HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	食中毒細菌の菌体蛋白アミノ酸組成に関する研究
Author(s)	高木, 光造; 飯田, 優
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 21(2), 144-151
Issue Date	1970-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23422
Type	bulletin (article)
File Information	21(2)_P144-151.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

食中毒細菌の菌体蛋白アミノ酸組成に関する研究

高木　光造*・飯田　優*

On the Amino Acid Composition of Cell Protein from Some Species of Food Poisoning Bacteria

Mitsuzō TAKAGI and Atsushi IIDA

Abstracts

In the present paper, we report a comparative study on the amino acid composition of cell proteins from some species of food poisoning bacteria; the six strains of the Enterobacteriaceae, Arizona Pc5, Arizona N178, Bethesda Na1A, Bethesda Ala20, Ballerup K6699, Ballerup Ballerup M, and one strain of *Vibrio parahaemolyticus*, 0–5. The methods of preparations and hydrolysis of cell proteins were almost the same as those described previously.[1]

Moreover, a crude cell-wall fraction[2] and a cell-wall fraction[2,3,4] were prepared from whole cells of *V. parahaemolyticus*, according to the following procedure, and their difference in amino acid composition was examined.

An aliquot volume of whole cells, which had been washed with Herbst's artificial sea water, was suspended in distilled water, and disintegrated by the freezing and thawing method. The suspension of dirupted cells was centrifuged at low speed to remove the unbroken cells and then at high speed until the crude cell-wall fraction was deposited. After being purified by a treatment with proteolytic enzyme; ribonuclease and trypsin, an aliquot volume of the crude cell-wall was layered on top of a linear gradient of sucrose in a glass centrifuge bottle, and then centrifuged to obtain the main cell-wall fraction. Finally, each fraction was dialyzed against distilled water, dried in the desiccator, and hydrolyzed with the method described above. The amino acid analysis was determined with a Hitachi Amino Acid Analyzer Model KLA-3. The results may be summarized as follows.

The main constituents of these proteins were found to be glutamic acid, aspartic acid, alanine, leucine, and lysine, and resembled approximately those of the other Enterobacteriaceae.[5] The cell proteins from the two strains of Bethesda had the richer content of glycine, and the one from *V. parahaemolyticus* had lower amounts of total nitrogens and amino acid nitrogens than the others, respectively. The amino acid composition of the whole cell and the crude cell-wall fraction from *V. parahaemolyticus* were found to resemble the one of cell protein, but the one of cell-wall fraction differed considerably from the others; their main constituents were aspartic acid, alanine, glutamic acid, leucine, phenylalanine, and valine.

緒　　言

著者らは食中毒原因細菌細胞の化学組成と毒性との関係を明らかにすることを意とし，まずその予

* 北海道大学水産学部食品化学第二講座
(Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

備的な試験段階として菌体蛋白のアミノ酸組成について検討を続け，前報[1,2]では *Vibrio parahaemolyticus* の生物型1および2，*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* および *Salmonella enteritidis* などの各1株について得られた実験結果を報告した。これにひき続き，今回は Arizona, Bethesda, Ballerup など腸内細菌の各2株の菌体蛋白におけるアミノ酸組成を測定して比較を行ない，また前報[1]で供試した *V. parahaemolyticus* 生物型1の菌株を用いて，その洗滌菌体より crude cell-wall 画分および cell-wall 画分を分画し，各画分のアミノ酸組成についても比較検討を行なったので，その結果を報告する。

実験方法

供試菌株: 供試菌株の Arizona Pc 5, Arizona N 178, Bethesda Na 1A, Bethesda Ala 20, Ballerup K 6699 および Ballerup Ballerup M は大阪府立衛生研究所より分与を受け，また *Vibrio parahaemolyticus* (坂崎の分類による血清型 0-5) は前報[1]の実験で供試したものと同一の菌株で，本学部微生物学教室より分与を受けたものである。

供試菌体: 供試菌の大量培養にさきだって *V. parahaemolyticus* は BTB・ティポール寒天培地，その他の菌株は普通寒天培地に平板画線培養を行ない，培地上に発育した集落よりS型集落各1個を釣菌し，前者は3% 食塩加ブイヨン，その他は普通ブイヨンに接種，37°C 一夜前培養し，あらかじめマグネチック・スターラーの攪拌子を入れた 2 *l* 三角フラスコ中の3% 食塩加ブイヨンまたは普通ブイヨン 1.2 *l* に前培養液の2白金耳を接種し，37°C でマグネチック・スターラーによる攪拌を続けて培養を行ないつつ，一定時間ごとに培地の所定量を無菌的に採取して，供試菌の増殖による培地の濁度を前報[1,2]と同様の方法で観察し，対数期直後におけるそれぞれの培養液から 3200×g, 15分間の遠心分離により菌体を集め，5回の洗滌によって培地成分を除去して得た洗滌菌体を供試菌体として使用した。なお，洗滌液は前記6株の腸内細菌では 0.85%食塩水を，*V. parahaemolyticus* では Herbst の人工海水を用いた。また，菌体蛋白の調製には各供試菌株とも2回ずつ培養を行ない，*V. parahaemolyticus* の菌体の分画には延べ 32 回培養を行なって2分し，それぞれ別個に供試した。

菌体蛋白の調製: 前記の各供試菌体について前報[1,2]と同様に凍結一融解法による破壊，加熱処理，エキス分の除去および洗滌などの操作を行なったのち，硫酸デシケーター中で減圧乾燥し，恒量化したものを菌体蛋白として供試した。

***V. parahaemolyticus* 菌体の分画**: 上記の *V. parahaemolyticus* の供試菌体を whole cell 画分として，これより Cummins ら[3]，Allsop ら[4] および Abdulla ら[5] の細菌細胞壁の調製法に基づいて crude cell-wall 画分と cell-wall 画分を調製した。各画分の調製法の概要は Fig. 1 に示したとおりで供試菌体をナス型フラスコに移し，湿菌量として 10%程度になるように水を加えて懸濁液としたのち 85.5% エタノールにドライアイスを投じて作った寒剤に浸して攪拌しながら凍結させ，つぎに 30～40°C の温湯に浸して溶解し，この凍結一融解の操作を6回反復して菌体の破壊を行なった。ついで液量の約10倍量の水を加えて均質になるまでスターラーで攪拌し，まず1000×g, 15分間遠心分離して未破壊細胞を除去したのち，上層部をとってその中に含まれる菌体破壊画分を沈澱させるため，22000×g, 15分間高速で遠心分離し，得られた沈澱について低速一高速遠心操作をなお2回反復して菌体破壊画分の分離を計った。この遠心操作3回目の沈澱を少量とって水に懸濁し，visking tube に移して 0°C の冷室中で塩素イオンが検出されなくなるまで水で透析したのち遠心分離して沈澱を集め，これを crude cell-wall画分として供試した。

低速－高速遠心操作3回目の沈澱の残余は 0.05M-燐酸緩衝液 (pH 7.6) に懸濁させたのち，リボヌクレアーゼを終濃度 100μg/ml となるように加えて溶解し，37°C の恒温器中でスターラーによる攪拌を続けてリボ核酸成分の消化分解を行なった。反応開始後一定時間ごとに反応液の少量をとり，

Cells of *V. parahaemolyticus*.

washed five times with Herbst's artificial sea water[1] by resuspending and centrifuging.

whole cell

suspended in a small amounts of distilled water and disintegrated by the freezing and thawing method.[1]

added with an aliquot volume of water, centrifuged at low speed (1000×g, 15 min.) to remove the unbroken cells and then at high speed (22000×g, 15 min.), and the low- and high-speed centrifugings were repeated three times.

dialyzed against distilled water — crude cell-wall fraction

suspended in 0.05M-phosphate buffer (pH 7.6) and treated with sequentially with ribonuclease (100 μg/ml at 37°C) and trypsin (500 μg/ml at 37°C) until the extinction had fallen to a constant level respectively.

washed with M-NaCl by centrifuging and resuspending and suspended in M-NaCl.

layered on top of a linear gradient of sucrose (0-40%, w/v, in M-NaCl) and centrifuged (1200×g, 60 min.).

dialyzed against distilled water until free from sucrose.

cell-wall fraction

Fig. 1. Outline of the preparation of a crude cell-wall fraction and a celll-wall fraction from whole cells of *V. parahaemolyticus*.

光電比色計(日立製 FPW-4型)を用い，フィルター66で吸光値を測定したが，吸光値は反応時間の経過とともに減少したので，その値が一定になるまで約7時間反応を行なった。ついでトリプシンを終濃度 500μg/ml となるように加えて溶解し，さらに 37°C で攪拌を続けて蛋白質の消化分解を計った。反応後前記同様一定時間毎に反応液の吸光値を測定し，吸光値が減少したのち一定になるまで反応を続けた。得られた消化液は遠心分離によって M-NaCl で1回洗滌し，少量の M-NaCl に懸濁させ，これを別に大海[6] の方法で遠心管中に調製した 0～40% ショ糖密度勾配 M-NaCl 溶液に重層[7]して 1200×g，60分間ショ糖密度勾配遠心を行ない，遠心後その主要部を集めて visking tube に移し，0°C の冷室中で塩素イオンが検出されなくなるまで水で透析を行なったのち遠心分離して沈澱を集め，これを cell-wall 画分として供試した。なお，酵素処理以降の操作で用いた試薬および水はすべてクロロフォルムで飽和して使用した。

以上の操作で得られた whole cell, crude cell-wall および cell-wall の各画分は調製後硫酸デシケーターに移して減圧にしたのち，隔日毎に吸引しつつ－20°C の氷室中に置き，恒量化させてから供試した。

測定方法: 各供試菌体蛋白および *V. parahaemolyticus* の各供試画分について全窒素をケルダー

ル法で測定し，また組成アミノ酸の測定は各試料 10～12 mg を前報[1,2]で行なったと同様の方法で，6N 塩酸とともに封管内で 110°C，22時間加熱後，生成したフミン質を濾別洗滌し，濾洗液を減圧濃縮して塩酸を除去し，pH 2.2 のクエン酸緩衝液で 10 ml に定容化した後，アミノ酸の定量は日立アミノ酸分析計 KLA-3型で測定した。また測定値は各供試菌ごとに別々に培養し，また大量に培養後混合し2分して，別々に調製した2検体における測定値の平均を求めた。

実験結果および考察

Arizona, Bethesda および Ballerup の各2株と *V. parahaemolyticus* 1株の菌体蛋白アミノ酸組成の測定結果を Table 1 に示した。Table 1 によると Arizona など 6株の腸内細菌菌体蛋白のアミノ酸組成はグルタミン酸がもっとも多く約 9～11%，ついでアスパラギン酸が約 7～10%，またアラニンが約6～8%，ロイシンが約 5～8%とほぼ同じ程度で比較的多かった。Bethesda 2株ではグリシンが6～7%でロイシンまたはアラニンについで多く，他の4株の菌体蛋白のグリシンが4～5%であるのに比べて高い値を示した。*V. parahaemolyticus* の生物型1 (0-5) の測定結果は前報[1]で報告した実験結果にほぼ合致し，菌体蛋白アミノ酸組成の主要アミノ酸は他の6株の菌体蛋白同様，グルタミン酸，アスパラギン酸，アラニン，ロイシンおよびリジンなどであったが，それらの組成割合は他の6株に比較するとそれぞれ幾分少ない値を示した。また今回の実験ではグラム陰性桿菌に特有なジアミノピメリン酸(以下 D. A. P. と記す)についても定量を行ない，アミノ酸自動分析計で得られるイオン交換カラムクロマトグラム上の D. A. P. の溶出位置を Fig. 2 に示したが，D. A. P. 含量は Arizona Pc5が1.7%でやや多く，他の菌株はいずれも0.4～0.5%前後であった。全窒素は Arizona 2株が 13.8～15.2%，Bethesda 2株は 15.4～15.5%，Ballerup 2株は 14.4～14.7%で，いずれも 14～15%前後の値であったが，*V. parahaemolyticus* は 11.5% で他の菌株の値に比較して少なかった。アミノ酸分析による窒素の回収率は Bethesda 2株は 90% 前後でもっとも多かったが，Ballerup 2株は 85～87%で前報[2]の *Proteus vulgaris* および *Salmonella enteritidis* の菌体蛋白とほぼ同様の値であり，ついで Arizona 2株は 80～84%，*V. parahaemolyticus* は 70% でもっとも少なかった。以上の結果から供試菌体蛋白のアミノ酸組成は菌種または菌株によって若干の差異があり，供試菌株中 *V. parahaemolyticus* は全窒素量と各アミノ酸の含量が少なく，他の菌株との間にやや顕著な差がみられ，Bethesda 2株ではグリシン含量が比較的多いことが認められたが，これらについては培養条件を規整して，菌体構造の研究とともにさらに比較検討されねばならないと考えられる。また著者ら[2]がさきに *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* および *Salmonella enteritidis* の各1株の菌体蛋白について行なった結果や，Clarke ら[8]が *Pseudomonas aeruginosa* の細胞壁画分について行なった結果によると，それらのアミノ酸組成はいずれもグルタミン酸，アスパラギン酸，アラニン，ロイシンなどが多く，これら4種のアミノ酸について本実験の7種の供試菌体蛋白はいずれもこれに似た組成を示しているが，その他のアミノ酸では差が認められた。なお前報[2]で述べたように，細菌のアミノ酸については細胞壁またはムコペプチドの構成アミノ酸に関する一連の研究があり，一般に細菌のムコペプチドに含まれる成分としてアラニン，グルタミン酸，D. A. P., グリシン，セリン，アスパラギン酸，オルニチンなどのほか数種類のアミノ酸が知られ，グラム陰性桿菌のムコペプチド構成アミノ酸はアラニン，グリシン，D. A. P. などとされている。本実験の供試菌7株はいずれもグラム陰性桿菌であるが，前述のごとくこれら供試菌体蛋白中にグルタミン酸やアラニンが多いことは，これらの一部がムコペプチドに由来しているものと考えられ，また D. A. P. はこれら供試菌株のムコペプチドの構成単位の一つとして含まれるものではないかと推定される。

V. parahaemolyticus の whole cell, crude cell-wall 画分および cell-wall 画分のアミノ酸組成の測定結果を Table 2 に示した。Table 2 によると菌体蛋白と whole cell のアミノ酸組成はほぼ同

Table 1. Amino acid composition of Arizona Pc5, Arizona N178, Bethesda Na1A, Bethesda Ala20, Ballerup K6699, Ballerup Ballerup M, and *V. parahaemolyticus*.(g. of amino acid in hydrolysates per 100 g. of prepared cell protein)

Amino acid	Arizona Pc5	Arizona N178	Bethesda Na1A	Bethesda Ala20	Ballerup K6699	Ballerup Ballerup M	*Vibrio parahaemolyticus* (0–5)
Cysteic acid	0.13	0.11	0 08	0.12	0.12	0.16	0.12
Aspartic acid	7.01	8.73	10.23	9.60	8.75	9.82	6.99
Threonine	3.56	3.61	4.20	3.80	3.53	4.04	2.80
Serine	1.87	1.97	2.64	2.50	2.18	2.61	2.13
Glutamic acid	9.31	10.11	11.05	10.02	9.51	10.63	7.73
Proline	2.13	2.79	2.08	2.36	2.26	2.47	2.54
Glycine	3.98	4.95	6.00	6.88	4.70	4.98	3.06
Alanine	6.62	6.72	8.04	7.32	7.34	7.32	5.24
Valine	4.05	5.50	5.90	5.12	4.03	5.86	2.21
DAP*	1.72	0.38	0.51	0.48	0.55	0.54	—
Methionine	2.82	1.78	3.93	1.22	1.16	2.77	0.83
Isoluecine	4.09	4.51	5.42	4.83	4.39	4.86	2.72
Leucine	5.23	7.48	8.35	7.27	8.01	7.25	4.63
Tyrosine	2.45	1.96	3.37	2.38	2.21	2.37	2.03
Phenylalanine	3.23	3.44	4.43	3.69	3.29	3.42	3.05
Lysine	4.95	5.80	5.43	6.09	6.00	5.64	4.40
Histidine	1.35	1.61	1.62	1.64	1.73	1.80	1.15
Arginine	3.26	5.28	5.23	5.96	5.73	5.17	3.10
NH_3	2.32	1.58	2.45	2.72	2.19	1.43	0.67
Total-N g. per 100 g. of dried matter	13.80	15.20	15.40	15.50	14.70	14.40	11.50
N recovered (%)	83.55	79.28	92.50	89.23	85.44	86.67	70.00

* Diaminopimelic acid was abbreviated as DAP.

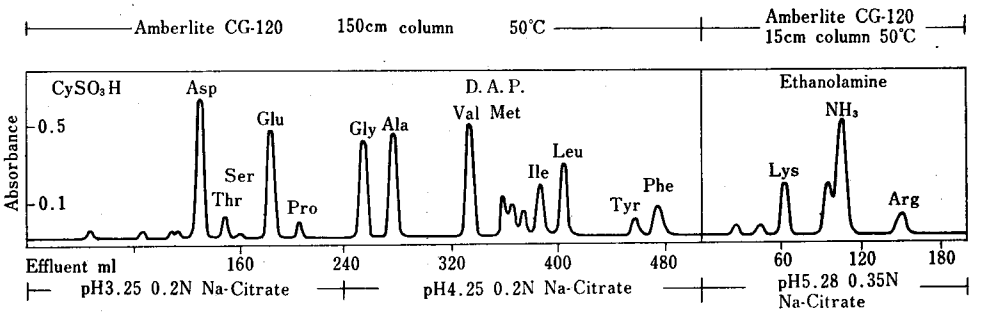

Fig. 2.　Amino acid analysis of the cell-wall fraction hydrolysates of *V. parahaemolyticus*.

じで，グルタミン酸が8%前後でもっとも多く，アスパラギン酸が約7%，アラニンが5～6%，ついでロイシン，リジン，フェニルアラニン，グリシン，アルギニンなども比較的多かったが，それらの組成割合は whole cell の方に幾分多い傾向がみられ，また全窒素およびアミノ酸分析による回収率も whole cell が高い値を示しており，この相違は菌体蛋白を調製する際に whole cell 中のエキス窒素化合物が溶出したことによるものと推察される。また whole cell には 0.8% 程度のエタノールアミンが含まれることが確認され，その溶出位置を Fig. 2 に示した。crude cell-wall 画分はアミノ酸組成では whole cell とほとんど差がみられなかったが，全窒素は whole cell に比べて少なく，アミノ酸分析による窒素の回収率はより高い値を示した。これは whole cell を破壊して分画遠心し，のち透析などの分画精製を行なうことによって，ある程度窒素化合物が除去された結果と考えられる。cell-wall 画分のアミノ酸組成について観察した結果ではアスパラギン酸がもっとも多く約6%，アラニンが約5%，グルタミン酸が約4%で，ついでロイシン，フェニルアラニン，グリシン，バリンの順になっており，これら主要アミノ酸の組成割合の順位が whole cell や crude cell-wall 画分に比較して，かなり異なることが認められた。また上記6種のアミノ酸のほか，リジン，アルギニンをはじめ多くのアミノ酸の組成割合は他の画分に比べて少なく，アミノ酸分析によるアミノ酸窒素の総計は他の画分の約半分に近い値であったが，このことは crude cell-wall 画分をさらに酵素消化し，分画することによって多くの蛋白質が分解されて除かれたことを意味するものと思われる。なお cell-wall 画分における D. A. P. とエタノールアミンの組成割合はいずれも少ないが，これを whole cell や crude cell-wall 画分における割合に比較すると，他のアミノ酸が減少したのに反してむしろ若干増加する傾向を示した。前記 Clarkeら[8]の研究結果によれば，*P. aeruginosa* の菌体より得られた crude cell-wall 画分と，これをトリプシンおよびリボヌクレアーゼで消化して得られた cell-wall 画分との間に各アミノ酸組成割合の差がみられ，酵素処理によって多くのアミノ酸の組成割合が減少する一方，ムラミン酸，グルコサミン，D. A. P. などの細胞壁構成成分とともにエタノールアミンも幾分増加する傾向が認められており，本実験の供試菌 *V. parahaemolyticus* についても cell-wall 画分を精製分画する過程でこれと似た結果が得られたことから，エタノールアミンが本供試菌株の細胞壁構成成分として存在する可能性が推察されるが，その存在形態などについては今後なお検討されねばならないと考えられる。さらに各種好塩性細菌の細胞壁について行なわれた結果によると，中等度好塩細菌 *Pseudomonas* sp. (No. 101)[9]の crude cell-wall 画分のアミノ酸組成はアラニンがもっとも多く，ついでグルタミン酸，グリシン，ロイシン，アスパラギン酸の順で，少量の D. A. P. が含まれているが，高等度好塩細菌 *Halobacterium cutirubrum*[10,11] の cell-wall 画分では D. A. P. は含まれず，グリシンがもっとも多く，アスパラギン酸，グルタミン酸，アラニン，スレオニン，ロイシン，セリンの順となっており，本実験の供試菌株 *V. parahaemolyticus* の各画分について得られた結果と比較

Table 2. Amino acid composition of cell protein, whole cell, crude cell-wall fraction, and cell-wall fraction from *V. parahaemolyticus*. (g. of amino acid in hydrolysates per 100 g of each preparation)

Amino acid	Cell protein	Whole cell	Fraction of crude cell-wall	Fraction of cell-wall
Cysteic acid	0.12	0.11	trace	trace
Aspartic acid	6.99	6.90	7.60	6.38
Threonine	2.80	2.95	3.17	0.35
Serine	2.13	2.32	2.48	trace
Glutamic acid	7.73	8.29	8.02	4.36
Proline	2.54	2.12	2.56	0.59
Glycine	3.06	3.45	3.53	2.95
Alanine	5.24	5.72	5.82	5.02
Valine	2.21	4.12	3.73	2.33
DAP*	—	0.28	0.32	0.70
Methionine	0.83	0.82	1.68	0.69
Isoleucine	2.72	3.70	3.32	1.78
Leucine	4.63	5.07	5.22	3.80
Tyrosine	2.03	2.02	2.77	1.97
Phenylalanine	3.05	3.51	4.19	3.40
Lysine	4.40	4.58	4.08	1.57
Histidine	1.15	1.40	1.29	0.30
Ethanolamine	trace	0.80	0.99	1.42
Arginine	3.10	3.84	3.57	1.20
NH_3	0.67	1.51	1.23	0.95
Total amino acid-N. per 100 g. of dried matter	8.05	9.90	9.81	5.90
Total-N g. per 100 g. of dried matter	11.50	12.20	11.10	—
N recovered (%)	70.00	81.18	88.33	—

* Diaminopimelic acid was abbreviated as DAP.

してかなりの差が認められる。

本実験においてはトリプトファン，ムラミン酸などは定量しなかったが，各供試蛋白および各供試画分に不明のニンヒドリン反応陽性のピークが各試料ごとにそれぞれ6～7個認められ，これらの未知成分も漸次確認されねばならないと考えられる。

なお本実験は食中毒原因細菌細胞の化学組成と毒性との関連を明らかにしようとする研究の予備的な実験であり，今後各菌株についてそれぞれ多数の菌株を供試し，菌体の各精製画分について生理活性を明らかにするとともに，その組成との関連について比較検討を行なうつもりである。

要　　約

1) Arizona, Bethesda および Ballerup の各2株と *V. parahaemolyticus* の1株を供試し，それらの菌体蛋白のアミノ酸組成について比較検討を行なった。なお *V. parahaemolyticus* についてはそのwhole cell より crude cell-wall 画分と cell-wall 画分を分画精製し，それら各画分のアミノ酸組成についても検討を加えた。

2) 供試菌7株の菌体蛋白にはいずれもグルタミン酸，アスパラギン酸，アラニン，ロイシンなどが多く含まれるが，アミノ酸の組成割合は菌種または菌株によって若干の差があり，供試菌株中

Bethesda 2株ではグリシンが他の供試菌株に比較して多かった。また *V. parahaemolyticus* は全窒素量，各アミノ酸の含量が比較的少なく，他の菌株との間にやや顕著な差が認められた。

3) *V. parahaemolyticus* の cell-wall 画分のアミノ酸組成はアスパラギン酸がもっとも多く，ついでアラニン，グルタミン酸，ロイシン，フェニルアラニン，グリシン，バリンの順であったが，一般にアミノ酸の組成割合は whole cell や crude cell-wall 画分に比べて少なく，アミノ酸分析によるアミノ酸窒素の総計は他の画分のほぼ半分の値であった。またいずれの画分にも少量のエタノールアミンが含まれ，これが本供試菌株の細胞壁構成成分として存在する可能性が推察された。

終りに臨み，本稿を御校閲下さった本学部微生物学教室坂井　稔教授，試料の菌株を分与下さった大阪府立衛生研究所，本学部微生物学教室ならびに，本実験の遂行に協力された石井チエ子氏に厚く御礼申し上げます。

文　　献

1) 高木光造・飯田　優 (1967). 北大水産彙報 **18(3)**, 171.
2) ———・——— (1969). 同　誌 **19(4)**, 288.
3) Cummins, C.S. & Harris, H. (1956). *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 583.
4) Allsop, J. & Work, E.(1963). *Biochem. J.*, **87**, 512.
5) Abdulla, E.M. & Schwab. J.H. (1966). *J. Bacteriol.*, **91**, 374.
6) 大海達雄 (1966). 蛋白質核酸酵素 **11**, 486.
7) 大沢省三 (1966). 同　誌 **11**, 507.
8) Clarke, K., Gray, G.W. & Reavely, D.A. (1967). *Biochem. J.*, **105**, 749.
9) Kushner, D. J. & Ōnishi, H. (1966). *J. Bacteriol.*, **91**, 653.
10) Kushner, D. J., Bayley, S. T., Boring, J. & Kates, M. (1964). *Canad. J. Microbiol.*, **10**, 483.
11) 増井正幹・大谷英一・加藤敬也・藤田益子 (1968). メディヤ・サークル **13**, 193.