

# 胞子形成菌の生化学的活性の不安定性について

## Ⅲ. 生化学的活性の不安定性の起因について

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷友次教授)

田 上 三 雄

(昭和31年3月24日受附)

(本論文の要旨は第9回日本細菌学会北陸地方支部集会で発表した.)

## Studies on the Instability of Biochemical Activities of Spore-forming Bacilli

### Ⅲ. On the Cause of Instability of Biochemical Activities

Mitsuo Tagami

*Department of Microbiology, School of Medicine,  
Kanazawa University*

*(Director : Prof. Tomoji Tani)*

## 緒 言

胞子形成菌の各種酵素系が他の細菌にとって比較的安定な+4°Cに蒸留水浮游液の形で保存される時、2乃至3日で急激にその活性を失うことを前報<sup>1)</sup>において報告した。

今回はこれら活性の不安定性の起因について細菌の死滅によるものか、Hardwick<sup>2)</sup>等の行つ

た実験条件の場合と同様に sporulation 乃至はその前段階の forespore の形成によるものか、或いは他の原因によるものかを知るため、菌液を種々条件を変えて保存した場合の酵素活性を調べ、又菌液上清に遊離する各種菌体成分について検討するため実験を行つた。

## 実験材料及び実験方法

使用菌株： B. subtilis           NRRL 株  
          B. mesentericus       教室I株  
          B. megatherium       C<sub>1</sub> 株  
          E. coli                学生株

1) ワールブルグ検圧法  
用量は第I報<sup>3)</sup>に従つた。

2) 遊離磷定量法  
Gomori 法<sup>4)</sup>に従つた。

3) 核酸の定量法  
DNA-磷：デフェニルアミン反応<sup>5)</sup>

RNA-磷：オルシン塩酸反応<sup>6)</sup>

4) 総窒素の定量法  
Fujita u. Kasahara の方法<sup>7)</sup>

5) 遊離アミノ酸の検出法  
2次元ペーパー・クロマトグラフィによる。  
第1溶媒：0.5%アンモニア水：フェノール  
          =23:77

第2溶媒：n-Butanol：Ethanol：水 =60:15:25  
上昇法，呈色剤：0.2% Ninhydrin-Butanol

6) 蛋白質量の測定

B. subtilis NRRL 株の 1mgN/ml の菌液を3000回、30分遠心し、その上清 3ml に同量の10%トリクロール酢酸を加え、光電管比色計で測定する。対照として蒸溜水の透光度を 100% とする。(使用フィルターB)

7) 菌液透光度の測定  
光電管比色計による。対照として蒸溜水の透光度を 100% とする。(使用フィルターB)

実験成績

1) 生菌数の計算

胞子形成菌である B. mesentericus 及び B. megatherium C<sub>1</sub> 株の10時間肉エキスブイヨン中で振盪培養した菌の 1mgN/ml の蒸溜水浮游液の10倍稀釈系列より毎日1白金耳をとり、寒天平板に接種しその生菌数を調べた。生菌数は第1表-1及び2に示す如く、日をへるにつれて減少する。しかし第1表-3に示す如く対照

第1表 各種胞子形成菌及び大腸菌の 1mgN/ml 蒸溜水浮游液で +4°C に保存した場合の生菌数

(1)

菌 株	B. mesentericus 教室 I 株			
	稀釈倍数	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
即日	無数	62	57	57
第1日	無数	35	23	45
第2日	無数	22	24	—

(2)

菌 株	B. megatherium C <sub>1</sub> 株			
	稀釈倍数	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
即日	無数	549	78	
第1日	無数	357	370	371
第2日	無数	234	222	307

(3)

菌 株	E. coli 学生株	
稀釈倍数	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
即日	無数	521
第1日	無数	106
第2日	無数	12

として同様に計算した大腸菌の生菌数の減少と比較するとむしろ少ない位で、決して生菌数の減少がこれらの菌において特に著明であるとはいえない。

2) 各種溶液中に保存した場合の酸化酵素活性

pH7.2 の Sørensen 磷酸緩衝液及び0.85%の生理食塩水を使用した場合、アスパラギン酸ソーダに対する酸化酵素活性は第1図に示す如く、第1日目迄はあまり低下は認められないが、第2日目には蒸溜水を用いた対照と同様に活性の急激な落下が認められた。

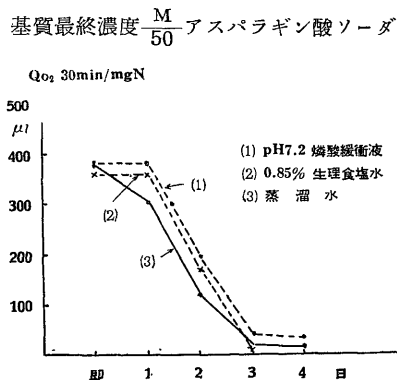
0.3%グルコース水溶液中に保存した場合は第2図に示す如く、(1) 0.3%グルコース水溶液中に保存し、保存液そのままを用い新に基質としてグルコースを追加しないもの。(2) 0.3%グルコース水溶液中に保存し、基質としてグルコースを加えたもの。(3) 蒸溜水中に保存して基質としてグルコースを加えたもの。

以上(1)(2)(3)の何れのものも第3日目には殆んど活性は零に落下する。

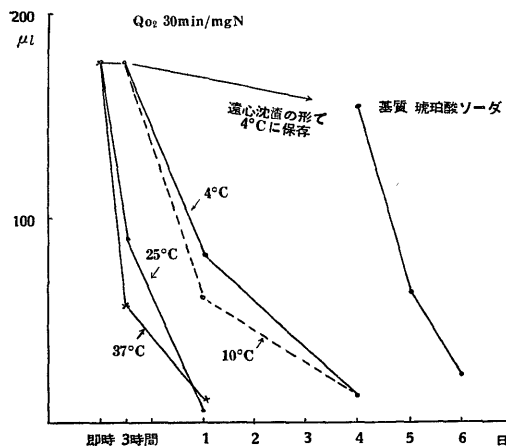
3) 保存温度による影響

B. subtilis の12時間振盪培養の菌液を 4°C, 10°C, 25°C, 37°C に保存した場合、琥珀酸ソーダに対する酸化酵素活性を比較した。第3図に示す如く 4°C 及び 10°C に保存した場合は3時間後の測定時には殆んど活性の低下は認められないが、25°C, 37°C に保存したものでは著明な低下が認められる。24時間後では 10°C, 4°C では略々活性は即時の活性の半分に落下する。25°C, 37°C では殆んど零となる。遠心沈渣のままの形で 4°C に保存して置けば、即時の  $Q_{O_2}$  176  $\mu$ l のものが第4日目まで 152  $\mu$ l となり殆んどもとの活性を保持している。第4日目に初めて菌液を作成して 4°C に保存すると、第5日、第6日で活性は殆んど零に迄落下する。

第1図 各種溶液中に保存した場合の酸化酵素活性 (B. subtilis)



第3図 酸化酵素活性の保存温度による影響 (B. subtilis)



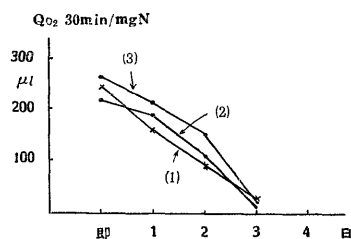
4) 培養時間による影響

肉エキスブイヨン中 5, 7, 12, 16, 20 の各時間振盪培養の B. subtilis を菌液として 4°C に保存した場合の基質のアスパラギン酸ソーダ及びグルコースに対する  $Q_{O_2}$  を調べた。第4図及び第5図に示す如く何れの培養時間の細菌も一様に 1 乃至 2 日で著明な酵素活性の落下が認められた。

5) 37°C 蒸溜水中で振盪した場合

第6図に示す如く基質のアスパラギン酸ソーダ及びグルコースに対して 1 時間目迄は夫々  $Q_{O_2}$  347  $\mu$ l 及び 324  $\mu$ l で殆んど活性は変わらないがその後徐々に酵素活性は低下し、4 時間目では 317  $\mu$ l 及び 270  $\mu$ l となる。然るに内呼吸は 2 時間から 4 時間迄は殆んど低下を認めない。

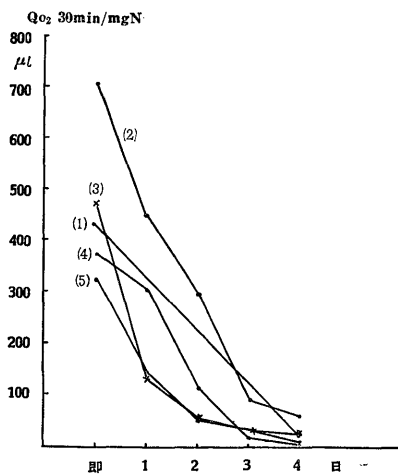
第2図 0.3%グルコース水溶液中に保存した場合の酸化酵素活性



- (1) 0.3%グルコース保存液中の菌を基質を加えずに用いた。
- (2) 0.3%グルコース保存液中の菌に更に基質としてグルコースを追加して用いた。
- (3) 蒸溜水中に保存したものにグルコースを基質として加えた。

第4図 酸化酵素活性の培養時間による影響 (B.subtilis)

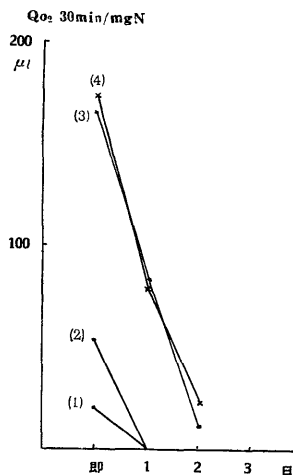
基質最終濃度  $\frac{M}{50}$  アスパラギン酸ソーダ



	pH	菌量
(1) 5時間振盪培養	7.4	6.06mgN
(2) 7 " "	7.4	15.8mgN
(3) 12 " "	7.9	31.2mgN
(4) 16 " "	8.0	39.2mgN
(5) 20 " "	8.2	58.1mgN

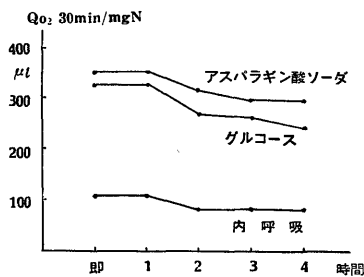
第5図 酸化酵素活性の培養時間による影響 (B.subtilis)

基質最終濃度  $\frac{M}{50}$  グルコース



	pH	菌量
(1) 8時間振盪培養	7.8	42.5mgN
(2) 12 " "	7.8	62.4mgN
(3) 16 " "	7.8	80.0mgN
(4) 20 " "	8.0	70.9mgN

第6図 37°C蒸溜水中で振盪した場合の酵素活性



(註) 第6図に示す基質呼吸値は内呼吸値を差引いてない。

6) 上清液の各種菌体成分の検索

a) 遊離燐

第7図に示される如く B. subtilis の上清液では即日 6γ/2ml のものが第3日目に 8γ/2ml へ B. megatherium では即日 1.2γ/2ml のものが3日目に 8γ/2ml へと増加の傾向を認めるが, E. coli では殆んど不変である。

b) 核酸

第8図に示す如く B. subtilis では RNA, DNA 共に第3, 第4日目で上清液への著明な増加が認められ, 又 B. megatherium では RNA, DNA 共に僅かの増加を認めた。然るに E. coli では RNA, DNA 共に上清への増加は認められない。

c) 上清液の遊離アミノ酸

B. subtilis の上清液 10ml をとり, 除蛋白操作を行い, これを水浴上で蒸発乾固し, 1ml の蒸溜水にとかし, その 0.005ml を2次元ペーパークロマトグラフィで定性分析した。第2表に示す如く第1日目では4種の著明なスポット(グルタミン酸, グリシン, アラニン, 未知のスポット)を認めたが第4日目には9種の著明なスポット(アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, 未知のスポット, アルギニン, バリン, ロイシン, フェニールアラニン)に増加し, 又何れのアミノ酸も量的の増加の傾向をも示した。然るに E. coli では第1, 第

4日目共にこの方法ではスポットを検出することが出来なかつた。

d) 上清の総窒素量

B. subtilis の上清液の総窒素量は第9図に示す如く、即日では 0.119mgN/ml, 第4日は 0.361mgN/ml で、第4日目には即日の約3倍に増加したが E. coli では殆んど増加は認められなかつた。

e) 上清の蛋白質量

第3表に示す如く即日において透光度92%のものが第3日目に87%の値を示した。

7) 光電管比色計による菌液透光度の測定

第4表に示す如く、B. subtilis では即日において透光度26%のものが第2日目より徐々に増加し、第4日目には38%を示した。然るに E. coli では即日から第4日目迄は変化を示さなかつた。

8) グラム染色性と光学顕微鏡写真

B. subtilis NRRL 株のグラム染色性は+4°C 蒸留水中に浮游した菌液で観察した結果、第10図に見られる如く、第1日目の菌では大部分の菌がグラム陽性菌であるが、第2、第3日目になると次第に陰性化し、第4日目で殆んど大部分が陰性菌となる。菌体の ghost cell 化するものや、菌体の幾分膨隆する像を認めるものもあるが、大部分の菌は光学顕微鏡的には著変を認めない。

9) 電子顕微鏡所見

a) B. subtilis 肉エキスブイオン中12時間振盪培養した菌の電子顕微鏡像は第14図に示す如く菌体一様に dense の像を示し、内部像を知り得ない。又 cell wall も殆んど認められない。

b) +4°C で蒸留水中に24時間保存した菌体は、第15図に示す如く、やはり一様に dense の像を示すが、cell wall は稍々 著明に認められるようになる。

c) +4°C で蒸留水中に48時間保存した菌では第16図に示す如く菌体の density が前者に比べて減弱し、菌体が稍々 膨化した像を示す。更に cell wall は極めて著明に認められるようになる。

d) +4°C で蒸留水中に96時間保存した菌で

は、第17図に示す如く菌体の density が更に減弱し、核様の内部像が認められるものもある。菌体の膨化は著明となる。

e) E. coli を肉エキスブイオン中で12時間振盪培養した場合、その直後の菌の電子顕微鏡像は第18図に示す如く、大部分の菌は菌体一様に dense の像を示し、cell wall も殆んど認められない。

f) 第19図は同上の E. coli を +4°C で蒸留水中に96時間保存した場合で、菌体の density は幾分低下するが、菌体の膨化は著明でなく、cell wall も殆んど認められない。

10) Nicotinamide, FAD 及びチトクロム c 添加実験

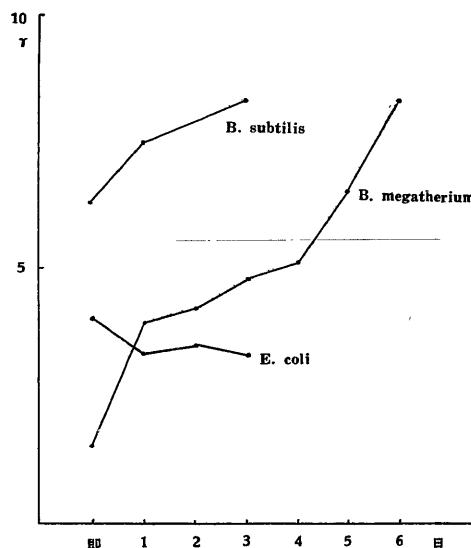
B. subtilis の蒸留水浮游液に予め Nicotinamide<sup>®</sup> を 1mg/0.5mgN 菌液の割合に加えて置き、これを +4°C に保存したものに更に FAD\* を 17/0.5mgN 菌液及びチトクロム c<sup>※</sup> を  $0.201 \times 10^{-8}M/0.5mgN$  菌液の割合で添加したのについて酸化酵素活性を検討したが活性の落下を防ぐことは出来なかつた。

(註) ◎ ナイアミド (ゾンネボード製薬)

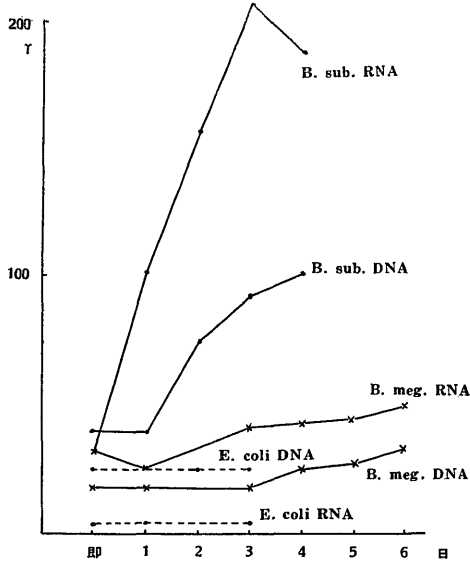
\* Chocla BB (日本衛材株式会社)

※ Keilin and Hartree の方法<sup>9)</sup>に従つて自製した。

第7図 1mgN/ml 菌液上清の遊離磷 (2ml中)



第8図 菌液1mgN/ml 上清の核酸

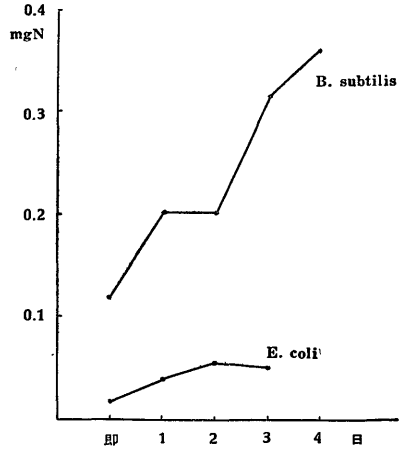


第2表 B. subtilis の菌液 1mgN/ml 上清の遊離アミノ酸

アミノ酸	保存日数			
	1日	2日	3日	4日
アスパラギン酸	±	+	+	+
グルタミン酸	+	+	+	+
Rf				
未知のスポット	+	+	+	+
フェニール0.22				
ブタノール0.05				
グリシン	+	+	+	+
セリン	-	-	±	±
アラニン	+	+	+	+
アルギニン	±	+	+	+
バリン	-	+	+	+
メチオニン	-	-	±	±
ロイシン	-	±	+	+
フェニールアラニン	-	±	+	+

(註) E. coli では第1日及び第4日共にスポットを認めなかつた。

第9図 菌液1mgN/ml 上清の総窒素量



第3表 上清の蛋白質量の変化

保存日数		B. subtilis 1mgN/ml の上清	
		透光度	%
即	日		92
第1日			92
第2日			91
第3日			87

第4表 菌液透光度の変化

保存日数	菌 株	
	B. subtilis	E. coli
即	26	28
第1日	26	28
第2日	28	28
第3日	31	28
第4日	38	28

総括及び考按

胞子形成菌の酵素活性の不安定性に関係すると思われる種々の因子について検討した。

酵素系全般の落下している点から、まず考えられることは生菌数の減少であるが、+4°C 蒸

溜水中で比較的その酵素活性の安定な E. coli を対照として B. mesentericus, B. megatherium の生菌数の計算を行つたが、これら胞子形成菌において特に著明な生菌数の減少は認められな

かつた。このことより酵素活性の低下は直接には生菌数の減少によるものとは考えられない。

次に菌浮游液の pH 及び滲透圧の影響を調べたが、至適 pH 及び生理食塩水中に保存した場合、即日から第 1 日目の活性の低下を防ぐ結果を得たが、第 2, 3 日目ではやはり活性の急激な落下を認めた。更に Hardwick & Foster<sup>2)</sup> が 0.3% グルコースを含む蒸留水中で 37°C で振盪する場合は酵素活性の低下が少なく、これはグルコースによつて Sporulation が妨げられるためだと述べているが、著者は 0.3% グルコースを含む蒸留水中で +4°C に増殖形を静置した場合の酵素活性を検討し、活性の著明な落下を認めた。

保存温度の影響として 37°C 及び 25°C に静置したときには短時間でその活性が著しく落下することの原因として考えられるのは autolysis と sporulation とである。しかし Norman<sup>9)</sup> 等によると sporulation には aeration が必要とされているから静置の状態にある場合には振盪培養に比べて酸素の供給は少なく、従つて sporulation による活性の落下は少ないものと考えられる。Richard A. Greenberg<sup>10)</sup> は sporeforming bacilli の autolytic substance の存在を示しているが、この場合保存温度が菌体成分に働く種々の融解酵素の至適温度に近い点より、菌体の lysis による低下が主因と思われる。遠心沈渣の形で +4°C に保存される時、活性が比較的安定に保たれる。従つて forespore の形成と共に酵素量の減少があるという Hardwick の実験から遠心沈渣の形で +4°C に保存されるときは、forespore の形成が行われ難いものと推定される。

1953年 Powell<sup>11)</sup> が lysis を起し易い成熟した細菌が蒸留水中で振盪される時、spore を形成し易いだろうと予想し、1954年中田<sup>12)</sup> が幼弱な細菌（5時間振盪培養以前の細菌）は蒸留水中で振盪しても spore を形成しないことを報告したが、著者は、5, 7, 12, 16, 20時間の各振盪培養の細菌について、細菌の培養時間と酵

素活性の不安定性の関係を検討した所、振盪 5 時間の幼弱菌を +4°C 蒸留水中に保存した場合でも酵素活性は速かに落下する。このことは胞子形成菌が必ずしも forespore 乃至 spore を形成しない場合でも酵素活性の急激な落下が起り得ることを示している。かくの如く細菌の age と酵素活性の不安定性との間には殆んど関係は認められなかつた。しかし若い菌ではアミノ酸に対する  $Q_{O_2}$  が高く、培養時間の延長と共に即ち成熟菌になるにつれて、グルコールに対する  $Q_{O_2}$  が増加する傾向のあることを観察した。これは胞子形成菌のみに見られる特異性か或いは細菌一般に共通の現象かは更に検討しなければならぬが、菌の age と酵素系との間に密接な関係のあることが予想される。

次に 1952年 Hardwick が行つた条件下で即ち 37°C 蒸留水中で増殖形細胞を振盪した場合、4 時間迄しか観察しなかつたが、1 時間迄は活性は殆んど不変で、その後次第に低下の傾向を示す。然るに内呼吸は 2 時間から 4 時間迄は殆んど低下を認めなかつた。

以上の実験成績より遠心沈渣のままのもの即ち比較的水分の少ない形で保存した菌は酵素活性の低下が 4 日目でも殆んど認められぬ程度であり、又生理食塩水や至適 pH の液に保存したときには幾分活性の低下を遅延させ得る点から酵素活性の落下と菌体成分の細胞外への流出との間に密接な関係のあることが予想される。そこで菌液上清の菌体成分の検索を行つた所、*B. subtilis* においては、遊離磷の増加、核酸 (RNA, DNA) の増加、遊離アミノ酸の増加、総窒素量の増加、蛋白質量の幾分の増加が認められた。Henry & Stancey<sup>13)</sup> はグラム陽性物質が RNA のマグネシウム塩に関係していると述べているが、著者の実験では上清への RNA の増加は同時に行つた菌体のグラム染色性の陰性化の成績と一致した。又菌液の透光度の測定の結果、*B. subtilis* においては第 2 日目より透光度の増加を認めた。これには細胞原形質自体の lysis による透光度的変化と cell wall の屈折率

の変化による場合の2通が考えられる。

この *B. subtilis* における各種菌体成分の上清への増加で考えられることは、この菌を取囲む細胞被膜の透過性の増加と菌体成分特に蛋白質の変化とである。

前者については、グラム陽性物質が細胞被膜に含まれているとされている<sup>14)</sup>現在、*B. subtilis* におけるグラム染色性の低下の認められることは、この菌の細胞被膜に何らかの変化が起つてゐることを示すものと考えられる。更にこの変化は電子顕微鏡像においても菌体の著明な膨化と cell wall において認められた。なお電子顕微鏡所見で注目すべき点は目をへるにつれて菌体の density が減弱し、やがて菌体の内部像即ち DNA の所在を示すと思われる像を得たことである。これは最初 electron dense の物質即ち RNA で覆われていた菌体とその流出により細胞内部像を示すようになったものと思われる。換言すれば細胞被膜の RNA のみならず原形質内の RNA の流出も存在すると考えられる。然るに *E. coli* においては菌体の density の幾分の低下はあつたが、菌体の膨化は殆んど認められず又 cell wall が著明になることもなかつた。

蛋白質の変化については Goebel & Avery<sup>15)</sup> が肺炎球菌の autolysis にはアミノ窒素及び非凝固性窒素の増加を伴う proteolysis が存在していることを報告したが、著者の実験における遊離アミノ酸の質的及び量的の増加は細胞被膜の透過性の問題の他に蛋白質の低分子化を考えなければならぬ。しかし +4°C に保存した場合融解酵素の作用の至適温度でないこと及び、生菌数の顕著な減少がないこと、更に上清への蛋白質の増加がそれ程著明でない等の諸点より全般的な構成蛋白質の lysis はまだ起きていないものと考えてよい。而も酵素系の全面的な落下の認められることよりまず第1に各々の酵素に

共通する助酵素類の細胞外への流出を考えねばならない。

Handler & Klein<sup>16)</sup> は組織が homogenate されるときまず DPN が破壊されるといい、Mann & Quastel<sup>17)</sup> はこの DPN の破壊は Nicotinamide の添加によつて阻止されると報告している。又同様にしてジアホラーゼよりの FAD の解離による活性の低下は FAD の添加によつてその活性が保たれるものと考えられている<sup>18)</sup>。孢子形成菌の酸化酵素活性の落下で考えられるのは、DPN 及びジアホラーゼの破壊とチトクロームの遊出である。これらを防ぐために予め Nicotinamide を加えて置いた菌液に FAD 及び cytochrome C を加えて酸化酵素活性を測定したが、活性の低下を防ぐことは出来なかつた。そこで更に根本的な所が侵されているとすれば、これらの助酵素の結合している酵素蛋白質自体の変化が考えられる。現在すべての酵素の主成分は蛋白質からなる<sup>19)</sup>とされ又核酸と酵素の間に蛋白合成<sup>19)</sup> 20) という面で密接な関係があることが示されているが、孢子形成菌の場合、生菌数の特に著明な減少がなくして、而も上清への僅かの蛋白質の増加やかなりの遊離アミノ酸の増加、更に電子顕微鏡所見より、菌体原形質の density の著明な低下や上清への核酸の増加の諸点より、菌体構成蛋白質よりも変化し易いと考えられる酵素蛋白質自体の変化を推定することが出来る。

以上の考察より孢子形成菌の細胞被膜が他の酵素活性の安定な菌に比べて透過性の増加し易い性質をもち、このために助酵素類の流出更には酵素蛋白質自体の変化乃至は細胞外への流出が起り総合的酵素系の機能に支調を来し、その結果酵素活性の不安定性が起るものと考えられる。

## 結 語

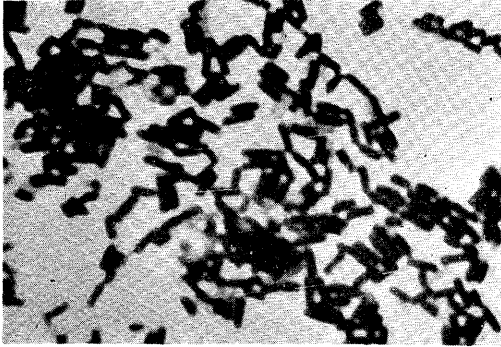
孢子形成菌の生化学的活性の不安定性の起因について対照の *E. coli* と比較検討した。

(1) 活性の急激な落下は單なる生菌数の減少のみによるものではない。



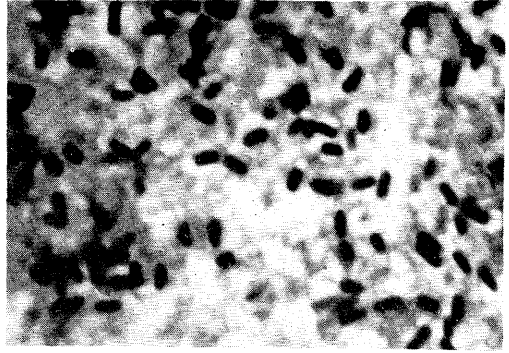
田上論文附図 (1)

第 10 図



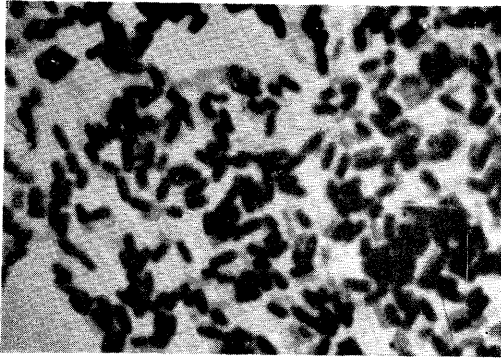
*B. subtilis* NRRL 株の蒸溜水浮游液として 4°C に保存した場合. 24時後, グラム染色, ×2500

第 13 図



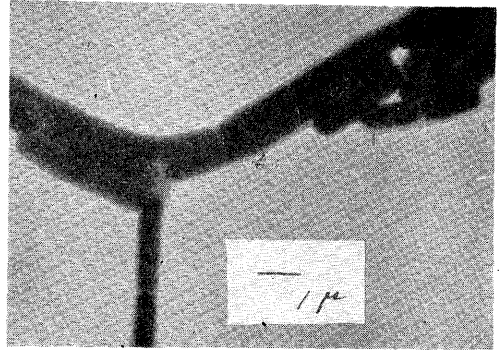
同, 96時間後, ×2500

第 11 図



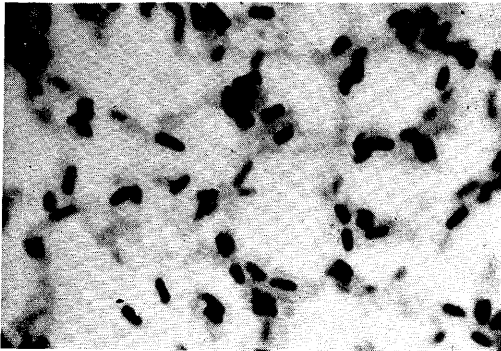
同, 48時間後, ×2500

第 14 図



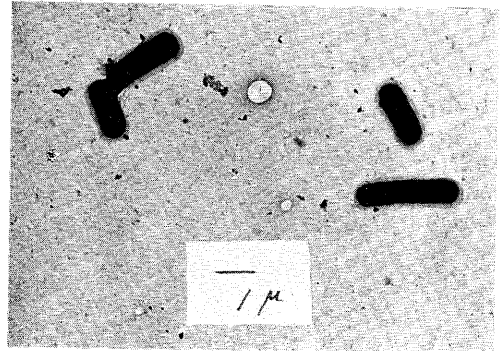
*B. subtilis* 12時間培養 即日の菌, ×6000

第 12 図



同, 72時間後, ×2500

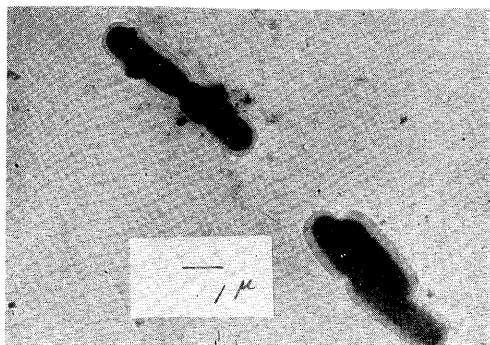
第 15 図



同, 蒸溜水浮游液として+4°C に保存, 24時間後  
×6000

田上論文附図 (2)

第 16 図



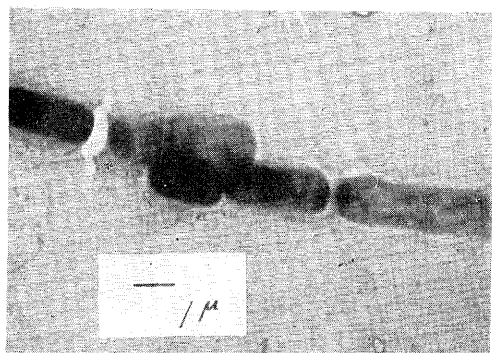
同, 48時間後 ×6000

第 18 図



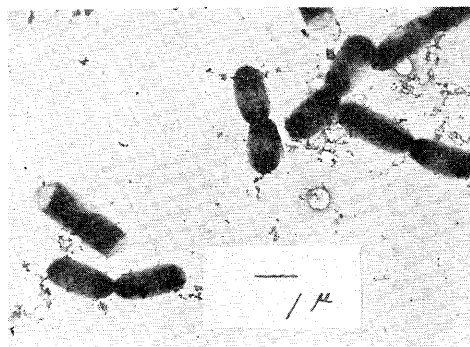
E. coli 12時間培養, 即日の菌 ×6000

第 17 図



同, 96時間後 ×6000

第 19 図



同, 蒸溜水浮游液として +4°Cに保存,  
96時間後 ×6000

(2) spore 及びその前段階である forespore の形成される場合は勿論酵素活性は落下するが、これらの形成の行われない条件下でも活性は落下する。

(3) 菌浮游液の状態で+4°C 保存されるときは、遠心沈渣の形(比較的水分の少ない状態)で+4°C 保存されるときより活性の落下が著しい。これは孢子形成菌の如き生化学的活性の不安定な菌を酵素化学的実験に供する場合に注意しなければならない点である。

(4) 菌液上清の菌体成分の検索により菌体成分の細胞外への流出及び蛋白質の低分子化が認められた。

(5) 電子顕微鏡所見より細胞被膜の変化及

び菌体の density の著明な減弱の像を得た。

(6) Nicotinamide, FAD 及び cytochrome C の添加実験によつて活性の低下を防ぐことは出来なかつた。

(7) 以上の結果より孢子形成菌の細胞被膜の透過性が変化し易いことに起因すると考えられる助酵素類の流出更には、これらの助酵素の結合している酵素蛋白自体の低分子化乃至は細胞外流出のために総合的酵素系の機能に変調を来し酵素活性の落下が起るものと思われる。

稿を終るに当り、御指導と御校閲を賜つた恩師谷教授に深く感謝の意を表します。又実験の御指導を戴いた西田助教授に感謝致します。

## 文

- 1) 田上三雄： 十全医学会雑誌，発表予定。
- 2) Hardwick, W. A., and Foster, J. W. : J. Bacteriol., **65**, 355 (1953).
- 3) 田上三雄： 十全医学会雑誌，発表予定。
- 4) 江上不二夫等： 標準生化学実験，初版，134頁，(1953) 文光堂。
- 5) 江上不二夫： 核酸及び核蛋白質，上巻，140頁，(1951) 共立出版株式会社。
- 6) 江上不二夫： 核酸及び核蛋白質，上巻，142頁，(1951) 共立出版株式会社。
- 7) 藤田秋治： 医学生物学研究領域に於ける検圧法と其応用，第2刷，395頁，(昭和24)，岩波書店。
- 8) W. W. Umbreit et al : Manometric techniques and tissue metabolism, p. 211, sixth printing (1951), Burgess Publishing Co.
- 9) Norman G. Roth and etc. : J. Bacteriol., **69**, 455 (1955).
- 10) Richard A. Greenberg and H. Orin Halvorson : J. Bacteriol., **69**, 45 (1955).

## 献

- 11) Powell, J. F. and Hunter, J. R. : J. Gen. Physiol., **36**, 601 (1953).
- 12) 中田大輔等： 日本細菌学雑誌，**10**, 613 (1955).
- 13) Henry, H., Stacey, M. : Nature, **151**, 671 (1943).
- 14) Evelyn L. Oginsky and Wayne W. Umbreit : An introduction to bacterial physiology p. 31 (1954).
- 15) Goebel, W. F., & Avery, O. T. : J. Exptl. Med., **49**, 267 (1929).
- 16) Handler, P. and Klein, J. R. : J. Biol. Chem., **143**, 49 (1942).
- 17) Mann, P. J. G. and Quastel, J. H. : Biochem. J., **35**, 502 (1941).
- 18) 江上不二夫等： 標準生化学実験，初版，p. 311 (1953) 文光堂。
- 19) Felix Haurowitz : Chemistry and biology of proteins, (1950), new york academic press inc. publishers.
- 20) E. F. Gale & J. P. Folkes : Nature, **173**, 1223 (1954).