

大腸菌のL-ラムノース代謝

金沢大学医学部医化学教室（主任：高木康敬教授）

沢 田 英 夫

（受付：昭和37年10月21日）

メチルペントース（6-デオキシヘキソース）は古くより自然界に広く存在することが知られている。すなわち、L-ラムノース（6-デオキシL-マンノース）は配糖体やゴム、粘質物等の複合多糖体¹⁾として植物に、また細菌の細胞壁²⁻⁴⁾や赤痢菌その他の菌体内毒素の多糖体⁵⁻⁷⁾さらに細菌の抗原多糖体^{8,9)}に含まれ、最近ではファージ吸着性の獲得とともに菌体内に出現することも認められている¹⁰⁾。一方L-フコース（6-デオキシL-ガラクトース）は海藻やウニ卵のゼリー状物質に多糖体硫酸エステル¹¹⁾として含まれるほか、血液型多糖類¹²⁻¹⁵⁾や *Bifidus* 因子¹⁶⁾さらに人乳にのみ存在するある種の糖ヌクレオチド¹⁷⁾の構成々分である。その他、2-O-メチルフコース、2-O-メチルラムノース、2,4-O-ジメチルラムノース等フコース、ラムノースのメチル誘導体は *Mycobacteria* の glycolipid¹⁸⁾ 中に含まれ、パラトース（3,6-ジデオキシD-グルコース）、アベコース（3,6-ジデオキシD-ガラクトース）、チベロース（3,6-ジデオキシD-マンノース）、コリトース（3,6-ジデオキシL-ガラクトース）はサルモネラ属菌、大腸菌のO抗原多糖体^{9,19)} 中にあり、明らかに抗原特異性と対応している。

このようにメチルペントースおよびその誘導体には生物学的に重要な機能が期待され、いろいろな立場から広く興味をもたれているがその

代謝および生合成については現在のところあまり知られていない²⁰⁻²⁶⁾。1937年 Kluyver, Schnellen²⁷⁾ は *Bacillus rhamnosifermentans* によるラムノース醱酵を研究し、消費されたラムノース炭素の約50%が1,2-プロパンジオールとして検出されることよりおそらくラムノースがグリセロアルデヒドとラクトアルデヒドとに分解され、後者が1,2-プロパンジオールに還元されるものと推定した。一方 Wilson 等²⁸⁾ は大腸菌によるL-ラムノース代謝の第一段階でL-ラムノースに変化することを報告し、Tecce²⁹⁾ および Englesberg³⁰⁾ も大腸菌あるいは *Pasteurella pestis* を用いそれぞれ独立に同じ結論を得ている。さらに Englesberg³⁰⁾ および Wilson 等³¹⁾ は生成したL-ラムノースがATPの存在下にリン酸化をうけ以下代謝されてゆくことを認めたが、その詳細を明らかにしていない。

著者はメチルペントースの生体内における生理的な役割に興味をもち、その研究の第一歩としてまずその代謝系を明らかにしたいと考えて大腸菌におけるL-ラムノースの分解経路を酵素化学的に研究した。本論文ではL-ラムノースイソメラーゼ、L-ラムノロキナーゼ、L-ラムノロースリン酸アルドラーゼの精製およびその性状について報告する。

実験材料および方法

試料 実験はすべて大腸菌B株を用いて行つた。すなわち第一リン酸カリ、0.8gm, 第二リン酸アンモン0.3gm, 硫酸アンモン、0.4gm, 酵母エキス（大五栄

養）、0.5gm, L-ラムノース、0.5gmを100ml (pH 7.0)に含む培地に本菌を37°C, 10時間振盪培養した後低温で遠心集菌、水洗後-10°Cに貯蔵し必要に応じ

て使用した。L-ラムノースは市販品を80% エチルアルコールより再結晶し実験に用いた。L-ラムヌロースは Barnett, Reichstein³²⁾の方法によつてつくつた。すなわち L-ラムノース無水物をまず乾燥ピリジンの8倍量と5時間還流させてから減圧下にピリジンを出来るだけ除去し、残留物を少量のエチルアルコールにとかした。この際未反応のL-ラムノースは結晶として析出するので除去し、可溶部分を濃縮、得られたシロップは少量の水飽和n-ブチルアルコールにとかし、あらかじめ水飽和n-ブチルアルコールに平衡させたセルローズカラム (2.2×35cm) に通し、水飽和n-ブチルアルコールを展開剤としてクロマトグラフィーを行つた³³⁾。そして各分画についてn-ブチルアルコール、エチルアルコール、水 (5:1:4) を展開剤とするペーパークロマトグラフィーを行い L-ラムノースの混入していない L-ラムヌロース分画を集め、減圧下に溶媒を全部除去し、得られたシロップをL-ラムヌロースとして実験に用いた。なおこのシロップから常法によりフェニールオサゾン (m.p. 179°C) をつくり、L-ラムノースのフェニールオサゾンと混融したが融点の降下は認められなかつた。L, DL, D-ラクトアルデヒドは Huff, Rudney^{34, 35)}の方法にしたがつてD, DL, L-スレオニン (D, DL-スレオニンは市販品, L-スレオニンは金沢大学薬学部木村行男博士より分与されたものを用いた) から合成し, Bisulfid 結合能

でその濃度を測定した³⁶⁾。L および D-フコースは New York University の Horecker 教授より, D-ラムノースは University of Nebraska, Pazur 博士よりそれぞれ譲与をうけた。その他 ATP, DPNH, 果糖 1.6-二リン酸, プロタミン硫酸塩は米国 Sigma 社製品を用いた。リン酸カルシウムゲルは Keilin, Hartree³⁷⁾, アルミナゲル Cr は Willstätter³⁸⁾の方法により調製した。また筋肉アルドラーゼは Taylor³⁹⁾, α-グリセロリン酸脱水素酵素は Racker⁴⁰⁾の方法によりそれぞれつくつた。酸性ホスファターゼは米国 Worthington 社製品を用いた。

定量法 ラムヌロースの定量は Disch, Devi のシステイン硫酸法によつた⁴¹⁾。ただし本法は元來ケトースの定量法として報告されたものであり E₄₁₂—E₃₈₀ が濃度に比例することが認められているが、ラムヌロースの場合は波長がややずれて 402mμ に最大吸収を示すので E₄₀₂—E₃₈₀ の値を用いた。なお標準ラムヌロース液の調製はL-ラムノースを基準とし、Dische のメチルペントースに対するシステイン硫酸法⁴²⁾にもとずいて行つた。そのほかケトペントースは Dische のシステイン、カルバゾール法⁴³⁾を、タンパクは Bücher⁴⁴⁾ および Warburg, Christian⁴⁵⁾の方法、また無機リン酸は Allein⁴⁶⁾の方法によりそれぞれ定量した。

実 験 成 績

I L-ラムノー スイソメラーゼ

I) 酵素活性の測定法

L-ラムノースを基質とし、生成されるL-ラムヌロースを定量することにより酵素の活性を測つた。反応液の組成は次の通りである。

L-ラムノース	2	μmoles
塩化マンガン	10	μmoles
トリス緩衝液 (pH7.6)	20	μmoles
酵素液 タンパク	5—15	μgm
全量	1.0	ml

これを 37°C に 10 分間インキュベートした後 10% 三塩化酢酸液 1 ml を加えて反応を停止させるとともに除タンパクし、生成されたラムヌロース量をシステイン硫酸法で定量した。そしてこの条件の下で 10 分間に 1 μmole のラムヌ

ロースを生成するに必要な酵素量を 1 単位とし、タンパク 1 mg 当りの単位数をもって比活性度をあらわした。なおこの条件においては、反応は少なくとも 20 分迄直線的にすすみ、その速度は酵素タンパク量に比例した。

II) 酵素の精製

操作はすべて 4°C 以下で行なつた。まず凍結菌体 5 gm を等量のアルミナ末で磨碎し、30 ml の蒸留水で抽出した。不溶物は 6,000×g 15 分間遠心沈殿して除去し、その上清を粗酵素液として以下 3 種の酵素の精製に供した。

1) マンガン処理

粗酵素液 20 ml に 0.2 M 塩化マンガン 1 ml を攪拌しながら加え、さらに時々攪拌をつづけつつ 15 分間放置してから 6,000×g 10 分間遠心沈殿

を行って核タンパクを含む不溶物を除去した。

2) 硫酸分画 I

マンガン処理で得られた上清分画 18ml に硫酸飽和液 12ml を加え、生じた沈殿は遠心沈殿により除去してから上清にさらに硫酸 4.6gm を攪拌しながら徐々に加え、20 分間放置した後 6000×g 10 分間遠心沈殿を行い、得られた沈殿を 5×10⁻³M システイン溶液 10ml にとかした。

3) 熱処理

硫酸分画を 55°C の水浴につけて 50°C となったとき直ちに 50°C の水浴に移し 2 分後急激に冷却し、生じた不溶性タンパクを 6,000×g 10

分間遠心沈殿して除去した。

4) 硫酸分画 II

熱処理した酵素液 8 ml に硫酸 1.07gm を攪拌しながら徐々に加え、20 分間放置してから遠心沈殿し、その上清分画にさらに硫酸 1.17gm を加えて生じた沈殿を集め、5×10⁻³M システイン溶液 2 ml にとかした。

以上の精製の一例を示めすと表 1 の如くであり、これらの操作により酵素は粗酵素液にくらべタンパク量当り約 50 倍に精製され、L-ラムヌロキナーゼ、L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼを含まない分画が得られた。

Table 1 Purification of L-rhamnose isomerase from E. Coli

Fraction	Total units	Specific activity (units/mg)
Extract	69.5	0.6
Mn ⁺⁺ fraction	146.9	1.9
Ammonium sulfate fraction	158.4	5.8
Heated fraction	112.0	24.2
Ammonium sulfate fraction	80.8	29.5

III) 酵素の性状

1) 至適 pH

本酵素の至適 pH はトリス緩衝液を用いた場合 7.6 付近にあり、それより酸性側では漸次反応速度を減少するのに対し、アルカリ性側では急激に減少する。その他の緩衝液についてもほぼ同じ傾向がみられ、反応速度にも差異は認められない。

2) 安定性

精製した L-ラムノースイソメラーゼは、4°C 以下の低温では少なくとも 2 週間活性の損失なしに保存することが出来るが、凍結融解をくり返すと速やかに失活する。

3) 基質特異性

本酵素は高い基質特異性を持ち D-ラムノ-

ース、D および L-フコースに対しては作用せず、さらに D-グルコース、D-ガラクトース、D-マンノース、L-アラビノース、D-キシロースもすべて基質にはなり得ない。

4) 反応の平衡

反応は可逆的で L-ラムノース、L-ラムヌロースのいずれを基質とする時も同じ平衡状態が得られ、L-ラムノースと L-ラムヌロースの濃度比は 2:3 である (第 1 図)。なお Green 等²²⁾は反応液に硼酸塩を加えた場合に平衡のずれることを報告しているが、精製酵素標品で硼酸ナトリウム 5 μmoles を添加した時の平衡状態における濃度比は L-ラムノース 32%、L-ラムヌロース 68% であった。

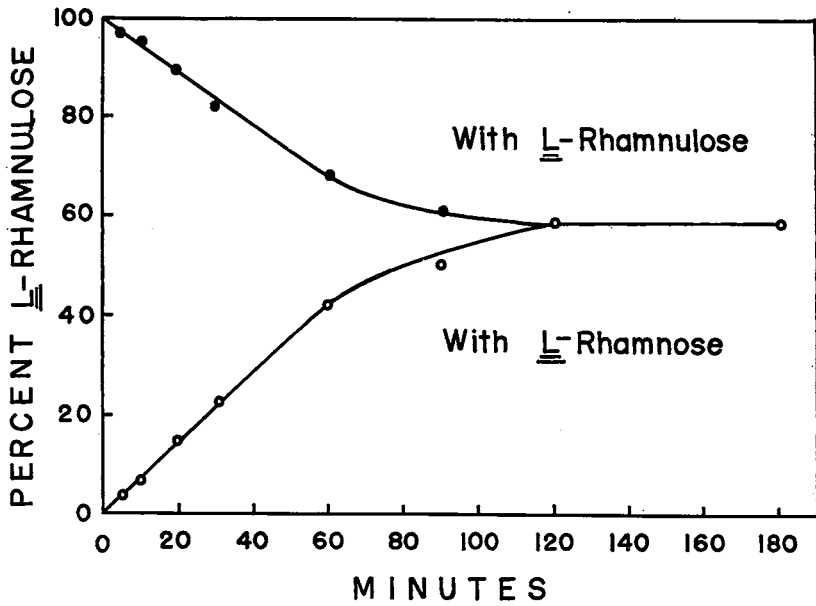


Fig. 1 The equilibrium between L-rhamnose and L-rhamnULOSE in Tris buffer, pH 7.6

5) 基質濃度の影響

本酵素の反応速度におよぼす基質濃度の影響は上記の反応条件の下では第2図に示す如くて

あり, この図からL-ラムノースに対する K_m は Lineweaver-Burk 法⁴⁷⁾により $2.0 \times 10^{-3}M$ と計算される.

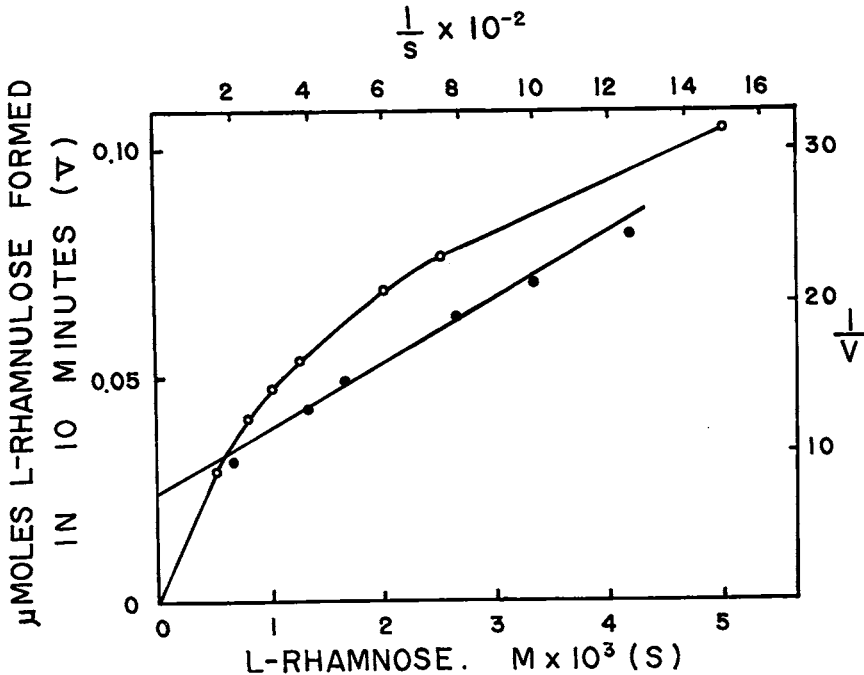


Fig. 2 The effect of L-rhamnose concentration on the reaction rate

6) 金属イオン及び阻害剤の影響

本酵素に影響をおよぼす物質をみると、第一に金属イオンであるが Mn^{++} は本酵素を活性化し、その至適濃度は 10^{-2} M である。 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} はいずれも 5×10^{-3} M で約 55% 阻害し、 Fe^{++} , Cu^{++} は 10^{-3} M において約 70% の阻害をきたす。 Mg^{++} は 5×10^{-3} M では阻害せず、 10^{-2} M で約 30% の阻害をきたすにすぎない。なお金属イオンによるこれらの阻害はシステインの添

加により回復されない。

次に p-chloromercuribenzoate (PCMB と略す) は Mn^{++} の存在しない時は 10^{-4} M で 55% の阻害を示すのに対し、 Mn^{++} を添加した時は 20% 阻害するにすぎない。 PCMB によるこの阻害は、システインの添加によりほとんど完全に回復される。また EDTA も Mn^{++} を加えない条件の下で約 65% 阻害する (第 2 表)。

Table 2 The effect of various compounds on the reaction rate of L-rhamnose isomerase

Additions	Concentration	Inhibition
	M	%
Mg^{++}	1×10^{-2}	30
Mg^{++}	5×10^{-3}	0
Fe^{++}	5×10^{-3}	88
Fe^{++}	1×10^{-3}	67
Co^{++}	5×10^{-3}	53
Co^{++}	1×10^{-3}	44
Ni^{++}	5×10^{-3}	58
Cu^{++}	2×10^{-3}	70
Zn^{++}	1×10^{-3}	56
PCMB	1×10^{-3}	67
PCMB	1×10^{-4}	55
EDTA	1×10^{-3}	67
PCMB(10^{-4} M)+Cysteine	2×10^{-4}	5
PCMB(10^{-4} M)+Cysteine	1×10^{-4}	14

7) 反応生成物の同定

反応の結果生成される物質の確認には次の如く多量の基質を用いた実験を行なった。すなわち L-ラムノース $10 \mu\text{moles}$, 塩化マンガン $50 \mu\text{moles}$, トリス緩衝液 (pH7.6) $100 \mu\text{moles}$, L-ラムノースイソメラーゼ $50 \mu\text{gm}$ を全量 5 ml として 37°C に 2 時間インキュベート, 50% 三塩化酢酸 0.5 ml を加えて反応を停止するとともに除タンパクしてからエーテルで三塩化酢酸を除き, 減圧

下で乾涸した。残留物を少量の水にとかし, 東洋濾紙 No.50 を用いて (a) n-ブチルアルコール, エチルアルコール, 水 (5:1:4), (b) 酢酸エチル, 酢酸, ギ酸, 水 (18:3:1:4) を展開剤とする上昇法によるペーパークロマトグラフィーを行った。アルカリ性硝酸銀液またはフロログルシノール液を用いて処理したところ⁴⁸⁾, 色調および Rf が L-ラムノースと L-ラムノースとに相当する 2 つのスポットを検出した (第 3 表)。

Table 3 Chromatography of isomerase reaction product

Sample	Solvent		Color test	
	A	B	Alkaline silver nitrate	Phloroglucinol
Enzymatic product	Rf	Rf		
	0.40	0.27	Dark-brown	Yellow-brown
L-Rhamnulose	0.32	0.21	Dark-brown	—
	0.40	0.27	Dark-brown	Yellow-brown
L-Rhamnose	0.34	0.21	Dark-brown	—

II L-ラムヌロキナーゼ

I) 酵素活性の測定法

L-ラムヌロキナーゼの活性は、リン酸エステル化による遊離のL-ラムヌロースの減少にもとづいて測定した。反応液の組成は次の通りである。

L-ラムヌロース	2 μ moles
塩化マグネシウム	10 μ moles
塩化カリウム	50 μ moles
ATP	5 μ moles
トリス緩衝液 (pH7.3)	20 μ moles
酵素液	タンパク 20—40 μ gm
全量	1.0 ml

これを37°Cで10分間インキュベートした後、5%硫酸亜鉛液1mlを加えて反応を停止させ、さらに0.3N水酸化バリウム液2mlを加えてタンパクおよび有機リン酸エステルを沈殿除去する。対照にはL-ラムヌロースを除いた反応液に硫酸亜鉛液を加えた後L-ラムヌロース及び水酸化バリウム液を加えたものを用いた。そして10分間にリン酸エステル1 μ moleの生成を触媒する酵素量を1単位とし、タンパク1mg当りの単位数をもって比活性度とした。なおこの条件では反応は少なくとも15分間迄は直線的にすすみ、かつその速度は酵素タンパク量に比例した。

II) 酵素の精製

1) マンガン処理

L-ラムヌロースイソメラーゼの精製におけると同様アルミナ磨砕によって得た粗酵素液10mlに1M塩化マンガン0.35mlを攪拌しながら加え、さらに時々攪拌をくりかえしつつ10分間放置後、10,500 \times g10分間遠心沈殿を行って核タンパクを含む不溶物を除去した。

2) 硫酸分画

マンガン処理後の上澄酵素液9mlに硫酸飽和液6ml(10⁻³M EDTAを含み、かつあらかじめアンモニア水でpH7.0に調製したもの)を加え、生じた沈殿を遠心除去した後その上清に上記硫酸飽和液21mlを再び加え、生じてくる沈殿を遠心沈殿により集め、2 \times 10⁻³Mシステインを含む10⁻³Mグリシルグリシン液(pH7.0)6mlにとかした。

3) リン酸カルシウムゲル処理

つぎにこの硫酸分画にリン酸カルシウムゲル懸濁液を2.7ml(リン酸カルシウムゲル30mg, ゲルとタンパクの比は約3:1となる)を加えてから6,000 \times g10分間の遠心沈殿を行うと不活性なタンパクはゲルに吸着除去され、酵素の大部分は上清中に見出される。

以上の操作の各段階における酵素の比活性度および収量は第4表に示す如くであり、粗酵素

液にくらべタンパク当り約 13 倍に精製されたが L-ラムノースイソメラーゼを十分に分離することは出来なかった。

Table 4 Purification of L-rhamnulokinase from E. coli

Fraction	Total units	Specific activity (units /mg)
Extract	72.8	0.4
Mn ⁺⁺ fraction	69.3	2.8
Ammonium sulfate fraction	42.0	4.2
Calcium phosphate gel fraction	28.8	5.4

III) 酵素の性状

1) 至 適 pH

本酵素の活性におよぼす pH の影響をトリス緩衝液でみると、pH7.2 から 8.8 迄の間では全く差異は認められないが、リン酸緩衝液ではトリス緩衝液よりかなり低い反応速度を示し、かつ至適 pH は 7.1 付近でその酸性側、アルカリ性側のいずれでもかなり著しい活性の減少を示す。

2) 安定性

L-ラムヌロキナーゼを 0-4°C に保つときはすみやかに活性が低下するが、-10°C では少なくとも 3 週間活性の損失なしに保存することが出来る。

3) 基質特異性

L-ラムヌロキナーゼはもっとも精製した標

品でも L-ラムノースイソメラーゼを含んでいるが、前に述べた如く後者は Mg⁺⁺ によりかなり阻害されるので、上記の反応条件ではたとえイソメラーゼが働くとしてもわずかである。事実表 5 に示す如く L-ラムノースに Mg⁺⁺ 存在下でキナーゼを作用させてもほとんど消費されないが、あらかじめイソメラーゼとインキュベートしてから Mg⁺⁺ を加えキナーゼを作用させると L-ラムノースの消失が認められる。他方 L-ラムヌロースに Mg⁺⁺ のない状態でイソメラーゼを作用させてから Mg⁺⁺ とキナーゼを添加すると、遊離のラムヌロースの減少が少なくなる。したがって本酵素は L-ラムノースには作用せず、L-ラムヌロースのみをリン酸化するものと思われる。なお D-フルクトースもリン酸化をうけない。

Table 5 Substrate specificity of L-rhamnulokinase

Substrate	Addition	Sugar consumed μmoles /10 min.
L-Rhamnose	Kinase	0.02
L-Rhamnose	Isomerase+Kinase	0.14
L-Rhamnulose	Kinase	0.52
L-Rhamnulose	Isomerase+Kinase	0.20

4) 基質濃度の影響

種々の基質濃度における L-ラムヌロキナーゼの反応速度を測定し、Lineweaver-Burk 法

により Km を求めると、L-ラムヌロース、ATP、Mg⁺⁺ のそれぞれに対し 4.0×10⁻³M、2.9×10⁻⁴M、4.2×10⁻⁴M である(第3,4,5図)。

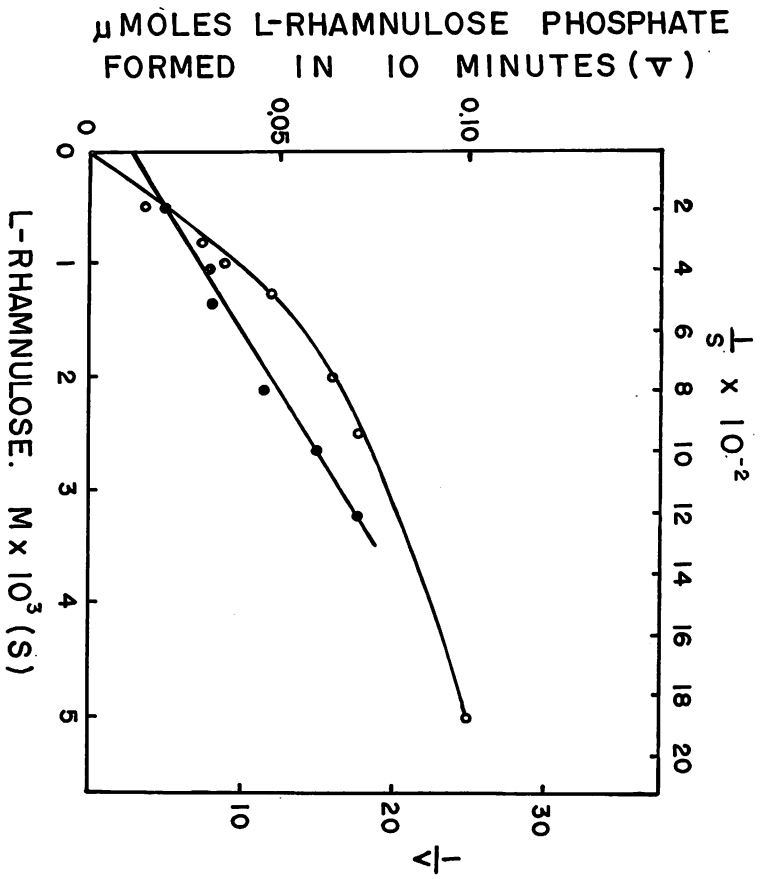


Fig. 3 The effect of L-rhamnulose concentration on the reaction rate

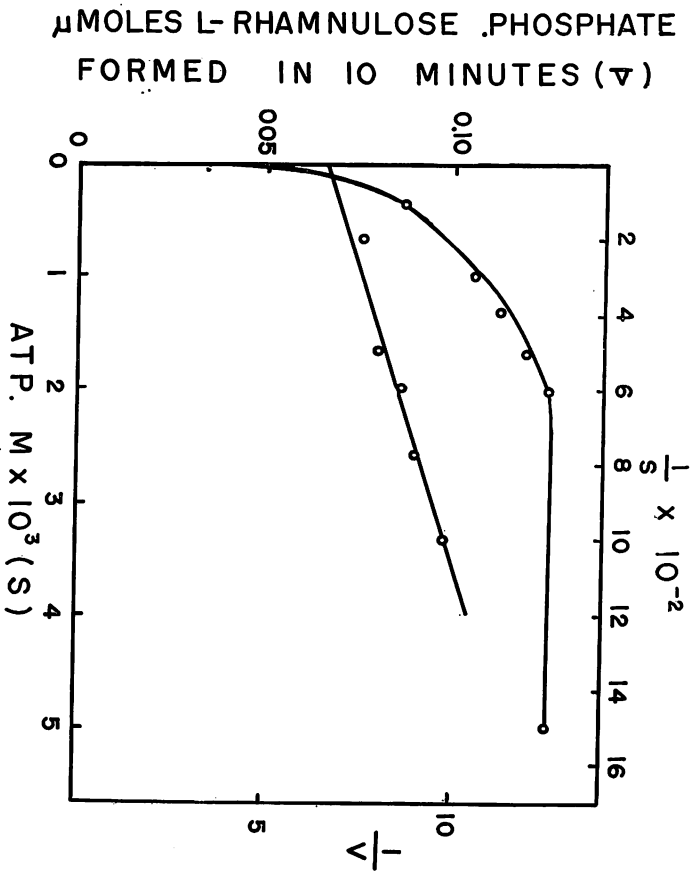


Fig. 4 The effect of ATP concentration on the reaction rate

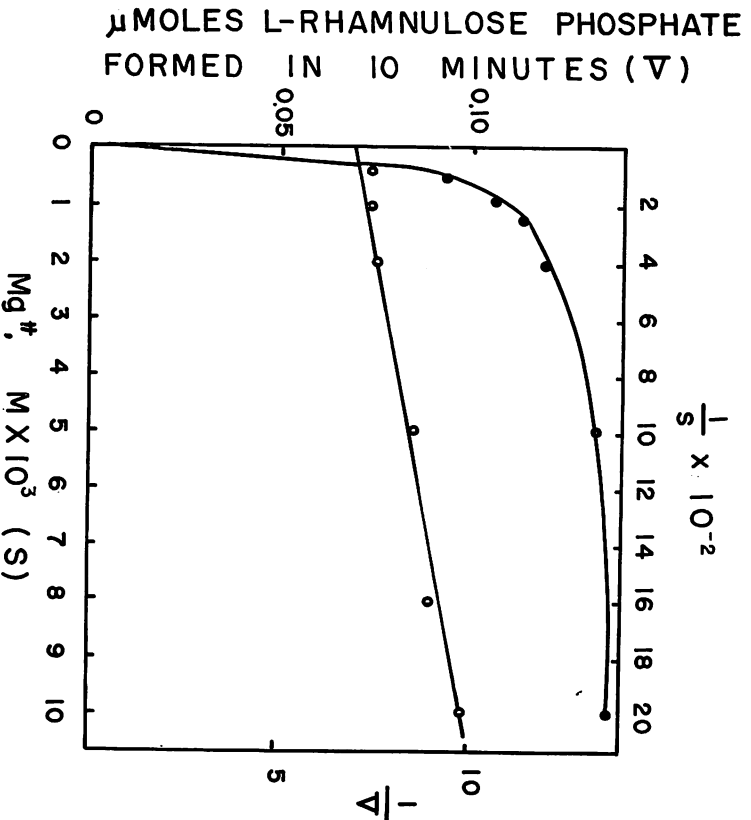


Fig. 5 The effect of magnesium concentration on the reaction rate

5) 金属イオン及び阻害剤の影響

一般にホスホキナーゼの反応は二価金属イオンを要求するが、L-ラムノキナーゼもMg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺により活性化される。ただしZn⁺⁺では影響されない(第6表)。そしてMg⁺⁺とATPの比が2:1の時に本酵素は最大の活性を

示す。なおEDTAは2×10⁻³Mで15%, 10⁻²Mでは70%の阻害をきたし、またPCMBは10⁻⁴Mで約80%の阻害をあたえるが、システイン、グルタチオンを同時に添加することによってこの阻害は完全に回復される(第7表)。

Table 6 The effect of metal ion on the reaction rate of L-rhamnulokinase

Metal	Concentration	Specific activity
None	M	μmoles/mg
Mg ⁺⁺	2×10 ⁻²	0.3
Mn ⁺⁺	1×10 ⁻²	5.9
Mn ⁺⁺	2×10 ⁻²	7.7
Co ⁺⁺	1×10 ⁻²	7.3
Co ⁺⁺	2×10 ⁻²	6.2
Ni ⁺⁺	5×10 ⁻³	5.0
Zn ⁺⁺	1×10 ⁻³	2.4
Zn ⁺⁺	5×10 ⁻³	1.3
Zn ⁺⁺		0.8

Table 7 The effect of EDTA and PCMB on the reaction rate of L-rhamnulokinase

Addition	Concentration	Inhibition
	M	%
EDTA	1×10^{-2}	70
EDTA	2×10^{-3}	15
PCMB	1×10^{-4}	80
PCMB + Cysteine	1×10^{-3}	2
PCMB + Glutathione	1×10^{-4} 1×10^{-2}	9

6) 反応生成物の同定

反応生成物の同定には次の実験を行なった。すなわちL-ラムヌロース $20 \mu\text{moles}$, 塩化マグネシウム $100 \mu\text{moles}$, ATP $50 \mu\text{moles}$, 塩化カリウム $500 \mu\text{moles}$, トリス緩衝液(pH7.3) $200 \mu\text{moles}$, L-ラムヌロキナーゼ $200 \mu\text{gm}$ を全量 10ml として 37°C に 60分間インキュベートしてから酢酸 1ml を加えて反応を停止させた。そしてさらにNorit A を加えてヌクレオチドを吸着し, これを低温 ($0-4^\circ\text{C}$) で遠心分離後濾別 (以下の操作はすべて $0-4^\circ\text{C}$ で行なった), Norit A はさらに水洗して洗液を同様に遠心分離後濾過した。これらの濾液を合せ, 1M 酢酸バリウム液 2ml を加え pH を 7.2 としてから 4 倍容量のエチルアルコールを徐々に加えて一夜放置した。生じた沈殿を遠心により集め, 80% エチル

アルコールで洗浄後水酸化カリウム上で減圧乾燥, 得られたバリウム塩を 0.05M 酢酸にとかし, さらに硫酸ナトリウム液を加えてナトリウム塩にかえ, 生じた硫酸バリウムを遠心沈殿により除去してから上清を pH 6.6 とした。

ここに得られた試料は Dische のシステイン硫酸反応⁴¹⁾ およびジフェニールアミン反応⁴⁹⁾ をあたえ, かつその吸収曲線は L-ラムヌロースのそれと全く同一であり, 最大吸収波長はそれぞれ $402 \text{m}\mu$ および $375 \text{m}\mu$ であった (第 6 図)。また組成は第 8 表に示す如くであり, かつ 1N 塩酸中 100°C の加熱でリン酸エステルの水解される速度をみると第 7 図のように 15 分間で約 85% が水解をうけ易水解性を示した。したがって L-ラムヌロキナーゼによる反応生成物は L-ラムヌロース-1-リン酸と考えらる。

Table 8 Analytical data for L-rhamnulose phosphate

Substance	Experiment 1	Experiment 2
	μmoles	μmoles
Total phosphorus	1.38	1.18
Phosphorus hydrolyzed	1.36	1.11
Ketose after hydrolysis	1.32	1.10
Methylpentose after hydrolysis	1.40	1.20

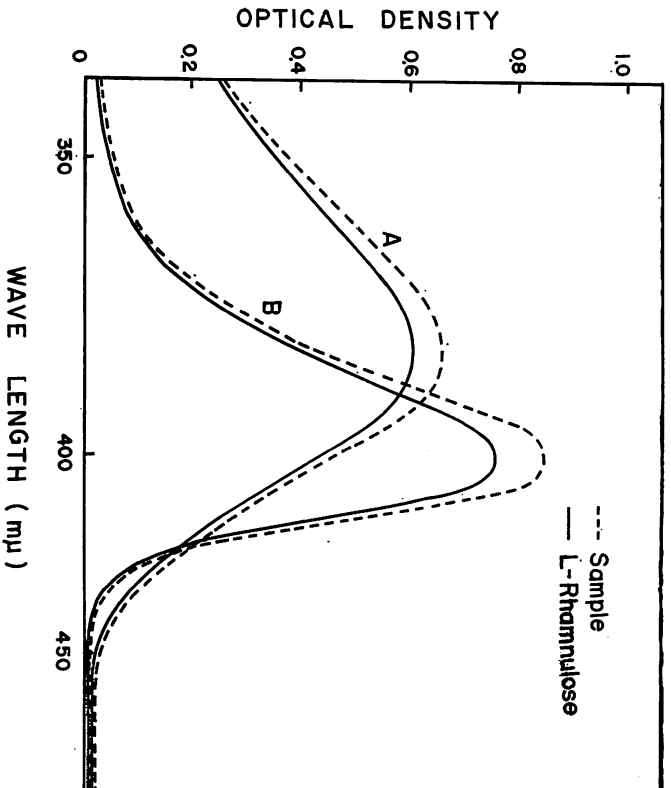


Fig. 6 Absorption spectrums of color developed by the cysteine sulfuric acid and the diphenylamine color tests of L-rhamnulose phosphate
A—Diphenylamine test, B—Cysteine sulfuric acid test

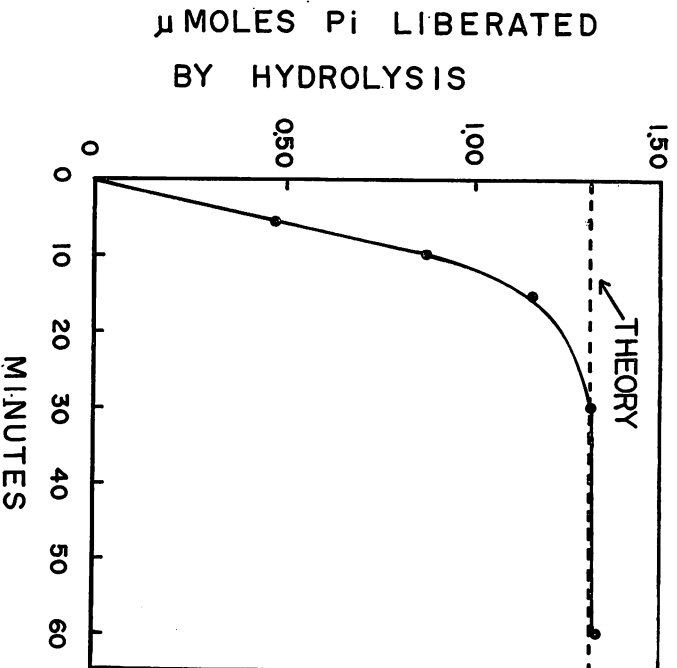


Fig. 7 Hydrolysis of L-rhamnulose phosphate in N HCl at 100°C.

III L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼ

I) 酵素活性の測定法

L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼの活性は、基質としてL-ラムヌロース1-リン酸を用い反応によるその減少から測定した。反応液の組成は次の通りである。

L-ラムヌロース1-リン酸	0.5 μ mole
シアンカリ	50 μ moles
グリシン緩衝液 (pH9.3)	40 μ moles
酵素液	タンパク 2-8 μ gm
全量	1.0ml

これを37°C 10分間インキュベートし、10%三塩化酢酸液1mlを加えて反応を停止するとともに除タンパクした後、システイン硫酸法によりL-ラムヌロース1-リン酸の残存量を測る。そして10分間に1 μ moleのL-ラムヌロース1-リン酸を分解するに要する酵素量を1単位とし、タンパク1mg当りの単位数をもって比活性度とした。この条件において反応は少なくとも15分迄は直線的にすすみ、その速度は酵素タンパク量に比例する。

II) 酵素の精製

1) プロタミン処理

上記の粗酵素液9mlに1%プロタミン液3mlを攪拌しながら徐々に加え、さらに20分間放置後10,500 \times g 10分間の遠心沈殿により不溶物を除いた。

2) アルミナゲルC₇処理

プロタミン処理後の上澄液11mlにアルミナゲルC₇懸濁液1.8ml(アルミナゲルC₇43mg)を攪拌しながら加え、20分間放置してから6,000 \times g 10分間の遠心沈殿により不活性タンパクを吸着したゲルを除いた。

3) 硫酸分画

つぎにこの上清11mlに硫酸飽和液11mlを攪拌しながら加え、30分後に6,000 \times g 10分間の遠心沈殿により生成した沈殿を集め、10⁻²Mシステインを含む5 \times 10⁻³Mグリシルグリシン液(pH7.0)7mlにとかした。

以上の操作の各段階における酵素の比活性度および収量は第9表に示す如くであり、粗酵素液にくらべ約15倍に精製することが出来た。しかしL-ラムヌロースイソメラーゼ、L-ラムヌロキナーゼを完全に分離し得なかった。

Table 9 Purification of L-rhamnulose phosphate aldolase from E. coli

Fraction	Total units	Specific activity (units /mg)
Extract	31.8	0.2
Protamine fraction	30.0	0.8
Alumina gel C ₇ fraction	28.8	2.5
Ammonium sulfate fraction	15.0	3.0

III) 酵素の性状

1) 至適pH

本酵素の至適pHはグリシン緩衝液で9.3付近にあり、それよりわずかに酸性又はアルカリ性側でも反応速度は急激に低下する。

2) 安定性

精製した本酵素は、-10°Cでは少なくとも

1カ月間は活性の損失なしに保存することが出来る。

3) 基質濃度の影響

L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼの反応速度におよぼす基質濃度の影響は第8図の如くであり、8.0 \times 10⁻³Mで最大速度に達し Line-weaver-Burk 法によりL-ラムヌロース1-リン酸に対するK_mは1.0 \times 10⁻²Mと計算される。

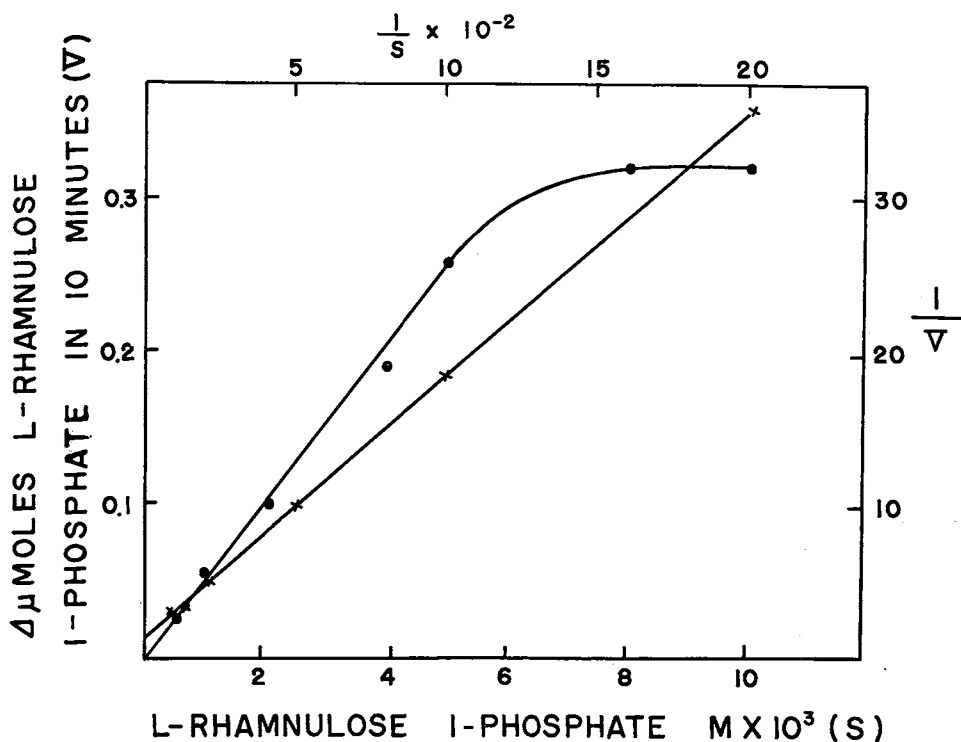


Fig. 8 The effect of L-rhamnulose phosphate concentration on the reaction rate

4) 金属イオン及び阻害剤の影響

L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼは Co^{++} , Ni^{++} の存在により著しく阻害されるが Mg^{++} の阻害は認められず, Mn^{++} は逆にわずかなが

ら促進する. また PCMB による阻害は L-ラムヌロースイソメラーゼ, L-ラムヌロキナーゼの場合にくらべて小さい (第10表).

Table 10 The effect of inhibitors on the reaction rate of L-rhamnulose phosphate aldolase

Inhibitor	Concentration	Inhibition
	M	%
Co^{++}	1×10^{-3}	50
Co^{++}	5×10^{-3}	92
Ni^{++}	1×10^{-3}	50
Ni^{++}	5×10^{-3}	100
Mg^{++}	1×10^{-2}	0
PCMB	1×10^{-5}	16
PCMB	1×10^{-4}	22

5) Stoichiometry

さきに述べた如く, Kluyver, Schnellen は *Bacillus rhamnosifermentans* におけるラムノースの醗酵の結果多量の 1,2-プロパンジオールを生ずることを認め, おそらくラムノースが 2つの三炭素物質に分解するものと推定している. しかしながら大腸菌から部分精製した酵素を用いた著者の実験では, 炭素鎖開裂の基質はリン酸化されたラムノースリン酸であることが示されたので, 生成物の中三炭糖は遊離の形でなくリン酸化されており, かつグリセロアルデヒドよりもジヒドロキシアセトンリン酸であることが考えられる. したがってまず反応液についてジヒドロキシアセトン1-リン酸の存在を α グリセロリン酸脱水素酵素を用いた酵素的方法⁴⁰⁾ およびアルカリ易水解性リン定量法⁵⁰⁾ で検討したところいずれも本物質が含まれている

ことを示した. そこでこれにもついで反応を化学量論的に追及した. すなわち, L-ラムノース1-リン酸 1.5 μ moles, シアンカリ 75 μ moles, グリシン緩衝液 (pH9.3) 60 μ moles, L-ラムノースリン酸 アルドラーゼ 9 μ gm を全量 1.5ml として 37°C にインキュベートし, 一定時間毎に 1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 0.2ml を加え, 100°C 1分間加熱して反応をとめ全量を 2ml とした. 対照としては酢酸緩衝液を加えてから酵素液を添加し, 直ちに 100°C 1分間加熱して冷却したものを使用した. そしてこれらの試料の一部を用いて分析したところ第11表に示す如くラムノースリン酸の減少とアルカリ易水解性リン, ジヒドロキシアセトン1-リン酸の生成の間に完全な Stoichiometry の存在することが認められた.

Table 11 Stoichiometric data

Incubation time	Rhamnulose phosphate	Alkali labile phosphorus	DHAP
minutes	- 4 μ mole	+ 4 μ mole	+ 4 μ mole
10	0.13	0.11	0.10
20	0.22	0.20	0.17

DHAP : Dihydroxyacetone phosphate

6) メチルペントースの生成

このように L-ラムノースリン酸アルドラーゼによる炭素鎖の開裂の結果ジヒドロキシアセトンリン酸の生成されることは認めえたが, もう一つの物質と考えられるラクトアルデヒドの生成については何等証明されていない. そこでこの物の形成を確認し, 合わせて反応の可逆性を検討するために本酵素によるメチルペントースの合成を行なった. 第12表に示す如く, 筋アルドラーゼで果糖 1,6-二リン酸から生じるジヒドロキシアセトンリン酸と合成ラクトアルデヒドとが本酵素の存在下において反応し, メチルペントースを生ずることを認めた. この際筋アルドラーゼがなくても少量ながらメチルペン

トースが生成されるのに対し, L-ラムノースリン酸アルドラーゼを除くとメチルペントースの生成は全く認められなかった (第12表). これは L-ラムノースリン酸アルドラーゼがアルドラーゼの作用をもち果糖 1,6-二リン酸を分解するためであることがアルドラーゼの活性測定法⁵¹⁾ にしたがって明らかにされた.

そして反応生成物に酸性ホスファターゼを作用させた後 n-ブチルアルコール, エチルアルコール, 水 (5:1:4) を展開剤としてペーパークロマトグラフィーを行うと, ラムノースに相当するスポットの形成されていることがわかったが他の糖の存在は認められなかった. さらにペーパークロマトグラフィによりこの反応

Table 12 Formation of methylpentose by L-rhamnulose phosphate aldolase

Addition	Methylpentose found
Complete system*	7.32 <small>μmoles</small>
—Muscle aldolase	2.56
—L-Rhamnulose phosphate aldolase	—
—Muscle aldolase and L-rhamnulose phosphate aldolase	—

* The complete system contains 50 μmoles of D-fructose 1,6 diphosphate ; 13 μmoles of DL-lactaldehyde; 60 μmoles of glycine buffer, pH 9.3; 40 μgm of muscle aldolase; and 50 μgm of L-rhamnulose phosphate aldolase. The reaction mixture was incubated for 2 hours at 37°C.

生成物を精製した後、Dische のメチルペン
トースに対するシステイン硫酸反応⁴²⁾、ケート
スに対するシステイン硫酸反応⁴¹⁾およびジフ
ェニールアミン反応⁴⁹⁾を行ないそれぞれの吸

収スペクトルを標準品のそれと比較したところ
差異が認められず、ラムノースであることが
確認された (第9図)。

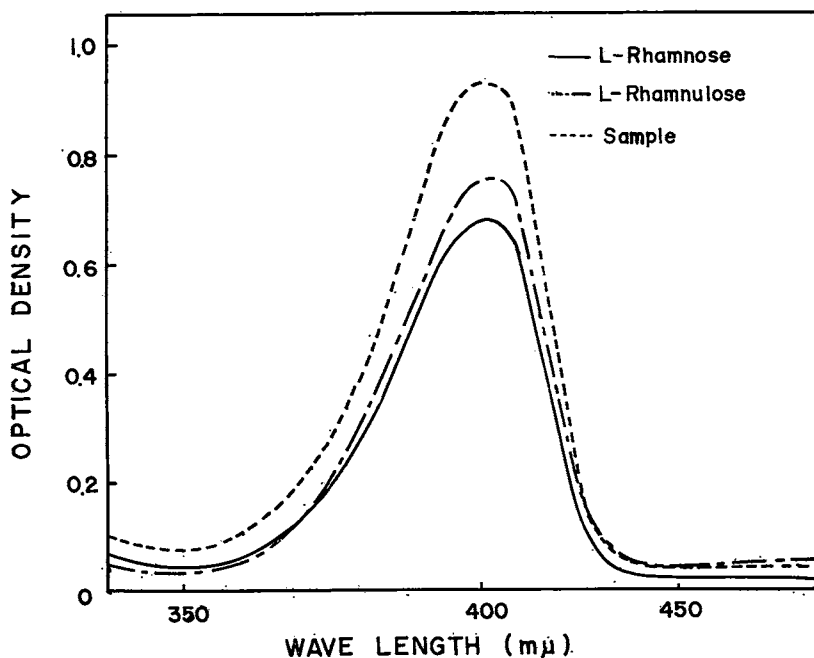


Fig. 9 Absorption spectrums of color developed by the cysteine sulfuric acid test of L-rhamnulose phosphate aldolase product

最後に反応生成物の立体配位を決めるため、このものに対する L-ラムノースイソメラーゼの作用を調べた。D-ラクトアルデヒドからの反応生成物は L-ラムノースイソメラーゼによって変化をうけず、L-ラクトアルデヒドからの反応生成物のみがその基質となり得、L系であることを示した。しかしながらこの場合イソメラーゼによる反応の過程をみると、等量の合成 L-ラムノースにくらべ約半量が反応をうけ平衡に達した時と一致するので、生成物が全部 L-ラムノースではなく、ほぼ半量が L-ラムノースで他は構造近似のメチルケトペン

ースらしいと考えられた。そこで D-および L-ラクトアルデヒドからの反応生成物をさらに確認するため、(a) 酢酸エチル, 酢酸, ギ酸, 水 (18:3:1:4), (b) ベンゾール, エチルアルコール, 水 (169:47:15) を展開剤に用いてペーパークロマトグラフィーを行ったところ、L-ラクトアルデヒドからの反応生成物はラムノースに一致する 1 個のスポットとして認められ、D-ラクトアルデヒドからのものは文献^{20,23)}に記載された Rf 値から 6-デオキシ D-ソルボースと推定された (第13表)。

Table 13 Chromatography of reaction products from L- and D-lactaldehyde by L-rhamnulose phosphate aldolase

Substance	Solvent A	Solvent B
	Rf	Distance from the origin
Enzymatic product from L-lactaldehyde	0.27	12.2
Enzymatic product from D-lactaldehyde	0.32	7.8
L-Rhamnose	0.21	
L-Rhamnulose	0.27	12.5

考 察

細菌による糖の代謝に際し、かなり早い段階でアルドースがケトースにイソメリ化される例がいくつか知られている。(Cohen は大腸菌における L-フコース²²⁾, D-アラビノース⁵¹⁾のイソメリ化, Lampen, Mitsuhashi⁵²⁾ は *Lactobacillus pentosus* による D-キシロースのイソメリ化, さらに Heath 等⁵³⁾ は *Lactobacillus plantarum* の L-アラビノースイソメラーゼについて報告している。また D-グルクロン酸, D-ガラクトチュロン酸もイソメリ化をうけてからさらに代謝されることが示されている^{54,55)}。L-ラムノースの代謝においても Wilson, Ajl²⁸⁾ は大腸菌で L-ラムノースにイソメリ化され、次いでリン酸化をうけるもの

と推定し³¹⁾, Tecce²⁹⁾ は大腸菌で, Englesberg³⁰⁾ は *Pasteurella pestis* でやはり L-ラムノースのイソメリ化がおこることをそれぞれ独立に報告した。しかしこれらの報告はいずれも粗酵素液を用いた実験にとどまり、酵素化学的な記載は全くみられない。

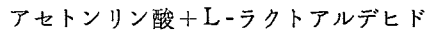
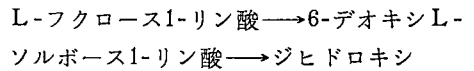
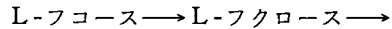
さて著者は本論文に述べる如く L-ラムノースを炭素源として生育した大腸菌より L-ラムノースイソメラーゼを分離精製し、L-ラムノースの代謝におけるイソメリ化反応の存在を酵素化学的に確認するとともに、さらにその性状について種々検討した。さきに Tecce 等は Co^{++} , Mn^{++} が L-ラムノースイソメラーゼを活性化し、 Ca^{++} , Cd^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} もまたそ

の活性を高めるが、EDTA 及び o-フェナンスロリンは逆に低下させることおよびシステインは活性を高めるが Co^{++} 又は Mn^{++} の共存においてはその効果のないこと等より、イソメラーゼが SH 基に Co^{++} の結合した金属酵素であろうと推定している⁵⁶⁾。しかしながら精製したイソメラーゼでは Mn^{++} による活性化はみられるが他の金属イオンはいずれも効果なく、むしろ阻害的に作用した。そして EDTA, PCMB により著しく阻害されるが Mn^{++} の存在するときはその阻害が低下することおよび PCMB の阻害は同時にシステインを添加することにより回復される事実を考え合わせるとき、むしろ本酵素は SH 基に Mn^{++} が結合した金属酵素であることが示唆された。なお現在迄に報告されている糖のイソメラーゼの反応平衡はいずれもアルドース側に著しくかたよっており^{22, 53)} L-ラムノースイソメラーゼでもラムノースがラムヌロースに約40%変化した状態で平衡になると報告されていたのに対し²⁸⁻³⁰⁾、精製したイソメラーゼでは平衡点はケトース側にかたより、平衡状態におけるアルドースとケトースの比は 2:3 でやや趣を異にしている。

つぎにリン酸化反応であるが、大腸菌から精製した L-ラムヌロキナーゼは L-ラムヌロースには直接作用するが、L-ラムノースに対しては L-ラムノースイソメラーゼをあらかじめ作用させておいたときのみ反応することが明らかになった。したがって大腸菌における L-ラムノースの代謝ではまずイソメリ化がおこり、つぎにリン酸化されることが確認された。また本酵素は SH 酵素であり、反応の結果生成される L-ラムヌロースリン酸は糖とリン酸の組成比が 1:1 であり、かつ酸によりすみやかに加水分解されることからその構造は L-ラムヌロース 1-リン酸と推定される。

最後はもっとも興味深い炭素鎖の開裂に働く酵素である。Huang, Miller²¹⁾ は筋アルドラーゼにより L-フクロース 1-リン酸は分解されないが、phosphoketopentose epimerase を同時に作用させると三炭糖リン酸が生成されるこ

とを認めた。そしてこれは Tung 等⁵⁷⁾ による基質特異性の研究から、筋アルドラーゼは 3, 4 位の水酸基が cis 配位のものよりも trans 配位のをよりすみやかに分解することが認められているので、trans 配位をなす 6-デオキシ L-ソルボース 1-リン酸が cis 配位である L-フクロース 1-リン酸よりもすみやかに筋アルドラーゼで分解をうけるためであろうと考え、L-フコースの代謝過程を次の如く推定した。

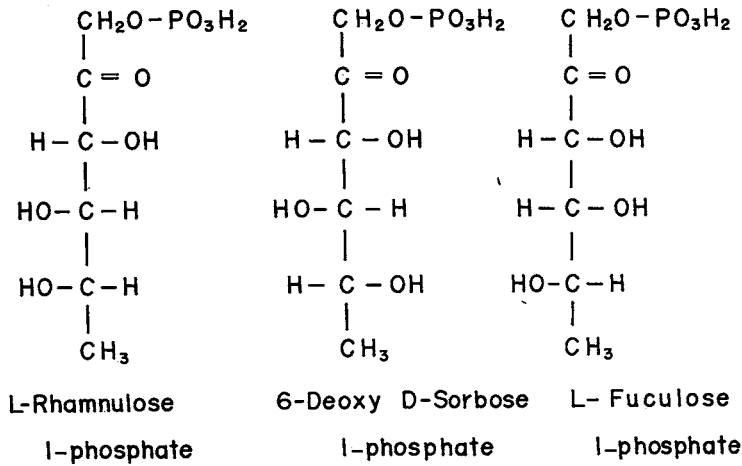


Kluyver, Schnellen は *Bacillus rhamnosifermentans* による醗酵産物の分析よりラムノースがグリセロアルデヒドとラクトアルデヒドとに分解することを示唆し、また Englesberg⁵⁸⁾ は *Pasteurella pestis* の菌懸濁液による分解実験よりラクトアルデヒドが生成されることを報告している。

著者は本論文に示す如く、L-ラムヌロース 1-リン酸が L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼによりジヒドロキシアセトンリン酸と L-ラクトアルデヒドに分解されることを明らかにし得た。ここに生じたジヒドロキシアセトンリン酸は Embden-Myerhof の径路を経て代謝され、また L-ラクトアルデヒドは 1,2-プロパンジオールに還元⁵⁹⁾された後リン酸エステルに変化しさらに代謝されるであらう⁶⁰⁾。この反応をさらに確認するため逆反応すなわちジヒドロキシアセトンリン酸及びラクトアルデヒドよりのメチルペントースの合成を試みた。さきに Huang 等²⁰⁾ は筋アルドラーゼを、Hough²³⁾ は pea のアルドラーゼを用い DL-ラクトアルデヒドより D-ラムヌロース 1-リン酸と 6-デオキシ L-ソルボース 1-リン酸が生成されることを報告している。いずれも 3, 4 位の水酸基は trans 配位であるから上述の如く筋アルドラーゼの基質となり得るのは当然である。それに対して L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼによる場合は、L-ラクトアルデヒドから

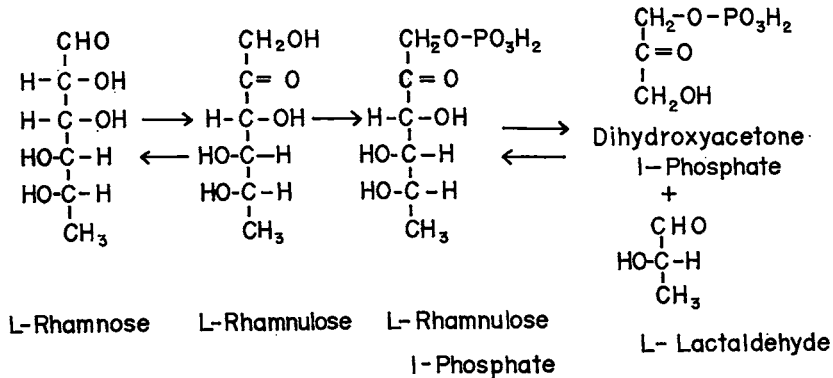
はL-ラムヌース, D-ラクトアルデヒドよりは多分6-デオキシD-ソルボースのリン酸エステルと考えられるものの生成を認めたが, 生じたラムヌースリン酸を酸性ホスファターゼで水解してからL-ラムノースイソメラーゼを使って立体配位をみたところ, 等量の基準L-ラムヌースと比較して半量しか反応しなかった。他の物質が同時に生成されているようである。しかしこのものはペーパークロマトグラフ

ィーではラムヌースから分離することが出来ないで, フクロースである可能性が強く目下検討中である⁶²⁾。ただ筋肉及び pea のアルドラーゼとL-ラムヌースリン酸アルドラーゼとではジヒドロキシアセトンリン酸とラクトアルデヒドとから合成されるものが異なり, その立体構造が対照的であることは酵素化学的に興味深い。



以上の事実から大腸菌におけるL-ラムヌースの代謝系は次の如く表わされ, かつイソメラーゼとアルドラーゼ反応の可逆性は, もしも脱

リン酸反応にホスファターゼが働けばこの系がL-ラムヌースの合成路ともなり得る可能性を示唆している。



結 論

L-ラムヌースを炭素源として生育した大腸菌 B株の無細胞抽出液より, L-ラムヌースイ

ソメラーゼ, L-ラムヌロキナーゼ, L-ラムヌロースリン酸アルドラーゼをそれぞれ部分精製

し、その性状を調べた。

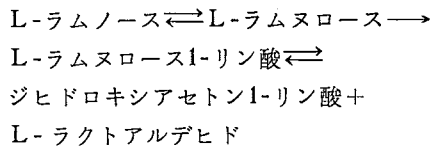
1) L-ラムノースイソメラーゼは約 50 倍に精製したが、本酵素は L-ラムノースに対し強い基質特異性をもち、反応の平衡状態ではアルドースとケトースの比は 2 : 3 であった。PCMB により阻害されるがシステインの添加によりこの阻害は回復し、また Mn^{++} により特異的に活性化される。

2) L-ラムヌロキナーゼは約 13 倍に精製された。イソメラーゼと同様 PCMB で強い阻害をうけるが、システインまたはグルタチオンを同時に添加するとこの阻害は完全に回復する。反応生成物は L-ラムヌロース 1-リン酸と考えられる。

3) L-ラムヌロースリン酸 アルドラーゼは約 15 倍に精製した。本酵素に対する PCMB の阻害は、イソメラーゼ、キナーゼにくらべて小さい。反応の結果ジヒドロキシアセトンリン酸

と L-ラクトアルデヒドを生ずるが、逆反応のときは L-および D-ラクトアルデヒドよりそれぞれ L-ラムヌロース、6-デオキシ D-ソルボースのリン酸エステルの生成することを認めた。ただし L-ラクトアルデヒドからの反応生成物中には、同時に L-ラムヌロース以外にこれと類似の構造をもつと思われる糖が少なくとももう一つ存在することが示唆された。

以上の知見にもとずき大腸菌は次の如き L-ラムノースの代謝経路をもつことを明らかにした。



御指導、御校閲をいただいた高木教授に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 木原芳次郎：多糖類化学（右左田，江上編，共立出版）285，1955。
- 2) Suthard, W. H. and Hayashi, J. A. : Bacteriol., 78, 79, 1959.
- 3) Salton, M. R. J. : Biochim. Biophys. Acta, 45, 364, 1960.
- 4) Ikawa, M. and Snell, E. E. : J. Biol. Chem., 235, 1376, 1960.
- 5) Nishimura, C. et al. : Japan. J. Microbiol., 2, 247, 1958.
- 6) Westphal, O. and Lüderitz, O. : Ang. Chem., 66, 407, 1954.
- 7) Naoi, M. et al. : Biochem. Z., 330, 421, 1958.
- 8) McCarty, M. : J. Exp. Med., 96, 569, 1952 ; 102, 11, 1955 ; 104, 629, 1956.
- 9) Davies, D. A. L. et al. : Nature, 181, 822, 1958.
- 10) Fukasawa, T. and Nikaido, H. : Virology, 11, 508, 1960.
- 11) 江上不二夫，山科郁男：多糖類化学（左

- 12) Bray, H. G. et al. : Biochem. J., 40, 124, 1946.
- 13) Kabat, H. G. et al. : J. Exp. Med., 88, 43, 1948.
- 14) Aminoff, D. et al. : Biochem. J., 46, 426, 1950.
- 15) Annison, E. F. and Morgan, W. T. J. : Biochem. J., 50, 460, 1952.
- 16) Kuha, R. et al. : Chem. Ber., 88, 1135, 1955 ; 89, 2514, 1956.
- 17) Kobata, A. : Biochem. Biophys. Research Comm., 7, 346, 1962.
- 18) Mac Lennan, A. P. et al. : Biochem. J., 80, 309, 1961.
- 19) Lüderitz, O. et al. : Biochem. Z., 330, 193, 1958.
- 20) Huang, P. C. and Miller, O. N. : J. Biol. Chem., 230, 805, 1958.
- 21) Huang, P. C. and Miller, O. N. : J. Biol. Chem., 231, 201, 1958.
- 22) Green, M. and Cohen, S. S. : J. Biol. Chem., 219, 557, 1956.

- 23) Hough, L. and Jones, J. K. N.: J. Chem. Soc., 4052, 1952.
- 24) Hauser, G. and Karnovsky, M.L.: J. Biol. Chem., 224, 91, 1957.
- 25) Hauser, G. and Karnovsky, M. L.: J. Biol. Chem., 233, 287, 1958.
- 26) Heath, E. C. and Rosemann, S.: J. Biol. Chem., 230, 511, 1958.
- 27) Kluver, A.J. and Schnellen, C.: Enzymologia, 4, 7, 1937.
- 28) Wilson, D. M. and Ajl, S.: J. Bacteriol., 73, 410, 1957.
- 29) Tecce, G. and Di Girolano, M.: Giorn. Microbiol., 1, 286, 1956. C.A., 51, 18116, 1957.
- 30) Englesberg, E.: Arch. Biochem. Biophys., 71, 179, 1957.
- 31) Wilson, D. M. and Ajl, S.: J. Bacteriol., 73, 415, 1957.
- 32) Barnett, J. and Reichstein, T.: Helv. Chim. Acta, 20, 1529, 1937.
- 33) Hirst, L. et al.: Nature, 163, 177, 1949.
- 34) Huff, E. and Rudney, H.: J. Biol. Chem., 234, 1060, 1959.
- 35) Huff, E.: Biochim. Biophys. Acta, 48, 506, 1961.
- 36) Lewis, K.F. and Weinhouse, S.: "Methods in Enzymology", ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Academic Press Inc., New York, 3, 275, 1957.
- 37) Keilin, D. and Hartree, E.F.: Ref. Proc. Roy. Soc., B 124, 397, 1938.
- 38) Willstätter, R. et al.: Ber. deut. Chem. Ges., 58, 2448, 1925.
- 39) Taylor, T.F. et al.: J. Biol. Chem., 173, 591, 1948.
- 40) Racker, E.: J. Biol. Chem., 196, 347, 1952.
- 41) Dische, Z. and Devi, A.: Biochim. Biophys. Acta, 39, 140, 1960.
- 42) Dische, Z. and Shettles, L. B.: J. Biol. Chem., 175, 595, 1948.
- 43) Dische, Z. and Borenfreund, E.: J. Biol. Chem., 192, 583, 1951.
- 44) Bucher, J.: Biochim. Biophys. Acta, 1, 292, 1947.
- 45) Warburg, O. and Christian, W.: Biochem. Z., 310, 384, 1941.
- 46) Allein, R.J. L.: Biochem. J., 34, 858, 1940.
- 47) Lineweaver, H. and Burk, D.: J. Am. Chem. Soc., 56, 658, 1934.
- 48) Smith, I.: "Chromatographic Techniques", William Heinemann Medical Books LTD., London, 164, 1958.
- 49) Dische, Z.: J. Biol. Chem., 204, 983, 1953.
- 50) Herbert, D. et al.: Biochem. J., 34, 1108, 1940.
- 51) Cohen, S. S.: J. Biol. Chem., 201, 71, 1953.
- 52) Lampen, J. O. and Mitsuhashi, S.: J. Biol. Chem., 204, 1011, 1953.
- 53) Heath, E. C. et al.: J. Biol. Chem., 231, 1031, 1958.
- 54) Takagi, Y. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 31, 264, 1959.
- 55) Ashwell, G. et al.: J. Biol. Chem., 235, 1559, 1960.
- 56) Tecce, G. and Di Girolano, M.: Boll. Soc. Biol. Sper., 32, 1195, 1956. C. A., 51, 9793, 1957.
- 57) Tung, T.C. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 14, 488, 1954.
- 58) Englesberg, E.: J. Bacteriol., 73, 8, 1957.
- 59) Gupta, N.K. and Robinson, W. G.: J. Biol. Chem., 235, 1609, 1960.
- 60) Rudney, H.: J. Biol. Chem., 210, 361, 1954.
- 61) Huggins, C. G. and Miller, O.N.: J. Biol. Chem., 221, 719, 1956.
- 62) Frontali, L. and Tecce, G.: Nature, 184, 1315, 1959.