反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸および蛋白質栄養と その反芻胃内棲息の栄養学的意義

小 野 寺 良 次

宮崎大学農学部農業化学科, 宮崎市 880

Amino Acids and Proteins Nutrition of Rumen Ciliate Protozoa and Their Nutritional Significance of Inhabitation in the Rumen

Ryoji ONODERA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Miyazaki University, Miyazaki-shi 880

は じ め に

反芻胃内繊毛虫類は、宿主動物にとって何なのか？この問題は、反芻胃内に初めて繊毛虫類が発見されたとき、すでにその発見者達 (GRUBY et DeLAFOND) によって意識されていた¹⁾。PASTEUR が植物性物質の発酵における細菌の役割を確証した後、ZUNTZ は反芻胃内微生物による繊維の嫌氣的発酵を証明したが²⁾、繊毛虫類の発見 (1843) — 反芻胃内微生物の最初の発見 — は、その 36 年も前の出来事であったのである。家畜の消化に関する研究を続けてきていた GRUBY et DeLAFOND は、その時点で、すでに、「反芻動物は草食動物である。しかし、反芻胃内繊毛虫類は植物性栄養素によって生育し、その結果、植物性栄養素が動物細胞物質に転化され、それらの動物細胞は、さらに、宿主によって消化されるのであるから、そういう意味では、反芻動物は肉食動物である。」と述べ、経験的に繊毛虫類の宿主動物に対する栄養学的意義について推論していた¹⁾。その後、乾草浸出液等による繊毛虫類の培養が試みられたが³⁻⁹⁾、今世紀初頭までの結果では、いずれも失敗に終わっていた。その間、当時の顕微鏡でも十分観察が可能であったことから、繊毛虫類の形態および分類に関する研究は着実に発展した (6, 10-18)。

繊毛虫類の反芻胃内棲息の意義を知るための、これま

での研究方法は二つに大別されよう。一つは、繊毛虫類の能力を間接的に検討しようとするもので、具体的には、無繊毛虫動物を人工的に作り出し、この動物の生理学および栄養学的諸機能を対照の含繊毛虫動物と比較する方法をとるものである。もう一つは、繊毛虫類を反芻胃内から単離し、そのらの固有の諸能力を直接的に検討することによって、反芻胃内での役割を推察しようとするものである。これら二つの方法による研究が本格化し始めたのは、いずれも、1930 年頃と考えられる。前者については、BECKER ら¹⁾が、反芻胃内に 2% 硫酸銅を注入することによって無繊毛虫山羊を作成し、飼料中諸成分の消化率等を含繊毛虫山羊と比較しているのがそれである。もっとも、無繊毛虫動物作成の動機は、彼らに限らず、当初、反芻胃内への繊毛虫類の定着と感染源および宿主特異性の検討を志向していたことにあったようである¹⁴⁾。BECKER ら¹⁾は、この実験に取り組むに当たり、それまでに提出されていた諸学者の繊毛虫観を次の 6 項目に整理し、それぞれに関して検討を加えている。(1) 反芻胃内繊毛虫類は、自身をなげうって、植物性物質をより易消化な動物性物質に転化している。(2) 彼らは有害な寄生虫である。(3) 彼らは単なる無害な共生動物 (Commensals) である。(4) 彼らは宿主に害をもたらす *Schizomycetes* (分裂菌類: 細菌) の増殖を抑制している。(5) 彼らはセルロースの消化を助けている。(6) 彼ら

は反芻胃内容物の混合や粉碎などに関与し、機械的役目を果たしている。しかし、BECKERらの結果は、上記各項目のうち(3)項を除くいずれをも否定し、結局、繊毛虫類は単なる無益無害な共生動物と考えざるを得ないと結論に達している。ただし、繊毛虫類が「餌泥棒」かどうかについては更に検討を要するとしていた。これを契機に、このような無繊毛虫動物作成による存在意義の検討は、その後多くの研究者によって続けられてきているが、得られた結果は可否両論である。今後、一層重視されるべき研究方向であろう。これらの研究経過と問題点については、阿部¹⁵⁾、板橋¹⁶⁾および筆者¹⁷⁾らのまとめを参照されたい。

このように、間接的に繊毛虫類の存在意義を検討する研究は、やがて *in vitro* でも行われるようになった。YODERら¹⁸⁾は、繊毛虫類および細菌の細胞懸濁液を使用して、セルロースの消化を検討した結果、繊毛虫類のみで約7%、細菌のみで約40%の消化率を示していただけに、繊毛虫類と細菌との混合系では、多い場合で67%の消化率を示すことを明らかにし、繊毛虫類が全体的に細菌の代謝活性を昂揚させることを示唆した。

後者、すなわち繊毛虫類の諸能力を直接的に検討した本格的な研究は、MARGOLIN¹⁹⁾以降に始まったと考えられる。繊毛虫類の培養については、KNOTH²⁰⁾がCO₂およびメタンを使用して嫌気的条件を調製し、pH 6.8とすることによって、107時間の培養に成功しているけれども、繊毛虫類固有の代謝能力(特にセルロースの分解能)の検討を志向し、セルロースを含む培地で14日間の培養に成功している点では、MARGOLIN¹⁹⁾以降と考えてよいようである。WESTPHAL²¹⁾は、MARGOLINの研究を参考にして、セルロースの消化を検討し、繊毛虫類はセルロースを分解しないと述べている。その後、HUNGATE²²⁾は浸透圧、pHおよび嫌気的条件を考慮して塩類溶液を調製し、*Eudiplodinium neglectum*(反芻胃内繊毛虫類の一種)によるセルロースの分解を記載した。この種の研究における研究者の最大の悩みは、繊毛虫類の培養時に細菌の混入が不可避であった点である。それだけに、反芻胃内繊毛虫類の純粋培養の確立が強く望まれてきたが、残念ながら今日なお、未確立のままである。最近、日野ら²³⁾は、化学的成分既知培地での繊毛虫類の増殖系培養を可能にしているので、純粋培養の確立もそう遠いことではないであろう。とにかく、HUNGATE²²⁾による塩類溶液調製後は、繊毛虫類をよく洗浄後、その細胞懸濁液によって、また、抗生物質の量産後は、それらを添加して混入細菌の影響を抑制することによって、繊毛虫類の諸性質が多くの研究者によって検討

されてきた。それらの結果は、繊毛虫類を増殖系で把握したものではないが、それでも、反芻胃内における繊毛虫類の活動の推察を可能にする多くの資料を提供してきた。それらは、すでに多くの総説にまとめられている^{2,24-28)}。

直接的に繊毛虫類の性質を検討した研究としては、上記のような機能的側面だけに限らず、繊毛虫類を宿主の栄養源と見る立場から、それらの栄養価やアミノ酸組成を検討したものがある。白ネズミによる反芻胃内微生物の栄養価判定試験によれば、生物価は菌体蛋白質と虫体蛋白質との間に差が認められないが、消化率は前者よりも後者が高いので、正味蛋白利用率(NPU)は繊毛虫類の方が高いことが指摘されている^{30,31)}。また、反芻胃内繊毛虫類の体蛋白質構成アミノ酸としては、細菌のそれに比して、リジン含量の-highいことが特徴である³²⁻³⁴⁾。

HORIGUCHI and KANDATSU^{35,36)}は、上記虫体蛋白質のアミノ酸組成を検討中に、自然界から始めて、C-P結合をもつ第三のアミノ酸といわれる2-アミノエチルホスホン酸(シリアチン)を検出した。この物質を白ネズミに高濃度に投与しても、毒性は認められず、体内に吸収されて³⁷⁾、C-P結合をもつ新しい型の磷脂質(Sphingophosphonolipids)が合成されることが示された³⁸⁾。今後、さらに、シリアチンの生理、生化学的作用の解明が期待される。

本稿は、反芻胃内繊毛虫類に関するこれまでの知見を全面的に総説するものではなく、筆者らの研究経過を中心に記述し、繊毛虫類棲息の意義に言及することを主眼としている。筆者らは、1963年以降、反芻胃内繊毛虫類固有の機能的側面、特に、アミノ酸および蛋白質代謝を検討するために、いわば“直接的方法”の立場から研究に着手した。その当時、すでに反芻胃内微生物の諸機能の把握のためには、微生物生態論³⁹⁻⁴³⁾的思考方法の必要性、特に、「微生物間の栄養源の競争競合および相互利用を中心とした方法の導入²⁵⁾」が強調されていた。これらの概念を基底にして、筆者らの研究が進められたことを付言したい。

I. アミノ酸栄養

反芻胃内の遊離アミノ酸濃度は、飼料給与後の時間によって異なるが、通常、100~150 μgN/ml程度存在する^{44,45)}。これらは、飼料中の遊離アミノ酸および微生物による飼料蛋白質の分解産物に由来するものと考えられる。筆者らは、まず、繊毛虫類の栄養源としてのこれらの遊離アミノ酸の重要度を知ることをはじめの目的とした。反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸栄養に関する研究は、WILLIAMSら⁴⁶⁾に始まった。彼らは、塩類溶液中で*Ophr-*

yoscolex caudatus を培養後, DL-Val-4- ^{14}C , DL-Ala-2- ^{14}C および DL-Leu-2- ^{14}C が虫体内に濃縮されることを認めた。*Epidinium ecaudatum* についても同様の結果が得られている⁴⁷⁾。高橋・粕川⁴⁸⁾も Berkefeld 濾過反芻胃内液によって、*Entodinium* を主体とする混合繊毛虫類を培養後, Gly-2- ^{14}C の虫体蛋白質への取り込みを確認した。同時に、彼らは各種アミノ酸を個々に添加して、繊毛虫類による各アミノ酸の消費量をバンスライク法で検討した結果、Pro および Met を除く各種アミノ酸が消費されて、アンモニアが生成されることを示した⁴⁸⁾。これに対して、ABOU AKKADA and HOWARD⁴⁹⁾ は、カゼイン加水分解物を加えた緩衝液中で *Entodinium* を培養しても、虫体内に組み込まれるアミノ酸量は無視出来る程度であり、無基質で培養した場合は、6 時間後に、虫体 N が約 6% 減少して、非蛋白態 N (NPN) となり、その 50~70% がアンモニア、20% は α -アミノ態 N であることを示した。この結果と高橋・粕川⁴⁸⁾の結果を統一的に説明することは困難であることから、筆者らはまず、繊毛虫類によるアミノ酸の消費をバンスライク検圧法によって追試した。繊毛虫類の培地としては、「対象のもつ自然的な性格を可能な限り生かす⁴²⁾」ために、ザイツ濾過反芻胃内液を使用し、これに 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のディヒドロストレプトマイシンサルフェートおよび 10 $\mu\text{mole}/\text{ml}$ の Glu, Met および Lys を個々に添加して、GUTIERREZ⁵⁰⁾の緩衝液で 5 回洗浄した混合繊毛虫類を 24 時間培養した。その結果、いずれのアミノ酸を添加した場合でも、培地中の α -アミノ態 N は、培養前よりも培養後に高くなり、この方法では、アミノ酸消費量の検討は不可能であることが分かった⁵¹⁾。なお、この結果は ABOU AKKADA and HOWARD⁴⁹⁾の結果と一致するものであった。高橋・粕川⁴⁸⁾は、抗生物質を使用しないで 20 時間の培養を行っているので、繊毛虫類と共に混入した細菌の増殖によって、結果に相違が生じたものと推察された。反芻胃内細菌によるアミノ酸の分解については多くの報告がある⁵²⁻⁵⁸⁾。筆者らの結果⁵¹⁾からは、繊毛虫類が、培養中、培地中に α -アミノ態 N を増加させるものと考えられたので、被検アミノ酸を添加しない対照培養を並行し、対照培養および被検アミノ酸添加培養各区のそれぞれの培養前後のアミノ態 N の差の、更に、各区間の差を求めて、被検アミノ酸の消費量とすることにした。その結果、見かけ上 Glu, Try, Lys, His などよく消費されたが、Asp, Val, Ala, Arg, Phe などまったく消費されなかった⁵¹⁾。また、繊毛虫類・細菌の共存培養時のアミノ酸消費量は、各微生物の単独培養時のそれよりも見かけ上小さい値となった。この原因は、被検アミノ酸

消費量の低下によるものではなく、繊毛虫類による細菌の捕食分解産物としてのアミノ態 N の増加によるものと推察された⁵¹⁾。次に、 ^{14}C 標識アミノ酸を使用して培地中に添加したアミノ酸の真の動きを検討した。繊毛虫類による ^{14}C -アミノ酸の取り込みについては既述の通り、2, 3 の研究者⁴⁸⁻⁴⁹⁾によって検討されてきたが、これらは、アミノ酸取り込みの確認を主目的とし、繊毛虫類の N 栄養源としてのアミノ酸の重要度には言及していない。筆者らは、繊毛虫類と細菌とのアミノ酸取り込み量の比較および繊毛虫類と細菌との共存時のアミノ酸の動きに注目しながら検討し、次のような結果を得た。(1) バンスライク検圧法の結果⁵¹⁾では見かけ上消費されなかった各アミノ酸も虫体内に取り込まれ、量的には、虫体蛋白質成分中に少ない Met が多く取り込まれ、逆に、蛋白質成分中に多い Glu, Lys および Asp は取り込み量が少なかった。(2) 繊毛虫類・細菌共存培養時に菌体内に取り込まれた ^{14}C -アミノ酸の放射能は、単独培養時に虫体内に取り込まれたその 2~10 倍であり、培地中の ^{14}C -アミノ酸の放射能は、3 時間培養後、前者で、始めの 24.2~83.9% も減少したのに対して、後者では、0~2.8% しか減少しなかった。しかも、虫体内に取り込まれた放射能は、単独培養時よりも共存培養時の方が常に高い値を示した⁵⁹⁾。したがって、虫体内にもアミノ酸は取り込まれるけれども、その量は、細菌による取り込み量よりもかなり少ないこと、およびアミノ酸を取り込んだ菌体は続いて繊毛虫類に捕食されると推察され、その場合の方が虫体内に移行するアミノ酸量が多いことが分かった。 ^{14}C -アミノ酸で標識した細菌を添加して繊毛虫類を培養すると、放射能は虫体内に移行し、3 時間目に最大となった。このとき虫体内に取り込まれた菌体 N 量は、アミノ酸のうち最もよく取り込まれた Met の N 量の約 20 倍であった⁵⁹⁾。以上の結果から、繊毛虫類の主要な N 栄養源は、遊離のアミノ酸よりも細菌などの粒状物質であろうこと、および、アミノ酸の虫体内への主要な移行経路として「アミノ酸→細菌→繊毛虫」という食物連鎖が存在することが推察された^{59,60)}。同じ頃 COLEMAN⁶¹⁾も、 ^{14}C -Glu で標識した *E. coli* を添加した培地で *Entodinium caudatum* を培養し、48 時間後に、添加菌体の 97% が代謝され、始めの放射能の 28% が虫体内に保持された事実から、*E. caudatum* にとって遊離アミノ酸よりも菌体の捕食によって得られるアミノ酸の方が有効であろうと推察した。

II. 食物摂取様式

古くから、反芻胃内繊毛虫類の体内に植物片の摂取が

認められ^{6,7,13,62,63}、また、絨毛虫類同志の共喰い現象 (Cannibalism) も知られており^{64,65}、絨毛虫類による粒状物質の捕食についてはよく観察されていた。一方、*Isotrichidae* 科に属する3種の絨毛虫類は、グルコース、フラクトースおよび蔗糖を摂取して、自己の貯蔵多糖を形成することが認められ⁶⁶、溶液状物質も摂取されることが明らかになった。その後、*Ophryoscolecidae* 科の一属である *Entodinium* は好んで澱粉粒を摂取し、揮発性脂肪酸 (VFAs)、CO₂、H₂ および微量の乳酸を産生するにもかかわらず、溶液状の澱粉および可溶性糖類を代謝しないことが示され⁶⁷、また、同科に属する *Ophryoscolex* の栄養源としても粒状物質が必須であることが認められ⁶⁸、絨毛虫類の種類によって、主要栄養物質の摂取様式が異なることが示唆された。

筆者らは、先に、¹⁴C-アミノ酸で標識した反芻胃内細菌を培地に添加して絨毛虫類を培養した場合、虫体内に高い放射能が検出されたことから、絨毛虫類による細菌の捕食を推察したが、ここでは、フクシンで染色した細菌を培地に添加して、菌体の虫体内への移行の様相を実際に観察した⁶⁹。その結果、反芻胃内細菌は筆者らの実験条件下でも、あらゆる種類の絨毛虫によって捕食されることが分かった。絨毛虫類は、始め、絨毛を使って口腔内に多数の細菌を集め、一定量に達すると食胞を形成して体内に送り込んだ。その間約15秒であった。続いて、その他の粒状物質の捕食についても検討し、染色酵母も同様あらゆる種類の絨毛虫類によって捕食されることを認めた⁶⁹。*Isotricha* 属によるクロレラの取り込みは、葉緑素の変色により、確認が困難であった⁶⁹。*Entodiniinae* および *Diplodiniinae* 各亜科⁷⁰に属する絨毛虫類は、染色セルロース粉末および炭素粉末を取り込んだ⁶⁹。炭素粉末の摂取は、これらの絨毛虫類が、摂取に当たって、粒子の栄養性を厳密には区別していないことを示唆している。MULLERら⁷¹は、*Paramecium* および *Tetrahymena* による Polystyrene latex particle の取り込みについて報告している。GUTIERREZ⁷² および GUTIERREZ and DAVIS⁷³は、*Isotricha*、*Entodinium* および *Diplodinium* が、特定の細菌を選択的に取り込むと述べているが、彼らの実験は、細菌取り込み後の虫体を破壊し、その中に含まれる生菌種を検討したものであり、取り込まれた細菌種というよりは、虫体内でなお生存していた細菌種と考えるべきものであろう。COLEMAN⁶¹は、虫体内で易消化な細菌と難消化な細菌とがあることを報告している。MINATOら⁷⁴は、反芻胃内細菌の局在性について、例えば、*Bacteroides amylophilus* などは、澱粉粒に対する付着性が強く、その表面に密集することを

報告しているが、そのような場合には、虫体による澱粉粒摂取に伴い、虫体内に *B. amylophilus* などが特に多く摂取されることはありうることであろう。

続いて、筆者らは、溶液状物質の摂取に関して若干の知見を得た。カゼインをザイツ戸過反芻胃内液に添加すると、コロイド状に溶解する。このような溶液状のカゼインは、*Isotrichidae* 科の絨毛虫類によって速やかに分解されたが、*Ophryoscolecidae* 科の絨毛虫類によっては全く分解されなかった⁷⁵。CHALMERら⁷⁶の方法に従って、カゼインを難溶性とし、粒状にして与えると、*Ophryoscolecidae* は、速やかにこれを分解した⁷⁵。したがって、*Ophryoscolecidae* は、可溶性糖類の場合^{67,77}と同様に、溶液状蛋白質をも分解せず、溶液状物質を経口的には摂取し得ないものと考えられた。また、これらの絨毛虫類は、経口的に粒状物質を摂取する際でも、同時にその培地に溶存している物質を、通常、経口的には摂取し得ないと考えられた⁷⁸。しかし、COLEMAN⁷⁹によれば、荷電粒子などの場合、溶存物質がそれに吸着される性質があれば、同時に溶存物質も摂取される。このように、*Ophryoscolecidae* は、経口的には粒状物質のみを摂取するので、いわゆる「粒食性⁶⁹」が彼らの主要な栄養物質の摂取様式であると考えられた。摂取される粒子は必ずしも固形物に限らず、たとえば、オリーブ油の微滴も *Entodinium caudatum* によって取り込まれ⁸⁰、また、その他の絨毛虫類についても取り込みが確認されている⁸¹。

他方、前項で述べたように、¹⁴C 標識アミノ酸は、溶液状であるにもかかわらず、*Ophryoscolecidae* 体内に取り込まれ、また、*E. caudatum* では、¹²C-グルコースからのガス生成量がグルコースを添加しない対照区のそれと変わらないにもかかわらず、¹⁴C-グルコースの取り込みが確認されているので⁸²、*Ophryoscolecidae* による溶液状物質の摂取が皆無でないことは明らかである。この点について、COLEMAN⁸²は、低分子の溶液状物質が細胞膜から摂取されることを指摘し、その場合、外質膜の透過性は大きくても、外質膜と内質膜の間にある障壁が低分子物質の内質膜への透過を妨げるために代謝をうけにくくしているのではないかと推察している。外質中では代謝されにくい⁸²にもかかわらず、筆者らの実験によれば、アミノ酸はある程度、*Ophryoscolecidae* によって代謝されるので⁸³、低分子物質でもその理化学的性質によって、内質膜付近の障壁の透過性が異なるものと推察される⁷⁹。溶液状でも、既述のように、蛋白質のような高分子物質の膜透過による摂取は考えにくい、どの程度の分子量の物質までが透過されるかは不明である。

III. 蛋白質代謝

反芻胃内絨毛虫類による蛋白質の代謝に関しては、すでに研究が進み^{46,49,84)}、動物性および植物性の各蛋白質は、*E. caudatum* および混合絨毛虫類によって分解され、ペプチド、アミノ酸およびアンモニアを生成することが認められ^{49,84)}、更に、*E. caudatum* のプロティナーゼおよびペプチダーゼがある程度精製された⁴⁹⁾。

筆者らは、前述のように、*Ophryoscolecidae* が溶液状のカゼインを分解せず、加熱変性させた粒状カゼインのみを分解するのに対して、*Isotricha* は、溶液状のカゼインをも分解することを明らかにした⁷⁵⁾。その場合、5時間培養後の分解産物は、*Ophryoscolecidae* および *Isotrichidae* で、アンモニア態Nが、NPNの、それぞれ、12.8および15.6%、アミノ態Nが、28.7および17.3%、ペプチド態Nが、52.5および43.6%であって、いずれの場合もペプチドの占める割合が極めて大きいことから、虫体内における蛋白質の消化が不完全であることを推察した⁷⁵⁾。その後、絨毛虫類は、培地中に添加したポリペプトン（カゼインのパンクレアチン消化物）を分解して、アミノ酸およびアンモニアを生成することを明らかにすると共に、カゼインの分解によって生成したペプチドは、培養3時間目に、*Ophryoscolecidae* および *Isotrichidae* で、それぞれ、35.7および46.9%であったものが、更に培養を続けることによって（15時間目）、それぞれ、10および5%に減少し、その時、主にアミノ酸の占める割合が、それぞれ、47.1および57.7%と大きくなることを明らかにした⁸⁵⁾。このように、*Ophryoscolecidae* のみの場合でも、*Isotrichidae* を含む場合とほぼ同様の結果が得られていることから、これらの虫体が膜透過によってペプチドを体内に取り込み、体内でそれを分解したのか、それとも、体外にペプチダーゼを分泌して分解したのか、食物摂取様式を知る立場からも問題となるところである。この点に関しては、絨毛虫類懸濁液、そのホモジネートおよび絨毛虫類懸濁液培養後（5時間）の上澄液の各々によってポリペプトンから生成されたアンモニア態Nに対するアミノ態Nの比が、前者（3.9～5.1）に比較して、後者（上澄液）（12.8～26.0）で著しく高い事実から、絨毛虫類はペプチダーゼを体外に分泌している可能性があるとして推定した⁸⁵⁾。しかし、膜透過によるポリペプトン摂取の可能性は必ずしも否定されていない。

続いて、このように、カゼインの分解によって生成した培養液のアミノ酸パターン（MAA）を、絨毛虫類の内因性アミノ酸パターン（EnAA、次項で詳述）およびカゼ

インの構成アミノ酸パターン（CAA）と比較した結果、MAAではLeuが最も多く、続いてGluが多かったが、Leuは、CAA中では3番目に多いものであり、また、EnAA中では10番目に多いアミノ酸であって、EnAA中に最も多いAlaはMAA中では6番目に多いアミノ酸であった。全体的に見ると、MAAは、EnAAおよびCAAの影響をうけながらも、それらとは異なったパターンを示したので、カゼインの分解によって生じたアミノ酸は、虫体内の代謝にそれぞれ特有な様式によって関与しているものと推察された⁸⁶⁾。すでに、反芻胃内絨毛虫類の蛋白質の合成についても、放射性同位元素で標識したアミノ酸の使用により検討され始めており^{87,88)}、分解の問題と合わせて、いずれ、絨毛虫類の蛋白質の代謝様式が解明されるであろう。

IV. アミノ酸代謝

COLEMAN⁸⁹⁾は、*E. caudatum* が¹⁴C-グリシンを他の物質に転化することなく、そのままの形で自己の体蛋白質中に組み込むと共に、虫体細胞“プール”中では、N-アセチルグリシンの形で保持していることを示した。その他の11種類のアミノ酸についても、同様に、虫体蛋白質中にはそのままの形で組み込まれ、培養液および細胞“プール”中ではVFAsおよびN-アセチルまたはN-ホルミル誘導体に転化して存在していることが示された⁷⁹⁾。*Isotricha* spp.⁹⁰⁾ および *E. simplex*⁹¹⁾ についても類似の検討が行われている。HARMAYER⁹²⁾は、アミノ酸混合物を添加して *Isotricha* spp. を培養し、ArgおよびCys以外のアミノ酸があまり分解されないと述べている。

筆者らは、具体的なアミノ酸代謝の検討に入る前に、当初の実験で⁵¹⁾、絨毛虫類培養後の培地中のアミノ態Nが培養前のそれよりも常に高くなることをまず問題にし、それらのアミノ酸パターンの検討を行った。当初使用していたザイツワル反芻胃内液中にはアミノ酸が含まれているので、ここでは、人工緩衝液を使用することにした。それまで、多くの研究者によって試作された緩衝液^{22,50,84,93-99)}は、大同小異であって、最大の問題は緩衝能が弱いために培養中にpHを再調整せねばならないことであった。筆者らは、神立・高橋の緩衝液⁹⁴⁾を基にして、緩衝能の強い緩衝液（B-9）を調製し、これが絨毛虫類の培養により適していることを確認した¹⁰⁰⁾。B-9緩衝液によって絨毛虫類を培養すると、当初の実験と同様に、培地中にアミノ態Nが増加した¹⁰¹⁾。これらのアミノ酸は、絨毛虫類の死滅に伴う虫体内遊離アミノ酸の溶出や自己消化によるものでなく、内因性の代謝産物であることが示された¹⁰¹⁾。B-9緩衝液中で混合絨毛虫類を12

時間培養すると、虫体N成分が約22%減少し、培地中にNPNが増加した。そのうち、アンモニア態Nおよびアミノ態Nは、それぞれ、44.8および43.8%を占め、両者はほぼ同値であった¹⁰¹⁾。次に、これらの内因性アミノ酸パターンを検討した結果、Alaが最も多く、次いでGlu, Proの順に多かった。そして、これら3種のアミノ酸だけで、内因性アミノ酸全体の約65%を占めているのが特徴であった。また、もう一つの特徴は、ArgおよびCysがほとんど検出されなかったことである¹⁰¹⁾。その後の検討によれば、内因性アミノ酸パターンは、糖質添加によってAlaが増加するなど培養条件または虫体の状態によって¹⁰²⁾、また、*Entodinium* および *Dasytricha* など小型虫体の多い場合にGluが多くなり、*Epidinium*, *Ophryoscolex* および *Isotricha* など大型虫体の多い場合にAlaが多くなるなど、繊毛虫類の種類によっても¹⁰³⁾、それぞれ異なることが示された。HARMEYER¹⁰⁴⁾は、*Isotricha* について同様の検討をし、24時間の培養で、虫体N成分の25%が減少し、培地中N成分の30%がアミノ酸で、とくに、Ala, Glu, Asp, Proが多く、その他に、シトルリンおよびオルニチンが検出されたと述べている。筆者らも、上記内因性アミノ酸の薄紙クロマトグラム中に蛋白質構成アミノ酸以外に6種類のニンヒドリン陽性未同定スポット(US-1~US-6)を検出した¹⁰¹⁾。

次に、これらの未同定スポットのうち、始めに、US-1をイオン交換カラムクロマトグラフィーによって単離し、水・エタノール・エーテル系で針状結晶を得、その元素分析、質量分析、赤外線吸収スペクトル、融点および比旋光度測定および薄紙クロマトグラフィーによって、これがL-(+)-ピベコリン酸であることを決定した¹⁰⁵⁾。ピベコリン酸は、ZACHARIUSら¹⁰⁶⁾によって、植物の種子から検出され、その後の研究では、これが白ネズミのリジン代謝における中間代謝産物であることが示されたが¹⁰⁷⁾、やがて、白ネズミでは、D-リジンの代謝産物であることが明確にされた¹⁰⁸⁾。微生物関係では、*Euglena gracilis* によるピベコリン酸からのリジン合成¹⁰⁹⁾ および *Pseudomonas putida* によるリジンの代謝産物¹¹⁰⁾ の証明がある。反芻胃内微生物関係では、反芻胃内から単離した *E. coli* がリジンを分解して等モルの醋酸および酪酸を生成することを明らかにしたもの¹¹¹⁾、および、反芻胃内混合細菌がリジンからβ-アミノ吉草酸およびカダペリンを生成することを示したもの¹¹²⁾のみで、いずれも細菌に関するものであった。筆者らは、ピベコリン酸の定量法を確立するとともに¹¹³⁾、まず、反芻胃内繊毛虫類が何からピベコリン酸を生成するかを検討した⁸⁹⁾。その結果、B-9緩衝液中で繊毛虫類を24時間培養する

と、培地上清中に蓄積したピベコリン酸のモル濃度は、虫体蛋白質中リジンの減少モル濃度とほぼ一致し、また、培地中にリジンを添加した場合のみ、アミノ酸を添加しない対照区よりもピベコリン酸生成量が多くなることが分かった⁸⁹⁾。繊毛虫類の場合も、ピベコリン酸はリジンから生成されるものと推定された。続いて、L-リジン-U-¹⁴Cを培地に添加して繊毛虫類を6時間培養した結果、明らかに培地上清中に放射性のピベコリン酸が検出され、比放射能から算出したその量は、*Isotrichidae* を含む混合虫体および *Ophryoscolecidae* のみの場合でそれぞれ、0.053および0.062 μmole/mlであった。このとき虫体内には、それぞれ、0.056および0.048 μmole/mlのリジンが他の物質に転化されることなく取り込まれていた⁸⁹⁾。放射性のピベコリン酸を添加して繊毛虫類を培養しても、ピベコリン酸はまったく変化をうけなかったため、この物質は反芻胃内繊毛虫類のリジン代謝における終末産物であると考えられた⁸⁹⁾。さらに、リジンからピベコリン酸が生成する場合の機序を知るためにL-リジン-2,6-¹⁵Nを添加して繊毛虫類を培養した結果、¹⁵Nの多くは、ピベコリン酸とアンモニア画分に検出され、アミノ基転移反応に関与するアミノ酸中には極微量検出されただけだったので、ピベコリン酸は、リジンのε-アミノ基の転移反応によってではなく、α-アミノ基の酸化的脱アミノ反応によって生成するものと推定された⁸⁹⁾。

続いて、筆者らは、反芻胃内繊毛虫類のリジン合成能の検討を行った。先にも述べたように、繊毛虫体蛋白質は、細菌体蛋白質に比して、リジン含量の高いことが特徴の一つであるが³²⁻³⁴⁾、繊毛虫類のリジン合成能については、一般的に否定的であった。それは、VOGELらが比較生化学的観点から一連の実験を行い、「動物細胞はリジンを合成しない。」¹¹⁴⁾と提唱し、これがある程度定説化していたからであった。しかし、その後、GUTTMAN¹¹⁵⁾は、16種類のトリパノゾーマ科の鞭毛虫類のうち9種類が、リジンの代りにα,ε-ジアミノピメリン酸(DAP)を含む培地でも生育することを示し、これらの鞭毛虫類がDAPからリジンを合成しうることを示唆した。しかし、彼らは、DAPからのリジン合成能を、直接証明してはいなかった。一方、HARMEYER und HEKIMOGLU¹¹⁶⁾は、4種類の反芻胃内繊毛虫類を醋酸-2-¹⁴Cと共に培養後、虫体蛋白質中の他のアミノ酸と同様に、リジンにも微量の放射能を検出した。筆者らは、まず、DAP-1, 7-¹⁴Cを培地に添加して混合繊毛虫類を12時間培養した結果、2, 117 μmole/mlのリジンが生成され、そのうち約9%がさらにピベコリン酸に転化されていることが明らかになった¹¹⁷⁾。生成されたリジンからはピベコリン酸のみが次

の代謝産物として検出され、その他の画分には放射能が検出されなかったので、DAP からのリジンの生成は、細菌によってではなく、繊毛虫類自体によって行われたと考えられた¹¹⁷⁾。なお、このとき虫体内には、0.050 $\mu\text{mole/ml}$ のリジンが組み込まれていた¹¹⁷⁾。また、*Entodinium* と *Diplodinium* との間にはリジン合成能に差が認められなかった¹¹⁸⁾。次に、細菌、藻類および高等植物などのリジン合成 (DAP 経路) の出発物質である L-Asp-U-¹⁴C および醋酸ナトリウム-U-¹⁴C からのリジン合成量を繊毛虫類で検討してみると、いずれからも無視出来る程度のリジンしか検出されなかったので、反芻胃内繊毛虫類は、すでに、DAP 合成能を失っているものと推定された¹¹⁸⁾。最後に、真菌類のリジン合成 (α -アミノアジピン酸 (AAA) 経路) の前駆物質である DL-AAA-6-¹⁴C を添加して繊毛虫類を培養した結果、この物質からはまったくリジンが合成されなかった¹¹⁸⁾。以上の結果から、反芻胃内繊毛虫類は、DAP からのリジン生成能を保持しているが、DAP の合成能はすでに失っていると考えられた。

US-2 は、 δ -アミノ吉草酸であることが示され¹¹⁹⁾、これは繊毛虫類による Pro 代謝の終末産物であると推定されると共に、「Arg $\rightarrow$ オルニチン $\rightarrow$ Pro $\rightarrow$ δ -アミノ吉草酸」という一連の代謝経路が明らかにされた¹²⁰⁾。また、US-3 は α -アミノ-n-酪酸であることが分かっている¹²¹⁾。

V. 繊毛虫類棲息の意義

既述のように、繊毛虫類の体蛋白質構成アミノ酸は、細菌のそれに比してリジン含量の高いことが特徴である³²⁻³⁴⁾。高等動物の栄養上、リジンはその合成経路の複雑さに起因して、必須アミノ酸の中でも特に必須性の高いアミノ酸であることが知られている。また、白ネズミによる繊毛虫体の正味蛋白利用率は、細菌体のそれよりも高いことが指摘されている^{30,31)}。N 栄養の面からは、主に以上の結果にもとづいて繊毛虫類の反芻胃内棲息の意義が推察されてきた。

筆者らは、前項既述のように、反芻胃内繊毛虫類の DAP からのリジン生成能を明らかにすると同時に、繊毛虫類が DAP 合成能をすでに失っていることを示した¹¹⁸⁾。したがって、繊毛虫類は、反芻胃内において、何から DAP の供給を受けているに違いないと考えられた。Work and Dewey¹²²⁾は、生物界における DAP の分布を検討し、118 種の細菌のうちグラム陽性球菌、*Streptomyces* spp. および *Actinomyces* spp. 以外の細菌および藍藻類に DAP を検出したが、他の藻類、真菌類、植物ウイルスおよび原生動物には検出できなかったと述べて

いる。その後、DAP は、グラム陽性および陰性細菌に広く分布し、それらの細菌細胞壁のペプチドグリカン中のテトラペプチド鎖 (L-Ala-D-Glu-L-Lys (or meso-DAP) -D-Ala) の中に組み込まれていることが示された¹²³⁾。通常、テトラペプチド鎖中の二塩基性アミノ酸は、L-リジンまたは meso-DAP であるが、まれに、オルニチン、2,6-ジアミノ-3-ヒドロキシピメリン酸または 2,4-ジアミノ酪酸が含まれることがある¹²⁴⁾。Weller ら¹²⁵⁾は、反芻胃内混合細菌の DAP 含有量が、菌体総 N に対する DPA-N の百分率で示すと、0.57~0.64% であることを明らかにした。しかし、これまでの知見によれば、細菌細胞壁中のペプチドグリカンは、トリプシン¹²⁶⁾、ペプシンまたはキモトリプシン¹²⁷⁾によっては消化されず、また、正常な羊の反芻胃内で生育した細菌のペプチドグリカンは、その小腸内ではまったく消化されないことが示され、さらに、羊の体内に注入された DAP それ自体も代謝されることなく尿中に排泄されることが示された¹²⁸⁾。Allison¹²⁹⁾は、細菌細胞壁の消化が困難であることから、その中に含まれる非アミノ態およびアミノ態 N は恐らく宿主動物にとって栄養価値をもたないだろうと述べている。しかし、繊毛虫類による細菌の捕食はよく知られた事実である^{61,69,72,73,130-133)}。

筆者らは、優勢ではないけれども *E. coli* が反芻胃内に棲息しており¹³⁴⁾、しかも、その細胞壁中に DAP を含有していることが知られているので¹³⁵⁾、これを山羊の反芻胃内から単離し、10 μCi の DAP-1, 7-¹⁴C および 5 $\mu\text{mole/ml}$ の L-リジンを添加して純粋培養を行い、放射性の DAP を含む *E. coli* の細胞壁を得た¹³⁶⁾。この細胞壁中に含まれる放射能の 95.0% は DAP であり、2.1% がリジンであった。得られた *E. coli* 細胞壁を添加して繊毛虫類を 6 時間培養後、培養液を加水分解して、その薄紙クロマトグラムのオートラジオグラムを検討した結果、多量のリジンの生成が認められ、その他に、明確なピペコリン酸のスポットが検出された。この時、添加した細胞壁中 DAP の放射能の 22.0% が、リジン (虫体内リジンを含む) およびピペコリン酸に転化していた。また、リジンの代謝産物としては、ピペコリン酸しか検出されなかったので、この場合のリジンの合成は明らかに繊毛虫類によって行われたと考えられた¹³⁶⁾。続いて、反芻胃内混合細菌およびその細胞壁を加熱処理後、これらをそれぞれ添加して繊毛虫類を 6 時間培養した結果、前者からは少なくとも 0.351 $\mu\text{mole/ml}$ の、また後者からは少なくとも 0.641 $\mu\text{mole/ml}$ のリジンがそれぞれ生成されたと考えられた¹³⁶⁾。以上の結果から、繊毛虫類は、DAP を反芻胃内細菌細胞壁に求めて、自らリジンを生成

しているものと考えられた。また、細菌細胞壁のペプチドグリカン中に DAP の代りにリジンが含まれる場合も、同様に繊毛虫類によってペプチドグリカンが分解され、リジンの利用可能な状態が作り出されるものと考えられた。したがって、反芻胃内に繊毛虫類が棲息している限り、細菌細胞壁は決して宿主動物にとって無益ではなく、むしろ、リジンの生成源として有益であると考えられた。すでに、羊を使った実験で、リジンが無繊毛虫動物の制限アミノ酸になることが示されており^{137,138)}、宿主動物に対するリジンの供給面で反芻胃内繊毛虫類が果たしている役割は極めて大きいと考えられた。

おわりに

反芻家畜の主たる特徴が反芻胃内微生物の諸機能に対する宿主の依存であろうことは言をまたないところであろう。しかし、反芻胃内微生物がいかなる機能をもっているかということになると、その全貌はまだまだ解明されていない部分が多い。

近時、反芻胃内微生物の諸機能に関する知見集積の遅滞にたまり兼ねてか、宿主の微生物に対する依存という特徴を無視した飼育法が指導され、多くの問題を生み出しているように見うけられる。単に採算が合えばよいということでなしに、反芻家畜の特徴を生かした真の価値の生産性の増大を計ることが極めて重要なように思われる。その基礎として、反芻胃内微生物の諸機能に関する資料が、従って、そのための研究者が一層数を増すことが期待される。

本稿は、昭和 50 年度 (1975) 日本畜産学会賞受賞講演原稿に加筆したものである。

文 献

- 1) BECKER, E.R., J.A. SCHULZ, and M.A. EMMERSON, Iowa State Coll J Sci 4: 215-241. 1930. より.
- 2) HUNGATE, R. E., "The Rumen and Its Microbes", Academic Press. New York and London. 1966.
- 3) COSTE, M., Compt Rend Acad Sci 59: 149-155 1864.
- 4) EDWARDS, M., Compt Rend Acad Sci 59: 155-156. 1864.
- 5) POUCHET, F. A., Compt Rend Acad Sci 59: 276-283. 1864.
- 6) SCHUBERG, A., Zool Jahrb 3: 365-418. 1888.
- 7) CERTES, A., Bull Soc Zool France 14: 70-73. 1889.
- 8) GUENTHER, A., Z Wiss Zool 65: 529-572. 1899.
- 9) BECKER, E.R., and M. TALBOTT, Iowa State Coll J Sci 1: 345-373. 1927.
- 10) STEIN, F., Abhandl Kais Boehm Ges Wiss 1858.
- 11) STEIN, F., Lotos 9: 2-5. 1859.
- 12) STEIN, F., Lotos 9: 57-60. 1859.
- 13) DOGIEL, V. A., Arch Protistenk 59: 1-288. 1927.
- 14) BECKER, E. R., and T. S. HSIUNG, Proc Nat Acad Sci 15: 684-690. 1929.
- 15) 阿部又信, 獣畜新報 629: 18-22. 1974.
- 16) 板橋久雄, 栄養生理研究会報 19: 39-50. 1975.
- 17) 小野寺良次, 獣畜新報 628: 1258-1262. 1974.
- 18) YODER, R. D., A. TRENKLE, and W. BURROUGHS, J Anim Sci 25: 609-612. 1966.
- 19) MARGOLIN, S., Biol Bull 59: 301-305. 1930.
- 20) KNOTH, M., Z Wiss Biol Abt F 1: 262-282. 1928.
- 21) WESTPHAL, A., Z Parasitenk 7: 71-117. 1934.
- 22) HUNGATE, R. E., Biol Bull 83: 303-318. 1942.
- 23) HINO, T., M. KAMETAKA, and M. KANDATSU, J Gen Appl Microbiol 19: 397-413. 1973.
- 24) OXFORD, A. E., Exp Parasitol 4: 569-605. 1955.
- 25) 堀口雅昭・久保辰雄・神立 誠, 栄養障害研究会報 7: 93-121. 1963.
- 26) HUNGATE, R. E., M. P. BRYANT, and R. A. MAH, Ann Rev Microbiol 18: 131-166. 1964.
- 27) 神立 誠, 乳牛の科学 梅津元昌編 174-185. 農文協. 東京. 1964.
- 28) GRAIN, J., Ann Biol (Paris) 6: 17-45. 1967.
- 29) 湊 一・植村定次郎, 発酵と微生物Ⅲ 植村・相田編 198-299. 朝倉書店. 東京. 1970.
- 30) McNAUGHT, M. L., E. C. OWEN, K. M. HENRY, and S. K. KON, Biochem J 56: 151-156. 1954.
- 31) BERGEN, W. G., D. B. PURSER, and J. H. CLINE, J Dairy Sci 51: 1698-1700. 1968.
- 32) WELLER, R. A., Aust J Biol Sci 10: 384-389. 1957.
- 33) 堀口雅昭, 博士論文 東京大学. 1960.
- 34) PURSER, D. B., and S. M. BUECHLER, J Dairy Sci 49: 81-84. 1966.
- 35) HORIGUCHI, M., and M. KANDATSU, Nature 184: 901-902. 1959.
- 36) HORIGUCHI, M., and M. KANDATSU, Bull Agr Chem Soc Japan 24: 565-570. 1960.
- 37) 玉利正人・堀口雅昭・神立 誠, 日農化誌 45: 433-440. 1971.
- 38) MAGET-DANA, R., M. TAMARI, J. MARMOUYET, et L. DOUSTE-BLAZY, Eur J Biochem 42: 129-134. 1974.
- 39) HUNGATE, R. E., Ann Rev Microbiol 4: 53-66. 1950.
- 40) 植村定次郎, 日農化誌 31: A93-A98. 1957.
- 41) HUNGATE, R. E., Bacteriol Rev 24: 353-364. 1960.
- 42) 植村定次郎・古坂澄石・須藤恒二, 微生物実験法: 微生物工学講座 2. 友田・坂口・山田・朝井共編 160-220. 共立出版. 東京. 1962.
- 43) 植村定次郎, 科学 33: 408-413. 1963.
- 44) ANNISON, E. F., Biochem J 64: 705-714. 1956.

- 45) 常磐憲司, 卒業論文 東京大学. 1963.
- 46) WILLIAMS, P. P., R. E. DAVIS, R. N. DOETSCH, and J. GUTIERREZ, *Appl Microbiol* **9**: 405-409. 1961.
- 47) GUTIERREZ, J., and R. E. DAVIS, *Appl Microbiol* **10**: 305-308. 1962.
- 48) 高橋直身・粕川照男, 明大農研報 **13**: 1-6. 1962.
- 49) ABOU AKKADA, A. R., and B. H. HOWARD, *Biochem J* **82**: 313-320. 1962.
- 50) GUTIERREZ, J., *Biochem J* **60**: 516-522. 1955.
- 51) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **39**: 206-211. 1968.
- 52) EL-SHAZLY, K., *Biochem J* **51**: 647-653. 1952.
- 53) SIROTNAK, F. M., R. N. DOETSCH., R. E. BROWN, and J. C. SHOW, *J Dairy Sci* **36**: 1117-1123. 1953.
- 54) LEWIS, D., *Brit J Nutr* **9**: 215-230. 1955.
- 55) WARNER, A. C. I., *J Gen Microbiol* **14**: 749-762. 1956.
- 56) VAN DEN HENDE, C., W. OYAÉRT, and J. H. BOUC KAERT, *Zbl Vet Med* **6**: 681-692. 1959.
- 57) HOSHINO, S., and Y. HIROSE, *J Dairy Sci* **46**: 323-326. 1963.
- 58) BRYANT, M. P., and I. M. ROBINSON, *J Dairy Sci* **46**: 150-154. 1963.
- 59) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **40**: 205-211. 1969.
- 60) 小野寺良次, 博士論文 東京大学. 1967.
- 61) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **47**: 449-464. 1967.
- 62) EBERLEIN, R., *Z Wiss Zool* **59**: 233-304. 1895.
- 63) LIEBETANZ, E., *Arch Protistenk* **19**: 19-80. 1910.
- 64) DOGIEL, V. A., *Quant J Microscop Sci* **88**: 337-343. 1947.
- 65) LUBINSKY, G., *Can J Zool* **35**: 579-580. 1957.
- 66) OXFORD, A. E., *J Gen Microbiol* **5**: 83-90. 1951.
- 67) ABOU AKKADA, A. R., and B. H. HOWARD, *Biochem J* **76**: 445-451. 1960.
- 68) WILLIAMS, P. P., J. GUTIERREZ, and R. N. DOETSCH, *Proc Soc Am Bacteriologists, Ann Meeting*. p. 32. 1960.
- 69) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **41**: 14-21. 1970.
- 70) LUBINSKY, G., *Can J Zool* **35**: 141-159. 1957.
- 71) MULLER, M., P. RÖHLICH, and I. TÖRÖ, *J Protozool* **12**: 27-34. 1965.
- 72) GUTIERREZ, J., *J Protozool* **5**: 122-126. 1958.
- 73) GUTIERREZ, J., and R. E. DAVIS, *J Protozool* **6**: 222-226. 1959.
- 74) MINATO, H., A. UEKI, and T. SUTO, *Proceeding of the First Intersectional Congress of IAMS* **2**: 187-196. 1974.
- 75) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **41**: 307-313. 1970.
- 76) CHALMER, M. I., D. P. CUTHBERTSON, and R. L. M. SYNGE, *J Agr Sci* **44**: 254-262. 1954.
- 77) 久保辰雄・神立 誠, 日本畜産学会大会講演 1965.
- 78) ONODERA, R., Y. TOYOFUKU, S. FUJITA, S. NAKAHARA, and M. KANDATSU, *Jap J Zootech Sci* **45**: 652-656. 1974.
- 79) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **47**: 433-447. 1967.
- 80) COLEMAN, G. S., and F. J. HALL, *Tissue and Cell* **1**: 607-618. 1969.
- 81) WARNER, A. C. I., *Program-Handbook: IV International Symposium on Ruminant Physiology* p. 45. Sydney. 1974.
- 82) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **57**: 303-332. 1969.
- 83) ONODERA, R., and M. KANDATSU, *Agr Biol Chem* **36**: 1989-1995. 1972.
- 84) 神立 誠・高橋直身, 日畜会報 **34**: 148-155. 1963.
- 85) UEDA, Y., R. ONODERA, and M. KANDATSU, *Jap J Zootech Sci* **46**: 34-41. 1975.
- 86) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 臨時増刊 学会号 p. 29. 1971.
- 87) CHESTERS, J. K., *J Protozool* **15**: 509-512. 1968.
- 88) HOSHINO, S., and S. SUGIYAMA, *Comp Biochem Physiol* **48B**: 39-45. 1974.
- 89) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **35**: 91-103. 1964.
- 90) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **49**: 315-323. 1967.
- 91) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **71**: 117-131. 1972.
- 92) HARMEYER, J., *Z Tierphysiol Tierernaehr Futtermittelk* **28**: 65-75. 1971.
- 93) SUGDEN, B., and A. E. OXFORD, *J Gen Microbiol* **7**: 145-153. 1952.
- 94) SUGDEN, B., *J Gen Microbiol* **9**: 44-53. 1953.
- 95) HEALD, P. J., and A. E. OXFORD, *Biochem J* **53**: 506-512. 1953.
- 96) 神立 誠・高橋直身, 日農化誌 **29**: 833-838. 1955.
- 97) COLEMAN, G. S., *J Gen Microbiol* **22**: 555-563. 1960.
- 98) CLARKE, R. T. J., *J Gen Microbiol* **33**: 401-408. 1963.
- 99) MAH, R. A., *J Protozool* **11**: 546-552. 1964.
- 100) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **41**: 343-348. 1970.
- 101) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **41**: 349-357. 1970.
- 102) 小野寺良次・神立 誠, 日畜会報 **44**: 学会号. p. 109. 1973.
- 103) 小野寺良次・後藤正博・堤和加夫・神立 誠, 日畜会報 **45**: 学会号. p. 33. 1974.
- 104) HARMEYER, J., *Z Tierphysiol Tierernaehr Futtermittelk* **28**: 75-85. 1971.
- 105) ONODERA, R., and M. KANDATSU, *Agr Biol Chem* **33**: 113-115. 1969.
- 106) ZACHARIUS, R. M., J. F. THOMPSON, and F. C.

- STEWART, J Am Chem Soc **74**: 2949. 1952.
- 107) ROTHSTEIN, M., and L. L. MILLER, J Am Chem Soc **75**: 4371-4372. 1953.
- 108) GROVE, J. A., T. J. GILBERTSON, R. H. HAMMERSTEDT, and L. M. HENDERSON, Biochim Biophys Acta **184**: 329-337. 1969.
- 109) ROTHSTEIN, M., and E. M. SUFFRAN, Arch Biochem Biophys **101**: 373-377. 1963.
- 110) MILLER, D. L., and V. W. RODWELL, J Biol Chem **246**: 2758-2764. 1971.
- 111) DOHNER, P. M., and B. P. CARDON, J Bacteriol **67**: 608-611. 1954.
- 112) LEWIS, T. R., and R. S. EMERY, J Dairy Sci **45**: 1363-1368. 1962.
- 113) ONODERA, R., and M. KANDATSU, Agr Biol Chem **36**: 1563-1569. 1972.
- 114) VOGEL, H. J., "Evolving Genes and Proteins" ed. by V. BRYSTON, and H. J. VOGEL, 25. Academic Press. New York. 1965.
- 115) GUTTMAN, H. N., J Protozool **14**: 267-271. 1967.
- 116) HARMMEYER, J., und H. HEKIMOGLU, Zbl Vet Med A **15**: 242-254. 1968.
- 117) ONODERA, R., and M. KANDATSU, Nature New Biol **244**: 31-32. 1973.
- 118) ONODERA, R., and M. KANDATSU, Agr Biol Chem **38**: 913-920. 1974.
- 119) TSUTSUMI, W., R. ONODERA, and M. KANDATSU, Agr Biol Chem **39**: 711-714. 1975.
- 120) 堤和加夫・小野寺良次・神立 誠, 日本農芸化学会大会講演要旨集 **49**: 407. 1974.
- 121) 小野寺良次・三浦和也・塩村範秀・神立 誠, 日本農芸化学会西日本支部第 135 回大会講演要旨集 p. 13. 1972.
- 122) WORK, E., and D. L. DEWEY, J Gen Microbiol **9**: 394-406. 1953.
- 123) GHUYSEN, J. M., Bacteriol Rev **32**: 425-464. 1968.
- 124) OSBORN, M. J., Ann Rev Biochem **38**: 501-538. 1969.
- 125) WELLER, R. A., F. V. GRAY, and A. F. PILGRIM, Brit J Nutr **12**: 421-432. 1958.
- 126) SALTON, M. R. T., and J. G. PAVLIK, Biochim Biophys Acta **39**: 398-407. 1960.
- 127) HOOGENRAAD, N. J., and F. J. R. HIRD, J Gen Microbiol **62**: 261-264. 1970.
- 128) MASON, V. C., and F. WHITE, J Agr Sci **77**: 91-98. 1971.
- 129) ALLISON, M. J., "Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant" ed. by A. T. PHILLIPSON, 456-473. Oriel Press. Newcastle upon Tyne. 1970.
- 130) GUTIERREZ, J., and R. E. HUNGATE, Science **126**: 511. 1957.
- 131) GUTIERREZ, J., J Protozool **6**: 21-22. 1959.
- 132) COLEMAN, G. S., J Gen Microbiol **37**: 209-223. 1964.
- 133) WALLIS, O. C., and G. S. COLEMAN, J Gen Microbiol **49**: 315-323. 1967.
- 134) PEARSON, H. A., Appl Microbiol **17**: 819-824. 1969.
- 135) WEIDEL, W., and H. PLEZER, Adv Enzymol **26**: 193-232. 1964.
- 136) ONODERA, R., T. SHINJO, and M. KANDATSU, Agr Biol Chem **38**: 921-926. 1974.
- 137) KLOPFENSTEIN, T. J., D. B. PURSER, and W. J. TYZNIK, J Anim Sci **25**: 765-773. 1966.
- 138) PURSER, D. B., T. J. KLOPFENSTEIN, and J. H. CLINE, J Nutr **89**: 226-234. 1966.