Streptococcus mutans の Sucrose 代謝の機構

佐 藤 節 子

東北大学歯学部 口腔生化学教室 (指導: 山田 正教授)*

[受付: 昭和54年10月22日]

抄録: *Streptococcus mutans* strain FIL の sucrose 代謝の機構を明らかにするため, これを glucose および sucrose を炭素源として連続培養しそれぞれの菌の乳酸産生速度を調べた。Sucrose 培養菌は glucose および sucrose から同程度の速さで乳酸を産生したが glucose 培養菌の sucrose からの乳酸産生速度は glucose からのものより小さかった。Cell-free extract の invertase の比活性はどの培養条件のものでもほぼ等しかった。しかし sucrose 培養菌をトルエン処理したものは phosphoenolpyruvate (PEP) と sucrose とを共に反応させると phosphorylsucrose, glucose 6-phosphate (G6P), fructose 6-phosphate (F6P) および fructose を生成したが glucose 培養菌のものは phosphorylsucrose をほとんど生成せず, またほかの生成物の量も少なかった。これらの結果は sucrose が PEP-dependent phosphotransferase system (PEP-PTS) によって phosphorylsucrose としてとり込まれた後に G6P と fructose に分解されること, この系が sucrose を炭素源として培養した菌で誘導されることを示していた。

諸 言

う蝕の発生に sucrose が重要な関与をしていることは種々のデータから明らかであり, この sucrose が歯垢中の細菌によって代謝されて生ずる酸はエナメル質を脱灰してう蝕の初発の直接の原因になっていると考えられている¹⁻³⁾。歯垢中の細菌の中でも *Streptococcus mutans* はう蝕の発生に大きな関与をしていると考えられ, この菌の sucrose 代謝はう蝕の発生にことさら重要な意味をもつ。ことに *Streptococcus mutans* では糖代謝の第一段階が代謝全体の速度を規定する重要な段階であることが Iwami and Yamada⁴⁾ により明らかにされているが, sucrose 分解酵素である invertase^{5,6)} や多糖合成酵素である glucosyltransferase⁷⁾ および fructosyltransferase⁷⁾ については比較的よく調べられているものの, sucrose の菌体内へのとり込み機構についてはあまり研究されていなかった。Sucrose のとり込み機構は *Bacillus subtilis* についてよく調べられている。この菌は PEP-PTS によって sucrose を phosphorylsucrose として細

胞内にとり込み, そこで G6P と fructose に分解する^{8,9)}。*Staphylococcus aureus* でも同様の機構の存在が示唆されている¹⁰⁻¹²⁾。1979年 Tanzer¹³⁾ や Wittenberger¹⁴⁾ らが *S. mutans* においても sucrose が PEP-PTS によってとり込まれることを示しているが, 生じた phosphorylsucrose がさらにどのように代謝されるかについては明確な結論を得ていない。我々も *S. mutans* FIL が PEP-PTS によって sucrose を phosphorylsucrose としてとり込むという結果を得たが, さらにこの transferase の活性が培養条件によって大きく変わることを観察するとともに, この時生じた phosphorylsucrose の代謝過程についても明らかにしたのでここに報告する。

材料ならびに方法

I 菌および培養条件

S. mutans strain FIL¹⁵⁾ を容量380ml の連続培養装置 (New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.) を用いて dilution rate 0.20-0.21 h⁻¹, 温度37°C, pH 7.0 (2 N KOH で調整), 嫌気条

Mechanisms of Sucrose Metabolism in *Streptococcus mutans*.

Setsuko SATO (Laboratory of Oral Biochemistry, Tohoku University School of Dentistry, Sendai)

* 仙台市星陵町4の1 (〒 980)

Jap. J. Oral Biol. 22: 16-22, 1980.

件(窒素ガス)下で連続培養を行った。培地は先に Yamada ら¹⁶⁾が報告したものを基準にして、炭素源の糖量、L-glutamate および NH_4HCO_3 の量のみを培養条件によって変えた。Glucose excess (グルコース過剰条件・窒素制限条件)の培地は 1 l 当り glucose 9.9g, L-glutamate 0.1g および NH_4HCO_3 0.2g, glucose limitation (グルコース制限条件)の培地は glucose 2.7g, L-glutamate 1g および NH_4HCO_3 2g, sucrose limitation (シュクロース制限条件)の培地は sucrose 2.6g, L-glutamate 1g および NH_4HCO_3 2g を含む。

II 乳酸産生速度の測定

培養した菌を20mM リン酸緩衝液 (PPB, pH 7.0) で3回洗った後、100 mM PPB (pH 7.0), 5 mM MgCl_2 , 糖 (10mM glucose, 10mM fructose あるいは 5 mM sucrose) および菌 (4.4mg dry weight) を含むように懸濁液 2 ml を調整した。懸濁液をインキュベート (37°C, 10min) した後、perchloric acid (60%, 0.2ml) を加えて反応を止め遠心 (12,000×g, 10min) によって菌体を除いた。上清の乳酸量を Barker-Summerson 法¹⁷⁾によって定量した。

III Cell-free extract, 可溶性画分 (soluble fraction) および顆粒画分 (particle fraction) の invertase 活性

培養した菌を20mM PPB (pH 7.0) で洗い同一緩衝液に懸濁し氷冷しながら超音波破碎 (Kubota Insonator, model 200M; 最大出力, 10min) を行った。遠心 (22,500×g, 4°C, 30min) によって得られた上清を cell-free extract とした。また上記のようにして超音波破碎を行った後、破碎されなかった菌を遠心 (2,500×g, 4°C, 10min) で除き、さらに遠心 (100,000×g, 4°C, 30min) を行って得られた上清を可溶性画分、沈殿を顆粒画分とした。

100mM PPB (pH 7.0), 500mM sucrose および cell-free extract を含む反応液 2 ml をインキュベート (37°C, 30min) した後、加熱 (100°C, 5 min) によって反応を止めた。Cell-free extract の代わりに可溶性画分または顆粒画分を用いて同様に反応を行った。反応後遊離してきた glucose と fructose を酵素法¹⁸⁾によって定量した。蛋白量

は Biuret 法¹⁹⁾ および Lowry 法²⁰⁾によって定量した。

IV トルエン処理菌による糖のリン酸化反応

トルエン処理菌²¹⁾は、20mM PPB (pH 7.0) 懸濁液 (1 ml 当りトルエン処理菌の乾燥重量 5 ~ 10mg を含む) にトルエン (10% by volume) を加えて攪拌 (0°C, 20min) した後、20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で菌を3回洗いこの緩衝液に再度懸濁することによって得た。

100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 5 mM MgCl_2 , 1.5mM PEP あるいは 1.5mM ATP, 糖 (10mM glucose, 10mM fructose あるいは 10mM sucrose) およびトルエン処理菌 (0.4mg dry weight) を含む反応液 2 ml をインキュベート (37°C, 30min) した後、加熱 (100°C, 5 min) によって反応を止めた。遠心 (12,000×g, 10min) によって菌体を除き、上清の反応生成物を酵素法¹⁸⁾によって測定した。

V Phosphorylsucrose の同定

トルエン処理菌 (0.4mg dry weight), 2 mM Tris-HCl 緩衝液, 1.5mM PEP, 5 mM MgCl_2 および 10mM [$\text{U-}^{14}\text{C}$] sucrose (0.1mCi/mMole) を含む反応液 2 ml をインキュベート (37°C, 5 min) した後、加熱 (100°C, 5 min) によって反応を止めた。遠心によって菌体を除き上清を凍結乾燥した。これを少量の水にとかし薄層クロマトグラフィー (アビセル SF セルロース薄層プレート, フナコシ薬品株式会社) を行った (溶媒 n-butanol: acetate: 蒸留水 = 4: 1: 1 容量比, 展開 15cm, 3 h)。風乾後オートラジオグラフィー (富士写真フイルム株式会社) を行った。一週間後プレートに diphenylamine-aniline 試薬を噴霧し標準糖を発色させた。標準糖で同定できなかった phosphorylsucrose と思われる R_f 0.02 の部位を水で抽出し塩酸による加水分解 (0.1N, 100°C, 10 min)⁸⁾ あるいは alkaline-phosphatase 処理⁸⁾ した後再び上記のようにクロマトグラフィーを行った。

VI トルエン処理菌による phosphorylsucrose と sucrose の加水分解

Sucrose 1.4mM あるいは *B. subtilis* Marburg QB-13 から得た levansucrase²²⁾ を用いて合成し

た²³⁾ ⁶G-phosphorylsucrose 1.4mM, 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) およびトルエン処理菌 (0.04mg dry weight) を含む反応液 1 ml をインキュベート (37°C, 5 min) した後, 加熱 (100°C, 5 min) によって反応を止めた。遠心によって菌体を除き, 上清の glucose あるいは G6P を酵素法¹⁸⁾によって定量した。

結 果

I 休止菌の乳酸産生速度

Sucrose 培養菌は glucose, fructose および sucrose からほぼ同程度の速さで乳酸を産生するのに対し, glucose 培養菌の sucrose からの乳酸産生速度は glucose や fructose からのものより小さかった (Table 1)。

II Invertase 活性

Table 1. Lactate production by resting cells

Growing conditions	Sugar	Relative amount of lactate produced (%)	
Glucose excess	Glucose	100	100
	Fructose	100	94
	Sucrose	40	26
Glucose limitation	Glucose	100	100
	Fructose	76	79
	Sucrose	46	39
Sucrose limitation	Glucose	100	100
	Fructose	77	102
	Sucrose	98	108

Reaction mixture contained 100 mM PPB(pH 7.0), 5 mM MgCl₂, sugar (10 mM Glucose, 10 mM Fructose or 5 mM sucrose) and resting cells(4.4 mg dry weight) was incubated at 37°C for 10 min.

Table 2. Specific activity of invertase in the cell-free extract and the soluble and the particle fractions

Growing conditions		Specific activity*	
(a)	Glucose excess	0.35	0.33
	Glucose limitation	0.38	0.36
	Sucrose limitation	0.37	0.36
(b)	Sucrose limitation	Soluble fraction	0.31
		Particle fraction	0.006

* Micromoles of glucose released from sucrose per min per mg protein.

Cell-free extract の invertase の比活性は培養条件によって差がみられなかった。また invertase 活性は可溶性画分にも認められ顆粒画分には認められなかった (Table 2)。

III トルエン処理菌による糖のリン酸化反応

Sucrose 培養菌は sucrose と PEP から G6P, F6P および fructose を多く生成したが glucose 培養菌ではこれらの生成量が少なかった。Glucose と PEP が反応して生成する G6P の量はどの条件の培養菌でもほぼ同程度の量であった。これら sucrose や glucose のリン酸化反応は PEP の代わりに ATP を添加してもほとんどおこらなかったが, fructose は PEP と ATP とよく反応して G6P と F6P を生成した (Table 3)。これらのどの反応条件においても glucose 1-phosphate, fructose 1, 6-bisphosphate, glyceraldehyde 3-phosphate および hydroxyacetone phosphate の生成はほとんど認められなかった (データは示していない)。また sucrose の PEP によるリン酸化反応は monoiodoacetate (IAA) で著明に阻害されたが, glucose のリン酸化反応は阻害されなかった (Table 4)。

IV Phosphorylsucrose の生成

Sucrose 培養トルエン処理菌は PEP および sucrose と反応して G6P, F6P および fructose のほかに Rf 0.02の反応物を生成した。この反応物は塩酸の加水分解によって G6P と fructose を, alkaline-phosphatase の処理によって sucrose をそれぞれ遊離すること, また levansucrase から合成した ⁶G-phosphorylsucrose とこの Rf 0.02 の反応物がクロマトグラフィーで常に一致した挙動を示すことなどから ⁶G-phosphorylsucrose と同定

Table 3. Sugar phosphorylation by toluene-treated cells

Growing conditions	Substrates	Products (mM)			
		Glucose 6-P	Fructose 6-P	Glucose	Fructose
(a) Glucose excess	Glucose	0.00	0.00	—	—
	Glucose+PEP	0.79	0.26	—	—
	Glucose+ATP	0.07	0.03	—	—
	Fructose	0.00	0.00	—	—
	Fructose+PEP	0.49	0.18	—	—
	Fructose+ATP	0.21	0.09	—	—
	Sucrose	0.00	0.00	0.02	0.02
	Sucrose+PEP	0.10	0.03	0.00	0.01
	Sucrose+ATP	0.02	0.01	0.04	0.02
(b) Glucose limitation	Glucose	0.00	0.00	—	—
	Glucose+PEP	0.86	0.26	—	—
	Glucose+ATP	0.00	0.00	—	—
	Fructose	0.00	0.00	—	—
	Fructose+PEP	0.43	0.15	—	—
	Fructose+ATP	0.32	0.13	—	—
	Sucrose	0.00	0.00	0.04	0.03
	Sucrose+PEP	0.33	0.11	0.01	0.02
	Sucrose+ATP	0.02	0.00	0.05	0.02
(c) Sucrose limitation	Glucose	0.00	0.00	—	—
	Glucose+PEP	1.00	0.30	—	—
	Glucose+ATP	0.02	0.00	—	—
	Fructose	0.00	0.00	—	—
	Fructose+PEP	0.37	0.14	—	—
	Fructose+ATP	0.41	0.16	—	—
	Sucrose	0.00	0.00	0.03	0.04
	Sucrose+PEP	0.91	0.27	0.02	1.22
	Sucrose+ATP	0.03	0.00	0.04	0.02

Reaction mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 5 mM MgCl₂, 10 mM sugar and the toluene-treated cells (0.4mg dry weight) was incubated at 37°C for 30min.
— : Not determined.

Table 4. Effect of NaF and IAA on sugar phosphorylation by the toluene-treated cells

Growing conditions	Substrates	Relative amount of G6P produced (%)		
		Control	Additions	
			NaF	IAA
Glucose limitation	Glucose+PEP	100	94	100
	Sucrose+PEP	100	92	9
Sucrose limitation	Glucose+PEP	100	93	109
	Sucrose+PEP	100	115	2

NaF (sodium fluoride) and IAA (monoiodoacetate) were added at the final concentration of 10 mM.

した (Fig. 1 a)。Glucose 培養トルエン処理菌を用いた場合はこれらの生成物はほとんど認められなかった (Fig. 1 b)。

V トルエン処理菌による phosphorylsucrose と sucrose の加水分解の活性
Phosphorylsucrose の加水分解の比活性は su-

Toluene-treated cells were incubated with PEP and $[U-^{14}C]$ sucrose. a; Toluene-treated cells of *S. mutans* grown under sucrose limitation. b; Toluene-treated cells of *S. mutans* grown under glucose excess.

Fig. 1 An autoradiographic analysis by thin-layer chromatography

Table 5. Hydrolyzation of phosphorylsucrose and sucrose by the toluene-treated cells

Growing conditions	Substrates	
	Phosphorylsucrose	Sucrose
Glucose excess	0.20*	0.02
Sucrose limitation	0.16	0.01

* Micromoles of glucose 6-phosphate released from phosphorylsucrose or glucose released from sucrose per min per mg dry weight of the toluene-treated cells.

crose のものの約10倍で、培養条件による差はほとんどみられなかった (Table 5)。データは示していないが sucrose の加水分解の活性にも培養条件による差はほとんど認められなかった。

考 察

Sucrose を炭素源として培養した *S. mutans*

FIL は glucose を炭素源として培養した菌よりも速く sucrose を代謝するが²⁴⁾、これは sucrose 分解酵素である invertase の活性の差によるものとは考えられない^{21,24,25)}。トルエン処理菌の PEP による glucose のリン酸化反応の活性は培養条件によって差がみられなかったが PEP による sucrose のリン酸化反応の活性は sucrose を炭素源として培養した菌で高かった。トルエン処理菌の invertase 活性および phosphorylsucrose を G6P と fructose に加水分解する invertase 様酵素活性に培養条件による差がほとんどみられなかったことから、sucrose 培養菌では sucrose の PEP によるリン酸化反応系そのものが誘導されているものと考えられた。実際 $[U-^{14}C]$ sucrose を用いて反応生成物を調べると sucrose 培養菌では phosphorylsucrose を生成しているのに glucose 培養菌ではそれが認められなかった。また sucrose 培養のトルエン処理菌は sucrose と PEP から多くの G6P, F6P および fructose を生成したが G6P と F6P の和はほぼ fructose の量に等しかった。F6P は phosphoglucose isomerase によって G6P から生じたものと考えられる。これらの結果は sucrose は PEP-PTS によって phosphorylsucrose として菌体内にとり込まれること、とり込まれた phosphorylsucrose は sucrose よりも速く加水分解されやすいこと⁹⁾、glucose 培養菌の sucrose の PEP-PTS 活性は sucrose 培養菌にくらべて低いことなどを示していると考えられる。また IAA が sucrose の PEP によるリン酸化反応のみを著明に阻害し glucose の PEP によるリン酸化反応はほとんど阻害しなかったという結果は sucrose の PEP によるリン酸化反応系が glucose の PEP によるリン酸化反応系と明らかに異なるものであることを示している。

Glucose および sucrose は PEP によってよくリン酸化されるが ATP ではほとんどリン酸化されなかった。しかし fructose は ATP でも PEP でもよくリン酸化された。ATP による fructose のリン酸化反応は hexokinase あるいは fructokinase によるものと考えられ、fructose のとり込みの機構が glucose や sucrose とはまた異ったものであることが示唆される。PEP による fructose

のリン酸化反応では F6P がよく生成されていた。最近 *Escherichia coli* の fructose の PEP-PTS には fructose 1-phosphate を生成する系と F6P を生成する系があることが示されている²⁶⁻²⁸⁾。*S. mutans* FIL でも F6P を生成する PEP-PTS があることが考えられる。

以上の結果から *S. mutans* FIL は sucrose を菌体外で glucose あるいは fructose に分解して単糖とした後に菌体内にとり込む経路のほかに, sucrose そのものを PEP-PTS によって phos-

phorylsucrose としてとり込み, そこでさらに G6P と fructose に加水分解して代謝してゆく経路をもつことがわかった。この sucrose に対する PEP-PTS は sucrose を炭素源として培養することによって誘導されると考えられる。

御懇切なる御指導と御校閲を賜った山田正教授に厚くお礼申し上げます。また, *B. subtilis* Marburg QB-13 を御分与してくださいました Dr. M. Pascal に感謝いたします。

Summary: We studied the mechanisms of sucrose metabolism in *Streptococcus mutans* strain FIL. Resting cells grown in a sucrose limited continuous culture produced lactate from sucrose as well as from glucose but those grown under glucose excess or glucose limitation produced lactate from sucrose more slowly than from glucose. Specific activities of invertase of cell-free extracts from the cells grown under these three conditions were not different.

When phosphoenolpyruvate (PEP) and sucrose were incubated with the toluene-treated cells of *S. mutans* grown under sucrose limitation, glucose 6-phosphate (G 6 P), fructose 6-phosphate (F 6 P), fructose and a small amount of phosphorylsucrose were obtained. Phosphorylsucrose was identified by an autoradiography after thin-layer chromatography, hydrolyzation by HCl and by incubation with alkaline-phosphatase. A little G 6 P, F 6 P and fructose were produced by the toluene-treated cells of *S. mutans* grown under glucose excess or glucose limitation, but phosphorylsucrose was not detectable. ATP could not replace PEP as phosphate donor. Phosphorylation of sucrose with PEP was inhibited by monoiodoacetate (IAA) but that of glucose was not. Sodium fluoride (NaF) had no inhibitory effect on phosphorylation of either sugar.

Phosphorylsucrose was hydrolyzed more rapidly than sucrose. Specific activities of phosphorylsucrose hydrolytic-enzyme were not different between the toluene treated cells of *S. mutans* grown under sucrose limitation and those grown under glucose excess.

These results indicated that sucrose was incorporated into the cells by PEP-dependent phosphotransferase system and phosphorylsucrose was then hydrolyzed into G 6 P and fructose. This sucrose phosphotransferase activity was inducible in the cells grown under sucrose limitation.

文 献

- 1) Brown, A. T.: Sugars in nutrition, (Edited by Sipple H. L. and McNutt K. W.), p. 689, Academic Press, New York, 1974.
- 2) Brown, A. T.: The role of dietary carbohydrates in plaque formation and oral disease *Nutr. Rev.*, 33: 353-361, 1975.
- 3) Gibbons, R. J. and van Houte, J.: Dental caries. *Annu. Rev. Med.*, 26: 121-136, 1975.
- 4) Iwami, Y. and Yamada, T.: *Streptococcus mutans* と *Streptococcus sanguis* の解糖反応律速段階と酸性 pH での糖代謝. 歯基礎誌補冊, 21: 142, 1979, *Archs. oral Biol.* in press.
- 5) Chassy, B. M., Bielawski, R. M., Beal, J. R., Porter, E. V., Krichevski, M. I. and Donkersloot, J. A.: Extracellular invertase in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *Life Sci.* 15: 1173-1180, 1974.
- 6) Gibbons, R. J.: Presence of an invertase-like enzyme and a sucrose permeation system in strains of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 6: 122-131, 1972.
- 7) Gibbons, R. J.: Streptococci and Streptococcal disease, (Edited by Wannamaker, L. W. and Matsen, J. M.), p. 371-385, Academic Press, New York, 1972.
- 8) Lepesant, J. A. and Dedonder, R.: Trans-

- port du saccharose chez *Bacillus subtilis*. *C. R. Acad. Sci. paris* 267 : 1109-1112, 1968.
- 9) Lepesant, J. A., Kunst, F., Pascal, M., Kezlarova-Lepesant, J., Steinmetz, M. and Dedonder, R. : Specific and pleiotropic regulatory mechanisms in the sucrose system of *Bacillus subtilis* 168. In : Microbiology, (Edited by Schlissinger, D.), American society for Microbiology, Washington, D. C., p. 58, 1976.
 - 10) Egan, J. B. and Morse, M. L. : Carbohydrates transport in *Staphylococcus aureus*. I. Genetic and biochemical analysis of a pleiotropic transport mutant. *Biochem. Biophys. Acta.* 97 : 310-319, 1965.
 - 11) Hengstenberg, W., Egan, J. B. and Morse, M. L. : Carbohydrate transport in *Staphylococcus aureus*. VI. The nature of derivatives accumulated. *J. Biol. Chem.* 243 : 1881-1885, 1968.
 - 12) Friedman, S. A. and Hays, J. B. : Initial characterization of hexose and hexitol phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferases of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 130 : 991-999, 1977.
 - 13) Slee, A. M. and Tanzer, J. M. : Phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase activity in *Streptococcus mutans* NCTC 10449. *Infect. Immu.* 24 : 821-828, 1979.
 - 14) St. Martin, E. J. and Wittenberger, C. L. : Characterization of a phosphoenolpyruvate-dependent sucrose transferase system in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immu.* 24 : 865-868, 1979.
 - 15) Yamada, T., Endo, K. and Araya, S. : A fructose 1,6-diphosphate-independent L-lactate dehydrogenase in a strain of *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* 21 : 233-236, 1976.
 - 16) Yamada, T., Kimura, S. and Igarashi, K. : Metabolism of glucosylsucrose and maltosylsucrose by *Streptococcus mutans*. *Caries. Res.* in Press.
 - 17) Barker, S. B. and Summerson, W. H. : The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* 138 : 535-554, 1941.
 - 18) Bergmeyer, H. U. : Methods of Enzymatic Analysis. 2nd Edition, 3 : 1196-1445, Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc., New York and London, 1974.
 - 19) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 : 751-766, 1949.
 - 20) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
 - 21) McCabe, M. M., Smith, E. E. and Cowman, R. A. : Invertase activity in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Archs. Oral Biol.* 18 : 525-531, 1973.
 - 22) Pascal, M. and Dedonder, R. : Purification et propriétés de la levane-sucrase exocellulaire de *Bacillus subtilis* Marburg. *Carbohydr. Res.* 24 : 365-377, 1972.
 - 23) Kunst, F., Pascal, M., Lepesant, J. A., Walle, J. and Dedonder, R. : Purification and some properties of an endocellular sucrose from a constitutive mutant of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Eur. J. Biochem.* 42 : 611-620, 1974.
 - 24) Tanzer, J. M., Brown, A. T. and McInerney M. F. : Identification, preliminary characterization, and evidence for regulation of invertase in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 116 : 192-202, 1973.
 - 25) Kuramitsu, H. K. : Characterization of invertase activity from cariogenic *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 115 : 1003-1010, 1973.
 - 26) Ferenci, T. and Kornberg, H. L. : Role of fructose-1,6-diphosphatase in fructose utilization by *Escherichia coli*. *FEBS. Lett.* 14 : 360-363, 1971.
 - 27) Ferenci, T. and Kornberg, H. L. : The role of phosphotransferase-mediated synthesis of fructose 1-phosphate and fructose 6-phosphate in the growth of *Escherichia coli* on fructose. *Proc. R. Soc. Lond.* 187 : 105-119, 1974.
 - 28) Jones-Mortimer, M. C. and Kornberg, H. L. : Genetical analysis of fructose utilization by *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. Lond.* 187 : 121-131, 1974.