大腸菌のスレオニン要求株による L-ホモセリン蓄積

田中晴雄, 中山 清
(協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 42 年 6 月 30 日 受 理

L-Homoserine Accumulation by a Threonine-Auxotroph
of *Escherichia coli*

By Haruo TANAKA and Kiyoshi NAKAYAMA

Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Machida, Tokyo

A threonine-auxotroph of *Escherichia coli* was found to accumulate a significant amount of an amino acid in the culture broth. The amino acid was isolated in crystalline form from the culture broth and was identified as L-homoserine. The cultural conditions of L-homoserine production by the organism was investigated. The concentration of L-threonine in the medium influenced remarkably on the accumulation of L-homoserine by the organism. L-Homoserine accumulation was maximum at a suboptimum concentration, about 300 micrograms of L-threonine per milliliter, for the growth of the organism. The addition of L-isoleucine or α -aminobutyric acid to the medium stimulated L-homoserine accumulation. About 4 milligrams of L-homoserine per milliliter accumulated with the medium containing glycerol (5%).
(Received June 30, 1967)

緒 言

1951 年 Fling ら⁽¹⁾が *Neurospora* のメチオニン要求株の菌体中にホモセリンおよびスレオニンが蓄積することを見だして以来, ホモセリンはアスパラギン酸系アミノ酸生成経路の中でスレオニンとメチオニンへの分岐点として, 重要な位置をしめていることが明らかにされた。

鮫島ら⁽²⁻⁷⁾は *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*) のスレオニン要求株が, その培養液中にリジンと同時に著量の L-ホモセリンを蓄積することを見だし, 蓄積条件および蓄積機構について報告している。

われわれは大腸菌のスレオニン要求株が L-ホモセリンを蓄積することを見だし, その培養条件について検討したのでその結果について報告する。

実 験 方 法

供試菌株 : B. D. Davis 博士 (Harvard Med. School, Boston, Mass.) から分与された *Escherichia coli* 43-6 (Thr⁻)⁽⁸⁾ を用いた。

培養方法 : *E. coli* 43-6 の保存 slant より 1 白金耳

をとり, グルコース 2.0%, 酵母エキス 1.0%, ペプトン 1.0%, 食塩 0.25% を含む種培地に植菌し, 30° で 24 時間振とう培養後, 発酵培地に 10% の割合で植菌し, 30° で 4 日間振とう培養した。発酵培地は図表の脚註に示した。培養液量は 250 ml 容三角フラスコに種培地では 30 ml, 発酵培地では 20 ml を用いた。

ホモセリンの定量 : 培養液上清 10 μ l を東洋濾紙 No. 50 にスポットし, イソ酪酸, 1 N アンモニア (5:1)

Fig. 1. Calibration Curve for L-Homoserine Assay.

Fig. 2. Infrared Absorption Spectra of L-Homoserine.

(a) Authentic L-homoserine. (b) The crystalline obtained from the culture broth.

の溶媒で展開風乾後、ニンヒドリンで発色し、飽和硝酸銅溶液を 0.04% の割合で含むメタノール溶液 5 ml で抽出後、506 mμ の吸光度を測定してホモセリンを定量した。標準曲線は Fig. 1 に示した。標準物質としては当社製の L-ホモセリンを用いた。

実験結果

I. L-ホモセリンの分離、同定

E. coli 43-6 の培養液上清から藤田ら⁽⁹⁾の方法でホモ

セリンの結晶を得た。この結晶はペーパークロマトグラフィ、赤外吸収スペクトル、元素分析では L-ホモセリンの標準品と一致し、また *E. coli* 177-184 (L-ホモセリン要求株) による bioassay⁽³⁾ の結果から L-ホモセリンと同定した。元素分析値は C=40.23, H=7.72, N=11.92% (理論値 C=40.33, H=7.62, N=11.76%) である。赤外吸収スペクトルは Fig. 2 に示したごとくである。

TABLE I. EFFECT OF CARBON SOURCE ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Carbon source	%	A*			B*		
		Final pH	Growth mg/ml	L-Homo-serine mg/ml	Final pH	Growth mg/ml	L-Homo-serine mg/ml
Glucose	5.0	5.0	4.1	1.1	5.4	3.4	1.8
	2.0	6.8	3.6	1.1			
Fructose	5.0	6.7	4.1	1.9	5.8	4.4	2.6
	2.0	8.6	1.6	0.9			
Lactose	5.0	6.0	3.2	2.1	6.0	3.8	2.7
	2.0	8.7	1.7	1.4			
Xylose	5.0	8.5	1.2	0.7	6.4	3.8	2.6
	2.0	8.4	1.0	0.8			
Mannitol	5.0	5.2	3.3	2.1	5.8	4.2	2.5
	2.0	6.8	4.4	1.7			
Sorbitol	5.0	8.6	2.1	0.5	6.8	2.9	1.3
	2.0	8.6	2.0	0.7			
Glycerol	5.0	5.2	3.3	2.9	6.4	3.7	3.0
	2.0	8.2	3.2	1.8			
Sucrose	5.0				5.4	3.3	3.2
	2.0						

* Basal medium A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, yeast extracts 1.0%, L-threonine 200 mg/ml, fumarate 2.0%, CaCO_3 2.0%, pH 7.8. B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, L-threonine 300 mg/ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

II. 培養条件の検討

1. 炭素源の検討

炭素源としてグルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンニトール、グリセロール、シュクロースについて検討した。その結果、Table I に示したようにフマル酸を加えた場合はグリセロールが最もよく、マンニトール、ラクトース、フラクトースでも良好であった。一方、グルコース、キシロース、ソルビトールではよくなかった。フマル酸を加えない場合はシュクロース、グリセロール、ラクトース、キシロース、マンニトールで良好であった。

2. 窒素源の検討

窒素源として硫酸、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素について検討した。全体として蓄積量が低かったが、硫酸が最もよかった (Table II)。

TABLE II. EFFECT OF NITROGEN SOURCE ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Nitrogen source	Addition %	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.1	7.8	1.4	1.0
	1.4	8.4	1.1	1.2
	0.7	8.6	0.9	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.1	8.1	0.7	0.6
	1.4	8.6	0.9	0.7
	0.7	8.7	0.7	0.2
NH_4Cl	1.7	8.2	1.2	0.2
	0.85	8.2	0.8	0.2
	0.43	8.7	0.7	0.9
$\begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{CO} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	1.0	8.8	0.6	0.7
	0.67	8.8	0.6	0.8
	0.33	8.8	0.6	0.7

Basal medium: Glucose 5.0%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, yeast extracts 1.0%, L-threonine 2007/ml, fumarate 2.0%, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

Fig. 3. Effect of L-Threonine Concentration on L-Homoserine Accumulation.

Basal medium: Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

Fig. 4. Effect of Peptone Concentration on L-Homoserine Accumulation.

Basal medium: Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, fumarate 2.0%, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

3. スレオニンの濃度の検討

E. coli 43-6 はスレオニン要求株であるので、その生育およびホモセリン蓄積に対するスレオニン濃度の影響を検討した。その結果 Fig. 3 に示したように、L-スレオニン 300 γ /ml で最もよく 2.6 mg/ml の L-ホモセリンが蓄積された。さらに高濃度では生育はややよくなるけれども L-ホモセリン蓄積は減少した。また、スレオニンの代替物としてペプトンを用いた場合についても検討した。結果は Fig. 4 に示したごとくである。

4. リン酸およびマグネシウムの濃度の影響

基礎培地としてグルコース 5.0%, 硫安 2.0%, 酵母エキス 1.0%, フマル酸 2.0% の組成の培地を用いた場合についてリン酸およびマグネシウム濃度の影響について検討した。その結果 Table III に示したように、リン酸、マグネシウムともに顕著な影響はみられなかった。

TABLE III. EFFECT OF PO_4^{3-} AND Mg^{2+} CONCENTRATION ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

KH_2PO_4 %	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ %	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
1.0	0.25	5.2	2.0	1.1
	0.10	4.6	2.3	0.9
	0.05	4.8	2.2	0.9
	0.01	4.9	2.3	0.8
0.5	0.25	4.6	2.3	0.7
	0.10	4.8	2.2	0.8
	0.05	4.8	2.6	0.9
	0.01	4.8	2.3	0.9
0.25	0.25	4.8	2.4	0.8
	0.10	4.8	2.4	0.6
	0.05	4.8	2.2	0.7
	0.01	4.8	2.2	0.9
0.10	0.25	4.8	2.2	0.9
	0.10	4.8	2.3	0.9
	0.05	4.8	1.8	1.0
	0.01	4.8	1.7	0.9

Basal medium: Glucose 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, yeast extracts 1.0%, fumarate 2.0%, L-threonine 2007/ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

5. アスパラギン酸, フマル酸, アスパラギンの添加効果

E. coli におけるホモセリンの生合成はアスパラギン酸を経ることが明らかにされている。そこでアスパラギン酸と、容易にアスパラギン酸に変化するフマル酸およびアスパラギンについてそれらの添加培養実験を試みた。その結果 Table IV に示したように、グルコースを炭素源とし、酵母エキスを含む場合はアスパラギン酸、アスパラギン、フマル酸の添加効果が認められた。しかし、グリセロールを炭素源とし、酵母エキスを添加しない場合はアスパラギン酸、アスパラギンはむしろ L-

TABLE IV. EFFECT OF ASPARTATE, ASPARAGINE AND FUMARATE ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Addition (2.0%)	L-Threonine γ /ml	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
None	300	4.8	4.2	0.6
	200	4.8	3.8	0.6
	100	4.8	3.4	0.7
Aspartate	300	5.0	3.7	1.5
	200	5.0	2.8	0.6
	100	5.0	2.7	1.7
Asparagine	300	5.0	3.1	0.7
	200	5.0	3.3	1.0
	100	5.0	2.7	1.8
Fumarate	300	5.0	3.8	0.6
	200	5.0	3.6	0.8
	100	5.0	3.2	1.2

Basal medium : Glucose 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, yeast extracts 1.0%, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

ホモセリン蓄積を阻害した。

6. アスパラギン酸系アミノ酸の影響

アスパラギン酸系アミノ酸としてイソロイシン, ロイシン, バリン, メチオニン, リジンを 100~900 γ /ml の濃度に添加し, L-ホモセリン蓄積に対する影響を検討した。その結果 Table V に示したように, イソロイシンでホモセリン蓄積が増大し, メチオニンでは阻害された。また, α -aminobutyric acid (α -AB), α -ketobutyric acid (α -KB) の場合も検討したが, α -AB 100 γ /ml, 300 γ /ml 添加で促進され, α -KB でやや阻害された。 α -AB 高濃度では生育, ホモセリン蓄積ともに阻害された。また, イソロイシン, α -AB を 1 日目または 2 日目に添加した場合にはホモセリン蓄積は増大した (Table VI)。

7. 有機酸および天然物の添加による生育促進効果

以上の実験では *E. coli* 43-6 の生育は悪く, 菌体量 (乾物重量) で 2.0~4.0 mg/ml である。そこで, 生育の改善を主目的として有機酸および天然物の添加を試みた。その結果 Table VII に示したように, 有機酸ではクエン酸ソ-

TABLE V. EFFECT OF AMINO ACIDS OF ASPARTIC FAMILY ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Amino acid	Addition γ /ml	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
None		7.0	2.3	1.5
L-Isoleucine	100	6.2	2.5	2.0
	300	6.2	2.4	2.0
	900	6.6	2.6	2.7
L-Lysine-HCl	100	6.8	2.4	1.6
	300	6.8	3.0	1.6
	900	6.8	2.7	1.5
L-Methionine	100	6.7	2.5	1.2
	300	6.5	2.3	0.7
	900	6.6	2.5	0.8
L-Leucine	100	6.8	2.6	1.4
	300	6.6	2.3	1.4
	900	6.9	2.3	1.3
L-Valine	100	6.7	2.2	1.6
	300	6.5	2.6	1.7
	900	6.8	2.0	1.4

Basal medium : Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, L-threonine 200 γ /ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

ード (0.5%), 乳酸 (2.0%) でややよくなり, 菌体量 5.4 mg/ml まで上昇した。またホモセリン蓄積はクエン酸 (2.0%), リンゴ酸 (0.5%) で促進され, ピルビン酸ソーダ, 酢酸ソーダでは阻害された。

天然物の添加では Table VIII に示したように, 生育はクロレラエキスを最もよく促進され, ペプトン, NZ-アミン, トヨエキス, コーン・スティープ・リカーでもやや促進された。L-ホモセリン蓄積はトヨエキス, 肉エ

TABLE VI. EFFECT OF L-ISOLEUCINE AND DL- α -AMINOBUTYRIC ACID FEEDING ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Amino acid	Addition		Glycerol as carbon source			Fructose as carbon source		
	hours	mg/ml	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
None	—	—	5.9	4.1	3.2	5.8	4.1	2.3
L-Isoleucine	24	0.3	6.0	3.4	3.4	6.0	4.0	2.9
		1.0	6.0	3.8	4.0	6.0	3.9	3.1
		3.0	6.0	3.3	4.3	6.0	4.2	2.7
		10.0	6.0	3.4	3.2	5.8	3.9	3.2
	48	0.3	6.0	3.4	3.2	5.8	3.8	2.8
		1.0	6.0	3.5	2.7	5.8	4.3	3.0
		3.0	6.0	4.1	3.3	5.8	3.9	2.9
		10.0	6.0	3.3	2.7	5.8	3.7	3.0
DL- α -Aminobutyric acid	24	0.3	5.6	4.7	2.5	5.8	4.6	2.5
		1.0	5.8	4.5	3.0	6.0	3.8	2.7
		3.0	5.8	4.1	2.9	6.0	3.4	2.7
		10.0	6.0	3.2	2.7	6.0	3.7	2.5
	48	0.3	5.8	4.0	2.7	5.8	3.8	2.7
		1.0	5.8	3.7	2.5	6.0	3.8	3.0
		3.0	5.8	3.4	2.5	5.8	4.2	3.4
		10.0	5.6	4.3	2.8	5.8	3.8	3.7

Basal medium : Carbon source 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, L-threonine 300 γ /ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

TABLE VII. EFFECT OF ORGANIC ACIDS ON GROWTH AND L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Organic acid	Addition %	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
None	—	6.0	4.2	1.8
Sodium citrate	{ 0.5 2.0	{ 6.3 8.5	{ 5.4 3.9	{ 2.2 3.0
α -Ketoglutarate	{ 0.5 2.0	{ 6.8 7.4	{ 3.7 3.3	{ 2.2 1.3
Fumarate	{ 0.5 2.0	{ 6.8 6.1	{ 3.5 3.4	{ 2.2 0.9
Malate	{ 0.5 2.0	{ 6.9 6.8	{ 3.9 3.1	{ 2.6 0.8
Sodium pyruvate	{ 0.5 2.0	{ 5.0 5.0	{ 3.7 4.8	{ 0.6 1.2
Sodium acetate	{ 0.5 2.0	{ 7.4 6.8	{ 3.9 3.0	{ 1.3 0.4
Lactate	{ 0.5 2.0	{ 6.8 5.9	{ 4.2 5.4	{ 2.2 0.7
Sodium succinate	{ 0.5 2.0	{ 6.5 6.5	{ 4.6 4.8	{ 1.9 1.6

Basal medium: Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, L-threonine 500 γ /ml, pH 7.8.

TABLE VIII. EFFECT OF NUTRIENTS ON GROWTH AND L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Nutrient	Addition %	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
None	—	6.2	3.2	2.3
Peptone	{ 0.25 0.50 1.0 2.0	{ 5.0 5.0 5.0 5.0	{ 3.9 4.4 4.7 5.8	{ trace " " "
NZ-Amine	{ 0.25 0.50 1.0 2.0	{ 5.0 5.0 5.0 5.0	{ 4.3 4.2 4.9 5.3	{ " " " "
Chlorella extracts	{ 0.2 0.4 1.0	{ 8.2 7.3 6.4	{ 6.8 7.1 7.5	{ 0.6 0.9 0.8
Torula extracts	{ 0.2 0.5 1.0	{ 6.1 6.0 5.8	{ 3.6 3.8 5.0	{ 2.9 3.1 2.2
Meat extracts	{ 0.2 0.5 1.0	{ 6.7 6.9 6.8	{ 2.6 2.7 3.6	{ 2.5 2.6 3.1
Corn steep liquor	{ 0.2 0.5 1.0	{ 5.0 5.0 5.0	{ 3.6 4.7 5.4	{ 1.4 1.2 1.0

Basal medium: Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, L-threonine 300 γ /ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

キスで促進され, その他ではむしろ阻害された。さらにクロレラエキスを添加による生育促進効果について実験した結果, 菌体量で約 11 mg/ml まで上昇させることがで

TABLE IX. GROWTH ACCELERATING EFFECT OF CHLORELLA EXTRACTS

Chlorella extracts	L-Threonine γ /ml	pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
None	300	5.7	3.4	1.9
0.1	{ 100 200 300 500	{ 5.8 5.8 7.5 7.5	{ 5.0 7.1 7.0 8.5	0~1.5
0.2	{ 100 200 300 500	{ 6.0 6.5 7.9 7.6	{ 2.8 8.9 7.0 8.0	
0.5	{ 100 200 300 500	{ 5.3 7.4 6.8 6.8	{ 8.2 10.1 8.3 6.6	
1.0	{ 100 200 300 500	{ 5.8 5.0 7.4 6.6	{ 7.8 10.8 10.4 8.4	

Basal medium: Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

TABLE X. EFFECT OF VOLUME OF CULTURE MEDIUM ON L-HOMOSERINE ACCUMULATION

Volume of culture medium ml	Final pH	Growth mg/ml	L-Homoserine mg/ml
10	6.2	3.8	3.9
20	5.7	3.4	1.9
30	5.4	3.6	1.2
40	5.2	3.2	trace

Fermentation medium: Glycerol 5.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, L-threonine 300 γ /ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.8.

きた。しかし, ホモセリン蓄積は抑制された (Table IX)。

8. 培養液量の検討

通気量の影響を検討するため, 培養液量を変えた実験を行なった。Table X に示したように, 生育は培養液量によりほとんど変化しなかったが, L-ホモセリン蓄積は液量の少ない方がよく, 10 ml で 3.9 mg/ml の蓄積量を得た。

考 察

以上 *E. coli* 43-6 (Thr⁻) による L-ホモセリン蓄積を確認し, L-ホモセリン蓄積のための培養条件を検討した結果, 4.3 mg/ml の蓄積量を得たが, さらに蓄積量をあげるためには生育の改善が必要であると考え, 若干の生育実験を行なった。生育は 11 mg/ml まで上昇させることができたが, L-ホモセリンの蓄積量はむしろ減少した。生育がよい条件で, しかも L-ホモセリン蓄積を上

昇させるためにはさらに検討を要すると考えられる。クロレアエキスによる生育促進効果は興味深い現象である。

奈良⁽⁷⁾はイソロイシンの効果について *C. glutamicum* の場合は植菌時に加えたのでは効果がなく、菌生育後に加えた場合に効果があると報告しているが、*E. coli* 43-6 の場合は植菌時に加えた場合でも効果があることが示された。 α -AB は植菌時に加えると高濃度では阻害現象が認められたが、菌生育後に加えた場合は *C. glutamicum* 同様促進効果が認められた。*C. glutamicum* の場合はリジンも同時に蓄積したが、*E. coli* ではほとんど蓄積しなかった。このことは *C. glutamicum* の場合はアスパラギン酸系アミノ酸合成のリジン分岐路の最初の段階であるアスパラギン酸セミアルデヒドとピルビン酸との縮合反応がリジンにより阻害されないが⁽¹⁰⁾、*E. coli* の場合は阻害されること^(10,11)から矛盾なく説明できる。

要 約

(1) *E. coli* (Thr⁻) が蓄積するアミノ酸を結晶として分離し、ペーパークロマトグラフィー、元素分析、赤外吸収スペクトル、*E. coli* 177-184 による bioassay により L-ホモセリンと同定した。

(2) L-ホモセリン蓄積のための培養条件を検討した結果、グリセロール 5%、硫安 1.4%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.03%、L-スレオニン 300 r/ml、CaCO₃ 2.0% の培地を用い、培養 24 時間に α -AB 3 mg/ml を添加した場合に L-ホモセリン 4.3 mg/ml の蓄積量を得た。リジンの副生はほとんど認められなかった。L-ホモ

セリン蓄積はアミノ酸では L-イソロイシン、 α -AB で促進され、L-メチオニンで阻害された。有機酸ではクエン酸ソーダ、リンゴ酸ソーダで促進され、ピルビン酸ソーダ、酢酸ソーダで阻害された。培養液量は少ない方がよかった。

終りに臨み、本実験に用いた大腸菌の変異株を分与された B. D. Davis 博士 (Harvard Med. School, Boston, Mass.), 本研究の遂行にあたり御指導、御鞭撻を賜った当研究所長木下祝郎博士に深謝します。

- (1) M. Fling, N. H. Horowitz: *J. Biol. Chem.*, **190**, 277 (1951).
- (2) S. Kinoshita, H. Samejima, K. Nakayama, T. Nara, C. Fujita: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 193 (1960).
- (3) 鮫島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎: 本誌, **34**, 750 (1960).
- (4) 鮫島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎: 本誌, **34**, 754 (1960).
- (5) 鮫島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎: 本誌, **34**, 824 (1960).
- (6) 鮫島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎: 本誌, **34**, 828 (1960).
- (7) 奈良 高, 鮫島広年, 藤田忠三, 木下祝郎: *Amino Acids*, 発酵と代謝, No. 4, 65 (1961).
- (8) B. D. Davis: *Nature*, **169**, 534 (1952).
- (9) 藤田忠三, 奈良 高, 鮫島広年, 木下祝郎: 本誌, **39**, 216 (1965).
- (10) K. Nakayama, H. Tanaka, H. Hagino, S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 611 (1966).
- (11) Y. Yugari, C. Gilvarg: *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 612 (1962).