Bacillus subtilis PCI 219 の胞子の発芽

機構に関する研究 (第3報)

アルカリ金属イオンならびにメチレン青の結合量と発芽との関係

村 上 八 郎

(宮崎大学農学部農学科)

昭和 46 年 5 月 10 日 受理

Studies on the Germination Mechanism of *Bacillus subtilis* PCI 219 Spores

Part III. Relation between the Germination and the Binding
of Alkaline Metals and Methylene Blue by the Spore

By Hachiro MURAKAMI

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture University of Miyazaki

The mechanism of stimulation of alkaline metals on the germination of the spore of *B. subtilis* PCI 219 induced by L-alanine was studied.

It was suggested that there were more than one binding site available to methylene blue (MB) on the spore and one of them (site I) was competed for binding with K^+ or Na^+ . Association constants for K^+ , Na^+ and MB to the site I were calculated as follows: $k_K=160$, $k_{Na}=300$ and $k_{MB}=5.4 \times 10^6$. Total number of the site I on a spore were found to be 2.6×10^7 .

In the absence of MB, the germination velocity was closely related to the amount of metal ions bound to the site I, but in the presence of MB the germination rate was affected by the amount of both cations and MB bound to the site I; the former stimulated the germination and the latter inhibited.

Results obtained showed that what was effective on the germination, was not intrinsic cations of the spore but bound cations from the external solution and suggested that the site I was negative group of the spore.

(Received May 10, 1971)

緒 言

Alderton ら^(1,2)によれば, 胞子はカーボキシル基をもった一種のイオン交換体である。そして Rode ら⁽³⁾は, アルカリ土類金属イオンと胞子との結合, およびそれが発芽に及ぼす効果について報告している。胞子へのカチオン結合が, 内層にまで溶質の透過を許すイオン交換樹脂の機能によるものか, あるいは表層における物理的なあるいは化学的な結合によるものかあきらかでない。またアルカリ金属イオンは, 著しい発芽促進効果をもっている⁽⁴⁾が, それがカルシウムイオンなどのように, 胞子と結合することによって発揮されるか否かもあきらかでない。

本報では, カリウムおよびナトリウムと胞子との結合をメチレン青との競合結合の形でとらえて検討し, さらにそれが発芽に及ぼす影響について報告する。

実験材料および方法

胞子の調製法 既報⁽⁴⁾に従って培養, 調製したが, 生育中に結合した exchangeable cation を除去するために H-spore 化^(5,14)したのち, 10 mg spore/ml の懸濁液として 4°C に貯蔵した。また使用に先立って, 脱イオン水 (以下の実験では, すべて脱イオン水を用いた) で 1 回洗浄した。

色素の選定および精製 メチレン青 (以下 MB と略称) は塩基性色素で, 溶液では陽イオンに解離し胞子

によく結合され、磷酸緩衝液中では強く発芽を阻害する⁽⁶⁾。それゆえ、アルカリ金属イオンと競合結合して、その発芽効果を阻害することが推測される。さらに未発芽胞子による生理的還元をうけない⁽⁶⁾。以上の理由によって、本報では MB を使用した。その精製は市販品 (Merck) を最初水で、ついで酒精溶液から再結した。

色素の結合量測定法 溶媒(水あるいは磷酸緩衝液)と MB 水溶液を混和したのち、胞子懸濁液を加えて(終濃度 0.2mg spore/ml) 速やかに分散させ、経時的にその一部をとり 3000rpm, 20 分間遠沈した上澄の色素濃度を 660m μ で吸光度を測定し、MB の標準曲線から非結合色素濃度を求め、初濃度との差から結合量を計算した。測定温度は、室温(13~18°C)であった。なお、使用した器具はすべてガラス製であったが、その吸着による誤差は無視しうるものであった。吸光度測定には、日立 101 分光光度計(セルは 10mm)を用いた。

カリウムおよびナトリウムの結合量の測定法 色素の場合と同様に、結合処理前後の懸濁液中の濃度の差から結合量を求めたが、懸濁液の胞子濃度は 5mg/ml とした。なお、定量には日立製、FPF 2 型焰光光度計を用いた。

結果および考察

I. MB の結合

i. 磷酸緩衝液の濃度と結合量 : ことなつた濃度の磷酸緩衝液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.17) 中での胞子の MB 結合量をみると (Fig. 1), 緩衝液の濃度が高くなるに従って結合量は低下した。MB の胞子への結合は、他の有機イオンの蛋白質への結合と同様に、胞子蛋白質の陰性基との結合が主体となっていると考えられる^(7a)。従って磷酸塩の阻害作用は、そのカチオンが MB と競合的に結合するためであろう⁽⁸⁻¹¹⁾。しかし高濃度の緩衝液中では、結合量がほぼ一定になることから、別の形態の結合があると推定される。

ii. 結合点 : $6.7 \times 10^{-3} \text{M}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.17, Na と K の合計濃度は $1.13 \times 10^{-3} \text{M}$) 中で胞子に結合する MB の量を測定した結果 (Table I) および

Fig. 1. Relation between Methylene Blue Binding by the Spore and the Concentration of Phosphate Buffer.

The binding reactions were carried out in various concentrations of phosphate buffer (pH 7.17) for 30 minutes at room temperature.

Concn. of dye : $12 \times 10^{-6} \text{M}$, Concn. of spore : 0.2 mg/ml.

$6.7 \times 10^{-3} \text{M}$ ならびに $2.9 \times 10^{-2} \text{M}$ の磷酸緩衝液中での測定値から、 $1/A$ および $1/r$ を求め両者の関係を Fig. 2 に示した。ここで A は結合処理液中の遊離 MB の濃度 (mole/l), r は結合した MB (mole/l)/胞子 (mole/l) とす

Table I. Binding of Methylene Blue by the Spore

Cation ^(a) $\times 10^{-3} \text{M}$	Methylene blue			Spore ^(b) $\times 10^{-13} \text{M}$	$1/r$ ^(c) $\times 10^{-6}$	$1/A$ ^(d) $\times 10^5$	k_b ^(e) $\times 10^5$
	Total $\times 10^{-6} \text{M}$	Free $\times 10^{-6} \text{M}$	Bound $\times 10^{-6} \text{M}$				
1.13	3.2	0.6	2.6	5	19.2	16.7	5.4
"	4.8	1.0	3.8	"	13.2	10.0	5.4
"	6.4	1.5	4.9	"	10.2	6.7	5.2
"	8.0	2.0	6.0	"	8.3	5.0	5.6
"	9.6	2.7	6.9	"	7.2	3.7	5.4
"	12.0	3.9	8.1	"	6.2	2.6	5.5
"	16.0	6.3	9.7	"	5.2	1.6	6.0
"	24.0	10.0	14.0	"	3.6	1.0	—
"	32.0	15.2	16.8	"	3.0	0.7	—
"	40.0	20.0	20.0	"	2.9	0.5	—

(a) : Cations of phosphate buffer, $\text{K}^+ : 2 \times 10^{-4} \text{M}$, $\text{Na}^+ : 9.3 \times 10^{-4} \text{M}$.

(b) : Assuming a spore cell to be a protein molecule, the spore concentration was calculated, $0.2 \text{ mg spore/ml} = 3 \times 10^{11} \text{ spore cells} / 6.023 \times 10^{23} (\text{M}) = 5 \times 10^{-13} (\text{M})$.

(c) : Spore (M)/bound methylene blue (M).

(d) : $1/\text{free methylene blue (M)}$.

(e) : Calculated from the equation, $r = nk_a A / (1 + k_a A + k_b B)$.

Fig. 2. Reciprocal Plot of Methylene Blue Binding by the Spore (I).

The binding reactions were carried out in $6.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ phosphate buffer for 30 minutes (curve I) and for 5 hours (curve II), in $6.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ for 30 minutes (curve III) and in $2.9 \times 10^{-3} \text{ M}$ for 30 minutes (curve IV).

Concn. of spore: 0.2 mg/ml .

る。ただし胞子の濃度は細胞 1 個を蛋白質 1 分子と同様に取り扱い、 $1 \text{ mg spore} = 1.5 \times 10^9 \text{ cell}$ として計算した。従って、 r は胞子細胞 1 個に結合する MB イオン、あるいは分子の平均数である。今胞子の結合点が隣りの結合点の影響を受けないとすれば、各点の MB に対する親和力は同一であるはずであり、(1) 式が成立する^(7b), 8)。

$$1/r = 1/nk_a A + 1/n \quad (1)$$

ただし n は胞子 1 個あたりの総結合点の平均数、 k_a は MB との結合定数とする。

Fig. 2 の直線部を外挿して得られる $1/A$ の切片は、 $1/n$ 、直線の勾配は $1/n \times k_a$ に相当する^(7c), 11)。ただし k_a は MB の見かけの結合定数とする。結合処理 30 分では、MB の低濃度域 ($3.2 - 12.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) では直線となりそれを外挿して $n = 2.6 \times 10^7$ 、 $k_a = 4 \times 10^6$ が得られた。すなわち、これら直線関係を与える結合は、MB にたいする親和力の等しい同種の結合点 (これらの結合点を site I と総称する) との間で成立している。しかし高濃度の MB では、 $1/r$ が直線の下方にそれているので、親和力のより低い site との結合が加わっていることが推定される^(11), 12)。結合処理 5 時間では、低濃度域でも直線関係が失われるので、第 2 の site との結合が生じて

いると考えられる。カチオン濃度 $1.13 \times 10^{-2} \text{ M}$ および $5.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ の磷酸緩衝液中では、低濃度の MB でも 30 分処理ですでに直線関係が失われた。

つぎに曲線 I, III および IV において、MB の低濃度域では磷酸緩衝液の濃度が高いほど r/A が小、すなわち MB にたいする結合容量が低いことが認められた。これは site I の一部が、カチオンによって占有されているためであると考えられる。従って Fig. 1 で述べた磷酸緩衝液のカチオンが MB と競合する site は、この site I であることになる。

II. カチオンの結合

アルカリ金属イオンが発芽を促進する⁽⁴⁾のは、それが胞子と結合する結果であるとの推測を確かめるために、次の実験を行なった。

i. K^+ および Na^+ の結合定数: 磷酸 1 カリ + 水酸化カリおよび磷酸 1 ナトリウム + 水酸化ナトリウム緩衝液 (いずれも pH 7.17, カチオン濃度: $3.75 \times 10^{-4} \text{ M}$ および $4.4 \times 10^{-4} \text{ M}$) 中で胞子と結合する K^+ および Na^+ の量を測定した結果 (Table II) によると、処理 30 分間では Na^+ の方が結合量は多かった。また K^+ の結合量は、処理時間の延長に従って増加した。

次に種々の濃度の MB を含む磷酸 1 カリ + 水酸化カリ緩衝液中で MB の結合量を測定して、 $1/r$ と $1/A$ の関係を求めたところ (Fig. 3), 処理 30 分までは直線となった。そしてその結合量は、処理 5 分間の場合に比較して

Table II. Binding of Potassium and Sodium^(a) by the Spore

Cation ^(b)	Treating period (min)	Concn. of cation		Moles bound by 1g spore	k ^(c)
		Starting $\times 10^{-3} \text{ M}$	Final $\times 10^{-3} \text{ M}$		
K	30	0.375	0.355	0.4	121
	60	0.375	0.345	0.6	252
	90	0.375	0.330	0.9	413
	180	0.375	0.320	1.1	537
Na	30	0.440	0.400	0.8	298

(a): After the spore (50mg) was suspended in the phosphate buffer^(b) (10ml) for indicated times at room temperature, the suspensions were centrifuged. The supernatant was assayed for the content of potassium or sodium.

(b): The suspension medium was composed of $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{KOH}$ or $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$ and regulated the pH value to 7.17.

(c): Association constant was calculated from the equation, $k = [\text{bound cation (mole/l)}] / [\text{free cation (mole/l)}] \times [\text{number of free binding sites (mole/l)}]$.

Fig. 3. Reciprocal Plot of Methylene Blue Binding by the Spore (II).

The reactions were carried out in KH_2PO_4 - KOH buffer for 5 minutes (curve I), 30 minutes (curve II) and 5 hours (curve III).

Concn. of spore: 0.2 mg/ml.

かなり増加したが、処理時間を5時間に延長してもその増加はわずかであり、さらに第2の site との結合が加わることが、曲線の形状から推定された。従って、処理時間30分で結合平衡に達したと近似的に見なしうると考えられるので、以下の実験では結合処理時間は30分とした。 K^+ および Na^+ の結合量も、site I にたいしては30分で平衡に達し、それ以後の増加は第2の site との結合⁽¹⁰⁾と見なした。Fig. 2と同様に、直線部を外挿して $n=3 \times 10^7$ が得られた。従って、次式によって K^+ 、 Na^+ の結合定数 k_K 、 k_{Na} が求められる。

$$k_K = [\text{結合した } \text{K}^+ (\text{mole/l})] /$$

$$[\text{遊離の } \text{K}^+] [\text{遊離状態の site}] \quad (2)$$

ただし、 $[\text{site}] = \text{孢子濃度} \times n / 6.023 \times 10^{23} \div 3.75 \times 10^{-4} \text{ mole/l}$ である。かくして $k_K \div 160$ 、 $k_{\text{Na}} \div 300$ が得られた。アルカリ金属が蛋白質に結合するという確実な証拠はないといわれた^(7d)が、Lewis ら⁽¹⁰⁾は筋肉ミオシンが K^+ および Na^+ と結合することを報告している。本実験の値は Lewis らの $k_K = 800 \pm 210$ 、 $k_{\text{Na}} = 1600 \pm 500$ に比して低かった。

以下に述べる実験は、主として pH 7.17 の磷酸緩衝液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) 中で行なわれたが、そのときの孢子にたいする K^+ と Na^+ の結合量は両者の合計量で

示し、その計算にあたっては k_K と k_{Na} の加重平均値 $270 \{ (120 \times 3 + 300 \times 14) / 17 \}$ を用いることとした。そして Na^+ と K^+ を総称して、カチオンとして記述することとした。

ii. カチオンの結合量と発芽：種々の濃度の磷酸緩衝液中に30分間孢子を懸濁して、カチオン結合処理を行なった。このときの結合量は、競合する他のカチオンが存在しないので、次式によって計算される。

$$S = [\text{結合したカチオン (mole/l)}]$$

$$[\text{孢子 (mole/l)}] = nk_b B / (1 + k_b B)$$

ここで、 k_b はカチオンと孢子の site I との結合定数とし、 B は遊離のカチオン濃度であるが、近似的に初濃度を用いた。処理が終了のち、 $9 \times 10^{-8} \text{ M}$ になるように L-アラニン結晶を加えて溶解させたのち、 37°C に incubate し、10~15分ごとに懸濁液の O. D. (600 mμ) を測定し、その値が始発時の 1/2 にまで低下するに要する時間 (t) をグラフによって求めた。結果を Fig. 4 に示したが、 S の増加はカチオンの低濃度域では直線的であるが、高濃度域では増加速度は低下し、曲線は結合容

Fig. 4. Relation between Cation Binding by the Spore and the Germination Velocity.

After the binding reactions were carried out in various concentrations of phosphate buffer (pH 7.17) for 30 minutes at room temperature, aliquots of the suspensions were fortified with L-alanine and then incubated at 37°C . The incubating suspensions were measured for the O. D. (600 mμ) at intervals of 10 or 15 minutes and the times required for the 50 per cent reduction in O. D. were determined graphically.

—●— S (bound cation, calculated),

—×— $1/t$ (t : time required for the 50 per cent reduction in O. D.).

量 (2.6×10^7) に収束する。次に $1/t$ の変化をみると, S と同様の曲線をえがき, S が 2.4×10^7 以上の胞子では一定値を示した。これらの結果から, 胞子の発芽初速度は, 懸濁液のカチオン濃度の影響をうけるとするよりも, 胞子のカチオン結合量に支配されるとする方が, より適確な表現であると考えられる。

次に, カチオン結合量と発芽率 (dark spore の生成率) との関係を, 低濃度域のカチオン溶液でしらべた結果 (Fig. 5) によると, S が 2.06×10^7 まではその増加に応じて発芽速度が増大し, また S が 1.13×10^7 までは 2 時間以内にほとんど完全に発芽したが, それ以下では 4 時間後でも発芽は不完全であった。しかし, さらに 12 時間の incubation により完全に発芽した。次にカチオンが全く存在しないときは, dark spore の生成はほとんど認められなかった。胞子は多量のカルシウムを含んでいるが^(5,14), 上記の結果は発芽に有効な作用をするのは懸濁液中のカチオンであって, 体内のカチオンは発芽を促進する作用をもたないと推定される。そして胞子の heterogeneity⁽¹³⁾ は, カチオンの結合においても考えられるところで, 低濃度カチオンの懸濁液中でも一部の胞子は発芽し, その発芽によって溶離したカルシウムなどのカチオンが, 未発芽胞子の発芽を促進するものと考えられる。

Fig. 5. Relation between Cation Binding by the Spore and the Germination Rate.

The spore was treated similarly as in Fig. 4 and after 1~4 hours incubation, per cent of germination (dark spores per cent) was determined. Figures represented the number of cations (S) bound by the spore.

III. MB とカチオンの競合的結合と発芽との関係

i. 結合量の計算: 種々の濃度の MB を含む磷酸緩衝液 (pH 7.17, カチオン濃度は $1.13 \times 10^{-3} M$, $1.13 \times 10^{-2} M$ および $5.0 \times 10^{-2} M$) 中での MB 結合量を測定し, それから計算した site I との MB およびカチオンの結合量を Fig. 6 A~6 C に示した。計算式は次のとおりである^(8,10)。

$$r = [\text{結合 MB}] / [\text{胞子}] = nk_a A / (1 + k_a A + k_b B) \quad (3)$$

$$S = [\text{結合カチオン}] / [\text{胞子}] = nk_b B / (1 + k_a A + k_b B) \quad (4)$$

ここで $k'_a (= 4 \times 10^5)$ の代りに k_a を用いたが, その理由は次のとおりである。すなわち k'_a は次式 (5) を満足させるもので, 競合するカチオンの影響が考慮されていない。

$$r = nk'_a A / (1 + k'_a A) \quad (5)$$

そこで, Table I における測定値 A および r , ならびにそれからグラフ的に求められた $n (= 2.6 \times 10^7)$, および II の i の k_b の値を式 (3) に代入して, k_a の平均値として $(5.4 \pm 0.2) \times 10^5$ が求められた (ただし MB の初濃度 $16 \times 10^{-6} M$ 以上に対する計算値は除外した)。この値は低濃度域の MB の結合が, 競合結合を示す式 (3) によく適合することを示すもので, 事実 $k_a = 5.4 \times 10^5$ として計算した結合量と実測値とが, きわめてよく一致した (Fig. 6 A)。また MB 初濃度が $16 \times 10^{-6} M$ 以上になると, 式 (6)⁽¹⁰⁾ に従って他の種類の site との結合量がいちじるしくあらわれてくる。

$$r = r_1 + r_2 = k_{a1} A n_1 / (1 + k_{a1} A + k_{b1} B) + k_{a2} A n_2 / (1 + k_{a2} A + k_{b2} B) \quad (6)$$

ただし各記号は, site I と第 2 の site にたいする定数とする。Fig. 6 B および 6 C ではカチオンの濃度が高いので, site I にたいするカチオンの結合量が大となり, 反対に MB の結合量は減少する。その結果, MB は低濃度でも site I 以外の site と結合することになる。

上記の結合処理 30 分後の懸濁液に, $9 \times 10^{-3} M$ になるように L-アラニン結晶を加え, $40^\circ C$ に 2 時間 incubate したときの発芽率 (dark spore 生成率) を測定した。カチオン濃度 $1.13 \times 10^{-3} M$ の磷酸緩衝液中 (Fig. 6 A) では, カチオンの結合量は少なく, 発芽率は MB の結合量に強く支配されることが認められた。カチオン濃度が高いと (Fig. 6 B, 6 C) カチオンの結合量が多くなり, 発芽に対して強く影響することがみられた。また MB の阻害作用は, site I にたいする結合によっておこること

Fig. 6. Relation between the Germination and Binding of Methylene Blue and Cations by the Spore.

Reaction systems were consisted of phosphate buffer containing various concentrations of methylene blue and 0.2 mg spore per ml. The bound methylene blue and the germination were determined similarly as in Table I and Fig. 5.

Concentration of phosphate buffer: 6.7×10^{-4} M (Fig. 6 A), 6.7×10^{-3} M (Fig. 6 B), and 2.9×10^{-2} M (Fig. 6 C).

—○— methylene blue bound by site I,
—●— total bound methylene blue,
—×— cation bound (calculated),
—△— germination (%).

は、始発濃度 40×10^{-6} M における全結合量はほぼ等しいにもかかわらず、発芽率の相違が大きいことから推定される。

次にカチオンの結合点は、site I 以外にはないかという問題が残る。tris (hydroxymethyl) aminomethane などの有機塩基も、カチオンと同様な発芽誘起効果をもつこと⁽⁴⁾は、これら陽イオンに共通な形の結合によって、その効果が発揮されるとするのが妥当であろう。K⁺ は筋肉ミオシンとの結合で、 $-\text{COO}^- \cdots \text{H}_3^+ \text{N}^- + \text{K}^+ = -\text{COO}^- \cdots \text{K}^+ \cdots \text{H}_2\text{N}^- + \text{H}^+$ なる結合、すなわち水素結合の位置をキレート結合で H⁺ と競合する形が推測され⁽¹⁰⁾、また高分子の有機イオンでは、ファンデルワールス力による結合も生ずるであろう。しかし、これらのイオンに共通した結合は、胞子の陰性基との間の静電的結合である。それゆえ、陽イオンの発芽にたいする促進効果は、

site I への静電的結合によって、発現するものと考えられる。

摘 要

細菌胞子の L-アラニンによる発芽を促進するアルカリ金属の作用機構をあきらかにするために、胞子への結合量と発芽との関係をしらべた。磷酸緩衝液中でメチレン青 (MB) の胞子への結合状態から、胞子の結合点には少なくとも 2 種あることが推定せられ、そのうち MB の結合にたいして K⁺ および Na⁺ が競合する結合点 (site I) について検討した。site I と K⁺, Na⁺ および MB との結合定数として 160, 300 および 5.4×10^5 、胞子 1 個あたりの結合点数として 2.6×10^7 が得られた。K⁺ および Na⁺ の結合量と発芽速度の間には、密接な関連が見出された。また、発芽を強く阻害する MB の存在下での

発芽をみると, カチオン結合による促進作用が, MB の結合量に応じた阻害をうけることがわかった. これらの事実, 胞子の L-アラニンによる発芽を促進するものは, 外部から結合したカチオンであり, 細胞内に含まれる Ca などは効果がないことを示している. そして, その結合点は胞子の陰性基であって, カチオンはそれと静電的な結合をすることが推定された.

終りに臨み, 有益な御助言をいただいた本学教授中津誠一郎博士, およびアルカリ金属の一部を定量していただいた本学教授斎藤文次博士に感謝いたします.

-
- (1) G. Alderton and N. Snell : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 139 (1963).
 - (2) G. Alderton and P. T. Thompson : *Science*, **143**, 141 (1964).
 - (3) L. J. Rode and J. W. Foster : *J. Bacteriol.*, **91**, 1333 (1966).
 - (4) 村上八郎 : 農化, **44**, 539 (1970).
 - (5) L. J. Rode and J. W. Foster : *J. Bacteriol.*, **91**, 1589 (1966).
 - (6) 村上八郎 : 宮大農報, **18**, 121 (1971).
 - (7a) I. M. Klotz : 蛋白質化学 (4), 水島三一郎, 赤堀四郎編, 共立出版, 1956, p. 46.
 - (7b) *idem* : 同上, 1956, p. 28.
 - (7c) *idem* : 同上, 1956, p. 30.
 - (7d) *idem* : 同上, 1956, p. 48.
 - (8) I. M. Klotz, H. Triwush and F. M. Walker : *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2935 (1948).
 - (9) F. Karush : *ibid.*, **72**, 2714 (1950).
 - (10) S. Lewis and H. A. Saroff : *ibid.*, **79**, 2112 (1957).
 - (11) A. Ray, J. A. Reynolds, H. Polet and J. Steinhardt : *Biochem.*, **5**, 2606 (1966).
 - (12) G. Scatchard, J. S. Coleman and A. L. Shen : *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 12 (1957).
 - (13) J. C. Vary and N. G. McCormick : "Spores," III, ed. by L. L. Campbell and H. O. Halvorson, American Society for Microbiology, 1965, p. 188.
 - (14) L. J. Rode and J. W. Foster : *J. Bacteriol.*, **91**, 1582 (1966).
-