Corynebacterium glutamicum のリジン要求株 M-14 による L-イソロイシン生成と若干の前駆物質およびアミノ酸の効果

萩野浩志, 加瀬 広, 中山 清
(協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 48 年 11 月 2 日 受 理

L-Isoleucine Production by a Lysine Auxotroph of *Corynebacterium glutamicum* and
the Effect of Some Precursor Substances and Amino Acids on the Production

By Hiroshi HAGINO, Hiroshi KASE and Kiyoshi NAKAYAMA

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

An L-lysine auxotrophic mutant of *Corynebacterium glutamicum* M-14 was found to produce L-isoleucine at a low concentration of L-lysine. The optimum concentration of L-lysine for L-isoleucine accumulation was 10~20 $\mu\text{g/ml}$ and 2.0 mg/ml of L-isoleucine was produced in a synthetic medium containing glucose (10%) as a carbon source. L-Homoserine and L-aspartic acid increased L-isoleucine production in the medium containing L-lysine at the concentration (100 $\mu\text{g/ml}$ as monohydrochloride) inhibitory to *de novo* production of L-isoleucine. Addition of L-methionine or L-threonine decreased L-isoleucine production remarkably in the medium containing L-lysine at the concentration optimal for *de novo* production of L-isoleucine (10 $\mu\text{g/ml}$ as monohydrochloride). α -Aminobutyric acid and α -hydroxybutyric acid increased the L-isoleucine production significantly and 6.2 mg/ml of L-isoleucine was produced when 10 mg/ml of α -hydroxybutyric acid was supplemented to the medium.

The effect of α -aminobutyric acid and α -hydroxybutyric acid on the increase of L-isoleucine production was noted also in some hydrocarbon utilizing microorganisms.

(Received November 2, 1973)

緒 言

発酵法による L-イソロイシンの生成については DL- α -アミノ酪酸⁽¹⁻¹¹⁾, D-スレオニン⁽¹²⁻¹⁷⁾等の前駆物質を添加する方法が, 種々の微生物で研究されてきた。一方, 最近ではグルコースからの直接発酵が *Brevibacterium flavum*⁽¹⁸⁾, および *Serratia marcescens*⁽¹⁶⁾ のアナログ抵抗性変異株で報告されている。

先に著者らは種々の微生物よりリジン要求株を分離し, その変異株が α , ϵ -ジアミノピメリン酸を蓄積することを報告⁽¹⁹⁾した。その菌株のなかで, *Corynebacterium glutamicum* のリジン要求性の一菌株が, 著量の L-イソロイシンを生成蓄積することを併せて報告した。そこで, この菌株の L-イソロイシン蓄積を調べたところ, 要求物質である L-リジンを適量添加することが必要で

あることが認められ, さらに L-イソロイシンの生合成に関連するアミノ酸, 前駆物質の添加による L-イソロイシンの蓄積量は L-リジン濃度に強く影響をうけることがみいだされた。さらに関連して *C. glutamicum* の若干の他の栄養要求株, および炭化水素資化性菌の L-イソロイシン生成についても調べた。本報では, これらの結果につき報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株 実験に用いた菌株は, *C. glutamicum* ATCC 13032 株から N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる変異処理により誘導されたリジン要求性株 M-14 である。他に *C. glutamicum* のメチオニン, リジン二重要求性株, ロイシン要求性株, ロイシン, リジン二重要求性株, さらに炭化水素資化性菌を

Table I. Composition of Media

I. Seed medium	
Medium A (g/liter);	glucose 20, yeast extract 10, peptone 10, NaCl 2.5 (pH 7.2)
Medium B (g/liter);	sorbitol 20, yeast extract 10, peptone 10, meat extract 10, NaCl 2.5 (pH 7.2)
II. Fermentation medium	
Medium A (g/liter);	glucose 100, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, biotin 30 μg , CaCO_3 20 (pH 7.2)
Medium B (g/liter);	Df 700 oil* 100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, KH_2PO_4 2, Na_2HPO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, yeast extract 3, thiamine hydrochloride 1 mg, CaCO_3 20 (pH 7.2)
Medium C (g/liter);	Df 700 oil* 100, NH_4NO_3 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, Na_2HPO_4 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, H_3BO_3 0.6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, $\text{CuCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg, nonion OT 221** 0.1, corn steep liquor 1 (pH 7.2)

* n-alkane mixture ($\text{C}_{11} \sim \text{C}_{14}$) (sterilized separately),

** trade name of a detergent (polyoxyethylene sorbitan monooleate).

用いたが、それらの菌株は本文中に示した。

2. 培地組成および培養方法 使用した培地の組成は Table I に示したが、*C. glutamicum* の培養には種培養培地 A、発酵培地 A を用い、炭化水素資化菌の培養には種培養培地 B、発酵培地 B (細菌、酵母)、または発酵培地 C (放線菌) を用いた。なお使用した培養基、培地液量については種培養培地 A、B は 30 ml の培地を含む 250 ml Erlenmeyer フラスコ、発酵培地 A は 20 ml の培地を含む 250 ml Erlenmeyer フラスコ、発酵培地 B、C は 10 ml の培地を含む太型試験管 (250×19 mm) を使用した。培養方法は、寒天斜面上に生育した菌を 1 白金耳かきとり、種培養培地に植菌し、30℃、24 時間培養した種培養を 10% 量 (v/v) 発酵培地に植菌し、30℃ で 96 時間培養した。なお寒天斜面培地は細菌、酵母、放線菌によって、それぞれ bouillon 培地、麴汁培地、Bennet 氏培地を使用した。

3. 分析方法 L-イソロイシンの定量は n-ブタノール、酢酸、水 (4:1:2, v/v) の溶媒で展開したペーパークロマトグラムから L-イソロイシン相当のニンヒドリン発色スポットを切抜き、メタノール-硝酸銅溶液で抽出し、506 mμ の吸光度値から定量した。なお用いたペーパークロマトグラムではイソロイシンとロイシンの Rf 値は同一であり、イソロイシン、ロイシンの分別

定量はできない。しかし、*C. glutamicum* M-14 の一部の発酵液についてはアミノ酸自動分析計で分析したところ、ロイシンは微量であって、アミノ酸自動分析計での L-イソロイシンの定量値はペーパークロマトグラムからの定量値とほぼ一致した。従って L-イソロイシンの定量は、ペーパークロマトグラフィー法で実施することに問題はないものと考えられた。なお、ロイシン添加時の L-イソロイシンの定量には、アミノ酸自動分析計を用いた。他の菌については L-イソロイシン生合成前駆物質および関連物質の添加時のみ、イソロイシン Rf 区分にニンヒドリン発色スポットを生成するため、この定量におけるロイシンの妨害はないものと考えられた。またイソロイシンが L 型であることは、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 によるバイオアッセイの結果とニンヒドリン法の結果の比較から確認された。

実験結果および考察

1. *C. glutamicum* 変異株による L-イソロイシン蓄積

(1) *C. glutamicum* M-14 の L-イソロイシン蓄積と L-リジン濃度: *C. glutamicum* のリジン要求変異株による L-イソロイシンの蓄積については、先に報告⁽¹⁹⁾した。栄養要求性変異株、特にリジン要求性株による L-イソロイシンの蓄積については、他の微生物での報告はない。栄養要求性変異株による発酵生産物の蓄積にお

Fig. 1. Effect of L-Lysine Concentration on the Growth and L-Isoleucine Production by *C. glutamicum* M-14.

—●— L-isoleucine, ---●--- growth.

Fermentation was carried out in the medium A supplemented with L-lysine (as monohydrochloride) at different concentrations.

いては、一般に要求物質の濃度がその蓄積量に影響を及ぼす例が多い。そこで、*C. glutamicum* M-14 の L-イソロイシン蓄積と L-リジン濃度との関係を合成培地で調べた。結果は Fig. 1 に示したように、L-イソロイシンの蓄積は L-リジン（一塩酸塩として）10~20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で最大となり、その蓄積量は 2.0 mg/ml であった。L-イソロイシンの生成は L-リジン濃度が高くなると減少し、L-リジン濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ （一塩酸塩として）では L-イソロイシンの生成は 0.2 mg/ml であった。このことは、*C. glutamicum* のアスパラギン酸系アミノ酸合成の最初の反応であるアスパラギン酸のリン酸化反応が、L-スレオニンと L-リジンの共存下で共制的に阻害されることが知られており⁽²⁰⁾、L-リジンの低濃度下では L-イソロイシンは aspartokinase の制御がはずれた結果、L-スレオニンを経て過剰に生成されるものと考えられる。なお図中にみられるように、この菌株は L-リジン無添加の場合もかなりの生育が認められた。しかしこの菌株は、最小寒天培地では全く生育が認められないが、L-リジンの添加で初めて生育することを認めていることから、leaky 的な要求性株とは考えられず、L-リジン無添加での生育は種培養培地から持ち込まれた L-リジンによるものと考えられる。

(2) 他の栄養要求性変異株による L-イソロイシン蓄積：大腸菌の L-イソロイシンの生合成は、L-イソロイシン自身による L-threonine dehydratase のフィードバック阻害⁽²¹⁾、L-バリンによる acetohydroxy acid synthetase の阻害⁽²²⁾、および L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシンによる抑制⁽²³⁾により制御されていることが報告されている。*C. glutamicum* の L-イソロイシン生合成については完全には研究がなされていないが、aspartokinase は L-リジンと L-スレオニンにより阻害され、L-メチオニンにより抑制されていることが報告⁽²⁴⁾されている。そこでこれらの知見から、L-イソロイシンの蓄積に有利と考えられるロイシン要求株、ロイシン、リジン二重要求株、メチオニン、リジン二重要求株の 8 株の変異株について、L-イソロイシンの蓄積を要求物質 0~200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度を含む合成培地を用い調べた。その結果、各菌株の最大 L-イソロイシン蓄積量を Table II に示したが、その生成量はロイシン要求株で 1 mg/ml 程度であって、メチオニン、リジン二重要求株、ロイシン、リジン二重要求株でそれぞれ 1 mg/ml 以下であった。

Table II. L-Isoleucine Accumulation by Some Auxotrophs of *C. glutamicum*

Strains	Auxotrophy	Maximum L-isoleucine produced (mg/ml)
<i>C. glutamicum</i>		
KY 9119	leucine	1.0
KY 9129	leucine	0.8~1.0
KY 9131	leucine	1.0
KY 9137	leucine	trace
KY 9150	leucine	trace
KY 9507	leucine, methionine	0.65
MMD 330	methionine, lysine	0.5
MMD 339	methionine, lysine	0.5

Fermentation was carried out in the medium A supplemented with L-leucine, L-methionine and L-leucine, or L-methionine and L-lysine at a concentration of 0 to 200 $\mu\text{g/ml}$.

(3) 関連アミノ酸の添加と L-イソロイシン蓄積：アスパラギン酸族のアミノ酸、およびロイシン、バリンなど L-イソロイシン生合成に関連のあるアミノ酸類のリジン要求株 M-14 の L-イソロイシン蓄積に及ぼす影響について、L-イソロイシン蓄積に至適な L-リジン濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 、および L-イソロイシン蓄積に不適な L-リジン濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ の 2 段階の条件の培地で比較検討

Fig. 2. Effect of Some Amino Acids Related to L-Isoleucine Biosynthesis on L-Isoleucine Production by *C. glutamicum* M-14.

Fermentation was carried out in the medium A supplemented with L-lysine (10 $\mu\text{g/ml}$ or 100 $\mu\text{g/ml}$) and amino acids described in the figure.

した。その結果は Fig. 2 に示したごとく、培地中の L-リジン濃度によって添加アミノ酸の L-イソロイシン蓄積への影響の差が認められた。すなわち、L-リジン濃度 100 μ g/ml では L-アスパラギン酸、L-ホモセリン、L-スレオニン、D-スレオニンの添加により L-イソロイシンの生成が増加することが認められ、特に L-ホモセリンの添加効果は顕著であった。それに対して L-リジン濃度 10 μ g/ml の場合には、これらのアミノ酸の効果はほとんど認められなかった。さらに L-メチオニン、L-スレオニンは L-リジン 10 μ g/ml の濃度で L-イソロイシンの蓄積を顕著に阻害したが、L-リジン濃度 100 μ g/ml の場合は特に強い阻害効果は認められなかった。このことは L-リジン 10 μ g/ml の培養では、aspartokinase の阻害が解除されているために、L-イソロイシン前駆体であるアスパラギン酸系アミノ酸の *de novo* 合成が促進される結果、先に述べた homoserine dehydrogenase の阻害、抑制に起因すると考えられる L-スレオニン、L-メチオニンによる L-イソロイシン生成阻害が顕著にみられるものと考えられる。L-リジン高濃度 100 μ g/ml の培養では aspartokinase の活性が阻害され、アスパラギン酸系アミノ酸の *de novo* 合成が抑えられ、上記添加アミノ酸を前駆体とした salvage 合成により、L-イソロイシンが生成するものと考えられる。従って L-スレオニン、L-メチオニンの阻害作用も顕著でないものと考えられる。なお L-イソロイシンの添加の場合は、添加した L-イソロイシンを含む培養液中の L-イソロイシンの全量を示したが、L-リジン濃度 10 μ g/ml の場合は、L-イソロイシンの添加は L-イソロイシンの生成を減少させることが認められた。一方、L-リジン濃度 100 μ g/ml 添加の場合、L-イソロイシン 5mg/ml の添加では加えた L-イソロイシンの減少も認められたが、L-イソロイシン 1mg/ml の添加のときは、新たな生成による L-イソロイシン量の増加が認められるという相違した結果が得られたが、その原因については追究していない。

さらに L-アスパラギン酸を添加した場合に、L-リジン濃度のいかんによらずに著量の L-バリンの蓄積が認められた。この L-バリンの蓄積は、L-リジン 100 μ g/ml 濃度の培養の方が L-リジン 10 μ g/ml の培養より多量であった (5.3mg/ml)。

DL- α -アミノ酪酸の添加により、L-イソロイシンが著量生成する現象が種々の細菌で認められており⁽¹¹⁻¹³⁾、*C. glutamicum* でも同様な現象が認められている。*C.*

Fig. 3. Effect of DL- α -Aminobutyric Acid and Some Amino Acids Related to L-Isoleucine Biosynthesis on L-Isoleucine Production by *C. glutamicum* M-14.

Fermentation was carried out in the medium A supplemented with L-lysine (10 μ g/ml or 100 μ g/ml) and DL- α -aminobutyric acid (10mg/ml) and amino acids described in the figure.

glutamicum M-14 では、L-リジン濃度によって L-イソロイシン生成に及ぼす関連アミノ酸の添加効果が異なるという興味ある現象が認められたので、さらに DL- α -アミノ酪酸添加条件下 (10mg/ml) で、上記アミノ酸添加と L-リジン濃度の L-イソロイシン生成に及ぼす影響を調べた。結果は Fig. 3 に示したが、アミノ酸を添加しない場合には L-イソロイシン生成量の L-リジン濃度による顕著な差は認められなかった。しかしながら、 α -アミノ酪酸無添加の場合と同様に、L-リジン濃度 100 μ g/ml の場合に L-ホモセリン、L-スレオニン、D-スレオニン、L-アスパラギン酸の添加効果が顕著に認められたが、L-リジン濃度 10 μ g/ml の場合は、その効果はほとんど認められなかった。最も著しい効果の認められた L-ホモセリンの場合は、5mg/ml 濃度の添加で 5.3mg/ml の L-イソロイシンの生成を認めた (対照、L-ホモセリン無添加の培養での L-イソロイシンの生成 3.2mg/ml)。L-メチオニン添加による L-イソロイシン生成の阻害は、 α -アミノ酪酸無添加の場合に比較して強くはないが、L-リジン 10 μ g/ml 濃度で認められた。なお L-スレオニンによる L-イソロイシン生成の阻害は、いず

れのリジン濃度においてもほとんど認められなかった。L-イソロイシン添加の L-イソロイシン生成に及ぼす影響は、1mg/ml 濃度の添加ではほとんど認められないが、5mg/ml 濃度の添加では L-イソロイシンの生成を減少させた。

さらに L-アスパラギン酸添加による L-バリンの蓄積も、DL- α -アミノ酪酸添加の場合も同様に顕著に認められ、L-リジン濃度 100 μ g/ml の場合に特に多く、その生成量は 5mg/ml に達した。

以上のごとく、L-イソロイシン生成の前駆物質の添加によってその前駆物質を著量消費し、L-イソロイシンの生成が顕著に増加するという現象は、M-14 の親株である *C. glutamicum* ATCC 13032 株では認められず、M-14 に特徴的に認められる現象であるが、特に L-イソロイシン生成に及ぼす前駆物質および関連アミノ酸の効果が、要求物質である L-リジン濃度によって影響されるという事実はその機構の面から興味深い。

(4) α -ハイドロキシ酪酸、 β -メチルアスパラギン酸の添加： α -ハイドロキシ酪酸からの L-イソロイシン生成は、多くの細菌で報告⁽²⁵⁾ されている。また大腸菌では、 β -メチルアスパラギン酸からの L-イソロイシンの生成も報告⁽²⁶⁾ されており、 β -メチルアスパラギン酸を経る L-イソロイシン生成経路の可能性も考えられている。そこで、*C. glutamicum* M-14 におけるこれらの化合物の L-イソロイシン生成に及ぼす添加効果を調

Table III. Effect of α -Hydroxybutyric Acid and β -Methylaspartic Acid on L-Isoleucine Production by *C. glutamicum* M-14

Addition	Concentration (mg/ml)	L-Isoleucine (mg/ml)
α -Hydroxybutyric acid	10	6.20
	5	3.80
β -Methylaspartic acid	10	1.50
	5	1.35
None	—	1.10

Fermentation was carried out in the medium A supplemented with L-lysine at a concentration of 20 μ g/ml.

べた。結果は Table III に示したように、 α -ハイドロキシ酪酸 10mg/ml 濃度の添加で 6.2mg/ml、5mg/ml 濃度の添加で 3.8mg/ml の L-イソロイシンの蓄積が認められた。また β -メチルアスパラギン酸の添加によっても、若干の L-イソロイシン蓄積の増加が認められた。このことは *C. glutamicum* においても、L-イソロイシン生成に β -メチルアスパラギン酸を経る経路も存在することを示しているのかもしれない。

2. 炭化水素資化性微生物による L-イソロイシン蓄積

Table IV に示した炭化水素資化能を有する細菌、酵母放線菌の 12、菌種について L-スレオニン、D-スレオニン、L-ホモセリン、DL- α -アミノ酪酸、 α -ハイドロキ

Table IV. L-Isoleucine Production by Hydrocarbon Utilizing Microorganisms

Strains	Addition	L-Isoleucine (mg/ml)						
		D-Thr	L-Thr	L-Hser	HBA*	α -AB**	α -AB*** ^{a)} + L-Asp	α -AB*** ^{a)} + fumarate
<i>Arthrobacter hydrocarboglutamicus</i> ATCC 15583		0.20	0.25	0.85	t	1.00	0.95	0.45
<i>A. simplex</i> KY 3151		t***	t	t	t	0.05	0.10	0.10
<i>Micrococcus paraffinolyticus</i> ATCC 15582		0.35	0.45	1.50	0.50	1.55	1.50	2.15
<i>M. paraffineus</i> KY 4307		t	t	0.75	0.25	0.95	1.70	1.55
<i>Brevibacterium ketoglutamicum</i> KY 4304		t	0.20	t	t	t	t	t
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i> ATCC 15592		0.40	0.30	1.20	0.75	1.50	1.65	1.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8501		t	t	t	t	0.10	0.15	0.50
<i>P. rendrelli</i> KY 4020		0.05	0.10	t	t	t	0.15	0.55
<i>Candida lipolytica</i> KY 5034		t	t	t	t	0.10	1.0	0.10
<i>C. tropicalis</i> IAM 4924		t	t	0.45	t	0.40	t	0.55
<i>Nocardia globerula</i> ATCC 21022		t	t	0.10	0.30	0.20	0.25	0.15
<i>Streptomyces antibioticus</i> KY 615		t	t	t	t	t	0.30	t

Fermentation was carried out in the medium B for bacteria and the medium C for yeast and actinomycetes. The medium contained one of the compounds listed in the table at the concentration of 10 mg/ml.

* HBA: α -hydroxybutyric acid, ** α -AB: DL- α -aminobutyric acid, *** t: trace,

^{a)} α -AB was added at the final concentration of 10 mg/ml.

シ酪酸の添加による L-イソロイシンの生成につき、炭化水素を炭素源とする培地で検討した。結果は Table IV に示したが、これらの化合物の無添加の場合には、L-イソロイシンの生成はほとんど認められなかったのに対し、添加した場合は試験した多くの菌株で L-イソロイシンの蓄積が認められた。なかでも最も普遍的に効果の認められた化合物は DL- α -アミノ酪酸であって、L-イソロイシンの生成量も最も多かった。DL- α -アミノ酪酸にさらに加えて L-アスパラギン酸、フマル酸を添加することにより、L-イソロイシンの蓄積量の増加も認められた。L-ホモセリン、L-スレオニン、D-スレオニンの添加によって、L-イソロイシンの生成蓄積した菌株もそれぞれ数株認められた。

要 約

Corynebacterium glutamicum のリジン要求株 M-14 を用いて、L-イソロイシンの生成蓄積につき調べた。この菌株の L-イソロイシンの生成は、要求物質である L-リジンの濃度に依存し、L-リジン高濃度の存在ではその生成は阻害され、低濃度 (10~20 $\mu\text{g/ml}$) の存在で最大となった。その生成量は、合成培地で 2.0mg/ml 程度であった。L-イソロイシン生合成経路に関連した諸アミノ酸添加の L-イソロイシン生成への影響をみたところこれらのアミノ酸の添加効果は培地中の L-リジンの濃度によって影響された。すなわち、L-イソロイシン蓄積に不適当な L-リジン濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ での培養では、L-ホモセリン、L-アスパラギン酸、L-スレオニンの添加によって L-イソロイシン生成の増加が認められた。L-リジン濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ での培養では L-メチオニン、L-スレオニンによる L-イソロイシン蓄積の阻害が認められた。L-リジン濃度のいずれでも顕著であったことは、L-アスパラギン酸を添加した場合、L-アスパラギン酸の消費とともに L-バリンの蓄積が認められたことである。DL- α -アミノ酪酸および α -ヒドロキシ酪酸の添加は、L-イソロイシン生成を顕著に増加し、 α -ヒドロキシ酪酸 10mg/ml 添加の場合、6.2mg/ml の L-イソロイシンが生成した。DL- α -アミノ酪酸の添加時に各アミノ酸の添加効果を調べたが、上の場合と同様の結果を得た。 α -メチルアスパラギン酸添加による L-イソロイシン生成の増加も認められた。炭化水素資化性細菌、酵

母、放線菌の L-イソロイシン生成についても、 α -アミノ酪酸、 α -ヒドロキシ酪酸添加の効果が認められた。

- (1) I. Chibata, M. Kisumi and M. Ashikaga: *Biotechnol. Bioeng.*, **2**, 361 (1960).
- (2) 林喜久子, 渡辺 泰, 藤井義紹, 志村憲助: *Amino Acid 醱酵と代謝*, **1**, 89 (1959).
- (3) 志村憲助, 斎藤 薫: 同上, **2**, 97 (1960).
- (4) 林部正也, 伊藤昌雄, 渡辺敏彦, 植村定治郎: 同上, **2**, 100 (1960).
- (5) 志村憲助, 斎藤 薫: 同上, **3**, 101 (1961).
- (6) 林部正也, 植村定治郎: 同上, **3**, 108 (1961).
- (7) M. Hayashibe and T. Uemura: *Nature*, **191**, 1417 (1960).
- (8) M. Hayashibe and T. Watanabe: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 82 (1962).
- (9) 林部正也, 杉橋孝夫, 佐伯敬道, 荒川和也: *農化*, **36**, 437 (1962).
- (10) T. Nara, H. Samejima and S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 120 (1964).
- (11) 大多和重勝, 大島正志, 神田信夫, 浅野和夫: *Amino Acid & Nucleic Acid 醱酵と代謝*, **13**, 70 (1966).
- (12) M. Kizumi: *J. Biochem.*, **52**, 390 (1962).
- (13) M. Kizumi, Y. Ashikaga, J. Kato and I. Chibata: *ibid.*, **52**, 400 (1962).
- (14) M. Kizumi, J. Kato and I. Chibata: *J. Biochem.*, **56**, 450 (1964).
- (15) M. Kizumi, J. Kato, S. Komatsubara and I. Chibata: *Appl. Microbiol.*, **21**, 569 (1970).
- (16) M. Kizumi, S. Komatsubara and I. Chibata: *J. Bacteriol.*, **72**, 1065 (1972).
- (17) 志田俊郎, 藤井義紹, 植村定治郎: *Amino Acid 醱酵と代謝*, **7**, 16 (1963).
- (18) I. Shiio, A. Sasaki, S. Nakamori and K. Sano: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2053 (1973).
- (19) 加瀬 広, 中山 清: *農化*, **44**, 457 (1970).
- (20) K. Nakayama, H. Tanaka, H. Hagino and S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 611 (1966).
- (21) H.E. Umbarger and B.B. Brown: *J. Biol. Chem.*, **233**, 415 (1958).
- (22) *idem*: *ibid.*, **233**, 1156 (1958).
- (23) M. Freundlich, R.O. Burns and H.E. Umbarger: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1804 (1962).
- (24) T. Nara, H. Samejima, C. Fujita, M. Ito, K. Nakayama and S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 532 (1961).
- (25) 松島宏親, 間瀬泰男: *農工*, **51**, 443 (1973).
- (26) T. Abramsky and D. Shemin: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2971 (1965).