[農化 第 51 巻, 第 8 号, R75~R81, 1977]

麹菌の自己消化に関する研究

(昭和 52 年度農芸化学奨励賞受賞)

魚 住 武 司

(東京大学農学部農芸化学科)

Studies on the Autolysis of *Aspergillus oryzae*

Takeshi UOZUMI

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo,

Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

はじめに

微生物の生育と自己消化は、基本的な生命現象の両側面であり、両者の研究が相まって、生命現象が全体として解明されと考えられるが、従来、生育の研究はきわめて多いにもかかわらず、自己消化の研究はまれであった。

麹菌は、酒、みそ、醤油など、わが国の醸造食品の製造に用いられる基本的な微生物であり、醸造の過程で起こる自己消化の産物が、呈味成分の生産に関して重要な役割をになうと考えられている。しかし、麹菌の自己消化に関する研究はほとんど例がなかったので、自己消化の現象を解明することを基礎的な目的とし、また有効な呈味成分を得られる可能性をも期待して自己消化の研究を行なった。自己消化物の呈味に関しては、酵母の自己消化物を添加することによってシャンペンの味を良くするという報告⁽¹⁾などもあったので、筆者らも、合成酒の味を良くするような呈味物質を期待して、麹菌の自己消化物の味を調べてみたが、残念ながら、特にうまい成分は得られなかった。

一方、基礎的な面では、麹菌の自己消化の条件および産物について検討し、初めてその大要を明らかにすることができた。また自己消化の機構に関しては、麹菌の自己消化の過程で菌体核酸が急速に分解され、これが菌体内ヌクレアーゼ活性の著しい活性化に起因することを発見した。さらに、この現象が、*Aspergillus oryzae* 菌

体内の主要なヌクレアーゼでありながら、従来知られていなかった新酵素によることを明らかにし、これを精製結晶化して、nuclease O と命名した。同時に菌体内に、本酵素に特異的で、かつきわめて親和性の高い阻害蛋白が存在することを初めて見出して、これを精製し、nuclease O と阻害蛋白との相互作用を明らかにするとともに、菌体内のヌクレアーゼ活性が、阻害蛋白によって調節されていることを示し、自己消化における核酸の分解機構を解明するとともに、微生物の菌体内ヌクレアーゼ活性の調節機構について全く新しい知見を加えることができた。以下に、麹菌の自己消化の条件、産物および機構についてまとめてみたい。

I. 麹菌の自己消化の概要

麹菌の菌体を構成する主成分は、菌体の乾物中、蛋白質が約 50%、核酸が約 6% で、主として細胞の中味を構成し、糖分が 16%、アミノ糖が 5% で細胞壁を構成し、その他に脂質が 8% 程度ある。麹菌が自己消化を起こすと、核酸が最も分解されやすく、菌体内の全量の 90% 程度が分解溶出される。次に分解されやすいのが蛋白質であり、約 75% が分解溶出されるが、糖分は 20% 程度しか分解されない⁽²⁾。その結果、細胞の中味は大部分が溶解して空になり、少数の顆粒が残るのみとなる。しかし、細胞壁は溶解することなく残る。液体培地で振盪培養して得た新鮮な菌体を negative contrast の位相差顕微鏡で見ると、細胞内には全体に中味がつま

っている様子が白く見える。この菌体を蒸留水に懸濁し、三角フラスコに満たして密栓し、30°C で3日間自己消化させると、Fig. 2A のようになり、細胞内に黒く見えるのは、中味が溶解して消失した部分であり、白く見えるのは残った顆粒である。細胞壁はそのまま残っている⁽³⁾。酒粕中の麴菌体を検鏡すると、同様の自己消化の起こっていることがわかる⁽⁴⁾。細菌の自己溶解現象⁽⁵⁾では、細胞壁の溶解が主であるが、カビの自己消化は、これとは全く異なり、中味の溶解が主であり、酵母の自己消化と類似の現象である⁽⁶⁾。

II. 自己消化の条件

麴菌の自己消化の条件を検討するためには、液体培養で得た菌体を各種緩衝液に懸濁して密閉し、嫌氣的に静置することによって溶出する菌体成分の溶出率を測定する。

(a) 温度 *Asp. oryzae*⁽²⁾ では比較的高温において自己消化が速く、McIlvaine の緩衝液 (pH 6) 中では、45°C では1~3日間、30°C では5~7日間で自己消化が終了し、菌体内核酸の80~90%、蛋白の60%および糖の10%が分解溶出する。10°C では、7日以内には、ほとんど自己消化が起こらない。*Asp. niger*⁽⁷⁾ では、45°C が最適であると報告されている。

(b) pH *Asp. oryzae*⁽²⁾ を pH 2~11 の各種の緩衝液中で自己消化させると、各種菌体成分の溶出の至適 pH は、蛋白が pH 5、核酸が pH 5~8、糖が pH 3 であり、それぞれの成分の90%、65% および20% が分解溶出する。*Asp. niger*⁽⁷⁾ では pH 4 が至適である。

(c) エネルギー源 *Asp. oryzae* の懸濁液中に2%濃度のグルコースを添加すると、密閉静置による半嫌氣的条件下においても、グルコースは発酵によって代謝され、ガスの発生と芳香が現われ、48時間後にはグルコースは消失する。4日間の静置による自己消化は、グルコース無添加のものにくらべて約半分に抑制される。菌の懸濁液に2%のグルコースを添加し、さらに通気振盪を行うと、4日間にわたって自己消化は全く起こらない。したがって、エネルギー源の存在は自己消化を抑制すると言える⁽²⁾。パン酵母においても、同様な傾向があり、C:N 比の高い酵母は保存性が良く、菌体内の貯蔵糖分が消費され尽した後に自己消化が起こる⁽⁸⁾。

(d) 自己消化の促進剤 麴菌の懸濁液に各種の薬剤を0.1M 濃度になるように添加すると、トルエン、

Fig. 1. トルエン等による自己消化の促進⁽²⁾

各薬剤 0.1 M 存在下, pH 5.4, 30°C で自己消化。

benzoate など親油性の強い物質は自己消化を著しく促進するが、*p*-hydroxybenzoate, terephthalate など、親水性基の多い物質は、自己消化の促進作用が劣る (Fig. 1)。C₁~C₈ の各種の液状脂肪酸では、C 鎖が長くなるにつれて自己消化促進作用が増し、caproate (C₆) および caprylate (C₈) は、トルエンと同等の効果を示すが、stearate など、固体の脂肪酸は効果が低い。ジカルボン酸では、oxalate, tartrate, succinate は効果がないが、adipate (C₆) および sebacate (C₁₀) は、それぞれモノカルボン酸の propionate (C₃) および valerate (C₅) と同程度の自己消化促進作用を示す。Na lauryl sulfate および Span 80 などの界面活性剤は自己消化を促進するが、Span 80 よりも親水性の強い Tween 80 はほとんど効果がない。一般に、親油性の強い液状の物質が自己消化を促進し、親水性の強い物質は自己消化促進作用が低いと結論される⁽²⁾。またトルエン、酢酸エチルなどの有機溶媒の他に、2,4-ジニトロフェノール、HgCl₂ などの代謝阻害剤が麴菌の自己消化を促進する⁽⁹⁾。

III. 自己消化の産物

Asp. oryzae⁽³⁾ を最適条件において十分に自己消化させると、菌体内の全核酸の90%、全蛋白の75%、糖類の20%が分解して菌体外に溶出する。核酸は最終的に

Fig. 2. 自己消化した麹菌菌体⁽³⁾

(A) 嫌氣的あるいは (B) 好氣的に、蒸留水中で 30°C, 3 日間自己消化したもの。

は脱リン酸, 脱アミノ等の作用を受け, ウリジン(28%), キサンチン(24%), ヒポキサンチン(17%)となる。蛋白は, 60% が遊離アミノ酸, 15% がペプチドとなる。糖の分解産物の平均重合度は 1.1~1.4 であり, モノマーとしてはグルコース, リボースおよびグルコサミンが検出された。顕微鏡観察によると, *Asp. oryzae* を嫌氣的に自己消化させると, 細胞質は細胞壁に接する部分から溶けはじめ, ついには中央部に数個の顆粒が残るのみとなる (Fig. 2 A)。しかし細胞壁は 45 日間自己消化した後にも残っている。一方, 菌体を蒸留水に懸濁し, 通気振盪して好氣的に自己消化させると, 細胞の中央に空泡ができ, その空泡がしだいに大きくなって, ついには細胞内が全く空になるような経過をとる⁽³⁾。この場合, 太い菌糸 (元の菌体) の中央に空泡ができる間にも, 外部には細い菌糸の発育が見られる (Fig. 2 B)。このようすから, 好氣的条件では菌体はすぐに死滅することなく, 菌体内の成分を呼吸によって消費しながら生活を続け, しだいに細胞内が空になって死滅すると考えられる。これと類似の現象は, Mizunuma によって *Asp.*

sojiae の自家呼吸の問題として研究され, アミノ酸や核酸成分が呼吸によって消費され, アンモニアが生成することが報告されている⁽¹⁰⁾。 *Asp. niger* の自己消化物中からは各種の糖, 有機酸, 多価アルコール, アミノ酸およびグリコペプチドが検出されている⁽⁷⁾。

IV. 自己消化の機構

好適な環境におかれた微生物は生育を続け, 菌体は新しく合成され続ける。一方, 栄養源の不足, 酸素の不足, 高温, 生化学的阻害剤または有機溶媒の作用などの悪条件下においては生育が止まり, さらに菌体成分の分解が起こる。微生物の菌体内に常に存在しているプロテアーゼ, スクレアーゼなどの多種多様な分解酵素が, 生育過程においては, 菌体を分解する作用を現わさない理由としては, 二つ考えられる。一つには, 分解酵素は常に活性の状態で存在しているが, 生育過程においては, 菌体成分の分解量よりも合成量が多いために, 外見上分解が起こらないという場合であり, もう一つには, 分解酵素が通常は何らかの活性調節を受けて不活性な状態になっており, 自己消化を起こすような条件において, これが活性化されるという場合が考えられる。第一の場合については, 例えば大腸菌の静菌における RNA および蛋白の turn over 率は 1 時間につき 5% 程度であると報告されている⁽¹¹⁾。したがって, エネルギー源の不足, 薬品による阻害, 有機溶媒の作用などによって合成反応が妨げられると分解反応のみが起こることになるが, このことによって自己消化はある程度説明できる。第二の場合には, 分解酵素は生育過程においては, zymogen の形で, あるいはまた細胞内の微細な構造の中にくみこまれて基質との接触が断たれ, 不活性の状態で存在しているが, すべての菌体は多少とも turn over をしているので, このような微細構造を維持するためには, つねにエネルギーの供給と生合成が必要である。したがって, エネルギー源の欠乏, 細胞の死などによって生合成が止まると, まず細胞内の微細構造が崩れ, それとともに各種の分解酵素が活性化されることになり, 自己消化が活発に起こることになると考えられる。一例として, 酵母のリボゾームは ATP の存在下では安定であるが, ATP がないと, リボゾーム中に存在する latent RNase が活性化され, RNA の分解が起こると報告されている⁽¹²⁾。また *Asp. sojae* のアルカリ性プロテアーゼは, zymogen として存在し, 微量の他のプロテアー

ぜの作用によって活性化されることが知られている⁽¹³⁾。

筆者らは、このような自己消化の機構が、*Asp. oryzae* の自己消化における顕著な現象である菌体内核酸の分解の際にも存在するのではないかと考えて、検討を行なった。その結果、麹菌の自己消化の初期に菌体内ヌクレアーゼ活性が約 3 倍に活性化することを見出し⁽¹⁴⁾、新鮮な菌体内にはヌクレアーゼインヒビター（阻害蛋白）が存在してヌクレアーゼを不活性化しているが、自己消化の際にはインヒビターが消滅し、ヌクレアーゼが活性化することを明らかにした⁽¹⁵⁾。この際に活性化されるヌクレアーゼを精製し性質を調べたところ、新酵素であったので、nuclease O と命名した^(16,17)。またインヒビターは nuclease O に対して特異的に作用し、麹菌の菌体外核酸分解酵素（RNase T₁, RNase T₂, nuclease S₁）には全く作用しない新物質であり、RNA および DNA の両者を分解するヌクレアーゼの蛋白性インヒビターとしては、全生物界を通じて、最初のものであった⁽¹⁸⁾。nuclease O の精製結晶化と諸性質およびインヒビターの精製と作用機作について、さらに研究を行なった。

(a) Nuclease O

Asp. oryzae IAM 2608 の 2 kl タンク培養で得た菌体 113 kg の自己消化濾液から、nuclease O を、硫酸塩析、CM-Sephadex C-50 および Sephadex G-100 のクロマト 2 回によって、超遠心的および電気泳動的に単一に精製し結晶化した (Fig. 3)⁽¹⁹⁾。nuclease O の超遠心による沈降定数は 2.9 S、沈降平衡法による分子量は 64,000、等電点は pH 10.0 である⁽²²⁾。結晶標品の比活性は 593 units/mg（熱変性 DNA を基質として毎分 1 μ mole のウラニル試薬可溶性ヌクレオチドを生じる活性を 1 unit とする）である。Mg²⁺ あるいは Mn²⁺ を要求し、至適 pH 7.4~8.2 において、RNA および熱変性 DNA をよく分解する。未変性 DNA に対する分解速度

Fig. 3. Nuclease O の結晶⁽¹⁹⁾

は、熱変性 DNA の約 20 分の 1 である。DNA および RNA の分解産物は、5' p の dinucleotide および trinucleotide が主体であり、mononucleotide は 3.4~13.6 % しか生じない。塩基特異性はないが、di および trinucleotide はそれ以上分解を受けない。未変性 DNA に対する切断様式は、endo 型の 1 本鎖切断である^(20,21)。DNA に対する K_m は 2.2×10^{-5} M である⁽²²⁾。*Asp. oryzae* のヌクレアーゼの比較を Table I に示す。これらのうち、nuclease O, DNase K₁ と DNase K₂ は菌体内酵素であり、他はタカジヤスターゼから分離された菌体外酵素である。

(b) ヌクレアーゼインヒビター

新鮮な麹菌菌体 (*Asp. oryzae* IAM 2608) 125 kg を Manton-Gaulin ホモジナイザーで破砕抽出し、nuclease O の特異的阻害蛋白 (inhibitor) を硫酸塩析、Sephadex G-75, DEAE-Sephadex A-50 (2 回) Bio-gel P-60 の各カラムクロマト、調製用 disc 電気泳動 (2 回) および焦点電気泳動 (4 回) によって 16 万倍に精製し、電気泳動的にほぼ単一にした (Fig. 4)⁽²²⁾。比活性は 583 units/mg (1 unit の nuclease O を完全阻害する inhibitor

Table I. Comparison of Nucleases from *Aspergillus oryzae*

Nucleases	Molecular weight	Opt. pH	Metal requirement	Substrate			Terminal P	Product	Base specificity
				RNA	denat. DNA	nat. DNA			
Nuclease O	64,000	7.4~8.2	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	+	+	+	5'	oligo	no
Nuclease S ₁		4.4	Zn ²⁺	+	+	—	5'	mono	no
DNase K ₁		8.5~9.0	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	—	+	+	3'	oligo	G-G, G-A
DNase K ₂		8.0	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	—	+	+	5'	oligo	G-G, G-A
RNase T ₁	11,000	7.5	—	+	—	—	3'	oligo	G-X
RNase T ₂	36,000	4.8	—	+	—	—	3'	mono	no

Literatures : Nuclease S₁⁽³¹⁾, DNase K₁ and DNase K₂^(32,33), RNase T₁ and RNase T₂⁽³⁴⁾.

Fig. 4. Inhibitor のディスク電気泳動⁽²²⁾

精製した inhibitor を pH 9.5 (A) あるいは pH 8.9 (B) でアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。B のゲルを 2 mm 間隔に切断し、緩衝液で溶出後 inhibitor 活性を測定した結果 (C) は、蛋白のバンドと inhibitor 活性の一致を示している。

の量を 1 unit とする) である。inhibitor は分子量 22,000、等電点 pH 4.09 の熱安定 (100°C, 10 分) な蛋白であり、キモトリプシンの作用によって失活する。nuclease O を特異的に阻害するが、*Asp. oryzae* の菌体外核酸分解酵素 (nuclease S₁, RNase T₁, RNase T₂) には全く作用しない。nuclease O に対する阻害は非拮抗的であり、 K_i は $3.2 \times 10^{-12} M$ であって、その親和性はきわめて強く、nuclease O と 1 分子 : 1 分子の安定な複合体を形成する。Sephadex G-100 カラムによる分子量は、nuclease O : 46,000, inhibitor : 22,000, 複合体 : 73,000 である。nuclease O-inhibitor 複合体は不活性であるが、キモトリプシンを作用させると、inhibitor が分解されてヌクレアーゼ活性が完全に回復する。活性化された nuclease O は inhibitor の添加によって再び阻害を受けるので、キモトリプシンは nuclease O の脱感作 (desensitization) を起こすことなく、inhibitor へのみ作用することがわかる。一定量の nuclease O に対して inhibitor を加えていくと、ヌクレアーゼ活性は直線的に阻害され、酵素に対して当量の inhibitor が加えられたときに活性が 0 となる (Fig. 5)。また一定量の inhibitor に対して nuclease O を添加していくと、nuclease O の量が inhibitor の量よりも少ない間

Fig. 5. Nuclease O と inhibitor の当量関係
一定量の nuclease O (35, 23.3, あるいは 11.7 mU/ml) に対して inhibitor を添加したときのヌクレアーゼ活性の減少を示す。

Fig. 6. 一定量の inhibitor に対して nuclease O を添加した場合の酵素活性の発現⁽²²⁾

は、ヌクレアーゼ活性がほとんど現われず、nuclease O の量が inhibitor の量を上回るとはじめて、ヌクレアーゼ活性が現われ、以後は nuclease O の添加量に従って直線的にヌクレアーゼ活性が増加する (Fig. 6)。これらは、nuclease O と inhibitor の親和性がきわめて強いために現われる現象であり、両者の混合物は mutual depletion system を形成する。すなわち、nuclease O と inhibitor は、どちらか一方の遊離濃度が 0 に近づくまで、当量的に結合し、過剰な方のみが遊離の状態で存在し、他方は全部 complex に取りこまれて、遊離物と

Fig. 7. 培養中の *Asp. oryzae* 菌体内のヌクレアーゼ活性とインヒビター含量の変化

してはほとんど存在しなくなる⁽²²⁾。この inhibitor の nuclease O に対する親和性 ($K_i=3.2 \times 10^{-12}M$) は従来きわめて強いといわれているラット血清中の DNase inhibitor の脾臓 DNase に対する親和性 ($K_i=1.38 \times 10^{-10}M$)⁽³⁰⁾ よりもさらに約 100 倍も強いものである。

(c) 菌体内ヌクレアーゼ活性の調節

麹菌を液体培地で振盪培養し、培養の経過とともに菌体をすりつぶし、菌体内の全インヒビター活性と、遊離の nuclease O 活性と、その他のヌクレアーゼ類の活性を RNA を基質として測定すると、Fig. 7 のようになった。ただし、全インヒビター活性は、菌の homogenate を 80°C 10 分間熱処理して、混在する nuclease O およびその他のヌクレアーゼを失活させた後に、外部から添加した nuclease O に対する阻害活性を測定したものであり、菌体中の遊離の inhibitor と E-I complex 中の inhibitor との合計を示すものである。また菌の homogenate 中のヌクレアーゼ活性を直接測定したものは菌体中の遊離の nuclease O 活性とその他のヌクレアーゼ類の活性の合計を表わすものとし、homogenate に過剰の inhibitor を加えたときに阻害されて減少する活性を遊離の nuclease O に由来する活性とし、残存する活性を nuclease O 以外のヌクレアーゼ活性とした⁽¹⁶⁾ (一部未発表データ)。この結果、菌体内の遊離の nuclease O の活性は、培養初期の活発な生育期においては 0.5 units/g 菌体であるが、生長の停止期 (48 hr) においては活性が全くなり、その後培養の老化にともなって活性が増大し、96 hr には 0.6 units/g にまで上昇した。inhibitor の活性は、これと逆の変動を示し、inhibitor が菌体内の nuclease O の活性を調節していると考えられた。一方、nuclease O 以外のヌクレアーゼ活

性は、培養の全期間を通じて 0.2~0.3 units/g ではほぼ一定であった。この結果から、培養の初期の生長期と後期の自己消化期においては、nuclease O が菌体内のヌクレアーゼ活性の主体 (70%) を占めることがわかり、nuclease O は自己消化期に活性化されて作用するのみならず、生長期においても何らかの生理的役割を持っていると考えられる。なお、嫌氣的に自己消化を行なわせると、inhibitor は完全に消滅する⁽¹⁶⁾。菌体内で主要な活性を占める nuclease O が従来発見されなかった理由としては、生育停止期には不活性化されていることと、菌体外酵素 (RNase T₁, RNase T₂, nuclease S₁) の研究が多かったためと考えられる。

Nuclease O (EC 3.1.4.9) と類似の酵素は *Neurospora crassa*⁽²³⁾, *Azotobacter agilis*⁽²⁴⁾, カイコ^(25,26) など多くの生物に存在するが、この種のヌクレアーゼの inhibitor は、nuclease O の inhibitor が最初のものであり、その後 *N. crassa*⁽²⁷⁾ にも発見され、またウシの血漿中⁽²⁸⁾ にも存在が示唆されている。*Aspergillus* 属の各種のカビをすりつぶし、nuclease O に対する inhibitor 活性の有無を検討した結果、*Asp. oryzae* (10 株) と *Asp. flavus* (2 株), *Asp. sojae* (2 株), *Asp. parasiticus* (2 株), *Asp. tamarii* (2 株) など、*Asp. oryzae* の近縁種には、調べたすべての菌株中に inhibitor が存在したが、*Asp. niger* などには検出されなかった⁽²⁹⁾。*Asp. niger* 中に自己の nuclease に対する inhibitor が仮に存在したとしても、この inhibitor は特異性が異なるために *Asp. oryzae* の nuclease O に対して作用しないのかもしれない。この種の蛋白性 inhibitor は特異性が強く、それぞれ自己あるいは近縁種の酵素にしか作用しないのがふつうであるので、それぞれの菌体の nuclease を用いて検討すれば、各種のカビに同様の inhibitor が見つかる可能性があると考えられる。

おわりに

以上のように、筆者らは本研究を通じて、*Asp. oryzae* の自己消化現象の概要を解明し、核酸分解機構の一端として、nuclease O と inhibitor を発見し、その性質を明らかにすることができた。この他にも、麹菌菌体内では各種の酵素が活性調節を受けながら存在し、自己消化の際に活性化されることが起こっているかもしれないが、多くの酵素と基質とがからみ合っているので、酵素の活性化と自己消化との因果関係を解明することは困難

な仕事であろう。nuclease O については、自己消化の際に活性化されて働く以外に、生長期において、活性化された状態にあるので、この酵素の真の生理的意義は、生長期における何らかの作用であると考えられるが、これについては今後の研究によって解明したいと考えている。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました東京大学教授有馬啓先生、同田村学造先生、同助教授別府輝彦先生に心から厚く御礼申し上げます。また有益な御助言御協力をいただきました発酵学教室の方々にも心から厚く御礼申し上げます。

- (1) E. M. Popova : *Biokhim. Vinodeliya*, **6**, 53 (1960).
- (2) K. Arima, T. Uozumi and M. Takahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 1033 (1965).
- (3) T. Uozumi, M. Takahashi and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 1042 (1965).
- (4) 魚住武司, 有馬 啓 : 日本醸造協会雑誌, **61**, 563 (1966).
- (5) 緒方靖哉 : 農化, **50**, R69 (1976).
- (6) 魚住武司, 有馬 啓 : 化学と生物, **3**, 569 (1965).
- (7) E. Emiliani and I. U. de Davie : *Appl. Microbiol.*, **10**, 504 (1962).
- (8) D. C. Vosti and M. A. Joslyn : *Appl. Microbiol.*, **2**, 70, 79 (1954).
- (9) 堀越弘毅 : 農化, **32**, 603 (1958).
- (10) T. Mizunuma : *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 88, 843, 853 (1963).
- (11) J. Mandelstam and H. Halvorson : *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 43 (1960).
- (12) Y. Ohtaka and K. Uchida : *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 94 (1963).
- (13) K. Yamamoto : *Agric. Biol. Chem.*, **23**, 110 (1959) ; **25**, 453, 519 (1961).
- (14) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 963 (1968).
- (15) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima :

- Agric. Biol. Chem.*, **32**, 969 (1968).
- (16) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1409 (1968).
- (17) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 25 (1969).
- (18) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 636 (1969).
- (19) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 645 (1969).
- (20) T. Hino, T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1109 (1971).
- (21) T. Uozumi, T. Hino, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 434 (1972).
- (22) T. Uozumi, K. Ishino, T. Beppu and K. Arima : *J. Biol. Chem.*, **251**, 2808 (1976).
- (23) S. Linn and I. R. Lehman : *J. Biol. Chem.*, **241**, 2694 (1966).
- (24) A. Stevens and R. J. Hilme : *J. Biol. Chem.*, **235**, 3023 (1960).
- (25) E. Soeda, J. Mukai and S. Akune : *J. Biochem. (Tokyo)*, **63**, 14 (1968).
- (26) M. Himeno, I. Morishima, F. Sakai and K. Onodera : *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 575 (1968).
- (27) K. Hasunuma and T. Ishikawa : *Genetics*, **70**, 371 (1972).
- (28) M. Anai, H. Haraguchi and Y. Takagi : *J. Biol. Chem.*, **247**, 199 (1972).
- (29) T. Uozumi and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1739 (1974).
- (30) G. Berger and P. May : *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 148 (1967).
- (31) T. Ando : *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 158 (1966).
- (32) M. Kato, T. Ando and Y. Ikeda : *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 329 (1968).
- (33) M. Kato and Y. Ikeda : *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 321, **65**, 43 (1969).
- (34) "Microbial Ribonucleases," ed. by F. Egami and K. Nakamura, Springer-Verlag, Berlin, 1969, p. 19.

(昭和 52 年 5 月 30 日受理)