酵母菌における増殖・分化の調節機構に関する研究†

(1990 年度農芸化学奨励賞受賞)

土 屋 英 子

(広島大学工学部)

酵母は主として出芽により増殖する菌類の総称であるが、このうち有性世代の存在が知られているものに子のう酵母と異担子菌酵母がある。これらの1倍体細胞には2つ、または4つの接合型があり各接合型細胞は接合型特異的な性フェロモンを生産・分泌する。またこれらは相手接合型性フェロモンを受容して性接合が可能な生殖細胞へと分化する能力を持つ。性フェロモンによる細胞の分化は細胞の増殖周期と深い関連を持ち、細胞分裂の完了からDNA複製開始に至る時期(G1期)内の特定の時期に起こる。このように酵母は真核生物の増殖・分化を研究するうえできわめて有用なモデル系の1つと考えられる。本研究は真核細胞の増殖・分化の調節機構解明の糸口を得ることを目的とし、異担子菌酵母 *Rhodospodium toruloides*, *Tremella mesenterica*, 子のう酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の性フェロモン(ロドトルシン A, トレメロジエン A-10, および α 因子)の生理作用、ならびに細胞周期の調節と核機能の発現について解析を行ったものである。

1. 異担子菌酵母の性フェロモンとフェロモン情報のトランスメンブレンシグナリング

異担子菌酵母 *T. mesenterica* には4つの接合型(AB, Ab, aB, ab)が存在し、Aを持つものはA型のフェロモンを、aを持つものはa型の性フェロモンを構成的に生産、分泌している。同様に異担子菌酵母 *R. toruloides* には2つの接合型(A, a)が存在し、このうちA型細胞のみが構成的に性フェロモンを生産し、a型細胞はA型フェロモンに応答して生産するようになる。筆者らは理

化学研究所神谷勇治博士、現名古屋大学坂神洋次博士らとの共同研究により *T. mesenterica* のAB型細胞、および *R. toruloides* A型細胞の分泌する性フェロモンを単離精製しその化学構造を決定した結果、これらがいずれもペプチドのC末端にS-ファルネシルスチンを持つ新規なリポペプチドであることを明らかにした(図1)⁽¹⁻³⁾。このような特異なC末端構造は最近子のう酵母 *S. cerevisiae* の α フェロモン(α 因子)⁽⁴⁾、発癌遺伝子の1つであるRAS蛋白⁽⁵⁾等にも見出され興味を持たれている。また、フェロモンが生物活性を発現するためにはいずれのフェロモンにおいてもその全構造が必要であることを明らかにした⁽⁶⁾。

R. toruloides のA型フェロモン(ロドトルシン A)を受容菌 a 細胞に加えると急激に上清中の活性が低下した(図2)⁽⁷⁾。この現象は0~4°Cの低温下でも起こることから最初われわれはフェロモンのレセプターへの結合によると考えたがその後の解析の結果この現象はフェロモン分子のC末端側から4番目のArgと3番目のAsn間のトリプシン型エンドペプチダーゼの切断反応によるものであることが判明した⁽⁸⁾。このエンドペプチダーゼはa型細胞の細胞膜に存在し、この酵素の特異的阻害剤(トシルアルギニンメチルエステル、アンチパイン、チオール基修飾酵素など)が細胞の生育に全く影響を与えずにフェロモン作用のみを阻害すること、この酵素を欠く変異体が取得されこの株はロドトルシン A に対する応答性を欠いていたこと、この活性はa型細胞に特異的でA型細胞には存在しないことが明らかになり、本酵素は性フェロモンのシグナル伝達に必須なものであると考えられた⁽⁹⁾。a型細胞表層より精製した酵素(トリガーペプチダーゼと呼ぶ)は分子量約63Kの糖蛋白で基質特異性がきわめて高いという特徴を有していた。表1に示すように本酵素は完全な形のロドトルシン A のみを分解し、フェロモンのペプチド部分のみ

† A Study on the Controls of Growth and Feromonal Response in Yeasts.

Eiko TSUCHIYA (Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Higashihiroshima 724)

図 1 ロドトルシン A, トレメロジェン A-10 の化学構造

(化学合成),あるいはプロテアーゼの基質として一般に用いられるカゼイン等には全く作用しなかった. また本酵素は SH 酵素でさらに反応にホスホリピドと Ca^{2+} の存在を要求した⁽¹⁰⁾.

Ca^{2+} は細胞にとって必須な元素であるが通常その細胞内濃度は 10^{-7} M 程度の低濃度に保たれており, 多細胞生物などではその急上昇が筋収縮, ホルモン分泌などの細胞応答を引き起こすことが知られている. 別の実験によりロドトルシン A の作用時に Ca^{2+} が必要と考えられたこと, また前述のようにトリガーペプチダーゼの反応が Ca^{2+} 要求性であったことよりロドトルシン A のシグナル伝達の過程に Ca^{2+} をセカンドメッセンジャーとする経路の存在を予想しフェロモン添加時の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みを測定した. この結果, フェロモン添加直後に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の急激で一過的な取り込みの上昇が起こることが明らかになった⁽¹¹⁾. この上昇は生物活性を有するロドトルシン A を添加したときのみ観察され C 端のフェルニル基を欠くアナログなどでは認められないこ

図 2 a 型細胞によるロドトルシン A 活性の減少

と, a 型細胞に特異的であること, 前述のトリガーペプチダーゼ活性を欠きフェロモンに応答しない変異株では認められないことから性フェロモンの情報伝達に深くかかわっていると考えられた. 近年動物細胞などにおいては細胞膜受容体にリガンドが結合することにより, イノシトールリン脂質の代謝を介した細胞内カルシウムの動員が起こることが知られてきている. *R. toruloides* では探索した限りにおいてこの系の関与を示す結果は得られなかった. 一方, 細胞における Ca^{2+} の流入, 排出には細胞膜に存在する Ca^{2+} /カルモジュリン依存性の Ca^{2+} -ATPase が関与することが知られている. 興味深いことに a 型細胞膜の Ca^{2+} -ATPase はロドトルシン A によって dose dependent な阻害を受けることが明らかにな

表 1 トリガーペプチダーゼの基質特異性

Substrate	Hydrolysis
a) Rhodotorucine A	+
b) SH-Rhodotorucine A	—
c) Tremerogen a-13	+
d) Tremerogen A-10	—
Casein	—
BSA	—
Hemoglobin	—
Cytochrome c	—

表 2 α 細胞表層 Ca^{2+} -ATPase に対する
ロドトルシン A の添加効果

測 定 条 件	ATPase 活性	
	$\mu\text{mol}/\text{分}$	(%)
Complete	0.67	(100)
- Mg^{2+}	0.64	(96)
-CaM	0.12	(18)
-ホスホリビド	0.38	(57)
-ロドトルシン A	0.00	(0)
+ロドトルシン A S-オキシド	0.59	(88)

CaM, カルモジュリン.

った⁽¹²⁾ (表 2). さらにこの阻害はロドトルシン A のトリガーペプチダーゼによる水解産物 (C 末端側の S-フェルネスルトリペプチド) によっても認められた. また, 細胞膜の可溶化物中よりカルモジュリンアフィニティカラムによって部分精製した Ca^{2+} -ATPase 標品中にはトリガーペプチダーゼが存在すること, この標品にトリガーペプチダーゼの阻害剤を添加しておくこととロドトルシン A による活性阻害が起こらないことなどから, α 型細胞の細胞膜中でトリガーペプチダーゼと Ca^{2+} -ATPase が複合体を形成して存在し, フェロモン情報の細胞内への伝達に働いていると考えられた.

子の酵母 *S. cerevisiae* では近年性フェロモン α -因子のシグナリング機構が詳しく調べられこの経路にはレセプターと結合して存在すると考えられる GTP 結合蛋白質 (GPAI) の活性調節が関与することが示された (詳細については文献 13, 14 参照). しかし筆者らは *S. cerevisiae* の α 細胞が α 因子を受容した際にも *R. toruloides* と同様 Ca^{2+} の一過的な取り込み上昇が起こること⁽¹⁵⁾, EGTA や Ca^{2+} イオノフォアなどの存在下には α 因子の作用が阻害されることを観察しており, この菌のフェロモン作用の過程にも Ca^{2+} を介した調節系が存在するものと考えている.

2. 細胞周期と性フェロモン作用

性フェロモンによって誘導される細胞の変化は異担子菌酵母では接合管の形成として認められ, 子の酵母では細胞凝集および突起形成と種によって異なるが最も普遍的に認められる現象は細胞がまず DNA 複製開始前 (G1 期) の特定の時期に揃って増殖を停止することである. このことは性的細胞融合後に引き続いて起こる核の融合の際に 2 つの核が 1n の状態を保っていることが

効果的な 2 倍体形成を保障すると考えるときわめて合目的な調節であると言える. 性フェロモンによる増殖停止の時期は Hartwell らの解析により G1 期の“スタート”と呼ばれる時期であることが知られている⁽¹⁶⁾. 正常な増殖においてこの時期の通過には *CDC 28*, *CDC 36*, *CDC 37*, *CDC 39* 等の遺伝子の働きが必要である⁽¹⁷⁾. 性フェロモンの情報がこれらの細胞周期の遺伝子に作用して増殖停止を引き起こしていると仮定すると, これら遺伝子に変異を持つ株を親株としてその抑制変異株を取得すればそのなかに α 因子に耐性なものが得られるのではないかと考え *cdc 28* 株を親株としてスクリーニングを行ったが, 単一変異によって *cdc 28* を抑制し, α 因子耐性となるものは得られなかった. しかしこのとき得られた *cdc 28* の抑制変異株の 1 つは $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込み能が高く, またカルモジュリンのアンタゴニストとして知られるトリフルオペラジンに耐性となっていた⁽¹⁸⁾. また別の実験により制限温度処理によってスタート期に生育を停止させた *cdc 28* 株の核内では核の主要な蛋白リン酸化酵素の 1 つが顕著に低下することを見出した⁽¹⁹⁾. この酵素は cAMP, Zn^{2+} などでは活性化されなかったが Ca^{2+} により活性化を受けた. これらの結果は酵母の細胞周期においてスタート期の通過の時期にも Ca^{2+} による調節が関与している可能性を示唆している. Ca^{2+} はミクロチューブルの脱重合に関与することから M 期における Ca^{2+} の役割についてはよく研究が行われている. 酵母においても大矢らにより Ca^{2+} 依存性の変異株を用いて M 期における Ca^{2+} の役割について解析が進められている⁽²⁰⁾. しかし動物細胞などにおいては発癌プロモーターの作用により細胞内の Ca^{2+} 動員が起こり静止期の細胞が増殖期に入り DNA 複製が誘導されることや S 期直前に Ca^{2+} , カルモジュリンの顕著な増加があることなどが報告されており, G1 期から S 期への移行にも Ca^{2+} による調節が働くと考えられる. また, *CDC 28* 遺伝子の産物は真核生物一般に共通して存在する蛋白リン酸化酵素でスタート期と M 期の両方で細胞周期の調節に働くことが知られている. この蛋白は細胞周期を通じて細胞内に一定量存在するがスタート期と M 期に特異的な活性化が起こることが最近明らかにされてきた⁽²¹⁾. 現在この蛋白の活性化機構の詳細は明らかではないが, この過程に Ca^{2+} を必要とする反応が存在することも考えられる. スタート期の調節と Ca^{2+} のかわわりは前述のように性フェロモンの作用によって細胞内 Ca^{2+} の変動が

表 3 *cdc* 変異株における細胞および核内の DNA ポリメラーゼ活性⁽²⁵⁾

菌 株	DNA ポリメラーゼ活性 (単位/mg タンパク質)			
	非同調化細胞 ^a		同調化細胞 ^b	
	細胞	核	細胞	核
A 364 A	1.5	11.5	1.2	10.5
<i>cdc 25</i>	1.5	8.9	0.9	2.4
<i>cdc 28</i>	1.4	13.0	1.1	2.0
<i>cdc 4</i>	1.4	16.9	1.0	3.1
<i>cdc 7</i>	1.3	14.1	1.4	16.4
<i>cdc 8</i>	1.2	11.3	0.9	7.3
<i>cdc 3</i>	1.4	12.1	1.2	12.0

活性はすべて許容温度で測定した。

^a 許容温度で培養した細胞。

^b 4 時間の制限温度処理を行い *cdc* 変異で停止させた細胞。

起こることを考えあわせるときわめて興味深い。

3. 酵母の細胞周期における核機能の発現

さきに述べたように性フェロモンの情報が細胞内に伝達されると細胞は G1 期のスタート期に生育を停止する。この機構を生化学的に解析するため *S. cerevisiae* より核の単離法を検討した。酵母は厚い細胞壁に被われており細胞内オルガネラの単離は容易ではない。筆者らは細胞壁の溶菌酵素処理と機械的破砕法を組み合わせ、比較的短時間のうちに損傷の少ない核を単離する方法を確立した⁽²²⁾。さらにこの単離核よりクロマチンを分画しその抽出蛋白を用いて酵母の複製起点を有するプラスミド DNA を鋳型とした *in vitro* DNA 複製系を確立した⁽²³⁾。性フェロモンを作用させた細胞や、*cdc* 変異で G1 期に生育を停止させた細胞の核抽出液ではこの *in vit-*

表 4 α 因子で同調化した A 364 A 株の全細胞および核内における DNA ポリメラーゼ活性⁽²⁵⁾

α 因子 処理	DNA ポリメラーゼ活性 (単位/mg タンパク質)		
	細胞	核	活性比(核/細胞質) ^a
—	1.5	11.5	2.3
+	1.1	4.2	0.53

^a 細胞質中の酵素活性は、核と細胞のタンパク含量の比が 1:11 であるという実験結果に基づいて次式から算出した。

細胞質中の活性 = 全細胞の活性 $\times$ 11 - 核の活性。

ro DNA 複製活性は著しく低かった。また対数増殖期の細胞質中にはこの *in vitro* DNA 複製を促進する活性が認められたが、静止期の細胞や性フェロモンを作用させた細胞中にはこのような活性はほとんど認められなかった⁽²⁴⁾。DNA 複製はきわめて多種類の蛋白が共働することによって開始、進行するがこのなかでも DNA ポリメラーゼはその中心的な作用を担っている。したがって *in vitro* DNA 複製系の活性化は細胞質中の DNA ポリメラーゼによることも考えられる。そこで G1 期から S 期の各時期に *cdc* 変異、および α 因子を用いて同調化した細胞を用い、全細胞、および核内の DNA ポリメラーゼ活性を測定した。この結果、表 3 に示すように全細胞のポリメラーゼ活性はどの時期の細胞でもほぼ一定であるのに対し、核内の活性は G1 期の前期ではきわめて低く、G1 期後期の DNA 複製開始直前に上昇することを明らかにした⁽²⁵⁾ (表 3)。核内の DNA ポリメラーゼレベルの低下は α 因子で処理して G1 期停止した細胞でも認められたが細胞全体の活性は他の細胞と変化がなかった (表 4)。

現在酵母において DNA ポリメラーゼ I をはじめと

図 3 *S. cerevisiae cdc 28* 株核抽出液中のプロテインキナーゼの DEAE セルロースカラムクロマトグラム

図4 *S. cerevisiae* 単離核による pJDB219 の取り込み
 A: 取り込み反応の時間経過: ●, 28°C; ○, 2°C; □, NP-40 処理核, 28°C
 B: *in vitro* 反応で核内に取り込まれた pJDB219 のサザンブロット解析

図5 単離核における WGA 結合物質の電子顕微鏡観察
 A, 朱染色; B, ビオチン化 WGA とストレプトアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼによる酵素染色を行ったもの, 矢印の部分に酵素反応で生じた高電子密度産物の沈着が認められる。

していくつかの DNA 複製にかかわる酵素の遺伝子が取得され細胞周期におけるその発現が解析されている。しかしこれら遺伝子の発現量の細胞周期に伴う変動はい

ずれも S 期にのみその産物が働くことを説明するほどに大きなものではない⁽²⁶⁾。このような DNA 複製にかかわる酵素も他の蛋白と同様細胞質で合成された後核内に輸送される。したがって S 期にのみ働くこれらの酵素は核内への輸送または核内での保持の段階で調節を受けている可能性がある。筆者らの得た結果は細胞周期において蛋白の核への局在化を支える何らかの機構が存在することを示唆している。

4. 酵母の単離核による核膜を介した物質輸送系の解析

性フェロモンの情報は細胞膜上のレセプターで認識された後、多くの生化学反応を介して核内に伝達され細胞増殖の停止、ならびに生殖細胞特異的遺伝子の発現が誘起される。前述のようにレセプターから細胞内への情報伝達には Ca^{2+} や GTP 結合蛋白が重要な働きをすることが明らかになったが現在いずれの酵母においても核内への情報の伝達機構は全く明らかではない。核は 2 重の膜系によって包まれた構造を持ち、細胞質から核内への物質の輸送はこの 2 重膜を貫通して存在する核孔を通じて行われる。この輸送はきわめて厳格な制御を受けており分子量 30 K 以上の分子は通過しにくく、60 K 以上のものは通過できない⁽²⁷⁾。しかし核内には高分子の蛋白が取り込まれ、また mRNA やリボソームサブユニットが核外へ輸送される。性フェロモンによって核内へ伝えられる情報物質もおそらく特殊な蛋白分子ではないかと予測され、この核内への情報伝達の機構を解析するためにはまず有効な *in vitro* 系の確立が必要であると考えられた。そこでこの系の確立のため基質として検出・同定が容易で高分子であるプラスミド DNA (pJDB219, 分子量約 7.4 M) を用い単離核による *in vitro* 輸送系の確立を試みこれに成功した⁽²⁸⁾。*S. cerevisiae* の単離核を ^3H ラベルした pJDB219 と incubate すると温度、時間に依存したプラスミドの核内への蓄積が観察された (図 4)。この反応は ATP, Mg^{2+} を要求した各種酵素阻害剤を用いた実験によりこの反応には核の ATPase、蛋白リン酸化酵素が働いていることを明らかにした。さらにこの *in vitro* 輸送反応が小麦胚芽レクチンによって強く阻害されることを見出した⁽²⁹⁾。WGA の局在部位を電子顕微鏡観察によって調べた結果 WGA は核孔付近に結合していることを明らかにした (図 5)。そこで核膜の抽出物を WGA アフィニティカラムで分画した結

表 5 酵母核膜の WGA 結合性 ATPase に対する各種阻害剤の影響

阻 害 剤	ATPase 活性 (Pi の遊離, cpm/5 分)
なし	2188 (100)
+Na ₃ N ₃ (10mM)	2046 (94±2)
+ケルセチン 20μg/ml)	2117 (96±5)
+バナジン酸 Na (2mM)	2074 (92±5)
+DCCD (1.5mM)	2281(102±2)
+EDTA (1mM)	403 (20±2)
+EGTA (2mM)	2044 (94±2)
+WGA (25μg/ml)	449 (21±3)
-NP-40	875 (40±2)
-NP-40+ホスファチ ジルセリン (20μg/ml)	1599 (75±3)

果, カラム溶出液中に WGA 感受性の ATPase 活性を見出した。この酵素は膜酵素の性質を有し, また既報の酵母オルガネラ由来の ATPase とは異なる酵素化学的性質を有する新しいものであることが確認された(表 5)。動物細胞の核孔にも WGA 結合蛋白が存し, *in vivo* での WGA の添加が核膜における高分子輸送を阻害することが報告されている⁽³⁰⁾が WGA 感受性の核膜酵素の存在を確認したのは筆者らが初めてである。

以上述べてきたように筆者らは酵母の性フェロモンの作用について種々の側面から主として生化学的手法を用いて検討を加えてきた。近年の分子遺伝学的手法の進歩により酵母, とくに *S. cerevisiae* は真核生物の生命現象の解析に真核生物の大腸菌と称されるほどに広く用いられるに至っている。しかし遺伝学的に明らかにされた系のうち生化学的裏付けが得られているものはまだまだ少ない。筆者らの確立してきた系をさらに発展させ, この間のギャップを埋めていくことができればと考えている。

本研究は広島大学名誉教授福井作蔵先生, ならびに広島大学教授宮川都吉先生の御指導のもとに行ったものであります。両先生の長年にわたる御指導, 御鞭撻と暖かい励ましに深く感謝いたします。研究の遂行にあたりましては広島大学工学部生物物理化学教室卒業生の皆様をはじめ多くの方々の御協力を得ました。また広島大学工学部醸酵工学科の諸先生方には貴重な御助言をいただきました。記してここに深謝いたします。

- (1) E. Tsuchiya and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1089 (1978).
- (2) Y. Sakagami, A. Isogai, A. Suzuki, S. Tamura, E. Tsuchiya and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1093 (1978).
- (3) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, K. Abe, E. Tsuchiya, S. Fukui, C. Kitada and M. Fujino: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1077 (1979).
- (4) R. J. Anderegg, R. Betz, S. A. Carr, J. W. Crabb and W. Duntze: *J. Biol. Chem.*, **263**, 18236 (1988).
- (5) J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs and C. J. Marshall: *Cell*, **57**, 1167 (1989).
- (6) E. Tsuchiya, S. Fukui, Y. Kamiya, Y. Sakagami and M. Fujino: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 459 (1978).
- (7) E. Tsuchiya and S. Fukui: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 473 (1978).
- (8) T. Miyakawa, M. Nishihara, E. Tsuchiya and S. Fukui: *J. Bacteriol.*, **151**, 1184 (1982).
- (9) T. Miyakawa, M. Kaji, T. Yasutake, Y. K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui: *J. Bacteriol.*, **162**, 294 (1985).
- (10) T. Miyakawa, M. Kaji, Y. K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui: *J. Bacteriol.*, **169**, 1626 (1987).
- (11) T. Miyakawa, T. Tachikawa, Y. K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui: *J. Bacteriol.*, **162**, 1304 (1985).
- (12) T. Miyakawa, T. Tachikawa, Y. K. Jeong, E. Tsuchiya and S. Fukui: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 893 (1987).
- (13) F. Cross: *Ann. Rev. Cell Biol.*, **4**, 429 (1988).
- (14) 中山直樹, 宮島郁子:「細胞内シグナル伝達機構」, 新井賢一編, 秀潤社, 1989, p. 42.
- (15) T. Tachikawa, T. Miyakawa, E. Tsuchiya and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **61**, 1209 (1987).
- (16) J. R. Pringle and L. H. Hartwell: in "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," ed. by J. N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach, Cold Spring Harbor Lab., 1981, p. 97.
- (17) S. I. Reed: *Genetics*, **95**, 561 (1980).
- (17) 福地 健, 鈴木秀明, 鞍野克司, 土屋英子, 福井作蔵, 宮川都吉: 農化, **64**, 414 (1990).
- (19) E. Tsuchiya and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2963 (1986).
- (20) 大矢慎一, 安楽泰宏: 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 2300 (1988).
- (21) B. Lewin: *Cell*, **61**, 743 (1990).
- (22) K. Kamimura, E. Tsuchiya, T. Miyakawa

- and S. Fukui : *Curr. Microbiol.*, **6**, 175 (1980).
- (23) E. Tsuchiya and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 907 (1983).
- (24) K. Kamimura, E. Tsuchiya, T. Miyakawa and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1093 (1983).
- (25) E. Tsuchiya, K. Kimura, T. Miyakawa and S. Fukui : *Nucleic Acids Res.*, **12**, 3143 (1984).
- (26) L. H. Johnston : *Curr. Opinion Cell Biol.*, **2**, 274 (1990).
- (27) L. Gerace : *Ann. Rev. Cell Biol.*, **4**, 335 (1988).
- (28) E. Tsuchiya, S. Shakuto, T. Miyakawa and S. Fukui : *J. Bacteriol.*, **170**, 547 (1988).
- (29) E. Tsuchiya, K. Hiraga, S. Fukui and T. Miyakawa : *FEBS Lett.*, **250**, 285 (1989).
- (30) 米田悦啓, 内田 颯 : *実験医学*, **6**, 715 (1988).
-