

## 結核菌に対する Rifampicin の作用機序

今野 淳・大泉耕太郎・林 泉  
岡 捨 己

東北大学抗酸菌病研究所

受付 昭和 47 年 6 月 13 日

ACTION MODE OF RIFAMPICIN ON *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS*\*

Kiyoshi KONNO, Kotaro OIZUMI, Izumi HAYASHI and Sutemi OKA

(Received for publication June 13, 1972)

Purified DNA-dependent RNA polymerase was prepared from BCG and the inhibition of RNA polymerase activity by rifampicin was observed. Uptake of  $^{14}\text{C}$ -rifampicin by *M. phlei* sensitive and resistant to rifampicin was studied. Purified DNA-dependent RNA polymerase was obtained as follows: 70 g of BCG were disrupted by Ribi cell-fractionator, and the homogenates were centrifuged successively at  $70,000\times g$  for 40 minutes and then 240 min. The supernatant was centrifuged at  $105,000\times g$  for 10 hours. The sediment was adsorbed to DEAE-cellulose column and the eluate was fractionated by ammonium sulfate precipitation. Then the enzyme was purified further by a linear glycerol density gradient. *M. phlei* strains sensitive or resistant to rifampicin cultured on Sauton's liquid medium were suspended in Dubos liquid medium and  $^{14}\text{C}$ -rifampicin was added to give a final concentration of 10 mcg/ml. Uptake of  $^{14}\text{C}$ -rifampicin by cells were measured. Rifampicin inhibited purified DNA-dependent RNA polymerase activity obtained from BCG cells. Nearly 70% of activity was inhibited by 0.1 mcg/ml of rifampicin. The increase in the concentration of rifampin to 1.0 mcg/ml did not affect much in the inhibition of RNA polymerase. Rifampin did not affect the chain elongation on RNA synthesis but inhibited the chain initiation in RNA synthesis in BCG. In rifampin resistant strain of *M. phlei*,  $^{14}\text{C}$ -labeled rifampin was taken up somewhat less degree than sensitive strain. The mode of mechanism of resistance seemed not by cell wall permeability change but by the change of enzyme conformation of RNA polymerase.

Rifampicin は *Streptomyces mediterranei* から産生された Rifamycin B を基礎にして作られた広域半合成抗生物質で、グラム陽性菌に効果があり、結核菌にもすぐれた抗菌作用を示す。その作用機序は主として *E. coli* で追求された。*E. coli* を使用した実験において、rifampicin は DNA-依存性 RNA ポリメラーゼの活性を阻害することが明らかにされた<sup>1)~4)</sup>。Rifampicin は RNA ポリメラーゼと結合し、この rifampicin-RNA ポリメ

ラーゼ複合体はゲル濾過法によるクロマトグラフィー、あるいは蔗糖密度勾配遠心法によつて分離された<sup>5)</sup>。さらに rifampicin の RNA ポリメラーゼ活性阻害は、生物によつて差があることが報告された。すなわち rifampicin は細菌由来の RNA ポリメラーゼに対しては低濃度で阻害を示すが、動物由来の RNA ポリメラーゼに対しては高濃度でも阻害を示さなかつた<sup>6)</sup>。以上の実験はすべて *E. coli* を用いた実験であるが、White ら<sup>7)</sup>は

\* From the Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tohoku University, 4-12, Hirose-machi, Sendai 980 Japan.

*Mycobacterium smegmatis* を用いて RNA ポリメラーゼの部分精製酵素を作り、rifampicin はやはり DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性を阻害することを報告している。結核菌を用いて rifampicin の作用機序を観察した報告はないので、われわれは *Mycobacterium bovis*, BCG より RNA ポリメラーゼを精製し、rifampicin による阻害を確かめた。また Rifampicin 感性および耐性の *Mycobacterium phlei* を用いて、放射性 rifampicin の細胞透過性を観察した。

#### 実験材料ならびに方法

使用菌株：RNA ポリメラーゼ活性の実験には、BCG 日本株を用いた。放射性 rifampicin のとり込みの実験には、*M. phlei* を用いた。

材料：アデノシン-8-<sup>14</sup>C 5'-三リン酸、四ナトリウム塩（比放射能 52 mCi/mM）およびウリジン-5-<sup>3</sup>H 5'-三リン酸、四ナトリウム塩（比放射能 22.2 Ci/mM）は、New-England Nuclear, Boston, Mass., U. S. A. より購入した。ライボヌクレオサイド三リン酸、仔牛胸腺 DNA は、Sigma Co. St. Louis, Miss., U. S. A. より購入した。<sup>14</sup>C でラベルした Rifampicin (<sup>14</sup>C H=N, 比放射能 6.7 mCi/mM) は、第一化学株式会社東京より提供を受けた。

#### 方 法

RNA ポリメラーゼの調製および精製法：RNA ポリメラーゼは、ほぼ Fuchs の方法<sup>8)</sup> に従った。BCG をソートン培地に2週間表面培養し、70 g を 350 ml の TMA 緩衝液 (0.01 M トリス-酢酸, 0.01 M 酢酸マグネシウム, 0.022 M 塩化アンモニウム, 0.001 M 2'-メルカプトエタノール, pH 7.3) に浮遊し、Ribi の細胞分画器で菌を破碎した。遠心はすべて 2°C の状態で実施した。Ribi の細胞分画器で破碎した菌は、70,000 g で 40 分遠心し、その上清を 70,000 g で 240 分遠心した。その上清をさらに 105,000 g で 10 時間遠心し、その沈渣をとった。沈渣を少量の TMA 緩衝液に溶解し、あらかじめ TMA 緩衝液で平衡した DEAE-セルロースカラム (直径 3.0 cm, 長さ 25 cm) に吸収させた。それを KCl の 0 から 1 M の直線濃度勾配法により、蛋白および RNA ポリメラーゼ活性を分画した。10 ml ずつの 40 分画とし、RNA ポリメラーゼ活性のある部分を集めて、さらに硫酸沈殿で活性の多い部分を求めた。すなわち硫酸 30~65% 飽和で沈殿した蛋白を少量の TMA 緩衝液に溶解し、同緩衝液に対し透析を行った。これを部分精製 RNA ポリメラーゼとした。それをさらに精製するため、直線グリセロール濃度勾配遠心法 (30~5 % v/v) で日立 RPS 25 A ローターを用い、24,000 rev/

min, 13 時間遠心して精製した。これを精製 RNA ポリメラーゼとした。

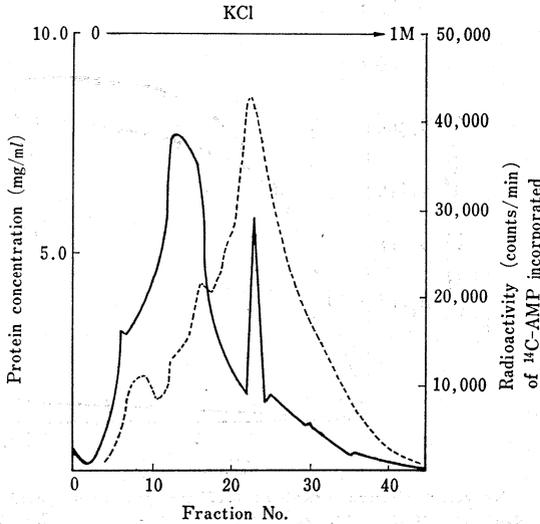
RNA ポリメラーゼ活性測定法：部分精製 RNA ポリメラーゼおよび精製 RNA ポリメラーゼ活性は、<sup>14</sup>C あるいは <sup>3</sup>H でラベルしたライボヌクレオサイド三リン酸が、冷トリクロル酢酸不溶部分にとり込まれる量を測定した。われわれの標準の RNA ポリメラーゼ測定法は次のごとくである。トリス塩酸緩衝液 pH 7.9, 10 μモル, MgCl<sub>2</sub> 2 μモル, ATP (Adenosine triphosphate), GTP (guanosine triphosphate) および CTP (cytosine triphosphate) 200 mμモル, <sup>14</sup>C-ATP (50 μCi/μmol) 2 mμモル, 仔牛胸腺 DNA 25 μg および RNA ポリメラーゼ酵素標品, 反応液全量 0.2 ml とした。<sup>3</sup>H-UTP (uridine triphosphate, 0.45 mμ/moles, 22.2 μCi/μmole) を使用した際は、他の3つの非放射性的ライボヌクレオサイド三リン酸は 1/5 の濃度で実験を行った。反応液を 37°C に incubate し、一定時間後に 8.0% の冷トリクロル酢酸 (TCA) 1 ml を加えて反応を停止させた。ウシ血清アルブミン 10 mg/ml の 1 滴をキャリアとして加え、試験管を氷水中に 30 分放置して沈殿を完成させた。冷 TCA 不溶物はメンブランフィルター (ミリポア, type HA, 孔径 0.45 μ) で集め 5% TCA 5 ml で 2 回洗浄し、さらに 0.5% TCA 30 ml で洗浄した。フィルターは乾燥し、15 ml のトルエンシンチレーター (2,5-Diphenyloxazole (PPO) 5 g, 1,4-Bis [2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)]-benzene (POPOP) 0.4 g をトルエン 1 l に溶解した。) に入れ、Beckman LS 150 液体シンチレーションカウンターで測定した。

Rifampicin 感性および耐性 *M. phlei* の <sup>14</sup>C-rifampicin のとり込み：Rifampicin 100 mcg/ml 耐性の *M. phlei* 株を、Rifampicin を低濃度から高濃度に含む Dubos 液体培地に継代培養して作った。Rifampicin 感性株 (1 mcg/ml) および耐性株 (100 mcg/ml) を、ソートン液体培地に 7 日間表面培養した後に集菌洗浄し、Dubos 培地で 50 mg/ml になるように均等浮遊液を作った。その浮遊液に <sup>14</sup>C-rifampicin を 10 mcg/ml になるように加え、一定時間ごとに一定量の浮遊液をとり、メンブランフィルターで菌を濾過し、150 ml の蒸留水で洗浄し、さらに 0.5% TCA 50 ml で洗浄した。濾紙は乾燥し、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### 結 果

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび硫酸分画による部分精製 RNA ポリメラーゼ活性：図 1 に示すごとく DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでは、RNA ポリメラーゼ活性は蛋白濃度の高い最初の部分にはなく、次の小さいが鋭角的な蛋白濃度

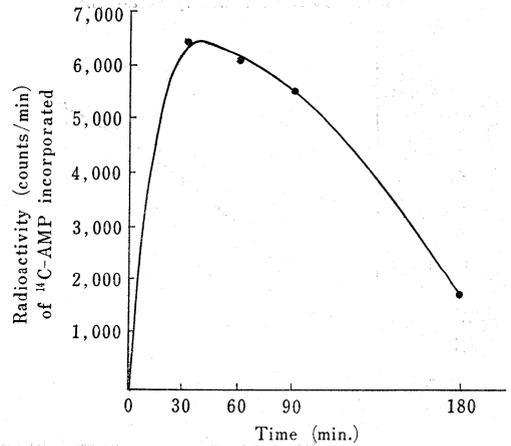
Fig. 1. DEAE-cellulose Column Chromatographic Separation of RNA Polymerase



Crude enzyme particles were applied to a column (3×25 cm) of DEAE-cellulose and eluted by an application of a linear concentration gradient approaching one molar potassium chloride. RNA polymerase activity was detected in the portion coinciding with the second narrow sharp peak of protein.

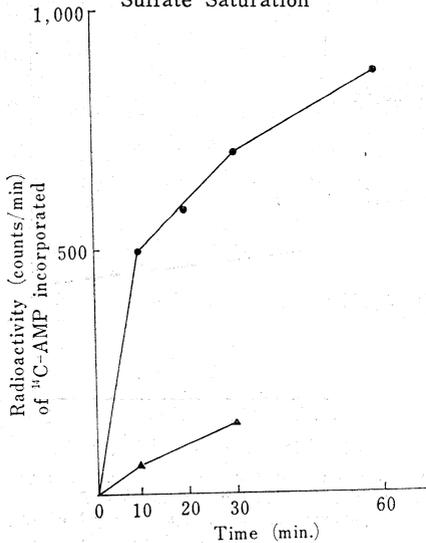
— : Protein concentration      ..... : Radioactivity

Fig. 3. RNA Polymerase Activity of Partially Purified Enzyme



Reaction mixture consisted of 22.4 mg protein of partially purified enzyme preparation, 70 μ moles of Tris-HCl, pH 7.9, 17.5 μ moles of β-mercaptoethanol, 14 μ moles MgCl<sub>2</sub>, 14 μ moles of MnCl<sub>2</sub>, 175 mcg of calf thymus DNA, each 1.4 μ moles of GTP, UTP and CTP, and 14 μ moles of <sup>14</sup>C-ATP, in a final volume of 1.4 ml. At intervals, 0.2 ml was withdrawn for the assay. The peak of reaction products was at 30 minutes and decreased rapidly, suggesting the possible contamination of decomposing enzyme of the reaction product.

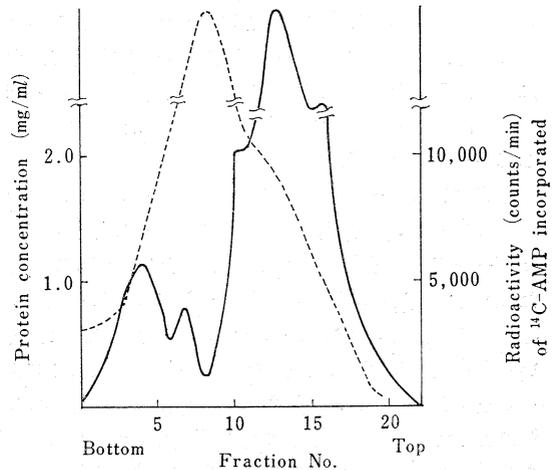
Fig. 2. RNA Polymerase Activity of the DEAE-cellulose Eluate Fractionated by Ammonium Sulfate Saturation



The major part of the enzyme activity was precipitated by the addition of ammonium sulfate between 30 to 65 per cent saturation.

●—● : RNA polymerase activity in the protein precipitated between 30 to 65 per cent saturation (1 mg protein),  
▲—▲ : between 0 to 30 per cent saturation (0.6 mg protein).

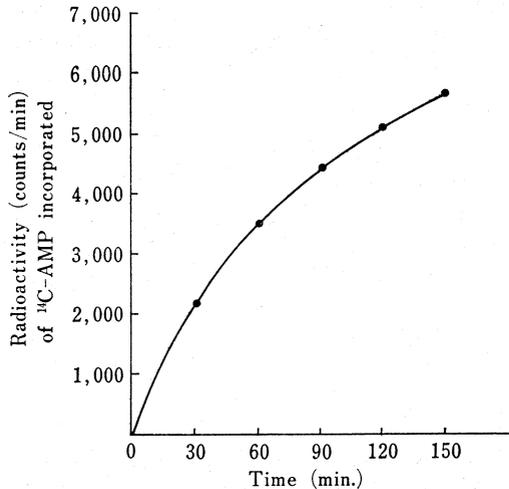
Fig. 4. Distribution of Protein and RNA Polymerase after Centrifugation through a Linear Glycerol Density Gradient



Partially purified enzyme was further purified by a linear glycerol density gradient (30 to 5 per cent v/v) centrifugation at 24,000 rev./min. for 13 hours. The portion showing RNA polymerase activity and inactive protein were fairly well separated.

..... : RNA polymerase activity  
— : protein concentration

Fig. 5. RNA Polymerase Activity of Purified Enzyme Obtained by Centrifugation through a Linear Glycerol Density Gradient



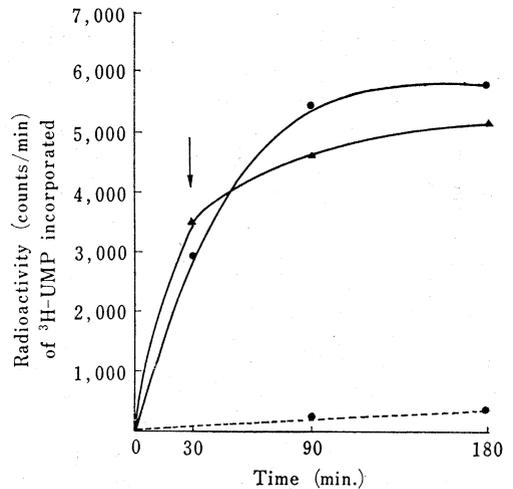
Reaction mixture consisted of 6 mg protein of enzyme preparation, 40  $\mu$  moles of Tris-HCl, pH 7.9, 10  $\mu$  moles of  $\beta$ -mercaptoethanol, 8  $\mu$  moles of  $MgCl_2$ , 8  $\mu$  moles of  $MnCl_2$ , 100 mcg of calf thymus DNA, each 800 m $\mu$  moles of GTP, UTP and CTP, and 8 m $\mu$  moles of  $^{14}C$ -ATP in a final volume of 1.6 ml. At intervals an aliquot of 0.2 ml was withdrawn for the determination of radioactivity incorporated into acid insoluble material. Purified enzyme contained no more contamination of enzyme which decomposes the reaction product.

を示す部分と一致して存在した。酵素活性の高い部分を集めて硫酸分画を行った。その結果は図2に示すごとく、RNAポリメラーゼ活性の強い部分は、硫酸30~65%飽和で沈殿する蛋白画分に認められた。沈殿をTMA緩衝液に溶解し、同緩衝液で透析し、それを部分精製RNAポリメラーゼとした。その酵素液の純度をみるために、時間ごとに活性を追求した。図3にみられるごとく、RNAポリメラーゼ反応生成量は30分で最大に達し、その後急速に減少する。この事実は部分精製酵素の中に、RNAを壊すRNAaseのようなものが混在していることを示す。

直線グリセロール密度勾配遠心法によるRNAポリメラーゼの精製：部分精製RNAポリメラーゼを直線グリセロール密度勾配遠心法で分画した結果は、図4に示したごとくである。RNAポリメラーゼ活性の高い画分は、非活性の高濃度蛋白画分から比較的よく分離された。高い酵素活性を示す画分を集め緩衝液に対し透析してグリセロールを除いた後、再び105,000 g, 10時間遠心の沈渣として酵素を回収し、これを緩衝液に溶解したものを精製酵素標品とした。精製酵素標品を用いて反応生成量を経時的に観察したところ、生成量は150分まで経時的に増加し、さきの部分精製酵素を用いた際に観察されたようなRNAを分解する酵素の混在を示唆するごとき現象は認められなかった。

精製RNAポリメラーゼに対するrifampicinの効

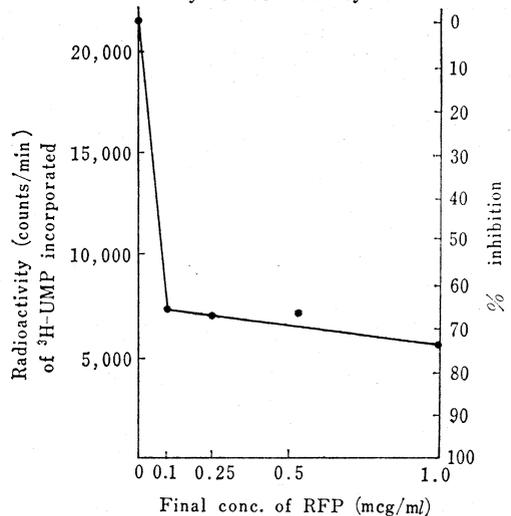
Fig. 6. Effect of Time of Addition of Rifampin on RNA Polymerase Reaction



Reaction mixture contained 0.776 mg protein of purified enzyme preparation, 60  $\mu$  moles of Tris-HCl, pH 7.9, 25  $\mu$  moles of  $\beta$ -mercaptoethanol, 20  $\mu$  moles of  $MgCl_2$ , 10  $\mu$  moles of  $MnCl_2$ , 250 mcg of calf thymus DNA, each 200 m $\mu$  moles of GTP, ATP and CTP, and 0.45 m $\mu$  moles of  $^3H$ -UTP in a final volume of 1.0 ml. At intervals, an aliquot of 0.2 ml was withdrawn for the assay of the enzyme activity.

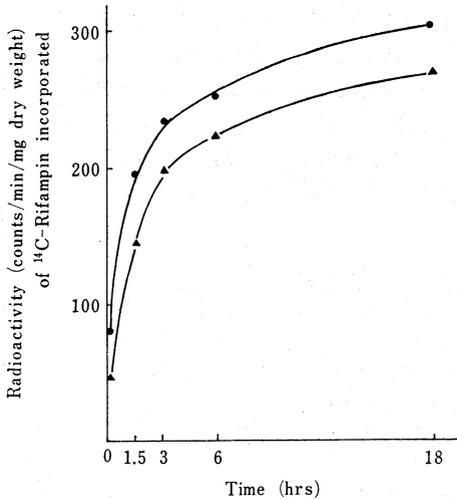
●—●: control, ▲—▲: rifampin was added 30 minutes after the start of the reaction (at the point indicated by an arrow) at a final concentration of 1 mcg/ml, ●—●: enzyme was preincubated with the drug for 30 minutes at 37°C and then reaction was started by addition of missing components.

Fig. 7. Effect of Rifampin on RNA Polymerase Activity



Each reaction mixture consisted of 0.155 mg protein of purified enzyme preparation, 8  $\mu$  moles of Tris-HCl, pH 7.9, 5  $\mu$  moles of  $\beta$ -mercaptoethanol, 4  $\mu$  moles of  $MgCl_2$ , 4  $\mu$  moles of  $MnCl_2$ , 50 mcg of calf thymus DNA, each 40 m $\mu$  moles of GTP, ATP and CTP, 0.045 m $\mu$  moles of  $^3H$ -UTP. Rifampin was added to give a final concentration of 0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mcg/ml to each reaction mixture respectively. Final volume was 0.2 ml. The enzyme was preincubated with the drug for 30 minutes and the reaction was started with addition of the missing components. The mixture was incubated at 37°C for further 150 minutes.

Fig. 8. Uptake of  $^{14}\text{C}$ -rifampin by *M. phlei* and *M. phlei* Resistant to Rifampin



$^{14}\text{C}$ -rifampin was added to the cell suspension to a final concentration of  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ . At intervals an aliquot of the suspension was removed and washed on millipore filter membrane. The radioactivity remained on the filter was determined.

●—●: *M. phlei* sensitive to rifampin.  
▲—▲: *M. phlei* resistant to rifampin

果: BCG 由来の精製 RNA ポリメラーゼ活性に対する効果を観察するにあつて、rifampicin 添加の時期についての実験を行った。図6にみられるごとく、rifampicin の RNA ポリメラーゼに対する阻害効果は、酵素と rifampicin をあらかじめ  $37^\circ\text{C}$  に 30 分インキュベートした後、他の反応液構成成分を加えて反応を開始させた場合に発現し、反応開始 30 分後に rifampicin を添加しても阻害効果は観察されなかつた。この結果から rifampicin は RNA 生合成の各段階のうち RNA 鎖延長の過程には影響を与えず、合成開始の段階に作用することが知られた。次いで反応液中の最終濃度が  $0.1\ \text{mcg}/\text{ml}$  から  $1\ \text{mcg}/\text{ml}$  に至る濃度になるような量の rifampicin と酵素をあらかじめ 30 分間  $37^\circ\text{C}$  にインキュベートした後、他の構成成分を加えて反応を開始させ 150 分インキュベートした際の反応生成量を比較して、各濃度での rifampicin の阻害効果を観察した。図7に示すごとく、BCG より得られた精製 RNA ポリメラーゼ活性に対する rifampicin の阻害は、 $0.1\ \text{mcg}/\text{ml}$  の終濃度で 70% であつた。rifampicin の濃度をさらに高くしても阻害の程度はあまり増加せず、 $1\ \text{mcg}/\text{ml}$  で 73% の阻害を示すにとどまつた。

Rifampicin 感性および耐性 *M. phlei* の放射性 rifampicin のとり込み: 抗酸菌の rifampicin 耐性機構の一端を知るために、rifampicin に対する細胞壁の透過性を *M. phlei* の感性菌および耐性菌とで比較した。図8に示すごとく、感性菌と耐性菌の間には、 $^{14}\text{C}$ -

rifampicin のとり込みのうえで顕著な差異は認められなかつた。すなわち rifampicin 耐性の機序は耐性菌における細胞壁の透過性の変化に基づくものではなく、RNA ポリメラーゼ自体の構造上の変化に起因することが想像された。

## 考 案

*E. coli* を用いた実験から、rifampicin は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を阻害することが明らかにされた。RNA ポリメラーゼは DNA の遺伝性を写しとる段階、すなわち転写 (transcription) に関与する酵素で、トランスクリプターゼ (転写酵素) とも呼ばれる。本酵素は DNA を鋳型として 4 つのライボスクレオタイド (ATP, GTP, UTP, および CTP) を RNA の分子内に重合させ、大きな分子量をもつ DNA に貯えられている遺伝情報の一部を RNA 分子に写しとり、蛋白合成の場に伝える。本酵素が触媒する反応は、4 段階を経て行われることが主として *E. coli* の実験系で明らかにされている。すなわち ① DNA と酵素が結合し複合体が形成される反応 (会合, association)。② 次いで DNA-酵素複合体に最初の 2 コのライボスクレオタイドが結合し、この間にホスホジェステル結合を成立させる (合成開始, initiation)。③ さらに基質ライボスクレオタイドが付加され、RNA 鎖が延長する (重合, polymerization または延長 elongation)。④ 反応の終結 (終結 termination) の 4 段階である。以上の 4 段階のうち rifampicin が阻害するのは合成開始の段階で、いつたん合成が開始されたあとの RNA 鎖の延長段階では阻害は認められない<sup>5)</sup>。rifampicin は RNA ポリメラーゼと結合し複合体を形成し、この複合体はセファデックスカラムにより単離された<sup>6)</sup>。以上の事実はすべて *E. coli* を用いた実験から知られたものである。抗酸菌に対する rifampicin の作用機序について、White らは *M. smegmatis* より部分精製した RNA ポリメラーゼを用いて実験した成績から、 $1\ \text{mcg}/\text{ml}$  の rifampicin で 90% 阻害を示すことを報告している<sup>7)</sup>。

今回のわれわれの報告は *M. bovis*, BCG から DEAE-セルローズ、硫酸分画、さらにグリセロール密度勾配遠心により精製した DNA 依存性 RNA ポリメラーゼに対する rifampicin の阻害効果を観察したものである。DEAE-セルローズカラムおよび硫酸分画による部分精製の段階では RNA 分解酵素の混在がみられたが、グリセロール密度勾配遠心によりこれを除きえた。精製酵素は透析によりグリセロールを除去したあと、 $105,000\ \text{g}$  10 時間の遠心で沈渣として回収し、緩衝液に溶解し、少部分ずつ  $-70^\circ\text{C}$  に保存したが、活性は数週間の観察期間中良く保たれた。

この BCG 由来の精製 DNA 依存性 RNA ポリメラ

ーゼ活性は、0.1 mcg/ml の rifampicin で 70% 阻害を受けたが、rifampicin 濃度をさらに上げて阻害の程度の上昇は著明でなく“dose dependency”はあまり明らかでなかつた。最近 *E. coli* の精製 RNA ポリメラーゼによる DNA 依存性のアデノシン重合体形成<sup>9)10)</sup> および DNA 非依存性のアデノシン重合体、ユリジン重合体形成<sup>11)12)</sup> が報告され、これらの酵素は RNA ポリメラーゼと分離不能であるという。BCG より精製した RNA ポリメラーゼにも非依存性のポリ A およびポリ U 形成能を認めたので、これが rifampicin の濃度を上げて阻害率が増加しない理由として考えられる。RNA ポリメラーゼ活性阻害を観察する際の rifampicin 添加の時期についての実験成績から、BCG 由来の精製酵素に対する阻害効果の発現には酵素と rifampicin のプレインキュベーションが必要で、rifampicin は RNA 合成の開始の段階を阻害し、合成が開始され RNA 鎖が伸長しつつある重合の段階には作用しないことが知られた。

豊原<sup>13)</sup>は結核菌を用いて <sup>14</sup>C-rifampicin のとり込みを感性菌と耐性菌とで比較している。今回の実験でも rifampicin 耐性の *M. phlei* が <sup>14</sup>C-rifampicin を感性菌と大差なくとり込んでいることから、耐性の機構は薬剤に対する細胞壁透過性の変化によるものでなく、RNA ポリメラーゼ自体の構造上の変化に基づく rifampicin と酵素の結合性の変化によることが推定された。

### 結 論

結核菌に対する rifampicin の作用機序を明らかにするため、*Mycobacterium bovis*, BCG より精製した DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性に対する rifampicin の阻害を観察した。また rifampicin 耐性の機構を知るため、*M. phlei* の rifampicin 感性および耐性菌を用い、<sup>14</sup>C で標識した rifampicin のとり込みをみた。

その結果 rifampicin は BCG より精製した DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を 0.1 mcg/ml の濃度で

約 70% 阻害した。rifampicin の濃度を上げて阻害率は増加しなかつた。rifampicin は RNA 合成の開始 (initiation) を阻害したが延長 (chain elongation) は阻害しなかつた。rifampicin 耐性の *M. phlei* は、耐性菌よりわずかに劣る程度に <sup>14</sup>C-rifampicin をとり込む。したがって rifampicin の耐性機構は膜透過性の変化に基づくものではなく、RNA ポリメラーゼ自体の構造上の変化によるものと考えられた。

### 文 献

- 1) Lancini, G. C. and Sartori, G.: *Experientia*, 24: 1105, 1968.
- 2) Hartmann, G., Honikel, K. O., Knüsel, F. and Nüesch, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 145: 843, 1967.
- 3) Sippel, A. and Hartmann, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 157: 218, 1968.
- 4) Umezawa, H., Mizuno, S., Yamazaki, H. and Nitta, K.: *J. Antibiot.*, 21: 234, 1968.
- 5) Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K. and Staehelin, M.: *Proc. N. A. S.*, 61: 667, 1968.
- 6) Wehrli, W., Nüesch, J., Knüsel, F. and Staehelin, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 157: 215, 1968.
- 7) White, R. J., Lancini, G. C. and Silvestri, L. G.: *J. Bact.*, 108: 737, 1971.
- 8) Fuchs, E., Zillig, W., Hofschneider, P. H. and Preuss, A.: *J. Mol. Biol.*, 10: 546, 1964.
- 9) Chamberlin, M. and Berg, P.: *Proc. N. A. S.*, 48: 81, 1962.
- 10) Chamberlin, M. and Berg, P.: *J. Mol. Biol.*, 8: 708, 1964.
- 11) Smith, D. A., Ratliff, R. L., Trujillo, T. T., Williams, D. L. and Hayes, F. N.: *J. Biol. Chem.*, 241: 1915, 1966.
- 12) Smith, D. A., Ratliff, R. L., Williams, D. L. and Martinez, A. M.: *J. Biol. Chem.*, 242: 590, 1967.
- 13) 豊原希一: 結核, 46: 211, 1971