

原 著

結核菌に対する Kanamycin の作用機序

大泉 耕太郎・熊野 伸子
今野 淳・岡 捨 己

東北大学抗酸菌病研究所内科

受付 昭和 48 年 10 月 20 日

MODE OF ACTION OF KANAMYCIN ON MYCOBACTERIUM
BOVIS, BCG*Kotaro OIZUMI, Nobuko KUMANO, Kiyoshi KONNO
and Sutemi OKA

(Received for publication October 20, 1973)

Mode of action of Kanamycin on Mycobacterium bovis BCG was studied. S-30 extract as a source of ribosomes and S-100 fractions as a source of supernatant factors were prepared from BCG cells. Ribonucleic acid (RNA) was extracted from phage f_2 particles and used as a messenger.

In BCG ribosomal system employing phage f_2 RNA as a messenger, the optimum magnesium concentration for ^{14}C -leucine incorporation into polypeptide was 14 mM and the synthesis reached maximum at 120 minutes incubation.

When Kanamycin was added to the system actively engaged in polypeptide synthesis, it caused immediate and intensive inhibition. At various concentrations of Kanamycin, the inhibitory effect on polypeptide synthesis was examined. Incorporation of ^{14}C -leucine into polypeptide decreased to 45.8% of the control at 10 μg per ml of Kanamycin and to 42.0% at 100 μg per ml. From these evidences it was shown that Kanamycin inhibits the chain extension in polypeptide synthesis. By zonal centrifugation analysis, the changes in distribution of ribosome classes and messenger RNA in BCG cells treated with Kanamycin were examined. In BCG cells treated with 100 μg per ml of Kanamycin for one hour, disappearance of polysomes and messenger RNA in the same region was observed, indicating the blockage of ribosomal cycle.

Kanamycin inhibits polypeptide synthesis, followed by the breakdown of polysomes and detachment of messenger RNA.

Kanamycin はアミノ糖類抗生物質 (aminoglycoside antibiotics, oligosaccharide antibiotics) で、近縁物質である Streptomycin と共に抗結核剤として広く用いら

れている。

アミノ糖類抗生物質の作用機序については主として大腸菌を用いて研究が進められ、コドン-アンチコドン

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

(codon-anticodon) の誤読 (misreading) に基づく異常蛋白の蓄積がその作用機序とされていた¹⁾⁻³⁾。近年、ポリ U、ポリ A などの人工メッセンジャー RNA に代つて、より自然なメッセンジャーとしてファージ RNA を用いる *in vitro* の蛋白合成の実験方法が開発され、蛋白合成の詳しいメカニズムすなわち合成開始 (initiation)、ポリペプチド鎖の延長 (extension, elongation)、終了 (termination) などの機構が明らかにされるにつれて Streptomycin の一次作用点も次第に明確になつてきている。

Davis および Modolell⁴⁾ はファージ RNA をメッセンジャー RNA とし大腸菌ライボソームを用いた *in vitro* のポリペプチド合成系で Streptomycin はポリペプチド鎖の延長を急速にしかもほぼ完全に阻止することおよび同時にポリライボソーム (ポリソーム) の崩壊を起こすことを認めた。また Luzzato および Schlessinger⁵⁾ は Streptomycin はポリペプチド鎖の延長ではなしに合成の開始を阻害しライボソーム分布の扁奇すなわちポリソームの減少とモノソームの蓄積をもたらすと報告している。

以上の成績はすべて大腸菌を用いて得られたものであり、抗酸菌の *in vitro* でのポリペプチド合成系に対する Kanamycin の作用機序に関する研究報告はなされていない。

有路、山口⁶⁾ は Kanamycin と接触した結核菌の超微形態についての電顕学的観察を行い、蛋白合成の阻害を示唆するライボソームおよびメゾソームの消失が認められることを報告している。

本研究はウシ型菌 BCG を用いて Kanamycin の作用機序を観察したものである¹⁰⁾。人工ホモポリヌクレオチドおよびファージ RNA をメッセンジャー RNA として用いた試験管内ポリペプチド合成系に対する Kanamycin と影響を観察し、更に Kanamycin による生菌体内のライボソーム分布の変化を蔗糖密度勾配遠心法により観察した。

実験材料ならびに方法

材料：使用菌株；ウシ型菌 BCG 日本株を用いた。

放射性アミノ酸；¹⁴C-L-leucine (U) (比放射能 282 mCi/m mole) および ¹⁴C-L-isoleucine (U) (比放射能 270 mCi/m mole) は第一化学薬品より購入した。³H-L-phenylalanine (G) (比放射能 4.5 Ci/m mole) は New England Nuclear, Boston, Mass., U. S. A. から得た。

phospho (enol) pyruvate, trisodium salt および pyruvate kinase (type II) は Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss., U. S. A. 製のものを用いた。ポリ U (ポリウリジン酸アンモニウム塩) は Miles Laboratories, Inc., Kankakee, Ill., U. S. A. 製を使用した。

方法：ライボソーム標品としては S-30 extract を、また上清因子および補助因子標品としては S-100 画分をそれぞれ BCG 菌体より Modolell, Davis の方法⁴⁾で調製した。

S-30 extract の調製法；ソートン液体培地に 2 週間表面培養して得た 36 g の BCG 菌体を 1.5 倍量の海砂で 20 分間摩砕し、菌 1 g につき 2 ml の標準緩衝液 (0.01 M Tris, pH 7.8, 60 mM NH₄Cl, 7.5 mM 酢酸マグネシウム, 6 mM 2'-メルカプトエタノール) を徐々に加え糊状としたものを 20,000 g, 15 分遠心した。上清にデオキシライボヌクレアーゼを終濃度 3 μg/ml に加え、30,000 g, 35 分遠心し、上清を 500 倍量の緩衝液で透析したのち更に一度遠心した。この上清を小試験管に分注して -70°C で凍結保存した。

S-100 画分の調製；透析前の S-30 extract を、105,000 g, 3 時間遠心し、その上層 2/3 を注意深く吸い取り透析した。透析後再び 105,000 g, 3 時間遠心後の上清を S-30 extract と同様に保存した。

ファージ f₂ の分離；ファージ f₂ 粒子の分離は、Webster ら⁷⁾ の方法に拠つた。ポリペプトン培地 (pH 7.8) 4 l に E. coli, W 1895 HfrC の一夜培養液 40 ml を加え、更に培養を続けた。濁度がプラトーに達した後ファージ f₂ を感染させた。溶菌が進み培地が澄んできた時点で終濃度が 2 M になるように固型硫酸アンモニウムを加え 4°C に一夜放置した。沈殿を遠心により集め 40 ml の水に浮遊させ、これに 100 μg/ml および 50 mM の終濃度になるように卵白リゾチームおよび EDTA を加えて溶菌を完成させた。更に粘度を低下させるためデオキシライボヌクレアーゼ (2 μg/ml) および硫酸マグネシウム (0.2 M) を添加した。13,000 g 30 分の遠心で菌体残渣を除いたあと硫酸アンモニウムを 2 M 濃度に加え、4°C に放置してファージ粒子を沈降させた。沈殿を遠心で集め 12 ml の水に懸濁した。この懸濁液を 26,000 g で 20 分遠心し上清をとり、これを 105,000 g で 2 時間遠心してファージをペレットして集めた。塩化セシウム遠心法による精製過程は省略した。

ファージ f₂ RNA の抽出；ファージペレットを 0.01 M tris-HCl, pH 7.6 (0.14 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 μg/ml ポリビニル硫酸, 0.5% ベントナイトおよび 2% ナトリウムドデシル硫酸を含む) に懸濁した。等量のフェノール溶液 (フェノール：1 mM EDTA=75：25, v/v) を加え混合液を 10 分間激しく振とうした。3,000 rpm で 10 分間遠心したのち水層を分離した。フェノール層から更に 2 回抽出し、3 回分の水層を合わせ酢酸カリウムを 0.1 M に添加し、2 倍量のエタノールを加えて -20°C に置き RNA を沈殿させた。沈殿を遠心して集め乾燥したのち -20°C に保存した。

転移 RNA (t-RNA) の調製；Holley ら⁸⁾ の方法を若

干変更⁹⁾してアミノ酸受容能を有する RNA (transfer RNA, tRNA) を酵母より調製した。酵母 900 g を 1.2 l の脱イオン水に浮遊しフェノール溶液 (フェノール: 水=78:28 v/v) 1.8 l を加え 1 時間攪拌したのち 4°C に一夜放置した。3,000 rpm 15 分の遠心で水層および中間層を集め再び遠心した。水層を注意深く集め、これに 1/10 容の 20% 酢酸カリウム液, pH 5 および 2.5 容の冷 95% エタノールを加えた。混合液を攪拌したのち 4°C に一夜放置した。上澄を捨て、残りを遠心し沈殿を集めた。これを等容の 70% および 90% の冷エタノールで洗い、更にエーテルで洗った。洗浄後の沈渣を 200 ml の 0.02 M 酢酸カリウム緩衝液 pH 5.6 に溶き不溶物を 8,000 rpm 5 分の遠心で除いた。この溶液をあらかじめ上記の緩衝液で処理した DEAE-セルロース 15 g のカラム (直径 3 cm 長さ 15 cm) に吸着させたのち溶出液の 260 m μ における吸光度が 0.05 になるまで 0.3 M の塩化カリウム溶液でカラムを洗浄した。洗浄後 400 ml の 0.8 M 塩化カリウム溶液で t-RNA の溶出を行った。t-RNA を含む画分を集め 2 倍容の冷エタノールを加え -20°C に放置し沈殿を完成させた。上澄を捨てた残りを遠心し沈渣を集め、これを 1 mM EDTA を含む 0.05 M Tris-HCl, pH 9.0, 100 ml に溶き 37°C に 1 時間置き、t-RNA と結合しているアミノ酸を遊離させた。再び溶液に 2 M 酢酸カリウム, pH 5.0 を加えて酸性にしたのち 2 容の冷エタノールを加え -20°C に一夜置き遠心により沈渣を集めた。沈渣を等容の 70% エタノール, エタノールおよびエタノール-エーテル (1:1) で洗い乾燥したのち -70°C に保存した。

ポリペプチド合成; フェージ f₂ RNA をメッセンジャーとするポリペプチド生成観察のための反応系の組成は Modolell, Davis⁴⁾の方法を踏襲した。反応液の組成は次のごとく 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 60 mM NH₄Cl, 12 mM Magnesium acetate, 10 mM reduced glutathione, 1 mM adenosine triphosphate (ATP), 0.02 mM guanosine triphosphate (GTP), 3 mM potassium phosphoenol pyruvate, 30 μ g/ml pyruvate kinase, 0.0355 mM ¹⁴C-leucine, 0.05 mM 19 種アミノ酸, 22.5 μ g/ml フェージ f₂ RNA, 1.12 mg/ml の t-RNA, 1/10 容のブレインキュベートした S-30 extract* (蛋白質量 2.65 mg/ml) および 2/10 容の S-100 画分 (3.6 mg/ml) より成る。この反応液中のマグネシウムの終濃度はブレインキュベートした S-30 extract および S-100 画分の

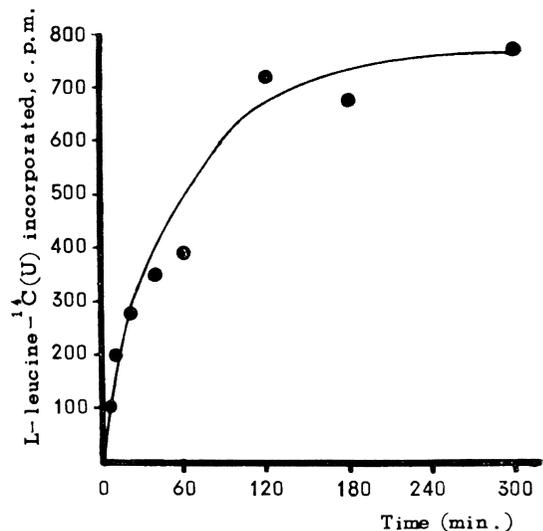
* S-30 extract の endogenous メッセンジャーの影響をなくすため 0.2 ml の S-30 extract に 4 μ l の Tris-HCl, pH 7.8 と 10 mM ATP, 0.2 mM GTP, 50 mM phosphoenol pyruvate および 30 μ g/ml の pyruvate kinase を含む溶液 20 μ l 加え、水で 0.3 ml とし 37°C に 30 分間インキュベートしたものをブレインキュベート S-30 extract とした。

添加により, 13.75 mM になる。poly U (100 μ g/ml) をメッセンジャーとした場合は 0.0037 mM の ¹⁴C-isoleucine および 0.0111 mM の ³H-phenylalanine を ¹⁴C-isoleucine の代りに用いた。

反応液を 37°C にインキュベートし一定時間ごとに一定量を取り、これに 5% 冷トリクロル酢酸を加え、反応を停止させたのち 90°C 75 分間加熱して、熱トリクロル酢酸不溶性物質をメンブランフィルター (ミリポア, type HA, 孔サイズ 0.45 μ) 上に集め 5% トリクロル酢酸 5 ml で 2 回、更に 0.5% 液 30 ml で洗浄した。フィルターを乾燥し 15 ml のトルエンシンチレーター (2,5-diphenyloxazol (DPO) 5g, 1,4-Bis [2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)]-benzene (POPOP) 0.4g をトルエン 1 l に溶解) 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。

Kanamycin 処理前後の BCG 菌体中のライボソームクラスおよびメッセンジャー RNA の分布; Dubos 液体培地に 2 週間培養の BCG を用い 10 mg/ml の浮遊液を調製した。¹⁴C-uracil を 0.2 μ Ci/ml に添加し 24 時間 37°C に置きライボソーム中の RNA にまずラベルして置き、Kanamycin を 100 μ g/ml に添加、³H-uracil を 20 μ Ci/ml に加え、20 分間パルスラベリングを行った。菌体を遠心で集め、冷食塩水で洗浄したのちドライアイスで冷却しながら海砂と共に摩砕し、少量の 10 mM MgSO₄ 含有の Tris-HCl, pH 7.5 を加え 8,000 g 10 分間遠心して抽出液を得た。この 1.0 ml を 15~30% の直線蔗糖密度勾配の上に重層し日立 RP 25 A スウィングローターで 25,000 rpm 5 時間 2°C で遠心したのち、32 の画分に分画した。それぞれの画分の放射活性

Fig. 1. Time Course of f₂RNA Directed ¹⁴C-leucine Incorporation into Acid Insoluble Materials by BCG Ribosomes

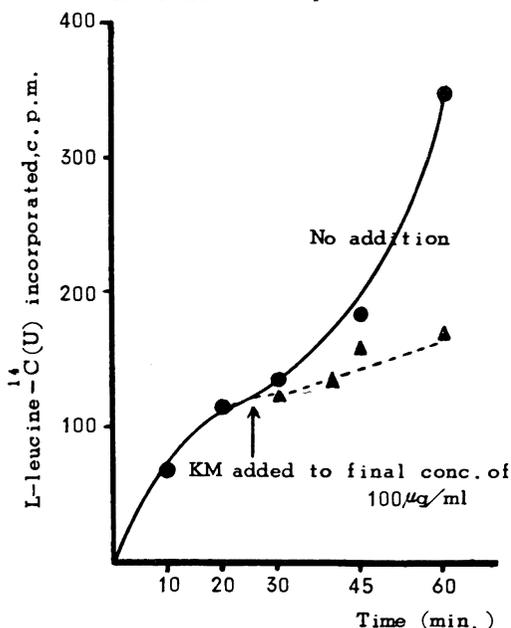


を Beckman LS 150 型液体シンチレーションカウンターで測定した。

結 果

ファージ f_2 RNA をメッセンジャー RNA として用いた際の BCG ライソソームによる ^{14}C -leucine のポリペプチドへの取り込みの経時的推移を図 1 に示した。BCG ライソソーム系による至適 Mg イオン濃度は予備実験の成績から 14 mM 付近にあることが知られ、これは *E. coli* ライソソーム系におけるその 2 倍強である。図 1 にみられるごとくポリペプチド生成は経時的に増加し 120 分でプラトーに達した。

Fig. 2. Kinetics of Inhibition by Kanamycin of ^{14}C -leucine Incorporation



At 25 minutes incubation period the reaction mixture was divided into two portions. Kanamycin was added to a portion at a final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. At intervals samples were removed for the assay. The data have been corrected for the small dilution caused by the addition of kanamycin solution.

^{14}C -leucine のポリペプチドへの取り込みが進行している f_2 RNA をメッセンジャーとする合成系へ Kanamycin を添加すると、それ以後の ^{14}C -leucine の取り込みは強力に阻止される (図 2)。このことは Kanamycin がライソソーム上のポリペプチド鎖の伸長を阻止することを示すものと考えられる。

ファージ f_2 RNA または poly U をメッセンジャーとした場合のポリペプチド生成に対する Kanamycin の種々の濃度における阻害効果を観察した結果を表 1 A および B に示した。

表 1 A にみられるごとく f_2 RNA をメッセンジャーとした場合 ^{14}C -leucine のポリペプチドへの取り込みは反応系での Kanamycin 濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき対照の 45.8% に減じ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のときには対照の 42% に減少する (表 1 A)。これに対し人工メッセンジャー poly U の存在下での ^3H -phenylalanine の Polyphenylalanine への取り込みは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Kanamycin を添加した場合、対照の 81.4%、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のときでも対照の 80.8% に減ずるにとどまった (表 1 B)。すなわち Kanamycin によるポリペプチド生成阻害はより生理的で自然に近いファージ f_2 RNA をメッセンジャーとして用いたときのほうが人工メッセンジャーであるホモポリマーを用いた場合より遙かに顕著であることが知

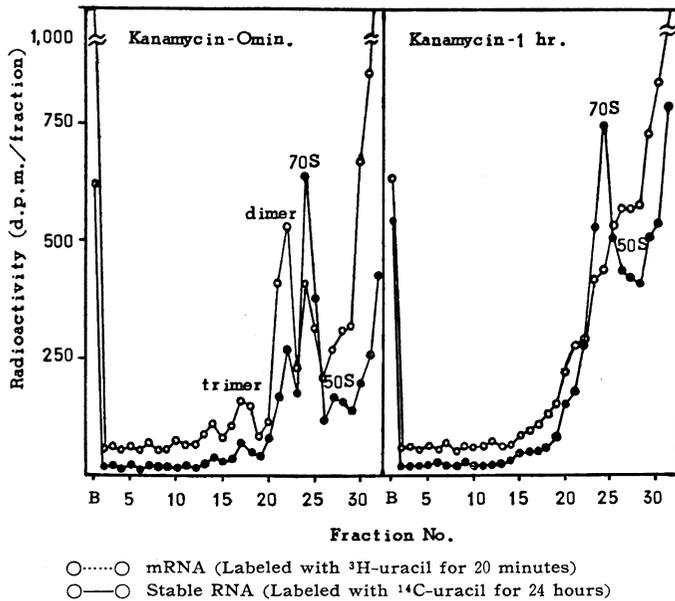
Table 1 A. Amino Acid Incorporation into Polypeptide with Phage f_2 RNA by the Ribosomes from *M. bovis*, BCG in the Presence of Kanamycin

Concentration of Kanamycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Phage f_2 RNA directed	
	^{14}C -Leucine incorporation c.p.m.	(%)
0	1,425	(100)
1	822	(57.7)
10	653	(45.8)
100	599	(42.0)
250	526	(36.9)
500	407	(28.6)

Table 1 B. Amino Acid Incorporation into Polypeptide with Homopolynucleotide (poly U) by the Ribosomes from *M. bovis*, BCG in the Presence of Kanamycin

Concentration of Kanamycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Poly U directed	
	^3H -Phenylalanine incorporation c.p.m. (%)	^{14}C -Isoleucine incorporation c.p.m. (%)
0	13,070 (100)	550 (100)
1	13,250 (101.4)	620 (112.7)
10	10,640 (81.4)	1,050 (190.9)
100	10,560 (80.8)	1,620 (294.5)
250	10,490 (80.3)	2,390 (434.5)
500	10,490 (80.3)	2,720 (494.5)

Fig. 3. Disappearance of Polysomes Consistent with mRNA in that Region and Accumulation of 70S Monosome were Observed in the Cells Treated with Kanamycin for 60 Minutes



られた。

一方 Kanamycin のコドン-アンチコドン誤読 (misreading) 活性を poly U 下での polyisoleucine 生成から観察した。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Kanamycin 存在下では polyisoleucine の生成は対照の 190.9% に増加し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Kanamycin 濃度ではそれぞれ対照の 294.5% および 434.5% にまで増加した。このように poly U 存在下での polyisoleucine 生成がみられることから、Kanamycin は BCG ライボソーム系においてもコドンの誤読を惹起することが知られた。

BCG 生菌を Kanamycin と接触させた場合のライボソームクラスとメッセンジャー RNA の分布状態の変化を観察した。

Kanamycin と接触していない対照菌体中の BCG ライボソームおよびメッセンジャー RNA の分布の状況は図 3 に示すごとくで遊離の 50S および 70S ライボソーム粒子のピークに加えてポリソームとして主に二量体 (ダイマー)、三量体 (トライマー) のピークが明瞭に認められる。これに対し図 3B に示すごとく Kanamycin と 1 時間接触した菌体中のライボソームクラス分布のパターンには大きな変化が認められる。すなわちポリソーム、特に二量体、三量体のピークの消失が著しく、これに相応して 70S および 50S 粒子の蓄積が顕著となり Kanamycin によりライボソームサイクルがブロックされたことを示している。

考 案

アミノ糖類抗生物質の制菌作用機序はペプチド合成の場における genetic code の誤読によると想定されていた。すなわち DNA から復写された情報を蛋白合成の場に伝えるメッセンジャー RNA の指令がアミノ糖類抗生物質がもたらすライボソームの解読機能の変調より誤つて翻訳される結果、菌体内に異常蛋白が蓄積するという考え方である。

このコドン誤読説 (codon misreading theory) は poly U, poly A などの人工ホモポリヌクレオチドをメッセンジャー RNA として代用した実験成績に立脚したものである。最近、これに代つて、ファージ RNA をメッセンジャー RNA として用いるポリペプチド合成系が開発され実験が進むに従い、コドンの誤読のみでは説明できない現象が知られてきた。

すなわちウイルス RNA をメッセンジャーとしたポリペプチド合成の場に Streptomycin を添加すると、ポリペプチドの合成はほとんど瞬時にしかも完全に停止する⁴⁾。したがって異常蛋白が生成され、これが体内に蓄積されるいとまはないものと思える。また後に述べるごとく E. coli の生菌体中では Streptomycin の添加によりライボソームクラスの分布に著しい偏りがみられるようになる。このような事実からコドンの誤読とポリペプチド合成の阻害はアミノ糖類抗生物質の作用の異なつた二面を表現したものと考えられるようになってきた。

誤読説に対する反証として Brownstein および Lewandowski¹⁰⁾ はライボソームレベルでの実験では Streptomycin の影響を強く受けてコドンの誤読が高度に認められるが、Streptomycin の発育阻止は全く受けない E. coli の変異菌の存在を示した。Tanaka ら¹¹⁾ は deoxystreptamine 部分は強いコドン誤読効果を示すが、制菌効果を示さない事実からコドンの誤読と制菌効果とは互いに独立した作用であることを報告している。

Davis 一派は Streptomycin の E. coli に対する作用機序について次のような考え方を示している¹²⁾¹³⁾。すなわち Streptomycin はライボソームの 30S 亜粒子の A-site (aminoacyl-site または acceptor-site) にひずみ (distortion) を与え aminoacyl-tRNA が結合するのを妨げる。その結果合成途上にあるペプチド鎖は P-site (peptidyl site または donor site) に凍結されべ

プチド鎖の延長は止まる。Streptomycin による A-site のひずみは A-site が同時にコドン-アンチコドンの認識の部位 (recognition site) でもあるので, poly U, poly A などの人工メッセンジャーを用いた場合の Streptomycin によるコドン誤読の原因ともなる。更にこの後の彼らの報告¹⁴⁾によれば, Streptomycin はペプチド合成開始時のイニシエーターである フォルミルメチオニル-tRNA を E. coli の 70 S-initiation complex から離脱させるので 30 S ライボソーム上の P-site (peptidyl-site または puromycin-reactive site) のひずみをもひき起こすものと考えられるという。

ファージ RNA をメッセンジャーとした BCG ライボソーム系でのポリペプチド合成反応は 120 分でプラトーに達するが, これは E. coli 系の反応速度に比べると非常に緩徐である。すでに ¹⁴C-leucine のポリペプチドへの取り込みを行つている BCG ライボソーム系に Kanamycin を終濃度 100 μ g/ml に添加すると, 取り込みは直ちに, しかも強力に阻害された。この事実は Kanamycin は形成途上のポリペプチド鎖の伸長を妨げ, ペプチド鎖の完成を阻止することを示す。

ファージ RNA または合成 ポモポリヌクレオチド (poly U) をメッセンジャーとする系に種々の濃度に Kanamycin を添加してポリペプチド生成に対する阻害効果をみると, poly U を用いた場合の polyphenylalanine 生成阻害に比しファージ RNA を用いた際の leucine のポリペプチドへの取り込みのほうが遙かに強く阻止された。また poly U を用いて Kanamycin のコドン-アンチコドンの誤読 (misreading) 活性を観察したところ, 本来 poly U (U, U, U, ……) というコードに相当しないはずの isoleucine のポリペプチドへの取り込みが 250 μ g/ml の Kanamycin 存在下では非添加対照の 434% にも促進された。しかしコード poly U に相当する phenylalanine の取り込み阻害は軽度であつた。このコドンの誤読はライボソーム上の A-site が Kanamycin により機能障害を起こしたためと説明しようが, これが直ちに制菌作用とは結びつきえない理由は先に述べたごとくである。

Modolell, Davis⁴⁾¹⁴⁾ および Luzzatto, Schlessinger⁵⁾¹⁵⁾ は E. coli に Streptomycin を作用させた場合にみられるポリソームの崩壊を観察し報告している。

Kanamycin を 1 時間作用させた BCG 生菌を体中のライボソームクラスおよび mRNA の分布を観察したところ Kanamycin 作用菌ではポリソームの消失とこれに相当する部分での mRNA の消失が認められた。このことから Kanamycin は BCG 菌体中のライボソームサイクルをブロックすることが知られた。

以上の実験成績からウシ型菌 BCG に対する Kanamycin の作用機序はポリペプチド合成阻害とこれに引き続くポリソームの崩壊と mRNA の離脱にあると結論された。

文 献

- 1) Davies, J., Gilbert, W. and Gorini, L.: Proc. Natl. Acad. Sci., 51: 883, 1964.
- 2) Davies, J., Gorini, L. and Davis, B.D.: Mol. Pharmacol., 1: 93, 1965.
- 3) Masukawa, H. and Tanaka, N.: J. Antibiotics, Ser. A, 21: 70, 1968.
- 4) Modolell, J. and Davis, B.D.: Proc. Natl. Acad. Sci., 61: 1279, 1968.
- 5) Luzzatto, L., Apirion, D. and Schlessinger, D.: Proc. Natl. Acad. Sci., 60: 873, 1968.
- 6) Ariji, F., Yamaguchi, J. and Oka, S.: Kekka-ku, 46: 53, 1971.
- 7) Webster, R.E., Engelhardt, D.L. and Zinder, N.D.: J. Mol. Biol., 29: 27, 1967.
- 8) Holley, R.W., Apgar, J., Doctor, B.P., Farrow, J., Marini, M.A. and Merrill, S.H.: J. Biol. Chem., 236: 200, 1961.
- 9) 河田昌東: 蛋白質核酸酵素, 15: 1201, 1970.
- 10) Brownstein, B.L. and Lewandowski, L.J.: J. Mol. Biol., 25: 99, 1967.
- 11) Tanaka, N., Masukawa, H. and Umezawa, H.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 26: 544, 1967.
- 12) Davis, B.D.: Proceedings of the 6th international congress of chemotherapy, vol. 1, page 10, Univ. Tokyo Press, 1970.
- 13) Modolell, J. and Davis, B.D.: Nature, 224: 345, 1969.
- 14) Modolell, J. and Davis, B.D.: Proc. Natl. Acad. Sci., 67: 1148, 1970.
- 15) Luzzatto, L., Apirion, D. and Schlessinger, D.: J. Mol. Biol., 42: 315, 1969.
- 16) Konno, K., Oizumi, K., Kumano, N. and Oka, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 108: 101, 1973.