

海洋細菌の無機塩要求性に関する生理学的研究 VII

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	4212
掲載ページ	p. 1357-1364
発行年月	1976年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



海洋細菌の無機塩要求性に関する生理学的研究—VII

細胞質膜におけるチトクロム系の無機塩要求性

大工勝信・坂井 稔

(1976年3月17日受理)

Physiological Studies on the Inorganic Salt Requirements of Marine Bacteria—VII
Salt Requirements for Cytochromes in the Cytoplasmic Membrane

Katsunobu DAIKU* and Minoru SAKAI*

In the previous paper we reported the fact that the type-specific salt requirements for the succinic acid oxidation among M (marine)-, MH (marine halophilic)-, TH (terrestrial halophilic)- and T (terrestrial)-types were ascribed to the electron transport chain in the cytoplasmic membrane. Subsequently, the sequence of electron-transferring substances and the site of the type-specific salt requirements in the electron transport chain were studied. Coenzyme Q could be extracted from the cells of the four types. The electron transport activity was inhibited by the addition of malonate and cyanide, though it was not affected by the addition of 8-hydroxyquinoline, urethane, 2-N-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HOQNO) and antimycin A. The behavior of these inhibitors showed that the electron transport chain was made up of succinic dehydrogenase-flavoprotein (F. P.) → coenzyme Q → cytochrome c → cytochrome a → $1/2O_2$. The O_2 -uptake activity was restored to the original level when methylene blue was added to this chain blocked by cyanide. The restorative effects suggested that either F. P. ($E_0' = -0.22$ V) or coenzyme Q ($E_0' = +0.09$ V) was linked to methylene blue ($E_0' = +0.01$ V) and that the electrons flowed through methylene blue bypass. The salt requirements completely disappeared in this bypass. This finding leads to the conclusion that the type-specific salt requirements are attributed to cytochrome c → cytochrome a → $1/2O_2$, that is, cytochrome oxidase-relating cytochromes. This conclusion, therefore, should be appropriated to the oxidation not only of the succinic acid but also of the other intermediate metabolites of the TCA-cycle.

前報¹⁾で M (海洋) 型, MH (海洋性好塩) 型, TH (陸性好塩) 型および T (陸) 型菌によるコハク酸酸化において認められる各菌型の特異的無機塩要求性は, それぞれの細胞質膜における電子伝達系に基づくことを明らかにした。ひきつづき本報では, この菌型特異的無機塩要求性が電子伝達系の如何なる成分に因るものであるかを知ることを目的に, 種々の電子伝達系構成成分を特異的に阻害する試薬を供試し, また一部の成分については抽出によつて各種構成成分の在否を確認した上で, 上記無機塩要求性に関与する電子伝達系成分についての検討を行つた。その結果, 菌型特異的無機塩要求性はチトクロムオキシダーゼ関連のチトクロム (以下 cyt. と略記する) に基づくことを明らかにしたので報告する。

実験方法

供試菌および培養法 各菌型の代表供試菌株, それぞれの供試液体培地および培養法はすべて第3報²⁾

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

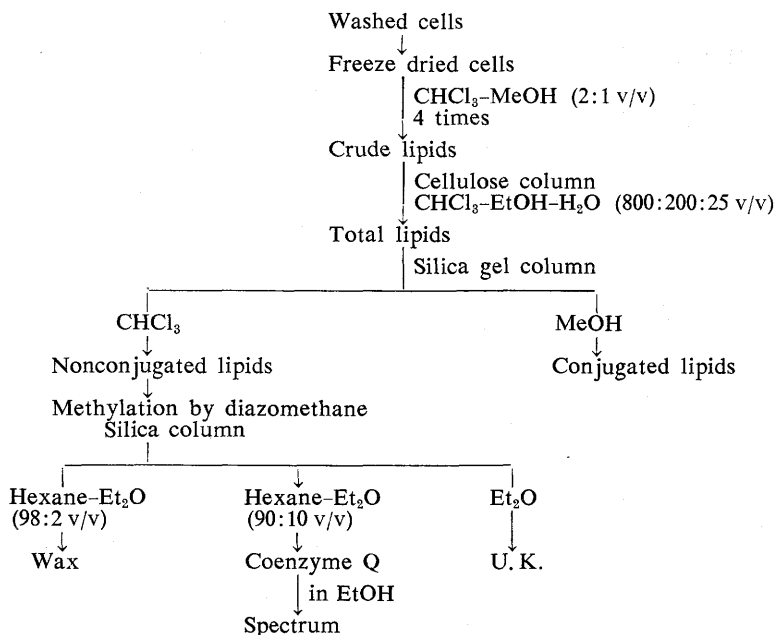


Fig. 1. Procedure for the preparation of coenzyme Q from marine pseudomonad 1055-1 (M-type), marine pseudomonad 3-1-51 (MH-type), *Pseudomonas* sp. 2-39 (TH-type) and *Pseudomonas* sp. 7-17 (T-type).
U.K.: unknown substance

の記載通りである。すなわち M 型 marine pseudomonad FHU* 1055-1, MH 型 marine pseudomonad FHU 3-1-51, TH 型 *Pseudomonas* sp. FHU 2-39 および T 型 *Pseudomonas* sp. FHU 7-17 株の各供試培地における振とう培養菌を供試した。

spheroplast の作成法およびその洗滌法 第 4 報³⁾の記載と同様である。

細胞質膜の調製法 第 5 報⁴⁾の記載と同様である。

コエンチム Q の調製法 Fig. 1 に示す方法によつた。なお調製したコエンチム Q (以下 CoQ と略記する) の還元は NaBH_4 (和光純薬) によつた。

電子伝達系に対する供試阻害剤 電子伝達系に対する特異的阻害剤, 販売会社名およびその阻害部位⁵⁾を以下に略記した。8-ヒドロキシキノリン (8-hydroxyquinoline, 和光純薬; cyt. b), 2-N-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HOQNO), Sigma; cyt. b—cyt. c またはフラビンタンパク質—cyt. b), ウレタン (urethane, 和光純薬; cyt. b), アンチマイシン A (antimycin A, P-L Biochemicals; cyt. b—cyt. c) および KCN (和光純薬; cyt. a)。また目的に応じてコハク酸脱水素酵素の阻害剤としてマロン酸ナトリウム (和光純薬) も併せて供試した。

電子伝達系に対する阻害剤の影響 細胞質膜の電子伝達系の活性は, 各種濃度の上記阻害剤を添加し, コハク酸を基質として, O_2 消費量をワールブルグ検圧法⁶⁾により測定し, 供試阻害剤の影響を検討した。反応条件は次の通りである。主室: タンパク量 2.5 mg の細胞質膜を含む 50 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 1.0 ml, 阻害剤溶液 (50 mM トリシュー塩酸で pH 7.4 に調製) 0.5 ml および 100 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml の計 2.0 ml。側室: 基質溶液, すなわち 25 mM コハク酸を含む 50 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml。副室: CO_2 吸収剤としての 20% KOH 溶液 0.2 ml。側室の基質溶

* Faculty of Fisheries, Hokkaido Univ.

液は 15 分間 25°C 水槽中で平衡させた後、主室に注加し、60 分間反応させた。なおタンパク量は Lowry 法⁷⁾により定量した。

電子伝達系に対するメチレン青の効果 細胞質膜の電子伝達系をマロン酸ナトリウムまたは KCN で阻害し、メチレン青を添加したときの O₂-消費活性の回復をワールブルグ検圧法⁹⁾により検討した。反応条件は次の通りである。主室：タンパク量 3 mg の細胞質膜を含む 50 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 1.0 ml, マロン酸ナトリウムまたは KCN 溶液 (50 mM トリシュー塩酸で pH 7.4 に調製) 0.5 ml, 0.2% メチレン青溶液 0.5 ml および 150 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml の計 2.5 ml。側室：30 mM コハク酸を含む 50 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml。他の条件は上記阻害剤の場合と同様である。

チトクロム系の無機塩要求性 コハク酸を基質とし、各種濃度の NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ および MgSO₄ を添加し、ワールブルグ検圧法⁹⁾により O₂-消費量を次の条件で測定した。主室：タンパク量 3.5 mg の細胞質膜を含む 50 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 1.0 ml, 可検塩溶液 0.5 ml, KCN 溶液 (50 mM トリシュー塩酸で pH 7.4 に調製) 0.5 ml, 0.2% メチレン青溶液 0.5 ml および 200 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml の計 3.0 ml。側室：35 mM コハク酸を含む 50 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml。他の条件は上記阻害剤の場合と同様である。

チトクロムオキシダーゼ試験 Kovács 法⁸⁾によつた。

結 果

電子伝達系成分の確認 1. CoQ: 細菌細胞内における CoQ は炭素数 8~10 個の炭化水素鎖を有するキノン誘導体であることが知られている⁹⁾ので、各供試菌について Fig. 1 に示すような脂質の抽出法によりこれを単離し、エタノールに溶解後、吸収スペクトルを求めた。その結果は Fig. 2 に示すように、酸化型は 275 m μ に最大吸収を有し、また還元型は最大吸収が 290 m μ へと移行すると共に、その最大吸収が酸化型の約 1/3 である CoQ 特有のスペクトル¹⁰⁾を示した。なおこのスペクトルは AMS¹⁰⁾による *Salmonella typhimurium* および大腸菌の CoQ 試料と完全に一致した。したがつて供試 4 株の電子伝達系には CoQ が構成成分の一つとして存在することが知られた。2. cyt. b: cyt. b およびその前後の電子伝達を阻害する 8-ヒドロキシキノリン, ウレタン, HOQNO およびアンチマイシン A は、文献⁹⁾にみられる阻害濃度範囲において電子伝達活性に対する阻害作用がほとんど認められなかつた。したがつて供試 4 株の電子伝達系には cyt. b の機能を有する成分が存在しないか、あるいは少なくとも著者らの実験系には関与しないものと判断された。3. cyt. c: STANIER *et al.*¹¹⁾は *Pseudomonas* 属やその他の菌種において、チトクロムオキシダーゼ試験陽性の菌種はいずれも cyt. c を有することを報告している。供試 4 株はいずれも *Pseudomonas* 属に属し*, かつチトクロムオキシダーゼ試験陽性菌であることから cyt. c を有するものと判断した。4. cyt. a: Fig. 3 に示すように 1055-1 (M 型) 株では 5 \times 10⁻³ M, 2-39 (TH 型) および 7-17 (T 型) 株は 10⁻³ M の KCN で完全に電子伝達活性が阻害された。しかし、3-1-51 (MH 型) 株では 5 \times 10⁻³ M の KCN で約 70% の阻害が認められ、またそれ以上の濃度でも約 30% の活性が残存した。この活性残存はターミナルオキシダーゼとして cyt. a のほかに cyt. cd や cyt. o のごとき KCN に対する感受性の低い成分^{12,13)}が併存する結果と推定された。このように供試株の電子伝達系は KCN によつて阻害されることから cyt. a が存在するものと判断した。

以上の結果を総合すると、供試 4 株のコハク酸を基質とする電子伝達系には、前報¹⁾で報告したようにコハク酸脱水素酵素-フラビンタンパク質が存在することから、細胞質膜の電子伝達系は、コハク酸脱水素酵素-フラビンタンパク質 \rightarrow CoQ \rightarrow cyt. c \rightarrow cyt. a \rightarrow 1/2O₂ よりなるものと考えられた。

* 供試菌株中の marine pseudomonad FHU 1055-1 (M 型) 株の分類学的位置については、その後著者らにより *Alteromonas haloplanktis* と同定された (日本水産学会昭和 50 年度秋季大会および昭和 51 年度春季大会で講演発表した)。

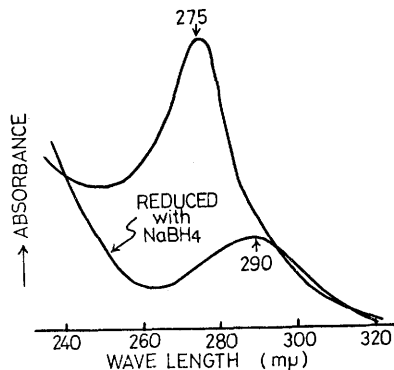


Fig. 2. Spectra of coenzyme Q isolated from marine pseudomonad 1055-1 (M-type), marine pseudomonad 3-1-51 (MH-type), *Pseudomonas* sp. 2-39 (TH-type) and *Pseudomonas* sp. 7-17 (T-type). The preparation of coenzyme Q is given in Fig. 1.

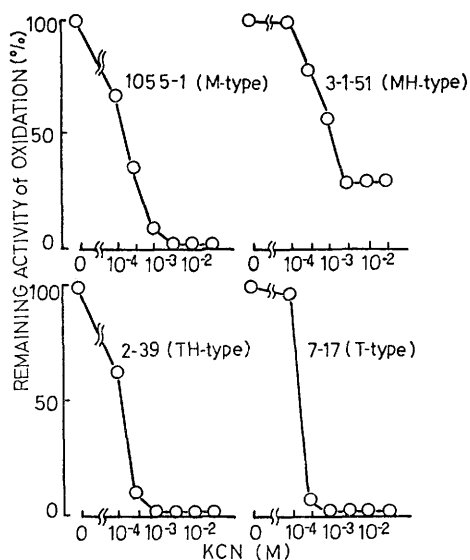


Fig. 3. Inhibitory effects of cyanide on the cytochrome oxidase of the cytoplasmic membrane of marine pseudomonad 1055-1 (M-type), marine pseudomonad 3-1-51 (MH-type), *Pseudomonas* sp. 2-39 (TH-type) and *Pseudomonas* sp. 7-17 (T-type). The cytoplasmic membrane was prepared from the spheroplasts by the procedure described in the previous paper³. The activity of the cytochrome oxidase was measured with the Warburg respirometer. Experimental conditions: reaction mixtures, 1.0 ml of the cytoplasmic membrane suspension containing 2.5 mg protein, 0.5 ml of KCN solution neutralized with tris-HCl (pH 7.4), 0.5 ml of 25 mM succinic acid solution neutralized with tris-HCl (pH 7.4) and 0.5 ml of 100 mM tris-HCl solution (pH 7.4); 0.2 ml of 20% KOH solution to absorb CO₂; temp., 25°C; time, 60 min; gas phase, air.

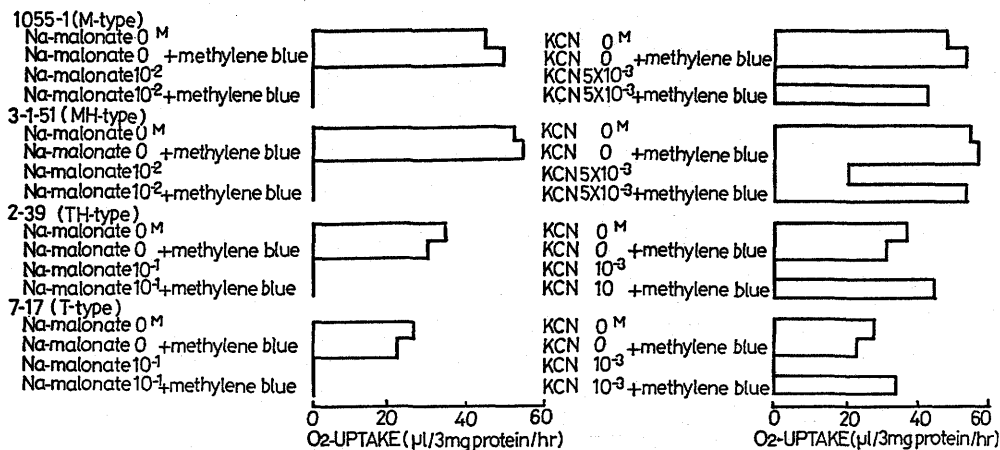


Fig. 4. Effects of methylene blue on the electron transport chain blocked by malonate or cyanide. The activity of the electron transport chain of the cytoplasmic membrane was measured with the Warburg respirometer. Reaction mixtures: 1.0 ml of the cytoplasmic membrane suspension containing 3.0 mg protein, 0.5 ml of Na-malonate or KCN solution neutralized with tris-HCl (pH 7.4), 0.5 ml of 30 mM succinic acid solution neutralized with tris-HCl (pH 7.4), 0.5 ml of 0.2% methylene blue solution and 0.5 ml of 150 mM tris-HCl solution (pH 7.4). Other conditions are the same as in Fig. 3.

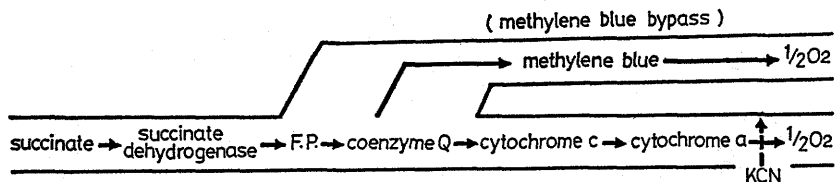


Fig. 5. Postulated electron flow pathway or methylene blue bypass in the electron transport chain of the cytoplasmic membrane. The methylene blue bypass indicates the electron flow shunt in the case of the electron transport chain blocked by KCN.

F. P.: flavoprotein

KCN により阻害された電子伝達系に対するメチレン青の効果 前報¹⁾で求めたマロン酸ナトリウムおよび上記で定めた KCN の阻害濃度量により電子伝達系を阻害した条件下でメチレン青を添加し、その効果を検討した結果、Fig. 4 に示すように、マロン酸により電子伝達系を阻害した場合はメチレン青が添加されても、供試 4 株において活性の回復は認められなかつたが、一方 KCN で阻害した場合はほとんど元の状態までに活性が回復した。この回復効果は、自働酸化色素であるメチレン青が電子伝達系の一部を代行した結果によるものと考えられる。このようにメチレン青が電子受容体としての役割を演ずる部位は、コク酸脱水素酵素—フラビンタンパク質と cyt. a の間と推定されるが、メチレン青の酸化還元電位は標準状態 (25°C, pH 7.0, 1 気圧) において $E_0' = +0.01 \text{ V}^{14)}$ であることから、cyt. c の $E_0' = +0.25 \text{ V}^{15)}$ および cyt. a の $E_0' = +0.29 \text{ V}^{16)}$ などの酸化還元電位の高い成分から電子を受取ることは考えられない。これに対し、コハク酸脱水素酵素—フラビンタンパク質の flavine mononucleotide (FMN) の $E_0' = -0.22 \text{ V}^{14)}$ からは電子の受容が可能であり、また CoQ の $E_0' = +0.09 \text{ V}^{14)}$ はメチレン青にやや近い電位を有していることから、あるいは細胞内環境においてはメチレン青の電子供与体として作用することも考えられる。し

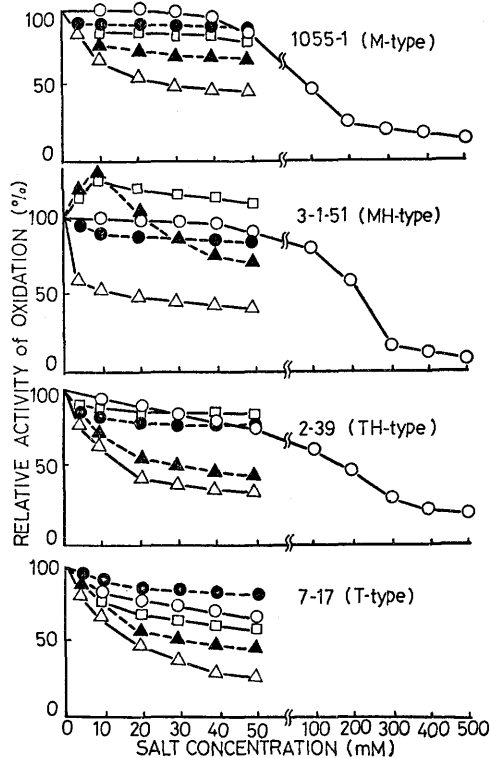


Fig. 6. Effects of salts on the methylene blue bypass of marine pseudomonad 1055-1 (M-type), marine pseudomonad 3-1-51 (MH-type), *Pseudomonas* sp. 2-39 (TH-type) and *Pseudomonas* sp. 7-17 (T-type). Reaction mixtures: 1.0 ml of the cytoplasmic membrane suspension containing 3.5 mg protein, 0.5 ml of KCN solution neutralized with tris-HCl (pH 7.4), 0.5 ml of 0.2% methylene blue solution, 0.5 ml of salt solution and 0.5 ml of 150 mM tris-HCl solution (pH 7.4). Other conditions are the same as in Fig. 3.

NaCl, ○—○; KCl, ●—●; CaCl₂, △—△; MgCl₂, ▲—▲; MgSO₄, □—□

たがつてメチレン青が電子受容体として機能する部位は、コハク酸脱水素酵素の補欠族であるフラビントンパク質または CoQ のいずれかであろうと考えられる。

以上の結果から、KCN により阻害された電子伝達系におけるメチレン青の活性回復現象は、Fig. 5 に示すごとくメチレン青による電子伝達側路を通じて行われたものと判断された。なおこの電子伝達側路を以下においてはメチレン青バイパスと呼称する。

メチレン青バイパスにおける無機塩の影響 上記メチレン青バイパスにおける NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ および MgSO₄ の影響を検討した結果は Fig. 6 に示す通りで、供試 4 株について無機塩要求性は認められなかった。ただ、3-1-51 (MH 型) 株については、Fig. 3 に示したように KCN による電子伝達活性の阻害が完全でなく約 30% の活性が残存したが、その残存活性部分が MgCl₂ 10 mM および MgSO₄ 10 mM によりそれぞれ約 30% 程度活性化された。しかしながらメチレン青バイパスを通さない場合 (第 5 報⁴⁾ および第 6 報¹¹⁾ 参照) に対比してその活性化は著しく低下する事実から、KCN 感受性部分 (すなわち cyt. a) の無機塩要求性は消失したものと判断された。

これらの結果を、第 5 報⁴⁾ で報告した細胞質膜における菌型特異的無機塩要求性と第 6 報¹¹⁾ で報告した電

子伝達系における菌型特異的無機塩要求性とを対比すると、メチレン青バイパスを通じて電子伝達が行われる場合は、明らかに上記菌型特異的無機塩要求性は完全に消失することが知られる。したがってコハク酸酸化における菌型特異的無機塩要求性は、メチレン青バイパスにより電子伝達が代行される $\text{cyt. c} \rightarrow \text{cyt. a} \rightarrow 1/2\text{O}_2$ (Fig. 5 参照) の過程、すなわちチトクロムオキシダーゼ関連のチトクロム系に因る要求であると考えられる。

考 察

第5報⁴⁾および第6報¹⁾で報告したように、細胞質膜によるコハク酸の至適酸化においてM型菌は CaCl_2 5 mm、 MgCl_2 10 mm、 MgSO_4 10 mm、MH型菌は NaCl 140 mm、 MgCl_2 5 mm、TH型菌は NaCl 100 mm、 CaCl_2 20 mm を要求するが、T型菌は塩類を要求せず、またこのような菌型特異的無機塩要求性は酸化的リン酸化過程に因る要求でなく、細胞質膜に局在する電子伝達系に因る要求であることを明らかにした。本報では、この無機塩要求性が電子伝達系の如何なる過程に関与する要求であるかを知ることを目的に、まず電子伝達系の構成成分について検討を行った。

電子伝達系を研究するにはその構成成分を個々に取出し、あるいはこれを再構成し、その作用機作を追求するのが最も望ましいが、活性を保持したまま各構成成分を取出すことは困難を伴い、またそれらを再構成することはさらに至難であつて、現在までに再構成に成功したと考えられる実験例はきわめて少ない¹⁷⁾。このような理由から、著者らは個々の電子伝達成分を特異的に阻害する試薬を供試することにより、各成分の存否を検討した。その結果、各供試菌の細胞質膜における電子伝達系はコハク酸を基質とした場合、コハク酸脱水素酵素—フラビンタンパク質 \rightarrow CoQ \rightarrow $\text{cyt. c} \rightarrow \text{cyt. a} \rightarrow 1/2\text{O}_2$ から成るものと考えられた。さらに KCN により阻害した電子伝達系のメチレン青バイパスにおける無機塩要求性の検討から、菌型特異的無機塩要求性は $\text{cyt. c} \rightarrow \text{cyt. a} \rightarrow 1/2\text{O}_2$ の過程にあることを知つた。この結果から、各菌型それぞれにおいて特異的に要求される無機塩は、チトクロムオキシダーゼ関連のチトクロム系を活性化して電子伝達系全体の活性を高めると共に、これに共転する酸化的リン酸化を促進し、最終的には ATP 生成を高める生理学的役割を演ずるものと判断された。

電子伝達系にはコハク酸のみならずイソクエン酸、 α -ケトグルタル酸およびリンゴ酸など TCA 回路の中間代謝産物を基質とする脱水素酵素が、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の酸化還元を介してチトクロム系に接続していることが知られているが¹⁸⁾、これらの基質の酸化においても上記同様のチトクロム系の関与が推定される。したがって、菌型特異的無機塩要求性は、各菌型細菌の基本的生理代謝の相違に起因するものと考えられる。

MACLEOD *et al.*,¹⁹⁾ MACLEOD and HORI²⁰⁾ および MACLEOD²¹⁾ は、marine pseudomonad B-16 株*のコハク酸脱水素酵素とフマラーゼが無機塩の存在しない場合に高い活性を示し、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素は塩類によつて活性化されず、またイソクエン酸脱水素酵素は多種の塩類により非特異的に活性化されると報告している。このように海洋細菌の TCA 回路の各脱水素酵素は無機塩に対して画一的応答を示さないようにみられるが、著者らの研究から明らかなように、無機塩要求性は脱水素酵素自体に因るものでなく、それに続く電子伝達系中のチトクロム系に因るものであり、上記の報告と著者らの知見の間に矛盾はないと考えられる。また LANYI²²⁾、LANYI and STEVENSON²³⁾ および LIEBERMAN and LANYI²⁴⁾ は、高度好塩細菌 (extremely halophilic bacteria) の *Halobacterium cutirubrum* において、その大部分の酵素は好塩性または耐塩性を有し、また NADH 脱水素酵素やチトクロムオキシダーゼ活性も高濃度の NaCl を畑求するが、一方 Mg^{2+} や Ca^{2+} は活性の安定化に関与し、直接活性化に関与しないことをみており、真正海洋細菌と一般好塩細菌の無機塩要求性にはかなりの相違があるものと考えられる。

以上の知見は、M, MH, TH および T 型の型別法²⁵⁾が海洋細菌と非海洋細菌の鑑別法として妥当なもの

* marine pseudomonad B-16 株は J. L. REICHEL and P. BAUMANN (1973) により *Aalteromonas haloplanktis* と同定された。

であることを支持すると共に、本型別法に対し重要な論拠を与えたものであると考えられる。

要 約

前報において、M, MH, TH および T 型菌の細胞質膜によるコハク酸酸化において認められる菌型特異的無機塩要求性は電子伝達系に因る要求であることを明らかにしたので、本報ではひきつづき電子伝達系の構成成分およびその無機塩要求部位について検討を行った。得られた結果は次のように要約される。

1. 電子伝達系の各種構成成分を抽出あるいはそれらを特異的に阻害する種々試薬を供試し、電子伝達系の構成成分を検討した結果、電子伝達系はコハク酸脱水素酵素—フラビンタパク質 → CoQ → cyt. c → cyt. a → $1/2O_2$ の過程から成ることが知られた。

2. KCN により阻害された電子伝達系は、メチレン青の添加により活性が元の状態にまで回復した。この活性回復は Fig. 5 に示すメチレン青バイパスによる電子伝達と考えられた。

3. メチレン青バイパスによる電子伝達においては無機塩要求性が完全に消失することから、菌型特異的無機塩要求性は上記 1. の電子伝達系のうち cyt. c → cyt. a → $1/2O_2$, すなわちチトクロムオキシダーゼ関連のチトクロム系に因る要求であると判断された。

文 献

- 1) 大工勝信・坂井 稔: 本誌, **42**, 1121-1127 (1976).
- 2) 大工勝信・坂井 稔: 同誌, **42**, 1009-1012 (1976).
- 3) 大工勝信・坂井 稔: 同誌, **42**, 1013-1023 (1976).
- 4) 大工勝信・坂井 稔: 同誌, **42**, 1115-1120 (1976).
- 5) W. HEINEN: in "Methods in Microbiology" (ed. by J.R. NORRIS and D.W. RIBBONS), Vol. 6A, Academic Press, New York, 1971, pp. 383-393.
- 6) 赤堀四郎: 酵素研究法, 1, 朝倉書店, 東京, 1955, pp. 509-602.
- 7) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 8) N. KOVÁCS: *Nature*, **178**, 703 (1956).
- 9) T. RAMASARMA: in "Advances in Lipid Research" (ed. by P. PAOLETTI), Vol. 6, Academic Press, New York, 1972, pp. 107-180.
- 10) G.F. AMS: *J. Bacteriol.*, **95**, 833-843 (1968).
- 11) R. Y. STANIER, N. J. PALLERONI and M. DOUDOROFF: *J. gen. Microbiol.*, **43**, 159-271 (1966).
- 12) 奥貫一男・山中健生: チトクロム, 朝倉書店, 東京, 1970, pp. 219-224.
- 13) G. C. HILL and C. A. M. CROSS: *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 590-596 (1973).
- 14) J. L. PEEL: in "Methods in Microbiology" (ed. by J. R. NORRIS and D. W. RIBBONS), Vol. 6B, Academic Press, New York, 1972, pp. 11-20.
- 15) I. C. GUNSALUS and C. W. SHUSTER: in "The Bacteria" (ed. by I. C. GUNSALUS and R. Y. STANIER), Vol. II, Academic Press, New York, 1961, p. 388.
- 16) I. C. GUNSALUS and C. W. SHUSTER: *ibid.*, p. 349.
- 17) 奥貫一男・山中健生: チトクロム, 朝倉書店, 東京, 1970, pp. 132-135.
- 18) F. M. HAROLD: *Bacteriol. Rev.*, **36**, 172-230 (1972).
- 19) R. A. MACLEOD, C. A. CLARIDGE, A. HORI, and J. F. MURRAY: *J. Biol. Chem.*, **232**, 829-834 (1958).
- 20) R. A. MACLEOD, A. HORI: *J. Bacteriol.*, **80**, 464-471 (1960).
- 21) R. A. MACLEOD: in "Advances in Microbiology of the Sea" (ed. by M. R. DROOP and E. J. F. WOOD), Vol. 1, Academic Press, New York, 1968, pp. 95-126.
- 22) J. K. LANYI: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2864-2869 (1968).
- 23) J. K. LANYI and J. STEVENSON: *ibid.*, **245**, 4074-4080 (1970).
- 24) M. M. LIEBERMAN and J. K. LANYI: *Biochim. Biophys. Acta*, **245**, 21-31 (1971).
- 25) 大工勝信・藤田八束・絵面良男・坂井 稔: 本誌, **42**, 307-313 (1976).