



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

| | |
|------------|---|
| Title | 酵母菌によるCysteine Sulfinic acidの利用 |
| Author(s) | 内貴, 信夫 |
| Citation | [岐阜大学教養部研究報告] vol.[5] p.[28]-[36] |
| Issue Date | 1969 |
| Rights | |
| Version | 岐阜大学教養部生物学教室 (Faculty of General Education, Gifu University) |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12099/47408 |

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

酵母菌によるCysteine Sulfinic acidの利用

内 貴 信 夫

岐阜大学教養部生物学教室

(1969年10月28日受理)

Utilization of Cysteine Sulfinic Acid by Yeast

Nobuo NAIKI

Laboratory of Biology, Faculty of General Education, Gifu University, Gifu

1. Cysteine sulfinic acid (CSA) was good utilized by *Saccharomyces cerevisiae* as a sole sulfur source in the sulfur deficient medium.
2. Sulfide formation from cysteine, sulfite, CSA and these combinations was studied by using the intact cells. Sulfide formation from CSA nearly equals that from sulfite, and more hydrogen sulfide is produced from cysteine. Rates of hydrogen sulfide formation obtained from the combinations of cysteine and sulfite or CSA are higher than that from cysteine alone, but the rate obtained from the combination of sulfite and CSA roughly equals that from sulfite alone. These results indicated that sulfite is an obligate intermediate in the formation of H₂S from CSA.
3. Sulfide formation from CSA by the cell free preparation was necessary to be added α -ketoglutarate and pyridoxal phosphate in the reaction mixture containing NADPH generation system.
4. A protein fraction (50~70% AmSO₄ saturation) obtained from the crude cell extract showed transamination activities to α -ketoacids from CSA. The maximum rate of transamination activity was obtained in the presence of α -ketoglutarate. Oxaloacetate and pyruvate was effectively, but the latter being little. From results of paper chromatography, it became clear that α -ketoacids added in the reaction mixture are converted to corresponding amino acids.
5. CSA- α -ketoglutarate and CSA-oxaloacetate transaminase activities were inhibited competitively by the addition of aspartate or glutamate respectively.
6. The mode of utilization of CSA by yeast almost agrees with that of *Escherichia coli*. Namely, CSA cleave in the three-carbon skeleton and sulfite, the latter is reduced to sulfide by sulfite reductase in the cells.

多くの微生物は Cysteine sulfinic acid (CSA) を唯一のイオウ源として良好な生長を示す。CSA がイオウ源として利用される時、2つの可能な径路が考えられる。1つは CSA の

脱硫により生ずる sulfite が sulfide に還元されて後 Cysteine に導入される方法であり、他の 1 つは CSA を直接還元して Cysteine を生産する方法である。前者は *Escherichia coli* で報告されたものであり^{1,2)}、後者は *Aspergillus nidulans* で見出されている³⁾

酵母は CSA を sulfate 同様イオウ源としてよく生長するが、そのイオウ原子がどのような経路で利用されているのかまだ明白でない。酵母抽出液には NADPH を助酵素として sulfite を sulfide に還元する強い活性が存在するし^{4,5)}、又作られた sulfide を Cysteine に導く serine sulfhydrase の存在も知られている⁶⁾ 従って CSA の利用もおそらく sulfite への脱硫を含むものと考えられるが、CSA の直接の還元も現在の所否定出来ない。

この報告は酵母の CSA 利用の方法をしらべそれが脱硫課程を含む *E. coli* 型である事を確認したものである。

MATERIALS AND METHODS

Strain and Culture Conditions—用いた菌株は *Saccharomyces cerevisiae* で培地は次のものを 1 l 中に入っている。KH₂PO₄, 3g; MgCl₂ · 6H₂O, 1g; NH₄Cl, 1g; Glucose, 40g; Vitamin B₁, B₂, B₆, Ca-Pantothenate, Nicotinamide, *p*-Aminobenzoic acid, 各 200 μg; Biotin, 5 μg; Inositol, 10mg; MnCl₂ · 4H₂O, 18 μg; FeCl₃ · 6H₂O, 120 μg; Zn(CH₃COO)₂ · 2H₂O, 120 μg; H₃BO₃, 28 μg; KI, 50 μg。この組成の培地をイオウ欠乏培地とよび、特に指摘しない限りイオウ源として Na₂SO₄ を 200 μM になる様加えた。このイオウ濃度は欠乏培地で酵母の最高生長を支持するのに十分なイオウ濃度である。菌の接種はあらかじめ培養した菌を十分洗滌して 100 倍の生長が可能な濃度に加えた。培養温度は実験を通じて 30°C である。

Preparation of Crude Protein Solution—酵母細胞は B. Braun の Cell homogenizer を用いて破壊した。すなわち酵母を遠心分離で集菌し水洗後その容量の 2 倍の磷酸緩衝液 (0.1M, pH7.4) に懸濁してガラスビーズと共に 1 分間 2000 回の振盪をあたえて細胞をつぶした。これを遠心し上清を集め 75% 硫酸飽和にして蛋白分画を集め、上記磷酸緩衝液にとかし同じ緩衝液で透析して硫酸をのぞいた。この様にして得た蛋白溶液を粗蛋白溶液と呼び以後の実験に供した。

Determination of Sulfur Compounds

i) Sulfide determination—種々のイオウ化合物より作られる sulfide の定量には前報^{5,7)}と同様 2 つの側室を持つ Warburg 容器により行った。即ち主室には菌懸濁液又は粗蛋白液を、副室には sulfide を捕獲する亜鉛溶液を、側室の 1 つには試験するイオウ化合物溶液を、他の側室には反応停止液として高濃度の硫酸溶液を入れた (各成分濃度は Results 参照)。容器内には窒素ガスを満して sulfide の酸化を防いだ。定時反応後副室に捕獲された sulfide は methylene blue 法により発色させ 660 mμ で吸光度を測定した。

ii) Sulfite determination—結果の項に詳述されるが、酵母の粗蛋白液中より 50~70% 硫酸飽和で得られる分画には CSA より sulfite を離脱する活性が見られるので、作られた sulfite を前報⁸⁾と同じ方法により定量した。即ち pH7.4 の磷酸緩衝液 (0.1M) 0.9 ml 中には蛋白分画及び Co-factor を含ませる。30°C で平衡にさせた後 CSA の 0.1 ml を加え (成分濃度は Results 参照) 定時反応後飽和昇汞水 1 ml を加える。遠心後上清中の sulfite は Grant⁹⁾の方法で比色定量した。

iii) Cysteine determination—Cysteine の定量は Grunert & Phillips¹⁰⁾による Nitroprusside 法を採用した。原報¹⁰⁾の反応停止には 30% metaphosphate が用いられているが市販の

metaphosphate は不純物を含み nitroprusside 反応を妨害したので、ここでは metaphosphate のかわりに三塩化酢酸液を 5% になる様反応液に加えた。定量に関する他の点は全て原報に従った。

Protein determination—蛋白の定量は常法に従い Folin-Ciocalteu による青色を 650m μ で比色定量した。¹⁰標準蛋白質として仔牛血清 albumin を用いた。

Paper Chromatography—CSA よりの脱硫は α -ketoacid の添加により著しく反応速度を増す(結果の項参照)。これは CSA の分解に transamination の反応が関与している事を暗示する。従って加えた ketoacid が対応する amino acid にかわっているかどうかを Paper chromatography によりしらべた。

濾紙に添着する sample から無機化合物及び過剰の CSA をのぞくため、反応後の試料は Dowex50 (H⁺-form) の径 1 cm 高さ 20cm の Column を通し 0.01N-HCl で洗滌した。CSA は塩酸での洗滌により他の amino acid より効果的に除去する事が出来る。Column に残った amino acid は 3N-NH₄OH で溶出し減圧で乾燥して少量の水にとかし、Chromatography の Sample とした。展開液は水飽和 Phenol: 28%NH₄OH=200:1 及び Butanol: 酢酸: 水=60:20:20 の 2 種を用いその Rf 値より Amino acid を測定した。

RESULTS

Availability of CSA for Growth—CSA を唯一のイオウ源としてイオウ欠乏培地に加えた時酵母がどのような生長をするかは図 1 で見られる。対照として Sulfate, Sulfite 及びイオウ源のない時も図 1 で示した。

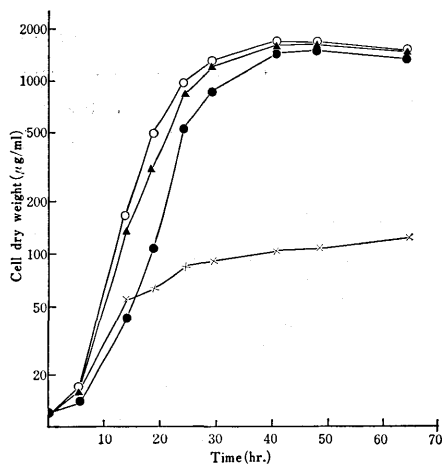


Fig. 1. Growth curves of *Saccharomyces cerevisiae* in sulfur deficient medium with sulfate, sulfite or CSA as a sole source of sulfur. All sulfur sources provided at 200 μ M and incubated in 30°C. ○, Sulfate; ●, Sulfite; ▲, CSA; ×, without sulfur source.

それぞれのイオウ源は 200 μ M 濃度に培地に加えてある。3 種のイオウ源はいずれも良好な生長を示し無添加の場合より乾量として約 15 倍の増量を得た。特に CSA は誘導期、対数期、定常期のいずれの生長期も Sulfate とほとんど同一の曲線を示し、Sulfite よりもむしろ良好なイオウ源である事を示す。無添加の場合のわずかの生長は接種菌自体がもちこんだイオウ源によるものと思われる。

Sulfide Production by the Intact Cells—CSA が Sulfide に還元される時、脱硫により Sulfite を経ているか又は直接 Cysteine に還元された後 Cysteine desulfhydrase により Sulfide を生成するのかわかる目的で Cysteine, Sulfite, CSA 及びこれ等の組合せを基質として作られる Sulfide 量を測定して見た。定量に用いた Warburg 容器の主室には 2ml の反応液を加えた。反応液の最終組成は M/15KH₂PO₄, 4% glucose 及び菌体とイオウ化合物である。菌体乾量及びイオウ化合物の濃度は表 1 の中に示してある。

Cysteine 濃度が他のイオウ化合物濃度より半減してあるのは Cysteine の高濃度による阻害

TABLE I
Rates of hydrogen sulfide formation by the intact cells

| Column | Sulfur Source and concentration (mM) | Cell content (mg dry weight/vessel) | H ₂ S formation (m μ moles/mg cells/hr) | |
|--------|--|-------------------------------------|--|------|
| | | | I | II |
| A | Cysteine (1.5) | 12.2 | 15.0 | 16.4 |
| | SO ₃ ⁼ (3.0) | 12.2 | 4.8 | 4.6 |
| | CSA (3.0) | 12.2 | 3.9 | 3.7 |
| | Cysteine(1.5)+SO ₃ ⁼ (3.0) | 12.2 | 19.6 | 20.6 |
| | Cysteine(1.5)+CSA(3.0) | 12.2 | 21.8 | 23.5 |
| B | SO ₃ ⁼ (3.0) | 30.2 | 4.2 | 3.9 |
| | CSA (3.0) | 30.2 | 3.0 | 3.2 |
| | SO ₃ ⁼ (3.0) +CSA (3.0) | 30.2 | 4.0 | 3.9 |

Hydrogen sulfide was determined by using Warburg vessel equipped with two side armes. Main compartment contained 2 ml of basal reaction mixture, one of the side armes received sulfur substrate(s), the other arm 0.1 ml stop solution, and in the center well was placed a filter paper soaked with 0.2 ml of saturated zinc acetate solution. The basal reaction mixture was composed M/15 KH₂PO₄, 4% glucose, sulfur source and cells, as indicated in table.

作用を考慮したためである。又酵母細胞の Sulfite よりの Sulfide 生産活性は Cysteine よりの Sulfide 生産活性より著しくひくいので、Sulfite 及び CSA よりの Sulfide 生産量の測定には菌量を Cysteine の場合の2.5倍用いて行った (表1参照)。

もし CSA からの Sulfide 生産が Cysteine を通らず Sulfite より作られるならば Cysteine と CSA を同時にあたえた時の Sulfide 生産量は Cysteine 及び Sulfite を単独にあたえた時の Sulfide 生産量の和に近い値を示すだろう。もし CSA が Cysteine に還元された後 Sulfide を作るのならば Cysteine と CSA を同時にあたえた時の値は Cysteine 単独のものに近い値が期待されよう。表1のA欄から Cysteine+CSA より作られる Sulfide 量は Cysteine 単独のものより多く Cysteine+Sulfite の値に近似である。一方B欄の値を見ると Sulfite+CSA より作られる Sulfide 量は Sulfite 単独の時の値に近い。この事は酵母の CSA 利用は脱硫による Sulfite 形成が先行しその後 Sulfide に還元される事を強く指示している。

Sulfide Production by the Crude Protein Solution—酵母が CSA を直接還元して Cysteine を作る可能性を粗蛋白溶液についてもたしかめて見た。即ち CSA を NADPH 再生系と組み合せて試験した結果は表IIで見られる。いずれの場合も Cysteine の形成は全く見られない。又 CSA を単独に加えた場合は Sulfide の形成も見られない。CSA からの Sulfide 形成は反応液中に α -ketoglutarate が存在する時 Sulfite からの Sulfide 形成とかなり等しい値として現われた。

この事は CSA の利用は直接の還元ではなく脱硫による Sulfite 生産が唯一の径路であり、又 CSA の脱硫には Transamination が先行又は同時におこる必要のある事を示している。還元の際し NADH の再生系でも行ったが Cysteine の形成は勿論 Sulfide 生産も示さなかった。

Sulfite Production from CSA by the Protein Fraction—以上の結果は酵母の CSA 利用の方法は *E. coli* のそれに極めてよく類似する。Leinweber and Monty²⁾ は *E. coli* による CSA 利用は CSA より Sulfite を分離する蛋白分画と、分離した Sulfite を Sulfide に還元する蛋白分画の必要な事をのべている。

そこで酵母の粗蛋白溶液を 硫安飽和で2つの分画にわけける事を試みた。1つは0~50%飽

TABLE II
Hydrogen sulfide formation from CSA or sulfite by the crude protein solution

| Addition | H ₂ S formation (m μ moles/mg/hr) | Cysteine formation (m μ moles/mg/hr) |
|--|---|---|
| CSA | 0.0 | 0.0 |
| CSA + α -ketoglutarate | 5.03 | 0.0 |
| SO ₃ ⁼ | 6.15 | 0.0 |
| SO ₃ ⁼ + α -ketoglutarate | 6.05 | 0.0 |

One ml of reaction mixture contained in 9.5 mg proteine, and the following in μ moles; potassium phosphate buffer (pH 7.4), 400; MgCl₂, 2; glucose-6-phosphate, 5; NADP, 0.16; pyridoxal phosphate, 0.2; sulfur source, 3; α -ketoglutarate, 3. Temperature, 30°C. Duration of experiment, one hr.

和で他は50~70%飽和の分画である。両分画は pH7.4 の燐酸緩衝液で充分透折して硫酸をのぞいた。50%飽和分画には Sulfite reductase を含みその詳細はすでに報告した³⁾又この分画に CSA を α -Ketoglutarate 及び Pyridoxal phosphate と共に加えて見たが Sulfite 生産能はほとんど見られなかった。70%分画を同様試験した所 CSA より Sulfite 離脱の強い活性の含まれているのを知った。そこでこの分画につき Co-factor を検討してみた。その結果は表 III で見られる。

TABLE III
Requirements for the formation of sulfite from CSA

| Reaction mixture | Sulfite formation (m μ moles/mg/30 min.) |
|-------------------------------|---|
| Complete | 580.0 |
| Boiled enzyme | 3.2 |
| Minus CSA | 4.2 |
| Minus α -ketoglutarate | 10.3 |
| Minus pyridoxal phosphate | 54.6 |

One ml of complete reaction mixture contained in μ moles; potassium phosphate buffer (pH7.4), 100; CSA, 6; α -ketoglutarate, 6; pyridoxal phosphate, 0.2; dialyzed enzyme protein (50~75% AmSO₄ saturation), 0.484 mg. Incubation was at 30°C for 30 min. Reaction was terminated by the addition of 1 ml saturated Hg Cl₂. The supernatant was assayed for sulfite after Grant method.

蛋白分画を 100°C で 3 分間加熱したもの及び CSA をのぞいたものでは Sulfite 生産はほとんどみられない。反応液より α -Ketoglutarate をのぞいたものも著しい活性の低下を示し Pyridoxal phosphate をのぞいたものも活性は約10%まで低下した。

この事は CSA の Sulfite 離脱に Transamination system が重要な役割を演じている事を暗示する。

Effect of α -ketoacids on the Sulfite Production from CSA— α -ketoglutarate 以外の α -ketoacid として Oxaloacetic acid と Pyruvate の 2 種を選び Sulfite 生産におよぼす効果をしらべてみた。表 IV で見られる様に Oxaloacetate は α -Ketoglutarate の約半分の効果を示し Pyruvate は Oxaloacetate より更に不良の結果を示した。

もしこれ等 α -Ketoacid に CSA より amino 基が移行するなら反応液中に α -Ketoacid に対応

TABLE IV
Effect of α -ketoacid on the sulfite formation from CSA

| Ketoacid | Sulfite formation (μ moles/mg/30 min.) | Rate of activity (%) |
|-------------------------|--|-------------------------|
| α -Ketoglutarate | 520 | 100 |
| Oxaloacetate | 283 | 54.4 |
| Pyruvate | 86.5 | 16.6 |

The experiments is carried out at the same conditions as described in Table III, except for the kinds of α -ketoacids.

する Amino acid が蓄積されているだろう。そこで反応液をイオン交換樹脂を通して濃縮し Paper chromatography にかけてその Rf 値を測定したものは表 V である。明かに両展開液による Rf 値は相当する Amino acid が生産されている事を示している。

TABLE V
Rf values of amino acids converted from α -ketoacid

| α -ketoacid | Amino acid | Rf | | | |
|-------------------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | | Solvent 1 | | Solvent 2 | |
| | | Standard | Test sample | Standard | Test sample |
| α -Ketoglutarate | Glutamate | 26.1 | 25.0 | 28.5 | 29.2 |
| Oxaloacetate | Aspartate | 17.8 | 18.4 | 23.3 | 21.4 |
| Pyruvate | Alanine | 58.1 | 59.0 | 30.4 | 29.5 |

Two milliliters of the reaction mixture contained 1.94 mg protein fraction (50~70% AmSO₄ saturated fraction); 200 μ moles phosphate buffer (pH 7.4); 0.4 μ moles pyridoxal phosphate; 12 μ moles CSA; 12 μ moles α -ketoacid. Incubation was at 30°C for 2 hr. Reaction was terminated by adding 0.5ml of 50% trichloroacetic acid. Two milliliters of the supernatant were diluted to 150 ml with water, and placed on a Dowex-50 (H⁺-form) column. CSA was removed by washing with 0.01N-HCl. Amino acids remained on the column were eluted with 3N-NH₄OH. The effluent was concentrated to dryness *in vacuo*, and dissolved in 1 ml water. The samples were chromatographed with following solvents: Solvent 1, water saturated phenol: 28% NH₄OH=200: 1 (v/v); solvent 2, butanol: acetic acid: water=60: 20: 20.

Competitive Inhibition of Sulfite Production from CSA by Aspartate or Glutamate —Singer and Kearney¹²⁾ は *Proteus vulgaris* で CSA が酸化される時行われる Transamination は Glutamate-Aspartate transaminase の作用による事を指摘し, *E. coli* でも Glutamate-Aspartate transaminase が CSA よりの transamination に関与する事が報告されている!¹²⁾

もし CSA の Transamination が Glutamate-Aspartate transaminase と共通の酵素により行われているなら, それ等は互に拮抗的阻害を示すだろう。

図2の(A)は CSA と α -Ketoglutarate の存在下に Aspartate を加えた時 CSA よりの Sulfite 生産がどのように変化するかを示してある。

6 μ moles の α -Ketoglutarate 存在下で CSA の濃度を増加させると Sulfite 生産量は漸次増加する。CSA の濃度を一定とし, これに 3mM 及び 6mM の Aspartate を加えるとその濃度の高まりと共に Sulfite 生産が抑制されて来る。あきらかに CSA, α -Ketoglutarate 及び

Aspartate は互に拮抗的な阻害を示している。

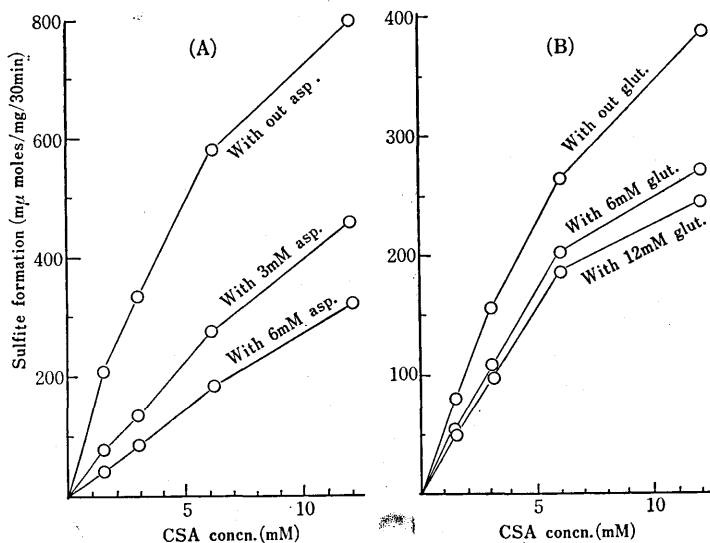


Fig. 2. Competitive inhibition by aspartate and glutamate on sulfite formation from CSA. (A) Effect of aspartate on the reaction between CSA and α -ketoglutarate. One ml of reaction mixture contains; 0.484 mg, protein; 100 μ moles, phosphate buffer (pH7.4); 0.2 μ mole, pyridoxal phosphate; 6 μ moles, α -ketoglutarate; CSA and aspartate, as indicated. Incubation time, 30min. (B) Effect of glutamate on the reaction between CSA and oxaloacetate. One ml of reaction mixture contains; 0.968 mg, protein; 6 μ moles, oxaloacetate; phosphate and pyridoxal phosphate, same concentration as (A); CSA and glutamate, as indicated.

同様の結果は Oxaloacetate 存在下での CSA からの Sulfite 生産は Glutamate の濃度により拮抗的に阻害されている (図 2 (B))。

これ等の結果は CSA の Transamination が Glutamate-Aspartate transaminase と同一の酵素活性部位で行われている事を支持すると同時に CSA は最初に脱アミノが行われて β -sulfinylypyruvate になった後 sulfite が脱硫する事を暗示している。

DISCUSSION

動物組織で CSA が Sulfite, Pyruvate 及び Glutamate より作られる事は Chapeville and Formageot¹³⁾ により見出された。Singer and Kearney¹²⁾ は *Proteus vulgarie* が Cysteine を酸化する時 CSA が中間物にあらわれる事から、この逆反応が Cysteine の合成の径路になる可性を指摘した。また Shepherd³⁾ は *Aspergillus nidulans* の Acetone powder を用いて CSA が Glutamate, pyruvate, sulfite より合成される事を報告した。

一方 Cobey and Handler¹⁴⁾ は *E. coli* で実験し CSA は良好なイオウ源であるにもかかわらず sulfite 及び可能な Co-factor を加えた反応液で CSA の合成が見られない事を報告している。又 Leinweber and Monty^{1,2)} は同じく *E. coli* では CSA の利用は Sulfite への分解が唯一の径路である事を見ている。又 Clowes¹⁵⁾ も *Salmonella typhimurium* を用い Cysteine 合成途上に CSA の存在の可能性につき否定的な結果を得ている。

酵母は CSA を唯一のイオウ源として非常に良好な生長を示す事は図 1 で見られる。しかしこの sulfur atom がどの様に利用されているかの報告はない。

生菌を用いて Cysteine, sulfite, CSA よりの sulfite 形成を見ると Cysteine からのそれは他の 2 つからよりも多く、CSA からの形成量は sulfite とほぼ等しい値として現れる。一方これ等イオウ化合物の組合せの結果も CSA が直接 Cysteine に還元される根拠は全く見出せない(表 I)。しかしこれ等 3 化合物の生菌への透過性の異りが上述の様な結果として現れるのかもしれない。そこで Cell free にした蛋白部で Sulfide 形成をしらべて見たが(表 II)やはり CSA が直接還元されて Cysteine になる可能性は見出せず、むしろ CSA は Sulfite を脱硫してから sulfide に還元される事を支持する。

CSA からの脱硫に α -Ketoacid 及び Pyridoxal phosphate の存在が必要な事は *E. coli*, *P. vulgaris* の場合と同様である。この活性部は 50~70% 硫安飽和部に含まれている事は CAS からの Sulfide 生成に少くとも 2 つの酵素の関与を暗示する。なぜなら酵母の Sulfite reductase は 50% 飽和によりのぞかれる事は前報⁵⁾ に詳述した。

この 50~70% 分画の酵素は CSA の Amino 基を α -Ketoacid に転位する transaminase 活性を含み、この活性は Glutamate 及び Aspartate により拮抗的に阻害される。したがって CAS からの transamination は Glutamate-Aspartate transaminase と同一の酵素により作用を受けている。

おそらく 50~70% 分画にはこの Transaminase 以外に脱アミノにより作られた β -sulfinyl pyruvate より sulfite を離脱さず Sulfinylpyruvate desulfurilase 活性を含むものと想像されるが、この点に関してはこれだけの実験から結論を出せない。なぜなら sulfinylpyruvate は不安定な物質であり酵素の関与なしに偶発的に Sulfite を分離する可能性があるからである。

この実験の結果は酵母の CSA 利用は *E. Coli* と同様 Sulfite の脱硫後、Sulfite は還元され Sulfide になり炭素鎖に導入される事は疑わしくない。

REFERENCES

1. Leinweber, F-J., and K. J. Monty. 1961. The mode of utilization of cysteine sulfinic acid by bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**: 355.
2. Leinweber, F-J., and K. J. Monty. 1962. The metabolism of cysteine sulfinic acid in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **63**: 171.
3. Shepherd, C. J. 1956. Pathways of cysteine synthesis in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **15**: 29.
4. Wainwright, T. 1962. Reduction of sulphite by yeast enzyme. *Biochem. J.* **83**: 39 P.
5. Naiki, N. 1964. Some properties of sulfite reductase from yeast. *Plant & Cell Physiol.* **6**: 179.
6. Schlossmann, K., J. Brüggemann und F. Lynen. 1962. Biosynthese des Cysteins. I. Nachweis und Isolierung der Serinsulhydrase aus Bäckerhefe. *Biochem. Z.* **336**: 258.
7. Naiki, N. 1961. Effect of nutritional conditions on hydrogen sulfide generation by yeast. *Sci. Rep. Fac. Liberal Arts and Educ. Gifu Univ.* **12**: 509.
8. Naiki, N. 1964. Enzymatic defects in sulfate reducing system of sulfite-less yeast mutants. *plant & Cell Physiol.* **5**: 71.
9. Grant, W. M. 1947. Colorimetric determination of sulfur dioxide. *Anal. Chem.* **19**: 345.
10. Gruner, R. R., and P. H. Philips. 1951. A modification of the nitroprusside method of

- analysis for glutathione. Arch. Biochem. **30**: 217.
11. Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric method for measuring protein. In *Methods in Enzymology*. **3**: p.447.
 12. Singer, T. P., and E. B. Kearney. 1956. Intermediary metabolism of l-cysteine sulfinic acid in animal tissues. Arch. Biochem. Biophys. **61**: 394.
 13. Chapeville, F., et P. Formageot. 1954. La formation enzymatique de l'acid cysteinesulfinique á partir de sulfite. Biochem. Biophys. Acta. **14**: 415.
 14. Cobey, F. A., and P. Handler. 1956. Sulfite metabolism in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta. **19**:324.
 15. Clowes, R. C. 1958. Nutritional studies of cysteineless mutants of *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. **18**: 140.