ビタミン B₁ 欠乏時におけるラット肝細胞の RNA ならびに タンパク質合成について

RNA and Protein Synthesis in Liver of Rats maintained on Vitamin B₁-deficient Diet

(昭和 44 年 4 月 3 日 受理)

中 川 暉* 大 浦 彦 吉** 塚 田 欣 司**
(Hitomi Nakagawa) (Hikokichi Oura) (Kinji Tsukada)

Rats fed on thiamine-deficient diet showed a slight increase in body weight for the first two weeks but the weight began to decrease thereafter and the weight was lower than the initial weight after 31 days. The body weight recovered by the oral administration of thiamine.

Wet weight of the liver from rats fed on thiamine-deficient diet showed a slight increase for the first 18 days but not thereafter.

Majority of thiamine in liver cells was present in the cytoplasm and showed a rapid decrease with continuation of thiamine-deficient diet.

Ribosomal pattern of the post-mitochondrial supernatant fraction showed decrease in heavy polysomes and increase in light polysomes after 18 days on thiamine-deficient diet, and this tendency appeared more markedly after 25 to 31 days of thiamine deficiency, but recovered rapidly by the administration of thiamine.

In the purified ribosomal pattern, heavy polysomes tended to increase after 7 days of thiamine deficiency and incorporation of [³H] orotic acid into the polysomal RNA increased in the polymer portion above trimers. After 25 to 31 days of thiamine deficiency, heavy polysomes decreased and light polysomes increased markedly, and incorporation of [³H] orotic acid also decreased markedly. Ratio of polysomes of over hexamers to total polysome showed transitory increase after 7 days of thiamine deficiency but decreased thereafter.

Specific activity of the incorporation of [³H] orotic acid into the polysomal RNA *in vivo* and that of the incorporation of [¹⁴C]-leucine into the polysomal RNA *in vitro* showed a transitory increase after 7 days of thiamine deficiency and then decreased day by day. Specific activity of the incorporation of [³H] orotic acid into nuclear RNA *in vivo* increased slightly over that of the control after 7 days of thiamine deficiency but there was no great difference and the activity decreased after 18 days of deficiency. Both recovered rapidly by the administration of thiamine.

Rich ら¹⁾²⁾, Noll ら³⁾⁴⁾, Gierer⁵⁾ によってウサギ網状赤血球およびラット肝細胞から、それぞれリボソーム集合体、即ちポリソームが分離されて以来、ポリソームがタンパク質合成の活性単位として数多くの報告がなされて来た。即ち DNA のもつ遺伝情報が、メッセンジャー RNA (m-RNA) に転写されこれがリボソームと結合し、アミノアシルトランスフェ RNA が m-RNA の triplet code を解読し、結合酵素とペプチド合成酵素の存在のもとにトランスフェ RNA (t-RNA) からのアミノ酸が次々にリボソームの 50 S 亜粒子上でペプチド結合し、リボ

ソームまたは m-RNA の 3' 末端がポリソームの末端リボソームから離れる時に、完成したポリペプチド鎖が遊離する²⁾ という moving tape hypothesis が提出されている。

この様な観点からビタミン B₁ (V. B₁) 欠乏時において核酸ならびにタンパク質合成がいかに変化するかを究明することは、非常に興味のあることである。

従来 V. B₁ はチアミンピロリン酸 (TPP) 型でピルビン酸脱水素酵素 (EC 1.2.4.1) およびオキシグルタル酸脱水素酵素 (EC 1.2.4.2) の補酵素としての働きが古くから重視され V. B₁ 欠乏時における両酵素活性の低下につ

* 富山大学教育学部 ** 富山大学薬学部

いては、幾多の報告がされて来たが近年 Witt ら⁶⁾ によってチアミンは、ビルビン酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.1) の補酵素としての役割以外に、ビルビン酸脱炭酸酵素の合成はチアミンに依存しているという報告がみられるに至った。即ち V. B₁ 欠乏時においては、解糖系およびトリカルボン酸 (TCA) サイクルにおける代謝異常、即ち ATP 産生障害が起こることは必然であり、塩基、リボース、ATP より合成される核酸合成に多大な影響を与えることが考えられる。また Horecker ら⁷⁾ および Racker ら⁸⁾ が TPP はペントースサイクルにおけるトランスケトラーゼ (EC 2.2.1.1) の補酵素としての役割もはたしていることを相次いで報告して以来、トランスケトラーゼはトランスアルドラーゼ (EC 2.2.1.2) と共にヘキソースからペントース即ちリボース生成における可逆反応に関与しており、したがって TPP はリボース合成を介しても核酸合成に関係を有する可能性が考えられるに至った。

著者らは V. B₁ 欠乏飼料を長期間ラットに投与し、欠乏初期、体重の減少期および V. B₁ 投与による体重の回復期におけるラット肝細胞の RNA 合成ならびにタンパク質合成の活性機能の変化について実験を行なったので報告する。

実験材料および方法

実験材料

1. 実験動物

ウィスター系ラット雌、体重約 50g のもの 80 匹を 2 群に分けた。V. B₁ 欠乏群は、Scherman ら⁹⁾ の V. B₁ 欠乏飼料に準じて、精製澱粉；68%，ビタミンを含まないカゼイン；18%，バター；8%，肝油；2%，マッカラム塩；4% を、対照群には日本クレア固型飼料 CE-2 をそれぞれ *ad libitum* に与え 22°C の飼育室にて管理した。なお V. B₁ 欠乏群は、欠乏 32 日目より欠乏飼料を与えながらチアミンモノロダン塩を 1 日 20 μg ラット腹腔内に注射した。

2. 試薬

³H-オロチン酸、¹⁴C-(U)-L-ロイシンは New England Nuclear Corporation、ハイアミン、2,5-diphenyloxazol (PPO)、1,4-bis-2-(phenyloxazolyl)-benzen (POPOP) は Packard Instrument Company Inc.、ホスホエノールビルビン酸、ビルビン酸キナーゼは Sigma Chemical Company、牛血清アルブミンは Armour Pharmaceutical Company、デオキシコロール酸ソーダ (DOC) は Difco Company、V. B₁ 定量用タカジアスターゼは三共 K. K.、その他の試薬は和光純薬 K. K. のものを使用した。

実験方法

1. ポリソームの分離

18 時間絶食後のラット (1 群 3 匹を使用した) に ³H-オロチン酸 37.5 μc (比活性 1 mc/4 μ moles) を腹腔内に注射し 90 分後に断頭して肝を摘出して、Wettstein ら¹⁾ の方法に準じてポリソームを分離した。即ち 0.05M Tris-塩酸 pH 7.6, 0.025 M 塩化カリ, 0.005 M 塩化マグネシウム等を含む 0.25 M ショ糖液 (Med. A) 2.5 倍容を加えて Thomas 社製ホモジェナイザーで 8 回のストロークによって磨砕した。その磨砕液を 15,000×g, 10 分間の遠心の後上清 2/3 を取り DOC 最終濃度 1.3% を加えて、ポストミトコンドリア上清とした。

日立超遠心器ローター No. 40 用チューブに、2M, 0.5 M ショ糖液 (Med. A の成分をふくむ) で 2.5 ml および 3 ml の層を作り、その上にポストミトコンドリア上清を更に重層して 2°C において、40,000 r. p. m., 180 分間の遠心によって得た透明なペレットをショ糖を含まない Med. A で懸濁し低速度の遠心によって得た上清を精製ポリソームとした。

2. 核の分離

³H-オロチン酸 7 μc を腹腔内に注射し、20 分後に肝を摘出し、0.003 M 塩化カルシウムを含む 0.25 M ショ糖液 2.5 倍容を加えて磨砕した。3,000×g, 20 分間の遠心によって得た沈澱を、2.2M ショ糖液に懸濁し 2°C において 40,000 r. p. m. (ローター No. 40) 60 分間の遠心によって得たペレットを、ショ糖を含まない Med. A で懸濁して精製核とした。

粗核は Hogeboom ら¹⁰⁾ の方法により磨砕液を 3,000×g, 20 分間遠心後のペレットを再び塩化カルシウムを含む 0.25M ショ糖液で懸濁し、塩化カルシウムを含む 0.34M ショ糖液の上に重層して 4,000 r. p. m. 10 分間の遠心を 3 回行なって得たペレットを粗核とした。

3. 総 V. B₁ の測定

肝を秤量後水 10ml で磨砕した。0.1N 硫酸 25ml を加えて沸とう浴中に 30 分間置き、室温に冷却して 4 M 酢酸ソーダ 2 ml, 5% タカジアスターゼ 3ml を加えて 40°C にて 90 分間保温し、水を加えて一定量とした後遠心分離し上清をバームチッドに吸着させ、その脱着液をブロムシアンを用いるチオクロム法¹¹⁾によって八木式微量蛍光光度計を用いて総 V. B₁ を測定した。

4. ショ糖密度勾配遠心分離

30ml 容チューブに、1.0~0.3M ショ糖凸状密度勾配を作った。即ち攪拌中の 0.3 M ショ糖 (Med. A の成分を含む) 22ml に、1.3M ショ糖 (Med. A の成分を含む) 27.5ml を滴下しつつ、同時にその混液はチューブに移行するよう装置して行なった。

肝 0.5g あたりのポストミトコンドリア上清および 30

O. D. 単位 (260m μ) の精製ポリソームをショ糖密度勾配の上に重層して日立 RPS 25 水平ローターにて、2°C、25,000 r. p. m. にて150分間遠心した。遠心チューブの底から連続溶出しフラクションコレクターを附した UV ICORD (LKB 社製 Optical unit type 4701 A) で 254 m μ における吸収を連続自動記録し同時に 1.25 ml ずつ分取した。

5. *in vivo* における RNA 合成

a) 細胞質 RNA

精製ポリソーム 0.1ml (RNA 0.5~0.4mg を含む) に冷 H₂O 0.9ml, キャリヤーとして 2mg 牛血清アルブミンを加え hyflosuper-cel (20 mg/ml) を含む 10% 過塩素酸で沈澱させた。

次いで hyflosuper-cel 40mg を置いたミリポアフィルターに移し、20 ml 5% 過塩素酸、5 ml アセトン、10 ml エタノール、3 ml エーテルの順に洗い、酸不溶性画分を乾燥後、バイアルに移しハイアミン 0.5 ml を加えて 60°C、10 分間保温後、トルエン系シンチレータ (PP O; 4g, POPOP; 100 mg をトルエンに溶解し 1 l とした) 10ml を加え、Packard liquid scintillation counter 3003 型でポリソーム RNA に取り込まれた ³H-オロチン酸の c. p. m. を O. D. 単位あたりに換算した比活性で示した。

b) 精製核 RNA

精製核に等量の 20% 過塩素酸を加え沈澱を同様に 10% 過塩素酸、エタノール、およびエーテルで洗浄後試験管に移し、3ml の 0.5N 水酸化カリを加えて 37°C、18 時間水解し、水解後過塩素酸を加えて酸不溶性画分を遠心によって除き、上清を水酸化カリで中和して沈澱を除きその上清 0.2 ml をバイアルに取り、ジオキサン系シンチレータ (ナフタレン; 60 g, PPO; 4 g, POPOP; 200 mg, メタノール; 100 ml を P-ジオキサンに溶解して 1 l とした) 10 ml を加えて c. p. m. を測定し、mg-RNA あたりに換算した比活性で示した。RNA の定量は Dische ら¹²⁾ の方法によって行なった。

6. 精製ポリソームへの ¹⁴C-ロイシンの *in vitro* における取り込み

Tris 塩酸 pH 7.8; 20 μ moles, 塩化マグネシウム; 1.5 μ moles, メルカプトエタノール; 1.0 μ moles, GTP; 0.2 μ moles, ATP; 0.5 μ moles, ホスホエノールピルビン酸; 5.0 μ moles, ピルビン酸キナーゼ; 10 μ g, ¹⁴C-(U)-L-ロイシン; 0.1 μ c/0.02 μ moles, 各アミノ酸; 0.13 μ moles, 105,000 $\times$ g 上清 (正常ラット); 3 mg タンパク質, 精製ポリソーム; 0.08 ml (RNA 0.4~0.3 mg を含む) を総量 0.5 ml とし、37°C、15 分間反応後、酸不溶性画分に取り込まれた ¹⁴C-ロイシンの

c. p. m. を RNA 合成の場合と同様な方法で測定し、mg タンパク質あたりに換算した比活性で示した。タンパク質は Lowry ら¹³⁾ の方法によって定量した。

実験結果

1. 体重と肝重量の変化

第 1 図 生育曲線

V. B₁ 欠乏飼料をラットに投与すると、第 1 図に示す如く初期 2 週間は体重はやや増加するが対照群の体重増加に比較してその増加率は減少している。それ以後体重は対照群に比較して著しく減少しはじめ、31 日目には初体重よりも低下した。この時のラットは神経麻痺症その他 V. B₁ 欠乏症を呈した。しかし V. B₁ 投与により体重は増加の傾向が認められた。

また湿肝重量は第 2 図に示す如く 18 日まではわずかに増加するが、その後肝重量の増加は認められなかった。

2. 肝における総 V. B₁ 量の変化

磨砕液における総 V. B₁ 量は第 3 図に示す如く、欠乏日数の経過と共に急激に減少した。しかし精製核においては欠乏前と欠乏時における差は認められなかった。これは核分離の過程においてショ糖高張液を使用するため、V. B₁ の一部が溶出したものと考えられる。粗核にお

第2図 肝重量の変化

●····● ; 対照群 ●——● ; V. B₁ 欠乏群
 従線は標準偏差を示す(1実験に4~6匹のラット使用)

ける V. B₁ 量は欠乏日数の経過と共に減少した。肝組織中の V. B₁ はその大部分が細胞質に存在しており、核に存在する V. B₁ も共に欠乏日数の経過と共に減少した。Balaghi ら¹⁴⁾は、¹⁴C-チアゾールチアミンを用いて正常時および V. B₁ 欠乏時の肝組織における V. B₁ 量を報告しているが著者らの値と一致した。

3. ショ糖密度勾配遠心分離法によるポリソームの解析
 ポストミトコンドリア上清におけるポリソームパターンは第4図に示す如く、対照、欠乏後3日、7日、12日までは変化が認められないが、欠乏後25日および31日のポリ

第3図 肝グラムあたりの総VB₁量

●——● ; 磨碎液画分 ○····○ ; 精製核
 ×····× ; 粗核

ソームパターンは、重合度の大きいポリソーム (heavy polysomes) が減少し、重合度の小さい monomer (73S), dimer (110S) 部分 (light polysomes) が増加して、欠乏日数の経過と共に heavy polysomes が light polysomes に移行する傾向があらわれた。しかし V. B₁ 投与3日には急速に回復し V. B₁ 投与11日には対照に回復した。

精製ポリソームの解析は第5図に示した。欠乏7日の

第4図 ポストミトコンドリア上清におけるポリソームパターン

A ; 対照 B ; 欠乏3日 C ; 欠乏7日 D ; 欠乏12日 E ; 欠乏18日
 F ; 欠乏25日 G ; 欠乏31日 H ; V. B₁ 投与3日 I ; V. B₁ 投与11日

第5図 精製ポリソームパターン

A ; 対照 B ; 欠乏3日 C ; 欠乏7日 D ; 欠乏12日 E ; 欠乏18日
F ; 欠乏25日 G ; 欠乏31日 H ; V.B₁ 投与3日 I ; V.B₁ 投与11日

パターンは対照に比較して monomer, dimer 等のピークが減少し、逆に heavy polysomes が増加する傾向が認められた。

また各フラクションあたりの³H-オロチン酸のc. p. m. も trimer 以上のポリマー部分に取り込みの増加を明確に認めた。

しかし欠乏21日, 18日は再び対照と類似したパターンを示した。欠乏25日になると明らかに heavy polysomes が減少し monomer, および特に dimer が増加した。欠乏食投与後31日に至っては、この傾向は更に顕著にあらわれ ³H-オロチン酸の取り込みも減少した。V.B₁ 投与3日後は急速に回復し、V.B₁ 投与11日目には対照まで回復した。

さて Staehelin ら¹⁵⁾ は size の異なるポリソームに結合している m-RNA の分子量はポリソームの size の増加と共に増大していることを報告し、Noll ら⁴⁾ はポリソームをリボスクレアゼ (EC 2.7.7.16) 処理して 73S と 110S に分解すると、¹⁴C-アミノ酸の取り込みの比活性は 73S にはなく、(73S)₂ 即ち dimer から (73S)₁₀ 即ち 250S の decamer までポリソームの size と共に増加し、250~600S (73S)₁₀ で一定に達することを報告しているので、第5図のポリソームパターンにおける hexamer 以上のポリソームの全リボソームに対する割合を積算によって求めた。

第6図 ヘキサマー以上のポリソームの全リボソームに対する割合

矢印は V.B₁ 欠乏群に対する V.B₁ 投与を示す

第6図に示す如く hexamer 以上のポリソームは、対照では 49.5% を示したが、欠乏7日では 66.3% に増加しその後欠乏日数の経過と共に減少して欠乏31日では 29.4% にまで低下し、V.B₁ 投与後は急速に回復した。欠乏7日に一過性の増加を示しているが、その後 hexamer 以上のポリソームが減少していることは、V.B₁ 欠乏時におけるタンパク質合成の活性機能が相当に低下していることを示唆している。

4. *in vivo* における RNA 合成ならびに *in vitro* におけるタンパク質合成

hexamer 以上のポリソームの減少は、ポリソームのタンパク質合成の活性機能の低下を示唆しているが、これを確かめるために、*in vitro* における ^{14}C -ロイシンの取り込みの比活性の測定を行なった。その結果第7図に示す如くタンパク質合成の活性は、欠乏7日では対照に対して24%の増加を示し、その後減少しはじめ欠乏18日を経過すると対照より低下し、欠乏31日には20%の低下を

第7図 *in vivo* における ^3H -オロチン酸ならびに *in vitro* における ^{14}C -ロイシンのとり込みの変化

- ; ポリソーム RNA 合成 (*in vivo* において精製ポリソーム RNA にとり込まれた ^3H -オロチン酸の比活性の対照に対する割合)
- - - ■ ; 核 RNA 合成 (*in vivo* において精製核 RNA にとり込まれた ^3H -オロチン酸の比活性の対照に対する割合)
-● ; タンパク質合成 (*in vitro* において精製ポリソームにとり込まれた ^{14}C -ロイシンの比活性の対照に対する割合)

矢印は V. B₁ 欠乏群に対する V. B₁ 投与を示す

示した。この時のポリソーム RNA への ^3H -オロチン酸の取り込みの比活性は、やはり欠乏7日に35%の増加を示し、その後減少しはじめ欠乏31日には対照に対して34%も減少した。

即ち RNA 合成およびタンパク質合成は欠乏初期7日に一過性の増加を示しその後欠乏日数の経過と共に減少するという、V. B₁ 欠乏時における生体の RNA およびタンパク質合成の変化の多様性を示した。

しかるに核 RNA への ^3H -オロチン酸の取り込みの比活性は、欠乏7日は対照よりやや増加しているが大差は示さず欠乏18日以後に減少し欠乏31日では23%の低下を示した。

考 察

タンパク質欠乏飼料を与えたラット肝の RNA ならびにタンパク質合成に関しては、すでにいくつかの報告がなされている。Girolamo ら¹⁶⁾は無カゼイン飼料を30日間投与したラット肝の核 RNA を 28 S, 18 S, 18~4 S 画分に分け、これら画分を Nirenberg¹⁷⁾の大腸菌無細胞系に加えてタンパク質合成を促進する画分は、28 S 画分であり対照の 28 S 画分より 3.6 倍も促進したことを報告している。

更に急速にラベルされる核 RNA の放射能比活性は 18~4 S 画分では減少したと報告している。以上は生体である期間タンパク質無摂取の状態にしても、肝細胞のすべての画分の、またすべての種類の RNA 合成が低下するのではなく、ある一定の時期にある種の RNA は合成が促進されているか或いは安定化されているということが考えられる。

Mandel ら¹⁸⁾は無カゼイン飼料を長期間(30~50日)投与したラットの肝細胞質ポリソームパターンの完全な崩壊を報告しているが、これは Girolamo ら¹⁶⁾の核における RNA, 18~4 S 画分の合成が低下するという報告から考察しても一致する現象である。

Sidransky ら¹⁹⁾はスレオニン欠乏飼料をラットに投与して3日および7日という欠乏初期におけるポリソームパターンは、heavy polysomes が増加し、*in vitro* におけるアミノ酸の取り込みの比活性は対照に対して76%の増加を示したと報告し、この増加は栄養素欠乏に対する生体の示すレスポンスであろうと説明しているがその機作にはふれていない。

著者らの実験においては、V. B₁ 欠乏7日をピークにしてポリソーム RNA およびタンパク質合成の活性は、一過性の増加を示しその後欠乏日数の経過と共に減少しており、この減少期は体重の減少期と一致した。さて湿肝グラムあたりの DNA 量に関しては対照との差は認め

られなかったが、欠乏日数経過時における肝重量の増加は認められず、したがって肝組織あたりにおける核酸合成およびタンパク質合成の活性は対照に比して多大に低下していると考えられる。

欠乏初期における RNA およびタンパク質合成の一過性の増加に対しては、著者らも V. B₁ 欠乏に対する生体のレスポンスであろうと考えるが欠乏 7 日の核 RNA 合成が対照と大差を示さなかったことは、核 RNA プレカーサーの合成は増加し、したがって合成された核 RNA はすみやかに細胞質に移行しポリソーム RNA 合成を増加せしめたものと考えられる。

総 括

1. V. B₁ 欠乏飼料を投与したラットは、はじめ 2 週間までは体重はやや増加したがその後欠乏日数の経過と共に減少し、31 日では初体重よりも減少した。しかし V. B₁ 投与によって回復した。
2. V. B₁ 欠乏ラットの湿肝重量は欠乏 18 日までは、わずかに増加するがその後増加は認められなかった。
3. 肝細胞における V. B₁ はその大半が細胞質に存在し欠乏日数の経過と共に急速に減少した。
4. ポストミトコンドリア上清画分のポリソームパターンは、欠乏 18 日より heavy polysomes の減少, light-polysomes の増加を示し、この傾向は欠乏 25 日および 31 日では更に顕著にあらわれ、V. B₁ 投与後は急速に回復した。
5. 精製ポリソームパターンにおいては欠乏 7 日のポリソームは、対照に対して heavy polysomes の増加の傾向がみられ、³H- オロチン酸の取り込みも trimer 以上のポリマー部分において増加した。欠乏 25 日および 31 日では heavy polysomes が減少し light polysomes の増加が顕著にあらわれ、³H- オロチン酸の取り込みも極度に減少した。なお hexamer 以上のポリソームの全リボソームに対する割合は、欠乏 7 日で一過性の増加を示しその後減少した。
6. *in vivo* における ³H-オロチン酸のポリソーム RNA への取り込みの比活性、および *in vitro* における ¹⁴C-

ロイシンの取り込みの比活性は、いずれも欠乏 7 日に一過性の増加を示し、その後欠乏日数の経過と共に減少した。また *in vivo* における核 RNA への ³H- オロチン酸の取り込みの比活性は欠乏 7 日で対照よりやや増加しているが大差は示さず、欠乏 18 日より減少した。そしていずれも V. B₁ 投与後は急速に回復した。

本研究の要旨は第 20 回日本栄養・食糧学会総会および第 39 回日本生化学会総会に発表した。

文 献

- 1) Warner, J. R., Rich, A., Hall, C. E.: *Science*, **138**, 1399 (1962)
- 2) Warner, J. R., Knopf, P. M., Rich, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **49**, 122 (1963)
- 3) Wettstein, F. O., Staehelin, T., Noll, H.: *Nature*, **197**, 430 (1963)
- 4) Noll, H., Staehelin, T., Wettstein, F. O.: *Nature*, **198**, 632 (1963)
- 5) Gierer, A.: *J. Mol. Biol.*, **6**, 148 (1963)
- 6) Witt, I., Heilmeyer, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 340 (1966)
- 7) Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1009 (1953)
- 8) Racker, E., La Haba, G., Leder, I. G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1010 (1953)
- 9) Scherman, H. C., Spohn, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **45**, 2719 (1923)
- 10) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., Striebig, J.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 111 (1952)
- 11) Fujiwara, M., Matsui, K.: *Anal. Chem.*, **25**, 810 (1953)
- 12) Dische, Z., Borenfreund, E.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**, 193 (1957)
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 14) Balaghi, M., Pearson, W. N.: *J. Nutr.* **89**, 127 (1966)
- 15) Staehelin, T., Wettstein, F. O., Oura, H., Noll, H.: *Nature*, **201**, 264 (1964)
- 16) Girolamo, A. D., Girolamo, M. D., Gaetani, S., Spadoni, M. A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **114**, 195 (1966)
- 17) Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H.: *Proc. Natl. Sci. U. S.*, **47**, 1588 (1961)
- 18) Mandel, P., Quirin, C., Bloch, M., Jacob, M.: *Life Science*, **5**, 325 (1966)
- 19) Sidransky, H., Staehelin, T., Verney, E.: *Science*, **146**, 766 (1964)