[農化 第 36 卷, 第 1 号, p.1~6, 1962]

水稻のデオキシリボ核酸について*

吉 井 啓 (愛媛大学農学部)

昭和 36 年 3 月 16 日 受理

植物ウイルスには昆虫によって伝染するものが多いが、その中には媒介虫体内で増殖すると考えねばならぬ例が少なくない⁽¹⁾。稲萎縮病ウイルスはこの 1 例であって、稲とツマグロヨコバイとの間でこの現象を見ることが出来る。筆者はこのような植物と動物との間を往来するウイルスについて、その増殖と伝染との機構を解析するために種々観察をつづけているが⁽²⁾、今回は次の観点より植物のデオキシリボ核酸 (DNA) について観察を加える必要を感じ、まず水稻より抽出精製した DNA についてその理化学的性質を検討した。すなわち現在までに知られたものでは、植物ウイルスは、バクテリオファージ以外はすべてリボ核蛋白 (RNP) であり、動物ウイルスは馬の脳脊髄炎ウイルスなど少数例を除いてはデオキシリボ核蛋白 (DNP) の場合が多い⁽³⁾。しかるに、

(1) 植物のリボ核酸 (RNA) に対し「情報」の提供者と考えられる植物 DNA についての報告は極めて少ない。もっとも TMV の RNA や萎縮稲の RNA はそれ単独でもウイルス活性をもっている^(4~6)。このような活性 RNA の出現に当って主導性をもつと思われる intact DNA の活性についても観察が必要であろう。

(2) 植物ウイルスの RNP が媒介虫体内で増殖する現象を説明するには、植物の RNA とその DNA、媒介虫の RNA とその DNA について観察し、それぞれの構成ヌクレオチドの種類・数・分布などの特性⁽⁷⁾を相互に比較考察する必要がある。

(3) バクテリオファージの DNA についてはもちろんだが、植物 DNA がウイルスの発生に当ってその役割が考察されている例がある。たばこ葉の DNA は TMV の蛋白と合わせると活性ウイルス蛋白を形成し、たばこがモザイク病に罹かるのがこの例^(8,9)である。このようなウイルスが植物体内で増殖する場合に intact な DNA がはたす役割は明確にしなければならない。

(4) ウイルスなどの異常蛋白はいうまでもなく、正常蛋白代謝の場においても、活性をもつ DNA 自体の機能⁽¹⁰⁾についての観察が必要であろう。

以上のように DNA については、種々考察しなければならない重要事項が多いが、動物組織に比べると植物組織から抽出純化され、その諸性質の検討された例は極めて少ない。したがって筆者は動物組織に対して試みられた種々の DNA 抽出法^(11,12)を植物組織に応用して、ほぼ考察に供せられる程度にまで純化した DNA をうることができた。ここには水稻葉から抽出した DNA について観察した 2, 3 の理化学的性質を取りまとめて記述した。

実験材料および実験方法

(1) 水稻 DNA とその分離法 DNA 分離用の水稻 (品種は松山雄町, 千葉旭) は、ガラス室内で春日井式水耕法⁽¹³⁾によって栽培した 30~40 日苗で、採葉後直ちに分離に供した。分離法は蛋白変性法の 1 種で、K. S. Kirby の提案した⁽¹⁴⁾方法 (第 1 図) であるが、植物の生葉から分離が容易なように性能のよいホモジナイザーで組織を十分に磨砕し、抽出透析にはマグネチックスターラーを使用するなど、多少の工夫を加えた。収量は稲生葉 100 g からソーダ塩として約 40 mg である。

(2) 水稻 DNA の理化学的性質の観察方法 対照にはこうし胸腺 DNA (和光純薬 KK 製) を本報の Kirby

* On the Deoxyribonucleic Acid Prepared from Rice Plant.

By Hiromu YOSHII (Faculty of Agriculture, Ehime University)

第1図 Kirby 法による水稻 DNA の分離過程

ル* (フェノール：水=85：15 または水飽和フェノールに NH_3 (1% w/v), KCN 添加) およびブタノール-ピリジン (ピリジン：水：*n*-ブタノール=1：1.5：3 の上層にピリジン 1 容添加) を用い、フタル酸アニリン (フタル酸 1.66 g, アニリン 0.93 g, 水飽和ブタノール 100 ml) を呈色剤として用いた。

c. 紫外線吸収スペクトル：試料の 0.01~0.05%, 0.1 N HCl 溶液によりベックマン型分光光度計（島津製 QB-50 型）を用い測定した。

d. ブリンおよびピリミジン塩基：試料 10 mg に 70% HClO_4 0.2 ml を加え、封管して 100° 下 60 分加水分解する。分解後水 2 ml を加え攪拌濾過し減圧濃縮後、10 N KOH で中和し氷冷して KClO_4 を除去後供試する。すなわちこれを少量の 0.1 N HCl で溶解し、東洋濾紙 No. 51 A (35×35 cm) によって常法に習い⁽¹⁸⁾二次元展開クロマトグラムをえた。1 次元溶媒はイソプロパノール-塩酸 (イソプロパノール 170 ml に濃塩酸 41 ml を加え水で 250 ml), 2 次元溶媒は *n*-ブタノール-アンモニア (水飽和 *n*-ブタノール 100 ml に 15 N NH_4OH 1 ml) を用い、 20° 下に 1 次元は 24 時間、2 次元は 14 時間展開した。展開後はこれにフルオレッセイン液を噴霧し、紫外線下で各スポットを検出し、また各塩基は 0.1 N HCl 4 ml で抽出し、その紫外線吸光度を測定して計量した。なお塩基を計量する際の各分子吸光係数 (me) は次の値を用いた⁽²¹⁾。すなわちアデニン (adenine=

法により更に精製して供試し、考察の資料をえた。対照 DNA には植物核酸として酵母 DNA を用いるのが適当かも知れないが、観察結果の考察には、最も頻繁に供試され実験結果の多いこうし胸腺 DNA が極めて便宜である。また目下観察中の水稻萎縮病媒介虫のツマグロヨコバイ DNA にとっても胸腺 DNA を対照とすることは有利である。このような理由から対照核酸にこうし胸腺 DNA を供試した。

a. 窒素および燐とその含有比 (N-P 率): 窒素は常法の Micro-Kjeldhal 法で、燐は硫酸湿性灰化後 Allen 法⁽¹⁵⁾で比色定量した。

b. 糖成分：デオキシリボースの検出には Dische のジフェニルアミン反応⁽¹⁵⁾とシステイン-硫酸反応⁽¹⁵⁾ および Cohen によるトリプトファン反応⁽²⁰⁾を併用した。リボースには Meibbaum のオルシン-塩酸反応の Kerr と Seraidarian 改良法⁽¹⁶⁾を当てた。もっともこの際は多量のデオキシリボースが存在するので試料の乾燥加熱に留意し⁽¹⁷⁾, 600 と 660 m μ での測定値を標準と比較した。なお水稻 DNA の糖成分を胸腺 DNA と比較するために次の方法⁽²⁰⁾での濾紙クロマトグラフィーによりさらに検討した。すなわち試料 2 mg に 20% HClO₄ 0.5 ml を加え, 封管して 100° 下 20 分間水解し KOH で中和, KClO₄ 除去後減圧で濃縮し, 東洋濾紙 No. 50 により 25° 下 20 時間展開した。展開剤^(18,19)にはフェノ-

* 2種の処法による観察は全く同一の結果を示した。

A) は $264\text{ m}\mu$ で 13.3×10^3 , グアニン (guanine=G) は $245\text{ m}\mu$ で 10.9×10^3 , シトシン (cytosine=C) は $274\text{ m}\mu$ で 10.1×10^3 , 5-メチルシトシン (5-methylcytosine=MC) は $285\text{ m}\mu$ で 9.4×10^3 , チミン (thymine=T) は $263\text{ m}\mu$ で 7.25×10^3 として定量した。

e. 赤外線吸収スペクトル : 試料 2.5 mg を AgCl 固体膜により湿度 45% 下に速度 8 分で赤外分光光度計 (日本分光製 DS-301 型) にかける吸収特性を検討した。

f. 蛋白および多糖類混在の有無 : Biuret 反応⁽¹⁷⁾, およびクロロホルムゲル法を併用して蛋白を, Anthrone 試薬⁽²²⁾およびヨード反応によって多糖類, 澱粉様物質の混在を検した。

実験結果

(1) 水稻 DNA の窒素, 燐および N-P 率 (第 1 表) は, $N=11.86\sim 13.20\%$, $P=7.03\sim 7.80\%$, $N/P=1.70\sim 1.73$ である。この値は対照のこうし胸腺 DNA が $N=12.11\sim 13.30\%$, $P=7.01\sim 7.40\%$, $N/P=1.72\sim 1.80$ であるのと比較するとほぼ同じである。

(2) 糖成分は Dische のジフェニルアミン反応 (D) とシステイン-硫酸反応 (C-S) およびトリプトファン反応が共に陽性で, デオキシリボースが確認できる。なお本反応の可視部吸収スペクトルの最大吸収点は, $D=593\sim 597\text{ m}\mu$, $C-S=487\sim 506\text{ m}\mu$ にみられ, 対照の胸腺 DNA と全く同一である。またその測定吸光度 ($E_{1\text{cm}}^{0.01\%}$) は $D=0.118$, $C-S=0.125$ であって, 胸腺 DNA の $D=0.128$, $C-S=0.132$ に比べるとデオキシリボースの含量はやや劣るが, 比較的良好に似ている。他方 Kerr と Seraidarian のオルシン塩酸改良法による測定結果では, 1 mg の水稻 DNA はリボース $68.8r$ を含むことになったが, デオキシリボースは約 $1/10$ の割合で Bial 反応を呈するから⁽²³⁾, DNA 中のデオキシリボース 43.2% はリボース $43.2r$ に相当する呈色をする。故に $68.8r-43.2r=25.6r$ がリボースに当たること

第 1 表 水稻 DNA および胸腺 DNA の窒素・燐の含量

回数	試料	N %	P %	N/P
I	水稻	12.82	7.40	1.73
	胸腺	12.11	7.01	1.73
II	水稻	11.86	7.03	1.69
	胸腺	13.30	7.40	1.80
III	水稻	13.20	7.80	1.69
	胸腺	12.80	7.22	1.77

水稻 DNA の分離日, I は 22/Ⅶ, II は 30/Ⅶ, III は 8/Ⅸ, 1960.

になる。そして RNA はリボース含量が 46.7% であるから, $25.6r$ のリボースは 5.5% の RNA を含むかも知れないことを示している。一方胸腺 DNA 1 mg はリボース $62.5r$ を含むことになったが, これは同様に 4.1% の RNA を含む可能性を示している。すなわち供試 DNA はリボースを混有するが, その程度は RNA として 6% 以下と考えられよう。

なお濾紙クロマトグラフィー (第 2 図) によると, 水稻 DNA は胸腺 DNA

第 2 図 供試 DNA の糖成分比較のためのペーパークロマトグラム

注: 水稻は水稻 DNA, 胸腺は胸腺 DNA, 対照は 2-デオキシリボースとリボースを示す。なお R_F 値の大きい方がデオキシリボース, 小さい方がリボースである。またブタノールは, ブタノール-ピリジンで, フェノールはフェノール水で展開したことを表わす。

第 3 図 水稻 DNA および胸腺 DNA の紫外線吸収
A は水稻 DNA, B は胸腺 DNA を示す。

とはほぼ同じ箇所 (ブタノール-ピリジンでは $R_F=0.63$, フェノールでは $R_F=0.73$ (水稻) ~ 0.71 (胸腺)) に明瞭なスポット (緑 $\sim$ 褐色, 紫外線で黄色の蛍光) が 1 つ* 見られる。

(3) 紫外外部吸収スペクトル (第 3 図) を見ると, 水稻 DNA の最大吸収点は $259\text{ m}\mu$, 最小吸収点は $231\text{ m}\mu$ に表われ, その $E_{1\text{cm}}^{\text{max. } 259}/E_{1\text{cm}}^{\text{min. } 231}=2.41$ である。これは胸腺 DNA の $E_{1\text{cm}}^{\text{max. } 259}/E_{1\text{cm}}^{\text{min. } 231}=2.31$ に比べると大変似ている。また構成燐酸の燐原子当り吸光係数 $\epsilon(P)$ (第 2 表) は最大 $\epsilon(P)=6400\sim 6500$, 最小 $\epsilon(P)=2650\sim 2700$, 最大 $\epsilon(P)/$ 最小 $\epsilon(P)=2.37\sim 2.42$ を示す。これも胸腺 DNA の最大吸収点 $259\text{ m}\mu$, $\epsilon(P)=6350\sim 6400$, 最小吸収点 $231\text{ m}\mu$, $\epsilon(P)=2700\sim 2750$, その最大 $\epsilon(P)/$ 最

* 2-デオキシリボースはブタノール-ピリジンでは $R_F=0.60$ ⁽¹⁸⁾, フェノールでは $R_F=0.73$ ^(18, 19) を示す。

第4図 水稻 DNA の構成塩基のペーパークロマトグラム

A: アデニン, G: グアニン, C: シトシン,
MC: 5-メチルシトシン, T: チミン

第3表 水稻 DNA および胸腺 DNA の構成塩基のモル比百分率

試料	Adenine (A)	Guanine (G)	Cytosine (C)	5-Methyl- cytosine (MC)	Thymine (T)	Pu/Py	A+C+MC/ G+T	A/T	G/C+MC
水稻 DNA { I	27.7	22.2	18.3	3.2	28.6	1.00	0.97	0.97	1.03
II	28.3	21.8	18.6	3.7	27.6	1.00	1.02	1.03	0.98
胸腺 DNA { I	29.3	20.5	19.6	1.0	29.6	0.99	1.00	0.99	1.00
II	29.6	20.6	20.6	0.8	28.4	1.01	1.04	1.04	0.96

ニンでは 250 および 275 mμ と 225 mμ, シトシンでは 275 mμ と 238 mμ, 5-メチルシトシンでは 285 mμ と 237 mμ, チミンでは 265 mμ と 233 mμ であって, 文献値と一致した. ただ胸腺 DNA とは異なり水稻 DNA は約 3~4% の MC を含み, 第5図に示すように MC の吸収は著しく強かった. なお水稻 DNA はプリンとピリミジンの比 (purine/pyrimidine=Pu/Py) が1である他に, A/T, G/(C+MC), (A+C+MC)/(G+T) もそれぞれ1の近似値を示している.

(5) 赤外線吸収スペクトル (第6図) を見ると, 水稻 DNA は胸腺 DNA に比べると細部では若干相違点が見られるが, DNA が示す特有の波数での吸収ピークが表われていて, 胸腺 DNA と相似点の多いことがわかる.

(6) 供試両 DNA は, 10 mg を使用しても Biuret反応⁽¹⁷⁾ において認められる吸光がなかったし, クロロホルムゲル法によっても蛋白質の混在は認めなかった.

次に Anthrone 法による測定結果では, DNA 1 mg 中にはグルコースとして水稻は 86.1 r, 胸腺は 72.2 r の糖を含むことになった. ところでデオキシリボースは DNA 中に 43.2% あり, その Anthrone 試薬による呈色度

第5図 水稻 DNA および胸腺 DNA の 5-メチルシトシン含量比較

0.1 N HCl 中で観察する. Aは水稻 DNA, Bは胸腺 DNA を示す.

第2表 水稻 DNA および胸腺 DNA の紫外線吸収

回数	試料	最大		最小		最大 ε(P) 最小 ε(P)
		mμ	ε(P)*	mμ	ε(P)	
I	水稻	259	6500	231	2700	2.41
	胸腺	259	6350	231	2750	2.31
II	水稻	259	6400	231	2700	2.37
	胸腺	259	6400	231	2700	2.37
III	水稻	259	6400	231	2650	2.42
	胸腺	259	6350	231	2700	2.35

* ε(P)=30.98 E/c·l ただし c=濃度 (g/l), l=吸収層の厚さ (cm),
E=測定吸光度, 30.98=炭の原子量. 水稻 DNA の分離日は第1表と同様.

小 ε(P)=2.31~2.37 と比較すると, 両者は極めてよく似ている.

(4) 水稻 DNA の構成塩基 (第3表および第4図) には A, G, C, T および MC の5塩基がみられる. そしてそのおのおのの 0.1 N HCl 中での紫外線吸収スペクトルでは, その最大および最小吸収点はそれぞれアデニンでは 260 mμ と 228 mμ, グア

第6図 水稻 DNA および胸腺 DNA の赤外線吸収スペクトル
Aは水稻 DNA, Bは胸腺 DNA を示す.

合はグルコースに対しほぼ 10% である⁽²⁴⁾。今 1 mg DNA 中のデオキシリボースは Anthrone 法ではグルコース 43.2 μ g として定量されることになる。それでこの値を越す部分、水稻 DNA での 86.1 μ g-43.2 μ g=42.9 μ g、胸腺 DNA での 72.2 μ g-43.2 μ g=29.0 μ g はグルコースなど六炭糖類によるものである。すなわち供試両 DNA には六炭糖類 (hexose polymer) がグルコースとして混在するが、それは 3~4% 以下とみられる。なおヨード反応は陰性であったから澱粉類似物質の存在は考えられない。

考 察

本報で採用した K. S. Kirby の方法は、DNA と蛋白質との静電気結合以外の化学結合を検討するため DNP から DNA を分離する必要上工夫されたものであり、1 種の蛋白変性分離法と言える。この方法は比較的簡易であり、かつこれによると DNA は除蛋白され、その最大 $\epsilon(P)$ /最小 $\epsilon(P)$ の値からみても或る程度純度が高いと考えられる。これがここに本法を採用した理由の 1 つである。

尤も DNA 本来の生物学的活性とは遺伝現象の中で DNA が果たすと考えられる役割であるから、この意味では抽出した DNA の活性を確認しなければならない。本法では Transforming principle (TP) 活性をもつ細菌 DNA やバクテリオファージの活性 DNA の抽出法と同様か、または一層穏和な条件で分離操作が行なわれていると考えられるので、純離過程でその生物活性を失なう心配はまずないと思われるが、しかしその確認が必要である。最近では C^{14} , N^{15} などで標識をつけた DNA 試料がえられ、また DNA の光散乱、粘度、沈降定数などの理化学的性質と活性との間の関係が次第に明白にされてきたので⁽¹²⁾、近い将来に本法の抽出 DNA の活性を直接確認したいと考えている。

DNA の窒素および燐の含量は、こうし胸腺については理論値として $N=15.24\%$, $P=9.22\%$, $N/P=1.65$ とされている⁽²⁵⁾。これと比較すると、本報の胸腺 DNA の実測値 $N=12.11\sim13.30\%$, $P=7.01\sim7.40\%$, $N/P=1.73\sim1.80$ はややその値が小さい。これは試料の純度も関係するが、吸着水*も影響するのかも知れない。次に紫外線吸収スペクトルを見ると、純胸腺 DNA では最大吸収点 259m μ , $\epsilon(P)=6400\sim6600$, 最小吸収点 231~232 m μ , $\epsilon(P)=2700\sim2800$, 最大 $\epsilon(P)$ /最小 $\epsilon(P)=2.36\sim2.37$ であり、純酵母 DNA では最大吸収点 260 m μ , $\epsilon(P)=6100$, 最小吸収点 232 m μ , $\epsilon(P)=2500$, 最大 $\epsilon(P)$ /最小 $\epsilon(P)=2.44$ として観察された例⁽²⁵⁾がある。これと比較すると本試料の水稻や胸腺の DNA 測定値はかなりの近似値を示している。また赤外線吸収スペクトルを見ても供試両 DNA は極めて類似している。そしてそれぞれ DNA に特有とされている 895, 930, 967 cm^{-1} の吸収⁽²⁶⁾を見ることができる。E. R. Blout らは 1020 cm^{-1} に RNA にない吸収を記載しているが⁽²⁶⁾、筆者がえた結果は J. W. Rowen の観察⁽²⁶⁾とよく一致していて、この部分に特有な吸収を見なかった。1240, 1370, 1490 および 1530 cm^{-1} における両 DNA の吸収の僅かな差異は、その構成塩基での僅少な相違 (後記) によるものと推察される。ただ水稻 DNA では 960 cm^{-1} に吸収のみられない点が胸腺 DNA と異なる点であるが、これは構成磷酸基の一部がマスクされているような事実を示唆するのかも知れないが詳でない。

DNA の塩基組成については特異な関係が成り立ち、A, G, C, T の間では $A/T=1$, $G/C=1$, $(A+G)/(T+C)=1$, $(A+C)/(G+T)=1$ であると考えられる人が多い。そしてこの関係は DNA では 2 本のポリヌクレオチド鎖がアデニン酸とチミジン酸、グアニン酸とシチジン酸の組合わせにより相補的に接着し、いわゆる Watson-Crick モデルを表わすとされている^(3,25)。ところでコムギ胚やクロバーの DNA では、上記の 4 塩基の他に 5-メチルシトシン (MC) が総塩基の約 5% 含まれている^(25,27)。そしてこの場合は MC と C を加えたものが G と等量になり、塩基間には Watson-Crick モデルを説明するに足る関係を示すことになる。動物 DNA でも牛胸腺その他の組織の DNA 中に、総塩基の 1~2% MC を含む例を見ることができる⁽²⁵⁾。本実験でも胸腺 DNA には MC が 0.8~1.0% 含まれていることを見たが、水稻 DNA には 3.2~3.7% の含量があり、胸腺 DNA より MC を多く含むようである。しかして A/T , $G/(C+MC)$, $(A+C+MC)/(G+T)$ がいずれも 1 またはその近似値であることからみると、水稻 DNA は胸腺 DNA と同様に、Watson-Crick モデルを表わす特有の塩基組成関係を持っていると見てよいようである。

要 約

本報告は、水稻葉から Kirby 法によってデオキシリボ核酸 (DNA) を分離し、その主な理化学的性質をこうし胸腺 DNA を対照として比較観察したものである。

* 60°, 3 時間で約 15~20% (未発表)。

(1) 供試 DNA はその N, P の含量および N-P 率, 含有糖成分などから見ても, また紫外線や赤外線の吸収スペクトルからも, 対照の胸腺 DNA によく似ており, その純度はかなり高いと思われる。

(2) 構成塩基にはアデニン (A), グアニン (G), シトシン (C), チミン (T) の他に 5-メチルシトシン (MC) が確認された。特に水稻 DNA では MC の含量は大きく約 3.5% である。

(3) 塩基組成をみるとプリン塩基対ピリミジン塩基比は 1 であり, $A/T, G/(C+MC), (A+C+MC)/(G+T)$ の値もすべて 1 の近似値を示し, いずれも胸腺 DNA と酷似である。それで水稻 DNA はいわゆる Watson-Crick モデルを表わす例の一つと言えよう。

終りに本研究に当って有益な助言を与えられ, かつ原稿校閲の労をとられた当学部生物化学教室前川一之教授に深謝すると共に, 本実験に援助下さった同教室の櫛部政久氏, 赤外線吸収スペクトルの測定に協力いただいた日本分光工業に感謝する。また観察実施に際して積極的な助力を惜しまなかった当植病教室木曾皓助手をはじめ専攻学生諸君には併記して謝意を表わす。

- (1) 福士貞吉 : 植物バイラス, 朝倉書店, p. 74 (1952).
- (2) 吉井 啓 : ウイルス, 7, 306, 315 (1957); 8, 385, 394 (1958); 9, 415, 453, 462 (1959).
- (3) J. N. Davidson : 核酸の生化学, 共立出版 p. 233 (1959).
- (4) A. Gierer, G. Schramm : *Nature*, 177, 702 (1956).
- (5) H. Fraenkel-Conrat : *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 882 (1956).
- (6) 吉井 啓 : ウイルス, 9, 582 (1959).
- (7) 江上不二夫 : 蛋・核・酵, 4, 356 (1959).
- (8) T. Y. Wang, B. Commoner : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 42, 831 (1956).
- (9) B. Commoner : *Spec. Publ. N. Y. Acad. Sci.*, 5, 237 (1957).
- (10) 細田淳子 : 蛋・核・酵, 5(11), 43 (1960).
- (11) 渡辺 格, 鈴木肇之 : 核酸及び核蛋白質, 上巻, 共立出版, p. 165 (1953).
- (12) 樋 友彦 : 蛋・核・酵, 3, 435 (1958).
- (13) 斎藤 清 : 作物水耕の理論と実際, 朝倉書店 p. 68 (1949).
- (14) K. S. Kirby : *Bioch. J.*, 66, 495 (1957).
- (15) 八木康夫 : 核酸及び核蛋白質, 上巻, 共立出版 p. 132 (1953).
- (16) S. E. Kerr, K. Seraidarian : *J. Biol. Chem.*, 159, 211 (1945).
- (17) S. Zamenhof : *Methods in enzymology* (ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan), 3, p. 696 (1957).
- (18) F. R. Wyatt : *The nucleic acids* (ed. E. Chargaff and J. N. Davidson), 1, p. 243 (1955).
- (19) 鈴木直治, 富沢長次郎 : 作物試験法 (農技協), p. 355 (1957).
- (20) W. G. Overend, M. Stacey : *The nucleic acids* (ed. E. Chargaff and J. N. Davidson), 1, p. 9 (1955).
- (21) 佐藤康夫 : 蛋・核・酵, 1, 118 (1956).
- (22) W. Z. Hassid, S. Abraham : *Methods in enzymology* (ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan), 3, p. 34 (1957).
- (23) W. C. Schneider : *ditto*, 3, p. 680 (1957).
- (24) L. H. Koehler : *Anal. Chem.*, 24, 1576 (1952).
- (25) E. Chargaff : *The nucleic acids* (ed. E. Chargaff and J. N. Davidson), 1, p. 307 (1955).
- (26) G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson : *ditto*, 1, p. 493 (1955).
- (27) 三浦謹一郎 : 蛋・核・酵, 5(11), 19 (1960).