[農化 第 43 卷 第 6 号, p.345~353, 1969]

植物種子発芽体 nuclease による 2'-mononucleotide の生成について (その1)*

片谷 健一, 西本 健市, 秋本 政明, 川田 寛
(日本化学飼料株式会社)

昭和 43 年 9 月 16 日 受 理

Formation of 2'-Mononucleotides from RNA by the Plant Seed Sprouts (I)

By Ken-ichi KATAYA, Ken-ichi NISHIMOTO, Masaaki AKIMOTO and Hiroshi KAWATA
Nippon Chemical Feed Co., Ltd.

By using the crude enzymes extracted from millet (*Panicum miliaceum* L.), milo maize (*Sorghum vulgare*) and soy bean (*Glycine hispida maxim.*) sprouts, the general properties of their nucleases and the identification of the nucleotides obtained from RNA hydrolysates were studied. Furthermore their mode of action was considered.

1) pH optimum of the nucleases from these sprouts are at pH 4.5~5.0 on RNA and bis (*p*-nitrophenyl) phosphate, but on *p*-nitrophenyl phosphate at pH 4.5 and 7.5 respectively. The nucleases are fairly stable at pH 4.0~7.0. Their temperature optimum are at 60°C. Since they retain 80% of the activities after heating at 60°C for 30 min, they are considered to be fairly heat stable. They are activated by a few chelating agents and inhibited by metal ions. They do not show any activities on DNA, thymidine-5'-*p*-nitrophenyl phosphate and 5'-ADP. 2) The hydrolysates of RNA by these enzymes are characterized to be 2'-CMP, 2'-AMP, 2'-UMP and 2'-GMP from the following results; the eluting position in the column chromatogram, carbazole reaction, periodate Schiff's reaction, *R_f* values of paper chromatography, the recovery of adding authentic 2'-mononucleotides and no identification of other isomers than 2'-mononucleotides are recognized. 3) From the results that 2',3'-cyclic mononucleotides are decyclized into 2'-mononucleotides, it may be considered that the formation of 2'-mononucleotides from RNA is due to the decyclization of 2',3'-cyclic mononucleotides which are liberated in the early stage of the reaction.

(Received September 16, 1968)

緒 言

筆者らは、植物種子発芽体 nuclease には、RNA を分解して、緑豆のように 5'-mononucleotide のみを生成

するものと、麦類、アワなどのように 5' 体と 3' 体の mononucleotide のほかに、nucleoside-5'-diphosphate を生成するものがあることを報告した⁽¹⁾。

今回は、RNA 分解生成物の、濾紙電気泳動クロマトグラムにおける過ヨード酸シッフ反応が陰性であるイナキビ、マイロ、および大豆各発芽体の抽出液に含まれる nuclease について検討したところ、緑豆、麦類およびア

略号 RNase: ribonuclease PDase: phosphodiesterase 5'-PDase: 5'-phosphodiesterase DNase: deoxyribonuclease PMase: phosphomonoesterase PNPase: polynucleotide phosphorylase 2',3'-cyclic 2'-Dase: nucleoside 2',3'-cyclic phosphodiesterase DNPP: bis (*p*-nitrophenyl) phosphate PNPP: *p*-nitrophenyl phosphate 5'-NpT: thymidine-5'-*p*-nitrophenyl phosphate

* 本報を 植物種子発芽体の核酸分解酵素に関する研究 (第6報) とする。

ワなどが酸性とアルカリ性の両域に nuclease を有するのとは異なって、酸性側にのみ至適 pH を有する nuclease が認められ、また RNA 分解生成物は、いずれも 2'-mononucleotide であるとの興味ある知見がえられた。

従来、核酸を分解して 2'-mononucleotide を生成する酵素については、微生物界および動植物界にも報告はみあたらない。ただ、動物界では牛の脾臓⁽²⁾、脾臓⁽³⁾および脳⁽⁴⁾に存在する 2',3'-cyclic PDase が、2',3'-cyclic mononucleotide を開環して 2'-mononucleotide を生成するという報告と、植物界では rye grass^(2,5) の酵素が 2',3'-cyclic AMP のみに作用して 2' および 3'-AMP を混成するという報告があるのみである。

本報では、まず、各抽出液の酵素的性質と 2'-mononucleotide の生成経路などについて報告する。

実験方法

1. 試料と抽出酵素液の調製

イナキビ (*millet: Panicum miliaceum* L.) とマイロ (*milo maize: Sorghum vulgare*) は、国産および米国産の飼料用市販品を、大豆 (*soy bean: Glycine hispida maxim.*) は国産の食用市販品を用い、それぞれ 4～5 日間、約 30°C の水床で発芽させ、発芽体に 2 倍量の冷水を加えて磨砕した後、綿布による搾汁を酵素液とした。

2. 酵素活性の測定

各酵素活性の測定は、それぞれ下記の方法に準じて行なった。

1) **RNase** : 酵母 RNA を基質として、志村ら⁽⁶⁾の方法によって酵素活性と活性単位を測定した。

2) **PDase** : Galilhe ら⁽⁷⁾の方法で調製した CaDNPP を基質として中尾ら⁽⁸⁾の方法によって酵素活性を測定した。なお、活性単位は、吸光度 (O.D._{420mμ}) 0.001 の増加をもって 1 単位とした。

3) **DNase** : California Biochem Research 社製の salmon sperm DNA を基質として、中尾ら⁽⁹⁾の方法によって酵素活性を測定した。

4) **5'-PDase** : Razzel ら⁽¹⁰⁾の方法で調製した 5'-NpT を基質として、松下ら⁽¹¹⁾の方法を用いて酵素活性を測定した。

5) **PMase** : PNPP を基質として、杉本ら⁽¹²⁾の方法を用いて酵素活性を測定し、活性単位は、吸光度 0.001 の増加をもって 1 単位とした。

6) **PNPase** : 5'-ADP を基質として、今田ら⁽¹³⁾の方法によって酵素活性を測定した。

3. 分解生成物の同定

1) **イオン交換カラムクロマトグラフィー** : 分解液の含有 nucleotide および標品回収試験における分析は、ギ酸およびギ酸ソーダの 2 成分系溶離剤を用いる gradient elution method⁽¹⁴⁾ によった。ただし、UMP 画分については、さらに Cohn⁽¹⁵⁾ の方法によって再クロマトを行ない、2'-UMP と 3'-UMP を分離した。

2) **呈色反応** : イオン交換カラムクロマトグラフィーによってえられた各 mononucleotide の画分を活性炭カラムに吸着させ、アンモニア性 50% エタノール溶液 (NH₃ 1.4%) で溶出を行ない、溶出液を濃縮した試料について Carbazole 反応⁽¹⁶⁾および過ヨード酸シッフ反応⁽¹⁷⁾を行なった。

3) **ペーパークロマトグラフィー** : 上記の試料を東洋濾紙 No. 50 にスポットし、飽和硫酸アンモニウム溶液、1 M 酢酸ソーダ溶液、イソプロパノール (80:18:2) を溶媒として、上昇法により 18～24 時間、30°C で展開した。スポットは、東芝製蛍光検査灯を用い、波長 254 mμ で検出した。

4. 基質および標準物質

RNA は、和光純薬製酵母 RNA を浅野⁽¹⁸⁾の方法によって精製して用いた。また、PNPP は生化学工業 (株) 製の、各 2'(3')-mononucleotide, 5'-AMP および 5'-ADP などは Sigma 社製のものを用いた。2',3'-cyclic mononucleotide は、Todd ら⁽¹⁹⁾の方法で筆者らが合成したものを用いた。

実験結果

1. 抽出酵素液の諸性質

抽出酵素液の酵素的性質を RNA 基質で検討し、その結果を Fig. 1 (a)～(d) に示した。すなわち、イナキビとマイロの至適 pH は 4.5 に、大豆は 5.0 にあり、至適温度はいずれも 60°C にある。また、いずれも 60°C、30 分間の熱処理 (pH 5.6) で 10～20% 失活し、20°C、pH 4.0～7.0 で 24 時間は安定である。

基質 DNA, 5'-NpT および 5'-ADP に対しては全く活性を示さず、Fig. 2 に示すように、DNPP に対しては pH 4.5 に、PNPP に対しては pH 4.5 と不明確ながら pH 7.5 の 2 点に、至適 pH がみられる。

金属イオンなどによる影響は、各 10⁻³ M 終濃度における RNase 活性を測定して、その結果を Fig. 3 に示した。すなわち、いずれも Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ などによって 40～80% 阻害され、クエン酸、システイン、EDTA

Fig. 1. Properties of the Crude Enzymes Extracted from Millet, Milo Maize and Soy Bean Sprouts.

Opt. pH, Opt. temp., pH stability and heat stability on RNA substrate were shown in (a), (b), (c) and (d). The incubations of (b), (c) and (d) were carried out at pH 4.5. (a) Reaction mixture containing 15 mg of RNA, 0.7 ml of buffer solution and 1.0 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 30 min. After stopping the reaction by adding McFayden's reagent and centrifugation, optical density of the supernatant was measured at 260 mμ⁽⁶⁾.

(b) Reaction mixture was incubated for 30 min. (c) Remaining activity was measured after the enzyme solutions were kept at 20~25°C for 24 hr. (d) Remaining activity was measured after the enzyme solutions were heated at pH 5.6 for 30 min. Buffer used; pH 3~6, 0.1 M acetate buffer solution, pH 7~9, 0.1 M Tris buffer solution.

●—● Millet ○—○ Milo maize ×.....× Soy bean

Fig. 2. pH Activity Curves of the Crude Enzymes on Various Substrates.

The measurements of the enzymatic activities are as follows.

PDase: Reaction mixture containing 1 μmole CaDNPP, 2.0 ml of buffer solution and 1.0 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 30 min. After stopping the reaction by adding 1 N NaOH and centrifugation, optical density of the supernatant was measured at 420 mμ⁽⁶⁾.

PMase: Instead of CaDNPP, PNPP was used and measured as same as PDase activity except for incubated for 15 min⁽¹²⁾.

●—● Millet ○—○ Milo maize ×.....× Soy bean

Fig. 3. Effect of Metal Ions or Reagents on the Activities of RNases.

RNase activities were measured at O.D._{260mμ}, after incubating with 10⁻³ M of metal ions or reagents at pH 4.5, 37°C for 30 min.

□ Millet ▨ Milo maize ■ Soy bean

などによって15~20% 賦活される。

2. RNA の分解と分解生成物の同定

イナキビ, マイロおよび大豆の各酵素液4.0mlを0.5% RNA 溶液10mlに加え, pH 4.5, 温度60°Cで6時間反応を行なった。反応終了後, 各分解液をカラムクロマトグラフィーにより分析した結果, Fig. 4 (a)~(c)に示すように画分A~Dがえられた。これらの画分は過ヨード酸シッフ反応, Carbazole 反応は陰性であることより少なくとも5' 体でないことは明らかであり, また, 吸収比 ($E_{260}/260$, $E_{280}/260$) およびペーパークロマトグラフィーの結果より, A, B, C, D 画分はそれぞれ2'-CMP, 2'-AMP, 2'-UMP, 2'-GMP と判定せられる。さらに,

各既知量の前記画分に, 相当する既知量の標品2'(3')-mononucleotide を添加してイオン交換カラムクロマトグラフィーによる分別を行ない, 溶出位置と各2'-mononucleotide としての回収率を検討した結果からも, 前記画分はそれぞれ2'-CMP, 2'-AMP, 2'-UMP, 2'-GMP であることを確認した。

以上の結果を Table I と Fig. 5~7 に示す。

3. 2'-Mononucleotide の生成経路

イナキビ, マイロおよび大豆各酵素液を, NaF 0.05% 共存下に, 60°C, 30 分間の予熱処理を行なって, 2',3'-cyclic CMP または同 AMP に加え, 温度60°C, pH 5.0 で2時間反応を行ない, 各反応液をペーパークロマトグ

Fig. 4. Column Chromatography of the Hydrolysates by the Crude Enzymes Extracted from Millet, Milo Maize and Soy Bean Sprouts.

10 ml of 0.5% yeast RNA was hydrolyzed with 4.0 ml of each crude enzyme solution at pH 4.5, 60°C for 6 hr respectively, and then the hydrolysates were analyzed by the anion exchanger column chromatography⁽¹⁴⁾.

Table I. Characterization of the Mononucleotide Obtained by the Crude Enzymes from Millet, Milo Maize and Soy Bean Sprouts

Characterization	Obtained mononucleotides				Authentic mononucleotides							
	A	B	C	D	CMP		AMP		UMP		GMP	
					2'	3'	2'	3'	2'	3'	2'	3'
$\lambda_{\max}$ (m μ)	287	257	262	257	278	279	257	257	262	262	257	257
Periodate Schiff's reaction	purple	"	"	"	purple	"	"	"	"	"	"	"
Carbazole reaction	—	purple	—	purple	—	—	purple	"	—	—	purple	"
O. D. ratio	$E_{250/260}$				pH 2		pH 12		pH 2		pH 12	
	$E_{280/260}$				pH 2		pH 12		pH 2		pH 12	
	0.47~				0.48		0.90		0.80		0.85	
	0.48				0.45		—		0.76		—	
	0.90~				0.86		—		0.83		—	
	0.92				—		—		—		—	
R_f value*	0.72~				0.76		0.27		—		0.52	
	0.26~				0.68		0.17		—		—	
	0.27				—		—		—		—	
	—				0.50~		0.52		—		—	
Recovery (%)**	96~				—		—		—		—	
	103				—		—		—		—	

* See Fig. 5.

** Recovery (%) of each mononucleotide as 2'-former in the chromatograms shown in Fig. 6~7.

Fig. 5. Paper Chromatography of the Chromatographed Fractions.

- Sample ; 1. Authentic 2',3'-cyclic mononucleotide.
 2. Fractions obtained by millet.
 3. Fractions obtained by milo maize.
 4. Fractions obtained by soy bean.
 5. Authentic 2'(3')-mononucleotide.

Solvent used ; Sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1 M CH_3COONa : isopropanol
 (80 : 18 : 2).

Method ; Ascending paper chromatography was carried out
 at 30°C for 18~30 hr on a filter paper TÖYŌ No. 50.

ラフィーによって展開した。その結果は Fig. 8 に示す
 クロマトグラムより、2',3'-cyclic CMP および 同 AMP
 の環状結合がいずれも開環されて、未反応物がわずかに
 残っているが、大部分が 2'-CMP および 2'-AMP とな

ることが認められた。

そこでさらに、浅野の方法⁽²⁰⁾を改変して、温度 20°C、
 pH 5.0 の条件で RNA に 6 時間反応させ、経時的に
 2',3'-cyclic mononucleotide と 2'-mononucleotide の

Fig. 6. Recovery of the Chromatographed Fractions.

The mixtures of each known quantity of the authentic 2'(3')-mononucleotides and the fraction of each chromatographed mononucleotide shown in Fig. 4 were analyzed by the anion exchanger column chromatography. The chromatographed mononucleotides were separated as 2'-mononucleotides, and the recovery (%) was shown in Table I.

□ Chromatographed fractions
 ■ Authentic mononucleotides

生成量をペーパークロマトグラフィーにより観察した。

その結果は Fig. 9 および Table II に示すように、反応の初期に 2',3'-cyclic mononucleotide の生成が顕著に認められるが、反応時間の経過に伴って 2',3'-cyclic mononucleotide は次第に消失し、逆に 2'-mononucleotide の生成量が増加することが認められた。なお、5' (3')-AMP 基質で本酵素を作用させた結果から、2'-mononucleotide の生成経路は、phosphotransferase によるものではないことを確かめた。

考 察

イナキビ、マイロおよび大豆発芽体抽出酵素液に含まれる nuclease が RNA より 2',3'-cyclic mononucleotide を経て 2'-mononucleotide のみを与えることは、きわめて興味深い。

従来、核酸を分解して、2',3'-cyclic mononucleotide を生成する植物種子発芽体起源の nuclease は、Merola らが大豆について⁽²¹⁾、Shuster らが rye grass について⁽²²⁾報告している。その他エンドウ葉⁽²³⁾、トウモロコ

Fig. 8. Paper Chromatography for Detecting 2',3'-Cyclic PDase Activity.

Reaction mixture containing 1.0 ml of 10 mM 2',3'-cyclic CMP (AMP) solution, 2.0 ml of 0.1 M acetate buffer solution (pH 5.0) and 1.0 ml of each crude enzyme solution was incubated at 60°C for 2 hr. The crude enzyme solution was preheated at 60°C for 30 min in the presence of 0.05% NaF.

- Sample ; 1. Authentic 2',3'-cyclic CMP or AMP.
2. Authentic 2',3'-CMP or AMP.
3. Product obtained by millet.
4. Product obtained by milo maize.
5. Product obtained by soy bean.

Method ; See Fig. 5.

Fig. 7. Recovery of the Chromatographed UMP Fractions.

The mixtures of each known quantity of the authentic 2'/(3')-UMP and chromatographed UMP fractions were separated by the method of Cohn⁽¹⁶⁾.

- Chromatographed fractions
■ Authentic mononucleotides

Fig. 9. Formation of 2',3'-Cyclic Mononucleotides and 2'-Mononucleotides from RNA.

Reaction mixture containing 1.0 ml of 5% RNA solution, 2.0 ml of 0.1M acetate buffer solution (pH 5.0) and 1.0 ml of the crude enzyme solution was incubated at 20°C. The crude enzyme solution was preheated as shown in Fig. 8.

- Sample ; 1. Authentic 2',3'-cyclic CMP, AMP, UMP, GMP.
 2. Authentic 2'-CMP, AMP, UMP, GMP.
 3. Products obtained after 30 min.
 4. Products obtained after 45 min.
 5. Products obtained after 60 min.
 6. Products obtained after 120 min.
 7. Products obtained after 180 min.
 8. Products obtained after 360 min.

Method ; The details are shown in Fig. 5.
 (notice) This figure shows the case of the crude enzyme solution extracted from soy bean sprout.

シ⁽²⁴⁾, 緑豆⁽²⁵⁾などについての報告も多数みられるが, これらはいずれも, 2',3'-cyclic mononucleotide を経て 3'-mononucleotide を生成するものであり, 本報における酵素系とは最終生成物が全く異なるところより, 明らかに別異な酵素と思われる。

また, 本 nuclease は, 5'-NpT, 5' および 3'-AMP などに全く作用を示さず, 2',3'-cyclic mononucleotide の環状結合を開環して 2'-mononucleotide を生成することから, 本 nuclease による 2'-mononucleotide の生成経路は, RNA よりまず 5' または 3'-mononucleotide が生成され, ついでこれらの 5' または 3' 位のリン酸が 2' 位に転移するのではなく, 2',3'-cyclic mononucleotide を経て 2'-mononucleotide が生成されるのである。このことは, 本 nuclease が 2' 位に環状結合をつくりえない DNA には全く作用せず, RNA との初期反応段階において 2',3'-cyclic mononucleotide が生成され, 反応時間の経過に伴って, 2',3'-cyclic mononucleotide が次第に消失して 2'-mononucleotide の生成量が増加することより明らかである。

以上のことは, イナキビ, マイロおよび大豆発芽体各抽出酵素液中には, RNA を分解して 2',3'-cyclic mononucleotide を生成する nuclease と, ついでこの 2',3'-cyclic mononucleotide を開環して 2'-mononucleotide を生成する 2',3'-cyclic PDase の両作用を同時にもつ酵素が存在するものか, またはこれらがそれぞれ別個に存在するものかは現段階では不明であるので, 各抽出酵素液の精製分別を行なった結果により次報で報告する。

要 約

イナキビ, マイロおよび大豆発芽体より抽出した酵素液について, 含有 nuclease の一般的性質, RNA 分解生成物および分解経路などの検討を行なった。

(1) 各抽出酵素液は, RNA, DNPP および PNPP 基質に対し, pH 4.5~5.0 に至適 pH を有し, PNPP 基

Table II. Formation of 2',3'-Cyclic Mononucleotides and 2'-Mononucleotides from RNA

Products	Nucleases	The degree of the formation during the incubation					
		30	45	60	120	180	360 (min)
2',3'-Cyclic mononucleotides	Millet sprout	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
	Milo maize "	(+)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)
	Soy bean "	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
2'-Mononucleotides	Millet sprout	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)
	Milo maize "	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)
	Soy bean "	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)

The degree of the formation was judged by the density of the spots on paper chromatogram shown in Fig. 9.

質に対してはさらに pH 7.5 にもわずかに至適 pH がみられる。しかし, DNA, 5'-NpT および 5'-ADP に対しては活性を示さない。

(2) 至適温度は, RNA 基質に対して 60°C にあり, pH 5.6, 60°C, 30 分間の熱処理で約 20% が失活し, pH 4.0~7.0 で安定である。また, 金属イオンにより阻害され, 一部のキレート剤により賦活される。

(3) RNA 分解生成物は, イオン交換カラムクロマトグラフィーにおける溶出位置, 各画分の Carbazole 反応, 過ヨード酸シッフ反応, ペーパークロマトグラフィーの *R_f* 値 および標品 2', (3')-mononucleotide を添加して行なったイオン交換カラムクロマトグラフィーにおける回収率などの結果から, それぞれ 2'-CMP, 2'-AMP, 2'-UMP および 2'-GMP であり, その他の異性体は認められない。

(4) 各 2'-mononucleotide の生成経路は, RNA より各 2', 3'-cyclic mononucleotide を経て, 2'-mononucleotide が生成される。また, 2', 3'-cyclic mononucleotide にも作用して 2'-mononucleotide が生成される。

終りにのぞみ, 本研究に際し御助言と御校閲を賜った北海道大学水産学部斎藤恒行教授, ならびに本報告の発表を許可された当社竹井俊郎社長に深甚な謝意を表します。

なお, 本研究は昭和 43 年 4 月 2 日, 名古屋大学で開催された日本農芸化学会大会において講演報告した。

- (1) 川田 寛, 片谷健一, 秋本政明, 西本健市: 昭和 42 年度日本農芸化学会大会講演。
- (2) P. R. Whitfeld, L. A. Heppel and R. Markham: *Biochem. J.*, **60**, 15 (1955).
- (3) F. F. Davis and F. W. Allen: *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 14 (1956).
- (4) G. I. Drummond, N. T. Iyer and J. Keith: *J.*

- Biol. Chem.*, **237**, 3535 (1962).
- (5) D. M. Brown, C. A. Dekker and L. A. Heppel: *J. Chem. Soc.*, 40 (1954).
- (6) 志村保彦, 藤島鉄郎, 千葉秀雄, 吉備政次郎: 特許公報, 昭和 38-7087 (1963).
- (7) M. P. de Garilhe and M. Laskowski: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 370 (1950).
- (8) Y. Nakao and K. Ogata: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 291 (1963).
- (9) Y. Nakao and K. Ogata: *ibid.*, **27**, 199 (1963).
- (10) W. E. Razzel and H. G. Khorana: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2105 (1959).
- (11) S. Matsushita, F. Ibuki, T. Mori and T. Hara: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 436 (1965).
- (12) 杉本 洋, 岩浅 孝, 石山二郎, 横塚 保: 農化, **37**, 677 (1963).
- (13) A. Imada, Y. Nakao and K. Ogata: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 611 (1962).
- (14) 川田 寛, 片谷健一, 秋本政明, 西本健市: 農化, **41**, 239 (1967).
- (15) W. E. Cohn: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2811 (1950).
- (16) Z. Dische and E. Landsberg: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 193 (1957).
- (17) T. G. Buchanan, C. A. Dekker and A. G. Long: *J. Chem. Soc.*, 3162 (1950).
- (18) 浅野仁子: 蛋白 核酸 酵素, **5**, 158 (1960).
- (19) S. P. Colowick and N. O. Kaplan: "Methods in Enzymology", Vol. III, 1957, p. 811.
- (20) 浅野仁子: 蛋白 核酸 酵素, **5**, 236 (1960).
- (21) A. J. Merola and F. F. Davis: *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 431 (1962).
- (22) L. Shuster, H. G. Khorana and L. A. Heppel: *ibid.*, **33**, 452 (1959).
- (23) M. H. Holden and N. W. Pirie: *Biochem. J.*, **60**, 39 (1955).
- (24) C. M. Wilson: *Biochim. Biophys. Acta*, **68**, 177 (1963).
- (25) J. Stockx and L. Vandendriessche: *Arch. Intern. Physiol. et Biochem.*, **69**, 545 (1961).