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

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 (II)

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

Nucleases from millet, milo maize and soy bean sprouts were purified by the following methods; centrifugation, fractionation with ammonium sulfate, adsorption on calcium phosphate gel, Sephadex treatment, ethanol fractionation and column chromatography on DEAE-cellulose. The crude enzymes are separated into two fractions with nuclease activity (PR_1 , PR_2) and two fractions with phosphatase activity (PM_1 , PM_2). They were purified approximately to 1000 fold of the nuclease and 700 fold of the phosphatase per protein, which are identified as nearly unitary protein by starch zone electrophoresis. 1) pH and temperature optimum of PR_1 and PR_2 on RNA are at pH 5.0, 60°C and pH 6.0, 50°C, respectively. Their pH and temperature optimum on 2',3'-cyclic mononucleotides are all at pH 7.0 and 60°C. 2) PR_1 which is stable at pH 4.0~6.0 does not lose any activity by the heat treatment (at pH 5.5, 60°C, for 30 min), while PR_2 which is stable at pH 4.5~7.5 loses 40% of the activity. PR_1 is inhibited by metal ions except for Mg^{2+} , but PR_2 does not need metal ions. 3) In PR_1 hydrolysates of RNA, more 2'-pyrimidine mononucleotides are found than 2'-purine mononucleotides, while in PR_2 nearly equal amount of 2'-mononucleotides are found. From these results, it may be concluded that PR_1 is the endonuclease slightly specific to pyrimidine base, but PR_2 is the exonuclease nonspecific to bases. Each of them does not show any activities on DNA and methyl RNA. 4) In the decyclization of 2',3'-cyclic mononucleotides, PR_1 can easily act on pyrimidines while hardly on purines. On the other hand, PR_2 can act easily on both of them. The relative rate of decyclization is as follows; $CMP > UMP > AMP > GMP$. But they can not decyclize 3',5'-cyclic mononucleotides. 5) In RNA hydrolysis, a large amount of 2',3'-cyclic mononucleotides are found in the early stage of the reaction, but they are decreased gradually and 2'-mononucleotides are formed concomitantly in the last stage. 6) pH optimum of PM_1 and PM_2 are at 5.0 and 7.5. Temperature optimum are all at 37°C. They are heat labile and are stable at pH 4.5~7.0.

(Received September 16, 1968)

緒 言

前報⁽¹⁾において、イナキビ、マイロおよび大豆各発芽体より抽出した酵素液について、酵素の性質、RNA 分解生成物の同定、および RNA より 2'-mononucleotide

の生成経路などについて報告した。

本報では、前記各発芽体より nuclease の精製分別を行なったところ、各 2 種の nuclease と phosphatase が分別されたので、これらの酵素的性質について検討した。その結果、2 種の nuclease は、相互にやや性質を異にするが、いずれも RNA に作用して 2',3'-cyclic

* 本報を 植物種子発芽体の核酸分解酵素に関する研究 (第 7 報) とする。

mononucleotide を生成し, ついでこの環状結合を開環して, 2'-mononucleotide を生成する基質特異性の強い nuclease であること, また 2 種の phosphatase は, 既報⁽²⁾の緑豆, 麦類およびアワなどの発芽体に存在する酵素と全く同一な酸性およびアルカリ性酵素であることなどの知見がえられたので報告する.

実験方法

供試発芽体, 各酵素活性の測定および分解生成物の同定などはすべて前報⁽¹⁾と同様に行なった. また, 酵素の精製は, Fig. 1 に示す方法によって行ない, 酵素の精製度は, 各精製段階における酵素活性とケルダール法によって蛋白量とを測定し, 原酵素液の比活性を 1 とした場合の比率で示した.

諸基質および標準物質は前報⁽¹⁾で用いたものを供試したほか, 3',5'-cyclic AMP は Sigma 社製のものを,

Fig. 1. Steps of Purification Procedure.

また, methyl RNA は Anderson ら⁽³⁾の方法により, RNA core は鈴木ら⁽⁴⁾の方法によりそれぞれ合成したものをを用いた.

2',3'-Cyclic PDase の活性は, Drummond ら⁽⁵⁾の方法を改変して測定した. すなわち, 10 mM 2',3'-cyclic mononucleotide 溶液 0.1 ml, 0.1 M 酢酸または 0.1 M トリス緩衝液 0.2 ml および酵素液 0.1 ml よりなる反応組成液を 60°C, 30 分間反応させたのち氷冷し, このうち 0.05 ml を東洋濾紙 No. 50 にスポットし, イソプロパノール, 28% アンモニア水, 水 (70:5:25) を溶媒とする一次元上昇法ペーパークロマトグラフィーを行なった. えられた 2'-mononucleotide のスポットを切取って, 0.1 N 塩酸溶液 4.0 ml で抽出し, 抽出液の 260 mμ における吸光度をそのまま酵素活性とした.

実験結果

1. 酵素の精製

各発芽体 800 g を供試して酵素の精製を行なった結果を Table I および Fig. 2 (a)~(c) に示した. すなわち, 各 2 種の nuclease (PR₁, PR₂) および phosphatase (PM₁, PM₂) が分別され, 蛋白当り nuclease は約 1000 倍に, phosphatase は約 700 倍に精製された. これらの精製酵素は, Fig. 3~4 に示すように, デンブンゾーン電気泳動と紫外部における吸収曲線の結果から, いずれもほぼ単一に近い蛋白であることが確認せられた. ただし, Table I には各分別酵素の精製度をマイロの場合を一例として掲げた.

以下, これらの各画分を 0~4°C の冷水に対して透析を行なったのち, 酵素的性質の検討を行なった.

2. 一般的性質

まず, nuclease は RNA を基質とした場合の結果を

Table I. Purification of Nuclease and Phosphatase from Milo Maize Sprout

Step No.	Volume (ml)	Protein (mg)	Substrates					
			RNA		DNPP		PNPP	
			total activity (×10 ³ units)	purification	total activity (×10 ³ units)	purification	total activity (×10 ³ units)	purification
(I)	1200	16,400	14,900	1	150	1	410	1
(II)	1140	7800	14,200	2	145	2	400	2
(III)	180	735	10,000	15	83	12	264	14
(IV)	220	30	1920	72	17	63	54	72
(V)	155	28	1900	75	16	63	54	77
(VI)	150	6.0	1250	229	13	236	37	246
(VII) { *	72	1.2	1100	1010	11	1000	—	—
**	60	1.6	—	—	—	—	27	680

* nuclease fraction ** phosphatase fraction

Fig. 2. Column Chromatography of Millet, Milo Maize and Soy Bean Sprouts Enzymes on DEAE-cellulose.

The enzymes were isolated into each two fractions of nuclease (PR₁, PR₂) and phosphatase (PM₁, PM₂) respectively. The former were measured on RNA and DNPP and the later on PNPP. The chromatographic conditions are as follows.

Column; 2×30 cm, bufferized with 0.005M Na-phosphate buffer solution (pH 7.0).

Flow rate; 10.5 ml/60 min

Fraction size; 6.0 g

- Protein concentration (mg/ml)
- RNase activity measured on RNA (O.D. at 260 mμ)
- ×····× PDase activity measured on DNPP (O.D. at 420 mμ)
- ▨▨ PMase activity measured on PNPP (O.D. at 420 mμ)

Fig. 3. Starch Zone Electrophoretic Patterns of the Purified Nucleases and Phosphatases.

Electric conditions ; 300 V, 8~9 mA, 18 hr

Size of starch block ; 1.4×3.4×25.0 (cm)

Buffer used ; 0.02 M Na-phosphate buffer solution (pH 6.0, $\mu=0.1$)

●.....●	Millet	} protein concentration (mg/ml)
○.....○	Milo maize	
×.....×	Soy bean	
●.....●	Millet	} RNase or PMase activity (O.D. at 260 mμ or 420 mμ)
○.....○	Milo maize	
×.....×	Soy bean	

Fig. 5 (a)~(d) に示した。すなわち、各 nuclease の至適 pH と至適温度は、PR₁ は pH 5.0, 60°C に、PR₂ は pH 6.0, 50°C にある。耐熱性は両者に著しい差がみられ、PR₁ は pH 5.5, 60°C, 30 分間の処理で全く失活

しないが、PR₂ は約 40% が失活する。また、20°C において PR₁ は pH 4.0~6.0 で、PR₂ は pH 4.5~7.5 でいずれも 24 時間は安定である。

金属イオンなどの影響は各 10⁻³ M 終濃度における

Fig. 4. Ultraviolet Absorption Spectra of the Purified Nucleases and Phosphatases.

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

Fig. 5. Properties of the Purified Nucleases on RNA.

Opt. pH, opt. temp., pH stability and heat stability of the purified nucleases on RNA substrate were shown in (a), (b), (c) and (d). The incubations of (b), (c) and (d) were carried out at pH 5.0 (PR₁) and 6.0 (PR₂) respectively.

(a) Reaction mixture was incubated at 37°C for 30 min.

(b) Reaction mixture was incubated for 30 min.

(c) After the enzyme solution was kept at 20°C for 24 hr, the remaining activity was measured.

(d) After the enzyme solution was heated at pH 5.5 for 30 min, the remaining activity was measured.

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. 6. Effect of Metal Ions or Reagents on the Activities of the Purified Nucleases.

The activities of PR₁₋₂ were measured on RNA at O.D._{260mμ}, after incubating with 10⁻⁸ M of metal ions or reagents at pH 5.0 (PR₁) and 6.0 (PR₂), 37°C for 30 min respectively.

□ Millet ▨ Milo maize ■ Soy bean

RNase 活性を測定して、その結果を Fig. 6 に示した。すなわち、PR₁ はクエン酸、システイン、EDTA などにより 40~50% 賦活されるが、Mg²⁺ を除く大部分の金属イオンにより著しく阻害される。PR₂ は Co²⁺、Cu²⁺ により特に阻害され、その他の金属イオンによる影響はほとんどみられず、また前記のキレート剤によってわずかに賦活される。

つぎに、PR₁ と PR₂ の 2',3'-cyclic mononucleotide に対する諸性質を 2',3'-cyclic CMP 基質で検討し、その結果を Fig. 7 (a)~(d) に示した。すなわち、ともに至適 pH は pH 7.0、至適温度は 60°C にあり、PR₁ は pH 5.5、60°C、30 分間の処理で失活しないのに対し、PR₂ は約 20% が失活する。また、20°C において PR₁ は pH 4.0~6.0 で、PR₂ は pH 4.5~7.0 で 24 時間安定である。

Phosphatase は、PNPP 基質として検討し、その結果を Fig. 8 (a)~(d) に示した。すなわち、至適 pH は

PM₁ は pH 5.0 に、PM₂ は pH 7.5 に、至適温度はともに 37°C にある。耐熱性はいずれもきわめて弱く、pH 5.5、70°C、15 分間の処理で約 90% が失活する。これらはともに 20°C、pH 4.5~7.0 で 24 時間安定である。また金属イオンなどの影響については、Fig. 9 に示すように、PM₁ は大部分の金属イオンにより著しく阻害され、一部のキレート剤により賦活される。これに対し、PM₂ は金属イオンの影響はほとんどみられず、一部のキレート剤により賦活される。

3. 塩基および基質特異性

各精製 nuclease (PR₁, PR₂) を RNA 基質でそれぞれ 9000 単位/ml に調製して供試した。すなわち、Fig. 10 に示すように、RNA をそれぞれ分解し、各分解液をイオン交換カラムクロマトグラフィーによって分析した。これらの生成各 mononucleotide 4 画分の同定は前報⁽¹⁾と同様に、過ヨード酸シッフ反応、carbazole 反応、吸収比 ($E_{260/260}$, $E_{280/260}$)、ペーパークロマトグラフィー

Fig. 8. Properties of the Purified Phosphatases.

Opt. pH, opt. temp., pH stability and heat stability of the purified nucleases on PNPP substrate were shown in (a), (b), (c) and (d). The incubation of (b), (c) and (d) were carried out at pH 5.0 (PM₁), 7.5 (PM₂) respectively.

- (a) Reaction mixture was incubated at 37°C for 15 min.
 - (b) Reaction mixture was incubated for 15 min.
 - (c) Remaining activity was measured after the enzyme solution was kept at 20°C for 24 hr.
 - (d) Remaining activity was measured after the enzyme solution was heated at pH 5.5 for 15 min.
- Buffer used; See Fig. 5.

●—● Millet } PM₁
 ○—○ Milo maize }
 x—x Soy bean }

Fig. 7. Properties of the Purified Nucleases on 2',3'-Cyclic CMP.

Ten μ moles 2',3'-cyclic CMP was incubated with 1.0 ml of each purified nuclease PR₁₋₃ (9000 units/ml on RNA). The incubations of (b), (c) and (d) were carried out at pH 5.0 (PR₁) and 6.0 (PR₂) respectively.

- (a) Reaction mixture was incubated at 60°C for 60 min.
- (b) Reaction mixture was incubated for 60 min.
- (c) After the enzyme solution was kept at 20°C for 24 hr, the remaining activity was measured.
- (d) After the enzyme solution was heated at pH 5.5, 60°C for 30 min, the remaining activity was measured.

Then the hydrolysates were examined by paper chromatography as shown in the text. The spots of 2'-mononucleotides on paper chromatograms were cut off and eluted with 4.0 ml of 0.1 N HCl. The optical density of the eluents were measured at 260 m μ .

●—● Millet } PR₁
 ○—○ Milo maize }
 x—x Soy bean }

Fig. 9. Effect of Metal Ions or Reagents on the Activities of the Purified Phosphatases.

Phosphatase activities of PM_{1-2} were measured on PNPP at O.D._{420mμ}, after incubating with 10^{-3} M of metal ions or reagents at pH 5.0 (PM_1) and 7.5 (PM_2), 37°C for 15 min respectively.

□ Millet ▨ Milo maize ■ Soy bean

Table II. Degradation of RNA by the Purified Nucleases from Millet, Milo Maize and Soy Bean Sprouts

	2'-Mononucleotide				Total
	CMP	AMP	UMP	GMP	
Degradation { PR_1	15.7~21.1	7.3~10.9	14.2~22.7	7.4~10.7	44.4~65.4
of RNA (%) { PR_2	12.7~14.8	12.3~15.1	12.7~15.2	11.9~15.7	49.6~60.9
Molar ratio { PR_1	1.90~2.29	1.00	1.84~2.46	0.96~1.04	—
{ PR_2	1.05~1.11	1.00	1.05~1.17	0.84~1.08	—

The samples are the hydrolysates in Fig. 10.

一などの結果より, また各画分に, 相当する既知量の標品各 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, 2'-mononucleotide としての回収率を検討した結果などから, いずれも 2' 体のそれぞれ CMP, AMP, UMP, GMP であることを確認した。また, 生成各 2'-mononucleotide のモル比は, Table II に示すように, PR_1 では pyrimidine 系が purine 系の約 2 倍であるのに対し, PR_2 ではほぼ等モル比で生成される。

つぎに, 各 nuclease の基質特異性は, Fig. 11 に示す

ように, PR_1 と PR_2 は, RNA と DNPP に対してはほぼ同等の活性を示すが, いずれも methyl RNA, DNA, 5'-NpT および 3',5'-cyclic AMP に対しては全く活性を示さず, RNA core に対しては, PR_1 の活性は PR_2 よりきわめて弱い。また, 2',3'-cyclic mononucleotide に対しては, Table III に示すように, PR_1 は purine 系にはほとんど作用せず, pyrimidine 系にはきわめて速やかに作用して 2'-mononucleotide を生成する。一方, PR_2 は purine, pyrimidine 系のいずれにも作用して 2'-mononucleotide を生成するが, その相対速度は C>

Fig. 10. Column Chromatography of the Hydrolysates of RNA by the Purified Nucleases.

2.0 ml of 5% yeast RNA was hydrolyzed with 8.0 ml of each PR_1 and PR_2 (9000 units/ml on RNA) at pH 5.0, 60°C (PR_1) and at pH 6.0, 50°C (PR_2) for 24 hr respectively, and then each hydrolysate was analyzed by the anion exchanger column chromatography⁽¹³⁾.

(notice) This figure shows the case of the nucleases purified from millet sprout.

Nuclease	Substrates														
	RNA (260 mμ)		DNPP (420 mμ)	RNA core (260 mμ)	Methyl RNA (260 mμ)	DNA (595 mμ)	5'-NpT (420 mμ)	3',5'-Cyclic AMP (Decyclizing ability and decyclized products)	2',3'-Cyclic						
	(O. D.)	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2								
PR ₁								inactive	inactive	inactive	(-)	2'-CMP	(-)	2'-UMP	(-)
PR ₂								inactive	inactive	inactive	(-)	2'-CMP	2'-AMP	2'-UMP	2'-GMP

Fig. 11. Substrate Specificity of the Purified Nucleases.

Each purified nuclease PR_{1-2} was adjusted to 9000 units/ml on RNA and then was used. The incubations were carried out at pH 5.0 (PR_1) and 6.0 (PR_2) respectively. The measurements of the activities on various substrates are shown in the previous paper⁽¹⁾.

□ Millet Milo maize Soy bean

Table III. Decyclization of Various 2',3'-Cyclic Mononucleotides

Enzymes	Substrates	Substrate decyclized per 30 min (%)	Relative rate
PR ₁	2',3'-cyclic CMP	58.9~60.4	100
	" AMP	48.4~61.5*	1.7~2.1
	" UMP	57.6~61.6	98~102
	" GMP	39.7~47.4*	1.4~1.6
PR ₂	2',3'-cyclic CMP	70.6~80.2	120~133
	" AMP	53.8~68.3	91~113
	" UMP	70.7~80.3	120~133
	" GMP	25.0~37.9	43~63

* incubated for 24 hr.

U>A>G の順序である。

なお, 前報⁽¹⁾と同様の方法によって, PR₁ と PR₂ をそれぞれ RNA に作用せしめた場合, 反応初期に 2',3'-cyclic mononucleotide を顕著に生成し, 反応時間の経過に伴って cyclic mononucleotide は次第に消失し, 逆に 2'-mononucleotide の生成量が増加することを確認した。

考 察

従来知られている動植物界の nuclease のうち, 本酵素と対照すべきものをあげ, Table IV にこれらの諸性質を要約した。すなわち, rye grass, 大豆および牛脾臓の nuclease などは, RNA および 2',3'-cyclic mononucleotide に対する分解生成物がいずれも 3'-mononucleotide であるのに対し, 本酵素が 2'-mononucleotide を生成する点で明らかに異なる。

また, 牛の脾臓, 脾臓および脳に存在する 2',3'-cyclic PDase は, 分解生成物が 2'-mononucleotide である点では同様であるが, DNA, DNPP および RNA core などには作用せず, また, RNA 分解生成物が 3'-mononucleotide かまたは全く作用せぬなどの点で, 明らかに本酵素とは異なる。

以上のように, 本酵素は 2',3'-cyclic mononucleotide のみならず RNA にも作用して, いずれも 2'-mononucleotide を生成し, その他の異性体は全く認められぬことより, 前記既往の nuclease または 2',3'-cyclic PDase とは異なっており, 全く新しい型の nuclease であると考えられる。

つぎに, RNA から 2'-mononucleotide が生成される経路は, 前報⁽¹⁾では粗酵素液を用いたために, RNA を 2',3'-cyclic mononucleotide に分解する酵素と, ついでこの環状 mononucleotide を開環して, 2'-mononucleotide を生成する酵素が別個に存在するのか, または両

Table IV. Comparison of Various RNase and 2',3'-Cyclic PDase

Enzyme	Origin	Opt. condition on RNA and 2',3'-cyclic mononucleotide in parenthesis		Effect of metal ion	Character of the mononucleotides liberated					Substrate specificity			
		pH	Temp. (°C)		RNA	2',3'-cyclic CMP	AMP	UMP	GMP	RNA	DNA	Methyl RNA core	DNPP
PR ₁	Millet, Milo maize and Soy bean sprouts in this paper.	{ 5.0 (7.0)	{ 60 (60)	inhibit	2'	2'	2'	2'	2'	(+)	(-)	(+)	(+)
PR ₂		{ 6.0 (7.0)	{ 50 (60)	ineffective	2'	2'	2'	2'	2'	(+)	(-)	(+)	(+)
RNase	Rye grass ^(7,11)	{ 4.5 (7.2*)	{ 37* (37*)	—	3'	—	2' & 3'	—	—	(+)	(+)	(-)	(-)
	Soy bean ⁽⁸⁾	{ 5.2 (5.2*)	{ 35* (35*)	ineffective	2', 3'-cyclic & 3'	3'	(-)	3'	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Bull pancreas ⁽⁹⁾	{ 7.5~8.0 (-)	{ 60 (-)	inhibit	3'	3'	(-)	3'	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
2',3'-cyclic PDase	Bull spleen ^(10,11)	{ 9.0 (7.2)	{ — (30*)	inhibit	3'	2'	2'	2'	2'	(+)	(+)	(+)	(-)
	Bull pancreas ⁽¹²⁾ and brain ⁽⁶⁾	{ — (6~7)	{ — (30*)	inhibit	inactive	2'	2'	2'	2'	(-)	(-)	(-)	(-)

* experimental example in each reference.

作用をもつ酵素によるものか不明であったが、本報の結果により、塩基特異性を異にする 2 種の nuclease が分別され、そのいずれもが初期反応段階において RNA を 2',3'-mononucleotide に分解し、反応時間の経過とともに、生成された 2',3'-mononucleotide を逐次開環して 2'-mononucleotide を生成する経路をとることが明らかとなった。このことは、本酵素が 2' 位に環状結合をつくりえない DNA または methyl DNA, あるいは 3',5'-cyclic mononucleotide などに全く作用せぬことより、糖部分に対する特異性が強いことから裏付けられる。

要 約

イナキビ、マイロおよび大豆発芽体 nuclease の精製分別を行ない、精製各酵素の酵素的性質および特異性などを検討した。

(1) 各抽出酵素液を遠心分離、硫酸アンモニウム分画、リン酸カルシウムゲル処理、Sephadex 処理、エタノール分画および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーなどの方法によって、各 2 種の nuclease (PR_1 , PR_2) と phosphatase (PM_1 , PM_2) を分別した。

(2) 分別 nuclease の RNA 基質に対する至適 pH と至適温度は、それぞれ PR_1 は pH 5.0 と 60°C に、 PR_2 は pH 6.0 と 50°C にある。また 2',3'-cyclic mononucleotide に対する至適 pH と至適温度は、いずれも pH 7.0 と 60°C にある。

(3) PR_1 は pH 5.5, 60°C, 30 分間の処理で全く失活せず、pH 4.0~6.0 で (20°C, 24 時間) 安定であるのに対し、 PR_2 は約 40% が失活し、pH 4.5~7.5 で安定である。これらの nuclease は、いずれも金属イオン非要求酵素である。

(4) 2',3'-Cyclic mononucleotide に対しては、 PR_1 は purine 系にはほとんど作用せず、pyrimidine 系にはきわめて速やかに作用して 2'-mononucleotide を生成する。一方、 PR_2 はいずれにも作用して 2'-mononucleotide を生成するが、その相対速度は $C > U > A > G$ の順序である。

(5) PR_1 は、塩基特異性の強い endonuclease であ

り、 PR_2 は、塩基特異性のない exonuclease である。また、これらは DNA, methyl RNA および 3',5'-cyclic mononucleotide などには全く作用しない。

(6) 2 種の phosphatase (PM_1 , PM_2) は、PNPP 基質に対して至適 pH は、 PM_1 は pH 5.0 に、 PM_2 は pH 7.5 に、至適温度はいずれも 37°C にある。これらは、いずれも耐熱性はきわめて弱い金属イオン非要求酵素である。

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) 片谷健一, 西本健市, 秋本政明, 川田 寛: 農化, **43**, 345 (1969).
- (2) 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.
- (3) A. S. Anderson, G. R. Barker, J. M. Gulland and M. V. Lock: *J. Chem. Soc.*, 369 (1952).
- (4) 鈴木友二, 岩永貞昭, 佐竹正年: 薬誌, **74**, 167 (1954).
- (5) G. I. Drummond, N. Y. Iyer and J. Keith: *J. Biol. Chem.*, **237**, 3535 (1962).
- (6) 志村憲助, 吉田充輝: 化学と生物, **4**, 270 (1966).
- (7) L. Shuster, H. G. Khorana and L. A. Heppel: *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 452 (1959).
- (8) A. J. Merola and F. F. Davis: *ibid.*, **55**, 431 (1962).
- (9) 入江昌親: 蛋白 核酸 酵素, **12**, 386 (1967).
- (10) 田中兼太郎: 同上, **2**, 118 (1957).
- (11) P. R. Whitfeld, L. A. Heppel and R. Markham: *Biochem. J.*, **60**, 15 (1955).
- (12) F. F. Davis and F. W. Allen: *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 141 (1956).
- (13) 川田 寛, 片谷健一, 秋本政明, 西本健市: 農化, **41**, 239 (1967).
- (14) W. E. Cohn: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2811 (1950).