薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (2) 119—128 (1994)

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵及び肝由来のデオキシリボヌクレアーゼの部分精製とその性質. ウシ脾臓由来
デオキシリボヌクレアーゼ II との比較

仁田一雄,* 塚本佳雅, 佐野彰仁, 萩生田克枝, 尾崎浩一,
鈴木成恵, 細野雅祐, (故)川内廣明, 高柳義男
東北薬科大学附属癌研究所

Partial Purification and Properties of Deoxyribonucleases from
Eggs and Liver of *Xenopus laevis*. Comparison with
Deoxyribonuclease II from Bovine Spleen

Kazuo NITTA,* Yoshimasa TSUKAMOTO, Akihito SANO,
Katsue HAGIOITA, Kouichi OZAKI, Narie SUZUKI,
Masahiro HOSONO, Hiroaki KAWAUCHI (deceased)
and Yoshio TAKAYANAGI

Cancer Research Institute, Tohoku College of Pharmaceutical Sciences,
Komatsushima 4-4-1, Aoba-ku, Sendai 981, Japan

(Received September 10, 1993)

Deoxyribonucleases from eggs and the liver of *Xenopus laevis* were partially purified by DEAE-cellulose and heparin-Sepharose affinity column chromatographies. The fractions having egg and liver DNase activities were eluted on high performance liquid chromatography through TSK gel G3000SW at the molecular weights of 41.5 and 45 kDa, respectively. The frog DNases hydrolyzed a native DNA over a heat-denatured DNA, and also formed double-strand cuts not only in linear λ -DNA but also in closed circular pBR322DNA. The pH optimum of the DNases was 4.5—5.0 in 50 mM acetate buffer. These enzyme activities were abolished by treatment at 80°C for 5 min and pH 2, 3 or 12 for 1 h. The enzymes act in such a manner as deoxyribonuclease II (from bovine spleen)-type nuclease with respect to substrate specificity, optimum pH and cation dependence.

Keywords—frog (*Xenopus laevis*); egg DNase; liver DNase; bovine splenic DNase II

緒 言

核酸分解酵素であるデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) やリボヌクレアーゼ (RNase) に関する研究は, 微生物や哺乳類由来のものが中心となっている.¹⁾ 両生類特にカエルの臓器由来のこれらの酵素については, Nagano ら²⁾及び Nitta ら³⁾のウシガエル (*Rana catesbeiana*) 肝由来の RNase, Malicka-BLaszkiewicz ら⁴⁾の *Rana esculenta* 肝由来の RNase の報告がある. 我々はウシガエルあるいはニホンアカガエル (*Rana japonica*) 卵由来のレクチン活性を有する RNase⁵⁻⁸⁾ について, またアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵由来の RNase⁹⁾ について報告した.

哺乳類の胚発生機構の研究結果と、両生類や鳥類胚におけるそれとの比較から、少なくとも脊椎動物においては初期胚の発生における基本的な遺伝子機構は極めて共通していることが明らかにされてきている。¹⁰⁾ 古くから、アフリカツメガエルは発生生物学の分野で非常に重要な研究材料であるが、¹¹⁾ 卵あるいは肝由来の DNase や RNase に関する情報の提供は発生学のモデル実験の作製に寄与し、ひいては生物の進化系統樹へと発想が展開できるものと考えられる。¹²⁾ そこで、カエル DNase についての報告がないことから、アフリカツメガエル卵及び肝由来 DNase の精製を試み、またその性質についてウシ脾臓由来 DNase II¹³⁾ と比較した。

実験材料及び実験方法

アフリカツメガエルは日本ライフサイエンス (株) より購入した。実験には雌のカエルを使用した。ヘパリン-Sepharose は Pharmacia-LKB 社から、DEAE-セルロースは James 社から購入した。サケ精子由来の DNA (type III) と酵母 RNA (type VI) は Sigma 社製のものを、また λ -DNA と pBR322DNA は宝酒造社製のものを使用した。ウシ脾臓由来 DNase II は、特に精製せずに、Seravac 社製のものを使用した。DNase II は TSK gel G3000SW カラムによるゲル濾過で、12.4—66.2kDa の間に少なくとも 3 つのタンパク質のピークが認められた。またウシ脾臓由来 DNase I は Sigma 社製のものをを用いた。

1) アフリカツメガエル卵及び肝由来 DNase の部分精製 a) DNase の抽出——(i) 卵 DNase の抽出は既報の方法に準じて行った。^{9,14)} 卵のアセトン脱脂粉末を出発原料として用いた。抽出操作を 3 回繰り返して得た 0.15 M NaCl 抽出物を、ヴィスキングチューブ (30/32) を用い蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。この生理食塩水抽出物を Sephadex G-75 でゲル濾過して得られた S1 画分¹⁴⁾に DNase 活性が認められた。

(ii) 肝 DNase は、肝臓のアセトン脱脂粉末 (50 g) を出発原料として用い、上記と同様の方法で抽出し、生理食塩水抽出画分 (SEF) を得た (4.5 g)。

b) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー——(i) 卵 DNase: S1 (1.0 g) を 1 mM リン酸緩衝液 (PB) (pH 6.8, 20 ml) に溶解し、1 mM PB で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.0×35 cm) に充填した。溶出は、既報の方法に準じて、¹⁴⁾ PB のモル濃度を段階的に 1, 10, 50, 100, 200 mM と上昇させて行った。得られた各画分を蒸留水に対して透析し、上記と同様に処理した。50 mM PB 溶出画分 (ED3) の収量は 94.8 mg であった。

(ii) 肝 DNase: SEF (1.0 g) を 1 mM PB (20 ml) に溶解し、上記と同様に 1 mM PB で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.0×35 cm) に充填した。溶出は PB のモル濃度を段階的に 1, 10, 30, 50, 100, 200 mM と上昇させて行った。得られた各画分を蒸留水に対して透析し、上記と同様に処理した。10 mM PB 溶出画分、カラムフラクション 90—130 (LD3) 及び 131—176 (LD4) の収量はそれぞれ 30.6, 33.9 mg であった。

c) ヘパリン-Sepharose カラムクロマトグラフィー——(i) 卵 DNase: 上記の ED3 画分 (94.8 mg) を 50 mM 酢酸緩衝液 (AB) (pH 6.0, 5.0 ml) に溶解し、不溶物を遠心分離にて除去した後、上清を 50 mM AB で平衡化したヘパリン-Sepharose カラム (1.0×20 cm) に充填した。同じ緩衝液で十分に洗浄し、非吸着画分を溶出させた後、NaCl の濃度勾配を 0—0.8 M にし、直線濃度勾配法により吸着画分を溶出させた。カラムフラクション 55—63 の画分 (EHB) を集め、上記と同様に処理した。EHB 画分の収量は 7.0 mg であった。

(ii) 肝 DNase: 上記の LD3 画分 (51.4 mg) を 50 mM AB (5.0 ml) に溶解した後、上記と同様にヘパリン-Sepharose カラムで分画し、カラムフラクション 59—68 の画分 (LHB) を集めた。LHB 画分の収量は 0.85 mg であった。

2) **DNase 活性及び RNase 活性の測定** DNase 活性の測定は Shishido らの方法¹⁵⁾ に準じて行った。反応液は、DNA 溶液 (サケ精子 DNA を 500 $\mu\text{g/ml}$ になるように脱イオン水に溶解し 0.2 M NaCl に調整したもの、未変性 DNA 溶液) 0.5 ml, 0.1 M AB (pH 5.0) 0.1 ml, 及び酵素溶液 0.05 ml に脱イオン水を加え全量を 1 ml とした。また最適 pH の検討には次の緩衝液を使用した。0.1 M AB (pH 3.0—6.0); 0.1 M PB (pH 6.0—7.5); 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0—9.0)。これらの反応溶液を 37°C, 30 分間保温し、ウシ血清アルブミン水溶液 (1.0 mg/ml) 0.1 ml 添加後、10% 過塩素酸 2.2 ml を加え反応を停止させ、氷水中で 20 分間静置した。次に、この氷冷物を 3000 r.p.m. で 15 分間遠心分離し、得られた上清の 260 nm における吸光度 (A_{260}) を測定した。DNase 活性は 37°C, 1 分間保温による A_{260} の 0.001 増加分を 1 unit とした。熱変性 DNA 溶液は未変性 DNA 溶液を水浴中で 95°C, 10 分間加熱し、直ちに氷水中で急冷することによって調製した。特に断わらない限り、基質として未変性 DNA を用いた。

RNase 活性の測定は基質として酵母 RNA を用い、Uchida ら¹⁶⁾ の方法に準じて行った。^{6,7)}

3) **分子量の測定** 分子量の測定は TSK gel G3000SW カラムを用い、50 mM PB (pH 7.0) を溶離液とし、流速 1.0 ml/min で行った。分子量マーカーとして以下のものを使用した: γ -グロブリン, 160 000; ウシ血清アルブミン, 66 200; オボアルブミン, 45 000; シトクロム C, 12 400; バシトラシン, 1 400 (バシトラシンは他のマーカータンパク質による検量線の直線上にはのらなかった)。

4) **酵素の安定性** 酵素標品として EHB 及び LHB 画分を使用した。熱安定性には、カエル DNase は 10 units, DNase II は 7 units, また pH に対する安定性には、カエル DNase は 40 units, DNase II は 7 units 使用した。

a) 熱安定性——酵素溶液 (10 mM PB, pH 7.0) を各温度 (40, 50, 60, 70, 80, 90, 95°C) で 5 分間放置した後、酵素活性を測定した。

b) pH に対する安定性——酵素を各 pH 溶液 (pH 2—12 の 5 mM HCl—5 mM NaOH 溶液) 中で、室温, 1 時間放置した後、酵素活性を測定した。被検溶液の pH は活性測定時の緩衝液の pH には影響を与えなかった。

5) **金属イオン依存性** 酵素溶液 (カエル DNase は 20 units, DNase II は 7 units 使用した) に各種金属イオン水溶液を終濃度 1, 5 及び 10 mM になるように添加し、酵素活性を測定した。

6) **λ -DNA と pBR322DNA の分解** λ -DNA (1.68 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$) と pBR322DNA (1.95 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$) を 0.2 mM EDTA を含む 50 mM AB (pH 5.0) 中で、EHB (0.04—0.2 units, 10 μl) と 37°C, 15 分間保温した後、1.2% SDS 溶液を終濃度 0.3% になるように加え、55°C で 10 分間放置した。消化物は 1% アガロース/89 mM Tris (pH 8.3)/89 mM ホウ酸/2.5 mM EDTA で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。¹⁷⁾ LHB (0.04—0.2 units), DNase II (0.0014—0.07 units) 及び DNase I (0.06 units) でも同様に行った。

結 果 及 び 考 察

アフリカツメガエル卵及び肝由来 DNase の部分精製

卵の S1 画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって DNase 活性は 50 mM PB 溶出画分, ED3, に認められた (データは示さない, 文献 14)。ED3 の収率は 9.5% であった。RNase 活性は 1 mM PB 溶出画分と 10 mM PB 溶出画分とに認められた。⁹⁾

肝由来 SEF の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって DNase 活性は 10 mM PB 溶出画分, LD3 及び LD4, に認められた (Fig. 1)。LD3 及び LD4 の収率はそれぞれ 3.1%, 3.4% であった。得られた各画分の RNase 活性の有無を検討したが、卵の場合と異なり、どの画分にも

活性は認められなかった。

ED3 及び LD3 画分をさらにヘパリン-Sepharose カラムクロマトグラフィーで精製した。卵 DNase は 0.22—0.27 M NaCl で溶出され (EHB 画分, Fig. 2a), その収率は S1 を基準とすると 0.7% となるが, 精製効率は悪く (3 倍), 精製方法を考慮しなければならない (Fig. 3a) でもタンパク質のピークと活性のピークが一致しない。一方, 肝 DNase は 0.23—0.29 M NaCl で溶出され (LHB 画分, Fig. 2b), その収率は SEF を基準とすると 0.05% となり, 20 倍に精製された (Table I)。

2-メルカプトエタノール存在下 0.1% SDS-10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)-クマシーブリリアントブルー R 250 染色により, EHB 及び LHB 画分のどちらも, 2 本以上のバンドが観察された (データは示さない)。EHB 画分の TSK gel G3000SW によるゲル濾過では, 活性は 17—18 min の溶出画分 (G18) に観察されたので, 分子量は 41.5 kDa (Fig. 3a), また G18 の SDS-PAGE から 43.5 kDa であることが予測された (データは示さない)。LHB 画分のゲル濾過では, 活性は 17.2 min のタンパク質のピークに観察された (Fig. 3b)。上記の結果から, これらのカエル DNase の分子量は類似しているものと推測された。また TSK gel G3000SW を用いた高速液体クロマトグラフィーにより, これらの DNase を精製することが可能である。ブタ脾臓 DNase は 2 量体 (分子量 35000 と 10000) であることが報告されているが,¹⁸⁾ カエル DNase が 2 量体であるかどうかを検討するには, さらに精製することが必要である。

アフリカツメガエル卵及び肝由来 DNase の性質

アフリカツメガエル卵及び肝 DNase の性質を DNase II と比較した。

未変性 DNA と熱変性 DNA を基質として卵及び肝 DNase の基質特異性を検討し, DNase II で得られた結果と共に Fig. 4 に示した (卵 DNase, 肝 DNase どちらの結果もよく一致していたので, 卵 DNase の結果だけ示した)。得られた結果は, カエル DNase を 10 units, DNase II を 7 units 用いた時のものである。これらの値は 120 分間保温した時の活性を 100 として表示した。卵及び肝 DNase は熱変性 DNA より未変性 DNA に対して高い活性を示し, また DNase II は卵及び肝 DNase よりも未変性 DNA に対して高い活性を示した (Fig. 4, 文献 19)。卵 DNase の最適 pH は 4.5—5.0, 肝 DNase は 5.0, また DNase II は 4.5 であった (Fig. 5)。これらの結果から, 前述のように DNase 活性測定は未変性 DNA を基質とし, 0.1 M AB (pH 5.0) を用いて行った。

加熱処理による DNase の活性変動を Fig. 6 に示した。これらの値は未処理の酵素活性を 100 として表示した。カエル DNase の場合, 50°C 処理では活性低下は観察されなかったが, 85°C 処理で活性は約 20% に低下した。DNase II は 80°C 処理で完全に失活した。60—70°C では, 3 種

Fig. 1. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Liver SEF

SEF was applied to a column of DEAE-cellulose (2.0×35 cm) pre-equilibrated with 1 mM PB (pH 6.8). Elution was performed with a stepwise increase of the molarity of PB (pH 6.8) as indicated with arrows from 1 to 7. Eluent: 1, 1 mM PB; 2, 10 mM PB; 3, 30 mM PB; 4, 50 mM PB; 5, 100 mM PB; 6, 200 mM PB; 7, 200 mM acetic acid. Fractions of 5.0 ml each were collected. The activity was measured as described in the text. +, -; DNase activity positive and negative in the fractions, respectively.

TABLE I. Partial Purification of DNases from Eggs and Liver of *Xenopus laevis*^{a)}

Fraction	Total weight (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Eggs				
S1	1000	518700	519	1
ED3	98.4	72000	759	1.5
EHB	7.0	11200	1600	3.1
Liver				
SEF	1000	80000	80	1
LD3	30.6	13056	427	5.3
LD4	33.9	13560	400	5
LHB	0.51	816	1600	20

a) The acetone-dried powder of eggs (19 g) or liver (11 g) was used as a starting materials.

Fig. 2. Heparin-Sepharose Column Chromatographies of ED3 (A) and LD3 (B)

ED3 and LD3 obtained by DEAE-cellulose were applied to a column of heparin-Sepharose (1.0×22 cm) pre-equilibrated with 50 mM AB (pH 6.0), respectively. The column was washed with 300 ml of the same buffer, then the enzyme was eluted with a linear gradient of 0 to 0.8 M NaCl in the same buffer. Fractions of 5.3 ml each were collected. The activity was measured as described in the text. EHB and LHB were obtained from fractions indicated with bars.

の酵素中、肝 DNase が最も安定であった。

pH に対する安定性を Fig. 7 に示した。これらの値は未処理の酵素活性を 100 として表示した。pH 4—9 で、卵及び肝 DNase の活性低下は認められなかったが、pH 2 あるいは 12 では完全に失活した。肝 DNase はアルカリ側で安定で、卵 DNase と比べて酸性側では不安定であることが示唆された (Fig. 7)。一方、DNase II は pH 9 以上で活性が低下し、アルカリ側でより不安定になると思われる。一般的に酵素標品に多量の夾雑タンパク質が含まれている状態で酵素の熱安定性や pH 安定性を測定することは、データの信頼性を低下させることになるので、EHB 及び LHB 画分を用いて得られた結果を精製 DNase で確認することが必要である。

2 価及び 3 価の金属イオンの酵素活性に及ぼす影響を Table II に示した。卵及び肝 DNase 活性は低濃度の Ca^{2+} 、 Fe^{2+} によってはほとんど阻害されなかったが、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} によっては低濃度でさえ強く阻害された。 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 及び Co^{2+} は低濃度の場合、阻害は顕著ではないが、10 mM (終濃度) の添加によってかなり阻害された。 Mn^{2+} はカエル DNase 活性を阻害したが、DNase II 活性は阻害しなかった。一方、10 mM Mg^{2+} の添加により、カエル DNase 活性は 50—60% 阻害され、DNase II 活性は約 90% 阻害された (Table II)。カエル

Fig. 3. Gel Filtration Profiles of EHB (A) and LHB (B)

The sample was applied to TSK gel G3000SW and eluted with 50 mM PB (pH 7.0), with a flow rate of 1.0 ml/min. The molecular weight of the enzyme was estimated from the retention time (min) using standard marker proteins: 1, γ -globulin; 2, bovine serum albumin; 3, ovalbumin; 4, cytochrome c; 5, bacitracin. The activity was measured as described in the text.

Fig. 4. Hydrolysis of Native DNA and Denatured DNA by Frog Egg DNase (A) and Bovine DNase (B)

Aliquots of the reaction mixture were incubated for the times indicated, cooled on ice and assayed for the activity as described in the text. When the incubation of native DNA with EHB or bovine DNase II was performed for 120 min, its activity was defined as 100. ○, native DNA; ●, denatured DNA.

Fig. 5. pH Dependence of Frog DNases

The reaction was performed in 0.1 M acetate buffer at the pHs indicated for 30 min. The activity was assayed as described in the text. ○, egg DNase; ●, liver DNase.

TABLE II. Effect of Metal Ions on DNase Activity

Metal ion and concentration (mM)		Remaining activity (%)		
		Frog DNase		Bovine DNase
		Egg	Liver	
Ca ²⁺	1	92.9	100	96.0
	5	72.8	88.4	102.0
	10	56.2	73.4	101.2
Mg ²⁺	1	70.4	90.2	103.5
	5	49.7	76.3	20.5
	10	38.5	53.2	12.1
Mn ²⁺	1	78.1	91.3	101.1
	5	49.7	27.2	98.3
	10	26.6	0	104.3
Cd ²⁺	1	94.7	69.3	60.7
	5	48.8	33.5	22.0
	10	16.6	5.8	12.1
Co ²⁺	1	84.0	61.3	81.5
	5	42.6	39.9	61.8
	10	37.3	19.1	53.2
Zn ²⁺	1	2.4	9.8	89.0
	5	0.3	3.5	30.9
	10	0	0	15.0
Ni ²⁺	1	60.4	48.0	52.0
	5	29.9	35.8	19.1
	10	20.1	8.7	10.4
Fe ²⁺	1	97.0	114.5	98.3
	5	62.7	46.8	80.9
	10	46.7	27.2	34.1
Al ³⁺	1	7.4	11.6	6.4
	5	4.7	0.6	1.2
	10	1.2	0	0.9

Fig. 6. Heat Stability of Frog DNase and Bovine DNase

Aliquots of these enzymes were heated various temperatures for 5 min, cooled on ice and assayed for the remaining activity as described in the text. When they were simultaneously treated at room temperature, their activities were defined as 100%. ▲, egg DNase; ●, liver DNase; ○, bovine DNase.

Fig. 7. Effect of pH on the Stability of Frog DNases and Bovine DNase

Aliquots of these enzymes were treated at the various pHs for 1 h at room temperature, cooled on ice and assayed for the remaining activity as described in the legend to Fig. 5. ▲, egg DNase; ●, liver DNase; ○, bovine DNase.

Fig. 8. Electrophoresis of λ -DNA (A) and pBR322 DNA (B) Incubated with Frog DNases, DNase II and DNase I

Experimental conditions are described in the text. Lane: 1, none (DNA only); 2, 0.2 units of LHB; 3, 0.08 units of LHB; 4, 0.04 units of LHB; 5, 0.2 units of EHB; 6, 0.08 units of EHB; 7, 0.04 units of EHB; 8, 0.07 units of DNase II; 9, 0.028 units of DNase II; 10, 0.0014 units of DNase II; and 11, 0.06 units of DNase I. cr and sh indicate the positions of circular-relaxed and superhelical forms, respectively.

DNase の場合と同様に, DNase II の活性は低濃度の Al^{3+} で阻害され, また Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} でも阻害された. データとしては示さないが, EDTA はカエル DNase 及び DNase II の活性には影響を与えなかった. DNase II の活性測定は通常 10 mM EDTA 存在下で行われているが,¹⁸⁾ これは高濃度の Mg^{2+} が DNase II 活性を阻害するためである.

カエル DNase はどちらも λ -DNA と pBR322DNA をほぼ同等の濃度で加水分解したので (Fig. 8; データは示さないが, 0.1 units, 30 分間保温で DNA は完全に加水分解された), 鎖状あるいは環状 DNA のどちらにも作用することが示唆された. pBR322 DNA の肝 DNase 処理の場合, superhelical 型が減少し, circular-relaxed 型が増えること (Fig. 8, lane 2), また卵 DNase と DNase II の場合, linear 型への転換は観察されず, 酵素量の増加に伴い, superhelical 型と circular-relaxed 型のどちらも急速に分解された (Fig. 8, lane 5 及び 9). DNase I の場合, superhelical 型から circular-relaxed 型への変換が明らかに観察された (Fig. 8, lane 11). DNase II とカエル DNase の場合, この変換は顕著には認められないが, カエル DNase は pBR322 DNA を superhelical 型から circular-relaxed 型に変換し, その後 linear 型を経ずに分解するものと考えられる.²⁰⁾ これらの結果から, 卵及び肝 DNase はウシ脾臓由来 DNase II と類似の酵素であることが示唆された. DNase II と DNase I との重要な性質の違いは DNA の 3'-末端にリン酸を付けて切るか, 5'-末端にリン酸を付けて切るかという点にある.²¹⁾ この点に関して, アフリカツメガエルばかりでなくウシガエル, ニホンアカガエル等のカエル DNase について DNase II との類似性を検討中である.

結 語

ウシガエル及びニホンアカガエル卵由来のシアル酸を認識する癌細胞凝集レクチンのアミノ酸配列は脾臓由来の RNase と約 30% の相同性があり, これらのレクチンは RNase 活性を有している.^{5-8,22)} またウシガエル肝より単離された RNase³⁾ はウシガエル卵レクチンのアミノ酸配列と約 80% の相同性を有している. しかもウシガエル卵レクチンと肝 RNase の酵素化学的性質は非常に

よく類似しているが、この酵素にはレクチン活性は認められていない。⁶⁾ ウシガエル卵及び肝由来のタンパク質間での類似点と相違点の関係と同様のことが、酵素化学的によく類似している2種のアフリカツメガエルの DNase の場合にも当てはまる可能性が示唆される。これらの酵素の精製、アミノ酸配列の決定、単クローン抗体の作製、さらにアフリカツメガエル生体での酵素分布等が今後の課題である。

謝辞 日本私学振興財団の学術研究振興資金の助成を受けたことに感謝致します。

引用文献

- 1) R. J. Roberts, *Methods Enzymol.*, **65**, 1 (1980).
- 2) H. Nagano, H. Kikuchi, Y. Abe, R. Shukuya, *J. Biochem.*, **80**, 19 (1976).
- 3) R. Nitta, N. Katayama, Y. Okabe, M. Iwama, H. Watanabe, Y. Abe, T. Okazaki, K. Ohgi, M. Irie, *J. Biochem.*, **106**, 729 (1989).
- 4) M. Malicka-BLaszkiewicz, A. Kubicz, *Acta Biochim. Polonica*, **26**, 275 (1979).
- 5) K. Nitta, G. Takayanagi, H. Kawauchi, S. Hakomori, *Cancer Res.*, **47**, 4877 (1987).
- 6) Y. Okabe, N. Katayama, M. Iwama, H. Watanabe, K. Ohgi, M. Irie, K. Nitta, H. Kawauchi, Y. Takayanagi, F. Oyama, K. Titani, Y. Abe, T. Okazaki, N. Inokuchi, T. Koyama, *J. Biochem.*, **109**, 786 (1991).
- 7) Y. Kamiya, F. Oyama, R. Oyama, F. Sakakibara, K. Nitta, H. Kawauchi, Y. Takayanagi, K. Titani, *J. Biochem.*, **108**, 139 (1990).
- 8) K. Nitta, F. Oyama, R. Oyama, K. Sekiguchi, H. Kawauchi, Y. Takayanagi, S. Hakomori, K. Titani, *Glycobiology*, **3**, 37 (1993).
- 9) K. Nitta, K. Ozaki, K. Hagioita, Y. Tsukamoto, Y. Terasaki, N. Suzuki, A. Sano, M. Hosono, H. Kawauchi, Y. Takayanagi, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 353 (1993).
- 10) Y. Masui, H. J. Clarke, *Int. Rev. Cytol.*, **57**, 185 (1979); 中辻憲夫, 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 2098 (1993).
- 11) J. L. Maller, *Cell Differ.*, **16**, 211 (1985); 浅島 誠, “両生類の発生と変態,” 渡辺強三監修, 西村書店, 新潟, 1987, pp. 1—15.
- 12) K. Hayano, M. Iwama, H. Sakamoto, H. Watanabe, A. Sanda, K. Ohgi, M. Irie, *J. Biochem.*, **114**, 156 (1993).
- 13) G. Bernardi, A. Bernardi, A. Chersi, *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 1 (1966).
- 14) K. Nitta, G. Takayanagi, H. Kawauchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2325 (1984).
- 15) K. Shishido, T. Ando, *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 477 (1972).
- 16) T. Uchida, F. Egami, *Methods Enzymol.*, **12**, 228 (1967); 内田庸子, “核酸実験法, (別冊蛋白質・核酸・酵素),” 共立出版, 東京, 1972, pp. 189—199.
- 17) M. Thomas, R. W. Davis, *J. Mol. Biol.*, **91**, 315 (1975).
- 18) T.-H. Liao, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10708 (1985).
- 19) G. Bernardi, M. Griffe, *Biochemistry*, **3**, 1419 (1964); E. T. Young, II, R. L. Sinsheimer, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1247 (1965); 高木康敬, 玉野井冬彦, 広瀬 進, 岡崎今治, 黒沢良和, 梶崎弘幸, 穴井元昭, 高浪 満, “生化学実験講座, 核酸の化学 II,” 東京化学同人, 東京, 1976, pp. 3—65.
- 20) Y. Hibino, T. Yoneda, N. Sugano, *Biochim. Biophys. Acta*, **950**, 313 (1988).

-
- 21) Y. Kurokawa, T. Ogawa, S. Hirose, T. Okazaki, R. Okazaki, *J. Mol. Biol.*, **96**, 653 (1975).
 - 22) K. Titani, K. Takio, M. Kuwada, K. Nitta, F. Sakakibara, H. Kawauchi, G. Takanagi, S. Hakomori, *Biochemistry*, **26**, 2189 (1987).