た. すなわちカラムからの溶離液 0.1 cc をスピッツロールに入れ, 37° に 3 min 保つた後, グリシン緩衝液 (pH 11.0) にとかした 0.4% RNA 0.1 cc を加えて酵素反応を行なわせ, 90 min 後 McFadyen 試薬¹²⁾ 0.2 cc を加えて反応を停止, 15 min 冷所に放置して 3000 rpm で 10 min 遠沈, その上澄液 0.2 cc を試験管にとり蒸留水で希釈して全量 3 cc とし蒸留水を対照として 260 m μ の吸光係数を測定した. この方法で行なつた際の 0 分の E_{260} は 0.02~0.04 の値を示した. なおマムシ毒 100 μ g 中の RNase 活性をこの方法で測定した結果, 120 min の酵素反応後 ΔE_{260} の値は 0.92 になつた. DNA を基質にした場合も RNA とほとんど同じようにして行なつたが, DNA は 0.4% 溶液でも相当粘度が高いため短時間に酵素液中に加えるのは困難である. したがつてあらかじめ基質をスピッツロールに入れて 37° に保ち, 酵素液をあとから加えて反応させた. なおマムシ毒 100 μ g 中の DNase 活性は $\Delta E_{260}/120 \text{ min} = 0.13$ を示し, この際の 0 分の値は 0.032 であつた.

DEAE-cellulose ならびに CM-cellulose イオン交換繊維は東洋汙紙 (100~200 mesh) あるいは Carl Schleicher & Schüll (200~300 mesh) のものを用い Ellis¹³⁾ の方法にしたがつて作成した. カラムにはできるだけ微粒子を除去し約 30 min で沈下する部分を傾斜洗浄して用いた. DEAE-cellulose のイオン交換容量¹⁴⁾ は 0.7 meq/1 g dry weight, N 1.08%, CM-cellulose 0.56 meq/1 g dry weight であつた.

カラムクロマトグラフィー 各 Fig. に記したカラムを作成し 0.005M AcOH 緩衝液 (pH 7.0) 300~500 cc を流して緩衝化した後, マムシ毒 200 mg を AcOH 緩衝液 (pH 8.0) 2 cc にとかした液を吸着させる. mixing vessel に 0.005M AcONa 350 cc, reservoir に 0.1M AcONa 300 cc をそれぞれ入れて連結し 10~15 cc/hr の速度で連続的にモル濃度を変えて流して溶離し, 約 5 cc ずつ集めて蛋白量と酵素活性を測定した. 再クロマトグラフィーの場合はジエステラーゼ部分を集めて約 5 cc まで凍結濃縮した後, セロファンチューブ (Difco. Co. 製) に入れて 5° 約 3 hr 透析する. ついで透析内液を所定のカラムに吸着させ, 上に述べた溶離方法でクロマトグラフィーを行なつた.

本研究の費用の一部は財団法人笹庵社からの奨励金によつた. ここに深謝します. また本研究は文部省機関研究「酵素の分離と精製に関する研究」の装置を使用した. ここに謝意を表します.

京都大学薬学部

12) D. A. McFadyen: J. Biol. Chem. **107**, 297(1934).

13) S. Ellis, M. E. Simpson: J. Biol. Chem. **220**, 940(1956).

14) H. A. Sober, F. J. Gutter, M. M. Wyckoff, E. A. Peterson: J. Am. Chem. Soc. **78**, 753(1956).

UDC 547.993 : 598.126

181. 鈴木友二, 岩永貞昭, 佐竹正年: 蛇毒蛋白の研究 (第7報^{*1)})

マムシ毒中の3種のホスホジエステラーゼの性質について

Tomoji Suzuki, Sadaaki Iwanaga, and Masatoshi Satake: Studies on Snake Venom. VII. On the Properties of Three Phosphodiesterases obtained from Mamushi Venom (*Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE).

(Faculty of Pharmacy, Kyoto University^{*2})

Of the three kinds of phosphodiesterase fractionated from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE by the combination of diethylaminoethyl- and carboxymethyl-cellulose, diesterase-I with the largest yield showed marked activity against deoxyoligonucleotides and hydrolyzed ca. 70% of RNA to form the corresponding 5'-mononucleotides and left non-dialyzable oligonucleotide. Activity of diesterase-III to deoxyoligonucleotides is weak but it hydrolyzes RNA completely. Characteristics of diesterase-II are still obscure at present. These three kinds of diesterase show similar behavior to optimal pH, stability, and effect of group reagents but behave differently to the effect of metal ions. Diesterase-I is not affected by magnesium ion, and diesterase-II and -III are activated by it. The nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase of snake venom are considered to be the same enzyme.

(Received October 12, 1959)

^{*1} この論文の要旨は, 第79回日本薬学会年会で発表 (1959). 第6報: 本誌 **80**, 857(1960).

^{*2} Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

前報^{*1}で著者等はイオン交換繊維のクロマトグラフィーによりマムシ毒から 3 種のホスホジエステラーゼ (以下ジエステラーゼと略) を分画した。今回はこれら酵素の酵母 RNA, 子ウシ胸腺 DNA, deoxyoligonucleotides, RNase core, apurinic acid ならびに diphosphopyridine nucleotide (DPN) に対する活性を比較し, また至適 pH, 安定性, 金属イオンの影響なども調べてそれぞれのジエステラーゼ作用の特性を明らかにしようとした。

各種ジエステラーゼの核酸ならびにその誘導体に対する作用 まず予試験的に上に述べた数種の磷酸ジエステル化合物が, 3 種のジエステラーゼの共存する粗毒によつてどの程度水解されるかを調べた。活性の測定はポリスクレオチドを用いた場合主として酸可溶部の 260 m μ における吸光係数の増加で求め, DPN の場合は酵素反応のあとアルコール脱水素酵素とエタノールを加えて残存する DPN を DPNH とし, 340 m μ における吸光係数の減少から定量した。deoxyoligonucleotides, DPN, RNA などは短時間で 100% 近く水解されるが, DNA, RNase core, apurinic acid などに対する活性はきわめて弱い。ついで著者等は前 3 者の基質を用いて前報で分画した 3 種のジエステラーゼと反応させた結果, 各ジエステラーゼはいずれの基質も水解するが, その速度はかなり異なることをみとめた。すなわち RNA を基質にした場合ジエステラーゼ-I (14 μ g)^{*3} の水解曲線はほぼ一次曲線になるが, ジエステラーゼ-II (38 μ g) ならびに III (8.5 μ g) は約 30 分の lag のあと急速に水解しはじめ, 120 分の反応ではジエステラーゼ-I の約 2 倍の活性を示す (Fig. 1)。deoxyoligonucleotides を基質にした場合は逆にジエステラーゼ-I (0.9 μ g) の活性がきわめて著しく (Fig. 2), 同様に DPN, Ca bis[bis(*p*-nitrophenyl) phosphate](Ca(DNPP)₂) に対してもジエステラーゼ-I の水解力はジエステラーゼ-III に比べて強い (Fig. 3, 4)。なお, これら 3 種のジエステラーゼがいずれも DPN を水解し得ることは, 従来蛇毒でスクレオチドピロホスファターゼ (以下ピロホスファターゼと略) として報告されているものはジエステラーゼそのものであるという可能性を示すが, このことは次の二, 三の事実からも明らかと考える。すなわち, i) クロマトグラフィーにおけるジエステラーゼとピロホスファターゼの活性ピークは常に同じ部分でみとめられる。ii) 蛇毒ピロホスファターゼの至適 pH はジエステラーゼのものとはほとんど一致する。iii) 温度変化によるピロホスファターゼとジエステラーゼの失活曲線はいずれも同じ態度をとる (Fig. 5)。iv) 雨傘蛇毒のピロホスファターゼ活性は他の蛇毒に比べて弱いが, ジエステラーゼ活性も同様に弱い^{*4}。

Fig. 1. Time Course Curve of Three Phosphodiesterases for RNA

Conditions: Each reaction mixture contained 0.1 cc. of 0.2M glycine buffer (pH 11.0) containing 0.5 mg. of RNA and enzyme, in a total volume of 0.2 cc. After incubation at 37°, the reaction was terminated by the addition of 0.2 cc. of McFadyen's reagent. The residual RNA was removed by centrifugation and after 0.2 cc. of the supernatant diluted to total volume of 3.0 cc. with distilled water, the acid-soluble nucleotides were measured at 260 m μ .

*3 カッコ内は各酵素の蛋白量を示す。

*4 その後 Boman 等もジエステラーゼ部分で常にピロホスファターゼ活性を認めている。(W. Bjork, H. G. Boman: Biochim. et Biophys. Acta 34. 503(1959)).

Fig. 2. Time Course Curve of Three Phosphodiesterases for Deoxyoligonucleotides

Conditions: Each reaction mixture contained 0.25 mg. of deoxyoligonucleotides (dissolved in 0.2M glycine buffer (pH 11.0)) and enzyme in a total volume of 0.1 cc. Assay methods were the same as for Fig. 1.

Fig. 3. Time Course Curve of Three Phosphodiesterases for Ca Bis[bis(*p*-nitrophenyl) phosphate]

Conditions: Each reaction mixture contained, in a final volume of 0.8 cc., the following amounts of materials: 0.25 μ mole of Ca bis[bis(*p*-nitrophenyl) phosphate], 1 μ mole of $MgCl_2$, 0.25 cc. of 0.17M veronal buffer (pH 9.0), and enzyme. The activity was expressed as extinction at 430 m μ of *p*-nitrophenol liberated.

Fig. 4. Time Course Curve of Three Phosphodiesterases for Diphosphopyridine Nucleotide

Conditions: Each reaction mixture contained, in a final volume of 0.65 cc., the following amounts of materials: 0.37 μ mole of DPN, 0.5 cc. of 0.066M phosphate buffer (pH 8.0), and enzyme. Quantity of DPN cleaved was assayed by yeast alcohol dehydrogenase.

Fig. 5.

Effect of Temperature on the Stability of Phosphodiesterase-I and Nucleotide Pyrophosphatase Activity

Conditions: Each incubation tube contained 0.4 cc. of 0.01M Tris buffer (pH 7.3) containing about 20 μ g. of diesterase-I. After incubation for 15 min. at the temp. indicated, the samples were cooled in ice bath and the activities of diesterase and nucleotide pyrophosphatase was measured by the same method as in Figs. 1 and 4.

以上 Fig. 1, 2, 3, 4 の水解曲線はいずれも実測値をプロットしたため水解力をそのまま比較することはできないので単位時間の水解力を取り, 各酵素蛋白 1 mg あたりの酵素活性で比較してみた。ジエステラーゼ-I は deoxyoligonucleotides, Ca(DNPP)₂, DPN などに対してはジエステラーゼ-II と III の約 4 倍の活性をもつが, RNA に対しては約 1/3 の活性しか示さない (Table I)。なお, ここに用いた deoxyoligonucleotides は脾臓の DNase で調製したもので, したがってヌクレオチドの一方の末端のデオキシリボースの 5 位に磷酸がエステル結合していると考えられる。このような構造の物質に対して蛇毒ジエステラーゼが著しい活性を示すことは, 最近

Table I. Comparison of Specific Activities of Three Phosphodiesterases toward Various Substrates

Substrates	Diesterase-I	Diesterase-II	Diesterase-III
Ca bis[bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate]	17.1	3.9	5.5
Deoxyoligonucleotides	772	133	147.7
RNA	57.1	35.5	183.5
DPN	12.8	3.5	5.8

Specific activities are expressed in terms of enzyme unit/mg. protein.

The enzyme units are; with Ca bis[bis(*p*-nitrophenyl)phosphate], $\Delta E_{430}/15$ min.; with deoxyoligonucleotides, $\Delta E_{260}/30$ min.; with RNA, $\Delta E_{260}/2$ hr.; with DPN, μ mole of DPN decreased per 5 min.

Khorana¹⁾によつて報告されていて、著者等の分画したジエステラーゼ-I がこの基質を急速に水解するのに RNA に対する活性がジエステラーゼ-III よりも明らかに劣るという知見から、これらジエステラーゼが構造特異性をもつものであると予想される。

このように 3 種のジエステラーゼは RNA の水解力で差を示したので、つぎに RNA と長時間反応させこれらの酵素が粗毒で見たと同じように RNA を完全に水解し得るかという点を調べた。ジエステラーゼ-II と III は RNA をほとんど水解したが、ジエステラーゼ-I では 40 時間の反応でもなお酸不溶部のヌクレオチドを約 30% 残す (Fig. 6)。この際ジエステラーゼ-I と II による RNA の分解産物がすべて 5'-モノヌクレオチドであるかどうかを調べるため、Fig. 6 の条件で RNA と 12 時間反応させた後、ウシの精液の 5'-ヌクレオチダーゼを加えさらに 2 時間反応させて遊離無機磷を定量し、5'-ヌクレオチダーゼを作用させない場合の遊離無機磷量との差を求めた。その結果ジエステラーゼ-II の分解産物はそのほとんどが 5'-ヌクレオチドであることがわかったが、ジエステラーゼ-I では分解産物中に 5'-モノヌクレオチド (約 62%) の他、5'-ヌクレオチダーゼでも分解されないヌクレオチド (約 29%) があることをみとめた (Table II)。なお、ジエステラーゼ-III では 5'-ヌクレオチダーゼの夾雑が多いので RNA 中の全磷のほとんど 100% 近くが遊離無機磷として検出された。著者等はこのヌクレオチドの性状について現在検討しつつあるが、非透析性であること、最終濃度 0.15% の過塩素酸で沈殿すること、イソプロパノール・アンモニア・水 (70 : 0.35 : 30) の溶媒系で浮紙クロマトグラフィーを行なつた際原点にとどまることなどからかなり分子量の大きいポリヌクレオチドと考えている。

つぎに酵母 RNA を脾臓の RNase で水解してえた非透析性の RNase core に対する 3 種のジエステラーゼの水解作用を比較したが、いずれのジエステラーゼも RNA を基質にした際に比べて約 $\frac{1}{10}$ の活性しか示さなかった (Fig. 6, 7)。すなわち末端のヌクレオチドのリボースの 3 位に磷酸がエステル結合しているオリゴヌクレオチドは蛇毒ジエステラーゼの基質になりにくいことを示し、このことは最近の Sinsheimer²⁾ の報告とも矛盾しない。同じようにして DNA あるいは DNA からプリン塩基だけを除去した apurinic acid を基質に用いて水

Table II. Percentage of 5'-Mononucleotide produced on Hydrolysis of RNA by Three Phosphodiesterases

Enzymes	Free P_i in acid soluble	5'-Mononucleotides	Undialyzed nucleotide
Diesterase-I	1.3	68.8	29.9
Diesterase-II	9.3	90.7	0
Diesterase-III	100	0	0

The standard assay procedure described in the Experimental section was used for these experiments.

Fig. 6. Exhaustive Digestion of RNA by Three Phosphodiesterases

Conditions: Each reaction mixture contained, 0.1 cc. of 0.2M glycine buffer (pH 11.0) containing 1 mg. of RNA and enzyme, in a total volume of 0.1 cc. Chloroform was used as a bacteriostatic agent. Assay methods were identical with those in Fig. 1.

Fig. 7. Hydrolysis of RNase Core by Three Phosphodiesterase

Conditions: Each reaction mixture contained 0.1 cc. of 0.2M glycine buffer (pH 11.0) containing 0.8 mg. of RNase core and enzyme, in a total volume of 0.2 cc. Assay methods were identical with those in Fig. 1.

1) R. W. Razzell, H. G. Khorana: J. Am. Chem. Soc. 80, 1770(1958).

2) J. F. Koerner, R. L. Sinsheimer: J. Biol. Chem. 228, 1049(1957).

解作用を比較したが, 上に述べた RNase core に対すると同様活性はきわめて弱く, かつこの場合いずれのジェステラーゼにおいても有意の差はみとめられなかった。

3種のジェステラーゼの諸性質 著者等は3種のジェステラーゼについて若干の性状を比較した。いずれのジェステラーゼも pH 10~11 で最高活性を示し (Fig. 8), かつグリシン緩衝液以外に pH 10 の 0.2M 磷酸緩衝液, 0.2M 硼酸緩衝液を使用しても活性にはほとんど差が見られなかった。このように強アルカリ性の pH 域で活性を示す RNA 水解酵素は他に類を見ない。なお, 第2報³⁾で著者等はグリシン緩衝液でジェステラーゼ活性が抑えられペロナール緩衝液で活性の増大されることを述べたが, RNA を用いた本研究では紫外部に吸収のあるペロナール緩衝液を使いにくいので, アルカリ性で広範囲の pH 域をもつグリシン緩衝液を使用した。

安定性においても3種のジェステラーゼはほとんど同じ態度を示し, 酸性, 中性, アルカリ性の緩衝液中に室温 (約 20°) で 24 時間放置後 RNA を基質に用いて活性の変化を調べても Fig. 9 に示すごとく pH 7~8 付近でいずれもほとんど失活を見ない。またこの pH 域で水結保存 (-10°) すれば約 3 カ月は充分保存にたえる。温度の影響に対しての失活曲線も3種のジェステラーゼではほとんど差が見られない (Fig. 10)。

Fig. 8. Effect of pH on the Activities of Three Phosphodiesterases

Conditions: All conditions and assay methods were identical with those in Fig. 1 or Fig. 2.

Fig. 9. Effect of pH on the Stabilities of Three Phosphodiesterases

Conditions: Each incubation tube contained 0.2 cc. of 0.2M buffer containing about 20 μ g. of each diesterase. After incubation for 24 hr. at 20°, the samples were cooled in ice bath and the activity of each diesterase was measured by the same method in Fig. 1. Following buffers were used: Tris buffer for pH 6.3~9.0, glycine buffer for pH 9.5~11.0.

Fig. 10. Effect of Temperature on the Stabilities of Three Phosphodiesterases

Conditions: Each incubation tube contained 0.4 cc. of 0.01M Tris buffer (pH 7.3) containing about 20 μ g. of each diesterase. After incubation for 15 min. at the temp. indicated, the samples were cooled in ice bath, and then the activity of diesterase was measured by the same method in Fig. 1.

金属イオンの影響では3種のジエステラーゼの活性は相違し、とくに Mg^{2+} の存在でジエステラーゼ-I の活性はむしろ抑えられるが、ジエステラーゼ-II と III の活性はいずれも増大し、ジエステラーゼ-III では $1.6 \times 10^{-2} M$ の濃度で約 40% 増大した (Fig. 11). 動物細胞の endonucleotidase である DNase-I が Mg^{2+} で活性化され、DNase-II は活性化されないという例⁴⁾もあるので、これらの現象はジエステラーゼを区別する一つの手段になると考える。また Ca^{2+} によつてもほとんど同じ現象が見られたが、他の金属イオン (Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}) は $10^{-3} M$ の濃度ではほとんど影響を示さなかつた。なおマムシ毒そのまゝを用いた場合は粗毒中にかなりの Mg が含まれるので Mg^{2+} の影響はきわめて少ない。いずれの酵素も一般の RNase と同様 0.1~0.2 のイオン強度で活性を示した (Fig. 12). グループ試薬で活性に影響するものとしては EDTA, KCN, システインなどで、SH 試薬のモノヨード酢酸、モノフルオロ酢酸アミドなどによる阻害は全く見られなかつた (Table III).

Fig. 11. Effect of Mg^{2+} on the Activities of Three Phosphodiesterases

Conditions: Reaction mixture contained 0.1 cc. of 0.2M glycine buffer (pH 11.0) containing 0.5 mg. of RNA, enzyme, and the indicated amount of $MgCl_2$ (final concn.) in a total volume of 0.3 cc. Incubation for 90 min. at 37°. Assay methods were identical with those in Fig. 1.

Fig. 12. Effect of Ionic Strength on the Activity of Phosphodiesterases

Conditions: Reaction mixture contained 0.1 cc. of 0.04M Tris buffer (pH 9.0) containing 0.3 mg. of RNA, enzyme, and the indicated amount of NaCl (final concn.) in a total volume of 0.3 cc. Incubation for 40 min. at 37°. Assay methods were identical with those in Fig. 1.

Table III. Effects of Various Reagents on the Activity of Three Phosphodiesterases

Group reagent	Final concn. (M)	Diesterase-I		Diesterase-II		Diesterase-III	
		activity ^{a)}	relative	activity ^{a)}	relative	activity ^{a)}	relative
None	0	0.500	100	0.525	100	0.77	100
E. D. T. A.	1.25×10^{-4}	0	0	0	0	0	0
Cysteine	2.5×10^{-3}	0.213	42.6	0.179	34.1		
KCN	2.5×10^{-3}	0.35	70.0	0.45	85.7	0.64	83.1
ICH ₂ COOH	1.25×10^{-4}	0.505	101	0.43	81.9	0.71	92.2
FCH ₂ CONH ₂	1.25×10^{-4}	0.430	86	0.57	109	0.59	76.7
Arsenite	2.5×10^{-2}	0.430	86	0.49	93.4	0.655	85.1

Conditions: Reaction mixture contained 0.2 cc. of 0.2M glycine buffer (pH 11.0) containing 0.25 mg. of RNA, enzyme, and the indicated amount of various reagents, in a total volume of 0.4 cc. Incubation for 120 min. at 37°. Assay methods were identical with those in Fig. 1.

^{a)} Activity was expressed as extinction at 260 mμ of acid soluble nucleotides produced.

以上の主な点を要約すると、i) カラムクロマトグラフィーによつてマムシ毒から分画した3種のジエステラーゼは RNA, deoxyoligonucleotides, Ca bis[bis(*p*-nitrophenyl) phosphate], diphosphopyridine nucleotide などすべてを水解するが、それぞれに対する活性比には明らかな差がみとめられた。ii) ジエステラーゼ-I の部分は deoxyoligonucleotides, DPN に対して著しい活性を示すが、RNA に対しては約 70% まで水解して相当す

4) L. A. Heppel, J. C. Rabinowitz: Ann. Rev. Biochem. 27, 613(1958).

る 5'-モノヌクレオチドを生成し, かつ非透析性のオリゴヌクレオチドを残す. iii) ジエステラーゼ-III は deoxyoligonucleotides, DPN などに対する活性は弱いが, RNA を完全に水解し得る. iv) ジエステラーゼ-I は Mg^{2+} でほとんど影響されないが, ジエステラーゼ-II ならびに III の活性はいずれも増大した. v) ジエステラーゼ-II については現在のところはつきりした特徴を掴めない. vi) 蛇毒のヌクレオチド・ピロホスファターゼはジエステラーゼと同一の酵素と考える.

実験の部

酵素 前報^{*1}の方法によつて分画したジエステラーゼ-I, II ならびに III の凍結濃縮液を 3° で約 3 hr 透析, その後 -10° で凍結保存し用時希釈した. 各酵素液 1 cc 中の蛋白量⁵⁾は Beckman DU 分光光度計の液層 1 cm のセルで 280 および 260 m μ の吸光係数から求めた. 1 cc 中の蛋白量はジエステラーゼ-I 1.4 mg, II 1.9 mg, III 0.42 mg である. 5'-ヌクレオチダーゼは京大医化学教室杉野幸夫氏がウシの精液から調製したもので酵素単位は Heppel⁶⁾の方法によつて求めた.

基質 酵母 RNA, ウシ胸腺 DNA ならびに $Ca(DNPP)_2$ は前報のものをを用いた. RNase core は RNA からつくつて用いた. すなわち RNA 400 mg を 4 cc の蒸留水に溶解し, pH 6.8 に補正, これに脾臓の RNase 500 μ g を加えて 37°, 24 hr 反応させ, この間しばしば NaOH を加えて pH を 6.8 に保つ. ついで 10% オクタノール含有 $CHCl_3$ で 2 回除蛋白後 3 日間透析 (3°), 凍結乾燥して調製した. 収量 52 mg. apurinic acid は DNA 200 mg から Chargaff⁷⁾の方法に準じて調製した. 収量 110 mg. deoxyoligonucleotides は DNA 500 mg から Butler⁸⁾の方法に準じて調製した. 収量は Mg 塩として 420 mg. DPN⁹⁾は酵母から抽出したもので, 純度約 85%.

緩衝液 グリシン, 磷酸, 硼酸緩衝液はすべて 0.2M 溶液を用い pH は日立ガラス電極 pH メーターで補正した.

酵素作用の測定 RNA ならびに RNase core を基質にした場合は各 Fig. に示した酵素と基質をスピッツロールに入れて全量 0.2 cc で反応させ, 所定の時間後 McFadyen 試薬¹⁰⁾ 0.2 cc を加えて反応を停止し前報に準じて水解力を測定した. 酸可溶部の 5'-モノヌクレオチドの量はつぎの方法で測定した. まず Fig. 5 の酵素反応液で 12 hr, 37° に保つたあと 70°, 5 min 加熱して反応を停止, この反応液 0.1 cc, ウシ精液の 5'-ヌクレオチダーゼ 2.5 U, 0.17M ベロナール緩衝液 (pH 9.0) 0.2 cc ならびに Mg^{2+} 1 μ mol を混合して全量 0.6 cc とし, 37°, 2 hr 反応させる. 生成した無機磷は Ging¹¹⁾の方法によつて定量した. ここでえられた無機磷量と, 別に 5'-ヌクレオチダーゼを入れないで同様操作で求めた遊離無機磷量との差から酸可溶部の 5'-モノヌクレオチド量を算出した. deoxyoligonucleotides を基質にした場合は Fig. 2 の全反応液 0.1 cc を 37° に所定時間保ち, McFadyen 試薬 0.2 cc で反応を停止させ, 15 min 冷所に放置, 遠心後その上澄液 0.1 cc をとり蒸留水で全量 3.0 cc に希釈して $4E_{260}$ を測定した. なおこの際の 0 min の値は蒸留水を対照として 0.1~0.12 を示す. DPN を基質にした場合は Fig. 4 の全反応液 0.65 cc を 37° で反応させ所定時間後アルコール脱水素酵素液 (pH 8.0 の M/15 磷酸緩衝液に結晶アルコール脱水素酵素 10~20 μ g, EtOH 2.4%, セミカルバジド M/200 を含むもの) 2.4 cc を加えて 15 min, 20° に保ち, 生成した DPNH の量を 340 m μ の吸光係数から求めその値から分解した DPN の量を逆算した.

本研究の費用の一部は財団法人蓬庵社の奨励金によつた. ここに深謝します. またウシの精子の 5'-ヌクレオチダーゼを分与していただいた京都大学医学部医化学教室 杉野幸夫氏に謹謝します. なお本研究は文部省機関研究「酵素の分離と精製に関する研究」の装置を使用した. ここに謝意を表します.

京都大学薬学部

5) O. Warburg, W. Christian: Biochem. Z. **310**, 384(1941).

6) L. A. Heppel, R. J. Hilmoe: J. Biol. Chem. **188**, 665(1951).

7) C. Tamm, M. E. Hodes, E. Chargaff: *Ibid.* **195**, 49(1952).

8) J. A. Little, G. C. Butler: *Ibid.* **183**, 695(1951).

9) 鈴木, 飯塚, 村田: 本誌 **89**, 868(1960).

10) D. A. McFadyen: J. Biol. Chem. **107**, 297(1934).

11) N. S. Ging: Anal. Chem. **28**, 1330(1956).