

# イチョウ種子のリボヌクレアーゼに関する研究\*

原 彰・佐藤 武  
吉原和子・渡部常樹

## Studies on the Ribonucleases from Ginkgo (*Ginkgo biloba* Linné) Nuts

Akira HARA, Takeshi SATO, Kazuko YOSHIHARA  
and Tsuneki WATANABE

(Laboratory of Biochemistry)

### 緒 論

著者らは、先にソテツ種子の胚乳<sup>1)</sup>及び胚<sup>2)</sup>からリボヌクレアーゼを分離精製してその性質及びリボ核酸分解生成物などについて検討した結果、裸子植物においても、現在までに報告されている高等植物の多くのリボヌクレアーゼとほぼ類似した性質を有する酵素が存在する事を明らかにした。

本報においては、イチョウ種子の胚乳から硫酸塩析、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、セファデックス G<sub>100</sub> ゲルろ過法によってリボヌクレアーゼを分離精製して2種の酵素を得たので、それらの性質及びリボ核酸に対する作用などについて検討した結果を報告する。

### 実験材料及び方法

(1) 材料 イチョウ種子は市販のものを使用した。実験に使用したものは採取後約6カ月経過しているものと思われる。基質としてのリボ核酸、リボヌクレアーゼの作用を調べる為に調整したリボ核酸 (CR-ESTFIELD の方法による) 及び DEAE-セルロースは前報<sup>1)</sup>と同じである。

セファデックス G<sub>100</sub> は、Pharmacia 社製、濃縮の為に使用したコロジオンバッグはメンブラン-フィルター社製である。

(2) 活性測定法 反応時間が1時間である以外は前報<sup>1)</sup>と同じである。従って酵素単位は1時間当りで示した。

(3) DEAE-セルロース-尿素系クロマトグラフィー リボ核酸分解産物の分画には、TOMLINSON, TENER<sup>3)</sup>による方法で調製した DEAE-セルロースカラムを使用した。DEAE-セルロースを2M炭酸アン

モニウム溶液に浸し、カラムに詰め同じ溶液で洗浄した後、炭酸アンモニウムを充分量の水で除去し、7M尿素を含む0.005Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) によって緩衝化したものを、再びカラム (1×45 cm) に詰めなおした。溶出は、7M尿素を含む0.005Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) 500 ml と7M尿素と0.3M食塩を含む0.005Mトリス-塩酸緩衝液とで構成される食塩の直線的濃度勾配法によって行なった。

(4) 活性炭カラムによる脱塩及び濃縮 DEAE-セルロース-尿素系カラムで溶出された画分は、尿素及び塩を除く為に活性炭処理を行なった。活性炭カラムの調製法は、中尾らの方法<sup>4)</sup>により、1.4%アンモニア含有エタノール、水、0.1規定塩酸での洗浄をくり返した後、0.001M EDTA 溶液で洗浄し、水洗して風乾させたものを使用した。活性炭を0.01規定塩酸に懸濁しカラムに詰め、各スクレオチド画分を0.1規定塩酸を加えてpH 2.0となるようにして吸着させた。吸着後0.01規定塩酸につづいて水で洗液のpHが5.0になるまで洗浄し、エタノール:28%アンモニア水:水 (容量比 50:5:45) によって溶出し、溶出液を35°C以下で減圧濃縮した。濃縮液に1規定塩酸を加え塩酸濃度を0.1規定とし、37°Cで3時間保つ事によって、生じていると思われる2',3'-スクレオシド環状リン酸を分解して、2'又は3'-スクレオチドとした。

(5) ペーパークロマトグラフィー ろ紙は東洋ろ紙 No. 50 を使用し、展開溶媒 (1) n-ブタノール:28%アンモニア水:水 (容量比 86:5:14)<sup>5)</sup> (2) イソプロパノール:28%アンモニア水:水 (容量比 70:5:25)<sup>6)</sup> (3) 飽和硫酸溶液:イソプロパノール:水 (容量比 79:2:19)<sup>7)</sup> を用い、すべて室温で上昇法展開を行なった。

(6) 酵素調製 水抽出-イチョウ種子から殻を除き、さらに胚を除いた胚乳 380g に 600 ml の冷水を

\* 本報告の一部は、昭和43年度日本農芸化学会西日本支部大会において発表した。

Table 1. Summary of enzyme purification procedures

Step.		Volume (ml)	Total Protein (A <sub>280</sub> )	Total activity (units)	Specific activity (units/A <sub>280</sub> )	Yield (%)
Water extracts		660	47,454	92,766	1.3	100
Ammonium sulfate ppt.		190	3,534	42,608	12.1	68
Chromatography on DEAE-cellulose	(RNase G <sub>1</sub> )	99.5	448	2,336	5.2	3.7
	(RNase G <sub>2</sub> )	235	139	22,349	161	36
Rechromatography on DEAE-cellulose (RNase G <sub>1</sub> )		36	245	22,24	9.1	3.5
Gel filtration through Sephadex G <sub>100</sub> (RNase G <sub>1</sub> )		14.1	1.37	1,015	740	1.6
Rechromatography on DEAE-cellulose (RNase G <sub>2</sub> )		68	67.5	19,658	290	31.2
Gel filtration through Sephadex G <sub>100</sub> (RNase G <sub>2</sub> )		14.1	1.32	18,100	13,700	28.8

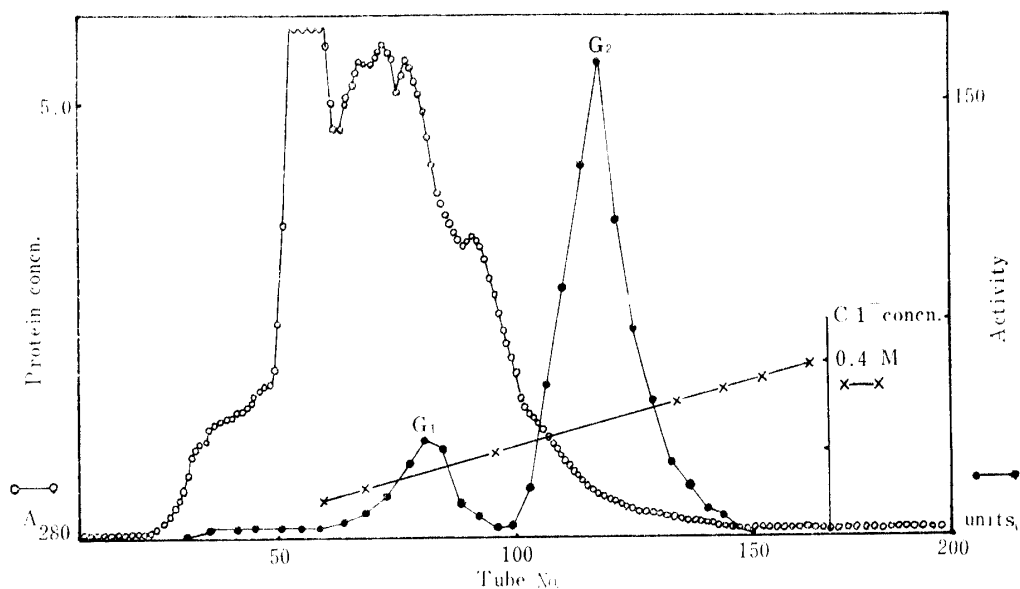
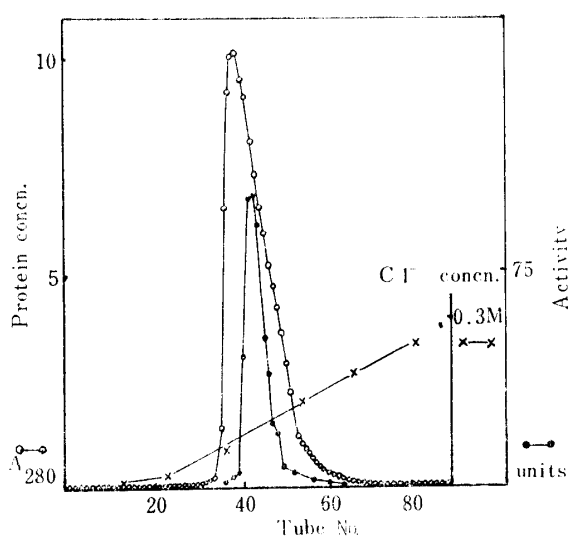
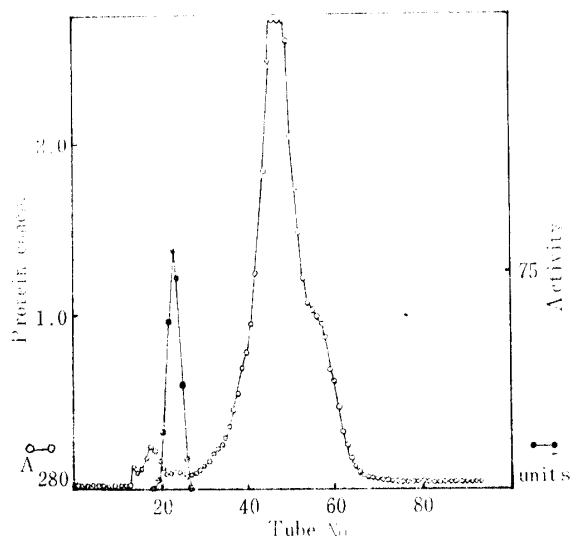


Fig. 1. Chromatography on DEAE-cellulose of ammonium sulfate fraction.

Fig. 2. Rechromatography on DEAE-cellulose of RNase G<sub>1</sub>.Fig. 3. Gel filtration through Sephadex G<sub>100</sub> column of RNase G<sub>1</sub>.

加え、氷冷下ワーリングブレンダーで破碎(セット3, 3分間)後、遠心分離(10,000回転, 10分間, 4°C)し上清660 mlを得た。硫酸分画-上清660 mlに硫酸159 gを加え0.4飽和度(HEPPELの式<sup>8)</sup>による)とし、一夜放置後遠心分離(6,000回転, 20分間, 室温)し、液表面に生じた浮遊物を除いた。上清にさらに硫酸171 gを加え0.75飽和度とし同様に遠心分離して上清を傾しゃして除き、沈でんを冷水65 mlに溶解し水に対して透析した。透析中に生じた多量の白い沈でんを遠心分離(10,000回転, 10分間, 4°C)して除き、得られた上清に1規定苛性ソーダを加えて、pH 8.0に調整して、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー-酵素液190 mlをDEAE-セルロースカラム(5×20 cm)に吸着させ0.1 M食塩を含む0.02 Mリン酸カリ-0.1 Mホウ酸ソーダ緩衝液(pH 8.0, 以下のクロマトグラフィーではすべてこの緩衝液を使用した。)600 mlと0.5 M食塩を含む同じ緩衝液600 mlによって構成される食塩の直線的濃度勾配クロマトグラフィーを行ない、酵素画分として二つのピークが得られた(第1図)。一方は収量3.7%(試験管番号71~85)であり、他方は36%(試験管番号105~135)であった。以下前者の画分をRNase G<sub>1</sub>, 後者をRNase G<sub>2</sub>とした。

DEAE-セルロースカラムによる再クロマトグラフィー-RNase G<sub>1</sub>画分を緩衝液に対して透析した後、同緩衝液によって平衡化したDEAE-セルロースカラム(1×45 cm)に通し、緩衝液150 mlと、0.4 M食塩を含む緩衝液150 mlによって構成される食塩の直線的濃度勾配クロマトグラフィーを行なった(第2図)。得られた酵素画分(試験管番号41~49)までをゾールし、コロジオンバッグを用いて吸引濃縮した。又、RNase G<sub>2</sub>画分は0.1 M食塩を含む緩衝液に対して透析後、同緩衝液によって平衡化したDEAE-セルロースカラムに通した後、0.1 M食塩を含む緩衝液150 mlと0.5 M食塩を含む緩衝液150 mlによって構成される食塩の直線的濃度勾配クロマトグラフィーを行なった(第4図)。得られた酵素画分(試験管番号34~51)は、RNase G<sub>1</sub>と同様コロジオンバッグで濃縮した。

セファデックス G<sub>100</sub> カラムによるゲルろ過-約5 mlに濃縮したRNase G<sub>1</sub>, RNase G<sub>2</sub>画分を0.1 M食塩を含む緩衝液を溶媒として洗浄したセファデックス G<sub>100</sub> カラム(2.1×54 cm)に通し、同溶媒

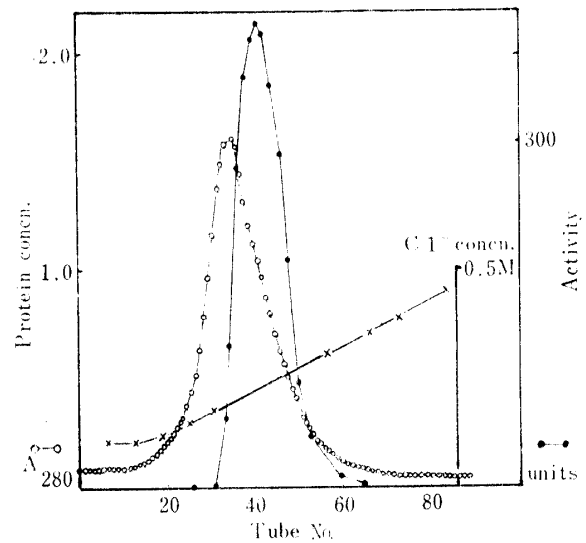


Fig. 4. Rechromatography on DEAE-cellulose of RNase G<sub>2</sub>.

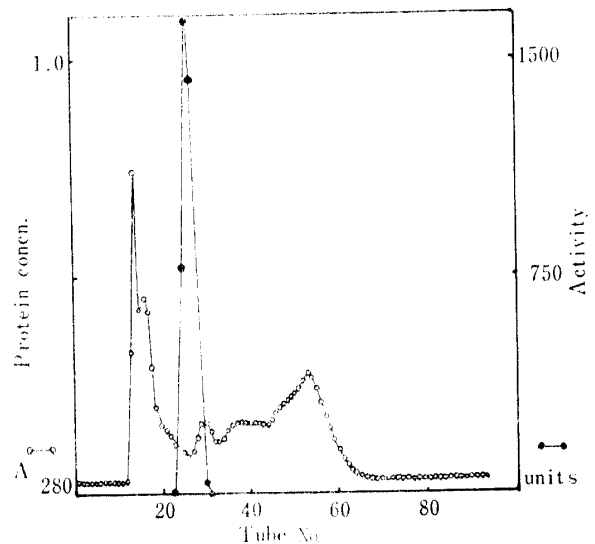


Fig. 5. Gel filtration through Sephadex G<sub>100</sub> column of RNase G<sub>2</sub>.

によって溶出した(RNase G<sub>1</sub>については第3図, RNase G<sub>2</sub>については第5図に示した.)。

以下の実験では、ここで得られた酵素液を水に対して透析したものをを用いた。

### 実験結果

(1) 酵素精製 酵素精製の要約を表1に示した。最初のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーは第1図で示されるように酵素活性は二つの画分RNase G<sub>1</sub>, RNase G<sub>2</sub>に分かれるが、この段階での収量は、前者が3.7%, 後者は35.6%であった。

DEAE-セルロースの再クロマトグラフィー(第2図及び第4図)は、それ程の効果はなかったが、どこ

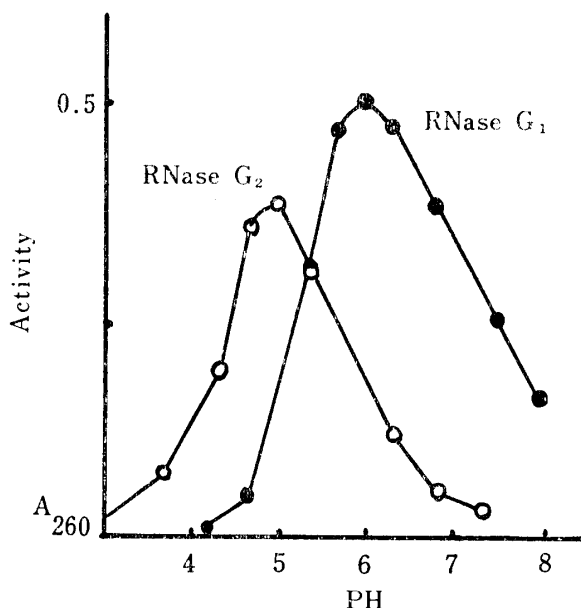


Fig. 6. Effect of pH on RNase activity,

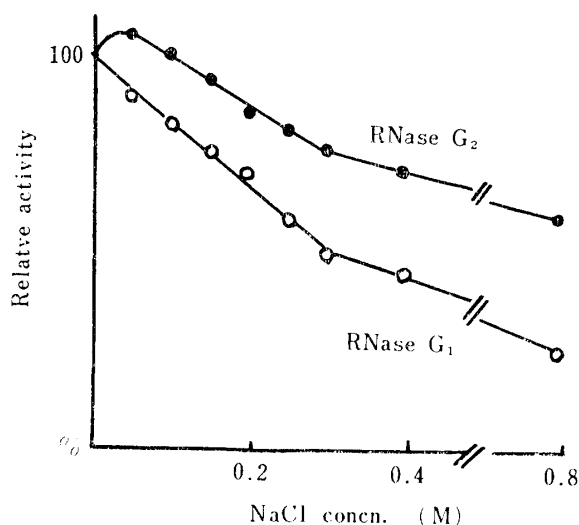


Fig. 7. Effect of NaCl concentration on RNase activity.

らの画分もセファデックス  $G_{100}$  カラムゲルろ過(第3図及び第5図)によって高度に分離された。最も精製された画分は  $280 m\mu$  の紫外吸収を基準にして RNase  $G_1$  では約 700 倍, RNase  $G_2$  では 1,400 倍であり, 特に RNase  $G_2$  画分は3回のクロマトグラフィーで約 20% の活性が失われたのみで, 収量は約 29% であった。

(2) 酵素の至適 pH 酵素の至適 pH は, クエン酸-リン酸ソーダ緩衝液によって測定した結果, 第6図のように RNase  $G_1$  は至適 pH 6.0 付近にあり, RNase  $G_2$  は 5.0 であった。従って以下の食塩濃度の影響, 温度に対する安定性, リボ核酸分解物の同定

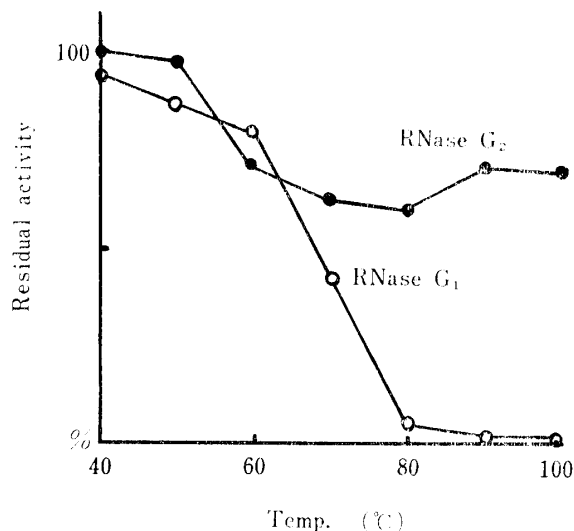


Fig. 8. Effect of temperature on RNase stability.

の実験では, それぞれの至適 pH で行なった。

(3) 酵素反応に及ぼす食塩濃度の影響 酵素反応のイオン強度による影響を食塩を用いて行なった結果を第7図に示した。RNase  $G_1$  は, 食塩濃度が 0.3 M までの増加に従い直線的に活性は低下し, 0.3 M では 50% であるが, 0.8 M では 25% の活性を示した。一方, RNase  $G_2$  は, 0.1 M までの食塩濃度では活性はやや高くなるが, さらに増加するに従い低下し, 0.3 M 食塩濃度中では 75%, 0.8 M では 60% の活性を示した。

(4) 酵素の種々の温度に対する安定性 酵素の温度に対する安定性を第8図に示した。酵素液は, 各温度に5分間保った後, 水中で急冷後, 活性を測定した。RNase  $G_1$  は  $70^\circ\text{C}$  以上で急激に失活し,  $80^\circ\text{C}$  では 95% 以上失活した。一方, RNase  $G_2$  は,  $60^\circ\text{C}$  以上ではほぼ 60% の活性が残存した。

(5) 酵素に及ぼす2価金属イオンの影響 主な2価の金属イオン  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  の影響を  $10^{-3} M$  の濃度で RNase  $G_2$  について検討したところ,  $\text{Hg}^{2+}$  によって 88%,  $\text{Pb}^{2+}$  によって 60% の活性が阻害され,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  によって 20% 程阻害されたが,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  はほとんど活性に影響を及ぼさなかった。

(6) リボ核酸分解物の固定 RNase  $G_1$  及び RNase  $G_2$  によるリボ核酸分解物は, 溶媒 (2) によるペーパークロマトグラフィーによって, 2'(3')-モノヌクレオチドよりも高い位置にスポットが検出され, ヌクレオシドか, 又はヌクレオシド 2',3'-環状リン酸を生じていると思われたので, さらに検討する為

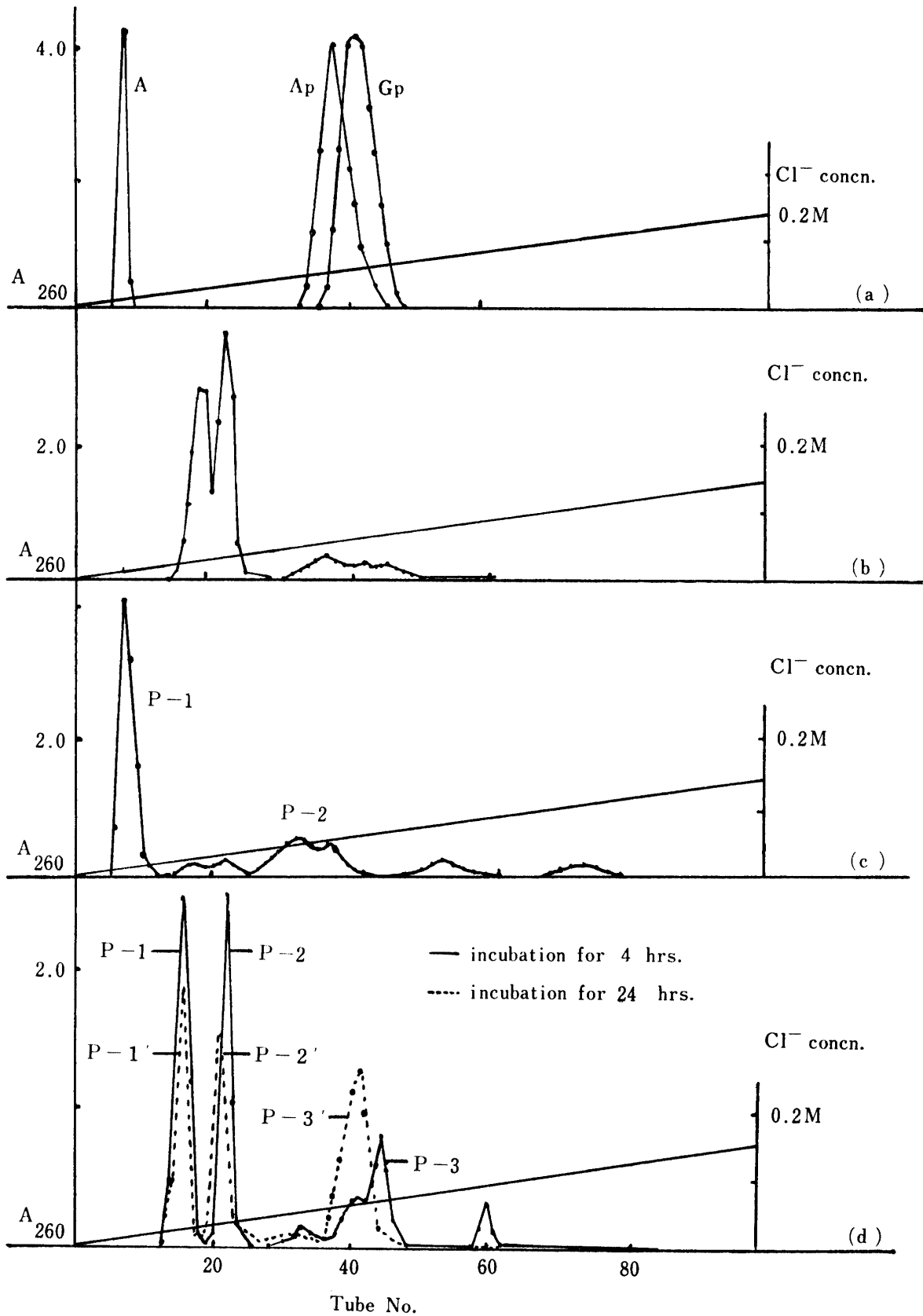


Fig. 9. Elution patterns of the digested products of RNA by RNases.

- (a) Markers, A : adenosine, Ap : 2'(3') adenylic acid and Gp : 2'(3') guanylic acid.  
 (b) Digested products by endosperm RNase.  
 (c) Digested products by RNase G<sub>1</sub>.  
 (d) Digested products by RNase G<sub>2</sub>,

に分解産物を 7 M 尿素を含む DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった。7 M 尿を含む DEAE-セルロースカラムでは塩濃度勾配溶出によって、オリゴヌクレオチドをそれぞれがもつリン酸基の遊離電荷 (負) の数に従って分画できる。即ち、ヌクレオシドは電荷 0 であるから吸着されないが、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸は負の電荷を 1 個、ヌクレオチドは 2 個もっているため、分離して溶出される。実験では同じ大きさのカラムで同じ組成の食塩の直線的濃度勾配溶出によっているので、マーカーの位置から、それぞれの溶出物の種類が推定できる。

(1) ソテツ胚乳酵素による分解産物-比較の為にソテツ胚乳酵素によるリボ核酸分解物のクロマトグラフィーを第 9 図 (b) に示した。酵素分解は pH 4.7, リボ核酸 5 mg に 950 単位の酵素を加え 37°C で 2 時間反応させた後、さらに 450 単位の酵素を加えて 20 時間反応を続けた。この酵素の場合、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸を生ずる事が証明されている<sup>1)</sup>が、マーカーの溶出位置は第 9 図 (a) と比較するとヌクレオシドとモノヌクレオチドの間に溶出ピークがある事

からもその存在が確認された。

(2) RNase G<sub>1</sub> による分解産物—RNase G<sub>1</sub> による分解は pH 6.0, リボ核酸 5 mg に酵素 440 単位を加えて 20 時間行ないクロマトグラフィーにかけた。第 9 図 (c) で、始めのピークはマーカーとの比較から、ヌクレオシドであると考えられたので確認する為に、溶出液を活性炭処理、減圧濃縮、酸処理し、溶媒 (1) を用いてペーパークロマトグラフィーを行なった。溶媒 (1) ではヌクレオチド類は展開しないで原点に残りヌクレオシドのみが移動する。第 10 図 (a) の如く、アデノシン、シチジン、ウリジン、グアノシンに相当するスポットが検出されたが、ウリジンに相当するスポットは、マーカーの位置よりもやや上昇しているため、溶媒 (3) によって展開したところ、第 10 図 (b) のようにアデノシン、グアノシン、ウリジンに相当するスポットが検出されたが、シチジンに相当するスポットは明確ではなかった。RNase G<sub>1</sub> の分解産物として、ヌクレオシドが生じた事は、RNase G<sub>1</sub> 中にヌクレオチダーゼ活性が存在する事を示している。一方、第 2~第 4 のピークまでは、収

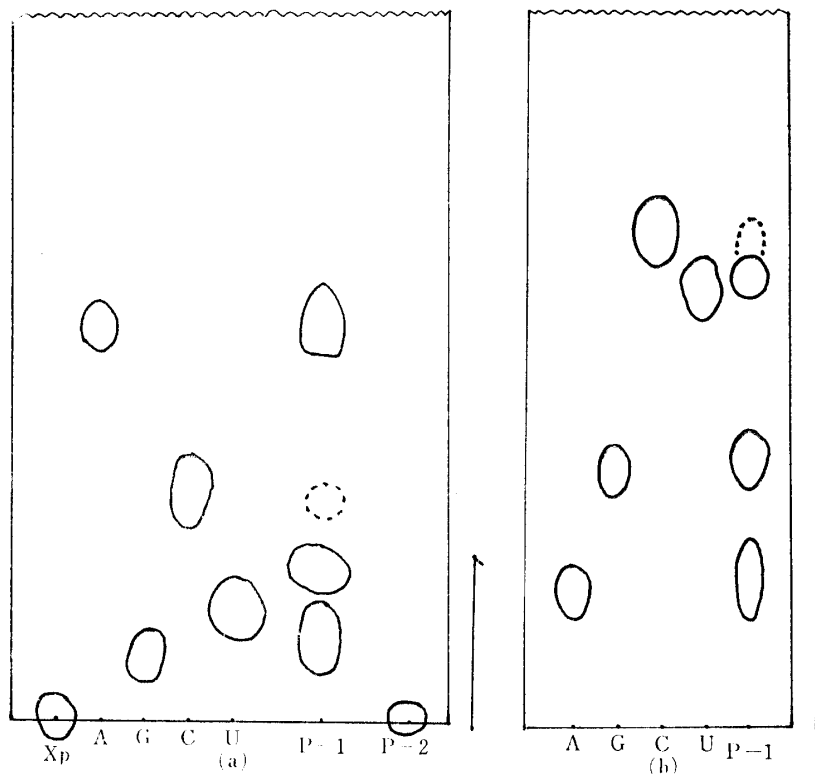


Fig. 10. Paperchromatograms of the digested products of RNA by RNase G<sub>1</sub>. (a) Solvent 1. (b) Solvent 3.

P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> were shown in Fig. 9. (c). A, G, C and U indicate respectively adenosine, guanosine, cytidine and uridine. Xp includes 2'(3') adenylic, guanylic, cytidylic and uridylic acids.

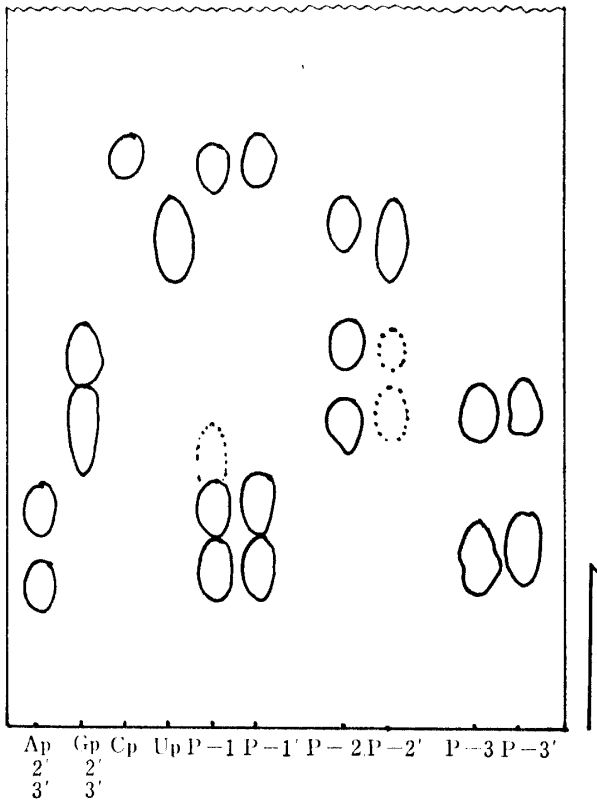


Fig. 11. Paperchromatogram of the digested products of RNA by RNase G<sub>2</sub>. Ap, Gp, Cp and Up indicate respectively 2'(3') adenylic, guanylic, cytidylic and uridylic acid. P-1, P-1', P-2, P-2', P-3, and P-3' were shown in Fig. 9. (d).

量が少い為に同定できなかったが、第2のピークは、マーカーの位置からややずれているが、モノヌクレオチドであると思われる。

(3) RNase G<sub>2</sub> による分解産物—RNase G<sub>2</sub> による分解は、pH 5.0, リボ核酸 4 mg に酵素 1260 単位加えて 37°C で、4 時間反応させたもの、及び 2520 単位加えて 20 時間反応させたものをクロマトグラフィーにかけた。第9図(d)において、実線で示した溶出曲線が4時間反応産物、点線で示した溶出曲線が20時間反応産物であるが、後者では、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸に相当する画分、P-1' 及び P-2' が減少し、モノヌクレオチドに相当する画分、P-3' が増加している事は、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸が、2倍量の酵素と長い反応時間で分解されて、モノヌクレオチドを生じたと考える事で説明できる。それぞれのピークを活性炭処理、減圧濃縮、酸処理、溶媒(3)によってペーパークロマトグラフィーを行なった結果、第11図のような結果が得られた。P-1 及び P-2 は、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸を

含むと考えられるが、酸処理して環状リン酸を分解しているのでスポットでは、2'(3')-ヌクレオチドとしてあらわれる。P-1 からは各々シチジル酸と 2' 及び 3'-アデニル酸に相当するスポットが得られた事から、シチジン 2',3'-環状リン酸、アデノシン 2',3'-環状リン酸として、このピークに含まれていた事が推定された。P-2 からは、ウリジル酸と 2' 及び 3'-グアニル酸に相当するスポットが得られた事からウリジン 2',3'-環状リン酸とグアノシン 2',3'-環状リン酸としてこのピークに含まれていた事が推定された。一方、P-3 からは、3'-アデニル酸、3'-グアニル酸のスポットが検出された事から、生じたヌクレオシド 2',3'-環状リン酸が酵素によって分解されて 3' のモノヌクレオチドのみが生じた事が考えられる。ウリジル酸とシチジル酸のスポットは認められなかった。尚、このピークには末端にヌクレオシド 2',3'-環状リン酸をもったジヌクレオチド(負の電荷を2個もつ)も含まれる可能性があるが、検出されなかった。DEAE-セルロース尿素系のカラムクロマトグラフィーでは、ここでの条件下で、アデノシン及びシチジン 2',3'-環状リン酸とグアノシン及びウリジン 2',3'-環状リン酸とが分離できる事が明らかになった。

プリン及びピリミジン 2',3'-環状ヌクレオチドの酵素による分解を確かめる為に、アデノシン 2',3'-環状リン酸とシチジン 2',3'-環状リン酸をそれぞれ 0.5 mg を 0.02 ml の水にとかし、pH 5.0 の 0.1 M ケエン酸-0.2 M リン酸緩衝液 0.03 ml, 酵素 0.15 ml (480 単位) を加え、37°C で 24 時間反応させ、前報<sup>2)</sup> と同様の方法で分解率を求めたところ、アデノシン 2',3'-環状リン酸が 48.6% 分解されたのに対して、シチジン 2',3'-環状リン酸は約 1% の分解率を示したにすぎない。

## 考 察

リボヌクラーゼは、種々の材料から分離精製されているが、特に江上らのリボヌクラーゼ T<sub>1</sub> やすい臓のリボヌクラーゼ I は特異性が高い。高等植物中からは、特異性の高い酵素は見い出されていなかったが、最近、米ぬかから、リボヌクラーゼ T<sub>1</sub> 型の酵素<sup>9)</sup> が分離された。裸子植物の酵素についての報告は初めてであるので特異性のあるリボヌクラーゼの存在が期待されたが、ソテツ及びイチョウの種子からは、現在まで報告されている高等植物の大多数の酵素と類似の酵素しか見出されなかった。

ソテツ種子胚乳からは至適 pH を 4.7 にもつただ

1種の酵素が分離されたが、イチョウの種子の胚乳からは、至適  $pH$  を 6.0 (RNase G<sub>1</sub>) と 5.0 (RNase G<sub>2</sub>) とにもつ2種の酵素が分離された。DEAE-セルロースカラムで分離された時の RNase G<sub>1</sub> と RNase G<sub>2</sub> との比は、1対10であり、RNase G<sub>1</sub> は量的に少なかった為に、2価の金属イオンの影響やヌクレオチダーゼ活性との関連についての詳しい検討はなされなかった。RNase G<sub>1</sub> と RNase G<sub>2</sub> は至適  $pH$ 、イオン強度の影響、耐熱性によって区別された。RNase G<sub>1</sub> は食塩の存在下で RNase G<sub>2</sub> と比較してより低い活性を示し、両酵素ともソテツ胚乳中の酵素よりもイオン強度の影響を受けやすかった。耐熱性については、RNase G<sub>1</sub> は 70°C 以上で急激に失活し、ソテツ胚乳酵素と似た失活曲線を描くが、RNase G<sub>2</sub> は 100°C、5分間の加熱でも 60%の活性を保持し、ソテツ胚乳酵素と類似していた。2価の金属イオンは、ソテツの胚及び胚乳酵素と同様、RNase G<sub>2</sub> では、 $10^{-3}M$  Hg<sup>2+</sup> によって 90%、 $10^{-3}M$  Pb<sup>2+</sup> によって 6%、Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> によってやや阻害される程度で、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> によっては影響されなかった。

基質特異性については、RNase G<sub>1</sub> の場合、リボ核酸を分解してヌクレオシドを生じた事から、ヌクレオチダーゼ活性が存在する事になるが、酵素が RNase 活性とヌクレオチダーゼ活性とをどちらも所有しているのか、或いは、フォスファターゼが混在しているのか明らかにできなかった。mung bean メバエからのリボヌクレアーゼ (RNase M<sub>2</sub>)<sup>10)</sup> は、3'-ヌクレオチダーゼ活性をも示す事が証明されており、RNase G<sub>1</sub> もかなりの程度精製されている事から、単一の酵素である可能性もあるが、尚、検討の余地がある。

他方、RNase G<sub>2</sub> はリボ核酸を分解してヌクレオシド 2',3'-環状リン酸を生じ、さらにモノヌクレオチドにまで分解した。その際に、ヌクレオシド 2',3'-環状リン酸の分解物は、3'-モノヌクレオチドであったしかも、3'-モノヌクレオチドは、グアノシン、アデノシンのスポットのみが検出された事から、プリンモノヌクレオチドの生産が早いと考えられる。ソテツ胚乳リボヌクレアーゼは、プリン及びピリミジン環状ヌクレオチドのいずれをも分解してモノヌクレオチドを生ずる事が示されている<sup>2)</sup> が、イチョウ RNase G<sub>2</sub> の場合、アデノシン 2',3'-環状リン酸が 48% 分解されているのに、シチジン環状リン酸は、1%であり、誤差の範囲内にあるので、果して RNase G<sub>2</sub> がシチ

ジン 2',3'-環状リン酸を分解できるかどうか断定できなかったが、誤差であるとするれば、ソテツ胚乳リボヌクレアーゼと違って、タバコ葉やエンドウ葉等のプリン 2',3'-環状ヌクレオチドのみをモノヌクレオチドにまで分解する RNase I 型に属する。いずれにせよ、ヌクレオシド環状リン酸の分解については、ソテツの胚乳リボヌクレアーゼに比べ、シチジンヌクレオチドの分解ははるかに低い事が明らかになった。

## 結 論

前報において<sup>1)2)</sup>、ソテツ種子中のリボヌクレアーゼについて検討を行なった。本報では、ソテツと同様に裸子植物に属するイチョウ種子中のリボヌクレアーゼの部分精製、性質について記述した。

結果は次のように要約される。

(1) イチョウ種子胚乳から、硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、セファデックス G<sub>100</sub> によるゲルろ過によって二種類の酵素 RNase G<sub>1</sub> と RNase G<sub>2</sub> が分離された。

(2) DEAE-セルロースカラムで溶出されたときの RNase G<sub>1</sub> と RNase G<sub>2</sub> の比は 1対10であった。

(3) RNase G<sub>1</sub> は至適  $pH$  が 6.0 にあり、RNase G<sub>2</sub> よりもイオン強度の影響を受けやすく、70°C、5分間の加熱によってほとんど失活した。

(4) RNase G<sub>1</sub> は、リボ核酸を分解してアデノシン、グアノシン、ウリジン、シチジンといくつかのオリゴヌクレオチドを生じた。ヌクレオシドは、RNase G<sub>1</sub> の直接の作用によって生じたものであるのか、又は混在するフォスファターゼによって生じたものであるのかについては検討されなかった。

(5) RNase G<sub>2</sub> は、至適  $pH$  が 5.0 にあり、100°C、5分間の加熱によっても 60%以上の活性を示した。RNase G<sub>2</sub> は、 $10^{-3}M$  の Hg<sup>2+</sup> によって 90%、Pb<sup>2+</sup> によって 60%阻害された。

(6) RNase G<sub>2</sub> は、リボ核酸を分解してアデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジンの 2',3' 環状リン酸及び、3'-アデニル酸、3'-グアニル酸を生じた。

## 文 献

- 1) 原 彰, 矢野 浩・渡部常樹, 日農化誌, **43**, 13~20 (1969)
- 2) 原 彰, 吉原和子・渡部常樹: 鹿大農学術報告, **19**, 81~88 (1969)
- 3) TOMLINSON, R. V. and TENER, G. M.: *Biochemistry.*, **2**, 697~702 (1963)
- 4) 中尾義雄, 栄養食糧発酸外国文献会誌, **14**,



- A 33 (1963)
- 5) MARKHAM, R. and SMITH, J. D. : *Biochem. J.*, **45**, 294 (1949)
- 6) BOULANGER, P. and MONTREJUIL, J. : 原報不明, クロマトグラフィーの実際 I, 424~425 (1964) 広川書店
- 7) MARKHAM, R. and SMITH, J. D. : *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951)
- 8) HEPPEL, L. A. : "Method in Enzymology", vol. 2, 571 (1955) Academic Press Inc., New York
- 9) 川崎良文・阿久根了, 昭和43年度日農化大会講演要旨, 223 (1963)
- 10) LORING, S. H., MCLENNAN, J. E. and WALTERS, T. L. : *J. Biol. Chem.*, **241**, 2876~2880 (1966)

### Summary

In the previous papers<sup>(1)(2)</sup>, the authors reported the studies on the ribonucleases from the Japanese cycad. In the present paper, they described the partial purification and properties of ribonuclease from the seeds of ginkgo. Both ginkgo and cycad belong to the gymnosperm.

The results obtained are summarized as follows :

- 1) Two ribonucleases named RNase G<sub>1</sub> and RNase G<sub>2</sub> were isolated from endosperm of ginkgo nuts by means of ammonium sulfate precipitation, column chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration through Sephadex G<sub>100</sub> column.
- 2) Total activity ratio of RNase G<sub>1</sub> to RNase G<sub>2</sub> was 1 to 10, at the time when they were isolated by column chromatography on DEAE-cellulose,
- 3) RNase G<sub>1</sub> had an optimum pH at 6.0. It was more sensitive to ionic strength than RNase G<sub>2</sub> and was inactivated almost completely by 5 minutes' heating at 70°C.
- 4) RNase G<sub>1</sub> hydrolyzed ribonucleic acid giving rise to adenosine, guanosine, cytidine, uridine and some oligonucleotides. It was left to further investigation whether these nucleosides were produced by the direct action of RNase G<sub>1</sub> or by a contaminating phosphatase in RNase G<sub>1</sub> fraction.
- 5) RNase G<sub>2</sub> had an optimum pH at 5.0 and kept its activity above 60% after 5 minutes' heating at 100°C, but was inhibited 90% by 10<sup>-3</sup> M Hg<sup>++</sup> and 60% by 10<sup>-3</sup> M Pb<sup>++</sup>.
- 6) RNase G<sub>2</sub> hydrolyzed ribonucleic acid giving rise to 2', 3'-cyclic phosphates of adenosine, guanosine, cytidine and uridine, and 3'-adenylic and 3'-guanylic acids.