

# ラット肝リボゾーム中のテンプレート活性を示すリボ核酸の諸性質

伊吹 文男・北 脩・三好 正満・金森 正雄

FUMIO IBUKI, OSAMU KITA, MASAMITSU MIYOSHI, and MASAO KANAMORI

## Characterization of ribonucleic acid with template activity in rat liver ribosomes

**要旨:** ラット肝のリボゾームより RNA を調製し、たんぱく質合成に対する役割りを明らかにするために、本研究を行った。RNA はリボゾームよりフェノール法にて抽出、エタノールにて沈澱として得たのち、Sephadex G-200を用いるゲルろ過で7区分に分画した。塩基組成はDowexを用いるカラムクロマトグラフィーにより分析されたが、Ap:Up, Gp:Cp はいずれも1:1より大きくはずれ、水素結合はあまり高次構造に関与していないと考えられる。

大腸菌 K-12 の S-30 画分を用いてこれら RNA のテンプレート活性を測定したが、時間経過および RNA の添加量とアミノ酸の熱酸不溶性画分(たんぱく質)へのとりこみには直線関係が認められ、またすべての RNA 画分にはほぼ同じようなテンプレート活性が認められた。しかし EDTA にて、これらの RNA を処理したところ、Sephadex のゲルろ過によって、比較的分子量の大きいと考えられる区分が、その活性を減少したのに対し、低分子量の RNA は、活性を増加せしめるという RNA の高次構造を考察する上に非常に興味ある結果を得た。

### I 緒 論

近年、たんぱく質合成に対する研究発展は著しく、特に大腸菌を中心とした系は、合成開始から、終結に到るまで、ほぼその生合成機構が明らかにされている。これに比較して、いわゆる真核細胞 (eucaryotic cell) では、その機構解明に遅れをとっていたが、動物細胞、特にラット肝や赤血球、蚕絹糸腺を用いての研究が数多く報告されるにつれて、生合成機構が明らかにされ、基本的には、大腸菌など原核細胞 (pro-caryotic cell) の系との差異は認められない<sup>1)~4)</sup>。

一般にたんぱく質合成の研究で大腸菌系を用いる場合は、メッセンジャー RNA (mRNA) の代りに合成ポリヌクレオチドを反応系に加えるのが通常であ

り、このことを利用して、たんぱく質合成におけるアミノ酸のコードが実験的に決定されたことについては、今更、論述の必要はないであろう。これに対して、動物系、特にラット肝や、蚕絹糸腺を用いた、たんぱく質合成の研究では、特に合成ポリヌクレオチドを添加することなく行われるのが通常である。このことは、動物系では大腸菌系のように、preincubation によって、容易に内因性 mRNA を代謝回転せしめることが難しく、リボゾームと非常に安定な複合体を形成しているのではないかと考えられる。

近年、mRNA、すなわちテンプレート活性をもつ RNA の単離が、報告されている<sup>5)</sup>。植物では、リボゾームを含まない系からテンプレート活性をもつ高分子 RNA が、大豆を材料として伊吹、森<sup>6),7)</sup>によって

単離されている。ラット系では、J. M. Hill<sup>9)</sup>, C. E. Zomzely<sup>9)</sup>, A. Girolamo<sup>10)</sup> らによって、肝や脳組織中にテンプレート活性を示す RNA の存在が報告されている。しかし、これらの RNA がリボゾームと複合体を形成している mRNA であるのか、あるいはリボゾームの RNA そのものが、テンプレート活性をもっているのかなどについて実験的に統一された見解はなく、依然として不明な点が多い。

本報では、このような点に注目して、ラット肝より、リボゾーム由来の RNA を単離、Sephadex によるゲルろ過にて分画し、テンプレート活性を中心に、その性質を検討して、たんぱく質合成における役割りについて研究した。

## II 試料と実験方法

### 1. ラット肝リボゾームより RNA の調製法

リボゾームは K. Moldave<sup>11)</sup> の方法によって調製した。市販のウィスター系ラットの雄（平均体重200g）を一夜絶食後、切首し肝臓を摘出した。2倍量の冷 medium A (0.35 M sucrose, 0.035 M KHCO<sub>3</sub>, 0.025 M KCl, 0.004 M MgCl<sub>2</sub>, 0.02 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) を加えて、テフロン・シリンジのホモゲナイザーを用いて摩擦する。10,000g, 20分の遠心によって、膜、ミトコンドリアなどを除いたのち、上清を超遠心 (100,000g, 120分, 日立65 P 分離用超遠心機使用) して、リボゾームを沈澱として得た。このリボゾームに冷 medium A を2倍量加え、摩擦後、等量の90%フェノール<sup>12)</sup> を加えて約2時間攪拌、遠心によって水層を得る。沈澱およびフェノール層に相当量の水を加えて同様の操作をおこない先の水層と合わせる。これらの処理によって、リボゾーム RNA は、ほぼ水層に回収される。水層に対して0.1量の20%酢酸カリウム (pH 5 に調整), 2倍量の冷エタノールを添加, -20°C で一夜放置する。RNA は沈澱として回収される。このものを水に十分懸濁したのち、そのまま、水に対して24時間透析し、遠心分離によって上清を得る。この上清から、再度、酢酸カリウムとエタノールの添加によって RNA を沈澱せしめる。この沈澱を水に懸濁、透析後、遠心によって上清を得、粗リボゾーム RNA として -20°C に保存した。以上の操作はすべて 4°C でおこなわれた。

### 2. 核酸の塩基組成分析法

RNA の塩基組成は、RNA をアルカリによってモノヌクレオチドまで加水分解したのち、Dowex 1 を用いるカラムクロマトグラフィーによって分析された<sup>13)</sup>。すなわち RNA に 0.3N 水酸化カリウムを加

え、37°C に18時間放置して、RNA をモノヌクレオチド (2' と 3' の混合物) に完全に加水分解したのち、5%過塩素酸で中和する。氷冷して、過塩素酸カリウムを沈澱として、できるだけ除去したのち、上清を塩基組成分析に用いた。

カラムクロマトグラフィー<sup>14)</sup> は、カラムとして 1 ml のピペットを用い (16.7cm×0.059cm<sup>2</sup>), Dowex 1×2, Cl<sup>-</sup> 型 (200~400メッシュ) を充填する。核酸量として 1 mg (mg/ml の O. D. 260nm を40として計算する。) のアルカリ加水分解物 (50 μl) をカラムに添加したのち、0.0035 N HCl から、0.25 M NaCl への直線的濃度勾配系を用いて溶出した。0.5 ml ずつ分画したのち、0.01 N HCl で6倍に稀釈して、紫外吸収を測定した。

### 3. ラット肝 RNA のテンプレート活性の測定法

たんぱく質合成に対するラット肝 RNA のテンプレート活性は大腸菌の S-30 画分を用いて測定された<sup>15)</sup>。

#### 1) 大腸菌 (E. coli) K-12の培養

水酸化ナトリウムで pH を7.0に調整した1% beef extract, 1% polypeptone, 0.5% NaCl を含む培地を調製し、1 atm, 100°C 30分間オートクレーブする。種培地に E. coli K-12株1白金耳を移植して30°C で一夜培養後、本培地に移して、30°C で振とう培養をおこなう。520nm における O. D. 値が0.5~0.6に達した時点 (対数増殖期) で培養をとめ、遠心により集菌する。菌体は 0.014M MgAc<sub>2</sub>, 0.06M KCl を含む0.01M Tris-HCl, pH 7.8液で3回洗浄され以下の実験に供した。

#### 2) S-30画分の調製法

集菌、洗浄後一夜凍結した E. coli K-12 は等量のアルミナとともに5分間すりつぶされた後、2倍量の冷 Tris-HCl (0.014 M MgAc<sub>2</sub>, 0.06 M KCl, 0.006 M mercaptoethanol を含む) と共に、ホモゲナイザーを用いて乳化され、2000 g, 20分の遠心によって、上清を得た。上清に 2 μg/ml の割合に DNase (2200 u/mg, Worthington Biochemical Corp., U.S.A.) を添加し、4°C で5分間保つ。この溶液を、30,000g, 30分遠心して得られた画分を S-30 画分とした。上記操作はすべて 4°C でおこなわれた。

#### 3) Preincubated S-30 の調製法

E. coli のもつ内因性 template activity すなわち、mRNA によるアミノ酸のとりこみをできるだけ小さくするために、2) で得た S-30 画分は、さらに以下の処理がおこなわれた。すなわち、S-30 画分10 ml, Tris-HCl (pH 7.8) 10<sup>-3</sup> mole, ATP (disodium

salt, Kohjin Co., Japan) 5  $\mu$  moles, creatine phosphate (disodium salt, hydrate crystalline, Sigma Chemical Corp., U. S. A.)  $10^{-4}$  mole, creatine phosphokinase (from rabbit muscle, Sigma Chemical Corp., U. S. A.) 0.5 mg, 2-mercaptoethanol  $10^{-4}$  mole, 20 amino acids 各 0.2  $\mu$  mole から成る液を 37°C に80分間保つ。その後、反応液は 0.014 M  $MgAc_2$ , 0.06 M KCl, 0.006 M 2-mercaptoethanol を含む冷 Tris-HCl (pH 7.8) に対して2時間ずつ、3回透析された。ついで透析内液は 30,000g で30分遠心され、得られた上清を pre-incubated S-30 画分とした。たんぱく質量の測定は、この画分を十分稀釈したのち、Lowry-Folin 法<sup>10)</sup> を用いて行った。

#### 4) アミノ酸のとりこみ測定法

反応混合液は総量 0.5ml 中に、Tris-HCl (pH 7.8) 25  $\mu$  moles,  $MgAc_2$  5  $\mu$  moles, ATP 0.1  $\mu$  mole, creatine phosphate 5  $\mu$  moles, creatine phosphokinase 25  $\mu$ g, GTP (from equine muscle, sodium salt, Sigma Chemical Corp., U. S. A.) 0.125  $\mu$  mole, 2-mercaptoethanol 5  $\mu$  moles, 19 amino acids (leucine を除く) 各 12.5  $\mu$  moles,  $^{14}C$ -L-leucine (331 mCi/mM, Radiochemical Center, England) 0.5  $\mu$  Ci, preincubated S-30 画分 (たんぱく質として 0.5 mg) および RNA 標品を含んでいる。反応は 37°C でおこなわれ、適時ピペットで 0.1ml の反応液を Whatman disc paper に、吸着させたのち、冷 10% トリクロール酢酸 (TCA) にひたして、反応を停止する。さらに 90°C, 5% TCA 中に30分間ひたして RNA などを溶解除去、さらに冷 5% TCA で2回洗浄する。ethanol-ether (3:1, V/V) に30分ひたして、TCA を除いたのち、十分風乾して、いわゆる hot acid insoluble fraction (protein) へとりこまれた放射性アミノ酸量を測定した。

放射能の測定は、上記 disc paper をガラス製バイヤルに入れ toluene scintillator solution を 5ml 添加して、Packard Model 2002 を用いておこなわれた。

### III 実験結果と考察

#### 1. ラット肝リボソームより調製した RNA の分画とその特性

実験方法 1) で調製された粗リボソームから調製した、RNA (以下すべて r-RNA と記す) には、28S, 18S, 5S のリボソーム RNA, および調製過程でこれらの RNA より生成したと考えられる低分子の

RNA, また、リボソームに結合していた内因性の mRNA などが含まれている。これら高分子から低分子までの RNA を分画精製するために Sephadex G-200 によるゲルろ過を行った。

Sephadex G-200 を 2% 酢酸カリウム (pH 6.0) 溶液で十分膨じゅんさせたのち、径 2.5cm, 長さ 40.5 cm のカラムに充填し、十分安定化したのち、r-RNA 水溶液 (5 mg/ml) 3 ml を添加し、2% 酢酸カリウム (pH 6.0) 溶液で溶出した。その 1 例を Fig. 1 に

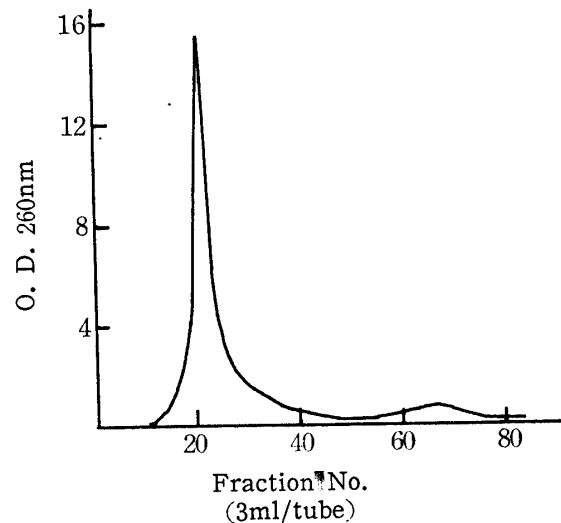


Fig. 1. Gel filtration pattern of RNA from rat liver ribosomes on Sephadex G-200.

示す。void volume に現われたピークは、28S, 18S RNA, リボソーム付着 mRNA などと考えられる。60~70画分にみられるピークは 5S RNA および調製中に混入せる転位 RNA (t RNA) と思われる。一方 25~60 画分に溶出してくる RNA は、混在している RNase か、調製中に物理的・化学的原因により分解されたものと考えられる。画分 I として画分 15~19 を、II として 20~25, III として 26~35, IV として 36~48, V として 49~59, VI として 60~70, VII として 71~

Table 1. UV absorption characteristics of RNA from rat liver ribosomes

	$\epsilon_{230}/\epsilon_{260}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$
Crude r-RNA	0.402	0.603
Fraction I	0.476	0.578
" II	0.495	0.588
" III	0.441	0.537
" IV	0.449	0.545
" V	0.460	0.539
" VI	0.470	0.538

Table 2. Base composition of RNA from rat liver ribosomes

r-RNA (Fraction II)	Base composition(molar %)				Base ratios			
	Cp	Ap	Gp	Up	$\frac{Pu}{Py}$	$\frac{A}{U}$	$\frac{G}{C}$	$\frac{G+C}{A+U}$
	11.9	33.2	30.0	25.0	1.71	1.32	2.52	0.72

Cp, cytidylic acid ; Ap, adenylic acid ; Gp, guanylic acid ; Up, uridylic acid.

80をそれぞれプールしたのち、画分Ⅰ～Ⅲは、そのまま、画分Ⅳ～Ⅶは、適当に濃縮したのち、カリウム塩として、エタノールにより沈澱せしめた。水に溶解、透析したのち遠心して、上清をそれぞれ精製 r-RNA 画分とした。

各画分の r-RNA の一つの基本的特性として紫外吸収パターンを測定したのが、Table 1 である。220～300 nm 全域の測定もおこなったが、特に各画分に著しい差は認められなかったが、Table 1 の  $\epsilon_{230}/\epsilon_{260}$  から判るように、粗 r-RNA と比べて各画分は、吸収ピーク260nm 付近でやや広がりを見せている。

基本的特性の第2として、画分Ⅱについて塩基組成を示したのが、Fig. 2 および Table 2 である。各ヌクレオチドは2' と3' の混合物であるが、分析を微量化したためか、その分離は認められなかった。しかし、各ヌクレオチドの分離は定量分析を行うに十分であった。なお各ヌクレオチドの同定は、 $\epsilon_{250}/\epsilon_{260}$ 、 $\epsilon_{280}/$

$\epsilon_{260}$ 、 $\epsilon_{290}/\epsilon_{260}$  の各分子吸光比の比較により行い、peak-1 を CMP, peak-2 を AMP, peak-3 を UMP, peak-4 を GMP と同定した。CMP 280nm, AMP, UMP, GMP 260nm の酸性におけるミリモル吸光度を、それぞれ13.0, 14.2, 9.9, および11.8として各ヌクレオチドのモル%を求めたのが、Table 2 に示した値である。明らかにC : G, A : Uが1 : 1の対応を示していないことから、少なくとも画分Ⅱの r-RNA ではその構造に水素結合の寄与はあまり大きくないと考えられる。なお他の画分は、量的に少なく分析に供するだけの試料を得ることができなかった。

なお Sephadex G-200 での分離の他、近年広く核酸の分離に用いられている methylated albumin-kieselguhr column<sup>17)</sup> も試みてみたが、回収率が非常に低く、40%前後である上に、特定の核酸の吸着が認められ、Sephadex による分画のように、全核酸が溶出し得なかったので本研究には適当と考えられなかった。

## 2. ラット肝リボソームより調製したRNAのテンプレート活性について

緒言に述べたごとく、真核細胞、特にラット肝系を用いるたんぱく質生成の研究では、とりたてて、mRNA の代用として、合成ポリヌクレオチドを加えることが少ない。そこで、ラット肝系でのたんぱく質合成の際の、mRNA がリボソーム付着の mRNA によるものか、あるいはリボソーム RNA が本質的にテンプレート活性を有しているのかが、重要な課題になっているが、肝リボソームよりわれわれの調製した r-RNA について、その活性を検討した。

Fig. 3, Fig. 4は、実験方法で述べたテンプレート活性測定法の定量性を検討した結果である。Fig. 3は E. coli K-12 preincubated S-30画分の系において、<sup>14</sup>C-leucine の酸不溶性画分へのとりこみに対する r-RNA の添加効果の経時変化を示したものである。r-RNA としては、画分Ⅱ 330 $\mu$ g を用いた。r-RNA を添加しないものも、相当量のとりこみが認められるが、これは preincubation したにもかかわらず、依

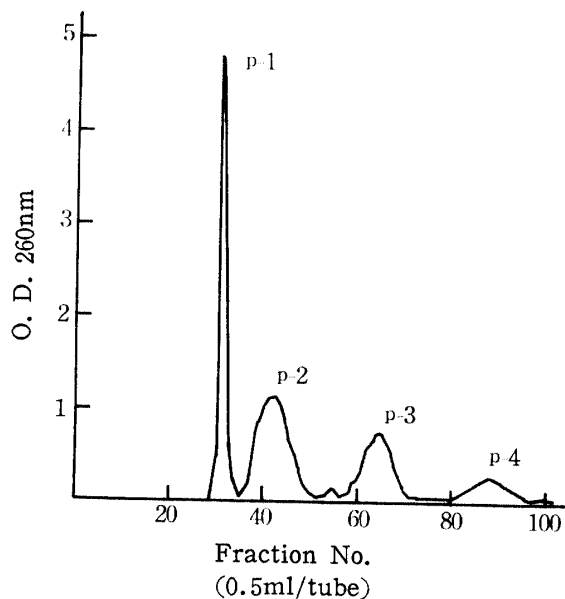


Fig. 2. Chromatogram of the alkaline hydrolysis of RNA on Dowex 1 x 2 column. p-1, cytidylic acid ; p-2, adenylic acid ; p-3, uridylic acid ; p-4, guanylic acid.

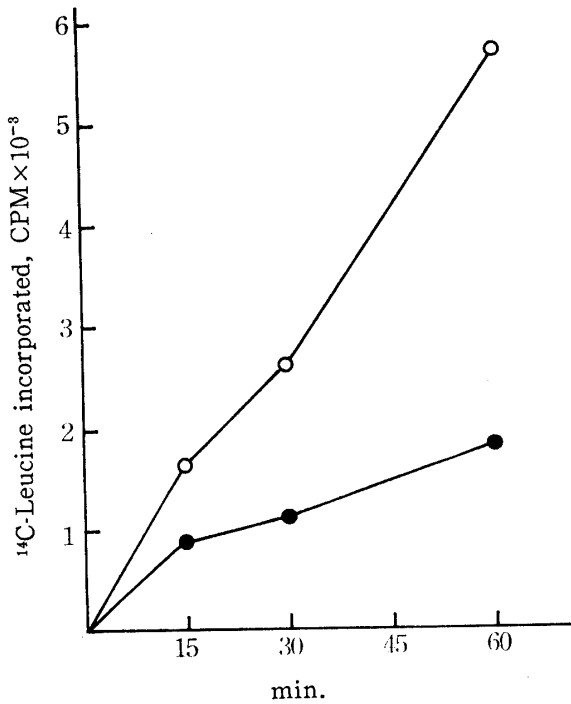


Fig. 3. Time course of incorporation of <sup>14</sup>C-L-leucine into protein in the presence and in the absence of RNA. ○—○, with RNA; ●—●, without RNA

然として E. coli K-12 の系が、内因性の mRNA を若干含んでいることを示している。しかしそのとりこみは45~60分でほぼとまるのに対し、r-RNA を添加したものは60分までは完全に時間経過に比例してとりこみが進み、テンプレート活性をもつことは明らかである。Fig. 4 は、r-RNA の添加量と <sup>14</sup>C-leucine のとりこみ量の相関関係を検討したもので、330μg までは、ほぼ直線性が存在する。なお、これらの反応は完全に温度依然性を示し 20°C では、とりこみは著しく低く時間経過による増加も、ほとんど認められなかった。これらのことは、S-30 画分に含まれている酵

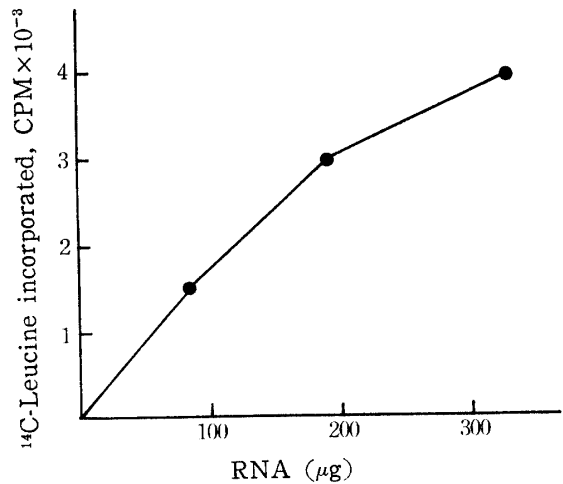


Fig. 4. The relationship between the incorporation of <sup>14</sup>C-L-leucine into protein and the concentration of RNA.

素系が、十分その機能を発現し得ないものと考えられる。この結果はTable 3 に示してある。

Sephadex G-200ゲルろ過による各画分のテンプレート活性を示したのが Table 4 の結果である。すべての画分が、アミノ酸のとりこみに対して、促進効果をもつことを示している。ここで注目されるのは、比較的高分子の r-RNA は、反応時間に比例してアミノ酸のとりこみを増加せしめるのに対し、低分子の r-RNA では、60分前後でとりこみが最大になることである。低分子 r-RNA の構造が不安定で長時間の反応では、活性を失うのか、あるいは低分子なるが故に、反って反応性に富み早い時期にアミノ酸のとりこみが極大値に達するのか、何れかの原因によるものと推察される。

一般に、たんぱく質合成系では、メタル・イオン特にマグネシウムの重要性がよく知られている<sup>19)</sup>。核酸は、RNA, DNA 共にマグネシウムとは強い親和力

Table 3. Effect of temperature on template activity of RNA from rat liver ribosomes

	<sup>14</sup> C-L-Leucine incorporation (cpm/mg of S-30 protein)			
	Incubation at 20°C		Incubation at 37°C	
	60 min.	90 min.	60 min.	90 min.*
Crude r-RNA **	2406	2414	5636	7640
Fraction II **	2542	2598	5282	6186
Endogenous activity	2514	2734	4446	6126

\* Incubation time.

\*\*In the reaction mixture, 200 μg of RNA was added.

Table 4. Template activity of RNA fractionated by gel filtration

r-RNA fraction (150 μg)	<sup>14</sup> C-L-Leucine incorporation (cpm/mg of S-30 protein)		
	Incubation time (min.)		
	30	60	90
Fraction I	778	1886	2080
" II	656	1582	1982
" III	886	2190	2266
" IV	978	1996	2070
" V	876	1982	1922
" VI	848	2166	2132
" VII	984	1778	2050
Endogenous activity	548	778	1312

Table 5. Template activity of RNA after EDTA treatment

r-RNA (300 μg)	<sup>14</sup> C-L-Leucine incorporation (cpm/mg of S-30 protein)	
	Incubation time (min.)	
	60	90
Crude r-RNA	2254	3778
Crude r-RNA treated with EDTA	3104	3558
Fraction II	2370	2784
Fraction II treated with EDTA	1424	2084
Endogenous activity	1042	1112

を有し、リボソームにおいても、その構造保持のためにマグネシウムは必須のものである。そこで、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) で、r-RNA を処理することによって結合あるいは混在している微量の金属イオンを除去してテンプレート活性におよぼす影響を検討した結果が以下の通りである。EDTA 処理は r-RNA を終濃度 50mM Tris-HCl (PH 7.8),

0.3 mM EDTA, 50mM KCl となるように調整した溶液に溶解したのち、50mM Tris-HCl (PH 7.8) に対して 120 分、3 回透析するという条件により行った。Table 5 の結果は、予備的に行ったものであるが、粗 r-RNA では、EDTA 処理によって 60 分の反応では、著しくとりこみが促進されるのに対し、画分 II では、むしろ EDTA 処理によってその活性は減少

Table 6. The effect of treatment of RNA with EDTA on template activity

r-RNA (150 μg)	<sup>14</sup> C-L-Leucine incorporation* (cpm/mg of S-30 protein)	
	non-treated	EDTA-treated
	Fraction I	1474
" II	1576	1410
" III	2204	1904
" IV	2304	4387
" V	1900	2109
" VI	1496	1642
" VII	1260	2032
Endogenous activity	1224	1224

\*All tubes were incubated for 60 minutes.

している。90分の反応では、粗 RNA もその活性は無添加に比較して減少している。そこで反応時間を60分に限定して、各 RNA 画分の EDTA 処理の効果を検討した結果を Table 6 に示す。分子量の一番大きい画分 I の r-RNA は、EDTA 処理により活性の増加を示したが、画分 II, III の r-RNA は若干活性の低下を来した。それに対し、比較的 low molecular weight と考えられる画分 IV~VII は、すべて EDTA 処理によって、活性の増加を来した。特に Fig. 1 の図では、ほとんどピークとしては認められない画分 IV が著しい活性の増加を示しているのは、注目に値する。比較的高分子の r-RNA が EDTA 処理によって活性の低下を来すのは、多分これら RNA とマグネシウム・イオンなどによって結合していた mRNA がはずれるのか、高次構造が金属イオンを失うことによって、不安定になったためであろう。これに対して、低分子 RNA の EDTA 処理による活性増加は、構造変化がむしろ *E. coli* S-30 系に対して、より適した形態をとったものと考えられるが、詳細については更に検討する必要がある。

EDTA 処理前後の各 r-RNA の紫外吸収パターンには、特記すべき変化は認められなかった。

以上、ラット肝 r-RNA について、大腸菌系を用いて、テンプレート活性を検討したが、上記結果は、いずれの r-RNA 画分にもテンプレート活性が存在することを示唆している。近年 C. E. Zomzely<sup>9)</sup> らは、ラット脳組織を用いて、ポリゾームよりテンプレート活性を示す RNA を単離し、同じラット脳リボゾームの系を用いて研究を行っている。ラット肝リボゾームより単離した RNA のテンプレート活性は、現在本報告および A. Girolamo<sup>10)</sup> や J. M. Hill<sup>8)</sup> の研究もすべて、大腸菌を用いる heterogenous な系で測定されているが、ラット肝リボゾームを用いる homologous な系で、これらの研究を行うのが、今後に残された課題であろう。

本研究遂行にあたり、大腸菌 K-12 株を分与いただいた京都大学化学研究所、左右田健次氏、放射能測定に際し、多大の御便宜を与えていただいた京都大学食糧科学研究所、松下雪郎氏、森友彦氏に深く謝意を表するものである。

#### 引用文献

- 1) "Advances in Protein Chemistry" vol. 27 ed. by C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, Acad. Press, New York, 1973, p. 213.
- 2) "Ann. Rev. Biochem." vol. 40 ed. by E. E. Snell, Ann. Rev. Inc., Palo Alto, Calif., 1971, p. 409.
- 3) "Ann. Rev. Biochem." vol. 42 ed. by E. E. Snell, Ann. Rev. Inc., Palo Alto, Calif., 1973, p. 397.
- 4) K. Moldave, F. Ibuki, P. Rao, M. Schneir, L. Skogerson and R. P. Sutter, "Regulatory Mech. for Protein Syn. in Mammalian Cells", Acad. Press, New York, 1968, p.191.
- 5) "Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biology" vol. 7 ed. by J. N. Davidson and W. E. Cohn, Acad. Press, New York, 1967, p. 231.
- 6) T. Mori, F. Ibuki, S. Matsushita and T. Hata, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 607 (1968).
- 7) T. Mori, F. Ibuki, S. Matsushita and T. Hata, Agr. Biol. Chem., **33**, 1229 (1969).
- 8) J. M. Hill and E. Bresnick, Arch. Biochem. Biophys., **146**, 403 (1971).
- 9) C. E. Zomzely, S. Roberts and S. Peache, Proc. Natl. Acad. Sci., **67**, 644 (1970).
- 10) A. Girolamo, M. Girolamo, S. Gaetani and M. A. Spadoni, European J. Biochem., **1**, 164 (1967).
- 11) "Methods in Enzymology" vol. 12, part A ed. by L. Grossman and K. Moldave, Acad. Press, New York, 1967, p. 478.
- 12) K. S. Kirby, Biochem. J., **64**, 405 (1956).
- 13) S. Matsushita and F. Ibuki, Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., **22**, 44 (1960).
- 14) "核酸実験法" 共立出版社, 1966, p. 113.
- 15) "Methods in Enzymology" vol. 6 ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Acad. Press, New York, 1963, p.17.
- 16) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 17) J. D. Mandell and A. D. Hershey, Anal. Biochem., **1**, 66 (1960).
- 18) 伊吹文男, 化学, **22**, 915 (1967).

### Summary

Template activity and several fundamental properties of RNA from rat liver have been studied. Experiments were performed with RNA which was extracted from the ribosomes with phenol methods and precipitated with addition of ethanol as potassium salt. This RNA has been separated into seven fractions by gel filtration on Sephadex G-200.

Base composition of RNA preparation was determined with the chromatography of the alkaline hydrolysates on a Dowex 1 column. The base ratios A/U of 1.32 and G/C of 2.52 have been obtained. This result demonstrates that hydrogen bond makes relatively small contribution to the configuration of RNA.

The cell free amino acid incorporating

system from *E. coli* K-12 (S-30 fraction) was used to test the template activity of the fractionated RNA. All the RNA fractions obtained from rat liver ribosomes had the template activities. The incorporation of amino acid into protein proceeded with reaction time and was almost proportional to the concentration of RNA added. The effect of treatment of RNA fraction with EDTA on template activity was investigated. It is very interesting phenomenon that the EDTA treatment enhanced the template activity in the case of relatively low molecular RNA fractions while the same treatment resulted in the decreased activity for the high molecular RNA.