

白ネズミ顎下腺遊離核に於ける RNA- ポリメラーゼ活性について

野 原 広 美

新潟大学歯学部口腔生化学教室

(昭和46年10月10日受付)

On the Activity of RNA-Polymerase in Nuclei Isolated
from Rat Submaxillary Gland

Hiroyoshi NOHARA

Department of Oral Biochemistry, Niigata University School of Dentistry

4種のスクレチッド-三-リン酸 (ATP, GTP, CTP, UTP) よりデオキシ・リボ核酸 (DNA) の塩基配列と相補的なリボ核酸 (RNA) を合成する酵素, RNA ポリメラーゼ (nucleoside triphosphate: RNA nucleotidyl-transferase) は1960年, Weiss¹⁾ により始めて DNA および蛋白質との複合体として白ネズミ肝から分離され, “aggregate enzyme” と呼ばれた。この酵素の活性は DNA と結合して存在する種々の物質即ち塩基性蛋白であるヒストン²⁻⁷⁾, 酸性蛋白⁷⁻¹²⁾ および RNA¹³⁻¹⁷⁾ により制御されることが知られている。従って, 種々の組織に於ける本酵素の活性の強さをしるためには, これ等諸因子を可及的に自然の状態のまま調製することが前提条件になる。この意味から, 無きづな核を調製し, その酵素活性を測定することは有意義と考えられる。一方 Widnell と Tata¹⁸⁾ は白ネズミ肝から分離した核の RNA-ポリメラーゼ活性に2種類あることを発見した。即ち低イオン強度で Mg⁺⁺ 存在の下では, グアニン及びシトシンの多い RNA (GC-rich RNA) が合成され, 0.4M硫酸アンモニウムおよび Mn²⁺ の存在下ではアデニン及びウラシルの多い RNA (AU-rich RNA) が合成されることを見出した。

更に Pogo 等¹⁹⁾ および Maul と Hamilton 等²⁰⁾ はラヂオ・オートグラフィを用い, 低イオン強

度での GC-rich RNA は核小体で, 高イオン強度での AU-rich RNA は核質で合成されることを証明した。このように, 有核細胞の核においては GC-rich RNA 即ちリボゾーム型 RNA は核小体の RNA ポリメラーゼにより, 又 AU-rich RNA 即ちメッセンジャー型 RNA は核質の酵素により合成されることが推定されていたが, 最近これが Roeder と Rutter 等²¹⁾ により証明された。

細胞の遺伝情報発現の第一段階としての DNA の転写即ち RNA 合成の研究は, 種々のホルモンの作用機構の研究と関連して, 肝, 骨髄, 副腎, 甲状腺, 子宮等に於いて活発に行われているが, 口腔領域に於けるこの種の研究は少い²²⁾。しかし, Selye 等²³⁾ によりイソプロテレノール (isoproterenol, 1-[3', 4'-Dihydroxy-phenyl]-2-isopropylaminoethanol) の注射により白ネズミの唾液腺が特異的に肥大することが発見されて以来, 細胞分裂を供う増殖系のモデルとして核酸代謝の研究の対象となって来た²⁴⁻²⁶⁾。Barka²⁷⁾ は isoproterenol の注射により唾液腺における ³H-uridine の取込みが増加することを報告しているが, Baserga と Heffler 等²⁸⁾ はそれはプールの大きさの変動によるとしており, イソプロテレノールの RNA 合成に対する効果は明らかでない。このような問題を解決するには in vitro の研究を待つ外ない。そこで著者は, 白ネズミ顎下腺か

ら核を分離し、直接その RNA-ポリメラーゼ活性を調べることを企てこれに成功し、若干の知見をえたので報告します。

実験材料および方法

試 薬

^{14}C -ATP (50mci/m mol), ^{14}C -UTP (51mci/m mol) は The Radiochemical Centre, Amersham より、イソプロテロール (DL-isoprote-renol), トライトン (Triton N-101) 及び仔牛胸腺 DNA は Sigma Chemical Company より得、その他の試薬は reagent grade のものを用いた。

動 物

白ネズミは体重 140-160g の牝を用いた。イソプロテロールは蒸留水 1ml 当り 24mg の割にとかし、体重 100g 当り 24mg を注射した。

顎下腺核の調整

顎下腺は多量のムチンを含み純粋な核の調製は困難であるが、Stein と Baserga²⁹⁾等の Triton N-101 を用いる方法を少し改良し一応或程度純粋な核を高収量に得ることが出来た。顎下腺剔出後の操作はすべて 4°C 以下でおこなった。

剔出した顎下腺は鋏で細かく刻み、約 4 倍量の 0.32M sucrose, 0.002M MgCl_2 , 0.005M mercaptoethanol を含む液 (メヂウム A) を加え、テフロン・ホモジェナイザーで 10 往復ホモジェナイズした。このホモジェネートを 600g, 5 分の遠心で沈澱させ、約 8ml のメヂウム A に懸濁した。この遠心洗滌を 5 回繰り返した後、沈渣を 1% トライトン N-101 を含むメヂウム A で遠心洗滌した。この沈渣を 1% トライトン N-101 を含むメヂウム A に懸濁し、15 分間扱はんした後、二重の約 200 メッシュのナイロンの布で口過した。この口液を遠心し、更にメヂウム A で 2 回洗滌した後、0.25M sucrose, 1mM MgCl_2 , 5mM mercaptoethanol 液に顎下腺 1.5g 当り 0.5ml の割に懸濁した。肝の核も全く同様に調整した。

反応条件および分析

Widnell と Tata 等の方法¹⁸⁾を基本とし、そのマイクロ化を図り又種々条件を検討した結果、最終的に次のようになった。

低イオン強度— Mg^{2+} 系の反応液

1M Tris (pH 8.5) 0.025ml, 2M KCl 0.010ml, 0.1M MgCl_2 0.013ml, 5mM ATP, GTP, CTP 混液 0.021ml, 0.5mM UTP 0.010ml, ^{14}C -UTP 0.1 μci , 0.5M KF 0.006ml, 0.1M phosphoenolpyruvate 0.010, 1.25mg/ml pyruvate kinase 0.010ml, 核液 0.080ml, 全量 0.25ml.

0.4M 硫酸アンモニウム— Mn^{2+} 系の反応液

1M Tris (pH 7.5) 0.025 ml, 3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.033ml, 0.05M MnCl_2 0.010ml, 5mM ATP, GTP, CTP 混液 0.021 ml, 0.5 mM UTP 0.010ml, ^{14}C UTP 0.1 μci , 0.5M KF 0.006ml, 0.1M phosphoenol pyruvate 0.010ml, 1.25mg/ml pyruvate kinase 0.010ml, 核液 0.080ml, 全量 0.25ml.

インキュベーションは 37°C, 15 分間、ゆるやかに振とうしながら行った。反応は 0.2M ピロリン酸 0.1ml および 5% トリクロール醋酸 4 ml を加えて停止させた。0°C, 30 分放置後、沈渣を東洋口紙会社製グラスフィルター (GA-100) 上に集め、これを約 20ml の 5% トリクロール醋酸—0.02M ピロリン酸液で洗滌し、乾燥後 ガスフロー・カウンターでその放射活性を測定した。

リボヌクレアーゼ・インヒビター (RN-ase inhibitor) の調製

(RN-ase inhibitor) は白ネズミ肝より Shortman³⁰⁾の方法により調整し、その DEAE-セルローズ分画を用いた。

DNA の定量

DNA は Schneider³¹⁾の方法に従って、仔牛胸腺 DNA をスタンダードとして定量した。

結 果

反応条件の検討

白ネズミ顎下腺は小さくかつ又純度のよい核を高収量に得ることは困難である。著者は Triton N-101 を用いる方法により、一応或程度の純度をもった核を比較的高収量に得ることが出来た。しかし、それにもかかわらず、十分な核が得られないので、可及的に反応系を縮小させ、かつ標識ヌクレオチド-三-リン酸の濃度を低下させ感度を上げることにより、その RNA ポリメラーゼ活性の

測定を可能にした。

KCl, KF, 燐エノールピルビン酸-同キナーゼ (PEP-PK-ase) の影響

等張の蔗糖を 0.08M KCl に置きかえることにより 25% の活性の上昇が見られ, 明らかに K^+ の必要性が認められた (表 1)。又クレオチッド-三-燐酸 (XTP) の分解に関係があると考えられる燐酸分解酵素の阻害剤である F^- の添加も有効であることが認められた。XTP の再生系である PEP-PK-ase 系も有効であった。

Table I.

Effects of phosphoenolpyruvate-pyruvate kinase and KF on the incorporation of ^{14}C -ATP.

The incubation mixture for complete system A contained, in 0.25 ml, 25 μ moles of Tris buffer (pH 8.5), 1.3 μ moles of $MgCl_2$, 5m μ moles of each of ATP, GTP, CTP and UTP, 0.1 μ c of ^{14}C -ATP, 20 μ moles of KCl, 3 μ moles of KF, 1 μ moles of phosphoenol pyruvate (PEP), 12.5 μ g of pyruvate kinase (PK-ase) and 0.8 ml of nuclear solution.

The incubation mixture for complete system B was the same as that of complete system A, except that 25 μ moles of Tris buffer (pH 7.5), 100 μ moles of $(NH_4)_2SO_4$ and 1 μ moles of $MnCl_2$ were added in place of Tris buffer (pH 8.5), KCl and $MgCl_2$, respectively. Incubated at 37°C for 15 min. For assay conditions, see Text.

Exp. No.	reaction composition	p moles of ^{14}C -ATP incorporated
3	Complete system A	3.6
3	Minus KCl, plus sucrose	2.9
4	Complete system A	5.4
4	Minus KF	4.8
4	Minus PEP-PK-ase	4.4
3	Complete system B	10.1
3	Minus PEP-PK-ase	9.6
3	Minus PEP-PK-ase, KF	8.1

ATP, GTP および CTP の濃度の影響

基質濃度, 特にプリン・ヌクレオチッド-三-燐酸の濃度が RNA 合成の初期の段階即ち initiation の速度を決定する因子であることが認められているので³²⁾, 標認 XTP (UTP) 以外の 3 XTP の濃度の影響を調べた。表 2 に示したように 400mM 以上の 3 XTP の濃度が至適であることが分った。

Table II.

Effects of various amounts of ATP, GTP and CTP on the incorporation of ^{14}C -UTP.

Reaction mixtures for system A and B were the same as those of Table I, except that the given amount of ATP, GTP and CTP and 0.1 μ c of ^{14}C -UTP in place of ^{14}C -ATP were added. For other conditions, see Table I.

Concentration of each of ATP, GTP and CTP added (μ M)	p moles of ^{14}C -UTP incorporated	
	System A Exp. 6	System B Exp. 9
20	4.5	7.8
60	4.6	7.8
120	5.6	10.1
220	6.0	10.1
420	6.7	11.4
620	6.5	-

pH の変化の影響

至適 pH を求めるため, 低イオン強度— Mg^{2+} 系および高イオン強度— Mn^{2+} 系の RNA ポリメラーゼ活性を種々の pH で測定した結果が表 3 に示してある。低イオン強度— Mg^{2+} 系では, pH 7 から 8.5 まで, pH の上昇と共に活性の上昇が認められ pH 9.0 ではやや減少の傾向が見られた。この結果は白ネズミ肝における Widnell と Tata¹⁸⁾ の結果と一致している。高イオン強度— Mn^{2+} 系のポリメラーゼ活性は pH 7.0 で低いのみで pH 7.5 - 9 の間では変化がなく, Widnell と Tata 等¹⁸⁾ の

Table III.

Effect of pH on the incorporation ^{14}C -UTP.

Reaction mixtures for system A and B were the same as those of Table II, except that 55 m μ moles of each of ATP, GTP and CTP and the buffer adjusted to the indicated pH were added.* 0.1 M K-phosphate buffer was used. For other conditions, see Table I.

pH	p moles of ^{14}C -UTP incorporated	
	System A Exp. 7	System B Exp. 8
7.0*	3.2	8.1
7.5	3.6	10.5
7.9	4.6	9.8
8.5	6.9	10.5
9.0	6.1	10.7

Table IV.

Effect of the concentration of Mg^{2+} on the incorporation of ^{14}C -UTP.

Reaction mixture was the same as that of system A in Table III, except that Tris buffer (pH 8.5) and the given amount of $MgCl_2$ were added.

Concentration of Mg^{2+} (mM)	p moles of ^{14}C -UTP incorporated
0.5	3.3
1.0	3.3
2.0	3.5
4.0	3.6
8.0	4.3
16.0	4.3

pH 8 以上で pH の上昇に従い活性が減少している結果と異っている。この違いは、組織の相違によるものかあるいは核の調製法が異なるためであろう。何れにしても至適 pH は低イオン強度— Mg^{2+} 系の場合は 8.5, 高イオン強度— Mn^{2+} 系の場合は 7.5 であることは肝の場合に一致している。

Mg^{2+} 濃度の影響

低イオン強度— Mg^{2+} 系における Mg^{2+} 濃度の影響を検索した結果, 8–16mM が至適であることが分った (表4)。Widnell と Tata 等¹⁸⁾ は白ネズミ肝遊離核を用い, 6mM が至適であり 10mM では活性が低下することを認めている。一方 Meisler と Tropp 等³³⁾ は同じく肝遊離核を用い, 12mM $MgCl_2$ が至適であると報告しており, 著者の結果と一致している。

著者の実験で, Mg^{2+} 濃度の変化による活性の変化が少いことは Meisler と Tropp 等と同様核を 1 mM $MgCl_2$ を含む液に懸濁していることによると考えられる。

Mn^{2+} 濃度の影響

高イオン強度— Mn^{2+} 系における至適 Mn^{2+} 濃度は 2–4 mM で肝 RNA ポリメラーゼに対する Widnell と Tata 等¹⁸⁾ の結果と一致している (表5)

顎下腺および肝遊離核 RNA ポリメラーゼ活性の比較

上述の実験結果を基にして構成した至適の反応液組成を用い, 顎下腺および肝の RNA ポリメラ

Table V.

Effect of the concentration of Mn^{2+} on the incorporation of ^{14}C -UTP.

Reaction mixture was the same as that of system B in Table III, except that Tris buffer (pH 7.5) and the given amount $MnCl_2$ were added.

Concentration of Mn^{2+} (mM)	p moles of ^{14}C -UTP incorporated
0.5	6.4
1.0	7.4
2.0	7.6
4.0	6.4
8.0	6.2
16.0	6.2

ーゼ活性を比較した結果は表6に示してある。

先づ, 低イオン強度— Mg^{2+} 系の場合であるが, 顎下腺核の活性は DNA の重量(mg)当りで表わすと肝核のその約1/2であるが, 原組織の重量(g)当りで表わすと肝核のその約1/7となる。このように顎下腺核の低イオン強度— Mg^{2+} 系 RNA ポリメラーゼ活性は肝核のそれに比して弱い。尚原組織の重量当りの活性は同一組織でもかなりの変動を示すが, これは DNA 当りで表わした活性が割合一定した値を示すことを考えると, 核の収量がその都度変動する為と推察される。

肝上清から調整した RN-ase inhibitor を添加した所, 顎下腺核, 肝核共にその活性が約2倍に増加した。このことは, 著者の得た顎下腺核および肝核が大略同程度のリボヌクレアーゼを持っていることを示している。

高イオン強度— Mn^{2+} 系に於いては, 顎下腺核の活性は DNA の重量当りでは肝のその約1/3~1/4 であるが, 原組織の重量当りでは 1/8~1/9 になっている。この場合にもやはり低イオン強度— Mg^{2+} 系の場合と同様, 原組織の重量当りで表わされた顎下腺核の活性は DNA の重量当りで表わされたそれより低値を示している。

高イオン強度— Mn^{2+} 系においては, 顎下腺核および肝核のポリメラーゼ活性は RN-ase inhibitor の影響をうけなかった。

イソプロテレノール注射白ネズミ顎下腺核の RNA ポ

Table VI.

RNA polymerase activities in nuclei isolated from submaxillary gland and liver.
Reaction conditions were the same as those described in Text, except that on occasion 123 μ g of ribonuclease inhibitor was included in the incubation mixture.

Incubation conditions	Ribonuclease inhibitor	Exp. No.	p moles of 14 C-UTP incorporated	
			per mg of DNA of isolated nuclei	per g of original tissue
Submaxillary gland nuclei				
Mg $^{2+}$ activated in the absence of ammonium sulphate	Minus	13	34.2	11.6
		15	28.6	22.2
		16	28.2	17.0
	Plus	13	46.1	15.6
		15	60.5	56.2
		16	58.6	36.0
Mn $^{2+}$ activated in the presence of ammonium sulphate	Minus	13	113.0	38.4
		15	138.0	107.0
		16	143.0	89.0
	Plus	13	123.0	42.0
		15	128.0	100.0
		16	133.0	82.0
Liver nuclei				
Mg $^{2+}$ activated in the absence of ammonium sulphate	Minus	13	59.6	82.0
		15	70.2	130.0
		16	84.2	140.0
	Plus	13	116.0	163.0
		15	132.0	242.0
		16	146.0	250.0
Mn $^{2+}$ activated in the presence of ammonium sulphate	Minus	13	414.0	576.0
		15	448.0	826.0
		16	503.0	860.0
	Plus	13	408.0	560.0
		15	394.0	726.0
		16	365.0	620.0

リメラーゼ活性

Barka²⁷⁾ はイソプロテレノール注射後18時間で in vivo における 3 H-ウリジンの核 RNA への取り込みが最大になると報告している。そこで、イソプロテレノール注射18時間後、顎下腺をとり出し、その核の RNA ポリメラーゼ活性を測定した。

表7に示すように、イソプロテレノール注射白ネズミにおいては、低イオン強度—Mg $^{2+}$ 系のポリメラーゼ活性は顎下腺と肝で大略同値を示したが、高イオン強度—Mn $^{2+}$ 系の活性は肝のそれが高値を示した。表6との比較から、イソプロテレノールの注射により、顎下腺核の低イオン強度—Mg $^{2+}$ 系のポリメラーゼ活性は増加しているが、高イオン強度—Mn $^{2+}$ 系のそれは影響が認められ

ないことが分る。一方肝核の活性は両系共むしろ減少の傾向がみられた。

尚顎下腺核の低イオン強度—Mg $^{2+}$ 系の活性に対する RN-ase inhibitor の促進効果は低下の傾向を示していることがうかがえた。

考 察

この研究は Triton N-101 を用いて顎下腺から調製した核が RNA ポリメラーゼ活性を持つことを示し、且その性格を或程度明らかにした。

エネルギーの再生系、磷酸分解酵素の阻害剤、或濃度以上の基質、適当な pH、及び適量の Mg $^{2+}$ 又は Mn $^{2+}$ 等の2価陽イオン等の必要性が研究されたが、基本的には動物核のモデルとされている肝核のそれと一致していた。

Table VII.

Effects of isoproterenol on the RNA polymerase activities of nuclei isolated from submaxillary gland and liver. For conditions, see Table VI.

Incubation conditions	Ribonuclease inhibitor	Exp. No.	p moles of ^{14}C -UTP incorporated / mg of DNA of isolated nuclei
Submaxillary gland nuclei			
Mg $^{2+}$ activated in the absence of ammonium sulphate	Minus	19	43.0
		21	46.4
	Plus	19	67.4
		21	67.6
Mn $^{2+}$ activated in the presence of ammonium sulphate	Minus	19	111.0
		21	136.0
	Plus	19	111.0
		21	139.0
Liver nuclei			
Mg $^{2+}$ activated in the absence of ammonium sulphate	Minus	19	42.0
		21	46.0
	Plus	19	87.0
		21	100.0
Mn $^{2+}$ activated in the presence of ammonium sulphate	Minus	19	282.0
		21	339.0
	Plus	19	306.0
		21	344.0

顎下腺核の低イオン強度—Mg $^{2+}$ 系のRNAポリメラーゼ活性即ちリボゾーム型RNAの合成能(遊離核のDNAのmg当り)¹⁸⁾は肝核のその約1/2であった。一方、高イオン強度—Mn $^{2+}$ 系のポリメラーゼ活性即ちメッセンジャー型RNAの合成能¹⁸⁾は、顎下腺核においては肝核の約1/3~1/4であった。これ等の結果は、顎下腺核のRNA合成能は肝のそれに比して一般にかなり低いが、リボゾーム型RNAよりも特にメッセンジャー型RNAのポリメラーゼ活性の低調なことを示唆している。然し、ここで注意しなければならないことは著者の肝核リボゾーム型RNAポリメラーゼ活性がWidnellとTata¹⁹⁾およびMeislerとTropp³³⁾等のそれに比し相当低値を示していることである。この相違は、高イオン強度—Mn $^{2+}$ 系での活性が上述の研究者とほぼ一致していること、又高濃度の硫酸アンモニウムがRN-ase活性をほぼ完全に抑えること³³⁾等を考えると、著者のTriton N-101を用いる方法で得た核が多量のRN-aseを含むことによると推察される。RN-ase inhibitorの添加により、リボゾーム型RNAポリメラーゼ活性が約2倍に増加したことは、この考えとよく

符合する。しかしRN-ase inhibitorの添加により顎下腺核および肝核のポリメラーゼ活性がほぼ同じ程度増強されたことは、完全にRN-ase活性が抑えられなかったとしても、顎下腺核においては肝核に比して、メッセンジャー型RNAのポリメラーゼ活性がリボゾーム型RNAのそれに対し相対的に低いという上述の推察を許すであろう。

顎下腺核の低イオン強度—Mg $^{2+}$ 系におけるRNAポリメラーゼ活性は肝核のそれに比し、遊離核のDNAのmg当りとして表わした場合は約1/2であるが原組織の重量当りとして表わすと約1/7となる。同様に、顎下腺核および肝核の高イオン強度—Mn $^{2+}$ 系の活性の比はDNAのmg当りで表わした場合は1/3-1/4であるが、原組織の重量当りで表わした場合は約1/10となる。これ等の結果は、顎下腺組織は肝のそれに比し核を少量しか含まないことを示している。尚この場合、核の収量は考慮に入れるべきであろう。

イソプロテレンール注射18時間の白ネズミ顎下腺核のRNAポリメラーゼ活性は、低イオン強度—Mg $^{2+}$ 系において約1.5倍の増加を示したが、高イオン強度—Mn $^{2+}$ 系においては変化を示さな

かった。本実験は充分量の基質を含んだ系で行っているので、Baserga と Heffler²⁸⁾の主張している如く基質のプールの変動を考慮する必要はない。尚イソプロテレノール投与の場合、RN-ase inhibitor の添加による低イオン強度—Mg²⁺系の活性の増加が少いことは、イソプロテレノールの効果が RN-ase の活性を低下させることに関連している可能性を暗示している。種々のホルモン即ち成長ホルモン、コルチゾン、エストラジオール、テストステロンが等が、その生理作用を発現する前に、それぞれの標的器官の低イオン強度—Mg²⁺系の RNA ポリメラーゼ活性を著明に促進すること²²⁾は、本研究に於いてイソプロテレノールの注射により、顎下腺の低イオン強度—Mg 系のポリメラーゼ活性が増強された事実と合せ考え興味深い。

要 約

白ネズミ顎下腺遊離核を用い、その RNA ポリメラーゼの諸性質を低イオン強度—Mg²⁺系および高イオン強度—Mn²⁺系で研究した。

肝に比し、顎下腺の RNA ポリメラーゼ活性は一般に低いが、特にメッセンジャー型 RNA ポリメラーゼ活性の低いことが認められた。

イソプロテレノールの注射により、顎下腺のリボゾーム型 RNA ポリメラーゼ活性の増加が認められた。

文 献

- 1) Weiss, S. B.: Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the internucleotide linkage of ribonucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **46**: 1020-1030, 1960.
- 2) Huang, R. C. and Bonner, J.: Histone; A suppressor of chromosomal RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**: 1216-1222, 1962.
- 3) Bonner, J. and Huang, R. C.: Properties of Chromosomal Nucleohistone. *J. Mol. Biol.*, **6**: 169-174, 1963.
- 4) Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: Evidence for the complete DNA-dependence of RNA synthesis in isolated thymus nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**: 1590-1596, 1962.
- 5) Allfrey, V. G., Littau, V. C. and Mirsky, A. E.: On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**: 414-421, 1963.
- 6) Barr, G. C. and Butler, J. A. V.: Histones and gene function. *Nature*, **199**: 1170-1172, 1963.
- 7) Hnilica, L. S.: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol. 7: p. 25-106, Academic Press, 1967.
- 8) Butler, J. A. V.: Role of histones and other proteins in gene control. *Nature*, **207**: 1041-1042, 1965.
- 9) Langan, T. A.: Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis, *BBA Library*, Vol. 10: p. 233-242, Elsevier Publishing company, 1967.
- 10) Wang, T. Y.: Restoration of histone-inhibited DNA-dependent RNA synthesis by acidic chromatin proteins. *Exp. Cell Res.*, **53**: 288-291, 1968.
- 11) Splesberg, T. C. and Hnilica, L. S.: The effect of acidic proteins and RNA on the histone inhibition of the DNA-dependent RNA synthesis in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **195**: 63-75, 1969.
- 12) Gilmour, R. S. and Paul, J.: RNA transcribed from reconstituted nucleoprotein is similar to natural RNA. *J. Mol. Biol.*, **40**: 137-139, 1969.
- 13) Frenster, J. H.: Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of ribonucleic acid. *Nature*, **206**: 680-683, 1965.
- 14) Frenster, J. H.: A model of specific de-repression within interphase chromatin. *Nature*, **206**: 1269-1270, 1965.
- 15) Huang, R. C. and Bonner, J.: Histone-bound RNA, A component of native nucleohistone. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**: 960-967, 1965.
- 16) Shih, T. Y. and Bonner, J.: Chromosomal

- RNA of calf thymus chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, 30-35, 1969.
- 17) Bekhor, I., Kung, G. M. and Bonner, J.: Sequence-specific interaction of DNA and chromosomal protein. *J. Mol. Biol.*, **39**: 351-364, 1969.
- 18) Windnell, C. C. and Tata, J. R.: Studies on the stimulation by ammonium sulphate of the DNA-dependent RNA polymerase of isolated rat-liver nuclei. *Biochim. Biophys. Acta*, **123**: 478-492, 1966.
- 19) Pogo, A. O., Littau, V. C., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: Modification of ribonucleic acid synthesis in nuclei isolated from normal and regenerating liver; Some effects of salt and specific divalent cations. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **57**: 743-750, 1967.
- 20) Maul, G. G. and Hamilton, T. H.: The intranuclear localization of two DNA-dependent RNA polymerase activities. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **57**: 1371-1378, 1967.
- 21) Roeder, R. G. and Rutter, W. J.: Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **65**: 675-682, 1970.
- 22) Tata, J. R.: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol. 5: p. 191-250, Academic Press, 1966.
- 23) Selye, H., Veilleux, R. and Cantin, M.: Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science*, **133**: 44-45, 1961.
- 24) Barka, T.: Induced cell proliferation; The effect of isoproterenol. *Exp. Cell Res.*, **37**: 662-678, 1965.
- 25) Barka, T.: Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. *Exp. Cell Res.*, **39**: 355-364, 1965.
- 26) Baserga, R.: Twenty-first annual symposium on fundamental cancer research, University of Texas M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, p. 261-266, Williams and Wilkins, Baltimore, 1968.
- 27) T. Barka: Stimulation of RNA synthesis in the salivary gland by isoproterenol. *Exp. Cell Res.*, **41**: 573-579, 1966.
- 28) Baserga, R. and Heffler, S.: Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol and its inhibition by Actinomycin D. *Exp. Cell Res.*, **46**: 571-580, 1967.
- 29) Stein, G. and Baserga, R.: The synthesis of acidic nuclear proteins in the prereplicative phase of the isoproterenol-stimulated salivary gland. *J. Biol. Chem.*, **245**: 6097-6105, 1970.
- 30) Shortman, K.: Studies on cellular inhibitors of ribonuclease. I. The assay of the ribonuclease-inhibitor system and the purification of the inhibitor from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 37-40, 1961.
- 31) Schneider, W. C.: *Methods in Enzymology*, Vol. 3: p. 680-684, Academic Press, 1957.
- 32) Anthony, D. D., Zeszotek, E. and Goldthwait, D. A.: Initiation by the DNA dependent RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**: 1026-1033, 1966.
- 33) Meisler, A. I. and Tropp, B. E.: Studies on ribonucleic acid synthesis in nuclei isolated from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **174**: 476-490, 1969.