ハブ毒の研究

2a: ハブ毒中に含まれる蛋白分解酵素について

前野 弘 夫・中 野 正・三 橋 進

群大医学部微生物学教室 (主任 三橋進教授)

小 此 木 丘

群大医学部病理学教室 (主任 川合貞郎教授)

沢 井 芳 男

東大伝染病研究所試験製造室 (主任 沢井芳男助教授)

[受付: 1月25日・1960年]

ハブ咬傷による症状を大別すると全身性のものと咬傷局所とに分けられる。ハブ咬傷の局所の病変の特徴は激しい腫脹と皮下の出血、筋肉の融解、変性壊死である。これらの症状は筋肉質に富む下腿、大腿、前膊等を咬まれた場合特に著しい¹⁻¹¹⁾。

ハブ咬傷による死亡率はハブ毒血清導入以前12%前後に達しておった。明治37年北島博士¹²⁾によつてハブ毒血清療法が行われるようになってから死亡率は2~3%に減少した。しかるに筋肉の変性壊死が激しい為、治療には数カ月要することは稀でなく血清療法によつても不具者の発生率は減少せず、咬傷患者の7%前後を示す現状である。¹³⁾

以上の事実より吾々はハブ咬傷局所の主症状たる筋肉の変性壊死を惹きおこす主因の一つは、ハブ毒中に含まれる蛋白分解酵素^{2) 4) 5) 11)}によるものであらうと考え、この研究に着手した。

ハブ毒中には強い蛋白分解酵素が含まれ、しかも乾燥保存に対し、極めて強いことは前報^{11) 14-16)}に報告した。既に多くの蛇毒には蛋白分解酵素作用のあることが見出されており、¹⁷⁻²¹⁾一つの蛇毒には2種以上の蛋白分解酵素のあることも明らかにされておる。²²⁾⁻²³⁾しかしながら、蛇毒中よりこれら酵素の精製分離は未だ成功しておらず、従つて、蛋白分解酵素が生体に対して如何なる作用を示すかは実験的に明らかにされておらない。たゞKellner ら²⁴⁾によれば結晶トリプシンが家兎に対して強い致死作用を示すことを明らかにしている。

ハブ毒中には、蛋白分解酵素の外に多くの酵素が見出されており、逢坂²⁵⁾は phospholipase A, phosphodiesterase 及び 5'-nucleotidase の存在を明らかにし、澱粉電気泳動

でこれらの酵素を分離確認した。同様に鈴木ら²⁶⁾は、同じハブ毒中に phosphodiesterase, glycerophosphatase 及び 5'-nucleotidase を見出している。しかし局所の病変と、これを惹き起す因子との関連性に関する研究は、これまで全くなされてない。吾々はすでに前報¹¹⁾でハブ毒の示す溶血作用、蛋白分解酵素作用、出血壊死作用及び致死作用に就て述べ、更に新鮮な生毒、凍結乾燥及び保存等によるこれらの活性の比較を報告した。本報においては、蛋白分解酵素を部分的に精製し、このものの若干の酵素学的性質を明らかにしたので報告する。

実験材料および実験方法

ハブ毒: 本実験に使用した毒素は、1942年奄美大島に生存する毒蛇ハブ(*Trimeresurus flavoviridis* Hallowell) から得た毒液を、デシケータ中、塩化カルシウム又は硫酸上で乾燥させたものである。

基質: 0.05M第二磷酸ソーダ溶液に2%になるようにカゼインを溶解して基質として用いた。この溶液の pH は 7.0である。又、金属の影響を調べる時には、カゼ

MAENO Hiroo, NAKANO Tadashi and MITSUHASHI Susumu (Department of Microbiology, School of Medicine Gunma Univ.) Director Prof. S. Mitsuhashi., OKONOGI Takashi (Department of Pathology, School of Medicine, Gunma Univ.) Director Prof. S. Kawai, SAWAI Yoshio: (Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo) Department of Biological Products, Director Dr. Y. Sawai: STU DIES ON HABU SNAKE VENOM. 2a: Enzymic studies on the Protinase of HABU snake venom. —Jap. J. of Bac., 15(8), 740-744, 1960.

インを0.05Mヴェロナル緩衝液にとかし pH 7.3となして使用した。

酵素活性測定及び単位：反応液は 0.25 M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) 0.5 ml, 酵素液 0.5ml 及び 2%カゼイン 1.0 ml を含む。35°C で10分作用せしめた後 0.4Mトリクロル醋酸 2.0 ml を加えて反応を停止し、その濾液 1.0 ml について FolinTMの方法に従って遊離したチロシンを定量した。この反応条件において 1 μ ml のチロシンを生成せしめる酵素量を 1 単位とした。

蛋白の定量：蛋白量はマイクロキューダール法による窒素の定量か又は FolinTMの方法を用いた。

血清及び抗血清：免疫血清は伝染病研究所製の免疫馬血清を用いた。対照の血清としては健康馬血清を用いた。

澱粉電気泳動：支持体には、バレイシヨ澱粉を使用し、5°Cの氷室で行った。

実験結果

蛋白分解酵素の精製：ハブ毒中の蛋白分解酵素の精製を行う為には その酵素活性の測定及び酵素の諸性状を知ることが必要である。従つて、本報においては先ず酵素の部分的精製を試み、この標品による至適 pH, 反応条件等を検討した。精製操作は、全て 0°C にて行つた。ハブ乾燥毒 200mg を 21.5ml の 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し不溶成分を除去し上清に結晶硫酸を加えて分割した。硫酸の飽和度と各分割中に含まれる蛋白分解酵素活性を図1に示した。これで分る様にハブ毒中の蛋白分解酵素は硫酸分割で大きく2つに分けられる。従つて低濃度で沈澱する部分を H α -proteinase, 硫酸飽和度の高い所で沈澱する部分を H β -proteinase と呼ぶことにする。更に精製された標品を得る為に次の方法を試みた。ハブ毒 10 g を 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 400 ml に溶解し遠心して不溶性部分を除去する。上清 (Fraction I) に 126 g の結晶硫酸を加え、生ずる沈澱を同じ磷酸緩衝液 200ml に溶解する (Fraction II)。これに結晶硫酸を加え15~25%飽和度で生ずる沈澱を磷酸緩衝液 (0.05M, pH 7.5) 又は、ヴェロナル緩衝液 (0.05 M, pH 7.5) に溶解する。15,000 $\times$ G, 20分間遠心して得た上清を Fraction III とした。各分割の比活性を表 I に示した。

Fraction III を更に澱粉電気泳動にかけた。泳動図を図2に示した。この Fraction III を用いて以下の諸性状を調べた。

酵素濃度の影響：前に述べた条件で酵素活性と酵素濃

図1 硫酸の飽和度とこれによつて沈澱する蛋白分解酵素活性との関係

表1 各分割の蛋白分解酵素の比活性

割 分	比活性 (単位/mg窒素)
I	2.18
II	1.32
III	6.50

図2 F-III の Zone Electrophoresis

泳動条件は本文記載

- 蛋白消化酵素活性
- 蛋白質量

度との関係を調べ、その結果を図3に示した。即ち酵素蛋白の窒素濃度が約0.25mg 以下の濃度では活性と酵素濃度との間に直線関係がみられた。

反応速度：図4に示した様に、上記測定条件では最初の15分間は活性と時間との間には直線関係がみられる。

基質濃度：基質濃度と酵素活性の間における関係は表

図 3 酵素量と酵素活性との関係

反応条件本文記載通り

図 4 反応速度に及ぼす EDTA の影響

反応液は $125 \mu\text{mole}$ の磷酸緩衝液 (pH 7.3), 0.24 mg の酵素蛋白窒素及びカゼイン 20 mg を含む。反応液の全容は 2.0 ml である。

曲線 I EDTA を添加せず。

曲線 II 反応開始 10 分後に EDTA を終末濃度 $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ になるように加えた。

曲線 III 反応開始前に EDTA と酵素を preincubation した。EDTA の濃度は曲線 II のときと同様である。

図 5 蛋白分解酵素活性に及ぼす pH の影響

反応条件は本文記載通り

0.063 M 磷酸バッファー又は

0.013 M ヴェロナールバッファー

を使用した。反応液には酵素の蛋白窒素 0.234 mg を含む。

—●— 磷酸バッファー

—○— ヴェロナールバッファー

表 2 基質濃度の酵素活性に及ぼす影響

基 質 濃 度 (per cent)	酵 素 活 性 遊離チロシン量 (μmole)
1.000	1.17
0.100	0.52
0.050	0.40
0.020	0.20
0.010	0.14
0.005	0.11

反応条件は本文記載通り。反応液には酵素蛋白窒素 0.346 mg を含む。

2 に示した。これより基質濃度が少くとも反応液の 1% 以上であることが必要である。

至適 pH: 磷酸緩衝液, ヴェロナール緩衝液を用いて酵素作用に及ぼす pH の影響を調べた。図 5 に示した如くいずれの緩衝液にても, 至適 pH は 7.8 であった。同一反応条件では, 磷酸緩衝液の方がヴェロナール緩衝液よりも活性が高い。

図6 正常血清及びハブ抗毒素血清の蛋白分解酵素活性に及ぼす影響

反応条件は本文記載の通り。反応液には酵素 (F-III) の蛋白窒素 0.346 mg を含む。正常血清及びハブ抗毒素血清は 1 ml につき夫々 6.13 及び 7.00 mg の蛋白窒素を含む。

—●— ハブ抗毒素血清
—○— 正常血清

表3 種々なる物質の酵素活性に及ぼす影響

阻 害 剤	阻害度 (per cent)	
	$10^{-3}M$	$5 \times 10^{-3}M$
MgCl ₂		0
ZnCl ₂		35
FeSO ₄		12
BaCl ₂		5
CaCl ₂		8
CuSO ₄		6
KCN		0
NaN ₃		0
Cysteine	70	100
Vitamine C	0	
Monoiodoacetate		0
EDTA	90	100
CoCl ₂		0

反応条件は本文記載通り。反応液には、酵素蛋白窒素 0.2 mg を含む、pH 7.3 のヴェロナールバッファーを用いた。

粗害剤の影響：種々の金属イオン及び薬剤の酵素活性に及ぼす影響を調べた。ヴェロナール緩衝液を用い、添加した薬剤は終末濃度、 $10^{-3}M$ 又は $5 \times 10^{-3}M$ になるように調製した。表3に示す如くシステイン及びEDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) は強い阻害作用を示した。Zn²⁺, Fe²⁺ 及び Cu²⁺等に弱い阻害作用がみられた。又、反応進行中にEDTAを添加すると、ただちに反応は停止しないが、添加直後より反応速度が次第に減少し、約20分後に反応は完全に停止する (図4)。

正常血清及び抗血清の影響：Fraction IIIの活性に及ぼす正常血清及びハブ抗血清の影響を調べた。正常血清及び抗毒素血清 1 ml 中の蛋白窒素は夫々6.13及び7.00mgであつた。図6に示す如く、ハブ抗毒素血清は H α -proteinase に対し強い阻害作用を示した。

討 論

Rao ら²²⁾は、コブラ毒に含まれる蛋白分解酵素は至適 pH が5であることを示し従つて、コブラ毒には、5つの蛋白分解酵素があるとした。吾々は硫酸分画により2つの蛋白分解酵素を分離し得ることを示した。しかし、図1の如く典型的に2つの蛋白分解酵素の山がみられたのは、本乾燥毒のみで、最も新しい凍結乾燥毒は、むしろ逆に0.4—0.5 飽和度のところに一つの山を示すのみである。又ある標品 (1944年採取) では H β -proteinase の山があるが H α -proteinase の山がみられない。これらの事実は恐らくハブ毒を乾燥せしめるときに、凍結乾燥によらないで、塩化カルシウム上で室温で乾燥せしめた為、自己消化を生じた結果か、あるいは各々の proteinase の含量が採取時期又は、ハブにより異なるものとも考えられる。H α -proteinase はEDTA及びシステインにより強く阻害されることを明らかにしたが、H β -proteinase もEDTAにより強く抑制されることが分つた。Deutsch and Dinnig²⁸⁾は cottonmouth moccasin の毒に含まれる蛋白分解酵素は、EDTAにより強く阻害されることを示し、Henriques²⁹⁾は *Borthrop jararaca* の毒に含まれる蛋白分解酵素がEDTAやシステインにより強く阻害されることを示した。かように蛇毒に含まれる蛋白分解酵素はペプシンやトリプシンと異りEDTAによりすべて阻害される様に思われるが、必ずしも阻害されるものばかりとは限らない。例えば、マムシ毒 (*Agkistrodon blomhoffii*) の蛋白分解酵素は、EDTAにより阻害されない³⁰⁾。ハブ毒から分離した H α -proteinase は、未だ均一にはされていないが、この標品が粗毒と同様に極めて強い出血壊死作用を示し病理組織学的には両者の病理組織

像を区別出来ない程類似した症状を呈する事と又粗毒及び H α -proteinase による局所の病変は EDTA により強く抑制されることから筋肉の融解, 変性壊死の本態及び出血の一因は蛋白分解酵素によることを暗示する¹⁰⁾。従って, EDTA は, ハブ咬傷における治療剤としての可能性をもつものと考えられる。

結 論

1. ハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) 毒には, H α -及び H β -proteinase が含まれ, 両者は硫安分画法で分離し得る。

2. H α -proteinase の至適 pH は 7.3 であり, EDTA シスチン及び抗ハブ毒血清により強く阻害される。

3. H α -proteinase についての 種々の 酵素的性質を調べた。

文 献

- 1) 三橋進・前野弘夫・林義次：日本細菌学会関東支部総会, 1957 年 11 月。
- 2) 三橋進・前野弘夫・小此木丘 他：伝研学術集談会, 1958 年 3 月。
- 3) 前野弘夫・三橋進：酵素化学シンポジウム第 10 回(札幌), 1958 年 7 月。
- 4) 三橋進・前野弘夫・小此木丘 他：総合医学, **15**, 19, 1958。
- 5) 三橋進・沢井芳男・小此木丘：東京医事新誌, **75**, 3, 1958。
- 6) 小此木丘・三橋進・沢井芳男：東京医事新誌, **75**, 13, 1958。
- 7) 小此木丘 他：日本病理学会誌, **47**, 471, 1958。
- 8) 三橋進・前野弘夫 他：伝研学術集談会, 1958 年 11 月。
- 9) 小此木丘・山口和夫：伝研学術集談会, 1958 年

11 月。

- 10) 山口和夫：北関東医学, **8**, 145, 1958。
- 11) 三橋進・前野弘夫・沢井芳男・小此木丘：日本細菌学雑誌, **14**, 771, 1959。
- 12) 北島多一：細菌学雑誌, 154 号, 541-556, 明治 41 年 9 月(1908)。
- 13) 内山裕：鹿児島大学医学雑誌, **10**, 303, 昭和 33 年。
- 14) Mitsuhashi, S., Maeno, H. et al.: Japan J. Microbiol., **3**, 95, 1959。
- 15) Maeno, H., Mitsuhashi, S. et al.: Japan J. Microbiol., **3**, 131, 1959。
- 16) Okonogi, T., Mitsuhashi, S., Maeno, H. et al.: Japan J. Microbiol., 印刷中。
- 17) Flexner, S. and Noguchi, H.: Univ. Pennsylvania Med. Bull., **15**, 345, 1902。
- 18) Martin, C. J.: J. Physiol., **32**, 207, 1905。
- 19) Noc, F.: Ann. inst. Pasteur, **18**, 387, 1904。
- 20) Eagle, H.: J. Exptl. Med., **65**, 613, 1937。
- 21) Janszky, B.: Arch. Biochem., **28**, 139, 1950。
- 22) Rao, Shanta, S. and Rao, S. S.: Venoms, The American Association for the Advancement of Science, 1st ed.: p. 179, 1956。
- 23) Handodoan, Z.: ibid., p. 205, 1956。
- 24) Kellner, A. and Robertson, T.: J. Exptl. Med., **99**, 387, 1954。
- 25) Ohsaka, A.: J. Biochem. (Japan), **45**, 295, 1958。
- 26) 鈴木友二・岩永貞昭：薬学雑誌, **78**, 354, 1958。
- 27) Folin, O. and Ciocalteu, V.: J. Biol. Chem., **73**, 627, 1927。
- 28) Deutsch, H. P. and Diniz, C. R.: J. Biol. Chem., 216, 17, 1955。
- 29) Henriques, O. B., Lavras, A. A. C. and Fichman, M.: Biochem. J., **68**, 597, 1958。
- 30) 前野弘夫・三橋進：未発表。