ヒマ毒タンパク質リシン

の構造と毒性

船津 勝, 石黒 正恒

Masaru FUNATSU, Masatsune ISHIGURO

九州大学農学部生物化学教室

タンパク毒素に関する研究は最近著しく進展し、毒素の示す多様な生理活性、毒素自体のタンパク構造、さらに構造と生理活性との関連について多くの知見が得られてきた。植物性タンパク毒素についても、ヤドリギのビスコトキシン(viscotoxin) A₃ の一次構造におけるアミノ酸順列が決定され⁽¹⁾、ヒマのリシン(ricin)に関する研究も、タンパク化学的に純粋な標品としてリシンDが結晶状に単離され、その分子構造が論じられる段階に至った⁽²⁻⁴⁾。

リシンDは6.25%の糖を含み、分子量60,000の酸性糖タンパク質であって、アミノ酸組成は一般植物タンパク質に類似し⁽⁵⁾、D-アミノ酸の存在については明らかでないが、毒ペプチド、たとえばタマゴテングタケのファロイジンなどに見られるような異常アミノ酸⁽⁶⁾は含まれていない。したがって、酵素やタンパク性ホルモンと同様に、毒性はタンパク質の立体構造に依存している生理的活性タンパク質と考えることができ、リシンタンパク質の毒性発現の化学的機構が重要な問題になる。ただ、毒素の場合、その一次反応は何かといういわゆる反応特異性のほかに、臓器親和性、さらに種特異性という問題がある。これらの問題はタンパク構造との関連において考えられなければならない。ホルモンについても同じことがいえるが、酵素の場合には反応特異性のみが問題になるにすぎず、この点、毒素やホルモンの作用の化学機構は酵素よりはるかに複雑である。

微量の毒素やホルモンが顕著な生理作用を呈する機構において、臓器親和性は重要な役割を演じていると考え

ることができる。すなわち、毒素あるいはホルモンタンパク質のもつ臓器親和性によって、これらの生理的活性タンパク質は特定の臓器あるいは組織に集中し、局所的に濃縮されることになる。この濃縮によって、はじめてこれらの生理活性タンパク質は有効に働くものと考えることができる。

リシンのような代謝毒の一次反応に含まれる生化学反応は、必ずしもリシンの標的となる特定の臓器のみに存在するものではなく、生体内に広く存在している反応と考えられ、これに対し、微量の毒素が特定の部分に集中せず、生体内に散逸すると、各所で非常に微弱な障害が起こるだけで、全体として顕著な毒作用の発現は認められないであろう。この意味で、臓器親和性は毒性の発現において重要な意義をもつものと考えることができる。以上のことから、毒素タンパク質の化学修飾は、結果の解釈が酵素の場合ほど簡単ではないといえる。すなわち、一次反応に関係する活性アミノ酸残基と、臓器親和性に関与するアミノ酸残基とは別々である可能性が大きく、しかも上述のように両者とも毒性の発現に重要な役割をもつものと考えられるので、たとえ特異的な化学修飾によって毒素が毒性を喪失しても、修飾されたアミノ酸残基が一次反応、臓器親和性のいずれに関与するものかをただちに決定することは困難である。

以上のように、毒素の構造と毒性という問題の中には、酵素と同じ問題のほかにホルモンと共通する多くの問題が含まれており、毒素は、生理的活性タンパク質として酵素より一層複雑な、興味深い研究対象である。

図 1 ヒマ (*Ricinus communis* L.) 種子

1. 今日までに分離された主なリシン標品と その性質

ヒマ (*Ricinus communis* L.) の種子中に、経口的にも猛毒性を発揮し動物を死に至らしめる、熱に不安定な毒素が含まれていることは古くから知られ、リシンと呼ばれていたが、その本体がタンパク質であることが明らかにされたのは、今世紀初頭に行なわれた Osborne らの研究⁽⁶⁾によるものである。リシンの精製にタンパク化学的方法を適用しうることを示したこの Osborne らの研究は、その後のリシン精製の基礎になり、1つの活性タンパク質としてのリシンの研究が進められた。

しかしながら、リシンの本体がタンパク質であるとする Osborne の見解も、はじめから全面的に受入れられたわけではない。Karrer ら⁽⁷⁾は、リシンが経口的にも毒性を示すことから、高分子のタンパク質そのものが本体であることに疑問をもち、その当時酵素の本態について論議されていた担体説 (Träger Theorie) と同じ考えで、低分子の毒成分が高分子の担体タンパク質に結合している可能性を考えた。これを証明するため、吸着、トリプシン分解による低分子化など種々の方法によって低分子毒成分の分離を試みたが、いずれも成功せず、Osborne の見解を実験的に否定することができなかった。その後、タンパク質研究法が非常に進歩したにもかかわらず、Karrer らの考えを支持する知見はまったく得られていない。

Karrer らの研究の後、約 20 年間リシンの本体につ

いての本格的な研究は行なわれていないが、1947年に主として免疫学との関連においてリシンがふたたびとり上げられ、Kabat ら⁽⁸⁾、Le Breton および Moulé⁽⁹⁻¹²⁾、さらに守山⁽¹³⁾により精製が行なわれ、毒性の本態が追究された。Kabat らが得たリシン標品のリシン B₁ および Moulé が得たリシン Tb の性状は、表 1 に示すとおりである。これらの研究とほとんど時を同じくして、Kunitz および McDonald⁽¹⁴⁾ は、はじめてリシンの結晶化に成功した。表 1 に結晶リシンの性状を示す。以上のリシン標品はいずれも、タンパク質として、また生理活性からみて純粋なリシンとは認められなかった⁽¹⁵⁾。

Kabat ら⁽⁸⁾によれば、リシン B₁ は血清学的には均一なタンパク質とみなすことができるが、毒力は結晶リシン (Cannan ら⁽⁸⁾) の約 2/3 であった。したがって、無毒で同じ免疫反応を示す異種タンパク質が約 1/3 混在しているものと考えられた。さらに、この標品は強い赤血球凝集作用を示し、この作用の強さがリシンの量を知る目安になると考えられた。

Moulé ら⁽⁹⁻¹²⁾が分離したリシン Tb は、無定形ではあったが、結晶リシン⁽¹⁴⁾に匹敵する毒性をもち、血球凝集作用⁽¹⁵⁾と同時に強いタンパク質分解酵素作用を示した。しかも、生のタンパク質を強力に分解するという特殊な作用が認められた。しかし、リシン Tb は均一なタンパク質ではなく、電気泳動によって、A、B 2 成分の混合物であることが明らかにされた。ただ、A、B 2 成分の毒性およびタンパク質分解酵素活性はほとんど同じで、しかも両成分中の 2 つの活性の比は等しく、さら

表 1 諸 種 リ シ ン 標 品 の 性 状

	リシンB ₁	リシン Tb	結晶リシン (Kunitz 氏)	リシン C ₁	リシンD
$s_{20-w} \times 10^{13}$	5.3	4.55	3.9	4.04	4.64
分 子 量	85,000	70,000	36,000	31,000(光散乱) 66,200(S, D)	60,000
等 電 点	5.2	A : 6, B : 5.5	5.4~5.5		5.9 ^c
紫外吸収 $\left\{ \begin{array}{l} \text{max.} \\ \text{min.} \end{array} \right. \epsilon_{280}$		$\left\{ \begin{array}{l} 276 \\ 252 \end{array} \right\}$ pH 6.5	$\left\{ \begin{array}{l} 280 \\ 250 \end{array} \right\}$ pH 5.5	$\left\{ \begin{array}{l} 279 \\ 250 \end{array} \right\}$ pH 6.0	$\left\{ \begin{array}{l} 280 \\ 250 \end{array} \right\}$ pH 5.0 8.5×10^4
毒 力 $\left\{ \begin{array}{l} \text{T. U.}^a \\ \text{MLD}_{48}^b \end{array} \right.$	0.40	0.25~0.28	0.25 0.01	0.30 0.015	0.02 0.001
タンパク分解酵素活性	?	+	?	—	—
血球凝集素活性	+	?	+	—	—

a : 20 g のマウスを 24 時間以内に致死させるに要するリシン窒素の μg 量. b : μg リシン N/g マウス体重 (48時間). c : Cu^{++} の存在下で結晶化させた標品. ? : 報告されていないことを示す.

に熱によってまったく同じように 2 つの活性は低下した.

以上のことから, Moulé はリシンの本体は特殊なタンパク質分解酵素であると考え, 毒作用の機序として, 動物体内に入ったリシンは特定の臓器にカテプシンの分解作用を受けることなく侵入し, そこで動物の生命維持に不可欠なある種の酵素のアボタンパク質に作用してこれを分解し, その酵素を失活させることによって致死的な毒作用を示すものであろうと推察した.

Kunitz および McDonald の結晶リシン⁽¹⁴⁾ は, アルカリに溶けるが, pH 5~8 では難溶性のグロブリンである. 超遠心および電気泳動では均一なタンパク質としての挙動を示すが, 溶解度曲線からは 2 成分以上の複合体であることが推察された. この標品にも血球凝集作用が認められたので, Kunitz は, 成分タンパク質の 1 つは毒性の本体で, 他の 1 つは血球凝集素であろうと考えた. しかし, 両者の分離は行なわれなかった.

以上のリシン標品は, いずれも強い致死作用と, 同時に血球凝集作用あるいは特殊なタンパク質分解酵素作用を示した. しかし, 古くから血球凝集作用がリシン本来の作用と考えられていたが, 毒作用(致死)と血球凝集作用との強さの間には相関が認められなかった. さらに, 毒作用に大差がないにもかかわらず, 一方では血球凝集作用が, 他方ではタンパク質分解酵素作用が毒作用の本態と考えられた. このような食い違いの原因が標品の純度の差にある可能性があったので, われわれはヒマ小粒種から Moulé らの方法でリシン Tb を, また大粒種からリシン Tb と結晶リシンを調製し, タンパク質としての均一性を検討し, さらにその純化を試みた^(15,16).

まず, 生理作用に関しては, 調製した Tb および結晶

リシンともに血球凝集, タンパク質水解の両作用をもち, Tb は結晶リシンよりいずれも強力(3~4 倍)であったが, 毒性は両者まったく同じであった. したがって, 毒性と他の生理作用とは並行せず, これら 3 つの生理作用が 1 つのタンパク質に由来するとは考えられなかった. 事実, 連続濾紙電気泳動によってこれら 3 つの生理作用が別々の画分に泳動することがわかり, さらにヒドロキシアパタイトによるクロマトによって, Tb は 3 成分, 結晶リシンは 2 成分に分画され, 血球凝集作用およびタンパク質分解酵素作用をまったくもたない強い致死作用を示すリシン C₁ が分離された. 同時に, 血球凝集素もリシンとは異なるタンパク質として分離された⁽¹⁷⁾.

リシン C₁ の性状は表 1 に示すとおりであるが, MLD_{48} は $0.015 \mu\text{gN/g}$ マウス体重 で, 結晶リシン, リシン Tb と同じ毒性を示し, 精製による毒性の上昇が認められなかった. さらに, C₁ を CM-セルロースによるカラムクロマトにかけると, なお少量の異種タンパク質が分別されることがわかったので, 改めてヒマ種子脱脂粉末よりリシンの精製を試みた. すなわち, 主としてセルロース誘導体によるカラムクロマトによってリシンを精製し, 結晶として単離し, リシン D と名付けた^(4,18~20). 図 2 にリシン D の結晶写真を示す.

リシン D の CM-セルロースクロマトおよび結晶化に, 微量の金属が著しい影響を及ぼす. 脱イオン水を用いた場合と, これに微量の金属, たとえば 10^{-7}M の Cu^{++} を加えた場合とではクロマト像が異なり, また結晶化にも 10^{-6}M の Cu^{++} の存在が必要であった^(4,20). ただ, クロマトによって精製したリシン D は, 結晶化しなくても Cu^{++} の存在で結晶化したものとまったく同じ毒性を

図 2 リシンDの結晶写真

示し、 MLD_{48} は $0.001 \mu gN/g$ マウス体重 であった。

リシンDの性状は表1に示すとおりで、分子量 60,000 で、 Cu^{++} の存在下に結晶化したものは等電点 5.9 で、6.25%の糖を含む糖タンパク質であった。タンパク質分解酵素活性および血球凝集素活性をもたず、強い致死毒作用を示し、マウスの致死量から計算すると、リシンDの結晶 1 g は 2,000人の人間を死に至らしめることになる。

2. リシンDの構造^(4,21,22)

表2に示すように、リシンDは493個のアミノ酸残基と23個の糖残基からできている⁽⁵⁾。アミノ酸組成をみると、一般植物タンパク質と同じように酸性アミノ酸含量が高いが、ヒスチジンおよびメチオニン残基は1分子中わずかに6個で最も少ない。異常アミノ酸の存在は認められなかった。SH基はなく、6個のS-S結合が含まれていた。糖としてはリシン1mole中マンノース17mole、グルコサミン(N-アセチルグルコサミン)6moleが含まれていた。

化学構造に関しては、まず末端アミノ酸の検索が行なわれ、N末端アミノ酸としてイソロイシンとアラニンがリシン1mole 当り1mole ずつ検出され、またC末端アミノ酸としてセリンとフェニルアラニンがそれぞれ1mole ずつ検出された。その結果、リシンは2本のポリペプチド鎖からなることが明らかになり、2本鎖はそれぞれイソロイシン鎖(Ile鎖)、アラニン鎖(Ala鎖)と呼ばれた⁽²¹⁾。さらに、両鎖のN末端はH-Ile-PheおよびH-Ala-Aspであることもわかった。

ついで、2本のポリペプチド鎖の会合状態が検討され

表 2 リシンD、酸化Ala鎖および酸化Ile鎖のアミノ酸および糖組成

	リシンD	酸化Ala鎖	酸化Ile鎖
アミノ酸	Asp	59	35
	Thr	35	19
	Ser	37	19
	Glu	46	21
	Pro	26	13
	Gly	36	18
	Ala	37	15
	1/2 Cys	12	+
	Val	29	13
	Met	6	3
	Ile	35	16
	Leu	42	23
	Tyr	20	8
	Phe	18	5
	Lys	9	7
	His	6	3
糖	Arg	32	14
	Try	8	6
	CySO ₃ H	0	7
小 計		493	248
糖	Glucosamine	6	4
	Mannose	17	13
	小 計	23	17
合 計		516	265

た。リシンの構造として、2種類のタンパク質が単に会合している場合とS-S結合などによって結合されている場合との2つの可能性が考えられた。もし、単に会合しているにすぎない場合には、毒作用の本体は2種類のタンパク質(サブユニット)のいずれかということになり、さらに精製を行なう必要があった。

そこで、まず第1の可能性を検討するため、8Mの尿素溶液中でのセファデックスによるゲル濾過、種々の条件におけるセルロース誘導体によるカラムクロマトを行なったが、2つのサブユニットを解離させることはできなかった。しかし、過ギ酸でS-S結合を酸化開裂させると、両鎖は8M尿素溶液中で解離することがわかった。このようにして分離した2つのサブユニット(過ギ酸酸化タンパク質)のN末端アミノ酸は、それぞれイソロイシンとアラニンであったので、リシンDを構成するIle鎖とAla鎖であることが認められ、リシンD中で両鎖はS-S結合で結合されているという上記の第2の可能性が正しいことがわかった⁽²¹⁾。過ギ酸酸化Ile鎖とAla鎖

図 3 RoCM-リシンDのディスク電気泳動像

* セファデックス G-75 によるゲル濾過前(左), 後(右).
a: リシンD, b: イソロイシン鎖, c: アラニン鎖

の amino 酸組成を表 2 に示すが, 両鎖は amino 酸組成はかなり異にしており, とくにフェニルアラニン, リジン, トリプトファン, シスチン含量に顕著な差異が認められ, 異なるタンパク質であることが明らかになった⁽²²⁾. しかし, これらの 2 つのタンパク質の構成 amino 酸残基数と分子量はほぼ等しかった.

2 つのサブユニットの結合に関与している S-S 結合の数を求めるため, β -メルカプトエタノールによる還元の開裂を試みた. すなわち, 常法により尿素 0~8 M の存在下で還元を行ないカルボキシメチル化した後, 生成した CM-システインの量を調べたところ, 尿素が存在しない状態で 1 つの S-S 結合が容易に, しかも特異的に還元され(この条件で還元され, カルボキシメチル化されたものを RoCM-リシン D と呼ぶ), これをディスク電気泳動にかけると 図 3 に示すように 2 つのサブユニットが分離された. 他方, RoCM-リシン D をセファデックス G-75 にかけて, 未還元のリシン D を除き, さらに DEAE-セルロースカラムにかけると, 2 つのサブユニットを分別することができた. 分別された 2 つのタンパク質について amino 酸組成, N および C 末端 amino 酸の分析を行なった結果, amino 酸組成は上記の酸化サブユニットの amino 酸組成とそれぞれよく一致し, S-S 結合は鎖間に 1 個, Ile 鎖中に 1 個, さらに Ala 鎖中に 4 個存在することがわかった. また, Ile 鎖の C 末端は Ser, Ala 鎖の C 末端は Phe であることも確かめられた.

以上のことから, リシン D の主鎖は 図 4 に示すよう

図 4 リシンD主鎖の構造模式図

な構造であると推定された^(5,21).

すでに述べたように, リシン D はマンノースとグルコサミンを含むので, これらの糖の結合様式についても検討を行なった⁽²³⁾. RoCM-リシン D の DEAE-セルロースカラムクロマトによって分別された Ile 鎖と Ala 鎖を, ナガーゼ, ついでプロナーゼによって限定水解し, 糖ペプチドを分離したところ, Ile 鎖から 1 種, Ala 鎖から 2 種の糖ペプチドが得られた. これらの 3 種の糖ペプチドの構造は, 図 5 のように, いずれも糖はオリゴサッカライドの形で, アスパラギン酸 (あるいはアスパラギン) 残基を通じてタンパク質に直接結合し, Ile 鎖に 1 箇所, Ala 鎖に 2 箇所結合点があることがわかった. 糖の結合を含むリシン D 主鎖の構造は 図 6 のようになる.

図 5 リシンDより分離した糖ペプチドの構造

G: グルコサミン, M: マンノース,
Asx: アスパラギン酸またはアスパラギン

図 6 リシンDの構造模式

G: グルコサミン, M: マンノース

3. リシンDの構造と毒性

上述のようなサブユニット構造をもつリシンDは、還元、カルボキシメチル化によって2つのサブユニットを切り離し、四次構造を破壊すると、毒性を顕著に低下する。分離した両鎖の毒性をみると、Ile 鎖はリシンDの約 1/50 の毒性を示すが、Ala 鎖はほとんど毒性を示さない。このような毒性低下の原因としてまず第1に考えられることは、四次構造の変化である。すなわち、2つのサブユニットが四次構造を形成したときにもつ立体構造が毒性発現に関与していれば、四次構造の破壊は当然毒性の低下を招くことになる。そこで、リシンD、CM-Ile 鎖および CM-Ala 鎖について旋光分散のパラメーターを比較検討したが、サブユニットを切り離すことによって起こるペプチド主鎖の構造変化は認められなかった⁽²⁴⁾。アミノ酸残基側鎖の微細構造の変化については不明であるが、切り離されたサブユニットとリシンDは酵素に対して異なる態度を示すことがわかった。すなわち、リシンDはペプシン (pH 2.2)、トリプシン (pH 8.0) で 30°C、8時間処理してもほとんど加水分解を受けないが、分離したサブユニットはトリプシンによって、同一条件で容易に分解される。したがって、リシンD中と分離された状態とではサブユニットの立体構造に微細な変化が推察され、サブユニットが S-S によって結合したときに作る四次構造が毒性を発現する可能性が推定された。この場合、さらに2つのサブユニットの間に形成されるアミノ酸残基側鎖の立体的配位が毒性を発揮する構造となるのか、あるいは2つのサブユニットのいずれか一方の四次構造中における立体配位が毒性を発揮するののかという問題がある。これに対して、分離された Ala 鎖は毒性をほとんどもたないにもかかわらず、Ile 鎖は単独で弱いながら毒性を示すこと、さらに後述する酸性および塩基性リシンがいずれも Ile 鎖をリシンDと共通なサブユニットとしてもっていることを考えると、Ile 鎖がリシンDの本体と考えることができる。

分離された Ile 鎖の毒性が低下する原因として、上述の四次構造の破壊に伴う立体構造の変化のほかに、なお1つの可能性が考えられる。すなわち、本稿のはじめに述べた臓器親和性に関連するもので、サブユニットを切り離すことによって、Ile 鎖が一次反応を発揮しうる構造は維持していても、臓器親和性に関与する構造を失う

と、生物体内で特定の臓器に濃縮されることがなく、全体に散逸して散発的に弱い一次反応を起こし、その結果、弱い毒作用（毒性の低下）を示すようにみえる可能性である。これは今後の重要な問題として残されている。

リシンDの化学的修飾による毒性の変動については、2,3 の知見が得られている。サブユニット間 S-S 結合の修飾（還元）についてはすでに述べたが、他のアミノ酸残基側鎖の修飾に関しても、修飾基と毒性との関係については上に述べたような問題が含まれているので、ここでは現象論的な記載に止める。

リシンDを pH 7.0 でヨウ素化すると、リシン 1 mole 当り 5 mole のチロシン残基がヨウ素化されてジヨードチロシンになり、活性もほとんど失われた。ジヨード化されたチロシン残基のうち、3個は Ile 鎖、2個は Ala 鎖のものであった⁽²²⁾。また、リシンDを pH 4.5、21°C で NBS によって酸化すると、30分で4.6個のトリプトファン残基が酸化されるが、毒性にはほとんど変化がなかった⁽²²⁾。さらに、リシンDを 0°C で1時間無水酢酸と反応させて、11個のアミノ基のうちの9個をアセチル化すると、毒性は、はじめの 10% にまで低下した⁽²²⁾。

他方、酵素的修飾については興味ある知見が得られた。リシンDは、上述のように、ペプシン、トリプシンによっては水解されないが、ナガーゼを pH 8.0、30°C で 1:200 の割合で作用させると特異的な水解を受ける。水解過程における各サブユニットのN末端アミノ酸の変化をみると、Ala 鎖の末端は16時間の水解でも変化しないが、Ile 鎖の末端は変化して新しいN末端としてグルタミン酸が出現し、その量は16時間でほぼ平衡に達した。この時点でリシン修飾物を分離し、アミノ酸組成を調べたところ、約30個のアミノ酸がとり除かれていることがわかった。沈降定数も、リシンDの 4.90 S に対し、4.69 S とわずかに小さくなっていた。したがって、Ile 鎖のN末端部分で新しくN末端となったグルタミン酸残基までの約30残基のアミノ酸が除かれたものと考えられるが、毒性にはほとんど変化が認められないので、Ile 鎖のN末端部分は毒性発現には必要でないことが明らかになった。同時に、Ile 鎖のN末端部分はリシン分子の表面に露出しているが、Ala 鎖のN末端部分はナガーゼの作用をまったく受けないことから考えると、分子内部に埋もれており、しかも Ala 鎖は4つの S-S

結合を含むので、比較的緻密な構造をもっていることが推定された。

4. リシンの多様性

すでに述べたように、Moulé はその標品 Tb^(11,12) が 2 種のリシンの混合物であり、したがって少なくとも 2 種のリシンが存在することを示唆しているが、その後われわれがヒドロキシアパタイトによってリシン Tb の精製を試みたところ、2 種のリシン (Tb- I, -II) が分画された⁽¹⁵⁾。また、リシン D の分離精製過程でも、リシン D 以外に 1 つのリシンが分離された⁽¹⁸⁾。一方 Waller らも、Amberlite CG-50 によるカラムクロマトによって臓器親和性を異にする 2 種のリシンを分離している⁽²⁷⁾。このように、ヒマ種子中にはいくつかのリシンが存在することが明らかになった。そこで、リシンの多様性と相互の構造的な関係を検討するため、ヒマ種子大粒種と小粒種から 3 種のリシンを分離した⁽²⁶⁾。

上述のリシン D は大粒種から分離されたものであったが、小粒種からもリシン D と化学的性質がまったく同じリシン標品が得られた。この標品について糖の組成、タンパク質との結合様式を調べたところ、リシン D とまったく同じであること、換言すれば、リシン D は大粒種、小粒種ともに含まれることが明らかになった⁽²⁶⁾。

一方、大粒種からリシン D とともに他の 1 つのリシンが分離された⁽²⁵⁾。このリシンは pH 8.3 のディスク電気泳動でリシン D よりわずかに大きな移動度を示し、したがってリシン D より酸性の強いタンパク質と考えられたので、酸性リシンと呼ぶことにした。これについては、現在なお均一性に問題が残っているが、毒性はリシン D よりわずかに弱く、MLD₄₈ は 0.0016~0.0048 μg リシン N/g マウス体重 である。

他方、小粒種からリシン D が得られたが、さらにリシン D より塩基性の強いタンパク質として他の 1 つのリシン標品が分離された⁽²⁵⁾。このリシン標品は塩基性リシンと呼んでいる。リシン D よりやや毒性が弱く、MLD₄₈ は 0.005~0.02 μg リシン N/g マウス体重 である。

以上のことから、*Ricinus communis* 種子には、リシン D、酸性および塩基性リシンと、少なくとも 3 種のリシンが含まれることになる。これら 3 種のリシンの構造に関しては、まずいづれも N 末端アミノ酸としてイソロイシンとアラニンをもち、Ile 鎖、Ala 鎖という 2 本の

ペプチド鎖からなるサブユニット構造をとっている。アミノ酸組成は、表 3 に示すように、個々のアミノ酸については多少の差が認められるが、全体として 3 者非常によく似ており、塩基性リシンが他のリシンより塩基性アミノ酸含量が多いにすぎない。

β-メルカプトエタノールによる還元を酸性および塩基性リシンについて行ない、カルボキシメチル化した後ディスク電気泳動にかけると、サブユニットへの解離が認められた。その結果、これら両者においても、2 つのサブユニットは 1 つの S-S 結合によって結合され、リシン D と同じ構造をもつことがわかった。さらに、Ile 鎖は、酸性リシンの場合やや大きな移動度を示すが、塩基性リシンの Ile 鎖はリシン D とまったく同じ移動度を示し、Ile 鎖は 3 つのリシン標品に共通であることが推察された。一方、Ala 鎖のほうはリシン D と酸性リシンとはよく似ているが、塩基性リシンのものはまったく異なるタンパク質であった。

リシン D において分離された Ile 鎖が弱いながら毒性をもっていたこと、また上述のように Ile 鎖が 3 種のリシンに共通であることを考えると、Ile 鎖が毒性の本体である可能性が推察される。Ala 鎖の生理的意義は現在詳らかでないが、上述 Waller らの研究⁽²⁷⁾ を考え合わせると、このサブユニットがリシンの臓器親和性に関係している可能性も考えられる。

表 3 各種リシンのアミノ酸組成*1

アミノ酸	酸性リシン	リシン D	塩基性リシン
Asp	59.00	59.00	59.00
Thr	33.41	34.43	35.17
Ser	32.94	32.90	29.36
Glu	46.87	45.59	44.09
Pro	25.22	25.91	23.36
Gly	35.49	35.80	34.84
Ala	36.25	36.78	37.46
Val	28.31	27.41	29.46
Met	4.09*2	5.15	5.94
Ile	33.11	30.57	28.81
Leu	42.06	42.09	41.17
Tyr	20.06	20.71	19.37
Phe	16.35	16.06	15.37
Lys	8.67	9.05	9.85
His	+*3	5.64	6.13
Arg	31.19	32.53	35.40

*1 リシン D 1 mole (分子量 6 万) 中 Asp 59 mole として計算。

*2 加水分解中の酸化のための減少。

*3 定量していない。

5. リシンの毒作用

リシタンパク質の構造に関しては上に述べたような知見が得られているが、リシンの毒作用の機序についてはまだほとんど解明されていない。しかし、毒作用に関しては、すでに述べたように、臓器親和性、一次反応機構という重要な問題が含まれており、リシンの構造の解明はこれらの問題を究明する基礎として重要であるが、問題はむしろ今後に残されている。

リシンの毒作用について得られている知見についてはすでに他の総説^(3,4)で述べ、その後重要な発展はほとんど見られないので、ここでは簡単に述べることにする。

まず、臓器親和性に関して、古賀^(28,29)はリシンDを¹³¹Iでラベルしてラットの腹腔内に注射し、組織への分布の時間的経過を調べた。その結果、¹³¹I-リシンDはリンパ系を経て、肝臓さらに最終的には脾臓に集積し、脾臓中では、とくに脾臓実質に著しい集積が認められた。

Waller⁽²⁷⁾は、すでに述べたように、分離した2つのリシン標品のうち1つは肝臓に強い親和性を示し、その組織に著しい変性を起こすが、リンパ組織に対しては軽い充血を起こすにすぎず、他の1つはこれとは逆にリンパ組織を著しく破壊し、肝臓には充血と軽い壊死を起こすのみで、リンパ組織に親和性をもつものであることを見いだした。さらに、Waller⁽²⁷⁾らは、このような臓器親和性にはヒマ種子の貯蔵期間が影響を与え、期間が長くなると特異性が失われることを報告している。

毒作用の機構については、現在まったく不明であるが、Thompson⁽³⁰⁾はラットに致死量のリシンを腹腔内注射し、24時間後、血液成分および肝臓代謝物の変化を調べた。その結果、フマラーゼがリシン中毒によって活性を2/3に低下することを知り、リシンは肝臓の代謝系、おそらくTCAサイクルに作用してこれを阻害するものと推定した。これに対し、Waller⁽²⁷⁾らは*in vitro*での追試を試みたが、ミトコンドリアにおける呼吸系および分離したフマラーゼに対して、リシンは直接なんらの影響も与えなかった。卵のふ化過程において、リシンが胚の生育を阻害することも観察されている^(31~33)。

また、致死量以下のリシンの投与によって、ウサギ、ネコなどが発熱し、40~41°Cという高い体温を長時間保つことも知られている⁽³⁴⁾。このような症状は、リシンの一次反応に関連して興味あることと考えられる。

文 献

- 1) G. Samuelsson, L. Seger & T. Olson: *Acta Chem. Scandinavica*, 22, 2624 (1968).
- 2) 船津勝, 船津軍喜: 蛋白質 核酸 酵素, 5, 451 (1960).
- 3) 船津勝: 蛋白質 核酸 酵素, 9, 640 (1964).
- 4) 船津勝, 船津軍喜: 蛋白質 核酸 酵素, 13, 905 (1968).
- 5) M. Ishiguro, G. Funatsu & M. Funatsu: *Agr. Biol. Chem.*, 35, 729 (1971).
- 6) T. B. Osborne, L. B. Mendel & J. F. Harris: *Am. J. Physiol.*, 14, 259 (1905).
- 7) P. Karrer, A. P. Smirnoff, H. Ehrensperger, J. van Slooter & M. Keller: *Z. Physiol. Chem.*, 135, 129 (1924).
- 8) E. E. Kabat, M. Heidelberger & A. E. Bezer: *J. Biol. Chem.*, 168, 629 (1947).
- 9) E. Le Breton & Y. Moulé: *Compt. Rend.*, 225, 152 (1947).
- 10) E. Le Breton & Y. Moulé: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 31, 94 (1949).
- 11) Y. Moulé: *Arch. Sci. Physiol.*, 5, 277 (1951).
- 12) Y. Moulé: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 1461, 1467 (1951).
- 13) 守山英雄: 医学と生物学, 10, 163 (1947).
- 14) M. Kunitz & M. R. McDonald: *J. Gen. Physiol.*, 32, 25 (1948).
- 15) 船津勝, 船津軍喜: 農化, 33, 461 (1959).
- 16) 船津軍喜: 農化, 33, 465, 520 (1959); 34, 139 (1960).
- 17) T. Takahashi, G. Funatsu & M. Funatsu: *J. Biochem.*, 51, 288 (1962); 52, 50 (1962).
- 18) M. Ishiguro, T. Takahashi, G. Funatsu, K. Hayashi & M. Funatsu: *J. Biochem.*, 55, 587 (1964).
- 19) M. Ishiguro, T. Takahashi, K. Hayashi & M. Funatsu: *J. Biochem.*, 56, 325 (1964).
- 20) M. Ishiguro, G. Funatsu & M. Funatsu: *Agr. Biol. Chem.*, 35, 724 (1971).
- 21) M. Funatsu, G. Funatsu, M. Ishiguro & S. Nanno: *Japanese J. Med. Sci. Biol.*, 23, 264 (1970).
- 22) 船津勝, 船津軍喜, 石黒正恒, 南野稠: 第15回毒素シンポジウム (大阪, 1968, VI) 予講集, p. 40 (1968).
- 23) 南野稠, 石黒正恒, 船津軍喜, 船津勝: 第17回毒素シンポジウム (箱根, 1970, VII) 予講集, p. 33 (1970).
- 24) 原健次, 石黒正恒, 船津軍喜, 船津勝: 日本農芸化学会昭和46年度大会(東京, 1971, IV)講演要旨集, p. 288 (1971).
- 25) 船津軍喜, 船津勝: 第16回毒素シンポジウム (箱根, 1969, VII) 予講集, p. 3 (1969).
- 26) 南野稠, 見明史雄, 石黒正恒, 船津軍喜, 船津勝: 日本農芸化学会昭和46年度大会(東京, 1971, IV)講演要旨集, p. 288 (1971).
- 27) G. R. Waller, K. E. Ebner, R. A. Scroggs, B. R. Das Gupta & J. B. Corcoran: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 121, 685 (1966).
- 28) 古賀敏生: 九州大学胸部疾患研究所紀要, 10, 25 (1965).
- 29) 古賀敏生, 杉山浩太郎, 船津勝, 石黒正恒, 加藤允義, 住吉昭吉, 田中健蔵: 同上, 10, 57 (1965).
- 30) J. F. Thompson: *J. Pharm. Exptl. Therap.*, 100, 370 (1950).
- 31) P. Ancel & S. Lallemand: *Compt. Rend.*, 212, 312 (1941).
- 32) P. Ancel: *Compt. Rend.*, 229, 736 (1949); *Arch. Anat. Histol. Embryol.*, 30, 5 (1947).
- 33) 橘猛, 林正雄: 日本微生物学病理学雑誌, 36, 175 (1950).
- 34) E. T. Eperjessy, G. Bálint & K. Thuránszky: *Acta Physiol. Hung. Tomus*, XXXIII, 177 (1965).