UDC 547.993.2

181. 佐々木豊作：台湾コブラ蛇毒の化学的研究（第2報*）

精製蛇毒の末端アミノ酸に就いて

Toyosaku Sasaki: Chemical Studies on the Poison of Formosan Cobra. II.
The Terminal Amino Acid Residues of Purified Poison (Neurotoxin).

(Laboratory of Organic Chemistry, Hyogo University of Agriculture**)

When the venom of Formosan cobra (*Naja naja atra*) is purified by acetone and ammonium sulfate, a strong poisonous component, that gives one spot moving towards the cathode side in paper electrophoresis, is obtained. It has almost no lecithinase action and its minimum lethal dose in mice is 0.08~0.1 γ /g., causing respiratory paralysis. As tested by Sanger's DNP method and Akabori's hydrazinolysis method, its N-terminal amino acid was determined as leucine and its C-terminal amino acid as glycine. It was found from the formation of bis-dinitrophenyl-aspartic and -glutamic acid α -monohydrazides*** during hydrazinolysis that the peptide chain contains aspartic acid with a free carboxyl group in the β -position and glutamic acid with free carboxyl group in the γ -position. The result of determination of these amino acids is given in Table I. Since these amino acids are present in one molecule each, the peptide composing this strong poisonous component is not branched and one mole each of aspartic and glutamic acids containing free carboxyl group are present in the peptide chain. From the content of these amino acids, the minimum molecular weight of this peptide is assumed to be around 6000. Cystine is not present as a terminal amino acid and it is clear that there is no cystine with a free carboxyl group in the peptide chain since there was no cystine derivatives in the sodium hydrogen carbonate layer during decomposition by Akabori's hydrazinolysis.

(Received March 23, 1957)

著者は前報¹⁾で台湾コブラ蛇毒の窒素分布、毒成分の精製等に就いて報告し、アセトン及び硫酸アンモンにて精製すればレンチナーゼ作用の殆んどない強毒成分が得られることを報告した。本強毒成分は原毒の約 10 倍の毒力を有し、マウスに注射すると呼吸麻痺にてたおれる一種の神経毒である。其の後鈴木等²⁾は著者の方法に従い精製せる精製毒の沝紙電気泳動法を試み陰極側に移動する一個のスポットを認めて居る。著者もまたこの方法により沝紙電気泳動法を試みたところ唯一個のスポットを認めたので上記の方法で精製し得た強毒成分（以下 neurotoxin と呼ぶ）は単一な物質より成るものと推定する。

よつてこのものの構造研究の第一段として末端アミノ酸を知るために Sanger のジニトロフェニル（以下 DNP と略記）化法³⁾及び赤堀等のヒドラジン分解法⁴⁾によりアミノ末端アミノ酸並びにカルボキシル末端アミノ酸に就いて研究した。実験材料として用いたものは粗製の台湾コブラ蛇毒を先ずアセトンにて精製しアセトン濃度 1:1 にて沈澱する部分を集め更に硫酸アンモンにて飽和する際に沈澱する部分を集め、沝紙電気泳動法で陰極側に移動する唯一個のスポットを与えるものでマウスに対する毒力は MLD 0.08—0.1 γ /g のものである。試料を重曹の存在のもとで 1-フルアル-2,4-ジニトロベンゼンで DNP 化して得た DNP-neurotoxin を 6*N* 塩酸で一例では 5 時間、一例では 16 時間加水分解して得たもののエーテル可溶性の部分より 2,4-ジニトロフェノール及び DNP-ロイシンを検出し、水溶液の部分よりは ϵ -DNP-リジンを検出した。加水分解 5 時間の場合に於いても DNP-プロリンその他の耐酸性の少ない DN-P アミノ酸の生成は認め得なかつた。以上のことからアミノ

* 本報の一部は第 75, 76 回日本薬学会年会講演 (1955, 1956)。

** Sasayama, Hyogo-ken.

*** 1-DNP-2-[N-DNP-aspartyl(or glutamyl)]hydrazine.

1) 佐々木：本誌 **71**, 587(1951) を第 1 報とする。2) 鈴木、萩原、高木：本誌 **74**, 167(1954)。3) F. Sanger: Biochem. J. (London) **39**, 507(1945)。4) S. Akabori, K. Ohno, T. Ikenaka, A. Nagata, and I. Haruna: Proc. Japan Acad. **29**, 561(1953); S. Akabori, K. Ohno, T. Ikenaka, Y. Okada, H. Hanafusa, I. Haruna, A. Tsugita, K. Sugae, T. Matsushima: Bull. Chem. Soc. Japan **29**, 508(1956)。

末端アミノ酸としてはロイシンのみであることを知った。

カルボキシル末端アミノ酸については赤堀等のヒドラジン分解法⁴⁾によつた。即ち neurotoxin を無水ヒドラジンと共に 100° で加熱分解し分解物を DNP 化したものを重曹溶液で処理し重曹溶液に移行する部分をとり塩酸酸性にし酢酸エステルに移行した部分をシリカゲルにより⁴⁾ 又は其の酢酸エステル移行部を塩酸で加水分解したものについて Levy⁵⁾ に従い二次元的にペーパークロマトグラフィーに依り分離定性並びに定量を行つた結果カルボキシル末端アミノ酸として検出されたものはグリシンのみであつた。其の際に bis-DNP-アスパラギン酸 α -モノヒドラジド並びに bis-DNP-グルタミン酸 α -モノヒドラジド*** が得られることからアスパラギン酸の β 位のカルボキシル基並びにグルタミン酸の γ 位のカルボキシル基が遊離したものがペプチド鎖中に存在することが明らかである。アミノ末端ロイシン、カルボキシル末端グリシン及びペプチド鎖中にて 1 個のカルボキシル基が遊離して存在するアスパラギン酸並びにグルタミン酸を定量した結果を Table I に示す。

Table I. Terminal Amino Acid Residues and Aspartic and Glutamic Acid Residues bearing free Carboxyl Group in Peptide Chain

	Ash-free neurotoxin (mole/g.)	Calcd. molar ratio of amino acid	Assumed molar ratio of amino acid	Calcd. min. mol. wt.
C-Terminal Glycine	0.0136	1.00	1	7353
N-Terminal Leucine	0.0139	1.02	//	7194
Aspartic acid	0.0153	1.13	//	6536
Glutamic acid	0.0158	1.16	//	6329

此の Table から明らかなようにアミノ末端アミノ酸及びカルボキシル末端アミノ酸は同じ mol 数であることから neurotoxin を構成するペプチド鎖は分枝しない 1 本のペプチドより成るものと考えられる。又そのペプチド鎖中に β 位のカルボキシル基の遊離したアスパラギン酸及び γ 位のカルボキシル基の遊離したグルタミン酸の各一分子を含むものである。なお mol % より計算して得られる分子量は Table I に示した通りである。加水分解其の他の操作中若干の損失あるものと思われるから真の最小分子量はアスパラギン酸及びグルタミン酸の mol % より計算した分子量よりも幾分小さいものと思われ、その最小分子量は 6,000 前後のものとして推定される。またシスチンは末端アミノ酸としては検出されなかつたことは勿論のこと、ペプチド鎖中のカルボキシル基の遊離したシスチンとしても存在しないことはヒドラジン分解の際に重曹溶液に移行する部分にシスチンの DNP 誘導体⁴⁾を検出し得なかつたことから明らかである。

本研究は恩師朝比奈泰彦先生並びに上田英之助教授の御指導御鞭撻によるものである。なお本研究費の一部は文部省科学研究助成補助金によつたものであり厚く感謝する。

実 験 の 部

台湾コブラ蛇毒の精製 粗製コブラ毒を第 1 報¹⁾ 記載の方法に従い精製。即ち原毒を 10% 水溶液となしアセトンを加え最初に沈澱する部分を除き更にアセトンを加えアセトン濃度 1:1 に沈澱する部分をとり再沈澱に依り精製したものを乾燥、これを 10% 液となし硫酸アンモン飽和溶液を加え沈澱する部分を除き最後に硫酸アンモンの結晶を加え飽和して生ずる沈澱をとり再沈澱に依り精製後透析し硫酸アンモンの反応が無くなつてから減圧乾燥したもので、 γ 紙電気泳動法 (磷酸緩衝液 pH 6.9, 270 V, 1 mA/8 cm, 5 hrs, γ 紙の長さ 38 cm) に依り陰極側に移動する唯 1 個のスポットを与えた (呈色試薬 BPB 昇汞エタノール溶液⁶⁾)。マウスに対して MLD 0.08~0.1 γ /g, レシチナーゼ作用殆んどなくマウスに注射すれば呼吸麻痺でたおれる。

アミノ末端アミノ酸 neurotoxin の DNP 化、加水分解、DNP アミノ酸の分割は Sanger³⁾ の方法に従つておこなつた。即ち一例を述べれば neurotoxin 0.0408 g を 10% 重曹水 0.4 cc にとかしその溶液に 1-フルオール-2,4-ジニトロベンゼンの 5% エタノール液 0.8 cc を加え 2 時間室温で振盪。塩酸酸性にした後、2,4-ジニトロフェノール及び未反応の 1-フルオール-2,4-ジニトロベンゼン等を除くためにエーテルで振盪した後水層に塩酸を加え 6N とし 105° に 16 時間熱し加水分解。水を加え約 1N としエーテルで数回振盪、エーテル液を合し、25 cc とする。その中より 0.5 cc をとり減圧にてエーテルを留去、少量のアセトンに溶解し定量的に γ 紙上に採り Levy⁵⁾ の方法に従い先ずトルエン：エチレンクロロヒドリン：ピリジン：0.8N アンモニア (5:3:1.5:3) で展開したものを約 4 時間 40° で乾燥、二次元的に 1.5 M 磷酸緩衝液 (pH 6) で更に展開し

5) A. L. Levy: Nature **174**, 126(1954)

6) E. L. Durrum: J. Am. Chem. Soc. **72**, 2943(1950).

2個のスポットを得た。一つは2,4-ジニトロフェノールで他の一つはDNP-ロイシンであつた。DNP-ロイシン部を切りとり5ccの水で55~60°にて15分間抽出した後更に15分間放置してからEPU2型日立分光光度計を使用、360 m μ に於ける吸光度を測定するか或いは伊藤ベックマンB2型分光光度計で405 m μ に於ける吸光度を測定する。これより同時に測定した盲検値を差し引いたものから予め作製した検量線に依りDNP-アミノ酸の量を知つた。3回の平均値0.0114 mol %、これをDNP-ロイシンを前記同様処理した際に得られる回収率(83.3%)を考慮して計算すると0.0138 mol %、これより最少分子量7353を得。

水に可溶性の部分はその一部をとり減圧乾燥後塩酸含有メチルエチルケトンにて処理し、可溶性物質をピリジン：イソアミルアルコール：1.6 N アンモニア(6:14:20)⁷⁾を展開剤としペーパークロマトグラフィーに依り ϵ -DNP-リジンに一致する1個のスポットを得た(東洋汙紙 No. 50, Rf 0.49)。

なお上記と同様な条件で只加水分解の時間を5時間とした場合にもDNP-ロイシン及び ϵ -DNP-リジンを検出し得たがDNP-プロリンその他のDNP-アミノ酸は得られなかつた。

カルボキシ末端アミノ酸 赤堀等のヒドラジン分解法⁴⁾によつた。即ちneurotoxin 0.0218 g、無水ヒドラジン 1.0 ccを還流冷却器を付して重湯煎上に10時間100°に加熱する。硫酸上減圧にてヒドラジンを除去、3%重曹液10 ccに溶かしそれに1-フルオール-2,4-ジニトロベンゼン 0.3 cc(0.45 g)を20 ccのエタノールに溶解したものを加え2時間室温で振盪。水を50 cc加え塩酸性とし酢酸エステルで数回振盪抽出。酢酸エステル液を2%重曹溶液と数回振盪し重曹液に移行する部分を更に酸性として酢酸エステルにて数回振盪、抽出液を合し120 ccとし検体とした。これ等の操作中に重曹溶液が褐色を呈するのでアスパラギン酸或いはグルタミン酸のヒドラジド誘導体の存在を予想したので検体中の一定量を取り真空中酢酸エステルを留去後6 N 塩酸を加え重湯煎上100°に5時間加熱したものを酢酸エステルにて振盪抽出、減圧蒸留後少量のアセトンに溶解、定量的に濾紙上にとりアミノ末端アミノ酸の場合の様にLevy⁵⁾の方法によつて二次元的に展開分離。検出せるものはDNP-グリシン、DNP-アスパラギン酸、DNP-グルタミン酸でその定量にはアミノ末端アミノ酸の場合の様にEPU2型日立分光光度計にて360 m μ に於ける吸光度を測定するか或は伊藤ベックマンB2型分光光度計で405 m μ に於ける吸光度を測定する方法に依つた。定量結果はTable Iに示す。その際のDNP-アスパラギン酸とDNP-グルタミン酸の分離定量の場合に1.5 M 磷酸緩衝液の代りに2 M 磷酸緩衝液を使用した⁸⁾。次に加水分解しないアスパラギン酸或はグルタミン酸のヒドラジド誘導体の定性には赤堀等の方法⁴⁾に従いシリカゲルによるカラムクロマトグラフィーでBuOH:CHCl₃:2% AcOH=3:97:100或はBuOH:CHCl₃:2% AcOH=10:90:100で展開、bis-DNP-アスパラギン酸 α -モノヒドラジド及びbis-DNP-グルタミン酸 α -モノヒドラジド***を確認し得た。

兵庫農科大学

7) G. Biserte, R. Ostetx: Bull. soc. chim. biol. **33**, 50(1951).

8) D. Glick: "Methods of Biochemical Analysis" (International Publishers, Inc.) **II**, 364.