UDC 547.993 : 598.126

80. 鈴木友二, 岩永貞昭 : 蛇毒蛋白の研究 (第3報)

マムシ毒中の二, 三の酵素の分離について

Tomoji Suzuki and Sadaaki Iwanaga : Studies on Snake Venoms. III.

Purification of Some Enzymes in Japanese Mamushi Venoms

(Agkistrodon halys blomhoffi BOIE).

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto*)

Some improvements were effected in the method of Sinsheimer for separating phosphodiesterase from snake venom by acetone fractionation. Application of this improved procedure to snake venom from domestic asp (*Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE) effected separation of phosphodiesterase by a comparatively easy procedure. However, this method cannot be termed suitable considering the increased specific activity of phosphodiesterase, recovery of the enzyme, and utilization of enzymes other than phosphodiesterase.

A method was devised for obtaining phosphodiesterase of high purity in a good yield from asp venom by the use of column chromatography with cellulose-calcium phosphate gel as the adsorption agent. The sample of phosphodiesterase obtained by this method contains non-specific phosphomonoesterase but not 5'-nucleotidase that it can be used for structural studies of nucleic acid. Use of ammonium sulfate fractionation to the mixture of L-amino acid oxidase and lecithinase-A, separated from phosphodiesterase by this column chromatography, afforded L-amino acid oxidase free from lecithinase-A. The purity of L-amino acid oxidase so obtained was about 11 times that of the crude snake venom. The crude snake venom contains a substance that suppresses the action of L-amino acid oxidase and this substance is adsorbed on calcium phosphate gel.

(Received October 4, 1957)

本邦産マムシ毒 (*Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE) の蛇毒は L-アミノ酸酸化酵素活性が強^り, またアルカリフォスファターゼ類の活性も外国産の蛇毒類に著しくは劣らない²⁾. 今回著者等は最近に採取したと思われるマムシ毒を原料として二, 三の酵素の分離を試みた. 研究に際しては, 核酸の構造研究の目的のために極めて高い純度のものが要求されているフォスフォジエステラーゼ (以下ジエステラーゼと略) の精製に中心をおいたが, そのためには分離操作中における各分画について 5'-ヌクレオチダーゼ, フォスフォモノエステラーゼ (以下モノエステラーゼと略) の活性をも調べ, 更に L-アミノ酸酸化酵素並びにレンチナーゼ A の活性についてもしらべつつ研究を進めた. その結果として, ジエステラーゼ, L-アミノ酸酸化酵素を分離し, またモノエステラーゼの微量を含む 5'-ヌクレオチダーゼをも分離したが, ここにえた 5'-ヌクレオチダーゼはジエステラーゼと共に核酸の構造決定など生化学的研究にそのまま利用できる.

ジエステラーゼの精製については従来から二, 三の報告があるが, いずれもその夾雑が望ましくない 5'-ヌクレオチダーゼとの分離を主な目的としており, 原料には主として蝮蛇科に属する東部米国産の蛇 (*Crotalus adamanteus*)* の毒を用いている. 著者等はまず従来の方法をマムシ毒に応用することから始めたが, i) 濾紙法による吸着クロマトグラフィーを応用した Butler³⁾ の方法, ii) カチオン交換剤を用いる Laskowski⁴⁾ の方法, iii) アセトン分画沈澱をくり返して後, 65° に 60 分加熱して 5'-ヌクレオチダーゼのみを失活させる Sinsheimer⁵⁾ の方法などを試みた. i) の Butler 法は外国においても再現性に乏しいといわれているが, 著者等が東洋濾紙 No.

* Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto. 1) 本誌投稿予定.

** この蛇は蛇毒の濾紙電気泳動像から考えて日本産ハブに近いものと思う.

2) 鈴木, 岩永 : 本誌 78, 359(1958).

3) R. O. Hurst, G. C. Butler : J. Biol. Chem. 193, 91(1951).

4) M. Privat De Garilhe, M. Laskowski : Biochim. et Biophys. Acta 18, 370(1955).

5) R. L. Sinsheimer, J. F. Koerner : J. Biol. Chem. 198, 293(1952).

50 を用いてマムシ毒に応用した結果でも文献より一層再現性に乏しく, ジエステラーゼと 5'-ヌクレオチダーゼとの分離も悪くて良好なクロマトグラムがえられなかつた. また ii) のカチオン交換剤を用いた Laskowski の方法ではマムシ毒の蛋白は殆んど全量吸着されずに流出する. これはマムシ毒においてはハブ毒, コブラ毒の場合と異なつて酵素蛋白と他種蛋白が強く結合しているためによるが, これは第 1 報⁹⁾ の沱紙電気泳動の結果からも推察できたことである. iii) の Sinsheimer 法をマムシ毒に応用した結果は熱処理によつてジエステラーゼの活性を著しく減少させることを経験したので, 著者等は多少の改良を試みた. 即ち前報に報告した様にマムシの粗毒中のジエステラーゼはコブラ毒と同じく 55°, 60 分の処理に対して安定であり, 5'-ヌクレオチダーゼはこの際その約 80% が失活するのを知つたので, まず粗毒のままを熱処理した後アセトン分画に移る方法をとつた. その操作法は Table I に示したが, 収量は Table II の如く 8% である. この方法は簡単な操作で一応ジエステ

Table I. Purification of Phosphodiesterase by Acetone Fractionation

500 mg. of crude venom is suspended in 50 cc of water centrifuged, 0°, 6,000 r.p.m. 20 mins.	
Supernatant (I)	Precipitate
incubated for 30 mins. at 55°, centrifuged, 6,000 r.p.m. 20 mins.	
Supernatant (II)	Precipitate
added 33 cc. of acetone, after 1 hr. at 5°, centrifuged, 10,000 r.p.m. 40 mins.	
Supernatant (III)	Precipitate
added 66 cc. of acetone, standing overnight in cold room, centrifuged, 10,000 r.p.m. 40 mins.	
Precipitate (IV)	Supernatant
suspended in 50 cc. of water, precipitated with 40% and 66% acetone and this procedure repeated.	
Precipitate (V)	
suspended in 16 cc. of water, lyophilized partially purified phosphodiesterase (VI)	

Table II. Phosphodiesterase Activity of each Fraction during Precipitation

Procedure described in Table I				
Fraction number	Total E 280	Total unit	Specific activity	Recovery (%)
Crude Venom	535	55.3	0.113	—
(II)	425	42.6	0.1	77
(V)	148	5.42	0.04	9.8
(VI)	135	4.5	0.03	8.1

ラーゼを分離し得るというものの, 収量悪く, かつえられた標品の比活性も低い. またジエステラーゼ以外の諸酵素をすべて犠牲にするということは, 蛇毒の高価な点を考えれば賢明でない. 従つて著者等はジエステラーゼ以外の酵素をも同時に分離できるよう考慮を払いながらジエステラーゼを精製する方法を考案しようとし, 適当な吸着剤と溶出液の選択に努めつつクロマトグラフィーによる分離を試みた. その結果として新たに沱紙燐酸カルシウムゲル吸着に基づくジエステラーゼの精製法を考察したが, この方法によれば, 5'-ヌクレオチダーゼの夾雑なく, しかも活性の高いジエステラーゼを好収量でえることができる. またこの際 L-アミノ酸酸化酵素とレンチナーゼ A は共存したままジエステラーゼと分別されるが, 更に L-アミノ酸酸化酵素とレンチナーゼ A を分離するには, 硫酸塩析によるのが最も好都合である.

各種吸着剤の活性試験 まずクロマトグラフィーに用いる吸着剤のジエステラーゼに対する吸着試験を Batch 法で行った。選んだ吸着剤は吸着クロマトグラフィー用のものとして磷酸カルシウムゲル (Ca-P-gel), アルミナ-C γ -ゲル (Al-C γ -gel), ハイフろスーパーセル, セライト 545 であり, イオン交換クロマトグラフィー用としてカルボキシメチルセルロース (CM-cellulose), Amberlite IRC-50, 磷酸セルロース (P-cellulose) などである。この Batch 法の結果は Fig. 1 に示したが, 縦軸には酵素活性を吸着剤を加えない場合を 100%として示し, 横軸には吸着剤の量を示した。マムシ毒のジエステラーゼは Ca-P-gel と Al-C γ -gel にのみ良く吸着され, CM-cellulose, IRC-50 には殆んど吸着されない。P-cellulose, セライト 545 はジエステラーゼに対して吸着能を全然示さなかつた。この結果に基づいて著者等はマムシ毒を Ca-P-gel と Al-C γ -gel に吸着させる方法をと

Fig. 1.
Adsorption of Phosphodiesterase on various
Adsorbents

1. Carboxymethylcellulose (115 mg./cc.)
2. Cellulose powder (200 mg./cc.)
3. Amberlite IRC-50 (XE 64) (360 mg./cc.)
4. Calcium-Phosphate-Gel (29 mg./cc.)
5. Alumina-C γ -Gel (245 mg./cc.)

2 mg. of crude venom (in 1 cc. of H₂O) was used

り, これからジエステラーゼを溶出させる条件について検討した。即ち Fig. 1 の結果から一定量の蛇毒溶液に対して必要な吸着剤の量を算出し, これにジエステラーゼを吸着させる。次いで下記の各種溶出剤を用いて, その濃度をかえつつジエステラーゼを抽出し, 各部分の蛋白量と酵素の活性をはかりジエステラーゼを良好な収量で回収し得る条件をしらべた。使用した溶出剤は酢酸緩衝液 (pH 5.6~6.8), トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.2), グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.0), 塩化カリウム液, 硫酸アンモン液 (pH 7.0), 重炭酸ナトリウム液などである。上のうち Ca-P-gel からの溶離にはグリシン緩衝液と塩化カリウム液が, Al-C γ -gel からの溶離には硫酸アンモン液と重炭酸ナトリウム液が最も適当であつた。また Al-C γ -gel の場合は酵素の活性の上昇, 酵素の回収ともに Ca-P-gel の場合に比べて悪く, その点から考えて, ジエステラーゼの精製には Ca-P-gel を吸着剤とするのが最も良いと判定した。Table III に Ca-P-gel による吸着並びに各種溶出液による溶離の状態を示し, Table IV に各溶出部分のジエステラーゼ活性と 5'-ヌクレオチダーゼ活性を示した。この分散吸着法を 3~4 回にわたって試みたが再現性にとみ, かつ全操作を通じて全蛋白量の回収も良好で常に 100%付近の値を示した。この方法の特徴は, 操作が簡単で 1 日で酵素の分離ができ, 5'-ヌクレオチダーゼ活性はその殆んどがグリシン溶出部のみに認められて, ジエステラーゼと良く分離されていることにある。またジエステラーゼは 0.2 M と 0.5 M の塩化カリウム液で約 45%溶離回収され, また 0.2 M グリシン溶出部における 5'-ヌクレオチダーゼの回収は約 27%で, これらの結果を次の項のカラムクロマトグラフィーのときの参考とした。なお Ca-P-gel によつて粗蛇毒蛋白の約 76%が吸着されているが (Table IV), これから直接 0.1 M 以下の塩化カリウム液, または 0.2 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.2), または 0.2 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.0) で抽出を行うと, いずれの場合も吸着された蛋白の約半量ずつが 5'-ヌクレオチダーゼ活性をともなつて溶出される。

カラムクロマトグラフィーによるジエステラーゼの分離 前項の Ca-P-gel を吸着剤に用いた結果をカラムクロマトグラフィーに応用するにあつて, 著者等は吸着剤に汚紙粉を加えて流速を高めるよう工夫した。即ち Ca-P-gel をそのままカラムに詰めるときは, 流速が著しく遅く (1.0~1.5 cc/hr) 溶出に長時間を要したので,

Table III. Elution of Phosphodiesterase adsorbed on a Calcium-Phosphate-Gel

100 mg. of crude venom is suspended in 50 cc. of water
centrifuged, 0°. 4500 r.p.m. 15 min.

Supernatant	Precipitate
40 cc. of Calcium-Phosphate-Gel (29 mg./cc.) added, after 30 min. at room temperature, centrifuged	
Precipitate	Supernatant (I)
extracted with 50 cc. of 0.2 M tris buffer (pH 7.2)	
Precipitate	Supernatant (II)
extracted with 50 cc. of 0.2 M glycine buffer (pH 9.0)	
Precipitate	Supernatant (III)
extracted with 50 cc. of 0.1 M KCl solution	
Precipitate	Supernatant (IV)
extracted with 50 cc. of 0.5 M KCl solution	
Precipitate	Supernatant (V)

Table IV. Phosphodiesterase and 5'-Nucleotidase Activities of each Fraction obtained according to the Purification Procedure described in Table III

Fraction number	Total E 280	Total unit		Specific activity		Recovery (%)	
		Phospho-diesterase	5'-Nucleo-tidase	Phospho-diesterase	5'-Nucleo-tidase	Phospho-diesterase	5'-Nucleo-tidase
Crude venom	107.5	11.5	1292	0.113	12.0	—	—
Supernatant (I)	24.7	0	0	0	0	0	0
Supernatant (II)	9.75	0	42	0	4.7	0	3.5
Supernatant (III)	34.6	0	325	0	10.1	0	27
Supernatant (IV)	5.75	2.25	0	0.551	0	20	0
Supernatant (V)	31.5	4.25	0	0.23	0	37	0

Tiselius⁷⁾ の方法に準じて沔紙粉 (50~100 mesh) を含ませたものを新たに作成し, これをカラムクロマトグラフィー用とした. Fig. 2 はこの沔紙-Ca-P-gel を用いて得たクロマトグラムで, 予想通りジエステラーゼ活性は 0.5 M 塩化カリウム溶出部に見出され, その回収率は 35~40%である (Table V). また粗毒からの純度の上昇は I の部分で 5 倍, II の部分で約 25~30 倍で, I, II いずれの部分にも 5'-ヌクレオチダーゼ活性は殆んど認められなかつた. またこの部分の酵素標品を DNA からのオリゴヌクレオチドに作用させるとジエステラーゼの作用で生成したヌクレオチド類のみ検出でき, 5'-ヌクレオチダーゼによるヌクレオシドの遊離をみない.

L-アミノ酸酸化酵素とレンチナーゼ A の分離 前項のカラムクロマトグラフィーによるジエステラーゼの分離の研究に平行して, 著者等は各分画部分について L-アミノ酸酸化酵素活性を調べ, 一方河内等¹¹⁾ はレンチナーゼ A 活性を調べた. その結果上記両酵素の殆んどが 0.005 M 塩化カリウム溶出部に集つており, ジエステラーゼと分離されていたが, その際の L-アミノ酸酸化酵素活性は, 粗毒における全酵素単位の 2.5~3.0 倍を示した. このことは粗毒中に L-アミノ酸酸化酵素の活性を阻害するものが含まれ, このものが Ca-P-gel 吸着によつて除去された可能性を示している. 0.005 M 塩化カリウム溶出部について L-アミノ酸酸化酵素とレンチナーゼ A を分離するためには硫酸分割を試みた. Fig. 3 は約 160 mg の蛋白量の試料で作成した硫酸塩析曲線で, 0.3 飽和の硫酸濃度でレンチナーゼ A が約 60%, 0.5 飽和の硫酸濃度で L-アミノ酸酸化酵素の約 65%が塩析され

7) S. M. Swingl, A. Tiselius: Biochem. J. 48, 171(1951).

†) 武田研究所杉野氏に酵素標品を送つてしらべてもらった.

††) 本誌に別報の予定.

Fig. 2. Chromatography of Japanese Mamushi Venom on a Cellulose-Calcium-Phosphate-Gel

—•—•— extinction at 280 mμ. - - - - activity of phosphodiesterase expressed in extinction at 440 mμ of *p*-nitrophenol liberated. ○ - - - ○ activity of L-amino acid oxidase expressed in μL of O₂ uptake. Conditions: 300 mg. of venom was placed on a Cellulose-Calcium-Phosphate-Gel column (1.5×16 cm.). Effluent was with KCl solution at a rate of 6.5 cc. per hour. Enzyme activity was measured with 1 cc. of effluent solution.

Table V. Phosphodiesterase and Phosphomonoesterase Activities of each Fraction obtained from Fig. 2.

Fraction	Total E 280	Total unit		Specific activity		Recovery (%)	
		Phospho- diesterase	Phosphomo- noesterase	Phospho- diesterase	Phosphomo- noesterase	Phospho- diesterase	Phosphomo- noesterase
Crude venom	327	48	26.5	0.146	0.081	—	—
0.005 mol elute	234	1.7	0	0.064	0	3.3	0
0.1 mol elute	7.88	0	5.6	0	0.7	0	21.1
(I)	26.1	13.6	4.2	0.5	0.15	28	15
(II)	1.02	4.25	0	4.17	0	9.0	0

Unit recovery 40.3%

る。小スケールでもかくの如き結果をえたので、更に大量の試料で試みれば一層好結果を収めると考え、まず 0.28 飽和の硫酸濃度で塩析してレンチナーゼ A を除き、次いで硫酸濃度を 0.58 飽和に上昇させて淡黄色の L-アミノ酸酸化酵素を沈澱させた。この操作を 2 回くり返して後沈澱を少量の水に溶して透析膜に入れ、これを 0.77 飽和の硫酸液中に浸せば、内部液の硫酸濃度の上昇にともなつて酵素蛋白が再沈澱する。かくしてえた L-アミノ酸酸化酵素の標品の比活性は粗毒に比べて約 11 倍に上昇している。また 0.005 M 塩化カリウム溶出部からの塩析による酵素の収量は約 27%である (Table VI)。

総括 1) 蛇毒中のジエステラーゼをアセトン分別法によつて分離する Sinsheimer の方法に多少の改良を加えてマムシ毒に応用した結果、ジエステラーゼを比較的簡単な操作で分離した。しかし、ジエステラーゼの比活性の上昇、酵素の回収、ジエステラーゼ以外の酵素の活用等を考え併せると、この方法は良好なものといにくい。2) 汚紙-Ca-P-gel を用いる吸着クロマトグラフィーを応用して純度の高いジエステラーゼを好収量で得る方法を考案した。この方法によつてえたジエステラーゼの標品は非特異性のモノエステラーゼを含むが 5/-

Fig. 3.
Salting out Curve of L-Amino Acid Oxidase
and Lecithinase A
Enzyme activity were measured with the
precipitated protein
- - - - - L-Amino acid oxidase
- Lecithinase A

ヌクレオチダーゼを含まないので核酸の構造研究に利用しうる。3) 沱紙-Ca-P-gel クロマトグラフィーでジェエステラーゼと分別した L-アミノ酸化酵素+レンチナーゼ A 部分に硫酸分割法を応用し、レンチナーゼ A を含まない L-アミノ酸化酵素をえた。かくしてえた L-アミノ酸化酵素の純度は粗毒の約 11 倍に上昇している。4) 蛇毒の粗毒中には L-アミノ酸化酵素を阻害する物質があり、このものは Ca-P-gel に吸着される。

Table VI. Increase in L-Amino Acid Oxidase Activity during Combined Purification
Procedure (Chromatography and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fractionation)

Fraction	Total E 280	Total unit	Specific activity	Recovery (%)
Crude venom	327	132.8	0.41	—
0.005 M elute in Fig. 2	163.8	476	2.9	100
Supernatant with 0.28 saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	32.8	171	5.22	36
Precipitate with 0.58 saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	27.9	129.6	4.64	27

本実験に用いた蛇毒は武田薬工株式会社よりいただいた、ここに深謝する。また実験に種々の御便宜をあたえられた武田研究所杉野幸夫氏に謝意を表す。また実験の一部に協力された星葉大河内佐十氏に感謝する。

実 験 の 部

蛇 毒 マムシ (*Agkistrodon halys blomhoffi* Boie) の毒の水溶液は一般に僅かに濁りがあり、その 1 mg を 1 cc に溶かして 280 m μ における吸光係数を測定した結果は 1.09 であった。

蛋白量の測定 Beckman D. U. 分光光度計を用いて 280 m μ における吸光係数を求め、その値から全蛋白量を算出。

酵素活性の測定と酵素単位 ジエステラーゼ、モノエステラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼなどの活性の測定法並びに酵素単位はいずれも第 2 報⁹⁾ に準じた。L-アミノ酸化酵素の活性は、Warburg 検圧計で測定。主室に酵素液 0.5 cc と 0.14 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 1.0 cc、側室に 0.1 M ロイシン 0.5 cc、副室に 20% KOH 0.2 cc と沱紙切片を入れて 5 分空振後、測定の基質を加え酸素吸収を測定。37.5°, 60 分の酸素吸収が 60 μL に達した時を 1 単位とした。

比活性の算出 純化された程度を知るため、単位あたりの蛋白量と酵素活性の単位との比を求めて比活性を算出。即ち ジエステラーゼは E 440/15 min./E 280, 5'-ヌクレオチダーゼは P γ /10 min./E 280, L-アミノ酸化酵素は 60 μL O₂/60 min./E 280 で比活性を示してあり、Table VI 中の Total unit の欄の数字を Total E 280 の欄の数字で除した値が比活性となる。

吸着剤の作成と試験 Al-C γ -gel は文献⁹⁾ 記載の方法で調製。又沱紙 Ca-P-gel は粉末東洋沱紙 (50~100

mesh), 0.1 M CaCl_2 及び 0.033 M KH_2PO_4 溶液をアンモニアアルカリ性で混合し、一夜冷所に放置後、ネスラー反応が陰性になるまで水洗して作った。CM-cellulose と P-cellulose は Peterson¹⁰⁾ 等の方法に従い粉末東洋汙紙 (100~200 mesh) から作成。吸着能の試験に際しては、吸着剤の懸濁液を Fig. 1 の量ずつ遠心管に入れ、おのおのに粗毒 2 mg を 1 cc の水に溶かした液を加えた後全量を 3 cc とし、10 分放置後遠心、上澄液の蛋白量とジエステラーゼ活性を求めた。

吸着用カラムの調製とジエステラーゼの分離 汙紙-Ca-P-gel を 1.5×30 cm のカラムにつめ、圧力を加えて 16 cm の高さの塔となし、蒸留水で一夜洗浄後 0.005 M KCl 300 cc を流す。カラムの調製後吸着剤の上部にある液を静かに吸い上げて吸着層を露出させる。マムシ毒 300 mg を 3 cc の水に溶かして遠沈した上澄液を吸着塔の上に加え、全量沈下するのをまつて 0.005 M KCl で溶出する。溶出液はフラクションコレクターに一定量 (6.5 cc) ずつ採取し、おのおの溶出部分について蛋白量とジエステラーゼ活性を求めた。一定濃度の溶出液での蛋白の溶出が終了したら順次溶出剤の濃度の高いものを用い上の操作を反復する。

硫安分割による L-アミノ酸酸化酵素の分離 この操作はすべて 5° で行つた。汙紙-Ca-P-gel クロマトグラフィーによる 0.005 M KCl 溶出部分を集めて 12 時間静置透析後、アンモニア水で pH 7.5 とし、結晶硫酸アンモン微粉末を加えて 0.28 飽和とする。1 時間放置後 7500 r.p.m. で 15 分遠沈し、上澄液をとつて 0.45 飽和 (pH 7.0) とすると淡黄色の沈澱を生成する。1 時間放置後 7500 r.p.m. で 30 分遠心分離、沈澱を 5 cc の水に溶かし再び上記の硫安塩析をくり返す。最後に 0.45 飽和のときの沈澱を 5 cc の水に溶かしてセロファン透析膜に入れ、これを 0.77 飽和硫安液 (pH 7.6) 中に 24 時間放置。透析膜中に生成した沈澱は 0.1 M KCl に溶かして保存し、酵素活性を測定。

京都大学医学部薬学科

10) E. A. Peterson, H. A. Sober: J. Am. Chem. Soc. **78**, 751(1955).

UDC 547.993 : 598.126

81. 鈴木友二, 岩永貞昭: 蛇毒蛋白の研究 (第4報)

コブラ毒のアルカリ性フォスファターゼ類の分離について

Tomoji Suzuki and Sadaaki Iwanaga: Studies on Snake Venoms. IV.
Purification of Alkaline Phosphatases in Cobra Venoms.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

The venom from Formosan cobra (*Naja naja atra* CANTOR), differing from that of domestic asp (*Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE), is adsorbed easily on alumina-C γ -gel, calcium phosphate gel (Ca-P-gel), as well as carboxymethylcellulose (CM-cellulose), Amberlite IRC-50 (XE-64), and phosphate-cellulose, and any of the ion exchangers can be utilized for obtaining phosphodiesterase free from phosphomonoesterase from cobra venom. The sample of purified phosphodiesterase from the cobra venom does not contain 5'-nucleotidase or phosphomonoesterase, being approximately 25 times purer than the crude venom, and was obtained in approximately 10% yield.

Column chromatography with CM-cellulose was applied to the separation of alkaline phosphatase from cobra venom and stepwise elution analysis and gradient elution analysis, using acetate buffer solution as the eluate, were attempted. By these means, glycerophosphatase, phosphodiesterase, and 5'-nucleotidase were separated in good yields. It was found that the active portion of phosphodiesterase was separated into two by this column chromatography and the presence of two kinds of phosphodiesterase was evidenced by rechromatography.

(Received October 4, 1957)

さきに著者等は本邦産のマムシ毒から、吸着クロマトグラフィーと硫安分割法の組合わせで、フォスフォジエステラーゼ、L-アミノ酸酸化酵素、レンチナーゼ A などの分離¹⁾を行つた。今回は台湾産コブラ毒からフォスファターゼ類の分離を試みたが、コブラ毒はマムシ毒に比べてフォスファターゼの活性が強く、好都合である。研究に際しては前報の汙紙磷酸カルシウムゲル (汙紙-Ca-P-gel) の吸着クロマトグラフィーで分けにくかつた

1) 鈴木, 岩永: 本誌 **78**, 362(1958).