UDC 547.993 : 598.126

109. 佐々木豊作：台湾コブラ蛇毒の化学的研究 (第 4 報)

精製レシチナーゼの末端アミノ酸，分子量並びにアミノ酸組成について

Toyosaku Sasaki: Chemical Studies on the Poison of Formosan Cobra. IV.
Terminal Amino Acid Residues, Molecular Weight and Amino Acid
Composition of Purified Lecithinase.

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

The Formosan cobra venom was purified by fractional precipitation with acetone, ammonium sulfate, and ethanol, and a homogeneous substance, assumed to be lecithinase, was obtained. Its minimum lethal dose in mouse was 12~13 γ /g. and its lecithinase action was approx. 16 times that of the crude venom. Its molecular weight was calculated as 28,500 (osmotic pressure method). Aspartic acid was detected as the N-terminal amino acid and aspartic acid, glutamic acid, and glycine as the C-terminal acid. C terminal aspartic and glutamic acids are present as asparagine and glutamine, and the carboxyl group in the β -position in the N-terminal aspartic acid is thought to be present as an amide form or in peptide bonding. From the result of determination of these terminal amino acids, the peptide chain constituting the lecithinase is assumed to be branched. The composite amino acids of the lecithinase are shown in Table III from which it can be seen that all the nitrogen in the lecithinase are only from these amino acids. Since the lecithinase gives a weak positive Molish reaction, presence of a sugar component can be assumed but the amount must be very small since the lecithinase is composed almost entirely of these amino acids.

Comparison of these results with the properties of crotoxin obtained by Fraenkel-Conrat and others¹³⁾ indicate difference in the terminal amino acids and amino acid composition and, therefore, the lecithinase-active substance in crotoxin must have a different structure from the lecithinase in Formosan cobra venom.

(Received December 3, 1957)

蛇毒中に, lecithin の存在で溶血作用を起す物質即ち lecithin に作用して不飽和の脂肪酸を分離し溶血作用のある lysolecithin とする酵素の存在は古くから知られている. 著者が第 2 報¹⁾ 第 3 報²⁾ に於いて台湾コブラ蛇毒より分離精製した神経毒 neurotoxin に就いて末端アミノ酸及びアミノ酸組成を研究し, neurotoxin の構造, 分子量等に就き若干の知見を報告したが, 今回 neurotoxin の精製中均一な lecithinase と推定されるものを得た.

粗製台湾コブラ蛇毒をアセトンにて精製する際にアセトン濃度 1:1 で沈澱する部分は毒力極めて強く同時に lecithinase 作用も著しく強くなることは第 1 報³⁾ に報告した通りである. この部分を更に硫酸アンモンで分割沈澱して精製すると lecithinase の部分は先に沈澱して lecithinase 作用のない neurotoxin と分離される³⁾. この部分を水溶液としエタノールで分割沈澱精製すればマウスに対して MLD 12~13 γ /g (neurotoxin の 1/120 ~ 1/130 の毒力) の極めて毒力の弱い部分が得られるがこの部分は lecithin の存在で溶血作用著しく強く原毒の約 16 倍の強さである. lecithin の存在しない場合は溶血作用を起さないことから著者の得たものは De⁴⁾ が Indian cobra 毒に検出した hemolysin とは異り lecithinase に相当するものである. この様にして得られた精製 lecithinase は Adamkiewicz 反応, Pauly のジアゾ反応及び Millon 反応を呈する. また Molish 反応弱陽性なり. 浮紙電気泳動法にて検すると pH 5 (磷酸緩衝液) にて陰極側に移動する一個のスポットを与えることから均質なものとして推定される. よつてこれを材料として先ず Mallette⁵⁾ の方法に従い滲透圧法にて分子量測定の結果 28,500 の値を得た. 次に末端アミノ酸の検出を試みた. 試験方法は第 2 報¹⁾ 記載の Sanger のジニトロ

* Sasayama, Hyogo-ken.

1) 佐々木: 本誌 77, 845(1957).

2) 佐々木: 本誌 77, 848(1957).

3) 佐々木: 本誌 71, 589(1951).

4) S.S. De: Indian J. Med. Research, 27, 793(1940); C.A. 34, 7438⁸(1940).

5) M. F. Mallette: Arch. Biochem. Biophys. 48, 315(1954).

フェニル (以下 DNP と略記) 化法⁶⁾ Levy⁷⁾ の二次元クロマトグラフィーによる DNP アミノ酸の分離定性定量を行つた他に Braunitzer⁸⁾ の方法をも試みアミノ末端アミノ酸としてエーテル可溶性部分にアスパラギン酸, ロイシン, バリンを検出した. また水溶性の部分に ϵ -DNP リジンを検出した.

カルボキシル末端アミノ酸に就いては第2報¹⁾ 記載の赤堀等の方法⁹⁾ に従い lecithinase を無水ヒドラジンにて分解せるものを DNP 化して得られる DNP アミノ酸の中重曹溶液に移行する部分を Levy の方法⁷⁾ 或いは Braunitzer⁸⁾ の方法に従い二次元ペーパークロマトグラフィーにより定性, 定量を行つた. その際にアスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, セリン, を検出したがアスパラギン酸及びグルタミン酸は bis-DNP アスパラギン酸 β -モノヒドラジド及び bis-DNP グルタミン酸 γ -モノヒドラジドとして得られるのみで bis-DNP アスパラギン酸 α -モノヒドラジド或いは bis-DNP グルタミン酸 α -モノヒドラジドは得られなかつた. このことからアスパラギン酸及びグルタミン酸は何れもカルボキシル末端より由来するものでそれ等のアミノ酸はアスパラギン及びグルタミンの形でカルボキシル末端に存在するものと考えられる. また bis-DNP アスパラギン酸 α -モノヒドラジドが得られなかつたことからアミノ末端アスパラギン酸は β 位のカルボキシル基はアミド態として即ちアスパラギンの形として存在するか或いはペプチド結合の状態では存在するものと考えられる.

これ等の末端アミノ酸に就いての実験結果を Table I に示す.

Table I. DNP-Amino Acids obtained by DNP-and Hydrazinolysis-Method.

	Aspartic acid	Glutamic acid	Glycine	Serine	Leucine	Valine
Amino acids obtained by hydrazinolysis-method. (mol. per 100 g. protein)	0.0275	0.00759	0.00418	0.0010 ^{a)}		
Amino acids obtained by DNP-method. (mol. per 100 g. protein)	0.00592				0.00071 ^{a)}	0.00055 ^{a)}

a) These Values are small and negligible as compared with the amounts of the other.

Table I から明らかな様にアミノ末端の部分に検出されたロイシン及びバリン, カルボキシル末端に検出されたセリンは他のアミノ酸に比較して収量著しく少く末端アミノ酸とは認め難い. 従つてアミノ末端アミノ酸としてはアスパラギン酸, カルボキシル末端アミノ酸としてはアスパラギン酸, グルタミン酸及びグリシンが存在するものと推定される. これ等の含量, 分子比, 含量より計算して得られる分子量等を Table II に示す.

Table II. Terminal Amino Acid Residues and its Molar Ratio of Lecithinase

	Ash-free Lecithinase (mol./100 g.)	Calcd. molar ratio of amino acid	Assumed molar ratio of amino acid	min. mol. wt.	Calcd. mol. wt.
C-Terminal Aspartic acid	0.0275	7.83 ^{a)}	8	3,636	29,088
C-Terminal Glutamic acid	0.00759	2.16	2	13,176	26,352
C-Terminal Glycine	0.00418	1.19	1	23,900	23,900
N-Terminal Aspartic acid	0.00593	1.69	2	16,860	33,720

a) Calculated for molecular weight of 28,500 obtained by the osmotic-pressure method.

Table II に示したカルボキシル末端アスパラギン酸及びグルタミン酸は既に述べたごとくアスパラギン及びグルタミンの形で存在したアミノ末端アスパラギン酸は β 位のカルボキシル基がアミド態か或いはペプチド結合の形で存在するものと考えられるが Table II から分る様に末端アミノ酸の含量から計算して得られる lecithinase の分子量は 24,000~30,000 程度のものとなるがこの値は浸透圧法によつて得られる分子量 28,500 に略一致する値である. 浸透圧法によつて得られた分子量 28,500 に対する各末端アミノ酸の分子比を計算した結果は, Table II に示した通りであるがアミノ末端アスパラギン酸 2, カルボキシル末端アミノ酸はアスパラギン酸 8, グルタミン酸 2, グリシン 1, となり lecithinase を構成するペプチド鎖は分枝した構造のものと推定される.

更に lecithinase を構成するアミノ酸組成に就いて研究を行つた. 精製した lecithinase が Adamkiewicz 反

6) Sanger: Biochem. J. **39**, 507(1945).

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

8) G. Braunitzer: Chem. Ber. **88**, 2025(1955).

9) S. Akabori, et al: Proc. Japan Acad. **29**, 561(1953); Bull. Chem. Soc. Japan **29**, 508(1956).

応, Millon 反応何れも陽性であることからトリプトファン及びチロジンの存在することは考えられるがこれを 6 N 塩酸で 20 時間加水分解したものに就き構成アミノ酸をペーパークロマトグラフィー及び濾紙電気泳動法によつて検索した結果 15 種のアミノ酸を検出した。これ等のアミノ酸を第 3 報²⁾に於いて neurotoxin の構成アミノ酸を定量したのと同じ方法で定量した結果は Table III に示した通りである。

Table III. Amino Acid Composition of Lecithinase isolated from the Formosan Cobra venom, and Crotoxin isolated from the Venom of *Crotalus terrificus terrificus*.

Amino acid	Lecithinase isolated from the Formosan Cobra venom (T. Sasaki)					Crotoxin (H. Fraenkel-Conrat and B. Singer)			
	Amino acid residue g./100 g. protein	N as % of total N 16.70%	Calcd. No. of residue for mol. wt. of 28,500 ^{a)}	Assumed No. of residue	Min. mol. wt.	Calcd. mol. wt.	Insoluble DNP-fraction %	Soluble DNP-fraction %	Crotoxin %
Glycine	2.67	3.92	13.30	13	2,138	27,794	6.1	7.5	7.2
Threonine	3.41	2.83	9.60	10	2,970	29,700	5.2	4.8	5.3
Serine	2.06	1.98	6.74	7	4,239	29,673	4.2	4.9	4.6
Cystine	7.88	6.46	11.00	11	2,593	28,523	10.4	10.7	12.9
Aspartic acid	17.14	12.48	42.30	42	672	28,224	9.8	16.8	11.7
Glutamic acid	9.17	5.96	20.20	20	1,406	28,120	10.9	20.2	12.8
Tyrosine	8.27	4.25	14.42	14	1,972	27,608	8.5	4.3	10.8
Leucine	8.03	5.96	20.20	20	1,406	28,120	9.6	6.6	8.7
Valine	3.49	2.95	10.05	10	2,838	28,380	2.4	1.9	2.4
Phenylalanine	6.22	3.54	12.30	12	2,310	27,720	6.6	5.2	6.6
Alanine	2.90	3.42	11.65	12	2,448	29,346	4.2	5.4	4.3
Lysine	5.06	6.64	11.25	11	2,532	27,852	8.5	3.3	8.6
Arginine	5.78	12.41	10.65	11	2,703	29,733	10.5	4.6	8.5
Histidine	5.13	9.42	10.70	11	2,673	29,403	2.3	1.4	2.2
Proline	4.54	3.92	13.30	13	2,138	27,794	3.8	5.0	4.8
Tryptophan	4.26	3.82	6.52	7	4,374	30,618	2.6	2.2	3.9(2.7)
Methionine	—	—	—	—	—	—	1.1	0.9	1.5
Amide	2.25 ^{a)}	12.00	40.02 ^{a)}	40 ^{a)}	713	28,520	0.92	1.49	1.1
Total	96.01	101.96	224.18	224		28,655 ^{b)} 28,500 ^{c)}			

a) These values are omitted from the total.

b) Average molecular weight for all amino acids and amide.

c) This value was obtained by the osmotic-pressure method.

Table III より明らかな様にアスパラギン酸, グルタミン酸及びロイシンが特に多く含有されているが全窒素に対する各アミノ酸の N % の総和は殆んど 100% となり lecithinase を構成する窒素成分はこれ等のアミノ酸のみより構成されているもので他の窒素成分は含有しないということが明らかである。Molish 反応弱陽性であることから若干の糖成分の存在が予想されるが Table III でも明らかな様に lecithinase 100 g に対する各アミノ酸残基の g 数の総和が殆んど 100% に近いことから見て lecithinase を構成するものは殆んどこれ等のアミノ酸だけであつてその他の成分は含有されていてもはなはだ少ないものと考えられる。また浸透圧法により得た分子量 28,500 に対する各アミノ酸残基の計算された分子量の平均値は 28,655 となり殆んど一致する。またアミノ酸残基の総和は 224 個とり各残基の g 数を総計したものは 27,376 となり浸透圧法により得た分子量 28,500 に近い値となりこの点から見ても lecithinase を構成するものはこれ等アミノ酸のみで他の成分は含有されていてもはなはだ少ないことが明らかである。

かつて Slotta 及び Fraenkel-Conrat¹⁰⁾ は *Crotalus terrificus terrificus* 蛇毒より神経毒作用並びに lecithinase 作用を持った結晶蛋白質である crotoxin を得たと報告している。著者が台湾コブラ蛇毒の研究中溶血作用の殆んどない neurotoxin を分離し得ることから³⁾ Slotta 等の神経毒作用と lecithinase 作用とを兼有す

10) K. H. Slotta, H. L. Fraenkel-Conrat: Ber. 71, 1076(1938).

る結晶 crotoxin を得たという報告に疑問を持つていたが最近 Neumann 及び Habermann¹¹⁾, Neumann¹²⁾ は *Crotalus terrificus terrificus* 蛇毒の crotoxin に就いて研究の結果 lecithinase 作用のない神経毒 crotoactin 及び lecithinase 作用物質即ち phospholipase A の分離精製に成功している。また Fraenkel-Conrat 及び Singer¹³⁾ も crotoxin の DNP 化物について再検討の結果 crotoxin を水に可溶性の DNP-protein 及び水に不溶性の DNP-protein の二種に分離し得ることを見て crotoxin は少くとも二種の蛋白質の混合物であるという結論に到達しており、それ等二種の DNP-protein の末端アミノ酸を研究して水に可溶性の部分及び水に不溶性の部分の何れの部分にも アミノ末端アミノ酸としてセリン、カルボキシル末端アミノ酸としては可溶性の部分にアスパラギン酸を検出している。また分離しない元の crotoxin に就いてはアミノ末端としてセリン、カルボキシル末端としてはアスパラギン酸を検出しているが著者が台湾コブラ蛇毒から精製して得た lecithinase の末端アミノ酸に就いての研究結果アミノ末端アミノ酸としてアスパラギン酸、カルボキシル末端アミノ酸としてアスパラギン、グルタミン、グリシンを検出したことから考えると *crotalus terrificus terrificus* 毒中の lecithinase 作用物質は台湾コブラ蛇毒より得た lecithinase とは構造に於いて著しい差異があるものと考えられる。このことは Table III に示した Fraenkel-Conrat 等の crotoxin のアミノ酸に就いての分析結果とコブラ蛇毒の lecithinase のアミノ酸に就いての分析結果との間に相当の差があることから見ても明らかである。この事は他の起源の lecithinase 作用物質についても云われ得ることで同じ lecithinase 作用を持つていても起源を異にすると構造に差異のあることが考えられ従つてその至適 pH 及び最適温度等種々の値が報告されていることは¹⁴⁾ 当然の事と考えられる。

本研究は恩師朝比奈泰彦先生の御指導を得たものである。又元兵庫農大教授上田英之助博士の御便宜御鞭撻を得たものである。厚く感謝の意を表します。

実 験 の 部

Lecithinase の精製 粗製台湾コブラ蛇毒を 10%水溶液となし Me_2CO にて濃度 1:1 にて沈殿する部分を再沈殿により精製後減圧乾燥したものゝ 10%水溶液とし $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 飽和溶液を加え半飽和にて沈殿する部分を再沈殿により精製後透析減圧乾燥後再び 10%水溶液となし無水 EtOH を加え 50%(v/v) にて沈殿せる部分を再沈殿により精製したる後水に不溶性の変性蛋白質を遠心分離除去した溶液を減圧乾燥した。マウスに対して MLD 12~13 γ /g, Adamkiewicz 反応 Pauly のジアゾ反応及び、Millon 反応何れも陽性にして Molish 反応も弱陽性を呈す。沔紙電気泳動法にて pH 5.0 (磷酸緩衝液) 270 V. 1 mA/3 cm, 2.5 時間沔紙の長さ 40 cm で陰極側に移動する一個のスポットを与えた (BPB 昇汞 EtOH 液)。

Lecithinase 作用 第1報記載の方法³⁾ に従い 5%家兔血球を用い lecithin 源としては 10%卵黄液を使用して検体は 0.1%より倍数希釈の方法で希釈した液を用いて 30 分間 37° 孵卵器中に入れ 24 時間後検した。上記の方法で精製した lecithinase は原毒の 16 倍の強さの溶血作用を示した。なお上記の方法と全く同一で只卵黄を使用しない場合は全く溶血作用は認められなかつた。

分子量測定 Mallette⁵⁾ の方法によつた。H₂O を溶媒とし 25° で測定。3 回の平均値分子量 28,500 を得た。

アミノ末端アミノ酸 第2報¹⁾ 記載と同一方法にて Sanger⁶⁾ に従い DNP 化後加水分解 DNP アミノ酸の分割を行い Levy の方法⁷⁾ か或いは Braunitzer の方法⁹⁾ により二次元ペーパークロマトグラフィーにより DNP アミノ酸の定性並びに定量を行った。定量は EPU 2 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バックマン B 2 型分光光度計で 405 m μ に於ける吸光度を測定することによつて行つた実験結果は Table I, Table II に記載した通りである。これは盲検値並びに回収率を考慮して得た値である。

H₂O に可溶性の部分はその一部をとり第2報¹⁾ 記載と同様に処理しピリジン・イソアミルアルコール・1.6% NH_4OH (6:14:20)¹⁵⁾ を展開剤としペーパークロマトグラフィーにより ϵ -DNP リジンを検出した。

なお DNP-lecithinase の加水分解時間を 5 時間とした場合にも DNP グリシン, DNP-アロリンその他の耐酸性の少ない DNP アミノ酸は得られなかつた。

カルボキシル末端アミノ酸 第2報¹⁾ 記載と同様 Akabori⁹⁾ のヒドラジン分解法によつた。この方法でアスパラギン酸或いはグルタミン酸のヒドラジドの DNP 化物が生成するのを認めたので 6 N HCl にて 100° 5 時

11) W. P. Neumann, E. Habermann: Biochem. Z. 327, 170~185(1955).

12) W. P. Neumann: Naturwiss. 42, 370(1955).

13) H. L. Fraenkel-Conrat, B. Singer: Arch. Biochem. Biophys. 60, 64(1956).

14) J. B. Sumner, K. Myrbak: The Enzyme vol. I. 990.

15) G. Biserte, R. Osteux: Bull. soc. chim. biol. 33, 50(1951).

間加水分解せるものに就いて Levy⁷⁾ の方法又は Braunitzer⁸⁾ の方法に従い二次元クロマトグラフィーにより分離定量を行つた。なおアスパラギン酸とグルタミン酸の分離定量は二次元目の 1.5 M 磷酸緩衝液の代りに 2 M 磷酸緩衝液を使用した¹⁶⁾。別に加水分解せざるものに就いて第 2 報¹⁾ 記載の様に赤堀等の方法⁹⁾ に従いシリカゲルによるカラムクロマトグラフィーで bis-DNP-アスパラギン酸 β -モノヒドラジド及び bis-DNP-グルタミン酸 γ -モノヒドラジドを検出したが 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 -モノヒドラジドは検出されなかつた。なお DNP-アスパラギン酸, DNP-グルタミン酸も検出出来なかつた。

全窒素 常法に従いキールダール法で定量した。2 回平均値全窒素 16.70%

アミド態窒素 第 3 報²⁾ 記載の Bailey, Lugg¹⁷⁾ 等の方法によつた。

アミノ酸の検出 lecithinase を 6 N HCl にて 110° で 20 時間封管中で加水分解せるものを HCl を減圧蒸留除去後 Phenol : 0.1% NH₄OH (80 : 20) 及び BuOH · AcOH · H₂O (4 : 1 : 1) にて二次元展開を行いニンヒドリンによる呈色によりアスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, セリン, スレオニン, リジン, アルギニン, バリン, ロイシン, チロジン, アラニン, フェニールアラニン, シスチン, プロリンを検出し又 pH 5.9 (緩衝液: 酸性フタル酸カリ- NaOH 液) 600 V., 1 mA/cm, 2 時間 (沔紙 35 cm) の条件で沔紙電気泳動法¹⁸⁾ を行いニンヒドリン試薬及びジアゾ試薬でアスパラギン酸, グルタミン酸, ヒスチジン及びチロジンを検出した。なお lecithinase は Adamkiewicz 反応陽性であることからトリプトファンの存在を知つた。

トリプトファンの定量 第 3 報²⁾ 記載の如く Spies, Chambers¹⁹⁾ の方法により定量した。2 回平均値 0.0229 mol. per 100 g protein.

アミノ酸の定量 lecithinase を 6 N HCl で加水分解 (20 時間 110°) したものに就いて第 3 報²⁾ 記載の如く処理し Levy の方法⁷⁾ に従い pH 9.0 (Na₂CO₃-NaHCO₃ 液) にて 40° に熱しながら DNP 化を行い DNP-アミノ酸となしたるものをトルエン・ピリジン・エチレンクロールヒドリン・0.8 N NH₄OH (30 : 9 : 18 : 18) 及び 1.5 M 磷酸緩衝液にて二次元展開を行うか或いは Braunitzer の方法⁸⁾ で一次元目を 0.1% NH₄OH 飽和 BuOH を使用して二次元展開を行つて DNP-アミノ酸の分離定量を行つた。但しグルタミン酸及びアスパラギン酸の分離定量は Glick¹⁶⁾ に従い二次元目は 2 M 磷酸緩衝液を使用した。

DNP ヒスチジン及び DNP アルギニンの定量はトルエン・ピリジン・エチレンクロールヒドリン・0.8 N NH₄OH (30 : 9 : 18 : 18) にて展開分離したる後定量を行つた⁷⁾。定量は EPU 2 型日立分光光度計にて 360 m μ (但しプロリンの場合は 385 m μ) に於ける吸光度を測定し定量した。定量法の詳細は第 3 報²⁾ の通りである。定量結果は Table III の様である。

兵庫農科大学有機化学教室

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

17) K. Bailey : Biochem. J. **31**, 1406(1937); J. W. H. Lugg : Ibid, **32**, 2133(1938); 赤堀 : "蛋白質化学" (共立出版) I, 243.

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

19) J. R. Spies, D. L. Chambers : Anal. Chem. **20**, 30(1948).