ら所定の温度に 5~6 hr たもつた。恒温槽は水銀トルエン温度調節器と電子管式継電器により $\pm 0.1^\circ$ に調節した。5~6 hr で平衡に達した後、あらかじめ所定の温度に加温したフィルター付ビペットで上澄液を採取し、溶液の濃度は水溶液の場合はメチルオレンジを指示薬として $N HCl$ で滴定し、また有機溶媒の場合は減圧、常温で溶媒を蒸発させ恒量になるまで減圧乾燥して決定した。

本研究に使用した塩基は三共株式会社より提供されたもので、ここに深謝します。

京都大学薬学部

UDC 547.993 : 598.126

156. 佐々木豊作：台湾コブラ蛇毒の化学的研究 (第7報^{*1}) 台湾コブラ蛇毒の
Zone Electrophoresis

Toyosaku Sasaki: Chemical Studies on the Poison of Formosan Cobra. VII.
On the Zone Electrophoresis of Formosan Cobra Venom.

(Laboratory of Organic Chemistry, Hyogo University of Agriculture^{*2})

Zone electrophoresis of cobra venom was carried out with starch as a carrier and under conditions of pH 7.5 (acetate buffer, $\mu=0.15$), 470 V, 24 mA, and at 2° (length of starch block, 55 cm.). Formosan cobra venom was separated into three protein fractions. The two portions closest to the anode were found to contain lecithinase-A, glycerophosphatase, phosphodiesterase, strongly toxic component (neurotoxin), two kinds of phosphomonoesterase, and at least two kinds of 5'-nucleotidase. The peak of neurotoxin did not agree with that of lecithinase-A and other enzyme-active peaks, and therefore there is no connection between these enzymatic activity and toxicity. It may be concluded that lethal action of Formosan cobra venom is solely due to this neurotoxin because recovery rate of toxicity of this fraction reached ca. 92%. The other one portion which transmits most rapidly to the cathode side did not show the enzyme activity described above.

(Received October 1, 1959)

蛇毒成分の分離精製，確認については多くの報告がある。鈴木，岩永¹⁾は alumina-Cr-Gel, calcium phosphate gel, carboxymethylcellulose 等を使用するカラムクロマトグラフィーで蛇毒成分を精製し，特にアルカリ性フォスファターゼ類の分離精製を行ない良好な結果を得ており，また最近岩永，河内²⁾はマムシ毒のレンチナーゼ A を diethylaminoethylcellulose を使用するカラムクロマトグラフィーで分離している。蛇毒についての zone electrophoresis についても多くの報告があるが，逢坂³⁾は沖縄はぶ *Trimeresurus flavoviridis flavoviridis* HALLOWELL の毒成分の分離確認に澱粉を担体とする zone electrophoresis を行なっている。著者もまた台湾はぶ *Trimeresurus mucrosquamatus* CANTOR の毒成分の分離確認に同一方法を応用してほぼ満足すべき結果を得た⁴⁾。著者は台湾コブラ蛇毒の比較的多量を分画する必要にせまられたが，さきに述べた zone electrophoresis の場合，分離能も比較的高くしかも相当多量の試料を処理し得ることを知つたので，分離精製の手段としてこの方法によることを考えた。

zone electrophoresis の方法は逢坂³⁾が，沖縄はぶ毒について行なつたのと同じ方法によつたが，緩衝液には酢酸塩を使用し，pH 7.5 で行なつた。泳動後各画分について毒力，各種酵素活性等を測定した結果は Fig. 1, 2 に示した通りである。

Fig. 2 は単位蛋白量に対する各活性の強さを比較した図である。これらの図に明らかなように台湾コブラ蛇毒の蛋白成分は zone electrophoresis により大きく三つの部分に分けられる。その内陽極に近い二つの部分には図

*1 第6報：本誌 79, 35(1959).

*2 Sasayama, Hyogo-ken. 1) 鈴木，岩永：本誌 78, 368(1938).

2) 岩永，河内：本誌 79, 582(1959).

3) A. Ohsaka : J. Biochem. (Tokyo) 45, 259(1958).

4) 佐々木：本誌 80, 739(1960).

Fig. 1. The Starch Zone Electrophoretic Pattern of Formosan Cobra Venom (at pH 7.5 in acetate buffer ($\mu=0.15$) for 50 hr. at 3.5 mA/cm²).

Fig. 2. The Specific Activity per Unit Amount of Protein in the Same Electrophoretic Run as Fig. 1

に示されたようにフォスフォモノエステラーゼ、フォスフォジエステラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、グリセロフォスファターゼ、レンチナーゼ A、および著しく毒性の強い部分 (neurotoxin) が存在した。鈴木、岩永等はマムシ、はぶ、および台湾コブラ毒の諸酵素を分離する際に^{1,2,5,6)} 台湾コブラ毒からフォスフォジエステラーゼ、レンチナーゼ A をそれぞれ二種ずつ分離したが、著者の方法では図示したようにフォスフォモノエステラーゼ二種、5'-ヌクレオチダーゼは少なくとも二種、その他のものについては一種ずつ検出した。このように陽極に近い二つの部分からは種々の活性が検出されたが、陰極に最も近い残り一つの蛋白成分は上記のいずれの活性をも持たない。

毒力の著しく強い部分のピークは一カ所にあるのみで、このことから強毒成分は一種のみで他の部分には毒性があつても著しく弱いものと推定される。この毒性の強い部分のピークは図にも明らかにようにレンチナーゼ A 作用およびその他の酵素活性のピークとは一致しない。このことは単位蛋白量に対する活性の強さを比較した Fig. 2 においても同様であつて、この強い毒性を示す成分 (neurotoxin) はレンチナーゼ A および他の酵素作用と全く関係のないことが分かる。これらのことは著者がさきにレンチナーゼ作用成分を含まない神経毒 neuroto-

5) 岩永、楊、河内：本誌 78, 791(1958).

6) 第 12 回日本薬学会大会講演要旨 264 (1959) (本誌投稿予定).

Fig. 3. Recovery Rate of Activities(%)

Each activity in the starting sample (150 mg. of crude cobra venom) in the same electrophoretic run as Fig. 1 was arbitrarily valued at 100; the activity at each fraction was given as percentage of rate with the starting sample.

xin を分離したことにも一致する⁷⁾. また台湾コブラ蛇毒の致死的作用はほとんどこの毒性の強い部分 (neurotoxin) にのみによることは、使用した原毒 (150 mg) の毒力を 100 とした場合, Fig. 1 の-9~-15 の各画分の毒力の回収率 (%) はそれぞれ 1.3, 4.4, 6.0, 22.0, 38.0, 19.0, 1.3 であり (Fig. 3), その和は約 92%に達することから結論し得る.

鈴木, 岩永等⁸⁾ によつて 2, 3 のフォスファターゼ類の活性が蛇毒中の亜鉛により阻害されることが報告されているので, その内ほとんど影響を受けないフォスフォジエステラーゼとその他にレシチナーゼ A および毒力の 3 活性を対照として回収率をみた結果を Fig. 3 に示した. これらの結果を見ると各活性の回収率がいずれも 80% 以上であり, 毒力の回収率においては約 92%に達し, はなはだ良好であることが分かる. なお別に pH 5.4 (酢酸塩緩衝液), 450 V, 2° で上記同様 zone electrophoresis を行なつたところ, 若干の差はあつたが上記の場合とほとんど同一展開図が得られ, 活性の分布図もほとんど同一であつた. 台湾コブラ蛇毒の各成分の分画の目的に澱粉を担体とする zone electrophoresis を応用すると再現性もよく, 回収率もまた良好なのでこれを他の精製方法と併用すると一層良い結果が得られるものと考えられる.

実 験 の 部

実験材料 採毒後乾燥状態で十数年間保存されたもの.

Zone electrophoresis 馬鈴薯澱粉を蒸留水で洗浄, 洗液が 280 mμ の吸収がなくなる迄洗浄したものを使用した. 1.5×5×55 cm の澱粉の block の一部を 1 cm 幅に切り取り, この間隙に粗製コブラ毒 150 mg を 4.5 cc の生理食塩水に溶解し乾燥澱粉に混合してつめた. その出発点は block の中央より陽極側 8 cm の所であつた. pH 7.5 (酢酸塩緩衝液 $\mu=0.15$), 470 V, 24 mA, 2°, 50 hr の条件で泳動を行なつた. 泳動終了後 1 cm 間隔に澱粉 block を切り取り 20 cc の生理食塩水で抽出, 各画分について毒性, 酵素活性, 蛋白量等を測定した.

蛋白質の測定 280 mμ における吸光度を測定し定量した. 台湾コブラ蛇毒は 1 mg/cc のものは 0.860 の吸光度を示した.

レシチナーゼ A 活性の測定 第 6 報記載の方法による.

フォスファターゼ類の定量 鈴木, 岩永の方法⁹⁾ にしたがつて行なつた. 1) フォスフォモノエステラーゼ: *p*-nitrophenylphosphate を基質とし遊離するパラニトロフェノールの吸光係数を測定した. 2) フォスフォジエステラーゼ: $\text{Ca}[\text{bis}(p\text{-nitrophenyl})\text{phosphate}]_2$ を基質とし遊離するパラニトロフェノールの吸光係数を測定した. 3) 5'-ヌクレオチダーゼ: adenosine 5'-phosphate (Nutritional Biochemicals Co. 製品) を基質として測定, 遊離した無機燐を Ging⁹⁾ の方法にしたがい定量した. 4) グリセロフォスファターゼ: β -glycerophosphate (東京化成製品) を基質とし, 遊離無機燐を Ging⁹⁾ の方法にしたがい定量した. 活性が非常に弱い

7) 佐々木: 本誌 71, 587(1951); 77, 845(1957); 78, 517(1958). 8) 鈴木, 岩永: 本誌 78, 354(1958).

9) N. S. Ging: Anal. Chem. 28, 1330(1956).

で Fig. 1 には 30 min に遊離される無機燐の γ 数を示した。

毒力の測定 15~20 g のマウスを用い第5報^{10,11)}記載の方法にしたがつて行なつた。各群5匹のマウスを使用し、24 hr 以内の死亡数を記録し、その結果から Weiss の表によりプロビットを求め log dose に対し plot した結果より LD₅₀/g を求めた。

本研究は京都大学薬学部鈴木友二教授の御懇切な御指導によるもので、厚く御礼申し上げます。

兵庫農科大学有機化学教室

10) 佐々木：本誌 79, 35(1959).

11) E. S. Weiss : Am. J. Public Health 38, 22(1948).

UDC 547.993 : 598.126

157. 佐々木豊作：台湾はぶ蛇毒の化学的研究 (第2報^{*1}) 台湾はぶ蛇毒の Zone Electrophoresis

Toyosaku Sasaki : Chemical Studies on the Venom of Formosan Habu
(*Trimeresurus mucrosquamatus* CANTOR). II. On the Zone
Electrophoresis of Formosan Habu Venom.

(Laboratory of Organic Chemistry, Hyogo University of Agriculture^{*2})

Formosan Habu venom was fractionated by zone electrophoresis using starch as a carrier and examinations were made on enzyme activity and biological activity of each fraction. Hemorrhagic activity was not in proportion to the protease activity as measured with casein as the substrate and their peaks were not in agreement. It follows, therefore, that the component with strong hemorrhagic activity obtained from Formosan Habu venom has no protease activity or even if this activity is present, it must be extremely weak. The venom was also found to contain at least two kinds each of lecithinase and proteolytic enzyme.

(Received October 1, 1959)

台湾はぶは、蝮蛇科 Viperidae に属し、その咬傷部の出血、壊死作用の強いのが特徴である。その毒の酵素化学的研究では鈴木、岩永¹⁾のアルカリ性フォスファターゼについての報告があり、蛋白分解酵素作用については山口²⁾、土屋³⁾、佐藤、平野⁴⁾等の研究がある。従来文献によるといわゆる出血毒である台湾はぶ蛇毒はいわゆる神経毒である台湾コブラ蛇毒に比べて著しく強い蛋白分解酵素作用を持つことが注目されていて、蛋白分解酵素と出血作用および毒性との間にどのような関係があるかは非常に興味ある問題である。従来蛇毒中の蛋白分解酵素は出血ならびに壊死をひきおこす成分であるといわれており⁵⁾、最近では三橋⁶⁾、山口⁷⁾等は沖縄はぶ *Trimeresurus flavoviridis flavoviridis* HALLOWELL の毒素について研究した結果、毒作用の主役をなすものは蛋白分解酵素であつて、これが出血と筋組織の壊死作用を引きおこす本態であろうと述べている。従来これらの報告から考えて台湾はぶ蛇毒においても出血壊死作用をもつ成分は毒素中の蛋白分解酵素であろうとの予想のもとに本研究を行なつたところ予期に反した知見を得た。すなわち台湾はぶ蛇毒について股粉を担体として zone electrophoresis による展開分画を試み、各画分について酵素活性、生物学的活性等について追求し Fig. 1 の結果を得た。

*1 第1報：本誌 79, 221(1959). *2 Sasayama, Hyogo-ken. 1) 鈴木、岩永：本誌 78, 354(1958).

2) 山口：台湾総督府中央研究所衛生部報告第1号。台湾産毒蛇の毒素についての血清学的比較研究347頁(1921).

3) 土屋：農化 11, 720(1935); 13, 23(1937); 学術協報 10, 396(1935) (化学総覧 II, 9, 556(1935)); 台北理農紀 9, 137, 277(1936).

4) 佐藤、平野：学術協報 10, 399(1935) (化学総覧 II, 9, 556(1935)); 台北理農紀 9, 83, 106(1935).

5) E. Kaiser, H. Michel : "Die Biochemie der tierischen Gifte" p. 217.

6) 三橋：蛋白質核酸酵素 4, 116(1959). 7) 山口：北関東医学 8, 145(1958) (化学総覧 33, 357(1959)).