UDC 547.993 : 598.126

鈴木友二, 岩永貞昭: 蛇毒蛋白の研究 (第8報^{*1}) マムシ毒, ハブ毒の
L-アミノ酸酸化酵素の基質特異性について

Tomoji Suzuki and Sadaaki Iwanaga: Studies on Snake Venom. VIII. Substrate Specificity of L-Amino Acid Oxidase in Mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffi* BOIE) and Habu (*Trimeresurus okinavensis* BOULENGER) Venoms.

(Faculty of Pharmacy, Kyoto University^{*2})

Substrate specificity of L-amino acid oxidase in the venoms of Japanese "Mamushi" (*Agkistrodon halys blomhoffi*) and "Habu" (*Trimeresurus okinavensis*) was examined with 46 kinds of amino acid. The enzymes from these snake venom were stronger than that of cobra venom and were especially marked in oxidizing arginine and isoleucine. This specificity to these two amino acids has not been found in any literature, either in Japan or abroad, or in cobra venom.

(Received October 12, 1959)

L-アミノ酸酸化酵素の活性は動物組織や細菌では極めて弱く、蛇毒でのみ著しく強い。そのためこの酵素源としては蛇毒が専ら用いられ、 α -アミノ酸からの α -ケト酸の製造¹⁾、D-アミノ酸中に夾雑する微量の L-アミノ酸の除去²⁾、アミノ酸の立体配位の決定³⁾ など実験室的な用途はひろい。L-アミノ酸酸化酵素は毒蛇の種類によりその性質、基質特異性などが多少相違し、外国産の二、三の蛇毒の基質特異性については報告^{4,5)} されているが、日本産のものについての報告を見ない。著者等はすでに吸着実験⁶⁾ やクロマトグラフィー⁷⁾ のときなどの L-アミノ酸酸化酵素の挙動について報告したが、今回はその基質特異性をしらべた。

蛇毒を長期間保存すると L-アミノ酸酸化酵素は失活し、この失活は主に助酵素部分 FAD の光分解によると考えられるが、このとき同時にアポ蛋白部分も変性するらしく、活性の減少した蛇毒に FAD を添加しても回復を見ない⁸⁾。したがってできるだけ新しい蛇毒の使用が望まれるが、日本で新しいものの入手し易いマムシ毒、ハブ毒はその外観も黄色が強く FAD 含量も高いように見られ、実際 L-アミノ酸酸化酵素の活性は一般に外国産のものに勝るとも劣らない。

L-アミノ酸酸化酵素のアポ蛋白と FAD との結合は非常に強く、Singer 等⁹⁾ も、また著者等も FAD と活性なアポ蛋白部分との分離に成功していない。また著者等のマムシ毒での吸着実験やクロマトグラフィーの操作でも、FAD とアポ蛋白との結合はこわされずに結合型のまま他の諸酵素とよく分画され、しかもこれら操作の結果、全酵素単位は約3倍近くに上昇し粗毒中には L-アミノ酸酸化酵素の阻害物質が存在することが推察された⁹⁾。したがって蛇毒の高価なことや、その中にホスホジエステラーゼ、レンチナーゼ A など生化学的研究上有用な酵素が存在することを考えると、他酵素と分画して後に L-アミノ酸酸化酵素を利用し他酵素を別に活用することが望まれる。

基質特異性 まず基質特異性を調べるに先立つて酵素活性の測定条件を二、三検討した。マムシ毒、コブラ毒の L-アミノ酸酸化酵素の pH-活性曲線を作成し Fig. 1 の結果をえた。また基質濃度をかえた場合、高濃度の基質によつて活性低下が見られる (Fig. 2)。したがって各種アミノ酸を基質にする際は溶解度の低い場合を考慮に入れて通常 $5 \times 10^{-4} M$ のアミノ酸を用いることにした。

^{*1} 第7報 鈴木, 岩永, 佐竹: 本誌 **80**, 861(1960). ^{*2} Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) A. Meister: J. Biol. Chem. **197**, 309(1952).

2) J. R. Parikh, J. P. Greenstein, M. Winitz, S. M. Birnbaum: J. Am. Chem. Soc. **80**, 953(1958).

3) W. S. Fones: Arch. Biochem. Biophys. **36**, 86(1952).

4) E. Frieden, K. Dittmer, L. T. Hsu: J. Biol. Chem. **192**, 425(1951).

5) E. A. Zeller: Advances in Enzymology **8**, 495(1948).

6) 鈴木, 岩永: 本誌 **78**, 362(1958).

7) 岩永, 河内: 本誌 **79**, 582(1959).

8) 岩永, 楊, 河内: 本誌 **78**, 791(1958).

9) T. P. Singer, E. B. Kearney: Arch. Biochem. **29**, 190(1950).

Fig. 1.
pH-Activity Curves

Conditions: Reaction mixture contained 1 mg. of venom, $5 \times 10^{-4}M$ L-leucine, and 0.2M Tris buffer (pH 7.0~9.0) or 0.2M veronal buffer (pH 6.0~6.5) in a total volume of 2.2 cc. (37.5°, air)

●—● Mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffi*)
○—○ Habu (*Trimeresurus okinavensis*)
●—● Cobra (*Naja naja atra*)

Fig. 2.

Effect of Substrate Concentration
on Enzyme Activity

Conditions: Reaction mixture contained 1 mg. of Mamushi venom, 0.2M Tris buffer (pH 7.2), and the indicated amounts of L-leucine (final concn.) in a total volume of 2.2 cc. (37.5°, air)

外国産蛇毒との比較のため, Zeller¹⁰⁾ や Bender 等¹¹⁾ の用いたアミノ酸をできるだけ集め, それに 8 種のアミノ酸同族体を加えて計 46 種で実験した. 著者等の測定した結果を表中の I, II に, また比較のために Bender 等¹⁰⁾ のコブラ毒についての結果を III に記した. なお, 表中の O₂ uptake μL は Bender 等の catalase 存在下の場合の値に補正したので, 実測値の 1/2 の値で表わされている.

Table I. Relative Rate of Oxidation of Various Amino Acids
by L-Amino Acid Oxidase in Japanese Snake Venoms

Amino Acids	O ₂ uptake, μL/mg. venom/hr.		
	Mamushi (I)	Habu (II)	Cobra (from Bender, <i>et al.</i> ¹¹⁾)
DL-Alanine	8	8	0
DL-β-Alanine	0	0	0
DL-2-Aminobutyric acid	121	63	0
DL-2-Aminovaleric acid	154	204	31
DL-2-Aminocaproic acid	127	133	74
DL-2-Aminolauric acid	0	0	0
DL-Valine	0	0	0
L-Leucine	165	163	77
DL-Isoleucine	21	76	0
DL-2-Aminoisobutyric acid	0	0	0
DL-2-Aminoisheptanoic acid	132	98	0
L-Glutamic acid	0	0	0
DL-Aspartic acid	0	0	0
L-Asparagine	7	42	0
L-Tyrosine	218	228	246
DL-Bromotyrosine	109	121	0
DL-Iodotyrosine	98	105	0
DL-Phenylglycine	16	12	0
DL-Phenylalanine	177	192	111

10) E. A. Zeller, A. Maritz: *Helv. Chim. Acta* **27**, 365(1945).

11) A. E. Bender, H. A. Krebs: *Biochem. J.* **46**, 210(1950).

DL-Phenylserine	0	0	0
DL-Tryptophan	128	79	76
L-Histidine	12	12	0
L-Proline	0	0	0
DL-Serine	0	0	0
DL-Threonine	0	0	0
DL-Homoserine	44	56	
L-Arginine	77	165	32
L-Canavanine	96	122	
DL-Citrulline	119	145	
DL-Ornithine	0	0	0
DL-Lysine	0	0	0
DL-Homolysine	0	0	
DL-Diaminobutyric acid	0	0	
DL-Methionine	168	279	94
DL-Ethionine	14	24	
DL-Propionine	0	0	
DL-Buthionine	0	0	
L-Cysteine	143	136	
DL-Homocysteine	191	176	
L-Cystine	0	0	0
DL-Jienkolic acid	0	0	
DL-S-Methylcysteine	179	209	
DL-S-Ethylcysteine	157	157	
DL-S-Butylcysteine	12	0	
DL-S-Methylmethionine	0	0	

Conditions: Reaction mixture contained 1 mg. of the venom, 0.2M Tris buffer (pH 7.2), and $5 \times 10^{-4}M$ L- or DL-amino acid in a total volume of 2.2 cc. (37.5°, air).

脂肪族アミノ酸についていえば、一般に直鎖アミノ酸は枝鎖アミノ酸に比べて酸化され易く、マムシ毒、ハブ毒とも炭素数5個のノルバリンをもつともよく酸化する。コブラ毒についての報告では炭素数6個のアミノ酸がもつとも酸化され易く、炭素数4以下のアミノ酸や側鎖をもつ鎖状アミノ酸であるイソロイシンは殆んど酸化されていない。

またヒドロキシアミノ酸であるセリン、スレオニン、ジアミノ酸であるリジン、オルニシン、ジカルボン酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸などは全く酸化されないが、末端に $H_2N-C(=NH)-NH-$ 基(アルギニン)、 $H_2N-C(=O)-NH-$ 基(シトルリン)、 H_2NCO- 基(アスパラギン)などをもつアミノ酸はよく酸化された。これらの結果はアルギニンの場合を除けばⅢのコブラ毒についての報告とほぼ一致する。マムシ毒、ハブ毒ともアルギニンを酸化するが、ことにハブ毒についての Q_{O_2} 値は外国文献にあるいずれの蛇毒よりも著しく大きい。

芳香族をもつチロシン、フェニルアラニン、トリプトファンなどはいずれも極めて酸化され易く、すべてのアミノ酸を通じて同程度に酸化されたものはメチオニンだけである。

含硫アミノ酸の場合はメチオニンや S-メチルシステインがよく酸化され、エチオニンは急激に低下する。炭素数の1個少ない化合物で同じような比較を試みたが S-エチルシステインは S-メチルシステインと殆んど同程度に酸化された。末端に SH 基をもつシステイン、ホモシステインが酸化されるのに、それらの SH 基が OH 基にかわつただけのセリン、ホモセリンが殆んど酸化されていないことは基質と酵素の結合を考えると参考になる。

以上を要約するとマムシ毒、ハブ毒の L-アミノ酸酸化酵素活性はコブラ毒におけるより強く、かつマムシ毒、ハブ毒は多種のアミノ酸に作用し、とくにアルギニン、イソロイシンの両者をよく酸化するが、この二つのアミノ酸に対する親和性はコブラ毒のみならず外国文献のいずれにも見られなかつたものである。

なお Table I の実験に用いた蛇毒は抗血清製造用のものである。その後、採取して間もないマムシ毒を著者が凍結した標品について同じような測定を行なつたが Q_{O_2} の値に著しい差はみとめなかつた。また測定には L- または DL-アミノ酸を使用した。D-アミノ酸による酵素活性の阻害は考慮する要はないと考える。

実験の部

蛇毒 マムシ毒、ハブ毒は抗血清製造用の乾燥標品で、またコブラ毒は名城大学田中哲之助博士の採取したものをを用いた。

アミノ酸 Table I に示した製品は、いずれも著者等の教室で微生物定量用の培地に用いているものである。フェニルグリシン、ホモリシン¹²⁾、ホモセリン¹³⁾、2-アミノイソヘプタン酸¹⁴⁾ は教室の合成品である。

L-アミノ酸酸化酵素活性の測定 マムシ毒またはハブ毒 2 mg をそれぞれ 1 cc の蒸留水にとかして酵素液とした。ワールブルグセルの主室に、酵素液 0.5 cc, 0.2M トリス緩衝液 (pH 7.2) 1.0 cc, 副室に 20% KOH 0.2 cc と濾紙切片、側室に $5 \times 10^{-3} M$ のアミノ酸をそれぞれ加えて全量 2.2 cc として、37.5° に調製した恒温槽に浸し 3 min 振盪後、基質液を主室に移し 30 min の O_2 消費を測定した。 Q_{O_2} はロイシンを基質とした場合、マムシ毒で 165, ハブ毒で 163 であった。

終りに蛇毒を分与下さった名城大学薬学部 田中哲之助博士ならびに武田薬工研究所 大村栄之助博士に厚く御礼申し上げます。また本研究の費用の一部は財団法人蓬庵社からの奨励金によつた。ここに深謝致します。

京都大学薬学部

12) S. Takagi, K. Hayashi: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 7, 183(1959).

13) K. Hayashi: Ibid. 7, 187(1959).

14) S. Takagi, K. Hayashi: Ibid. 7, 96(1959).

UDC 547.833.9.07

新美仁作：1-(Bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 誘導体の脱ブロム化反応

Jinsaku Niimi: Studies on the Debromination of 1-(Bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Derivatives.

(Faculty of Pharmacy, Kyoto University*)

Three kinds of 1-(x-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivative, with bromine in different position in each, were reduced with zinc dust and acetic acid. It was found that bromine atoms in 3- and 4-positions remain inert and only that in 2-position undergoes reductive debromination. Reduction with metallic sodium in liquid ammonia effects quantitative debromination in all these positions.

(Received October 14, 1959)

著者は 1-(2-bromobenzyl)-2-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline¹⁾ (I) の合成過程で 1-(2-bromobenzyl)-6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinoline (VI) を常法にしたがつて 50% 酢酸中亜鉛末とともに油浴中加熱還流させ、反応成績体を修酸塩として捕捉元素分析を行なつたところ、予想される 1-(2-bromobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (II) oxalate の組成とは異なつた組成を示すことを知り、この成績体が還元反応によつて一部脱ブロム化反応の起こつた成績体を含有するものと考え、この修酸塩を再び遊離塩基とした後、さらに 50% 酢酸-亜鉛末と加熱還流した。ここに得られた成績体は予期したとおり

*1 Yoshida-konoe-chō, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 新美：本誌 80, 123(1960).