蛇毒の酵素化学的研究 (第 2 報¹⁾) ヒャップダ毒より致死活性物質Ac₁-Proteinase の精製²⁾

二改俊章, 杉原久義, 田中哲之助

名城大学薬学部³⁾Enzymochemical Studies on Snake Venoms. II.¹⁾ Purification of LethalProtein Ac₁-Proteinase in the Venom of *Agkistrodon acutus*²⁾

TOSHIAKI NIKAI, HISAYOSHI SUGIHARA and TETSUNOSUKE TANAKA

Faculty of Pharmacy, Meijo University³⁾

(Received November 1, 1976)

A proteolytic enzyme named Ac₁-proteinase was isolated from the venom of *Agkistrodon acutus* by a combination of gel filtration on Sephadex G-75 and chromatographies on diethylaminoethyl (DEAE)-Sephadex A-50, DE32 cellulose, and DEAE-Sephadex A-50. By these procedures, 38 mg of purified preparation was obtained from 1 g of crude venom.

Ac₁-proteinase also had lethal and hemorrhagic activities. These three activities were inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or cysteine but not by soy bean trypsin inhibitor (SBTI) or diisopropyl fluorophosphate (DFP). The preparation was homogeneous as judged by disc electrophoresis at pH 8.3, and pH 7.5 polyacrylamide gels, immunodiffusion, and isoelectric focusing. The molecular weight of this protein was determined to be approximately 24500 and the isoelectric point was found to be pH 4.7 by isoelectric focusing with carrier ampholyte. The minimum hemorrhagic dose, LD₅₀ and proteolytic activities of this protein were 0.223 and 76.5 µg mouse and 0.544 unit, respectively. This protein did not contain any carbohydrates or nucleic acids.

Keywords—venom; purification of Ac₁-proteinase; *Agkistrodon acutus*; lethal-hemorrhagic-proteolytic activities; homogeneity determination by electrophoresis

台湾に生息する毒蛇にはタイワンハブ、アオハブ、ヒャップダの出血性の毒蛇 3 種類と向神経性の毒蛇であるタイワンコブラ、アマガサヘビ、あるいは出血性と向神経性の両者の因子をもつクサリヘビなどの毒蛇がいる。沢井ら⁴⁾の調査によれば、これら毒蛇による致命率ではヒャップダが一番高く、ついでアマガサヘビ、タイワンハブとなっている。これはヒャップダとタイワンハブは最も攻撃的であり、しかも毒量も多いことが致命率を高めているものと考えられている。またその治療については 85% が漢方によっており血清療法によるものはわずか 15% に過ぎず、有効な近代医療の適用がまたれている。ヒャップダの免疫に関しては共同研究者の田中⁵⁾の古い報告があるが、他の毒蛇に比べて抗毒素価の上昇度は少ない。このような点も血清療法への信頼感の薄さの一因子となっていると思われる。

毒素の毒作用に関する生化学的研究は近年急激に盛んになってきたが、神経毒に比べヒャップダ毒を含めて出血毒のそれは遅れており今後の研究が待たれている。

ヒャップダ毒の致死、出血因子などについてはゾーン電気泳動で分離を試みた楊ら⁶⁾の報告があるが、5'-nucleotidase, adenosine triphosphatase (ATPase) 活性が含まれておりまだ精製はされておらず、その後の報告

1) 第 1 報: 杉原久義, 二改俊章, 森浦正憲, 神谷和人, 田中哲之助, 日細菌, 27, 47 (1972).

2) 日本薬学会第 94 年々会, 仙台, 1974 年 4 月.

3) Location: Yagoto, Tenpaku-ku, Nagoya.

4) a) 沢井芳男, 曾 長生, *The Snake*, 1, 9 (1969); b) 沢井芳男, 曾 長生, 郭 宗波, 呉 振声, *ibid.*, 2, 13 (1970); c) 沢井芳男東大教授退官記念号, *ibid.*, 5, 29 (1973).

5) 田中哲之助, 実験医学, 25, 159 (1941).

6) C.C. Yang, C.C. Su, C.T. Chen, *J. Biochem.*, 46, 1209 (1959).

は見あたらない。

今回、著者らはハッポダ咬症による致死がいかなる機構によるのかを解明するために、致死画分を追うことによりこの因子の精製を行なったので、ここに報告する。⁷⁾

実 験 の 部

材料 新鮮凍結乾燥ハッポダ毒は台湾の楊振忠教授より入手した 1972 年に採毒したもの、および蘇卿抒氏より入手した 1974 年に採毒したものである。Sephadex G-75, diethylaminoethyl (DEAE) sephadex A-50 はファルマシア社製、DE32 cellulose はワットマン社製を用いた。Casein (Hammarsten), tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) は大阪大学蛋白質研究所奨励会事業部より入手し他の試薬類は試薬特級を使用した。マウスは dd 系雄性、16—18 g を用いた。

各種活性の測定法 致死活性——逢坂ら⁸⁾の方法に準拠し 1 群 8 匹 6 群用意し、1.4 倍間隔希釈系列の毒液を尾静脈内に接種し 4 日間の生死を観察した。LD₅₀ の算出は Litchfield-Wilcoxon 法⁹⁾によった。

出血活性——Kondo ら¹⁰⁾の方法によった。すなわち、ウサギ背部皮内に 3 倍希釈系列の蛇毒液を 0.1 ml 注射し、24 時間後エーテル麻酔により動物を殺し皮膚をはぎとり、皮膚の裏側から測定した出血斑の直径より平行線検定法¹¹⁾によって活性を測定し直径 10 mm の出血斑を与える蛋白量を最小出血量 MHD であらわした。

プロティナーゼ活性 Murata ら¹²⁾の方法に準拠した。Casein を 2% 濃度に 0.4M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) に加熱溶解して基質液としこれの 0.5 ml、適当濃度の蛇毒液 0.5 ml を混和、37°, 15 分間保温後 0.44M trichloroacetic acid (TCA) / 1 ml で反応を止め 30 分間放置後ろ過、ろ液 0.5 ml に 0.4M Na₂CO₃ 2.5 ml および 3 倍希釈した Folin 試薬 0.5 ml を加え、30 分後に 660 nm の吸光係数を測定した。活性の単位は、1 分間当たり 660 nm の吸光係数 1 を示す活性を 1 単位とした。

Clotting 活性¹³⁾——基質として 0.1% bovine fibrinogen 生理食塩水溶液を内径 10 mm、長さ 100 mm の小試験管に 1.8 ml 入れ、あらかじめ 28±1° で保温しておく。このものに蛇毒液 0.2 ml を吹出しピペットで加え、同時にストップウォッチを作動させ clot の出現を拡大鏡で観察し、この時までの秒数を測定した。活性としては clot 出現までの秒数の逆数を蛋白量で割りそれを 10 倍して表わした。

TAME 水解活性, Phosphodiesterase, Phosphomonoesterase, 5'-nucleotidase, ATPase の活性の測定法は前報¹⁾で報告した通りである。

結 果

致死活性物質の分離

Sephadex G-75 ゲルろ過 粗毒 1000 mg を 0.01M NaCl 含有 0.04M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 3 ml に溶解し不溶性物質を遠沈除去後、同緩衝液で平衡化した sephadex G-75 でゲルろ過を行なった。溶出後の蛋白量は 280 nm の吸収で測定した。その結果 Fig. 1 に示すような溶出パターンが得られた。各ピークを溶出順に 1, 2, 3, 4, 5 とした。プロティナーゼ活性は 1, 2, 4。TAME 水解活性および clotting 活性は 1, 2 に見られた。致死活性は 1, 2, 3, 4 と 4 つのピークに分かれて溶出されてきたが、今回は 4 の致死画分について精製を試みた。

DEAE Sephadex A-50 クロマトグラフィー Sephadex G-75 で得られた 4 画分を前ステップと同じ緩衝液で平衡化した DEAE sephadex A-50 カラムにアプライし、素通り部分を分取した後、食塩濃度を 0.5M まで直線的に上昇させたところ、Fig. 2 に示すパターンが得られた。致死蛋白は塩濃度 12 m MHO と 18 m MHO 付近に分かれて溶出してきたので、今回は 18 m MHO 付近に溶出してくる画分について分離精製を試みた。この画分を集め 0.05M NaCl 含有 0.02M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.2) で透析を行なった。

DE32 Cellulose クロマトグラフィー 透析した画分を DE32 cellulose カラムにアプライし、素通り部分を分取した後、食塩濃度を 0.5M まで直線的に上昇させたところ、Fig. 3 に示すパターンが得られた。

7) 杉原久義, 二改俊章, 神谷和人, 田中哲之助, 日細菌, 27, 89 (1972); 杉原久義, 二改俊章, 田中哲之助, *ibid.*, 29, 572 (1974).

8) a) 逢坂 昭, 近藤 久, 医学生物学最近の展望, 1, 269, 医学生物学研究奨励会 (1960); b) A. Ohsaka, H. Ikezawa, H. Kondo, N. Uchida, *Brit. J. Exper. Path.*, 41, 478 (1960).

9) J.T. Litchfield, F. Wilcoxon, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 96, 99 (1969).

10) H. Kondo, S. Kondo, H. Ikezawa, R. Murata, A. Ohsaka, *Jpn. J. Med. Soc. Biol.*, 13, 43 (1960).

11) D.J. Finney, "Statistical Method in Biological Assay," Charles Griffin, London, 1952, p. 99.

12) Y. Murata, M. Satake, T. Suzuki, *J. Biochem.*, 53, 431 (1963).

13) "第八改正日本薬局方第一部解説書," 日本公定書協会編, 広川書店, 東京, 1971, p. 1224.

Fig. 1. Gel Filtration of the Venom of *Agkistrodon acutus* on a Column of Sephadex G-75

—: absorbance at 280 nm
Agkistrodon acutus venom was applied to a column (2.5 × 99 cm) of Sephadex G-75 equilibrated with 0.04M Tris-HCl buffer contained 0.01M NaCl, pH 7.0, and 3 ml fractions were collected at a flow rate of 9 ml/hr.

Fig. 3. DE32 Cellulose Column Chromatography

—: absorbance at 280 nm, — — —: conductivity
 The lethal fraction obtained from chromatography on DEAE sephadex A-50 was dialyzed against 0.02M Tris-HCl buffer contained 0.05M NaCl, pH 8.2, and applied to a column (1.9 × 43 cm) of DE32 cellulose equilibrated with same buffer. The column was eluted with a linear gradient from 0.05M to 0.5M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

Fig. 2. DEAE Sephadex A-50 Column Chromatography

—: absorbance at 280 nm, — — —: conductivity
 The lethal fraction was applied to a column (1.9 × 43 cm) of DEAE sephadex A-50 equilibrated with 0.04M Tris-HCl buffer contained 0.01M NaCl, pH 7.0. The column was eluted with a linear gradient from 0.01M to 0.5M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

Fig. 4. DEAE Sephadex A-50 Rechromatography

—: absorbance at 280 nm, — — —: conductivity
 The lethal fraction obtained from chromatography on DE32 cellulose was dialyzed against 5 mM ammonium acetate buffer, pH 7.5, and applied to a column (1.9 × 43 cm) of DEAE sephadex A-50 equilibrated with same buffer. The column was eluted with a linear gradient from 5 mM to 0.5M ammonium acetate in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

DEAE Sephadex A-50 リクロマトグラフィー 14 m MHO 付近に溶出してくる致死画分を集め 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.5) で透析し, DEAE sephadex A-50 カラムにアプライし 0.5M 酢酸アンモニウムで gradient elution を行なったところ, Fig. 4 に示すパターンが得られ, 致死蛋白は最後のピークに溶出してきた。これを最終標品とした。

最終標品の均一性

ディスク電気泳動¹⁴⁾ ポリアクリルアミドを支持体とした 8.3 ゲルと 7.5 ゲルのディスクを別々に通電 1 本

14) 永井 裕, 別冊蛋核酵, 物理化学的実験法, 3, 3 (1967).

Fig. 5. Disc Electrophoresis of Ac_1 -Proteinase

当り 2 mA で 3 時間泳動した。染色は 1 % コマジーブリリアントブルー R 250 を用い 12 時間染色後、12.5% TCA で脱色した結果 Fig. 5 に示す単一なバンドが得られた。

その他セルロースアセテート膜¹⁵⁾を用い、ベロナール緩衝液 (pH 8.6) で行なった電気泳動では、陽極に移動する 1 本のバンドがみられ、また台湾血清疫苗製造所より分与されたヒヤッポダ毒抗血清との免疫電気泳動、および Ouchterlony のゲル内沈降反応¹⁶⁾でも 1 本の沈降線を形成するのみであった。これらの結果よりこの最終標品は単一であると判断し、これを Ac_1 -Proteinase と命名した。

Ac_1 -Proteinase について粗毒中に含まれる各種活性の検討を行なった。Table I に示すように精製標品にはプロティナーゼ、致死および出血活性が存在し、粗毒中に含まれる他の諸活性はすべて除かれている。

Table II は各精製段階における致死、出血、プロティナーゼ活性の変動をまとめたもので粗毒 1000 mg を出発材料として最終標品の収量は 38 mg であった。マウスに対する LD_{50} は粗毒の 122 μ g から 76.5 μ g となり活性は 1.59 倍に上昇し、その収率は 6% である。出血活性は粗毒の 0.6 μ g から 0.223 μ g となり活性は 2.69 倍に上昇し、その収率は 12.5% である。プロティナーゼ活性は粗毒の 0.171 単位から 0.544 単位となり 3.1 倍に上昇し、収率は 12.1% である。このように活性の上昇度が 3 者ともに異なっている理由は粗毒中に含まれるこれらの活性の本態が、それぞれ 1 種類ではなく、その中から Ac_1 -Proteinase 画分のみを精製したために認められる現象である。

Ac_1 -Proteinase の性質

分子量の測定 Dunker ら¹⁷⁾の方法による、SDS ディスク電気泳動により測定を行なった。5% アクリルアミドゲルを支持体とし、0.1% ブロムフェノールブルー液を marker として 1 本当り 9 mA で 2 時間泳動した。standard として bovine serum albumin (monomer 66000, dimer 132000, trimer 198000), ovalbumin 46000, α -chymotrypsinogen 25700, pepsin 35500, trypsin 23000 を用いおのおのの mobility の差から分子量を求めたところ Fig. 6 に示すように MW 24500 と算出された。

TABLE I. Various Enzymatic and Physiological Activities

Enzymatic activities	Crude	Ac_1 -Proteinase
Proteinase	+	+
TAMEase	+	—
Clotting	+	—
5'-nucleotidase	+	—
ATPase	+	—
Phosphodiesterase	+	—
Phospholipase A	+	—
Physiological activities		
Lethal	+	+
Hemorrhagic	+	+

15) 小川恕人, “電気泳動実験法,” 文光堂, 東京, 1967, p. 111.

16) O. Ouchterlony, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **25**, 186 (1948).

17) A.K. Dunker, *J. Biol. Chem.*, **244**, 5074 (1969).

TABLE II. Summary of the Purification of Ac₁-Proteinase

Step	Lethal activity				Hemorrhagic activity			Proteolytic activity		
	Protein (mg)	LD ₅₀ (μg)	Relative activity	Yield (%)	M.H.D (μg)	Relative activity	Yield (%)	unit/mg	Relative activity	Yield (%)
Crude venom	1000	122.0 (102.5 145.1)	1.0	100	0.6	1.0	100	0.173	1.0	100
Sephadex G-75	177.6	111.9 (90.9 130.8)	1.09	19.5	0.575	1.04	18.8	0.258	1.5	26.8
DEAE Sephadex	111.0	88.0 (72.1 107.5)	1.38	15.9	0.328	1.83	18.7	0.396	2.3	25.7
DE32 Cellulose	80.4	82.0 (71.9 93.4)	1.52	12.2	0.274	2.28	18.1	0.519	3.0	24.4
DEAE Sephadex	38.0	76.5 (55.0 106.4)	1.59	6.0	0.223	2.69	12.5	0.544	3.1	12.1

Fig. 6. SDS Disc Electrophoresis

1, bovine albumin trimer; 2, dimer
3, monomer; 4, egg albumin; 5, pepsin
6, α-chymotrypsinogen; 7, Ac₁-Proteinase
8, trypsin

Fig. 7. Isoelectric Focusing of the Ac₁-Proteinase

—: absorbance at 280 nm, ----: pH
Isoelectric focusing with carrier ampholyte covering the pH range 3—10 was conducted in a column of capacity for 24 hr at 4°.

等電点¹⁸⁾ LKB 8100 electrofocusing 蛋白分離装置を用い、pH 3—10 carrier ampholyte を使用し、最終標品 1 mg を 1 % グリシン溶液で 1 夜透析後、4° 300 V で 20 時間泳動し 280 nm の吸光度および pH を測定し、Fig. 7 に示すように等電点を pH 4.7 とした。

糖の定性試験 モーリッシュ反応¹⁹⁾ アンスロン硫酸反応²⁰⁾ により糖の定性反応を行なったところ、粗毒に

18) 松尾雄志, 堀尾武一, 蛋核酵, 12, 737 (1967).

19) H. Molisch, *Monatsch. Chem.*, 7, 108 (1886).

20) D.L. Morris, *Science*, 107, 254 (1948).

Fig. 8. UV Spectrum of Ac₁-Proteinase

においては陽性であったが、今回得られた最終標品では陰性であり糖は含まれていないことが判明した。

核酸の確認 核酸はオルシン反応²¹⁾を行なった結果、粗毒、最終標品とも陰性であった。それは UV スペクトルの吸収曲線（日立 124 吸光度計）からもうかがい知ることができる。すなわち吸収極大は 280 nm に認められ 260 nm には吸収が認められず (Fig. 8), この Ac₁-Proteinase は糖および核酸をもたない単純蛋白と思われる。

各種阻害剤による影響

Table III は各種阻害剤の 3 つの活性に対する影響をみたもので、EDTA、システインでは終濃度 2 mM で 37° 15 分間保った後、致死、出血、プロティナーゼ活性を測定したところ、三者とも完全に阻害され、Soy bean trypsin inhibitor (SBTI), diisopropyl fluorophosphate (DFP) では三者とも阻害を受けなかった。

TABLE III. Effects of Various Inhibitors on the Ac₁-Proteinase

Inhibitor	Lethal	Hemorrhagic	Proteolytic
None	—	—	—
EDTA	+	+	+
Cysteine	+	+	+
SBTI	—	—	—
DFP	—	—	—

総 括

1. 新鮮ヒャップダ毒から Sephadex G-75, DEAE sephadex, DE32 cellulose, DEAE sephadex リクロマトグラフィーの精製操作を経て出血活性 (MHD 0.223 μg), プロティナーゼ活性 (0.544 単位) をもった致死蛋白 (LD₅₀ 76.5 μg) を得た。
2. この精製毒について均一性を調べた結果、ディスク電気泳動, セルロースアセテート膜電気泳動, Ouchterlony のゲル内沈降反応, 免疫電気泳動でそれぞれ単一であった。これを Ac₁-Proteinase と名づけた。
3. この Ac₁-Proteinase は糖, 核酸を含まず, PI 4.7, 分子量 24500 の酸性蛋白である。
4. この蛋白は EDTA, システインによって致死, 出血, プロティナーゼの各活性が阻害されるが, SBTI, DFP では阻害されない。
5. 精製過程を通じてこのヒャップダ毒中には致死作用を持つ蛋白は 1 種ではなく, 少なくとも 3 種以上存在することがうかがわれた。

考 察

Crotalidae 科や Viperidae 科の毒蛇咬傷の際の顕著な症状として局所壊死, 浮腫, 出血などが見られるが,^{4c, 8a, 22)}

- 21) W. Mejbaum, *Z. Phys. Chem.*, **258**, 117 (1939); M. Bial, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **28**, 253 (1902); *idem*, *ibid.*, **29**, 477 (1903).
- 22) a) 桑島謙夫, “医学の進歩 I,” 木下良順編, 共立出版, 東京, 1942, p. 1; b) 逢坂 昭, 蛋核酵, **13**, 1007 (1968); c) 小此木丘, 星 昭二, 本間 学, 三橋 進, 前野弘夫, 沢井芳男, 牧野正顕, 小野継男, 松下仁六, 日細菌 **16**, 909 (1961); d) T. Okonogi, S. Hoshi, M. Honma, S. Sasamoto, K. Aoki, S. Mitsuhashi, H. Maeno, Y. Sawai, *Jpn. J. Microbiol.*, **3**, 499 (1959); e) T. Okonogi, S. Hoshi, M. Honma, S. Mitsuhashi, H. Maeno, Y. Sawai, *ibid.*, **4**, 189 (1960); f) 沢井芳男, 木場一夫, 小此木丘, 三島章義, 川村善治, 鎮 西弘, *The Snake*, **3**, 97 (1971).

従来その作用はプロティナーゼによるのではないかと考えられていた。^{8a,23)} これは Crotalidae に属する蛇毒は一般にプロティナーゼ活性が強いということ、²⁴⁾ およびこの活性物質が致死、出血活性と挙動をとみにしていること、この酵素の生化学的性質からプロティナーゼがそれらの本態であろうと考えられてきたのである。もちろんこの証明はその本態を単離することによってのみ可能となる。しかし、分析技術の進歩した現在でもこれらを単離した例は少なく、その解明にはこれからの研究に待たねばならぬ点が極めて多い。蛇毒中のプロティナーゼが致死、出血作用の本態であるのか、あるいはこれらとは関係なく、他の生理活性の本態となっているのかを知することは興味深いことである。

蛇毒プロティナーゼの精製についてはこれまでに若干の報告がある。

鈴木ら²⁵⁾ は日本産マムシ毒を DEAE cellulose にかけると 3 種のプロティナーゼ (a, b, c) と出血因子 HR-I, HR-II が得られるが、プロティナーゼ b は HR-II そのもので、これはまたマムシ毒の致死因子の 1 つであることを証明した。3 種のプロティナーゼのうち a には特に生理作用は認められず、c には著しい浮腫作用²⁶⁾ がありこの両者には出血作用は見い出されていない。

逢坂らは奄美大島産ハブ毒より H₂-プロティナーゼ (分子量 24000) を単離したが²⁷⁾、それには出血作用が全くないところから、このハブ毒では出血因子と蛋白分解酵素は全く別のものであると結論している。H₂-プロティナーゼの致死活性についてはまだ調べられていない。

その他 *Crotalus atrox* 毒から α -プロティナーゼ²⁸⁾ (分子量 23000) が、*Aghistrodon piscivorus leucostoma* 毒から leucostoma peptidase A²⁹⁾ (分子量 22500), *Bitis arietans* 毒からプロテアーゼ A³⁰⁾ (分子量 24300) などが精製されているが生理作用はわかっていない。

一方 Ouyang³¹⁾ は台湾に生息するハブ属のアオハブ毒を殿粉ゾーン電動法により分画し、致死、出血、プロティナーゼ活性を有する画分を得、プロティナーゼが出血をおこす際、重要な役割を果たしていると推定して論じているが、この画分は未だ不純であり (抗凝固活性も共存) 完全に単離した後でなければ結論は下すことができない。

次に致死—出血因子とプロティナーゼを分離した報告は少なく、逢坂ら³²⁾ が先のハブ毒より sephadex G-100 により, HR1, 2 を分離している。精製した出血因子 HR1³³⁾ はプロティナーゼの痕跡が含まれているが、EDTA 処理による影響から見て出血因子とは異なるものと推定している。またプロティナーゼ活性のない出血因子 HR2a, 2b^{27a,b)} は EDTA, システイン処理により完全に失活し、粗毒中に含まれる他の酵素活性を全く含んでいない。このようにハブ毒では出血、致死因子はプロティナーゼとは全く別個のものであることが判明した。

Grotto ら³⁴⁾ は *Vipera palestinae* 毒からプロティナーゼ活性をもつ出血因子 (分子量 44000) を部分精製したが、SBTI, DFP 処理の結果この両者は別個のものであると示唆しているけれども、それぞれの単離はおこなわ

23) K.H. Slotta, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe.*, **12**, 406 (1955); H. Maeno, S. Mitsuhashi, T. Okonogi, S. Hoshi, M. Honma, *Jpn. J. Exp. Med.*, **32**, 55 (1962).

24) A. Ohsaka, T. Omori-Satoh, H. Kondo, S. Kondo, R. Murata, *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.*, **33**, 193 (1966); G. Oshima, T. Satoh-Omori, T. Suzuki, *Toxicon*, **7**, 229 (1969); H.F. Deutsch, C.R. Diniz, *J. Biol. Chem.*, **216**, 17 (1955).

25) M. Satake, Y. Murata, T. Suzuki, *J. Biochem.*, **53**, 438 (1963); S. Iwanaga, T. Omori, G. Oshima, T. Suzuki, *ibid.*, **57**, 392 (1965); G. Oshima, S. Iwanaga, T. Suzuki, *ibid.*, **64**, 215 (1968); G. Oshima, Y. Matuo, S. Iwanaga, T. Suzuki, *ibid.*, **64**, 227 (1968); T. Omori, S. Iwanaga, T. Suzuki, *Toxicon*, **2**, 1 (1964).

26) T. Suzuki, *Mem. Inst. Butantan. Simp. Internac.*, **33**, 389 (1966).

27) a) T. Takahashi, A. Ohsaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 293 (1970); b) *Idem, ibid.*, **207**, 65 (1970).

28) G. Pfeiderer, G. Sumyk, *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 482 (1962); R. Zwillig, G. Pfeiderer, *Z. Phys. Chem.*, **348**, 519 (1967).

29) F.W. Wagner, A.M. Spiekerman, J.M. Prescott, *J. Biol. Chem.*, **243**, 4486 (1968).

30) S.J. Van Der Walt, F.J. Joubert, *Toxicon*, **9**, 153 (1971).

31) C. Ouyang, S. Shiau, *Toxicon*, **8**, 183 (1970).

32) T. Omori-Satoh, A. Ohsaka, S. Kondo, H. Kondo, *Toxicon*, **5**, 17 (1967).

33) T. Omori-Satoh, A. Ohsaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 432 (1970).

34) L. Grotto, C. Moroz, A. de Vries, N. Goldbaum, *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 356 (1967).

れていない。また Toom ら³⁵⁾ も *Malayan pit viper* 毒より致死, 出血, プロティナーゼをそれぞれ等電点分画で精製している。

マムシ毒からは出血, 致死活性を有するプロティナーゼ b (HR-II) 以外にプロティナーゼのない致死, 出血因子 HR-I が Oshima ら³⁶⁾ により単離されており, この毒中の致死, 出血因子はプロティナーゼ活性のあるものとなないものの 2 種類があることがわかる。

杉原³⁷⁾ はプロティナーゼ活性のない酸性蛋白で分子量約 10 万の致死, 出血因子をタイワンハブ毒より単離し, “Mucrotoxin A” と命名した。山川³⁸⁾ はサキシマハブ毒より 3 つの致死因子を分離しており, 2 つは致死, 出血活性をもち, 他の 1 つは致死, 腫脹作用があると報告しているが, プロティナーゼとの関係には触れていない。

以上, ハブ属からは HR1, HR2a, 2b, “Mucrotoxin A” と, プロティナーゼの存在しない, あるいは明らかにプロティナーゼとは異なる因子が単離されているが, 一方マムシ属においては HR-I があるもののプロティナーゼ b つまり HR-II が単離されており, 属の違いによりその致死, 出血因子にも特徴があるように思われる。

著者らは日本産マムシと同属のヒョウポダ毒の致死因子を単離し, 致死, 出血, プロティナーゼの関係を調べた。この毒中には致死作用をもつ蛋白は少なくとも 3 種以上あるが, 今回単離された Ac_1 -Proteinase は致死, 出血作用を同時にもっており, マムシ毒のプロティナーゼと類似している。特に EDTA, システインで阻害を受け, SBTI, DFP では影響を受けず, AE 水解活性もないという点はプロティナーゼ b とよく似ている。しかしプロティナーゼ b とは, 糖を含まないこと, 分子量の小さいことなど細部では異なっている。

いずれにせよハブ毒, タイワンハブ毒と異なり, プロティナーゼそのものが致死, 出血活性をになっていることは興味深いことである。このことがマムシ属の特徴であるかどうかは, さらに多くの毒について調べる必要があるが, 今後の検討がまたれるものである。

35) P.M. Toom, P.G. Squire, A.T. Tu, *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 339 (1969).

36) G. Oshima, T. Omori-Sato, S. Iwanaga, T. Suzuki, *J. Biochem.*, **72**, 1483 (1972).

37) 杉原久義, 森浦正憲, 田中哲之助, 日細菌 **27** (1), 90 (1972); 杉原久義, 森浦正憲, 田中哲之助, 日本薬学会第 92 年々会講演要旨集, 於大阪 (1972).

38) 山川雅延, *The Snake*, **4**, 96 (1972).