蛇毒の酵素化学的研究 (第 5 報¹⁾) ヒャップダ毒より致死
活性物質 Ac_3 -Proteinase の精製

杉原久義, 二改俊章, 梅田 浩, 田中哲之助
名城大学薬学部²⁾

Enzymochemical Studies on Snake Venoms. V.¹⁾ Purification of Lethal
Protein Ac_3 -Proteinase in the Venom of *Aghistrodon acutus*

HISAYOSHI SUGIHARA, TOSHIAKI NIKAI, HIROSHI UMEDA and TETSUNOSUKE TANAKA
Faculty of Pharmacy, Meijo University²⁾

(Received March 14, 1978)

Ac_3 -Proteinase was purified from the lyophilized venom of *Aghistrodon acutus* using gel filtration on a Sephadex G-75 column, followed by chromatography on diethylaminoethyl (DEAE)-Sephadex A-50, DEAE-Sephacel and DEAE-Sephacel rechromatography. By these procedures, 22.7 mg of purified preparation was obtained from 1 g of crude venom. The purified preparation was homogeneous as judged by disc electrophoresis over polyacrylamide gel at pH 8.3 and isoelectric focusing.

Ac_3 -Proteinase possessed both lethal and hemorrhagic activities. These and proteolytic activities were inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), cysteine or antiserum, but not by soybean trypsin inhibitor (SBTI), *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) or diisopropyl fluorophosphate (DFP).

The molecular weight of Ac_3 -proteinase was estimated to be about 57000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the isoelectric point was found to be pH 4.7, indicating that the protein was acidic. The minimum hemorrhagic dose, LD_{50} and proteolytic activities of the purified preparation were 0.95 μ g, 108 μ g/mouse, and 0.253 unit/mg, respectively. Both Ac_1 - and Ac_2 -proteinases were simple proteins, while Ac_3 -proteinase was a glycoprotein.

Keywords—venom; purification of Ac_3 -proteinase; *Aghistrodon acutus*; gel, ion exchange chromatography; lethal-hemorrhagic-proteolytic activities; homogeneity determination by electrophoresis

著者らはヒャップダ毒中より各種の生理活性を有する成分の分離を試みそのうち致死, 出血作用を示す 2 種類のプロテイナーゼ (Ac_1 -proteinase,³⁾ Ac_2 -proteinase¹⁾) を単離し, その生化学的性質などを報告⁴⁾ したが, 今回は他の画分の精製を行い新たに致死, 出血活性を示すプロテイナーゼを単離したのでここに報告する。

実 験 の 部

材料

凍結乾燥ヒャップダ毒は日本蛇族学術研究所より入手したものである。Sephadex G-75, diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex A-50, DEAE Sephacel はファルマシア社製を用いた。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 14—16 g を用いた。

各種活性の測定法

致死活性 逢坂ら⁵⁾の方法に準拠し 1 群 5 匹 5 群のマウスを用意し, 1.4 倍間隔希釈系列の毒液を尾静脈内

1) 第4報: 杉原久義, 二改俊章, 川口智久, 田中哲之助, 薬誌, 98, 1523 (1978).

2) Location: Yagotourayama, Tenpaku-ku, Nagoya.

3) 二改俊章, 杉原久義, 田中哲之助, 薬誌, 97, 507 (1977).

4) 杉原久義, 二改俊章, 田中哲之助, 日本薬学会東海支部 53 年度例会講演要旨集, 於岐阜, 1978, p. 7.

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

に接種し4日間の生死を観察した。LD₅₀の算出はLitchfield-Wilcoxon法⁶⁾によった。

出血活性 Kondoら⁷⁾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0.1 mlを注射し、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⁸⁾により活性を測定し直径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⁹⁾の方法に準拠した。Caseinを2%濃度に0.4 M 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0.44 M 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0.4 M 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。

TAME 水解活性、Clotting 活性、Phospholipase A, Phosphodiesterase, Phosphomonoesterase, 5'-nucleotidase, ATPaseの各活性の測定法は第1報¹⁰⁾ 第2報³⁾で報告した通りである。

結 果

致死活性物質の分離

Sephadex G-75 ゲル濾過 粗毒1000 mgを0.01 M NaCl 含有0.04 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.2) 3 mlに溶解し不溶物を遠心除去後、同緩衝液で平衡化したSephadex G-75でゲル濾過を行った。その結果Fig. 1に示すような溶出パターンが得られた。各ピーク順に1, 2, 3, 4, 5とすると、プロティナーゼ活性は1, 2, 4の画分に、致死活性は1, 2, 3, 4と4つのピークに分かれて溶出してくるが、今回は第1, 2を合わせた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で得られた第1, 2画分を合わせ、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0.5 Mまで直線的に上昇させるとFig. 2に示すパターンが得られた。各ピークをそれぞれ1, 2, 3, 4, 5とすると、プロティナーゼ、出血活性は2, 3の画分、プロティナーゼ、出血、致死活性をもつ画分は5に溶出してきた。この5の画分を集めて0.01 M NaCl 含有0.01 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.2)で透析を行った。

Fig. 1. Gel Filtration of the Venom *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 0.04 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.2 and 3 ml fractions were collected at a flow rate of 9 ml/hr.

Fig. 2. DEAE Sephadex A-50 Column Chromatography

—●—: absorbance at 280 nm, ----: conductivity.
 The lethal fraction (indicated with black bar at Fig. 1) was applied to a column (1.9×43 cm) of DEAE Sephadex A-50 equilibrated with 0.04 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.2. The column was eluted with a linear gradient from 0.01 M to 0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

- 6) J.T. Litchfield, F. Wilcoxon, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99 (1969).
- 7) H. Kondo, S. Kondo, H. Ikezawa, R. Murata, A. Osaka, *Jpn. J. Med. Soc. Biol.*, **13**, 43 (1960).
- 8) D.J. Finney, "Statistical Method in Biological Assay," Charles Griffin, London, 1952, p.99.
- 9) Y. Murata, M. Satake, T. Suzuki, *J. Biochem.*, **53**, 431 (1963).
- 10) 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).

Fig. 3. DEAE Sephadel Column Chromatography

—●—: absorbance at 280 nm, ———: conductivity.

The lethal fraction (indicated with black at Fig. 2) obtained from chromatography on DEAE Sephadex A-50 was dialyzed against 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.2, and applied to a column (1.5 × 43 cm) of DEAE-Sephacel equilibrated with same buffer. The column was eluted with a linear gradient from 0.1 M to 0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

Fig. 4. DEAE Sephadel Column Rechromatography

—●—: absorbance at 280 nm, ———: conductivity.

The lethal fraction (indicated with black bar at Fig. 3) obtained from chromatography on DEAE Sephadex was dialyzed against 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.2, and applied to a column (1.5 × 43 cm) of DEAE Sephadel equilibrated with same buffer. The column was eluted with a linear gradient from 0.1 M to 0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 15 ml/hr.

DEAE Sephadel クロマトグラフィー 透析した画分を DEAE Sephadel カラムにアプライし、0.1 M NaCl で素通りさせた後、食塩濃度を 0.5 M まで直線的に上昇させると Fig. 3 に示すパターンが得られた。塩濃度 15 m MHO 付近に致死活性画分が溶出してきた。この画分には致死活性のほか出血、プロティナーゼ活性がみられた。この画分を集め 0.01 M NaCl 含有 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) で透析を行った。

DEAE Sephadel リクロマトグラフィー 透析した画分を DEAE Sephadel カラムにアプライし、0.15 M NaCl で素通りさせた後、食塩濃度を 0.5 M まで直線的に上昇させると Fig. 4 に示すパターンが得られた。塩濃度 18 m MHO 付近に致死、出血活性を有するプロティナーゼが溶出してきた。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¹¹⁾ ポリアクリルアミドを支持体とした 8.3 ゲルのディスクに標品約 22 μg をアプライし、1 本あたり通電 0.1 mA で 4° 約 18 時間泳動した。染色は 1% コマジーブリリアントブルー R250 を用い、48° 2 時間あるいは室温で 12 時間染色後、脱色液 (酢酸:メチルアルコール:水, 1:5:5) で脱色した結果 Fig. 5 に示す単一なバンドが得られた。この結果より最終標品は単一であると判断しこれを先の Ac₁-P, Ac₂-P に準じ Ac₃-proteinase (以下 Ac₃-P) と命名した。

最終標品における各種酵素活性および生理活性

精製 Ac₃-P について粗毒中に含まれる各種活性の検討を行った。その結果は Table I に示すようにこの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。

精製における各活性の動向

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動向をまとめたもので粗毒 1000 mg を出

Fig. 5. Disc Electrophoresis of the Main Peak (Ac₃-Proteinase) from DEAE Sephadel Column Rechromatography

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

TABLE I. Various Enzymatic and Physiological Activities
fo Crude and Ac₃-Proteinase

	Crude	Ac ₃ -Proteinase
Enzymatic activities		
Proteinase	+	+
TAMEase	+	—
5'-nucleotidase	+	—
ATPase	+	—
Glycerophosphatase	+	—
Phosphomonoesterase	+	—
Phosphodiesterase	+	—
Phospholipase A	+	—
Physiological activities		
Lethal	+	+
Hemorrhagic	+	+
Clotting	+	—

TABLE II. Summary of the Purification of Ac₃-Proteinase

Step	Protein (mg)	Lethal activity			Hemorrhagic activity			Proteolytic activity		
		LD ₅₀ (μg)	Relative activity	Yield (%)	M. H. D (μg)	Relative activity	Yield (%)	unit/mg	Relative activity	Yield (%)
Crude venom	1000	150	1.0	100	1.2	1.0	100	0.144	1.0	100
Sephadex G-75	488	100(89—113)	1.5	73.2	0.658	1.8	89.0	0.220	1.5	74.6
DEAE Sephadex	58	87(64—104)	1.7	10.0	0.674	1.8	10.3	0.348	2.1	14.0
DEAE Sephacel	28	107(103—111)	1.4	3.9	0.728	1.7	4.6	0.326	2.0	6.3
DEAE Sephacel	22.7	108(99—118)	1.4	3.2	0.950	1.3	2.9	0.253	1.8	4.0

Fig. 6. SDS Disc Electrophoresis

1, pentamer; 2, tetramer; 3, Ac₃-Proteinase; 4, trimer;
5, dimer; 6, monomer.

Fig. 7. Isoelectric Focusing of Ac₃-Proteinase

—●—: absorbance at 280 nm, — — —: pH
Isoelectric focusing with carrier ampholyte covering the
pH range 3.5—10 was conducted in a column of capacity
for 48 hr at 3°.

発材料として最終標品の収量は 22.7 mg であった。マウスに対する LD_{50} は粗毒 150 μ g から 108 μ g となり活性は 1.4 倍に上昇し、その収率は 3.2% である。Casein を基質としたプロティナーゼ活性は粗毒の 0.144 単位から 0.253 単位となり 1.8 倍に上昇し、収率は 3.5% である。出血活性は MHD として粗毒 1.2 μ g であるが最終標品は 0.95 μ g となり、活性は 1.3 倍に上昇し、その収率は 2.9% である。

このように各活性はそれ程上昇していないが、その理由は Ac_3 -P と同様、致死、出血およびプロティナーゼ活性を示す Ac_1 -P、 Ac_2 -P や他の出血因子、プロティナーゼが粗毒中には含まれており、これらが分離されること、およびこの Ac_3 -P が不安定なためと思われる。

Ac_3 -Proteinase の性質

分子量の測定 Shapiro¹²⁾ および Weber と Osborne¹³⁾ の方法による SDS ディスク電気泳動により測定を行った。10% 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マーカーとして 1 本あたり 7 mA で約 4 時間泳動した。標準として BDH 社製分子量測定マーカーを使用した。Monomer (14300), dimer (28600), trimer (42900), tetramer (57200), pentamer (71500) を用い各々の mobility の差から分子量を求めたところ Fig. 6 に示すように約 57000 と算出された。

等電点¹⁴⁾ LKB 8100 エレクトロフォーカシング蛋白分離装置を用い、PH 3.5—10 のキャリアンホライトを用い、最終標品 5 mg を 1% グリシン溶液で一夜透析後、4° 300 V で 24 時間、更に 500 V で 24 時間泳動し、280 nm の吸光度および pH を測定したところ、Fig. 7 に示すようにその等電点は pH 4.7 と測定された。

糖の定性および定量試験 アンスロン硫酸反応¹⁵⁾ により糖の定性反応を行ったところ、陽性であった。定量はグルコースを用いて標準曲線を描き測定したところ、 Ac_3 -P 1 mg あたりグルコースに換算して 1.1 μ g の糖を含んでいた。

各種阻害剤の 3 つの活性に対する影響

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 (ethylene diamine tetra acetic acid), システイン, DFP (diisopropyl fluorophosphate) は終濃度 20 mM, PCMB (*p*-chloromercuri benzoate) は終濃度 5 mM, SBTI (soy bean trypsin inhibitor) は終濃度 100 μ g/ml で、37° 5 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、EDTA により強い阻害をうけ、システインによっても阻害をうけたが、SBTI, DFP によっては阻害をうけなかった。また、抗血清により三活性とも阻害された。

Ac_3 -P のプロティナーゼ活性の熱に対する安定性 Ac_3 -P を 37°, 55° 10 分間保ち、プロティナーゼ活性を測定すると、それぞれ 25%, 55% の活性の低下がみられ、また 60° 10 分で活性は完全に消失していた。さらに Ac_3 -P の 8.3 ゲルディスク電気泳動を 4° と室温で行ったところ、4° では 1 本のバンドのみであったが、室温では 7—8 本のバンドが認められた。これは泳動温度の上昇にもとづく本酵素の自己消化によるものと考えられる。

TABLE III. Effects of Various Inhibitors on the Ac_3 -Proteinase

Inhibitors (final concentration)	Lethal	Hemorrhagic	Proteolytic
None	—	—	—
EDTA (20mM)	+	+	+
Cysteine (20mM)	+	+	+
SBTI (100 μ g)	—	—	—
DFP (20mM)	—	—	—
PCMB (5mM)	—	—	—
Antiserum (60 s.c. LD_{50} unit)	+	+	+

—: no inhibition.

+: inhibition.

12) A. L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815 (1967).

13) K. Weber, M. Osborne, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).

14) 松尾雄志, 堀尾武一, 蛋核酵, **12**, 737 (1967).

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

Fig. 8. Heat Inactivation of Purified Ac_3 -Proteinase

180 μ g of purified Ac_3 -Proteinase was heated at 37° in test tubes. Then, the remaining proteinase activity was measured.

また、37° 10 分間本酵素を保温後、4° で電気泳動を行っても同じように自己消化によると思われるバンドが認められたことから首肯される。

Ac_3 -P の保温時間によるプロティナーゼ活性の変動 精製 Ac_3 -P を 37° で各時間保温後、プロティナーゼ活性を測定したところ Fig. 8 に示すような結果を得た。45 分の保温でその活性は約 50% に減少した。このことからこの酵素の不安定さがうかがわれる。

総 括

1. 新鮮ヒヤッポダ毒から Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-50, DEAE Sephacel, DEAE Sephacel の精製操作を経て、致死活性 (LD_{50} 108 μ g/mouse), 出血活性 (MHD 0.95 μ g) を持ったプロティナーゼ (0.253 unit/mg), Ac_3 -proteinase を得た。

2. このプロティナーゼはディスク電気泳動において単一であり、分子量 57000, 等電点 pH 4.7 の糖蛋白である。

3. このプロティナーゼは EDTA, システインによって致死, 出血, プロティナーゼの 3 活性がともに阻害を受けるが, SBTI, DFP では阻害されない。なお 3 活性ともヒヤッポダ毒抗血清によって阻害される。

4. 最終標品には致死, 出血, プロティナーゼの 3 活性のみ存在し, 粗毒における他の活性はみられなかった。

5. この酵素は自己消化力が強く, 室温操作あるいは 37° 保温により活性が速やかに減少し, また, 熱に対しても不安定である。

考 察

著者らは台湾に生息するヒヤッポダによる咬傷時における顕著な症状, つまり致死, 出血, 壊死, 浮腫およびその他の生理作用に興味を持ち, これまでに本毒中より致死, 出血作用の本態と思われる Ac_1 -P,⁴⁾ Ac_2 -P¹⁾ を単離し, また血液凝固因子を精製¹⁶⁾した。

今回単離した Ac_3 -P を Ac_1 -P, Ac_2 -P と比較してみると Table IV に示すように致死, 出血作用を有すること, 等電点, 阻害剤に対する挙動などはよく似ているが, 分子量が大きく, 糖蛋白である点はこれまでに精製した

TABLE IV. Comparisons of Various Properties of Ac_1 -, Ac_2 - and Ac_3 -Proteinases

Property	Ac_1 -Proteinase ^{a)}	Ac_2 -Proteinase ^{b)}	Ac_3 -Proteinase
Sugar	—	—	+
Nucleic acid	—	—	—
Molecular weight	24500	25000	57000
Isoelectric point	pH 4.7	pH 4.9	pH 4.7
Inhibitors	EDTA, cysteine antiserum	EDTA, cysteine antiserum	EDTA, cysteine antiserum
Lethal activity	76.5 μ g	110 μ g	108 μ g
Hemorrhagic activity	0.22 μ g	0.43 μ g	0.95 μ g
Proteinase activity	0.54 unit/mg	0.17 unit/mg	0.25 unit/mg

a) Taken from *Yakugaku Zasshi*, **97**, 507 (1977).

b) Taken from *Yakugaku Zasshi*, **98**, 1523 (1978).

16) 第 3 報: 杉原久義, 二改俊章, 小田文彦, 田中哲之助, 薬誌, **98**, 832 (1978).

Ac₁-P, Ac₂-P とは異なっていた。大島ら^{17,18)}は日本産マムシ毒からプロテイナーゼ活性を持たない出血, 致死因子 HRI, プロテイナーゼ活性を持つ致死, 出血因子であるプロテイナーゼ b を単離している。このプロテイナーゼ b は分子量 95000, 等電点 pH 4.18 の糖蛋白であり, EDTA, システインで阻害されるが, PCMB, DFP, SBTI で阻害されない。Ac₃-P は等電点 pH 4.7 の糖蛋白であり, また阻害剤に対する挙動もプロテイナーゼ b に似ていたが, 分子量は 57000 とプロテイナーゼ b に比較して小さかった。

各精製段階において Ac₁-P は 3 活性とも上昇しているが Ac₃-P は Ac₂-P と同様な活性動向を示し, 本酵素の不安定さがうかがわれた。これは Ac₃-P が自己消化力の強い蛋白であることが主な原因と考えられ, 今後精製方法の検討をすることにより, 収率をさらに上昇させることが可能であろうと思われる。こういった不安定さがこれまで Ac₃-P の精製を困難にさせていた主因と考えられる。いずれにせよハッポダ毒中から単離された致死, 出血因子が 3 つともプロテイナーゼであったことは極めて興味深いことである。マムシ科ハブ属から分離された致死因子, HR₁,¹⁹⁾ HR_{2a}, HR_{2b}^{20a,b)} Mucrotoxin A²¹⁾ はいずれもプロテイナーゼとは分離されているが, マムシ科マムシ属からのプロテイナーゼ b, Ac₁-P, Ac₂-P, Ac₃-P がプロテイナーゼそのものであることは分類学的にも更に検討すべきものと思われる。

ハッポダ毒 1 g 中からは約 38 mg の Ac₁-P が得られるが, これは 497×LD₅₀(マウス)の致死活性, 170400×MHD の出血活性, 20.672 unit のプロテイナーゼ活性, また Ac₂-P は約 12.8 mg が得られ, これは 116×LD₅₀(マウス)の致死活性, 29700×MHD の出血活性, 2.214 unit のプロテイナーゼ活性に相当し, Ac₃-P は約 22.7 mg が得られ, これは 210×LD₅₀(マウス)の致死活性, 23894×MHD の出血活性, 5.743 unit のプロテイナーゼ活性に相当する。今回使用した粗毒は従来のハッポダ粗毒に比較していくらか活性が弱く, 新鮮毒を用いて Ac₃-P の分離を行えば, 収量その他の数値に若干の変動が見られるかもしれない。Ac₁-P, Ac₂-P, Ac₃-P の病理学的, 生理学的な性状は現在検討中であるが, Ac₃-P をマウスに静注するとマウスは鼻腔から泡沫状の出血をし, 短時間に死亡する。このような所見は粗毒の静注時に見られるものと一致し, Ac₁-P, Ac₂-P の静注時には見られない所見である。このような点からもハッポダ咬傷時における Ac₃-P の動物に対する役割が注目される。

謝辞 ハッポダ毒の入手に当って御配慮をいただいた日本蛇族学術研究所所長, 沢井芳男博士に感謝いたします。

- 17) G. Oshima, T. Omori-Satoh, S. Iwanaga, T. Suzuki, *J. Biochem.*, **72**, 1483 (1972).
- 18) 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).
- 19) T. Omori-Satoh, A. Osaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 432 (1970).
- 20) a) T. Takahashi, A. Osaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 293 (1970); b) *Idem, ibid.*, **207**, 65 (1970).
- 21) 杉原久義, 森浦正憲, 田中哲之助, 日細菌, **27**, 90 (1972); 杉原久義, 森浦正憲, 田中哲之助, 日本薬学会第92年年会講演要旨集, 於大阪, 1972, p. 49 (第 III 分冊).