

Title	蛇毒プロテイナーゼの研究
Author(s)	大島, 源一郎
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29619
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 4 】

氏名・(本籍)	大 島 源 一 郎 おお しま げん いち ろう
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 3 4 6 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 3 月 28 日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文名	蛇毒プロティナーゼの研究
論文審査委員	(主査) 教 授 鈴木 友二 (副査) 教 授 伊勢村寿三 教 授 成田 耕造

論 文 内 容 の 要 旨

游蛇科に属する海蛇亜科やコブラ亜科の蛇毒には分子量 6 千内外の神経毒が含まれている。一方蝮蛇科毒蛇の咬傷時に起る一連の局所病変は、蛇毒中に含まれるプロティナーゼがその原因と考えられてきた。鈴木等は日本産のムムシ毒中に 3 種のプロティナーゼ a, b, c を見出し、これらのうちプロティナーゼ b は同毒中に含まれる 2 種の出血因子 (HR-I および HR-II) の内の後者と同一物であること、そしてプロティナーゼ b はムムシ毒中の致死作用と関連深いことを明らかにしてきた。この論文はムムシ毒中に含まれる 3 種のプロティナーゼ a, b, c の精製法を確立し、それら標品の物理化学的性状を調べ、かつプロティナーゼ b の酵素蛋白の性質について考察した。

I マムシ毒プロティナーゼ a, b, c の精製と物理化学的諸性質

イオン交換クロマトおよびゲル濾過の併用により、ムムシ粗毒 32.7g から精製プロティナーゼ a, b, c, をそれぞれ 138mg, 3.42g, 2.69g 得ることが出来た。これら精製標品は超遠心的、電気泳動的、クロマトグラフィー的にいずれも均一であった。プロティナーゼ a, b, c の沈降定数はそれぞれ 3.63S, 5.54S, 4.94S であった。プロティナーゼ b, c の拡散定数は 5.26D, 5.88D, 偏比容は 0.722ml/g, 0.695ml/g, 固有粘度は 0.052 dl/g, 0.042dl/g であった。なおプロティナーゼ a は粗毒中の含量が少ないため上記 3 種の値を測定出来なかった。プロティナーゼ a, b, c の分子量は略 50,000, 94,000, 64,000 と算出された。これらの等電点は pH6.00, pH4.18, pH3.85 で、280m μ における吸光度 ($A_{1\%}^{1\text{cm}}$) は 9.08, 7.40, 10.98 であった。プロティナーゼ a, b, c の窒素含量は 13.83%, 12.69%, 13.90%, ポリプチド含量は 76.5%, 76.5%, 91.2% であった。プロティナーゼ a, b, c はいずれも糖蛋白質に属し、糖含量は 13.6%, 17.5%, 8.40% であった。蛇毒プロティナーゼに含まれる糖組成は周知の血中糖蛋白質に含まれるものと等しく、従ってこれら糖残基と蛋白との結合様式

も、血中糖蛋白のそれと同じであると思われる。

Ⅱ プロティナーゼ b の構造と活性の関係について

プロティナーゼ b は尿素によって立体構造の変化を受け、カゼイン水解活性および出血活性はほぼ平行かつ不可逆的に消失する。このことは両活性の発現に特定の high order structure を必要としていることを意味する。プロティナーゼ b は一分子中に 2 個の Ca 原子を含む。これら Ca イオンを除去すると、プロティナーゼ b は不可逆的に high order structure の変化をきたし、カゼイン水解活性、出血活性を共に消失する。従ってプロティナーゼ b 中の Ca 原子は酵素の high order structure を保つ上に重要な役割を果しているものと思われる。プロティナーゼ b は SH 化合物によりカゼイン水解活性を消失するが、この失活は Ca イオンによって保護されず、その処理により分子中に SH 基が増加する。従って SH 化合物の作用はキレート剤よりもむしろ還元剤として働くものと思われる。プロティナーゼ b は分子中に 1 個の SH 基を有する。しかしこの SH 基は未変性の状態や EDTA 処理あるいは 8 M 尿素処理後においては、SH 試薬と反応せず、EDTA を含む 8 M 尿素処理後に初めて、SH 試薬と反応するようになる。このプロティナーゼ中の 1 個の SH 基がカゼイン水解活性や出血活性の発現に関与しているか否かは不明である。

論文の審査結果の要旨

蝮蛇科の毒蛇による咬傷時には出血がおきて、かつ咬傷時の局所病変はこれらの毒に特徴的に含まれるプロティナーゼによると考えられてきた。鈴木らは日本産のマムシ毒中に 3 種のプロティナーゼ a, b, c を見出し、これらのうちプロティナーゼ b は 2 種の出血因子 (HR-I および HR-II) のうちの HR-II と同一物であることを明らかにした。また 2 種の出血因子はマムシ毒中の致死作用と不可分の関係にあった。大島はマムシ毒中に含まれる 3 種のプロティナーゼ a, b, c の精製法を確立し、かつそれら標品の物理化学性状を調べるとともに、プロティナーゼ b の酵素蛋白の性質と出血活性との関係について考察した。

〔Ⅰ〕 マムシ毒プロティナーゼ a, b, c の精製と物理化学的諸性質：イオン交換クロマトおよびゲルろ過の併用により、マムシ粗毒 32.7 g から精製プロティナーゼ a, b, c をそれぞれ 138 mg, 3.42 g, 2.69 g 得た。プロティナーゼ a, b, c のそれぞれの物理化学的恒数は、沈降定数 3.63 S, 5.54 S, 4.94 S, 分子量約 50,000, 94,000, 64,000, 等電点 pH 6.00, pH 4.18, pH 3.85 で、280 m μ における吸光度は ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) 9.08, 7.40, 10.98, 窒素含量 13.83%, 12.69%, 13.90%, ポリペプチド量 76.5%, 76.5%, 9.12% であった。プロティナーゼ a では含量が少ないため以下の値を測定できなかったが、プロティナーゼ b, c の拡散定数は 5.26 D, 5.88 D, 偏比容は 0.722 ml/g, 0.695 ml/g, 固有粘度は 0.052 dl/g, 0.046 dl/g であった。また、プロティナーゼ a, b, c の糖含量は 13.6%, 17.5%, 8.40% で、含まれる糖の組成は周知の血中糖蛋白質に含まれるものとほぼ等しかった。

〔Ⅱ〕 プロティナーゼ b の構造と活性の関係について：プロティナーゼ b は尿素によって立体構造の変化を受け、カゼイン水解活性および出血活性はほぼ平行かつ不可逆的に消失する。このことは、

両活性の発現に特定の高次構造を必要とすることを意味する。プロティナーゼ b は 1 分子中に 2 個の Ca 原子を含み, Ca を除去すると不可逆的に高次構造の変化をきたし, カゼイン水解活性, 出血活性が消失する。プロティナーゼ b 活性は SH 化合物で消失するが, この失活は Ca イオンによって保護されず, その処理により分子中に SH 基が増加する。したがって SH 化合物の作用はキレート剤としてよりも還元剤として働くものと思われる。プロティナーゼ b は分子中に 1 個の SH 基を有するが, EDTA を含む 8 M 尿素処理後に初めて, SH 試薬と反応するようになる。

以上, 大島君の論文は, 動物性の毒素蛋白の性質を明らかにし, 蛋白の高次構造と生理活性との関連を明らかにした点, 興味あるもので理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。