The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	台湾産アマガサヘビ毒成分のβ1-ブンガロトキシンのアミノ酸配列とホスホリパーゼ活性
Author(s)	近藤, 淑
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32108
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【5】

氏名・(本籍)	近藤　淑（こんどう きよし）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4208 号
学位授与の日付	昭和53年3月25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
学位論文題目	**台湾産アマガサヘビ毒成分のβ_1-ブンガロトキシンのアミノ酸配列とホスホリパーゼ活性**
論文審査委員	(主査) 教授 成田　耕造 (副査) 教授 松原　央　教授 松島　祥夫

論文内容の要旨

台湾産アマガサヘビ（*Bungarus multicinctus*）の粗毒より，CM-Sephadex C-25, Sephadex G-75カラムクロマトを用いて，前シナプス性神経毒たんぱく質，β_1-ブンガロトキシン（β-タイプの主成分，以下β_1-トキシンと記す）を精製した。このβ_1-トキシンは分子量, 20,500, アミノ酸180残基からなる塩基性たんぱく質（等電点pH 9.5）で，神経筋接合部での運動神経末端部に作用して，アセチルコリンの放出阻止と神経伝達の阻害を起こし，その致死活性（LD_{50}）は0.019μg/gマウスであった。β_1-トキシンは二本のポリペプチド鎖——A鎖（分子量13,500, アミノ酸120残基）とB鎖（分子量7,000, アミノ酸60残基）——からなり，両鎖は鎖間ジスルフィド結合によって連結されていることが分かった。

両鎖のアミノ酸配列を決定したところ，A鎖は前シナプス性トキシンであるノテキシンや，蛇毒およびブタ膵臓のホスホリパーゼAとアミノ酸配列が相同しており，一方B鎖は蛇毒から得られる低分子量トキシンやプロテアーゼインヒビターとアミノ酸配列が相同していることが分かった。

A鎖とホスホリパーゼAとのアミノ酸配列の相同性から予知されたように，β_1—トキシンは卵黄レシチンを水解し，脂肪酸とレゾレシチンを生成するホスホリパーゼA活性を持っていた。このβ_1-トキシンの酵素活性は酸性pHでは安定であるが，pH 8以上では急激に活性の減少を見せた（37℃, 20h)。また卵黄レシチン水解の至適 pH は8.0（37℃）であった。

ホスホリパーゼAの特異的阻害剤であるp-bromophenacyl bromideでβ_1-トキシンを修飾すると，ホスホリパーゼ活性が減少するとともに，ヒスチジン1残基の消失が起こった。この酵素活性の減少とヒスチジン残基の減少は擬一次反応に従った。また失活速度はpH依存性を示し，見かけの pKa は

6.9であった。このpKa値からもこの失活にはヒスチジン残基が関与していることが推定された。また修飾されたヒスチジン残基の同定をおこなったところ，A鎖のヒスチジン—48であることが分かった。この残基の局在はノテキシンやホスホリパーゼAと同一であり，また周辺のアミノ酸配列はかなり相同性の高い領域であった。ブタホスホリパーゼA_2ではこの残基が活性部位の1つであると結論されており，またβ_Y-トキシンはカルシウムイオン，基質により，上記試薬による失活から保護されることより，ヒスチジン—48（A鎖）はβ_1-トキシンのホスホリパーゼ活性に関与していると結論した。また修飾されたβ_1-トキシンのホスホリパーゼ活性の減少と毒性の低下とは共に平行していることより，ホスホリパーゼ活性がβ_1-トキシンの神経毒作用に関与していると推定した。

論文の審査結果の要旨

アマガサヘビは哺乳動物の運動神経・筋接合部に作用する2種の神経毒タンパク質を含有する。これらは神経末端部の前シナプス膜に作用してアセチルコリンの放出を阻止するβ-ブンガロトキシンと，後シナプスの筋細胞のアセチルコリン受容体に結合してアセチルコリンの伝達を阻止するα-ブンガロトキシンとである。近藤君は粗毒からβ-ブンガロトキシン画分を分別し，その主成分であるβ_1-ブンガロトキシンを純化して，その化学的性質を明らかにした。すなわち，この毒素は120残基のアミノ酸を含有するA鎖と，60残基のアミノ酸を含有するB鎖とから構成され，両鎖がシスチンによるSS結合で連結した等電点9.5，分子量20,500の塩基性タンパク質で，ホスホリパーゼA活性をもつことを示した。

ついでA，B両鎖を還元後アルキル化した毒素から分離し，それぞれのアミノ酸配列順序を決定した。その結果，A鎖は他の蛇毒および哺乳動物の膵臓に分泌されるホスホリパーゼA_2のアミノ酸配列と極めて類似していること，B鎖は蛇毒や哺乳動物の膵臓に分泌されるプロテアーゼインヒビターと類似の構造をもっているという極めて注目すべき事実を明らかにした。

ついで，ホスホリパーゼA_2の特異的阻害剤であるp-ブロモフェナシルブロミドをこの毒素に作用させると，毒素の致死活性の消失に並行してホスホリパーゼ活性が消失し，ヒスチジン残基1個のみが上述の試薬と反応することを解明し，反応に関与したヒスチジンは，A鎖のアミノ末端から48番目の残基であることを証明した。この位置のヒスチジン残基は，他のホスホリパーゼA_2の触媒部位残基として同定されているものに一致し，ホスホリパーゼ活性が毒素の致死活性に関与することを明らかにした。

近藤君が明らかにした上述の研究結果は，前シナプス神経毒作用機作を解明するために一つの方向を与えたものであり，理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。