



Title	サキシマハブ毒のアルギニンエステル水解酵素に関する研究(農芸化学科)
Author(s)	知念, 功; 大城, ゆみ子; 饒平名, とく子; 小渡, 恵子; 兼村, 憲勝; 岩永, 貞昭
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(27): 57-68
Issue Date	1980-11-29
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4086
Rights	

サキシマハブ毒のアルギニンエステル 水解酵素に関する研究

知念 功*・大城ゆみ子**・饒平名とく子***
小渡 恵子****・兼村 憲勝*****・岩永 貞昭*****

Isao CHINEN, Yumiko OSHIRO, Tokuko NOHINA, Keiko
ODO, Norikatsu KANEMURA and Sadaaki IWANAGA: Stud-
ies on arginine ester hydrolyzing enzyme of Sakishima
habu (*T. elegans*) venom

I 緒 論

Crotalidae科やViperidae科の蛇毒には、トリプシンの基質としてよく用いられる合成基質アルギニンエステル⁸⁾等を加水分解し、カゼインの様な極普通のタンパク質を加水分解しない酵素が存在することが知られている。

一方蛇毒中に存在するブラジキニン遊離酵素⁵⁾、スロンピン様酵素^{6,4)}や毛細血管透過性亢進¹⁰⁾因子は、このアルギニンエステル等の合成基質を加水分解することが知られている。

また一方琉球列島には、3属8種¹¹⁾(亜種を含む)の毒蛇が棲息していることがわかっているが、実際毎年人畜に多大な被害を与えている毒蛇は、そのうちでもハブとサキシマハブが主である。この両毒

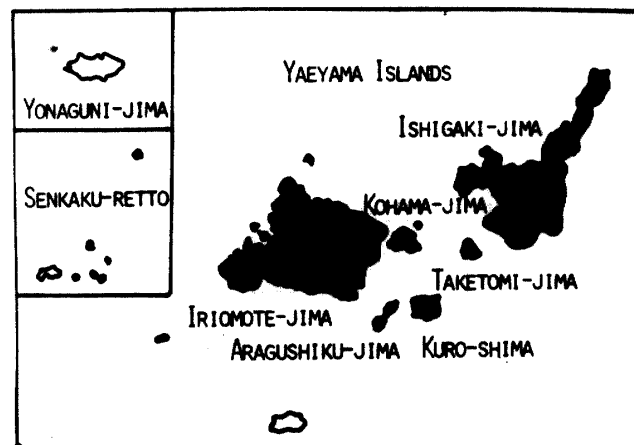


Fig. 1 Distribution map of *T. elegans*

* 琉球大学農学部農芸化学科 ** 第一企業KK *** 光島建設KK

**** 金武中学校 ***** 沖縄県庁農林水産部糖業農産課

***** 大阪大学蛋白質研究所 (現在九州大学理学部生物学科)

琉球大学農学部学術報告 27: 57~68 (1980)

蛇は、分布・形態・習性等が異なっており、とくに分布では、ハブは、奄美群島や沖縄群島に棲息しているのに対し、サキシマハブは、琉球列島の最南端の八重山群島に棲息している (Fig. 1 で黒くぬりつぶしている島々に棲息する)。またハブは、サキシマハブに比べ、動きが敏捷であり、人畜への被害も大であり、毒性も大であるといわれている。一方酵素活性を比較してみると、ハブ毒の方は、ホスホリパーゼ A₂¹⁾、およびカゼイン水解活性が高いのに対し、サキシマハブ毒は、コラゲナーゼ活性³⁾やアルギニンエステル水解活性が高い。特にサキシマハブ毒は、他の蛇毒と比較しアルギニンエステル水解活性が著しく高い。逆にハブ毒は、この酵素活性が、他の蛇毒と比較した場合、極端に低い。

本研究では、この両蛇毒を生化学的に比較すると共に、アルギニンエステル水解活性を有する点で、ブラジキニン遊離酵素、スロンピン様酵素、毛細血管透過性亢進因子との関連性を追究することにしており、今回は、その一環として、そのサキシマハブ毒のアルギニンエステル水解酵素の精製をこころみた。以下にそれを詳細に報告する。

II 実験材料及び実験方法

1. 実験材料

サキシマハブおよびハブから採取した毒液は、8,000 rpm で30分間冷凍遠心したのち、得られる上清を凍結乾燥し、黄色粉末を得た。これを -20°C に保存し、粗毒として用いた。

2. アルギニンエステル水解酵素活性測定法

Robertsらのヒドロキサミン法⁹⁾に従って定量した。つまり試料0.5 ml (タンパク質含量 $10\mu\text{g}$ 以下)に20 mM Tos-Arg-O-Methyl-Ester (TAMEと略す) (378.8 mg TAME/50 ml, 0.4 M Tris HCl (pH 8.5)) 0.5 mlを加えたのち、 40°C で10分間インキュベートした。次にアルカリ性ヒドロキシルアミン溶液1 mlを加え室温に放置した。次に6% TCA-4 N HCl 0.5 mlと0.11 M FeCl₃-0.04 N HCl 2 mlを加えたのち500 nmの波長で吸光度を測定し (Fig. 2), 残存するエステル量を求め、酵素反応前の基質中のエステル量よりこの残存エステル量を差引いた値をアルギニンエステル水解酵素活性とし、反応時間1分間当り酵素量mg当りに水解されるエステル量であらわした。TAME以

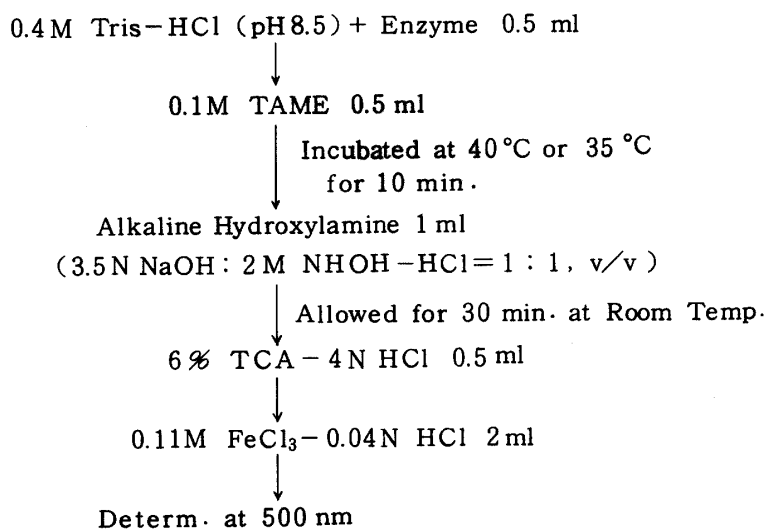


Fig. 2 Hydroxamate Method (TAME Method)

外の合成基質を用いる場合は、この方法と同様に行なった。

3. カゼイン消化法

2%カゼイン溶液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml を加え、37 °C で 15 分間インキュベートしたのち、0.44 M TCA 液 1.0 ml 加え、30 分間室温に放置し、濾過し、その濾液 0.5 ml に 0.4 M Na_2CO_3 溶液 2.5 ml 加え、Folin 試薬 0.5 ml 加え、室温で 30 分間放置し、660 nm の波長で吸光度を測定した。得られた値をチロシン μg 量に換算したのち、酵素量 mg、反応時間 1 分当りであらわした。

4. カラムクロマトグラフィー

1) セファデックス G-75 ゲルカラムクロマトグラフィー

常法²⁾に従ってゲルを水に浸した後、デカンテーションにより洗滌を行った。これを 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化し脱気した後 $5 \times 85 \text{ cm}$ カラムにつめた。それに試料をのせた後、同緩衝液で上昇法により溶出した。

2) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

常法²⁾に従って粉末 DEAE セルロースを 0.5 M 苛性ソーダ溶液と 0.5 M 塩酸溶液で数回交互に洗滌し、活性化した後、緩衝液で平衡化を行った。それを吸引し、脱気したのちカラムにつめステップワイズ法またはグラジェント法により溶出を行った。

なおこのカラムクロマトグラフィーで溶出した各分画は、280 nm の波長で吸光度を測定し、蛋白質量を求めたのち、アルギニンエステル水解活性及びカゼイン消化活性を測定した。

5. ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動¹⁰⁾

カラムクロマトグラフィーによって得られた活性分画の純度を調べるため、前報と同様な方法により、7.5%ゲルを作り、pH 9.4 で、1 チューブあたり、2 mA の電流を約 2 時間通電し、泳動した。なおマーカーとしては、ブロムチモールブルーを用い、染色には、0.004% Coomassie Brilliant Blue 溶液を用いた。

III 実験結果

1. Tos-Arg-O-Methyl-Ester 溶液 (ヒドロキサメート) の可視部吸収スペクトル

Fig. 3 に示すように $10 \times 10^{-3} \text{ M}$ ヒドロキサメート溶液の可視部吸収スペクトルは、500 nm にピークがあるため、この波長で、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ TAME 溶液と $10 \times 10^{-3} \text{ M}$ 濃度で、吸光度を測定した結果、Fig. 4 に示すようにその濃度と吸光度との間には、直線関係が見られた。そのため Fig. 4 を標準曲線として用いることにした。

2. サキシマハブ毒のプロテアーゼ活性

Table 1 に示した様に、サキシマハブ粗毒は、アルギニンエステル、カゼイン、不溶性コラーゲンリジンエステル、グリシンリジンエステルを加水分解した。また数値上は、この蛇毒の場合、アル

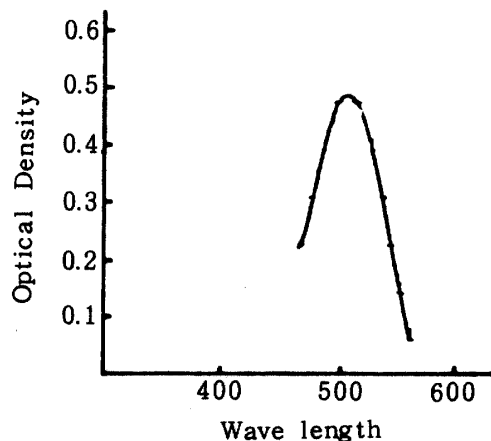


Fig. 3 Visible absorption spectrum of tosyl-arginine-hydroxamate solution

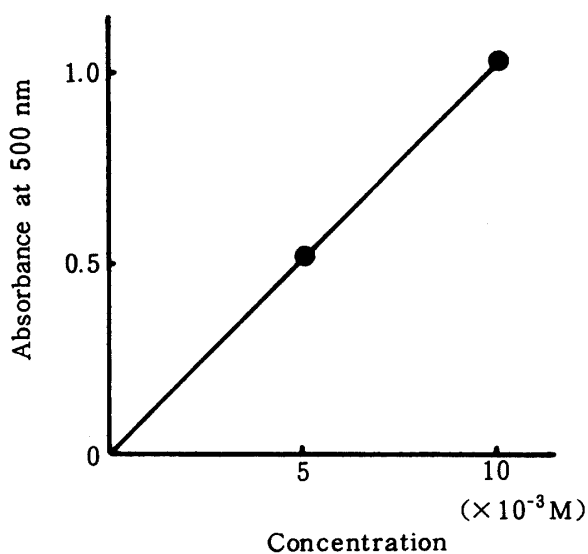


Fig. 4 Standard curve of Tosyl-Arginine-hydroxamate solution

Table 1 Proteinase activity of *T. elegans* venom

Substrate	Activity
Tos - Arg - OMe . HCl	49.41 ($\times 10^{-3} M$ TAME / mg / min)
Casein	13.26 (μg Tyrosine / mg / min)
Insoluble collagen	3.26 (μg Hypro. / mg / min)
Tos - Lys - OMe . HCl	1.43 ($\times 10^{-3} M$ TLME / mg / min)
Ac - L - Gly - Lys - OMe . AcOH	0.38 ($\times 10^{-3} M$ AGLLE / mg / min)
Ac - Tyr - OEt . H ₂ O	0 ($\times 10^{-3} M$ ATEE / mg / min)
Lys - OEt . 2HCl	0 ($\times 10^{-3} M$ LEE / mg / min)

ギニンエステル水解活性が最も高い値を示している。次にカゼイン水解活性が高い値を示している。一方この蛇毒をセファディクスG-75カラムを用いゲル透過を行なった結果, Fig. 5に示すように, アルギニンエステル水解活性は, Tube no 100 ~ 付近でその活性ピークがあらわれているのに対し, カゼイン水解活性は, Tube no 120付近でその活性ピークがあらわれた。サキシマハブ毒の場合は,

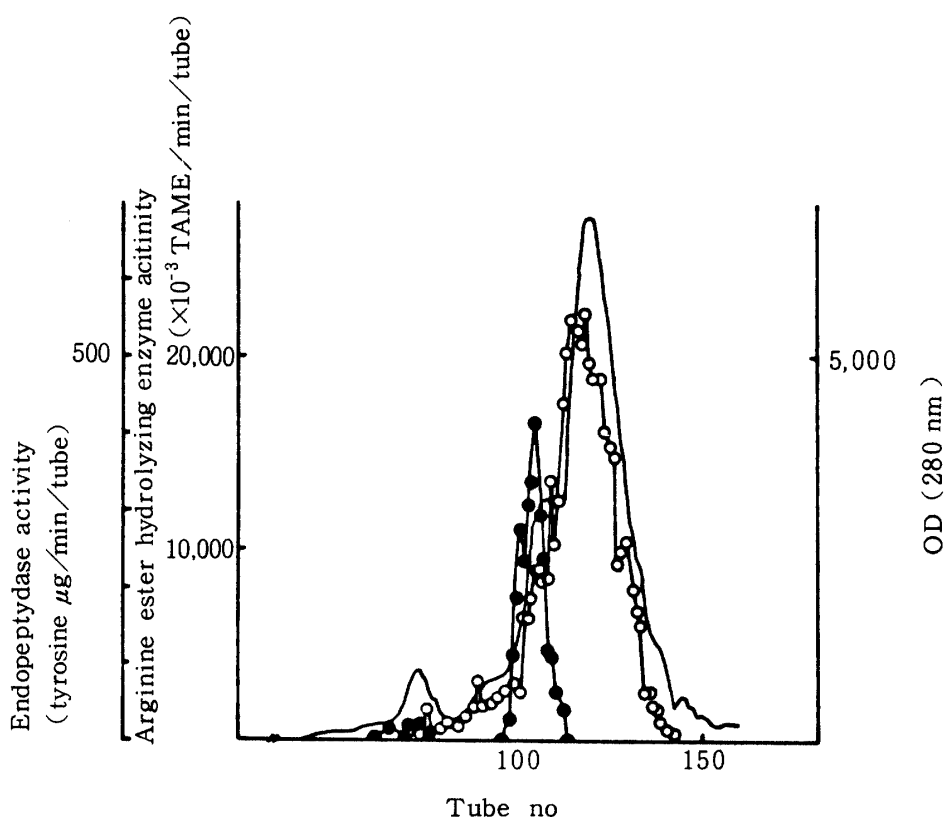


Fig. 5 Separation of endopeptidase and TAME-hydrolyzing enzyme from *T. elegans* by Sephadex G-75 gel column chromatography. Column size 85 × 5.0 cm, flow rate 20 ml/hr, fraction size 5 ml and temperature 5 °C. Load applied was 2,000 mg, of protein (—) Protein concentration, absorbance units, (●-●) Arginine ester hydrolyzing activity, (○-○) endopeptidase activity.

アルギニンエステル水解酵素のみを追究することにした。

3. 酵素活性測定条件の設定

1) 酵素濃度の影響

Fig. 6 に示すように、酵素濃度は、1 ml 当り粗毒が 1 から 20 μg になるように種々変えて調整した。その結果、この蛇毒の場合、その活性は、酵素量 10 μg までは、その濃度に例し、ほぼ直線的に増大した。またこの蛇毒の場合、酵素量 2 μg でも十分にその活性は、測定可能であるため、酵素の節約上本研究では、酵素量は 2 μg 用いた。

2) 反応温度の影響

Fig. 7 に示したように、反応温度を 30 °C から 60 °C まで種々変えて反応を行ない、本酵素活性と反応温度との関係を調べた。その結果、本酵素の至適温度は、45 °C であることがわかった。

3) 熱安定性

本酵素の熱安定性を調べるため、粗毒を用いて 0.02 % 酵素溶液を調整し、その溶液を 50 °C, 70 °C,

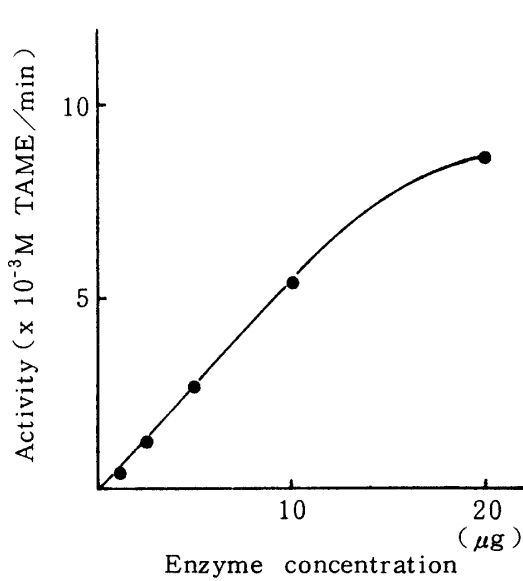


Fig. 6 Effect of enzyme concentration on arginine ester (Tos-Arginine Methyl Ester, TAME) hydrolyzing enzyme activity of *T. elegans* venom.

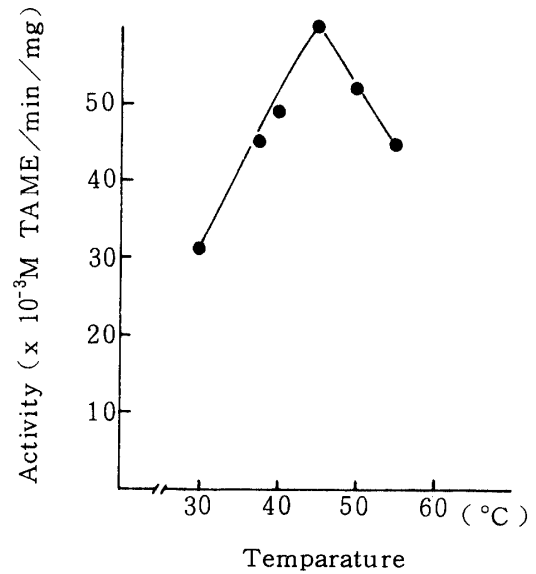


Fig. 7 Relationship of reaction temperature to TAME hydrolyzing enzyme activity of *T. elegans* venom.

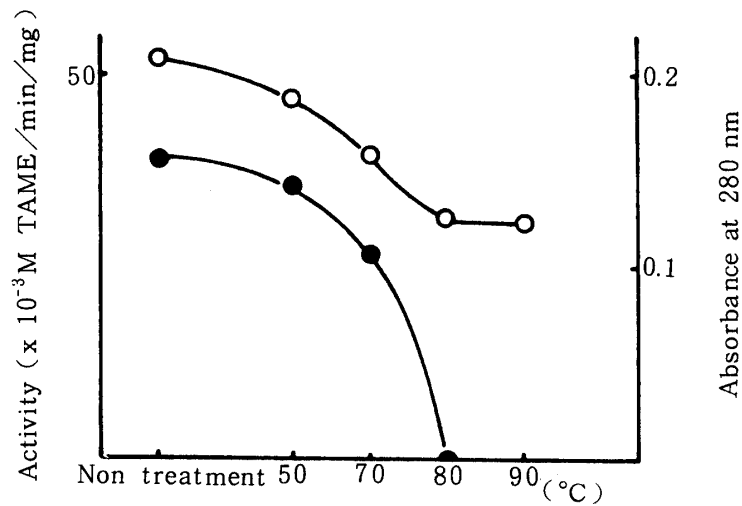


Fig. 8 Heat stability of TAME hydrolyzing enzyme of *T. elegans* venom (●—●) Protein concentration, absorbance units, (○—○) TAME hydrolyzing enzyme activity

80 °C, 90 °C で 10 分間加熱した後, 8,000 rpm で 30 分間冷凍遠心し, 得られる上清液について波長 280 nm で吸光度を測定しタンパク含量を求め, 次に本酵素活性を測定し, 本酵素の熱安定性を求めた。その結果, Fig. 8 に示したように, この酵素溶液のタンパク質含量は 80 °C 及 90 °C の加熱処理で 50% の減少がみられた。本酵素活性は, 50 °C では, 殆んど減少はみられなかったが, 70 °C では,

急激に減少し 80 °C, 90 °C では、活性はみられなかった。

4) 反応時間の影響

上述の様に、本酵素の至適温度が 45 °C であり、またこれまで酵素反応温度は 40 °C で行なっているため、反応温度を 40 °C と 45 °C の両温度で、反応時間を 10 分から 60 分まで種々変え反応を行ない本酵素活性と反応時間の関係を求めた。その結果、Fig. 9 に示したように、本酵素活性は、45 °C では、20 分間まで反応時間に比例し直線的に増大するのに対し、40 °C では、60 分間まで増大した。

5) 基質濃度の影響

本研究では、基質は、 10×10^{-3} M 濃度で用いているが、Fig 10 に示したようにこの濃度以下での、この基質濃度と本酵素活性の関係を調べたが、この濃度以下でも、その活性は殆んど変化がみられなかった。

6) pH 安定性

pH 2.5 から 11 まで種々異なる緩衝液を用いて酵素溶液を作り、これを 18 時間放置したのち遠心し、上清液について本酵素活性を求めた。その結果、Fig. 11 に示したように、この範囲の pH では、本酵素は安定であり、その活性には、変動が見られなかった。

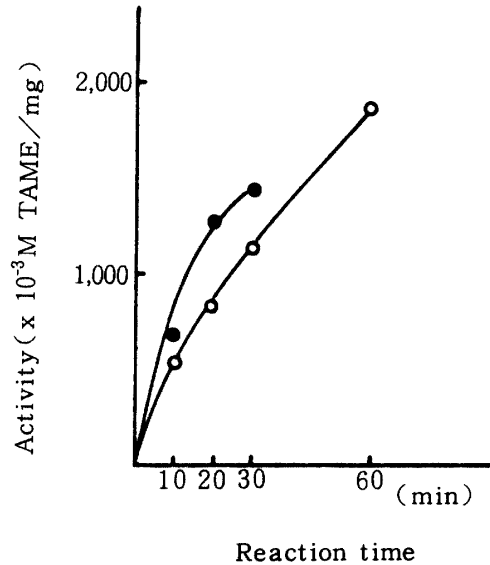


Fig. 9 Effect of reaction time on TAME hydrolysis by *T. elegans* venom. 0.5 ml of 20 mM TAME solution was added to 0.5 ml (5 μ g) of the venom solution and incubated at 40 °C (○—○) or 45 °C (●—●)

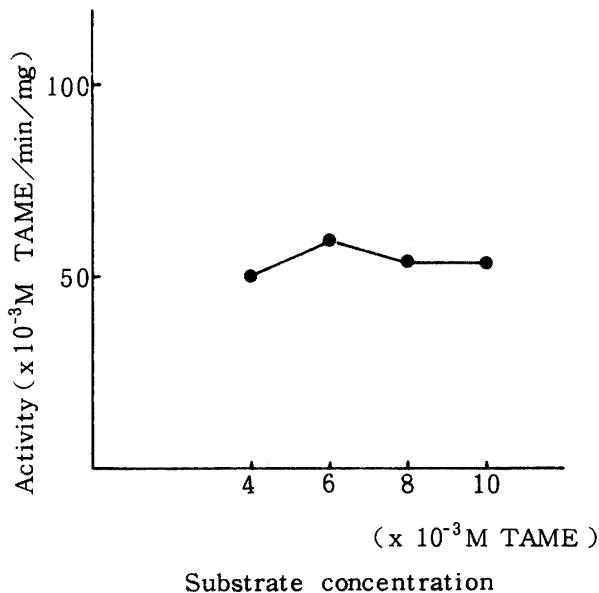


Fig. 10 Variation of rate with substrate concentration

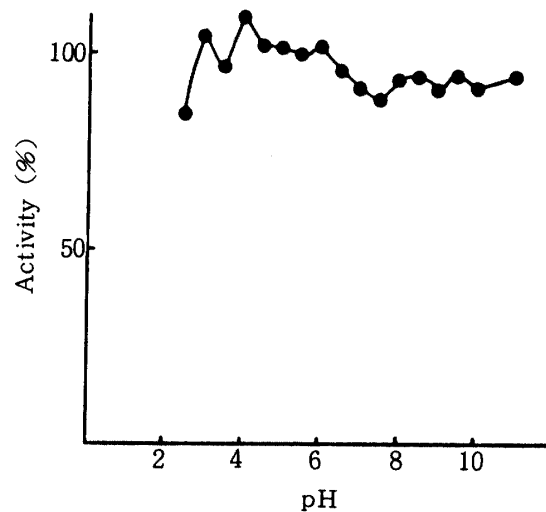


Fig. 11 pH stability of TAME hydrolyzing enzyme of *T. elegans* venom.

4. 精製

上述の様にサキシマハブ毒では、他の蛇毒に比べ、TAME水解活性が高いために、この酵素の精製をこころみた。この蛇毒2gをセファデックスG-75カラム(5×85cm)にかけ、上昇法により溶出した結果、Fig. 12が得られた。タンパク質ピークは、フラクション50~60付近で小ピークが2個、90~120で主要ピークが見られた。本酵素活性は、主要ピークの前方フラクション80~90で小ピーク、90~100で主要活性ピークが見られた。主要活性ピークは、F-III分画とした。この分画は、タンパク質回収率が約15%、活性回収率が約62%で、約4倍に純化されていた(Table 2)。このF-III分画をさらに精製するために、同カラムで再クロマトグラフィーした。その結果、Fig. 13が得られた。タンパク質ピークは、フラクション100付近で小ピーク、160~220で主要ピークが見られた。一方活性ピークは、フラクション160~200で見られた。この分画をF-III-3としてあつめた。この分画のタンパク質回収率は約9%であり、活性回収率は約41%であった。約4.7倍に純化されていた。最後にこの分画をDEAEセルロースカラムにのせ精製した結果、Fig. 14が得られた。タンパク質ピークは、フラクション50~60で小ピーク、120~180で主要ピークが見られた。一方活性ピークは、フラクション120~145、146~155、156~170で、ほぼ3個のピークが見られた。ここでは、便宜上フラクション123~146をF-III-3-cとし、147~170をF-III-3-dとしてあつめた。なお、F-III-3-cは、タンパク質回収率が約3%、活性回収率が約20%で、約7倍に純化されていた。一方F-III-3-dは、タンパク質回収率が約2%で、活性回収率が約24%、約12倍に純化されていた。以上の結果は、Table 2にまとめた。またこれらの精製過程の純度は、各精製過程でディスクゲル電気泳動を行なって調べた。その結果Fig. 15が得られた。精製の最終段階で得られた純化倍率の

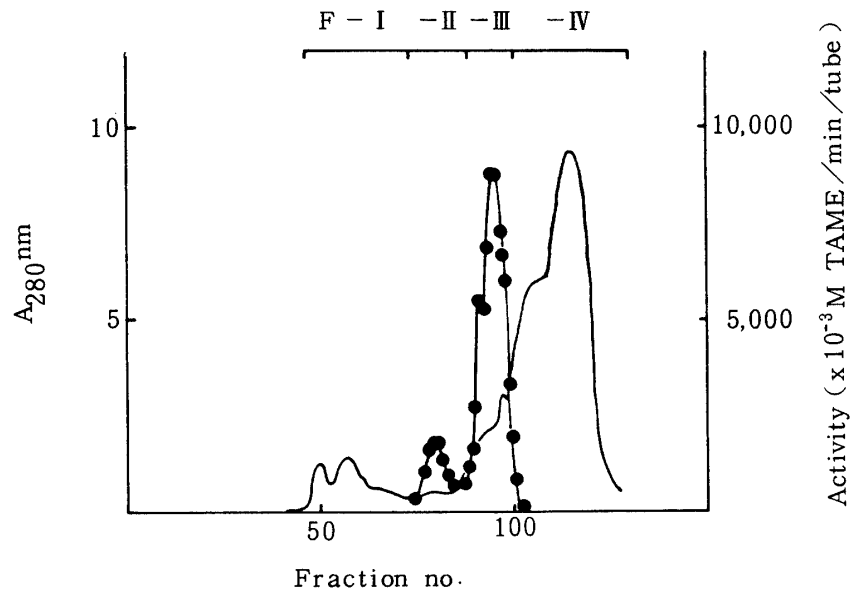


Fig. 12 Elution profile of *T. elegans* venom. Dried venom (2.0g.) was dissolved in 25 ml of 0.05 M Tris HCl buffer (pH 7.0) and applied to a Sephadex G-75 column measuring 5 x 85 cm. Flow rate, 20 ml/hr, temperature, 5 °C, fraction size, 10 ml; (—) protein, (●—●) TAME hydrolyzing enzyme activity.

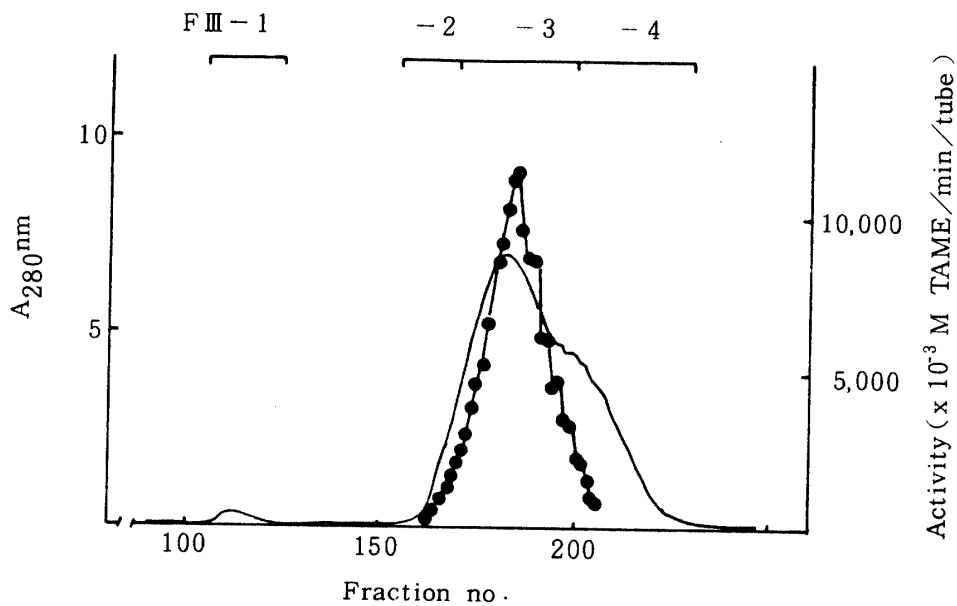


Fig. 13 Rechromatography of F-III on Sephadex G-75. Column size 85 x 5.0cm, flow rate 20 ml/hr, temperature 5 °C, and fraction size 5 ml. Load applied was 1,500 mg. of protein. (-) Protein concentration, absorbance units. (●-●) Arginine ester hydrolyzing activity.

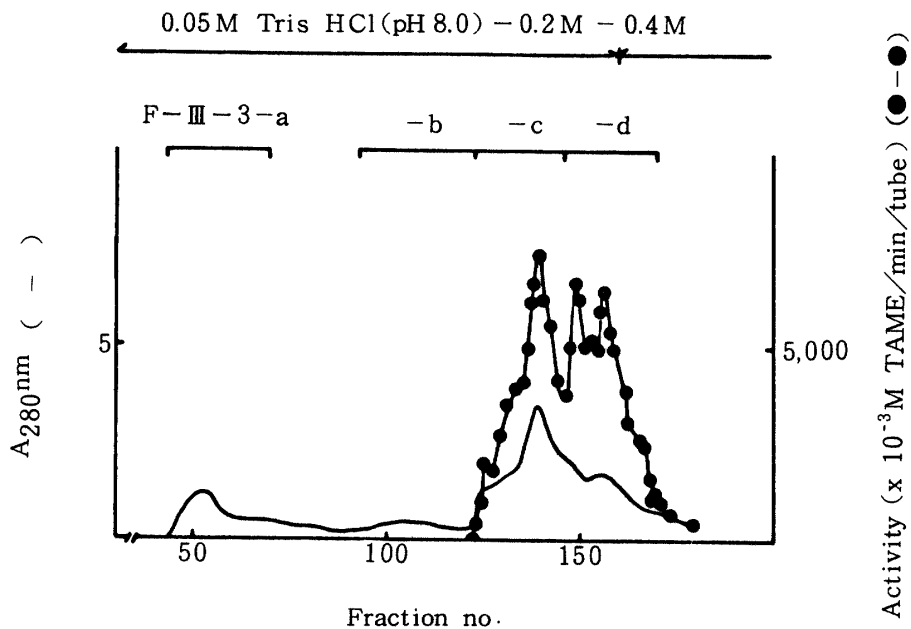


Fig. 14 DEAE cellulose fractionation of arginine ester hydrolyzing enzyme from F-III-3. 776 mg of F-III-3 was fractionated on a 3.6 x 30 cm column using gradient elution. Flow rate, 20 ml/hr, and fraction size, 5ml.

Table 2 Summary of Purification of Arginine Ester Hydrolyzing Enzyme from *T. elegans* Venom.

	Protein		Arginine Ester Hydrolyzing Enzyme Activity			
	mg	Recovery*	Activity**	Recovery*	Specific Activity	Purification
Crude Venom	10,000	100	494,100	100	49.41	1
Sephadex G-75 (1st)	1,548	15.48	306,225	61.98	197.82	4.00
Sephadex G-75 (2nd)	896.76	8.97	207,241	40.64	231.10	4.68
DEAE Cellulose (F-III-3-c)	295.45	2.95	99,109	20.06	335.45	6.79
DEAE Cellulose (F-III-3-d)	194.33	1.94	119,485	24.18	614.86	12.44

* % ** x 10⁻³ M TAME / min / mg

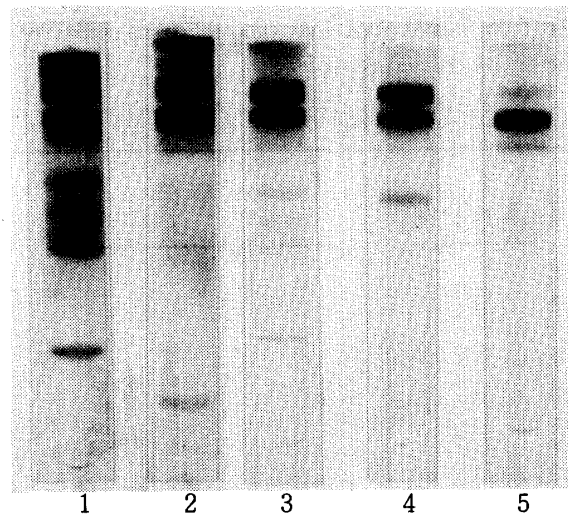


Fig. 15 Analytical acrylamide gel electrophoresis showing purification achieved at each step of the fractionation of arginine ester hydrolyzing enzyme from *T. elegans* venom.

1. Whole *T. elegans* venom.
2. Sephadex G-75 (1st)
3. Sephadex G-75 (2nd)
4. DEAE Cellulose (F-III-3-c)
5. DEAE Cellulose (F-III-3-d)

高い F-III-3-d は、主要バンドが 2 個とその下に薄いバンドが見られた。同じく純化倍率の高い F-III-3-d では、主要バンドが 1 個ずつ見られた。

IV 考 察

サキシマハブ毒は、Table 1 に示したようにアルギニンエステル水解活性が高い値を示している。この値は、これまでの文献値⁷⁾と比較し、最も高い値である。また一方台湾ハブ (*T. mucroszumatus*) 毒でも、この酵素活性は、高い値である。分布上サキシマハブは、八重山群島に棲息し、台湾ハブは、台湾に棲息し、この両者は、地理的に近い所に棲息していることから、この点での近似性は、生物学的にも興味をもたれる。

またこの蛇毒の TAME 水解酵素の至適温度は、先に述べたように 45°C である。一方ハブ毒の場合も低いながらもこの酵素活性を有し、その値は、サキシマハブ毒の約 $\frac{1}{10}$ の 5.27 (10^{-3} M TAME/mg/min) である。このハブ毒の本酵素の至適温度もこのサキシマハブ毒の場合と同じで 45°C であり一致していた。ところがこのサキシマハブ毒中のプロテアーゼの一種であるカゼイン消化酵素の至適温度は、これらの至適温度の値より高くなり、50~55°C であり、異っていた。またこの蛇毒中のこの TAME 水解酵素とカゼイン消化酵素の両酵素は、pH 安定性も若干異なり、前者は、pH 2.5~11 の範囲で安定であったのに対し、後者は、pH 5~10.5 の範囲では安定であったが、pH 5 以下では、不安定であった。また Fig. 5 に示した様に、この TAME 水解酵素をセファデックス G-75 カラムにのせゲル濾過を行った場合、この TAME 水解酵素は、tube no. 100 付近で、シャープな主要活性ピークとなってあらわれたのに対し、カゼイン消化酵素は、tube no. 120 付近でブロードな活性ピークがあらわれ、この両酵素は、溶出箇所、ピークの形が異っていた。以上のことからこの蛇毒中に存在する TAME 水解酵素とカゼイン水解酵素は、同じプロテアーゼでありながら、別々の酵素であり、TAME 水解酵素は、TAME のみを水解し、カゼインを水解しない酵素であると思われる。またこの TAME 水解酵素は、Fig. 8 に示したように、熱に対し不安定であるが、この TAME を水解する *Bothrops jararaca* 毒のトロンビン様酵素、マムシの毛細管透過性亢進因子及び血液凝固酵素 *Vipera russelli* 毒の第 X 因子活性化酵素、*Aghistrodon pisciurus laticinctus* 毒の TAME 水解酵素は、耐熱性⁷⁾であるため、この点では、本酵素はこれの酵素とも異なっている。

また本蛇毒をセファデックス G-75 カラムにのせた結果 (Fig. 5)、2 個の酵素活性ピークが見られ、その内の主要活性ピーク (F-III 分画) をさらに精製して行くと最終的に 3 個の活性ピーク (Fig. 14) が見られるところから、この蛇毒には、カラムクロマト的に少なくとも 4 種類の TAME 水解酵素が存在すると推察された。

V 要 約

サキシマハブ毒のタンパク質水解活性を調べた結果、Tos-Arg-OMe HCl, Casein, Insoluble Collagene, Tos-Lys-OMe HCl, Ac-L-Gly-Lys-OMe AcOH に対する水解活性が見られた。その内でも TAME 活性は、49.41 ($\times 10^{-3}$ M TAME/mg/min) で高い値であった。この TAME 水解酵素は、pH 2.5~11 の範囲で安定であったが、70°C 以上 (10 分間) に加熱するとその活性は、急激に減少した。またその酵素の至適温度は、45°C であった。この蛇毒をセファデックス G-75 カラムにのせ精製すると 2 個の活性ピークが見られ、その内の主要活性ピーク部をさらにセファデックス G-75, DEAE セルロースカラムを用いて精製すると、最終的にこの分画から 3 個の活性ピークが見られた。

引用文献

1. 知念 功 1972 ハブ毒ホスホリパーゼAのニワトリ血清への作用, 琉球大学農学部学術報告 **19** 256~268
2. 知念 功, 真栄田義昭, 保良和政, 四方治五郎, 1978 サキシマハブ毒のプロテアーゼに関する研究 琉球大学農学部学術報告 **25** 203~216
3. 知念 功, 石松 亮, 福田亘博 1980 ハブ毒のコラゲナーゼに関する研究 琉球大学農学部学術報告 **27** 43~56
4. Deui A. R. Banerjee and N. K. Saker, 1959 Intern Congr Physiol Sci. 21st Buenos Aires 1957 Symp. Spc. Lectures.
5. Hamberg, U. et al 1957 Release of bradykinin as related to the esterase activities of tripsin and of the venom of *Bothrops Japaraca* *Experientia* **13** 489~
6. Holty, P. and Raudonat H. W. 1956 Relation between proteolytic activity and blood coagulating action and bradykinin liberatg action of snake venoms. *Arch. Exptl. Pathol. Phamahol.* **229** 113~
7. 岩永貞昭, 田宮信雄, 逢坂 昭 1972 蛇毒 タンパク毒素下(鈴木友二外編集) 665 東京 講談社
8. Neurath, H. and Schwert G. W. 1950 Action of the crst. pancreatic proteolytic enzymes. *Chem. Rer.* **46** 69~
9. Roberts P. S. 1958 Measurement of the rate of plasmin action on synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* **232** 285~
10. Sato, T. Iwanaga S. Mizushima, Y. and Shzuki T. 1965 Studies on snake venoms XV. Separation of agrginine ester hydrolase of *Agkisterodon halys blmhoffii* venom into three enzymatic entities; "Bradykinin releasing", "Clotting" and "Permeability increasing". *J. Biochem. (Tokyo)* **57** 380~

Summary

Sakishima habu venom hydrolyzes Tos-Arg-OMeHCl ($49.41 \text{ TAME} \times 10^{-3} \text{M/mg/min}$), casein ($13.26 \text{ tyrosine } \mu\text{g/mg/min}$), insoluble collagen ($3.26 \text{ hypro. } \mu\text{g/mg/min}$), Tos-Lys-OMeHCl ($1.43 \text{ TLME} \times 10^{-3} \text{M/mg/min}$), and Ac-L-Gly-Lys-OMeOH ($0.38 \text{ AGL} \times 10^{-3} \text{M/mg/min}$).

The TAME hydrolyzing enzyme is stable in a pH region of 2.5 to 11 and at temperature below 50°C (10 min); however it becomes unstable over 70°C . The enzyme activity was maximum at 45°C .

Sephadex G-75 gel filtration of the venom was found to contain two active peaks, and further purification of the main active fraction by Sephadex G-75 and DEAE cellulose column chromatography was demonstrated to have three active peaks.