

琉球大学学術リポジトリ

サキシマハブ毒のプロテアーゼに関する研究(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 知念, 功, 真栄田, 義昭, 保良, 和政, 四方, 治五郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4197

サキシマハブ毒のプロテアーゼに関する研究

知念 功*・真栄田 義昭*
保良和政*・四方 治五郎*

Isao CHINEN, Yoshiaki MAEDA, Kazumasa YASURA, and
Harugoro YOMO: Studies on proteases of *T. elegans*
venom

I 緒 論

琉球列島に棲息する主要な毒蛇ハブ⁶⁾、サキシマハブ⁶⁾等は、毎年人畜に対し、多大な被害を与えてきている。これらの毒蛇に咬まれた場合、咬傷局所に急激な融解、壊死、または、血管壁への損傷を伴う出血等が見られる^{4,5)}。このような局所作用は、蛇毒中の強いタンパク質分解酵素作用等によるものと考えられる。蛇毒中には、プロテアーゼ²⁾、ペプチダーゼ、トロンビン様酵素コラゲナーゼ、アリルアミターゼ⁴⁾、等が存在することから、これらの酵素作用によってこの局所作用はひきおこされているものと思われる。

本研究では、この局所作用を引きおこすタンパク質分解酵素作用を、琉球列島に棲息する主要毒蛇ハブ、およびサキシマハブについて比較研究し、その局所作用機構を解明することにしていく。そのため今回は、サキシマハブ毒のタンパク質分解酵素について研究することにした。これまでにCrotalidae科やElapidae科の毒蛇のプロテアーゼ活性は、Elapidae科より10~50倍も強²⁾いことなどから、毒蛇の科によりこの酵素活性には、差異があるようである。またこの蛇毒プロテアーゼは、これまでに分離精製もいくつかなされており^{2,3)}、マムシ毒では、3種、ハブ毒では3種以上のプロテアーゼが存在すると報告²⁾がなされており、毒蛇の種によってもそのプロテアーゼの数は異なっている²⁾。この酵素は、EDTA やシステインによって失活されやすく、金属イオンを要求しないこと、また至適反応pHが、8.5~10であること²⁾が共通した性質といえる。マムシ毒のプロテアーゼの場合は、分子内に2原子のCa²⁺が存在し、*Crotalus atrox* 毒のプロテアーゼでは、Zn²⁺、Ca²⁺の存在が報告されている。

本研究では、サキシマハブ毒のプロテアーゼについて酵素学的性質を調べると共に、カラムクロマトグラフィーにより、本酵素を分離精製し、その精製酵素については、金属イオンの存在等を調べたので以下にそれらの結果を報告する。

II 実験材料および方法

1 カゼイン消化法によるプロテアーゼ活性測定法⁷⁾

1) 基質の調製

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 旭カーボンKK

カゼイン 1g に、あらかじめ蒸留水 30 ml を加えた後、2 N 苛性ソーダ溶液 1 ml を加え、直火で煮沸し、溶解したのち、室温まで冷却し、2 N 塩酸を加え、pH を 8.5 に調整した。その後、トリス緩衝液 (pH 8.5) で 50 ml に定容した。

2) 酵素反応法

凍結乾燥したサキシマハブ毒粉末をトリス緩衝液 (pH 8.5) に溶かし、1 ml 当り 25 μ g になるように調製した。

3) 酵素反応法

先に調製した基質溶液 1 ml に酵素溶液 1 ml を加え、50 °C で 30 分間反応を行なった後 15% トリクロロ酢酸溶液 1 ml を加えて反応を停止させ 10 分間放置し、ToYo 濾紙 No. 5 c 7 cm を用いて濾過した。その濾液 1 ml に 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 5 ml を加え 10 分間放置し、フェノール試薬 (市販品を 2 倍に希釈) を 0.5 ml 加えよく攪拌し 30 分間室温に放置した後 660 nm の波長で吸光度を分光光度計で測定し、その酵素活性を求めた。

2 カラムクロマトグラフィー¹⁾

1) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー常法¹⁾に従い、よく洗浄した DEAE セルロースをカラム (2.6 × 35 cm) に詰めたのち、そのカラムを 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) を用いて平衡化し、試料一定量をのせ同緩衝液 300 ml で溶出した。次に 0.6 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で直線グラジェント法により溶出した。

2) セファデックスカラムクロマトグラフィー¹⁾

蒸留水でよく洗浄したセファデックスゲルは、煮沸処理を 2~3 回くり返し洗浄を行なったのち、カラム (2.2 × 112 cm) に詰め、さらに蒸留水を流し洗浄を行なった。次に蒸留水で溶出を行なった。なおセファデックス G-75 ゲルを用いた場合は、溶出液として 0.05 M トリス緩衝液 (pH 8.5) を用いた。

なお以上のカラムクロマトグラフィーによって得られた各分画については、280 nm の波長でその吸光度を測定し、タンパク質量を求めるとともに、上述の方法により、そのプロテアーゼ活性を求めた。

3 ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動法¹⁾

カラムクロマトグラフィーによって得られる各分画の純度を調べるため、前報と同様に、7.5% ゲル濃度で pH 9.4 用ゲルを調製し、泳動を行なった。蛇毒プロテアーゼ活性を調べる場合には、7.5% ゲル濃度で、pH 9.4 用ゲルを調製する際、用いる水の代わりに 0.8% カゼイン溶液を同容加えて調製した。泳動は、1 チューブ当り 1~2 mA の電流を 2~3 時間通電した。マーカーとしては、0.005% ブロムチンブルーを用いた。染色は、0.044% Coomassie Brilliant Blue 溶液で行なった。脱色には、7% 酢酸/メタノール溶液を用いた。

4 金属塩含量の定量

蛇毒および精製プロテアーゼ中の金属塩含量は、そのまま蒸留水にとかし、1 ml 当り、1 μ g になるように調製した水溶液について、その含量を原子吸光光度計で測定し、求めた。標準液としては、市販のカルシウム、マンガン、亜鉛、マグネシウム溶液を用い、1 ml 当り 1~10 μ g の溶液を調製し用いた。

III 実験結果

1 酵素濃度の影響

10 μ g から 100 μ g まで、それぞれの濃度のことなる蛇毒酵素液を調製し、その溶液 1 ml に、2%

カゼイン溶液 1ml を加えて、40°C で 30 分間反応を行なった反応液について、本酵素活性を測定し、その活性と酵素濃度との関係を検討した。その結果、Fig 1. に示したように、酵素量 50 μg までは、その酵素活性は、直線関係が得られた。そのため以後、本酵素活性を測定するに際しては、用いる酵素量は、50 μg 以下用いることにした。

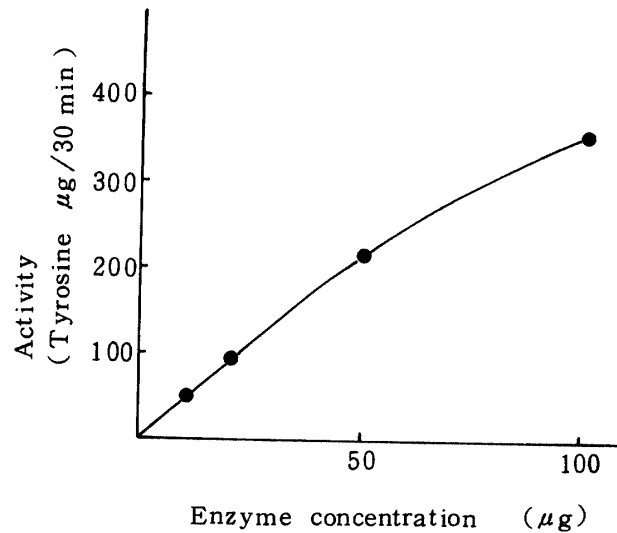


Fig. 1. Effect of enzyme concentration on *T. elegans* venom protease activity

2 反応時間の影響

前項と同様に 2% カゼイン溶液 1ml に、酵素液 1ml 加えたのち、40°C で、10 分間から 120 分間各々反応を行ない、それぞれ本酵素活性を求め、本酵素活性と反応時間との関係を調べた。その結果 Fig

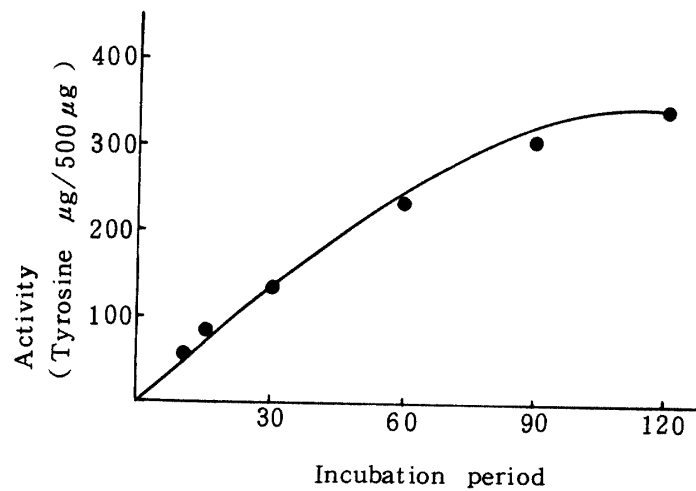


Fig. 2. *T. elegans* venom protease activity as a function of incubation time

2に示すように、本酵素活性は、反応時間60分までは、直線関係が見られた。そのため本研究では、便宜上その反応時間は、30分間行なうことにした。

3 反応温度の影響

前項と同様に、基質溶液1mlと酵素液1mlを添加した反応液を、20から60℃まで各々反応温度を変えて30分間反応を行ない、本酵素活性とその反応温度との関係を調べた。その結果、Fig. 3に示したように、本酵素活性の至適反応温度は、50～55℃であることがわかった。そのため本酵素活性を測定する際の反応温度は、以後50℃で行なった。

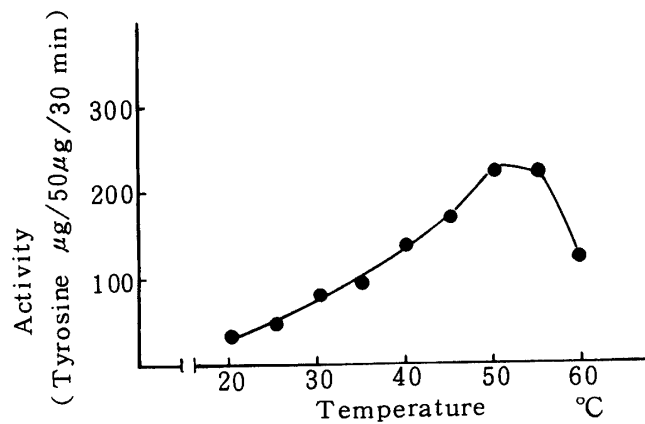


Fig. 3. Relationship of *T. elegans* venom protease activity to reaction temperature

4 反応pHの影響

pH 6.0から11.0まで、種々pHの異なる緩衝液を用いて、それぞれpHの異なる酵素、基質溶液を作成し、50℃で30分間反応を行ない、本酵素活性と反応pHとの関係を調べた。その結果、Fig. 4に示すように、本酵素の至適反応pH 8.0～9.75間に存在することがわかった。

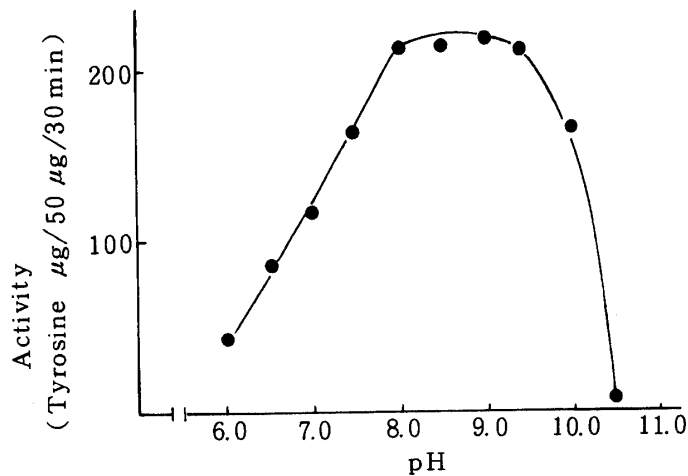


Fig. 4. Effect of pH on proteinase activity of *T. elegans* venom

5 pH 安定性

本研究では、本酵素を種々のセルロースやゲルを用いてカラムクロマトグラフィーを行ない、精製するため、種々pHの異なる緩衝液を用いる必要上、本酵素のpH安定性を調べた。pH 2.5からpH10.5までpHの異なる緩衝液を用いて種々pHの異なる酵素液を調製し、4°Cで18時間放置したのち12,000 rpmで30分間遠心し得られる上清について本酵素活性を測定した。本酵素溶液は、pH 5～10.5間では、18時間放置しても安定であるが、pH 5以下では、その活性は急激に減少し不安定であることがわかった。その結果をFig. 5に示した。

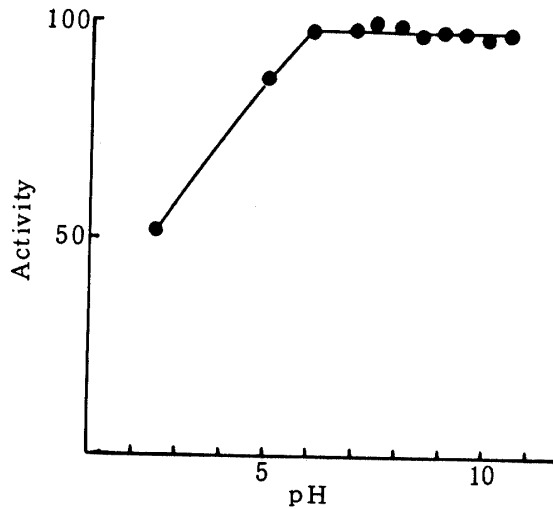


Fig. 5. pH stability of *T. elegans* venom protease activity

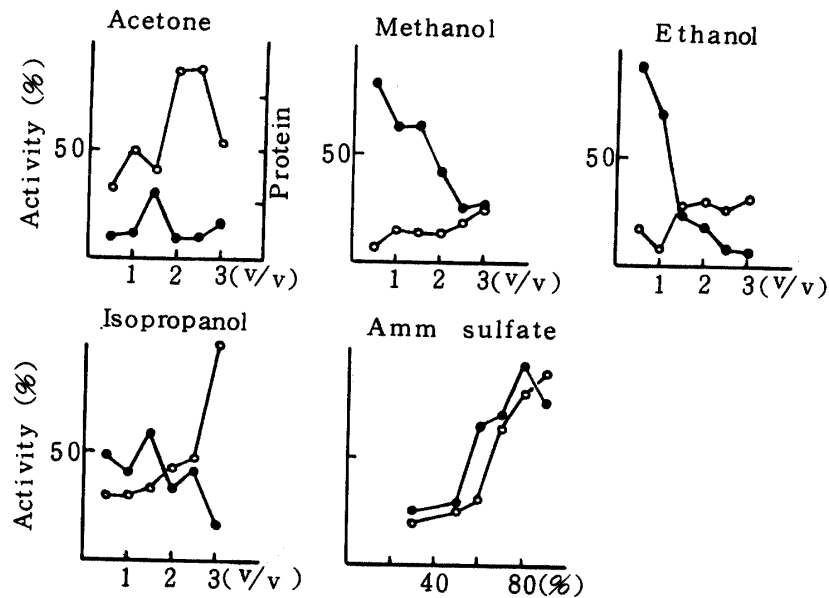


Fig. 6. Effect of organic solvent concentration on *T. elegans* activity
 (●-●) Activity, (○-○) Protein concentration.

6 有機溶媒の影響

一般に、酵素タンパク質を迅速、簡単に精製する場合、有機溶媒等を低温で添加し、その有機溶媒との相互作用で、比較的安定に目的とするタンパク質を沈澱させ、分離することが出来るため、本研究でも、その基礎研究として本酵素の種々の有機溶媒に対する影響を調べることにした。

本酵素は、アセトンやイソプロピルアルコールに対しては不安定であり、50%量添加するとその酵素は、ほとんど失活した。エタノールやメタノールに対しては、添加量が少ない場合は、安定であったが、その添加量が増加すると失活することがわかった。また硫酸アンモニアを用いた場合には、その添加量が増すに従いその酵素活性回収率も増加し、90%以上にもなった。以上の結果はFig.6に示した。

7 硫酸濃度の影響

前項で述べたように、硫酸を加えた場合、本酵素活性回収率は、増大したため本項では、この硫酸沈澱法の場合、用いる緩衝液のpHによってその活性回収率に差異が生ずるとも思われるため、その酵素溶液中のpHを変え、そのpHと硫酸濃度との関係を検討することにした。その結果、pH 7, 8.5, 10.5では、その回収率には有意差は見られなかった。しかしながらpH 7では、その回収率はわずかながらよいのではないかと思われた。以上の結果は、Fig 7に示した。

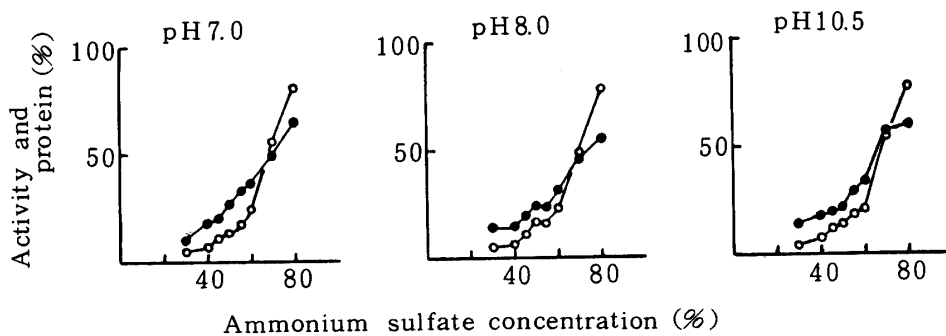


Fig. 7. Precipitation of protease from pH 7.0, pH 8.5, and 10.5 *T. elegans* venom solution by ammonium sulfate (●—●) Activity, (○—○) Protein concentration

8 金属塩の影響

同蛇毒をセファデックスゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、ディスクゲル電気泳動にかけた場合、2個のタンパク質バンドが見られる本酵素分画について金属塩等の影響を調べた結果、本酵素は、 Hg^{2+} や PCMB によって著しく阻害を受け、 Cd^{2+} や EDTA および Cu^{2+} によっても阻害を受けた。また Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} によっては、逆に活性化されることがわかった。(Table 1)

またマムシ毒や *Crataleus atrox* 毒のプロテアーゼでは、 Ca^{2+} や Zn^{2+} の存在が報告されているところから、本酵素も同様に金属プロテアーゼと思われるところから本研究では本酵素溶液に EDTA を 10^{-3} M 濃度まで加え、 $50^{\circ}C$ で 10 分間インキュベートし、本酵素活性を調べた結果、本酵素活性は、EDTA 濃度の増加と共に減少し、特に 10^{-3} M 濃度では、その活性は 8% にまで減少した (Fig 8)。次に金属塩等による本酵素の賦活効果を調べた。本酵素液に EDTA を 6×10^{-3} M 濃度加え、 $50^{\circ}C$ で 10 分間プレインキュベートしたのち、40 時間蒸留水で透析し、添加した EDTA や酵素と共に存在すると思われる金属等を除去したのち、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛等

を加え、本酵素に対する賦活効果を調べた。その結果、いずれの金属塩でも賦活効果が見られた。特に塩化カルシウムを加えた場合は、その効果がよいことがわかった。その結果は、Fig 9に示した。

Table 1. Effect of various metal ions on activity of protease from *T. elegans* venom

Saet	Conc.	Specific activity (Tyr. $\mu\text{g}/50 \mu\text{g}/\text{min}$)	%
None		235.41	100
CuSO ₄	2.5×10^{-4} M	147.63	62.72
FeCl ₂	"	202.35	85.98
ZnCl ₂	"	255.3	108.3
CdCl ₂	"	66.63	28.3
CaCl ₂	"	235.02	99.87
CoCl ₂	"	275.88	117.2
HgCl ₂	"	18.15	7.7
BaCl ₂	"	246.27	104.7
KCl ₂	"	235.05	99.87
EDTA	"	127.2	54.0
MnCl	"	312.24	132.3
ICH ₂ COOH	"	237.6	100.96
Pb/NaCl	"	223.56	95.0
PCMB	14×10^{-4} M	33.12	14.09

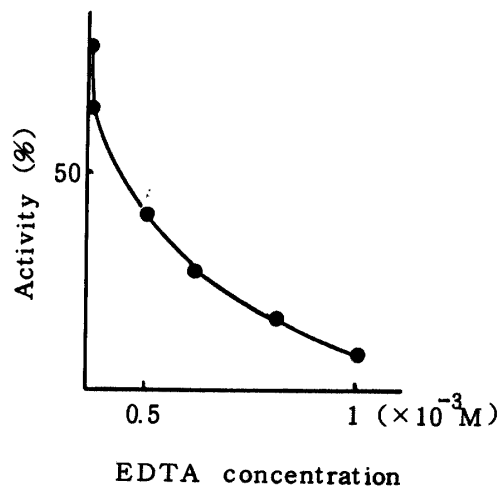


Fig. 8. Effect of EDTA concentration on *T. elegans* venom protease activity

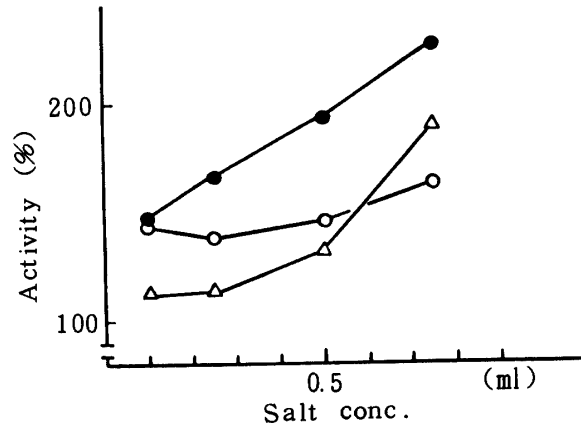


Fig. 9. Activation of enzyme solution desalted by addition of EDTA by divalent metal ion

(●-●) CaCl₂ , (△-△) MgCl₂ , (○-○) ZnCl₂

9 精製

セファデックス G-75ゲルを詰めたカラムを 0.05 M トリス緩衝液 (pH 8.5) で平衡化したのち、粗毒 1 g を同緩衝液に溶かし、それを同カラムにのせ、同緩衝液で溶出した。その結果、主要タンパクピークが 2 個見られたが、本酵素活性は、その後方の主要タンパクピークで主要活性ピークが見られた (F-III) (Fig 10)。次にその主要活性分画を集め、セファデックス G-100 カラムにかけて精製した。本実験では、溶出は水で行なった。その結果、2 つのタンパク質ピークが見られたが本酵素活性は、最初に現われた小さ

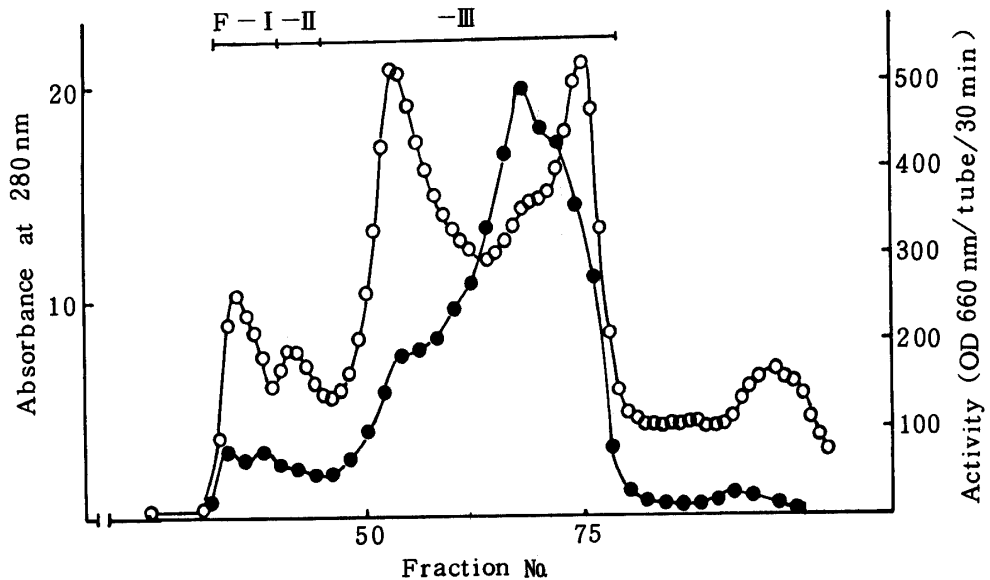


Fig. 10. Chromatogram of *T. elegans* venom on a sephadex G-75 column column size; 3.6 × 132 cm, Sample; 1g, One fraction; 10 ml, Flow rate; 25 ml/hr, Elution buffer; 0.05 M tris buffer (pH 8.5)
(○-○) Protein concentration, (●-●) Protease activity

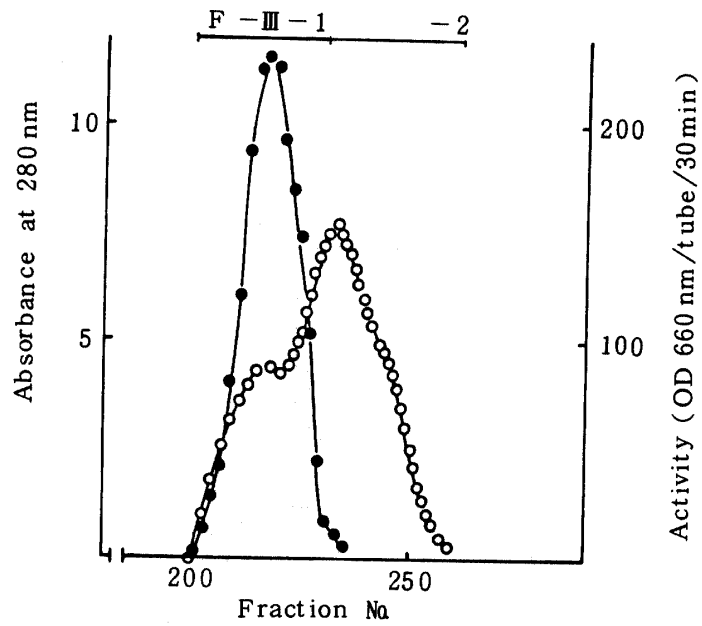


Fig. 11. Sephadex G-100 column chromatogram of fraction (F-III) obtained by sephadex G-75 column chromatography. Column size; 3.8×132 cm. One fraction; 5 ml. Sample; 288 mg. Flow rate; 25 ml/hr. Elution solvent; distilled water, (○-○) Protein concentration, (●-●) Protease activity

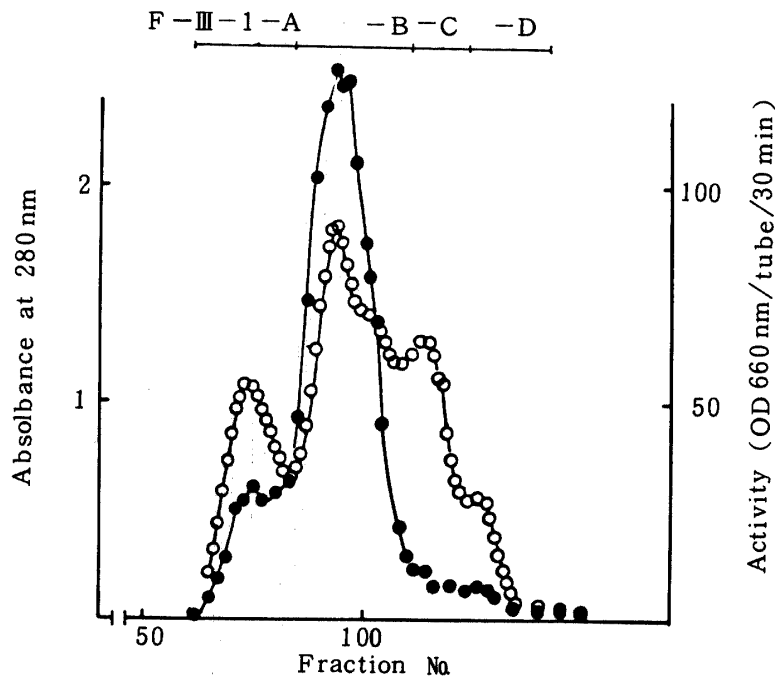


Fig. 12. Chromatogram of F-III-1 on Sephadex G-50 gel column. Column size; 2.2×112 cm. One fraction; 3 ml. Flow rate; 31.2 ml/hr. Load applied was 118.14 mg of protein, Elution solvent; distilled water, (○-○) Protein concentration, (●-●) Protease activity

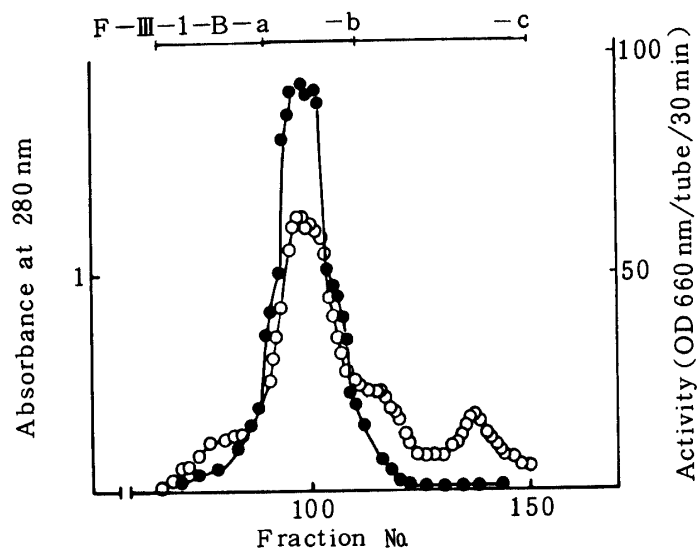


Fig. 13. Sephadex G-50 column chromatogram of fraction F-III-1-B obtained by the sephadex G-50 column chromatography. Column size; 2.2×112 cm, One fraction; 2.5 ml, Sample; 43.5 mg, Elution solvent; distilled water, (○-○) Protein concentration, (●-●) Protease activity

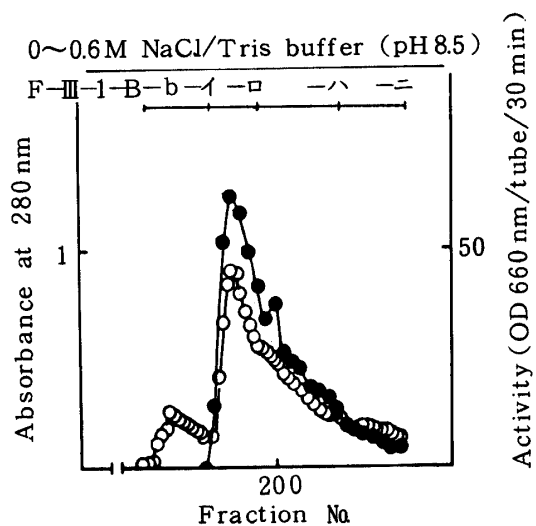


Fig. 14. DEAE cellulose column chromatogram of fraction F-III-1-B-b obtained by the sephadex G-50 column chromatography. Column size; 2.6×35 cm, One fraction; 3 ml, Sample; 20.5 mg, Elution buffer; 0.005 M tris buffer (pH 8.5), (○-○) Protein concentration, (●-●) Protein activity

なタンパク質ピークでのみ見られた (Fig 11)。次にこの活性分画を集めてセファデックス G-50ゲルカラムにかけた。このカラムクロマトグラフィーでも溶出は蒸留水で行なった。その結果、タンパク

質ピークは、5個見られたが本酵素活性は、最初に現われたタンパク質ピークで見られると共に、大部分の活性ピークは第2のタンパク質ピークで見られた (Fig 12)。この大部分の活性を有する分画をさらに精製するために、この分画を集め、さらに同ゲルカラムで再クロマトグラフィーを行なった。その結果、本酵素活性は、主要タンパク質ピーク部分で見られた (Fig 13)。この主要活性分画を次に、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにかけた結果、本酵素活性は、本クロマトグラフィーの吸着部で主要タンパク質ピークとなってあらわれた (Fig 14)。この主要活性ピーク部のタンパク質的純度を調べるためにこの分画を溶出順にディスクゲル電気泳動にかけた結果、本酵素活性の高い分画では、タンパク質は単一であることがわかった (Fig 15)。以上の精製過程を表にまとめた結果、Table 2 が得られた。本酵素は、これらの精製過程を通して最終的に、タンパク質回収率は4.1%になり、活性回収率は、約14%であった。その比活性は、約71 (OD660 nm/ μ g/30 min) であり、その純化率は、3.4倍であった。

Table 2. Summary of purification of protease from *T. elegans* venom

	Protein μ g	%	Activity (OD660nm/tube/30min)	%	Specific activity (OD660nm/ μ g/30min)	Purification
Sephadex G75 Fr.86-95	288,000	100	5,973.75	100	20.7	1
Sephadex G100 Fr.200-230	118,140	41.0	3,800.197	63.6	32.2	1.6
Sephadex G50 Fr.84-109	43,463.8	15.1	2,147.54	36.0	49.4	2.4
Sephadex G50 Fr.90-110	20,455.1	7.1	1,415.03	23.7	69.18	3.3
DEAE Cellulose Fr.185-196	11,678.3	4.1	830.99	13.9	71.16	3.4

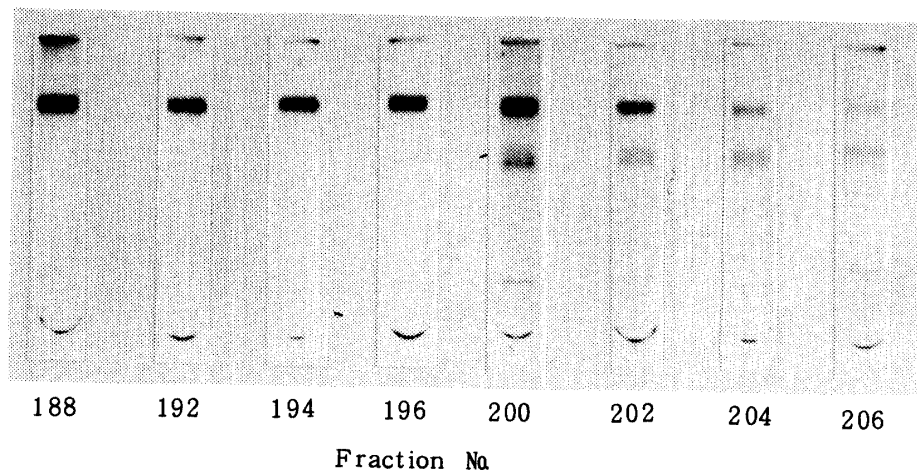


Fig. 15. Analytical acrylamide gel electrophoresis of fractions which obtained by DEAE cellulose column chromatography (Final purification step)

10 本蛇毒プロテアーゼの金属塩含量

マムシ毒²⁾の精製プロテアーゼでは、 Ca^{2+} が存在し、*Crotalus atrox*²⁾毒では、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} の存在が確認されているところから、本研究でも得られた精製酵素について金属含量を原子呼光々度計により定量した。その結果、Table 3に示したように粗毒では、 Na^+ が最も高い値を示し、次に K^+ が高く、

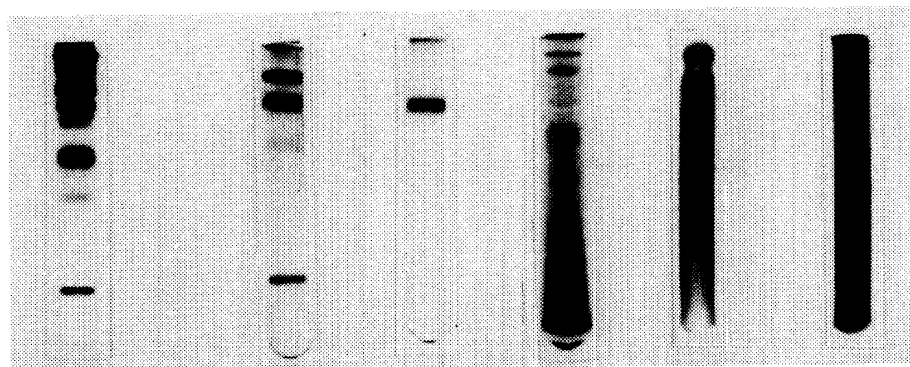
Table 3. Content of inorganic salt in *T. elegans* venom (mg/100 mg)

	Zn	Ca	Mg	Mn	Na	K
Crude venom	0.112	0.0415	0.009	—	0.185	0.56
Partially purifying protease	0.56	0.01	—	—	0.135	0.03
Purifying protease	0.02	0.072			1.599	

Zn^{2+} 、 Ca^{2+} の存在も認められた。ディスクゲル電気泳動にかけた場合、タンパク質バンドが2個見られる部分精製酵素では Zn^{2+} 含量が粗毒よりも高くなっており、その他に Ca^{2+} の存在も認められた。精製酵素では、 Na^+ 、 Ca^{2+} が高くなり、逆に Zn^{2+} は極端に低くなった。

11 ディスクゲル電気泳動法による金属タンパク質の分布

7.5%ゲル濃度のディスクゲルに部分精製酵素をのせ泳動を行なったのち、金属キレート剤であるBT溶液で分離タンパク質中の金属を染色した結果、この酵素では、金属を有すると思われるバンドが2個見られた。その結果は、Fig 16に示した。



Solution for pore gel	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	0.1% Casein	0.1% Casein
Enzyme	Crude venom	P. P. E*	P. E**	Crude venom	P. P. E	None
Dye reagent	C. B. B***	C. B. B	C. B. B	BT****	C. B. B	C. B. B

Fig. 16. Protease activity and metal ion distribution of partially purifying enzyme

* Partially purifying enzyme, ** Purified enzyme, *** Coomassie Brilliant Blue
**** Eriochrome Black

12 プロテアーゼの分布

0.8%カゼインを加えて作成したディスクゲルに粗毒、部分精製酵素および精製した酵素を各々のせ、泳動を行なったのち、50°Cで30分間酵素反応を行ない、染色を行なって、このプロテアーゼの分布を調べた結果、粗毒と部分精製酵素では、この電気泳動により、移動度の低い部分にプロテアーゼ活性が見られたが精製酵素では、このプロテアーゼ活性は見られなかった。これらの結果もFig 16に示した。

IV 考 察

サキシマハブ毒中のプロテアーゼは、エタノール、メタノール、イソプロノール、アセトン等を加えた場合、その濃度が高くなるに従いその活性は減少することから本酵素は、このような有機溶媒に対しては不安定であり、これらの有機溶媒を加えることにより変性し失活するものと思われる。同蛇毒中に存在するエステラーゼやホスホリパーゼの場合は、これらの有機溶媒に対しては、比較的安定であり、ほとんど失活しなかった。

本酵素の賦活効果を調べた結果では、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛溶液でその効果が見られ、特に塩化カルシウムの場合、その濃度が増すにつれてその酵素活性も比例的に著しく増加するところから Ca^{2+} は、本酵素に必要な金属イオンであると思われる。

最終的に本酵素は、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー等により、ほぼ純化されたが、その酵素の純化度は、3.4倍であり、そのタンパク質回収率は4.1%、活性回収率は13.9%といずれの結果も低い値であったが、これは、カラムクロマトグラフィー等の精製過程や透析等の脱塩段階で本酵素の安定化に必要と思われる Ca^{2+} 等が除去され変性しているものと思われる。そのためこの精製過程や透析段階では、溶出溶媒や透析液中に Ca^{2+} イオン等を添加する必要があると思われる。

精製酵素では、 Ca^{2+} や Na^{+} が存在していたが、 Na^{+} イオンの場合は、精製過程で溶出液に食塩を添加しているところから、蒸留水での透析段階で十分に脱塩されていないために増大しているものとも考えられる。 Ca^{2+} の場合は、前述のように本酵素に対し賦活効果を示すところから、この金属イオンは、本酵素の安定化の点で重要な役割をするものと思われる。

この精製酵素の場合は、カゼインを加えて作成したディスクゲルカラムを用いて電気泳動を行なっても、この方法では、プロテアーゼ活性を示さなかった。ところがカゼイン消化活性を示し、ディスクゲル電気泳動により2バンドを示し、また Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} を有する部分精製酵素では、この電気泳動法により、プロテアーゼ活性を示すところから、この部分精製酵素には、カゼイン消化性プロテアーゼとこの電気泳動法により活性を示すプロテアーゼとがあり、カゼイン消化性プロテアーゼは、 Ca^{2+} を有するところから、後者の電気泳動法により活性を示すプロテアーゼは、 Zn^{2+} を有するプロテアーゼであると推定される。つまり本蛇毒中には、 Ca^{2+} を有するプロテアーゼと Zn^{2+} を有するプロテアーゼがあり、少なくとも2種類のプロテアーゼが存在するものと考えられる。

V 要 約

サキシマハブ毒のプロテアーゼ活性は、カゼイン消化法で測定した場合、至適温度は、50°Cであり、至適pHは、8.0~9.5であった。またこの酵素はpH 5~10.5で安定であった。本酵素は、エタノール、メタノール、イソプロパノール、アセトン等の有機溶媒に対しては、不安定であったが、硫酸に対しては、安定であるが、長時間放置すると失活した。また塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛で賦活効果が見られ、特に CaCl_2 では、その効果が大きかった。

本酵素をセファデックス G-75, G-100, G-50, および DEAE セルロースカラムの順にのせて行き精製した結果, 本酵素は, はほぼ単一になり, その純化率は, 3.4 倍になり, タンパク質回収率は, 4.1% であった。またこの精製酵素は, Ca^{2+} を有していた。その他に本蛇毒中には, Zn^{2+} を有するプロテアーゼが存在すると推定された。

謝 辞

本研究を終えるにあたり, 本蛇毒中の金属塩含量を測定して下さった琉球大学農芸化学科渡嘉敷義浩助手に深謝します。

引用文献

1. 知念功, 江川義和, 外間宏一, 四方治五郎 1977 甘蔗幹茎酸性インベルターゼに関する研究, 琉球大学農学部学術報告, 24
2. 船津勝ほか編 1972 タンパク毒素下, p664, 講談社
3. G. D. Dimitrov 1971 Purification and partial characterization of two proteolytic enzymes from the venom of *Vipera Russellii*, *Toxicon*, 9: 33~44
4. 桑島謙夫 1942 蛇毒とその免疫, 医学の進歩, 第1輯; 1~45, 共立出版
5. 逢坂昭 1968 出血因子と溶血因子, 蛋核酵素, 13: 1007
6. 高良鉄夫 1962 琉球列島における陸棲蛇類の研究, 琉球大学農学部学術報告, 9: 1~202
7. 四方治五郎, 神谷和子, 知念功 1977 オニヒトデ幽門垂プロテアーゼの精製に関する研究, 琉球大学農学部学術報告, 24: 231~241

Summary

The proteinase of *T. elegans* venom was most active at pH8.0-9.5 and 50°C with 1% casein solution as substrate, stable between pH5.0 and 10.5 and by addition of ammonium sulfate, but unstable by addition of organic solvents; ethanol, methanol, isopropanol, and acetone.

The enzyme was inactivated by addition of EDTA and reactivated by CaCl_2 and MgCl_2 .

A proteinase was purified from the venom by gel filtration on Sephadex G-75, G-100, and G-50, and DEAE cellulose column chromatography with 4.1% over all yield and a 3.4 fold increase in specific activity. The purified enzyme was found to be homogeneous by disc gel electrophoresis and contain Ca^{++} .

There was the other proteinase in this venom, which contained Zn^{++} .