

琉球大学学術リポジトリ

[原著]ハブ毒の Arginine Ester Hydrolase について

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学保健学部 公開日: 2014-07-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安仁屋, 洋子, 松崎, 吉彦, Aniya, Yoko, Matsusaki, Kichihiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016372

ハブ毒の Arginine Ester Hydrolase について

琉球大学保健学部薬理・中毒学教室
安仁屋洋子 松崎吉彦

緒 言

Arginine ester hydrolase (AE hydrolase) とは N- α -benzoyl-L-arginine ethylester (BA-EE) や p-tosyl-L-arginine methylester (TAME) などの合成 arginine ester 類のみを水解し、いわゆる蛋白質を消化しない酵素であり種々の生理活性を有している。Sato ら (1965) の報告によるとマムシ毒の AE hydrolase は bradykinin 遊離, thrombin 様酵素および毛細血管透過性亢進などの生理活性を示す 3 つの成分に分離出来、Oshima ら (1969) はハブ毒については AE 水解活性はあるが bradykinin 遊離活性はほとんどないと述べている。しかし著者ら (1978) はハブ咬症患者が受傷直後から激痛を訴えること、ハブ毒をラット腹腔内に投与すると痛み特有のストレッチ反応が著明に認められること、またハブ毒により脳脊髄液から kinin が遊離されることを観察している。

本報告はハブ毒中の AE hydrolase の分離を行ない、さらに kinin 遊離活性, thrombin 様酵素活性また毛細血管透過性との関係について検討した成績である。

実験材料および実験方法

ハブ *Trimeresurus flavoviridis* (Hallowell) の毒は沖縄県公害衛生研究所ハブ支所において採毒 (1967年) し、凍結乾燥後室温保存したものをを用い、実験動物にはウィスター系ラット (150-200g) と家兎 (2-3kg) を使用した。Fibrinogen はヒト血液より分離精製したもの、TAME (関東化学), bradykinin (半井化学), Sephadex G-100 (Pharmacia, 40-120 m μ), Amberlite CG-50 (Type II) を使用し、その他の試薬はいづれも市販の特級品を使用した。

カラムクロマトグラフィー: ハブ粗毒 400mg を 4 ml の 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.5, 0.15 M

NaCl 含有) に溶解し、Sephadex G-100 カラム (2.6 \times 63cm) に添加し、5 $^{\circ}$ C にて同緩衝液で溶出した。溶出液は 5 ml ずつ分取後蛋白質量を 280m μ おける吸光度で測定した。得られた各画分を 5 $^{\circ}$ C にて蒸留水に一夜透析後凍結乾燥した標品の AE hydrolase 活性を測定し、高い活性を示した標品についてさらに Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーを行なった。標品 500mg を 0.005 M Borate-HCl buffer (pH 8.3) 4 ml に溶解し、Amberlite CG-50 カラム (1.6 \times 35cm) に添加し、5 $^{\circ}$ C にて溶出した。溶出は補給槽に 0.4 M NaCl 含有の同緩衝液 500ml を、混合槽には緩衝液のみ 500ml を入れ、linear gradient 溶出を行ない、溶出液は 3 ml ずつ分取し 280m μ における吸光度を測定した。

蛋白質量の測定: 紫外線吸収法により 280m μ における吸光度を測定した。あらかじめハブ粗毒溶液を用いて検量線を作製し、これより蛋白質量を算出した。

AE 水解活性の測定: Sato ら (1965) の方法により TAME 0.5ml (5 μ mole) にハブ粗毒あるいはカラムクロマトグラフィーで得られた画分 0.5ml (40-60 μ g を生理食塩液に溶解) を加えて 37 $^{\circ}$ C にて 10 分間インキュベート後、残存する TAME を Roberts (1958) の方法で比色定量した。酵素活性は 1 分間当たり 1 μ mole の TAME を水解する酵素量 (mg 蛋白質量) を 1 unit として表示した。

Kinin 遊離活性: Kininogen としてはヒト血漿を 56 $^{\circ}$ C, 3 時間加熱後、3,000rpm にて 20 分間遠心分離して得られた上清を使用し、kininogenase としてはハブ粗毒あるいはカラムクロマトグラフィーで得られた画分を使用した。Kinin 遊離活性は抽出 20 時間前に estradiol (20 μ g) を投与したラット子宮筋の収縮作用により測定した。ヒト血漿 0.5ml にハブ粗毒あるいはカラムクロマトグラフィーで得られた画分 0.05ml (10 μ g を生理食塩液に溶解) を加え 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベート後、その反応液 0.05

mlを浴槽容積 5mlのMagnus 装置に懸垂した子宮筋に作用させた。この場合、浴槽温度は25°C、栄養液には de Jalon液を用い、この溶液には atropine, chlorpheniramine および tryptamine を 10^{-6} g 濃度になるように加えた。Kinin 遊離活性は産生された kinin による子宮筋の収縮高を合成 bradykinin 量に換算した。

Thrombin 様酵素活性： Satoら (1965) の方法で測定した。1% fibrinogen (0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.4) の 0.5ml に各画分 0.25ml (190 μ g を生理食塩液に溶解) を加え、室温で反応させ fibrin 線維出現の有無を観察した。30分以内に fibrin 線維を生じたものを(+)とした。

血管透過性活性： 家兎(3Kg)の背部を電気バリカンで脱毛後、1% Evans Blue(20mg を生理食塩液に溶解) を耳静脈より投与し、カラムクロマトグラフィーで得られた各画分0.1ml (2.5 μ g を生理食塩

液に溶解) を背皮内注射後、60分後に家兎を殺し、背皮を剥離して色素漏出斑を観察した。血管透過性は色素漏出斑の直径が9mmを超えるものを(+)とした。

その他カラムクロマトグラフィーで得られた各画分について protease 活性, phospholipase 活性をそれぞれ Kunitz (1946) の方法, Harbermann & Neumann (1954) の方法で測定した。

実験成績

カラムクロマトグラフィーで得られた画分のAE 水解活性： Sephadex G-100 でゲル濾過したハブ粗毒は Fig. 1 に示すように3つのピークに分画された。各画分を透析凍結乾燥後 AE 水解活性を測定した結果は同じく Fig. 1 に示すように始めの2つの画分に活性が認められた。

第2画分について Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーを行なったところ、Fig. 2 に示すような9つの画分が得られた。AE 水解活性はFig. 2 に示すとおり、第4、第5および第6画分が強く、それぞれ 21.50, 17.09 および 14.60 units/mg の値を示した。第1および第7画分には弱くそれぞれ 6.78 および 4.45 units/mg の値であり、第2、第3、第8および第9画分にはほとんど認められなかった。

Kinin 遊離活性： ハブ粗毒 1 μ g の kinin 遊離を合成 bradykinin の子宮筋収縮高から換算すると約 10^{-8} g であった。次に Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーで得られた画分のうち、第1、第4、第7および第9画分についてハブ粗毒の場合と同様 1 μ g を用いて kinin 遊離活性を測定すると Fig. 3 に示すように第4および第7画分は bradykinin 量に換算してそれぞれ約 10^{-8} g および 10^{-9} g の値を得た。ハブ粗毒および第4画分においては収縮の開始は遅く、収縮1分後でも持続する収縮曲線が観察されたが、第7画分においては収縮の開始は遅いが最高収縮を示したあと直ちに弛緩が見られた。

Thrombin 様酵素活性： Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーで得られた画分のうち、AE 水解酵素活性の比較的弱い第1画分と第7画分のみ thrombin 様酵素活性が観察されたがとくに第1画分の活性が著明であった。

血管透過性活性： Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーで得られた各画分の血管透過性活性は Photo. 1 に示すようにAE 水解活性の強い第4および第5画分、またAE 水解活性の弱い第1画分に著明な血管透過性の亢進が観察された。

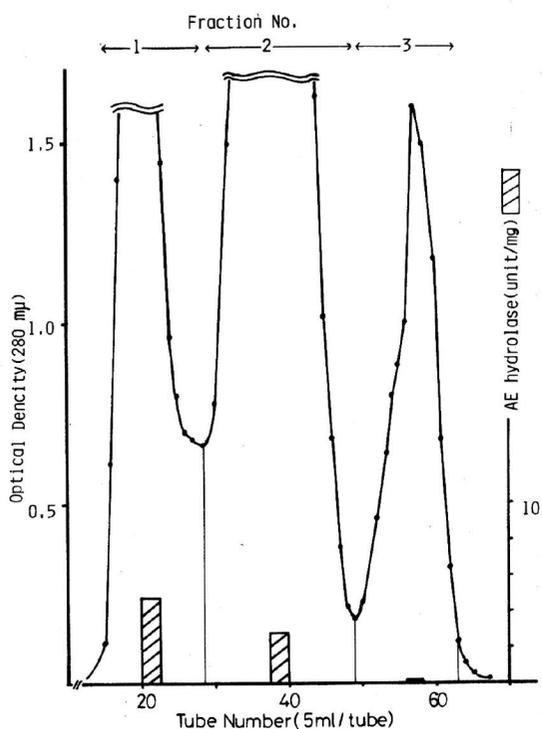


Fig. 1. Gel filtration of Habu venom on Sephadex G-100 column.

The column (2.6×63cm) was equilibrated with 0.005 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 0.15 M NaCl. 400 mg of Habu venom was dissolved in the same buffer and applied on the column.

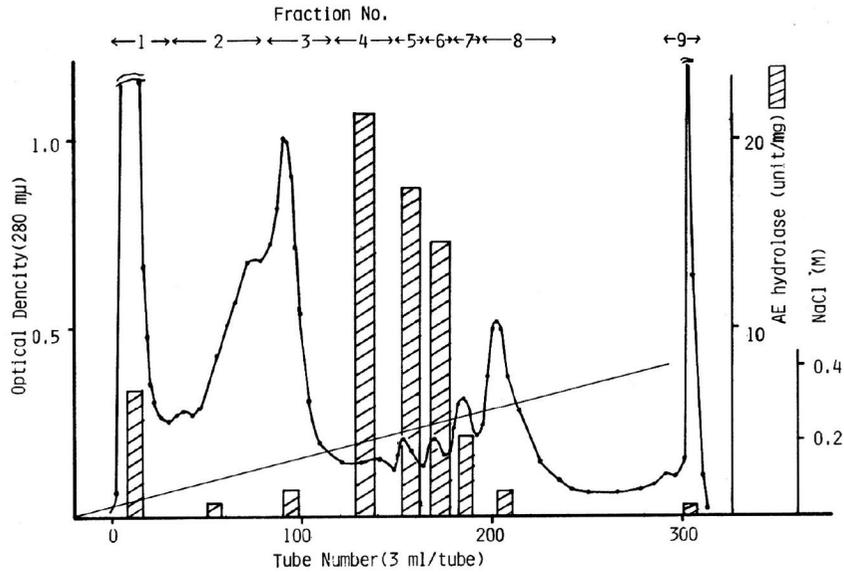


Fig. 2. Amberlite CG-50 column chromatography of the fraction with AE hydrolytic activity.

The column (1.6×35 cm) was equilibrated with 0.005 M Borate-HCl buffer (pH 8.3). 500 mg of the second fraction obtained by Sephadex G-100 column chromatography was dissolved in the same buffer and applied on the column. Linear gradient elution was carried out with 500 ml of the buffer in the mixing vessel and the same volume of the buffer containing 0.4 M NaCl in the reservoir.

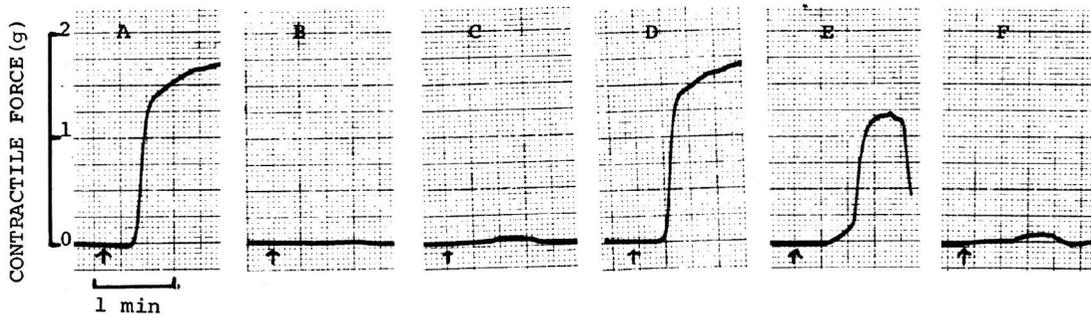


Fig. 3. Kinin assay on the isolated rat uterus.

A : 10 ng of synthetic bradykinin, B : Physiological saline solution, C : 1 μ g of fraction 1, D : 1 μ g of fraction 4, E : 1 μ g of fraction 7, F : 1 μ g of fraction 9.

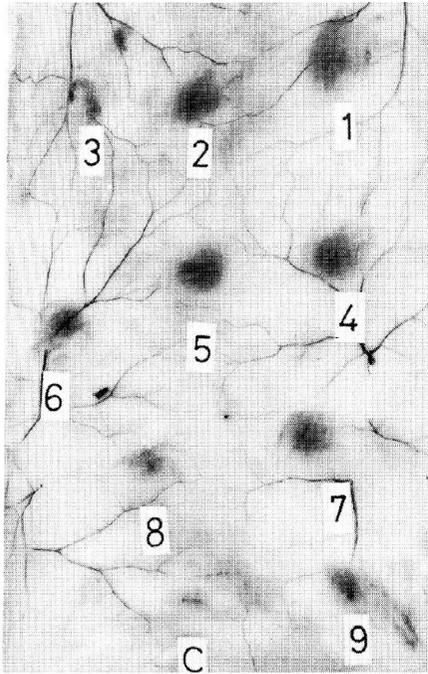


Photo. 1. Effect on vascular permeability. Each number showed the effect on the permeability after the injection of each fraction which was obtained by Amberlite CG-50 column chromatography. C was physiological saline solution.

Phospholipase および proteinase 活性： Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーで得られた各画分について phospholipase と proteinase の活性を測定した結果を Table. 1 に示した。一般的に第 4 画分を境として始めの画分には phospholipase 活性が強く、以後の画分には proteinase 活性が強く認められた。

総括ならびに考察

蛇毒の AE hydrolase の意義については次のような研究経過がある。すなわち、蛇毒の proteinase は血漿グロブリンから bradykinin を遊離するという Rocha e Silva ら (1949) の研究にはじまり、ついで Deutsch & Diniz (1955) は蛇毒の proteinase 活性と bradykinin 遊離とは平行関係になると発表した。のちに Hamberg & Rocha e Silva (1957), また Holtz ら (1960) は *Bothrops jararaca* の毒が有する bradykinin 遊離および血液

凝固活性は合成 arginine ester である BAEE 水解活性と関係があり、毒の proteinase 活性とは無関係であると報告した。

一方 Sato ら (1965) はすでに述べたようにマムシ (*Agkistrodon halys blomhoffii*) 毒の AE hydrolase について研究し、その生理活性によって次の 3 つに分類した。第 1 は血液凝固活性 (thrombin 様酵素活性) をほとんどもたず、しかも bradykinin 遊離活性を示す AE hydrolase であって含有量は少ない。第 2 は fibrinogen から fibrin への転換を行なういわゆる thrombin 様酵素活性を示す AE hydrolase で含有量は多い。第 3 は血管透過性の亢進を示す AE hydrolase で含有量は多い。

ハブ毒の AE hydrolase について Oshima ら (1969) は含有量は多いが bradykinin 遊離活性はほとんどないと報告しており、thrombin 様酵素活性また血管透過性亢進を示す AE hydrolase についての記載はない。したがって著者らはハブ毒から Sephadex G-100 および Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーによる AE hydrolase の分離を試みた。AE 水解活性を示す幾つかの画分が得られたので、これらの画分について kinin 遊離、thrombin 様酵素および血管透過性活性の有無について検討した。得られた成績は一括して Table, 1 に示した。

AE 水解活性の強い画分は第 4、第 5 および第 6 画分であるが、第 4 画分について kinin 遊離作用の有無を検討した結果、比較的大量の kinin が遊離されることを観察した。またこの第 4 画分は血管透過性を亢進させるが血液凝固因子である thrombin 様酵素活性は全くないことが証明された。

一方この第 4 画分にはかなり強い phospholipase と proteinase 活性が認められるので phospholipase 活性は強いが比較的弱い proteinase 活性と AE 水解酵素活性を保有している第 1 画分について検討した。第 4 画分における成績とは異なり thrombin 様酵素活性がきわめて強く kinin 遊離活性は全く認められなかった。しかし血管透過性の亢進が第 4 画分と同程度に認められた。

さらに第 7 画分についても検討した。この画分は第 1 画分とは反対に proteinase 活性は強いが phospholipase 活性は全くなく AE 水解活性は弱いながらも保有している画分である。この画分は第 1 画分、第 4 画分と異なり明らかに thrombin 様酵素活性を示し、かつ kinin 遊離作用をも保有していることが

Table 1. Relationships between AE hydrolase and activities of kinin releasing, vascular permeability and thrombin like action, and also phospholipase and proteinase

Activity \ Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Phospholipase* (min)	43	>45	>45	20	2	2	2	2	20
Proteinase** (O. D. 280m μ)	0.108	0.063	0.143	0.268	0.388	0.273	0.293	0.113	0.012
AE hydrolase (unit/mg)	6.78	0.78	1.48	21.50	17.09	14.60	4.45	1.38	0.61
kinin releasing (ng)	0	?	?	10	?	?	1	?	0
Thrombin like action	+	-	-	-	-	-	±	-	-
Permeability	++	++	±	++	++	+	+	±	±

* by the method of Habermann and Neumann

** by the method of Kunitz

証明され、また血管透過性の亢進も認められた。

以上の成績からハブ毒の Amberlite CG-50カラムクロマトグラフィーで得られたAE 水解活性を示す画分はいずれも特有の生理活性を有したが、これらの活性は画分中に混在している casein を基質とした proteinase 活性また卵黄の熱凝固で測定した phospholipase 活性によるものではなく AE hydrolase によるものと考えられる。また AE 水解活性を示す画分は kinin 遊離, thrombin 様酵素または血管透過性亢進などの生理活性を混在したかたで保有しており, 単一生理活性を有する AE hydrolase としては分離出来なかった。しかしながら第4画分の kinin 遊離活性をもつ AE hydrolase と第1画分の thrombin 様酵素活性をもつ AE hydrolase とに分離出来る可能性がある。

結 論

ハブ毒の AE hydrolase について Sephadex G-100さらに Amberlite CG-50カラムクロマトグラフィーによる分離を試み, それらの生理活性について検討した。ハブ毒の AE hydrolase は比較的含有量が多く, 一般的に血管透過性亢進および thrombin 様酵素活性を有する AE hydrolase と血管透過性亢進と kinin 遊離活性を有する AE hydrolase に分離された。

本研究に際して fibrinogen を御恵与いただきました琉球大学保健学部生化学教室中田福市教授に感謝

いたしますと同時にハブ毒を御恵与いただきました沖縄県公害衛生研究所ハブ支所に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Deutsch, H. F., Diniz, C. R. : Some proteolytic activities of snake venoms. J. Biol. Chem. 216, 17-26, 1955.
- 2) Habermann, E., Neumann, W. : Die Hemmung der Hitzekoagulation von Eigelb durch Bienengift-ein Phospholipase-Effekt. Z. Physiol. Chem. 297, 179-193, 1954.
- 3) Hamberg, U., Rocha e Silva, M. : Release of bradykinin as related to the esterase activity of trypsin and of the venom of *Bothrops jararaca*. Experientia 13, 489-490, 1957.
- 4) Holtz, P., Raudonat, H. W., Contzen, Chr. : Über das bradykininbildende Prinzip des Schlangengift. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 239, 54-67, 1960.
- 5) Kunitz, M. : Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol. 30, 291-310, 1946.
- 6) Matsusaki, K., Aniya, Y. : Behavioral effects of intraspinally injected Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom on rats. Ryukyu Univ. J. Health Sci. Med. 1, 30-34, 1978.

- 7) Oshima, G., Sato-Ohmori, T., Suzuki, T. :
Proteinase, arginineester hydrolase and a
kinin releasing enzyme in snake venoms.
Toxicon. 7, 229-233, 1969.
- 8) Roberts, P.S. : Measurement of the rate of
plasmin action on synthetic substrates. J.
Biol. Chem. 232, 285-291, 1958.
- 9) Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T.,
Rosenfeld, G. : Bradykinin, a hypotensive
and smooth muscle stimulating factor
released from plasma globulin by snake
venoms and by trypsin. Amer. J. Physiol.
156, 261-273, 1949.
- 10) Sato, T., Iwanaga, S., Mizushima, Y.,
Suzuki, T. : Studies on snake venoms XV.
Separation of arginine ester hydrolase of
Agkistrodon halys blomhoffii venom into
three enzymatic entities : "bradykinin
releasing", "clotting" and "permeability
increasing". J. Biochem. 57,380-391,1965.

Abstract

**Arginine Ester Hydrolase of the Venom of Habu,
Trimeresurus flavoviridis (Hallowell)**

Yoko ANIYA and Kichihiko MATSUSAKI

Department of Pharmacology and Toxicology,
College of Health Sciences,
University of the Ryukyus.

Arginine ester (AE) hydrolase of the venom of Habu was observed in relation to its biological action such as kinin releasing, vascular permeability and thrombin like action. AE hydrolase of the venom was purified by Sephadex G-100 and then Amberlite CG-50 column chromatography. Results obtained were as follows: AE hydrolytic activity was observed in two or more fractions which were separated by Amberlite CG-50 column chromatography. AE hydrolases of the venom, although they were not physicochemically homogenous state, were classified into two groups. The first was AE hydrolase which increased vascular permeability and converted fibrinogen to fibrin. The second was AE hydrolase which contained both activities of vascular permeability increasing and kinin releasing.

(Ryukyu Univ. J. Health Sci. Med. 2 (2))