

主論文

五

新 制
薬
102 函

インドコブラ神経毒の構造ならびに
重症筋無力症の病態解明への応用
に関する研究

太 田 光 熙

目 次

序 論	1
第1章 神経毒の分離精製とその構造	3
第1節 コブラ科ヘビ毒からの神経毒タンパク質の精製	3
第2節 インドコブラ (<i>Naja naja</i>) 神経毒タンパク質の構造	7
第3節 台湾コブラ (<i>Naja naja atra</i>) 毒中の神経毒タンパク質の精製	20
第4節 考察ならびに総括	21
実験の部	25
第2章 Toxin Bの高次構造	28
第1節 Toxin BのS-S架橋位置	28
第2節 Toxin Bのラマンスペクトル	32
第3節 考察ならびに総括	34
実験の部	36
第3章 Toxin Bの構造と致死活性との相関性	37
第1節 トリプトファン残基の修飾	38
第2節 チロジン残基の修飾	42
第3節 その他のアミノ酸残基の修飾	44
第4節 ジチオエリスリトールによるS-S架橋の部分還元	49
第5節 考察ならびに総括	51
実験の部	55
第4章 コブラ科ヘビ神経毒を用いた重症筋無力症患者血中の抗アセチルコリン レセプター抗体の検出	59
第1節 重症筋無力症患者血中の抗アセチルコリンレセプター抗体の測定法...	60
第2節 重症筋無力症の臨床像と抗アセチルコリンレセプター抗体価	65
第3節 重症筋無力症と胸腺異常	68
第4節 考察ならびに総括	70
実験の部	74
結 語	76
謝 辞	77
引用文献	78

序 論

地球上の毒ヘビは200種余りであるが、これらの毒ヘビの咬傷による致死作用にはヘビの種類により大きな差異がある。マムシ科やクサリヘビ科に属するヘビ毒の最も著しい毒作用は血液循環障害と出血作用で、咬傷個所に激しい出血や壊死、浮腫などがみられ、また全身的には血圧降下などを起こすことが特徴である。一方、コブラやウミヘビによる咬傷の際にはこうした病変はほとんどみられないが、これらの毒ヘビの毒液は致死活性が強く、クラレ様の神経毒作用を示す神経毒タンパク質を含んでいる。これらの毒液を貯蔵する毒腺は発生学的には顎下腺、あるいは耳下腺の分化したものであり、毒液中には有毒、無毒のものを含め、数十種類のタンパク質、ペプチドが存在する。このほかに少量の糖類や金属が含まれ、 Na^+ や K^+ のほか、とくに Zn^{2+} の含量が高い。¹

致死活性の強い神経毒タンパク質の分離精製は、コブラ科やウミヘビ科に属する毒ヘビの毒液を用いて盛んに行なわれているが、著者は2種のコブラ毒から Sephadex によるゲル濾過法とイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせる方法により、容易にそれらの粗毒中の神経毒を均一なタンパク質として分離精製することに成功した。^{2,3}

著者がそのアミノ酸配列を明らかにしたヘビ神経毒のほか、現在までに種々のヘビ毒から多くの神経毒が分離されており、アミノ酸残基数から2群に大別されている。すなわち、アミノ酸残基数が60-62個からなり、6,700-7,000の分子量を有する一群と、アミノ酸残基数が70-74個からなり、7,800-8,000の分子量を有する一群の神経毒である。²前者はI型神経毒(または Short toxin)、後者はII型神経毒(または long toxin)と呼ばれる。台湾コブラを除き、一般にコブラ科の毒ヘビの毒液中にはI型およびII型神経毒が複数個ずつ含まれている。また、同種のヘビを用いても、ヘビの年齢、性別、毒液採集の時期、回数などの違いによって得られる神経毒の構成成分にかなりの変動がみられる。²

著者は、インドコブラ (*Naja naja*) および台湾コブラ (*Naja naja atra*) 毒中より、急性致死をひき起す数種の神経毒タンパク質を分離精製し、その全アミノ酸配列³ならびにこれらの中の Toxin B については S-S 架橋の位置を決定するとともに、⁴円偏光二色性、ラマンスペクトルを測定し、⁵高次構造についても検討した。また、化学修飾を行ない、致死活性と構造との相関性や免疫学的抗原性との関連を明らかにした。^{6,7}

一方、ヘビ神経毒は運動神経終板のシナプス後膜上に局在するアセチルコリン受容体(AChR)に不可逆的な特異結合性を有し、アセチルコリンによる刺激伝達を阻害する特徴的な生理作用を保持している。著者はこれらの神経毒の選択毒性に注目して、抗AChR抗体の検出法を確立した。⁸この方法を用いて重症筋無力症(Myasthenia Gravis, MG)や、MGと類似したいくつかの自己免疫疾患の血清中の抗AChR抗体を測定した。その結果、抗AChR抗体はMG患者血清中のみに高頻度に検出されることを見い出した。⁹また、同一患者血清中の抗AChR抗体を長期にわたり測定した結果、抗AChR抗体の力価と臨床像との間には一定の相関性が見られたことより、MGの病態にこの抗体が重要な役割をもつことを明らかにした。¹⁰⁻¹⁴

第一章 神経毒の分離精製とその構造

有毒動物の毒液成分の研究は古くから行われているが、いまなおその本体不明のものや、化学的性状、薬理的作用の判明しないものが少なくない。これらのうち、特にコブラ科のヘビ毒はそのクラール様の神経毒の本体がどのようなものであるかに興味をもたれてきた。^{3,15} すでに中井¹⁶はインドコブラ毒より一種の神経毒タンパク質“Toxin A”を分離しその一次構造を決定している。しかし、インドコブラ毒中にはToxin A 以外に数種の神経毒タンパク質が含まれている。著者はこれらの神経毒タンパク質の構造を明らかにするとともに、構造と致死活性との相関性を知る目的で以下の実験を行ない、次の諸点を明らかにした。

(1)インドコブラ毒を分画して得た主要な神経毒タンパク質のうち、Ⅱ型神経毒に属するToxin B,³ Toxin C,¹⁷ Toxin D¹⁸の一次構造を明らかにした。その結果、Toxin A とともにこれらの神経毒タンパク質の一次構造の間には高い相同性がみられた。

(2)インドコブラ毒中には上記Ⅱ型神経毒以外に、Ⅰ型神経毒タンパク質(Toxin I, Toxin II と命名)も含まれていることが明らかとなった。² これらの神経毒タンパク質のN末端近辺の構造は、台湾コブラ毒液中のCobrotoxinと類似性の高いものであった。

(3)台湾コブラ毒液中には数種のⅠ型神経毒タンパク質が含まれていた。しかし、Ⅱ型神経毒タンパク質は存在しないことがわかった。²

第一節 コブラ科ヘビ毒からの神経毒タンパク質の精製

毒ヘビから採集される毒液の凍結乾燥標品中には、アミノ酸酸化酵素、核酸分解酵素、ホスホリパーゼや種々のタンパク質分解酵素など、多くの酵素のほか、クラール様作用を示す神経毒タンパク質(Neurotoxin)、腫瘍細胞や一部の動物の赤血球に対して細胞毒活性を示すタンパク質(Cytotoxin,^{19,20} Direct lytic factor²²)など、多くの生理活性物質が含まれている。

著者は神経毒タンパク質の精製の第一段階として粗毒をSephadex G-50により大まかに分画し、ついで陽イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーによりポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動的に均一なタンパク質標品を得た。

1) Sephadex G-50 を用いるインドコブラ(*Na ja na ja*)粗毒のゲル濾過:

インドコブラ粗毒（凍結乾燥粉末）2gを1%酢酸（10ml）に溶かし、不溶物を遠心（2500×g, 10分）により除去したのち、1%酢酸で平衡化した Sephadex G-50（3.8×190cm）のカラムでゲル濾過を行なった。Fig.1に溶出パターンを示した。

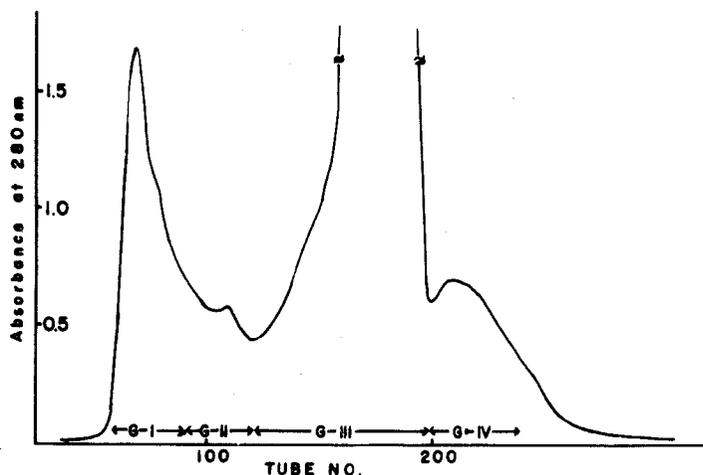


Fig.1. Gel filtration of the crude *Naja naja* venom on Sephadex G-50. A solution of 2g of crude venom was placed on a column (3.8×190 cm) equilibrated with 1% acetic acid and eluted with the same elution medium at a flow rate of 42 ml/hr. Fractions of 10 ml were collected and the eluate was monitored at 280 nm. Fraction designated as G-III was pooled and lyophilized.

分離したそれぞれの画分を凍結乾燥した後、マウスを用いて各画分の致死活性²³を測定した。その結果、分子量がほぼ5,000~10,000に相当するタンパク質が溶出されるG-IIIの画分に致死活性の90%以上が回収された。

2) CM-セルロースによるG-IIIの陽イオン交換クロマトグラフィー：次にG-IIIを0.005M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.8）で平衡化したCM-セルロースカラム（3.4×101 cm）上にのせ、0.005M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.8）と0.5M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）を用いてgradient elution法によりクロマトグラフィーを行なった。Fig.2にその溶出パターンの1例を示したが、原毒の製造番号により、溶出される各画分に多少の量的相違が認められた。このクロマトグラフィーでToxin A 近辺に溶出される致死活性の強い神経毒タンパク質をそれぞれ、Toxin B, C, D と命名した。また、これらの神経毒タンパク質のほか、さらに高い塩濃度で溶出され、そのアミノ酸組成がCobrotoxin²⁴に類似した2種の神経毒タンパク質も分離された。これらをToxin I, IIと命名した。²

CHROMATOGRAPHY OF G-III ON A CM-CELLULOSE COLUMN

Conditions: Column size: 3.4 x 101 cm
 Fraction volume: 10 ml
 Buffer: 0.005 M AcO₂Na, pH 5.8
 0.5 M AcO₂Na, pH 6.5

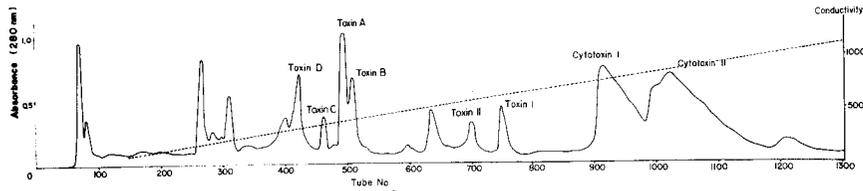


Fig.2. Chromatography of G-III in Fig.1 on CM-cellulose. A solution of 3.1 g of the lyophilized fraction G-III was applied to a column (3.4 x 101 cm) of CM-cellulose equilibrated with 0.005 M sodium acetate buffer, pH 5.8. Elution was conducted with a linear gradient of increasing salt concentration (---) and pH from 0.005 M sodium acetate, pH 5.8 to 0.5 M sodium acetate, pH 6.5. Fractions of 10 ml were collected at a flow rate of 150 ml/hr and the eluate was monitored at 280 nm.

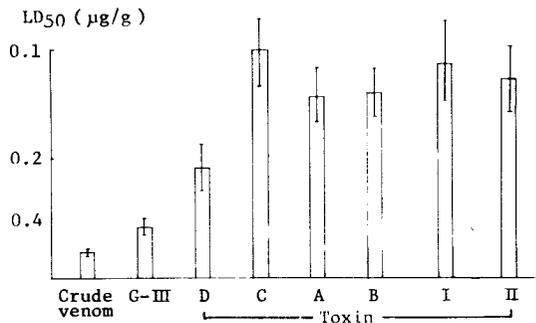


Fig.3. Comparison of lethal toxicity range of each fraction obtained by CM-cellulose chromatography. The toxicity of each fraction was shown by the rectangular histogram. LD₅₀ doses were determined by subcutaneous injection of a progressively diluted solution into white mice weighing 16 to 18 g, using five animals at each dose level.

Toxin A, BはCM-セルロースクロマトグラフィーで非常に接近した位置に溶出されるため、再クロマトグラフィーを行ない、ディスクゲル電気泳動的に均一にまで精製した。これらの神経毒の粗毒からの収率は、Toxin A, 7%; Toxin B, 6%; Toxin C, 1%; Toxin D, 2%; Toxin I, 1%; Toxin II, 0.5%であった。また、これらの神経毒タンパク質の致死活性をFig.3に示した。図中、縦軸はマウスの単位体重(♂)当りのLD₅₀(μg)の値である。Toxin A, B, C, I, IIはほぼ同程度の致死活性を示し、皮下注射によるLD₅₀はマウスの♂体重当り0.10~0.13μgで

あった。Toxin Dは上記神経毒と比較して致死活性は低く、そのLD₅₀は0.21 μ gであった。

3)台湾コブラ (*Naja naja atra*) 神経毒タンパク質の精製: 台湾コブラ粗毒からの神経毒タンパク質の精製は、インドコブラ神経毒タンパク質の精製法に準じて、Sephadex G-50 (3.8 \times 190cm) およびCM-セルロースを用いて行なった。

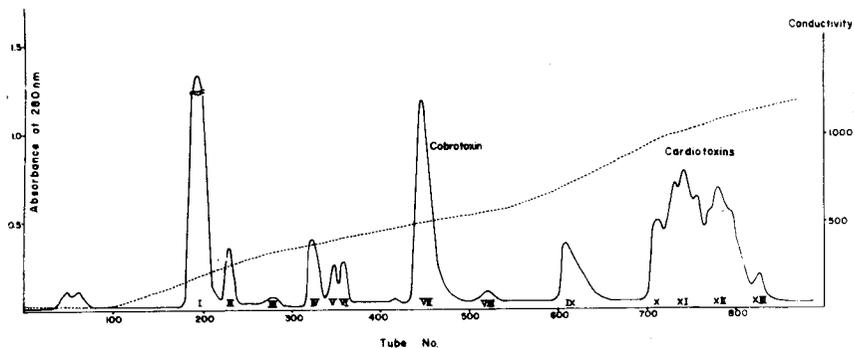


Fig.4. Chromatography of G-III of *Naja naja atra* venom on CM-cellulose. A solution of 3g of the lyophilized fraction G-III was applied to a column (2.8 \times 140 cm) of CM-cellulose equilibrated with 0.005 M sodium acetate buffer, pH 5.8. Elution was conducted with a linear gradient of increasing salt concentration (---) and pH from 0.005 M sodium acetate, pH 5.8 to 0.5 M sodium acetate, pH 6.5. Fractions of 15 ml were collected at a flow rate of 140 ml/hr and the eluate was monitored at 280 nm.

CM-セルロースカラムクロマトグラフィ-の溶出パターンをFig. 4 に示した。各画分を溶出順にCM-IからCM-VIIIと命名した。CM-IX以降の画分はすでに報告されている心臓毒作用を示すCardiotoxin²¹である。CM-I以外の画分はディスク電気泳動により均一なタンパク質であることがわかった。これらの致死活性をFig. 5 に示した。各画分の収率は第3節Table 8 に示したが、主要な神経毒タンパク質はCM-VIII (Cobrotoxin)で、すでに一次構造はYang²⁴らにより決定されている。Fig. 5 より、台湾コブラ毒中には、Cobrotoxin以外にこれに匹敵する強い致死活性をもつ2種の画分 (CM-II, VI) や、アミノ酸組成 (後述) はCobrotoxinに類似していたが、致死活性の弱い4種の画分 (CM-III, IV, V, VIII) が存在することが明らかとなった。またこれらの画分はCM-IIIを除き、I型神経毒タンパク質の特徴の1つであるアラニン、メチオニンやフェニルアラニン残基を欠いており、I型神経毒タンパク質と考えられた。

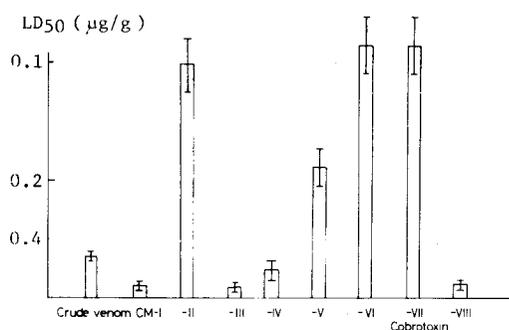


Fig.5. Comparison of lethal toxicity range of each fraction obtained by CM-cellulose chromatography. The toxicity was shown by the rectangular histogram. LD50 doses were determined by subcutaneous injection of a progressively diluted solution into white mice weighing 16 to 18 g, using five animals at each dose level.

第2節 インドコブラ (*Naja naja*) 神経毒タンパク質の構造

前節で述べた方法により精製された神経毒タンパク質のアミノ酸配列を決定するため、まず Toxin A, B, C, D および Toxin I, II のアミノ酸組成を調べた (Table 1)。

Table 1. Amino acid composition of *Naja naja* neurotoxins

Amino acid	Toxin A	Toxin B	Toxin C	Toxin D	Toxin I	Toxin II	Cobrotoxin
Aspartic acid	8.89 (9)	8.61	9.20	9.01	8.01	7.33	7.89 (8)
Threonine	8.18 (9)	8.30	8.74	7.78	5.72	5.64	7.79 (8)
Serine	2.80 (3)	3.60	3.05	2.53	3.78	4.01	3.84 (4)
Glutamic acid	1.30 (1)	1.13	1.30	2.16	6.59	5.80	7.43 (7)
Proline	6.06 (6)	5.38	5.78	6.00	4.92	3.88	2.28 (2)
Glycine	4.85 (5)	4.60	4.25	4.90	6.71	5.90	6.59 (7)
Alanine	2.10 (2)	1.85	2.90	2.20	—	—	— (0)
Half-cystine	9.13 (10)	8.40	8.24	9.60	7.18	6.54	7.08 (8)
Valine	3.37 (4)	3.40	3.75	3.50	3.11	2.12	1.09 (1)
Methionine	— (0)	—	—	—	—	—	— (0)
Isoleucine	4.31 (5)	3.60	4.30	4.46	1.79	1.78	2.01 (2)
Leucine	<u>1.00</u> (1)	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	3.11	2.20	<u>1.00</u> (1)
Tyrosine	1.12 (1)	1.01	1.36	1.35	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	2.06 (2)
Phenylalanine	2.84 (3)	2.96	2.70	2.96	—	—	— (0)
Tryptophan	1.03 (1)	1.01	1.10	1.05	N.D.	N.D.	N.D. (1)
Lysine	3.53 (4)	3.64	4.36	3.84	5.84	4.56	2.69 (3)
Histidine	0.80 (1)	0.82	0.79	0.88	1.71	2.36	1.58 (2)
Arginine	5.70 (6)	5.60	4.62	5.00	4.05	3.45	6.08 (6)

The value of amino acid underlined was taken as 1.00.

Tryptophan was determined by spectroscopy in alkaline solution.

The numbers in parentheses represent the nearest integers.

N.D. ; not determined

Toxin A, B, C, D のアミノ酸組成は表のごとく相互に酷似し, I型神経毒には含まれていないアラニンやフェニルアラニン残基を含むことやアミノ酸残基数などからすべてII型神経毒タンパク質と考えられた。著者はこれらの中, すでに中井ら¹⁶によりその一次構造が明らかにされているToxin A以外のToxin B, C, Dの全アミノ酸配列を決定した。また, Toxin I, IIに関してはN末端近傍のアミノ酸配列を決定した。

1. Toxin Bのアミノ酸配列: Table 1よりToxin BはToxin Aと比較してセリンとイソロイシンの残基数に差が見られ, これらのアミノ酸残基の置換が予想された。そこで, Toxin A, Bのフィンガープリントを作り, 比較検討することを考えた。まず, Toxin A, Bをそれぞれ還元し, 生じるシステイン残基のSH基をカルボキシメチル(RCM)化²⁵したのち, トリプシンで消化し, 消化物をpH 3.6の溶媒系²⁶で高圧濾紙電気泳動(40 v/cm, 2時間)を行なった。次にこれと直角方向に溶媒Ⅲ(実験の部参照)を用いた下降法ペーパークロマトグラフィーを行ない, 両者のフィンガープリント²⁷を作製し, 各々のトリプシン消化ペプチドを比較した。その結果, Ehrlich反応陽性を示すペプチドのスポットにのみ相違が認められた。また, これらのペプチドはRCM化しないToxin A, Bのトリプシン消化によっても生成することがわかった。このことを利用して, Toxin A, Bのトリプシン消化物を1%酢酸で平衡化したSephadex G-25(1.1×146cm)によりゲル濾過して得たペプチドをアミノ酸分析した結果, Toxin Aからのペプチドとはセリンとイソロイシンの値にのみ相違がみられた1種のペプチド以外はすべて同じペプチドが分離された。

(i) Toxin BのN末端およびC末端配列

Toxin BのN末端付近のアミノ酸配列は, RCM化(実験の部参照)して得たRCM·Toxin B(20mg)を用いてエドマン分解直接法²⁹により, N末端より33位までのアミノ酸配列を下記の如く決定した。H·Ile-Arg-Cys-Phe-Ile-Thr-Pro-Asp-Ile-Thr-Ser-Lys-Asp-Cys-Pro-Asn-Gly-His-Val-Cys-Tyr-Thr-Lys-Thr-Trp-Cys-Asp-Gly-Phe-Cys-Ser-Ser-Arg-……。一方, C末端付近のアミノ酸残基は, 市販のカルボキシペプチダーゼAおよびBを用いる方法により検討した。しかし, アミノ酸の遊離は認められず, Toxin BのC末端アミノ酸残基はプロリン残基か, 遊離のカルボキシル基をもたないことなどが予想された。そこで, プロリン残基をC末端にもつペプチドに作用してC

末端残基を遊離させる *Penicillium janthinellum* の培養液より分離される酸性カルボキシペプチダーゼ³⁰を用い、Toxin B の C 末端アミノ酸配列を検討した。経時的に遊離されるアミノ酸を調べたところ、Toxin B の C 末端より 4 残基の遊離がみられ、その配列は $-\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{OH}$ と決定できた。さらに、ヒドラジン分解法³¹によっても C 末端アミノ酸残基としてプロリンを確認した。

(ii) RCM · Toxin B のキモトリプシン消化

Toxin B の N 末端より 33 位以降のアミノ酸配列を決定するため、RCM-Toxin B のキモトリプシンおよびトリプシン消化によって得られるペプチドを分離したのち、それぞれのペプチドの構造を検討した。RCM · Toxin B (8mg) をキモトリプシン (基質 : 酵素 50 : 1, w/w) により 3 時間消化した後、消化液を塩酸酸性にして反応を停止し、0.2% 酢酸で平衡化した Sephadex G-15 (1.8 × 184cm) のカラムでゲル濾過し、溶出液を波長 226nm, および 280nm でモニターした。溶出パターンを Fig. 6 に示した。溶出順に各画分を C-I ~ C-V と命名した。

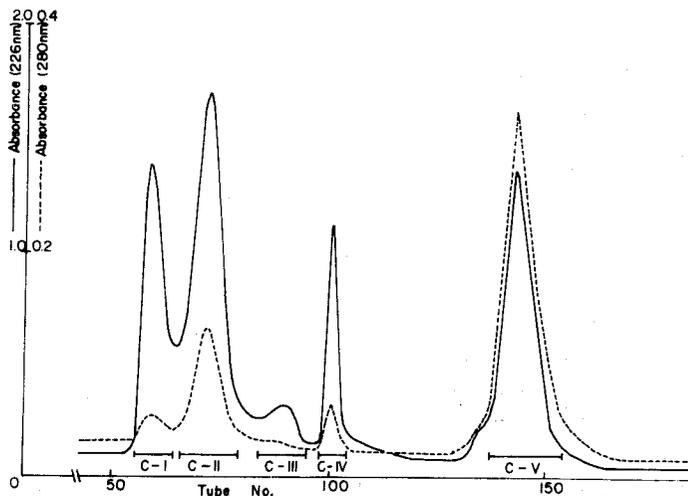


Fig. 6. Gel filtration of the chymotryptic digest of reduced and S-carboxymethylated toxin B on a Sephadex G-15 (1.8 × 180 cm) column in 0.2% acetic acid solution. Fractions of 2.7 ml were collected at a flow rate of 15 ml/hr and the eluate was monitored at 226 nm (—) and 280 nm (---).

図中、C-IVを除くC-IよりC-Vまでの4つの画分は、pH 3.6の溶媒系を用いた高圧濾紙電気泳動 (50V/cm, 2時間) により、すべて均一なペプチドである。

ことを確認した。C-IVは2種のペプチドの混合物であったことから、上記の条件で高圧濾紙電気泳動を行ない、ペプチドC-IV-1, C-IV-2を得た。得られた6種のキモ

トリプシンペ
プチドのアミ
ノ酸組成およ
び収率を
Table 2に示
した。カッコ
内の数値は分
析値に最も近
い整数を示し、
トリプトファ
ン残基は分光

Table 2. Amino acid compositions of chymotryptic peptides derived from RCM-toxin B

Amino acid	C-I	C-II	C-III	C-IV-1	C-IV-2	C-V
CM-Cysteine	5.90 (6)	2.06 (2)		1.02 (1)	1.02 (1)	
Aspartic acid	4.90 (5)	2.90 (3)			1.08 (1)	
Threonine	4.92 (5)	2.01 (2)				1.93 (2)
Serine	2.54 (3)	1.00 (1)				
Glutamic acid	1.12 (1)					
Proline	2.80 (3)	1.85 (2)	1.14 (1)			
Glycine	2.68 (3)	1.00 (1)			0.90 (1)	
Alanine	1.96 (2)					
Valine	2.66 (3)	1.07 (1)				
Isoleucine	1.13 (1)	1.64 (2)		0.94 (1)		
Leucine	0.96 (1)					
Tyrosine		0.77 (1)				
Phenylalanine	1.00 (1)			1.00 (1)	1.00 (1)	
Lysine	0.85 (1)	0.90 (1)	1.00 (1)			1.00 (1)
Histidine		0.74 (1)				
Arginine	2.69 (3)		2.04 (2)	0.99 (1)		
Tryptophan						+ (1)
Yield (%)	69	67	75	88	89	85
Position	30-67	5-21	68-71	1-4	26-29	22-25

The values of the amino acids underlined were taken as 1.0. The numbers in parentheses represent the nearest integers. Tryptophan was determined spectrophotometrically.

学的方法あるいはエールリッヒ反応によりその有無を判定した。

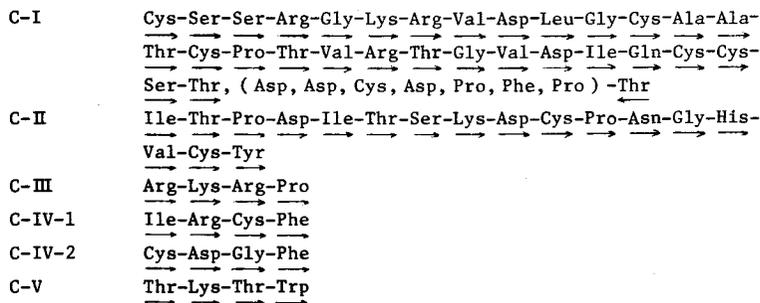


Fig.7. Amino acid sequences of chymotryptic peptides from RCM-toxin B. Right- and left-handed arrows showed that the sequence was elucidated, respectively, by Edman degradation or by the hydrazinolysis.

ペプチドC-Iを除く5種のペプチドのアミノ酸配列はN末端より順次エドマン分解直接法を行ない、それぞれFig. 7に示す配列であることを明らかにした。

Table 3. Amino acid composition of tryptic peptides derived from C-I

Amino acid	C-I-T-1	C-I-T-2	C-I-T-3	C-I-T-4
CM-Cysteine	1.01 (1)		2.15 (2)	3.04 (3)
Aspartic acid			1.31 (1)	4.41 (4)
Threonine			2.00 (2)	3.22 (3)
Serine	1.80 (2)			1.10 (1)
Glutamic acid				1.32 (1)
Proline			0.95 (1)	2.22 (2)
Glycine		0.96 (1)	1.00 (1)	1.30 (1)
Alanine			1.54 (2)	
Valine			1.90 (2)	<u>1.00</u> (1)
Isoleucine				<u>0.90</u> (1)
Leucine			0.75 (1)	
Tyrosine				
Phenylalanine				0.80 (1)
Lysine		<u>1.00</u> (1)		
Histidine				
Arginine	<u>1.00</u> (1)	1.03 (1)	<u>1.00</u> (1)	
Yield (%)	25	47	18	30
Position	30-33	34-36	37-49	50-67

The value of the amino acid underlined was taken as 1.0.
The numbers in parentheses represent the nearest integers.

C-I のC末端残基はヒドラジン分解法によりトレオニンであることを決定した。表中右向き矢印はエドマン分解直接法により、左向き矢印はヒドラジン分解法により決定されたアミノ酸残基を示した。C-I はC末端側7残基のアミノ酸配列が決定できなかったため、C-I をトリプシンで消化し、消化物を pH3.6の高圧濾紙電気泳動(40^v/cm, 2時間), および溶媒II(実験の部参照)を用いた下降法ペーパークロマトグラフィーにより精製した。得られた4種のトリプシンペプチドをC-I-T-1~C-I-T-4と命名し、これらのアミノ酸組成をTable 3に示した。各ペプチドについて上述の方法によりアミノ酸配列を検討した結果をFig. 8に示した。C-I-T-1, C-I-T-2, C-I-T-3のペプチドの構造は、トリプシン消化のC-Iを用いるエドマン分解法によりすでにその構造が決定された部分ペプチドであった。C-I-T-4はアミノ酸配列未決定の7残基を含むペプチドであったが、Fig. 8に示したようにC-I-T-4のアミノ酸配列はC末端より2残基以外はエドマン分解法により決定できた。また、未決定の2残基の中、C-IのC末端がすでにトレオニンであることが決まっていたため、C端から2番目のアミノ酸基はプロリンと決定できた。

C-I-T-1	<u>Cys-Ser-Ser-Arg</u>
C-I-T-2	<u>Gly-Lys-Arg</u>
C-I-T-3	<u>Val-Asp-Leu-Gly-Cys-Ala</u> -(Ala-Thr-Cys-Pro-Thr-Val-Arg)
C-I-T-4	<u>Thr-Gly-Val-Asp-Ile-Gln-Cys-Cys-Ser-Thr-Asp-Asp-Cys-</u> <u>Asp-Pro-Phe</u> , (Pro, Thr)

Fig. 8. Amino acid sequences of tryptic peptides from C-I. Right-handed arrows showed that the sequence was elucidated by Edman degradation. The sequences in parentheses were determined from the amino acid composition of the peptides and from data of the sequence analysis of RCM-toxin B and chymotryptic peptide C-I.

(iii) Toxin B のアミノ酸配列

Toxin B の N 末端より 33 位までのアミノ酸配列の結果や、キモトリプシンペプチド、およびトリプシンペプチドのアミノ酸配列などの結果から、Toxin B の全アミノ酸配列は Fig. 9 により矛盾なく説明できた。図中、C、T の記号を付した個所は、キモトリプシン、トリプシンにより加水分解された部位を表わしている。以上の結果、Toxin B は N 末端にイソロイシン、C 末端にプロリン残基をもつ 71 個のアミノ酸残基で構成され、分子量 7812、分子中に 5 組の S-S 架橋をもつ II 型神経毒タンパク質であることが明らかとなった。また、その等電点は電気泳動法により $pI = 9.5$ 、分子吸光係数は $E = 8200$ と決定された。

2. Toxin C のアミノ酸配列： Toxin A, B とほぼ同程度の致死活性を示す

Toxin C の粗毒中の含量は、粗毒の製造番号により変動がみられた (Fig. 2)。収率は粗毒から 1% と低く、このため全アミノ酸配列は、Toxin B の場合に得られた結果を参照して決定した。Toxin C のアミノ酸組成は Table 1 に示した通り、Toxin A, B と同型の神経毒タンパク質であり、分析値から Toxin A と比較して、アラニン、グリシン、リジン、アルギニンのアミノ酸残基数が異なっていた。

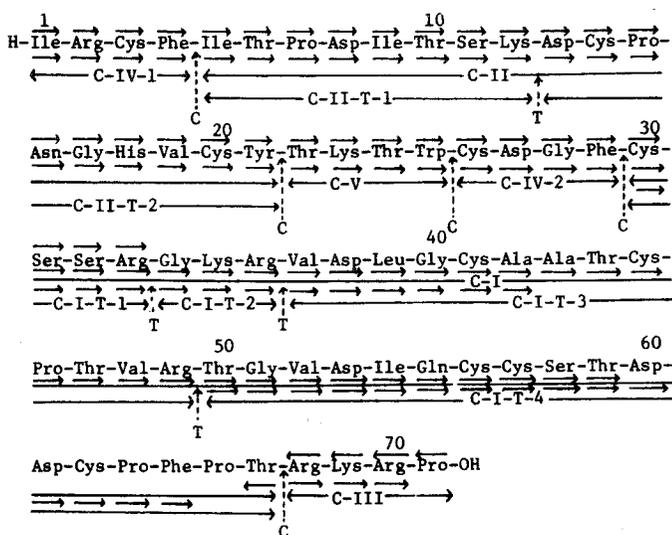


Fig.9. Amino acid sequence of Toxin B from Indian cobra venom (*Naja naja*). Horizontal arrows below amino acid residues denote the sequences of chymotryptic and tryptic peptides. Right- and left-handed arrows show that the sequence was elucidated, respectively, by Edman degradation, by the action of acid carboxypeptidase or by the hydrazinolysis. C and T represent the peptide bonds which were hydrolyzed by the action of chymotrypsin or trypsin, respectively.

(i) Toxin C の N 末端および C 末端配列

RCM-Toxin C (16 mg) を用い、N 末端近傍のアミノ酸配列はエドマン分解直接法により、1 位から 32 位までを次の如く決定した。H·Ile-Arg-Cys-Phe-Ile-Thr-Pro-Asp-Ile-Thr-Ser-Lys-Asp-Cys-Pro-Asn-Gly-His-Val-Cys-Tyr-Thr-Lys-Thr-Trp-Cys-Asp-Ala-Phe-Cys-Ser-Ile……。一方、C 末端残基はヒドラジン分解法によりプロリン残基であることを明らかにした。

(ii) RCM·Toxin C のトリプシンおよびキモトリプシン消化

RCM·Toxin C (16 mg) および RCM-Toxin B (16 mg) をそれぞれトリプシンにより酵素消化した。生成したペプチドは pH 3.6 の高圧濾紙電気泳動 (35v/cm, 2.5 時間), ならびに溶媒 I, II を用いた下降法ペーパークロマトグラフィーにより均一なペプチドとして分離した。

Table 4. Amino acid compositions of tryptic peptides derived from RCM-toxin C and RCM-Toxin B

Amino acid	Tryptic peptide name															
	T-1		T-2		T-3		T-4		T-5		T-6		T-7		T-8	
	C*	B**	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B
CM-Cys			1.00	0.97	2.01	1.57	1.60	2.00			2.15	1.91	3.04	2.90		
Asp			1.25	1.12	2.00	2.08	0.93	0.92			1.31	1.02	4.41	4.14		
Thr			1.78	2.10	1.21	0.73	1.05	1.14			2.00	1.85	3.22	2.80		
Ser			1.21	1.00			1.28	1.87					1.10	1.19		
Glu													1.32	1.15		
Pro			1.10	1.18	1.05	0.77					0.95	1.17	2.22	2.19	1.00	0.96
Gly			1.00	1.00	1.00	1.00		1.11	0.96	0.90	1.00	1.31	1.31	1.39		
Ala							0.97				1.52	2.08				
Val					0.83	0.86					1.90	1.68	1.01	1.24		
Ile	0.99	0.82	1.62	1.71			0.94				0.75	0.88	0.90	1.05		
Leu																
Tyr					0.60	0.62										
Phe			0.89	0.90			0.93	0.95					0.80	0.90		
Trp							+	+								
Lys			1.00	1.00	1.00	1.00			1.00	1.00	1.00				1.00	1.00
His					0.60	0.89										
Arg	1.00	1.00					1.00	1.00	1.03	1.10		1.00	1.00	1.00	1.06	1.10
Yield	51%	48%	20%	32%	15%	28%	18%	20%	47%	35%	18%	19%	10%	18%	56%	56%

The value of amino acid underlined was taken as 1.00.

Tryptophan was determined spectrophotometrically.

* Tryptic peptide from RCM-toxin C

** Tryptic peptide from RCM-toxin B

トリプシン消化ペプチドにはTを付して表示し、それらのペプチドのアミノ酸組成をTable 4に示した。表中のCにはRCM-Toxin Cからの、BはRCM-Toxin Bからのトリプシンペプチドの分析値を示した。両者を比較した結果、RCM-Toxin BからのペプチドとはT-4およびT-6の組成に相違がみられ、T-4ではセリン、イソロイシン、グリシン、アラニンが、T-6ではリジンとアルギニンの残基数が異なっていた。つぎにRCM-Toxin Cをキモトリプシンで消化して得られたペプチドを、トリプシン消化ペプチドの分画条件と同様の方法で精製した。得られたペプチドにC-を付し、そのアミノ酸組成をTable 5に示した。各ペプチドの名称はTable 2で示されたToxin Bの結果と対応させるため、相当するペプチドには同一の番号を付した。

Table 5. Amino acid composition of chymotryptic peptides derived from RCM-toxin C

Amino acid	C-I	C-II	C-III	C-IV-1	C-IV-2	C-V
CM-cysteine	5.72 (6)	2.00 (2)		<u>1.00</u> (1)	<u>1.00</u> (1)	
Aspartic acid	4.79 (5)	3.07 (3)			<u>0.93</u> (1)	
Threonine	4.41 (5)	2.01 (2)				1.72 (2)
Serine	2.28 (2)	1.03 (1)				
Glutamic acid	<u>1.00</u> (1)					
Proline	3.32 (3)	2.20 (2)	1.30 (1)			
Glycine	2.83 (3)	<u>1.00</u> (1)				
Alanine	1.95 (2)				0.97 (1)	
Valine	2.26 (3)	0.87 (1)				
Isoleucine	1.76 (2)	1.67 (2)		0.99 (1)		
Leucine	0.93 (1)					
Tyrosine		0.75 (1)				
Phenylalanine	0.90 (1)			1.00 (1)	0.93 (1)	
Tryptophan						+ (1)
Lysine	2.00 (2)	0.93 (1)	<u>1.00</u> (1)			<u>1.00</u> (1)
Histidine		0.92 (1)				
Arginine	1.87 (2)		2.30 (2)	0.89 (1)		
Yield (%)	23	20	14	18	27	18

The value of amino acid underlined was taken as 1.00.
The numbers in parentheses represent the nearest integers.
Tryptophan was determined spectrophotometrically.

その結果、キモトリプシン消化ペプチドのうち、アミノ酸組成を異にするものは、C-IとC-IV-2であった。C-Iのセリン(Toxin B)とイソロイシン(Toxin C)の置換は、RCM-Toxin CについてのN末端配列の結果で明らかにされており、またアルギニン(Toxin B)とリジン(Toxin C)の置換は上記のトリプシン消化ペプチドT-6の結果と、トリプシンの特異性から推定できた。残るC-IV-2についてはそのアミノ酸配列の検討の結果、Cys-Asp-Ala-Pheとなり、Toxin BのCys-Asp-Gly-Pheと異なっていた。

(iii) Toxin Cのアミノ酸配列

以上の結果より Toxin Cのアミノ酸配列はFig. 10 となり、Toxin Aの28位のグリシンがアラニンに、49位のアルギニンがリジンに置換した構造をもつことが決定できた。このToxin Cのアミノ酸配列は、Karlssonらにより決定された *Naja naja siamensis* (タイコブラ)の主要な神経毒 *siamensis* 3の一次構造の63位のアスパラギン酸がアスパラギンと置換している以外は同一であることがわかった。

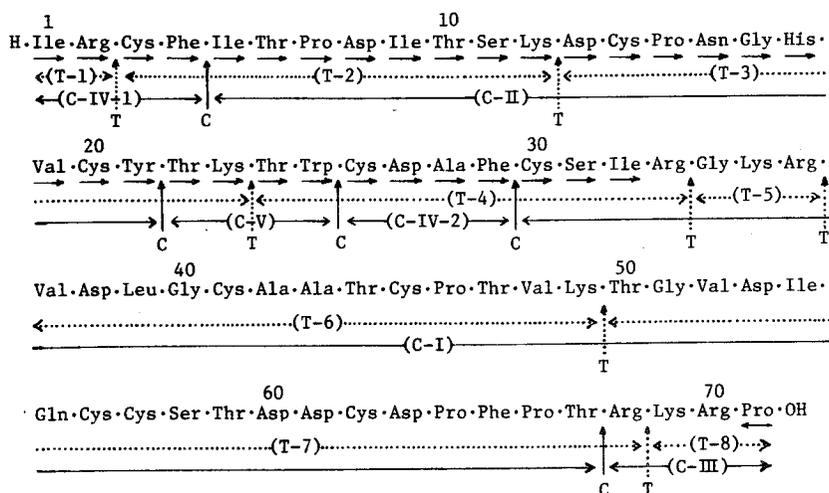


Fig.10. Amino acid sequence of Toxin C from Indian cobra (*Naja naja*). Horizontal arrows below amino acid residues denote the sequences of tryptic and chymotryptic peptides. Right- and left-handed arrows show that the sequence was elucidated, respectively, by Edman degradation, or by the hydrazinolysis. T and C represent the peptide bonds which were hydrolyzed by the action of trypsin or chymotrypsin, respectively.

3. Toxin D のアミノ酸配列¹⁸ インドコブラ毒より得られる Toxin D は、粗毒より 2% の収率で得られ Toxin A, B について粗毒中に多く含まれている神経毒タンパク質で、Toxin A, B, C のアミノ酸組成と酷似した組成を示した (Table 1)。Toxin D のマウスに対する致死活性は、Toxin A, B, C のそれに比べると約 50% で、神経毒タンパク質間の構造と致死活性との相関性を明らかにするための好材料と考えられたため、その一次構造を検討した。

(i) Toxin D の N 末端および C 末端配列

N 末端近傍のアミノ酸配列は、RCM 化した後、エドマン分解直接法により、N 末端より 31 番目までの配列を以下の如く決定した。H·Ile-Arg-Cys-Phe-Ile-Thr-Pro-Asp-Ile-Thr-Ser-Lys-Asp-Cys-Pro-Asn-Gly-His-Val-Cys-Tyr-Thr-Lys-Thr-Trp-Cys-Asp-Gly-Phe-Cys-Arg……。C 末端残基は酸性カルボキシペプチダーゼおよびヒドラジン分解法により、プロリン残基と決定した。

(ii) RCM-Toxin D のキモトリプシン消化

Toxin B の構造決定に用いた方法に準じて、RCM-Toxin D をキモトリプシンで

酵素消化した後、生成したペプチドは消化物を 0.2% 酢酸溶液で平衡化した Sephadex G-15(1.8×184cm) を用いるゲル濾過法により分画した。

Table 6. Amino acid composition of chymotryptic peptides derived from RCM-toxin D

Amino acid	C-I	C-II	C-III	C-IV-1	C-IV-2	C-V
CM-Cysteine	6.28 (6)	2.20 (2)		1.02 (1)	1.02 (1)	
Aspartic acid	4.97 (5)	3.03 (3)			1.17 (1)	
Threonine	4.78 (5)	1.93 (2)				2.00 (2)
Serine	1.16 (1)	1.01 (1)				
Glutamic acid	1.60 (2)					
Proline	3.25 (3)	1.89 (2)	1.18 (1)			
Glycine	2.97 (3)	1.18 (1)			1.13 (1)	
Alanine	2.24 (2)					
Valine	2.85 (3)	1.10 (1)				
Isoleucine	1.91 (2)	1.65 (2)		0.90 (1)		
Leucine	0.62 (1)					
Tyrosine		0.75 (1)				
Phenylalanine	1.00 (1)			1.00 (1)	1.00 (1)	
Lysine	1.02 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)			1.00 (1)
Histidine		0.69 (1)				
Arginine	3.15 (3)		2.26 (2)	1.02 (1)		
Tryptophan						+ (1)
Yield (%)	28	64	48	95	90	49

The value of amino acid underlined was taken as 1.0.
Tryptophan was determined spectrophotometrically.
The numbers in parentheses represent the nearest integers.

溶出順に C-I から C-V と命名し (C-IV のみ 2 種のペプチドの混合物であったことから Toxin B の場合と同様にし て分画), これらのペプチドのアミノ酸組成を Table 6 に示した。Toxin B の結果 (Table 2) と比較すると, C-I のみに差がみられた。C-II ~ C-V についてはエドマン分解直接法により, N 末端より分析し, その結果を Fig. 11 に示した。

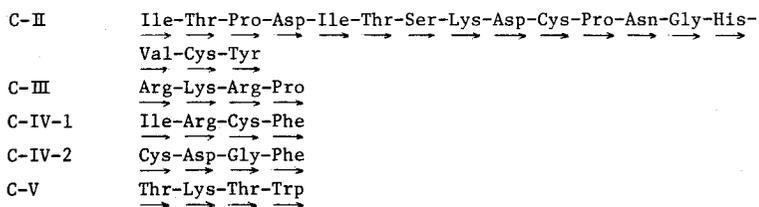


Fig. 11. Amino acid sequences of chymotryptic peptides from RCM-toxin D. Right-handed arrows showed that the sequence was elucidated by Edman degradation.

RCM-Toxin DのN末端近傍のアミノ酸配列から、C-I-1はN末端(Ile)から4位(Phe)までの、C-IIは5位(Ile)から21位(Tyr)までの、C-Vは22位(Thr)から25位(Trp)までの、C-IV-2は26位(Cys)から29位(Phe)までのアミノ酸配列と一致した。C-IIIはC末端がプロリンであることより、C末由来のペプチドと考えられた。Toxin Bと異なるペプチドC-Iについては、さらにトリプシンで消化し、生成したペプチドをpH 3.6の高圧濾紙電気泳動(40v/cm, 2時間)と溶媒IIを用いた下降法ペーパークロマトグラフィーを組み合わせで分離した。

Table 7. Amino acid composition of tryptic peptides derived from chymotryptic peptide C-I

Amino acid	C-I-1	C-I-2	C-I-3	C-I-4	C-I-5
CM-cysteine	0.84 (1)			1.80 (2)	2.60 (3)
Aspartic acid				1.12 (1)	4.00 (4)
Threonine				1.88 (2)	2.70 (3)
Serine					0.92 (1)
Glutamic acid			0.98 (1)		0.96 (1)
Proline				1.17 (1)	1.81 (2)
Glycine			0.94 (1)	1.00 (1)	1.16 (1)
Alanine				1.98 (2)	
Valine				1.89 (2)	1.06 (1)
Isoleucine		0.74 (1)			0.98 (1)
Leucine				0.79 (1)	
Tyrosine					
Phenylalanine					<u>1.00</u> (1)
Lysine				<u>1.00</u> (1)	
Histidine					
Arginine	<u>1.00</u> (1)	<u>1.00</u> (1)	<u>1.00</u> (1)		
Yield (%)	22	45	59	57	40

The value of amino acid underlined was taken as 1.00.

The numbers in parentheses represent the nearest integers.

得られたペプチドをC-I-1~C-I-5と命名した。これらのアミノ酸組成値をTable 7に示した。これらのうち、ペプチドC-I-1およびC-I-2はトリプシンの特異性から、Cys-Arg, Ile-Argと推定された。ペプチドC-I-3およびC-I-4の全アミノ酸配列はエドマン分解直接法によってGly-Glu-ArgおよびVal-Asp-Leu-Gly-Cys-Ala-Ala-Thr-Cys-Pro-Thr-Val-Lysと決定できた。C-I-5はC末端2残基を残して、Thr-Gly-Val-Asp-Ile-Gln-Cys-Cys-Ser-Thr-Asp-Asp-Cys-Asp-Pro-Phe(Pro, Thr)と決定した。未決定の2残基は、Toxin Bのキモトリプシン消化の場合に67位-68位のThr-Arg間のペプチド結合が100%切断されたことから判断して、ペプチドC-I-5のC末端はトレオニン残基と推定された。

(iii) Toxin Dの全アミノ酸配列

以上の結果を合わせ考えて、Toxin Dの全アミノ酸配列をFig. 12に示すように決定決定した。

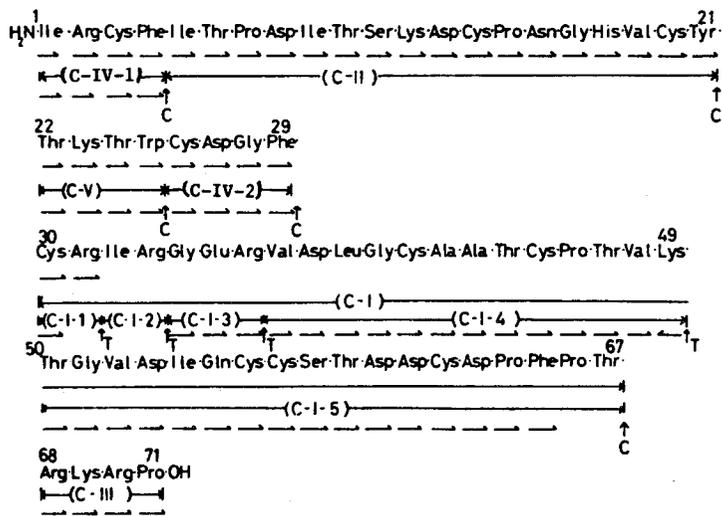


Fig. 12. Amino acid sequence of Toxin D from Indian cobra venom (*Naja naja*). Horizontal arrows below amino acid residues denote the sequences of chymotryptic and tryptic peptides. Right- and left-handed arrows show that the sequence was elucidated, respectively, by Edman degradation by the action of acid carboxypeptidase or by the hydrazinolysis. C and T represent the peptide bonds which were hydrolyzed by the action of chymotrypsin or trypsin, respectively.

Toxin DはN末端にイソロイシン，C末端にプロリン残基をもつ分子量7,880のⅡ型神経毒タンパク質であり，Toxin Bの31位のセリンがアルギニンに，32位のセリンがイソロイシンに，35位のリジンがグルタミン酸に置換した以外は同一の構造であることが明らかとなった。

インドコブラ毒中のⅠ型神経毒タンパク質の部分構造：インドコブラ毒のCM-セルロースクロマトグラフィーで主要なⅡ型神経毒群の溶出位置からさらにおくられて溶出され，Ⅱ型神経毒と同程度の致死活性をもつ2つの画分が得られた。これらの画分をToxin I，Ⅱと命名した(Fig. 2)。また，これらのアミノ酸組成(Table 1)は，台湾コブラ毒中の主要なⅠ型神経毒Cobrotoxinと類似していた。両神経毒タンパク質の粗毒中の含量は，Toxin Bの場合と同様に，製造番号により若干の変動が見られたが，両者とも粗毒中の含量はほぼ0.5から1%であった。これらの神経毒のN末端近傍のアミノ酸配列をエドマン分解直接法によりFig. 13のように決定した

が、これらのアミノ酸配列は Fig.13 に示すごとく Cobrotoxin の構造と高い相同性をもっていた。

	10	
Cobrotoxin	H.Leu.Glu.Cys.His.Asn.Gln.Gln.Ser.Ser.Gln.Thr.Pro.Thr.Thr.Thr.Gly.	
Toxin I	H.Leu.Glu.Cys.His.Asn.Gln.Gln.Ser.Gln.Gln.Pro.Pro.Thr.Thr.Thr.Gly.	
Toxin II	H.Leu.Glu.Cys.His.Asn.Gln.Gln.Ser.Gln.Gln.Pro.Pro.Thr.Thr.Lys.Gly.	
	20	30
	Cys.Ser.Gly.Gly.Glu.Thr.Asn.Cys.Tyr.Lys.Lys.Arg.Trp.Arg.Asp.His.Arg.	
	Cys.Ser.Gly.	
	Cys.Ser.Gly.Gly.Glu.Asn.Asn.Cys.Tyr.Lys.Lys.Arg.	
	40	50
	Gly.Tyr.Arg.Thr.Glu.Arg.Gly.Cys.Gly.Cys.Pro.Ser.Val.Lys.Asn.Gly.Ile.	
	60	
	Glu.Ile.Asn.Cys.Cys.Thr.Thr.Asn.Arg.Cys.Asn.Asn.OH	
	Asn.OH	
	Asn.OH	

Fig.13. N- and C-terminal sequences of *Naja naja* type I neurotoxins

また、カルボキシペプチダーゼAを用いたC末端残基の分析から、両神経毒ともにC末アミノ酸も Cobrotoxin と同じく アスパラギンであった。

第3節 台湾コブラ (*Naja naja atra*) 毒中の神経毒タンパク質の精製

台湾コブラ毒をインドコブラ毒の場合と同様にCM-セルロースで精製した溶出パターンを Fig. 4 に示した。これらのうち、CM-I 以外はディスクゲル電気泳動法により均一なバンドを示した。これらのアミノ酸分析値および粗毒からの収率を Table 8 に示した。すでに一次構造が決定されている Cobrotoxin²⁴ は、致死活性およびアミノ酸組成から CM-VII に相当した。

CM-II は、アルギニンが1残基少ない以外 (Cobrotoxin) と同じアミノ酸組成をもつ³³ 神経毒タンパク質であった。CM-I, III を除く CM-II, IV, V, VI および VIII のアミノ酸組成は Cobrotoxin のそれと類似していた。しかし、これらの致死活性 (Fig. 5) には著しい差があり、CM-II および CM-VII は Cobrotoxin と同程度の致死活性を示し、CM-IV, V および VIII はそれぞれ Cobrotoxin のその約 15%, 50% および 10% であった。

Table 8. Amino acid composition of *Naja naja atra* CM-fractions.

Amino acid	CM-I	CM-II	CM-III	CM-IV	CM-V	CM-VI	CM-VII	CM-VIII	Cobrotoxin
Aspartic acid	16.7	7.5	6.9	7.7	8.0	8.0	7.8	7.8	8
Threonine	4.4	6.8	3.9	7.3	7.2	7.6	7.8	6.6	8
Serine	4.3	3.2	4.3	3.6	3.7	3.6	3.8	3.2	4
Glutamic acid	7.6	6.9	4.0	7.5	7.5	6.9	7.4	7.0	7
Proline	3.5	2.3	2.9	2.2	1.9	3.1	2.3	2.4	2
Glycine	8.1	6.4	5.1	6.7	6.4	5.4	6.6	6.4	7
Alanine	8.9	-	3.9	-	-	-	-	-	0
Half-cystine	7.9	6.9	6.4	7.3	6.9	6.5	7.1	7.5	8
valine	3.5	1.1	2.6	1.1	1.2	1.9	1.0	1.4	1
Methionine	<u>1.0</u>	-	-	-	-	-	-	-	0
Isoleucine	3.3	1.9	1.4	2.0	2.2	1.7	2.0	2.0	2
Leucine	4.1	<u>1.0</u>	1.6	<u>1.0</u>	<u>1.0</u>	1.8	<u>1.0</u>	<u>1.0</u>	1
Tyrosine	7.6	1.9	4.6	2.1	2.1	<u>1.0</u>	2.1	2.1	2
Phenylalanine	3.6	-	4.0	-	-	-	-	-	0
Lysine	4.2	2.8	<u>1.0</u>	2.7	2.7	4.1	2.7	3.0	3
Histidine	0.8	1.7	0.9	1.8	1.7	1.8	1.6	1.6	2
Arginine	4.7	5.2	4.4	5.2	5.2	3.8	6.1	5.8	6
Tryptophan									1
Yield	9.9%	0.9%	0.4%	1.8%	0.8%	0.8%	11.0%	0.5%	

The value of amino acid underlined was taken as 1.0.

第4節 考察ならびに総括

毒ヘビに含まれる毒の本体を解明することは、それ自体が目的ということもあるが、これらの動物による咬傷に対する治療方法の確立という面からも有意義と考えられる。また粗毒中の特異性の強い生理活性物質は、その選択毒性を活用し複雑な生理現象の解明に活用できる可能性がある。著者がここで扱った神経毒タンパク質は、その特異的な生理作用を利用して、神経筋接合部の電気生理学的研究に活用され、また、生化学的には種々の組織中のアセチルコリン受容体 (AChR) の分離精製に広く応用されている。^{34,96} これらの神経毒タンパク質の精製法には定まった方法はなく、各研究者により別々の方法が用いられている。^{1,35}

著者が確立した Sephadex G-50 および CM-セルロースを組み合わせる方法は、まず、分子ふるい法により、ヘビ毒に含まれる多くのタンパク質を分子量の大きさに従って分画したのち、致死活性の強い画分をイオン交換クロマトグラフィーにより、さらに分離精製する方法である。この精製法の特徴は、致死タンパク質をまず致死活性をもたない他の高分子量画分 (主として酵素類) と分離したことである。致死活性を有する分子量 5,000-10,000 の画分中には主として神経毒タンパク質群 (Neurotoxins) と細胞毒タンパク質群 (Cytotoxins) が含まれていた。

この両群はともに塩基性タンパク質であったが、それらの等電点には著しい差異（神経毒群の pI は 9 - 10, 細胞毒群の pI は 11 以上）があったため、CM-セルロースを用いて塩濃度を順次高める gradient elution 法によってそれぞれを比較的容易に分画精製することに成功した。また、均一に分離した神経毒のアミノ酸組成を検討することにより、著者は、コブラ科に属するヘビのうち、インドコブラの毒液中には、I 型および II 型神経毒タンパク質が複数個含まれることを明らかにした。しかし、台湾コブラ毒中には、I 型神経毒タンパク質の Cobrotoxin 以外は、Cobrotoxin のアミノ酸組成と類似した 3 種の神経毒が分離されたのみで、II 型神経毒は分離されなかった。これらの結果や、ウミヘビ毒が I 型神経毒のみを含み、コブラ科に多量に含まれる Cytotoxin を含まない事実と考え合わせて、神経毒タンパク質の進化を論じる上で興味ある事実と考えられる。タンパク分子が単純な形から、より複雑なタンパク質へと進化していくとの考えから、Tuらは 2 種の型の神経毒タンパク質と Cytotoxin の 3 者は、生物活性という面からは非常に異っているものの、発生学的な面から Fig. 14 に示す相関があるものと推定している。

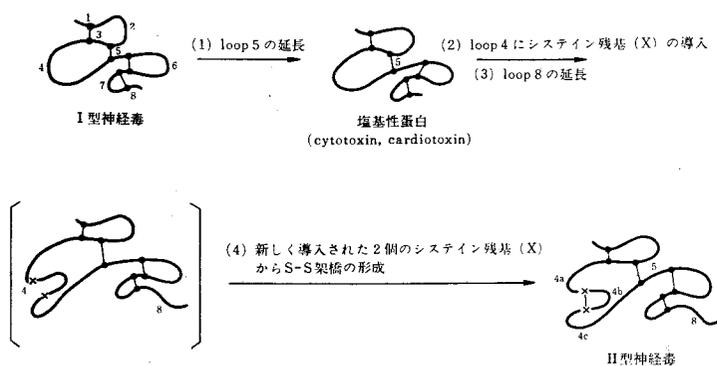


Fig. 14. I 型神経毒から II 型神経毒への進化仮想図¹⁹⁾

すなわち、彼は半シスチン残基間に含まれるアミノ酸残基数を基準にして、構造的にも相同性の高いウミヘビおよびコブラ科 I 型神経毒を最も原始的なタンパク質群と考え、この分子の Fig. 14 の loop 5 にアミノ酸残基が数個導入された結果、塩基性タンパク群が出現したと考えている。さらに、このタンパク質群の loop 4 の中に 2 個の半シスチン残基を含む 4 残基が導入されるとともに、C 末部分の loop 8 が延長された結果、II 型神経毒が出現したという進化仮説である。ウミヘビは I 型神経毒のみ

Fig. 15にToxin Aおよび著者が明らかにしたToxin B, C, Dの一次構造を示した。著者が明らかにしたToxin Dは共通残基の一部が他の残基に置換していた。すなわち、Toxin Dの一次構造をToxin A, B, Cをはじめ、他のコブラ科Ⅱ型神経毒タンパク質のアミノ酸配列を比較すると、35位のアミノ酸残基はいずれも共通して塩基性アミノ酸のリジン残基であるのに対し、Toxin Dの35位は酸性アミノ酸のグルタミン酸残基であった。このリジン残基からグルタミン酸残基という電荷の相反するアミノ酸残基の置換が、その神経毒性の発現に大きく寄与していると考えられた。

同じコブラ科のヘビ毒中に含まれる神経毒タンパク質のうち、同型神経毒間のアミノ酸残基の相違は、遺伝子レベルでの一塩基変換で説明できる場合が多い。著者が明らかにしたインドコブラ毒中のⅡ型神経毒タンパク質 (Fig. 15) について考えると、Toxin A, B, C, D 間でみられる、イソロイシン→セリン、アルギニン→リジン、リジン→グルタミン酸、アラニン→グリシンの置換は、例えば、AUU→AGU, AAA→GAA, GCU→GGU, AGA→AAAですべて説明できることから、多くの同型神経毒タンパク質は、神経毒タンパク質の産生にあずかる1つの遺伝子が何らかの原因により point mutation をおこした結果生じた可能性が考えられる。

神経毒タンパク質は分子内にメチオニン残基をもたないことから、アミノ酸配列の決定には、タンパク分解酵素のトリプシンやキモトリプシンで消化し、生成したペプチドを高圧濾紙電気泳動法や下降法ペーパークロマトグラフィーを組み合わせ精製して得られるペプチドの構造を調べる方法が用いられてきた。しかし、この方法では得られるペプチドの回収率、特に分子量の大きいものの収率が極めて悪い欠点があった。また、タンパク分解酵素により長時間消化すると、それぞれの酵素のもつ特異性とは異なったペプチド結合の切断がおこることが多いことなどから、著者はこのような欠点を改良するため、酵素による消化時間を短かくし、生成ペプチドの分画にSephadexを用いるゲル濾過法を採用し、ペプチドの回収率を大幅に上昇させることに成功した。その結果、構造研究に用いる神経毒タンパク質の量を大幅に少量化できた。

実 験 の 部

実験材料：インドコブラ (*Naja naja*) 粗毒は、インドの Haffkine Institute、およびアメリカの Serpentarium Laboratories から、台湾コブラ (*Naja naja atra*) 粗毒は Sigma 社から購入した。

致死活性の測定²³：マウス (dd系, 雄性, 体重 16~18g) 5匹を1群とし、試料の倍数希釈液を1匹当たり 0.2ml ずつ皮下注射し、24時間以内にその半数が死亡する試料の量を LD₅₀ とした。

還元カルボキシメチル (RCM) 化²⁵：Crestfield の方法を一部変えて実施した。試料を 5M 塩酸グアニジンを含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) に、1% (w/v) タンパク質溶液となるように溶解した。つぎに、この溶液の 1ml 当たり 100μl の β-メルカプトエタノールを加え、反応容器中の空気を窒素ガスで十分に置換した後、密封して、37°C、4時間以上放置した。この溶液にモノヨード酢酸をタンパク質 1mg 当たり 5mg の割合で加え、反応液の pH を 1M NaOH で pH 8.6 に調節しながら反応を行なった。反応を完了させるため、さらに 30分間攪拌をつづけ、1% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (2.5×50cm) のカラムでゲル濾過して脱塩し、280nm に吸収を示す画分を凍結乾燥した。反応が完結しているかどうかは試料の一部を加水分解後、アミノ酸分析してシスチンの有無を検討する方法に従った。

アミノ酸分析³⁹：試料を 1 mM フェノールを含む 6M HCl (0.5ml) にとかし、減圧下に封管後、105°C、24時間加水分解した。水解後塩酸を減圧下に除去し、残渣を pH 2.2 の緩衝液に溶かし、アミノ酸分析計 (日立, KLA-3B 型) により分析した。

トリプトファンの分析：試料を日立自記式分光光度計 124 型を用いて波長 200 nm から 320 nm のスペクトルを測定し、トリプトファン特有のスペクトルを示すか否かにより定性的に有無を確認した。さらに、エールリッヒ試薬²⁸ [ジメチルアミノベンズアルデヒド (1g) をアセトン (90ml)、濃塩酸 (10ml) に溶解] を試料溶液の一部を塗布した濾紙に噴霧し、発色の有無により確認した。

トリプシンおよびキモトリプシン消化：Worthington 社製の TPCK 処理トリプシンおよびキモトリプシン (3回再結晶製品) を使用した。試料を 0.2M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) に最終濃度 1% (w/v) になるように溶解し、酵素を基質重量の約 1/50 量加え、37°C、3時間消化した。消化物をただちに 0.2% 酢酸で平衡化した Sephadex G-15 または Sephadex G-25 に通し、波長 226 nm、280 nm に吸

収を示す各画分を凍結乾燥した。

ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動：Williams⁴⁰らの方法に従った。pH2.8およびpH4.0用ゲルを用い、ゲル濃度15%、カラム1本当たり3mA、30分泳動後、試料が分離用ゲルに入ってから5mAに変えて2時間泳動した。試料は20~50 μ gを使用した。アミドブラック10Bでタンパク染色を行ない、10%酢酸により脱色した。

高圧濾紙電気泳動：Toyo No 51濾紙を使用した。溶媒としてピリジン：酢酸：水=1：10：289(v/v/v)²⁶，pH3.6，を用い、30-50v/cmの電圧下、1時間から2.5時間泳動した。濾紙からのペプチドの調製は2本のガイド片(巾5mm)により、ニンヒドリン試薬(2%ニンヒドリン-アセトン溶液)を噴霧し、ペプチドの位置を確認し、これを目安に濾紙よりペプチドの存在する部分を切り取り、5%ピリジンあるいは1%酢酸で溶出後、ロータリーエバポレーターにより減圧乾燥した。

下降法ペーパークロマトグラフィー：Toyo No. 51濾紙を用いて下記の溶媒Ⅰ、Ⅱ、Ⅲで、室温で14時間から40時間展開した。ペプチドの位置はニンヒドリン試薬により確認した。

溶媒Ⅰ⁴¹ 1-ブタノール：酢酸：ピリジン：水=15：3：10：12(v/v/v/v)

溶媒Ⅱ 1-ブタノール：酢酸：水=4：1：5(v/v/v)

溶媒Ⅲ 1-ブタノール：酢酸：水=3：1：1(v/v/v)

N末端分析(エドマン分解直接法)²⁹：RCM化した試料(0.5~20mg)を用いて、

Edmanの原報に基づく改良法により、また、PTH-アミノ酸の定量は269nmの紫外外部吸収を測定する方法に従った。PTH-アミノ酸の同定には、Merck社のKieselgel F₂₅₄プレートを用い、Jeppsson⁴²らの溶媒Ⅳおよび溶媒Ⅴで展開した。さらに必要に応じて、Carle Place社ポリアクリルアミドsheetにより、トルエン：n-ペンタン：酢酸=60：30：35(v/v/v)の溶液1 μ l当りに250mgの[2-(4'-ブチル・フェニル)-1,3,4-オキシジアゾール]⁴³を加えた溶媒⁴³を用いて展開し、暗所で短波長紫外線ランプによっても検討した。水層より回収されるPTH-アルギニン乾燥後、残渣を70%エタノール(0.1ml)にとかし、その一部を濾紙につけ、Sakaguchi⁴⁴反応の改良法によって同定した。PTH-ロイシンおよびPTH-イソロイシンの区別は、最終的にはRCM-Toxinの酵素消化によって得られるペプチドのアミノ酸分析の結果によった。各段階におけるPTH-アミノ酸の回収率は、エドマン分解に用いたペプチドのモル数に対する各段階のPTH-アミノ酸のモル数の百分率で測

定したが、この値が15%前後になると薄層クロマトグラム上では同定が困難になり以下のアミノ酸配列は決定できなかった。

○末端分析：ヒドラジン分解法はGoetzl³¹らの方法に従った。また、カルボキシペプチダーゼAおよびB(DFP処理)を用いる方法も併用した。すなわち、0.2M重炭酸アンモニウム(pH8.0)(0.2ml)中に試料(0.1~0.5 μ mole)を溶解させ、カルボキシペプチダーゼA、Bをそれぞれ基質重量の1/50量を加え、37°Cで消化した。消化開始後、0、0.5、1、3、6、12、24時間後に消化液の一部を取り、遊離アミノ酸をアミノ酸分析計により同定した。

酸性カルボキシペプチダーゼ(Penicillium janthinellum³⁰の培養濾液より精製)は東京農大の一島英治博士より供与されたものを用いた。RCM·Toxin B(2mg)を0.2M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)に溶解し、酸性カルボキシペプチダーゼを基質重量のほぼ1/50量加え、37°Cで消化した。消化液の一部を経時的に採取し、アミノ酸分析計により遊離アミノ酸を同定した。

フィンガー・プリント法：Ingram²⁷の方法により、まず酵素消化物(1mg)をToyo No. 51(50×60cm)の濾紙の1点につけ、pH3.6の溶媒系で高圧濾紙電気泳動(35 \sqrt /cm, 2時間)を行ない、ついで、電気泳動と直交する方向に溶媒Iを用いて下降法で40時間展開した。濾紙上のペプチドの位置の同定はニンヒドリン試薬によった。

等電点電気泳動：Vesterberg⁴⁵らの方法に従った。Carrier ampholyte(LKB社)pH3-10を濃度1%で使用した。Carrier ampholyteを全量の3/4含む50%シヨ糖濃度の濃溶液と、1/4量含む淡溶液を適量まぜ合わせて、カラム(12×50cm)内に24層つくり、陽極と接触する部分にリン酸、陰極と接触する部分にエチレンジアミンをそれぞれ0.05ml添加した。2°C, 400V(2mA)で2時間泳動後、750V(15mA)に上げ、さらに12時間泳動させた。

第 2 章 Toxin B の高次構造

前章で明らかにしたごとく、ヘビ毒から得られる神経毒タンパク質は、単純タンパク質で、1分子当り I 型神経毒タンパク質で 8 残基、II 型で 10 残基の半シスチン残基を含み、すべて分子内で S-S 架橋を形成している。また、Cobrotoxin⁴⁶、 α -Bungarotoxin⁴⁷、Toxin B は、それらの CD-スペクトルから、分子内に β -構造が存在することが示唆されていた。

著者は、ヘビ神経毒タンパク質の分子内の S-S 架橋と高次構造、さらに S-S 架橋と致死活性との相関を知る目的で、Toxin B 分子中の 5 組の S-S 架橋の位置⁴、およびレーザーラマン分析法により高次構造を検索した⁵。また、Toxin B 中のチロジンやトリプトファン残基など特定のアミノ酸残基の存在状態を分光学的に測定し、次章に述べる化学修飾法の結果と比較検討し、以下の諸点を明らかにした。

- (1) Toxin B 分子中の 5 組の S-S 架橋は、それぞれ 3-20, 14-41, 26-30, 45-56, 57-62 番目の半シスチン残基によって形成されている。
- (2) Toxin B 分子の高次構造はランダムコイルと逆平行 β 構造からなっている。
- (3) 分子内 S-S 伸縮振動から、5 組の S-S 架橋のうち、3 組が *Gauche - Gauche* 形、残り 2 組が *Gauche - Trans* 形をとっている。
- (4) Toxin B 中のチロジン残基の水酸基は、分子内の他の残基と弱く水素結合した状態で存在している。
- (5) Toxin B 中のトリプトファン残基は水溶液中では露出した状態で存在していると考えられる。

第 1 節 Toxin B の S-S 架橋位置

I 型神経毒タンパク質が 4 組の S-S 架橋をもつ^{37,38}のに対し、II 型の Toxin B は 5 組の S-S 架橋をもち、架橋を還元して開裂させると全く致死活性、抗原性が消失する(第 3 章)ことから、毒性の発現には S-S 架橋の必要性が考えられた。そこでまず S-S 架橋の位置を検討した。

一般に S-S 架橋の位置を決定するには、S-S 交換反応の起こらない条件下で S-S 架橋を含むペプチドを分離することが必要である。そこで、架橋位置の決定に

必要なシスチン残基を含有するペプチドを分離するため、S-S交換反応を阻害するN-エチルマレイミド(1mM)の存在下にToxin Bをトリプシン、キモトリプシン、ペプシンなどのタンパク質分解酵素を用いて消化したが、全S-S架橋の位置の決定に必要なシスチン残基含有ペプチドは得られなかった。そこで、S-S交換反応の起こりにくい酸性条件下でも活性を保持し、特異性の広いAspergillus nigerの培養濾液より精製された酸性プロテアーゼAを用いて検討した。

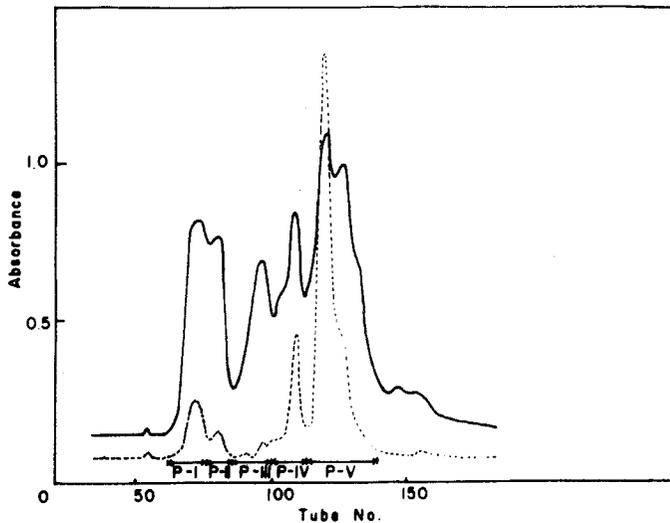


Fig.16. Sephadex column chromatography of acid protease A digest of Toxin B. The digest of Toxin B was applied on a Sephadex G-25 column (2.2 x 240 cm) and eluted with 0.1 M formic acid. Fractions of 5.0 ml were collected and monitored at 226 nm (—) and 280 nm (---).

酵素消化後、消化物を0.1Mギ酸で平衡化したSephadex G-25 (2.2×240cm)でゲル濾過し、生成した各ペプチドを波長226nm, 280nmでモニターし、画分P-I~Vを得た(Fig.16)画分P-Iは未消化物であった。P-I以外の画分は、さらに高圧濾紙電気泳動(50v/cm, 2.5時間, pH3.6)によって分離、精製を行ない、⁴⁸ニトロプルシド試薬に対して陽性を示す7種のシスチン含有ペプチドを得た。Table9にそれらのアミノ酸組成を示した。表中の4種のペプチドP-III-2, P-IV-1, P-V-1, P-V-2は分子中に1個のシスチン残基を含むことから、これらを過ギ酸⁴⁹化して高圧濾紙電気泳動(40v/cm, 2時間, pH3.6)を行ない、それぞれのペプチド鎖をシステイン酸含有ペプチドとして分離した。

Table 9. Amino acid composition of disulfide peptides and their oxidized components (A) from Toxin B

Amino acid	P-II-1	P-II-2	P-II-3	P-III-2		P-IV-1		P-V-1*		P-V-2			
				Total	A-1	A-2	Total	A-1	A-2	Total	A-1	A-2	
Cysteic acid					<u>1.00</u>	<u>1.00</u>		<u>1.00</u>	<u>1.00</u>		<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	
Aspartic acid	2.82	3.60	3.78	1.20	<u>1.12</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	0.88	<u>1.00</u>	2.00			
Threonine	2.77	3.65	3.40						<u>1.00</u>	1.13			
Serine	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	1.20						1.77	1.87			
Glutamic acid	0.80	0.94	<u>1.00</u>						1.77	1.92			
Proline	0.97	2.00	2.02	<u>1.00</u>	1.07		0.93	1.10					
Glycine	0.82	1.01	1.09	<u>1.90</u>	1.10	1.31	1.00		1.09	1.04	1.21	<u>1.00</u>	1.30
Alanine		1.56	1.56	1.83		2.18	1.87	1.86					
Half-cystine	3.01	3.17	4.30	1.95			1.74			1.66		1.77	
Valine	1.51	1.40	1.80									0.98	0.96
Methionine												1.00	1.00
Isoleucine	0.75	0.76											
Leucine				0.70		0.88	0.79	0.77					
Tyrosine									0.77	0.80		0.87	0.85
Phenylalanine			0.72						1.02	0.95		1.13	0.95
Lysine									0.82	<u>1.00</u>			
Histidine				0.70	0.70							1.00	0.68
Arginine	0.66	0.62	1.03						1.24	0.87		1.10	0.95

The value of the amino acid underlined was taken as 1.0.
 * Tryptophan was detected by Ehrlich reaction.

Table 10. Amino Acid Composition of Thermolytic Peptides of Fraction P-II and Oxidized Components (A) from P-II-T-3

Amino acid	P-II-T-1	P-II-T-2	P-II-T-3		
			Total	A-1	A-2
Cysteic acid				<u>1.00</u>	<u>1.00</u>
Aspartic acid	2.70	1.85			
Threonine	1.19	1.01	0.81	1.21	
Serine	0.95	1.00			
Glutamic acid			<u>1.00</u>		1.22
Proline	1.08		<u>1.07</u>	1.31	
Glycine					
Alanine					
Half-cystine	1.87	2.20	1.88		
Valine					
Methionine					
Isoleucine			0.78		0.91
Leucine					
Tyrosine					
Phenylalanine	<u>1.00</u>				
Lysine					
Histidine					
Arginine					

The value of the amino acid underlined was taken as 1.0.

得られたペプチドのアミノ酸組成は Table 9 中のそれぞれのペプチドの A-1, A-2 のカラムに示した。これらのアミノ酸組成と Toxin B のアミノ酸配列を考え合わせ, 3 組の S-S 架橋は N 末端より 3-20, 14-41, 26-30 位にある半システイン残基相互の間で形成されていることが明らかとなった (Fig. 17)。

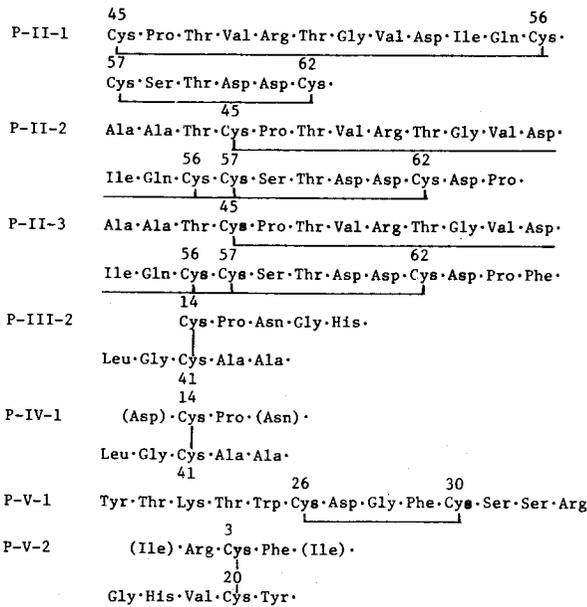


Fig.17. Structures of the peptides obtained from acid protease digest of Toxin B.

2 組の S-S 架橋をもつペプチド P-II-1, P-II-2 および P-II-3 は, 酸性プロテアーゼ A による消化で 56 位と 57 位の間でのペプチド結合の切断が起こらず決定できなかった。そこで, ペプチド P-II-1, P-II-2 を 1 mM の N-エチルマレイミドの存在下にサーモライシンで消化し, 消化物を高圧濾紙電気泳動 (40V/cm, 2 時間, pH 3.6) にかけた結果, 56 位と 57 位の間でのペプチド結合が加水分解されたと考えられる 3 種のシステイン含有ペプチド (P-II-T-1, P-II-T-2, P-II-T-3) が分離された。その結果, P-II-T-1, P-II-T-2 からはそれぞれ 1 種のペプチドのみが, P-II-T-3 からは 2 種のペプチドが分離された (Table 10 中の A-1, A-2)。得られたペプチドのアミノ酸組成から, 残る未決定の 2 組の架橋は, Fig. 18 に示すごとく, 45 位と 56 位, 57 位と 62 位の半システイン残基により形成されていることが明らかとなった。

以上の結果から, Toxin B の S-S架橋様式は Fig. 19 のように決定できた。この架橋様式は, すでに明らかにされている I 型神経毒タンパク質の Cobrotoxin³⁷ や Erabutoxin³⁸ の様式と比較すると, Toxin B では 26-30 位間で形成された 1 組の S-S 架橋が余計に存在している以外, 他の 4 組は同じ様式であることがわかった。

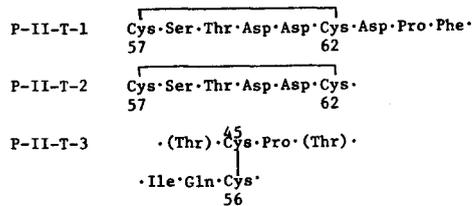


Fig. 18. Structures of the thermolytic peptides of fraction P-II.

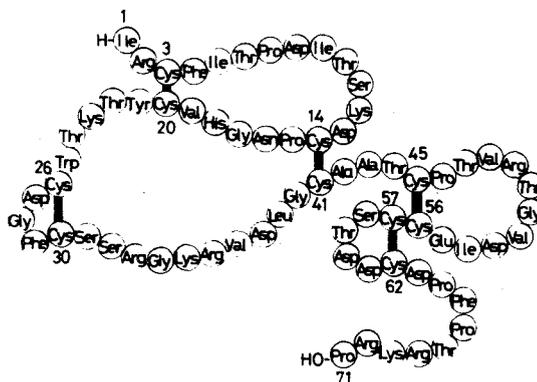


Fig. 19. Amino acid sequence of Toxin B showing the positions of the disulfides bridges.

第 2 節 Toxin B のラマンスペクトル

レーザーラマン分光分析法はタンパク質の高次構造を推定する有力な手段の一つである。すでに I 型神経毒タンパク質のエラブウムヘビ (*Laticauda semifasciata*) からの Erabutoxin⁵⁰ やトゲウミヘビ (*Lapemis hardwickii*) の神経毒の高次構造がラマンスペクトルにより測定されている。しかし, II 型神経毒タンパク質についての報告はみられなかった。そこで, I 型神経毒タンパク質と比較するため, 水溶液中での Toxin B のラマンスペクトルを測定し, 高次構造を推定するとともに, ジスルフィド

結合およびチロジン、トリプトファン残基の存在状態についても考察した。

100 mg/ml の濃度の Toxin B 水溶液のラマンスペクトルを Kr レーザーの 6471 Å の発振線（出力 300 mW）と Spex 1401 分光器を用いて測定した（スペクトルの分解能は 7 cm^{-1} ）。

Fig. 20 に Toxin B のラマンスペクトルを示した。

Amide I および III のバンドが 1670 と 1241

cm^{-1} に観察された。このことは、分子中にランダムコイルと逆平行 β 構造が多く存在しており、 α -ヘリックス構造はほとんど存在していないことを示唆している⁵²。一方、S-S の伸縮振動が 510 と 523 cm^{-1} に観察され、この強度の比がほぼ 10 : 8 であるため、5 組の S-S 結合

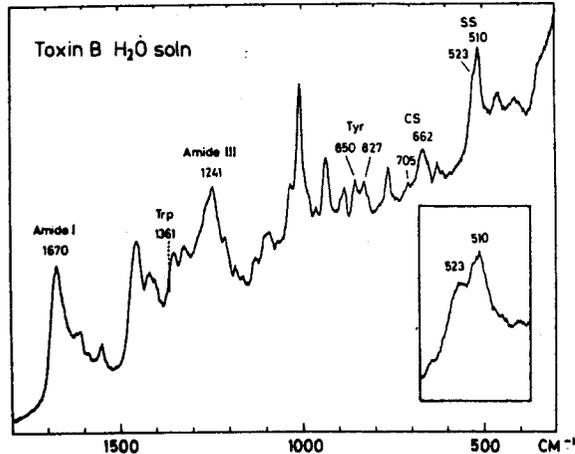


Fig. 20. Raman spectrum of Toxin B in water.

のうち、3 組が Gauche - Gauche 形 (G-G 形)、2 組が Gauche - Trans 形 (G-T 形) をとっていると解釈された⁵³。シスチン残基の C-S 伸縮振動については、すべてシスチン残基の $\text{HC}\alpha - \beta\text{S}$ について、T 形の散乱が 662 cm^{-1} に強く、G 形の領域の 705 cm^{-1} に弱く観察された。一方、分子内に 1 個存在する 21 位のチロジン残基については 827 と 850 cm^{-1} の強度比が 8 : 10 であるため、フェノール性水酸基は弱い水素結合状態で存在していると解釈された⁵⁴。また、一般に埋もれた状態で存在するトリプトファン残基は、 1361 cm^{-1} に鋭いピークを示すが、Toxin B ではこのピークが見られなかったため、25 位に存在するトリプトファン残基は水溶液中で露出しているものと推定された⁵⁵。これらの結果は次章で述べる Toxin B の化学修飾の実験結果を支持するものであった。

第3節 考察ならびに総括

著者は、Toxin Bのアミノ酸配列を前章のように決定したが、半シスチン残基が他のヘビ神経毒や塩基性タンパク質群(Cytotoxin, Cardiotoxin類)などと同じように、分子内にCys-Cysのアミノ酸配列が存在しており、S-S架橋の位置の決定にはこのペプチド結合の加水分解が最大の難点と考えられた。そこで、種々のタンパク質分解酵素(トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、ナガーゼ、パパイン、プロナーゼ)を用いてこの結合の切断を試みたが、期待した結果は得られなかった。一方、サーモライシンがCys-Cysのアミノ酸配列をもつCytotoxin IのS-S架橋の位置の決定に有効であったことから⁵⁶、サーモライシンでToxin Bを消化し、S-S架橋を決定するために必要なペプチドの分離を試みた。しかし、目的とするペプチドは得られなかった。つぎに、Toxin Bを酸性プロテアーゼAで消化して得たペプチドP-II-1とP-II-2をさらにサーモライシン消化した結果、Cys-Cys結合が加水分解されることがわかった。

Toxin BのS-S架橋の位置はII型神経毒の*Naja nivea*からのToxin α ⁵⁷のそれと同一であった。また、I型神経毒とは26位と30位の半シスチン残基間のS-S架橋が1個余計に存在していることが明らかとなったが、この架橋の近傍にI型神経毒では活性発現に必須なアミノ酸残基のチロジンやトリプトファン残基が位置している。このため、これらの残基の存在状態への上記の26-30位間のS-S架橋の影響を、Toxin Bのラマンスペクトルを測定する方法により検討した。その結果、特にチロジン残基由来のダブルレットピークの強度比がI型神経毒のそれと比較して、著しく相違していた。すなわち、I型神経毒の場合、フェノール性水酸基はプロトンアクセプター(COO^- や NH_2)と強く水素結合を形成していることが推定されたのに対し、Toxin Bでは弱く水素結合を形成していることが推定された。これらの事実から、26-30位間のS-S架橋の形成によって、その近傍のアミノ酸残基は、I型神経毒とは異なる存在状態を形成しているものと推定される。

これらの結果は、構造と致死活性の関連を知るために行なった次章の化学修飾の実験でI型神経毒とII型神経毒で異なっていた事実とも一致していた。さらに、ラマンスペクトルの測定結果から、Toxin B分子中のランダムコイルと逆平行 β 構造の含量がI型神経毒に比較して多いことが推定された。また、S-S結合に関して、I型神経毒のCobrotoxinではGauche-Trans形が1組であるのに対し、Toxin Bでは2^{58,59}

組存在するなど，Ⅰ型とⅡ型の神経毒タンパク質の高次構造はかなり相異していることが明らかにされた。

実 験 の 部

酸性プロテアーゼによる消化： *Aspergillus niger* var *macrosporus* より精製された酸性プロテアーゼ A (明治製菓) を用いた。Toxin B 24 mg を 1 M ギ酸：1 M 酢酸 = 2 : 1 (v/v) (pH 2.0) 3 ml に溶解させ、本酵素 (基質：酵素 = 20 : 1, w/w) を加えて、40°C, 24 時間消化した。消化物を 0.1 M ギ酸で平衡化した Sephadex G-25 (2×240 cm) で分画した。

サーモライシンによる消化：ペプチド P-II-1, P-II-2 を 0.2 M NH_4HCO_3 (pH 7.8) に N-ethylmaleimide (1 mM) を加えた溶液 (0.5 ml) にとかし、サーモライシン (基質：酵素 = 20 : 1 (w/w), Worthington 社) を加え、37°C で 48 時間消化した。消化物を溶媒 I を用いて下降法ペーパークロマトグラフィーにより 30 時間展開し、ニトロプルシド試薬によりシスチン含有ペプチドを検索し、常法に従って濾紙より抽出した。

シスチン含有ペプチドの検出：シスチン含有ペプチドの検出にはシアニドニトロプルシド試薬を用いた。下記の試薬 a をペーパークロマトグラムに噴霧し、風乾後、試薬 b を噴霧した。赤褐色に発色したものをシスチン含有ペプチドとした。

試薬 a) ニトロプルシドナトリウム (1.5 g) を 2 M 硫酸 (5 ml) にとかし、これにメタノール (95 ml) と、28% アンモニア水 (10 ml) を加えた後、濾過して調製した。

試薬 b) NaCN (2 g) を水 (5 ml) にとかし、メタノールを加えて 100 ml とした。過ギ酸酸化：Mueller らの方法⁴⁹に従った。30% 過酸化水素：ギ酸 = 1 : 9 (v/v) の溶液数滴をシスチン含有ペプチドに加え密封し、30 分間、室温で放置したのち、水を加えて減圧下に濃縮乾固した。生成したペプチドは、pH 3.6 の高圧濾紙電気泳動法により分離した。

第 3 章 Toxin B の構造と致死活性との相関性

生物活性をもつタンパク質の構造と機能との相関性を知るための有効な手段として、種々の修飾試薬を用いて特定のアミノ酸残基を修飾し、活性に及ぼす影響を測定する方法が一般に用いられている。

著者は、Toxin B中のトリプトファン残基、チロジン残基、遊離アミノ基およびカルボキシル基などの官能基を化学修飾し、分子内におけるそれらの残基の存在状態や、致死活性、ならびに抗原性に及ぼす影響について調べ、それらの結果を I 型神経毒と比較した。また、Toxin B分子中のすべての S-S 結合を還元したのち、再酸化する方法によって、S-S 結合と致死活性との関連についても検討した。さらに、Toxin Bの C 末端構造と致死活性との関係を知るため、penicillium janthine-illum の産生するカルボキシペプチダーゼを用いて、C 末端 4 残基を消化除去した修飾 Toxin を調製し、その活性発現との関係について検討した。つぎに、Toxin B がトリプシンによる限定分解ですみやかに致死活性を消失することが見出されたため、トリプシンによる加水分解部位と致死活性との相関についても検討し、以下の諸点を明らかにした。

(1) Toxin B 分子中に存在する 1 個のトリプトファン残基を 3 種の異なる方法で化学修飾したが、⁶ 修飾 Toxin B はすべてもとの致死活性の 50% 以上を示したことから、トリプトファン残基は致死活性発現に必須のアミノ酸残基ではないと考えられる。また、抗原性の変化も見られなかった。

(2) Toxin B 分子中のチロジン残基のフェノール性水酸基の pKa は 11.0 で正常よりやや高い値を示したが、テトラニトロメタンにより容易に修飾されたことから、露出した状態にあると考えられた。また、ニトロ化 Toxin B の致死活性、抗原性と、もとの Toxin B のそれらとの間には変化は見られなかった。⁷

(3) Toxin B 分子中のすべての遊離カルボキシル基は、グリシンメチルエステルにより容易に修飾され、致死活性は消失した。一方、遊離アミノ基は段階的修飾により、2 番目に修飾されるアミノ基が致死活性発現に必須であることがわかった。^{2,59}

(4) Toxin B の C 末端 4 残基を酵素的に除去した Toxin B (1-67) の致死活性は、もとの Toxin B のその 70% を示した。²

(5) トリプシンによる Toxin B の致死活性の消失は、34-35 位 (Arg-Gly) 間のペ

プチド結合の切断によるものと決定した。

(6) Toxin BのS-S架橋を還元した結果、S-S結合の再生とともに、致死活性はもとのToxin Bの75%にまで回復した²。

(7) Toxin Bと等モル量のジチオエリスリトール(DTE)により、Toxin B分子中の26-30位間のS-S架橋が選択的に還元され、致死活性はもとのToxin Bの15%まで低下した。一方、CobrotoxinのS-S架橋は、5.5倍量(モル比)のDTEによっても還元されなかった。

第1節 トリプトファン残基の修飾

トリプトファン残基は、I型、II型神経毒タンパク質の共通アミノ酸残基の一つである。著者はToxin B中のトリプトファン残基を3種の方法で修飾し、致死活性および抗原性に及ぼす影響を調べ、I型神経毒タンパク質の結果と比較検討した⁶。

1) トリプトファン残基の修飾法

A. オゾン酸化⁶⁰: この方法はオゾンによりトリプトファン残基のインドール核をN-ホルミルキヌレニン残基に変換する修飾法である。Toxin Bのギ酸溶液に8°Cでオゾンガスを通じ、反応開始後1分毎に反応液の一部を取り出し、反応成績体のアミノ酸分析と致死活性の測定を行なった。

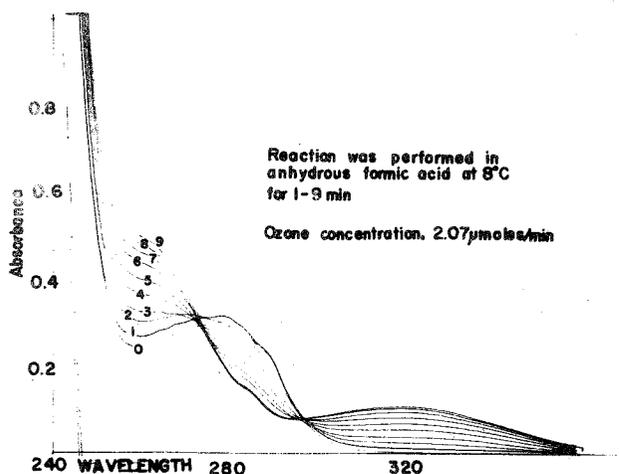


Fig.21. Absorption spectra of ozonized-toxin B.

1分毎の反応成績体の吸収スペクトル(240~360nm)の変化をFig. 21に示した。反応の進行とともに290nm近辺のトリプトファン特有の吸収帯は徐々に減少し、新たにN'-ホルミルキヌレニンに基づく320nmの吸収の増大が観察された。反応開始後8分以降には320nmの吸収の増大がみられなかった(Fig.21)。反応経過中のToxin Bの致死活性と320nmにおける吸光度の変動との関係をFig.22に示した。

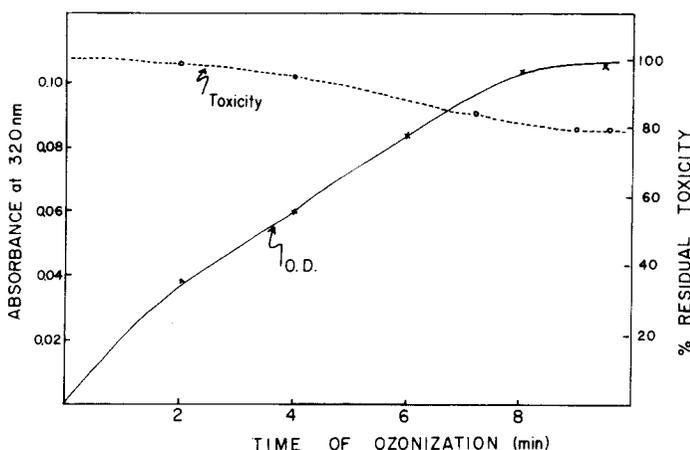


Fig.22. Relationship between the formation of N'-formylkynurenine and the toxicity of Toxin B as a function of time of ozonization.

Table 11. Amino acid composition of Toxin B derivatives

Amino acid	Residues/mole of protein				
	Native toxin B	Ozonized toxin B*	NCPS chloride-treated toxin B	HNB bromide-treated toxin B	Nitrated toxin B
Cysteic acid	-	0.43	-	-	-
Aspartic acid	9	8.95	8.71	8.80	8.60
Threonine	9	8.83	8.32	8.16	8.36
Serine	4	4.06	3.46	3.66	3.90
Glutamic acid	1	1.14	1.20	1.08	1.21
Proline	6	6.05	5.54	5.91	6.13
Glycine	5	4.78	5.13	5.08	4.52
Alanine	2	2.15	1.90	2.23	2.17
Half-cystine	10	8.83	8.35	8.95	8.55
Valine	4	3.31	3.36	3.48	3.32
Methionine	0	0	0	0	0
Isoleucine	4	3.40	3.81	3.91	3.69
Leucine	1	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyrosine	1	1.04**	0.86	0.96	trace
Phenylalanine	3	2.78	2.76	2.86	2.82
Lysine	4	3.84	3.52	3.80	3.74
Histidine	1	0.86	0.91	0.78	0.80
Arginine	6	5.36	5.21	5.10	5.90
Tryptophan	1	-	-	-	+
Kynurenine	-	0.93	-	-	-
NCPS-tryptophan	-	-	1.01***	-	-
HNB-tryptophan	-	-	-	0.95***	-
Nitrated tyrosine	-	-	-	-	0.90

* Sample was treated with ozone for 8 min.

** All values were expressed as molar ratios with a value of 1.0 for leucine as standard.

*** Determined spectrophotometrically.

反応を開始して8分後のToxin Bの致死活性はもとの80%であった。得られた修飾Toxin Bのアミノ酸分析値をTable 11に示したが、Toxin B 1モルに対し、キヌレニン0.93モルの生成が見られたことから、トリプトファンのキヌレニンへの変換は8分間でほぼ完了したと考えられた。

B. 2-ニトロ-4-カルボキシフェニルスルフェニルクロリド(NCPS·Cl)⁶¹による修飾: Hortonらの方法に従い、トリプトファン残基のインドール核の5位に2-ニトロ-4-カルボキシフェニル基を付加する反応である。Toxin Bを30%酢酸に溶かし、NCPS·ClをToxin Bに対して10倍(モル比)過剰に加え、室温で10分間反応させた。修飾されたToxin Bの致死活性はもとのToxin Bの46%を示した。そのアミノ酸分析の結果をTable 11に示した。修飾Toxin B中のNCPS-トリプトファンは波長365nmの吸光度に基づき定量した。

C. 2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジル・ブロミド(HNB·Br)^{52,63}による修飾: Barmanらの方法に従った。Toxin Bを10M尿素溶液中に4時間放置したのち、HNB·Brをモル比で2倍、10倍、50倍過剰量に加え、室温で、1時間反応させた。反応の進行を410nmの吸収の増加により観察した結果、50倍過剰量の試薬と反応させた場合に、Toxin B 1モルに対しHNB-トリプトファン0.95モルの生成が見られた(実験の部参照)。得られた修飾Toxin Bの致死活性はもとのToxin Bの50%を示した。また、アミノ酸分析値(Table 11)から、他のアミノ酸組成には変化がみられなかった。

2) トリプトファン残基を修飾したToxin Bの諸性質

3種の異なる方法によりトリプトファン残基を修飾したToxin Bのアミノ酸分析値をTable 11に示した。Toxin B 1モルからそれぞれキヌレニン、NCPS-トリプトファン、HNB-トリプトファンがほぼ1モル得られたことから、これらの方法でToxin B中のトリプトファン残基はほぼ修飾されたと考えられた。オゾン酸化法で得られたToxin Bの致死活性は、もとのToxin Bよりやや低下していたが、その一因として、Toxin B中の5残基のシスチンの一部がオゾン酸化をうけ、0.43残基のシステイン酸が生成したためと考えられた。また、NCPS·ClやHNB·Brによりトリプトファンをアルキル化して得られたToxin Bの致死活性はもとのToxin Bのそれぞれ46%、50%にまで低下したが、その原因は明らかにできなかった。一方、これら3種の修飾Toxin Bの抗原性をオクタロニー法⁶⁴および定量沈降反応⁶⁵によって検討

した。それらの結果を Fig.23, 24 に示したが、抗 Toxin B 抗体との反応性に変化は見られなかった。

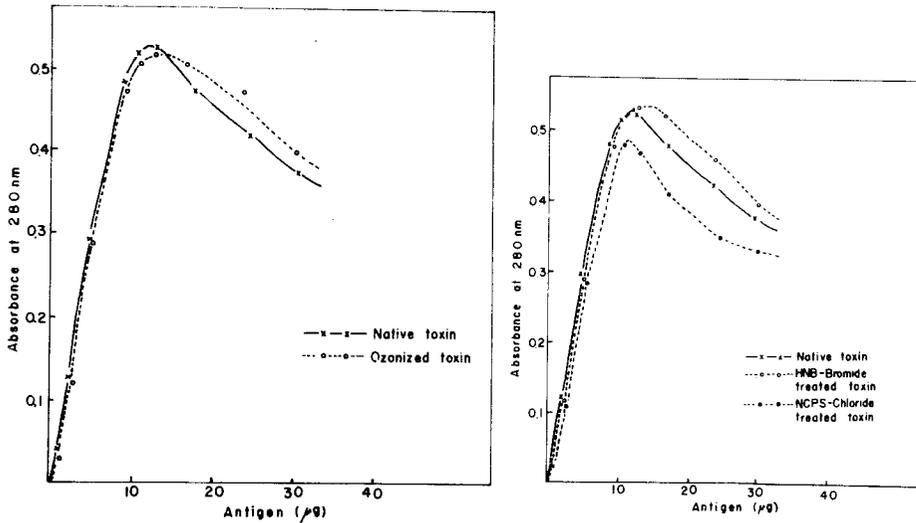


Fig.23. Comparison of the precipitin curves of Toxin B and chemically modified derivatives with anti-Toxin B antibody.

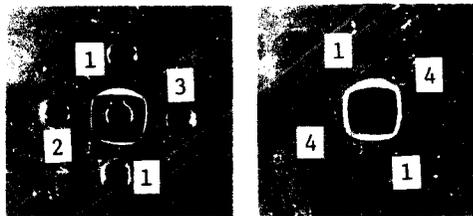


Fig.24. Immunodiffusion in agar gel. Central well: Anti-Toxin B antibody. Surrounding well: (1) Toxin B, (2) Ozonized Toxin B, (3) HNB-Toxin B, (4) NCPS-Toxin B.

第2節 チロジン残基の修飾

Toxin B分子中には21位にチロジン残基があり、トリプトファン残基と同様、神経毒タンパク質の数少ない共通アミノ酸残基である。そこで、この残基の存在状態および致死活性や抗原性発現との関係を調べるため、まずチロジン残基のフェノール性水酸基のpKaを測定した。また、テトラニトロメタン(TNM)によるチロジン残基のニトロ化を行なった⁷。

1) フェノール性水酸基のpKaの測定:

Toxin B中のチロジン残基の水酸基のpKaは、Toxin B溶液のpHを7.5から13まで順次変え、波長245, 295 nmにおける吸光度の変化で測定した。

滴定曲線をFig.25に示した。

その結果、pKaは約11.0

で、通常のチロジン残基

の値よりやや高値を

示した。強固な水素結合

を形成し分子内に埋没さ

れた状態で存在するチロ

ジン残基の水酸基のpKa

は一般に11.5以上の値

を示すことから、埋没型

として存在しているとは

考えられなかった。

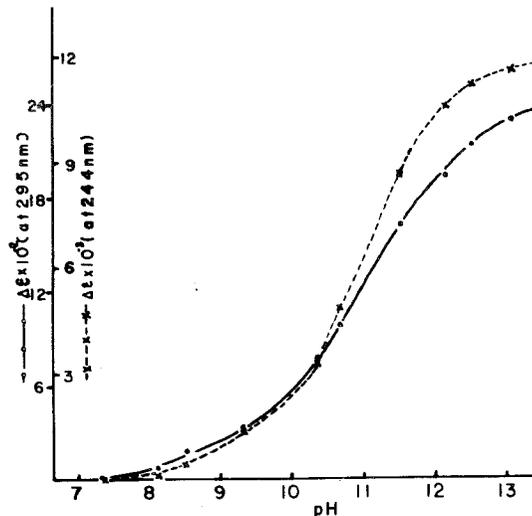


Fig.25. Spectrophotometric titration of the single tyrosine group in Toxin B

2) テトラニトロメタン

(TNM)⁶⁶による修飾:

0.1Mリン酸緩衝液(pH

8.0)中でToxin Bを

過剰のTNMと反応させ、チロジン残基を3-ニトロチロジン残基に修飾した。得

られたニトロ化Toxin Bのアミノ酸分析値をTable 11に示した。この修飾により1

モルのチロジンはほぼ1モルの3-ニトロチロジンに変換され、また、他のアミノ

酸組成には変化が見られなかった。このニトロ化Toxin Bの致死活性は、もとの

Toxin Bのその約80%を示した。また、オクタロニー法および定量沈降反応によ

って抗原性を検討した (Fig.26, 27) が変化はみられなかった。

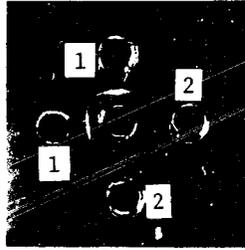


Fig.26. Immunodiffusion in agar gel. Central well : Anti-Toxin B antibody. Surrounding well : (1) Toxin B, (2) Tyr-21 nitrated Toxin B.

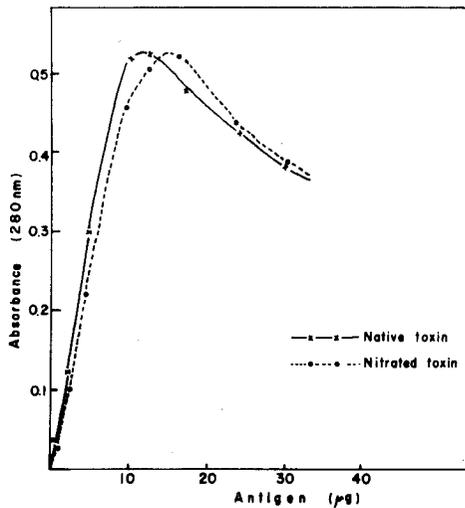


Fig.27. Quantitative precipitin reactions of Toxin B and its nitrated derivative with anti-Toxin B antibody

以上のごとく、Toxin Bの致死活性、抗原性はTNMによるニトロ化によって影響を受けないことがわかったが、これらの結果から、共通残基のチロジンはToxin Bでは致死活性および抗原性発現に必須のアミノ酸残基でないと考えられた。

第3節 その他のアミノ酸残基の修飾

前節で明らかにしたトリプトファン残基、チロジン残基のほか、Toxin B中の遊離のアミノ基やカルボキシル基を種々の試薬を用いて修飾した。また、S-S架橋をβ-メルカプトエタノールで還元した後、中性条件下で再酸化させ、S-S架橋の再生と致死活性との関係について調べた。一方、I型、II型神経毒タンパク質相互の一次構造上の著しい相違の一つがC末端近辺の残基数にあることから、Toxin BのC末端数残基を酸性カルボキシペプチダーゼで消化除去し、致死活性に及ぼす影響について検討した。さらに、Toxin Bがトリプシンによる限定分解ですみやかに致死活性を消失したことから、致死活性発現に必須な部位を知るため、トリプシン消化後におけるToxin B分子の構造変化について検討した。²

- 1) カルボキシル基：Toxin B分子中の遊離カルボキシル基をKoshlandの方法に⁶⁷従い、5Mグアニジン塩酸の非存在下および存在下で、0.2M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩溶液中でグリシンメチルエステルを反応させた。修飾Toxin Bのアミノ酸組成を調べた結果 (Table 12), 両条件下でともにグリシンは修飾Toxin 1モルに対し約12モルとなり、もとのToxin B分子中に存在する5残基に比べ、7残基の増量が認められた。

Table 12. Amino acid composition of carboxy and amino groups - modified Toxin B

Amino acid	Toxin B	Carboxy group - modified Toxin B		Amino group - modified Toxin B	
		- 5 M Guanidine-HCl	+ 5 M Guanidine-HCl	TNBS x 1.2	TNBS x 2.2
Aspartic acid	8.95 (9)	8.45	8.95	8.56	8.48
Threonine	8.74 (9)	8.20	8.42	8.32	8.23
Serine	3.75 (4)	3.14	3.70	3.05	3.21
Glutamic acid	1.30 (1)	1.15	1.30	1.05	1.23
Proline	5.78 (6)	5.67	5.95	5.13	5.61
Glycine	4.70 (5)	11.71	11.80	4.72	4.84
Alanine	1.90 (2)	1.85	2.10	2.18	2.31
Half-cystine	8.24 (10)	7.97	8.75	8.74	8.89
Valine	3.70 (4)	3.38	3.68	3.41	3.33
Methionine	— (0)	—	—	—	—
Isoleucine	4.20 (4)	3.85	4.20	3.68	3.78
Leucine	<u>1.00</u> (1)	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>
Tyrosine	1.16 (1)	0.93	0.93	0.81	0.71
Phenylalanine	2.70 (3)	2.66	2.96	2.83	2.79
Lysine	4.30 (4)	3.83	3.46	2.92	1.83
Histidine	0.79 (1)	0.79	0.85	0.78	0.80
Arginine	5.62 (6)	5.26	5.68	4.94	4.81

The value of leucine underlined was taken as 1.0.
The numbers in parentheses represent the nearest integers.

Toxin Bには遊離カルボキシル基が7個存在しているが、この修飾法により、変性剤の存在の有無にかかわらず、すべての遊離カルボキシル基が修飾されたものと考えられた。これらの修飾 Toxin Bはともに致死活性を消失していたが、抗原性はもとの Toxin Bと比べ変化は見られなかった。

2) アミノ基： Toxin B分子中に存在する遊離アミノ基はフルオレッセンイソチオシアナート (FITC) で修飾した。すなわち、遊離アミノ基に対し4倍 (モル比) 過剰量の FITC⁶⁸を加え、室温で2時間反応を行ない、遊離アミノ基を修飾した FITC-Toxin Bを調製した。得られた修飾 Toxin Bは、致死活性を示さなかったが、抗原性には変化が見られなかった。つぎに、遊離のアミノ基を段階的に修飾するため、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS)⁶⁹を用いて修飾を行なった。0.1 M ほう酸ナトリウム (pH 8.6) 中、TNBSを Toxin B に対しモル比でそれぞれ 1.2, 2.2倍過剰量加え反応させ、生成物を DEAE-セルロースにより分画した。

Fig. 28 に TNBS を 1.2 倍モル用いて反応させた時の生成物のクロマトグラフィーの溶出パターンを示した。最初に溶出される画分は分子当たり1モルのアミノ基が修飾された Toxin B で、次に溶出される画分は2モルのアミノ基が修飾された Toxin B であった。それぞれの条件下で得られた修飾 Toxin B のアミノ酸組成を Table 12 に示した。

1.2 倍量 (モル比) の TNBS を反応させて得た修飾 Toxin B のリジンの残基数は、もとの Toxin B が 4 残基であるのに対して約 1 残基減少した値を示した。また、2.2 倍モル量の TNBS を用いた場合に得られた修飾

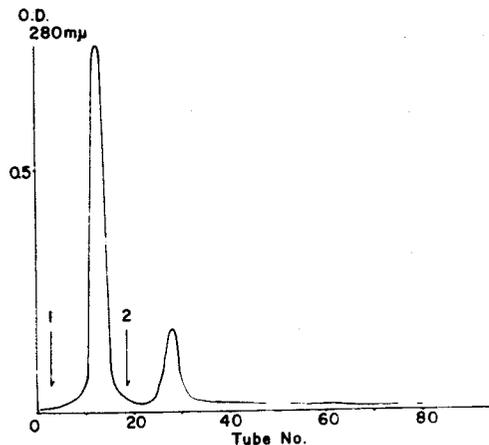


Fig. 28. Chromatography of amino group-modified Toxin B on DEAE-cellulose. TNBS (1.2 molar excess) treated Toxin B was applied to a column (1.6 x 22 cm) of DEAE-cellulose equilibrated with 0.005 M sodium borate buffer, pH 8.6. The column was eluted stepwise with 0.05 M sodium borate buffer, pH 6.6 containing 0.5 M NaCl. Fractions of 4 ml were collected at a flow rate of 50 ml/hr and the eluate was monitored at 280 nm.

Toxin Bのリジン残基数は18モルで、ほぼ2残基の減少が見られた。

修飾Toxin Bの致死活性は、1残基が修飾された場合にはもとのToxin Bの約80%、2残基が修飾されたものでは10%以下に低下していた。これらの結果から、TNBSにより最初に修飾を受けるリジン残基は致死活性の発現に関係ないが、さらに1モルのTNBSにより2番目に修飾されるリジン残基が活性発現に必須と考えられた。

3) Toxin Bの還元再酸化：5 M グアニジン・塩酸中でToxin Bを変性させた後、反応容器中の空気を窒素ガスで置換し、 β -メルカプトエタノールを加え、室温で4時間反応させ、完全にToxin Bを還元した。つぎに、1%酢酸(pH 2.3)で平衡化したSephadex G-25(2.5×50cm)でゲル濾過して還元Toxin B溶液を得た。この溶液に1 M トリス溶液を加えpHを7.09に調整し、ビーカー中に静置した状態で再酸化を開始した。経時的に溶液の一部をとり、Toxin B抗体との反応性および致死活性を測定した。また、タンパク質中のシステイン残基の量は、モノヨード酢酸によりSH基をカルボキシメチル(CM)化してCM-システイン残基とした後、加水分解しアミノ酸分析計により定量した。反応経過中におけるタンパク質中のSH基の減少と致死活性の復元の関係をFig. 29に示した。

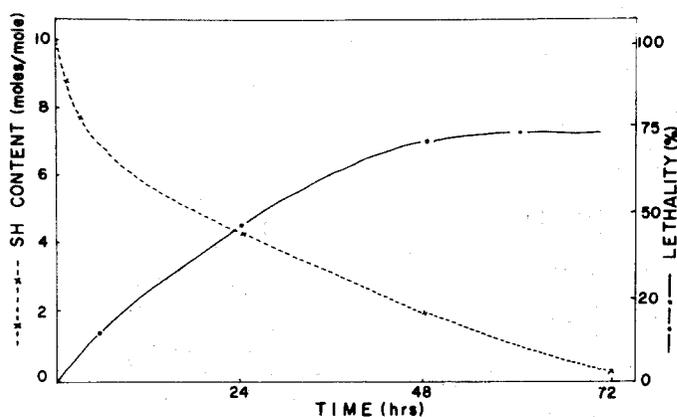


Fig. 29. Restriction of the lethal toxicity and disappearance of free-SH groups on oxidation of reduced Toxin B.

還元Toxin Bは致死活性を全く示さなかった。再酸化開始後8時間までにはほぼ2組、48時間後に4組、72時間後には残る1組の架橋が形成されSH基は消失した。一方、致死活性は24時間後で50%、48時間後には75%まで回復したが、100%までは

回復しなかった。再酸化開始直前および開始後 1 時間, 24 時間再酸化した標品の抗 Toxin B 抗体との定量沈降反応曲線を Fig. 30 に示した。

還元 Toxin B は抗体とは全く沈降物を形成しなかったが, 1 時間後のものではわずかに抗体との反応性が見られ, 24 時間再酸化して得られた標品はもとの Toxin B のほぼ 70% にまで反応性を回復することがわかった。

4) C 末端残基の除去:

Toxin B の C 末端はプロリンで, 市販のカルボキシペプチダーゼ A や B では消去されないことから, C 末端にプロリンをもつペプチドやタンパク質に作用する *Penicillium janthinellum*

の培養濾液より調製した酸性カルボキシペプチダーゼ³⁰を用いて Toxin B の消化を試みた。反応液の一部を用いて経時的に遊離するアミノ酸を測定した結果, 2 時間後に, Toxin B 1 モルに対し, 0.9 モルのプロリン, 1.0 モルのリジン, 2.1 モルのアルギニンの遊離がみられ, 以後消化を継続しても他のアミノ酸の遊離は見られなかった。すなわち, この酵素による消化で C 末 4 残基が消去された Toxin B (1-67) が得られた。Toxin B (1-67) の致死活性はもとの Toxin B の 70% を示したことから, C 末端近傍は致死活性発現に必須のアミノ酸残基ではないと考えられた。また, Toxin B 抗体との反応性についても調べたが, 抗原性の変化も観察されなかった。

5) トリプシンによる限定分解: Toxin B に対し 1/1000 (w/w) 量のトリプシンを加え消化した。経時的に消化物の一部を用いて致死活性を測定した。Fig. 31 に示すように, 消化開始直後から 30 分までに致死活性は急激に低下し, 3 時間でほぼ消失した。そこで, トリプシンにより, Toxin B 分子中のどのペプチド結合が加水分解されたかを調べるため, 45 分間限定分解した消化液にトリプシンの 2 倍量 (w/w)

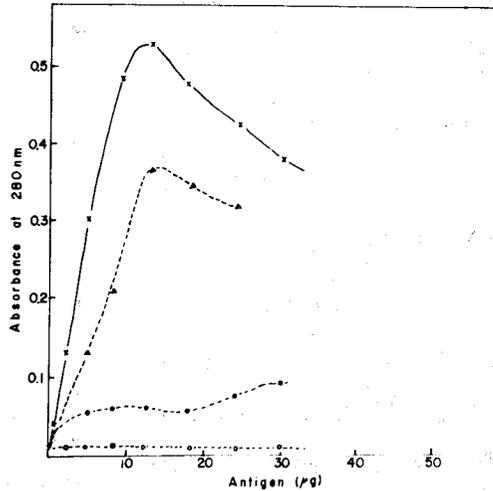


Fig. 30. Quantitative precipitin reactions of reoxidized Toxin B with anti-Toxin B antibody. x---x; Native toxin B, ○---○; Reduced toxin B, ●---●; 1 hr-Reoxidized toxin B, ▲---▲; 24 hr-Reoxidized toxin B.

のトリプシンインヒビターを加えて反応を停止し、消化物を 0.2% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 でゲル濾過した。

その結果, void volume 付近に主要な画分が溶出した以外に, カラム容量近辺に, モル比が 1.0 : 1.1 : 1.0 を示すトリペプチドが得られた。このトリペプチドの構造は Toxin B の構造から Lys-Arg-Pro と考えられた。また, void volume に溶出された画分はアミノ酸組成 (Table 13) から Toxin B の N 末の Ile から 68 位の Arg までのアミノ酸残基からなるペプチドと推定された。一方, 前述の

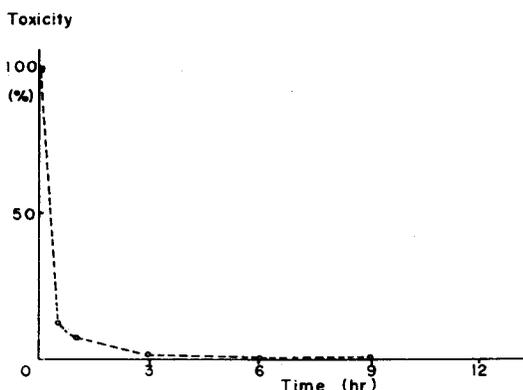


Fig. 31. Decreased lethal toxicity of limited proteolysis of Toxin B with trypsin. Toxin B was dissolved in 1 ml of 0.2 M NH_4HCO_3 , pH 7.8 at a concentration of 10 mg/ml and digested with trypsin (substrate : enzyme = 1000 : 1 (w/w)) at 37°C. Aliquot was assayed for lethal toxicity.

ごとく, Toxin B の C 末端 4 残基が除去された Toxin B (1-67) の致死活性はもとの Toxin B のほぼ 70% であったが, トリプシンによる限定分解によって得られた Toxin B (1-68) のアミノ酸組成をもつ生成物はほとんど致死活性を示さなかった。

Table 13. Amino acid composition of peptides T-1 and T-2.

Amino acid	Toxin B (1-68)	T-1	T-2
CM-cysteine	—	4.78	4.16
Aspartic acid	9.20	4.91	4.70
Threonine	8.71	4.73	3.56
Serine	3.82	1.05	2.63
Glutamic acid	1.31	1.20	0.20
Proline	4.78	3.13	1.43
Glycine	4.25	3.03	1.82
Alanine	1.90	2.02	0.21
Half-cystine	8.24	—	—
Valine	3.75	2.81	0.76
Isoleucine	4.20	1.06	2.96
Leucine	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	0.11
Tyrosine	<u>1.27</u>	—	<u>1.00</u>
Phenylalanine	2.70	1.03	1.52
Lysine	2.68	1.10	1.41
Histidine	0.79	—	0.60
Arginine	4.63	2.79	1.70

Toxin B (1-68) was obtained by gelfiltration of trypsin digest of Toxin B.
The value of amino acid underlined was taken as 1.00.

これらの結果から、トリプシンによる限定分解で得られた成績体は分子内のペプチド結合の一部が加水分解されていることが予想された。そこで、生成物を還元カルボキシメチル化した後、0.2%酢酸で平衡化した Sephadex G-50 (1.6×136cm)によりゲル濾過した。その結果、Fig. 32に示すように2つの画分(T-1, T-2と命名)が得られた。それらのアミノ酸

組成を Table 13 に示した。

T-1はToxin Bの一次構造から考え、34位から68位までの部分ペプチドに相当し、T-2はN末端より33位までの部分ペプチドであった。これらの結果から、トリプシンによるToxin Bの限定分解でその致死活性が著しく低下するのは、33-34位(Arg-Gly)間のペプチド結合が切断されるためであることが明らかとなった。

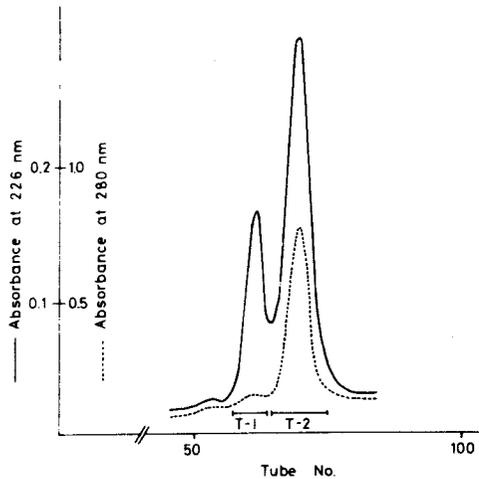


Fig. 32. Chromatography of limited hydrolysate of Toxin B with trypsin on a column of Sephadex G-50. The hydrolysate with trypsin for 45 min treatment was reduced and carboxymethylated, then applied to a column (1.6×136 cm) equilibrated with 0.2% acetic acid. Fractions of 2.8 ml were collected at a flow rate of 30 ml/hr and the eluate was monitored at 280 nm.

第4節 ジチオエリスリトールによるS-S架橋の部分還元

一般にタンパク質分子内のS-S架橋は、タンパク質の高次構造の維持や生物活性の発現に重要な役割を演じている。また、同一分子内のS-S架橋でもその存在状態が異なり、還元剤に対する反応性を異にする例も知られている。⁷⁰⁻⁷³ 例えばパピインの場合には、8M尿素の存在下で1組のS-S架橋のみが還元され、6M塩酸グアニジンの存在下ですべてのS-S架橋が還元される。これらの相違は分子内のS-S架橋の存在状態のちがいによると報告されている。⁷³ また、用いる還元剤の種類により異なった結果が得られる場合もある。メルカプトエタノールやチオグリコール酸、メルカ

プトエタノールアミンのようなメルカプタン誘導体では、通常大過剰量が還元が必要とされているのに対し、ジチオスレイトール(DTT)やその異性体ジチオエリスリトール(DTE)は還元力が強く、これらの還元剤によりタンパク質分子内のS-S架橋は比較的容易に還元される。例えば、生長ホルモンの2組のS-S架橋⁷⁴や、ウシトリプシンインヒビターの1組のみのS-S架橋⁷⁶などは、タンパク質変性剤の非存在下でも容易に還元される。

著者は、一般のタンパク質に比較して、分子内にS-S架橋の含量が高く、さらにこれらの架橋位置も明らかなToxin BおよびCobrotoxin³⁷を用いて、S-S架橋のDTEによる還元と致死活性の相関について、両神経毒タンパク質間に差がみられるか否かを検討した。

Toxin BおよびCobrotoxinを0.2 Mトリス緩衝液(pH8.6)に溶解した後、神経毒1モルに対し、それぞれDTEを1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5モルになるように加え、S-S架橋を還元し、生成するSH基の定量は、モノヨード酢酸と反応させ、カルボキシメチルシステインとしてアミノ酸分析する方法により測定した。

結果をTable 14に示した。

変性剤の非存在下で、Cobrotoxinは全く還元されなかったのに対し、Toxin Bは1.1モルのDTEによってS-S架橋の20%、すなわち、分子内に存在する5組のS-S架橋のうちの1組が還元されたと考えられた。さらに、4.4モルのDTEによって38%、すなわち、ほぼ2組の

Table 14. Reduction of Toxin B and Cobrotoxin with dithioerythritol (DTE)

DTE	Toxin B	Cobrotoxin
1.1 *	20 % **	0
2.2	33 %	0
3.3	34 %	0
4.4	38 %	0
5.5	95 %	trace

* The molar ratio of DTE to neurotoxins.

** The value of SHgroup was determined by the amount of carboxymethyl-cysteine in modified neurotoxins.

S-S架橋が還元され、5.5モルによってほぼすべてのS-S架橋が還元された。DTEを1.1および5.5倍量加えて得られた還元Toxin Bの致死活性は、それぞれもとのToxin Bの15%および2.5%であった。また、1組のS-S架橋が還元されたと考えられるToxin Bは、抗Toxin B抗体との反応性で変化は見られなかったが、全部のS-S架橋が還元されたToxin Bは抗体との反応性を消失していた。一方、Cobrotoxinは5.5モルのDTEで処理しても、S-S架橋は全く還元されず、また、

致死活性にも変化はみられなかった。

つぎに、1.1モルのDTEにより選択的に還元されるToxin B分子中の1組のS-S架橋の位置を明らかにするため、Toxin Bを1.1倍モル量のDTEで還元して得られる生成物のSH基を¹⁴C標識モノヨード酢酸を用いてカルボキシメチル化した。得られた¹⁴C標識Toxin B中の残りのS-S架橋を常法に従い5M塩酸グアニジン存在下にβ-メルカプトエタノールにより還元後、カルボキシメチル化した。得られた成績体をトリプシン消化したのち、消化物を0.2%酢酸で平衡化したSephadex G-25(1.5×165cm)で分画した。その結果、カラム容量よりもおくれで溶出される画分に¹⁴Cの放射活性のほぼ90%が溶出された。この画分のアミノ酸組成は、CM-Cys 1.9 2, Asp 1.15, Thr 1.00, Ser 1.74, Gly 1.15, Arg 1.00であり、また、エールリッヒ反応が陽性であったことから、Toxin Bの24-33位の部分ペプチドであることがわかった。これらの結果から、1モルのDTEで選択的に還元されるToxin B分子中の1組のS-S架橋は26-30位間で形成されたものであることが明らかとなった。このS-S架橋の還元により致死活性がもとのToxin Bの15%まで低下した事から、このS-S架橋は活性発現に重要な役割を演じていると考えられた。

第5節 考察ならびに総括

第1節から第4節までで述べたII型神経毒のToxin Bの化学修飾の実験から得られた結果と、すでに報告されているI型神経毒のCobrotoxinに関する結果の比較から、致死活性に関与するアミノ酸残基には著しい相違(Table 15)があることが明らかとなった。^{78,79}

Amino Acid Residues	Methods	Toxin B (Type II)		Cobrotoxin (Type I)	
		Lethality	Antigenicity	Lethality	Antigenicity
Tyrosine residue	TNM(Tetranitromethane) +5M Guanidine·HCl	80%	+ (Tyr-21)	100%	+ (Tyr-35)
Tryptophan residue	Ozone HNB·Br(2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromide) NCPS·Cl(2-Nitro-4-carboxyphenylsulfenyl chloride)	80% 50% 46%	+ (Trp-25) + +	0% 0% 0%	- (Tyr-25, Tyr-35) - (Trp-29) -
Free-carboxyl groups	EDC+Methylglycinate·HCl +5M Guanidine·HCl	0%	+	100%	+ N.D. (Glu-21)
Free-amino groups	Fluor(Fluorescein Isothiocyanate) TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonate)	0%	+	0%	-
Reduction of S-S linkages	1:1	80%	+	100%	+ (Lys-27)
	1:2	10%	N.D.	0%	- (Lys-27, Lys-47)
	β-Mercaptoethanol Reoxidation DTE(Dithioerythritol)	0% 75% 15%	- + N.D. (Cys ²⁶ , Cys ³⁰)	- 3% 90%	- - +
Enzyme digestion	1:6	2%	-	100%	+
	Trypsin (1:1000, E:S) Acid carboxypeptidase	0% 70%	- (Arg ²² , Gly ²⁴) + (Arg ⁶⁸ -Lys-Arg ⁷¹ -Pfo)	100% 100%	+ +

N.D. Not detect

Table 15. Results of chemical modifications in Toxin B and Cobrotoxin.

第1節で述べたごとく、Toxin Bは分子内のトリプトファン残基をオゾン酸化しても致死活性に大きな変化を示さなかった。また、NCPS・ClやHNB・Brによりトリプトファン残基をアルキル化した修飾Toxin BはもとのToxin Bのほぼ50%の致死活性を保持していた。この毒性低下の一因としては、NCPS・ClやHNB・Brによる修飾の場合には、トリプトファン残基のインドール核に大きな疎水基が導入されるため、もとのToxin Bでは分子の表面に露出して存在していると考えられるトリプトファン残基が分子内に埋もれた状態に変化するためと推定された。一方、Cobrotoxin⁸⁰⁻⁸³やウミヘビ神経毒などのI型神経毒は、オゾン酸化やHNB・Brによるトリプトファン残基の化学修飾で、致死活性はもとの神経毒の数%にまで低下することから、活性発現に不可欠な残基と考えられており、Toxin Bの結果とは著しく異なっている。

第2節のチロジン残基に関する化学修飾の結果もトリプトファンの場合と同様に、I型神経毒とは異なっていた。CobrotoxinはN末より25位と35位に2個のチロジン残基をもち、TNMにより修飾すると、35位のチロジン残基のみがニトロ化されるが、致死活性、抗原性ともに変化しない。しかし、すべての神経毒タンパク質に共通な位置に存在する25位のチロジン残基は、6M尿素の存在下でもニトロ化を受けず、5M塩酸グアニジンの存在下ではじめてニトロ化され、致死活性、抗原性ともに消失する。⁸⁴この25位のチロジン残基のフェノール性水酸基は異常に高いpKa値を示すことから、分子の内部に埋蔵された状態か、または分子内のカルボキシル基やアミノ基などと強く水素結合している事が推定されている。⁸⁴これに対し、Toxin B中の21位にある共通残基のチロジンのフェノール性水酸基は、正常よりやや高いpKa値を示したものの、変性剤の非存在下で容易にニトロ化された。また、ニトロ化Toxin Bは致死活性、抗原性ともに、もとのToxin Bのそれらと変わらなかったことから、チロジン残基は致死活性および抗原性発現に必須でないと結論した。また、チロジン残基の水酸基が弱く水素結合していることはラマンスペクトルによっても推定された(第2章第2節)。

以上のように、Toxin BとCobrotoxinのトリプトファンやチロジン残基の化学修飾で見られた両神経毒間での著しい相異は、II型神経毒のToxin Bでは、これらの残基が位置する近傍に、I型神経毒のCobrotoxinに存在しない1組のS-S架橋(26-30位間)が存在しているためと推定された。

また、Toxin Bの遊離のカルボキシル基をすべて修飾すると致死活性が消失したこ

とから、Cobrotoxinと同様に、Toxin B中のカルボキシル基は致死活性の発現に必須であることが明らかとなった。しかし、カルボキシル基の存在状態には両者の間に差がみられた。Cobrotoxinは変性剤の非存在下でKoshlandの試薬によって、7個のうち6個の遊離カルボキシル基が修飾されるが、残る1個は変性剤の存在下ではじめて修飾され、致死活性も消失する。^{85,86}このように、Cobrotoxinは、変性剤の存在下でのみ修飾される1個の埋蔵型カルボキシル基が存在し、この残基が活性発現に関与していることが知られている。しかし、Toxin BにはCobrotoxinで見られる埋蔵型カルボキシル基が存在しないことが明らかとなった。

一方、Toxin Bの遊離アミノ基の化学修飾では、Cobrotoxinと類似した結果が得られた。⁸⁶すなわち、Toxin B 1モルを1.2モルのTNBSで処理すると、リジン1モルが修飾されるが、致死活性、抗原性はほとんど変化しなかった。しかし、2.2モルのTNBSで処理すると、リジン2モルが修飾され、致死活性は10%まで低下した。Cobrotoxinの場合も、1モルのTNBSで共通残基の27位のリジンのε-アミノ基が修飾されるが、致死活性は変化しない。しかし、2モルのTNBSにより、27位のリジンに加え47位のリジン残基が特異的に修飾され、致死活性、抗原性はともに消失する。以上のごとく、カルボキシル基やアミノ基のような電荷を有するアミノ酸残基が致死活性発現に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

生理活性をもつタンパク質の中にはその機能や高次構造の維持にC末端付近のアミノ酸残基が重要な役割を演じているものが多い。例えば、ウシ脾臓RNase Aでは、C末端アミノ酸2残基の除去によりその酵素活性が天然の50%、さらに2残基を除去すると0.5%にまで低下し、C末端数残基の重要性が報告されている。⁸⁷⁻⁹¹Ⅱ型神経毒のToxin BはⅠ型神経毒にくらべC末端が数残基長い。そこで、Toxin BのC末端数残基の致死活性発現への役割を調べるため、penicillium janthinellumの産生する酸性カルボキシペプチダーゼを用いてToxin Bを消化した。その結果、C末端4残基のみが順次遊離され、他のアミノ酸の遊離は見られなかった。得られたToxin B(1-67)の致死活性はToxin Bの70%を示し、抗原性にも変化は見られなかった。これらの結果から、Toxin BのC末端4残基は活性発現に必須でないと考えられる。Karlsson⁹²らもNa.ja.na.ja.Siamensis毒から得た神経毒タンパクで同様の実験結果を報告している。

一般にタンパク質のS-S架橋は還元剤の種類や分子中での存在状態により還元

され方が異なっている。著者はⅠ型神経毒のCobrotoxinとⅡ型神経毒のToxin BのS-S架橋の還元をDTEを用いて行なったが、両者の間で著しく異なった結果が得られた。すなわち、Toxin Bを等モルのDTEで還元すると、26-30位のシステイン残基間のS-S架橋が最初に還元されたが、このような結果はおそらくこのS-S架橋が神経毒タンパク質の分子の表面に露出しており、還元を受けやすい状態で存在しているためと考えられた。さらにDTEをToxin Bの5.5倍まで増すことにより分子中のすべてのS-S架橋は完全に還元された。一方、Cobrotoxinは過剰のDTEによっても還元されなかった。以上の結果は、Ⅰ型とⅡ型神経毒ではそれらの高次構造が異なっていることを示唆している。

また、両神経毒の高次構造のちがいは、トリプシンに対する感受性、すなわち、Toxin B分子は1/1000量(w/w)のキモトリプシンにより限定消化しても致死活性に変化は見られなかったが、トリプシン消化では30分以内に致死活性が著しく低下した。一方、Cobrotoxinではキモトリプシン、トリプシン消化によって致死活性の低下は見られなかった。

実験の部

トリプトファン残基の化学修飾

i) オゾン酸化⁶⁰ : Toxin B (2.5 μ mole) を無水ギ酸 (2ml) に溶解し, 8°C でオゾン発生装置からのオゾンガス (流量, 2.07 μ mole/min) を導入して反応を行ない, 1分毎に反応液の一部 (0.1ml) をとり, 水 (3ml) を加えた後, 240 nm から 360 nm までの吸収スペクトル (Fig. 21) を測定する方法で反応の進行状況を追跡した。さらに 1分毎の反応液を用いて, 致死活性, 抗原性, アミノ酸組成を調べた。オゾン酸化によりトリプトファン残基から生成する N¹-ホルミルキヌレニンはキヌレニンとしてアミノ酸分析計で定量した。

ii) 2-ニトロ-4-カルボキシフェニルсульフェニルクロライド (NCPS·Cl) による修飾⁶¹ : Toxin B (2 μ mole) を 30% 酢酸 (2ml) に溶解し, これに過剰量の NCPS·Cl (20 μ mole) を酢酸 (1ml) に溶解した溶液を滴加し, 室温で 10 分間反応させた。反応終了後, たちちに 0.18 M 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (2.5 \times 30cm) を用いて脱塩後, 凍結乾燥した。NCPS-Trp の定量は 365 nm における分子吸光係数 4.000 を用いて算出した。

iii) 2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロマイド (HNB·Br) による修飾⁶² : Toxin B (2 μ mole) を塩酸で pH 2.7 に調整した 10 M 尿酸溶液 (1ml) に溶解し, 37°C で一夜放置後, アセトン (0.2ml) に溶解した HNB·Br を Toxin B に対し 2, 10, 50 倍量 (モル比) を攪拌しながら滴下し反応を行った。滴下終了後, 反応を完結させるため, さらに室温で 1 時間攪拌をつづけた後, 1% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (2.0 \times 50cm) で脱塩した。HNB-Trp は 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 2.7) に溶解し, 410 nm における分子吸光係数 18,900 を用いて定量した。2, 10, 50 倍量 (モル比) の HNB·Br を用いて修飾して得られた Toxin B 中のトリプトファン残基の HNB 化トリプトファン残基の生成量は, それぞれ Toxin B 1 モル当り, 0.11, 0.68, 0.95 モルと算出された。

チロジン残基の化学修飾

i) テトラニトロメタン (TNM) による修飾⁶⁶ : Toxin B (1.5 μ mole) を 3ml の 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 8.0) に溶解し, 10 倍量 (モル比) の TNM を加えて 20°C, 4 時間反応させた。生成した修飾 Toxin B は, 反応終了後, 1% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (2.0 \times 50cm) で脱塩後, 凍結乾燥標品とした。3-ニトロチロジン

はアミノ酸分析計により定量した。

ii) チロジン残基中の水酸基の滴定：Toxin Bを0.1M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し(0.18^{mg/ml})、20°Cで日立124型分光光度計で測定した。対照セルに0.01Mリン酸緩衝液を入れ、試料用セルには上記の試料溶液を入れ、NaOH溶液を加え、順次pHを13まで変化させ、240 nmから320 nmまでの吸収スペクトルを測定した。pHを横軸にとり244および295 nmの吸光度を縦軸にとり、滴定曲線を作成した(Fig. 25)。

カルボキシル基の修飾⁶⁷

Toxin B(1.5 μ mole)を2 mlの1Mグリシンメチルエステル塩酸塩水溶液に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸(EDC·HCl)(167^{mg})を加え、反応液のpHを0.1M HClで4.75に保ちながら、室温で3時間放置する。反応終了後、生成物は1%酢酸で平衡化したSephadex G-25(2.0 \times 50 cm)で脱塩後、凍結乾燥した。変性条件下での修飾はToxin B(1.5 μ mole)を1 mlの2Mグリシンメチルエステル塩酸塩水溶液にとかし、これに5Mになるように塩酸グアニジン(1 g)を加えた後、さらにEDC·HCl(172^{mg})を加えて反応を行った。EDC·HClはD. E. Koshland博士(アメリカ)から供与をうけた。

アミノ基の化学修飾

i) フルオレッセンイソチオシアナート(FITC)による修飾⁶⁸：Toxin B(1.5 μ mole)を0.1M NaClを含む0.05M炭酸ナトリウム、pH9.0(1 ml)に溶解し、これに10倍量(モル比)のFITCのアセトン溶液をゆっくり加え、4°C、4時間攪拌しながら反応を行った。FITC-Toxin Bは反応液をBiogel P-2で脱塩した後、凍結乾燥粉末として分離した。

ii) トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)による修飾⁶⁹：Toxin B(1.5 μ mole)を3 mlの0.2Mホウ酸ナトリウム(pH8.6)にとかし、これにモル比で1.2倍量のTNBSを加え、25°C、2時間反応させ、反応生成物はDEAE-セルロース(1.6 \times 22 cm)カラムを用いて精製した(Fig. 28)。TNP化の程度は分離精製したTNP-Toxin Bを常法に従いアミノ酸分析し、リジン量の低下により測定した。

また、Toxin Bを22倍モルのTNBSで修飾する反応も上記と同様の方法で行なった。抗Toxin B抗体の調製

Toxin B溶液と等容量の完全フロイドアジュバント(FCA)を混合して、オスの

ウサギの下肢および背部に皮下注射した。抗原が強力な致死活性をもつため、抗原量は $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ から始め、一週毎に倍量に増量し、7週目以降は $500 \mu\text{g}/\text{Kg}$ を約3ヶ月続けて注射した。最終免疫より10日目に血清を採取した。定量沈降反応、オクタロニー法に使用した抗Toxin B抗体は、50%飽和硫酸沈殿法により亜分画したグロブリン画分を用いた。

オクタロニー法⁶⁴

1% Agar noble (Difco) 生食液に0.01%窒化ナトリウムを加え、煮沸溶解したのち、シャーレに注入し、厚さ2mmの寒天ゲルを調製した。直径3mmの穴に抗体 $10 \mu\text{l}$ 、抗原 $10 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を注入し、 37°C の湿箱中、一晚拡散させたのち、沈降線を観察した。

定量沈降反応⁶⁵

抗Toxin B抗体はPBSで3倍に希釈した液 ($50 \mu\text{l}$) を用いた。抗原は各修飾タンパク質のそれぞれ12.5, 25, 50, 100, 125, 160, 240, $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む溶液 $100 \mu\text{l}$ を用いた。 4°C で、一晚反応させた後、生じた沈殿を $3,000 \text{ rpm}$ 10分間遠心して採取し、この沈殿をPBS (2 ml) で2回洗浄した。タンパク量は沈殿を1%炭酸ナトリウム (1 ml) に溶解し、280nmの吸光度を測定する方法に従った。Toxin Bとの定量沈降反応や上清試験により、用いた抗体量での当量域は抗原量 $10\text{--}12.5 \mu\text{g}$ の範囲であることがわかった。

酸性カルボキシペプチダーゼによる消化

Toxin B ($1 \mu \text{mole}$) を 0.8 ml の 0.05 M 酢酸ナトリウム ($\text{pH} 6.3$) にとかし、これに *Penicillium janthinellum* 培養濾液より得た酸性Cpase³⁰懸濁液 ($10 \mu\text{l}$) を加え、 37°C 、3時間消化した。消化物を0.2%酢酸で平衡化したSephadex G-50 ($1.0 \times 142 \text{ cm}$) のカラムに通し、カラム容量近辺の溶出液を濃縮してアミノ酸分析した。その結果、遊離アミノ酸としてプロリン、リジン、アルギニンが $1.0:1.05:2.13$ のモル比で検出された。用いた酵素は東京農大、一島英治博士より供与を受けた。

還元再酸化

Toxin B: Toxin B ($2 \mu \text{mole}$) を 5 M 塩酸グアニジン (2 ml) に溶解させ、 β -メルカプトエタノール ($50 \mu\text{l}$) を加え、 1 M NaOH で pH を 8.1 に調製したのち、窒素ガスで容器の空気を置換し、室温で4時間還元した。この溶液を1%酢酸で平衡

化した Sephadex G-25 (2.0×50cm) で脱塩し、280 nm に吸収を示す画分を還元 Toxin B として集めた。この溶液 (400 μg/ml) をビーカーに移し、1 M トリス溶液を加えて pH を 7.1 に調整して空気酸化した。酸化開始後、それぞれ 1, 3, 6, 24, 48, 60, 72 時間後に反応液の一部を採取し、致死活性と SH 基の定量を行った。SH 基の測定は反応液にモノヨード酢酸 (10 mg) を加え、SH 基をカルボキシメチル化し、生成物中のカルボキシメチルシステイン残基数をアミノ酸分析により算出する方法に従った。

Toxin B および Cobrotoxin のジチオエリスリトール (DTE) による部分還元：

Toxin B (0.5 μmole) および Cobrotoxin (1 μmole) をそれぞれ EDTA (1 mg/ml) を含む 1 ml の 0.2 M トリス緩衝液 (pH 8.6) に溶解した後、DTE をそれぞれ 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 μmole 加え、0°C, 90 分間反応させた。つぎに、すべての SH 基の 10% 過剰量のモノヨード酢酸を加えて、室温、暗所で 1 時間カルボキシメチル化した。反応液を 1% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (2.0×50cm) で脱塩し、凍結乾燥後アミノ酸分析した。

Toxin B の 1.1 倍過剰の DTE で還元される S-S 架橋の開裂位置を決定するのに必要なペプチドの分離：

Toxin B を 1.1 倍モルの DTE で処理した反応液に 1 μCi のモノヨード酢酸 ($1-^{14}\text{C}$) (比活性 5.2 mCi/mM, New England Nuclear) を含むモノヨード酢酸を加えてアルキル化した。反応液を脱塩後、それぞれ 600 ml の 0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) と 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いて CM-セルロースカラム (1.7×25cm) により濃度勾配溶出法により精製した。得られた部分 ^{14}C 標識カルボキシメチル化 Toxin B をさらに常法に従って RCM 化した後、トリプシン (基質：酵素 = 50 : 1 (w/w)) で消化した。ついで生成したペプチドは 0.2% 酢酸で平衡化した Sephadex G-15 (1.5×165cm) のカラムにかけ、226, 280 nm の吸光度と放射活性を測定することによって ^{14}C 標識ペプチドを分画した。

放射活性の測定

試料の一部 (50 μl) を Madson⁹⁴ の方法によりシンチレーション混合液 (トルエン：トリトン X-100 = 2 : 1 の溶液に 2,5-ジフェニルオキサゾール (DPO) を 0.4% (w/v) に加えて調製) に溶かし、Beckman 社製液体シンチレーションカウンター Model LS-100 で測定した。

第 4 章 コブラ科ヘビ神経毒を用いる重症筋無力症患者血中の抗アセチルコリンレセプター抗体の検出

コブラ毒中の I 型, II 型神経毒は終板の神経筋接合部の後シナプス膜上のアセチルコリンレセプター (AChR) にほとんど不可逆的に結合することより神経筋接合部での刺激伝達作用を遮断することが明らかにされている⁹⁵。最近, この性質を利用したヘビ神経毒のアフィニティークロマトグラフィーによってシビレエイ (Torpedo California) や電気ウナギ (Electrophorus) の発電器官をはじめとして種々の組織から AChR を分離精製する研究が盛んに行なわれている⁹⁶。一方, 1973 年, らは⁹⁷電気ウナギから精製した AChR で家兔を免疫することによりヒトの重症筋無力症 (Myasthenia gravis, MG) と類似した実験的自己免疫性重症筋無力症 (Experimental Autoimmune MG, EAMG) の動物モデルが作製できることを見出した。これらの知見は MG の病因を解明する糸口となりつつある。

MG は臨床的には反復運動に際し急速な筋力低下, 易疲労ないし脱力状態をきたす疾患で, 発症時に眼瞼下垂や複視が出現することが多い。本症は電気生理学的に肋間筋における微小終板電位 (mepp) の振幅が大幅に減少していることや⁹⁸, 生化学的に生検筋中の AChR 量が正常筋に比して著明に減少していることなどが明らかにされている⁹⁹。さらに, 1974 年, Appel¹⁰⁰⁻¹⁰²らは AChR と神経毒との特異的な結合が MG 患者の血清によって阻害されることを報告した。これらの知見から, MG 患者血中に抗 AChR 抗体の存在が考えられるようになるとともに, 抗 AChR 抗体のもつ臨床的意義が注目されるようになった。

一方, MG 患者の 80% 以上に胸腺異常 (胸腺過形成, 胸腺腫) が合併して見られることや, 胸腺の摘出により臨床症状が改善することなどから胸腺異常と本症との関連も注目されている。

現在, MG の診断法として優れた方法は見出されていない。そこで, 著者は MG 患者血清中の抗 AChR 抗体の検索が MG の診断や病態の解明にも役立つものと考え, 抗 AChR 抗体の定量法を検討し, 二種の測定法を確立した⁸。これらの測定法を用いて得た結果と, MG の臨床像との相関から, 抗 AChR 抗体のもつ病因論的意義を胸腺異常を含めて考察し, 以下の諸点を明らかにした。^{9, 12-14, 103-107}

(1) 抗 AChR 抗体の定量を目的として, 2 種の測定法 (コンカナバリン A セファロ

ース法 (Con A法), 抗ヒト Ig G法) を確立した。これらの測定法により, MG患者血中に70%以上の頻度で抗AChR抗体が存在することが明らかとなった。

(2) 新生児MG患者血清を抗ヒト Ig G法により測定した結果, 抗体価と臨床像との間には相関性が認められた。

(3) 胸腺摘出術を行ったMG患者血中の抗体価を経時的に測定した結果, 抗体価と臨床像との間に高い相関性が見られた。

(4) 子ウシ胸腺中に, MG患者血中の抗AChR抗体と免疫学的に交叉反応性を示すニコチン作動性AChR様タンパク質が存在することがわかった。

(5) MG患者から摘出した胸腺組織の抽出物中に, 血清の抗AChR抗体量と比較して高濃度の抗体が存在することが明らかとなった。

第1節 重症筋無力症患者血中の抗アセチルコリンレセプター抗体の測定法

1974年, Almon¹⁰⁰らは, MG患者の血清中にラット除神経筋から調製したニコチン作動性AChRとアマガサヘビ神経毒の α -Bungarotoxin (α -BuTX)¹⁰⁸の結合を阻害する因子が存在することを報告した。その後, この阻害因子が γ -グロブリン画分に含まれることや, 分離精製したAChRを抗原としてウサギを免疫すると, MG様の症状を呈することから, MG患者の血清中の阻害因子は抗AChR抗体であることが明らかとなるとともに, α -BuTXを活用したこの抗体の測定法もいくつか報告されている。しかし, その検出率は33% (15例中5例) と低く, 用いる血清も1mlと多量であることから, よりすぐれた測定法の開発が望まれていた。

そこで, 前記の方法で分離し, 構造を明らかにしたインドコブラ神経毒Toxin Bが構造的にも薬理的にも α -BuTXと酷似していたため,⁹⁵ Toxin Bを用いて, 抗AChR抗体の定量法を検討した。^{8,9,12-14}

1) Toxin BとAChRとの複合体の性質¹²

複合体の形成に及ぼす温度と時間の影響: ¹²⁵I-Toxin B (0.2 pmole) とAChR (70 μ g タンパク量) との結合反応を種々の条件下で行ない, 生成する複合体の量を測定し, Fig. 33に示す結果を得た。37°C, 1時間の反応で複合体の生成は直線的に増加の傾向を示し, 約4時間で飽和に達した。以後15時間まで結合量はほぼ一定であった。そこで, ¹²⁵I-Toxin BとAChRの反応時間は37°C, 4時間とした。

Toxin B と AChR の特異性 :

125 I - Toxin B (0.2 pmole) と AChR との結合反応を ACh の拮抗剤の d-ツボクラリン (1mM) を含む血清の存在下で 37°C, 5時間行ない, 複合体の生成量を後述の Con A 法で定量した。結果を Fig. 34 に示す。

11 例の正常血清 (100 μ l) の存在下で形成される複合体の生成量を平均して 100% とすると, 1mM の d-ツボクラリンの存在下では 8.3% に, また, 125 I - Toxin B の 300 倍量の非標識 Toxin B の存在下では 8.4% に低下した。このことは, AChR と 125 I - Toxin B との結合が特異的であることを示している。一方, 18 例の MG 患者血清 (100 μ l) の存在下では複合体の平均生成量は正常血清の場合の 78.2% に低下した。これらの結果は Almon の報告のように, MG 患者血清中には 125 I - Toxin B と AChR の結合を阻害する因子が存在することを示している。

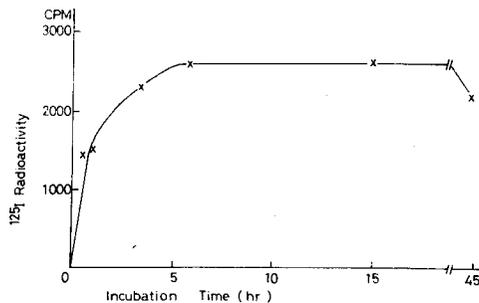


Fig. 33. Time course of 125 I-Toxin B binding to the acetylcholine receptors from denervated rat skeletal muscle. Acetylcholine receptors (15 fmoles) were incubated with 125 I-Toxin B (200 fmoles) for various times. The incubation mixture was applied to a column of Concanavalin A Sepharose and the radioactivity remaining in the column was measured by a gamma counter.

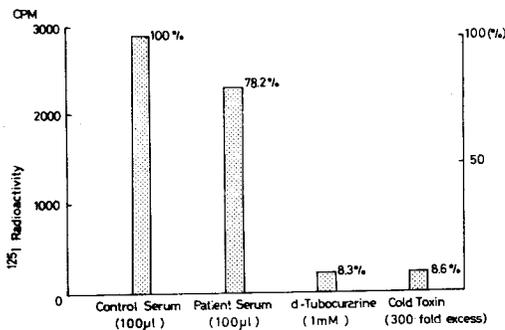


Fig. 34. The specific binding of 125 I-Toxin B to acetylcholine receptors. Acetylcholine receptors were preincubated with control serum (100 μ l), d-tubocurarine (1 mM), 300-fold excess of cold Toxin B or patient serum (100 μ l) for 16 hr at 4°C. At the end of this period, 125 I-Toxin B was added to the mixture and incubated for 5 hr at 37°C. The radioactivity remaining on the Concanavalin A Sepharose column was counted.

112) 抗AChR抗体の測定法の原理

Con A法 : AChR と血清を 4°C で一夜放置したのちに, 反応液に 125 I - Toxin B を加え, さらに 37°C で 4 時間放置する。ついで, この反応液を Con A - Sepharose のカラムに通す。正常血清を用いた時にカラムに吸着する放射活性を 100% とする。

AChRは糖タンパク質であり、MG患者血清中にAChR分子を認識した抗体が存在すると、この抗体とAChRとの結合によりCon Aへの 125 I-Toxin B・AChR複合体の結合は阻害されることが考えられるが、その阻害はCon Aカラム中の放射活性の低下となってあらわれる。すなわち、Con AカラムへのAChR・ 125 I-Toxin B複合体の結合能の減少の程度から血清中の抗AChR抗体量を測定する方法である。

抗ヒトIgG法：抗ヒトIgG法は、AChRを血清と4°Cで一晩放置したのちに、 125 I-Toxin Bと37°C、4時間反応させる。血清中のAChRと 125 I-Toxin Bとの結合反応を阻害しない抗AChR抗体は、 125 I-Toxin B・AChR・抗AChR抗体複合体を形成する。この複合物をヒトIgGに対するウサギ血清を加えて沈殿させ、沈殿物中の放射活性から、抗AChR抗体を定量する方法である。抗AChR抗体量は、便宜的に単位AChR量に結合した 125 I-Toxin Bのモル数として算出した。
10, 107

3) 上記二法によるMG患者血清中の抗AChR抗体の測定結果

Con A法：成人型MG 70例についてのCon A法による結果をFig.35に示した。

正常対照 30 例の平均値を

100%とすると、平均値 ± 2SD (標準偏差は 3.0%) は 100 ± 6% (図中破線内が正常域を示す) となった。そこで、94%以下の結合率を示した時の血清を陽性と判定した。その結果、MG 70 例中 52 例が平均値 - 2SD 以下の結合を示し、それらの平均結合率は 84.2% であった。Osserman 分類による

MGの病型と平均結合率を比較すると最も軽症とされている眼筋型のI型(6例)が87.6%，全身型のIIA(42例)86.1%，IIB(17例)73.7%，III(5例)81.2%となり、最も軽症群のI型の平均結合率が全身型よりやや高く、正常値に最も近かった。IIA群は著明な結合率の減少を示す例から正常値を示す例までかなり広範囲に分布する傾向を示し、陽性率は42例中26例(62%)と全身型MGの中で最も低かった。

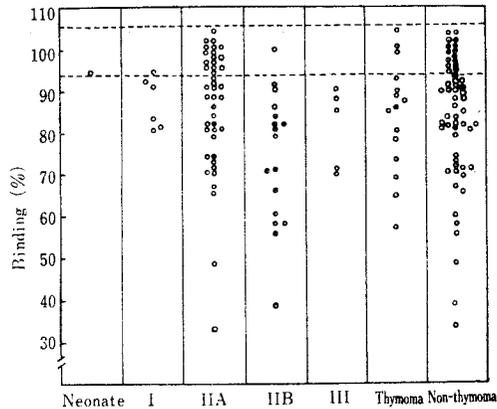


Fig.35. Anti-acetylcholine receptor factors were determined by Concanavalin A Sepharose assay in myasthenic sera.

一方, II B, III型の陽性率はそれぞれ94%, 100%と極めて高い陽性率を示した。次にMG群を胸腺腫群(15例)と非胸腺腫群(胸腺過形成)(55例)に分類して比較したが, 平均結合率および陽性率に有意な差は認められなかった。

^{10, 107}
抗ヒトIgG法

MG 132例をOsserman分類に従って分類した時の結果をFig. 36に示した。

正常対照70例の血中抗

AChR抗体の平均力価+

2SDが 0.48 ± 0.32 pmole

/mlであったため, 0.8 pmole

/mlを正常上限値とした

(図中破線)。また, MG群

のうち完全寛解例, 新生児

MG, 小児型(若年発症型)

MGは別に分類した(Fig.

36)。

完全寛解8例のうち1例を除

き, 抗AChR抗体は正常値に近い値を示した。小児型MG(18例)の平均値は 0.70

pmole/mlとなり, 4例(陽性率22%)のみが陽性を示した。Osserman分類で眼

筋のみの障害が見られるI型(11例)の平均値は 0.98 pmole/mlで, うち4例(36%)

が陽性を示したものの, 正常上限値をややこえる程度であった。全身型MGのII A

(47例), II B(37例), III(10例)の平均値はそれぞれ $5.82, 7.93, 10.09$

pmole/mlと臨床的障害度がますますつれて高値を示す傾向が見られるとともに, 陽性率

も高く, それぞれ87%, 92%, 90%であった。つぎに, MGを非胸腺腫群, 胸腺腫

群に分別して比較したが, その平均値に有意な差は認められなかった。しかし, 胸腺

腫群(28例)全例が陽性を示した。

MG患者の臨床像はかなり変動することから, 著者はMGの病型の新しい分類を試みた。すなわち, 採血時点での臨床症状を追跡できたMG群124例を胸腺腫群と非胸腺腫群に分け, さらにそれぞれをmild(眼症状に軽度の四肢症状を伴うもの), moderate(軽度の球症状に眼症状あるいは四肢症状を伴うもの), severe(球症状, 眼症状, 四肢症状を呈するもの)群に細分類した。患者血清中の抗AChR抗

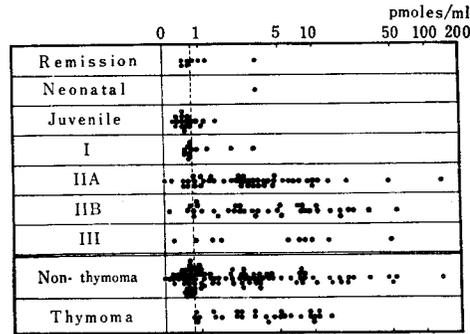


Fig. 36. Relationship between titers of serum anti-acetylcholine receptor antibody determined by anti-human IgG assay and Osserman's classification in myasthenia gravis

体量を抗ヒト Ig G法で測定した結果を Fig. 37 に示した。各群の平均力価は非胸腺腫群で mild (30 例) 2.5 pmole

/ml, moderate (24 例) 14.3

pmole/ml, severe (4 例)

22.9 pmole/ml となり, 陽性

率はそれぞれ 73.3%, 95.8% 100% を示し, 前述した Osse-

man 分類の成績 (Fig. 36)

より一層臨床像との相関性が

観察された。一方, 胸腺腫群

については, mild (12 例)

3.8 pmole/ml, moderate (10 例) 3.9 pmole/ml, severe (2 例) 9.1 pmole/ml となり, 全例陽性を示したが, 非胸腺腫群でみられたような臨床像と抗体価との相関性は認められなかった。

つぎに, MG の血清中に高頻度に検出される抗 AChR 抗体が

MG に特異的であるか否かを知るため, MG 以外の自己免疫疾患について, 抗ヒト IgG 法

により測定した。その結果を Fig. 38 にまと

めた。甲状腺機能亢進症 (2 例), 全身性エ

リテマトーデス (52 例) 強皮症 (5 例), シェーグレン症候群 (10 例), 皮膚筋炎 (2 例) のうち, 全身性エリテマトーデスの 2 例で正常上限をわずかにこえる値が認められた以外はすべて正常値を示した。これらの結果は, 抗 AChR 抗体が MG に極めて高い疾患特異性をもつものであることを示している。

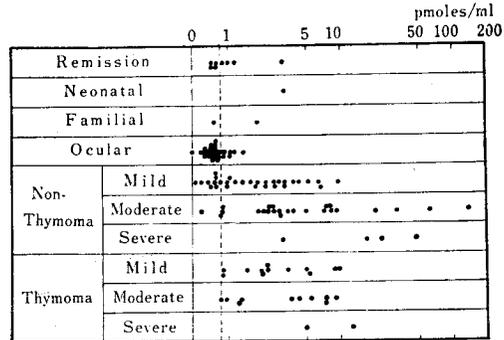


Fig. 37. Relationship between titers of serum anti-acetylcholine receptor antibody determined by anti-human IgG assay and Patten's classification in myasthenia gravis

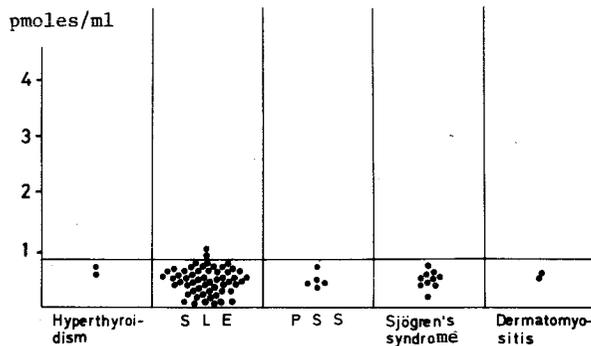


Fig. 38. Titers of serum anti-acetylcholine receptor antibody in other autoimmune diseases. SLE; systemic lupus erythematosus. PSS; progressive systemic sclerosis.

第2節 重症筋無力症の臨床像と抗アセチルコリンレセプター抗体価

従来よりMG患者から分娩される新生児の約12%に一過性の新生児重症筋無力症(Neonatal MG)が見られることが報告されており、母体からの液性伝達因子の存在が示唆されてきた¹⁴。しかし、この新生児にMG症状をおこす本体の解明は今までなされていなかった。著者はMGの母親から分娩された新生児MGの1症例について、母子の血清中の抗AChR抗体を前述の2種の方法を用いて経時的に測定した^{13,14}。

現在、MGの治療法としては、ステロイド剤、抗コリンエステラーゼ剤、免疫抑制剤などの薬物療法や胸腺に対する放射線療法、ならびに胸腺摘出術などの外科的療法が行なわれている。しかし、その治療効果と抗AChR抗体との相関性についての研究はほとんど行なわれていない。そこで、これらの療法のうち、胸腺摘出術とステロイド療法を受けたMG患者の臨床像と抗AChR抗体の相関性について検討した^{10,107}。

1) 新生児重症筋無力症と抗体価

新生児MGの血清は臍帯血および生後12日目、21日目、107日目に採取したものをを用いた。結果をTable 16に示した。抗ヒトIgG法により生後21日目の新生児MGの血清中からは、抗AChR抗体は検出されなかったが、母の血清中の抗体価は、妊娠初期から産褥期まで一貫して高値を示した。一方、Con A法では分娩後18日目の母の血清中には抗体が検出されたが、臍帯血中には検出されなかった。この新生児MGの臨床症状は、生後約3週間で消失したが、抗ヒトIgG法で検出された血中抗体価と臨床像との間には一致した変動が認められた。これらの結果から、新生児のMGの成因に関与している抗体は抗ヒトIgG法で検出される抗体であると考えられる。

2) 胸腺摘出術と血中抗AChR抗体量との関連

胸腺摘出術を受けたMG 69例について、胸腺(または胸腺腫)摘出前後の臨床経過と抗AChR抗体価との関係をFig. 39に示した。MGの臨床症状をmild, moderate, severeに分類した。上段に非胸腺腫群(47例)、下段に胸腺腫(22例)を示したが、両群の間でほぼ同じ傾向が見られた。

これらの結果から、つぎの諸点が明らかとなった。すなわち、①胸腺摘出直後の抗体価は一時的に増加したのち減少する傾向を示す症例、急速に減少する症例、余り変動がみられない症例など、症例ごとのばらつきが観察されたが、全体としては年数の経過とともに減少する傾向が見られた。

Table 16. Anti-acetylcholine receptor factors in neonatal myasthenia gravis

Date	Mother		Neonate	
	Anti-human IgG assay (pmoles/ml)*	Concanavalin A Sepharose assay (%)**	Anti-human IgG assay (pmoles/ml)	Concanavalin A Sepharose assay (%)
Apr. 12, 1976	6.40			
Oct. 19, 1976 (birth day)			2.90 ***	100.2 ***
Oct. 30, 1976 (12th day)			1.48	
Nov. 5, 1976 (18th day)	6.00	72.5		
Nov. 8, 1976 (21st day)			0.50	
Feb. 2, 1977 (107th day)	5.63		0.24	

* Control serum ; mean \pm 2 SD, 0.48 ± 0.32 pmole/ml (n = 70)
 ** Control serum ; mean \pm 2 SD, $100 \pm 6.0\%$ (n = 30)
 *** Sample serum was obtained from umbilical-cord blood.

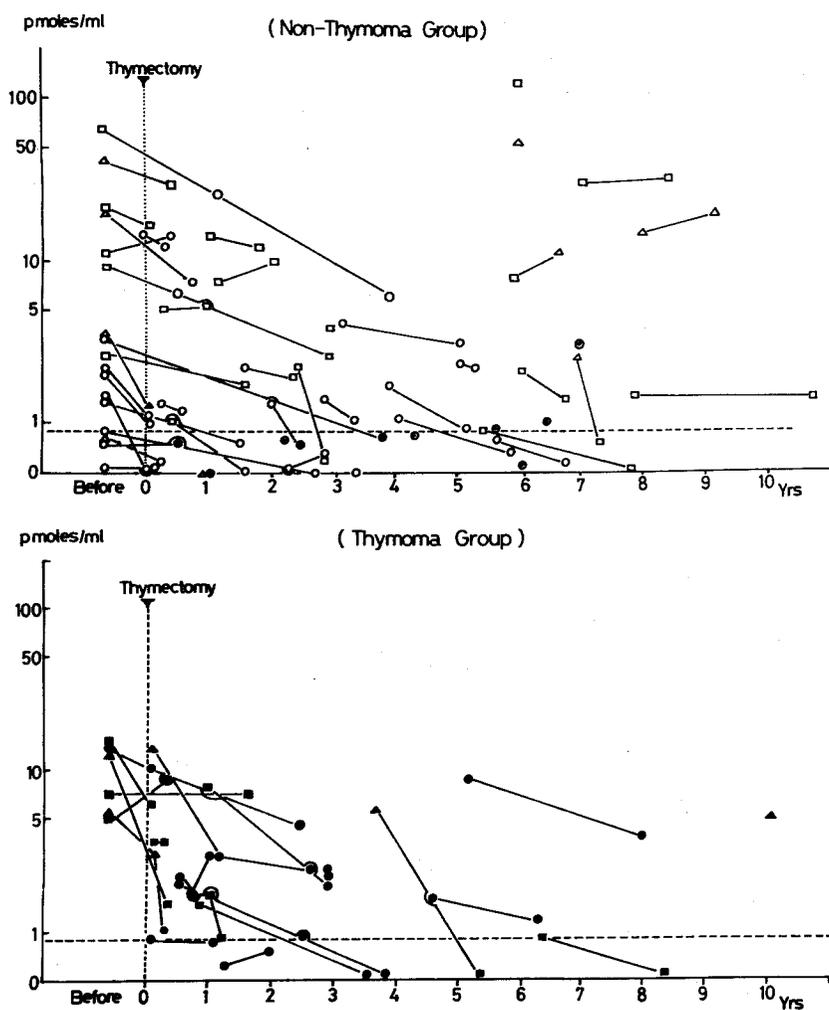


Fig.39. Effects of thymectomy and its time course upon the titers of anti-acetylcholine receptor antibodies. Clinical stage of myasthenia gravis was classified by remission (●), mild (○), moderate (□) and severe (△). Myasthenia gravis with thymoma represented black sign.

②手術後完全寛解をきたした9例は術後2年以降に多く見られ、1例を除き抗体価はほぼ正常値を示した。③手術後5年以上経過したMG群は、最近4年以内に手術を受けた群と比較して抗体価のバラツキ例が多く、術後の臨床症状も比較的重症例が多くみられた。その一因として両群間の胸腺摘出の方法の差が考えられる。すなわち、最近4年間の術式が周辺脂肪組織まで切除する徹底した完全摘出方式であるのに対し、それ以前の術式は胸腺組織のみを摘出する方法であり、一部の取り残しの可能性が十分考えられる。

3) ステロイド療法と抗体価

ステロイド療法中にクリーゼ(急性増悪)を起こした症例Aの結果を Fig. 40 に示した。ステロイド剤投与により抗体価はやや減少の傾向にあったが、症状の悪化に伴って上する兆候を示し、クリーゼ時に顕著な抗体価の増加が認められた。その後、症状の改善とともにもとのレベルに低下した。このように、クリーゼと抗体価との間には密接な相関が示された。

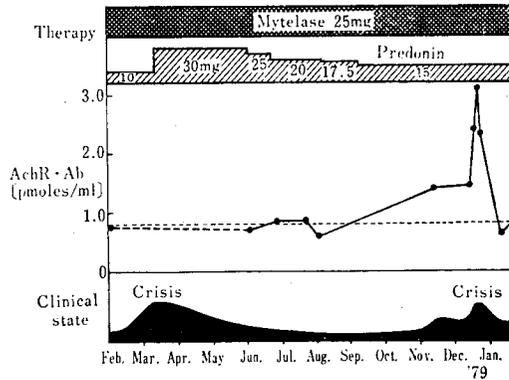


Fig.40. Time course of anti-acetylcholine receptor antibody during myasthenic crisis in case A with myasthenia gravis.

Fig. 41 にステロイド療法により症状の改善が見られた症例Bの抗体価の変動を示した。ステロイド剤投与後、臨床症状の改善とともに抗体価は著しく減少し、ステロイド剤減量後も比較的低値を維持している。以上2例から、ステロイド剤は何らかの機序により抗体産生をおさえると考えられた。

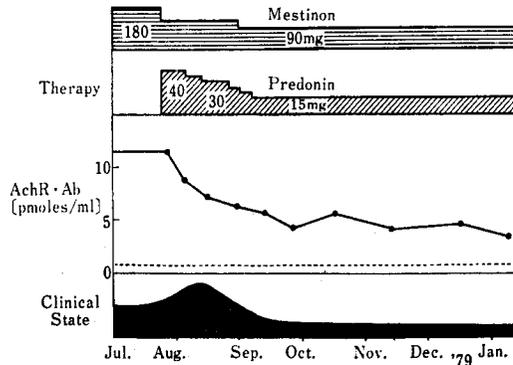


Fig.41. Effect of corticosteroid treatment on anti-acetylcholine receptor antibody and clinical symptoms in case B with myasthenia gravis.

第3節 重症筋無力症と胸腺異常

重症筋無力症は高率に胸腺異常を合併することや、胸腺の摘出術が治療に有効であることなどが知られている。^{122, 123}このことはMGの発症に胸腺が何らかの重要な役割を演じていることを示唆しているとともに、抗AChR抗体の産生機序の解明との関連でも注目されている。すでにAharonov¹¹⁶らは、子ウシ胸腺中に電気ウナギの発電器官から精製したAChRと免疫学的に交叉反応性を示す因子が存在していることを報告していたが、この胸腺成分の本体は不明であった。そこで著者は子ウシ胸腺中の¹²⁵I-Toxin Bと特異的に結合する成分について検討した。^{103, 104}また、摘出されたMG患者胸腺中の抗AChR抗体を測定した。¹⁰⁵

1) 子ウシ胸腺中のAChR様タンパク質

子ウシ胸腺中に存在し、Toxin Bと特異的に結合するタンパク質について、Con A-Sepharoseを用いて検討した。その結果、子ウシ胸腺より、ラット骨格筋からのAChRの調製方法と同様の方法を用いて調製した画分中に、¹²⁵I-Toxin Bと特異的に結合する成分が存在することが認められた。(Fig.42)

¹²⁵I-Toxin Bとの複合体の生成量は¹²⁵I-Toxin Bの500倍過剰量のToxin Bの存在下で10%以下に、1mMのd-ツボクラリンの存在下では20%以下となった。これらの結果から、¹²⁵I-Toxin Bとの結合は特異的と考えられた。また、AChRの拮抗剤のd-ツボクラリンでToxin Bの結合が阻害され

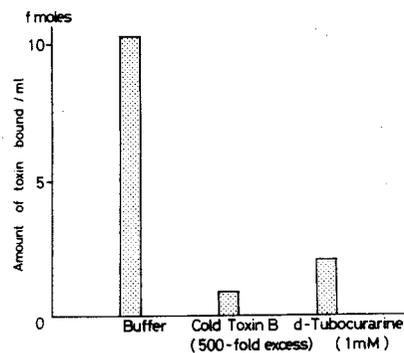


Fig.42. Specific binding of ¹²⁵I-Toxin B to acetylcholine receptor-like protein from calf thymus by a Concanavalin A Sepharose assay.

たことから、この成分はニコチン作動性AChR様タンパク質と考えられた。この成分の胸腺中での含量を湿重量当りでラット正常下腿筋中のAChR含量と比較すると約4%であった。また、Sepharose 6Bによるゲル濾過法でこの成分の分子量は約25-30万と推定されたが、この分子量はシビレエイ(Narke japonica)より得られるAChRとほぼ同程度であった。

つぎに、この成分とMG患者血清中の抗AChR抗体との反応性を検討した。結果をTable 17に示した。

Table 17. Cross-reaction between acetylcholine receptor-like protein in calf thymus and myasthenic sera.

Case (Age, Sex)	Histology	Titer of Anti-AChR Antibody pmoles/ml (Anti-Human IgG Assay)	Binding Activity % (Con A Assay)
MG 1 (51,F)	Thymoma	1.593	56.9
MG 2 (31,M)	Thymoma	0.432	65.1
MG 3 (32,F)	Hyperplasia	1.729	70.6
MG 4 (33,F)	Hyperplasia	0.141	99.5
Control Serum n=11		0.045 (mean \pm 2SD)	100 \pm 11

正常の血清 11例を子ウシ胸腺中のAChR様タンパク質を用いて抗ヒトIgG法で測定したときの正常上限値は0.045 pmoles/ml, Con A法では100% \pm 11%を示した。つぎに4例のMG患者血清中の抗AChR抗体をAChR様タンパク質を用いて測定した。その結果, 抗ヒトIgG法では全例が, Con A法では3例が陽性を示したことから, この成分はヒトの抗AChR抗体と交叉反応性をもつことが明らかとなった。

2) 摘出したMG患者胸

腺中の抗AChR抗体

8例のMG患者および1例の先天性心臓疾患患者より摘出した胸腺組織または胸腺腫組織を生理食塩水で抽出後, 抽出液をSepharose 6Bカラム(1.4 \times 31cm)を用いてゲル濾過した。その結果, 抗AChR抗体は全例

7S IgGが溶出する位置に見られた。さらに, 抗

AChR抗体は抗ヒトIgA

血清を加えても吸収されず, 抗ヒトIgG血清により吸収されたことから, 抗AChR

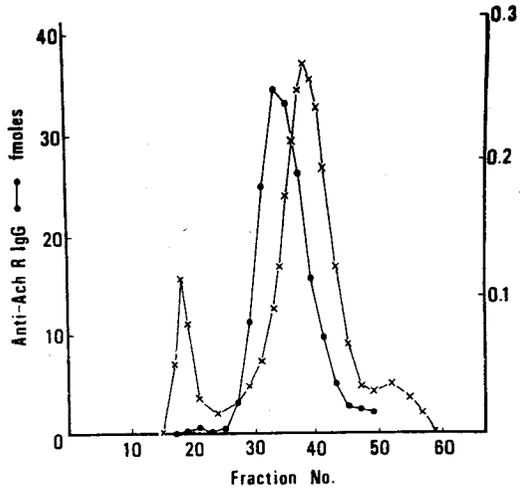


Fig.43. Location of anti-acetylcholine receptor IgG in the fractions of thymus extract from a patient with myasthenia gravis on a column (1.4 \times 31 cm) of Sepharose 6B in 0.02 M tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.3 M NaCl. Fractions of 0.7 ml were collected at a flow rate of 20 ml/hr and the eluate was monitored at 280 nm.

抗体は 1 g A ではなく 1 g G クラスに属するものと考えられた。溶出パターンの 1 例 (Table 18 中の Case 3) を Fig. 43 に示した。また、胸腺摘出時の血清についても上記の胸腺組織と同様の検討を行ない、これらの試料中の抗 AChR 抗体量と 1 g G 量を測定し、1 g G 1 mg 当りの抗 AChR 抗体量を Table. 18 に示した。

Table 18. Comparison of the concentration of anti-acetylcholine receptor IgG between sera and thymus extracts from patients with myasthenia gravis.

Case (age,sex)	Thymic histopathology	Amount of anti-Ach R IgG (pmoles/mg IgG)		Ratio (thymus/serum)
		Thymus	Serum	
1. K.M.(56,M)	hyperplasia	0.12	0	—
2. T.Y.(44,F)	hyperplasia	1.51	0.71	2.1
3. E.K.(46,M)	hyperplasia*	4.03	0.59	6.8
	thymoma	1.68	0.59	2.9
4. M.N.(26,F)	hyperplasia	1.96	0.09	21.8
5. K.M.(50,F)	hyperplasia	1.86	0.17	10.9
6. R.M.(27,F)	thymoma	4.05	0.30	13.5
7. T.F.(33,M)	thymoma	0.79	0.29	2.7
8. T.N.(32,F)	thymoma	1.84	0.50	3.7
9. U.K.(12,M)**	normal	0	0	—

* A residual hyperplastic thymus

** A patient with congenital heart disease

その結果、正常胸腺 (Case 9) は抗 AChR 抗体を全く含まなかったのに対し、他の 7 例 (Case 2 から 8) は胸腺と血清中の単位 IgG 当りの抗 AChR 抗体量の比が約 2 ~ 22 となり、胸腺組織中には血清に比べ高濃度に抗 AChR 抗体が存在していることが明らかとなった。なお、Case 1 の血清中には抗 AChR 抗体が存在しなかったが、胸腺中にはわずかながら検出された。

第 4 節 考察ならびに総括

近年、ニコチン作動性 AChR の分離精製や MG 患者血清中の抗 AChR 抗体の測定に、AChR に特異的に結合するアマガサヘビ毒からの α -Bungarotoxin が繁用されている。しかし、アマガサヘビ毒中にはシナプス小胞に作用して ACh の遊離を阻害する β -Bungarotoxin¹¹⁷ が存在し、不十分な精製では混在する可能性があった。本研究に用いたインドコブラ神経毒 Toxin B は、前章で明らかにしたごとく、71 個のアミノ酸残基よりなる分子量約 7,800 のポリペプチドで、その一次構造ならびに薬理作用

は α -Bungarotoxinのそれと酷似した特徴をもつ神経毒である¹¹⁸。また、インドコブラ粗毒中にはシナプス小胞に作用する成分は含まれず、比較的容易に純品が得られるなどの長所があったことなどから、著者は α -BungarotoxinのかわりにToxin Bを活用することを考えた。

1974年、Almon¹⁰⁰らは、MG患者の血清中の抗AChR抗体の検出にSephadex G-200を用いるゲル濾過法を用いて、MG患者15例中5例(33%)に抗AChR抗体を検出したと報告した。しかし、この方法は血清およびAChRが多量に必要なことや、カラムクロマトグラフィーに長時間を要し、さらに検出率が低いことなどの短所があった。そこで、著者は少量の血清(50 μ l)とAChRおよびインドコブラ神経毒を用いる改良Con A法により、MG患者70例中52例(74%)の血清中に抗AChR抗体が存在することを明らかにした^{10, 107}。Mittag¹¹¹らも同様の方法により、MG患者の67%に抗AChR抗体が検出されたことを報告している。これらの結果はCon A法がゲル濾過法よりもすぐれていることを示している。

一方、すでにLindstrom¹¹⁹⁻¹²¹らは、1976年、ヒトの骨格筋AChRを利用した抗ヒトIgG法と呼ばれる高感度の抗AChR抗体の測定法を報告している。著者は、彼らの方法を改良した抗ヒトIgG法を考案し、この方法を用いてMG患者血中に高頻度に抗AChR抗体が存在することを明らかにした。すなわち、Lindstrom¹²⁸らが用いているヒト骨格筋は、ラットの除神経筋に比べてその含量が極めて少なく、また常時入手することが困難である。そこで、著者は常時得られやすくAChRの含量の高いラットの除神経筋をAChR源としたが、MG患者血清中の抗AChR抗体との交叉反応性もヒトのAChRにはおよばなかったが、測定法には充分活用し得るものであることがわかった。さらに、著者の抗ヒトIgG法ではAChR・神経毒複合体を精製する操作が省かれているが、抗AChR抗体の検出率にはほとんど影響がみられなかった。この抗ヒトIgG法により、MG患者の血清132例中99例(75%)に高力価の抗AChR抗体が検出できたが、これらの結果は本法がMGの診断に有効に利用できることを示している¹⁰⁷。

Con A法、抗ヒトIgG法の2種の方法で得られた結果をMGの病型と対応させて観察すると、I型(眼筋型)の陽性率は全身型のII A, II B, IIIに比べ両法でともに極めて低く一致した結果が得られた。全身型の結果についても両法の間には差は見られなかった。しかし、臨床像と抗体価との関係では、Con A法より抗ヒトIgG法の結果

がより強い相関を示した。特に新生児MGでは臨床像の消失が抗ヒトIgG法での抗体の消失と一致したが、このことは新生児MGの発症に関与している血清因子は母体から持続的に移入されるIgGのうち、抗ヒトIgG法で検出される抗体と考えられた。また、ステロイド療法中にクレーゼを起こした症例ではその時期に一致して抗ヒトIgG法で検出される抗体の一過性の上昇が観察されるなど、これらの結果は抗ヒトIgG法で検出される抗体がMGの臨床像の決定に重要な役割を演じていることをうかがわせるものである。

つぎに、MGを胸腺腫群と非胸腺腫群に分類すると、抗ヒトIgG法で胸腺腫群全例が陽性を示したが、臨床像と抗体価との間には非胸腺腫群で見られたほどの相関は見られなかった。このことは、胸腺腫群の血清中には、抗ヒトIgG法により検出される抗体の中に、臨床像の決定に直接関与しない抗体が存在している可能性を示唆している。

現在、MGの治療法の一つとして胸腺摘出術が有効と考えられている。¹²³しかし、抗AChR抗体価の面から多数の症例を長期にわたって検索した例はSeadding¹²⁴らの報告のみである。著者はMG 69例の胸腺摘出患者の抗体価の変動と臨床症状を長期にわたり検討した。その結果、摘出術後に抗体価の急激な減少は見られないものの、長年にわたり徐々に低下する傾向を示したが、この傾向は臨床経過とよく一致していた。現在、胸腺摘出術と抗AChR抗体の産生機序の相関は明らかでないが、胸腺の摘出が抗体価の低下をもたらすことが明らかとなり、MGの治療法として有効であることが確かめられた。

MGの病因を探る重要な手掛りとして、MGに高頻度に合併する胸腺異常がある。¹²²著者は、子ウシ胸腺中にニコチン作動性AChR様タンパク質が存在することや、このタンパク質がMG患者血清中の抗AChR抗体と免疫学的反応性を示すことを明らかにした。すでにAharonov¹¹⁶らも電気ウナギからのAChRと子ウシ胸腺抽出物との間で、体液性、細胞性の両面で免疫学的交叉反応性を証明しているが、おそらく著者と同一のものと考えられる。現在、これらは胸腺内に存在する骨格筋様細胞“myoid-cell”由来のものと考えられている。

さらに、著者はMG患者からの摘出胸腺中に主として7S IgGタイプの抗AChR抗体が存在し、しかも胸腺に含まれる全IgG量に対する抗AChR抗体の割合が、血清レベルに比べ著しく高いことを明らかにした。MGにおける抗AChR抗体の抗原が

骨格筋由来のAChRであるのか、あるいは胸腺内に存在するAChR様タンパク質¹²⁶なのかはいまだ明らかではない。現在、まだヒト胸腺内からニコチン作動性AChR様タンパク質は見出されていない¹²⁷。しかし、胸腺内に血清レベルより高濃度の抗AChR抗体が含まれる事実は、胸腺に抗原となるべきAChR様タンパク質が存在し、何らかの刺激侵襲により、これを標的とした免疫反応が惹起され、胸腺異常をひき起すのかも知れない。いずれにしても、本症に特異的に見られる胸腺異常の原因を追究する上で、また、胸腺摘出術が抗AChR抗体の減少をもたらし、治療面での有効性と 관련된知見が得られたことは興味深い。

MGの発症機序に関しては未解決の点が多い。しかし、一つの手掛りを動物モデル(EAMG)に求めることができる。EAMGの発症過程は、シビレエイの発電器官から精製されたAChRが、ラット骨格筋AChRと免疫学的交叉反応性をもつことから、これを抗原として動物を免疫することにより抗シビレエイ抗体が生成し、これが神経筋接合部のシナプス後膜上のAChR分子に作用する結果、急性期EAMG像がつくられるものと考えられている^{120, 121}。さらに電顕的観察からも、その発症過程において骨格筋終板上での抗原抗体複合物がシナプス後膜上に観察でき、時間経過とともにマクロファージを主体とした炎症性細胞や補体反応により二次的にシナプス後膜のクレフトが破壊され、それとともに、AChRの数が減少していくことが明らかにされている^{120, 121}。ヒトのMG発病初期にも骨格筋終板でこのような現象がおこっているものと想像される。したがって、血清中の抗AChR抗体はMGの発症の引き金として働くことが考えられ、臨床症状は、むしろ終板上でのシナプス後膜の破壊の度合と関連しているかも知れない。Con A法や抗ヒトIgG法で得られた抗体価が必ずしも臨床症状と相関しない症例が多かったことも、この考え方を支持している。

実 験 の 部

¹²⁵I-Toxin Bの調製：¹⁰⁹クロラミンT法により調製した。Toxin B (4 μ g)を0.5 Mリン酸緩衝液 (pH7.5) (100 μ l)に溶解し、これに0.1M NaOH (10 μ l)に溶解した Na¹²⁵I (New England Nuclear 製)を加え、攪拌後、さらにクロラミンT (10 μ l, mg/ml)を加え、1分間反応を行なった。反応後、メタ重亜硫酸ナトリウム (20 μ l, mg/ml)を加えて反応を終了させ、ただちに0.5% BSAを含む0.5Mリン酸緩衝液 (pH7.0)で平衡化したSephadex G-50 (0.9 \times 20 cm)でゲル濾過し、無機ヨードと高分子量の変性タンパク質を除去した。得られた¹²⁵I-Toxin Bの比活性は、 $4\sim 5 \times 10^5$ Ci/moleであった。

ラット除神経筋からのAChRの調製：¹⁰⁰Almonらの方法に従った。Wistar系ラット (オス, 200-250g)の両側大腿部を切開して坐骨神経を1cm以上の長さで切除し、10日後に除神経下腿筋を採取した。得られた下腿筋湿重量の4倍量の0.1M NaCl 1mM PMSF, 0.1% NaN₃を含む0.05M Tris·HCl (pH7.4)を加え、筋肉を細かく切断し、最終濃度が0.1%になるようにTriton X-100を加えて磨碎し、4°Cで一晩攪拌した後、17,000 \times g 30分遠沈を行なって得た上清をAChR画分として用いた。得られた画分の¹²⁵I-Toxin Bの結合能は $4\sim 5 \times 10^{-9}$ Mであった。子ウシ胸腺からのAChR様タンパクの抽出法は、上述のラット除神経筋からのAChRの調製方法に準じた。

抗AChR抗体の測定法

1) Concanavalin A Sepharose 法 (Con A法) : カラム (1.1 \times 9cm)に Concanavalin A Sepharose を約0.4ml充填したのち、0.2% Triton X-100, 0.1M NaClを含む0.05M Tris·HCl (pH7.4)で平衡化した。前記の方法で調製したAChR溶液の50倍希釈液 (250 μ l)に患者血清 (50 μ l)を加え、4°Cで一晩放置した後、¹²⁵I-Toxin B (0.2pmole)を加え、さらに37°Cで4時間放置しCon Aカラムに通した。つぎに、このカラムを前記緩衝液 (2ml)で2回洗浄し、カラムに吸着した放射活性をガンマカウンター (パッカード社5220型)で計測した。正常対照血清30例を用いた時の平均値 \pm 2SDは $100 \pm 6\%$ であった。

2) 抗ヒトIgG法 : AChR画分 (100 μ l)と100倍希釈したMG患者血清20 μ l 50 μ l, 100 μ lを加え、これに総IgG量を合わせるため、100倍希釈した正常血清を180 μ l, 150 μ lおよび100 μ l加えて、4°Cで一晩放置し、AChR量に対して2

倍量の¹²⁵I-Toxin B (50 μ l)を加え、さらに37°C、4時間放置した。つぎに反応液中のIgGを十分に沈殿させるにたる抗ヒトIgG家兎血清を加え、4°Cで一晩反応させた。2,500×g 10分遠沈して得た沈殿を生食(2ml)で洗浄後、沈殿物中の¹²⁵I放射活性を測定し、抗AChR抗体の量を¹²⁵I-Toxin Bの比活性からml当りのpmole量として表示した。正常の対照血清70例の平均値±2SDは0.48±0.32 pmole/mlであった。なお、AChRを含まない系での測定値をブランクとして差し引いた。

MG患者から摘出した胸腺中の抗AChR抗体：

摘出胸腺組織約1~2gを磨砕したのち、生理食塩水(5ml)で抽出した。この一部を0.3M NaClを含む0.02M Tris·HCl(pH8.0)で平衡化したSephacrose CL-6B(1.4×31cm)のカラムに通して分画し、各試験管内の抗AChR抗体量を抗ヒトIgG法で、また、IgG量はBehring社、LCパルチゲンGで定量した。同様の操作を同一患者の血清についても行ない、胸腺と血清中での抗AChR抗体量を1mg中の値として算出した。

抗AChR抗体の測定を行なった対象MG患者

1) 臨床症状、テンシロンテスト、Harvey-MaslandテストなどによりMGと診断された132例、および正常対照70例を対象とした。

2) 新生児MG：昭和49年に発症した母親(ⅡB)から分娩された女兒で、生後数時間後、筋緊張低下、啼泣微弱、筋無力性顔貌を呈し、2日目には哺乳力低下、四肢運動低下も観察された。3日目より抗コリンエステラーゼ剤の投与で上記症状は軽快し、生後3週間でMG症状の消失が観察された症例である。

3) 症例A：33才の女性で非胸腺腫、Osserman分類でⅡBに属し、昭和46年に胸腺摘出術を受けたが、その後も頻回にクリーゼを繰り返し、昭和49年よりステロイド療法が行なわれている。その後、若干の症状の改善がみられているものの、53年12月に再びクリーゼに陥った症例である。

症例B：42才の女性で非胸腺腫、ⅡBに属し、昭和52年胸腺摘出を受けているが著明な病状の変化は認められていない。53年7月よりステロイド療法が行なわれ、臨床症状が徐々に改善している症例である。

結 語

著者は主としてインドコブラ神経毒タンパク質の構造とその諸性質について、生化学的研究を行なうとともに、神経毒タンパク質の重症筋無力症の病態解明への応用についても検討し、以下の諸点を明らかにした。

1) インドコブラ (*Naja naja*)、台湾コブラ (*Naja naja atra*) 粗毒から、Sephadex G-50 と CM-セルロースを組み合わせるにより、容易に神経毒タンパク質を精製できる方法を考案した。その結果、インドコブラ毒からは I 型神経毒群と II 型神経毒群の両群が分離されたのに対し、台湾コブラ毒からは I 型神経毒群のみが分離された。精製された神経毒のうち、II 型神経毒の Toxin B をはじめ、主要なインドコブラ神経毒の一次構造を明らかにした。その結果、II 型神経毒間には極めて高い構造上の相同性がみられた。

2) Toxin B 分子内の S-S 架橋の位置を決定することに成功したが、II 型の Toxin B には 5 組の S-S 架橋が存在しており、I 型神経毒に比べ 1 組多く存在していた。5 組の中の 4 組の架橋位置は I 型と同様であった。しかし、ラマンスペクトルの測定結果から、Toxin B 中のチロジンやトリプトファン残基などの存在状態は I 型のそれらの残基とは異なっていることが明らかとなった。

3) 種々の化学修飾法を用いて Toxin B の構造と致死活性との関係を調べた結果、チロジンやトリプトファン残基などの化学修飾と致死活性の相関や、トリプシンに対する感受性、ならびに還元剤に対する S-S 架橋の感受性に大きな差があることがわかった。このことは 2) で明らかにした II 型神経毒の Toxin B では I 型神経毒に比べ、1 組余計に存在する S-S 架橋が大きな役割を演じているものと考えられる。

4) Toxin B が骨格筋中のシナプス後膜に存在するアセチルコリンレセプターにほとんど不可逆的に結合する薬理活性を活用して、2 種の抗アセチルコリンレセプター抗体の測定法を確立した。これらの方法を用いて、多くの自己免疫疾患患者血中の抗アセチルコリンレセプター抗体を測定した結果、重症筋無力症患者血中に高頻度でその抗体が検出された。さらに、この抗体のもつ病因論的意義を各治療法との関係で調べた結果、重症筋無力症の臨床像の決定に大きな役割を演じていることが推定できた。

5) 重症筋無力症は高率に胸腺異常を合併することから、胸腺との関連を検討した。その結果、子ウシ胸腺内に神経毒と特異的に結合するアセチルコリンレセプター様

タンパク質が存在することが明らかとなった。また重症筋無力症患者の摘出胸腺中に血清中より高いレベルの抗アセチルコリンレセプター抗体が検出されたが、このことは、重症筋無力症に合併する胸腺異常と何らかの関連を有しているものと考えられる。

謝 辞

終りに臨み、本研究に際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った恩師京都大学薬学部山科郁男教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の御指導をして下さった京都大学薬学部林恭三助教授に深く感謝致します。さらに、本研究の一部の御指導と御協力をいただいた前姫路工業大学佐々木豊作教授および国立宇多野病院西谷裕副院长に感謝致します。

また、本研究に御協力いただいた京都大学薬学部生物化学教室の方々に感謝します、

引 用 文 献

- 1) 林 恭三, 太田光熙: 代謝 15: 209 (1978)
- 2) 林 恭三, 太田光熙: 蛋白質・核酸・酵素 20: 53 (1975)
- 3) M.Ohta, T.Sasaki and K.Hayashi: FEBS Lett., 71: 161 (1976)
- 4) M.Ohta and K.Hayashi: Biochem. Biophys. Res. Commun., 55: 431 (1973)
- 5) T.Takamatsu, I.Harada, T.Shimanouchi, M.Ohta and K.Hayashi: FEBS Lett., 72: 291 (1976)
- 6) M.Ohta and K.Hayashi: Biochem. Biophys. Res. Commun., 57: 973 (1974)
- 7) M.Ohta and K.Hayashi: Biochem. Biophys. Res. Commun., 56: 981 (1974)
- 8) 林 恭三, 太田光熙: 日本臨牀夏季増刊号 37: 1515 (1979)
- 9) 中尾一和, 西谷 裕, 太田光熙, 林 恭三: 医学のあゆみ 100: 578 (1977)
- 10) 太田光熙, 林 恭三: ホルモンと臨床: 27: 833 (1979)
- 11) 西谷 裕, 中尾一和, 太田光熙, 林 恭三: 代謝 15: 245 (1978)
- 12) M.Ohta, K.Nakao, H.Nishitani and K.Hayashi: Snake, 11: 143 (1979)
- 13) 中尾一和, 西谷 裕, 太田光熙, 鈴木将夫, 奥野武彦, 北条醇厚, 望月康弘, 林 恭三: 医学のあゆみ 102: 201 (1977)
- 14) K.Nakao, H.Nishitani, M.Suzuki, M.Ohta and K.Hayashi: N. Engl. J. Med., 297: 169 (1977)
- 15) C.Y.Lee and Y.M.Chen: Animal, Plant and Microbial Toxins (ed. by A.Ohsaka, K.Hayashi and Y.Sawai), Vol.2, p.193, Plenum Press (1976)
- 16) K.Nakai, T.Sasaki and K.Hayashi: Biochem. Biophys. Res. Commun., 44: 893 (1971)
- 17) M.Ohta and K.Hayashi: in preparation
- 18) M.Ohta and K.Hayashi: in preparation
- 19) K.Hayashi, M.Takechi and T.Sasaki: Biochem. Biophys. Res. Commun., 45: 1357 (1971)
- 20) M.Takechi, K.Hayashi and T.Sasaki, Mol. Pharmacol., 8: 446 (1973)
- 21) K.Narita and C.Y.Lee: Biochem. Biophys. Res. Commun., 41: 339 (1970)
- 22) L.Fryklund and D.Eaker: Biochemistry, 12: 661 (1973)
- 23) L.J.Reed and H.Muench: Am. J. Hyg., 27: 493 (1938)
- 24) C.C.Yang, H.J.Yang and J.S.Huang: Biochim. Biophys. Acta, 188: 65 (1968)
- 25) A.M.Crestfield: Anal. Chem., 28: 117 (1956)
- 26) A.M.Katz, W.J.Dreyer and C.B.Anfinsen: J. Biol. Chem., 234: 2897 (1959)
- 27) V.M.Ingram: Biochim. Biophys. Acta, 28: 539 (1958)
- 28) M.J.H.Smith and K.W.Taylor: Biochem. J., 55: 30 (1953)
- 29) S.Iwanaga, P.Wallen, N.J.Gron Dahl, A.Henschen and B. Brombäck: Eur. J. Biochem., 8: 189 (1969)
- 30) S.Yokoyama, A.Dobayashi, O.Tanabe and E.Ichishima: Agr. Biol. Chem., 39: 1211 (1975)

- 31) E.J.Goetzl and H.Metzger : *Biochemistry*, 9 : 3862 (1970)
- 32) E.Karlsson, D.Eaker and G.Ponterius : *Biochim. Biophys. Acta*, 257 : 235 (1972)
- 33) K.Nakai, C.Nakai, T.Sasaki, K.Kakiuchi and K.Hayashi : *Naturwissenschaften*, 57 : 387 (1970)
- 34) 林 恭三, 太田光熙 : *化学* 28 : 467 (1973)
- 35) A.T.Tu : *Ann. Rev. Biochem.*, 42 : 235 (1973)
- 36) 田宮信雄 : *蛋白質・核酸・酵素* 22 : 554 (1977)
- 37) C.C.Yang, H.J.Yang and R.H.C.Chiu : *Biochim. Biophys. Acta*, 214 : 355 (1970)
- 38) Y.Endo, S.Sato, S.Ishii and N.Tamiya : *Biochem. J.*, 122 : 463 (1971)
- 39) D.H.Spackman, W.H.Stein and S.J.Moore, : *J. Biol. Chem.*, 235 : 648 (1960)
- 40) D.E.Williams and R.A.Reisfeld : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 373 (1964)
- 41) S.G.Walley and J.Watson : *Biochem. J.*, 55 : 328 (1953)
- 42) J.O.Jeppsson and J.Sjöquist : *Anal. Biochem.*, 18 : 264 (1969)
- 43) M.R.Summers, G.W.Smythers and S.Oroszlan : *Anal. Biochem.*, 53 : 624 (1973)
- 44) R.Acker and C.Crocker : *Biochim. Biophys. Acta*, 9 : 704 (1952)
- 45) O.Vesterberg and H.Svensson : *Acta Chem. Scand.*, 20 : 820 (1966)
- 46) C.C.Yang, C.C.Chang, K.Hayashi, T.Suzuki, I.Ikeda and K.Hamaguchi : *Biochim. Biophys. Acta*, 168 : 373 (1968)
- 47) K.Hamaguchi, K.Ikeda and C.Y.Lee : *J. Biochem.*, 64 : 503 (1968)
- 48) G.Toennies and J.J.Kolb : *Anal. Chem.*, 23 : 823 (1951)
- 49) J.M.Mueller, J.G.Pierce, H.Davoll and V.du.Vigneaud : *J. Biol. Chem.*, 191 : 309 (1951)
- 50) I.Harada, T.Takamatsu, T.Shimanouchi, T.Miyazawa and N.Tamiya : *J. Phys. Chem.*, 80 : 1153 (1976)
- 51) N.T.Yu, T.S.Lin and A.T.Tu : *J. Biol. Chem.*, 250 : 1782 (1975)
- 52) N.T.Yu and C.S.Lin : *J. Am. Chem. Soc.*, 94 : 5127 (1972)
- 53) M.C.Chen, R.C.Lord and R.Mendelsohn : *Biochim. Biophys. Acta*, 328 : 252 (1973)
- 54) M.N.Siamwiza, R.C.Lord, M.C.Chen, T.Takamatsu, I.Harada, H.Matsuura and T.Simanouchi : *Biochemistry*, 14 : 4870 (1975)
- 55) N.T.Yu : *J. Am. Chem. Soc.*, 96 : 4664 (1974)
- 56) M.Takechi and K.Hayashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49 : 584 (1972)
- 57) D.P.Botes : *J. Biol. Chem.*, 246 : 7383 (1973)
- 58) H.Sugeta, A.Go and T.Miyazawa : *Chem. Lett.*, 83 : 2161 (1972)
- 59) R.B.Martin : *J. Phys. Chem.*, 78 : 855 (1974)
- 60) A.Previero, M.A.Collet-Previero and P.Jolles : *J. Mol. Biol.*, 24 : 261 (1967)
- 61) E.Scoffone, A.Fontana and R.Rocchi : *Biochemistry*, 7 : 971 (1968)
- 62) H.R.Horton and D.E.Koshland, Jr. : *J. Am. Chem. Soc.*, 87 : 1126 (1965)
- 63) T.E.Borman and D.E.Koshland, Jr. : *J. Biol. Chem.*, 242 : 5771 (1965)
- 64) O.Ouchterlony : *Progr. Allergy*, 5 : 1 (1958)

- 65) E.A.Kabat and M.M.Mayer : Experimental Immunochemistry, III, p.22 (2nd ed., Charles C.Tomas, Springfield, U.S.A., 1961)
- 66) J.F.Riordan, M.Sokolovsky and B.L.Vallee : Biochemistry, 6 : 3609 (1967)
- 67) D.G.Hoare and D.E.Koshland,Jr. : J. Biol. Chem., 242 : 2447 (1967)
- 68) C.C.Chang : J. Biochem., 67 : 343 (1970)
- 69) A.F.S.A.Habeeb : Anal. Biochem., 14 : 328 (1966)
- 70) M.Sela, F.H.White,Jr. and C.B.Anfinsen : Science, 125 : 691 (1957)
- 71) H.Neumann, I.Z.Steinberg, J.R.Brown, R.F.Goldberger and M.Sela : Eur. J. Biochem., 3 : 171 (1967)
- 72) P.Azari : Arch. Biochem. Biophys., 115 : 230 (1966)
- 73) E.Shapira and R.Arnon : J. Biol. Chem., 244 : 1026 (1969)
- 74) W.W.Cleland : Biochemistry, 3 : 480 (1964)
- 75) T.A.Bewleg, J.S.Dixon and C.H.Li : Biochim. Biophys. Acta, 154 : 420 (1968)
- 76) W.K.Liu and J.Meienhofer : Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 : 467 (1968)
- 77) D.P.Botes : Biochim. Biophys. Acta, 359 : 242 (1974)
- 78) C.C.Chang and K.Hayashi : Biochem. Biophys. Res. Commun., 37 : 841 (1969)
- 79) C.C.Chang and C.C.Yang : Biochim. Biophys. Acta, 295 : 595 (1973)
- 80) A.T.Tu and P.M.Toom : J. Biol. Chem., 246 : 1012 (1971)
- 81) B.S.Hong and A.T.Tu : Federation Proc., 29 : 888 (1970)
- 82) A.T.Tu and B.Hong : J. Biol. Chem., 246 : 2772 (1971)
- 83) A.Seto, S.Sato and N.Tamiya : Biochim. Biophys. Acta, 214 : 483 (1970)
- 84) C.C.Chang, C.C.Yang, K.Hamaguchi, K.Nakai and K.Hayashi : Biochim. Biophys. Acta, 236 : 164 (1971)
- 85) C.C.Chang, C.C.Yang, M.Kurobe, K.Nakai and K.Hayashi : Biochem. Biophys. Res. Commun., 43 : 429 (1971)
- 86) C.C.Chang, C.C.Yang, K.Nakai and K.Hayashi : Biochim. Biophys. Acta, 251 : 334 (1972)
- 87) R.Hayashi, S.Moore and W.H.Stein : J. Biol. Chem., 248 : 3889 (1973)
- 88) R.Hayashi, S.Moore and W.H.Stein : J. Biol. Chem., 248 : 2296 (1973)
- 89) H.Taniuchi : J. Biol. Chem., 245 : 5459 (1970)
- 90) B.Gutte, M.C.Lin, D.G.Caldi and R.B.Merrifield : J. Biol. Chem., 247 : 4763 (1972)
- 91) M.C.Lin, B.Gutte, D.G.Caldi, S.Moore and R.B.Merrifield : J. Biol. Chem., 247 : 4768 (1972)
- 92) E.Karlsson, D.Eaker and G.Ponterius : Biochim. Biophys. Acta, 257 : 235 (1972)
- 93) D.P.Botes : Biochim. Biophys. Acta, 359 : 242 (1974)
- 94) N.P.Madson : Anal.Biochem., 29 : 542 (1969)
- 95) C.Y.Lee : Ann. Rev. Pharmacol., 12 : 265 (1972)
- 96) J.-P.Changeux : Handbook of Psychopharmacology, Vol.6, p.235 (ed. by L.L.Iverson, S.D.Iverson and S.H.Snyder, 1975)

- 97) J.Patrick and J.Lindstrom : Science, 180 : 871 (1973)
- 98) D.Elmqvist, T.R.Johns and S.Thesleff : J. Physiol., 22 : 71 (1972)
- 99) D.M. Fambrough, D.B.Drachman and S.Satyamurti : Science, 182 : 293 (1973)
- 100) R.R.Almon, C.Andrew and S.H.Appel : Science, 186 : 55 (1974)
- 101) R.R.Almon and S.H.Appel : Biochim. Biophys. Acta, 393 : 66 (1975)
- 102) R.R.Almon and S.H.Appel : Ann. N. Y. Acad. Sci., 274 : 235 (1976)
- 103) K.Nakao, M.Ohta, H.Nishitani and K.Hayashi : Excerpta Medica, 427 : 244 (1977)
- 104) 太田光熙, 中尾一和, 西谷 裕, 泉沢幸江, 林 恭三 : 医学のあゆみ 101 : 763 (1977)
- 105) M.Ohta, K.Ohta, F.Matsubara, H.Nishitani, K.Hayashi, N.Maruyama and T.Shirai : Immunol. Lett. 1 : 209 (1980)
- 106) 林 恭三, 太田光熙, 松原史よ : 免疫とホルモン (伊藤貞次, 熊谷 朗編) 247-275 (1979) 共立出版, 東京
- 107) 太田光熙, 西谷 裕 : 最新医学 34 : 2159 (1979)
- 108) D.Mebs, K.Narita, S.Iwanaga, Y.Samejima and C.Y.Lee : Biochem. Biophys. Res. Commun., 44 : 711 (1971)
- 109) W.M.Hunter and F.C.Greenwood : Nature, 194 : 495 (1962)
- 110) J.C.Meunier, R.Sealock, R.Olsen and J.-P.Changeux : Eur. J. Biochem., 45 : 371 (1974)
- 111) T.Mittag, P.Kornfeld, A.Tormay and C.Woo : N. Engl. J. Med., 294 : 691 (1976)
- 112) 西谷 裕, 中尾一和, 太田光熙, 野口貞子, 林 恭三 : 医学のあゆみ 102 : 335 (1977)
- 113) K.E.Osserman : " Myasthenia Gravis ", Grune & Stratton, New York (1958)
- 114) T.Namba, S.B.Brown and D.Grob : Pediatrics, 45 : 488 (1970)
- 115) J.Keesey, J.M.Lindstrom, H.Cokely and C.Herrmann, Jr. : N. Engl. J. Med., 296 : 55 (1977)
- 116) A.Aharonov, R.Tarrab-Hazdai, O.Abramsky and S.Fuchs : Proc. Nat. Acad. Sci., 72 : 1456 (1975)
- 117) C.Y.Lee, S.L.Chang, S.T.Kau and S.H.Luh : J. Chromatogr., 72 : 71 (1972)
- 118) C.C.Chang and C.Y.Lee : Arch. Intern. Pharmacodyn., 144 : 241 (1963)
- 119) J.M.Lindstrom, M.E.Seybold and V.A.Lennon : Neurology, 26 : 1054 (1976)
- 120) J.M.Lindstrom and E.H.Lambert : Neurology, 28 : 130 (1978)
- 121) J.M.Lindstrom, B.Einarson, V.A.Lennon and M.E.Seybold : J. Exp. Med., 144 : 726 (1976)
- 122) B.Castleman : Ann. N. Y. Acad. Sci., 135 : 496 (1966)
- 123) A.E.Papatestas : Amer. J. Med., 50 : 465 (1971)
- 124) G.K.Scadding, H.C.Thomas and C.W.H.Havard : Brit. Med. J., 1 : 1512 (1977)
- 125) R.L.Van der Velde and N.B.Friedman : Fed. Proc., 25 : 661 (1966)
- 126) J.M.Lindstrom, V.A.Lennon, M.E.Seybold and S.Whittingham : Ann. N. Y. Acad. Sci., 274 : 254 (1976)
- 127) G.A.Nicholson and S.H.Appel : J. Neurol. Sci., 34 : 101 (1977)
- 128) H.C.Hartzell and D.M.Fambrough : J. Gen. Physiol., 60 : 248 (1972)