

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 氏 名         | 武 智 晶 幸<br>たけ ち まさ ゆき   |
| 学 位 の 種 類   | 薬 学 博 士                 |
| 学 位 記 番 号   | 薬 博 第 165 号             |
| 学位授与の日付     | 昭 和 53 年 5 月 23 日       |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当 |
| 研 究 科・専 攻   | 薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻   |
| 学 位 論 文 題 目 | インドコブラ毒中の塩基性タンパクに関する研究  |

論文調査委員 (主 査) 教 授 山 科 郁 男 教 授 富 田 謙 吉 教 授 矢 島 治 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、インドコブラ毒中の塩基性タンパクの構造および性質に関するものである。

コブラ科のヘビ毒中には、一般に分子量6000～7000の強塩基性タンパクが40～50%含まれており、その生理活性については、いくつかの報告があった。特に Braganca らはインドコブラ毒中から塩基性タンパクを分離し、このタンパクが吉田肉腫細胞に対して選択的細胞毒性を示すことを報告していた。

著者は、この Braganca らの報告に興味をもちインドコブラ毒中より2種の塩基性タンパクを分離精製し、その構造と生理活性との関係を明らかにするために以下の研究を行った。

まず、インドコブラ粗毒を Sephadex G-50, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによって精製し、Disc 電気泳動的に均一な2つの塩基性タンパク (Cytotoxin I, II と命名) を分離した。Cytotoxin I, II は、ともに60個のアミノ酸残基から構成された分子量約6500、等電点12.2の強塩基性タンパクであった。

アミノ酸配列および S-S 架橋位置は Cytotoxin I, II とも同じ方法により決定した。すなわち、N末端付近のアミノ酸配列については還元カルボキシメチル (RCM) 化した後、エドマン分解法により、C末端付近のアミノ酸配列は RCM 化した後、カルボキシピプチダーゼ A および B 消化法により決定した。残りの部分のアミノ酸配列は RCM 化した後、ブロムシアン分解し、分解物を Sephadex G-25, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製したペプチドフラグメントのエドマン分解法により決定した。

つぎに、Cytotoxin I, II の S-S 架橋位置は N-エチマレイミド存在下に RCM-Cytotoxin I, II を、それぞれサーモライシン消化し、生成するペプチドを Sephadex G-25, ろ紙クロマトグラフィーにより精製して得た4個のしすちん含有ペプチドのアミノ酸組成および過ギ酸酸化の結果から決定することができた (図1, 2)。

つぎに、Cytotoxin II について、その構造と吉田肉腫細胞に対する細胞毒活性との関係を調べた。まず

Cytotoxin II の種々のアミノ酸残基の化学修飾の実験から、細胞毒性を示すためにはアミノ基、特に、その正電荷と、S-S 架橋を含む高次構造が必須であることを明らかにした。また、吉田肉腫細胞を種々の試薬で修飾した後、Cytotoxin II の細胞毒性の変化を検討した結果、N-エチルマレイシドで処理した場合にのみ細胞毒性が低下することを見いだした。

以上の研究により、インドコブラ毒中に多量に含まれる塩基性タンパク、Cytotoxin I, II のアミノ酸配列ならびに S-S 架橋位置することができた。特に、種々のコブラ毒中の塩基性タンパクのうちで、S-S 架橋位置が決定されているのは Cytotoxin I, II のみである。このことにより、コブラ毒中の神経毒タンパクと塩基性タンパクの S-S 架橋位置が互いに類似したものであることがわかり、タンパク分子の進化演程の面で、両者の間には密接な関係があるものと考えられる。また、Cytotoxin I, II の特異的な高次構造が吉田肉腫細胞に対する選択的細胞毒性を示すために必須であることも明らかになった。

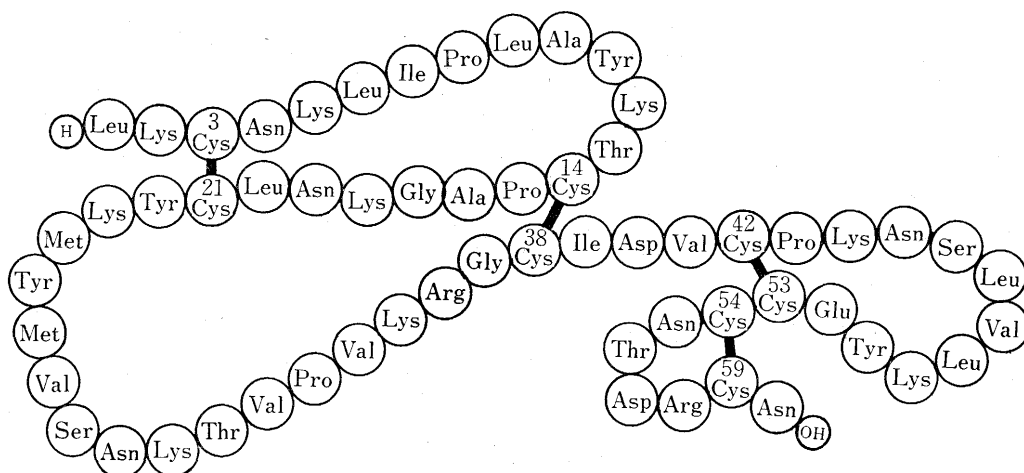


図1 インドコブラ毒中の Cytotoxin I の一次構造

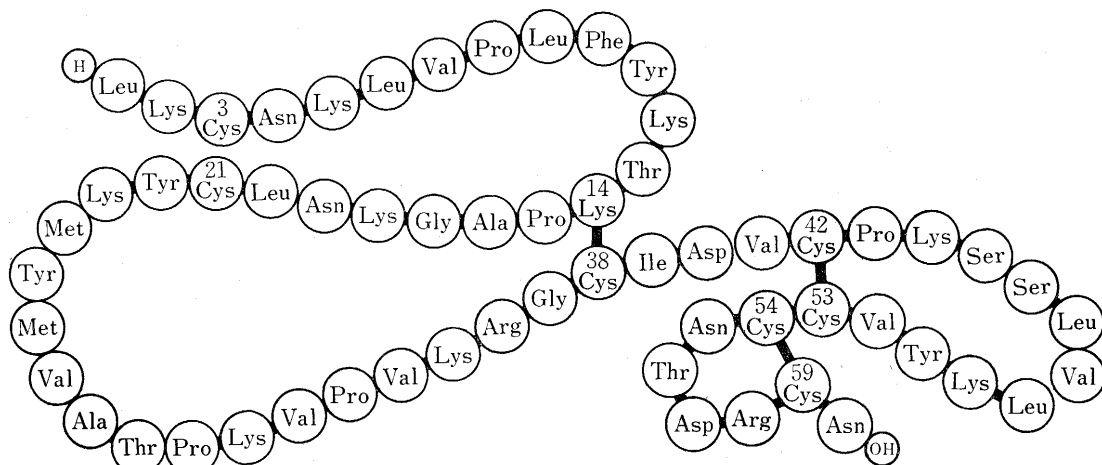


図2 インドコブラ毒中の Cytotoxin II の一次構造

## 論文審査の結果の要旨

蛇毒の毒液中には、他の生物には見られない種々の生理活性物質が濃縮された状態で含まれている。神経毒作用をもつタンパクやいくつかの酵素が単離され、詳しく研究されている。

本論文はインドコブラ毒中に動物細胞に対して毒作用をもつタンパクが存在することに注目し、これを単離し、構造と活性の相関、および細胞に対する作用機作を研究したものである。

神経毒など毒液中のタンパクの多くが中酸性タンパクであるのに対し、細胞毒活性をもつものは塩基性であり、2種存在し、しかもいずれも多量成分であることが見いだされた。2種いずれも均一状態にまで精製し、ジスルフィド結合の位置を含めて一次構造が決定された。すでに決定されている神経毒タンパクと比較すると、いずれも60個のアミノ酸から成るこれらのタンパクが共通の祖先タンパクをもつことが示唆されて興味深い。

吉田肉腫をはじめ各種の腫瘍細胞に対する本タンパク、およびそれに種々の修飾を施したものの作用を調べた結果、本タンパクが腫瘍細胞に特異的に毒作用を示すことが分った。毒作用は主として細胞膜の透過性の攪乱によるものと思われ、細胞の腫瘍化に伴って膜の諸性質に変化が生ずるという一般的事実と考え合せて興味深い。

また、細胞毒作用には個々のアミノ酸残基よりも分子全体のコンホメーションが優先的に働いていることが修飾実験の結果などから示されている。

以上、細胞毒活性を示すコブラ毒中のタンパクの構造、活性について得られた知見は薬学研究上多くの意義あるものを含んでいる。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。