薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (7) 471-484 (1987)

イオンチャネルに作用する海産生物毒の薬理学的研究

大泉 康

三菱化成生命科学研究所, 〒194 東京都町田市南大谷 11 号

Pharmacological Studies on Toxins from Marine Organisms That Act on Ion Channels

YASUSHI OHIZUMI

Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences, 11 Minamiooya,
Machida, Tokyo, 194, Japan

Ciguatoxin (CTX), the principal toxin in ciguateric fish, produced a marked potentiation of contractile responses to agonists in the vas deferens. CTX markedly elevated the Na content of the vas deferens treated with ouabain. These effects of CTX were abolished by tetrodotoxin. These data suggest that CTX causes an increasing Na⁺ permeability across Na channels of smooth muscle cells, and this may play an important role in its mechanism of potentiation. We have shown for the first time that maitotoxin (MTX), the most potent marine toxin known from ciguateric fish, produces a Ca²⁺-dependent release of norepinephrine (NE) from a rat pheochromocytoma cell line, PC12 or adrenergic nerve terminals of the vas deferens and Ca²⁺-dependent contraction of smooth or cardiac muscle. These effects of MTX may be due to an increase in Ca²⁺ permeability which possibly occurred through Ca channels in muscle and nerve membranes. MTX has been widely used as a valuable tool, since Ca²⁺ plays an important role in the regulation of many cellular functions.

We have isolated geographutoxin II (GTX II) from the venom extract of *Conus geographus*. Our pharmacological and electrophysiological results show that GTX II has the novel action of blocking skeletal muscle Na channels without effect on nerve Na channels. GTX II inhibited [³H]saxitoxin binding to Na channels of skeletal muscles but not of nerves. These results indicate that GTX II is the first to discriminate between the tetrodotoxin/saxitoxin receptor site on nerve and muscle Na channels.

Anthopleurin-B (AP-B), a cardiotoxic polypeptide isolated from *Anthopleura xanthogramica*, caused powerful excitatory and inhibitory actions in the ileum, taenia caeci and vas deferens. The AP-B-induced contractions of intestinal smooth muscles are due to the excitation of cholinergic nerves, while that of the vas deferens is caused by the NE release from adrenergic nerve endings. The AP-B-induced relaxation of the taenia caeci is due to the excitation of adrenergic nerves, while the relaxation of the ileum is mediated through non-adrenergic inhibitory mechanisms.

Palytoxin (PTX) caused a first rapid contraction followed by the slow phasic contraction of the vas deferens. Our results reveal that the first component is the result of a direct action of PTX on smooth muscle site, whereas the second phase is the result of an indirect action mediated through the NE release from adrenergic nerve endings. Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase may be involved in the promotion of the first contraction of PTX. AP-B and PTX provide useful probes to study the neurotransmitter release.

Keywords—marine toxin; Na channel; Ca channel; muscle; nerve; ciguatoxin; maitotoxin; geographutoxin II; anthopleurin B; palytoxin

1. はじめに

海に生息する生物の種類は膨大な数にのぼり、海洋資源として人類の福祉に役立つ財宝であるといえる。特に海洋動物の種類は数十万種に達すると言われており、昆虫を除くと大部分の動物は海に生息していることにな

本総説は、昭和 62 年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

Fig. 1. Ion Channel Model

る。これまでに海洋生物から海人草の駆虫成分，棘皮動物の抗真菌成分，イソメの殺虫成分など応用開発研究の対象として注目すべき生理活性物質が単離され，医薬品あるいは農薬として利用された。またそれぞれフグ毒及び赤潮生物毒として取出されたテトロドトキシン (TTX) とサキシトキシン (STX) は選択性が高く優れ，Na チャネルの生理機構の解明のための必須な tool として多くの生理学者，薬理学者，生化学者に汎用されている。近年，細胞の生理機能の調節機構に関する分子レベルの研究は急速に進歩した。これには特異的な作用を示すトキシン類の寄与が極めて大きいと言える。このような豊富な海洋生物の中には興味深い生理活性物質が少なからず存在することが予想される。しかし，研究材料の確保が容易でないなどの大きな問題があり，その研究は大変魅力的な割にはあまり進展していないのが現状である。海産生理活性物質に関する薬理的及び有機化学的研究は，まだ未開拓の分野であり，今後より一層の発展が期待されている。本稿では細胞の生理機能の調節にとって極めて重要な役割を果しているイオンチャネルの謎を解明するのに有用な海産毒の作用について述べる。

2. イオンチャネル

本論に入る前にイオンチャネルについて簡単に説明しておきたい。細胞膜の興奮性を直接調節しているのは，蛋白質から出来ているイオンチャネルと呼ばれるイオンの通過する細孔である (Fig. 1)。この孔は通過するイオンを選択することが出来る。神経や骨格筋の細胞は，静止時において細胞内が外部に対して電氣的に負になっている。通電などの刺激によって電位がある一定レベル (閾膜電位) を越えると，Na 及び Ca チャネルの活性化ゲートが開き，それぞれのイオンに対する透過性が増大する。この閾膜電位の値は，それぞれのチャネルによって異なる。しかし，更に電位が減少してある一定以上に達すると，両チャネルの不活性化ゲートが閉じて Na⁺ や Ca²⁺ の流入が減少する。これをチャネルの不活性化という。これに少し遅れて，K チャネルの活性化ゲートが開き，K⁺ が流出するので，再び負の電位に引き戻される。この興奮に伴う一過性の電位の変化を活動電位という。

最近，天然界から薬理的に重要な神経毒が発見された。この中には Na チャネルに結合し，その機能を変える神経毒があり Table I¹⁾ に示したように Na チャネルの結合部位によって4つの種類に分類される。第1のグループは，receptor site 1 に結合する TTX や STX であり，Na チャネルの興奮を抑制する。第2のグループは，バトラコトキシン，ベラトリジン及びグラヤノトキシンなどの毒である。これらのトキシンは receptor site 2 に結合し，活性化，不活性化の2種類のゲートが開状態から閉状態に変化するのを抑制することにより，チャネルを開き放しの状態にする。第3のグループは，Na チャネルの receptor site 3 に結合するイソギンチャク毒シーアネモネトキシン類 (トキシン II など) や

TABLE I. Neurotoxin Receptor Sites on the Sodium Channel

Site	Neurotoxins	Physiological effect
1	Tetrodotoxin Saxitoxin	Inhibit ion transport
2	Veratridine Batrachotoxin Grayanotoxin Aconitine	Cause persistent activation
3	North African α scorpion toxins Sea anemone toxins	Slow inactivation
4	American β scorpion toxins	Enhance activation

北アフリカ産サソリ毒 α -スコルピオントキシン類などポリペプチド毒である。これらのトキシンは、不活性化ゲートの開状態から閉状態になるのを特異的に抑制するので、このチャネルの開口時間が延長されて Na^+ の透過性が増大する。第4のグループの神経毒は、メキシコ産サソリ毒 β -スコルピオントキシン類と称されるポリペプチドで Na チャネルの receptor site 4 に結合する。このトキシンは Na チャネルの活性化ゲートに特異的に効果を及ぼすことにより、膜の発火を起こす。

3. シガテラ魚の毒

熱帯・亜熱帯のサンゴ礁海域に生息する本来は無毒の食用の魚が毒化して、しばしば食中毒を引き起こすことが知られている。この食中毒はシガテラと呼ばれ、死亡率は低い、特異的な症状が長く続くという。この食中毒の症状は、1) 低温の物体に触れると痛みを感じる知覚異常（ドライアイスセンセーション）、2) 下痢、嘔吐などの消化器系障害、3) 血圧降下や心拍数の減少など循環器系障害、4) 脱力感、関節痛などその他の障害、の4つのタイプに分けられる。

1) シガトキシンとスカリトキシン シガテラ魚の主要な毒はシガトキシン (CTX) と呼ばれ、古くからその化学的及び薬理学的研究が行われてきた。この CTX は鞭毛藻の一種である *Gambierdiscus toxicus* によって生産され食物連鎖によって魚に移行したものである。Scheuer らは大量のドクウツボから 1.3 mg の CTX を単離したが、未だその化学構造の解明に至っていない。²⁾ CTX のマウスにおける急性毒性 ($0.45 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) は強く海産毒としては後で述べる マイトトキシン (MTX) に次ぐ猛毒である。CTX の興奮膜に対する作用は、まず Ryner らによって最初に検討された。それによると、CTX がアmaksアメフランシの神経節の膜電位を脱分極させたり、³⁾ カエル骨格筋の細胞膜の Na^+ 透過性を増加させる。⁴⁾ この CTX の作用が TTX で抑制されるので、CTX は Na チャネルに作用すると考えられる。

筆者らは、今まで検討されていなかった CTX の平滑筋に対する作用をモルモット輸精管を用いて詳細に検討した。その結果、アドレナリン (Ad) 作動性神経終末からノルエピネフリン (NE) 遊離に基づく収縮作用⁵⁾ 及び平滑筋収縮薬の収縮の増感現象が見い出された (Fig. 2)。⁶⁾ ここで特記すべき点は、この増感現象が TTX によって完全に抑制され、低 Na^+ 溶液でも顕著に抑制されることである。また、神経機能が不可逆的に退化した低温保存標本やフェントラミン存在下でも、この CTX の作用が認められる。 Na^+ , K^+ -ポンプ阻害剤 (ウバイン) 存在下で CTX を作用させると、輸精管の組織 Na 含量はコントロールのそれに比べ 30% も増加し、この CTX の作用も TTX で完全に抑制される (Fig. 3)。⁶⁾ CTX が Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase (Na^+ , K^+ -ATPase) 阻害作用を示さないことなどから、CTX による増感現象は輸精管平滑筋細胞膜の Na チャネルの Na^+ の透過性が増加したために起こると考えられる。この CTX の発見により、平滑筋にも Na チャネルが存在する可能性が

Fig. 2. Effect of CTX on the Dose-Response Curves for NE (A), Acetylcholine (B) or High-K (C) in the Guinea-Pig vas Deferens ○, Control; □, Treatment with CTX (10^{-7} g/ml); and ■, Treatment with CTX ($>10^{-7}$ g/ml)

NE, ACh or high-K was added 30 min after administration of CTX. Each dose-response curve was obtained by using different tissues. The maximum response to NE (3×10^{-4} M), ACh (3×10^{-5} M) or high-K (100 mM) is expressed as 100%. Vertical lines indicate S.E.M. ($n=6$).

初めて示唆された点が注目されることである。一方、シガテラ魚ナンヨウブダイの食中毒の症状には、平衡喪失、歩行失調、持続性のふるえが認められることがある。この魚の食中毒原因毒はスカリトキシンと呼ばれ、その薬理作用は不明であった。筆者らは、スカリトキシンの作用をモルモット輸精管及び消化管を用いて詳細に検討したところ、この毒が末梢神経の Na チャネルを活性化させて NE 及びアセチルコリンを遊離させることにより、収縮作用を示すことを明らかにした。⁷⁾

2) マイトトキシン シガテラ魚サザナミハギの食中毒の原因物質はマイトトキシン (MTX) と呼ばれ、*G. toxicus* によって生産され魚の体内に移行したものである。マウスにおける MTX の最少致死量はわずか $0.15 \mu\text{g/kg}$ (i.p.) である。これは TTX の 50 倍の強さに相当し、今まで知られている海産毒の中で最も強いものである。しかし、この毒の化学構造の詳細は不明であり、その薬理作用も最近まで検討されていなかった。

筆者らは、ラット副腎髄質腫細胞 (PC12 細胞) にあらかじめ [^3H]NE を取り込ませ、MTX を作用させたところ、[^3H]NE の遊離が顕著に増加することを初めて見出した。^{8,9)} MTX のこの作用は外液 Ca^{2+} 濃度に依存性を持ち、 Ca^{2+} 除去液では完全に消失する。また、MTX は PC12 細胞の ^{45}Ca 取り込みを著しく促進する。この MTX による [^3H]NE 遊離及び ^{45}Ca 取り込みの促進効果は、外液から Na^+ を除去しても顕著に認められることから、 Na^+ を介さず Ca^{2+} の取り込みを直接促進させて NE の遊離を引き起こすと考えられる。MTX の作用を Ca^{2+} の取り込みを促進させる物質としてよく用いられる KCl 及び A23187 (Ca イオノフォア) と比較検討を行った。その結果を Table II⁸⁾ に示す。MTX と KCl による [^3H]NE 遊離作用は、Ca 拮抗薬ベラパミル、二価陽イオン Mn^{2+} あるいは局所麻酔薬テトラカインで抑制されるが、A23187 の [^3H]NE 遊離作用はベラパミルやテトラカインで影響を受けない。以上の結果は、PC12 細胞における MTX の作用機構が A23187 のような Ca イオノフォアのそれとは全く異なっていることを示している。MTX による PC12 細胞からの NE 遊離は、外液の Ca^{2+} 濃度に依存して起こるが、MTX 存在下における Ca 用量-作用曲線は、ベラパミルによって高用量側へ平

Fig. 3. Effects of TTX on the CTX-Induced Alteration of the Tissue Na^+ and K^+ Content in the Presence of Ouabain (Ouab)

CTX (5×10^{-7} g/ml) was added 30 min after treatment with Ouab (10^{-5} M) and TTX (10^{-6} M). The ion content was measured 30 min after application of CTX. Vertical lines indicate S.E.M. ($n=6$). a) Significance with $p < .01$ when compared to Ouab alone.

□ Ouab; ■ Ouab+CTX.

TABLE II. Effect of Several Agents on the Norepinephrine Release and Ca^{2+} Influx Induced by Maitotoxin, K^+ , and A23187

Addition	Percentage of response to				
	[^3H]Norepinephrine			^{45}Ca influx	
	Maitotoxin	K^+	A23187	Maitotoxin	K^+
	10^{-8} (g/ml)	51.4 (mM)	20 (μM)	10^{-8} (g/ml)	51.4 (mM)
None	100	100	100	100	100
Tetrodotoxin (1 μM)	90	ND	ND	ND	ND
Verapamil (30 μM)	0	7	118	53	0
(300 μM)	4	ND	130	5	0
Mn^{2+} (5 mM)	3	1	0	6	2
Tetracaine (1 mM)	0	0	105	0	1

Each value represents the mean of duplicate assay. Values are expressed as a per cent of the amount in the respective control cultures. Per cent release of [^3H]norepinephrine from the control cells induced by various agents were: maitotoxin, 4.10 ± 1.21 ; K^+ , 3.06 ± 0.17 ; A23187, 3.54 ± 0.24 . Ca^{2+} influxes into control cells (nmol/mg/90 s) were: maitotoxin, 14.86 ± 2.33 ; K^+ , 2.40 ± 0.21 . ND, not determined.

行移動される。これは、MTX の作用がベラパミルによって競合的に阻害されることを示している。⁹⁾ 以上の事実は、MTX が PC12 細胞のある種の Ca チャネルを直接活性化していることを示唆している。また、MTX はモルモット輪精管の Ad 作動性神経終末から NE の遊離を引き起こす。¹⁰⁾ この NE 遊離作用は、TTX 処理によって影響を受けず、 Na^+ を栄養液から除去しても認められる。しかし、この効果は Ca^{2+} 除去液あるいはベラパミル処理で抑制される。このような物質は今まで知られておらず、MTX は生理機構解明のための新しい有用な tool として一躍脚光を浴びた。

MTX はモルモット消化管¹¹⁾及び輪精管¹⁰⁾ ウサギ大動脈において Ca^{2+} 依存性の収縮作用を示す。大動脈において各種 Ca 拮抗薬及び二価陽イオンは MTX による収縮の用量-作用曲線及び MTX 存在下の Ca^{2+} の用量-作用曲線をいずれも高用量側に平行移動させる (Fig. 4).¹²⁾ また、これら平滑筋の組織 Ca 含量は MTX によって顕著に増加する。以上の結果は、MTX が平滑筋細胞膜の主として Ca^{2+} 透過性を増加させその結果、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇して収縮が起こることを示している。一方、昆虫の骨格筋の活動電位 (Ca スパイク) は、外液の Ca^{2+} に依存していることが知られている。MTX はこの活動電位の振幅をやや減少させるが、この効果は低濃度の Co^{2+} で拮抗される。K チャネル阻害剤 (TEA) はこの活動電位の持続時間を延長させるが、TEA 存在下で MTX を投与すると、更にその著しい持続時間の延長が認められる。この MTX の作用も Co^{2+} により完全に拮抗される。¹³⁾ 以上の結果は、MTX によって Ca スパイクの波形に変化が認められた最初の例である。

モルモット及びラット心筋において、MTX は陽性変力効果及び陽性変時効果を引き起こす。¹⁴⁾ ラッ

Fig. 5. Effect of MTX (10 ng/ml) on the Time Course of Concentration-Relaxation Cycles in a Single Beating Action of a Cardiac Cell

The degree of longitudinal contraction ($\Delta L/L_0$) was expressed as a ratio to the cell length in the resting state at time zero. Times after the addition of MTX (min): ●, 0; ○, 2.5; ▲, 4; △, 18. The application of the stimulation pulse is indicated as a solid bar on the abscissa.

Fig. 4. Effect of MTX on the log Dose-Contractile Response Curve for Ca^{2+} in the Presence or Absence of Verapamil or MgCl_2 in the Rabbit Aorta

○, MTX; ●, verapamil + MTX; □, MgCl_2 + MTX. The aorta was incubated in a Ca^{2+} -free solution for 60 min before the cumulative application of CaCl_2 . Verapamil (10^{-6} M) or MgCl_2 (10^{-2} M) and MTX (10^{-8} g/ml) were added 45 and 30 min before the application of CaCl_2 , respectively. The maximum response to NE (3×10^{-6} M) is expressed as 100%. Symbols and vertical bars indicate means $\pm$ S.E. of mean ($n=7$).

Fig. 6. Effect of MTX (10 ng/ml) on the Contractile Activity of Myocardial Cells Isolated from Adult Rat Heart in the Absence (a) or Presence (b) of Verapamil ($1 \mu\text{M}$)

In (b), MTX was applied after 10 min pretreatment with verapamil. The value (the mean of three observations) for normally beating (●), arrhythmically moving (○) or irreversibly shortened (▲) myocytes was expressed as a percentage of that in total rod cells (a, 27 cells; b, 36 cells). Myocytes were perfused with a medium containing $1.2 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ and were stimulated by rectangular pulses (2 Hz, 3 ms, 15 V/cm).

ト単離心筋細胞に対する MTX の作用を、高速度カメラシステム及びテレビカメラを用いて検討したところ、MTX 投与後収縮の増大が起こった後 (Fig. 5),¹⁵⁾ 不整拍動する細胞が多くなり遂には不可逆的なダメージを受けた細胞になる (Fig. 6).¹⁵⁾ このような心筋細胞に対する毒性はベラパミルなどの Ca 拮抗薬で抑制されることが明らかとなった。心筋に比較的高用量の MTX を投与すると、細胞内への Ca^{2+} 流入が急激に起こり、サルコメアの過剰収縮、ミトコンドリアの膨化変性、グリコーゲン顆粒の消失などの電子顕微鏡的微細構造の変化が認められる (Fig. 7).¹⁶⁾ ところで、虚血心筋またその再灌流心筋では、 Ca^{2+} の細胞内濃度が異常に増加する (Ca-overload). それに伴って起こる心筋の所見は MTX で引き起こされた微細構造の変化に驚くべきほど酷似して

Fig. 7. Electron Micrographs of Myocardial Cells Sampled from Guinea-Pig Isolated Left Atria Incubated for 30 min in Normal Krebs-Ringer Medium (a) or in the Medium Containing MTX (b, 5×10^{-9} g/ml; c and d, 3×10^{-8} g/ml)

Magnification: a and c $\times 8800$, b and d $\times 11000$. N, nucleus; M, mitochondria; mf, myofibrils; gl, glycogen granules; sg, specific granules (photographed by S. Kondo).

いる。これらの結果は、MTX が Ca^{2+} と心筋虚血時の形態変化との関係を解明するための有用な試薬として利用可能なことを示唆している。

筆者らのグループが 1982 年に MTX の Ca 依存性の作用を報告して以来,⁸⁾ MTX を用いた薬理学的、生理学的研究が活発に行われている。まず、Freedman らは、MTX が培養神経細胞 NG 108-15 の ^{45}Ca の取り込み促進効果が、Ca チャネルの開口時間を延長する作用をもつ BAY K8644 によって増強されることを示し、MTX が Ca チャネルを直接活性化していると報告した。¹⁷⁾ この他、MTX はカエル骨格筋の持続的収縮、¹⁸⁾ ラット脳シナプトソームへの ^{45}Ca の流入、¹⁹⁾ ラット脳下垂体細胞からのホルモンの分泌²⁰⁻²³⁾ をそれぞれ引き起こすという。

以上述べたように MTX が種々の筋肉、神経及び分泌細胞において顕著な Ca^{2+} 依存性の反応を示すことが明らかにされた。最近、細胞の増殖性、運動性、エンドサイトシスなどにも Ca^{2+} が調節的に機能しており、生理学的性質の異なった Ca チャネルが広く生物界に分布していることが明らかにされつつある。今後 MTX は細胞内情報伝達機構の解明のために Ca アゴニストとして更に広く利用されるに違いない。

以上述べた 3 種の主要なシガテラ毒の研究成果は、これらの毒の薬理学的性質を明確にさせ食中毒発現機構解明に大きな手掛りを与えたといえよう。

4. イモ貝の毒

1) アンボイナのペプチド毒 熱帯・亜熱帯の海域に生息しているイモ貝類は肉食性の巻貝で、毒矢を用いて餌生物を捕食する。イモ貝のなかで最も毒性の強いアンボイナ *Conus geographus* はヒトを刺して死亡させる

geographotoxin I:

geographotoxin II:

Fig. 8. Chemical Structures for GTX I and II

Fig. 9. Effects of GTX II (3×10^{-7} M) on Contractions of the Mouse Hemidiaphragm Induced by Various Agonists

Agonists except caffeine (Caf) were administered directly to the bath medium. Caf was applied by changing to a Ca^{2+} -free medium containing 20 mM Caf after a 30-min incubation with the Ca^{2+} -free medium. GTX II was added 15 min before the addition of agonists. The maximal response of each preparation to direct stimulation (0.1 Hz, 5 ms, supramaximal voltage) is expressed as 100%. Each datum represents the mean $\pm$ S.E.M. ($n=4-6$). Gra, grayanotoxin I; Ver, veratridine.

□ none; ▨ GTX II (3×10^{-7} M).

Fig. 10. Effects of 1×10^{-8} M GTX II on Sodium Currents in a Bullfrog Sartorius Muscle Fiber

Potassium currents were eliminated by 120 mM CsF. A and B, families of sodium currents before (A) and 15 min after (B) treatment with GTX II. Membrane potential steps are in 20-mV increments (30–170 mV from the holding potential of –100 mV. C and D, time-lapsed multiple photographs of sodium currents associated with a step depolarization from –100 mV to –30 mV before and during GTX II treatment for 15 min (C) and during washing out with toxin-free solution for 16 min (D).

こともあり、猛毒な貝として恐れられている。筆者らは、アンボイナの毒腺抽出物にマウス骨格筋の収縮を強く麻痺させることを認めたので、その活性物質の分離を行った。その結果、ジェオグラフトキシン I 及び II (GTX I 及び II) と名付けたアミノ酸 22 残基のペプチド毒を単離し、その一次構造を解明することに成功した。^{24,25)} これらのペプチドの化学構造上の特徴は、天然界で希なアミノ酸であるヒドロキシプロリンが 3 残基も含まれていること、シスチンが 6 残基含まれ内部に S-S 結合が 3 個存在する点である (Fig. 8)。

マウスにおける急性毒性及び骨格筋の収縮を阻害する効力は、GTX II の方が GTX I より強い。GTX II は、マウス骨格筋の直接電気刺激による収縮を用量依存性に抑制し、その IC_{50} 値は 3×10^{-8} M で、ほぼ TTX と同程度の阻害効力をもつ。²⁶⁾ GTX II は Na チャネルを興奮させることにより筋収縮を起こすグラヤノトキシンやベラトリジンの収縮反応も抑制する。しかし、Ca チャネルを興奮させる KCl あるいは骨格筋の筋小胞体から Ca^{2+} を遊離させるカフェインによる収縮には影響を与えない (Fig. 9)。²⁶⁾ 更に、骨格筋活動電位の発生及び内向きの Na 電流 (Fig. 10)²⁷⁾ が GTX II によって抑制されることなどから、このトキシンは Na チャネルの選択的阻害剤であることが明らかになった。ところが、驚くべきことに GTX II は骨格筋の Na チャネルを強力に阻害するにもかかわらず、ザリガニ巨大神経、ラット上頸交感神経節、培養神経細胞 N1E-115 の活動電位には全く影響を与えない (Fig. 11)。²⁷⁾ なおモルモット輸精管の Ad 作動性神経の Na チャネルは、比較的高濃度の GTX II によって阻害される。²⁸⁾ そこで筆者らは、GTX II の Na チャネル阻害効力が組織によって大きく異なる原因を明らかにするため、骨格筋及び神経の Na チャネルに対する GTX II の親和性を検討した。GTX II は、 $[^3H]$ -STX のラット骨格筋のホモジネート及び T 管膜の Na チャネルに対する結合を極めて低濃度から抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ 6×10^{-8} M 及び 3×10^{-8} M である。しかし、ラット上頸交感神経節の Na チャネルへの $[^3H]$ STX 結合に対しては、GTX II の濃度を上げてしても影響を与えない。T 管膜への $[^3H]$ STX の結合実験データをスキッチャードプロットによって解析を行ってみると、STX の結合は GTX II によって競合的に阻害されることが分かった (Fig. 12)。²⁹⁾ ラット脳シナプトソームにおいて GTX II は、 $[^3H]$ STX の結合を比較的高用量において用量依存性に抑制するが、 $[^3H]$ バトラコトキシン及び $[^{125}I]$ - α -スコルピオントキシンの結合には阻害効果を全く示さないので、GTX II は Na チャネルの receptor site 1 に結合し、そのチャネルの機能を阻害すると推定される。筆者らは、このようにして Na チャネルの receptor site 1 の構造が骨格筋と神経では異なっていることを初めて明らかにすることに成功した。すなわち GTX II は、筋肉と神経の Na チャネルの構造の違いを識別できる最初の物質であり、Na チャネルをサブタイプに分ける試薬として注目され、これから盛んに利用されるであろう。

一方、Olivera の研究グループは、アンボイナから単離した μ -コノトキシン GIHA (GTX I と同一と思われる) の作用を電気生理学的に検討し、この毒がラット脳の Na チャネルに影響を与えずに、骨格筋の Na チャネルの電流を阻害することを示した。³⁰⁾ 更に彼らは、 $[^3H]$ STX の種々の組織の Na チ

Fig. 11. Effects of GTX II on Various Tissues

A and B, effect on the action potential of guinea-pig extensor digitorum longus muscle. Action potential (upper trace) and its derivative (lower trace) before (A) and 6 min after (B) application of 5×10^{-7} M GTX II. Ca^{2+} -free medium was used to depress muscle contraction. C and D, effect on crayfish giant axon. Action potential (lower trace) and its derivative (upper trace) before (C) and 1 h after (D) application of 5×10^{-6} M. E and F, effect on guinea pig papillary muscle of the heart. Action potential (upper trace) and contraction (lower trace) before (E) and 30 min after (F) application of 1×10^{-6} M GTX II. The derivative of the corresponding action potential shown in the inset was recorded at twice faster sweep speed.

Fig. 12. Binding of $[^3\text{H}]\text{STX}$ to T-Tubular Membranes of Rabbit Skeletal Muscles in the Presence or Absence of GTX II

T-tubular membranes were incubated with increasing concentrations of $[^3\text{H}]\text{STX}$ from 0.4 to 40 nM for 30 min at 36°C and bound STX was measured using the rapid membrane filtration assay. Nonspecific binding in the presence of $2\ \mu\text{M}$ tetrodotoxin has been subtracted from the results.

a) $[^3\text{H}]\text{STX}$ binding was measured in the presence (●) or absence (○) of 50 nM GTX II and are plotted. b) $[^3\text{H}]\text{STX}$ binding in the presence (●) or absence (○) of GTX II is presented as a Scatchard plot.

チャンネルへの結合に対する μ -コノトキシン **GIIA** 及び **GIIB** の影響を検討し、両者とも骨格筋と発電器官の Na チャンネルに強い親和性を示し、神経と心臓の Na チャンネルに対しては親和性が弱いことを示した。⁸¹⁾ また、これらのトキシンと TTX の Na チャンネルへの親和性の違いによって Na チャンネルをサブタイプ化することが可能であるとした。更に Yanagawa らも μ -コノトキシン **GIIA** が $[^3\text{H}]\text{TTX}$ の発電器官と脳 P_2 画分への結合を阻害することを示し、このトキシンが receptor site 1 と結合することにより、Na チャンネルの機能が阻害されるとした。⁸²⁾

アンボイナから神経筋接合部のシナプス前膜に作用し、その伝達を阻害するペプチド毒 ω -コノトキシン (ω -CgTX) が単離された。⁸³⁾ Kerr と Yoshikami は、 ω -CgTX の作用を電気生理学的手法を用いて検討し、このトキシンが神経の Ca チャンネルの選択的阻害剤であることを示した。⁸⁴⁾ Ca チャンネルは電気生理学的性質により L 型、T 型及び N 型の 3 つのサブタイプに分けられているが、 ω -CgTX は神経の L 型と N 型の Ca チャンネルだけを阻害するという。⁸⁵⁾

2) ニシキミナシの蛋白質毒 ニシキミナシ *Conus striatus* は肉食性のイモ貝で、その毒性はアンボイナより弱い。筆者らは、ニシキミナシの毒腺抽出物の薬理作用を検討したところ、強い強心作用のあることを見出した。そこで、その活性を指標にして強心成分の分離を行ったところ、ストリアトキシンと名付けた分子量約 25 000 の糖蛋白質を単離することができた。⁸⁶⁾ ストリアトキシンはモルモット心筋において $3 \times 10^{-9}\ \text{M}$ という極めて低濃度で強心作用を示す。また心収縮力の増加に伴って活動電位の持続時間の延長が認められる。これらのストリアトキシンの効果は、TTX により抑制される。以上の結果から、ストリアトキシンは心筋の Na チャンネルの不活性化ゲートを閉じにくくさせて、その開口時間を延長させることにより、強心作用を示すと結論される。⁸⁷⁾ ストリアトキシンは、Na チャンネルの不活性化過程を解明する tool として有望であると思われるが、更に今後の詳細な検討が必要である。

5. 腔腸動物の毒

1) イソギンチャクペプチド毒 近年、イソギンチャクから Na チャンネルの receptor site 3 に特異的に結合するペプチド類が単離され、Na チャンネルの生理機構解明のための薬理試薬として広く使われている。まず、*Anemonia sulcata* から ATX I, II 及び III と名付けられた 3 種のペプチド毒が単離された。この ATX 類は心筋やザリガニ巨大神経の活動電位持続時間を延長させる。^{88,89)} この作用は TTX 処理や Na^+ 除去液中で消失するので、これらの毒は Na チャンネルの不活性化過程を抑制すると考えられている。一方、*Anthopleura xanthogrammica* からは強心性ポリペプチドであるアンソプレウリン-A, B 及び C (AP-A, B 及び C) が単離された。これらのペプチドの構造と薬理作用は、前に述べた ATX 類のそれらに類似している。AP-A は、心臓に対し極めて低濃

度から心拍数に影響を与えることなく強心作用を示す。⁴⁰⁾ モルモット心筋及びザリガニ巨大神経の Na 電流の不活性化は AP-A により遅くなり、活動電位持続時間が延長される。^{41, 42)}

筆者らは、各種平滑筋に対する AP-B の作用を検討したところ、このペプチドが極めてユニークな収縮及び弛緩作用を示すことを発見した。^{43, 44)} AP-B はモルモット腸管において一過性の最大収縮反応を引き起こした後、弛緩反応を示す。このような二相性の反応は周期的に長時間にわたって起こる (Fig. 13).⁴³⁾ 一方、モルモット盲腸紐において AP-B は、持続的収縮反応を引き起こし、その間周期的に弛緩反応を示す (Fig. 14). これらの AP-B の反応は、TTX での処理や、低 Na⁺ 溶液中で抑制される。腸管の AP-B による収縮作用は、コリン作動性神経を抑制する薬物 (アトロピン) で抑制されるが、その弛緩反応は Ad 作動性神経を抑制する薬物 (フェントラミンやプレチリウム) で影響を受けない。盲腸紐の場合には AP-B による収縮はアトロピンにより抑制され、またその弛緩はフェントラミンなどで抑制される。これらの事実は、AP-B による両組織の収縮反応はコリン作動性神経終末からのアセチルコリン遊離によって起こること、また AP-B の弛緩反応は、盲腸紐の場合には Ad 作動性神経が、腸管の場合には非 Ad 作動性神経がそれぞれ興奮するために起こることを示している。⁴³⁾ モルモット輸精管に AP-B を投与すると、リズムカルな収縮が長時間観察される。AP-B の用量を上げるにつれて、輸精管の収縮頻度が増加する (Fig. 15).⁴⁴⁾ この収縮反応はフェントラミン、プレチリウムあるいは TTX によって抑制される。また AP-B は輸精管の Ad 作動性神経終末からの NE 遊離量を用量依存性に増加させ、10⁻⁵ M においてはその遊離量を対照群の約 300 倍も促進させる。この AP-B の NE 遊離作用も TTX 処理で完全に抑制される。AP-B の作用のイオン依存性を検討した結果、NE の遊離は外液 Na⁺ が 80—150 mM において濃度依存性に増加すること (Fig. 16).⁴⁵⁾ 外液 Ca²⁺ の濃度が 0.2—0.7 mM において濃度依存性に増加するが、0.7—2.5 mM においては逆に濃度を上げるにつれて抑制されることなどが明らかにされた (Fig. 17).⁴⁵⁾ このように AP-B による NE 遊離における Ca²⁺ の至適濃度が 0.7 mM 付近であり、それ以上では低下していくことは興味深い現象である。以上の結果から、AP-B による輸精管の収縮反応は Ad 作動性神経終末からの NE 遊離に基づく間接作用であると考えられる。

以上述べたことをまとめると、これらのペプチド

Fig. 13. Effect of Atropine, Phentolamine or Bretylium on the Contraction and the Relaxation Induced by AP-B in the Guinea-Pig Isolated Ileum

(a) Control (AP-B 10⁻⁸ M); (b) atropine (Atr) 10⁻⁶ M; (c) phentolamine (Phent) 2 × 10⁻⁶ M; (d) bretylium (Bret) 10⁻⁴ M.

Fig. 14. Effect of Phentolamine or Guanethidine on the Contraction and the Relaxation Induced by AP-B in the Guinea-Pig Isolated Taenia Caeci

(a) Control (AP-B 3 × 10⁻⁸ M); (b) phentolamine (Phent) 10⁻⁶ M; (c) guanethidine (Guan) 3 × 10⁻⁵ M. AP-B was added at arrows after treatment with Phent or Guan for 15 min.

Fig. 15. Isometric Rhythmic Contractile Response to Different Concentrations of AP-B in the Guinea-Pig Isolated vas Deferens

AP-B was added 20 min after washing out the first standard dose of norepinephrine (NA, 3×10^{-5} M); 90 min after application of AP-B, the second dose of NA was added in the presence of AP-B. The presence of AP-B is indicated by the broken bar. Vertical calibration applies to each record.

Fig. 16. Effect of Varying the Concentration of External Na^+ on Release of Norepinephrine (NA) by AP-B (3×10^{-8} M)

For each experiment, vasa deferentia were incubated in 4 ml medium. For low Na^+ -Krebs solution, NaCl was replaced by isotonic sucrose. Symbols indicate mean ($\pm$ SE, $n=5$) of amount of NA released by successive 30 min incubations in medium containing AP-B (3×10^{-8} M).

○, none; ●, AP-B.

Fig. 17. Effect of Varying the Concentration of External Ca^{2+} on Release of Norepinephrine (NA) by AP-B (3×10^{-8} M)

For each experiment, 3 vasa deferentia were incubated in 4 ml medium. Symbols indicate mean ($\pm$ SE, $n=5$) of amount of NA released by successive 30 min incubations in medium containing AP-B (3×10^{-8} M).

○, none; ●, AP-B.

毒は平滑筋を支配している自律神経あるいは心筋の Na チャネルの receptor site 3 に結合することにより、その不活性化ゲートの開口時間を延長させてチャネルの Na^+ 透過性増大 (興奮) を引き起こす。その結果、平滑筋では自律神経から神経伝達物質が遊離して収縮あるいは弛緩が起こり、心筋では収縮力が増大すると推定される。

2) イワスナギンチャクの毒パリトキシン 亜熱帯サンゴ礁に生息しているイワスナギンチャクには猛毒パリトキシン (PTX) が含まれている。PTX の化学構造の解明は困難を極めたが、最近ようやく構造決定された。⁴⁰⁾ PTX の分子量は 2679 で、糖、アミノ酸あるいは核酸などの反復構造を含まない有機化合物としては最大である。PTX のマウスにおける静脈内投与による LD_{50} 値はわずか $0.5 \mu\text{g/kg}$ で海産毒として前に述べた MTX に次ぐ毒性である。この致死作用には、PTX の冠血管の収縮などによる心血管系の影響が深く関与している。そのため血管拡張薬が PTX の致死作用を減弱するという。^{47, 48)}

PTX は 10^{-12} M という極めて低濃度で薬理作用を発現させる。骨格筋⁴⁹⁾及び神経^{50,51)}において PTX は顕著な膜の脱分極作用を示す。この PTX による脱分極は TTX を処理しても影響を受けないが、外液から Na^+ を除去すると抑制される。消化管平滑筋においても膜電位を脱分極させ、顕著な収縮を引き起こす。その平滑筋の収縮は、 Mg^{2+} や D-600 などの Ca 拮抗薬で抑制されるので、⁵²⁾ 平滑筋細胞膜の Ca^{2+} 透過性が増大したために起こるとされてきた。しかし PTX による平滑筋収縮作用機構には不明な点が多く残されていた。

そこで、筆者らはモルモット輸精管を用いて PTX の作用を詳細に検討した。輸精管にこのトキシンを投与すると、初め速かな収縮 (first component) とそれに続くゆるやかな収縮 (second component) からなる二相性の収縮反応が認められる。この PTX の収縮のいずれの component も TTX によってほとんど影響を受けない。この second component はフェントラミン、レセルピンあるいは 6-ヒドロキシドパミンで処理したり、低 Na^+ 溶液中では著しく抑制される。ところが first component は、上に述べたいずれの処理によっても抑制されない。また、PTX は輸精管の Ad 作動性神経終末から NE 遊離を顕著に増加させ、その作用は外液 Ca^{2+} に依存性がある。以上の事実から PTX の first component は平滑筋直接作用により、second component は Ad 作動性神経から NE が遊離して生ずる間接作用であると考えられる。これは、PTX による平滑筋の収縮に神経伝達物質の遊離が大きく関与していることを示した最初の例である。

興味深いことに、PTX による輸精管の収縮の first component は、 Na^+ , K^+ -ATPase 阻害剤であるウワバインによって顕著に抑制される。ところが予想に反して、この second component は、ウワバインによって逆に増強される。⁵⁴⁾ この結果は、PTX による輸精管平滑筋直接作用がウワバインで選択的に抑制されるが、神経からの NE 遊離は促進されることを示している。その後、血管平滑筋においても PTX の収縮作用 (直接作用) がウワバインなどの強心配糖体によって抑制されることが報告された。^{55,56)} 一方、Habermann らは、PTX が赤血球から K^+ 遊離を引き起こすことを示したが、⁵⁷⁻⁵⁹⁾ この PTX の作用もウワバインによって拮抗されるという。また彼らは、 $[\text{H}]$ ウワバインの赤血球の膜画分への結合が PTX によって阻害されることを明らかにし、以上の結果に基づいて、PTX が Na^+ , K^+ -ATPase に作用して、その近傍に細孔 (チャネル) を形成すると推論している。以上述べた事実から、少なくともある種の細胞においては PTX の作用機序として Na^+ , K^+ -ATPase が深く関与していることが、明らかとなった。

PC12 細胞は、Ad 作動性神経の生理機能を研究するための良い細胞モデル実験材料として汎用されている。筆者らは、PTX の NE 遊離作用を詳細に調べるため、このトキシンの PC12 細胞に対する作用を検討した。PTX による PC12 細胞からの $[\text{H}]$ NE 遊離は、TTX で影響を受けないこと、低い濃度の PTX の作用は外液の Na^+

Fig. 18. Effects of Varying the Concentration of External Na^+ on $[\text{H}]$ NE Release Induced by PTX from PC12 h Cells

PTX was added after a 2-min incubation in desired concentrations of Na^+ . Measurements of $[\text{H}]$ NE released were made 2 min after the application of 30 nM (●) or 1 μM (○) PTX. The amount of $[\text{H}]$ NE released in the medium is expressed as percentage of total $[\text{H}]$ NE stored in the cells. Each point represents the mean of results from triplicate culture dishes.

Fig. 19. Concentration-Response Curve for PTX in ^{22}Na and ^{45}Ca Influxes into PC12h Cells

PC12h cells were incubated for 2 min in the assay medium containing desired concentrations of PTX and 1 μCi of ^{22}Na (○) or ^{45}Ca (●). Each point represents the mean of results from duplicate culture dishes.

に依存し、高濃度の場合には外液の Na^+ ではなく Ca^{2+} に依存することが明らかにされた (Fig. 18).⁶⁰⁾ PTX による PC12 細胞への ^{22}Na 取り込み促進効果は低濃度から認められる。しかし、PTX の濃度を上げると ^{22}Na だけでなく ^{45}Ca の取り込みも増加する (Fig. 19).⁶⁰⁾ これらの結果から、低濃度の PTX は主として膜の Na^+ の透過性を増加させることにより、高濃度の PTX は直接 Ca^{2+} の透過性を促進させて $[\text{H}]\text{NE}$ の遊離を起こすと推定される。PTX は、細胞膜に存在するある種の Na チャネルを活性化させるトキシンと思われるが、PTX で処理した神経の細胞膜は、 Na^+ の他に Li^+ 、 Cs^+ や NH_4^+ も通過させるので、⁵¹⁾ PTX の作用が Na チャネルの receptor site 3 に結合するパトラコトキシンなどの神経毒のそれとは異なっていると考えられる。このことから、PTX は新しいタイプのユニークなカテコールアミン遊離試薬といえよう。

6. おわりに

最近、海産生物毒 TTX や STX が Na チャネルに特異的に結合する性質を利用し、放射能で標識した両トキシンの結合を指標にして、 Na チャネル分子を精製することに成功した。更に精製されたチャネル蛋白質を人工膜に組み込み、そのチャネルの機能をすべて備えた再構成膜を作ることにも可能になった。このように海洋生物毒は、イオンチャネルを分子レベルで解明するのに重要な役割を果している。本稿で述べたようにシガテラ、イモ貝、腔腸動物などから得られたトキシン類もイオンチャネルの生理機構の解明のために極めて有用な tool であることが明らかとなった。今後更に海洋生化学資源の開発が進み、イオンチャネルだけでなく、レセプターや細胞内小器官の機能の解明に役立つ生理活性物質が海洋生物から発見され、それらを用いることにより細胞生理学が飛躍的な進歩を遂げることを期待したい。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、いつも心温い御支援、御激励を賜りました恩師東北大学名誉教授 小澤 光先生に深く感謝の意を表します。本研究に御協力、御助言下さいました東北大学農学部教授 安元 健先生、名城大学薬学部教授 平田義正先生、ハワイ大学医学部教授 柴田章次先生、三菱化成生命科学研究所の共同研究者及び研究助手の皆様にも厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) W. A. Catterall, *Science*, **223**, 653 (1984).
- 2) P. J. Scheuer, W. Takahashi, J. Tsutsumi, T. Yoshida, *Science*, **21**, 1267 (1967).
- 3) L. L. Boyarsky, M. D. Rayner, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**, 332 (1970).
- 4) M. D. Rayner, *Fed. Proc.*, **134**, 332 (1970).
- 5) Y. Ohizumi, S. Shibata, K. Tachibana, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **217**, 475 (1981).
- 6) Y. Ohizumi, Y. Ishida, S. Shibata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **221**, 748 (1982).
- 7) M. Tatsumi, A. Kajiwara, T. Yasumoto, Y. Ohizumi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **235**, 783 (1985).
- 8) M. Takahashi, Y. Ohizumi, T. Yasumoto, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7287 (1982).
- 9) M. Takahashi, M. Tatsumi, Y. Ohizumi, T. Yasumoto, *J. Biol. Chem.*, **258**, 10944 (1983).
- 10) Y. Ohizumi, A. Kajiwara, T. Yasumoto, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **227**, 199 (1983).
- 11) Y. Ohizumi, T. Yasumoto, *Br. J. Pharmacol.*, **79**, 3 (1983).
- 12) Y. Ohizumi, T. Yasumoto, *J. Physiol.*, **337**, 711 (1983).
- 13) T. Miyamoto, Y. Ohizumi, H. Washio, T. Yasumoto, *Pflügers Arch.*, **400**, 439 (1984).
- 14) M. Kobayashi, Y. Ohizumi, T. Yasumoto, *Br. J. Pharmacol.*, **86**, 385 (1985).
- 15) M. Kobayashi, G. Miyakoda, T. Nakamura, Y. Ohizumi, *Eur. J. Pharmacol.*, **111**, 121 (1985).
- 16) M. Kobayashi, S. Kondo, T. Yasumoto, Y. Ohizumi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 1077 (1986).
- 17) S. B. Freedman, R. J. Miller, D. M. Miller, D. R. Tindall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 4582 (1984).
- 18) S. Gomi, S. Chaen, H. Sugi, *Proc. Jpn. Acad.*, **60(B)**, 28 (1984).
- 19) H. Ueda, S. Tamura, N. Fukushima, H. Takagi, *Eur. J. Pharmacol.*, **122**, 379 (1986).
- 20) G. Schettini, K. Koike, I. S. Login, A. M. Judd, M. J. Cronin, T. Yasumoto, R. M. MacLeod, *Am. J. Physiol.*, **247**, E520 (1984).
- 21) J. M. Anderson, D. A. Keefer, D. D. Koritnik, T. Yasumoto, M. J. Cronin, *Am. J. Physiol.*, **249**, E337 (1985).

- 22) G. Schettini, A. D. Gogol, R. M. MacLeod, T. Yasumoto, M. J. Cronin, *Eur. J. Pharmacol.*, **109**, 335 (1985).
- 23) I. S. Login, A. M. Judd, M. J. Cronin, K. Koike, G. Schettini, T. Yasumoto, R. M. MacLeod, *Endocrinology*, **116**, 622 (1985).
- 24) H. Nakamura, J. Kobayashi, Y. Ohizumi, Y. Hirata, *Experientia*, **39**, 590 (1983).
- 25) S. Sato, H. Nakamura, Y. Ohizumi, J. Kobayashi, Y. Hirata, *FEBS Lett.*, **155**, 277 (1983).
- 26) Y. Ohizumi, S. Minoshima, M. Takahashi, A. Kajiwarra, H. Nakamura, J. Kobayashi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **239**, 243 (1986).
- 27) M. Kobayashi, C. H. Wu, M. Yoshii, T. Narahashi, H. Nakamura, J. Kobayashi, Y. Ohizumi, *Pflügers Arch*, **407**, 241 (1986).
- 28) Y. Ohizumi, H. Nakamura, J. Kobayashi, *Eur. J. Pharmacol.*, **120**, 245 (1986).
- 29) Y. Ohizumi, H. Nakamura, J. Kobayashi, W. A. Catterall, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6149 (1986).
- 30) L. J. Cruz, W. R. Gray, B. M. Olivera, R. D. Zeikus, L. Kerr, D. Yoshikami, E. Moczydlowski, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9280 (1985).
- 31) E. Moczydlowski, B. M. Olivera, W. R. Gray, G. R. Strichartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5321 (1986).
- 32) Y. Yanagawa, T. Abe, M. Satake, *Neurosci. Lett.*, **64**, 7 (1986).
- 33) B. M. Olivera, J. M. McIntosh, L. J. Cruz, F. A. Luque, W. A. Gray, *Biochemistry*, **23**, 5087 (1984).
- 34) L. M. Kerr, D. Yoshikami, *Nature (London)*, **308**, 282 (1984).
- 35) E. W. McCleskey, A. P. Fox, D. Feldman, R. W. Tsien, *J. Exp. Biol.*, **124**, 177 (1986).
- 36) J. Kobayashi, H. Nakamura, Y. Hirata, Y. Ohizumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 1389 (1982).
- 37) 大泉 康, 梶原晶子, 小林正紀, 中村英士, 小林淳一, 日本薬学会第 105 年会, 金沢, 1985 年 4 月.
- 38) U. Ravens, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **296**, 73 (1976).
- 39) G. Romey, J. P. Abit, H. Schweitz, G. Wunderer, M. Lazdunski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 4055 (1976).
- 40) S. Shibata, T. R. Norton, T. Izumi, T. Matsuo, S. Katsuki, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **199**, 298 (1976).
- 41) K. Hashimoto, R. Och, K. Hashimoto, J. Inui, Y. Miura, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **215**, 479 (1980).
- 42) P. A. Low, C. H. Wu, T. Narahashi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **210**, 417 (1979).
- 43) Y. Ohizumi, S. Shibata, *Br. J. Pharmacol.*, **72**, 239 (1981).
- 44) T. R. Norton, Y. Ohizumi, S. Shibata, *Br. J. Pharmacol.*, **74**, 23 (1981).
- 45) Y. Ohizumi, S. Shibata, *Am. J. Physiol.*, **243**, C237 (1982).
- 46) D. Uemura, K. Ueda, Y. Hirata, H. Naoki, T. Iwashita, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2781 (1981).
- 47) J. S. Wiles, J. A. Vick, K. Christensen, *Toxicon*, **12**, 427 (1974).
- 48) J. A. Vick, J. S. Wiles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **34**, 214 (1975).
- 49) T. Deguchi, N. Urakawa, S. Takamatsu, "Animal, Plant, and Microbial Toxins," Vol. 2, A. Ohsaka, K. Hayashi, Y. Sawai, ed., Plenum Publishing Corporation, New York, 1976, pp. 379-384.
- 50) J. M. Dubois, K. B. Cohen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **201**, 148 (1977).
- 51) I. Muramatsu, D. Uemura, M. Fujiwara, T. Narahashi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**, 488 (1984).
- 52) K. Ito, H. Karaki, N. Urakawa, *Eur. J. Pharmacol.*, **46**, 9 (1977).
- 53) Y. Ohizumi, S. Shibata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 209 (1980).
- 54) Y. Ishida, A. Kajiwarra, K. Takagi, Y. Ohizumi, S. Shibata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 551 (1985).
- 55) Y. Ishida, N. Satake, J. Habon, H. Kitano, S. Shibata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 557 (1985).
- 56) H. Ozaki, H. Nagase, N. Urakawa, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**, 153 (1984).
- 57) E. Habermann, G. Ahnert-Hilger, G. S. Chhatwal, L. Beress, *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 481 (1981).
- 58) E. Habermann, G. S. Chhatwal, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **319**, 101 (1982).
- 59) G. Ahnert-Hilger, G. S. Chhatwal, H. J. Hessler, E. Habermann, *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 486 (1982).
- 60) M. Tatsumi, M. Takahashi, Y. Ohizumi, *Mol. Pharmacol.*, **25**, 379 (1983).