動物起源の生物活性物質の解明

中嶋暉躬

東京大学薬学部, 〒113 文京区本郷 7-3-1

Bio-organic Elucidation of Active Principles in Non-mammalian Origin

Terumi NAKAJIMA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,
Hongo, Bunkyo-ku Tokyo, 113, Japan*

Biologically active materials were characterized chemically from various kinds of amphibian skin, and from the venom of wasps or spiders. The assay system employed for the biological activity on smooth muscle, were vaso-constriction and -dilation, smooth muscle contraction and relaxation.

Cytotrophic action including haemolysis, granulocyte degranulation, platelet aggregation, chemotaxis of leucocyte, and modulation of neural synaptic transmission were adopted for screening of the other materials.

Many kinds of active peptide homologous to mammalian peptide hormone, for example thyrotropin-releasing hormone (TRH), neurotensin, cholecystokinin (CCK), angiotensin, were found in high concentration from the methanol extract of the frog skin. A new cytotrophic peptide family was found both in frog skin and wasp venom. These peptides were rich in hydrophobic amino acids and basic ones. A peptide named mastoparan acts directly on the GTP binding protein as the hormone mimetic action and degranulates histamine granules of the mast cells. Another peptide revealing chemotactic activity for neutrophils acts directly on the FMLP receptor of the cells. These types of cytotrophic peptides modulate a cell signalling system *via* GTP-binding protein in such cells.

Finally, over 15 kinds of neurotoxin were found from the spider venom which inhibit synaptic transmission of glutamate, both for lobster neuromuscular junction and mammalian hippocampal neurons. A specific binding protein for this type of spider toxin was isolated from the bovine brain. The protein is a family of calreticulin previously isolated as a calcium regulating protein from sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle.

Keywords—frog skin peptide; wasp venom; spider venom; G-protein enhancer; polyamine toxin; neural glutamate blocker

1. はじめに

生薬学の書物をみると動物生薬の項にはシャチュウ、ボウチュウ、ロホウボウ、センソ等々、陸棲の小動物起源のものがたくさん載っている。小動物は民間薬としても使われており、ホタル、マゴタロウムシ、アマガエル等いろいろなものがある。センソはガマの分泌毒として大変有名であるが、この成分の1つである強心性ステロイド (bufadienolide) がホタルの虫体に多量にあること

や、¹⁾ ヤマカガシの頸腺に同様の強心ステロイドが含まれていること²⁾ は余り知られていない。これと似たようなことは他にもたくさんあることが十分予想され、新奇な活性物質の発見も十分期待される。これらの物質が我々に対して特異な作用を顕すということはヒト側にこれらの物質に対する受皿があるということに他ならない。したがって、小動物起源の生物活性物質を化学的に解明し、物質としての情報を提供し、かつ、その作用機序を明らかにすることは、薬学領域の研究発展に止まらず、ひろく生命科学の研究に新たな足掛りを与える点で重要である。研究を進めるにあたって、例えば、多量に集めることの出来る家畜等の臓器からの場合と異なり、野生の小動物を多量に集めることはほとんど不可能である。したがって予備的な実験も含めて極めて限られた量で成果を挙げなければならず、そのために分離・精製法などすべてにわたって効率化、微量化、高感度化が要求される。我々はこのような視点に立って新たな生物活性物質の解明と、さらには、その活性発現機構の解明を心がけている。

2. 活性ペプチドの宝庫、カエルの皮膚

ガマ毒中の強心ステロイドや幻覚作用を顕すブフォテニン、あるいはココイの名で知られる南米矢毒ガエルのバトラコキシン、プミリオトキシン、ヒストリオニコトキシン等、あるいはまた、中米の Zetek カエルのフグ毒等々の興味ある活性物質に加えて各種のいわゆる活性アミン類がカエル皮膚に存在する。これらの物質の他に、カエルの皮膚はまた活性ペプチドの宝庫である。^{3,4)}

カエル皮膚の活性物質探索の第一段のスクリーニングは以下のようにして行った。まず、新鮮なカエル皮膚中の各種酵素を失活させるために 6% トリクロロ酢酸で手早く洗った後、メタノールに漬け込んで数日冷蔵し『皮膚ざけ』をつくる。メタノール層を低温で減圧濃縮し、残渣は *n*-ヘキサン処理をして中性脂肪を除いた後、希酢酸あるいはギ酸に溶解させ、上澄を pH 3 に調整した SP-セファデックスカラムに流し、0.5 M ギ酸アンモニウム (pH 3) までの直線濃度勾配溶出で展開する。得られた各フラクションはそれぞれ一部を凍結乾燥してギ酸アンモニウムを除去した後、生理食塩水に溶かし生物活性を調べる。生物活性としてはラットに静注した時の血圧変動、各種平滑筋に対する収縮、弛緩活性等が主なものであった。このやり方は、一段落するまでは時間もかかり、かつ、限られた情報範囲ではあるが、各フラクションに対して生物活性のクロマトグラムが得られ、しかも 1 つのフラクションに関して種々の活性スペクトルが分かると同時にクロマトグラムの溶出位置から活性物質の物理化学的性質まである程度予測出来る点で有利であった。なお、最終的に単離されたものがペプチド性であるかどうかは、各種プロテアーゼによる活性の消失をみると、並びに塩酸加水分解後のアミノ酸分析によりアミノ酸の種類と予測される含量があるかどうかで判別した。このようにして搜し出された各種カエル皮膚中の活性ペプチドを Table I に示す。

この表から分かるようにカエル皮膚にはブラジキニン関連ペプチド、サブスタンス P 関連ペプチドはじめ各種の活性ペプチドが多量に含まれている。因みにチョウセンズガエル 1 匹あたりの皮膚の thyrotropin-releasing hormone (TRH) 量は 0.5 mg ほどであり、²¹⁾ このカエルの皮膚は 1 g にも満たないので哺乳類の視床下部よりも高濃度である。他の活性ペプチドもこれとほぼ同様であり、これらのペプチドはその存在意義は明らかに哺乳類のそれとは異なっている。カエルの皮膚には少なくとも 3 種類の外分泌腺があり、そのうちの 1 つが活性ペプチド及び活性アミン²²⁾ を産生している。これらの物質は細胞レベルではいずれも細胞膜電位を変えて細胞内外のイオン平衡に影響を与えるものであるのでカエルの皮膚での水電解質代謝を調節しているものらしい。恐らくは Na, K, Ca 及び Cl のカエル体内への取り込みに関係していると思われる。動物は進化の過程で水中から陸上へ上がったといわれており、両棲類は魚類と爬虫類の間に位置付けられている。そうだとすれば海で生活できるカエルがいてもよさそうなものである。海水中で生きられるカエルはカニクイガエル位なものであとはほとんど知られていない。恐らくカエルの皮膚は淡水魚の腎臓と同じく機

TABLE I. Amphibian Skin Peptide Analogous to Peptide Hormon

Amino acid sequence		Origin
A) Bradykinin and related peptides		
1. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg		<i>Rana nigromaculata</i> , ⁶⁾ <i>R. brevipoda</i> , <i>R. pipiens</i> (North America) ⁸⁾
2. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg		<i>Rana rugosa</i> ⁷⁾
3. Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg		<i>Heleophryne depressa</i> (Africa) ⁸⁾
4. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Val-Ala-Pro-Ala-Ser		<i>Rana nigromaculata</i> ⁸⁾
5. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg-Ile-Ala-Pro-Glu-Ile-Val		<i>Rana rugosa</i> ⁷⁾
6. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Gly-Lys-Phe-His		<i>Bombina orientalis</i> (Korea) ¹⁰⁾
B) Ranatensin and related peptides		
7. Ser-Asn-Thr-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr-Asn-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂		<i>Rana rugosa</i> ¹¹⁾
8. Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂		<i>Bombina orientalis</i> (Korea) ¹⁰⁾
9. Pyr-Val-Pro-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂		<i>Rana pipiens</i> (North America) ⁸⁾
10. Pyr-Thr-Pro-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂		<i>Rana catesbeiana</i> (North America) ¹²⁾
11. Pyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂		<i>Uperoleia rugosa</i> (Australia) ¹³⁾
12. Pyr-Leu-Trp-Ala-Val-Gly-Ser-Phe-Met-NH ₂		<i>Phyllomedusa sauvagei</i> (South America) ¹⁴⁾
13. Pyr-Leu-Trp-Ala-Val-Gly-Ser-Leu-Met-NH ₂		<i>Phyllomedusa sauvagei</i> (South America) ¹⁴⁾
C) Substance P related peptides		
14. Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂		<i>Kassina senegalensis</i> (Africa) ¹⁵⁾
15. Asp-Glu-Pro-Lys-Pro-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂		<i>Hylambates maculatus</i> (Africa) ¹⁶⁾
16. Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asp-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH ₂		<i>Hylambates maculatus</i> (Africa) ¹⁶⁾
17. Pyr-Pro-Asp-Pro-Lys-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂		<i>Uperoleia rugosa</i> (Australia) ¹³⁾
18. Pyr-Ala-Asp-Pro-Lys-Thr-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂		<i>Uperoleia rugosa</i> (Australia) ¹³⁾
D) Cholecystokinin related peptides		
19. Pyr-Asn-Asp-Tyr(SO ₃ H)-Leu-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂		<i>Hylambates maculatus</i> (Africa) ¹⁶⁾
20. Asp-Tyr(SO ₃ H)-Leu-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂		<i>Rana erythraea</i> (Philippine) ¹⁷⁾
E) Neurotensin related peptide		
21. Pyr-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu		<i>Xenopus laevis</i> (Africa) ¹⁸⁾
F) Angiotensin related peptide		
22. Ala-Pro-Gly-Asp-Arg-Ile-Tyr-Val-His-Pro-Phe		<i>Crinia georgiana</i> (Australia) ¹⁹⁾
G) TRH		
23. Pyr-His-Pro-NH ₂		<i>Bombina orientalis</i> (Korea) ²⁰⁾

能的に体内からのイオンの漏出をさせないように働くと同時に外からのこれらイオンの積極的な取り込みに関与しているに違いない。だが、まだ釈然としないことがある。それならば、各種カエルの皮膚で共通の活性ペプチド及びアミンが機能していてもよさそうなものであるが、Table I から分かるようにそれぞれ種類によって違ったものが含まれている。これはおそらく、種による生活様式の違い——例えば、水から外にでられないアフリカツメガエル、繁殖期しか水に入らないアマガエル、水に入ったり出たりできるトノサマガエル——などによるものと思われる。今後の課題である。

カエルは 19 科 218 属に分けられ約 2600 種が知られているが、我々が調べたのは限られた項目の生物活性でしかスクリーニングをしておらず、かつ、1% にも満たない種類でしかみていないので、まだ予測しないものが発見される可能性は大きい。そのようなもので我々が偶然に発見した新たなペプチド群がある。我々はある活性ペプチドが単離されたかどうかの検定は活性のクロマトグラムと構成アミノ酸個々についてのクロマトグラムが一致するかどうかで行っている。そうすることにより目的とするペプチドのアミノ酸組成が予測できると同時に混入しているペプチドのアミノ酸組成も同時に分かるからである。実は TRH をカエル皮膚から発見した時にも別の活性ピークとほぼ重なるかたちで等モルのグルタミン酸、プロリン、ヒスチジンが随伴していたことがその糸口になった。グラニュリベリン R (24) もラナテンシン R (7) に随伴していたペプチドであり、アミノ酸配列解析の結果、カルボキシル末端がアミド化されていることが分かり、単なるペプチド断片ではなく何等かの生物活性をもつことが予想された。このペプチドはアミノ末端側にロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン等疎水性アミノ酸が多く、カルボキシル末端側にアルギニン、セリン等親水性アミノ酸からなっており、一種の界面活性剂的性質があるのではないかと考え、ラット後腔マスト細胞に作用させたところ、強力な脱顆粒作用があることが分かった。一方、先に述べたカエル皮膚からの抽出過程でメタノール抽出物のうち 60% アセトニトリルを加えた時油状物が析出するが、この上澄を、ODS カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーで分離して得られる一連のペプチドは、アミノ酸配列解析を行った結果、やはりカルボキシル末端がアミド化されたペプチドであった。このようにして発見されたペプチド群を Table II に示す。これから分かるように、グラニュリベリン R (24) のアミノ末端部と他のペプチドのアミノ末端部は互いに類似しており、さらに驚くべきことに、これらのペプチドはハチ毒から得られた一連の好中球遊走ペプチド (Table III-C) とアミノ酸配列が極めて酷似している。トウキョウダルマガエルから得られた 31, 32 以外はすべてカルボキシル末端がアミド化されているので、然るべくプロセッシングを経て生産されていると思われる。これらのペプチドの皮膚での本来の生理的役割は不明である。しかし、Table II から分かるようにこれらのペプチドは疎水性アミノ酸が多く、かつ、塩基性であり、ハチ毒ペプチドと同様に、好中球遊走活性がある。ペプチド (30), (31) はごく最近、森川が単離したペプチドである。²⁴⁾ ペプチド (30) はブレベニン-1 (burevenin-1) ペプチド (31) はブレベニン-2 (burevenin-2) と名付けているが、やはり、アミノ末端付近はよく似たアミノ酸配列をしている。これと極めて近いペプチド、ピピニン (pipinin) が堀川らによりアメリカヒョウガエル皮膚から単離されている。²⁵⁾ ピピニンはマスト細胞脱顆粒活性を指標に単離された物であるが、ブレベニンはそれとは異なり、細菌に対する抗菌性を指標に単離したものである。ブレベニン-1 (30) は *Batillus subtilis*, *Staphyrococcus aureus* 等のグラム陽性菌に対し 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下で有効である。ブレベニン-2 (31) は興味あることに、これら 2 種のグラム陽性菌に同濃度で有効である他、グラム陰性菌、*E. coli* に対しても有効であった。古くはヨーロッパスズガエルからボンビニン (bombinin),²⁶⁾ 最近ではアフリカツメガエルからマガイニン (magainin) 等の抗菌性ペプチドが単離されている。²⁷⁾ これらのペプチドはいずれもカエルがむきだしの皮膚で外からの微生物の侵入を防ぐものがあるにち

TABLE II. Cytotrophic Amphibian Skin Peptide

	Amino acid sequence	Origin
24.	Phe-Gly-Phe-Leu-Pro-Ile-Tyr-Arg-Arg-Pro-Ala-Ser-NH ₂	<i>Rana rugosa</i> ⁽¹¹⁾
25.	Phe-Leu-Pro-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ala-Gly-Phe-Leu-Gly-Asn-Leu-Phe-NH	<i>Rana erythraea</i> (Philippine) ⁽¹⁷⁾
26.	Phe-Leu-Pro-Leu-Leu-Phe-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Phe-NH ₂	<i>Rana erythraea</i> (Philippine) ⁽¹⁷⁾
27.	Phe-Leu-Pro-Leu-Leu-Ile-Gly-Ala-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu-Pro-Lys-Ile-Phe-NH ₂	<i>Rana erythraea</i> (Philippine) ⁽¹⁷⁾
28.	form-Phe-Leu-Lys-Asn-Leu-Leu-Pro-His-Leu-Pro-Gly-Trp-Ile-Asp-Ala-Val-Ser-Asn-Ala-Phe-Ser-NH ₂	<i>Hylambates maculatus</i> (Africa) ⁽²³⁾
29.	Phe-Val-Gly-Ala-Ile-Ala-Ala-Ala-Leu-Pro-His-Val-Ile-Ser-Ala-Ile-Lys-Asn-Ala-Phe-NH ₂	<i>Hylambates maculatus</i> (Africa) ⁽²³⁾
30.	Phe-Leu-Pro-Val-Leu-Ala-Gly-Ile-Ala-Ala-Lys-Val-Val-Pro-Ala-Leu-Phe- Cys-Lys-Ile-Thr-Lys-Lys-Cys	<i>Rana brevipoda</i> ⁽²⁴⁾
31.	Gly-Leu-Leu-Asp-Ser-Leu-Lys-Gly-Phe-Ala-Ala-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Val-Leu-Gln-Ser-Leu-Leu-Ser-Thr- Cys-Lys-Leu-Ala-Lys-Thr-Cys	<i>Rana brevipoda</i> ⁽²⁴⁾

がないという発想で発見されたものである。このような作用のあるペプチドが他にもあったわけで、我々の単離したペプチド (30), (31), 及びピピニンがカルボキシル末端にシスチンループをもつこと、アミノ酸配列が好中球遊走ペプチドに類似していること等から、マガイニンとは別のグループに入るものと考えている。最近、無脊椎動物、脊椎動物を問わずこのようなペプチド性物質によるある種の新しい生体防御方式があるのではないかとされており、作用メカニズムの解明も含めて先が楽しみな領域である。

3. スズメバチ、アシナガバチの毒

ハチ毒のうちでミツバチ毒は古くから医療用としても知られ、神経痛やリウマチによる関節炎に有効であるといわれヨーロッパ諸国とくにロシア、ブルガリア等で用いられてきた。わが国でもミツバチを使った蜂針療法という言葉があるように民間薬的な使い方がされている地方がある。このような背景のためかミツバチ毒は早くから研究され発痛性アミン類や溶血性ペプチドメリチン等の活性ペプチド、及びホスホリパーゼ等酵素あるいは抗炎症性蛋白等の存在が明らかにされている。²⁸⁾

一方、スズメバチ類の毒の方はヨーロッパにまで分布しているクロスズメバチの毒についてイギリスの Schachter が 1954 年にヒスタミン、セロトニン等の発痛性アミンの他にブラジキニン様の生物活性をもつペプチドの存在を報告しハチ毒キニンと呼んだのが最初である。²⁹⁾ ハチ毒キニンはその後物質的にもブラジキニンのアミノ酸配列を含むペプチドであることが確認された。現在までに解明されている各種ハチ毒キニンを Table III-A に示した。これらハチ毒キニンはスズメバチ、アシナガバチ等 *Vespinæ*, *Polistinae* 属のハチ毒からのみ発見されミツバチも含めて他のハナバチ科ベッコウバチ科等々の毒には含まれておらずスズメバチ科特有のものと考えられていたが、最近コガネムシの幼虫を符するツチバチ科 (*Megascolia* 属, *Campsomeris* 属) の毒液からもハチ毒キニンを発見した。^{37,38)}

それまではハチ毒キニンは単純に発痛性のペプチドと位置づけていたがゴキブリの神経系を用いる生理学的検索でこれらキニンはニコチン性シナプス伝達を阻害する一種の神経毒として作用しているらしい。

我々は、アシナガバチ、スズメバチなど、ミツバチとは異なるハチ毒ペプチドをもつハチでも刺されれば痛みがずっと後まで残ること、また前述の Schachter がスズメバチ毒には内因性ヒスタミン遊離因子の存在を予想していたことなどに着目し、ラット腹腔肥満細胞を用い、これにハチ毒抽出物をくわえ、脱顆粒の状態を位相差顕微鏡で検鏡するという方法で、毒液中の内因性ヒスタミン遊離因子を検索し、クロスズメバチ毒からマストパランを発見した。³⁹⁾ その後、これと同族のペプチドはスズメバチ科のハチ毒には共通して含まれていることを他のハチについて確認し、これらのアミノ酸配列を明らかにした。マストパラン類は、Table III-B に示すように、どれもアミノ酸 14 個からなるペプチドアミドで、アミノ酸配列からはミツバチ毒のペプチドとは全く異なったものである。ペプチド鎖のうち、ほとんどがロイシン、イソロイシン、アラニン等の疎水性アミノ酸及び塩基性アミノ酸リジンからなり、酸性アミノ酸は含まないといった特異な組成であり、かつアミノ酸配列に繰り返しの傾向がみられるなど、高次構造的にも興味をそそられるペプチドであった。

一方、我々は、これまでハチ毒ペプチドの検索の仕方として、カエル皮膚と同様初期には、血圧活性、平滑筋収縮活性、肥満細胞膜顆粒等の生物活性のみを指標として検索するという戦略を取ってきたが、活性はともかく毒液中のペプチドを物質的に総ざらいするという方法を併用し、スズメバチ毒成分の再検討を行った。すなわち、毒囊凍結乾燥物を 50% アセトニトリルで抽出し、遠心上清を直接 ODS カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーで分離し、210 nm で検出することによりペプチド性物質の一斉分離を行ってみた。Fig. 1 に代表的なクロマトグラムを示すが、この

TABLE III. Wasp Venom Peptide

	Amino acid sequence	Origin
A) Bradykinin and related peptides (waspskins)		
32.	Gly-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ile-Asp	<i>Vespa mandarinia</i> ⁽⁸⁰⁾
33.	Ala-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ile-Val	<i>Vespa xanthoptera</i> ⁽⁸¹⁾
34.	Gly-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Val-Ile	<i>Vespa analis</i> ⁽⁸²⁾
35.	Gly-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Val-Val	<i>Vespa tropica</i> ⁽⁸³⁾
36.	Thr-Ala-Thr-Thr-Lys-Arg-Arg-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	<i>Paravespula lewisii</i> ⁽⁸²⁾
37.	Pyr-Thr-Thr-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	<i>Polistes fuscramatus</i> (North America) ⁽⁸⁴⁾
38.	Ala-Arg-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg	<i>Polistes rothneyi</i> ⁽⁸⁵⁾
39.	Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	<i>Polistes jadvigae</i> ⁽⁸²⁾
40.	Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	<i>Polistes jadvigae</i> ⁽⁸²⁾
41.	Arg-Thr-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	<i>Polistes jadvigae</i> ⁽⁸²⁾
42.	Ser-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	<i>Polistes chinensis</i> ⁽⁸²⁾
43.	Pyr-Glx-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Lys	<i>Parapolybia indica</i> ⁽⁸⁶⁾
44.	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg-Lys-Ala	<i>Megascolia flavifrons</i> (France) ⁽⁸⁷⁾
45.	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg	<i>Megascolia flavifrons</i> (France) ⁽⁸⁷⁾
B) Mastoparans		
46.	Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH ₂	<i>Paravespula lewisii</i> ⁽⁸⁶⁾
47.	Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa mandarinia</i> ⁽⁴⁰⁾
48.	Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa xanthoptera</i> ⁽⁴¹⁾
49.	Ile-Lys-Trp-Lys-Ala-Ile-Leu-Asp-Ala-Val-Lys-Lys-Val-Ile-NH ₂	<i>Vespa analis</i> ⁽⁴²⁾
50.	Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa tropica</i> ⁽⁸³⁾
51.	Val-Asp-Trp-Lys-Lys-Ile-Gly-Gln-His-Ile-Leu-Ser-Val-Leu-NH ₂	<i>Polistes jadvigae</i> ⁽⁴³⁾
52.	Ile-Asn-Trp-Lys-Lys-Met-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Lys-Met-Ile-NH ₂	<i>Parapolybia indica</i>
53.	Ile-Asn-Trp-Ala-Lys-Leu-Gly-Lys-Leu-Ala-Leu-Glu-Ala-Leu-NH ₂	<i>Ropalidia</i> sp. (Papua New Guinea) ⁽⁴⁴⁾
54.	Ile-Asn-Trp-Ser-Lys-Leu-Ser-Met-Ala-Lys-Glu-Val-Ile-NH ₂	<i>Ropalidia</i> sp. (Papua New Guinea) ⁽⁴⁴⁾
55.	Ile-Asn-Trp-Lys-Ala-Leu-Leu-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Val-Leu-NH ₂	
C) Vespid chemotactic peptides		
56.	Phe-Leu-Pro-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa tropica</i> ⁽⁸³⁾
57.	Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa mandarinia</i> ⁽⁴⁶⁾
58.	Phe-Leu-Pro-Met-Ile-Ala-Lys-Leu-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-NH ₂	<i>Vespa analis</i> ⁽⁴²⁾
59.	Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Ala-Lys-Leu-Val-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂	<i>Paravespula lewisii</i> ⁽⁴²⁾
60.	form-Ile-Val-Gly-Leu-Leu-Lys-Gly-Ile-Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-NH ₂	<i>Parapolybia indica</i> ⁽⁸⁶⁾
61.	Ile-Val-Pro-Phe-Ile-Gly-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Leu-Thr-NH ₂	<i>Icaria</i> sp. (Papua New Guinea) ⁽⁴²⁾
62.	Phe-Leu-Pro-Leu-Leu-Ile-Leu-Gly-Ser-Leu-Leu-Met-Thr-Pro-Pro-Val-Ile-Gln-Ala-Ile-His-Asp-Ala-Gln-NH ₂	
63.	Ile-Leu-Gly-Thr-Ile-Leu-Gly-Leu-Leu-Lys-Gly-Leu-NH ₂	<i>Paraponera clavata</i> (South America) ⁽⁴⁷⁾
		<i>Protonectalina sylviae</i> (South America) ⁽⁴⁸⁾

Fig. 1. Chromatograms of Vespid Venoms

(A) *Vespa mandarinia*, (B) *Vespa xanthoptera*, (C) *Paravespula lewisii*, (D) *Icaria* sp.
column: TSK LS-120T (4.6×250 mm), elution: linear gradient from acetonitril-0.02%
HCl (5 : 95) to acetonitril-0.02% HCl (60 : 40)/30 min, flow rate: 1 ml/min, column temp.:
40°C.

分離条件では、アセトニトリル濃度の低いところ (5—10%) ではセロトニン、カテコラミンなどハチ毒中の活性アミンが、中間 (10—30% 程度) ではハチ毒キニンが、高濃度 (50—60%) ではマストパラン類 (図中にピークを X で表示) が検出された。さらに、ピーク Y で表示したマストパランよりもさらに疎水性の高い物質が主成分の 1 つとして共通して認められることを発見し、この物質は既知のどの毒成分とも一致しなかった。ピーク Y の物質はやはりペプチドであり、このペプチドのアミノ酸配列をそれぞれ分析したところ、Table III-C に示すように、いずれもマストパランに類似したアミノ酸 13 個からなる、やはり疎水性アミノ酸に富むペプチドであった。

このペプチドは単離細胞に対する作用を検討したところ好中球、単球に対し強い走化性を示すことが判明し、vespid-chemotacticpeptide (Ves-CP) と命名した。⁴⁵⁾ すでに Table II に示したように非常によく似たペプチドがカエル皮膚から発見されたことは興味深い。

マストパランは、塩基性で疎水性の高いペプチドであり、アルコールに易溶で、アルカリ性では水に難溶である。円二色性 (CD) スペクトル測定の結果からは水溶液中ではランダムなコンホメーションをとっているが、アルコール中では α ヘリックス構造をとるという特異な性質をもっている。リゾホスファチジルコリンのミセル存在下でも、ヘリックス構造をとる CD スペクトルが得られた。⁴⁹⁾ マストパランのヘリックス構造は、軸の片側にロイシン、イソロイシン、アラニン等の疎水性アミノ酸残基が張り出す、典型的な両親媒性ヘリックスである。このヘリックス構造は NMR スペクトル解析からも支持されているので、恐らくこのペプチドが細胞膜と相互作用をする時にはヘリックス構造をとっているものと想像される。⁵⁰⁾

マストパランは脂質二重層膜、いわゆる黒膜法による実験では、このペプチド添加により膜の電導度上昇が観測され、さらにリボソームを用いる実験でも、マストパランの添加により、Ca イオンの移動が認められ、マストパランはリン脂質膜に作用し、イオンの膜透過を助長させる性質のある

TABLE IV. Properties of Mastoparan Analogs

Property	MP (N-14)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Histamine release	+++	++	+++	+	+	+	+	++
Helical index	+++	+++	++	++	++	+	+	-
Affinity to liposomes	++	+	-	-	-	-	-	-
Ca ²⁺ influx	++	+	-	-	-	-	-	-
Inhibition of CaM	+++	++	++	-	-	-	-	-
Mastoparan: Ile ¹ -Asn ² -Leu ³ -Lys ⁴ -Ala ⁵ -Leu ⁶ -Ala ⁷ -Ala ⁸ -Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu ¹⁴ -NH ₂								

ことが分かった。⁵¹⁾

このようなリン脂質膜との相互作用の他に、マストパランは蛋白質とも相互作用を示し、Ca²⁺ イオンの存在下カルモジュリンと強く結合し、カルモジュリン感受性酵素活性の阻害、また膜結合性ホスホリパーゼ A₂ の活性化など、いろいろな活性が報告されてきた。^{52,53)} そこで、いままで述べてきたマストパランの物理化学的な諸性質とヒスタミン遊離活性との相関を調べるために、以下の実験を行った。すなわち、マストパランの肥満細胞からのヒスタミン遊離はマストパラン (MP) の C 末端側のヘプタペプチドアミド (MP₈₋₁₄) でも弱いながら認められるので、これより N 末端側に 1 個ずつアミノ酸を延長したペプチドを合成し、それらにつきヒスタミン遊離活性と他の物理化学的諸性状、例えばメタノールの中でのヘリックス含量、リポソームの Ca²⁺ 流入、カルモジュリン活性の阻害などの相関を研究した。その結果を Table IV にまとめると、一般の物理化学的性状はペプチド鎖の延長とともに増強されるのに反し、ヒスタミン遊離活性は MP₁₋₁₄ 及び MP₈₋₁₄ が強く、これらとは必ずしも一致しない結果となった。⁵⁴⁾ したがって、ヒスタミン遊離作用は単純にこのペプチドの物理化学的性質によるものだけではないことが示唆された。

野沢らは、マストパランが細胞内イノシトール-3-リン酸を一過性に上昇させることを報告し、⁵⁵⁾ このペプチドが細胞内 Ca²⁺ 動員に関係することが示唆された。この事実は、マストパランが他のペプチドホルモンと同じく、細胞膜受容体を介する細胞内情報伝達系に関与することを予想させた。百日咳毒素 (IAP) は、この情報伝達系で重要な役割を果たす細胞膜 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) を ADP リボシル化することにより伝達阻害をすることが知られているが、肥満細胞のマストパランによる脱顆粒は IAP により阻害されることが分かった。⁵⁶⁾ したがって、G 蛋白質の関与する細胞内情報伝達系にマストパランが作用することが予想された。そこで我々は、ウシ脳により精製した Go, Gi 蛋白質を用い、マストパラン存在下での活性化状態を調べたところ、GTP 結合率の上昇が観測され、このペプチドは直接 G 蛋白質を活性化することが判明した。⁵⁷⁾ G 蛋白質と分子レベルでどのような相互作用があるかは、今後の解明すべき問題点であろう。

マストパランは肥満細胞以外にも、副腎クロム親和細胞からのカテコラミン遊離、⁵⁸⁾ 血小板からのセロトニン遊離、⁴¹⁾ 下垂体細胞からのプロラクチン遊離⁵⁹⁾ など、非特異的に顆粒球等に働き脱顆粒などを行い、また好中球の細胞内 Ca²⁺ の一過性動員なども行うが、これらはいずれも細胞膜受容体を介しない G 蛋白質の非特異的直接的活性化の結果と考えられる。

Ves-CP はマストパランより 1 個アミノ酸残基の少ないペプチド群であり、やはり配列は繰り返しが多く、疎水性ペプチドである。CD スペクトル測定の結果は、マストパランと類似して水溶液中ではランダム、疎水性環境下ではヘリックス構造をとり、疎水性アミノ酸残基がヘリックスの片側に配列する構造をとる。⁶⁰⁾ このことはその後 NMR による解析でも確かめられた。⁶¹⁾

構造活性相関について、以下の検討を行った。⁴⁵⁾ まず、ペプチド (56) の合成ペプチド断片につい

TABLE V. Chemotactic Activity of Ves-CPs in Various Concentration

Conc. (nmol/ml)	Ves-CP-T 56	Ves-CP-M 57	Ves-CP-X	Ves-CP-A ^{a)} 58	Ves-CP-L 59	Icaria-CP 61
0.1	47± 2	41± 2	39± 4	94± 3	20± 2	107± 7
0.5	97± 6	123± 3	92± 2	114± 1	49± 2	132± 4
1.0	130± 4	110± 3	109± 1	109± 2	45± 3	141± 4
2	155± 7	142± 8	122± 4	132± 7	36± 2	119± 5
5	172± 6	159± 10	157± 4	152± 6	40± 2	109± 14
10	146± 10	167± 9	134± 2	83± 5	34± 1	
20	157± 4	129± 4	121± 28		27± 2	
50	143± 3	104± 5	2± 0			

a) Met at position 4 is replaced by α -amino butyric acid.

Peripheral blood monocytes were collected by Ficoll-Paque centrifugation and suspended at 5×10^6 cells/ml in Gey's BSA (pH 7.0). Chemotaxis assay was performed in multi-well chemotaxis chambers with 5μ pore sized polycarbonate membrane filter and the cell suspensions in chambers were incubated at 37°C for 90 min in a humidified incubator. The data represented are the mean $\pm$ SE of the migrated cells per oil immersion field (20 fields counted) for triplicate filters. Buffer control: 4 ± 1 , for-Met-Leu-Phe (10^{-8} M): 138 ± 7 .

て、マクロファージ及び好中球の遊離活性を検討した。N 末端部のヘプター、ヘキサペプチド、及び C 末端部のヘキサ、ペプター、トリペプチドアミド、さらに中間部の Lys-Ile-Leu-Gly (Ves-CP₇₋₁₀) はマクロファージに対しいずれも遊離活性を示さず、マクロファージに対しては全アミノ酸配列が必要であろうと考えている。一方、好中球に対しては、弱いながら C 末端部ヘプタペプチドアミドに遊走活性が認められた。したがって、これら 2 種の細胞に対する活性の差は、ペプチドの親和性が異なるか、あるいは相互作用の機序が異なることによると予想された。

Table III-C に示した白血球遊走ペプチドは、マストパラン同様、肥満細胞からのヒスタミン遊離活性もある。しかし、塩基性アミノ酸を含まないパプアニューギニア産のチビアシナガバチから単離されたペプチド (61), Icaria-CP は $30 \mu\text{M}$ の濃度でもヒスタミン遊離活性を示さない。ところが、このペプチドは他の Ves-CP に比し、Table V に示すように、最も強い遊走活性を示す。⁶²⁾ したがって、リジン残基の有無がこのような活性発現に重要な役割をもつものと考えられる。そこで、Icaria-CP の 7 位のプロリンをリジンあるいはロイシンに置換したアナログを合成し、肥満細胞脱顆粒活性を調べた結果、リジン置換体は脱顆粒活性を示すようになった。したがって、塩基性アミノ酸残基が少なくとも 1 個ペプチド鎖中に存在することが脱顆粒活性に必須であることが分かった。

Ves-CP はマストパランのように疎水性で物理化学的諸性質も似ているにもかかわらず、マストパランにはみられない走化性を起こさせる活性がある。この活性は、ペプチド鎖中のリジン残基の欠落したものの方が強力である。一方、Ves-CP もマストパラン同様、モルモット好中球に対し、一過性の細胞内 Ca^{2+} 動員を行い、マストパランのごとく細胞内を介する情報伝達機構と何らかのかかわりをもっていることが示唆されている。しかし、ウシ脳より精製した G 蛋白質に対しては走化性の強い Icaria-CP は相互作用を現さず、マストパランとは異なる機序が考えられた。リジン置換体、及びリジンを含む他の Ves-CP は弱いながら G 蛋白質に対し GTP 結合率を上昇させるので、Ves-CP が弱い肥満細胞脱顆粒活性があるのはこのためと考えられ、これはマストパラン様機序に基づくものであろう。

Ves-CP, Icaria-CP とともに好中球に作用して O_2^- 産生を行い、formyl-Met-Leu-Phe (FMLP) と同様の働きがあり、さらに興味あることに、 O_2^- 産生は IAP により阻害され、G 蛋白質とは直接相互作用はしないもののやはり G 蛋白質カスケードによる情報伝達機構に関与していることが分かった。

Fig. 2. A Possible Mechanism of Hydrophobic Venom Peptides on the Cascade of Transmembrane Control

た。好中球の FMLP 受容体に対する *Icaria-CP* の影響を調べた結果、*Icaria-CP* は FMLP 受容体と競合的結合を行った。したがって、*Icaria-CP* は FMLP 受容体を介して G 蛋白質活性化、 IP_3 産生、 Ca^{2+} 動員という、ペプチドホルモンと同様の経路の情報伝達系に働くことが判明した。⁶³⁾

したがって、マストパランと *Ves-CP* の作用機序は Fig. 2 のように考えることができる。

なおペプチド (62) は *poneratoxin* と呼称され南米産のハリアリ *Paraponera clavata* の毒腺から単離したペプチドで、N 末端付近のアミノ酸配列は *Ves-CP* と類似している。このアリに刺されるとヒトでも目眩、嘔吐など激しい症状を示す危険なアリとして知られているが、ゴキブリに対し神経毒として働くことが知られている。⁴⁷⁾

Ves-CP の好中球における情報伝達の機序と Table II に示したカエル皮膚のペプチド群の生理的機能に関して画一的な解釈はまだ行われていない。しかしカエルの皮膚においても細胞レベルにあっては同様のメカニズムが働いていることは十分予想され、いわゆる *metabotropic receptor* を介して何らかの情報伝達をしているものに違いない。皮膚におけるターゲット細胞が何であるか興味をそそられる。

4. クモ毒の解明

グルタミン酸は生体内に比較的高濃度に存在するアミノ酸であるが脳内においては興奮性の神経伝達物質として、またハンチントン病、てんかん等各種脳疾患に関与するアミノ酸としてさらには学習記憶等脳の高次機能を司るアミノ酸の1つとして最近特に注目を集めている。一方、脳出血、虚血等によって脳内で異常なグルタミン酸の放出がおこると興奮毒性物質として重篤な神経毒性作用をあらわすといわれている。このような脳内におけるグルタミン酸及びそのレセプターの機能の解明にはまだ不明な点が多い。

ところで昆虫類をはじめとする節足動物は運動神経の神経筋シナプスでグルタミン酸が伝達物質として放出される。1982 年川合らはジョロウグモが網にかかった昆虫を咬んで麻痺させることに着目し、イセエビ歩脚を用いてジョロウグモ咬毒の作用を解析し、毒液中にはイセエビの神経筋接合部に働き、グルタミン酸による神経興奮伝達を強力に阻害する物質の存在することをつきとめた。⁶⁴⁾ またジョロウグモ毒はモルモットの海馬スライスを用いる電気生理学的解析により、哺乳類

脳でもある種のグルタミン酸受容体に阻害的に働くことを明らかにしこの毒素を JSTX (Joro spider toxin) と命名した。⁶⁴⁾ その後他のクモ毒, 及びカリウドバチ毒からも同様の作用をもつ物質が発見されている。この種の物質はグルタミン酸の脳における機能を解明する手段物質の1つとして, また新しい農薬のリード化合物として注目を集めるようになった。

JSTX はイセエビ歩脚を用いる実験によってシナプス後膜側のグルタミン酸レセプターを遮断することが明らかになった。この場合, 興奮性神経終末からのグルタミン酸の放出には影響を与えない。すなわち, 興奮性神経を刺激して発生するシナプス後電位は JSTX によって抑制されるが, 一旦減少したこの電位は標本を繰り返し正常リンゲル液で洗っても全く回復しない。したがって JSTX はイセエビのグルタミン酸レセプターに実質上不可逆的に結合するものと考えられる。

JSTX のグルタミン酸レセプター各サブタイプに対する機構の詳細はまだ十分明らかでない。グルタミン酸レセプターはアセチルコリンレセプターと同じく, 内部にイオンチャンネルを形成する複合体と考えられる。

このようなイオノトロピック型グルタミン酸レセプターはキスカル酸・AMPA 型, カイニン酸型, *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型と 3 種類に分類するのが一般的である。⁶⁶⁾ 甲殻類や昆虫の神経筋シナプスはキスカル酸型といわれており, したがって JSTX はキスカル酸型のレセプターを強く阻害すると考えられている。しかし, JSTX とグルタミン酸の結合部位は同一でなく, いわゆる非競合的な阻害機構を示し, 膜電位によって影響されないことから毒素はおそらくレセプターイオンチャンネル分のうち, 細胞外側に近い部分に結合するものと考えられる。

我々がパプアニューギニア産のオオジョウロウグモ毒腺から同様のクモ毒 NSTX を単離し, はじめてその構造を明らかにしたのは 1986 年であった。その後 JSTX も類似の構造をもつことが分かった。⁶⁸⁻⁶⁹⁾ JSTX は初期にはペプチド様物質と考えられていたが解析の結果はそうではなく NSTX, JSTX とともにポリアミン類とアミノ酸がつらなった直鎖構造の末端に 2・4 ジヒドロキシフェニル酢酸が結合した新奇な化合物であった。さらにジョウロウグモ毒にはマストパランのように肥満細胞脱顆粒活性の強い画分があり, これをネフィラトキシン (nephilatoxin) と名付けて解析を進めた結果, このトキシシンもポリアミン類を中心とする同様の直鎖構造の末端にインドール酢酸類が結合した物質であった。⁷⁰⁾ これとほとんど時を同じくして同様な毒素がオニグモやコガネグモから単離された。⁷¹⁾ さらに前述のカリウドバチ毒も同じくポリアミン部をもつ類似構造をもつことが中西らにより明らかにされており,^{72,73)} この種の毒素はポリアミントキシシン群と呼ばれるようになった。これらの構造を Fig. 3 に示す。

天然毒の構造をもとにいろいろな個所を変換し構造と活性発現の関係を調べた。まず, ポリアミン部について JSTX-3 (67) の末端から順次ポリアミン鎖を短縮したものでは 2・4 ジヒドロキシフェニルアセチルアスパラギンカタベリンが活性発現の最小構造であり活性は約 1/100 となり, また天然毒と異なり洗滌により直ちにグルタミン酸による興奮伝達機能が回復した。⁷⁴⁾ NSTX-3 (64) について末端のアルギニンをリジンに置換してもあまり活性に変化はないが, アスパラギン酸に置換したり, アルギニンの α アミノ基をアセチル化するとほとんど活性を示さなくなるので少なくとも 3 個以上の塩基性を示す窒素原子の存在が必要である。⁷⁵⁾ 一方, 2・4-ジヒドロキシフェニル酢酸を取り去ると活性を示さなくなるのでこの部分は重要であると考えている。しかしこの部分はモノヒドロキシフェニルでも 3・4 あるいは 2・5 ジヒドロキシでもよく, インドールの結合した天然毒ネフィラトキシンの存在を考えるとこの場所には嵩張った置換基が必要と考えられた。なおこの部分を取り去ったものはイセエビ歩脚の神経筋興奮伝達は阻止しないが, マスト細胞からのヒスタミン放出作用は残存するのでこの作用はポリアミン部に由来すると考えられる。また JSTX-3 (67) のヨウ素置換体は 3 置換, 5 置換, 3・5 ジ置換体ともクモ毒活性が残存し,⁷⁶⁾ ¹²⁵I を用いる

Fig. 3. Spider Polyamine Toxins in the Venom of *Nephila maculata* and *Nephila clavata*

ことによりイセエビ歩脚の神経筋接合部のオートラジオグラフィーを撮影することに成功した。⁷⁷⁾ さらに JSTX-3 (67) の 2・4 ジヒドロキシフェニル酢酸部を 1 ジメチルアミノナフタレン-5-スルホン基に置換した蛍光性合成クモ毒も活性があり, これらの手法を駆使することにより脳内グルタミン酸シナプスの局在が組織化学的に確かめられることが期待されている。

また, アスパラギンを除いたものとして 2・4 ジヒドロキシフェニルアセチルスぺルミンにクモ毒様活性があることが分かり, さらに簡単な化合物としてフェニル酢酸, ナフチル酢酸等のスぺルミン誘導体を合成した (Table VI). これらはイセエビ歩脚に対して可逆的ではあるがいずれも活性を表すことが分かり, 特にシクロヘキシルアセチルスぺルミンや直鎖のヘプタノイルスぺルミンも予想に反してかなり強いクモ毒様活性があった。⁷⁸⁾ いろいろな小動物を使ってナフチルアセチルスぺルミンについて更に詳細な毒性の検討を行った結果ゲジやボウフラは 1% 水溶液を吹きつけると致死作用を表す他, ワラジムシ, ヤスデ, スナゴミムシダマシ等餌とともに経口的に与えても致死毒性を表すことが分かった. なおマウスに経口投与した際には 30 mg/kg では毒作用は認められず, この毒は農薬としても開発の可能性をもっていた。⁷⁹⁾

我々は, また, JSTX-1 (65) やナフチルアセチルスぺルミンがラット海馬培養細胞のグルタミン酸に対する反応, すなわち, 細胞内 Ca イ

オン上昇作用に対してグルタミン酸アゴニストのうち *N*-メチル-D-アスパラギン酸による上昇のみを阻害することを見だし, かつ, 我々がウシ脳より精製したクモ毒結合蛋白質に対するモルモット抗体が同様の作用をもつことを見だし,⁸⁰⁾ このクモ毒結合蛋白を単離した。⁸¹⁾ この蛋白は分子量 60 kDa の酸性蛋白であり N 末端部のアミノ酸配列は以外にも骨格筋の筋小胞体より単離されたカルレテキュリン (calreticulin) と非常に酷似していた。⁸²⁾ 一方神経シナプス後膜側に骨格筋の筋小胞体と相同の Ca イオン供給装置としてサブサーフェイスシスターン (subsurface cistern) が知られており,⁸³⁾ おそらくこの種のポリアミントキシンはここに働き Ca イオン供給も阻害する可能性がある. クモ毒はこれから神経機能解明の手段物質の 1 つとして利用されようとしている。

この他, 我々は日本産各種クモの毒腺につき活性物質の検索を行った。⁸⁴⁾ 咬まれると大変痛いカバキコマチグモ毒には多量のセロトニンとカテコラミン類が検出されている. 検索したクモ毒のうち興味ある毒素を有していたのはコクサグモであった. このクモは体長 1 cm にもみえない小さなクモであり, 低い植え込み等に棚のような巣を作るので俗にタナグモ等と呼ばれている. 毒腺は小さく人畜に被害を与えるものではないが毒素の作用はやはりグルタミン酸シナプスにおける伝達阻

TABLE VI. Suppression of Excitatory Post Synaptic Potentials (EPSPs) in the Lobster Muscle by Synthetic Compounds

R	Inhibition (%)	
	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
	—	54
	—	55
	18	35
	11	—
	8	—
	47	85
	21	—
	19	50
	41	79
	32	—

Suppression is expressed as percentage reduction in amplitude of EPSPs.

- 12) T. Nakajima, "Chemistry and Biology of the Kallikrein Kinin System in Health and Disease," ed. by J. J. Pisano, K. F. Austin, DHEW, Publication No. (NIH) 76-791, 1974, p. 165.
- 13) T. Nakajima, T. Yasuhara, V. Erspamer, G. F. Erspamer, L. Negric, R. Endean, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 689 (1980).
- 14) T. Yasuhara, T. Nakajima, K. Nokihara, C. Yanaihara, N. Yanaihara, V. Erspamer, G. F. Erspamer, *Biomed. Res.*, **4**, 407 (1983).
- 15) T. Akizawa, K. Yamazaki, T. Yasuhara, T. Nakajima, M. Roseghini, G. F. Erspamer, V. Erspamer, *Biomed. Res.*, **3**, 232 (1982).
- 16) T. Yasuhara, T. Nakajima, G. F. Erspamer, V. Erspamer, *Biomed. Res.*, **2**, 613 (1981).
- 17) T. Yasuhara, T. Nakajima, V. Erspamer, G. F. Erspamer, Y. Tsukamoto, M. Mori, *Peptide Chemistry*, **1985**, 363 (1986).
- 18) K. Araki, S. Tachibana, M. Uchiyama, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2081 (1973).
- 19) V. Erspamer, P. Melchiorri, T. Nakajima, T. Yasuhara, R. Endean, *Experientia*, **35**, 1132 (1979).
- 20) T. Yasuhara, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3301 (1975).
- 21) T. Nakajima, "Hormons, Adaptation and Evolution," ed. by S. Ishii, Springer-Verlag, Berlin, 1980, p. 287.
- 22) S. Yoshie, T. Iwanaga, T. Fujita, *Cell Tissue Res.*, **239**, 25 (1985).
- 23) T. Yasuhara, T. Nakajima, V. Erspamer, Y. Tsukamoto, M. Mori, *Peptide Chemistry*, **1986**, 69 (1987).
- 24) N. Morikawa, K. Hagiwara, T. Nakajima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 184 (1992).
- 25) R. Horikawa, J. J. Pisano, 9th American Peptide Symposium, Canada, 1985.
- 26) A. Csordas, H. Michl, *Monatsh. Chem.*, **101**, 182 (1970).
- 27) M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5449 (1987).
- 28) B. E. C. Banks, R. A. Shipolini, "Venoms of Hymenoptera," ed. by T. Piek, Academic Press, London, 1986, p. 330.
- 29) M. Schachter, E. M. Thain, *Br. J. Pharmacol.*, **9**, 352 (1954).
- 30) H. Kishimura, T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2896 (1976).
- 31) T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 935 (1977).
- 32) T. Nakajima, T. Yasuhara, H. Yoshida, Y. Ueno, C. Ohtsuka, M. Hamamoto, N. Nobumori, Y. Hirai, *Jpn. J. Sanit. Zool.*, **35**, 139 (1984).
- 33) T. Yasuhara, T. Nakajima, V. Erspamer, *Peptide Chemistry*, **1982**, 213 (1982).
- 34) S. Udenfriend, T. Nakajima, J. J. Pisano, Proc. 7th Internatl. Congress Biochem., VIII-4, Tokyo, 1967, p. 501.
- 35) M. Watanabe, T. Yasuhara, T. Nakajima, "Animal, Plant and Microbial Toxins," Vol. II, ed. by A. Osaka, K. Hayashi, Y. Sawai, Plenum Press, New York, London, 1976, p. 105.
- 36) T. Toki, T. Yasuhara, T. Nakajima, *Jpn. J. Sanit. Zool.*, **39**, 105 (1988).

- 37) T. Yasuhara, P. Mantel, T. Nakajima, T. Piek, *Toxicon*, **25**, 527 (1987).
- 38) T. Piek, B. Hue, P. Mantel, T. Nakajima, M. Pelhate, T. Yasuhara, *Comp. Biochem. Physiol.*, **96C**, 157 (1990).
- 39) Y. Hirai, T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, M. Fujino, C. Kitada, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1942 (1979).
- 40) Y. Hirai, T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **2**, 447 (1981).
- 41) Y. Hirai, M. Kuwada, T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1945 (1979).
- 42) T. Yasuhara, H. Itokawa, R. Kano, N. Suzuki, H. Nakamura, T. Nakajima, *Peptide Chemistry*, **1985**, 177 (1984).
- 43) Y. Hirai, T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **1**, 185 (1981).
- 44) 道津邦彦, 奥村 薫, 萩原健一, 中嶋暉躬, 未発表.
- 45) T. Yasuhara, T. Nakajima, K. Fukuda, Y. Tsukamoto, M. Mori, C. Kitada, M. Fujino, *Peptide Chemistry*, **1983**, 185 (1984).
- 46) Y. Tsukamoto, S. Fukutani, Y. Morikawa, H. Fujimoto, Y. Tanaka, M. Mori, T. Yasuhara, T. Nakajima, C. Kitada, M. Fujino, *Jpn. J. Oral. Biol.*, **27**, 1254 (1985).
- 47) T. Piek, B. Hue, P. Mantel, T. Nakajima, J. O. Schmidt, *Comp. Biochem. Physiol.*, **99C**, 481 (1991).
- 48) 道津邦彦, M. S. Palma, 萩原健一, 中嶋暉躬, 日本薬学会第 112 年会 1992 年 3 月, 福岡.
- 49) T. Higashijima, K. Wakamatsu, M. Takemitsu, M. Fujino, T. Nakajima, *FEBS Lett.*, **152**, 227 (1983).
- 50) K. Wakamatsu, T. Higashijima, M. Fujino, T. Nakajima, T. Miyazawa, *FEBS Lett.*, **162**, 123 (1983).
- 51) K. Okumura, K. Inui, Y. Hirai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **2**, 450 (1983).
- 52) D. A. Malencik, S. R. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 50 (1983).
- 53) A. Argiolas, J. J. Pisano, *J. Biol. Chem.*, **258**, 13687 (1983).
- 54) S. Uzu, T. Nakajima, K. Saito, K. Wakamatsu, T. Miyazawa, M. Fujino, *Peptide Chemistry*, **1985**, 229 (1986).
- 55) Y. Okano, H. Takagi, T. Takamatsu, T. Nakashima, Y. Kuroda, K. Saito, Y. Nozawa, *FEBS Lett.*, **188**, 363 (1985).
- 56) T. Higashijima, S. Uzu, T. Nakajima, T. Miyazawa, *Peptide Chemistry*, **1987**, 75 (1988).
- 57) T. Higashijima, S. Uzu, T. Nakajima, E. M. Ross, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6491 (1988).
- 58) Y. Kuroda, M. Yoshioka, K. Kumakura, K. Kobayashi, T. Nakajima, *Proc. Jpn. Acad.*, **56 (B)**, 660 (1980).
- 59) H. Kurihara, K. Kitajima, T. Senda, H. Fujita, T. Nakajima, *Cell Tissue Res.*, **243**, 311 (1985).
- 60) T. Nakajima, S. Uzu, K. Wakamatsu, K. Saito, T. Miyazawa, T. Yasuhara, Y. Tsukamoto, M. Fujino, *Biopolymers*, **25**, 115 (1986).
- 61) I. Shimada, K. Kato, K. Saito, C. Kitada, M. Fujino, T. Nakajima, Y. Arata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 596 (1990).
- 62) T. Nakajima, T. Yasuhara, S. Uzu, K. Wakamatsu, T. Miyazawa, K. Fukuda, Y. Tsukamoto, *Peptides*, Suppl. **3**, 425 (1985).

- 63) M. Koike, K. Nagashima, K. Saito, M. Nakanishi, M. Fujino, T. Nakajima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 165 (1991).
- 64) N. Kawai, A. Niwa, T. Abe, *Brain Res.*, **247**, 169 (1982).
- 65) J. C. Watkins, "Amino Acid Neurotransmitters," ed. by F. V. DeFeudis, P. Mandel, Raven Press, New York, 1881, p. 205.
- 66) Y. Aramaki, T. Yasuhara, T. Higashijima, M. Yoshioka, A. Miwa, N. Kawai, T. Nakajima, *Proc. Jpn. Acad.*, **62 (B)**, 359 (1986).
- 67) Y. Aramaki, T. Yasuhara, T. Higashijima, A. Miwa, N. Kawai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **8**, 167 (1987).
- 68) Y. Aramaki, T. Yasuhara, K. Shimazaki, N. Kawai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **8**, 241 (1987).
- 69) T. Toki, T. Yasuhara, Y. Aramaki, Y. Hashimoto, K. Shudo, N. Kawai, T. Nakajima, *Jpn. J. Sanit. Zool.*, **41**, 9 (1990).
- 70) T. Toki, T. Yasuhara, Y. Aramaki, K. Osawa, A. Miwa, N. Kawai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **9**, 421 (1988).
- 71) E. V. Brishin, T. M. Volkova, A. S. Arseniev, O. S. Reshetova, V. V. Onoprienko, L. G. Magazanic, S. M. Antonov, I. M. Fedorova, *Bioorg. Khim.*, **12**, 1121 (1986).
- 72) A. T. Eldefrawi, M. E. Eldefrawi, K. Konno, N. A. Mansour, K. Nakanishi, E. Oltz, P. N. R. Usherwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4910 (1988).
- 73) T. Piek, R. H. Fokkens, H. Karst, C. Kruk, A. Lind, J. vaMarle, T. Nakajima, N. M. M. Nibbering, H. Shinozaki, W. Spanjer, "Neurotox '88. Molecular Basis of Drugs & Pesticides Action" ed. by G. G. Lunt, Excerpta Medica, Amsterdam, New York, Oxford, 1988, p. 61.
- 74) N. Kawai, T. Nakajima, *J. Toxicol.-Toxin Reviews*, **9**, 203 (1990).
- 75) T. Teshima, T. Matsumoto, T. Wakamiya, T. Shiba, T. Nakajima, N. Kawai, *Tetrahedron*, **46**, 3813 (1990).
- 76) K. Hagiwara, Y. Aramaki, K. Shimazaki, N. Kawai, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1233 (1988).
- 77) K. Shimazaki, K. Hagiwara, Y. Hirata, T. Nakajima, N. Kawai, *Neurosci. Lett.*, **84**, 173 (1988).
- 78) T. Asami, H. Kagechika, Y. Hashimoto, K. Shudo, A. Miwa, N. Kawai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **10**, 185 (1989).
- 79) T. Toki, T. Nakajima, *Jpn. J. Sanit. Zool.*, **43**, 59 (1992).
- 80) A. Hossain, A. Miwa, M. Tagashira, K. Hagiwara, N. Kawai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **12**, 291 (1991).
- 81) A. Hossain, K. Hagiwara, N. Kawai, T. Nakajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3079 (1991).
- 82) A. Hossain, M. Tagashira, K. Hagiwara, T. Nakajima, *Proc. Jpn. Acad.*, **67 (B)**, 203 (1991).
- 83) S. Fujimoto, K. Yamamoto, K. Kuba, K. Morita, E. Kato, *Brain Res.*, **202**, 21 (1980).
- 84) K. Hagiwara, A. Tokita, A. Miwa, N. Kawai, Y. Murata, A. Uchida, T. Nakajima, *Jpn. J. Sanit. Zool.*, **42**, 77 (1991).

-
- 85) K. Hagiwara, T. Sakai, A. Miwa, N. Kawai, T. Nakajima, *Biomed. Res.*, **11**, 181 (1990).
- 86) T. Inui, K. Hagiwara, K. Nakajima, T. Kimura, T. Nakajima, S. Sakakibara, *Peptide Research*, **5**, 140 (1992).