OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Characterization of Binding Sites for Spider Toxin, 〔3H〕 NSTX-3, in the Rat Brain
Author(s)	稲生, 英俊
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37159
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【3】

氏名・(本籍)	稲生英俊（いのう ひでとし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9067 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Characterization of Binding Sites for Spider Toxin, 〔^{3}H〕NSTX−3, in the Rat Brain (クモ毒,〔^{3}H〕NSTX−3のラット脳における特異的結合の解析)
論文審査委員	(主査)教授 御子柴克彦 (副査)教授 和田　博　教授 遠山　正彌

論文内容の要旨

〔目　的〕

クモ毒腺中より発見された一連の神経毒（ＪＳＴＸ，ＮＳＴＸ，アルジオピンおよびアルジオトキシンなど）はいずれも共通の部分構造をもち，脊椎動物および無脊椎動物のキスカル酸およびカイニン酸感受性グルタミン酸レセプターを強く阻害することが報告された。グルタミン酸レセプターについては構造や機能について未だ不明の点が多く，これらのクモ毒がその解明に大きな手がかりを与えるのではないかと期待されている。そこで，私はそのうちのＮＳＴＸ－３に着目し，そのトリチウム体を合成を行い，ラット脳膜標品に対するその特異的結合の解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

〔^{3}Ｈ〕ＮＳＴＸ－３の合成　Ｌ－〔^{3}Ｈ〕アルギニン（7.4ＭＢq）に対しベンゾキシカルボニルクロライド（Ｚ－Ｃl）を作用させ，αアミノ基に保護基を導入（Ｚ化）した。生成したＬ－〔^{3}Ｈ〕Ｚ－アルギニンはＨＰＬＣによって精製した。ＮＳＴＸ－３合成の中間体（豊島らによって報告）とＬ－〔^{3}Ｈ〕Ｚ－アルギニンを水溶性カルボジイミドを用いてカップリングさせた。トリフルオロメタンスルフォン酸／トリフルオロ酢酸／チオアニソール／ｍ－クレゾール（5：20：6：6，V/V）によって脱保護した後ＨＰＬＣによって精製した。

結合実験　結合実験標準溶液は60μg ラット脳粗膜標品，4.95 nM〔^{3}Ｈ〕ＮＳＴＸ－３，10μＭベスタチン，50mM トリス酢酸（pH7.4）（全容200μl）を含む。反応は０℃にて１ｈ行った。反応溶液に３Ｍ NaCl，20μl 加え，さらに，０℃にて30min 反応させた後，セルハーベスター（Brandel）を用い0.33％ ポリエチレンイミンで予めコートしたグラスフィルター（Whatman GF/

B）によってろ過した。非特異的結合を求めるときには反応溶液中に2.5 μM NSTX－3を含む。特異的結合は全結合から非特異的結合を差し引いたものとした。

〔^{3}H〕NSTX－3の膜標品に対する特異的結合の飽和曲線の解析により結合のキネティクスを求めた。データの解析はコンピューターによる曲線回帰によって行った。それによると，小脳においては高親和性（Kd=7.75 nM，Bmax=0.37 pmol/mg protein）および低親和性（Kd＝202 nM，Bmax＝5.54 pmol/mg protein）の2つの結合部位が存在することが明らかとなった。

次に，NSTX－3の各種アナログによる〔^{3}H〕NSTX－3の結合に及ぼす阻害効果について検討した。用いたアナログは（Des－Arg－NSTX－3）←Lys，（Des－Arg－NSTX－3）←Ala，（Des－Arg－NSTX－3）←Asp，（NSTX－3）－Ac である。（Des－Arg－NSTX－3）←X は NSTX－3 の末端のアルギニンがXによって置換されたもの，（NSTX－3）－Ac はNSTX－3 の末端アルギニンのαアミノ基がアセチル化されたものであることを示す。これらのうち後2者は，in vivo の活性が非常に弱いが，いずれもNSTX－3 とほぼ同等の強い〔^{3}H〕NSTX－3結合阻害活性を示した（$IC_{50}=10^{-7}\sim10^{-6}$M）。また，ポリアミン（スペルミン，スペルミジンおよびカダベリン：クモ毒は部分構造としてポリアミンを有している）は上記アナログよりも弱い結合阻害活性を示した（$IC_{50}=10^{-4}\sim10^{-3}$M）。一方，グルタミン酸レセプターの拮抗型アゴニスト（AMPA，NMDA，L－グルタミン酸，L－アスパラギン酸，カイニン酸およびキスカル酸）は非常に弱いかあるいは全く結合阻害活性を示さなかった。

〔総　括〕

今回の研究により少なくともラット小脳中には親和性の異なる2つの結合部位が存在することが明らかとなった。電気生理学的測定によるとJSTXなどクモ毒の示すグルタミン酸レセプター阻害活性は非常に強いことが知られており，このことから考えるとin vitro におけるNSTX－3 の結合も相応に強いものであると予想される。したがって，高親和性を示した結合部位が生理的条件下における真の結合部位ではないかと思われる。クモ毒アナログを用いた結合阻害実験では活性のあるアナログとともに不活性のアナログも同様の阻害効果を示したが，これは低親和性の結合部位の寄与が大きいためにこのような結果を得た可能性がある。ポリアミンによる阻害効果がアナログによるものに比して約10^3 オーダー低いことからもクモ毒の構造相関性の重要さが示唆される。また，グルタミン酸レセプターの拮抗型アゴニストがほとんど阻害活性を示さなかったことから，NSTX－3 はグルタミン酸レセプターの拮抗型アンタゴニストではなくチャンネルブロッカーなどとして機能しているのではないかと予想している。

論文の審査結果の要旨

クモ毒NSTX－3 はグルタミン酸受容体のサブタイプの1つであるキスカル酸／カイニン酸受容体の強力な拮抗薬として働くことが近年発見された。特に分子内に官能基を多くもつことから，アフィニティ・

リガンドとしての有用性が注目されている。しかし，今までは電気生理学的研究が大部分であり，ラベル化合物の合成が遅れていたこともあって生化学的薬理学的研究はほとんどなされていなかった。本論文ではＮＳＴＸ－３　のトリチウム体の合成に初めて成功し，それを用いてラット脳における特異的結合部位の解析を行い，いくつかの重要な結果を得ている。小脳においては親和性の異なる２つの結合部位を見いだし，そのうち高親和性結合部位の生理的重要性を指摘している。また，種々のグルタミン酸受容体アゴニストを用いた結合阻害実験より，ＮＳＴＸ－３　の阻害様式が非拮抗型であることを証明している。
キスカル酸／カイニン酸受容体の構造解析等を進めるにあたって非常に重要かつ有用な示唆を与えるものである。以上のことから，本論文は，医学博士の学位論文として価値があると認める。