

# PRF

蛋白質研究奨励会ペプチド研究所報 Vol. 3 No. 2 1977. 3.

## Theodor Wieland 教授とテングダケ

奨励会ペプチド研 宗像英輔<sup>\*1</sup>

Theodor Wieland教授が写真中（P 11）手に持っておられる向かって右がタマゴテングダケ、左がシロテングダケである。タマゴテングダケは名前の grüner Knollenblätterpilz が示す通り その傘の部分は黄緑色であり、シロテングダケは文字通りの白色である。写真からもおわかりいただけると思うが傘の下に独特のヒダがあり、これがテングダケの顕著な特徴となっている。昨年は6月から8月にかけてヨーロッパ全体がきびしい暑さと異常乾燥に見舞われて余り多く育たなかったようであるが、一昨年はキノコの成育に適した気象条件であつたらしく、9月中旬から10月にかけて遊びがてらHeidelberg近郊の森に行くといたる所でテングダケが目についたものであつた。色合いも決して毒々しい感じではなく、見かけはなかなかどうして気品にあふれているのであるが、このキノコ1個にはほぼ1人ないし2人の成人を死に致らしめるに十分な毒成分を含んでいる。こちらではキノコのシーズンになると、雑誌などにキノコの識別法が写真入りで報道され注意を促されるのであるが、それにもかかわらず毒キノコ特にテングダケによる事故が今だに後をたたず、キノコ豊作の年には20人を越える人々が奇禍にあうとのことである。

テングダケの毒成分の研究の歴史は1700年代の終りに迄さかのぼることができるが、実質的に現代科学のメスが入るのは1930年代後半のことになる。Gatterman-Wielandの実験書で我々にもなじみの深いWieland教授の父君Heinrich Wieland(1877—1957,1927年ノーベル化学賞)のもとMünchenで始まったこの研究は、第二次大戦の戦時・戦後の不自由な時代にも間断なくおし進められ、かれこれ40年にわたり綿々と続けられてい

る。

順序が前後するが、Theodor Wieland教授は1913年Münchenの生まれで今年63歳である。Freiburg、Münchenで化学を学び、1937年父君のもとで学位を取得後、Heidelbergの当時のKaiser-Wilhelm医学研究所(戦後1948年にMax-Plank研究所と改名)化学部門のRichard Kuhn教授(1900—1967、1938年ノーベル化学賞)のもとにポストを得て、1947年Mainz大学の教授として転出される迄の10年間、Kuhn教授の薫陶のもとでアルカロイド・パントテン酸などの化学的・生化学的研究、更にはアミノ酸の分離法の研究などを手がけておられるが、同時にテングダケの毒ペプチドの研究に手を染められたのも言うまでもない。又、意外に知られていないことであるが、この時期に電気泳動法の担体として濾紙を使う今日ひんぱんに使われる「濾紙電気泳動法」の開発が教授の手によってなされている。Mainzの時期はとても短かく、4年後の1951年秋にはFrankfurt大学の有機化学の正教授として再度転出され、1967年に亡くなったKuhn教授の後任として、HeidelbergのMax-Plank研究所に戻って来られる迄の約17年間Frankfurtで研究のかたわら教壇にたたれている。

現在迄にWieland教授により450にのぼる論文が発表されており、その研究分野はキノコ毒・ペプチド化学に限らずアルカロイドの有機化学から生体内のエネルギー代謝・酵素化学などと、有機化学を軸にして分析化学・生化学に広く及んでいる。しかし、なんと言ってもTheodor Wielandの名前と切り離して考えられないのが、テングダケの一連の毒ペプチドAmatoxinとPhallotoxinの研究であろう。

前述の様に、1930年代の後半MünchenにあったHeinrich Wielandの研究室から、Phalloidinの単離(F. Lynen教授の学位論文)、その化学構造の研究(B. Witkop博士の学位論文)などの報告が発表されるのであるが、1940年代の終りから1950年代の初めにかけて、それ迄単一と考えられていたPhalloidinが実は単一ではなく、Phalloin、Phallisin更には酸性のPhallacidinなどの混合物であること、又、ほぼ時を同じくしてAmanitinも種々のAmatoxin同族体の混合物であることが明らかにされた。この頃にはテングダケの毒成分の研究はすっかりWieland教授のグループに移り、毒成分の分離が一段落して各々の成分が純粹に得られる様になるとさっそく本格的な構造研究が開始され、1962年に至りPhalloidinとその同族体、又、Amatoxinについては1968年に最終的な化学構造が決定された。ごく最近更に2種の酸性Phallotoxinの構造が明らかになり、現在までに6種のPhallotoxinと6種のAmatoxinの構造が決められている。

余談になるがこれらの毒ペプチドの構造研究と並行してペプチド合成化学の方法論についての研究もなされ、ベンゾイルクロリドを用いた混酸無水物法、チオフェニールエステルを用いた活性エステル法などは、それぞれ1950年、1951年に発表され、後にこれらの方法は、R. A. Boissonnas、J. R. Vaughan並びにM. Bodanszkyによって改良確立され、今日でも重要な縮合法としてペプチド合成に広く使われていることは周知の通りである。

Phallotoxin、Amatoxinの部分構造  
ないしは全構造が明らかになるにつ  
れてこれらの全合成を志向した研究  
が1960年代の初め頃から行なわれて  
きたが、なにぶんにも構成アミノ酸  
の問題を含めて極めて複雑な構造を  
持つため、ごく最近になってPhallo-  
toxinのうち Phalloinの全合成が完  
成したにとどまっている。

1970年代に入ると、これら毒ペプ  
チドの研究は化学構造・合成といっ  
た有機化学的な研究から少し方向を  
変えて、生化学的な仕事が多くなっ  
て来ている。現在のWieland研究室



Theodor Wieland教授※2

の言わば番頭格のHeinz Faulstich博士を中心にしたグループにより、化学構造と生理活性の相関々係、更には毒性発現のメカニズム解明をめざした研究が着々と成果をあげながら進行している。2、3例をあげると、Amatoxinが細胞内核質のRNA-polymerase IIの活性を阻害し、そのために蛋白質の合成系に障害をもたらすこと、そして又、この現象が特に肝臓、腎臓に於いて著しいことが明らかにされている。これらの臓器の機能障害が中毒死の原因となっていることはほぼ確実ではあるが、RNA-polymerase IIに対する阻害作用だけでは十分に説明できず、更に多くの生化学反応が関与しているものと考えられている。と言うのは、AmatoxinのうちAmanullinという成分は無毒であるにもかかわらずRNA-polymerase IIの阻害作用を示すのである。無毒で上記の阻害作用を有するということがターンオーバーの極めて速いガン細胞の成育を阻止できるのではないかというアイデアをもたらし、実際或る種のガン細胞が*in vitro*で成育しなくなるという実験結果が得られ、日本でも製薬関係の業界紙で一部報道されたようであるが、こちらではテレビ・新聞・雑誌などのマスコミを通じて、「新しい制ガン剤！」として大々的に報道される一幕もあった。

一方、Phallotoxinの方も肝臓障害をもたらすことが明らかにされ、しかも細胞膜に存在するアクチン様蛋白質と特異的に結合し、そのポリメリゼーションを促進し、肝臓に極めて特殊なフィラメントを形成することが電子顕微鏡的に確認されている。アクチン様蛋白質との特異的結合はウサギ筋肉より得られたアクチンを使った実験でも確認されており、Phallotoxinの毒作用の解明の有力な手がかりになりそうである。

Amatoxin、Phallotoxinの化学的・生化学的研究には多量の純粋な毒ペプチドが必要なことと言うまでもない。そのために天然のキノコから抽出・分離・精製をする大量処理の設備が置かれ、これには専従の職員もいる。一昨春秋に約40kgのテングダケを使っ

て始まった抽出の仕事が最近ようやく大づめに来ている。種々の抽出操作を経た後、それぞれの分画の粗精製品をゲル滲過にかけるのであるが、最初に使われるカラムは40×150cmというSephadex L.H-20のもので、この中には約20kgの樹脂がたまっている。ここで得られたフラクションを更に細かく精製してゆき純品を得るのであるが、最終的に、Phalloidinにして10g弱、 $\alpha$ -Amanitinが約5gという収量である。今から25年前の1952年はまれにみるキノコの豊作で、なんと650kgのキノコを処理して27gのPhalloidinを得たということが*Justus Libigs Ann. Chem.*, **593**, 157 (1955) に記されている。この時期にはまだゲル滲過法などの効率の良い分離法も十分に確立されておらず、滲紙の粉末などのカラムを用いて精製が行なわれており、収量も今日のそれとは比較にならない。

一昨年は秋から暮近くまで網膜剝離症で入院しておられたWieland教授は、昨年はずっかり元気を回復され、視力に若干不自由がおありらしいが毎日ご自分で車を運転して研究所に通って来られる。研究意欲はますますお盛んで、土曜日・日曜日にも研究所に出て来られることも多く、図書室で調べものをしておられる姿をしばしば見かけることがある。既に2度来日されており、又、先頃亡くなられた小竹無二雄先生が父君のもとで永く研究生活を送られたことから特に親交を持たれたこともあって、ことのほか日本に興味を寄せておられる教授並びにIrmgard夫人は、昨年春にHeidelberg城と背中合わせの山腹に新築された家の庭の一部に日本風の小川を模したつくりをされたが、竹がないので物足りない残念がっておられる。

研究室のことも書く予定であったが紙数の関係で又の機会としたい。

- ※1 昭和49年12月よりアレキサンダー・フォン・フンボルト財団の奨学研究員としてHeidelberg、Max-Planck 研究所留学中
- ※2 Heidelberg Tageblatt社提供

## 蛋白研メモ

### ひとの動き

- ・永井克也代謝部門助手は、51年10月15日米国より帰国復職されました。
- ・綱沢進化学構造部門助手は、51年12月14日米国より帰国復職されました。
- ・韓国ソウル大学校兪炳高副教授は、日本学術振興会外国人招へい研究者として、物性部門において51年9月1日から52年8月31日まで薬物と生体内物質間の分子相互作用の研究をしておられます。

## 蛋白研セミナー

3月までに開催されるセミナー

題 目	開催予定日	担当者	担当部門
金属表面の水素を探る	3.28~3.30	泉 美 治	有 機

このセミナーはsemiclosedで行なわれますので出席ご希望の方は阪大蛋白研泉美治教授までご連絡下さい。開催日時場所は下記の通りです。

開催日時 3月28日13時~3月30日8時

開催場所 関西地区大学セミナーハウス

連絡場所 阪大蛋白研有機部門 泉 美治 TEL (06)877-5111 内線 3831・3832

## 最近の話題

### 細菌のトリペプチド性抗生物質の取込みの機構

1972年、Bayerらは、<sup>1</sup> phosphinothricin が *in vitro* 系では *E. coli* のグルタミン合成を強く阻害するが細菌に対してはあまり効果がなく、phosphinothricyl-Ala-Alaの形にすると初めて強力な抗菌性を示すことを認めていた。同様なことは (N<sup>5</sup>-phosphono)-Met-S-sulfoximineについても認められていた。

最近、Diddensらは、<sup>2</sup> 上記の阻害物質と合成した類似物を用いて種々の阻害実験を行ない、これらのタンパク質合成の阻害剤がペプチドの形で菌の栄養物取込み口である oligopeptide-transport system を通じて体内に取込まれ、もとのアミノ酸に分解された後作用することを認めた。さらに Met-S-dioxide とその Ala-Ala 誘導体を同時に細菌に働かせると、その抗菌作用が相乗的に働くことを見出し、それらがアミノ酸およびペプチドの両方の摂取系から取込まれるためであろうと説明している。これらの事実は細胞内に取込まれにくい阻害剤もペプチド性に変えることによって容易に吸収させる可能性を示唆するもので、有用な医薬の開発に新しい道を開くものとして興味深い。(奨励会ペプチド研 岸田保雄)

- 1) E. Bayer *et al.*, *Helv. Chim. Acta.*, **55**, 224 (1972).

- 2) H. Diddens, H. Zähler, E. Kraas, W. Göhring, and G. Jung, *Eur. J. Biochem.*, **66**, 11 (1976).

### Sequential polypeptideの新合成法

ペプチドの sequential polymer はコラーゲン、エラスチン、ヒストン等のモデルとして数多く合成され、天然物の高次構造の解明や生化学的反應機構の解明に広く用いられ多くの成果をあげている。その合成には、構成単位となるオリゴペプチド活性エステルを塩基の存在下DMSO等の溶媒中加熱縮合させる方法が主として用いられていた。しかし、生成物が難溶性の場合、この縮合法では高分子量のものが得られない欠点があった。

最近、Goodmanらは注意して合成した Val-Val-Ala-OPep-TFAを一旦セライト上に吸着させ、昇華装置を用いて減圧下 (0.025mmHg)、125℃で加熱縮合させると好収率で高重合物を与えることを見出した。<sup>1</sup> 重合物はセライトからトリフルオロエタノールで抽出するが、得られたものの分子量は4万~8万で、しかも、Manningの方法でテストした場合重合の過程ではほとんどラセミ化していないことが明らかとなった。この方法の応用範囲はまだ明らかではないが、一般的に応用しうる可能性は十分あるものと思われる。(奨励会ペプチド研 大西隆信)

- 1) M. Sakarellos-Daitsiotis, C. G. C. Sakarellos, and M. Goodman, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 7105 (1976).

### 猫の脊髄より得た新しいトリペプチド

Lofeらは猫の脊髄より新しくヒスチジン、グリシン、リジンよりなるトリペプチドを分離した。<sup>1)</sup> すなわち、パルビタール麻酔猫の腰髄(L<sub>2</sub>-L<sub>3</sub>)脊側部をすみやかに取り出し、一旦液体窒素で凍結したのちアセトン塩酸液にてホモジェナイズし、上清を凍結乾燥後、Sephadex G-15-DEAE-Sephadex でペプチド部分を分離し、一部はダンシル化してのちポリアミドプレートでの二次元展開、他はそのままシリカゲルプレートで二次元展開しフルオレスカミンによる蛍光検出法を用いていずれも14ヶのスポットを見出した。そしてそのうちの一つを抽出し、N末端分析ならびにアミノ酸組成からHis-(Gly, Lys)と推定した。そこで、His-Gly-LysとHis-Lys-Glyを合成し、種々の溶媒系によるクロマトグラフィーにより天然物の同定を試みたがこれら二つは常に全く同じRf値を示し同定不可能であった。しかし、合成品による種々の神経作用を調べたところ、これら両者とも神経系の阻止作用を示すことを明らかとしている。調べた部位は猫の延髄・楔状核部、脊髄(L<sub>3</sub>-L<sub>5</sub>)の後角部、中脳毛様体部の3ヶ所で、それらの部位の単一ニューロンに微小電極を挿入し、さらにこれらの物質を電気泳動的に注入することによって放電頻度を記録し、これらの物質は自然発火(natural firing)に対する影響は強くないが、グルタミン酸の注入による発火の増加を著しく抑制する作用のあることを明らかにしている。その程度はHis-Gly-Lysの方がHis-Lys-Glyより強い。そして生理的役割については脊髄後角に終わる下降線維に抑制的な働きを示すことを示唆している。(阪大医 和田 博)

- 1) C. J. Lofe, J. P. Gent, J. H. Wolstencroft, and M. Szelke, *Nature*, **264**, 188 (1976).

### 不溶化アンヒドロトリプシンによるC末端アルギニンペプチドの精製

トリプシンの活性部位セリンを修飾してデヒドロアラニンに変えたアンヒドロトリプシンはもは

や酵素としての活性は示さない。しかし、C末端にカルボキシル遊離のアルギニンを持つペプチドに対するaffinityはもとのトリプシンよりも強く<sup>1)</sup>、そのaffinityには立体特異性があり、Bz-ArgとBz-D-Argとでは大きく異なる。

石川らはこのアンヒドロトリプシンをAxén, Ernbackらの方法でセファロースにつけて不溶化し、このカラムにMet-Lys-bradykinin, tuftsin, fibrinopeptide Aなどを流すと強く吸着され、希塩酸水溶液で流し出せることを見出した。tuftsinの場合2.7μM濃度からの吸着による回収率がほぼ100%であり、希薄溶液からのC末端アルギニンのペプチドの単離、分析にこのシステムが有効であることが示された。<sup>2)</sup> zymogenからenzyme、prohormoneからhormoneへの変換或いは他の特異的酵素分解においてトリプシン様酵素が大きな役割を持っているが、その結果生ずるC末端アルギニンのペプチドの解析にこのアンヒドロトリプシン—セファロースの利用は有効であろう。(奨励会ペプチド研 瀬戸保彦)

- 1) H. Yokosawa and S. Ishii, *J. Biochem. (Tokyo)*, in press  
2) H. Yokosawa and S. Ishii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1443 (1976).

### Endorphinsとその向精神神経作用

最近のScienceに2報連続してendorphin類縁物質の中樞神経に対する作用が報じられている。脳下垂体性ホルモンであるβ-lipotropin(β-LPH; 91ヶのアミノ酸よりなるペプチド、1965年C. H. Liにより全構造決定)の部分分解産物である種々のペプチドにモルフィン様作用のあることが見出され最近注目を集めているが、これらの論文ではMet-enkephalin(β-LPHの61より65のペプチド)、Leu-enkephalin(前者のMetをLeuにかえたもの)、α-endorphin(β-LPHの61-76)、β-endorphin(β-LPHの61-91、別名C-フラグメント)、γ-endorphin(β-LPHの61-77)を用いて各種の中樞作用を比較検討している。

Bloomらは、<sup>1)</sup>これらの物質をラット脳の大槽(cysterna magna)あるいは脳室内に注入し、rigidity, corneal reflexの喪失、tail-pinch

responseの喪失、wet-dog shakeの四つの反応について観察し、その結果、 $\beta$ -endorphinが最も著明な反応を示すことを見出した。これまでモルフィン様作用の強弱については *in vivo*, *in vitro*ともあまり明確にされていなかったが、この実験では他のペプチドの1/100~1/400でカタトニーを誘発し、それはモルフィンの拮抗薬である naloxoneの注入により瞬時に回復することを認めている。又、 $\beta$ -endorphinは体温を下げ、 $\gamma$ -endorphinは体温を上げるとの興味ある観察も行なっている。

Jacquetらは、<sup>2)</sup>直接脳のPAG(periaqueductal gray)部に注入することによりほぼ同じ結果を得ており、 $\beta$ -endorphinが強力な脳での neuro-

modulatorである可能性を示唆した。

以上の実験から、これらの著者は人の精神々経作用におけるこれらのペプチドの役割を高く評価し、これらの代謝異常が精神分裂症を誘発する可能性について言及している。分裂症で幻聴の激しい患者にnaloxoneを投与し、数分以内に幻聴が中止したという注目すべき観察をも引用している。(阪大医 和田 博)

- 1) F. Bloom, D. Segal, N. Ling, and R. Guillemin, *Science*, **194**, 630 (1976).
- 2) Y. F. Jacquet and N. Marks, *Science*, **194**, 632 (1976).

## PRF・NEWS

### D-アミノ酸供給の現状と当会取扱い品の光学純度に関するお知らせ

最近、各種生理活性ペプチドにD-アミノ酸を導入して特異性を高めたり持続性を持たせたり或いは阻害剤を合成したりする試みが多くなり、高純度のD-アミノ酸を求める声が次第に高まってまいりました。しかし、生産者の立場から見ればその総需要は極めて微々たるもので、まだ工業的に大量生産される段階には至っておりません。従いまして、その入手価格もL-アミノ酸に比べますと非常に高価であります。

L-アミノ酸は現在主として酵素法かまたは醗酵法で作られておりますのでその光学純度は極めて高く、そのままご使用いただきましても何等ご心配はございません。しかし、D-アミノ酸はDL-アミノ酸を酵素法にて分割した残りの部分から回収されておりますために、現在市販されているものの中には光学純度の低いものがあり、L体の混入率8%を越えるものも見出されております。

当会ではできる限り光学純度の高いD-アミノ酸を入手すべく多大の努力を重ねておりますが、L体混入率3~5%のものを入手するのが精一杯でありまして、残念ながら高純度品をご提供できないのが現状であります。従いまして、当会の取扱うD-アミノ酸には当会分析室にて測定したL体混入率が表示されておりますので、よくお確かめのうへご使用下さいませようお願い申し上げます。

なお、当会では独自の精製操作を加え、高純度のBoc-D-アミノ酸を合成し発売する計画を立てております。従いまして、今後当会から発売いたしますBoc-D-アミノ酸は光学純度に関しても保証付のもののみになります。つきましては、精製の難易によりやむなく発売価格を変更することもありますので、事情をご賢察のうえ悪しからずご了承下さいますよう重ねてお願い申し上げます。

## 新 製 品

Code	化 合 物	価 格 (円)	
2121	Boc-Cys (Acm) Boc-S-Acetamidomethyl-L-Cysteine	1 g	3,700
		5 g	11,300
		25g	43,300
3085	Carnosine $\beta$ -Ala-His	1 g	2,900
		5 g	7,100
4051-V	Human Calcitonin (ca 0.5mg in vial) Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly- Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His- Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala- Pro-NH <sub>2</sub>	1-3vials	60,000/vial
		4-10vials	54,000/vial

## 輸入販売品 (固相法による合成品)

Code	化 合 物	価 格 (円)	
4052	$\gamma$ -Endorphin ( $\beta$ -Lipotropin 61-77) Peninsula Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu	0.5mg in vial 40,000	
		0.5mg in vial 66,000	
4053	Human $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -Lipotropin 61-91) Peninsula Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln- Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile- Ile <sup>23</sup> -Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	0.5mg in vial 66,000	

なお前回お届けしました輸入品リスト中の code 4047  $\beta$ -Endorphin は camel 型のものであります。その構造式で Ile<sup>23</sup> が抜けておりました。お詫びかたがた謹んで訂正申し上げます。

## カタログ外在庫品特売

Code	化 合 物	価 格 (円)	
A-2	Asp- $\beta$ -p-Nitroanilide	0.1g	1,800
		1g	6,000
A-3	Z-Glu-Tyr-NH <sub>2</sub>	0.1g	2,000
A-9	Gly-Pro-Leu- $\beta$ -Naphthylamide·HBr	0.1g	2,800
		1g	15,300
C-1	Gly-Val	0.1g	1,500
E-1	Met-Met	0.1g	3,500

なお、カタログ外在庫品は在庫量に限りがありますので、品切れの際はご容赦下さい。

# PRF

Vol. 3 No. 2 1977. 3

編集発行 財団法人 蛋白質研究奨励会

〒562 大阪府箕面市稲476 TEL(0727)29-4121