第14回　日本神経化学会

予　稿　集

昭和46年10月15・16日(1971)

日仏会館ホール
東　京

日本神経化学会

第14回　日本神経化学会

予　稿　集

昭和46年10月15・16日(1971)

日仏会館ホール
東　京

日本神経化学会

目　　次

1. 脳組織の解糖調節における cyclic AMPの役割 …… 1
高　垣　玄吉郎
（慶大・医・生理）

2. 人脳の cyclic 3′, 5′-AMP系 …… 4
児　玉　万　典・松　角　康　彦
（熊大・医・脳外科）
清　水　宏　俊
（熊大・医・1薬理）

3. アルコールの長期間連続投与時に於ける脳内 adenyl cyclase 及び cyclic nucleotide phosphodiesterase 活性の変化に就いて …… 8
栗　山　欣　弥・Israel, M.A.
（京府医大・薬理；N.Y. State Univ, Dawnstate Med. Center）

4. 脳の cyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesterase, Ⅳ. "Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent" phosphodiesteraseについて …… 11
山　崎　礼　子・垣　内　史　朗
手　島　佳　子
（大阪府立中宮病院）

5. 3′, 5′-cyclic AMP依存性蛋白質燐酸化酵素の多様性および再構成 …… 15
公　文　　明・西　山　　馨
山　村　博　平
（神大・医・2生化）

6. Synaptic membrane での Ca の動き，およびそれに対する caffeine の影響 …… 19
斉　藤　喜　八・吉　田　　博
（阪大・医・1薬理）

7. 単一ニューロン細胞体におけるエネルギー産生系酵素の活性 …… 23
加　藤　尚　彦（東大・医・脳研）
Lowry, O.H.
（Washington 大学・薬理）

8. ネコ脊髄における γ-アミノ酸（GABA）の分布 …… 27
宮　田　雄　平・田　中　百合子
大　塚　正　徳
（東医歯大・医・薬理）

9. ニューロン核におけるRNA合成 ……31
黒川正則・田村立夫
井上朋子・瀬谷典子
（東大・医・脳研）

10. 牛末梢神経に存在する酸抽出性の蛋白質について ……35
戸張千年・植村慶一
平野修助
（東邦大・医・2生理）

11. 脳特異的S100タンパク質の精製とその性質 ……39
礒辺俊明・奥山典生
（都立大・理・化学）

12. メチル化蛋白質の合成と分解 ……43
柿本泰男・三宅正治
中嶋照夫・小西博行
（阪大・医・高次研）

13. 蛋白質のメチル化酵素 ……47
三宅正治・柿本泰男
松岡征夫
（阪大・医・高次研）

14. 初老期，老年期痴呆患者の脳蛋白の変化――とくに神経原線維変化との関係について……51
播口之朗・西村健
金子仁郎
（阪大・医・精神）

15. 魚脳ガングリオシドについて ……55
石塚稲夫・Wiegandt, H.
（Marburg大学・生化）

16. 無脊椎動物神経組織（ganglion, fiber）の脂質構成 ……59
駒井裕一・松川恵子
佐武明
（新潟大・脳研・神経化学）

17. 幼児型Gaucher病の糖脂質異常代謝について ……63
久保田勝
（信州大・医・2生理）
武富保
（信州大・順応研・生化）

18. 実験的クレチンラット脳の神経化学的研究——特に髄鞘形成障害に関して …… 67
辻 村 良太郎・狩 山 直 之
野 村 純 一・鳩 谷 龍
（三重大・医・精神）

19. ミエリン欠損マウス（Jimpy および Quaking）の脳の 2′, 3′－cyclic nucleotide 3′－phosphohydrolase 活性 …… 71
栗 原 正
（新潟大・脳研・神経薬理）

20. ラット脳の AMP deaminase の多様性とその性質 …… 75
小笠原 信 明（愛知県コロニー）
吉 野 昌 孝・川 村 康 彦
（名大・医・2生化）

21. 脳 adenosine kinase：部分精製，性質，および adenosine の取込みにおける役割 …… 79
清 水 宏 俊・岡 山 博 人
田 中 正 三
（熊大・医・1薬理）
児 玉 万 典
（熊大・医・脳外科）

22. －75℃～－78℃下で有機溶媒処理されたラット脳 Na・K・ATPase の脂質要求性について …… 83
野 口 鉄 也（慶大・医・生理）
Freed, S.
（N.Y.医大，生化・神経；Brookhaven 研，化学）

23. Mixed function amine oxidase の特性及び調節機構 …… 87
櫻 井 征 彦
（長崎大・医・精神）

24. ミトコンドリアのモノアミン酸化酵素（MAO）の活性化と抱水クロラールの影響 …… 91
伊 藤 秀 博・奥 山 典 生
（都立大・理・化学）

25. ラット脳のコレステロール生合成——特にスクワレン酸化酵素について …… 95
山 本 尚 三・大 西 兄 子
早 石 修
（京大・医・医化）

26. セロトニンの生合成に関する酵素的研究(1)，トリプトファン水酸化酵素の性質 …… 99
堀　真一郎・貫和敏博
真下陽子・幕内晴朗
村松　宰・市山　新
（東大・医・栄養）

27. 人間脳によるセロトニンO－サルフエートの生成と新しい酵素活性測定法 …… 103
日高弘義
（名大・医・1生化）

28. 白ネズミの脳シスタチオニン合成酵素に関する研究 …… 107
柏俣重夫
（名大・医・2生化）

29. プトレアニン，N－（4－アミノブチル）－3－アミノプロピオン酸の生合成について …… 111
中嶋照夫・佐野　勇
（阪大・医・高次研）

30. ホモカルノシンの分解酵素 …… 115
谷口和覧・今岡信夫
（阪大・医・高次研）

31. 発育期ラツテ脳におけるチミジンキナーゼの変化 …… 119
山上　栄・森　浩一
川北幸男
（阪市大・医・神経）

32. ラット脳発育に伴う解糖系の研究 …… 123
須田治彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

33. 脳発達障害の神経化学的研究（第2報） …… 127
成瀬　浩・小松せつ
永山素男　（国立精研）
宮本侃治（国立武蔵療養所）

34. B_6 依存性痙攣における代謝障害 …… 131
多田啓也・高田五郎
（阪市大・医・小児）
吉田稔男・荒川雅男
（東北大・医・小児）

35. 生体内に於けるキノホルムの運命とその作用 …… 134
高橋康夫・荒木一明
（新潟大・脳研・神経薬理）

招待講演： The biosynthesis of plasmalogens during myelination of the rat …… 138
Debuch, H. (Physiol. Chem. Inst., Köln)

1. 脳組織の解糖調節における cyclic AMP の役割

高　垣　玄吉郎（慶大・医・生理）

〔要約〕

清水ら[3]はさきに脳皮質切片における cyclic AMP の形成はメジウムのカリウム濃度によって変化することを指摘し，その 20～25 mM の濃度までは対照(5 mM)と変らずそれ以上では濃度に比例して cyclic AMP 形成が高まることを述べた。そして，脳切片の好気的解糖もまた 20 mM 以上のカリウム濃度で亢進することと[4]と符合するから，解糖調節と cyclic AMP と関係があるのではないかと示唆した。しかし，cyclic AMP は解糖調節の直接の effector とは一般には考えられていない[1]。演者の報告はうえの清水の示唆を実験にうつして得た結果であって，cyclic AMP をメジウムに加えても脳切片の好気的解糖が亢進しないことを確め，しかし FDP および triose P の濃度が高まるから，phosphofructokinase に対してはアロステリックな effector であることを知った。FDP 濃度を高める cyclic AMP の濃度は 0.01 mM 程度以上であり，これは 5'AMP の有効な濃度と変らない。histamine(1 mM)や ouabain(0.05 mM)は cyclic AMP の形成を高めるが[3]，好気的解糖速度を亢進せず，FDP, triose P の濃度を高めるにすぎない。これらの事実は cyclic AMP が phosphofructokinase のアロステリックな effector であることを示すが，同時に脳切片では phosphofructokinase の段階が直接に好気的解糖を調節するのではないという演者のさきの結論[4]を確めえたものであると考える。

〔方法〕 モルモット大脳皮質切片を用い，実験方法はさきに報告した方法[4]とほとんど同じである。切片をインクベイトするメジウムとしては glycylglycine buffer (pH 7.4) を含む Krebs-Ringer 溶液を用い，無機リン濃度は 1.2 mM とした。グルコースを基質として(5 mM)，空気中で 30 分間 37°C にインクベートしたのちの解糖中間代謝物質の量を，切片とメジウムを一緒にホモジナイズした過塩素酸上清について酵素的方法で測定し，脳切片の湿重量当りで表現した(μmoles / g slices)。メジウムのカリウム濃度 5 mM および 20 mM のときに，メジウムに加えた cyclic AMP または 5'AMP の解糖速度およびその中間代謝物質の濃度に対する影響をみたのである。表 1～表 5 には，それぞれ 5 例以上の実験の平均値のみを示した。

〔実験結果と考察〕 演者はさきに，脳皮質切片(モルモット)における好気的解糖では，phosphofructokinase は調節酵素であるけれども，むしろそれより解糖酵素系のさらに下流の段階が決定的役割を果していると考えられると述べ，おそらく triose-phosphate dehydrogenase の段階の調節のほうが重要であるだろうと報告した[4]。その主な根拠は次のようであった。すなわち，メジウムのカリウム濃度を 5 mM (対照)から順次に高めてみると，20 mM までは脳切片の好気的解糖速度の高進はなくて，20 mM 以上ではじめてカリウム濃度に応じて解糖速度が高まること；ところが，FDP 濃度はメジウムのカリウム濃度が 5 mM から 20 mM までに著明に高まり，20 mM 以上でおそらく減少し，カリウム濃度をさらに 30 mM 以上に高めれば，FDP 濃度もまた高まること；さらに，メジウムのカリウム濃度を変化させたときの ATP 濃度の変化とメジウムに ATP を加え

(表1)

Effect of Cyclic AMP on Aerobic Glycolysis(K^+ 5.1mM)

Cyclic AMP	Glucose consump.	FDP	TrioseP	PEP	Pyruvate	Lactate
-	11,925.	20.9	57.5	34.0	368.7	12,886.
0.0066mM	8,759.	14.9	53.6	31.5	347.1	11,730.
0.033mM	11,230.	46.8	71.6	32.4	422.9	13,914.
0.1mM	11,217.	60.3	77.7	37.3	325.1	12,407.
1.0mM	12,061.	63.5	85.7	34.3	329.8	11,668.

Mean of five experiments. mμmoles/g slices.
Incubation: Glycylglycine Buffer, 30 min.

(表2)

Effect of Cyclic AMP on Aerobic Glycolysis(K^+ 20mM)

Cyclic AMP	Glucose consump.	FDP	TrioseP	PEP	Pyruvate	Lactate
-	12,064.	93.3	105.1	32.2	304.5	12,065.
0.0066mM	15,008.	157.1	125.3	28.9	394.2	13,795.
0.033mM	12,631.	158.2	122.6	27.7	275.6	11,522.
0.1mM	14,037.	259.0	118.7	28.0	351.0	13,806.
1.0mM	13,413.	271.1	149.9	24.0	320.8	13,183.

Mean of five experiments. mμmoles/g slices.
Incubation: Glycylglycine Buffer, 30 min.

(表3)

Effect of 5'AMP on Aerobic Glycolysis(K^+ 5.1mM)

5'AMP	Glucose consump.	FDP	TrioseP	PEP	Pyruvate	Lactate
-	11,925.	20.9	57.5	34.0	368.7	12,886.
0.0066mM	12,082.	23.7	54.4	39.6	401.4	13,498.
0.033mM	11,077.	62.9	75.2	43.6	398.8	12,665.
0.1mM	13,352.	60.0	74.9	34.6	365.0	13,815.
1.0mM	12,502.	51.7	82.2	33.5	356.1	11,773.

Mean of five experiments. mμmoles/g slices.
Incubation: Glycylglycine Buffer, 30 min.

(表4)

Effect of 5'AMP on Aerobic Glycolysis(K^+ 20mM)

5'AMP	Glucose consump.	FDP	TrioseP	PEP	Pyruvate	Lactate
-	12,064.	93.3	105.1	32.2	304.5	12,065.
0.0066mM	13,256.	103.1	105.1	32.4	407.9	14,129.
0.033mM	13,171.	183.5	128.5	28.4	342.2	14,103.
0.1mM	11,737.	226.8	132.1	27.7	317.9	12,428.
1.0mM	14,946.	201.2	141.1	31.8	410.1	14,503.

Mean of five experiments. mμmoles/g slices.
Incubation: Glycylglycine Buffer, 30 min.

たときの解糖中間代謝物質の濃度の変化は，triose-phosphate dehydrogenaseの段階の調節的意義を示唆するものであったこと；などである。

ところで，メジウムに1.0mMまでのcyclic AMPを加えた成績では，表1および表2に示したように，好気的解糖速度はcyclic AMPによってまったく変化しない。グルコース消費も乳酸形成も対照と変らないのである。メジウムのカリウム濃度が20mMのときのcyclic AMPの影響(表2)をもしらべたのは，カリウム濃度を20mM以上にすると解糖速度が高まるのであるから，カリウム濃度5mMのときにcyclic AMPの解糖速度高進の効果がみられなくても，カリウム濃度20mMではcyclic AMPが解糖を高進するのではないかと考えたからである。

解糖速度には影響をしないのに，FDPおよびtriose Pの濃度はcyclic AMPによって明らかに増加する(表1および表2)。増加の割合はtriose PよりもFDPのほうが著明で，cyclic AMPがphosphofructokinase活性を高めるためであることを示す。0.0066mMのcyclic AMPではFDPとtriose Pの濃度をほとんど増加せず，0.033mMでは明瞭な増加が認められた。

以上の成績と清水S[3]の所謂カリウム効果の場合のcyclic AMP濃度の変化の範囲をあわせ考えると，カリウム効果の場合にcyclic AMPがeffectorとなっ

(表5)

Effects of Histamine & Ouabain on Aerobic Glycolysis

Additions	Glucose consump.	FDP	TrioseP	PEP	Pyruvate	Lactate
Control	11,925.	20.9	57.5	34.0	368.7	12,886.
Histamine 1mM	13,359.	67.8	85.3	39.4	449.6	13,967.
Ouabain 0.05mM	11,916.	92.4	102.1	35.6	241.3	11,924.
Histamine & Ouabain	12,224.	97.3	96.0	33.9	250.0	11,819.

Mean of five experiments. mμmoles/g slices.
Incubation: Glycylglycine Buffer, 30 min.

てFDP濃度が増加したとは思われない。

さらに，表3および表4に示すように，5'AMPによってもうえのcyclic AMPと同様の成績がえられた。5'AMPの場合もやはり0.01mMぐらいの濃度以上でないとFDP濃度を高めず，解糖全体の速度は全く影響されない。FDPの増加のほうがtriosePの増加よりも著明である点も，cyclic AMPと同様である。

清水ら[3]によると，histamine (1mM), ouabain (0.05mM) によって脳切片のcyclic AMP形成が著明に増加する。ところが，グルコース消費も乳酸形成もこれらの物質によって全く変化せず，FDPとtriose P濃度に及ぼす影響はcyclic AMPを加えたときと同様である(表5)。histamine (1mM) は脳切片のATPなどアデニンヌクレオチドの濃度にはほとんど影響を及ぼさないが，ouabain (0.05mM) はATP濃度をやや低下し，AMPを増加せしめる。ouabainについては，ピルビン酸濃度が明らかに低下するから，Rollestonら[2]の云うように別の作用のあることが明らかである。

以上の成績を総括して考察するならば，cyclic AMPは5'AMPと同様にphosphofructokinaseの活性の増加に有効なeffectorであることが確められたにすぎない。それは脳切片の好気的解糖調節に決定的な役割を果しているとは考えられず，ましてその点の生理的意義を論ずることもできないだろう。

以上の成績から明瞭であることは，5'AMPによってもcyclic AMPによっても，FDPとtriose Pの濃度は高まるけれども，解糖全体の速度は高まらないと云う事実であって，phosphofructokinaseがdirectな調節段階ではないことを示しているであろう。

〔文献〕

1) Rall,T.W. & Gilman,A.G. Neuroscience Research Program: 8, (3), 1970

2) Rolleston,F.S. & Newsholme,E.A.: Biochem. J. 104, 524, 1967.

3) 清水宏俊： 神経化学 9,(Supple.) 1, 1970.

4) 高垣玄吉郎 神経化学 9,(Supple.) 144, 1970.

2. 人脳のcyclic 3′, 5′-AMP系

児玉万典・松角康彦（熊大・医・脳外科）
清水宏俊　（熊大・医・1薬理）

〔要約〕

脳手術の際に得られる新鮮人脳組織（正常部位および腫瘍組織）を用いて，ヒトの脳組織のcyclic AMP（adenosine 3′,5′-monophosphate）系の特性を調べた。その結果，
① ヒトの大脳皮質にcyclic AMP, adenyl cyclase, phosphodiesterase の存在することを確認した。cyclic AMP 値は灰白質で 1.4×10^{-9}/g wet weight，白質や各種腫瘍組織ではこれの約10分の1であった。
② ノルエピネフリン，ヒスタミン（そして多分セロトニン）が脳切片内 cyclic AMP 値を著しく増加させた。特にノルエピネフリン効果は調べられた各種脳（サル，ウサギ，モルモット，ラット，マウス）中でヒト大脳 cyclic AMP 系に対する反応が最も強く，対照群の25倍にも達した。ノルエピネフリン効果は6分前後のインキュベーションで最も著明で，0.5mM で最高効果を示し，部位差，個体差は著明でなかった。
③ agonistの比較実験，antagonistの組合せ実験から，②のカテコラミン感受性はβ-adrenergic receptor type と同定された。
④ 脱分極剤の一種，veratridine（0.05mM）もノルエピネフリンとほぼ同程度の cyclic AMP 値上昇作用を有した。ノルエピネリンと veratridine の同時添加では協力作用を示し，細胞外adenine 由来の nucleotides の73%もが cyclic AMP に転換した。

各種の動物において，脳は他の臓器に比して著しく高い adenyl cyclase[18], phosphodiesterase[4] 活性を有し，cyclic AMP の濃度が biogenic amine[8,13]，膜脱分極[9,15]，アデノシン等[12,14]により調節されていることは，既に知られている。しかし人間の脳の cyclic AMP 系に関する実験成績は未だ皆無である。

躁うつ病の患者の尿中 cyclic AMP が，病状に並行して変化するという報告や[1]，「抗うつ剤が，モルモット脳切片内の cyclic AMP 形成を増加する」という我々の成績[10]を考えると，人脳の cyclic AMP 系の性質を知ることは，重要な生理学的および病理学的意義をもっていると思われる。

〔実験方法〕

本実験を通じて用いられた正常人脳灰白質，白質の組織は，脳腫瘍および，脳動脈瘤の手術時，術後のより良い改善を得るために止むを得ず行なった頭蓋内減圧手術時得られたものである（試料についての詳細は，一部文献16に報告）。腫瘍組織においては，組織学的診断が確定したものである。

組織内の cyclic AMP の定量には，手術時得られた組織を直ちに，ドライアイス—アセトン溶液で凍結保存し，使用時に7.5% TCA 液中にて homogenate を行ない，その上清中の含量を Ebadi 5[6] の方法（fire-fly luciferin-luciferase 使用）により，液体シンチレーションカウンターにて測定した。

人脳 cyclic 3′5′-AMP 系のホルモン等に対する反応性をみるためには，手術時得られた組織を直ちに氷冷 Krebs-Ringer-Bicarbonate-Glucose（NaCl, 122mM: KCl,

3mM: $MgSO_4$, 1.2mM: $CaCl_2$, 1.3mM: KH_2PO_4, 0.4mM: D-glucose, 10mM: $NaHCO_3$, 25mM:) 中に移し，可及的速やかに，スライスを作製し，直ちに O_2 通気下，15分間のプレインキュベーション後，清水[13]の pulse labelling 法により測定した。

adenyl cyclase 活性は，Krishna[11]の方法で得た顆粒分画を酵素標品とし，表に示した条件で反応させた。 phosphodiesterase 活性は，Brooker[3]の方法によった。

〔結果と考察〕

〔I〕 cyclic AMP，adenyl cyclase，phosphodiesterase の人脳内存在。

実験動物脳内の endogenous cyclic AMP 値は，測定方法により[2,6,7,16]，多少の相異はあるが，比較的高濃度に存在していることは既に知られている。 我々が人脳において得た値は表Ⅰの如くであり，既知の他動物における値とほぼ一致する。 一方，神経細胞体（perikaryon）の存在しない皮質下白質においては，著しく低濃度で，同様に神経細胞のみられない，脳腫瘍組織の glioma や meningioma においても，白質同様極めて少ない。 さらに神経発生学的に bipotential な方向性をもつと言われる medulloblastoma においても，上記腫瘍同様，極めて少ない。

〔表 I〕

Distribution of 3',5'-cyclic AMP in human brain

Tissue	cyclic AMP (pmoles/mg protein)
Cortical gray matter	28.0*
Subcortical white matter	≦ 2.1
Glioma	≦ 3.5
Medulloblastoma	≦ 1.5
Meningioma	≦ 3.5

* 1.4 nanomoles/g wet weight

人脳灰白質顆粒分画には adenyl cyclase が存在する（表Ⅱ）。 この標本は神経ホルモンや脱分極剤にはほとんど感受性を示さないが，NaF添加により，2～3倍の活性増加がみられる。

〔表 II〕

Adenyl cyclase activity of human cerebrum measured with the particulate fraction.

Addition	cyclic AMP formed (n mole/min/mg protein) Exp.1	Exp.2	Exp.3
None	0.19	0.24	0.20
None	0.19	0.24	0.18
NE*	0.19	--	--
NE(0.1 mM)	0.18	--	--
NE*+HN**	0.19	0.26	0.19
NE*+HN**	--	0.27	0.18
NaF(10 mM)	--	0.58	0.60
NaF(10 mM)	--	0.57	0.57
NaF(10 mM)+NE*	--	0.58	--
NaF(10 mM)+NE*+HN**	--	0.55	0.61
NaF(10 mM)+NE*+HN**	--	--	0.57
veratridine	0.18	--	--

The cyclase activity was measured with 2000 xg precipitates of homogenate of human cerebral cortex in a reaction mixture containing 40mM Tris-HCl,pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 6.7mM caffeine, 3mM [8-^{3}C]-ATP, and enzyme(0.3-0.5 mg protein) in a total volume of 0.2ml. Incubation: 30°C 10 min.
* 0.5mM l-norepinephrine bitartrate
**0.5mM histamine hydrochloride

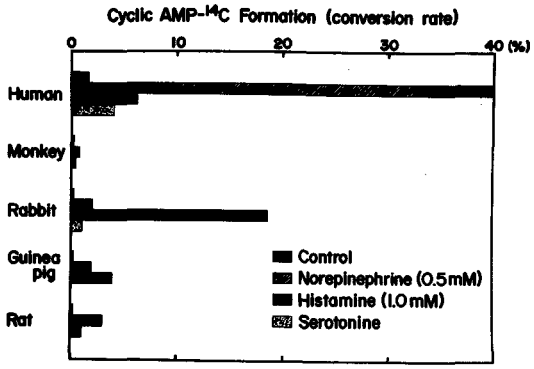
人脳のphosphodiesterase 活性は，モルモット大脳のそれとほぼ同程度の強さで，ノルエピネフリンやヒスタミン添加により，活性の変化は認めなかった。

〔II〕 cyclic AMP 値の調節因子について。

(a) 種差 人脳cyclic 3'5'-AMP 系の，biogenic amine に対する反応性を，他動物と比較したのが図Ⅰであるが，ノルエピネフリンに対する感受性は，ヒト大脳において著しく強いのが特徴的である。 ヒト，ラットおよびマウスの大脳灰白質では，ノルエピネフリンの刺激効果が，ヒスタミンより強力であり，ウサギやモルモットでは，ヒスタミンの効果の方が強力である。 セロトニンの効果は著明でない。

(b) ノルエピネフリン効果 人脳におけるノルエピネフリン効果の time course

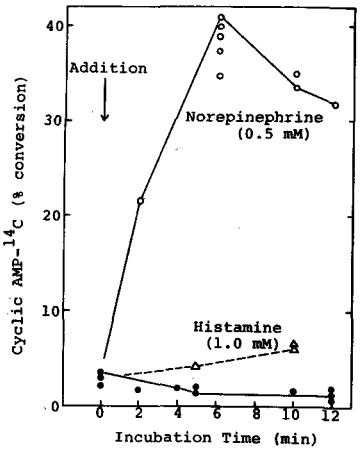
〔図 I〕



The response to biogenic amines of cerebral slices of various animals

Number of experiments are 3,1,6,3, and 2 for human, squirrel monkey, guinea pig(Hartley), rabbit(New Zealand White), rat(Wister), respectively. Incubation times are 7 min for control, norepinephrine, and serotonine, and 10 min for histamine. Other experimental condition was the same as was described in Table IV.

〔図 II〕



Time course of cyclic AMP level in slices of human cerebral cortex after exposure to biogenic amine.

The slices were incubated with ^{14}C-adenine for 40 min and, after wash, further incubated inth presence and absence(●) of amines.

をみたのが図IIであり，exogenous に与えられた^{14}C-adenineより切片内で形成された^{14}C-adenine nucleotidesから、cyclic AMPへの転換率は、インキュベーション開始直後より、急激に上昇し、6分間で最高に達した後、徐々に低下の傾向がみられ、ヒスタミンにおいては、10分迄、極めてゆるやかな上昇の傾向がみられた。ノルエピネフリン効果（6分後）の Dose-effect relationship の大略は表IVにみられる。

上記の反応性の実験に使用した人脳灰白質は、主として、左右前頭葉、側頭葉であるが、部位や個人差による相異は著明でなかった。人脳 cyclic AMP系に対するノルエピネフリンの著明な刺激効果は、上記 pulse labelling 法のみならず、直接切片内の cyclic AMP値を測定した結果からも明らかである（表 III）。pulse labelling 法では、対照群の 25.4 倍の増加が認められるのに対し、全 cyclic AMP値の測定では、13.4 倍の増加が認められ、前者の方法がより感度の良い測定法であることがわかる。

〔表 III〕

The norepinephrine effect on formation of cyclic AMP in incubated slices of human cerebral cortex

	Cyclic AMP level	
	cpm/mg prot.*	moles/mg prot**
Without NE	310(65)	14(5) x10^{-12}
With NE(0.5mM)	7880(1030)	187(49)x10^{-12}
No. of expts.	N=5	N=3
Stimulation	X25.4	X13.4

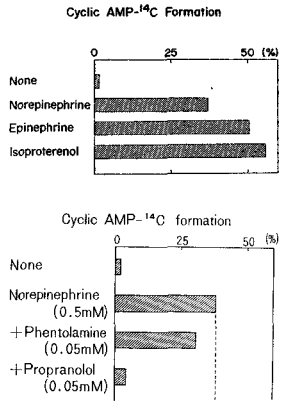
After preincubation, slices were incubated with or without norepinephrine for 7 min. Figures in paretheses indicate ±SD.
*Newly formed ^{14}C-cyclic AMP in slices pre-incubated with ^{14}C-adenine.
**Total endogenous cyclic AMP

(c) カテコラミン agonist, antagonist の効果。同濃度（0.5mM）のカテコラミン agonist中ノルエピネフリンよりも、エピネフリン、さらにイソプロテレノールの方が強力である（図 III）。Chasin ら[5]は、モルモット小脳では、cyclicAMP

のカテコラミンに対する態度は、β-receptor type であり，大脳ではむしろ、α-receptor type であるとしているが、ヒト大脳皮自質では、低濃度（0.05mM）のプロプラノロール（β-blocker）により，その作用は選択的に著しく抑制されることからも、その反応様式は、β-receptor typeであると思われる。

(d) その他の知見　脱分極剤であるベラトリジンの cyclic AMP 転換率に及ぼす影響も、カテコラミン同様強力であり、殊に 0.5mM のノルエピネフリンに、0.05mM のベラトリジンを併用した場合、その転換率は 72.6 % にも及ぶ(表IV)。この転換率は、著者らが各種動物、各種薬剤を用いて、これまでに得た最高の値であり、取り込まれたアデニンのほとんど全てが、cyclic AMP に転換し得ることを示している。　この取り込まれたアデニンから生じたアデニンヌクレオチド、プールの細胞内局在を知ることは、adenyl cyclase の局在を知る手がかりとなるであろう。autoradiographic technique により、この問題を追求しつつある。

〔図 III〕



Effect of catecholamines on the formation of cyclic AMP in human cerebral slices, and its antagonism by α-, β-adrenergic blockers.

Doses of agonists were 0.5mM and incubation time was 6min throughout this experiment.

〔表 IV〕

Effect of biogenic amines and veratridine on the formation of cyclic AMP in slices of human cerebral cortex

Addition	Concentration (mM)	Incubation (min)	Cyclic AMP formation (%) Case NO.* I	II	III	IV	V
None		0	3.2	-	-	3.6	
		5	-	1.8	-	-	1.4
		10	-	-	-	-	1.9
		12	2.0	-	-	1.6	-
NE	1.0	6	-	-	-	-	38.4
	0.5	2	- -	-	-	21.4	-
	0.5	6	39.3	34.5	37.2	40.8	38.7
	0.5	10	-	-	-	33.3	-
	0.05	6	-	-	30.4	-	28.1
Serotonine	1.0	6	4.1	-	-	-	-
	0.1	3	-	2.0	-	-	-
Histamine	1.0	5	-	-	4.2	-	-
	1.0	10	8.8	6.0			
	0.1	10	-	-	3.2	-	-
Veratridine	0.05	8	-	-	41.0	-	-
	0.05	10	46.4	-	-	-	-
NE plus Veratridine	0.5 0.05	10	-	-	72.6	-	-

Cortical slices labeled by prior incubation with [^{14}C]-adenine was incubated with various amines for a certain period of time and the radioactivity of [^{14}C]-cyclic AMP in the slices was measured. The results were expressed as the percentage of [^{14}C]-cyclic AMP in the total ^{14}C present in the slices.

*Details of cases, from which brain specimens were taken, were described elsewhere .

1) Abdula,Y.H.& Hamada,K., Lancet, 1 378 (1970)
2) Breckenridge,B.M., Proc.Nat. Acad.Sci. 52 1580 (1964)
3) Brooker,G.,Thomas,L.J.,& Appleman, M.M., Biochem. 7 4177 (1968)
4) Buther,R.W.& Sutherland,E.W., J.Biol.Chem., 237 1244 (1962)
5) Chasin,M., Rivkin,I,, Mamrak,F., Samaniego,S.,& Hess,S.M., J.Biol.Chem., 246 3037 (1971)
6) Ebadi,M.S., Weis,B.,& E.Costa, J.Neurochem., 18 183 (1971)
7) Goldberg,N.H., Larner,J., Sasko,H, & Otoole,A.G., Analyt.Biochem., 28 523 (1969)
8) Kakiuchi,S.& Rall.T.W., Mol. Pharmacol., 4 367 (1968)
9) Kakiuchi,S., Rall,T.W.,& McIlwain, H., J,Neurochem., 16 485 (1969)
10) Kodama,T., Matsukado,Y., Suzuki,T. Tanaka,S.,& Shimizu,H., Biochim. Biophys.Acta, in the press
11) Krishna,G., Weiss,B.,& Brodie,B.B. J.Pharmacol.Exptl.Therap., 163 379 (1968)
12) Sattin,A.,& Rall,T.W., Mol.Pharmacol., 6 13 (1970)
13) Shimizu,H., Daly,J.W.,& Creveling, C.R., J.Neurochem., 16 1609 (1969)
14) Shimizu,H.& Daly,J.W., Biochim. Biophys.Acta, 222, 465 (1970)
15) Shimizu,H., Creveling,C.R.,& Daly, J.W., Mol.Pharmacol., 6 184 (1970)
16) Shimizu,H., Tanaka,S, Suzuki,T., & Matsukado,Y., J.Neurochem., 18 1152 (1971)
17) Steiner,A.L., Kipnis,D.M., Utiger, R.,& Parker,C., Pro.Nat.Acad.Sci., 64 367 (1969)
18) Sutherland,E.w., Rall.T.W.;& Menon, T., J.Biol.Chem., 237 1200 (1962)

本実験の一部は 16) に発表した。

3. アルコールの長期間連続投与時に於ける脳内 adenyl cyclase 及び cyclic nucleotide phosphodiesterase 活性の変化に就いて

栗山欣弥・Israel, M. A.（京府医大・薬理；N.Y. State Univ, Dawnstate Med. Center）

〔要約〕

Swiss albino マウス(♀)に液体飼料にエタノールを加え連続経口投与した場合の脳内 adenyl cyclase 及び cyclic 3,5'- nucleotide phosphodiesterase 活性の変化と、Adenyl cyclase のノルエピネフリン及びヒスタミン添加により惹起される活性増加に対するエタノール連続投与の影響を観察した。

エタノールの連続経口投与（1-3週間）は大脳皮質 homogenate の adenyl cyclase 活性及び ^{14}C-adenine で pulse labelling を行った組織切片に於ける cyclic ^{14}C-AMP 産生の両実験に於て著明な増加を示した。一方 cyclic 3,5'-nucleotide phosphodiesterase 活性には有意差のある変化が認められなかった。

0.1mM 濃度のノルエピネフリン及びヒスタミンを対照群より得た大脳皮質切片では著明な cyclic AMP 生成の増加を招来に対し、エタノール連続投与群ではこれ等生体アミンの添加による影響が著明に減退する事が認められた。大脳皮質 homogenate の adenyl cyclase 活性も同様な傾向を示し、エタノール投与群では Ca^{++} の添加による活性増加のサが認められた。

これ等の成績はエタノールの連続投与が脳内 cyclic AMP の代謝を変化させると共に adenyl cyclase の生体アミンに対する感受性の変化を介して、中枢神経系統の変容を招来する可能性を示しているものと考えられる。

Adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP)は多数のアミンやホルモン作用時に於ける細胞内媒介物質と考えられている。演者等及び他研究者の既報(3,7,8)に依ればアルコールの連続投与は諸種ホルモン分泌亢進を変動を招来する事が明かなので、この様な条件下で脳内cyclic AMP の代謝自体がどの様な変化を示すかを観察した。今回はアルコールの経口連続投与の大脳皮質内 adenyl cyclase 及び cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (phosphodiesterase) 活性に対する影響及び adenyl cyclase のノルエピネフリン及びヒスタミンに対する感受性に対する影響に就て報告する。

実験方法；Swiss albino マウス(♀)(体重 25-28g)にエタノールと Freund (4) が発表した方法で連続経口投与した。この液体飼料は 6l/day の市販 Metrecal, 6% (W/V) のエタノール又は等カロリーの蔗糖及び蒸溜水で作成した。液体飼料の各日摂取量とエタノール投与群に於て測定し、同量の等カロリーの蔗糖と含む液体飼料を対照群に投与した。エタノールの平均摂取量は 26-33 mg/g 体重/日で、実験使用時の血清エタノールの含有量は 2.9-3.1 mg/ml であった。大脳皮質の adenyl cyclase 活性は 0.32 M 蔗糖溶液中で homogenize した後 Krishna 等(6)の記載に従い ^{3}H-ATP より産生された cyclic ^{3}H-AMP と分離する事に依り測定した。カラムクロマトグラフィーによる回収率の変動は既知量の cyclic ^{3}H-AMP を用いる事により補正した。反応液は Tris-Hcl (pH 7.3): 40 mM, $MgSO_4$: 3.3 mM, theophylline : 10 mM, tris ATP: 2 mM (0.125 mM ^{3}H-ATP(S.A. 7.93 C/mM)と含む）及び 1-2 mg(protein) の homogenate より構成した。大脳皮質切片に於ける cyclic AMP 産生は Shimizu 等 (12) の方法を modify する事に依り測定した。(8-^{14}C) adenine を用い adenosine-5'-triphosphate と pulse-labelling した後、この切片と実験薬物を含有する容器内で incubate した。反応の停止は 10μmole の cyclic AMP 添加

と同時に3分間煮沸後 homogenize する方法に従った。この homogenate を流元中で乾燥状態に近くした後、残渣を蒸溜水中に suspend し、遠心した。全放射能を液体シンチレーション法で測定した後、cyclic ^{14}C-AMP (上清液中) と Krishna 等(6)の方法で他の labelled nucleotides より分離した。実験結果は組織内全 ^{14}C-adenine に対する cyclic ^{14}C-AMP への転化率及び p mole cyclic AMP/g 湿重量/分で表わした。phosphodiesterase 活性は Butcher and Sutherland (2)法を modify した Weiss(14) の記載に従い測定した。遊離無機燐酸は Martin and Doty (10)の原法を modify した Swanson 等(13)の方法で測定した。蛋白質含有量は Lowry 等の方法(9)で、そして血清エタノール含有量は perchloric acid で除蛋白した上清液について酵素法(1)で測定した。

実験結果及び考察:

Table 1 Effect of chronic ethanol administration on cyclic AMP formation in mouse cerebral cortex

	Slice		Homogenate
	% Conversion	Cyclic ^{14}C-AMP Formed (p mole/g w.w./min.)	Adenyl Cyclase Activity (p mole/mg protein/min.)
Control	0.35 ± 0.08	412 ± 13	176 ± 20
EtOH-treated	0.60 ± 0.02(+71)*	835 ±124(+102)*	253 ± 22(+44)*

Both control and EtOH-treated animals were fed by liquid diets for 2 weeks. Incubation; Homogenate 30°C, 7 min.; Slice 37°C, 4 min. Results in this table indicate mean ± S.D. obtained from 4 separate experiments and numbers in parenthesis indicate percent changes compared with respective controls. * $p < 0.01$

エタノール の連続経口投与(2週間)は著明に大脳皮質内 Adenyl cyclase 活性の増加を示した (Table 1)。更に ^{14}C-adenine で pulse labelling を行った大脳皮質切片でも同様に著明な cyclic ^{14}C-AMP 産生の増加が認められた。同様な cyclic AMP 生成の増加は1及び3週間のエタノール投与後にも認められた。これに対し大脳皮質の phosphodiesterase 活性にはエタノール投与により有意差のある変化はまったく見られなかった (Table 2)。

Table 2 Effect of chronic ethanol administration on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity of mouse brain

Duration of Feeding	Phosphodiesterase activity# (mμmole/mg protein/min.)	
	Control	EtOH-treated
1 Week	57.6 ± 2.9	59.2 ± 4.0 (+2.8)
2 Weeks	59.7 ± 10.7	56.6 ± 6.5 (-5.2)

Incubation; 37°C, 6 min. # Mean ± S.D. obtained from 5 separate experiments. Numbers in parenthesis indicate percent changes compared with respective controls.

神経組織内の cyclic AMP 産生は in vitro に於ける幾種のアミンの添加により著明に増強される事が知られている (11,12)。マウスの大脳皮質切片及び homogenate を用いた本実験に於ても 0.1 mM 濃度のノルエピネフリン及びヒスタミンは著明に cyclic AMP の産生を増強する事が認められた (Table 3)。しかしながらエタノール投与群より得た homogenate では両アミンを添加しても活性の増加が認められなかった。F^- (10 mM) の添加に対する homogenate の adenyl cyclase 活性の反応はエタノール投与群でも認められた

Table 3 Effect of various drugs on cyclic AMP formation in cerebral cortex from control and ethanol-treated mice

Drugs	Slice (% Conversion)		Homogenate (p mole/mg protein/min.)	
	Control	EtOH-treated	Control	EtOH-treated
None	0.35±0.08	0.60±0.02	176±20	253±22
dl-Norepinephrine : 0.1 mM	0.68±0.04(+94)*	0.77±0.23(+28)	289±24(+64)*	260±42(+ 3)
Histamine: 0.1 mM	0.56±0.05(+60)*	0.78±0.07(+30)*	230±36(+31)**	242±40(- 5)
Fluoride: 10 mM	-	-	387±68(+120)*	405±59(+60)*

Mean ± S.D. obtained from 4 separate experiments is shown. For experimental conditions see Table 1. **p<0.05, * p<0.01 compared with value for same preparation without drug addition.

その刺戟効果は1/2に減少した。同様なエタノール投与に依る cyclic AMP生成の生体アミンに対する感受性の低下は大脳皮質切片を用いての実験でも見のがされた(Table 3)。

これ等の実験結果はエタノールの連続投与が脳内 cyclic AMP の代謝を変化させると共に adenyl cyclase の生体アミンに対する感受性の変化を介して中枢神経作用の変容と招来する可能性を示しているものと考えられる。脳内ノルエピネフリンおよびセロトニンの濃度はエタノールの連続投与により有意のある変化を示さないもの(5, 8)が知られているが、一方セロトニンの turnover rate の増加 (8) が知られて居り、本実験で観察されたエタノールの連続投与に依る adenyl cyclase 活性の生体アミンに対する感受性の低下はこれ等の観点からも興味ある事実と考えられる。

参考文献

1. Bonnischen, R., in Method of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer ed.: transl. by D.H. Willamson), p 285, Academic Press, New York (1963)
2. Butcher, R.W., and Sutherland, E.W., J. biol. Chem., 237, 1244 (1962)
3. Ellis, F.W., J. Pharmacol. exp. Therap., 153, 121 (1966)
4. Freund, G., Arch. Neurol., 21, 315 (1969)
5. Häggendal, J., and Lindqvist, M., Acta Pharmacol.Toxicol., 18, 278 (1961)
6. Krishna, G., Weiss, B., and Brodie, B.B., J. Pharmacol. exp. Therap., 163, 379 (1968)
7. Kuriyama,K., Sze, P.Y., and Rauscher, G.E., Life Sci. Pt II, 10, 181 (1971)
8. Kuriyama, K., Rauscher, G.E., and Sze, P.Y., Brain Res., 26, 450 (1971)
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. biol. Chem., 193 265 (1951)
10. Martin, J.B., and Doty, D.M., Analyt. Chem., 21, 965 (1949)
11. Robinson, G., Butcher, R.W., and Sutherland, E.W., Ann. Rev. Biochem., 37, 149 (1968)
12. Shimizu, H., Daly, J. W., and Creveling, C.R., J. Neurochem., 16, 1609 (1969)
13. Swanson, P.D., Bradford, H.F., and McIlwain, H., Biochem. J., 92, 235 (1964)
14. Weiss, B., J. Neurochem., 18, 469 (1971)

4. 脳の cyclic 3′, 5′－nucleotide phosphodiesterase,
V. "Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent" phosphodiesterase について

山崎礼子・垣内史朗・手島佳子（大阪府立中宮病院）

〔要約〕

われわれは、ラット脳より得た 100,000 × g 遠心沈殿上清中の 3′,5′- nucleotide phosphodiesterase の活性が Ca^{2+} 及び Mg^{2+} の両者に依存していることを見い出し、これを "Ca^{2+} plus Mg^{2+} - dependent" phosphodiesterase と名づけた。セファローズ 6B カラムクロマトグラフィーによって、脳の上清区分より、2つの酵素活性（Frs. I & II）を分離した。Fr. I は cyclic AMP, cyclic GMP を水解し、cyclic UMP を殆んど分解せず、Ca^{2+} の影響を受けない。Fr. II の活性は Ca^{2+} によって賦活されて、cyclic AMP, cyclic GMP, cyclic UMP を水解してその 5′- 化合物にする。"Ca^{2+} plus Mg^{2+} - dependent" phosphodiesterase は Fr. II に当る。

上記カラムクロマトグラフィーによって、一つの活性化因子（PAF; phosphodiesterase activating factor）が Fr. III として分離された。Fr. II と Fr. III よりなる再構成系は、Fr. II 単独活性に比較して；(1) Ca^{2+} に対する感受性が高く、その Ca^{2+} dose-activity カーブが 0.5 pCa 単位以上左方に shift される結果、2×10^{-6} M Ca^{2+} にて略 maximum に近い酵素活性が得られる。（この値は筋収縮の trigger となる Ca^{2+} 濃度と略一致するのは興味深い）。(2) Ca^{2+} response 全体としての amplitude（Ca^{2+} 高濃度時酵素活性 / Ca^{2+} 低濃度時活性）が大きくなる。尚、Fr. I の活性は Fr. III（PAF）の添加によって影響を受けない。

---

cyclic AMP は ATP より合成され（adenyl cyclase），5′-AMP に水解される（phosphodiesterase）。他組織に比して脳と両酵素の活性が強く，前者≪後者である。脳組織中の cyclic AMP 濃度は、種々の刺激によって速やかに変動し、その酵素的機作として adenyl cyclase による調節がよく研究された。[1] われわれは，分解系にもまた調節機転の存在する可能性を追究して、脳 phosphodiesterase 活性が低濃度の Ca^{2+} によって賦活されること、並びにこの機作に脳より得た非透析因子（PAF; phosphodiesterase activating factor）が関与していることを発見して昨年のこの学会で報告した。その後われわれは、上記が生理的な機構であるかどうかに特に留意して，その酵素的性格について実験的検討を加えた。以下にこの酵素（Ca^{2+} plus Mg^{2+}- dependent phosphodiesterase）の性質について得た知見を報告する。研究の一部は文献[2-4]既報。

《実験方法》 酵素活性測定；オ1法は生成物を Pi に転化して測定し，オ2法では {^{3}H} cyclic AMP を用いて，反応終了後に基質並びに生成物を分離して定量した。両方法の結果は互に良く一致した（表1）。反応液（1 ml）は 80 μmoles imidazole 緩衝液，PH 6.9，3 μmoles $MgCl_2$，1.8 μmoles cyclic AMP を含む。酵素液；ラット脳より得た 100,000 × g 遠心沈殿上清（GEDTA，0.05 mM 添加）を透析（10 mM Tris-HCl，PH 7.5 ＋ 1 mM $MgCl_2$）して用いた。酵素標品はすべて -80° に急速凍結して保存した。

《結果並びに考察》 〔A〕 酵素活性が Ca^{2+} と Mg^{2+} の両者に依存していること。① 0.1 mM GEDTA の添加によって活性は½に減少した（図1）。この阻害には Mg^{2+} は無関係であって（過剰に添加してある），代って，反応液中に存在するある微量金属イオンに酵素活性が依存しており，それを微量の GEDTA が奪ったためと解さ

表1. 反応の stoichiometry

Ca^{2+}濃度	定量法	反応時間 15分	30分	60分	120分
1.9×10^{-7} M	I (生成物)	109	203	363	621
	II {生成物	91	197	320	563
	II {△基質	70	167	361	601
6.2×10^{-6} M	I (生成物)	320	580	946	1026
	II {生成物	322	577	869	963
	II {△基質	324	557	930	1016

表2. 各種2価 cation の添加効果

活性	単独添加 0.1 mM	単独添加 1.0 mM	cation (0.12 mM) $Mg^{++}Cl_2$ (3 mM)
	μmoles Pi/30 min/mg protein		
$MgCl_2$	0.53	0.77	—
$CaCl_2$	0.06	0.06	3.1
$SrCl_2$	0.04	0.04	2.5
$BaCl_2$	—	0.08	1.0
$ZnCl_2$	0.34	0.66	0.60
$FeSO_4$	0.77	0.02	0.45
$CoCl_2$	0.53	1.8	2.3
$NiCl_2$	0.09	0.15	1.5
$MnCl_2$	2.0	1.5	1.8
$CuSO_4$	0.01	0.01	—
None	0.02		0.95

表3. Fr.I 及び Fr.II の酵素的性質

assay の条件	活性 blank	120分後	240分後
Fr. I			
cyclic AMP {with GEDTA	18	20	15
cyclic AMP {with Ca^{2+}	20	18	15
cyclic GMP {with GEDTA	19	20	17
cyclic GMP {with Ca^{2+}	21	19	16
cyclic UMP {with GEDTA	1.1	0.9	1.1
cyclic UMP {with Ca^{2+}	1.1	1.3	1.3
activity ratio (with Ca^{2+})			
cyclic GMP / cyclic AMP	1.1	1.1	1.1
cyclic UMP / cyclic AMP	<0.1	<0.1	<0.1
Fr. II			
cyclic AMP {with GEDTA	51	31	21
cyclic AMP {with Ca^{2+}	103	60	38
cyclic GMP {with GEDTA	43	18	12
cyclic GMP {with Ca^{2+}	59	28	18
cyclic UMP {with GEDTA	18	8.8	9.6
cyclic UMP {with Ca^{2+}	47	27	23
activity ratio (with Ca^{2+})			
cyclic GMP / cyclic AMP	0.6	0.5	0.5
cyclic UMP / cyclic AMP	0.5	0.5	0.6

(註) 終末濃度は、1.0 mM (GEDTA) 又は 0.04 mM (Ca^{2+})

れる。最も可能性の強い金属イオンとして Ca^{2+} 又は Mn^{2+} が考えられる。次に EDTA 添加にては、3～10 mM にて活性は零になるのに反して、GEDTA ではその濃度を増しても、阻害率は最初の 70 % から変らない（図1）。このことは、実験条件下で EDTA と結合し、GEDTA とは結合しない金属イオンもまた酵素活性に関与していることを示す。結合常数からみて、この条件に適合するのは Mg^{2+} である。以上酵素活性には少くも2種の金属イオン、1つは Mg^{2+} 他は多分 Ca^{2+} (or Mn^{2+})、が必要であることが示唆された。② Ca^{2+} は、Mg^{2+} 存在下においては、各種イオン中で最も良く酵素活性を賦活し（表2）、また 10^{-6} M オーダーの低濃度において有効であった（図3）。但し Mg^{2+} と共存させずに、Ca^{2+} のみを単独に添加した場合には無効である（表2）。Mn^{2+} は単独に添加して有効である（表2）。しかし、その至適濃度は 10^{-4} M のオーダーにあり、また 10^{-5} M 以下においては、その効果が認められない（図2）。かく Ca^{2+} は Mn^{2+} よりも低濃度において有効であるにもかゝわらず、その GEDTA に対する結合常数は Mn^{2+} よりも小さい（$\log K = 11.0$ for Ca GEDTA ; 12.3 for Mn GEDTA）。即ち、latent の Mn^{2+} に酵素活性が関与しており、Ca^{2+} は GEDTA と結合してこの latent Mn^{2+} を unmasking することによって見かけ上酵素を賦活している可能性は否定される。10^{-6} M オーダーの Ca^{2+} によって unmasking されうる Mn^{2+} の量は高々 10^{-7} M のオーダーに過ぎぬからである。他の金属、Fe, Co, Ni, Zn 等に対しても、同様な理由によって Ca^{2+} は優位にある。③脳組織中の総マンガン濃度は、0.023 μmoles/g と報告されており[5]この意味でも Mn^{2+} のこの酵素反応への関与は疑問視される。一方、脳中カルシウム量は、2.2 μmoles/g であるが[5]、その殆んどは結合型であってカルシウムイオンと

してはおそらく 1×10^{-5} M 以下にしか存在しないものと考えられている[6]。Mg については略 5 μmoles/g である[5]。即ち Ca^{2+} 及び Mg^{2+} に関しては，正にその必要な濃度が生理的に存在しうるものと考えられる。以上①②③より，われわれはこの酵素を "Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependant" phosphodiesterase と名づけた。

〔B〕2つの異った酵素活性が脳の上清区分にみられること。Sapharose 6B カラムクロマトグラフィーによって，脳上清から2つの活性区分（I, II）を分離した（図4）。Fr. I は cyclic AMP, cyclic GMP を水解し，cyclic UMP を殆んど分解せず，また Ca^{2+} の影響をうけない。Fr. II の活性は，Ca^{2+} によって賦活されて，cyclic AMP, cyclic GMP, cyclic UMP をその 5′- 化合物に水解する。Fr. II は不安定であって，30°，120分間にその活性の略半分を失うのに反して，Fr. I はその間殆んど一定の活性値を保つ（表3）。"Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent" phosphodiesterase は Fr. II に相当する。

〔C〕酵素の Ca^{2+} に対する感受性に PAF (phosphodiesterase activating factor) が関与していること。この酵素（Fr. II）の失活現象は，2つの異った機構によっておきる。一つは非可逆的な変化であって，4°に保存中に，30°に反応中に，更に −80°に freeze-thaw する際に生ずる。活性のみならず Ca^{2+} に対する感受性もそこなわれる。他の一つは，非透析性活性化因子（PAF）の欠乏によるものであって，これは両因子を添加することによって回復する。図6は酵素活性（活性/mg蛋白）が酵素液添加量（従ってその中に含まれている両因性 PAF 量）に依存して変化することを示す。図中各直線を0分に外挿して得た値は初速度を示し，また直線の勾配は活性の "非可逆的" タイプの失活率を示す。即ち，PAF の作用は，反応の初速度に関係しているのであって，後者にではないことが示されている。

PAF は Sapharose 6B カラムによって，Fr. III 中に溶出されて，酵素活性から分離された（図4）。Fr. II と III による再構成実験（図5）の結果は：① PAF の作用は酵素の Ca^{2+} に対する感受性を高める。Frs. II + III の系では，その dose-activity curve が pCa 0.5 unit 左方に shift されて，2×10^{-6} M Ca^{2+} が略 submaximum に近い活性値を与えた。この値は筋収縮の Trigger

図1. GEDTA, EDTA の添加効果

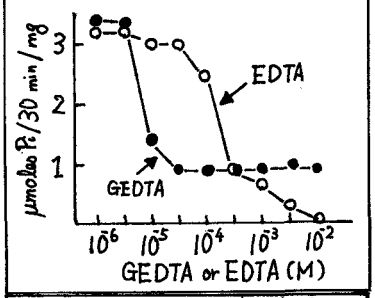


図2. Mg^{2+}, Mn^{2+} の添加効果

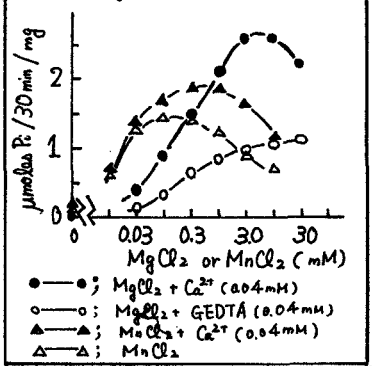


図3. Ca^{2+} の添加効果

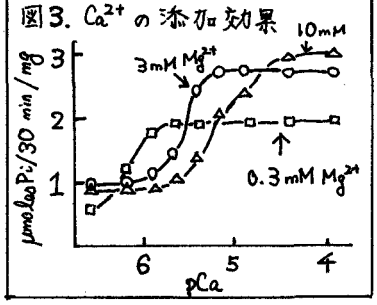


図4. 上清のカラムクロマトグラフィー

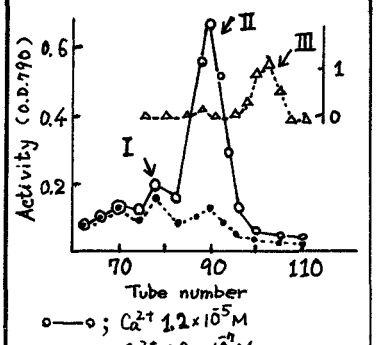


図5. Fr.Ⅲの作用

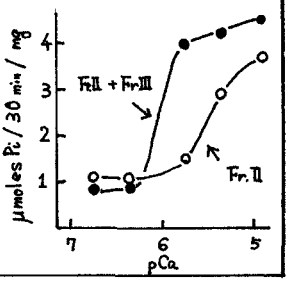


図6. 酵素標品添加量と酵素活性(mg蛋白当りの活性)との関係

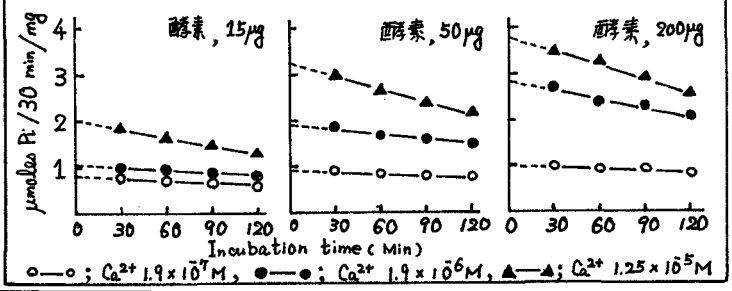
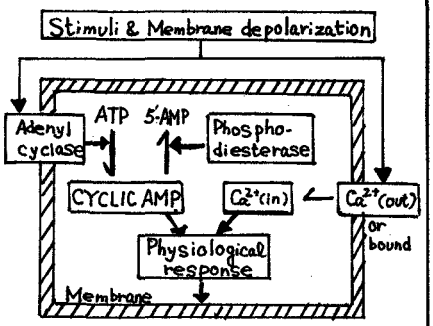


図7. 生理的意義についての考察



となる Ca^{2+} 濃度と略一致する。②PAFは低濃度 Ca^{2+} ($< 6\times10^{-7}$ M) 下の酵素活性を抑制し，高濃度 Ca^{2+} ($> 6\times10^{-6}$ M) 下の活性最大値を更に高めるように作用する結果，Ca^{2+} response の amplitude を増大せしめる。③PAFは Fr. Ⅰには作用しない。図6において，Fr. Ⅱの最高活性(●—●)は内因性PAFによって増大している。Fr. Ⅰのそれ(○—○)は内因性PAFの影響をうけない。内因性PAFの影響の最も著しいのは 1.9×10^{-6} M Ca^{2+} 存在下の活性においてであって，上記両構成系の実験結果(図5)と良く一致する。Cheung[7]もまた脳より得た非透析性の活性化因子について報告しているが，その報告は "Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent" phosphodiesterase の問題を扱っておらず，Ca^{2+} と活性化因子との関係が調べられていない。即ち現時点においては両因子間の identification をなし得ない。

〔D〕この機構の生理的意義に関して。Ca^{2+} による脳phosphodiesterase活性調節の生理的意義に関する直接的な実験結果は，未だ得られていないが，一つの可能性を次に示す。神経組織に加えられた刺激が，adenyl cyclase の賦活を通じて細胞内cyclic AMP を増加し[1,8]他方 Ca^{2+} influx をも促進する[6]。Ca^{2+} の細胞内濃度が高まるにつれてそれが脳phosphodiesterase活性を stimulate し，それによって cyclic AMP の過剰な蓄積が抑制される。即ち，cyclic AMP と Ca^{2+} の両者を含む系において，図7に示した如き，negative feed back loop が存在する可能性を指摘したい。

〔文献〕
1) Kakiuchi, S., and Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4, 367 (1968); ibd. 379 (1968).
2) Kakiuchi, S., and Yamazaki, R., Proc. Japan Acad., 46, 387 (1970); BBRC, 41, 1104 (1970).
3) Kakiuchi, S., Yamazaki, R., and Nakajima, H., Proc. Japan Acad., 41, 587 (1970).
4) Kakiuchi, S., Yamazaki, R., and Teshima, Y., BBRC, 42, 968 (1971).
5) Tower, D.B., in Handbook of Neurochem., vol 1., ed by Lajtha, Plenum Press, New York.
6) Hodgkin, A.L., and Keynes, R.D., J. Physiol., 138, 253 (1957).
7) Cheung, W.Y., BBRC, 38, 533 (1970); J. Biol. Chim., 246, 2859 (1971).
8) Shimizu, H., Creveling, C.R., and Daly, J., PNAS, 65, 1033 (1970); Mol. Pharmacol., 6, 184 (1970).

5. 3′, 5′－cyclic AMP依存性蛋白質燐酸化酵素の多様性および再構成

公文　明・西山　馨・山村博平
（神大・医・2生化）

〔要約〕

脳を含め多くの組織では、一種類の蛋白質燐酸化酵素が多数の不活性型として存在し、少なくとも四種類の不活性型が分離される。これらは共通の蛋白質燐酸化酵素とそれぞれ相異る3',5'-cyclic AMP (cyclic AMP) －結合蛋白質（R－蛋白質）との複合体である。cyclic AMPは各複合体のR－蛋白質にアロステリックに結合して蛋白質燐酸化酵素を遊離させ、その酵素活性を発現させる。これまでに解析を加えた三種類の複合体の分子量は、1.8×10^5, 1.2×10^5 および 7.5×10^4 であり、それぞれが1個の蛋白質燐酸化酵素（分子量、3×10^4）と1個のR－蛋白質（分子量、1.5×10^5, 9×10^4 又は 5×10^4）とから構成されている。これら三種類の不活性型は、別に精製したR－蛋白質と蛋白質燐酸化酵素から完全に再構成し得る。従つて不活性型の多様性は、R－蛋白質の多様性に基いている。これらのR－蛋白質はagingにより全て更に小さい且つ同一のcyclic AMP－結合蛋白質（分子量、4×10^4）に崩壊する。この蛋白質は最早や不活性型複合体を形成し得ない。従つてR－蛋白質がその機能を示すには、更に低分子因子の関与を示唆する。他方、四種類の不活性型はcyclic AMPに対するKaが相互に異る。このことは本蛋白質燐酸化酵素がcyclic AMPの幅広い濃度変化に対応して賦活されることを意味し、その多様性のもつ生体内意義を示唆する。

Cyclic AMP－依存性蛋白質燐酸化酵素は、蛋白質燐酸化酵素とある種のcyclic AMP－結合蛋白質（R－蛋白質）との複合体である。通常その活性はR－蛋白質により抑制された不活性型として存在する。cyclic AMPは、複合体のR－蛋白質へアロステリックに結合することにより蛋白質燐酸化酵素を遊離させ、本来の酵素活性を発現させる。昨年の本学会では、この様な蛋白質燐酸化酵素のcyclic AMPによる賦活化機構について報告したが、その後各組織の蛋白質燐酸化酵素について同様な機構の存在が報告されつつある（1-6）。更に蛋白質燐酸化酵素系には多数の不活性型が存在するが、このことについても既に指摘したところである(7)。今回はこれら不活性型の多様性の解析結果並びに再構成に就いて報告する。

実　験　方　法

蛋白質燐酸化反応の活性測定は、山村らの方法(7)に従つた。cyclic AMP－結合蛋白質の活性測定は、第一表の条件で行つた。蛋白質燐酸化酵素及びその不活性型酵素標品とR－蛋白質標品は、既報(2)に準じて調整した。即ち、組織(20 g)の可溶性画分を硫安および Calcium phosphate gel 処理ののち、NaCl (0-0.5 M) によるDEAE-cellulose column chromatography を行つ

Table 1. Assay System for Cyclic AMP-Binding Protein

Acetate buffer, pH 4.5	40 μmoles
$MgCl_2$	10 μmoles
^{3}H-cyclic AMP (1.2 Ci/m mole)	0.4 mμmoles
Theophylline	3 μmole
Enzyme	200 μl

0.4 ml : 4°, 15 min

The reaction was terminated by the addition of 5 ml of ice-cold 10 mM Tris-Cl buffer, pH 8.0 containing 40 mM $MgCl_2$. ^{3}H-cyclic AMP bound to protein was trapped on a Millipore filter and washed four times each time with 5 ml of the same buffer. The radioactivity remained on a filter was counted in a Bray's Solution with a Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer.

た。0-0.25 M NaCl で溶出される分画には、蛋白質燐酸化酵素(Enzyme II)およびその不活性型(Enzyme I) が混在した。0.3-0.4 M NaClで溶出される分画には、R－蛋白質および不活性型酵素(Enzyme III) が混在した。さらに hydroxylapatite column chromatography により Enzyme I, II, III および R－蛋白質が分離精製された。ちなみに、Enzyme II は蛋白質燐酸化酵素そのものでありEnzyme I および III はともに不活性型(又はその混合)である。

結　果　及　び　考　察

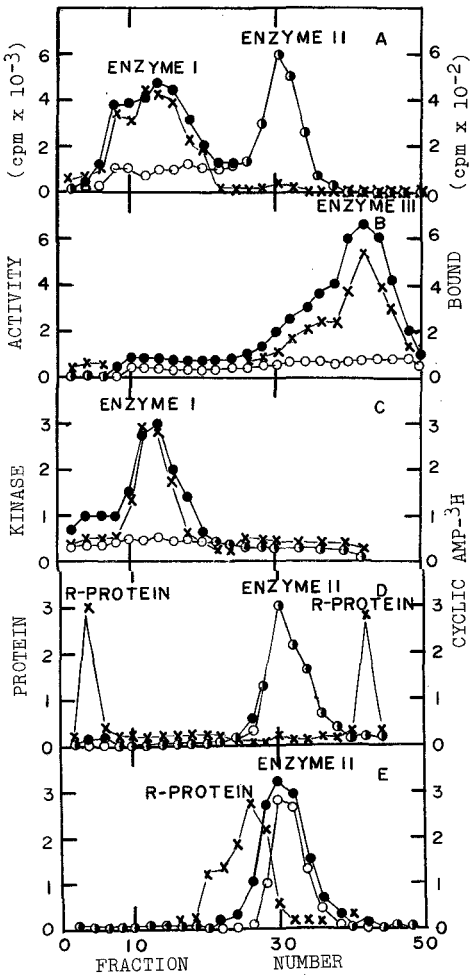
(1) Enzyme I, II および III によるヒストンの燐酸化部位

Enzyme II、および cyclic AMPにより賦活される Enzyme Iと III とを用い、ATP-γ-^{32}P 存在下にヒストンf_{2b} を燐酸化した。燐酸化ヒストンをトリプシンで消化し、その消化物の高圧沪紙電気泳動による展開後、radioautography を行つた。その結果、全て同一の放射性ペプタイドパターンを与えた。更に燐酸化ヒストンの酸水解の結果、各酵素が同じ比率でセリンおよびスレオニン残基を燐酸化することが判明した。このことは、Enzyme I および III がEnzyme IIと同一機能を有していることを示す。

(2) Enzyme Iおよび III の相違点

図1には、Enzyme I, II および III の hydroxylapatite columnによるrechromatography の結果を示した。図1－A には対照として Enzyme I および IIの溶出位置を示した。Enzyme III は Enzyme II よりも後に溶出される(図1－B)のに対し、Enzyme I はEnzyme IIよりも前に溶出された(図1－C)。Enzyme II は cyclic AMP による賦活化を受けず、cyclic AMP と結合しない(図1－A)。不活性型の Enzyme I および III は、cyclic AMP により賦活されると共に、cyclic AMP を結合し得る(図 1-A, 1-B, 1-C) 。この様に溶出位置を異にする二つの不活性型酵素を、cyclic AMP (10^{-6} M) の存在下に同様のrechromatography

Fig. 1 Hydroxylapatite column rechromatographies of protein kinases (Enzyme I, II and III) in the presence and absence of cyclic AMP



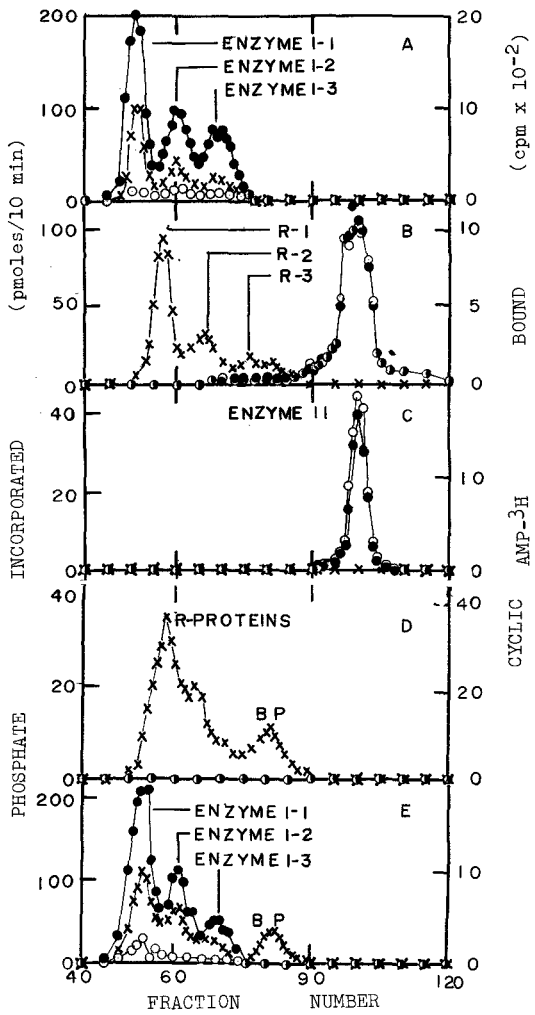
Each enzyme preparation was chromatographed upon a hydroxylapatite column (2 x 5 cm) with potassium phosphate buffer (0.05-0.25 M), pH 7.5. Protein kinase activities were assayed under the standard conditions in the presence (-●-) and absence (-○-) of cyclic AMP. Cyclic AMP binding protein (-✱-) was assayed by the method described in Table I. A. Enzyme I and Enzyme II. B. Enzyme III. C. Enzyme I. D. Enzyme I in the presence of cyclic AMP (10^{-6} M). E. Enzyme III in the presence of cyclic AMP.

を行うと、Enzyme I は Enzyme II および二種類のR－蛋白質に解離し（図1－D）、Enzyme III は Enzyme II および一種類のR－蛋白質に解離した（図1－E）。種々解析の結果 Enzyme Iおよび III から解離した蛋白質燐酸化酵素はともにEnzyme IIそのものであるが、R－蛋白質は相互に異つている。即ち不活性型の両者の差はR－蛋白質に由来することが明らかとなつた。

(3) 不活性型蛋白質燐酸化酵素の再構成

Sephadex G-200 によるゲル沪過の結果 Enzyme I は更に分子量を異にする三種類の不活性型から成ることが明らかとなつた（図2－A）。それぞれの分子量は 1.8×10^5 (Enzyme I-1), 1.2×10^5 (Enzyme I-2) および 7.5×10^4 (Enzyme I－3）と算定され（図3）、いずれもヒストンの同一部位を燐酸化する。すべての不活性型には R－蛋白質活性が存在し（図 2－A）、cyclic AMP により一種類の蛋白質燐酸化酵素と三種類のR－蛋白質（R-1, R-2 および R-3）とに解離した（図2 －B）。解離した蛋白質燐酸化酵素は cyclic AMPによる賦活化を受けずまた対照実験（図2－C）によりEnzyme IIに相当した。一方解離した三種類のR－蛋白質に就ては、その分子量が 1.5×10^5 (R-1), 9×10^4 (R-2) および 5×10^4 (R-3)であり、それぞれは Enzyme II に添加するとその活性を抑制し、この抑制効果は cyclic AMP により再び除去された。この様に Enzyme I の R－蛋白質は多数存在するが、これらの R－蛋白質は別に分離精製された（図2－D）。主分画（分子量 5-15 x 10^4）は Enzyme II に対して抑制効果をもつが、多くのR－蛋白質の混在したものであつた。副分画（BP, 分子量、4×10^4）は cyclic AMP－結合蛋白質ではあるが、Enzyme II に対して抑制効果が無かつた。図2－C および 2－D で用いた Enzyme II およびR－蛋白質とを混合した後ゲル沪過を行つたところ、三種類の不活

Fig. 2 Reversible dissociation of three cyclic AMP-dependent forms (Enzyme I-1, Enzyme I-2 and Enzyme I-3) into a protein kinase (Enzyme II) and three R-proteins.



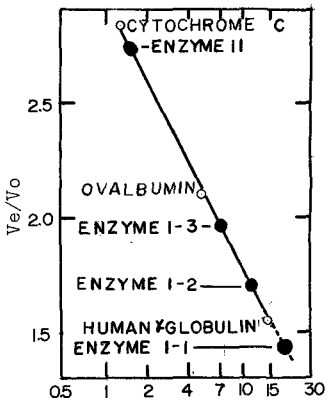
Each preparation was chromatographed on a Sephadex G-200 column (2.5 x 93 cm) together with standard proteins (cytochrome C, ovalbumin and human gamma globulin). A. Enzyme I. B. Enzyme I in the presence of cyclic AMP. C. Enzyme II. D. R-protein. E. Enzyme II and R-protein.

性型が構成された（図 2−E ）。構成された不活性型の分子量および cyclic AMP に対するKa値は、 Enzyme I −1 、Enzyme I −2 、および Enzyme I −3 のそれに一致した。この様に多様な不活性型は、蛋白質燐酸化酵素と R−蛋白質とから完全に再構成し得る。

(4) R−蛋白質の多様性

Enzyme I を4°で aging させたのち、図 2−B と同様に cyclic AMP 存在下にゲル沪過を行つた（図4）。その結果 Enzyme II および一種類の cyclic AMP 結合蛋白質（BP、分子量 4×10^4)が溶出されたが、新鮮な Enzyme Iより解離する三種類の R−蛋白質（図 2−B ）は検出されなかつた。このことは三種類の R−蛋白質が aging により分子量4×10^4の蛋白質に崩壊したことを示すと共に、R−蛋白質として活性のある最小蛋白質（ R−3 、分子量5×10^4）からおそらく小さな蛋白質因子(1×10^4)が除去されることにより、R−蛋白質として不活性な cyclic AMP結合蛋白質（ BP、分子量 4×10^4)を生じることを示唆している。更に詳細な検討によつて、R−蛋白質の多様性の問題も相互に共通するいくつかの因子により説明されるものと思われる。

Fig. 3 Estimation of molecular weights of protein kinases.



MOLECULAR WEIGHT (log M x 10^{-4})
The molecular weights of protein kinases were estimated by the method of Andrews.

(5) 不活性型蛋白質燐酸化酵素の多様性のもつ意義

四種類の不活性型の cyclic AMP による賦活定数は、相互に少しずつ異る。即ち Enzyme I-1 、Enzyme I-2 、Enzyme I-3 および Enzyme III に対するKa値は、それぞれ4.0×10^{-8} M, 2.4×10^{-8} M, 2.3×10^{-8} M および1.0×10^{-8} M であつた（図5 ）。このことは cyclic AMP 濃度が増加するにつれて、Enzyme III 、Enzyme I-3 、Enzyme I-2 および Enzyme I-1 の順に賦活されることを示しており、不活性型の多様性は cyclic cyclic AMPの幅広い濃度変化に対応するには都合の良い機構であると考えられる。

Fig. 4 Effects of aging on R-proteins in protein kinases (Enzyme I-1, Enzyme I-2 and Enzyme I-3).

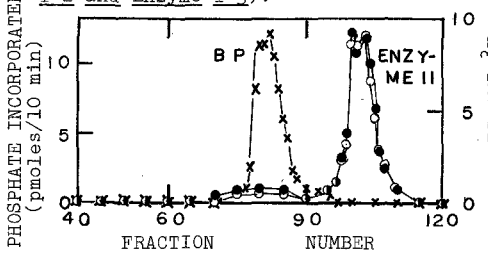
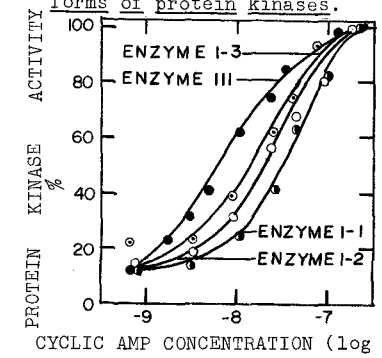


Fig. 5 Effects of varying concentration of cyclic AMP on the catalytic activity of various forms of protein kinases.



CYCLIC AMP CONCENTRATION (log M)

文　献

5. ERLICHMAN, J., HIRSCH, A.H., AND ROSEN, O.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 731 (1971).
1. GILL, G.N., AND GARREN, L.D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 335 (1970).
2. KUMON, A., YAMAMURA, H., AND NISHIZUKA, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 290 (1970).
4. REIMANN, E.M., BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A., AND KREBS, E.G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 187 (1971).
3. TAO, M., SALAS, M.L., AND LIPMANN, F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 652 (1970).
6. YAMAMURA, H., KUMON, A., AND NISHIZUKA, Y., J. Biol. Chem., 246, 1544 (1971).
7. 山村博平, 武田誠郎, 公文明, 中江活子, 西場義美, 神経化学(補遺), 9, 9 (1970).

6. Synaptic membraneでのCaの動き，およびそれに対するcaffeineの影響

斉藤喜八・吉田　博（阪大・医・1薬理）

〔要約〕

(1) Rat 大脳皮質より Whittaker らの方法に準じて Sucrose Gradient で Synaptic Membrane を調製して Ca-Uptake を調べ次のような性質を明らかにした。

(2) この Synaptic Membrane は Mg 存在下で ATP および濃度依存性の Ca-Uptake を示し骨格筋 Sarcoplasmic Reticulum とは異なり，Oxalate によって影響を受けない。この Ca-Uptake は 1～2分でほとんど最高に達し，それ以後は減少する傾向にある。

(3) Ca^{++}-Stimulated ATPase 活性の至適 CaCl₂ 濃度（EGTA 存在下）は 9×10^{-5} M であり，Ca-Uptake の至適 CaCl₂ 濃度（EGTA 存在下）も 9×10^{-5} M である。

(4) 同じ条件下で Brain Microsome はほとんど Ca-Uptake を示さない。また Intra-Synaptosomal Mitochondria は Synaptic Membrane の3倍の Ca-Uptake を示すが，最高に達するのに 5～10分を要し，Oligomycin により阻害される。したがって Synaptic Membrane の Ca-Uptake は Microsome，Mitochondria の Ca-Uptake とは異なるものと思われる。

(5) Synaptic Membrane に Uptake された ^{45}Ca は Caffeine によって Release してくるが Mitochondria の ^{45}Ca は Release してこない。

(6) Synaptic Membrane は Creatine Phosphate (CP)+Creatine Phosphokinase (cpk) により Ca-Uptake を示さないが，37℃，10分間 incubate 後では CP+CPK により Ca-Uptake を示すようになる。

神経細胞は興奮性を有し，この興奮現象は神経細胞膜を通しての Na^+，K^+ の動きによって起る。興奮後は膜内外の Na^+，K^+ の濃度勾配を静止時の状態にもどす必要があり，Na^+-K^+ ATPase が関与している。また Impulse を次の神経細胞へ伝達するためには神経終末から Transmitter の遊離が起らなければならなく，そのためには細胞膜の外側に Ca^{++} が存在が必要である。すなわち膜電位変化に続いて細胞内への Ca^{++} 流入が増加し，Transmitter の遊離が起るものと考えられる。この場合にも回復過程として Ca^{++} の細胞内からの追出し，あるいは細胞内の Ca^{++} を細胞膜にとり込む過程が必要で Na^+-K^+ ATPase の場合と同様に Ca^{++}-ATPase が関与しているのではないかと考えられる。これらのことを考えて今回は Synaptic Membrane での Ca^{++} の動きを調べた。その結果 ATP dependent な Ca-Uptake が認められたのでその性質を調べ，さらに Caffeine の影響を調べたので報告する。

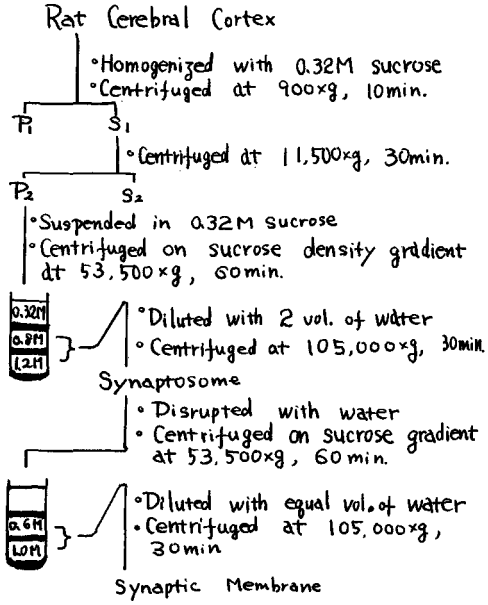
【実験方法】

Synaptic Membrane の調製：体重 200～250g の SD系ラット大脳皮質より Whittaker らの方法[11]を多少 modify して調製した。(Fig 1)

Na^+-K^+ ATPase 活性，Ca^{++}-Stimulated ATPase 活性の測定[6]：40mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)，100 mM NaCl，5mM KCl，2mM MgCl₂，2mM ATP での ATP 分解と 40mM Tris-HCl Buffer，2 mM MgCl₂，2mM ATP，0.1mM Ouabain での ATP 分解の差を Na^+-K^+ ATPase 活性とした。Ca^{++} Stimulated ATPase 活性は 40mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)，100mM KCl，2mM MgCl₂，0.1mM Ouabain，0.1mM EGTA，2mM ATP で Ca 存在下の活性から Ca の存在しない場合の活性を差引いた値とした。

SDH 活性の測定：60mM Phosphate Buffer (pH 7.4)　0.3mM Cytochrome C，Neotetrazolium

Fig1 Preparation of Synaptic Membrane



Chloride 0.5mg, 13mM Na-Succinate で37°C, 30分 incubate して Pellet として除蛋白して 500mμで測定した。

Ca-Uptake: Ca^{++} Stimulated ATPase活性測定と同じ medium で2mlで行い，反応停止は4mlの氷冷した同じ mediumで行い，105,000×g 30分遠心分離後，沈殿の Ca を測定した。

^{45}Ca の Release: Synaptic Membrane に上述の方法で ^{45}Ca を Uptake させてから 105,000×g, pellet としてとり，40mM Tris-HCl Buffer, 100mM KCl, 2mM $MgCl_2$ 中で反応させて遠心分離後沈殿に残っている ^{45}Ca を測定して ^{45}Ca の Release を調べた。

【結果】 Fig1 の方法で調製した Synaptic Membrane の電顕写真は袋状に見える。各分画への SDH 活性，Na^+-K^+ ATPase 活性，Ca^{++} Stimulated ATPase活性の分布を Fig 2 に示すが Na^+-K^+ ATPase 活性，Ca^{++} Stimulated ATPase は Synaptic Membrane に高く分布する。なお Ca^{++} Stimulated ATPase活性と $CaCl_2$ 濃度の関係は Fig 3 に示すように 10^{-4}M EGTA 存在下で

Fig2 Distribution of SDH-, Na^+-K^+ ATPase-, Ca^{++} Stimulated ATPase activity

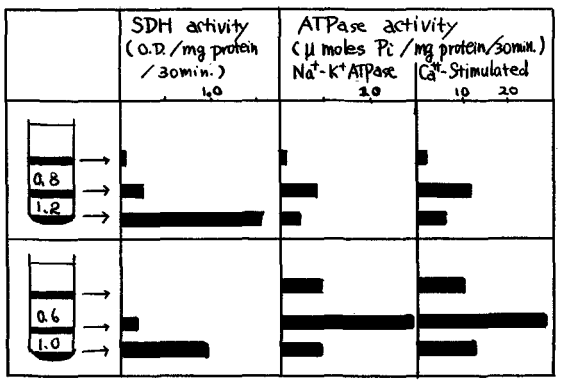
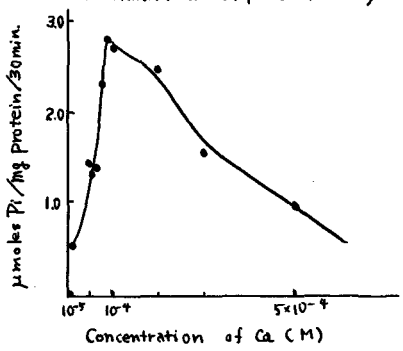


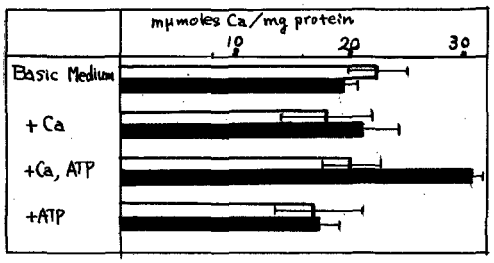
Fig3 Effect of Ca Concentration on Ca Stimulated ATPase Activity



で 9×10^{-5}M $CaCl_2$ の時最高である。

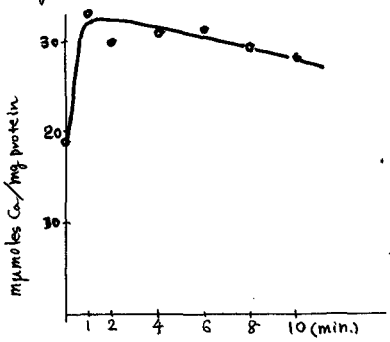
Synaptic Membrane での Ca-Uptake: Synaptic Membrane を用いて Ca^{++} Stimulated ATPase 活性測定と同じ条件で Ca-Uptake を調べた。Fig4 に示すように 0°C では Basic Medium に 9×10^{-5} M $CaCl_2$, あるいは Ca と ATP を添加しても Membrane の Ca の量に変動はないが，37°C では $CaCl_2$ と ATP 添加により約 10mμmoles/mg protein の Ca が増加している。したがって Synaptic membrane には ATP 依存性の，しかも温度依存性の Ca-Uptake が存在する。この Ca-Uptake は骨格筋 Sarcoplasmic Reticulum のように Oxalate による促進がみられない。次にこの Ca uptake の Time Course を調べてみると 1~2 分でほとんど最高に達し，それ以上の結合は

Fig 4 Ca Uptake of Synaptic Membrane



Basic Medium 40mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)
100mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM Ouabain, 0.1mM EGTA
ATP 2mM, CaCl₂ 9×10^{-5} M
□ 0°C ■ 37°C, 1min.

Fig 5. Time Course of Ca-Uptake



みられない。(Fig 5).
同じ条件で microsome 分画の Ca-Uptake を調べたが Time Course は1～2分で最高となるが Fig 6 に示すように

Fig 6 Ca Uptake of Brain Microsome

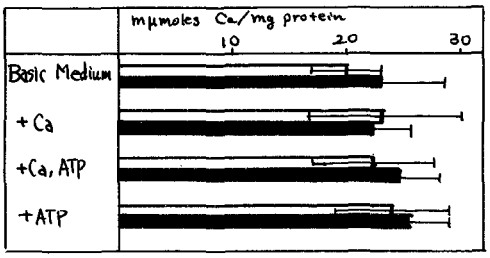


Fig 7 Effect of Ca Concentration on Ca Uptake

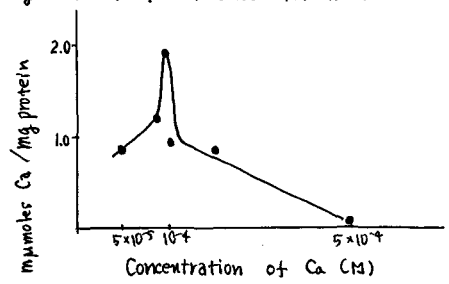
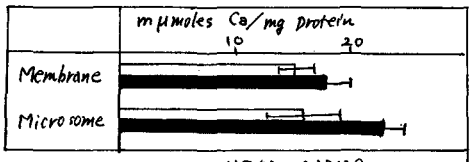


Fig 8. Ca-Uptake of Synaptic Membrane and Microsomes



40mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4), 0.25M Sucrose, 2.5mM MgCl₂, 0.01mM CaCl₂
□ ATP(−) ■ ATP (2mM)

2～3 mμmoles Ca/mg protein の Uptake しか示さない。また Intra synaptosomal / Mitochondria 分画でも Synaptic Membrane の3倍の Ca-Uptake を示すが，最高に達するのに 5～10 分を要する。

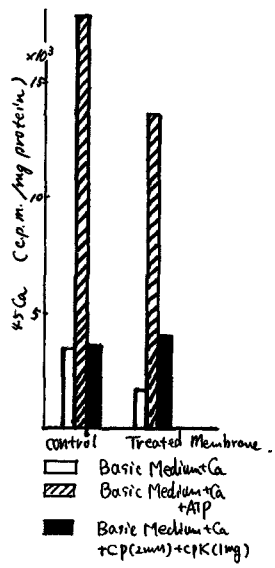
次に Ca^{++} Stimulated ATPase 活性の場合と同様に CaCl₂ 濃度との関連を調べた。ATP 存在下の Ca-Uptake から ATP が存在しない場合の Ca-Uptake を差引いた値を ATP dependent Ca-Uptake として Fig 7 に示したが Ca^{++} Stimulated ATPase 活性と同じく 9×10^{-5} M CaCl₂ (EGTA 存在下) で最高の Uptake を示す。なお Intra synaptosomal / Mitochondria の場合 CaCl₂ 濃度が 10^{-4} M (EGTA 存在下) で最高の Uptake を示し，5×10^{-4} M，あるいは 10^{-3} M CaCl₂ でも最高に近い Ca-Uptake を示す。また Oligomycin (2.5γ/ml) により 85～90 % 阻害される。

本来 Brain Microsome はかなりの Ca-Uptake を示す[2),3)]ので 40mM Tris-HCl-Buffer, 0.25M Sucrose, 2.5mM MgCl₂, 0.01mM CaCl₂ の Mixture[12)] で調べたところ 5～6 mμmoles Ca/mg protein の Ca-Uptake を示した。(Fig 8) 同じ条件で Synaptic Membrane では 2 mμmoles Ca/mg protein の Uptake しか示さない。したがってこれらのことより Synaptic Membrane には Microsome あるいは Mitochondria とは異なった固有の Ca-Uptake 機構が存在することは明らかである。

最近 Carvalho[1)] らは SR に Bound Phosphoryl Group. Acceptor が存在し cp+cpK で Ca-Uptake を示し，physiological に重要ではないかと言っている。我々は Synaptic Membrane 特異的

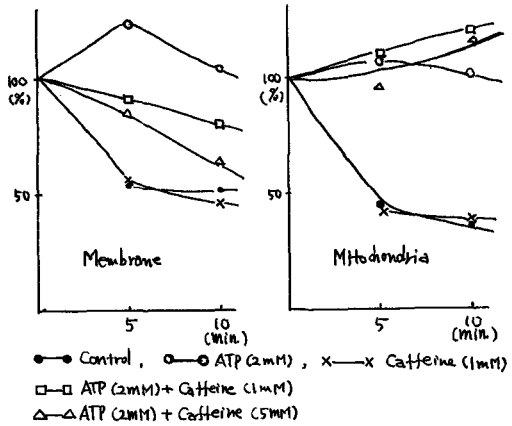
ATP に興味を持っているので同様に cp+cpK での Ca-Uptake をみた。その結果 Fig 9 に示すように Synaptic Membrane では cp+cpK で Ca-Uptake がみられない。しかし Fig 4 の Basic Medium に 9×10^{-5}M $CaCl_2$ を加えて 10 分間 incubate すると CP+CPK により Ca-Uptake を示すようになり，Synaptic Membrane には持込みの ATP によって Uptake される Ca^{++} の Fraction があるものと思われる。

Fig 9. Ca-Uptake Induced by ATP and cp+cpK.



⁴⁵Ca Release に対する Caffeine の影響： Frog SR で Caffeine が Ca の Release を速くすることが報告されている[5),9),10)]。Caffeine は中枢興奮薬であるので ⁴⁵Ca-Accumulated Synaptic Membrane からの ⁴⁵Ca Release に対する Caffeine の作用を調べた。その結果 Fig 10 に示すように ATP が存在しない場合 ⁴⁵Ca の Retention が悪く，Caffeine の効果はないが ATP が存在すると Ca が Retention され，ここに Caffeine を添加すると ⁴⁵Ca の Release をひきおこす。Mitochondria の ⁴⁵Ca は Release してこない。したがって前述のように Synaptic Membrane 固有の Ca-Uptake 機構が存在することが明らかになったが，さらに Caffeine によって Release してくる点でも Synaptic Membrane 固有の Ca の動きと言える。

Fig 10 Effect of Caffeine on ⁴⁵Ca Retention



Ohtsuki[7)] は Brain で microsome 分画が Ca の Regulation に重要であるとしている。一方 Robinson ら[2),3)] は Mitochondria により Regulate されていると考えている。これに対して我々は Synaptic Membrane を通しての Ca の動きも Ca の Regulation に重要な役割を果しているのではないかと考える。

【文 献】

1) Carvalho, A.P., and Mota, A.M., Arch. Biochem. Biophys., 142, 201 (1971).
2) Lust, W.D., and Robinson, J.D., J. Neurobiol., 1, 303 (1970).
3) Lust, W.D., and Robinson, J.D., J. Neurobiol., 1, 317 (1970).
4) De Meis, L.; Rubin, B.B. and Machado, R.D., J. Biol. Chem., 245, 1883 (1970).
5) Ogawa, Y., J. Biochem., (Tokyo). 67, 667 (1970).
6) Ohashi, T., Uchida, S., Nagai, K., and Yoshida, H., J. Biochem., (Tokyo). 67, 635 (1970).
7) Ohtsuki, I., J. Biochem., (Tokyo). 66, 695 (1969).
8) Robinson, J.D., J. Neurochem., 16, 587 (1969).
9) Weber, A. and Herz, R. J. Gen. physiol., 52, 750 (1968).
10) Weber, A. J. Gen. Physiol., 52, 760 (1968).
11) Whittaker, V.P., Michaelson, I.A., and Kirkland, R.J.A., Biochem. J., 90, 293 (1964).
12) Yoshida, H., Kadota, K., and Fujisawa, H., Nature, 212, 291 (1966).

7. 単一ニューロン細胞体におけるエネルギー産生系酵素の活性

加藤尚彦（東大・医・脳研）
Lowry, O.H.（Washington 大学・薬理）

〔要約〕

(1) 超微量定量の目的を満すために，高増幅で安定性のよい新しい酵素サイクリング法（NAD）を確立した。

(2) この方法（および従来のサイクリング法）を用いてウサギの単一ニューロン細胞体における HK, PFK, G6PDH, 6PGDH, ICDH(NADP), MDH, LDH の活性を測定した。対象としたニューロンは次の8種類である。大脳皮質の錐体細胞，アンモン角の錐体細胞，脳幹網様体内の巨大細胞，PURKINJE 細胞，DEITERS 細胞，顔面神経核細胞，脊髄前角細胞，後根神経節細胞。

(3) 8種類のニューロンはそれぞれ特有の酵素活性のパタンを示す。各種のニューロン間で MDH の活性差はもっとも少なく，G6PDH 活性の開きがもっとも大きい。

実験方法

試料調製　ウサギ（雄 1.5～2kg）の頸動脈を無麻酔下に切断，脳の各部位をとりだし，液体窒素で冷却した Freon-12（−150°C）内に投入する。この凍結組織塊から 8～10μ の切片をきりだし（クリオスタット −24°C），−50°C で凍結乾燥した。乾燥切片からの細胞のきりだしおよび重量測定（水晶系バランス）は，20°C，湿度 50% の恒温恒湿室で行なった。[2] 比較のためにこれらの細胞と同等の大きさの試料を小脳分子層の凍結乾燥切片からきりだし，同時に酵素活性を測定した。

酵素活性　ICDH[9], MDH および LDH[3], HK, G6PDH, 6PGDH[4], PFK[7] に関する従来の方法を改変して測定した。

油井法 Oil well method　測定試料が超微量であるため，HK, G6PDH, 6GPDH, ICDH は 0.16 μl, PFK, LDH は 0.88 μl, MDH は 4.9 μl の反応液内で測定した。とくに錐体細胞は小さくまた G6PDH, 6PGDH 活性が低いので，さらに微量(0.013

G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HK	Hexokinase
ICDH	Isocitrate dehydrogenase (NADP)
LDH	Lactate dehydrogenase
MDH	Malate dehydrogenase
PFK	Phosphofructokinase
6PGDH	6-Phosphogluconate dehydrogenase

この研究は Washington 大学薬理学教室で行なわれたもので，一部は Second National Meeting, AMERICAN SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY (March 15-19, 1971) において発表した。

μl)の反応液を用い，後述の二重サイクリング法によって測定した。

テフロン板に堀られた直径 3mm，深さ 2mm の油井に，100% 軽パラフィン油(比重 0.83～0.86)を満し，前記反応液の微小滴をその底に沈める。[8] きりだした細胞を油層を通じて反応液内へ加え，22.5°C(室温)で 60分間反応させた後，HCl(NAD 生成反応)または NaOH(NADPH 生成反応)を加えて反応を止める。HCl，NaOH の最終濃度は 0.1 N，最終の反応液量は 2～10 μl である。ついで油井を 60°C，30分間加熱し，生成された NAD および NADPH をほとんど完全に保ったままで，過剰の NADH および NADP を破壊した。[6]

酵素的サイクリング　NAD は新しく考案した NAD サイクリング法により，NADPH は従来の NADP サイクリング法[5]によって，800～150,000 倍に増幅した。新しい NAD サイクリングには ADH と MDH を用いたが，増幅率は 60,000 倍におよび，直線性も良好である。生成される NADP が少ない場合には，二重サイクリング法[5]を使用した。

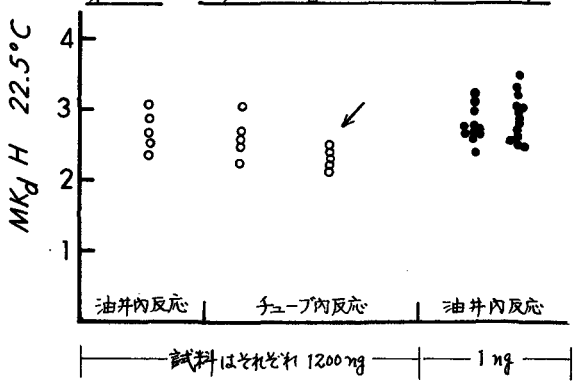
標準とブランク　既知量の NAD または NADPH を反応液に加えて同様に処理したものを標準とした。またブランクは反応液のみを同様に処理してえられる値である (reagent blank)。

実験結果

きりだした単一ニューロン細胞体の重量は 0.2 ng(錐体細胞)から 10 ng(巨大細胞)の範囲に分散している(第1表)。後根神経節細胞の内部には細胞核が明らかにみとめられるが，他の細胞では見えにくい。大型細胞の細胞質は海綿様に見え，凍結の過程で微細な氷の結晶が形成されることを示唆している。錐体細胞では著明な樹状突起をみとめることができる。

微量測定法の信頼性　同一の小脳分子層切片から μg および ng の小片をきりだし，蛍光測光用のテューブ内で反応させた μg 試料と油井内で反応させた ng 試料について活性を比較した。その1例としてヘキソキナーゼ活性の測定結果を第1図に示す。両試料の活性はきわめて良く一致し，微量定量法が十分に信頼しうるものであることを示している。他の6種類の酵素活性についても，ヘキソキナーゼ活性とおなじく，十分な信頼性がたしかめられた。

第1図　小脳分子層のヘキソキナーゼ活性



縦軸の単位は生成 NADPH モル/kg 乾燥重量/60分(22.5°C)。↙は試料を 22.5°C(空気中)に24時間放置後の測定値。

第1表　各種のニューロン細胞体における酵素活性の分布

	細胞体の重量(ng)	HK	PFK	G6PDH	6PGDH	ICDH	MDH	LDH
後根神経節細胞	6 - 0.7	1.73 (40) 0.06	2.36 (27) 0.23	0.286 (49) 0.022	0.153 (17) 0.009	0.73 (37) 0.02	28 (39) 1	7.6 (24) 0.6
前角細胞	5 - 0.7	1.83 (31) 0.06	2.54 (31) 0.10	0.349 (25) 0.036	0.189 (26) 0.009	0.74 (45) 0.05	44 (29) 2	3.75 (25) 0.14
PURKINJE細胞	1.8- 0.3	0.32 (27) 0.02	5.01 (28) 0.16	0.280 (28) 0.017	0.123 (17) 0.006	0.40 (21) 0.02	86 (24) 3	10.5 (36) 0.2
網様体の巨大細胞	10 - 0.7	2.06 (18) 0.105	1.90 (30) 0.11	0.083 (16) 0.007	0.128 (19) 0.009	0.71 (16) 0.05	52 (26) 2	2.82 (23) 0.10
DEITERS細胞	5 - 0.8	2.39 (19) 0.08	1.42 (30) 0.06	0.124 (23) 0.009	0.055 (27) 0.005	0.65 (16) 0.05	51 (26) 1	2.67 (25) 0.12
顔面神経核細胞	3 - 0.5	1.03 (23) 0.07	2.93 (30) 0.12	0.147 (26) 0.009	0.122 (24) 0.007	1.11 (19) 0.04	52 (26) 1	2.95 (25) 0.06
錐体細胞(大脳皮質)	1 - 0.2	0.89 (24) 0.04	2.25 (29) 0.10	0.036 (19) 0.003	0.095 (39) 0.007	1.36 (19) 0.06	59 (21) 2	9.5 (25) 0.4
錐体細胞(アンモン角)	1 - 0.2	0.88 (25) 0.06	1.52 (32) 0.08	0.038 (15) 0.003	0.074 (25) 0.005	0.74 (19) 0.04	54 (22) 1	10.6 (28) 0.6

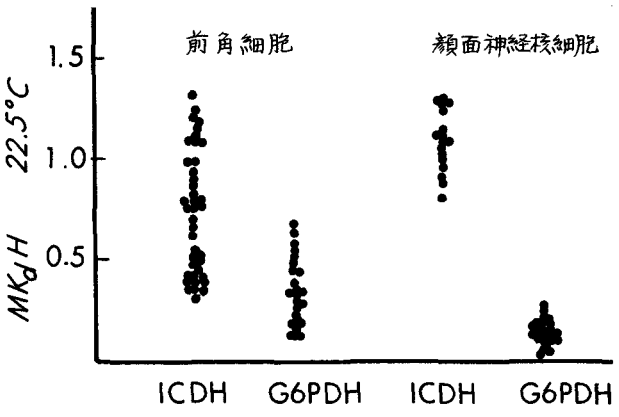
活性は生成NAD(またはNADP)モル/kg乾燥重量/60分(22.5°C)。
下段の数値は平均誤差(S.E.)。　カッコ内は測定数。

ニューロン細胞体の酵素活性

ニューロンについて，それぞれ特徴がある(第1表)。ニューロン間の活性のちがいがもっとも著しいのはG6PDHであり，最低の錐体細胞と最高の前角細胞との間に約10倍の開きがある。次に大きな開きを示すのはHKである。MDH活性は細胞によるちがいがもっとも少ない。前角細胞は他のニューロンにくらべてG6PDH，6PGDHの活性がもっとも高い。これにくらべDEITERS細胞はPFK，6PGDHの最低活性を示す。PURKINJE細胞は最高のPFK，MDH，LDH活性と，最低のHK，ICDH活性を示し，例外的な存在である。

細胞体における酵素活性は，測定した8種類の

第2図　前角細胞群における活性の不均一性



活性の単位は第1図とおなじ。

前角細胞群にみられる活性の不均一性　第2図に示すように，前角細胞のICDHとG6PDH活性は，おなじく運動神経細胞である顔面神経核細胞にくらべて，活性のバラツキが非常に大きい。このことは前角細胞が2種類以上の細胞群から成立っていることを示唆する。

考　察

LOWRY 等によって推進された微量測定法は，μg ていどの試料にたいして適用され，中枢神経系の層状構造の解析に大きな成果を収めた。油井法[8]の考案によってさらに試料の微量化が可能になったが，本研究は油井法と二重サイクリング法（新しく考案された NAD サイクリングをふくむ）を組織にはじめて適用し，各種ニューロンの細胞レベルにおける個別性を識別するとともに，細胞下の構造にたいする微量測定法の適用性に関して，新しい展望を開いたものである。

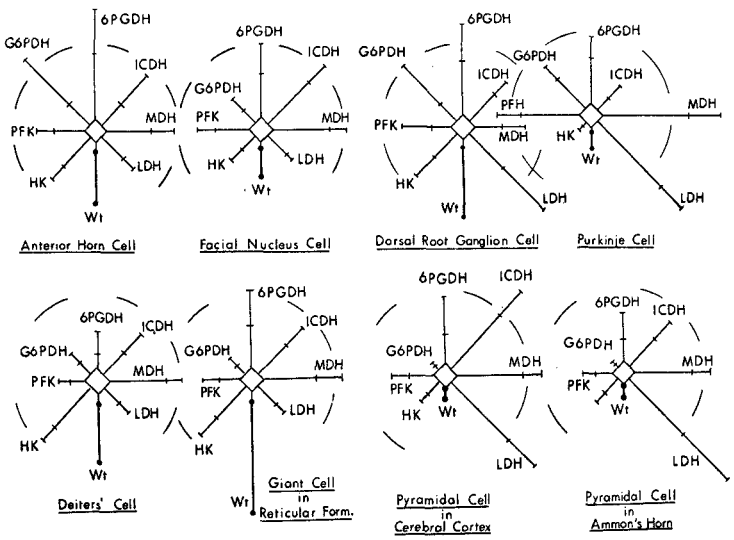
小脳の分子層は形態学的に比較的均一であり，生化学的にも均質であることが知られている[1]。μg および mg 試料の同時測定は（第1図），本報で述べた超微量定量法の信頼性にたいして十分な根拠を与えるものといってよい。

この研究で分析の対象とした8種類のニューロンは，それぞれ特徴的な酵素活性のパタンを示している（第1表，第3図）。要約すると次の5群に分けて考えることができる。

(1)前角細胞と顔面神経核細胞　(2)巨大細胞と DEITERS 細胞　(3)錐体細胞（大脳皮質および アンモン角）　(4)後根神経節細胞　(5) PURKINJE 細胞。

以上それぞれの細胞群の生理学的，発生学的な類似性を考慮するとき，酵素学的な分類との対応性は興味深い問題をふくんでいる。また前角細胞群が少なくとも2種類以上の細胞から構成されていることは，最近の組織化学的研究[10]とも一致している。

第3図　酵素活性にもとずく各種ニューロンのパタン化



文　献

(1) FRIEDE R. (1966) Topographic Brain Chemistry, p. 70, Academic Press, New York (2) LOWRY O.H. (1953) J. Histochem. Cytochem. 1, 420 (3) LOWRY O.H., ROBERTS N.R. & LEWIS C. (1956) J. biol. Chem. 220, 879 (4) LOWRY O.H., ROBERTS N.R., SCHULZ D.W., CLOW J.E. & CLARK J.R. (1961) J. biol. Chem. 236, 2813 (5) LOWRY O.H., PASSONNEAU J.V., SCHULZ D.W. & ROCK M.K. (1961) J. biol. Chem. 236, 2746 (6) LOWRY O.H., PASSONNEAU J.V. & ROCK M.K. (1961) J. biol. Chem. 236, 2756 (7) LOWRY O.H. & PASSONNEAU J.V. (1966) J. biol. Chem. 241, 2268 (8) MATSCHINSKY F.M., PASSONNEAU J.V. & LOWRY O.H. (1968) J. Histochem. Cytochem. 16, 29 (9) OCHOA S. (1955) Meth. Enzymol. 2, 699 (10) FERNANDEZ-CAMPA J. & ENGEL W.K. (1970) Nature 225, 748

8. ネコ脊髄におけるγ－アミノ酪酸（GABA）の分布

宮田雄平・田中百合子・大塚正徳
（東医歯大・医・薬理）

〔要約〕

ネコ脊髄におけるGABAの分布を調べ、脊髄におけるGABAの伝達物質としての役割を検討した。

ネコ脊髄を凍結し、cryostat 中で厚さ150μの横断切片を作り、これをさらに 500x500x150μ、または200x200x150μ の直方体に分割切断した。各々の組織小片のGABA含有量を Hirsch & Robinsの方法に準じた螢光法（最高感度 $1x10^{-11}$moles）、およびLowry らの enzymatic cycling を応用した微量定量法（最高感度 $5x10^{-13}$ moles）を用いて測定を行った。後角のGABA濃度は 2 ～2.6mM と前角の0.6 ～1.3mMに比べて高い値を示した。一方Goll 氏束の部位は0.1mM 前後の低い値を示した。最も高いGABA濃度が得られたのはRexed の Ⅲ, Ⅳ層付近であった。次にWall の記載した術式に従い、後根が脊髄に進入する部位の外腹側部で軟膜表面の血管を一側だけ焼灼した。8日後に脊髄を再び露れし後根電位を観察したところ焼灼側では単一電気刺激による後根電位が著るしく減弱したのに比べて、非焼灼側では正常通りの後根電位を記録することが出来た。GABA分布を調べてみると、焼灼側の後角において GABA濃度の著しい低下を認めたが、それ以外の部位には顕著な変化は見られなかった。以上の結果に基づきGABAが脊髄において presynaptic inhibition の伝達物質である可能性につき考察した。

哺乳類中枢神経系（CNS）において，γ－アミノ酪酸(GABA) の分布を明らかにすることは，GABAのCNS における役割を知る上からも重要である。第12回神経化学会において述べたように，もしGABAが哺乳類 CNSにおいて GABA作動性抑制性ニューロン中に選択的に分布するとすれば，CNS 中のGABA分布を知ることによって多数の抑制性ニューロンの局在を明らかにすることができるであろう(6,7)。我々はこれまで第11回神経化学会において報告したGABAの微量定量法(5)を用いて，CNS 単一遊離神経細胞のGABA含有量の測定を行ってきた(7,8)。この方法ではしかし広範囲にわたって組織のGABA分布を知ることは出来ない。今回我々は細胞レベルに近い尺度で神経組織のGABA分布を調べる方法を考案したので報告する。さらにこの方法を用いて，すでに組織学的，電気生理学的に多くの知見が得られているネコの脊髄についてGABA分布を調べ，また電気生理学的検索を行い脊髄におけるGABAの役割につき検討を行った。

実験方法

切片 ― Pentobarbital 麻酔下にネコの脊髄を遊離し，dry ice-acetone で-70°Cに冷やした iso-pentane中で凍結し，cryostat中で横断方向に切り厚さ150μの切片を得た。脊髄は主として L-6, L-7 の部分を用いた。

Slide glass ― Slide glass 上に約50μ の厚さで epoxy resinの薄膜を接着し，その周囲に約300μの厚さのcover glass を堤防状にはりつけた。

試料を作る手続き― 1) 厚さ150μ の脊髄の切片を上述の slide glass上におき，室温に約10分間おいた後，顕微鏡写真を撮影し部位の確認に用いた。2) 24x30x22cm のプラスチック製 cold box(1) に slide glass上の組織切片を入れ、-25 ～-28°C で再び凍結した。操作

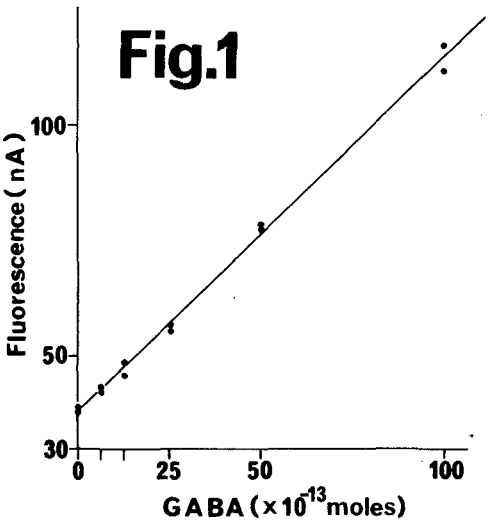
中は冷やした N_2-gas を cold box に 流した。 3) この slide glass の下に100μ 間隔の micrometerを置き，カミソリの小片で作ったナイフを用い，実体顕微鏡の下で切片周囲の cover glass 上においた定規にそって 500μ または200μ 間隔で脊髄切片を切り分けた。 4) Cold box中の温度を-45～-50°C に下げ各々の組織小片をfluorometer tube 中の 0.1N-HCl 20μl(500x500x150μ組織小片の場合) または5μl(200x200x150μ 組織小片の場合) 中に移した。 5) Fluorometer tube を乾燥器中38°C に保ち，HCl 及び水を蒸発により除き，GABA含有量の測定を行った。 6) 組織小片を移し終った後，epon上のナイフ跡を再び顕微鏡撮影し，その切り跡から組織小片の体積を計算し，組織中のGABA濃度を算出した。

定量法

500x500x150μ 組織小片 — Hirsch & Robins(3) の方法に準じた螢光法(1x10^{-11}moles まで測定可能)によりGABA含有量を測定した。

200x200x150μ 組織小片 — 第11回神経化学会において発表した微量定量法(5) を簡便化した方法を用いて測定を行った。この方法はLowryらの enzymatic cycling(4) を応用したもので，原理はすでに発表したものと同じであるが，実際上はより容易で，実用的であると思われるのでやや詳しくのべる。

0.22M tris-HCl buffer(pH8.0), 2.2mM α-ketoglutarate, 30μM NADP$^+$, 8mM β-mercaptoethanol, 0.2-0.3mg protein/ml GABASEを含む反応液5μl を凍結のとがった 1ml-fluorometer tube 中の試料に加え，38°C 30 分 incubate した．次いで0.17N-NaOH 20μlを加え15分間60°C に加熱し，余分の NADP$^+$ を破壊した。各試料に0.2M tris-HCl buffer(pH7.8), 1mM glucose-6-P, 5mM α-ketoglutarate, 0.03M ammonium acetate, 0.5mg/ml bovine plasma albumin , 0.2mM EDTA, 0.2mM ADP, 0.03mg/ml glutamate dehydrogenase, 0.006mg/ml glucose-6-P dehydrogenase を含む反応液 200μl を加え，38°C 90 分incubate した後100°C 5分間熱した．次に0.02M tris-HCl buffer(pH8.0), 0.1mM EDTA, 0.1mM NADP$^+$, 0.01mg/ml 6-P-gluconate dehydrogenase を含む反応液 1 mlを加え，25°C 30 分後に産生された NADPH の量を螢光計（一次フィルター 365nm, 二次フィルター 460nm）により測定した。この定量法によると 5x10^{-13}molesのGABA まで測定可能である。Fig.1 は標準曲線を示している。



脊髄の血管焼灼 — Pentobarbital麻酔下に，ネコの脊髄を露出し硬膜を開き，後根が脊髄に入る部位の外腹側で軟膜をつらぬいて脊髄に入る血管を，直径0.2mmのニクロム線で作った電気メスで焼灼した(9)．術後 8 日目以降に脊髄をとりだし上述の方法によりGABAの測定を行った。

結果

Fig.2B は正常ネコ脊髄におけるGABA 分布を500μ 目盛で示したものである．後角，特に

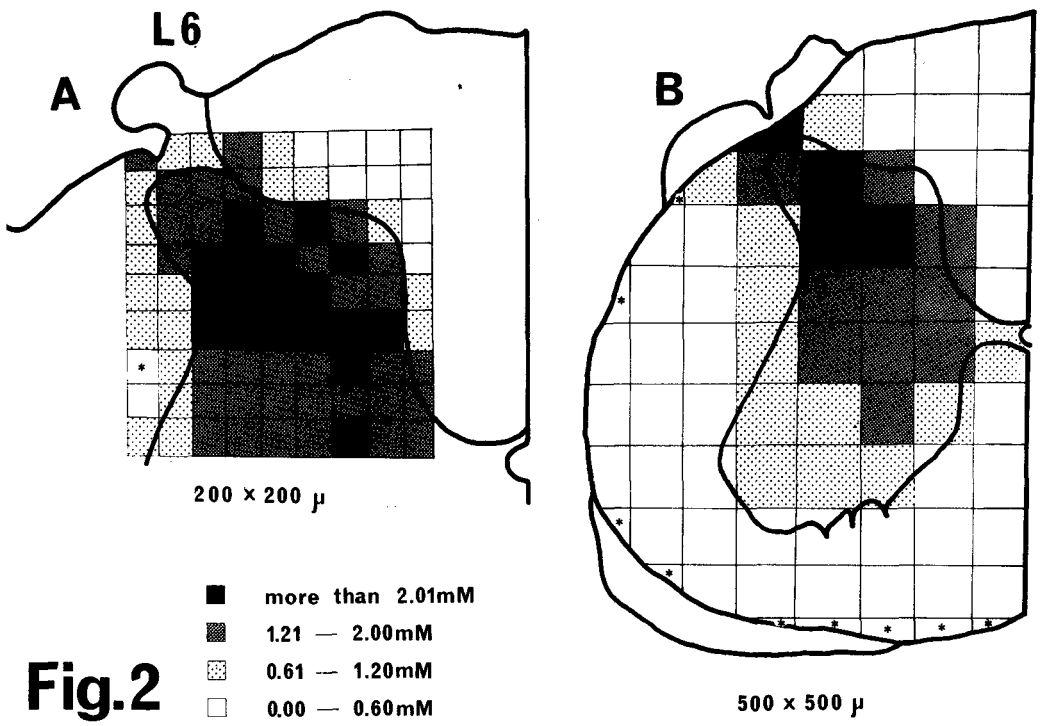


Fig.2

その背側部は 2～2.6mMと高い値を示したのに比べ，前角の運動ニューロンのある付近は 0.8mM 程度であった。一方Goll 氏束に相当する部位は常に低い値（約0.1mM）を示した。

Fig.2A は 200μ間隔でのGABA 分布を示している。Fig.2B の結果から後角にGABA が高濃度に存在することが明らかとなったので，更に詳しく200μ 間隔で調べてみると，後角のうち Rexed の Ⅲ,Ⅳ層付近にGABA濃度の最も高い部位があることがわかった。更にⅤ層の中心部でしばしば高い値がみられた。

Fig.2A に示したGABA が高濃度に分布する部位は，Wall によって示された後根電位の起源の局在部位(10) と類似している。一方 Eccles らによると，後根電位はpresynaptic inhibition の一つの現われであり，presynaptic inhibition は picrotoxin によって抑制されることが知られている(2)。これらの事実を考えあわせると，後角背側部に高濃度に存在するGABA は，presynaptic inhibition の伝達物質として機能している可能性が考えられる。この考えを検討するため次のような実験を行った。Wall の記載した術式に従って，後根の脊髄進入部外腹側にある血管の焼灼により，後角に存在する介在ニューロンの破壊を試みた。既ち腰膨大部の左側だけ血管焼灼を行い，8日後に腰膨大部の焼灼側の後根を単一電気刺激すると，同じ後根から記録される後根電位は著るしく減弱していたが，非焼灼側では正常通りの後根電位が記録された。次に脊髄をとり出し，cryostat で切った後に切片を左右に合せGABA濃度を比較すると，非焼灼側0.76 mM に比べ，焼灼側0.61mM と減少しているのがみられた。さらにFig.2B に示したと同じ方法でGABA 分布を調べると，焼灼側の後角背側部のGABA 濃度が著るしく減少してい

るのが見出された。これに比べて非焼灼側及び焼灼側の後角以外の部位のGABA濃度はFig.2Bに示したと略同様であった。

考察

哺乳類中枢神経系中のGABA分布を調べるためには，組織化学的にGABAを染め出す方法が考案されることが望ましい。しかしこのような方法は未だ存在しない。我々が今回報告した方法はある程度これに代るものである。我々の方法は定量的にGABA分布を知ることが出来る点では，普通の定性的ないし半定量的組織化学の方法よりも優れているが，しかしGABAの組織内での詳しい局在，例えばGABAが特定の神経終末中に含まれているかどうかといったことは知ることができない。100μの尺度でGABAの分布を知ることは現在の方法で十分可能であるが，それ以上は困難であろう。

脊髄の後根進入部の血管焼灼によって，後根電位が減弱ないし消失すると同時に，後角部のGABA量が減少したことは，GABAがpresynaptic inhibitionの伝達物質である可能性を示唆している。しかし血管焼灼によって起った二つの現象（後根電位の減弱と後角部GABAの減少）を結びつける前に，さらにGABA以外の物質に対する影響，血管焼灼によって起る脊髄の組織学的変化などが検討されねばならず，現在この線にそって実験中である。

文献

1) Aprison, M.H. and Hancock, C.J., Experiments in Physiology and Biochemistry, Vol.3, Academic Press, New York, 1970, p.31.

2) Eccles, J.C., The Physiology of Synapses, Springer-Verlag, Berlin, 1964.

3) Hirsch, H.E. and Robins, E., J.Neurochem., 9, 63 (1962).

4) Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schulz, D.W. and Rock, M.K., J.Biol. Chem., 236, 2746 (1961).

5) 大塚正徳，田中百合子，小幡邦彦，神経化学，7，Suppl. 67 (1968)

6) 大塚正徳，小幡邦彦，田中百合子，神経化学，8，Suppl. 37 (1969)

7) Otsuka, M., Obata, K., Miyata, Y. and Tanaka, Y., J.Neurochem., 18, 287 (1971).

8) Miyata, Y., Obata, K., Tanaka, Y. and Otsuka, M., J.Physiol.Soc.Japan, 32, 377 (1970).

9) Wall, P.D., J.Physiol., 164, 508 (1962).

10) Wall, P.D., Progress in Brain Research, Vol.12, Elsevier Publishing Company, New York, 1964, p.92.

9. ニューロン核におけるRNA合成

黒川正則・田村立夫・井上朋子
瀬谷典子　（東大・医・脳研）

〔要約〕

(1) 脳のP_{50}核（ニューロン：グリア比　50％：50％）におけるRNA合成は，核DNAあたり肝臓核の10−30倍におよぶ。これはα−アマニチン感受性のポリメラーゼ活性がとくに高いためである。

(2) P_{50}核にみられるこの特徴はグリア細胞核ではなく，ニューロン核の性質によるものと考えられる。

(3) P_{50}核からは肝臓核にくらべて，はるかに多量のα−アマニチン感受性RNAポリメラーゼ活性が可溶化される。

(4) 溶性RNAポリメラーゼのα−アマニチン感受性は，クロマチン側の性質にも依存している。ニューロン核のクロマチンと肝臓核クロマチンとの間に，あきらかなテンプレート活性のちがいがみとめられる。

分離した細胞核でRNA合成をしらべると，2種類以上のRNAポリメラーゼ活性が混在している。哺乳動物の細胞核では，第1表に示すように，生成RNAの分子種，2価イオン要求，至適イオン強度，酵素阻害，核内局在などの違いによって，ポリメラーゼI型とII型が区別される。細胞核からの酵素の可溶化と精製をめぐる最近の研究[4][10][13]-[15]は，I型，II型の酵素タンパクとしての違いを実体化しているように見えるが，一方では活性がさらに細分化される傾向があり[1][13]，またなにかの要素が酵素の相互変換に関与する可能性も考慮しなければならない。したがって分離核におけるRNAポリメラーゼ活性と生体細胞核におけるRNAの合成は，まだ非常にかけはなれた次元でしか比較できないのである。しかし一方ではホルモンによる影響のされ方がI型とII型でことなること[2][8]，発生の時期によってI型，II型（およびIII型）の活性比が変る[14]ことなど，RNAポリメラーゼ各型の動きが生体細胞核におけるRNA合成の調節に関与しているのではないかと思われる事実もある。クロマチンの細胞特異性とならんで，RNAポリメラーゼ活性のパタンもまた細胞の状態を特徴づけるパラメーターであるかもしれない。

ニューロンの細胞核ではグリア細胞核，肝細胞核にくらべてRNAポリメラーゼの比活性が高い[7]。

第1表　哺乳動物細胞核のRNAポリメラーゼ活性

	I　型	II　型	文献
生成されるRNA	rRNA	dRNA	19
2価イオン	$Mg^{2+} > Mn^{2+}$	$Mg^{2+} < Mn^{2+}$	19
イオン強度	低	高	19
アクチノマイシンD感受性	高	低	19
α−アマニチン感受性	なし	あり	3,9,18
核内局在	核小体	核質	11

以下述べるようにこれはもっぱらII型ポリメラーゼの高活性によるものである。また核ポリメラーゼのα-アマニチン感受性は，酵素とクロマチンの相互関係によって規定されている。

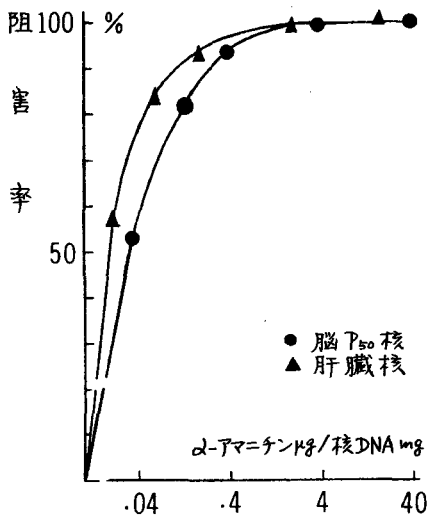
実験條件

成熟モルモットの脳灰白質，肝臓，成牛の灰白質，白質，肝臓から細胞核を分離し[6][7]，図，表に付記した條件下で反応させる。5% TCA-20 mM ピロ燐酸で反応を止め，沈渣をガラス沪紙上に集めて洗ったのち，とりこまれた ^{14}C-UMP の放射能を液体シンチレーションによって計測した。クロマチンは分離核から出発して可溶化するか[16]，あるいは沈渣として回収した[17]。RNA ポリメラーゼは ROEDER & RUTTER[13][15] にしたがって，0.3 M $(NH_4)_2SO_4$ の存在下で超音波処理によって核から溶出させたのち，分画4の段階まで精製した（−80°C 保存）。その他の定量操作は前報[6][7]に記載した通りである。

結果と考察

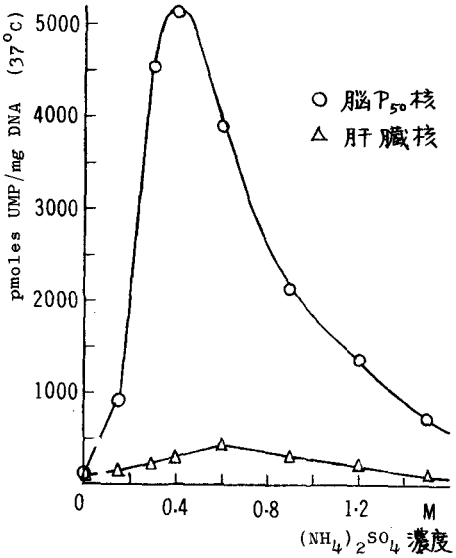
反応條件　低イオン強度下の核のRNA合成は 10分(37°C)でもっとも高く，その後減少する[7]。Mg^{2+} が Mn^{2+} よりも有効である（第2表）。高濃度の $(NH_4)_2SO_4$（または NaCl）が存在すると UMPのとりこみは 40分(37°C)まで増加し，以後一定値となる。この場合には Mn^{2+} が Mg^{2+} よりも有効である（第2表）。Mn^{2+} は 2 mM で至適であるが，Mg^{2+} の有効濃度域は比較的広い[7]。以上のことからI型は 5 mM Mg^{2+} 存在下で 37°C，10分間の ^{14}C-UMP とりこみ，II型は 2 mM Mn^{2+}，400～600 mM $(NH_4)_2SO_4$ 存在下で 37°C，40分間のとりこみをもって活性を表わした。α-アマニチンは第1図の結果から 4 μg/mg 核DNA またはそれ以上の濃度（反応液内では 1 μg/ml）で使用した。50%阻害をおこすのに必要なα-アマニチンの量は，おなじ核DNA量あたり脳細胞核(P_{50})の方が肝臓核よりも多い。上記のように操作的に定義されるI型にはわずかながらα-アマニチン感受性の活性（以下 Am-S 活性），II型には非感受性の活性（Am-IS 活性）がふくまれている。以下便宜的にα-アマニチンをふくまない反応液内の活性から，α-アマニチンをふくむ反応液内の活性をさしひいて Am-S 活性を表現した。

第1図　α-アマニチン濃度と Am-S 活性



核のRNA合成　反応液内の $(NH_4)_2SO_4$ 濃度を増すと脳の P_{50} 核では 0.4 M，肝臓核では 0.6 M でRNA合成がもっとも強く促進される（第2図）。NaCl でもほぼ同様の促進が認められるが，至適濃度は $(NH_4)_2SO_4$ よりも高く P_{50} では 0.8 M，肝臓核では1.0 M である。$(NH_4)_2SO_4$ または NaCl によって促進される活性はα-アマニチン感受性であり，

第2図　$(NH_4)_2SO_4$ 濃度と核のRNA合成



反応液(0.5 ml)は Tris-HCl (pH 8.0) 50 μmol, $MnCl_2$ 1 μmol, β-mercaptoethanol 5 μmol, ATP, CTP, GTP それぞれ 0.25 μmol, UTP 0.015 μmol, 14C-4-UTP 0.25-0.5 μCi, DNA 50-100 μg に相当する核，および各濃度の $(NH_4)_2SO_4$ をふくむ。

第2表　各種の細胞核におけるRNA合成　　モルモット

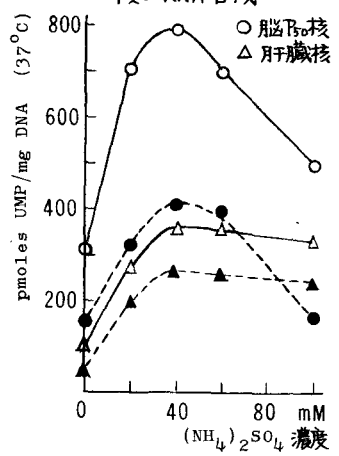
核		$(NH_4)_2SO_4$ (M)	全活性 (a)	Am-IS (b)	Am-S (a)−(b)	(a)−(b) / (b)
脳P50	Mg	0	298	217	81	0.37
		0.4	4010	195	3815	19.6
	Mn	0	162	129	33	0.26
		0.4	5024	388	4636	11.9
肝	Mg	0	95	78	17	0.22
		0.6	176	40	136	3.40
	Mn	0	51	42	9	0.21
		0.6	461	92	369	4.01
						ウシ
脳P36	Mg	0	96	59	37	0.63
	Mn	0.4	1127	101	1026	10.2
脳P0	Mg	0	21	15	6	0.40
	Mn	0.4	344	43	301	7.00
肝	Mg	0	72	39	33	0.85
	Mn	0.6	376	80	296	3.70

$MgCl_2$ 5 mM, $MnCl_2$ 2 mM. $(NH_4)_2SO_4$ をふくむ反応は 40 分，ふくまない反応は 10分(37°C). Am-IS は α-アマニチン(1 μg/ml)の存在下で測った活性．　単位は pmol UMP/mg DNA.

Am-IS 活性は塩の各濃度を通じてほとんど変化しない。核のRNA合成は低濃度の $(NH_4)_2SO_4$ によっても いくぶん促進されるが,[5]　この場合には Am-IS 活性の増加がむしろ目立っているので(第3図)，高濃度塩による合成促進とは別のメカニズムによるものと推定される。

第2図，第2表で示したように，脳P50核では肝臓核にくらべて Am-S 活性が極端に高い。ウシの P36 核と P0 核(グリア核のみ)を比較すると，脳細胞核の高いα-アマニチン感受性は，グリア核ではなく，ニューロン核の特徴であると考えられる。

第3図　低濃度の $(NH_4)_2SO_4$ と核のRNA合成



$MnCl_2$ は 1.2mM。反応 10分(37°)。点線は α-アマニチン(1 μg/ml)存在下の反応。

溶性ポリメラーゼ　ROEDER & RUTTER[13][15] の方法で可溶化される分画Ⅰの RNA ポリメラーゼは，Am-S, Am-IS の両活性をふくむ点では核の酵素活性と共通している。しかしその活性は外から加えられるDNAにほぼ完全に依存している。コウシ胸腺のDNA (Sigma, Type I) をテンプレートにする場合，未変性DNAよりも熱変性DNA (100°, 7分間加熱後急冷)の方がはるかに有効である(第3表)。また溶性ポリメラーゼの活性は低濃度の $(NH_4)_2SO_4$ によって促進されるが，核のポリメラーゼ反応とはちがって 200 mM 以上の濃度ではほぼ完全に阻害される。

同数の核から回収される Am-S 活性は実験ごとに変動するが，脳 P50 核の方が肝臓核よりも多い。モルモットの核から回収される Am-S 活性は核の DNA mg あたり たとえば P50 で 1400，肝臓核で 160 pmol (37°, 10分間にとりこまれた UMP 量)である。細胞核のポリメラーゼ活性と溶性酵素の活性はテンプレートの性質

がちがうし，また酵素の回収率や比活性が試料ごとに変動するため，量的な比較はむずかしいが，上記のような回収量のひらきから推定すると，ニューロン核における高い Am-S 活性は，一面において，核内の酵素量の問題として説明できるものと思われる。

α-アマニチンはテンプレートではなく，ポリメラーゼ・タンパクと結合することによってRNAの合成を阻害する[3][9][12]。酵素との結合は 1:1 と推定される。したがって同率の阻害をおこすのに必要な α-アマニチンの量が，核(DNA)あたり P_{50} 核の方が肝臓核にくらべて多いということも(第1図)，もし P_{50} 核において事実ポリメラーゼ分子が多いとすれば説明しやすいであろう。

テンプレートを未変性DNAから変性DNAにおきかえると溶性酵素の Am-S 活性は著しく増えるが，Am-IS 活性は減少する(第3表)。このことは酵素の α-アマニチン感受性がテンプレート側の性質によっても規定されることを示している。

α-アマニチン感受性にたいするクロマチン側の関与を知るために，次のような予備実験を行なった。核または核から精製したクロマチンを 0.2N HCl でホモジェナイズ後，0-4°C で30分間撹拌，遠心後の沈渣を 10 mM Tris (pH 8) で2回洗ったのちおなじ Tris 溶液に浮遊する。またクロマチンを 0.5M $(NH_4)_2SO_4$ - 50 mM Tris (pH 8) でホモジェナイズし，20°C で30分間振とう，100,000g，16時間遠心後の沈渣を10mM Tris (pH 8) で2回すすいだのちおなじ溶液に浮遊する。このように処理した核およびクロマチンはRNAポリメラーゼ活性を示さない。おなじ P_{50} 核からの溶性酵素を用いても，肝臓クロマチンをテンプレートにする場合は，P_{50} クロマチンにくらべて明らかに Am-S 活性が低い(第4表)。このことはニューロン核におけるRNA合成の特徴が，脱ヒストン・クロマチンのレベルにおいても維持されることを示している。

第3表　溶性ポリメラーゼの α-アマニチン感受性

酵素	2価イオン	$(NH_4)_2SO_4$ (mM)	テンプレート	全活性	Am-IS	Am-S
P_{50} 核より	Mn	60	(-)	4	--	--
			nDNA	458	245	213
			dnDNA	800	96	704
		240	nDNA	24	--	--
			dnDNA	28	--	--
肝臓核より	Mn	120	(-)	10	--	--
			nDNA	1169	73	1096
			dnDNA	2131	52	2079
		240	nDNA	71	--	--
			dnDNA	69	--	--

pmoles UMP/mg タンパク (37°C, 10分)

第4表　溶性酵素とクロマチンとの再構成

テンプレート		全活性	Am-IS	Am-S
HCl 処理	P_{50} 核	150	45	105
〃	肝臓核	64	43	21
HCl 処理	P_{50} 核クロマチン	119	37	82
〃	肝臓核クロマチン	53	43	10
$(NH_4)_2SO_4$ 処理	P_{50} 核クロマチン	77	24	53
〃	肝臓核クロマチン	65	39	26

クロマチン処理の方法は本文参照。各テーブは クロマチン DNA 30μg，P_{50} 核 酵素タンパク 67μg をふくむ。

(α-アマニチンは T. WIELAND 教授の好意による)

文献

(1) CHESTERTON C.J. & BUTTERWORTH P.H.W. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 232-241 (2) JACOB S.T., SAJDEL E.M. & MUNRO H.N. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 449-453 (3) JACOB S.T., SAJDEL E.M. & MUNRO H.N. (1970) Nature 225, 60-62 (4) JACOB S.T., SAJDEL E.M. & MUNRO H.N. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 765-770 (5) JOHNSON J.D., JANT B.A., KAUFMAN S. & SOKOLOFF L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 142, 489-500 (6) KATO T. & KUROKAWA M. (1967) J. Cell Biol. 32, 649-662 (7) KATO T. & KUROKAWA M. (1970) Biochem. J. 116, 599-609 (8) LIAO S. & STUMPF W.E. (1968) Endocrinology 83, 629-632 (9) LINDELL T.J., WEINBERG F., MORRIS P.W., ROEDER R.G. & RUTTER W.J. (1970) Science 170, 447-449 (10) MARUSHIGE K. & BONNER J. (1966) J. Mol. Biol. 15, 160-174 (11) MAUL G.G. & HAMILTON T.H. (1967) Proc. N.A.S. 57, 1371-1378 (12) MEIHLAC M., KEDINGER C., CHAMBON P., FAULSTICH H., GOVINDAN M.V. & WIELAND T. (1970) FEBS Letters 9, 258-260 (13) ROEDER R.G. & RUTTER W.J. (1969) Nature 224, 234-237 (14) ROEDER R.G. & RUTTER W.J. (1970) Biochemistry 9, 2543-2553 (15) ROEDER R.G. & RUTTER W.J. (1970) Proc. N.A.S. 65, 675-682 (16) SHAW L.M.J. & HUANG R.C.C. (1970) Biochemistry 9, 4530-4542 (17) SPELSBERG T.C. & HNILICA L.S. (1971) Biochim. Biophys. Acta 228, 202-211 (18) STIRPE F. & FIUME L. (1967) Biochem. J. 105, 779-782 (19) WIDNELL C.C. & TATA J.R. (1966) Biochim. Biophys. Acta 123, 478-492

10. 牛末梢神経に存在する酸抽出性の蛋白質について

戸張千年・植村慶一・平野修助
（東邦大・医・2生理）

〔要約〕

1) 牛末梢神経組織の酸抽出液よりCM cellulose column および Sephadex G-75 column を用いて2つの異った蛋白（p-2, p-3）を分離精製した。

2) Reisfeld 系 Disc 電気泳動で Lysozyme に対して p-2 蛋白は 0.30, p-3 蛋白は 1.07 の移動度を示す単一の Band を示した。

3) SDS Disc 電気泳動法による分子量測定では, p-2 蛋白はほぼ 58,000 で p-3 蛋白はほぼ 13,500 であり, Dansyl 法による蛋白の N 末端アミノ酸は共に Arginine であった。

4) p-2 蛋白を家兎に注射して作った抗体に対して, 抗原抗体反応を行ったところこの抗体は p-2 蛋白とのみ反応し, p-3 蛋白および牛脊髄の EAE 蛋白と反応せず, また日常の脳, 肝, 腎の酸抽出液とも反応せず, 末梢神経の酸抽出液のみ強く反応し, この蛋白は末梢神経組織にかなり特異的に存在していることが認められた。

5) Disc 電気泳動後, 染色 Band を抽出比色する方法によって, p-2 蛋白および p-3 蛋白の定量法を確立した。p-3 蛋白は末梢神経 myelin 構造蛋白のほぼ 260% を占め, その構造蛋白の1種であると考えられたが, p-2 蛋白は myelin 以外のものと考えられる結果を得た。

6) DOC, SDS, Triton などによって myelin 蛋白, 特に酸抽出性蛋白（p-3）の可溶化を試みた。

末梢神経組織は中枢神経組織より構成成分が比較的単純であり axon の構成成分や Schwann cell の myelin の分離に有利な材料と考えられる。既にわれわれは豚の脊髄および末梢神経組織より異った塩基性蛋白を分離精製しその性質について検討した。[9] また昨年の本会において牛の脊髄および末梢神経の myelin 蛋白について比較し報告した。[10] 今回は牛の末梢神経組織より酸で抽出される2つの異った蛋白を分離精製しその性質特に分子量, 蛋白N末端を検討し, これらの Disc 電気泳動法による定量法を確立しそれらの蛋白の末梢神経組織における局在を解明しようと試みたので報告する。

実験方法：

1) 塩基性蛋白の精製；既に報告した方法[9]にいくつかの改良を加えた。屠殺場より新鮮な牛の馬尾神経部を得て, 低温下で結合組織等より分離した後, 3回冷アセトン処理によって粉末を得, 更に湿重量の10倍量の pH2.0 冷 0.03N HCl 抽出し, 遠心上清を得た。その上清を Carboxymethyl (CM) cellulose (Serva製) column で stepwise の NaCl 濃度勾配による溶出および Sephadex G-75 column による溶出によって精製した。

2) Disc 電気泳動法と定量法；Reisfeld による方法[6]を改変して用いた。[9] またそれぞれの蛋白の定量法は, E.W. Johns が Histon の定量に用いた方法[3]を応用した。即ち染色したゲルを充分脱色した後それぞれの Band を切り取り粉末として, 4 ml の dimethyl sulfoxide を加え室温で 12～15 時間抽出し, 抽出液を O.D. 600 mμ で測定した。

3) アミノ酸組成の分析；既に報告した方法によった。[9]

4) SDS Disc 電気泳動法による分子量の測定；A.L. Shapiro らの方法[7]によった。即ち 0.2% SDS および 0.1M phosphate buffer pH7.1 を含む 10% Acrylamide を用い, 試料はそれぞれの蛋白 2 mg

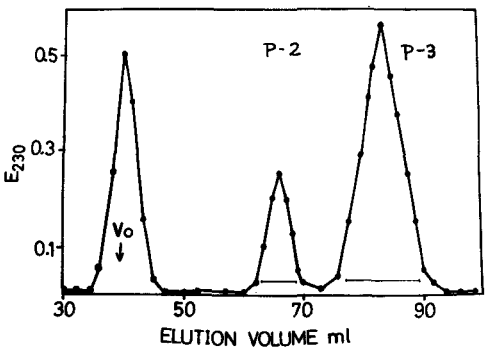
を1% SDS, 8M尿素, 1% β-mercaptoethanolを含む1ml中で45℃, 2時間変性させた後, 20μg程度をゲルにのせ1tube当り2-3mAで180分程度Disc電気泳動を行った。既知標準蛋白として, Bovine albumin(ナカライ化学製), Lysozyme, Papain, Trypsin(シグマ製), α-Chymotrypsin(ワシントン生化学工業製)を用いた。分子量の決定には既知標準蛋白に比して, 片対数グラフ上に縦軸に分子量, 横軸に蛋白の移動度をプロットし求めた。

5) 蛋白N末端アミノ酸の分析; 方法はC. Gros, B. Labouesse によった。[2] 即ちそれぞれの精製された蛋白を脱塩した後, 蛋白2mg/H₂O 0.3mlを250mg尿素, 0.15mlリン酸緩衝液pH8.2を加え20~30分室温で変性させた後, 0.25ml dimethyl formide および0.1mlのDNS-Cl溶液(DNS-Cl 10mg/ml acetonitrile)を加え室温で2時間Dansyl化させ, 10mlの10% TCAで反応をとめ3000 rpm 10分遠心し沈渣をさらに1N HClおよびacetoneで2回洗い充分乾燥させた後沸騰HCl 5.7N 0.5mlを加えガラス管に真空封入し110℃, 4時間分解した。その後HClを乾燥させ, Thin layer chromatography(silica gel G)によって2次元展開し, 標準DNS-amino acidとの移動度を比較した。展開溶媒にはJ. P. Zanettaらの方法[1](1次元: toluene - pyrisine - acetate = 150 : 50 : 3.5 v/v/v, 2次元: toluene - chloroform - ethanol - 25% ammonia = 100 : 80 : 6.7 v/v/v)を用いた。

6) 抗重抗体反応; 精製された蛋白数mgをFreund complete adjuvant(ヤトロン製)と共に兎に注射し10~20日に抗体価の上昇を確めた上で, 血清を採取した。これを抗体として Ouchterlony 寒天内沈降反応[3]を行った。

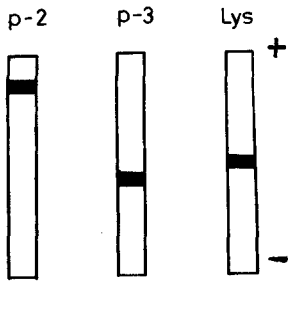
7) Myelinの精製; Laatsch らの方法[4]を改良した方法を用いた。新鮮な牛末梢神経組織の湿重量の10倍量のpH 7.0 0.8M蔗糖液中で, Teflon homogenizerでhomogenizeした後三重のガーゼで沪過した均一な沪液を分画に用いた。試料を含む0.8M蔗糖液にpH 7.0, 0.32M蔗糖液を重層して, 55,000g 60分遠心し中間層を0.8M蔗糖液に再懸濁してさらにもう一度重層遠心を行い, 中間層をとり蔗糖液を0.24Mに濃度に希釈して, 10,000g 10分遠心し, ミクロソームの混在を除いた沈渣を脱イオン水中でhypoosmotic shockを0℃ 20分かけた後10,000g 10分遠心し沈渣をMyelinとした。

Fig-1



8) Myelinの細分画; 分離精製されたMyelinをpH 6.9 冷0.1M CH_3COONH_4中で30分撹拌し, 105,000g 60分遠心して混在物を除き, その沈渣について, a) 0.1% Na-deoxycholate(DOC), b) 0.5% DOC, c) 0.5% Triton X-100, d) 0.5% Triton X-100 + 0.5M CH_3COONH_4,[1] e) 0.1% Na-dodecylsulfate(SDS), f) 0.5% SDS溶液中で30分撹拌後105,000g 60分遠心により上清と沈渣に分け細分画を行った。蛋白定量の測定にはLowry法[5]によった。

Fig-2



実験結果および考察

1) 塩基性蛋白の精製; 牛末梢神経組織をアセトン処理後HCl抽出遠心し上清を透析濃縮し, 試料をDisc電気泳動にかけると卵白Lysozymeに対するRf 1.07および0.30の

2つの main Band が認められた。牛脊髄の同様処理した試料からは Rf 0.60 を示すものが main Band で，これは EAE（実験的アレルギー性脳脊髄炎）蛋白に相当すると考えられる。牛末梢神経組織の HCl 抽出液を CM cellulose column にかけ充分 0.05 M 酢酸ナトリウム液 pH 4.6 で洗った後に，0.7 M NaCl で stepwise に蛋白を溶出透析濃縮後，Sephadex G-75 column (1.5×85cm) にかけて，0.05 M 酢酸ナトリウム液で溶出すると (Fig-1) の様な pattern が得られた。以下溶出量 66 ml 中心の peak を p-2，溶出量 83 ml 中心の peak を p-3 と示す。p-2 および p-3 はこの column でそれぞれ 1.7 と 2.2 の V_e/V_o を示した。Reisfeld 系 Disc 電気泳動では p-2 は Rf 0.30，p-3 は Rf 1.07 を示す単一な Band と認められた。(Fig-2)

2) 精製塩基性蛋白の性質；

a) アミノ酸組成分析；p-2 蛋白および p-3 蛋白のアミノ酸組成分析の結果を Tab-1 に示した。p-2 蛋白および p-3 蛋白の酸性アミノ酸はそれぞれ 19.95 moles% および 19.62 moles% で，塩基性アミノ酸はそれぞれ 16.20 moles% および 18.92 moles% であり Acidic / Basic 比は 1.23 と 1.04 であった。p-2 蛋白は Glu, Asp, Leu, Lys, Cys が多く，p-3 蛋白は Asp, Lys, Thr, Val が多かった。p-3 蛋白は既にわれわれが豚末梢神経より抽出した塩基性蛋白[9]に類似しており，この type の蛋白は高等動物に共通して末梢神経に存在するものと考えられた。b) 分子量の測定；p-2 および p-3 の2つの異った蛋白について SDS を含む Disc 電気泳動を行い分子量を求めた。(Fig-3) その結果 p-2 蛋白はほぼ 58,000，p-3 はほぼ 13,500 と以前を得た。c) 蛋白 N 末端の分析；精製された p-2 蛋白および p-3 蛋白を Dansyl 化と，分解後2次元薄層クロマトによってそれぞれの N 末端の分析を行ったところそれぞれ単一の強い蛍光スポットを検出し Rf 測定により共に Arg として確認された。(Fig-4)

d) 免疫学的検索；p-2 蛋白を兎に注射して得られた抗体について寒天ゲル内沈降反応を行ってその特異性を検討した。この抗体は，

Tab-1

Amino acid \ Sample	Bp2	p3
Asp	9.69	11.69
Thr	6.33	8.91
Ser	5.75	6.89
Glu	10.26	7.93
Pro	5.01	3.44
Gly	3.99	7.42
Ala	7.73	4.43
Cys	8.20	2.04
Val	6.66	8.22

Amino acid \ Sample	p2	p3
Met	0.55	0.81
Ileu	3.21	5.45
Leu	8.75	7.65
Tyr	2.93	1.68
Phe	4.81	3.96
Try	0.59	1.33
Lys	8.39	11.50
His	3.52	1.70
Arg	4.31	5.72
NH_3	7.77	9.33

Fig-3

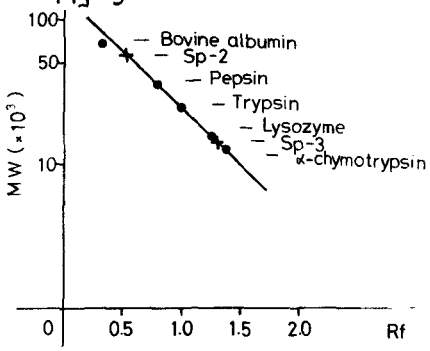


Fig-4 (p-2)

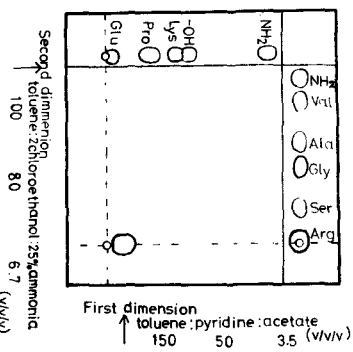
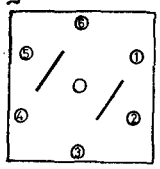
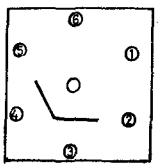


Fig-5

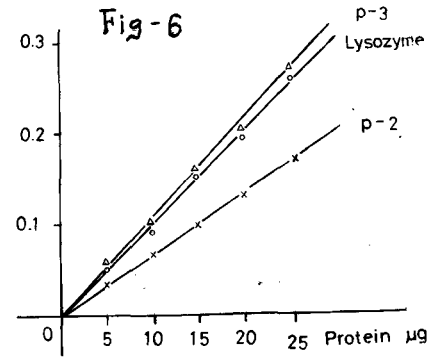


				Protein μg
1	Pig	SC	BP	20.0
2		PN	p-2	1.4
3			p-3	7.5
4	Bov.	SC	BP	10.0
5		PN	p-2	2.4
6			p-3	2.8

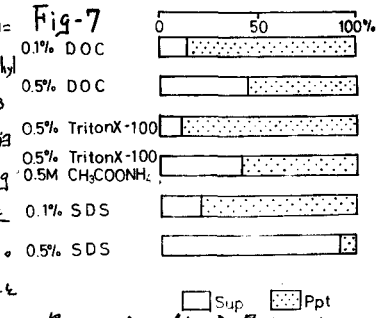


1	Rat	Br.	HCl sup	7.6
2			〃	15.6
3		PN	〃	4.7
4			〃	9.2
5		Kid.	〃	4.3
6		Liv.	〃	8.9

牛および豚の末梢神経のp-2蛋白と交叉反応するが，それぞれのp-3蛋白および豚の脊髄のEAE蛋白とは反応を示さなかった。このことはp-2蛋白は牛および豚に共通した構造をもち，p-3蛋白およびEAE蛋白とは異るものであることを示した。また Ratの全脳，末梢神経，腎臓，肝臓の酸抽出液との反応では，末梢神経のみに反応を示し，この蛋白は他臓器に比べて，末梢神経にかなり特異的に存在することが明らかとなった。(Fig-5)



3) 塩基性蛋白の定量とその局在：牛末梢神経より精製された p-2および p-3蛋白を定量的に Disc電気泳動に Applyし泳動した後，染色脱色した後，それぞれの染色 Bandを Dimethyl sulfoxideにより抽出比色して，その定量曲線を得た。(Fig-6) p-3蛋白は Lysozyme蛋白とほぼ等しい比色を呈するが，p-2蛋白は発色度がそれらよりやや低い。いづれの場合にも少くとも25μgまでは直線的であり，これによりこれらの蛋白を定量的に測定しうる。末梢神経 myelinを HCl抽出すると34.2%の蛋白が抽出される。この抽出液について透析濃縮して，Disc電気泳動法より定量すると p-2・p-3蛋白は抽出液のそれぞれ5.0%，8.8%を占める。即ち p-2蛋白は myelin全蛋白のほぼ2%，p-3蛋白はほぼ28.6%を占めることが明らかとなった。また 0.1M CH_3COONH_4 に抽出される蛋白を myelinに contamするものとして除外すると[1]，残りの myelinの構造蛋白の p-2は 1.0%を占め，p-3は 26.0%占めることが明らかとなった。このことより p-3蛋白は末梢神経 myelinの構成蛋白であり，p-2蛋白は myelin蛋白でないと考えられる。



4) 末梢神経 myelin蛋白の可溶化：分離精製された myelinの 0.1M CH_3COONH_4 処理の沈渣蛋白について可溶化を試みた。0.5% Triton液では残りの myelin蛋白の9%，0.5% Triton+0.5M CH_3COONH_4 液[1]では41%，0.1% DOCでは11%，0.5% DOCでは44%さらに 0.1% SDSでは20%，0.5%では80%がそれぞれ 100,000×60分上清となった。(Fig-7) これらの可溶化された分画を Reisfeld系の Disc電気泳動にかけ，定量した結果，0.5% Triton+0.5M CH_3COONH_4 抽出および 0.5% DOC抽出では，透析後 p-3蛋白はほぼ定量的に遊離されていることが明らかとなった。0.5% SDS抽出では 90%が可溶化されるが，SDSを含まない Disc電気泳動 gelには入りにくい。このことは蛋白と SDSの結合が強く，容易に離れにくいことが考えられる。これらの可溶化の方法について更に検討を進めることは，末梢神経 myelinの構成成分の分析，塩基性蛋白と Proteolipidの関係の解明，EAN(実験的アレルギー性神経炎)抗原性蛋白の精製について，有効な手段を与えるものと期待される。

文献：

1) Eng L.F., Chao F. O., Gerstl B., Pratt D., and Tavaststjerna M.G.; Biochemistry, 7, 4455 (1968) 2) Gros C. and Labouesse B.; European.J.Biochem., 7, 463 (1969) 3) Johns E.W.; Biochem.J., 104, 78 (1967) 4) Laatsch M., Kies M.W., Gordon S. and Alvord E.C.; J.Exptl.Med., 115, 777 (1962) 5) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R. J.; J.Biol.Chem., 193, 265 (1951) 6) Reisfeld R.A., Lewis U.J. and Williams D.E.; Nature, 195, 281 (1962) 7) Shapiro A.L., Vinuela E. and Maizel J.V.; Biochem.Biophys. Res.Comm., 28, 815 (1967) 8) 植村，塚田，神経化学；5, suppl. 113 (1966) 9) Uyemura K., Tobari C. and Hirano S.; Biochem.Biophys.Acta, 214, 90 (1970) 10) 植村，戸張，平野；神経化学，9, suppl. 79 (1970) 11) Zanetta J.P., Vincendon G., Mandel P. and Gombos.; J.Chromatog., 51, 441 (1970)

11. 脳特異的S100タンパク質の精製とその性質

礒辺俊明・奥山典生
（都立大・理・化学）

〔要約〕

S100タンパク質を，ウシ脳抽出液より (1)硫安分画 (2)DEAEセファデックス (3)セファデックスG75を用いる簡潔な方法で精製し，その性質について検討を行い以下の結果を得た。(1)精製タンパク質は7.5％ディスク電気泳動，超遠心沈澱で単一であり沈降定数2.2S，沈降平衡法で求めた分子量は16,000であった。(2)アミノ酸組成は酸性および疎水性アミノ酸に富んでいた（Glu+Asp；32％，Leu+Ileu+Val+Phe；29％）。(3)ディスク電気泳動法で均一性について検討し，報告されている不均一性が人為的なものであることを示唆する結果を得た。(4)SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約8,500なる結果を得た。沈降平衡法での測定値16,000との比較から，S100が二量体として存在する可能性を指摘した。(5)S100の紫外吸収スペクトルは異常な形を示し，250～290 mμの領域に7つの吸収極大をもっていた。アミノ酸分析の結果から250～270 mμの微細吸収帯がフェニルアラニンによることが推定された。一方，290 mμ付近の吸収については，トリプトファン以外のインドール様物質の関与が示唆された。(6)ペプチドマップ法により，トリプシン分解ペプチドとして23種類のペプチドを検出した。

現在，脳に特異的なタンパク質が何種類か存在するという事実が集積されつつありそれらの生理機能を知ることが，脳の機能を理解するための一つの手がかりとなるのではないかと考えられている。

S100タンパク質は，それらの脳特異タンパク質の一つであって，その神経系内，あるいは細胞内分布，構造，機能等についての報告，考察はすでに数多くなされている。しかし，これらの報告の結果は，必ずしも一致しているとはいえない。

特に，S100タンパク質自身の同定法を含めたcharacterization，分子量，不均一性などについて種々な結果が得られていることは，これらの報告相互の結果の関連の解釈を通じて，その構造－機能を考察することを困難にしているように思われる。

我々は以上の観点から，まずS100タンパク質の精製法を簡略化し，その方法により，多量の精製S100タンパク質を得た。この試料について諸性質を調べ，S100タンパク質がいくつかの特徴的な性質を有することを明らかにしたので報告する。

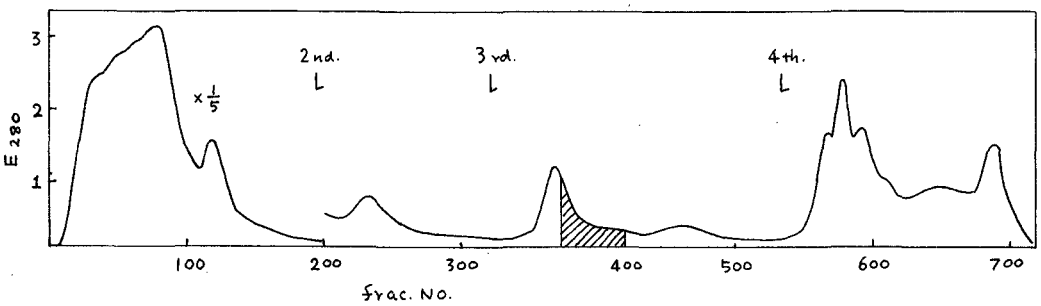
実験結果

1. S100タンパク質の精製

ウシ脳20コ（約8Kg）を生理的食塩水で洗浄したのち，4倍容の0.1Mリン酸カリウム緩衝液，pH 7.1（2.66M硫安および1mM EDTAを含む）とともに，ミキサー中でホモゲナイズした。ホモゲネートは，10,000×g，30分間遠心し，得られた上清1lにつき硫安を258g加えるとともに，溶液のpHを4.7に調節してタンパク質を塩析した（硫安85％飽和に相当）。これに，約2倍容の0.1Mリン酸カリウム緩衝液，pH 7.1（0.05M食塩および1mM EDTAを含む）を加え（硫安約50

%飽和に相当）不溶物を遠心除去した。得られた上清は，上記のリン酸カリウム－食塩－EDTA緩衝液に対して透析したのち，DEAEセファデックスに添加し，段階的溶離法で分画した。溶離図を図1に示す。

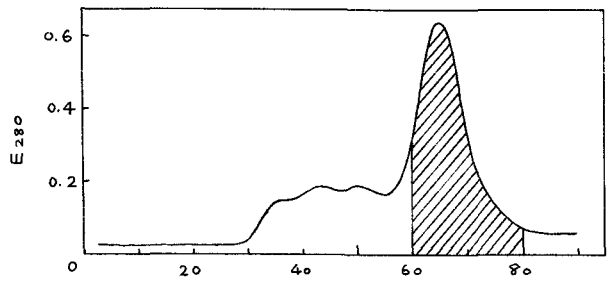
図1．DEAEセファデックスカラムクロマトグラフィー



buffer 1st.：0.1M K.P.B.＋0.1M NaCl ＋1mM EDTA（pH 7.1）
2nd.：〃 ＋0.17M 〃 ＋ 〃 （ 〃 ）
3rd.：〃 ＋0.22M 〃 ＋ 〃 （ 〃 ）
4th.：〃 ＋0.40M 〃 ＋ 〃 （ 〃 ）

0.1Mリン酸緩衝液－0.22M食塩－1mM EDTAでカラムボリュームの位置よりやや遅れて溶離される画分を（斜線）硫安法で濃縮後，さらにセファデックスG75で分画して精製S100タンパク質を得た（図2）。本法により得られたS100タンパク質量は約400 mgであった。

図2．セファデックスG75ゲルクロマトグラフィー



この標品は，超遠心沈澱法で対称に拡散する単一ピークを示し，沈降定数2.2S，沈降平衡法による分子量は16,000でUyemuraらの結果（1）とほぼ一致していた。

2．アミノ酸組成

表1に精製S100タンパク質のアミノ酸組成を示した。酸性アミノ酸および疎水性アミノ酸を特徴的に多く含み，Asp，Glu，Val，Leu，Pheの5アミノ酸が全アミノ酸の約57％を占めていた。

表1　アミノ酸組成

Amino Acid.	molar %	moles/mole S100	Amino Acid.	molar %	moles/mole S100
Lys	9.7	13.9	Ala	6.7	9.6
His	5.0	7.1	Cys/2	0.8 (1.8)*	1.1 (2.6)*
Arg	0.8	1.1	Val	7.9	11.3
Asp	9.9	14.1	Met	3.0	4.3
Thr	3.3	4.7	Ileu	4.3	6.1
Ser	4.3	6.1	Leu	9.6	13.7
Glu	22.4	31.4	Tyr	1.2	1.7
Gly	5.0	7.1	Phe	7.0	10.0

（ ）* システイン酸として定量した。

3．ディスク電気泳動

3-1. 均一性の検討

精製タンパク質は7.5%ディスク電気泳動でBPB位置に一致する単一バンドであった。

さらにその均一性を確認するため15%ディスク電気泳動を行うと2ないし3本あるいはそれ以上のバンドが出現し，Uyemuraら(2)によって報告されているS100の不均一性を支持しているように思われた。しかし，より詳細な検討を行うと，そのバンドの数は添加するタンパク質量に依存し（図3），各バンドを再電気泳動すると各々が再び複数バンドを与え，それらの間にパターンの差が認められなかった。さらに，この複数バンドは，タンパク質を過ギ酸々化することによって消失した（図4－a）。あるいはUrea，グアニジン処理によっても，一旦複数バンドは消失するが，長期間保存すると，会合体と考えられる多数のバンドが再び出現した（図4－b）。

図3. 濃度依存性

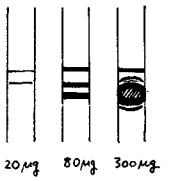
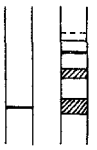
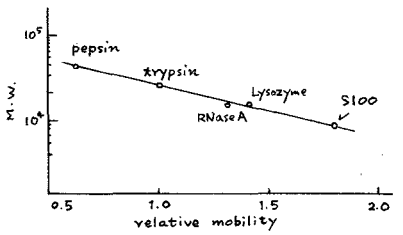


図4.



以上の結果より考察すると，報告されているS100の不均一性は，(i)ディスク電気泳動における multiple spot (ii)調製中のタンパク質の変性とそれに伴う会合などによる人為的なものであると考えられる。

図5. SDS-ゲル電気泳動



3－2. 分子量測定

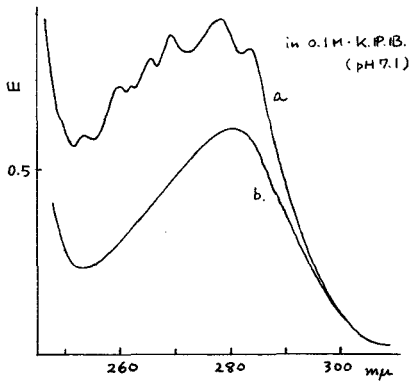
SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により，S100タンパク質の分子量を測定した（3）。（図5） ペプシン，トリプシン，リボヌクレアーゼA，リゾチームの移動度から作成した標準曲線により，S100タンパク質の分子量を計算すると，約8500という値が得られた。また，この値は，系中のβ-メルカプトエタノールの有無にかかわらず一定であった。

沈降平衡法で得られた分子量；16000と比較して考えると，S100タンパク質は，非共有結合性のモノマーあるいはサブユニット2コから形成されている可能性がある。

4．吸収スペクトルについて

S100タンパク質の紫外吸収スペクトルを図6－aに示した。この吸収スペクトルは254, 260, 262.5, 265.5, 269.5, 278.5, 294 mμの各波長に吸収極大，290mμ付近に肩をもつ異常な形をしていた。同時に，S100の後に溶離された精製酸性タンパク質のスペクトルも示したが（図6-b），これは280 mμに吸収極大をもつ一般的なタンパク質のスペクトルを示していた。

図6. 吸収スペクトル



4－1. Phe残基について

アミノ酸分析によれば，S100中には260～280 mμに吸収をもつTyr, Pheが各々2モル，10モル存在

する。この結果に基づいて考えると，Pheの吸収スペクトル全体に対する寄与は非常に大きいはずである。S100の250～270 mμの微細吸収帯はPheのものに2 mμ以内で一致していた。

4－2. Trp残基について

一方，290 mμ付近の肩などはPhe, Tyrのみからは説明できないし，タンパク質を過ギ酸々化すると280 mμ付近の吸収強度が著しく減少してスペクトルの形が大きく変化する。これらのことからS100中にTrpの存在を予想し，DAB法によるTrpの検出を試みた。S100とDABとの反応の呈色液は550 mμ付近に吸収極大をもっていたが，これはN-Acetyl-Trpの場合の600 mμに比べ著しく異なる値である。また吸収強度も1/10以下であった。より直接的なTrpの同定法として，チオグリコール酸共存法(4)によるアミノ酸分析を行ったがTrpは検出されなかった。以上の結果から，S100中にTrpの存在は考えられないか，それに代って290 mμ付近に吸収を示すようなindole様物質の存在を仮定する必要があるように思われた。

4－3. Tyr残基について

吸収スペクトルの解釈，およびS100の構造に関する知見を得るため，TyrのS100中における状態を分光滴定で検討した。滴定曲線より求めたTyrの解離定数は約11.7で極めて異常な値であった。このことはTyr残基がS100中で強い相互作用のもとに存在することを示唆する。この異常Tyrは，一般にタンパク質の高次構造を破壊すると考えられている過ギ酸々化処理を行っても(pK≒10.6)，urea，グアニジン処理しても(pK≒10.6)完全には正常化しなかった。

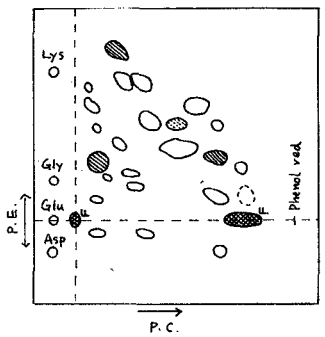
5. N末端について

ダンシル法によるN末端分析を主としてGrosらの方法(5)を用いて行った。本実験条件で，コントロールとしたタカアミラーゼAのN端アラニン，リボヌクレアーゼAのN端リジンが検出された。しかしS100ではα－アミノ基由来と考えられるスポットは全く検出されなかった。また，S100のurea変性時間を延長あるいは酸化S100を試料としたときも同様の結果が得られた。この事実はS100のN末端がblockされていることを示唆する。

6. トリプシン分解・ペプチドマップ(図7)

アミノエチル化したS100をTPCK処理トリプシンで37°C, 6時間分解したのち，ペプチドマップで分画した。分離されたペプチドは約23で，アミノ酸組成から予想される値19と比較的よく一致していた。また原点およびRPhR＝0.7の位置のスポットには蛍光が認められた。これらはEhrlich反応で赤紫色に呈色し，吸収スペクトルから考えられたインドール様物質に関係があるのかもしれない。一方原点に濃いスポットが残ることは，S100中にトリプシンの作用を受け難い構造が存在することを示唆する。

図7. ペプチドマップ



[文献]

1) 植村慶一；蛋白質・核酸・酵素，14,(4), 264,(1969) 2) Uyemura, K., J. Neurochem., 18, 429,(1971) 3) Shapiro, A.L. et al., BBRC., 28,(5), 815,(1967) 4) Matsubara, H. et al., BBRC, 35,(2), 175,(1969) 5) Gros, C. et al., Europ. J. Biochem, 2, 463,(1969)

12. メチル化蛋白質の合成と分解

柿本泰男・三宅正治・中嶋照夫
小西博行　（阪大・医・高次研）

〔要約〕

組織蛋白質にはN^{ε}-モノ、ジおよびトリメチルリシン，N^{G}-モノおよび$N^{G}N^{G}$-および$N^{G}N'^{G}$-ジメチルアルギニンおよび3-メチルヒスチジン残基がふくまれ、これらメチル化蛋白質は自然界の生物蛋白として広く分布している。
(1)脳抽出液をS-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}Cとインキュベートし、メチル化された蛋白質のアミノ酸残基を酸水解後分離し、^{14}C-メチル化された上記アミノ酸が生成されていることを、イオン交換クロマトグラフィー、沪紙クロマトグラフィー、沪紙電気泳動で確認した。(2)メチオニン-メチル-^{14}Cを注射したラット組織を分析すると、蛋白質中のリシンおよびアルギニン残基はメチル化されるが、遊離のリシンやアルギニンはメチル化されないこと、^{14}C-メチル化したリシンおよびアルギニン残基は蛋白中にとりこまれないことから、メチルアミノ酸の合成は蛋白質が直接メチル化されて生ずることを明らかにした。(3)マウスにメチオニン-メチル-^{14}Cを投与し、脳、肝、筋の蛋白質中のメチオニンとメチル化アミノ酸との放射能活性を経時的に測定し、蛋白合成、分解とメチル化の速さを比較した。蛋白合成はメチル化より速かに起こる。しかし分解速度は一致しており、メチル化されたアミノ酸は蛋白質内で脱メチルされることなく、蛋白構成成分として存在し、蛋白分解によって遊離のメチルアミノ酸となり放出されることがわかった。すなわちメチル化は蛋白質の非可逆的修飾である。

われわれはウシ脳蛋白質のアミノ酸残基として、N^{G}-モノ-，$N^{G}N^{G}$および$N^{G}N'^{G}$-ジメチルアルギニンが存在することを、脳蛋白酸水解溶液中からこれらの物質を分離同定することにより証明した。[1] その後組織蛋白水解液を部分精製し、酵素的にリシンおよびアルギニンを除きアミノ酸分析により蛋白中の上の3アミノ酸およびN^{ε}-モノ、ジおよびトリメチルリシンを定量する方法を開発し、[2] 動物の組織内、細胞内蛋白におけるこれらアミノ酸の分布、成長、再生肝における変化をしらべた。[3] その後細菌、植物および動物蛋白中のメチル化アミノ酸の分布を広範に研究し、メチルリシン誘導体は全生物、メチルアルギニン体は真生細菌をのぞく全生物蛋白中に存在することを明らかにした。[4] 細胞内では$N^{G}N^{G}$-ジメチルアルギニンが細胞核の中性蛋白中に、ジメチルリシンがヒストン中に多いという特徴があるが、他の分画にもほとんどすべてのメチルアミノ酸が存在する。最近Eylarらは、[5] われわれの提供した化合物を用いミエリンのA1蛋白中にN^{G}-モノおよび$N^{G}N^{G}$-ジメチルアルギニンを、Reporterら[6] はミオシン中に、従来から知られていたN^{G}-モノおよびトリメチルリシン、3-メチルヒスチジンに加えて、$N^{G}N^{G}$-ジメチルアルギニンの存在を証明した。これらの事実から以上のメチルアミノ酸は予想以上の各種類の蛋白質中に存在することが明らかとなった。

今回の報告ではこれらのメチル化アミノ酸がどのようにして合成されるか、メチル化された蛋白質中のメチル基の代謝的運命、代謝回転などについての実験結果をのべる。

〔実験材料と方法〕

L-メチオニン-メチル-^{14}C (11mC/m mole)およびS-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}C (47 mC/m mole) は New England Nuclear Corp.より、L-リシン-U-^{14}C (200mC/m mole)は第一化学よ

り購入した。リシン脱炭酸酵素は *Bacterium cadaveris* ATCC 9760 より,[7] アルギニンデスイミダーゼは *Streptococcus faecalis* ATCC, 11,420 より[8] 調製した。(菌株は千葉田・柿本氏より種供されました)

蛋白質分画の調製　組織あるいは酵素反応液から10%TCA. アセトン. エーテル不溶性分画を得それを蛋白質分画とした。[1]

蛋白質構成アミノ酸の分画　蛋白質分画を20倍量の6N HCl 中で110°, 18時間水解し、10容量の水でうすめ沪過、沪液を前報[1)2)]に従って処理し、(1)塩基脂肪族アミノ酸分画、(2)イミダゾールアミノ酸分画、(3)中酸性アミノ酸分画にわけた。

メチルリシンおよびアルギニン誘導体の分離　方法1：文献1)2)の条件でアミノ酸分析器にかけカラムからの溶出液を3mlづつ分取。方法2：Amberlite IR-120, NH_4型、200-400メッシュの1.2×25cmカラムを用い0.5Mアンモニアで溶出、3mlづつを分取。

放射能活性の測定　上のアミノ酸の3分画、あるいはカラム溶出液の各1~2mlにBrayの液[9] 10mlを加え、液体シンチレーションカウンターで測定した。

〔結　果〕

1)蛋白質のメチル化アミノ酸の同定　各5gのラット脳および肝の0.1Mリン酸緩衝液可溶分画に2.5μCのS-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}Cを加え37°, 3時間インキュベートし、蛋白分画を水解し、塩基性脂肪族アミノ酸分画を得、リシン脱炭酸酵素ついでアルギニンデスイミダーゼを作用させ、リシンおよびアルギニンから生じたカダベリン、およびシトルリンをAmberlite IR-120を用い除去し、方法1の方法でイオン交換クロマトグラフィーを行なった。図1a. 2aは試料の5/6を用い3ml分画の1mlをとり放射能を測定した結果であり、図1b, 2bは試料の1/6を用いてアミノ酸分析を行なった結果である。6ケの放射能活性ピークがみとめられ、溶出位置から図1a. 2aに示した化合物と推定される。各放射能ピーク毎にプールし、Amberlite IR-120, H^+型で除塩後、沪紙電気泳動および沪紙クロマトグラフィーで合成品と泳動距離、R_F値が推定化合物と一致することを確めた。また3種のメチルアルギニン誘導体はアルカリ水解(条件は文献1))で生ずるメチラミン-^{14}C, ジメチラミン-^{14}Cの同定を行ない推定を確認した。以前Paikおよび Kim[10] の酵素的蛋白メチル化の産物として生ずるメチルアルギニン体の同定は誤まっており、彼等のいう N^G-モノメチルアルギニンは N^G,N^G-および N^G,N'^G-ジメチルアルギ

図1　脳の塩基性脂肪族アミノ酸残基

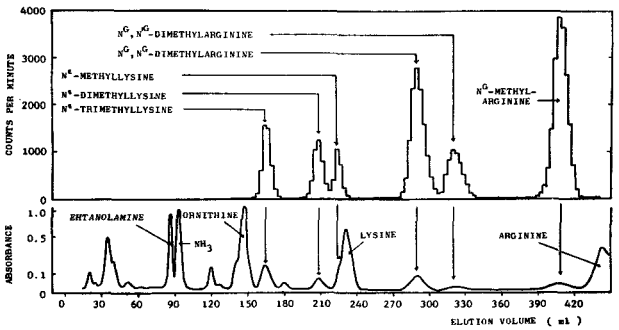
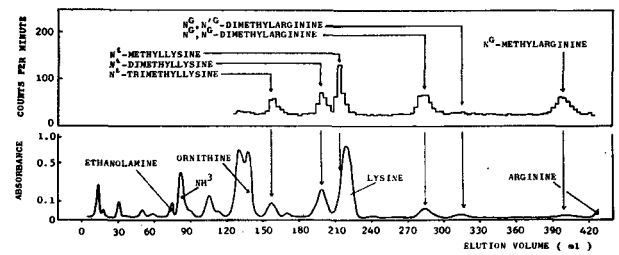


図2　肝臓の塩基性脂肪族アミノ酸残基



ニンの混合物であり、N^{α},N^{G}-ジメチルアルギニンはN^{G}-モノメチルアルギニンであることも彼等の分析条件を用いて明らかにした。

2)蛋白質中のメチルリシンおよびアルギニン誘導体の合成経路

蛋白質のリシンおよびアルギニンのメチル化は①先に合成された蛋白質のリシンおよびアルギニン残基がメチル化されるのか②リシンやアルギニンが先づメチル化されてそれが蛋白質にとりこまれるのか2つの様作が考えられる。組織抽出液にS-アデノシルメチオニンを作用させるとそのメチル基は活潑に蛋白質にとりこまれ、そのメチル基はリシンのN^{ε}、アルギニンのN^{G}に転位されるが、その際反応液の遊離アミノ酸分画には^{14}C-メチルリシンおよびアルギニン誘導体は検出されなかった。ラットにメチオニン-メチル-^{14}Cを注射し、24時間後、脳、肝、筋には表1のようにメチル化が蛋白質分画で見られたが、同臓器の遊離アミノ酸分画には全くリシン、アルギニンのメチル化は見出し得なかった。

表1. 蛋白質アミノ酸へのメチオニンの^{14}C-メチル転移(20μC注射後24時間)
(dpm/mg蛋白)

	脳	肝臓	筋肉
モノメチルリシン	1.3	1.0	2.3
ジメチルリシン	8.6	12.1	6.0
トリメチルリシン	7.6	7.9	12.6
ジメチルアルギニン	15.8	8.9	3.7
モノメチルアルギニン	1.6	5.6	0.0
3-メチルヒスチジン	1.5	3.2	3.7
中酸性アミ酸(メチオニン)	434	700	359

メチル化されたリシンやアルギニンがある種の蛋白に速かにとりこまれ遊離で証明されない可能性も考え、メチオニン-メチル-^{14}Cを注射したマウスの蛋白分画からメチル化リシンおよびアルギニン誘導体をイオン交換クロマトグラフィーおよび酵素を用いて精製し(方法は文献1に準じた)、ラット肝スライスの蛋白中へのインコーポレーションを観察した。スライス1g(8ml Krebs-Ringer-phosphate +1ml 0.1Mグルコース, 37°, 2時間)にとり込まれた各アミノ酸量は表2のようである。これから明らかなようにモノメチルリシンがわずかにとり込まれるが、先にのべた可能性は否定された。したがって蛋白質のメチル化は蛋白質のアミノ酸残基に行なわれることは明らかである。

表2. メチルアミノ酸のラット肝スライスの蛋白中へのとりこみ (mμmoles)

アミノ酸	とりこみ量
リシン*	34.1
モノメチルリシン	4.8
ジメチルリシン	1.2
トリメチルリシン	0.5
ジメチルアルギニン	0.7

*^{14}C-リシンはスライス内リシンのプールと混合するものとして計算

3)蛋白質のin vivoでのメチル化

マウスにL-メチオニン-メチル-^{14}Cを腹腔内に注射し、1および2時間後の臓器内蛋白のメチル化(塩基性脂肪酸アミノ酸分画)および蛋白へのとりこみ(中酸性アミノ酸分画)を見たのが図3である。蛋白合成の方がメチル化より活潑に速かにおこる。蛋白合成およびメチル化酵素活性、S-アデノシルメチオニンの合成速度と代謝回転などが関係しているのであろう。

4)メチル化蛋白質の分解速度

先にのべたように多種類の組織蛋白がメチル化されていること、および次報にのべるように多種類の組織蛋白がメチル化されることから、ある組織蛋白に^{14}C-メチオニンをとりこませ、その蛋白質の分解速度を観察し一方^{14}C-メチオニンによってメチル化されたリシンおよびアルギニン残基をふくむ蛋白質の分解速度を対比させることによ

り、メチル化が可逆的過程か否かを知ることができるはずである。そこでマウスに一匹7.2μCのメチオニン-メチル-^{3}Hを注射し、1, 4, 9, 21日目に殺して脳、肝、筋肉のメチオニンの放射能とメチル化アミノ酸の放射能を比較したのが図4である。図4から明らかなように各組織で4日以後では両アミノ酸群の変化はよく一致し、半減期も一致している。このことはメチル化された蛋白の少くとも大部分は蛋白が分解されるときにメチルアミノ酸として遊離され、メチル化は非可逆的な蛋白修飾であることを意味している。

図3. マウス組織蛋白のメチル化と蛋白合成

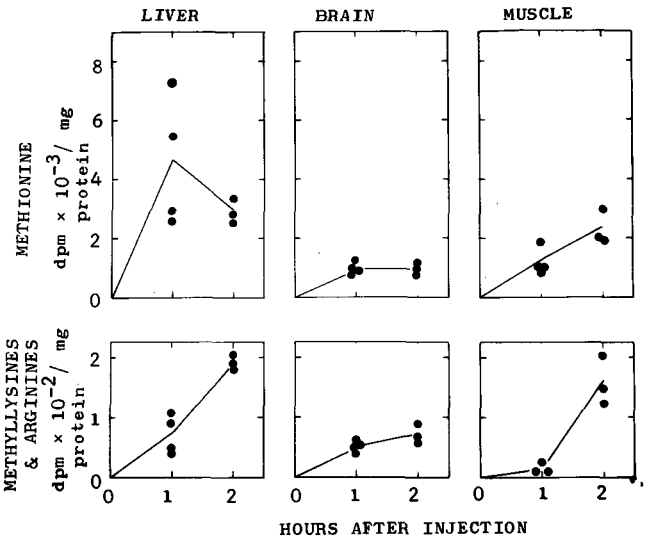
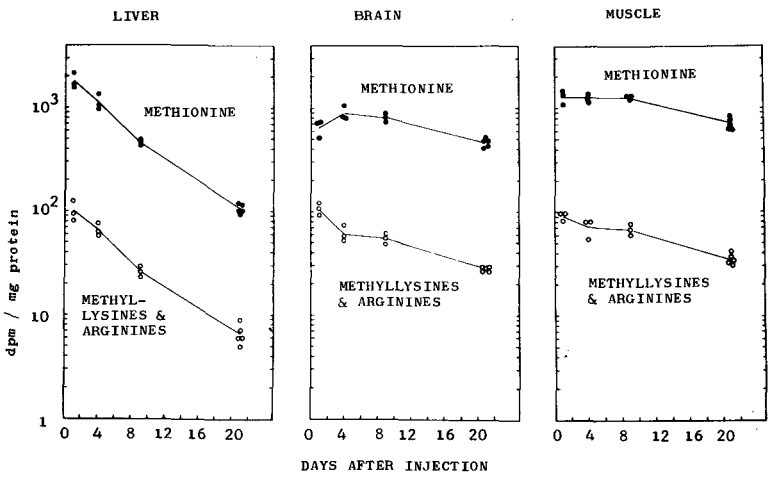


表3. 組織蛋白中3-メチルヒスチジンの放射能 (dpm/mg protein)

注射後	脳	肝	筋
1時間	0.9	0.4	0.7
2時間	1.1	1.5	3.4
1日	1.5	8.4	3.7
4日	1.8	3.5	6.5
9日	1.1	0.5	7.5
21日	0.3	0.1	1.9

図4 マウス組織蛋白の分解とメチル化蛋白の分解



5) 蛋白質内3-メチルヒスチジンの合成分解

3-メチルヒスチジンはミオシン、アクチンの構成アミノ酸であることが知られているが、実験結果[3,4]のマウスの組織蛋白内3-メチルヒスチジンの放射能をイミダゾールアミノ酸分画のイオン交換クロマトグラフィーで測定すると表3のような時間経過をとり変動する。メチル化はリシン、アルギニンよりおそい。その原因は不明である。

[文献] 1) Nakajima, T. Matsuoka, Y., and Kakimoto, Y., Biochim. Biophys. Acta. 230, 212 (1971), 2) Kakimoto, Y., Biochim. Biophys. Acta, 243, 31 (1971) 3) Matsuoka, Y., Nakajima, T., and Kakimoto, Y., 生化学会(1971), 4) Nakajima T., and Matsuoka., 生化学会(1971), 5) Brostoff, S., and Eylar, E.H., Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 765 (1971) 6) Reporter, M., and Corbin, J.L., Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 644 (1971) 7) Soda, K., and Moriguchi, M., Biochem. Biophys. Res. Comm. 34, 34 (1969), 8) Knovett, V.A., Biochem. Preparation, 3, 104 (1953) 9) Bray, G.A., Anal. Biochem. 1, 279 (1960), 10) Paik, W.K., and Kim, S., J. Biol. Chem. 245, 88 (1970)

13. 蛋白質のメチル化酵素

三宅正治・柿本泰男・松岡征夫
（阪大・医・高次研）

〔要約〕

多くの種類の蛋白質のアルギニンおよびリシン残基が酵素的にメチル化され，N^G-モノ，N^G,N^G-および$N^G,N^{G'}$-ジメチルアルギニン，N^ε-モノ，ジ，トリメチルリシンの6種のメチル化アミノ酸が形成される。本研究では，ラットおよびウシ脳のアセトン乾燥粉末の水可溶性分画あるいはその硫安分画を酵素材料として，S-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}Cによる蛋白質のリシンおよびアルギニン残基のメチル化を調べた。1)脳抽出液を用いて，メチル化反応を行ない，蛋白質をクロマトグラフィーで分離すると多くの蛋白質がメチル化された。各分画のリシンおよびアルギニン残基のメチル化は，量的にもまた形成されるメチル化アミノ酸の種類についても異なる。2)脳抽出液中の蛋白質をメチル化してから硫安分画を行い，一方硫安分画を行なって後に，メチル化することによって，メチル化酵素には，少なくとも2種類あることを示した。3)メチル化は，段階的にモノ→ジ→トリメチルアミノ酸へと進行することを，酵素反応を時間的に追跡すること，およびラベルしていないS-アデノシルメチオニンを添加実験することによって，確かめた。4)ラット脳の11,500×g上清から，硫安分画により，A1蛋白とヒストンをメチル化する酵素は，異なることを証明し，さらに両酵素を分離して，それぞれの蛋白質を基質とした場合の至適pH，K_m値等を調べた。

ラットおよびウシ脳内の蛋白質のメチル化を*in vitro*で観察し，基質蛋白およびメチル化酵素の多様性を示し，さらに蛋白中のアルギニンおよびリシン残基が段階的にメチル化されることを示した。さらに従来メチル化は，ヒストンを基質として研究されて来たが[1~3]，メチルアルギニン残基の存在が知られているA1蛋白[4]を用いて，ヒストンのメチル化と比較した。

〔実験方法〕

蛋白のメチル化は，通常S-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}Cと反応させた後，蛋白にとりこまれた放射能を直接カウントすることによって観察されて来たが[1~3]，メチル化アルギニンおよびリシンを含む分画に見いだされる放射能は，蛋白のそれの$\frac{1}{3}$にすぎない。したがって蛋白を直接カウントせず，蛋白を水解し，塩基性アミノ酸分画を得てカウントするか，また必要な場合には，さらにメチル化アミノ酸をイオン交換クロマトグラフィーによって，分離して，メチル化酵素活性を測定する方法を考案した。

1)蛋白質の加水分解液からメチル化アミノ酸の調製

反応液より前報に従って，蛋白分画をとり，その5~50mgを20倍量の6NHCl中で105°18時間水解した。水解液を約10倍の水でうすめ，1×4cmのAmberlite IR-120 H^+型(100~200メッシュ)に通し，30mlの水で洗った後，酸性，中性およびイミダゾールアミノ酸を20%ピリジン60mlで除いた。次に20mlの3Mアンモニアで塩基性アミノ酸分画を溶出した。メチル化酵素活性の測定の場合は，蛋白量，試薬，樹脂を上の約$\frac{1}{10}$にして，アンモニア溶出液を直接液体シンチレーション用バイアルに集めて，そのカウントを測定した。

2)メチル化アミノ酸のイオン交換クロマトグラフィー

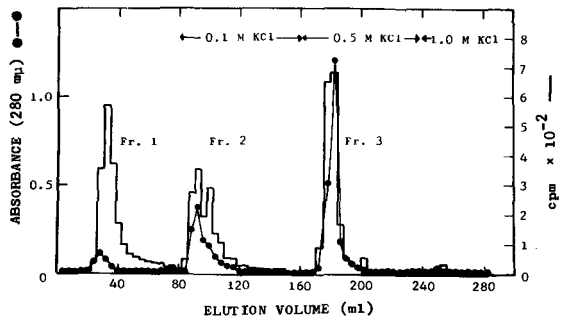
ラット脳を用いた実験では、メチル化アミノ酸は、アミノ酸自動分析器を用い、前報[5]にしたがって分析した（図3）。ラベルされたメチルアミノ酸は、メチルリシンの場合は、1.2×25cm、メチルアルギニンの場合は、1×20cmのAmberlite IR-120, NH_4^+型(100~200メッシュ)を用い、0.5Mアンモニアで展開して分離した。放射能は、溶出液の1~2mlを10mlのBray溶液中で、液体シンチレーションカウンターで測定した。

〔結果および考察〕

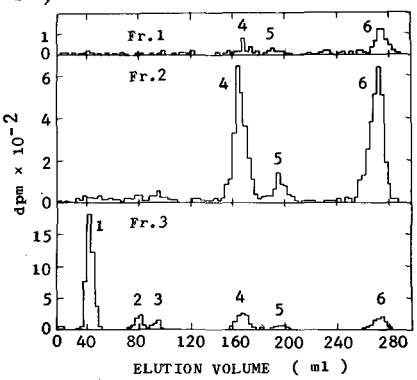
1)ラット脳蛋白質中のアルギニンおよびリシン残基のメチル化

ラット脳(1.5g)の0.1Mリン酸緩衝液,pH7.2抽出液6mlに0.5μCのS-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}C(52mC/mmole)を加えて,37°3時間反応させた。反応液を0.01Mトリス緩衝液,pH7.6に対して透析し、同じ緩衝液で平衡化した2×7cmのDEAE-セルロースカラム上で蛋白質を、KCl濃度を段階的に上昇させることによって溶出した（図1)。すべての蛋白質分画が異った程度にメチル化されている。次に図1の3つの分画の蛋白中のメチル化アミノ酸を先に述べたようにして、アミノ酸自動分析器を用いて、分析した（図2, 1: N^{ε}-ジメチル 2: N^{ε}-モノメチル 3: N^{ε}-トリメチルリシン 4: N^{α}, N^{α}-ジメチル 5: N^{α}, N'^{α}-ジメチル 6: N^{α}-モノメチルアルギニン)。すべての分画において、アルギニン残基は、メチル化されているが、リシン残基は、分画3においてのみ、特異的にメチル化されている。このことは、各蛋白によって、メチル化の様式が異っていることを示している。

(図1) 蛋白質のDEAE-セルロースによるクロマトグラフィー



(図2) メチル化アミノ酸のクロマトグラフィー



2)アルギニン残基とリシン残基のメチル化活性の分離

ウシ脳アセトン乾燥粉末(1.1g)の0.1Mリン酸緩衝液,pH7.2抽出液20mlを2μCのS-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}Cと、37°1時間反応させた後、蛋白を20%以下,20~30,30~40,40~50,50~60,60~70%で沈殿する6分画に分離し、各分画の蛋白中のメチル化アミノ酸を分析した(表1)。^{14}C-メチル基は、硫安低濃度で沈殿する蛋白に多いが、すべての蛋白分画にとりこまれている。このことは、やはり、基質蛋白の多様性を示している。硫安低濃度で沈殿する蛋白では、主にアルギニンがメチル化されるが、リシンは、硫安30%以上で沈殿する蛋白においてメチル化される。次に上

(表1) メチル化後の硫安分画

硫安濃度 %	蛋白量mg	放射能 dpm × 10^{-3} メチルリシン 全	モノメチルリシン	トリメチルリシン	メチルアルギニン 全	モノメチルアルギニン	ジメチルアルギニン
0—20	128	0.00	0.00	0.00	8.16	4.49	3.67
20—30	142	0.03	0.00	0.03	15.92	8.88	7.04
30—40	204	0.52	0.43	0.09	7.84	4.45	3.39
40—50	235	0.48	0.41	0.07	4.71	3.55	1.16
50—60	146	0.23	0.00	0.23	1.84	1.40	0.42
60—70	348	0.19	0.00	0.19	0.46	0.38	0.08

(表2) 硫安分画後のメチル化

硫安濃度%	蛋白量mg	放射能 dpm × 10^{-3}					
		メチルリシン			メチルアルギニン		
		全	モノメチルリシン	トリメチルリシン	全	モノメチルアルギニン	ジメチルアルギニン
0–30	12.1	0.12	0.12	0.00	12.67	7.68	4.99
30–40	10.8	0.27	0.27	0.00	1.17	0.61	0.56
40–50	5.7	0.44	0.31	0.13	0.53	0.24	0.29
50–70	15.1	1.03	0.29	0.74	0.24	0.09	0.15

図3 蛋白質のDEAE-セルロースによるクロマトグラフィー

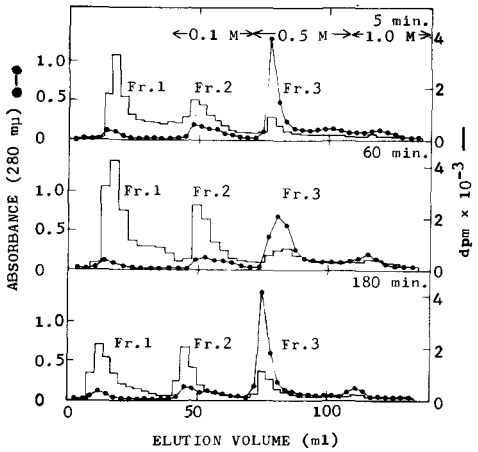


図4 メチル化アルギニンの時間経過

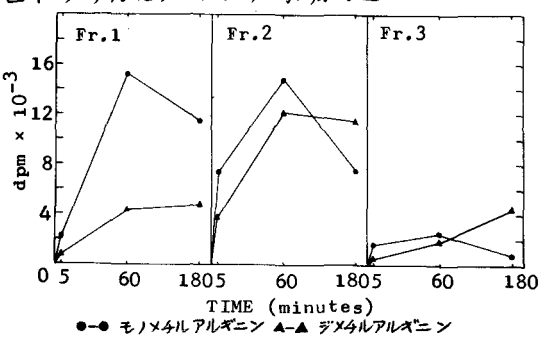
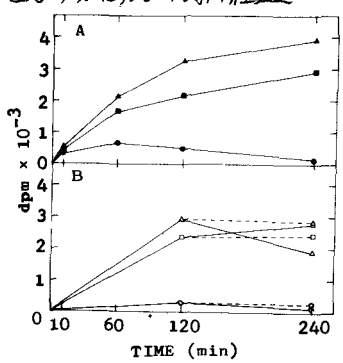


図5 メチル化リシンの時間経過



の抽出液を先に硫安分画しメチル化を観察した。硫安30%以下,30~40,40~50,50~70%の4分画に分け，各沈殿をS-アデノシルメチオニン-メチル^{14}Cと反応させた(結果表2)。アルギニン残基のメチル化は主に30%以下で沈殿する蛋白分画でおこる。表1の結果と対照すると，50~70%分画では，アルギニン残基がメチル化されているが，メチル化活性は，低い。すなわちアルギニンメチル化酵素は，30%以下に局在する。リシン残基，特にトリメチルリシン形成酵素は，表1,2の比較から，主に50~70%分画に局在している。以上脳抽出液には，少なくとも2つの異ったメチル化酵素が存在する。

3) アルギニンおよびリシン残基のメチル化の時間的経過

硫安40%分画9ml(167mg蛋白)を3分し，それぞれ1.25μcのS-アデノシルメチオニン-メチル^{14}Cと反応させ，5,60分後に等量の飽和硫安を加えて反応を止め，もう1つには，60分後にラベルされていないS-アデノシルメチオニン,5μモルを加えて，さらに2時間反応させた。沈殿を0.01Mトリス緩衝液,pH7.6に対して透析し，DEAE-セルロースでクロマトグラフィー(図3)を行いそれぞれについて，メチル化アミノ酸を分析した(図4)。分画3では，反応が，アルギニン→モノ→ジメチルアルギニンと段階に進むことが明らかに示されている。分画1,2においても3ほど明瞭でないが，同じ傾向が示されている。硫安50~70%分画を用いて，リシン残基のメチル化の時間経過を調べたのが図5である。(●–● モノメチル,▲–▲ ジメチル ■–■ トリメチルリシン) モノメチルリシンは，60分までは増加するが，その後減少し，ラベルされていないメチル供与体を加えるとさらに減少する。ジおよびトリメチルリシンは，増加を続ける (図5A)。次に，120分までS-アデノシルメチオニン-メチル^{14}Cと反応させた後，透析し，ラベルされていないS-アデノシルメチオニンを加えて反応させると，モノおよびジメチルリシンは，減少し，トリメチルリシンは，増加している (図5B)。これらの結果

から，リシン残基のメチル化も段階的に，リシン→モノ→ジ→トリメチルリシンへと起こることを示している。

4) AI蛋白質とヒストンのメチル化

天然にメチルアルギニンを含有している AI蛋白のメチル化[6]を観察することによってメチル化と蛋白質の機能との関係を追求する目的で AI蛋白のメチル化酵素を研究した。この際同じく天然にメチルリシンを含有しているヒストン[7]を対照として用いた。ラット脳の 0.32 M ショ糖(2mM Mg^{2+}含有)ホモジネートの 11,500×g 上清を用いて実験した。この分画は，両蛋白のメチル化活性を有するが，メチル化酵素の基質蛋白を含んでいない。

図6 メチル化酵素の硫安分画

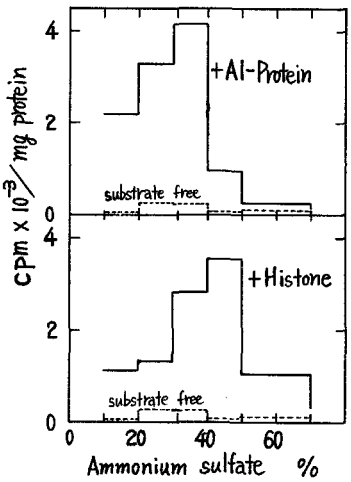


図7 時間経過

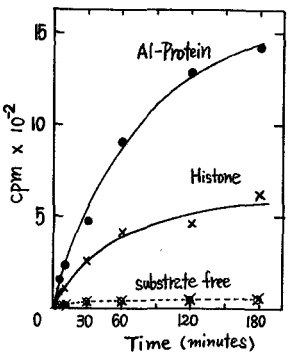
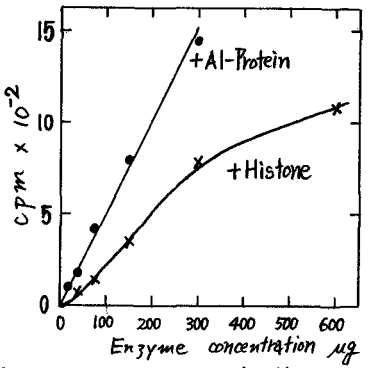


図8 酵素濃度変化



これを硫安分画した後，各分画について AI蛋白とヒストンをそれぞれ基質として S-アデノシルメチオニン-^{14}C-メチル基と反応させ，メチル化活性を調べた (図6)。AI蛋白をメチル化する酵素は，硫安低濃度で，ヒストンメチル化酵素は，高濃度で沈殿する。そこで硫安30%以下分画(約150μg)は，AI蛋白を基質とし，30~70%分画(約297μg)は，ヒストンを基質としてそれぞれ，その時間経過(図7)酵素濃度変化(図8)，基質濃度変化(図9) 至適pH(図10)を調べた。これらの結果から，2つの酵素は明らかに，異った酵素であると思われる。

図9 基質濃度変化

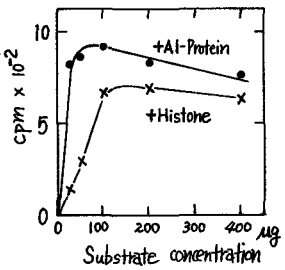
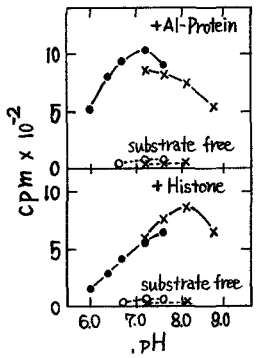


図10 至適pH



[文　献]

1) Kaye, A.M., and Sheratzky, D., Biochim. Biophys. Acta., 190, 527 (1969)
2) Paik, W.K., and Kim, S., Arch. Biochem. Biophys., 134, 632 (1969)
3) Burdon, R.H., Biochim. Biophys. Acta., 232, 371 (1971)
4) Brostoff, S. and Eylar, E.H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 765 (1971)
5) Kakimoto, Y., Biochim. Biophys. Acta., 243, 31 (1971)
6) Baldwin, G.S., and Carnegie, P.R., Science, 171, 579 (1971)
7) Delange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L., and Bonner, J., J. Biol. Chem., 244, 5669 (1969)

14. 初老期，老年期痴呆患者の脳蛋白の変化－とくに神経原線維変化との関係について

播口之朗・西村　健・金子仁郎
（阪大・医・精神）

〔要約〕

前回の報告でアルツハイマー病や老年痴呆では，脳の水溶性蛋白のうち，われわれがB-2, B-4と呼ぶ2種の酸性蛋白が著しく減少していることを示した。今回はこれらの蛋白が痴呆脳で減少する機序を解析しようと試みた。アルツハイマー病及び老年痴呆患者の大脳皮質の水溶性画分をsodium dodecyl sulfate (SDS), β-mercaptoethanol (β-ME)で処理しSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うとB-4が著明に増加する。不溶性画分からも同じ方法で高濃度のB-4が証明される。神経原線維変化を染めるthioflavin Sを不溶性画分に結合させ，その蛍光をmarkerとして蔗糖密度勾配法で分画すると1.4Mの層に強い蛍光を示す画分が得られる。正常対照例ではこの画分を欠く。

この画分をSDS，β-ME処理後SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離すると明瞭にB-4, B-3が証明された。B-4はvinca alkaloidと結合し沈澱することからneurotubule proteinと同定された。B-2はSDS, β-ME処理では回復しないが8M ureaを含む系で電気泳動を行うと回復する。得られた成績からアルツハイマー病，老年痴呆の神経細胞ではneurotubule proteinや他の酸性水溶性蛋白が解離し難い会合体あるいは複合体を形成し，そのために通常の電気泳動上は証明され難くなるものと理解される。さらに水溶性蛋白のこのような状態が組織学的に神経原線維変化として観察されるものと推定した。

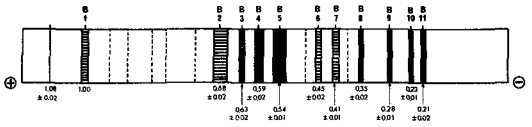
初老期痴呆に属するアルツハイマー病と老年期にみられる老年痴呆ではともに高度な脳の老人性変化が認められる。この老人性変化は大脳萎縮，神経細胞脱落，神経原線維変化，老人斑，顆粒空胞変性などよりなりそれらの形態学的特徴はすでに詳細に明らかにされているが，それらにともなう生化学的変化については未だ僅かしか知られていない。われわれはこれまでにアルツハイマー病や老年痴呆では脳総蛋白量が著しく減少すること，とくに水溶性蛋白のうちポリアクリルアミドゲル電気泳動上でわれわれがB-2, B-4と呼ぶ二種の酸性蛋白が殆ど消失していることなどをみいだし，さらにB-2, B-4についていくつかの性質を明らかにした。今回はB-2, B-4が痴呆患者脳で減少することの意味およびこの変化と病理組織学上の所見との対応関係について検討した結果を報告する。

〔材料および方法〕 1) 人脳材料：痴呆例は臨床的病理組織学的に診断の確定したアルツハイマー病4例と老年痴呆3例であり，いずれも死後3～16時間の剖検脳が用いられた。対照群は死後4～24時間を経過した脳損傷のない9例の正常人剖検脳であり，16才から65才までの青壮年のものが含まれている。 2) 脳蛋白の抽出：人脳組織に湿重量の4倍容の0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)を加えてホモジェナイズする。ホモジネートを4°C, 100.000×g, 30分間遠沈し上清を水溶性画分，沈渣を水不溶性画分とした。 3) 水不溶性画分からの蛋白抽出：1% sodium dodecyl sulfate (SDSと略す)と1% β-mercaptoethanol (β-MEと略す)を含む0.01 M sodium phosphate buffer，或は8 M ureaを含む0.01 M sodium phosphate buffer で水不溶性画分を37°C，1時間

incubateし その上清を 0.1% SDS, 0.1% β-ME を含む 0.01 M sodium phosphate buffer で12時間透析した後に電気泳動に供した。 4) SDS-アクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PA-電気泳動と略す): Shapiro ら[5]の方法に従った。分離ゲル(1.0×12.0 cm)には 5% acrylamide, 0.075% BIS, 0.1% SDS が含まれている。試料蛋白量は 2～4 mg で, Lowry 法により測定した。分離ゲル中を marker の brom phenol blue が 8 cm 泳動された時にゲルをとりだし, amido black 10B で染色し, 10% 酢酸で脱色した。 5). ゲル中の蛋白の分離精製: 前報の方法に従った。 6) Vinblastine と蛋白の結合: 水溶性画分に 1.8×10^{-3} M になるよう vinblastine sulfate を加え, 4°C, 1時間 incubate した。100.000×g, 30分間遠沈ののち沈渣を 0.01 M sodium phosphate buffer に suspend し, 同じ buffer に対して 12時間透析したものに 3)の処理を加えて電気泳動に供した。 7) thioflavin-S と蛋白との結合: 水不溶画分(0.3～0.5 mg dry weight /ml. sodium phosphate buffer)に final 0.02% になるよう thioflavin-S を加え, 37°C, 1時間 incubate した後に遠沈により上清と沈渣に分けた。この沈渣を sodium phosphate buffer で2回洗滌, 遠沈して非結合 thioflavin-S を除去したのちに, 沈渣を 0.32 M sucrose 中に suspend した。 8)蔗糖密度勾配法: 図3に示すような密度勾配をつくり, 7)で得た suspension をこれに重層した。このものを 100.000×g, 1時間遠沈し蛍光を marker として各画分を採取した。

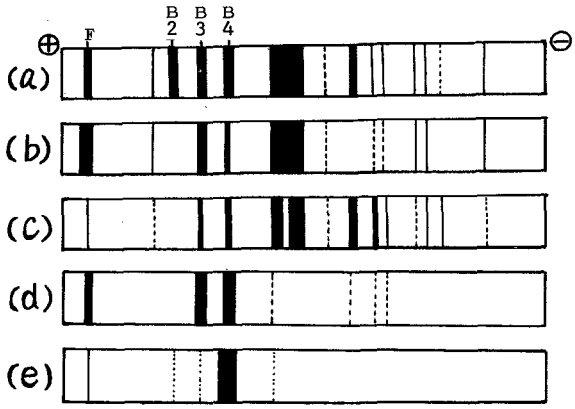
[結果] 1) 痴呆脳での B-2, B-4 の存在様式: 図1に正常青壮年者脳の水溶性蛋白の 7.5% ポリアクリルアミドゲル(PA)電気泳動パターンを示す。アルツハイマー病と老年痴呆では B-2, B-4 が殆ど消失し, B-3 が著減している。これら酸性水溶性蛋白の減少の原因として会合状態の変化, 複合体の形成などを想定し, 上と同じ材料について SDS-PA-電気泳動をおこなった。図2(a)は正常対照のパターンである。B-2, B-3, B-4 は 7.5% PA-電気泳動の際の同名の band に対応する。アルツハイマー病と老年痴呆では図2(b)に示すように B-2 が消失しているが, B-3, B-4 は SDS, β-ME 処理を施さない場合に比して著しく増量している。つぎにアルツハイマー病と老年痴呆の水不溶性画分を SDS, β-ME 処理し 100.000×g, 30分間遠沈後, その上清について SDS-PA-電気泳動を行うと, 図2(c)のように B-3, B-4 が明瞭に認められる。B-2 は SDS, β-ME 処理では回復してこないが一例のアルツハイマー病脳材料を用いた予備実験で, 水不溶性画分から 8M urea を含む 0.01 M sodium phosphate buffer で蛋白を抽出し, 8M urea-PA-電気泳動をおこなうと B-2 とみなされる band が認められる。

図1: 人脳水溶性蛋白の 7.5% アクリルアミドゲル電気泳動パターン



上の結果から B-2, B-3, B-4 は痴呆脳では正常脳とは異る会合体あるいは複合体として存在することが推測されるが, そのような変化が形態学的には神経原線維変化として観察されるのではないかと考え次の実験を行った。蛍光物質である thioflavin-S は神経原線維変化と比較的特異的に結合することが組織化学的に証明されている[4]。そ

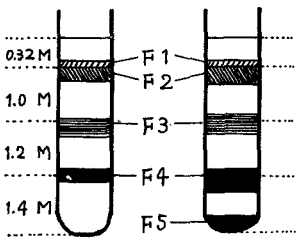
図2. SDS-アクリルアミドゲル電気泳動



こで水不溶性画分に thioflavin-S を結合させ，蔗糖密度勾配法で分画すると図3の如く5層の蛍光を呈する画分に分けられた。蛍光はF4，F5画分で強く，特にF5は対照人脳では得られない痴呆脳に特異的な画分である。このF5をSDS，β-ME処理後，SDS-PA-電気泳動を行うと図2(d)のようにB-3とB-4が特異的高濃度に出現する。F4について同様に電気泳動を行うと痴呆脳ではF5とほぼ同じパターンを示すが対照群ではB-4が痕跡的に認められるのみである。その他の画分ではB-3，B-4は痕跡的であるか，あるいは全く認められなかった。このように神経原線維変化と結合する蛍光物質が多量に存在する画分でのみB-4が高濃度に認められることは，B-4蛋白が神経原線維変化の主要構成々分となっていることを示唆する。

2) B-2, B-3, B-4 と neurotubule 蛋白の関係：アルツハイマー病や老年痴呆の最も重要な病理学的変化は神経原線維変化である。この変化は現在形態学的立場からは，neurotubule からなるという見解が有力である。neurotubule 蛋白が vinca alkaloid と特異的に結合して重合体をつくり沈澱することはよく知られている。そこでB-2，B-3，B-4を多量に含む正常人脳の sodium phosphate buffer 抽出液に vinblastine を加え生じた沈澱について SDS-PA-電気泳動を行うと（図2，e），B-4のみが特異的高濃度にみいだされた。前回報告した分子量，アミノ酸組成の成績とあわせて判断すると，B-4が neurotubule蛋白であることはほぼ確実である。

図3



〔考察〕 脳の老人性変化の中で最も特徴的な所見は神経原線維変化である。Alzheimer が初老期痴呆患者の脳でみいだして以来その成因について多くの説が唱えられてきたが未だ定説はない。最近の電顕による観察では[6]，神経原線維変化は神経細胞内を束状に走る，あるいは無秩序に散在する中約200Åで約800Å毎にねじれを有する管状構造として認められている。正常神経細胞内に存在する外径240Å，内径150Åの管状構造である microtubule（neurotubule）との形態上の近似から神経原線維変化は neurotubule の構造変化によって生ずるものではないかと推測されているが直接の証明はない。今回われわれが得た成績は神経原線維変化の構成々分として neurotubule が含まれている可能性を強く示唆するが，水不溶性画分の SDS，β-ME 処理で B-4 のみならず B-3 も増加することから神経原線維変化は neurotubule のみの単一の要素より成るもの

ではなく複数の要素により構成されている可能性も考慮しなければならない。

またアルツハイマー病患者脳の sodium phosphate buffer 抽出液を SDS, β-ME で処理すると，処理前殆ど認められなかった B-3，B-4 が明瞭に認められるようになるが，これはアルツハイマー病では B-3，B-4 の大部分が正常状態よりも解離し難く且つ SDS，β-ME，urea などで解離されるような形の会合体あるいは複合体として存在することを示唆する。

B-2 については未だ充分検討が進んでいないが，最近 Huneeus ら[2]によって示された neurofilament のアミノ酸組成と B-2 のそれは極めて似ていることから，B-2 は neurofilament に由来するものである可能性が高い。またアルツハイマー病材料を 8 M urea を含む系で電気泳動すると，B-2 とみなされる band が回復することから B-2 も B-3，B-4 同様痴呆脳では異常な会合状態や複合体を形成しているものと推測される。しかし神経原線維変化形成に関与しているか否かはまだ明らかでない。

以上の考察からアルツハイマー病や老年痴呆の神経細胞では neurotubule を主体とする酸性水溶性蛋白が正常脳におけるよりも解離し難い会合体あるいは複合体を形成し，そのために界面活性剤や変性剤を用いない通常の電気泳動では証明され難くなるものと理解される。そしてこのような状態の蛋白が形態学上神経原線維変化として観察されるものと推定される。最近次第に明らかにされつつある neurotubule の axoplasmic transport における機能などの重要性から，neurotubule の性状の変化は老人や痴呆患者の脳機能低下の発現に重要な意義をもつものと考えられる。

〔文献〕

1. 播口之朗，西村　健，市丸精一，金子仁郎，神経化学，8 Suppl., 9 (1969)
2. Huneeus, F.C. & Davison, P.F., J. Mol. Biol., 52, 415 (1970)
3. Marantz, R., Ventilla, M., & Shelanski, M., Science, 165, 498 (1969)
4. Schwarz, P., Kurucz, J., & Kurucz, A., J. Amer. Geriat. Soc., 12, 908 (1964)
5. Shapiro, A.L., Viñuela, E., & Maizel, J.V., Jr., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 815 (1967)
6. Wisniewski, H., Terry, R.D. & Hirano, A., J. Neuropath & Exper. Neurol., XXIX, 163 (1970)

15. 魚脳ガングリオシドについて

石塚稲夫・Wiegandt, H.
(Marburg大学・生化)

〔要約〕

哺乳動物の脳のガングリオシド(G)については，すでに10種類近くの物質が分離されその化学構造も確立されているが，無脊椎動物には報告がなく，魚類についての研究は少ない。われわれは大量のタラ脳から出発し，G画分を得た．これはシリカゲルのTLCでは哺乳動物とは異るパターンを示し，トリシアロガングリオシドよりおそいRfを示す二つのバンドが主成分であった。これらのGをオゾン分解法にてオリゴ糖に導きPPCにて14日展開して，それぞれのオリゴ糖を分離抽出した．これらの中の主成分DesGGNT4およびDesGGNT5はGanglio N-tetraoseにNANAが4個および5個結合したものであるが，その構造決定するためにCholera vibrioのNAseとFowl plague virusのNAseを用いて選択的にNANAを切断するとかGLCにて構成糖成分を定量するとか，PPCにて標準物質と比較するとかの方法を組合わせ，DesGGNT5はGlcの次のGalにNANAが3個結合し，末端のGalに2個ついたものであり，DesGGNT4ではその構造のうち末端のGalにつくNANAが1個少ないものであることを確定した．

哺乳動物脳のガングリオシド(G)については，多くの研究があるが，他の動物脳特に魚類については研究は少ない．ポリシアロG(ここでは一分子中3個以上のノイラミン酸を有するものを指す)については1963年KuhnおよびWiegandtによってGGNT3aおよびGGNT4が記載された．(Gの命名法は(2)を参照) その後Tettamanti ら(3) Ishizuka ら(4) Avrova(5)らによって魚類脳中に主成分として4-5個のシアリン酸を有するGが多いことが報告された。ここではタラ脳Gの組成と構造について発表したい。(GNT=ガングリオーN-テトラオース G=ガングリオシド)

〔抽出〕 1時に魚脳各約300gをC-M(2:1)と共に超音波によって細砕し，フォルチ法の統木による変法(2)により，下層(有機層)と上層(水層)に分け，水層は濃縮後水で透析，非透析成分を凍結乾燥した(4)。抽出物の脂質含有量は表1に示す。

表1 脳組織1gあたりの脂質・脂質リンNANA・粗G量の比較

	ソルビF層 mg/g	脂質リン μmole/g	GNANA μmole/g	粗G mg/g
牛	170.0	63.0	1.97	—
フナ	72.2	39.2	—	32.3
コイ	89.0	38.5	1.23	28.2
タラ	143.0	67.4	0.81	4.5

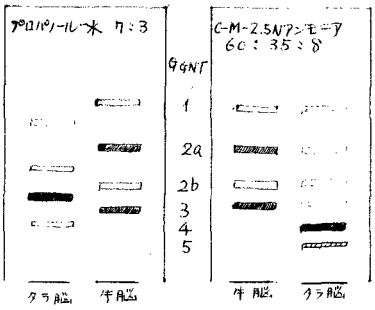


図1. 粗ガングリオシド分画の薄層クロマト
シリカゲルG，発色 Ehrlich 試薬

〔粗G分画〕 シリカゲルTLC上プロパノール－水(7:3)で展開すると，哺乳動物とは異なるパターンを示した。魚GはGGNT2bと3との間に走るバンドが主成分をなす。(図1-a)アルカリ性の展開溶媒で分離すると，魚Gのバンドはトリシアロ4Gよりおそく走る2つのバンドが主成分をなす。(図1-b)

〔8－O－アセチルNANA〕 中性とアルカリ性の溶媒中での挙動のちがいから，魚Gでは SA は主として O-acetyl 化物と予想された。vibrio cholera NAse 分解によって魚粗Gから得られたSAは，8－O－アセチルNANAとPc上で等しく走ること，塩酸ヒドロキシルアミンとアルカリの存在下にアセトヒドロキサメートを作ること，過ヨード酸を消費しないこと等から8－O-acetyl NANAと同定された。Tettamanti，Avrovaらが魚Gより O－アセチルNANAを見出さなかったのは，彼等がアンモニアを含む系を使ってTLCを行なったため O－アセチル基が速やかに切断したものも考えられる。

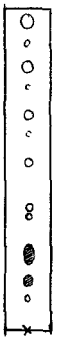
〔Gより糖部分の分離〕

G相互の分離・構造決定はめんめんれば オゾン分解法(6)によってセラミド部分をはずした。この際アルカリにより O－アセチル基も切断される。この様にして得られた neuraminyl oligosaccharide は Desphingo－sinoganglioside とよばれる(略号 DesG) Dowl (アセテート)のカラムにのせ水で溶出して中性糖その他を除いたのち，1.0モルピリジン－アセテート pH4.8で溶出されたDes G 混合物は 0.1 M Na_2CO_3 で中和後 Sephadex G 10のカラムで，塩その他の不純物を除き，Preparative Pc(酢エチ－ピリジン－酢酸－水 5:5:1:4)で 14日展開すると図2の様に分離された。(表2)各スポットより水で Des G ナトリウム塩を抽出した。これらのうち DesGGNT3b, 4 および 5 はこれまで構造が同定されていない。Avrova, Tettamanti らによってこれらポリシアロGは魚，両棲類，はちゅう類に見出されており，またGGNT4は哺乳類脳に微量成分として，報告され，特に小脳に多く(7)，発生学的にも興味が深い。

表2 牛脳および魚脳中のG種による分布比較

G	G含量 n moles/g 組織	
	牛	※
GGNTri	80	—
GGNT1	810	37
GGNT2a	430	12
GGNT2b	858	12
GGNT3a	306	16
GGNT3b	—	9
GGNT4	17※	129
GGNT5	—	15

※ GGNT4は Klenkの人脳たおけるデータによる。



DesG- NANA分布(%)

Lac 1	tr.
GNTri 1	tr.
GNT 1	4.5
Lac 2	tr.
GNT 2a	3.0
GNTri 2	1.8
GNT 2b	2.8
GNT 3a	5.7
GNT 3b	3.1
GNT 4	63.2
GNT 5	9.5
?	2.5

図2. 魚脳 DesG 混合物のペーパークロマトグラム

表3 酸および V. cholerae Neuraminidase 感受性NANAのGalactoseに対する比率

DesG	酸水解後	Neuraminidase分解後
3a+3b	2.00 : 3.03	2.00 : 2.06
4	2.00 : 4.01	2.00 : 2.98
5	2.00 : 5.05	2.00 : 4.13

酸水解条件： 0.075N－H_2SO_4，80°，1時間

Vibrio cholerae Neuraminidase：ca 6 munit /m mole NANA 37°; 48 h.

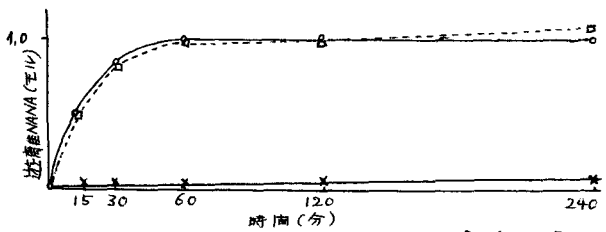
Galactose 定量： β-galactose dehydrogenase (E.C. 1.1.1.48)

まえもって 2/3 N－H_2SO_4 100° 5 h 水解

NANA 定量： Warren 法，DesG3a を標準試料として計算

〔ノイラミニダーゼ分解〕 NAase (3,2,1,18) (Vibrio cholera) では、DesGGNT3a+3b, DesGGNT4および5共にDesGGNT1まで分解された。このことは分解産物のPC, および酸水解とNAse分解後のgal：NANA比の定量(表3)によってたしかめられた。(4) もっとよい条件で(ca, 0.6 m unit/μmole NANA⁻) NAase分解を行なうと、上記すべての物質から、DesGGNT1, 2b, および3がみられた。このさいDesGGNT2aが分解産物として見出されないのはNANA(2→3)gal結合がNANA(2→8)NANA結合よりはるかにNAseにまって切れ易いためと考えられる。この結果DesGGNT3bはtrineuraminosyl ganglio-N-tetraose 3aに対するNANAの結合位置のちがいによるanomer, DesGGNT4およびそれぞれGNTに4個および5個のNANAが結合したものであることが判明した。

図3 FPV Neuraminidase 分解の time course



□---□ DesG3a　○—○ DesGGNT4　×—× DesGGNT5

DesGGNT3aは精製ヒドリの標品、同時にV. cholerae neuraminidase処理をおこなってNANA値を定量比較した。

Vibrio cholerae NAaseと異り、fowl plague virus(FPV)よりのNAaseはNANA(2→3)gal結合のみを選択的に切り、NANA(2→8)NANA結合をほとんど切らない(8) 3'-Neuraminyl lactoseのNANAが100%切れる条件で、DesGGNT1, 2aおよび2bからそれぞれ0%, 54%および8%のNANAが遊離された。Vibrio cholerae NAaseではすでに知られている様に各々0%, 50%, 50%切断される。Vibrio cholerae NAaseに比較してFPV NAaseで切断されるNANA量のtime courseをとったのが図3である。GGNT3a, 4共に1モルの末端NANA(2→3)gal結合を含み、DesGGNT5はNANA(2→8)NANA結合のみが末端にあることが証明された。FPV NAaseで処理したDesGGNT3a+3b分画からは、DesGGNT3aが消失し、DesGGNT4からはDesGGGNT3bおよび痕跡のDesGGNT2bが生成された。これを応用して比較的多量にあるDesGGNT4からpreparative PCによってDesGGNT3bを純粋に得ることができた。

〔ガスクロマトグラフィーによる構成糖分析〕

Clampらの方法(9)によって、メタノリシス-中和-再N-アセチル化したDesG標品をピリジン, TFBSAに室温2時間でTMS化し、4% SE-30のカラムを使って昇温分析をおこなった。(表4)

表4 Desphingosino ganglioside の構成糖モル比

	gal	glc	galNAc	NANA
DesG 3b	1.82	1.00	1.02	2.99
DesG 4	2.00	1.00	0.99	4.10
LNT	1.94	1.00	1.00※	—
GNT	1.98	1.00	1.01	—

※ N-acetyl glucosamine

DesG3aを標準試料としてとり分析値を補正した。LNT(lacto-N-tetraose), GNT(ganglio-N-tetraose)を比較のためにかかげた。Gal = galactose, glc = glucose galNAc = N-acetyl galactosamine.

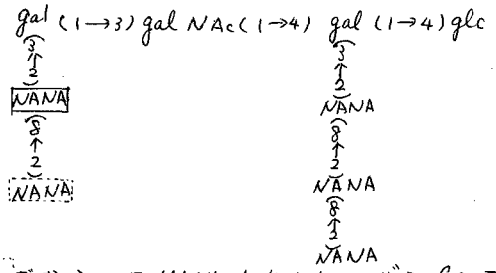
〔部分水解〕 DesG4を 5.6×10^{-3} Mギ酸水溶液で80℃ 15分部分水解後のPCによって、DesGGNT3a, 3b, 2aおよび2bが同定された。このことはDesGGGNT4はその分子中にDesGGGNT3aおよび3bを含むことを示す。この事実は、DesGGNT3aの部分水解によってDesGGNT2aと2bが生成することと同じ意味を持つと

考えられる.

〔推定構造式〕

これらの結果にむじゅんしない構造式としては、右の図のものしか考えられない。(図4) 更に過ヨード酸酸化によって確証を得たいと考えている。

図4. DesGGNT SNANAの推定構造式



〔考察〕

これまで魚、脊椎動物にはGの存在が報告されていない。最も下等な脊椎動物lamprey, rayなど(5)またサメ(6)には哺乳類に微量成分として存在するdisialyl hexosaminyl dihexosyl ceramideが主成分をなしていることが知られている。これらの知見からは一見下等動物脳にはG-NANA量が高い様にみえるが実際は表1.2にみるように、哺乳類に比較して少ない。これまで脳のGとしてはGNT系列の糖を骨格とするもののみが報告されている。肝がこの点では脳に大変よく似ているが、SAは主としてN-glycolgl neuramin酸である。脾、腎、等の臓器からは、Lacto-N-tetraose, Lacto-N-neotetraose等を骨格とするGが主成分をなすことが知られており、臓器によるいちぢるしい特異性と共に、種による特異性(NANA数・SAのちがい)は系統発生的にみて非常に興味のあるところである。

□でかこったNANAを欠くものがDesGGNT4であり、更に□でかこんだNANAを失なったものがDesGGNT3bである。糖の略号は表4と等しい。

〔文献〕

(1) R. Kuhn and H. Wiegandt:Z. Naturforsch. 18b(1963)541
(2) H. Wiegandt:Angew. Chem. Internat ed. 7(1968) 87
ibid. Advance in Lipid Res. in press
(3) G. Tettamanti et al. Rendiconti, Classe de Science (B) 99 (1965)
(4) I. Ishizuka, M. Kloppenburg and H. Wiegandt:BBA 210 (1970) 299
(5) N. F. Avrova:J. Neurochem. 18 (1971) 667
(6) H. Wiegandt and G. Baschang:Z. Naturforsch. 20b (1965) 164
(7) E. Dominick and W. Gielen;Hoppe-Seyl. Z. 349 (1968) 731
(8) R. Dzenieck and A. Gauhe:BBRC 38 (1970) 651
(9) T. Bhatii, R. E. Chambers and J. R. Clamp:BBA 222 (1970) 339
(10) G. Tettamanti and V. Zambotti:Enzymologia 35 (1968) 61
(11) R. Öhman. A. Rosenberg and L. Svennerholm;Biochemistry 9 (1970) 3774
(12) R. K. Yu and R. W. Ledeen:J. Lipid Res. 11 (1970) 506

16. 無脊椎動物神経組織（ganglion，fiber）の脂質構成

駒井裕一・松川恵子・佐武明
（新潟大・脳研・神経化学）

〔要約〕

無脊椎動物の海産腹足類アメフラシと節足動物ザリガニの神経組織をganglionとfilerに分け，各々の脂質を分析し，およそ次の結果を得た。両無脊椎動物ともganglion，filerの主な脂質は燐脂質で，且つホスファチジルコリンがその半分を占め，セレブロシドおよびセレブロシド硫酸エステルを欠いている。ガングリオシドも認められず，代りに薄層クロマト上未知の糖脂質群を認めた。アメフラシ神経組織にのみ未知のグリセロー燐脂質の存在を認めた。これ等の神経組織は髄鞘を欠き，且つ形態的にニューロン性要素の占める比率が高く，分析結果はニューロンの性質を大きく反映していると考える。
ganglionとfilerの脂質構成が多くの点に於てよく似ていると共に，先に報告した豚脳神経細胞体脂質構成とも二三の点を除いてよく似ている。相違点の一つは，これ等無脊椎動物神経系には豚脳神経細胞体と異なり，ガングリオシドを欠くことであって，従来神経細胞膜の構成成分と擬され，且つ，神経興奮のからくりに一役演じていると考えられて来たガングリオシドは少くとも，この無脊椎動物神経系の機能には必要がないということになった。

豚脳幹部から多量かつ，純粋に得た神経細胞体を分析した結果，神経細胞体は脂質構成に於て，燐脂質，特にホスファチジルコリンが主成分で，セレブロシド，及びセレブロシド硫酸エステルが欠如するという特性を持つ事が明らかになった。更に近年，神経組織の機能との関連が示唆されているganglioside の含量は予期に反して脳灰白質の約1/4であった(1)。
又ラット脳小胞体を細分画，分析した結果，粗面小胞体にはganglioside がないことから脳の所謂小胞体のganglioside はplasma membrane に由来することを推考した(2)。
電顕上先に得られた神経細胞体のplasma membrane はその内部構造に比し必ずしも保存がよくないことが多く，細胞体分離の途中，ganglioside を含む膜成分の一部が失なわれた可能性がある。しかし又固定の途中に細胞表面を損傷する可能性も大きい(3,4)。
本実験に於ては，構造が単純で且つその大部分が神経細胞要素で占められるアメフラシ（Aplysia kurodai）およびザリガニ（Cambarus clarki）の2種の無脊椎動物のganglionとfilerの脂質を分析した結果，神経細胞体のそれに似て，燐脂質特にホスファチジルコリンを主成分とし，セレブロシド及びセレブロシド硫酸エステルを欠くこと，神経細胞体と異なりganglioside を全く欠くが，他の新種の糖脂質を含み，アメフラシでは更に新しい燐脂質の存在を認め，その構造を究明中である。

材料および実験方法

I　材料および分離方法

アメフラシは新潟市の海岸より約150匹採取し，ザリガニは関東地方より約100匹購入し使用した。生きた動物からganglionおよびfilerを一緒に摘出し，眼科用ハサミおよ

び小ピンセットを用い，立体顕微鏡(10倍)下で，両者を分離し更に両神経組織の周囲の結合組織を可及的に分離除去した。なお，ザリガニの ganglion の構造はアメフラシのそれに比べて複雑で，fibrous element の若干の混入は避けられなかった。

2. 脂質分析

上記方法で得た両無脊椎動物の ganglia および fibers は Folch らの原法(5)に従い，上，下層分画を繰り返し洗浄した。洗浄後の上層は Visking tube に入れ，蒸留水を外液として氷室(0-4°C)にて頻々外液をかえて，3昼夜透析を行い，乾固した。シアリン酸は NANA を標準として Aminoff の変法(6)，糖は galactose を標準として anthrone 法(7)，スフィンゴシンは Lauter らの方法(8)，グリセロールは Hanahan らの方法(9)，コレステロールは Zak 法(10)，燐は Keenan らの方法(11)を用いた。燐脂質分画は Skipski らの方法(12)に従い，塩基性プレート上，クロロホルム(C)：メタノール(M)：酢酸：水(25：15：4：2 v/v)溶液で展開した後，ホスファチジルエタノールアミン(PE)，ホスファチジルコリン(PC)，ホスファチジルセリン(PS)スフィンゴミエリン(SM)および未知の燐脂質(UP)分画をかき取ったものを用いた。脂酸分析は Svennerholm の方法(13)に従い，20% DEGS on Celite 545上，カラム温度190°Cで gas liquid chromatography を行った。各脂酸エステルの同定は log retention time, internal standard 挿入および mass spectrum による。また不飽和脂酸の同定のためには，水素添加も併用した。総蛋白含量は Lowry らの方法(14)を用いた。

実験結果および考察

アメフラシおよびザリガニらの無脊椎動物は脊椎動物，特に哺乳動物にくらべて神経系が極めて単純で，その構造は ganglion とそれを結ぶ fiber から成り，神経生理学或いは神経薬理学の分野では神経刺激の伝導或いは伝達に関する研究のモデルとして，たびたび用いられているが，神経化学の領域でも細胞要素の生化学的研究の材料として適当なものと思われる。私共はこれ迄，豚脳幹部の神経細胞体の脂質構成について報告してきたが，今回これら無脊椎動物の神経系を細胞体を主成分とする ganglion および主に軸索を含む fiber とに分け，その脂質構成を神経細胞体のそれと比較しながら，特に神経興奮の伝導と伝達とに関連して考察した。先ず，表1に示す如く，総脂質含量および総蛋白含量は両無脊椎動物ともganglion が fiber より若干高く，神経細胞体のそれらに比べると著しい低値を示した。このことは両無脊椎動物からの

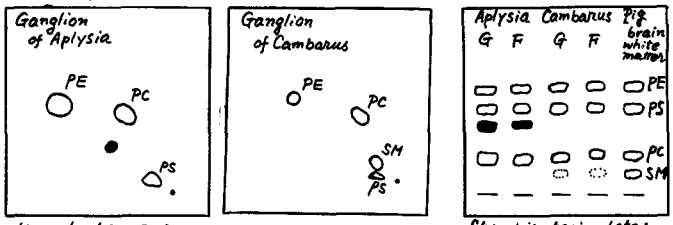
表1

	Aplysia kurodai		Cambarus clarki		Neuronal perikarya
	Ganglion	Fiber	Ganglion	Fiber	
Water-insoluble lipid fraction					
Yield*	20.7	13.0	26.7	19.6	77.6
Cholesterol**	20.3	29.2	22.1	24.5	9.0
Total phospholipids**	71.5	67.7	76.8	65.3	86.7
phosphatidyl ethanolamine***	29.5	35.4	24.2	36.2	33.1
phosphatidyl choline	54.2	46.8	49.4	44.0	54.5
phosphatidyl serine	12.8	12.3	13.6	9.9	10.2
unknown phosphatide	3.5	5.5	not detected		--
sphingomyelin	trace	trace	12.8	9.9	2.2
Glycolipids	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Water-soluble lipid fraction					
Hexose as galactose	1.4	1.3	0.24	0.57	
Sialic acid as NANA****	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1
Total protein*	32.6	28.5	42.6	35.1	165
Lipid/protein	0.63	0.46	0.63	0.56	0.47

*Expressed as mg per g of wet tissue.
**Expressed as per cent of the total lipid content.
***Expressed as mg per cent of the total phospholipids.
****Expressed as mg per g of dry tissue.

標品の水分含量が神経細胞体の入れに比べて多いことに帰因するものと思われる。各脂質ではいづれの組織でも燐脂質が主成分であり，そのうち PC が一番多く，SM と LP を除けば，全組織を通じて各燐脂質含量は，ほぼ同一パターンを示していた。なお，SM はアメフラシでは殆んど認められなかったが，ガリガニでは，ganglion (12.8%) および filer (9.9%) ともかなり高率に認められたが，その本態は未だ明らかにしていない。セレブロシドおよびセレブロシド硫酸エステルに関しては豚脳幹部の神経細胞体で認められないことを報告して来たが，両無脊椎動物の ganglion および filer いづれの組織にも，定量的にも，またTLC（図1）でも全く検出されなかった。このことから，神経細胞要素にはこれらの糖脂質が存在しないことを更に証明し得たものと考えている。これらの糖脂質は髄鞘の主な構成脂質であって，このことはアメフラシの ganglion および filer の電顕的検索で，髄鞘が全く存在しないことと一致する。コレステロール含量は両無脊椎動物とも filer の方が ganglion よりわずかに高値であり，また，神経細胞体の約2倍の高率に存在していた。

図1

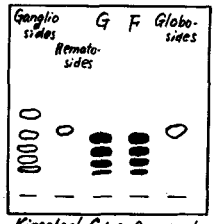


Kieselgel G; I. C-M-28% Ammonia (13-7-1, v/v), II. C-M-Acetone-A.A-H2O (10-2-4-2-1, v/v); Diffmer's R.

Skipski's basic plate; C-M-A.A.-H2O (25:15-4-2, %); Diffmer's R.

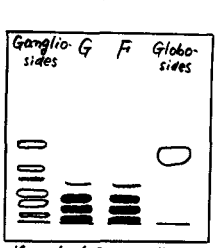
脂質／蛋白比をみると両無脊椎動物とも神経細胞体の入れに近く，但し ganglion が filer より数分高値を示した。以上いづれの無脊椎動物に於いても，各々の ganglion および filer の脂質組成は極めて似たパターンを示し，更には神経細胞体の入れともよく似たものであることが明らかとなった。

図2



Kieselgel G; n-Propanol-H2O (7-3, %); Bial R.

ガングリオシドが定量的〔シアリン酸(−)〕にも，またTLC（図2）でもまったく検出されなかった。そして，シアリン酸を有しない新しい糖脂質の存在がTLC（図2）および糖の定量で認められた。この未知の糖脂質は Folch らの方法(5)に従えば上層分画に回収され，TLC で4分画に分れ，その Rf はガングリオシド各分画とも，又ヘマトシド或はグロボシドとも異なり，Bial 試薬の噴霧では茶色を呈していた。（シアリン酸は赤紫）。生理学上，神経興奮伝導実験に model として用いられている両無脊椎動物の神経系にガングリオシドが存在しない事実は McIlwain (16) の主張や Lehninger (15) の神経細胞膜模式図が，この神経標品には当てはまらないことを意味する。しかしながら高等動物神経系に，ガングリオシドの存在を必要とする，或はガングリオシドの存在により modify される神経興奮伝導伝達様式が存在する可能性は否定出来ない。又両無脊椎動物に認められたガングリオシド以外の糖脂質がガングリオシドに仮想されている役割を果たしている可能性もある。なお，他の無脊椎動物，ゴキブリおよびカタツムリ(17)，イカ(18)の神経系に於いても，ガングリオシドが存在しないという我々の結果を支持する報告もある。アメフラシ



Kieselgel G; C-M-H2O (65-25-4 %); Bial R.

でみられる未知の燐脂質は総燐脂質中燐の比率にして，ganglion で3.5%，fiber で5.5%とわずかに存在し，ganglionより fiberにおしろ多い。TLC（図1.図2）でもアメフラシのみに検出され，塩基性プレートでは Rf が PCと PSの間に位置を占めている。その構造に関しては現在追究中であるが，糖(−)，グリセロール(+)，ニンヒドリン反応(+)，スフィンゴシン(−)，脂肪酸結合部はアルカリで分解され，その組成は表2で示すごとく，$C_{16:0}$ が最も多い。両無脊椎動物燐脂質の脂酸構成は表2で明らかなように，PE はアメフラシでは ganglion，fiber いずれも $C_{18:0}$ が最も多く，次いで $C_{22:2}$ が多い。ザリガニでは ganglion，fiber 両組織とも $C_{18:1}$ が最も多く，その他 $C_{18:0}$，$C_{20:1}$，$C_{22:2}$ が多く，$C_{16:0}$ はアメフラシのそれにくらべて著しく低い。PC はアメフラシでは主として $C_{16:0}$ からなり，$C_{22:2}$ は全く認められないが，ザリガニでは $C_{18:1}$ および $C_{16:0}$ が主体で，$C_{22:2}$ もかなり検出される。PS はアメフラシで ganglion および fiber とも $C_{18:0}$ が大半を占め，次いで $C_{22:2}$，$C_{16:0}$ の順に多く，ザリガニではほぼ $C_{22:2}$ と $C_{18:0}$ から成っていた。ザリガニでみられた SM（0.5%塩酸−メタノール，封管，80°C，4時間 methanolysis）は $C_{22:2}$ が ganglion で45.3%，fiber では76.2%と長鎖の不飽和脂酸で大半が占められていた。このように，同一動物の ganglion と fiber ではよく似た脂酸構成を示すが，アメフラシとザリガニの間では差異を認めた。

表2

Fatty acids (wt. %)

Number of C atoms and double bonds	Aplysia kurodai								Cambarus clarki					
	Ganglion				Fiber				Ganglion			Fiber		
	PE	PC	PS	UP	PE	PC	PS	UP	PE	PC	PS	PE	PC	PS
16 : 0	8.1	47.4	9.5	63.5	11.9	60.9	7.2	51.1	2.4	23.6	0.8	1.9	24.2	0.6
16 : 1	1.4	3.4	—	—	1.1	3.5	—	0.3	0.3	3.3	0.2	0.7	4.5	1.4
18 : 0	23.9	5.0	58.5	14.6	34.0	6.1	59.7	1.5	17.5	5.4	19.3	13.5	4.9	33.7
18 : 1	9.7	9.5	1.0	—	4.1	3.5	1.7	—	22.7	23.7	1.8	23.0	30.3	2.8
18 : 2	0.3	0.8	1.6	—	0.3	—	0.7	—	1.5	2.1	0.3	3.5	3.7	0.5
20 : 0	0.9	—	—	1.6	0.3	—	—	3.0	—	0.4	0.4	0.3	0.4	1.6
20 : 1	7.2	2.0	—	—	4.1	1.5	6.5	—	10.4	9.1	3.4	9.1	7.4	3.7
20 : 2	3.0	—	—	2.2	2.8	—	—	3.1	0.7	1.2	0.6	0.7	1.9	4.8
22 : 2	20.5	—	22.9	13.1	21.3	—	18.2	33.8	22.2	19.2	64.1	12.1	7.8	32.8
Unidentified	25.0	31.9	6.5	5.0	20.1	24.5	7.6	7.2	22.3	12.0	9.1	35.2	14.9	18.1
Saturated	35.1	54.9	70.1	80.9	49.7	70.9	69.1	57.7	20.1	29.5	21.4	15.7	29.9	35.9
Unsaturated	47.7	42.2	28.0	16.6	44.5	28.2	28.2	38.4	57.8	58.6	70.4	49.1	55.6	46.0

（脂肪酸の質量分析は東大医学部植田伸夫博士，山川民夫教授にお願致しました。記して感謝致します。）

——文　献——

1) Y. Tamai, S. Matsukawa, and M. Satake: Brain Res., 26, 149 (1971)
2) 松川恵子，玉井洋一，佐武明，神経化学，9，suppl. 64 (1970)
3) W. Bondareff, H. Hydén, J. Ultrast. Res., 26, 399 (1969)
4) A. Hambergerm H. A. Hansson, and J. Sjostrand, J. Cell Biol., 47, 319 (1970)
5) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane-stanley, J. Biol. Chem., 266, 497 (1957)
6) D. Aminoff, Biochem. J., 81, 384 (1961)
7) T. A. Scott, and E. H. Melvin, Anal. Chem., 25, 1656 (1953)
8) C. J. Lauter and E. G. Trams, J. Lipid Res., 3, 136 (1962)
9) D. J. Hanahan and J. N. Olley, J. Biol. Chem., 231, 813 (1958)
10) B. Zak, Am. J. Clin. Path., 27, 583 (1957)
11) R. W. Keenan, G. Schmidt and T. Tanaka, Anal. Biochem., 23, 555 (1968)
12) V. P. Skipski, R. F. Peterson and M. Barcley, Biochem. J., 90, 374 (1964)
13) L. Svennerholm, J. Lipid Res., 9, 570 (1968)
14) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R, J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1956)
15) A. L. Lehninger, Proc. Natl. Acad. Sci, 60, 1069 (1968)
16) H. McIlwain, Chemical Exploration of the Brain, (Elsevir, Amsterdam, 1963)
17) C. G. Honegger, and T. A. Freyvogel, Helv. Chim. Acta, 46, 2265 (1963)
18) 山川民夫（私信）

17. 幼児型Gaucher病の糖脂質異常代謝について

久保田　勝（信州大・医・2生理）
武　富　保（信州大・順応研・生化）

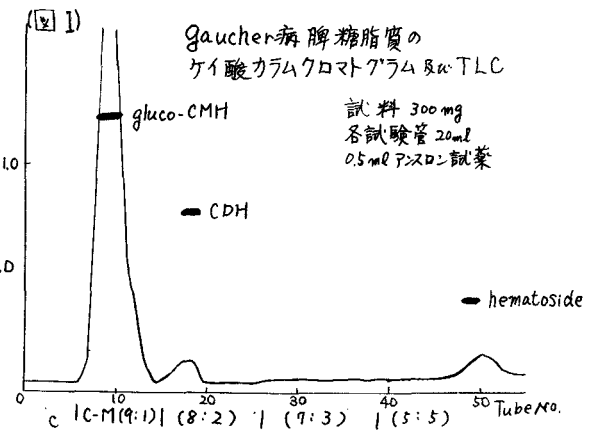
〔要約〕

Gaucher病の幼児型の脳において，Svennerholmら(4)は，glucocerebrosideとhematoside，G_O，G_Iの増加を報告している。一方前回の本学会で武富ら(5)は，脳でglucocerebrosideの異常増加は認めず，ganglioside ではG_IがG_{II}に比べて相対的に増加しており，G_Oは存在しているがわずかであった。そして脾でのglucocerebroside の蓄積重量は肝の約4～5倍量に相当し，網内系臓器の中で主に脾に異常に蓄積することを指摘している。今回私達はgaucher病と診断され脾摘除術を行いその後3ヶ月して死亡した男児(1年7ヶ月)の脳，肝，骨髄，血球そして摘除脾について糖脂質分析を行った。本症例も従来の報告(2,3)のように脾，肝にglucocerebrosideの異常蓄積があり生化学的にgaucher病であることが判った。脳のcerebrosideにおいてkerasineとphrenosineに分けられ，kerasineにglucaseが約16％含むことが判ったがglucocerebrosideの異常蓄積は認められない。gangliosideもG_Oはほとんどなく，G_IとG_{II}の相対量が同年令の脳と比べると若干多くなっていることは前回の報告と一致した。しかし本症例では脾摘除後に代償的に肥大したと思われる肝と摘除脾の両にglucocerebrosideの量は前回の脾摘除をうけない症例に比べて相対的に肝に多いことが判った。又肝脾以外の網内系組織骨髄でもglucocerebrosideの増量が認められた。血球ではgloboside が主成分であった。gaucher病は現在まで網内系の組織のglucosidase の酵素欠損といわれているが脾で処理される血球に由来するgloboside の分解過程における代謝異常とは考え難いことが明らかにされてきた。

実験と結果

（臨床経過及び病理所見）gaucher病の診断で信大小児科に入院，入院時の主要所見としてhepatosplenomegalyと全身のリンパ節腫大を認め，神経学的には発育遅延とケイレンが見られた。その後脾腫が著明になりsplenoectomyを行った。摘除脾の重量は340g。剖検所見は，肝臓は重量810gと非常に大きい(1年7ヶ月の標準として370g)。割面は虎斑状色調で，黄色の強い所では小葉構造は不明瞭であった。全身のリンパ節腫大が見られる。骨髄では暗赤色の中に一部白色調のところがある。脳には肉眼的にも顕微鏡的にも異常所見は見られない。

（実験方法）脳，脾，肝，骨髄，血球はFolchの方法でC-M(2:1%)の20倍量で総脂質を抽出した。脳ではC-M(2:1%)抽出液の1/5量の0.1M KClを加えて上層，下層の2層に分ける。上層は流水中に2日間透析して凍結乾燥を行い粗gangliosideを得た。一方総脂質は，アセトンに溶かしアセトン可溶と不溶にわけ，可溶部分の中性脂質を除いた不溶部分をエーテルに溶かし，リン



（図1）

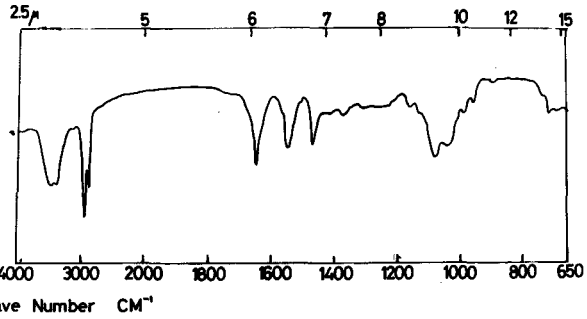
脂質を除き，不溶部分の粗スフィンゴリピドを得た。粗スフィンゴリピドは Mallinckrodt silicic acid と Hyflosupercel (2:1 W/W) でカラムクロマトを行った。カラムの溶出パターンは，アンスロン硫酸で調べ，各ピークの同定には I.R スペクトル，TLC と化学分析を使用した。

粗ガングリオンドは活性化した Kiesel gel H と C-M-W (60:35:8 %) の溶出液によってカラムクロマトを行った。溶出パターンは，アンスロン硫酸で比色した。

(摘除脾) 粗スフィンゴリピドのケイ酸カラムクロマトを行い，C-M で糖脂質を溶出した。図1はアンスロン硫酸による糖脂質の溶出パターンを示す。C-M (9:1) に main fraction があり，このIRスペクトル(図2)とGLCの糖成分(図4A)が glucose より glucocerebroside と同定した。Sphingosine base は C_{18}-sphingosine が大部分であった。脂酸は $C_{16:0}$ (20%), $C_{22:0}$ (22.9%), $C_{24:0}$ (2.2%) $C_{24:1}$ (19.3%) と短鎖と長鎖の脂酸が存在している。又オキシ酸は detect されなかった。glucocerebroside は，粗スフィンゴリピドの約50%を占めた。

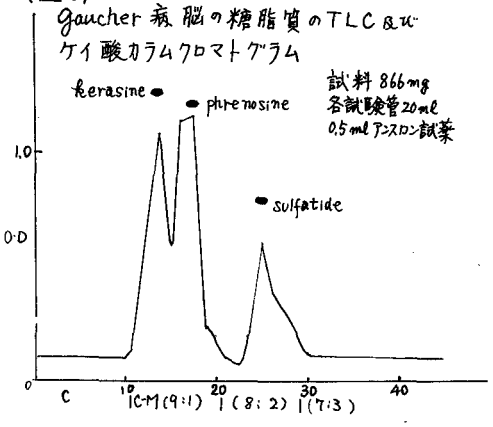
C-M (9:1) の後半に lactosyl ceramide と C-M (5:5) に hematoside が存在した。

(図2) Gaucher病脾 glucocerebroside の I.R スペクトル

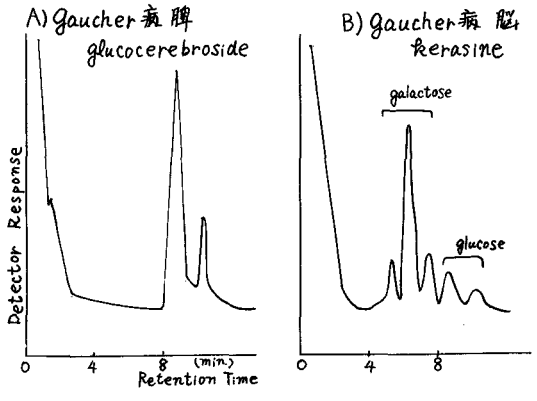


(大脳) 粗スフィンゴリピドはケイ酸カラムクロマトにより cerebroside と sulfatide の2画分に分れた(図3)。これらはリン脂質の contaminate を除くためフロリジルによる再クロマトを行った後，IRスペクトルとTLCで同定した。この cerebroside 画分は2-peak からなり，kerasine と phrenosine より成っていた。この両者の pure な部分を集め糖成分を調べた所，前者では galactose が主構成で glucose が全体の16%程度含まれていた(図4B)。後者の phrenosine は galactose だけ detect された。Svennerholm ら(4)の報告した glucocerebroside の異常蓄積は認められなかった。脂酸は長鎖の直鎖酸が kerasine で，長鎖のオキシ酸が phrenosine で目立った。又 sulfatide は直鎖酸とオキシ酸の存在が認められた。

(図3)



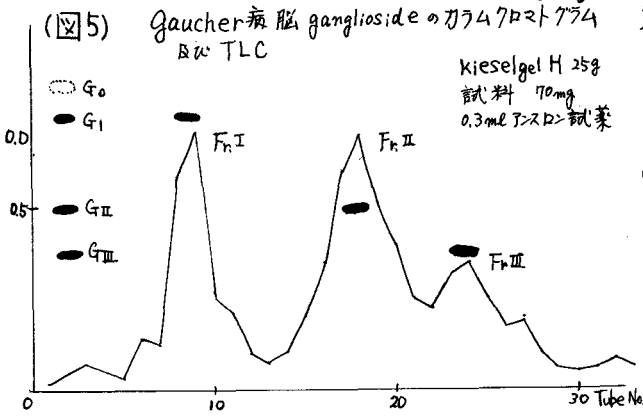
(図4)



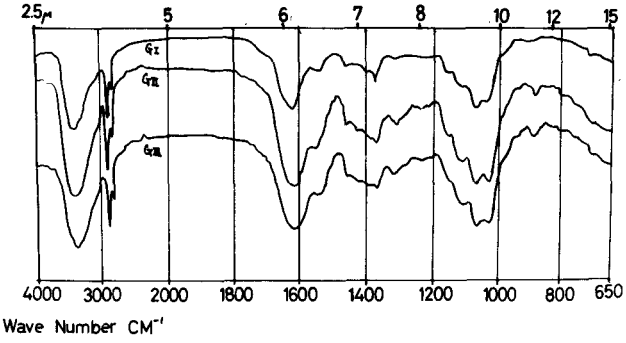
収量は粗スフィンゴリピドに対してcerebroside 46% (kerasine 2.2%, phrenosine 2.4%), sulfatide 10%を得た。透析後凍結乾燥を行った粗ガングリオシドはKieselgel Hを使用してC-M-W(60:35:8%)で溶出した(図5)。溶出パターンよりfraction I, fraction II, fraction IIIに分け，これらをIRスペクトル(図6)TLC(図5)そして箱守の完全メチル化法により同定した。メチル化糖のGLC分析によりfraction Iはmethyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl α,β-galactosideとmethyl 2,3,6-tri-O-methyl α,β-glucosideからなっていた。尚構成糖はgal/glc = 2.0よりGIと同定した。fraction IIはmethyl 2,4,6-trio-methyl α,β galactosideとmethyl 2.3.6-tri-O-methyl α.β-glucosideでgal/glc = 2.2でGIIと同定した。fraction IIIのメチル化糖はfraction Iと同じで，gal/glc = 2.1であったがTLCよりGIIIと同定した。全ガングリオシドに対する各ガングリオシドの含有量は，GI 31.0%, GII 47.4%, GIII 21.6%でGoはほとんど認められなかった。GIIIに比べてGIが同年令脳より大量に含まれていることが判った。脂酸はC16:0が多くGI(93.5%), GII(92.5%), GIII(73.8%)でgangliosideの特徴を示している。

Sphingosine baseはC18-sphingosineが主でC20-sphingosineが20～30%含まれていた。

(図5) Gaucher病脳 ganglioside のカラムクロマトグラム
BW TLC



(図6) Gaucher病脳 ganglioside のIRスペクトル



(肝,骨髄) 脾摘除後に網内系組織で主に働いた臓器の肝は湿重量も810gと肥大していた。粗スフィンゴリピドをカラムクロマトを行い脾(図1)と同様の溶出パターンを得た。

glucocerebrosideは粗スフィンゴリピドの約25%程度で，脾では約50%含有し，脾は肝の大体2倍のglucocerebrosideを含むことが判った。hematosideも同様に溶出された。

骨髄もカラムクロマトグラフィーを行いglucocerebrosideが大量に溶出された。

(血球) 血球については量的には少なかったのでTLCで同定した結果，globosideのcontrolに一致する所に，アンスロン硫酸で糖の発色を見た。又glucocerebrosideの蓄積はなかった。又粗スフィンゴリピドの脂酸分析で，直鎖酸の外にオキシ酸の存在を認めた。

考　察

gaucher病における脳の影響についてglucocerebrosideの異常蓄積とgangliosideのGo,GIの増量に注目して分析を行ったが，GIが相対的に増加しているだけで，前回の

報告とこの点では,ほぼ一致した。ここで私達は,脾肝以外に骨髄と血球について糖脂質分析を行ったが,網内系組織をもつ骨髄にもglucocerebrosideの蓄積があった。血球については,Dawson, Swelley(1)は,ブタにおいて,これら網内系組織を循環する血球の糖脂質の大部分は,血球の分解過程によると報告しているが,血球では糖脂質の異常蓄積はなかった。gaucher病の網内系組織のglucocerebrosideの増加は,hematoside, loctosyl ceramideなどのOligosaccharideをもったsphingolipidsがmonoglucosylceramideまで容易に分解されるがglucosidaseの欠損から分解過程が進まず,glucocerebrosideの沈着がおこるという今までの考え方を3種類の網内系臓器と血球の比較により生化学的に確認した。

脳でkerasineに約16%のglucoseをGLC分析により detectした。このglucoseを含むcerebrosideは,脳のgangliosideが前駆物質になっていると推定され,脳において少ないながらも存在する網内系組織でglucocerebrosideの分解が阻害されて,glucoseの含有量が若干多くなったと考える。果して,このような影響によってgangliosideの分布に若干の変化が見られたのかどうかは問題である。

脾摘除による肝その他の網内系組織の代償作用について,前回の症例と比較した。

	性	年令	脳重量	脾臓	肝臓	gluco-CMHの肝に対する脾の割合
本症例	♀	1年7月	910g	340g	810g	2～3倍
前回例	♀	8ヶ月	205g	240g	505g	4～5倍

年令差が1年もあり比較できない点もあるが,本症例で肝の湿重量が脾に対して,わずかだが多く,又glucocerebrosideの蓄積量も脾摘除後の肝で増加していることが,判った。このことより肝の網内系が脾摘除後3ヶ月間,代償的に作用したと考え,又骨髄でのglucocerebrosideの増加にかゝわらず血球の糖脂質には異常が見られないことから,gaucher病は,全身の網内系疾患であることを再確認した。なほ,リンパ節についても追加検討したい。

文　献

(1) Dawson, G and Sweeley C.C, J. Biol. Chem, 245, 410 (1970)
(2) Makita, A, Suzuki, C, Yosizawa, Z & Konno, T. Tohoku J. exp. Med, 88, 277 (1966)
(3) Suomi, W.D and Agranoff, B.W, J. Lipid Res 6, 211 (1965)
(4) Svennerholm, L. "Inborn Disorders of Sphingolipid Metabolism" p169 (1967)
(5) 武富保, 河村成子　神経化学 9, 68 (1970)

18. 実験的クレチンラット脳の神経化学的研究－特に髄鞘形成障害に関して

辻村良太郎・狩山直之・野村純一
鳩谷龍　（三重大・医・精神）

〔要約〕

今回われわれは実験的クレチンラットにおける髄鞘形成障害過程を脂質の面より検討を加えてみた。

生下時、^{131}I による radiothyroidectomy を行なった Wistar 系ラットおよび正常対照群の各発育段階(10,15,22,30,60日目)の脳より髄鞘を分離して脂質を抽出し、total lipide, total phospholipide, total cholesterol, total glycolipide を定量した。総脂質はアルカリ水解処理後、珪酸カラムクロマトグラフィーを行ない、フロリジルカラム、TLC を組合せて Cerebroside, Sulfatide, Sphingomyelin を分離精製し定量した。各 sphingolipid を methanolysis し脂肪酸は methylester とし、オキシ酸はTMS化してガスクロマトにかけそれぞれの組成を分析した。

Hypothyroidism による髄鞘脂質への影響は全脂質におよび、特に髄鞘形成とその成熟に最も重要な Cerebroside, Sulfatide, Cholesterol への影響が著明で正常対照群の1/3に減少し、active myelination のはじまる時期が正常ラットに比し約1週間遅れ、60日を経過してもその差が parallel のままで正常レベルに戻らなかった。Cerebroside, Sulfatide, Sphingomyelin の脂肪酸組成は対照群、実験群において、発育に伴なう pattern の変化に著明な差は認められず、オキシ酸組成が Hypothyroid rat において very long-chain acid ($C_{24h:0}-C_{26h:1}$) 及び monoenes の相対的増加が対照群に比し判別されているのが特徴的であった。

脳の発育障害に関する研究は極めて重要な課題であるにかかわらず最も遅れた研究分野の一つである。内分泌性脳発達障害の典型としてクレチン症があげられるが、その成因に関しても未だ充分明らかではない。

以前、鳩谷ら[1]は生下時、^{131}I 投与による radiothyroidectomy を行った実験的クレチンラットにおいて電気生理学的にその transcallosal response の発達が著しく遅れ、組織学的にも髄鞘形成障害が顕著であることを認めた。一方、辻村[2]はニワトリ胚の髄鞘形成を追求した実験で、髄鞘形成に最も重要な脂質は Cerebroside, Sulfatide, Sphingomyelin および Cholesterol であり、Sphingolipide の long-chain fatty acids の増加が髄鞘の成熟に本質的な役割を演じていることを報告した。近年、髄鞘が灰白質、白質の脂質構成、脂肪酸組成と異なることが明らかにされているが[3][4]、甲状腺機能低下動物の脳髄鞘の脂質分析を行なった報告はないので、われわれは radiothyroidectomy によるクレチンラットの脳より髄鞘分画を分離し myelin lipids の分析を行ない甲状腺機能低下と髄鞘形成障害の関係をより詳細に検討した。

実験方法

生下時、^{131}I を 150~200 μCi 腹腔内に注射した Wistar 系ラットの生後10, 15, 22, 30, 60日目の各発育段階の脳および正常対照群の脳より植村の方法[5]で髄鞘分画を分離し、Folch 法で脂質を抽出し総脂質を計量し、総リン脂質、総コレステロールを定量した。総脂質を Mäteneon 法[6]に従い、メタノール性 1-N KOH で 37°C 18時間水解処理後、10% HCl で pH 4~6 にしこれを Folch 法[7]に従いクロロホルム／メタノール／水で分配しこの下層を純溶媒上層で、上層を純溶媒下層で振り出しそれぞれの下層をプールして減圧乾固した。この

ものを珪酸カラムにかけクロロホルムおよびクロロホルム：メタノール(98：2, V/V)で中性脂質および水解物を除去しついで充分量のメタノールでcrude sphingolipid fractionを溶出し総糖脂質を定量した。このcrude sphingolipid fractionを珪酸カラムにかけ、溶媒系クロロホルム：メタノール(90：10, 80：20, 70：30, 60：40, 50：50, 40：60, 30：70, 20：80, 0：100, V/V)でクロマトグラフィーを行ないCerebroside, Sulfatide, Sphingomyelinを分離抽出した。Cerebroside, Sulfatide分画はSilica Gel GによるTLCプレートを用い溶媒系クロロホルム：メタノール：水(65：25：4, V/V)で展開し、アンスロン硫酸による発色で確認した。90 C-Mで主としてCerebrosideが80 C-MでSulfatideが溶出されるが、溶媒系の移行部分でCerebroside, Sulfatideが重複している。この重複している部分をプールし上記のTLCで展開し、ヨウ素蒸気で発色させCerebroside, Sulfatideのスポット確認後それぞれに相当する部分をプレートからかき取り、メタノールで溶出しそれぞれの分画にプールして定量を行なった。Sphingomyelin分画はSilica Gel HのTLCプレートを用い溶媒系クロロホルム：メタノール：酢酸：水(50：25：7：3, V/V)で展開しDragendorffによる発色で確認した。50 C-Mから20 C-Mの部分でSphingomyelinが溶出され、それらをプールして定量を行なった。Cerebroside, Sulfatideの各分画にはリン脂質の混入があるのでこれらの分画はさらにフロリシルカラムにかけ混入しているリン脂質を除去した。Cerebroside, Sulfatide, Sphingomyelinの純度はTLCおよびIRで確認した。

分離精製したCerebroside, Sulfatide, Sphingomyelinを塩酸メタノール法でmethanolysisを行ない、石油エーテルで脂肪酸、オキシ酸を抽出し、Cerebroside, SulfatideはSilica Gel GのTLCプレートを用い溶媒系エチールエーテル：ヘキサン(15：85, V/V)で展開しヨウ素蒸気で発色させ、脂肪酸およびオキシ酸のスポット確認後それぞれに相当する部分をプレートからかき取り、メタノールで溶出し脂肪酸メチルエステルは窒素気流中で濃縮してガスクロマト(10% DEGS, Diasolid L, 2 mガラスカラム, 197°C)にかけ脂肪酸組成の分析を行なった。オキシ酸はTMS試薬で処理しTMS誘導体にしてガスクロマト(4% SE-30, Diatoport S, 2.5 mガラスカラム, 220°C)にかけて分析した。同定は標準物質との相対保持時間の比較，水素添加前後のChromatogramの比較により行なった。

TABLE I. BODY AND BRAIN GROWTH IN CONTROL AND HYPOTHYROID RATS

		Age (days) 10	15	22	30	60
Mean body weight (g)	Control	21.67	34.72	53.67	98.63	161.6
	Hypothyroid	20.51	28.05	34.08	52.16	96.5
Mean brain weight (g)	Control	1.17	1.27	1.44	1.55	1.75
	Hypothyroid	1.10	1.16	1.26	1.36	1.54
Number of animals	Control	82	36	32	31	12
	Hypothyroid	223	67	67	58	26

TABLE 2. LIPID CONTENT IN MYELIN FRACTION OF CONTROL AND HYPOTHYROID RAT BRAINS

Lipid content (mg/g fresh wet weight of brain)

		Total Lipids N	Total Lipids H	Total Phospholipids N	Total Phospholipids H	Total Cholesterol N	Total Cholesterol H	Total Glycolipids N	Total Glycolipids H
Age (days)	10	19.96	15.34	14.51	10.46	4.17	3.04	0.50	0.32
	15	33.21	23.46	22.38	16.42	7.00	4.41	1.11	0.56
	22	46.03	29.28	31.05	19.40	10.96	6.34	3.83	1.20
	30	53.33	45.25	34.34	29.73	12.49	9.50	4.64	2.35
	60	63.46	45.69	39.52	31.81	15.79	9.92	5.76	4.29

Distribution within total lipids (%)

		Total Phospholipids N	Total Phospholipids H	Total Cholesterol N	Total Cholesterol H	Total Glycolipids N	Total Glycolipids H
Age (days)	10	72.7	68.2	20.9	19.8	2.5	2.1
	15	67.4	70.0	21.1	18.8	3.3	2.4
	22	67.5	66.2	23.8	21.6	8.3	4.1
	30	64.4	65.7	23.4	21.0	8.7	5.2
	60	62.3	69.6	24.9	21.7	9.1	9.3

N:Control, H:Hypothyroid

結果と考察

体重および脳重量は表1に示したごとく実験群においてその増加が抑制されているが、体重増加の抑制が顕著でありHypothyroidismの影響は発育に伴ない益々強く現われるようである。脳重量への影響はこれに比してそれ程著明ではない。

表2に示したごとく総脂質、総リン脂質、総コレステロールおよび総糖脂質は対

照群、実験群ともに発育に伴いその絶対量は増加するが、相対的割合の増加を示すのは総コレステロールおよび総糖脂質である。Hypothyroidism の Myelin lipids への影響は全脂質におよび、特に髄鞘形成とその成熟に最も重要と考えられるコレステロールと糖脂質への影響が顕著に現われ、糖脂質は正常ラットの1/2に減少している。リン脂質といえど例外でなく Hypothyroidism の影響をまぬがれることはできない。

糖脂質の合成が最も顕著に抑制されるこの所見はクレチンラットの全脳を用いて分析した Walravens[8] らの結果および、先天的髄鞘形成不全を示す "Jimpy" および "Quaking" マウスの全脳について分析した Baumann[9] らおよび Galli[10] らの報告とよく符合している。リン脂質については Cuaron[11] らが家兎の全脳について、Walravens ら[9] がラット全脳について分析を行ない Hypothyroidism によるリン脂質への影響は殆んどないと報告しているが、髄鞘分画について検討したわれわれの結果はリン脂質といえど少なからず影響をうけることを示している。この所見は野村ら[12] によるラット全脳についての分析結果と符合している。

表3に示したごとく Cerebroside, Sulfatide, Sphingomyelin はともに Hypothyroidism の影響をうけ、特に Cerebroside, Sulfatide の合成が顕著に抑制され正常対照群の1/2に減少している。Sphingomyelin はそれ程著明に影響をうけていないが、それでも生後30日目において正常ラットの1/2に減少している。

TABLE 3. SPHINGOLIPID CONTENT IN MYELIN FRACTION OF CONTROL AND HYPOTHYROID RAT BRAINS

Sphingolipid content (mg/g fresh wet weight of brain)

		Cerebrosides		Sulfatides		Sphingomyelins	
		N	H	N	H	N	H
Age (days)	10	0.32	0.25	0.20	0.06	0.24	0.19
	15	0.70	0.40	0.41	0.16	0.69	0.52
	22	3.12	0.99	0.71	0.21	1.10	0.85
	30	3.97	2.03	0.67	0.32	1.09	0.84
	60	4.99	3.52	0.77	0.76	1.12	0.87

N: Control, H: Hypothyroid

TABLE 4. COMPOSITION OF UNSUBSTITUTED FATTY ACIDS IN SPHINGOMYELIN OF BRAIN

Fatty acids	10		15		22		30		60		(Days)
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	
14:0	2.6	0.6	0.7	0.9	—	0.5	0.3	0.3	0.7	tr.	
15:1	0.6	—	—	0.8	—	—	tr.	—	0.4	0.3	
16:0	16.9	4.1	5.4	16.2	3.0	3.2	3.3	4.0	3.1	3.3	
16:1	1.6	tr.	4.8	1.2	tr.	0.5	1.0	tr.	tr.	0.4	
17:0	0.4	—	0.2	tr.	0.6	—	0.5	—	—	—	
17:1	0.9	—	tr.	1.0	—	—	—	—	0.3	0.2	
18:0	56.4	86.7	67.9	65.2	75.5	75.8	67.2	78.5	66.7	71.3	
18:1	8.9	tr.	5.5	6.1	tr.	3.2	5.4	2.2	tr.	3.8	
19:0	0.9	2.3	4.0	1.4	2.5	2.8	4.6	2.0	0.5	2.0	
19:1	0.8	—	—	—	—	—	tr.	0.6	tr.	—	
20:0	1.8	tr.	2.1	1.0	2.9	2.3	3.1	2.4	4.2	3.3	
20:1	0.8	—	—	—	1.4	1.1	0.6	—	tr.	—	
21:0	1.1	—	—	—	tr.	—	tr.	—	tr.	tr.	
22:0	2.2	1.7	2.4	4.1	3.4	2.3	3.7	1.9	5.0	2.8	
22:1	0.1	—	1.9	0.3	0.9	tr.	1.2	1.3	2.6	2.3	
23:0	—	—	—	tr.	tr.	—	tr.	—	tr.	—	
24:0	1.4	0.8	1.2	0.4	2.6	1.1	1.9	2.3	3.8	1.8	
24:1	2.5	1.1	2.9	0.4	7.1	7.2	7.0	4.4	12.7	8.5	
25:0	—	—	—	tr.	tr.	—	tr.	—	tr.	—	
25:1	—	—	1.1	0.7	—	—	tr.	—	tr.	—	
Sum of 210–251	7.3	3.6	9.4	5.9	14.0	10.6	13.8	9.9	24.2	15.4	
Sum of 240–251	3.9	1.9	5.2	1.5	9.7	8.3	8.9	6.7	16.5	10.3	
Monoenes	16.2	1.1	15.1	10.5	9.4	12.1	15.4	8.5	16.0	15.5	

N: Normal control rats. H: Hypothyroid rats
Expressed as percentage of the total unsubstituted fatty acids.

TABLE 5. COMPOSITION OF UNSUBSTITUTED FATTY ACIDS IN CEREBROSIDE OF BRAIN MYELIN

Fatty acids	10		15		22		30		60		(Days)
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	
14:0	0.3	0.5	1.9	0.4	0.6	0.3	—	0.2	0.2	0.2	
15:0	—	—	0.2	—	0.2	—	—	—	—	—	
15:1	0.2	—	0.5	—	0.5	0.2	0.4	—	0.1	—	
16:0	13.7	18.3	10.3	15.1	3.8	3.0	2.8	1.9	2.2	0.8	
16:1	0.6	0.4	3.2	0.6	1.0	0.4	0.3	0.2	0.4	—	
17:0	0.2	0.2	0.7	0.2	0.2	—	0.2	0.1	0.2	—	
17:1	0.3	—	0.4	—	0.6	0.2	—	—	0.1	0.1	
18:0	34.9	36.2	26.5	27.5	23.1	24.9	16.2	14.7	10.5	10.8	
18:1	12.4	11.7	10.5	10.0	1.3	3.1	2.3	2.6	1.9	0.7	
19:0	3.4	1.3	2.6	2.3	3.7	2.8	1.7	2.2	2.9	0.7	
20:0	2.5	3.4	1.6	4.2	3.0	4.8	2.9	4.4	3.5	4.0	
20:1	0.2	0.3	2.1	0.9	0.3	0.7	1.9	0.9	0.8	—	
21:0	0.4	0.2	0.5	0.2	0.2	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	
21:1	0.4	—	0.3	0.2	0.3	—	0.6	0.3	0.2	—	
22:0	6.0	5.1	3.5	4.0	13.6	14.3	11.9	11.2	7.9	8.9	
22:1	1.2	1.8	2.3	2.7	1.2	2.0	2.2	3.6	3.0	2.8	
23:0	0.6	0.2	0.7	0.9	1.1	1.2	1.9	2.6	1.5	2.5	
23:1	—	—	—	—	0.3	—	0.5	0.6	0.3	0.4	
24:0	13.4	15.2	14.5	16.7	19.0	20.9	20.5	21.1	20.5	19.0	
24:1	7.6	6.4	10.0	9.5	20.6	17.0	24.9	23.5	36.2	37.5	
25:0	1.8	0.2	6.8	0.3	1.4	0.8	1.2	1.6	1.1	1.8	
25:1	0.2	—	—	1.3	2.5	0.8	2.3	1.5	1.7	2.1	
26:0	0.7	0.5	1.2	1.0	1.2	0.4	2.0	1.5	1.6	1.1	
26:1	—	—	—	1.9	—	1.7	2.9	2.2	3.2	2.1	
Sum of 210–261	32.3	28.6	39.5	38.8	61.4	59.4	71.3	70.1	77.4	78.7	
Sum of 240–261	23.7	22.3	32.3	30.7	44.7	41.6	53.8	51.5	64.8	63.9	
Monoenes	23.1	20.6	26.3	27.1	26.8	24.3	38.3	35.4	48.0	46.0	
Odd number fatty acids	6.5	1.9	12.4	5.5	11.0	6.3	9.2	10.0	8.3	7.7	

N: Normal control rats. H: Hypothyroid rats.
Expressed as percentage of the total unsubstituted fatty acids.

TABLE 6. COMPOSITION OF UNSUBSTITUTED FATTY ACIDS IN SULFATIDE OF BRAIN MYELIN

Fatty acids	10		15		22		30		60		(Days)
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	
14:0	1.1	0.7	0.4	1.7	0.2	1.1	0.3	1.6	1.3	0.2	
14:1	0.4	—	—	—	—	—	—	0.5	—	—	
15:0	0.4	—	—	0.8	—	—	—	0.4	—	0.3	
15:1	0.5	0.3	0.8	0.6	—	—	—	0.5	—	—	
16:0	12.5	16.1	13.7	15.0	4.9	6.6	5.5	5.2	2.4	3.6	
16:1	3.6	3.1	—	1.9	0.2	0.2	0.4	0.5	0.9	1.2	
17:0	0.2	0.3	—	0.8	—	0.3	—	0.3	—	0.2	
17:1	0.9	0.2	1.1	0.3	0.2	1.5	—	0.3	1.3	—	
18:0	35.9	38.4	26.2	24.8	16.2	12.3	15.2	16.0	15.6	15.4	
18:1	9.1	10.7	6.5	5.9	2.2	3.4	1.7	3.7	7.6	8.1	
19:0	2.1	0.5	2.0	0.4	0.5	0.4	1.0	0.3	0.8	2.3	
19:1	1.0	—	2.9	1.7	0.2	0.3	2.5	—	2.3	0.7	
20:0	0.8	2.4	1.1	1.1	3.4	3.3	0.6	0.8	0.9	0.5	
20:1	—	0.3	0.2	2.4	0.9	0.7	0.4	1.4	0.2	0.4	
21:0	—	—	—	—	0.1	0.3	—	—	—	0.1	
21:1	—	—	—	—	0.2	0.9	—	0.3	—	—	
22:0	7.9	4.6	8.6	1.5	9.9	8.0	10.4	11.4	7.1	10.3	
22:1	1.3	1.9	3.5	1.2	2.1	3.7	4.2	0.7	3.2	4.3	
23:0	0.7	—	0.8	0.5	1.0	1.7	1.4	1.9	1.3	0.7	
23:1	—	—	—	—	0.2	—	0.3	—	0.1	0.5	
24:0	10.5	13.4	14.7	13.2	24.9	29.7	26.5	28.2	20.8	21.0	
24:1	4.5	5.2	10.1	11.8	22.1	21.1	24.4	21.8	25.6	23.7	
25:0	3.1	1.6	0.9	2.7	4.6	1.0	2.6	3.8	2.5	1.4	
25:1	—	—	1.3	—	3.2	—	0.3	—	0.9	0.8	
26:0	0.5	—	2.5	2.0	2.2	2.1	0.9	1.6	1.7	2.6	
26:1	—	—	3.0	—	0.6	1.4	2.2	—	2.3	1.7	
Sum of 210–261	28.5	26.7	48.4	43.0	71.1	69.9	73.2	69.7	66.0	67.1	
Sum of 240–261	18.6	20.2	32.5	29.8	57.6	55.3	56.9	55.4	54.9	51.2	
Monoenes	21.3	21.7	23.4	25.9	32.1	33.2	37.1	29.5	45.2	41.4	
Odd number fatty acids	6.9	2.6	9.8	7.6	10.2	6.4	10.1	7.8	9.2	7.0	

N: Normal control rats. H: Hypothyroid rats
Expressed as percentage of the total unsubstituted fatty acids.

正常ラットにおいて Cerebroside, Sulfatide および Cholesterol の最大増加ピークが15～22日目に存在するが、Hypothyroid rat においてその最大増加ピークが22～30日目に存在する。この所見は正常ラットにおいては active myelination が15日目頃に始まると推定できよう。さらに重要なことは生下時 Hypothyroid の影響をうけたラットは生後60日を経てもなおその影響が続き、正常ラットとの差が parallel のままで決して正常レベルに戻らないことである。

表4に示したごとくSphingomyelinの主要な脂肪酸は対照群、実験群ともに$C_{18:0}$で発育にともなうpatternの変化は全体として少なく、long-chain fatty acidsの相対的増加が対照群および実験群においてともに認められるが、Hypothyroid ratでその相対的増加が対照群に比して抑制されているのが特徴的である。

表5および表6に示したごとく、Cerebroside、Sulfatideの脂肪酸組成は対照群、実験群ともに発育に伴い著明な変化を示し、全体としてlong-chain fatty acidおよびmonoenesの相対的増加が顕著である。対照群、実験群ともに主要な脂肪酸は$C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$, $C_{24:1}$であり発育に伴なうpatternの変化に有意の差は殆んど認められないが、唯発育の初期においてHypothyroid ratのmonoenesおよびodd-number fatty acidsが対照群と比較して相対的に減少している傾向が認められる。これらの所見はdesaturation enzyme syetemおよびodd-number acids synthesis syetemが発育の初期においてHypothyroidismにより障害されていることを意味するかもしれない。

TABLE 7. COMPOSITION OF α-HYDROXY FATTY ACIDS IN CEREBROSIDE OF BRAIN MYELIN

Fatty acids	10		15		22		30		60		(Days)
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	
18h:0	3.0	3.1	1.5	1.9	1.8	2.4	0.8	2.0	1.3	0.9	
18h:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
19h:0	1.4	0.5	2.0	0.3	0.2	0.7	0.2	1.5	tr.	0.2	
19h:1	0.3	0.6	2.1	0.4	0.2	0.1	tr.	1.5	tr.	–	
20h:0	7.2	5.7	8.3	3.7	2.9	3.9	2.1	3.4	1.7	3.0	
20h:1	0.6	0.2	–	–	0.3	–	tr.	–	tr.	–	
21h:0	2.4	0.9	2.7	0.5	0.6	1.6	0.5	0.8	0.2	0.6	
21h:1	1.2	3.8	1.6	3.3	0.8	1.9	0.3	0.4	0.9	1.0	
22h:0	29.3	31.4	16.3	30.3	26.9	28.9	19.9	26.1	19.6	23.6	
22h:1	0.6	1.4	0.2	0.5	tr.	–	0.2	0.3	tr.	0.4	
23h:0	4.5	3.8	8.2	4.4	5.3	6.7	6.7	6.1	4.3	8.1	
23h:1	0.8	0.6	0.2	0.4	0.5	–	0.3	0.2	0.1	1.1	
24h:0	40.3	41.7	40.9	50.3	46.4	44.3	46.2	42.7	39.1	49.3	
24h:1	1.8	3.7	1.6	0.8	10.1	5.4	17.9	13.5	27.8	4.3	
25h:0	0.9	0.8	6.1	3.1	1.4	1.1	1.4	–	0.8	2.5	
25h:1	–	–	–	–	–	–	tr.	0.4	–	–	
26h:0	5.6	1.8	8.2	–	2.6	1.5	1.5	0.9	2.0	2.0	
26h:1	–	–	–	–	–	1.5	2.5	0.1	2.2	2.9	
Sum of 21h:0–26h:1	87.5	89.9	86.0	93.6	94.6	92.8	97.3	91.5	97.0	96.8	
Sum of 24h:0–26h:1	48.6	47.9	56.7	54.3	60.5	53.7	69.5	57.6	71.9	61.0	
Monoenes	5.3	10.4	5.8	5.4	11.8	9.0	21.2	16.5	31.1	9.7	

N : Normal control rats. H : Hypothyroid rats.
Expressed as percentage of the total α-hydroxy fatty acids.

TABLE 8. COMPOSITION OF α-HYDROXY FATTY ACIDS IN SULFATIDE OF BRAIN MYELIN

Fatty acids	10		15		22		30		60		(Days)
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	
18h:0	8.0	9.5	3.2	5.0	1.9	3.6	1.3	1.3	1.5	1.4	
19h:0	1.2	1.2	0.3	0.3	1.2	2.2	0.3	0.3	0.6	0.5	
19h:1	3.1	3.7	0.4	0.2	0.8	tr.	0.9	0.2	–	0.3	
20h:0	16.8	20.4	3.4	5.7	4.2	8.7	2.2	4.1	1.4	4.7	
20h:1	0.4	0.5	0.5	–	0.9	1.9	0.4	tr.	0.4	–	
21h:0	2.5	1.8	2.8	2.6	1.5	2.0	0.3	2.8	1.1	1.3	
21h:1	1.0	1.0	0.6	1.0	2.7	4.2	1.0	1.0	0.4	1.4	
22h:0	20.1	18.5	30.1	31.2	21.1	18.9	20.1	21.0	18.4	19.7	
22h:1	2.8	3.0	1.9	1.6	4.1	0.4	3.0	4.3	0.6	0.2	
23h:0	4.5	3.9	5.1	4.5	4.1	6.7	5.2	8.6	4.0	7.4	
23h:1	–	–	0.3	–	tr.	0.5	0.6	0.2	0.2	0.2	
24h:0	29.7	26.3	41.4	42.4	42.1	39.8	45.1	44.2	46.7	52.4	
24h:1	5.8	5.2	6.2	5.6	5.9	1.9	13.0	10.6	16.3	2.1	
25h:0	2.1	1.1	2.1	tr.	3.7	6.8	2.9	0.9	3.5	3.0	
25h:1	–	–	0.4	–	0.6	0.5	1.3	–	1.3	–	
26h:0	1.9	4.0	1.4	tr.	2.9	1.9	1.9	0.4	1.5	0.4	
26h:1	–	–	tr.	–	2.3	–	0.5	–	2.1	4.9	
Sum of 21h:0–26h:1	70.5	64.8	92.1	88.8	90.9	83.5	95.0	94.0	95.6	93.1	
Sum of 24h:0–26h:1	39.5	36.5	51.4	48.0	57.5	50.8	64.7	56.1	71.5	62.9	
Monoenes	13.0	13.3	10.0	8.4	17.2	9.4	20.7	16.3	21.4	9.2	

N : Normal control rats
H : Hypothyroid rats
Expressed as percentage of the total α-hydroxy fatty acids.

表7、表8に示したごとくCerebroside, Sulfatideのオキシ酸組成は対照群、実験群ともに発育に伴ない著明な変化を示し、全体としてvery long-chain acids($C_{24h:0}$–$C_{26h:1}$)の相対的増加が顕著である。対照群、実験群ともに主要なオキシ酸は$C_{22h:0}$, $C_{24h:0}$, $C_{24h:1}$であり発育に伴ないよく似たpatternの変化を示すが、Hypothyroid ratにおいてvery long-chain acidおよびmonoenesの相対的増加が対照群に比し抑制されている。

Ställberg-Stenhagen ら[13]が脱髄を示す人脳のSphingomyelinの脂肪酸組成について、Baumann ら[9]が先天的髄鞘形成不全を示す"Quaking"マウスの全脳の脂肪酸組成について分析し、Sphingomyelinおよび Cerebroside, Sulfatideのlong-chain fatty acidが著明に減少すると報告している。今回われわれの結果はこれらの報告と異なり脂肪酸のchain elongation syetemは殆んど障害をうけずlong-chain fatty acidsが出現し、発育とともにその割合が増加するのが認められ、発育の初期において、monoenes, odd-number acidsの合成が抑制され、オキシ酸のvery long-chain acidおよびmonoenesの相対的減少が特徴的であった。この所見は甲状腺機能低下に由来するクレチン症が脱髄性疾患はもとより、先天的髄鞘形成不全を示す"Gimpy"および"Quaking"マウスの病態と本質的に異なることを示しているのかもしれない。

文献

1) Hatotani, N. and Timiras, Paola, S.Neuroendocri., **2**: 147, 1967. 2) Tsujimura, R. J. Embry. exp. Morph. (in press). 3) O'Brien, G.S. and Sampson, E.L. J. Lipid Res., **6**: 537, 1965. 4) O'Brien, G.S. and Sampson, E.L. J. Lipid Res., **6**: 545, 1965. 5) 植村：神経研究の進歩, **9**: 121, 1966. 6) Matenson, E.: Biochim. Biophys. Acta., **116**: 296, 1966. 7) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H.: J. Biol. Chem., **226**: 497, 1957. 8) Walravens, P. and Chase, H.P.,: J. Neurochem., **16**: 1477, 1969. 9) Baumann, N.A., Gacque. C.M., European J. Biochem., **4**: 340, 1968. 10) Galli, C. and Re Cecconi Galli, D.: Nature, **220**: 165, 1968. 11) Cuaron, A., Gamble, J., Myant, N.B. and Osorio, C.: J. Physiol., **168**: 613, 1963. 12) 野村，永井，森，塚田：神経化学, **8**: 56, 1969. 13) Ställberg-Stenhagen, S. and Svennerholm, L. J. Lipid Res., **6**: 146, 1965.

19. ミエリン欠損マウス（Jimpy および Quaking）の脳の 2′, 3′－cyclic nucleotide 3′－phosphohydrolase 活性

栗原　正（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要約〕

脳の 2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′-Phosphohydrolase（CNP）活性について，Jimpy，Quaking およびそれぞれの正常な対照マウスを比較した。両変異マウスの脳CNP活性は対照のそれに比較して著しく減少していた。活性の減少は Quaking よりも Jimpy の方により はげしく，変異マウスのミエリン欠損度に対応していた。発生生長過程における CNP 活性の推移から，Jimpy の脳では生後15日までに，Quaking の脳では21日にミエリン形成が停止すると推定した。

同様の活性減少は両変異マウスの脊髄にも見られた。しかし坐骨神経には差がなかった。

次に，Jimpy および年令の対応する正常な対照マウスの脳からそれぞれミエリンを精製し，精製の各段階でCNPを測定した。Jimpy から精製したミエリンは形態的同定が困難であったが，CNPの比活性は正常マウスの脳から出発した場合と同様精製が進むにつれて増加した。しかし Jimpy の場合精製ミエリンに回収されたCNP活性はわずか14%で，正常マウスの脳から出発した場合の43%に比し著しく低かった。

ミエリンは酵素的に不活性であると最近まで一般に信じられていた(1)。しかしながら，2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′-Phosphohydrolase（CNP）が中枢神経系では主にミエリンに存在することを示す証拠が現在累積しつつある（2,3,6-11,14,17,18）。CNPが中枢神経系に強い酵素であることは以前から知られていた(4)。筆者らはCNPが中枢神経系のとくに白質に強いこと，そして脳 homogenate を分画すると主にミエリン画分に活性が回収されることを発見した(7)。筆者らは更にCNP活性が発生生長過程においてミエリンとパラレルに増加することを示した(8)。のちに Olafson ら(18)も同様の知見を得た。Banik and Davison (3) は3つの標識酵素を用いて脳 homogenate を分画し，CNP のみが特異的にミエリン画分に回収されることを示した。本研究*(9-11)は，CNPとミエリンとの密接な関係を示す証拠を更に得る目的で，ミエリン欠損変異マウス（Jimpy および Quaking）(19) を用いてCNPを測定したものである。

実験材料および実験方法

変異マウス　Jimpy は X 染色体にある劣性致死遺伝子 jp による変異で♂にのみ現われる。Jimpy の遺伝子型は jp/Y である。Quaking は劣型的な劣性遺伝子 qk による変異で，遺伝子型は qk/qk である。両変異マウスとも中枢神経系全体にわたってミエリンが極めて少ない。ほとんどすべての軸索には正常な染色性を示すミエリンが断片的に形成されている。灰白質および白質の一般的な構築は正常である。ミエリンの欠損はミエリン形成期のごくはじめから明らかであり，ミエリンが破壊されるのではなく，

---

*本研究は筆者がフランス国立科学研究センター神経化学研究所の P. Mandel 教授のもとで行ったもので，J. L. Nussbaum 博士との共同研究である。

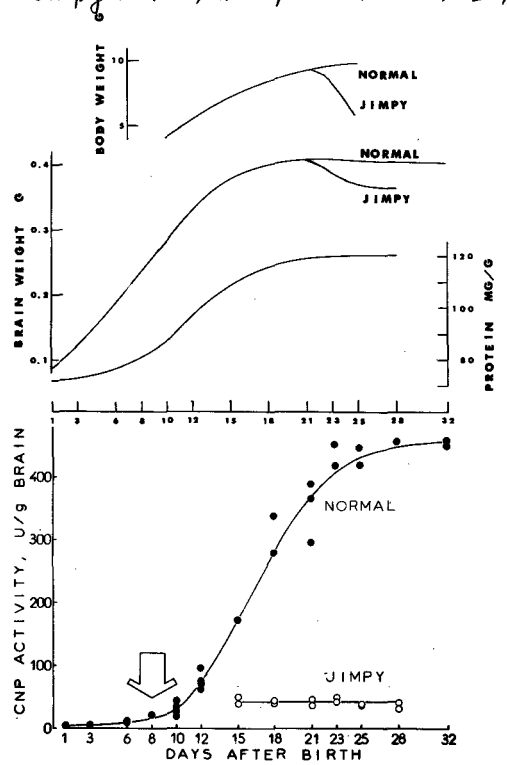
ミエリン形成が妨げられると見られる。Quaking よりJimpyの方がはげしいミエリン欠損を示し，Quakingが数カ月生きながらえるのに対し，Jimpyは30日以内に死んでしまう。変異マウスはJackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, U.S.A.) から得たもので，Centre de Neurochimie du C.N.R.S. (Strasbourg, France) において3年以上繁殖させ続けた。実験に供した動物はJimpy (jp/Y)，対照として同じstrainの正常の♂(+/Y)，Quaking (qk/qk)，対照として同じstrainの外見上正常なマウス(+/+又は+/qk)である。

ミエリンの精製　Jimpy 22匹およびほぼ年令の対応する正常なマウス17匹の脳からそれぞれ図3の方法でミエリンを精製した。

CNPおよびタンパクの測定　CNPはKurihara and Tsukada (7)の方法で測定した。ただし酵素の活性化には音波処理の代りにsodium deoxycholate処理を用いた。deoxycholate処理の手順は次の通りである。脳homogenateまたはそれから調製した画分(タンパクおよびsucroseの濃度をそれぞれ12mg/ml，0.32M以下にうすめる)0.2 mlに0.2M Tris-HCl (pH 7.5) 0.1 mlおよび1%(w/v) sodium deoxycholate 0.2 mlを加える(20-25°で)。よく混合させてから同じ温度で5分放置する。冷蒸留水2 mlを加え，Potter-Elvejem homogenizerの中でTeflon pestleを手で上下に動かして均一なサスペンションにする。この溶液を適当に希釈した後ただちに酵素活性を測定する。タンパクの測定はLowryら(13)に従った。

結果および考察

Jimpyの体重，脳重，脳のタンパク量，脳のCNP活性の推移を正常の♂と区別して



←図1　Jimpyとその対照の体重，脳重，脳のタンパク量およびCNP活性．矢印はミエリン形成開始の時期を示す．

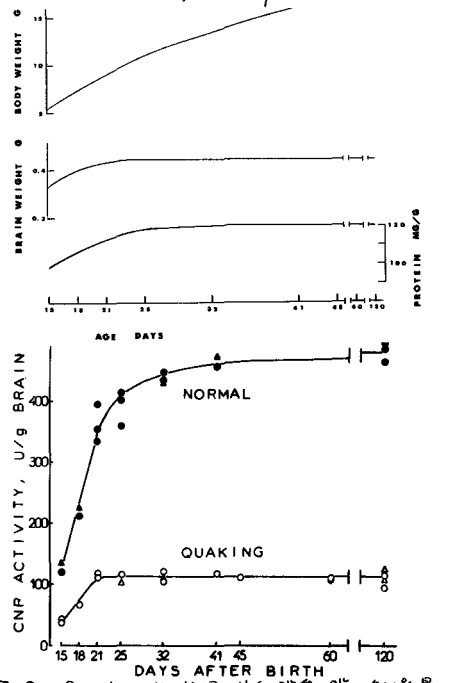


図2　Quakingとその対照の体重，脳重，脳のタンパク量およびCNP活性．体重，脳重，脳のタンパク量は両者に差はない．

表1　生後12日の活性
（U/g brain）

+/+ × +/Y の F_1	+/jp × +/Y の F_1	
95.2	65.8	29.8
62.0	60.7	26.0
70.1	69.0	29.5
74.1	79.8	25.8
	77.9	30.8
	68.2	30.0

表2　生後10日の活性
（U/g brain）

+/+ × +/Y の F_1	+/jp × +/Y の F_1
26.3	14.6
43.4	14.8
33.7	34.1
19.3	35.0
	31.0
	21.5

表3　坐骨神経と脊髄の活性
（U/mg protein）

マウス	生後日数	匹数	坐骨神経	脊髄
J	17	4	1.7	0.981
N	17	4	1.7	4.24
J	28	5	1.8	0.701
N	28	5	1.9	5.18
J	28	4	1.3	0.625
N	28	4	1.2	5.93
Q	34	3	1.5	3.40
N	34	3	1.7	6.98
Q	71	4	1.3	3.85
N	71	4	1.4	7.81

きる生後15日から死ぬ直前の28日までにつき図1に示した。対照については生後直後から示してある。Jimpyの CNP活性は対照の正常の仔に比較して著名に減少していることがわかる。Jimpyの脳のCNP活性は極端に低く，又生後15日から28日の間ほとんど一定である。正常の仔では活性ははるかに高く，15日から28日にかけては著しい活性の増加が見られる。表1はJimpyがほとんど区別できない生後12日において，+/jp × +/YのF_1の仔を任意に12匹とり，脳のCNP活性を測定した結果である。この12匹はCNPの活性によって2群に分かれ，高い方は正常，低い方はJimpyであったと推定される。同様の実験を生後10日において行ったところ（表2），CNP活性による両者の識別は困難であった。Quakingおよびその対照につき体重，脳重，脳のタンパク量，脳のCNP活性の推移を生後15日から120日までについて図2に示した。Quakingの脳のCNP活性も非常に低いが，Jimpyほど極端に低くはない。このことはQuakingよりもJimpyの方がよりはげしいミエリン欠損を示すという事実に一致している。QuakingとJimpyを比較してもう一つ異る点は，Quakingでは活性が21日まで増加し続けるのに対し，Jimpyでは15日までに活性が一定のレベルに達してしまうことである。表3は両変異マウスの坐骨神経および脊髄のCNP活性を示す。坐骨神経については変異マウスと対照とで差が見られない。Jimpyの脊髄は脳と同様著明に活性が減少していた。又Quakingの脊髄では活性が半減していた。

以上の結果はCNPが中枢神経では主にミエリンに存在することを示すもう一つの有力な証拠である。更に又，CNP活性の推移から判断すると，Jimpyでは生後15日までに，Quakingでは21日にミエリン形成が停止すると推定される。この推定はHogan and Joseph (5)が脂質の研究から得た推定「Quakingでは生後20日にミエリン形成が停止する」とよく一致する。又両変異マウスのミエリン欠損が，脱髄ではなくミエリン形成不全によるものであることを裏書している。

表4はJimpyおよび正常の対照マウスの脳から図3の方法でミエリンを精製し，精製の各段階でCNPとタンパクを測定したものである。ミエリンを精製していくと両者とも次第に比活性が高くなっていき，精製ミエリンは脳homogenateの約4倍であった。このことはJimpyの場合にもある程度精製が達成されたと考えることもできる。しかしながら，精製ミエリンに回収されるCNP活性は対照では43%であるが，Jimpyではわずか14%である。この事実に対して3つの説明が可能である。(i) Jimpyのミエリンは正常のミエリンとちがう比重をもつ。(ii) Jimpyのミエリンは層が少ないためこわれやすいか軸索に結合したまま多くはミエリン以外の画分にきてしまう。(iii) 正常

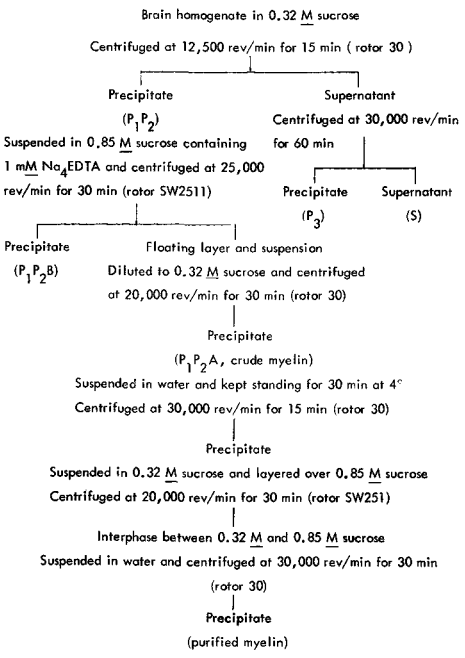


図3　ミエリンの精製

表4

CNP AND PROTEIN IN DIFFERENT STAGES OF MYELIN PURIFICATION

Mice	Fractions	CNP				Protein		
		Specific activity (U/mg of protein)	Total activity (U)	Recovery (%)		Total protein (mg)	Recovery (%)	
Jimpy	Homogenate	0.304	284	100		932	100	
	P_1P_2	0.388	245	86	101	630	68	98
	P_3	0.336	30.4	11		90.6	10	
	S	0.062	11.8	4		191	20	
	P_1P_2B	0.284	128	45	69	450	48	57
	Crude myelin (P_1P_2A)	0.800	67.5	24		84.5	9	
	Purified myelin	1.15	39.7	14		34.5	3.7	
Normal	Homogenate	2.53	1830	100		722	100	
	P_1P_2	3.05	1520	83	92	499	69	100
	P_3	1.66	104	6		62.6	9	
	S	0.375	58.4	3		156	22	
	P_1P_2B	1.00	312	17	68	311	43	61
	Crude myelin (P_1P_2A)	7.30	937	51		128	18	
	Purified myelin	10.6	789	43		74.5	10.3	

ではCNPは大部分ミエリンにある。しかし，Jimpyではミエリンが少ないために別の膜系にあるCNPの割合が多い。なおJimpyから精製したミエリンの形態的な同定は困難であった。

ミエリン欠損マウスの研究はCNPと中枢神経系のミエリンとの密接な関係を明らかにしたが，CNPがミエリンだけに存在するとは考えられない。CNPはわずかではあるが脳の腫瘍組織(12)，培養した脳細胞(16)，赤血球の膜(20)にも存在する。「CNPはミエリンを含めて細胞質膜に局在する酵素である」という仮説(11)が現在のところ妥当のようである。末梢神経から精製したミエリンはhomogenateにくらべて比活性がほとんど上昇していないという知見(21)もこの仮説によって説明できる。進化の過程である種の細胞はその細胞質膜に強いCNP活性をもつに至ったのであろう。oligodendrogliaもその一つであったにちがいない。oligodendrogliaの細胞質膜からミエリンが形成されるにしたがい，多量のCNPがミエリンに沈着したのであろう。このような仮説は幼若動物のミエリンに関するAgrawalら(2)の考えとも一致する。分離したグリア細胞についての実験(15)は問題点（ミエリンの混入，グリアの種類の同定）が解決されれば重要な示唆を与えることになるであろう。

文　献

(1) Adams et al. J. Neurochem. 10 383 (1963); (2) Agrawal et al. Biochem. J. 120 635 (1970); (3) Banik and Davison Biochem. J. 115 1051 (1969); (4) Drummond et al. J. Biol. Chem. 237 3535 (1962); (5) Hogan and Joseph J. Neurochem. 17 1209 (1970); (6) 山宮笠原, 神経化学 7 suppl. 72 (1970); (7) Kurihara and Tsukada J. Neurochem. 14 1167 (1967); (8) Kurihara and Tsukada J. Neurochem. 15 827 (1968); (9) Kurihara et al. Brain Res. 13 401 (1969); (10) Kurihara et al. J. Neurochem. 17 993 (1970); (11) Kurihara et al. Life Sci. Part II 10 421 (1971); (12) 栗原川上 未発表; (13) Lowry et al. J. Biol. Chem. 193 265 (1951); (14) 宮武ほか 神経化学 8 suppl. 88 (1969); (15) 永田ほか 神経化学 7 suppl. 122 (1970); (16) 中沢 脳のにぎる仮説 (1971); (17) 野村ほか 神経化学 8 suppl. 56 (1969); (18) Olafson et al. Canad. J. Biochem. 47 961 (1969); (19) Sidman et al. Science 144 309 (1964); (20) Sudo et al. in prep.; (21) 植村ほか 神経化学 7 suppl. 79 (1970)

29. ラット脳のAMP deaminaseの多様性とその性質

小笠原 信 明　（愛知県コロニー）
吉 野 昌 孝・川 村 康 彦（名大・医・2生化）

〔要約〕

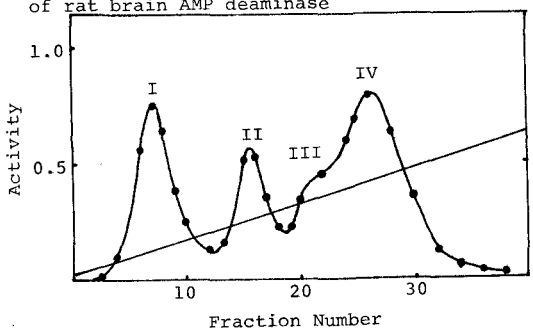
脳組織のアンモニアは微量にすぎないが脳の活動に応じて速かに変動することが知られている。しかしその発生源となる物質についてはあまり明らかでなく、蛋白質、アデニル酸、グルタミン等が考えられている。今回我々はアデニル酸を脱アミノし、しかも adenine→guanine nucleotide変換に生理的に重要な意味をもつと考えられるAMP deaminaseについて基礎的研究を行った。脳のAMP deaminaseにはP-celluloseで分画し得る4個の互いに性質を異にするIsozymeが存在する。P-celluloseカラムクロマトでNaCl濃度をgradientに上昇させると0.3, 0.5, 0.65, 0.8 M NaClでそれぞれI, II, III, IV型が溶出される。各型は更にDEAE-cellulose, 硫安分画, Sepharose-6Bゲル沪過等で精製できる。各型はセルローズアセテート電気泳動でも移動度を異にする。熱に対する安定性はI<II<III<IVの順序でIV型が最も安定である。4つの型共にActivatorのATP, アルカリ金属が存在しない状態では基質AMP濃度と活性の関係はSigmoidになり全てアロステリック酵素と考えられる。Hillのn値はI型のみ3~4で、II, III, IV型では2である。みかけのK_m値の大きさにはI<II<III<IVの関係があり、これはActivator存在下でも同様である。ATPはアルカリ金属より有効なActivatorであり、GTPは低濃度で4型共に阻害するがIII,IV型がI,II型に比べて阻害されにくい。細胞内分布では100,000 x g上清, Mitochondria, Synaptosome分画に4型共に存在するが、顆粒分画にはI型が多い。

〔実験方法〕

AMP deaminaseの活性は5 mM AMP, 5 mM ATP, 50 mM KPO_4 buffer, pH 6.9, 0.02 % mercaptoethanol存在下に37°C, 5分で生成するアンモニア量を直接Indophenol法で測定した。Kineticsの実験にはNucleotideは全てTris塩をbufferにはTris-acetate buffer, pH 6.9を使用し生成したアンモニアをSelingsonの装置で拡散トラップ後Indophenol法で測定した。P-celluloseカラムクロマトは0.1 % mercaptoethanolを含む0.02 M KPO_4, pH 6.9を用いNaClの濃度を0.1Mから1.2M迄gradientに上昇させた。セルローズアセテート電気泳動は0.1 % mercaptoethanolを含む0.05 M KPO_4 buffer, pH 8中で行った。細胞分画はEichbergらの方法によった。

〔結果及び考察〕

Fig. 1. P-cellulose column chromatography of of rat brain AMP deaminase



白鼠大脳をWaring blenderで5倍量の0.1 % mercaptoethanolを含む0.02 M KPO_4 buffer, pH 6.9でHomogenize後10,000 x g上清をP-celluloseカラムにかけNaCl濃度をgradientに0.1Mから1.2M迄上昇するとFig.1にみられるような活性のパターンが得られる。I, II, III, IV型はそれぞれNaCl濃度0.3, 0.5, 0.65, 0.8Mに活性Peakをもって溶出される。各型は更にDEAEセル

Fig. 2. Cellulose thin-layer chromatography of reaction product.

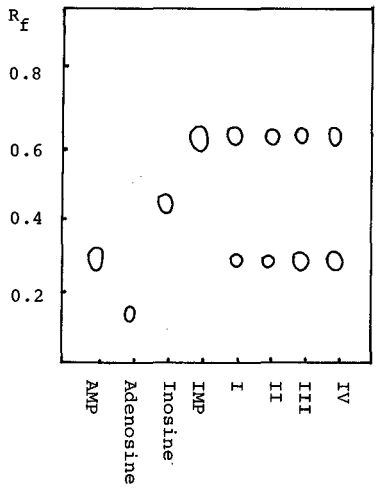
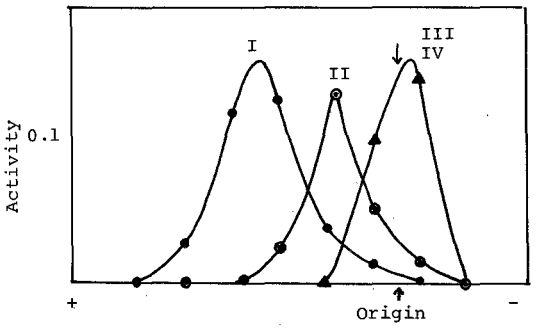


Fig. 3. Cellulose acetate electrophoresis



ロースゲル, 硫安分画, Sepharose-6B ゲル沪過によって, 10,000×g上清からI, II型は約100倍, III型は350倍, IV型は800倍迄に精製した。精製標品はAdenosine deaminaseを全く含まないこと, 反応生成物はIMPのみであること(Fig. 2). 各型はP-celluloseから常に一定濃度のNaCl濃度で溶出すること等から, 4つの型はそれぞれAMP deaminaseのIsozymeであると考えられる。なお4つのIsozymeのCombinationを行っても新しい型の酵素は得られないこと, 特定の型からは異った型が生成されないこと等から各酵素はHybridではないと考えられる。各型はFig. 3に示す如くセルロースゲル電気泳動でも移動度が異なり, I型が最も速く陽極に移動する。

Fig. 4. effect of AMP concns. on activity in the absence of activator.

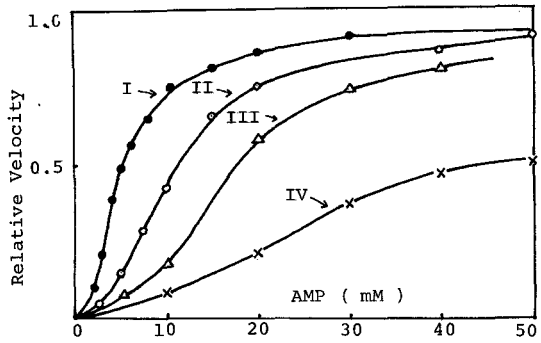
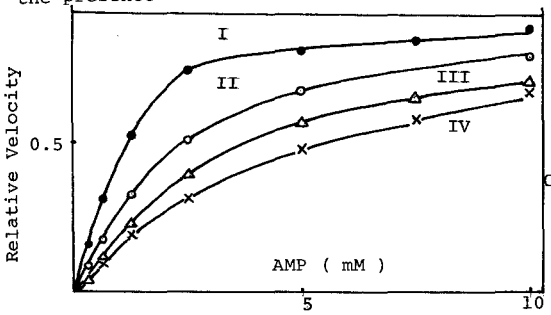


Fig. 5. Effect of AMP concns. on activity in the presence of activator.



〈AMP濃度と活性との関係〉

ActivatorであるATP, アルカリ金属が全く存在しない時のAMP濃度と活性の関係をFig. 4に示した。みかけのAMPのK_mはI, II, III, IV型でそれぞれ8, 11, 17, 42 mMでかなりの相異がある。Fig. 4のdataからHillの"n"値を計算するとI型では約3, II, III, IV型では約2という値が得られた。ActivatorであるATP(5 mM), NaCl(100 mM)両者存在下では基質と活性の関係はFig. 5に示す如くHyperbolicになりAMPのK_m値はI, II, III, IV型でそれぞれ0.8, 2.4, 3.8, 5.2 mMとかなり減少する。Activatorの存在は各型のAMPに対するK_m値を小さくするのみでV_{max}には全く影響がない。このことは4型共にMonod, Wyman, Changeux[6]のいう典型的なK-systemに属するアロステリック酵素であることを示している。

Fig. 6. Kinetics of thermal stability

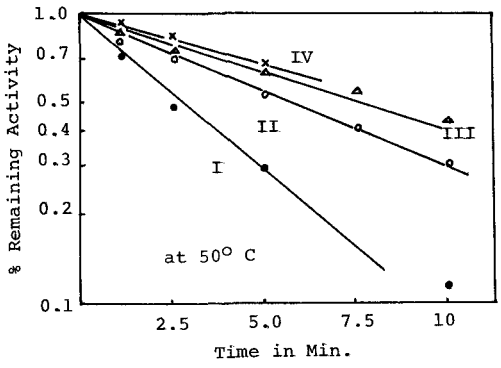


Fig. 7. Heat inactivation at different temp.

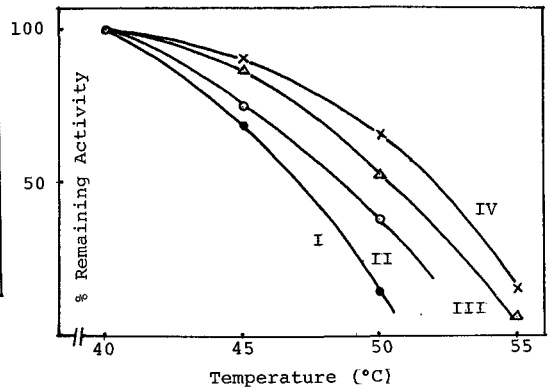


Table I. Effects of alkali metals and ATP

Additions	I	II	III	IV
None	0 %	0 %	0 %	0 %
Na 50 mM	34	30	8	21
K 50 mM	20	9	16	6
ATP 2.5 mM	83	84	83	96
ATP 2.5 mM + Na 50 mM	100	100	100	100
ATP 2.5 mM + K 50 mM	80	94	76	85

Table II. Effects of GTP

GTP concns.	I	II	III	IV
0 (mM)	100%	100%	100%	100%
0.05	30	28	77	80
0.2	17	39	42	64

Table III. Cellular distribution

Homogenate	1340
P_1 (nuclear fr.)	143
P_2A (Myelin Fr.)	58
P_2B (Synaptosomal Fr.)	211
P_2C (Mit. Fr.)	251
P_3 (Microsomal Fr.)	67
S_3	554

〈熱に対する安定性〉

Fig. 6 及び Fig. 7 に示した如く、耐熱性にも4つの型ではかなりの相異がある。最も熱に安定であるのはIV型であり、最も不安定と考えられるのはI型である。

〈活性化及び阻害〉

AMP deaminase は動物組織に広く分布し、これまでに活性化及び阻害についてかなりの報告がある。例えばヒトの赤血球の酵素[1]はアルカリ金属単独ではKのみに活性化作用があり、Na,Li,Rb,Csには全く効果がない。しかもATP単独でも効果はないがATPとNa,Li,Rbが共存すると活性化が起る。しかしイヌ・ネコの赤血球酵素はATPのみによって活性化されるがアルカリ金属は全く効果がない[1]。一方ウサギ[12]・ラット[7]・ニワトリ[8]の筋の酵素はアルカリ金属で活性化される。ウシ脳の酵素ではアルカリ金属はActivatorとなり得るがATPの方が効果が大きい[2]。以上のように動物組織により、活性化にはかなりの相違がある。ラット脳の4つの型についてのアルカリ金属及びATP添加の効果をTable Iに示した。4つの型共、ATPによって活性化される。Na,Kは ATP に比べると低いが単独で活性化効果がある。活性化は Rb, Li でも起るが Csでは全く起らない。

GTP はウシ脳[10,11]、ウサギ筋肉[12]等についてはInhibitorとなることが報告されている。しかし、ニワトリ赤血球では逆にActivatorとなる[4]。ラットの4つの型のAMP deaminase は共に低濃度の GTP によって阻害をうける。しかし Table II に示した如く AMP 濃度 2 mMでは III, IV型は I, II型に比べ、阻害の程度は低い。

Fig. 8. P-cellulose column chromatography of supernatant fraction.

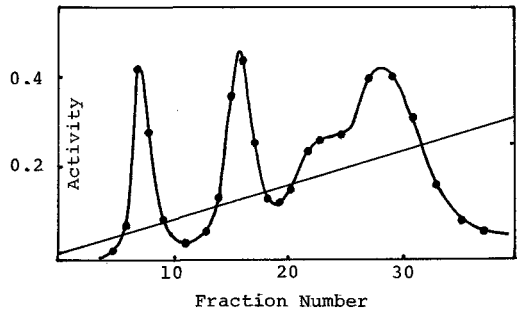
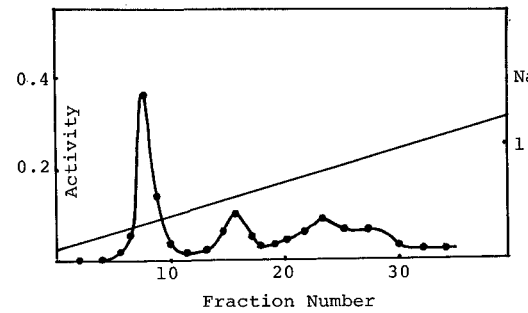


Fig. 9. P-cellulose column chromatography of mitochondrial fraction.



〈細胞内分布〉

Eichberg等[3]の方法によってラット大脳の細胞分画を行った。AMP deaminase は主として Supernatant と P_2 の画分に存在する。P_2 分画でも Myelin 分画には少く、Synaptosome と Mitochondria 分画に存在する。Supernatant を P-cellulose カラムにかけ AMP 濃度を 0.1 から 1.2M まで gradient に上昇させると Fig. 8 のようなパターンが得られる。Mitochondria 分画では Fig. 9 の如きパターンが得られた。図から明らかなように4つの型のうちのいずれが Particle bound で、残りが Supernatant 由来というような明瞭な分布の差はないが Particle には I 型が多い。

〈その他の性質〉

4型共至適pHは7附近にある。分子量は Sepharose-6B ゲル沪過では4型共ほゞ同位置に溶出され約20万である。

〈考察〉

最近 Lowenstein[5]らにより筋でのアンモニアの生成はいわゆる Purine nucleotide cycle (AMP → IMP → Adenylosuccinate → AMP → IMP) によることが提唱され、この Cycle のもつ機能として 1)アミノ酸の脱アミノ、2) TCA cycle の中間産物の生成、3)各 Adenine nucleotide の濃度の調節 4)アンモニア生成による Phosphofructokinase の調節をあげている。更に AMP deaminase は Adenine → Guanine nucleotide 変換の最初の Step の酵素であり、ATP で活性化され、GTP で阻害される事実はこの酵素が A → G 変換に重要な意味をもっているものと考えられる。脳での性質を異にする4つの Isozyme が如何なる生理的意味をもつかは今後の興味ある問題と考えられる。

なお、Birnbaum[2]らによって最近ウシの筋の AMP deaminase が高度に精製され、P-cellulose クロマトで2つに分離すること、及び KCl による活性化にかなりの差があることが報告されている。

〔文献〕

1) Askari,A., and Franklin,Jr.,J.E.,Biochim.Biophys.Acta, 110,162 (1965).
2) Birnbaum,R.S.,Stine,W.R.,and lowenstein,J.M., Fed.Proc., 30,1114 Abs. (1971).
3) Eichberg,Jr.,J.,Whittaker,V.P.,and Dowson,R.M.C., Biochem.J., 92,91 (1964).
4) Kawamura,Y.,Yoshino,M.,and Ogasawara,N., Seikagaku, 42,524 (1970).
5) Lowenstein,J.M.,and Tornheim,K., Science, 171,397 (1971).
6) Monod,J.,Wyman,J.,and Changeux,J.-P., J.Mol.Biol., 12,88 (1965).
7) Ronca,g.,Raggi,A.,and Ronca-Testoni,S., Biochim.Biophys.Acta, 167,626 (1968).
8) Sammons,D.W.,Henry,H.,and Chilson,O.P., J.Biol.Chem., 245,2109 (1970).
9) Setlow,B., and Lowenstein,J.M., J.Biol.Chem., 242,607 (1967).
10) Setlow,B., and Lowenstein,J.M., J. Biol.Chem., 243,3408 (1968).
11) Setlow.B., and Lowenstein,J.M., J.Biol.Chem., 241,1244 (1966).
12) Smiley.Jr.,K.L., and Suelter C.H., J.Biol.Chem., 242,19-0 (1967).

21. 脳 adenosine kinase：部分精製，性質，および adenosine の取込みにおける役割

清水宏俊・岡山博人・田中正三（熊大・医・1薬理）
児玉万典（熊大・医・脳外科）

〔要約〕

(1) モルモット脳より adenosine kinase を精製した。80,000 xg 上清を硫安分画した後，DEAE Sephadex column chromatography により精製した。精製された酵素は adenosine deaminase，AMP deaminase，ATPase がほぼ完全に除かれていたが，myokinase はなお混在した。この kinase は常温での失活著しく，Mg^{++} を必要とし，至適 pH は 5.5，adenosine に対する Km は 2.0×10^{-5} M であった。

(2) ^{14}C-adenosine の脳への取込みを in vivo，in vitro で観察した。頸動脈に注入した場合や大脳切片と incubate した際には取込まれた ^{14}C の 75% 以上はリン酸化物として同定された。ホモジェネートと incubate すると 90% 以上は非リン酸化物（主に脱アミノ化合物）で，脳室内注入では両者がほぼ当量形成された。

(3) 2,8-^{3}H-U-^{14}C-adenosine の脳切片内への取込み→リン酸化の際の ^{3}H/^{14}C を測定し，adenosine の取込み→リン酸化が kinase によって触媒されている可能性を示した。^{14}C-adenosine の切片内への取込みの kinetic analysis によりこの可能性は実証された。

(4) ouabain (5×10^{-6} M) は kinase activity にも adenosine influx にも影響がなかった。調べられた3種の unnatural adenosine analogues は kinase activity，adenosine influx (into slices) の両方を阻害した。

Adenosine は心臓や脳の血管拡張物質であり[3,4]脳 cyclic 3',5'-AMP 値を著しく上昇させる。[6,7]脳切片は adenosine を積極的に取込み，速やかにリン酸化するので，[6,7]これが上記 adenosine の薬理作用と関連していることが考えられるが，[3,7]その取込み機作はこれまで全く不明であった。

切片と同様な取込機構は in vivo 脳にも存在するか？ 麻酔下のラットの右総頸動脈に ^{14}C-adenosine (8.1 mμmole, 0.4 ml) を注射して2分後に断頭，脳組織の酸抽出液を作成すると注入放射能の 1.9% が取り込まれていて，代謝物の分布は切片の場合に似て 75% 以上がリン酸化物として同定される (Fig. 1)。

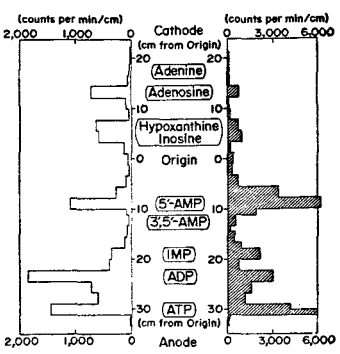


Fig 1. Paper electropherogram of acid extracts of brain tissue exposed to ^{14}C-adenosine in vivo and as incubated slices.

Adenosine の取込→リン酸化はどのような代謝経路で行なわれるか？ 肝，腎，赤血球には adenosine kinase の存在が知られているので，脳の場合にも kinase による直接リン酸化が考えられる。しかし [8-^{14}C]-adenosine を脳の全ホモジェネート，可溶分画，または顆粒分画と ATP 存在下にインキュベートしても，ほとんどが inosine や hypoxanthine に代謝され，有意義量の ^{14}C-nucleotides の検出は不可能である。一方 ^{14}C-adenine の脳切片への取込みは phosphoribosyltransferase によるので，[8-^{14}C]-adenosine のリン酸化過程に右の2つの可能性が考えられる。

① ^{14}C-Adenosine + ATP $\xrightarrow{\text{adenosine kinase}}$ ^{14}C-AMP + ADP

② ^{14}C-Adenosine $\xrightarrow{\text{purine nucleosidase}}$ ^{14}C-Adenine + Ribose
^{14}C-Adenine + PRPP $\xrightarrow{\text{adenine phosphoribosyltransferase}}$ ^{14}C-AMP + PP_i

モルモット大脳切片を〔2,8-^{3}H-U-^{14}C〕-adenosine (1.3×10^{-6}M) とインキュベートし，この二重標識化合物の切片内代謝物中の放射能(dpm)比 ^{3}H/^{14}C を測定すると，用いたadenosine中での比と変らない(右表)。用いたadenosine中の^{14}Cはpurine moietyとribose moietyとにそれぞれ5ケづつ存在し，^{3}Hはpurine moietyのみに存在するので，若し②の経路で代謝されるならば生じたnucleotides中の^{3}H/^{14}C比はprecorsor adenosineのそれの2倍になるべきである。われわれの実験結果は脳細胞へのadenosineの取込→リン酸化が①の経路を経ていることを示す。それでは本当に……

^{3}H/^{14}C Ratio in metabolites of [2,8-^{3}H-U-^{14}C]-adenosine in incubated slices of brain.

Compound analyzed	Incubation time (min)	^{3}H/^{14}C
Adenosine*	-	4.9
Adenosine**	3	4.8
ATP	3	4.6
ATP	6	5.0
AMP	3	4.9
AMP	6	5.0
Adenine***	-	9.2

* added in the medium.
** recovered from the slices.
*** prepared by acid hydrolysis (0.1 N HCl, 100°C, 1 h) of the precorsor adenosine.

脳にadenosine kinaseは存在するか？ モルモット大脳のホモジェネートを80,000×g, 1時間遠沈し，上清を硫安分画すると，50～75%飽和分画を酵素標品とした場合の^{14}C-adenosineの酵素的消失はATP(0.7 mM)の添加で約2倍に割合を増す。この分画を脱塩後DEAE Sephadex A-25のカラムによって再分画すると，ATP依存性の酵素と非依存性の酵素とに分かれる(Fig.2)。後者の酵素からは^{14}C-inosineのみが形成されるのでadenosine deaminaseと考えられる。前者からはATP(15%), ADP(11%), AMP(70%), IMP(4%)がisotope代謝物として形成され，adenosine kinaseの他にmyokinase, AMP deaminaseの混在が考えられる。そこでCM-Sephadexを用いて更に精製を試み，AMP deaminaseやATP-aseは完全に除くことが出来たが，myokinaseとの分離には成功しなかった。肝adenosine kinaseも，酸処理，アルカリ処理，DEAE-cellulose, Hydroxylapatite, アルミナ等を用いてmyokinaseからの分離が試みられているが，未だ成功していない。(2)

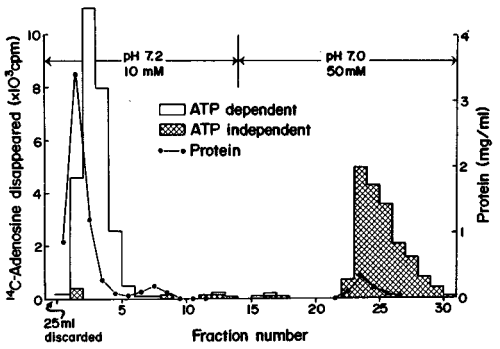


Fig.2 Chromatography of ammonium sulfate-fractionated brain extract.
The extract(2ml, 43mg protein) was applied on a 2.1x22cm column of DEAE Sephadex A-25 equilibrated with 0.01M phosphate buffer,pH 7.2. Fractions of about 3ml were collected After the 14th fraction, buffer was changed to 0.05M phosphate buffer, pH 7.0.

得られた脳adenosine kinaseは極めて不安定で，Mg^{++}を必要とし，至適pHは5.5 (Fig. 3)，adenosineに対するKmは2×10^{-5}Mであった。以上の結果から，adenosineは脳組織に取り込まれ，そのほとんどがadenosine kinaseにより速かにリン酸化されることが明らかとなった。

では，この取込はどのような様式で行なわれ，リン酸化とどのように共役しているのだろうか？ active transport？ facilitated diffusion？ simple diffusion followed by the phosphorylation？ モルモット大脳切片を^{14}C-adenosineとインキュベートし，その取り込みの時間経過をみるとFig.4のようである。メヂウム中の^{14}C-adenosineを除去後，切片を強力に洗っても，切片内には常に一定量の^{14}C-ade-

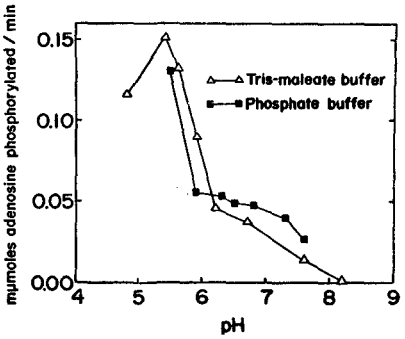


Fig.3 Effect of pH on the activity of brain adenosine kinase.

Reaction mixture: 20 mM buffer, 0.7mM ATP, 0.04mM [8-^{14}C]-adenosine(47mCi/mmole), & 5μg of enzyme protein in a total volume of 0.2 ml.
Incubation: 30°C, for 10 min.

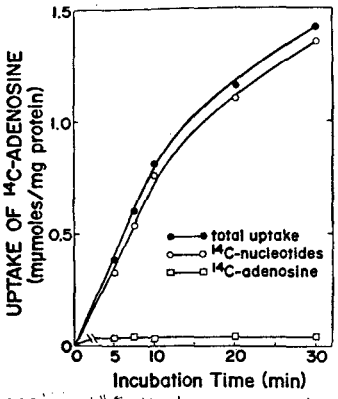


Fig.4 Time course of uptake of adenosine by cerebral slices of guinea pig.

After preincubation for 20 min, slices were incubated with [8-^{14}C]-adenosine(0.01 mM, 48μCi/μmole) at 37°C in Krebs-Ringer-bicarbonate-glucose solution gassed by oxygen.

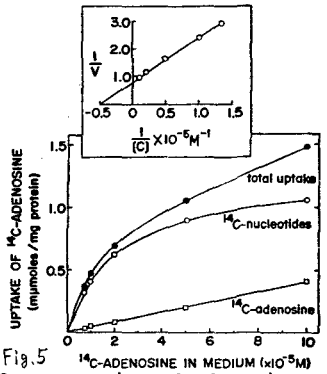


Fig.5 Concentration of adenosine vs. its uptake and phosphorylation by slices of guinea pig brain.

Incubation: 6min, 37°C
Total uptake(•) was calculated from the radioactivity counted in an aliquot of acid extract of slices and from the specific activity of ^{14}C-adenosine added inthe medium. The amount of ^{14}C-adenosine in slices(□) was estimated from the radioactivity in the supernatant fluid which was prepared by treatment of the extract with $ZnSO_4$-$Ba(OH)_2$. The inset shows reciprocal plots of the rate of formation of ^{14}C-nucleotides.

nosineが存在する。メダウムの^{14}C-adenosineの濃度を変えて切片内への取込をみると(Fig.5)，切片内の^{14}C-adenosine濃度(□)はメダウムのそれに直線的に比例して増すのに対し，ヌクレオチドの濃度(○)は　双曲線的に上昇する。切片内の未変化^{14}C-adenosineの濃度はメダウムのそれの約30%であり，inulin space(約15%)よりはるかに高いので，アデノシンは未変化で細胞内に入っていると考えられ，Fig.4, Fig5の結果はその入り方が非酵素的過程(多分simple diffusion)によることを示している。一方，切片内でのヌクレオチドの形成は時間と共に増加し(10分までは直線的，Fig.4)，Fig.4に示された条件で10分間インキュベートした後の切片内^{14}C-nucleotidesの濃度は35 mμmole/g (wet weight, slice)にも達するのに対し，その時のメダウム中の^{14}C-adenosineの濃度は8.6 mμmole/mlであった。即ち脳切片は外から与えられたadenosine-^{14}Cを4倍以上にも濃縮し得る能力を備えており，これは過去の報告[6]と一致し，見かけ上のactive processである。このactive processがadenosine kinaseによって制御されていることは，Fig.5 (inset)に示したLineweaver-Burkのplotからも明らかである。即ち切片内^{14}C-nucleotides形成のprecoursor adenosineに対する見かけ上のKmは1.9×10^{-5} Mで，adenosine kinaseのそれと一致した。以上の結果を総合すると，アデノシンはdiffusionによって細胞内に入り，次でkinaseによりリン酸化される。リン酸化によるadenosineのtransformationがdiffusionを促進させ，見かけ上のactive uptakeを示す。以下の実験は，さらにこれを支持した。

Inhibitorの影響　ouabain (0.005 mM)は精製された脳adenosine kinaseに対しては全く影響がなかった。脳切片による^{14}C-adenosineの取込は同濃度のouab-

ain により5~7% 阻害されたが，これは influx の抑制ではなく efflux の増加によることが明らかとなった。adenosine と構造の類似する adenine-9-β-D-arabinofuranoside, adenine-9-β-L-ribofuranoside, 3'-deoxyadenosine 等は 0.1~1.0 mM の濃度で kinase 活性を 25~87% 阻害し，切片への adenosine の取込を 28~56% 阻害した。adenine phosphoribosyltransferase の阻害剤である 4-aminopyrazolo-3,4-d-pyrimidine (0.5 mM) は，kinase 活性にも取込にも影響がなかった。以上は adenosine の influx に関する知見であったが……

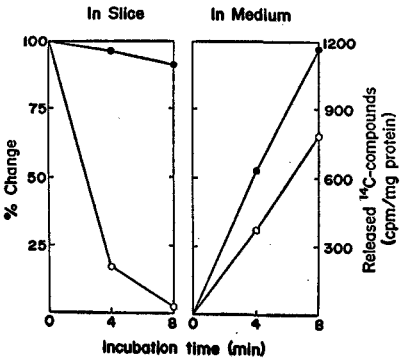


Fig.6 Release of radioactive compounds from brain slices prelabeled with ^{14}C-adenosine.

Cerebral slices were pulse-labeled with 0.01mM [8-^{14}C]-adenosine(48 μCi/μmole) for 10 min, washed, and divided into two portions. Each portion was further incubated in a frsh medium for 4 or 8 min, followed by separation of the slices from medium by filtration.

o—o ; ^{14}C-adenosine
●—● ; Total ^{14}C-compounds

Efflux や net change はどうか？ [8-^{14}C]-adenosine でいったん pulse label された脳切片からの isotope の遊出を Fig.6 に示す。切片中の未変化 adenosine (o) はそのほとんどが8分間のインキュベートで遊出されるのに対し，全 isotope (●) は7%しか失なわれない。メヂウム中の遊出 isotope を分析すると，ほとんどは adenosine (o) で，他に inosine, hypoxanthine を認める。メヂウム中の ^{14}C-adenosine は切片内に先に存在した未変化 adenosine よりは数倍多いので，細胞内で一部 AMP → adenosine の変化が起っていることは確かである。

net change をみるために，脳切片を 0.1mM adenosine と10分間インキュベートし，細胞内の ATP レベル，総 adenine nucleotides 量を測定したが，変化はなかった。これは内在性 adenine nucleotides のレベルが著しく高いためであり，外からの adenosine がこれらレベルを上昇させないからと云って，それが代謝的効果を欠くことにはならない。外から与えられた adenine や adenosine は細胞内の特殊な pool に限局してヌクレオチドに転換し[7,10,11]，この pool のヌクレオチドは選択的に cyclic AMP 形成に関与する（モルモットで 40%[10]，ヒトで 70%[13] が cyclic AMP に転換し得る）。最近，autoradiographic electronmicroscopy によりこの pool は殆んどが synaptic area (70% が nerve ending, 30% が postsynaptic dendritic trunk) に存在することが明らかとなった。[1]（下図参照）

1) Bloom,F. and Daly,J.: 私信
2) Lindberg,B. et al.:J.Biol.Chem. 242 350 (1967)
3) 大月三郎，他，医学と生物学 76 107 (1968)
4) Rubio,R. et al.:Am.J.Physiol. 216 56 (1969)
5) Santos,J.N. et al.:J.Neurochem. 15 367 (1968)
6) Sattin,A. and Rall,T.W.:Mol.Pharmacol. 6 13 (1970)
7) Shimizu,H. and Daly,J.:Biochim.Biophys.Acta 222 465 (1970)
8) Shimizu,H. and Daly,J.:"Methods in Neurochemistry" F.Rainer(Ed) Marcel Decker,New York,印刷中
9) Shimizu,H. et al.:J.Neurochem. 16 1609 (1969)
10) Shimizu,H. et al.:Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 65 1033 (1970)
11) Shimizu,H. et al.:Adv.Biochem.Psychopharmacol. 3 135 (1970)
12) Shimizu,H. et al.:Mol.Pharmacol. 6 184 (1970)
13) Shimizu,H. et al.:J.Neurochem. 18 1157 (1971)

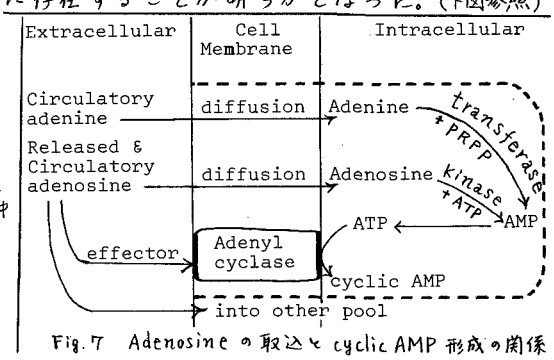


Fig.7 Adenosine の取込と cyclic AMP 形成の関係

22. −75℃～−78℃下で有機溶媒処理されたラット脳Na・K・ATPaseの脂質要求性について

野口鉄也（慶大・医・生理）
Freed, S.（N.Y.医大・生化・神経；Brookhaven研・化学）

〔要約〕

膜酵素はその脂質含有の為可溶化することが困難であり，多くの研究者は可溶化の為にdetergentを用いている。しかしその後の検索によってDeoxycholateは酵素，特にNa·K·ATPaseに対して，酵素そのものの性質を変え，由来組織により或いは濃度によって活性化させたり失活させたりする作用のあることが明らかとなって来た。

他方，従来より，酵素反応の減速化を目的として，有機溶媒0℃以下の温度の中で蛋白変性を見ることなく酵素活性の測定が充分に可能であることが示めされている。

著者らはNa·K·ATPaseの脂質要求性の検討を目的として，detergentを用いることなく，直接−75℃に冷却したクロロホルム・メタノール(1/1)でラット脳組織を処理してその脂質の可溶部分を抽出したところ，その残渣中のMg·ATPaseおよびAcetylcholine Esteraseは良く保存されているが，Na·K·ATPaseの活性がほとんど完全に消失していることを見出した。そこでこの脂質部分をシリカゲル薄層クロマトグラムで画分し，各脂質成分について有機溶媒−75℃下で再構成しNa·K·ATPaseに対する活性化能を検討したところCholesterolがNa·K·ATPase活性に不可欠であることがわかった。尚このCholesterolによって活性化される部分はOuabainおよびCa⁺⁺に感受性をもつものであった。（この研究はNew York Medical CollegeおよびBrookhaven National Laboratoryに於て行ったものである。）

膜酵素はその脂質含有の為，ほとんど水不溶性であり生化学的検索には通常デターゼントを利用して可溶化が試みられている。又一般に組織から脂質を抽出するには有機溶媒が用いられるが，その時にはすでに蛋白質はほぼ完全に変性し生物活性は維持されていない。しかし有機溶媒を0℃以下に冷却後使用するならば，或る種の酵素の活性は良く保存され，低温下で酵素の活性測定が可能であることがすでに示めされている(1-3)。

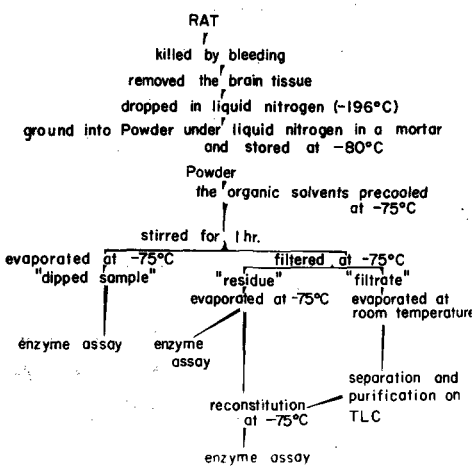
他方Na·K·ATPaseの酵素活性が脂質に依存性であることが知られるようになり，特に燐脂質の重要性が示めされたが，未だ決定的解答が得られないまま今日に至っている(4-8)。そこで吾々は従来使用されているデターゼント等を使用することをせずに，直接脳組織に対して−75℃～−78℃に冷却した有機溶媒を用いて脂質の抽出を行い，Na·K·ATPaseの脂質要求性について検討した。

一方　法　(図-1)

ウィスター系ラット(体重150－200g，お子区別なし)を瀉血断頭，脳を剔出し，直ちに液体窒素(−196℃)中に投入し凍結させる。予め液体窒素を満した乳鉢に凍結脳を移し，液体窒素中で磨砕し，脳パウダー(Powder)を作った。脳パウダーは実験開始まで−80℃下に保存された。以下の実験は−75℃－−78℃の間で行なわれた。　脳パウダー(蛋白量約200mg)

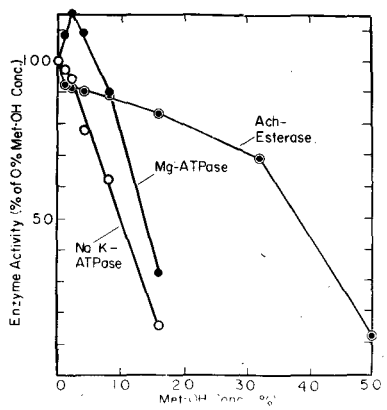
にクロロホルム・メタノール(1/1)100ml,或いはメタノール100mlを加えて1時間撹拌する。次いでこのホモジネートを2等分し,一方は直ちに-75℃下で乾燥(Molecular distillation in a high vacuum line)し"dipped sample",他方は同様-75℃下でガラスフィルターで沪液-"filtrate"と残渣-"residue"に分けた。残渣も又-75℃下で乾燥し,沪液はその酵素活性を測定する時以外は全て室温下窒素気流中で濃縮乾燥する。

図-1 方法.



沪液は乾燥後室温でクロロホルム・メタノール(2/1)に再び溶かし,Folchの方法に従って無機燐を除き,薄層クロマトグラム(シリカジェル-メルク社製),展開液クロロホルム・メタノール・酢酸水(50:25:7:3)で展開.Phosphatidyl ethanolamine, Phosphatidyl serine, Phosphatidyl choline, Sphingomyelin, Cholesterol分画に分け,それぞれのスポットから各物質を抽出純化した。Cholesterol分画は,その分画中にCardiolipine,遊離脂肪酸等を含む為,更にシリカジェル薄層クロマトグラム,展開液石油エーテル:エーテル(1/1)で再クロマトしCholesterolを他の夾雑物から精製した。薄層上での各物質の検出には一般には50% H_2SO_4 噴霧,燐脂質にはZinzadze法.Ninhydrin噴霧を併用し,常に市販の純正標品を対照に用いて同時に展開しRf値より物質の同定を行った。脂質部分の残渣への再構成実験には前記の抽出に用いたクロロホルム・メタノール(1/1)を用い,組織内実在量の倍量を残渣に加え,1時間撹拌し,後-75℃下で乾燥再構成標品(Reconstituted Sample)とした。以上4種類の酵素標品はそれぞれ酵素活性測定に供する為,30mM Tris Buffer pH 7.5中にてホモジェナイズした。Na·K·ATPase活性の測定には30mM Tris Buffer pH 7.5 $MgCl_2$·2mM. NaCl·150mM. KCl·6mM, 酵素標品150μg蛋白量,ATP-2Na 3mMの系を用いて37℃,5分間プレインキュベイションし,ATP添加によって反応を開始し,15分後に冷TCAを加えて反応を停止,Martin & Doty法(9)によりOrthophosphateの産生から酵素活性を算出した。蛋白質の定量にはLowryの方法(10)に従った。Acetylcholine Esteraseの活性測定はEllmanらの方法(11)によった。

図-2.



—結果及び考按—

1)酵素活性に対する反応液中のメタノール濃度の影響.

酵素反応液(37℃)中のメタノール濃度を変化させ酵素活性に与える影響を調べると(図-2)Na·K·ATPaseは濃度が増すに従ってその活性は急減し,16%濃度で対照の15%活性に低下する。Mg·ATPaseは2%濃度で活性にピークを認めるが,8%濃度を越えると急激

に減少し，16%濃度で対照の約30%活性になる。しかしAcetylcholine Esteraseはメタノールに対する態度を異にし，30%濃度に達しても活性は対照の70%と良く保持されていた。このことから2つのATPaseとAcetylcholine Esteraseとは37℃でメタノールに対する感受性が異なり，ATPase酵素の活性維持に必要な部分に低濃度のメタノールによって障害を受ける部分のあることが考えられる。一方脳パウダーから"dipped sample"を作る時の撹拌温度を検討した。クロロホルム・メタノール(1/1)の溶媒中で温度を-78℃から-50℃の間でホモジネートを1時間撹拌し，直ちに-78℃で乾燥させ，それぞれの酵素標品(異なる温度)につき酵素活性を測定すると，2つのATPaseとAcetylcholine Esteraseは温度変化に対して全く同じ態度を示し，-70℃以下では酵素の失活が始り，明らかに蛋白質の変性によることが示唆された。従って本実験中，酵素が有機溶媒に触れている時は常に-75℃以下の環境で実験が行なわれた。

2)有機溶媒処理に対するATPase酵素の活性変化(表-1)

表に見られるようにMg·ATPaseは有機溶媒に対してほとんど影響を受けない。メタノール処理後の残渣は対照の脳パウダーと同じ活性を示し，クロロホルム・メタノール(1/1)処理後の残渣にもMg·ATPase活性は83%であった。一方単に有機溶媒に浸された標品-"dipped sample"ではNa·K·ATPase活性は良く維持され，メタノールで91%，クロロホルム・メタノール(1/1)で81%であった。沪過後のメタノール残渣でもNa·K·ATPase活性は72%を示したが，クロロホルム・メタノール(1/1)残渣ではその活性はほとんど消失してしまい対照の2.4%であった。尚メタノール沪液，クロロホルム・メタノール沪液には2つのATPase活性は認められなかった。

表-1.

	(Mg)-ATPase		(Na·K)-ATPase		(Na·K·Mg)-ATPase
	enzymic activity	% of orig. L.N.powder	enzymic activity	% of orig. L.N.powder	enzymic activity
orig. liquid nitrogen brain powder	12.0	100	8.5	100	20.5
powder, methanol dipped	11.5	95.8	7.7	90.5	19.2
powder, chloroform-methanol dipped	11.0	91.7	6.9	81.1	17.9
methanol residue	12.0	100	6.1	71.1	18.1
chloroform-methanol residue	10.0	83.3	0.2	2.35	10.2
methanol filtrate	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
chloroform-methanol filtrate	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

enzymic activity : △Pi mMoles/g-protein/hr.

この結果からメタノール沪液中には部分的に，クロロホルム・メタノール沪液中にはほとんど，Na·K·ATPaseの活性維持に必要な物質が抽出されていることが考えられた。

3)Na·K·ATPaseの脂質要求性

そこで吾々はクロロホルム・メタノール抽出物をその残渣と低温下，有機溶媒中で再構成することを試みた。表-2にある如く，クロロホルム・メタノール全沪液を残渣と再構成するとNa·K·ATPaseの活性は脳パウダーの活性にもどり，Mg·ATPase活性にはほとんどその影響を認めない。次いでこの抽出物をシリカゲル薄層クロマトグラムで展開し，それぞれの画分について再構成を試みるとCholesterol fraction(未純化)にNa·K·ATPaseの活性化能力が最も強く，全沪液を用いた時の115%に達する。Phosphatidyl ethanolamine, Phosphatidyl serine,

表-2.

	(Mg)-ATPase	(Na·K·Mg)-ATPase	(Na·K·Mg)-ATPase / (Mg)-ATPase	(Na·K)-ATPase	% of chl-met filtrate
chloroform-methanol residue recombined with;	9.1	9.7	1.07	0.6	—
chloroform-methanol filtrate	8.5	18.4	2.16	9.9	100
"cholesterol fraction"	9.1	20.5	2.26	11.4	115
phosphatidyl ethanolamine	9.0	11.6	1.29	2.6	26.2
phosphatidyl serine	9.4	11.5	1.22	2.1	21.2
phosphatidyl choline	9.0	11.1	1.23	2.1	21.2
sphingomyelin	8.5	9.5	1.12	1.0	10.1

enzymic activity : △Pi mMoles/g-protein/hr.

表-3.

	(Mg)-ATPase	(Na·K·Mg)-ATPase	(Na·K·Mg)-ATPase / (Mg)-ATPase	(Na·K)-ATPase
chloroform-methanol residue recombined with;	10.5	11.2	1.07	0.7
chloroform-methanol filtrate	10.7	12.8	1.20	2.1
"cholesterol fraction"	11.1	13.8	1.24	2.7
phosphatidyl ethanolamine	11.8	11.9	1.01	0.1
phosphatidyl serine	11.4	14.2	1.25	2.8
phosphatidyl choline	11.1	14.1	1.27	3.0
sphingomyelin	10.3	11.0	1.03	0.7

enzymic activity: △ Pi mMoles/g-protein/hr.

Phosphatidyl choline, Sphingomyelin, では活性化は弱く, Cholesterol fraction の約半にとどまった. Cholesterol を含まない燐脂質添加標品では 10^{-4}M Ouabain の影響は認められないが, Cholesterol の存在する標品では, 再構成されて活性化された酵素活性量と同濃度の Ouabain で抑制された。又 2mM Ca^{++} で之同じ結果が得られた. 従って Cholesterol で活性化される部分は Na·K·ATPase の Ouabain 感受性部分であることも考えられる。

一方 TANAKA らは(4, 5, 6) DOC 処理後の酵素に対して, Buffer 中での脂質添加実験を行い燐脂質に Na·K·ATPase の活性化能のあることを示している。吾々も有機溶媒処理後の標品に対してこの方法を試みた。抽出した各脂質分画を Tris Buffer 中で 20kc, 150 watt, 10分間 ソニケイションして エマルジョンを作り, クロロホルム·メタノール(1/1)残渣と 37°C 30分 インキュベイションして添加を行い, 次いで酵素活性の測定を行った。表-3に見られるように燐脂質はもとよりのこと, Cholesterol fraction にも酵素の活性化がなく, 吾々の実験では有機溶媒 -75°C において のみ, その再構成が可能であり, 常温の Buffer 中では不可能であることが示された.

尚, Cholesterol fraction には前記の如く夾雑物が含まれている為, 更にシリカゲル薄層クロマトグラムで石油エーテル·エーテル(1/1)を用い展開, Cholesterol の純化を行いこの標品につき再構成実験を行った。(表-4)

表-4

	(Mg)-ATPase	(Na·K·Mg)-ATPase	(Na·K·Mg)-ATPase / (Mg)-ATPase	(Na·K)-ATPase
chloroform-methanol residue recombined with;	9.1	9.7	1.06	0.6
"cholesterol fraction"	9.1	20.5	2.26	11.4
cholesterol	8.9	17.5	1.97	8.6
origin (unknown)	8.7	10.9	1.24	2.2

enzymic activity △ Pi mMoles/g-protein/hr

表の如く純化された分画で も未純化のものと殆んど同じ活性化能を示し, Cholesterol そのものが低温有機溶媒処理され活性を失った残渣 Na·K·ATPase に必要な脂質であることが明らかとなった。尚市販の Cholesterol について同様の実験を試みほぼ同程度の活性化を得ることが出来た。

一文　献一

1) Bielski,B.H.J., and Freed,S., Biochim.Biophys.Acta. 89, 314, 1964 2) Freed,S., Science, 150, 576, 1965 3) Douzou,P., Sireix,R., and Travers,F., Proc. US Nat. Acad. Sci., 66, 787, 1970 4) Tanaka,R., and Abood, L.G., Arch. Biochem. Biophys., 108, 47, 1964 5) Tanaka,R., and Strickland,K.P., Arch. Biochem. Biophys., 111, 583, 1965 6) Tanaka,R., J. Neurochem., 16, 1301, 1969 7) Wheeler,K.P. and Whittam,R., Nature, 225, 449, 1970 8) Fenster,L.J., and Copenhave,J.H., Biochim. Biophys. Acta. 137, 406, 1967 9) Martin,J.B., and Doty,D.M., Anal. Chem., 21, 965, 1949 10) Lowry O.H., Rosenbrough, N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951 11) Ellman,G.L., Courtney,K.D., Andres,V., and Featherstone,R.M., Biochem, Pharmacol., 7, 88, 1961

23. Mixed function amine oxidaseの特性及び調節機構

櫻井征彦（長崎大・医・精神）

〔要約〕

精神科治療に用いられるchlorpromazine（CP）などのphenothiazine系薬物の代謝酵素について今日知られているのはZieglerらにより発表されたmixed function amine oxidaseのみである。従ってCPの代謝及びこれを介しての精神分裂病の病態生理を研究するに当り，先ず本酵素の特性及び調節機構を研究し次の結果を得た。ブタ肝ミクロソームの本酵素を，最初にcellulose zone electrophoresisを用いて精製した。本酵素は電気泳動的にも超遠心的にも単一でミクロソーム画分の70－80倍の活性を有し，回収率は10％であった。沈降定数は16.0Sで，分子量は462,000であった。吸収曲線はフラビン蛋白質の特性を有し，FAD含量は14.6 mμmoles/mg蛋白であり，本酵素1モル当り約6モルのFADを有し，アミノ酸組成では芳香族アミノ酸が比較的多かった。N末端分析では，本酵素1モル当り6モルのアスパラギン酸を有している。sodium dodecyl sulfateと稀塩酸を用いるsubunit studyの結果，本酵素は分子量約7万を最小単位とする6つの同一のsubunitからなり，1つのsubunitより1つのFADを補酵素として有することが判った。基質特異性は広範囲に渡るがphenothiazine系薬物が最良の基質であることが判り，その側鎖，核の変化した種々の誘導体についてKmを求めた。ラットを用いてCPの急性投与による脳，肝ホモジネートの酵素活性の影響を見たところ，脳では極めて弱い活性しかなかったが，肝の本酵素活性はCPの投与で著明に減少した。一方，phenobarbitalの投与では肝の本酵素活性は増加した。

分裂病の治療にクロールプロマジン（CP）が用いられ始めてすでに20年近くになるが，その作用機序は全く不明のままである。しかしある病者はCPが奏効し，ある病者は無効に終ることはよく知られた事実であり，又正常者に比し分裂病者が驚くべきCP耐性を示すことも臨床でよく経験することである。このことは分裂病者の病態生理が分裂病者間でも異なり，又正常者とは非常に異なったものとして薬物代謝の上に反映されているとみなすことができる。一方近年，Zieglerら[2]により，ブタ肝ミクロソームより抽出精製されたmixed function amine oxidaseがNADPH$_2$，O_2と共役して，広範囲に渡る第三アミンを基質としてそのN-oxideの形成を触媒し，これらアミンの内，特に精神科治療に用いられているCP，イミプラミン等が本酵素の最良の基質となり得ることが判って来た。従って本酵素の精製及び作用機序を研究することにより，上述の向精神薬の作用機序更には病者の病態生理の解明に資することができると考え，本研究を行なった。今回は，超遠心的にも電気泳動的にも単一に精製された本酵素の酵素化学的，物理；免疫化学的特性と，本酵素の調節機構の一端として，ラットの腹腔内に投与されたCP，phenobarbital（PB）の脳，肝の本酵素活性に及ぼす影響について，現在得られつつある結果を合せて報告する。

実験方法：

mixed function amine oxidase（式I），Demethylase（式II）の活性の測定は，酵素標品により次の2つの方法を用いた。

$$R-\overset{\bullet}{N}\lessgtr^{R_1}_{R_2} + NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow R-\overset{\bullet}{N}\overset{O}{\lessgtr}^{R_1}_{R_2} + NADP^+ + H_2O \quad \cdots\cdots (1)$$

(Dealkylase)

$$R-\overset{\bullet}{N}\overset{H}{\lessgtr}^{R_1}_{R_2} \longrightarrow RNHR_1 + HCHO \quad \cdots\cdots (2) \qquad (R_2 = CH_3)$$

1）粗酵素に対して；反応液3ml中：aniline，300μmoles；pyrophosphate，75μmoles（反応液 pH 8.4）；

$MgCl_2$, 15 μmoles ; $NADP^+$, 1.5 μmoles ; DL-isocitrate, 15 μmoles ; isocitrate dehydrogenase, 1.5 μ moles $NADP^+$ reduced/m. ; enzyme protein 1–20 mg を含む，38°C，3 分間温置後，反応は dimethylaniline (DMA) (9 μmoles) を添加すると開始された。3–10 分後 3M TCA, 0.18 ml を加えて反応を停止し，生じた DMA-N-oxide は Ziegler と Pettit の方法[13]で測定した。同時に demethylase 活性は，生じたホルムアルデヒドを Nash の方法[10]で比色法により測定した。 2) 高度に純化された酵素に対して；基質特異性 $NADPH_2$ の減少度より分光光度計を用いて測定した。反応液 1 ml 中：glycine buffer (pH 9.0), 100 μmoles, NADPH, 0.2 μmoles ; substrate, 3 μmoles ; enzyme protein, 5–50 mg を含む。

蛋白量の測定は biuret 法により，Klein (FAD) 含量は Bernard の方法[2]で測定した。沈降定数，分子量の測定 (Yphantis の方法[14]) は Beckman 社製 E 型分析用超遠心機を用いて測定した。アミノ酸分析は，6N 塩酸中 110°C，30 時間加水分解して Spackman の方法[11]で測定した。トリプトファン量は，FAD を除いたアポ酵素で Goodwin と Morton の方法[6]で，ジスルフィド量は過ギ酸酸化後 Hirs の方法[7]で定量した。N 末端分析は Eriksson と Sjöquist[5]による Edman の改良法を用いて行なった (PTH 法)。

実験結果及び考察：

[I] mixed function amine oxidase の精製：ブタ肝ミクロソーム B の粗酵素の精製法はすでに Ziegler ら[12]により報告されている。その principle step は次の如くである。

ミクロソーム分画を 0.1M guanidine (pH 8.0) で処理し，78,000×g，30 分間の沈澱物を水で可溶化し (蛋白量 20 mg/ml)，amine oxidase は Triton X-102 と X-45 の混合を溶液 1 ml 当り 5 mg 加え，0–4°C，1 時間温置後，ミクロソームより解離させ，更に溶液 1 ml 当り 1 mg のプロタミン硫酸を加え，沈澱物は 78,000×g，45 分間で除き，上清の 35–50% 硫安画分を更に 45–50% 硫安で再分画し，沈澱物を 0.05 M glycine-histidine buffer (pH 6.0) で溶解後，同様の buffer で平衡化した DEAE-cellulose column に通した。素出液は pressure dialysis で濃縮後，0.03M glycine buffer (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-100-120 に通し，最初に溶出された黄色画分を得た。cellulose zone electrophoresis ; 加温を防ぐ為冷室でカラムは内外に冷鋼を用いて行なった。buffer system は Davis[4]と同様にした。Tris-HCl (pH 8.9) で平衡化したセルロースカラム (4×60cm) に，Tris-HCl (pH 6.7) に溶解した 2ml 酵素液 (5–10 mg 蛋白値) を注意深く重層し Tris-glycine (pH 8.3) で，10mA (350V) で 5 時間泳動した。鋭利な黄色バンドがカラム底に十分に近づいた所で泳動を終り，電解槽と同じ buffer で溶出にこれを溶出した。この黄色画分は，ミクロソーム画分の 70–80 倍の活性を有し，ミクロソーム分画よりの回収率は約 10% であった。本酵素は容易に polymerize し，冷蔵保存では沈澱物を生じた。最も良い保存法は 0.03M histidine buffer (pH 6.3) 中，蛋白濃度 1.0 mg/ml 以下で，0–4°C に於いてそれ迄同活性の低下は見られなかった。本標品は acrylamide disc electrophoresis (ゲル濃度 5%, pH 9.0) で単一なバンドを示し，沈降像にても単一であることを示した。

[II] 物理，蛋白化学的特性：1) 沈降定数と分子量―単一な本酵素の $S^0_{20,w}$ は 16.0 S であり，Yphantis の沈降平衡法から求めた分子量は 462,000 ± 6,000 であった。2) 吸収スペクトルとフラビン含量―本酵素は黄色を呈し，その吸収曲線は 274, 380, 450 mμ に吸収極大を，470–480 mμ に肩を有するフラビン蛋白質の特性を有し，FAD 含量は 14.6 mμmoles/mg 蛋白であり，従って本酵素 1 モル当り (分子量 46 万) 約 6 モルの FAD を含むことになる。3) アミノ酸組成―このフラビン酵素は他のフラビン酵素 (リポアミド脱水素酵素[9]など) に比べ，チロシン，フェニールアラニン，トリプトファン等の芳香族アミノ酸

が比較的多いことが判明した。 4) N末端分析 — 分子量46万当り 5.0-5.7モルのPTH-アスパラギン酸が検出され、本酵素1モル当り6モルのアスパラギン酸基N末端に有することが明らかになった。

[III] subunit study: 1) Sodium dodecyl sulfate (SDS) 処理 — 高度に純化された酵素蛋白質を、SDS, 1%, β-mercaptoethanol, 1%を含有する 0.01 M sod. phosphate buffer (pH 7.0) 中で 37°C, 2時間温置後、その10倍稀釈液で5時間透析し、更に1夜蒸水で透析し、十分にSDSを酵素液より除いた。SDS処理後の本蛋白質は沈降像で単一で、$S_{20,w}$ は 3.0S であった。Yphantis の方法に測定された分子量は 70,300±980 で、低分子の subunit に解離していた。

2) 稀塩酸処理 — 酵素液中に相当する量の 3N および 6N 塩酸を添加し、直ちに超遠心分析を行なったところ、0.1N 塩酸 (final concentration) では、早く沈降する component と、遅い沈降速度の component が見られ、又両者の中間にわずかに存在する component が見られた。沈降定数はそれぞれ 6.9S (約 80%), 3.2S (約 20%) であった。0.83M 塩酸液では、5.6S (70%), 3.0S (30%) が、1.25M 塩酸液では、5.6S (60%), 2.9S (40%) の2つの component が見られた。同様に処理した標品を沈降平衡に到達させて得た干渉像も同様に単一の蛋白液でなく、0.1M 塩酸液では、分子量 66,100±700, 141,400±5,100, と 222,300±8,000 の, 0.83 M では 68,900±1400 と 145,400±1,600 の2-3つの component に解離した。以上の結果から分子量7万 (7S), 14万 (5.6S), 22万 (6.9S) はそれぞれ monomer, dimer, trimer であり、本酵素は生ず分子量22万の trimer に解離し、次に dimer, monomer と解離する様に思われる。電顕学的研究 (R.M. Oliver) は以上の結果を裏付けた。本酵素は分子量約7万を最小単位とする6つの同一の subunit からなり、1つの subunit 当り1つの FAD を補酵素として有する高分子蛋白質であると言える。

[IV] 基質特異性: 1) model compounds — 第1表に示すように、第二アミンより第三アミンが、diethylamine より dimethylamine が Km が小さく、より良い基質となり得る。直鎖のアミンでは、C原子が多くなるに連れ oxidase 活性が高く、C原子の9つ迄なる dimethylnonylamine が最高の活性を示した。この分子の長さは 12Å で CP のそれに相当する。

2) phenothiazine derivatives Bar related compounds — 第2表に示すように、promazine の Km は 6.6×10^{-5}M であったが、側鎖の C 原子が2個の phenethiazine の Km は 1.2×10^{-4}M と増大した。側鎖の一部が hetrocyclic ring となった trifluperazine と prochlorperazine の Km はそれぞれ 1.7×10^{-5}M, 3.8×10^{-5}M で、核の2位に Cl がついた CP, chlorprothixene の Km はそれぞれ 3.3×10^{-5}M, 3.0×10^{-5}M と小さな値を示した。核自体の変化した imipramine の Km は 5.0×10^{-5}M で小さかったが、側鎖、核ともに変化した amitryptyline, butriptyline の Km はいずれも 1.0×10^{-4}M で大きな値を示した。その他 phenothiazine 系又はその類似物以外に、atropine, morphine, nicotine, ephedrine, N,N-dimethyltryptamine を基質としその N-oxide の生成を触媒することはすでに報告されている。本酵素は同一の subunit からなるにもかかわらず (おそらく FAD 近傍における1つの binding site であろうが)、以上の様に広範囲の基質特異性を有している。

第1表 Substrate specificity of the amine oxidase for some model compounds

compound	Km	Vmax[a]
N,N-dimethylaniline	3.3×10^{-5}M	1.1
N-ethyl, N-methylaniline	5.9×10^{-5}M	1.0
N,N-diethylaniline	1.3×10^{-4}M	0.9
N-methylaniline	3.2×10^{-4}M	0.6
N,N-dimethyloctylamine	1.0×10^{-3}M	1.5
N-methyloctylamine	4.0×10^{-3}M	0.9

a Rate expressed as μmoles of substrate-dependent NADPH oxidized / min / mg protein

[V] ラット肝ホモジネートにおける CP, PB の影響： mixed function amine oxidase の調節機構として，Arrhenius[1] は corticosteroid が本酵素活性を高めることを報告し，ストレスと本酵素が何らかの関係を有することがわかり興味ある結果である。又，最近，本酵素活性が年令と伴に上昇することがラット肝で証明されている[3]。演者は CP 自体が，その代謝酵素に及ぼす影響を調べてみた。

成熟ラット肝ホモジネートの本酵素活性をみたところ，CP の 30mg/kg の腹腔内への 1 回注射では，対照 (Saline) に比し酵素活性が著明に減少した（対照，2.59，CP 投与後，1.78）。尚 PB の 80 mg/kg の腹腔内注射では，やや活性の増加が見られた。同時に大脳，小脳，脳幹部の本酵素活性を測定したが，いずれも 0.05 以下であり，CP と PB 処置にても活性には大した変動は見られなかった。CP の急性投与の影響は，患者血中の CP 濃度が，初めの 1 週間は上昇するが，その後減少していくという Lader の報告[8]と合わせると興味ある結果であるが，現在更に CP の慢性投与による本酵素活性を検討中であり合わせて報告する。

第 2 表 Substrate specificity of the amine oxidase for phenothiazine derivatives and related compounds

Compound	Km	Vmax
Promazine	6.6×10^{-5} M	1.5
Phenethiazine	1.2×10^{-4} M	1.0
Trifluperazine	1.7×10^{-5} M	1.7
Prochlorperazine	3.8×10^{-5} M	1.7
Chlorpromazine	3.3×10^{-5} M	2.0
Chlorprothixene	3.0×10^{-5} M	0.9
Imipramine	5.0×10^{-5} M	1.0
Amitryptyline	1.0×10^{-4} M	1.5
Butriptyline	1.0×10^{-4} M	1.4

第 3 表 N-oxidation and demethylation of DMA catalyzed by liver and brain homogenates from rats of CP or PB treatment

Treatment	Body weight (g) before treat.	Body weight (g) after treat.	Liver weight (g)	Liver oxidase act. (mμ moles / m. / mg protein)	Liver demethylase act. (mμ moles / m. / mg protein)	Brain* oxidase act. (mμ moles / m. / mg protein)	Brain* demethylase act. (mμ moles / m. / mg protein)
Saline	370	368	12.0	2.59	0.77	<0.05	<0.05
CP (30mg/kg/i.p.)	372	354	13.0	1.78	0.51	<0.05	<0.05
Saline	258	252	9.9	1.52	0.30		
CP (30mg/kg/i.p.)	252	244	9.5	1.33	0.27		
PB (80mg/kg/i.p.)	248	237	9.4	1.77	0.41		

* 大脳，小脳，脳幹部の各分画を測定したがいずれも <0.05 であった。

（本研究の大部分はアメリカ合衆国テキサス大学で，D.M. Ziegler らその協同でなされた。）

文献

1) Arrhenius,E., Cancer Res., 28, 264, 1966.
2) de Bernard,B., Biochem.Biophys.Acta., 23, 510, 1957.
3) Das,M.L. and Ziegler,D.M., Arch.Biochem.Biophys., 140, 300, 1970.
4) Davis, B.J., Ann.N.Y.Acad.Sci., 121, 404, 1964.
5) Eriksson,S. and Sjöquist, J., Biochem.Biophys.Acta, 45, 290, 1960
6) Goodwin, T.W. and Morton,R.A., Biochem.J., 40, 628, 1946.
7) Hirs, C.H.W., Methods in enzymology (ed.S.P.Colowick and N.O.Kaplan), Academic Press Inc., New York, Vol.11, P.59, 1967.
8) Lader, M.H., 国際精神薬理学会議，「精神分裂病に関するシンポジウム」，1970年9月（レニングラード）.
9) Massay, V., Hoffman,T. and Palmar, G., J.Biol.Chem., 237, 3820, 1962.
10) Nash, T., Biochem.J., 55, 416, 1953.
11) Speckman,D.H., Stein,W.H. and Moore, S., Anal.Chem., 30, 1190, 1958.
12) Ziegher,D.M., Mitchell, C.H. and Jollow, D., " Microsomes and drug oxidations " (J.R.Gillette et al), P.173, Academic Press, New York (1969).
13) Ziegler,D.M. and Pettit, F.W., Biochem.Biophys.Res.Commun., 15, 188, 1964.
14) Yphantis, D.A., Biochemistry, 3, 297, 1964.

24. ミトコンドリアのモノアミン酸化酵素（MAO）の活性化と抱水クロラールの影響

伊藤秀博・奥山典生
（都立大・理・化学）

〔要約〕

脳内のモノアミン代謝調節にＭＡＯが何らかの役割をはたしていると考えられている。昨年、磯辺らは阻害物質の除去によってＭＡＯ活性が増大する可能性を報告した。われわれは蛋白質あるいはその複合体がゆるやかに変質するような条件、つまり種々の物理化学的処理によりミトコンドリア膜中のＭＡＯ活性が次第に増大する現象を見出した。すなわち長期凍結保存、加熱、希釈、凍結融解処理をミトコンドリアに対し行うことによりＭＡＯ活性がおよそ２倍まで増大した。一方このようなＭＡＯの活性化は抱水クロラールなどの化学試薬によってもみられ、とくに抱水クロラールは低濃度でも著しい活性化がみられた。またこの活性化はすでに物理化学処理により十分に活性化したものにはみられなかった。そこで新鮮なミトコンドリアを用いて、抱水クロラールなどの濃度、処理時間の活性に対する影響をさらに詳しく調べた。一方界面活性剤によってミトコンドリアの処理を行うと、ＭＡＯは可溶化され活性の回収率は約２倍であったが、抱水クロラール処理、凍結融解によってはＭＡＯは可溶化されず、活性化現象はＭＡＯが可溶化されたためではないと考えられる。以上の事実から、生体内では膜中のＭＡＯは活性が幾分 mask された準安定の状態で存在すると考えられる。

脳内のモノアミン類の濃度はほぼ一定のレベルに保たれており、これらの代謝調節にはモノアミン酸化酵素（ＭＡＯ）も分解速度の制御という意味で何らかの役割をはたしていると考えられている[6]。昨年日本生化学会において磯辺らは、ＭＡＯの阻害物質が脳組織中に存在する可能性について述べ、これらの除去によってＭＡＯ活性が増加することを報告した[2]。このような研究の過程においてミトコンドリアの外膜に存在するＭＡＯの活性は、粗ミトコンドリア分画を凍結保存するというような、温和な処理のみによっても次第に増大し、一方また微量の抱水クロラールあるいはその他のアルデヒド類の添加によっても活性が増大することを見出した。そこでこのような現象についての基礎的な検討を試みた。

〔実験材料および方法〕

1．酵素活性の測定

基質には ^{14}C-チラミンを用い、生成したアルデヒドを液体シンチレーション計数法により測定した[1]。すなわち酵素反応液に、0.2Mトリエタノールアミン酢酸緩衝液（pH7.4）を用い、反応時間10分で活性測定を行った。酵素活性は反応生成物の radioactivity (cpm/10 min) で示し、1,500 cpm/min が 0.3 μmoles/min に相当する。酵素反応時間10分以内は反応時間と酵素活性が比例する部分であることを確めた。反応液中に抱水クロラールを含む場合の活性測定に対する影響を調べたのが第１表であるが、約３％低い測定値を示したが、以後の実験には影響

第１表　抱水クロラールのMAO活性測定に対する影響

	活性 (cpm/10min)
ＭＡＯ活性	2,150
反応終了時に 10^{-3}M 抱水クロラールを加え生成物を抽出した場合	2,090

ないものと考えた。

2．粗ミトコンドリア分画の調製(5)

ウシ大脳灰白質5gに50mlの0.32Mショ糖を含む0.01M-トリエタノールアミン酢酸緩衝液(pH 7.4)を加え、Potter型ホモジェナイザーを用い4°C、2分間10回上下しホモジェナイズした。ホモジェネートは900g 10分間遠心により細胞破砕物および核を除き、上清をさらに10,000g 15分間遠心し、得られた沈澱を30mlの上記の緩衝液に再懸濁し遠心(10,000g 15分間)する。この操作を2回繰返し洗浄した沈澱(110～160mg蛋白を含む)を粗ミトコンドリア分画とした。

〔実験結果〕

1．物理化学的処理による活性の上昇

1-1．凍結保存の影響

粗ミトコンドリア分画の調製直後と長期間−20°Cで凍結保存した後のMAO活性を比較した結果を第2表に示した。MAO活性は調製のバッチにより異るが、一般に1.5～2倍に上昇する現象が認められた。以後の実験では調製直後の新鮮な分画を用いた。

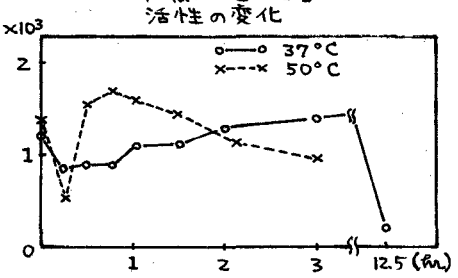
第2表 凍結保存の影響

		調製直後	40日間凍結保存後
a	MAO活性 (cpm/10min)	1,100	1,520
b	抱水クロラールによる活性化後の活性	2,630	1,720
	$\frac{b}{a}$	2.4	1.1

1-2．加熱処理の影響

次に加熱処理によるMAO活性の変化を調べるために、粗ミトコンドリア分画をウォーター・バスを用いて37°Cにincubateした後に、活性を測定した結果を第1図に示した。処理により活性はいったん下るが、再び上昇し約3時間で保温前よりも高い活性を示すようになった。さらに温度を上げ50°Cでincubateを行うと最高活性を示す時間は約1時間後で以後は次第に酵素は失活した。

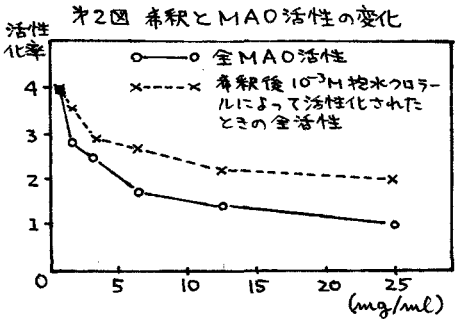
第1図 加熱処理による活性の変化



1-3．希釈の影響

蛋白質は一般に希釈によって変性することが知られている。粗ミトコンドリア分画を0.32Mショ糖を含む0.01Mトリエタノールアミン酢酸緩衝液(pH 7.4)で希釈し、ミトコンドリア濃度と希釈直後のMAO活性の関係を検討したのが第2図である。縦軸は粗ミトコンドリア分画(25mg蛋白/ml)の全活性を1とし、希釈した後の全活性をその倍数で示してある。希釈の結果、ミトコンドリア濃度が下るとMAO活性が増大することが認められた。

第2図 希釈とMAO活性の変化

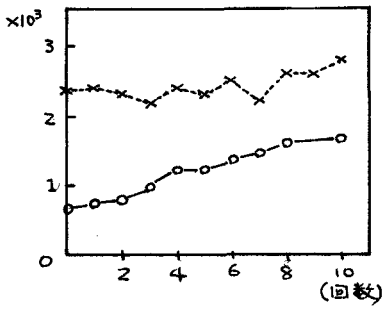


1-4．凍結融解処理による活性の変化

粗ミトコンドリア分画をフリーザーを用いて凍結(−20°C、1hr)後、融解し直にMAO活性を測定した。この凍結融解処理を10回

繰り返したときのMAO活性の変化を第3図に示した。MAO活性は処理の回数に従ってほぼ比例的に上昇し、10回の処理後活性は2.5倍まで増大した。

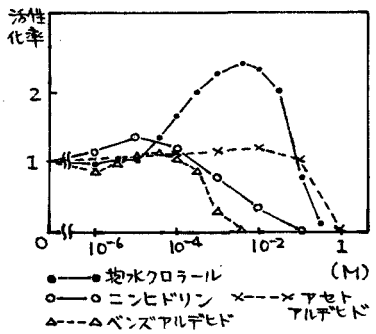
第3図 凍結融解処理と活性変化

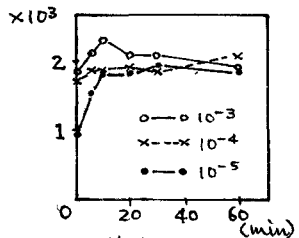


2. 抱水クロラールおよびその他のアルデヒド類による活性の上昇

上述したように物理化学的な方法によるミトコンドリアMAOの活性化は抱水クロラールのような化合物によっても起った。このことは第2表、第3図、第2図などでも示されている。しかし物理化学的処理と抱水クロラールによる活性化の相互関係について見ると、物理化学的処理により十分に活性化されたものには、抱水クロラールの活性化の影響はまったくみられない。そこで抱水クロラールについての実験は調製直後の生体内のミトコンドリアに近い状態にあると考えられるMAO活性について行った。粗ミトコンドリア分画のMAO活性測定を異った濃度の抱水クロラールの存在下で行った(第4図)。縦軸はMAO活性を抱水クロラールを含まない場合を1としてその活性化率を、横軸は酵素反応液中の抱水クロラール濃度を示す。この結果から抱水クロラール濃度が10^{-5}M以上ではその濃度に応じて活性が増大し、3×10^{-3}Mで最大の活性化率(2.5倍)を示した。また高濃度では逆に強い阻害を示した。同様の実験をベンズアルデヒド、ニンヒドリン、アセトアルデヒドについて行い、同様に第4図に示した。上記3種の試薬によってともに若干の活性化がみられたが、ベンズアルデヒド、およびニンヒドリンは抱水クロラール、アセトアルデヒドに比べて10~100倍低い濃度で強い阻害を示した。次に抱水クロラールについてあらかじめPre-incubationを行い、その後基質を加えて活性測定を行った(第5図)。縦軸はMAO活性、横軸はPreincubationの時間を示す。10^{-5}Mという低濃度でも10分のPre-incubationによりMAO活性が増大したことから、一般に時間とともに活性化が進行すると考えられるが、10^{-3}, 10^{-4}Mのように十分量の抱水クロラールの存在下では、ほぼ瞬時に活性化は完了しているように思われる。

第4図 抱水クロラールおよび他のアルデヒド類による活性の変化





第5図 抱水クロラールによる活性化とPreincubationの時間

3. 可溶化とMAOの活性変化

3-1. 界面活性剤によるMAOの可溶化と活性

非イオン系界面活性剤Emulgen810を用いるミトコンドリアの破壊、可溶化の結果MAOが可溶化されることは小幡[4]らによる報告があるが、われわれは最終濃度1%になるようにEmulgenを加え、4°C, pH7.4, 4時間撹拌の後に30,000g 60分の遠心を行い、その上清と沈澱のMAO活性を測定した(第3表)。可溶化の結果上清および沈澱のMAO活性回収率の和が210%となって活性の上昇がみられた。ところが処

理後は上清も沈澱も抱水クロラールによる活性の上昇を示さず、逆に若干の阻害がみられた。

3-2. MAOは抱水クロラールで可溶化されるか

次に1,2において示された活性増加はMAOが可溶化されたためとも考えられるので、この点について調べた。凍結融解処理および10^{-3}M抱水クロラール、10分間、37°C処理後、30,000g 60分遠心しその上清と沈澱についてMAO活性を測定した(第4表)。処理後の上清にはいずれの場合も活性はほとんど見出されなかった。またミトコンドリア中のMAOは活性化が起っていた。以上からミトコンドリアのMAOの活性化はMAOが可溶化されたためではないと考えられる。

第3表 EmulgenによるMAOの可溶化と活性

		体積 (ml)	MAO活性	活性回収率	抱水クロラールによる活性化後
粗ミトコンドリア分画		2.0	650	100	1,970
可溶化処理遠心後	上清	6.2	330	145	290
	沈澱	0.8	1,020	65	990

第4表

		体積 (ml)	MAO活性	活性回収率
凍結融解後の粗ミトコンドリア分画		8.0	1,150	100%
遠心後	上清	4.4	70	1
	沈澱	3.6	1,780	71
抱水クロラール処理後		8.0	1,120	100
遠心後	上清	5.6	60	0.7
	沈澱	2.4	2,160	61

[考察]

物理化学的処理の結果に見られるようにミトコンドリア中に存在するMAO活性は、蛋白質あるいはその複合体をゆるやかに変質させる条件下で次第に増大する。このような事実は、生体内においてはMAO活性が幾分maskされた状態、云いかえればmeta-stableな状態で存在することを示すと考えられる。すなわち活性化に際して、ミトコンドリア膜のコンホメーションが変化してMAOが露出するとも考えられるし、また血液のアミン酸化酵素の限定分解でも観察され[3]、また磯辺らの研究[2]でも示唆されたように、MAOをmaskしていた阻害物質が除去されたとも考えられる。現在までの実験ではこのどちらとも考えられ、確定的な議論をするためには、さらに多くの研究を必要とする。

一方、MAOが上述のようにmeta-stableな状態に存在するとすれば、抱水クロラールのような薬理作用をもつ物質により活性化されアミン類の減少を惹起させたり、あるいはイミプラミンのような物質で阻害されてアミンの濃度を増大させたりすることも可能で、アミン作用説[6]に対して一応有用な事実を提供するものと考えられる。

[文献]

(1) 橋本豊、奥山典生, 生化学, 42, 350 (1970)

(2) 磯辺俊明、奥山典生, 第43回日本生化学会抄録、生化学, 42, 570 (1970)

(3) 菊地直枝、奥山典生, 未発表

(4) 小幡二三郎、畔柳詔子、庄貞行、上条一也、中村泰治, 生化学, 40, 15 (1968)

(5) Stahl, W.L., Smith, J.C., Napolitano, L.M., and Barford, R.E., J. Cell Biol., 19, 293 (1963)

(6) 塚田裕三編、脳の生化学 (1969)

25. ラット脳のコレステロール生合成—特にスクワレン酸化酵素について

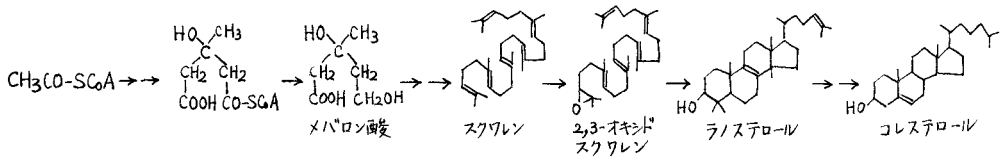
山本尚三・大西兒子・早石　修
（京大・医・医化）

〔要約〕

脳に多量に存在する脂質成分であるコレステロールの脳における代謝とその変動を明らかにするために、放射性のスクワレンおよびその誘導体を用いて、放射能のステロールとそれに至る中間体のオキシドスクワレンへの取込みを調べた。ラットの全脳ホモジネートと^{14}C-スクワレンを反応させるとステロールの生成が認められるが、2,3-オキシドスクワレンを共存させると放射能は専らその部分に見出される。基質類縁体の^{3}H-10,11-ジヒドロスクワレンを用いると、次の閉環が起らないので、エポキシドの蓄積が認められる。これらの方法で脳のスクワレン酸化酵素活性を調べると、顆粒分画と可溶分画の両者が必要であり、後者は肝可溶分画で置換されうる。反応にはTPNHと分子状酸素を必要とする。SKFなどによる阻害は認められないが、一酸化炭素を含む気相中でエポキシド化は阻害される。酵素活性はラットの成長に伴って変動し、生後約2週間は活性は高いが、それ以後は低下し、2個月程度では殆んど認められない。

コレステロールは脳神経組織の脂質成分のうち高い比率を占め、特にミエリンの総脂質の約40%はコレステロールである(1)。その代謝を明らかにすることは、神経の構造と機能の理解に寄与するものと思われる。脳のコレステロールの由来に関しては、古くは肝臓で合成されたものが脳へ取込まれると考えられたこともあったが、Srereらの研究により、^{14}C-酢酸からコレステロールへの放射能の取込みで、ラット脳における in situ の合成を調べると、幼若ラットで活性が強く、成熟ラットでは殆んど合成がみられないことが明らかになった(6)。またメバロン酸からの放射能の取込みをみた報告もある(4)。

コレステロールの生合成経路は肝臓と酵母で詳しく研究されている。アセチルCoA



からメバロン酸を経て、炭素数30個の鎖状炭化水素のスクワレンを生じ、これが末端二重結合のところでエポキシ化され、ついで閉環してステロイド核を形成してラノステロールを生じ、さらにコレステロールに至る。スクワレンをエポキシ化する酵素は分子状酸素とTPNHとを要求する酸素添加酵素である(9)。

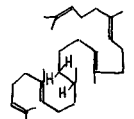
われわれは脳のスクワレン酸化酵素活性を、(1) 2,3-オキシドスクワレンを用いて^{14}C-スクワレンの放射能を捕捉する。(2)類縁体の10,11-ジヒドロスクワレンが、エポキシ化

されるがその後閉環しないことを利用する。という2種の方法で測定し、その諸性質を明らかにすることが出来た。

〔実験方法〕

酵素標品：主として生後1週間前後のラットを用いた。断頭脱血後、全脳を取出し湿重量を秤量する。ホモジネートは、2倍量の0.1M リン酸緩衝液、pH 7.5（1mM EDTA を含む）を加え、Potter-Elvehjemのホモジナイザーで調製する。顆粒分画を調製する場合は、7倍量の緩衝液を加えてホモジナイズし、800×g で10分間遠心し、その沈渣を3倍量の緩衝液で洗浄し、先の遠心上清と合わせ、さらに100,000×g で60分間遠心し、その沈渣を約5倍量の緩衝液で洗浄後再び遠心し、その沈渣を最初の湿重量に等しい容量の懸濁液とする。ラット肝可溶分画は、2倍量の緩衝液とホモジナイズして、8,000×g で15分間遠心した上清をさらに100,000×g で60分間2回遠心し、その上清を用いる。

基質：^{14}C-スクワレンはメバロン酸-2-^{14}Cよりラット肝ホモジネートを用いて調製した(5)。10,11-ジヒドロスクワレン-13-^{3}H（右の構造式参照）はCorey らの方法で(2)、日本新薬綜合研究所の松村進午博士と東北大学の小倉協三博士に合成していただいたものである。2,3-オキシドスクワレンは van Tamelen らの方法(8)により合成した。



10,11-ジヒドロスクワレン

酵素活性測定：スクワレン酸化酵素活性は、^{3}H-ジヒドロスクワレン（2.5 nmoles, 20,000 cpm）, TPNH（1μmole）, リン酸緩衝液、pH 7.5（0.1 mmole）とホモジネートのみ、または顆粒分画と肝可溶分画とを1mlの反応液で37°で60分間反応させ、生じたエポキシドを定量する。ステロール生成をみる場合は、^{14}C-スクワレン（5 nmoles, 10,000 cpm）を用いる。反応液を鹸化処理した後、石油エーテルで抽出し、シリカゲル薄層クロマトをジクロロメタン中で行い、スクワレン(S)、オキシドスクワレン(OS)、ステロール（コレステロール(C)、ラノステロール(L)）の各分画（第1図参照）を掻取って、液体シンチレーションカウンターで計測する。

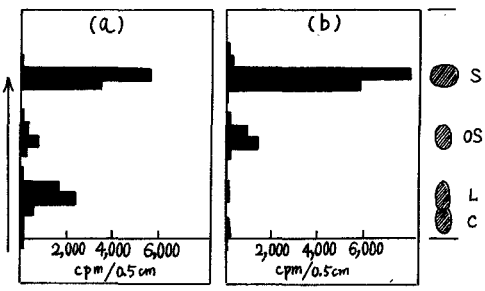
コレステロール定量：Lieberman-Burchard 反応(7)をアルカリ水解した試料(3)について行う。

〔実験結果〕

(1) ステロール生成

ラット全脳ホモジネートのみ、または顆粒分画と可溶分画とを^{14}C-スクワレンと反応させると、第1図(a)のようにステロールの生成が認められる外、通常若干の放射能がオキシドスクワレンにも認められる。ステロール生成には脳の顆粒分画と可溶分画の両者が必要で、後者は肝可溶分画で置き

第 1 図



第 1 表

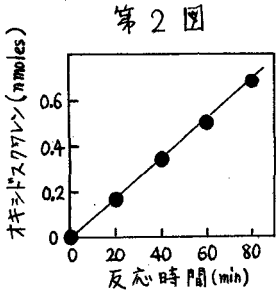
酵素系	ステロール生成量
	nmoles/hr
脳顆粒分画	0.15
〃 ＋脳可溶分画	0.75
〃 ＋肝可溶分画	2.22

換えることが出来、さらにより有効である(第1表)。

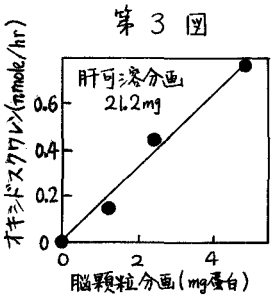
(2)オキシドスクワレンによる放射能捕捉

^{14}C-スクワレンからステロールを生成する系に、2,3-オキシドスクワレンを添加すると、第1図(b)の如く放射能はオキシドスクワレンにのみ認められ、ステロールの生成は見られない。オキシドスクワレン生成は直線状に進行し(第2図)、顆粒分画(第3図)と可溶分画(第4図)の両者に依存する。

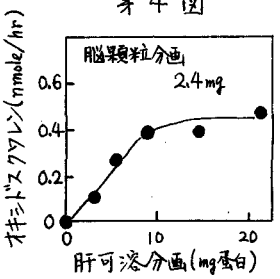
第2図



第3図



第4図



(3)10,11-ジヒドロスクワレンを基質とするスクワレン酸化酵素活性

スクワレンの類縁体の10,11-ジヒドロスクワレンを基質として反応させると、そのエポキシ化は第2表の如くスクワレンの添加によって阻害される。反応にはTPNHと分子状酸素を必要とする(第3表)。エポキシ化は少くとも60分間は直線状に進行し(第5図)、顆粒分画(第6図)と可溶分画(第7図)の両者の存在が必要である。

第2表

スクワレン添加	ジヒドロスクワレン酸化
n moles	n mole/hr
0	0.342
10	0.130
30	0.042

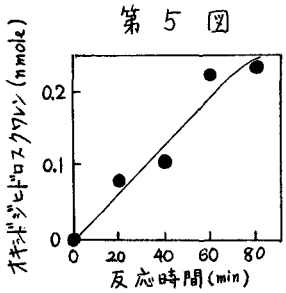
第3表

反応系	ジヒドロスクワレン酸化
	n mole/hr
TPNH + O_2	0.062
O_2	0.004
TPNH	0

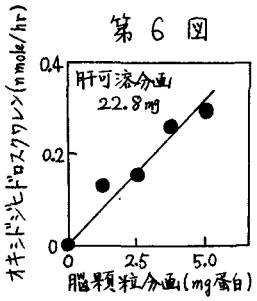
第4表

気相	活性
	%
空気	100
N_2: O_2 = 90:10	109
CO: O_2 = 90:10	31
空気	100
N_2: O_2 = 95:5	84
CO: O_2 = 95:5	33

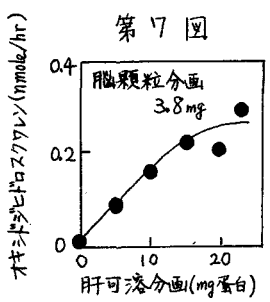
第5図



第6図



第7図

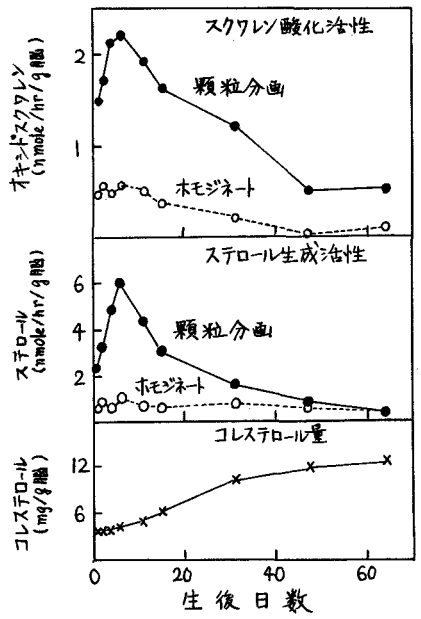


肝ミクロソームの種々の物質の水酸化、脱メチルに関与するチトクローム P-450の強力な阻害剤であるSKF 525A、SKF 8742A、Lilly 18947、Lilly 38704、MG 3062は、0.1mMでは殆んど脳のスクワレン酸化酵素に影響しない。一酸化炭素を含む気相中では第4表のように可成り著明な阻害が認められる。

(4) ラット成長に伴う脳のスクワレン酸化酵素活性の変動

生後種々の日数を経たラットの全脳のホモジネートおよび顆粒分画のスクワレン酸化活性とステロール合成活性とを調べると、第8図の如く生後2週間程は活性が認められるが、約1個月以後は殆んど活性はない。この頃にはコレステロール量は略一定値に達している。

第 8 図



〔考察〕

ラット脳のスクワレン酸化酵素の変動は、コレステロール生合成の変動をみた他の報告（例えば(4)）と略一致し、ミエリン形成と密接に関連していると考えられる。酵素活性に必要な可溶分画は本体は不明であるが、脳と肝と共通して有効であることは興味あるところである。一酸化炭素を含む気相中でみられる阻害は、果してP-450に関連しているものかどうか、脳におけるP-450の存在が明確にされていない現在、今後の細胞分画と分光学的研究が必要である。

〔文献〕

(1) Autilio, L.A., Norton, W.T., Terry, R.D., J. Neurochem., 11, 17 (1964).
(2) Corey, E.J., Russey, W.E., J. Am. Chem. Soc., 88, 4751 (1966).
(3) Entenman, C., Methods in Enzymol., 3, 311 (1957).
(4) Kandutsch, A.A., Saucier, S.E., Arch. Biochem. Biophys., 135, 201 (1969).
(5) Popják, G., Methods in Enzymol., 15, 438 (1969).
(6) Srere, P.A., Chaikoff, I.L., Treitman, S.S., Burstein, L.S., J. Biol. Chem., 182, 629 (1950).
(7) Stadtman, T.C., Methods in Enzymol., 3, 392 (1957).
(8) van Tamelen, E.E., Curphey, T.J., Tetrahedron Letters, 121 (1962).
(9) Yamamoto, S., Bloch, K., J. Biol. Chem., 245, 1670 (1970).

26. セロトニンの生合成に関する酵素的研究(1)，トリプトファン水酸化酵素の性質

堀　真一郎・貫和敏博・真下陽子・幕内晴朗
村松　宰・市山　新　（東大・医・栄養）

〔要約〕

セロトニンの生合成機構及びその調節機構を酵素レベルで研究する目的で牛の松果体からトリプトファン水酸化酵素を約30倍精製し，その性質を調べたところ鉄ガこの酵素の活性発現と密接な関連を持つことが明らかとなった。松果体のトリプトファン水酸化酵素は哺乳動物の脳幹の酵素と同様，還元型プテリジンとジチオスレイトールを助酵素あるいはその安定化剤として絶対的に必要とするほか鉄によって著明に活性化される。鉄による最大の活性化は酵素をジチオスレイトールとカタラーゼの存在下にpH 8.5～9の間で $1\sim5\times10^{-5}$M の鉄と共に嫌気的条件下にプレインキュベートした時に認められる。好気的条件下にも活性化が認められるが，活性化に伴う酵素の失活が特に活性化反応の至適pHであるアルカリ条件で速かである。この効果は鉄に特異的で銅，水銀，カドミウム，コバルト，錫，ニッケル，カルシウム，マグネシウム，マンガン等は全て活性化作用を持たない。O-フェナンスロリンなどの鉄のキレーターは酵素活性を100%阻害するがこのキレーターの阻害効果は鉄の添加により完全に打ち消される。m-フェナンスロリン，ジエチルジチオカルバメイト等は阻害効果を示さない。鉄による活性化機構に関しては，現在研究中である。精製酵素を用いて予備実験を行ったところ本酵素がp-クロロフェニルアラニン，フェニルアラニン及びその他のカテコールアミン生合成の中間体による阻害効果が認められたので，その解析の結果も合わせて報告する予定である。

セロトニンはトリプトファン(TP)から5-ハイドロオキシトリプトファン(5HTP)を経て生合成される。この内，第二段階の5HTPの脱炭酸反応を触媒する酵素は，5HTPの他，3,4-ジオキシフェニルアラニン(DOPA)などをも基質とする。即ちカテコールアミンの生合成にも関与する基質特異性の広い芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素であることが明らかにされた(10,11)。従って，第一段階のTP-水酸化酵素がセロトニン生合成の律速酵素として(4)，又恐らく各種代謝調節機構の支配を受ける段階として注目されたが，従来この酵素のアッセイ，精製が困難であったためK酵素の性質，反応機構，調節機構などは長らくの間不明であった。先年われわれはカルボキシル基を^{14}Cで標識したTPからの放射性炭酸ガスの生成でTP-水酸化酵素活性を測定する方法を開発し，始めてこの酵素の簡便なアッセイを可能とすると共にモルモットの脳より部分精製した酵素標品を用いて本酵素が還元型プテリジンを助酵素とする水酸化酵素で，フェニルアラニン水酸化酵素とは異った酵素であることを報告した(6,7,8)。今回，セロトニンの生合成機構及びその調節機構を酵素レベルで更に追求する目的で牛の松果体からのTP-水酸化酵素の精製を試みたところ，本酵素が鉄と嫌気的条件でプレインキュベートすると著明に活性化されることがみとめられた。この現象を利用して松果体よりTP-水酸化酵素をより高度に精製し酵素の基本的な性質を調べたので報告する。

〔実験方法〕

TP-水酸化酵素活性は表1に示した反応条件でL-TP-(側鎖-1)-^{14}C からの$^{14}CO_2$の生成で測定した(8,9)。生成した炭酸ガスはGliemannの方法(2,3)に従い25%

β-フェネチルアミンに捕捉レベックマン DPM-100 液体シンチレーションカウンターにて測定した。芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素は豚の腎臓より硫安分画により部分精製した(10)。牛の松果体は東京芝浦臓器KKの御好意により摘出後直ちに凍結保存したものを適時融解して使用した。

表1 TP-水酸化酵素のアッセイ条件

Preincubation	
0.2 M Tris-酢酸, pH 8.1	0.010 ml
2.5 mg/ml カタラーゼ	0.010
0.2 M DTT*	0.025
Enzyme + H_2O	0.150
1.32 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	0.005
	0.20
↓ Preincubation 37°C, 30min under N_2	
Assay	
プレインキュベートした酵素液	0.100 ml
0.25M Na-燐酸, pH 7.0	0.100
H_2O 又は 添加物	0.015
1.84 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	0.005
10 mM $DMPH_4$*	0.023
0.85 mM L-TP-^{14}C (91,000 cpm/0.005 ml)	0.005
	0.25
↓ Reaction 37°C, 30'min	
反応を 1N HCl 0.2 ml にて停止した後, 1N NaOH 0.2 ml にて中和。	
Evolution of $^{14}CO_2$	
中和した反応液	0.65 ml
1M Tris-Acetate, pH 8.8	0.15
H_2O	0.10
5mM PALP*, pH 7.0	0.04
豚の腎臓脱炭酸酵素	0.06 (約30 i.u)
	1.0
↓ Incubation 37°C, 30min	
脱炭酸反応を 30% PCA 0.2 ml にて停止。	

〔実験結果〕

1) 牛の松果体からのTP-水酸化酵素の精製　実験は特に断らない限り，表2に概括した方法に従い約30倍精製した酵素標品を用いて行った。松果体のTP-水酸化酵素は大部分の活性が3,300×gと25,000×gの間で沈澱する顆粒分画に認められるが，松果体を4倍量の20mM Tris (0.5mM DTT-0.5mg% カタラーゼを含む) とワーリングブレンダーにてホモゲナイズし，更にpHを14% NH_4OH で注意深く10に調節することにより約50%の効率で可溶化した。次いで，硫安分画を30%と50%飽和の間で行い透析した後 DEAE-cellulose のカラムを素通り (緩衝液; 20mM Tris-酢酸, pH 7.4-0.2mM DTT) させ，更に Hydroxylapatite カラムからの吸脱着 (溶出液: 0.2M $(NH_4)_2SO_4$ in 20mM Tris-酢酸, pH 7.4) により表2に示した様に約17%の収量で約30倍精製した。精製標品にはテロシン水酸化酵素活性は全く認められず，又活性には還元型プテリジンと鉄とDTTがほぼ絶対的に必要である他，後述の如く鉄によって著明に活性化される。尚本酵素の精製に関しては各ステップの操作に検討を加え，更にp-cellulose カラムクロマト等の操作を加えることにより，現在より高収量で高度の精製が可能となっている。

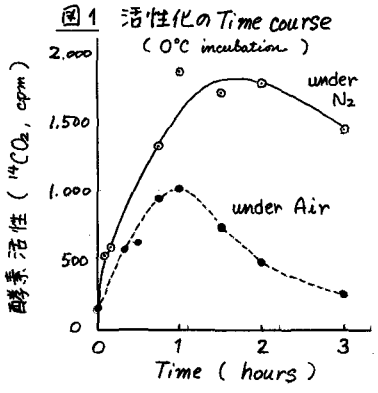
表2 TP-水酸化酵素の精製

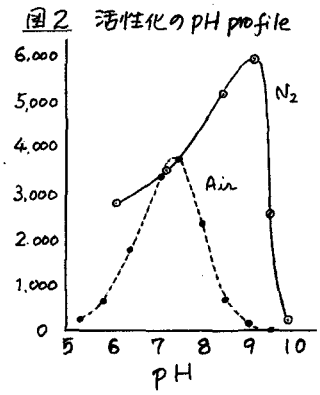
	容量 (ml)	酵素活性 n moles/15min	蛋白量 mg	収量 %	比活性 unit/mg
ホモジネート	565	5,057 (207)	15,707	100	0.32
上清液 (77,500×g)	735	2,226 (103)	3,528	44	0.63
硫安分画	230	1,607 (428)	1,230	32	1.31
Hydroxylapatite	160	880 (139)	94.4	17	9.32

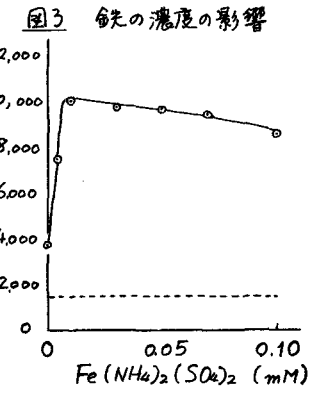
2) 鉄によるTP-水酸化酵素の活性化　表2の( )内に精製各段階の酵素標品の活性を鉄とプレインキュベートしないで測定した値を示したが，この様に松果体のTP-水酸化酵素は鉄により著明に活性化される。図1，図2，図3にそれ

(*本文中には次の略語を用いた。DTT: Dithiothreitol; $DMPH_4$: 2-amino-4-hydroxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropteridine; PALP: Pyridoxal phosphate)

それぞれの活性化反応の Time course, pH および鉄の濃度に対する依存性を示した。最大の活性化は DTT とカタラーゼの存在下に pH 8.5～9.0 の間で $1～5 \times 10^{-5}$ M の鉄と嫌気的にインキュベートした時に得られる。好気的条件でも活性化反応は認められるが活性化に伴う失活が特に活性化反応の至適 pH であるアルカリ条件で速やかである。表3に示







の活性化反応に対する各種金属イオンの効果を示したが現在迄に調べた範囲内ではこの効果は鉄に特異的である。金属を加えないで嫌気的条件下でプレインキュベートした場合にも軽度の活性化が認められるが、これは溶液中に痕跡量の鉄が混在しているのか、あるいは酵素蛋白質を還元状態にすることが活性化の本態であることを示唆するのか未だ結論を下し得ない。

3) 松果体の TP-水酸化酵素の性質

上記の如く TP-水酸化酵素は鉄と嫌気的条件下にプレインキュベートすることにより著明に活性化されるが活性化反応を行わない場合にも常に多少の酵素活性が認められる(表1, 表3参照)。この残留活性は表4に示した様に o-フェナンスロリン等鉄のキレーターによって、強く阻害される。銅を特異的に強くキレートするジチオカルバメイト及び鉄とのキレート作用のない m-フェナンスロリンは無効であり、又図4に示した様に o-フェナンスロリンの阻害効果は2価鉄を加えることにより打ち消されること、及び過剰量の鉄を加えることにより更に5～10倍の酵素活性の促進が認められることなどから o-フェナンスロリンの阻害効果は酵素標品中に存在する痕跡量の鉄をキレートするためであろうと考えられる。尚その際、45 μM の o-フェナンスロリンの阻害効果が 255 μM の2価鉄で完全に打ち消されることは注目に価する。精製酵素の至適 pH は7附近(図5)還元型プテリジン($DMPH_4$)及び鉄に対する Apparent Km 価はそれぞれ図6と図4に示した様に約 7×10^{-5} M と 6×10^{-6} M である。L-トリプトファンに対する Km に関しては p-クロロフェニルアラニン, L-フェニルアラニン及びその他のカテコールアミン生合成の中間体による阻害効果の解析を合せ

表3 TP-水酸化酵素の活性化反応の金属に対する特異性

金属 (0.05 mM)	TP-水酸化酵素活性 − Fe^{++}	+ Fe^{++}
	$^{14}CO_2$ 生成 (cpm)	
None	2,234	3,454
Fe^{++}	—	8,000
Cu^{++}	1,368	3,253
Hg^{++}	587	1,680
Cd^{++}	1,367	1,791
Co^{++}	310	567
Sn^{++}	685	794
Ni^{++}	385	529
Ca^{++}	910	1,431
Mg^{++}	784	1,730
Mn^{++}	1,187	1,384
Fe^{+++}	5,594	6,400
活性化前	182	1,181

て現在研究中である。　メラトニン，N-アセチルセロトニン，セロトニン，5-ハイドロキシインドール酢酸などによる阻害効果は殆んど認められないが，あっても僅少である。

表4　各種キレーターの効果

キレーター（10^{-4}M）	TP-水酸化酵素活性 $^{14}CO_2$ evolved (cpm)
None	6,842
o-phenanthroline	0
m-phenanthroline	7,514
α·α'-dipyridyl	1,182
8-Hydroxyquinoline	558
Tiron	321
Na-diethyldithio-carbamate	6,139
EDTA	276

図4　鉄と o-phenanthroline の効果

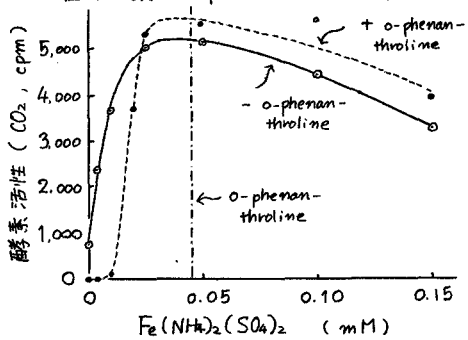


図5　TP-水酸化酵素活性に対するpHの影響

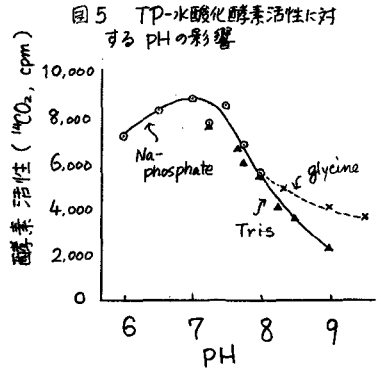
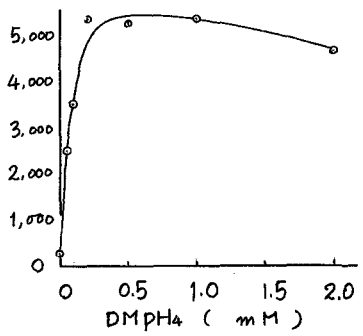


図6　DMPH4の濃度の影響



［考察］

最近 Shiman, Akino & Kaufman は牛の副腎髄質のチロシン水酸化酵素の2価鉄による活性化機構に関して，還元型プテリジンから生成する H_2O_2 による酵素の不活性化を防ぐためであると結論した（11）。　一方 Guroff & Rhoads は緑膿菌のフェニルアラニン水酸化酵素が鉄，水銀，銅及びカドミウムとプレインキュベートすると著明に活性化されることを報告した（5）。　今回われわれが牛松果体の TP-水酸化酵素で観察した鉄による活性化現象は鉄に特異的であること，カタラーゼの存在下で最も著明な効果が認められることなどから上記2つの酵素とは異った反応機構によるものと推察される。　より高度に精製した酵素標品を用いて活性化機構の解析を行う予定である。

［文献］

1) Christenson, J.G., Dairman, W., and Udenfriend, S., Arch. Biochem. Biophs. 141 356 (1970)
2) Gliemann, J., Diabetes 16 643 (1967)
3) Gliemann, J., Diabetologia 3 382 (1967)
4) Green, H., Advances in Pharmacol. 6A 18 (1968)
5) Guroff, G., and Rhoads, C.A., J. Biol. Chem., 742 3641 (1967)
6) 市山 新，中村重信，西塚泰美，早石 修　神経化学 第6巻増刊号 4 (1967)
7) 市山 新，藤沢 仁，中村重信，奥野幸子，早石 修　神経化学 第7巻増刊号104 (1968)
8) Ichiyama, A., Nakamura, S., Nishizuka, Y., and Hayaishi, O., J. Biol. Chem., 245 1699 (1970)
9) Ichiyama, A., and Nakamura, S., Method in Enzymology (Ed, S.P. Colowick & N.O. Kaplan) 17 449 (1970)
Lovenberg, W., Weissbach, H., and Udenfriend, S., J. Biol. Chem., 237 89 (1962)
11) Shiman, R., Akino, M., and Kaufman, S., J. Biol. Chem., 246 1330 (1971)

27. 人間脳によるセロトニンO－サルフエートの生成と新しい酵素活性測定法

日 高 弘 義（名大・医・1生化）

〔要約〕

セロトニンはカテコールアミン，ヒスタミンと並んで生体内アミンとして重要なものである。その重要性は腸管での働きや炎症のときの出現のほかに神経系では刺戟伝達物質としての役割にあると思われる。近来セロトニンの生合成，代謝系の酵素学的研究の進歩は著しいものがあり，生合成の律速段階と考えられる tryptophane 5-Hydroxylase やその他 aromatic amino acid decarboxylase, monoamine oxidase 及びその multiform, serotonin sulfotransferase など多くの知見が得られている。このうち serotonin sulfotransferase は数年来著者らにより研究されている。この酵素はほとんどの哺乳動物の脳に存在し本酵素によりセロトニンが不活性化されることが直接的に証明されている。著者らの考案した本酵素測定法は阻害実験や kinetics の実験を行うには不充分であると考えられるので今回本酵素に特異的な活性測定方法を考案した。新しい測定法は基質にセロトニンと S-活性硫酸をもらい酵素を加えて反応させたのち Biorex 4 resine の小さなカラムで product であるセロトニンOサルフェート［S^{35}］を分離し液体シンチレーションカウンターでその放射能を測定する。この測定法をもちいて人間脳内での serotonin sulfotransferase の分布をしらべた。Hypothalamus に最も高い活性が thalamus には比較的低い活性があることがわかった。更に Mg^{++}, Mn^{++} p-chloromercurybenzoate, cysteine, pargyline などの影響もしらべた。

セロトニンは腸管にもっとも多く存在し腸などのゼン動に重要なものであるが，炎症に於ては起炎物質として神経系に於ては刺戟伝達物質として重要でありカテコールアミン，ヒスタミンと並んで生体アミンの代表的な物質である。近来セロトニンの生合成や代謝の重要な酵素の研究が盛んで，多くの知見が得られている。このうち Serotonin sulfotransferase の研究は著者らが数年来行なって来ており家兎の肝臓，脳などから比較的高度に精製し（1，2）同時にセロトニンがこの酵素により不活性化されることを直接的に証明した（3）。しかし著者らの考案した本酵素の活性測定法（4）では充分な阻害実験や kinetics が不可能であると考えられるので新しい本酵素特異の活性測定法を考案し2，3の物質の影響をしらべた。人間尿中でセロトニンO-サルフェートの存在の証明やカルチノイドの患者に多量のセロトニンO-サルフェートの排せつが認められている（5,6）にもかかわらず人間の組織での本酵素活性測定の報告はないので新しい活性測定法で人間脳の本酵素の存在をしらべ同時に脳内分布についても測定を行った。

材料及び方法

人間の脳は心臓発作で死んだ58才の男子のものを死後5時間後にとり出し実験に使用した。脳のそれぞれの部位を単離しただちに3倍量の冷たい 0.05M pH 7.4 のリン酸緩衝液でホモゲナイズし超高速遠沈により（105000×g）透明な上清を得，酵素液としてそれぞれの部位を比較した。家兎の脳の場合も同様な操作で酵素液を得た。この間の詳し

（註） 本研究の大部分は日高が米国 Univ. of Colorado に留学中行なわれたものである。

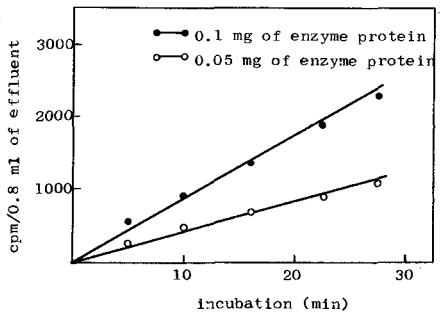
表1 反応液中のそれぞれの物質を取り除いた時の活性の変化

Omission	cpm[1)]/30min	cpm[2)]/30min
Complete	3450	7090
-Serotonin	146	138
-PAPS^{35}	40	48
-Enzyme	100	120
Boiled enzyme	160	152

1) 10 mg of brain tissue of rabbit

2) 20 mg of brain tissue of rabbit

図1 反応時間と酵素濃度のセロトニンO-サルフェート生成におよぼす影響



いことはすでに日高ら(2)により発表してあるのでそれを参照されたい。セロトニンO-サルフェートは岸本，高橋，江上(7)らの方法により合成した。活性硫酸 -S^{35} は米国 NEN 社又は印度の Bachawat 教授より得た。イオン交換樹脂（Biorex 4 その他）は Biorex 社よりその他試薬はすべて市販のものをもちいた。酵素反応液の組成は次のごとくで，0.1mM のセロトニンクリアチニン硫酸塩，0.01μC の活性硫酸 -S^{35} 0.1ml の 1M リン酸緩衝液 pH 7.4 を蒸留水で全量 1.0ml にする。反応は 37°C で酵素液を加えることにより始める。反応後2分間煮沸しすぐ流水に冷却し 0.1N 塩酸を 2ml 加え，変性タンパクを遠沈で除く。使用酵素のタンパク量が少ないときはこの操作は省略してもよい。酵素液はすべてピロリン酸－硫酸バッファー（0.0167M，pH 7.5）で透析し -20°C で保存した。product をセロトニン O-サルフェートと同定するために paper chromatography と paper electrophoresis を行なった。paper chromatography は n-butanol-acetic acid-H_2O (4 : 1 : 1, v/v/v), 20 % KCl, isopropanol-6N ammonia (20 : 3, v/v), butanol-pyridine-H_2O (1 : 1 : 1, v/v/v) の4つの異なった系で行なった。paper electrophoresis は 0.1 M citrate buffer (pH 5.5) 中で 120 V で行なった。chromatography 又は electrophoresis を行なった後 paper strips をレントゲンフィルムに密着させ1週間暗室に放置し放射能を detect した。product の発色は Ehrlich 試薬 α-nitroso β-naphthol 等でしらべた詳細はすでに報告した(1)。

実験結果及び考察

Serotonin sulfotransferase の活性測定法及び product の同定

家兎脳より得た酵素をもちいて実験を行なった。37°C で図1に示した時間反応させたのち Biorex 4 の小さいカラム（0.8cm × 3cm）に除蛋白した反応液の上清をかけ更に 10ml の 0.1N HCl でカラムを洗いその洗滌液とカラムを通過した反応液上清をあわせて測定すべき試料とした。この測定液の 0.1～1.0ml を Bray's 液中で液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。Biorex 4 resine カラムは使用の前に 0.1N HCl 20ml と水 20ml でよく洗ってから使用した。表1に示すごとく放射能は完全系のみ見出された。この放射性物質をすでに報告してある方法(8)で paper chromatography 及び electrophoresis により同定した。放射能は合成した serotonin O-sulfate の部位に完全に一致し product とこの合成セロトニン O-サルフェートを混ぜて chromatography 及び electrophoresis を行なったところ放射能のある部位とセロトニン O-サルフェートの発色は完全に一致した。product の生成と反応時間は表1に示す様に直線的であり酵素量に比例した。（図1）

表2 種々の物質の酵素活性へおよぼす影響

Addition (M)		cpm/10min	% of change
none		1190	-
cystein	10^{-3}	1680	+ 14
DTT	10^{-2}	1700	+ 43
	10^{-3}	1500	+ 26
$MgCl_2$	5×10^{-3}	1900	+ 60
	5×10^{-4}	1200	0
$MnCl_2$	5×10^{-3}	1460	+ 23
	5×10^{-4}	1180	0
Pargyline	10^{-3}	1170	0
	5×10^{-4}	1210	0

図2 p-chloromercurybenzoate (p-CMB)の活性におよぼす影響

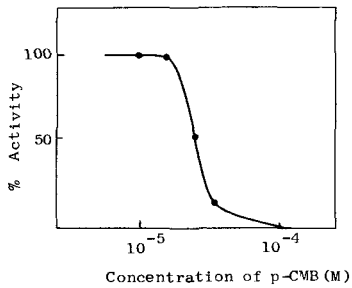


表3 人間脳内 serotonin sulfotransferase の分布

tissue	cpm/100mg of tissue
Rutamen	1110
Coudatus	1271
Thalamus	788
Hypothalamus	2054
Cerebellum	1139
Pons	1422
Hypocumpus	1063

種々の物質の活性に及ぼす影響

表2に示す様に Mg^{++}, Mn^{++} はそれぞれ 5×10^{-3} M で60%及び23%の本酵素活性上昇作用があることがわかった。これは Lipman らの報告した phenolsulfotransferase とは異なったもので興味がある。又 cysteine や dithioerythritol (DTT) など SH 物質は phenolsulfotransferase と同様に活性上昇作用がみとめられ更に p-chloromercurybenzoate は強い阻害作用がみとめられた。(図2) これらのことから serotonin sulfotransferase と phenol sulfotransferase との相違を結論することは出来ないのが今後の研究に興味をそそることと思われる。

人間脳による Serotonin O-sulfate の生成とその活性の脳内分布

人間脳内に於ける本酵素の分布は表3に示すごとくである。Hypothalamus の活性が重量あたりでは最も高く thalamus では最も低かった。人間脳での本酵素活性の存在は非常に興味があり又重要であると考えられるので Hypothalamus の homogenate の上清をもちいて product が本当に Serotonin O-sulfate であることを家兎の場合で分析したと同様な方法で分析した。確かに Authentic の Serotonin O-sulfate と同じ物質が生成されていることを確かめた。

以上放射性活性硫酸をもちいた新しい Serotonin Sulfotransferase の活性測定法と人間脳での活性の存在を確かめたのであるが、人間脳の活性は家兎の脳のそれと比較して約1/20(重量あたり)の活性しかなかった。これは種属による違いか又は人間の脳が新鮮でなかったのかは不明である。しかしすでに日高ら(2)によって報告されている様に動物によって脳の本酵素活性に相違のあることからあるいは家兎の活性が他の動物のそれより高いことが想像される。

文献

1. H. HIDAKA, T. NAGATSU and K. YAGI, Biochim. Biophys Acta 177 (1969) 354

2. H. HIDAKA, T. NAGATSU and K. YAGI, J. Neurochem 16 (1969) 783

3. H. HIDAKA, T. NAGATSU, K. TAKEYA, S. MATSUMOTO and K. Yagi, J. Pharm. Exptl. Therap. 166 (1969) 783

4. H. HIDAKA, T. NAGATSU, and K. YAGI, Anal. Biochem. 19 (1967) 388

5. V. E. Davis, J. A. Hutt and H. Brown, J. Lab. Clin. Med. 66 (1965) 390

6. V. E. Davis, J. A. Hutt and H. Brown, Clin. Chim. Acta 13 (1966) 380

7. Y. KISHIMOTO, N. TAKAHASHI and F. EGAMI, J. Biochem. (Tokyo) 49 (1961) 436

8. H. HIDAKA, T. NAGATSU and K. YAGI, Arch. Biochem. Biophys. 117 (1966) 196

28. 白ネズミの脳シスタチオニン合成酵素に関する研究

柏 俣 重 夫（名大・医・2生化）

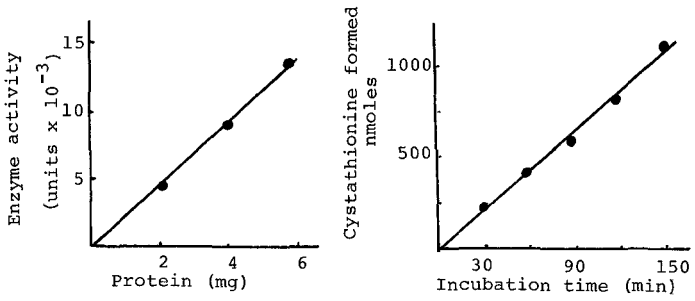
〔要約〕

BINKLEYは1951年白ネズミ肝抽出物中にHOMOCYSTEINEとSERINEとからCYSTATHIONINEを合成する酵素があることを最初に示した(1)。脳におけるCYSTATHIONINE合成酵素の存在はHOPEが白ネズミ脳ホモジェネートを用いてHOMOCYSTEINEとSERINEと共にインキュベートし生成したCYSTATHIONINEを分離同定したことによって明らかにされた(2)。肝の合成酵素については酵素学的に詳しく調べられ多くの報告がある(3-6)。しかしながら脳については、HOMOCYSTINE尿症が本酵素の遺伝的な欠落もしくは活性低下に起因し慢々知能低下を招来することや脳（特にヒト脳）にCYSTATHIONINEが大量に存在すること等よりCYSTATHIONINE及びその合成酵素と脳の機能との関連において多くの報告や示唆がなされて来た(7-9)が、酵素学的な性質についての報告は少ない。著者はCYSTATHIONINE合成酵素活性の白ネズミの発育に従う変動を検索する中で、脳の酵素活性変化のパターンが肝とは相当に異ること、しかも肝の酵素活性が殆んど可溶性画分に局在するのに対して脳の場合ホモジェネート全活性の約半分程が粒子画分に存在することを示唆する結果を得た(10)。本報告ではCYSTATHIONINE合成酵素の白ネズミ脳での細胞下局在についてのべると共に、ミトコンドリヤ画分に存在すると考えられる酵素の可溶化及び可溶性画分とミトコンドリヤ画分の酵素のAGINGによる影響について言及する。

〔実験方法〕

CYSTATHIONINE合成酵素の活性測定は既に記載した方法(3,10)によった。白ネズミ肝粗抽出液の場合(11)と同様にCYSTATHIONASEの活性阻害剤として常に反応液中にCu^{++}（硫酸銅）を入れ反応を行わせた。反応液中の蔗糖濃度は0.09 Mに保った。酵素活性と蛋白量及び反応時間との間には直線的関係が認められた（図1）。

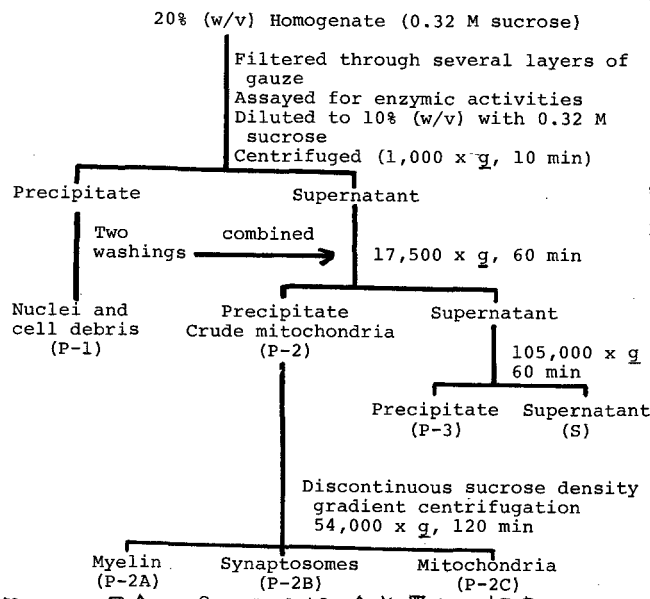
図1. ACTIVITY OF CYSTATHIONINE SYNTHASE AS A FUNCTION OF AMOUNTS OF HOMOGENATE OR INCUBATION TIME



CYSTATHIONINE合成酵素の測定法の信頼性はMUDDらの方法(12)に準拠して確めた。即ちTCA除蛋白上清をDOWEX 50 (H^+) X4(100-200 MESH)のカラム(1 x 7 CM)に吸着させ水(100 ML), 0.4 N HCl(100 ML), 水(100 ML)で順次洗ったのち L-SERINE-U-^{14}C (2.3 x 10^4 DPM/μMOL) とDL-HOMOCYSTEINEから生成した^{14}C-CYSTATHIONINEを2 N NH_4OH (20 ML)で溶出しその一定量をBRAY SOLUTION(13)に加えALOKA LSC-502型液体シンチレーションカウンターで測定した。脳ホモジェネートで現行法で0.42 μMOL、アイソトープ法で0.37 μMOLのCYSTATHIONINEが120分の反応后検出された。コハク酸脱水素酵素はミトコンドリヤの標識として(14)、活性はPENNINGTONの方法によって測定した(15)。酵素活性の表示としては1分間に1 μMOLの

CYSTATHIONINE 或いはテトラゾリウムホルマザンを生成する酵素量を 1 UNIT とした。蛋白量は牛血清アルブミンを基準としてビュウレット法(16,17)で測定した。相対比活性は（回収された活性の％）÷（回収された蛋白量の％）で RSA として表示した。

表 1. PREPARATION OF SUBCELLULAR FRACTIONS FROM RAT BRAIN



実験に用いられた脳は、体重 250-350 g の白ネズミの下丘より切断した大脳部分を用いた。細胞分画は EICHBERG らの方法(18)に準じて行った（表 1）。全操作は 0-4°C で行い得られた各画分は 0.32 M 冷蔗糖液に再懸濁して用いた。また細胞画分の同定は名古屋大学医学部病理学第一教室の浅井淳平博士によって電子顕微鏡で確認された。

TRITON X 100 は 0.2% になるように 0.32 M 蔗糖液に溶解したものを使用し、超音波処理は特に記載しない限り 20 Kc, 7 分で行った。各種の方法で処理された画分は 4°C で 30-40 分放置後、超遠心された。

〔実験結果及び考察〕

VOLPE ら(8)はサルの脳 CYSTATHIONINE 及びその合成酵素活性の脳内分布を調べ CYSTATHIONINE はニューロン内で合成され軸索に沿って移動し白質に蓄積するとの示唆を与えている。著者の実験で合成酵素の約半分の活性が脳ホモジェネートの粒子画分に存在するとの結果を得た(10)が、表 2 にみられる如く脳ホモジェネートを通常の遠心法で分画した時、回収酵素活性の 37% が P-2 画分に、43% が S 画分に集った。コハク酸脱水素酵素活性では殆んど(92%)が P-2 画分に回収された。この時ホモジェネートからの全画分に対する回収率は蛋白量で 91%、CYSTATHIONINE 合成酵素で 111%、コハク酸脱水素酵素で 86% であった。粗ミトコンドリヤ画分を更に精製するために、不連続蔗糖密度勾配法で分画した結果を表 3 に示した。P-2 画分からの全画分に対する回収率は蛋白量で 71%、CYSTATHIONINE 合成酵素で 74%、コハク酸脱水素酵素 57% であったが、合成酵素の大部分は P-2C 画分に回収された（回

表 2

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF CYSTATHIONINE SYNTHASE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE IN RAT BRAIN I. FRACTIONATION OF HOMOGENATE

Fraction	P-1		P-2		P-3		S	
	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA
Protein	11		64		4		21	
CTS*	17	1.5	37	0.6	3	0.8	43	2.0
SDH**	7	0.6	92	1.4	1	0.3	0	0.0

* Cystathionine synthase activity
** Succinate dehydrogenase activity

表 3

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF CYSTATHIONINE SYNTHASE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE IN RAT BRAIN II. FRACTIONATION OF CRUDE MITOCHONDRIAL FRACTION (P-2)

Fraction	P-2A		P-2B		P-2C	
	%	RSA	%	RSA	%	RSA
Protein	21		45		34	
CTS*	9	0.4	8	0.2	83	2.4
SDH**	3	0.1	22	0.5	75	2.2

* Cystathionine synthase activity
** Succinate dehydrogenase activity

収酵素活性の80%)。その細胞内分布のパターンはコハク酸脱水素酵素のそれに大体同じである(後者では75%がP-2C画分に集まる)。これらの結果はCYSTATHIONINE合成酵素が可溶性のものとミトコンドリヤ局在のものと2つあることを示しているが、現在の所これら局在の異る合成酵素が全く同じものであるか、或いは所謂アイソザイムであるのか明らかでない。そして又、分画されたミトコンドリヤには神経終末由来のもの、神経細胞体由来のもの、グリヤ細胞由来のものが混在していると考えられるが、得られた結果から合成酵素がいずれの由来のものか示すことは出来ない。しかし霊長類の脳で、この酵素が灰白質に多く白質に少ないと報告されている(8)ことからP-2C画分に高濃度に存在することは合成酵素がグリヤ細胞由来のミトコンドリヤ画分にあるとは考えにくい。

表4

EFFECTS OF VARIOUS TREATMENTS ON CYSTATHIONINE SYNTHASE ACTIVITY OF CRUDE MITOCHONDRIAL FRACTION (P-2)

Treatment	105,000 x g Supernatant		105,000 x g Precipitate		Sum of activity*	Recovery of activity (%)
	S.A**	T.A***	S.A**	T.A***		
None	-	-	2.1	132	132	100
% Distribution				100		
Triton X 100	7.1	253	2.3	63	316	239
% Distribution		80.1		19.9		
Sonication	10.3	305	2.6	87	392	297
% Distribution		77.9		22.1		
0.064 M Sucrose	4.4	48	2.5	131	179	136
% Distribution		26.6		73.4		
0.032 M Sucrose	8.5	101	1.6	82	183	139
% Distribution		55.4		44.6		

* units x 1000
** Specific activity, units/mg protein x 1000
*** Total activity, units x 1000

表4では粗ミトコンドリヤ画分(P-2)を用いてCYSTATHIONINE合成酵素の可溶化の目的で、いくつかの処理を行った結果を示す。新しく調製したP-1を除いた上清を等分に分け17,500 x G, 60分遠心してP-2画分を得、その画分に表に示す如く各種の処理を行った。TRITON X 100及び超音波破砕は回収全活性の80%を105,000 x G, 60分の上清に集め、回収率は未処理のものの全活性の240-300%に及んだ。低張処理の場合も同じ傾向の回収率を示した。これらの結果は白ネズミ脳でのアスパラギン酸アミノ基転移酵素の場合(19)と同じように合成酵素が所謂'OCCULUDED'或いは'LATENT'の状態にあると考えられ、外来性の基質の利用が妨げられている可能性を示唆する。TRITON X 100や超音波処理はミトコンドリヤの膜を破かいし内部の酵素を遊りさせるが、低張庶糖液、0.064 Mを用いた場合は105,000 x G, 60分の沈降部分に70%強の活性が残っている。BENDAL (20)やSALGANICOFF (19)の報告にみられる如く、0.064 M庶糖液はミトコンドリヤのMATRIXにある酵素の遊出を抑え、ミトコンドリヤに不可逆的な損傷を与えることなく神経終末部分を破かいするものと考えれば、0.032 M庶糖液での低張処理の結果を合せて、CYSTATHIONINE合成酵素はミトコンドリヤのMATRIXにあってしかも膜にゆるく結合していることを想定させる。0.064 Mの低張処理で比較的高活性(比活性として4.4 X 10^{-3} UNIT/MG蛋白)の酵素を遊りさせるが、これは再懸濁時の機械的な破かいがその一因となっていると考えられる。

表5は4°Cに酵素標品を放置しておいた場合の効果を示す。即ち可溶性画分Sとミトコンドリヤ画分P-2Cを各々蛋白量が10-15 MG/MLになるように調製し4°Cの冷凍室に

表5

EFFECT OF AGING* ON BRAIN CYSTATHIONINE SYNTHASE ACTIVITY

Expt.	Fraction used	KM**	Cystathionine synthase activity*** (units/ml x 1000) 0 Day	10 Days (% increase)		17 Days (% increase)	
I	P-2C	-	35	32	- 9	77	+ 120
	S	-	45	37	- 18	145	+ 222
II	P-2C****	+	10	22	+ 120	22	+ 120
	P-2C	+	7	22	+ 214	20	+ 186
	S	-	17	41	+ 141	115	+ 576
	S	+	17	42	+ 147	112	+ 559
III	P-2C	-	22	36	+ 64	142	+ 546
	S	-	28	30	+ 7	42	+ 50

* Aging was performed by keeping enzyme preparations at 4°C.
** Kanamycin, 50 ug/ml.
*** The enzymic activity was assayed at the day indicated after preparation of each fraction.
**** A supernatant obtained by centrifugation (105,000 x g, 60 min) of a sonicated P-2C fraction (20 Kc, 5 min).

放置し、標品調製時より一定期間過ぎた場合の合成酵素活性を測定した。P-2C画分を超音波処理しその105,000 X Gの上清の場合には約3 MG/MLの酵素液として実験に用いた。全て0.32 M蔗糖液を使用し、微生物の成育を抑えるため一部の実験ではKANAMYCINを用いた。表にみられるように酵素活性は例外なく長期間の放置によって上昇してくるが、その上昇の度合は各標品によって可なり異っている。最も著しい上昇を見たのでは、調製時の6倍近くにもなった。KANAMYCIN抵抗性の微生物の成育は除外出来ないが、少くとも一合成酵素に活性阻害物質が結合している可能性を強く示唆する。現在研究は続行中であるが、合成酵素活性の制御機構を解明する上にも興味深いことと考えられる。

〔文献〕

1. Binkley, F., J. Biol. Chem., 191, 531 (1951).
2. Hope, D.B., Fed. Proc., 18, 249 (1959).
3. Kashiwamata, S., and Greenberg, D.M., Biochim. Biophys. Acta, 212, 488 (1970).
4. Kimura, H., and Nakagawa, H., J. Biochem. (Tokyo), 69, 711 (1971).
5. Brown, F.C., and Gordon, P.H., Can. J. Biochem., 49, 484 (1971).
6. Pan, F., Chin, S.F., and Pai, S.H., Endocrinol., 88, 723 (1971).
7. Gaitonde, M.K., in A. Lajtha (Editor), Handbook of Neurochemistry, III, Plenum Press, New York, 1970, p. 225.
8. Volpe, J.J., and Laster, L., J. Neurochem., 17, 425 (1970).
9. Perry, T.L., Berry, K., Hansen, S., Diamond, S., and Mok, C., J. Neurochem., 18, 513 (1971).
10. Kashiwamata, S., Brain Res., 30, 185 (1971).
11. Kashiwamata, S., Anal. Biochem., in press.
12. Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., and Laster, L., J. Biol. Chem., 240, 4382 (1965).
13. Bray, G.A., Anal. Biochem., 1, 279 (1960).
14. Whittaker, V.P., Biochem. J., 72, 694 (1959).
15. Pennington, R.J., Biochem. J., 80, 649 (1961).
16. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M., J. Biol. Chem., 177, 751 (1949).
17. Cleland, K.W., and Slater, E.C., Biochem. J., 53, 547 (1953).
18. Eichberg, J.Jun., Whittaker, V.P., and Dawson, R.M.C., 92, 91 (1964).
19. Salganicoff, L., and De Robertis, E., J. Neurochem., 12, 287 (1965).
20. Bendall, D.S., and De Duve, C., Biochem. J., 74, 444 (1960).

29. プトレアニン，N-(4-アミノブチル)-3-アミノプロピオン酸の生合成について

中嶋照夫・佐野　勇
（阪大・医・高次研）

〔要約〕

中枢神経系に高濃度に存在するプトレアニン、N-(4-アミノブチル)-3-アミノプロピオン酸の生合成について検討した。

1）ウシ脳上清を酵素標品としてこれにスペルミジン-^{14}Cとと NADを加えて反応を行ないプトレアニン-^{14}Cが生成されることを証明した。したがってプトレアニンは次の反応過路を通って合成されるものと思われる。

$$H_2N\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH\text{-}(CH_2)_3\text{-}NH_2 \longrightarrow H_2N\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH\text{-}(CH_2)_2\text{-}CHO \longrightarrow H_2N\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH\text{-}(CH_2)_2\text{-}COOH$$

スペルミジン　　アルデヒド　　プトレアニン

2）ラットの脳室および腹腔内に放射性スペルミジンあるいはプトレスチンを投与してプトレアニンがスペルミジンから生合成されることを確認し、プトレアニンの合成能は脳のみならず肝にも存在することを明らかにした。

3）プトレアニンの定量法の感度をあげラットおよび家兎の体内分布を再検討し、脳に20-30、肝に5-2、その他の臓器には1 μmole/gあるいはそれ以下存在することを明らかにした。

4）プトレスチン-^{14}Cを投与して肝におけるプトレアニンおよびポリアミンの生成、消退を比較検討した。プトレアニンはスペルミジンから生合成されることを確認し、その消退の半減期は約4日でスペルミジンのそれと一致することを明らかにした。

われわれは一昨年の本学会においてウシ脳からプトレアニンを結晶としてとり出し、その構造をN-(4-アミノブチル)-3-アミノプロピオン酸と決定したことを報告した。このアミノ酸の自然界における存在は今まで知られておらず、しかも中枢神経系に高濃度に分布していることに興味がもたれた。[1] プトレアニンの生物学的意義は現在のところ全く知られていない。

今回プトレアニンが自然界に広く分布し、中枢神経系にも比較的高濃度に存在しているスペルミジン、N-(3-アミノプロピル)-1,4-ジアミノブタン、から生合成されることを証明したので報告する。さらにプトレアニン合成能はラットの脳にも肝にも存在することが判明したのでプトレアニンの動物体内分布を再検討した。

〔実験材料および方法〕

1）スペルミジン-1,4-^{14}Cおよびプトレスチン-1,4-^{14}Cは New England Nuclear Corp. より購入した。

2）プトレアニン分画とポリアミン分画の調製 ── 組織を等量の10%トリクロロ酢酸（TCA）中でホモジネートとし、3倍量の5% TCAで稀釈した。3000 rpm、10分間遠沈し上清を Dowex 50×2、100-200メッシュ、H^+型に通した。水洗、1Mピリジンで洗ったのち、0.5Mアンモニアで溶出することによりプトレアニン分画をえた。さらにレジンを水洗、0.1M酢酸ナトリウム洗滌、水洗ののち2Mアニモニアの50%エタノール溶液で溶出することによりポリアミン分画をえた。レジンは組織1g当り1ml、使用した試薬はそれぞれレジンの10倍量を用いた。この操作でのプトレアニン、スペ

ルミジン、スペルミンの回収率は90-100%である。

3）プトレアニン分画およびポリアミン分画の放射能の分析 ── プトレアニン分画は1×16 cm Amberlite IR-120, 200-400メッシュ、NH_4^+型の上で0.3Mアンモニアを用い展開した。溶出液4mlづつ集め、その2mlづつを10mlのBrayの溶液に入れ放射能を測定した。プトレアニンは10-13分画に溶出される。このプトレアニンを含む分画の残りを集めプトレアニンの定量に用いた。ポリアミン分画は1×7 cm Amberlite IR-120, 200-400メッシュ、H^+型の上で4N塩酸を用い展開した。溶出液を4mlづつ集め、その0.1あるいは0.2mlをとり、これに0.5Mアンモニア1mlを加え、10mlのBray溶液中で放射能を測定した。さらに各分画1mlづつとり固形苛性ソーダを入れた真空デシケーター中で乾固し、ポリアミンの定量に用いた。これらの放射性物質の同定は沪紙クロマトグラフィーと高圧沪紙電気泳動上の性質を合成品と比較することにより行った。

4）沪紙クロマトグラフィーは東洋沪紙No51を用い4つの溶媒系で展開した。高圧沪紙電気泳動はピリジン-酢酸-水（50：5：945、pH 3.4）中で70 V/cmの電圧勾配で20-40分間行った。

5）プトレアニンはアミノ酸自動分析器により[1]、スペルミジンおよびスペルミンはDubinの方法[2]により定量した。

〔結果〕

1）ウシ脳上清によるプトレアニンの合成 ── ウシ脳10gを0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）10ml中でホモジネートとし、19,000×g 10分間遠沈した。上清10mlにNAD（0.1 m mole）、ニコチン酸アミド（0.1 m mole）、プトレアニン（0.02 m mole）、スペルミジン-^{14}C（8 μCi）を添加し、37°2時間反応した。等量の10%TCAで反応を止め、上清を1.6×5 cm Dowex 50カラムに通し、上述の方法でプトレアニン分画をえた。この分画の一部を40分間高圧沪紙電気泳動し、沪紙の1/3はニンヒドリン発色を行い、残りの2/3は原線から1cmづつ切りとり放射能を測定した。図1に示すように放射能がプトレアニンの泳動位置に集まっていることが判かる。さらにプトレアニン分画の残りを高圧沪紙電気泳動し、プトレアニンの泳動位置に相当する部分を切りとり0.5M酢酸に抽出した。これに70 mgのプトレアニン硫酸塩を加え、80%メタノール中で結晶化を行った。再結晶を5回繰返し、結晶の比放射能を検討した結果が表1に示してある。比放射能は再結晶を繰返しても一定であった。

図1 プトレアニン分画の電気泳動と放射能分析

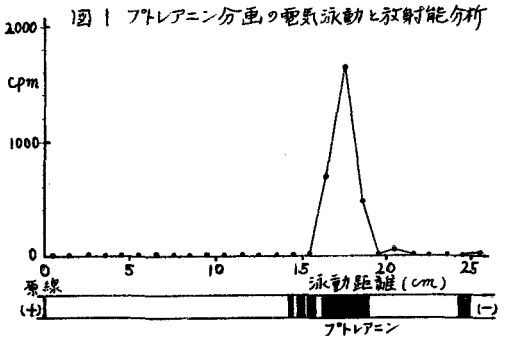


表1 生成プトレアニンの比放射能

結晶化	回収量 (mg)	使用量 (mg)	放射能 (dpm)	比放射能 (dpm/mg)
第1回	54	4.3	7,912	1,840
第2回	44	4.3	7,716	1,794
第3回	35	4.8	8,299	1,729
第4回	27	4.9	8,345	1,703
第5回	16	5.3	9,360	1,766

またこの放射性物質の沪紙クロマトグラフィーのRf値は合成プトレアニンのRf値と一致した(表2)。

表2 プトレアニンのRf値

溶媒系	Rf値
ピリジン-アセトン-3Mアンモニア (50:30:25)	0.53
イソプロパノール-蟻酸-水 (4:1:1)	0.53
n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:1)	0.18
n-ブタノール-酢酸-ピリジン-水 (4:1:1:2)	0.36

2) ラットの脳および肝におけるプトレアニンの生合成 ―― プトレアニンは中枢神経系のみに存在すると考えたのでその特異的存在の様作を生合成の面から明らかにするため、スペルミジン-^{14}Cの投与実験を行った。すなわちスペルミジン-^{14}C 2 μCiおよび10 μCiをそれぞれ脳室および腹腔内に投与し、24時間後に脳および肝をとり出し、放射能のプトレアニンへの分布を検討した。表3に示すように脳のみならず肝にも合成能が存在することが認められた。そこでexogenousのスペルミジンはendogenousのものとはその代謝様式が異なる可能性が考えられたので、代謝プールとよくまざると考えられているプトレスチン[3]の投与実験を行った。すなわちプトレスチン-^{14}C 5 μCiおよび20 μCiをそれぞれ脳室および腹腔内に投与し検討した。表3にみられるごとくやはり脳にも肝にも合成能が存在する。

表3 スペルミジンおよびプトレスチン-^{14}C投与によるプトレアニンへの放射能の取り込み

投与物質	臓器	プトレアニン			スペルミジン		
		mμmole	×10^{3}dpm	×10^{3}dpm/mμmole	mμmole	×10^{3}dpm	×10^{3}dpm/mμmole
スペルミジン-^{14}C	脳	49.9	21.2	0.4	799	1,363	1.8
	肝	32.0	21.2	0.7	4070	2,036	0.5
プトレスチン-^{14}C	脳	33.7	6.31	0.2	807	2,424	3.0
	肝	23.1	3.14	0.1	6415	1,159	0.2

3) ラットおよび家兎の体内分布の再検討 ―― 上述の結果はわれわれがさきに報告したプトレアニンは中枢神経系のみに特異的に存在するということと矛盾する。したがって動物体内分布について再検討を試みた。すなわちラットおよび家兎の各臓器約10 gづつを用いAmberlite IR-120, 100-200メッシュ, H^+型レジンを通して塩基性脂肪族アミノ酸分画をえた。この分画をさらに1×16 cm Amberlite IR-120, 200-400メッシュ, NH_4^+型カラム上で0.3 Mアンモニアを用い展開した。溶出液の初めの20 mlを捨て、つづく40 mlを集めて減圧乾固し、アミノ酸自動分析器にかけてプトレアニンを定量した。表4にその結果を示したが、プトレアニンは脳に最も高濃度に存在し、肝にはその1/10の濃度、その他の臓器には1 mμmole/g あるいはそれ以下の濃度存在した。したがって前回報告したことはプトレアニンの分析の感度を過大評価したことと使用した組織量が少なかった結果であり、肝にも存在することが明らかになった。

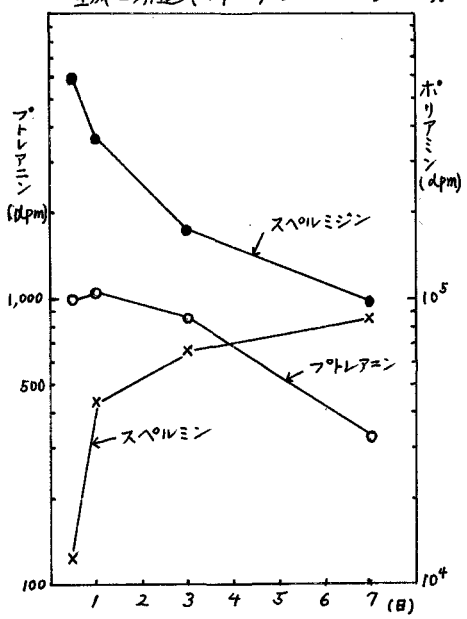
表4 プトレアニンの体内分布

臓器	プトレアニン (mμmoles/g)	
	ラット	家兎
脳	28.1	22.4
肝臓	4.6	2.0
肺臓	1.3	1.2
心臓	1.3	――
小腸	――	0.8
筋肉	0.5	0.4
腎臓	<0.1	0.3
脾臓	0.3	――
血液	<0.1	<0.1

4) ラットの肝臓におけるプトレアニン-^{14}Cとポリアミン-^{14}Cの生成と消退 ―― 以上の結果プトレアニンは脳にも肝にも存在し、その合成能も両臓器にあることが判明した。したがってこの2つの臓器の間でのプトレアニンの濃度の差は合成と分解の平衡の差として把握しなければならない。ラットの腹腔に10 μCiのプトレスチン-^{14}Cを投与して経時的にプトレアニン、スペルミジン、スペルミンへの放射能のとり込みを

検討したのが図2である。注射後12時間ではプトレスチンの放射能は消失しており、プトレアニンはスペルミジンから作られることが確認された。プトレアニンの代謝の半減期は約4日と算出される。脳については現在検討中であり、本学会で報告する予定である。

図2 肝における放射性プトレアニン、ポリアミンの生成と消退（dpm/tissueで表わした）。



〔参考文献〕

1) Kakimoto, Y., Nakajima, T., Kumon, A., Matsuoka, Y., Imaoka, N., Kanazawa, A., and Sano, I., J. Biol. Chem., 244, 6003 (1969).
2) Dubin, D.T., J. Biol. Chem., 235, 783 (1960).
3) Russell, D.H., Medina, V.J., and Snyder, S.H., J. Biol. Chem., 245, 6732 (1970).

30. ホモカルノシンの分解酵素

谷口和覧・今岡信夫
（阪大・医・高次研）

〔要約〕

ウサギ脳についてホモカルノシン，カルノシン分解酵素を検討した．活性測定にはホモカルノシン-γ-アミノブチリル-^{14}C，カルノシン-β-アラニル-^{14}Cを合成し，反応で生じた^{14}C-γ-アミノ酪酸，β-アラニンを測定した．脳ホモジネートを硫安で分画すると，40～60％飽和で沈殿する分画と20～40％飽和で沈殿する分画とにホモカルノシン分解活性がみとめられた．前者(酵素I)はMn^{++}，メルカプトエタノールで賦活され，至適pHは8である．一般的性質はカルノシナーゼに似ているが組織分布の差，熱変性の度合の差からカルノシナーゼとは異っている．後者(酵素II)はCo^{++}で賦活されメルカプトエタノールで強く阻害される．至適pHは6である．酵素Iは中枢神経系と腎に強い活性がみられた．酵素IIは腎，脾，胃，肝，筋，肺，心臓に活性があり；脳での活性は弱い．

カルノシン分解活性は50－70％硫安飽和で沈殿する分画と20～40％飽和で沈殿する分画にわけられる．前者が従来から知られているカルノシナーゼに相当する．体内分布は酵素I，IIの分布とことなっている．

酵素Iは中枢神経系でホモカルノシンの分解に関与すると考えられるが，いずれにせよホモカルノシン，カルノシンは異なった酵素で分解され，しかも少くとも二種の分解酵素が関与している．

ホモカルノシン（γ-アミノブチリルヒスチジン），[1][2]ホモアンセリン（γ-アミノブチリル-1-メチルヒスチジン）[2][3]はいずれも中枢神経系に特異的に存在し，同族体のカルノシン，アンセリンが筋肉中に高濃度存在することと考えあわせ，これらのヒスチジンをふくむペプチドは興奮性組織で何らかの機能的意義をもつと考えられる．
これらのペプチドの生合成についてはMeister[4]，Winnick[5]らの研究があり，おそらく一種類の酵素がこれらのジペプチドを合成すると考えられている．一方脳におけるホモカルノシンの代謝についてはほとんど知見がなく，カルノシナーゼにより分解されると想像されていたにとどまっているのでわれわれは新しい酵素活性測定法を用いてこの点を検討した．

＜実験材料と方法＞

1．^{14}C-ホモカルノシンおよび^{14}C-カルノシンの調製

γ-アミノ酪酸-1-^{14}C 50μCをcarbobenzoxyl化し，エチルクロロ蟻酸と混合無水化合物をつくり，ヒスチジンと反応させ，接触還元でcarbobenzoxy基をはずし生成物をイオン交換樹脂，高圧濾紙電気泳動で精製した．9.8μCのホモカルノシンをえた．この分画にはわずかにヒスチジンが混在しているが，この研究には支障はない．
^{14}C-カルノシンの合成はβ-アラニン-1-^{14}C，50μCを用いて同様の操作で行った．ただしカルノシンの精製は中邨[3]らの方法でカラムクロマトグラフィーにより行い，7.0μCをえた．

2．酵素活性の測定法

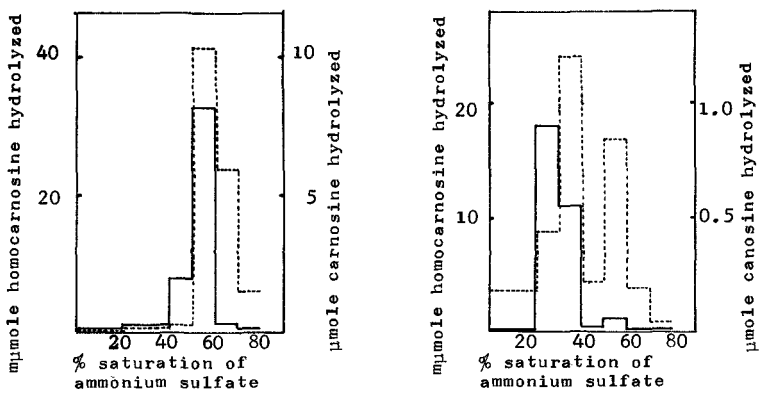
基質のホモカルノシンは^{14}Cでラベルされていないホモカルノシンを加え，2mMの水

溶液をつくり、0.1 μmoleが18000 dpmに相当するようにした。カルノシンについては、同様に200 mMの水溶液をつくり、10 μmoleが14000 dpmに相当するようにした。反応液の組成は二種あって、酵素I(後述)については酵素液、基質液0.05 ml、トリス-塩酸緩衝液pH8.0(終末0.1 M)、Mn^{++}(終末2 mM)、メルカプトエタノール(終末20 mM)からなり、最終0.2 mlとした。酵素II(後述)については酵素液、基質液0.05 ml、トリス-塩酸緩衝液pH 6.0(終末0.1 M)、Co^{++}(終末10^{-4}M)から成り最終0.2 mlとした。37°Cで1時間反応せた。反応終了後、試験管を100°Cで2分加熱し急冷後水0.8 mlを加えた。反応液全体を0.6×3 cm、Amberlite IR120、ピリジン型、100~200メッシュカラムに通した。カラムを3 mlの5%ピリジンで洗うと、β-アラニン、γ-アミノ酪酸は溶出されるが、ホモカルノシン、カルノシンは溶出されないから、溶出液をバイアルにあつめ、Bray液10 mlを加え、Liquid Scintillation Counterで放射能を測定した。

〈結果〉

1.脳酵素の硫安分画。ウサギ脳を4倍量の0.1Mトリス-塩酸緩衝液でホモジネートとし、遠沈してえた上清を飽和硫安で分画し、各分画についてホモカルノシン、カルノシン分解酵素活性を測定した。図1に示すようにホモカルノシン分解酵素活性は40~60% 飽和で沈澱する酵素Iと20~40%飽和で沈澱する酵素IIの2種がみとめられた。カルノシン分解についてと同様に2分画に活性があった。50~70%で沈澱する分画が従来からしられているカルノシナーゼと同様の性質をもっている。

2.各酵素の一般的性質



Incubation condition: pH 8, Mn^{++}, mercaptoethanol added

Incubation condition: pH 6, Co^{++} added

図1 —— Homocarnosine hydrolyzing activity
------ Carnosine hydrolyzing activity

表1	Enzyme I	Enzyme II	carnosinase
optimal pH	8	6	8
precipitation by ammonium sulfate	40-60% saturation	20-40% saturation	50- 0% saturation
stimulatory cation	Mn^{++}	Co^{++}, Fe^{++}	Mn^{++}
effect of mercaptoethanol	stimulatory	inhibitory	stimulatory

表Iに示すような性質がある。いずれの酵素も比較的安定で4°C、あるいは凍結により比較的急速に失活する。酵素I、カルノシナーゼについてはMn^{++}の添加効果はっきりみられるが酵素IIではEDTA透析を行うとCo^{++}の効果は著明になる。

3.酵素の部分的精製

酵素Iはウサギ脳から精製した。(表2)

(1)2羽のウサギの頸動脈を切断して脱血してから、大脳、小脳をとり出し、17.8 gをえた。Mn^{++} 2 mM、メルカプトエタノール10 mMをふく

む0.1Mトリス塩酸緩衝液PH8.0 71.2mlでホモジネートとし、10,000g、30分遠沈して上清をあつめた。

(2)上清を飽和硫安で分画し、40~65%飽和の間で沈澱する部分をあつめ、同じ緩衝液に対して20時間透析した。

(3)氷冷した酵素液に-20°Cに冷却したアセトンを加え、30~40%添加で沈澱する部分をあつめ、セファデックスG-50のカラムでアセトンをのぞいた。

(4)えた液に同量のMn++6mM、メルカプトエタノール60mMを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液を加え54.5°Cで2分加熱し、変性した蛋白を遠沈でのぞいた。

表2

Step	volume (ml)	protein (mg)	total activity*	specific activity**
1	60.0	465	1023	2.2
2	10.3	129	1391	10.7
3	5.7	41.6	561	13.4
4	11.4	21.6	369	17.0

* mμmole homocarnosine hydrolyzed/hr
** mμmole homocarnosine hydrolyzed/hr/mg. protein

酵素IIについては酵素Iを含まないウサギ肝から部分的精製をこころみ、硫安分画(20~40%)、アセトン分画(0~10%)により比活性は約40倍に上昇したがつづいて検討中である。

4.組織分布

酵素I, II, カルノシナーゼについて組織分布をしらべた。組織2gを0.1Mトリス塩酸緩衝液PH7.0、8mlでホモジネートとし、遠沈上清を硫安で分画し、20~40%飽和、40~70%飽和で沈澱する部分をあつめ、前者について酵素II、後者について酵素I、カルノシナーゼの活性を測定した。

表3	Enzyme I*	Enzyme II**	Carnosinase***
Brain	54.1	7.8	22.6
Spinal cord	35.4	0.9	11.5
Lung	2.5	52.5	49.3
Heart	0.0	36.8	13.2
Liver	4.2	124.8	35.5
Kidney	264.8	981.5	97.4
Spleen	4.2	267.6	4.7
Stomach	0.0	154.5	0.6
Intestine	0.6	8.2	0.9
Muscle	1.5	53.2	2.2

*,**: mμmole homocarnosine hydrolyzed/g/hr
*** :μmole carnosine hydrolyzed/g/hr

酵素Iは脳、脊髄、腎につよい活性がある。酵素IIの分布は酵素Iの分布と異っていて、腎、脾、胃、肝、筋、肺、心臓の順になっている。一方カルノシナーゼの分布はホモカルノシン分解に関与する酵素の分布とは異って、腎、肺、肝、脳、心臓の順になる。即ち三種の酵素の組織分布はそれぞれ異っている。(表3)

5.酵素Iとカルノシナーゼの異同

酵素Iカルノシナーゼ[6]に似た性質をもっているが、組織分布がことなること、硫安による塩析のパターンがやや異ること、熱処理によりカルノシナーゼがより早く失活することから両酵素は異った蛋白であると考えられる。(図2)

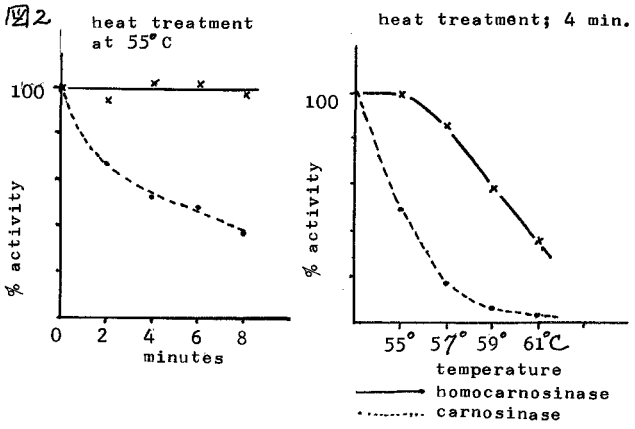
<考察>

ホモカルノシンを加水分解する酵素には少くとも二種あり、20~40%硫安飽和で沈澱する酵素IIは、アミノペプチダーゼに似た性質をもち、各組織に広く分布しているが、40~60%で沈澱する酵素Iはカルノシナーゼに似た性質をもち、中枢神経系

と腎に局在している。ホモカルノシンは中枢神経系に局在しているから酵素Iがホモカルノシン代謝に関与すると考えられるが、つづいて脳酵素と腎酵素の異同の問題、各酵素のホモカルノシンに対するKmなどについて検討したい。

なお従来カルノシンはカルノシナーゼにより分解されるとされているが、組織蛋白を分画するとカルノシナーゼ分画以外にも分解活性があり、カルノシン、ホモカルノシンなどの分解に関しては、組織内の多種のペプチダーゼの作用も考慮されるべきであろう。

図2



〈文献〉

1) Pisano,J.J., Wilson,J.D., Cohen,L., Abraham,D., and Udenfriend,S., J. Biol. Chem. 236, 499, (1961)
2) Kanazawa,A., Kakimoto,Y., Miyamoto,E., and Sano,I., J. Neurochem. 12, 957, (1965)
3) Nakajima,T., Wolfgram,F., and Clark,W.G., J. Neurochem. 14, 1107, (1967)

31. 発育期ラット脳におけるチミジンキナーゼの変化

山上　栄・森　浩一・川北幸男
（阪市大・医・神経）

〔要約〕

1)発育期ラット脳において，全脳のチミジンキナーゼ活性は　生後6日目に急速に増加して，最大となる。しかしその後　減少して　生後90日目ではほとんどその活性を認めない。発育各期の脳を小脳，大脳，その他の部位に分け，チミジンキナーゼ活性を比較すると，小脳の活性は，他の部位より高値を示した。とくに，生後6日目においてその差は顕著となり，小脳の活性は他部位の約5倍であった。全体として小脳の活性の変遷は，全脳のそれに類似している。また，これら全脳と小脳の発育期における特徴的な活性の変化は　前報で示した発育期脳DNAへの^{3}H-チミジンのとりこみの変化とも平行するものであった。

2)生後6日目のラット脳においてチミジンキナーゼの最も高い活性は，主として細胞上清に認められる。しかし，核やミトコンドリアにも僅かな活性の分布が認められた。

3)脳のチミジンキナーゼの至適pHは8.0であって，その反応にATPとMg^{++}の存在を必要とする。Mg以外の2価のカチオンの添加は，いずれも反応を著しく阻害する。SDS，Dioxane，Ethylene glycol，尿素なども，反応を著しく阻害する。また，チミジンキナーゼのfeed back inhibitorであるdTTPの2mMを添加すると　反応は完全に阻害される。この酵素は凍結，融解操作を1度以上繰返すと，活性は30%近くまで減少する。Lineweaver と Burk の方法で測定した Km は 2.8×10^{-6}M であった。

（はじめに）われわれは既に発育初期のラット脳で，ラベルされたTdRが，酸可溶性分画にとりこまれ，TdR → TMP → TDP → TTP と急速に燐酸化され，DNAの前駆物質となり活発にDNAにとりこまれることを報告した。[1)2)] これらTdR代謝のなかでもTdR → TMPの反応を触媒するTdRキナーゼは，DNA合成と平行して著しい活性の上昇がみられ，DNA合成の制御に重大な役割を担っていることが再生肝[3)]や腫瘍組織[4)]などで報告され注目を集めている。しかし脳においては，いまだにこの酵素について記載されていない。従って，今回は発育期脳のDNA合成の調節機構を明らかにする目的でTdRキナーゼをとり上げる。同時にこの酵素の諸性質について検討を加えたので報告する。

（方法）1)脳の摘出と上清分画の調製，出生直後，生後3日，6日，10日，14日，22日，90日のラットを用い，断頭によって脳を摘出する。氷冷したmedium I（0.25M－しょ糖，0.02M－トリス緩衝液（pH 7.4），0.04M－$MgCl_2$）の5倍容でホモジナイズする。得られたホモジネイトは105,000 g，120分間遠心して上清分画を調製した。

2)TdRキナーゼ活性の測定，TdRキナーゼはKlenperer と Haynes[5)]の原法に多少の改変を加えて測定した。反応混液は　蛋白量0.3mg～0.4mgの上清溶液，10μM－[6-^{3}H]－TdR，5mM－ATP，2.5mM－$MgCl_2$，0.05M－トリス緩衝液（pH8.0）を含み，全量を0.25mlとした。この反応混液を37°Cで　10分間インキュベートする。その後　100°C，3分間加熱し，反応を停止した後，直ちに氷冷する。加熱によって生じた変性蛋白を

脚注：TdR，チミジン；TMP，チミジン-5'-モノホスフェート；TDP，チミジン-5'-ジホスフェート：TTP，チミジン-5'-トリホスフェート

遠心で除き、その上清の3μlを前もってTdRとTMPの0.1μmoleをスポットしたアビセル・セルローズのガラスプレート上にスポットする。Tetraborateで飽和した1M酢酸アンモニウムと95%エタノール(50:50容)の溶媒を用い室温で薄層クロマトグラフィーを行った。展開後、プレートを乾燥し、スポットの位置をU.V.ランプで検出した。TdRとTMPのRfはそれぞれ0.703と0.378で完全に分離することが出来た。それぞれのスポットを取り出し、各スポットに含まれる放射能はPPO.4gとPOPOP 0.05gを1lのトルエンに溶解したシンチレーターを用い、シンチレーション・カウンターで計測した。酵素活性は、反応混液0.25ml中で37℃、10分間インキュベートした場合に生ずるTMPのμμmolesとして示し、比活性は蛋白量1mg当りの酵素活性として表わした。　3)各細胞分画の調製，生後6日のラット脳を氷冷したmedium Iの9倍容でホモジナイズする。核分画は800g、10分間遠心して調製した。その上清を12,000g、15分間遠心してミトコンドリア分画を得、さらにミトコンドリアの上清を105,000g、120分間遠心してミクロゾーム分画を調製した。最終の上清を上清分画とし、調製した各分画を酵素活性の測定に用いた。

(成績)　1)発育期ラット脳の各部位におけるTdRキナーゼ活性の変化，発育各期のラットの全脳，小脳，大脳、その他の部位からそれぞれ調製した上清分画におけるTdRキナーゼの比活性の変化を図1に示す。全脳の比活性は、生後6日目に急速な上昇を示し、その後減少する。生後90日の比活性は生後6日の約2%以下に過ぎない。同じような変化は小脳においても認められた。このことは、全脳のTdRキナーゼの変化が主として小脳のそれを反映していると考えて差支えないであろう。

2)生後6日のラット脳における上清分画のTdRキナーゼ活性の細胞内分布，表1に前述した方法に従って分画した各細胞分画の蛋白量とTdRキナーゼの比活性を示す。TdRキナーゼは　上清分画に最も高い比活性が認められた。また、核とミトコンドリ分画にも少量の存在が示された。

表1．生後6日のラット脳における各細胞分画のTdRキナーゼの分布

分画	蛋白 mg/g 重量(%)	TdRキナーゼ 比放射活性 (μμmoles/mg protein/min)
核	31.2 ± 3.8 (20.5)	32.8 ± 4.9
ミトコンドリア	46.4 ± 4.5 (30.5)	16.7 ± 4.5
ミクロゾーム	29.4 ± 3.4 (19.3)	7.2 ± 0.5
上清	32.1 ± 4.6 (21.2)	140.6 ± 15.6
ホモゲネート	152.0 ± 14.2 (100)	39.1 ± 4.5

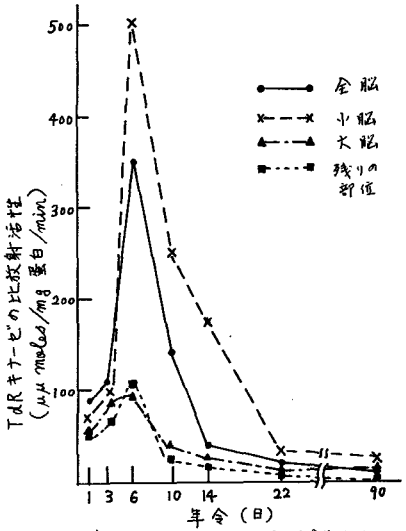


図1．発育期ラットの全脳，大脳，小脳およびの残りの部位のTdRキナーゼの変化

3)生後6日のラット脳の上清分画におけるTdRキナーゼの諸性質　a)至適pH，TdRキナーゼ活性におよぼすpHの効果をトリス－塩酸緩衝液(pH7.0からpH10.0まで)，とトリス・マレイン酸緩衝液(pH6.0のみ)を用いて測定した。図2に示すように至適pHは8.0であった。b)ATPの効果，この酵素の最大活性の発現には、ATPの3mMから8mMの添加が要求される(図3)。反応混液にATPを加えない場合には最大活性の12%の活性を示したにとどまった。c)Mg^{++}の効果，図4にATP

の5mMが存在する場合に、TdRキナーゼ活性におよぼすMg^{++}の効果を示す。Mg^{++}の1mMから3mMの添加によって、活性はかなりの上昇を示す。しかし、Mg^{++}が反応混液に加えられない場合でも、なおある程度、活性は保持されることが示された。このことは、脳のTdRキナーゼは、その最大活性の出現に、Mg^{++}の添加を必要とするが、内因性のMg^{++}もまた重要な役割をなしていることを示唆するものである。

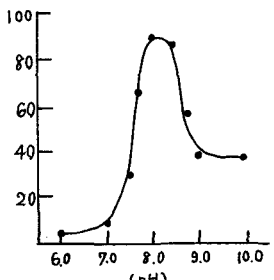


図2. TdRキナーゼ活性におよぼすpHの効果

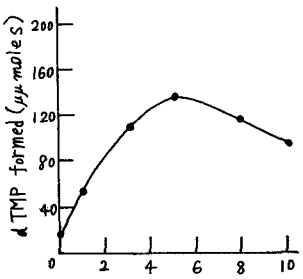


図3. TdRキナーゼ活性におよぼすATPの効果

d) Mg^{++}以外の2価の金属イオンの影響とその他の阻害物質の影響, Mg^{++}の存在する場合に、反応混液にさらにCa^{++}, Co^{++}, Mn^{++}, Ba^{++}, Zn^{++}, Ni^{++}, Cu^{++}, Fe^{++}などを添加すると、TdRキナーゼ活性は顕著に阻害される(表2). 最も著しい阻害効果はNi^{++}で認められた。またTdRキナーゼは蛋白の構造に変化を与えるSDS, dioxane, Ethylene glycol, 尿素などの添加によっても、その活性を著しく阻害される. 最も顕著な阻害はSDSの添加で認められた。e) TTPによるfeed back inhibition, TTPがTdRキナーゼの強力なfeed back inhibitorであることは、数々の動物組織において既に認められている。図5には、脳のTdRキナーゼがTTPによって強く阻害されることを示した。TTPの約2mMの添加によって反応は完全に阻害された。

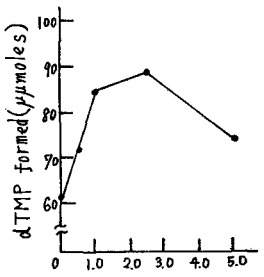


図4. TdRキナーゼ活性におよぼすMg^{++}の効果

表2. TdRキナーゼにおよぼす金属イオンと試薬の阻害効果

添加物	濃度 (M)	dTMP	阻害 (パーセンテージ)
対照群		86.0 ± 2.4	
$CuCl_2$	25×10^{-3}	19.4 ± 2.6	(77.4)
$CoCl_2$	25×10^{-3}	18.0 ± 3.0	(79.1)
$MnCl_2$	25×10^{-3}	14.4 ± 0.2	(83.3)
$BaSO_4$	25×10^{-3}	12.7 ± 0.7	(85.2)
$SrCl_2$	25×10^{-3}	26.4 ± 1.8	(69.3)
$ZnCl_2$	25×10^{-3}	10.2 ± 1.4	(88.1)
$NiCl_2$	25×10^{-3}	6.0 ± 2.8	(93.0)
$CuSO_4$	25×10^{-3}	15.6 ± 4.6	(81.9)
$FeSO_4$	25×10^{-3}	13.5 ± 2.5	(84.3)
SDS	6×10^{-4}	15.1 ± 1.4	(82.4)
Dioxane	2.0	14.8 ± 0.2	(82.8)
Ethylene glycol	2.0	76.5 ± 6.4	(11.0)
Urea	2.0	36.0 ± 3.0	(58.1)

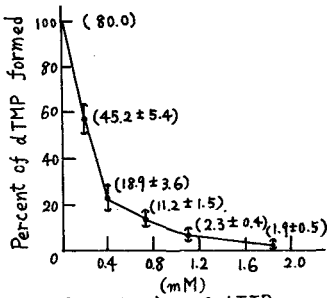


図5. TdRキナーゼ活性におよぼすdTTPの阻害効果

f) 安定性, 上清分画を−20°Cで約1ヶ月凍結すると、TdRキナーゼ活性はかなり保持される(図6). しかし同じサンプルを1ヶ月に4回凍結・融解を繰返すと、その活性は最初の約30%にまで減少

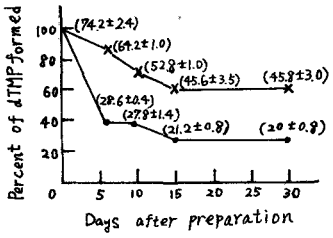


図6. −20°Cにおけるキナーゼの安定性

した。 g) Michaelis 定数 (Km)，図7の直線から明らかなように、この酵素と基質としてのTdRとの間に一般のMichaelis Menten kinetics[6]が成立する。Michaelis定数(Km)はLineweaver & Burk[7]の方法に従って表わすと 2.8×10^{-6} Mであった。

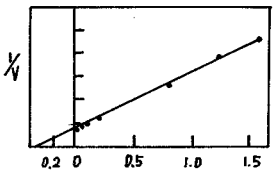


図7. 基質濃度と酵素活性の関係

（考察） 上述したように生後6日目のラット小脳上清のTdRキナーゼは、その諸性質において、他の動物組織で報告されたものと大差がない。

既にわれわれは[1,2]、DNAへのTdRのとりこみが生後6日目において最も活発であることを報告している。この時期は、図1にも示したように、TdRキナーゼ活性が最も高くなる時期でもある。こうしたDNA合成とTdRキナーゼとの平行関係は、再生肝[3]やTetrahymena[8]でも報告され、TdRキナーゼがDNA合成を調節する最も本質的な機構の一つと考えられている。恐らく、同様な機構が、発育期のラット脳においても働いているのであろう。小脳のTdRキナーゼ活性の変化は、図1に示したように全脳と類似したパターンを示している。Chiu & Sung[9]も発育期ラット小脳においてDNAポリメラーゼが生後6日で最大に達すると報告していることは注目に価する。DNA合成に関与する両酵素がともに発育初期の小脳において他部位より高い活性を示している[10]ことは、小脳のDNA量が他部位より著しく高いことと考え合わせて興味がひかれる。恐らく両酵素と高いDNA量との間には密接な関連があるものと思われる。

（文献）

(1) Mori K. Yamagami S. and Kawakita Y. (1970) J. Neurochem. 17, 835.
(2) 森浩一．山上栄．川北幸男．(1968) 神経化学, Supl. 7, 33.
(3) Bollum F. J. and Potter V. R. (1959) Cancer Res. 19, 561.
(4) Bukovsky J. and Roth J. S. (1965) Cancer Res. 25, 358.
(5) Klemperer H. G. and Haynes G. R. (1968) Biochem. J. 108, 541.
(6) Michaelis L. and Menten M. L. (1913) Biochem. Z. 49, 333.
(7) Lineweaver H. and Burk D. (1934) J. Am. Chem. Soc. 56, 658.
(8) Stone G. E. and Prescott D. M. (1964) J. Cell Biol. 21, 275.
(9) Chiu J-F. and Sung S. C. (1970) Biochem. biophys. Acta 209, 34.
(10) Howard E. (1968) Exp. Neurol. 22, 191.

32. ラット脳発育に伴う解糖系の研究

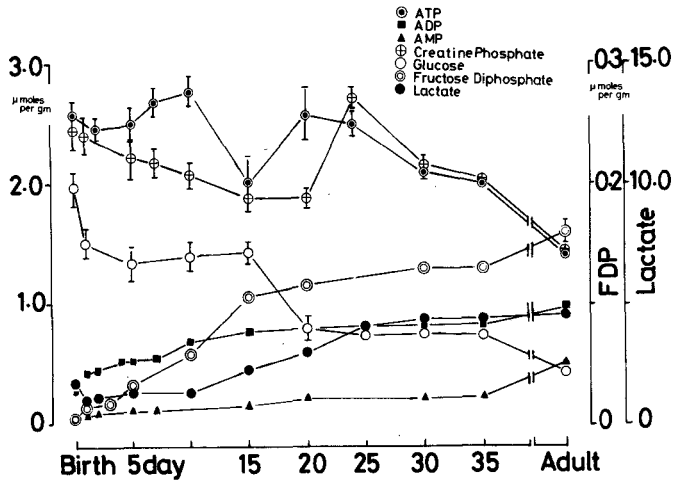
須田治彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

〔要約〕

脳解糖系の調節機構が発育と共に，どのように推移するかを知る目的で，ラット脳を用い，脳内の ATP, ADP, AMP, Glucose, FDP, Lactate, CreatinePhosphate の含量を検索した。ラット脳発育に伴なって，各々の物質含量の変化では，出生後15日を境として，Glucose, ATP, CreatinePhosphate 含量は減少する。幼若ラットの断頭脳では，ATP, Glucose, CreatinePhosphate 含量は，かなりの時間最初の量を保っているが，成鼠脳ではこれらの物質の90%以上が，1分以内に失なわれる。一方 Lactate, AMP, の蓄積は急上昇する。Anoxia による Lactate の蓄積は，幼若期では緩やかであるが，発育経過にともなって急激に増加する。Glucose 減少量も幼若期では緩やかで出生後15日を過ぎると，成鼠とほぼ同程度の減少を示す。Phosphofructokinase は脳解糖系の調節の主役を演じていると云われていることから，FDP 含量の変化を，Anoxia の経過と共に観察した。FDP は，幼若脳の Anoxia 状態で ATP, Glucose, Lactate, ADP, AMP, CrP 量に変化の時間すでに最初の量の3倍から5倍の脳内蓄積が認められ，この現象は，ADP, AMP, Pi 量の増加による PFK の活性化では説明できない。Anoxia による FDP 量の蓄積が最大値を示す時間は，発育に従って短縮されることを認めた。以上の諸実験から Anoxia に伴う脳解糖系の調節機構が発育に伴って変動していることを確かめ，Lowry 等の成績とも異同を論じた。

脳解糖系の調節機構に関する研究は脳スライスを用いたもの[7X8]と，断頭脳を用いたもの[3X4]とが報告されており，いづれも Phosphofructokinase (PFK)[5X6]が重要な Key Enzyme であることが強調されている。我々は，脳発育に伴う解糖系の調節因子について断頭脳を用いて検索を試みた。

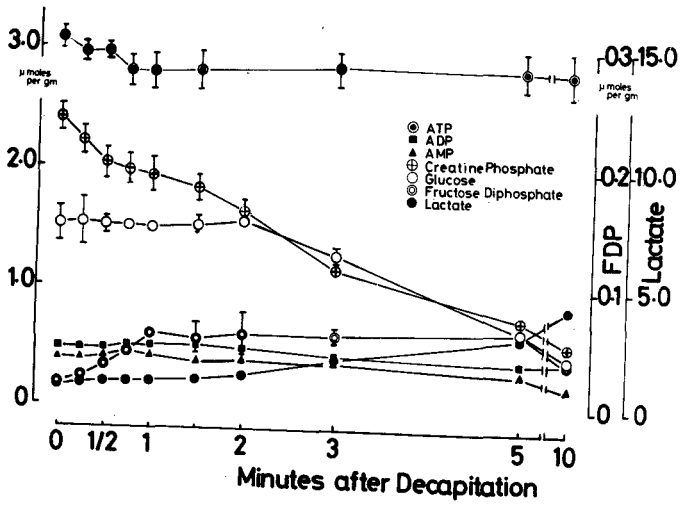
第1図



材料及び方法

実験材料は同腹の新生仔ラットを用いた。断頭により Anoxia を起させ，時間を追って液体窒素で凍結固定した。凍結した脳を組織量100 mg 当り 1.0 ml の 0.3M PCA で除蛋白し，0.3M KOH で中和後 10 mM EDTA を含む 0.5M Tris HCl Buffer (pH: 7.5) を 0.5 ml 加えた。Fructose 1.6-Diphosphate (FDP) 定量の試料には 0.5M Triethanolamine HCl Buffer (pH: 7.5) を同量

第2図 1-day-old Rat



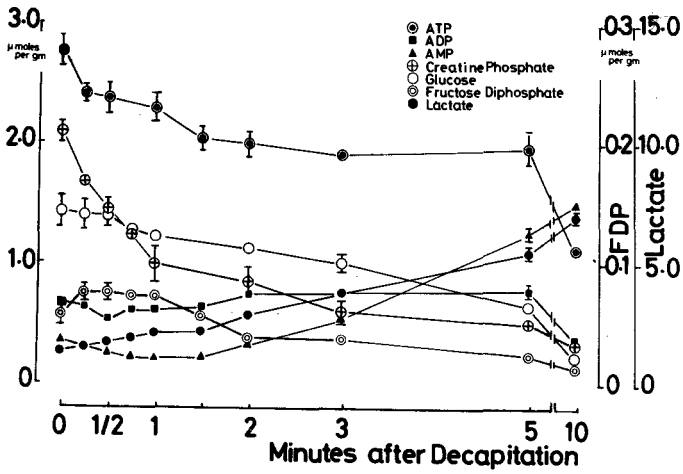
加えた。各物質の定量方法は Methods of Enzymatic Analysis[1] によった。

結果及び考察

1) ラット脳発育に伴う脳内物質含量の変化.

第1図に示す様に ATP 含量は出生後10日迄は大きな変化がなく, 15日目に一時減少し, 再び増加する。Creatine Phosphate (CrP.) 含量は出生後20日迄漸時減少し. ATP 含量と比較すると少ない。CrP 含量は20日から25日にかけ急激に増加し, ATP 含量より多くなる。Glucose 含量は出生時に高く, 以後発育に従って減少するが, 出生後15日から20日にかけて急激に減少する。Lactate 含量は出生時高く, 出生後1日目に減少する。10日目より急激に増加し25日目になると, 成鼠の含量と同程度になる。FDP 含量は出生時より増加して, 7日頃から15日目にかけて, 急激に増加する。ADP, AMP, 含量は, 発育を通して大きな変化を示さない。

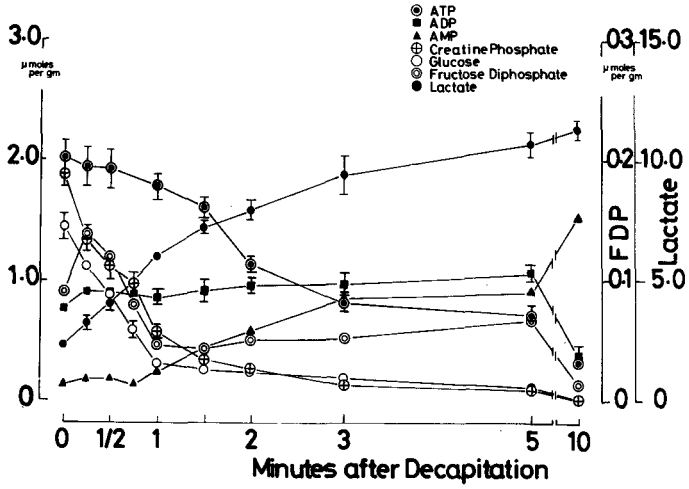
第3図 10-day-old Rat



2) 発育に伴う Anoxia の影響.

出生後1日目ラットを Anoxia にした時の脳内各物質含量の変化を第2図に示した。この時期では. ATP, Glucose 含量の変化が少なく, ATP 含量は10分後で90%, Glucose 含量は3分後で80%が, それぞれ保たれている。ADP, AMP 含量は変化を示さない。CrP 含量は時間と共に, 緩やかに減少し3分後に50%になる。FDP 含量の変化をみると, ATP, ADP, AMP, CrP, Glucose, Lactate 含量が変化していない時期(1分後)に最初の量の3倍から5倍程度に増加する。また, この時期では, 蓄積された FDP 含量は高まったままで保たれており, 5分後でも尚, 最初の量の15倍である。

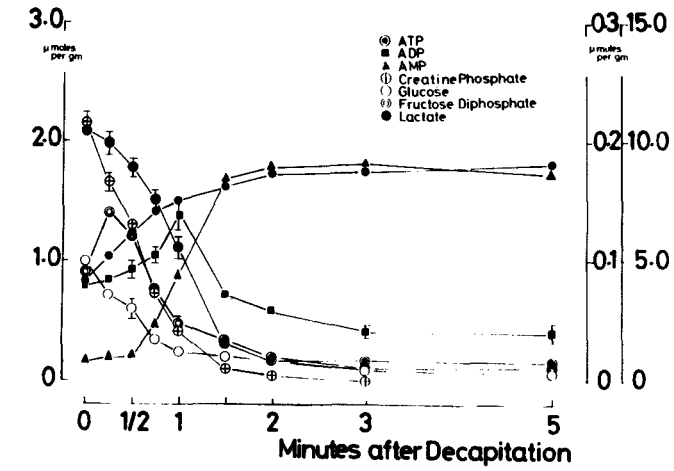
第4図 15-day-old Rats



生後10日目のもの（第3図）ではATP含量は時間と共に減少するのが認められ，5分後に65%に減少する。CrP含量は生後1日目のものより減少が急で1分後に60%迄減少する。またGlucose含量も減少する。FDP含量の蓄積する時間が，1日目りものより早くなり，30秒で最大値になり，しかも，2分後には高まったFDPは減少し始める。ADP，AMP含量は5分迄は大きな変化がない。

生後15日目りもの（第4図）り変化をみると，ATP含量の減少が10日目りものと比してさらに急になり，CrP含量も更に急激に減少する。FDP含量は，断頭後15秒で高い蓄積を示し，以後急に減少する。ADP含量は5分間の増加が10日目と比して少なくなり，10分後には減少している。AMP含量の蓄積は5分迄，除々に増加し，10分後は著しく蓄積する。Lactate蓄積も10日目よりさらに急激になっているが，5分間は時間と共に直線的に増加している。

第5図 30-day-old Rats



生後30日（第5図）になると，ATP含量は，1分後に50%になり，2分後には，わずか10%になる。CrP含量は，1分間に20%，2分後にはほとんど零になる。Glucose含量も1分後には20%ほどしか保たれていない。FDP含量は，15秒後に蓄積の最大値を示し，その後急激に減少する。ADP含量は，AMP含量の蓄積に先立って蓄積されるが，1分を過ぎると減少し始め，また，AMP蓄積は，1分30秒後には蓄積が最大となり，それ以後変化しない。Lactate蓄積は，1分30秒後急激に増加するが，それ以後は一定値を保つ。

幼若期には，成体に比して無酸素或は低酸素状態に対して強い抵抗力を持つことは良く知られている[2]。この事を脳り代謝上からみると，幼若ラット脳のAnoxia状態で，

ATP, CrP, Glucose 含量が，かなりの時間最初の量を保って，解糖系の最終産物である lactate 含量の蓄積も非常に少ない。即ち，出生時には脳の代謝も低く，エネルギー利用も少ないものと考えられる。発育が進むにつれて anoxia によって始めに CrP 含量の減少が，次で ATP 含量の減少が起る。lactate 蓄積は時間と共に増加していく。出生後10日以後になると CrP, ATP 含量の減少が著しくなり，lactate 蓄積も顕著になる。この事は，脳の発育に伴い，解糖系は漸時強なものとなり，15日目から20日目にかけて，好気的な代謝系が急速に発達するものと考えられ，この時期から anoxia の影響が特に著明に現われる。

Lowry 等が既に報告している様に，幼若マウスでも，成鼠でも，anoxia により FDP が急激に蓄積することは，ラットにおいても同様である。然し，ラットについて観察した限りでは，幼若期より発育が進むにつれて，FDP 蓄積の最大となる時間が早められることが認められ，解糖系調節の一つの key Enzyme としての PFK の活性化機構が，幼若期と成熟期で異ることが考えられる。即ち，ラット幼若期には，Glucose, lactate, ATP, CrP 含量に変化なく，又，PFK の活性化因子として知られる ADP, AMP, Pi の量も変化していない時期にも認められるからである。Lowry 等は幼若，成鼠いづれの場合にも，マウス断頭脳では5秒後，2分後に FDP の2つの最大値を記録しているが，我々の成績では，出生後では3分をピークとしたなだらかな曲線をなり，5日目には1分をピークとしており15日目では15秒後がピークで，その後急速に減少をし，1分後には正常含量以下となった。FDP の第2のピークはついては，30日目のものでは認めることができなかった。ラットの場合にも，成鼠を用いた時には15秒後に第1のピークが認められ，その後著明な減少なしに第2のピークを2分後に認められる。このように Lowry の成績と異なる点があるが，これについては今後も検討を要すると思われるが，発育に伴なって，脳の解糖系の調節機構も変化していることは明らかで，今後は脳の機能発現やミエリネーションとの関連について追求を進める。

〔文献〕

(1) Bergmeyer, H.-U. : Methods of Enzymatic Analysis. (1965) Academic Press.

(2) Jilek, V. : Developmental Neurobiology (1970) Charles C. Thomas Publisher. ed. Himwich, W. A.

(3) Lowry, O.H., Passanneur, J.V., Hasselberg, F.X., Schultz, D.W., J. Biol. Chem. 239 18 (1964)

(4) Lowry, O.H., Passanneur, J.V., J. Biol. Chem. 239 31 (1964)

(5) Lowry, O.H., Passanneur, J.V, J. Biol. Chem. 241 2368 (1966)

(6) Maker, H.S., Lehrer, G.H., : Handbook of Neurochemistry. vol.6. (1971) Plenum Press. ed. Lajtha, A.

(7) Rolleston, F.S., Newsholme, E.A. Biochem. J. 104 524 (1967)

(8) TAKAGAKI, G., J. Neurochem. 15 903 (1968)

33. 脳発達障害の神経化学的研究（第2報）

成瀬　浩・小松せつ・永山素男（国立精研）
宮本侃治　（国立武蔵療養所）

〔要約〕

われわれは，1968年の本学会において，実験的仮死分娩ラットで脳の蛋白質代謝回転が低下していることを報告した。今回は仮死分娩の条件を前回より厳密に設定するとともに，多数例にもちいうる分析方法を使って統計的に検討した。まず，満期産と早産を自然分娩の開始の有無によって厳密に区別し，それぞれについて対照群と出生時にAnoxiaを経過したAnoxia群をつくった。さらに妊娠中に低蛋白餌を与えた低蛋白餌群（対照および Anoxia 10分群）をもちいた。これらのラットについて，生後3日目に C^{14}-ロイシンを腹腔内注射し，脳蛋白へのとりこみ率（蛋白質の総放射能／酸可溶性分画の総放射能）を算出した。この結果，出生時Anoxiaが23分以内の満期Anoxia群のとりこみ率は正常群と差がなく，40分のAnoxiaのものではじめてとりこみ率が低下する傾向をしめした。一方，早産および低蛋白餌群では，出生時Anoxiaをへない対照群のとりこみ率は正常群と差がなく，10分のAnoxiaをへた早産Anoxia 10分群，低蛋白餌Anoxia 10分群は，それぞれの対照に比し著明なとりこみ率の低下をしめした。これらの実験結果から，出生時Anoxiaに対する個体の抵抗性について論じ，ラットでは出生前の数時間に抵抗性が増加することおよび，この抵抗性が胎児期の栄養条件に依存することを推論した。

胎生期あるいは新生児期におこるさまざまな侵襲による脳発達障害の研究は，臨床的に重要な課題である。われわれは，精神薄弱あるいは脳性麻痺の原因と目されるさまざまな侵襲を実験動物にくわえて脳発達障害をおこし，実験心理学的，形態学的検索をおこなうとともに神経化学的検索をおこなっている。このうち，これら脳発達障害動物脳における解糖呼吸系代謝および蛋白質代謝については1968年本学会総会に報告した。特に，蛋白質代謝については，実験的仮死分娩ラットにおいて蛋白質代謝回転が低下することを見いだし報告した。[1] 今回は，実験的仮死分娩をおこす条件をさらに厳密に設定するとともに，多数例に適用しうる方法をもちいて蛋白質代謝を検討し，興味ある結果をえたので報告する。

〔実験動物〕

動物はWistar－今道系ラットをもちい，一定条件下で飼育した。このラットは，現在の条件下では大部分が，交尾後21日目の13－18時に出産する。動物を妊娠中あるいは出産時の処置により，つぎの各群にわけた。

正常群　妊娠中あるいは，出生時にまったく処置をくわえず，自然分娩により出産したラット。

満期Anoxia群　自然分娩により1～2匹娩出したのち，断頭により母ラットを殺し，帝王切開により子宮を摘出，母体からの酸素供給をたち一定時間放置したのち，子宮壁および羊膜をひらき呼吸を開始せしめた。さらに母ラットの死後，呼吸開始までの時間，すなわちAnoxiaの持続時間により満期Anoxia 10分群，満期Anoxia 15

分群，満期 Anoxia 23分群，満期 Anoxia 40分群の各群にわけた。

低蛋白餌群　交尾後7日目より出産まで，低蛋白餌をあたえ，自由に摂食させた。低蛋白餌の蛋白含量は，9%であり，これに対し，他の群の動物にもちいた飼料の蛋白質含量は，25%である。この群をさらに出産時の條件により2群にわけた。すなわち，自然分娩により出生したものを低蛋白餌対照群　満期 Anoxia 10分群と同様に，自然分娩により1～2匹娩出した後，残りの胎児を10分間無酸素状態においたものを，低蛋白餌 Anoxia 10分群とした。

早産群　交尾後21日目の12～13時に，分娩を開始していない母ウサギを断頭により殺した。母ウサギの死後できるだけすみやかにとりだし，呼吸を開始させた仔ウサギを早産対照群とした。この手技によると，母ウサギの死から胎児の呼吸開始までに要する時間は1分以内であった。一方，母ウサギを殺した後，満期 Anoxia 10分群と同じ方法により，10分間無酸素状態においたものを早産 Anoxia 10分群とした。

〔生化学的方法〕

生後3日目の午後，上記各群のラットの腹腔内に，体重1gあたり 0.6μCi (0.012ml) の T-C^{14}-ロイシン (216 mCi/mmole) 水溶液を注射。30°C のフラン器中で保温し，一定時間後に断頭，脳を摘出。摘出脳を氷冷した5%トリクロル酢酸 5ml中でホモゲナイズし，10,000g × 10分遠沈した。沈渣はさらに2回5%トリクロル酢酸 5mlで洗滌した。以上3回の遠沈上清をあわせて15mlとし，酸可溶性分画とした。

沈渣は，アセトン 2mlに再溶解，遠沈して2回洗滌した後，エタノール：エーテル (3：1) 2mlに溶解して一夜放置，遠沈した後，再度エタノール：エーテル (3：1) で洗滌。5%トリクロル酢酸 2mlに溶解させ 90°C 10分間加熱した後遠沈，再度5%トリクロル酢酸 2mlで洗滌。さらにエーテル 5mlで3回洗滌してトリクロル酢酸を除く。こうして脂質，核酸を除いた沈渣に 0.5N苛性ソーダを加え 100°C，10分間加熱して溶解させ，2.5mlにし，これを蛋白質分画とした。

放射能測定　酸可溶性分画，および蛋白質分画は，おのおの 50μlをガラス繊維沪紙（東洋沪紙 GB-60，直径 21mm）に吸収，乾燥させ，0.4% PPO，0.01% POPOPトルエン溶液 5ml中にいれ，液体シンチレーションカウンター（島津 LSG-13）によって放射能を測定した。この方法による計数効率は 90%であった。

計算　次式によりとりこみ率をもとめた。

$$\text{とりこみ率} = \frac{\text{蛋白質分画の總放射能}}{\text{酸可溶性分画の總放射能}}$$

統計学的検定には Student の t-test をもちいた。

〔実験結果〕

まず，正常群と満期 Anoxia群について，T-C^{14}-ロイシンの脳蛋白質へのとりこみを比較した（第一表）。表にしめしたように，正常群では T-C^{14}ロイシン腹腔内注射後10分，20分後のとりこみ率は，おのおの，0.521，1.164であった。満期 Anoxia群についてみると，出生時の Anoxiaが23分以内のもの，すなわち，満期 Anoxia 10分群，満期 Anoxia 15分群，満期 Anoxia 23分群は注射後10分でも，20分でも正常群との間に

（ヤー表）　正常群及満期Anoxia群脳蛋白の C^{14}-ロイシンとりこみ率

	10 min. after injection	20 min. after injection
Normal	0.521 ± 0.112 (20)	1.164 ± 0.329 (17)
Anoxia 10'	0.440 ± 0.054 (4)	———
Anoxia 15'	0.451 ± 0.150 (15)	0.969 ± 0.426 (15)
Anoxia 23'	0.494 ± 0.043 (5)	1.316 ± 0.312 (5)
Anoxia 40'	0.382 ± 0.079**(44)	0.731 ± 0.375*(5)

平均値±標準偏差　（例数）。
＊　P＜10%，＊＊　P＜2.5%

有意の差を見いだしえなかった。これに対し，Anoxia 40分群では，C^{14}-ロイシン投与10分後にはとりこみ率が0.382であり，危険率2.5%で正常群と有意の差があった。C^{14}-ロイシン投与20分後でも，とりこみ率，0.731であり，危険率10%で正常群との間に有意の差があった。したがって，満期出産では，出生時の23分以内のAnoxiaによっては，生后3日目のとりこみ率は低下せず，40分のAnoxiaによって，はじめて低下の傾向をみせる。

つぎに，低蛋白餌群，および早産群について，C^{14}-ロイシンの脳蛋白質へのとりこみ率を検討した（ヤニ表）。まず低蛋白餌群についてみると表にしめしたように，低蛋白餌対照群のとりこみ率は，C^{14}-ロイシン投与5分，10分后で，おのおの0.229，0.506であり，正常群との間に有意の差をみとめえなかった。これに対し，低蛋白餌Anoxia 10分群では，C^{14}-ロイシン投与5分后には，0.158，10分后には0.348と低

（ヤニ表）　低蛋白餌群及早産群脳蛋白の C^{14}-ロイシンとりこみ率

	5 min. after injection		10 min. after injection	
	Control	Anoxia 10'	Control	Anoxia 10'
満期産群	———	———	0.521 ± 0.112 (20)	0.440 ± 0.054 (4)
低蛋白餌群	0.229 ± 0.065 (20)	0.158 ± 0.058**(8)	0.506 ± 0.137 (22)	0.348 ± 0.090***(15)
早産群	0.234 ± 0.042 (12)	0.179 ± 0.027***(9)	0.506 ± 0.095 (25)	0.407 ± 0.03***(13)

平均値±標準偏差（例数）。
満期産群のControlは正常群の値。
＊＊　P＜2.5%，＊＊＊　P＜0.5%（いづれも対照群との比較）。

下し，それぞれ2.5%，0.5%危険率で対照群と有意の差をしめした。

早産群では，対照群のとりこみ率は，C^{14}-ロイシン投与5分，10分后におのおの0.234，0.506であり，正常群との間に有意の差をみとめなかった。一方，早産Anoxia 10分群では，C^{14}-ロイシン投与5分，10分后にそれぞれ0.179，0.407と低下し，いづれも危険率0.5%で早産対照群との間に有意の差があった。

〔考察〕

満期 Anoxia 群では，上記の実験結果にしめしたように，出産時の Anoxia が 40分になってはじめて，生后3日目のとりこみ率が低下する傾向をしめす。一方今回の実験をつうじて，満期 Anoxia群の3日間生存率をみると，満期 Anoxia 10～23分群では 90% 以上であるのに対し，満期 Anoxia 40分群では約20%に低下し，さらに45分群，50分群では，それぞれ 2.5%，0名であった。また，早産群では対照群，早産 Anoxia 10分群ともに3日間生存率は80%をこえた。こうした事実を考えあわせると，満期産ラット脳蛋白の C^{14}-ロイシンとりこみ率は，出生時の Anoxia によって影響をうけることが少く，個体の死をもたらす條件に近い非常に長時間の Anoxia によってはじめて低下するといえるのであろう。

このような結果は，われわれが 1968年の本学会總会で報告した結論，すなわち，Anoxia 10分群の脳蛋白質代謝回転の低下という結論と一見矛盾するかにみえる。しかし，当時われわれが Anoxia 10分群とよんだのは，今日の満期 Anoxia 10分群とはことなる。すなわち，1968年の抄録[1]でのべたように当時の Anoxia 10分群は，自然分娩の開始以前に帝王切開をおこない，胎児を無酸素状態においてえられたものである。しかも，当時は出産開始の早いラットを Anoxia 10分群の養親としたため，Anoxia 10分群のラットは，結果的に出産開始のおそいものをえらんだことになる。これに反し，今回の満期 Anoxia群は，自然分娩により1～2匹娩出した后に帝王切開をおこなってあり，自然分娩開始以前に帝王切開をおこなった早産 Anoxia 10分群と厳密に区別している。このように実験條件を詳細に検討するならば，1968年にわれわれが Anoxia 10分群とよんだものは今日の早産 Anoxia 10分群に相当すると考えられる。したがって今回の結果は，前報と一致していると考へられる。

早産群では満期産の場合とことなる結果がえられた。すなわち，早産のみではとりこみ率が変化しないにもかかわらず，出生時にわずか10分間の Anoxia が加わるととりこみ率の著明な低下がみられた。また表にはしめさなかったが，同一の母体からえた胎児を，早産対照群と早産 Anoxia 10分群にわけた実験でも，Anoxia群のとりこみ率が対照群に比し著明に低下するという結果がえられた。同じく10分間の出生時 Anoxia が，満期群ではとりこみ率に影響を与えず，早産群では著明な低下をもたらすという事実は，両群の Anoxia に対する抵抗性に大きな差があることをしめしていると考えられる。すなわち，ラット胎児脳の代謝が出生前のきわめて短かい時間に急激に変化し，Anoxia に対する抵抗性が増加すると考えられる。

低蛋白群においても，低蛋白餌対照群は正常群と同じとりこみ率をしめすのに対し，低蛋白餌 Anoxia群では著明に低下する。この事実も，早産群の場合と同様，Anoxia に対する抵抗性の低下によると推論される。すなわち，Anoxia に対する抵抗性は，胎児の成熟度とともに，胎児期の栄養條件によっても規定されると考えられる。

以上検討してきたように，出生時 Anoxia による脳蛋白代謝障害は，Anoxia の程度とともに，胎児の抵抗性に大きく依存すると考えられる。このような結果にもとずき，われわれは，この抵抗性の実体をあきらかにするためこれまでもちいてきた各群ラットの出生時の脳代謝，特に解糖呼吸系代謝について検討中である。

〔文献〕(1) 成瀬 永山 小松 佐々木 宮本 神経化学 7 Suppl. 166 1968

34. B_6 依存性痙攣における代謝障害

多田啓也・高田五郎（阪市大・医・小児）
吉田稔男・荒川雅男（東北大・医・小児）

〔要約〕

B_6依存性痙攣とは生後間もなくより痙攣発作がみられ，生理的意味でのビタミンB_6欠乏が存在するにも拘らず，多量のB_6（生理的需要量を遙かに越えた量10～100mg）の投与により痙攣が消失しB_6を中止するとやがて再び痙攣が出現するという特異な病像を示す疾患であり，1954年Huntらにより報告されて以来現在迄に約30例の報告が見られるが未だ代謝障害の部位は明らかでない．

吾々は本症の典型的症例を経験した．生後3日目から始まった難治性の痙攣で色々な抗痙攣剤に抵抗を示しB_6(20mg)の静注で速かに痙攣は消失する．B_6投与をやめると3～5日で再び痙攣が出現する．末血球GOT，GPT活性は正常．トリプトファン負荷後のキサントレン酸排泄量も正常であった．本症のprimary lesionと推測されるグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）は大脳に特異的に存在するとされて来たが最近Scrivenらにより白鼠の肺にもGADが存在することが証明された．そこで吾々は本症患者より針生検により得た肺組織を用いGAD活性を調べた結果，PALPを加えない時活性は著明に低くPALP添加により活性が正常レベルまで上昇する成績を得た．対照例ではPALP添加の効果は著明でない（PALP生添加で充分の活性を示す）．これらの成績より本症のprimary lesionはGADとPALPとの親和性の低下に基づくものと推測される．恐らくGAD-apoenzymeのPALP結合部位のgene mutationに基づく変化によるものであろう．

B_6依存性痙攣（B_6 dependent convulsions）とは，生後間もなくより痙攣発作がみられ，生理的意味でのビタミンB_6欠乏が存在するにも拘らず，多量のB_6（生理的需要量を遙かに越えた量10～100 mg）の投与により痙攣が消失しB_6を中止するとやがて再び痙攣が出現するという特異な病像を示す疾患であり，1954年Huntらにより報告されて以来，現在迄に世界各国より約30例の報告が見られる．本症はしばしば家族発生の傾向があり先天性代謝異常症と見做されており，恐らく脳におけるグルタミン酸脱炭酸酵素（ピリドキサール燐酸を補酵素とする）の過程の障害が推測されているが未だ何らの証明は得られていない．これまでの研究によりB_6欠乏の際見られるトリプトファン代謝異常は見られないこと，尿中ビタミンB_6および4-pyridoxic acidの排泄量も正常であることが知られている[2]．痙攣と脳代謝の関連から極めて興味深い疾患である．

演者らは本症の典型的な症例を経験，その代謝障害を追求し新知見を得たので報告する．

症例，妹，経妊は満期出産（吸引分娩），生下時体重3.4 kg，仮死はなく黄疸も正常に経過した．生後2日目より哺吐があり四肢のtwitchingが認められた．3日目から不気嫌，興奮状態が続き四肢の痙攣も頻発する様になり生後8日目に入院した．

入院時，脱水と右側頭-頭頂部に頭血腫がみとめられる以外には著変なく脳膜刺戟症状も見られなかった．痙攣の形は全身の強直性痙攣で時にinfantile spasm様の四肢を伸展挙上する発作が合併した．フェノバルビタール，アレビアチン，ゲモニール，ザロンチン，ネルボン，オスポロット等諸種の抗痙攣剤を用いたが発作の一時的軽減が見られるのみで難治であった．脳波所見では典型的hypsarhythmiaの像が見られ

気脳図では側脳室の軽度拡大（Evans' ratio 0.32）が見出された。

生後4ヶ月の時 status epilepticus の状態にあり 20mg のピリドキサール燐酸（PALP）を静注した所 2～3分で痙攣発作の消失をみた。その後4日間全く痙攣は見られなかったが5日目に再び発作が現われたので PALP 20mg 静注，痙攣は速やかに消失した。この際脳波をとりながら PALP 静注を行った，注射前みられた hypsarrhythmia が PALP 静注3分後には発作波特に spike 成分が消失し脳波上で著明な改善が認められた。

以上の所見より本症例を B_6 依存性痙攣と診断した。B_6 投与をやめると3～5日で不気嫌になり次いで四肢の twitching，眼瞼の痙攣が起り，やがて infantile spasms に移行する。診断確定後1日 30mg の塩酸ピリドキシンを経口投与しているが全く痙攣は出現せず現在2才になるが順調な発育を示し脳波所見も概ね正常化している。

入院時 routine 検査にはさしたる異常はなく，赤血球 GOT，GPT 活性も正常範囲，トリプトファン負荷後のキサントレン酸排泄増量も見出せない，尿，血清，髄液中のアミノ酸には著変は認められなかった。

代謝障害の検索

本症における primary lesion と推測される glutamic acid decarboxylase（GAD）は大脳に特異的に存在する酵素といわれて来たが，最近 Bachmar ら[2]や Scriver ら[3]はヒトの腎組織に γABA の存在を確認し，更に Scriver らにより白鼠の腎に脳の約 1/4 の GAD の存在を認めた。そこで吾々はヒトの腎組織を用い検討した結果明らかに glutamic acid ⟶ γABA の反応すなわち GAD が存在することが確認されたので本症患者において以下の検索を行った。

針生検により得た腎組織より皮質部分を分離し燐酸緩衝液（0.1M, pH 6.4）にて ホモジナイズし Scriver 及び Whelan らの方法に従ってグルタミン酸脱炭酸酵素活性を測定した。反応液組成は 0.5ml の腎ホモジネート（湿重量約 10mg），4.4mM グルタミン酸，0.0062mM ^{14}C-glutamic acid (U)（specific activity 225 mμ/m mole），0.1M 燐酸緩衝液（pH 6.4），final volume 1.5ml から成り，pyridoxal phosphate (0.5 μmales) を加えたものと加えないものとの両方の system で活性測定を行った。37°C，120分反応を行い，3N H_2SO_4 0.3ml の添加で反応を止め更に 90分間振盪を行いその間発生した $^{14}CO_2$ を central well の hyamine に吸収せしめ，hyamine 液を取り液体シンチレーションにて測定した。又，反応液を 4% sulfasalcylic acid で除蛋白し上清を Dowex 50 カラムにかけアンモニア（2N）にて elute し アミノ酸分画を取りニ次元薄層クロマトグラフィーで展開 γABA を分離しその radioactivity を gasflow counter にて測定した。

結果は表1，2の如くであり，$^{14}CO_2$ 発生量には患者と対照との間に有意の差は見出し得なかった。但し PALP 添加の効果は患者において著明であった。

一方，glutamic acid から γABA に導入された ^{14}C をみると著明な差があり，対照腎では PALP の有無で著差は無いが，患者腎では PALP を加えない場合 γABA への移行は著明に低く PALP 添加により対照腎と同様のレベルまで γABA への移行が増加するという成績が得られた。

$^{14}CO_2$ と γABA-^{14}C との data の差は恐らく患者腎の場合 GAD の process の障害により glutamate transaminase および glutamate dehydrogenase により直接 α-KG に転化し TCA サイクルにおいて $^{14}CO_2$ が産生される為によると推測される。

以上の成績により本症の primary lesion は GAD と PALP との親和性の低下——恐らくは GAD-apoenzyme の PALP 結合部位の gene mutation に基づく変化——にあると考えられる.

引用文献

1) Hunt, A.D., Stokes, J., McCrory, W.W. & Stroud, H.H.: Pediatrics, 13, 140, 1954.
2) Scriver, C.R. & Cullen, A.M., Pediatrics, 36, 14, 1965.
3) Scriver, C.R. & Whelan, D.T., Ann. N.Y. Acad. Sci., 166, 83, 1969.
4) Zachmann, M., Tocci, P. & Nyhan, W.L., J. biol. Chem., 241, 1355, 1966.

表1. $^{14}CO_2$ production from ^{14}C(U)-glutamic acid in the kidney of the patient with B_6 dependent convulsions and of controls.

	PALP	cpm per mg wet weight	cpm per mg protein
Patient T.Y.	+	222.6	2981
	−	133.3	2040
Controls K.T.	+	147.6	2477
	−	117.5	1835
K.C.	+	151.8	2467
	−	147.9	2355
K.Y.	+	135.0	2359
	−	119.4	2031

表2. Labeled GABA formation from ^{14}C(U)-glutamic acid in the kidney of the patient with vitamin B_6 dependent convulsions and of controls

	PALP	cpm per mg wet weight	cpm per mg protein
Patient T.Y.	+	691.5	9260
	−	0	0
Controls K.T.	+	635.0	10655
	−	618.9	9670
K.C.	+	563.2	9153
	−	597.4	9517
K.Y.	+	367.4	6729
	−	434.2	7384

35. 生体内に於けるキノホルムの運命とその作用

高橋康夫・荒木一明
（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要約〕

2・3・4-C^{14}キノホルムをラットの腹腔内に注射し，30分，2時間，6時間，24時間，7日後，各臓器を採取し，そのC^{14}を sample oxidizer で$C^{14}O_2$に変えシンチレーションカウンターで測定した。C^{14}は血液，肝などで非常に高いが，24時間では減少し，7日ではほとんど消失してしまう。神経系統の中，大脳，小脳，脊髄などではC^{14}はとりこまれない。但し坐骨神経には相当高くとりこまれ，殆ど7日後全組織が放射能をほとんど失ってもなおかなり高い放射能を含有している。このことは抽出法により分析した場合，chloroform-methanol 抽出分画，でほとんど同様であることが確かめられた。
経口的にC^{14}キノホルムを與えるとC^{14}は明らかに吸収されるが，投與後2時間で腹腔内注射の場合と臓器内分布のパターンが若干異っている。
尿及び糞の分析によると1日で非常に多く排泄され，7日ではほとんど排泄されてしまう。糞の方が尿より4～5倍多く排泄される。又尿で排泄されるC^{14}化合物を同定する為に Sephadex G-10 ゲル濾過及び薄層クロマトグラフィーで分析した結果はキノホルム・グルクロナイド，キノホルム硫酸抱合体，蛋白との結合体，遊離キノホルムなどが同定されたが未同定のものもある。
又長期間キノホルムを多量に投與したラットの大脳皮質，肝，坐骨神経の切片でC^{14}-glucose から$C^{14}O_2$及び蛋白への変化を測定したが，肝，坐骨神経ではこの変化が認められなかった。

スモンの原因に就ては色々の説が提唱されているが昨年椿ら[2]により疫学的研究からキノホルム中毒説が発表された。この説を確める為に実験的研究が必要であり我々はその第一歩としてキノホルムの生体内に於ける分布，代謝，排泄をしらべ次いで長期間多量にキノホルムを投与した動物の脳神経での二，三の代謝を検討した。本報告はこれまでに得られた成績の大要である。

実験方法

2,3,4-C^{14}キノホルム ―― 第一化学により Skraub 反応によってC^{14}-glycerol から合成された。 Sp. Act. 1.63 mC/m mole. 薄層ラヂオクロマトグラフィー，赤外分析，融点等から99%純粋であった。

生体内に於ける放射能分布及び排泄の測定法 ―― サラダ油にとかしたC^{14}キノホルム 6.6 μc/0.4 ml をラットの腹腔内注射或は胃内注入により投与した後，一定時間に断頭し臓器を採取し生理的食塩水で洗滌，夫々の臓器 500 mg を秤量し Packard automatic sample oxidizer で燃焼し$C^{14}O_2$とし ethanolamine にトラップ。ethanol, methanol で溶出しそれに toluen シンチレーターを添加してシンチレーションカウンターで測定した。又各臓器を20倍量の chloroform－methanol (2・1)(CM) で三回抽出。次いで5%TCA で三回抽出，更に90°15分 5%TCA で抽出し，CM分画，TCA分画，蛋白分画に分けて夫々の分画の放射能をも測定した。

次に尿糞を分析する為にC^{14}キノホルムを投与したラットを代謝測定用ケージに飼育し，尿，糞を毎日別々に採取し，上記の Sample oxidizer で燃焼させた後，シンチレーションカウンターで測定した。

又尿糞に於て排泄されたC^{14}の化学的形態を追求する為に尿に於ては Sephadex G-10 (1.5 × 150 cm) で溶出液は水を使ってゲル濾過を行い、更に β-glucuronidase (Sigma type I) と尿を Tris buffer pH 6.2 或は acetate buffer pH 5.0 中 37° 20時間反応させた後 又 Sulfatase (Sigma type III) と尿を acetate buffer pH 5.0 中 37° 20時間反応させた後、Sephadex G-10 にかけてそのパターンの変化を追求した。一方薄層クロマトグラフィーを Sephadex G-10 での各ピーク及び尿全体又糞の CM 抽出液等で行い、(日本無線 JTC 201) そのパターンを測定した。

in vitro での代謝実験 —— 200 g のラットにキノホルムを連日 500 mg/kg 経口投与した後、1, 3, 7, 14, 21 日で肝、大脳皮質、生殖腺を採取しその切片及び断片を Krebs-Ringer phosphate 中で U-C^{14} glucose 2.5 μc と反応させ検圧的に呼吸を測定すると共に3時間反応後 Hyamin に trap した $C^{14}O_2$ をシンチレーションカウンターで測定、又蛋白を常法に従って精製しガスフローカウンターで測定した。

血液測定 —— Gorden らの方法[1] による。

実験成績及び考察

C^{14} キノホルムの臓器内分布 —— 方法の項で述べた様にして腹腔内注射後 Sample oxidizer 法で分析した結果は表1の如くであった。大体の傾向として C^{14} のとりこみの高いのは肝臓、腎臓、血液等であり、次いで生殖腺、胃腸などであった。大脳、小脳、背髄等の神経系その他の部分は非常に低い放射能を含有しているに過ぎない。他の臓器も一般にかなり低かった。主なもので時間的経過をみると図1の様に30分で血液は既にかなり高い放射能を示すが、2時間では更に上昇し最高を示す。6時間では若干減少し、24時間では非常に減少する。肝腎もほぼこれに近い傾向を示すが6時間では血液より高い放射能を示す。併し何れも7日後には非常に減少して殆んどカウントが認められない位になる。殆んどすべての臓器が同様のパターンを示すが只生殖腺のみは何故か7日後に於ても依然としてかなりの放射能を保有しており注目に値する。

以上の実験により組織全体としての C^{14} の分布とその経過を知ることが出来たが、次にこれらを方法の項で述べた様にして CM 分画、TCA 分画、蛋白

表1

Distribution of C^{14}-chinoform in various organs
(Sample oxidizer method) DPM/g

	0.5 h	2 h	6 h	24 h	7 d
Cerebrum	306	412	386	90	40
Cerebellum	303	770	636	43	108
Sp. cord	563	657	580	113	25
Sci. nerve	500	2556	2405	472	461
Heart	1126	2005	1946	156	46
Lung	1862	2874	1536	318	64
Liver	5768	10432	10500	1432	56
Pancreas	823	1648	2302	208	116
Spleen	546	840	504	170	166
Kidney	6978	11280	16064	1450	100
Stomach	814	804	3780	1640	40
Intestine	418	840	3390	236	60
Muscle	226	538	614	62	44
Blood	7280	12222	7716	1268	20

図1

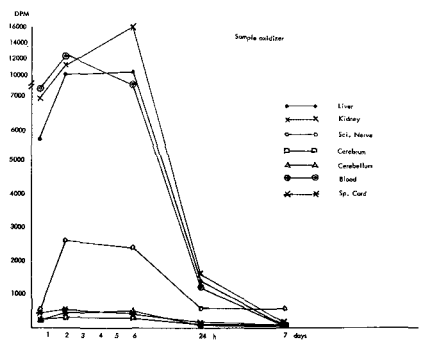


表2

Determination of blood in rat organs
(per cent blood)

Brain	0.8
Spinal cord	0.77
Scietic nerve	1.0
Muscle	0.4
Liver	3.2 — 5.5

分画に分けた場合の実験成績を述べると放射能の大部分はCM分画に存在しており TCA分画、蛋白分画には全り放射能は存在しない様である。それで各臓器のCM分画に就て前記の様に時間を追って分析してみた結果は二三の相違は認められたが大体前記の Sample oxidizer 法による成績と一致していた。特に重要なことはこの方法によっても生殖腺をかなり高い放射能をとりこみ、しかも他の臓器のCM分画が殆んど放射能を示さない7日後に於ても相当のカウントを示したことである。

この場合やはり大脳、小脳、脊髄及び spinal ganglion は生殖腺に比すれば非常に低い値を示したに過ぎない。

血液混在の影響を考えて上記の実験と同一條件での臓器中の血液を測定した結果は表2の如くで生殖組織での混在は非常に少く全り影響がないものと考えられた。

尚以上の実験はすべてC¹⁴キノホルムの腹腔内注射によるものであったが実際に人間の様に至口的に投与した場合にどうなるか、果して吸收されるであろうかとそう重要な問題を検討する為にC¹⁴キノホルムを 6.6 μc を 0.4 ml のサラダ油にとかして胃チューブで投与した後 2時間で各臓器をCM抽出した結果は表3の如くであり明かにC¹⁴キノホルムは腸から吸收されるがその分布のパターンは前記の注射の場合と異っている。この実に就ては尚時間的至過を追ってないので現在の所明確な結論は与えられない。

C¹⁴キノホルムの排泄 —— 方法の項で述べた様にして分析した尿及び糞の放射能の時間的至過は図2の如くで何れも殆んど1日で大部分が排泄され以後は少しずつ排泄されるに過ぎない。7日で殆んど大部分が排泄される。又尿と糞での比較は後者が前者の約4－5倍多い。この実に就て Sample oxidizer 法でなく尿は直接試料皿に乾燥、又糞はCM抽出法で分析した結果も大体同様の時間的至過を示していた。

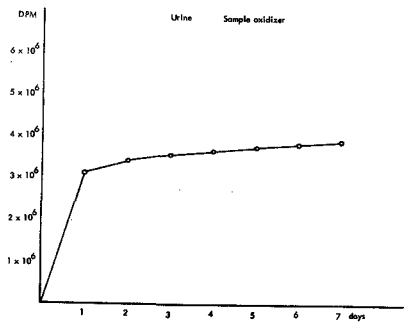
尿に於けるC¹⁴含有物質の同定 —— 尿（6時間或は24時間）の 0.5 ml ～ 2.0 ml を方法の項で記した様に Sephadex G-10 で分析すると図3の様な

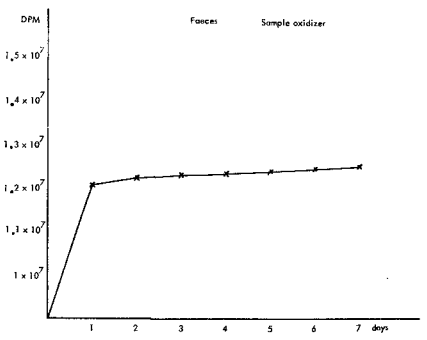
表3

Distribution of C^{14} in various organs after oral administration of C^{14}-chinoform (CPM/g)

Cerebrum	435
Cerebellum	215
Sp. Cord	130
Sci. Nerve	1150
Heart	1821
Lung	1733
Liver	10404
Pancreas	2430
Spleen	551
Kidney	22230
Stomach	76500
Intestine	3306
Muscle	19
Blood	3504

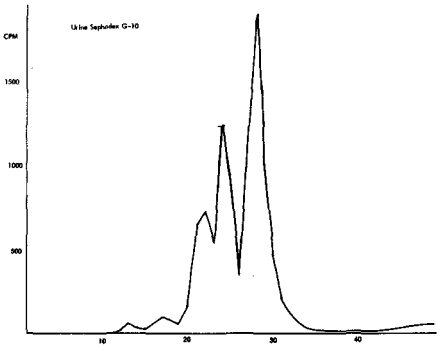
図 2

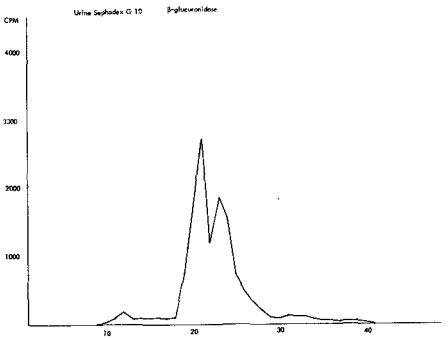




溶出パターンが得られる。即ち最初に小さなピークが出るがこれは蛋白と思われる。次に出てくる小ピークは尚未同定であり、次に3つの大きなピークが溶出される。これらを夫々ピークI、II、IIIとすると、IIIは方法の項で述べた様にβ-glucuronidaseと反応させると消失するのでC¹⁴キノホルム・グルクロナイドであると思われる。又IIはSulfataseと反応させると消失するのでC¹⁴キノホルムsulfateであると思われる。(図省略)依しピークIに就ては現在の所尚未同定である。このことは薄層ラヂオクロマトグラフィーでも確められた。

図3

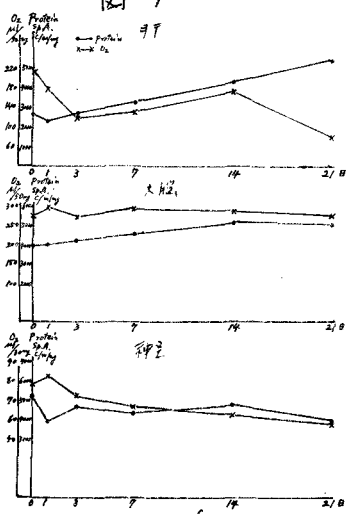




そして遊離キノホルムが尿に殆んど出現しないことも薄層クロマトグラフィーのパターンから明らかにされた。(図省略)糞に就ても検討しているが遊離キノホルムが排泄される様である。

キノホルム中毒ラットでの代謝実験——方法の項で述べた様にして行った結果肝ではキノホルム投与日数にほゞ比例して呼吸は低下し、2/日で対照の%になり、蛋白合成はそれに反して次第に上昇し、2/日では大体対照の2倍になる。これはミトコンドリヤの傷害と細胞修復過程の表現であるかも知れない。依し大脳皮質では呼吸は殆んど変化しないし蛋白合成も非常に僅かしか上昇していない。これはキノホルムが殆んど大脳にとりこまれないとそう前記の実験データと相応するものかも知れない。生骨神主に就ては日数と共に軽度ではあるが呼吸も低下するが同時に蛋白合成も軽度ではあるが低下してくる。(図4)このことはキノホルムが生骨神主に蓄積しているとそう前述のデーターと相応する様に思われ、この詳細な機序の追求が必要である。

図4



以上の成績がスモンの発症とどの様に関連してくるかに就ては今後なお多くの研究が必要であろう。

文献

(1) M. G. W. Gordon, J. I. Nurnberger; J. Histochem. Cytochem. 3, 130 (1955)

(2) T. Tsubaki, Y. Honma, M. Hoshi; Lancet April 3 (1971)

The Biosynthesis of Plasmalogens during Myelination of the Rat

Hildegard Debuch

(Physiol. Chem. Inst., Köln)

After Professor Klenk and myself were able to elucidate the chemical structure of plasmalogens from human brain, I have been particularly interested in the biosynthesis of these glycerophospholipids which are present to a special high degree – up to 90 per cent of the phosphatidyl-ethanolamine-fraction – in the myeline as ethanolamine phospholipids. Knowing the types of aldehydes and fatty acids, we first prooved the incorporation of ^{14}C-acetate into the plasmalogens after application of the isotop intracerebrally into 14 days old rats. 24 hours after injection the aldehydes were labelled much less than the corresponding fatty acids, which however after a longer survival time showed a higher specific radioactivity. This indicated a slower turnover of the plasmalogens with respect to the carbon chain at the 1-position of the glycerol.

Using different hydrolysis procedures – enzymic and chemical ones – we could estimate the special incorporation of acetate into the four different chains of the ethanolamine phospholipids: Into the 1- and 2-position of phosphatidylethanolamines as well as into the 1- and 2-position of the ethanolamine plasmalogens.

In this way we could not only show the ratio of activity between

the diacyl - and the plasmalogen - type of the brain lipid, but we could also estimate the different specific activities of the different chain lengths of fatty acids resp. of aldehydes. Palmitic acid of the 1-position of phosphatidyl-ethanolamine had a 2 to 3 times higher specific activity than hexadecanal, the C_{18} fatty acids were double in activity than the corresponding aldehydes. Since we knew from the work of others, that long chain alcohols condensate with dihydroxyacetonphosphate to glycerolethers and these can be precursors of plasmalogens, the question arose for us, when does the oxidation of the etherlinkage takes place. To proof this and to exclude the possibility of reduction of the esterlinkage we administered three possible precursors of plasmalogens labelled with ^{14}C in the carbon chain:

(1) 0-(1, 2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphoryl)ethanolamine (phosphatidylethanolamine)

(2) 0-(1-alkyl-2-acyl-sn-glycerol-3-phosphoryl) ethanolamine (ethanolamine etherphospholipid)

(3) 0-(1-alkyl-sn-glycerol-3-phosphoryl)ethanolamine,

and measured the radioactivity of the aldehydes after a special incubation time.

Whereas this was very little with the compounds (1) and (2), the last one seems to be a direct precursor of the plasmalogens. Between 12 and 96 hours after injection the specific radioactivity of the aldehydes were considerably higher than that of the total

fatty acids. The mean value of the ratios: spec. activity of aldehydes: spec. activity of fatty acids after 48 hours was about 30, after 60 hours 15.

Since the specific activity of the aldehydes was highest 60 hours after application of the radioactive lysophosphatide, we again isolated the ethanolamine phospholipids as mentioned above. About 50% of the total radioactivity administered has been found in this fraction, 64% therefrom was in the aldehydes. We also measured as well the ^{14}C-content of the aldehydes of the ethanolamine plasmalogens as that of the fatty acids from the 1-position of the phosphatidylethanolamine. — Here again: the labelling of the aldehydes was ten times higher than that of the fatty acids (the latter indicates, that some de novo synthesis occurred during that survival time). The distribution of the radioactivity between the different C_{16} - and C_{18} - chains had also been estimated.

We concluded from the results, that the oxidation of the saturated etherbinding to the enoletherbond only occur, if the 2-position of glycerol is not substituted but free.

The biosynthesis of the ethanolamine plasmalogens in the brain should therefore follow the way: 0-(1-alkyl)sn-glycerol ——— 0-(1-alkyl-sn-glycero-3-phosphoryl) ethanolamine ——— 0-(1-alk-1'-enyl-sn-glycero-3-phosphoryl) ethanolamine ——— 0-(1-alk-1' enyl, 2-acyl-sn-glycero-3-phosphoryl)ethanolamine.

Furthermore the high uptake of the radioactive lysophosphatide into the plasmalogen led us to conclude, that acyl coenzym A: 1-alkenyl-glycero-3-phosphorylethanolamineacyltransferase – an analog of LANDS acyltransferase is active in brain.

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO