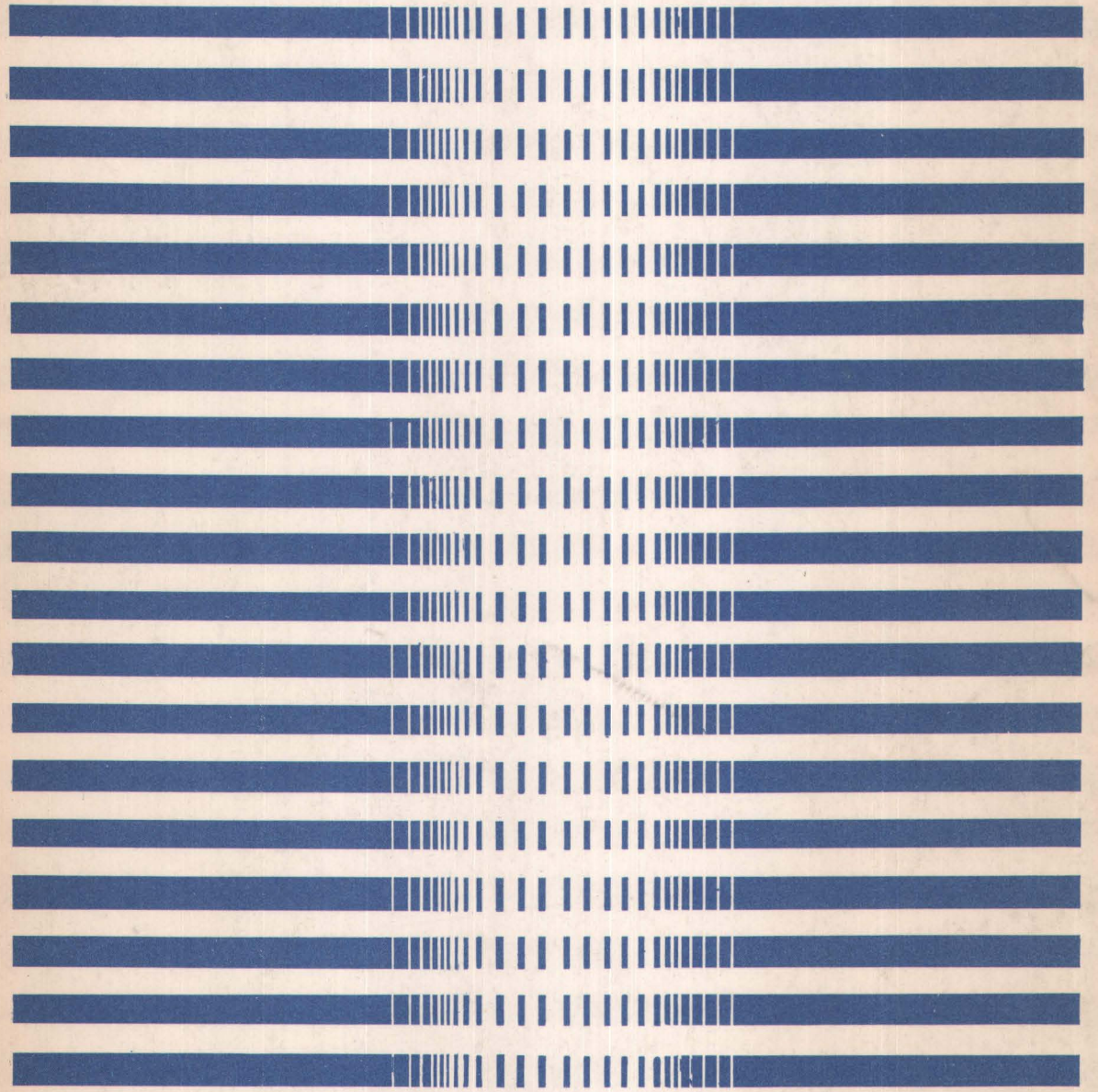
神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第15回 日本神経化学会抄録集



Vol. 11, 1972

日本神経化学会

神経化学

第15回日本神経化学会抄録集

PROCEEDINGS OF THE 15TH ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　大　阪
11月1日(水), 2日(木)

Vol. 11　1972

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1. ドーパ脱炭酸酵素阻害剤RO4－4602によるアミノ酸尿 …… 1

田中千賀子・大隅義継
堀井郁夫・高折修二
（京大・医・薬理）

2. 血清トリプトファン水準の脳各部位のトリプトファン及び5HT濃度，アミノ酸バランスに及ぼす影響 …… 5

渡辺昌祐・中島良彦
河野沢与・江原嵩
井口欽也・田口冠蔵
大月三郎
（岡大・医・精神）

3. 断眠後睡眠時のラット脳内 ^{3}H－Tryptophan代謝 …… 9

渋谷治男・融道男
島薗安雄
（東医歯大・医・神経）

4. アミンプレカーサー投与による猿脳内アミン代謝の研究 …… 13

岸本英爾・永井克子
塚田裕三
（慶大・医・生理）

5. Dopamine β-Hydroxylase阻害と脳内アミン …… 17

日高弘義
（愛知県コロニー）

6. 化学伝達物質受容部位に関する研究（その1）Acetylcholine及びその近縁物質による大脳シナプス膜のコンフォーメーション変化 …… 20

関谷真・菊野正隆
（上智大・理工・生化）

7. 向精神薬の神経終末顆粒への特異的結合の様式について …… 24

石谷良一
（千大・薬・微生物薬品化学）

8．ラット脳のＡＭＰ Deaminase の活性調節について …… 28
小笠原 信 明・渡 辺 智 正
後 藤 治 子
（愛知県コロニー）
吉 野 昌 孝
（名大・医・Ⅱ生化）

9．脳Na^+・K^+-ATPase に対するα-Tocopherol の効果 …… 32
川 井 紘 一・原 諭 吉
中 尾 真
（東医歯大・医・生化）

10．発育に伴うラット大脳DNA分解酵素の変動について …… 36
野 口 鉄 也・須 田 治 彦
塚 田 裕 三
（慶大・医・生理）

11．発育に伴うラット大脳DNA依存性DNA合成酵素の変動について …… 40
須 田 治 彦・野 口 鉄 也
塚 田 裕 三
（慶大・医・生理）

12．発育期ラット脳のチミジンヌクレオチドとDNA代謝に及ぼす甲状腺摘除の影響 …… 44
山 上 栄・切 池 信 夫
川 北 幸 男
（阪市大・医・神経精神）

13．MAM投与によるラット胎仔脳内Lysosomal Enzymesの変動 …… 48
松 谷 天星丸・塚 田 裕 三
（脳麻研・生化）
松 山 春 郎・高 屋 豪 瑩
（脳麻研・病理）

14. 分離ニューロンおよびグリア細胞群の発育段階における生化学的研究 52
永田　豊・御子柴克彦
塚田裕三
（慶大・医・生理）

15. 脳のAcetylcholinesterase Isozymeについて 56
小林清史・森　昭胤
高坂睦年
（岡大・医・脳研・病生化）

16. 培養神経組織でのミエリン形成と2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′-Phosphohydrolase（CNP）活性 60
塚田裕三・渋谷万里子
（慶大・医・生理）
小川恵弘
（脳麻研・病理）

17. 2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′-PhosphohydrolaseのpH statおよび比色による測定法 64
栗原　正・高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

18. 発育期の実験的高フェニールアラニン血症と〔^{35}S〕Sulfateの脳組織Sulfatideへの Incorporationについて 68
戸張千年・植村慶一
平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）

19. 実験的Anoxiaに於ける脳蛋白合成並びに脳内遊離アミノ酸パターン 72
高田五郎・多田啓也
（阪市大・医・小児）

20. ウロカネース欠乏症 (Urocanase Deficiency) ····· 76
吉田稔男・荒川雅男
(東北大・医・小児)
多田啓也
(阪市大・医・小児)

21. ヒト脳セレブロシドオキシ酸組成に関する2，3の新しい知見 ····· 79
河村成子・武富保
(信大・医・順応研・生化)

22. ハイプシン，N^6-(4-アミノ-2-ヒドロキシブチル)-2，6-ジアミノカプロン酸の発見 · 83
中嶋照夫・今岡信夫
柿本泰男・佐野勇
(阪大・医・高次研)

23. 脳内のメチル化蛋白質 ····· 87
柿本泰男・三宅正治
(阪大・医・高次研)

24. 脳のA1蛋白およびヒストンのメチル化酵素について ····· 91
三宅正治
(阪大・医・高次研)

25. モルモット脳の細胞核の酸性蛋白群について ····· 95
植村慶一・佐瀬厚子
平野修助
(東邦大・医・Ⅱ生理)
中山毅
(東邦大・医・Ⅱ外)

26. 人脳S-100蛋白の分離，アミノ酸分析及びRadioimmunoassayについて ····· 99
魚住徹
(阪大・医・脳外)
Robert J. Ryan
(Mayo Clinic)

27. Neurotuble ProteinのPolymerとColchicineの結合 …… 103
新井孝夫・奥山典生
（都立大・理・化）

28. 蛙の坐骨神経における軸索流－特に温度依存性について …… 107
阿部輝雄・芳賀達也
黒川正則
（東大・医・脳研）

29. ラット坐骨神経系のin vitroにおけるロイシン輸送 …… 111
山口仁・内藤利勝
（昭和大・医・神経）

30. 脳細胞膜の脱分極とCyclic AMPの形成：Pulse-labeling法と総cAMP定量との比較 …… 115
清水宏俊
（日本ロシュ）
岡山博
田中正三
（熊大・医・Ⅰ薬理）

31. 脳のCyclic 3′5′-Nucleotide Phosphodiesterase, V. Cyclic AMPとCyclic GMPの水解とカルシウムの影響について …… 119
垣内史朗・山崎礼子
手島佳子
（大阪府立中宮病院）

32. モルヒネの長期間連続投与時における脳内Cyclic AMP代謝の変動について …… 123
内藤勝己・中川一夫
木村宏・栗山欣彌
（京府医大・薬理）

33. ウシ脳からの3′5′-Cyclic AMP依存性蛋白燐酸化酵素の精製と基質蛋白による活性化・・・ 127
宮本英七
（大阪府立中宮病院）
P。Greengard
（Yale大学・薬理）

34. 中枢神経組織におけるCyclic AMP依存性蛋白質燐酸化酵素とその機能 ・・・・・・・・・・・・・・ 131
井上善英・山村博平
西山馨・松村末夫
公文明・西塚泰美
（神大・医・Ⅱ生化）

35. 自律神経による肝Phosphorylase活性化の機序について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 135
嶋津孝
（阪大・医・解剖）
天川葵
（園田学園女子大）

1．ドーパ脱炭酸酵素阻害剤RO4－4602によるアミノ酸尿

田中　千賀子・大隅　義継
堀井　郁夫・高折　修二
（京大・医・薬理）

末梢性芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害剤である N^1-(DL-seryl)-N^2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydrazine [Ro 4-4602] (Hoffmann-La Roche)は末梢臓器でのL-DOPAの消費を抑えて効果的に中枢Dopamine (DA)を増加させることが出来るのでParkinson病のL-DOPA療法の有力な補助剤として治療的応用が試みられている。今回はRo 4-4602の長期連続投与による中枢アミンおよび血中、尿中アミノ酸量に及ぼす影響について検討した。

Wistar系雄ラットを (1) 対照群、(2) 0.1 % Ro 4-4602 混合飼料群、(3) 1.0 % Ro 4-4602 混合飼料飼育群に分けて使用した。各群のラット尿、血清生化学検査およびアミノ酸分析、アミン量定量を行った。その結果、(i)中枢DA，末梢Noradrenaline (NA) および Serotonin (5-HT)の減少傾向がみられた。(ii)尿量の増加、蛋白尿、Phenylketon尿症の出現。(iii) 血清P低下、Alkaline phospatase 活性上昇、A/Gの減少、血糖値低下。(iv)血清Tyrosine, Proline, Threonine値上昇。(v) 尿中Tyrosine, Phenylalanine, Histidine, Serine, Methionine, Glycine 値上昇などの成績が得られた。以上の成績からRo 4-4602長期投与によってDOPA, Tyrosine, Phenylalanineなどの蓄積がおこり、overflow typeのアミノ酸尿やPhenylketon尿症を発症し、引続き二次的に腎臓のアミノ酸およびPなどの再吸収障害を来したものと考えられる。

Ro 4-4602は強いDOPA脱炭酸酵素阻害作用を持っていることが知られている。[2] Ro 4-4602の特徴は少量では脳の脱炭酸酵素には作用しないで，末梢の酵素を強く阻害することであり、L-DOPAと併用すると末梢でのL-DOPAの消費を抑えて効果的に脳DAの増加が得られるので，[1] Parkinson病の治療にL-DOPAとの併用が試みられている。Parkinson病のような慢性疾患の治療には長期投与の可能性が高いが、その場合のアミン代謝がどのような影響を受けるかは興味ある問題といえる。また、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素は神経組織以外にも内分泌臓器、消化管、膵臓、腎臓、脳毛細血管壁など広汎な生体内分布を示すことが知られている。Phenylalanine, Tryptophan水酸化酵素阻害剤投与によってラットにPhenylketon尿症が出現する[4]ことからも長期間DOPA脱炭酸酵素阻害剤を投与した場合にかなり広汎にアミノ酸代謝へ影響をおよぼすことが予測される。今回はRo 4-4602 の長期投与によるラット脳NA, DA, 5-HT量とアミノ酸量への影響について報告する。

方　法

体重200 g 前後のWistar系雄ラットを (1) 対照群、(2) 0.1 % Ro 4-4602混合飼料飼育群、(3) 1.0 % Ro 4-4602混合飼料飼育群の3群に分けて使用した。それぞれの群について、アミノ酸自動分析器(日本電子)を用いて Ro 4-4602 投与2週と4週のラット尿および血清のアミノ酸分析を行った。テクニコン自動分析器により血清生化学検査を行い、尿については尿量および糖、蛋白、Phenylketon体の検出などを行った。脳アミン量の定量にはラットは断頭致死させ、直ちに脳に摘出し砕氷上で小脳を除去して残りを終脳と脳幹に分割して用いた。その他、末梢臓器のアミン量もあわせて定量した。

NA, DA の定量は Anton らの方法により、5-HT の定量は Bogdanski らの方法により、日立の螢光分光光度計を用いて測定した。自律機能の指標として血圧と体温を測定した。血圧は非観血的にラット尾部にて測定し、体温は午後1時から2時の間にサーミスターを用いて直腸温を測定した。

結果および考察

実験期間を通じて Ro 4-4602 の摂取量は 0.1 % Ro 4-4602 投与群で 58 - 71 mg/kg, 1.0 % Ro 4-4602 投与群では 396 - 613 mg/kg であった。ラット体重増加は 0.1 % Ro 4-4602 投与群でやや減少し、1.0 % 投与群では 4 週間の間に約 10 % 減少した。Ro 4-4602 投与期間中やや鎮静傾向がみられ、1.0 % 投与群では投与開始2週頃から膝および股関節の強直と脊柱の変形が認められた。これについては第45回日本薬理学会総会(1972)で報告した。Ro 4-4602投与ラットの自律機能の指標として体温と血圧を測定すると、0.1 % および 1.0 % 投与群のいずれも体温および血圧の下降が認められ、特に、1.0 % 投与群では体温、血圧ともに有意の下降を示した。このような状態のラットアミン量の変化を調べると、図1, 2に示すごとく、Ro 4-4602 投与4週で脳アミンのうち終脳で DA の減少がみられた以外に著明な変化は認められなかった。末梢臓器では脾臓の NA は減少の傾向を示し、主に腸クロム親和細胞由来と考えられる胃および十二指腸の 5-HT 量も減少傾向を示した。長期投与の場合は、0.1 % と 1.0 % Ro 4-4602 投与群でのアミン量の変化が用量に比例した変化でないことは興味がある。そして体温下降や血圧下降を直接説明できるほどのアミン量の変化とは考えにくい。次に、腹腔大動脈から採血した血液から血清を分離して血清生化学検査を行った。Na, Cl, K, Ca値はほぼ正常であるが、血糖値の低下、Alkaline phosphatase 活性の上昇および A/G 値の低下がみられた。その他血清 P の低下が著明であった。尿検査の結果を示したのが表1である。尿量は Ro 4-4602投与4週でいずれの群も有意の増加を示した。尿量は 5 % Glucose, 0.9 % NaCl 溶液 25 ml/kg を負荷後5時間の尿量 (ml/5 hr) であらわした。尿の pH の変化、糖の排泄は認められなかったが、蛋白尿が特に Ro 4-4602投与4週目には確実に現われた。Ro 4-4602 1.0 % 投与群では投与開始翌日から Phenylketon 尿症があらわれ、4日目には全例 100 mg/dl以上の Keton 体の排泄が認められた。Phenylketon 尿症は Ro 4-4602 50 mg/kg 単独投与でもあらわれた。血清遊離アミノ酸量は Ro 4-4602投与により Tyrosine, Threonine, Proline 値が特に著明に上昇した。それに対して尿中遊離アミノ酸は Tyrosine, Phenylalanine, Histidine, Glycine, Serine, Threonine, Methionine を中心として広汎な総アミノ酸量の上昇がみられた。アミノ酸尿は先天性アミノ酸代謝異常や重金属および薬物による二次的アミノ酸尿

表1　Effect of Ro 4-4602 Feeding on Rat Urine

		Control	0.1% Ro.	1.0% Ro.
Urine volume*	4 W	1.05±0.02	2.11±0.64	3.45±0.74
Proteinuria**	2 W	± - +	+	+
	4 W	±	++	++
Glucoseuria**	2 W	-	-	-
	4 W	-	-	-
pH**	2 W	6 - 7	6 - 7	6 - 7
	4 W	6 - 7	6 - 7	6 - 7
Phenyl-ketonuria***	1 day	-	-	+
	2	-	-	+
	3	-	-	+
	4	-	-	+++
	10	-	±	++
	12	-	±	++
	2 W	-	±	++
	4 W	-	±	++

* 5% glucose sol. 25 ml/kg loading
** Hema-Combistix, Ames. + 30 mg/100ml, ++ 100 mg/100ml
*** Phenistix, Ames. + 15 mg/dl, ++ 40 mg/dl, +++ 100 mg/dl

症について多くの報告がある。尿アミノ酸増量の機序によって overflow type と renal type の2つに分けられる。表3,4に示されるように Tyrosine, Threonine が最も著明な overflow type のアミノ酸尿といえる。0.1% 投与群では 1.0% 投与群に比べて overflow type の特定のアミノ酸尿がみられ、投与後、2週の方が4週に比べて overflow type の傾向が強い。Histidine に代表されるような renal type のアミノ酸尿は逆に 0.1% より 1.0% 投与群に、2週より4週にその傾向が強く 1.0% 群4週では総アミノ酸尿の様相を示す。

以上のような成績から Ro 4-4602 の長期連続投与によって、最初DOPA 脱炭酸酵素阻害作用で DOPA から DA への変換が抑制されて DOPA, Tyrosine, Phenylalanine の体内蓄積を来たし、overflow type の Tyrosinosis, Phenylketon 尿症を発症したものと考えられる。Threonine も著明な血中濃度の上昇を伴い、Proline は血中濃度の上昇のみがみられた。この事実から Ro 4-4602 の酵素阻害作用が芳香族アミノ酸に限らないのではないかと思われる。この様な overflow type のアミノ酸尿に引続いて広汎な renal type のアミノ酸がみられることから腎臓におけるアミノ酸再吸収機序の障害が二次的に発生するものと考えられる。

図1

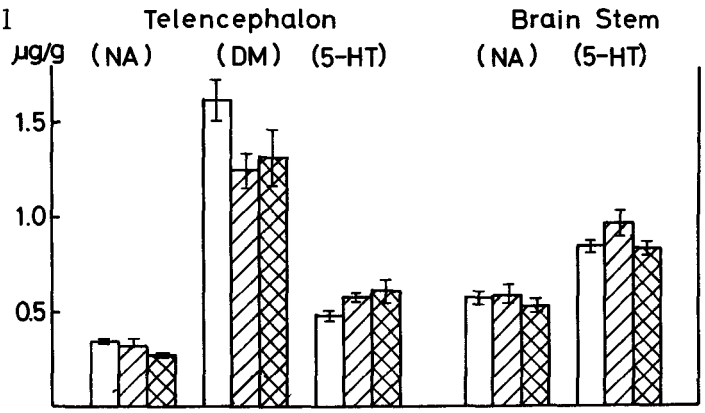
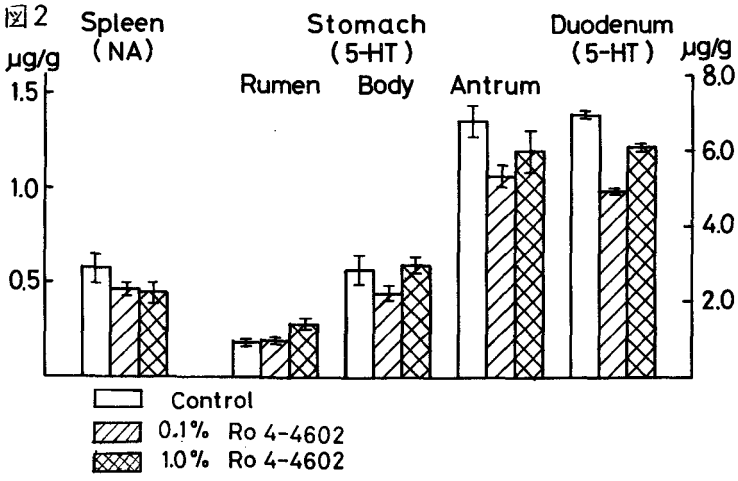


図2



先天性アミノ酸代謝異常疾患のうち骨の変化を伴うものがあり、Fanconi syndrome [5] といわれている。Tyrosine 尿症でも血清 P の低下、Alkaline phosphatase 活性上昇と共にクル病を伴うことがある。[3] Ro 4-4602 の連続投与により発生したアミノ酸尿も血清 P の低下、Alkaline phosphatase 活性の上昇と共に骨の変化を伴っているので Secondary Fanconi syndrome に属するものと考えられる。

表2 Free Amino Acid in Serum

	Control	Ro 4-4602 2 weeks 0.1 %	2 weeks 1.0 %	4 weeks 0.1 %	4 weeks 1.0 %	
Lysine	0.346	0.499	0.275	0.426	0.309	μm/ml
Histidine	0.062	0.068	0.077	0.088	0.069	
Arginine	0.128	0.146	0.123	0.131	0.128	
Asparate	0.014	0.020	0.034	0.010	0.018	
Threonine	0.124	0.352	0.529	0.596	0.153	
Serine	0.105	0.157	0.216	0.152	0.124	
Glutamate	0.112	0.123	0.136	0.097	0.101	
Proline	0.079	0.151	0.202	0.082	0.195	
Glycine	0.205	0.250	0.350	0.219	0.272	
Alanine	0.208	0.272	0.030	0.231	0.216	
Cystine	—	—	—	—	—	
Valine	0.128	0.127	0.209	0.118	0.201	
Methionine	0.049	0.025	0.027	0.053	0.048	
Isoleucine	0.075	0.082	0.055	0.138	0.099	
Leucine	0.137	0.104	0.108	0.147	0.185	
Tyrosine	0.036	0.048	0.129	0.038	0.119	
Phenyl-alanine	0.053	0.050	0.061	0.056	0.074	

表3 Free Amino Acid in Urine

	Control	Ro 4-4602 2 weeks 0.1 %	2 weeks 1.0 %	4 weeks 0.1 %	4 weeks 1.0 %	
Lysine	0.254	0.170	0.486	0.321	0.326	μm/ml
Histidine	0.106	0.213	0.670	0.479	0.522	
Arginine	0.072	0.079	0.329	0.087	0.073	
Asparate	0.049	0.082	0.161	0.085	—	
Threonine	0.259	0.379	3.355	0.450	3.470	
Serine	0.140	0.157	—	0.220	0.166	
Glutamate	0.115	0.138	0.161	0.152	0.229	
Proline	—	—	—	—	—	
Glycine	0.125	0.406	0.266	0.659	0.396	
Alanine	0.191	0.143	0.148	0.292	0.157	
Cystine	—	0.020	0.054	0.023	0.002	
Valine	0.030	0.095	0.041	0.078	0.029	
Methionine	0.140	0.059	—	0.299	0.648	
Isoleucine	0.058	—	—	0.094	0.007	
Leucine	0.147	0.150	0.120	0.216	0.095	
Tyrosine	0.013	0.043	0.411	0.051	0.478	
Phenyl-alanine	0.007	0.054	0.045	0.040	0.012	

文　献

1) Bartholoni, G. et al.: Nature, Lond. 215, 852 (1967).
2) Burkard, W.P. et al.: Arch. Biochem. Biophys. 107, 187 (1963).
3) Gentz, J. et al.: J. Pediat. 66, 670 (1965).
4) Lipton, M.A. et al.: Science 156, 248 (1967).
5) De Toni, G.: Ann. Paediat. 187, 42 (1956).

2．血清トリプトファン水準の脳各部位のトリプトファン及び5HT濃度，アミノ酸バランスに及ぼす影響

渡辺昌祐・中島良彦・河野沢与・江原　嵩
井口欽也・田口冠蔵・大月三郎
（岡大・医・精神）

脳の5HT合成の第一のステップは前駆物質アミノ酸であるL-トリプトファンの5-hydroxylationであることは既に知られており，トリプトファンhydroxylationが5HT合成のrate-limiting enzyamatic stepと考えられている。しかるに脳ではS-hydroxylaseは基質であるトリプトファンで飽和されていないので，通常脳のavailableなトリプトファン濃度と5HT合成が平行することがin vivoで示されており脳の5HT濃度を規制する最も重要な因子として血清トリプトファン濃度がある。　in vivoで負荷投与したトリプトファンの一部は他臓器で5HTPとなり脳にとり込まれる可能性があるとともに，一すでに肝のtryptophan oxygenase活性の亢進によって分解される。　脳灌流法では脳の代謝を保ちながら，他の臓器の代謝的関与がなく脳の5HT合成の，血液トリプトファン及び脳トリプトファン濃度に対する依存性を調べることがえまる。人工血液中のトリプトファン濃度を3，11倍及びトリプトファン欠如血液で脳を灌流し脳の5HT及びトリプトファン濃度になぼす影響を調べた。1)脳のトリプトファン濃度は血液トリプトファン濃度が正常の11倍までは平行して増加する。2)無トリプトファン血灌流では脳トリプトファンは消失する。3)脳トリプトファンの部位別濃度差はみられない。4)トリプトファンの脳動静脈差はO₂とCO₂と同程度である。5)脳の5HT濃度はThalamus＞N.Candatus＞Amygdala＞Cortexの順序で高トリプトファン血灌流で上昇するが増加率は元来高濃度の場所ほど高くなり部位別濃度差が著明となる。6)高トリプトファン血灌流では脳のイオノビンの減少傾向，無トリプトファン血灌流ではグリオシレの増加傾向がある。

脳の5HT合成は脳で利用され得るトリプトファン量によって規制されていることがin vivoの実験で調べられている。例えばトリプトファン負荷動物で脳のセロトニン濃度を著しく上昇させ得ること[1]や，又Wurtmanら[1]はトリプトファンの少量投与で血清や脳のトリプトファンや他のアミノ酸濃度にも影響しない程度の濃度であっても脳の5HTの濃度が上昇することを調べている。

一方．5HTP(5-hydroxytryptophan)の脱炭酸酵素活性は高く通常の状態では臓器中に5HTPを検出し得ないが，トリプトファンの負荷投与，MAOI投与，カルチノイドなどの病的状態では，血清や尿中に検出される[2]ことが調べられている。そして5HTPは血液脳関門を容易に通過するので，in vivoで投与されたトリプトファンによる脳の5HT増加現象は，hydroxylase活性の高い脳以外の臓器で生成されたSHTPが脳に入り脳5HTとなるものと脳自体で合成される両者より成りたっている。一方，トリプトファンのin vivoでの系統的投与では，肝のtryptophan oxygenase活性をinduceさせるために，脳5HT合成に使用されるトリプトファン量を，投与量に比例して増加することが困難である。

脳灌流法を用いれば，脳の機能を維持しながら脳の代謝を選択的に調べることの出来る利点を持ってあり，今回は，人工血液中のトリプトファン濃度を0，正常値(g μg/ml)，及び高トリプトファン血(正常の3倍及び11倍)で脳を一時間灌流し，脳の各部位のトリプトファン濃度，5HT濃度．及びアミノ酸バランスに及ぼす影響をしらべたので報告する。

実験方法

1). 体重2.5～3.5kgの成猫を用い．脳灌流法はGeigerの原法を改良した方法[3]で，一度脳を循環した血液は再度脳を循環させない開放式灌流を行った。
2) 人工血液組成は．既述の組成を用いた。無トリプトファン血灌流では改知組成[4]よりトリプトファンを欠如し，標準灌流では9.0μg/ml．高トリプトファン血灌流では33.0μg/ml（約3倍）及び99μg/ml（11倍）の二種類の実験を行った。本研究には無トリプトファン血灌流9例，標準灌流6例．高トリプトファン血灌流9例をまとめた。
3) 灌流時間は60分とし，脳を可及的速やかに摘出し氷冷下でCortex. Thalamus. N.caudatus, Amygdalaに分離した。
4) トリプトファンの定量はUdenfriendの方法[5]
5) 5HTの定量は．Snyderの方法[6]を用いた。
6) 脳のアミノ酸定量は．クエン酸リチウム緩衝液にて．抑本L-C4型アミノ酸自動分析装置を用いて分離定量した。

実験結果ならびに考察

1. 血液トリプトファン濃度の脳蓄積トリプトファン濃度に及ぼす影響（図1）

血清トリプトファン濃度を正常の3倍及び11倍に保ち．脳を1時間灌流した。血清トリプトファンが3倍の場合は．脳トリプトファンは18.8±2.6μg/g brainとなり．正常灌流脳の5.10±1.08μg/g brainの3.7倍を示した。又血清濃度が11倍の場合は58.1μg/g brainで正常の11.4倍に上昇した。反対に，血清トリプトファン欠如灌流では．1時間後には脳のトリプトファンはほとんど完全に消失した。図1に血清トリプトファン濃度と脳トリプトファン濃度の関係を図示した。両者は．血清トリプトファン濃度の正常の11倍まではかくとも平行することが分かった。
この結果はうさぎにLトリプトファンを経口投与して測ったGrahame-Smith[7]の成績と一致する。

図1

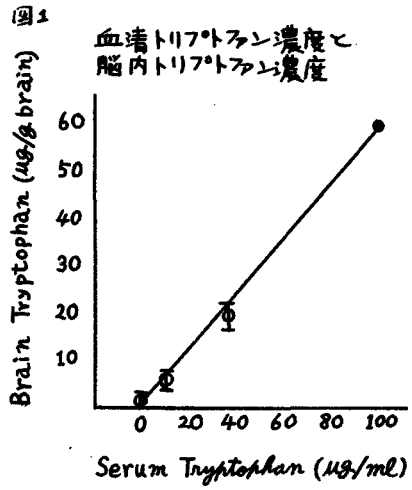


表1
各種アミノ酸の脳動静脈差と脳内濃度

	グルコース[8]	チロジン[9]	トリプトファン
動脈血濃度[1]	5.56	0.11	0.065
動静脈差[2]	0.52±0.06	0.005±0.0004	0.0090±0.0034
脳内濃度[3]	1.52±1.22	0.136±0.012	0.025±0.0053

1) μmole/ml　2) μmole/g脳/min　3) μmole/g脳

2 灌流液によるトリプトファンの脳動静脈濃度差とチロジンの脳動静脈差の比較

動脈血中の各アミノ酸濃度はすべて生理的範囲のものであり脳灌流開始30分以後の平衡状態における各物質の動静脈差とトリプトファンのそれと比較した。（表1）チロジンの動静脈差は0.005±0.0004μmole/g brain/minでありグルコースの100分の1程度の動静脈差がみられるが，トリプトファンはチロジンと同程度か，やや

高い動静脈差 0.009±0.0034 がみられた。脳内トリプトファンプールの大きさは、アルブミンのそれより少ないので脳トリプトファンの血液トリプトファンへの給源性はナロダンの場合よりも高いと考えられる。

3 脳トリプトファン濃度の脳の部位別差について（表2）

ネコ脳のCortex, Thalamus, N.Caudatus, Amygdalaの4部位に分けてSHTを測定した。

表2 正常ネコの部位別トリプトファン濃度（μg/g brain）

	cortex	thalamus	N. caudatus	Amygdala
正常ネコ(4)	16.95±2.05	20.80±3.76	19.08±0.93	17.95±2.35

いづれの部位においても濃度に有意差は far はばない一の濃度に分布しており、Eccleston[10]らの犬での結果と同一であった。このことは高トリプトファン血灌流脳でも同様であった。

4. 血液トリプトファン濃度の脳5HT濃度に及ぼす影響（図2. 表3）

表3 脳部位別 5HT の濃度変化 μg/g brain

脳部位	cortex	Thalamus	N. caudatus	Amygdala
高トリプトファン血灌流 (3)	0.777±0.238	2.442±0.363	2.100±0.914	1.58±0.056
正常ネコ (6)	0.353±0.079	0.781±0.100	0.732±0.023	0.721±0.228
無トリプトファン血灌流 (5)	0.466±0.147	1.146±0.313	0.876±0.091	0.634±0.322

33μg/mlの濃度の高トリプトファン血液で脳を灌流すると、脳のトリプトファン濃度は3.7倍に増加するが、脳の部位別濃度差はみられないことをすでに示したが、脳の5HTを部位別に測定した所、Cortexは0.777μmoleと正常の2.5倍、Thalamusは3.13倍、N.Caudatusは2.9倍、Amygdalaは2.2倍に増量していた。これを図2に示した。5HTの増加量の高いのは、Thalamus, N.Caudatus, Amygdala, cortexの順で、正常の場合に高濃度に存在する場所ほど、トリプトファン負荷による5HTの生成率が高いことを示している。脳の5HT濃度のlimiting factorがavailableなトリプトファン量に規制されるというよりも、むしろ各部位のS-hydroxylase活性度により規制されると思われる。無トリプトファン血灌流1時間

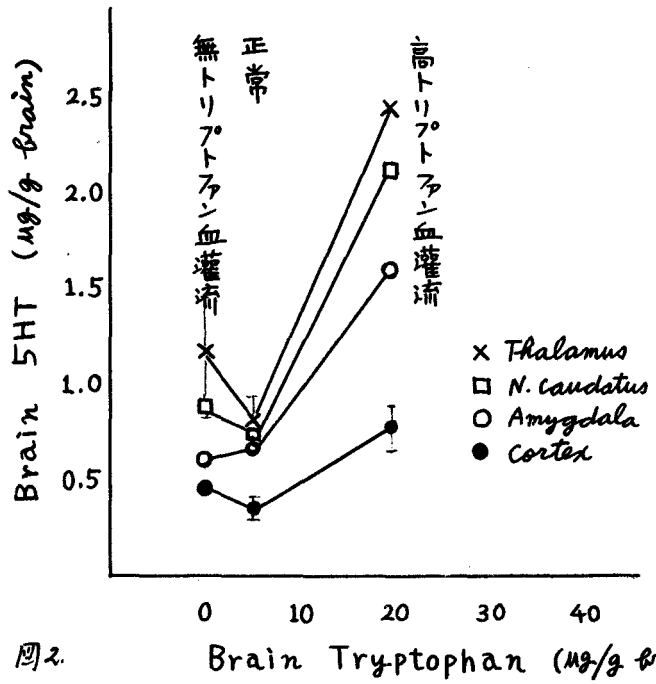


図2.

後には，脳トリプトファンはほとんど消失するにもかかわらず，脳 5HT 濃度は正常ネコのそれと同一レベルを保っており，その部位別濃度差も正常の場合と同一の順序であった。脳の遊離トリプトファンは血液トリプトファンに依存していることを既に示したが，血液トリプトファンが欠如している場合は，脳トリプトファンは protein bound プールからの efflux より供給されて必要な 5HT が生成されるのに，1時間程度の無トリプトファン血灌流では脳 5HT 濃度の変動はないと考えられる。

高トリプトファン，無トリプトファン血灌流における脳遊離アミノ酸 (μmole/g. brain)

	無トリプトファン血灌流(3)	正常灌流(5)	高トリプトファン血灌流(7)
ASP	1.500 ± 0.124	1.582 ± 0.285	1.831 ± 0.185
THR	0.607 ± 0.162	0.401 ± 0.093	0.456 ± 0.070
SER	0.554 ± 0.190	0.573 ± 0.052	0.561 ± 0.133
GLU	10.100 ± 1.741	7.590 ± 1.379	8.427 ± 0.186
GLU·NH$_2$	6.819 ± 1.201	4.937 ± 1.155	4.533 ± 0.351
GLY	0.968 ± 0.067	1.109 ± 0.255	1.168 ± 0.190
ALA	0.496 ± 0.065	0.321 ± 0.047	0.427 ± 0.111
CYS	+	+	+
VAL		0.25 ± 0.03	0.213 ± 0.068
MET		0.52 ± 0.10	
ILEU	0.321 ± 0.028	0.15 ± 0.04	0.194 ± 0.088
LEU	0.208 ± 0.039	0.24 ± 0.05	0.189 ± 0.028
TYR	0.123 ± 0.025	0.136 ± 0.012	0.082 ± 0.019
PHE	0.165 ± 0.008	0.22 ± 0.03	0.163 ± 0.084
TRY	0.011 ± 0.019	0.025 ± 0.005	0.827 ± 0.114
GABA	1.65 ± 0.15	1.756 ± 0.934	1.682 ± 0.318
LYS			0.295 ± 0.064
HIS			0.208 ± 0.025
ARG			0.077 ± 0.011
総アミノ酸		39.17 ± 0.80	

5. 高及び無トリプトファン血灌流による脳のアミノ酸バランスに及ぼす影響

高トリプトファン血灌流(3名)と無トリプトファン血灌流時の脳遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響を調べた。高トリプトファン血灌流では，タロビンの低下($p<0.05$)がみられた。又，無トリプトファン血灌流ではイソロイシンの増加傾向がみられた。in vivo において，アミノ酸の脳内への取り込みが他のアミノ酸の共存によって阻害されることが知られている[1)12)]。たとえばタロビンの取り込みが類似化合物であるメチオニン，中性アミノ酸に属するイソロイシン，ロイシン，バリン，シスタイン，システィンなどで阻害される。Moir[13)]は脳内トリプトファンと DOPA の相互作用が明かになっている所[14),15-)16)]から，この現象は precursor であるトリプトファンとタロビンの拮抗取り込み作用から証明されるかどうかを調べたが，血清のトリプトファン濃度を変えても脳内タロビン濃度に変化をきたさなかった。in vivo でなぜトリプトファンの血清濃度は時間と共に減衰するか…灌流法では一定濃度を constant に保つことができる点が異っており，われわれの結果では高トリプトファン血灌流で脳のタロビンの低下は拮抗取り込み作用により説明されると考える。

文献

1) J.D. Fernstrom and R.J. Wurtman, Science, 173.149, 1971 2) W. Lovenberg and K. Engelman, Methods of Biochemical Analysis. p23. 3) 島久淳介, 精神経誌, 70, 330, 1968 4) 大月三郎, 浜田昌祐, 神経化学, 8, 3, 1969 5) W.D. Denckla and H. K. Mewey, J. Lab. and Clin Med. 129, 160, 1967 6) S.H. Snyder, J. Axelrod and M. Zweig, Biochem. pharmacology, 14, 831, 1965 7) D.G. Grahame-Smith, J. Neurochem. 18, 1053, 1971 8) S. Watanabe, S. Otsuki, K. Mitsunobu, T. Sanmomiya and N. Okumura, J. Neurochem, 17, 1571, 1970 9) 浜田昌祐, 鈴木常夫, 矢倉良雄, 河野保子, 井口欽也, 三宮肇典, 大月三郎, 神経化学 Suppl. 9, 126, 1970 10) D. Eccleston, G.W. Ashcroft, Moir, A.T.B. Parker-Rhodes, A. Lutz, W. and O'Mahoney, D.P. J. Neurochem. 15, 947, 1968 11) M.A. Chirigos, P. Greengard, S. Udenfriend, J. biol. Chem. 235, 2075, 1960 12) G. Guroff and S. Udenfriend, J. biol. Chem. 233, 803, 1962 13) A.T.B. Moir, Brit. J. Pharmacol. 43, 724, 1971 14) A.T.B. Moir, Biochem. J. 144, 84, 1969 15) A.T.B. Moir and C.M. Yates, Brit. J. Pharmacol. 40, 562, 1970. 16) A.T.B. Moir, Brit. J. Pharmacol. 43, 715, 1971

3. 断眠後睡眠時のラット脳内 ^{3}H－Tryptophan代謝

渋谷治男・融　　道男
島薗安雄
（東医歯大・医・神経）

ラットの側脳室に注入管を固定し，24時間にわたり全睡眠を遮断したのち，^{3}H-l-tryptophanを注入し，睡眠しはじめる直前，15分間の睡眠後，40分間の睡眠後に断頭し終脳，間脳，中脳・橋・延髄の^{3}H-tryptophan，^{3}H-5-hydroxytryptamine,^{3}H-5-hydroxyindole acetic acid量を測定した。

^{3}H-5-hydroxytryptamine / ^{3}H-tryptophanの比を用いて調べたところ，対照動物の脳内3部位における値は，終脳＜間脳＜中脳・橋・延髄の順位であり，この値の平均値の差は$p < 0.01$で有意であった。また^{3}H-5-hydroxyindole acetic acid / ^{3}H-tryptophanも同じ傾向の差があり，^{3}H-5-hydroxyindole acetic acid / ^{3}H-5-hydroxytryptamineは，終脳＞間脳＞中脳・橋・延髄であり，3部位の差は有意であった。

24時間の全睡眠遮断後，ラットは平均26.5分間は眠らないが，睡眠しはじめる直前に脳内の^{3}H-5-hydroxytryptamineの値は対照動物よりも低くなり，^{3}H-tryptophanとの比も低下する傾向があった。

15分間の睡眠後に，間脳の^{3}H-5-hydroxytryptamine / ^{3}H-tryptophanは，中脳以下のそれよりも高くなる事実が注目された。

Jouvetらにより5-hydroxytryptamine(5HT)作動性ニューロンが睡眠の発生機序に関与していることが明らかにされている[3][14]が，5HTが作用する脳内の部位，また5HTの変化のひきがねとなる機構，あるいは徐波睡眠から逆説睡眠への移行に対応する脳内モノアミン代謝などについてはほとんど何も知られていない。raphe systemの破壊によって覚醒効果とともに終脳の5HTが減少し[3]，また24時間全睡眠遮断後睡眠させると，間脳において5HTが増加する[8]と報告されているが，これらの知見をより明確にし，5HTの変化する局在を明らかにするために^{3}H-tryptophan(^{3}H-Try)を脳内に注入し，その代謝を断眠後の変化と比較することを目的として研究に着手した。

実験方法

実験動物：成熟ラット(S.D.系♂　体重300g～436g)を使用した。

ラット側脳室への注入管固定方法(図1)：ラットをペントバルビタールで麻酔[9]，ラット用脳定位固定装置上に頭蓋骨頭頂部が水平になるように固定した。Nobleら[5]に従い，正中縫合より側方2mm，冠状縫合より後方1mmに，歯科用ドリルで穴をあけ，骨表面下4mmの深さまで注入管を挿入し，デンタルセメントで固定した。この時並べてスクリューを打ちこみ固定を補強した。注入管は骨表面より上方1cmのところであらかじめつけておいた折れめから折り，マンドリンを挿入放置しておく。

断眠動物および対照動物の用意：24時間の全睡眠遮断のためにSkinner箱による回避行動を用いた[8]（刺激－刺激間隔20秒，反応－刺激間隔40秒でショックの強さ：1mA，1秒間）。前もって回避行動を習熟させ，側脳室注入管を植えこんであるラットを午前9時半にSkinner箱に移し，4時間毎に15分間ずつ餌と水を摂取できるようにした。

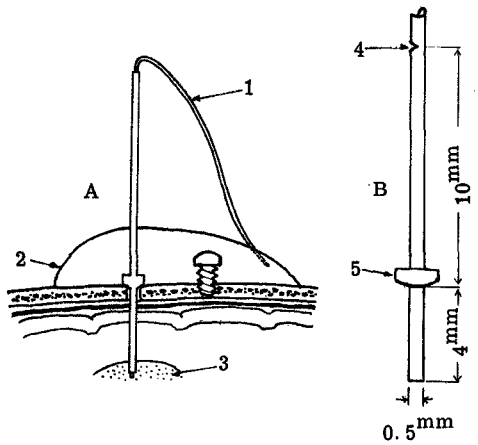


図1：側脳室への注入管固定模図
A：注入管固定　B：注入管
1：マンドリンを挿入、デンタルセメントで固定しておき注入時に抜く
2：デンタルセメント　3：側脳室
4：固定後注入管を折りやすいように前もってつけた折れめ
5：止め金

対照動物の餌は一昼夜断眠動物と同量に制限した。

^{3}H-tryptophanの注入：24時間全睡眠遮断後直ちに注入管を介しl-tryptophan-^{3}H (G) (spec. act. 4.5 Ci/mM) 30μl (30μCi) を側脳室へ注入した。なお実験開始前にthin-layer chromatogram scannerによりl-tryptophan-^{3}H (^{3}H-Try) が分解していないことを確認した。日内変動の影響を除外するために^{3}H-Tryは同一時刻に注入し、注入後入眠直前、睡眠15分後および睡眠40分後の各時点で断頭し測定に供した。実験動物に注射した同時刻に対照ラットに^{3}H-Tryを注入し、断眠ラットと同時間経たのち断頭した。

脳の分割：ラットは室温で断頭後ただちに冷凍室(4℃)内の砕氷上で脳を取りだし終脳 (TE) と間脳 (DI) および中脳＋橋＋延髄 (MPM) の3部位にわけた。

脳内標識物質(^{3}H-Try, ^{3}H-5HT, ^{3}H-5HIAA)の測定法：分割された脳組織は0.4N perchloric acid (PCA) 2.0 mlでホモジェネートし、13000 r.p.m, 10分間遠沈し、沈渣をPCA 1.0 mlで1回洗い、得た上清を5N K_2CO_3でpH 6.1に合わせ、0.2M phosphate bufferで3.0 mlとした。市山ら[2]の方法を変更したカラム操作で脳内物質を分離した。すなわち、上清をAmberlite CG 50 カラム(200-400 mesh 7mm × 10mm)に加え、そのeffluentを集めDowex 1-X2 カラム(200-400 mesh 7mm × 15mm)に加え、そのeffluentおよびH_2OからTry + 5-hydroxytryptophan (5HTP) (recoveryは5HTPとして75%)を得た。さらに、0.05M phosphate buffer (pH6.1)およびH_2Oで洗滌後、4N HCOOH, 12 mlで5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA)を溶出した(recovery：100%)。Amberlite CG-50カラムは0.05M phosphate bufferで洗った後1.5 NHClで5HTを溶出した。(recovery：92%)。これら溶出液の0.2 mlをBray溶液10 ml中に混じliquid scintillation spectrometer (Packard Model 524)で計測した。

結果

1. ^{3}H-Tryから^{3}H-5HT, ^{3}H-5HIAAへの転換の脳内3部位における差異

3標識物質の間の比をとって各部位の変化を注入後の時間経過を無視してしらべてみると、対照動物群について一定の傾向がみ出された。すなわち、^{3}H-5HT (+^{3}H-tryptamine)/^{3}H-Try (+^{3}H-5HTP) の比は、脳の後部にいく程高く、TE < DI < MPM の傾向があり^{3}H5HIAA / ^{3}H-5HT の比は、TEで最も高く、後部にいく程低く(TE > DI > MPM)、^{3}H-5HIAA / ^{3}H-Try はTE < DI < MPMの傾向があり、これら3つの比率の脳内3部位における平均値の差は、有意な変化(それぞれ $p<0.01$)であることが分った(図2)。またこの傾向は、断眠後の実験動物群でも同様にみ出され、実験・対照両群を合わせて

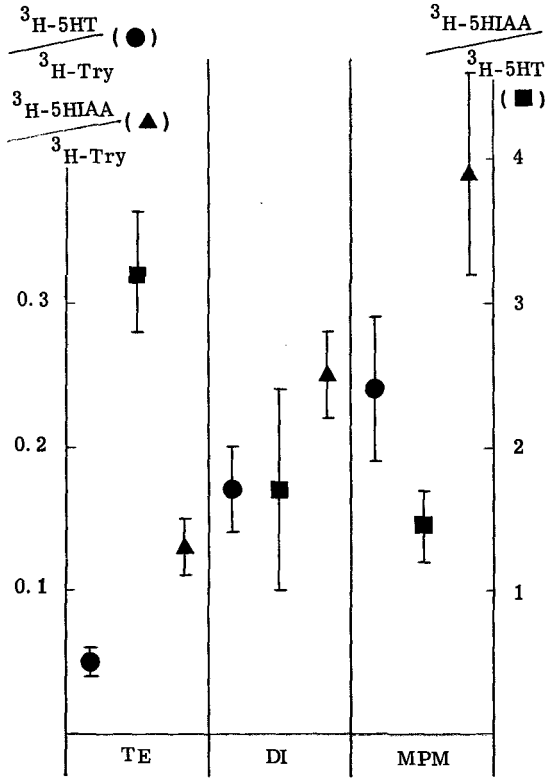


図2．脳内3部位における ^{3}H-Try, ^{3}H-5HT, ^{3}H-5HIAA

睡眠実験の対照動物のデータを集計したもので、^{3}H-Try 注入後断頭までの時間は20～81分（平均55分）．3つの比の各部位の間の平均値の差は分散分析により $p<0.01$ で有意であった。

I：S.E.M.（実験数は ^{3}H-5HT /^{3}H-Try の MPM は8，他はすべて9）

検定してもそれぞれの比の3部位における差は有意であった（それぞれ $p<0.01$）

2. 断眠の脳内 ^{3}H-Try 代謝に及ぼす影響

24時間全睡眠遮断を負荷した後，^{3}H-Try を脳室内に注入し，睡眠開始直前の時点で断頭し（睡眠直前群），脳内の標識物質の変動をみると，^{3}H-5HT はすべての部位で対照より低く（図3），また、^{3}H-5HIAA も同様な傾向がみられた。^{3}H-5HT/^{3}H-Try の比を用いて調べてみると，睡眠直前群の値は15分あるいは40分間の睡眠を与えた群より低く，MPM，DI では，対照より低い値が得られた。また15分間の睡眠後に DI における ^{3}H-5HT / ^{3}H-Try 比が MPM における比より高くなり（DI > MPM）これは、睡眠直前群、40分間睡眠群、あるいは対照群にみられる MPM > DI と逆であった。

考察

Pujol ら[40]はラットにプール法で91時間の逆説睡眠遮断を行なった後に脳内に ^{3}H-norepinephrine（NE）を注入したところこれが全脳領域で減少するところから、この時期にNEの代謝回転率が上昇していることを推論した。また最近同じグループ[41]によって同様な実験が5HT代謝についてなされている。それによると96時間の逆説睡眠遮断後 ^{3}H-Try をラット大槽内に注入したところ ^{3}H-5HT の合成が著明に増加したという。しかし ^{3}H-5HTP を注入した場合には変化がなかったことから ^{3}H-5HT の増加は tryptophan hydroxylase の活性増加によるものであろうと考えている。

Pujol らのグループによるこれらの実験から多くの示唆が得られが、実験方法上次の3点が問題になると考える。すなわち逆説睡眠のみの遮断であること，大槽内への注入のために動物を麻酔せねばならぬこと，動物の行動の変化（睡眠など）との対応が考慮されていないことなどである。われわれはこれらの点に対し、徐波・逆説両睡眠相を遮断する方法を用い、また側脳室に注入管をあらかじめ植えこむことにより、麻酔なしに標識前駆物質を注入することを工夫した．動物は一定時間の睡眠をとらせたのち実験に供し、同時刻に注入し，同じ時間を経過したそのを対照とした。

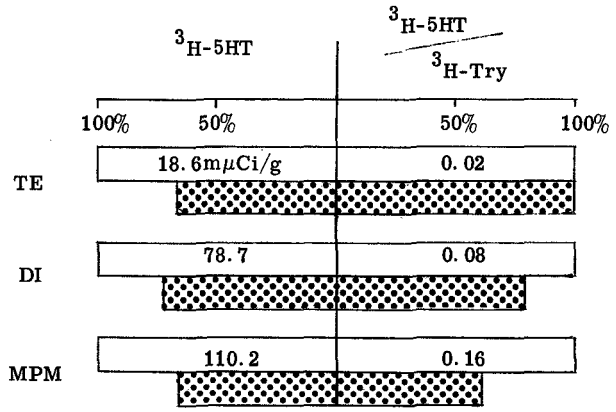


図3 睡眠直前群の ^{3}H-5HT
□ 対照（3例）
▨ 対照の値に対する百分比平均（2～3例）

結果の解釈にあたり、標識物質の比を用いたが、これはそのまゝ合成率や分解率として理解できるものではないが、この比によって比較することによりある一定の傾向が見出された。Sedvall ら[7]はNEの合成率を ^{14}C-NE (cpm/g) と tyrosine の specific activity (cpm/μg) の比で表わしており、脳内内在性 Try の値は Hery ら[1]の測定では cortex-diencephalon で 10.9 μg / g, brain stem-mesencephalon で 13.3 μg / g で、脳内分布にそれ程顕著な差はなく、Sedvall らの計算を用いたとしても、^{3}H-5HT / ^{3}H-Try 比の中脳－橋－延髄＞間脳＞終脳の傾向は変わらないと考えられる。また従来の研究から考えても、これは脳内における 5HT 合成の局在性を反映していると解釈できよう。また中脳－橋－延髄の脳幹網様体[8]の ^{3}H-5HT / ^{3}H-Try は周囲の組織に比べて高く、とくに橋の中央部より後部の脳幹網様体部分では他部位ではみられない高い値が得られている。^{3}H-5HT / ^{3}H-Try と ^{3}H-5HIAA / ^{3}H-Try の間には正の相関関係が、^{3}H-5HT/^{3}H-Try と ^{3}H-5HIAA/^{3}H-5HT の間には負の相関関係があり、前者が脳内における 5HT 代謝をよりよく表わしているように思われる。

24時間の全睡眠遮断後動物を放置しておいても直ちに入眠することなく、6匹の動物の平均で睡眠開始までに 26.5分（20～34分）を要することが分った。この時間内の ^{3}H-5HT の動きが睡眠誘発に関係あることを予想し実験を行なったが、各部位で対照よりやゝ減少した値が得られ、^{3}H-5HIAA の値も対照より低くなっているので、なお検討を続けている。

15分間の睡眠を与えた動物で間脳における ^{3}H-5HT / ^{3}H-Try が他部位と異なって増加することは、断眠後睡眠時に間脳において 5HT が急上昇する所見[8]と対応していることが考えられる。

文献

(1) F. Hery, J. F. Pujol, M. Lopez, J. Macon and J. Glowinski : Brain Res. 21; 391, 1970
(2) A. Ichiyama, S. Nakamura, Y. Nishizuka and O. Hayaishi : Adv. Pharmacol. 6; 5, 1968
(3) M. Jouvet : 精神医学 12; 4, 1970
(4) M. Jouvet : 脳と神経 24; 797, 1972
(5) E. P. Noble, R. J. Wurtman and J. Axelrod : Life Sci. 6; 281, 1967
(6) J. F. Pujol, J. Mouret, M. Jouvet and J. Glowinski : Science 159; 112, 1968
(7) G. C. Sedvall, V. K. Weise and I. J. Kopin : J. Pharmacol. exp. Ther. 159; 274, 1968
(8) 融, 土屋, 淡谷, 小林, 島薗 : 神経進歩, 14; 646, 1971
(9) E. S. Valenstein : J. Exp. Anal. Behav. 4; 6, 1961

4．アミンプレカーサー投与による猿脳内アミン代謝の研究

岸本英爾・永井克子
塚田裕三
（慶大・医・生理）

1．カテコールアミン（ＣＡ）、インドール誘導体（ＩＤ）の猿脳部位別分布を測定した。ドーパミン（ＤＡ）は松果体、下丘、尾状核、被殻に、セロトニン（５ＨＴ）は松果体、黒質、下丘、視床下部、延髄、橋に特に多量に存在する。
2．脳内ＣＡ、ＩＤは、それぞれのアミンプレカーサー（L-DOPA, L-5HTP）投与量に比例し増加する。
3．アミンプレカーサー投与による猿脳部位別アミンの継時的変化を見ると、その分布は生理的分布（水酸化酵素の分布と一致）と異なり、脱炭酸酵素の分布と一致した。
4．猿脳各部位でＣＡの増加はＩＤを減少させ、ＩＤの増加はＣＡを減少させる。
5．アミンプレカーサーの慢性投与では、脳内アミン量は脳内各部位で低下の傾向が認められるが、モノアミン向性のそれぞれの神経核では逆に増加する。
6．以上の結果はアミンプレカーサー投与によるアミンの増加が必ずしも生理的分布と一致するものではないこと、及び脳内各部位でのアミン代謝相互に大きな影響があることを示しており、特に臨床応用上考慮さるべき諸問題を提起したものと考える。

アミンプレカーサーの臨床応用が近時盛んに行われる様になったが、これらアミンプレカーサー投与時の脳内代謝の基礎的研究は極めて少ない。演者らはこの点に立脚して猿脳を用い、以下の実験を行った。

実験方法

1.実験動物：macacus rhesus monkey（体重1.9-3.5kg）を用いKetalar 50（Parke, Davis & SanKyo LTD.）1mg/kg筋注麻酔、15分後に断頭、脳を剔出し、表1.の如く21部位に分離した。L-DOPA, L-5HTPは0.05N-HCl、又は0.9%生食水に溶解し、筋注した。

2.アミンの定量法：CAではDA、ノルエピネフリン（NE）を、IDでは5HT, 5-ヒドロキシインドール酢酸（5HIAA）を生化学的方法で定量した。CAはTaylor, K.M. & Laverty, R.[5]; Kariya, T. & Aprison, M.H.[2]らの方法に従い、IDはFischer, C.A., Kariya, T. & Aprison, M.H.[1]の方法で定量した。回収率はそれぞれ70%, 80%前後である。

実験結果と考按

1.アミンの猿脳内分布：表1に示した如く、DAは松果体、下丘、尾状核、被殻、淡蒼球、歯状核、視床下部等に、NEは松果体、視床下部、歯状核、延髄、黒質等に多量に存在することを認めた。一方、5HTは松果体、黒質、下丘、視床下部、延髄、橋（背側部）等に、5HIAAは松果体、中脳、橋、延髄、視床等に多量に認めた。この結果は同じカテコール化合物、又はインドール化合物でも脳内ではその分布を異にしていることを示している。これらアミンの分布は人脳における分布とほぼ一致してい

る。[3],[4]

2.アミンプレカーサー投与による脳内アミンの増加：アミンプレカーサーを筋注で脳に投与し、投与量と脳内アミンの増加の関係をみた。図1にみられる如くプレカーサーの量に比例し、脳内アミンが脳内各部位で生合成されることを認めた。

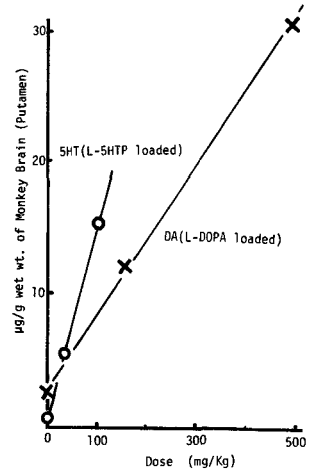
3.アミンプレカーサー投与による脳各部位アミンの継時的変化：L-DOPA (160mg/kg) 筋注による脳脳内CAの継時的変化を表2に示した。DAでは投与1時間后に被殻、尾状核、淡蒼球、歯状核、視床下部等に著明な増加を、NEでは視床下部で投与1時間后に減少を示し、4時間后に明らかな増加を認めた。L-5HTP(25mg/kg)筋注による脳脳内IDの継時的変化は黒質、尾状核、被殻等で投与1時間后に5HTの著明な増加、4時間后に同部位で5HIAAの著明な増加を認めた。プレカーサー投与后における脳内DA分布は生理的な分布にほぼ比例するが、5HT、5HIAA分布は、生理的な分布とは異なっている。以上の結果によりアミンの生理的分布は各々の水酸化酵素活性と一致しているが、プレカーサー投与時には脱炭酸酵素活性の分布に一致することが示され、プレカーサー投与時には非生理的な部位でのアミンの増量があることが分る。

Table 1 THE CONTENTS OF CATECHOLAMINES (CA) & INDOLEDERIVERTIVES (ID) IN RHESUS MONKEY BRAIN (μg/g wet wt.)

	Catecholamine		Ratio	Indolederivertives		Ratio
	DA	NE	DA/NE	5HT	5HIAA	5HT/5HIAA
1 Hypothalamus	1.15±0.99	4.15±1.04	0.36	2.21±0.22	1.20±0.17	1.83
2 Thalamus	0.65±0.41	0.58±0.36	1.12	1.03±0.11	1.65±0.21	0.62
3 Caudate nucleus	2.79±1.29	0.58±0.40	4.81	1.29±0.17	0.75±0.13	1.75
4 Putamen	2.53±0.98	0.26±0.02	9.73	0.83±0.10	0.93±0.20	0.90
5 Pallidum	1.80	0.62±0.45	2.90	1.55±0.16	1.33±0.22	1.16
6 Substantia nigra	1.14±0.82	0.82±0.004	1.39	2.69±0.17	0.93±0.41	2.71
7 Midbrain	0.67±0.32	0.46±0.09	1.46	1.65±0.13	2.75±0.35	0.60
8 Hippocampus				0.71±0.15	0.52±0.14	1.37
9 Superior colliculus				1.61±0.11	1.22±0.15	1.32
10 Inferior colliculus	3.58	0.35	10.2	2.66±0.28	1.19±0.15	2.24
11 Medulla (ventral)	0.72±0.55	0.88±0.30	0.82	1.63±0.24	1.67±0.14	0.98
12 Medulla (dorsal)				1.80±0.16	1.81±0.23	0.99
13 Pons (ventral)	0.49±0.05	0.30±0.46	1.63	1.11±0.18	1.63±0.45	0.69
14 Pons (dorsal)				1.69±0.25	2.45±0.34	0.69
15 Cortical grey	0.40±0.23	0.13	3.08	0.71±0.16	0.42±0.09	1.68
16 Cortical white	0.51	0.13	3.92	0.33±0.06	0.36±0.09	0.91
17 Cerebellar grey	0.25	0.40	0.63	0.52±0.08	0.39±0.14	1.32
18 Cerebellar white	0.51	0.21	2.43	0.48±0.10	0.35±0.10	1.36
19 Dentate nucleus	1.79	0.95	1.88	1.14±0.16	0.70±0.12	1.63
20 Pineal body	32.31	13.84	2.34	10.57±0.07	3.74±0.31	2.83
21 Spinal cord	0.22	0.21	1.05	1.21±0.34	0.52±0.21	2.32

(Mean ± S. D.)

Fig 1
DOSE RESPONSE CURVE
BY ADMINISTRATION OF AMINE-PRECURSORS



4.L-DOPA投与によるID及びL-5HTP投与によるCAの脳脳部位別変化：L-DOPA (500mg/kg) 筋注2時間后の脳内IDを表3に示した。5HTは各部位で約50％減少、下丘、歯状核、黒質では特にその減少が著しい。5HIAAの変化は少ない。L-5HTP(100mg/kg)筋注2時間后の脳内CAは視床下部、松果体、橋、中脳でDAが50％以上減少する以外は変化は少なく、NEは各部位で、僅かな減少がみられるが特に尾状核、被殻、淡蒼球でその減少が著しい。上記の結果はアミン代謝相互に深い関係があることを示唆す

Table 2 THE DISTRIBUTION OF CA & ID IN DIFFERENT REGIONS OF MONKEY BRAIN AFTER INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION OF L-DOPA & L-5HTP (μg/g wet wt.)

	L-DOPA (160mg/kg) loaded								L-5HTP (25mg/kg) loaded									
	DA				NE				5HT					5HIAA				
	1 hr	2	4	24	1 hr	2	4	24	1 hr	2	4	8	24	1 hr	2	4	8	24
1	5.29	1.62	1.39	0.89	1.23	1.57	6.18	4.27	4.28	3.33	3.25	2.70	1.76	2.55	2.67	2.43	2.65	1.15
2	3.14	1.38	0.90	0.09	0.20	0.31	0.74	0.46	2.01	2.12	1.76	0.79	0.81	3.07	3.45	3.96	3.88	2.98
3	20.30	12.09	0.52	1.25	0.09	0.32	0.37	0.26	7.82	6.21	3.89	0.76	0.75	3.70	6.68	12.63	4.29	1.50
4	23.51	17.03	1.12		0.08	0.14	0.32	0.21	7.21	5.53	4.10	0.74	0.60	5.04	8.79	12.52	7.56	2.93
5	7.68		0.81	0.66	0.17	0.30	0.35	0.71	4.76	2.72	2.36	0.91	0.85	3.32	3.55	4.65	5.63	2.95
6	2.88	1.96	1.53	0.55	0.22	0.48	0.40	0.75	7.89	8.54	6.43	3.26	1.99	2.84	6.06	7.77	7.12	2.08
7	2.22		0.56	0.27	0.59	0.34	0.87	0.31	3.16	3.55	3.26	1.26	1.33	4.09	6.08	5.56	5.64	3.19
8						0.29	0.40		1.22	0.97		0.63	0.55	0.97	1.33	1.92	1.37	1.12
9										2.16	1.89	1.06	0.85		4.92	2.76	2.45	1.92
10		1.07		0.80					4.93	4.07	2.67	1.94	1.22	1.66	1.73	1.81	4.27	0.70
11	2.54	1.44		1.32	0.42	0.69	0.70	0.60	3.01	3.61	2.46	1.75	0.96	1.86	2.54	3.16	3.57	1.70
12									3.33	3.69	3.03	2.06	1.29	2.14	2.85	3.91	3.44	1.64
13	3.79	0.54	0.50	0.35	0.21	0.45	0.42	0.80	2.02	1.44	1.23	0.83	0.83	2.34	2.22	3.82	3.40	1.80
14									3.58	4.71	2.57	1.74	1.63	3.63	3.88	4.84	6.98	3.57
15	2.79	0.72		0.78	0.38	0.38	0.31	0.21	1.18	0.91		0.53	0.50	0.78		1.15	1.19	1.08
16	1.71	0.54		0.63	0.17	0.22	0.50	0.17	0.96	0.73		0.28	0.39	0.59	0.48	0.92	1.17	
17	1.80	0.49		0.34	0.25	0.20		0.36	0.83	0.74	0.88	0.64	0.34	0.73	0.43	0.49	0.27	1.02
18		1.47		0.49	0.25		0.85	0.21	0.36	0.38	0.50	0.34	0.31	0.25	0.37	0.44	0.96	0.37
19	8.26	0.95		1.25	0.36	0.32		0.75	1.52	1.31	1.54		1.12	0.70	0.70	0.83	1.35	0.45
20		7.14		17.1		6.67		5.60	10.5	81.0		75.9	34.2	3.31	5.04		49.81	21.27
21	2.66	0.55	0.16			0.38	0.26	0.21	1.80	3.39	1.39	0.96	1.01	1.38	2.02	1.68	1.06	1.14

(see control values in Table 1)

Table 3
THE CHANGES IN THE CONCENTRATION OF CA & ID AFTER ADMINISTRATION OF L-DOPA OR L-5HTP (μg/g wet wt.)

	Catecholamines		Indolederivertives	
	L-5HTP 100mg/kg		L-DOPA 500mg/kg	
	DA	NE	5HT	5HIAA
1	0.55	1.95	0.81	0.65
2	0.55	0.46	0.48	1.61
3	2.03	0.06	0.79	0.54
4	2.36	0.07	0.44	0.94
5	1.11	0.18	0.62	1.19
6	1.01	0.35	0.60	0.76
7	0.13	0.42	0.78	2.63
8			0.34	0.44
9	1.28	0.23	1.21	0.55
10	2.10	0.34	0.27	0.89
11	0.35	0.36	0.95	1.30
12			0.70	1.29
13	0.11	0.16	0.37	0.90
14			1.00	2.35
15	0.21	0.10	0.34	0.29
16	0.18	0.05	0.03	0.22
17	0.12	0.14	0.22	0.46
18	0.55	0.09	0.03	0.13
19	1.01	0.25	0.19	0.75
20	4.62			
21		0.16		

(The values were determined at 2hrs. after injection of precursors.)

る。

5. L-DOPA, L-5HTP 同時投与による脳内アミンの変化：L-DOPA (160mg/kg) 筋注と、L-DOPA・L-5HTP (25mg/kg) 同時筋注の場合の1時間後の脳内CAの増量を比較した。表4に示した如くプレカーサー同時投与によりDAは各部位で約80%まで減少、逆にNEは各部位で約5倍の増加を示し特に黒質、視床下部ではその差が著しい。一方、L-5HTP (25mg/kg) 筋注とL-5HTP・L-DOPA (160mg/kg) 同時筋注1時間後の脳内IDの増量の比較では、プレカーサー同時投与によって5HTは各部位で僅かな減少を示し、淡蒼球で50%以上減少した。5HIAAも各部位で僅かな減少を示し、上丘で50%以上の減少を認めた。

6. アミンプレカーサー慢性投与による猿脳内アミンの変化：L-DOPA (50mg/kg)；L-5HTP (10mg/kg)；L-DOPA・L-5HTPをそれぞれ、猿に4ヶ月慢性経口投与を行い、脳内アミンの変化を追究した。表5に示す如く、CAではDA, NEともに減少の傾向が認められたが、L-DOPA単独投与猿の尾状核、被殻でDA含量の増加を認めた。IDでは5HT, 5HIAAともに変又は僅かな減少を認めた。全ての慢性投与猿で黒質、橋(背側部)に5HIAAの増加を認めた。

Table 4

THE CHANGES IN THE CONCENTRATION OF CA & ID AFTER SIMULTANEOUS ADMINISTRATION OF L-DOPA & L-5HTP

(μg/g wet wt.)

	Catecholamines				Indolederivertives			
	L-DOPA (160mg/kg)		L-DOPA + L-5HTP (25mg/kg)		L-5HTP (25mg/kg)		L-DOPA + L-5HTP (160mg/kg)	
	DA	NE	DA	NE	5HT	5HIAA	5HT	5HIAA
1	5.29	1.23	1.92	10.79	4.28	2.55	4.12	2.27
2	3.14	0.20	0.54	1.17	2.01	3.07	1.36	2.06
3	20.30	0.09	4.01	0.47	7.82	3.70	6.17	1.88
4	23.51	0.08	5.38	0.54	7.21	5.04	6.97	2.66
5	7.68	0.17	1.88		4.75	3.32	1.52	2.21
6	2.88	0.22	1.38	2.46	7.89	2.84	8.78	3.58
7	2.22	0.59	1.01	1.32	3.16	4.09	2.16	3.30
8					1.22	0.97	0.97	0.65
9					2.16	4.92	1.79	2.02
10			5.07	1.34	4.93	1.66	2.76	1.86
11	2.54	0.42	0.66	1.13	3.01	1.86	1.76	1.41
12					3.33	2.14	1.78	1.89
13	3.79	0.21	0.37	1.00	2.02	2.34	0.94	1.23
14					3.58	4.70	2.47	3.52
15	2.79	0.38	1.08	0.92	1.18	0.78	0.65	0.49
16	1.71	0.17	1.30	0.42	0.96	0.59	0.48	0.35
17	1.80	0.25		1.06	0.83	0.73	0.45	0.53
18	5.08	0.25	1.91	0.65	0.36	0.25		
19	8.26	0.36	5.97	1.24	1.52	0.80	1.62	0.75
20								
21	2.66	1.68	1.53	0.81	1.80	1.38	1.19	0.77

(The values were determined at 1hr. after injection of precursors.)

Table 5

THE EFFECT OF CHRONIC ADMINISTRATION OF AMINE-PRECURSORS ON THE CONTENT OF CA & ID IN MONKEY BRAIN

(μg/g wet wt.)

	Catecholamines						Indolederivertives					
	L-DOPA (50mg/kg/day)		L-5HTP (10mg/kg/day)		L-DOPA + L-5HTP		L-DOPA (50mg/kg/day)		L-5HTP (10mg/kg/day)		L-DOPA + L-5HTP	
	DA	NE	DA	NE	DA	NE	5HT	5HIAA	5HT	5HIAA	5HT	5HIAA
1	0.62	3.33	0.49	3.76	0.95	4.94	1.93	0.85	2.40	0.85	1.58	2.78
2	0.39	0.50	0.46		0.46	0.66	0.83	1.56	0.95	2.31	0.68	2.21
3	5.10	0.10	2.27	0.09	2.18	0.06	0.96	0.56	1.18	0.52	0.53	0.75
4	4.81	0.09	2.04	0.09	4.27	0.08	0.94	0.90	1.01	1.15	0.61	1.25
5	0.99	0.12	1.92	0.22		0.25	1.03	0.99	1.15	0.98	1.07	0.94
6	2.06	0.35	1.23	0.12	1.76	0.51	1.81	2.24	2.08	1.27	1.75	1.78
7	0.31	0.60	0.33	0.68	0.25	0.75	1.71	3.12	1.53	2.83	1.29	3.30
8							0.56	0.69	0.41	0.52	0.49	0.80
9	3.42	0.23	1.61	0.15	4.55	0.15			0.88	0.66	1.38	2.53
10	1.17	0.25	1.09	0.37	3.19	0.22	1.09	0.51	2.27	1.38	0.72	1.33
11	0.13	0.34	0.19	0.64	0.59	0.39	2.35	1.92	1.73	1.65	1.34	1.54
12							2.32	2.01	1.75	1.84	1.85	1.64
13	0.13	0.20	0.09	0.69	0.15	0.64	1.02	1.79	0.82	1.45	0.85	2.14
14							2.53	4.24	2.12	3.22	1.35	4.34
15	0.27	0.11	0.31	0.12		0.07	0.57	0.36	0.36	0.37	0.88	0.93
16	0.33	0.05	0.09	0.06	0.21	0.05	0.26	0.84	0.26	0.52	0.08	0.29
17	0.27	0.11	0.31	0.12		0.07	0.17	0.13	0.41	0.15	0.63	0.14
18	0.65	0.07		0.08		0.06	0.65	0.49	0.27	0.56	0.21	0.22
19	1.06	0.20				0.29	0.63	0.55	1.07	0.40	0.62	0.57
20	7.50	2.02		3.46	19.38	1.66						
21	0.17	0.13	0.15	0.13	0.26	0.12	1.28	0.54	1.11	0.71	1.09	0.52

(The values of L-DOPA & L-DOPA+L-5HTP were determined at 24hrs. after the last administration of precursors. The values of L-5HTP were determined at 55hrs. after the last administration of precursor. See control values in Table 1.)

これらの結果よりプレカーサーの慢性投与が脳内アミンの生合成系を阻害することの他、アミン代謝に多面的な作用を持つ可能性が考えられ、今後投与中断後の継時的変化等が追究されねばならない。

放射性アミンプレカーサーを投与したときの *Radioautography* の所見とアミンの生化学的定量値とはほぼ完全に一致している。

Radioautogram は学会当日供覧する。

(1) Fischer, C. A. , Kariya, T. & Aprison, M. H. : Comparative and General Pharmacology, 1,611 (1970)

(2) Kariya, T. & Aprison, M. H. : Analytical Biochemistry, 31, 102 (1969)

(3) Robins, E. , Robins, J. M. , Croninger, A. B. , Moses, S. G. , Spencer, S. J. & Hudgens, R. W. : Biochemical Medicine, 1, 240 (1967)

(4) Sano, I. , Gamo, T. , Kakimoto, Y. , Taniguchi, K. , Takesada, M. & Nishinuma, K. : Biochimica Biophysica Acta, 32, 586 (1959)

(5) Taylor, K. M. & Laverty, R. : J. of Neurochemistry, 16,1361 (1969)

5. Dopamine β-Hydroxylase 阻害と脳内アミン

日高弘義
（愛知県コロニー）

フザリン酸（5-butylpicolinic acid）は日高ら(4)によって発見された強力なDopamine β-hydroxylaseの阻害剤であるが，本物質をラットに投与すると脳内のノルアドレナリン（NE）の減少がみられるにもかかわらずドーパミン（DA）含量は増加しないこと，さらに脳内セロトニン含量が増加することなどが日高によって報告されている(3)。フザリン酸の誘導体である5-(10,11-dihalo)butylpicolinic acid及び5-(11-monohalo)butylpicolinic acidはフザリン酸より約8倍強力な本酵素の阻害剤であることがわかった。また，5-(dimethyldithiocarbamyl)methyl picolinic acidはフザリン酸と同程度の強力な阻害剤であることがわかった。

これらの誘導体をラットに投与すると脳のアミン量は著しく変化したが必ずしもフザリン酸の場合の変化と一致しなかった。すなわちNE含量はいずれの誘導体投与の場合も著しい減少を示し，阻害力の強い程，減少の度合も大きかった。DA量はフザリン酸の場合と異なり有意に増加しており，またセロトニンも増加していた。これらの事実は脳内セロトニン含量がDopamine β-hydroxylaseの阻害剤により増加するという演者のさきの結論(3)を確かめ得たものと考える。これら阻害剤による脳内セロトニン含量の増加はNE減少と関係があると考えられるのでその点についても多少の考察を加えた。

Dopamine β-hydroxylase（DBH）はDA⟶NEの段階を触媒する酵素であるが，tyrosine hydroxylase（TH）とならんでNE生合成の律速酵素のひとつと考えられている。THとDBHのどちらがより律速かは別にしてDBHの場合はDAの代謝に関係がある点が興味があると考えられる。フザリン酸は今までに発見されたDBH阻害剤のうちでは最も強力な物質で，本物質投与により脳内アミンの変化がみられ臨床的にも薬理的にも興味ある物質と考えられる。演者はその後フザリン酸誘導体を種々試みたところフザリン酸と同等またはそれより数倍強力な阻害剤を発見したので，それらの物質のDBH阻害程度，Kinetics，及びラットに投与した場合の脳内アミンの変化を追求した。

〔実験方法〕

酵素及びその活性測定

DBHはウシ副腎髄質よりKaufmanら(2)の方法により高度に精製したものをもちいた。活性測定はtyramineを基質として酵素的に生成したoctopamineをイオン交換樹脂で分離したのちsodium metaperiodateにより酸化しその生成物をspectrophotometricに定量した(5)。

脳アミンの測定

薬物を経口的に（50 mg/kg CMCに懸濁）10時間ごとに3回投与し最終投与後2時間後にラットを殺し脳のアミンを測定した。コントロール群はCMCのみを投与した。カテコールアミンはアルミナカラムで単離したものを蛍光法により測定した(1)。セロトニンはUdenfriendら(6)の方法を改良したWise(7)の方法により測定した。

カテコールアミン測定の場合回収率は75－90%で，セロトニンは90-100%であった．

〔実験結果〕

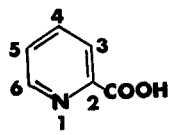
フザリン酸誘導体のDBH阻害

表1に示すようにフザリン酸のピリジン核の5の位置を種々の置換基に変えるとDBH阻害は著しく変化しハロゲン置換アルキル基の場合の阻害がもっとも強かった．その阻害力を50%阻害で表わすとDiethyldithiocarbamateの約100倍の強さであった．その次に強力な誘導体は5の置換基がdimethyldithiocarbamateでその強さはほぼフザリン酸に匹敵した．そこでこれらピコリン酸誘導体の阻害様式をしらべてみると，図1で代表されるように基質のtyramineに対してuncompetitiveであり(A)，Ascorbic acidに対してcompetitiveであった(B)．図1はdibromofusaric acidの例であるが他の誘導体も同様な傾向を示した．

表1. Inhibition of Dopamine β-Hydroxylase by the picolinic acids

Substitution*	50% inhibition
5-CH_2-CH_2-CHBr-CH_2Br	1 x 10^{-8}
5-CH_2-CH_2-CHBr-CH_3	1 x 10^{-8}
5-CH_2-CH_2-CHCl-CH_2Cl	1 x 10^{-8}
5-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3	7.6 x 10^{-8}
5-CH_2-S-CS-N-$(CH_3)_2$	7.7 x 10^{-8}
5-H	8 x 10^{-7}
5-NH-CS-N-$(CH_3)_2$	1 x 10^{-6}
5-CH_2-O-CO-N-$(CH_3)_2$	5 x 10^{-6}
5-SO_2-NH-CH_3	8 x 10^{-5}
Sodium Diethyl-dithiocarbamate	1 x 10^{-6}

*Basic structure is;



フザリン酸及びその誘導体の脳内アミンに対する影響

すでに日高は(3)フザリン酸投与によるラット脳のNEの減少及びセロトニンの増加を報告しているが表2に示すようにdibromofusaric acid (Br_2FA)の投与によりNEの著しい減少とセロトニンの増加が起っていることがわかった．さらにBr_2FA投与により脳内DAの増加もフザリン酸の場合と異なり興味がある．また，Br_2FAによる脳モノアミン酸化酵素への影響は全くなく，さきにフザリン酸の場合に報告した結果と同じであった．

図1.

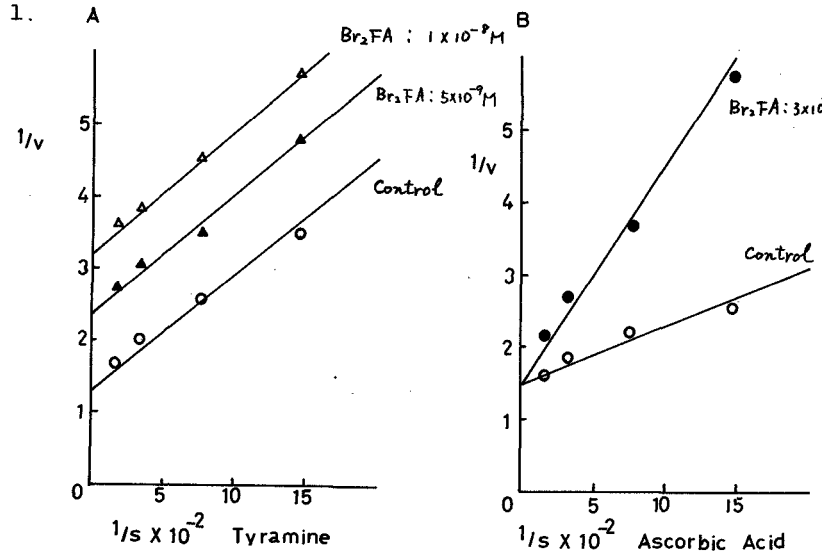


表2. Effect of the Picolinic Acids on the Biogenic Amines Content (μg/g) in Rat Brain

Treatment	No. of animals	Norepinephrine	Dopamine	Serotonin
Control	10	0.29 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.28 ± 0.03
FA	8	0.22 ± 0.02*	0.68 ± 0.02	0.34 ± 0.03**
Br_2FA	8	0.18 ± 0.02*	0.96 ± 0.03*	0.41 ± 0.01*

* $P < 0.005$, ** $P < 0.01$.

Drugs (50 mg/kg) were injected every 12 hours for three days.

〔考察〕

DBH阻害剤投与により脳のNEの減少は当然考えられるがセロトニンの増加は予想外の事実でありそのメカニズムは今後の研究にまたねばならない。しかし，今回の報告のようにDBHのより強力な阻害剤がセロトニンの増加をより促進することは非常に興味のあることと思われる。これら阻害剤投与によるNEの減少の著しい場合ほどセロトニンの増加の傾向が強いことはNoradrenergicな神経がセロトニンの生合成または代謝に影響を及ぼしていることも考えられるかもしれない。最近aromaticまたはalkyl thioureaなどのDBH阻害剤もやはり脳のセロトニンを増加させることが報告されており，それらの物質はセロトニンのturn overを増加させる傾向があることも同時に報告されている。いずれにせよ脳のセロトニンに対するカテコールアミンの役割をさぐる意味においても今後これらの物質は有力な武器になると考えられる。

〔文献〕

1. Anton, A. H. and Sayre, D. F., J. Pharmacol. Exp. Ther., 138, 360 (1962) and 145, 326 (1964).
2. Friedman, S. and Kaufman, S., J. Biol. Chem., 240, 4763 (1965).
3. Hidaka, H., Nature, 231, 54 (1971).
4. Hidaka, H., Nagatsu, T., Takeya, K., Takeuchi, T., Suda, H., Kojiri, K., Matsuzaki, M. and Umezawa, H., J. Antibiotics, 22, 228 (1969).
5. Pisano, J. J., Creveling, C. R. and Udenfriend, S., Biochem. Biophys. Acta, 43, 566 (1960).
6. Udenfriend, S., Weissbach, H. and Brodie, B. B., Methods of Biochemical Analysis, 95 (Interscience, New York, 1958).
7. Wise, C. D., Anal, Biochem., 19, 2517 (1967).

6．化学伝達物質受容部位に関する研究（その1）Acetylcholine及びその近縁物質による大脳シナプス膜のコンフォーメーション変化

関谷　真・菊野正隆
（上智大・理工・生化）

[要約]

1. Synaptic membraneのTryptophan由来の蛍光強度に，Eserineは，著明な増大をもたらす。

2. Acetylcholine (Ach)，Acetylthiocholine (ATCh)及びBenzoylcholine (Bch)は，Synaptic membraneのTryptophan由来の蛍光強度を減少させ，そのQuenchingの様相は，Eserineの存在の有無及びCa^{2+}の存在によって明らかな相違を示す。

3. Ach，ATch及びBchは，1-anilino-naphthalene-8-sulfonate (ANS)-membrane Complexの蛍光を減少させ，そのQuenchingの様相は，Ca^{2+}の存在とその濃度によって，各々特徴的な差異を示した。

4. ATRopineは，ANS-membrane complexの蛍光を増大させ，Ach等と相違する様相を示し，ATROpineの濃度によってAchのANS-membrane complexの蛍光に対するQuenchingの様相に影響をもたらした。

5. 以上の結果から，Eserineによってsynaptic membraneは，Conformationが，変化し，Ach等に各々，特有なreceptor siteがあると推定されること，及びCa^{2+}が，膜上でAchの働きに本質的な意義をもつであろうと示唆された。

タンパク質等の構造研究について，近年，蛍光測定法がよく適用されている[3),6)]。特に，タンパク質の疎水部分の探試薬として，1-anilino-naphthalene-8-sulfonateが著明である[2)]。論者等も一昨年の日本生化学会で，ヒト赤血球膜とヘモグロビンとの相互作用について，上記の試薬による成績を発表[4)]，以後も研究を続行し，有効性を確かめた。特に膜構造について，その微細構造のtransformationを検討するに有効な手段であろう。

そこで以前から注目されているsynapseに於ける伝達物質の受容の際にsynapse後膜のConformationの変化があるかどうかを検討するために，蛍光測定法を用いた。今回はAchについて追求した。Achのanalogueとして ATCh及びBchについても調べた。これ等の実験は，ラット脳からのsynaptic membrane (SM)について行った。またATRopineについても，Achと拮抗的に作用するか否かについて，その作用を検討した。又，金属イオン，例えば，K^+，Na^+，Ca^{2+}又はMg^{2+}等がAch等による脱分極に影響をもたらすことが観察されているので[2)]今回は，Ca^{2+}の作用についても調べた。

[実験方法] synaptic membrane (SM)の調整は，ラット脳(SD系及びWS系)のホモジネートのミトコンドリア画分から，密度勾配遠心法によって得るAzcurra and De Robertisの方法によった[1)]。この調整法では，ミエリン画分も混在するが，ミエリン画分と他の画分の性質の違いも検討した。

蛍光測定は，Hitachi 203 Fluorospectrometerを使用した。蛍光については，タンパク固有のtryptophan由来の蛍光の分析と，ANS（ナトリウム塩）を用いて，蛍光を分析した。強度のための標準物質は，0.1N H_2SO_4中の硫酸キニーネを用いた。

タンパク定量は、通常のLowry法によった。一連の実験のタンパク最終濃度は、ほぼ、0.045 mg/ml であった。

[結果及び考察]

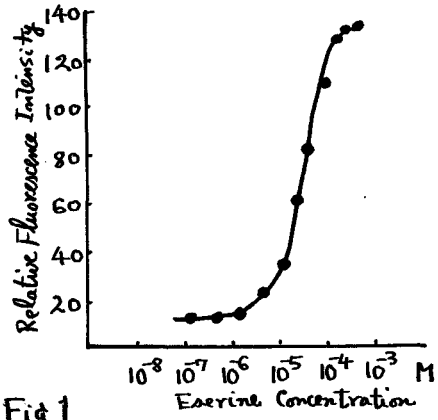


Fig 1.

1. Eserine の SM に与える影響。Eserine は Acetylcholinesterase (AchE) の阻害剤である。SM の suspension を 267 mμ で励起すると、tryptophan 由来の 335 mμ の蛍光を得る。Eserine で、滴定すると、蛍光は 355 mμ に red shift し、強度は劇的に増大する。Fig 1. に示されるように、10^{5}M 付近で、355 mμ に変位し、1.2×10^{-4}M で最大強度に達する。この結果から、Eserine は SM に作用して、膜の conformation に何等かの変化をもたらしていると考えられる。

2. Ach, ATch および Bch の SM に与える影響。これ等の試薬に対して、Eserine の存在の有無、および、Eserine 存在下での Ca^{2+} (0.85 mM) の影響を検討した (Fig. 2, 3, 4)。これ等の試薬は、SM の固有の蛍光 (355 mμ および 360 mμ) を減少させる (quenching effect)。Eserine の有無によって、それぞれ異った様相を示した。Ach と ATch とでは、Fig 2, 3 から解るように、ATch は Eserine 存在下で作用度が増大するが、Ach は、小さくなっている。つまり、Eserine 存在下での ATch および Ach への tryptophan 残基への影響の仕方が相違することから、各々の受容部位が相違すると思われる。

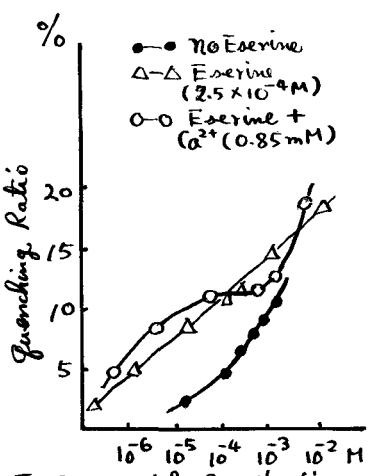


Fig 2.

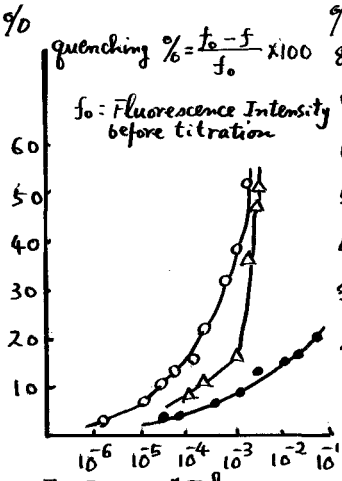


Fig 3.

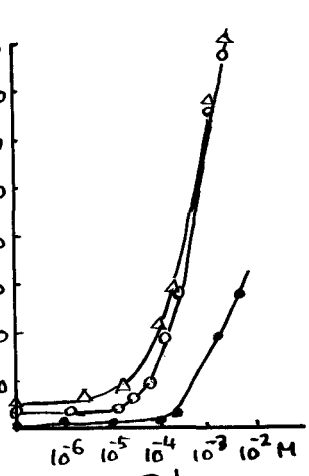


Fig 4. Bch

Bch は、特異的な quenching effect があるので、ATch および Ach とも異なる作用様序を示唆する (Fig. 4)。

Ca^{2+}(0.85mM)が存在する時には，Ach又，ATchについてもquenchingが大きくなるのは明らかで，恐らく，Ca^{2+}イオンが，これ等の物質の作用に本質的な影響を及ぼすと考えられる。このことは，更に，ANSE使用したhydrophotic probeによる他の実験で確かめ得た。

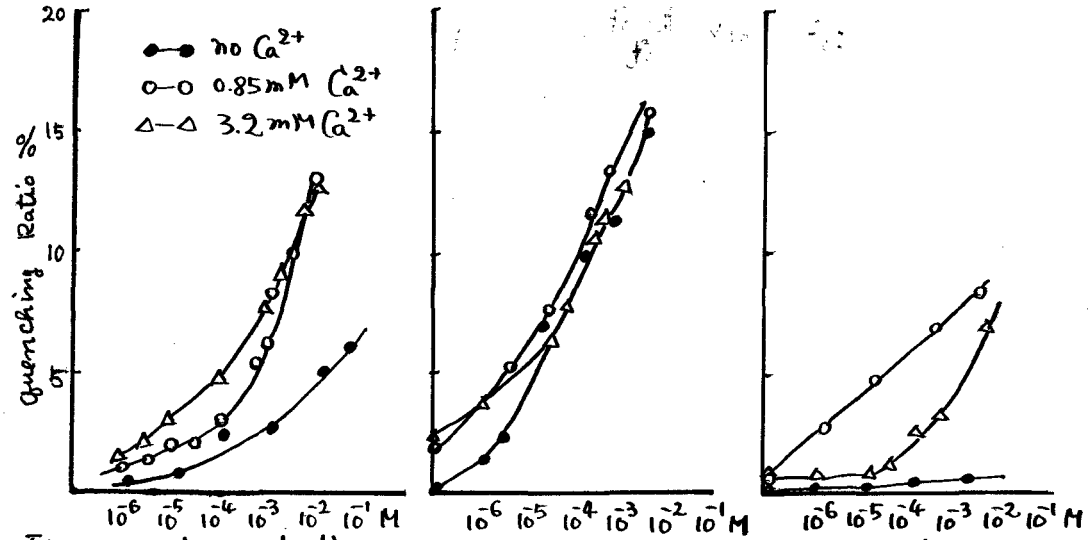


Fig.5. Ach Concentration Fig6. ATch Fig7. Bch

3 ANS-SM complexの蛍光に及ぼすAch, ATch及びBchの影響。ANS-SM complexの蛍光は，励起を365mμで行うと，475mμに観測されるが，これは，ヒト赤血球膜の場合と同様である。[5] これ等の実験はすべて，Eserine存在下で行った。Ca^{2+}は，ANS-SM complexの蛍光を 7.4×10^{-4}M で，ほぼ2倍に増大させる。Fig 5, 6, 7 から明らかなように，Ca^{2+}の濃度差が，顕著な影響を示すのは，AchとATchであるが，ATchは，Ca^{2+}の存在の有無に関らず，Achは，Ca^{2+}の存在によって，約2倍のquenching effectが，10^{-4}Mのオーダーで観察された。Bchとしては，結果として，Ca^{2+}の存在の有無による差が顕著である。これ等の結果から，Ca^{2+}は，膜構造のhydrophotic regionと関連をもちながら，Ach等の膜上のreceptorで，特能的要素になっていることを示し，且つ，Ach等の受容部位が，SMのreceptorの疎水部分と緊密な関係にあると推定される。

4. AtropineとAchとの拮抗。Atropineのみによる膜構造への影響を蛍光で同様な実験を行う。Fig 8, 9 で示されるように，特有の作用を示した。即ち，AtropineのANS-SM complexに与える影響は，quenchingではなく，10^{-3}M以上の濃度で急激な蛍光増大をもたらすものであった(Fig. 9)。これは，Achのもつ影響と正反対であることから，Achとは，全く相違する作用特性を示している。そこで，Fig 10 でみられるように，Atropine存在下で，Achの滴定を行うと，Atropineの二つの異った濃度の場合(7.6×10^{-3}M と 1.04×10^{-2}M)には，それぞれ著しく異った作用曲線が得られた。Achが，Atropineと拮抗的かどうかは不明であるが，明らかに相互に影響していると考えられる。

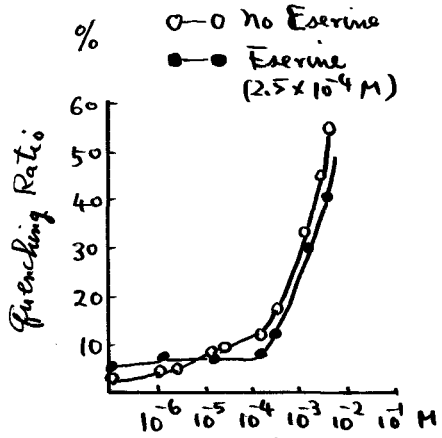


Fig8. ATRopine

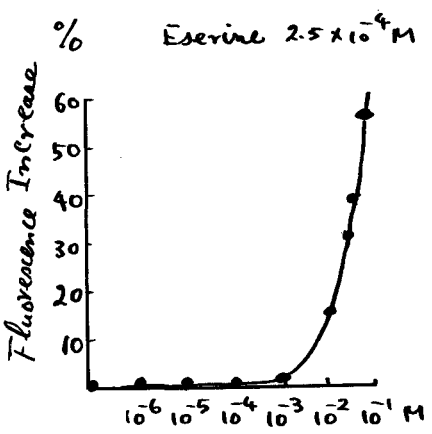


Fig 9. ATRopine

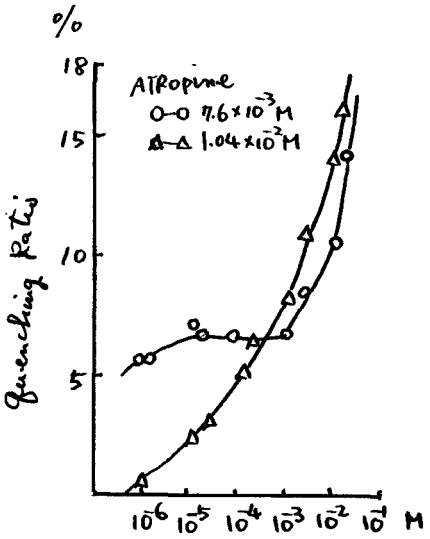


Fig10. Ach

[文献]

1) Azcurra J. M., and De Robertis, E., Int. J. Neuropharmacol. 6, 15, 1967
2) Del Castillo, J., and Katz, B., J. Physiol. (Lond.) 124, 560, 1954
3) Dodd, G. H., and Radda, G. K., Biochem. J., 114, 407, 1969
4) 関谷真, 菊野正隆 日本生化学会 (1969)
5) Sekiya, M., and Kikuno, S., in prep.
6) Stryer, L., J. Mol. Biol., 13, 482, 1965
7) Weber, G., and Yang, L. B., J. Biol. Chem., 239, 145, 1964

7。向精神薬の神経終末顆粒への特異的結合の様式について

石谷良一
（千大・薬・微生物薬品化学）

本実験より得られた知見を要約すると；

(1) 向精神薬の神経終末顆粒に対するbinding curveは，非特異的結合を示す親和性の低いlinear componentと特異的結合を示す親和性の高いnonlinear componentから成り立っている。

(2) 向精神薬のbinding curveより得られたnonlinear componentについて動力学的分析を行った結果は；Imipramine：Multiple-binding mode；Dimetacrine, chlorpromazine：single-binding mode, であった。すなわちimipramineのみが独特な結合様式を示した。

(3) Imipramineのみが持つ独特な結合様式についての特異性を検討したところ，神経終末顆粒との結合においてのみ認められ，myelin fragmentsに対する結合様式はsingle-bindingであった。さらにimipramineのmultiple-bindingに関与しているbinding componentsの内，親和性の最も高いと思われるbinding componentが凍結融解により破壊されることが判明した。

(4) 向精神薬はいずれも神経終末顆粒に対する5-HTの結合を抑制するが，その抑制能は5-HTの濃度に依存性を示した。すなわち，5-HTが1.4×10^{-6}Mの時には各薬物の抑制能には殆んど差が認められなかったが，2.1×10^{-7}Mではimipramineが最も強い抑制能を示した。

緒言

薬理活性物質とその標的器官との結合様式を検索することは，その物質の機能を生化学的に研究する上で有効な手段となる。しかしながら向精神薬の作用機序に関する研究においては殆んどこの種の報告が見られず，僅かに5-HTの神経終末顆粒に対する結合様式についてのMarkhamら(11,12)の報告があるのみである。著者はすでに細胞分画(7)及び電顕autoradiography(8)により，向精神薬が神経終末顆粒その内でも特にsynaptic membraneと特異的に親和性を有することを報告している。本実験では，ラット大脳皮質よりisolateした神経終末顆粒と向精神薬の結合様式を動力学的に検討し，さらにその結合様式の持つ生理的意義として，中枢神経系における化学的刺激伝達物質としての重要な生理機能を持つ5-HTの神経終末顆粒への結合に対する競合作用についても検索することを目的とした。なお向精神薬としては，抗うつ剤として臨床効果の顕著なimipramineと新規化合物でありimipramine同様の薬効を持つdimetacrine(6)，及びphenothiazine系のトランキライザーであるchlorpromazineの3種薬物を用いた。

実験方法及び実験材料

(1) 向精神薬のRI-標識体の合成

a) [H^3]-Imipramine：窒素ガス封管中，100°C 40hr Pt(red.)触媒下1CiのT_2O(tritium water)を標識前駆体とし，比放射能12.6 μCi/mgの[H^3]-imipramineを合成した。

b) [H^3]-Dimetacrine：Eidimoffら(3)らの酸性交換法にて，1CiのT_2Oを標識前駆体とし，比放射能22μCi/mgの[H^3]-dimetacrineを合成した。Chlorpromazineについては，比放射能12 μCi/mgの[S^{35}]-標識体をRadiochemical Center (England)より購入し実験に供した。

(2) 神経終末顆粒の作製

Whittaker (16) らの方法に準じ，Wistar系雄ラットの大脳皮質より3-段階のショ糖密度勾配遠沈にて分画した particle density 0.8－1.2 M sucrose の F-B 分画を用いた。Myelin fragments としては，particle density 0.32－0.8 M sucrose の F-A 分画を用いた。なお F-A 及び F-B 両分画中に含まれる顆粒成分については，電子顕微鏡による形態学的考察を行った。

(3) 結合実験

F-B 分画を等量の水にて希釈後，$10^5 \times g$ 60 min 超遠沈を行い得られた pellet 部分を，imipramine と dimetacrine の結合実験においては：0.05 M Tris·HCl in 0.16 M NaCl (pH 7.3) の medium にて，chlorpromazine の場合には：0.05 M Tris·maleate in 0.16 M NaCl (pH 7.1) の medium にて 6 mg protein/ml になるように懸濁した。結合実験には上記の懸濁液 0.5 ml を用い，各濃度の薬物を添加し最終反応容量を 2.0 ml とした。Incubation 温度は 1～2°C とし，incubation (30 min) 終了後直ちに 60,000 ×g 30 min の条件下で遠沈を行い上清部と pellet 部分に分画した。薬物の結合量は次の算式から求めた。[Drug bound] = [Drug initial] - [Sup.]

5-HT の結合実験については，原則として Marchbanks (12) の実験条件に従い 1～2°C で反応させた。Incubation 時間は 15 min とし，incubation 終了後直ちに 60,000 ×g 30 min の条件下で遠沈を行い，得られた pellet 部分の 5-HT 量を結合量とした。

(4) 放射能の計測

(H^3)-Radioactivity の計測方法は，酸素フラスコ (500 ml) を用いて乾式燃焼法により T_2O とし親水性の dioxane phosphor で，あるいは (C^{14}) 及び (S^{35})-radioactivity の場合と同様に直接 PT-21 emulsion phosphor (13) にて Beckman DPM 100 または Aloka LSC 502 型 liquid scintillation spectrometer で計測した。Absolute dissociation constant (dpm) は internal standard 並びに channel ratio 法 (9) にて算出した。

なお，C^{14}-5-HT としては，Radiochemical Center より比放射能 140 μCi/mg の 5-hydroxytryptamine-3-C^{14} (creatinine sulfate) を購入し実験に供した。

実験結果

(1) 向精神薬の結合様式及び動力学的分析

Fig. 1-1 に各薬物の binding curve の結果を示した。Imipramine の結合には2相性がみられた。すなわち $3 \sim 4 \times 10^{-4}$ M で飽和される親和性の高い部分 (specific binding component) と，本実験に用いた濃度では飽和されずほぼ直線関係を示す親和性の低い部分 (non-specific binding component) から成り立っている。Dimetacrine と chlorpromazine に関しても imipramine と同様のパターン，すなわち2相性の結合様式が認められた。そこで結合様式をより詳細に検討すべく，動力学的分析を試みた。Fig. 1-2 にその理論的考察の概略を示した。Binding curve [A] を Weinstein (15) らの方法に従って linear component (Fig. 1-2 の [B]) と non-linear component (Fig. 1-2 の [C]) に分割した。[C] すなわち特異的結合部分について以下の動力学的分析を行った。今，[a] と [c] との間に平衡関係が成立し，かつ結合に関与す

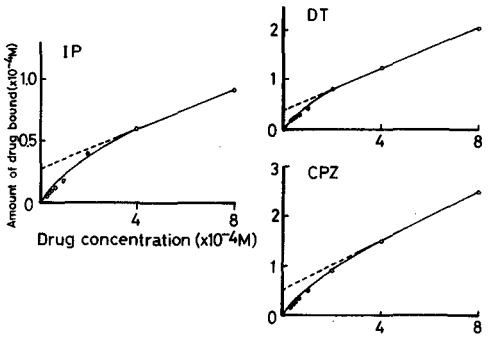


Fig. 1-1. Binding of drugs to synaptosomes. IP, imipramine; DT, dimetacrine; CPZ, chlorpromazine.

る部位(binding site)が1種類であると仮定すれば: $a = x\cdot[(s\cdot Ka)^{-1}+1]^{-1}$ という関係式が成り立つ。但しここでいう[s]とは[Drug initial − a]すなわち[Free]の薬物濃度を意味する。Σ式について両辺の逆数をとり,縦軸を1/a, 横軸を1/sでプロットすれば一次関数となる。向精神薬のbinding curveより得られたnonlinear componentについてΣ記の分析を行った結果は:

Imipramine: Multiple-binding mode

Dimetacrine, chlorpromazine: Single-binding mode

であった。Fig.1-3にその結果を示したが, imipramineのみが複雑な結合様式を示した。

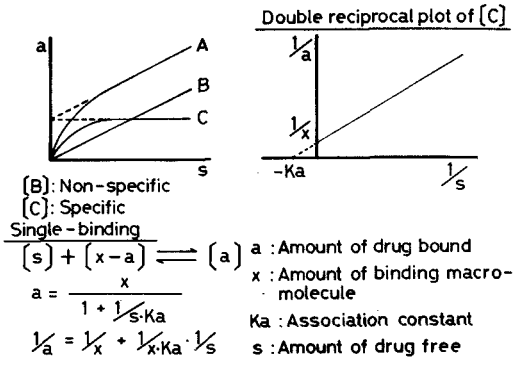


Fig. 1-2. Kinetic analysis of binding.

(2) Imipramineの持つ結合様式の特異性について

すでに,著者は神経終末顆粒に対する向精神薬の結合能が異なることを見い出しているが,その時に用いた凍結融解処理法にて,向精神薬の結合に関与するbinding-componentの性質を検討した。凍結融解を15回繰した場合,dimetacrineとchlorpromazineの結合に関与するbinding componentはその性質に変化が認められずsingle-binding modeを呈した。しかしながらimipramineにおいては,最も親和性の高いすなわち2.6~2.0×10^{-5}Mの濃度に認められたbinding componentが凍結融解により破壊されることが判明した。さらに,myelin fragmentsに対するimipramineの結合様式について検討したところ,神経終末顆粒との結合におけるmultiple-binding modeは認められず,single-binding modeを呈した。

(3) 5-HTの神経終末顆粒への結合に対する向精神薬の作用について

向精神薬はいずれも,神経終末顆粒に対する5-HTの結合を抑制するが,その抑制能は5-HTの濃度に依存性を示した。Fig.2-1にその結果を示した。

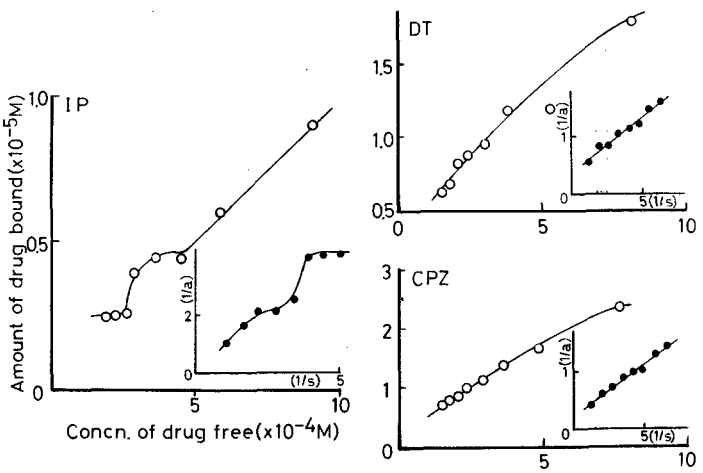


Fig. 1-3. Kinetics of drug binding. Insets show the double reciprocal plots of binding. a, amount of drug bound (X 10^{-5}M); s, concentration of drug free (X 10^{-4}M). IP, imipramine; DT, dimetacrine; CPZ, chlorpromazine.

薬物の生理濃度に近い低濃度側においては,exogenous 5-HTが1.4×10^{-6}Mでは向精神薬の抑制能には殆んど差が認められなかった。しかしながらexogenous 5-HTが2.1×10^{-7}Mではimipramineが最も強い抑制能を示した。

考察

動力学的分析において,[s]は[Drug initial]−[a]すなわち[Free]の薬物量としたが,この

時の〔a〕は nonlinear component の値のみを用いた。実際に，〔c〕=〔Drug initial〕−〔a+b〕：〔a〕= 特異的結合量，〔b〕= 非特異的結合量，として2重逆数プロットを行うと，chlorpromazine および dimetacrine について直線性が得られなかった。Imipramine の飽和性結合様式に関与している binding components の内，親和性の最も高いと思われる binding component が凍結融解に感受性を有することが判明した。Marchbanks (12) の報告によると，神経終末顆粒に対する 5-HT の結合様式は multiple-binding mode を呈する。さらにその内の high affinity binding component は，神経終末顆粒にのみ存在し，detergent; freezing および acid pH により破壊されると報告している。以上の知見から imipramine の結合に関与する binding components と 5-HT の binding components は性質が類似していることが示唆された。すでに組織化学的に明らかにされているごとく (4,5)，中枢神経系においては serotonergic terminals と catecholaminergic terminals が存在する。さらに exogenous 5-HT の神経終末顆粒への取り込みには2相性があり，5×10^{-7}M 以上の濃度を用いると serotonergic terminals (Type1: high affinity) の他に catecholaminergic terminals (Type2: low affinity) にも取り込まれると報告されている (10,14)。

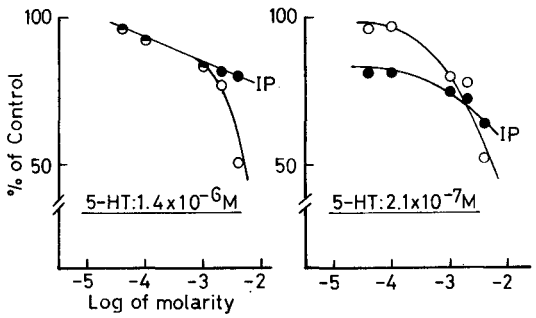


Fig. 2-1. Effect of IP and DT at various concentrations (plotted as log of molar concentration) on the binding of 5-HT. —●—●—, IP; —○—○—, DT.

そこで本実験では，exogenous 5-HT として 2.1×10^{-7}M と 1.4×10^{-6}M の2種濃度を用いて向精神薬の競合作用についても検討した。その結果は，5-HT が 1.4×10^{-6}M の時には各薬物の抑制能には殆んど差が認められなかったが，2.1×10^{-7}M では imipramine が最も強い抑制能を示した。Exogenous 5-HT として用いた 2.1×10^{-7}M の濃度が，Snyder (10,14) らの指摘しているように serotonergic terminals を特異的に標識しているとすれば，以上の現象は向精神薬の神経終末顆粒に対する結合様式の特異性で説明可能と思われる。すなわち imipramine の神経終末顆粒に対する結合様式が 5-HT のそれと類似していることから，他の薬物よりもより強く競合的に 5-HT の結合を抑制するものと推察される。Carlsson (1,2) らも，5-HT の accumulation に関して，central adrenergic neure では desmethyl imipramine の方が imipramine より抑制能が強いが，serotonergic neure では imipramine の方が抑制能が強いと報告している。

参考文献

1) CARLSSON, A., CORRODI, H., FUXE, K. AND HÖKFELT, T.: Europ. J. Pharmacol. 5, 357 (1969)
2) CARLSSON, A., CORRODI, H., FUXE, K. AND HÖKFELT, T.: Europ. J. Pharmacol. 5, 367 (1969)
3) EIDINOFF, M.L. AND KNOLL, J.E.: J. Amer. chem. Soc. 75, 1992 (1953)
4) FUXE, K., HAMBERGER, B. AND HÖKFELT, T.: Brain Res. 8, 125 (1968)
5) HILLARP, N.A., FUXE, K. AND DAHLSTRÖM, A.: Pharmacol. Rev. 18, 727 (1966)
6) ISHITANI, R., SAITO, K. AND KITAGAWA, H.: Jap. J. Pharmacol. 20, 432 (1970)
7) ISHITANI, R., SATOH, T., SUGA, T. AND KITAGAWA, H.: Jap. J. Pharmacol. 22, 313 (1972)
8) ISHITANI, R.: Jap. J. Pharmacol. 投稿中
9) IWAKURA, T. AND KASHIDA, Y.: Radioisotopes 14, 132 (1965)
10) KUHAR, M.J., SHASKAN, E.G. AND SNYDER, S.H.: J. Neurochem. 18, 333 (1971)
11) MARCHBANKS, R.M., ROSENBLATT, F. AND O BRIEN, R.D.: Science 144, 1135 (1964)
12) MARCHBANKS, R.M.: J. Neurochem. 13, 1481 (1966)
13) PATTERSON, M.S. AND GREENE, R.C.: Anal. Chem. 37, 854 (1965)
14) SHASKAN, E.G., SNYDER, S.H. AND HENDLEY, E.D.: Fed. Proc. 29, 263 (1970)
15) WEINSTEIN, H., VARON, S. AND ROBERTS, E.: Biochem. Pharmacol. 20, 103 (1971)
16) WHITTAKER, V.P., MICHAELSON, I.A. AND KIRKLAND, R.J.A.: Biochem. J. 90, 293 (1964)

8. ラット脳のAMP Deaminaseの活性について

小笠原 信 明・渡 辺 智 正・後 藤 治 子
（愛知県コロニー）
吉 野 昌 孝
（名大・医・Ⅱ生化）

ラット脳の AMP DEAMINASE には P-CELLULOSE カラムクロマトで分離しうる ISOZYME が存在し各々は AMP に対する K_m, 熱安定性, 電気移動度等にかなりの差のあることを報告してきた. 今回 P-CELLULOSE, DEAE-CELLULOSE 硫安分画で I, II, IV型を各々精製し活性化及び阻害についての実験を行った。

3つの ISOZYME はすべて ACTIVATOR, INHIBITOR の存在で基質 AMP に対する K_m のみ変化し V_{max} の変化しない K-SYSTEM に属する ALLOSTERIC 酵素と考えられる. ACTIVATOR, INHIBITOR の存在しない状態では3型共に AMP に対する飽和曲線は SIGMOID になり, I型では HILL の n 値は4, II,IV型では2となる. ACTIVATOR である ATP, アルカリ金属の存在下では3型共に n 値は1に近づく. INHIBITOR である GTP, Pi の存在下ではI型では n 値は4のまま変化しないが, II,IV型では2から4に近づく.

3型共に ATP には HOMOTROPIC INTERACTION があり, SITE は2, BINDING CONSTANT は約2 mM である. 筋酵素でみられるような ATP の低濃度での INHIBITION は全くみられない. K, Na は非常に低濃度で各型を活性化し, 1 mM でもその効果は認められる. Li, Rb も同様に低濃度で活性化するが Cs は高濃度でも全く効果がない.

INHIBITOR である GTP, Pi 濃度と活性の関係にも軽い逆 SIGMOID があり, GTP, Pi にも HOMOTROPIC INTERACTION が存在する.

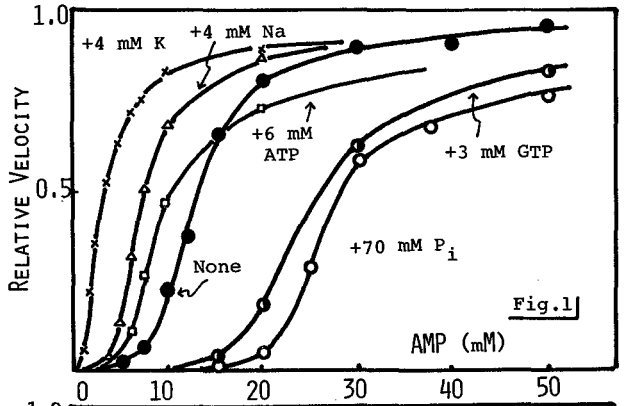
AMP DEAMINASE は動物組織に広く分布するが脳組織では筋について活性が高い. この酵素は ADENINE NUCLEOTIDE から GUANINE NUCLEOTIDE への変換の最初の STEP の酵素であり, 又 PURINE NUCLEOTIDE CYCLE の構成酵素としてアンモニア生成と関係が深い[1]. 本酵素は ATP 及びアルカリ金属により活性化され, GTP によって阻害をうけるアロステリック酵素の性質を有することが知られている[2]. 我々は先にラット脳において他の組織ではみられないいくつかの ISOZYME が存在し, 各型は P-CELLULOSE カラムクロマトのパターン, 基質 AMP に対する K_m, 熱安定性等にかなりの差があることを報告した[3,4]. 今回はこれら ISOZYME において ATP GTP アルカリ金属の作用機構と共に各々の型の性質をより明らかにし, 脳における AMP DEAMINASE の特異な性質を解明しようとした。

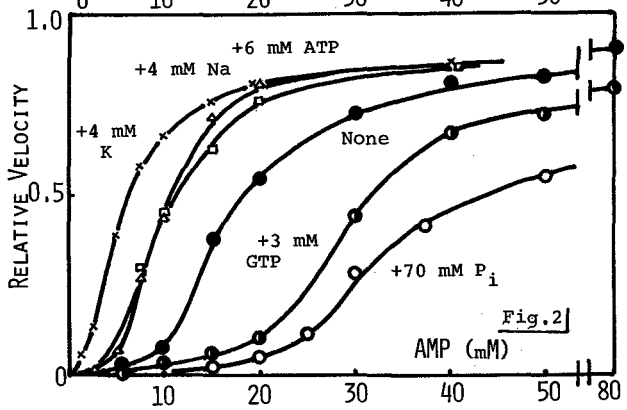
〔実験方法〕

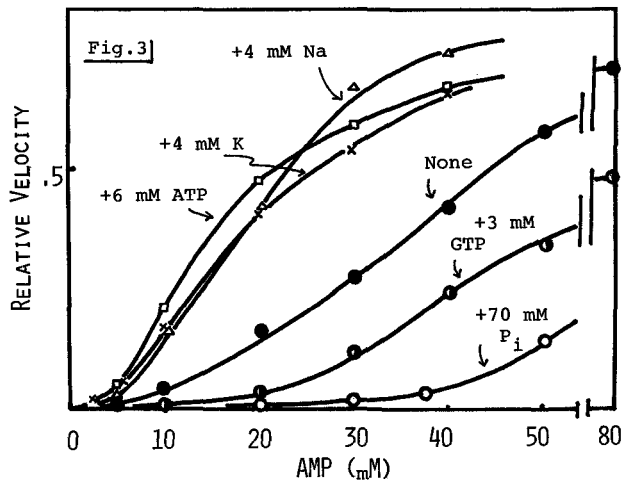
AMP DEAMINASE は凍結したラット大脳を5倍量の 0.02 M KPO_4, pH 7.0 で HOMOGENIZE し, 10,000xG 上清を P-CELLULOSE カラムにかけ ISOZYME を分離後, 更に P-CELLULOSE カラムの再クロマト, 硫安分画, DEAE-CELLULOSE クロマトにより I, II 及び IV型を精製した。安定化の目的で精製過程には全て 0.1 % MERCAPTOETHANOL 及び 0.05 M NaCl を添加した. 活性化及び阻害の実験は全て精製酵素を 0.02 M TRIS-HCl, pH 7.0 で平衡させた SEPHADEX G-50 で脱塩したものを用いた。酵素活性は 37° C, 10分で生成するアンモニアを直接ネスラー試薬で発色させて測定した。NUCLEOTIDES はすべて TRIS 塩を使用した。

〔実験結果及び考察〕

FIGS.1-3 にみられるように ACTIVATOR INHIBITOR の存在しない条件ではI, II, IV型共に基質 AMP と活性との関係は SIGMOID になるがI型では II, IV型に比して SIGMOIDICITY が強く





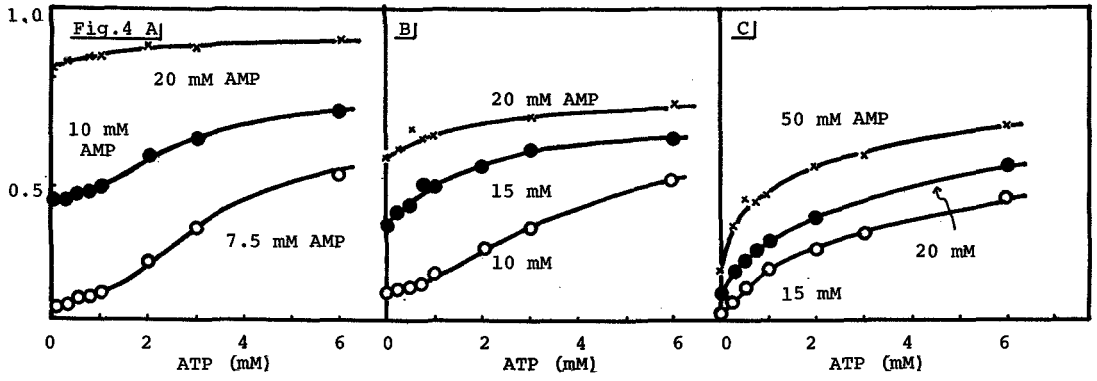


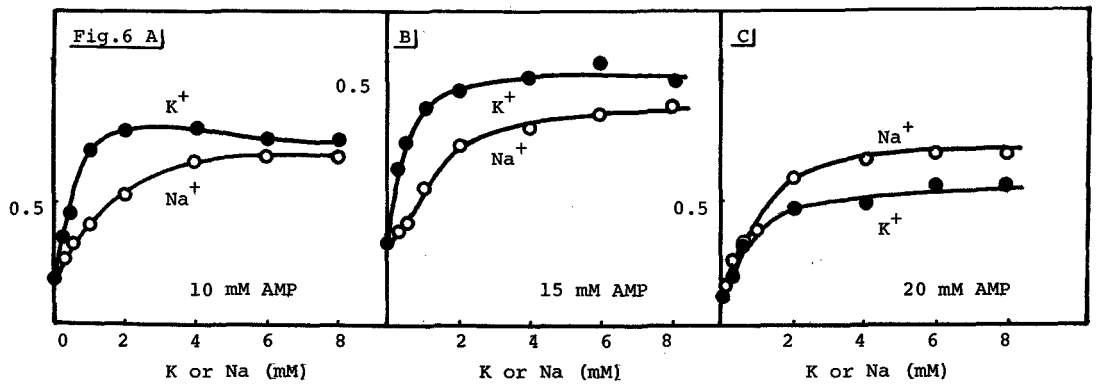
HILLのn値をFIGS.1-3のデータから計算するとIで4，II,IVでは約2となる。ACTIVATORであるATP,Na,Kを加えると3型共にAMPに対するみかけのK_mは小さくなりn値はそれぞれの濃度を上昇させると1に近づく。INHIBITORであるP_I,GTPの存在下では3型共にAMPに対する飽和曲線は右にずれ，AMPのK_mは大きくなりHILLのn値はIでは4で変化しないが，II,III型では2から4と大きくなる。3型共にACTIVATOR,INHIBITORの存在でV_{max}は変化せず基質に対するK_mのみ変化することから，これら酵素はMONOD,WYMAN,CHANGEUX[5]のいうK-SYSTEMに属するアロステリック酵素と考えられる。

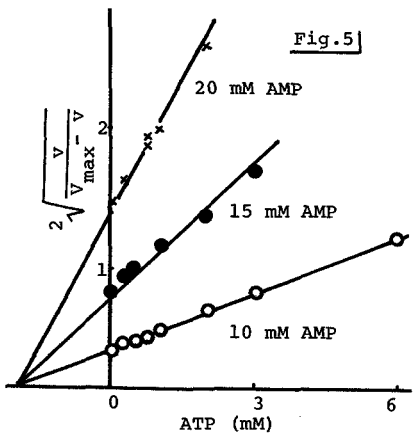
ATPによる活性化を調べるためにFIG.4 ABCにみられるように3型についてAMP濃度を変化させた時のATPの効果をみた。いずれの型でもAMPの低い条件ではわずかながらSIGMOIDICITYが現われる。このことはATPの結合にHOMOTROPIC INTERACTIONがあることを示している。例えばFIG.5のようにFIG.4BからQUOTIENT FUNCTIONをもめPLOTすることにより，II型ではATPのINTERACTION SITEは2でありBINDING CONSTANTは2 mMであることが分る。同様の処理をI,IV型でも行い，ATPに対するSITEは2，BINDING CONSTANTは約2 mMを得た。

筋肉のAMP DEAMINASE[7]についてはATPは低濃度(0.1 mM)ではINHIBITORとして，高濃度ではACTIVATORとして作用することが報告されているがラット脳の酵素ではATPはACTIVATORとして働き，INHIBITORとしての作用は各型共にFIG.4にみられるように全く認められなかった。

FIG.6ABCに示す如く3型についてK,Naの活性化の効果をみた。1 mMの濃度ですでにACTIVAOTRとしての効果が認められる。牛の脳の酵素は0.2 Mで最高に活性化されることが報告されている[6]が，この値と比較するとラット脳の酵素は非常に低濃度のK,Naで活性化される。K,Naと同様に，Li,Rbは低濃度で3型共に活性化されるがCsは低濃度では



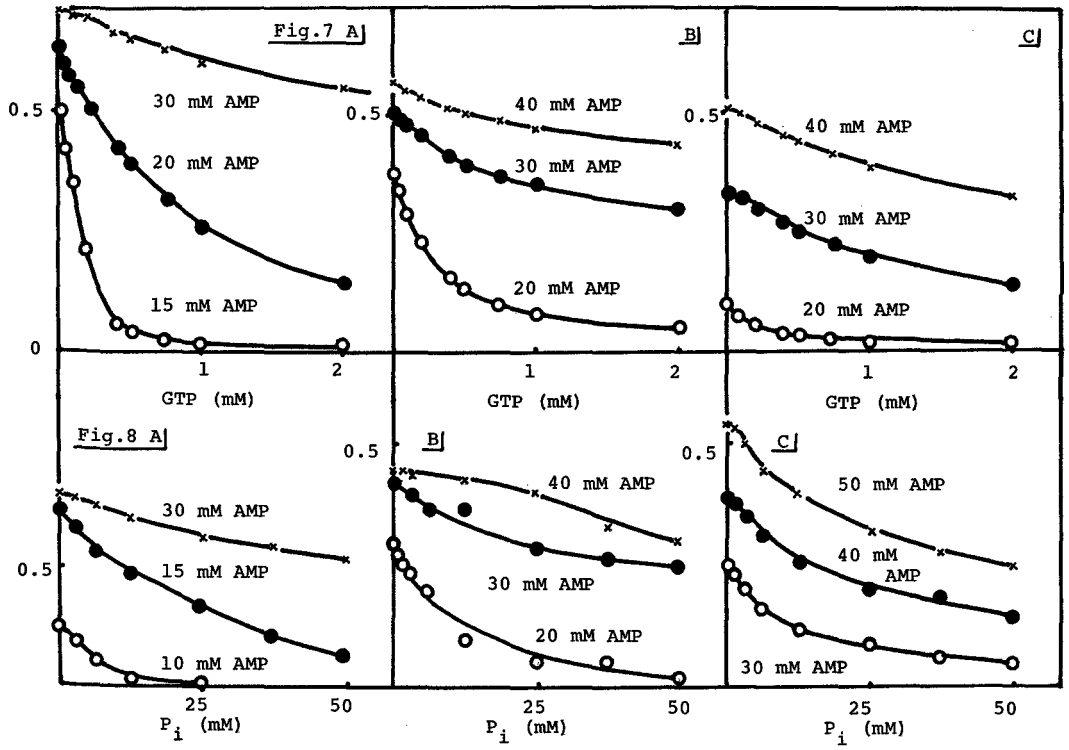




勿論高濃度(40, 400 mM)でも活性化効果は全く認められなかった。

一般にGTPは種々の動物臓器のAMP DEAMINASEのINHIBITORであることが知られている。最近ニワトリ赤血球のAMP DEAMINASEではGTPは低濃度(0.1 mM)ではINHIBITORとして作用し高濃度ではACTIVATORとして作用し、しかもACTIVATORとして考えられてきたATPもGTPと全く同様に低濃度ではINHIBITORYに高濃度ではACTIVATORとして作用し、INHIBITOR, ACTIVATORとしてのNUCLEOTIDEの特異性はないことが明らかになった。[8] 脳の酵素では各型共に低濃度でも高濃度でもGTPはINHIBITORYに作用しNUCLEOTIDEの特異性は存在する。FIG.7 ABCにみられるように高濃度のAMP存在下では軽い逆SIGMOIDがみられる。FIG.7のデータからQUOTIENT FUNCTIONをとり、FIG.5と同様にPLOTしてGTPのINTERACTION SITEの数とBINDING CONSTANTを求めるとI, II, III型共にSITEは2でBINDING CONSTANTは0.2-0.3 mMであり、各型でのSITEの数、BINDING CONSTANTには差は認められない。

P_I濃度の活性に対する影響をAMP濃度を変えてみた図をFIG.8 ABCに示した。いずれの型でも高いAMP濃度では軽い逆SIGMOIDがみられ、P_IにHOMOTROPIC INTERACTIONのあることを示している。GTPの場合と同様にP_IのINTERACTION SITEの数とBINDING CONSTANTを求めると、3型共にSITEは2, BINDING CONSTANTは10 mM前後と各型での大きい差は認めら



れなかった。

以上の如くラット脳に存在するAMP DEAMINASE のISOZYMEは MONOD,WYMAN,CHANGEUX[5]のK-SYSTEMに属すALLOSTERIC酵素であり,種々の物質によって活性調節をうける。即ちアルカリ金属, ATPによって活性化され, P_I,GTPによって阻害され複雑にその活性が調節されていると考えられる。脳の機能の変化に応じて微妙に変化するアンモニアとPURINE NUCLEOTIDE CYCLEによるアンモニア生成との相関を考える時,CYCLEの構成酵素としての脳AMP DEAMINASEがCYCLEの回転を如何に調節しているか, 又このCYCLEの生理的意味は何かという問題はADENINE→GUANINE NUCLEOTIDE変換の調節と同様, 興味ある問題である。

REFERENCES

1) Lowenstein,J.M., and Tornheim,K,, Science, 171, 397 (1971)
2) Setlow,B., and Lowenstein,J.M., J.Biol.Chem., 243, 3409 (1968)
3) Ogasawara,N., Yoshino,M., and Kawamura,Y., Biochim.Biophys.Acta,258,680 (1972)
4) 小笠原・吉野・川村, 第14回 日本神経化学会 予稿集, p.75 (1971)
5) Monod,J., Wyman,J., and Changeux, J.-P., J.Mol.Biol., 12, 88 (1965)
6) Setlow,B., and Lowenstein, J.M., J.Biol.Chem., 243, 6216 (1968)
7) Tomozawa,Y., and Wolfenden,R., Biochemistry, 9, 3400 (1970)
8) (unpublished observations)

脳Na　9. 脳$Na^+ \cdot K^+$-ATPaseに対するα-Tocopherolの効果

川井紘一・原　諭吉
中尾　真
（東医歯大・医・生化）

要約

ブタ大脳灰白質のミクロゾーム分画より得られたNa^+, K^+-ATPaseに対しての抗酸化剤の作用を検討中、遊離のα-tocopherolに阻害作用がある事を見出した。阻害作用はミクロゾームをNaI処理後0.1%ルブロールでNa^+, K^+-ATPaseを可溶化する事により強くなり完全阻害を示し、その半阻害濃度は5.7×10^{-5} Mであり血中濃度の約2倍の濃度である。一方DOC処理ミクロゾームでは同じ濃度の遊離のα-tocopherolは約½の阻害効果を示した。

阻害の次数はほぼ1次であり、阻害剤の結合速度は非常に早く5分のプレインキュベーションで充分である。阻害の形式は基質であるATPとは非競合的である。システィンの共存下でもその阻害は影響されない。

抗酸化作用のないα-tocopherolの酢酸エステルでは阻害作用がみられなかったが、ルブロールにより可溶化した酵素の0°Cでの保存に対して若干保護効果を示した。又リノール酸エステル、ニコチン酸エステル型も同様の保護効果を示した。

神経系の活動にはNa^+, K^+-ATPaseによるNaの不均一な分布が前提となっている。このNa^+, K^+-ATPaseは重要な生理機能を有する酵素の一つとして、生理的な物質によって調節されている事が期待されるが、今迄の所基質，生成物，Na^+，K^+，Mg^{++}等直接酵素作用に働く物質以外は阻害或いは促進する生理的物質は殆んどない。

たまたま抗酸化剤によるNa^+, K^+-ATPaseの保護作用を観察中、遊離のα-tocopherol[1]が強い阻害効果を示す事が見出されたので、その特異的な作用その他の性質について報告する。

実験方法

凍結したブタの大脳皮質を中尾[2]らの方法により9倍量の0.1% Deoxycholateを含む0.25 M Sucroseでhomogenateし、分画遠心によりMicrosome分画を集め、DOC処理ミクロゾームとした。それを2 M NaI処理し、NaI処理ミクロゾームとした。このNaI処理ミクロゾームをタンパク量4 mg/mlの濃度で0.1% Lubrol WXにより30分間処理し、100,000×g，1時間の遠心による上清をルブロール可溶化ミクロゾームとした。

酵素反応は氷冷下、終濃度140 mM NaCl，14mM KCl，5 mM $MgCl_2$，0.5 mM EDTA，40 mM Imidazole-HCl pH 7.1中に酵素標品を懸濁し、次にα-tocopherolを加え5分間preincubationした後，3mM ATPを加えて37°C 15分間incubateし、生成された無機リン酸をFiske-Subbarow法により測定し定量した。

α-tocopherolは超音波処理により水に懸濁させて用いた。一部はメタノールに溶

解したもの、DOCその他の表面活性剤により分散させたものも用いた。

結果

1) ルブロール可溶化ミクロゾームのagingへの効果

0°CでLubrol可溶化microsomeを保存するとき、それは次第に失活していくが、それを防ぐ目的で遊離のα-tocopherolおよびその酢酸エステルを使った時の実験である。図1よりわかる様に酢酸エステルは失活を防ぐが、みかけ上遊離のα-tocopherolは失活を早めた。

2) 遊離のα-tocopherolの各種Na^+, K^+-ATPase標品への阻害効果

遊離のα-tocopherolの濃度を変えて、酵素を0°Cで5分preincubationした時の活性をみると図2, 図3に示す様にDOCミクロゾームでは不完全阻害を示し、ルブロール可溶化ミクロゾームでは完全阻害を示した。half-maximal inhibition濃度はそれぞれ 9.7×10^{-5}M および 5.7×10^{-5}M であった。NaI処理microsome, detergent free microsomeはDOC-microsomeと同じ傾向を示した。又図2からわかる様にOuabain-insensitive-ATPaseは遊離のα-tocopherolにより阻害されなかった。

3) 阻害剤のNa^+, K^+-ATPaseとの反応

図3, 及び図2より本阻害剤の酵素活性への阻害はほぼ一次反応である事がわかる。又酵素への吸着は非常に早い事がpreincubationの時間を変えてみた実験、表1よりわかる。また、ATPとの関係は図4より非競合的である事がわかる。又表2に示す様に

図1. ルブロール処理Na KATPaseの保存に対するα-Tocopherol及びα-Tocopheryl acetateの影響

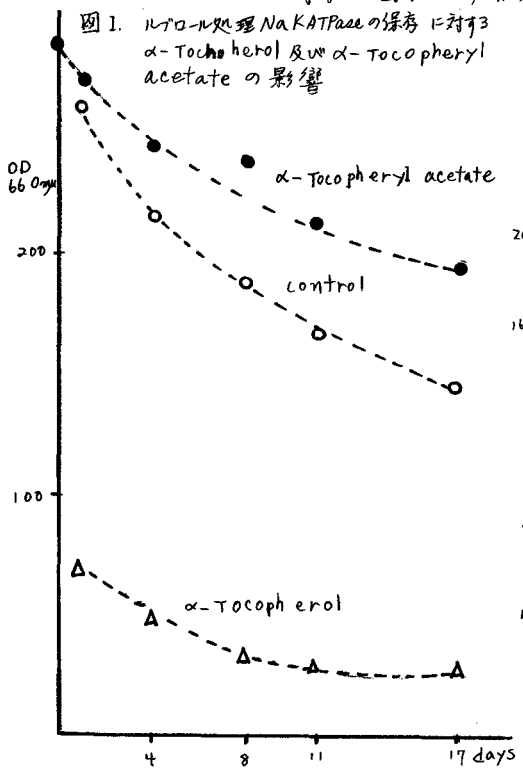
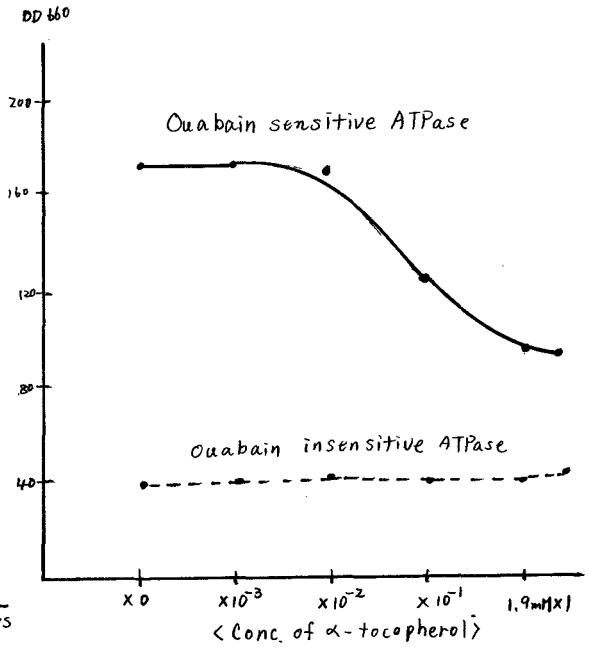


図2. DOC処理ミクロゾームATPaseに及ぼすα-Tocopherolの影響



Dithiothreitol及びcysteineはこの阻害を打ち消さなかった。酵素反応中間体に対する影響については検索中である。

4) 阻害剤の特異性

この阻害効果が遊離のα-tocopherolに特異的なものであるかどうかをみるために、酢酸エステル型を用いてみるにhalf-maximal-inhibition濃度は2.96×10^{-2}Mと約500倍も違った。コンケン酸エステル，リノール酸エステル型や，他の抗酸化剤も、事実上阻害作用を示さず弱い保護効果を示した。又他の脂溶性ビタミンとの関係も検索中である。

考察

以上の結果，遊離のα-tocopherolはブタ脳より得たNa^+,K^+-ATPaseを強く阻害する事はあきらかである。エステル型のものは阻害作用を示さず、又他の抗酸化剤も阻害作用なく、SH剤の共存下でも阻害作用を示す事等から特異的な作用と思われる。

酵素に作用させる方法としてMethanol溶液や他の表面活性剤を使用した場合でも阻害作用はみられるが、音波処理の場合，5.7×10^{-5}Mが半阻害濃度であった。この懸濁液はまだ完全な溶液ではなく，emulsionであるから更に半阻害濃度が低い可能性もある。いづれにしろこの濃度は血中正常濃度3～13 mg/lからあまりはずれておらず、又極めて脂溶性の性質から言って、細胞膜を通過し、又細胞膜と結合し易い事は期待されるので、腎や神経のNa^+K^+-ATPaseに作用している事は充分考え得る。

図3. Lubrol処理Na,KATPaseの阻害

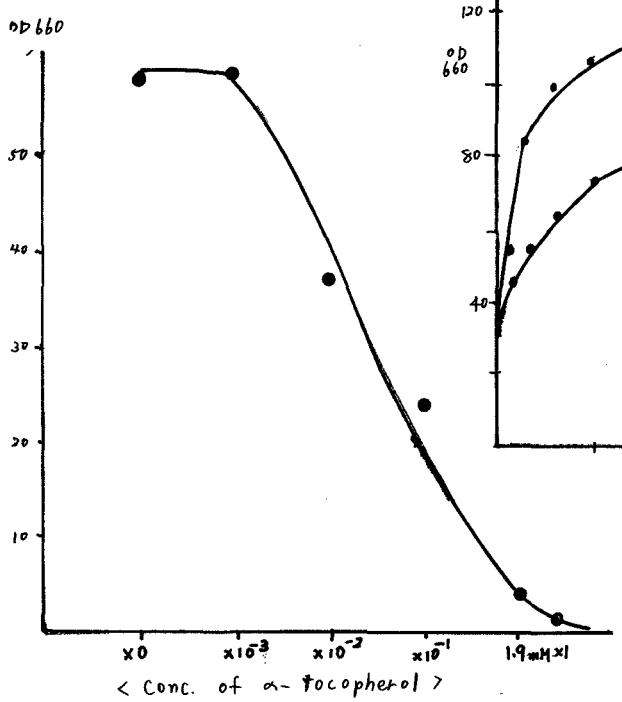
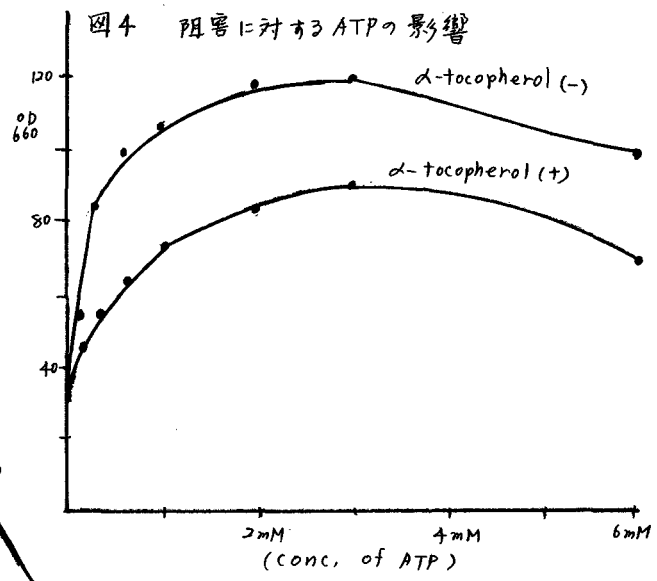


図4 阻害に対するATPの影響



α-tocopherol の欠乏症 はかなり広範囲の組織を侵し、脳神経に対する障害も認められている事も合わせ考えると興味深い。

表 1

preincubation 時間の影響

Min	0	1	5	10	30	30
OD 660mμ	169	167	171	151	149	α-Tocopherol (−) 276

表 2

cysteine, DTT の影響

	α Tocopherol (−)	× 10^{-2}	× 10^{-1}	× 1 1.5 mM
1 mM DTT (−)	123	95	76	19
〃 (+)	107	87	71	9
1 mM Cysteine (−)	122	113	77	16
〃 (+)	127	114	80	15

文 献

1) O.A. Roels, Nutrition Reviews 25, 33 (1967)

2) N. Mizuno, K. Nagano, T. Nakao, Y. Tashima, M. Fujita and M. Nakao; Biochim, Biophys. Acta, 168, 311 (1968)

10．発育に伴うラット大脳DNA分解酵素の変動について

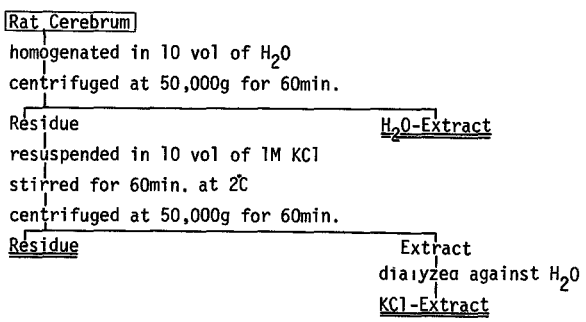
野口鉄也・須田治彦
塚田裕三
（慶大・医・生理）

脳の発育過程で神経細胞と神経膠細胞とが分裂増殖の時期を異にし，神経細胞は発育初期に分裂増殖が行なわれ，発育後は修復機転としても神経細胞の分裂は認められない。このことから脳の発育期にDNAの代謝調節機構を追究するならば神経細胞，神経膠細胞の分裂増殖の制御機作に何らかの手懸りを得るものと考え，ラット大脳のDNA polymerase 並びにDNaseにつき検討したので本報ではDNaseの変動につき報告する。

ラット大脳のDNaseはpH8.9で変性DNAをより良い基質とするBasic DNaseとpH5.0で未変性DNAを良い基質とするAcid DNaseとに区別される。大脳水抽出上清液を酵素源として，出生前後の時期にその活性を見ると，Acid DNaseはBasic DNaseより常に活性は強い。Acid DNaseは受精17日目から20日目に急減し，出生7日目に再び峯をもつ変化を示すが，Basic DNaseはこの変化は明瞭ではない。両DNaseの受精17日目と成熟の大脳での細胞内分布を比較すると，Acid DNaseは両時期ともMt画分に多く存在するが，Basic DNaseは成熟ではN画分に，17日目ではMs画分に多く，分布を異にする。又両DNaseは水抽出後1MKClを用いると更に不活性結合型の酵素が活性化されて抽出される。この量は発育期を通じて遊離型のものと相反する変動をし，Mirror Imageを示す。又この両型の和はどの時期でも殆んど等しく生体内での変動は結合型⇄遊離型の移行によって行なわれることを示した。一方細胞内に於いて，核内及び核外間でも酵素量が変動することを見出した。

実験方法

図1



酵素標品　胎生期のものは開腹後胎仔を採り出し，瀉血断頭後，開頭し大脳を摘出した。酵素の抽出を図1の如く行った。細胞内分画法は0.32M Sucroseを用い従来の方法によった。分画後各画分を水で透析した。核内外の酵素活性の検討にはMyを粗N画分から離したN画分と800g Superとを用い，図1に沿って酵素を抽出した。細胞内各画分間の酵素分布の比較には透析後の画分のSuspensionをそのまま用いた。

酵素活性の測定　Incubation Medium (i) Acid DNase: 0.3ml-1mg/ml変性又は未変性DNA，0.9ml-0.1M$MgCl_2$，1.5ml-0.1M Ammonium acetate-Buffer pH5.0，約4mg蛋白量の酵素標品，水で全量6mlとする。(ii) Basic DNase: 0.5ml-1mg/ml変性又は未変性DNA，0.9ml-1mM$MgCl_2$，1.5ml-0.1M Tris-Buffer，約4mg蛋白量の酵素標品，水で全量6mlとする。酵素を入れることによって反応を開始し，37℃で温浴，0分，10分，70分と随時反応液を1mlずつとり，氷冷過塩素酸で反応を止め，その3000rpm 20分の上清を260mμで比色し，70分時と10分時のO.D.の差から酵素活性を算出した。（但しDNA 1μg/mlのO.D.260mμ＝0.020とした。）用いたDNAはCalf Thymus DNA (Worthington)，変性は100℃，10分の熱処理を行った。

蛋白定量　Lowry[2]らの方法によった。　硫安分画　各抽出液にTris-Buffer pH7.4を加えてpHを整え，氷冷下で固型硫安を加えて目的濃度に分画を行った。分画後各画分は水に対して透析し硫安を除いた。

結果及び考察

図2.

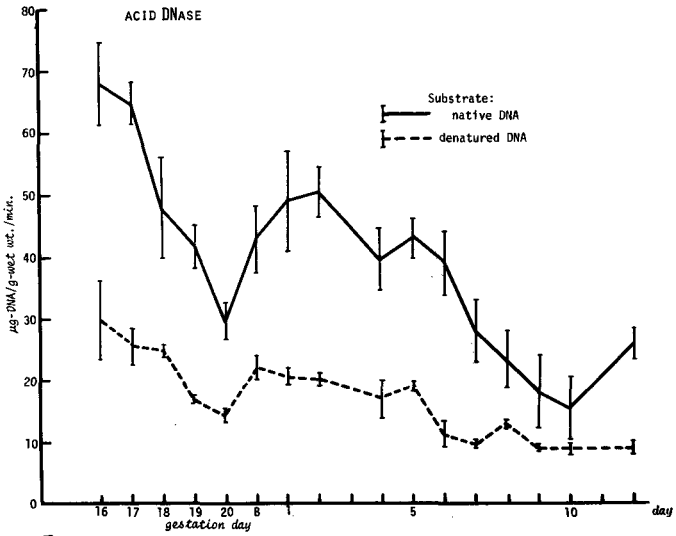
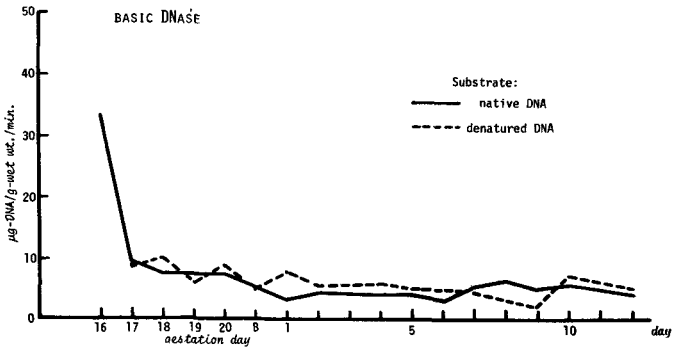


図3.



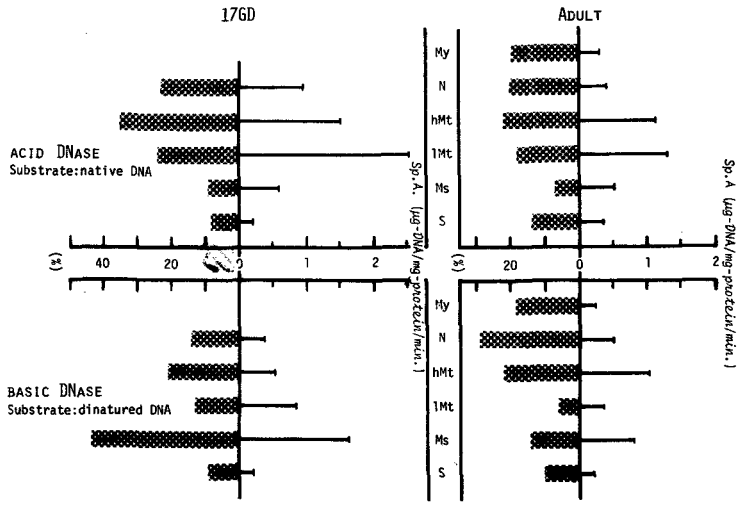
酵素の抽出　Acid DNase, Basic DNase及び基質の種類に関係なく組織水Homogenateのもつ全酵素活性の80%以上はH_2OExtractに回収される。次いでそのResidueを図1に従って1M KClで抽出すると，Residueにあった酵素活性以上の活性が，発育段階によって異るが(後述) KCl Extractに回収され，比活性もH_2OExtractに比して高い。このことは組織内で活性逸離型と不活性結合型の二種の型で両DNaseとも存在することを示す。

酵素活性の大脳発育に伴う変化

H_2OExtractの酵素活性について検討してみると，Acid DNaseは受精20日目まで活性は減少し，生後2日目にかけて再度上昇，以後10日目まで漸次減少する二峯性の変化を示す。この変化は未変性DNAを基質として用いる時に著しく，活性も高く発育期では未変性DNAが良い基質であることが分る(図2)。Basic DNaseはどの時期でもAcid DNaseの約1/5の活性で著明な二峯性を示さず，胎生期から生後にかけて漸減する。又変性DNAと未変性DNAとの間に大きな差はない。(図3) Palladin[3]は家兎脳ではAcid DNase活性の変動は出生直前から出生時に一度減少し，生後9日及至10日目に才二峯をもつ全く同様の変化を報告している。ラット大脳では出生直前に神経細胞の増殖が停止し，出生後神経膠細胞の増殖が盛んとなるとする報告[4]を考慮すると，この二峯性変化が神経細胞と神経膠細胞の分裂に関連するのかも知れない。

細胞内酵素分布　すでにKoenig[5]らは成鼠大脳でAcid DNaseがLysosomeに比活性高く存在することを報告している。受精17日目と成鼠との細胞内分布を，Acid DNaseは未変性DNAを，Basic DNaseには変性DNAを基質として検討した。酵素は各画分のSuspensionを用いた。図4にみる如く，成鼠大脳のAcid DNaseは両Mt画分に多く，比活性も高い。

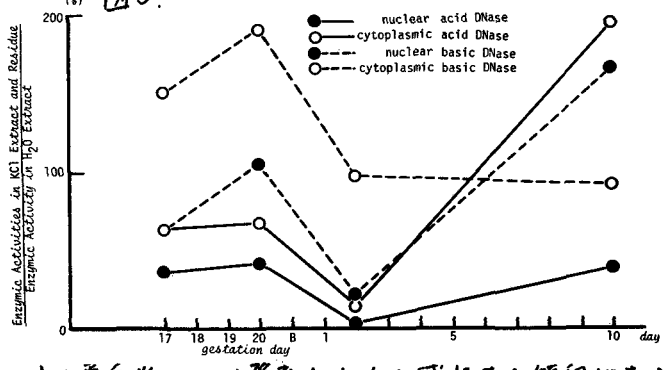
図4.



これはMt画分にLysosomeが回収される為と考えられる。Basic DNaseは成熟ではN画分に最も多く(30%)回収されるが，比活性はMt画分に高く，次いでMs画分がこれに続いている。この分布はAcid DNaseと異っている。Acid DNaseの分布は受精17日目では成熟に似て両Mt画分に多く比活性も高いが，Basic DNaseは胎生期では40%，Ms画分に回収され比活性も高く成熟のそれと異る。このことはDNaseの分布，特にBasic DNaseが発育期で分布を異にすることを示し興味がある。

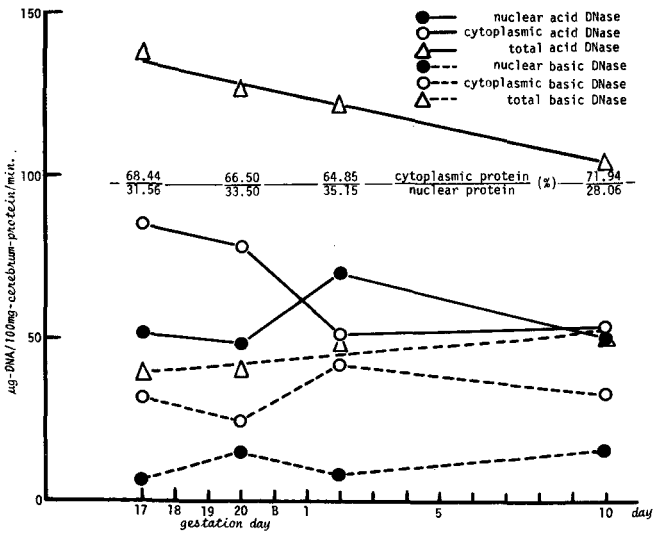
<u>遊離型と結合型の量的変動</u> 核内，核外分離後それぞれに含まれる遊離型(H_2OExtract中の全酵素活性)に対する結合型(KClExtract + Residueの全酵素活性)の比を発育を追ってみると(図5)，Acid DNase(未変性DNA基質)，Basic DNase(変性DNA基質)を問わず，受精17日目で結合型が少く，20日目でこの値は上昇し，生後2日目で再び低値を示し，以後結合型が増加する。更に核内及び核外の酵素活性の総和(遊離型＋結合型)を100mg大脳蛋白当りで表わすと(図6)，Acid DNaseは胎生期で核外に多く生後2日目で逆転し10日目で殆んど等しくなるが，核内外の和(Total = nuclear + Cytoplasmic)は蛋白当りでは発育とともに減少する傾向がある。Basic DNaseは常に核外に多く，核内外の和はやや増加を示す。これらのことから，図2に示したH_2OExtractの酵素活性の変化は，遊離型⇄結合型の変化の表現であって，酵素量そのものが増減しているのではないことが明らかとなった。さらに酵素の細胞内分布も変動することから，以上の酵素の活性変動に加えて，酵素の細胞内局在の変動をも考慮して，発育期でのDNA代謝をみなければならないであろう。

図5.



<u>硫安分画での酵素の態度</u> 受精17日目，生後2日目，成熟の大脳(total)と核内及び核外の各H_2OExtractにつき硫安分画を行い各画分に分布する全酵素活性を百分率で示した(図7)。Acid DNaseは発育段階の区別なく，核内では65%以上の酵素が85%飽和硫安上清に，核外では50%以上 60-85%画分に回収される。一方Basic DNaseの

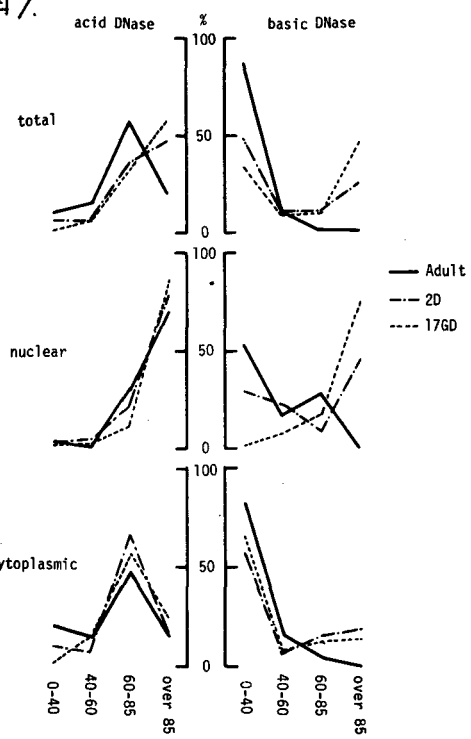
図6.



のうち，核外のものは50%の酵素がどの時期でも0-40%画分に回収されるが，核内のものは胎生17日目では85%飽和硫安上清のものが最も多く，0-40%画分には殆んどない。しかし生後2日目では0-40%，40-60%画分にも酵素活性は回収され，成熊になると逆に0-40%に最も多く回収される。この変化を脳組織(Total)としてみると，Acid DNaseは発育に従って上清画分から60-85%画分に集まるようになり，又Basic DNaseは硫安の低濃度に回収されるようになる。このことは成熊に至る間に，核外の酵素の寄与が多くなることによると考えられる。Sung[6]は成熊の両DNaseについて硫安分画を行い同様の結果を得ている。

従来より，知られているDNaseはEndonucleaseとExonucleaseの二型に区別されている。Sung[6]は脳組織より水抽出されたAlkaline DNase (pH8.9) とAcid DNase (pH5.0) ともにEndonucleaseであると報告し，特にAlkaline DNaseはHealy ら[7]の羊脳のPhosphodiesteraseと類似のものと推測している。従って，ここに示したDNaseも同種のものと考えられるが硫安分画で示された発育とともに酵素の質的変化もあり，今後，さらに酵素化学的に検討を加え，生理的意義を見出したい。

図7.



文献

1) 植村．塚田．飯田，：神経進歩 7, 763, 1963 2)Lowry O.H.,Rosebrough N.J.,Farr A.L.& Randall R.J.: J.biol.Chem. 193, 265, 1951 3)Palladin A.V.: in Biochemistry of the Developing Nervous System (ed. by Waelsch H.) p177 Academic Press,1955 4)Altman J.: in Handbook of Neurochemistry II (ed. by Lajtha A.) p137 Plenum Press, 1969 5)Koenig H.,Gaines D.,McDonald T.,Gray R.& Scott J.: J. Neurochem. 11, 729, 1964 6)Sung S.-C.: J. Neurochem. 15, 477, 1968 7)Healy J.W.,Stollar D.,Simon M.I.& Levine L.:Arch.Biochem. 103, 461, 1963

11. 発育に伴うラット大脳DNA依存性DNA合成酵素の変動について

須田治彦・野口鉄也
塚田裕三
（慶大・医・生理）

脳の発育過程で神経細胞と神経膠細胞とが分裂増殖の時期を異にし，神経細胞の成熟後はもはや分裂は認められない。そこで胎生期の脳発育期にDNA代謝調節機構を追求するなら，神経細胞，神経膠細胞の分裂増殖の制御機構を知り得るものと考え，ラット大脳のDNA依存性DNA合成酵素の変動について検討した。ラット大脳のDNA依存性DNA合成酵素は組織湿重量，蛋白量あたりで，いづれも胎生16日から出生時にかけ急減し，この変化は変性DNA鋳型の場合顕著である。出生後は合成酵素活性に大きな変化はなく，2日以後は未変性DNA鋳型による活性が高くなる。核内に存在する酵素は1.0 M KClで抽出して始めて全活性がとらえられる。核のTris抽出では核内全活性の約10％，0.2 M KCl抽出では約50％の活性が回収され，この分画は比活性が最も高い。核抽出の酵素は未変性DNA鋳型に対して活性が高い。核内外の酵素分布変化をみると，発育に従って核内分布が多くなり，胎生期の核内分布が約30％に比し，成熟では約70％である。Trisで抽出される酵素を硫安分画すると未変性DNAを鋳型とした活性は，胎生期，成熟共に60～80％飽和分画に70％以上回収される。しかし変性DNA鋳型による活性は，成熟と胎生期のものではやや異なるパターンを示した。以上のことから，大脳では胎生期に変性DNA鋳型による活性が強く，生後活性は低くなるが，核内に局在し，未変性DNA鋳型による活性が強くなることを示した。

細胞増殖の最も旺盛な時期に変性DNAを鋳型とするDNA合成酵素の活性が高いことが胸腺[1][2]，肝臓[3]等の組織，或いは腫瘍組織[4]で認められている。一方脳のDNA合成酵素については出生後のラットにつきElkin & Sung[5][6]らの報告がある。神経細胞の増殖は胎生期に最も旺盛であることから，吾々はこの時期に注目して本酵素の活性変動を詳細に検討したので報告する。

実験方法

酵素標品　1) 材料　胎生各時期の胎仔を開腹によって採り出す。瀉血断頭後，開頭し大脳を摘出した。組織の核画分(Nuclear frac.)及び核以外の画分即ち細胞質画分(Cytoplasmic frac.)を分離する場合には，0.32 M Sucroseを含むTris Buffer[(2)参照]を用いてHomogenizeし，これを800 g 20分遠沈，上清をCytoplasmic frac.とした。粗核画分は更に1.0 M Sucroseを含むTris Bufferにresuspendし105,000 g 60分遠沈 My画分を除き，Nuclear frac.とした。これら2 fractionをTris Bufferに対して透析し酵素標品とした。

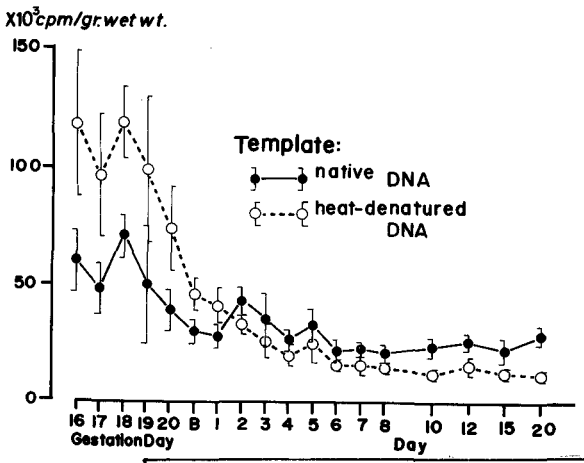
2) 抽出方法　酵素の抽出には先ず10倍容の2mM β-Mercaptoethanolを含む10 mM Tris HCl Buffer pH: 7.4 (Tris Buffer)で材料をHomogenize後，105000 g 60分遠沈，その上清をTris Extractとした。ひきつづき当容のTris Buffer中のKCl濃度を0.2 M, 0.5 M, 1.0 Mと段階的に上げて抽出を繰り返えし，抽出物をそれぞれ0.2 M KCl Extract, 0.5 M KCl Extract, 1.0 M KCl Extractとした。各KCl ExtractはTris Bufferに対して透析しKClを除き，酵素標品とした。全脳組織全体を用いる時はTris Buffer中でHomogenizeし，抽出遠沈後1.0 M KClを含むTris BufferでKCl Extractを作り透析によってKClを除いた。

蛋白質定量　Lowry[7]らの方法によった。

DNA依存性DNA合成酵素(DNA Polymerase)活性の測定　0.1 M Tris HCl Buffer pH 7.4 中に2 μ moles $MgCl_2$, 2μ moles Dithiothreitol, 20 mμ moles dATP, dCTP, dGTP, 0.5 μCi の ^3H labelled dTTP (20 μg Calf Thymus DNA (変性DNAは100°C 20分の熱処理), 酵素標品(60～100 μg蛋白量)を加えて, 総容0.4 mlとして37°Cで反応を行った。反応後 Bollum[8]の方法に従って処理し液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

硫安分画　氷冷中でTris Extractに粉末硫安を加えて目的濃度に1硫安分画を行い, 分画後各画分をTris Bufferに対して透析し硫安を除いた。

図1. 発育に伴うDNA Polymerase活性の変動

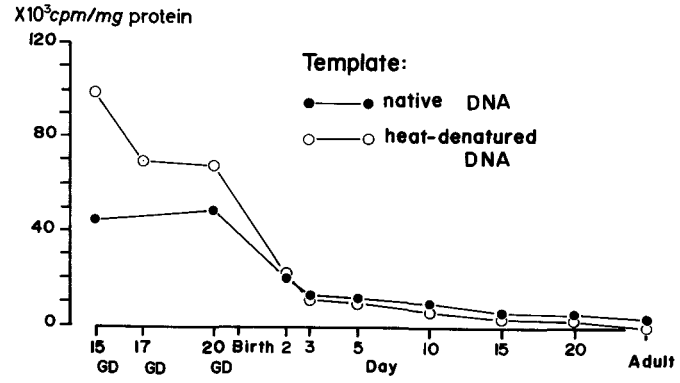


——結果及び考察——

発育に伴うDNA Polymerase活性の変動

Tris Bufferによる酵素の抽出をラット大脳の発育段階に沿って行い, 酵素活性を測定した。受精後16日目から出生時にかけて胸腺末変性, 変性DNAいずれを鋳型としてそ酵素活性は急激に減少する。出生後は活性も低く変動は少ない。しかし胎生期では鋳型として未変性DNAより変性DNAを用いたほうが高い活性を示すが, 生後はこの関係が逆になる。Chiu & Sung[7]は生後2日目で変性DNA／未変性DNAの比1.36と報告しているが; 胎生期ではほぼ2であり, 発育過程に従って鋳型依存性が変化することが判る。

図2. Tris抽出によるDNA Polymerase活性の変動



酵素の核内外の分布変動

大脳から Tris Bufferで抽出される画分中の蛋白量は胎生期から生後10日目にかけては約35%で殆んど一定している。この Tris Extract中の酵素の比活性を見ると図2の如く, 図1と同様な変動を示す。Tris Buffer抽出残渣を1.0 M KClで抽出すると, 組織蛋白量の約20%が抽出され, この量も又, Tris Extractの場合と同様ほぼ一定である。この中に抽出される酵素の比活性を発育の日を追って見ると(図3), 活性変動はTris Extractと酷似し, 受精20日目から生後2日目にかけて急激に減少するが, 鋳型依存性は逆で, 胎生期から生後にかけて常に未変性DNA鋳型の活性が高い。この点を更に検討する為, 受精20日目と生後の大脳から Nuclear Frac., Cytoplasmic Frac. を分けとれるにつき各抽出段階での酵素活性を検討した。(表) 受精20日目でも生後でも Cytoplasmic Frac. に存在する酵素活性は, 両鋳型依存性とも殆んど全部 Tris Bufferに回収されるが, Nuclear Frac. のものは, 受精20日目で Tris

図3. KCl 抽出による DNA Polymerase 活性の変動

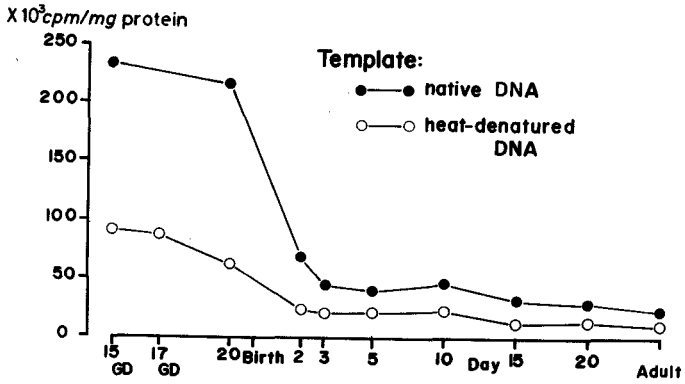
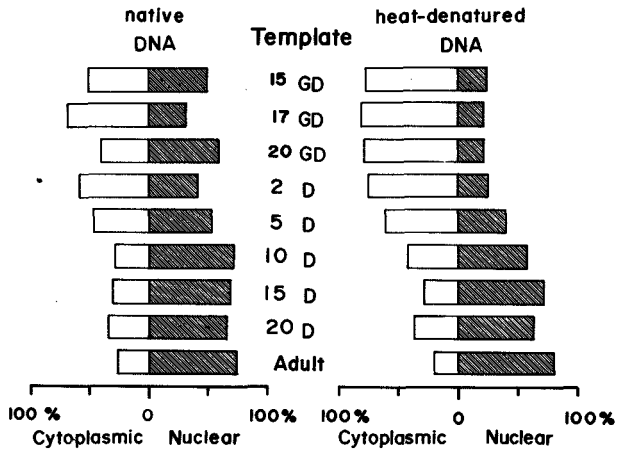


表 核内外の DNA Polymerase 活性の分布

	20th Gestation Day						Adult					
		Template: native DNA		Template: heat-denatured DNA				Template: native DNA		Template: heat-denatured DNA		
	mg protein	specific activity ×10³cpm / mg Protein	total activity ×10³cpm	specific activity ×10³cpm / mg Protein	total activity ×10³cpm		mg protein	specific activity ×10³cpm / mg Protein	total activity ×10³cpm	specific activity ×10³cpm / mg Protein	total activity ×10³cpm	
Homogenate	100						100					
Cytoplasmic fraction												
Tris Extract	40.28		4.66	187.70	5.38	216.71	22.04		2.04	44.96	1.26	27.77
residue	29.41		<0.014	<0.41	<0.009	<0.26	15.69		<0.015	<0.24	<0.003	<0.05
Nuclear fraction	26.16	100.0					4.21	100.0				
Tris Extract		26.83	5.90	41.41	2.70	16.79		14.35	13.33	8.04	4.71	2.84
0.2 M KCl Extract		8.76	44.39	101.72	22.86	52.39		8.24	148.85	51.57	52.50	18.20
0.5 M KCl Extract		16.08	9.62	40.47	14.35	60.39		20.09	23.35	19.73	11.56	9.76
1.0 M KCl Extract		32.88	2.33	19.96	0.63	5.42		10.19	15.56	6.67	5.56	2.37
residue		16.24	<0.39	<1.66	<0.26	<1.10		47.14	<0.15	<0.30	<0.01	<0.19

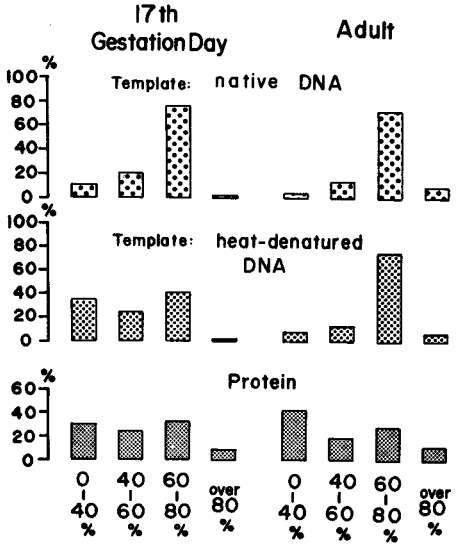
図4. 核内外の DNA Polymerase 活性分布の変動



Extract中に 20%(未変性DNA) 0%(変性DNA), 成熟で 9% (両DNA) しか抽出されず, ひきつづいて KCl の段階的抽出を行うことによって残りの活性が回収されてくる。ここに回収される酵素は未変性鋳型依存性の活性が, 変性鋳型依存性のものより強く, Cytoplasmic Frac. のものと異る。又両時期とも 0.2 M KCl で抽出される酵素の比活性はどの抽出条件のものより高い値を示した。依って, 脳組織から Tris Extract で活性変動を見た図1, 図2, は Cytoplasmic の酵素変動を示すものであり, KCl Extract 図3, は Nuclear のものを示すと考えられる。次に, Cytoplasmic Fra., Nuclear Fra. を分離し, それぞれから抽出される酵素活性の Nuclear Fra., Cytoplasmic Fra. の間で分布をみると(図4) 変性DNA鋳型依存性酵素では発育に従って核に多く分布するようになり, 成熟では 80% が核で回収され, 後精巣日目のものと比較すると核内外の比がしれかわってくる。一方未変性DNA鋳型依存性のものについてみると明確な変動は認められなかった。粗核画分より分離された My画分には酵素活性を認められなかった。尚, Chiu & Sung[9] は全脳核分画から燐酸濃度を上げて酵素の抽出を試みており, 0.2 M 濃度で, 未変性依存性で比活性の高い酵素を抽出し, この酵素は Nuclear Chromatin-membrane

Complexに存在するものと推測している。又生後10日目,17日目,成熟の小脳の核からTris Bufferで抽出後燐酸濃度を上げて酵素を抽出しても,変性DNA鋳型依存性酵素活性は全く認められないと報告している。吾々がここに報告した大脳の例ではどの時期にもNuclear Fra.から変性DNA依存性の強い酵素が抽出された。これは大脳と小脳との差であるのか,抽出条件が異る為か明らかでない。

図5. DNA Polymerase 硫安分画



硫安分画における酵素

脳組織からTris Bufferで抽出したものにつき硫安分画を行うと図5にみられるごとく胎生期,成熟ともに鋳型を問わず60～80%飽和硫安分画にほとんどが回収され比活性も最も高い。Chiu & Sung[10]は生後10日目の脳で硫安分画を行い未変性DNA鋳型依存性の酵素は45～70%飽和硫安分画に集まるが,変性DNA依存性のものは25～40%に回収されると報告している。吾々の成績では受精後17日目の大脳で変性DNA依存性酵素が0～40%画分と35%近く回収されたが,成熟のものではこの分画の活性は低かった。このことは発育の過程で酵素蛋白が変化することを考えさせる。Chiu & Sung[11]は生後発育を追ってラットの大脳,小脳からDNA Polymeraseを抽出しSucrose density Gradientによって変性DNA鋳型と未変性DNA鋳型とを分け詳細な検討をしている。小脳ではYAHAGAHI[12]らのThymidine Kinaseの発育に伴う頂動の報告と一致して生後6日目にピークをもつ変動を示すが,このことは,小脳分子層の細胞増殖が生後継続することと一致するものであろう。一方大脳では,吾々がここに示した成績とほぼ一致しており,大脳では生後の細胞増殖は少なくなりと考える。

[引用文献]

1) Bollum F.J. Fed. Proc. 17, 193, (1958)
2) Harford C.G. & Kornberg A. Fed. Proc. 17, 515, (1958)
3) Wallace P.G., Hewish D.R., Venning H.M. & Burgoyne L.A. Biochem. J. 125, 47, (1971)
4) Iwamura Y., Ono T. & Morris H.P., Cancer Res. 28, 2466, (1968)
5) Chiu J.F. & Sung S.C., Biochim. Biophys. Acta 209, 34, (1970)
6) Sung S.C. Canad. J. Biochem. 47, 417, (1968)
7) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., J. Biol. Chem. 193, 265, (1951)
8) Bollum F.J. in Methods in Enzymology XII B (Ed. by Grosshaul, Moldave K.) P.168 Academic Press (1968)
9) Chiu J.F. & Sung S.C. Biochim. Biophys. Acta 262, 397, (1972)
10) Chiu J.F. & Sung S.C. Biochim. Biophys. Acta 246, 44, (1971)
11) Chiu J.F. & Sung S.C. Biochim. Biophys. Acta. 269, 368, (1972)
12) Yahagahi S., Hori K. & Kawakita Y., J. Neurochem. 19, 369, (1972)

12．発育期ラット脳のチミジンヌクレオチドとDNA代謝に及ぼす甲状線摘除の影響

山上　栄・切池信夫
川北幸男
（阪市大・医・神経精神）

1）出生直後のラッテの甲状腺摘除によって発育期の大脳、脳幹のＤＮＡ量には著しい影響がおよばない。反対に小脳では摘除群の生後14日と21日とで対照群よりも低値を示す。2）^{3}H-*Thymidine* の *In vivo* における大脳、小脳、脳幹のＤＮＡへのとりこみは生後７日で最大値に達する。甲状腺摘除によって大脳と脳幹のＤＮＡ代謝には大きな影響がみよばないが、小脳では、摘除群のＤＮＡへの^{3}Hのとりこみは生後14日と21日で対照群より高値を示し、ピークも生後14日に偏位するのが見受けられた。3）生後14日の小脳においてＤＮＡの^{3}Hの分布は摘除群では対照群より多い。また*Thymidine pool* のTMP，TDP，TTPへの^{3}Hの分布も摘除群では対照群より多かった。一方TDR＋*Thymine*、THOなどへの^{3}Hの分布は対照群の方が多かった。4）発達期の小脳のTDR+*Thymine*、TMP、TDP、TTPの比放射活性も生後14日の摘除群で対照群より高値を示した。これらの結果は、甲状腺摘除によって発育初期の小脳の*Thymidine nucleotide* とＤＮＡの代謝が特異的な影響を受け、それらの代謝が最も活発に行われる時期が正常時にみられる生後７日から生後14日～21日と変ることを示唆するものである。他方、大脳や脳幹のＤＮＡや*Thymidine nucleotide* の代謝は摘除によって著しい影響を受けないようである。

われわれはこれまでに発達期脳の核酸、蛋白質代謝におよぼす甲状腺摘除の影響について検討を加えてきたが[1,2]なかでも全脳のＤＮＡ量には大きな影響がおよばないことを報告してきた。[1,2]しかし脳の発育は同じ時期においても部位により、細胞の種類などによっても可成りの相違があることが広く認められている。[3]甲状腺機能低下症でも組織学的には、とくに小脳の細胞増殖に大きな影響がおよび、プルキニエ細胞などの出現が著しく遅滞するといわれる。[4]生化学的にも摘除ラッテの生後14日目に小脳ＤＮＡ量の一時的な低下が報告されて注目を集めている。[5]これらを考慮すると、甲状腺摘除における発達期の脳ＤＮＡ代謝の変化を局所的に検索することは甲状腺ホルモンの脳の細胞増殖におよぼす作用機構を明らかにする上でも必要と思われる。そこで、われわれは今回脳を局所的に分離し、摘除時におけるＤＮＡ代謝を比較すると共にＤＮＡ代謝に関連する*Thymidine nucleotide* の代謝にも検討を加えたので合わせ報告する。

実験方法

(1)甲状腺摘除ラッテの作製，出生直後に同腹のラッテを２群（10匹以内）に分け、一方の皮下にCarrier freeの^{131}I 100μc（0.01ml）を注射し、甲状腺摘除群とし、他方には等量の生理的食塩水を注射して対照群として用いた。

(2)〔^{3}H〕-Thymidineの注射，出生直後、生後７日目，14日目，21日目，28日目，60日目のラッテ皮下に5μc/g体重の〔^{3}H〕-Thymidine（比放射能 5.0curie/m mole）を注射した。注射後２時間で断頭し、直ちに、脳を大脳、小脳および脳幹（中脳、間脳、延髄などを含む）に分け、実験に供した。

(3)酸可溶性分画の調製，脳の各部位に５倍容の冷0.6N-PCAを加え、ホモジナイズし

た。このホモジネートを10,000 g 15分間遠心して上清を分離し、その後、0.2N-PCAの等容を加えて、沈澱を洗い、生じた上清を先の上清と混和して酸可溶性分画とした。

(4) Thymidine nucleotide の分離，酸可溶性分画からのThymidine nucleotideの分離は、Cohnらの方法[6]をわれわれが多少改変した方法[7]に従った。得られた酸可溶性分画を10N-KOHで中和し、生じた$KClO_4$を遠心によって除去する。さらにこの溶液にアンモニア水を滴下しpH 10.5とする。この混液をDowex-1,（Cl型，200-400メッシュ，$1\,cm^2 \times 12\,cm$）のカラムに通過させた。その後、蒸留水100 mlでカラムを洗い（分画Ⅰ）、さらに0.01M-NH_4ClでThymineとTDR（分画Ⅱ）を、0.003N-HCl（pH 2.5）でTMP（分画Ⅲ）を、0.01N-HCl - 0.05M-NaClでTDP（分画Ⅳ）を、0.01N-HCl - 0.2M-NaClでTTP（分画Ⅴ）、最後に0.1N-HClでその他の吸着物（分画Ⅵ）をそれぞれ各溶媒の100 mlずつを用いて溶出した。各溶出液の5 mlをフラクションコレクターで集め、260 nmにおける吸光度を測定したものが図1である。次に、各分画をプールし、Dowex 50（H^+型 200-300メッシュ，$1.0\,cm^2 \times 3\,cm$）のカラムに通し、脱塩とpurine誘導体を除去した。この溶液をNaOH上で真空ポンプを用いて蒸発させた後、放射能計測を行った。(図1) また一部は、RobertsとFriedkinの方法[8]に従ってThymineおよびTDR誘導体がO-aminobenzaldehydeと特異的に反応して生ずる3-hydroxyquinaldineより発する蛍光を分光蛍光光度計で測定し定量した。他の一部はイソ酪酸；水；アンモニア水；0.1M-EDTA溶液（100：5.8：4.2：1.6，v/v）の溶媒を用いてペーパー・クロマトグラフィーを行い、Rf値と紫外

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；THO，^3Hを含む水，

部の吸収曲線からTDRおよびTDR誘導体の同定を行った。THOの放射能は、分画Ⅰと分画Ⅲとを80°Cのホットプレート上で蒸発させ、その際生じた水を集めて計測した。

(5) RNA、DNAの抽出と定量，RNA、DNAの抽出は、前報[7]で述べた方法に従った。DNAとRNAはSanten-Agranoff[9]法に従い268.5と285 nmと260と280 nmの吸光度でそれぞれ定量した。

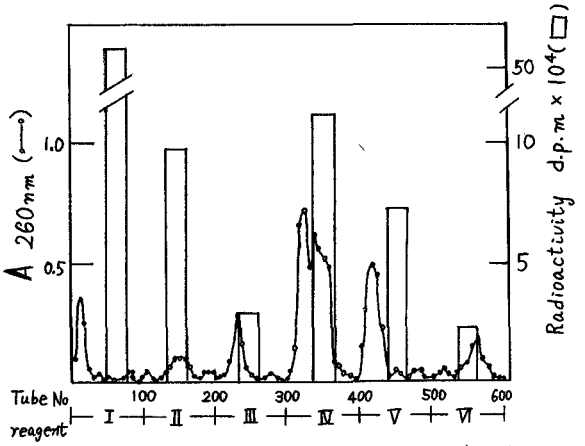


図1 生後7日目のラット大脳から抽出した酸可溶性分画のクロマトグラフィーと放射能の分布，分画Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，Ⅴ，Ⅵの説明は本文の実験方法を参照

結果および考察

1) 体重と脳重の変化，発育期における甲状腺摘除群と同腹対照群の体重と脳重の変化を図2，3に示す。体重の顕著な相違は生後21日以後において認められ、摘除群では生後28日で平行に達する。大脳、小脳、脳幹の重量への甲状腺摘除の影響は生後21日以後において認められ対照群と摘除群との間の差異が拡大することが示された。

2) DNAの量的変化，大脳、小脳、脳幹におけるDNAの量的変化を図4に示す。小脳のDNA量では生後14日と21日において摘除群が対照群よりかなり低値を示し特徴的な変化を認めた。この結果はBalázsら[5]によって報告されたものとも一致している。

他方、大脳と脳幹ではいずれの時期においても両群の間に顕著な差が認められなかった。

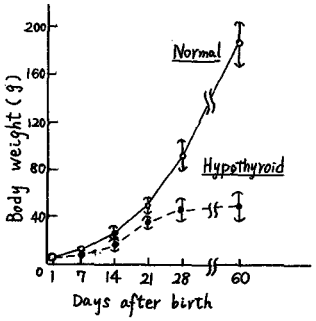


図2. 発育期ラッテの体重におよぼす甲状腺機能低下の影響

3) DNA代謝におよぼす甲状腺摘除の影響, 発育期の大脳、小脳、脳幹のDNAへの〔^{3}H〕-Thymidineのとりこみにおよぼす甲状腺摘除の影響を相対比放射活性（DNAの比放射活性／酸可溶性分画のThymidineプールの比放射活性）の変化として表わした（図5）。大脳と脳幹の比放射活性は 対照、摘除両群で、生後7日目に最大値に達し、以後急速に減少し生後28日では著しい低値を示している。これに対して小脳の活性はどの時期でも大脳、脳幹より高値を示し、約5倍であった。とくに摘除群では生後14日にピークがみられ、この時期に対照群より高値を示したことは注目される。

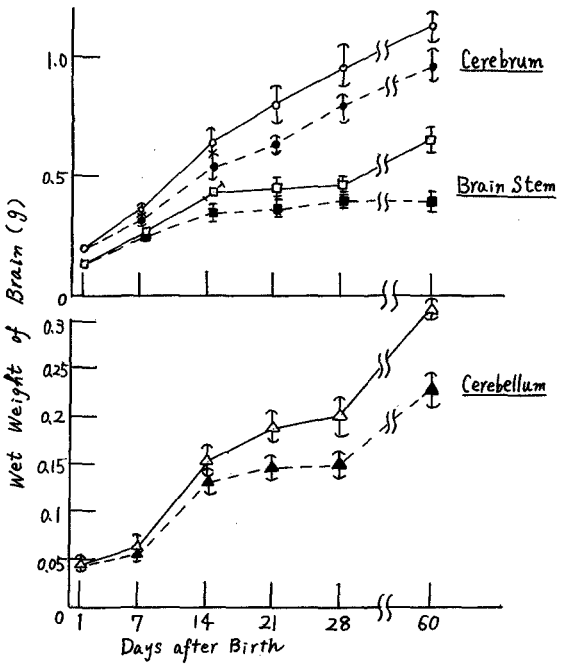


図3 発育期ラッテ脳の各部位の重量におよぼす甲状腺摘除の影響

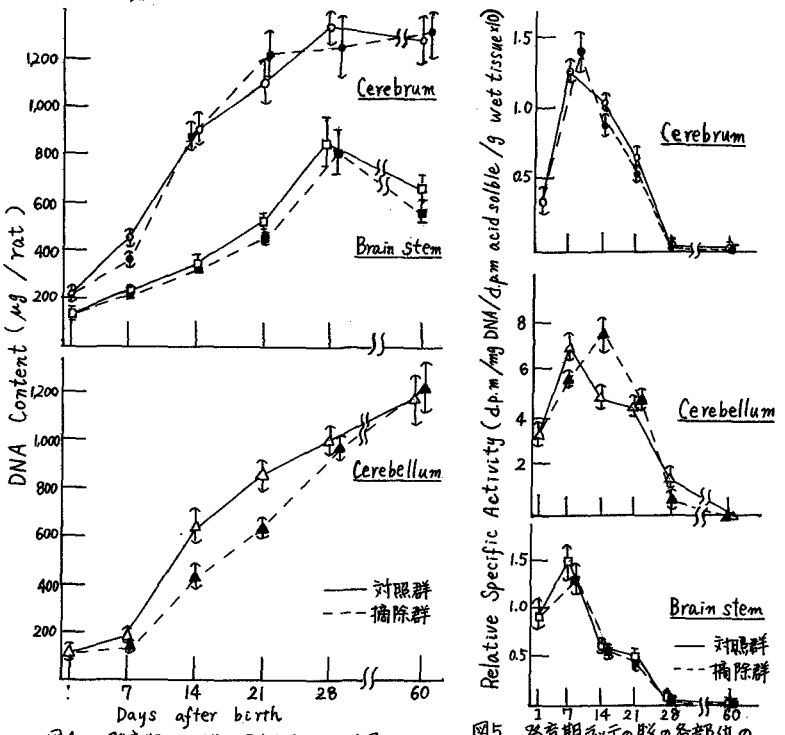


図4. 発育期ラッテ脳の各部位のDNA量におよぼす甲状腺摘除の影響

図5 発育期ラッテの脳の各部位のDNAへの〔^{3}H〕-Thymidineのとりこみにおよぼす甲状腺摘除の影響

4) Thymidine nucleotideの代謝に及ぼす甲状腺摘除の影響, 生後14日の小脳における^{3}H-Thymidineの代謝に及ぼす摘除の影響をくわしく調らべるために、注射後2時間における酸可溶性分画とDNA分画への^{3}Hのとりこみを比較した（表1）。小脳にとりこまれた^{3}Hの約70%が酸可溶性分画に、残

り約25%がDNA分画にとりこまれ、RNAにはほとんどとりこみは認められていない。摘除群のDNAへの放射能の分布は対照群より多く、反対に、酸可溶性分画への放射能の分布は対照群の方に多いことが認められた。(表1a) DNAへの^3Hのとりこみは酸可溶性分画内のThymidineのリン酸化の過程とも関係があると思われるので、酸可溶性分画内のThymidine nucleotideへの^3Hの分布に検討を加えた。(表1b) 生後14日目の小脳において摘除群のTMP、TDP、TTPなどへの^3Hの分布は対照群より多く、逆にTDR+Thymine、THOなどへの^3Hの分布は摘除群より対照群で多いことが認められた。さらに発育期におけるラット小脳のThymidine nucleotideへの^3Hのとりこみの変化を図6に示す。ここでもTDR+Thymine, TMP, TDP, TTPの比放射活性は、生後14日の摘除群で対照群より高値を示し、小脳DNA代謝にみられたパターン(図5)と同じ変化を示している。とくにTDP、TTPでこうした傾向は顕著になっている。図5と表1の結果を考え合わせ、摘除群では対照群に比べて生後14日目にThymidine nucleotideの代謝がはるかに活発であることを示唆するものである。今迄述べた結果から出生直後の甲状腺摘除によって小脳のThymidine nucleotideとDNAの代謝が最も急速に行われる生後7日目に一時的な抑制を受け生後14日～21日まで延長すると考えられる。一方、大脳や脳幹のDNA代謝には著しい影響が及ぼないようであり、甲状腺機能低下症で小脳の細胞増殖が特異的に阻害されるというLegrand[4]の組織学的見解ともよく一致するものである。

表I 生後14日のラット小脳の酸可溶性分画, DNAとRNA分画中の^3Hの分布におよぼす甲状腺摘除の影響

分画	対照群		摘除群	
a)(ホモジネート中の全放射能を100とした場合の各分画の%)				
酸可溶性分画	73.3±1.38		65.3±3.79	
RNA	0.3±0.08		0.3±0.05	
DNA	20.5±1.19		26.6±1.09	
回収率	93.9±2.11		92.1±3.05	
b)(酸可溶性分画中の全放射能を100とした場合の各分画の%)				
(I) THO	58.9	78.6	56.3	68.5
(II) Thymine+TDR	19.7		12.2	
(III) TMP	2.6	7.2	3.6	14.0
(IV) TDP	2.7		4.5	
(V) TTP	1.9		5.9	
(VI) 他の化合物	0.6		0.6	
回収率	86.4		83.1	

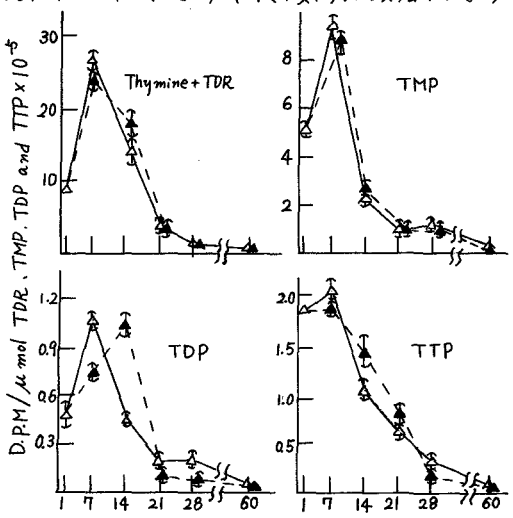


図6 発育期ラット小脳の酸可溶性分画における Thymine+TDR, TMP, TDP, TTPなどの比放射活性におよぼす甲状腺摘除の影響, いずれのラットも[H^3]-Thymidineの注射後2時間で断頭した。

文 献

1) 山上 栄, 森 浩一, 川北幸男; 神経化学 Suppl. 9, 83 (1970)
2) 山上 栄; 神経研究の進歩, 16, 232 (1972)
3) Dobbing J; In Himiwich W.A (Ed.) Developmental Neurobiology. Charles C. Thomas Publisher. Springfield (1970) pp 241
4) Legrand J; Arch. Anat. Microscop. Morph. Exp., 56, 205 (1967)
5) Balázs R., Kovács, S., Teichgräber P., Cocks W.A & Eayrs J.T; J. Neurochem. 15, 1335 (1968)
6) Cohn W.B; In Chargaff E. & Davidson J.N (Ed) The Nucleic Acids, Vol. I (1955) pp. 211.
7) Mori K. Yamagami S. & Kawakita Y; J. Neurochem, 17, 835 (1970)
8) Roberts D & Friedkin M.; J. biol Chem, 233 483 (1958)
9) Santen R.J & Agranoff B.W. Biochim. Biophys. Acta 72, 251 (1963)

13. MAM投与によるラット胎仔脳内Lysosomal Enzymesの変動

松谷 天星丸・塚田 裕三
（脳麻研・生化）
松山 春郎・高屋 豪瑩
（脳麻研・病理）

Cycasinのaglyconである Methylazoxymethanol（MAM）を，妊娠ラットに一回腹腔内注射することによって，その胎仔の終脳の Ventricular Zone の細胞が破壊され，細胞増殖が抑えられ，将来小頭症を来すという事実にもとづき，周産期における侵襲と，脳の発育異常発現機序との関連を追及するために，妊娠ラットへのMAM投与に伴う胎仔脳の変化を生化学的並びに形態学的面から追及した。

1) MAMを妊娠中15日目のラットに一回腹腔内投与した場合，その胎仔の体重変化は対照と差がみられなかったが脳重の増加は著明に抑えられた。 2) 大脳当りのDNA量は投与後8 hrs.より増加は抑えられ，そのまゝ4日間停止し，投与後5日目より再び増加した。MAMの影響は妊娠中15日投与では4日間続くこと，これ以後再び細胞の増殖が行はれることが判った。 3) MAMの侵襲をうけた細胞にはLysosomeの出現がみられLysosomal Enzymeである DNase，β-Glucronidase， Acid—Phosphatase 並びに Alkaline—Phosphatase の活性の増加が48 hrs後に最高値を示し，120 hrs.で対照の値に戻った。この経過は組織化学的所見とほゞ一致した。 4) 侵襲をうけた脳室壁の円柱上皮細胞の崩壊は将来大脳皮質深部の神経細胞の脱落を来すことが光顕的に確められ，このような皮質構築の一部欠損脳でもミエリン形成は生後25日までは正常に進行していることが Lipid 含量及び 2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphohydrolase 活性の面から確められた。

SPATZ & LAQUEUR (1968)[8]らは妊娠ラットにmethylazoxymethanol(MAM)を投与することによって，その仔動物に小頭症が発現することを明らかにした。これは脳の組織発生期の終脳壁の Columnal Epitherial Cell（以下C.E.Cellと略す）の分裂周期の特定Stageにある細胞が破壊され神経細胞の脱落を来すためであることが明らかにされている。なおMAMは投与時期の違いによって発現する病像を異にするがラットの妊娠15日又は16日目に投与した場合，大脳皮質深部の神経細胞の脱落を来すことが考えられている。Virus，X線照射等の侵襲により，脳の先天異常を来すことは知られているが，胎盤を通じてMAMという化学物質が胎仔脳に作用し，小頭症を誘発する事実は，周産期における侵襲により惹起される脳の先天異常の発現機序を追及する上の一つの手段であり，更にMAMによって誘発された大脳皮質の組織構築の欠損が知能発現と各神経細胞層との機能的関連性を探る上に重要な手がかりを与えるものと考えられる。そこで私共はMAMを用いて，ラットの発育脳における終脳壁の C.E. Cell の崩壊に伴うDNA量の変化とその(C.E.Cell)又は神経芽細胞の崩壊時における Lysosomal Enzyme の誘導の状態を生化学的，形態学的面から追及し，対比させ，神経芽細胞又は C.E.Cell 崩壊に伴う脳内変化の一部を把えた。又神経細胞の脱落を来すような発育のゆがめられた脳におけるミエリン形成の異常の有無を検索しましたので報告する。

実験方法 動物は Wister-Imamichi 系白鼠を用い，一夜雌雄を交配させ，翌朝膣栓中に精子を確認したものを妊娠中一日と起算し，妊娠中15日又は16日目に一回 MAM を 20mg/Kg，妊娠動物に投与〔I.P.〕し 注射後図に示す如く，24. 48. 72. 96. 120. 144. 時間目に妊娠動物をネンブタール麻酔の下に開腹し，胎仔を摘出し，その大脳について生化学的並びに形態学的検索を行った。又生後の幼若動物については妊娠ラットを自然分娩せしめ，その仔を生後 5. 10. 16. 20. 25 日目に屠殺し，その大脳半球，脳幹，脊髄

について生化学的測定を行った。以下の図表に示した生化学的結果は第15日目投与の動物について測定を行ったものである。

生化学的測定：

DNAはSchmidt-Thannhauserの変法により抽出を行い，BurtonによりDeoxypentoseを定量した。その定量に当っては610，650 mμのdichromatic reading法に従った。RNAはMejbaum法により，ProteinはLowry法により定量した。

図1 Brain Weight of MAM-treated Rat

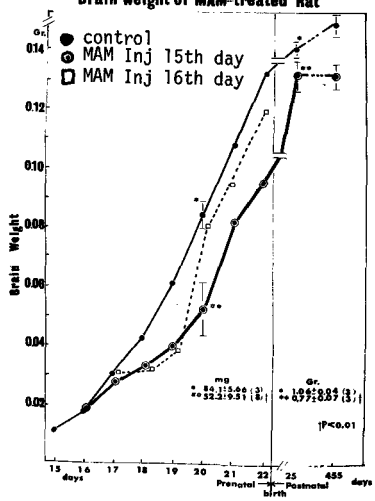
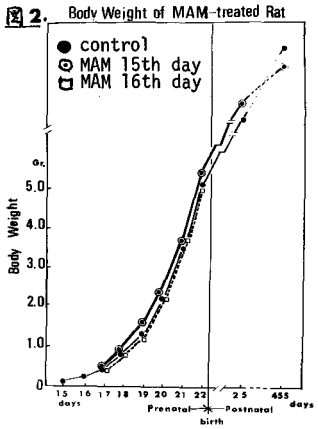


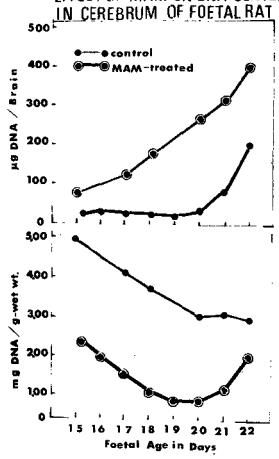
図2. Body Weight of MAM-treated Rat



Acid-Phosphatase (ACP)，Alkaline-Phosphatase (ALP)活性はKing-Armstrongの変法[2]，β-Glucuronidase活性はFishman法[5]，DNase活性は酸可溶性分画に遊離したOligonucleotideをBurton法でDeoxypentoseの定量により測定した。[3,4] Lipidの抽出はFolch-Piの方法により，C:M(2:1)を用い，そのクロロホルム層についてPhospolipid-PはLowry法，CholesterolはZakの方法[9]，CerebrosideはSvennerholmの方法[10]に従い，2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase活性はKurihara & Tsukada[6]の法に従った。

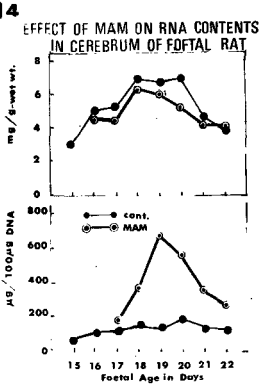
実験結果及び考察　脳重の変化　図1はMAM投与に伴う胎仔の脳重変化である。MAMの第15日目投与では投与後96hrs.まで，第16日目投与では投与後72hrs.まで脳重の増加は抑制され，15日目投与では投与後120hrs.で有意差を示し，何れも胎生19日目からは脳重は再び増加しはじめたが，第15日目より第16日目投与の方が脳重が速かに正常値に近づくのが認められた。このことは，脳室壁のC.E.CellのMAMの傷害をうける分裂周期の特定Stageのものが胎生15～16日にかけて多いことが考えられ，従って，第16日目投与の方が傷害をうけるStageにある細胞が少なかったため脳重の正常化も早いものと考えられた。

図3 EFFECT OF MAM ON DNA CONTENTS IN CEREBRUM OF FOETAL RAT



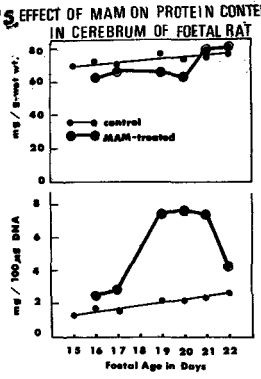
体重変化　第15日又は第16日目投与，何れも対照に比して胎仔の体重は殆んど差がなかった。MAM投与により障害をうける臓器はMAM投与の時期の違いによって異ることが報告されているが，妊娠第15又は第16日目投与の場合は体重については脳重にみられる如き変化は認められず，この時期におけるMAMの他の臓器細胞に及ぼす影響についてはまだ不明の点も多いが，少くとも脳のうける影響とは異ることが考えられた。（図2）

図4 EFFECT OF MAM ON RNA CONTENTS IN CEREBRUM OF FOETAL RAT



DNA量の変化　図3に示す如くラットの発育脳ではDNA量は

細胞質の増大により湿重量当りでは発育に伴って減少して行くのが認められたが，脳全体としてみたとき日々激しい増加をしているのが判る．第15日にMAM投与によりDNA量の増加は著明に抑えられ，投与後4日間はDNA量の増加は停止した。MAMの影響は投与後8hrs.ですでに現れ対照に比して脳当りの量は約½であった。MAMの影響は96hrsまで続き投与後5日目から再び増加がみられた．このことはMAMの傷害をうけるStageの細胞が崩壊し，核の高分子のDNAが速かに変化するものと考えられ，又DNAのグアニンの7の位置がMAMによってメチル化[12]されることとDNA含量の減少との関連も考えなくてはならないであろう．投与後96hrs位たってMAMの影響は消失し，C.E.Cellの再生により，DNA量が増加しはじめるものと考えられた。この成績は松本ら[7]のものとほぼ一致するがDNA量の差異については使用した大脳の部位の差によるかも知れない。このDNA量の増加の停止と増加開始の経過は形態的変化とも一致していた。又16日目投与したものではDNA量の増加の抑制が弱かった。このことは15日と16日目では傷害をうけるStageのC.E.Cellの数が異るものと考えられる．



Protein, RNA量は組織湿重量当りでは何れも96～120hrsでやや減少がみられるのに対し，これをDNA当りで算出すると投与後96hrsまで上昇を示し，以後漸次対照の値に戻った．このDNA当りの高い値を示したことは，細胞崩壊によって測定し得る高分子のDNAがprotein, RNAに比して早く消失するための現象とも考えられるが成熟ラットの肝でみられるMAMによる蛋白合成の抑制，RNAはDNAに比してメチル化される度合が少ないということ[11]も考えられ今後なお追及されねばならない。（図4.5）

酵素の変化　細胞の破壊に伴っておこる脳内変化の一つとしてLysosomal Enzyme（以下L.E.と略）の変化を追及した。L.E.[1]は胎生期の活性についてはまだ明らかにされたものが殆んどみられないが，MAM投与によって侵襲をうけたC.E.Cellではdnase, β-Glucronidase, ACP（図6.7.8.）の誘導がみられ，その活性は投与後48hrsで高い値を示し，120hrs.まで高く，それ以後対照の値に戻ることがみとめられた．16日目投与のものはL.E.の活性上昇を少なく，この差DNA量との成績とも一致しており，C.E.Cellの傷害の度合とL.E.の誘導との間に平行関係が認められ，L.E.が崩壊産物の処理に関与するであろうことが考えられた．これらの生化学的に把えられたL.E.の消長は組織化学所見とも一致するものがあり，L.E.と幼若細胞の崩壊や修復過程との

図6

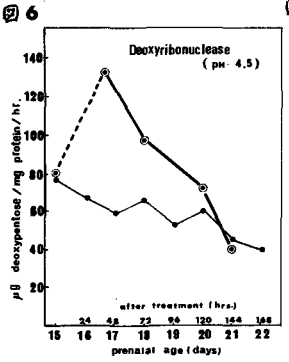


図7

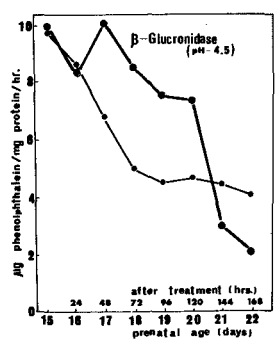


図8

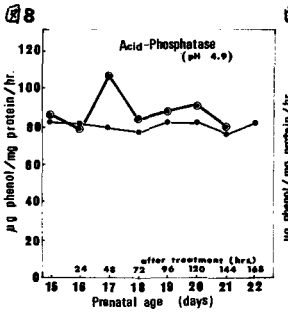
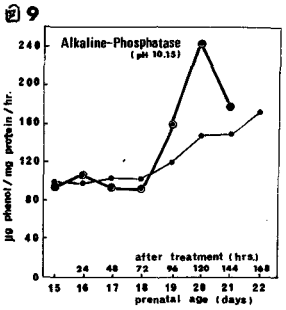


図9



◉ MAM-treated　● Control

関係には興味がもたれる。又MAMによる細胞崩壊期に電顕像で，残存した細胞内に崩壊細胞の破片やミエリン像が認められているが，分画遠心法により細胞内顆粒を分離すると，成熟ラット脳での核分画と同一蔗糖密度中に細胞崩壊産物が回収され，β-glucronidase 活性はこの分画において高値を示し，本顆粒にL.E.が局在することが考えられた。
一方，ALP（図9）の態度はL.E.とはその活性の態度を異にした。対照ではALPは胎生第19日目頃から活性値は上昇しはじめるが他のL.E.の活性が正常値に戻り，組織の上では崩壊した核がみられなくなった120 hrsにおいて始めてその活性の上昇がみられた。このことはALPと他の三つの酵素との役割の差を示唆するものである。

ミエリン形成に及ぼす影響　一方脳室壁のC.E.CellがMAMにより傷害をうけ，将来，小頭症を来す如き歪められた発育脳におけるミエリン形成の状態を検討した。図10に示す如く大脳半球でPhospholipidはやゝ低い値を示した。しかしミエリンの主たる構成リピットであるCerebroside（図11），Cholesterol（図12）については，大脳半球，脳幹，脊髄共に対照に比して差はみられなかった。又ミエリンに局在するミエリンのmaker enzymeと考えられる2',3'-Cyclic Nucleotid 3' Phosphohydrolase 活性（表1）についても殆んど差はみとめられず，ミエリン形成は生後25日までは正常に進行しているものと思われた。大脳半球のPhospholipidの差についてはミエリン以外の膜成分との関連も考えられ，今後検討する必要が考えられる。又皮質構築の上で第5層の細胞の脱落していることが光顕的に確められており，このこととPhospholipidの低値を示したこととの関係，及び学習能力との関連は今後検討されねばならない。（組織化学所見及び電顕像は当日供覧する。）

表1　2',3'-CYCLIC NUCLEOTIDE 3' PHOSPHOHYDROLASE ACTIVITY IN YOUNG RAT BRAIN

Day after Birth	Cerebral hemisphere		Brain Stem		Spinal cord	
	control	MAM-treated	control	MAM-treated	control	MAM-treated
9	0.22	0.11	0.19	0.18	1.13	1.29
16	0.91	0.88	1.12	1.35	2.93	3.29
20	2.22	2.49	---	---	4.24	4.06
25	2.34	2.71	5.69	5.59	5.24	5.61

Activity: U/mg protein

図10
PHOSPHOLIPID CONTENT OF YOUNG RAT

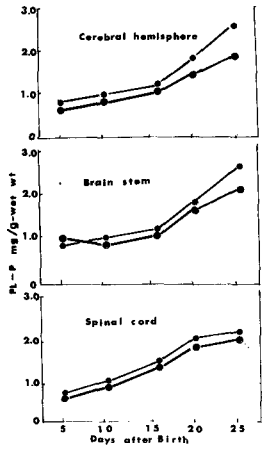


図11 CEREBROSIDE CONTENT OF YOUNG RAT

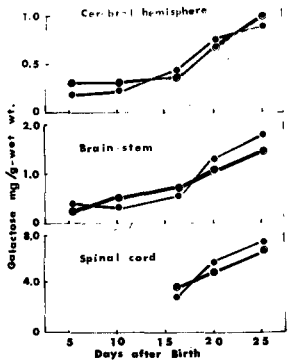
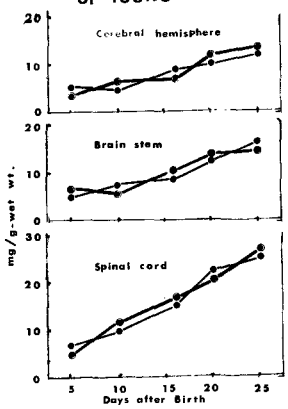


図12 CHOLESTEROL CONTENT OF YOUNG RAT



終りに，生化学定量に協力して下さった岡田澄子，羽田由紀子研究所員に感謝します。

1) Anderson P.J. and Song S.K. (1962) J.Neuropathol.Expl.Neurol. 21, 283　2) Armstrong E.J. King R.I. Harris (1934) Can.Med.Assoc.J. 31, 376　3) Brody S. (1953) Acta Chem.Scand., 7, 721
4) In Procedures in Nucleic acid research (Ed.by G.L. Cantoni & David R. Davies) p.101, Haper & Publishers　5) Fishman W.H., Springer B., Brunetti R. (1948) J.Biol.Chem. 173, 449
6) Kurihara T. and Tsukada Y. (1967) J.Neurochem. 14, 1167　7) Matsumoto H. Spatz M. and Laqueur G.L. (1972) J.Neurochem., 297　8) Spatz M. and Laqueur G.L. (1968) Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 129, 705　9) Zak B. (1957) Am.J.Clin.Path. 27, 583　10) Svennerholm L. (1963) J.Neurochem., 10, 613
11) Shank R C. and Magee P.N. (1967) B.J. 105, 531
12) Nagata Y, and Matsumoto H. (1969) Proc.Soc.exp.Biol.Med 132, 383

14. 分離ニューロンおよびグリア細胞群の発育段階における生化学的研究

永田　豊・御子柴克彦
塚田裕三
（慶大・医・生理）

脳はその活動の主役を演ずるニューロンとその周囲のグリア細胞とが複雑に混在する不均一な組織である。従って脳機能と密接に関連した代謝系の追求には両種の細胞を分離摘出して夫々の生化学的特徴を明らかにすることは脳活動発現の物質的基盤を探る上で重要な課題と考えられる。既に我々は前報[1]の如く新鮮白鼠脳を細切し、細胞沪過と密度勾配遠心法によってニューロン細胞体とグリア細胞分画を分離する方法を開発した。このようにして得られた細胞群は細胞分離の経過中大部分のニューロン突起や細胞膜の破損は避けられず、これら細胞群を用いての実験結果の解釈には充分慎重であらねばならない。

今回は分離ニューロンおよびグリア細胞群について、D-アミノ酸の能動的蓄積とtransport enzymeとしてのNa,K-ATPase活性について検討を加え、グリア細胞分画に高い活性を示すことからイオンやアミノ酸の能動輸送系についてグリアは単なる支持組織に止らず、活発な役割を果していることが示唆された。また、ニ三の酵素活性について動物の出生後、種々の段階でニューロンとグリア分画について検討し神経系の機能の発達と関連して考察した。Na,K-ATPase活性はニューロンでは出生直後より高い活性を示したが、グリア分画は10-20日目頃著しい活性の増加を示した。ブドウ糖代謝によるエネルギー生産系で重要な位置を占める乳酸脱水素酵素は出生後次第に活性が増大するがAcetylcholine Esterase活性は生後15日目にニューロン細胞体およびグリア細胞群で活性の極大を示した。

既に前報[1]に於て報告した如く細胞沪過によって脳細胞群をほぐし密度勾配遠心法によってニューロン細胞体およびグリア細胞群を分離するというRose[2] Hamburger[3]らの方法を改良して細胞分離をおこなった。今回は、生後種々の発育段階に於ける白鼠脳よりニューロン細胞体およびグリア細胞群を分離し、両細胞群についてNa,K-ATPase, 乳酸脱水素酵素(LDH), アセチルコリンエステラーゼ(AchE)等について比較検討をおこなった。

[実験材料および実験方法]

Wistar系の確定性哺白鼠より生れた同腹の生後3日目,10日目,15日目,20日目,30日目,白鼠および成熟鼠をエーテル麻酔下に生食水で脳を灌流脱血した新鮮脳をカミソリの刃で細切し、冷10% Ficoll(100mM KCl, 10mM Ⓟ, pH 7.4 含有)に浮遊させガラス・シリンジの底部に装着したナイロン網(20日以前の幼若脳については193μ, 55μ, 55μの3回; 30日および成熟脳については430μ, 193μ, 106μ, 55μの4回ナイロン網を通過させる)を細胞沪過装置を用いて順次ゆっくり低温下に沪過をおこなった。これに30% Ficollを等量加えて20%浮遊液とし、30%

Table 1

PREPARATION OF NEURONAL AND GLIAL CELL FRACTIONS FROM RAT BRAIN CORTEX

Whole cerebrum	10.80 g-wet weight z(10 rats)	
Cerebral cortex removed	4.55 g-wet weight	100 %
Cell suspension filtered through nylon meshes	2.78 g-wet weight	61.1 %

Distribution of protein content in each fractions after density gradient centrifugations.

A (undisrupted cells, myelin etc.)	207.32 mg-protein	81.19 %
B (myelin, glial cells)	25.98 mg-protein	10.93 %
C (glial cells)	0.41 mg-protein	0.17 %
D (neuronal cells)	0.60 mg-protein	0.60 %
E (disrupted neuronal cells)	2.10 mg-protein	0.88 %
F (nucelar)	0.54 mg-protein	0.23 %

Table 2 CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY IN ISOLATED NEURONAL & GLIAL FRACTIONS

Experiments No.	C (glial)	D (Neuronal)	G (orig. cell susp.)
1	4.51×10^{-5}	2.12×10^{-5}	
2	10.20 "	1.47 "	5.54×10^{-5}
3	16.35 "	0.78 "	-
4	6.12 "	1.17 "	
5	4.92 "	2.35 "	
Average	8.42×10^{-5}	1.57×10^{-5}	5.54×10^{-5}

Dilution of blood comparable with reaction velocity at pH 8.0 of the samples on the same protein basis.

Ficoll液に1M蔗糖液で連続密度勾配を作ったセルロースチューブに重ね、更に15%および10% Ficoll液を重層して、SW-25ロータで20,000rpm/40分遠心を行った。遠心後、細胞群は4つの層に分れるが、15-20% Ficoll中間層にほぼ純粋のグリア細胞群が、30% Ficoll層の上1/3部分にニューロン細胞体を多く含む層が得られた。形態学的検索によって幼若白鼠脳より得られた細胞群は成熟脳のそれよりも、稍、突起が少い傾向がみられるが、殆んど類似の形態が観察された。これら細胞沪過と密度勾配遠心法によるニューロン細胞体およびグリア細胞群の分離は特にニューロンの大部分の細胞突起はちぎれて細胞膜が傷ついた状態であることは、細胞分離の過程で或程度止むを得ないが、その回収率は表1の通りである。グリア細胞層は形態的にも、ほぼ一様な細胞突起を含む小細胞群より成り、炭酸脱水酵素活性の測定結果よりみても、グリア細胞の特性をもつものと推定される(表2)。しかし、ニューロン分画の細胞破損は操作上避けられない。炭酸脱水酵素は、RadiometerによるpH変動を測定するWilbur & Anderson④法により、Na,K-ATPaseは、Gibbs⑤法により、37°C 15分間反応後、遊離無機燐量をMartin-Doty⑥法により測定した。乳酸脱水素酵素活性(LDH)の測定はKornberg ら⑦の方法、そのIsozymeの分離測定は小川⑧法により、アセチルコリンエステラーゼ(Ach E)活性の測定は、Ellman ら⑨の方法を用いて行った。

Fig.1 D-Glutamate Accumulation in Isolated Brain Cell Fractions (Adult rat, aerobic incubation for 30 min.)

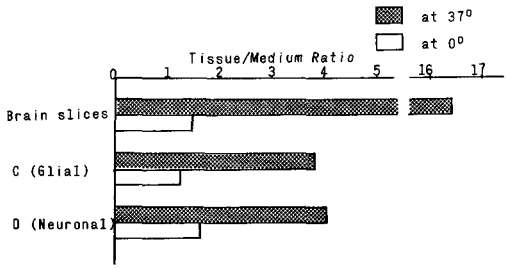


Table 3 Mg & Na,K-ATPase Activity in Isolated Cell Fractions from Rat Brain (m mol./g-prot./hr.)

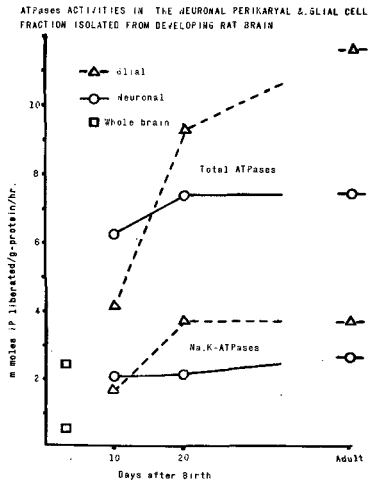
Fractions	Mg-ATPase	Na,K-ATPase
C (Glial)	7.94 ± 1.00 (3)	3.70 ± 0.48 (3)
D (Neuronal)	4.76 ± 0.32 (6)	2.67 ± 0.20 (6)
Whole Brain	6.10 ± 0.02 (3)	6.54 ± 0.57 (3)
Cerebral cortex	9.08 ± 0.31 (4)	9.11 ± 1.01 (4)
white matter	4.17 ± 0.02 (3)	1.76 ± 0.32 (3)

Mean ± S.E.M.

[実験結果および考察]

分離したニューロン細胞体群と、グリア細胞群をnormal Krebs-Ringer-phosphate, pH 7.4で、1回洗浄後、細胞内に蓄積したのち代謝されにくいD-glutamate 5mMを含む溶液中で、0.1%ブドウ糖基質存在下、37°Cで好気的条件で30分間incubationをおこなった(図1)。脳皮質切片に比べるとD-glutamateの取り込みは、分離細胞群では、大分低いが、低温下では殆んど取り込みはみられない。このことから、この取り込みは、エネルギーを使用する能動的過程であることが理解される。また各発育段階でのニューロンとグリアのアミノ酸取り込みには著明な差が認められなかった。このようなアミノ酸の能動的蓄積のおこなわれている条件では、Kイオンが選択的に取り込まれており⑩細胞内では、K-glutamateとしてelectroneutralityが保たれているものと考えられる。　膜のtransport enzymeとしてのNa,K依存ATPase活性について調べた結果では、脳組織に高い活性が認められるが、殊に、グリア細胞群にニューロンよりも高い活性を示し、脳組織に於けるイオンやアミノ酸等の能動輸送系にグリア細胞群が、重要な働きをして

Figure 2



いることが推論される(表3)。白鼠の生後発育段階に従って両種細胞群のATPase活性を比較してみると、酵素全体の活性は、生後日数と共に増加し、30日以後、ほぼ一定のレベルに達する。ニューロンでは、生後早期より、高い活性を示すが、グリア細胞分画では、生後10日頃より、20日頃にかけて、急激な活性の増加が認められることはMyelinationや神経機能の発現と関連して注目に値する(図2)。

一方ブドウ糖基質の好気的分解によるエネルギー生産系の上で重要な位置を占める乳酸脱水素酵素(LDH)活性を発育段階に従って比較した。生後30日目頃迄、徐々にその活性は増加するが、ニューロンの方がグリア細胞群より明らかに高い活性を示したが成熟動物に於ては、両種細胞間に殆んど差は認められなくなった(図3)。LDHアイソザイム・パタンについて検討すると、生後間もない時期にはLDH-4の活性が高いが、次第に低下し成熟時になると低い活性となる。一方LDH-1活性は生下時は極めて低く、嫌気的解糖系から好気的エネルギー生産系への移行にともなってアイソザイムパタンが変化することを認めた。又生後15日目頃からは、LDH-4は低下し始め、LDH-1は活性上昇が認められた。これらの成績は三浦らの結果とも一致する[11]。既にmicrodissection法によるニューロンのみのLDH isozyme活性の成績はあるが[12]、我々は、グリア細胞群でもニューロンと同様の結果を得た。又我々の成績では、LDH-4とLDH-1

Figure 3 Developmental Changes of LDH Activity in Neuronal & Glial Cell Fractions from Rat Brain

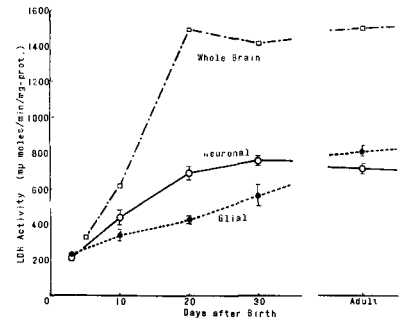
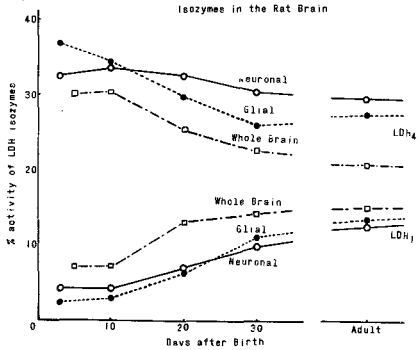
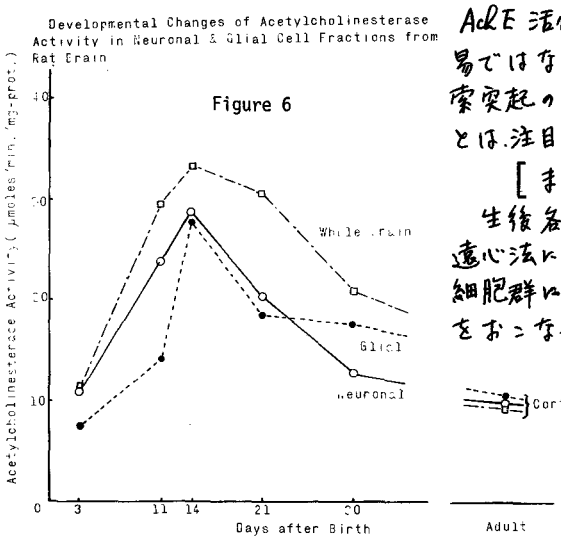


Figure 4 Developmental Changes of Percent Activity of LDH Isozymes in the Rat Brain



との発育的変動は、ニューロンおよびグリア細胞群で著しい差異を認めなかった(図4)。シナプス伝達物質として脳活動に重要な影響をもっていると考えられるアセチルコリン(Ach)および、その分解酵素Acetylcholine esterase(AchE)は、神経末端に局在する酵素としてよく知られている[13]。Ach-E分布を発育段階に従ってしらべると、生後15日目位にその最高酵素活性が認められた。これは、Metzler, Hummらの成績と一致する[14]。この酵素活性はニューロン分画には、発育初期には、グリア分画より活性上昇が著しいが、以後グリア細胞群との間に著明な差異は認められなくなる(図5)。このことは、細胞分離過程でのニューロンの細胞破壊が激しいことから考えても、大部分のニューロン分画のAchE漏出が考えられる。この点、microdissectionによる脊髄前角ニューロンでは神経細胞体にのみ真性コリンエステラーゼの活性が高いのに反して、グリア細胞では、全く存在しないというLowryらの成績[15]とも相違する。しかし我々の成績では、グリア分画に於て、ニューロンに匹敵する程の高いAchE活性が示されることから、小型ニューロン分画のcontaminationが考えられる一方、グリア分画にも



AchE 活性が認められ得るのか、この点の解明は容易ではない。何れにしても、AchE 活性の増加は軸索突起の伸長、ミエリン形成期と一致して高まることは注目に値する。

[まとめ]

生後各発育期の白鼠脳より細胞沪過と密度勾配遠心法によって分離したニューロン細胞体とグリア細胞群について2.3の酵素活性について比較検討をおこなった。Na, K-ATPase は、ニューロンよりも、むしろグリア細胞群に高い活性を示し、物質の能動輸送系に大きな働きをしていることが推定された。また、乳酸脱水素酵素およびアセチルコリンエステラーゼも発育過程に従ってニューロン細胞体もグリア細胞群もともに高い活性を示した。以上の結果から、発育過程に於てもニューロンのみならずグリア細胞群も脳機能発現に伴って活発な代謝を示していることが推定された。

[文 献]

1) 永田 御子柴 塚田(1970) 神経化学 9, Suppl. 122

2) Rose, S.P.R. (1967) Biochem. J. 102, 33

3) Blomstrand, C. & Hamburger, A. (1969) J. Neurochem. 16, 1401

4) Wilbur, K.M. & Anderson, N.G. (1948) J.B.C. 176, 147

5) Gibbs, R., Roddy, P.M. and Titus, E. (1965) J.B.C. 240, 2181

6) Martin, J.B. & Doty, D.M. (1949) Anal. Chem. 21, 945

7) Kornberg, A. (1955) In "Methods in Enzymology" 1, 441, Academic Press,Ed. Colowich, S.P. & Kaplan,N.O.

8) 小川 (1965)代謝 2, 91

9) Ellman, G.L., Courtney,K.D., Andres, U. and Featherstone, R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88

10) Tsukada, Y., Nagata, Y., Hirano, S., and Matsutani, T. (1967) J. Neurochem. 13, 1421

11) Miura, S. (1966) Folia Psychiat. Neurolog. 20, 337

12) Hazama, H. and Uchimura, H. (1970) Brain Res. 28, 288

13) Whittaker, V.P. (1968) In "Structure and Function of Inhibitory Neuronal Mechanisms" Ed. Von Euler, C., Skoglund, S. & Sodenberg, U. 487 Pergamon Press, Oxford

14) Metzler, C.J. & Humm, D.G. Science 113, 382 (1951)

15) Lowry, O.H. (1962) In "The Chemistry of the Individual Neuron", Bulletin of the New York Acad. Sci. Med., See Ser. 38, 788

15. 脳のAcetylcholinesterase Isozymeについて

小林清史・森　昭胤
高坂睦年
（岡大・医・脳研・病生化）

(1) Disc電気泳動法により，脳のAChE isozymeを分離・検出した。
(2) AChE活性の測定は，私どもの考案した^{14}C-acetylcholineを用いる方法によった。
(3) 諸動物脳のAChEは，2～3の泳動帯として検出されたが，その数および泳動パターンには種属による明らかな差異が認められた。
(4) これらの泳動帯はいずれもbutyrylthiocholineを基質として用いたときには検出されず，AChE isozymeであることが確認された。
(5) 各泳動帯は，10^{-4}M eserineやDFPにより完全に阻害され検出されなかった。10^{-3}M strychnineでは阻害効果がみられたが，10^{-3}M pentylenetetrazolやbemegrideでは変化がみられなかった。
(6) Elマウスでは，成熟にともなってAChE活性の増大がみられ，isozymeパターンにも著しい変化が認められた。この変化はElマウスの痙攣発現との関連性を示唆する興味ある所見と考えられた。
(7) Elマウスの泳動帯I-IIとIIIの至適pHは，それぞれpH 7.8とpH 8.0であり，またMichaelis定数は，それぞれ3.3×10^{-5}M，1.3×10^{-5}Mであった。

1959年にMarkertら(5)が，同じ基質特異性をもちながら異なる分子構造を有する酵素をisozymeと呼ぶことを提唱して以来，多くの酵素でisozymeが発見されている。そのなかには，例えばLDHやCPKのごとく，その臓器特異性を利用して臨床診断に応用されているものや，遺伝生化学的にかなり明らかにされた血清ChE (7)などもある。一方，脳のacetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7)のisozymeについても，かなり多くの研究がみられるが，その生理・生化学的意義はほとんど解明されていない。中枢神経系におけるもっとも有力な刺激伝達物質候補であるacetylcholineの機能を明らかにしていく一手段としてAChE isozymeの研究が果たす役割もまた大きいものと考える。

実験方法

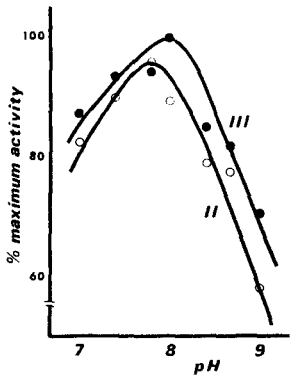
実験材料はカエル，ヘビ，ニワトリ胎児，マウス，ネコおよびヒトの脳であるが，主としてElマウス脳を用いた。各動物脳は断頭後ただちに頭蓋からとり出して小脳を含む全脳を使用し，ヒト脳は手術時にえられた脳腫瘍患者脳のうち，正常組織と思われる前頭葉皮質をただちに凍結後使用した。それぞれの脳に0.1% Triton-X 100溶液を加えて20% homogenateを作り，12,000g，15分間冷凍遠沈してえられた上清を泳動に用いた。電気泳動はDavis (1)により考案されたpolyacrylamideを支持体とするDisc電気泳動法により行なった。AChEの検出にはacetylthiocholineを基質とし，INT [2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride] を発色剤として用いるUriel (8)の方法を用いた。さらに，泳動後の各泳動帯のAChE活性測定は，私どもの考案した方法によった（第1表）。なお，実験方法の詳細は前報(3)に報告した。

実験成績

同一条件で泳動，検出した各動物およびヒト脳のAChE isozymeを第1図に示した。動物脳のAChEは2～3本の泳動帯として検出されたが，その易動度および相互の活性の強さには差異がみられた。ニワトリ胎児（18日目）では極めて境界鮮明な3本の泳動帯が検出されたが，他の動物では泳動帯の幅が広く，相互の境界もやや不鮮明であった。ヒト脳（脳腫瘍剔出のさいえられた皮質前頭葉組織）では非特異性esteraseは少くとも11本の泳動帯として検出しうるにもかかわらず，本実験で用いた検出法によってはAChEを検出することができなかった。

Elマウス脳では，3本の泳動帯が分離・検出された。このうち，易動度の大きい2つの泳動帯は極めて接近していて分離が不十分であるため，以下の実験では両者を1つとして処理した。これらの泳動帯はいずれもbutyrylthiocholine iodideを基質として用いたときには検出されなかった。

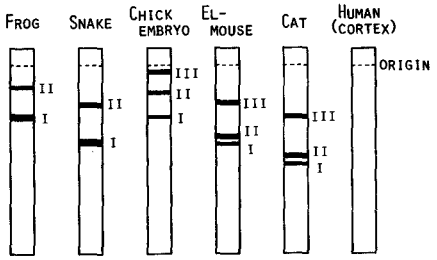
つぎに，acetyl-1-^{14}C choline iodideを用いて第1表に示した方法により，Elマウス脳のAChE各泳動帯の至適pHとMichaelis定数を求めた。至適pH曲線は第2図に示すごとくであり，至適pHは泳動帯I-IIで7.8，泳動帯IIIで8.0であった。



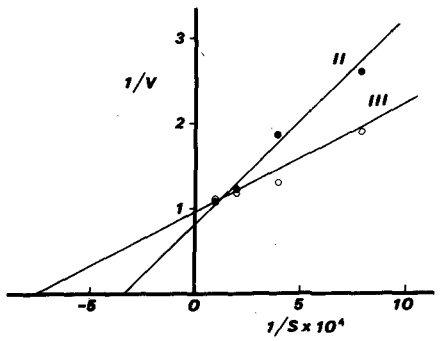
第2図　至適pH曲線（Elマウス）

第1表　AChE活性測定法

1) REACTION MIXTURE IN A VIAL
   0.1 ML OF ENZYME SOLUTION
   0.1 ML OF PHOSPHATE BUFFER
   0.1 ML(0.07μC) OF ^{14}C-ACETYLCHOLINE IODIDE (S.A.: 9μC/MG)
2) INCUBATION: 37°C, 1 HOUR
3) STOPPED THE REACTION BY 0.1 ML OF 4N-HCL
4) DRIED IN VACUUM ON H_2SO_4 DESICCATOR
5) ADDED 0.2 ML OF 3N-METHANOLIC KOH
6) ADDED 10 ML OF SCINTILLATOR
   POP 8 G, POPOP 110 MG, BUTYL CELLOSOLVE 150 MG,
   TOLUENE 850 MG
7) RADIOMETRY BY SCINTILLATION COUNTOR



第1図　諸動物脳AChE isozyme pattern



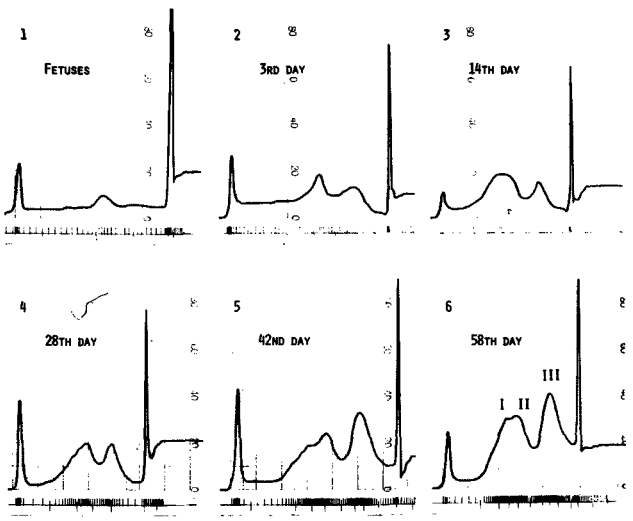
第3図　Michaelis定数（Elマウス）

Michaelis定数をLineweaver-Burk式により求めたものが第3図である。すなわち，泳動帯I-IIでは3.3×10^{-5}M，泳動帯IIIでは1.3×10^{-5}Mであった。

ついで，抗AChE剤を含む諸薬物のAChE isozymeにおよぼす影響をみた。10^{-4}M eserineや10^{-4}M DFPを加えるとAChEは完全に阻害され検出されない。両薬物の濃度により，isozymeのどれかが特異的に阻害されるということはなか

った。10^{-4}M SCCや GABOB-cholineによってはまったく変化がみられなかった。一方，痙攣剤であるpentylenetetrazolやbemegrideによっても影響がみられなかったが，10^{-3}M strychnineを加えるとAChE isozymeは全体に阻害されたが，その程度は泳動帯Ⅲでもっとも強いようである。

Elマウスの成熟各段階におけるAChE isozymeのパターンを比較したものを第4図に示した。胎児脳では活性が極めて弱く，泳動帯Ⅱのみが検出される。その後，活性は次第に増大して他の泳動帯も出現するが，生後4週頃まではいずれもⅡの活性がもっとも強い。しかし，生後6～7週頃にはこの関係は逆転して，泳動帯Ⅲが明らかに優勢となる。一方，Elマウスのうち体位変換刺激により痙攣を起こす群と起こさない群とを比較すると，前者では泳動帯Ⅲが優勢であったが，後者ではⅡとⅢが均等あるいはⅡが優勢であった。さらに，痙攣発作中の脳では対照に比して泳動帯Ⅲの活性が強く検出された。



第4図 Elマウス成熟段階によるAChE isozyme pattern

考　　按

電気泳動法により脳のAChEが2～4の泳動帯として分離・検出できることは，これまでにも報告されてきた。これがisozymeであるかどうかについては議論のあるところであったが，最近Igbarら(2)がneuraminidase処理を行なっても泳動パターンには変化がみられないことを報告し，これは酵素蛋白それ自体の構造の相異によることを示唆したことにより，問題はかなり解決されたといえよう。しかしながら，AChE isozymeの生理・生化学的意義に関しては現在までほとんど何もわかっていない。ニワトリ胎児の脳で，9日目頃に新しい泳動帯が出現することを脳の電気活動と関連づけて説明しようとしたIgbarらの論文がこの点に論及した唯一のものではないかと思われる。私どものElマウスを用いた実験から，成熟段階によるAChE isozymeパターンの変化が明らかにされたが，とくに生後6～7週における泳動帯Ⅲの変化が目立っており，これはElマウスが刺激により痙攣を起こしはじめる時期に一致している。さらに，痙攣群と非痙攣群，発作間歇期のものと発作中のものとの間にみられる差異が，やはり泳動帯Ⅲにおいて明らかであることは興味深い。てんかん発作とACh代謝との関係については多くの研究がみられるが，AChEに関しては成瀬ら(6)がChE活性がElマウス生後第6週から対照より10%以上高くなることや，痙攣回数と活性との間に逆の相関関係があることを報告していること以外には余り多くの研究はされていない。AChE

isozyme 間の代謝的差異を追究する一指標として痙攣との関連を研究中である。

AChE に対する阻害効果に関する実験で興味深いのは strychnine によるものである。この薬物の作用部位は脊髄 Renshaw 細胞と運動ニウロン間の抑制性シナプスであり，この部の伝達を抑制することが明らかにされている。同様のことが他の中枢神経系においても行なわれていると想像されているが，本実験の結果からすると strychnine が AChE の活性を阻害することによって，脳における刺激伝達系に関与していることが考えられ，抑制性シナプスの抑制だけでなく，別の作用機序も推定されよう。同じく痙攣剤である pentylenetetrazol については，Mahon ら (4) が脳の AChE 活性を阻害し，これが本剤の痙攣作用と関連していることを示唆したが，本実験では本剤や bemegride によっては AChE isozyme に変化を見出しえなかった。

なお，本研究で得られた泳動帯は，いずれも eserine や DFP により完全に阻害され，基質として butyrylthiocholine を用いた場合にはまったく検出されえないことから，AChE isozyme であることが確認された。各 isozyme 間には，至適 pH や Michaelis 定数に若干の差異が認められた。

文　献

1) Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964)
2) Iqbar, Z. and Talwar, G.P., J. Neurochem., 18, 1261 (1971)
3) 小林清史・森昭胤・高坂睦年，条件反射，112，52 (1972)
4) Mahon, P.J., Brink, J.J., J. Neurochem., 17, 949 (1970)
5) Markert, C.L. and Møller, F., Proc. Natl. Acad. Sci., 45, 753 (1959)
6) 成瀬浩・黒川正則・秋元波留夫，脳神経，14，463 (1962)
7) 荻田善一，生物物理化学，16，269 (1972)
8) Uriel, J., Ann. Inst. Pasteur., 101, 104 (1961)

16. 培養神経組織でのミエリン形成と2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′-Phosphohydrolase (CNP)活性

塚田裕三・渋谷万里子
(慶大・医・生理)
小川恵弘
(脳麻研・病理)

CNPが中枢神経系のミエリンに局在して存在していることについては，既に多くの報告がある。本報では，生後0日のマウス小脳の組織培養により，ミエリン形成を形態学的に観察しながら，同時に培養組織についてCNP活性を経時的に測定してみると，形態学的に観察されるミエリン形成量に比例して培養20日目まで酵素活性が上昇しその後40日目までほぼ一定の値を維持した。この酵素活性の上昇は *in vivo* における小脳発育の成績と極めてよく一致した。また，EAE血清やMS患者血清を20日目の培養細胞に添加すると形態学的に脱髄が認められることはよく知られているが，この時CNP活性を測定してみると著しく低下していることを見い出した。そこで *in vitro* でEAE血清やMS血清のCNP活性に及ぼす影響を検討したが，特記すべき変化を認めることは出来なかった。従って上記血清が培養組織で脱髄やCNP活性の低下を来たすのは，髄鞘に直接作用することによるためではなく，ミエリン形成細胞（オリゴデンドログリヤ）に作用し，二次的に脱髄を来たすものと考えられた。
（2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′Phosphohydrolase をCNPと略称する）

〔まえがき〕

2′,3′-Cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase (CNP) は，中枢神経系のミエリンに局在することは既によく知られている。(1)(2) また，脳の髄鞘形成に伴ってCNP活性が上昇することも既に報告されている。(3)(4)(5) 私共は新生仔マウス小脳の培養組織につき，ミエリン形成を形態学的に観察しながら同時にCNP活性の変化を測定した。その結果，*in vivo* における脳の発育の変化と極めて類似の結果を得たので報告する。また，EAE血清やMS患者血清を培養組織に添加すると急速に脱髄がおこることが知られており(6)，その時のCNP活性の変化をも追求した。

〔実験方法〕

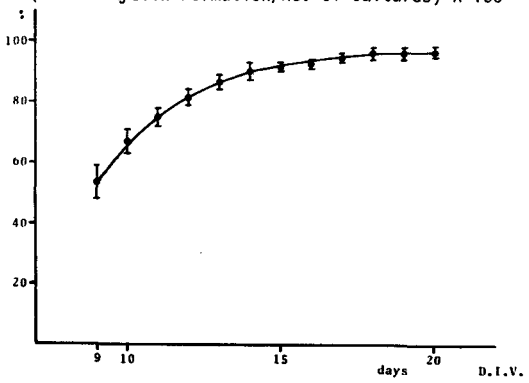
1. 組織培養の条件

生後0日のマウスの小脳を無菌的に摘出し，12個に矢状断しコラーゲン膜をはったカバーグラスの上に2個づつ植えつけ，Maximow's double cover slip method に従って培養した(7)。培養液の組成は，Gey氏塩類溶液 (Gey's B.S.S.) 25%，牛血清限外沪液25%，馬血清25%，鶏胚抽出液25%をそれぞれ等量加え，グルコースを最終濃度 600mg% になるように添加した。PHは7.2~7.4，培養温度は35.5°Cに調節した。培養液の交換は3日毎に行なった。

2. CNP活性の測定

カバーグラス5枚分の培養細胞をミクロホモジナイザー中で，水0.5mlを加えホモジネートし，この0.1 mlを酵素液とした。Kurihara & Tsukada の方法に従い(1) 0.2M Na_2HPO_4

Fig-1
Rate of normal Myelination in cultured Cerebellum of new born Mice
(No. of Myelin Formation/No. of Cultures) X 100



0.1 M Citric acide Buffer (pH=6.2), 0.5% Triton X-100, 酵素液, 0.03 M 2',3'-Cyclic adenosine phosphate のカリウム塩の各々0.1 mlづつ加え, 37°C 20分間反応させた後, 氷酢酸0.04 mlを加え反応を止めた。この0.05 ml溶液を東洋沪紙No.51-Aにスポットし, 飽和硫安：0.5M酢酸ナトリウム：イソプロピルアルコール=80：18：2で展開した。展開後, 2'-AMPをU.V.でチェックして切り抜き, 0.01 NHClで抽出後260mμの吸光度から反応生成物を定量した。蛋白の定量は, Lowryらの方法に従った。反応液に血清を加えた場合は, 反応停止後absolute Ethanol 1.5 mlを加えて除蛋白後, 上清に水飽和クロロホルム3 mlを加えて水層を分離しこれを沪紙上にスポットした。

Fig-2
2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase Activities of Mouse Cerebellum

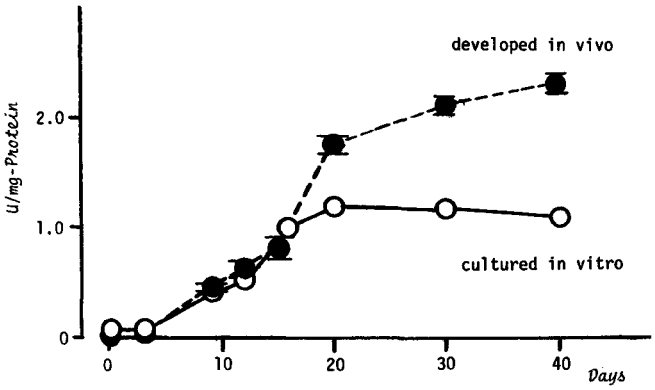
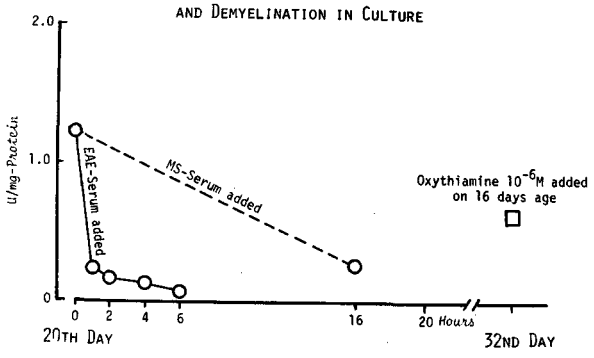


Fig-3
2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase Activity and Demyelination in Culture



〔結果及び考按〕

・培養組織でのミエリン形成

マウス小脳でのミエリン形成を形態学的に観察すると図-1のごとく培養20日目には全ての神経線維にミエリン形成が認められる。更に培養を続けると40日目までは, その状態を維持させることが出来る。

・マウス小脳培養でのCNP活性

マウス小脳組織培養 0, 3, 9, 12, 20, 30, 40日目のCNP活性及びそれに対応するin vivoでのCNP活性の変化を比較してみると, 図-2に示す様に, in vivoでの小脳は15日まで徐々に活性が上昇するのが認められ, 次に20日目まで急激な増加がみられ, その後40日目まで徐々に活性増加がみられる。一方, 培養組織では16日目まではin vivoと同程度の活性上昇を示すが, 20日目ではin vivoのものに比しCNP活性は低値を示した。その後40日目まではCNP活性は

Table-1
EFFECTS OF SERUM ON CNP-ACTIVITY

Addition	Conc.	U/mg Protein
normal serum (Guinea Pig)	50%	1.88*
	10%	1.79*
EAE serum (Guinea Pig)	50%	1.60*
	10%	2.01*
normal serum (Rabbit)	50%	1.95
	10%	1.63
EAE serum (Rabbit)	50%	1.92
	10%	1.43
none		1.75
normal serum (Human)	50%	1.57
	10%	1.64
MS serum (Human)	50%	1.43
	10%	1.30
none		1.31

* Serum was inactivated for 30 min at 56°C

Preincubation: 30 min at 37°C

Table-2 EFFECTS OF SERUM ON INACTIVE CNP

Addition		Enzyme					
		Myelin (freshly prepared)				Homogenate (fresh)	
		Cerebrum		Cerebellum		Cerebrum	
		O.D.	U/mg Protein	O.D.	U/mg Protein	O.D.	U/mg Protein
none		0.048	0.314	0.039	0.178	0.040	0.125
normal Serum (Rabbit)	50%	0.069	0.451	0.050	0.228	0.063	0.197
	50%*	0.041	0.268	0.034	0.155	0.063	0.197
	10%	0.046	0.301	0.028	0.128	0.042	0.131
EAE Serum (Rabbit)	50%	0.104	0.680	0.090	0.410	0.072	0.225
	50%*	0.059	0.386	0.045	0.205	0.052	0.163
	10%	0.078	0.536	0.083	0.378	0.072	0.225
MS Serum (Human)	30%	0.041	0.167	-	-	-	-
0.5% TritonX-100		0.450	9.300	0.490	10.127	0.242	3.024

* Inactivation; 56°C 30min

Adult mice were used as experiment animal

Plateauとなる。このことは，培養条件下でも一定期間はミエリン形成がin vivoと同様に進行するが，ミエリンの充分な形成のためには，培養条件下では栄養的並びに生理学的制約のため限度があるものと考えられる。Zanettaらは培養されたミエリンfreeの腫瘍グリヤ細胞のCNP活性を測定し，かなり高い値を得ているが(P)私共の培養組織ではミエリンの出現によりCNP活性は急激に増加することを認めた。

・EAE血清，MS患者血清の影響

EAE血清やMS患者血清をミエリン形成の完了した培養組織に添加すると急速な脱髄現象がみられることが知られている。そこで，これらの血清を培養細胞にかけたときの脱髄の進行とCNP活性の変化とを追求した。図-3の様に培養20日目のものに血清を作用させると形態学的にミエリンのBalooningさらには脱髄が認められると同時にCNP活性の急激な低下を認めた。即ち，EAE血清を添加すると1時間以内にCNP活性は1/5以下に低下した。MS血清添加の場合は，EAE血清に比し脱髄の速度も遅くCNP活性も添加後16時間目で明らかな低下が認められた。

Pechán.I.らは，EAE抗原をモルモットに注射すると数時間で中枢神経系のCNP活性が上昇することを報じ，脱髄に伴ってCNP活性が局所で増

Table-3 CNP ACTIVITIES IN SERUM & CULTURED MEDIUM

ENZYME SOURCE	O.D.(260mμ)
Non-haemolized	
normal (human) 50%	0.004
normal (guinea pig)	0.006
inactivated normal (human)	0.001
Haemolized	
normal (rabbit) 50%	0.078
EAE (rabbit)	0.051
normal (guinea pig)	0.049
inactivated normal (rabbit)	0.054
inactivated EAE (rabbit)	0.035
None	0.002
Cultured Medium	
Control	0.013
+ EAE serum (guinea pig) 50%	
after 1.5 h incubation	0.026
after 4.5 h incub.	0.015
+ MS serum (human) 50%	
after 1.5 h incubation	0.041
after 4.5 h incub.	0.030

Triton X-100 has been added in reaction mixture.
Inactivation : 56°C, 30 min

加するという。(9) これは培養組織の場合と趣を異にしているが私共の成績では，培養液中へのCNPの遊離はとらえることが出来なかった。(表3) また，ビタミンB_1の拮抗物質であるOxythiamine (10^{-6}M)をミエリン形成の完成した培養組織16日目に添加して培養を続けると，ミエリンの崩壊が認められ，CNP活性も低い値にとどまった。(図3) そこで次に，EAE血清やMS血清のCNP活性に及ぼす影響をin vitroで検討してみた。生後20日目のマウス小脳ホモジネートにTriton X-100を添加したものを酵素源として種々の濃度の血清を加え，pre-incubation 30分後に基質を添加して酵素活性の変化を調べた。表-1みられる様に血清を加えたものは，加えなかったものよりCNP活性が増加する傾向がみられるが，EAEやMS血清及び正常人血清の間では有意の差は認められなかった。血清添加により酵素活性が増加する傾向にあるのは，血清中に混在する赤血球膜由来のCNPによるものと思われる。(10) 次に血清がミエリンに作用してCNPを遊離させたり或いは活性化したりする作用があるのではないかと考えマウスの大脳及び小脳から蔗糖密度勾配法によりミエリン分画を分離し直ちにin vitroで血清を加え新鮮ミエリン分画中のCNP活性の変化をみてみた。表-2の様に血清を添加しても新鮮ミエリンでは，CNP活性は極めて低くCNP活性に変化を与えることは出来なかった。然しこの場合にも血清添加により常にCNP活性が増加する傾向が認められた。これもまた前記の赤血球膜由来のCNP活性の混在が考えられるので溶血した血清を酵素源としてCNP活性を検討してみた。その結果は表3に示す如くで，溶血血清は非溶血血清に比して活性が高く血清を非動化することにより活性は低下した。以上の実験によりin vitroではEAE血清やMS血清はCNP活性に影響を与えないものと結論され，培養組織に対するこれら血清の脱髄作用はミエリン形成細胞(オリゴデンドログリヤ)に作用することにより二次的にミエリンの崩壊を来たし，CNP活性も低下するものであると考えられた。

〔文献〕 1) Kurihara,T.& Tsukada,Y.: J. Neurochem. 14, 1167, 1967 2) Olafson,R.W.,Durumond,G.I.,& Lee,J.F. Canad.J.Biochem. 47,961, 1969 3) Kurihara,T.& Tsukada,Y.: J. Neurochem. 15, 827, 1968 4) Kurihara,T., Nussbaum,J.L.& Mandel,P. : J. Neurochem. 17, 993, 1970 5) Braum,P.E.& Barchi,R.L.: Brain Res. 40, 437, 1972 6) Yonezawa,T.: Acta Path. Jap. 11, 465, 1961 7) Bornstein,M.B.& Murray,M.R.: J.Biophys. Biochem. Cytol.: 4, 499, 1958 8) Zanetta,J.P., Benda,P., Gombos,G.& Morgan,I.G.: J. Neurochem. 19, 881, 1972 9) Pechan,I.& Simekova,J.: J. Neurochem. 19, 557, 1972 10) Sudo,T.,Kikuno,M.& Kurihara,T.: Biochim. Biophys. Acta 255, 640, 1972

17. 2′,3′-Cyclic Nucleotide 3′-Phosphohydrolaseの pH stat および比色による測定法

栗原　正・高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase（CNP）の測定のためにpH stat法を考案した．反応の経過はRadiometerの滴定装置をpH statとして作動させることにより自動的に記録される．反応速度を一定に保つために反応液の中に2-メルカプトエタノールを加えることが必要であった．この方法は速度論的研究に最も有効であるが，CNPの迅速な測定法としても利用できる．

CNPの活性値が至適pHで得られるように比色法を改良した．CNPとE.coli alkaline phosphataseの反応を別々にそれぞれの至適条件で行わせた．この方法は操作も容易で再現性も良く，至適pHにおける活性値を求めるための簡便な方法として広く利用に耐え得ると思われる．

2′,3′-Cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase（CNP）の測定に現在用いられている方法は反応産物を分離するためにクロマトグラフィーを行う（1-3）かE.coli alkaline phosphataseとの共役反応を利用する（4）かしている．しかしこれらの方法には正確な初速度を求めることが困難であるという欠点がある．共役反応を利用した比色法は検体の活性値を求めるには便利な方法であるが，反応液のpHはCNPに不利な条件になっている．我々はpH statを用いた簡単な方法を考案したのでここに報告したい．またCNPの活性値が至適pHで得られるように比色法を改良したのであわせて報告する．

〔方法〕酵素源および活性化　ブタ大脳の白質（corpus callosumおよびcentrum semiovale）を酵素源として用いた．白質を9容の冷蒸留水でhomogenizeし，0.2mlずつ分注して-20°に保存した（2週間以内に使用）．酵素の活性化はKurihara et al.（5）に従った．酵素の希釈度は活性測定に直接用いた酵素液を組織homogenateと比較した際の希釈度として定義した．pH stat法　Radiometerの自動滴定装置（SBR2c/SBU1a/TTT1c/PHA924/TTA31）をpH statとして用いた．反応は37°で行い，反応液の上にN_2ガスをゆっくり流した．メーターは0.025 M KH_2PO_4 in 0.025 M Na_2HPO_4（37°でpH 6.84）および0.05 Mフタル酸水素カリウム（37°でpH 4.02）により2点調整した．反応液の組成は（終濃度）7.5 mM adenosine-2′,3′ cyclic phosphate（A>p），0.1 M NaCl，0.5 mM 2-メルカプトエタノールおよび酵素，反応液の全量は2ml．酵素を加える前にpHを6.6に合わせ，40-100μlの酵素液を加えることにより反応を開始させる．反応中pHを6.6に保ちながら0.01N NaOHの消費量を自動的に記録した．滴定後は毎回反応槽に0.2N HCl 2.2mlを入れて2-4分incubateする．このincubationが充分であれば酵素を入れる前にア

ルカリの消費は全く見られない．μmole/min/ml homogenate で表わした活性(A)は次式により計算される：$A = r \times 12.5 \times \frac{f \times d}{v}$ [r, アルカリの消費速度(μl/min)；f, アルカリの factor；d, 酵素の希釈度；v, 反応液に加えた酵素の量(μl)]．adenosine-2'phosphate (A2'p) の非解離部分に対する補正は係数1.25 (pH 6.6) として上式に含まれている．補正係数 (C) は式：$-\log(C-1) = pH - pK_a$ で与えられる．37°における A2'p の pK_a (6.0) は 0.1M NaCl の存在下滴定により決定した．ペーパークロマト法　酵素液0.2ml および 0.2M imidazole buffer (pH 6.2) 0.1ml から成る混液を37°で3分 preincubate し，30mM A>p 0.1 ml を加えて反応を開始させる．20分 incubate したのち酢酸 0.04ml を加え，50μl をペーパーにつける．以後の操作は Kurihara and Tsukada (2) に従う．$A = \Delta E_{260} \times 0.620 \times d$ [ΔE_{260}, 酵素の代りに水で得た blank を差引いたもの]．比色法 (two-step procedure)　ペーパークロマト法と同じ条件で incubate したのち 0.2M Na_2CO_3 0.2ml を加える．0.3ml をとり E. coli alkaline phosphatase (Sigma, Chromatographed) 0.1ml (50μg) と37°で1h反応させる．7% TCA 1ml を加えて遠心し，上清 0.5ml に 2.5% ammonium molybdate in 5N H_2SO_4 0.05ml および 0.11% の Fiske-Subbarow's reducing powder (6) を含む還元剤 0.45ml を加えて発色させる．次のようにして得られた値を blank として吸光度から差引く．0.2M imidazole buffer (pH 6.2) 0.1ml と 30mM A>p 0.1ml だけで incubate したのち 0.2M Na_2CO_3 0.2ml を加える；0.2ml をとり酵素液 0.1ml および E. coli alkaline phosphatase 0.1ml (50μg) を加えて1h反応させる．$A = \Delta E_{720} \times 0.280 \times \frac{d}{e}$ [ΔE_{720}, 上記の blank を差引いたもの；e, 0.4mM KH_2PO_4 で得た E_{720}]．

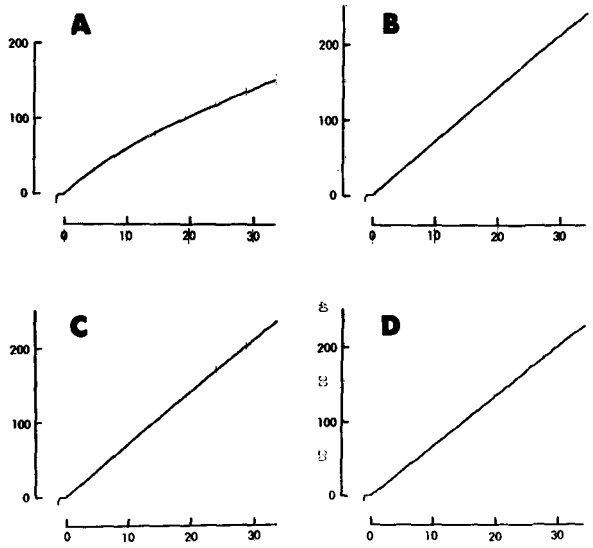


図1　SH化合物の影響を示す滴定記録
A, control；B, 0.5mM 2-メルカプトエタノール；C, 0.5mM L-システイン；D, 0.25mM ジチオスレイトール．縦軸：0.0102N NaOH の消費量(μl)．横軸：時間 (min)．希釈度100の酵素液50μl を用いた．

〔結果〕 pH stat法　滴定下の条件では CNP は不安定で最初の数分をすぎると反応速度は次第に低下していく (図1A)．反応速度を一定に保つには SH 化合物を添加することが有効であった (図1)．標準法では 0.5mM の 2-メルカプトエタノールを反応液に加えることにした．2-メ

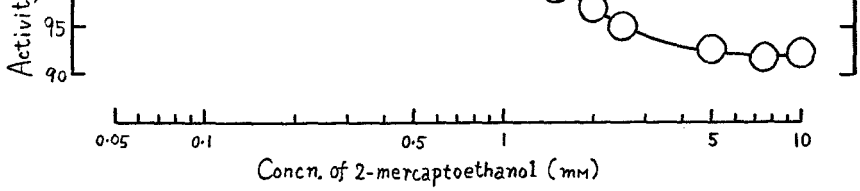


図2　2-メルカプトエタノール濃度の活性値に対する影響　2-メルカプトエタノールが存在しないときの初速度を100%活性とした．希釈度50の酵素液60μl を用いて滴定を行った．

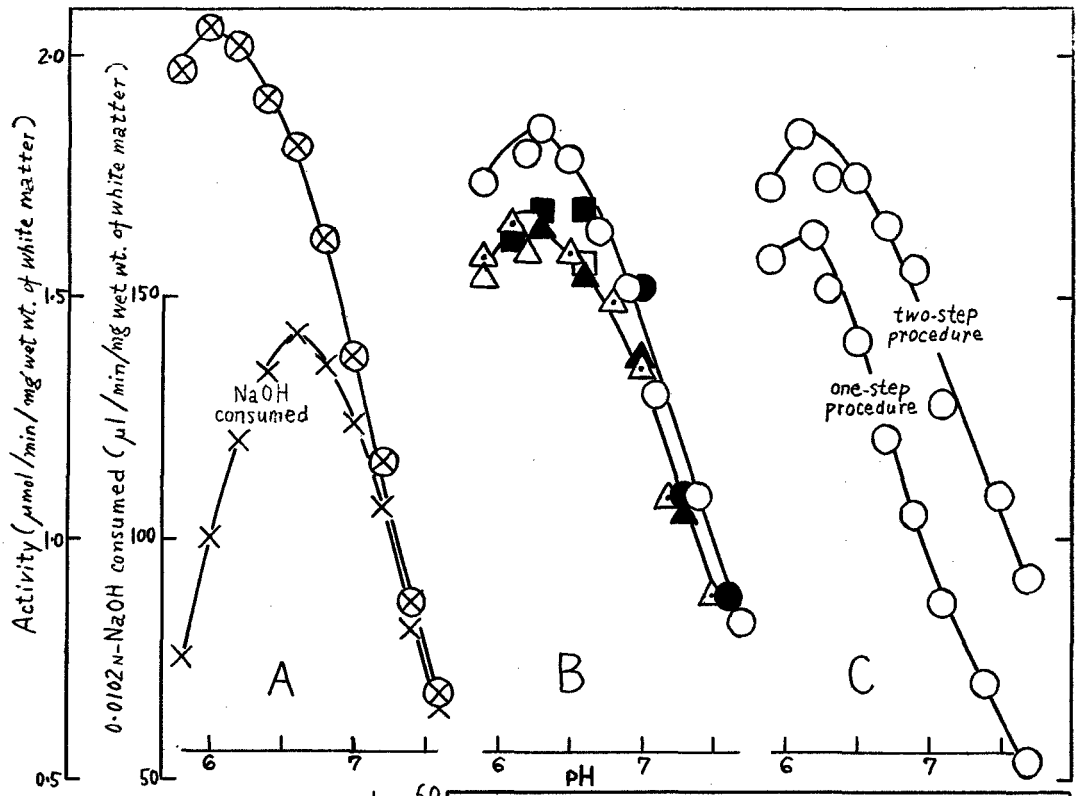


図3↑ 種々の方法でえられた pH-活性曲線の比較. A, pH stat 法; B, ペーパークロマト法; C, 比色法. 用いた buffer は imidazole (○), tris (●), citrate (△), phosphate (▲), citrate-phosphate (◬), dimethylglutarate (□) および MES (■). one-step 比色法: 酵素, 0.05 ml, 0.2M imidazole buffer 0.05 ml, E. coli alkaline phosphatase 0.05 ml (50μg) および 30 mM adenosine-2', 3' cyclic phosphate 0.05 ml から成る反応液を 37°C 20分 incubate, 3% TCA 1 ml を加え遠心, 上清 0.5 ml の Pi を測定した; 測定は図5Bの直線部分で行った.

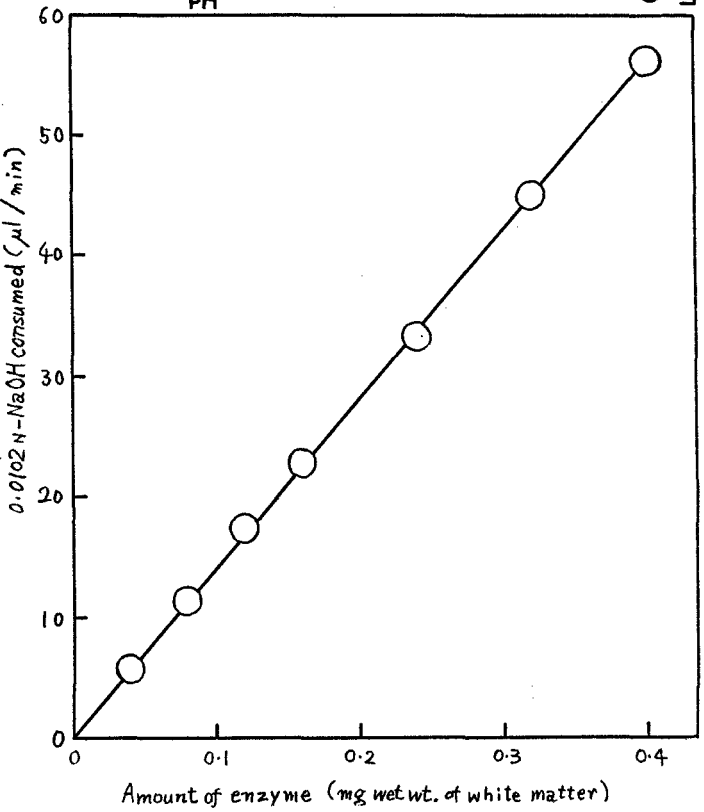


図4→ pH stat 法における酵素量とアルカリの消費量との関係. 酵素の希釈度 25-100; 反応液に加えた酵素の量 40-100 μl.

ルカプトエタノールは広い範囲の濃度にわたって有効であるが, 1mM 以上では多少阻害的に働く(図2). アルカリの消費速度は

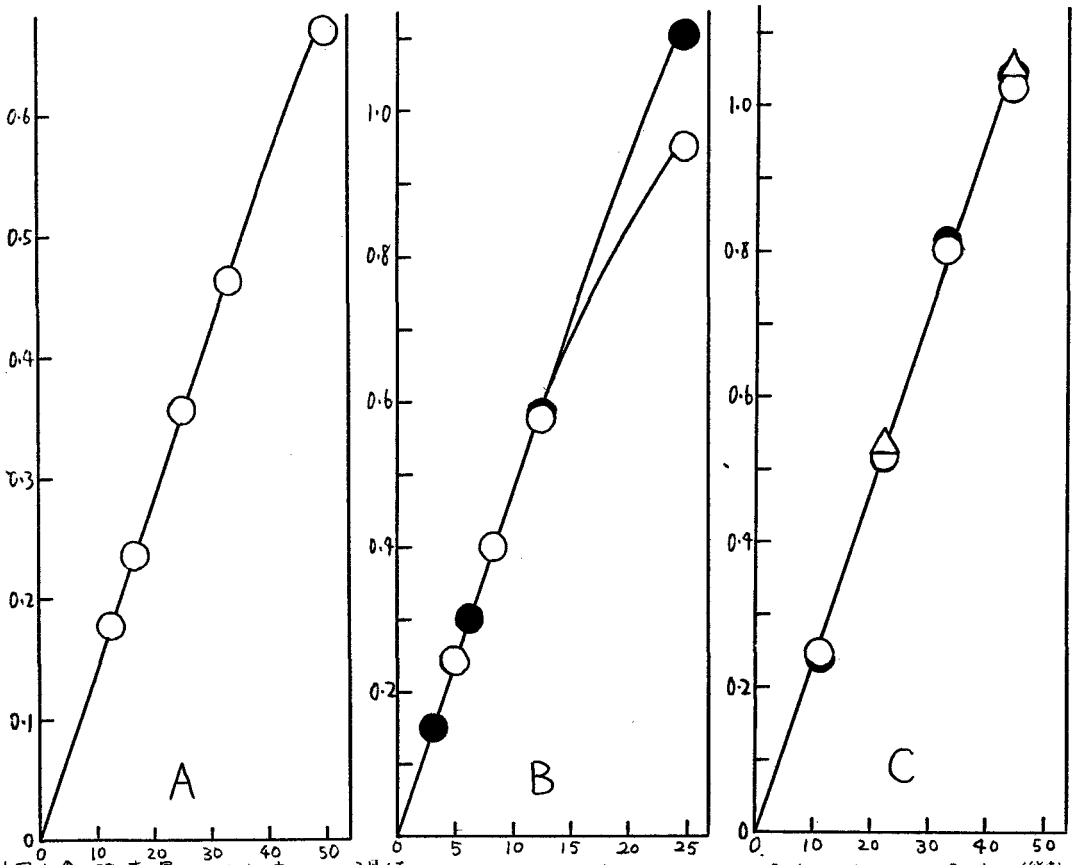


図5↑ 酵素量と吸光度との関係 A, ペーパークロマト法; B, one-step比色法; C, two step比色法. 縦軸: ΔE_{260} (A) または ΔE_{720} (BおよびC). 横軸: 酵素量 (μg 蛋白量). 反応液に加えた *E. coli* alkaline phosphatase の量 (BおよびC): 50μg (○), 100μg (●) または 25μg (△). One-step 比色法は図3の説明の項に記載 (ただしpH6.2のbufferを用いた).

pH 6.6 で, μmole で表わした活性は pH 6.0 付近で最大であった (図3A). A2'p の解離を考慮すると高い pH で滴定を行うことが望ましい. 我々は測定感度が最大である pH 6.6 を選んだ. 酵素量とアルカリの消費量との関係は図4に示す. pH stat 法では反応を連続的に記録できるので, 低い基質濃度でも正確な初速度を求めることができる. A>p に対する K_m は 0.38 mM であった. 比色法 適当な buffer を選ぶために種々の pH と buffer で活性を測定してみた (図3B). 同じ buffer を用いると活性は pH 6.2 で最大であり, 同じ pH では citrate, phosphate または dimethylglutarate よりも imidazole または tris の方が高い値を与える. 従って imidazole buffer (pH 6.2) を比色法の標準法に使うことにした. Olafson ら (4) は pH 7.5 で共役反応を行ったが CNP の活性は pH 7.5 では非常に低い (図3B). CNP の至適 pH (6.2) で共役反応を行うと高い吸光度では alkaline phosphatase が rate-limiting になってしまう (図5B). そこで我々は CNP と alkaline phosphatase の反応を2段階に分けてそれぞれ至適条件で反応を行わせる方法 (two-step procedure) を開発した. この方法ではテストした全域にわたって直線性が成立していた (図5C). two-step procedure は操作も容易で再現性も良く, 至適 pH で活性値を求めるための簡便な方法として広く利用に耐え得ると思われる.

[文献] (1) Drummond et al., J. Biol. Chem. 237 3535 (1962); (2) Kurihara and Tsukada, J. Neurochem. 14 1167 (1967); (3) Lundblad and Moore, Brain Res. 12 227 (1969); (4) Olafson et al., Can. J. Biochem. 47 961 (1969); (5) Kurihara et al., J. Neurochem. 17 993 (1970); (6) Fiske and Subbarow, J. Biol. Chem. 66 375 (1925).

18. 発育期の実験的高フェニールアラニン血症と〔^{35}S〕Sulfateの脳組織Sulfatideへの Incorporation について

戸張千年・植村慶一
平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）

発育期の高フェニールアラニン(phe)血症は、神経機能の障害を起こし、形態学的に髄鞘の変化もあることが報告されている。乳幼期のシロネズミに実験的高phe血症を作り、髄鞘形成の変化・特に[^{35}S]$NaSO_4$を用い、Sulfatideの代謝を中心として追究を行った。出生直後よりphe負荷を与えると、仔ネズミの生存率が悪いため、今回は生後5日目より母ネズミにphe負荷を与え、母乳を介し仔ネズミを高phe血症にした。高phe血症は、体重、脳重の発達を共に阻害し、生後30日目で対照の約60%であった。また髄鞘量を脳1g当りから得られる髄鞘タンパク総量として対照と比較すると、phe負荷でほぼ30%の低下が見られ、髄鞘の脂質成分中 Cholesterol, Cerebroside, Sulfatide もやはり、ほぼ30%の減少を認めた。脳のSulfatideの代謝活性は低いが蓄積されたものは消失し難いことが知られている。(A.N. Davison et al : Biochem. J. 98, 915, 1966). 〔^{35}S〕Sulfateの脳組織髄鞘中 Sulfatideへの組込みは、phe負荷群(生後30日目まで負荷)は対照に比べ½に低下し、Sulfatide代謝が高phe血症で強く阻害された。[^{35}S]の脳への取込みは投与後2日目で最大値に達するが、正常群に〔^{35}S〕投与後2日間phe負荷を与えても、その脳組織への取込みに大きな影響はなかった。然し正常群で[^{35}S]が最大限に取込まれた後phe負荷を行い[^{35}S]の消失を比放射能(脂質DPM/血清DPM)で見ると負荷後4日目で対照の30%に減少した。即ちphe負荷によるSulfatideの代謝阻害は[^{35}S]の取込みの阻害より脳から強く消失することに起因するものと考えられた。

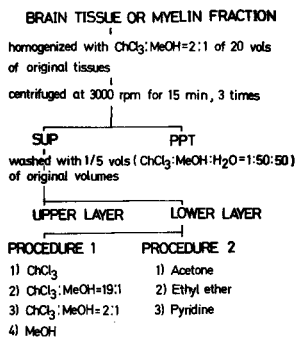
乳幼期の高phe血症は神経機能の発育遅滞を伴うことが知られている。また形態学的には脱髄変性を惹起しているとも報告されている[2]。なお高phe血症に伴って、脳組織中の脂質成分に変化が起るとも知られている[1]。さてシロネズミでは生後脳重の増加とそれに伴う諸成分の増加が認められ特に脂質成分は、髄鞘の発育と平行して急速に増加している[3]。脳脂質中の含硫脂質であるSulfatideも又その動態は同様であがしかし、その代謝活性はむしろ低いこと及び長期に亘り継続して脳内に蓄積し発育に伴うCerebroside sulfotransferase活性上昇と平行すると考えられている[4]。一方血中phe量の増加によって脂質代謝が阻害されることが知られている[5][6]。今回は特にSulfatideの代謝に注目し高pheの影響について追究を行った。

実験方法； a) 高phe血症動物の作製；実験動物にはWister系のシロネズミを使用しL-pheを含む7%の固形飼料で飼育を行った。特に発育期のシロネズミを高phe血症にするには母ネズミに上記の7% L-phe固形食を与え母乳を介し仔ネズミの血中phe値を上昇する方法を用いた。さらにこの場合生後直ぐに高phe食で飼育すると実験動物の生存率が極めて低いので今回は生後5日目よりphe食の負荷を行った。 b) [^{35}S]Na_2SO_4の投与；[^{35}S]Na_2SO_4(ヤトロン化学)を用いて、体重1g当り0.6μCをCarrier freeで腹腔内に注射した。注射後血中濃度、脳組織内の取込みの経時的変化は図-3に示す如く注射後24時間で最大値(48時間)の80%程度示すので実験に際しては注射後24時間後に瀉血屠殺して試料とした。 c) 脂質の抽出分離；組織を図-1に示す如く、Folchの方法[7]に準じ乗湿重量の20倍量のC-M=2:1で抽出し、その後C-M層の½容のH_2Oで洗い上層及び下層に分け、さらに下層を"Synthetic upper phase"[8]で3回洗滌しその下層について脂質

を分離した。特に実験動物に[^{35}S]Na_2SO_4を用いた時は，H_2Oのかわりに0.01%Na_2SO_4液により洗滌を行い遊離のNa_2SO_4を除いた。その後Florisilカラムを用いて溶出する方法[17](procedure 1)及び各試薬で抽出する方法(procedure 2)の方法で脂質を分離した。Sulfatideはprocedure 1及び2共に(3)で抽出されるが，この分画を薄層クロマトグラフィー(シリカゲルG；溶媒はC：M：H_2O＝65：25：4)で分離し標準Sulfatideからその値を測定した。なおSulfatideの回収率はprocedure 1あるいは2でも特に差は認められなかった。 d) 髄鞘分画の精製；髄鞘の分離には，植村らの方法[10]によった。即ち屠殺後新鮮脳を0.8 M sucrose中で乗湿重量の20倍量でホモゲナイズし，0.32 M sucroseを重層遠心し，さらに中間層を再度同操作を行った。得られた中間層にHypoosmotic shockを30分施行し遠心後沈渣になるものを髄鞘とした。 e) 化学的測定；髄鞘中の脂質分析は，以下の方法に従った。i) cholesterol＝Zakの方法[11] ii) phospholipid＝Lowryの方法[14] iii) cerebroside＝Svennerholmの方法[12] iv) sulfatide＝Keamの方法[13] v) proteinはLowryの方法[15]より 放射能の測定；放射能は島津製液体シンチレーションカウンターを用い，各試料は測定用瓶中で乾燥後Scincillator(PPO 4g，POPOP 0.1g/l toluene)を加え測定した。尚DPMの算定は"Count Ratio"法を用い[^{35}S]放射能のtime decayについて補正を行った。

Fig-1

FLOW SHEET FOR ISOLATION OF CEREBROSIDES AND SULFATIDES



実験結果及び考察；

高phe食負荷の発育に対する影響をみるために生後5日目より母ネズミに7%L-phe食を与え仔ネズミの成長をみると図-2に示す如く体重及び脳重は共に対照例に比し低値を示し特に発育の急激に進む生後15日目より対照との差は著しく，30日目では体重は60%～70%，脳重は20%～30%減が認められた。またphe負荷を続けた生後30日目の仔ネズミの脳遊離アミノ酸値は脳1g当りPhe及びTyrは各々78 mgと5.65 mgであり明らかに高phe血症を示していた。従って母ネズミの母乳を介してのこの方法でも高phe血症の作製が可能と考えられた。[^{35}S]Na_2SO_4を腹腔内に注射し脳組織内えの組込をみると，血液中の放射能は急激に減少するにもかかわらず脳組織内には注射後24時間以上に亘り次第に放射能の増加がみられ，他の報告[16]にもみられるように[^{35}S]Na_2SO_4は脳内に継続して増加・蓄積することを示している。図-3．次に発育期高phe血症動物脳の脂質成分を対照群と比較すると，脳組織1g当りの

Fig-2

BODY AND BRAIN WEIGHT OF DEVELOPING NORMAL AND HYPERPHENYLALANINEMIC RATS

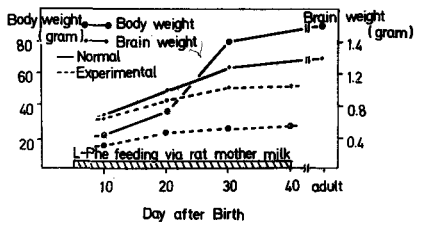
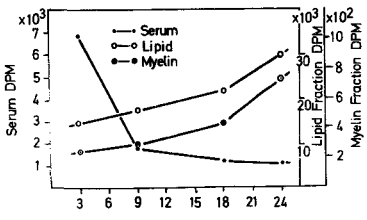


Fig-3

^{35}S-SULFATE INCORPORATION INTO LIPID AND MYELIN FRACTION OF ADULT RATS



0.6μC of ^{35}S-Sulfate /g-body weight was intraperitoneally injected into rats

含有量は，Cholesterol，Cerebroside，Sulfatide は共に実験群で低値を示し phe 負荷群 30日目のものは Phospholipid を除きほぼ 30％の低下がみられた。また脳 1g 中より得られる髄鞘量をタンパク量として表わしてみるとやはり 30日目で対照に比しほぼ 30％の低下がみられた。(表-1) 次に脂質成分中の Sulfatide に注目し，その代謝活性を検討した。脳組織及び髄鞘分画に取込まれた $[^{35}S]Na_2SO_4$ 放射能を Sulfatide 量で除し更にこの値を血液の放射能で補正したものを Radioactivity とした。この値を比較検討すると正常群の生後30日目のものは 20日目のそれと比し脳および髄鞘はそれぞれほぼ 1.5倍と 2倍の値を示した。(表-2) これらの成積は Davison[16]らの報告とも一致した。また Sulfatide 中の放射能は髄鞘分画中の全放射能にほぼ等しく，Sulfatide 量の発育過程に伴う増加よりも髄鞘タンパク量の増加の方がより多かった。次に実験群の30日目については，髄鞘タンパク量が 30％減，Sulfatide 量もほぼ同等の減少を認め，髄鞘中の Sulfatide の Radioactivity は，対照の 20％に過ぎなかった。　既に我々は UDP-galactose の Cerebroside への取込みについても検討し報告したが(脳細胞膜)やはり乳幼期のシロネズミの高 phe 血症の場合で低下を認めており，Sulfatide の代謝活性の低下と考え合せると，高 phe 血症脳で脂質代謝が強く阻害されるものと考えられた。また既に脳の Sulfatide の代謝活性は低く，長時間継続して脳組織内に蓄積され，一度蓄積されたものは消失し難いと報告されている。そこで高 phe 血症の場合の Radioactivity の低下が $[^{35}S]Na_2SO_4$ の Sulfatide への組込みの阻害によるものなのかあるいは蓄積されたものが急速に消失することによるものかを明らかにすることを試みた。$[^{35}S]Na_2SO_4$ の脳内への取込み量を注射後48時間でほぼ最大値に達することを確めた後生後30日目のシネズミを用いて実験を進めた。1g 体重当り 2mg の L-phe を $[^{35}S]Na_2SO_4$ と共に腹腔内に注射しその後 2日間 7％の phe 食にかえ $[^{35}S]Na_2SO_4$ 注射直後より高 phe 血症にて $[^{35}S]Na_2SO_4$ の脳組織への取込みに対する影響について

Table-1

LIPID CONSTITUENTS OF NORMAL AND HYPERPHENYLALANINEMIC RATS BRAIN MYELIN　values were expressed as mg/g-brain wet weight

Day after Birth		Brain weight (gram)	Myelin (mg prot./g.w.w.)	Phospholipid	Cholesterol	Cerebroside	Sulfatide
10	Normal	0.67	2.18	30.3	6.76	0.38	<0.05
	Experiment.	0.66	1.87	28.4	6.07	0.39	<0.06
20	Normal	0.90	12.7	39.8	8.96	4.65	1.07
	Experiment.	0.88	10.7	36.0	7.73	3.03	0.75
30	Normal	1.27	23.7	40.6	13.3	5.84	1.28
	Experiment.	0.92	18.9	37.8	10.9	4.02	0.94
40	Normal ※	1.29	35.9	49.7	16.5	10.7	1.75
	Experiment.	0.95	21.7	41.7	9.04	4.82	1.17

※ 90 days after birth

Table-2

^{35}S-SULFATE INCORPORATION INTO MYELIN AND SULFATIDE FRACTION OF NORMAL RATS

Day after Birth	Myelin content (mg prot./g.w.w.)	Radioactivity (DPM/mg prot.)	Sulfatide content (mg/g.w.w.)	Radioactivity (DPM/mg sulf.)
20	12.7	0.097	0.81	0.750
30	23.6	0.132	1.22	1.72

Table-3

EFFECT OF HIGH PHENYLALANINE ON ^{35}S-SULFATE INCORPORATION INTO MYELIN AND SULFATIDE FRACTION

Condition	Myelin content (mg prot./g.w.w.)	Radioactivity (DPM/mg prot.)	Sulfatide content (mg/g.w.w.)	Radioactivity (DPM/mg sulf.)
Normal	23.6	0.132	1.22	1.72
Experimental	18.8	0.069	0.94	0.333

Table-4

^{35}S-SULFATE INCORPORATION INTO LIPID FRACTION OF YOUNG RATS* BRAIN

(Values were expressed as DPM in Lipid / DPM in Serum)

Days after inj.	1	2	5	7
Control	13.1	30.3	25.9	112.5
Experiment.	12.7	28.1	10.9*	33.6*
E/C Ratio	0.98	0.97	0.42	0.30

* 30 days after birth

* These groups were fed by higt phenylalanine loading from 3 days after ^{35}S-Sulfate injection

追究した。表-4の如く脳組織中への[^{35}S]放射能の取込み量はphe負荷群も対照とほとんど差は認められなかったが，脳組織中の比活性（脂質・放射能／脳・放射能）は実験群でやゝ低値を示した。一方[^{35}S]Na_2SO_4の取込みがほゞ最大値に達した後から，即ち正常群に[^{35}S]Na_2SO_4を投与した後3日目よりphe負荷を行い，脳脂質に取込まれた[^{35}S]Na_2SO_4がphe負荷で如何なる影響を受けるかを検討した。その結果，phe負荷の[^{35}S]・脂質の消失に対する態度は，比放射能（脳・放射能/血清・放射能）でみると，phe負荷後3日目で対照群の42%，5日目で30%であった。(表-4) このことを考えるとphe負荷のSulfatideの[^{35}S] Radioactivityの低下は[^{35}S]の取込みの阻害よりもむしろ脳中に蓄積されたものがより早く消失することに起因していると考えられた。

いづれにしても髄鞘中のSulfatideの代謝が高phe負荷で阻害されており明らかに髄鞘形成不全の1つの要因と考えられる。そこで他の脂質成分あるいはタンパクの代謝面からも髄鞘形成についてpheの影響を更に多面的に進める必要があると考える。

1) 早野 ら：神経化学 9(Suppl),117,1970
2) L.Crome et al: J.Neurol.Neurosurg.Psychiat.,25,143,1962
3) L.F.Eng et al: Lipid,3,157,1967
4) G.M.McKhann et al: J.Neurochem.,14,717,1967
5) L.Barbato et al: Brain Res.,7,399,1968
6) S.N.Shah et al: J.Neurochem.,17,479,1972
7) J.Folch et al: J.bilo.Chem.,226,497,1957
8) Y.Kishimoto et al: J.Lipid Res.,1,72,1959
9) H.E.Carter et al: J.biol.Chem.,169,77,1947
10) 植村 ら：神経化学 9(Suppl),79,1970
11) B.Zak et al: Am.J.Clin.Path.,27,583,1957
12) L.Svennerholm: J.Neurochem.,1,42,1956
13) E.L.Kean: J.Lipid Res.,9,319,1968
14) O.H.Lowry et al: J.biol.Chem.,207,1,1954
15) O.H.Lowry et al: J.biol. Chem.,193,265,1951
16) A.N.Davison et al: Biochem.J.,98,915,1966

19. 実験的Anoxiaに於ける脳蛋白合成並びに脳内遊離アミノ酸パターン

高田五郎・多田啓也
（阪市大・医・小児）

我々は，周産期低酸血症の脳発育に及ぼす影響について，特に脳蛋白合成能の面から検討する目的で，娩出直後並びに生後10日目の白鼠を用い，100%窒素ガス通気により anoxia を引起し，anoxia 中のもの及び蘇生後種々の期間生存せしめたものについて，腹腔内に ^{14}C-Leucine を注射し，その1時間後の大脳に於ける ^{14}C-Leucine の脳への取込み，脳蛋白への組込み，脳内遊離アミノ酸濃度を調べた。生直後の白鼠に於ける anoxia 中の変化は，^{14}C-Leucine の脳への取込みの著明な亢進，脳蛋白への組込みの著明な低下，脳内遊離アミノ酸中アラニンの著明な増加などであるが，その回復期には，脳内遊離アミノ酸の大部分が低下する。生後10日目の白鼠では，anoxia からの回復期には ^{14}C-Leucine の脳への取込み，脳蛋白への組込みは共に亢進するが，その変化は1日で略正常に戻り，その後には何ら影響を及ぼさない。

今回の我々の成績は，幼若白鼠大脳の蛋白合成能は，anoxia 中著明に低下するが，その回復は意外に早く，蛋白合成能の面からみた anoxia による生化学的な変化は reversible で，永続的なものとはなりにくいことを示すものと思われる。

---

anoxia の脳に及ぼす影響について生化学的に検索した報告は数多くみられるが，その影響の時間的な変化，又その永続性について経時的に追求した報告はあまりないようである。ここでは anoxia の幼若白鼠脳の蛋白合成能・血中アミノ酸の脳への転送能・脳内遊離アミノ酸プールに及ぼす影響について調べ，その異常が anoxia からの回復と共にどう変化するかを経時的に追求した。周産期に於ける脳の発育段階は白鼠脳では生後10日目に相当し，その時期は又脳蛋白合成の最も旺盛な時で，従って各種の侵襲に対して最も敏感な時でもある所から，生後10日目の白鼠脳についても anoxia による急性変化及びその影響の永続性について，同様に経時的に追求し，2～3の知見を得たので報告する。

〈方法〉

実験動物には生直後及び生後10日目の Sprague-Dawley 系白鼠（同腹・両性）を用い，対照群と anoxia 群とに分け，anoxia 群は anoxia 直前腹圧迫による蘇生術を行なった。ここでいう生直後とは，満期自然分娩後に時間以内のもので，全て初回哺乳を終えたものをさす。anoxia は 24°C 前後に保ったガラス室（直径 12cm・高さ 18cm の円柱型）に 100% 窒素ガスを流すことにより引起した。この方法では，anoxia の持続時間は生直後の白鼠では60分，生後10日目の白鼠では5分30秒が略100%生存可能な最長時間で，それ以上だと死亡率が急増する。

anoxia 中の変化を調べた実験（A群）は，生直後に ^{14}C-l-Leucine を腹腔内に注射し，その直後から60分間 anoxia にし，しかる後蘇生に成功したもの（この間30分経過）のみを直ちに断頭して調べた。anoxia 後の経時的な変化について調べた実験（B・C・D・E・F・G・H・I群）では，生直後の白鼠には60分間 anoxia にしたあと1

表 1. 脳内遊離アミノ酸パターン

アミノ酸	A 群			B 群			C 群			E 群			F 群			H 群		
	cont.	anoxia	% for cont.	cont.	anoxia	% for cont.	cont.	anoxia	% for cont.	cont.	anoxia	% for cont.	cont.	anoxia	% for cont.	cont.	anoxia	% for cont.
GABA	1.306	1.357	104	0.608	0.522	86	0.375	0.328	87	3.590	3.459	96	1.467	1.511	103	1.235	1.238	100
Lys				0.194	0.192	99				1.555	1.539	99	0.235	0.237	101	0.093	0.084	90
His										0.200	0.208	104	0.095	0.095	100	0.021	0.020	95
Arg										0.185	0.199	108	0.176	0.188	107	0.074	0.072	97
Asp	1.999	1.843	92	1.141	0.407	36	1.406	1.086	77	7.110	6.768	95	2.568	2.703	105	2.553	2.222	87
Thr	0.754	0.837	111	0.534	0.439	82	0.447	0.320	72	1.448	1.299	90	0.690	0.680	98	0.216	0.213	99
Ser	1.108	1.286	116	0.936	0.750	80	1.017	0.725	71	2.927	2.637	90	1.478	1.398	95	0.739	0.722	98
Glu	5.266	5.439	103	3.337	1.822	80	3.362	2.399	71	6.347	6.751	106	4.228	4.415	104	3.794	3.896	103
Glun	2.988	3.095	104	1.432	0.664	46	1.105	0.861	78	3.154	2.532	80	1.195	1.197	100	1.219	1.094	90
Gly	2.491	3.260	131	1.889	1.243	66	1.554	1.085	70	3.752	3.584	96	1.673	1.447	87	0.658	0.681	103
Ala	2.196	3.788	173	1.118	1.772	158	1.076	0.794	74	4.012	3.853	96	1.944	1.897	98	0.765	0.900	118
Val										1.176	1.416	120						
Met	0.257	0.274	107	0.199	0.200	101							0.262	0.291	110	0.063	0.053	84
Ileu	0.220	0.274	125	0.030	0.032	107	0.023	0.022	94	0.754	0.680	90	0.310	0.316	102	0.029	0.027	93
Leu	0.473	0.647	137	0.060	0.070	117	0.060	0.051	85	1.454	1.298	89	0.651	0.664	102	0.062	0.052	83
Tyr	0.186	0.163	88	0.078	0.078	100				0.772	0.763	99	0.123	0.124	101	0.034	0.037	109

註 表中の数字は各群の平均値を示す.

表 2

実験群	生存日数	anoxia 持続時間	anoxia 迄の ^{14}C-leucine 注射までの生存期間	RI. of free amino acids cpm/100mg of brain wet weight			RI of brain protein cpm/1mg of brain protein			体重	RI. 注射量 μCi	例数
				control	anoxia	% for control	control	anoxia	% for control			
A	生直後	60 分	RI. 注射直後 anoxia	2089	3830	183	2018	314	16	6	1.5	13
B	生直後	60 分	1 日時間	1918	2969	155	1694	1294	76	7	1.5	12
C	生直後	60 分	1 日	986	1153	128	3104	3225	104	6	2	6
D	10 日	5 分 30 秒	1 日時間	294	481	164	154	226	147	16	3	6
E	10 日	5 分 30 秒	12 時間	636	643	101	436	537	123	20	4	7
F	10 日	5 分 30 秒	1 日	655	630	96	505	506	100	20	4	6
G	10 日	5 分 30 秒	3 日	100	93	93	187	166	89	15	3	8
H	10 日	5 分 30 秒	6 日	688	697	101	295	289	98	28	5	6
I	10 日	5 分 30 秒	10 日	110	108	93	197	187	90	32	6	5

註　表中の数字は各群の平均値を示す

時間・1日間生存せしめ，又生後10日目の自鼠には5分30秒間anoxiaにしたあと1時間，12時間・1日・3日・6日・10日間生存せしめたものにつき，^{14}C-Leucineを腹腔内に注射し，その1時間に断頭により取出した大脳について調べた。

判定なお法は，第13回日本神経化学会にて発表した東駿砂南アミノ酸負荷の時のお法に準じるが，生直後の脳Dは0.5% Triton-X-100 をかえた 0.25 M sucrose を10倍量，生後10日目の脳Dは5倍量をかえてホモジナイズし，cell debris は 3000 rpm. 10分の遠心沈澱により除いた。蛋白測定

は，生後10日目の脳にはBiuret法，生直後の脳にはLowry法を用いた。脳内遊離アミノ酸分析には，ホモジェネートの遠心後上清をう倍量の4%スルホサリチル酸で除蛋白し，その上清をアミノ酸自動分析計（日本電子，JLC-6AH）にかけた。

〈結果〉

① 生直後の60分間のanoxia中の変化を調べた群（A群）では，^{14}C-leucineの脳への取込みの著明な亢進，脳蛋白への組込みの著明な低下を示し，脳内遊離アミノ酸プールではアラニンの著明な上昇，グリシン，イソロイシン，ロイシンの軽度の上昇が認められる。

② 生直後に60分間anoxiaにし蘇生後1時間経過した群（B群）では，A群と同様^{14}C-leucineの脳への取込み亢進，脳蛋白への組込み低下を示すが，その程度は軽い。脳内遊離アミノ酸プールについては，アラニンの増量と他の大部分のアミノ酸（特にアスパラギン酸・グルタミン酸・グルタミン・グリシン）の低下が認められる。

③ 生直後に60分間anoxiaにし，その後1日経過した群（C群）では，^{14}C-leucineの蛋白への組込みは就眠群と差はないが，脳への取込みはまだ亢進している。脳内遊離アミノ酸プールはアラニンも含めて大部分のアミノ酸の低下を示すが，B群に比しその程度は軽くなっている。

④ 生後10日目に5分30秒anoxiaにし，蘇生後1時間経過した群（D群）では，^{14}C-Leucineの脳への取込み，脳蛋白への組込みは共に亢進している。

⑤ 生後10日目に5分30秒anoxiaにし，その後12時間経過した群（E群）では，^{14}C-Leucineの脳への取込みには差がないが，蛋白への組込みはまだ亢進している。脳内遊離アミノ酸プールでは，グルタミンの軽度の低下，ドリンの軽度の増量がみられる。

⑥ 生後10日目に5分30秒anoxiaにし，その後1日・3日・6日・10日間経過した群（F・G・H・I群）では，各群いずれの場合にも，^{14}C-Leucineの脳への取込み，脳蛋白への組込み・脳内遊離アミノ酸プールの全てに変化は認められない。

〈考察〉

脳内遊離アミノ酸パターンの変化のうちA群に於けるアラニンの著明な増量は，Hypoxia中乳酸が著明に蓄積する[1]ことと軌を一にし，Hypoxia中LDH・GPTの活性が亢進する事実[1]と符合し，嫌気的解糖が亢進していることを示すものと思われる。C群では，他のアミノ酸と同様低下の傾向を示しているのは，嫌気的解糖による適応現象はもはや終了していることを示すものであろう。E・F・H群に於てアラニンの変化の認められないのは，既に回復した後の姿と思われる。B・C群に於ける他の大部分のアミノ酸特にアスパラギン酸・セリン・グルタミン酸・グルタミン・グリシン等の非必須アミノ酸の低下は，回復に際し内在基質としてより多く利用される為であろう。

A群で^{14}C-Leucineの脳への取込みが亢進している様にみえるが，これは恐らく見掛けであって，蛋白合成の著明な低下による二次的な変化と解釈出来るであろう。

P987

〈文献〉 1) Jilek, L. et al: Physiology of the perinatal period Vol. 2 Appleton-C-C. E.D.H. Corp. NewYork 1970.

20. ウロカネース欠乏症 (Urocanase Deficiency)

吉田稔男・荒川雅男
(東北大・医・小児)
多田啓也
(阪市大・医・小児)

ヒスチジンは histidase (histidine deaminase) (I) によりウロカニン酸 (urocanic acid) となり、更に urocanase (II) により imidazolone propionic acid, formiminoglutamic acid (FIGLU) となり、更に formiminoglutamate formiminotransferase (III) により THFA (tetrahydrofolic acid) とカップルしてグルタミン酸となる。ヒスチジン代謝の先天性代謝異常として今迄知られていた疾患は、酵素(I)の欠損によるヒスチジン血症および酵素(III)の欠損によるフォルムイミノトランスフェレース欠損症であったが、我々は更に酵素(II)の欠損症を見い出したので報告する。

(1) ヒスチジンを経口負荷し尿の塩化第二鉄反応を調べると陽性を示しなおその尿のイミダゾール誘導体を分析するとウロカニン酸の著明なる排泄増加を認める。

(2) ヒスチジン負荷による尿中FIGLUの排泄増加が認められず、一方ウロカニン酸の静注負荷後の尿でもFIGLUの排泄増加を認めない。

(3) 皮膚の histidase 活性は正常であるが、肝における urocanase 活性は正常に比し著明な活性低下を認めた。

以上の結果から本症は"urocanase 欠乏症"または"ウロカニン酸尿症"と呼ばれるべき疾患と考える。

ヒスチジン代謝の先天性代謝異常として今迄知られていた疾患は、高ヒスチジン血症 (hyperhistidinemia)[2] とフォルムイミノトランスフェレース欠損症 (formiminotransferase deficiency)[1] の2つであったが、最近我々はウロカニン酸尿症 (urocanic aciduria)[5] を見い出した。

ウロカニン酸尿症の発見の手がかりは、重症心身障害児のスクリーニングの過程において、ヒスチジンを経口負荷すると尿の塩化第二鉄反応が陽性を示したことであり なおその尿に排泄されるべきFIGLU (formiminoglutamic acid) がまったく認められなかったことである。さらにイミダゾール誘導体の分析により多量のウロカニン酸の排泄を認めたので"ウロカニン酸尿症"と命名した。

1. 症候：患児は16才の男子で、妊娠、出産に異常なく、以後精神身体発育遅延を軽度にみとめている。1才7ケ月の頃結核性髄膜炎になり以後重症の精神身体発育遅延をきたしている。母親は肺結核で死亡しており、患者の症状の詳細は不明である。12才のときに重症心身障害児施設に入所しており、体重27.4kg (正常33.0kg)、頭囲52cm (正常52.8cm)、肝脾は触れず、四肢の拘縮と hemiplegia を認めている。

検査所見としては、貧血はなく、肝機能正常、血清蛋白、空腹時血糖、尿酸、血清葉酸など正常である。トリプトファン負荷試験による尿中キサンツレン酸の排泄は正常で、血中尿中遊離アミノ酸の分析ではヒスチジンの濃度は正常であった。

脳波では dysrhythmia がみられ、気脳術では Evans' ratio 0.5 と脳室の著明な拡大と asymmetry、頭部X線像では脳底部の石灰化像がみとめられる。

その他、染色体分析で異常なく、肝の組織所見も正常である。

2. 病態代謝： ヒスチジンの経口負荷試験（100mg/kg）では正常対照と比較して著明な代謝遅延、血中濃度の上昇がみとめられる。

ヒスチジンの経口投与（300mg/kg）後の24時間尿を用い、イミダゾール誘導体を薄層およびペーパークロマトグラフィーにて分析すると、ウロカニン酸の排泄が著明で、そのほか imidazole propionic acid, imidazole pyruric acid, imidazole lactic acid, imidazole acetic acid の排泄増加も著明である。薄層クロマトグラフィーによる分析では、セルロース薄層を用い、アセトン・酢酸・水（70：10：20）で展開し、Pauly 試薬で発色させると上記物質はきれいに分離する。

一方ウロカニン酸は277 mμ に特有の吸収を示すので、ヒスチジン負荷尿のウロカニン酸を測定すると、正常対照では1日量として0.1 mmol 以下の排泄のみみとめられるが、患者では3.15～7.70 mmol.（平均5.49 mmol.）のウロカニン酸の排泄増加がみとめられる。

3. 酵素活性の測定

(1) 皮膚の histidase 活性： 指先の皮膚（stratum corneum）約10mg をもちい、Zannoi & La Du の方法[1]により測定すると、対照は2.57～11.71 のところ、患者では9.32（μmol. of urocanic acid formed/h/g. wet weight）であり活性の低下はみとめられず、むしろやや活性の亢進がみとめられる。

(2) 肝における urocanase 活性：[3] 肝生検により得た40～50mg（湿重量）の肝をもちいて、Tabor & Mehler の方法により urocanase 活性を測定した。活性は37°C 30分の incubation 中に肝組織中 urocanase により分解されるウロカニン酸の量によってあらわしている。結果は表1のごとくで対照に比して著明な活性の低下が認められる。

4. 尿中 FIGLU（formiminoglutamic acid）

(1) ヒスチジン負荷試験後の尿中 FIGLU を測定すると、患者ではまったく排泄がみとめられない。すなわちヒスチジン塩酸塩を体重kgあたり0.33gを経口投与後、8時間蓄尿し、尿中 FIGLU を Tabor & Wyngaarden の方法[4]により測定すると、正常対照は26.5～40.6 μmol./8h の FIGLU の排泄がみとめられるが、患者では測定不能でまず0に近いことが考えられる。

(2) ウロカニン酸負荷試験後の尿でも FIGLU の排泄がみとめられない。すなわち、33 mg/kg のウロカニン酸を静注負荷し、8時間蓄尿し、尿中 FIGLU の排泄をみたところ、対照では10.6 μmol/8h のところ患者の尿では FIGLU の排泄はほとんどみとめられない。

以上の結果より考えると、本症では肝のウロカニン酸分解酵素（urocanase）の欠損がみられることにより、(1) ヒスチジン負荷後の尿中ウロカニン酸の著明な排泄増加がみとめられ、(2) ヒスチジン負荷により血中ヒスチジンの代謝遅延もみられ、尿中では塩化第二鉄反応陽性物質がみとめられ (3) ヒスチジン負荷によっても尿中 FIGLU 排泄がまったくみとめられず (4) ウロカニン酸負荷によっても尿中 FIGLU 排泄がみとめられないことが明らかである。

ウロカネース（urocanase）を阻害する物質として succinic acid が知られているが、患者の尿中有機酸の分析では succinic acid の異常排泄はみとめられない。

ヒスチジン負荷前の尿ではウロカニン酸の排泄増加はそれほど著明ではないが、薄層ウロマトグラフィーによるイミダゾール誘導体の分析では、今まで知られていない場所にPauly反応陽性物質がみとめられ、その物質の排泄も多く、ウロカニン酸由来の物質が尿中に出ている可能性がある。

おわりに：ウロカニン酸は皮膚に多くふくまれ、紫外線から皮膚を保護する働きがあるといわれている。しかし皮膚にはウロカニン酸を分解するurocanaseはほとんどない。肝におもに存在するurocanaseの欠損と、精神身体発育遅延などの臨床症状との関連はこれから追究する必要がある。

文献

1) Arakawa, Ts., Ohara, K., Takahashi, Y., Ogasawara, J., Hayashi, T., Chiba, R., Wada, Y., Tada, K., Mizuno, T., Okamura, T. & Yoshida, T. : Ann. Paediat., 205, 1, (1965)
2) Ghadimi, H., Partington, M.W. & Hunter, A. : New Engl. J. Med., 265, 221 (1961)
3) Tabor, H. & Mehler, A.H. : Methods in enzymol., 2, 228 (1955)
4) Tabor, H. & Wyngarden, L. : J. Biol. Chem. 234, 1830 (1959)
5) Yoshida, T., Tada, K., Honda, Y. & Arakawa, Ts. : Tohoku J. exp. Med., 104, 305 (1971)
6) Zannoi, V.G. & La Du, B.N. : Biochem. J., 88, 160 (1963)

表1 The urocanase activity in the liver

(The urocanase activity was expressed as μ moles of urocanic acid which were decomposed during the incubation for 30 min. with liver specimens)

	μmol./g of wet weight	μmol./mg of protein
patient (T.O.) 16yr. 0 mth.	0.51	0.0059
controls		
1. 7yr. 2mth.	2.81	0.0427
2 17yr. 7 mth.	4.32	0.0658

21. ヒト脳セレブロシドオキシ酸組成に関する2，3の新しい知見

河村成子・武富保
（信大・医・順応研・生化）

脳のセレブロシドがかなり特徴的な脂酸構成であることはよく知られているところである。なかでもオキシ酸は直鎖酸より量が多く重要な構成脂酸である。今回、筆者らは諸種脳のセレブロシド脂酸組成の分析中に、変ったオキシ酸組成を示す神経変性脳をみたので、オキシ酸に関する検討を重ね、2，3の新しい知見を得た。

(1)、オキシ酸組成の年令的変化が再検討された結果、若年性脳脂質症と診断された患者脳(19才)では、白質部オキシ酸が成人脳パタンを示すにもかかわらず、灰白質部オキシ酸はそれとは全く異ったパタンであり年令的変化を示さないのをみた。

(2)、オキシ酸比率の年令的変化が、オキシ酸メチルエステルのエステル定量分析と、総脂酸メチルエステルのガスクロマト分析による二通りの新しい手法によって検討された。この方法によってSudanophilic leukodystrophy 患者脳では特にオキシ酸の比率が低いという知見が得られた。

(3)、不飽和脂酸の二重結合の位置が筆者ら[3]の"オゾノリシスーガスクロマト分析"の方法で検討された結果、不飽和脂酸にはω9 > ω7 > ω8, ω10 の々系列があり、加令と共にω9系列の↑増加、ω7系列の↓減少という年令的変化がみられた。

[実験方法]

実験材料： 表-1に示す12種の脳組織を使った。

セレブロシドの分離・精製及び同定： 脳組織1gあたり20mlのC-M(2:1,v/v)で総脂質を抽出し、次いで溶媒分画法でスフィンゴリピドを得、更にケイ酸カラムクロマト法によって総セレブロシドを分離した。夾雑物は出来るだけフロリジルカラムの再クロマトで除いた。セレブロシドの同定・純度は、TLC・IRスペクトラム・GLCによる糖組成の分析によった。この総セレブロシドが脂肪酸分析に用いられた。

脂肪酸メチルエステルの調製とTLCによるオキシ酸の分離： 脂肪酸メチルエステルは、5% HCl-CH_3OH 中、3時間・煮沸で得られた。メチルエステルの一部は総脂酸としてそのまゝ、又一部はヘキサン-エーテル(85:15, v/v)で展開してオキシ酸を分取した。

脂肪酸メチルエステルのGLC： オキシ酸のGLC分析は普通TMS誘導体として行なわれるが、TMS化も処理前後で検討したところ、TMS化されていなくても充分GLC分析可能であるのを確認したので、本実験ではオキシ酸メチルエステルは、そのままGLC分析された。ガスクロ条件：3% SE-30, 4φ カラム, 208°C、別に総脂酸メチルエステルを

(表-1)

No.	Age	Diagnosis	Tissue Used
*1	2mo.	Congenital hydrocephalus	occipital, total
*2	3	——	frontal, total
*3	5	Down's Syndrome	occipital, total
4	19	Gaucher D.	white matter
5	28	Tay-Sachs D.	grey matter
*6	4yr.	——	total
7	17	——	frontal, white
*8	32	——	grey matter / white matter
9	38	——	total
10	55	——	total
	19yr	Juvenile type lipidosis (若年型脳脂質症)	occipital grey matter / white matter
	35	Sudanophilic leukodystrophy (SLD)	frontal, white matter

(* Formalin fixation tissues)

直接GLC分析することによってオキシ酸と直鎖酸の同時分析が試みられた。ガスクロ条件：3% SE-30, 4ft カラム, 208°C, carrier gas flow を下げて分析された。

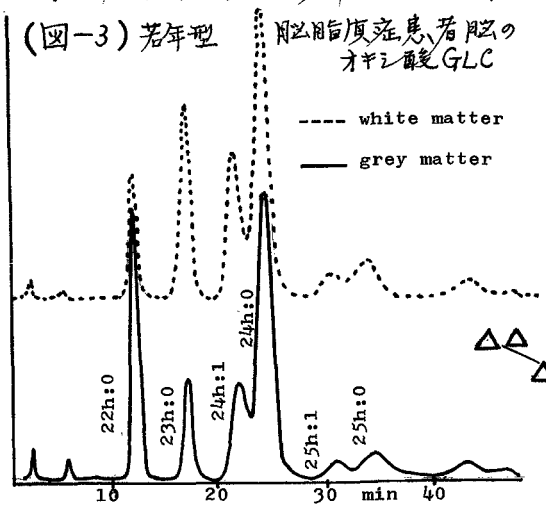
オキシ酸/総脂酸の比率を求める方法：これに関連して、フレノシンとケラシンをケイ酸カラムクロマトで分離する方法が山川ら[4]によって報告されているが、今回は次の2通りの方法で総脂酸メチルエステル中のオキシ酸の比率が求められた。1). 総脂酸メチルエステルをTLC上でオキシ酸と直鎖酸にわけ各々のエステル値を定量する方法[1]。2). 総脂酸メチルエステルのGLC上でオキシ酸ピーク総面積/総脂酸ピーク総面積の比率から求める方法。

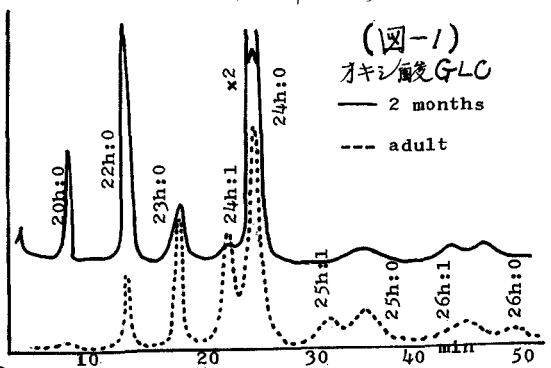
"オゾン分解－GLC法"による不飽和脂酸の二重結合の位置の決定：演者ら[3]の方法に従い脂肪酸メチルエステルをオゾン分解して得られたfatty aldehydeのGLCから決定された。ガスクロ条件：17% EGS, 6ft カラム, 105°C

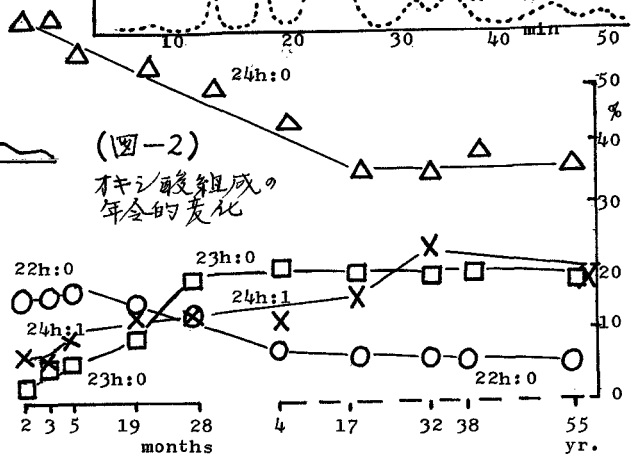
〔実験結果及び考察〕

オキシ酸組成の年令的変化：図-1, 2に見られる如く主なオキシ酸組成はC22h:0, C23h:0, C24h:0, C24h:1である。全年令を通してC24h:0が主体であるが、幼児脳は偶数飽和酸が圧倒的(70-80%)であり、成人脳はむしろ奇数及び不飽和脂酸が高いのが特徴である。年令と共にC22h:0が低下するにつれ、C23h:0が上昇する変動曲線が特徴的である。C24h:1の上昇も特徴的であるが、直鎖酸24h:1の増加(幼児脳, 10% → 成人脳, 40~50%)ほどではない。C25h:0, C26h:0は比率は低いが加令と共に増加するのがわかる。

若年型脳脂質症に見られたオキシ酸組成の変動：年令的変化は上のように要約出来たが、若年型脳脂質症と診断された患者脳(17才)のオキシ酸組成が年令的変化を示さないのを見た。図3は白質部と灰白質部のセレブロシドのオキシ酸GLCである。白質部：22h:0 8.8, 23h:0 19.3, 24h:1 17.3, 24h:0 37.0(%)；灰白質部：22h:0 21.0, 23h:0 12.1, 24h:1 13.1, 24h:0 37.7(%)；灰白質部のC22h:0の比率が極めて高い。図-3の白質部のGLC

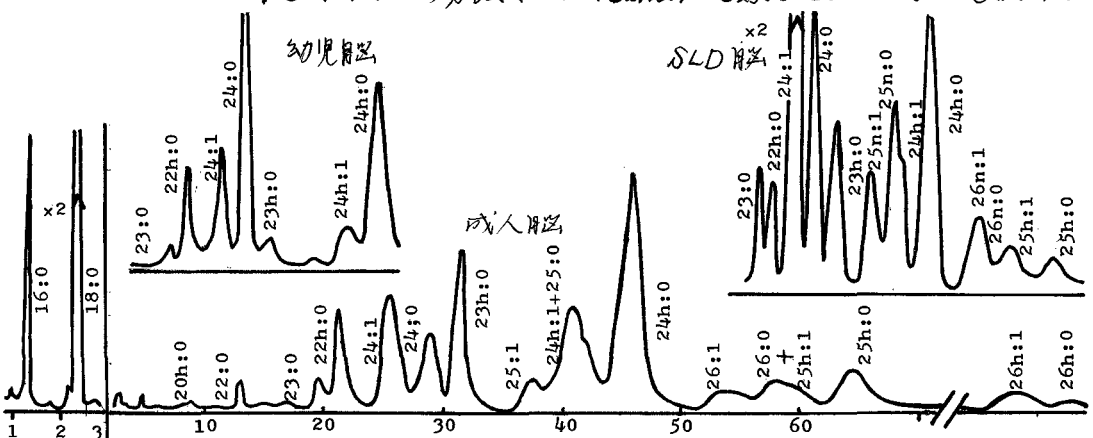






は、図-1のadult GLCによく合致するが灰白質オキシ酸は、むしろ2monthのGLCに似たパタンである。この点に関連して、まず成人脳セレブロシド・オキシ酸組成を両部位で比較してみたところ、差は無いことをみとめた。次に関連脂質としてスルファチドのオキシ酸組成(セレブロシドオキシ酸組成と同じ年令変化を示す)を患者脳について検討した。主なオキシ酸組成は、白質部: 22h 14.8, 23h 13.5, 24h:1 15.6, 24h 38.5 (%); 灰白質部: 22h 12.8, 23h 8.0, 24h:1 16.0, 24h 41.2 (%)であったことから、やはりスルファチドにおいてもセレブロシドと同様の異常性を示すのを確認した。他方、直鎖酸に関する分析から、灰白質部セレブロシドのC24:1がやや低下しているのもみられたがその他の組成に大差はなかった。更に関連脂質としてスフィンゴミエリン(成人脳白質・灰白質部では著しく異った組成を示す。オキシ酸はない。)についても検討してみたところ、何ら異常はなかった。以上の実験結果から本患者脳は、白質部オキシ酸には年令的変化がみられるが、灰白質部オキシ酸C22h, C23h, C24h:1には年令的変化がみられない、と云える。オキシ酸は長鎖直鎖脂肪酸が2酸化と機構により分解される途中で生成されることが知られているがこの過程に何らかの障害があるものと思われる(⟶C24⟶C24h⟶C23⟶C23h⟶C22⟶C22h⟶)。

セレブロシド総脂肪酸メチルエステルのGLC: このように、オキシ酸組成が加令及び疾患脳で変動することと、関連してオキシ酸量の変動を見る為に、セレブロシド総脂肪酸中のオキシ酸の比率をGLC分析から求める新しい手法が試みられた。図4は成人脳、幼児脳及び疾患脳(SLD)のセレブロシド総脂肪酸メチルエステルのGLCである。各々のピークの同定のために総脂肪酸はTLCでオキシ酸と直鎖酸に分離され、別々に同条件でGLC分析され、retention timeが比較された。この方法によると、C24h:1とC25:0及びC26:0とC25h:1の



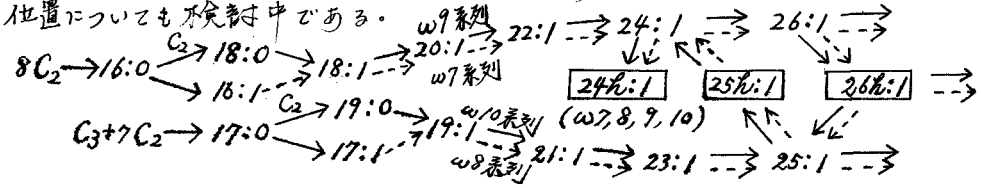
(図-4) セレブロシド総脂肪酸のメチルエステルのGLC

ピークが重なるという難点は残る。しかしこの同時分析の手法によって、オキシ酸のみならず、直鎖酸の概略もしることが出来るし、また直鎖酸、オキシ酸、飽和酸、不飽和酸全組成の関連をみることが出来るので脂質組成の変動をみる実験には中々よく応用出来ると思われる。

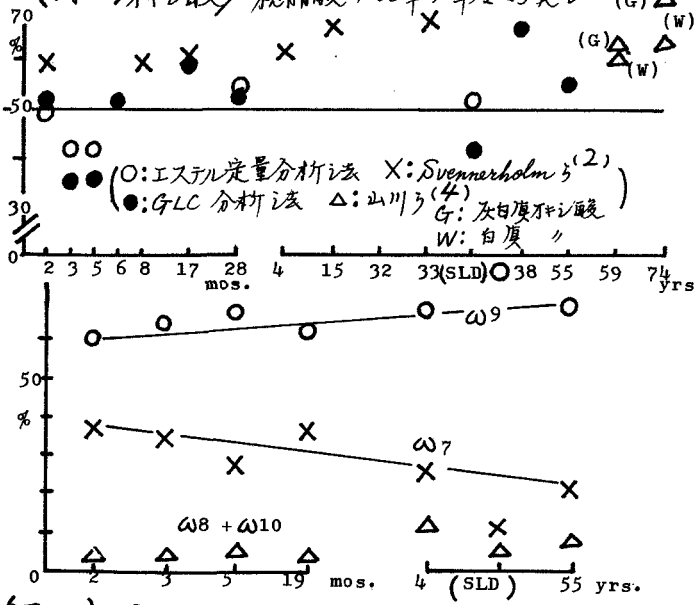
オキシ酸/総脂肪酸の比率の年令的変化とSLD脳にみられた変動: このGLCパタンピークで、オキシ酸総面積の総脂肪酸総面積に対する比率が容易に求められた。図5には、別法エステル定量分析により得られた比率も示されている。また山川ら(4)及びSvennerholmら(2)の結果も比較検討のために併せて示した。図から明らかのように、

オキシ酸は幼児脳に既にみられ、その後増加を示す。成人脳ではほぼ50～70%の定値を示しており図-2の変動パターンと似ているのがみとめられる。この方法は迅速でしかも定量性をもつことが認められたが、この方法を用いて、SLD脳のオキシ酸比率が低いという新しい知見が得られた(図-4)。本疾患脳の遊離酸、オキシ酸組成には、何ら異常はみられなかった。

不飽和脂肪酸の二重結合の位置の決定 及び 二重結合の位置の年令的変化と、SLD脳にみられた変動：既にみたようにオキシ酸には C_{24}に1, C_{25}に1, C_{26}に1の不飽和脂肪酸が存在し加令と共に幼児脳ほぼ10% → 成人脳ほぼ40%のように変動する。疾患脳で変動するのもみられている。不飽和脂肪酸の性質をより詳しく知るために、筆者ら[3]が既に報告した方法によって脂肪酸メチルエステルをオゾン分解し、それによって得られるfatty aldehydeのGLCによる分析によって、二重結合の位置が決定された。図-6からC7, C8, C9, C10の4種のfatty aldehydeのピークがみられる。従ってω7, ω8, ω9, ω10の4系列から成ることが判る。4系列の比率が図-7に示されているが、ω9, ω7が主体をなし、ω9系列が増加し、ω7系列が減少するという年令的変化が得られた。また、この方法を用いることによって、SLD脳ではω9系列の比率が特別に高いという新しい知見が得られた(図-6,7)。この実験の結果から、不飽和脂肪酸のお調は至急合が次のようにまとめられた。遊離酸不飽和酸の二重結合の位置についても検討中である。



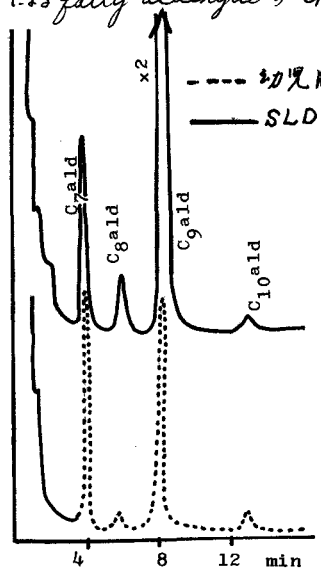
(図-5) オキシ酸／総脂肪酸の比率の年令的変化



(図-7) 不飽和脂肪酸中のω7, 8, 9, 10系列の年令的変化

(図-6)

オキシ酸メチルエステルのオゾン分解による fatty aldehyde の GLC



文献：(1) Goddu, R.F., LeBlanc, N.F., and Wright, C.M., Analytical Chem., 2, 1251 (1955) (2) Svennerholm L., and Ställberg-Stenhagen, S., J. Lipid Res., 2, 215 (1968) (3) Taketomi, T., and Kawamura, N., J. Biochem., 72, 189 (1972) (4) Yamakawa, T., and Nishimura, S., Japan J. Exp. Med., 36, 101 (1966)

22. ハイプシン，N^6-（4-アミノ-2-ヒドロキシブチル）-2，6-ジアミノカプロン酸の発見

中嶋照夫・今岡信夫
柿本泰男・佐野勇
（阪大・医・高次研）

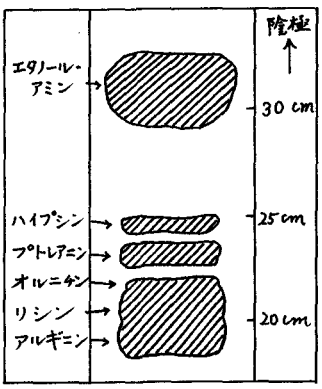
1）ウシ脳のTCA抽出液より今まで知られていなかった一つのアミノ酸を単離し、NMR、過ぎ度酸一過マンガン酸カリによる酸化、沃化水素一赤燐による還元および質量分析によりN^6-(4-アミノ-2-ヒドロキシブチル)-2,6-ジアミノカプロン酸であると構造決定し、ハイプシンと命名した。
2）ハイプシンのラットの体内分布をしらべ、脳、肝、腎、血液に比較的多く存在すること、人尿中にも排泄されていることを明らかにした。ついで家兎を用い脳内分布を検討し、大脳および小脳に比較的多く分布していることを証明した。発育に伴なうハイプシンの脳内含量の変化をみると、ラット脳では生後2週前目頃より出現し、1-2ケ月でほぼ成熟値に達する。
3）ウシ脳タンパク質分画を用い、ハイプシンがタンパク質構成アミノ酸の一つであることを証明した。
4）ハイプシンの臓器タンパク質中の分布を検討し、ハイプシンは全ての臓器のタンパク質中に存在するが、肝のタンパク質に比較的多いことを明らかにした。

脳のアミノ化合物の分離同定の一連の研究で、今まで知られていなかった一つのアミノ酸、ハイプシンを発見した。さらにこの物質の動物体内分布、発育に伴なう脳内含量の変化を検討し、タンパク質中にも存在することを見いだしたのでこれらの知見を報告する。

〔実験方法および結果〕

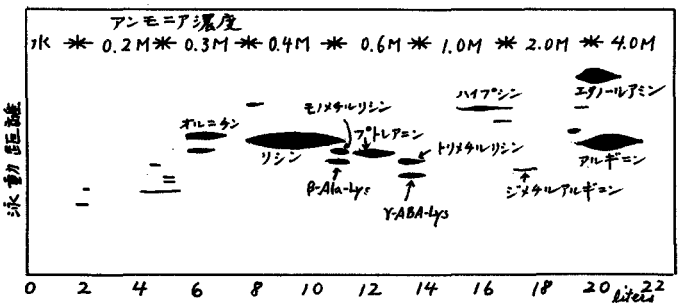
1）ハイプシンの分離同定および構造決定：ウシ脳200個（82 Kg）のTCA抽出液（120 liters）を Amberlite IR-120, 100-200 mesh, H^+型に通し、水洗後1Mピリジン溶液で酸性および中性アミノ酸を除去した。塩基性アミノ酸を2Mアンモニア50%エタノール溶液で溶出し減圧乾固した。乾固物を水に溶かし、Amberlite CG 50, 100-200 mesh, NH_4^+型に通し、水洗によりイミダゾールアミノ酸を除去したのち、アンモニア溶液で塩基性脂肪族アミノ酸を溶出した。溶出液を減圧乾固し、その一部（脳3g当量）を高圧沪紙電気泳動を行ないニンヒドリンで発色させた。泳動條件はピリジン-酢酸-水（5:50:945, pH 3.4）で 70 volts/cm 40 min. 泳動させた。図1に示すようにアルギニン、オルニチン、リシン、プトレアニン、エタノールアミンのほかに未知のバンドが見られた。この物質を分離精製するために塩基性脂肪族アミノ酸分画を 6.3×120 cm Amberlite IR-

図1. ウシ脳の塩基性脂肪族アミノ酸分画の高圧沪紙電気泳動パターン。



120, NH_4^+型上でアンモニアの濃度を段階的に上げて展開した（図2）。溶出液15,040－17,040 mlを集め減圧乾固し、さらに2×49 cm Amberlite CG 50, NH_4^+型上で0.25Mアンモニアを用いて展開した。目的物質は114－145 mlの分画に溶出し、他にニンヒドリン陽性物質の混在はみられなかった。この分画を減圧乾固し、塩酸塩として90%メタノール中より結晶化させ105 mgの針状結晶をえた。母液からさらに32 mgの結晶をえた。この物質の元素分析値はC, 39.07; H, 8.28; N, 13.52; Cl, 22.82%であり、実験式は$C_{10}H_{25}N_3O_3Cl_3$となる。この物質の構造決定は阪大理学部らによりなされた[1]。すなわちNMRの分析より4つのC-$\underline{CH_2}$-C、3つのC-$\underline{CH_2}$-N、3つの$\underline{NH_3^+}$あるいは$\underline{NH_2^+}$、それぞれ1つのC-$\underline{CH}$(OH)-CとC-$\underline{CH}$(COOH)-Nの存在が示されたこと、過沃度酸－過マンガン酸カリによる酸化でβ-アラニンとL-リシンに分解されること、沃化水素と赤燐による還元でN^{ε}-(4-アミノブチル)-リシンに変化することおよび質量分析で分子量が233と決定されたことからこの物質はN^{ε}-(4-アミノ-2-ヒドロキシブチル)-2,6-ジアミノカプロン酸であると構造決定された。そしてヒドロオキシプトレスケンとリシンが縮合したような構造であるのでハイプシンと命名した。

図2. ウシ脳の塩基性脂肪族アミノ酸分画のイオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン



2）ハイプシンの動物体内分布：ハイプシンの定量は組織の塩基性脂肪族アミノ酸分画をアミノ酸自動分析器にかけて行った。アミノ酸自動分析の条件は30 cmカラムを使用し、0.57M食塩を含む0.38Mクエン酸緩衝液、pH 4.26、を用い60°で流速60 ml/hで分析した。この条件でプトレアニンはアルギニンの37 min.、ハイプシンは122 min.後に溶出される。ハイプシンの発色率はリシンの149%であり、10－100 nmolesのハイプシンは5%以内の誤差で測定される。ハイプシンのラッテの体内分布を表1に示した。ハイプシンは脳、肝、腎、血液に比較的多く存在する。中枢神経系では小脳、大脳に比較的多い（表2）。発育に伴なう脳内含量の変化をみるとラッテ脳では生後2週目頃より出現し、1－2ケ月でほぼ成熟値に達する（表3）。人尿中への排泄量は1－2 nmoles/mgクレアチニンで年令、性別によって大差はみられなかった（表4）。

表1. ハイプシンのラッテの体内分布

組織	ハイプシン濃度 (nmoles/g)	
脳	4	8
肝	3	2
腎	2	9
筋肉	2	<1
血液	2	2
小腸	<1	<1
脾	<1	<1
心	<1	<1
肺	<1	<1
子宮	<1	<1
皮	<1	<1

表2. 家兎の神経系におけるハイプシンの分布

部位	ハイプシン濃度 (nmoles/g)		
大脳	6	5	5
中脳	2	2	2
海馬	2	3	2
小脳	4	10	6
脳幹	1	5	1
脊髄	2	2	1
坐骨神経		<1	<1

表3. ラッテ脳のハイプシン含量の発育による変動

年令	ハイプシン濃度 (nmoles/g)		
1日	<1	<1	<1
1週	<1	<1	<1
2週	1	1	
3週	3	2	4
2ケ月	5	4	6
6ケ月	6	6	7
12ケ月	3	3	

3）タンパク質中のハイプシンの分離同定：ウシ脳12個（4.4 Kg）をクロロホルム－

メタノール（1：1）溶液中でホモジネートとし、沪過後の残渣を10%TCAに懸濁させ、80°15分間加熱した。冷却後沪過し、残渣を5%TCAでよく洗い、最後にアセトン、エーテルで洗って乾燥させ、430gのタンパク質分画をえた。400gのタンパク質分画を6N塩酸中で20時間加水分解し、冷却後沪過し、沪液を減圧濃縮した。さらに水を加えて減圧濃縮をくりかえし、塩酸を十分に除去したのち、濃縮液を水で稀釈し、Amberlite IR-120、Amberlite CG50を用い、上記の方法で塩基性脂肪族アミノ酸分画をえた。この分画を5.4×68cm Amberlite IR-120, NH_4^+型上で0.5Mアンモニア6litersついで0.7Mアンモニアで展開した。目的物質はリシンのうしろアルギニンの前の分画に溶出されるので、この分画すなわち溶出液4,830－7,185mlを集め減圧乾固した。さらにこの分画を1×20cm Amberlite IR-120, NH_4^+型上で0.5Mアンモニアで展開した。目的物質は溶出液79.8－113.4mlの分画にジメチルアルギニンと共に溶出される。ジメチルアルギニンを除くために、1×20cm Amberlite CG50, NH_4^+型上で0.25Mアンモニア120ml、ついで0.5Mアンモニで展開した。ジメチルアルギニンは溶出液29.4－42mlに、目的物質は138.6－151.2mlに溶出される。この分画を集め同定に用いた。図3に単離物質のアミノ酸自動分析上の溶出パターンを示した。カラムは15cmを用い、展開條件は上記の條件を用いた。単離物質の溶出部位はウシ脳TCA抽出液から単離し、構造決定したハイプシンのそれと全く一致した。さらに電気泳動上の泳動距離、沪紙クロマトグラフィー上のRf値もハイプシンのそれと全く一致した（表5）。単離物質をダンシル化し、薄層クロマトグラフィーを行ったが、Rf値はハイプシンのダンシル誘導体のそれと一致した。また単離物質138mμmoles当量を水50μlに溶かし、1mgの過沃度酸を加え室温で1時間反応させたのち、さらに稀釈した過マンガン酸カリ溶液を色が残留する程度加えて1時間反応させるとこの物質はβ-アラニンとリシンに分解することが証明された。以上の結果からウシ脳タンパク質から単離された物質はハイプシンであると同定した。

表4. ハイプシンの人尿中への排泄量

男性		女性	
年令（才）	ハイプシン（nmoles/mgクレアチニン）	年令（才）	ハイプシン（nmoles/mgクレアチニン）
7	2	7	2
7	2	8	2
8	2	9	2
11	2	9	2
20	1	12	1
21	1	16	3
36	1	18	1
37	2	18	3
38	2	23	1
43	3	24	2
45	1	29	2
49	1	68	2

図3. ウシ脳タンパク質からの単離物質のアミノ酸自動分析上の溶出部位

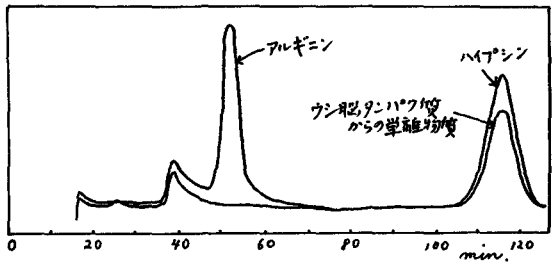


表5. ハイプシンのRf値

溶媒系	Rf値
ピリジン－アセトン－3Mアンモニア（50：30：25）	0.34
イソプロパノール－氷酢酸－水（4：1：1）	0.30
イソプロパノール－アンモニア－水（8：1：1）	0.14
n-ブタノール－酢酸－水（4：1：1）	0.04
n-ブタノール－ピリジン－酢酸－水（4：1：1：2）	0.14

4）ハイプシンの組織タンパク質中の分布：家兎の肝、筋肉、腎、肺、心、脾、脳の各器官から上記の方法によりタンパク質分画を精製した。タンパク質分画1gを6N

塩酸10 mlを用い、減圧した封管中で110°、20時間加水分解した。水解物を沪過し、沪液を水で20倍に稀釈したのち、15 mlのAmberlite IR-120、H^+型に通し上記の方法で塩基性アミノ酸分画をえた。この分画に含まれている多量のヒスチジン、リシンおよびアルギニンを除くため、この分画をさらに1×20 cm Amberlite IR-120, NH_4^+型上で0.7Mアンモニアで展開した。溶出液3 mlづつ集め、5 μlを用いて高圧沪紙電気泳動を行い、ヒスチジン、リシンおよびアルギニンの溶出部位を決定した。ハイプシンはリシンとアルギニンに挟まれた分画に溶出されるので、この分画を集め減圧乾固し、アミノ酸自動分析器にてハイプシンの定量を行った。肝のタンパク質分画に1－0.1 μmoleのハイプシンを加え回収実験を行ったが、この操作での回収率は60－70%であった。表6に各組織のタンパク質中のハイプシン含量を示した。ハイプシンは各組織タンパク質中に含まれているが、肝のタンパク質に比較的多く含まれている。

表6. 組織タンパク質中のハイプシン含量

組織	ハイプシン濃度 (mμmole/gタンパク質)		
脳	44	11	17
肝	56	50	67
腎	31	44	35
心	15	23	30
筋肉	36	33	21
脊髄	36		
肺	18	18	18
脾	32	35	

〔考察〕

自然界にはaspergillomarasmine B[2]、lycomarasmine[3]、octopine[4]、saccharopine[5]、lysinonorleucine[6]、lysinoalanine[7]などのように2つのアミノ酸がイミノ窒素の形で縮合したような物質が多く知られている。しかしハイプシンの如くアミンとアミノ酸の縮合した構造のものはわれわれが発見したプトレアニンが知られているのみである。プトレアニンはスペルミジンから生合成されることは前回の本学会で報告したが、ハイプシンの生合成に関しては現在のところ未知である。しかし今回ハイプシンがタンパク質の一つの構成アミノ酸であることを明らかにしたことから、タンパク質のリシン残基がメチル化、アセチル化されるのと同様に、修飾されて出来る可能性が考えられる。現在われわれはハイプシンの生合成をタンパク質の修飾という観点から検討を進めるとともに、いかなるタンパク質に特異的に存在するかについても検討中である。

ハイプシンの生理学的意義は現在のところ全く見当もつかないが、β-アラニルハイプシンおよびγ-アミノブチリルハイプシンが脳に存在することから、ヒスチジン、メチルヒスチジンのジペプチドと同様に神経化学の今後のテーマになる可能性がある。

〔参考文献〕

1) Shiba, T., Mizote, H., Kaneko, T., Nakajima, T., Kakimoto, Y. and Sano, I., Biochim. et Biophys. Acta, 244 (1971) 533.
2) Robert, M., Barbier, M., Lederer, E., Roux, L., Bieman, K. and Vetter, W., Bull. Soc. Chim. France, (1962) 187.
3) Haenni, A.L., Barbier, M. and Lederer, E., C. R., 255 (1962) 1476.
4) Akashi, S., J. Biochem. Tokyo, 25 (1937) 261, 281, 291.
5) Kjaer, A. and Larsen, P.O., Acta Chem. Scand., 15 (1961) 750.
6) Franzblau, C., Sinex, F.M., Faris, B. and Lampidis, R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 21 (1965) 575.
7) Patchornik, A. and Sokolovsky, M., J. Am. Chem. Soc., 86 (1964) 1860.

23. 脳内のメチル化蛋白質

柿本泰男・三宅正治
（阪大・医・高次研）

メチルリシンおよびメチルアルギニンを構成アミノ酸としてふくむ脳蛋白について研究し、脳蛋白中これらアミノ酸をふくむ蛋白として①N^G-モノメチルおよびN^G,N'^G-ジメチルアルギニンをふくむミエリンのA1蛋白と②N^ε-トリおよびジメチルリシンおよびN^G,N^G-ジメチルアルギニンをふくむ核蛋白とがあり、反対にこれらアミノ酸は上の蛋白のmarkerとなることを以下の実験結果からほぼ明らかにした。

1) 蛋白中のN^G-モノおよびN^G,N'^G-ジメチルアルギニン3残基の脳内分布はセレブロシドの分布と一致し、N^G,N^G-ジメチルアルギニンおよびトリおよびジメチルリシンの分布はDNAの分布にほぼ一致する（ウシおよびヒト脳）。

2) ラット脳内の上のアミノ酸残基の成長に伴なう変化をみると、先の2つのアミノ酸はセレブロシドと同様ミエリン形成期に急に増加し、N^G,N^G-ジメチルアルギニンは生後濃度がやゝ低下し1ケ月以後は一定となる。

3) N^G-モノおよびN^G,N'^G-ジメチルアルギニンをふくむ蛋白はA1蛋白と共に精製される。

細胞核の中酸性蛋白質にはN^G,N^G-ジメチルアルギニン残基を多くふくむ蛋白質があることは以前にも報告したが、現在その精製を試みつつある。

われわれは生体の蛋白質の構成アミノ酸として、従来から知られたメチルリシン(3種)、3-メチルヒスチジンに加えて、新たに3種のメチルアルギニンを見出し、それらの分布、生体の機能との関係、蛋白質のメチル化とメチル化された蛋白質の分解などについて研究してきた。(1～6) これらのメチル化アミノ酸は自然界に広く、しかも多種類の蛋白質中に存在する。脳内のメチル化リシン体およびアルギニン体をふくむ蛋白質についての研究を今回発表する。

実験材料および方法

脳からの蛋白質分画調製：方法1.一脳を20倍量の冷却(-20°)クロロホルム-メタノール(2:1)でホモジネートとし沪過、残渣を20倍量の同上液で、ついで冷却アセトン10倍量で洗い乾燥せしめる。方法2－脳を10倍量の10%トリクロール酢酸でホモジネートとし、遠心し沈殿を5倍量のトリクロール酢酸で2回、10倍量のアセトンで2回洗う。

蛋白中メチルリシンおよびメチルアルギニン誘導体の定量：既報の方法によった。(6)

蛋白質の定量：Lowry法(7)によった。

DNAの定量：Schneider法(8)で抽出しジフェニルアミンによるデオキシリボースの定量。(9)

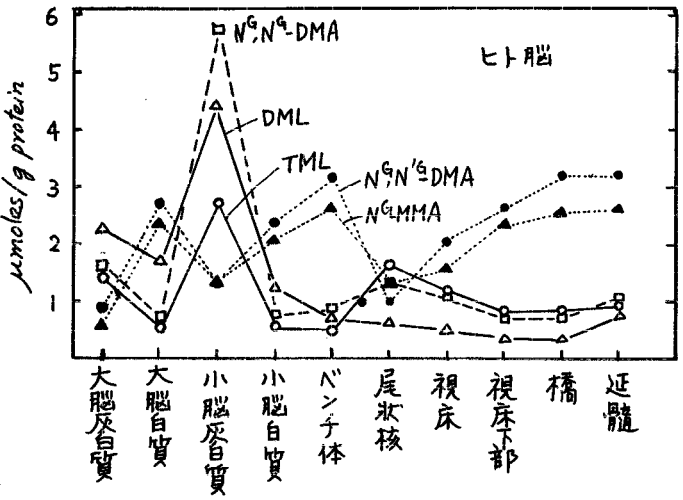
セレブロシドの定量：脳をクロロホルム：メタノール抽出し、抽出液を乾固し、アセトン、エーテル不溶、ピリジン可溶分画をとり、アンスロン法で糖を定量した。(10)

結果

ヒト脳蛋白中メチルアミノ酸残基の脳内分布

ヒト脳(交通事故死)の各部位1.5～2gから方法2に従い蛋白質分画を得、その50mgを用いて、ふくまれるメチルアミノ酸残基を定量すると図1に示す結果が得られた。この図から明らかなように、N^G-モノメチルアルギニン(図中 N^G-MMAと略)および N^G,N'^G-ジメチルアルギニン(N^G,N'^G-DMA)量は両者の分布が平行し、その多い部位は自質に富む部位である。また N^G,N^G-ジメチルアルギニン(N^G,N^G-DMA)、N^ε-ジメチルリシン(DML)および N^ε-トリメチルリシン(TML)の分布も平行し、さきの2種のメチルアルギニン体とは全く異なる分布を示している。小脳灰白質に多いことはこれら後3者をふくむ蛋白質は核と関係していることを予想せしめる。

図1. ヒト脳蛋白中メチルアミノ酸残基の脳内分布

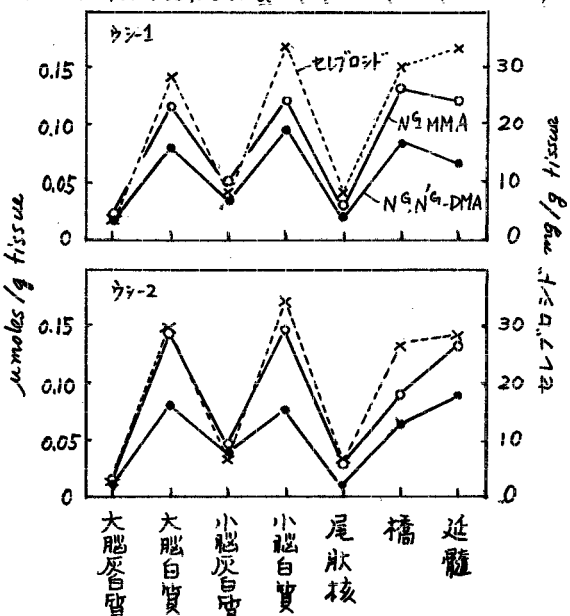


白質部から方法1に従って蛋白質分画をとり、水→0.6M KCl→pH 1.7で抽出すると、N^G,N^G-ジメチル-および N^G-モノメチルアルギニン残基をふくむ蛋白質はpH 1.7で抽出されることがわかった。そこで酸可溶性蛋白分画を用いて脳内分布を再検討した。

ウシ脳酸可溶性蛋白中メチルアルギニン残基の脳内分布

ウシ脳の各部位から方法1で蛋白質分画をとり、その約150mgを水20mlに浮遊せしめpH 1.8とし4°で一夜抽出し、遠沈、沈渣を0.05N HClで洗い、抽出液をあわせ、これに40%トリクロール酢酸10mlを加え遠沈し、沈渣をアセトン20mlで2回洗い、得られた蛋白質分画を用いメチルアミノ酸残基を定量した。またクロロホルム-メタノール可溶性分画を用いセレブロシド(+スルファチド)の定量を行なった。図2に示すように N^G-モノおよび N^G,N'^G-ジメチルアルギニン残基の分布はミエリンのmarkerとして用いたセレブロシドの分布によく平行している。

図2. ウシ脳の酸可溶性蛋白中メチルアルギニン残基の脳内分布

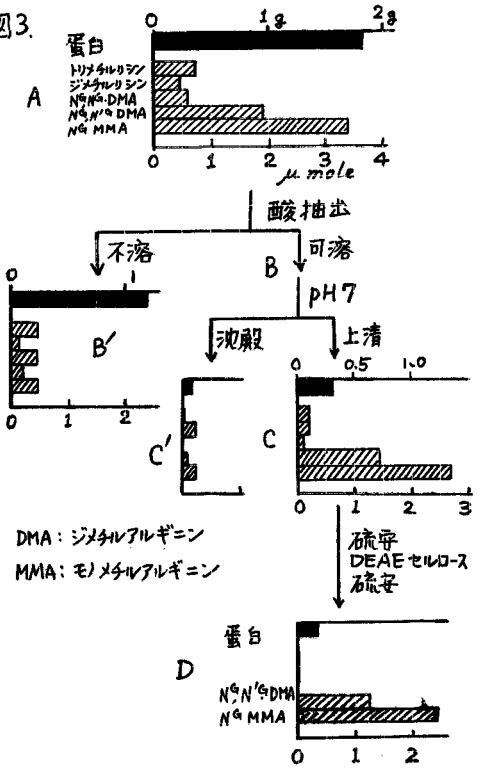


ウシ脳酸可溶性蛋白質中メチルアルギニン残基をふくむ蛋白質

上の2つのアミノ酸残基はミエリンと関連し酸で抽出され3蛋白質中に存在するこ

とおよびミエリンの主要な塩基性蛋白質はA1蛋白でありその107位に上の2種のメチルアルギニン残基をふくむことから,[11] 脳の蛋白でこれら2種のアミノ酸残基をふくむ蛋白質はA1蛋白であろうと予想した。そこでウシ脳白質から方法1で作成した蛋白分画2gを用いA1蛋白精製法[12]に従って精製し、各段階での蛋白量と、そこにふくまれるメチルアミノ酸を定量した。その結果を図3に示すが、最初のA分画からD分画に精製されると上の2種のメチルアルギニン体のみをふくむ蛋白分画となり、またここに2/3のメチルアルギニン残基をふくむ蛋白質が回収されている。さらに均質のA1まで精製したが蛋白量あたりのメチルアルギニン量は変らなかった。以上のことから脳白質の酸可溶性蛋白のほとんどはミエリンのA1蛋白に由来するといえる。

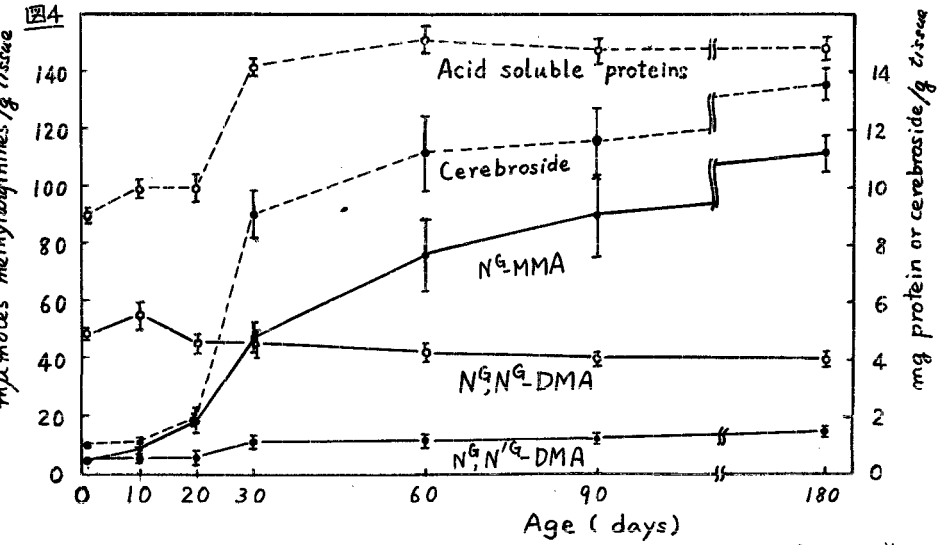
図3.



ラット脳中酸可溶性蛋白中のメチルアルギニン残基の成長に伴なう量的変動

先に用いた方法で酸可溶性蛋白分画をとりラット成長の各期でメチルアルギニン残基を定量した。同時にセレブロシドを定量した。N^GモノおよびN^G,N'^G-ジメチルアルギニンがミエリンの蛋白に局在しているとすれば、これらの含量の変化はセレブロシドの変化に平行し、髄鞘形成期に増加すると期待しうる。図4に示すようにセレブロシドは生後20日から30日の間に著明に増加し、この時期にN^Gモノメチルアルギニンも増加する。N^G,N'^G-ジメチルアルギニン残基はラット脳では少ないが、やはりこの時期に増加している。ところがN^G,N^G-ジメチルアルギニン残基は10日目から減少し、60日以後は変化しない。脳内DNAの変化はこれに平行すると考えられ、このアミノ酸残基と

図4

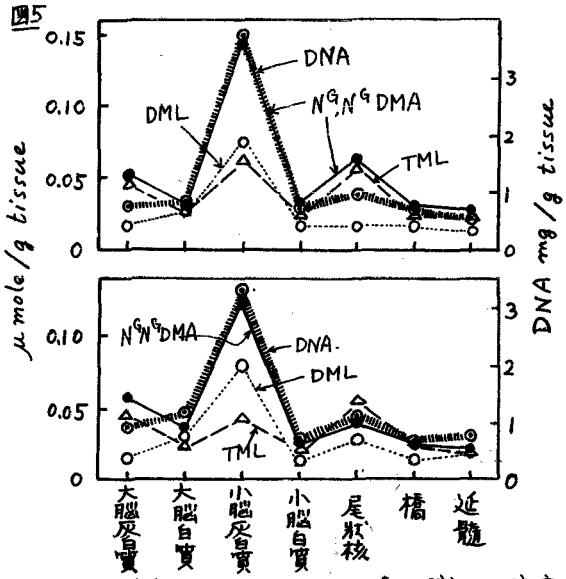


ふくむ蛋白質が核に関連しているという上の予想を裏づけるものである。

ウシ脳内蛋白中の N^G,N^G-ジメチルアルギニンおよびメチルリシン体残基の脳内分布

この予想を裏づける傍証としてウシ脳を用い、蛋白中のメチルアミノ酸残基を図5に示した部位で測定した。そして同時にDNA含量も測定した。その結果 N^G,N^G-ジメチルアルギニン、N^E-ジメチルおよびトリメチルリシン残基の量はDNA量にほぼ比例して分布していることが、図5の結果から明らかになった。とくに良く平行しているのは前2者のアミノ酸残基である。N^G-モノおよび N^G,N'^G-ジメチルアルギニン残基量はウシでも図1に示したヒト脳と同様全く逆の分布を示した。

図5



つぎに小脳を用いて N^G,N^G-ジメチルアルギニン残基をふくむ蛋白の性質について実験したが、この蛋白質は0.6 M KClで抽出され、pH3で上清に残り、硫安40%で沈殿することを知り、現在精製中である。

考察

メチル化された蛋白質は自然界で非常に広範な分布を示すが、これはすべての蛋白質に非選択的に at random に起こるのではなく、ある種の蛋白質の一定部位に、しかも定まった様式と率で起こると考えられる。たとえば本報告でのべたように脳では、ミエリン蛋白の約1/3をしめるA1蛋白の107位のアルギニン残基がメチル化をうけ N^G-モノおよび N^G,N'^G-ジメチルアルギニン残基となり、しかもアルギニン：モノメチルアルギニン：ジメチルアルギニンの比率は種属によって一定している。脳ではメチルアミノ酸をふくむ蛋白質はこのA1蛋白と、核にふくまれる中酸性蛋白との2種が主であると考えられる。

脳のモノメチルおよび N^G,N'^G-ジメチルアルギニン残基のほとんどがA1蛋白に由来することが本報告で明らかになったが、今後メチル化アルギニン残基をmarkerとして病態におけるミエリンのA1蛋白の変動や代謝回転などを研究したい。

文献

1) Y. Kakimoto, S. Akazawa, J. Biol. Chem., 245, 5751 (1970), 2) T. Nakajima, Y. Matsuoka, Y. Kakimoto, Biochim. Biophys. Acta 230, 212 (1971), 3) Y. Kakimoto, Biochim. Biophys. Acta, 243, 31 (1971) 4) 柿本泰男, 三宅正治, 中嶋照夫, 小西博行, 神経化学 43 (1971), 5) 三宅正治, 柿本泰男, 松岡征夫, 神経化学 47 (1971) 6) 柿本泰男, 中嶋照夫, 蛋白質, 核酸, 酵素 17 (2) 105, (1972), 7) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, R.J. J. Biol. Chem., 193, 265 (1951), 8) Schneider, W.C., J. Biol. Chem. 164, 747 (1946), 9) Burton, K., Biochem. J. 62, 315 (1956), 10) 牧田亭 生物化学実験法 VII. 脂質実験法 106 (1967) 共立出版 11) Brostoff, J., Eylar, E.H., Proc. Nat. Acad. Sci, 68, 765 (1971) 12) Oshiro, Y., Eylar, E.H., Arch. Biochem. Biophys., 138, 392 (1970)

24. 脳のA1蛋白およびヒストンのメチル化酵素について

三宅正治
（阪大・医・高次研）

(1)前回の報告で、脳の細胞質分画のA1蛋白とヒストンメチル化酵素は、異なった酵素であることを明らかにした。今回これらの両メチラーゼをさらに精製し、それぞれの蛋白のアルギニン残基をメチル化する酵素であることを明らかにした。
(2)A1蛋白とヒストンメチル化活性は、共にラットのすべての臓器に認められ、特に睾丸が非常に高く、つぎが脳で、肝臓は、最も低く脳の約1/10程度であった。
(3)ヒト脳の各部位については、両活性とも、尾状核、小脳灰白質視床が最も高く、その他の部位は、ほぼ同じで、延髄は、最も低かった。
(4)脳のメチル化活性のラットの成長に伴なう変化を調べた。細胞質分画のA1蛋白メチル化活性は、出生直後から10日目にかけて、一度減少した後ミエリン形成が活発になる20～30日目に一致して再び増加し、adultのレベルに達する。核のヒストンメチル化活性は、出生直後に最も高く、成長に従って、著しく減少し、30日目でadultのレベルに達する。
(5)ヒト、ウシ、ウサギから得たA1蛋白に、ラット、ウサギ脳のメチル化酵素を働かすと、A1蛋白は、異種および同種の酵素によってメチル化された。3種のA1蛋白のメチル化反応の基質としての活性は、それらに元からあったメチル化アミノ酸の含量が少ないほど高い。

われわれは、これまでin vivoとin vitroの両方で、蛋白質のメチル化[7X8]を研究し、蛋白質が合成された後に、メチル化されて、6種のメチルアミノ酸が形成されること、メチル化は、非可逆的修飾であること、さらにメチル化は、段階的にモノ→ジ→トリメチルアミノ酸へと進行すること、基質蛋白質とメチル化酵素の多様性を明らかにしてきた。特に酵素については、アルギニン残基とリシン残基をメチル化する2つの酵素が存在することを示し、さらにラット脳細胞質には、A1蛋白とヒストンをそれぞれメチル化する2つの異った酵素が存在することを明らかにした。今回これらの2つのメチラーゼをさらに精製し、ともにアルギニン残基をメチル化するアルギニンメチラーゼであることを証明した。またメチル化活性の成長に伴なう変化、臓器分布、脳内分布A1蛋白メチラーゼの種特異性などについて研究した。

〔実験方法〕

(1)蛋白メチル化活性の測定

反応組成は、酵素液0.1ml(50～1000μg蛋白)、0.2Mリン酸緩衝液,pH6.7(A1蛋白を基質とする場合)または、0.2Mトリス緩衝液,pH8.0(ヒストンを基質とする場合)0.1ml(両緩衝液とも0.01%のメルカプトエタノールを含む)、A1蛋白またはヒストン0.05ml(100μg)S-アデノシルメチオニン-メチル-^{14}C 0.1ml(0.025μCi)総量0.35mlである。37°1時間反応させた後、同量の20%TCAで反応を止め、前報[8]と同じように、蛋白質を加水分解した後、塩基性アミノ酸分画を得て、直接その分画の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(2)メチルアミノ酸のイオン交換クロマトグラフィー

(1)で述べた反応組成の約10倍量を用いて，37°，4～6時間反応させた後，前と同様に塩基性アミノ酸分画を得た。これを1×20cmまたは，1.2×25cmのAmberlite IR-120, NH_4^+型(200～400メッシュ)上で，0.5Mアンモニアついで1.0Mアンモニアで展開して，各メチル化アミノ酸を分離した。放射能は，分取した溶出液(3～4ml)の内，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。また各ピークの同定は，ペーパークロマトグラフィー(ピリジン：アセトン：3Mアンモニア＝50：30：25)で行なった。

(3) A1蛋白の調製

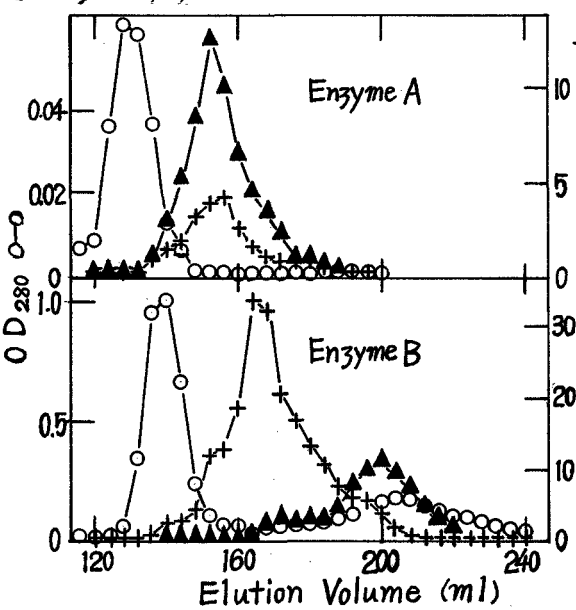
ウシ，ウサギおよびヒト脳よりOshiro等[1]の方法に準じて，精製した。

〔実験結果および考察〕

(1) A1蛋白とヒストンメチル化酵素の分離

前回の報告で，ラット脳0.32M治糖ホモジネート上清には，A1蛋白とヒストンをメチル化する活性があり，それらは，硫安分画，至適pH等さらに，基質特異性，Bio-Gelの溶出位置から異なった酵素であることを明らかにした。今回これらの酵素をさらに精製した。ラット脳(8g)を9倍量の0.32M治糖(2mM $MgCl_2$, 0.01%メルカプトエタノールを含む)でホモゲナイズした後，1,1500×gで遠沈し，上清を硫安0-30%(Enzyme A)と40-60%(Enzyme B)の2分画に分けた。再度硫安分画した後，それぞれ，0.01Mリン酸緩衝液，pH6.7(0.01%のメルカプトエタノールを含む)で平衡化した2×110cmのBio-Gel A-0.5m(100～200メッシュ)でカラムクロマトし，溶出液を5mlずつ分取して集めた。各分画の蛋白質を，硫安で濃縮した後，それぞれA1蛋白とヒストンを基質として，酵素活性を測定した。(図1) この段階で，両酵素は，ホモジネートにくらべて，それぞれ，

[図1] メチラーゼのBio-Gelによるクロマトグラム

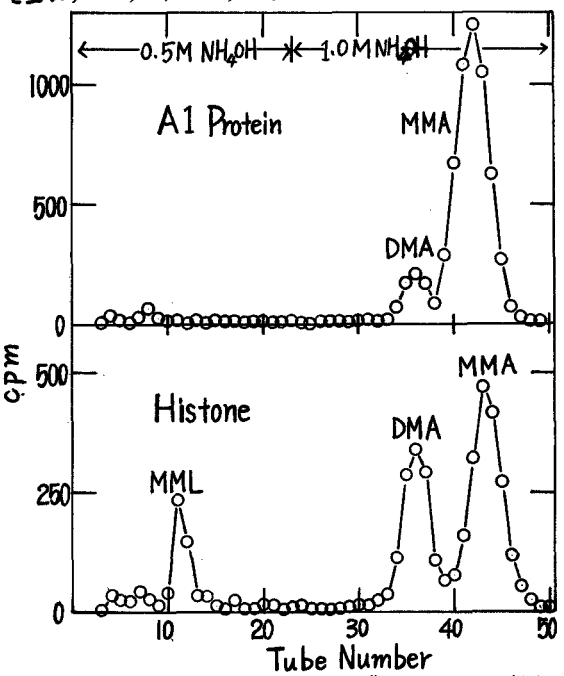


約170倍と約250倍に精製されていた。また両酵素とも，ヤトクローム C，ミオシンおよびコラーゲン(これらは，天然にメチルアミノ酸を含む)そしてリゾチームを基質としない。つぎにこれらの酵素標品を用いて，A1蛋白およびヒストンのどのアミノ酸残基がメチル化されているかを調べた。(図2) 図から明らかなようにA1蛋白およびヒストンの両方とも，ほとんどアルギニン残基のみが，メチル化されている。ヒストンの場合にモノメチルリシンに放射能の取込があるのは，endogenousに含まれている基質によるものである。先に述べたように，A1蛋白には，天然にメチルアルギニンが存在[2]することが知られているが，ヒストンには，今まで，メチルリシンしか知られていない。しかし，ヒストンでもアルギニン残基が，メチル化されているのではないかと考え，ウサギの肝臓から，ヒストンを精製分画し，F_1 F_2 F_3 の3分画に，メチルアルギニンが存在する

ことを明らかにした。これらの結果からアルギニンメチラーゼの中に，さらに，基質蛋白に特異的なメチラーゼが存在することがわかった。このようなメチラーゼの複雑な多様性は，tRNAメチラーゼ[3]と似ている。このような多様性にメチル化の生理的意義があるのかもしれない。

(2) メチル化活性の臓器分布および脳内分布　ラットの各臓器の0.25 Mショ糖ホモジネート上清について，そのA1蛋白とヒストンメチル化活性を測定した。(表1) その結果ほとんどすべての臓器に両活性が認められる。A1蛋白メチル化活性は，睾丸が最も高く，次が脳，膵臓で，肝臓は最も低かった。ヒストンメチル化活性も，睾丸が最も高く，次が脳で，やはり肝臓が最も低かった。つぎに，ヒト脳の各部位の0.32 Mショ糖ホモジネート上清についても同様にして，酵素活性を測定した。(表2) 両活性ともすべての部位に認められ，A1蛋白メチル化活性は，大脳小脳とも，ミエリンの存在する白質が高いということはなく小脳では，むしろ灰白質の方がやや高かった。またいずれの活性も尾状核および小脳灰白質で最も高く，延髄で最も低くかった。

〔図2〕 メチルアミノ酸のクロマトグラフィー



MMA:モノメチルアルギニン DMA:ジメチルアルギニン MML:モノメチルリシン

表1 メチル化活性の臓器分布

Organs	Specific Activity cpm×10⁻³/mg protein	
	A1 Protein	Histon
Testis	8.62	3.17
Brain	1.23	1.28
Spleen	1.06	0.15
Heart	0.81	0.40
Pancreas	0.50	0.18
Muscle	0.44	0.21
Kidney	0.26	0.21
Liver	0.09	0.09

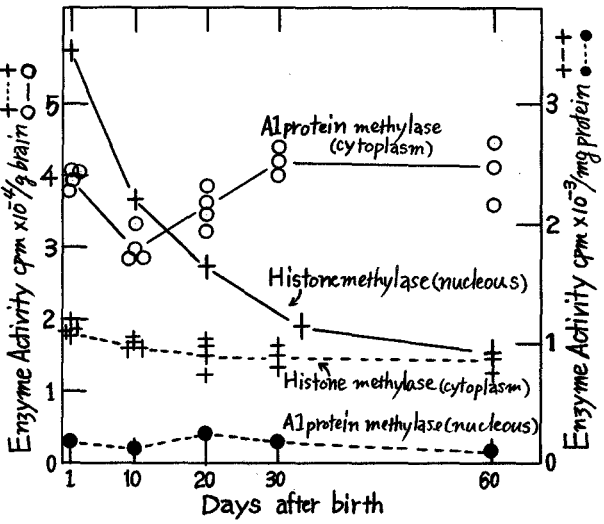
表2 メチル化活性の脳内分布

	比活性 cpm×10⁻³/mg蛋白	
	A1蛋白	ヒストン
尾状核	0.64	0.62
小脳灰白質	0.45	0.76
視床	0.44	0.56
視床下部	0.37	0.42
小脳白質	0.30	0.35
ベンチ体	0.29	0.33
大脳白質	0.28	0.38
大脳灰白質	0.27	0.47
橋	0.24	0.35
延髄	0.14	0.22

(3) メチル化活性の成長に伴なう変化[4]　ラットの出生直後から生後60日までの各時期で，脳の細胞質と核のA1蛋白とヒストンメチル化活性を測定した。核からメチラーゼの調製[5]は，核を単離した後，クロマチンを得，1.5 M食塩を含むトリス緩衝液，pH7.8で抽出して，食塩を含まない同じ緩衝液に透析した上清を酵素材料として用いた。結果を図3に示す。細胞質のA1蛋白メチル化活性は，あまり大きな変化はないが，生後1日目から10日目にかけて，一度減少した後，増加しはじめ，30日目でほぼadultのレベルに達する。ラットのミエリンのA1蛋白の形成は，生後20～30日目に活発であるが，その時期とメチル化活性の上昇時期は，ほぼ一致する。つぎにメチル化されるアミノ酸の内容についても調べた。細胞質のA1蛋白メチル化活性では，全期を通じて，ジメチルとモノメチルアルギニン

の比は，ほぼ1：3~4と一定である。また核の活性は，低くほとんど変はない。ところが，核のヒストンメチル化活性は，出生直後に最も高く，その後著しく減少するが，細胞質のそれは，ほぼ一定である。先の臓器分布の結果も合わせて考えると，ヒストンメチル化活性は，細胞分裂の盛んな時期あるいは，盛んな臓器，すなわち蛋白合成の盛んな時には，高まると考えられる。

[図3] メチル化活性の成長に伴なう変化



(4) A1蛋白およびそのメチル化酵素の種特異性

ウシ，ウサギおよびヒトA1蛋白を基質，ラットおよびウサギ脳ホモジネート上清を酵素材料として，A1蛋白のメチル化を研究した。(表3) ウシのA1蛋白メチル化活性が高いのは，表4に示したように，A1蛋白1モル中に存在するモノメチルアルギニンとまだメチル化されていないアルギニン残基の和すなわち，それぞれメチル化されて，ジメチルとモノメチルアルギニンになる基質の量が多いからと考えられる。ウサギA1蛋白がいずれの酵素を用いても，よい基質になり得ないのは，その精製度に問題があると考えられるが，ウサギの酵素によってもメチル化されるのは，tRNA[6]が，同種の生物から得た酵素によってはメチル化されない事を考えると興味がある。すなわちtRNAの場合は，合成されるとすぐに，メチル化される部位が飽和されてしまうためであるが，A1蛋白の場合は，各動物によって，メチル化の程度が一定に保たれていると考えられる。つぎに表3の反応系について，そのメチル化されるアミノ酸を分析した。(表5) ラットとウサギのいずれの酵素を用いた場合にも，メチル化されるジメチルとモノメチルアルギニンの比は，ウシA1蛋白では，ほぼ1：4~5，ヒトでは，ほぼ1：2である。これらの比は，それぞれ表4に示したモノメチルアルギニンとアルギニンの比とほぼ一致する。

[表4] A1蛋白中のメチルアミノ酸量

アミノ酸＼種	アミノ酸量 mole/mole A1蛋白 ウシ	ヒト
ジメチルアルギニン	0.07	0.21
モノメチルアルギニン	0.18	0.22
アルギニン*	0.75	0.57

*(A1のモル数)−(ジおよびモノメチルアルギニンのモル数)

[表3] A1蛋白の種特異性

酵素＼A1蛋白	比活性 cpm x10⁻³/mg蛋白 ラット	ウサギ
ウシ	1.21	0.86
ヒト	0.79	0.68
ウサギ	0.29	0.28

[表5] メチルアミノ酸への取込み

メチルアミノ酸＼種	ヒトA1蛋白 ラット酵素	ウサギ酵素	ウシA1蛋白 ラット酵素	ウサギ酵素
ジメチルアルギニン	5.14	3.75	7.69	1.87
モノメチルアルギニン	7.99	6.73	27.32	10.63

(cpm x10⁻³)

[文献]

(1) Oshiro Y. and Eylar E.H., Arch. Biochem. Biophys. 138 392 (1970)
(2) Baldwin G.S. and Carnegie P.R., Science 171 579 (1971)
(3) 口野嘉幸，蛋白質核酸酵素 Vol 17 No 4 252 (1972)
(4) Paik W.K., Kim S. and Lee H.W., Biochem. Biophys. Res. Comm. 46 933 (1972)
(5) Burdon R.H. and Garren E.V., Biochim. Biophys. Acta. 232 371 (1971)
(6) Kuchino Y. and Nishimura S., Biochim. Biophys. Res. Comm. 40 306 (1970)
(7) 柿本他 日本神経化学会予稿集 14回 43
(8) 三兒他 日本神経化学会予稿集 14回 47

25. モルモット脳の細胞核の酸性蛋白群について

植村慶一・佐瀬厚子
平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）
中山毅
（東邦大・医・Ⅱ外）

モルモット脳肝腎組織より細胞核分画を密度勾配遠心法で調製し形態学的にcheckした。脳より得た核分画のDNA・RNA蛋白比は1：0.29：4.9であった。核分画を段階的なNaCl濃度溶液で抽出すると，0.15 Mで核の可溶性蛋白が抽出されるが，0.35 M附近で新しく抽出される蛋白群が存在した。脳では0.35 M NaClで抽出される蛋白量が比較的多いがこれはDisc電気泳動およびアミノ酸分析より核の可溶性蛋白と類似のものと考えられた。核分画を0.15 Mおよび0.35 M NaClで充分洗ったのち，2.0 M NaClでクロマチン分画を抽出した。脳のクロマチン分画のDNA・RNA・蛋白比は1：0.14：2.0であった。クロマチン分画より低濃度のNaClに可溶性分画(CnS)と不溶性分画(CnP)に分離した。脳のCnS分画の蛋白量は他の臓器のものに比べて少なく，Davis系Disc電気泳動では移動度の速い蛋白の比較的多い傾向を示した。CnP分画よりHCl抽出でHistone分画を得て，Reisfeld・Urea系Disc電気泳動で比較すると，脳肝共に極めてよく類似したパターンを示した。HCl抽出した残渣より更にPhenol・Acetate・H_2O(2：1：1)で抽出し，Acetate・Urea系で電気泳動を行うと，脳と肝のものはそれぞれ異った多様なbandがみられ臓器による差異があり，酸性のNonhistone分画に相当すると考えられた。核のこれらの酸性蛋白群の生理的意義について今後検討を重ねたい。

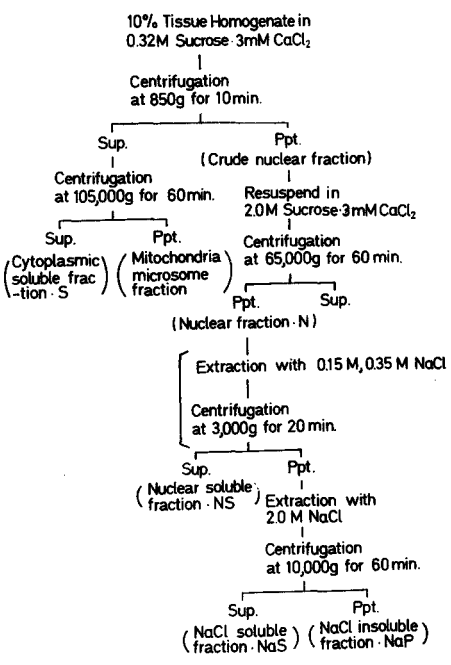
動物細胞の核に存在するクロマチンはDNAとそれにassociateした蛋白群(クロマチン蛋白)よりなり，クロマチン蛋白は塩基性のHistone蛋白と酸性のNonhistone蛋白よりなると考えられる。最近酸性のNonhistone蛋白は組織による特異性があり，[1][2] DNAよりの転写を調節している可能性を示す報告が出されている。[3][4][5] しかし脳組織におけるこの蛋白群については，いくつかの報告があるが，[6][15] まだ未知の点が多い。我々はこの蛋白群の分離法およびDisc電気泳動法によるパターンの検討を行ったので報告する。

［実験方法］

1)細胞核およびクロマチン分画の調製；モルモットを断頭瀉血後，速やかに脳，肝および腎臓を剔出し細切後，テフロンガラスホモゲナイザーでホモゲナイズした。ホモジネートを原材料として，次ページ図に示した方法で細胞核およびクロマチン分画の調製を行った。方法の詳細については文献1)6)14)を参考にした。分離核の純度は電顕および化学的方法によって検定した。

Fig. 1

PREPARATION OF CHROMATIN FRACTION



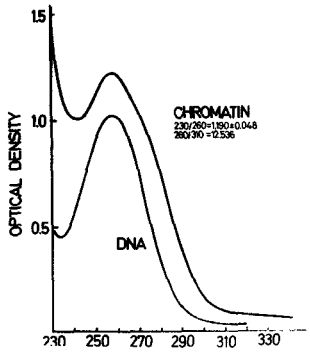
2) クロマチン蛋白の分離; 2.0M NaCl可溶性分画(NaS)よりFig. 5図に示した方法によって蛋白の分離を行った。即ち13倍量の脱イオン水中で透析しNaCl濃度を低下させて遠心し上清分画(CrS)と沈渣(CrP)に分離し、その沈渣分画より ① 2.0M NaCl, 5.0M Urea中で長時間遠心、又は ② 0.25 N HCl抽出2回でHistone分画を除いたのちに、Phenol:Acetate:H_2O(2:1:1)によって抽出された分画をNonhistone分画とした。3) DNA・RNA・蛋白の定量; DNAとRNAはSchmidt-Thannhauser法をHutchisonらによって改良された方法[7]、蛋白はLowryらの方法[8]によって測定した。4) Disc電気泳動法; a) Davis系(pH 8.6)[9] b) Reisfeld系(pH 4.3)[10]のゲルに5M, 緩衝液に3Mのureaを加えたUrea-Reisfeld系, c) 0.1% SDS・0.1M リン酸緩衝液(pH 7.1)のShapiro系[11], d) Acetate-Ureaの Takayama系[12]のいづれかの方法を用いた。4) アミノ酸分析; 蛋白試料を定沸点のHCl中で110°C 24時間分解後、034型日立液体クロマトによってアミノ酸の定量を行った。[13] 蛋白のアミノ酸構成はmol%を円形グラフで中心よりの距離で示した。

Tab. 1 CHEMICAL COMPOSITION OF NUCLEAR AND CHROMATIN FRACTION FROM GUINEA PIG BRAIN

	DNA	RNA	PROTEIN
NUCLEAR FRACTION	1.0	0.29 ± 0.04	4.91 ± 0.55
CHROMATIN FRACTION	1.0	0.14 ± 0.02	2.01 ± 0.10

ULTRAVIOLET ABSORPTION SPECTRA OF CHROMATIN AND DNA FROM GUINEA PIG BRAIN

Fig. 2



[実験結果]

1) 核およびクロマチンの調製; モルモット脳より得た核分画は形態学的には核小体のはっきりした核膜を伴った核を多く含み、化学的にはDNAに対する蛋白比4.9, RNA比0.29を示し比較的に純度のよい細胞核の集合分画と考えられた。尚核分画へのDNAの回収率は50~60%であった。クロマチン分画を得るため、0.1M NaCl, 0.05M NaF, 0.05M Tris buffer (pH 7.0)で核分画を洗った後、2.0M NaCl抽出を行い超遠心によって蛋白を分離してReisfeld-Urea系Disc電気泳動を行うと脳では肝に比較してSlow migrating multiple bandが著明に見出された。次にJohnsらの方法[15]に従って NaClによる抽出をStepwiseに行い蛋白とDNAを測定すると Fig. 3 図に示す如く、0.35M附近で新しく抽出される蛋白のpeakがみられるがDNAは2.0M NaClではじめて抽出される。0.15M, 0.35M, 2.0M NaCl各抽出蛋白についてReisfeld-Urea系のDisc電気泳動を行うと Fig. 4 図の如くなり、Slow migrating multiple bandは0.35M NaClで抽出され、この分画はアミノ酸組成も0.15M NaCl

Fig. 3 THE EXTRACTION OF PROTEINS AND DNA FROM BRAIN AND LIVER NUCLEAR FRACTION WITH GRADUALLY INCREASING CONCENTRATIONS OF SODIUM CHLORIDE

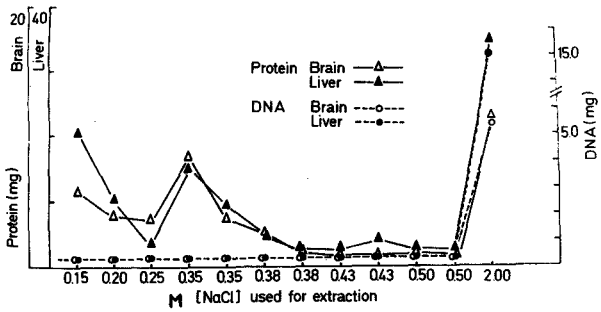
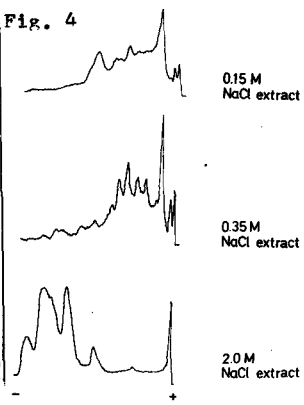
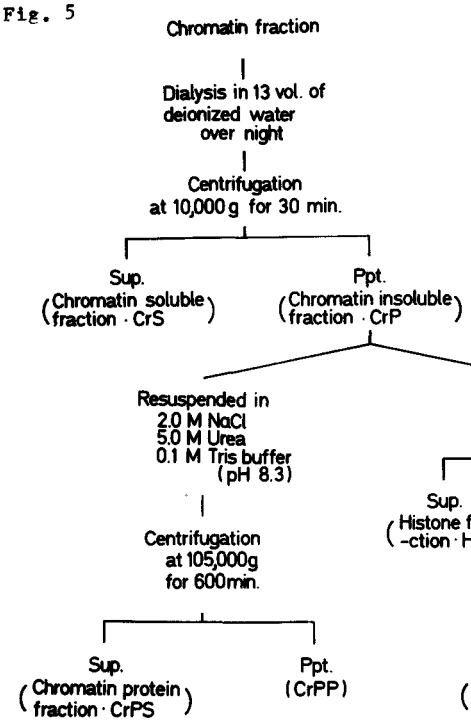


Fig. 4



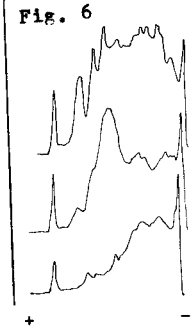
ISOLATION OF CHROMATIN PROTEIN

Fig. 5



DENSITOMETRIC PROFILES OF DISC ELECTROPHOREGRAMS (pH 8.3 Davis)

Fig. 6



抽出のものと比較的類似していた(ネ10図)脳については核の可溶性蛋白のうちある種のものがクロマチンに吸着する可能性を示した。脳は他の臓器に比べ0.35M抽出蛋白の多い傾向を示すため以後の実験では0.15Mおよび0.35M NaCl抽出をそれぞれ3回づつ行ったのち、2.0M抽出を行った。2.0M NaClによって脳の核のDNAの60～70%が可溶化される。得られたクロマチン分画の組成をネ1表にUV吸收をネ2図に示した。

2) クロマチン蛋白の分離と電気泳動パターン；ネ5図の方法によって得た脳のCrS分画は核の全蛋白量の17%，NaS全蛋白量の約10%を占めるが肝や腎に比べて比較的少量であった。脳についてCrS分画，細胞質可溶性分画(S)，および核の可溶性分画(NS)を比較するとネ6図の様なパターンが得られた。また脳肝腎のCrS分画を比較するとネ7図の如くDavis系でもパターンに臓器差があり脳では特にBPBに一致するBandが著明であり比較的酸性のものが多い傾向を示した。また同じ試料をShapiro系で検討しても臓器による差異が認められた。次にCrP分画より0.25N HClで2回抽出してHistone分画を分離し，その残渣よりPhenol·Acetate·H2O(2:1:1)で抽出してNon-histone分画を得た。Histone分画は全Na

Fig. 7 DENSITOMETRIC PROFILES OF DISC ELECTROPHOREGRAMS

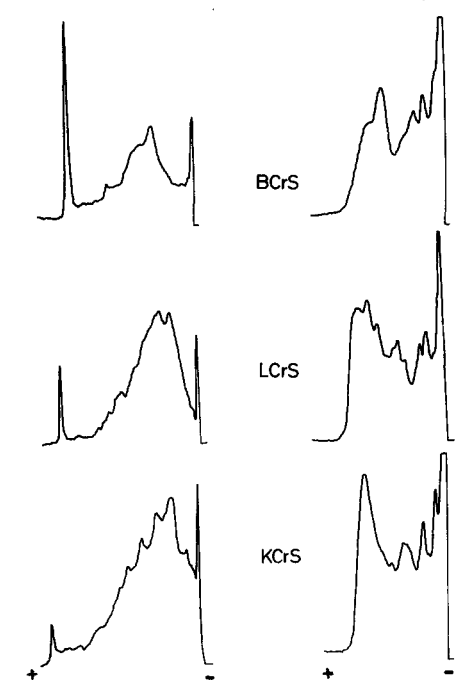
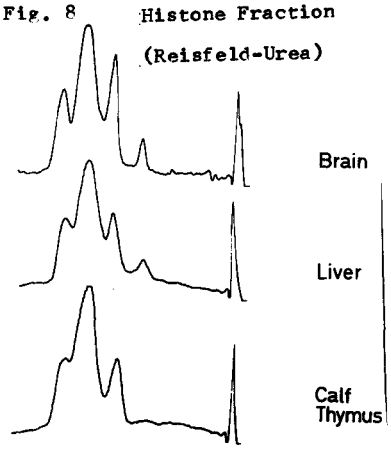


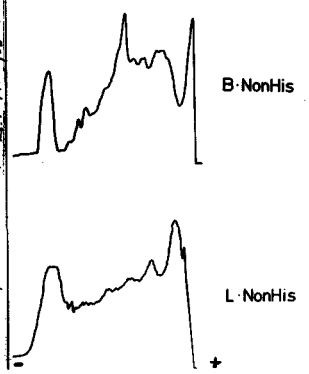
Fig. 8 Histone Fraction (Reisfeld-Urea)



S蛋白の55～65%を占めた。脳肝より得たHistone分画を市販のCalf Thymus Histone (Sigma) とReisfeld-Urea系Disc電気泳動パターンを比較するとヤヌス図の様になり極めてよく類似し膨潤差は認められなかった。一方Nonhistone分画のTakayama法によるAcetate-Urea系電気泳動パターンはヤヌス図の様で脳と肝で明瞭な差異がみられそれぞれがかなり異った多様な蛋白成分よりなることを示唆した。この分画については膨潤差が比較的著明であると考えられる。また2.0 M NaCl可溶性分画(NaP)より同様に0.25N HCl処理すると約10%の蛋白が抽出されるが、その残渣を同様にPhenol-Acetate-H_2Oで抽出し脳肝腎で比較すると共通のいくつかのbandがみられこれらは核膜の蛋白由来する可能性が示唆された。

DENSITOMETRIC PROFILES OF DISC ELECTROPHOREGRAMS (Takayama, Urea + Acetate)

Fig. 9

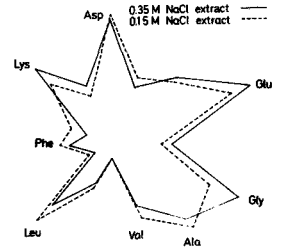


3)蛋白分画の構成アミノ酸の分析；

脳の核分画の0.15 Mおよび0.35 M NaCl抽出分画，CnPのHCl抽出分画およびCnPのHCl抽出残渣を0.1N NaOHで抽出した分画のそれぞれの蛋白群のアミノ酸組成を分析した結果を円形グラフで示したのがFig 10図，Fig 11図およびFig 12図である。HCl抽出分画はLys. His. Argの塩基性アミノ酸とGlu, Gly, Ala, Leuが多く酸性；塩基性アミノ酸比は(14.3 : 22.1) = 0.65であり、Histone分画に相当した。一方NaOH抽出分画は酸性；塩基性アミノ酸比は(20.5 : 15.3) = 1.34で比較的酸性でNonhistone分画に相当すると考えられる。また脳と肝のNaOH抽出分画のアミノ酸組成はお互に類似しているが，Ser. Glyなどで有意の差を示した。

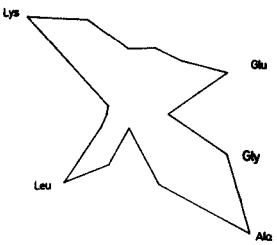
Fig. 10

COMPARISON OF AMINO ACID COMPOSITION OF THE PROTEINS EXTRACTED (0.15 M AND 0.35 M NaCl) FROM NUCLEAR FRACTION OF GUINEA PIG BRAIN



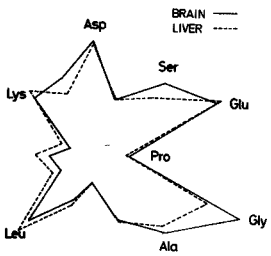
AMINO ACID COMPOSITION OF HISTONE FROM GUINEA PIG BRAIN

Fig. 11



AMINO ACID COMPOSITION OF NONHISTONE PROTEIN

Fig. 12



これらのNonhistone蛋白群は量が少なくDNAとの結合の強いことなどのため取扱いがむづかしいが、今後更にリン酸化の問題や転写との関係などについて組織の特異性を明らかにしてゆきたい。(本研究の一部は71年生化学会，72年生理学会に於て発表した。)

(文献)(1) Loeb. J. E. & Creuzet, C.; Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 1007 (1970)
(2) Teng, C. S., Teng, C. T. & Allfrey, V. G.; J. Biol. Chem., 246, 3597 (1971)
(3) Baserga, R. & Stein, G.; Fed. Proc. 30, 1752 (1971)
(4) Wang, T. Y.; Exptl. Cell Res., 61, 455 (1970)
(5) Gilmour, R. S. & Paul, J.; J. Mol. Biol., 40, 137 (1969)
(6) Shaw, M. J. & Huang, R. C. C.; Biochemistry, 9, 4530 (1970)
(7) Hutchison, W. C. & Munro, H. N.; Analyst, 86, 768 (1961)
(8) Lowry, O. H. et al.; J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
(9) Davis, B. J.; Ann. New York Acad. Sci., 121, 404 (1964)
(10) Reisfeld, R. A., Lewis, V. J. & Williams, D. E.; Nature, 195, 281 (1962)
(11) Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 (1967)
(12) Takayama, K. et al.; Arch. Biochem. Biophys., 114, 223 (1964)
(13) Uyemura, K., Tobari, C. & Hirano, S.; Biochim. Biophys. acta, 214, 190 (1970)
(14) Johns, E. W. & Forrester, S.; Europ. J. Biochem., 8, 547 (1969)
(15) Graziano, S. L. & Huang, R. C. C.; Biochemistry, 10, 4770 (1971)

26. 人脳S-100蛋白の分離，アミノ酸分析及びRadioimmunoassayについて

魚住　徹
（阪大・医・脳外）
Robert J. Ryan
(Mayo Clinic)

Autopsyによって得られた人脳よりMOOREの方法に準拠してS100蛋白を抽出し，DEAE Cellulose及びSephadex G100 Column Chromatographyを用いて精製した。精製中のS100蛋白の追跡はstarch gel electrophoresis及びpolyacrylamide gel electrophoresisによった。精製された人脳S100蛋白はGel filtrationの成績からみて分子量およそ25,000と考えられ，アミノ酸分析からdicarboxylic amino acidが33～34%を占める事が判った。吾々はモルモットを用いて人脳S100の抗血清を得ようと努力したが失敗し，Mooreの抗血清（rabbit anti beef S100 serum）を用いる事により Radioimmunoassayの可能な事を知った。そのassay sensitivityは0.7ng/0.2ml of sampleであった。

1965年MOORE[4)5)]によって分離されたS100蛋白は中枢及び末梢神経に存在するとされLevine[3)]らによってComplement fixation reactionを用いて定量可能となり，彼らの分離した牛S100蛋白の抗体は人を含めて多種類の動物のS100蛋白と交叉反応する事が知られている。而し人脳中のS100蛋白は未だ分離されておらず，そのアミノ酸構成も知られておらない。又Radioimmunoassayも確立されていない。吾々は，組織特異性蛋白の測定が診断的意味を有する場合があり得るとの考えからこの蛋白をとりあげ人脳中よりこれを抽出精製し，アミノ酸分析を行ない又Radioimmunoassayの可能なる事を明らかにしたので報告する。

〈材料と方法〉

① Autopsyで得られた人脳を－20°cに保存し使用した。

② 抽出はMOOREの原法に準拠し部分的にmodifyした。即ち凍結人脳を融解後，2倍量の50mM Tris-phosphate buffer (pH=7.3)をもってhomogenizeし，遠沈の上清をとりこれに5倍量のacetoneを加えてacetone powderとした。このacetone-dry-powderに50mM Tris phosphateを加えて3% solutionとし(pH=7.3)，この上清をとり固形Amononium sulfateを加え(70gm/100ml)，更にその上清を硫安飽和とし(pH=4.1)その沈澱を集めた。この沈澱を72時間dialyzeし，lyophilizeしこれをfraction Aと名付けた。③これをDEAE-Cellulose Chromatographyで分画した。即ち5mM Tris-phosphate buffer (pH=7.3)，更にこれに同称のpH=7.3で0.2M NaClを含むもの，更にpH=6.2でNaCl 1.0Mの溶液をそれぞれeluentとして逐次chromatographyを行なった。

④ DEAE Cellulose chromatography の最後の溶出部分即ち 50mM Tris phosphate, pH=6.2, 1.0 M NaCl で溶出されたものを dialysis, lyophilization して得られた分画を, Sephadex G100 Column chromatography により精製した。 elution は 0.2M NaCl - 0.05 M phosphate buffer で行なった。

⑤ 精製過程における S-100蛋白の追跡は, Starch gel electrophoresis 及び polyacrylamide disc で行なった。

⑥ アミノ酸分析は Beckman Model 121 analyzer で行なった。

⑦ 吾々はモルモットを用いて人脳 S100 蛋白の抗血清を得ようと努力したが失敗した。 MOORE の好意により牛 S100 のウサギ抗血清を入手しこれを用いて Radioimmunoassay を行なった。この抗血清は人 S100 とよく交叉反応し, 2抗体法 (goat anti-rabbit-γ-globulin serum) を用いた。

〈結果〉

① Starch Gel Electrophoresis --

MOORE の報告の如く S-100 蛋白は starch gel electrophoresis で buffer front より (+) の方に速く移動するが, これは Fig. 1 に示す如く Sample の位置によって異なり (−) 端から 7.5cm の所に Sample を置くと buffer front と重なってしまう。 10 ~ 15cm の所に置くとよい resolution が得られた。

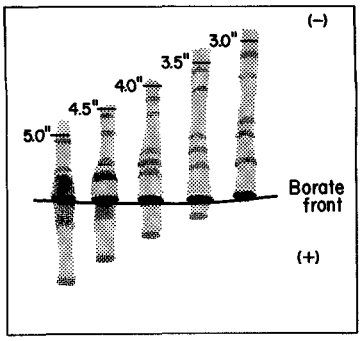


Fig. 1

② DEAE-Cellulose-Chromatography --

S-100 蛋白は DEAE Cellulose Column Chromatography により DEAE-C fraction (50mM Tris-phosphate buffer, pH=6.2, containing 1N NaCl and 10mM mercaptoethanol) に溶出された。

Fig. 2A の場合, 390 mg の Fraction A を 1 x 29cm の DEAE Cellulose (equilibrated with 5mM Tris phosphate buffer pH=7.3 ····· buffer A) に change します buffer A で溶出, 次に buffer B (5mM Tris phaophate, pH=7.3 - 0.2 M NaCl), 更に buffer C (50mM phosphate buffer, pH=6.2, 1.0 M NaCl) で溶出した。

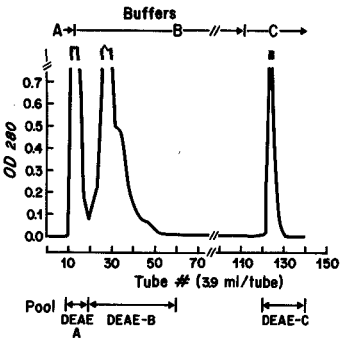


Fig. 2A

Fig. 2B に DEAE-A, B, C 各 fraction の electrophoretic mobility を示す。

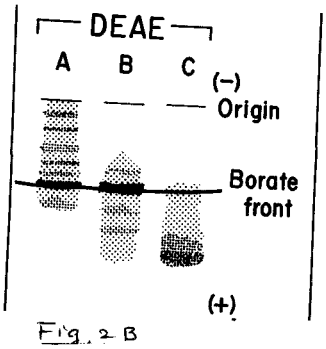


Fig. 2B

③ Gel-filtration --

DEAE-C fraction を G100 colum chromatography で分画した pattern を Fig 3 の上段に示す。

S100 fraction は 狙んど-C fraction に見出だされた。これを rechromatography する際 marker protein と共に流した pattern が Fig. 3 の下段に示してある。S100 蛋白は chymotrypsinogen (Chy) より少し大きいと考えられ Andrews[1] の方法で計算すると分子量 25,000 と推定される。

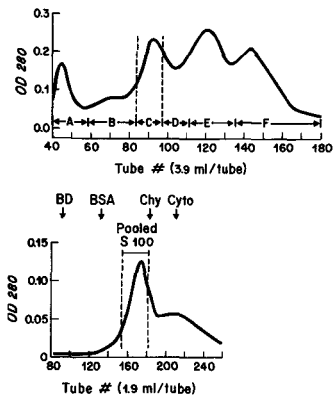


Fig. 3

④ Electrophoresis --

Polyacrylamide gel electrophoresis の pattern を示すと Fig. 4A, 4B の如くである。

G100 で分画された B, C, D 分画, 更に rechromatography を行なったもの, S100 + BSA, BSA 単独の各 electrophoresis が Fig. 4A に示され, Fig. 4B には, 同一の Voltage で 30分 及び 35分 の場合の S100 の mobility, S100 と BSA, BSA 単独の場合が示されている。

BSA の main band は, S100 に比して 1/1.52 の速さで動く。

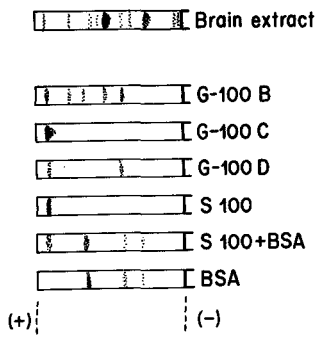


Fig. 4A

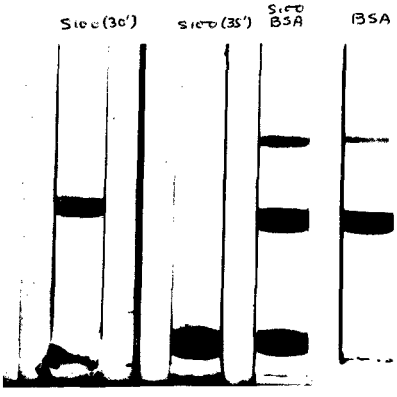


Fig. 4B

⑤ アミノ酸分析 --

dicarboxylic amino acid が全アミノ酸の 33-34% を占めている。

Valine を 10.0 とした時のアミノ酸構成は, Alanine 10.8, Arginine 0.8, Aspartate 15.8, ½ Cystine 1.7, Glutamate

30.8, Glycine 9.2, Histidine 4.2, Isoleucine 3.3, Leucine 12.5, Lysine 11.7, Methionine 4.2, Phenylalanine 7.5, Proline 0, Serine 7.5, Threonine 5.0, Tyrosine 1.7, である。

⑥ Radioimmunoassay --

Beef Bと human S100 を共に Greenwood らの方法で ^{125}I で iodinate した。Beef S100 の方がより高い specific activity が得られた。

Fig. 5 は 100pg ^{125}I-Beef S100 と 300pg ^{125}I human S100 との rabbit anti Beef S100 serum との結合曲線で 1:300 の dilution で凡そ 30-40 % の結合を示すのが判る。

Fig. 6 は standard curve で Beef S100, human S100 共に交叉反応し, Assay の sensitivity はおよそ 0.7 ng/tube である。

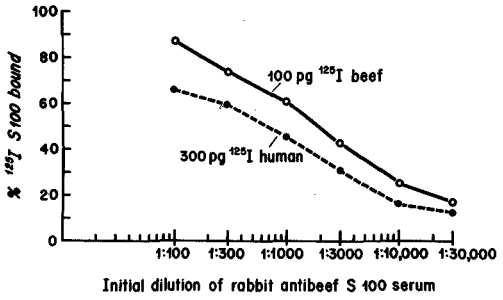


Fig. 5

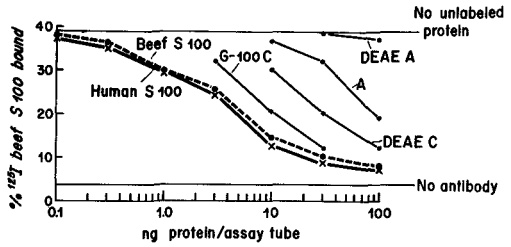


Fig. 6

⑧ 臨床材料の成績 --

少数例であるので系統的な報告は未だない。CSF について, Disc disease 28例, multiple sclerosis 8例はいずれも 4ng/ml 以下で negligible. 20 ng/ml 以上に値のあったのは, optic glioma, retrobulbar neuropathy, Subdural hematoma, Parkinson's Disease と probable meningitis, cerebellar ataxia 各1例であった。

参考文献

1) Andrews, P: Biochem J., 91: 222-233, 1964,
2) Greenwood, FC, Hunter, WM, Glover JS: Biochem. J., 89: 114-123, 1963.
3) Levine, L. Moore, BW: Neurosci Res Program Bull, 3: 18-22, 1965.
4) Moore, BW: Biochem Biophys Res Commun 19: 739-744, 1965.
5) Moore, BW: J. Biol chem, 240: 1647-1653, 1965.

27. Neurotuble ProteinのPolymerとColchicineの結合

新井孝夫・奥山典生
（都立大・理・化）

精製したウシ脳のneurotubule protein（NTP）の性質とcolchicine の結合様式について検討した。

colchicine－NTP complex をSephadex G-200による gel filtration で分析すると，M.W.約120000の分子種が検出され，Davis 系で disc電気泳動を行うとM.W.約120000の分子種とそのpolymerが検出された。このpolymer はβ-mercaptoethanol（β-ME）の添加によっても解離しない。一方，尿素およびSDSで変性させ，それぞれを尿素系 disc 電気泳動とSDS系gel 電気泳動で分析すると，M.W. 57000 の分子種とそのpolymerが検出される。このpolymerはβ-MEを添加すると解離し，M.W. 57000の分子種の単一なbandのみを与える。このことから，尿素，SDS変性によるPolymerはS-S結合によるものと考えられる。一方，colchicine－NTP complex のdisc電気泳動の時に存在したpolymer は非共有結合によるものと考えられる。この結合は，生体中でneurotubules（NT）を形成している結合と本質的に同一であると考えられる。また，colchicine のけい光スペクトルを1-Anilino-8-naphtalene sulfonate（ANS）と比較することなどにより，NTP に対するcolchicineの結合様式を推定した。その様式は親水性の部位と疎水性の部位とよりなる。このcolchicine－NTP間の結合様式は，生体中でNTを形成するNTP 相互の結合に関係があるものと思われる。

NTPはM.W.約60000 の2個のsubunitをもつM.W.約120000の分子である。このNTP 1分子に対して結合の強さの異なる2分子のGTP が結合しており，更に1分子のcolchicineが結合することが知られている(1)。一方，NTP のpolymerであるNTは，神経細胞のaxon，dentrite等に多量に存在し，軸索輸送，細胞分化等に重要な役割を果たしていると考えられている。特にneuroblastomaの分化の際に，NTPはneuriteのない未分化の細胞内にNT以外の形でpoolされ，細胞分化に伴って重合しNTとなり，neuriteが形成されることを示唆する報告がある(2,3)。我々は，NTPのとりうるいくつかの状態を電気泳動等で検出し，これらとNTとの関係，およびcolchicin の結合様式を調べた。これは，細胞内でのNTPの存在状態と，それらに対するcolchicineの作用を知る上で興味のあることと思われる。

〔実験材料および方法〕

<u>NTP の精製</u>：ウシ脳をPMC buffer（0.01 M sodium phosphate－0.01 M $MgCl_2$－2×10^{-5} M colchicine）でhomogenaizeし，その上清を硫安分画（0.35－0.50 飽和）した。得られた沈殿を少量のPMC bufferに溶解し，透析後の試料をDEAE－Sephadexカラムにchargeし，stepwise で溶出した。0.35M NaClを流したのち，0.55M NaClで溶出されてくる分画を精製標品とした。assay は，colchicine－NTP 複合体のけい光スペクトルを利用する簡便な方法で行なった(4)。

<u>NTP のmonomer とpolymer の検出</u>：colchicine－NTP複合体はSephadex G-200 gel filtrationおよび7.5％ acrylamide gel disc 電気泳動（pH 9.4）（Davis系 disc 電気泳動）(5)で分析した。8M 尿素で処理した試料は，Davis系

のgelおよび泳動bufferに6M尿素を含む尿素系disc電気泳動で，1% SDS－8M尿素で処理した試料は，Dunkerの系(6)のgelおよび泳動bufferに6M尿素を含むSDS系gel電気泳動でそれぞれ分析した。同時に，β-ME の影響も調べた。

colchicine の結合様式の推定：colchicine と ANS の各種溶媒（水，アルコール等）に溶解した時，およびタンパク質に結合した時のけい光強度と極大波長を調べ，その性質を比較することによりcolchicineの結合様式を推定した。colchicineは350 mμで励起し，ANSは360 mμで励起した時のけい光スペクトルをこの分析に用いた。

〔実験結果と考察〕

1. NTP のpolymerの検出

(i) colchicine-NTP 複合体

精製標品のG-200 gel filtrationのパターンを図1に示す。fraction number 41のピークは，M.W.約120000のcolchicin-NTP複合体であり，void volume に出てくる高分子はcolchicine 結合能力を失った分子種である。図2にDavis 系disc電気泳動図を示した。このパターンはβ-MEを添加しても変化はみられない。図3はRm が約0.5 の band を monomer とし，以下Rm が大きい順にdimer，trimer…と仮定して，そのM.W.の比を対数であらわし，Rmに対して目盛ったものである。図3で直線関係が得られることは，monomer，dimer，trimer …の仮定が正しかったことを示している。ここで述べたmonomerのM.W.は約110000で，gel filtration で得られるM.W.と一致している。また，β-MEを添加してもパターンの変化がみられないことは，これらdimer，trimer…はS-S以外の力で結合していることを示している。

図1. G-200 gel filtration

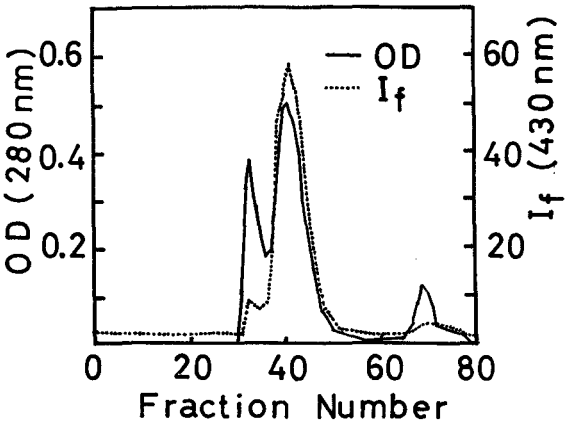


図2

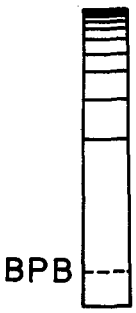
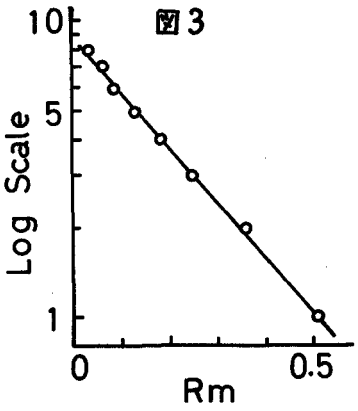


図3



(ii) 尿素，SDSで処理したNTP

精製標品を8M 尿素および1% SDS－8M 尿素で変性後，それぞれを尿素系disc電気泳動，SDS系系gel電気泳動を行なう。図4にSDS系gel 電気泳動図を示す。変性直後は，subunitに解離してM.W. 57000の単－bandを与えるが（図4-1），β-MEを添加せずに保存すると，次第にRm の小さいbandが増え（図4-2），更に長期間保存するとgelの上端でとまってしまう。これらにβ-MEを添加すると，再び図4-1 のような単一のbandになることから，このpolymer はS-S結合によるものと結論することができる。

2. colchicineの結合様式

350mμで励起した時のcolchicineの溶媒変化に伴うけい光スペクトルの変化，およびNTPと結合した際のけい光スペクトルの変化を表1に整理した。colchicineは溶媒の疎水性が増加するに従って，けい光強度は少しづつ増加し，その極大はred shiftする。NTPと結合すると強度は著しく増加（約300倍）するが，極大の波長は水溶液の場合とほぼ等しく，430mμ付近にある。一方，タンパク質の疎水域測定試薬として知られているANSは，水溶液中では515mμに極大があり，量子収率は0.004と小さい。EtOHに溶解すると，463mμ（0.37）となり，n-BuOH溶液では，464mμ（0.56）となる。即ち，溶媒の疎水性が増加するとともに，けい光強度が著しく増加し，その極大はblue shiftする(7)。また，疎水域を多くもっているBSAと結合すると，疎水性の強い溶媒の場合と同様，量子収率は著しく増加(0.75)し，極大もblue shift（469mμ）する。ANSとcolchicineの性質の比較により，colchicineの場合は，親水性の部分が結合に関与しており，それは図5のring Cのcarbonyl基が水素結合等でNTPに結合しているものと考えられる。これは，colchicine analogの細胞分裂阻害作用の有無からcolchicineのactive siteを調べたSchindlerの報告(8)と矛盾しない。

図4

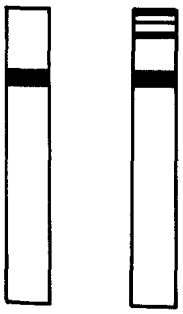
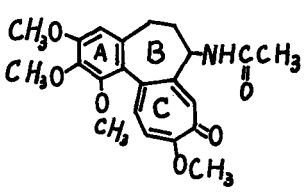


表1

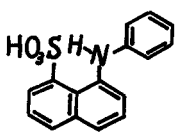
Solvent	R.I.	λmax
Water	1.0	435mμ
MeOH	1.9	440
Ethylen glycol	2.3	450
EtOH	2.5	450
i-PrOH	3.7	475
n-BuOH	6.5	480
i-AmOH	5.2	500
Chloroform	8.9	470
NTP complex	320	430

図5

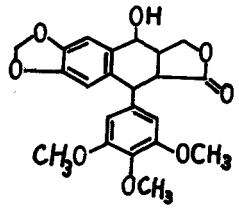


Colchicine

図7



ANS



Podophyllotoxin

図6はNTPとANSの相互作用を示したが，NTPは疎水域のないpepsinとANSと結合する疎水域を多くもったBSAとの中間型の関係をもち，変性に伴なって結合するANSの量が増加する。図7にANSの構造を示した。ANSは，分子全体が疎水域に入りこむと考えられているから，図6の結果をnativeな状態ではcolchicineのring Aは入りうるが，ANSが入りこむには小さい疎水域が存在し，変性につれて疎水域が広がり，ANSの結合が容易になると解釈することも可能である。ring Aの結合（疎水結合）も考慮することは，同じく分裂阻害剤として知られているpodophyllotoxineとcolchicineの結合が拮抗するという事実と矛盾しない。図7にpodophyllotoxineの構造を示したが，この分子は，colchicineのring Aを共通部分としてもっているからである。

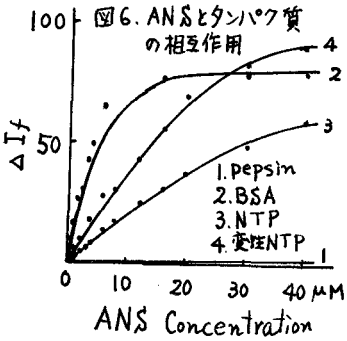
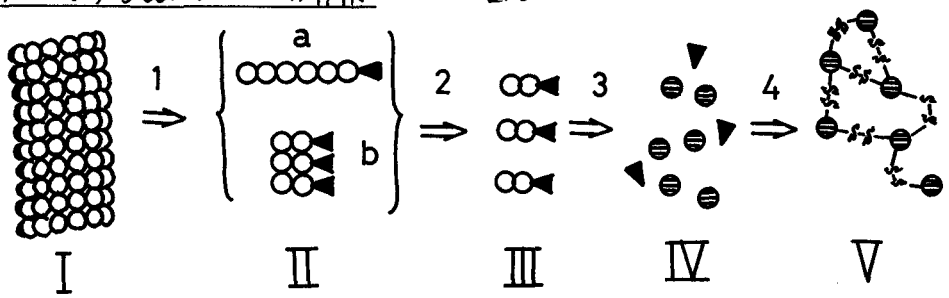


図6. ANSとタンパク質の相互作用

3. NTに対するcolchicineの作用　　図8



gel filtration, 電気泳動などによって検出される種々の分子種から, colchicineのNTに対する作用様式, さらにNTPによるNTの構成様式について考えてみた。図8に各分子種間の関係を整理した。(I)は電子顕微鏡などでも観察されたNTの模型図で, M.W. 57000の粒子が線状につながり, 更にらせん状に積み重ねられ管状になっているものと考えられている。これらの粒子相互間の結合には, 強さの異る2種類の結合があるものと考えられるが, どちらも疎水性結合, 水素結合などのような非常に弱い結合であり, bufferと共にhomogenize する程度でも, 弱い方の結合は切断され, NTは破壊される。このようなNTにcolchicineを作用させると, 反応1で示したようにcolchicineはNTPに結合すると共に、NTP相互間の弱い結合を切断するものと考えられる。そのためcolchicineを結合したIIのaまたはbのような各種のNTP polymer を生ずるものと考えられる。しかも十分過剰のcolchicineを添加した時でも, colchicineを結合した各種のNTP polymerを生ずることからII-bのような形をとっているのではないかとも想像される。このmonomerであるNTPはIIIに示したように, 1分子あたり1分子のcolchicineを結合しているが, この分子にSDSや尿素のようなタンパク質変性剤を作用させると, colchicineを遊離するとともにM.W. 57000の2つの分子種に分散する。このような状態でしばらく保存すると, 自然酸化(反応4)がおこりS-S結合よりなる変性polymerを生ずる。このことは, 自然に変性が起る時にも観察され, colchicine-NTP複合体を長期間保存しておくと, colchicineを遊離するとともに, 沈殿を生ずる過程として理解できる。この様な重合体をSDS, 尿素中でβ-MEで処理すると, 再びM.W. 57000 のものが得られる。一方, NTPをβ-MEのみで処理しても, M.W. 57000 のものは生成されない。このことから, NTP subunit 相互間の強い結合もS-S 結合ではないことがわかる。このように, NTP分子相互間の結合, およびcolchicineの作用様式を考えると, colchicineがNTの構成を阻害して, 細胞分化を妨げることも一応理解しうると考えられる。

また, NTPにGTPなどが結合しており, らせん状のpolymerを形成するという事実は, 単にactineとの対比というだけでなく, TMVやflagellinなどでもみられるような, タンパク質粒子によるらせん状polymerの形成という事実との対比という点でも, その機作の解明には興味深いものがあると考えている。

[文献] (1) Weisenberg, R.C., Borisy, G.G. and Taylor, E.W., Biochemistry, 5, 4466 (1968) (2) Seeds, N.W., Gilman, A.G., Amaro, T. and Nirenberg, M.W., Proc. Natl. Acad. Sci., 66, 160 (1970) (3) Kates, J.R., Winterton, R. and Schlessinger, K., Nature, 229, 345 (1971) (4) 新井彦夫, 奥山典生, 生化学, 印刷中 (5) Ornstein, L. and Davis, B.J., Disc Electrophoresis, Reprinted by Rochester Industries, Distillation Products (1962) (6) Dunker, A.K. and Rueckert, R.R., J. Biol. Chem., 244, 5074 (1969) (7) Stryer, L., J. Mol. Biol., 13, 482 (1965) (8) Schindler, R., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 149, 409 (1965)

28. 蛙の坐骨神経における軸索流－特に温度依存性について

阿部輝雄・芳賀達也
黒川正則
（東大・医・脳研）

(1) 蛙の第9脊髄神経節内に ^{3}H-ムーロイシンを注入し、坐骨神経内の軸索流 (axonal flow) を観察した。

(2) 蛙の坐骨神経では流速のことなる少なくとも2種類の軸索流が認められる。速い流れの速度は150 mm/日、遅い流れは0.5～1 mm/日程度である。

(3) 速い軸索流はコルヒチンによって完全に阻止されるが、ジゴスポリンA（サイトカラシンD）、GEDTAでは影響されない。

(4) 速い流れの速度は低温になるほど減少する。Q_{10} は2°C～25°Cの範囲では温度によらず一定で、2.6である。

(5) 速い軸索流は in vitro の神経でも証明され、流速は in vivo の場合とほぼおなじである。

WEISS & HISCOEの実験によって最初に示された軸索流は、1-2 mm/日の遅い、遠心性の流れであったが、[1] その後の研究によって速い軸索流、求心性の軸索流の存在が明らかになった。[1] 軸索をニューロン細胞体から遮断しても軸索流が持続することから流れを支えるメカニズムは軸索に内在するものと推定されている。軸索流の機構と生理的意義を調べる目的には、in vivo と in vitro の実験系が平行して使用できるような材料が望ましい。以下の実験では蛙の坐骨神経を材料として、このような実験系の基礎条件を確立し、とくに軸索流の温度依存性について若干の検討を加えた。

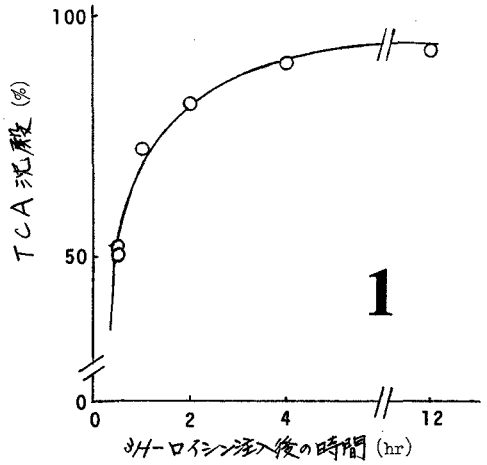
実験方法 体重200～600gのウシガエル Rana catesbeiana を使用した。ウレタン麻酔下で側腹部を切開し、第9脊髄神経節（直径約1mm）の側背面を露出する。神経節内に ^{3}H-ロイシン（4μCi/0.2μl）を注入するために次のような方法を用いた。流動パラフィンの油井内で[1] 蛙リンゲル液と ^{3}H-ロイシンの水溶液を混合して20μCi/μlの ^{3}H-ロイシン溶液を作り、0.2μl宛分取して別々の油井内に保存する。単位容量あたりのμCiを増すために、市販の4,5-^{3}H-ムーロイシン（RCC: 20 Ci/mmole）を凍結乾燥後、微量の水に溶解した。ミクロピペット（先端の径10～15μm、ダイヤモンド・ペーストで研磨したもの）の先端部に流動パラフィンを満し、ミクロシリンジで油井内の ^{3}H-ロイシン滴を吸入する。続いてピペットの先端を神経節内に刺入し、微動装置につないで定速度でシリンジの中筒を押し、約120秒かかって ^{3}H-ロイシンの注入を完了する。吸入および注入はいずれも実体顕微鏡下で行い、^{3}H-ロイシン液と流動パラフィンの界面の移動をめじるしにした。アイソトープ注入後、切開部を縫合し、指定温度の恒温槽に蛙を入れる。遅い軸索流を観察するには、この状態で数十日間飼育する必要があるので、テトラサイクリンの経口投与によって感染を防止した。アイソトープ注入後一定の時間をおいて、後根－第9脊髄神経節－坐骨神経をとりだし、蛙リンゲル液で洗った後、5mmごとに切断する。各神経片をバイアルに入れ Soluene-100 (Packard)

0.5ml を加えて溶解した後(50℃, 2時間)、トルエン系シンチレーターを加え、3時間以上放置後液体シンチレーションを計測した。初期の実験では対側の神経を対照として同様に計測したが、カウントは無視できる程度なので、以後省略した。薬物の作用をみる実験では、ｳﾘｼﾞﾝを注入して2時間後に、神経節から70～80mm離れた神経部位に5μlの薬物溶液を注入し、その36時間後に神経をとりだした。対照実験では薬物の溶媒のみを注入した。

温度依存性を調べる実験では、指定の温度で蛙を2週間以上飼育した後、室温でアイソトープを注入、タンパク質への取入を待つため3時間室温においた後、もとの低温にもどした。この際、直腸温は2時間以内に恒温槽の温度にまで低下した。

オートラジオグラフィーは神経を10%ホルマリンで固定、パラフィンに包埋、10μmに薄切、脱パラフィン後、乳剤 Sakura NR-M2 をかけて30日間露出、ヘマトキシリン・エオジン染色後鏡検した。

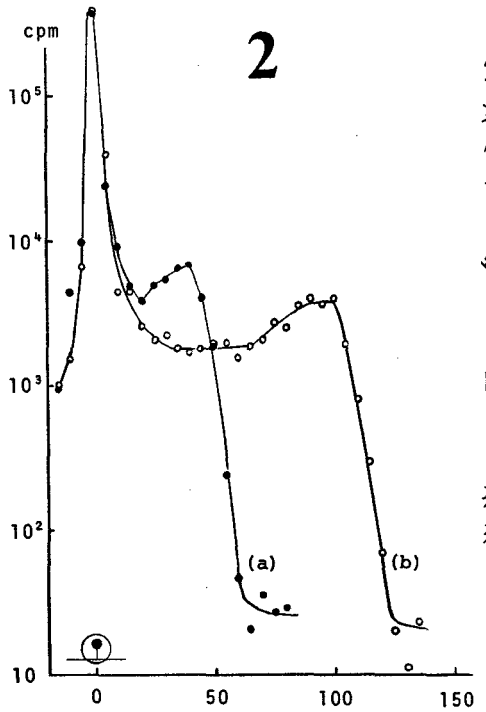
結果と考察　**軸索流の証明**　神経節内に注入されたｳﾘｼﾞﾝは速やかにタンパク質にとりこまれる(第1図)。注入12時間後(25℃)の蛙の神経では、神経節に隣接する約20mmまでは、カウントの10～15%がＴＣＡ可溶性分画であるが、それより末梢側では95%以上がタンパク質にとりこまれている。同条件下の神経をオートラジオグラフィーで調べると、神経節から10－20mmの部位ではアイソトープが軸索の内部のみならず、軸索外 (endo-, peri-, epi-neurium) にも存在する。これ以上末梢側では軸索外部のアイソトープはほぼ完全に消失して、軸索内に限局されるようになるが、ごくわずかのアイソトープが epineurium にみとめられることもある。軸索内のアイソトープの分布は一様ではなく、軸索の周辺部に偏在する傾向が強い。これは神経の近位部で特にめだつ所見である。第2図は軸索流の標準的なパタンを示す。特徴的なことは神経節からある距離をおいてカウントの峰(クレスト)があり、これに続いてカウントが急激に低下し、基線のレベルに達することである。このパタンは OCHS ら[11]が猫の坐骨神経で報告したものに類似しているが、クレストの形成が猫にくらべてはるかに明瞭である。クレストを構成するカウントは、とりこまれた全カウントの5%前後である。クレストの位置はアイソトープ注入後時間とともに末梢へ移動するが巾は拡がらない。クレストの移動は軸索流の存在を示しており、拡散によるアイソトープの移動は存在するとしてもきわめて遅く、神経節の近傍に限局されるものと考えてよい。



神経節を、10%TCA, 5%TCA(80℃, 20分), エーテル:エタノール(4:1)(3回)で順次抽出し、沈殿をToluene に溶解した。抽出液の一部と沈殿溶解液の放射能を測定した。

流速　クレストの下降線と基線との交点(T)、またはクレストが半分のカウントにまで下降する位置(H)をアイソトープ注入後の時間に対してプロットすると、第3図に示すようにいずれも直線になる。流速は1.2mm/日である。これは猫の坐骨神経について報告されている400mm/日[11]よりは低いが、明らかに速い軸索流の範囲に入る速度である。またアイソトープ注入後30～60日後に比較的平坦で、やや不規則なクレストが出現し、その移動速度は0.5～1mm/日程度と算出される。

薬物の作用　コルヒチンが軸索流を阻止す

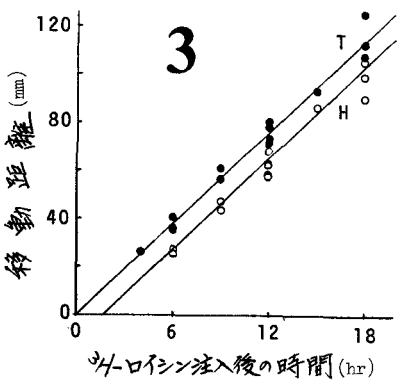


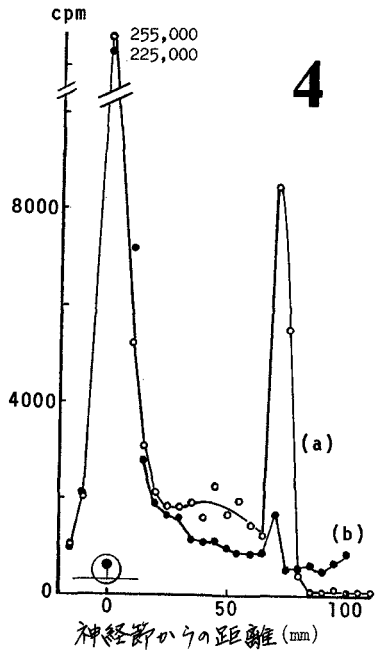
(a) ^{3}H-ロイシン注入9時間後 (b) 18時間後(25℃)

ることについてはすでに多くの報告がある。[1] 第4図に示したようにわれわれの実験系でもこの事実を確めることができた。コルヒチンの注入部位に限局して多量のアイソトープが蓄積し、その末梢側へはほとんどアイソトープは移動しない。この事実もまた、前述のようにアイソトープの受動的な拡散が無視できる程度にしか起らないことを示している。またここに蓄積したカウントは、とりこまれた全カウントの約5%に相当し、36時間経過したにもかかわらず前述のクレストのカウント量の割合と変らない。神経節にはラベルされたタンパク質の大部分が残存するのに、速い軸索流成分が増加しないというこの結果は、速い軸索流で移動する成分は、神経節内で他のタンパク質とは別のコンパートメントに存在することを示している。コルヒチンは微小管 microtubules の構成タンパク質と推定されるチュブリン(二量体)と結合することが知られており,[13] コルヒチンによる軸索流の阻害をこれによって説明しようとする立場がある。最近の電顕的研究によるとコルヒチンは必ずしも微小管に影響を与えないこと、微小管以外の構造にも変化を与えることが示されている。[6][9] われわれもコルヒチンの注入による坐骨神経の電顕形態の変化を検討しているが、現在のところ微小管の変化を認めていない。コルヒチン以外にも軸索流に影響する物質がえられれば、軸索流のメカニズムを調べる手掛りがふえる。

OCHS は速い軸索流がオキザレートによって阻害されることから、Ca^{2+}の関与を想定しているが,[10] われわれはGEDTA(100mM, 5μl を神経内注入)によって影響を認めることができなかった。またミクロフィラメント系に作用すると言われている[15]ジゴスポリンA(10mM・5μl)も軸索流に影響しない。

<u>温度依存性</u> 2°, 6°, 10°, 18°, 25°Cの各温度に保った蛙についてクレストの移動距離を時間に対してプロットすると、いずれの温度でも直線になる。低温ではクレストの全カウント数は温度によらずほぼ一定している。第5図に示すように各温度における流速の対数と温度との間には直線関係があり、したがって2~25°Cの温度範囲では流速のQ_{10}は温度によらず一定で2.6と算出される。蛙の坐骨神経における AChE 軸索流のQ_{10}は温度によって1.6~2.2の範囲で変動すると報告されており,[8] 第5図の結果とは異なる。このことは2つの軸索流のメカニズムが異なることを示唆するものかも知れない。また最近金魚の視神経で、20.5°C, 9°Cの2点における実験から2.6のQ_{10}が報告されている。[3]

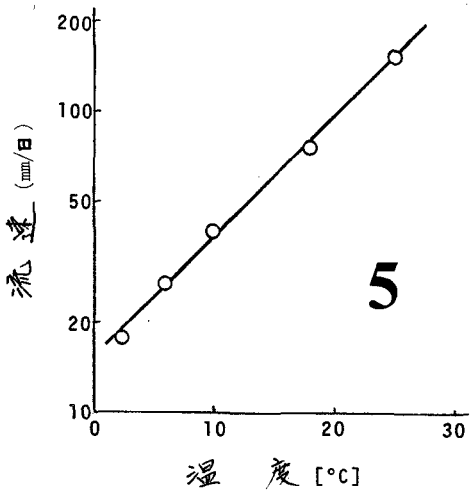




(A) 0.56M コルヒチン注入 (溶媒; 0.1M Tris-HCl(pH 7.5):エタノール = 4:1, V/V)
(b) 対照 (溶媒のみ注入)

流速の対数と絶対温度の逆数をプロット (Arrhenius plot) すると直線になり、見かけの活性化エネルギーは16.2 Kcal/mole と計算される。この流速の温度依存性を規定する要因としてふたつのことが考えられる。ひとつは、軸索流には酸化的リン酸化をふくめた多くの反応系が関与していることが考えられるので、それらのうちの律速過程の活性化である。ただし通常の酵素反応ではQ10は1~2の値をとると言われているので,[12] ここでえられた値はそれよりやや高い。他の要因は、軸索流に関与していると考えられる微小管の温度による変化である。紡錘体の微小管については、重合ー脱重合の平衡があることが知られており、30°~10°Cの範囲で低温になるにしたがい、徐々に脱重合する.[4][5] 神経系の微小管については、重合ー脱重合の平衡関係の解析はなされていないが、電顕的に、低温では微小管が減少し、常温にもどすと再現することが報告されている.[10]

in vitro の実験　in vivo の実験では薬物の有効濃度を厳密に規定できないので、平行して in vitro の実験系を使用した。後根ー脊髄神経節ー坐骨神経をとりだした後、湿沪紙上でリゾレシチン 0.2μl を神経節内に注入、蛙リンゲルで洗ったあと、神経節と坐骨神経を別々のコンパートメントに入れ、両者の間にシリコングリースの隔壁を設ける。このコンパートメントはそれぞれ別々に定温のリンゲル液によって循環する。in vitro の実験では現在のところ軸索流パタンの再現性が in vivo の場合ほど良くない。これは一つには神経をとりだす際の損傷(伸展その他)によるものと考えられる。しかし in vitro の神経における軸索流の速さは、in vivo と同じく150 mm/日程度であり、速い流れの検討に使用できる。循環液内に5mM GEDTA, 50μM ジゴスポリンAを加えても軸索流は影響されない。(ジゴスポリンAは塩野義製薬研究所の御好意により供与されたものである。)



(1) DAHLSTRÖM A. (1971) Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 261, 325-358 (2) DIXON M. & WEBB E.C. (1964) Enzymes, 2nd ed., Longmans, London (3) GRAFSTEIN B., FORMAN D.S. & McEWEN B.S. (1972) Exp. Neurol. 34, 158-170 (4) INOUE S. (1964) In: Primitive Motile Systems in Cell Biology (ALLEN R. & KAMIYA N., ed) pp. 549-594, Academic Press, New York (5) INOUE S. & SATO H. (1967) J. gen. Physiol. 50, 259-288 (6) KARLSSON J.-O., HANSSON H.-A. & SJÖSTRAND J. (1971) Z. Zellforsch. 115, 265-283 (7) KATO T. & LOWRY O.H. (1972) J. Neurochem. (in press) (8) KLODOS I. & NIEMIERKO S. (1968) Acta biochim. Pol. 15, 31-36 (9) NORSTRÖM A., HANSSON H.-A. & SJÖSTRAND J. (1971) Z. Zellforsch. 113, 271-293 (10) OCHS S. (1972) Science 176, 252-260 (11) OCHS S. & RANISH N. (1969) J. Neurobiol. 2, 247-261 (12) RODRIGUEZ ECHANDIA E.L. & PIEZZI R.S. (1968) J. Cell Biol. 39, 491-497 (13) WEISENBERG R.C., BORISY G.G. & TAYLOR E.W. (1968) Biochemistry 7, 4466-4479 (14) WEISS P. & HISCOE H.B. (1948) J. Exp. Zool. 107, 315-395 (15) WESSELLS N.K., SPOONER B.S., ASH J.F., BRADLEY M.O., LUDUENA M.A., TAYLOR E.L., WRENN J.T. & YAMADA K.M. (1971) Science 171, 135-143

29. ラット坐骨神経系のin vitroにおけるロイシン輸送

山口　仁・内藤利勝
（昭和大・医・神経）

ラット坐骨神経系を材料として，直列六分画の神経隔絶箱を用いて in vitroでのAxonal flowを証明し，その特徴を知る目的で本実験をおこなった。坐骨神経系を5カ所で十分に隔絶し，リンゲル重炭酸緩衝液中に温置し，脊髄部分が占める第一室には^{14}C－ロイシンの0.01 μCi/mlを加えた。Overnight（約20時間）後^{14}C－ロイシンは隔絶された神経を介して末梢側へ下降輸送され，各室のメジウム，神経のPCA可溶，および不溶分画に含まれる放射活性を測定した。輸送された^{14}C－ロイシンは，末梢ではほとんどメジウム中に排出され，神経組織の分画に残存する活性はわずかであった。この輸送機構は種々の実験条件の影響をうけ，低温度，低酸素および化糖の条件であきらかな減少を認め，燐酸緩衝液を用うると輸送はほとんど途絶した。種々の代謝阻害剤を加えると，IAAとNaCNによって，輸送は阻害されたが，DNP NaN3の影響はみられなかった。PuromycinとCycloheximideはともに輸送を低下せしめ，Colchicineも著明な阻害作用を示した。神経の結紮実験では明瞭な差を認めず，熱処理実験では，輸送は中等度減少した。このin vitroにおけるロイシン輸送を，他のアミノ酸輸送と比較するとグルタミン酸＞リジン＞ロイシン＞チロジン＞AIBの順序となった。以上のようなラット坐骨神経系のロイシン輸送の結果から，これがin vivoのAxonal flowと同義の現象であり，その機構解明に新しいアプローチを提起するであろう。

さきに演者らは，ラット坐骨神経のアミノ酸摂取について報告し[1]，その際末梢神経に摂取されたアミノ酸がひきつづいてAxonal flowにくみこまれる可能性を考察した。ニューロン細胞体から軸索内を通って神経終末までの物質輸送機構はAxonal flowと呼ばれて，神経機能調節など重要な役割を果していると考えられている[2),3)]。Axonal flowは100-400mm/day，1-3 mm/dayとの速度の異なる二つの流れがありそれぞれFast transport，Slow transportと区別している。[4),5)] しかしこれらの研究はin vivoでの実験であり，Ochsのin vitroの実験[5)]もin vivoの実験の最終段階をin vitroで観察したものにすぎない。Axonal flowの特性をさらに詳細に検討するために，また血行による移行を除外するために，in vitroでの実験方法の確立が必要であり，その目的で以下の実験をおこなった。

［実験方法］　体重300g以上のラットから左右一対の坐骨神経／L4-L6脊髄標本を剔出した。坐骨神経を膝関節部より上行して臀筋梨状筋を切開し腸骨をはずして神経叢より脊椎横突起側方を切断して脊椎腔内に入り，比較的長い馬尾神経をへて神経根より二対の神経線維が入る脊髄のL4-L6まで，全体を連続剔出し，そのSomaをつけた末梢神経を坐骨神経系とし実験材料とした。同一動物の一方の神経を対照実験，他方を条件付実験に供し比較検討した。温置装置として電気生理で繁用されているアクリル樹脂板より手製した隔絶箱を使用した。これは直列六分画で隔絶部の厚さは3mm各室内径は12X35X15mm 隔絶部に三角の切こみを施しその溝に中枢側の第一室から末梢側の第六室まで坐骨神経系を伸展した（表1）。

（表 1）

RAT SCIATIC SYSTEM ANATOMICAL SEQUENCE, IN THE APPARATUS	CHAMBER#1 L_4-L_6 SPINAL CORD+RADIX	#2 CAUDA EQUINA	#3 SCIATIC, PLEXUS, PELVIS	#4 SCIATIC, BUTTOCK	#5 SCIATIC, UPPER FEMUR	#6 SCIATIC, LOWER FEMUR
WET WEIGHT	105MG	31MG	26MG	19MG	17MG	11MG

隔絶は切こみに三角小片をのせワセリンを塗り各室間の連絡を防ぎ刺激電位の波形を調べ隔絶状態をチェックした。各室には4mlの1mMロイシンを含むリンゲル重炭酸緩衝液 NaCl 136.0mM, KCl 5.6mM, $CaCl_2$ 2.2mM, Glucose 5.5mM, $MgCl_2$ 1.2mM, $NaHCO_3$ 16.2mM 5%炭酸ガス 30°平衡時 pH 7.34 をメジウムとしていれた。[6] L_4-L_6 脊髄部分が占める中一室には ^{14}C-ロイシンの 0.01μCi/ml を混じた。種々の阻害実験では阻害剤を各室均等に加えた。種々のアミノ酸輸送の比較実験ではロイシンによる実験と同様に各室等モル濃度のアミノ酸を用い中一室には ^{14}C-アミノ酸の同量即ち 0.01μCi/ml を加えて濃度を調製した。そして室温約45時間放置したのち放射性物質の移動を観察した。その他の実験では神経をセットした隔絶箱を 95% O_2 + 5% CO_2 の気相中に入れ 37° Overnight（約20時間）インクベートし，終了後各室のメジウム内に移動した ^{14}C-ロイシンの量を液体シンチレーションカウンターで検出し，次に各室の神経を切断し湿重量を計り3% PCA でホモジナイズし PCA 可溶分画と不溶分画を得てその放射活性を測定した。シンチレーション測定にはトルエンのシンチレーション用ソルベントとトリトン X-100 を 2:1 に混合したものを用いた。[7]

［結果および考察］ 坐骨神経系を ^{14}C-ロイシンを含むメジウムで温置するとロイシンは活発に摂取され一部は蛋白にとりこまれる。表その中一室の PCA 可溶分画，不溶分画のカウント数はほぼメジウムと平衡状態にあることが，乾燥重量を湿重量の約20%細胞外空間を約50%として[1]，計算すると得られる。即ち20時間放置で神経と外液の平衡状態が十分成立し，45時間放置すれば更に平衡性が高まる。PCA 可溶分画のカウント数は中一，二室でメジウムの2%，中四，五，六室で3.5%とメジウム値とほぼ平行するのに対し，PCA 不溶分画は中一室で0.3%，中四，五，六室で5%となり遠位末梢側で可溶分画より絶対数も多く増加傾向が強くみられる。これは可溶分画は単にメジウムと平衡状態にあるにすぎずロイシンは不溶分画を介して輸送されることを示唆している。しかしこの実験方法では両分画ともカウント数は中三室以下10以下の微量であり，これ以上の考按は困難である。神経を介するロイシン輸送は末梢で大部分メジウム中に exit されメジウムの値は他の分画の20倍以上である。これは Axoplasmic protein[4] または Transport fila-

（表 2）

FRACTIONATION	NO. OF NERVES	CHAMBER#1 M.±S.D.	#2 M.±S.D.	#3 M.±S.D.	#4 M.±S.D.	#5 M.±S.D.	#6 M.±S.D.
MEDIUM	23	61200±10600	1410±1360	140±80	120±60	100±30	110±50
PCA SOLUBLE	25	1100± 380	31.2±28.3	6.0±6.3	4.0±2.7	3.4±2.3	4.0±2.5
PCA INSOLUBLE	10	221± 102	16.8±18.2	7.4±5.1	5.0±4.3	6.2±2.5	5.3±3.9

UNIT, COUNT PER MINUTE

ment[5]とロイシンとの結合がきわめて弱く，同時にCounterbalancing作用[8]により高分子化合物と結合したロイシンがメジウム中に遊離すると思われる。そのため以下の実験結果について専らメジウムのカウント数を比較検討した。ロイシン輸送の時間経過実験(表3)では10時間までの輸送量は冲＝室，100 cpm/HR；冲≡室 5cpm/HR；冲四，五，六室，2cpm/HR とほぼ直線的に一定であるが20時間値45時間値では近位末梢側で減少し遠位で増加していた。これはロイシン輸送が近位末梢と遠位末梢とでSlow transportとFast transportのような二元的機構と解釈するひとつの根拠と考えられる。この輸送をロイシン以外のアミノ酸で調べてみるとグルタミン酸＞リジン＞ロイシン＞チロシン＞メーアミノイソ酪酸(AIB)の順序となり(表4)生理的に多量に存在するグルタミン酸の輸送が最も活発であり，非生理的なAIBの遠位末梢側への輸送は認められず，これはAxonal flowが選択的であり特異的過程であることを示唆している。次にロイシン輸送の諸因子のDeprivation studyを行った，(表5)。窒素ガスで置換した低酸素，メジウムからブドウ糖を削除した系，および4°Cの低温実験で，遠位末梢側のカウント数は対照に比べて低下した。とくに低温では全ての阻害実験中最も顕著な途絶を示した。逆に近位末梢側では，Damming現象[5]により，対照より高い値であった。メジウムより重炭酸緩衝液を除いて，M/15 ゼレンゼン燐酸緩衝液で置換した実験では，全末梢側でロイシン輸送はほとんど失活した。このようにロイシン輸送機構は温度に依存的であり，酸素を用いてエネルギー源としてブドウ糖を消費し，かつ重炭酸緩衝液中でおこなわれることが必要条件であるものと思われる。Axonal flowはoriginalには，神経を結紮すると，その中枢側では末梢神経の直径がまし，末梢側ではその直径が小さくなり，結紮を解消すると神経は再び元の直径に復するという観察から提起された概念であり，その後多くの学者が，結紮あるいわ圧潰をおこなうことにより，ミトコンドリア，カテコールアミン含有小胞，酵素，燐脂質，放射活性蛋白がその中枢側に蓄積することを認めて，確かめられたのであるが，われわれも同様にAxonal flow中断の目的で神経結紮を隔絶部や室中で行うと，対照より転送輸送減少をみたが明瞭の差ではなかった。輸送ロイシンが末梢でメジウムに

(表3)

TIME COURSE	NO. OF NERVES	CHAMBER #1 M.±S.D.	#2 M.±S.D.	#3 M.±S.D.	#4 M.±S.D.	#5 M.±S.D.	#6 M.±S.D.
2 HR	6		23± 5	8±3	5± 2	4± 3	3±2
4 HR	6		218±200	18±7	9±2	9± 4	7±2
6 HR	6		452±430	28±11	16±4	13± 3	11±3
8 HR	6		672±668	38±16	21±6	17± 3	15±4
10 HR	6		874±901	43±19	24±7	21± 4	17±5
48 HR	6	25201±4993	1365±916	326±132	233±75	226±124	151±59

(表4)

AMINO ACID	NO. OF NERVES	CHAMBER #1	#2	#3	#4	#5	#6
GLUTAMATE	4	40300	1780	290	583	220	230
LEUCINE	4	71070	180	30	20	20	30
LYSINE	4	72570	720	60	40	40	60
TYROSINE	4	57390	190	4	3	2	4
A.I.B.	4	79400	950	5	2	2	1

(表5)

EXPERIMENT CONDITION	NO. OF EXPS.	CHAMBER#1 % OF CONTROL	#2	#3	#4	#5	#6
N_2 GAS	2	101 %	532 %	174 %	19 %	29%	12 %
NO GLUCOSE	2	74	1476	2919	149	44	27
TEMP.4°C	2	99	1196	1684	2	0	2
PO_4 BUFFER	4	101	6	3	6	10	5
LIGATION							
@ CHAMBER	3	100	279	216	67	76	41
@ SEPTUM	2	102	150	86	80	82	54
PRETREATED WITH HEAT							
47°C,30MIN	2	113	61	17	30	25	21
60°C,30MIN	2	108	34	37	33	9	12

exitされるため結紮部を容易にジャンプするためと考えられる。脳切片のロイシン摂取は47°30分の前処置で½に60°で0になるが[9]全脊神経系では47°で1/5, 60°で1/10と低下した。これは摂取減少と同時にロイシン輸送の担体またはMicrotubulusのごとき構造の加熱による不可逆的変性と推定される。種々の代謝阻害剤の影響を調べると(表6), 10^{-2}M IAAは末梢側を一様に20~25%と阻害し, 10^{-2}M NaCNは遠位末梢側ほど阻害が多く50→25%となる。10^{-4}M DNPと10^{-3}M NaN_3では阻害は認められなかった。蛋白合成阻害剤では10^{6}/ml Puromycinは遠位末梢側ほど減少が甚しいが10^{-5}M Cycloheximideは遠位近位ともに阻害した。この両阻害剤ともにロイシン輸送をあきらかに阻害するが, その作用機転は異るという印象をうける。Axonal flowはMicrotubulus系に依存的であり[10], それはColchicineによって破壊されるが[11], コルヒチンは10^{6}/mlの濃度で輸送を減少せしめそれは近位末梢側でより顕著であるという興味ある結果をえたが, コルヒチンがSlow transportを阻止するという報告[10]と一致するものであると思われる。

(表6)

METABOLIC INHIBITOR	NO. OF EXPS.	CHAMBER#1 % OF CONTROL	#2	#3	#4	#5	#6
10^{-2}M IAA	3	116 %	16 %	27 %	26 %	21 %	26 %
10^{-2}M NaCN	3	112	53	40	21	34	28
10^{-4}M DNP	2	76	104	197	152	137	102
10^{-3}M NaN_3	2	112	54	191	148	26	151
10^{6}/ML PUROMYCIN	3	110	92	84	37	44	43
10^{-5}M CYCLOHEXIMIDE	3	83	9	30	41	33	20
10^{6}/ML COLCHICINE	4	98	10	65	129	63	68

[文献]

1) M.Yamaguchi,T.Yanos,T.Yamaguchi and A.Lajtha,J.Neurobiol.,1,419,1970.
2) B.S.McEwen,D.S.Forman,and B.Grafstein,J.Neurobiol.,2,361,1971.
3) J.O.Karlson and J.Sjöstrand,Brain Res.,37,279,1972.
4) R.J.Lasek,Exp.Neurol.,21,41,1968.
5) S.Ochs,Science,176,252,1972.
6) P.F.Cranefield,F.Brink and D.W.Bronk,J.Neurochem.,1,245,1957.
7) M.S.Patterson and R.C.Greene,Analyt.Chem.,37,854,1965.
8) D.A.Jones and H.McIlwain,J.Neurobiol.,2,311,1971.
9) T.Yamaguchi,M.Yamaguchi and A.Lajtha,Biochim.Biophys.Acta,266,422,1972.
10) A.C.James,J.J.Bray,I.G.Morgan and L.Austin,Biochem.J.,117,767,1970.
11) P.Banks,D.Mayor and D.R.Tomlinson,J.Physiol.,219,755,1971.

30. 脳細胞膜の脱分極とCyclic AMPの形成：Pulse-Labeling法と総cAMP定量との比較

清水宏俊
（日本ロシュ）
岡山博
田中正三
（熊大・医・Ⅰ薬理）

モルモット大脳切片を^{14}C-adenineでpulse-labelした後，種々の薬剤を用いて切片内cyclic AMP（cAMP）の形成を促進させ，生じたcAMPを分離，精製の後，その総量と放射活性を測定し，次の結果を得た。

① 13μM以下のアデニンで2～40分間preincubateしても，取り込まれたアデニンは，その後の総cAMP値には有意義な影響を与えない。

② 2分間で取り込まれた^{14}C-adenineは30分間で取り込まれたものより，はるかに（3～4倍）高率に^{14}C-cAMPに転換した。30分と40分とでは大差はなく，^{14}C-cAMPへの転換率は安定する。

③ ^{14}C-adenineで40分間pulse-labelされた切片を，アデノシン，ヒスタミン，ベラトリジンで刺激すると，生じた^{14}C-cAMPの比放射能はほぼ一定であった。アデノシンによる刺激を5分から15分に延長しても，比放射能に著しい変化は認められなかった。ベラトリジンは最も強力な効果を示した（1.2 nmole cAMP/mg protein）。

④ ^{14}C-adenineで40分間インキュベートした際にlabelされるcompartmentは，細胞内全ATPの約19～23％と計算された。

⑤ アデノシン，ヒスタミン，ノルエピネフリン，セロトニンの4種の内因性物質を至適濃度で同時に添加すると，ベラトリジン以上の効果（2.7 nmole/mg prot）を示した。

一昨年の本学会でわれわれは種々の脱分極剤が脳切片内のcAMP形成を促進することを見出し，これが脱分極の程度に比例することから，「脳細胞の脱分極がcAMP値上昇をもたらす」とする見解を発表した（1,2）。この脱分極によるcAMP値上昇（脱分極効果）は，その生化学的機構は未だ明らかでないが，脳組織に極めて特異性の高い現象であり，皮質下白質や培養グリア細胞では観察されない（3,4）から，神経細胞に選択的に密接した現象であることには疑いない。一昨年の発表ではcAMP値の変動を知る方法としてpulse-labeling法（5）—— 予め^{14}C-adenineでpulse-labelされた脳切片を用い，その切片内の^{14}C-cAMPをradioassayする方法 —— を用いた結果を主にして考察を進めたため，切片内の真のcAMP値は不明であった。その後われわれは^{14}C-adenineでpulse-labelされた脳切片内の総cAMP量を測定する方法を開発し，各種刺激下での標識された切片内の総cAMP値とcAMPの比放射能を測定した。その結果，脱分極効果とアミン効果は共に共通のATPを利用することがわかった。

〔実験方法〕

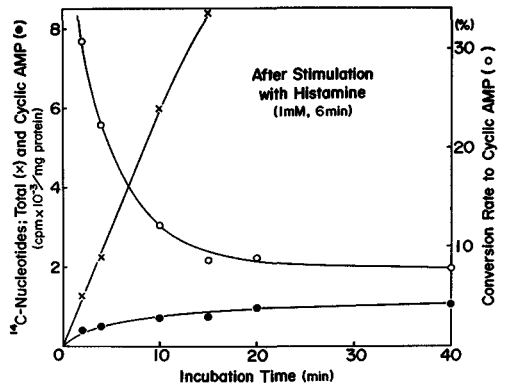
材料はモルモット（Hartley，雄）の大脳皮質を用い，切片はMcIlwain tissue chopperを用いて厚さ0.25 mmに揃えたものを用いた。インキュベーションの条件は前回の報告（1）に従った。切片内cAMPはTCA抽出液を先ず薄層クロマト（5）で精製し，これを更に高圧沪紙電気泳動（6）で精製した。精製中の回収率はTCAホモジェネート中に一定量（約10,000 cpm）の^{3}H-cAMPを加え，その回収より求めた。上記の方法で精製されたcAMP中の^{14}Cを直接radioassayすることにより^{14}C-cAMPの定量を行なった。

また精製された標品の一部を用い，Ebadiら(7)の方法により総cAMP量を酵素的に測定した。ATPはTCA抽出液を稀釈してluciferin-luciferase系を用いて螢光測定した。

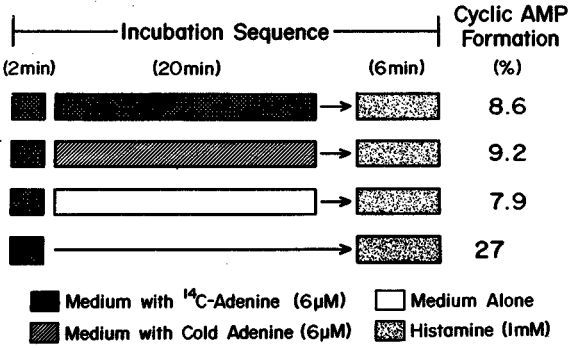
〔実験結果〕

アデニン負荷 —— pulse-labelingに用いられる^{14}C-adenineは2~13μMと比較的低い濃度ではあるが，40分間という長時間のインキュベーションの後には，これら外因性ATP前駆物質が総cAMP値に影響する可能性もある。そこで，切片を予め種々の濃度のアデニンと30~40分間インキュベートし，その後更に10分間アデニンを含まないメジウム（ヒスタミン1.0mM添加群と無添加群）でインキュベート後，切片内総cAMP値を測定した。アデニン1mMでpreincubateした場合，5回の実験中2回，ヒスタミン添加群のcAMP値が，アデニンを加えずにpreincubateした場合に比し，25~40%高く観察された。他の3回の実験では1mMによるpreincubateの効果は認められなかった。また，アデニンの濃度を10~50μMの範囲でpreincubateした場合には，5回の実験中，ヒスタミン添加群，無添加群共に，アデニン無添加でpreincubateした場合との間に有意差を認めなかった。これらの結果は，脳切片に対し，アデノシンは有効にcAMP値を増すが，アデニンは無効(8)という従来の報告に一致し，また2~13μM程度の濃度の^{14}C-adenineを用いるpulse-labeling法においては，adenyl cyclaseと密接したATP compartmentの拡大は生じていないことを示す。

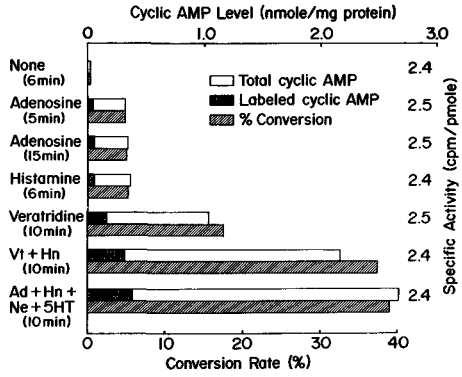
Pulseの持続時間 —— アデニン負荷により，ATP compartmentの有意義な拡大は生じないことが明らかとなったが，Pulse-labelingの時間は^{14}C-cAMPの量に影響するであろうし，その際の総cAMP値との関係も知られていない。そこで，脳切片を^{14}C-adenine (7μM)で2分から40分の異なるpulse時間でインキュベートし，Pulse後直ちにヒスタミン(1mM)で6分間刺激し，切片内の総放射能(×)，^{14}C-cAMP(●)，総cAMP値，総放射能に対する^{14}C-cAMPの割合(%, ○)を測定した(図1)。Pulse時間の長短にかかわらず総cAMP値は一定であったが，^{14}C-cAMPへの転換率は短pulseのもので著しく高く，20~40分のpulseではほぼ一定であった。短Pulseでlabelされた切片にみられた^{14}C-cAMPへの高い転換率は，Pulse後さらに20分間アデニンを含まないメジウムでインキュベートすることにより，



（図1 ↑）　（図2 ↓）



消失した(図2)。



(図3)

形成されたcAMPの比放射能——脳切片を^{14}C-adenine (7μM)と40分間インキュベートした後，これを更に種々のcAMP形成促進剤と共にインキュベートし，切片内に生じたcAMPの総量と比放射能を測定した。また^{14}C-cAMPの総放射能とlabelingに用いた^{14}C-adenineの比放射能(37μCi/μmole)から，外因性のcAMPも算出した(図3)。ヒスタミンとアデノシンとベラトリジンは，それぞれcAMP形成の機作が異なると思われるにもかかわらず生じたcAMPの比放射能には差がなかった。特にアデノシンの場合，そのcAMP値上昇効果は，細胞に取り込まれてATP源として役立つことと，effectorに対する刺激効果との両方によると考えられていたが，実験結果ではアデノシン(0.2mM)による刺激時間を変えても(5分，15分)，生ずるcAMPの比放射能に著変が認められなかった。即ち，アデノシン効果はそのほとんどが，cAMP前駆物質の細胞内増加によるものではなく，ヒスタミン等と同様なeffectorとしての作用と考えられる。アデノシンとヒスタミン，ベラトリジンとヒスタミンの間にも，pulse-labeling法でみられたのと同様な相乗効果(9)がみられた。^{14}C-cAMPと総cAMPは全く同様な態度で変動し，したがって，単独効果でも相乗効果でも，生ずるcAMPの比放射能に大差はない。脱分極効果もアミン効果も，細胞内ATPの利用(cAMP形成のための)に関しては同一機作によるといえる。これまでに脳切片内cAMP値を上昇させることの知られている内因性物質，アデノシン，ノルエピネフリン，ヒスタミン，セロトニンを同時に添加すると，cAMP値は2.8 nmole/mg proteinにまで達し，これはベラトリジン単独の効果をはるかに上まわり，ベラトリジンとヒスタミンを同時に加えた効果に匹敵した。他の薬剤の如何なる組合せによっても，モルモット大脳切片内cAMP値がこれ以上になることはなかった。

cAMP形成のcompartmentの計算——脳切片中のcAMPは著しく上昇した場合でも切片内全ATPの1%以下に過ぎない。一方^{14}C-adenineでpulse-labelされた切片内では95%以上の^{14}Cがadenine nucleotideで存在し，その10~40%もがcAMPに転換するので，脳切片内にはadenyl cyclaseに密接したATP-compartmentが存在し，この中のATPがアミン効果の場合も脱分極効果の場合も同様に利用されることになる。また，このcompartmentは細胞外アデニンにより特に良くlabelされ，約40分のlabelの後にはcompartment内の内因性と外因性のATPの混合もほぼ安定する。ところで，このcompartmentのsizeを，われわれはかつて，全ATPの約10% (10)と概算したが，同一切片標本を用いてpulse-labeling法と全cAMP，ATPの定量とを同時に行なった実験はこれまでになかったので，正確な計算は不能であった。そこで^{14}C-adenineで40分pulse-labelされた切片をヒスタミンで刺激し，その際生ずる^{14}C-cAMPと^{14}C-ATPの比放射能を求めることによりcompartment sizeの計算を試みた。表1にみら

表 1

Total levels and specific activities of adenine nucleotides in slices previously labeled with [8-^{14}C] adenine and incubated with histamine.
Cerebral slices of a guinea pig were labeled with [8-^{14}C]-adenine (0.6 μCi, 7 μM) for 40 min, followed by further incubation with or without histamine (1.0 mM) for varying times. Total levels and specific activities of each compound were determined as described in text. Each labeled nucleotide was expressed on a mole basis using the specific activity of [8-^{14}C]-adenine used for the labeling.

b = a/c x 100 , d = Histamine was omitted

Incubation time	Compounds analyzed								
	Cyclic AMP				ATP			Total adenine nucleotides	
(min)	Total	Labeled[a]	Specific activity	Conversion rate[b]	Total	Labeled	Specific activity	Total	Labeled[c]
Experiment 1	pmole/mg protein		dpm/pmole	%	nmole/mg protein		dpm/pmole	nmole/mg protein	
0	22	3.3	9.3	0.38	10.5	0.30	2.2	26.4	0.85
2	216	38	11	4.6	10.8	0.31	2.3	26.0	0.82
6	359	60	11	6.9	10.1	0.29	2.3	26.3	0.87
15	297	48	10	5.8	10.4	0.29	1.8	25.8	0.82
Experiment 2									
5[d]	20	3.5	11	0.36	10.2	0.33	2.6	26.1	0.96
6	307	66	13	6.9	9.8	0.32	2.5	26.0	0.96
7	295	59	12	6.2	9.8	0.30	2.4	26.3	0.95
10[d]	19	3.4	11	0.35	9.9	0.31	2.5	25.9	0.98

れるように，cAMPの比放射能は常にATPのそれより高く，その比は4.4～5.3に及ぶので，compartment sizeは細胞内全ATPの19～23%と計算される。

〔文献〕

1) Shimizu, H.: Bulletin Jap. Neurochem. Soc. 9 1 (1970)
2) Shimizu, J. & Daly, J.W.: Europ. J. Pharmacol. 17 240 (1972)
3) Shimizu, H., Tanaka, S., Suzuki, T & Matsukado, Y.: J. Neurochem. 18 1157 (1971)
4) Schultz, J., Hamprecht, B. & Daly, J.W.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. in press
5) Shimizu, H., Daly, J.W. & Creveling, C.R.: J. Neurochem. 16 1609 (1969)
6) Shimizu, H., Tanaka, S. & Kodama, T.: J. Neurochem. 19 687 (1972)
7) Ebadi, M.S., Weiss, B. & Costa, E.: J. Neurochem. 18 183 (1971)
8) Sattin, A. & Rall, T.W.: Mol. Pharmacol. 6 13 (1970)
9) Shimizu, H. & Daly, J.W.: in Methods of Neurochemistry, (ed. R. Fried) vol. 2, p. 147 (1971)
10) Shimizu, H., Creveling, C.R. & Daly, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 65 1033 (1970)

31. 脳のCyclic 3′5′-Nucleotide Phosphodiesterase, V。Cyclic AMPとCyclic GMPの水解とカルシウムの影響について

垣内史朗・山崎礼子
手島佳子
（大阪府立中宮病院）

演者らは、さきにラット大脳皮質の可溶性 phosphodiesterase の活性が生理的濃度のカルシウムイオンによって調節されていること、並びに、その機作に脳より分離した耐熱性の蛋白因子が関与することを報告した（Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent phosphodiesterase 並びに modulator protein；前報では PAF）。今回は次の事実について述べる。① Ca^{2+} 依存性の活性は不安定であって、速やかに消失する。Mg^{2+} + EGTA の添加によって、それを部分的に防止し得るが、アルブミンの添加によっては逆に、カルシウムレスポンスの消失を速める。② Ca^{2+} 依存性酵素の kinetics は Michelis-Menten の式には従わず、みかけ上少くとも2個の km が求められる。Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って km 値の減少と Vmax 値の増大がみられたがそれは c-GMP を基質とした場合に著しい。低濃度基質（1μM）での assay でも c-GMP 水解の方が、c-AMP 水解よりも速やかに行われた。③ 脳以外に心筋，腎，肝，骨格筋の新鮮粗酵素においてもカルシウムレスポンスが認められ（c-GMP > c-AMP）たが、大脳皮質の場合が圧倒的である。④ PCMB，Theophylline による脳 phosphodiesterase の阻害を調べた。

c-AMP	Ca^{2+} 6×10^{-8}M	$Km_1 = 3.7\times10^{-6}$M	(0.13)
		$Km_2 = 1\times10^{-4}$M	(0.82)
	Ca^{2+} 1.2×10^{-5}M	$Km_1 = 2\times10^{-6}$M	(0.45)
		$Km_2 = 5\times10^{-5}$M	(5.5)
c-GMP	Ca^{2+} 6×10^{-8}M	$Km_2 = 2\times10^{-5}$M	(0.48)
	Ca^{2+} 1.2×10^{-5}M	$Km = 2.2\times10^{-6}$M	(2.2)

（カッコ内は Vmax 値を示す）

cyclic AMP のホルモン作用 mediator としての役割は、すでに確立したものとみなされ、この一般公式（two messenger 学説）は、シナプスでの transmission をも包含する。一方，cyclic GMP の各組織における分布が最近調べられ、この物質が、cyclic AMP 類似の、しかしそれとは異った意味でのホルモン作用 mediator としての役割を果している可能性が強く示唆されるにいたった。[4] 両者は、夫々 Adenyl cyclase，Guanyl cyclase によって合成され、phosphodiesterase (s) によって夫々の 5′-nucleotide に水解される。両者夫々に特異的な phosphodiesterase が存在するのか、或はまた、同一の酵素が両 nucleotides に作用するのかは、未だ明らかではない。

演者らはさきに、ラット大脳皮質の可溶性 phosphodiesterase の活性が Ca^{2+}，Mg^{2+} 両イオンに依存しているのを発見して報告した（Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent phosphodiesterase）。[5,6] 続いて、この Ca^{2+} による賦活機構に、脳に存在する耐熱性蛋白因子（modulator protein）[註1] が関与していることを見出し、それを酵素から分離した。[6,7] 脳の可溶性区分のゲル沪過クロマトグラフィーの例を図1に示すが、酵素活性は2ッのピーク（Fr. I and II）に分離され、modulator protein は、Fr. III に溶出される。以下に脳 phosphodiesterase による cyclic AMP，及び cyclic GMP 水解について、その後に得た知見を報告したい。一部既報。[5-8]

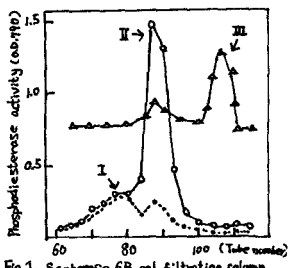


Fig.1. Sepharose 6B gel filtration column chromatography of 100,000×g sup of rat brain. (Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent phosphodiesterase は Fr. II に溶出される。）

《実験方法》 phosphodiesterase 活性は pH 法[2] 及び isotope 法[1] によって測定した。ラット大脳皮質（及び他の組織）ホモジネートの 100,000×g 遠心沈殿上清を透析して（粗酵素液），或は

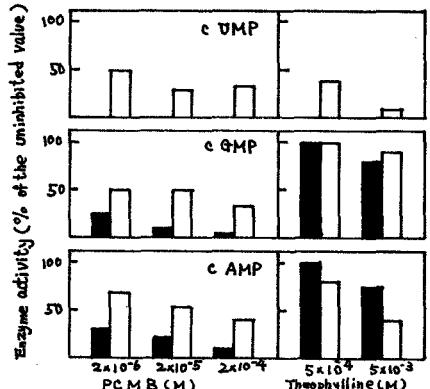


Fig.2. Inhibition of brain phosphodiesterase by P-chloromercuribenzoate and Theophylline. (■ Fr.I enzyme: □ Fr.II enzyme) (※) Fr.I enzyme は cyclic UMP を分解しない。

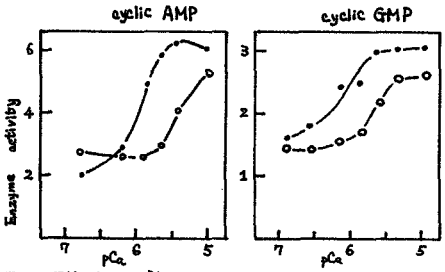


Fig.3. Effect of Ca^{2+} on hydrolysis of cyclic AMP and cyclic GMP by Fr.II with (•—•) and without (o—o) the addition of the modulator protein.

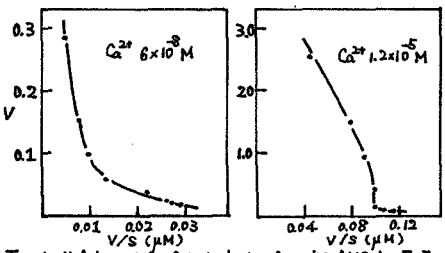


Fig. 4. Hofstee plot of hydrolysis of cyclic AMP by Fr.II enzyme, at 6×10^{-8}M Ca^{2+} and 1.2×10^{-5}M Ca^{2+}.

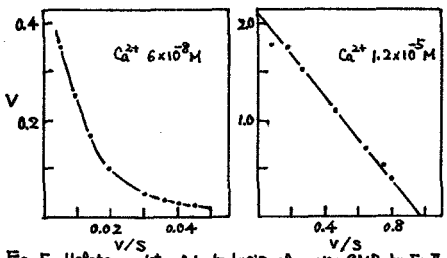


Fig. 5. Hofstee plot of hydrolysis of cyclic GMP by Fr.II enzyme, at 6×10^{-8}M Ca^{2+} and 1.2×10^{-5}M Ca^{2+}.

Sapharose 6B カラムにかけたのちに（Fr. I, II, III）使用した。

§結果§ §1. Stability of Enzyme. 脳 phosphodiesterase のカルシウムレスポンス（Ca^{2+} 1.2×10^{-5}M 添加時活性／Ca^{2+} 2×10^{-4}M 時活性の比）は不安定であって、4°数日，或は室温（20°）overnight にて著しく減弱する。表1ではこれを安定化する条件を調べた。$MgCl_2$（1～2mM）或は EGTA（0.05mM）を酵素液中に添加することによって、カルシウムレスポンスの減弱を部分的に防止し得た。dithiothreitol の添加或は freeze-thawing（-80°）によっては、カルシウムレスポンスは保たれるが、酵素活性そのものが低下した。牛血漿アルブミン（0.2～1mg/ml）の添加は、カルシウムレスポンスの安定化に無効であるのみならず、Mg^{2+} 共存時に、逆に base line（Ca^{2+} 2×10^{-7}M 活性）の上昇をもたらし，カルシウムレスポンスは著しく減少した。Mg^{2+}, EGTA, アルブミン等の上記の作用機序は不明であるが、以下の実験には 1mM $MgCl_2$ + 0.05mM EGTA を含む medium を用いて酵素を調製し、またゲル沪過クロマトグラフィーを行った。この medium 使用においても、カルシウムレスポンスは比較的速やかに失われ、それは表3, 4に示すごとくである。例えば kidney の酵素では、6日後にはカルシウムレスポンスが完全に消失した。Ca^{2+} 依存性の活性に比べて、basal な活性（at 6×10^{-8}M Ca^{2+}）は良く保たれる。§2. Inhibitor について. Fr.I 及び II の活性は共に SH 阻害剤（NEM, PCMB）によって阻害された。PCMB に対して、Fr.I 酵素の方が Fr.II 酵素より6強く阻害され、2×10^{-4}M の濃度にて Fr.I は略完全に阻害されたのに対して，Fr.II では約60%阻害されたに過ぎない（図2）。Theophylline による阻害では、基質によって異る結果を得た。cyclic UMP の分解が最も強く抑えられ、cyclic AMP の場合がそれに次ぐ。cyclic GMP の分解は、Theophylline によって殆んど阻害されない。cyclic AMP を基質とした場合，Theophylline は Fr.II 酵素をより強く阻害した（図2）。§3. cyclic AMP 水解，cyclic GMP 水解の Ca^{2+} 依存性について. Fr.II 酵素による cyclic AMP 水解，cyclic GMP 水解は共に Ca^{2+} に依存する。図3で" modulator protein 添加時での half maximum activity は cyclic AMP, cyclic GMP について、夫々略 2×10^{-6}M Ca^{2+}, 7×10^{-7}M Ca^{2+} において見られる。

modulator protein 無添加時でのこの酵素の賦活には，10^{-5} M の Ca^{2+} を必要とし，細胞内 Ca^{2+} の生理的濃度（10^{-6} M のオーダー）から推して，modulator protein 添加による dose-response curve の shift は，critical な意義を持つ。§4. kinetic Studies

Fr.II 酵素の基質-活性曲線は，Michaelis-Menten kinetics に従わない。データーの Hofstee plot（図4，5）は折れ曲った形となり，見かけ上少くとも2つの Km 値が求められる。表2にその結果をまとめた。Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って，Km 値は減少し，且つ Vmax は増大するが，仲でも cyclic AMP よりも cyclic GMP を基質とした時に著明である。後者では，Hofstee plot は1本の直線になり，同時に Km 値は 10^{-5} M から 10^{-6} M に減少し，Vmax は5倍近く増大した（図5）。Fr.I 酵素の km は cyclic AMP に対して 5×10^{-5} M，cyclic GMP には 1.8×10^{-5} M であった。§5. 各種組織による cyclic AMP 水解と cyclic GMP 水解に対する Ca^{2+} の影響。ラット大脳皮質，心筋，腎，肝，骨格筋（Hind legs）の可溶性粗酵素（透析，overnight）の fresh preparation（殺した翌日に incubate），並びに aged preparation（同一酵素液を4°，6日後に incubate）による cyclic AMP，及び cyclic GMP 水解を測定した結果を，表3，4に示す。基質の初濃度を 1×10^{-6} M としたのは，これら nucleotide の生理的濃度を考慮した結果である。[註2)] 表から，①大脳皮質以外の組織の phosphodiesterase においてもカルシウムレスポンスのみられること，②基質濃度の低いところでは，Ca^{2+} の影響が cyclic AMP の場合よりも，むしろ cyclic GMP の水解に対して強くあらわれること，③組織によって，カルシウムレスポンスが速やかに減衰すること（前述）等が結論される。

Table 1. Stability of Brain Phosphodiesterase

Treatment of enzyme preparation	Activity of enzyme (I)	(II)	(II)/(I)
	(I) Ca^{2+} 2×10^{-5} M	(II) 1.2×10^{-5} M	
	(μmole·mg protein^{-1}, 30 min^{-1})		
Before aging	1.2	3.3	2.8
After aging (20 hours at 20°)			
without further addition	1.0	1.3	1.3
with bovine plasma albumine	0.76	0.76	1.0
with dithothreitol	0.55	0.86	1.6
with $MgCl_2$	1.0	2.7	2.7
with EGTA	1.1	3.0	2.8
with $MgCl_2$ + bovine serum albumin	1.5	1.7	1.1

(All the preparations contained 10 mM Tris HCl, pH 8.5, as the basic medium)

Table 2. Kinetic Properties of Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent Phosphodiesterase in Fraction II.

Incubation condition		Km Values
cyclic AMP	Ca^{2+} 6×10^{-8} M	$Km_1 = 3.7\times10^{-6}$ M (0.13)
		$Km_2 = 1\times10^{-4}$ M (0.82)
	Ca^{2+} 1.2×10^{-5} M	$Km_1 = 2\times10^{-6}$ M (0.45)
		$Km_2 = 5\times10^{-5}$ M (5.5)
cyclic GMP	Ca^{2+} 6×10^{-8} M	$Km_1 = 1.1\sim2.4\times10^{-6}$ M (<0.1)
		$Km_2 = 2\times10^{-5}$ M (0.48)
	Ca^{2+} 1.2×10^{-5} M	$Km = 2.2\times10^{-6}$ M (2.2)

Numbers in parenthesis are estimated Vmax values (μmole·mg protein^{-1}, 30 min^{-1}).

《考察》 この酵素が Michaelis-Menten の式に従わないことは他の研究者も認めるところであって，[1,9)] 基質の negative cooperativity によると考えられている。[註3)] このような場合，"見かけ" の km 値を求める（表2）と共に，practical な見地からのデーター（表3，4）をも参考にして酵素を性格づける必要がある。表2，3，4 のいづれの結果からも，Ca^{2+} がこの酵素の低濃度基質下での活性を増大させることは明らかであるが，cyclic GMP 水解の方が，cyclic AMP 水解よりも一層強く Ca^{2+} によって賦活されることは興味深い。最近，Thompson, Appleman[9)] は，2種類の phosphodiesterase をラット脳，及び各種の組織から分離した。彼等は，それを夫々 "cyclic GMP 酵素"，"cyclic AMP 酵素" と仮称した。前者の km は，cyclic AMP に対して 1×10^{-4} M，cyclic GMP に 1.3×10^{-5} M（いづれも脳），後者は cyclic AMP に対する km，2×10^{-6} M を持ち，cyclic GMP を殆んど分解しないという。ゲル沪過カラムの elution protile，その他の点から，彼等の "cyclic GMP 酵素"，"cyclic AMP 酵素" は，夫々演者の Fr.I 及び II 酵素に相当する。事実，Fr.I の km は彼等の報告と略一致する。しかし，Fr.II に関しては，彼等とは逆に，むしろ cyclic GMP に対する affinity の方が強く，且つ低濃度基質での活性

Table 3. Hydrolysis of 1μM cyclic AMP by the Dialyzed Supernatant Fraction from Various Tisses

Tissue	Activity of fresh Preparation (II) (I) Ca^{2+} 6×10^{-8}M (II) 1.2×10^{-5}M / (I)			Activity of aged (6 days) prep. (II) (I) Ca^{2+} 6×10^{-8}M (II) 1.2×10^{-5}M / (I)		
	(nmole·mg protein^{-1}·30min^{-1})			(nmole·mg protein^{-1}·30min^{-1})		
Brain	12.9 ± 0.3	56.5 ± 0.5	4.38	10.8 ± 0.5	37.6 ± 1.1	3.47
Heart	2.85 ± 0.07	3.30 ± 0.13	1.16	3.02 ± 0.11	3.41 ± 0.05	1.13
Kidney	4.86 ± 0.18	8.43 ± 0.47	1.73	4.57 ± 0.06	4.71 ± 0.25	1.03
Liver	1.27 ± 0.03	1.72 ± 0.09	1.35	1.20 ± 0.06	1.28 ± 0.04	1.07
Muscle	1.21 ± 0.01	1.40 ± 0.02	1.16	1.31 ± 0.02	1.30 ± 0.02	0.99

Table 4. Hydrolysis of 1μM cyclic GMP by the Dialyzed Supernatant Fraction from Various Tissues

Tissue	Activity of fresh preparation (II) (I) Ca^{2+} 6×10^{-8}M (II) 1.2×10^{-5}M / (I)			Activity of aged (6 days) prep. (II) (I) Ca^{2+} 6×10^{-8}M (II) 1.2×10^{-5}M / (I)		
	(nmole·mg protein^{-1}·30min^{-1})			(nmole·mg protein^{-1}·30min^{-1})		
Brain	23.6 ± 0.7	297.5 ± 2.8	13.6	19.9 ± 0.5	148.2 ± 4.0	7.46
Heart	1.61 ± 0.06	4.64 ± 0.02	2.88	1.28 ± 0.04	3.34 ± 0.04	2.61
Kidney	7.28 ± 0.22	15.0 ± 0.3	2.07	10.2 ± 0.2	10.6 ± 0.0	1.05
Liver	1.47 ± 0.03	2.42 ± 0.07	1.65	1.47 ± 0.02	2.38 ± 0.02	1.62
Muscle	0.32 ± 0.00	0.54 ± 0.01	1.72	0.23 ± 0.00	0.38 ± 0.00	1.64

(The result are expressed as the mean of 4 determinations ± standard error of deviation)

もcyclic GMPの方に高いことを，演者らは見い出した（特にCa^{2+} 1.2×10^{-5} Mにおいて）．Inhibitor Studiesの結果や，酵素のStability（表3.4）からみて，Fr. IIに基質特異性を異にする複数の酵素が存在する可能性が考えられるが，未だそれを云々し得る段階ではない。

従来の実験データーからは，Ca^{2+} plus Mg^{2+}-dependent phosphodiesterase は，大脳皮質にのみ分布すると考えられたが，今回，脳以外の組織においても，もしfresh preparationを用いるならば，カルシウムレスポンスが存在することを認めた。しかしCa^{2+}依存性の活性は，脳において圧倒的に顕著であり，脳機能との特異的な関係が想定しうる点には，変りはない。従来からの報告では[3] phosphodiesterase は stable enzyme とされていた。演者らは，Ca^{2+}依存性の活性は非常に labile であり，それが消失した後にも，Ca^{2+}非依存性活性（basal activity）が残存し，また条件によっては，basal activity が逆に上昇することを明らかにした（特にアルブミン添加）。phosphodiesterase活性測定時にアルブミンを添加することが，多くの研究者によって行われているが，このようなincubation 時での添加においても，上述の影響をまぬがれ得ない点に，今後注意を喚起とする。

註1）論文[5-7]では PAF（Phosphodiesterase Activating Factor）と呼んだ。しかしその後，これはCa^{2+} sensitizer であって actimtor でないことが明らかになった（図3）．

註2）一般には 1mM基質（略 Vmax）にて incubate される．1μM基質での incubation は Sutherlandらのグループによって提唱された。[1]

註3）複数個の酵素の存在による可能性も考えられる。しかし electrophoresis にて6個の isozyme を分離した報告[10]では，low K_m 酵素が消失してしまっている。

文献 (1) Beavo, J.A., Hardman, J.G. and Sutherland, E.W.: J. biol. Chem., 245 5649 (1970); ibid, 246 3841 (1971) (2) Suther, R.W. and Sutherland E.W.: J. biol. Chem., 237 1244 (1962) (3) Cheung, W.Y.: in "Role of Cyclic AMP in Cell Function" ed. by P. Greengard & E. Costa, Raven Press, New York (1970) (4) Goldberg, N.: 5th International Congress on Pharmacology, 1972 July, San Francisco (5) Kakiuchi, S. and Yamazaki, R.: Proc. Japan Acad., 46 387 (1970); also in BBRC, 41, 1104 (1970) (6) Kakiuchi, S., Yamazaki, R. and Teshima, Y.: BBRC, 42, 968 (1971); also in "Advances in Cyclic Nucleotide Research", Vol 1, ed. by P. Greengard, R. Robison & R. Paoletti, Raven Press, New York (1972) (7) Kakiuchi, S., Yamazaki, R. and Nakajima, H.: Proc. Japan Acad., 46, 587 (1970) (8) Kakiuchi, S., Yamazaki, R. and Teshima, Y. (in Press) (9) Thompson, W.J. and Appleman, M.M.: Biochemistry, 10, 311 (1971); J. biol. Chem. 246, 3145 (1971) (10) Uzunov, P. and Weiss, B.: BBA (in press)

32. モルヒネの長期間連続投与時における脳内Cyclic AMP代謝の変動について

内藤勝己・中川一夫
木村宏・栗山欣彌
（京府医大・薬理）

要約　マウスにモルヒネを慢性投与した場合の脳内cyclic AMP代謝変動について検索を行ない，次の結論を得た。
1) モルヒネの経口的投与（1～4週間）は大脳皮質のadenyl cyclase活性を増加せしめると共に，^{14}C-adenineでpulse labellingを行なった大脳皮質切片において cyclic-^{14}C-AMP産生の増加を来たすが，一方cyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesterase活性には変化を与えなかった。2) モルヒネの慢性投与群ではノルエピネフリン，ドーパミン，ヒスタミンおよびセロトニンのin vitroにおける添加により惹起される大脳皮質切片のcyclic AMP産生刺激効果が著しく減弱した。一方homogenate標品に特異的とされるFluoride添加によるadenyl cyclase活性の増加はモルヒネの慢性投与群においても減弱を示さなかった。3) ナロルフィンの投与はモルヒネ慢性投与による大脳皮質内cyclic AMP産生の増加には拮抗を示さなかったが，モルヒネ慢性投与群に見られたcyclic AMP産生系に対するノルエピネフリンおよびドーパミンの感受性低下を回復せしめた。但しヒスタミンに対するcyclic AMP産生系の感受性低下はナロルフィンによって拮抗されなかった。4) モルヒネの急性投与（25 mg/kg i.p.）時においては上記のような大脳皮質内cyclic AMP代謝系の変動はまったく認められなかった。

adenine 3′, 5′-monophosphate（cyclic AMP）は中枢神経系をはじめとして諸臓器において生体アミンやホルモン作用時に細胞内mediatorとして作用するものと考えられている。一方モルヒネの連続投与時の脳内生体アミンの代謝に関しては，steady state levelには変化がないがturnover rateが亢進すると一般に考えられている(8)。本研究ではこのようにモルヒネ投与により生体アミンの代謝変動が著しいと考えられる条件下で，脳内神経ホルモン作用時のmediatorとしてのcyclic AMPの代謝自体がどのような変化を示すかを検討した。

実験方法；Swiss albinoマウス（体重25－30g，雄性）を用い，慢性投与実験においては塩酸モルヒネをShusterら(5)の発表した方法に従って連続経口投与した（dose; 55～98 mg/kg/day）。対照群にはモルヒネを除去したものを投与した。モルヒネの効果はhot plate法による鎮痛効果およびanimexによる運動量の測定によって判定した。adenyl cyclase活性は大脳皮質を0.32M庶糖溶液中でホモジナイズした後，Krishnaら(2)の記載に従い，^{3}H-ATPより産生されたcyclic ^{3}H-AMPをカラムクロマトグラフィーにより分離する事により測定した。反応液としてはTris-HCl（pH 7.3）：40 mM，MgSO$_4$：3.3 mM，theophylline：10 mM，ATP：1mM（^{3}H-ATP S.A. 26 mc/m mol）及び3－5 mg proteinのホモジネートを含むものを用いた。大脳皮質切片における cyclic ^{14}C-AMPの産生はShimizuら(4)の方法に従い8-^{14}C-adenineを用いてadenosine-5′-triphosphateをpulse labellingした切片を用い，直ちにホモジナイズする方法によって行ない，反応停止は0.5 mg cyclic AMPの添加と同時に3分間煮沸し，cyclic AMPの分離はカラムクロマト法(2)によって行なった。放射

能はBray氏液を用い液体シンチレーションカウンターで測定した。phospho-diesterase活性はWeiss(7)の記載に従い，遊離された無機燐酸をSwansonら(6)の方法で測定した。またタンパク量はLowryら(3)の方法で測定した。

実験結果および考按

Table 1 Effect of chronic morphine administration on cerebral cyclic AMP formation.

A. Slice; c AMP formation (% conversion)

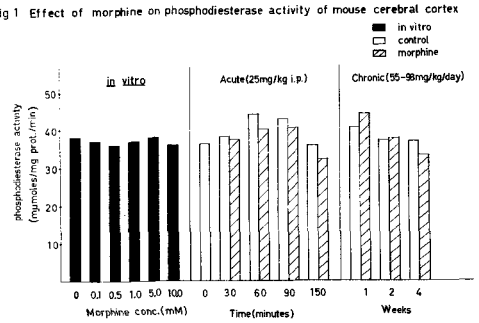
	1 W	2 W	4 W
control	0.91±0.16	0.70±0.17	0.70±0.09
morphine	1.59±0.36	1.32±0.34	**0.94±0.13

* P<0.01
** P<0.05

B. Homogenate; adenyl cyclase activity (pmole/mg/min)

	1 W	2 W	4 W
control	182±19	186±8	166±5
morphine	*227±24	*240±12	*187±5

Fig 1 Effect of morphine on phosphodiesterase activity of mouse cerebral cortex



1) モルヒネ慢性投与の大脳皮質 cyclic AMP 代謝におよぼす影響

モルヒネの連続経口投与(1～4週間)により耐性の増加および運動量の減少が認められた動物において大脳皮質切片の cyclic AMP 産生は著増を示した(Table 1)。これらの ^{14}C-adenine により pulse labelling を行った組織において ^{14}C-adenine および ^{14}C-labelled の adenine nucleotide の組織内量および ^{14}C-ATP 自体の含量は対照群に比して有意差はなく，一方 adenyl cyclase 活性自体が著増を示していること(Table 1)および phosphodiesterase 活性に変化のないこと(Fig 1)から考えて，モルヒネ慢性投与群における大脳皮質内 cyclic AMP 産生増加は adenyl cyclase の活性増加に因するものと考えられる。

2) モルヒネ慢性投与時における大脳皮質 cyclic AMP産生に対する生体アミン反応の変化について

神経組織の cyclic AMP 産生は in vitro における種々の生体アミンの添加により著しく増強されることが知られている(4)。本実験においても対照群より得られた大脳皮質切片に1mM程度のノルエピネフリン，ドーパミン，セロトニンおよびヒスタミンを添加した場合，著しい cyclic AMP産生増加を認めた(Fig 2)。一方モルヒネ慢性投与群においてはこれらの生体アミン添加に対する cyclic AMP 産生系の感受性の著しく減退することが認められた(Fig 2)。更に homogenate のレベルで特異的に出現すると云われている Fluoride の adenyl cyclase 活性に対する増強作用はモルヒネ慢性投与によっても感受性の低下を示さなかった(Fig 3)。これらの事実はモルヒネの慢性投与は生体アミンに対する脳組織内 cyclic AMP産生系の感受性を選択的に低下せ

Fig 2 Effect of biogenic amines on cerebral cAMP formation

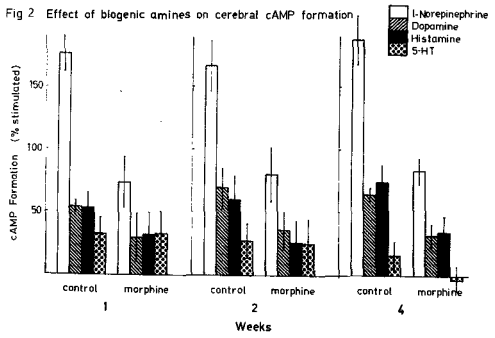
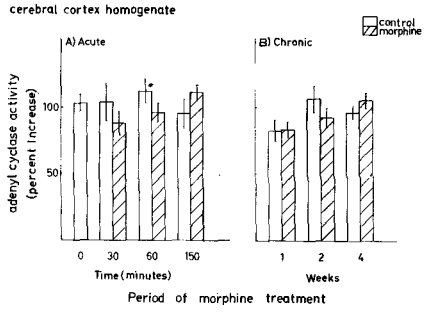


Fig 3 Effect of Fluoride(10mM) addition on adenyl cyclase activity in cerebral cortex homogenate

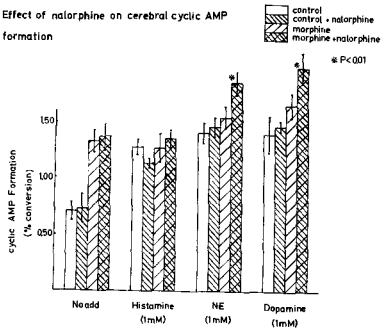


しめるもので，Fluoride による adenyl cyclase 賦活の機構には阻害しないことを示すものであると共に，adenyl cyclase に対する両活性機構は本質的に異なるものであることを示すものではないかと考える。

3) ナロルフィンのモルヒネ慢性投与群における大脳皮質内 cyclic AMP 代謝変動に対する影響

モルヒネ慢性投与群における大脳皮質 cyclic AMP 産生系の増強および生体アミン賦活効果の減退現象の薬理学的意義の一端を知る目的で narcotic antagonist の一つであるナロルフィン投与の影響を検討した（Fig 4）。モルヒネの慢性投与を2週間行なった動物に対しナロルフィン（5mg/kg i.p.）を投与し5分後の大脳皮質切片において，cyclic AMP 産生の増加現象はナロルフィンにより影響を受けなかったが，ノルエピネフリンおよびドーパミンに対する cyclic AMP 産生系の感受性低下はナロルフィン投与により回復することが認められた。しかしながら同一条件下においてヒスタミンに対する感受性低下はナロルフィンにより拮抗されなかった。

Fig 4 Effect of nalorphine on cerebral cyclic AMP formation



4) モルヒネ急性投与の大脳皮質内 cyclic AMP 代謝系に対する影響

上記 1)～3)に認められたモルヒネ慢性投与時の脳内 cyclic AMP 代謝系変化の特異性の一端を見る目的でモルヒネ（25mg/kg i.p.）を一回投与した場合の変化を検討したが，鎮痛効果の発現に関係なく，大脳皮質内 adenyl cyclase 活性（Fig 5），phosphodiesterase 活性（Fig 1）および cyclic AMP 産生（Fig 6）のいづれも変化をうけず，また生体アミンに対する cyclic AMP 産生系の感受性も著変を示さなかった。

Fig 5 Effect of acute morphine administration (25mg/kg i.p.) on cerebral adenyl cyclase activities and analgesia

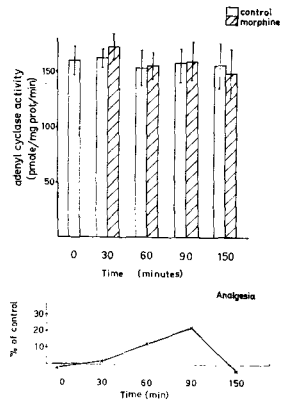
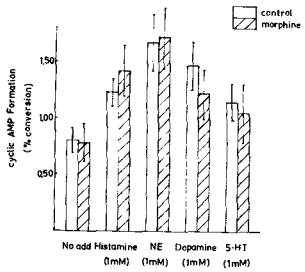


Fig 6 Effect of acute morphine administration (25 mg/kg i.p.) on cyclic AMP formation (90 min after injection)



結語　モルヒネの慢性投与は adenyl cyclase 活性の増加を介して脳内 cyclic AMP 産生を増加せしめる一方，カテコールアミンに対

する cyclic AMP 産生系の感受性を低下させるものである。これらの変化は急性投与時には見られず，しかもナロルフィンによりカテコールアミンに対する cyclic AMP 産生系の感受性低下のみが拮抗されることは，このカテコールアミンに対する感受性変化がモルヒネ依存現象に対し重要な役割をなしていることを示している様にも考えられる。しかしながらモルヒネ慢性投与時と同様な脳内 cyclic AMP 代謝の変化即ち，cyclic AMP 産生の増加と生体アミンに対する cyclic AMP 産生系の感受性低下は慢性アルコール投与時にも発現するものであり(1)，これらの現象が各薬物の依存現象発現に特異的なものとは考え難く，むしろ薬物依存現象に共通した背景をなす脳内の生化学的変化ではないかと考える。

参考文献

1) 栗山欣彌, M.A. Israel : 第14回 日本神経化学会 (1971)
2) Krishna, G., B. Weiss and B.B. Brodie : J. Pharmacol and Exp. Ther. 163, 379 (1968)
3) Lowry, O.H., Rosebrough, N.T. Farr, A.L. and Randall, R.J. : J.B.C. 193, 265 (1951)
4) Shimizu, H., J.W. Daly and C.R. Creveling : J. Neurochem. 16, 1609 (1969)
5) Shuster, L., R.V. Hannam and W.E. Boyle : J. Pharmacol and Exp. 140, 149 (1963)
6) Swanson, P.D., Bradford, H.F. and McIlwain, H. : Biochem. J. 92, 235 (1964)
7) Weiss, B. : J. Neurochem. 18, 469 (1971)
8) Way, E.L., H. Loh and F.H. Shen : Science 162, 1290 (1968)

33. ウシ脳からの3′5′-Cyclic AMP依存性蛋白燐酸化酵素の精製と基質蛋白による活性化

宮本英七
（大阪府立中宮病院）
P. Greengard
（Yale大学・薬理）

ウシ脳から異なった分子量をもつ2種の3′,5′-cyclic AMP（cyclic AMP）依存性蛋白燐酸化酵素を精製した。精製された酵素は庶糖密度勾配遠心沈殿法において，7.7S（分子量，140,000）および5.4S（分子量，84,000）の沈降係数を示し，両酵素ともに3種の異なった緩衝液を用いたポリアクリルアミドの電気泳動上において単一の蛋白帯として移動した。酵素活性はそれぞれの蛋白帯と一致した。両酵素ともにcyclic AMPおよび酵素に特有の基質蛋白により解離，活性化された。cyclic AMPと基質蛋白の効果は付加的であった。基質蛋白による活性化はcyclic AMP非依存性の酵素活性の増大をもたらし，蛋白量ならびに蛋白とのpreincubation timeに依存性であった。プロタミン親和性カラムを用い，holoenzymesからcatalytic subunitとregulatory subunitを分離，溶出した。すなわち，7.7S酵素は3.6S（分子量，40,000）のcatalytic subunitと6.1S（分子量，100,000）のregulatory subunit，5.4S酵素は3.6Sのcatalytic subunitと2.0Sのregulatory subunitに解離した。これらの結果は上にのべた酵素の解離実験の結果を確かめた。7.7S酵素の等電点はpH 4.6であり，そのcatalytic subunitとregulatory subunitの等電点はそれぞれpH 7.8とpH 3.8であった。さらに，分離したcatalytic subunitとcyclic AMP結合蛋白（regulatory subunit）を用い，cyclic AMP依存性酵素の再構成について検討した。

3′,5′-cyclic AMP（cyclic AMP）依存性燐酸化酵素は酵素活性を示すcatalytic subunitと，cyclic AMPに結合し，酵素活性に抑制的に働いているregulatory subunitからなりたっている。cyclic AMPが酵素を活性化するのは，このnucleotideが酵素に附着して，holoenzymeよりregulatory subunitをとり除くことにある。cyclic AMPによるこの酵素活性化機構はよく似た形で，酵素に対する基質蛋白にもより，その蛋白特異性はかなり高いことが明らかとなった。ここでは酵素蛋白の精製法と活性化機構を中心にのべる。

実験方法

蛋白質燐酸化反応の酵素活性測定はKuo and Greengardの方法（3）にしたがった。庶糖密度勾配遠心沈殿は既報(7)の方法により行ない，それぞれの実験において，カタラーゼ（11.6S，分子量232,000），グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（7.7S，分子量140,000），馬肝臓アルコール脱水素酵素（5.4S，分子量84,000）を標準蛋白として用い，沈降係数および分子量はMartin and Amesの方法(4)にしたがい計算した。cyclic AMP-結合蛋白質の活性測定はGilmanの方法（2）に準じて行なった。ゲル電気泳動法はOrstein（8）およびDavis（1）の方法にしたがった。Isoelectric focusingの操作ならびに実験は既報（6）の方法に準じて行なった。

結果および考察

（1）ウシ脳からのcyclic AMP依存性蛋白燐酸化酵素の精製

既報の方法（5,6）を修正し，表1に要約した精製法で，ウシ脳から異なった分子量をもつ2種のcyclic AMP依存性蛋白燐酸化酵素を得た。すなわち，精製されたこれ

らの酵素は庶糖密度勾配遠心沈殿において，7.7S（分子量，140,000）および5.4S（分子量，89,000）の沈降係数，分子量を示した。精製比は粗ホモジネートの遠心分離上清中の酵素活性と比較し，7.7S酵素は155倍，5.4S酵素は100倍であり，酵素活性のyieldは1.0%であった。

(2) 精製された酵素の性質

(a) 電気泳動

2.0 mgの7.7S酵素および5.4S酵素を用い，ポリアクリルアミド，ゲル電気泳動により蛋白純度をしらべた。それぞれの酵素標品は ① Tris-chloride buffer, pH 8.1, ② Tris-glycine buffer, pH 9.5, ③ NaOH-KCl buffer, pH 12.0, の3種の異なった緩衝液を用いた電気泳動上において単一の蛋白帯として移動した。別の実験で，電気泳動を行なったゲルを縦断し，一方を着色し，他方を2mm毎に切片化して各切片の酵素活性を測定すると，得られた酵素活性は着色された蛋白帯と一致し，精製された両酵素標品ともに電気泳動上均質であることを示した。

第1表　酵素精製法

牛　肺（凍結）
↓ 溶解→細切
3倍量の5mM燐酸緩衝液 pH 7.0 でホモジェネート
↓ 遠心分離
上清
↓ プロタミン硫酸処理
↓ 遠心分離
上清
↓ 0–45% 硫安分画
↓ 遠心分離
沈殿
↓ 5mM燐酸緩衝液 pH 7.0にとかし
↓ 透析
DEAE セルロース カラム クロマトグラフィー
↓ 5–300mM リン酸緩衝液 pH 7.0 linear gradient
Hydroxylapatite カラム クロマトグラフィー
↓ 5–200mM リン酸緩衝液 pH 7.0 linear gradient
ピーク1　ピーク2
↓ Preparative gel electrophoresis　↓ Sepharose 6B
5.4S酵素　↓ Preparative gel electrophoresis
7.7S酵素

(b) Kinetic study

7.7S酵素，5.4S酵素のそれぞれについて，基質蛋白の特異性，Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}などの2価陽イオンの効果，ATPに対するKm，ヒストンに対するKm，cyclic AMPに対するKa値およびそのほかのcyclic nucleotidesによる活性化効果，ADP，アデノシン，アデニンなどのアデニン類似物質による酵素活性の抑制度をしらべたが，両酵素の間に著明な差がなく，これらの結果は既報(6)の酵素性質と類似した。

(C) 基質蛋白およびcyclic AMPによる酵素蛋白の解離

それぞれ7.7S酵素と5.4S酵素を1 mg/mlのヒストン存在下で，30°C，5分間インキュベートし，5–20%庶糖密度勾配中で遠心沈殿した。両酵素の場合とも，その酵素活性が3.6S（分子量，40,000）の位置に移行し，もはやcyclic AMPによる依存性を示さなかった（図1A）。つぎに 5×10^{-6} M cyclic AMPを用い，両酵素蛋白に対する効果をしらべた。7.7S酵素はその酵素活性が5.4Sおよび3.6Sの位置に移行し（図1B），同じ条件下で，5.4S酵素は5.4Sと3.6Sの位置に酵素活性を認めた。cyclic AMPの濃度を 5×10^{-4} Mに高めると，両酵素とも3.6Sの位置に酵素活性が移行した。興味のあることは，200 mg/mlのヒストン，或いは 5×10^{-6} M cyclic AMP（図1B），それぞれ単独存在下では（これらの濃度は反応溶液中において，酵素反応をみるための至適濃度に近い），両酵素を完全には解離し得ないが，ヒストンとcyclic AMPの両者が存在すると，7.7S酵素，5.4S酵素とも3.6Sに移行し，酵素蛋白が完全に解離したことである（図1B）。すなわち，酵素の活性化は酵素蛋白が解離することによっておこり，cyclic AMPおよび基質蛋白（ヒストン）の両方がこれに関与している。さらに両者の存在により酵素の解離，活性化が強められ，その効果は付

加的である。

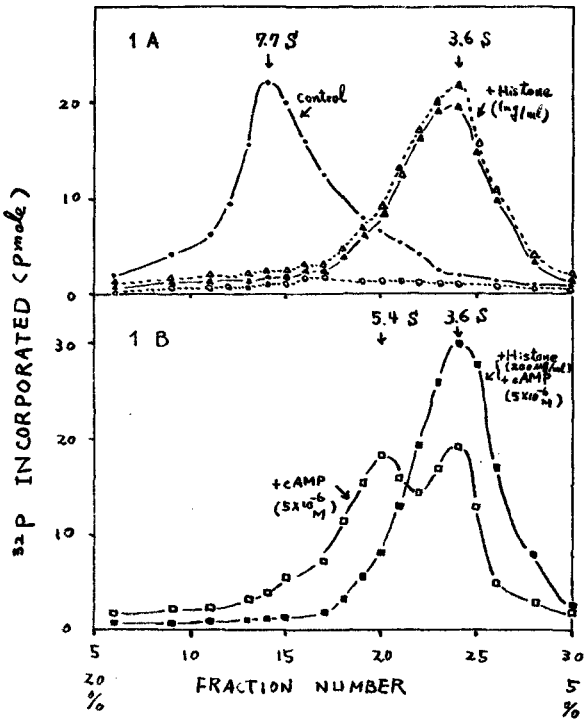
ついで，酵素蛋白を解離する基質蛋白の特異性をしらべた。酵素の基質として役立つプロタミン，カゼインは両酵素を解離することに対し効果があった。ただし，プロタミンは両酵素を完全に解離したが，酵素活性のrecoveryは低かった（約25%）。ほかに，ウシ血清アルブミン，フルクトース-6-リン酸キナーゼ，馬肝臓アルコール脱水素酵素，グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素，カタラーゼをしらべたが，いずれも効果がなく，しらべた蛋白の中では基質となる蛋白のみが有効であった。

(d) 基質蛋白による酵素活性化

酵素の基質蛋白に対する活性化は酵素がcyclic AMPに対する依存性を失ない，cyclic AMPによるstimulationをもはや示さなくなることで，この現象は酵素を基質蛋白と事前にインキュベートした後に，酵素活性を測定することによっても明らかとなる。酵素の活性化はヒストンとpreincubateした時間とともに上昇し，preincubation中にヒストンを含まないと，そのような活性化はみられなかった（図2）。この際，cyclic AMPの添加によって測定される酵素の全活性には両者の間に差がなかった。また，酵素の活性化は用いたヒストン量に依存した（図3）。ヒストンによる酵素の活性化は，酵素をヒストンとpreincubateしなかった場合，preincubate中にヒストンの存在しなかった場合に比較して著明な差を認めた。その値は500 μg/mlのヒストン量まで上昇した。

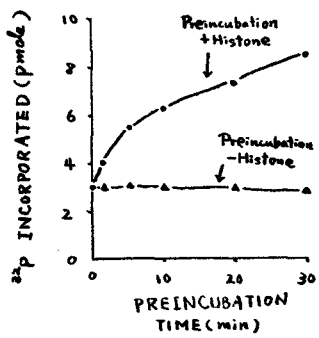
この方法を用い，酵素の活性化におよぼす基質蛋白の特異性をしらべた。庶糖密度勾配遠心沈殿法において，酵素蛋白の解離能力についてしらべた蛋白のほかに，アセチルコリンエステラーゼ，乳酸脱水素酵素，アビディン，ライソザイム，ポリセリン，β-ガラクトシダーゼを用いたが，いずれも効果を認めなかった。histone mixture以外のほかのヒストン分画，すなわち，slightly lysine-rich histone, lysine-rich histone, arginine-rich histoneはhistone

Fig. 1. Sucrose density gradient centrifugation of the 7.7 S enzyme.



The enzyme solution and the corresponding centrifuge tube of the gradient contained the same compound tested as indicated. After centrifugation, protein kinase activity was assayed in the presence (——) and absence (·····) of 5 μM cyclic AMP.

Fig. 2. Effect of varying preincubation time on activation of 7.7 S enzyme.



The enzyme was preincubated with or without 100 μg of histone at 30° for indicated time. After preincubation, all tubes were adjusted to contain 100 μg of histone and then protein kinase activity was assayed in the absence of cyclic AMP.

mixture とほぼ同じ程度酵素を活性化し，プロタミン，カビインにもその効果を認めた。ここに再び，基質蛋白がほかの蛋白と比較してかなり特異的に，酵素を活性化することを確かめた。

(e) Holoenzyme および subunits の等電点

7.7 S 酵素を cyclic AMP (5×10^{-6} M) およびヒストン (200 μg/ml) の存在下で 30°C，5分間インキュベートしたのち Isoelectric focusing に適用した。Holoenzyme の等電点は pH 4.6 で既報(6)の結果と一致した。catalytic subunit と regulatory subunit の等電点はそれぞれて pH 7.7 および pH 3.8 であった。

(3) Holoenzyme から subunits の分離

上にのべたことから，基質蛋白が酵素に対し強い親和性をもっているのみならず，酵素蛋白を解離，活性化することが明らかとなった。このことから，つぎに，Eizita CM-セルロース-ヒドラジドを用い，プロタミンを結合させて，所謂，親和性カラムを作り，酵素をそのクロマトグラフィーに展開させた。catalytic subunit と regulatory subunit は完全に分離して溶出された。溶出後，庶糖密度勾配遠心沈殿法で，subunits の分子量をしらべた。すなわち，7.7 S 酵素は 3.6 S (分子量，40,000) の catalytic subunit と 6.1 S (分子量，100,000) の regulatory subunit からなり，5.4 S 酵素は 3.6 S の catalytic subunit と 2.0 S (分子量，20,000) の regulatory subunit からなることがわかった。catalytic subunit に関し得た分子量のこの値は，酵素の解離，活性化の実験で得た結果と同じであった。

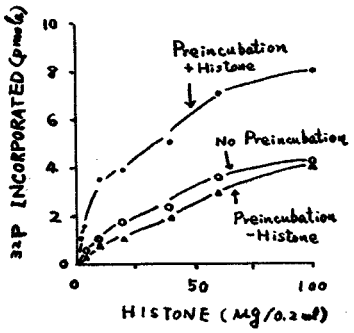
(4) cyclic AMP 依存性酵素の再構成

親和性カラムクロマトグラフィーを用いて得た catalytic subunit は cyclic AMP-結合蛋白 (regulatory subunit) の添加により酵素活性が抑制された。この酵素活性の抑制は cyclic AMP の存在により取り除かれた。

(5) 基質蛋白による酵素活性化枠構の意義

基質蛋白が in situ における酵素活性化にどのような意義をもっているかは現在の所まだ明らかではない。注目されることは，3×10^{-7} M レベルのヒストンが酵素の活性化に効果を示したことである。このような低濃度で酵素蛋白に変化の生ずることから生体内での役割を充分に想定しうる。また，ロブスターの尾筋肉から精製した cyclic AMP および cyclic GMP 依存性酵素は両者ともにヒストン，プロタミンなどの基質蛋白によって解離，活性化され，cyclic nucleotides による酵素の活性化枠構とともに，広く cyclic nucleotide 依存性蛋白燐酸化酵素に共通した枠構であると考えられた。

Fig. 3. Effect of varying concentration of histone on activation of the 7.7 S enzyme.



The enzyme was preincubated with or without the indicated amount of histone at 30° for 10 min. Before the initiation of the reaction, all tubes were adjusted to contain the indicated amount of histone and then protein kinase activity was assayed in the absence of cyclic AMP.

REFERENCES

1. Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964).
2. Gilman, A.G., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 67, 305 (1970).
3. Kuo, J.F., and Greengard, P., J. Biol. Chem., 245, 4067 (1970).
4. Martin, R.G., and Ames, B.N., J. Biol. Chem., 236, 1372 (1961).
5. Miyamoto, E., Kuo, J.F., and Greengard, P., Science, 165, 63 (1969).
6. Miyamoto, E., Kuo, J.F., and Greengard, P., J. Biol. Chem., 244, 6395 (1969).
7. Miyamoto, E., Petzold, G.L., Harris, J.S., and Greengard, P., Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 305 (1971).
8. Orstein, L., Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321 (1964).

34. 中枢神経組織におけるCyclic AMP依存性蛋白質燐酸化酵素とその機能

井上善英・山村博平
西山馨・松村末夫
公文明・西塚泰美
（神大・医・Ⅱ生化）

Cyclic AMPは神経刺戟伝達との関連が想定され著しく注目を集めているが、その作用機作はなお明らかでない。我々は一昨年高等有核細胞における cyclic AMP の第一義的作用点として、protein kinase活性化の分子機構解明に成功したが、その後更に本酵素の性質と機能について一連の検索の結果、次の如き成果と理解を得た。即ち、脳神経系組織の protein kinase は分子量8.5万から20万以上に及び極めて多数の分子種の集合である。これらは全て同一の機作により活性化され、cyclic AMP によって多数の Regulatory units と共通の catalytic unit に解離される。catalytic unit には電気泳動的に異なる二種が検出されるが、これ等は酵素化学的、機能的に区別され得ず、isozymes もしくは分離中の proteolysis 等による artifact の可能性がある。一見多種多様に見える protein kinase もその catalytic unit は単純であり、少くとも機能的には種特異性を認めない。各種臓器との交叉反応の実験成績から本酵素は広い基質特異性を有する事実が判明し、細胞内の多くの酵素系や機能蛋白質を pleiotropic に燐酸化し、それらの調節を通して細胞固有分化機能の充進へ導くものと思われる。この機構は神経細胞の excitation の化学的背景をなすと思われるが、特に脳組織には驚異的に多量の基質蛋白質が存在する。特に膜構成蛋白質の燐酸化反応を提示し、その神経刺戟伝達に果す重要性を指摘したい。

Cyclic AMP は脳神経系に著しく多く、その刺戟伝達に果す役割が強く想定されている(1)。一昨年、我々と同時に米国の3研究室において cyclic AMP による protein kinase の活性化機構が次式に基くことが解明された(2-5)。

$$\text{PROTEIN KINASE} + \text{CYCLIC AMP} \rightleftharpoons \text{CATALYTIC UNIT} + \text{REGULATORY UNIT}$$

その後、本酵素について更に系統的解析を行った結果、本酵素は臓器特異性、種特異性に乏しく、またその中広に基質特異性の故に細胞内の種々の重要な酵素のみならず、幾多の機能蛋白質を燐酸化し、それら諸機能の同調的制御を通して細胞の固有分化機能の発現へと導く事を提示した(6-8)。もとより神経ホルモン作用の全てが cyclic AMP を介し、cyclic AMP 作用の全てが protein kinase を介するとする事は早計であるが、脳神経系におけ

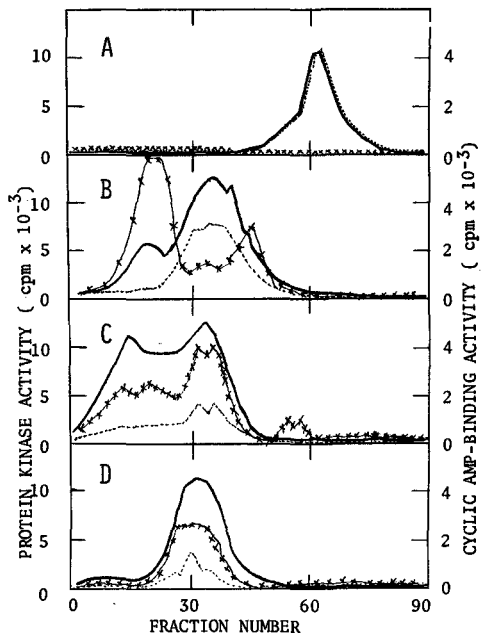


Fig. 1 *Gel filtration of rat brain multiple cyclic AMP-dependent protein kinases on a Sephadex G-200 column.* —— protein kinase activity with cyclic AMP (1 μM); ····· protein kinase activity without cyclic AMP; x-----x cyclic AMP-binding protein. A: protein kinase B_0, B: protein kinase B_1, C: protein kinase B_2, D: protein kinase B_3.

る本酵素とその作用の解明は問題への有力な鍵となろう。そこで以下では脳神経系の本酵素について次の諸点について概要を報告する。

(1) protein kinase の多様性
(2) catalytic unit の特性
(3) protein kinase の機能の概要
(4) 脳神経系における protein kinase の基質蛋白質、特に膜成分の燐酸化反応。

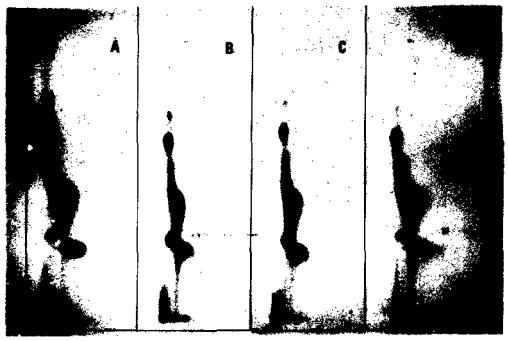


Fig. 2 *Radioautograph of the electropherogram of tryptic digestion of histone fully phosphorylated by each cyclic AMP-dependent protein kinase isolated from rat brain.* A: protein kinase B_0; B: protein kinase B_1; C: protein kinase B_2; D: protein kinase B_3.

(実験方法)

本実験には全て白鼠脳を使用し、解剖学的局在は現段階では考慮していない。酵素活性の測定等は既報(2, 6-8)に従ったが、その他詳細は紙面の関係で省略する。

(実験結果並びに考察)

(1)脳神経系 cyclic AMP-dependent protein kinase の多様性について

脳における本酵素は一見単純ではない。それは細胞の全ての分画に存在するが膜成分との結合では強固ではない。可溶性酵素には極めて multiple species が認められ、それらは DEAE-cellulose, hydroxylapatite のクロマトにより一応の四分画、protein kinase B_0, B_1, B_2 及び B_3 に分離した。この中 B_0 は本酵素の catalytic unit である。第1図はこれらの Sephadex G-200 による分析結果であり、B_0 以外は尚単一でない。B_0 の推定分子量は3.5万、cyclic AMP-dependent 型としては分子量8.5万から20万以上に及ぶ不確定多数の集合から成っている。しかし、これ等の分子種は cyclic AMP によって全てに共通の catalytic unit と種々異った regulatory units とに解離される。第2図はこれ等一連の解析結果の一つであり、それぞれの catalytic unit は同一基質を用いる限り同一部位を燐酸化する事を示した fingerprint である。換言すると、本酵素の多様性は regulatory unit のそれに由来する。多数の regulatory units 相互の関連と相違は現在解析中である。第3図には

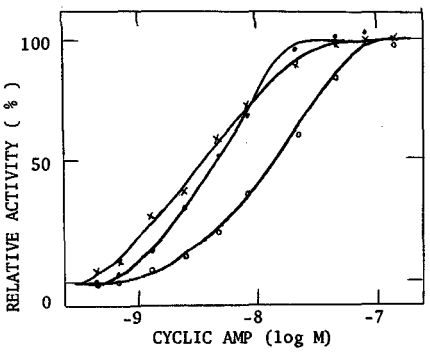


Fig. 3 *Effect of various concentration of cyclic AMP on rat brain cyclic AMP-dependent protein kinases.* ●——● protein kinase B_1, o——o protein kinase B_2, x-----x protein kinase B_3.

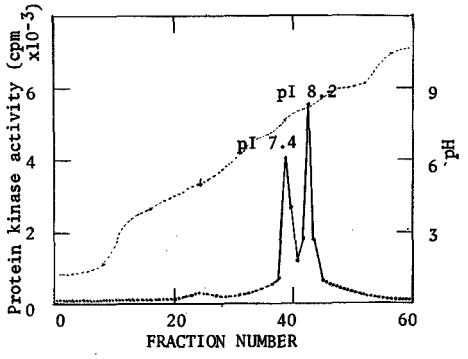


Fig. 4 *Isoelectrofocusing electrophoresis of the catalytic unit of rat brain cyclic AMP-dependent protein kinases.* ●——● protein kinase activity; ····· pH.

これらの酵素の cyclic AMP に対する親和性が相互に多少異るンとを示した。これ等の多様性が単離中の artifact かどうかは不明であるが、単に中枢神経系細胞種の多様性に由来したものとは即断出来ぬ根拠があり、更に詳しい蛋白化学的検索を行っている。

〔2〕 Catalytic unit の特性について

脳組織の多彩な本酵素の regulatory units は相互に異る事は上に述べた。しかしこれ等の catalytic unit が単一である事を意味しない。即ち第4図の如く、B_0 は isoelectrofocusing electrophoresis により等電点の異なる2成分に分離される。この2成分は B_1, B_2, B_3 全ての catalytic unit それぞれより得られる。しかしこの2成分は単独で活性を示し、第1表の如く、酵素化学的諸性質は等電点以外に区別出来ない。同一基質の同一セリン、スレオニンを燐酸化し、分子量も同一である。電気泳動による人工産物ではない。両成分は機能的にも区別出来ず、また第2表の如く同じ catalytic unit (cyclic AMP-binding protein) によって cyclic AMP-dependent 型となる。酵素のこうした microheterogeneity は ampholine カラムの発達によって今日では多くの例が報告されているが、この場合もその理由は不明である。isozymes か、或いは精製中の proteolysis 等による人工産物の可能性がある。

Table I *Properties of electrophoretically distinct two components of the catalytic unit.*

	pI 7.4 component	pI 8.2 component
Histone:protamine ratio	2.57	2.50
Km value for ATP	5×10^{-6}	5×10^{-6}
Optimum pH	pH 7.0	pH 7.0
Optimum Mg^{++} ion	3 mM	3 mM

Table II. *Effect of cyclic AMP-binding protein on the two components of brain catalytic unit of cyclic AMP-dependent protein kinases.*

Reaction system	pI 7.4 component	pI 8.2 component
Component alone	3,000 *cpm*	3,000 *cpm*
Component + cyclic AMP	3,200	2,790
Component + cyclic AMP-binding protein	950	900
Component + cyclic AMP-binding protein cyclic AMP (10^{-6}M)	2,900	3,090

〔3〕 Cyclic AMP-dependent protein kinase の機能の概要

序論に述べた如く本酵素は臓器特異性に乏しく pleiotropic の作用を有する。我々は各種組織について一連の解析の結果、細胞反応における本酵素の重要性について一定の結論に到達した(6,7)。そこで実験根拠は省略してもその概念を簡単にここに述べておく事は神経系組織における本酵素の機能を考察する上に著しく有用であろう。第5図に要約した如く、cyclic AMP により活性を発動した本酵素は細胞内の種々の重要な酵素系、例えば glycogen phosphorylase 系、synthetase を燐酸化し、それぞれ活性の促進、抑制を来し、また一方ある種の lipase を燐酸化して活性促進を来す。その結果、糖、脂肪は極めて能率よく分解をうけ生体エネルギー産生へと導かれよう。他方本酵素は上述の酵素系のみならず、ヒストン、リボゾーム等、数多くの蛋白質を燐酸化する。これ等の意義はなお推定の域を出ないが、こうした多数の蛋白質の燐酸

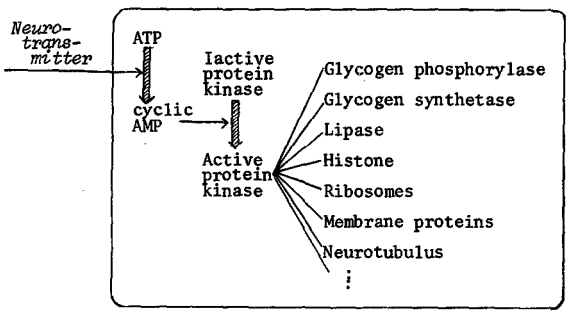


Fig. 5 *A hypothetical function of cyclic AMP-dependent protein kinase in the simultaneous excitation of various cellular reactions.*

Table III *Rat brain endogeneous phosphate acceptor proteins for cyclic AMP-dependent protein kinase.*

Fraction	Phosphate accepted (*pmoles / mg of protein*)	
	- cyclic AMP	+ cyclic AMP
Soluble fraction	16.5	99.0
Microsomal fraction	16.0	68.5
Mitchondrial fraction	1.1	9.0
Purified whole histone	185.0	445.0

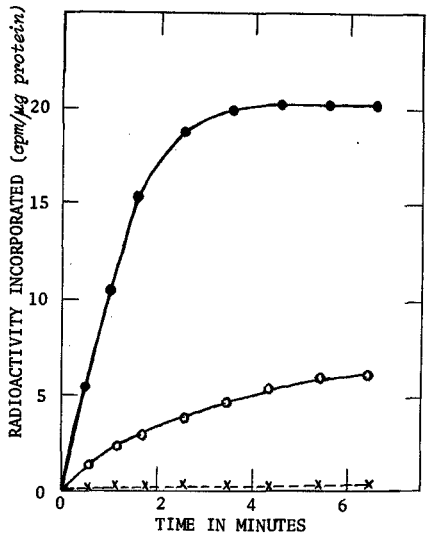


Fig. 6 *Enzymic phosphorylation of membrane-bound phosphate acceptor proteins by cyclic AMP-dependent protein kinase.* The reaction was carried out under standard conditions. ●——● with cyclic AMP (1μM), o——o without cyclic AMP, x-----x without protein kinase.

化反応を通して細胞のもつ固有分化機能が発現されてゆく公算が強い。如何なる細胞が如何なる基質を内在するかはその細胞の反応性の理解に著しく重要であろう。そこで最後に神経系の内部構築について一言したい。

(4) 脳神経における protein kinase の基質

cyclic AMP により活性化された本酵素は神経系各細胞の *excitation* に際して作動し、恐らく上述の機構に基き、エネルギー産生はじめ多くの諸反応の亢進を招来すると思われる。しかし真に神経細胞固有の内部構築、即ち基質の解明が重要であろう。

第3表には脳組織の各分画に予想外に多量の基質蛋白質の存在する事を示した。対照として純粋のヒストンの燐酸受容量をも掲げたがこれと比較して脳の可溶性分画、ミクロゾーム膜成分は *crude* の *mg* 当りの数値であり、驚異的に燐酸化されることが理解されよう。可溶性分画には種々の上述の酵素系、*neurotubulus* (9)等があろうが、第6図には膜蛋白質の燐酸化反応を示した。この膜構成蛋白質は著しく難溶であり、強い *hydrophobic* の性質がある。その溶解度を第4表に示したが SDS ゲル電気泳動により少くとも3種の膜蛋白質が燐酸化される事が判明した。神経刺戟伝達に際して膜蛋白質の燐酸化反応は恐らくイオン透過、介在、脱介在に関連し、基本的な役割を果す可能性が高い。現在、これらの一面に焦点をあてて更に解析を行っている。

Table IV *Solubility of membrane-bound phosphate acceptor proteins.*

Reagent		Solubility (%)
H_2O		0
Acid-base	1 N NaOH	0
	1 N HCl	0
	70% Formic acid	92
	20% Formic acid	18
	70% Acetic acid	70
	20% Acetic acid	1
Detergent	2% SDS	90
	5% Triton X-100	6
	2% Na deoxycholate	9
	2% Na Cholate	1
Organics	80% Phenol	41
	80% Pyridine	0
	n-Butanol	0
Others	8 M Urea	18
	4 M Guanidine HCl	7
	2% Litium iodosalicylate	0

〔文　献〕

1. P.Greengard, *Role of cyclic AMP in cell function*, Raven press, New York (1970) p 287.
2. A.Kumon *et al.*, *B.B.R.C.*, 41, 1290 (1970).
3. M.Tao *et al.*, *P.N.A.S.*, 67, 408 (1970).
4. E.M.Reimann *etal.*, *B.B.R.C.*,42, 187 (1971).
5. G.N.Gill & L.D.Garren, *P.N.A.S.*,68, 786 (1971).
6. H.Yamamura *et al.*, *J.B.C.*, 246, 1544 (1971).
7. H.Yamamura *et al.*, *B.B.R.C.*, 46, 589 (1972).
8. A.Kumon *et al.*, *J.B.C.*, 247, 3726 (1972).
9. D.B.P.Goodman *et al.*, *P.N.A.S.*, 67, 652 (1970).

35. 自律神経による肝Phosphorylase活性化の機序について

嶋津　孝
（阪大・医・解剖）
天川　葵
（園田学園女子大）

肝glycogen phosphorylase(phosphorylase)はアドレナリン、グルカゴンなどの作用とは別に、交感神経の直接的な作用を受けて瞬間的に活性化されるが、この神経に対する応答は、血糖調節の初期反応として重要な意味を持っている。phosphorylaseに対するホルモン作用と、神経作用との間には現象面でいくつかの相違が認められるが、夫々の作用機序の違いについては十分な解析がなされていなかった。アドレナリン(76μg/kg)あるいはグルカゴン(100μg/kg)を家兎の静脈内に投与するとdephosphophosphorylase kinase (DPP kinase)活性は1~5分後に90~200%の上昇をきたし、この際、C-AMP含量は約3倍(アドレナリン注射1分後)ないし8倍(グルカゴン注射2分後)に増加した。しかしながらphosphorylase phosphatase(PPase)の活性はこれらホルモンの投与では有意の低下を示さなかった。これに反して、交感神経刺激では著明なphosphorylaseの活性上昇があるにもかかわらずDPP kinaseならびにC-AMP含量の増加は認められなかった。ところがこの場合には刺激30秒後に、すでにPPase活性の著しい低下が起っていることから、交感神経刺激によるphosphorylase活性の瞬間的な上昇はPPaseの不活性化を初発段階としていることが主たる作用機序の一つであると考えられる。なお、副交感神経の刺激ではphosphorylase活性に有意の変化はなく、DPP kinase, C-AMPの変動も認められなかった。

肝glycogen phosphorylaseはグリコーゲンの分解反応を司る律速酵素の一つであって、カテコールアミン、グルカゴンの投与あるいは交感神経刺激後にみられる血糖値の上昇は本酵素が活性化されることが主な原因である。[6] アドレナリン、グルカゴンは、肝細胞膜に局在するadenyl cyclaseを活性化することによって細胞内のC-AMP濃度を上昇させ、ここで生じたC-AMPはprotein kinaseに作用してdephosphophosphorylase kinase(DPP kinase)の活性化をもたらし、究極的にはphosphorylaseの活性化につながると考えられている。ところが、交感神経の刺激によるphosphorylaseの活性化は図1に示すごとく、現象的にはアドレナリンの作用といくつかの点で相違が認められる[7]ものの、作用機序の詳細については不明であった。本報告はこの点を明らかにするため、自律神経刺激によってphosphorylaseの活性化酵素(DPP kinase)および不活性化酵素(PPase)ならびにC-AMP濃度がどのような挙動をとるかを調べ、併せてアドレナリン、グルカゴンの作用機序との相違をより明確にするために行った実験成績である。

(図1) Differential effects of sympathetic stimulation and of catecholamines on glycogenolytic enzymes

	Splanchnic-nerve stim.	Catechol-amine
G6P-ase	↑	±
Phosphorylase	↑	↑
Delay for max activat.	30 sec	> 60 sec
Decay (half time)	90 sec	
DCI	no effect	inhibited
Vagal stim.	counteract	no effect
Adx.	no effect	affected
Reserpine	no effect	

〔実験方法〕

動物は家兎を用い、自律神経の電気刺激は既報の方法[6]によった。adrenaline bitartrate(76μg/kg)あるいはglucagon(100μg/kg)は門脈あるいは耳静脈より注射した。麻酔開腹下に刺激又は注射前の肝葉の一部、

(約2g) ならびに刺激後(または注射後)の肝葉を夫々液体窒素中で速やかに凍結し、低温下(−10°C)で酵素の抽出を行った。phosphorylase 活性は既報の方法[6]で、DPP kinase 活性は家兎肝より別に精製したDPP (図2) を基質として、反応時間(37°, 5分)内に生じたphosphorylase を定量することにより、またPPase活性は家兎肝より精製したphosphorylase*を基質として用い、反応時間(37°, 10分)内に減少したphosphorylase活性から求めた。PPase 活性の測定に際しては、粗抽出液中に存在するnonspecific proteasesによるphosphorylase の低下を除外するため、NaF存在下(PPase のみ阻害)と非存在下で測定したphosphorylase の残存活性の差をもってPPase活性とした。

C-AMPは凍結肝葉のTCA抽出液をGilman[3]ならびにWalton & Garren[8]らの方法によりDowex-50のカラムクロマトを行った後、protein binding assay によって定量した。

PURIFICATION OF DPP FROM RABBIT LIVER

	DPP ACTIVITY MμMOLES/MG/MIN	P.F.
9,500 x G SUP	122.8	1.0
40% ACETONE PPT	450.8	3.7
45°C, 5MIN SUP	1094.5	8.9
$(NH_4)_2SO_4$ 0.33-0.55	2652.7	21.6
25% ETHANOL PPT	4752.0	38.7
AMYLASE DIGESTION	4308.5	35.0
SEPHADEX G-100 FRACTION	9601.7	78.8

(図 2)

〔実験結果〕

1) Phosphorylase並びにDPP kinase に対する影響

肝phosphorylase活性は図3に示すように交感神経刺激で刺激開始30秒で刺激前値の約3倍となるが、副交感神経刺激ではほとんど変化しない。アドレナリンあるいはグルカゴンの注射でもかなり著明な活性上昇が認められる。この際DPP kinase 活性を測定すると、アドレナリン注射では、注射1分後に約90% の活性上昇が認められ、グルカゴン注射では更に著明な上昇(約200%)が起っている。ところが交感神経刺激ではDPP kinase 活性は上昇せず(刺激5分以内)、また副交感神経刺激でも変動は認められなかった。(図4)

2) C-AMP 濃度の変化

アドレナリンまたはグルカゴンの投与によって肝C-AMP 濃度は注射1~2分後に最高となり、夫々注射前値の3倍及び8倍となる。(図5)。グルカゴンはアドレナリンよりも有効である。本実験で使用したアドレナリンの投与量(2.3×10^{-7} moles/kg)は薬物量に近い量であることを考えると、生理的に有意であるとは必ずしも言いきれない。これらの知見はExton[2]らの最近の報告と一致している。一方、交感神経刺激では少くとも刺激開始10分間は、肝内C-AMP 濃度の増加は認められず、又、副交感神経刺激でも変動がなかった。この事実は、上述のDPP kinase 活性が変化しないことと軌を一にするもので、交感神経刺激による瞬間的なphosphorylase 活性の上昇はC-AMP の増量とそれに基ずくDPP kinaseの活性化に帰因するものではないことを示している。

3) phosphorylase phosphatase(PPase) 活性に及ぼす影響

phosphorylase の不活性化酵素であるPPase活性は交感神経刺激開始30秒後に約18%の低下を来し、1分後には26%、5分後には40%の低下を示した。アドレナリンあるいはグルカゴンの投与は本酵素の活性に有意の変化をもたらさなかった(図6)。

---

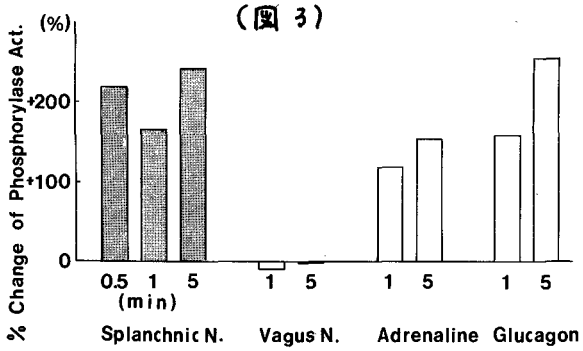
* 精製法はメジウムとして0.1M NaFを用いる他はDPPの精製とほぼ同様の方法によった。

交感神経の刺激によってPPase活性が低下する酵素学的背景はいまだ十分に明らかではないが、本酵素にも活性型と不活性型が存在する可能性があり[4]、交感神経刺激は活性型から不活性型への転換を促進するように働いているのかも知れない。

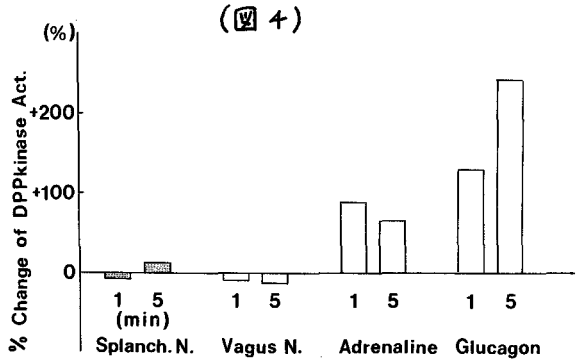
4) DPP kinase活性とCa^{++}との関係

最近筋phosphorylaseの活性化に低濃度のCa^{++}が重要な働きを持つことが明らかにされ、protein kinaseによるphosphorylase b kinaseの活性化反応とは別に、Ca^{++}によるphosphorylase b kinaseの賦活作用が注目されている[1,2,3]。肝のDPP kinaseに対するCa^{++}の作用については不明であるので、若干の検討を加えた。部分精製したDPP kinaseを用いてCa^{++}によるDPP kinaseの活性化をin vitroでしらべたところ、透析によってCa^{++}を除去したフラクションに於ても、EGTAによってDPP kinase活性は部分的に低下し、CaEGTAを用いてCa^{++}を$2\sim8\times10^{-6}M$にするとほぼ元のレベルに回復する。詳細は現在検討中であるが、肝DPP kinase活性の発現にCa^{++}が関与している可能性は否定できない。

(図3)

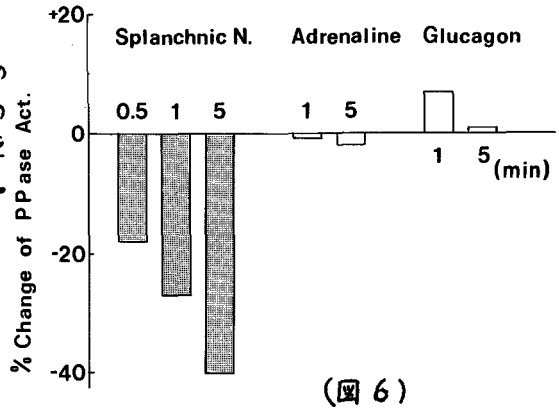


(図4)



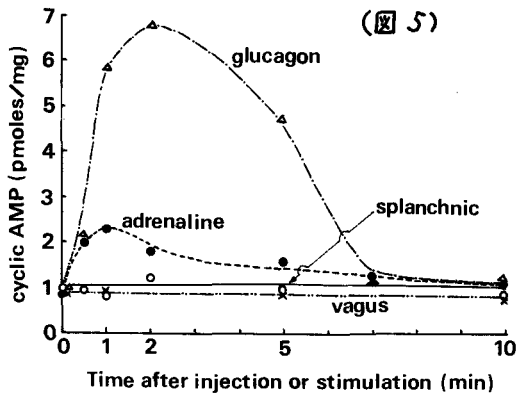
〔考察〕

交感神経による肝phosphorylase活性化の機序は、カテコールアミン、グルカゴンのそれとは異なり、PPase活性を抑えることを初発段階としていることが明らかになった。



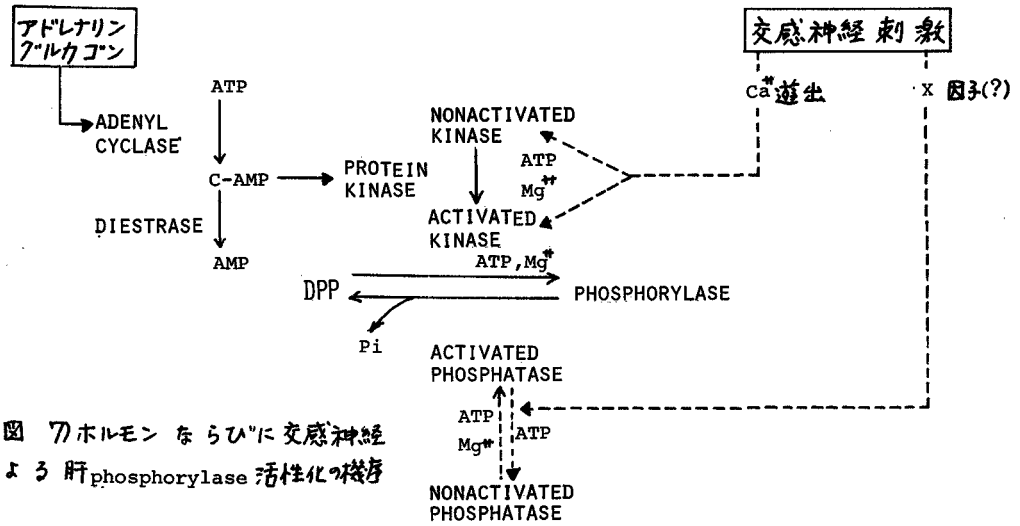
(図6)

(図5)



正常家兎肝抽出液中のphosphorylase活性は平均14.9mu/mg protein/minであるが、この活性を維持しているDPP kinase活性は20.9mu/mg protein/minであるのに対し、PPase活性は369.7mu/mg protein/minであり、DPP kinaseに比してPPase活性が圧倒的に強い。従って、

交感神経刺激によって PPase 活性が抑えられることは、phosphorylase 活性を瞬間的に高める上で極めて合理的な調節機序と考えられる。PPase の抑制をもたらす詳しい機作は未解決の課題であるが、おそらく、交感神経刺激によってカテコールアミンとは別に、未知の因子が放出（ないしは生成）され、これが PPase の不活性化を促進するものと思われる。図7に肝 phosphorylase 活性の調節に関与しているカテコールアミン、グルカゴンと、交感神経との作用機序の違いを模式的に示した。



（図 7）ホルモンならびに交感神経による肝phosphorylase活性化の機序

C-AMPの protein binding assay は、神大医、第二生化学教室に依頼した。御協力いただいた同教室の武田、大賀両博士に感謝します。

〔文 献〕

1) Brostrom,C.O.,Hunkeler,F.L. and Krebs,E.G.,J.Biol.Chem.,246,1961(1971).

2) Exton,J.H.,Robison,G.A.,Sutherland,E.W.and Park,C.R.,J.Biol.Chem.,246,6166(1971).

3) Gilman,A.G.,Proc.Natl.Sci.,67,305(1970).

4) Merlewede,W.,Goris,J. and De Bradt,C.,Europ.J.Biochem.,11,499(1969).

5) Ozawa,E.,Hosoi,K. and Ebashi,S.,J.Biochem.,61,531(1969).

6) Shimazu,T. and Amakawa,A.,Biochim. et Biophys.Acta,165,335(1968).

7) Shimazu,T. and Amakawa,A.,Biochim. et Biophys.Acta,165,349(1968).

8) Wallton,G.M. and Garren,L.D.,Biochemistry,9,4233(1970).

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO

神経化学　Vol. 11

第 15 回　日本神経化学会抄録集

昭和47年11月 1 日（水）

2 日（木）

大阪大学医学部付属病院第 1 講堂（大阪）