神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第16回 日本神経化学会抄録集

Vol. 12, 1973

日本神経化学会

神経化学

第16回日本神経化学会抄録集

PROCEEDINGS OF THE 16TH ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 東 京

11月30日(金), 12月1日(土)

Vol. 12 1973

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1　視床下部電気刺激による血中アンモニアならびに肝尿素サイクル酵素活性の変動。
── 急性精神病における血中アンモニア変動のメカニズムに関する実験的研究── …… 1

東村輝彦
（山田赤十字病院）
神谷重徳・服部尚史
鳩谷　龍・
（三重大・医・神経）

2　脳内アンモニアの処理機構について。…… 4

小西博行・祖父江憲治
中嶋照夫・佐野　勇
（阪大・医・高次研）

3　ビリルビンのミトコンドリアにおよぼす影響について。
── イソクエン酸脱水素酵素を中心に── …… 8

小笠原信明・渡辺智正
後藤治子
（愛知コロニー研・生化）

4　ビリルビン毒性に関する研究。── ラット脳の糖質代謝におよぼす影響── …… 12

加藤りつ子・柏俣重夫
丹羽富士子
（愛知コロニー研・生化）

5　実験的脳浮腫ラットの代謝異常。…… 16

桑島淳二・中村恵二
藤谷武一・門河敏明
吉田耕一・清水当尚
（大日本製薬・研）

6　脳可塑性の生化学的研究。── 大脳半球剔除ラット神経組織の生化学的変化について。(1) …… 20

駒井裕一・長野泰甫
荒木恵子・小林征男
奥田正英・佐武　明
（新潟大・脳研・神経化学）

7 ラット大脳ＣＮＰ活性と学習行動との相関について。…… 24
野村正彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

8 ＭＡＭ投与による実験的小頭症ラットの脳内物質変化と行動変化について。…… 28
松谷天星丸・岡田澄子
永吉道子・塚田裕三
（脳麻研・生化）
野村正彦
（慶大・医・生理）

9 毛様・上頸神経節におけるアセチルコリン合成・分解酵素の成長に伴う変動。…… 32
反町勝・片岡喜由
奥野幸子
（愛媛大・医・生理）

10 軟体動物巨大神経細胞の電気活動に対する含硫アミノ酸類の作用。
── 巨大アフリカ・マイマイ食道下神経節による── …… 36
竹内宏・森照胤
高坂睦年・
（岡山大・医・脳代謝研）
大森普爾・
（岡山大・医・薬）

11 手綱核ー脚間核路（反屈束）のコリン作動性線維。…… 40
片岡喜由・反町勝
奥野幸子・
（愛媛大・医・生理）
水野昇・
（京大・医・解剖）
中村豊・
（Max-Planck脳研）

12 CoA サイクリング── CoA およびアセチル CoA の酵素的微量定量法── …… 44
加藤尚彦・
（東大・医・脳研）

13 中枢神経系におけるアセチルCoA 加水分解酵素活性の細胞内分布について。…… 48
松田友宏・吉田　博
（阪大・医・I薬理）

14 脳組織のDNA合成酵素について。…… 52
須田治彦・野口鉄也
塚田裕三・
（慶大・医・生理）

15 ニューロン・グリアおよび肝臓細胞核におけるDNA合成活性。…… 56
鈴木　修・加藤尚彦
（東大・医・脳研）

16 ニューロンのクロマチンにみられる特性。…… 60
溝部文夫・田代朋子
瀬谷典子・黒川正則
（東大・医・脳研）

17 ラット大脳の酸性DNA分解酵素の性質。…… 64
野口鉄也・須田治彦
塚田裕三・
（慶大・医・生理）

18 マウス脳DNAのReassociation kineticsとそのDNA duplexesの性質。…… 68
森　浩一・
（阪市大・医・神経）
M.Wintzerith・ P.Mandel
（フランス・CRNS）

19 実験的高フェニルアラニン血症白鼠の脳組織におけるArylsulfatase Aの活性について …… 72
平野修助・岩崎美恵子
戸張千年・
（東邦大・医・2生理）
中井健而・
（東邦大・医・総研）

20 ミオイノシトールの大量投与による脳内イノシトール誘導体の動態。…… 76

鈴木　修・直井　信

八木国夫・

（名大・医・第一生化）

21 Spina bifida の術後，水頭症をおこした患者の髄液脂質組成について。…… 80

久保田　勝・丸山勝一

宇尾野公義・

（都立府中病院・神経内科）

武富　保・

（信大・医・順応生化）

22 血液脳関門を通過しないドーパミンβ水酸化酵素阻害剤。…… 84

原　ふみ子・橋爪義夫

原田保夫・浅野正久

日高弘義・

（愛知コロニー・研）

23 L-Alpha-hydrazinomethyldopa と Catecholamine 代謝 …… 88

岸川秀実・森　昭胤

高坂睦年・

（岡山大・医・脳代謝研）

大本堯史・

（岡山大・医・脳外）

24 カテコールアミンによる脳Na-K依存性 ATP ase の活性化作用機序。 …… 92

吉村啓一・

（北大・医・I生理）

25 脳内ノルアドレナリンの前駆物質としての 3,4－ジヒドロキシフェニルセリンについて。…… 96

佐野　勇・平井基陽

松岡征夫・中嶋照夫

（阪大・医・高次研）

26 リチウムイオンの脳インドールアミン代謝におよぼす作用。…… 99
渡辺昌祐・
（川崎医大・精神）
中島良彦・江原嵩
井口欽也・田口冠蔵
大月三郎・
（岡山大・医・神経）

27 うっ病者に対する L-5HTP の臨床効果と脳内アミン代謝。……103
加藤伸勝・高橋三郎
近藤久雄・森律
宮本宣博・
（京府医大・精神）

28 ヒト大脳,脳脊髄液および血清中の cyclic 3',5' －guanosine monophosphate phosphodiesterase 活性。 ……107
浅野富子・原ふみ子
日高弘義・
（愛知コロニー研）
渋谷正人・
（名大・医・脳外）

29 脳の Cyclic 3',5' －nucleotide phosphodiesterase : Modulator 蛋白について。…110
手島佳子・山崎礼子
宮本英七・垣内史朗
（大阪府立・中宮病院）

30 Cyclic AMP 依存性 protein kinase による A 1蛋白のリン酸化。 …… 114
宮本英七・垣内史朗
（大阪府立・中宮病院）

31 蛋白質の in vivo でのメチル化。 …… 118
三宅正治・井上良一
（阪大・医・高次研・神経）

32 末梢および中枢神経ミエリンの構成蛋白について：塩基性蛋白相互の比較。…… 122
北村邦男・山中たか子
相沢協子・植村慶一
（埼玉医大・I生理）

33 In vitro における微小管の生成。…… 126
芳賀達也・阿部輝雄
黒川正則・
（東大・医・脳研）

34 初老期，老年期痴呆患者の脳蛋白の変化。── とくに神経原線維変化との関係について(III) ── …… 130
播口之朗・西村健
多田国利・金子仁郎
（阪大・医・精神）

35 けい光プローブは興奮膜の何を示すか。── けい光プローブによる脂質 - たん白質相関の研究──… 134
林浩平・
（群大・医・生化）

1 視床下部電気刺激による血中アンモニアならびに肝尿素サイクル酵素活性の変動
── 急性精神病における血中アンモニア変動のメカニズムに関する実験的研究──

東村輝彦
（山田赤十字病院）
神谷重徳・服部尚史・鳩谷龍
（三重大・医・神経）

〔要約〕

われわれは，意識障害を伴う急性精神病において，その急期には，血中NH3値が著しく上昇し，寛解期には，それが正常範囲に戻ることを見出し，このような血中NH3の変動は，いわゆる急性精神病における cerebro-hepatic homeostasis の破綻の一局面を示す所見と考え，種々の実験的検討を重ねているが，今回は血中NH3変動のメカニズムを知るために，雄性家兎を用い，視床下部腹内側核に慢性的に電極を植込み，情動行動を起こす程度の電気刺激を一定時間反復し，肝尿素サイクルの酵素活性を測定した。その結果，肝尿素サイクルの Arginine Synthetase System および Arginase の活性が刺激反復2時間で低下し，6時間では刺激前の値に戻ることがわかった。これは血中NH3の刺激実験の結果－刺激反復2時間で血中NH3値は増加し，6時間で刺激前の値に戻る－と対応しており，血中NH3値の増加は，肝尿素サイクルの回転不全によるものであることを示している。このような結果から，われわれは，急性精神病の際にみられる血中NH3値の変動は，Ammonia の処理機構の障害によるもので，急性精神病における cerebro-hepatic homeostasis の破綻の一局面を示しているものと考える。

Ammonia は，脳の活動状態を示す生化学的指標のひとつとして，その変動が多くの人達により追究されているが，精神病患者の Ammonia 代謝に関しては，Riebeling[9] のほかに，3の研究[1)~4),8)]があるのみである。われわれ[6]は，先に意識障害を伴う急性精神病患者の血中NH3値を縦断的に測定し，その急期には血中NH3値が著しく上昇し，寛解期には正常範囲に戻ることを見出した。そして，このような血中NH3値の変動は，急性精神病における[5] cerebro-hepatic homeostasis の破綻の一局面を示す所見と考え，実験的検討を行ない，すでに視床下部腹内側核の電気刺激により血中NH3値が変動することを明らかにした[7]。今回は，かかる血中NH3値がいかなるメカニズムによるものであるかを検討するために，視床下部腹内側核に慢性的に電極を植込み，情動行動を起こす程度の電気刺激を加え，肝尿素サイクルの酵素活性の変動を測定したところ興味ある結果を得たので報告する。

1．実験方法

1．実験動物には，2.0~2.5 Kg の雄性家兎を用いた。

2．電極には，直径 0.1mm のステンレススチール製並行電極（先端間隔 1mm）を用いた。家兎をネンブタール麻酔下に改良型東大脳研式固定装置に固定し，頭蓋を穿孔し，硬脳膜を切開し，Sawyer[10] らの図譜によって上記電極先端を視床下部腹内側核に刺入し，電極の他端は頭蓋骨上に固定しそミニアチュアソケットに接続し，歯科用セメントで固定した。

3．電気刺激は，家兎が術後2週間を経て健康状態を回復したのち，電子管刺激装置（日本光電製）を用い，パルス幅 0.5~1.0 msec，100 c/s の単相性矩形波パルス刺激を

2分間隔で20秒間加えることとし，これを一定の時間反復した。なお被検家兎は，無拘束の状態におき，慣れの現象や疲労を考慮して，運動量が軽度に増加するよう絶えず電圧を調節しながら刺激した。刺激反復時間は，2時間および6時間とし別々の家兎について行なった。そして実験条件を同じくするために，対照家兎については，同一時間の絶食後に肝尿素サイクルの酵素活性を測定した。

4. 肝尿素サイクルの酵素の測定は，Arginine Synthetase Syetem，Arginase および Ornithine Transcarbamylase を，刺激終了後ただちにエーテル麻酔下で肝臓切片をとり出し0.9%のCTB溶液を加え，Potter-Elvejhem's microhomogenizer で充分磨砕し，遠沈分画後，Brown & Cohen[3]法により測定した。

5. 所定の実験終了後，すみやかに脳を摘出してアルコール固定，セロイジン包埋をおこない，厚さ50μの前額断連続切片を作り，電極刺入部位を検索した。

II. 実験成績ならびに考察

視床下部腹内側核の刺激により，家兎は視床下部腹内側核の刺激の際にみられるといわれる怒り一逃走反応，不安・恐怖様反応を示した。すなわち，家兎は所定の刺激が始まるとともに，刺激前の動作を中止してうずくまり，数秒経過後または刺激終了後怒ったように時には後肢を叩打しながら疾走運動を行ない，その時瞳孔は散大し，呼吸は促迫していた。このような情動行動を一定の時間反復させた後，肝尿素サイクルの酵素活性を測定した。その結果は，第1表の通りで，刺激反復2時間ではArginaseならびにArginine Synthetase Syetemの活性が低下し，刺激反復6時間では刺激前の値に戻っている。この所見は，われわれ[7]が先に発表した血中NH_3値の変動とよく対応している。すなわち，血中NH_3値は刺激反復2時間では刺激前の値に比較して50～100%増加し，6時間では刺激前の値に戻るが，このような血中NH_3値の変動は肝尿素サイクルのArginase，Arginine Synthetase Syetemの活性の変動と対応している。刺激反復2時間で，肝尿素サイクルのrate limiting stepといわれているcitrullineからArginineを合成する過程の酵素活性の低下が顕著なことは，血中NH_3の増加が，肝尿素サイクルの回転不全によるためと考えられる。そして，この

第1表　視床下部腹内側核慢性植込電気刺激による肝尿素サイクル酵素活性の変動

肝尿素サイクル酵素	対照	刺激反復時間 2時間	刺激反復時間 6時間
Arginine Synthetase System[a]	3.47±1.27	1.51±1.47 *	2.49±1.39
Arginase[a]	171.0±55.4	132.5±30.6 **	162.4±43.0
Ornithine Transcarbamylase[b]	504.0±134.1	480.0±109.7	589.1±225.0

第2表　視床下部外側核ならびに視床正中核慢性植込電気刺激による肝尿素サイクル酵素活性の変動（刺激反復2時間）

肝尿素サイクル酵素	対照	視床下部外側核	視床正中核
Arginine Synthetase System[a]	3.47±1.27	2.50±0.94	2.62±1.78
Arginase[a]	171.0±55.4	142.0±37.0	132.5±30.6
Ornithine Transcarbamylase[b]	504.0±134.1	477.0±120.0	480.0±109.7

a) μmoles urea formed/g·wet weight tissue/hour　　* $p<0.01$　** $p<0.02$

b) μmoles citrulline formed/g·wet weight tissue/hour　　N = 5～11

ような尿素サイクルの酵素活性の変動が，脳局所特異性を持っていることは，血中NH_3の場合と同様，第2表に示すように視床下部外側核ならびに視床正中核の刺激では，これらの酵素活性に変動がみられなかったことで明らかである。このような結果から，われわれは急性精神病の際にみられる血中NH_3の変動は，Ammoniaの処理機構の障害によるもので，急性精神病における cerebro-hepatic homeostasis の破綻の一局面を示しているものと考える。

Ⅲ．総括

われわれは，急性精神病の際に見られる血中NH_3値の変動を cerebro-hepatic homeostasis の破綻の一局面を示すものと考え，これを実験的に確かめる目的で，家兎の視床下部腹内側核に慢性的に電極を植込み，一定時間反復刺激を加え，肝尿素サイクルの酵素活性を測定し次のような結果を得た。

1) 肝尿素サイクルの Arginine Synthetase System および Arginase の活性は，刺激反復2時間で低下し，6時間では刺激前の値に戻る。これは血中NH_3値の刺激実験の結果と対応しており，血中NH_3の増加が，肝尿素サイクルの回転不全によるものであることを示している。

2) このような結果とNH_3刺激実験の結果とを考え合わせて，急性精神病の際にみられる血中NH_3の変動は，Ammonia処理機構の障害によるもので，急性精神病における cerebro-hepatic homeostasis の破綻の一局面を示しているものと考える。

文　献

1) Baruk, H. et Fabiani, P. : Ann. Méd. Psychol., 120: 721, 1962, 121: 257, 1963.
2) Baruk, H. : Confin. Psychiat., 6: 191, 1963.
3) Brown, G.W. and Cohen, P.P. : J. Biol. Chem., 234: 1769, 1959.
4) Chatagnon, C. et Chatagnon, R.A. : Ann. Méd. Psychol., 121: 468, 1963.
5) 鹿谷　龍 : 精神医学 3: 1005, 1961.
6) 東村　輝彦 : 北野病院紀要 10: 1, 1964.
7) 〃　〃 : 脳と神経 22: 1169, 1970.
8) 西紋孝・森本二郎 : 岡山医誌 65: 704, 1952.
9) Riebering, C. : z.f.d.g. Neur. u. Psychiat., 157: 418, 1936.
10) Sawyer. C. et al : J. Comp. Neurol., 101: 801, 1954.

2　脳内アンモニアの処理機構について

小西博行・祖父江憲治
中嶋照夫・佐野勇
（阪大・医・高次研）

〔要約〕

脳静脈血を脳静脈洞より、経時的に採取する方法を考案し大槽内に放射性グルコースと塩化アンモンを注入して、グルコースに由来するアミノ酸の放射能を検討した。

その結果

1) アンモニア負荷により、脳静脈血中の遊離アミノ酸含量の増加はみられなかった。
2) アンモニア負荷により、脳静脈血中のグルタミンの放射能が主として増加を示した。このことはグルタミンとして処理されたアンモニアはそのまゝの形で、脳外に運ばれていることを示唆している。
3) アラニンの放射能も増加していたことから、脳内アンモニアの一部もアラニンとなって放出されていると考えられる。

脳内アンモニア処理機構に関して、動物に塩化アンモンを負荷した場合、動物が生きている限り脳内アンモニアは0.5 μmoles/g 以上には増加しないが、脳内のグルタミンは負荷したアンモニアに比例して増加することが報告されている。[1] これらの知見より脳内のアンモニアはグルタミン酸と結合しグルタミンとなり処理されていると考えられている。[1] しかし、このように脳内でグルタミンとして処理されたアンモニアがどのような形で脳外に運ばれ処理されるかは明らかにされていない。さらに脳アンモニア処理に関してアラニンの役割を重視する考えもある。[2] 著者らは脳内で処理されたアンモニアがどのような形で脳外に運ばれているかを検討した。

実験材料および方法

実験動物は36時間絶食の2－3 kgの家兎を用いた。動物をネンブタールで麻酔したのち、鋏を用いて矢状静脈洞と横静脈洞とが交叉する部位に直径2mmの穴をあけ、テフロンカテーテルを入れ固定し、脳静脈血を経時的に採取出来るようにした。テフロンカテーテルを固定したのち、大槽穿刺を行い大槽内に、対照群は ^{14}C(U)グルコース 100μCi を、アンモニア負荷群は20μmolesの塩化アンモンと放射性グルコース100μCiを注入し、経時的に血液を採取した。動脈血は大腿動脈より採取した。

放射性グルコースは、D-Glucose-^{14}C(U), Specific Activity > 230mCi/mmol, Radiochemical Purity > 99% を使用した。

血液を3,000回転、15分間遠沈を行い血清を分離し、血清に等量の10%トリクロール酢酸を加えて除蛋白を行い、遊離アミノ酸を抽出した。約3mlの上清を0.9×2.5cmのAmberlite IR120, H^+型カラムに通しカラムを十分に水洗したのち、吸着したアミノ酸を

15mlの0.1MNH$_4$OHで溶出した。溶出液を減圧乾固しこの分画を用いて放射能の経時変化および各アミノ酸の放射能を検討した。アミノ酸の放射能の経時変化は上記分画の乾固物を水に溶かし，血清0.1ml当量をとりこれに10mlのBray[3]溶液を加え液体シンチレーションカウンターで測定した。各アミノ酸の定量および放射能の測定はアミノ酸自動分析機を用い，2本のカラムを同調させて行った。すなわち1本のカラムでアミノ酸分析を行ない，一方のカラムをフラクションコレクターに接続させて分取し，各分画に含まれる放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。カラムは0.9×50cm，Aminex 21-23を用い，流速120ml/hr，温度38℃で展開し，緩衝液第1液は0.3規定クエン酸リチウム緩衝液pH2.86，2液は同緩衝液pH4.15を用いた。

実験結果

1. アミノ酸の放射能の経時的変化

図1に血清1mlあたりの遊離アミノ酸の経時的変化を示した。対照群では放射能は注射後90分まで漸時増加し，90分から120分までプラトーとなり，120分以後は減少していた。アンモニア負荷群では30分で対照群の2－4倍の放射能を示した。放射能のピークは対照群に比し30分から60分の間に移動していた。放射能は120分で対照群の値に近づいていた。最大ピークの比較では，アンモニア負荷群は対照群の2－3倍の放射能を示した。

2. 各アミノ酸含量および放射能の比較

大槽穿刺後30分の対照群とアンモニア負荷群の脳静脈血中の遊離アミノ酸含量を表1に示した。アンモニア負荷によって，脳静脈血中のグルタミン酸，グルタミン，アラニンの増加はこの条件ではみられなかった。一方アミノ酸の放射能はグルタミン酸，グルタミン，アラニンに認め他のアミノ酸には著明な放射能は認められなかった。したがってこれら3つのアミノ酸について検討した。なおグルタミン酸とグルタミンの放射能は両者の分離が不十分なのであわせて測定し，あとで高圧ろ紙電気泳動により分離し両者の放射能の比率を求めた。

図1，アミノ酸の放射能の経時的変化

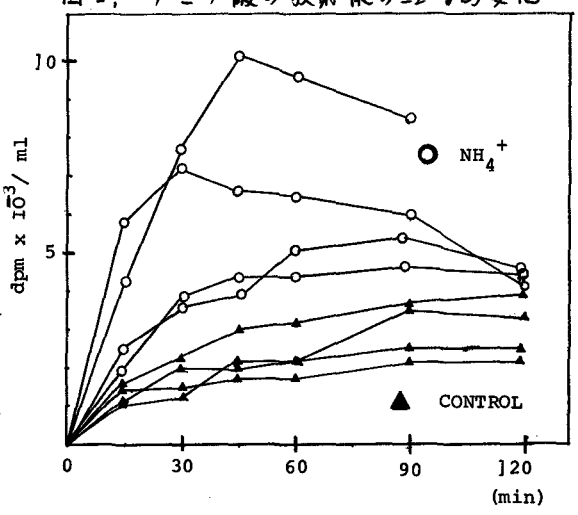


図2に対照群30分と90分，アンモニア負荷群は30分と対照群に比してピークが前に移動しているため60分のグルタミン酸，グルタミンの放射能を示した。注射後30分では，アンモニア負荷群は対照群の2－4倍の放射能を示した。60分のアンモニア負荷群は90分の対照群の2－3倍の放射能を示した。グルタミン酸，グルタミンの放射能の比率を表2に示した。これより対照群は1:2，アンモニア負荷群は1:5になっていると考えられる。以上の結果はアンモニア負荷により，主として脳静脈血中のグルタミンの放射能が増加していると考えられる。

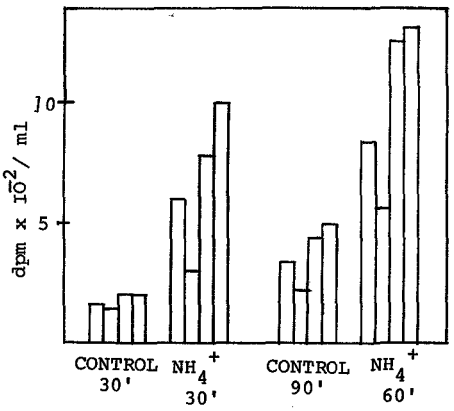
表1. 遊離アミノ酸含量 (μmoles/ml ± S.E.)

	対照群(30分)	NH_4^+負荷群(30分)
Asp	0.01	0.02 ± 0.00
Thr	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.03
Ser	0.21 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Asn	0.05	0.03 ± 0.01
Glu	0.22 ± 0.02	0.33 ± 0.04
Glun		
Pro	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Gly	0.72 ± 0.11	0.57 ± 0.13
Ala	0.42 ± 0.08	0.43 ± 0.03
Citrulline	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Val	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02
Met	0.11 ± 0.03	0.03 ± 0.01
ILeu	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.01
Leu	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02
Tyr	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02
Phe	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01

表2.

Glun/Glu	
CONTROL	NH_4^+
0.7	4.7
0.6	5.5
1.2	6.4
3.0	5.7

図2. Glu+Glunの放射能



3. アミノ酸の放射能の動静脈差

つぎに上記知見をさらに明確にするため動静脈差を検討した。動脈血は注射後対照群は90分にアンモニア負荷群は60分に大腿動脈より採取した。図3は対照群90分，アンモニア負荷群60分の血清1ml当量の遊離アミノ酸分画の放射能の動静脈差を示したものである。アンモニア負荷群の放射能は対照群の2－3倍の増加を示した。

図4は対照群90分，アンモニア負荷群60分のグルタミン酸，グルタミンの放射能の動静脈差を示したものである。アンモニア負荷によって脳静脈血中のグルタミン酸，グルタミンの放射能が2－5倍に増加した。これらの知見はアンモニア負荷によって脳静脈血中のグルタミンの放射能が2－3倍に増加していると結論される。

図3および図4より明らかなように，脳静脈血中の遊離アミノ酸の放射能のうち50%程度をグルタミン酸，グルタミンが占め，のこり50%のうち20%程度をアラニンが占めていたのでアラニンの放射能の変動を検討した。図5は対照群90分，アンモニア負荷群60分のアラニンの放射能の動静脈差を示したものである。アラニンの放射能に関しても，アンモニア負荷によって脳静脈血中の放射能が約2倍に増加していた。

図3. 遊離アミノ酸の放射能の動静脈差.

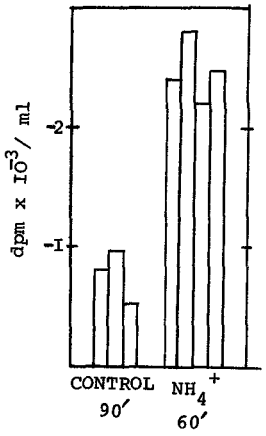


図4. Glu+Glunの放射能の動静脈差

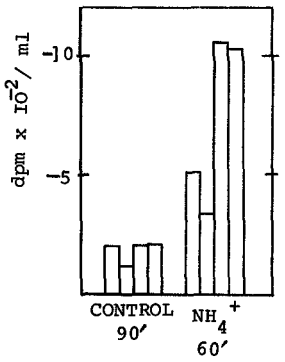
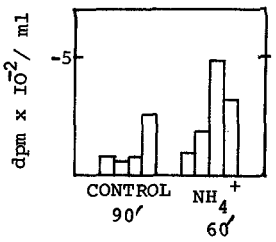


図5. アラニンの放射能の動静脈差



（考察） すでにグルコースを末梢に注射した際，脳内遊離アミノ酸のうちアスパラギン酸，グルタミン酸，グルタミン，アラニン，α-アミノ酪酸に放射能がはいって

いることが明らかにされている。[4] 今回の実験で α アミノ酪酸に関しては検討していないが，脳静脈血中のグルタミン酸，グルタミン，アラニンに放射能が取り込まれていることが確認された。アンモニア負荷によって脳静脈血中のアミノ酸含量の増加はみられなかったが，グルタミン酸，グルタミンの放射能が増加していた。さらにグルタミン酸とグルタミンの各々における放射能の比率から考え，アンモニア負荷により主としてグルタミンの放射能が対照群の2－3倍に増加していると考えられる。このことは脳内アンモニアがグルタミン酸と結合してグルタミンとなり，そのままグルタミンの形で脳外に運ばれていることを示唆している。グルタミン酸およびグルタミンの放射能が脳静脈血中の遊離アミノ酸の放射能の50% をしめていることから考え，グルタミンは脳内アンモニアの処理機構として重要な役割を果していると考えられる。

アンモニア処理に関してのアラニンの役割は，Felig[5]らにより筋肉でもアンモニア処理機構として提唱された。すなわちアンモニアはピルビン酸と結合してアラニンとなり，肝臓に運ばれ肝臓でピルビン酸とアンモニアになり，アンモニアは尿素にピルビン酸は糖新生に用いられ，アラニンサイクルが考えられている。今回の実験でアンモニア負荷により脳静脈血中のアラニンの放射能が2倍に増加することが示された。したがって脳のアンモニア処理機構としてアラニンサイクルも存在することが示唆された。このアラニンによるアンモニア処理機構は脳循環の低下した状態すなわち低酸素状態の場合強く働くという知見をえたので今後この点を明らかにするとともに，脳内遊離アミノ酸の放射能と脳静脈血中の遊離アミノ酸の放射能との相関および脳と肝臓との放射性遊離アミノ酸の動態を検討し，脳内のアンモニア処理に関して臓器相関を明らかにしたい。

（文献）

1. Tsukada, Y., Prog. Brain Res., 21A, 268 (1966)
2. Hathway, D.E., Mallison, A., and Akintowa, A.A., Biochem. J. 94, 676 (1965)
3. Bray, G.A., Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
4. Gaitonde, M.K., Dahl, D.R., and Elliott, K.A.C., Biochem. J. 94, 345 (1965)
5. Felig, P., and Wahren, J., J. Clin. Invest. 50, 2703 (1971)

3 ビリルビンのミトコンドリアにおよぼす影響について
── イソクエン酸脱水素酵素を中心に──

小笠原 信 明・渡 辺 智 正・後 藤 治 子
（愛知コロニー研・生化）

〔要 約〕

グルクロン酸抱合されていないビリルビンが核黄疸の起因物質であることは明らかなようである。ビリルビンの作用はミトコンドリアの1)脱共役剤になる。2)電子伝達系を阻害する。3)膜透過性を変化させる。4) Malate dehydrogenase. Glutamate dehydrogenase等を阻害することが報告されている。核黄疸剖検例について、ビリルビンの分布を調べたところミトコンドリア及びシナプトゾーム分画に大量に分布していた。ミトコンドリアに注目しTCAサイクルの律速酵素と考えられるNAD-linkedイソクエン酸脱水素酵素を調べたところ、ビリルビンは強力な阻害を示した。この酵素のActivatorであるADPの存在、否存在にかかわらず阻害は認められ、イソクエン酸、ADPの濃度が低いほど阻害は強力である。阻害はビリルビン1μM以下ですでに認められ、pHが高いほど強力である。ミトコンドリアレベルでの阻害をみるためにNAD(P) depleted ミトコンドリアで実験を行ったが、酵素実験と同様にNAD-linkedイソクエン酸脱水素酵素は阻害されたが、NADP酵素は阻害されなかった。更にintactのミトコンドリアでAntimycinAで電子伝達を止めphenazine ethosulfateで人工的に電子を酸素に流す系でもビリルビンは阻害を示すことから、電子伝達系の阻害や脱共役剤としての作用以外にTCAサイクルの阻害が充分考えられる。ビリルビンによる膜透過性の変化も考えられるので、今後TCAサイクルの阻害機構について検討していきたい。

核黄疸の生成機序については現在なお不明の点が多いようであるが、グルクロン酸抱合されていないビリルビンが原因物質であることは明らかなようである。ビリルビンの作用機構については、[5.6.8.12] これまで研究の主眼はミトコンドリアの機能に向けられ、1)脱共役剤としての作用、2)電子伝達系の阻害[1]、3)ミトコンドリア膜の透過性の変化[6.7.9]、4)ミトコンドリアのmalate dehydrogenase[3.4.8]、glutamate dehydrogenase[11]の阻害等が報告されている。

剖検例から得られた核黄疸脳についてビリルビンの分布を調べたところミトコンドリア及びシナプトゾームにその多くが分布することから、吾々はミトコンドリアに眼をむけNAD-linkedのイソクエン酸脱水素酵素をビリルビンが非常に低濃度で阻害することを見出し実際にこの阻害がミトコンドリアレベルでも起るかどうか検索した。

〔実験方法〕

脳のSubcellular Fractionationは Eichberg ら[2]の方法、すなわち庶糖密度勾配法により得て、ビリルビンの定量はジアゾ法によった。NAD-linkedのイソクエン酸脱水素酵素の活性はことわらない限り 33mM Tris-Hcl pH 7.5、1.33mM $Mncl_2$、0.67mM ADP、0.33mM NAD、1.67mMイソクエン酸の存在下3ml・室温で活性を測定した。1 unitはこの条件で340mμの吸光度を0.01変化させる量とした。NADP-linkedの活性は0.05mMのNADP存在下で行った。ミトコンドリアレベルの実験はOzawaら[10]の方法で得られるF_1、F_2分画をミトコンドリアとして使用した。TCAサイクルの回転をみるための実験はミトコンドリア蛋白として700γのミトコンドリアを使用し、Kcl 150mM、Pi 10mM、$Mgcl_2$ 10mM、Tris-Hcl pH 7.4 50mM、ピルビン酸1mM、コハク酸0.2mM、1.4-C^{14}コハク酸0.05μci、全量2mlで

30°C. 15分反応をおこない生成される $C^{14}O_2$ を測定した。他にADP 0.4 mM. phenazine ethosulfate 1mM. Antimycin A 1μM を使用した。

〔結果及び考察〕

Table I

Subcellular Distribution of Bilirubin

Fractions	Bilirubin (μg/g)	SDH	acid phosphatase
P_1	6.10	0.005	0.040
P_2 A	3.05	0	0.097
P_2 B	9.90	0.015	0.168
P_2 C	12.35	0.062	0.171
Microsome	4.09	0	0.069
Soluble	2.98	0	0.20

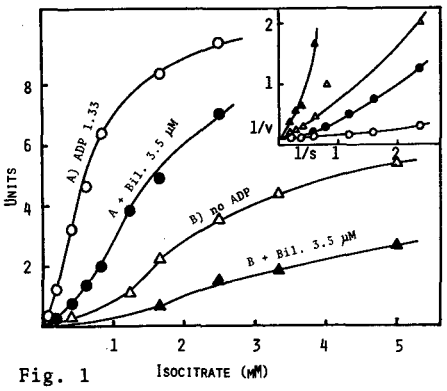


Fig. 1

I. 核黄疸におけるビリルビンの分布

臨床的にも病理的にも明らかに黄染をみとめた海馬部分よりEichbergらの方法によってビリルビンの分布を調べた。Table Iに示した如く大部分のビリルビンはミトコンドリア分画及びシナプトゾーム分画に分布していた。上清分画のビリルビン量は他の分画に比べて少い。この事実はビリルビンの侵襲点がミトコンドリアあるいはシナプトゾームにあることを示唆するものと思われる。

II. ビリルビンのNAD-イソクエン酸脱水素酵素阻害について

次にTCAサイクルの律速酵素と考えられるNAD-イソクエン酸脱水素酵素に及ぼす影響をみた。ラット脳ミトコンドリアのアセトン粉末抽出液についてビリルビンの影響をみたところかなりの阻害がみられたので酵素を部分精製した。ラット脳の粗ミトコンドリア分画から、TritonX-100処理、2回の硫安分画、Sepharose 6Bゲル沪過で比活性にして Triton上清から150倍に精製した標品について阻害実験を行った。

IIa. イソクエン酸濃度とビリルビン阻害の関係

Fig.1に示した如く、活性とイソクエン酸濃度の関係はActivatorのADPが存在しない場合にはシグモイドになり、Hillのn値は約2である。ActivatorであるADPを加えるとシグモイドの傾向は小さくなり、イソクエン酸に対するみかけのKmは小さくなるがVmは変化しない。ビリルビンを添加するとADPの存在、否存在にかかわらずイソクエン酸に対するみかけのKm値は大きくなり、活性－イソクエン酸濃度曲線は右に移動する。すなわち、イソクエン酸濃度の低いところではビリルビンによる阻害が強い。

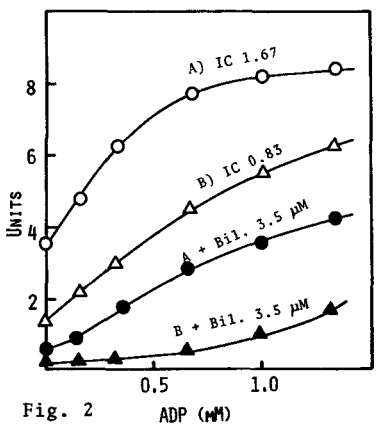


Fig. 2

IIb. ADP濃度とビリルビン阻害の関係

Fig.2に示す如く、この酵素はADPの存在で活性化されるが、ADPの存在、否存在に関係なくビリルビンにより活性は阻害される。イソクエン酸濃度の高い場合には曲線はHyperbolicであるが、低濃度では

Sigmoidicityがある。ビリルビンを加えるとイソクエン酸濃度が1.67 mMでもSigmoidになる。更に阻害はイソクエン酸濃度が低いほど強力である。

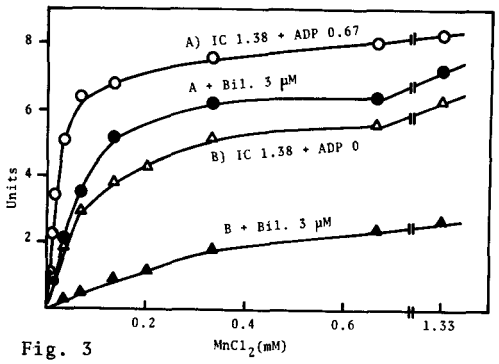


Fig. 3

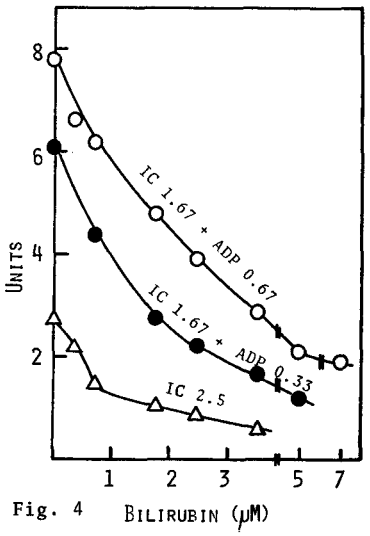


Fig. 4

IIc. NAD濃度とビリルビン阻害の関係

Activatorであ るADPが存在しない場合、活性とイソクエン酸濃度との関係はSigmoidになるが(Fig.1). NAD濃度との関係は明らかにHyperbolicである。ADPが存在するとVmは大きくなりKmは小さくなる。ビリルビンが存在するとVmは小さくなるがKmに変化はない。

IId. Mn濃度とビリルビン阻害の関係

Mn濃度と活性との関係をFig.3に示した。ADPの存在でMnに対するみかけのKmは小さくなる。ビリルビンはみかけのKmを大きくしVmを小さくする。

IIe. ビリルビン濃度と阻害の関係

Fig4に示した如く、ビリルビンは強力な阻害剤ですでに1μM以下で明らかな阻害を認める。ビリルビンの阻害はNAD酵素に特異的であり、ラット脳のミトコンドリア及び上清のNADP酵素には全く影響を示さない。NADP酵素の阻害実験には阻害が容易にみられるように低濃度の基質を用いたが、ビリルビンの影響はなかった。

IIf. pHとの関係、その他

種々の異なるpHでのビリルビンの影響をFig.5に示した。pH 7以下ではImidazol-HCl. 7以上ではTris-HCl bufferを用いた。酵素の至適pHはADP無添加で6.7附近に、ADPが存在すると7.2近辺になる。ビリルビンの阻害はpHの高い場合に強力である。

ビリルビン阻害の特異性を調べるために室温で2日間放置したビリルビンと新しく調整したビリルビンとの阻害効果を比較した。TableIIに示す如く、古いビリルビンでは全く阻害がみられないことから、少くともビリルビンの酸化

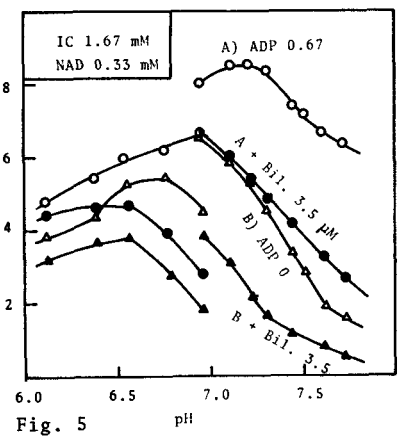


Fig. 5

Table II

ADP(mM)	0.67	0.33	0
IC (mM)	1.67	1.67	1.67
Control	5.8	4.6	2.8
Fresh bilirubin 3 μM	2.4	1.2	0.6
Old bilirubin 3.5 μM	5.8	4.6	2.9
Old bilirubin 35 μM	5.8	4.6	3.0

Table III

Effect of bilirubin on NAD(P) depleted brain mitochondria		
Expt. 1	a. IC + NAD + ADP	1.75 units
	b. a + bilirubin 6.7 μM	0.01
	c. a + b + NADP	3.5
Expt. 2	a. IC + NADP	4.5
	b. a + bilirubin 6.7 μM	4.0

Table IV

Ant	PES	ADP	CO_2 CPM
−	−	−	746
−	−	+	12,728
+	−	+	455
+	+	−	2,126
+	+	+	8,617

物や光分解物には阻害効果がないといえる。

Ⅲ. ミトコンドリアレベルでの阻害

ミトコンドリアレベルでビリルビン阻害がみられるかをみるために、先ずNAD(P) depletedミトコンドリアを調整しKCN存在下にビリルビンの影響をみた。TableⅢに示す如くこのようなサンプルでもビリルビン阻害はNAD酵素に特異であり、NADP酵素には全く影響しないことが明らかである。

次にintactのミトコンドリアでもNAD-linkedイソクエン酸脱水素酵素の阻害があり、TCAサイクルが停止するかどうか検討した。ミトコンドリア機能に及ぼすビリルビン作用は複雑であるが、脳ミトコンドリアではビリルビンを添加してもO_2 uptakeは上昇しないこと、更にコハク酸1.4 C^{14}からのC^{14}-CO_2の生成も上昇しないこと等から単純な脱共役剤ではないと考えられる。次に問題になるのが電子伝達系への阻害である。この阻害が起らない条件でTCAサイクルの回転をみるために、AntimycinAで電子伝達を止めphenazine ethosulfateを添加して人工的にelectronをO_2に伝達をさせる実験を行った。TableⅣにこの方法でTCAサイクルがAntimycin A存在下でもphenazine ethosulfateの添加によって有効に回転することを示した。この方法でのビリルビンの効果をみたのがFig.6である。ADP単独の場合と同様にAntimycin A, phenazine ethosulfate存在下でビリルビンの阻害が起ることはTCAサイクル自身に阻害があることを示している。ビリルビン添加が膜透過性を変化させることは当然予想されるので、今後TCAサイクルの阻害が如何なるメカニズムで起っているか、特に膜透過性の障害あるいは脱水素酵素レベル、例えばイソクエン酸脱水素酵素の阻害が起っているかをTCAサイクルの中間体の変動から検討していきたい。

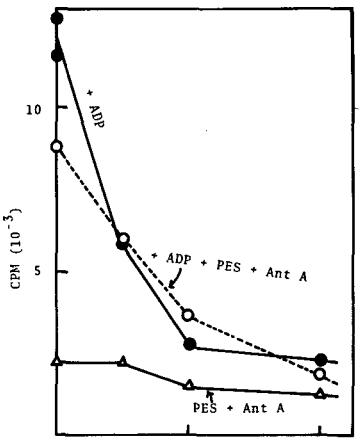


Fig. 6

〔文献〕

1) Cowger, M. L. et al., Biochemistry, 4, 2763 (1965). 2) Eichberg, J. et al., Biochem. J., 92, 91 (1964). 3) Kasagami, H., Nihon Univ. Med. J., 28, 631 (1969). 4) Kashiwamata, S., et al., IV International Meeting of ISN (1973). 5) Menken, M. et al., J. Neurochem., 13, 1241 (1966). 6) Mustafa, M. G. et al., J. Biol. Chem., 244, 6403 (1969). 7) Mustafa, M. G. et al., J. Biol Chem., 245, 1084 (1970). 8) Noir, B. A. et al., Febs Letters, 27, 270 (1972). 9) Odell, G. B., J. Pediat., 68, 164 (1966). 10) Ozawa, K. et al., J. Biochem., 59, 501 (1966). 11) Yamaguchi, T., J. Biochem., 68, 441 (1970). 12) Zetterstrom, R. and Ernster, L., Nature (Lond.) 178, 1335 (1956).

4 ビリルビン毒性に関する研究 ── ラット脳の糖質代謝におよぼす影響──

加藤 りつ子・柏俣 重夫
丹羽 富士子
（愛知コロニー研・生化）

〔要 約〕

核黄疸の成因については、いまだ、複雑で、明らかでない点が多いが、核黄疸とは、ビリルビン(Bil)による脳障害であることは、周知の事実とされている。

ところで、Bil阻害に関する生化学的知見としては、1954年、Day[1]がネズミの大脳切片を用いて、Bil呼吸阻害を報告して以来、主として、ミトコンドリアの機能、特に、電子伝達系および酸化的リン酸化に関する報告が数多くなされてきている。[2][3][4]

われわれは、すでに、脳ミトコンドリアのNAD依存性イソクエン酸およびリンゴ酸脱水素酵素が、in vitroで、Bilにより強く阻害されることを、明らかにしている。[5][6] しかしながら、in vitroでみられたBilによる酵素阻害が、in vivoでも証明されるかどうかを知るために、黄疸を示す系として知られているGunnラット[7]を用いて、脳内、Krebs cycleの代謝物およびピルビン酸、乳酸、アスパラギン酸、グルタミン酸のレベルを測定した。 もし、in vivoにおいても、Bilによって上述の脱水素酵素が阻害されるならば、代謝前駆物質の蓄積が、観察されるはずである。 ところが、クエン酸、イソクエン酸には変化がみられず、ピルビン酸、リンゴ酸の減少という結果が得られた。 この結果に基づき、Bilが、ラット脳解糖系におよぼす影響について検索した結果も、あわせ報告する。

試料調製および実験方法

材料 実験動物として、われわれの研究所で繁殖させた生後15日目のGunnラット(♂, ♀)およびWistar系ラットを使用した。 試料調製と測定法 Krebs cycle、その他の代謝物の測定； 200mg/kgのBil competitor(Salicylate or Novobiocin)を腹腔内に注射した後、一定時間後に全脳を取り出し、ただちに、0.6%PCAでhomogenizeした。断頭後、homogenizeするまでに要した時間は、15秒以内であった。Homogenateを28,000×g 30min 遠沈、その上清を0.5Mトリエタノールアミンを含む3N K_2CO_3 でpH6.0に中和し、再び、28,000×g 30min 遠沈後、上清を代謝物測定の試料とした。ピルビン酸(Pyr)、乳酸(Lac)、クエン酸(Cit)、イソクエン酸(Isocit)、リンゴ酸(Mal)、グルタミン酸(Glu)、アスパラギン酸(Asp)は、酵素法によりケイ光測定で求めた。[8] コハク酸(Suc)は、エーテル抽出後、Barr[9][10]の方法を改良して測定した。 解糖活性の測定； ラット大脳の105,000×g Supを20mM K-PO4緩衝液(pH7.4)で平衡させたSephadex G-25を通したものを酵素標品とした。酵素活性測定は、ニコチンアミドを除いた事以外はWeber[11]の系に従い、生成した乳酸量を、Hohorst[12]の方法によって測定した。反応時間(37°C)と酵素活性の関係を図1に示す。この結果から、15minで活性を測定した。 グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(Gal-3-PDH)活性の測定； 酵素標品は、解糖活性標品と同一のものを用い、測定はUelick[13]の方法に

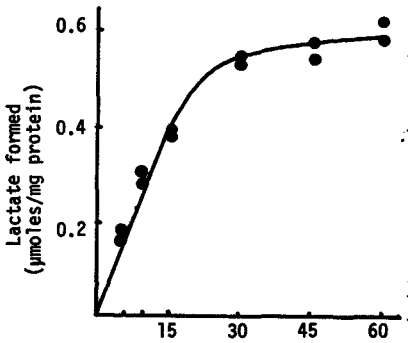


図1 Glycolytic activity as a function of incubation time.

従った。　血清Bil値の測定；ジアゾ反応法[14]に基づいて行なった。　蛋白濃度の測定；蛋白量は、紫外線吸収法[15]を便宜的に使用した。

結果および考察

血中Bilの存在様式には、抱合型(主として、グルクロン酸抱合、直接型)と、非抱合型(間接型)が知られている。非抱合型Bilは、主として、血清アルブミン(Alb)と結合して存在するが、非結合型(free Bil)も知られており、このfree Bilが、ヒト新生児における核黄疸成立の一つの重要な因子[16]として、注目されている。　われわれは、生後15日目においてGunnラットの血中Bil値が最高(約10 mg/dl)になるというJohnsonの報告[17]に基づき、生後15日目のラットを使用し、Bil-Alb複合体から、競争的にBilを解離させるBil competitorとして知られているSalicylate(Sal)[18][19]やNovobiocin(NB)[20]を、ラット腹腔内に投与した。直接Bil値は、j/jおよび対照群のいづれにも変化がみられなかった。図2は、生後15日目のj/j, j/+, wistarにNBを投与し、血中の間接Bil値を時間的に追った結果である。j/jの間接Bil値は、対照群に比べて、はるかに高い値(9mg/dl)を示しており、Johnsonの報告ともよく一致している。NB投与1hr後では、j/jの間接Bil値は0時間に比べ2mg/dl(22%)も減少した。さらに、脳の黄染がみられることからも、Bilが脳組織内に移行することを強く示唆している。　ところで、in vitroにおけるKrebs cycle脱水素酵素に対するBil阻害のわれわれの成績[5,6]を、in vivoで実証しようと試みた。まず予備実験として、Sal, NBをj/j, j/+, +/+, Wistarに投与後、時間的に試料調製のところで述べた代謝物のレベルの変化を調べた。Salは強力なBil competitorであるが、この予備実験から、実験系に使用するにはふさわしくないことが確認された。すなわち、Pyrを例にあげると図3に示すように、Sal投与1hr後には、対照群のj/+もj/jと同一レベルまで減少しており、単にBil competitorとしての役割だけでなく、別の薬理効果が生じている可能性が強い。しかしSal投与6hrs後には、+/+群の非投与群の値まで、ほとんど回復していることから、6hrs後にはSalの薬理効果はほとんど消失していると考えられる。これに反し、同じようなBil competitorであるNB投与の場合、図4に示すように、j/jと対照群との間のPyr値は、1hr後、有意の差が観察される。しかも1hr後のPyr値は、Sal投与6hrs後の値と非常によく一致していることから、単なる薬理効果をみているのでは

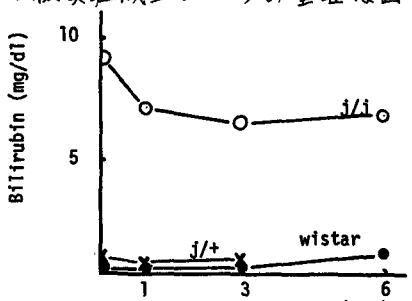


図2
Serum bilirubin concentration in 15-day old rat following novobiocin i. p. administration.

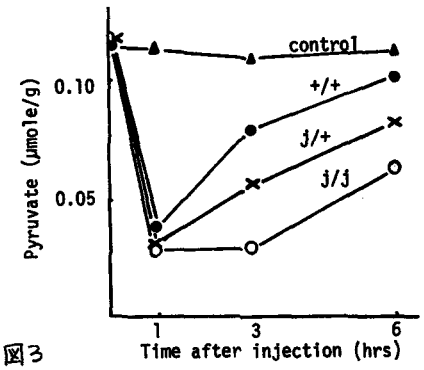


図3
Pyruvate levels in 15-day old rat brain following salicylate i. p. administration.

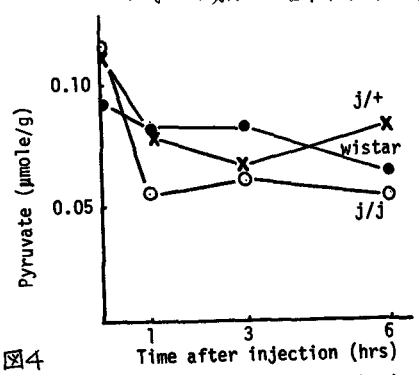


図4
Pyruvate levels in 15-day old rat brain following novobiocin i. p. administration.

ないことが示唆される。この結果から、NB投与1hrでKrebs cycleおよびその関連物質を測定することにした。表1に、ネと対照群(N, Wistar)のNB投与1hr後のKrebs cycleおよびその関連物質のレベルを測定した結果を示す。表1から明らかにわかるように、非投与群の物質レベルは文献値[21]と比較的よく一致したが、NB投与のネではPyr, Mal以外は、非投与群に比べ変化はなく、Pyr, Malのみ有意の減少がみられた。(Pyr; 54%, Mal; 72%)。Pyrに関しては、Wistarでは無変化であり、ネ群では有意の減少(25%)がみられたが、その減少の割合は、ネとWistarのちょうど中間値を示した。その他の有意な変化は、Wistarのlacの減少と、対照群に共通なAspの蓄積であった。これらのうち、ネのPyrとWistarのLacの減少に関しては、現在のところ説明に困難であるが、Aspの蓄積は、NB(もしくはその代謝物)の直接効果(作用機構は不明)で、ネで統計的有意差がないのはPyrの減少がオキザロ酢酸からGOTによって生成されるAspの減少をきたし、全体として、NBによるAspの蓄積が相殺されると説明することができる。そして、ネのAspの蓄積程度がWistarに比べ低いのは、Pyrの減少と無関係ではないことがうかがえる。さらに、ネのMalの減少もPyrに依存していると考えれば、BilはPyrを減少させることになるであろう。上記の結果から、まず第一に考えられることは、解糖系の阻害であるので、Weberの系を用いて解糖活性を調べた。

表 1
Intermediates levels in 15-day old rat brain following novobiocin i. p. administration

		Intermediates (nmoles/g ± S.E.)							
		Pyr	Cit	Isocit	Suc	Mal	Asp	Glu	Lac
Gunn rat j/j	control (n)[a]	116[b] ± 4	248 ± 31	8 ± 1.2	667 ± 65	382[b] ± 25	2290[d] ± 150	7880 ± 440	1900 ± 290
		9	10	9	8	10	10	10	9
	novobiocin (n)	53 ± 5	225 ± 31	7 ± 0.8	667 ± 46	299 ± 6	2730 ± 220	6790 ± 360	1400 ± 160
		9	8	7	9	9	10	10	8
Gunn rat j/+	control (n)	113[c] ± 9	201 ± 34	8.6 ± 0	596 ± 64	333 ± 24	1980[c] ± 98	7220 ± 450	1980 ± 160
		9	10	8	8	9	9	10	9
	novobiocin (n)	84 ± 6	224 ± 27	6.3 ± 0	570 ± 50	293 ± 27	2480 ± 150	6560 ± 350	1840 ± 220
		8	11	6	10	10	11	11	9
wistar	control (n)	92 ± 4	394 ± 60	6.6 ± 0.6	717 ± 55	349 ± 12	1780[b] ± 170	8300 ± 230	2310[b] ± 91
		9	10	5	8	9	9	9	9
	novobiocin (n)	82 ± 7	434 ± 21	6.4 ± 0.4	637 ± 61	323 ± 16	3010 ± 250	7610 ± 360	1700 ± 55
		9	9	5	8	9	9	9	9

a Number of rats
b $P < 0.01$
c $P < 0.02$
d n.s.

図5はNADの飽和曲線を0 $\times 10^{-5}$M Bil存在下、非存在下で比較した結果である。Bil非存在下では、10μM附近のNAD濃度でPlateauになる2相性の曲線を示したが、Bil存在下では、Plateau部分が消失し、10μM以下では50%阻害がみられた。その阻害形式はLineweaver Burk plotから拮抗的阻害であった。NAD酵素のBil阻害に関する当研究室の成績による

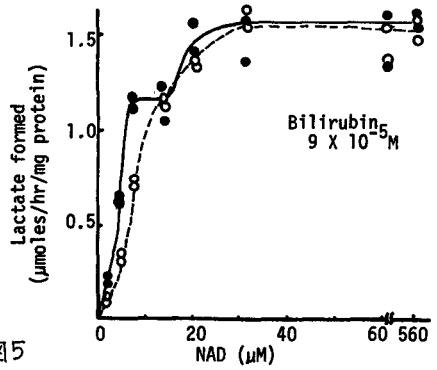


図5 Glycolytic activity as a function of NAD concentration in the presence and absence of bilirubin.

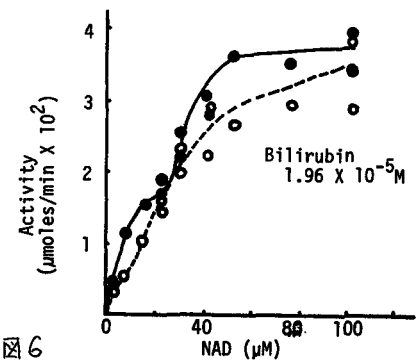


図6 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as a function of NAD concentration in the presence and absence of bilirubin.

と、ラット脳LDH活性は、ほとんど阻害されないが、Gal-3-PDH活性は阻害される。そこで、1.96×10^{-4} M Bilによる阻害を検討した結果が図6である。NAD飽和曲線は、解糖活性の飽和曲線と極めて類似しており、Bil非存在下では、20μM附近にplateau部分をもつ。Bil存在下では、解糖活性の場合と同様に、plateau部分が消失する傾向を示し、低濃度のNAD(20μM以下)では、Lineweaver-Burk plotより拮抗阻害を示した。これらふたつのNADに関する飽和曲線のパターンが類似しているのは、解糖活性が、Gal-3-PDHのパターンを反映しているものと考えられる。解糖活性およびGal-3-PDH活性のBilによる阻害の結果は、さきのin vivoの実験におけるBr_2の減少を、in vitroの系ではあるが、強く支持するものである。1954年以来Bil阻害作用機構に関する大半の研究は、ミトコンドリアに向けられてきたが、今回のわれわれの報告や、DNA合成障害[22]についてのGunnラット小脳での成績を含めて、今までのBil障害についての数多くの知見[23]や、Chenら[24]の報告したBilの脳内移行に関する電顕による病理組織学的な研究から考えて、Bilによる脳障害の成立機構を、総合的に理解するために、さらに、いろいろな可能性を検索することが必要と考えられる。

最後に、Bil測定をしてくださいました本研究所周生期学部門の太田恵子さんに、深く感謝いたします。

文献

1) Day, R. L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85, 261 (1954).
2) Cowger, M. L., Igo, R. P., and Labbe, R. F., Biochemistry 4, 2763 (1965).
3) Odell, G. B., Natzschka, J. C., and Storey, B., Amer. J. Dis. Child., 112, 351 (1966).
4) Mustafa, M. G., Cowger, M. L., and King, T. E., J. Biol. Chem., 244, 6403 (1969).
5) Ogasawara, N., Watanabe, T., and Gotoh, H., Fourth International Meeting of the International Society for Neurochemistry (Tokyo), 1973, Abstract, p. 400.
6) Kashiwamata, S., Niwa, F., Higashida, H., and Katoh, R., Fourth International Meeting of the International Society for Neurochemistry (Tokyo), 1973, Abstract, p. 401.
7) Johnson, L., Sarmiento, F., Blanc, W. A., and Day, R., Amer. J. Dis. Child., 97, 591 (1959)
8) Williamson, J. R., and Corkey, B. E., in Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. (Editor), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. XIII, 1969, p. 434.
9) Isaacs, T. L., and Broyer, T. C., Plant Physiol., 17, 296 (1942).
10) Barr, C. G., Plant Physiol., 23, 443 (1948).
11) Glazer, R. I., and Weber, G., Brain Res., 33, 439 (1971).
12) Hohorst, H. J., in Bergmeyer, H. U. (Editor), Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965, p. 266.
13) Velick, S. F., in Colowick, S. P., and Kaplan, N. O.(Editor), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. I, 1955, p. 401.
14) Malloy, H. T., and Evelyn, K. A., J. Biol. Chem., 119, 481 (1937).
15) Layne, E., in Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. (Editor), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. III, 1957, p. 447.
16) Nakamura, H., and Lardinois, R., Biol. Neonate, 21, 400 (1972).
17) Johnson, L., Garcia, M. L., Figueroa, E., and Sarmiento, F., Amer. J. Dis. Chil., 101, 76 (1961).
18) Schmid, R., Diamond, I., Hammaker, L., and Gundersen, C. B., Nature (Lond.), 206, 1041, (1965).
19) Diamond, I., and Schmid, R., J. Clin. Invest., 45, 678 (1966).
20) Bratlid, D., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 30, 331 (1972).
21) McIlwain, H., and Bachelard, H. S., Biochemistry and the Central Nervous System, Fourth Edition, Churchill Livingston, Edinburgh and London, 1971, p. 125.
22) Yamada, N., Sawasaki, Y., and Nakajima, H., Fourth International Meeting of the International Society for Neurochemistry (Tokyo), 1973, Abstract, p. 344.
23) Fleischner, G., and Arias, I. M., Amer. J. Med., 49, 576 (1970).
24) Chen, H., Wang, C., Tsan, K., and Chen, Y., Amer. J. Pathol., 64, 45 (1971).

5 実験的脳浮腫ラットの代謝異常

桑島淳二・中村恵二・藤谷武一
門河敏明・吉田耕一・清水当尚
（大日本製薬・研）

〔要 約〕

脳は酸素要求性の高い組織でありanoxiaにより脳障害（脳浮腫）が誘発されることはよく知られているが、その発症機序についてはまだ不明な点が多い。われわれは左側頸動脈結紮とhypoxia負荷により誘発される脳障害ラットの脳内代謝異常について検討し、脳内水分および電解質異常とエネルギー代謝、FFA、mitochondriaの酸化的燐酸化との関連性について若干の成績を得た。

1). この脳障害ラットは左側頸動脈結紮あるいはhypoxia負荷だけでは誘発されず、これらの操作を組合せることにより左前脳に特異的に障害が現われる。そして、左前脳は肥大し、水分、Na^+の増加とK^+の減少がみられ、脳浮腫の症状を呈する。

2). 脳障害時、左前脳内ATP, CrPの減少とAMP, lactateの増加がみられ、adenine nucleotideのenergy charge potential (ECP)が低下する。

3). この障害はFFAの増加を伴っており、特にpalmitic acid, stearic acid oleic acid, arachidonic acidの増加が著明である。

4) 障害脳において、mitochondriaの酸素消費量、ATP生成量、ATP/O値の低下がみられ、障害初期ではalbuminの添加によりATP/O値は正常値へ回復する。

5). oleic acid 2×10^{-5}M以上の添加により、脳mitochondriaの酸化的燐酸化能が著明に阻害される。

〔実験方法〕

脳障害ラットの作製法；　5週令のWistar系雄性ラット、体重70～90gのものを使用した。hexobarbital麻酔下に左側頸動脈を結紮し、1日後ラットを約11literのプラスチック製容器内へ入れ、10liter/minの速度でhypoxic gas 組成4% O_2+96% N_2を5分間、続いて組成6% O_2+94% N_2のgasを10分間送り込んだ。この操作を連続して4回繰返し、全過程で1時間のhypoxia負荷をラットに与えた。

脳内成分の定量；　脳内成分の定量は左右の前脳に分けておこなった。水分は乾燥法により、またNa^+, K^+は乾燥組織を6% PCAでhomogenizeし、その上清について炎光自動分析器により測定した。ATP, ADP, AMP, CrP, lactate, glucoseはLowry[9,10]の方法に従って定量したが、ラットの凍結に際してliquid nitrogenの代りにdry ice-acetone (-82°C)を使用した。これらの凍結剤による定量値にはほとんど差が認められない。ECPは(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)の式から算出した。[1] myelinはAutilio[2]の方法により精製し乾燥重量を測定したのち、脂質を抽出しcholesterol, phospholipid, cerebrosideをそれぞれ、Zak[14]、Chen[5]、Long[8]の方法により定量した。DNA, RNAの定量はWebb[12,13]の方法により、またAcid phosphatase, Cathepsin activityはGianetto[6]の方法によりtotalおよびfreeのactivityを測定した。FFAの定量は、ラットをdry ice-acetone (-82°C)で凍結後、前脳を取出しCHCl$_3$-MeOH (2:1, v/v)で抽出したのち、Bazan[3]の方法によりTLCを用いてFFAを分離し、diazomethaneでメチル化後gas chromatographyにより分別定量した。

mitochondriaの調製法と酸化的燐酸化の測定；　脳mitochondriaの調製はOzawa[11]の方法に従っておこない Fraction 1 を用いた。酸素消費量とATP生成量の測定はBrody[4]の

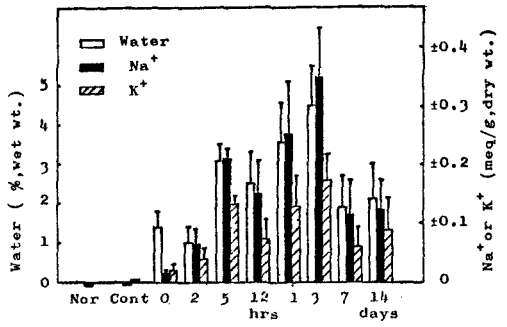
方法を若干改良しておこなった。酸素消費量はmanometricな方法で測定し、ATP生成量は6%PCAを加えて反応を停止させ、その上清中のG6Pを酵素的に定量しATPに換算した。

〔実験結果〕

1). 水分、Na^+、K^+； 1群5~8匹のラットを使用して脳障害時の左右の前脳内水分Na^+, K^+値を経時的に測定した。正常ラットおよび左側頸動脈結紮ラット(Control)では左右の前脳内水分, Na^+, K^+値はほぼ同じ値をしめし、左右の差は認められない。正常ラットの水分, Na^+, K^+値はそれぞれ79.0±0.1 (%, wet wt.), 253±3 (μeq/g, dry wt.), 500±4 (μeq/g, dry wt.)の値が得られる。左側頸動脈を結紮し1日後に1時間のhypoxia負荷を与えたラットでは負荷終了直後より左前脳内水分, Na^+, K^+値に変化がみられてくるが、右前脳においてはほとんど変化がみられずほぼ正常値をしめす。hypoxia負荷終了後、左前脳において軽度の水分およびNa^+値の増加とK^+値の減少を認め、その後時間経過と共にこの現象は進行し3日後でpeakに達する。この時点での左右の前脳内水分, Na^+, K^+値の差(左-右)はそれぞれ4.5±1.0 (%, wet wt.), 35±84 (μeq/g, dry wt.), -170±43 (μeq/g, dry wt.)の各値をしめした。1週間以上経過するとこの脳浮腫症状は軽減されてくる。(Figure 1) また、この脳障害ラットの左前脳内水分値とNa^+値およびK^+値の間にはそれぞれ正相関と逆相関がみられる。

Figure 1

Differences in water and electrolyte contents of left - right halves of rat forebrain



Time after the end of hypoxic exposure

Table 1

Metabolic intermediate levels in left half of rat forebrain

Group	ATP	ADP	AMP	CrP	ECP	Lact.	Gluc.	Na^+	K^+
Normal	3.10 ±0.04	0.362 ±0.006	0.058 ±0.004	3.07 ±0.09	0.934 ±0.001	2.25 ±0.08	1.37 ±0.07	54 ± 1	97 ± 2
Control	2.90 ±0.02	0.349 ±0.005	0.065 ±0.002	3.03 ±0.11	0.926 ±0.003	2.12 ±0.08	1.39 ±0.02	53 ± 1	96 ± 2
5 hrs	1.22* ±0.27	0.367 ±0.011	0.195* ±0.026	1.27* ±0.42	0.770* ±0.034	17.65* ±3.18	1.31 ±0.23	78* ± 3	79* ± 3
1 day	0.85* ±0.16	0.293 ±0.044	0.149* ±0.017	0.69* ±0.11	0.763* ±0.019	10.76* ±0.64	4.27* ±0.14	106* ± 6	56* ± 8
3	0.80* ±0.10	0.131* ±0.017	0.053 ±0.002	0.81* ±0.15	0.880* ±0.006	3.84* ±0.16	4.92* ±0.18	127* ± 3	38* ± 5
7	2.53* ±0.20	0.325* ±0.007	0.060 ±0.006	2.93 ±0.39	0.922 ±0.008	2.09 ±0.15	2.29* ±0.23	68* ± 6	85* ± 4

The values in the table are means ± S.E. of 5 rats.
ATP, ADP, AMP, CrP, Lact. and Gluc. ; μmoles/g, tissue wt.
Na^+ and K^+; μeq/g, tissue wt.
* The difference from the normal value is statistically significant with $P<0.01$.

2). 高エネルギー燐酸化合物と解糖系基質； 左前脳内のATP, ADP, AMP, CrP, ECP, lactate glucoseを測定した。(Table 1) Controlラットは正常ラットと同じ値をしめすが、Controlラットにhypoxia負荷を与えると負荷終了後5時間でATP, CrPの減少とAMP, lactateの増加を認めた。ATP, CrPは脳浮腫症状がpeakに達する1~3日後で最も低値をしめすが、lactateは5時間後ですでに著明に増加しておりその後減少してくる。ECPは5時間、1日、3日後で低下していた。また、ATP, CrPの各値に対するNa^+値およびK^+値の間には逆相関、正相関の関係にあり、それぞれの値に対する相関係数はATP: Na^+ ($r=-0.908$), CrP: Na^+ ($r=-0.863$), ATP: K^+ ($r=0.876$), CrP: K^+ ($r=0.825$)の各値が得られた。

3). myelin； この脳障害ラットの左前脳内myelin量は有意に減少しており、正常

ラットのmyelin量 14.50±0.49 (mg/g, tissue wt.) に対し、hypoxia負荷後 5時間および1日経過したラットではそれぞれ 11.32±1.10, 9.63±0.45 (mg/g, tissue wt.) の値が得られた。(Table 2) myelin中のcholesterol, phospholipid, cerebrosideは組織重量当りで有意に減少したが、myelin量に対するcholesterol, cerebrosideの比には変化なく、myelin量に対するphospholipidの比の減少と $CHCl_3$-MeOH (2:1, v/v) 不溶性成分の比の増加がみられたがいずれも有意な変化とはいえなかった。

Table 2

Myelin, DNA, RNA and hydrolase activities in left half of rat forebrain

Group	Myelin weight	DNA	RNA	Acid phosphatase	Cathepsin
Normal	14.50 ±0.49	1.17 ±0.04	2.71 ±0.11	42.6 ±0.6	8.01 ±0.10
Control	-	1.11 ±0.07	2.40 ±0.08	42.3 ±0.7	7.82 ±0.08
5 hrs	11.32* ±1.10	1.00* ±0.05	1.92** ±0.11	44.8 ±0.9	7.85 ±0.16
1 day	9.63** ±0.45	0.99** ±0.02	1.95** ±0.15	44.2 ±0.7	7.77 ±0.46

The values in the table are means ± S.E. of 5 rats.
Myelin, DNA and RNA ; mg/g, tissue wt.
Acid phosphatase ; released P μmoles/hr/g, tissue wt.
Cathepsin ; released tyrosine μmoles/hr/g, tissue wt.
*, ** ; The difference from the normal value is statistically significant with $P<0.05$ and $P<0.01$.

4). DNA, RNA ; hypoxia負荷後、5時間および1日経過したラットで、左前脳のDNAが軽度ではあるが有意な減少とRNAの著明な減少がみられた。(Table 2).

5). Acid phosphatase, Cathepsin activity ; ischemiaにより lysosomal enzyme が遊離するといわれており[7]、この脳障害ラットの左前脳について Acid phosphatase, Cathepsin activity を測定した。しかしこの脳障害ラットではいずれの酵素とも free および total activity に変化が認められなかった。(Table 2, total activity のみ記載した。)

6). FFA ; Controlラットの左前脳内FFAは正常ラットと同値をしめし変化がみられないが、hypoxia負荷後 5時間、1日経過したラットでは左前脳内 palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), arachidonic acid (20:4) が著明に増加した。(Table 3) しかし palmitoleic acid (16:1), linoleic acid (18:2) の増加は軽度であった。その後、さらに長鎖脂肪酸である (22:4), (22:6) が前記4種のFFAに劣らず著明に増加する結果を得ている。これらのFFAは正常ラットの脳脂質をアルカリ性アルコール中で加水分解すると多量に遊離されてくることを確認している。

Table 3

Free fatty acids in left half of rat forebrain

Group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4
Normal	31.1 ± 0.8	9.8 ±0.5	9.2 ± 0.2	9.0 ± 0.2	5.1 ±0.1	trace
Control	29.4 ± 1.7	6.8 ±1.3	9.6 ± 0.8	8.8 ±0.6	5.1 ±0.1	trace
5 hrs	86.6 ±11.9	16.9 ±2.2	107.6 ±16.5	66.2 ±11.2	10.2 ±1.6	44.0 ±14.9
1 day	195.5 ±57.5	-	231.5 ±59.0	156.4 ±59.3	19.6 ±4.9	172.4 ±82.3

The values in the table are means ± S.E. of 4 rats.
Free fatty acids ; μg/g, tissue wt.

7). Mitochondriaの酸化的燐酸化

この脳障害ラットの左前脳 mitochondria を用いて、succinate を基質にして bovine albumin 3 mg/vessel の添加の有無に分け酸化的燐酸化を測定した。(Table 4)

a). Albumin無添加実験 ; Controlラットの mitochondria では正常ラットの場合とほゞ同じ酸素消費量、ATP生成量の値をしめし、ATP/O 値は 1.58 であった。しかし、さらに hypoxia 負荷を与えたラットの mitochondria では 5時間以後 ATP生成量、酸素消費量共に減少し、ATP/O 値も低下した。この酸化的燐酸化の低下は脳浮腫の進行と平行して認められる。

b). Albumin 添加実験 ; 正常ラットの mitochondria の ATP/O 値は albumin の添加により 1.58 から 1.79 へ上昇する。hypoxia 負荷後 5時間経過したラットの mitochondria

のATP/O値は1.33と低下していたが、albuminの添加により1.81と上昇し、正常ラットmitochondriaのalbumin添加時の値とほぼ同じ値をしめした。しかし、hypoxia負荷後1日以上経過したラットのmitochondriaのATP/O値はalbumin添加によって若干の上昇はみられるが正常mitochondriaのATP/O値までの回復はみられない。

Table 4

Oxidative phosphorylation in left half of forebrain mitochondria

Group	Albumin absent			Albumin present		
	ATP	Oxygen	ATP/O	ATP	Oxygen	ATP/O
Normal	1941 ± 70	1234 ± 67	1.58 ±0.03	1946 ±108	1097 ± 85	1.79 ±0.05
Control	2133 ± 52	1351 ± 21	1.58 ±0.04	2148 ± 69	1239 ± 37	1.74 ±0.05
5 hrs	968* ±156	709* ± 83	1.33* ±0.08	1112* ±105	619* ± 67	1.81 ±0.05
1 day	801* ±126	584* ± 70	1.34* ±0.06	776* ±105	487* ± 63	1.58* ±0.04
3 days	230* ± 28	249* ± 32	0.93* ±0.05	255* ± 32	232* ± 28	1.10* ±0.07

The values in the table are means ± S.E. of 5 rats.
ATP ; mμmoles/N mg/min. Oxygen ; mμ atoms/N mg/min.
* The difference from the normal value is statistically significant with P<0.01.

Table 5

Effect of free fatty acids on oxidative phosphorylation of forebrain mitochondria

Addition	Mol	ATP	Oxygen	ATP/O
None	-	1910	1096	1.74
Stearic acid	1×10^{-5}	1811	1082	1.67
	3×10^{-5}	1859	1157	1.62
	1×10^{-4}	1832	1163	1.58
None	-	1936	965	1.87
Oleic acid	2×10^{-5}	1655	1098	1.51
	4×10^{-5}	1377	1099	1.26
	6×10^{-5}	898	907	0.94
	8×10^{-5}	484	932	0.52
	1×10^{-4}	205	603	0.34

ATP ; mμ moles/N mg/min.
Oxygen ; mμ atoms/N mg/min.

8) FFAによる脳mitochondriaの酸化的燐酸化阻害作用

脳障害ラットで著明な増加がみられたFFAのうち、stearic acid, oleic acidについて脳mitochondriaの酸化的燐酸化におよぼす影響をしらべた。(Table 5). stearic acid 10^{-5}~10^{-4}Mの添加によりmitochondriaの酸化的燐酸化は影響を受けなかったが、oleic acid 2×10^{-5}M以上の添加によりmitochondriaのATP生成量、酸素消費量およびATP/O値の低下を認め、oleic acidの濃度を増すにしたがってこの阻害効果は増強された。その他の飽和および不飽和脂肪酸による阻害効果については検討中である。なおstearyl CoA, oleyl CoA 10^{-5}~3×10^{-5}Mの添加ではほとんど影響を受けなかった。

〔考察〕 この脳障害ラットは左前脳に特異的に障害が現われ、左前脳は肥大し水分、Na^+の増加とK^+の減少がみられ脳浮腫の症状を呈している。脳内ATPの減少はエネルギー代謝に異常が生じている結果であり、脳組織におけるNa^+,K^+のactive transportにも異常をきたしていると予想され、その結果脳浮腫が現われてくると考えられる。一方、この脳障害は著明なFFAの増加を伴っており、ある種のFFAは脳mitochondriaに障害を与え酸化的燐酸化機能を低下せしめATPの生成を阻害するものと思われる。FFAと脳浮腫誘発との関連性については不明であるが、少なくとも脳障害を増悪させ、進行を助長する作用として働いている可能性が示唆される。

〔文献〕

6 脳可塑性の生化学的研究 ── 大脳半球剔除ラット神経組織の生化学的変化について (1)

駒井裕一・長野泰甫・荒木恵子
小林征男・奥田正英・佐武明
（新潟大・脳研・神経化学）

〔要約〕

出生直後大脳半球を剔除したラットは成熟後，大脳半球の欠除にもかかわらず，正常群と殆んど行動上判別が不可能で，中枢神経系の可塑性の生化学的本態および大脳両半球の必要性を知るための好材料と考えられる。今回私共の行った大脳半球剔除ラット成熟後の残存中枢神経系の macroscopical な生化学的分析結果は，表に示した様ないくつかの物質が，幅は少ないが正常ラットに比し，統計学的に有意義な，増或は減いづれか一方の方向の変化を示すことを明らかにした。このうち特に大脳以下の中枢神経系に於て認められたセレブロシドナサルファタイド，コレステロール，およびコルヒチン結合蛋白質の増加は，上記大脳半球欠除ラットに於ける代償機構ならびに，いわゆる脳の可塑性の化学的本態の一部を示すものと考えられる。

Changes in the Constituents of C.N.S. after Hemispherectomy

	% to the control	
Tissue weight	100 - 113	cerebrum, cerebellum
Water content	100	
Total protein per tissue weight	100	
Water-soluble protein per tissue weight	92 - 100	brain stem
Microtubules protein (colchicine binding activity) per total protein	100 - 130	cerebellum, brain stem, spinal cord
RNA per tissue weight	100 - 122 84 - 100	cerebrum, cerebellum, brain stem spinal cord
Ganglioside (lipid bound NANA) per tissue weight	86 - 100	cerebrum, brain stem
Phospholipid per tissue weight	90 - 100	cerebellum, spinal cord
Cholesterol per tissue weight	100 - 117	brain stem
Cerebroside + sulphatide per tissue weight	100 - 112	brain stem

成人に於て対脳の機能を維持するためには，両側大脳半球を必要とするとされている。しかしながら，患側の大脳半球剔除を行った片側性脳性麻痺患者では，患側の運動，知覚の機能および知能が術前より明改善することさえ認められる。更に本実験において，著者等はラットを出産後直ちに大脳半球剔除しても，成熟後は正常ラットの行動とほとんど区別がつけられないことを観察した。これ等の事実特に後者は，両側大脳半球の存在がラット等下等哺乳動物の正常な行動のために欠くべからざる条件ではないことを示唆すると同時に，中枢神経系の可塑性を知る手がかりを示すものと考え，その生化学的本態を知る可く以下の実験を行った。

実験方法

実験動物としては，Wistar albino 系ラットを用いた。生後1日以内の幼若ラットの頭皮（頭蓋骨を含めて）の頭頂部に，無麻酔下，小切開を加え，小骨窓をあけ，細いガラス管を用いて吸引することにより一側の大脳半球を剔除した。ついで，エルプ糸付縫合針（No.007）を用いて手術創（頭皮）を縫合し，70%アルコールにて消毒した後，親ラットのもとにかえし，対照ラットとして残した同胞と共に飼育した。これら手術操作は全て無菌的に行なわれた。以後，実験ラットの成長発育等の観察を続け，6ヶ月以後に種々の生化学的検索に供した。

実験試料の採取方法：実験動物をエーテル麻酔のもとで断頭し，以下氷室（0-4℃）にて，可及的速やかに残存大脳半球（手術反対側），小脳半球（左右），脳幹部（左右）脊髄（左右）の計7つの section に分画し，正常ラットについては大脳半球を左右それぞれに分けることにより計8つの section に分画し，体重，脳重量，水分含量，総蛋白，水溶性蛋白，microtubules protein（コルヒチン結合蛋白），RNA，コレステロール，およびセレブロシド＋サルファタイド，ガングリオ

ンド，燐脂質等を測定した。水分含量は湿重量と乾燥重量の差（乾燥器中，105°C，4時間加温）より算出した。蛋白はLowryらの方法に従い，水－ホモジェネート＋105,000×g，60分遠心，上清を水可溶性蛋白とした。脂質の抽出精製はFolchらの方法に従い，コレステロールはSearcy[4]，セレブロシドはScott－Meluin[3]，ガングリオシドはAminoffによるWarrenの変法[2]を，燐脂質はKennanら[5]の方法，RNAはFleck－Munroの変法[6]を用いた。組織のコルヒチン結合能（microtubules蛋白）は，可溶性，不溶性を分別することなく全ホモジェネートとして，ほぼWeisenbergら[7]の沪過法に従って行った。大脳皮質切片の酸素消費はD－glucoseを基質とし，Krebs－Ringer燐酸緩衝液 pH 7.4 中 37° 60分 反応とせWarburg検圧法で測定した。

実験結果および考察

1. 生物学的所見：術直後は元気なく，術中の出血のため，身体全体が白色を呈び，著明な貧血状態と思われ，哺乳時間及び乳の回数も低下しているが，ほぼ二日後には，身体全体に赤味をおび，哺乳時間，回数とも，正常仔ラットとほぼ変わらなくなる。

(A) 体重：正常群と比較すると，術後やや減少しているが，5日目頃より，ほぼ同じになり，成熟した際，有意の差は全く見られない。（図，1）.

(B) 脳神経：嗅覚，視覚，味覚等の検査は不可能であったが，三叉神経顔面知覚に関しては七下を用いて検査することが出来た。結果は両群の間には全く差異が認められなかった。又の他の脳神経の脱落症状については，検査法の制限もあり，認め得なかった。

(C) 運動および体知覚：大脳半球剔除ラットの如何なる発育の時期においても全く差異は認められなかった。

(D) 情動：機械的刺激からの逃げの反応についての検索では，正常脳ラットと全く差異を認めなかった。

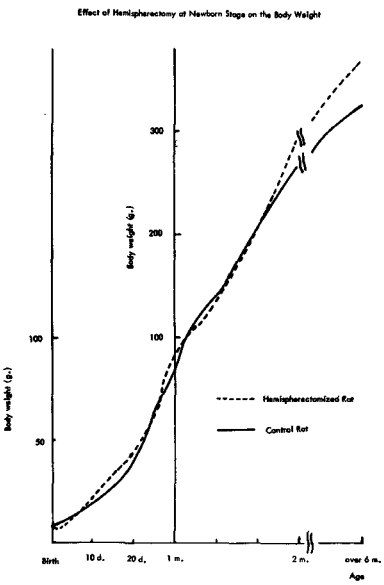
(E) 摂食：動作および乳の量において異常はみられなかった。

(F) 生殖，分娩：生殖行為は雌雄とも旺盛であったが，注目すべきは，大脳半球剔除雌ラットの10例の出産のうち仔を育てる能力（rearing）の全く欠如したものが3例，仔を育てることが出来たが巣作り（nesting）をみなかったのが2例あった。

以上，生直後，1側の大脳半球剔除を行ったラットでは rearing，nesting といった比較的高度と思われる行動に於て欠陥のある例もみられたが，成長，発育，運動，知覚又の他の習性に関しては，正常ラットと全く変わりのないことを観察した。

2. 剖検所見：大部分の例に於ては，剔除側の大脳半球はほぼ完全に欠如しており（この様なもののみ以後の生化学的検索に供した），殆んど頭蓋腔がみられない。残存脳で特に目立つことは嗅球の発育が著明であり，視神経は剔除側が非常に細く，残存脳側が非常に太い。又延髄腹側部で錐走する白い線状の束は術側で殆んど欠如し，対側で太い（当日，スライド予定）。

<図1>



3. 生化学的実験結果：（以下の表中，underlineのある数字は対照と較べて，統計的に有意の差のあるものである）。

(A) 脳重量：表1に示す様に左大脳半球剔除<表1> Brain Tissue Weight in C.N.S. of Rat after Hemispherectomy

(mg wet weight)

	Cerebrum L	Cerebrum R	Cerebellum L	Cerebellum R	Brain stem L	Brain stem R
Right Hemispherectomy (12)	611.1 ± 53.7		105.9 ± 12.5	114.0 ± 21.3	110.3 ± 17.7	100.0 ± 19.9
Left Hemispherectomy (19)		666.9 ± 49.4	124.1 ± 10.0	117.5 ± 11.6	112.5 ± 14.7	108.2 ± 18.0
Control (47)	612.7 ± 50.0	619.9 ± 40.2	107.7 ± 11.8	111.8 ± 17.2	115.4 ± 15.9	110.6 ± 11.1

を行った場合のみ，右残存大脳半球，左小脳半球には有意な重量の増加が認められた。

(B) 水分含量：正常ラットと比較して，全てのsectionで有意の差は認められなかった。（表2）.

<表2> Water Content (%) in C.N.S. of Rat after Hemispherectomy

		Control group	Experimental group: hemispherectomied side	Experimental group: contralateral side
Cerebrum	L	76.9 ± 0.6 (14)	—	77.2 + 0.4 (6)
	R	76.9 ± 0.6 (14)		
Cerebellum	L	76.1 ± 1.0 (15)	76.5 ± 1.3 (6)	78.1 ± 1.8 (6)
	R	76.3 ± 1.4 (15)		
Brain stem	L	70.2 ± 0.5 (7)	71.4 ± 1.1 (4)	71.3 ± 1.3 (4)
	R	69.9 ± 1.0 (8)		
Spinal cord	L	67.3 ± 1.4 (7)	67.4 ± 1.6 (5)	67.1 ± 0.9 (5)
	R	67.3 ± 1.4 (7)		

(C) 蛋白：総蛋白に関しては，大脳半球剔除ラットと正常ラットとの間に，いづれの部分に於ても，有意の差は見られなかったが，水溶性蛋白についてみると，右脳幹部に於いて，左右いづれの大脳半球剔除でも有意な減少が認められた。（表3）.

表4に各組織の全蛋白量当りのコルヒチン結合能を示した。対照にくらし，減少の傾向は見られず，殆んど等しいか或は増加の傾向を示し，特に右半球剔除ラットの左脳幹と右脊髄および左半球剔除ラットの右小脳と右脊髄に有意の増加を認めた。

(D) 脂質（表5）：検索した4成分のうち特にミエリンに特異的に多いセレブロシド＋サルファタイドおよびコレステロールは脳幹部に於て増加しており，右半球剔除ラットでは左右両側共に，左半球剔除ラットでは左側りに有意の増加を示した。ガングリオシド（脂溶性NANA）はおよそ減少の傾向を示す<表3> Concentrations of total and water-soluble proteins in C.N.S. of rat after hemispherectomy

(mg per g tissue wet weight)

	cerebrum l	cerebrum r	cerebellum l	cerebellum r	brain stem l	brain stem r
Total protein						
R. Hemi-spherectomy	109.7 ±7.2		109.3 ±11.5	111.5 ±11.1	103.9 ±11.6	104.2 ±10.6
L. Hemi-spherectomy		103.2 ±8.9	110.0 ±9.8	107.4 ±13.8	104.1 ±6.4	104.5 ±9.4
Control	103.4 ±9.9	105.0 ±10.6	107.4 ±11.2	107.7 ±11.0	107.3 ±9.4	108.1 ±8.6
Water-soluble protein						
R. Hemi-spherectomy	26.8 ±3.3		21.7 ±4.9	23.7 ±3.6	20.6 ±3.6	18.4 ±1.4
L. Hemi-spherectomy		25.6 ±4.0	23.0 ±5.1	21.7 ±4.9	18.8 ±2.4	17.8 ±2.9
Control	25.4 ±3.0	24.7 ±2.6	21.8 ±4.3	23.6 ±3.5	20.6 ±1.8	19.6 ±1.9

が，特に右半球剔除ラットの大脳と右側脳幹および左半球剔除ラットの左脳幹に有意の減少を認めた。又燐脂質（脂溶性燐）も，右半球剔除ラットで左小脳と左右脊髄に，左半球剔除ラットで，左右小脳と左脊髄に有意の減少を認めた。

(E) RNA（表6）：左右いづれの半球剔除においても残存側大脳，両側小脳に於て，又右側剔除に於てのみ右側脳幹に統計的に有意義な増加を認め，左右いづれの半球剔除に於ても脊髄の両側に有意の減少を認めた。

(G) 残存側大脳皮質切片の酸素消費および高濃度K^+の影響（表7）：K^+イオンの濃度にかかわらず酸素消費量に於て対照との間に差は認められなかった。<表4> Colchicine binding activity of C.N.S. of rat after hemispherectomy

(10^{-10}mole bound colchicine/mg protein)

	cerebrum l	cerebrum r	cerebellum l	cerebellum r	brain stem l	brain stem r	spinal cord l	spinal cord r
R. Hemi-spherectomy	3.34 ±0.52		2.19 ±0.16	2.03 ±0.34	2.52 ±0.12	2.44 ±0.36	1.96 ±0.14	2.15 ±0.29
L. Hemi-spherectomy		3.49 ±0.21	2.11 ±0.16	2.24 ±0.10	2.29 ±0.22	2.36 ±0.15	2.07 ±0.13	2.01 ±0.15
Control	3.35 ±0.17	3.36 ±0.23	2.08 ±0.17	1.94 ±0.27	2.15 ±0.22	2.14 ±0.28	1.86 ±0.23	1.67 ±0.22

以上の実験結果を整理し表8に示した。この表では，各構成々分について，対照との間に有意の差のないものを100，有意の増加或は減少を示したもののうちχの最も著しい値を採り，各々 >100，或は <100 の値で示した。又更に有意の差を示した部位も併記した。この表から，RNAが大脳，小脳，脳幹で増加し脊髄で減少することを除いて，他のものは不変か，変動を示すものは増加，或は減少のいづれか一

方の傾向のみを示すことが明らかである。即ち総蛋白量，水分含量は変化を示さず，増加の傾向は組織重量，コルヒチン結合能，コレステロール，セレブロシド＋サルファチドに於いて認められ，減少の傾向は水溶性蛋白，ガングリオシド，燐脂質に於いて認められる。このうちコレステロール，セレブロシド＋サルファチド，コルヒチン結合能（microtubules 蛋白）等神経線維要素がすべて増加していることは剔除後の機能，および脳の可塑性との関連に於て有意と考える。大脳および小脳に於けるRNA量の有意の増加の意義については現在検索中のDNA量の変動値についての結果と併せて考察したい。以上本実験に於て観察した生化学的変化が，大脳半球を欠除したラットの示す正常な行動の基礎の一部をなしている可能性は本実験の神経線維連絡増加を示す結果等から見て充分考え得られる。更に他の脳内物質および又の代謝の分析或は丸山等の細胞，細胞下規模での分析等を行うことにより，脳の代償機構，脳可塑性の本態の全貌が明らかにされるものと思われる。

〈表5〉

Content of lipid classes in C.N.S. of rat after hemispherectomy
(mg per g tissue wet weight)

	cerebrum l	cerebrum r	cerebellum l	cerebellum r	brain stem l	brain stem r	spinal cord l	spinal cord r
Cerebroside +sulfatide								
R. Hemi-spherectomy	4.9± 0.6		5.9± 0.6	6.3± 0.5	15.2± 2.8	13.7± 2.3	16.4± 1.2	17.0± 1.2
L. Hemi-spherectomy		4.9± 0.8	5.7± 0.3	5.8± 0.6	14.2± 1.2	13.1± 1.2	17.1± 0.8	16.8± 1.3
Control	4.5± 0.9	4.9± 0.9	5.5± 0.7	5.8± 0.6	12.6± 1.0	12.8± 1.1	15.9± 1.6	16.0± 1.2
Cholesterol								
R. Hemi-spherectomy	18.7± 0.8		18.9± 1.3	19.1± 1.6	38.4± 3.5	36.8± 1.8	43.8± 3.8	43.7± 4.2
L. Hemi-spherectomy		18.0± 1.8	17.8± 0.9	18.5± 1.6	38.1± 3.5	35.6± 1.1	45.1± 4.0	45.8± 3.8
Control	18.8± 1.2	19.8± 0.6	18.1± 1.2	19.1± 1.8	33.1± 3.5	32.7± 3.3	42.8± 3.5	43.3± 3.8
Lipid-bound NANA								
R. Hemi-spherectomy	0.605± 0.051		0.437± 0.097	0.447± 0.082	0.310± 0.046	0.301± 0.036	0.215± 0.033	0.227± 0.028
L. Hemi-spherectomy		0.666± 0.135	0.453± 0.103	0.436± 0.105	0.310± 0.030	0.308± 0.052	0.273± 0.059	0.289± 0.041
Control	0.656± 0.101	0.658± 0.078	0.503± 0.079	0.484± 0.088	0.347± 0.031	0.355± 0.034	0.232± 0.026	0.237± 0.027
Lipid-P								
R. Hemi-spherectomy	2.18± 0.12		2.12± 0.17	2.16± 0.21	3.40± 0.54	3.16± 0.31	3.35± 0.22	3.36± 0.26
L. Hemi-spherectomy		2.15± 0.25	2.06± 0.16	2.11± 0.19	3.02± 0.20	3.07± 0.22	3.62± 0.18	3.56± 0.32
Control	2.17± 0.11	2.23± 0.21	2.26± 0.18	2.30± 0.23	3.05± 0.21	3.04± 0.19	3.73± 0.21	3.75± 0.16

〈表6〉

RNA Content in C.N.S. of Rat after Hemispherectomy (mg per g tissue)

	Cerebrum L	Cerebrum R	Cerebellum L	Cerebellum R	Brain Stem L	Brain Stem R	Spinal Cord L	Spinal Cord R
Right Hemispherectomy	2.19 ±0.11		2.37 ±0.27	2.43 ±0.19	1.47 ±0.18	1.58 ±0.10	0.98 ±0.10	0.93 ±0.14
Left Hemispherectomy		2.17 ±0.16	2.33 ±0.20	2.37 ±0.18	1.54 ±0.14	1.51 ±0.12	1.00 ±0.07	1.00 ±0.07
Control	1.96 ±0.18	2.00 ±0.16	2.13 ±0.14	2.08 ±0.16	1.43 ±0.10	1.37 ±0.18	1.12 ±0.11	1.11 ±0.09

〈表7〉

Oxygen Consumption in Cortex Slices of Hemispherectomized Rat Brain
(μmole/g wet wt./hr)

	Krebs-Ringer	Krebs-Ringer + 50 mMK$^+$
Right Hemispherectomy	80.6 ± 5.5 (7*)	141.7 ± 16.2 (7*)
Left Hemispherectomy	80.3 ± 6.7 (8*)	133.6 ± 13.8 (8*)
Control	77.2 ± 4.4 (34*)	131.7 ± 14.0 (17*)

* Number of animal

〈表8〉

Changes in the Constituents of C.N.S. after Hemispherectomy

	% to the control	
Tissue weight	100 - 113	cerebrum, cerebellum
Water content	100	
Total protein per tissue weight	100	
Water-soluble protein per tissue weight	92 - 100	brain stem
Microtubules protein (colchicine binding activity) per total protein	100 - 130	*cerebellum, brain stem*, spinal cord
RNA per tissue weight	100 - 122 84 - 100	cerebrum, cerebellum, brain stem spinal cord
Ganglioside (lipid bound NANA) per tissue weight	86 - 100	cerebrum, brain stem
Phospholipid per tissue weight	90 - 100	cerebellum, spinal cord
Cholesterol per tissue weight	100 - 117	brain stem
Cerebroside + sulphatide per tissue weight	100 - 112	brain stem

— 文献 —

1. J.Folch,M.Lees & G.H.S.Sloane-Stanley, J. biol. Chem., 226(1957) 497. 2. D.Aminoff, Biochem.J., 81(1961)384. 3. T.A.Scott & E.H. Melvin, Anal. Chem.,25(1953)1656. 4. R.L.Searcy & L.M.Bergquist, Clin.Chem.Acta, 5(1960)192. 5. R.W.Keenan,G.Schmidt & T.Tanaka, Anal. Biochem.,23(1958)555. 6. M.Satake and S.Abe, J.Biochem.59 (1966)72. 7. R.C.Weisenberg,G.G. Borisy & E.W.Taylor, Biochemistry, 7(1968)4466.

7　ラット大脳 CNP 活性と学習行動との相関について

野村正彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

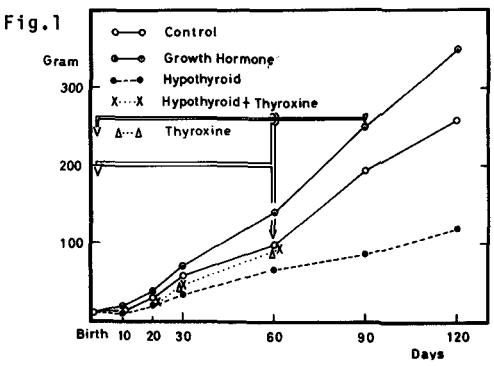
〔要　約〕
実験的甲状腺機能低下症ラットでは生后180日にわたり，大脳CNP活性が対照群に比し低値を示した。生后2日目より *Thyroxine* 注射を連日施し，甲状腺機能低下症に回復治療を施したものでは，CNP活性も回復する。亦生下時より *Bovine Growth Hormone* を2μg/g. *Body weight* 連日90日間にわたり投与したラットでは，脳重増加はさほど顕著ではないが，大脳CNP活性が明らかに上昇していることを認めた。甲状腺機能低下症ラットに生后2日目より *Bovine Growth Hormone* を注射すると，CNP活性はほゞ正常の値にまで回復することを認めた。
上記の各種ラットを用い，明度弁別オペラント学習を行うと，CNP活性が低下している甲状腺機能低下症ラットでは，極度に学習能力の低下が認められた。
一方CNP活性の上昇の見られた *Growth Hormone* 投与群では，学習能力も対照に比し良好で，大脳におけるCNP活性と学習能力との間に，強い相関関係のあることを認め，髄鞘形成が高次神経活動に大きな影響を持つことが示唆された。

中枢神経系における髄鞘形成不全と学習行動との関係を，生化学的に検索するために，甲状腺機能低下症ラットや *Thyroxine* (T_4)，*Bovine Growth Hormone* (G.H.) 投与ラットを用い，発育の各段階で脳の *Marker Enzyme* である *2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-phosphohydrolase* (CNP) 活性を測定しながら，同時に明度弁別オペラント学習を行い，CNP活性と学習能力との間に一定の相関関係を認めたので報告する。

〔方　法〕　Ⅰ. 実験動物の作製と飼育　1. 甲状腺機能低下症ラット：出生直后の Wistar 系ラット（出生后2時間以内）に，100μCi ^{131}I を腹腔内に注射して，*Radioiodine Thyroidectomy*（甲状腺剔除）を施し，これを飼育して甲状腺機能低下症ラットをつくり，発育の各時期に体重及び脳重を秤量し，生化学的な検索を加えるとともに，生后120日目に弁別学習を行った。　2. 甲状腺機能低下症治療ラット：甲状腺剔除を施したラットに，0.1μg/g. 体重の T_4 を生后より60日目まで毎日注射し，甲状腺機能低下症を治療した群と，2μg/g 体重の G.H. を生后より90日目まで注射した群をつくった[1.3.]。　3. 甲状腺ホルモン及び生長ホルモン投与群：対照群ラットに0.1μg/g 体重の T_4 を生后より毎日注射で投与した群と，対照群に2μg/g 体重の G.H. を毎日注射で投与した群を作製した。　4. 対照群：いづれも *Littermate* を用いて，実験に当てた。　Ⅱ. 脳内物質の生化学的定量　種々の実験群ラットの各発育時期に，深麻断頭後脳を剔出し脳内物質変化を検索した。髄鞘分画に局在するCNP活性は，Kurihara & Tsukada の方法[4.]に従い，剔出脳をガラスホモゲナイザーで Homogenate 後検出定量した。Ⅲ. オペラント弁別学習 (Brightness Discrimination)[2.5.] 生后120日目のそれぞれの実験動物を用い，1日23時間絶食させ，個々のケージに飼育した。Skinner Box は床上4cmの所

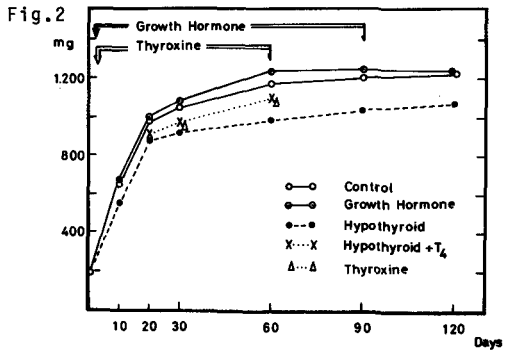
Body weight

Fig.1



Brain weight

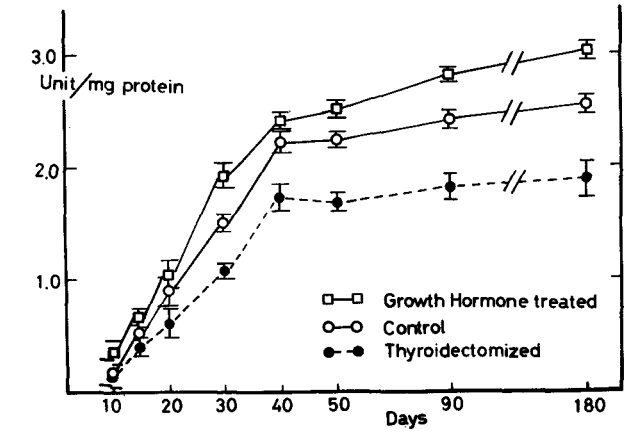
Fig.2



にBarがあり，その上に直径4cmの刺激呈示窓があって，これに光刺激が投射されるBarを一回押す毎に1個のPellet foodが出るようにセットして，初日は50回，以后31日30回の強化后弁別を開始した。S^+(2.5×10⁴ lx)の投射時Bar押しを行ったとき餌を出して強化し，S^-(0.5×10⁴ lx)の投射時Bar押しで餌を与えないようにする。各刺激の呈示時間は20秒間で，それぞれ5秒間のBlack-outを入れて10回のS^+，10回のS^-をGellermann系列に従ってランダムに呈示した。これを1日1sessionとし85%正反応率連続3日目のものを弁別規準完成とみなし，規準に達しないものは35 sessionで打ちきった。消去は同じスケジュールで行い，全ての反応を強化しない。1session 10回以下の反応数をもって消去完成とした。

〔〔結果及び考察〕〕　体重及び脳重の変化：図1に示す如く，対照は生后漸次体重増加を認めるが，甲状腺機能低下症では体重増加が著明に抑制され，生后120日目には対照の1/2から1/3程度であった。次にT4及びG.H.で回復試験を試みたものは，いづれもほゞ対照に近い値までもどった。次に対照ラットにT4投与したものでは，むしろ体重増加は少なく，G.H.投与のものでは体重増加は著明であった。脳重は図2に示す如く対照群では生后20日目まで著明な増加を認めた。甲状腺機能低下症ではいづれの時期でも脳重増加が低く，ほゞ10%程度小さい値を示した。甲状腺機能低下症にT4及びG.H.治療を加えたものではほゞ対照に近い値を示した。次に対照群T4を投与したものでは脳重も低い傾

Fig.3



Tab.1

The effects of Thyroxine and Growth Hormone on the 2,3-cyclic nucleotide 3-phosphohydrolase activity in Rat Brain

Condition	30 Days old Rats
Control	1.51± 0.06(24)
Hypothyroid(I^{131})	1.09± 0.10(31)
I^{131} + T_4	1.20± 0.08(4)
I^{131} + G.H.	1.50± 0.09(4)
Thyroxine (T_4)	1.34± 0.13(3)
Growth Hormone	1.89± 0.10(5)

U/mg. protein

Tab.2

PROGRAM FOR OPERANT BRIGHTNESS DISCRIMINATION TEST

Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓟ-d-Ⓝ-d-Ⓟ-d-Ⓟ-d-Ⓝ

Ⓟ: 20sec 2.5×10^{4} fl, positive discrimination stimulus
Ⓝ: 20sec 0.5×10^{4} fl, negative discrimination stimulus
d: 5sec Darkness
S^{+}: numbers of responses by Ⓟ
S^{-}: numbers of responses by Ⓝ
LZ: latency (sec)
During pretraining all rats were magazine trained, shaped to the bar press.

Fig.4

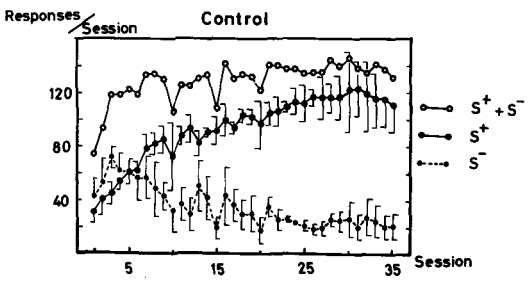


Fig.5

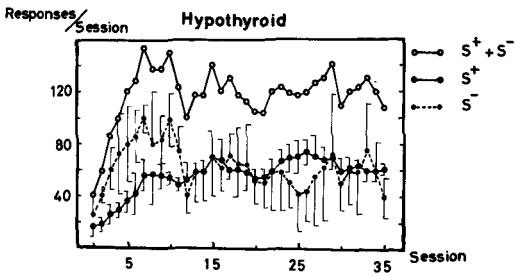
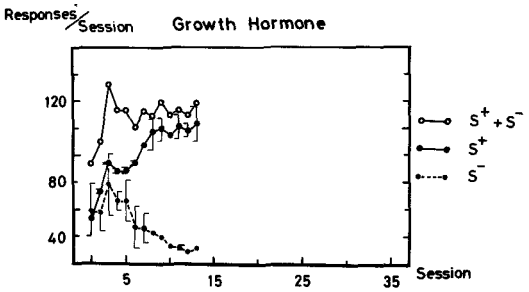
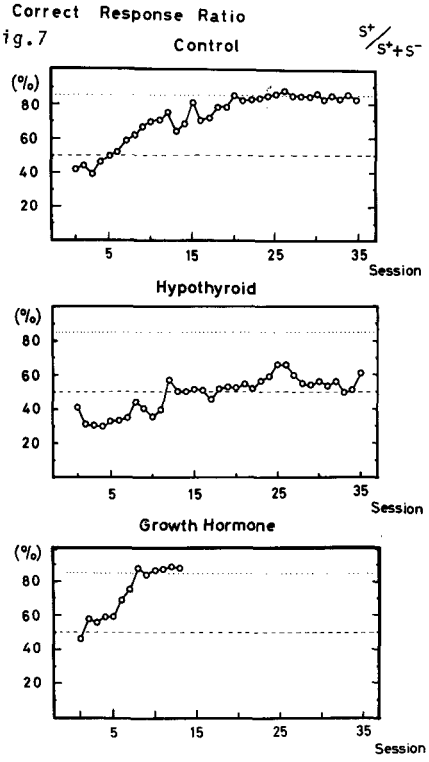


Fig.6



向がみられた。一方G.H.投与を行ったものでは脳重は増加の傾向を示した。即ち甲状腺機能低下症は，体重・脳重の面からみるとT4でもG.H.でも回復するようにみえる。　大脳CNP活性の変化：表1は生后30日目の各条件下のラット大脳内CNP活性を表示したものである。甲状腺機能低下症では対照に比して活性低下が認められた。更に回復試験を試みたものでは，かなり対照に近い値に回復を示し，体重・脳重と同様の結果を得た。即ち甲状腺機能の回復により，大脳における髄鞘形成不全の回復も認められた。又T4の過剰投与群ではCNP活性値はむしろ低く，G.H.の過剰投与群では活性は有意に高く，髄鞘形成亢進を思はせる。　図3は各条件下のラットCNP活性を発育に従って図示したもので，髄鞘形成時期に一致して酵素活性は急激に上昇を示し，生后40日目まで続いた。40日目以后はほゞ一定の値にとどまった。甲状腺機能低下症では髄鞘形成時期の活性上昇はゆるやかで，生后40日目以后でもなお対照に比し低い値を示した。これに反しG.H.投与群では活性上昇が急激であり，40日目以后もわずかの上昇を認めた。　明度弁別学習：　表2はGellerman sequenceを示したもので，$S^{+}\cdot S^{-}$それぞれ10回づつ計20回のBrightness Discriminationを1日1sessionとして弁別学習を行った。　図4は生后120日目の対照ラット5匹の弁別反応の平均値を示したもので，全期間を通じてResponseは120～140/sessionであり，S^{+}の反応はsession毎に増加の傾向を認め，S^{-}は減少の傾向が認められ，S^{+} S^{-}の弁別は第6session頃より明らかとなった。　図5は甲状腺機能低下症ラットのResponseを示しており，全反応数は120/session前后で対照とほゞ同じであ

Fig.7



ったが，全経過を通じ S^+ と S^- の分化はほとんど認められなかった。即ち甲状腺機能低下症群は第35 sessionsを行った時点でも弁別学習は全く形成されておらず，学習能力は極度に低下しているものと考えられた。　図6は生下時よりG.H.を90日間投与したラットの成績を示している。Responseは前二者とほゞ同様であるが，S^+ の反応は急激に増加し，S^- の反応は急激な減少を示した。そして弁別はすでに第3 sessionで認められ，第10 sessionでは85%の規準に達した。即ち学習能力が増強されたとみられる。　図7は正反応率を各種の実験群で対比させたもので，対照では第25 sessionで85%の規準に達しているが，甲状腺機能低下症では第35 sessionを終えた時点でも50%前後の値にとどまっており，弁別行動の形成は認められなかった。G.H.投与群は第10 sessionで85%規準に達し，弁別学習能力の増強が認められた。　図8は消去の経過を示すもので対照では8日目に総反応数累積290回で（S^+ 250, S^- 40）消去の完成がみられたが，甲状腺機能低下症では消去は認められず，G.H.投与群では4日目 164（S^+ 150, S^- 14）と非常に早かった。　図9は各種ラットの累積を代表的な実例で示したものである。

Fig.8

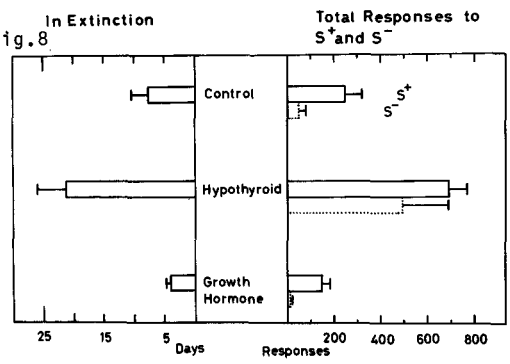
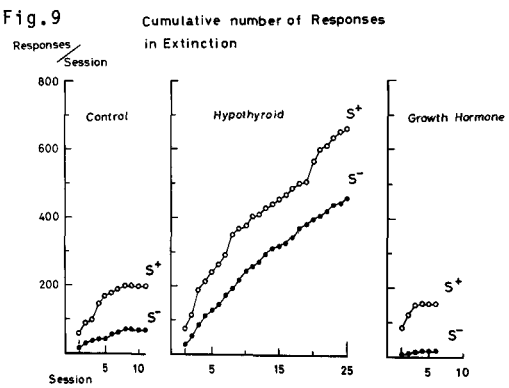


Fig.9



上記の如く，各種ラット群につき弁別学習を行はせたところ，髄鞘形成と学習能力との間に密接な関連性のある成績を得た。

〔文　献〕

1. Balázs,R.,Brooksbank,B.W.L.,Davison,A.N., Eayrs,J.T. & Wilson,D.A. Brain Research 15:219(1969)
2. Herrick,R.M.,Myers,J.L. & Korotkin,A.L. J.comp.physiol.Psychol 52:359(1959)
3. Krawiec,L.,Garcia Argiz,C.A.,Gómez.C.J., & Pasquini,J.M. Brain Research 15:209 (1969)
4. Kurihara,T & Tsukada,Y. J.Neurochem.14: 1167(1967)
5. 小川 隆，心評 10:23 (1966)

8 MAM 投与による実験的小頭症ラットの脳内物質変化と行動変化について

松谷 天星丸・岡田 澄子
永吉 道子・塚田 裕三
（脳麻研・生化）
野村 正彦
（鳳大・医・生理）

〔要 約〕

Methylazoxymethanol（MAM）を，妊娠15日目の母ラットに一回腹腔内注射することによって実験的小頭症ラットを作り，生後6ヶ月～12ヶ月に脳内物質の変化を検索し，併せて学習能力を追及した。(1)大脳におけるDNA含量は注射後8時間に於いて既に対照群の約50％に減少し，注射後5日目までその増加は抑制された。この胎仔が成熟した場合，大脳重量は対照群の約50％で，大脳当りのDNA含量も対照群のほゞ60％であった。しかし湿重量当りのDNA量は対照群とほゞ等しいことが示された(2) 小頭症ラットでは5HTの含有量が大脳半球においてのみ対照群に比して有意に高値を示した。又5HIAAの含有量も対照群に比して高い傾向を示した。然し胎生16日，又は胎生19日目にMAMを投与された場合には大脳重量，DNA量の低下及び5HT含有量の増加は何れも軽度であり，胎生15日目にMAMが投与された場合に最も強度の小頭症が出現した。(3) 生後6ヶ月及び9ヶ月の小頭症ラットについて，オペラント弁別学習を行った結果，6ヶ月，9ヶ月いづれの場合も軽度な弁別学習能力の低下を認めたが大脳重量の減少から予想された程大きな障害は認められなかった。

私共はSpatz & Laqueur ら(1)(2)に従い妊娠ラットにMethylazoxymethanol（MAM）を投与し，その母動物より得た仔動物に発現する小頭症ラットについて検索を行ってきた。昨年の本学会に於いて私共は，(3)脳の発育初期の終脳壁において，分裂期における円柱上皮細胞をMAMが選択的に傷害することを示し，その細胞の崩壊時におけるDNA量の変化と，その修復機構に役割を果すと考えられる胎仔脳におけるLysosomal Enzymeの変動について生化学的並びに形態学的面から検索を行い，円柱上皮細胞の崩壊に伴う脳内物質変化の一部について報告した。今回は6ヶ月～12ヶ月の小頭症ラットについて，DNA量とインドールアミンの変化について検索し，併せて小頭症ラットの学習能力について検討を行ったので報告する。

〔I〕実験方法 (1) 実験動物はWistar-Imamichi系白鼠を用い，一夜雌雄を交配させ，翌朝膣垢中に精子を確認したものを妊娠第一日と起算し，妊娠第14～19日までの各日において，午前10時頃に一回，MAM 20 mg/Kgを妊娠動物に腹腔内注射した。生後の実験を行ったものは自然分娩させ，胎生期に実験を行った動物については母動物をネンブタール麻酔下に開腹し胎仔を摘出した。なお成熟動物の脳内物質測定に当っては屠殺は浮血断頭によった。

(2) 脳内物質の測定： DNAはSchmidt & Thannhauserの変法により抽出を行い，Burton法によりDeoxypentoseを定量した。

表1 BRAIN WEIGHT OF MAM-TREATED RAT

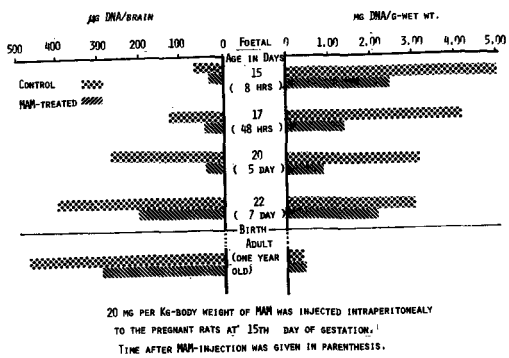
	CONTROL	MAM-TREATED
BODY WEIGHT		
ONE YEAR OLD (G)	563 ±44.7 (4)	447 ±28.7* (3)
20 TH G.D. (MG)	435 (10)	438 (10)
CEREBRUM WEIGHT		
ONE YEAR OLD (G)	1.31± 0.05 (3)	0.67± 0.03** (7)
20 TH G.D. (MG)	84.1 ± 5.66 (3)	52.2 ± 9.51* (8)
CEREBELLUM WEIGHT		
ONE YEAR OLD (G)	0.56 (2)	0.54 (3)
PROTEIN (MG/G-W.W.)	113.4 (2)	72.8 (3)
DNA (MG/G-W.W.)	0.34 (2)	0.41 (6)

MAM-20 MG/KG B.W. WAS INJECTED INTRAPERITONEALY TO THE PREGNANT RATS AT 15 TH DAY OF GESTATION.

* 0.02>P>0.01 ** P<0.01

その定量に当っては610, 650 mμの dichromatic reading 法に従った。蛋白の測定には Lowry 法を用いた。5-hydroxytryptamine (5HT) 及び 5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA) の定量は, Fisher, Kariya & Aprison らの方法(4)に従い約100mgの脳組織を用い, 20倍量のアセトン：N蟻酸 (95：5) で抽出し, 抽出液を蒸発乾固したものについて, 5HIAA は N·ブチル酢酸可溶分画に, 5HT は食塩水可溶分画にそれぞれ分別溶解した。5HIAA分画は更に食塩飽和塩酸溶液を加え, 振盪遠沈後水層を除き, 有機層にリン酸緩衝液を加え遠沈後水層に5HIAAを移行させた。5HT分画には更に硼酸緩衝液及びブタノールを加え遠沈後ブタノール層に対して更に飽和食塩硼酸緩衝液を加えて洗滌した後ブタノール層にヘプタン塩酸溶液を加え遠沈し水層に5HTを移行させた。5HIAA及び5HT分画について精製操作を行って得た5HIAA, 5HT水層分画についてそれぞれ濃塩酸を加えて終末濃度を3Nとし, 直ちに螢光法により300mμで励起し, 535mμの螢光強度を測定した。

図1



(3) オペラント弁別学習 (Brightness Discrimination Learning Test)：生後6ヶ月と9ヶ月の雄のラッテを実験群と対照群について各々5匹を用い, 1日23時間実験前に絶食させ, 強化終了後に1時間餌を与えた。実験動物は個々のケージで飼育した。Skinner Box は床上4cmの所にBarがあり, その上に直径4cmの刺激呈示窓があって, これに光刺激が投射される。Barを1回押す毎に1個のPellet-foodが出るようにセットし, 初日は50回, 以後3日間は30回の強化を行った後弁別学習を開始した。S^+ (2.5×10^4 f.l.) の投射時Bar押しを行ったとき餌が出るように強化し, S^- (0.5×10^4 f.l.) の投射時ではBar押しで餌を与えないようにする。各刺激の呈示時間は20秒間で, それぞれ5秒間のBlack-outを入れて, 10回の S^+, 10回の S^- を Gellerman 系列に従ってランダムに呈示した。これを1日1 Session とし5週間に亘って強化を行った。なほ5週間の強化を行った後は, 対照群, 実験群共に解剖し脳重を測定し, 小頭症であることを確認した。

II 実験結果及び考察

脳重 胎生15日にMAMを投与した場合, 胎生20日に於いてその胎仔の大脳重量は対照の大脳に比して有意に小さい値を示した。この胎仔脳が発育し, 生後1年の小頭症ラッテ脳では大脳重量は対照の大脳の半分であった。しかし小脳の重さは対照との間に差を認めなかった。(表1) なほ胎生16日以後にMAMを投与した場合には, 胎生15日に投与した場合の如く成熟ラッテに於て

表2. 5HT CONTENTS IN MAM-TREATED RAT BRAIN

μg/g-wet wt.

Brain Region	Gestation Day:	Administration of MAM on 15 th		16 th	19 th
	Age :	6 Month	12 month	12 month	12 month
Cerebral Hemisphere	Control	1.08±0.31 (6)	0.91	1.20	1.20
	MAM-treated	1.83±0.53* (7)	1.66	1.54	1.20
Remainder**	Control	1.56±0.19 (4)	-----	1.26	1.26
	MAM-treated	1.83±0.21 (4)	-----	1.58	1.51
Cerebellum	Control	0.50±0.10 (5)	0.36	0.32	0.32
	MAM-treated	0.53±0.13 (5)	0.27	0.33	0.46

20 mg/Kg body weight of MAM was injected intraperitonealy to the pregnant rats.

* $0.02>P>0.01$ **Remainder contained basal ganglia, brain stem, pons & medulla.

著しい大脳重量の低下は認められなかった。

DNA量　湿重量当りのDNA含量は妊娠15日で投与した場合，8時間後に既に対照の約50%に減少し，注射後5日目までDNA量増加の抑制がみられた。その後は再びDNA量の増加がみとめられた。しかし出生直前における大脳のDNA量はなほ対照群に比して湿重量当りで対照の70%に過ぎなかった。この胎仔が成熟した場合，1年後にはDNA量は大脳当りでは対照の約60%であったが，これを湿重量あたりでみると図1に示す如く対照との間に殆んど差は認められなかった。このことから単位重量当りの細胞密度は小頭症ラット脳と対照ラット脳とは殆んど差がないものと考えられた。胎生14, 15, 16, 17日目にそれぞれMAMを投与した場合，各々について注射後48時間目の大脳のDNA量を測定すると，DNA増加抑制の度合は，14, 15日に強くこのことは胎生14, 15日の胎仔脳で脳室壁で分裂期にある円柱上皮細胞のMAMの傷害をうけるものが最も多いことを示すものと思われる。

表3.　5HIAA CONTENTS IN MAM-TREATED RAT BRAIN

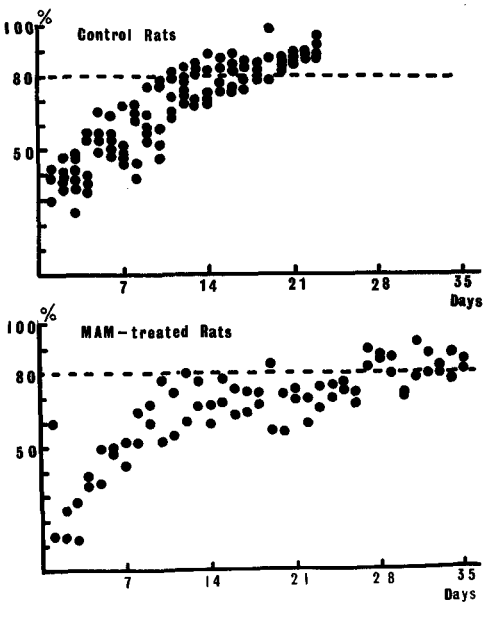
μg/g-wet wt.

Brain Region		Administration of MAM on			
	Gestation Day:	15 th		16 th	19 th
	Age :	6 month	12 month	12 month	12 month
Cerebral Hemisphere	Control	0.72±0.13 (6)	0.78	0.63 (2)	0.63 (2)
	MAM-treated	1.00±0.40 (6)	1.16	0.67 (2)	0.53 (2)
*Remainder	Control	0.99±0.16 (5)	-----	0.90 (2)	0.90 (2)
	MAM-treated	1.10±0.22 (5)	-----	0.91 (2)	0.87 (2)
Cerebellum	Control	0.33±0.09 (5)	0.47	0.20 (2)	0.20 (2)
	MAM-treated	0.36±0.05 (5)	0.56	0.19 (2)	0.20 (2)

20 mg/Kg body weight of MAM was injected intraperitonealy to the pregnant rats.
*Remainder contained basal ganglia, brain stem, pons & medulla.

5HT含有量　生後6ヶ月と12ヶ月の小頭症ラットについて，cerebral hemisphere, remainder, cerebellumの各部位について5HT, 5HIAAの含有量を測定した結果を表2, 3に示した。5HT含有量は胎生15日目にMAMを投与したものでは6ヶ月及び12ヶ月の小頭症ラットでcerebral hemisphereにおいて高い値を示し，特に6ヶ月のラットで有意差を認めた。しかしremainderおよびcerebellumでは対照に比して顕著な差は認められなかった。妊娠16日又は19日目にMAMを投与した場合には妊娠日数の増加に伴い，5HT含有量のcerebral hemisphereに於ける増加の割合は漸次減少し，胎生15日で投与したもので最も大きかった。このことはMAM注射後48時間における大脳のDNA量の低下の割合と平行する如くみえる。即ち大脳重量の低下，DNA量の低下，5HT含有量の増加の度合は胎生15日にMAMの投与をうけた動物に最も顕著であった。5HIAA含有量の増加は5HTに比して小さかった。

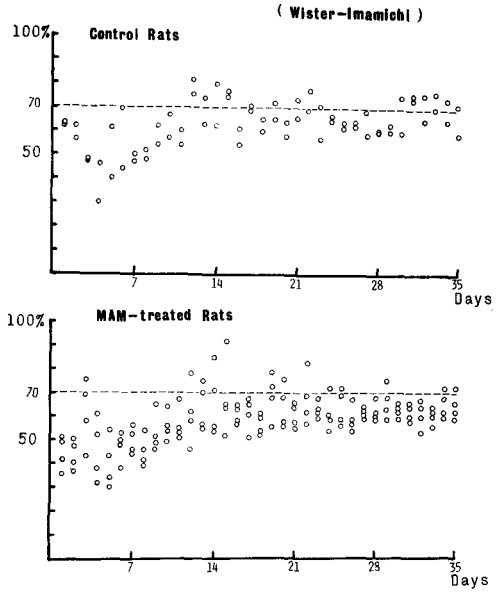
図2　Correct Response Ratio



オペラント弁別学習の成績　図2, 3は生後6月と9月との小頭症ラットについて光を條件刺激として行った弁別学習による結果を示したものである。S^+は正解落の数を表わし，$S^+ + S^-$はラットがBarを押した総回数を示す。従って$S^+/S^+ + S^-$の比は正解率を表わすものである。生後6ヶ月の動物では対照群の正解率は，学習開始後3週以内で

85%に達するが，実験群では正解率が80%のレベルに達するのにより多くの時間を要し，5回目で漸く80%のレベルに達した。このことから小頭症ラットの学習能力が対照群より劣ることが確められた。（図2）さらに，生後9月の小頭症ラットについて行った結果では，学習開始後5回目で正解率は対照群の殆んどのラットが70%以上に達したのに対し，実験群では70%のレベルに達するものが少なかった。（図3）しかし9ヶ月のラットでは6ヶ月のものに比し，対照群も学習能力が劣り，老化を思わせる成績であり，このことが同令のMAM投与の小頭症ラットの学習能力との差を小さくし，6ヶ月のもの程明らかな差を示さなかったものと解される。

図3 Correct Response Ratio
(9 Month Old)
(Wister-Imamichi)



6ヶ月群について強化終了後，消去実験を行った。即ちSなで強化せず，Bar押しの総数が1 Sessionで10回以内になるまでの日数は対照群では8日，実験群では23日で，消去により多くの日時を要した。以上のオペラント弁別学習の結果から，MAMによって発現した小頭症ラットが対照群に比して学習能力の劣ることが確められたが，大脳重量が対照の50%しかないこれらの小頭症ラットの学習能力が予想よりは劣っていなかったことは興味あることである。このことが大脳半球でのセロトニン含有量の増加と関連しているかも知れないが，この点は今後更に検討すべきである。Spatz[5]らが行った知能テストではMAMによる小頭症ラット（4ヶ月）で，実験群に有意の差でErrorが対照群より多く認められているが，彼等はmazeを用いており，Emotionalな影響を除外することは出来ない。私共は弁別学習を行い，学習能力のテストとしてはより適切なものであると考えている。私共は1年を経過した小頭症ラットに於いて湿重量当りのProtein（表1）及びその他RNA，lipid，脳内遊離アミノ酸のうちグルタミン酸，アスパラギン酸の大脳含有量が対照群より低く，脳内物質の面からみて全般的に発達不全を思わせる結果を得ているが，セロトニンのみが大脳半球で湿重量当り1.8倍に増加していることは興味あるところである。MAMの傷害によっておこる神経細胞の脱落は非セロトニン作動性の細胞が選択的におかされるためにセロトニン作動性の細胞の存在比率がより多くなった結果かも知れない。小頭症ラットにみられる大脳の細胞数の低下は主として第5層の細胞層の脱落であると云われており一定の細胞種が選択的におかされる可能性が考えられる。たぼ大脳湿重量当りのGABAの含有量並びに発育期における2'3'-Cyclic Nucleotid 3'-phosphohydrolase活性には変化は認められなかった。学習能力は大脳の一定部位の障害で選択的におかされるのか，大脳全体が学習能力に関与しているのかなぼ明らかではないが実験的小頭症動物を用いることにより今後この問題の解決に手がかりが与えられるかも知れない。

1) Spatz M. and Laqueur G. L. (1968) Proc. Soc. Exptl. Bio. Med. 127, 281 2) Matsumoto H. Spatz M. and Laqueur G. L. (1972) J. Neurochem., 19, 297 3) 松谷天星乳・塚田裕三・松山春郎・西屋敦醫 (1972) 神経化学 11, 48 4) Fisher C.A., Kariya T. and Aprison M.H. (1970) Comparative and General Pharmacology, 1, 61 5) Haddad R.K., Rabe A., Spatz M. and Valsamis M.P. (1969) Science, 163, 88

9 毛様・上頸神経節におけるアセチルコリン合成・分解酵素の成長に伴う変動

反町　勝・片岡喜由
奥野幸子
（愛媛大・医・生理）

〔要　約〕

家鶏の、エンブリオおよび孵化後29日迄のひよこを用い、毛様神経節および上頸交感神経節における、アセチルコリン合成、分解酵素の成長に伴った変化を調べた。

節前および節後神経共にコリン作動性である、毛様神経節では、ChAc活性は胎生14日目より急速に増加し、最大活性を示した孵化後29日には、胎生7日目の活性に比し、神経節当り、450倍、蛋白当りでは、90倍迄増加した。他方、AChE活性は、神経節当り7倍しか増加せず、蛋白当りでは変化は少くむしろ孵化後には減少した。

上頸神経節では、ChAc, AChE活性共、共に平行して、成長に伴った増加が見られた。

毛様神経節におけるChAc活性の変化は、節前神経終末に関する限り形態学的、電気生理学的所見と一致した。

序

家鶏毛様神経節には、毛様細胞、脈絡膜細胞の2種類の節細胞が存在する。前者におけるシナップス伝達は、化学的および電気的に、後者では化学的にのみ行われることが、Pilarらにより、電気生理的に明らかにされている。[1-4] 彼等によると、その内化学伝達は、コリン作動性であり、ノルアドレナリン作動性の関与はほとんどないといわれる。しかし、伝達物質である、アセチルコリン(ACh)の合成、分解酵素である、コリンアセチラーゼ(ChAc)およびアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の存在に関しては、AChEの組織化学的同定がなされているほか、文献が見当らない。

鳥類の毛様神経節における、成長に伴った、形態学的、電気生理学的変化についてくわしく報告されているが、生化学的に、合成、分解酵素がどのように変動するかは知られていない。中枢神経系においては、ChAc活性はコリン作動性ニューロンの末端となることは、一般的に受け入れられているので、今回、ChAc活性の変化と、すでに報告されている形態学的、電気生理学的変化がどのように関連するかについて検討した。毛様神経節においては、節前線維終末のみならず、節後線維終末においても、化学伝達は、コリン作動性であるので、酵素活性の変化は、節前線維終末および節後ニューロンの成熟過程を示すと考えられる。一方、上頸交感神経節では、節前線維のみコリン作動性であり、節後神経は、ノルアドレナリン作動性である為、コリン作動性神経終末の成熟を見るのに適しているかと考えられる。

実験方法

白色レグホン、エンブリオ及び ひよこを用いた。両神経節は、実体顕微鏡下で神経節の部分のみ取り出し、各1対を、0.3ml(毛様神経節)、0.2ml(上頸神経節)の、0.1%トリトンX 100液で、ガラスホモジナイザーを用いて、ホモジナイズした。酵素活性は、組織をとり出した日に行なった。

ChAc活性は Fonnum(1969)[5]の方法を、一部改変して行い、AChE活性は、acetylthiocholineを基質としたEllmanら(1961)[6]の方法によった。18日エンブリオ及び孵化後10日のひよこの両神経節ホモジェネートでは、コリンエステラーゼ(ChE)阻害剤である、DFP 1.6×10^{-5}M存在下でも、反応は阻害を受けなかったので両神経節では、AChEが全ChEのほとんどを占めると考えられ、従って以後の実験では、DFPを使用しなかった。蛋白は、Lowry(1951)[7]の方法によった。

結果

毛様神経節を同定し得た7日目のエンブリオにおいて、0.6 nmole/hr/pairの活性が見られ、14日迄変化は少なかったが、15日目より、孵化後11日迄ほとんど直線状に活性は増加した。蛋白当りの活性の増加速度は、さらに急速であり、孵化時には、最大値(孵化後29日)の2/3に迄達した。孵化時における活性は、1対の毛様神経節当り、90 nmole/hrであり、蛋白1mg当りの活性は、1.9 μmole/hrであった。後者の値は、ひよこ腰交感神経節[8]における値と同程度であり、中枢、末梢神経中最も高い。(Fig. 1) 他方AChE活性は、成長に伴って、やや増加したが蛋白当りの活性は、変化が少く、むしろ孵化後減少した。

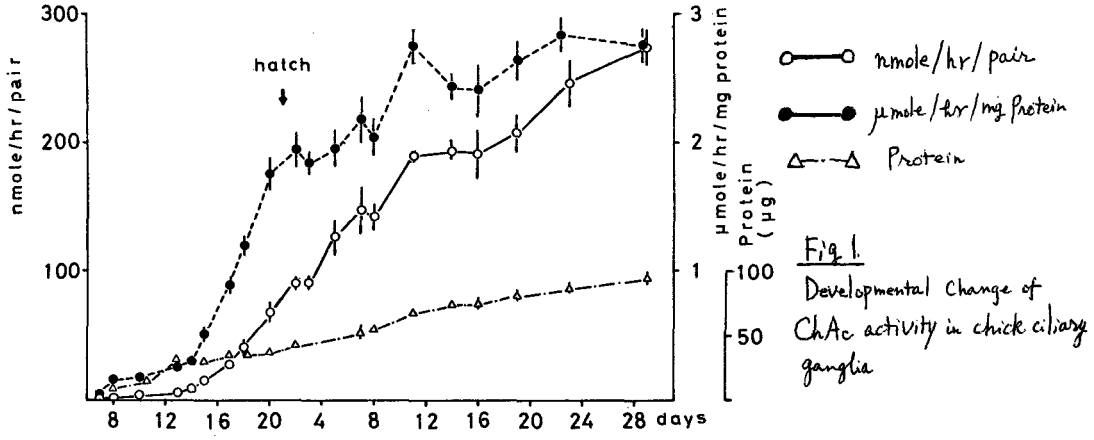


Fig. 1
Developmental Change of ChAc activity in chick ciliary ganglia

上頸交感神経節では、ChAc活性は、神経節を同定し得た13日目より増加が見られ、毛様神経節における と同様、孵化後29日に至る迄増加した。蛋白当りの活性は、孵化後13日迄増加したが、以後の変化は少ない。一方、AChE活性は、ChAc活性とほぼ平行して増加したが、蛋白当りの活性は、孵化後14日以後では、減少が見られた。(Fig. 2)

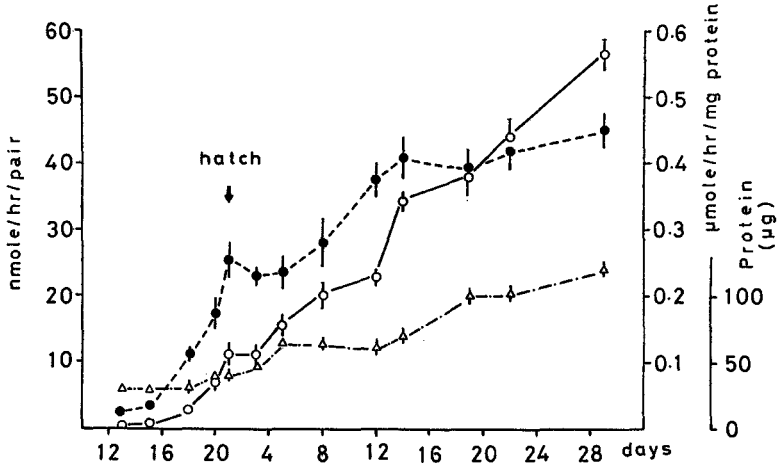


Fig. 2

Developmental change of ChAc activity in chick superior cervical ganglia

シンボルは、Fig. 1 と同じ。

考察

毛様神経節におけるAChの分布は、Pilarら[9]によって、節前線維終末に最も高く、次いで節細胞に高いことが報告されている。今回の実験で、AChの合成、分解に関与するChAc, AChEが見出された点は、彼等のAChについての報告と一致する。家鶏エンブリオの、脊椎神経節及び腰部交感神経節において、ChAc活性のピークは、2つの時期に見られること[8]、又シナップスの存在する証拠のない脊椎神経節及び視蓋において早期より、ChAc活性が見出されていること[8][10]より、ChAc活性が、シナップス伝達の形成とは必ずしも平行しないことが、Marchisioら[8][10]によって主張されている。しかし、毛様神経節における、ChAc活性の変化は、節前神経終末に関する限り、報告されている、形態学的[4]電気生理学的所見[4]と一致する点が多い。即ち、化学伝達は、胎生5日目に出現すること、形態的に、シナップス接合、シナップス小胞がこの時期に見られることとは、早期のChAc活性の出現と一致する。又ChAc活性は、14日目より急速に増加するが、形態的には、神経終末における小胞の数の著しい増加と、又電気生理的には、15日目迄は、電気的伝達は見られず、化学伝達のみであるという事実と極めて密接に関連する様である。

この実験の欠点は、節前神経終末、節後ニューロン夫々に存在する酵素活性を区別しえないことにあるが、節前神経終末のみが、コリン作動性である上頸神経節において早期に、ChAc活性が存在し、成長に伴って増加することから、毛様神経節においても節前神経終末のChAc活性は、早期に出現すると考えられる。しかし、腰部交感神経節では、ChAc活性の増加は2時期にみられることや、毛様、上頸交感神経節間の発生学的ちがいを考慮に入れると、簡単には論じえない。毛様神経節（エンブリオ13日目）の、培養を行った所、ChAc活性は、2日後に、30, 43%（2例）、5日後に、27%, 30%に減少したが、この条件下で、節前神経終末のみ変性し、節後ニューロンが活動していると仮定すると、ほぼ全体の70%の活性が、終末に在在すると推定される。この点は、今後の研究をまたねばならない。

上頸交感神経節では、ChAc活性とAChE活性の変化は、ある程度平行するが、毛様神

経節では、対照的であり、AChE 活性は、相対的に低く、蛋白当りの活性は、孵化後むしろ減少の傾向を示した。2つの酵素活性の変化が平行しない点は、家鶏の脊椎神経節、腰部交感神経節[8][11]、脊髄[12]においても認められており、少くともAChE 活性は、コリン作動性ニューロンの指標としては、不適切であることを示すと考えられる。

文献

(1) Martin, A.R. and Pilar, G. J. Physiol. (Lond) 168 443 (1963)
(2) Martin, A.R and Pilar, G. J. Physiol (Lond) 168 464 (1963)
(3) Marwitt, R, Pilar, G. and Weakly, J.N. Brain Res. 25 317 (1971)
(4) Landmesser, L. and Pilar, G. J. Physiol. (Lond.) 222 691 (1972)
(5) Fonnum, F. Biochem. J. 115 465 (1969)
(6) Ellman, G.L. et al Biochem. Pharmacol. 7 88 (1961)
(7) Lowry, O.H. et al J. biol. Chem. 193 265 (1951)
(8) Marchisio, P.C. and Consolo, S. J. Neurochem. 15 759 (1968)
(9) Pilar, G., Jenden, D.J. and Campbell, B. Brain Res. 49 245 (1973)
(10) Marchisio, P.C. and Giacobini, G. Brain Res. 15 301 (1969)
(11) Giacobini, G. et al J. Neurochem. 17 1177 (1970)
(12) Burt, A.M J. exp. Zool. 169 107 (1968)

10 軟体動物巨大神経細胞の電気活動に対する含硫アミノ酸類の作用
── 巨大アフリカ・マイマイ食道下神経節による──

竹内　宏・森　昭胤・高坂睦年
（岡山大・医・脳代謝研）
大森普爾
（岡山大・医・薬）

〔要約〕：1．巨大アフリカ・マイマイ（Achatina fulica FERUSSAC　）食道下神経節中に、周期的な自発発火を有する巨大神経細胞を同定し、その電気活動に対する42種の含硫アミノ酸とその関連物質の作用を観察した。細胞内誘導電位を直接観察するほかに、spike counterで、細胞の毎分あたりの自発発火spike　数を算えた。

2．42種の含硫物質のうち、L-homocysteic acid (L-HCA), L-homocysteinesulfinic acid (L-HCSA), S-((+)2-hydroxy-2-carboxy ethyl)-L-homocysteine　(OH(+)CE-L-HC)が、同定せる細胞の自発発火を抑制した。自発発火を完全に消失させるためのその臨界濃度は、上記の順に、$1\text{-}2\times10^{-5}$g/ml(5×10^{-5}-10^{-4}M), 5×10^{-5}-10^{-4}(3-5×10^{-4}M), 10^{-4}(4×10^{-4}M) だった。これら物質はすべて、homocystinuria　および cystathioninuria　の患者の尿中に見出されたものである。

3．この抑制作用を示すには、立体構造が関係する。上記の有効な3物質の立体異性体であるD-HCA, D-HCSA, OH(-)CE-L-HC は作用を呈さなかった。

4．Methionine metabolic pathway　上の主要含硫アミノ酸であるhomocysteine, homocystine, cystathionine, methionine, cysteic acid などは，いかなる作用も持たなかった。

5．GABA　の含硫誘導体を数種試みたが，同標本にいかなる作用も持たなかった。

Homocystinuria　および Cystathioninuriaは、methionine 代謝径路の先天性異常疾患である（1）（3）（4）（5）。われわれの一人 Ohmori たち（6）（7）（9）は、これらの患者の尿中に、数多くの異常含硫アミノ酸類の存在を証明した。われわれの研究で、これらの異常含硫アミノ酸類が、正常の methionine　代謝径路上の含硫アミノ酸類との比較において、神経細胞の活動性にどのような作用を呈するか検定した。またわれわれの一人 Takeuchi たち（8）はγ-amino butyric acid (GABA) の硫黄を含んだ誘導体のあるものが、高等動物の methionine sulfoxinine による痙攣を抑えることを証明した。われわれはこれらの物質の細胞レベルにおける作用を、軟体動物巨大神経細胞により検定した。

方　法：巨大アフリカ・マイマイ(Achatina fulica FERUSSAC)　を沖縄より移入し，これの食道下神経節を切り出してその結合織を除去し、巨大神経細胞群を露出させて、それの中に一個を同定した。同定の基準は、1．存在場処（右側 pallial nerveの起始部）、2．色調（褐色のpigmentを持つ）3．自発発火性（周期的な細胞膜電位の波動とともにグループ化した自発発火の繰返しが見られる）の3つである。本研究の全実験において、この一個の細胞が同定されて用いられた。この巨大神経細胞に微小電極を刺入し、前置増巾器を通じてブラウン管上で細胞内誘導電位を観察し，同時にspike counterを用いて毎分の自発発火spike 数を記録した。これを実験の指標として、これに対する42種の含硫物質（次ノ表）の作用を検定した。含硫物質は生理溶液（巨大アフリカ・マイマイのヘモリンフ中の無機イオン濃度により、処方された（11）。）に溶かして、直接標本に与えられた。これら溶液のpH は、7.2～8.3であった。

第1表。検定した含硫アミノ酸類とその関連物質。

EXAMINED SULFUR CONTAINING COMPOUNDS

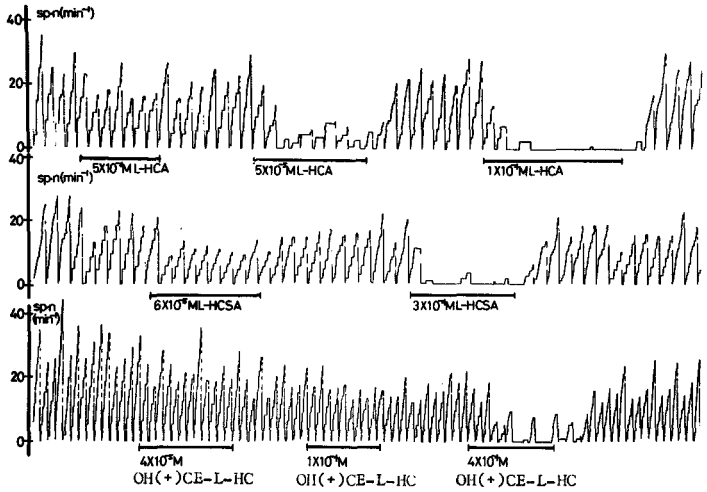
No.	NAME	MOLECULAR STRUCTURE
1	L-METHIONINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_3$
2	L-CYSTEIC ACID	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
3	TAURINE	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
4	L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SH$
5	L-CYSTINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$
6	DL-HOMOCYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SH$
7	DL-HOMOCYSTINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot S \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$
8	L-CYSTATHIONINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$
9	CYSTEAMINE	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SH$
10	TAUROCYAMINE	$H_2N \cdot C(NH) \cdot NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
11	L-HOMOCYSTEIC ACID	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
12	D-HOMOCYSTEIC ACID	〃
13	L-HOMOCYSTEINE SULFINIC ACID	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SO_2H$
14	D-HOMOCYSTEINE SULFINIC ACID	〃
15	S-CARBOXY METHYL-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_2 \cdot COOH$
16	L-CYSTEINE SULFINIC ACID	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SO_2H$
17	ISOVALTHINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH(CH \cdot (CH_3)_2) \cdot COOH$
18	DICARBOXY ETHYL-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH(CH_2 \cdot COOH) \cdot COOH$
19	ISOBUTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH(CH_3) \cdot COOH$
20	L-METHIONINE SULFONE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot S(O_2) \cdot CH_3$
21	S-(3-HYDROXY-3-CARBOXY-N-PROPYL)-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$
22	S-(2-HYDROXY-2-CARBOXY ETHYL)-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$
23	S-((+)2-HYDROXY-2-CARBOXY ETHYL)-L-HOMOCYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$
24	S-((-)2-HYDROXY-2-CARBOXY ETHYL)-L-HOMOCYSTEINE	〃
25	S-(3-HYDROXY-3-CARBOXY-N-PROPYL THIO)-L-HOMOCYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot S \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$
26	S-(3-HYDROXY-3-CARBOXY-N-PROPYLTHIO)-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$
27	S-METHYL-L-CYSTEINE	$H_3C \cdot S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$
28	S-(2-CARBOXY-1-METHYL ETHYL)-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S \cdot CH(CH_3) \cdot CH_3 \cdot COOH$
29	S-(2-CARBOXY-1, 1-DIMETHYL ETHYL)-L-CYSTEINE	$HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_3 \cdot S \cdot C(CH_3)_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$
30	L-METHIONINE METHYLSULFONIUM CHLORIDE	$H_3C \cdot SCl(CH_3) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$
31	GLUTATHIONE	$H_2N \cdot CH(COOH) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CONH \cdot CH(CH_2 \cdot SH) \cdot CONH \cdot CH_2 \cdot COOH$
32	DL-2-AMINO-3-HYDROXY PROPANE SULFONIC ACID	$HO \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
33	DL-SODIUM-3-AMINO-1-CARBOXY PROPANE SULFONATE	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(SO_3Na) \cdot COOH$
34	DL-SODIUM-3-AMINO-2-SULFO PROPANE SULFONATE	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(SO_3H) \cdot CH_2 \cdot SO_3Na$
35	DL-4-AMINO-2-PHENYL THIO BUTYRIC ACID	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(SC_6H_5) \cdot CH_2 \cdot COOH$
36	DL-4-AMINO-3-METHYL THIO BUTYRIC ACID	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(SCH_3) \cdot CH_2 \cdot COOH$
37	DL-3-AMINO-2-HYDROXY PROPANE SULFONIC ACID	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
38	DL-4-AMINO-3-SULFO BUTYRIC ACID	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(SO_3H) \cdot CH_2 \cdot COOH$
39	DL-2-AMINO-3-BROMO PROPANE SULFONIC ACID	$Br \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
40	DL-3-AMINO-2-CARBOXY PROPANE SULFONIC ACID	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(COOH) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$
41	DL-3-AMINO-2-SULFO PROPYLAMINE	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(SO_3H) \cdot CH_2 \cdot NH_2$
42	DL-3, 3'-DITHIO-BIS-4-AMINO BUTYRIC ACID	$HOOC \cdot CH_2 \cdot CH(CH_2 \cdot NH_2) \cdot S \cdot S \cdot CH(CH_2 \cdot NH_2) \cdot CH_2 \cdot COOH$

上記の物質が用いられた濃度は、立体構造上単体である場合には 10^{-4} (g/ml)，DL- 混合物の場合には 2×10^{-4} であった。下線を引いた 物質のみが、同定せる細胞に顕著な抑制作用を呈した。（1）和光純薬製、（2）吉富製薬製、（3）東京化成製、（4）われわれの研究室で合成、（5）興和新薬製、（6）山内製薬製、（7）科研化学の研究室で合成。

この範囲のPHの変化のみでは、実験の指標にいかなる変化も与えなかった。実験は室温22～24°Cでおこなわれた。

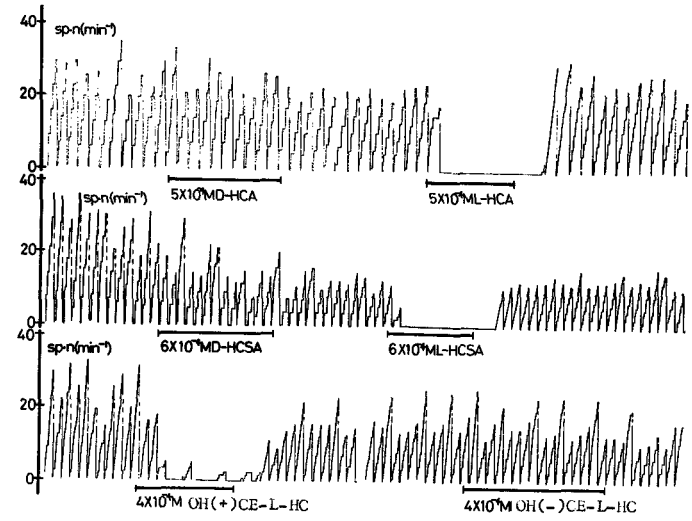
結果：第1表に掲げた42物質のうち、L-HCA，L-HCSA，OH(+)CE-L-HC（正式名称は要約2．を参照）の3物質のみが、同定せる細胞の自発発火に抑制作用を呈した。これら3物質が作用を示す臨界濃度については、要約2、を参照されたい。臨界濃度以上のこれら物質を標本に投与すると，同定せる細胞は大したsynaptic noiseの発生なしに、細胞膜の過分極を生じ、次第に自発発火 spike の数を減じ，やがて全くそれを消失するに至る。その作用の発現潜時は1分以内であり、その発現の様式により、この抑制作用は、同定せる細胞膜に対する直接作用と考えられる。

第1図. L-HCA, L-HCSA, OH(+)CE-L-HC の作用。



縦軸：毎分の自発発火 spike 数。横軸：時間経過、各histrogram は1分。上図：10^{-6}g/ml(5×10^{-6}M), 10^{-5}(5×10^{-5}M), 2×10^{-5}(10^{-4}M), L-HCA の投与。
中図： 10^{-6}(6×10^{-5}M), 5×10^{-5}(3×10^{-4}M) L-HCSA 投与。
下図： 10^{-5}(4×10^{-5}M), 3×10^{-5}(10^{-4}M), 10^{-4}(4×10^{-4}M) OH(+)CE-L-HC

第2図. 立体構造の相違による作用の差。

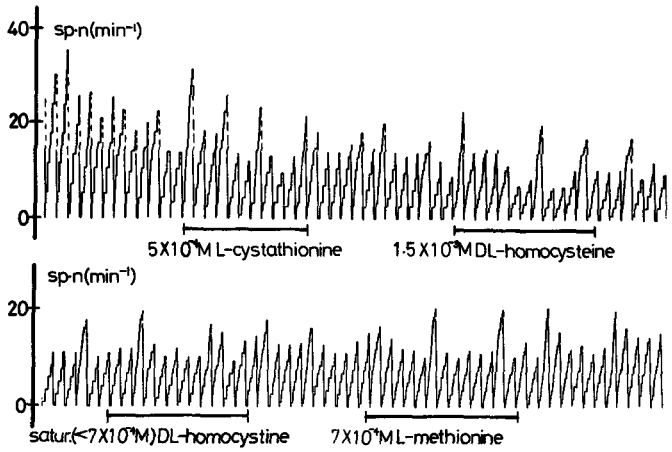


縦軸：毎分の自発発火 spike数。横軸：時間経過、各 histgram は1分。上図：10^{-4}g/ml(5×10^{-4}M) D-HCA ならびに L-HCA 投与。
中図：10^{-4}(6×10^{-4}M)D-HCSAならびに L-HCSA 投与。
下図：10^{-4}(4×10^{-4}M) OH(+)CE-L-HC ならびにOH(-)CE-L-HC投与。

上記3物質のうちでは、L-HCA がもっとも強い抑制作用を呈した（第1図）。この抑制作用を示すには、物質の立体構造が関係する（第2図）。すなわちD-HCA, D-HCSA は同定せる細胞に全く作用を示さず、OHCE-HC には4種の立体異性体があるが、OH(+)CE-L-HC(L-homocysteine と (+)chlorlactic acidより合成)以外のものは、いかなる作用も持たなかった。Methionine pathway 上の正常な主要含硫アミノ酸類は、いかなる作用も呈さなかった（第3図）。また高等動物で methionine sulfoximine 痙攣を抑える2物質（8）を含むところの含硫 GABA 誘導体11種は、いかなる作用も呈さなかった。

考　察：1、Walker たち（12）がAch sensitive neurone において、Ach の他にこれの agonist として、nicotine muscalineそして butyryl-cholineに Ach と同様の作用があることを証明した。同様にして，本研究で抑制作用を証明された 物質は、これらに構造上の類似がみられる点より、同定せる神

第3図。Methionine 代謝経路上の主要含硫アミノ酸類の投与。



縦軸：毎分の自発発火 spike 数。横軸：時間経過、各 histogram は1分。上図：10^{-4}g/ml(5×10^{-4}M) L-cystathionine ならびに 2×10^{-4}(1.5×10^{-3}M) DL-homocysteine 投与。下図：飽和 (<7×10^{-4}M) DL-homocystine ならびに 10^{-4}(7×10^{-4}M) L-methionine 投与。

経細胞の抑制性伝達物質の agonist として理解されよう。また上記3物質の1つが抑制物質である可能性も否定出来ない。

2. 周知のように、homocystinuria は cystathionine synthetase の先天性欠落、cystathioninuria は cystathionase の欠落である。正常な methionine pathway 上の主要含硫アミノ酸類がいかなる作用も呈さないのに、上記疾患患者の尿中に見出された3含硫物質が、1つの軟体動物巨大神経細胞の活動性に明らかな作用を呈したことは、興味ある問題である。上記2種の代謝性疾患には、多くの異常含硫物質の産生が推測される。これら疾患の病因解明のためには、これら異常含硫物質の作用について、多くの指標により検討されなければならない。

3. Curtis たち（2）は spinal interneurone に対するアミノ酸類の作用を検定した。そこでは含硫物質として HCA と Cysteic acid が検定されている。これらは興奮作用を有し、しかも D-型の作用が L-型よりも強いと云う。これはわれわれの結果と異なるが、細胞により感受性ある物質の pattern が異なる1つの例であろう。

4. 軟体動物巨大神経細胞への含硫アミノ酸類の作用には、Parmentier たち（10）の仕事がある。この場合も用いられた細胞が違うので、結果はわれわれと一致しない。

文　献：1) Carson, N.A.J.& Neill,D.W., Arch. Dis. Childh., 37, 505 (1962).

2)Curtis, D.R. & Watkins, J.C., J.Physiol. (Lond.), 166, 1 (1963).

3)Frimpter, G.W., Haymovitz, A. & Horwith, M., New Engl. J. Med. 268, 333 (1963).

4)Gerritsen, T. & Waisman, H.A., Pediatrics, 33, 413 (1964).

5)Harris, H., Penrose, L.S. & Thomas, D.H.H., Ann.hum.Genet., 23, 442 (1959).

6)Kodama, H., Ohmori, S., Suzuki, M. & Mizuhara, S., Physiol.Chem.&Physics, 2, 287(1970).

7)Kodama, H., Ohmori, S., Suzuki, M. & Mizuhara, S., Physiol.Chem.&Physics, 3, 81 (1971).

8)Kojima, K., Taira, M., Someyama, K. et Takeuchi, H., C.R.Soc.Biol.(Paris),166,1197(1972)

9)Ohmori, S., Kodama, H., Ikegami, T. & Mizuhara, S., Physiol.Chem.Physics,4, 286(1972).

10)Parmentier, J. & Case, J., Comp.Biochem.Physiol., 43A, 511 (1972).

11)Takeuchi, H., Morimasa, T., Kohsaka, M., Kobayashi, J. et Morii, F., C.R.Soc.Biol. (Paris) sous presse.

12)Walker, R.J. & Hedges, A., Comp.Biochem.Physiol., 24, 355 (1968).

11 手綱核 — 脚間核路（反屈束）のコリン作動性線維

片岡喜由・反町勝・奥野幸子
（愛媛大・医・生理）
水野昇
（京大・医・解剖）
中村豊
（Max-Planck脳研）

〔要約〕

アセチルコリン(ACh)の合成酵素，コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAc)の活性は従来，新線状体に最も高いとされていたが，その部位別分布を更に詳しく検討してみると，脚間核においては新線状体の約2倍にも達することが明らかとなった。これは脚間核に強力なコリン作動性線維支配が存在することを示唆する。一方解剖学的には，脚間核への入力は手綱核—脚間核路(反屈束)が代表的なものであることが知られているので，手綱核の焼灼破壊が脚間核の上記酵素及びGABA合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)活性にどのような影響を及ぼすかを追究した。手術後約1週間で脚間核のChAc活性は平均37%以上消失したが，GAD活性にはほとんど変化がみられなかった。更に中隔部や視索前野の焼灼破壊は，手綱核と脚間核のChAc活性を部分的に減少せしめた。又これらの変性手術後，脚間核においてシナップスの異型的な変性像が多数みとめられた。以上の結果から，脚間核を支配するコリン作動性線維のほとんどは手綱核から出発して反屈束に含まれること，更にその一部は中隔部や視索前野を去来し視床髄条に入って手綱核を支配するか，又は通過し反屈束線維に合流することが強く示唆される。一方脚間核を支配するGABA作動性線維の起原は核内介在ニューロンか，上記諸核以外の神経核でその線維は反屈束に含まれない可能性が強い。

AChは化学伝達物質の一つとして，脊髄のレンショウ細胞や神経—筋接合部ではすでに確定されている感が強いが，脳ではニューロン網が複雑に結合されていることによる技術的困難さから，AChを明確に同定できる線維群はまだみとめられていない。しかしその特異的な部位別分布[1]や細胞化学的方法によるシナプトゾーム画分[2]，それに特徴ある生理・薬理作用から脳の特定線維群ではAChが伝達物質として機能していることは充分考えられる。我々は脳のコリン作動性線維を一つ一つ同定することを目的として，ヒヒ脳のChAc活性を詳細にしらべた結果[3]，脚間核Interpeduncular nucleus (Ipd)に約20 mmoles ACh合成/kg/hrの活性をみとめたが，これは従来から最高値と報告されている新線状体のそれの約2倍であった。解剖学的にもIpd支配の大きな線維束の一つとして手綱核Habenula (Hb)より出発する反屈束Fasciculus retroflexusがあるのでここに注目して以下の実験を行った。

実験方法

成熟ラット，ウサギを用いた。ネンブタール麻酔後，定位脳固定を行い，両側Hb，中隔Septum (Sp)又は視索前野Preoptic area (PO)の焼灼破壊をほどこした。術後経日的に動物を断頭し全脳をとり出した後，目的とする神経核をbladeで切出したが，Hbは尤石別位にIpdはmedialに位置するため両側併せて採取した。重量は各1mg前後であった。脳残部は焼灼の程度をたしかめるための組織標本用に保存した。切りおとした組織は直ちに100μl，0.25% Triton-X溶液でホモジネートとし酵素活性を測定した。実験の一部に対照として新線状体(尾状核頭部)も採取した。

ChAc活性は放射活性 Acetyl CoA を用いて McCaman と Hunt の法[4]，又は Fonnum の方法[5]に従った。アセチルコリンエステラーゼ Acetylcholinesterase (AChE)活性は Ellman らの比色法[6]で測定した。GAD活性は carboxyl-^{14}C-glutamate を基質に用い，産生する放射活性 CO_2 の量から見積った。[7]

実験結果

(1) Ipd と新線状体の ChAc 活性

Ipd と新線状体での ChAc 活性をウサギ，モルモット，ヒヒ，ラットで測定した結果を表Ⅰに示す。新線状体は便宜的に尾状核頭部（Cd）に限った。表に示すように，ChAc活性は Ipd，Cd 両核においてこれら4動物種の間に至り立った傾差はみとめられず，大凡 Ipd の活性は Cd のそれの約2倍である。これは Ipd に強力なコリン作動性線維が集っていることを強く示唆するものである。

表 Ⅰ.（単位：m moles ACh合成/kg/hr）

	ウサギ	モルモット	ヒヒ	ラット
Ipd	22.2 ± 2.2 (4)	20.2 ± 1.8 (4)	18.8 ± 2.5 (3)	22.7 ± 1.5 (12)
Cd	12.7 ± 1.2 (4)	10.2 ± 0.6 (4)	8.4 ± 0.5 (3)	9.1 ± 0.8 (8)

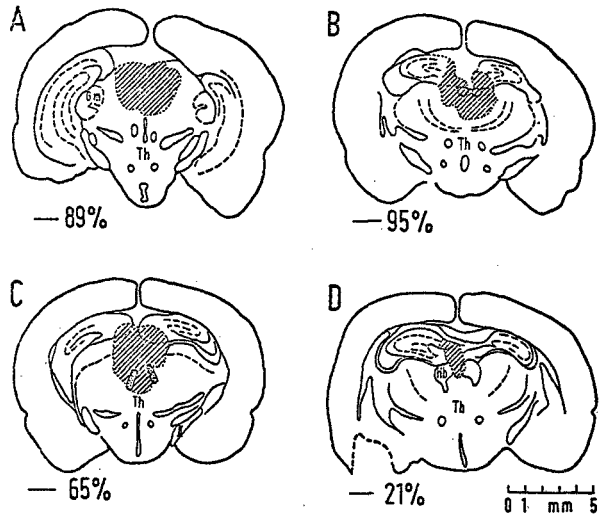
この Ipd における ChAc 活性は大脳皮質（Area 32），黒質，Pyramis のそれの 30, 50, 100 倍の強さであり，従来多くの研究者により報告された脳内 ChAc 活性のいずれよりも高いものであった。

(2) Hb 燒灼が Ipd 酵素活性に及ぼす影響

Hb 両側破壊後1週間で，ChAc活性は Ipd で有意の差をもって減少する。減少の程度は Hb 変性の程度に依存するが図Ⅰ, A, B の様にほぼ完全に破壊されている場合は Ipd の ChAc活性はほとんど残らない。反面図Ⅰ, D. のようにうまく標的されない場合の減少は部分的である。この意味するところは Ipd を支配するコリン作動性線維が大部分，反屈束にあり，Ipd 内の介在ニューロンや，反屈束以外の線維系は除外されることになる。この ChAc 活性の減少は術後1日目にすでに現出しはじめ，術後3日目には，50%の活性消失がみられた場合もあった。通常神経細胞の変性がその軸索末端に及ぶ期間は1週間以内とされ，transsynaptic な二次ニューロンの変性には長時日が必要とされることから，Ipd の ChAc 活性は反屈束末端に大部分が局在しているとみて支障ないように思われる。

術後1週間の酵素活性値の平均を表Ⅱにまとめた。Ipd の ChAc活性の Hb破壊後の減少率は9例の平均値でも 80%以上に及ぶが，Cd では活性の変化に有意の差はなかった。したがって Hb 破壊操作による非特異的な影響は ChAc 活性については除外できよう。一方 AChE 活性も Ipd で約 20% の減少がみられる。研究者によってはコリン作動性線維の標識に AChE 活性を用いることもしばしば見られるが，AChE は終末 bouton 局在はさだかでなく細胞体，シナプス後膜にもみとめられ ChAc 活性ほど適切な示標とはいえない。[1] GAD 活性は Hb 破壊後，Ipd, Cd ともにその減少をみとめなかった。Ipd における GAD 活性値は約 15 mmoles GABA 合成/kg/hr（表Ⅱ）で脳内ではかなり高い値であるが，Ipd を支配する GABA 作動性線維は反屈束には含ま

図 I



れず，その起原は，核内介在ニューロンが反屈束に関係しない他の神経核に求めざるを得ない。
又、新線状体には ChAc，GAD 両活性共に脳内では高い部位にぞくするが，大脳皮質除去，視床破壊では，これら酵素活性は減少しなかった。したがって新線状体，内のコリン作動性，GABA 作動性線維は核内介在ニューロン，又は反回性軸索分枝のものである可能性が強い。

表 II

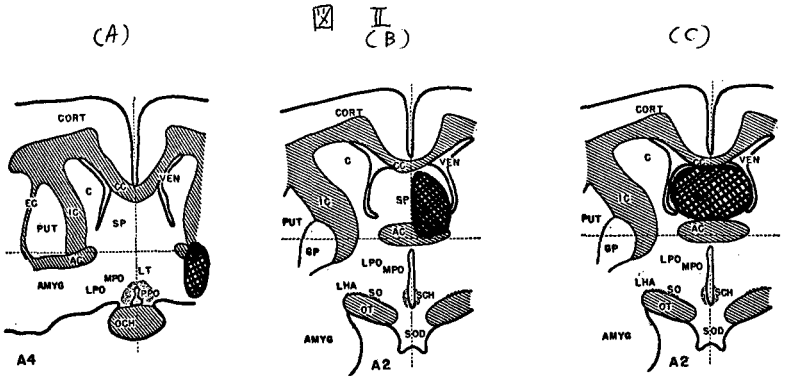
	Ipd			Cd		
	対照	P	術後	対照	P	術後
ChAc	22.7±1.5(12)	<0.001	3.1±0.7(9)	9.1±0.8(8)	N.S.	9.5±0.9(9)
AChE	1.56±0.20(6)	<0.05	1.15±0.06(18)	2.97±0.41(4)	N.S.	3.04±0.23(16)
GAD	18.7±2.3(6)	N.S.	17.0±2.6(9)	12.9±1.3(6)	N.S.	14.4±1.8(9)

(NS; $P>0.05$)

(3) SP 又は PO 破壊が Ipd 酵素活性に及ぼす影響

従来の解剖学的所見によると反屈束線維は必ずしも全部が手綱核から出るわけではなく，その一部は SP や PO から出て視床髄条 Stria medullaris に入り手綱核を通過して反屈束に入るものもあるという。そこで次の段階として SP 又は PO 破壊が Ipd，Hb の酵素活性にどのような影響をもたらすかを調べてみた。図II(A)のように，特に右側の PO が破壊されると同側の Hb と共に，Ipd の ChAc 活性が部分的に減少した。又(B)の様に片側の SP 破壊で手術側 Hb と共に，Ipd の ChAc 活性の減少もみられた。(C)は両側 SP がほぼ完全に破壊されたが Hb での酵素活性の減少は両側共 50% 以上に達した。これらの結果から明らかなように Ipd 支配のコリン作動性線維は大部分が Hb 由来であるとしても，他の一部は SP 又は PO より出て Hb を経ず通過する

図 II



Ipd	−41 %	Ipd	−24%	Ipd	−19 %
Hb(r)	−69 %	Hb(r)	−48%	Hb(r)	−54 %
Hb(l)	−26 %	Hb(l)	−15%	Hb(l)	−61%

ものもあるようである。又 SP. PO 由来のコリン作動性線維は視床髄条に入って恐らく同側の Hb をも支配する可能性が強い。(8)

Hb破壊後の Ipd の電子顕微鏡的観察によるとシナップスの典型的変性像が多数みられるが変性シナップス内の小胞が spherical か elongated であるかは今後の検索が必要である。又当然のことながら、反屈束や視床髄条について ACh を用いた電気生理学的検討が必要とされる。少くとも生化学的には反屈束は脳内での代表的なコリン作動性線維系として、その価値が高まるものと思われる。

文献

(1) Hebb, C.O. : Physiol. Rev. 37 196 (1957)
(2) Whittaker, V.P. : Progress in Biophysics and Molecululer Biology. 15 41 (1965)
(3) kataoka, k., Nakamura, Y. and Hassler, R. : Brain Res. in press (1973)
(4) McCaman, R.E. and Hunt, J.M. : J. Neurochem. 12 253 (1965)
(5) Fonnum, F. : Biochem. J. 100 479 (1966)
(6) Ellman, G.L. et al : Biochem. Pharmacol. 7 88 (1961)
(7) kataoka, K. et al : Exp. Brain Res. in press (1974)
(8) kataoka, k., Nakamura, Y. and Hassler, R. : IV Int. Nat. Meet. Neurochem. Abst 408. (1973)

12 CoA サイクリング ── CoA およびアセチル CoA の酵素的微量定量法──

加 藤 尚 彦

（東大・医・脳研）

〔要 約〕

Phosphotransacetylaseと Citrate synthetaseの2市販酵素を用いて、CoAおよびアセチルCoAの微量定量法を開発した。過剰量のアセチル-Pとオキザル酢酸の存在下で、微量のCoAとアセチルCoAはこ酵素によりサイクリックに反応する。微量のCoAとアセチルCoAに比例して toichiometric」に増幅された量の反応生成物（クエン酸とPi）が得られる。Aconitase, Isocitrate dehydrogenaseとNADPを用いて、生成クエン酸を定量的にNADPHに転換し、螢光測定を行った。またCoAとアセチルCoAが混在する場合、N-エチルマレイミドを用いてCoAをほとんど除去し、アセチルCoAのみを測定した。この測定の特徴は、(1)CoAおよびアセチルCoAを前もって分離精製する必要がない。(2)CoAとアセチルCoAが混在してもまずその和を測定し、つぎにCoAを除いてアセチルCoAのみを測定出来る。両者の差よりCoAの値が得られる。(3)最高増巾率は約20,000倍で、10^{-13} mol（脳湿重量にして25 mg）まで測定可能である、などである。この方法を用いて成熟マウス脳のCoAとアセチルCoAを測定し、CoA：13.7×10^{-6} mol/kg 湿重量（大脳，以下単位は同じ）、8.3×10^{-6}（小脳），アセチルCoA：3.3×10^{-6}（大脳）、4.3×10^{-6}（小脳）の値を得た。

CoAとアセチルCoAは、Choline acetylase の活性を維持し制御する因子であることが知られて来た。[2,10,11] このことは in vivo でのCoAとアセチルCoA濃度がアセチルコリンレベルを支配する可能性を意味し、両物質の脳内濃度を正確に知ることが重要となる。両物質の脳内濃度は低く、従来の方法[1,4]はこの目的には適合しなかった。そこで新しく正確で簡単な微量定量法を工夫した。

〔酵素と測定試料の調製〕 Phosphotransacetylase(Acetyl-CoA:Orthophosphate acetyltransferase,EC 2.3.1.8), Citrate synthetase(Citrate oxaloacetate-lyase(CoA-acetylating) EC 4.1.3.7), Isocitrate dehydrogenase(L_s-isocitrate:NADP oxidoreductase(decarboxylating) EC 1.1.1.42), は Boehringer(Mannheim), Aconitase(Citrate(isocitrate) hydro-lyase, EC 4.2.1.3.) は Sigma (St.Louis,Missouri)から入手した。Aconitaseは使用直前に0°Cで45分以上活性化した。[9] 硫安浮遊酵素は遠心して上清の硫安をとり除き、20mM Tris-HCl, pH8.0に溶解した。

測定試料には、成熟DDY系マウス（6週令・雄）の大脳と小脳を用いた。瞬間的に凍結（-150°C, Freon-12）した頭部より、-20°Cで組織をとり出し、粉末にして0.6N過塩素酸で抽出した。抽出液を$KHCO_3$で中和後、直接測定試料として用いた。[8]

〔サイクリング反応系〕 微量のCoAをこの系に加えると、過剰量のアセチル-Pの存在下で、CoAはPhosphotransacetylaseによりアセチル化されアセチルCoAとなる(図1)。アセチルCoAは過剰量のオキザル酢酸と反応し、Citrate synthetase によりCoAにもどる。この1回のサイクルにより、反応系中のCoAと等量のクエン酸とPiが生成される。多数回のサイクル反応後、クエン酸量を後述の方法で測定し、CoAまたはアセチルCoAの増幅値を

得る。この反応系を'CoAサイクリング'と命名した。反応溶液（50μl）の組成は、100mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM NH_4Cl, 0.02%ウシ血清アルブミン, 1.9mMアセチル-P, 1.2mMオキザル酢酸で、これに求める増幅率により、一定量の Phosphotransacetylase と Citrate synthetase を加えた。

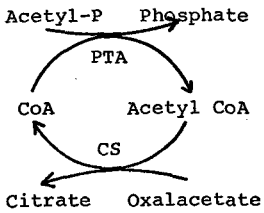


図1, CoAサイクリングの原理
PTA, Phosphotransacetylase
CS, Citrate synthetase

〔指示反応系〕 生成クエン酸の測定は、次の2酵素反応による。

クエン酸 $\xrightarrow{aconitase}$ シスアコニット酸 $\xrightarrow{aconitase}$ イソクエン酸

イソクエン酸 + $NADP^+$ $\xrightarrow[dehydrogenase]{Isocitrate}$ α-ケトグルタル酸 + CO_2 + NADPH + H^+

反応系（1.0ml）の組成は、100mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM $MnCl_2$, 0.02%ウシ血清アルブミン、0.2mM $NADP^+$, Isocitrate dehydrogenase, 45μg/ml, Aconitase, 500～800μg/mlである。

〔CoA除去反応〕 サイクリング反応系は、CoAとアセチルCoAを区別せずに増幅する。両者が混在する場合、次の方法によりCoAをほとんど除くことが出来る。試料にTris-HCl, pH7.5を20～100mMになるように加え、次にN-エチルマレイミド（NEM）を加えてCoA濃度の10倍以上とする。室温（25℃）で10分反応後、NEMの濃度の10倍となるようグルタチオンを加え、さらに10分反応させる。この反応液を直接試料としてサイクリング反応系に加える。CoAのSH基とNEMの結合は完全に非可逆的ではなく、サイクリング反応中にCoAが遊離される。しかし後述の如く1時間のサイクリング反応中、もとのCoA量の1%以下しか遊離されない。このCoAはブランクとなって測定にかかるが、アセチルCoAの定量には障害とならない程度である。

〔測定の実際例〕 (1)サイクリング反応、-80℃に貯蔵した溶液（酵素と基質を除く）をとかし、1.0mlをとり分ける。1.9μlの1Mアセチル-P溶液（-80℃保存）、1.2μlの1Mオキザル酢酸溶液（0.5NHClに溶解、-80℃保存）を加え、さらに2.5μlのPhosphotransacetylase（1mg/ml溶液）と33.5μlのCitrate synthetase（2mg/ml溶液）を加える。均一にまぜた後、5.3μlずつ9mm×70mmのパイレックス試験管底に分注し、氷冷しておく。

(2)試料、CoAとアセチルCoAの和を測定するためには、中和した抽出液（30～100mg組織/mlに相当）を0.5～5μlを、上記の反応系に加える。アセチルCoAのみを測定するには、1μlの抽出液を"油井"の中のパラフィンオイル中に置き[5]、0.3μlの200mM Tris·HCl, pH7.5を加える。さらに0.3μlの0.3mM NEMを加え、室温に20分放置する。0.3μlの3mMグルタチオンを加えて10分待ち、全量（1.9μl）を氷冷したサイクリング反応系に加える。

(3)標準曲線、0.1～1μMのCoAまたはアセチルCoAを1.0μlずつ、4～5つの異なったレベルでサイクリング反応系に加えて氷冷する。ブランクは反応系のみとする。脳抽出液にはCoAがアセチルCoAの2～4倍含まれており、アセチルCoA測定時でもCoA除去反応を省略できる（図3参照）。別に1mMのクエン酸溶液を2～10μlサイクリング反応液に加え、クエン酸スタンダードとする。反応による増幅率は、クエン酸スタンダードとCoA（またはアセチルCoA）スタンダードの比から求められる。

(4)反応および測定、以上の氷冷した試験管を、同時に30℃の水浴中に1時間静置した後、沸騰浴（100℃）中で3分間加熱し反応を止める。反応時クエン酸スタンダードは0℃に保持し、3分加熱後他の測定試料と同様に処理する。サイクリング反応中に

Aconitaseを活性化し、反応終了後これを用いて指示反応液を調製する。1.0mlの指示反応液を、室温にもどしたパイレックス試験管に加え、さらに30℃,45分反応させる。試験管の温度が室温と平衡した後、直接螢光比色計に入れて測定する。螢光比色には集光レンズと試験管アダプター(自家製)をつけた。Farrand MK-1スペクトロ螢光比色計を用いた。

〔各反応系の特徴〕 サイクリング反応には、pH7.5~8、温度30℃が至適条件である。反応系中のオキザル酢酸の30%が消費されるまで、クエン酸生成量は加えたCoAまたはアセチルCoAに比例する。また同じ範囲内で、反応は30℃2hr直線的に進む。図2に増幅率10,000倍/時の例を示した。0℃では30℃の2.3.5%の反応が進み、従って反応開始前の氷冷中に進む反応による誤差を3%以内に保つため、試料とスタンダードを、7分30秒以内に加え終らねばならない。反応由来のブランク(主に両酵素へのCoAの混入による)は低く、図2の条件で3×10^{-15}mol/assay(51.3μl)以内である。増幅率は両酵素の濃度増加とともに大きくなるが、頭うちとなり最高20,000倍/時程度である。2基質は前記の濃度が好ましい。アセチルーPを増減しても、増幅率はともに減少する。後述の如くオキザル酢酸を増加させると指示反応時の螢光が減少し、半分の濃度(0.6mM)に減らすと増幅率は10%増えるが、反応の直線範囲が半分となる。

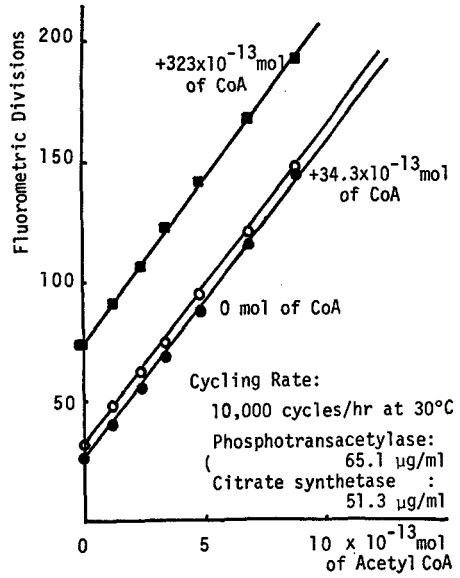


図2. アセチルCoA標準曲線。反応系は本文参照,30℃,1時間,51.3μlで反応:図内の値は添加CoA量;除去反応(*)後測定

Aconitaseには安定化因子としてクエン酸が含まれており、失活を伴わずには除去できない。このクエン酸は指示反応のブランクの大部分をしめる。一方サイクリング反応系のオキザル酢酸は、反応停止時の加熱により分解しピルビン酸を生じる。ピルビン酸は指示反応液中のNADPHの螢光を減らしブランクを低める。このためクエン酸はstoichiometricにNADPHに転換されず、螢光は不安定となる。しかし螢光は一定の範囲でクエン酸量に比例し、指示反応後すぐ測定すれば、かえってブランクが低く有利である。図2の例では、指示反応のブランクは2.5×10^{-13}mol/assayであった。

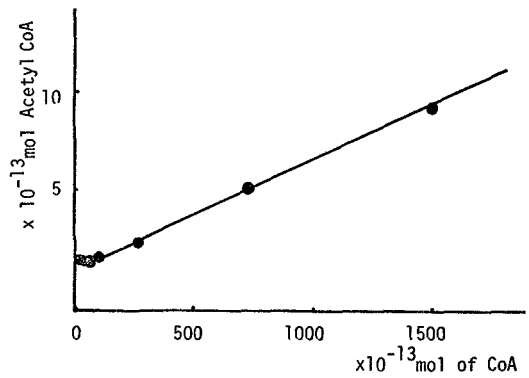


図3. CoA共存のためのブランク,反応溶液,51.3μl.横軸は添加CoA量,縦軸は添加CoA量に相当するブランク(アセチルCoAに換算).CoA除去反応(本文)後,30℃,1時間サイクリング反応.

図3にCoA除去反応後のブランクのレベルを示した。CoAの量が増えるとブランクも増えるが、増え方はサイクリング反応系中のアセチルCoA量とは無関係である(図2)。ブランクが問題となるのは、CoAがアセチルCoAの10倍以上のときである(図3)。このときはまずCoAとアセチルCoAの和を測定し、次にCoA除去後アセチルCoA

とCoAによるブランクを含む値を得る。両者の差より大体のCoA共存量を知り、この量のCoAをアセチルCoAスタンダードに加え、さらに除去反応後標準曲線を得る。CoAによるブランクは、共存CoA量の1%以下(図3)であるため、この方法により正確なアセチルCoA標準曲線が得られる。

〔脳中のCoA・アセチルCoA測定〕 大脳の抽出液は、サイクリング反応系の体積の10%量加えても、反応を阻害しない。また組織湿重量にして350μgまでの範囲で、添加抽出液量と増幅度は比例する(図4)。右表に示す如く、小脳のCoA・アセチルCoA濃度には動物により個体差が著しく、大きな分散値を示した。

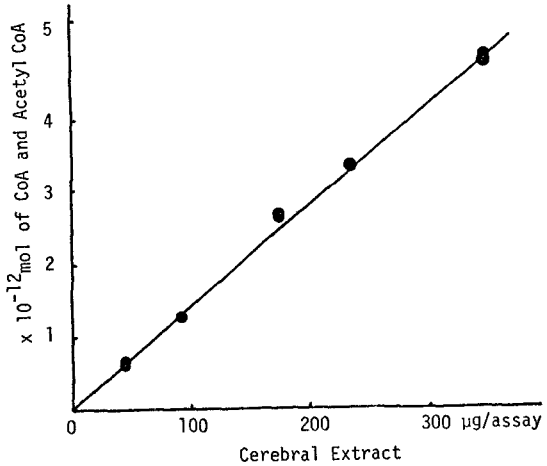


図4, サイクリング反応と添加抽出液の比例性: 横軸に示した湿重量相当の抽出液を添加。サイクリング反応, 3.340倍(6,680サイクル/時, 30分反応)。

		CoA + Acetyl CoA	Acetyl CoA	CoA
大脳	(7)	17.0 ± 1.0	3.3 ± 0.4	13.7
小脳	(6)	12.6 ± 4.3	4.3 ± 0.8	8.3
肝	(5)	167 ±24	34.1 ± 8.6	132.9

脳内のCoAおよびアセチルCoA濃度。単位: 10^{-6} mol/kg 湿重量±標準誤差。( )内は測定動物数, 1匹につき2測定施行。肝(瞬間凍結)の値は比較のため。

〔考 察〕 脳ではCoA・アセチルCoAの濃度が低く、従来の方法[1,2]を用いるには、前もって抽出液の炭素カラム処理や濃縮が必要であった。[1,2] この方法では増幅測定をするため、極微少量の試料で十分であり、また抽出液自体の蛍光や、共存するクエン酸などによるブランクを容易に除き得る。

CoAサイクリングの試みはなされた事が報告されているが、実用化されなかった。[1,3] この方法はCoA・アセチルCoAの測定に有用なばかりでなく、CoA・アセチルCoAがそれぞれ関与する多くの反応[8]の微量測定手段として、広範な物質および酵素の微量定量への道を開くものである。とくにCoA除去反応の工夫により、CoAのアセチル化反応系からCoAを除けるので、利用範囲が一層広い。

従来報告されていた脳中のCoA濃度(ラット, 88.5×10^{-6} mol/kg湿重量[4])は測定方法, 抽出法ともに不完全であり、正確な in vivo の値とは考えられない。アセチルCoAについても、全脳の平均値(ラット, 3.95×10^{-6} mol/kg)[12,13]が知られているのみであった。

現在のレベルでも5ngの凍結乾燥組織(湿重量25mg)の測定が可能であるが、反応系全体を1000分の1とし、生成したNADPHをさらにNADPサイクリング[7]で10,000倍に増幅すれば、単一ニューロンやその細胞下要素(1ng乾燥重量[5,6])の測定が可能であると思われる。

〔文 献〕

(1) Garland,P.B.,(1971) Recent Advance in Quantitative Histo- and Cytochemistry, Hans Huber Publisher,Bern Stuttgart Viena p.85 (2) Glover,V.A.S. and Potter,L.T.,(1971) J.Neurochem. 18, 571 (3) Jaenicke,L. and Lynen, F. (1960) The Enzyme, 3,p.3,Academic Press,New York (4) Kaplan,N.O. and Lipmann,F.,(1948) J.Biol.Chem. 174, 37 (5) Kato,T and Lowry,O.H.,(1973) J.Neurochem. 20,151 (6) Kato,T. and Lowry,O.H.,(1973) J.Biol.Chem. 248, 2044 (7) Lowry,O.H. et al, (1961) J.Biol.Chem. 236, 2746 (8) Lowry,O.H. et al, (1964) J.Biol.Chem.239,18 (9) Morrison,J.F.,(1954) Biochem.J. 58, 685 (10) Prempeh,A.B.A. et al, (1972) Biochem.J.129, 991 (11) Prince, A.K. and Hide,E.G.J.,(1971) Nature New Biol. 234, 222 (12) Schuberth,J. et al, (1965) J.Neurochem. 12, 451 (13) Schuberth,J. et al, (1966) J.Neurochem. 13, 819 (14) Tubbs,P.K. and Garland,P.B.,(1969) Methods in Enzymology XIII,p.535, Academic Press, New York

13 中枢神経系におけるアセチル CoA 加水分解酵素活性の細胞内分布について

松田友宏・吉田　博

（阪大・医・I薬理）

〔要　約〕

脳におけるアセチルCoA加水分解酵素活性の細胞内分布を調べた結果、次のようであった。

(1) soluble, mitochondrial fraction に特に高い分布を示し、myelin には極めて低い。

(2) その分布型は他のエステル加水分解酵素活性（EC 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.7）と著しく異っており、それらの阻害剤DFP, eserine により影響をうけない。

(3) 本酵素活性の Lineweaver-Burk plots はすべての分画において直線にのり、acetyl CoA に対する Km は $1.4 \sim 1.9 \times 10^{-4}$ M である。

(4) synaptosomes における本酵素活性はアセチルコリン合成能より高く（acetyl-CoA 濃度：2×10^{-4} M において），synaptosomal soluble fraction の本酵素活性の比活性は、他の soluble fraction（S_3, ニューロン細胞体，グリア細胞由来と考えられる）の比活性に比べ低く、1/3以下であった。（第46回日本生化学会大会，昭和48年9月，名古屋にて一部発表した。）

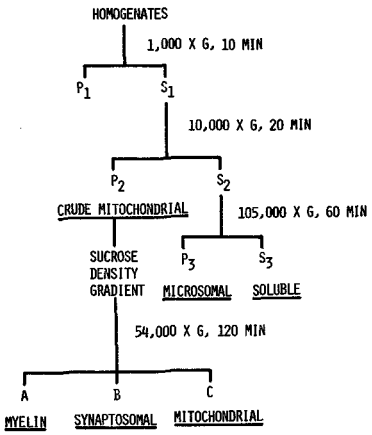
序

脳における Ach 合成酵素即ち acetyl CoA - choline acetyltransferase 活性は、その2つの products の1つ Ach による阻害は弱く、もう1つの product である CoA により強く阻害され、その阻害は acetyl CoA により拮抗される(7, 12) ことから、acetyl CoA / CoA ratio により調整されていると考えられる(12)。

我々は脳における Ach 合成の研究過程において、ラット脳 homogenates に Ach 合成系に比べ極めて比活性の高いアセチル CoA 加水分解酵素活性が存在することを認め、本酵素活性は acetyl CoA / CoA ratio を変えることから、Ach 合成の調節への関与を考え、まず本酵素活性の脳における細胞内分布を調べたので報告する。

FIG.1

SUBCELLULAR FRACTIONATION OF RAT BRAIN

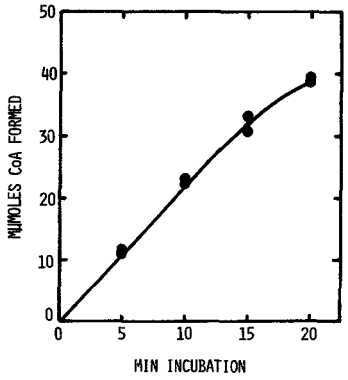


実験方法

ラット（Wister 系、体重 200 g 前後）の脳の細胞内分画は Fig. 1 に示したように、Whittaker らの方法に順じて行った（4, 11）。本酵素活性の測定は、各分画を 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) に対して透析した酵素液に、0.05 M phosphate buffer (pH 7.0), acetyl CoA を添加し、37 °C で incubate し、反応は TCA で停止し除蛋白後 1M Tris で中和し形成された CoA

を Ellman 試薬で定量した(1,9)。A-esterase 活性は酵素液を DFP (3.2×10^{-4} M) 存在下に 37°C, 15 min preincubation し、0.05 M phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM p-nitrophenyl acetate と 37°C 15 min incubate し、p-nitrophenol の形成を $A_{400m\mu}$ で測定した。B-esterase は DFP 非存在下に得られた esterase 活性と A-esterase 活性の差から求め(5)、AchE 活性は acetylthiocholine 法により測定した(2)。蛋白定量は Lowry らの方法(6)。

FIG.2
TIME COURSE OF ACETYLCoA HYDROLYZING ACTIVITY OF RAT BRAIN HOMOGENATES



実験結果並びに考察

ラット脳の各顆粒膜分画の電顕像は少数の隣接分画の contamination を含むが、主としてそれらを代表する顆粒膜からなっていた。

Fig. 2 に示したように、ラット脳 homogenates を 37°C で incubate する時、反応は約 15 分間は直線的に進行する。従って以下の実験では特にことわらない限り反応時間は 15 分とした。

本酵素活性の脳における細胞内分布 (Fig. 3) は、crude mitochondrial fraction (P_2), solube fraction (S_3) に高く分布しており、microsomes (P_3) には少い。crude mitochondrial fraction 中では、mitochondrial fraction (C) に著しく高く、Synaptosomes (B) がこれに次ぎ、myelin (A) には極めて低いことが特徴である。これは脳に存在する他のエステル加水分解酵素活性の分布型 (Fig. 4) と著しく異っている。非特異的エステル加水分解酵素である A-esterase, B-esterase 活性はともに Synaptosome (B) に高く、mitochondria (C) に低い。AchE は myelin (A) と Synaptosome (B) に高く、やはり mitochondria (C) に低い。またこれらの esterases の soluble fraction (S_3) における分布は microsomes (P_3) に比べ低いこと等が特に異っている (Fig. 4)。

FIG.3
SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF ACETYLCoA HYDROLYZING ACTIVITIES IN RAT BRAIN

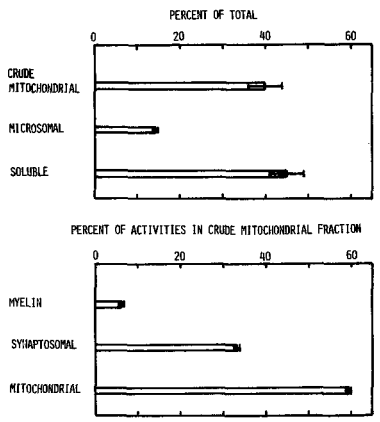
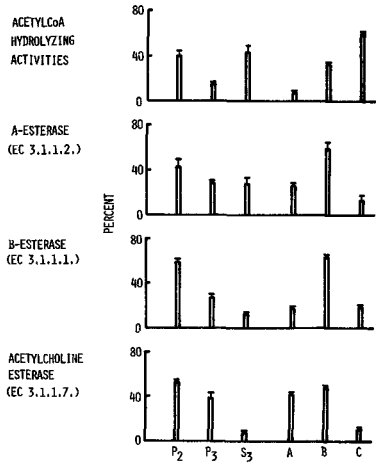


FIG.4



B-esterase, AchE の阻害剤 DFP (10^{-4}M) により、いずれの分画の本酵素活性も殆んど影響をうけず、AchE の阻害剤 eserine (10^{-4}M) によっても阻害されない (Table 1)。

各分画の蛋白 mg 当りの本酵素の比活性は Soluble fraction に最も高く (5.5)、これに mitochondria が次ぐ

(3.7), crude mitochondrial fraction, Synaptosomes, microsomes はいずれも 2.0 前後と低く、myelin は最も低い比活性を示している (Fig. 5)。これに対し、A-esterase, B-esterase, AchE の比活性はいずれも microsomes, Synaptosomes に極めて高い比活性を示す。尚ラット脳 homogenates の ACh 合成能は同じ単位で約 0.2 である。

各分画の本酵素活性について Lineweaver-Burk plots をとると、Fig. 6 に示しているように、調べた基質濃度の範囲ではいずれも直線にのり、横軸はいずれの分画についても単位は 1/mM で表現されており、原点から横軸の交点までの距離はほぼ等しい。

各分画の acetyl CoA に対する見かけの Km 値は局在こそ異なれ、いずれの分画においても、1.4 ～ 1.9 × 10^{-4} M である (Table 2)。一方、acetyl CoA-choline acetyltransferase の acetyl CoA に対する Km は 1 ～ 2 × 10^{-5} M (7, 12) であるから、本酵素に対する Km の約 1/10 である。Sollenberg (10) によれば、ラット全脳の acetyl CoA 濃度は 5 ～ 8 mμ moles/g と計算されており、脳内の生理的濃度は 10^{-5} ～ 10^{-4} M と考えられる。

本酵素活性は低いが、ACh 合成系が局在する Synaptosomes においても、Fig. 7 に示す如く、同一の synaptosomal preparation を同量用い、acetyl CoA (2×10^{-4} M) 存在下で本酵素活性 (●—●) は、acetyl CoA-choline acetyltransferase 活性 (○—○) の約 2 倍である。

Fonnum (3), Potter ら (8) によれば、acetyl CoA-choline acetyltransferase は synaptosomes において生理的イオン強度下において soluble cytoplasmic fraction に局在することが知られており、我々も確認している。本酵素活性の Synaptosomes 内における生理的イオン強度下の局在は Table 3 に示す通り、total activity の分布で

TABLE 1

EFFECTS OF DIISOPROPYL FLUOROPHOSPHATE (DFP) OR PHYSOSTIGMINE (ESERINE) ON ACETYLCoA HYDROLYZING ACTIVITIES IN RAT BRAIN

SUBCELLULAR FRACTIONS	ADDITIONS		
	NONE	DFP	ESERINE
	A_{412MU}		
HOMOGENATE	.230	.228	-
	.228	-	.235
CRUDE MITOCHONDRIAL	.274	.277	-
	.352	-	.357
MICROSOMAL	.315	.315	-
	.171	-	.160
SOLUBLE	.081	.091	-
	.074	-	.059
SYNAPTOSOMAL	.101	.109	-
	.159	-	.164
MITOCHONDRIAL	.146	.149	-
	.141	-	.138

FIG.5

SPECIFIC ACTIVITIES OF ACETYLCoA HYDROLYZING ACTIVITIES IN VARIOUS SUBCELLULAR FRACTIONS OF RAT BRAIN

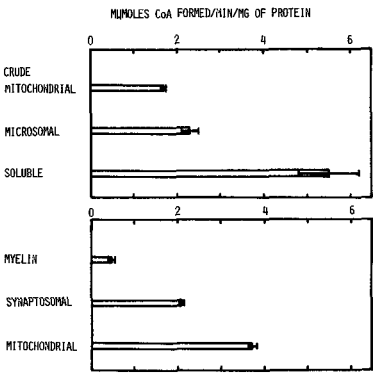
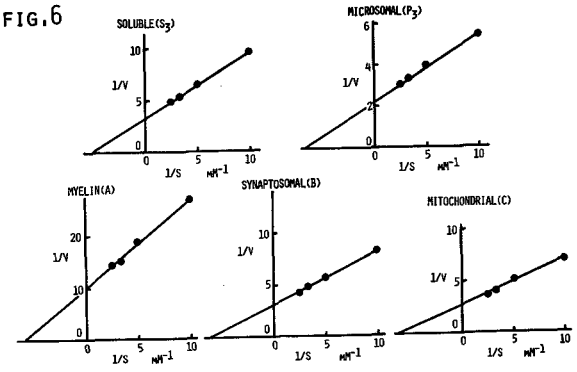


FIG.6



は particulate fraction に高く、soluble fraction にはうすい。Synaptosomes の soluble fraction の比活性は（1.75）であり、既述の他の soluble fraction（S_3, 主としてニューロンの細胞体，グリア細胞に由来すると考えられる）の比活性（5.5, Fig. 5参照）の 1/3 以下である。Synaptosomal soluble fraction における ACh 合成能は同じ単位で表現すると（2.8）である。acetyl CoA に対する Km は両分画ともやはり 1.4 ～ 1.9 × 10^{-4}M であった。

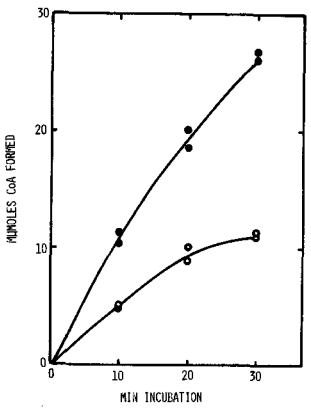
TABLE 2

APPARENT MICHAELIS CONSTANTS FOR ACETYLCoA

SUBCELLULAR FRACTIONS	Km
	10^{-4}M
CRUDE MITOCHONDRIAL (P_2)	1.9 ± 0.1
MICROSOMAL(P_3)	1.5 ± 0.1
SOLUBLE(S_3)	1.9 ± 0.1
MYELIN(A)	1.4 ± 0.2
SYNAPTOSOMAL(B)	1.4 ± 0.1
MITOCHONDRIAL(C)	1.6 ± 0.1

FIG.7

ACETYLCoA HYDROLYZING AND ACETYLCoA-CHOLINE ACETYLTRANSFERASE ACTIVITIES IN SYNAPTOSOMES OF RAT BRAIN



文献

(1) Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys., 82, 70 (1959).

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

(3) Fonnum, F., Biochem. J., 103, 262 (1967).

(4) Gray, E.G. and Whittaker, V.P., J. Anat., 96, 79, (1962).

(5) Krisch, K., In P.D. Boyer (Editor), The Enzyme, Vol. 5, 3rd Edition, Academic Press, New York, 1971, p. 43.

(6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

(7) Potter, L.T. and Glover, V.A.S., In H. Taber and C.W. Tabor (Editors), Method in Enzymology, Vol. 17B, Academic Press, New York, 1971, p. 798. 「(1968).

(8) Potter, L.T., Glover, V.A.S., and Saelens, J.K., J. Biol. Chem., 243, 3864,

(9) Schuberth, J., Biochim. Biophys. Acta, 122, 470 (1966).

(10) Sollenberg, J., In E. Heilbronn and A. Winter (Editors), Drugs and Cholinergic Mechanisms in the CNS, Försvarets, Forskningsanstalt, Stockholm, 1970, p. 27.

(11) Whittaker, V.P. at al, Biochem. J., 90, 293(1964).

(12) White, H.L. and Wu, J.C., J. Neurochem., 20, 297(1973).

TABLE 3

ACETYLCoA HYDROLYZING ACTIVITIES IN SUBFRACTIONS OF SYNAPTOSOMES OF RAT BRAIN

	SOLUBLE	PARTICULATE
APPARENT Km FOR ACETYLCoA	1.9 X 10^{-4}M	1.4 X 10^{-4}M
SPECIFIC ACTIVITIES	1.75 *	2.55 *
TOTAL ACTIVITIES	15%	85%

* MUMOLES CoA FORMED/MIN/MG OF PROTEIN

14 脳組織のDNA合成酵素について

須田治彦・野口欽也
塚田裕三
（慶大・医・生理）

〔要約〕
脳の発育に伴なうDNA依存性DNA Polymerase (DPase) について，大脳，小脳の発育を追って検討を加えた。我々はすでに脳DPaseがTris Extractと1.0M KCl Extractの両者に出現し，その性状の差異について報告した。これら両分画のDPase活性を脳あたりで，発育を追って検討してみると，大脳では生後15日頃にKCl Extract中のDPaseが最大活性を示し，小脳では生後10日から15日にかけて最大活性を示した。大脳ではこの時期に神経膠細胞の分裂増殖が盛んであり，又小脳では顆粒層の神経細胞が盛んで，しかも神経膠細胞の分裂増殖も盛んである時期と一致していることから，脳のKCl Extractに含まれる核由来のDPaseがDNA合成に直接関与している可能性が考えられた。次にSepharose 6Bを用いDPaseを分離すると，脳からはTris Extractに高分子DPase，KCl Extractからは高分子DPaseと低分子DPaseの2種の酵素分画が分離された。これを肝臓と比較すると，肝臓にはKCl Extract中に低分子DPaseが欠如していることと，高分子DPaseの鋳型依存性が脳のものと異り，DPaseの臓器間の差異が示唆された。また脳の低分子DPaseは脳に特異的であると考えられる。脳では発育が進むにつれてKCl Extract中の高分子DPaseの活性割合が減少することも，実際のDNA合成との関連において興味がもたれる。

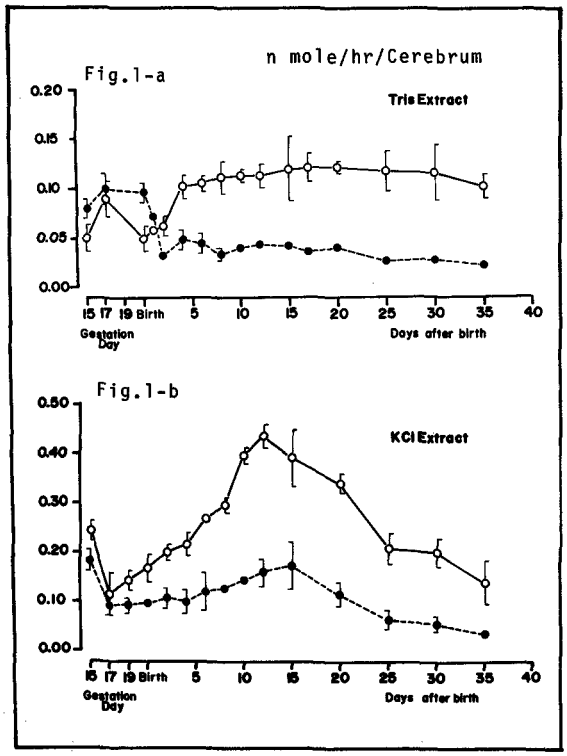
脳組織は神経細胞と神経膠細胞から構成されており，個細胞群の発育分化の過程を生化学的に解明することは，脳の機能を探ぐるよで重要である。我々は脳の発育を通じてDNA合成の調節機構をDNA合成酵素を中心に研究を進めてきた。昨年の本学会で，大脳発育に伴なうDNA依存性DNA Polymerase (DPase) について報告し[1]，脳組織では細胞質に存在するDPaseと核に存在するDPaseとがあり，発育に伴って核に存在するDPase分布が多くなること，又核に存在するDPaseは KCl 濃度をあげて始めて抽出されてくることを述べた。今回はTris Bufferにより抽出されてくる細胞質のDPaseと，KClにより始めて抽出されてくる核のDPaseとについて，大脳及び小脳の発育に伴なう変化と，更にゲル口過法によって，それぞれの酵素の部分精製について検討したので報告する。

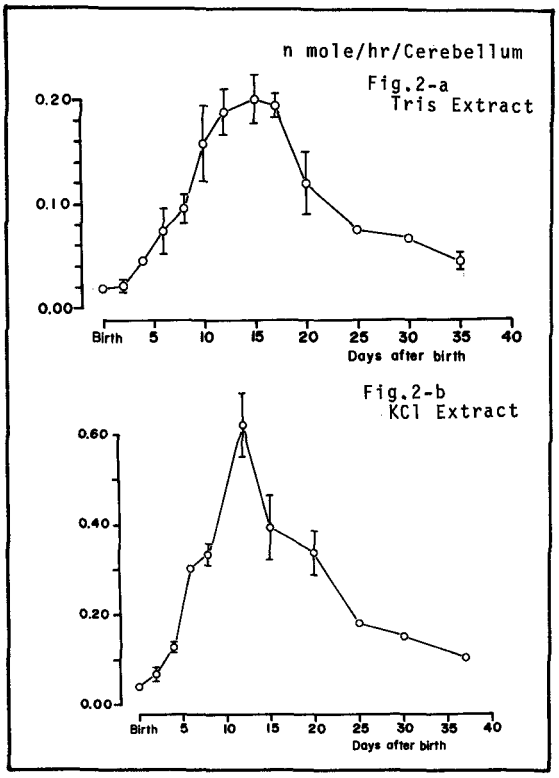
＝実験材料及び方法＝

1) 酵素標品及び抽出方法.
ラット発育の各時期から大脳，小脳，肝臓を摘出し，2mM β-Mercaptoethanolを含む10mM Tris HCl Buffer pH7.4 でホモゲナイズし，34800g．60分遠沈後，その上清をTris Extractとし，残査を更に1.0M KClを含む2mM β-Mercaptoethanol，10mM Tris HCl Buffer pH7.4で抽出，34800g 60分遠沈後，その上清をKCl Extradとした。

2) Sepharose 6Bを用いるゲル口過法.
カラムは直径1cm，長さ60cmで，2mM β-Mercaptoethanolを含む10mM Tris HCl Buffer pH7.4を流出溶液として用い，流量速度は約1ml／時間であった。

3) DNA Polymerase Assay等は前報[1]の方法によった。





結果及び考察

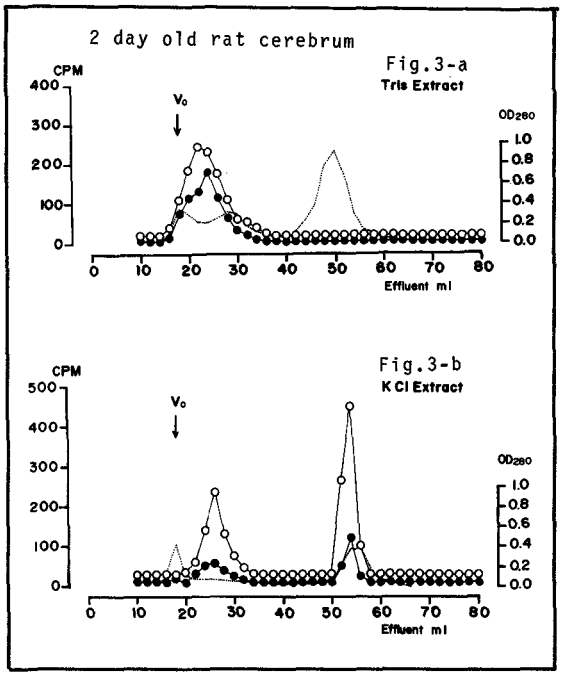
1) 大脳発育に伴なう DNA Polymerase 活性の変動

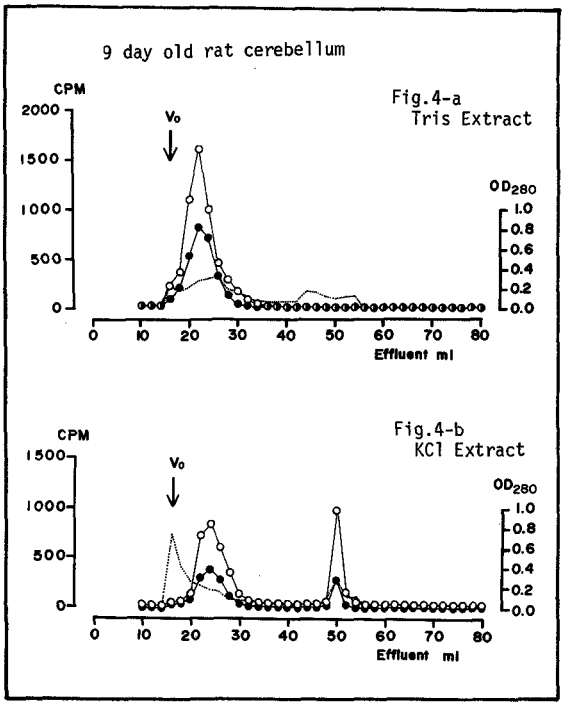
Tris Extract, KCl Extract に含まれる DPase 活性を大脳当りで示したのが図1-a, b である。Tris Extract の活性は出生時一時減少するが、その後上昇し、生後はほぼ一定の値を示した。DPase 活性は細胞の分裂後、細胞の発育のため蛋白質当り、組織湿重量当りで表現すると見かけ上減少するように表現された。[1] 次に KCl Extract の DPase 活性をみると、生後10日に最大活性を示す。この時期は神経膠細胞の分裂増殖の最も盛んな時期であり、[2] この時期の活性は神経膠細胞の DNA 合成に関与しているものと考えられる。鋳型依存性は、Tris Extract, KCl Extract 共に native DNA のほうが、heat-denatured DNA より有効であった。

2) 小脳発育に伴なう DNA Polymerase 活性の変動

小脳の発育に伴なう DPase 活性を大脳と比較してみると図2-a, b に示す如くである。Tris Extract の DPase 活性は蛋白質当りで生後8日、組織湿重量当りで生後10日、小脳当りで生後15日に最大値を示した。KCl Extract の活性はいづれで表現しても生後10日に最大値を示した。このことは、小脳では出生後顆粒層の神経細胞の分裂増殖が盛んであり、同時に神経膠細胞の分裂増殖も起っていることが考えられる。[2] 又小脳の KCl Extract に含まれる DPase 活性は、大脳の場合と同様 Tris Extract よりも高かった。以上の事から、大脳、小脳の発育に伴なう神経細胞と神経膠細胞の各々の分裂増殖の時期に一致して DPase 活性が変動しているものと考えられた。

図中のシンボル：○——○ native DNA
●——● heat-denatured DNA





3) Sepharose 6B を用いたゲル口過法による検索

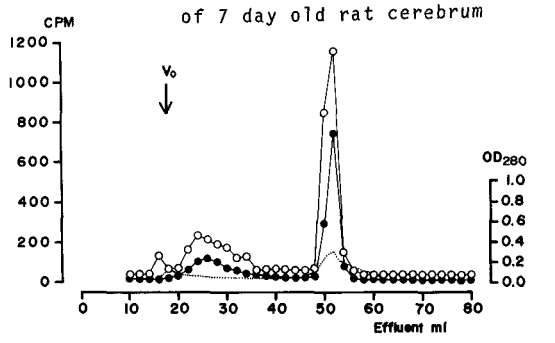
i) 大脳の DNA Polymerase (図3-a, b).
発育時期を問わず Tris Extract の DPase は Vo から 4～6 ml に最大活性を持つ DPase 分画と，KCl Extract からは Vo から 8～10 ml と 32～36 ml との2分画に最大活性を持つ DPase とが分離された。大脳に含まれる3種の DPase 活性割合を発育に従ってみると，発育が進むにつれて2種の高分子 DPase が減少し，KCl Extract に含まれる低分子 DPase が増加する傾向が認められた。

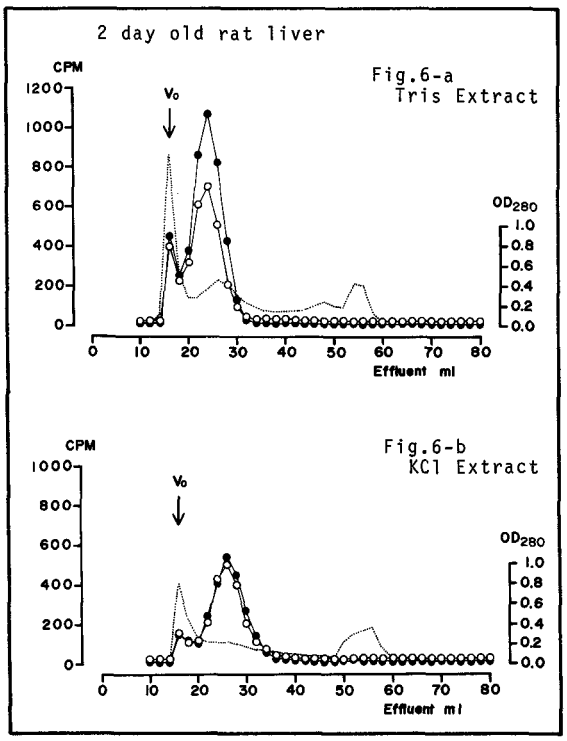
ii) 小脳の DNA Polymerase (図4-a, b).
小脳から抽出されてくる DPase は大脳の DPase と全く同じ分離パターンが得られた。即ち，Tris Extract からは Vo から 4～6 ml に1分画と，KCl Extract からは Vo から 8～10 ml と 32～36 ml との2分画とになった。以上の Sepharose 6B を用いたゲル口過法によって，大脳，小脳から分離された DPase は，2種の高分子 DPase と1種の低分子 DPase とで，大脳小脳の間には差異を認められなかった。

iii) 脳の核に存在する DNA Polymerase
生後7日目のラット大脳の核分画から抽出された DPase は，脳の KCl Extract に含まれると同じ DPase が分離された。(図5)
以上の事から，既年報告した様に，KCl によって抽出されてくる DPase は核に局在しており，脳の KCl Extract に含まれている低分子 DPase が発育と伴に相対的に多くなることから，脳の細胞分裂，増殖に関与している DPase は KCl Extract，即ち，核に存在している高分子 DPase であることが考えられる。

次に，脳と比較して肝臓の DPase を調べると，先ず，鋳型依存性に著しい違いがあった。即ち，肝臓の DPase は，Tris Extract，KCl Extract 共に native DNA，heat-denatured DNA との間に活性の差異がり

Fig.5 KCl Extract from Nuclei of 7 day old rat cerebrum





なく，同程度の活性を示した。DPaseの鋳型依存性，或は要求性については未解決の問題であるが，脳と肝臓の間に著明な違いのあることは注目される。

胎生期ラット大脳のTris Extract中のDPase活性はheat-denatured DNAを用いた時に，高い活性を示すが，Sepharose 6Bを用いたゲル口過法で分離した後では，DPase活性はnative DNAを用いたのが高い活性を示した。このことは，粗DPase標品ではDNaseなどDPase活性に影響を与える因子の存在により結果が異なってくるものと思われる。従って，脳のDPaseそのものは，上述の因子がなくなることにより，native DNAをより良い鋳型とする酵素であると考えられる。

肝臓のDNA Polymerase（図6-a, b）Tris ExtractからはV_0から4～6 mlの分画と，KCl ExtractからはV_0から8～10 mlの分画の2種のDPaseが分離された。肝臓のTris Extract中のDPaseはゲル口過後もheat-denatured DNAを良い鋳型とし，KCl ExtractのDPaseはnative DNA，heat-denatured DNA共に同程度の活性を示す酵素であった。また，脳のKCl Extractに含まれる低分子DPaseは肝臓に存在しなかった。これも臓器間の特異な差である。即ちKCl Extractに含まれる低分子DPaseは脳に特徴的であり，これは，発育が進むにつれて分布の割合が増加した。この低分子DPaseが再生能力を持たない成熟神経細胞の特徴になっているのかもしれない。

我々はSepharose 6Bのゲル口過法により脳から3種のDPaseを分離した。最近再生肝からDEAE cellulose によって低分子DPase（3.4S）が分離されているが，[3] 我々の分離した低分子DPaseの異同については今後の課題である。DNA合成酵素の活性が細胞質分画に高いことは，機能との関連で多くの疑問を投げかけており，核内酵素と細胞質酵素との機能的関連も今後検討されねばならない。

1). 須田，野口，塚田，神経化学 II (suppl). 40 (1972)
2). Altman J. in Handbook of Neurochemistry Vol. II (ed. by Lajtha A.) p177. Academic Press (1955)
3). Chang L.M.S. and Bollum F.J., J. Biol. Chem. 247 7948 (1972).

15 ニューロン・グリアおよび肝臓細胞核におけるDNA合成活性

鈴木　修・加藤尚彦

（東大・医・脳研）

〔要　約〕

成熟モルモットの大脳皮質と肝臓から細胞核を分離し、そのDNA合成活性を調べた。

(1) dATP、dGTP、dCTPの存在下で分離核標品はTTPを活発にとり込んだ。とり込み反応の性質と反応生成分の分析から、分離核内でDNAが合成される事を示した。

(2) "ニューロン核標品P_{51}"（ニューロン核51%：グリア核49%）は"グリア核標品P_3"（3%：97%）に比べて、核一個あたり約2倍のDNA合成活性を持っている。また肝臓核標品の活性は、グリア核標品P_3の約10倍であった。

(3) 全ての分離核標品のDNA合成活性は、更に仔ウシ胸腺DNAを加える事により著しく増加した。脳および肝臓核標品は、それぞれ特徴的な活性の増加パターンを示した。

(4) P_{51}核標品のような二種類以上の核の混合標品では、一種の核の酵素が可溶化され、他種の核のテンプレイトおよびプライマーを利用できる事を示した。

主として組織学的所見やラジオオートグラフの結果から[1]、成熟後ニューロンは細胞分裂を止め、また核DNAの代謝回転もほとんどないと信じられている。一方成熟脳からの分離核に、DNA合成酵素が保持されている事が最近報告された[8][15]。そこでニューロン核でのDNA代謝を解明する目的で、大脳皮質から分離した細胞核におけるDNA合成を調べ、肝臓分離核と比較検討した。

実験方法

成熟モルモット（雄，300g）の大脳皮質から、既報の方法[10]に従って、純粋な"ニューロン核標品，P_{51}"と"グリア核標品，P_3"を分離した。"ニューロン核標品，P_{51}"は、51%のニューロン核と49%のおもにオリゴデンドログリア核を含み、"グリア核標品，P_3"は、3%のニューロン核と97%のオリゴデンドログリア核からなっている。P_{51}核の分離法を用い、成熟モルモット肝臓より純粋な核標品を分離した。これらの分離核を用いて、^{3}H-dTTPの酸不溶性分画へのとり込み活性を調べた。反応系（100 μl）の組成は、50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM $MgCl_2$, 5mM Dithiothreitol, 1mM rATP, 各0.5 mMのdATP, dGTP, dCTP, 1.0μM ^{3}H-dTTP（各測定当り1.2μCi）である。分離核をDNAとして5~50μg加え、37℃で30分加温後、5倍量の10%TCA-20mMピロ燐酸溶液で反応を止めた。沈渣をグラスファイバー沪紙上に集め、5%TCAと有機溶媒で充分洗浄後、とり込まれた^{3}H-dTTP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。DNAは蛍光法[11]により、タンパクはLowryらの方法[13]により測定した。DNA測定の

スタンダードとテンプレイト・プライマーには仔ウシ胸腺未変性DNA(Sigma, Type 1)を用い、変性DNAはこれを100℃10分加熱処理したものである。

実験結果

大脳皮質核P_{51}と肝臓核では至適pH, 至適Mg^{++}濃度は異なる。活性測定の反応系では平均の濃度を用いた。Dithiothreitolを除くと、P_{51}核、肝臓核ともに活性は30%減じた。TTPのとり込みは少なくともC×10^6個(DNA 50μg)まで、加えた核数に比例して増加する。とり込みはP_{51}, P_3核ともに45分まで、肝臓核では2時間にわたり直線的に増加する。これら3種の標品とも−80℃に保存すれば、活性は少なくとも2週間は減少しなかった。

最高のTTPとり込み活性を得るには、dATP, dGTP, dCTPが同時に必要である(表1)。しかしTTPのみでも約40~60%の活性がみられた。これはTMPがDNAの末端に付加されるためか、あるいはホモポリマー(Poly T)の合成のためと思われる。TTPをとり込んだ酸不溶性の沈渣をDNaseで処理すると、放射能は可溶成分に回収された。RNase処理では全く可溶化されず、とり込み反応はDNA合成を示すものであると思われる。

	P_{51}	P_3	Liver
Complete System (d-A,G,C and *TTP)	100 %	100 %	100 %
*TTP only	38	44	60
*TTP + dATP	46	53	55
+ dGTP	44	-	74
+ dCTP	55	-	65
+ dATP,dGTP	74	-	73
+ dATP,dCTP	63	-	62
+ dGTP,dCTP	68	-	81

表1. 分離核DNAポリメラーゼ活性の基質要求性

P_{51}:ニューロン核標品, P_3:グリア核標品, 各標品の組成と反応系は"実験方法"参照。

分離核によるDNA合成活性は、種々の物質によって影響をうける(表2)。反応はrATPにより高められる。高濃度のアクチノマイシンDによる阻害は著明であり、サイクロヘキシミドでは影響されない。ポリアミンであるスペルミン、スペルミジンにより阻害され、NADもかなりの阻害を示した。NMNを加えると、活性測定系内のrATPと反応してNADが合成される[13]が、添加による阻害はみられなかった。これらの性質は、成熟大脳皮質細胞核のDNA合成活性が、これまでに他の真核細胞核について報告されているDNA依存性DNA合成酵素活性と近似している事を示している。

		P_{51}	Liver
No Addition		100 %	100 %
ATP omitted		76	76
Actinomycin D,	500 μg/ml	12	21
Cycloheximide,	80 μM	108	84
Spermine,	0.25 mM	42	43
Spermidine,	1.2 mM	72	61
NAD,	4.1 mM	45	35
NMN,	2.0 mM	130	106

表2. 分離核DNAポリメラーゼ活性に影響をおよぼす物質

P_{51}:ニューロン核標品, 反応系と核標品については"実験方法"参照。

ニューロン核標品P_{51}は、グリア核標品P_3の約2倍のDNA合成活性を示した(表3)。

		U/10^6 Nuclei	U/μg DNA
P_{51}	(40)	23 ± 1.1	2.7 ± 0.09
P_3	(15)	12 ± 1.1	1.6 ± 0.15
Liver	(26)	118 ± 1.0	15.6 ± 0.26

表3. 分離核のDNAポリメラーゼ活性

活性(u)は37℃, 30分の反応でとり込まれたTMP(f mol), カッコ内は測定数を、活性値はS.E.Mを付してある。P_{51}:ニューロン核標品, P_3:グリア核標品, 各標品の組成と反応系は"実験方法"参照。

ニューロン核とグリア核におけるDNA合成反応が相互に影響し合わないと仮定すると、各標品内のニューロン核対グリア核の%を考慮して、ニューロン核のDNA合成活性がグリア核より3倍活発であると結論できる。肝臓核にはグリア核P_3の約10倍の活性がみられた。

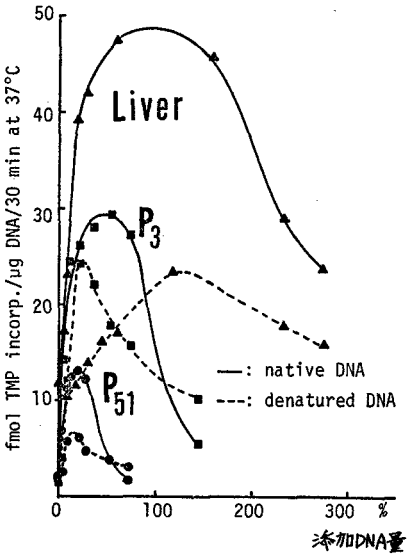
分離核標品と仔ウシ胸腺のDNAを同時に反応系に加えると、どの核標品においてもDNA合成が著しく高められる(表4)。この結果は核内の

	P_{51}	P_3	Liver
No Addition	100 %	100 %	100 %
Calf Thymus native DNA	490	1730	450
denatured DNA	250	1380	110
Yeast RNA	110		100

表4. 細胞核DNAポリメラーゼ活性のテンプレイト添加効果

各種標品の反応系に、核内DNAの$\frac{1}{3}$量のイラウン胸腺DNA及び添加DNAと等量のYeast RNAを加えて反応。
P_{51}：ニューロン核標品，P_3：グリア核標品

酵素がクロマチンDNAでは飽和されておらず、添加したDNAがテンプレイトやプライマーとして利用されることを示している。予備的な実験で、DNA合成酵素がこの活性測定条件でかなり可溶化されている事がわかった。RNAを加えても活性は変わらず(表4)、この活性はDNA依存性DNAポリメラーゼである事が示唆された。



添加DNAによる，分離核DNA合成活性の増加パターン。横軸に添加DNA(イラウン胸腺)の量を、核内DNA量に対する割合で表わした。
P_{51}：ニューロン核標品，P_3：グリア核標品

核内酵素がどの程度のDNAを加えると飽和されるかを右図に示した。大脳皮質核、肝臓核とも添加DNA量を増加していくと、やがてDNA合成はかえって抑制される。最高の活性増加を示すDNA濃度は、肝臓核が一番高く、多くの酵素を含んでいる事が示されていると思われる。P_3核標品はP_{51}核標品に比して高い添加DNA濃度でピークとなり、ニューロン核に比べてグリア核により多くの酵素が含まれている事が考えられる。未変性および変性DNAによるDNA合成の増加パターンも、核標品によってそれぞれ特徴を持っている。これらの結果は、核標品によって変性，未変性DNAそれぞれのテンプレイトやプライマーを要求する二種以上の酵素が異なった割合で含まれているのか、または含まれている酵素が二種のテンプレイト・プライマーを要求する程度が異なるのか、という二つの可能性を意味している。

	P_{51}	Liver	P_{51} + Liver
Number of Nuclei, $x10^6$	3.3	1.7	1.65 + 0.85*
U/μg DNA	1.8	11.6	8.0
U/μg Protein	0.44	4.67	2.26

表5. 混合核におけるDNAポリメラーゼ活性

活性(U)は37℃，30分の反応でとり込まれたTMP(f·mol)
*：P_{51}核と肝臓細胞核をそれぞれ半分量ずつ加えた核標品を混合核とした。P_{51}：ニューロン核標品

DNAの添加実験から二種類以上の核が標品内に混在している時、一方の核の酵素が他方の核のクロマチンDNAをテンプレイト・プライマーとして反応する可能性が考えられる。P_{51}核と肝臓核の活性と同時に、またそれぞれの核数の半分を混合してその活性を測定すると、表5に示す結果が得られた。活性をDNAあたりで表わすと、混合核はP_{51}と肝臓核の平均値より充分高い比活性を示した。これに反しタンパクあたりの比活性は、ほぼ平均値に近かった。この事実は肝臓核内の酵素が可溶化され、P_{51}核標品内のクロマチンをテンプレイト・プライマーとして反応している事を示していると思われる。

考　　察

大脳皮質細胞核内には肝臓核と同じく、rATP依存性を示し(表1)、また-SH基を持つと思われるDNA合成活性が見い出された。肝臓細胞核にはrATP依存活性が既に報告

されており[9][14]、rATP依存性活性はSH阻害剤により阻害される複製酵素である事が推測されている。[9] 一方発育中の小脳から部分精製されたA型酵素（変性DNA依存度が高く複製性と考えられている）は、rATPにより活性化されるSH酵素である事が示された。[5][6][7] これらの報告からみて、成熟大脳皮質の細胞核にも複製性の酵素が含まれる可能性が高いと思われる。しかしこうした依存性を示さない活性部分の方がより多く、ChuとSungにより報告されたB型酵素（未変性DNA依存度が高く修復性酵素と考えられている[3][6][7]）の特徴をより多く示している。

肝臓細胞核内のDNA合成活性は、NADより合成されるADPRポリマーによって阻害される事が知られている。[3][4] 同様な阻害は大脳皮質核にも見い出されるが（表2）NMNによって阻害されなかった。ニューロン核はNMNとrATPより活発にNADを合成するが、[12] この反応条件では、阻害するのに充分なNADが合成されていないためと思われる。

DNA添加実験により、DNA合成酵素の酵素量は、P51核よりP3核に高い事が推測された（図および表4）。従って表3から計算されたニューロン核内の高い合成活性は、酵素量を反映するものではなく、むしろクロマチンDNAのテンプレイト・プライマー活性が高い事を意味している可能性が強い。肝臓およびその変性化細胞核でも、添加DNAがDNA合成活性を高める事が知られている。[2][14] DNA無添加のときは細胞核自体のDNAが合成されるのに反して、添加した時には添加DNAと同じDNAが合成されると報告されている。[14] 従って同じ量の核内DNAと仔ウシ胸腺DNAが、分離核内のDNA合成酵素によって全く同等にテンプレイト・プライマーとして利用されるとは考えにくい。しかし図の未変性DNAによる活性増加曲線を横軸のマイナス側に外挿し、横軸との交点を求める事により、「仔ウシ胸腺DNAを尺度として、核内クロマチンの何％のDNAがテンプレイト・プライマーとして働いているか」を知る事は可能である。この方法により、P51核 1.5％, P3核 0.8％, 肝臓核 8.0％という値が得られ、前述のニューロン核のテンプレイト・プライマー活性が高いという推論を裏付けている。またA型、B型酵素のテンプレイト依存度の相違を考慮すると、[5][6][7] 図にみられる未変性、変性DNAによる、活性増加度の相違は、両酵素の存在比の相違を暗示していると思われる。各標品にみられる、高濃度のDNA添加による活性増加の抑制現象については、その意味づけは困難である。

表5に示されたように、P51核標品のような混合核標品では、それぞれ異種類の構成核内のクロマチンDNAと酵素間の相互作用を考慮に入れねばならない。従ってP51核標品とP3核標品にみられる相違から、直接ニューロン核の性質を推測するのは未だ危険であり、各核標品から抽出精製した酵素（分解酵素も含めて）や、抽出後のクロマチンにみられるテンプレイト・プライマーについて研究が進められるべきであろう。

〔文　献〕

(1) Altman,J. and Chorover,S.L.,(1963) J.Physiol.169,770 (2) Behki,R.M. and Schneider,W.C.,(1963) Biochim. Biophys.Acta, 68, 34 (3) Burzio,L. and Koide,S.S.,(1970) Biochem.Biophys.Res.Commun.40, 1013 (4) Burzio, L. and Koide.S.S.,(1971) Biochem.Biophys.Res.Commun.42, 1185 (5) Chiu,J.F. and Sung,S.C.,(1971) Biochim. Biophys.Acta, 246, 44 (6) Chiu,J.F. and Sung,S.C.,(1972) Biochim.Biophys.Acta, 262, 397 (7) Chiu.J.F. and Sung,S.C.,(1972) Nature New Biol.239, 176 (8) Chiu,J.F. and Sung,S.C.,(1973) J.Neurochem. 20, 617 (9) Girsham,J.W. et al,(1972) Biochem.Biophys.Res.Commun.49, 420 (10) Kato,T and Kurokawa,M.,(1967) J.Cell Biol. 32, 649 (11) Kissane,J.M. and Robins,E.,(1958) J.Biol. Chem. 233, 184 (12) Kurokawa,M et al, (1966) Proc.Jap.Acad. 42, 1217 (13) Lowry,O.H. et al, (1951) J.Biol.Chem. 193, 265 (14) Probst,G.S. et al, (1972) Biochim.Biophys.Acta, 281, 216 (15) Shimada,H. and Terayama,H., (1972) Biochim.Biophys.Acta,287, 415

16. ニューロンのクロマチンにみられる特性

溝部文夫・田代朋子
瀬谷典子・黒川正則
（東大・医・脳研）

〔要　約〕

ニューロンの細胞核はオリゴデンドログリア核や肝細胞核よりも高いRNAポリメラーゼB活性を示す。このことは以下に述べる理由から、ニューロンのクロマチンDNAにおける超構造の特性に由来するものと思われる。

(1) 脳の細胞核、肝細胞核からそれぞれRNAポリメラーゼBを可溶化、精製して比較すると、溶出パタン、タンパクあたりの比活性、硫安の至適濃度、テンプレート要求、2価イオン要求、メーアマニチン感受性の面で差異を認めない。

(2) 肝細胞核をトリプシンで処理すると、RNAポリメラーゼB活性は4～5倍に増加する。この際RNA合成の読取り開始は約八倍、RNAの平均鎖長は約2.6倍にふえる。オリゴデンドログリアの核でもおなじ方向の変化がおこるが、肝細胞核にくらべて増加の程度は少ない。ニューロン核ではトリプシン処理によってRNA合成は促進されない。

(3) ニューロンのクロマチンは270～290 nmの波長域で、肝クロマチン、オリゴデンドログリアのクロマチンよりも高い円偏光二色性を示し、DNAの超ラセン構造が相対的にゆるい状態にあるものと推定される。トリプシンまたはドデシル硫酸で処理すると、3種類のクロマチンの間に認められる円偏光二色性の差は消失する。

ニューロンの細胞核はオリゴデンドログリアの核、肝細胞核などにくらべてRNA合成能が高く、これは主としてRNAポリメラーゼBの活性が高いことによるものである (KATO & KUROKAWA 1968, 1970)。この知見は最近他の研究者によっても確かめられた (AUSTOKER et al. 1972; THOMPSON 1973)。

ニューロンの核（およびクロマチン）は、トリプシンによる部分的水解後のRNA合成について他の核（およびクロマチン）とは明瞭なちがいを示す。またニューロンのクロマチンが他のクロマチンよりも高い円偏光二色性を示す点も特徴的である (KUROKAWA et al. 1973)。以下に述べる事実から，ニューロンではクロマチンDNAのテンプレート活性が他のクロマチンよりもゆるやかな抑制を受けているものと推定される．ニューロン核における高いRNA合成活性は、少なくともその一面においては、テンプレート側のこのような特性にもとづいて説明することができる。

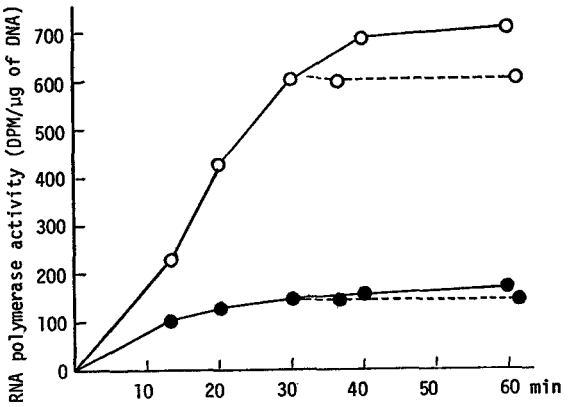
実験方法

成熟モルモットの大脳皮質からニューロン核を約50%ふくむP50核と、オリゴデンドログリア核(P3)を分離[4][6][8]、-80°Cに保存した。クロマチンは分離核より調製[1][2]、0～4°Cに保って10時間以内に使用。RNAポリメラーゼA,Bは MANDEL & CHAMBON (1971) に従って精製し、-80°Cに保存した。RNAポリメラーゼ活性の測定条件は才1図，才2図に付記した。また反応液のTCA沈渣を脱脂した後、[^{3}H]RNAをアルカリ水解し、(0.3N KOH, 37°C, 16時間)、活性炭に吸着、溶出後、沪紙クロマトグラフィー(95%エタノール：1M酢酸アンモニウム 7:3 v/v)によって[^{3}H]3'-UMP(Rf=0.2)と[^{3}H]U

(R_f=0.6)を分離し、それぞれの放射能を測定した。円偏光二色性(以下CDと略記)は第3図に付記した条件で測定し、DNA残基の濃度にもとずいて、平均残基楕円率〔θ〕を計算した。核のDNAは蛍光測光により定量[7]。クロマチンのDNAは0.25%ドデシル硫酸存在下のOD$_{260}$値から、ε_p=6800として計算した。タンパクの定量はLOWRY等の方法[9]によった。

実験結果と考察

P_{50}核と肝細胞核を0.3M硫安-25%グリセロール内で超音波によって破砕し、RNAポリメラーゼを可溶化、硫安沈澱後、DEAEセルロース・カラムを通して酵素A, Bを分離した[10]。溶出パタンはいずれの核でもおなじであり、硫安の直線勾配において0.25M付近で酵素Bが溶出される。またコウシ胸腺DNAをテンプレートとして活性を測ると、比活性(4~5 m mol/mg タンパク/10分, 37°C)、最高活性に必要な硫安濃度(60~80 mM)、テンプレートとして変性DNAを選択すること、2価イオン要求($Mn^{2+} > Mg^{2+}$)およびα-アマニチン感受性などの点で、脳の酵素と肝の酵素は同一の態度を示す。ただし核DNA量あたりの酵素活性の回収量を概算すると、P_{50}核は肝細胞核の3~4倍高い回収率を示す。しかしこのことは酵素Bの分子そのものがP_{50}では多いことを意味するとは限らず、P_{50}核では上記の条件下で酵素が可溶化されやすい状態にあることを示すものかもしれない。最近CHAMBON等[2]は〔^{3}H〕α-アマニチンとRNAポリメラーゼBとの特異的な結合を利用してこの酵素の分子数を推算し、単位DNAあたりの分子数については、各種の核を通じてそれほど極端な開きはないと述べている。



第1図 肝細胞核におけるRNA合成—トリプシン処理による変化

●—● トリプシンなし。○—○ トリプシン 10μg/試験管。いずれも反応10分後に硫安を加える(→0.4M)。破線の場合は3.2分の時点でUTP付加(→0.5mM)。反応液(0.5ml)の組成(終濃度):

Tris-HCl, pH 8.0 (100 mM); $MnCl_2$ (2 mM); β-mercaptoethanol (10 mM); $(NH_4)_2SO_4$ (0.4 M); ATP, CTP & GTP (0.5 mM each); UTP (0.01 mM); [5-^{3}H]UTP 1.5 μCi; nuclei (30-60 μg as DNA).

第1図は肝細胞核におけるRNA合成の時間的経過を示している。●—●は反応液内にトリプシンをふくまない条件で、○—○はトリプシン10μgの存在下で反応を開始し、いずれも10分後に0.4Mになるように硫安を加えた場合である。硫安存在下のRNA合成(主としてRNAポリメラーゼBの反応)は、核のトリプシン前処理によって約5倍に増加する。調製直後の新鮮なクロマチンについても、核と同じパタンの反応が観察される。硫安が存在しない場合のRNA合成(主としてRNAポリメラーゼAの反応)も、トリプシン処理によって増加するが、その程度はきわめてすくない(第2図参照)。第1図の破線は、反応3.2分後に5.9倍量のUTPを加えて〔^{3}H〕UTPを稀釈した場合の経過であり、とりこまれた〔^{3}H〕UMP量がその後少なくとも30分間にわたって減少しないことから、この条件下で新生RNAの水解がおこらないことは明らかである。これはP_{50}核の場合でも同様である。

才1表　新生[^{3}H]RNAのアルカリ水解

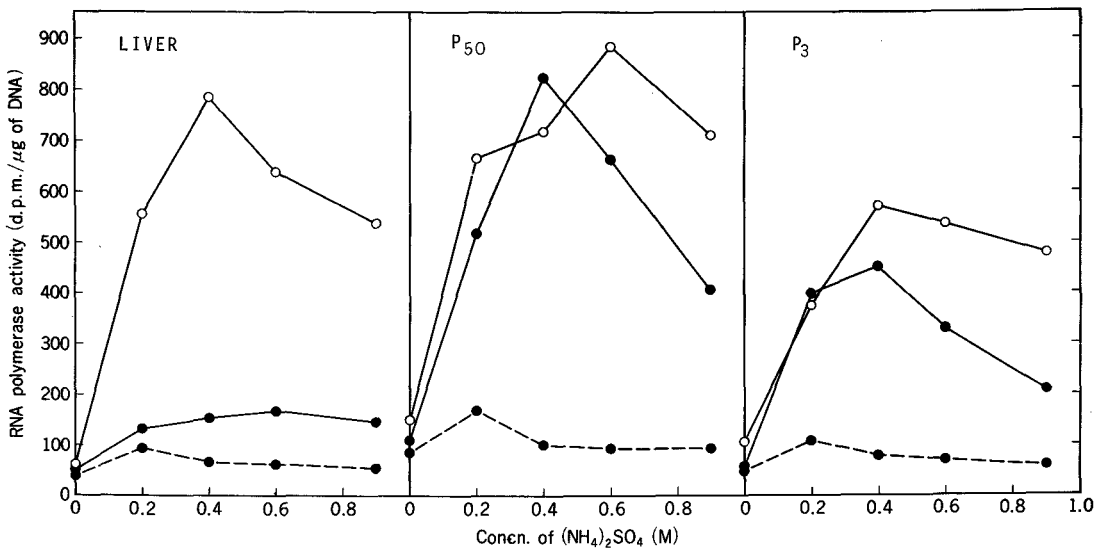
Liver Nuclei	[^{3}H]UMP	[^{3}H]U	UMP/U
Trypsin (-)	111 ± 12	2.22 ± 0.35	51 ± 6 (5)
Trypsin (+)	485 ± 52	3.80 ± 0.57	134 ±21 (4)
Ratio (+)/(-)	4.4	1.7	2.6
P_{50} Nuclei	[^{3}H]UMP	[^{3}H]U	UMP/U
Trypsin (-)	1592 ±103	14.6 ± 0.9	109 ± 1 (3)
Trypsin (+)	1244 ± 64	11.1 ± 0.6	112 ± 2 (3)
Ratio (+)/(-)	0.78	0.76	1.0

DPM/μg of DNA　　Mean ±S.E.

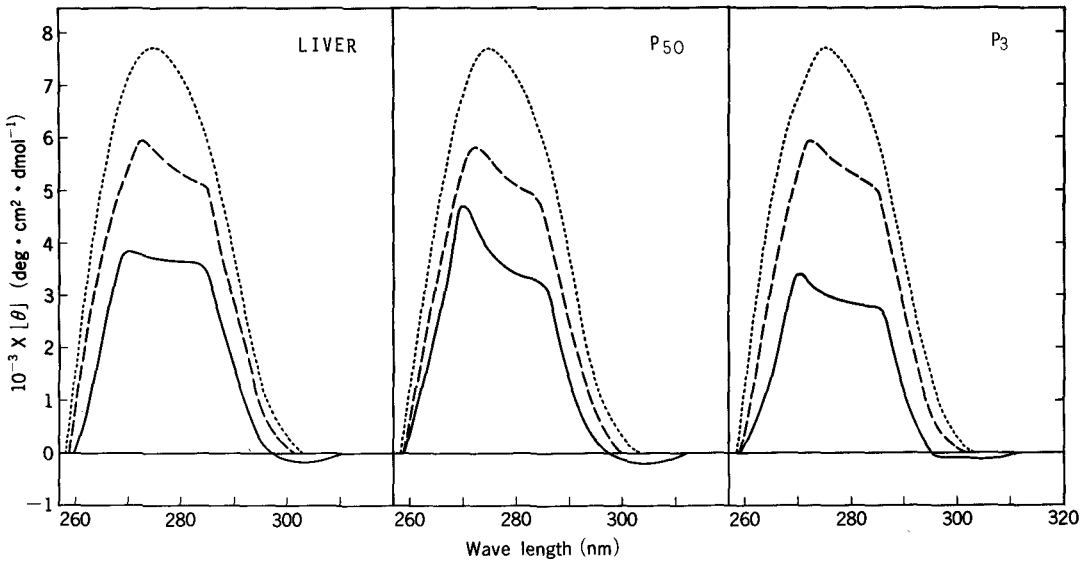
才1表は新生[^{3}H]RNAをアルカリ水解後[^{3}H]3'-UMPと[^{3}H]Uを分離、定量した結果を示す。Uは読取り開始部位の数、UMP/UはRNAの平均鎖長に対応すると考えることができるから、トリプシンは読取りの開始を容易にすると同時に、鎖長を伸ばす(2、6倍)ように作用することがわかる。

才2図は肝細胞核、P_{50}核、P_3核について、トリプシン処理にともなうRNA合成の変化を示している。肝細胞核ではすべての硫安濃度でRNA合成が促進されるが、0.4Mでもっともいちじるしい。同様の促進はオリゴデンドログリアの核(P_3)でも認められるが、肝細胞核よりも程度が少ない。これにくらべてP_{50}核では0.4M以下の硫安ではとんど促進されないか、むしろ僅かながら抑制が認められ、これはニューロン核の性質をあらわしている。0.6M以上の硫安による促進は、P_{50}核に混在するオリゴデンドログリア核によって説明することができる。P_{50}核では0.4M以下の硫安でトリプシンによるRNA合成の促進が認められないことに対応して、Uおよび UMP/Uの増加はみられない(才1表)。P_{50}を特徴づけているのは、トリプシンで処理するまでもなく、最初からU, UMP/Uが高いことである。

P_{50}核クロマチンのCDスペクトルは、肝細胞核やオリゴデンドログリア核にくらべて高く、特に290mμから270mμの波長域にわたって急激に上昇することが特徴的である(才3図)。トリプシンで処理すると、3種類のクロマチンの間に認められたCDスペクトルの差は



2　肝細胞核、P_{50}核、P_3核におけるRNA合成 ― トリプシン処理による変化。
●―● トリプシンなし。○―○ トリプシン 10μg/試験管。いずれも反応開始10分後に硫安を加え、その30分後に反応を停止。破線はα-アマニチン(1μg/mL)存在下の反応(トリプシンなし)。



3 肝細胞核、P_{50}核、P_3核クロマチンのCD(円偏光二色性)スペクトル
——未処理のクロマチン　----トリプシン(13μg/mℓ)処理後　••••0.5% SDS処理後
(PH8, 25℃, $OD_{260} \fallingdotseq 1.3$, 光路1cm)

消失する。またSDS処理は裸のDNAのCDスペクトルを示すと考えられているが[13]この場合も3種類のクロマチンは同じCDスペクトルを示す。260−320nmの波長域における〔θ〕の高値は、クロマチンDNAの疎な超ラセン構造に、またはDNAのB型が相対的にC型よりも多いことに対応している。[3]またトリプシンはクロマチンDNAの超ラセン構造を維持しているヒストンの架橋を水解することによって、クロマチンの立体構造をゆるめるものと考えられる。[14]このような解釈をとれば、ニューロンのクロマチンは元来ゆるい超ラセン構造を持つために、RNAポリメラーゼ分子とDNAテンプレート部位との接触を妨げるような立体的要因が少なく、その結果高いRNA合成能を示すのである、と考えることができる。テンプレート活性の高いクロマチン(ほぼオイ・クロマチンに対応する)はテンプレート活性の低いクロマチン(ヘテロ・クロマチン)にくらべて相対的に高いCDを示すという最近の報告[11]や、ニューロンの核が元来きわめて豊富なオイ・クロマチンによって満されているという古くからの形態学的な観察は、この意味で特に注目をひくのである。

文　献

[1] AUSTOKER J., COX D. & MATHIAS A.P. (1972) Biochem. J. 129, 1139-1155 [2] CHAMBON P., GISSINGER F., KEDINGER C., MANDEL J.L., MEILHAC M. & NURET P. (1972) Acta Endocrinol., Suppl. 168, 222-242 [3] HANLON S., JOHNSON R.S., WOLF B. & CHAN A. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 3263-3267 [4] KATO T. & KUROKAWA M. (1967) J. Cell Biol. 32, 649-662 [5] KATO T. & KUROKAWA M. (1968) Proc. Japan Acad. 44, 748-753 [6] KATO T. & KUROKAWA M. (1970) Biochem. J. 116, 599-609 [7] KISSANE J.M. & ROBINS E. (1958) J. Biol. Chem. 233, 184-188 [8] KUROKAWA M., TASHIRO T., MIZOBE F. & SETANI N. (1973) FEBS Lett. 34, 165-168 [9] LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 [10] MANDEL J.L. & CHAMBON P. (1971) FEBS Lett. 15, 175-180 [11] POLACOW I. & SIMPSON R.T. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 202-207 [12] SHAW L.M.J. & HUANG R.C.C. (1970) Biochemistry 9, 4530-4542 [13] SHIH T.Y. & LAKE R.S. (1972) Biochemistry 11, 4811-4817 [14] SIMPSON R.T. (1972) Biochemistry 11, 2003-2008 [15] THOMPSON R.J. (1973) J. Neurochem. 21, 19-40

17 ラット大脳の酸性ＤＮＡ分解酵素の性質

野口鉄也・須田治彦
塚田裕三
（慶大・医・生理）

〔要　約〕
ラット大脳に認められる二種のDNA分解酵素のうち，酸性側に至適pHをもつDNA分解酵素(acid DNase)の精製を試み，その性質の一部を明らかにした。
すなわち，ラット大脳より抽出，精製されたacid DNaseは基質としてnative DNAをとり，その活性出現にはMg^{++}或いはMn^{++}を必要とし，その至適濃度はMg^{++}で40mM，Mn^{++}で30mMであった。又至適pHは4.5であった。更に100mM以上のNa^{+}，K^{+}いずれの存在によっても酵素活性は抑制された。DNase Ⅰはnative DNAを分解し，Mg^{++}を要求するが，至適pHは6.8－8.2であり，DNase Ⅱは300mM Na^{+}を要求し，至適pHは4.5－5.5であることが知られている。従ってラット大脳のacid DNaseはDNase Ⅰ，DNase Ⅱいずれともその性質を異にする酵素と考えられる。

昨年の本会で吾々はすでに脳の発育に伴うDNA分解酵素の活性の変動，細胞内顆粒でのその分布変動　等につき報告した。(1)　今回は2種のDNA分解酵素のうち，酸性側に至適pHをもつDNA分解酵素(acid DNase)の精製を行い，その性質の一部を明らかにしたので報告する。

〔実験方法〕

精製方法　Fig 1の方法に従って0－4℃下にて精製を行った。先ずラット大脳を湿重量の10倍容の脱イオン水で Teflon Pestle Glass Homogenizer を用いて homogenize し，Homogenate を50,000g 60分遠沈，その上清を得た。沈渣を再び5倍容の脱イオン水で suspend し遠沈，その上清を1回目の上清に加えた。これに最終濃度10mMになるようにTris HCl Bufferを加えpH 7.4に調整し，次いで硫安分画を行い60－85%飽和硫安画分を得，その画分を水に対して一晩透析した。透析後，試料にAmmonium acetate buffer pH 5.0を10mMになるように加えpH 5.0とし，37℃，30分温浴，出来た沈澱物を2000g，30分遠沈，除去した。この上清を10mM Tris HCl buffer pH 7.4に対して透析し，これをSephadex G-200カラムで分画した。

Sephadex G-200カラム　Sephadex G-200カラム(2.4×100cm)は予め10mM Tris HCl buffer pH 7.4で平衡させ，カラム温度は外套管で4℃に保った。溶出は上記Tris bufferで行い，流速は6ml/時間とした。

酵素活性の測定　Complete system として，次のSystemを用いた。50μg native DNA，40mM $MgCl_2$，5－10μg蛋白量の酵素標品，最終濃度25mM Ammonium acetate buffer pH 4.5，全量1mlとし，37℃，60分温浴，氷冷過塩素酸で反応を止め，その

3,000rpm, 20分の上清を260nmで測定し，酵素活性を算出した。基質DNAはCalf Thymus DNA (Worthington) を用いた。尚ATPの添加実験にはBurton法(2)で生成物を測定した。

反応生成物の分画　Complete systemを用いて12時間，37℃で温浴し，Sevagの方法(3)に従って酵素反応を止め，7M Ureaを含む0.01M Tris HCl buffer pH 7.5 で予め平衡にしたDEAE-Celluloseカラム (Chloride型，2.0×30cm) に反応生成物をのせ，同bufferのNaCl濃度を0から0.4Mに直線的に増加させながら溶出し，260nmで測定した。(4)

〔結果及び考察〕

精製　Fig 2-iはSephadex G-200カラムの溶出パターンを示す。acid DNaseは主Peak Aと肩Peak Bの2つの部分に分かれ，各PeakはFig 2-iiとiiiに見られるように再カラムによっても全く同じ部位に溶出される。このことからacid DNaseは主なるComponent Aばかりでなく，Bを含むいくつかのComponentから成りたっていることを示唆し，この現象は水抽出段階の上清に直接硫安分画を行った時にも認められていた。(1) 各精製段階での酵素の回収率及び比活性を見ると (Tab.1)，Sephadexカラムによって精製されたPeak Aは大脳Homogenateに比較して，回収率は30%で，約300倍増加した比活性を示した。又pH 5.0 Supernatantを Sephadexカラムで分画するとTotal activity (従って回収率も) が増加することを認めたが，これはpH 5.0 Supernatantに含まれているInhibitor (塩類或いは高分子物質?) がカラムによって酵素画分から分離したためと思われる。

次いで，このPeak A画分を用いてacid DNaseの性質を検討した。

Metal requirement　Fig 3に示すようにacid DNaseは Mg^{++}, Mn^{++} いずれによっても

Fig.1

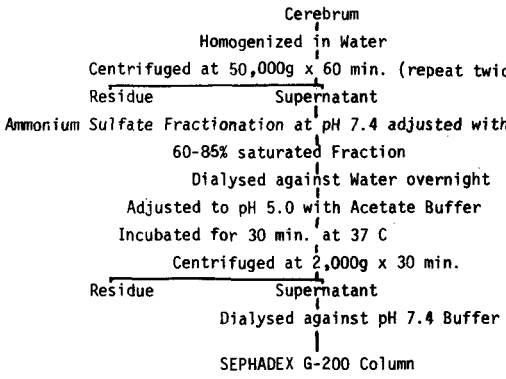


Fig.2-i

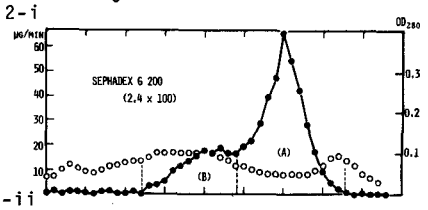


Fig.2-ii

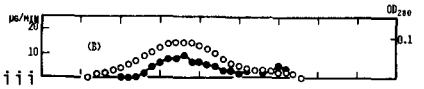
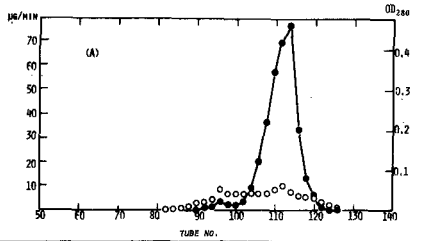


Fig.2-iii



Tab.1

Fraction	Total Protein (mg)	Total Activity (μg/min)	Specific Activity (μg/mg/min)	Yield (%)
Cerebrum Homogenate	5146	1220	0.237 (1)	100
50,000g Supernatant	1544	1368	0.866 (3.65)	112
Ammonium Sulfate 60-85% saturated Fr.	328	613	1.87 (7.88)	50.2
pH 5.0 Supernatant	89.6	500	5.58 (23.5)	41.0
Sephadex G 200 Fr. (A+B)	33.7	605	18.0 (75.8)	49.6
Sephadex G 200 Peak A	4.83	376	77.8 (328)	30.8

活性化され，その至適濃度は Mg^{++} 40mM, Mn^{++} 30mM であった。又それぞれの濃度によって得られる最高活性値は全く同値を示した。

Ionic strength optimum 脾及び胸腺から得られているDNase Ⅱは至適pHを4.5～5.5にもち 300mM Na^+ で活性化される。そこで本酵素標品を用いて Na^+, K^+ の影響を見ると(Fig.4)，Na^+, K^+ いずれも同じ効果を示し，イオン間の差がない。30mMで約30%の活性の上昇を認めるが，100mM以上では抑制効果を示し，250mMを越えると失活した。しかし，Na^+, K^+ が酵素の側に働くのか，或いは基質としてのDNAに働くのか，明らかでない。一方 Ca^{++} を Assay system に加えると抑制効果を示し，50mMで約30%の抑制を認めた。

pH optimum Fig.5に見るように，至適pHは4.5にあり，4.0及び5.5の活性はpH4.5の約85%，65%であった。尚用いた buffer は全て Ammonium acetate buffer である。

その他の性質 以上の結果から方法に示した Complete system を定め，時間に対する活性(Fig.6)，酵素量に対する活性(Fig.7)をみると，反応は90分まで直線的に進行し，又酵素蛋白量 0－15μg の間では，酵素量の増加に従って反応生成物も直線的に増加した。Lineweaver-Burk の方法によって acid DNase の Km を求めると(Fig.8)，Complete assay system，native DNA 基質で 16.67μg/ml の値を得た。以上の他に Tab.2 に見られるように本酵素は 10mM ATP の添加で活性の上昇は認められず，又100℃，10分間処理した heat derenatured DNA も，又RNAも基質とはなり得ないことを示した。(RNAは yeast RNA(sigma)を用いた。)

反応生成物の検討

Complete assay system で得られた反応生成物について DEAE Cellulose カラムを用いて分

Fig.3

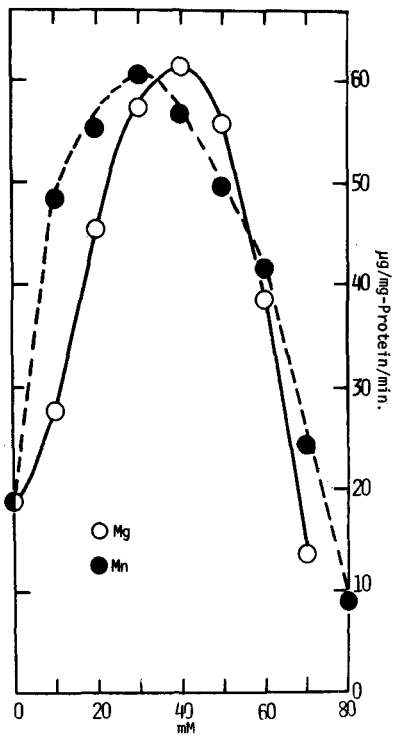


Fig.4

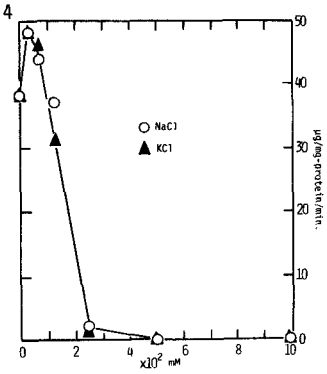


Fig.5

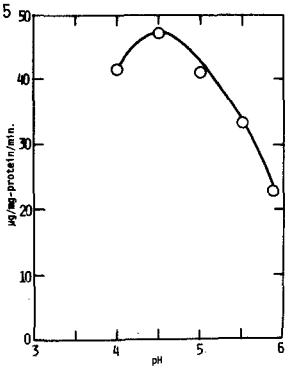


Fig.6

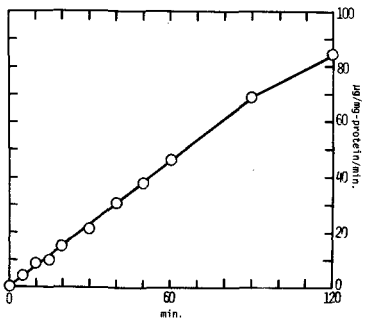
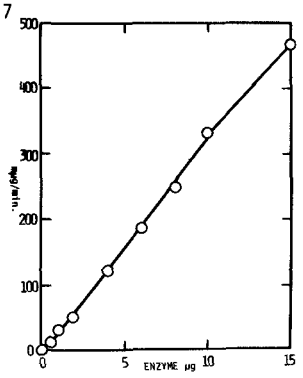


Fig.7



更に Oligonucleotide の Chain length を検討した。Fig.9に示すごとく，長い Chain を有する Oligonucleotide の外認められ Mononucleotide はなかった。従ってラット大脳より得られた acid DNase は従来想定されているように(5) Endonuclease であろうと考えられる。現在本酵素の加水分解部分について目下検討中である。

DNase I (膵臓 DNase) は native DNA を加水分解し，Mg^{++}を要求するが，至適 pH は 6.8-8.2 である。脾臓及び胸腺に認められる DNase II は 300mM Na^{+} を要求し，至適 pH は 4.5-5.5 である。(6)一方吾々がラット大脳より抽出，精製した acid DNase は native DNA を基質とし，Mg^{++} 或いは Mn^{++} を要求し，至適 pH は 4.5 にある。更に Na^{+} 或いは K^{+} の存在によって抑制される。(7)これらのことから，ラット大脳の acid DNase は DNase I，DNase II いずれともその性質を異にする酵素と考えられる。

〔文 献〕

(1)野口，須田，塚田 (1972)，神経化学，11，36

(2) Burton, K (1956), Biochem. J. 62, 315

(3) Sevag, M. G (1934), Biochem. Z. 273, 419

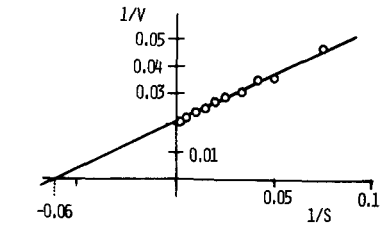
(4) Carrara, M and Bernardi, G (1968), Biochem. 7, 1121

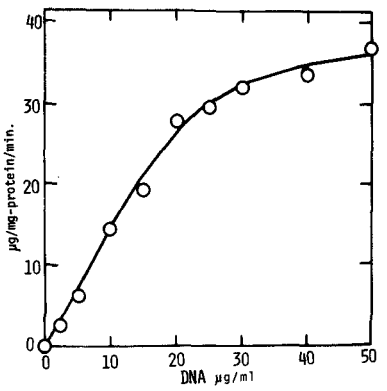
(5) Sung, S.-C. (1968) J. Neurochem. 15, 477

(6) Laskowski, M. Sr., (1971) The Enzymes, vol IV, ed. by Paul D. Boyer (Acad. Press) p. 289.

(7) Lehman I. R., (1971) The Enzymes, vol IV, ed. by Paul D. Boyer (Acad. Press) p 271.

Fig.8

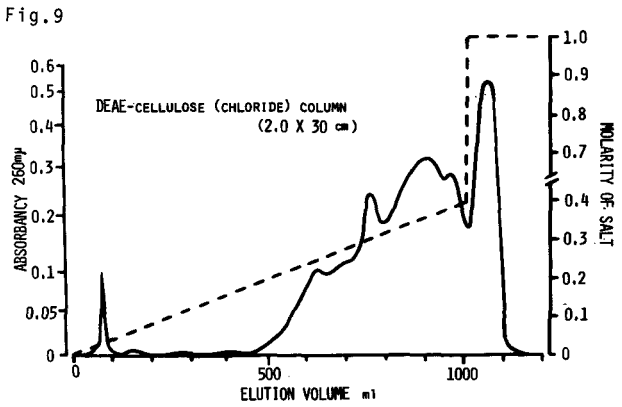




Tab.2

Complete System	100
" -Mg	13.1
" + ATP(10mM)	102
Boiled Enzyme	0
as Substrate (instead of native DNA)	
heat denatured DNA	16.5
RNA	6.52

Fig.9



18 マウス脳DNAのReassociation kinetics とそのDNA duplexes の性質

森　浩一
（阪市大・医・神経）
M.Wintzerith・ P.Mandel
（フランス・CRNS）

〔要　約〕

1) マウス脳の核 DNA を超音波処理により FRAGMENTATION した。FRAGMENT SIZE は4.9 x 10^5 DALTONS, アルカリ条件下では 7.5 x 10^4 DALTONS で、FRAGMENT中に 2 個の NICKSがあり単鎖での平均鎖長は 250 NUCLEOTIDES であった。

2) マウスの脳および肝DNA FRAGMENTのREASSOCIATION KINETICS に有意差は認められない。REASSOCIATION RATE CONSTANTはK_2= 0.0005 でこの K_2より求めた UNIT GENOME SIZEは2.14 x10^{12} DALTONS, 3.2 x 10^9 BASE PAIRS であり、マウスの脾、睾丸およびエンブリオのそれら、さらに MOUSE L-CELL や FIBROBLASTOMA CELL のそれらとも一致している。

3) マウス脳の DNA DUPLEXES の Tm は COT 10 で 73°C, COT 600で76.5°C, COT 2500 で 80°C, COT 9000 で 83°C となり RAPIDLY REASSOCIATING DUPLEXES ほど MISMATCHING が多い。

4) CsCl ANALYTICAL PYCNOGRAPHYで、マウス脳のSATELLITE DNAは 1.6924 g/cm³, MAIN BAND DNA は 1.702 g/cm³の DENSITYを示す。単鎖DNA の DENSITYは1.7110g/cm³ であり COT 10のDNA DUPLEX はSATELLITE DNA と単鎖DNAの DENSITYに近い2つのピークから成る。NUCLEASE S_1処理により、このCOT 10 DUPLEX の単鎖 DNA に一致する部分は二重鎖DNAの MAIN BANDのDENSITYに近い位置をとる。NUCLEASE S_1 処理後のCOT 150 DUPLEXのピークのDENSITYは NATIVE DNA のMAIN BAND のそれに一致する。

DNA-DNA REASSOCIATION KINETICSに基づいて、高等生物のゲノムには 反復配列DNA と非反復配列 DNA が含まれることが BRITTEN[3]らにより明らかとされた。マウス脳DNA の REASSOCIATION KINETICS とそのDNA-DNA DUPLEXES の性質について検討を加え、単鎖DNA に特異的に作用するNUCLEASE S_1 を利用することにより MISMATCHING の少ない反復配列 DNA を分画できると考えられるので報告する。

1) 実験方法

1-1) DNAの FRAGMENTATION

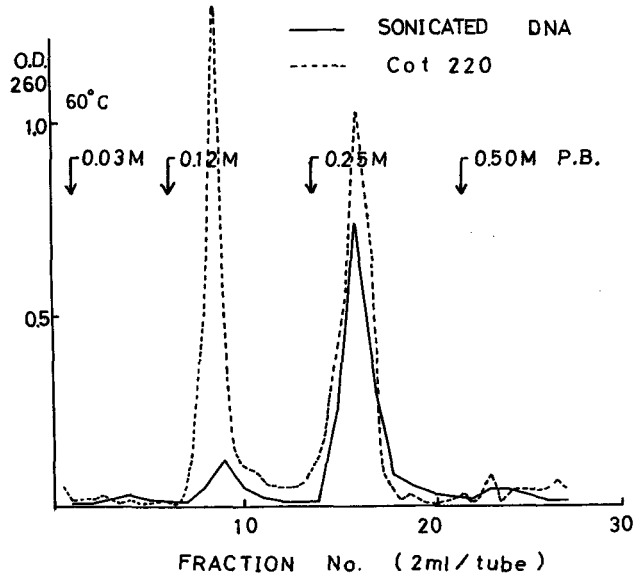
マウスの脳および肝の DNA はRPC5 および dd系マウスの核分画より MARMUR[11]の方法に従い抽出、RNASE 処理のあと PRONASE処理（250μg/ml, 37°C, 24時間）を行ない、残っている少量の蛋白と RNASE の分解を行なった。

DNAの FRAGMENTATION は超音波処理によって行なった。[12] すなわち DNA を0.12M PHOSPHATE BUFFER, pH 6.8(PHOSPHATE BUFFERを以下 P.B.と略) にとかしその濃度を 4 O.D. 260mμ/ml として M.S.E. SONIFIERを用いて DNA分子を切断した（周波数 20KC/s, PROBE φ 3/8", PROBE DEPTH 5mm, SPINCO R40用 TUBEに4 mlの容量で 10秒間）。得られた DNA FRAGMENT の分子の大きさは沈降定数 $S_{20.w}$の値から BERNARDI[2]（S_{20w} =0.057x$M^{0.382}$:pH NEUTRAL) および STUDIER[14]（$S_{20.w}$=0.0528x$M^{0.400}$:pH ALCALINE）の計算式に従ってその平均分子量を求めた。$S_{20.w}$は SPINCO ANALYTICAL ULTRACENTRIFUGE で BOUNDARY CENTRIFUGATION TECHNIQUEを用いて測定した。

1-2) DNA FRAGMENT の REASSOCIATION

DNA FRAGMENT の 100 μg を 0.36M, 0.12M, 0.03M の P.B.にとかしその容量（25μl～4ml）

第1図
CHROMATOGRAPHY ON HYDROXYAPATITE OF SONICATED NUCLEAR MOUSE BRAIN DNA AND FRACTIONATION OF DENATURED AND REASSOCIATED DNA (Cot 220)



に応じて毛細管および細ガラス管に封入し、100°C, 10分間、沸騰水中で加熱変性させ、直ちに60°Cで求めるCot値が得られる時間の間インキュベートをつづける。

ここで示すCotはBRITTEN[9]らに従ってDNAの濃度(Co)と反応時間(T)との積で、単位はMOLE NUCLEOTIDES X SECONDS X LITER^{-1}で表わされる。実際の実験では次のようにCot = O.D.$_{260}$/2 X H X Fの計算式でCotを算出した。Hは時間、Fは反応常数で反応液中の一価陽イオンの濃度によって決まり中性リン酸緩衝液を用いた場合は0.12M P.B.を標準としF=1, 0.03M P.B.ではF=0.0133, 0.36M P.B.ではF=4.4778でCot値を算出した。[4]

REASSOCIATIONを終えたサンプルは冷却蒸留水で0.03Mに稀釈し、前もって60°CのWATER JACKETED COLUMN (⌀ 10mmX H 200mmBED DIMENSION) につめた1mlのHYDROXYAPATITE (HAPと略) に吸着させ、0.03M, 0.12M, および0.25M P.B.の各15mlで溶出、0.03Mおよび0.12Mで単鎖DNAが、そして0.25Mで二重鎖DNAが溶出される。各分画のO.D.$_{260}$を測定し、おのおのその百分率を求めた。

1-3) 熱変性曲線およびTmの測定

熱変性曲線およびTmの測定はDNAおよびそのDUPLEXESをHAPカラムに吸着させ、0.12M P.B.を溶出液として用いカラムの温度を逐次上昇させ、各温度で溶出したDNAのO.D.$_{260}$を測定し、50%のDNAが溶出する温度をTmとした。[12]

1-4) DNA-DNA DUPLEXWS に対するNUCLEASE S_1の処理

NUCLEASE S_1は、ANDO[1]およびSUTTON[15]の方法に従って調製した。反応液は0.03M ACETATE BUFFER(pH 4.5), 3 x 10^{-5} M $ZnSO_4$, 0.01M NaCl, 基質として0.5-1.0 O.D.$_{260}$のDNAおよびそれに相当するDNA DUPLEXES, それに50μlの酵素を加え、全量を1mlとして37°C, 6時間インキュベートした。反応は冷却によって停止し、直ちにクロロホルム-イソアミルアルコール(24 : 1 v/v)で除蛋白した。

1-5) CsCl 密度勾配遠心法によるDNAおよびDNA DUPLEXESの分析

NATIVE DNAおよびDNA DUPLEXESを透析後、凍結乾燥し、CsClおよび20xSSCを加えて最終濃度で1xSSC, そしてCsCl濃度をABBÉ屈折計で屈折率を1.4000(1.7067 CsCl g/cm^3)に調節し、標準紫外線吸収光学系付SPINCO MODEL E分析用超遠心機でKEL-F ROTORを用い25°C, 42,040 RPMで20-24時間遠心し、平衡状態で写真撮影したフィルムをJOYCE-LOEBELデンシトメーターにかけてANALYTICAL CsCl PYCNOGRAPHYを得た。MARKERとしてMICROCOCCUS DNA (d=1.731 g/cm^3)を用いた。

2) 結果および考察

2-1) DNA FRAGMENT SIZE

第1表

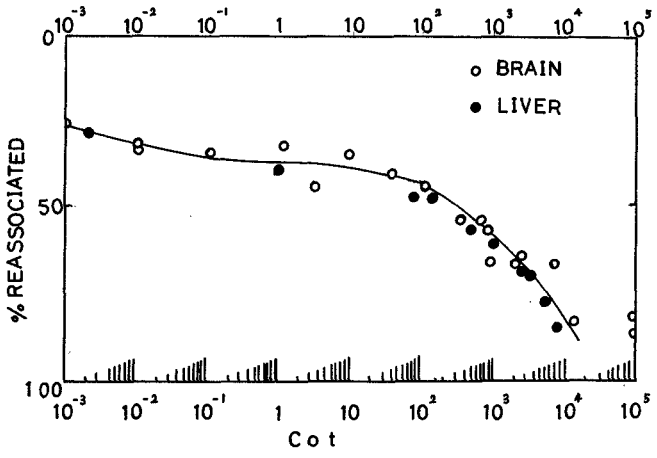
	pH NEUTRAL	pH ALCALINE
沈降定数 $S_{20,w}$	8.2	4.9
分子量 Mw(DALTONS)	4.9 x 10	7.5 x 10
塩基対の数 L	820	250
DOUBLE-STRANDED DNA	85 %	---

SONICATED DNA のHAPクロマトグラフィーを第1図に示す。85%のDNAが二重鎖DNAの溶出する分画で溶出されてくる。DNA FRAGMENTの大きさを第1表に示す。ここでアルカリ条件でのS値が中性条件でのS値より小さいことは、FRAGMENT分子の中にNICKが存在することを示すものであり、FRAGMENT中に存在するNICKの平均の数NNは OBRENOVITCH[13]によれば $N_N=\frac{Mw(NEUTRAL)}{2xMw(ALCALINE)}-1$ で表わされ、第1表の数値から $N_N=2.2$ で、これは1 FRAGMENT(中性)中に平均2個のNICKSがあることを示す。そして、このことはBRITTENらの方法でSHEARINGされたFRAGMENT[10]に存在するNICKの計算値 $N_N=2.5$ と一致する。しかし、後者のアルカリ条件下での塩基対の数は約400で、われわれの得たFRAGMENT(アルカリ性)の鎖長はその約2/3に相当する。

2-2) REASSOCIATION KINETICS

マウスの脳および肝のCOT カーブを第2図に示す。COT 400で50%のDNAがREASSOCIATEする($C_{OT}1/2 = 400$)。REASSOCIATIONのRATE CONSTANT $K_2 = 1/C_{OT_{1/2}}$ であるから $K_2=0.0025$ である。しかし、この値はGENOMEのDNAが全てUNIQUEであるとした時の値であって、実際には30%のDNAは理論値より早いREASSOCIATIONを示している。このために K_2 は見かけ上大きい値を示し、これを補正すると $C_{OT_{1/2}}=2000$ で $K_2=0.0005$ となり、この値はマウスの脾、睾丸のUNIQUE SEQUENCE DNAの K_2 と一致する。従ってREASSOCIATION KINETICSに関して脳、肝、脾睾丸など臓器DNAの間には差は認められない。またマウスのEMBRYO[7]、L-CELL[9]およびFIBROBLASTOMA[16]のDNAとの間にも有意差は認められていない。さらにこの K_2 の値からLAIRD[10]の方式に従ってUNITE GENOME SIZEを算出すると 2.14×10^{12} DALTONS, 3.2×10^9 BASE PAIRSとなる。

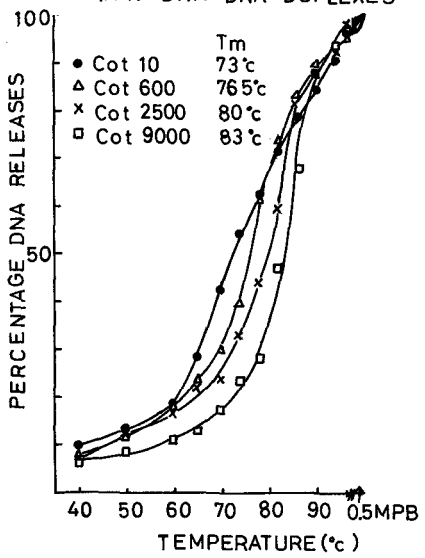
第2図 REASSOCIATION CURVE OF MOUSE BRAIN AND LIVER DNA



2-3) DNA-DNA DUPLEXのTm

DNA-DNA DUPLEXの塩基間の相補性(COMPLEMENTARITYあるいは逆にMISMATCHING)の程度は、そのTmによって示される[6]。MOUSE BRAIN DNA DUPLEXESのHAPクロマトグラフィーによる熱変性曲線を第3図に示す。COT 10, COT 600, COT 2500, COT9000のTmはそれぞれ73°C, 76.5°C, 80°Cおよび83°Cである。NATIVE DNAのTmは86°Cで、それとの差 $\Delta T_m=1°C$ は1.5%のMISMATCHINGに相当する(LAIRD[3]らの関係式)からそれぞれ19.5%, 14.3%, 9%および4.5%のMISMATCHINGがあり、したがって平均250個NUCLEOTIDES CHAINのうちそれぞれ平均して49個, 36個, 22個および11個がMISMATCHINGしておりCOT 10 DUPLEXはCOT 9000の4倍もMISMATCHINGが多いことがわかる。

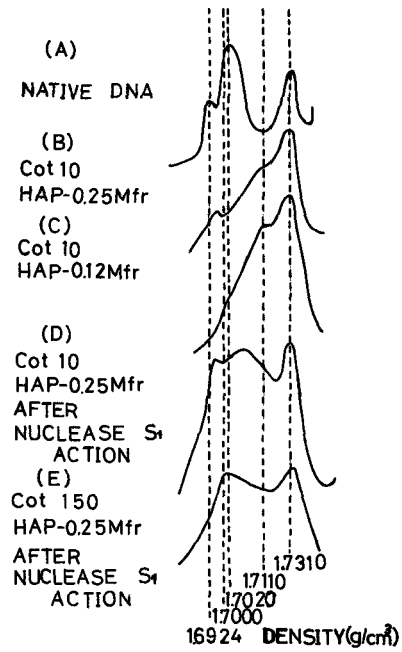
第3図 THERMAL DENATURATION OF MOUSE BRAIN DNA-DNA DUPLEXES



2-4) CsCl ANALYTICAL PYCNOGRAPHYによる BRAIN DNA DUPLEXES の分析

第4図はCsCl ANALITICAL PYCNOGRAPHYを示し点線は BUOYANT DENSITY を示す。 MOUSE BRAIN NATIVE DNA の MAIN BAND は 1.7020 g/cm³, SATELLITE DNA は 1.6924 g/cm³ に位置し、 MARKER の MICROCOCCUS DNAは 1.7310 g/cm³ に位置する (A)。単鎖 DNA は 1.7110 g/cm³ で二重鎖より重い DENSITYを示し(C), COT 10 の DUPLEXは SATELLITE DNA の DENSITY に等しい小ピークと単鎖DNAのDENSITY に重なる2つのピークとからなる (B)。 NUCLEASE S_1 の作用で単鎖DNA に対応する部分が分解消化されピークの位置が NATIVE DNA の MAIN BANDのピークに近づいた位置を示す。また、COT 150 DUPLEX を NUCLEASE S_1 で処理するとピークは NATIVE DNA の MAIN BAND のそれに一致する。したがって NUCLEASE S_1 はDNA DUPLEX の単鎖ヌクレオチドの部分を特異的に分解消化していることが分かり、MISMATCHING の多い RAPIDLY REASSOCIATING DUPLEX をこの NUCLEASE S_1 処理によって MISMATCHINGの少ない DUPLEX として得ることができる。しかし、 PYCNOGRAPHY における DUPLEX の BANDの広がりが NATIVE DNA のそれと比べてかなり広範囲にわたっていることは、DNA DUPLEXが NATIVE DNA とはなお少しではあるが異なった性質を有することを示唆すると考えられる。

第4図 ANALYTICAL PYCNOGRAPHY OF MOUSE BRAIN DNA AND ITS REASSOCIATED DUPLEXES



REFERENCE

1) Ando, T.; Biochim. Biophys. Acta 114, 158(1966)
2) Bernardi, G.; in Advance in Enzymology (Nord, F F. ed.) vol. 31, pp.1-49, Interscience Publi., New York and London (1968)
3) Britten, R. J. and Kohn, D. E.; Science 161, 529 (1968)
4) Britten, R. J. and Smith, J.; Carnegie Institution of Washington Yearbook, 68, 378 (1969)
5) Burton, K.; Biochem. J. 62, 315 (1956)
6) Church, K. and McCarthy, B. J.; Ann. Rev. Biochem. 39, 131 (1970)
7) Gelderman, A. H., Rake, A. V. and Britten, R. J ; Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 172 (1971)
8) Hahn, W.E. and Laird, C. D.; Science 173, 158 (1971)
9) Laird, C. D., McConaughy, B. L. and McCarthy, B. J.; Nature, 224, 149 (1969)
10) Laird, C. D.; Chromosoma 32, 378 (1971)
11) Marmur, J.; J. Mol. Biol. 3, 208 (1961)
12) Mori, K., Wintzerith, M. and Mandel, P.; Biochimie 54, 1427 (1972)
13) Obrenovitch, A. and Aubel-Sadron, G.; J. Chim. Phys. 68, 521 (1971)
14) Studier, F. W.; J. Mol. Biol. 11, 373 (1965)
15) Sutton, W. D.; Biochim. Biopys. Acta 240, 522 (1971)
16) Mori, K., Wintzerith, M. and Mandel, P.; unpublished data

19 実験的高フェニルアラニン血症白鼠の脳組織におけるArylsulfatase Aの活性について

平野修助・岩崎美恵子・戸張千年
（東邦大・医・2生理）
中井健而
（東邦大・医・総研）

〔要約〕

sulfatideの代謝には、合成系であるgalactocerebroside sulfotransferaseと、分解系である、cerebroside sulfatase 或いは、arylsulfatase Aが関与している事が知られている。そこで脳組織中のarylsulfatase Aについて検討を加え、併せて実験的高フェニールアラニン血症白鼠の脳組織中のarylsulfatase A活性の変化についても検討を加えた。

1) 高フェニールアラニン食で4ヶ月飼育した実験的高フェニールアラニン血症白鼠の脳homogenate中のarylsulfatase Aの活性は、対照に比べ増加の傾向を示したが、髄鞘分画中では、有意の差で増加を示した。 2) arylsulfatase Aの活性はTriton X-100 0.05%を、添加する事によって最も強く活性増加を来たした。 3) フェニールアラニン及びその中間代謝産物によるarylsulfatase Aの活性変化をみたが、phenylalanine, p-hydroxyphenylpyruvate, tyrosineでは、影響はなく、phenylpyruvic acidで活性の上昇を認めた。N-phenacetyl L-glutamineでは、活性低下を来たした。 4) 脳組織のsubcellular fraction中のarylsulfatase Aの比活性は、ミトコンドリア分画に最も高かった。しかし、Triton X-100 0.05%添加による活性の増加率は、髄鞘分画が最も高かった。 5) 脳組織中にもphenylpyruvic acid生成酵素の活性が明らかに認められたが、phenylpyruvic acid添加によるarylsulfatase A活性の上昇は脳の各subcellular fractionでも認められ、その増加率は、髄鞘分画で最も高かった。

発育期にある白鼠で実験的に作製された高フェニールアラニン血症動物の脳組織中のsulfatide量は、対照に比べ低く、^{35}S-sulfateのsulfatideへの^{35}S-放射能の比活性も対照に比べ低値を示し、高フェニールアラニン血症ではsulfatideの生成阻害の起こる事を、我々の教室で報告した。

一方、sulfatideの代謝にはgalactocerebroside sulfotransferaseと、cerebroside sulfataseが関与している事が知られており、sulfatideの分解系であるcerebroside sulfataseは、動物種により必ずしもarylsulfatase Aの活性と一致しないが、豚腎組織で精製した結果によればcerebroside sulfataseの活性とarylsulfatase Aの活性が共に同一の分画内に存在するとの報告[1]があり、一方Metachromatic leucodystrophyの場合にcerebroside sulfataseの欠損と同時にarylsulfatase Aの欠損もみられているとの報告[2]もあってarylsulfatase Aがsulfatideの分解に密接に関連している事が伺われる。

そこで今回は、脳sulfatideの代謝に関連し、実験的高フェニールアラニン血症動物の脳組織中のarylsulfatase Aの活性変化について検討を加えたので報告する。

〔実験方法〕

1) 実験動物：実験動物は、Wistar系の体重約100gの白鼠を7% L-phenylalanineを含む白鼠用固形飼料（オリエンタル酵母製）で4ヶ月間飼育し、実験的高フェニールアラニン血症動物を作った。瀉血屠殺時の血液中のphenylalanine及びtyrosineは、各々2.13及び0.48 μmoles/mlで、明らかに高フェニールアラニン血症状を示しており、また、脳組織内の遊離phenylalanine値も1.23 μmoles/gで、脳組織に於いても明らかに高フェニールアラニン血症の状態を示していた。

2) arylsulfatase A 活性の測定法：瀉血断頭後の頭蓋から、脳組織を可急的速やかに摘出し、組織重量当りの10倍量の0.32M sucrose 溶液中で脳組織を、Teflon Glass Homogenizer を用いて磨砕し酵素標品とした。活性測定は、Mehl[1]らの方法に準じ incubation medium には、0.2M acetate buffer (pH 4.3), p-nitrocatechol sulfate 2μmoles を含み、37℃空気相中で incubate した。反応は、1N NaOH を加えて停止し、遠沈後その上清を 515nm で測定し、nitrocatechol の生成量を測定した。酵素活性は、保温振盪して15分・30分と経時的に、直線的に増加する。活性は1時間当りの反応液中に含まれるタンパク量当りの nitrocatechol の量として表わした。本酵素活性は、aging 或いは freezing-thawing により活性増加がみられたので、本酵素活性の測定は、酵素を調製した後、可急的速やかに行った。

3) phenylpyruvic acid 生成酵素活性の測定：phenylpyruvic acid の生成酵素として、phenylalanine-pyruvate transaminase, phenylalanine-αketoglutarate transaminase, D-phenylalanine oxidase について、その活性を測定した。測定方法は、Lin[3]らの方法に準じて行い、生成した phenylpyruvic acid を、enole borate complex として、その量を測定した。比活性は、単位時間当りの反応液中のタンパク量当りの phenylpyruvic acid の生成量として表わした。

4) subcellular fraction の調整：脳組織を組織重量の10倍量の 0.32 M sucrose 中で Teflon Glass Homogenizer 中で homogenize し、800g x 20min で、核を除き、8000g x 15min での沈査をミトコンドリア分画とし、それ以外の上清を上清分画とした。ミエリン分画については、組織を、0.8 M sucrose 溶液中で Teflon Glass Homogenizer により homogenize し、0.32 M sucrose を重層して、55000g x 60 min. 遠心し、その中間層に得られるものをミエリン分画とした。

5) 化学物質の測定法：タンパク質は、Lowry[4]の方法、phenylalanine 及び tyrosine は、アミノ酸自動分析器によって測定した。

〔実験結果及び考察〕

sulfatide の代謝には、galactocerebroside sulfotransferase 及び cerebroside sulfatase が関与している事が知られ、また cerebroside sulfatase の活性は arylsulfatase A の活性と密接に関連する事も知られている。一方、実験的高フェニールアラニン血症動物では、脳組織の sulfatide 量が低下している事も確かめられており、高フェニールアラニン血症に於けるこの低下の原因を明らかにするために、arylsulfatase A の変化について検討を進めた。

成熟後の白鼠を高フェニールアラニン食で4ヶ月間飼育し、高フェニールアラニン血症を呈した脳組織の arylsulfatase A の活性を調べると、表-1に示すように、脳組織の homogenate では、実験群で増加の傾向を示し、髄鞘分画では、有意の差で高フェニールアラニン血症動物に高い事が示された。後述するように、本酵素は、0.05% Triton X-100 で最も強く活性化されるので、Triton 添加の場合の比活性も同時に測定したが、homogenate で 33.5%, myelin で 26.5% の増加が実験群で引き起こされていた。このことは、高フェニールアラニン血症に於ける sulfatide の低下が sulfatide の分解系の促進にも起因することを示している。高フェニールアラニン血症に於ける本酵素の活性化の原因を検討するために、本酵素の諸性質を検討する

(表－1)

ARYLSULFATASE ACTIVITY BRAIN TISSUE OF EXPERIMENTAL HYPERPHENYLALANINEMIC RAT

CONDITION / FRACTION	NORMAL	HIGH PHE	DIFFERENCE PERCENTAGE
HOMOGENATE			
NONE	108.9 ± 8.5	119.0 ± 14.5	+ 9.3*
+ TRITON	152.5 ± 8.0	203.6 ± 4.2	+33.5**
MYELIN			
NONE	43.3 ± 8.2	83.6 ± 20.2	+93.1***
+ TRITON	115.3 ± 21.2	145.8 ± 12.4	+26.5****

TRITON: 0.05% TRITON X-100

@ VALUES REPRESENT μMOLES/G-PROTEIN/HR. AND MEANS±S.D. OF 4 EXPERIMENTS.

EXPERIMENTAL RATS WERE FED BY HIGH PHENYLALANINE DIET FOR 4 MONTHS.

* P< 0.5, ** P< 0.01, *** P< 0.05, **** P< 0.1

と、本酵素はaging或いはfreezing-thawingにより、次第に増加するが、Triton X-100添加によっても、activationの効果がみられた。Triton X-100の濃度変化によるactivationの効果は、表-2に示すように、0.05%を含むincubation medium中で最も強くactivationされ約50%の増加がみられた。従って以後の実験に於いて、最大活性化を示す本酵素の酵素活性を測定する場合は、0.05% Triton X-100を含むincubation medium中で反応を行った。

(表 — 2)

EFFECT OF TRITON X-100 ON ARYLSULFATASE A ACTIVITY OF RAT BRAIN

TRITON CONCENTRATION IN MEDIUM	ABSORBANCE * MEANS±S.D.	ACTIVATION %
NONE	0.116 ± 0.008 (4)[a]	------
0.025 %	0.118 (2)	+ 1.7
0.05 %	0.173 ± 0.012 (4)	+49.1
0.1 %	0.119 (2)	+ 2.6

* ABSORBANCE NUMBERS ARE IN EXTINCTION AT 515NM AFTER INCUBATION FOR 15 MINUTES AT 37°C.

a EXPERIMENTAL NUMBERS ARE GIVEN IN PARENTHESIS.

(表 — 3)

EFFECTS OF PHENYLALANINE AND THE METABOLITES ON ARYLSULFATASE A ACTIVITY OF RAT BRAIN

ADDITION		SPECIFIC * ACTIVITY	ACTIVATION %
NONE		105.2	-------
L-PHE	5 MM	99.4	- 6.0
	10 MM	105.1	+ 1.0
L-TYR	5 MM	108.3	+ 3.5
	10 MM	120.4	+14.7
PPA[a]	1 MM	114.3	+ 9.5
	5 MM	134.8	+29.3
	10 MM	138.2	+33.7
pHPP[a]	1 MM	96.4	- 7.0
	5 MM	105.3	0
	10 MM	101.7	- 1.0
N-PHE GM[a]	1 MM	75.4	-27.0
	5 MM	66.3	-38.0
	10 MM	44.7	-57.7
TRITON X-100 0.05%		156.2	+49.0

INCUBATION TIME: 15 MIN.

* SPECIFIC ACTIVITIES REPRESENT μMOLES NITROCATECHOL LIBERATED PER G-PROTEIN FOR 60 MINUTES.

a PPA: PHENYLPYRUVIC ACID, pHPP: p-HYDROXYPHENYLPYRUVIC ACID, N-PHE GM: N-PHENACETYL L-GLUTAMINE

次にphenylalanine及びその中間代謝産物の、酵素活性に対するactivation効果をみると(表-3)、phenylpyruvic acidのみがactivationの効果を示し、濃度の上昇によって、activationの効果も増強され、10mMで33.7%の増加を示した。N-phenacetyl L-glutamineは、フェニールケトン尿症患者の尿中に見出され、ヒトの肝及び腎組織で生成される事が知られ[5]、脳には、その関与が少ないと思われる。しかし、本物質のみが、活性低下を引き起こしたので、ちなみにその効果についても検討を進めてみた。本酵素はlysozomal酵素であるので、この活性低下が、酵素活性の不活性化によるものか、活性阻害によるものかを、検討した(表-4)前述したように、本酵素は0.05% Triton X-100によって最も強く活性化されるので、nativeな条件と、Tritonにより活性化された条件とで、N-phenacetyl L-glutamineの濃度増加による阻害効果が、如何に異なるかを調べたが、濃度増加に伴う活性低下の割合は、N-phenacetyl L-glutamine 10mMで、nativeな条件で59%、Triton添加の時で47%と、ほぼ同程度の活性低下を示し、N-phenacetyl L-glutamineによる活性低下は、酵素の不活性によるものでなく、酵素活性の阻害によるものと理解出来た。

(表 — 4)

EFFECT OF N-PHENACETYL L-GLUTAMINE ON ARYLSULFATASE A ACTIVITY OF RAT BRAIN

ADDITION	SPECIFIC ACTIVITY	ACTIVATION %
NONE	85.8 ± 6.1 (7)	------
N-PHE GM		
1 MM	55.3 ± 10.7 (4)	- 35.5
5 MM	54.3 ± 7.8 (6)	- 36.6
10 MM	34.7 ± 3.9 (4)	- 59.5
TRITON X-100 0.05%	135.5 ± 15.3 (15)	------
+ N-PHE GM		
1 MM	125.9 ± 8.1 (8)	- 7.3
5 MM	102.9 ± 20.0 (7)	- 24.2
10 MM	71.9 ± 13.2 (8)	- 47.0

* VALUES REPRESENT μMOLES/G-PROTEIN/HR.

a EXPERIMENTAL NUMBERS ARE GIVEN IN PARENTHESIS.

N-PHE GM: N-PHENACETYL L-GLUTAMINE

次に、脳組織中のSubcellular fractionについて、Arylsulfatase Aの活性を調べたが、(表-5)先活性の最も強く存在するのは、粗ミトコンドリア分画であった。しかし、Triton添加によるactivationの最も強く起こるのは、髄鞘分画であり、その効果は、3倍にも達した。次いで、

(表 — 5)

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF ARYLSULFATASE A IN RAT BRAIN

FRACTION	SPECIFIC ACTIVITY (μMOLES/G-PROTEIN/HR)	ACTIVATION %
HOMOGENATE		
NONE	93.9 ± 17.4 (4)	+ 56.0
+ TRITON*	156.1 ± 15.8 (4)	
SUPERNATANT		
NONE	75.1 ± 5.4 (4)	+ 80.2
+ TRITON	130.2 ± 10.4 (4)	
MITOCHONDRIA		
NONE	409.3 ± 46.1 (4)	+ 63.0
+ TRITON	665.6 ± 42.7 (4)	
MYELIN		
NONE	37.0 ± 11.8 (4)	+242.0
+ TRITON	126.1 ± 13.0 (4)	

* TRITON: 0.05% TRITON X-100

Subcellular fraction中の、arylsulfatase A 活性に対する、phenylpyruvic acidの影響についても検討を重ねた(表-6)。phenylpyruvic acidの添加によって各分画共、10～120%の活性増加がみられ、特にMyelin 分画に於いては、10mM で、123% の活性増加を認めた。

(表 -- 6)

EFFECT OF PHENYLPYRUVIC ACID ON ARYLSULFATASE A ACTIVITY IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF RAT BRAIN TISSUE

FRACTION	SPECIFIC ACTIVITY (μMOLES/G-PROTEIN/HR)	ACTIVATION %
HOMOGENATE		
NONE	93.9 ± 17.8 (4)	------
PPA 1mM	81.0 ± 6.6 (4)	- 13.6
5mM	117.0 ± 7.7 (4)	+ 24.5
10mM	137.1 ± 11.4 (4)	+ 46.1
SUPERNATANT		
NONE	75.1 ± 5.4 (4)	------
PPA 1mM	95.0 ± 7.0 (4)	+ 26.6
5mM	119.7 ± 2.3 (4)	+ 59.1
10mM	115.9 ± 3.7 (4)	+ 54.1
MITOCHONDRIA		
NONE	409.3 ± 46.1 (4)	------
PPA 1mM	465.8 ± 34.9 (4)	+ 11.4
5mM	575.2 ±111.1 (4)	+ 41.0
10mM	463.0 ± 20.5 (4)	+ 11.3
MYELIN		
NONE	37.0 ± 11.8 (4)	------
PPA 1mM	42.4 ± 11.9 (4)	+ 11.4
5mM	60.5 ± 11.1 (4)	+ 56.3
10mM	82.6 ± 12.9 (4)	+123.0

* EXPERIMENTAL NUMBERS ARE GIVEN IN PARENTHESIS.

(表 -- 7)

PHENYLPYRUVIC ACID SYNTHETIC ACTIVITY IN BRAIN, LIVER AND KIDNEY OF RAT

TISSUE \ ENZYME	PHE-PYR TRANSAMINASE	PHE- KG TRANSAMINASE	D-PHE OXIDASE
BRAIN	140.0 ± 14.8	234.3 ± 20.0	7.13 ± 3.14
LIVER	170.0 ± 24.7	280.0 ± 36.1	9.02 ± 3.21
KIDNEY	148.1 ± 19.3	311.4 ± 35.2	435.8 ± 15.2

VALUES REPRESENT μMOLES/G-PROTEIN AND MEANS±S.D. OF 3 EXPERIMENTS.

次に、脳，肝，腎に於けるphenylpyruvic acid 合成酵素の分布をみると、表-7に示すように、腎に於いてはD-phenylalanine oxidaseの活性が特に強く認められたが、その他の、phenylalanine-pyruvate 及び、phenylalanine-α-ketoglutarate transaminaseの活性については、脳，肝，腎共に同程度の活性が認められ、高フェニールアラニン血症の際には、脳に於いてもphenylpyruvic acid が、充分に生成されている事を示している。

以上の事を考えると、高フェニールアラニン血症の脳内sulfatide量の低下は、sulfatideの分解系の促進にもよる事が充分考えられる。この促進は、高フェニールアラニン血症時に生成されるphenylpyruvic acid の影響によることも、推論される。高フェニールアラニン血症の脳組織内に、phenylpyruvic acid を検出した報告はないが、phenylpyruvic acid 生成酵素活性が、脳組織内に充分高いことは、高フェニールアラニン血症の際には、phenylpyruvic acid が、脳内で、生成されている事を示すものであり、長期に亘る高フェニールアラニン血症の際に、phenylpyruvic acid が脳組織のarylsulfatase A の活性を増強していると考えられる。アレルギー性脳脊髄炎の、髄鞘分画中のsulfatideの減少の際、髄鞘中の arylsulfatase A の活性増加のみが、有意の差で引き起こされている報告[6]もあるが、この実験的高フェニールアラニン血症白鼠の場合も、特に髄鞘中のarylsulfatase Aの活性増加が、有意の差でみられ、phenylpyruvic acid による arylsulfatase A の活性化も、髄鞘中で最も強く起こされていた。この事は、長期に亘る高フェニールアラニン血症の、髄鞘中のsulfatide代謝の異常と結びつくものと思われ、脱髄現象に於けるsulfatideの低下の原因とも考えられる。

(文献)

1) E.Mehl and H.Jatzkewitz: Biochem.Biophy.Acta,151,619,1968
2) E.Mehl and H.Jatzkewitz: Biochem.biophys.Res.Commun.,19,407,1958
3)E.C.C.Lin,B.M.Pitt,M.Ciren,andW.E.Knox:J.biol.Chem.,233,668,1958
4)O.H.Lowry,N.J.Rosebrough,A.L.Farr and J.Randall:J.biol.Chem.,193,265,1951
5)K.Moldave and A.Meister:Biochem.Biophys.Acta,24,434,1957
6)B.Maggio,H.J.Maccioni and F.A.Cumar:J.Neurochem.,20,503,1973

20 ミオイノシトールの大量投与による脳内イノシトール誘導体の動態

鈴木　修・直井　信
八木国夫
（名大・医・第一生化）

〔要　約〕

2-H^3-ミオイノシトールを用いて、投与したミオイノシトール（Inl）の脳内での動態を検討した。1) *in vivo* 実験。成熟ウィスター系雄ラットに標識Inlを尾静脈より注入したところ、血液に一過性の遊離Inlの放射活性の増大が認められた。この増加に一致して、脳の遊離Inl画分に放射活性が出現し、1時間以内に急速に減少するのが認められた。脳の遊離Inlの放射活性がどの時点においても血液のそれに比してはるかに大きいという事実は、脳の放射活性が脳血管中のものではないことを示しているのみならず、脳血液関門において能動輸送される可能性をも示唆している。この遊離Inlの脳内へのとりこみに引きつづき、脳のイノシトールホスファタイド（P-Inl）に放射活性が認められ、30時間を経てもかなり高い値を示した。これは一時的な脳内遊離Inlの増加がP-Inlの合成量を増すことによるとみられ、投与したInlが脳にとりこまれて脳の構造と機能に関与する可能性を示す。2)脳灌流実験。標識Inlの脳からの *efflux* を見るには、*in vivo* の実験では不可能とわかったので、われわれの設定した脳灌流法で検索した。Inlを含まない灌流液で1時間灌流したところ、標識Inlの *efflux* は見られなかった。これは *efflux* に対する脳血液関門の作用によるものか、もしくはとりこまれたInlが蛋白などと結合して保持されることによるものであろう。

ミオイノシトール（Inl）は動物体内において、一種の *essential growth factor* であること[11]は現在異論のないところであるが、補酵素として存在するのではなく、イノシトールホスファタイド（P-Inl）となって広く体内の細胞膜の構成成分として存在している。とくに脳神経系では、ミエリン部分に *monophosphoinositide* のみならず、*diphosphoinositide* と *triphosphoinositide* の形で多量に存在していることが知られている[6]。最近、P-Inlが単なる神経組織の"*building stone*"ではなく、神経機能に直接関与している可能性が示され注目されつつある[1)5)7)10)]。今回われわれは、脳でのInlの生理的ならびに薬理学的意義の解明にアプローチするために、投与したInlの脳中での動態を *in vivo* 実験と脳灌流実験法を用いて検討したので報告する。

実験方法

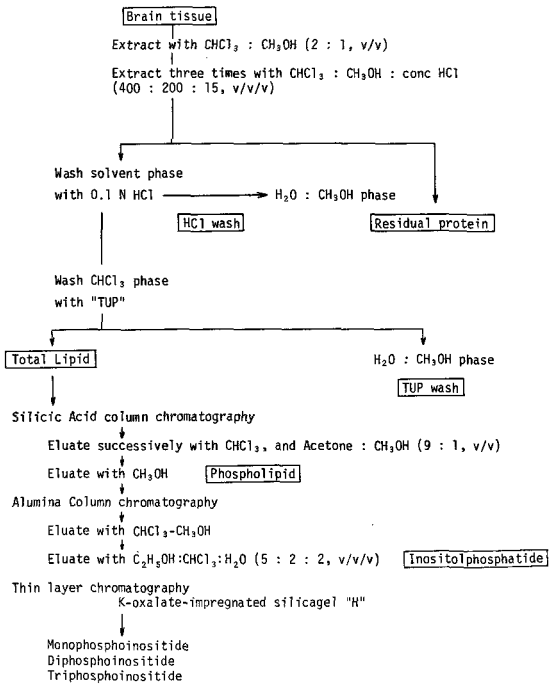
1) *in vivo* 実験

150～200 g のウィスター系雄ラットを用い、尾静脈より 2-H^3 Inl（2.2×10^6 cpm/mg）を生理的食塩水に溶解し、20 mg/kg の割合で注射した後、一定の時間（注射後30分、1時間、3時間、5時間、10時間ならびに30時間）を経て断頭し、脳を取り出し、その後の操作は図1の *flow sheet* に従って分画した。血液も脳のばあいと同じ時間に、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採取し、10,000 r.p.m. 5分遠沈し、血清を得て脳と同様な方法にて分画した。遊離Inlは図1の H_2O：CH_3OH *phase* に存在し、P-Inlは *phospholipid* 画分に存在する。硅酸カラムで脂質を分離する過程で、$CHCl_3$ および *acetone*：CH_3OH（9:1）による溶出液中には殆んど放射活性はなく、*total lipid* の放射活性の90％以上が CH_3OH による溶出液中に認められた。H_2O：CH_3OH *phase* と

phospholipid 画分につぎいづれも溶媒を留去した後に Soluene 350 を加えて溶解し、トルエンシンチレーターを加えて Aloka LSC-502 シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。同時に放射活性の効率も算出してカウント数を補正した。

つぎに標識 InI (2.2×10^6 cpm/mg, 20 mg/kg) を尾静脈より注入し、それぞれ、1時間、3時間ならびに5時間の間隔をおき、しかる後に大量の cold InI (1 g/kg) を尾静注し、1時間後に断頭して、脳の標識 InI の変化を見た。脳は取り出した後に前述と同様な過程によって、遊離 InI と P-InI の放射活性を測定した。時間による変動のための誤差を補正するために、同様に標識 InI を投与したラットを同時に用意し、cold InI (1 g/kg) のかわりに生理的食塩水を注射したものをコントロールとした。また分画して得た phospholipid 画分の放射活性成分が P-InI であることを証明するために、Gonzalez らの方法[2]によって、authentic sample として monophosphoinositide (MPI) を用い、薄層クロマトグラフィーによって同定した。

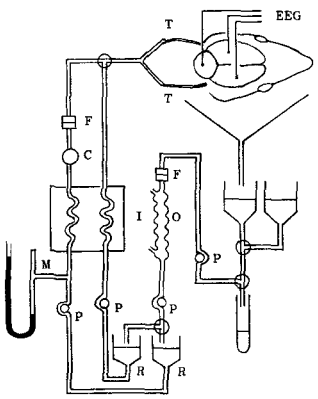
図1 Flow sheet for separation of free inositol and inositolphosphatide fraction from brain tissue



2)脳灌流実験

われわれは数年来ラットによる脳灌流法を本邦ではじめて手がけ、現在では脳波で見るかぎりでは、ほとんど例外なく1時間以上脳を生存せしめることに成功している。その詳細は文献[8][9]にゆずるが、装置の大略は図2に示すごとくで、いわゆる open system を用いている。灌流液は、人工血液で表1のような組成を有している。それぞれの実験に 400～500 g のウィスター系雄ラット2匹（灌流用と

図2 灌流方式



P: ポンプ　M: マノメーター
O: 人工肺　I: 恒温槽
F: ガラスフィルター　C: 調圧器
R: 貯血槽　T: カニューレ

表1 灌流血液成分（100 ml中）

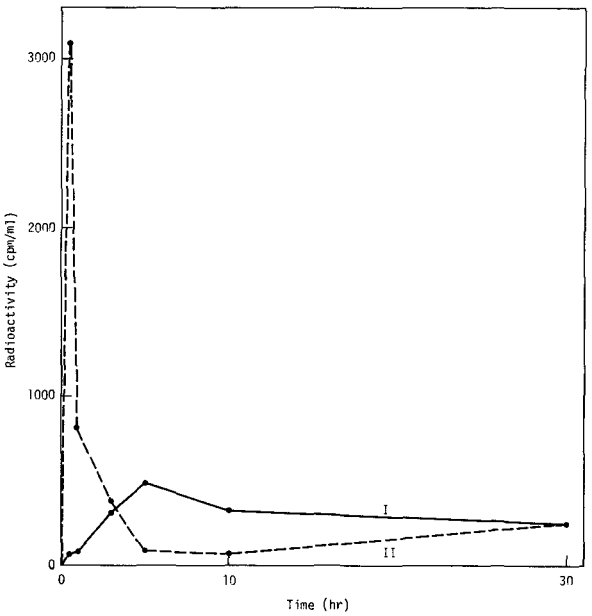
牛赤血球浮遊液	50 ml
Krebs-Ringer-デキストラン溶液	50 ml
低分子デキストラン	6.0 g
アルブミン	0.2
D-グルコース	0.1
シテジール酸-2Na	8 mg
アミノ酸混液	
アルギニン 2.7 mg	ヒスチジン 1.3
チロシン 1.8	イソロイシン 1.8
トリプトファン 0.6	ロイシン 4.1
バリン 2.0	リジン 7.4
グリシン 3.4	メチオニン 2.4
フェニルアラニン 2.9	

コントロール）を用意し、両方に同じく標識 Inl（2.2×10^6 cpm/mg, 20 mg/kg）を尾静脈より注入し、4～5時間後に一方の動物の灌流を開始し、1時間灌流してから、頭部より脳を取り出した。コントロール用のラットの脳も灌流脳と同時に取り出し、図1の方式にしたがって遊離 Inl と P-Inl の放射活性を測定し、灌流脳における放射活性を、コントロールの%として算出した。

実験結果および考察

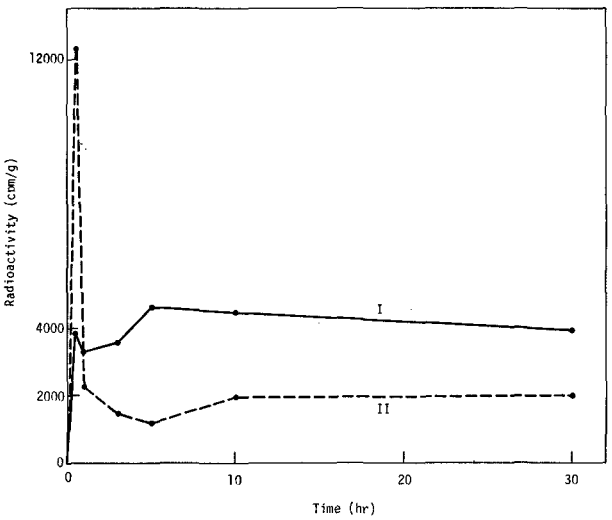
放射性 Inl 注射後の血液と脳における放射活性の time course をとると、それぞれ図3、図4に示すごとくである。遊離 Inl の放射活性は注射後30分において、血中に著しく増大し、これにともない脳内にも急速な増大が認められる。その後脳中と血中の遊離 Inl は同様に1時間以内に急速に下降し、長時間ほぼ一定値を保っている。注目すべき点はどの時間においても血中よりも脳中の方がはるかに放射活性が高いという事実である。このことは脳中の遊離 Inl の放射活性が脳血管中のものではないことを示しているのみならず、脳血液関門において Inl が能動輸送される可能性を考えさせる。腎臓のスライスの実験においては Inl が能動的に輸送されるという報告[4]と比較すると興味深い。

図3 Time course of [H^3]-inositol in serum



I：P-Inl
II：遊離 Inl

図4 Time course of [H^3]-inositol in rat brain



I：P-Inl
II：遊離 Inl

ついで Inl の放射活性が phospholipid のなかに認められるかどうかを検討したのが図5に示す成績で、これから放射性 Inl が P-Inl にとりこまれていることがわかる。

P-Inl は図3，図4に示すように、脳においても血液中においても注射後漸増し、約5時間後に最高値に達する。脳においては30時間経過してもかなりのレベルを保って、余り減少していない。おそらくは、血中遊離 Inl の一過性増量が脳の遊離 Inl の増量をきたし、その結果 P-Inl の合成量を増すのであろう。次に脳内標識 Inl の cold Inl 投与による変化を

図6に示した。予期に反して、脳内のInlの放射活性が減少するどころか、P-Inlはむしろどの時間間隔においても増加している。すなわち、coldInlは他臓器から標識Inlを追い出し、再び脳に標識Inlを取込ませたものと見なければならない。それ故in vivo実験では脳内Inlの動態をさぐるには限界があることが分る。この限界を克服するために前述と同様に一たびInlを脳に取り込ませておいてから灌流を行った結果が表2に示すものである。灌流液にInlを含まないグループでは1時間の灌流が何ら脳内標識InlとP-Inlに影響を与えていないことを示している。すなわち脳にはInlの保持機構が存在し、相当量の遊離Inlを貯蔵し得ることを示しているのか、または一度取り込まれた遊離Inlは脳血液関門のために血中にefflux することができないかによるものであろう。灌流液中に1 mg/mlのInlを含有したものでは、脳中Inlと血中Inlの交換が活発に行なわれているように思われる。おそらくは血中遊離Inlが脳中にとりこまれプールされたInlと交換されるのであろう。Inlは成熟体内においてはグルコースからゆるやかに生産され[3]むしろ不活発な物質と考えられてきたが、

図5 Identification of phosphoinositide by TLC

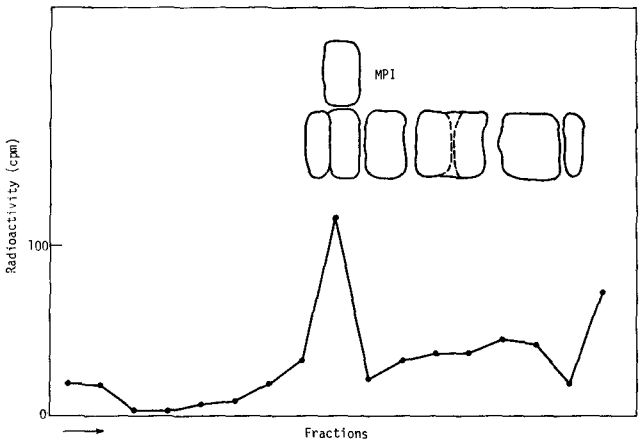
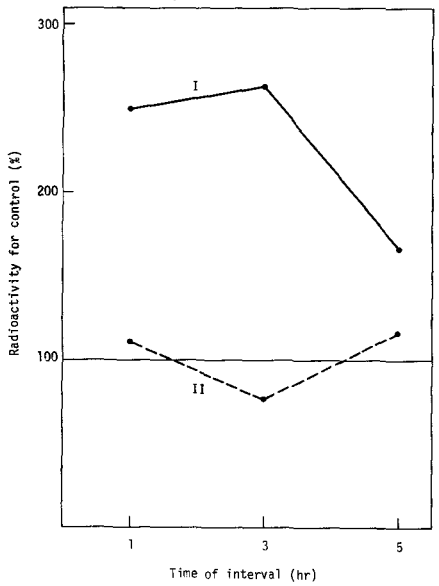


図6 Effect of massive dose of cold inositol on previously administered [H^3]-inositol in rat brain



I: P-Inl
II: 遊離Inl

表2 Effect of brain perfusion on [H^3]-inositol in rat brain (% for control)

Group	Inositolphosphatide	Free inositol
1 mg/ml inositol in perfusate	54 ± 16 (3)	71 ± 15 (2)
no inositol in perfusate	110 ± 9 (3)	95 ± 4 (2)

mean ± S.D. number of experiments in parentheses

今回の実験で、投与されたInlがきわめて活発な動態を示すことがわかった。本物質の多量投与と脳の機能との関連については今後検討したい。

文献

1) Eichberg, J., Shein, H. M., Schwartz, M. and Hauser, G., J. Biol. Chem., 248, 3615 (1973) 2) Gonzalez-Sastre, F. and Folch-Pi, J., J. Lipid Res., 9, 532 (1968) 3) Hauser, G., Biochim. Biophys. Acta, 70, 278 (1963) 4) Hauser, G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 696 (1965) 5) Kai, M. and Hawthorne, J. N., Ann. N. Y. Acad. Sci., 165, 761 (1969) 6) LeBaron, F. N., McDonald, C. P. and Ramarao, B. S. S., J. Neurochem., 10, 677 (1963) 7) Standefer, J. C. and Samson, F. E., Fed. Proc., 26, 765 (1967) 8) 鈴木修, 大石誠子, 八木國夫, 医学のあゆみ, 86, 859 (1973) 9) 鈴木修, ビタミン, in press 10) White, G. L. and Larrabee, M. G., J. Neurochem., 20, 783 (1973) 11) Yagi, K., Kotaki, A. and Yamamoto, Y., J. Vitaminol., 11, 14 (1965)

21 Spina bifida の術後，水頭症をおこした患者の髄液脂質組成について

久保田　勝・丸山勝一
宇尾野公義
（都立府中病院・神経内科）
武富保
（信大・医・順応生化）

〔要　約〕

正常脊髄液の脂質組成については，多くの報告があるが微量であるためしかるべき結果が得られていない。中でも糖脂質では，Samuelsson[5]，Nagai[3]，Ledeen[2]らの報告があるのみで詳細な研究は，今後に残されている。今回私達はSpina bifidaの患者で術後水頭症をおこし，脳室腹腔短絡術後，髄液のexternal drainageを行った症例を経験し，髄液採取の機会を得たので髄液の脂質分析を試み検討を行った。採取した髄液はFolchらの法により，クロロホルム－メタノール(2:1, v/v)で抽出し，total lipidsとcrude gangliosidesに分けた。これらをカラムクロマトグラフィー，薄層クロマトグラフィーで分離し，ガスクロマト分析を行った。中性脂質では，Cholesterolester (CE), Triglyceride (T.G), Free Fatty Acid (F.F.A), Cholesterolが存在し髄液中のtotal Cholesterolは343 μg/dl, Cholesterolester/total Cholesterol=59.0%であり，さらにcholesterolester (CE), Triglyceride (T.G)の脂酸組成は，$C_{16:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$が主体であるが，Free Fatty Acidは飽和脂酸が多く，$C_{16:0}$, $C_{18:0}$が主体であった。リン脂質では，Sphingomyelineの脂酸組成は，短鎖($C_{16:0}$, $C_{18:0}$)，長鎖($C_{24:0}$, $C_{24:1}$, $C_{25:0}$)脂酸が見られ脳白質の組成に類似している。中性糖脂質では，Cerebrosideが主体で髄液中に0.133 μmole/dl含まれ，Sulfatide, CDHは，detectされなかった。Cerebrosideの糖組成はgalactoseで脂酸組成は，直鎖酸とオキシ酸が見られた。GangliosideはGD1aが主で，次いでGM1, GD1bの順でTLC上spotを得た。これらの分析結果から髄液中の脳実質由来の脂質(Cerebroside, Sphingomyeline, FFA, Ganglioside)の変動により，脳病変を推定しうるかもしれない。

実験と結果

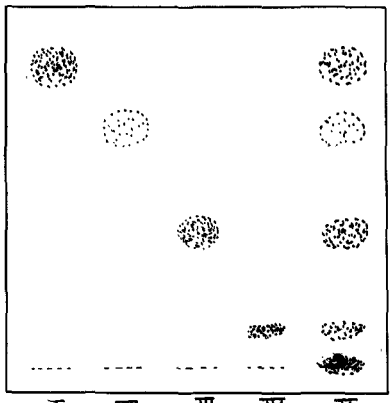
〔実験材料〕生後9ヶ月の女子で，生下時，腰部髄膜瘤を認め髄膜瘤の術後，水頭症を合併し脳室腹腔短絡術を施行，その後髄液中に感染の所見が認められ，髄液のexternal drainageを行い，髄液の排出を行った。初期は感染を伴ったため髄液中の細胞数，蛋白量等の増加が見られたが，採取した材料は，これら細胞数，蛋白量，糖含有量等が正常値のものに限った。髄液は，測定時まで凍結し－20℃に保存した。

〔抽出と精製〕採取した髄液2000 mlを7,000回転，15分間遠心を行い，細胞成分を除いた後，ロータリー・エバポレーターで約50 ml位まで濃縮し，凍結乾燥を行い，乾燥固型物として，25 gを得た。これを蒸留水20 mlに溶かした後，温めたメタノール200 mlに溶かし，最後にクロロホルム4400 mlを加えてよく混和，一昼夜放置した後，沪過を行い沪液に100 mlの0.1 N KClを加えてFolch分配を行った。上層は，Visking Tubeに入れ流水中に2日間透析し，内容物をロータリー・エバポレーターで濃縮後，凍結乾燥を行い，crude Gangliosides (72 mg)を，下層は蒸発乾固しtotal lipids (64 mg)を得た。

〈各脂質分析について〉

〔中性脂質〕total lipids 64 mgをacetone可溶分画と不溶分画に分け，acetone可溶分画40 mgを得た。中性脂質組成とその脂酸分析にTLCを行った。展開系としては，ヘキサン－エチルエーテル－酢酸(80:20:1, v/v/v)で35分間，展開し，ヨードを粉霧し，Cholesterol ester, Triglyceride, Free Fatty Acid, Cholesterolの各spotをdetectした。(図1)。各spotのヨードを粉霧していない部分をかきとり，脂酸分析

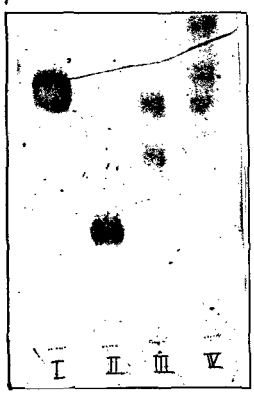
図 1) 中性脂質の薄層クロマトグラム.



ヘキサン－エチルエーテル－酢酸 (80:20:1, v/v/v)

I. Cholesterol ester (control)
2. Triglyceride (〃)
3. Free fatty acid (〃)
4. Cholesterol (〃)
5. C.S.F(髄液) アセトン可溶分画
ヨードエタノール粉塵.

図 2) 中性糖脂質の薄層クロマトグラム.



C-M-W (65:25:4, v/v/v)
I. Cerebroside
II. Sulfatide
III Cerebroside + Lactosylceramide
IV アクリジルカラムで溶出された CMH 部分
spray reagent.
アンスロン硫酸

のため 5% HCl in CH_3OH を加え, 100°C 3時間 メタノリーシスを行った。脂酸メチルエステルは石油エーテルで抽出し, ガスクロマト分析を行った。カラム条件は17% EGS で160°Cである。Free Fatty Acid の組成を除くと. Cholesterol ester, Triglyceride, の脂酸は血清の pattern に似ている (表1)。Free Fatty Acid には, 飽和脂酸が多いのが, 特長である。

Cholesteral の定量は, Zak 法で行い, 髄液当り total cholesterol 343 μg/dl, cholesterol ester / total cholesterol = 59.0% であった.

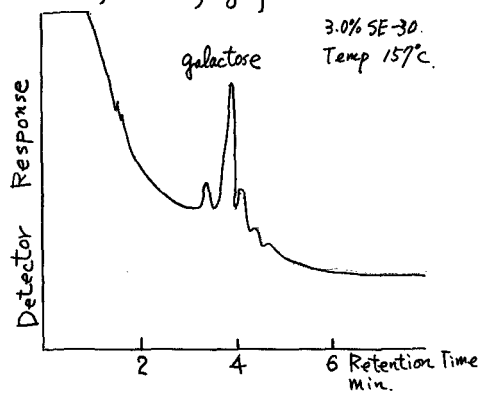
〔リン脂質〕 acetone 不溶分画をクロロホルム－メタノール－水 (65: 25: 4, v/v/v) で50分間, TLC 展開し, モリブデン・ブルー試薬でリン脂質を detect した。phosphatidyl-ethanolamine (PE), Lecithine, Sphingomyeline, Lyso-lecithine の Control に一致する Spot が得られ, これらの脂酸組成をガスクロマト (GLC) 分析で検討した。(表1).

Phosphatidyl ethanolamine, Lecithine, Lyso-lecithine では, $C_{18:2}$ が少なく $C_{18:2}$ が血清中に多いことを考えると. 神経系の組成を有している。

Sphingomyeline については, 短鎖 ($C_{16:0}$). 長鎖 ($C_{24:0}$, $C_{24:1}$, $C_{25:0}$) 脂酸が見られた。

〔中性糖脂質〕 total lipid をクロロホルムに溶かし, 110°C 5時間活性化したアクリジルをカラムに充填し, 最初クロロホルム 300 ml で中性脂質を溶出し, その後, クロロホルム－メタノール (9:1, v/v), クロロホルム－メタノール (8:2, v/v) を各 200 ml づつ溶出し, TLC で check して pure な cerebroside 分画を得た (図2)。この分画について, 同様にメタノリーシスを 5% HCl in CH_3OH で行い. 脂酸メチルエステルを石油エーテルで抽出後, メタノール層を炭酸銀で脱塩後, 沪過し, 沪液を蒸発乾固し, TMS 化を行い, 糖の TMS 誘導体を作り, GLC 分析を行った。カラム条件は 3.0% SE-30 でカラム温度 157°C で行った。(図3), galactose の Peak が main で少量の glucose の peak が見出された。

図3) GLC of TMS-derivative of Methylglycosides



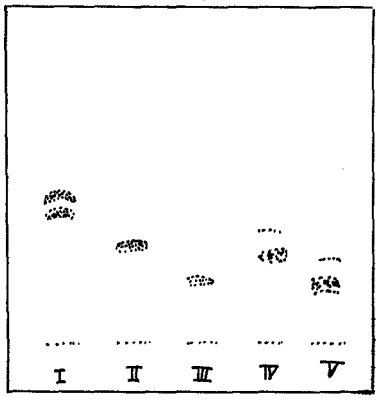
石油エーテルで抽出された脂酸メチルエステルは，ヘキサン－エチルエーテル－酢酸(80:20:1, v/v)でTLC展開を行い，直鎖酸とオキシ酸のspotが得られ，直鎖酸は$C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{24:0}$, $C_{24:1}$ がmainで，オキシ酸は$C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{23:0}$, $C_{24:0}$, $C_{24:1}$ がmainであった。

又Sulfatide, CDHはdetect出来なかった。

〔Gangliosides〕粗ガングリオシド147 mgを関東化学のケイ酸でカラムクロマトを行った。試料は，クロロホルム－メタノール(2:1, v/v)で充填し，その後，クロロホルム－メタノール(6:4, v/v)，クロロホルム－メタノール(5:5, v/v)，クロロホルム－メタノール(4:6, v/v)で溶出し，Gangliosideは，クロロホルム－メタノール(5:5, v/v)と(4:6, v/v)に溶出され，TLCでクロロホルム－メタノール－水(60:35:8, v/v/v)，90分間展開し，レゾルシン試薬で同定した。主成分はGD1aで次いでGM1, GD1bであった。

CE: cholesterol ester, TG: Triglyceride.
FFA: Free Fatty Acid, PE: Phosphatidyl-ethanolamine.
PC: Lecithine
SP: Sphingomyeline Lyso-PC: Lyso-lecithine
CMH: Cerebroside.
n-FA: Normal Fatty acid.
OH-FA: Hydroxy Fatty acid.

図4) TLC of Gangliosides



I. GM_2 + GM_1

II. GD1a

III. GD1b

IV. ケイ酸カラム，C－M(5:5, v/v)で溶出された分画

V. ケイ酸カラム，C－M(4:6, v/v)で溶出された分画

C－M－W(60:35:8, v/v/v)で90分間，展開，レゾルシン試薬で発色。

表1) Fatty acid compositions

Fatty acid	CE	TG	FFA	PE	PC	SP	Lyso-PC	CMH n-FA	CMH OH-FA
$C_{14:0}$	2.2	7.8	4.3	4.1	2.9			3.1	
15:0		5.6	3.1	2.9	3.4			3.2	
16:0	10.1	37.0	33.5	31.0	36.0	22.0	35.0	18.5	
16:1	8.9	15.0	10.7	9.2	4.8	2.5	5.2	3.7	
18:0	2.1	3.2	23.8	20.8	18.8	25.2	17.8	7.3	14.0
18:1	33.7	11.6	18.9	27.3	26.8	5.0	32.0	3.6	
18:2	41.1	19.8	5.8	5.3	7.3		7.6		
20:0	1.8			1.4		6.0	2.5	2.5	3.8
22:0						8.9		7.3	13.0
22:1								3.7	
23:0						4.8		2.9	10.3
24:0						6.8		26.8	15.2
24:1						6.4		17.4	13.9
25:0						12.5			

考　察

多発性硬化症と脊髄液の脂質変動の関連は，云うまでもなく，最近神経疾患と，その髄液所見が注目されつつある[7]。cerebroside，sphingomyeline は，糖成分，脂酸構成から考えて，神経系の白質由来を示しており，多発性硬化症や他の脱髄疾患のミエリンの変化を見る示標になるかもしれない。一方中性脂質では，Free Fatty Acid に飽和脂酸が多く含まれ，私共[1]が経験したプラ脊髄の Free Fatty Acid のほとんどが $C_{16:0}$，$C_{18:0}$ の飽和脂酸であったことから，Free Fatty acid も神経系近い組成を示している。又 Cholesterolester は正常脳には，ほとんど存在せず，武富ら[6]の報告した Taysacho 病の脳に cholesterolester の増加が見られたが，脂酸組成において $C_{18:2}$ がほとんどなく，髄液中の cholesterol ester は，$C_{18:2}$ が 41.1% も含まれており，血清中の Cholesterol ester に似ていた。

Cerebroside の糖組成の GLC 分析で Kiesel gel H よりかきとった sample の場合，永井[4]の指摘する様に GLC で glucose に相当する peak が見られた。そこで私達は，フロリジルカラムで cerebroside を pure にとり，これをメタノリーシスして GLC 分析を行った結果，galactose が主体であることが判った。又 sulfatide，CDH の存在の報告があるが，今回の症例で，髄液成分が正常の時は認められなかった。しかし感染をおこした髄液の分析で CDH が detect されたが，この場合は，血球成分が関与したためと考える。

Ganglioside 組成では，Hematoside は認められなかったが，Ledeen ら[2]は，水頭症の髄液中には，血清と同様 Hematoside が含まれることを報告している。今回の症例は Ganglioside 組成から考えると水頭症のための髄液変化はなく，正常髄液の Ganglioside 組成と考えられる。

今後，更に神経疾患と髄液脂質構成について検討を加えたいと思う。

文　献

(1) 久保田，武富：生化学，44，672 (1972)
(2) Ledeen, R.W & Yu. R.K.: Adv. Exp. & Biol. 19, 72. (1972).
(3) Nagai Y. & Kanfer J.N.: J. Lipid Res. 12, 143 (1971).
(4) 永井克孝：生化学，42，451 (1970).
(5) Samuelsson K.: Scand. J. Clin. Lab. Invest, 27, 381 (1971)
(6) Taketomi, T. and Kawamura, N. and Otano, A: Japan. J. Exp. Med., 41, 103 (1971)
(7) Tourtellotte W.W & Haerer A.F.: Arch. Neurol., 20, 605 (1969)

22 血液脳関門を通過しないドーパミンβ水酸化酵素阻害剤

原　ふみ子・橋爪義夫・原田保夫
浅野正久・日高弘義・
（愛知コロニー・研）

〔要約〕

NEは、チロシンよりドーパを経て、ドーパミンからドーパミンβ水酸化酵素(DBH)の触媒で生合成される。DBHは、NEの生合成の最終ステップを触媒する酵素であり、本酵素の阻害は、組織内NE量を減少させることが期待される。我々は、5-butyl picolinic acid（Fusaric acid, FA）および、その誘導体が今迄報告された如何なる阻害剤よりも強力にDBHを阻害することを報告してきた。今回は、それら強力な阻害剤のうち5-dimethyldithiocarbamyl picolinic acid（YP-279）が、血液脳関門を通過しない物質であることを発見したので報告したい。すなわち本物質は、腹腔内、または経口的にラットに投与すると、脳以外の末梢神経系のDBHを、効果的に阻害し、NEの生合成を阻害する。さらに血液を含む末梢組織では、本物質は検出できるが、脳では検出できなかった。従って、これらの点より、YP-279は、血液脳関門を通過しえないと考えられる。他の阻害剤、たとえばFA等は、脳と末梢いずれの組織にも効果をあらわすので、このYP-279とFA等を使用すれば、中枢神経系と末梢神経系でのカテコールアミンの作用機作の解明の手段になる可能性も考えられる。

ノルエピネフィリン(NE)の生体内で最も重要な役割は、末梢自律神経および中枢神経系におけるいわゆる伝達物質としての働きであろう。NEは、チロシンよりドーパを経て、前駆物質であるドーパミンから、ドーパミンβ水酸化酵素（DBH)の触媒で生合成される。従ってDBHは、NEの生合成の最終ステップを触媒する酵素であり、本酵素の阻害により生体内のNE量の変化が期待される。

我々は、昨年の本学会等[1,2]で、DBHの阻害剤が、脳内NEの減少と同時に、セロトニンの増加をもたらすことを報告したが、その後種々の誘導体の性質を検討したところ、それらのうち強力なDBH阻害作用をもつ5-dimethyldithiocarbamyl picolinic acid (YP-279)は、血液脳関門(B.B.B)を通過しないことがわかった。NEの代謝酵素に影響を及ぼす薬物が、NEの生体内濃度にも影響をもたらすということは、我々の今迄報告して来たDBH阻害剤[3,4]のほかにも、チロシン水酸化酵素の阻害剤や、モノアミン酸化酵素の阻害剤による組織内NE濃度の変化からも明らかである。従ってこれら薬物を動物に注射して生ずる種々の生体反応を研究するのは、NEの生理作用を解明する上に興味ある手段であろう。しかし、これら阻害剤を投与して生ずる種々の生体反応、例えば、DBH阻害剤についていえば、降圧作用等が、これら薬物の中枢作用によって生ずるのか、または、末梢作用によるものかは、判別できない場合が多い。そこで例えばB.B.Bを通過しえない阻害剤を使用すれば、その薬物の末梢投与により、脳以外の組織の酵素のみを阻害できるし、中枢性に投与すれば、中枢の酵素のみを選択的に阻害できると考えられる。そこで、今回我々は、B.B.Bを通過しえない新しいDBH阻害剤YP-279について報告したい。

〈材料および方法〉

YP-279は、著者らの考案で、万有製薬の協力により合成された[5]。FA，および 5-(3',4'-dibromobutyl) picolinic acid (Dibromo fusaric acid, BrFA)[5][6]については、すでに述べた方法で fungus より得た。ウィスター系ラット(約150g)を用い，薬物は，腹腔内投与によった。薬物は 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)で懸濁し，コントロールには，CMCのみを投与した。組織中カテコールアミンは、Anton ら[7]の方法で測定した。NEの回収率は，内部標準物質(internal standard)により測定し，常に 75～85%であった。有意差検定には Student's t-test をもちいた。アイソトープ実験は、3,4-dihydroxyphenylethylamine [ethyl-1-3H (N)] (Dopamine) (3H-DA) (10 c/m mole) を 5-10 μc/rat の割合で、静脈内，または大槽内に注射した。3H-DAを大槽内に注射すると，脳においては，図1Aの割合で代謝され，静脈内に注射すると，心臓において，図1Bの様な割合で，それぞれNEまたは acid or neutral metabolites に変る。そこで、薬物(75 mg/kg)を、腹腔より注射して，1時間後に3H-DAを注射し，脳内注入の場合は 20分後，静脈内注入の場合は 15分後に動物を殺し、それぞれ脳内、および心臓内のカテコールアミン，およびその代謝産物を Dowex 50 (H+ form, 0.5×4 cm) のカラムで分離測定した。このカラムによるカテコールアミン，および代謝産物の分離測定は、Carlsson ら[8]の方法を参考に，多少の修正を加えた。その溶出のパターンは，図2に示す如くである。

図1A

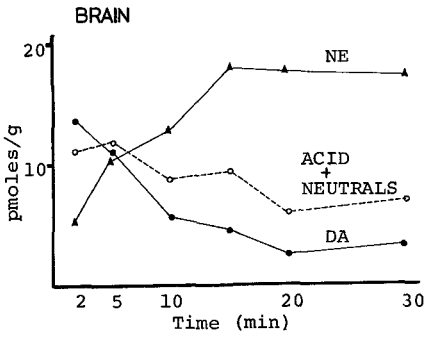
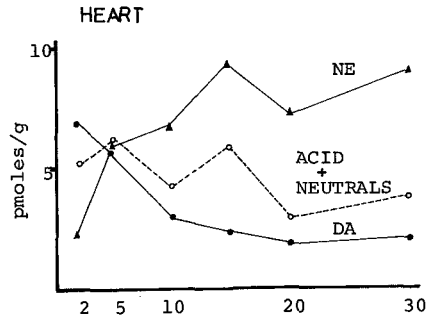
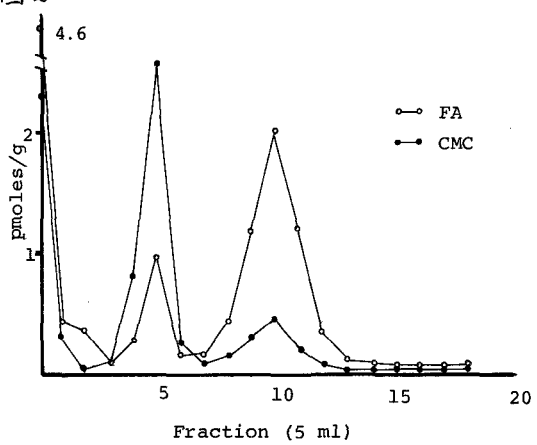


図1B



ラット組織中の薬物の濃度は，ウシ副腎髄質より Kaufman らの方法により、硫安分画，活性炭処理，カルシウムゲル吸脱着，DEAE-cellulose カラムにより精製したDBHを使用した。この精製DBH標品は、完全に生理阻害物質を含んでいなかった。実際に、組織内濃度を測定する場合は、組織を秤量後 5 ml のエチルアルコールで、ホモゲナイズし，遠沈後その上清を一定量とり，エチルアルコールを飛ばし，その残渣中のDBH阻害度を Creveling ら[9]の方法で，テラミンを基質として測定した。各臓器の薬物濃度は、それぞれの臓器のホモジネートに、既知のサンプルを加え抽出し、標準曲線を作製

図2



し、それより計算した。エタノールで組織を抽出した場合、内因性阻害物質はほとんど抽出されず、assay系に0.5ml以下の残渣を加えた場合は、有意の阻害をみなかった。

Table 1. Inhibition of DBH by picolinic acids

	50% inhibition
5-(3',4'-dibromobutyl)picolinic acid (Br_2FA)	10 nM
5'-butylpicolinic acid (FA)	76 nM
5'-dimethyldithiocarbamyl picolinic acid (YP-279)	77 nM

〈実験結果〉

種々のピコリン酸の誘導体を調べたうち Br_2FAがDBH阻害作用が最も強く、次にFAとYP-279が強力な阻害物質であることはすでに述べた(表1)。図3A, Bは、FA、Br_2FAおよびYP-279を75 mg/kgの割合で、腹腔内に注射した場合の脳内、および副腎髄質中のカテコールアミン量の変化である。このことは、^{3}H-DAを脳内に注入した場合も同様で、図4Aに示す様に、FAおよびBr_2FAは^{3}H-DA→^{3}H-NEの脳内での経路を明らかに阻害し、NEの生合成はコントロールの20%以下に減少している。しかしYP-279は、ほとんど影響を与えない。次に図4Bに示す様に、心臓での^{3}H-NEの生合成を調べてみると、FA, Br_2FA, YP-279, 三者とも有意に^{3}H-DAからの^{3}H-NEの生合成を抑制している。このYP-279による脳内NEの生合成に対する影響の欠除は、これらの結果より、本物質が、血液脳関門を通過しないことによると考えられる。そこでこれらの薬物を腹腔内にラットに注入し、血中および脳内濃

図3A

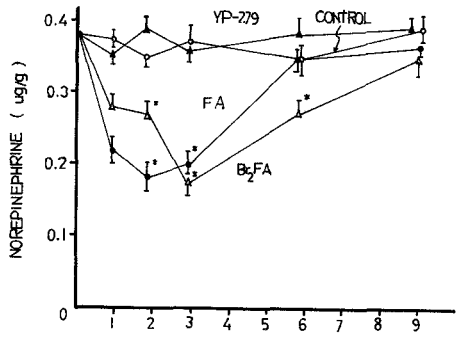


図3B

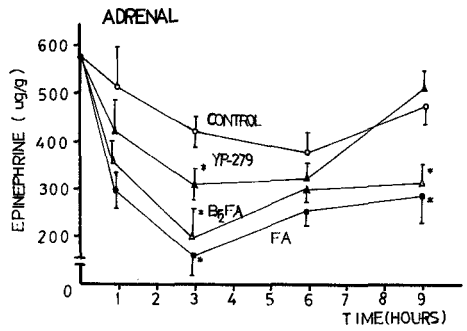


図4A

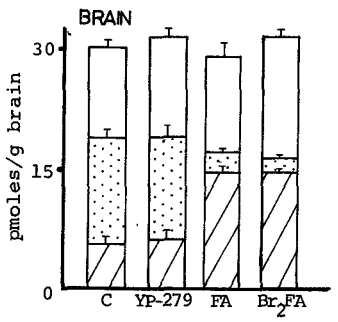


図4B

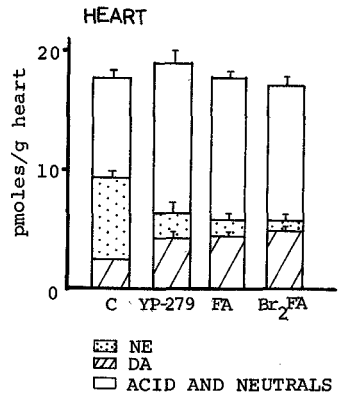
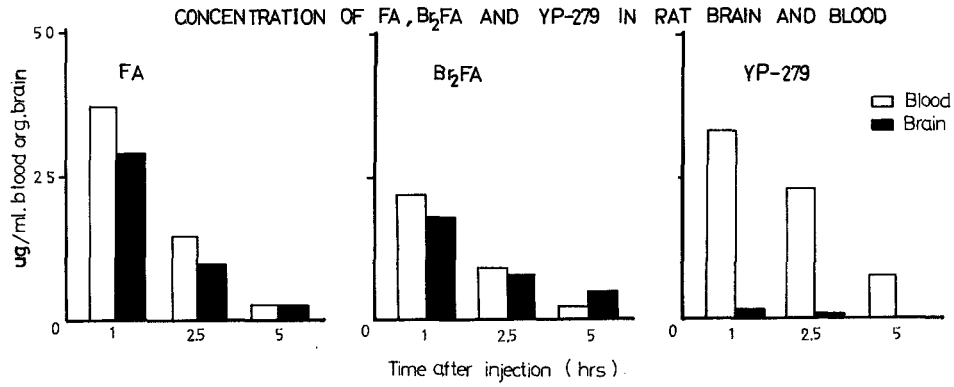


図5



度を経時的に測定してみると、図5の様になる。図から明らかな様に、YP-279の注射の場合のみ脳ではその濃度は非常に低かった。脳に含まれる血液の量（脳の重量の2～3%）から計算すると、YP-279注射時の1時間および2.5時間の脳内濃度は、血液中の本物質によるものと考えられる。

〈文献〉

1. 日高弘義（1972）神経化学 11, 17
2. H. Hidaka (1971) Nature 231, 54
3. H. Hidaka and Takeya (1972) Nature 239, 334
4. H. Hidaka, in Frontiers in Catecholamine Research, Perg. Press, in press (1973)
5. H. Hidaka, T. Asano and N. Takemoto (1973) Mol. Pharmacol. 9, 171
6. H. Hidaka et al (1969) J. Antibiotics 22, 228
7. A.A. Anton and D.G. Sayre (1962) J. Pharmacol. Exp. Ther. 138, 360
8. A. Carlsson and B. Waldeck (1963) Acta, Pharmacol. Toxicol. 20, 47
9. C.R. Creveling et al (1962) Biochim. Biophys. Acta 64, 125

23 L-Alpha-hydrazinomethyldopa と Catecholamine 代謝

岸川秀実・森　昭胤・高坂睦年
（岡山大・医・脳代謝研）
大木堯史
（岡山大・医・脳外）

〔要　約〕

要約：末梢性脱炭酸酵素抑制剤は、脳の DOPA 脱炭酸酵素を阻害することなく末梢における酵素活性のみを抑制し，その結果 DOPA の血中濃度は上昇し、脳内の catecholamine 特に dopamine 値は著しい上昇をきたすとされている。

われわれは、猫を用いた動物実験で脳内および血中の catecholamine 値の変動を追求した。末梢性脱炭酸酵素抑制剤として L-alpha-hydrazinomethyldopa (MK486) を使用したが、腹腔内投与の場合 L-DOPA 単独投与に比較して MK486 を併用することによって血中の DOPA 値は3倍となり、脳内では大脳基底核および全脳について検討したが DOPA および dopamine 値は caudate nucleus で最も高く、ついで pallidum が高値を示し thalamus などに比較して選択的に DOPA の取り込みおよび dopamine 値が高いことがわかった。

最近われわれは、catecholamine 測定法としてガスクロマトグラフィー (ECD) を用いることによって髄液中の catecholamine 類も分析可能が可能となった。臨床的にも Parkinsonism の患者について血中および髄液中の catecholamine 値の変動を追求した。L-DOPA 服用後2時間で血中 DOPA 値は最高に達し4時間では、最高値の1/2に減少したが、MK486 を併用することによって血中 DOPA 値は4時間後も著明な上昇値を維持した。一方髄液中の dopamine 値は DOPA 単独投与では、約2時間で最高値に達するがその後急激な減少を呈した。ところが MK486 の併用では4時間後も dopamine 値は、高値が維持された。

現在まで諸氏の報告によって脳内および血中の catecholamine 変動におよぼす L-DOPA 投与の効果が動物実験で論じられ、また本邦でも L-DOPA と末梢性脱炭酸酵素抑制剤の併用の効果についても検討がなされている。最近まで脳中，血中および尿中 catecholamine は螢光法によって測定されていた。この方法では、測定誤差が大きくまた微量定量に限界があると思われる。われわれはガスクロマトグラフィー (ECD) によって脳中、血中、尿中および髄液中の catecholamine 類の分析定量を行った。このガスクロマトグフィー法によると catecholamine 類代謝産物を同時にグラフ的に表現でき、また超微量分析定量も可能である。今回われわれは、動物実験でネコを用いて大脳基底核各部位および血中の catecholamine 値の変動を検討し、臨床的にも Parkinsonism の患者について、L-DOPA および MK486 併用による血中および髄液中の catecholamine 値の変動を調べたので報告する。

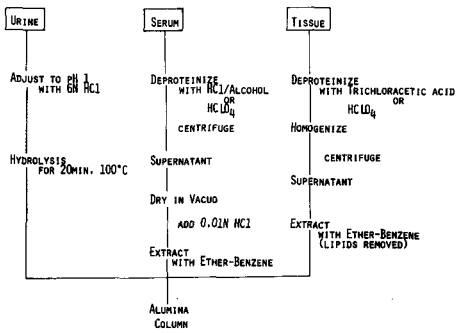
実験方法

1) 脳組織および体液中の catecholamine 類測定法

従来 catecholamine 類の測定は螢光法によっていたがガスクロマトグラフィー (ECD) による方法が、今井ら[1]および河合ら[2]によって考案された。しかし一般的普及には操作および処理段階で困難な幾つかの問題を残しているように思えるが、最近われわれも検討を加え測定可能となった。Fig.1. は組織．血中および尿中の試料の処理法を示したものである。Fig.2 は、髄液中のカテコールアミン類測定法を示した。内標準物質としては，heptachlor epoxide などを用いた。

2) 動物実験

Fig. 1



動物：ネコ（体重 3 Kg前後のもの）

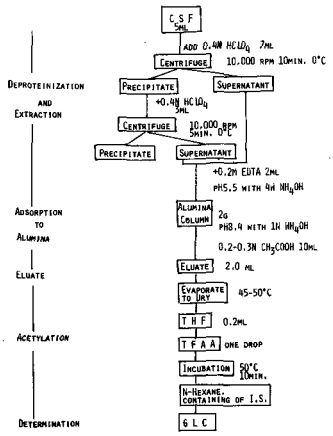
a)無処置対照群の脳内および血中のcatecholamine の測定

ケタラール(塩酸ケタミン 7mg/体重 kg筋肉注射）麻酔下 1 時間後に開胸術を行い、胸部大動脈および下行大静脈を露出する。まず下行大静脈を切断した後すばやく採血し、ついで胸部大動脈を二重結紮しこゝより 0°C の生理的食塩水を急速大量点滴を行うとネコの脳は完全に冷却固定される。次にすばやく東大式脳固定装置に頭部を固定し開頭後、脳を損傷することなしに摘出する。この場合脳組織は完全に冷却固定され、脳の各部位を解剖学的に分離摘出するのに容易である。各々の部位の組織は、摘出後すぐ -50°C のドライアイスアセトン固定または液体窒素固定を行った。その後前処理操作法にてガスクロマトグラフィーで catecholamine類の測定を行った。なお脳実質では、組織 50mg の重量で充分測定可能であった。

b) L-DOPAおよび MK486 の投与法

ケタラール麻酔下にL-DOPA 100mg/体重kg を腹腔内注射し、1 時間後対照群と同様に冷却生理的食塩水を脳内注入し、脳組織の冷却固定後，脳を摘出し，thalamus,pallidumおよび caudate nucleus に分離，残った大脳半球，脳幹および小脳を全脳としてcatecholamine 類の分析定量を行った。

Fig. 2



次に別のネコ 2 匹を使用．ケタラール麻酔下にL-DOPA 100mg/体重kg および同時に MK486 10mg/体重kg の腹腔内注射の併用を行い、各々のネコについて、1 時間後および 1 時間30分後に脳組織の摘出を行い脳内のcatecholamine 類の測定を行った。

実験結果

1)動物実験

無処置対照群ネコの脳組織各部位の catecholamine測定は、各々 3 匹について行いその平均値をFig.3に示した。dopamine 値は caudate nucleus > pallidum > thalamus > 全脳の順で高値を示した。

L-DOPA 投与 1 時間後の脳内 catecholamine について検討した結果 dopamine 値はthalamus,caudate nucleus,pallidum とほぼ同じ割合で増加した。

L-DOPA+MK486 の併用投与では、投与後 1 時間後では DOPA 値は caudate nucleus では約 4 倍、thalamus では約 2 倍，pallidum では約 1.5 倍に上昇した。dopamine 値はcaudate nucleus では約 4 倍。pallidum では約 2 倍、thalamus では約 1.5 倍に上昇を示し、また投与 1 時間30分後には caudate nucleus では約 6 倍 pallidum および thalamus では約 3 倍近く上昇し、特に caudate nucleus において MK486 を併用することにより選択的に dopamine 値が上昇することがわかった。norepinephrine は pallidum および caudate nucleus で軽度上昇

Fig. 3

CATECHOLAMINES LEVEL IN CAT BRAIN AFTER ADMINISTRATION OF L-DOPA OR L-DOPA + MK 486

LOCALIZATION OF BRAIN TISSUE		DOPA	DA	E	NE (mμ/g)
THALAMUS					
CONTROL			853	45	267
DOPA		309	904	48	302
DOPA + MK 486	1'	710	1413	48	300
	1.5'	1732	2840	36	220
PALLIDUM					
CONTROL			1389	13	312
DOPA		610	1680	12	300
DOPA + MK 486	1'	1091	3232	28	450
	1.5'	710	3950	22	560
CAUDATE NUCLEUS					
CONTROL			9350	12	273
DOPA		255	11090	13	273
DOPA + MK486	1'	1053	43060	14	442
	1.5'	1680	67200	16	475
WHOLE BRAIN					
CONTROL			315	15	90
DOPA		51	510	11	86
DOPA + MK 486	1'	63	2100	19	85
	1.5'	71	4600	36	100

1' : AFTER 1 HR.
1.5' : AFTER 1.5 HRS.

Fig. 4

CATECHOLAMINES LEVEL IN CAT SERUM AFTER ADMINISTRATION OF L-DOPA OR L-DOPA + MK 486

	L-DOPA	DA	E	NE (NG/ML)
CONTROL	0	3.0	0.5	2.0
DOPA	11.0	6.0	0.5	2.1
DOPA +MK 486 1'	33.0	4.0	0.8	2.2
1.5'	34.0	3.0	0.5	2.5

Fig. 5

CATECHOLAMINES LEVEL IN SERUM OF THE PATIENT WITH PARKINSONISM
L-DOPA 1000 MG PER OS

TIME AFTER ADMINISTRATION (HRS)	DOPA	DA	E	NE (NG/ML)
0	0	3.8	1.7	5.1
2	198.2	36.0	1.6	10.0
4	55.5	39.0	1.5	14.1

L-DOPA 1000 MG + MK 486 100 MG PER OS

TIME AFTER ADMINISTRATION (HRS)	DOPA	DA	E	NE (NG/ML)
1	39.7	10.4	1.1	15.8
2	301.0	7.4	1.5	12.4
4	320.0	8.2	2.2	28.4

を示したが、epinephrine値は、大脳基底核では、ほとんど変動を認めなかった。全脳ではepinephrineは約2倍に上昇を認めた。

次にFig.4に血清中のcatecholamine値の変動を示した。L-DOPA100mg/体重kg 腹腔内注射1時間後の血清のcatecholamin値はdopamineは、約2倍に上昇を示したが、epinephrineおよびnorepinephrineの変動は認めなかった。L-DOPA100mg/体重kg +MK486 10mg/体重kg 腹腔内注射の併用では，投与後1時間でDOPA値は3倍に上昇し、逆にdopamine値は$\frac{1}{2}$に減少し、epinephrineおよびnorepinephrineにはほとんど変動を認めなかった。

2) Parkinsonism 患者における測定

動物実験および諸氏の文献的[2) 3) 4)]報告にもとづいてわれわれはL-DOPAなどの薬物療法を受けていない新鮮例のparkinsonismの患者に対しL-DOPA単独の効果およびMK486併用の効果について検討した。

症例は57才の女性で、四肢のtremor, rigidityおよびbradykinesiaを主訴としたparkinsonismの患者でL-DOPAなどの薬物療法を受けていない症例についてL-DOPAおよびこれとMK486との併用を血中および髄液中のcatecholamine類の測定を行って比較した。

まず安静時にコントロールのためにL-DOPA投与前および L-DOPA 1000mg内服後に経時的に採血および髄液の採集を行った。なお途中神経症状、精神症状および全身状態に異常がないことを確かめた。

次に同一患者で2週間後L-DOPA1000mg+MK486 100mgを内服させ前と同様な厳重な経時的観察を行った。この間最初のL-DOPA内服からMK486併用の検査まで患者の希望でL-DOPAなどの薬物の服用を全く受けていない。その結果をFig.5およびFig.6に示した。

Fig.5は血中のcatecholamineの変動を示すが、血中DOPAはL-DOPA単独投与では、投与後2時間でほぼ最高値に達するが、MK486を併用すると投与後4時間後も血中DOPA濃度は維持され、血中dopamine濃度はL-DOPA単独投与に比らべ約$\frac{1}{5}$に減少した。一方髄液中のcatecholamineの変動はFig.6に示したが、L-DOPA単独投与では髄液中のdopamine値は、2時間で最高に達していると思えるが、その後急速な減少をきたした。ところがMK486の併用により髄液中dopamine値は、投与後4時間後も高濃度に維持された。

なお髄液中に4時間後にmetanephrineの高濃度検出を認めL-DOPAにMK486を併用の場合は、髄液中ではdopamine→homovanillic acid (HVA)への代謝経路のみでないことがうた

Fig. 6

CATECHOLAMINES LEVEL IN CSF OF THE PATIENT WITH PARKINSONISM

L-DOPA 1000 MG PER OS

TIME AFTER ADMINISTRATION (HRS)	DOPA	DA	E	NE (NG/ML)
0	0	0.39	0.59	0.68
2	0.2	35.6	1.81	0.91
4	0.1	0.84	0.63	0.27

L-DOPA 1000 MG + MK 486 100 MG PER OS

TIME AFTER ADMINISTRATION (HRS)	DOPA	DA	E	NE	MN (NG/ML)
1	0.34	12.2	1.10	1.60	0
4	0.32	22.5	1.70	0.30	39.2

がわれた。

考　按

catecholamine 類の測定技術の進歩により組織中および体液中の微量分析定量が可能となった。特にガスクロマトグラフィー法の発達により髄液中の catecholamine 類代謝産物も測定出来るようになった。

L-DOPA 投与および MK486 併用投与による脳内 catecholamine 値の変動は Rat および mouse などの小動物の whole brain に対して報告[5)6)]があるが、やはり脳組織を分離摘出し，各部位および全脳で比較することが望ましい。

今回われわれの動物実験では L-DOPA+MK486 の併用により大脳基底核の caudate nucleus に選択的 DOPA が取り込まれ dopamine 値の上昇を認めることがわかった。またわれわれの成績から血中 DOPA 値は脳内 dopamine 値をかなり忠実に反映しているように思われた。ヒトにおいて L-DOPA 単独投与より MK486 を併用することにより血中 DOPA 値は長時間高濃度に維持され、髄液中では、dopamine 値の上昇が持続した。また MK486 を併用することで髄液中に高濃度の metanephrine を検出した。現在髄液中の代謝産物として HVA は dopamine の主要代謝産物として考えられているが、HVA 濃度の測定は必ずしも最大の目安とはならないと思われる。

Parkinsonism の患者の治療上、われわれのネコの実験にもとづく L-DOPA+MK486 の適当量の併用効果が期待されうるが、臨床上の効果については今後の検討が望まれる。

文　献

1) Imai, K., Sugiura, M. and Tamura, Z. : Catecholamines in Rat Tissues and serum determined by Gas Chromatographic Method. Chem. Pharm. Bull. 19:2, 409-461, 1971.

2) Mars, H. : Modification of DOPA effect by decarboxylase Inhibition. Neurol. 22 417, 1972.

3) Vessel, E.S., Ng, L., Passananti, G.T. and Chase, T.N. : Inhibition of drug metabolism by levodapa in combination with a dopa-decarboxylase inhibitor. Lancet 2,370, Aug. 14, 1971 (in Letter to the Editor)

4) Yahr, M.D., Duvoisin, R.C. Mendoza, M.R., Schear, M.J. and Barrette, R.E. : Modification of L-DOPA therapy of Parkinsonism by alpha-methyldopahydrazine (MK486), Trans. Amer. Neurol. Ass. 96 : 55-58, 1971.

5) Strömberg, U. : DOPA effects on motility in mice; Potentiation by MK485 and dexchlorpheniramine. Psychopharmac. 18 : 58-67, 1970.

6) Butcher, L.L. and Engel. J.: Behaivioral and biochemical effect of L-DOPA after peripheral decarboxylase inhibition. Brain. Res. 15 :233-242, 1969.

24 カテコールアミンによる脳Na−K依存性 ATPase の活性化作用機序

吉村啓一

（北大・医・I生理）

〔要 約〕

Catecholamine (norepinephrine (NE), epinephrine, isoproterenol, dopamine と dopa) は脳の Na-k ATPase 活性を著明に増加した。この catecholamine の NaKATPase 活性増加作用は catecholamine 濃度 0.005mM と 1mM との間で dose-response の関係を示した。一方他の catecholamine の誘導体である tyramine, phenylephrine および ephedrine, metanephrine, VMA は NaKATPase 活性増加作用を示さなかった。これらの結果は catecholamine の Na-KATPase の活性化作用の発現には 3,4 dihydroxy benzene 核が必須であることを示す。3,4 dihydroxyphenylacetic acid も多少の活性化作用を示したがその作用は NE 作用と比較すると明らかに弱かった。このことは側鎖の α の位置の N が最大力価の発現に必要であることを推測させる。この NE の NaKATPase 活性増加作用は homogenate を 37°C の medium で preincubation することにより著明に減弱した。一方 basal の Nak-ATPase 活性は pre-incubation によりほとんど影響をうけなかった。このことは NE の結合部位と NaKATPase は異るものであることを推定させる成績である。なお serotonin も Na-KATPase の活性増加作用を示した。しかし NE と serotonin の最大効果との間には相加性はみとめられなかった。NE と serotonin との間に NaKATPase の活性化という点で構造上に特異性がみとめられないことを考えると NE と serotonin が異った結合部位を介して共通の Na-KATPase の活性化を行っている可能性を推定させる。なおαおよびβ遮断剤は NE 作用に著明な影響をおよぼさないようである。

さきにわれわれは catecholamine が脳の Na-K依存性ATPase (Na-K ATPase) 活性を著明に増加することを報告した (4,5)。この catecholamine による脳 Na-K ATPase 活性増加作用の機序をしらべるため今回種々の catecholamine 誘導体を用いて catecholamine の構造と Na-K ATPase 活性化作用との関係を検討した。またこの活性化作用の作用様式に関する若干の知見を得たので報告する。

実験方法

実験動物は体重 300～400g の Wistar 系雄ラットを用いた。動物を断頭により屠殺し脳を出来るだけすばやく氷冷した水で冷した。ATPase 活性の測定は脳の homogenate を 0.5ml の反応液中で incubate し放出された燐を測定することで行った。反応液は ATP (Tris塩) 4mM, $MgCl_2$ 6 mM, Tris-HCl buffer 50mM (pH 7.4), 脳の homogenate (1mg wet weight) および NaCl 100mM, KCl 20mM とそれぞれの試薬を含む。incubation は 37°C, 10分間の preincubation を行ったのち ATP を加えることで開始した。正確に10分間の incubation 後氷冷したトリクロル酢酸 (10%) の 0.2ml を加えて反応を止めた。遠沈後, 上清 0.5ml で燐の測定を Fiske and Subbarow 法で行った。ATPase 活性は μmoles phosphate release/mg protein/hr であらわした。Na-KATPase 活性は NaCl および KCl を含む反応液で放出された燐の値 (Total ATPase) から両者を含まない反応液で放出された燐の値 (MgATPase) の差をもとめ活性値とした。ATP (Tris塩) は Dowex 50 resin カラムで ATP (Na塩) を Tris 塩に変えて用いた。

結果と考察

視床下部の Na-k ATPase と MgATPase 活性はそれぞれ 6.2 と 13.1 であった。ouabain 0.5mM の添加は NaKATPase 活性を著明に抑制したが MgATPase 活性には影響しない。norepinephrine (NE)

および dopamine を添加すると視床下部の Na-K ATPase 活性の著明な増加がみられ(図1),この NE および dopamine 作用には明らかな dose response の関係がみられた。なお NE の最小有効濃度は約 5μM であり,最大反応は約 1mM の濃度であった。NE による Na-K ATPase 活性増加作用は脳の他の部位すなわち大脳皮質および小脳でもみとめられた。この catecholamine による Na-K ATPase 活性増加作用は他のアミンすなわち epinephrine, isoproterenol (図2) および l-DOPA (表1) でもみとめられた。しかし catechol 核の OH の1つ又は両方をとりのぞいた誘導体である phenylephrine, tyramine および ephedrine は視床下部の Na-K ATPase 活性を増加しなかった(表1)。また catechol 核の3の位置の OH を OCH_3 で置換した誘導体である metanephrine および 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid (VMA) は脳の Na-K ATPase 活性増加作用を示さず VMA (1mM) の添加はむしろ有意の抑制作用を示した。図3は小脳を用いて 3,4 dihydroxyphenyl acetic acid による Na-K ATPase の活性化作用を NE の効果と比較した。3,4 dihydroxyphenylacetic acid も有意の Na-K ATPase 活性増加作用を示した。しかしその活性増加作用は NE 作用と比較して明らかに弱かった。表2は以上の結果をまとめたものである表から明らかなように catecholamine による Na-K ATPase 活性増加作用の発現には 3,4-dihydroxybenzene 核が必須であることがわかる。すなわち1ケ又は両方の OH 基をとりのぞいたもの (phenylephrine, tyramine および ephedrine), および1ケの OH 基を $O-CH_3$ でおきかえたもの (metanephrine および VMA) には全く Na-K ATPase の活性化作用がみとめられない。3,4 dihydroxyphenylacetic acid にも Na-K ATPase の活性化効果がみとめられたが,その効果は catecholamine と比較すると明らかに弱いことは catecholamine の最強効果の発現には側鎖のβの位置の N 基の存在が重要であることを暗示しているのかもしれない(図3)。Tomasi (3) および Dunnick (1) らは catecholamine が肝細胞膜に結合する場合 3,4 dihydroxy benzene 核が必須であることを示した。同様の成績は赤血球膜に対する catecholamine の結合の場合でも得られている(2)。従って以上にの

図1

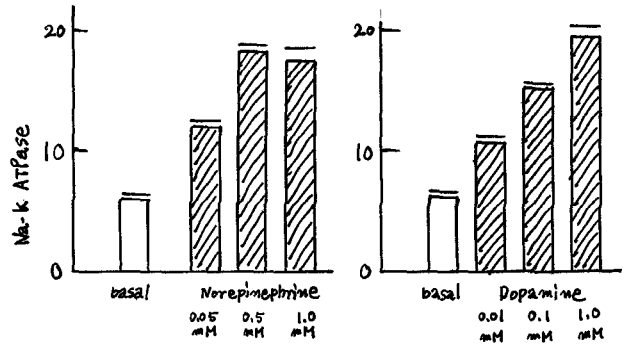


図2

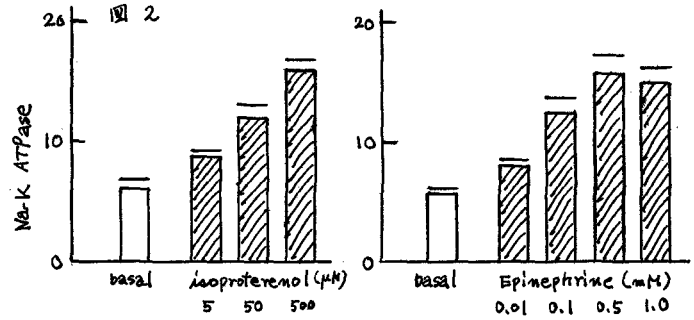


表1

Treatment	No. of paired Experiment	Control	Experimental	P
DOPA 0.05mM	7	7.04±0.13	11.15±0.81	<0.01
0.5mM			16.33±0.95	<0.001
Tyramine 0.5mM	4	6.46±0.37	8.10±0.36	n.s.
Phenylephrine 0.05mM	3	8.37±0.13	8.18±0.53	n.s.
0.5mM			9.32±0.51	n.s.
Ephedrine 0.1mM	2	5.90, 6.97	6.74, 7.10	n.s.
1.0mM	5	6.43±0.19	7.08±0.34	n.s.
Metanephrine 0.05mM	3	8.42±0.45	7.92±1.02	n.s.
0.5mM			7.96±1.39	n.s.
3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid 0.1mM	4	6.83±0.19	7.38±0.99	n.s.
1.0mM			5.26±0.24	<0.05

図 3

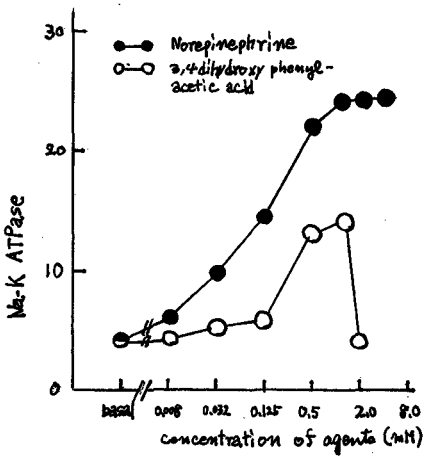


表 2

Name	Hormone analogues added				Stimulation of Na-K ATPase
Ephedrine		OH	CH_3	CH_3	(−)
Tyramine	4OH	H	H	H	(−)
Phenylephrine	3OH	OH	H	CH_3	(−)
Metanephrine	3OCH_3 4OH	OH	H	CH_3	(−)
3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid	3OCH_3 4OH	OH	—	—	(−)
3,4 dihydroxy phenyl-acetic acid	3OH 4OH	H	—	—	(+)
DOPA	3OH 4OH	H	COOH	H	(+++)
Dopamine	3OH 4OH	H	H	H	(+++)
Norepinephrine	3OH 4OH	OH	H	H	(+++)
Epinephrine	3OH 4OH	OH	H	CH_3	(+++)
Isoproterenol	3OH 4OH	OH	H	$CH(CH_3)_2$	(+++)

べた catecholamine による NakATPase 活性化の成績は catecholamine が脳の Catecholamine に対する receptor に結合することによって生ずる現象である可能性を示唆しているのかもしれない。

次に β-遮断剤 propranolol および α-遮断剤 phentolamine が NE の Na-K ATPase の活性化作用にいかなる影響をおよぼすかを検討した。表3は視床下部を用いて NE の NakATPase の活性化作用に対する propranolol の影響をしらべたものである。

表 3

Hypothalamus	Na-K ATPase		
	basal	Norepinephrine 0.1mM	Norepinephrine 0.5mM
control	6.96±0.40	14.47±1.23	17.54±1.12
Propranolol 0.5mM	5.51±0.34	11.94±2.07	14.02±1.17

表 4

	NaK ATPase		
Hypothalamus	basal	Norepinephrine 0.1mM	Norepinephrine 0.5mM
control	6.71±0.78	15.92±0.47	17.38±1.71
phentolamine 0.5mM	7.49±0.27	13.76±0.91	15.86±0.85
Cerebellum			
control	8.57±0.29	18.14±0.68	22.87±1.71
phentolamine 0.5mM	8.43±0.20	19.47±0.94	21.25±1.52

Propranolol 0.5mM の添加は basal および NE 存在下の Na-K ATPase 活性を有意に抑制した。しかし NE の活性化効果（対照に対する % stimulation であらわしたもの）は propranolol の存在によっては全く影響をうけなかった。従って以上の β-遮断剤の結果は NE の NaKATPase 活性増加作用は β-receptor を介して作用を発現しているとは考えにくい成績である。表4は視床下部および小脳を用いて α-遮断剤 phentolamine の NE 作用に対する影響を検討した成績である。Phentolamine 0.5mM の添加は basal の Na-KATPase 活性を幾分増加する傾向を示した。一方 NE 存在下の Na-KATPase 活性はわずかに低下した。従って NE の効果は約 20% 抑制された結果となった。しかし phenylephrine (α-stimulant) の添加が Na-KATPase に影響しなかった成績(表1)，phentolamine の抑制効果がかなり大量を用いたにもかかわらず非常に弱いことを考えると NE による NaKATPase の活性化作用が α-receptor を介する作用とすることも困難である。DunnicK(1) らは NE の肝細胞膜への結合は β-遮断剤では抑制がみられず，高濃度の phentolamine の添加がわずかな抑制的作用（20%）を示すと報告している。従って彼らの報告を考慮して我々の結果を考えると(1) NE の NaKATPase 活性化作用は NE が脳の receptor に結合することにより生ずること (2) この receptor に対する結合には α および β 遮断剤は著明な影響をしないと解釈出来るように思われる。但し Schramm (2) らは赤血球膜に対する NE の結合は高濃度の α および β 遮断剤で抑制され，その場合 β-遮断剤の方が抑制作用は強いとのべてい

る。いづれにせよ脳のcatecholamine receptorに対するcatecholamineの結合様式についてを検討した報告はなく今後検討を要する興味ある点である。

NEによる脳Na-KATPaseの活性化作用がNEが脳のreceptorに結合することにより生ずると考えた場合NEの脳receptorへの結合とNaKATPaseの活性化作用がいかなる関係にあるかという問題は興味がある。図4は小脳のhomogenateをNEを含まないmediumで10分間又は30分間preincubation後NEを加えNaKATPase活性を測定したものを対照すなわちpreincubationを行わないもの(通常の測定法)と比較し対照に対する%であらわした成績である。図に明らかなようにNEを含まないmediumでpreincubationした場合次で加えたNE効果は著明に減弱した。一方basalのNa-KATPase活性はpreincubationによりほとんど影響されなかった。これらの結果はNEの結合部位とNaKATPaseが異ったものであることを推定させる成績である。ところでpreincubationによりNEの効果が減弱したことが(1)NEとreceptorとの相互作用が障害されることによるのか(2)NEがreceptorに結合した後Na-KATPaseの活性化に導く過程が障害されることによるのかという点が次に問題となる。以前の報告でserotoninがNa-KATPaseを活性化することを示した(4,5)。NEとserotoninとの間にNa-KATPaseの活性化という点で構造上の特異性に類似がみられないことはNEとserotoninがNa-KATPaseを活性化する場合のreceptorは異っていることを推定させる。また最大効果量のNEとserotoninとの間に相加性がみとめられなかったこと(図5)は両者により活性化されるNa-K-ATPaseは共通であることを示唆している。すなわちNEおよびserotoninそれぞれに対する2つの異なったreceptorが共通のNa-KATPaseを活性化することを示していると考えられる。ところでserotoninのNa-KATPaseの活性化作用もまたpreincubationにより著明に減弱した。この結果はpreincubationにより(2)の可能性すなわちreceptorとNa-KATPaseの活性化との相互作用の過程が影響されていることを暗示する成績と思われる。この相互作用がいかなるものかという問題は今後に残された興味ある点である。

図4

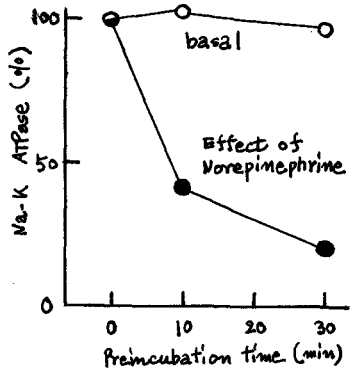
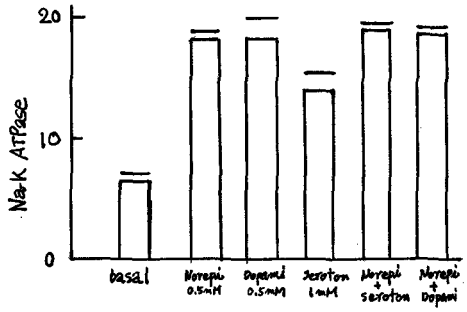


図5



文献

1. Dunnick J.K. and Marinetti, Biochim. Biophys. Acta, 249, 122 (1971)
2. Schramm M., Feinstein H., Naim E., Lang M. and Lasser M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 523 (1972)
3. Tomasi V., Koretz S., Ray T.K., Dunnick J. and Marinetti G.V., Biochim. Biophys. Acta, 211, 31 (1970)
4. Yoshimura K., J. Biochem., 74, 389 (1973)
5. Yoshimura K. and Hiroshige T., Fourth International Meeting of the ISN, abstract pp. 231 (1973)

25 脳内ノルアドレナリンの前駆物質としての 3,4－ジヒドロキシフェニルセリンについて

佐野 勇・平井基陽
松岡征夫・中嶋照夫
（阪大・医・高次研）

〔要 約〕
脳内ドーパミンあるいはセロトニンを特異的に増加させる方法として、それらアミンの直接の前駆アミノ酸の投与が行われる。ノルアドレナリンはドーパよりドーパミンを経て生合成されるが、ドーパを動物に与えてもノルアドレナリンは増加しない。非天然物質であるが、3,4-ジヒドロキシフェニールセリン（DOPS）により脳内ノルアドレナリン含量は増加するが、この物質には4つの異性体があり、これまでの研究はすべてラセミ体を用いてなされてきた。今回L-スレオ，L-エリスロ，DL-スレオおよびDL-エリスロ型をラットの腹腔内に投与して脳内カテコールアミンの変動を検討し、以下の知見をえた。
1）DOPSは脳内ノルアドレナリンを特異的に増加させる。2）D型は脳内ノルアドレナリン含量を増加させない。3）L-スレオ型は脳内ノルアドレナリン含量をわずかに増加させる。4）これに反してL-エリスロ型は脳内ノルアドレナリン含量を著明に増加させるが、この際生じるノルアドレナリンは非天然型のd型である。5）したがってDOPSを用いて脳内天然型のl-ノルアドレナリンを増加させることは不可能である。
以上の知見によりラセミ体を用いた現在までの知見が確認された。

近年アミン前駆物質療法としてパーキンソニスムに対してL-ドーパ療法、うつ病に対してL-5ヒドロキシトリプトファン療法が確立され、このことは神経化学の研究成果の臨床への応用として医学の分野で高く評価されている。われわれはもう一つの脳内活性アミンであるノルアドレナリンを特異的に増加させる方法、とくに前駆物質による方法を検討してきた。ドーパは脳内ドーパミンを増加させるが、ノルアドレナリン含量は影響されない。そこで非天然ではあるが3,4-ジヒドロキシフェニールセリン（DOPS）を用いることが検討され、この物質がin vitroの実験で芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素の基質となりうること、in vivoの実験で脳内ノルアドレナリン含量を増加させることが報告されている[1]。DOPSにはL型とD型およびスレオ型とエリスロ型の異性体があり、いままでの研究はすべてラセミ体を用いて行なわれてきた。今回L-スレオ、L-エリスロ、DL-スレオおよびDL-エリスロ型を用い、これらの物質をラットの腹腔内に投与し、脳内カテコールアミンの変動を検討した。

〔実 験 方 法〕

150－200 gのSD系雄ラットを用いた。動に前駆アミノ酸投与の16時間前に20mg/KgのJB-516（モノアミン酸化酵素阻害剤）を腹腔内に注射し前処置した。L-スレオDOPSを100mg/kg，L-エリスロDOPSを100mg/kgあるいはDOPSのラセミ体200mg/kgを動物の腹腔内に注入し、一定時間後に断頭致死せしめ、脳内カテコールアミンを測定した。脳内カテコールアミンの定量は武貞の方法[2]を変法して行なった。DOPSの定量はカテコール分画をイオン交換クロマトグラフィーで分別したのち、エチレンジアミン反応を行ない螢光定量する方法を用いた。

〔実験結果〕

1) DOPS投与による脳内カテコールアミンの変動

図1に200mg/Kgのし-スレオ,エリスロ-DOPSを腹腔内に投与し、30分後の脳内カテコールアミンをKirschnerとGoodall[3]の方法でイオン交換クロマトグラフィーを行なった溶出パターンを示した。この図よりDOPSの投与によって脳内カテコールアミンのうちノルアドレナリンが特異的に増加していることが明らかである。

2) DOPS投与後の脳内ノルアドレナリン含量の経時的変化

図2に200mg/KgのL-スレオ,エリスロ-DOPSを腹腔内に投与し、投与後15、30、60および120分の脳内ノルアドレナリン含量を示した。脳内のDOPSは注射後30分で最大含量を示し、以後減少し、120分でほとんど消失する。一方脳内ノルアドレナリン含量は注射後30分で最大値を示し、もとの値の約2倍に達する。以後漸減するが、120分後でももとの値の1.5倍の値を保っている。

3) DOPSの種々の異性体を用いての脳内ノルアドレナリン含量の検討

表1にDOPSの種々の異性体あるいはラセミ体を投与し、30分後の脳内ノルアドレナリン含量を測定した結果を示した。L-エリスロ-DOPS、DL-エリスロ-DOPSあるいはL-スレオ,エリスロ-DOPSを投与した場合脳内ノルアドレナリン含量は約1μg/gに上昇しているが、L-スレオ-DOPSあるいはDL-スレオ-DOPSを投与した場合は約0.5μg/gで増加はわずかである。またL-スレオ-DOPS 100mg/kgとDL-スレオ-DOPS 200mg/kg投与の値がほぼ等しいこと、L-エリスロ-DOPS 100mg/kg投与とDL-エリスロ-DOPS 200mg/kg投与の値がほぼ同じであ

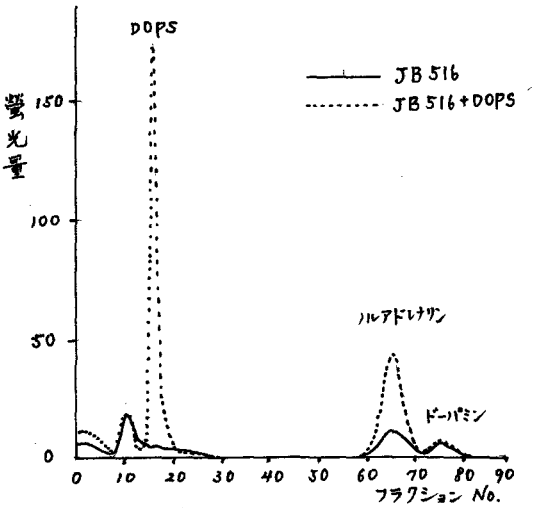


図1 ラット脳のカテコールamine

8g当量のラット脳のカテコール分画を1×40cm Amberlite CG 50カラムにかけ、4mlづつ集めた。各分画をEDTA添加し、420mμで励起し、520mμの蛍光を測定した。

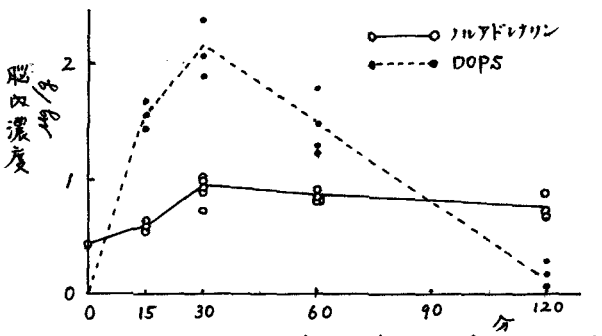


図2 DOPS投与後の脳内ノルアドレナリン含量の経時的変化

	投与量 (mg/Kg)	ノルアドレナリン (μg/g)
対照群 (5)	——	0.39
L-スレオ-DOPS (3)	100	0.48
DL-スレオ-DOPS (3)	200	0.46
L-エリスロ-DOPS (3)	100	1.13
DL-エリスロ-DOPS (3)	200	1.09
L-スレオ,エリスロ-DOPS (5)	200	0.99

表1 DOPS投与後の脳内ノルアドレナリン含量

ることはD-型は脳内ノルアドレナリン含量の増加には関与していないことを示している。

〔考　察〕

今回われわれはL-スレオ-DOPSとL-エリスロ-DOPSを入手する機会をえたので、これらの物質を動物に投与して脳内カテコールアミンの変動を検討した。その結果はいままでラセミ体を用いて研究された結果と全く同じであり、L-エリスロ-DOPSが脳内ノルアドレナリンを増加させるのに一番よい前駆アミノ酸であることを確認した。しかしL-エリスロ-DOPSの脱炭酸により生成されるノルアドレナリンはd-ノルアドレナリンであり、天然型はl-ノルアドレナリンであるので、現在のところ前駆アミノ酸の投与により天然型ノルアドレナリンを特異的に増加させるよい方法は発見されていない。

〔参考文献〕

1) Porter, C.C., Torchiana, M.L. and Stone, C.A.: Life Sciences, 11, 787, 1972.
2) 武貞昌志：生化学, 7, 475 と 478, 1960.
3) Kirschner, N. and Goodall, M.: J. Biol. Chem., 226, 207, 1956.

26 リチウムイオンの脳インドールアミン代謝におよぼす作用

渡辺昌祐
（川崎医大・精神）
中島良彦・江原嵩・井口欽也
田口冠蔵・大月三郎・
（岡山大・医・神経）

〔要約〕

感情障害に対するリチウムイオンの治療効果が確認され，臨床応用も次第に広範囲にわたって来た。しかるに，リチウムイオンの作用機序に関する研究は，精動障害の病態生化学的解明が，主として脳のアミン代謝・無機イオン代謝の面よりなされているので，この両面から検討されているが，なお未解決の状態である。

われわれは，in situ における リチウムイオンの脳インドールアミン代謝に及ぼす影響を調べる目的で，脳灌流法を用いて，NaイオンをLiイオンで置換した人工血液を作り，それに正常のトリプトファン濃度を保ってネコ脳を1時間灌流し，脳のトリプトファン，5-HT，5-HIAA濃度を，大脳皮質，海馬，尾状核，視床，小脳，延髄，延髄背側で測定した。Li 置換血液で脳を1時間灌流すると，

1. 脳トリプトファン濃度は対照にくらべて有意に減少する。
2. 脳5-HT濃度は変化しない。
3. 脳5-HIAA濃度は視床，海馬，尾状核で減少傾向を示した。

以上の結果 Na^+ を Li^+ に置換した血液で脳を1時間灌流すると，脳セロトニン代謝は抑制されると考える。

感情障害に対するリチウムイオンの治療効果はもはや確認され，ここ10年来次第に広汎囲な臨床応用がなされつつある。

しかるに，リチウムイオンの作用機序に関しては，なお多くの *speculation* がなされながら，なお未知の段階である。感情障害（主として躁うつ病）の病態生化学が，主としてアミン代謝，イオン代謝などの面から解明されており[1]，これらの代謝に対するリチウムイオンの作用が次第に明かにされつつあるが，なお不明の点も多い。

脳のカテコールアミン代謝に及ぼすリチウムイオンの作用の検討は多数の報告がみられるが，インドールアミン代謝に対するリチウムイオンの作用に関する研究は少い。

われわれは，脳灌流実験における特長の1つである人工血液組成を任意に作り得る長所を利用して，人工血液中のリンゲル液の $NaCl$ を同モルの $LiCl$ と置換した血液で，1時間脳を灌流し，脳の（in situ における）インドールアミン代謝に及ぼす作用を検討した。

実験方法

1) 脳灌流法は既述の通り[2]であり，1度脳を循環した血液は再度脳を通さない開放式灌流を行った。本報告はリチウム置換血液による灌流実験5例，標準灌流実験5例の結果である。

2) 人工血液組成は，既述の組成[2]のうち，$NaCl$ を同モルの $LiCl$ で置換したリンゲル液を用いた。血液トリプトファン濃度は 9.0 mg/ml であり，正常ネコ血液と同濃度である。

3) 灌流時間は60分とし，実験終了後可及的速かに脳を摘出し，氷冷下で cortex，

表1 脳トリプトファン濃度 μmole/100g brain

実験番号	I	II	III	IV	V	平均	有意差検定
リチウム血灌流	0.970	0.892	1.100	0.917	0.849	0.946±0.082	P<0.05
標準灌流	1.637	1.441	1.912	1.324	1.520	1.567±0.199	

Thalamus, Hippocampus, N. Caudatus, Cerebellum, medulla obl. および medullaの背側部を摘出した。

4) トリプトファンの定量はDenckla の方法[3]

5) 5-HT の定量はSnyder の方法[4]

6) 5-HIAA の定量はAnton の方法[5]によった。

7) 脳の全アミノ酸定量には，クエン酸リチウム緩衝液を用いて，和本 L-C 4型アミノ酸自動分析装置を用いて分離定量した。

実験結果及び考察

1. 脳トリプトファン濃度に及ぼす作用

リチウム血灌流脳と標準血灌流脳のトリプトファン濃度を測定した。(表1) 脳トリプトファンは脳の部位別濃度差がないことが明かになったので[6]，皮質における トリプトファン濃度を比較した。リチウム血灌流脳では0.946±0.082μmole/100g brainであり，標準灌流のそれに比較して60~70%(P<0.05)に減少した。

表2 脳アミノ酸バランス μmole/g brain

	リチウム血灌流(4)	標準灌流(5)	有意差検定
Asp	1.68±0.29	1.36±0.03	N.S.
Thr	0.45±0.05	0.75±0.01	P<0.05
Ser	0.46±0.04	0.71±0.04	N.S.
Glu	7.94±1.39	7.31±1.68	N.S.
Glu-NH_2	4.30±0.97	3.61±0.10	N.S.
Gly	0.92±0.16	1.33±0.23	N.S.
Ala	0.57±0.08	0.51±0.21	N.S.
Val	0.15±0.01	0.25±0.03	N.S.
Met	0.16±0.08	0.52±0.10	P<0.05
I-Leu	0.12±0.01	0.15±0.04	N.S.
Leu	0.20±0.04	0.24±0.05	N.S.
Tyr	0.12±0.02	0.14±0.01	N.S.
Phe	0.19±0.03	0.22±0.03	N.S.
GABA	1.76±0.42	1.29±0.12	N.S.

各種アミノ酸の脳組織へのとり込みに対するリチウムイオンの作用を検討した報告はin vivoの実験はみうけないが，in vitroでは D. F. de Almeida[7]の L-Histidine, Lahiri[8]の L-Lysine, Amino-isobutyrate, Cyclo-

表3 脳部位別 5HT濃度 μmole/100g brain

	リチウム血灌流 (5)	標準血灌流 (5)	有意差検定
大脳皮質	0.416 ±0.207	0.380±0.032	いづれの部位もN.S.
海馬	0.662 ±0.177	0.416±0.118	
尾状核	0.691±0.355	0.668±0.077	
視床	0.958 ±0.366	0.990±0.071	
小脳	0.416±0.162	0.310±0.105	
延髄	0.536±0.168	0.663±0.182	
延髄背側	0.837±0.271	——	

leucine, L-Lysine Aminobutyrate, Bidder ら[10]の L-amino isobutyric acid の成績がみられる。いづれの実験も，slice へのとり込みが medium 中の Na^+ を Li^+ に置換すると抑制されるか，Na^+ を欠如した場合ほど抑制が著しくなることを示しており，われわれの in situ の実験と一致している。また，NE類似構造を持つ [^{3}H]-metaraminol の脳組織への transport を，$K^+ = Rb^+ > Cs > Li$ の順序に抑制することを明らかにした paton[9]の成績や，小腸への glucose や水分の吸収が Na^+ を Li^+ に置きかえた場合に，active transport mechanism における Na^+ イオンの役割を Li がはたし得ないとのべている Fanet[10]の成績と類似する。

本実験では Na^+ が完全ではないが，ほとんど欠如しているので，トリプトファンの脳組織へのとり込みの抑制の機序の1つとして，Naイオンの減少又は消失も考えられる。いづれにせよNaイオンを Liイオンに置換した血液で脳を灌流すると，脳のトリプトファン濃度は有意に低下することは明らかである。他のアミノ酸については，Thr と met の2つのアミノ酸について減少傾向が認められた。

表4 脳部位別 5HIAA 濃度 μmole/100g brain

	リチウム血灌流 (5)	標準血灌流 (5)	有意差検定
大脳皮質	0.253±0.071	0.190±0.075	N.S.
海馬	0.307±0.079	0.512±0.076	
尾状核	0.418±0.166	0.750±0.197	
視床	0.420±0.103	0.676±0.139	0.05<p<0.10
小脳	0.299±0.165	0.225±0.080	N.S.
延髄	0.440±0.222	0.317±0.080	N.S
延髄背側	0.358±0.223	——	

2. 脳部位別5-HT濃度（表3）

リチウム置換血液で1時間脳を灌流した場合，脳の部位別5-HT濃度は，標準灌流のそれと比較して同濃度を保ち，視床，延髄背側，海馬に高濃度に認められた。

脳の5-HT合成が available なトリプトファン量に規制されることが明らかになっているが，リチウム血灌流の場合，脳のトリプトファン濃度が標準灌流の場合の60～

70%に減少したにもかかわらず，5-HT濃度に変化を認めなかった。

リチウムイオンの脳5-HT代謝に及ぼす研究は，NA代謝に対する研究に比較して極めて少い。

Ho ら[12]はラットにリチウムを慢性投与後，脳の視床下部．脳幹の5-HTが減少するが，小脳では5-HTの代謝回転は上昇し，視床下部では抑制すると報告した。また Corrodi ら[13]は，脳の5-HT濃度にリチウムは影響しないと報告し，トリプトファン hydroxylase inhibitor を併用すると，inhibitor のみにくらべて5-HT合成を一層阻害することを報告した。又，Kuriyama ら[14]は，リチウム投与によって，ラット脳のミナプトゾームの5-HTは減少するが，ミトコンドリアや全脳では減少がみられないと述べている。

反面 Perez-Cruet ら[15]は，前にリチウム慢性投与によって脳のトリプトファン，5-HT 5-HIAA いずれも上昇し，5-HT代謝が促進されると報告しているが，その相違は説明できない。リチウムイオンの脳5-HT代謝に及ぼす作用は，放射性5-HTを用いてさらに検討されなければならないであろう。

3. 脳部位別5-HIAA濃度

表4にみられる如く，リチウム血漿脳では，5-HIAA濃度が高い部位すなわち視床，海馬，尾状核では減少傾向がみられた。これらの部位では5-HT濃度は不変であるので，セロトニン代謝の抑制傾向があると考えられる。なお Bliss ら[16]のリチウム慢性投与ラット脳の5-HIAA濃度は変化しないと報告し，反対に Perez-Cruet ら[15]は5-HIAAが増加することを報告している。

文献

1) 高橋良，躁うつ病の生化学的研究，新福 編，「躁うつ病」医学書院，p 55-92, 1972
2) 森光淳介，精神経誌，70，330，1968
3) Denckla, W. D. and Dewey, H. K., J. Lab. and Clin. Med., 129, 160, 1967
4) Snyder, S. H., Axelrod, J. and Zweig, M., Biochem. pharmacol., 14, 831, 1965
5) Anton, A. H. and Sayre, D. F., J. Pharmacol. Exper. Ther., 179, 207, 1971
6) 渡辺昌祐，中島良彦，河野沢与，江原 嵩，井口欽也，田口昼蔵，大月三郎，神経化学，11，5，1972
7) de Almeida, D. F., Chain, E. B. and Pocchiari, F., Biochem. J., 95, 793, 1965
8) Lahiri, S. and Lajtha, A., J. Newrochem., 11, 77, 1964
9) Paton, D. M., Brit. J. Pharmacol., 4, 65, 1971
10) Bihler, I. and Adamic, S., Biochim. Biophys. Acta, 135, 46, 1967
11) Faust, R. G., Biochim. Biophys. Acta, 60, 604, 1962
12) Ho, A. K. S., Loh, H. H., Craves, F., Hitzemann, R. J. and Gershon, S., Europ. J. pharmacol., 10, 72, 1970
13) Corrodi, H., Faxe, K. and Schou, M., Life Sci., 8, 634, 1969
14) Kuriyama, K. and Specken, R., Life Sci., 9, 1213, 1970
15) Perez-Cruet, J., Taglimonte, A., Taglimonte, P., and Gessa, G. L., J. pharmacol. Exp. Ther., 178, 325, 1971
16) Bliss, E. L. and Ailion, J., Brain Res., 24, 305, 1970

27 うつ病者に対するL-5HTPの臨床効果と脳内アミン代謝

加藤伸勝・高橋三郎・近藤久雄
森　律・宮本宣博
（京府医大・精神）

〔要　約〕

うつ病の成因に関するセロトニン仮説およびカテコールアミン仮説は、抑うつ症状の発症に脳内のindoleamineとcathecolamineの交互作用の存在を示唆するが、われわれは、アミン・プレカーサー療法の治療効果の判定を通じ、とくに症状転換機序（switch mechanism）と脳内アミンの代謝動態の関連を調べた。今回は対象患者に内因性うつ病者のみを選び、アミン・プレカーサーとしてL-5HTPを投与し、脳内アミンの動態をよく反映するといわれる髄液内のアミン代謝産物を測定した。L-5HTPの臨床効果は有効、無効がはっきり区別され、有効例では速効性で切れ味がよい。治療前の髄液5HIAA濃度を非うつ病対照群（神経疾患患者）と比較するとうつ病群では明らかに低い。L-5HTP療法によく反応した群（反応群7例）と反応しない群（非反応群11例）につき髄液内5HIAAおよびHVA濃度値の変動を見ると、5HIAA値は反応群と非反応群にほとんど差はないが、HVA値は反応群と非反応群に明らかな差が認められた。即ち、L-5HTP療法中に髄液HVA濃度は反応群では治療前値の50%に増量し、治療中止後2週間でもなおその高値が維持されていた。このことは、内因性うつ病者ではL-5HTP投与により、セロトニン代謝系よりドーパミン代謝系がよりよく反応する傾向があることを示すが、うつ病ではドーパミン代謝に不安定性があり、これが臨床症状の周期性変動に関係している可能性を示唆している。

Wooleyらによるうつ病の脳内5HT (5-hydroxytryptamine)減少説、すなわち"セロトニン仮説"の提唱以来、うつ病者の治療にセロトニンの前駆物質で血液脳関門を通過するL-tryptophan, DL-5-hydroxytryptophan (5HTP)を投与する試みがなされたが、その臨床効果は必ずしもすぐれたものとはいえなかった。最近に至り、L-5HTPの製造が可能になり、佐野[12]によってその臨床的試用がなされ、内因性うつ病に対して著効を示すことが報告された。また、セロトニン仮説に基づき、脳内アミン代謝の動態をよく反映すると考えられる髄液中のインドールアミン代謝物質をうつ病者につき測定する研究も盛んになり、Ashcroft[1]その他により、セロトニンの主代謝産物である5HIAA (5-hydroxyindolacetic acid)の減少が報せられている。さらに、うつ病者に大量のL-tryptophanを投与しても髄液内5HIAAのレベルは増加せず、従って、トリプトファンからのセロトニンの生合成能に欠陥があると予測される報告も見られ、その上、髄液からの5HIAAの移送を抑制するprobenecid投与後でも、うつ病者では5HIAAの蓄積量が少ないともいわれ[13]、脳内セロトニン合成能の低下の確率は大きく、セロトニン仮説を支持する所見は多い。

一方、うつ病の成因に関しては、別に"カテコールアミン説"があり、脳内のノルエピネフリン、ドーパミンの低下の報告がある。さらに、その前駆物質のL-DOPAによるうつ病の治療の報告例もある。

うつ病の成因に関するこの二つのアミン仮説は、indoleamineとcathecolamineの交互作用を示唆するが、5-HTP, L-DOPA等のアミン・プレカーサー療法の作用機序にも、当然のことながら、両アミンの相互関連が予測される。

今回、われわれはうつ病者にL-5HTP療法を試みる機会を得たので、内因性うつ病者

TABLE 1. PSYCHIATRIC DATA FOR 18 PATIENTS WITH ENDOGENOUS DEPRESSION

PATIENT NO.	AGE	SEX	PREVIOUS HISTORY	GLOBAL SEVERITY ON ADMISSION	HAMILTON'S SCORE BEFORE AND AFTER L-5-HTP TREATMENT	
1	65yr	M	2	2	23	18
2	54	F	1	2	23	14
3	41	M	NO	3	37	35
** 4	58	F	10	3	27	3
** 5	53	F	6	2	26	2
** 6	52	F	3	3	17	2
** 7	30	F	NO	2	39	10
** 8	43	F	2	3	31	10
9	49	M	1	3	30	23
10	40	M	NO	2	22	22
11	25	M	3	3	38	34
12	46	M	NO	1	8	8
**13	38	M	1	2	22	9
14	43	M	2	3	35	30
15	26	F	NO	3	41	24
*16	40	M	1	2	26	15
17	32	F	1	1	16	16
18	57	F	4	1	24	20

** PATIENTS RESPONDED RAPIDLY WITH MARKED IMPROVEMENTS AND * WITH MODERATE IMPROVEMENTS.

は今回の抑うつ状態以前にも同様の病期のあるもの、8例は最初のうつ病期のものである。なお、これらの例には既往に躁状態として治療を受けたものおよび躁的興奮の認められたものは含んでいない。

性別は男子9、女子9で年令は25～65才である。うつ状態の臨床的評価にはHamiltonのうつ病評価表(Hamilton, 1960)を用いた。L-5HTP治療に先立ち、治療および髄液採取については全患者より同意を得た。

にL-5HTPを投与し、併せて髄液中の5HIAAおよびdopamineの主要代謝産物であるHVA(homovanillic acid)を測定し、情動精神病における症状の転換機序(switch mechanism)にindoleamineとcatecholamineのいずれが重要な役割をはたすかを調べた。

対象患者および実験方法

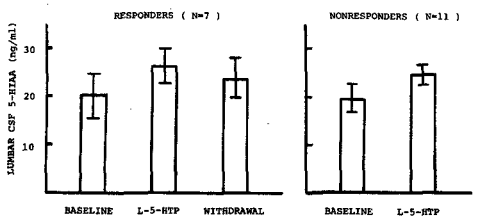
患者は内因性うつ病と診断されたもので、症状は中等度から重度の抑うつ状態にある入院患者18例である。18例中10例

TABLE 2. CONCENTRATION OF 5-HIAA AND HVA IN LUMBAR CSF IN NEUROLOGICAL AND DEPRESSED PATIENTS

GROUP	N	AGE IN YEARS MEAN ± S.E.M. (RANGE)	CONCENTRATION OF 5-HIAA (ng/ml) MEAN ± S.E.M. (RANGE)	HVA (ng/ml) MEAN ± S.E.M. (RANGE)
NEUROLOGICAL	25	39.9 ± 2.6 (24 - 64)	31.4 ± 2.4 (12.4-61.5)	38.0 ± 3.7 (15.9-87.6)
DEPRESSED	18	44.0 ± 2.7 (25 - 65)	19.7 ± 2.5* (7.9-46.6)	32.2 ± 3.0 (12.9-59.0)

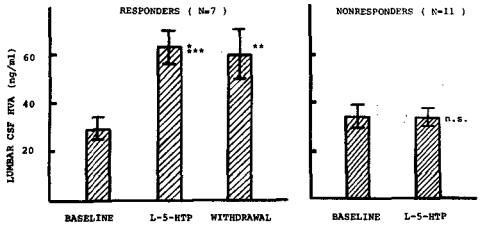
* SIGNIFICANTLY LOWER THAN NEUROLOGICAL GROUP, $p<0.01$.

FIGURE 2. CONCENTRATION OF 5-HIAA, BEFORE AND AFTER L-5-HTP TREATMENT



FIGURES ARE SHOWN BY MEAN ± S.E.M..

FIGURE 3. CONCENTRATION OF HVA, BEFORE AND AFTER L-5-HTP TREATMENT



DIFFERENCE FROM BASELINE LEVELS, * $p<0.01$, ** $p<0.05$
DIFFERENCE FROM NONRESPONDER GROUP, *** $p<0.01$
FIGURES ARE SHOWN BY MEAN ± S.E.M..

た。

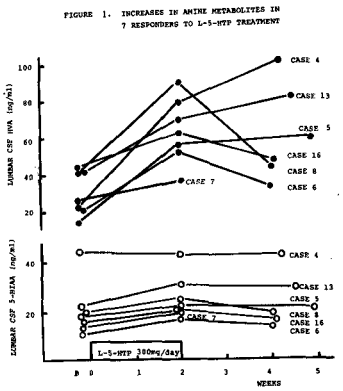
まず、既治療薬の影響を除くため、少くとも7日間のwash out期間をおき、最初の髄液採取を行なった。L-5HTP投与による副作用の胃腸障害を避けるため、プリンペラン(metoclopromide) 15 mgを併用し、L-5HTPは一日量300 mgを2週間投与した。L-5HTPの最終治療日に第2回目の髄液採取を行ない、さらに治療有効例については治療終了2週間目に第3回髄液採取を行なった。対象には24～64才までの年令層の神経疾患患者の髄液を用いた。神経疾患としては、変形性脊椎症などを選び、アミン代謝異常の指摘されているパーキンソニズム、アルコール中毒等は含まれていない。

化学的分析：髄液はあらかじめアスコルビン酸40 mgを含む試験管内に採取し、二分

して HVA 用には 1 N 塩酸 1 ～2 滴を加え、pH=3 とし、測定まで -20°C に凍結して貯えた。(約 1 週間は変化しない。) 5HIAA の測定は Korf and Valkenburgh-Sikkema 法 (1969),(6) HVA の測定には Gerbode and Bowers 法 (1968)(4) を用いた。

結果

L-5HTP 投与期間は 2 週間としたが、本剤の有効性を見るにはその投与期間で十分である。有効例では 3 ～7 日の間に劇的な改善が認められた。18 症例に関する臨床的データは表 1 の通りである。** 印の 6 例はうつ状態の著明な改善を示したもので、* 印はやや改善のみられたものである。改善例では、三環性抗うつ剤にみられるような躁状態への移行はなかった。L-5HTP に反応した 7 例中 6 例はうつ状態の周期の既往歴があり、1 名は最初の病期のものである。一方、非反応群は周期の回数も少ないか、最初の病期のものである。



18 例の患者から得られた髄液中の 5HIAA の値は、表 2 および図 2 にまとめられている。対照に選んだ非抑うつ神経疾患患者群 44 例の平均値は 31.4 ± 2.4 ng/ml, (12.4 ～61.5 ng/ml) であるのに対し、L-5HTP 治療前のうつ病者の 5HIAA 値は 19.7 ± 2.5 ng/ml (7.9～46.6 ng/ml) で、$p<0.01$ で統計学的にも明らかに有意差が認められた。

なお、神経疾患患者の髄液中の 5HIAA 濃度の値は既報告例の諸家の値とほぼ一致している。髄液中の HVA 値については非抑うつ神経疾患群は 38.0 ± 3.7 ng/ml (15.9～87.6 ng/ml) で、うつ病群は 32.2 ± 3.0 ng/ml (12.9～59.0 ng/ml) で有意差は認められなかった。

次に 5HTP 治療によく反応した群 (反応群 7 例) と非反応群 (11 例) につき、それぞれ 5HIAA 値と HVA 値を比較検討したのが、図 2 および図 3 である。図 2 に示されるように 5HIAA 値は、治療に反応するか否かに関係なく、反応群、非反応群共に治療前値の約 30 % の増加を示す。そして反応群では、治療中止後 2 週目ではほぼ治療前値にもどっている。すなわち、髄液 5HIAA 濃度値に関する限りでは、両群の間に差を認めることができない。

しかるに図 3 に示すごとく、HVA 値の変化はこれとは異っている。すなわち、L-5HTP 治療の反応群では、髄液 HVA 値は治療前値が 29.2 ± 4.3 ng/ml に対し、治療後値は 63.0 ± 6.8 ng/ml で、$p<0.01$ で統計学的有意差を示す。しかもこの増加した値は L-5HTP 治療中止後 2 週目でもなお維持され、60.1 ± 10.5 ng/ml を示し、$p<0.05$ で統計学的に有意差を示している。ところが L-5HTP 治療の非反応群では HVA 濃度値の上昇は殆ど見られていない。以上の結果から、5HTP 治療反応群と非反応群の間には、髄液 5HIAA 値には治療による変化は認められないが、HVA 値に関しては明らかに差が認められた。なお L-5HTP 治療反応群の各症例につき 5HIAA と HVA 濃度値を示すと図 4 のようになる。

考察

内因性うつ病患者では、髄液中 5HIAA 濃度は有意に低い。(表 2) この値は多数の報告とよく一致し(1,2,11)、うつ病で確かに髄液中の 5HIAA 低下があると考えてよい。この低値は、

うつ病自殺者脳中セロトニンおよび5HIAA測定値とよく並行するが，一方髄液中5HIAAは躁うつ両相において低く，うつ病回復期でも増加しないという報告もあり[8]，我々のデータでも回復後も低いので，この低値がうつ病におけるセロトニン代謝欠如の存在を示すものとは限らない。

うつ病のアミン前駆物質療法はとにかく“セロトニン仮説”に基づいて始められたが，われわれのデータは，うつ病患者の多くはL-5HTPを利用して脳内セロトニンを造る能力のあることを示している。L-5HTP投与後明らかに5HIAAは増加し，この結果はL-tryptophanを用いたDunnerの結果[3]と一致する。5HIAAの増加はL-5HTP治療に対する反応群，非反応群共に差はなく，L-5HTPが中枢のセロトニン代謝低下を補うが故に，治療的に有用であるという考えは適用できない。大月[10]らは，うつ病者の髄液中5HIAA濃度が有意に低い症例（6例，13±2,6 ng/ml）に，L-5HTPが特に有効であるというが，投与後の継時的変化は未測定である。

一方，L-5HTPの臨床効果については，佐野[12]の治験例の如く，非常に速効性で，切れ味のよい奏を確認した。この効果はむしろ，髄液中HVA値がよく対応していることは重要である。（図1,3）即ち，セロトニン前駆物質投与によって，むしろドーパミン代謝系がよりよく反応している。うつ病で，アミン前駆物質を与えた時には，カテコラミン系と，インドールアミン系の間に交互作用がおこり，これが何ら治療上重要な意味を持つと考えられる。動物実験では，L-5HTP 50 mg/kg投与（治療量の10倍）により，サルの視床下部，松果体，中脳でドーパミンの著しい減少がおこり[7]，臨床例でも，5例のうつ病患者に大量（1250～3250 mg/day, 2週投与）のL-5HTPを与えると髄液中の著明な5HIAA増加（+120%）とHVAの減少（-40%）が報告されている[2]。（治療効果なしという）遂にL-DOPA服用中のうつ病患者で，血小板中5HIAAが減少するという[9]の報告もあり，両アミン代謝の交互作用は，aromatic l-amino acid decarboxylaseに対する競合現象と説明されている。

われわれの症例でL-5HTPに反応した7例は，はじめは低いHVA値を示し，治療によって有意に高い値を示した。ドーパミン代謝に不安定性があって，これが臨床症状の同期性の変動に関係しているのかもしれない。また，種々の治療的干渉によって容易に"switch mechanism"の引き金がひかれる傾向をもつているのかもしれない。一般に髄液中HVA濃度は臨床症状の改善と並行するといわれ，内因性うつ病の制止症状の基礎には中枢におけるドーパミン欠乏が存在するといわれるが，ドーパミンを含む神経系のうちどれがうつ病で異常であるのかは未だ明らかでない。

文献

1.Ashcroft,G.W.et al: Lancet ii, 1049, 1966. 2.Brodie,H.K.H., Sack,R. and Siever,L.: Serotonin and Behavior, pp549, Academic Press, 1973. 3.Dunner,D.L. and Goodwin,F.K.: Arch.Gen.Psychiat., 26, 364, 1972. 4.Gerbode,F.A. and Bower,M.B.Jr.: J.Neurochem., 15, 1053, 1968. 5.Goodwin,F.K., Post,R.M., Dunner,D.L. and Gordon,E.K.: Am.J.Psychiat., 130, 73, 1973. 6.Korf,J. and Valkenburgh-Sikkema,T.: Clin.Chim.Acta, 26, 301, 1969. 7.岸本英爾，永井克子，塚田裕三：神経化学 11，13，1972. 8.Mendels,J.et al: Science, 175, 1380, 1972. 9.Murphy,D.L.: Am.J.Psychiat., 129, 141, 1972. 10.大月三郎，藤原二郎：臨床精神医学 2，923，1973. 11.Papeschi,R. and McClure,D.J.: Arch.Gen.Psychiat., 25, 354, 1971. 12.佐野勇：精神経誌，73，809，1971. 13.Van Praag,H.M., Korf,J. and Puite,J.: Nature, 225, 1259, 1970.

28 ヒト大脳，脳脊髄液および血清中の cyclic 3′,5′－guanosine monophosphate phosphodiesterase 活性

浅野富子・原　ふみ子・日高弘義
（愛知コロニー研）
渋谷正人
（名大・医・脳外）

〔要　約〕

ヒト大脳，脳脊髄液（CSF），および血清中に cyclic 3′,5′-guanosine monophosphate (cGMP) phosphodiesterase 活性を発見したのでそれらの性質について2,3検討した．本酵素の大脳，CSF，血清のgまたはml当りの活性を比較すると，血清は脳の1/1000，CSFはさらに低く血清の1/10以下であった．これらの酵素のpH活性曲線はすべて至適pH 7.5～8.0を示したが，大脳とCSFの酵素は一部用いたTris-maleate bufferにより明らかに阻害されたが血清の場合は阻害が極めて弱かった．また，蛇毒標品中に cyclic 3′,5′-adenosine monophosphate phosphodiesterase の活性化物質の存在が報告されているが，この蛇毒標品による活性化は大脳とCSFの cGMP phosphodiesterase に見られたが，血清中の酵素には見られなかった．theophylline による影響をこの3つの cGMP phosphodiesterase で調べたところ，三者とも阻害を受け，Kiは大脳，CSFでそれぞれ 2.7×10^{-4}, 3.3×10^{-4} M でよく似た値であったが，血清ではこれよりやや大きく 7.0×10^{-4} Mであった．以上の結果はすべて基質濃度 4×10^{-7} M で cGMP の生理的濃度に近いところで行なったものである．これらの結果よりどちらかといえばCSFの cGMP phosphodiesterase は血清のそれとは異なっているように考えられ，脳の酵素と似た点が多く認められた．

---

cyclic 3′,5′-guanosine monophosphate (cGMP) の生理作用はアセチルコリン等の作用やその他の方面から，方法論的には cyclic 3′,5′-adenosine monophosphate (cAMP) の研究の発展につれて最近多くの報告がみられるようになった．cGMPレベルの生体内調節に重要な役割を持つ酵素に guanylate cyclase と cGMP phosphodiesterase (cGMP・PDE) の存在が証明されている．cGMP・PDE と cAMP・PDE が同じ酵素であるか否かはそれらの単離精製の結果を待たねばならないが，一応最近までの報告[3]では異なる酵素であるとされている．cGMP・PDE活性は哺乳類の多くの組織にその存在が報告されているが，ヒトの組織の本酵素活性はほとんど報告されていない．今回われわれはヒト脳，脳脊髄液（CSF），および血清中に本酵素活性を発見したのでそれらの性質について低濃度基質存在下（4×10^{-7} M）で比較検討した．

〔材料および方法〕

ヒト脳は死後3時間以内の剖検によって得られたもので－80°Cに保存しておいたものを用いた．大脳皮質を適当量とり8倍量の0.32 M sucrose pH 7.5（Tris-HCl）でホモゲナイズし低速回転の遠沈（700×g および 10,000×g）により得られた上清を 105,000×g で2時間遠沈し，その上清をヒト大脳粗標品とした．ヒト血清は採血後室温に約1時間放置後遠沈してその上清を使用した．ヒトCSF（protein 0.3 mg/ml）は室温で5－6時間放置されたものでその後－20°Cに保存しておいたものを用いた．これはそのままでも活性測定できるが通常はコロジオンバッグで約5時間かけて2.5倍に濃縮したものを使用した．上記の酵素標品はすべて－20°Cに保存しておいた．酵素活性測定はすでにわれわれが報告した方法（2）で通常は ^{3}H-cGMP を用い基質濃度 4×10^{-7} M で行な

った。酵素を 3H-cGMP と pH 8.0, Mg^{2+} (4mM) 存在下で反応させ(30°C), 煮沸により反応を止めてから, 蛇毒 (Crotalus atrox) を 50μg 添加後さらに 30°C, 10分間 incubate し, もう一度煮沸し, 水を加えて全量を 1.5 ml にし, その 1ml を AG 50 (H^+ form) (0.5×2 cm) のカラムにかけ約 10 ml の水でカラムを洗い, 未反応の 3H-nucleotide を除去したのち, 3N-NH_4OH 1.5 ml で反応生成物である 3H-nucleoside を溶出し, 液体シンチレーションカウンターにより測定した.

〔実験結果〕

表1は大脳1g当り, またはCSFおよび血清1ml当りのcGMP・PDE活性を示したものであるが, 大脳に比して血清, CSFの活性は非常に低い. 特にCSFの活性は低く血清の$\frac{1}{10}$以下であった.

表1 cGMP phosphodiesterase activity

Tissue	pmoles/min/g or ml
cerebrum	5408 ± 134
CSF	0.493 ± 0.126
serum	5.28 ± 0.50

次に大脳, CSFおよび血清cGMP・PDE活性に対するpHの影響をみると図1のようになった. いずれの酵素も至適pHは7.5～8.0であるが, 大脳とCSFのcGMP・PDE活性はTris-maleate bufferにより明らかに阻害されるが, 血清の酵素は阻害が極めて弱いことがわかる. このことはCSF中の酵素が脳の酵素とよく似ており, 血清のものとは異なる根拠のひとつになるかもしれない.

snake venom 中の cAMP・PDE の activator の存在が報告(1)されているのでこれらの酵素に対する snake venom のおよぼす影響を調べた. その結果が表2である. 表で明らかなように大脳とCSFのcGMP・PDEは活性化されるが血清のcGMP・PDEは影響を受けないことがわかった. この事実も血清の酵素とCSFの酵素の違いを示しているが, 同時にCSFの酵素の origin が脳である根拠の一つと考えられる.

theophylline の影響をこれらの酵素について調べると表3に示したようにいずれの酵素も Ki が 10^{-4}M でよく阻害を受けることがわかった. 血清の酵素に対する theophylline の affinity は他の2つの組織のものと比較するとやや弱い傾向がある.

図1 Effect of pH on cGMP phosphodiesterase

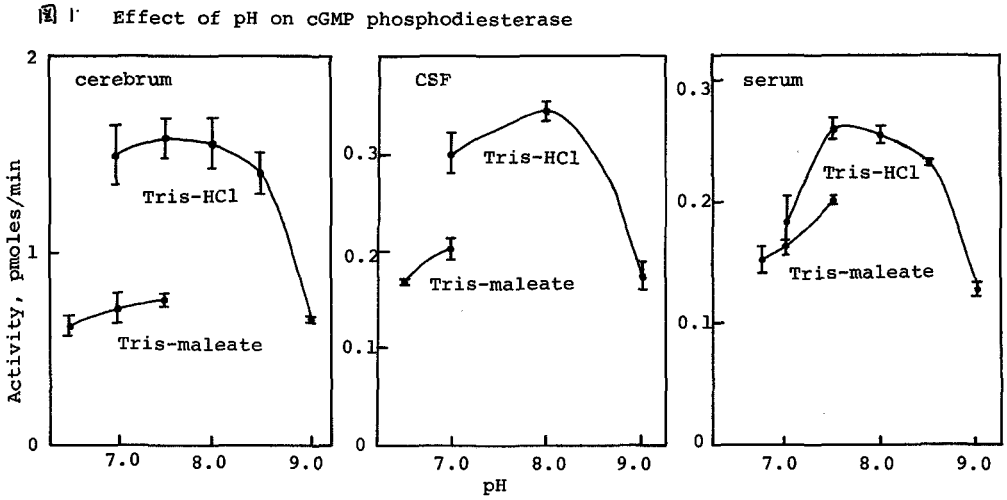


表2 Effect of snake venom on cGMP phosphodiesterase activity

Tissue	áctivity (pmoles/min/g or ml, tissue)	
	procedure 1	procedure 2
cerebrum	10470 ± 232	5408 ± 134
CSF	0.719 ± 0.108	0.384 ± 0.140
serum	11.2 ± 0.14	10.8 ± 0.32

この酵素活性測定法は2段階反応から成る。すなわち最初の反応ではcGMP-PDEによりcGMPが5'-GMPになり，次の反応では5'-GMPがSnake venom中の5'-nucleotidaseによってguanosineとリン酸にかわる。

Procedure 1：これらの2つの反応を同時に行なう。

Procedure 2：2段階反応を別々に行なう。

表3 Effect of theophyllin on cGMP phosphodiesterase

Tissue	Ki
cerebrum	2.7×10^{-4} M
CSF	3.3×10^{-4} M
serum	7.0×10^{-4} M

〔考察〕

ヒト大脳，CSF および血清中の cGMP-PDE についてその性質を2，3述べたが，CSFの酵素は大脳の酵素と性質は似ており，血清のそれとは異なるので少なくともCSFの酵素が血清に由来するものではないと考えられる。CSFの生成部位から考えてCSF中の酵素の由来を脳細胞と考えることは易いがヒト脳や血清にも他の動物の組織と同様に複数のPDEの存在が充分考えられるので，ヒトCSF中にそれら複数酵素のうちの一部分が入り込んでいる可能性もあり，今回のわれわれの実験からだけでは，CSFのcGMP-PDEのoriginが脳であると断定することはできない。

cAMP-PDEの性質については，大脳においてcAMP-PDEの活性はいわゆるLow Km酵素に限っていえばcGMP-PDEの約5分の1であり，CSFにおいても酵素活性の存在は確認したが非常に活性が低いため，CSFのcAMP-PDEの性質は充分に調べることはできなかった。

〔文献〕

(1) Cheung, W. Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 478 (1967).

(2) 渋谷，日高，生化学，45, 622 (1973).

(3) Russell, T. R., Terasaki, W. L. and Appleman M. M., J. Biol. Chem. 248, 1334 (1973).

29 脳のCyclic 3',5' — nucleotide phosphodiesterase:Modulator 蛋白について

手島佳子・山崎礼子
宮本英七・垣内史朗
（大阪府立・中宮病院）

〔要約〕

脳の Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性ホスホジエステレースは，その活性に分子量約2.4～2.8万の耐熱性の modulator protein とカルシウムイオン（>1μM）の存在を必要とする。modulatorのこの酵素に対する作用は，stoichiometric であって，catalytic なものではない。Ca^{2+} と modulator によるこの酵素の活性化の機構は，Ca^{2+}（>1μM）の存在下において，不活性型の酵素と modulator が結合して，活性型の Enzyme－Modulator complex を形成することによると思われる。この反応は可逆的であって，Ca^{2+} 濃度が低下すると（EGTA 添加）再び酵素（不活性）と modulator に解離する。Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性ホスホジエステレースは，cGMP分解酵素であろうと考えられる。すなわち，生理的濃度に近い基質濃度にて実験した場合に，cGMPをcAMPよりも，はるかによく分解するからである。この酵素の組織分布は，大脳皮質に圧倒的に多量存在し，（modulator も同様な分布を示す）脳機能との関係が推定される。

一昨年の本学会で，われわれは，脳の Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性ホスホジエステレース（PDE）に対する，耐熱性且つ非透析性の一つの活性化因子が，脳抽出液中に存在することを，報告した[1]。今回は，この因子の性質とその作用機作について報告する。（一部既報）[3,4]ここでは，この因子を Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性PDEの modulator と呼ぶことにする[註1]。なお，Cheung[5], Teo ら[6]によってPDEの protein activator が報告されているが，Ca^{2+} との関係においては調べられていない。これらとわれわれの modulator との identity については，今後の検討を必要とすると思われる。

〔実験方法〕ラット大脳皮質ホモジェネートの100,000×g 遠心沈殿上清を Sephadex G-200 カラムにかけて，20mM Tris·HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 0.1mM DTT, 0.1mM EGTA にて溶出した結果，酵素活性と modulator は，互に完全に分離して溶出された。Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性 PDE は Fr. II に，また modulator は Fr. III に溶出された（Fig. 1）。modulator はまた別に，Hog brain extract を加熱（100°, 5'）して得た上清より，硫安分画，DEAE クロマトグラフィー，

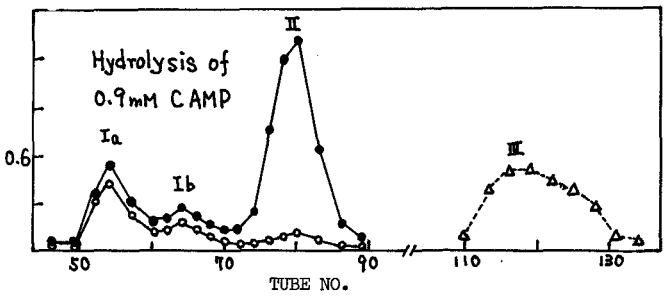


Fig.1. Separation of the modulator from PDE activity. Sephadex G-200 column chromatography of the supernatant fluid of the homogenate of rat cerebral cortex.
●—● PDE activity with 0.1 mM $CaCl_2$, o—o PDE activity with 1 mM EGTA, Δ--Δ Modulator activity.

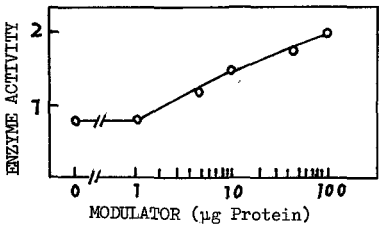


Fig.2. Determination of the modulator protein.

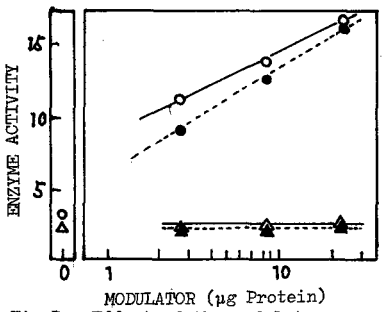


Fig.3. Effect of the modulator on brain PDE activity. The concentration of Ca^{2+} in the assay medium was 0.06 μM (▲—△, ▲···△), or 2.5 μM (○—○ ●···●). The modulator protein was added to the assay mixture either before (○—○, △—△), or after (●···●, ▲—▲) heating for 4 min in a boiling water bath.

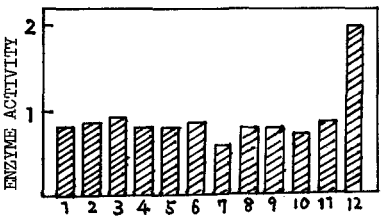


Fig.4. Specificity of the modulator. 1, none; 2, bovine plasma albumin; 3, albumin fr.V; 4, egg albumin; 5, γ-globuline; 6, trypsin; 7, ribonuclease; 8, myoglobin; 9, lysozyme; 10, ribonucleic acid; 11, deoxyribonucleic acid, each 60 μg.
12, 30 μg of the modulator protein.

Sephadex G-100 クロマトグラフィーによって精製され Fig.5 の実験に使用された。PDE 活性の定量は，生成物（5'-AMP, 5'-GMP）を蛇毒 nucleotidase によって P_i と adenosine (guanosine) に変えたのち，P_i を測定する方法[7]か，或は 3H ラベルの基質を用いて，それから生じた adenosine (guanosine) を分離測定する方法によった[8]。標準 assay 系は，0.175 ml 中に 60 μmole イミダゾール緩衝液，pH 6.9; 2.25 μmole $MgCl_2$; 0.225 μmole DTT; 0.9 μmole 基質を含む。modulator は，Ca^{2+} 2.5 μM 及び 20 μg 蛋白量の透析粗酵素（10万×g 上清）を含む標準 assay 系において，その賦活の度合により定量した[4]（Fig.2）。この条件下に，酵素活性を無添加時の2倍に増加させる modulator の量を 10 単位とした。

〔結果並びに考察〕

(A) modulator の作用. Fig.3 は，Fr. II の PDE 活性に及ぼす Fr. III (modulator) 添加の影響を示す。Ca^{2+} の存在下において，酵素活性は modulator 添加量の対数に略比例して増加した（○—○）。Ca^{2+} の濃度が threshold（～1 μM）以下の場合には，modulator の添加効果は見られず（△—△），また，別の実験結果から（図省略），modulator 無添加時には，Ca^{2+} 濃度を増加させても，酵素活性は変化しなかった。すなわち，脳 PDE の賦活には Ca^{2+} と modulator の両者の存在を必要とする。modulator が存在する場合には，1～10 μM の Ca^{2+} によって酵素活性が調節されることが見られた。われわれの以前の実験[1,2]において，modulator 無添加時においても，Ca^{2+} 濃度を高める（＞10 μM）ことによって，酵素の賦活を認めたのは，当時の酵素標品中にいくらかの modulator が残留していたためと判断される。当時は，modulator と PDE を分離するのに，EGTA を添加せずにゲル沪過クロマトグラフィーを行っていたからである（Fig.5 参照）。modulator の賦活効果は，添加後の lag phase なしにあらわれ，その程度は反応の時間には無関係であって，唯 modulator の添加量のみに関係したから，modulator が一つの酵素として PDE に働きかけるような，catalytic な性質のものではない。modulator はレシチナーゼC，リボヌクレアーゼの作用を受けず，トリプシン，或はナガーゼ処理によって失活したから一つの蛋白質と考えられる。しかし，それを 100° に加熱してもその活性は殆んど変化しなかった（Fig.3 点線）。Fig.4 に示すごとくに，その PDE に対する作用は，他の蛋白質にては代用されず，特異的なものと思われる。

(B) modulator の作用機構. 脳PDEに対する Ca^{2+} と modulator の賦活の機構は，もし modulator と非活性型の enzyme とが可逆的に結合して，活性型の enzyme-modulator complex を形成すると仮定して，この反応の平衡が，Ca^{2+} の濃度によって支配され，高 Ca^{2+} によって反応が enzyme-modulator complex の生成に傾くと仮定すれば首く説明される。この仮説を調べる目的で Fig. 5 の実験を行った。Fr. II PDE と DEAE, Sephadex G-100 にて精製した modulator とを混合しそのうちに，Sephadex G-200 カラムにかけて $CaCl_2$ を含んだ medium にて溶出したところ，Fig. 5B に示すごとくに，enzyme-modulator complex が形成されて溶出された。これが enzyme-modulator complex であることは，① その分子量が enzyme 単独のそれ (Fig. 5C) よりも大きく，② その場所に一致して modulator 活性 (△----△) が認められ，従って外因性 modulator を添加せず assay しても，PDE 活性が見られる (○—○) こと等から判断される。Fr. II と modulator を apply してから，カラムを EGTA を含む medium で溶出した場合には，enzyme と modulator とは夫々別個に溶出されて，enzyme-modulator complex の形成は見られなかった (Fig. 5A)。これらの結果は上記の仮説を支持するものであって，次の式にてまとめられる。

$$\text{Enzyme} + \text{Modulator} \underset{\text{EGTA}}{\overset{Ca^{++}}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{(active form)}}{\text{Enzyme·Modulator complex}}$$
(inactive)

Ca^{2+} が enzyme-modulator complex に結合するや否やは，今のところ明らかではないが，しかしこのことは，上記のモデルの本質には影響するものではない。Fig. 6 は Fig. 5 の実験結果から，modulator, enzyme, enzyme-modulator complex の分子量を算定したものであるが，夫々約 2.4～2.8万，16万，20万と推定され，1分子の酵素に結合する modulator が1分子か2分子かは，今後更に確しく検討したい。

(C) modulator の意義について. modulator は Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性 PDE に対して作用を示

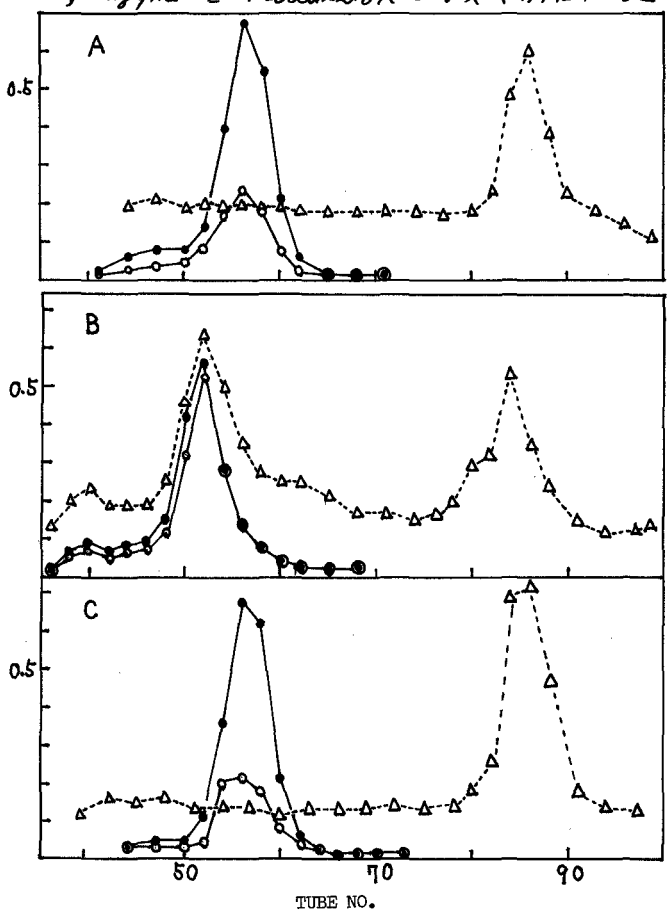


Fig.5. Formation of the enzyme-modulator complex. Column was eluted with the medium (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$ and 0.1 mM DTT) containing either 0.1 mM EGTA (panel A), or 0.2 mM $CaCl_2$ (panel B and C). PDE activity was assayed either in the presence (●—●) or absence (○—○) of the exogenous modulator. The modulator was shown by the dotted line (△--△).

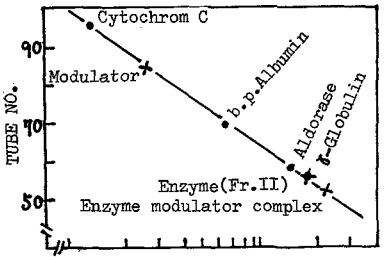


Fig.6. Estimation of molecular weight. Sephadex G-200 column, 2.5 ×90 cm, was eluted with 20 mM Tris HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$ 0.1 mM DTT and 0.2 mM $CaCl_2$.

Table 1. Distribution of the modulator protein.

Tissue	Modulator
	(units/g wet tissue)
Cerebral cortex	1002
Kidney	620
Heart muscle	72
Liver	26
Skeletal muscle	negligible

Table 2. Comparison of hydrolysis of C AMP and C GMP by Fr.II PDE.

Substrate	nmoles/mg protein/30 min	
	0.06 μM Ca^{2+}	12 μM Ca^{2+}
C AMP, 1.2 mM	1520	9910
C GMP, 1.2 mM	1880	5500
C AMP, 0.4 μM	10.2	46.4
C GMP, 0.4 μM	36.6	350.6

Modulator was added in all tubes.

す。modulatorの組織分布（表1）は，Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性PDE活性の分布[2]と殆一致して，大脳皮質に圧倒的に多量見い出された。Ca^{2+}とmodulatorによる脳PDE活性のコントロールが，どのような意義を有するのかは，未だ明らかではないが，この酵素（Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存的PDE）がcGMP PDEであろうと思われる証拠がいくつか見い出されている。すなわち，低濃度の基質に対しては，この酵素はcGMPをcAMPよりもずっと良く分解し，またCa^{2+}の効果もcGMPの水解において，より顕著に認められた（表2）。また，Ca^{2+}添加によるK_mの変化は，cGMPの水解の場合において特に著しく（$2\times10^{-5}M \rightarrow 2\times10^{-6}M$），このとき同時に，折れ曲った形のkinetic plotsが"正常"な形になる。[2] 現在，cGMPの脳における意義は未だ不明であるが，cGMP[9]およびその生成酵素であるguanylate cyclase[10]の脳における存在が報告され，更に脳cGMPの濃度が，アセチルコリンによって増加することが，最近報告されたのは，注目に値する。[11-13]

註1）以前にPAF（Phosphodiesterase Activating Factor）と呼ばれた。[1]

《References》

1. 山崎礼子，垣内史朗，手島佳子，第14回神経化学会予稿集，10，11（1971）.
2. 垣内史朗，山崎礼子，手島佳子，第15回神経化学会予稿集，11，119（1972）.
3. Kakiuchi, S., in Proc. 5th Int. Congr. Pharmacology, San Francisco 1972, vol 5, pp 192 (1973).
4. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., and Uenishi, K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, in press.
5. Cheung, W.Y., J. Biol. Chem., 246, 2859 (1970).
6. Teo, T.W., Wang, T.H., and Wang, J.H., J. Biol. Chem., 248, 588 (1973).
7. Butcher, R.W., and Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962).
8. Beavo, J.A., Hardman, J.G., and Sutherland, E.W., J. Biol. Chem. 245, 5649 (1970).
9. Goldberg, N., Dietz, S.B., and O'Tool, A.G., J. Biol. Chem., 244 4458 (1969).
10. Nakazawa, K., and Sano, M., in Abstracts 4th Int. Meeting ISN, Tokyo, p.57 (1973).
11. George, W.J., Polson, J.B., O'Tool, A.G., and Goldberg, N.D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 398 (1970).
12. Ferrendelli, J.A., Steiner, A.L., McDougal, D.R., and Kipnis, D. M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1061 (1970).
13. Kuo, J., Lee, T., Reyes, P.L., Walton, K.G., Donnelly, T.E., and Greengard, P., J. Biol. Chem., 247, 16 (1972).

30 Cyclic AMP 依存性 protein kinase による A1蛋白のリン酸化

宮本英七・垣内史朗

（大阪府立・中宮病院）

〔要 約〕

ウシ脳から得た cyclic AMP依存性 protein kinase はウシ脳から精製した A1蛋白を基質として役立て，リン酸化した。A1蛋白の in vitro におけるリン酸化をしらべ次のことが明らかとなった。1）精製した A1蛋白は脳の protein kinase によってリン酸化され，基質蛋白質として役をつことが初めて確認された。その反応は cyclic AMP に依存性であった。2）酵素に対する基質特異性としては，ヒストン分画のそれに匹敵し，カゼイン，プロタミン，ホスビチンにまさっていた。酵素の A1蛋白に対するみかけの Km は 2×10^{-5} M であった。3）A1蛋白内にとりこまれる最大量のリン酸は蛋白1モル当り 3.8モルであり，蛋白重量当り，ヒストンのそれの 3.6倍であった。4）リン酸化された A1蛋白のアミノ酸残基はセリンとスレオニンであり，ヒストンのそれはセリンのみであった。5）リン酸化された A1蛋白はリン酸化されていない A1蛋白とは電気泳動上異なった泳動パターンを示し，蛋白のリン酸化によって物理化学的性質に変化の生ずることが示された。6）A1蛋白とヒストンはそれぞれ cyclic AMP依存性 protein kinase を活性化し，活性化の程度は用いた条件下における基質特異性と相関した。7）protein kinase モジュレーターは，A1蛋白を基質として用いる時，酵素活性を阻害した。A1蛋白のモジュレーターに対する反応様式はヒストンのそれに類似していた。

A1蛋白はミエリン蛋白の約 30 %をしめ，動物に注射すると実験的アレルギー性脳脊髄炎をひきおこす。[1] すでに均質な単一蛋白にまで精製され，そのアミノ酸配列も明らかにされたが，[2,3] この蛋白のリン酸化による修飾はこれまで研究されたことがない。その研究は A1蛋白の膜蛋白としての存在およびミエリンの病態に関しても重要な生理的意義を有している可能性がある。

実験材料および方法

cyclic AMP依存性 protein kinase 精製法と酵素活性測定法：酵素は既報の方法[4]を用い，ウシ脳から DEAE－セルロースカラムの段階にまで精製した。酵素活性測定法は既報の方法[4]によった。

A1蛋白の精製：Oshiro と Eylar の方法[5]を用い，ウシ脳から精製した。Cellex P カラムを最終の方法として使用した。以下にのべる実験ではディスク・ゲル電気泳動上単一の蛋白 band のみを示す蛋白標品を用いた。

ディスク・ゲル電気泳動法：15 %のアクリルアミド濃度を用い，Reisfeld らの方法[6]に従った。

高圧沪紙電気泳動法：酢酸－ギ酸緩衝液 pH 1.9を用い，Allerton と Perlman の方法[7]によった。

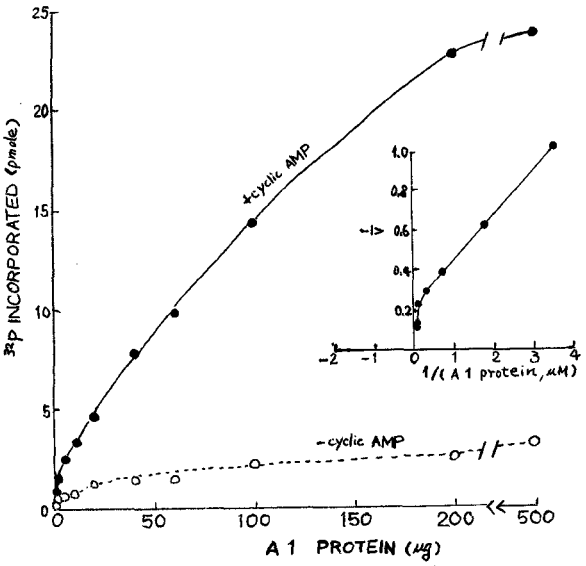
protein kinase モジュレーターの精製：既報の方法[8]により TCA 沈殿の段階にまで精製して使用した。

実験結果

A 1蛋白のリン酸化

A 1蛋白濃度の protein kinase 活性におよぼす効果は図1に示されている。リン酸化の程度は cyclic AMP の存在下で著明に増加した。200μg/0.2ml の濃度でほぼ最大活性に達した。酵素のA 1蛋白に対するみかけの K_m は 2×10^{-5} M であった。Lineweaver と Burk の方法でプロットすると直線にはならず凹状を示した（図1）。

Fig. 1. Effect of varying concentration of A 1 protein on the activity of the enzyme.



ついで，A 1蛋白の酵素に対する基質特異性を他の蛋白質のそれと比較した（表1）。混合ヒストンがもっともよい基質として役立ち，lysine-rich histone, slightly lysine-rich histone がこれに続いた。A 1蛋白はしらべた条件下ではこれら3者についで基質として役立ち，arginine-rich histone よりもよく，カゼイン，プロタミン，ホスビチンにまさっていた。

A 1蛋白リン酸化の程度

A 1蛋白とヒストンがどの程度リン酸をとりこむことが出来るかをしらべるために，高濃度のATP，より多くの酵素量を用い，長時間 incubate した（図2）。A 1蛋白は6時間までリン酸化の程度が直線状に上昇し，24時間の incubation によって最大活性に達した。A 1蛋白1モル当り 3.8モルのリン酸がとりこまれることがわかった。ヒストンはA 1蛋白に比較すると，最初の1時間はA 1蛋白よりも早い速度でリン酸化されたが，それ以後リン酸化の速度が遅くなった。24時間の incubation によって最大活性に達した。蛋白重量当りではA1蛋白の方がヒストンより 3.6倍多くリン酸化をうけることがわかった。

表1. 種々の基質蛋白質リン酸化の比較

基質（量）	酵素活性 -cAMP	酵素活性 +cAMP
	pmole	
Histone mixture, 200 μg	8.7	79.9
Lysine-rich histone, 200	6.3	36.7
Slightly lysine-rich histone, 200	4.1	31.7
A 1 protein, 200	2.4	22.5
Arginine-rich histone, 200	2.3	18.9
Casein, 500	1.2	6.0
Protamine, 500	2.4	4.3
Phosvitin, 500	0.5	0.6
Bovine serum albumin, 500	0.7	0.8

ディスク・ゲル電気泳動上のA 1蛋白 band と放射能の一致

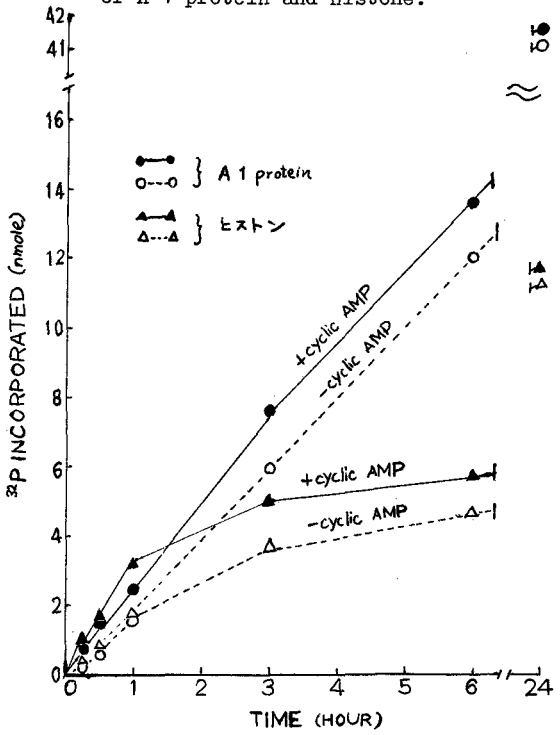
A 1蛋白を標準 assay 条件下で放射性 ATP と incubate したのち，一定量をとりディスク・ゲル電気泳動した。電気泳動後，蛋白の着色，脱色を行ない，ゲルを 2mm 毎の切片に切断し，それぞれの切片の放射能を測定した（図3）。放射能はA 1蛋白 band に一致した切片のみに検出され，ゲルの他の部分には認められなかった。A 1蛋白のリン酸化は cyclic AMP に依存性であった。これらの結果はオートラジオグラムを用いた実験でも確かめられた。すなわち，A 1蛋白 band と放射能とが位置的に一致し，

その放射能の強さが cyclic AMP に依存性であった。放射能はA1蛋白とprotein kinaseの両方或いはA1蛋白か酵素のいずれか一方を欠除した標品の電気泳動ゲルには認められなかった。

リン酸化アミノ酸残基の同定

A1蛋白とヒストンをそれぞれ5分間，標準反応溶液中で incubate したのち，所定の方法[+]に従い，リン酸化をうけた蛋白を回収した。最終の蛋白沈殿を6N HClにとかし，密封中で100°C，4時間，部分的酸加水分解した。酸水解後，デシケイター内で蒸発乾固ミセ，乾固物を少量の蒸溜水にとかした。一定量を高圧沪紙電気泳動にかけた。A1蛋白の酸水解物には，全放射能の内，35％をホスホセリンに，45％をホスホスレオニンに，10％をを他のペプチド中に，残りは無機リン酸中に認められた。これに反して，ヒストンの酸水解物には放射能はホスホアミノ酸としてホスホセリンのみに認められ，ホスホスレオニンには検出されなかった。同一のcyclic AMP依存性protein kinaseによってリン酸化をうけるアミノ酸残基の種類に相違の生ずることは，このことが酵素によって決定されているのではなく，基質蛋白質そのものによって決定されていることを示唆している。

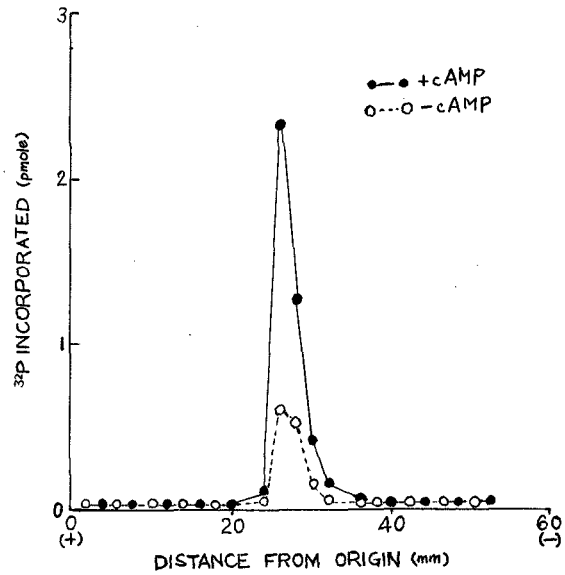
Fig. 2. Time course of phosphorylation of A 1 protein and histone.



リン酸化A1蛋白の物理化学的性質の変化

高濃度のATP存在下で24時間 incubate し，充分にリン酸化をうけたA1蛋白とリン酸化のうけていないA1蛋白とのパターンをディスク・ゲル電気泳動上で比較した。リン酸化A1蛋白は電気泳動上より速く移行した。チトクローム Cを標準蛋白としてRf値を計算すると，リン酸化とリン酸化のうけていないA1蛋白はそれぞれ0.52，0.58であった。この現象はリン酸化にともないA1蛋白が負の電荷を得ることによって，蛋白それ自身のもつ正

Fig. 3. The location of the radioactivity of A 1 protein on disc gel electrophoresis.



の電荷が減少することによっておこると説明される。ここに得られた結果はA1蛋白のリン酸化によって，この蛋白質のもっている物理化学的性質に変化の来たすことを示している。

A1蛋白による cyclic AMP依存性 protein kinase の活性化

protein kinase をウシ血清アルブミン，A1蛋白，ヒストンとそれぞれ preincubate し，続いて cyclic AMP の存在しない状態で酵素活性を測定した。A1蛋白或いはヒストン存在下で protein kinase を preincubate すると酵素活性に実質的な増加を来たした。それに反して，ウシ血清アルブミンは酵素を活性化することが出来なかった。蛋白重量当りでみると，cyclic AMP の存在しない状態で酵素活性を測定した場合，ヒストンはA1蛋白よりも酵素活性をより増加させた。このことは酵素の活性化が用いた條件下における基質特異性と相関していることを示している。これらの結果は基質蛋白質が酵素を解離，活性化することを示した以前の我々の結果[4,9]を確認したものであり，A1蛋白が酵素に対する基質として役立っただけでなく，酵素の活性化もまた行なうことを示している。

protein kinase モジュレーターの効果

ウシ脳から得た protein kinase モジュレーターはA1蛋白を基質として用いる時，酵素活性を阻害した。8 μg のモジュレーターは 0.2 ml の反応溶液中でA1蛋白(200 μg)とヒストン(40 μg)に対する酵素活性をそれぞれ41％と61％阻害した。protein kinase モジュレーターの存在によって酵素活性の刺戟をうけるフロタミン[8]の例と異なりA1蛋白はモジュレーターに対しむしろヒストンと似た反応の仕方を示した。

考察

A1蛋白の蛋白分子の修飾に関してはこれまで 107 の位置にあるアルギニンのメチル化が注目されている。約4モルのリン酸がA1蛋白にとりこまれることが示されたが，蛋白分子の一定部位に定まった方法と割合でもってリン酸化がおこっていると考えられる。とりこまれたリン酸の約90％はセリンとスレオニン残基に結合した。ホスホアミノ酸を部分酸水解によって分解することなく完全に回収することの困難性から考えて，とりこまれたリン酸の全てはホスホアミノ酸として存在し，セリンとスレオニン残基のみがリン酸化をうけると考えられる。

リン酸化によって蛋白のもっている物理化学的性質に変化の来たすことが明らかとなったことは例えこの蛋白が組織に対し構成的にのみ切いているものとしても他の高分子化合物との間の相互反応に大きな変化をひきおこすことが予想される。

REFERENCES

1. Kies, M.W., Thompson, E.B., and Alvord, E.C., Jr.,Abstracts Communications, Sixth International Congress of Biochemistry, Vol. 32, p.656, VIII-53 (1964)
2. Carnegie, P.R.,Biochem. J. 123, 57 (1971)
3. Eylar, E.H., Brostoff, S., Hashim, G., Caccam, J., and Burnett, P.,J. Biol. Chem. 246, 5770 (1971)
4. Miyamoto, E., Petzold, G.L., Kuo, J.F., and Greengard, P., J. Biol. Chem. 248, 179 (1973)
5. Oshiro, Y., and Eylar, E.H.,Arch. Biochem. Biophys. 138, 392 (1970)
6. Reisfeld, R., Lewis, U., and Williams, D.,Nature 195, 281 (1962)
7. Allerton, S.E., and Perlman, G.E.,J. Biol. Chem. 240, 3892 (1965)
8. Donnelly, T.E., Jr., Kuo, J.F., Reyes, P.L., Liu, Y.P., and Greengard, P., J. Biol. Chem. 248, 190 (1973)
9. Miyamoto, E., Petzold, G.L., Harris, J.S., and Greengard, P., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 305 (1971)

31 蛋白質の in vivo でのメチル化

三宅正治・井上良一
（阪大・医・高次研・神経）

〔要　約〕

ラットにメチオニン－メチル－^{14}Cを投与し各臓器，さらに脳，睾丸，肝臓では，各細胞分画の蛋白質中のメチオニンとメチルアミノ酸の放射能を経時的に測定し in vivo における蛋白質のメチル化を研究した。①各臓器でメチル化された蛋白質の代謝回転を比較すると3つのグループに大別できる。最も速いグループは，胸腺，脾臓および小腸で，最も遅いグループは，脳，睾丸および筋肉で，その中間に肝，腎，肺および心臓が属する。②各細胞分画中の蛋白質の分解速度とメチル化の速さを比較するとほぼ一致しており，一度メチル化されたアミノ酸残基は脱メチルされることなく，蛋白質の分解によってはじめて遊離される。③各臓器の蛋白質中の^{14}C－メチル化アミノ酸を分析すると，すべての臓器で，N^{ε}－モノ，ジ，トリメチルリシン，N^{δ}－モノおよびジメチルアルギニンおよび3－メチルヒスチジンの6種のメチルアミノ酸が形成されており，各臓器によって特徴あるパターンが得られた。④各細胞分画の中でミクロゾーム分画中の^{14}C－メチル化蛋白質は，速かに減少し，脳，睾丸の核分画では，むしろ注射後7日目に増加する。⑤ミクロゾームと核上清分画には，特にジメチルアルギニンを多く含む蛋白質が存在し両者の蛋白質をアクリルアミドゲル電気泳動で分析するとミクロゾームでは，高分子量から低分子量の蛋白質が一様にメチル化されるが，核上清では，低分子量の蛋白質が特にメチル化されている。

われわれは，これまでに，①メチル化される基質蛋白質の分布とそのメチル化アミノ酸残基の特異性[1)2)]と②精製蛋白質（EAE蛋白とヒストン）および細胞内在蛋白を基質として，メチル化酵素について研究[3)4)]，その結果①メチル化アミノ酸を含む蛋白質は細菌から哺乳動物に至る全生物，哺乳動物の全組織およびあらゆる細胞分画に，多種類存在し，またメチラーゼの基質となる蛋白質も多種類存在すること，②メチル化酵素は，アルギニンメチラーゼとリシンメチラーゼに大別され，しかも前者には，基質蛋白（EAE蛋白とヒストン）に特異的な酵素があり，多種類のメチラーゼの存在が予想されることを知った。今回は，in vivo でのメチル化蛋白質の動的変化を調べる目的で，メチオニン－メチル－^{14}Cをラットに投与後，各臓器，各細胞分画の蛋白質中のメチオニンとメチルアミノ酸とを経時的に分析した。

〔実験方法〕

(1)細胞分画および核分画法

細胞分画法は，肝臓および睾丸は，Schneider[5)]ら，脳については，植村ら[6)]の方法によった。核分画は，①0.2Mトリス緩衝液(pH8.0)可溶性②0.25N硫酸可溶性および③残査に分けた。各臓器および各細胞分画からの蛋白質の調製は，既報[3)]の方法によった。

(2)蛋白質の中酸性アミノ酸分画と塩基性アミノ酸分画の調製　既報[3)]の方法によった。

(3)メチルヒスチジン，メチルリシンおよびメチルアルギニン体の分離

塩基性アミノ酸分画を1×20cm Amberlite IR-120, NH_4^+型（200～400メッシュ）カラムを用い，0.1，0.5ついで1.0Mアンモニアで展開することによって，6種のメチルアミノ酸を分離し，放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

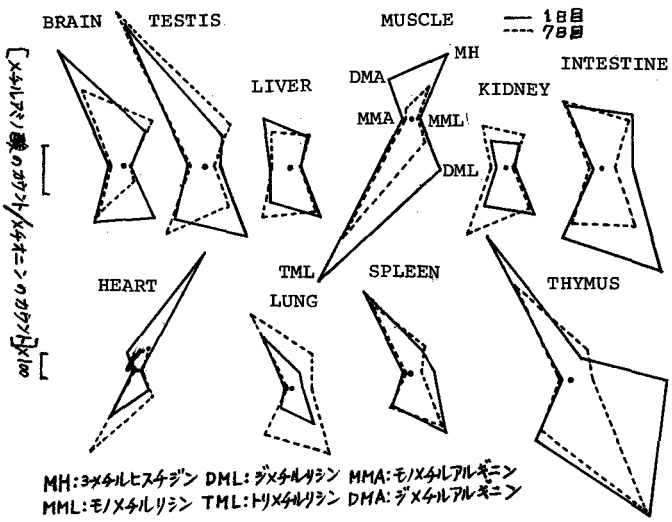
(4) SDS-アクリルアミドゲル電気泳動

Shapiro ら[7]の方法に従って、5%アクリルアミド, 0.1% SDS, 0.05M リン酸緩衝液(pH 7.1)で行なった。

〔結　果〕

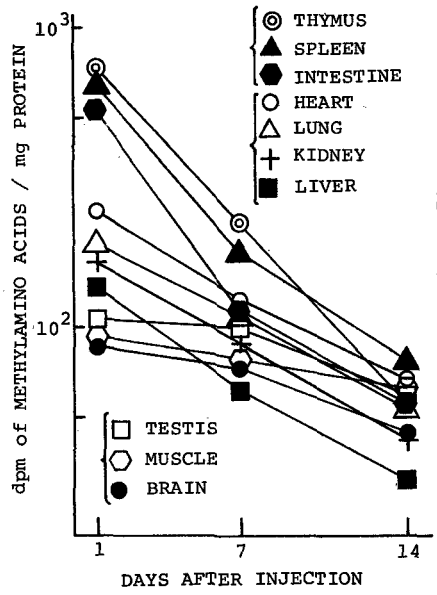
(1) ラット各臓器のメチル化蛋白質の代謝回転とメチル化アミノ酸

[図2] 各臓器のメチルアミノ酸パターンとその経時変化



200g 前後のラットにメチオニン-メチル-^{14}C (50μCi) を腹腔内に注射し、1, 7および14日目に殺して、各臓器内蛋白分画のメチルアミノ酸分画の放射能を測定したのが図1である。分解速度から見た蛋白の代謝回転速度に関して、3つのグループに大別できる。最も速いのは、胸腺、膵臓および小腸であり、最も遅いのが、脳、睾丸および筋肉で、その中間が、肝、肺、腎および心臓である。つぎに各臓器の蛋白のどのアミノ酸残基がメチル化されているかを調べたのが図2である。すべての臓器において6種のメチルアミノ酸が形成されているがそのメチルアミノ酸のパターンと経時変化には、いくつかの特徴が認められる。メチルリシン体が特に多い臓器は、筋肉および胸腺で、それぞれメチルリシンをその構成

[図1] 各臓器中メチル化蛋白の代謝回転

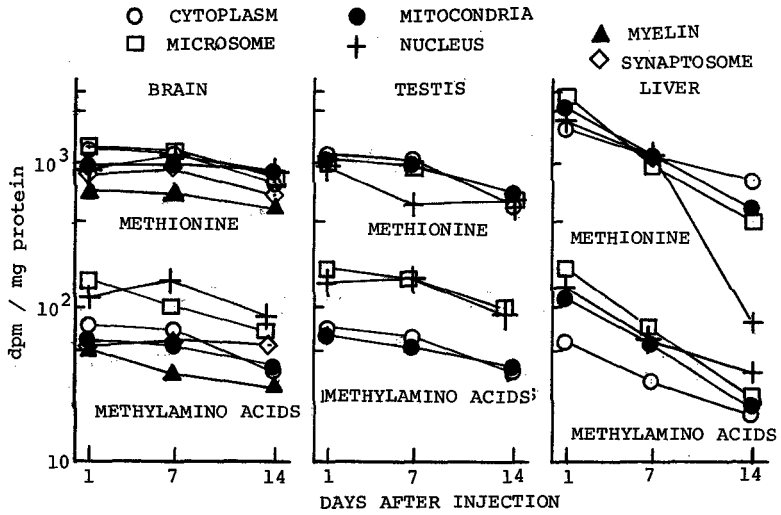


アミノ酸として含むミオシンおよびヒストンに主として由来すると思われる。心臓は、1日目に3-メチルヒスチジンが圧倒的に多いが、7日目では、著しく減少し、逆にトリメチルリシンが増加する特徴ある変化を示す。脳、睾丸および膵臓では、ジメチルアルギニンが多いという類似のパターンを示す。肝臓、肺および小腸は、メチルアルギニンとメチルリシンをほぼ等量含んでいる。さらに、脳、睾丸、肝筋肉および腎では、経時的に、モノおよびジメチルリシンは減少するが、トリメチルリシンは、反対に増加することは、興味ある事実である。

(2) 細胞分画レベルでの蛋白質分解とメチル化

脳、睾丸および肝臓の各細胞分画の蛋白質のメチルアミノ酸およびメチオニンの放射能を経時的に測定した結果が図3である。メチル化された蛋白質の分解速度とメチオニンでラベルされた蛋白質の分解速度は、3つの臓器の各々の細胞分画で、ほぼ一致し

[図3] 細胞分画レベルでの蛋白分解とメチル化

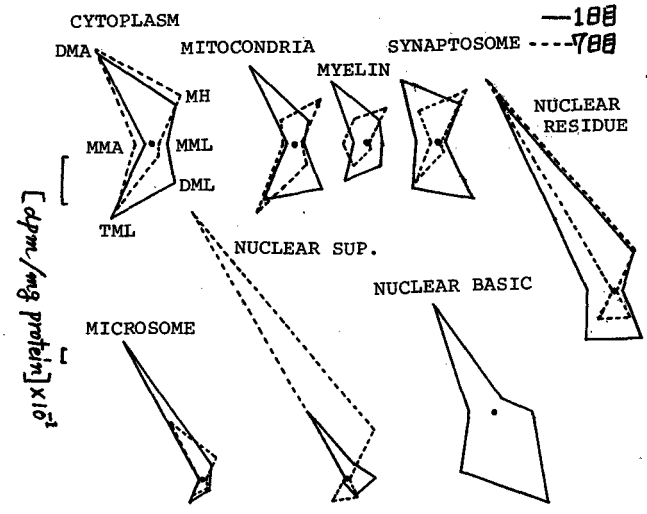


ている。このことは、蛋白質のメチル化が、非可逆的であることをわれわれが以前に、臓器レベルで示したが、それをさらに、細胞分画レベルでも証明したことになる。細胞分画の中で、ミクロゾーム分画中の^{14}C-メチル化蛋白質の消失が、いずれの臓器でも最も速く、脳および睾丸の核分画は1日目から7日目にかけて、逆に増加する。このことは、ミクロゾームで合成され、つづいてメチル化された蛋白質が、核へ移動しているのを示すのかもしれない。

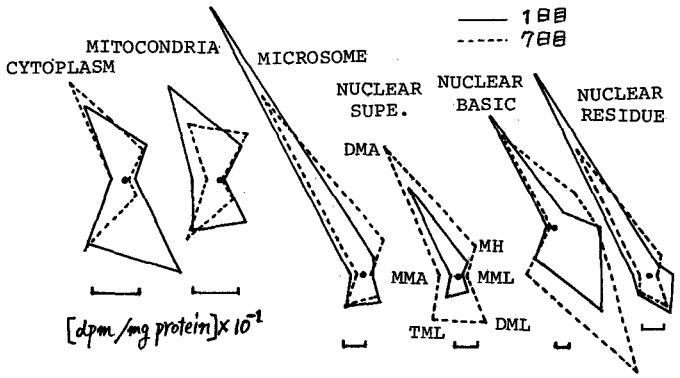
(3) 細胞分画中の蛋白質の各種^{14}C-メチルアミノ酸

脳および睾丸の各細胞分画でのメチルアミノ酸の分析結果をそれぞれ図4および5に示す。両臓器の各々の細胞分画レベルでの各^{14}C-メチルアミノ酸パターンは、よく一致している。両臓器において、まずメチルリシン体は、特に核塩基性分画に多く、これは主として、ヒストンに由来すると考えられる。しかしジメチルアルギニンもかなり多く存在し、この由来については、不明である。最も特徴あるパターンは、ミクロゾーム、核上清(トリス緩衝液可溶性)および核残査において、ジメチルアルギニンが他のメチルアミノ酸にくらべて、圧倒的に多いことである。しかも脳において最も著明であるが、このメチルアミノ酸は、1日目と7日目で、ミクロゾームでは、急激に低下し、一方核上清では上昇している。そこでミクロゾーム分画で合成、メチル化された蛋白質の一部が、核上清に移行する可能性を考えミクロゾームと核上清のメチル化蛋白質の性質を、SDS-アクリルアミドゲル電気泳動で検討した。メチオニン-メチル-^{14}Cを投与後1日目のラットの睾丸ミクロゾーム分画の0.2Mトリス緩衝液(pH8.0)可溶性分画(メチル化蛋白質の60%を含む)と、核上清分画の電気泳動の結果をそれぞれ図6と7に示す。ミクロゾームでは、高分子量から低分子量の蛋白

[図4] 脳の細胞分画のメチルアミノ酸パターン



[図5] 睾丸の細胞分画のメチルアミノ酸パターン

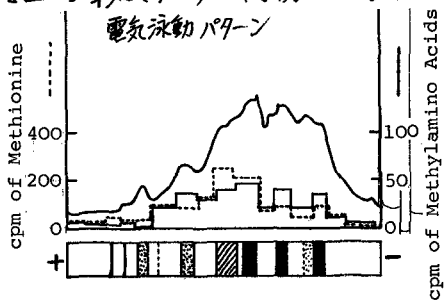


質が，一様にメチル化されているが，核上清では，低分子量の蛋白質が特にメチル化されている。従ってこの結果から直接ミクロゾームで合成，メチル化された蛋白が核へ移行していることは証明できない。両分画のメチル化された蛋白質のメチルアミノ酸の分析が必要である。

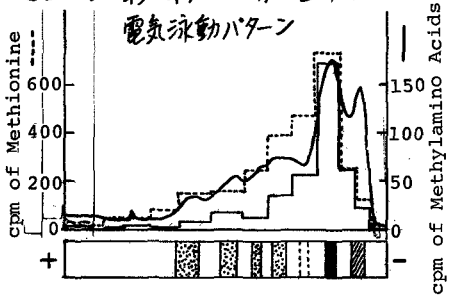
[考　察]

今回の研究結果と，これまでのわれわれが得た知見とから，蛋白質は一般的に合成されて，早期に一定のメチル化を受け，細胞構成成分としてそれぞれの部位に輸送される。すなわちメチル化の基質になるのは，合成後まもなくの蛋白質であると考えている。この仮説を支持する根拠には，①ラットにメチオニン-メチル-^{14}C を注射後1日目の各臓器の蛋白質へのメチオニンの取り込みとメチルアミノ酸への放射能の取り込みの相関係数を算出すると0.81という値が得られ，高い相関を示す。②メチオニンの蛋白への取り込みと減少が，メチル化と経時に平行する。図3に示したように3つの臓器の細胞分画の中で蛋白合成の盛んなミクロゾーム分画のメチル化が1日目で最も高い。③図6，7からわかるようにほとんどの蛋白質分画において，メチオニンの取り込みとメチル化は平行している。④例えばEAE蛋白やヒストンにおいて，そのメチルアミノ酸の量は，動物種によって常に一定である[4]。⑤再生肝において，すなわち蛋白合成の高まった状態において，蛋白量の増加に平行して，メチルアミノ酸残基の量が上昇する[8]。等が挙げられる。今後この作業仮説にもとずいて研究をすすめたい。その他メチル化蛋白質の細胞内移動，核内蛋白質のメチル化，蛋白内メチル基の転移などの可能性も示されているので，これらについて研究する。

[図6] 睾丸ミクロゾーム可溶性分画の電気泳動パターン



[図7] 睾丸核上清分画の電気泳動パターン



[文　献]

1) 松岡征夫：生化学 44 364 (1972)　2) 梅本ら：神経化学 11 87 (1972)
3) Miyake etal：J. Neurochem. 20 889 (1973)　4) 三宅正治：神経化学 11 91 (1972)
5) Schneider etal：J. Biol. Chem. 183 123 (1950)　6) 植村ら：神経研究の進歩 7 763 (1963)　7) Shapiro etal：Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 815 (1967)
8) 松岡征夫 (私信)

32 末梢および中枢神経ミエリンの構成蛋白について：塩基性蛋白相互の比較

北村邦男・山中たか子
相沢協子・植村慶一
（埼玉医大・Ⅰ生理）

〔要約〕
1)ウシ末梢神経組織よりミエリンを大量に調製し、有機溶媒あるいは界面活性剤処理を行なわず、直接ミエリンより塩酸抽出物を得、Sephadex G-75ゲル口過にて3つの蛋白成分に分画した。そのうちの2種類の塩基性蛋白(BM蛋白,BF蛋白)を精製した。
2)SDS電気泳動によると、末梢神経ミエリンは2つの主蛋白成分に分離され、移動度の早いものはBF蛋白に一致した。移動度の遅いもの(BR蛋白)は弱酸非抽出性であるという結果を得た。
3)ウシのBM蛋白と中枢ミエリンの実験的アレルギー性脳脊髄炎を起こす塩基性蛋白(A1蛋白)は、Reisfeld系およびにSDS系電気泳動法による移動度が一致し、アミノ酸組成も比較的類似していたが、いくつかのアミノ酸組成に違いがみられた。
4)BF蛋白とA1蛋白のそれぞれのTrypsin分解物について、Peptide Map法を用いて比較した結果、BF蛋白とA1蛋白は全く異なっており、それぞれのTryptophanを含むPeptideの移動度が互いに異なっていたことから、BF蛋白にはA1蛋白と同一の「Tryptophan部位」は存在せず、モルモットに対するEAEの抗原性はない、と結論された。

実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)は中枢神経系の脱髄疾患のモデルであるが、その抗原物質は中枢ミエリンの主構成蛋白の一つである塩基性蛋白(A1蛋白)であり[1]、既に全一次構造が決定されている[2,3]。さらにモルモットに対する抗原部位がいわゆる「Tryptophan部位」に存在することが明らかとなった[4]。一方、末梢神経系の脱髄疾患のモデルである実験的アレルギー性神経炎(EAN)を惹起させる原因物質は依然不明のままである。

我々は1970年にブタ末梢神経組織から中枢神経のとは全く異なった末梢神経独自の塩基性蛋白を精製し[5]、さらにウシ末梢神経組織から類似の蛋白(BF蛋白)を精製し、この塩基性蛋白が末梢神経ミエリンの構成蛋白の一つであることを証明し、1971年の本学会において報告した[6][7]。最近、Eylarらはウサギ坐骨神経から2種の塩基性蛋白を精製し、一種はP1蛋白)中枢のEAE蛋白(A1蛋白)とアミノ酸組成およびTryptic Peptidesが一致し[7]、他の一種(P2蛋白)はA1蛋白と同一の「Tryptophan部位」があること、およびP2蛋白はサルにEANを起こす抗原性を持つ[8]、と報告した。

今回、これらの蛋白相互の関係を明らかにする為、ウシ末梢神経組織よりミエリンを大量調製し、弱酸抽出性蛋白の分画を行ない、その性質を検討したので報告する。

〔実験方法〕

1)末梢神経ミエリン酸抽出性蛋白の精製：既に報告した方法[9]に従ってウシ末梢神経組織80g(湿重量)から得られたミエリンを0.03N塩酸100mlと共にTeflon-glass homogenizerにて上下5回の処理を行なった後、pHを2.0に調節し、4°Cにて約13時間撹拌した。16,000rpm 60分遠心して得られた上清を蒸留水に対し透析後、凍結乾燥した。再び0.03N塩酸1.1mlに溶解後、0.03N塩酸で平衡化したSephadex G-75にて分画を

行った。(Column size: 1.5 × 87 cm, Flow rate: 7.0 ml/hr)

2)ディスク電気泳動：Buffer系はReisfeldによる方法[10]に従い、Acrylamide濃度7.5%、Acrylamide/BIS比37.5のものを使用した。染色にはCoomasie Brilliant Blue R-250(半井化学製)を用いた。

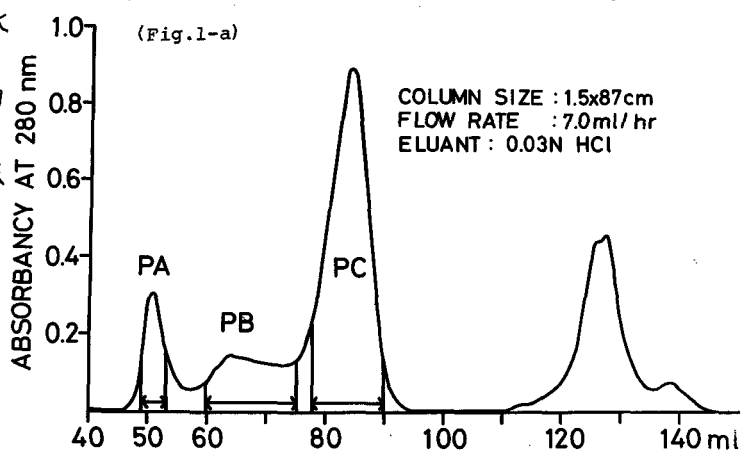
3)SDS電気泳動：Buffer系はShapiroの方法[11]に従い、SDS濃度1%、Acrylamide濃度10%、Acrylamide/BIS比29のものを使用した。試料はSDS 1%、β-Melcapto-ethanol 1%、Malachite Green 0.01%中にて45°C 60分の処理をした。

4)アミノ酸分析：蛋白1mgを定沸点塩酸1ml中にて110°C, 20時間分解し、日本電子JLC-6AH型アミノ酸自動分析機で分析した。[12]

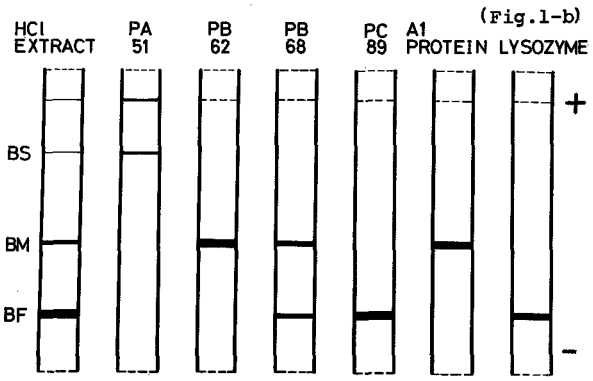
5)Peptide Map：Trypsin(Sigma社製TypeI)は前もってWangらの方法[13]に従ってTPCK(生化学工業製)処理をしたものを使用した。ウシA1蛋白およびBF蛋白8～10 mgを1mlの0.1M N-ethylmorpholin-acetate Buffer pH 8.0に溶解後、Trypsin水溶液(10 mg/ml) 10 μl を加え(Enzyme/Substrate比 1/100 W/W) 37°Cで2時間分解後さらにTrypsin水溶液10 μl を加え22時間分解を続けた。凍結することにより反応を止め、Peptide Mapに使用する際0.2 mlを40°Cにてevaporateの後、10 μl の0.1M N-ethyl-morpholin-acetate Bufferに溶解し、さらに10 μl の同液にて回収し、全量20 μl を1回の分析に使用した。最初に、n-Butanol: Acetic Acid: Pyridine: Water(15:3:10:12 V/V/V/V)にて室温下17時間Paper(Whatman 3MM) chromatography[15]を行なった後、24時間乾燥させた。次にPyridine: Acetic Acid: Water(1:1:100 V/V/V) pH 4.7中にて2,500Vの定電圧で100分電気泳動を行なった。Peptidesの検出には0.2% Ninhydrine-Acetone溶液を使用し、TryptophanのPAN UV LAMP(東京光学機械1A型)によってケイ光として観察した。

[結果と考察]

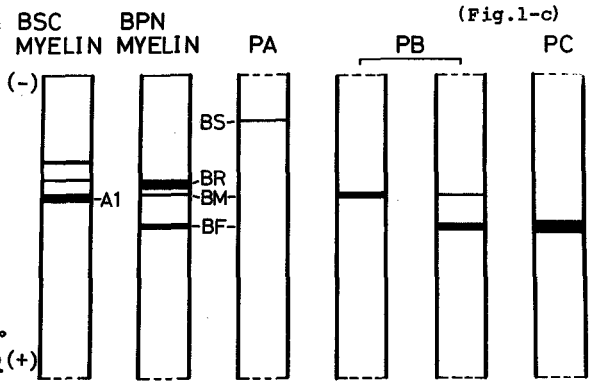
1)ウシ末梢神経ミエリンの酸抽出蛋白の分画：ミエリンの構成蛋白の約95%以上を可溶化出来る条件である1% SDSを用いたSDS電気泳動により、中枢および末梢神経ミエリンの構成蛋白については既に報告し[14]、又、末梢神経組織より抽出した塩基性蛋白(BF蛋白)がミエリン構成蛋白であることを証明した。[9] 末梢神経ミエリンの酸抽出蛋白はゲル口過によってほぼ3つのpeak、PA、PB、PCに分離され(Fig 1-a)、Reisfeld系ディスク電気泳動で分析すると(Fig 1-b)、PCにLysozymeと同じ移動度をもつBF蛋白が多量に存在することから、BF蛋白がミエリンの主構成蛋白の一つであることが実証された。PAはVoid Volumeに相当する部分で、移動度の遅い蛋白(BS蛋白)とゲルに入らない蛋白より成る。PBの前半部分(60ml-65



ml）に電気泳動的に純粋な蛋白(BM蛋白を得ることが出来、このBM蛋白の移動度はA1蛋白の移動度と一致していた。この様に、ミエリンから塩酸抽出を行なうと、有機溶媒、界面活性剤を用いずにすみ、又、ゲルロ過の操作だけで純粋な2種の塩基性蛋白を得ることが出来た。PA、PB、PCは図に示した様に分画し(PBは純粋なBM蛋白より成る前半62ml-65ml画分と、後半66ml-75ml画分に分けた)、蒸留水に対し透析後凍結乾燥したものについてSDS電気泳動で調べると(Fig 1-c)BF蛋白は末梢ミエリンの構成蛋白中最も分子量の小さいものであることが確認された。末梢ミエリンの構成蛋白中最も多い蛋白(BR蛋白)は酸抽出物のどの分画にも見られないことから酸不溶性蛋白であることが示唆された。分子量はBR:22,000、BM:20,000、BF:13,000であった。



(Fig.1-b)



(Fig.1-c)

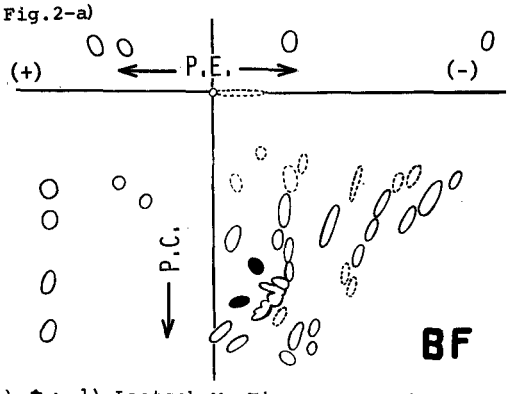
2)アミノ酸組成：BM蛋白はFig 1-aの62ml-65ml画分を用い、BF蛋白はPC画分を再クロして得られたものを使用した。又、A1蛋白は我々がウシ脊髄より精製したものを使用した。(表1) BF蛋白はBM、A1蛋白と全く異なっており、Lys、Asp、Gluといった極性アミノ酸残基含量が多く、Lysが特に多いことが特徴的である。BM蛋白はA1蛋白とよく似た組成をしているが、Arg、Valが有意に異なっており、他のいくつかのアミノ酸にも差異がみられることと、この蛋白1～1.5mgをウサギに注射しても臨床的にも病理的にもなんら変化のないことから、BM蛋白とA1蛋白は異なった性質の蛋白である可能性が示唆された。Eylarらはウサギ末梢神経のP1蛋白(ウシではBM蛋白に相当すると考えられる)がウサギA1蛋白と同一であることを報告している[7]が、ウシのBM蛋白とA1蛋白の異同については、尚詳細な検討が必要である。

(Table 1.)

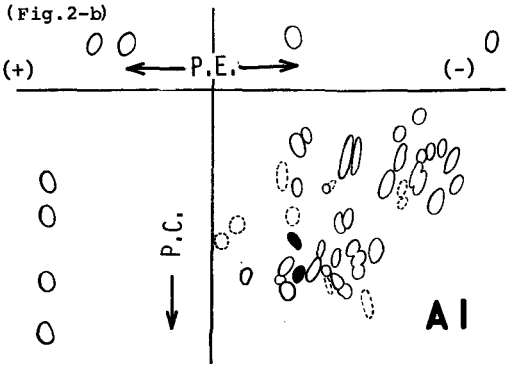
AMINO ACID	BF MOLAR %	BM MOLAR %	A1 MOLAR %
LYS	14.9	7.2	8.2
HIS	1.4	4.7	6.0
ARG	5.2	5.3	7.3
ASP	9.9	7.6	7.3
THR	9.3	4.8	4.6
SER	5.9	9.0	8.7
GLU	10.0	7.0	7.0
PRO	1.9	6.0	6.5
GLY	7.6	11.0	12.8
ALA	4.1	10.7	9.6
CYS/2	0.7	—	—
VAL	8.0	6.2	3.8
MET	2.3	1.3	1.4
ILEU	5.4	1.7	1.8
LEU	7.8	9.7	7.9
TYR	1.6	2.6	2.3
PHE	3.9	5.2	4.8

3)BF蛋白とA1蛋白のTryptic Peptidesの比較：Fig 2 にBF蛋白とA1蛋白のTryptic Peptidesを比較した。実線はNinhydrinにより、強く発色するspotで、破線は弱く発色するspotである。この2つのMapはcontrolのアミノ酸がPaper chromatography(P.C.)およびPaper electrophoresis(P.E.)上での移動度が全く一致したものを載せた。発色の強いspotはBF:28コ、A1:36コであり、Trypsinによって切断し難い部分があるためにpeptideが重複して現れる事を考慮すると、理論値BF:24コ、A1:32コと比較的よく一致していた。BF蛋白はLys、Arg総含量が比較的多いにもかかわらず[1]Trypsinによって分解されない部分(原点のspot)が存在することから、特異な構造を保持していることが予想された。A1蛋白にはP.C.での移動度が小さく、pH4.7でのP.E.での⊖方向への移動度の大きい塩基性Peptide群が存在するが、BF蛋白には少ない。BF蛋白にはP.C.での移動度の大きい非極性のPeptide群が存在し、又、P.E.で⊕方向へ移動するPeptideが2コ検出されたが、これらのPeptideはA1蛋白には見られなかった。Eylarらはウサギ A1蛋白と末梢神経のP2蛋白(ウシではBF蛋白に相当する)のTryptic Peptides中に同一の「Tryptophan部位」が存在することを報告している。[8] とかんがら、ケイ光で観察されたTryptophanを含むspot(黒ぬりのspot)を比較すると、A1の2つのspotはいずれもBF蛋白の2つのspotsよりもP.E.上での⊖方向への移動度が大きいことからBF蛋白とA1蛋白には共通した「Tryptophan部位」が存在するとは考えられなかった。又、BF蛋白をモルモットやウサギに注射しても、臨床的にも、病理的にも変化のないことから、現在までの成績からはBF蛋白はEAEはもちろんEANの抗原性を保持していないと結論された。(本研究の1部は第4回国際神経化学会に於て報告した。)

(Fig.2-a)



(Fig.2-b)



文献

1) Laatsch,M.,Kies,M.W.,Gordon,S.& Alvord,E.C.; J.Exper.Med.,115,777 (1962)
2) Carnegie,P.R.; Nature,229,25 (1971)
3) Eylar,E.H.; Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.,67,1425 (1970)
4) Westall,F.C.,Robinson,A.B.,Caccam,J.,Jackson,J.J. & Eylar,E.H.; Nature, 229,22 (1970)
5) Uyemura,K.,Tobari,C. & Hirano,S.;Biochim.Biophys.Acta.214,90 (1970)
6) 戸張、植村、平野；神経化学，10 35 (1971)
7) Brostoff,S. & Eylar,E.H.; Arch.Biochem.Biophys.,153,590 (1972)
8) Brostoff,S.,Burnett,P.,Lampert,P. & Eylar,E.H.;Nature,New biology, 235,210 (1972)
9) Uyemura,K.,Tobari,C,Hirano,S. & Tsukada,Y.; J.Neurochem.,19,2607 (1972)
10) Reisfeld,R.A.,Lewis,U.J. & Williams,D.E.;Nature,195,281 (1962)
11) Shapiro,A.L.,Vinuela,E. & Maizel,J.V.;Biochem.Biophys.Res.Comm.28,815 (1967)
12) Spackman,D.H.,Stein,W.H., & Moore,S.;Anal.Chem.,30,1190 (1958)
13) Wang,S.S. & Carpenter,F.H.; J. Biol.Chem.,240,1619 (1965)
14) 植村、戸張、平野、北村；生化学ンポジウム，p279 (1972)
15) Waley,S.G. & Watson,J.;Biochem.J.,55,328 (1953)

33 In vitro における微小管の生成

芳賀達也・阿部輝雄
黒川正則
（東大・医・脳研）

〔要　約〕

In vitro での微小管生成に対する各種イオンの影響を、流動複屈折によって定量的に検討し、併せて若干の速度論的解析を行なった。

(1) Ca^{++}は微小管の生成を阻害する。Ca^{++}の有効濃度は、10^{-5}～10^{-6}M程度であり、生体においてCa^{++}が制御因子としてはたらいている可能性を示唆する。

(2) 微小管の生成に至適なイオン強度は約0.05で、それ以下でも以上でも阻害的に作用する。微小管の生成にMg^{++}の存在が必要であるが、5mM以上では阻害的にはたらく。

(3) 至適イオン環境での微小管の伸長は、脳抽出液中に存在する「核」と単量体との反応により進行する。この反応の活性化エネルギーは約 22 kcal/mole と算出される。

(4) イオン強度が高い時や、Ca^{++}が存在する場合には、濃度に依存しない過程によって、微小管の生成が律速される。

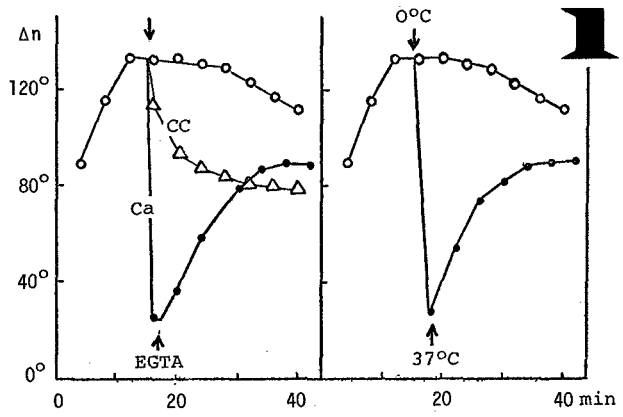
神経組織には多量の微小管が存在し、軸索流[3,8]への関与が示唆されている。微小管は、生体内において、その構成単位（チュブリン）単量体と動的平衡にあり、この平衡の制御が生理的機能の発現に密接に関連すると考えられている[4,6]。最近 WEISENBERG[10]は、微小管が in vitro で再構成される事を示した。WEISENBERG やそれ以後の研究者[2,9]は、微小管の生成を電子顕微鏡を用いて観察している。我々は in vitro での微小管の解離，会合に対する諸因子の影響を、流動複屈折を指標として定量的に解析する事を試みた。

実験方法

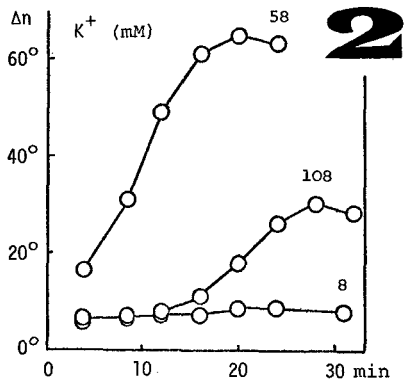
ブタ大脳を、0.32M 蔗糖溶液で洗った後、1.5 倍容の抽出溶液［50 mM PIPES 緩衝液 (pH 6.5), 0.5 mM $MgSO_4$, 1 mM EGTA, 0.1 mM GTP］内で、ミキサーでホモジェナイズし、70,000 g, 30分遠心後の上清を −80 ℃に保存した。使用時に、25℃、10分間の保温で融解させ、Sephadex G-50 カラムを通し、タンパク質画分を取って試料とした。試料を希釈後、37℃に保温し、一定時間毎に RAO-EDSALL 型の装置で流動複屈折を測定。この装置での直接の読みをΔnとして表示した（速度勾配は約1,000 sec^{-1}。速度勾配に対する依存度は非常に小さい）。媒質の標準組成は、43 mM PIPES 緩衝液 (pH 6.5, KOH で調整、K^+として 58 mM), 0.43 mM $MgSO_4$, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM GTP である。低濃度のCa^{++}の影響を調べる時には、CaとEGTA又はEDTAの混合液を使用した。EGTA又はEDTAの濃度は5mMとし、トリスでpHを調節、遊離Mg^{++}の濃度は2.43 mMとした。電子顕微鏡による観察は、1Mヘキシレングリコールで希釈後、酢酸ウラニル又は燐タングステン酸で陰染色して行なった。

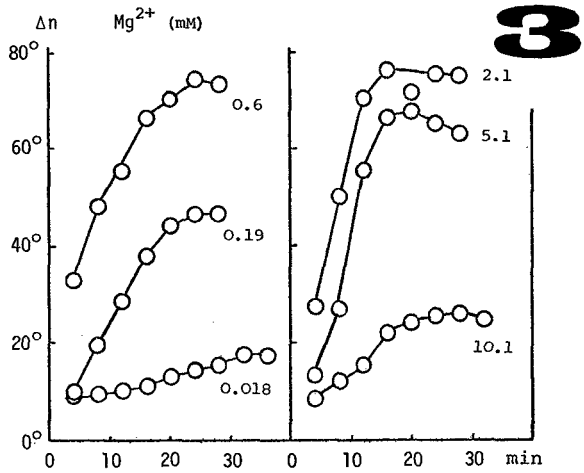
実験結果と考察

解離、会合の可逆性　試料を標準溶液中で37°Cに保温すると、複屈折(Δn)は最初の約15分は増加し、以後一定ないし徐々に低下する(図1)。Δnが一定になった時点でCa(2.9 mM)を添加すると、Δnは1分以内に減少するが、EGTA(5.8 mM)を加えるとふたたび増加する(図1, 左)。温度の上下によっても、同様に速やかなΔnの減少と回復が見られる(図1, 右)。Δnの増減が、微小管の生成と消失に対応する事は、平行して行なった電子顕微鏡的観察によって確かめられた。微小管は温度変化やCa^{2+}濃度変化によって可逆的に解離、会合するものと考えられる。一方コルヒチン(2.9 mM)を加える事によってもΔnは減少する(図1, 左, CCで表示)が、減少の速度は遅い。保温直前にコルヒチンを加えた場合は、0.1 mM以下の濃度でΔnの増加が完全に抑えられるので、コルヒチンとチュブリンの結合反応が律速段階になっているとは考えにくい。ひとつの可能性として、コルヒチンは微小管と平衡状態にある単量体チュブリンとだけ反応し、間接的に平衡を解離側にずらせるのに対して、Ca^{2+}や温度変化は微小管内のチュブリンに直接影響し、急速に解離するような状態に変える、と考えることができる。



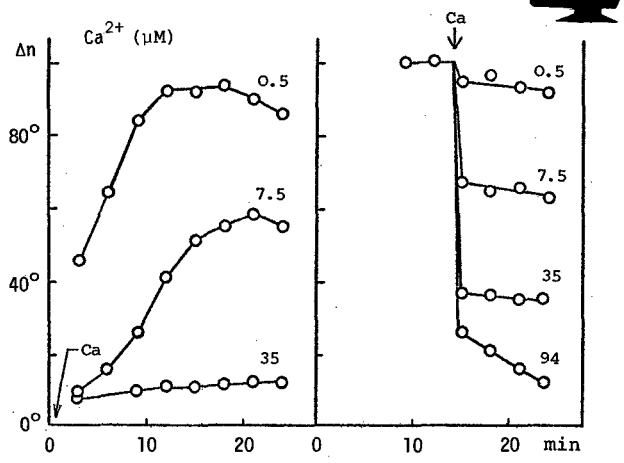
各種因子の影響　イ)イオン強度　イオン強度の影響を見るため、PIPES 緩衝液の濃度を6 mM(K^+として8 mM)に下げ、KClを0, 50, 100 mMになるように加えた(図2)。微小管の重合には、一定のイオン強度が必要であるが、イオン強度がさらに高くなると阻害的にはたらく。この作用は、塩の種類によっても異なり、Na^+はK^+に比べてより低い濃度で阻害的に作用する。





ロ) pH　PIPES 緩衝液によって pHを6.2から7.3にまで変化させると、pHの上昇に伴って、Δn増加が減少する。pH7.3ではΔnはまったく増加しない。

ハ) Mg^{2+}　EDTAを加える事によりMg^{2+}濃度を低く保つと、Δnはほとんど増加しない（図3）。これから微小管の重合にMg^{2+}の必要な事がわかるが、Mg^{2+}自体が必要なのか、MgGTPとして必要なのかは、現在のところわからない。5mM以上のMg^{2+}は、微小管生成にたいして阻害的に作用する。



ニ) Ca^{2+}　図4にCa^{2+}の影響を示す。遊離Ca^{2+}の濃度は、EGTA又はEDTAとCaとの結合定数から計算した。保温前にCaを加えても、Δnが一定になった後にCaを加えても、効果に大きな違いは見られない。したがってこの反応系は、各種のCa濃度でほぼ平衡状態にあるものと考えられる。微小管の解離に有効なCa^{2+}濃度は1～30μMである。媒質のイオン強度が高くなると、Ca^{2+}の有効濃度は低くなる傾向がある。このように生理的なCa^{2+}濃度が微小管の解離，会合に影響するので、生体内でもCa^{2+}が制御因子として作用する可能性が考えられる。しかし現在のところ、軸索流に直接Ca^{2+}が影響するという証拠は得られていない。[1]

ホ) 温度　微小管生成にたいする温度の効果を図5に示す。微小管と単量体との結合反応の速度定数k（後述）を各温度で求め、kと1/Tとの関係（図5，右）から活性化エネルギーを算出すると、アクチンの場合[5]とほぼ同じで、約 22 kcal/mole となる。

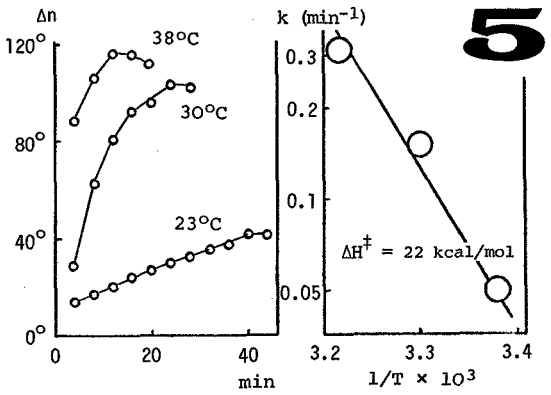
速度論的考察　微小管の生成には、脳抽出液内に「核」の存在が必要である。[2] 核の数と等しい数の微小管ができると考えてそれをf_nとし、単量体の濃度をmとすると、核又は微小管と単量体の結合速度は $k_1 m f_n$，微小管から単量体がはずれて行く速さは $-k_2 f_n$ であらわすことができる。したがって単量体の減少する速さ $-\frac{dm}{dt}$ は次式で与えられる。[5,7]

$$-\frac{dm}{dt} = k_1 m f_n - k_2 f_n \qquad [1]$$

$t=0$ の時 $m=m_0$，f_nはtによらないという条件で(1)式を積分すると、次の式が得られる。

$$F_c = m_0 - m = (m_0 - \frac{k_2}{k_1})(1 - e^{-k_1 f_n t}) \qquad [2]$$

m_0は、反応前の単量体の濃度、すなわちチュブリンの全濃度である。F_cは微小管を



構成しているチュブリンの量を表わす。ΔnがF_tに比例すると仮定すれば、〔3〕式の型の実験式が予想される。又m_0とt_nは試料の濃度〔S〕に比例するから、〔4〕および〔5〕の関係が予想できる。〔5〕式におけるaは定数である。

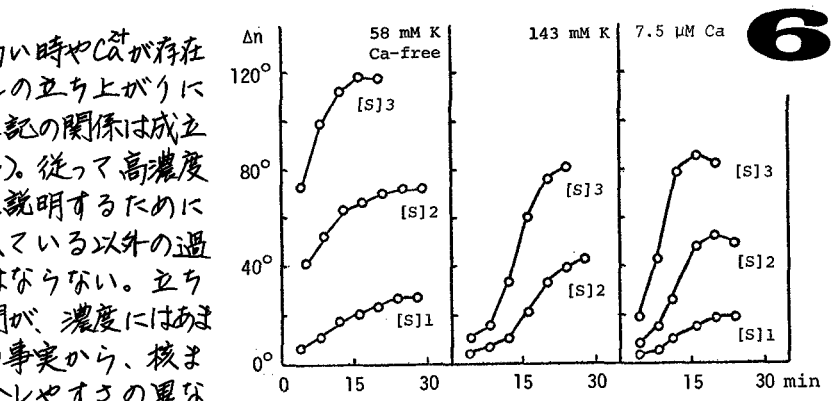
$$\Delta n = \Delta n_{max}(1 - e^{-kt}) \quad [3]$$

$$k \propto [S] \quad [4]$$

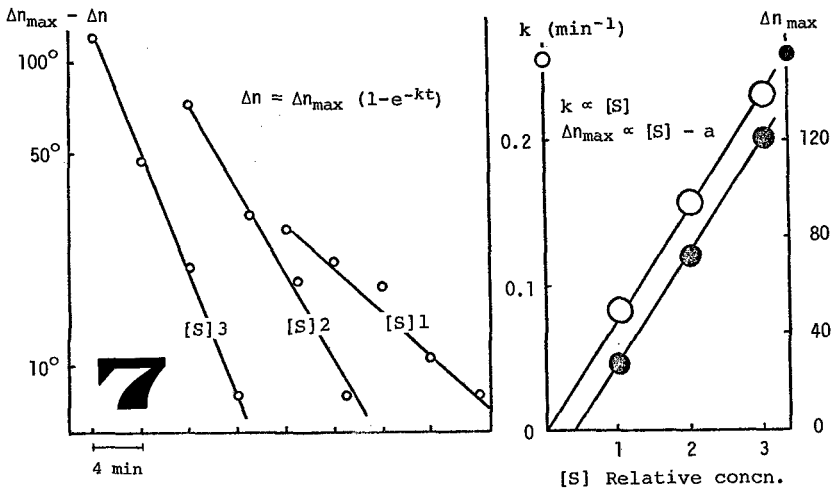
$$\Delta n_{max} \propto [S] - a \quad [5]$$

Ca^{2+}を含まない標準溶液におけるΔnとtとの関係は、図6の左端に示したごとくである。Δnが最高に達した時の値をΔn_{max}とすると、$\log(\Delta n_{max} - \Delta n)$と$t$が直線関係になることから（図7, 左）, Δnとtとの間に〔3〕式の関係が成立することは明らかである。また図7右に示した結果から、〔4〕, 〔5〕式が成立することも明らかである。従ってこの媒質条件における微小管の生成は、〔1〕式で示される最も単純な仮定によって説明することができる。

一方K^+の濃度が高い時やCa^{2+}が存在する場合には、Δnの立ち上がりに遅れがあるため、上記の関係は成立しない（図6, 中と右）。従って高濃度K^+またはCa^{2+}の作用を説明するためには、〔1〕式に含められている以外の過程を考慮しなくてはならない。立ち上がりの遅れの時間が、濃度にはあまり依存しないという事実から、核または単量体には会合しやすさの異なる2つの状態が存在し、この間の遷移が律速段階になっている、という型のモデルが考えられる。この過程を解明することは、微小管の解離, 会合におけるCa^{2+}の制御様式を知る上に重要と思われる。



6



7

〔文　　献〕

〔1〕 ABE T., HAGA T. & KUROKAWA M. (1973) Biochem. J. (in the press) 〔2〕 BORISY G.G. & OLMSTED J.B. (1972) Science 177, 1196-1197 〔3〕 DAHLSTRÖM A. (1971) Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B 261, 325-358 〔4〕 INOUÉ S. & SATO H. (1967) J. Gen. Physiol. 50, 259-292 〔5〕 KASAI M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 180, 399-409 〔6〕 OLMSTED J.B. & BORISY G.G. (1973) Ann. Rev. Biochem. 42, 507-540 〔7〕 OOSAWA F. & KASAI M. (1962) J. Mol. Biol. 4, 10-21 〔8〕 SCHMITT F.O. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60, 1092-1101 〔9〕 SHELANSKI M.L., GASKIN F. & CANTOR C.R. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 765-768 〔10〕 WEISENBERG R.C. (1972) Science 177, 1104-1105

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

播口之朗・西村 健
多田国利・金子仁郎
（阪大・医・精神）

〔要 約〕

われわれは，さきにアルツハイマー病および老年痴呆患者の脳では，われわれがB-2，B-4とよぶ2種の水溶性蛋白が著しく減少することを明らかにし，B-2，B-4蛋白が異常な集合状態をとり神経原線維変化（以下NF変化と略す）を形成する可能性を示唆した．

今回はまずB-2，B-4の減少とNF変化との対応関係を一層明確にするためにNF変化の乏しい痴呆性疾患でB-2，B-4の変化をしらべたが，それらの疾患ではB-2，B-4は著明な変動を示さなかった．一例の若年性アルツハイマー病の大脳皮質でもNF変化の乏しい部分ではB-2，B-4の減少は軽度であった．つぎにアルツハイマー病脳でB-2，B-4蛋白が不溶化する要因を解析するために種々の条件でB-2，B-4の変動をしらべ次の成績を得た．1）アルツハイマー病脳ホモジネートにGTPあるいはcolchicineを加えてもB-2，B-4は回復しない．2）アルツハイマー病脳ホモジネートにEDTAあるいはEGTAを加えるとB-2が回復する．3）しかしアルツハイマー病および老年痴呆の脳のEDTAにキレートされるCa，Mgは対象脳のそれらと比較して著差はなかった．4）アルツハイマー病脳ホモジネートと対照脳ホモジネートを混ぜると対照脳ホモジネートのB-2が著明に減少する．しかしアルツハイマー病脳ホモジネートを超遠心で上清と沈渣に分けて個々に対照脳ホモジネートと混じると，この現象は認められない．これらの成績からNF変化形成の要因につき若干の考察を加えた．

初老期，老年期に痴呆をきたす疾患のうちアルツハイマー病，老年痴呆は病理組織学上とくに高度な老人性変化を呈する。これらの疾患で認められる老人性変化のなかでも神経原線維変化は病因と密接な関係を有する基本的な病変であると考えられており，その化学的性状や形成機転の解明が重視されている。

われわれは，さきにアルツハイマー病および老年痴呆患者の脳の水溶性蛋白の変動をポリアクリルアミドゲル電気泳動をもちいてしらべ，それらの疾患では，われわれがB-2，B-4と呼ぶ2種の酸性蛋白が著しく減少することを認め，さらにこれらの蛋白が神経原線維変化の主要な構成要素であることを示唆する成績を報告した。[1)2)]

今回は他の痴呆疾患における脳水溶性蛋白の変動をしらべ，B-2，B-4の著しい減少が神経原線維変化と対応する所見であることを確認し，本変化の成立に関与する要因につき検討を加えた成績を報告する。

〔材料および方法〕 1）人脳材料：痴呆患者脳は剖検により得られたものを−20°Cで保存した。死後時間は3～16時間である。対照人脳は16～80才の脳に損傷のない事故死者脳であり，−20°Cに保存した。死因は失血死，心臓死で死後時間は4～24時間である。全例前頭葉皮質をもちいた。2）蛋白の抽出：人脳組織に湿重量の4倍容の0.01 M sodium phosphate buffer（pH 7.0）あるいは脱イオン水を加えてホモジナイズしたのち4°C，100,000×g，30分間遠沈し上清を水溶性画分とした。3）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下PA-電気泳動と略す）：7.5％ポリアクリルアミドゲルをもちい，原理的にはOrnstein & Davisの方法に従った。泳動終了後ゲルをamido black

10 B で染色し，10％酢酸で脱色したのち densitometer で濃度を測定した。4) Ca，Mg の定量：原子吸光法をもちいた。脳組織に 1％ EDTA 溶液を加えて 15倍および 250 倍稀釈ホモジネートをつくり，4°C，100,000×g，30分遠沈後それぞれ Ca，Mg 測定に供した。

〔成　績〕　1) 痴呆性疾患における脳水溶性蛋白の PA-電気泳動像：正常青壮年者の脳水溶性蛋白の PA-電気泳動像は図1の如くである。さきに報告した如く，アルツハイマー病および老年痴呆では B-2，B-4 が著しく減少あるいは消失する。初老期，老年期に痴呆を呈する他の疾患について B-2，B-4 の変化をしらべた成績を表1にまとめた。高度の神経原線維変化を示すアルツハイマー病，老年痴呆でのみ B-2，B-4 が同時に著しい減少を示す。また一例の若年性アルツハイマー病で神経原線維変化がほとんど認められない部分の大脳皮質では B-2，B-4 に著明な変化は認められなかった。

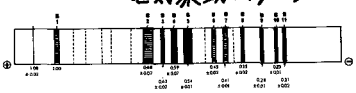


図1. 7.5％ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

2) GTP の影響：前報で B-4 が神経細管構成蛋白 tubulin である可能性を示した。tubulin 分子は1分子の GTP あるいは GDP を有し，これら guanine nucleotide を失うと aggregate し沈澱すること，tubulin 溶液に GTP を添加すると変性を抑制することが知られている。[3] アルツハイマー病脳ホモジネートに 10^{-2}～10^{-3} M GTP を加え 37°C，1時間 incubate したのち 100,000×g，30分間遠沈し，上清を PA-電気泳動したが B-2，B-4 は回復しなかった。

表1　痴呆性疾患における B-2，B-4 の変動

	例数	B-2	B-4
アルツハイマー病	5	↓	↓
老年痴呆	2	↓	↓
脳動脈硬化性痴呆	3	→	↘～↓
クロイツフェルト・ヤコブ病	1	↘	↘
オリーヴ・橋・小脳萎縮症	1	→	↘
痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症	2	→	↘
進行麻痺	1	→	→～↘

↓著明な減少～消失，↘軽度の減少，→不変

3) Colchicine の影響：colchicine は神経細管を構成する tubulin と結合し，subunit 間の結合を切断し tubulin 分子を分散させると考えられている。[4] アルツハイマー病脳ホモジネートに 10^{-3} M colchicine を加え室温で1時間 incubate したのち 100,000×g，30分間遠沈し，上清を PA-電気泳動したが B-2，B-4 は回復しなかった。

4) EDTA，EGTA の影響：tubulin は 10^{-4}～10^{-3} M の Ca^{++}，Mg^{++} で guanine nucleotide を放出し重合，沈澱する。[5] また tubulin 溶液からの microtubule 再構成に際し Ca^{++} は阻害因子となる。[6] アルツハイマー病脳ホモジネートに EDTA 5mM，あるいは EGTA 2mM を加え室温で1時間 incubate したのち 100,000×g，30分間遠沈し，上清を PA-電気泳動した。図2(b)に示す如く B-2 に相当する位置に明瞭な band が得られた。EDTA，EGTA 間には差は認められなかった。

5) 脳組織の Mg，Ca 濃度：アルツハイマー病，脳動脈硬化症，対照の前頭葉皮質で EDTA にキレートされる Mg，Ca 濃度を測定した（表2）。脳動脈硬化症で高い

表2　脳 Mg. Ca 濃度 (mEg/kg 乾燥重量)

	年令	Mg	Ca
対照 1	36	48.0	21.8
対照 2	47	53.4	30.6
対照 3	60	56.0	21.8
アルツハイマー病1	52	36.0	23.8
アルツハイマー病2	55	51.0	24.8
脳動脈硬化症	79	43.2	38.0

Ca値を示し，一例のアルツハイマー病でMg値が低いほかは痴呆例と対照の間に著差はなかった。

6) アルツハイマー病脳ホモジネートの対照脳ホモジネートへの影響：神経原線維変化を生ずる脳組織にはB-2, B-4の重合状態を変化させる要因が存在することが推測される。アルツハイマー病脳ホモジネート3容と対照脳ホモジネート1容を混合し，室温で1時間放置したのち4℃ 100,000×g，1時間遠沈し上清をPA-電気泳動した。図3(b)に示すようにアルツハイマー病脳ホモジネートと混合した対照脳のB-2は明瞭な減少（30～40%）を示す。2例の対照脳ホモジネートを同様に混合したものではこのような変化は認められなかった。またアルツハイマー病脳ホモジネートを4℃, 100,000×g, 30分間遠沈し，水溶性画分と沈渣に分離し，それぞれ別個に対照脳ホモジネートと混合した場合にはB-2の減少はみられなかった。

図2. アルツハイマー病脳に対するEDTAまたはEGTAの影響

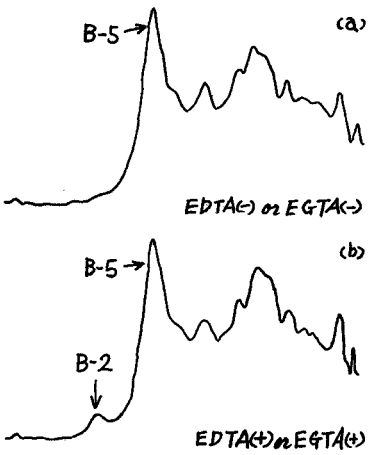
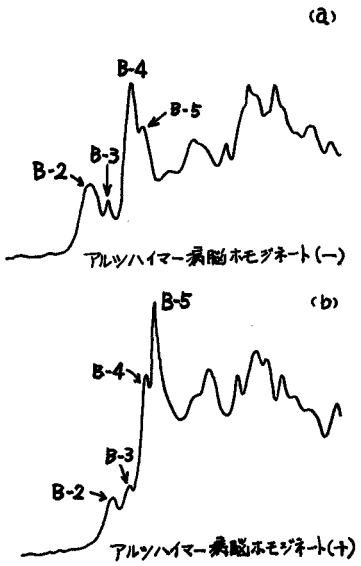


図3. 対照脳ホモジネートに対するアルツハイマー病脳ホモジネートの影響



〔考　察〕

われわれは前報でアルツハイマー病および老年痴呆の脳で認められるB-2, B-4蛋白の変化は形態学的に神経原線維として認められる変化に対応するものと推定した。神経原線維変化が高度に認められる症例にのみB-2, B-4の著しい減少がみられることは，さきの推定を支持するものである。したがって，これまでの成績を合せてみるとB-2, B-4の減少は神経原線維変化と直接関連した所見であり，B-2, B-4蛋白が神経原線維変化の主要構成要素となっていることは確実である。

神経原線維変化は電子顕微鏡では外径22nmで長軸に沿って80nmごとに中10nmにくびれるtwisted tubuleとして認められる。[7] 実験的にアルミニウム塩やvinca alkaloidを脳内に注入すると神経原線維変化に類似の構造が生ずる。この実験的神経原線維変化はいずれも中10nmで，くびれのない構造である。アルミニウム塩によるものは

neurofilament が増生したものとされ，vinca alkaloid によるものは neurotubule の subunit から成るとみなされている。[8] われわれがこれまでに得た成績をあわせて判断すると，アルツハイマー病，老年痴呆で出現する神経原線維変化は単一の subunit の重合によって構成されるのではなく，B-2，B-4 などを主体として複数種の subunit の集合によって構成されると考えられ，そのことが twisted tubule の形成と関係しているのではないかと推測される。また subunit 間の結合は強固な部分と弱い部分から成り，B-2 の一部は二価イオン（恐らくは Ca^{++}）を介して結合しているとみられる。EDTA でキレートされる Ca，Mg 濃度はアルツハイマー病・老年痴呆と対照との間で差を示さなかったが，さらに不溶性画分での測定も必要である。

アルツハイマー病脳ホモジネートにより対照脳ホモジネートの B-2 が減少する現象はアルツハイマー病患者の脳に水溶性蛋白の集合状態を異常に変化させる要因が存在することを示唆する。この現象の発現に溶性画分と不溶性画分の両者を必要とすることは異常な集合を initiate するための seed が必要であるのかも知れない。

（若年性アルツハイマー病の脳剖検材料を御分与下さった国立武蔵療養所，永島節雄先生に感謝します。）

〔文　献〕

1) 播口之朗，西村健，市丸精一，金子仁郎：神経化学，8 Suppl. 9 (1969)

2) 播口之朗，西村健，金子仁郎：神経化学，10，51 (1971)

3) Weisenberg, R.C., Borisy, G.G. & Taylor, E.W.: Biochemistry, 7, 4466 (1968)

4) Wiśniewski, H., Shelanski, M.L. & Terry, R.D.: J. Cell Biol., 38, 224 (1968)

5) Berry, R.W. & Shelanski, M.L.: J. Mol. Biol., 71, 71 (1972)

6) Weisenberg, R.C.: Science, 177, 1107 (1972)

7) Terry, R.D.; J. Neuropath. & Exper. Neurol., 22, 629 (1963)

8) Wiśniewski, H. & Terry, R.D.: in Alzheimer's Disease and Related Conditions. p223, ed. by Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, M., J & A Churchill, London (1970)

35 けい光プローブは興奮膜の何を示すか。
── けい光プローブによる脂質 − たん白質相関の研究──

林　浩平
（群大・医・生化）

〔要　約〕　神経興奮に伴う各種けい光プローブの一過性けい光変化の基盤となっている分子機序を追及する目的で，各種脂質－たん白質複合体および脳ミクロソームによるけい光プローブのけい光変化に及ぼす各種脂質，2価カチオンなどの影響を検討して次の結果を得た．(1) 1-Anilimo naphthalen-8-sulfonate(ANS)のけい光は脂質添加によって増加する．PE, PCのように極性の低い脂質ほど増加は大で，TPI, ガングリオシド(G)のように極性の高い脂質ではけい光増は少ない．(2) 血清アルブミン(BSA)で増加したANSけい光は，TPI, Gの添加で完全に抑制される．(3) Ca^{2+}存在下ではANS-BSAけい光はTPIによって僅かしか抑制されない．TPIにより完全に抑制されたANS-BSAけい光はCa^{2+}添加で著しく増加する．(4) ミクロソーム(mic)-ANSけい光は脂質添加によって変化しないが，ATPにより増強されたmic-ANSけい光はTPI, Gの添加でATPによる増加分だけ抑制される．(5) mic-ANSけい光はCa^{2+}によって増加するが，この場合は脂質によってなお増強される．(6) Tetracycline(TC)けい光はCa^{2+}(Mg^{2+})共存下TPI, Gによって増加するが他の脂質，たん白では増加しない．(7) TPI, Gで増加したTCけい光はBSAによって抑制される．以上の結果から神経興奮時のANS, TCなどの一過性けい光変化にはTPI, Gなどの興奮組織に特徴的に存在する極性の高い脂質とたん白質，2価カチオンの相互関係が重要な因子となっていると考えられる．

ANSは水溶液中では量子収率が低くそのけい光は実際上無視できるが，血清アルブミン，熱変性たん白の添加によってけい光は増加する(Weber et al, 1954)[1]．アルコール中では極性が低いものほどけい光が大きい(Streyer, 1965)[2]．これらのことがらからANSとその関連物質はhydrophabicityの変化を示すindicatorとして，エネルギー共役時のミトコンドリア膜の構造変化(Chance, 1970)[3]，筋sarcoplasmic reticulumのCa^{2+}能動輸送時のけい光変化(Martonosi et al 1971)[4,5]，シナプスその他の膜に広く用いられている．けい光プローブ法は非常に速い一過性の活性変化に伴う構造変化の追及にも用いられる利点をもつ．Tasakiら(1968)[6]は神経の活動電位に一致するANSけい光変化を観察し，興奮に伴う膜構造の一過性変化を推定した．最近はキレートけい光プローブ(2価カチオン存在下でhydrophobicな環境におかれるとけい光増加がある)としてのTCを用いて興奮に伴う構造変化とともにCa^{2+}の蓄積についても報告している[7]．ANSけい光は膜の脂質とたん白質のどちらに由来するかについては異論があり，またTCけい光についての基礎的知見は極めて不十分である．したがって神経その他の膜で観察されたけい光変化が分子又は複合体のどんな変化に対応するかは推測の域をでていない．著者は興奮膜に注目してけい光プローブの変化に対応する分子機序を明らかにする目的で各種脂質，たん白質，カチオンの相互関係とけい光変化の関係を追及した．

実験材料および方法：PC(卵よりPangborn法)以外の脂質は牛脳よりFolchのcephalin溶媒分画で得た各分画を珪酸又はDEAE-cellulose カラムで分画して得た．ガング

Abbreviation: ANS, 1-amilino-8-naphthalensulfonate; TC, tetracycline; PC, PE, PS, phosphatidylcholine, −ethanolamine, −serine; M(D,T)PI, mono-, di-, triphosphoinositide; BSA, bovine serum albumin

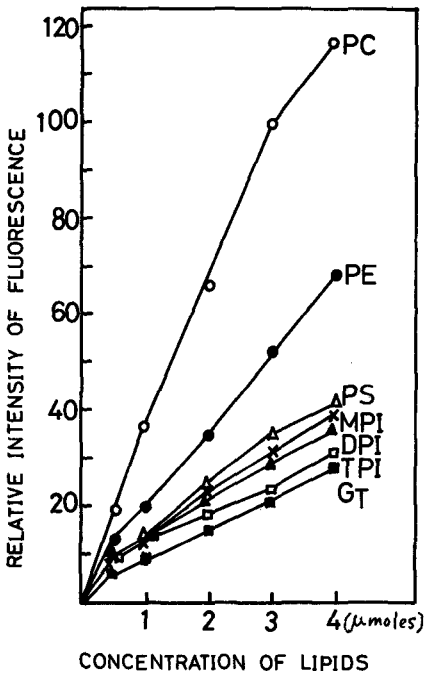


図1. 脂質によるANSけい光の増強. Excitation, 380, Emission 480mμ. GT, trisialoganglioside.

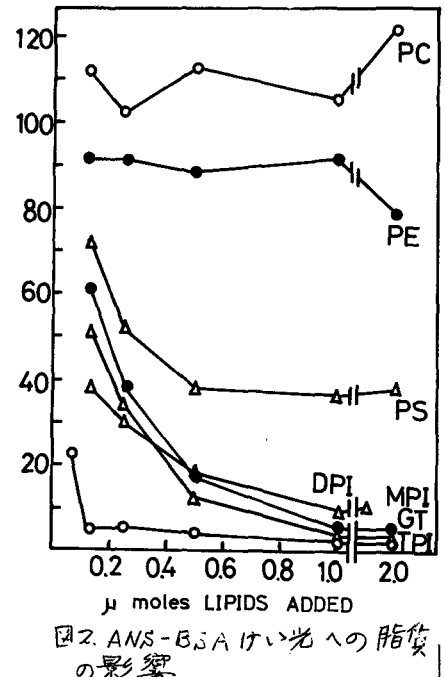


図2. ANS-BSAけい光への脂質の影響.

リオシド(GT, GD)はcephalin抽出残渣より熱C-Mで抽出し，2相溶媒系で分画後，珪酸カラムで分画した．脂質はTLCまたはホルムアルデヒドペーパー上で単一であった．各脂質は5% EDTA pH7.4でhomogenizeし凍結後凍結乾燥したものを水溶液または緩衝液として用いた．

BSAはペンテクス製を用いた．けい光は日立204型で，励起ANS, TCとも380mμ，けい光測定波長はANS 480 mμ, TC 520mμで測定した．

実験結果

ANSけい光への各種脂質の影響.

脂質によるANSけい光増加は，PCで最大，次いでPE, PS, MPI, DPI, TPI, GTの順で，極性が低いほどけい光増加効果が大きい(図1). Excitation maximumはPCの390mμよりTPIの340mμへとけい光減少に伴い移行している．

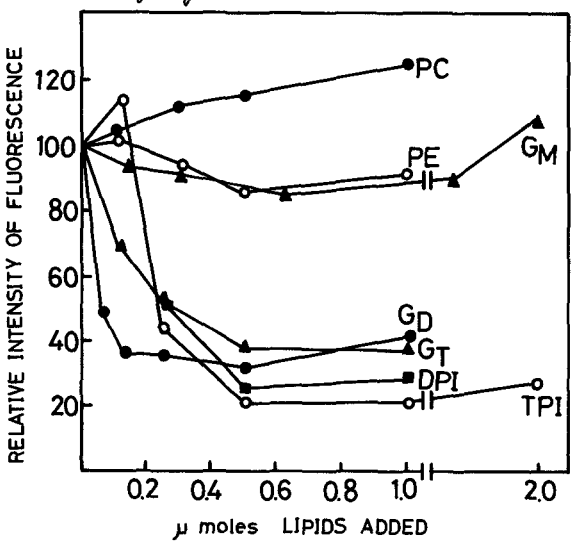


図3. 脳ミクロソーム-ATP-ANSけい光におぼす脂質の影響. ミクロソーム 0.5mg たん白; ATP 0.8μmole; ANS 50μM; GT GMの濃度はNANA; 反応液 4.0ml.

脂質，2価カチオンのBSA-ANSけい光への影響.

BSAによって著しく増強されたANSけい光は，極性の高いGT(trisialoganglioside), TPIによってほぼ完全に抑制されるが，PC, PEによっては抑制を受けない(図2)．比較的高濃度の脂質は図1にみられるようにそれ自身ANSけい光増大効果があるため，脂質によるBSA-ANSけい光抑制は低濃度でのみ観察される．TPI添加によってほぼ

表2. 脳ミクロソーム, $CaCl_2$, ANS けい光に及ぼす脂質の影響.

Lipids	μmole	Fluorescence intensity A	B
—	—	100.0	100.0
TPI	0.25	184.0	—
TPI	0.5	307.1	196.7
TPI	1.0	270.0	—
DPI	0.25	153.6	—
DPI	0.5	364.3	206.7
PC	0.5	153.3	156.7
PS	0.5	106.7	120.7
MPI	0.5	123.3	93.1
GD	0.3	284.4	317.2
GM	0.08	300.0	327.6

A, ミクロソーム, $CaCl_2$, 脂質の順に, B, ミクロソーム, 脂質, $CaCl_2$ の順に混合した. ミクロソーム, 0.5mg たん白相当; $CaCl_2$, 2μmoles; ANS, 50μM. Excitation, 380mμ; Emission, 480 mμ.

表3. TC-Mg(Ca) けい光に及ぼす脂質の影響.

Reagent	Fluorescence intensity
$MgCl_2$	24.9
$MgCl_2$ – PC	28.0
$MgCl_2$ – PE	33.7
$MgCl_2$ – PS	60.0
$MgCl_2$ – DPI	118.4
$MgCl_2$ – TPI	185.2
$MgCl_2$ – GD	75.6
$CaCl_2$	12.5
$CaCl_2$ – PC	15.3
$CaCl_2$ – PE	20.7
$CaCl_2$ – PS	24.4
$CaCl_2$ – DPI	59.8
$CaCl_2$ – TPI	68.5
$CaCl_2$ – GD	134.3

Tris-buffer pH 7.4, 15mM; GD, 1μmol. as NANA; Phospholipids, 1μmole; $MgCl_2$.$CaCl_2$, 4μmoles; TC, 10μmoles

表1. ANS-BSA けい光に及ぼす TPI, $CaCl_2$ の影響.

Reaction mixtures	Fluorescence intensity Excited at 380mμ	290mμ
BSA	100.0	100.0
BSA – $CaCl_2$	105.6	100.3
TPI – $CaCl_2$ – BSA	89.4	89.1
BSA – $CaCl_2$ – TPI	76.2	76.1
BSA – TPI – $CaCl_2$	62.2	60.9
BSA – TPI	1.6	2.1

BSA, 0.8mg; $CaCl_2$, 2μmoles; TPI, 0.5μmole; ANS, 50μM; reaction mixture, 4.0ml.

完全に抑制されたBSA-ANS けい光は(図2, 表1), Ca^{2+} 添加によって増加する. また Ca^{2+} 存在下ではBSA-ANS けい光はTPIによる著明な抑制を受けない.

ANS-脳ミクロソームけい光への脂質, 2価カチオンの影響. 脳ミクロソーム-ANS けい光は, 脂質添加によってほとんど影響されない. ミクロソーム-ANS けい光はATPによって増加することが知られているが, このATPによってけい光が増加した場合は, DPI, TPIおよびガングリオシドの添加によって, ATPによる増加分だけが抑制される(図3). Ca^{2+} 添加によってもミクロソーム-ANS けい光は著しく増加するが, この場合は水溶性複合脂質の添加によってけい光抑制はなく, かえって著しい増大がみられる(表2).

表4. Tetracyline – Mg(Ca) – 水溶性複合脂質に及ぼすアルブミンの影響.

REAGENT	INTENSITY OF FLUORESCENCE
GD – Mg	75.6
Mg – GD – BSA	38.3
BSA – GD – Mg	33.4
BSA* – GD – Mg	26.1
GD – Ca	101.0
Ca – GD – BSA	24.2
BSA – GD – Ca	23.2
BSA* – GD – Ca	14.6
TPI – Mg	175.7
Mg – TPI – BSA	168.8
BSA – TPI – Mg	152.1
BSA* – TPI – Mg	105.6
TPI – Ca	53.5
Ca – TPI – BSA	26.6
BSA – TPI – Ca	42.2
BSA* – TPI – Ca	33.9

TPI, 1μmole; BSA, 1 mg; BSA* 5mg; 他は表3と同じ.

Tetracycline けい光と脂質. ANS水溶液のけい光はBSAの添加によって著しく増加するが, TC水溶液のけい光はCa^{2+}(mg^{2+})存在下でBSAを加えても増加しない. またANSとは逆に極性の高い脂質ーDPI, TPI, G_Dーの添加によってけい光は強くなるが, PC, PEの添加ではけい光の変化はほとんどみられない(表3). またガングリオシドによるTCけい光はCa^{2+}添加で, TPIによるTCけい光はmg^{2+}添加によって著しく増加することと(表3)は, 2価カチオンの選択性と関連して興味がある. TPI, ガングリオシドのような水溶性複合脂質と2価カチオンによって高められたTCけい光はBSAの添加によって減少する(表4).

考察 Tasaki[8]らは興奮伝導に伴い神経膜のanionic siteに結合したCa^{2+}と1価カチオンの交換がおこり, 1価カチオン/2価カチオン比が大きくなり, 次いでmaclomoleculeのconformational changeと透過性の変化がおこることを推定した. この分子変化を追及する手段としてけい光プローブを用いている. ANSはhydrophobic siteへの結合によってけい光増があると考えられることから, 神経ではCa^{2+} rich poorly hydrated state → state with high water contentによってけい光の増→減があると彼らは考えた. TCの場合はinner surfaceに結合したCa^{2+}量のモニターという考え(Halletら, 1973)から, TCけい光は興奮に伴う一過性のCa^{2+}蓄積を示すものとみている. ANSけい光の由来については, 膜の脂質との結合による(Vanderkooiら[4] 1969 Elingら[9], 1971)との考えと, 膜のたん白質と結合する(Wallachら[10], 1970, Hasselbachら[11], 1970)との2説がある. 一般に膜の複合脂質は遊離状態にはなく, リポプロテインとして存在する. しかもPC, PEなどによるANSけい光増加には比較的高濃度を必要とする(図1). このような高濃度の脂質が遊離状態で存在するとは考えられないので, 膜のANSけい光を脂質だけに由来すると考えることはできない. 著者の結果ではTCけい光とCa^{2+}(mg^{2+})濃度の関係は単純ではなく, 膜のTCけい光増大即ちCa^{2+}濃度増加と単純に考えることには危険を伴う. またCa^{2+}(mg^{2+})存在下でTCけい光を増加させるのはTPI, ガングリオシドだけで(表3), 血清アルブミン添加で減少する(表4)こともTCけい光の分子機序を考える場合には無視できない. 著者は興奮性組織に特徴的に存在する水溶性複合脂質ーTPIとガングリオシドーとたん白質の複合体はCa^{2+}の脱着によってその極性を大きく変えること, 比較低濃度のアセチルコリンなどによってCa^{2+}が可逆的に置換されることなどから, これら水溶性複合脂質ーたん白質ーCa^{2+}複合体が興奮膜の活性部分を構成しているという仮説を提出してきた. 脂質, たん白質, Ca^{2+}の相互関係とけい光プローブのけい光変化の関係を追及した結果も, 興奮膜における水溶性複合脂質の重要な役割を示唆している. 上記実験結果は部分的に脂質生化学研究会(1972), 46回生化学会大会(1973)において発表された.

1. Weber, G., Laurence, D.J.R. (1954) Biochem. J. 56, xxxi 2. Streyer, L. (1965) J. Mol. Biol. 13, 482 3. Chance, B. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 560 4. Vanderkooi, J. Martonosi, A. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 133, 153 5. ibid (1971) 144, 99 6. Tasaki, I. Watanabe, A. Sandlin, R. Carnay, L. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 883 7. Hallet, M. Schneider, A.S. Carbone, E (1972) J. Membrane Biol. 10, 31 8. Tasaki, I. (1968) Nerve Excitation: A Macromolecular Approach. C. Thomas, Springfield. 9. Eling, T.E., DiAugustine, R.P. Biochem. J. (1971) 123, 539. 10. Wallach, D.F.H., Ferber, E., Selim, D., Weidekamm, E. (1970) Biochim. Biophys. Acta 203, 67 11. Hasselbach, W. et al (1970) J. Membrane Biol. 2, 341

MEMO

MEMO

MEMO

神経化学　Vol.　12

第 16 回　日本神経化学会抄録集

昭和48年11月30日（金）

12月 1 日（土）

日本電子工学院ホール（東京）