神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第18回 日本神経化学会抄録集

Vol. 14, 1975

日本神経化学会

神経化学

第18回日本神経化学会抄録集

PROCEEDINGS OF THE 18TH ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 東 京

11月13日(木), 11月14日(金), 11月15日(土)

Vol. 14 1975

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1　フェニールケトン尿症に対するインシュリン治療の可能性について…… 1

沖田美佐子・岸川秀実
小林清史・平田潤一郎
長尾堯司・庄盛敏廉
高坂睦年
（岡大・医・脳代謝研）

2　実験的フェニールケトン尿症ラットの脳内モノアミン代謝の研究…… 5

高坂新一・永井克子
川畑寿子・塚田裕三
（慶大・医・生理）

3　胎生期における高フェニールアラニン血症白鼠の脳内物質変化と行動異常について…… 9

辻本美恵子・永吉道子
平野修助
（東邦大・医・2生理）
中井健而
（東邦大・医・総合研）

4　うつ病の動物モデルの生化学的基礎…… 13

高橋良・K. Tachiki
西脇健三郎・仲村永徳
立石紀昭・永山治男
（長崎大・医・精神）

5　ストレスにより生じたラットの長期寡動状態とその脳内モノアミンの動態
－螢光組織化学的検索－…… 17

北山功・鳩谷龍
（三重大・医・精神）

6　ラットの睡眠に関与するトリプトファン代謝…… 21

渋谷治男・融道男
渡部修三・島薗安雄
（東医歯大・医・精神）

7 ラット視床下部各核レベルにおけるcholine acetyltransferaseと
acetylcholinesterase 活性 — その活性分布と情動行動変化にともなう活性の変化 — …… 25
内村英幸・斉藤　雅
平野　誠
（国立肥前療養所）

8 ラット視床下部各核レベルにおける5HT—MAOおよびtyramine—MAO活性 — その活性分布と情動行動変化にともなう活性の変化 — …… 29
平野　誠・斉藤　雅
内村英幸
（国立肥前療養所）

9 ラット脳内モノアミン変動状態におけるリチウムならびにデスメチルイミプラミン投与時の脳内セロトニン代謝および行動変化…… 33
中河原通夫・堀　彰
渡辺明子・仮屋哲彦
（東医歯大・医・精神）

10 L−5HTP，MK 486併用投与時の脳および末梢臓器の5HT濃度…… 37
沼田吉彦・熊代　永
金子元久・高橋志雄
星野仁彦・本多幸作
海野幸浩
（福島医大・精神）
鈴木武彦
（福島医大・薬理）

11 脳内アミンのγ−グルタミル化：ヒスタミンからのγ−グルタミルヒスタミンの生成…… 41
小西博行
（阪大・医・高次研・神経）
柿本泰男
（愛媛大・医・精神）

12 ラット大脳皮質のシナプトゾームによるグルタミン酸のとり込みの特徴：ウァバインの効果…… 45
高垣玄吉郎（都神経研・神経生化）

13 脳のγ－アミノ酪酸の代謝コンパートメントの証明…… 49
小西博行・中嶋照夫
佐野勇
（阪大・医・高次研・神経）
柿本泰男
（愛媛大・医・精神）

14 ウシ脳から精製したカルシウム結合タンパク質の諸性質…… 52
山縣文夫・笠井久隆
奥山典生
（都立大・理・化学）

15 ウシ末梢神経ミエリンの塩基性蛋白の分布と構造上の特徴について…… 56
植村慶一・山中たか子
北村邦男
（埼玉医大・1生理）

16 ラット脳のミエリン分画に存在するprotein kinase, 可溶化とその性質について…… 60
宮本英七・樫葉明
垣内史朗
（大阪府中宮病院）

17 ニューロン，グリアおよび肝細胞分離核のクロマチンDNAの大きさとDNA合成…… 64
井上順雄・加藤尚彦
（東大・医・脳研・生化）
小野哲也・岡田重文
（東大・医・放射線基礎）

18 ラット脳小胞体における膜とリボゾームとの関係…… 68
山上栄・大西博
森浩一・切池信夫
川北幸男
（阪市大・医・神経）

19 マウス脳のrapidly labelled DNA−like RNA
におけるuridylate rich regionの存在…… 72
切池信夫・森　浩一
山上　栄・大西　博
川北幸男
（阪市大・医・神経）

20 コリンアセチルトランスフェラーゼとアセチルコリンエステラーゼ
の酵素的微量測定法…… 76
加藤尚彦
（東大・医・脳研）

21 β−フェニルエチルアミンの新しい螢光測定法とその応用…… 80
鈴木　修・八木國夫
（名大・医・1生化）

22 インドールアミン酸素添加酵素と松果体におけるインドールアミン代謝…… 84
藤原元和・柴田正勝
貫和敏博・平田扶桑生
早石　修
（京大・医・医化）
水野　昇
（京大・医・解剖）

23 牛の松果体およびraphé nucleus regionにおける
tryptophan−5−monooxygenaseの細胞内分布…… 88
堀　真一郎・黒田洋一郎
大谷幸子
（都神経研・神経生化）

24 培養松果体におけるエストラジオールの作用 − RNAポリメラーゼ
活性，HIOMT活性への影響 − …… 92
溝部文夫・黒川正則
（東大・医・脳研）

25 免疫螢光法と活性測定法によるドーパミン－β－水酸化酵素とチロシン
水酸化酵素の軸索流について…… 96
永津郁子・近藤ゆかり
（名古屋保健衛生大・医・解剖）
永津俊治
（愛知学院大・歯・生化）

26 中枢ノルアドレナリンニューロンにおけるカテコールアミン合成酵素
レベルのレセルピンによる増加…… 100
反町勝・奥野幸子
片岡喜由
（愛媛大・医・1生理）

27 ラット青斑核刺激による大脳皮質からの ^{3}H—NAの遊離の証明…… 104
田中千賀子・稲垣千代子
藤原寛
（京大・医・薬理）

28 ネズミ大脳の“plain synaptic vesicle”による
〔^{3}H〕dopamine のとりこみ…… 108
田中亮・浅賀久照
竹田稔
（名市大・医・生化およびRochester大・医・脳研）

29 脳組織のdopamine結合能とadenylate cyclase活性…… 112
御子柴克彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

30 軟体動物巨大神経細胞の膜電位ならびに膜抵抗に対するGABAと
その関連物質の効果…… 116
竹内宏・横井功
森昭胤・高坂睦年
（岡大・医・脳代謝研）

31 動物体内における1－メチルヘプチル－γ－ブロモアセト酢酸の
合成および動向について…… 120
柳沢　勇・山根基輝
（東邦大・医・生化）
鳥居鎮夫・犬伏武生
（東邦大・医・生理）

32 脳のtryptophan－oxalacetate transaminase
の精製，性質および同定…… 124
湊川洋介・野口知雄
城戸　亮
（和医大・病生化）

33 中枢神経系における可溶性アセチル－CoA加水分解酵素の性質について …… 128
松田友宏・米原典史
吉田　博
（阪大・医・1薬理）

34 ビリルビン毒性に関する研究 II. 幼若ラット脳の解糖系におよぼす
影響…… 132
仙波りつ子・丹羽富士子
柏俣重夫
（愛知コロニー・発達障害研・生化）

35 白鼠でのetylnitrosoureaによる実験的gliomaの
物質組成とアミノ酸代謝について…… 136
野田行文・辻本美恵子
平野修助
（東邦大・医・2生理）
中井健而
（東邦大・医・総合研）

36 hydrocortisone投与幼若ラット脳の蛋白代謝の研究 …… 140
野口鉄也・須田治彦
塚田裕三
（慶大・医・生理）

37 マウス脳のカテコールアミン ー 系統による脳内含有量の相違と
痙攣発現機序に関係して …… 144
森　昭胤・平松　緑
小林清史・高坂睦年
（岡大・医・脳代謝研）

38 脳白質ガングリオシド分析法の再検討…… 148
河村成子・武富　保
（信大・医・順応研・生化）

39 スフィンゴリピドβ－ガラクトシダーゼ…… 152
遠藤晴久・飯田静夫
山川民夫
（東大・医・1生化）

40 神経組織の部位別脂質組成について ー 特にα－hydroxy
cerebroside を中心として…… 156
石部　武・山本　章
（阪大・医・2内）

41 髄膜腫の脂質構成について…… 160
久保田　勝・水谷　弘
（都立府中病院・脳外）
宇尾野公義
（都立府中病院・神経内）
武富　保
（信大・医・順応研・生化）

42 ラット小脳のguanylate cyclase の特異性…… 164
中沢欽哉・佐野　護
（愛知コロニー・発達障害研）

43 ラッテ脳におけるguanyl cyclaseの細胞内分布
と活性化について…… 168
天野恵美子・斉藤光生
中根正樹・出口武夫
（都神経研・神経医化）

44 Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性ホスホジエステレースとそのactivator
蛋白の脳における細胞内分布…… 172
上西圀宏・山崎礼子
手島佳子・樫葉明
宮本英七・垣内史朗
（大阪府立中宮病院）

45 牛下垂体cyclic 3',5'－AMP phosphodiesterase Ⅱ：
塩濃度によるassociation と dissociation …… 176
日高弘義・荘加ふみ子
（愛知コロニー・発達障害研・生化）

46 脳細胞膜の脱分極とcyclic AMPの形成Ⅳ：仲介物質に対する
特異的阻害剤…… 180
清水宏俊
（日本ロシュ研）

47 小脳切片におけるcyclic nucleotides の含量増加に
対するcytochalasin B の抑制効果…… 184
斉藤光生・出口武夫
（都神経研・神経医化）

1　フェニールケトン尿症に対するインシュリン治療の可能性について

沖田美佐子・岸川秀実・小林清史
平田潤一郎・長尾堯司・庄盛敏廉
高坂睦年　（岡大・医・脳代謝研）

〔要約〕

私たちはPKU患者に対する治療の試みとしてインシュリン投与を行ない、その結果、血中Pheの低下と尿中フェニール焦性ブドウ酸の減少及び血中カテコールアミンの上昇傾向を認めた。また、同時にみられる殆んどの血中遊離アミノ酸低下に拘らず、反対に上昇するアミノ酸の意義について考え、次に、急性高フェニールアラニン血症ウサギをつくりアミノ酸ならびにカテコールアミン代謝に及ぼすインシュリンの影響を再検討した。インシュリン投与により増加した血中遊離アミノ酸は、Glu, Asp, Arg, His, Pro, Orn, Tau, Met, Trpなどであり、これらアミノ酸の血中増加が脳への取り込みを増し、神経の過興奮に、或は神経伝達物質の合成に少なからぬ影響を与えるものと思われる。

正常ウサギでは、ヒトの場合とほとんど変らなく、インシュリンによって血中Pheをはじめ、ほとんどすべてのアミノ酸は低下する。DL-p-Chlorophenylalanine, L-Pheを投与して、急性高フェニールアラニン血症を起こさせると、Phe, Tyrの著明な増加と、カテコールアミンの低下を起こす。低下したカテコールアミン値は120分後においてもそのままの低値を維持する。この状態のウサギにインシュリンを注射するとPheは低下し、Tyrは増加し、カテコールアミンもまた増加するという結果を得た。さきに、ラットにおいて、ヒトの場合とは一致しない成績を得ていたがウサギを使ったこれらの成績はヒトの場合とよく一致した。　以上の成績からPKUのインシュリン治療に新たな示唆を得たものと考える。

PKU患者にインシュリンを注射すると、血中Pheおよび尿中フェニール焦性ブドウ酸値が低下するとともに、Tyr値が増加する症例のあることや、血中カテコールアミン（CA）値の上昇がみられること[4]から、インシュリンがPKUのPhe以下の代謝障害に対して、何らかの効果を有することが推測された。今回はPKU患者にインシュリン投与を行なった時、正常人では、血中遊離アミノ酸の殆んどが低下するが、PKUではGlu, Aspその他増加するものがあることを新たに知り、その意味について考えてみた。また、ウサギを用いて、実験的に急性高フェニールアラニン血症をつくり、これにインシュリンを注射して、血中遊離アミノ酸及び血中CA値の変動を追求し、特に、Phe, Tyrから、CAへの代謝径に及ぼすインシュリンの効果を再検討した。

方　法

1．PKU患者6例について血中遊離アミノ酸に及ぼすインシュリンの影響を調べた。

インシュリン投与方法は前報で述べたとうりで、投与量は0.2 IU/kg B.W.である。インシュリン投与前と投与後120分の血中遊離アミノ酸を分析、比較した。

2．動物実験

白ウサギ（体重約2.0 kg）を用いて、Edwardsら[1]の報告に基づき、表1に示した方法により急性高フェニールアラニン血症動物を作成した。DL-p-Chlorophenylalanine（DL-p-CPA）（片山化学製）及びL-phe（協和発酵製）はTriton X-100を用いて、0.9% NaCl液に懸濁し腹腔内に投与した。インシュリンは

表1　動物実験計画

Group	Time (h) 0	20	23	24	26
1 Normal / Insulin	—	—	—	採血 Insulin 0.2IU/kg	採血
2 Acute hyperphenylalaninemia	DL-P-CPA 300mg/kg	DL-P-CPA 150mg/kg	L-Phe 1g/kg	採血	採血
3 Acute hyperphenylalaninemia / Insulin	DL-P-CPA 300mg/kg	DL-P-CPA 150mg/kg	L-Phe 1g/kg	採血 Insulin 0.2IU/kg	採血

清水製薬製のインスジリンを用い、0.2 IU/kg B.W を皮下に投与した。採血は1,3群については、インシュリン投与直前と、インシュリン投与 2 時間後に、2群では L-Phe 投与後 1 時間と 3 時間に耳静脈より行なった。ウサギは DL-p-CPA 投与と同時に絶食として、水のみを自由に与えた。

3. 分析方法

血中遊離アミノ酸は、日本電子製 JLC-6AH 型アミノ酸自動分析装置により分析した。DL-p-CPA, L-Phe は分離されず、Phe の値の中およそ 15 % は DL-p-CPA の値である。

CA は河合ら[2]の方法を一部改変して ガスクロマトグラフィー（ECD）により分析した。採血以後の血液の処理はすべて 0°C で、器具はシリコン処理したものを使用した。

結　　果

1. PKU 患者の血中遊離アミノ酸の変化

PKU 患者 6 例のインシュリン投与による血中遊離アミノ酸の変化は図2～7の如く、対照正常人（図1）が Asp を除き一様に低下するのに比べて、Glu, Asp, Asn², Tau, Arg, Trp His, Orn, Pro, Met の増加例がみられた。

2. ウサギの血中遊離アミノ酸の変化

正常ウサギにインシュリンを投与すると、Phe, Tyr, Trp など何れも明らかに低下する（図8の1）。急性高フェニールアラニン血症ウサギは 正常ウサギに比べて、Phe は約40倍, Trp は約30倍に増加、Tyr もやゝ増加し、この値は 120 分後にも維持されている（図8の2）。これにインシュリンを投与すると、Phe, Trp は低下し、Tyr は増加傾向を示す（図8の3）。その他のアミノ酸は、正常ウサギでは、インシュリン投与によって大部分のものが低下し、低下率の大きいものから Trp, Leu, Ile, Gly, Arg の順である。Leu, Ile, Arg の低下率が大きいという点は正常人について得られた結果と同様である。急性高フェニールアラニン血症ウサギでは、インシュリン投与によって Glu, Tau, Asp, Pro, His, Orn が増加するものがあり、これもまた、PKU 患者にインシュリンを注射した場合に見ら

図1. 対照正常人

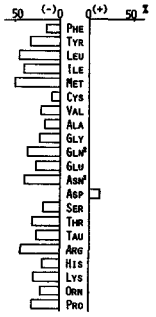


図2. 症例1

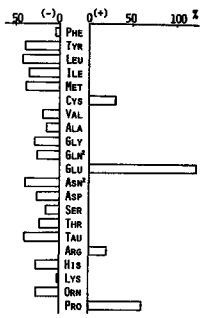


図3. 症例2

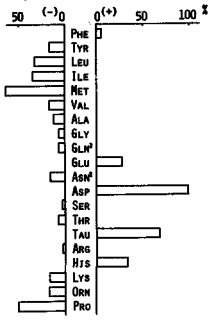


図4. 症例 3

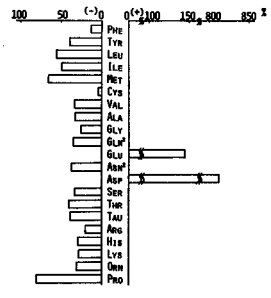


図5 症例 4

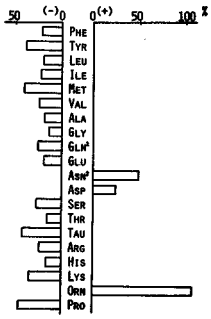


図6. 症例 5

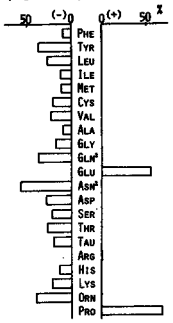


図7 症例 6

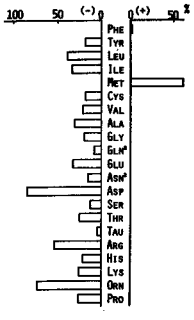
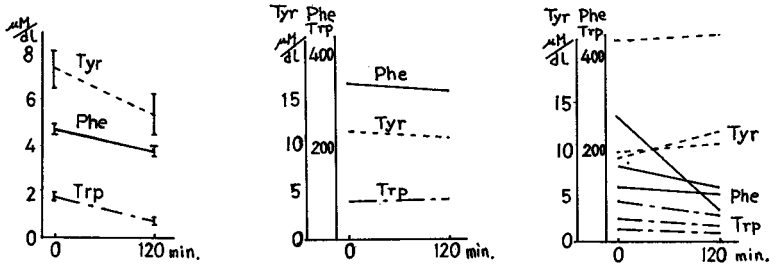


図8. ウサギの血中 Phe. Tyr. Trp 値に及ぼすインシュリンの効果

1. 正常ウサギ＋インシュリン　2 高 Phe 血症ウサギ　3. 高Phe血症ウサギ＋インシュリン



れる結果とよく一致している。

3. ウサギの血中カテコールアミン値の変化

各群の CA, tyramine の測定結果, 正常ウサギでは. インシュリンを注射すると 120分後には注射前に比べて. 血糖, アミノ酸の降下とともに すべて著明な低下を示した (図9)。

急性高フェニールアラニン血症ウサギでは CA や tyramine 値は著しく低下する。そして. 120分の経過の中で、epinephrine (E) のみが わずかに 増加傾向がみられるが、他は Phe 投与60分後も 180分後も変化なく、減少の過程を維持していた (図10)。高フェニールアラニン血症ウサギにインシュリンを注射すると (図 11). dopamine (DA), norepinephrine (NE), E は. 7例中 4例, tyramine は 7例中6例で増加した。この変化は、PKU 患者にインシュリンを投与した時の所見と極めて類似している。

このような、急性高フェニールアラニン血症ウサギにみられる CA, tyramine 値の減少あるいは増加は, アミノ酸の変化と関連するとみられ, インシュリンによって Phe は低下し、Tyr が増加することは確かな事実である。すなわち, インシュリンが Phe → Tyr, Tyr → tyramine, Tyr → DA 間の流れを増加せしめるものであろう。

考　　察

PKU 患者にインシュリンを注射すると、血中 Phe の低下と Tyr の増加を起こすほか、血中 CA や tyramine 値が高くなること, また. 血中 Phe 以外のアミノ酸にも種々の変動をもたらし、正常人では、一般に低下する中で、特に症例によっては, Glu, Asp, Asn², Tau, Arg, His, Orn, Pro, Met, Trp などの増加

図9. 正常ウサギの血中CA, tyramine値に及ぼすインシュリンの効果

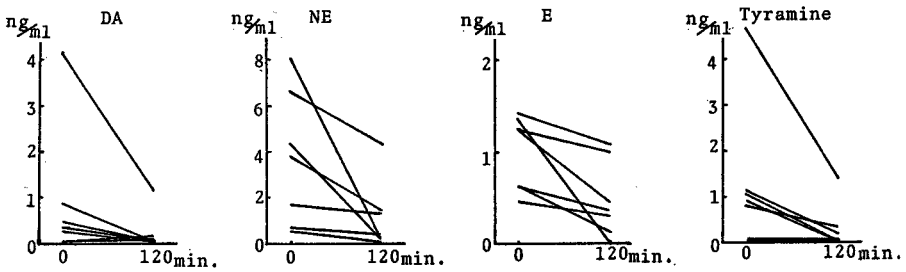


図 10. 急性高フェニールアラニン血症 ウサギの血中CA, tyramine値

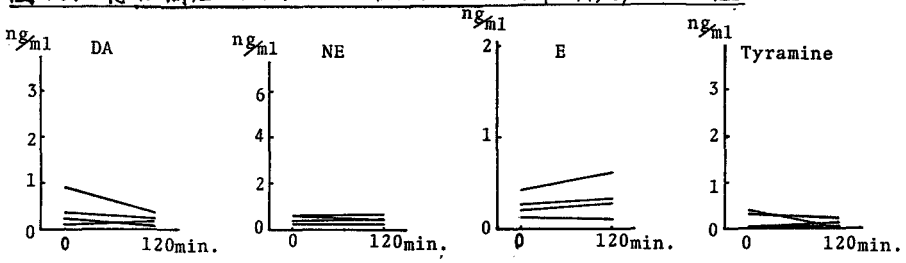
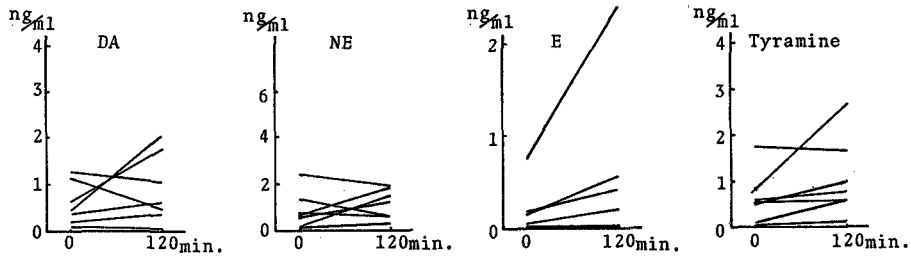


図11. 急性高フェニールアラニン血症ウサギの血中CA, tyramine値に及ぼすインシュリンの効果



を認めた。特に増加するGlu, Trpなど は脳内セロトニンの増加につながり、Tauは脳の異常興奮を抑制する。[3] Argはグルカゴン分泌を高めてインスリン分泌を促進させ、Hisは Histamineの前駆物質であり、MetはNEなどへの -CH3基の供与体となる。インシュリン投与による増加アミノ酸の中で、最も顕著なのはGluであるが、Gluがふえれば Arg, Pro などの増加も予想される。Aspは脳組織の電解質の変化にN-acetylaspartic acidと共に密接な関係をもつアミノ酸とされている。[5] 脳が高フェニールアラニンの状態から解放され、中枢神経系の生理に必要な種々のアミノ酸類のとりこみが高まることは、PKUの脳にとって望ましいことと考えてよい。殊にインシュリン投与によってフェニール焦性ブドウ酸の尿中排泄が減じ、Tyrの増加と、DA以下CA代謝に活性を与えることは、PKUの治療上好ましい現象である。 さきに、ラットによる急性高フェニールアラニン血症を作ってインシュリンに対する反応をみた結果では、ヒトの場合と異なった成績を得たが、今回はウサギを使用して急性高フェニールアラニン血症をつくり、インシュリン投与を行なってみたところ、Pheの減少、Tyrの増加, Glu, Tau, Asp, Hisなどの血中遊離アミノ酸の増加などヒトの場合とほとんど同様の成績を得た。 目下、PKU患者に対してインシュリン投与を行ない、その経過を観察中である。

文 献

1. Edwards D.J. and Blau K. : Biochem. J. 130, 495, (1972)
2. 河合聡, 今井一洋 : 代謝 6, 70 (1969)
3. Mutani R., Bergamini L., Fariello R. and Delsedime M.: Brain Research 70, 170, (1974)
4. 沖田美佐子, 岸川秀実, 小林清史, 庄盛敏麻, 高坂睦年 : 神経化学 13, 33 (1974)
5. Tallan H.H. : J. Biol. Chem. 224, 41, (1957)

2　実験的フェニールケトン尿症ラットの脳内モノアミン代謝の研究

高坂新一・永井克子・川畑寿子
塚田裕三
（慶大・医・生理）

〔要約〕

ラットを生後7%フェニールアラニン添加飼料で飼育することにより実験的フェニールケトン尿症を作製し、その脳内モノアミン代謝について検討するとともに、CNP活性、オペラント弁別学習についても検討を加えた。phe慢性投与群の脳内5-HT, 5-HIAA含量は著明に減少していたが、Dopamine(DA), Norepinephrine(NE)には有意差がなかった。普通飼料で育てた150~200gのラットに2g/kg pheを1回経口投与すると5-HTは2時間後に、5-HIAAは4時間後に最低値を示した。脳内トリプトファン(Tryp)は1時間後に最低となり5-HT減少の1つの原因とみられた。100mg/kg pheを腹腔内投与すると、血中phe、チロジン(Tyr)は増加するが、血中Trypは変化しなかった。脳中phe, Tyrは増加し、脳中Trypは血中pheが最も増加する時期に一致して減少した。慢性投与群でTryptophan hydroxylase活性, MAO活性を測定すると、Tryptophan hydroxylase活性はpku群で低下したがMAO活性には変化がなかった。又Tryptophan hydroxylase活性はin vitroでのphe添加によっても抑制された。これらのことから慢性投与群の5-HT減少は、Trypの脳中へのuptakeの抑制と、Tryptophan hydroxylase活性の抑制によるものと考えられた。CNP活性は50日目では変化なく、4か月目, 8か月目になると対照群より低値を示し脳発育後期のミエリン形成不全が示唆された。大脳あたりのDNA含量には対照群と差が認められなかった。オペラント明度弁別学習により、pku群に学習能力の低下がみられた。

肝中フェニールアラニン水酸化酵素の欠損に起因するフェニールケトン尿症(pku)は高度な精神障害を伴っている。我々は脳の高次機能と脳内物質との関連性を追求する為、サル、ラットに連日フェニールアラニン(phe)を負荷することにより実験的pku動物を作製し、これらの脳内物質変化について検討を加え、脳内のGABA, シスタチオニンが低下することを報告した。[1),(2)] 一方pku患者、実験的pku動物いずれに於いても脳内セロトニン(5-HT)含量が低下している報告がある。[3),(4)] そこで今回はラットで実験的pkuを作製し、脳内モノアミン代謝特に5-HT代謝に着目して生化学的検索を加えた。

〔実験方法〕

1、実験的Pkuラットの作製：Wistar albinoラットを用い出生直後から21日目まで母ラットに3%phe添加飼料（オリエンタル酵母製）を投与し、その後は仔ラットを種々の期間7%phe添加飼料で飼育し各時期で生化学的検索を行ない、4か月目に弁別学習実験に供した。

2、生化学的検索：5-HT, 5-HIAAはFischerらの方法[5]で定量した。Dopamine (DA), Norepinephrine (NE)はTaylorらの方法[6]又はCoxらの方法[7]で分離し、Kariyaらの方法[8]又はChangらの方法[9]で定量した。血中, 脳中の遊離アミノ酸はエタノール除蛋白後フロロホルム処理を行ない、アミノ酸自動分析器(JeL-6AH)で定量した。血中, 脳中のトリプトファン(Tryp)はDenckllaらの方法[10]で、チロジン(Tyr), pheはWongらの方法[11]で個別に定量した。DNAはSchmidt-Thannhauser-Schneider法[12][13]で分離しBurtonの方法[14][15]で発色させた後610mμと650mμの差で比色定量した。CNP活性はKurihara らの方法[16]で測定した。Tryptophan hydroxylase活性は0.1% Triton X-100を含むトリス塩酸bufferでhomogenizeし30,000g遠心後の上清をenzyme sourceとして、Martinらの方法[6]で測

定した。MAO活性はSolomonらの方法[17]で測定した。

3、学習実験：4か月目の雄ラットを用い飼料の投与量を制限して85%まで体重を減少させ、野村らの報告[19]に準じて明度弁別学習を行なった。

〔実験結果及び考察〕

phe慢性投与時の脳内アミン：生後50日目と4か月目のphe慢性投与群の脳内アミン含量を表1に示した。50日目では大脳半球脳幹部の両部位で5-HT, 5-HIAAが著明に減少した。DAは増加の傾向を示すが有意差ではない。NEは対照群と差がなかった。4か月目でも同様に5-HT, 5-HIAAは減少しておりDA, NEには変化はなかった。又50日目の群で脳中、血中のpheを測定してみると、顕著に増加しており明らかに高phe血症となっていた。又Tyrも同様に増加していた。(表2) フェニールピルビン酸の尿中への排泄をフェニケップを用いて調べてみると、phe投与後早期から5mg/dl前後の排泄が認められた。

phe急性投与実験：普通飼料で育てた150~200gの雄ラットに2g/kg pheを急性に1回経口投与した後の脳内アミン含量の経時的変化を検討した。図1に示した如く5-HTは投与後2時間で最低値を示し、その後もとの値に回復した。5-HIAAは4時間後に最低となった。一方DAは24時間にわたって徐々に増加したが、NEは増加の傾向を示したにすぎない。カテコールアミン(CA)の前駆体であるpheやTyrが増加しているにもかかわらず、急性、慢性実験いずれの場合にも脳内CAの増加は極めて軽微であることは、芳香族アミノ酸の異常な脳内蓄積によりCA合成系が抑制されている為かもしれない。

5-HT減少機序：phe投与により5-HT, 5-HIAAが減少するが、脳内5-HT含量は脳内Tryp濃度に依存することが考えられる。そこで2g/kg pheを急性に投与して脳内Trypを測定してみると、投与後1時間で最低値を示し、

表1 AMINE CONTENTS IN RAT BRAIN

(50 days)	CEREBRAL HEMISPHERE		BRAIN STEM	
	control	pku	control	pku
5-HT	0.79±0.03	0.33±0.12	1.04±0.10	0.43±0.16
5-HIAA	0.56±0.05	0.11±0.06	0.88±0.05	0.17±0.08
DA	0.77±0.08	1.28±0.44	1.08±0.13	1.45±0.34
NE	0.27±0.06	0.25±0.07	0.52±0.07	0.52±0.12

mean±S.D. of five samples

(4 months)	CEREBRAL HEMISPHERE		BRAIN STEM	
	control	pku	control	pku
5-HT	0.75±0.04	0.54±0.07	1.12±0.06	0.71±0.12
5-HIAA	0.39±0.03	0.12±0.03	0.67±0.04	0.23±0.04
DA	0.81 (2)	0.86±0.07	1.59 (2)	1.49±0.36
NE	0.30±0.05	0.24±0.06	0.49±0.03	0.51±0.07

mean±S.D. of three samples
μg/g.w.w.

表2 AMINO ACID CONTENTS IN 50 DAYS OLD RATS

	BRAIN (μmole/g.w.w.)		PLASMA (μmole/ml)	
	control	pku	control	pku
Asp	3.41±0.18	1.79±0.31		
Glu	8.82±0.57	6.45±0.43		
Gln	4.32±0.51	2.03±0.70		
GABA	2.53±0.50	1.86±0.35		
Tyr	0.10±0.05	0.67±0.37	0.09±0.02	0.48±0.25
Phe	0.10±0.03	0.73±0.34	0.08±0.03	2.01±1.37

mean±S.D. of four samples

図1 CHANGES OF AMINES AND TRYPTOPHAN IN RAT BRAIN

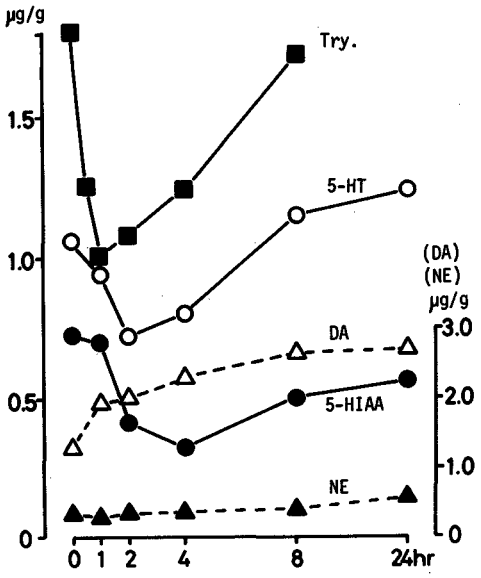


図2 CHANGES OF 5-HT AND AMINO ACIDS IN RAT BRAIN AND PLASMA

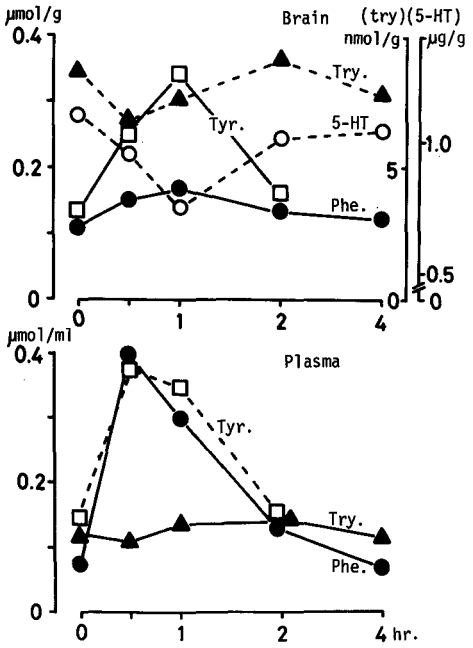


表3	control	pku
Tryptophan hydroxylase	1.49±0.15	1.13±0.15
Monoamine oxidase	68.7±5.6	65.3±4.3
Try.H 5 months	nmol/mg.prot./hour	
MAO 9 months	mean±S.D. of five samples	

表4 DNA CONTENT IN RAT BRAIN

50 days	control	pku
BRAIN WEIGHT (g)	1.39±0.05	1.16±0.04
DNA (mg/brain)	1.08±0.05	1.03±0.02
7 months	control	pku
BRAIN WEIGHT (g)	1.33±0.07	1.21±0.06
DNA (mg/brain)	1.16±0.06	1.13±0.04

mean±S.D. of four samples

8時間後にもとの値に回復した。(図1)即ち、脳内5-HT含量の減少は脳内Trypの減少によることを思わせる。5-HTの減少する今1つの機序には合成酵素であるTryptophan hydroxylase活性の抑制が考えられる為、慢性投与5か月目のPKUラットを用いて脳Tryptophan hydroxylase活性を測定してみると、表3に示す如く対照群の約76%に活性が低下していた。そこで正常の脳phe濃度の約10倍の10^{-3}M pheをin vitroで添加するとTryptophan hydroxylase活性は34%に抑制された。これらのことから慢性投与群の脳内5-HTの減少は基質である脳内Trypの減少に加えて、Tryptophan hydroxylaseのpheによる阻害が原因と考えられた。一方脳MAO活性を測定した結果では PKU群と対照群との間に差異はなく分解系の関与はないものと思われる。(表3)

次に脳内Trypとpheの関係を検討する為に2g/kg pheを経口投与した群で血中Trypを測定してみると、投与後2時間で最低値を示し24時間でもとの値にもどった。そこで100mg/kg pheを腹腔内投与してみると、図2に示した如く、血中phe, Tyrは30分で最高値を示し2時間でもとの値に回復した。しかしこの場合には、血中Trypは変動しなかった。脳内phe, Tyrは血中より遅れて投与後1時間で最高となり、脳内Trypは血中pheが最高となる時期に一致して最低値を示した。一方5-HTは1時間後に最低となり、これは脳中phe, Tyrが最高値を示す時期に一致している。次に1g/kg Tyrを経口投与して血中、脳中のTyrを高くしても脳内Trypには変化がみられなかった。又、200mg/kg Trypを腹腔内投与してみると脳内pheはやや減少した。これらのことから、経口的にpheが与えられると腸管でのTrypのuptakeがpheにより阻害され血中濃度が低下し、又脳内Trypの減少は血中Trypが脳内へuptakeされる際に血中pheによって阻害されるものと考えることが出来る。

脳内CNP活性：PKU患者では病理学的に脱髄像が認められ[19]、又生化学的にもミエリンの脂質構成等に異常が認められている[20]。そこでミエリンに局在することが確められている[15] CNP活性を測定してみた。(表5)対照群の大脳半球、脳幹部での活性が50日目よ

リ4か月目の方が高いことからミエリン形成は50日以降もゆっくり進行しているものと考えられる。一方慢性投与PKUラットでは50日目で対照群との間に差は認められなかったが、4か月目、8か月目になると、いずれの部位でも低値を示し脳発育後期に於けるミエリン形成が抑制されているものと考えられた。

大脳DNA量：慢性投与群の大脳DNAを測定してみると、表4に示す如く50日目、7か月目両群に於いて、脳重は減少しているが、脳あたりのDNA含量には差がなかった。即ち、大脳の細胞数には異常がなく、細胞の分化発育が障害されていることになろう。

明度弁別学習：PKUラットで迷路学習に異常が認められることは既報で平野らが報告しているが[21]、今回はオペラント明度弁別学習を行なった。図3に示した如く、対照群は15 sessionsで学習基準（85%正反応率）に達したが、PKU群は35 sessions後もいまだ学習基準には達せず、弁別学習能力が劣っていると考えられた。

PKUの精神障害の原因には現在多くの仮説が出されている。脳内セロトニン減少説[22]、脳内蛋白合成阻害説[23]、脱髄を含む器質的障害説、pheの異常代謝産物による中毒説等が代表的なものであるが、我々はミエリン形成障害、モノアミン代謝異常に着目して実験的PKU動物の行動異常と、脳内物質変化との関連性を現在更に検討中である。

表5　CNP activity (Unit/mg.prot.)

50 days	control	pku
CEREBRAL HEMISPHERE	2.53 ±0.39	2.63 ±0.14
BRAIN STEM	4.75 ±0.36	4.58 ±0.39
CEREBELLUM	2.99 ±0.11	2.72 ±0.05
MEDULLA	7.06 ±0.56	7.03 ±0.67

mean ±S.D. of three samples

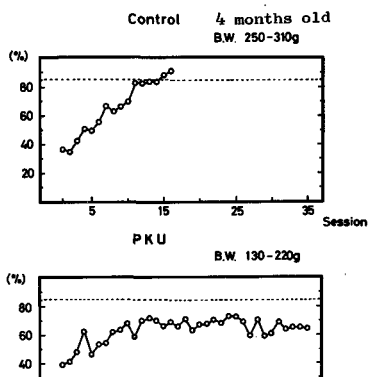
4 months	control	pku
CEREBRAL HEMISPHERE	3.25 ±0.04	2.79 ±0.13
BRAIN STEM	5.33 ±0.03	4.67 ±0.02
CEREBELLUM	3.05 ±0.29	2.78 ±0.19
MEDULLA	7.30 ±0.25	6.65 ±0.02

mean ±S.D. of three samples

8 months	control	pku
CEREBRAL HEMISPHERE	3.16 ±0.10	2.76 ±0.13
BRAIN STEM	5.34 ±0.13	4.26 ±0.43
CEREBELLUM	2.90 ±0.16	2.59 ±0.12
MEDULLA	6.49 ±0.25	5.98 ±0.29

mean ±S.D. of five samples

図3　Correct Response Ratio



【文献】

1. 野口欽也：神経化学 Vol 6(2/4)・131,(1967)
2. 平野降勅，相馬紀夫，中島昌子，松原英乃：神経化学 Vol.6 ・117,(1967)
3. C.A.Mckean : Brain Research 47, 469(1972)
4. Wang,H.L.,Harwalker,V.R. and Waisman,H.A. : Federation Proc. 20, 6,(1961)
5. Fischer,C.A.,Kariya,T. and Aprison,M.H. : Comp.Gen.Pharmac. 1, 61,(1970)
6. K.M.Taylor and R.Laverty : J.Neurochem. 16, 1361,(1969)
7. R.H.Cox,Jr. and J.L.Perhach,Jr. : J.Neurochem. 20, 1777,(1973)
8. T.Kariya and M.H.Aprison : Anal.Biochem. 31, 102,(1969)
9. Chang,C.C. : Int.J.Neuropharmac. 3, 643,(1964)
10. W.D.Denckla and H.K.Dewey : J.Lab.& Clin.Med. 69, 160,(1967)
11. Paul,W.K.Wong, Margaret,E.O'Flynn and Tohru Inouye : Clin.Chem. 10, 1098,(1964)
12. Schmidt,G.L. and Thannhauser,S.J. : J.Biol.Chem. 161, 83,(1945)
13. W.C.Schneider : J.Biol.Chem. 161, 293,(1945)
14. Burton,K. : Biochem.J. 62, 315,(1956)
15. Kurihara,T. and Tsukada,Y. : J.Neurochem. 14, 1167,(1967)
16. E.Martin,Gál and K.Patterson : Anal.Biochem. 52, 625,(1973)
17. Solomon,H.Snyder and Edith,D.Hendley : J.Pharm.and Exp.Ther. 163, 386,(1968)
18. 野村正晃，塚田裕三：神経化学 Vol.12, 24,(1973)
19. Alvord,E.C. et al : J.Neuropath.exp.Neurol. 9, 298,(1950)
20. R.C.Johnson and S.N.Shah : J.Neurochem. 18, 537,(1971)
21. 平野降勅，野口欽也，塚田裕三：神経化学 Vol.3 ・39 (1964)
22. Wooley,D.W. and Van der Hoeven Th. : Science 144, 883,(1964)
23. F.L.Siegel, K.Aoki and R.E.Colwell : J.Neurochem. 18, 537,(1971)

3 胎生期における高フェニールアラニン血症白鼠の脳内物質変化と行動異常について

辻本美恵子・永吉道子・平野修助（東邦大・医・2生理）
中井健而（東邦大・医・総合研）

〔要約〕

フェニールケトン尿症の妊婦が、無治療のまま経過すると、生まれた子供はフェニールアラニン水酸化酵素に異常がないのに拘らず、精神薄弱を残す例は、しばしば報告されているが、胎生期の高フェニールアラニン(Phe)血症が生後の脳組織に如何なる変化を与えているかを物質代謝の面や行動変化の上から明らかにしようと考え、研究を進めた。Wistar系白鼠を用い、妊娠10日目より7% L-Pheを含む固形食で飼育し、出産後の仔鼠8匹を、正常に飼育した出産直後の母鼠に正常母乳で養育させた。同時に摂取量を正常の1/2に制限し、妊娠10日目より飼育を行った低カロリー性の低栄養群白鼠群も実験に用いて次の結果を得た。(1) Phe負荷群、低栄養群共に実験開始と同時に母鼠の体重増加は見られなくなるが、生下時の仔鼠はPhe負荷群のみ正常に比べ体重、脳重量が低値を示していた。(2)脳重量は、Phe負荷群の生後30日及び11ヶ月目で低値を示していた。(3)脳湿重量1g当りのタンパク量及び脂質燐量は、共に実験群で対照と変化はない。(4)高Phe群でDNA、RNAの脳1g当りの濃度に変化は見られないが、生下時の脳外套部では、正常群に比べて低値を示した。(5)明暗弁別による食餌条件反応を用いた学習実験では、低栄養母鼠から生まれた群は、稍々正常群に比べ学習能力が低く、高Phe血症母鼠から生まれた群は、生後6ヶ月目の学習能力も極めて低かった。

胎生期に於ける侵襲は、生後の脳組織の発育に強い障害を及ぼす事が報告されている。胎生期に高フェニールアラニン(Phe)血症が続いた場合にも、その影響が生後に神経機能の遅滞となって現われ、胎生期のアミノ酸代謝異常が脳の発達異常と密接な相関を持つ事が認められる。フェニールケトン尿症の妊婦が、無治療のまま経過して出産した子供は、肝のPhe水解酵素に異常がないに拘らず、精神薄弱を残す例は[1,2]、この事実を示している。

そこで胎生期における高Phe血症が生後の脳組織に如何なる変化を与えているか、物質代謝の面や行動変化の上から明らかにしようと考え、本研究を行った。

〔研究方法〕

[1]実験動物：動物はWistar系の確定妊娠白鼠を用い、膣内に精子の存在を認めた日を0日とし4日目から7% L-Pheを含む固形飼料(オリエンタル酵母製)で飼育を行った。妊娠21日目で出産するが、この場合の仔鼠の生存率は、極めて少なく、生後の変化を追跡する事が難しかった。胎生10日目からの高Phe群の仔鼠は、生存可能であったので(図-1)に示す手順に従って生後の変化を観察した。即ち、出産直後(生後0日目)の実験群の仔鼠を正常の飼料で飼育した出産直後の母鼠に、正常の母乳で養育させたが、その際の仔鼠は、同程度の体重のものを8匹に揃えた。高Phe血症群では、

〔図-1〕 DIAGRAM OF METHOD FOR EXPERIMENTAL GROUPS

EXPERIMENTAL GROUP	GESTATION PERIOD (10 DAYS OF GESTATION —— BIRTH)	TYPE OF OFFSPRING	CROSS-FOSTERING AT BIRTH	POSTNATAL PERIOD NUMBER OF LITTER	POSTNATAL PERIOD FEEDING (TO 21ST DAY)
CONTROL	10g/100g-BODY WT.	C	---------	8	NORMAL DIET (FROM BIRTH)
F-HIGH PHE*	8g/100g-BODY WT. (7g-10g)	P	P — C	8	NORMAL DIET (FROM BIRTH)
F-UNDERFED	5g/100g-BODY WT. (50% RESTRICTED)	U	U — C	8	NORMAL DIET (FROM BIRTH)

* HIGH PHE DIET: RAT DIET SUPPLEMENTED 7% L-PHENYLALANINE

体重減少が著しく認められる為、対照例として低カロリー性の低栄養群白鼠を同時に作製した。この場合は、正常食の摂取量を正常群の1/2に制限し、妊娠10日目から母鼠を飼育し、出産後は、高 Phe 血症群の場合と同様に 8 匹の仔鼠を正常母鼠に飼育させた。

[2]化学定量法： 遊離アミノ酸、脂質燐、RNA 、DNA の抽出は、Schmidt-Thannhauser の方法を Hutchison[3] らによって改良した方法に従い、①遊離アミノ酸の定量は、アミノ酸自動分析器(日立 034 Liquid Chromatograph)で行った。②脂質燐の定量は、Lowry の方法[4]、③ RNA は、オルシノール法で[5]、④ DNA は、Dische[6] 及び Zamenhof[7] の方法、⑤タンパク量は、Lowry[8] らの方法に従い定量した。

[3] CNPase の活性測定方法： Kurihara-Tsukada[9] の方法により、Unit/mg-protein として示した。

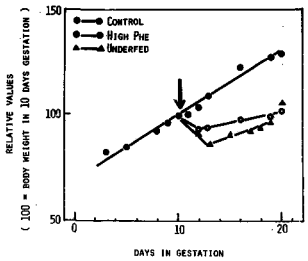
[4]オペラント弁別学習方法[10]： 生後3ヶ月目と6ヶ月目の実験動物を1日23時間絶食させ、Skinner Box において明暗弁別学習を行った。初め Bar を1回押す毎に1個の Pellet food が出るようにし、1日30回の強化を5日間行った後、光を投射時、Bar 押しで餌を与え(S^+)、光を投射しない時の Bar 押しで餌を与えない(S^-)ようにする。各刺激の呈示時間は、20秒間で S^+ 10回、S^- 10回を、Gellerman 系列に従いランダムに呈示した。これを1日1 session とし、80-85% 正反応率連続3日間で完成とした。消去は S^+、S^- のいずれの反応をも強化しない。1 session 10回以下の反応数で消去完成とした。

〔結果及び考察〕

妊娠中に L-Phe を負荷した群では、摂取量が正常群の約 80% で、その体重増加は(図-2)に示した。妊娠10日目を 100 とした相対体重値では、摂取量を 50% に制限した低栄養群と ほぼ同様の経過で、妊娠末期の 20 日目の両群は、共に正常群に比べ、同程度の低値を示した。しかし、生下時の体重及び内臓臓器重量は、Phe 負荷群のみ低い値を示し(表-1)、この体重減少は摂取量の低下だけで、説明が出来ない。

Phe 負荷群の生後の脳重量の変化は(表-2)(表-4) 30 日目、11ヶ月目で共に正常群の 20% 及び 10% 減で、胎生期の侵襲が、脳の発達に影響を与えている事を示した。脳組織の各部の重量低下は、(表-3)(表-4) Cerebrum Cerebellum 共に見られる。 Cerebrum

〔図-2〕 BODY WEIGHT OF PREGNANT RAT UNDER HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION



〔表-1〕 BODY AND TISSUE WEIGHT OF NEW BORN RAT* IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION**

CONDITION \ TISSUE	BODY (G)	WHOLE BRAIN*** (MG)	LIVER (MG)	KIDNEY (MG)
CONTROL	5.52±0.46 (25)	225.1±13.9 (19)	230.2±26.0 (10)	62.2±5.44 (10)
F-HIGH PHE	4.41±0.30 (16)	189.1±10.8 (16)	206.1±23.6 (16)	36.6±6.09 (10)
F-UNDERFED	5.03±0.13 (4)	234.1± 8.17 (4)	210.1±20.3 (4)	66.8±8.08 (4)

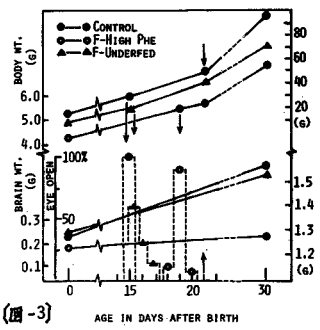
* AT BIRTH
** 50% RESTRICTED OF NORMAL DIET
*** WHOLE BRAIN: BRAIN MANTLE, BRAIN STEM AND CEREBELLUM

〔表-2〕 BODY AND TISSUE WEIGHT OF YOUNG ADULT RAT* IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION

CONDITION \ TISSUE	BODY (G)	WHOLE BRAIN (MG)	LIVER (G)	KIDNEY (MG)
CONTROL	96.7±3.70 (3)	1560.0±1.09 (3)	5.11±0.20 (3)	927.3±43.6 (3)
F-HIGH PHE	55.2±3.76 (3)	1274.8±10.2 (3)	3.17±0.28 (3)	659.2 (2)
F-UNDERFED	74.5±3.74 (3)	1532.9±29.1 (3)	3.69±0.51 (3)	891.2±66.8 (3)

* YOUNG ADULT: 30 DAYS AFTER BIRTH

DEVELOPING CHANGE OF BODY AND BRAIN WEIGHT IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION



〔図-3〕

とは、外套部、大脳核を含めた終脳及び間脳と中脳を云い、更に脳幹、小脳を含めたものを Whole Brain (全脳) と名ずけた。正常群と高Phe群で全脳及び大脳重量は低値を示したが、外套が大脳の中で占める割合は、生下時や11ヶ月目のもので、変化は見られなかった。出生後に見られる Eye-opening の時期は、脳波の出現と一致するといわれるが、開眼の時期を指標として、脳の機能活動の発現時期を観察すると(図3)正常群は、全例で生後15日目に、低栄養群では60%が15日目で、以下3日間に亘り、全例が開眼し、やはり低栄養群で機能発現が遅れると考えられた。Phe負荷群は18日目に20%、19日目に75%で、明らかに機能発現の遅れを認めており胎生期の Phe 負荷は、生後の脳の機能障害の起因となる事を示している。妊娠中の母鼠は、高 Phe 血症の為 Phenyl pyruvic acid (PPA) 或いは、Homogentisic acid の尿中排出が認められるが、出産期には、餌の摂取量が減少する為、尿中 PPA の出現も余り認められない。しかし、生下時の仔鼠の脳組織中の遊離 Tyrosine 量は、対照に比べ8倍、Phe 値も11倍で(表-5)明らかに高 Phe 血症である事が、確かめられた。生下時の脳湿重量1g当りのタンパク量及び脂質燐量には、変化がなかった(表-6)。核酸量は、(表-7)大脳1g当りで、RNA, DNA 共に実験群で変化を認めなかった。しかし、外套部の濃度は、RNA、DNA 共に高 Phe 血症群で低値を示し、生後11ヶ月目の成鼠では、変化が認められなかった。白鼠では、胎生期に神経細胞が増殖し、外套部の細胞構築が起こるといわれるが、過剰の Phe が胎生期の脳の細胞構築を障害し、外套部の DNA 値の低下を引き起こしているとも考えられる。いずれにしても、脳当りの DNA 量は、生下時、30日目で(表-8)

(表-3) WEIGHT OF BRAIN PARTS OF NEW BORN RAT* IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION

CONDITION	CEREBRUM*** WEIGHT (MG)	CEREBRUM*** MANTLE/CEREBRUM (%)	WHOLE BRAIN** (MG)
CONTROL	148.2±9.32(21)	55.9±6.35(14)	225.1±13.9(19)
F-HIGH PHE	117.4±9.88(16)	56.7±6.59(10)	189.1±10.8(16)
F-UNDERFED	150.0±11.4(4)	--------	234.1±8.17(4)

* AT BIRTH
** WHOLE BRAIN: BRAIN MANTLE, BRAIN STEM AND CEREBELLUM
*** TELENCEPHALON AND DIENCEPHALON

(表-4) WEIGHT OF BRAIN PARTS IN ADULT RAT* IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA**

CONDITION (EXP.NO.)	CEREBRUM*** WEIGHT (G)	CEREBRUM*** MANTLE/CEREBRUM (%)	CEREBELLUM (MG)
CONTROL (3)	1.47±0.02	69.8±2.00	443.0±17.3
F-HIGH PHE (3)	1.36±0.03	70.0±3.90	307.7±19.7

* RAT : 11 MONTHS OLD MALE RAT
** HIGH PHE DIET : 10TH GESTATION DAY - BIRTH
*** CEREBRUM : TELENCEPHALON AND DIENCEPHALON

(表-5) TYROSINE AND PHENYLALANINE CONTENT OF NEW BORN RAT BRAIN IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION

CONDITION	EXP.NO.	TYR (μMOL/G-W.W.)	PHE (μMOL/G-W.W.)
CONTROL	3	0.15±0.01	0.11±0.03
F-HIGH PHE	3	1.25±0.43	1.12±0.52
F-UNDERFED	3	0.11±0.01	0.12±0.02

(表-6) PROTEIN AND LIPID-P CONTENT OF NEW BORN RAT CEREBRUM IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA

CONDITION	PROTEIN (MG/G-W.W.)	LIPID-P (MG/G-W.W.)
CONTROL	82.7±5.46 (6)	1.10±0.17 (9)
F-HIGH PHE	80.2±9.86 (11)	1.06±0.10 (4)

EXPERIMENTAL NUMBERS WERE GIVEN IN PARENTHESES.

(表-7) NUCLEIC ACID CONTENT IN CREBRUM OF NEW BORN AND ADULT RAT IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA*

CONDITION		NEW BORN* CEREBRUM	NEW BORN* MANTLE	ADULT** CEREBRUM	ADULT** MANTLE
CONTROL	RNA	2.33±0.26 (11)	2.51±0.33 (11)	0.92±0.03 (3)	1.05±0.05 (3)
	DNA	3.51±0.42 (9)	4.01±0.39 (11)	0.93±0.06 (3)	0.92±0.01 (3)
F-HIGH PHE	RNA	2.26±0.20 (11)	1.78±0.23 (9)	0.90±0.12 (3)	0.95 (2)
	DNA	3.58±0.25 (7)	3.58±0.34# (9)	0.93±0.04 (3)	0.98 (2)

NUMBERS WERE DEMONSTRATED AS MEAN(MG.G-W.W.)±S.D.
* LOADING PERIOD: 10 TH GESTATION DAY — BIRTH
* NEW BORN: AT BIRTH
** ADULT: 11 MONTH AFTER BIRTH
# $P < 0.01$

(表-8) DEVELOPMENTAL CHANGE OF DNA CONTENT OF RAT CEREBRUM IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA AND UNDERNUTRITION

CONDITION	NEW BORN RAT* DNA (MG)	YOUNG ADULT RAT** DNA (MG)
CONTROL	0.52±0.04 (5)	1.14±0.02 (3)
F-HIGH PHE	0.42±0.02 (4)	0.92±0.08 (3)
F-UNDERFED	0.46±0.02 (4)	1.09 (2)

* NEW BORN RAT: AT BIRTH
** YOUNG ADULT RAT: 30 DAYS AFTER BIRTH

共に低値を示す事は、興味が持てる。CNPaseについては、生後11ヶ月目の脳で検討したが、正常群で、3.44±0.14(3例)、高 Phe 血症群で3.37±0.42(3例)で差は見られなかった。

図-4 MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIA / CONTROL GROUP (1)

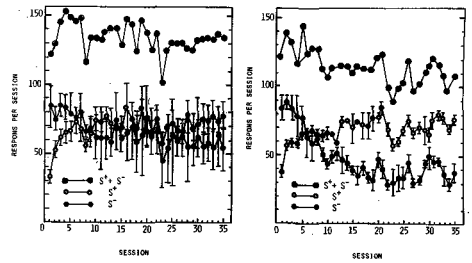
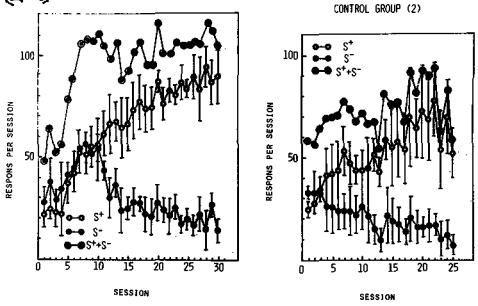


図-5 F-UNDERFED / CONTROL GROUP (2)



行動変化は、低栄養群は生後4ヶ月目のもの、高 Phe 群は生後6ヶ月目のものを用い検索を行った。まず白鼠が夜行性である事を利用し、視神経障害の有無を調べたが、100Luxの卓燈下から1分以内で、全例が暗所に移り、その障害はないと考えられた。次に両群について、明暗弁別による食餌条件反応によるオペラント学習を行った。正誤反応の経過(図-4,5)及び正解率(図-6,7)で見ると、正常に比べ、低栄養群で弁別能力の低下があり、Phe 負荷群では総反応数が多いのに拘らず著しい低下を認めた。その後続いて行った消去の結果(図-8)も同様の傾向であり、特に胎生期における Phe 負荷は、弁別能力の低下を強く引き起こしている事を示していた。

図-6 CORRECT RESPONSE RATIO*

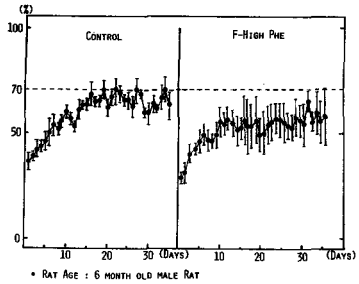


図-7 CORRECT RESPONSE RATIO

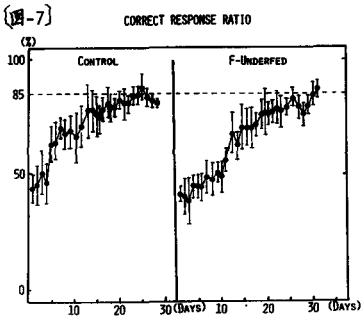
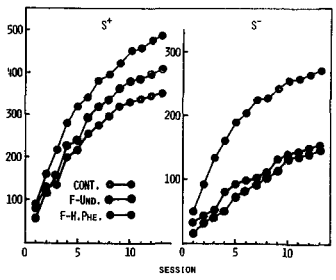


図-8 CUMULATIVE NUMBER IN EXTINCTION



以上の事は、妊娠中期以降の高 Phe 血症でも、脳の機能障害を起こすことを示しており、胎生期の脳への侵襲が、非可逆的な脳障害を、生後に残すことは明らかである。また、ヒトのMarasmusなどで生後の栄養障害よりも胎生期に栄養障害が、見られた場合に強く脳細胞の成長が阻害される報告もあるが、本研究の妊娠中の低カロリー群でやはり、弁別能力の低下があり、脳の細胞形成との関連が重要と考える。

12p314/15

終りに、本研究に御協力を頂いた若林薫研究員に、深謝致します。

〔文献〕

(1) Mabry, C.C., Denniston, J.C., Nelson, T.L. and Son, C.D.:New England J.Med. 269,1404, (1963) (2) L.J. H.Arthur, M.B.M.R.C.P and J.D.Hulme, S.R.D.:Pediatrics 46,235, (1970) (3) Hutchison, W.C. and Munro, H.N.: Analyst 86,178, (1961) (4) Lowry, O.H. et al,:J.biol.Chem., 207,1, (1954) (5) Mejbam,W.,:Z.Physiol.Chem. 258, 117, (1939) (6) Dische,Z.and Schwarz, K.,:Microchim.acta 2,13,(1937) (7) Zamenhof, S., Grauel,L., Marthens, E. and Stillinger, R.A.,: J.Neurochem. 19,61, (1972) (8) Lowry, O.H., Rosenbrough,N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.,:J.biol.Chem. 193, 265, (1951) (9) Kurihara, T. and Tsukada, Y.,: J.Neurochem. 14, 1167, (1967) (10) 野村正彦, 塚田裕三,:神経化学 12, 24, (1973) (11) Fujita, S. :Evolution of forebrain (ed. Hassler, E.R. and Stephan, H.) Thieme, Stuttgart p.180, (1966) (12) Winick, M. and Noble, A.,: J.Nutr. 91, 179, (1967) (15) Winick, M. and Rosso, P.: J.Pediat. 74, 774, (1969)

4　うつ病の動物モデルの生化学的基礎

高橋　良・K.Tachiki・西脇　健三郎
仲村永徳・立石紀昭・永山治男
（長崎大・医・精神）

〔要約〕

うつ病の発生機序を新鮮脳を用いた代謝研究により明らかにすることを目的として、音刺激を条件刺激，tetrabenazine 注射を無条件刺激としてラットに条件づけを行ない、条件反射学的に作成したうつ病のモデル動物を対象とし、l-^{3}H-tryptophan をトレーサーとして用い“うつ病”時のアミン代謝を研究した。その結果、モデルうつ病時には1)血中 total tryptophan がへるがfree tryptophan の割合がふえた。2)肝の tryptophan pyrrolase活性，tyrosine transaminase活性には特に変化はなかった。3)脳の telencephalon，midbrain のtotal tryptophan と[3H]-tryptyphan は著明な増加を示した。4)脳 5-hydroxytryptamine(5HT) は減少を示し、5-hydroxyindoleacetic acid(5HIAA) は増加を示した。5)また^{3}H-5HIAA と 5HIAAの比放射活性が同時に増加を示した。6)脳 dopamine(DA)，norepinephrine(NE)はモデル“うつ病”と関係を示さなかった。なお、非“うつ病”時のモデルラットの生化学的所見は対照ラットの結果と同様であった。

以上の所見からモデルうつ病時には脳へのtryptophan の取込みの増加と脳5HT の合成増加およびその利用促進があり、利用が合成を上廻り脳5HT レベルは低下しているものと思われた。これらからモデルうつ病は脳シナプス間隙における活性 5HT の過剰によるものと推測された。この結論は従来のヒトのうつ病の 5HT 欠乏説に相反するものであるが、最近の臨床生化学的所見と一致する点が少なくないことを述べた。

従来のうつ病研究の諸成果からうつ病の原因は脳幹の機能失調、特にモノアミン低下にあるとの見解が一般的となった。しかし直接的な所見としては自殺者の脳アミン量の報告が4篇あるのみで、最近は髄液内アミン代謝物の測定結果がアミン仮説を支持する間接的証拠として報告されている(19)。そこでアミン仮説を直接的に検証し更にその化学的発生機序を明らかにするにはどうしても新鮮脳を用いた代謝研究が必要となる。特にうつ病の多くはストレスによって誘発されるので、最終的にはストレス要因が脳のアミン代謝を変化させる機序を明らかにすることが重要であろう。これらの研究のためにはうつ病の動物モデルの作成が必要となるが、今日まで報告された動物モデルは動物界にもうつ病様の状態が存在することを強く示唆するものではあるが、上述の研究目的には不十分であった。厳密に統制された実験条件下で、客観化された指標をもとに定量可能な方法で安価に作成されるモデルが求められる。また急性薬物モデルは薬物の直接作用のため本来のうつ病の病理から遠ざかる。そこで我々は実験心理学的方法によりうつ病の動物モデルを作成することに成功し(16)、これを用いて上述の研究を行ないつつある。この方法は人間にうつ病を惹起しうる tetrabenazine(TBZ) を無条件刺激，音刺激を条件刺激としてラットに自発運動量を指標に条件づけを行なう方法である。これにより一定回数強化後条件刺激のみで一定時間続く行動静止が出現し、抗うつ剤の前処置でこの行動静止は抑制される。このモデルうつ病の作成率は訓練ラットの約43%に相当する。我々は昨年本学会で無条件刺激であるTBZ の作用機序について報告し、TBZ による行動鎮静作用は脳内5HT レベルの低下にもかかわらずシナプス間隙への 5HT の放出増加によるものと推測した。今回は当初の目的である音刺激に

より誘発されるモデルうつ病の脳アミン代謝の研究結果を予報として報告する。

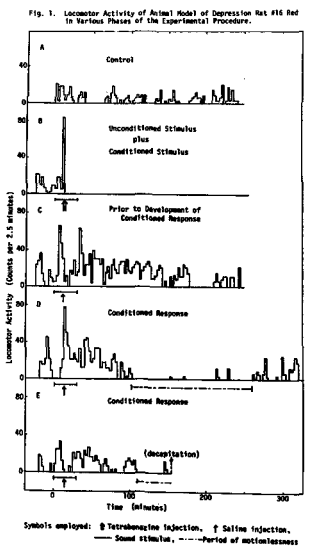
——方　法——

動物: 300g 乃至 450g の SD系雄ラットを用い実験に使用前3週間以上、照明(暗期: 0730 から 1930, 明期: 1930 から 0730) と室温(24°±1°C)を統制した条件下で飼育した。詳細は既報(16)参照。

行動測定: 動物の行動測定法は赤外線法によった。モデルうつ病作成の詳細は既報(16)にゆずるが、条件強化は週5日行ない音刺激は30分与え、音開始10分後に30mg/kgのTBZ溶液を腹腔内に注射した。テストには音刺激と等量の生食水注射を行なった。条件強化約13～30回で条件反射性のモデルうつ病が形成された。生化学的研究のための断頭の当日、ラットをAM 0745に測定箱に入れ20分順応させたのち音刺激を与えた。音刺激開始10分後にpulse dose のL-[^{3}H]-tyrptophan (Sp.Act. = 1.0 Ci/mmol; 50 μCi/Kg body wt.)を含む生食水を腹腔内に注射した。行動静止が明らかに確認されたのちラットを断頭した。しかしうつ病ラット1匹は条件反射は確立しテストのたびに行動静止を示したが、断頭前のテストに際し同位元素を扱うための情況変化による外制止のため行動静止を示さなかった。そこでこれはうつ病ラットの非反応期として断頭し研究した。通常の対照として条件づけを行なわないラットに放射性tryptophan(tryp.)を含む生食水を注射し、うつ病ラットと同じ時間に断頭した。この対照ラットの行動はAnimex DS で測定したが、行動量の減少はみられなかった。

生化学的測定: 断頭後直ちに全脳と肝を摘出しdry iceで凍結した。脳組織の5HT, DA, NE, 5HIAA量は前報(18)のカラムクロマト法で分離、測定した。脳組織のtryp. はDenckla & Dewey法(10)で測定、断頭時の血液から得た血漿の一部をAmicon Centrifulo membrane cones(CF 50A)で分画し、free tryp. 量を測定し(12)、残りの血漿からtotal tryp.(12)、tyrosine (tyr.)(21)を測定した。各サンプルの放射活性は液体シンチレーションカウンター(Pacard 3385)で測定した。

——結果と考察——



モデルうつ病ラット: Fig.1 にモデルうつ病ラット(#16 red)の条件反射形成の各段階を示したが、1Aは条件づけ前のラットの行動量、1BはTBZ 30mg/Kg 注射後にみられる行動静止を示す。1Cは TBZ を用いた強化7回後のテスト結果であるが、未だ条件反射は形成されていない。1Dは27回強化後の条件反射性行動静止を示している。1Eは生化学実験当日の断頭時までの条件反応を示すが、このうつ病ラットは音刺激開始後155分に断頭した。Fig.2は第2のうつ病ラット(#23, blue)の所見であるが、2Cと2Dの結果からわかるように断頭日に行動静止が起らなかった。

しかし条件刺激開始後250分に断頭した。この第1第2のうつ病ラットはほぼ同数の条件強化(37回と35回)を受け、最後のTBZ注射後45時間目に断頭された。(TBZは注射後8時間で体内から消失する。)

血漿中のアミン前駆物質: 対照ラットを含めこれらのラットの血中のtotal [^{3}H], tryp., free tryp., tyrの濃度はTable 1 に

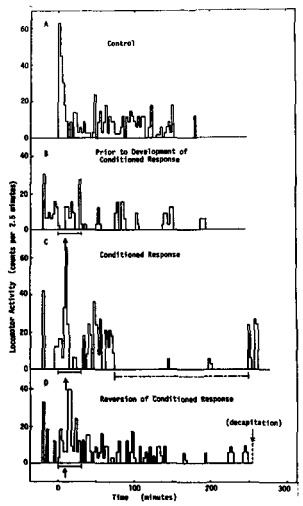


Fig. 2 Locomotor Activity of Animal Model of Depression Rat #23 Blue.

See Fig. 1 for details concerning the figure legends.

示した。各値は単独ラットからえられたものなので明瞭な差異のみについて述べるが、うつ病ラットでは [3H] と % free tryp.の著明な増加と free trypの軽度の増加がみられると共に total tryp. が対照値の半分に低下しているのがみられる。この % free tryp.の高値は大部分 total tryp.の低下によるものと思われるが、脳への tryp. の取込み、従って脳5HT

Table 1

Total [^{3}H], Tryptophan and Tyrosine of the Blood Plasma

Animal	Total [^{3}H]	Total Try	Free Try	% Free	Tyrosine
	(DPM/ml) x 10^{-5}	(μg/ml)	(μg/ml)	(%)	(μg/ml)
Control	9.62	20.6	2.21	10.7	12.0
Model Depression (Reversion)	15.6	25.8	- *	- *	12.2
Control	9.89	23.6	4.57	19.4	14.5
Model Depression	31.6	13.6	5.08	37.4	13.6

Rats were injected i.p. with a dose of 50 μCi/g body wt. of [^{3}H]L-Tryptophan.

* Due to lack of insufficient amount of sample, the free tryptophan value could not be determined.

合成に直接的役割を果す free tryp.の割合が2倍に増加していることは注目に値する。なお血中 [3H] のすべてがtryp.に関係しているか否かは現在明らかではないが、一部はtryp. metabolite と関連しているかもしれない。Tyr.レベルには大きな差はみられなかった。

肝酵素活性：末梢においてtyr.とtryp.の代謝に関係する酵素は tyr. transaminase と tryp. pyrrolase であるが、脳に取込まれるこれらアミン前駆物の量は夫々の酵素活性に影響されるので、肝におけるこれらの酵素活性値は注目に値する。結果をTable 2 に示したが、うつ病ラットと対照ラットの間で tyr. transaminase活性には大きな差はなかった。一方tryp.pyrrolaseは行動静止を生じなかったうつ病ラットで上昇傾向があったが、その他では大きな差はなかった。従って上述のうつ病ラットにみられた血中 free tryp.の増加と total tryp.の減少は末梢での代謝によるのでなく、5HT合

Table 2

Enzymatic Activities of Tyrosine Transaminase and Tryptophan Pyrrolase of Rat Liver

Animal	Tyrosine* Transaminase	Tryptophan‡ Pyrrolase
Control	4.5	1.6
Model Depression (Reversion)	5.4	2.6
Control	5.7	1.8
Model Depression	4.9	1.4

Enzymatic activities are given as follows:
Tyrosine Transaminase: umol/mon./g Tissue wt.
Tryptophan Pyrrolase: umol/hr./g Tissue wt.

* Diamondstone (1966)[11]

‡ Knox et al (1970)[15]

成のための脳へのtryp.の取込みと利用の増加に関連するのかもしれない。

脳 tryptophan と5HT代謝：以上の推測はTable 3に示した所見からも支持される。ここでも統計処理は行なわないがうつ病ラットの終脳と間脳・中脳(midbrain)の total tryp レベルは対照ラットのいずれの値より遙かに高い値を示している。このtrypの高値が脳への取込みの増加に

Table 3

Contents of 5-Hydroxytryptamine, 5-Hydroxyindoleacetic Acid, Tryptophan and Radioactivity of Samples from Brain Areas of the Rat

Brain Area	Animal	5-HT Content	5-HT [^{3}H]	5-HT Specific Activity	5-HIAA Content	5-HIAA [^{3}H]	5-HIAA Specific Activity	Tryptophan Content	Tryptophan [^{3}H]*
		(nmol/g)	(DPM/g)	(DPM/nmol)	(nmol/g)	(DPM/g)	(DPM/nmol)	(nmol/g)	(DPM/g)
Telencephalon	Control	2.21	347	157	2.39	2,850	1,190	32.5	23,900
	Model Depression (Reversion)	2.57	1,132	440	1.91	3,500	1,830	28.4	40,400
	Control	2.68	934	349	2.23	4,790	2,150	29.8	53,100
	Model Depression	1.92	854	445	3.42	17,700	5,180	47.6	180,000
Mid Brain	Control	4.32	555	128	4.06	3,580	880	28.8	28,200
	Model Depression (Reversion)	4.09	833	204	5.74	5,170	900	26.0	36,500
	Control	3.41	1,400	411	4.32	6,340	1,470	25.0	52,000
	Model Depression	2.81	992	353	7.30	19,800	2,720	52.1	245,000

* Radioactivity in the tryptophan fraction which contains in addition to amino acids, neutral compounds (e.g. alcohols, aldehydes).

よるらしいことはうつ病ラットの脳組織における^{3}H-trypの高値によっても裏づけられる。ここで、脳trypの高値は脳5HTのレベルの増加をもたらす筈である。しかしTable 3にみる如く、うつ病ラットの終脳の1.92nmol/gの値もmidbrainの2.81nmol/gの値もいずれの対照ラットの値よりも低い。この結果は5HTの合成を上廻る利用の亢進によるものとして説明できるであろう。即ちけいれん時の脳Achの動態に似ている。この解釈はまた5HIAAの所見によっても支持される。Table 3に示す如くうつ病ラットでは終脳midbrainの5HIAA量が極めて高く、5HTの代謝回転の増加が起っていることが明らかである。更にこのことはうつ病ラットの終脳, midbrainの^{3}H-5HIAAの高値と5HIAAの比放射活性の高値によっても裏づけられる。また5HIAAの比放射活性がすべての場合5HTのそれより大きい値をもっていることは新しく合成された5HTが最初に放出されることを示している。なお、行動静止を生じなかったうつ病ラットの生化学的所見が対照ラットの結果と類似している事実は条件反射性うつ病の無発現が生化学的所見に反映されていることを意味し極めて興味深い。このことはTBZの慢性投与自体は脳アミンに有意の影響を与えないという既報の結果(20)と一致している。次にDA, NEの測定結果は行動静止とこれらアミンとの間に関係のないことを示した。

さてモデルうつ病ラットの条件刺激後の行動静止時の姿勢はTBZ注射後のものと同様である。しかしうつ病ラットの行動静止はTBZ後のものと異なりimipramineによって阻止され、このことが人のうつ病との類似性を示している。以上の生化学的研究結果は"うつ病"時と非"うつ病"時及び夫々の対照のラットからえた単独データーであり、勿論まだ不十分な数である。しかし多面的な分析と結果の内的一貫性, 全結果がでるまでの各分析担当者の独立性保持, およびえられた生化学的所見とTBZ急性実験結果との類似性などからみて、研究結果の信頼性は十分高いものと思われる。そしてうつ病ラットからえられた所見のすべては、モデルうつ病が脳内の機能的5HTの過剰によるとの仮説をつよく支持するものであった。勿論この結論は従来のうつ病のアミン欠乏説に全く相反するものである。しかしこの活性5HT過剰説はうつ病の病因に関する最近の臨床生化学的所見と一致する面が少なくない。例えば(1) Parachlorophenylalanineの投与は正常人の尿又は髄液中の5HIAAを80%も減少させてもうつ病を惹起しない(5, 9, 13)。(2) trypの抗うつ効果の主張は再現性がなく(6), 最近trypは鎮静又は抗躁効果があると主張された(17)。(3) Probenecid後の髄液5HIAA蓄積率は未治療うつ病者において、抗うつ剤治療中の病者より高い(1, 3, 14)。(4) 5HTレセプター阻害剤methysergideは躁病の症状を悪化させること(7)などである。また動物実験でimipramineの長期投与は脳5HT合成に阻害効果をもつことが報告されている(2, 4, 8)。現在我々はうつ病ラットの例数をますと共に音刺激からうつ病が発生するまでの潜伏期における脳5HT代謝及びこれに対する治療薬の影響などを研究しつつある。

文献

(1) Asberg, M., Bertilsson, L. et al Clin. Pharmacol Therap. 14, 277(1973). (2) Alpers, H.S. and Himwich, H.E., J. Pharmacol. Exp. Therap. 180, 531(1972). (3) Bowers, M.B.Jr., Psychopharmacol. 23, 26(1972). (4) Bruinvels, J., Eur. J. Pharmacol. 20, 231(1972). (5) Carpenter, W.T., Ann. Internal. Med. 73, 609(1970). (6) Carrol, B.J., in Depressive Illness ed. Davis, B.M. et al, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 226(1972). (7) Coppen, A., Prange, A.J.Jr. et al, Lancet II, 338(1969). (8) Corrodi, H. and Fuxe, K., Eur. J. Pharmacol. 7, 56(1969). (9) Cremota, V.Y.Jr. and Koc, B.K., Clin. Pharmacol. Therap. 7, 768(1966). (10) Denckla, W.D. and Dewey, H.K., J. Lab. Clin. Med. 69, 160(1967). (11) Diamondstone, T.I., Anal. Biochem. 16, 395(1966). (12) Duggan, D.E. and Udenfriend, S., J. Biol. Chem. 223, 318(1956). (13) Engelman, K., Lovenberg, W. and Sjoerdsma, A., New Eng. J. Med. 277, 1103(1967). (14) Goodwin, F.K. and Post, R.M., Adv. Biochem. Psychopharmacol. 11, 341(1974). (15) Knox, W.E., Yip, A. and Reshef, L., Method Enzymol. Vol. 17A, 415(1970). (16) 永山治男, 木戸湾彦, 森田武東, 高橋良, 精神医学 16, 863(1974). (17) Prange, A.J.Jr., Wilson, I.C. et al, Arch. Gen. Psychiat. 30, 56(1974). (18) Tachiki, K., 高城昭紀, 立石紀昭, 高橋良, 神経化学 13, 29(1974). (19) 高橋良, 臨床化学 4 (1975)印刷中. (20) 立石紀昭, Tachiki, K. et al, 精神薬療基金研究報告 6, 83(1974). (21) Waalkes, T.P. and Udenfriend, S., J. Lab. Blin. Med. 50, 733(1957).

5 ストレスにより生じたラットの長期寡動状態とその脳内モノアミンの動態
—螢光組織化学的検索—

北山　功・鳩谷　龍
（三重大・医・精神）

〔要約〕

発情周期に一致した規則的な自発活動の律動周期を示す成熟雌ラットをストレス下に置くことにより、数週間以上に亘る自発活動の周期性の消失と持続的な活動水準の低下状態を作ることに成功した。このようなストレスにより引き起こされた長期間に亘るホルモン依存性の生体リズムの消失と持続的な寡動状態を、一応人間のうつ状態に類似の状態と仮定し、その脳内アミンの動態を螢光組織化学法により検討した結果、次の如き所見が得られた。

1）延髄と橋のNA細胞群（A1、A2、A5、A7）および青斑核（A6）主要部でカテコールアミンの螢光強度が著明に増強した。

2）隆起漏斗路のDA神経終末（中央隆起外層）の螢光強度は減少した。

同様の所見はストレス直後の動物でも見られる点から、この様な長期寡動動物に於いては、ストレス直後の脳内アミンの変化が修復されないまゝ持続していることを物語っており、行動変化と脳内アミンの変動との関連に於いて興味ある所見であると同時にうつ病の病態発生に関しても示唆的である。

うつ病の本質は生命的力の減退であり、一般にその発病時状況を見ると、前段階として心身の過労に基づく疲弊や生体リズムの変調が先駆している場合が多い。成熟雌ラットには、発情周期と一致して規則的に出現する自発活動の周期的律動が見られることが知られている。[11] もしこのようなラットをストレス状態に曝すことにより、この性周期と結びついた自発活動の周期性の消失と持続的寡動状態を作ることが出来れば、人間のうつ状態にかなり類似したものと考えられ、その脳内アミンの動態[10][12]を検討することはうつ病の生物学的基盤の解明への端緒を得る可能性があると思われる。

〔実験方法〕

（1）規則的周期活動ラットの選択 —— 室温20±2°C・自然光の入る部屋に据えられた自由回転ケージ（ドラムの直径30.5 cm）の中でウイスター系成熟雌ラットを飼育し、毎日午前10時にラットの走行によるドラムの回転数を記録した。あるラットについては、同時に膣粘膜の角化状況、体重、直腸温、餌・水の摂取量、音刺激による10秒間の回転数も記録した。これらの中から、性周期に一致した規則的な自発走行活動を示すラットを選択した。

（2）"うつ病モデル"ラットの作製 ——（1）で選択したラットを強制回転機（ドラムの直径30.5 cm、5回転／分）に入れ、昼夜連続で強制走行ストレスを加えた。餌と水は回転中も摂取できるように工夫した。疲労が高度になると体温下降が始まるが、直腸温が33°C以下になった時初めて24時間の休息を与えた。この強制走行と休息の組み合せを3回繰り返した後に、再び元の自由回転ケージに戻した。ストレス前と同様に毎日の回転数を記録し、走行周期の消失と活動水準の低下が数週に亘って持続し

たものを〝うつ病モデル〟ラットとした。

（3）脳内モノアミンの検索

（a）螢光組織化学法——検索時ラットが23～25週令になるように実験の系を組み、午前10～11時に断頭し、Falck, Hillarp等の螢光組織化学法[4]の変法[14]により脳組織切片（横断、厚さ7μ）を作製し、主要神経路[15]を代表する12箇所の細胞群[16]と神経終末[17]の顕鏡及び写真撮影を行った。

（b）螢光顕微分光的解析——（a）に用いた切片に隣接する組織切片をニコン製螢光顕微分光光度計SPM-Flにかけ、アミンの螢光強度を半定量的に比較検討した。この際Lichtensteigerの方法[9]に従って、2.78×10^{-4}MのNAを含んだ2%ゼラチン・スタンダードを作り、このNA螢光強度に対する百分率として次の計算式により相対的螢光強度（Ir）を算出した。

$$Ir = \frac{c_{(4)} - t_{(2)}}{G_{NA(16)} - Gf_{(3)}} \times 100$$

c：脳組織内モノアミン、ニューロンの絶対的螢光強度

t：同一切片内のモノアミン、ニューロン近傍の非特異的背景の螢光強度

GNA：NAを含んだスタンダードの絶対的螢光強度

Gf：NAを含まないスタンダードの絶対的螢光強度

測光面積は7.5×7.5μで、（ ）内の数字は測光箇所を表わす。

〔実験結果及び考察〕

先ず、正常ラットの脳内各部位のモノアミンの性周期内変動を螢光顕微分光光度計を用いて検索し、Table 1の結果を得た。視床下部（A12、PVP）と中央隆起（ME）で30～50%の動きが見られたが、他の部位では大きな変動がなく、しかもdiestrous day 第1日目のラットについて見ると、延髄と橋に属するA1、A2、A5、A7で螢光強度が他の時期より強く、ME外層では逆に最も弱いことが判った。このことから、モデル動物のモノアミンの比較には、diestrous day 第1日目のラットをコントロールとして選んだ。

Table 1

RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITY OF REGIONAL BRAIN MONOAMINES IN NORMAL RATS DURING ESTROUS CYCLE

neuron systems	cell bodies and terminals	diestrous day 1	diestrous day 2	proestrous day	estrous day
ascending NA systems	A1	108	86	101	103
	A2	125	118	98	107
	A5	137	137	136	108
	A6	213	232	234	266
	A7	219	236	171	152
	PVP	113	147	120	170
	int. ME	46	41	51	67
nigro-striatal DA system	A9	126	127	118	124
	CPU	69	84	73	73
tubero-infundibular DA system	A12	71	71	74	96
	ext. ME	93	102	100	132

Relative fluorescence intensity was represented as a percentage of the noradrenaline standard.

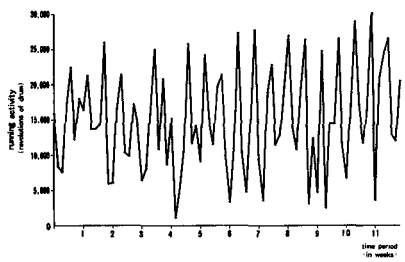
nomenclature for mammalian containing cell bodies and nerve terminals (by Swedish school)

A1: soc. reticularis lateralis
A2: ventrolateral part of soc. solitarius
A5: tractus rubro-spinalis
A6: locus coeruleus
A7: soc. subcoeruleus
PVP: soc. paraventricularis
int. ME: internal layer of median eminence
A9: substantia nigra soma compacta
CPU: soc. caudatus putamen
A12: soc. arcuatus
ext. ME: external layer of median eminence

正常な成熟雌ラットはFig.1のような4～5日毎の発情期に一致した走行活動のピークを示す自発活動の規則的な周期性が見られる。このようなラットに〔実験方法〕（2）の方法でストレスを加えると、その影響は次の3群に分けることができた。

1）ストレス後しばらくは自発活動とその周期性も消失するが、第2週目頃から次第に回復して、5～6週後にはほぼストレス

Fig.1 TYPICAL RECORD OF DAILY SPONTANEOUS RUNNING ACTIVITY OF NORMAL FEMALE RAT



EFFECT OF FORCED RUNNING STRESS ON SPONTANEOUS RUNNING ACTIVITY

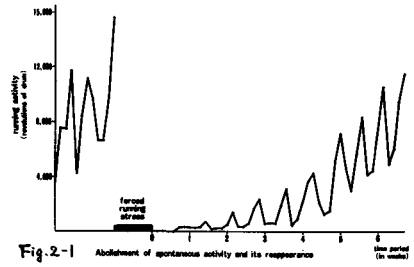


Fig.2-1 Abolishment of spontaneous activity and its reappearance

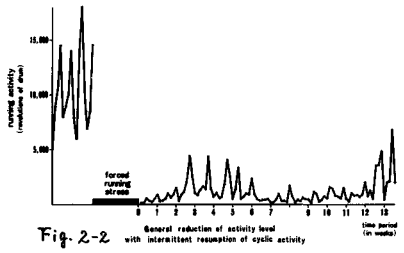


Fig. 2-2 General reduction of activity level with intermittent resumption of cyclic activity

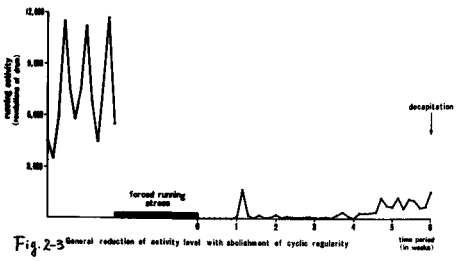


Fig.2-3 General reduction of activity level with abolishment of cyclic regularity

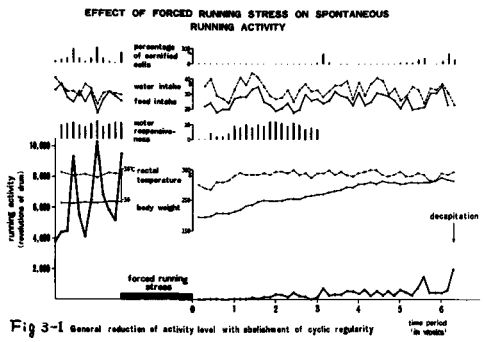


Fig 3-1 General reduction of activity level with abolishment of cyclic regularity

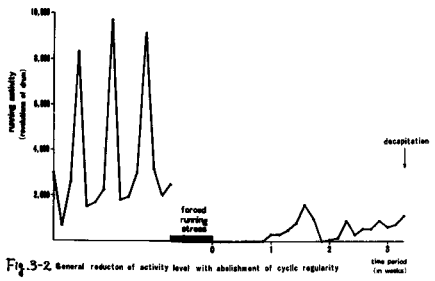


Fig.3-2 General reduction of activity level with abolishment of cyclic regularity

前の状態にまで戻るもの（Fig 2-1）。

2）ストレス後、全体に活動水準が低下するが、間歇的に活動周期が出現するもの（Fig 2-2）。

3）ストレス後、数週を経ても活動水準と周期性の戻らないもの（Fig 2-3）。

この3のタイプ、即ち、ストレス後長期間に亘るホルモン依存行動の消失と持続的寡動状態を、一応人間のうつ状態の動物モデルと仮定し、その脳内モノアミンの動態を diestrous day 3 1日目のコントロールラットと比較検討した。〝うつ病モデル〟ラットとしては、ストレス終了後3週以上に亘り持続的活動水準の低下と自発活動の周期性の消失を示す3例を用いた（Fig 2-3 Fig 3-1~2）。更に、ストレス直後及びストレス後2週目のラットについても脳内アミンを顕鏡し、その蛍光強度を測定した。実験群の脳内各部位のモノアミンの蛍光強度を、コントロールの相当部位の強度に対する百分率として表わしたのが Table 2 である。〝うつ病モデル〟ラットでは、コントロールに比べ、青斑核（A6）を含めてA1～A7で著明に蛍光強度が増強した。隆起漏斗路（A12, ext.ME）の蛍光は逆に減少傾向にあるが、弓状核（A12）については元来蛍光量の少ない所だけに、なお問題が残る。このような傾向は、ストレス直後及び2週後のラットに於いても同様に

認められた。

以上の所見を要約すると、ストレスによる異常行動ラットの脳内アミンの主な変化は、青斑核[8]を初めとする上行性NA神経系の蛍光の増強と中央隆起のDA蛍光の減少であり、この所見はストレス直後のラットにも、ストレス数週後のラットにも共通に見られた。

Table 2

PERCENTAGE OF FLUORESCENCE INTENSITY OF REGIONAL BRAIN MONOAMINES IN EXPERIMENTAL RATS COMPARED WITH THAT FOUND IN CONTROLS

neuron systems	cell bodies and terminals	immediately after stress	2 weeks after stress	3 weeks after stress	4 weeks after stress	6 weeks after stress
ascending NA systems	A1	188	342	155	176	181
	A2	260	258	138	151	807
	A5	181	183	135	178	200
	A6	159	148	140	135	110
	A7	232	171	142	157	166
	PVP	100	121	88	136	84
	ire.ME	91	82	71	62	98
nigro-striatal DA system	A9	82	69	137	136	72
	CPU	98	106	73	108	92
tubero-infundibular DA system	A12	29	31	53	51	42
	arc.ME	82	52	92	40	91

Control rats were decapitated on the diestrous day 1.
The fluorescence intensity of the regional brain monoamines in control rats was regarded as 100 %.

このことは、我々が"うつ病モデル"と仮定した慢性寡動ラットにおいては、ストレス直後の脳内アミンの変動が修復されないまゝ持続していることを物語っており、行動変化と脳内アミンの変動との関連[1]に関して興味ある所見と云える。従来、ストレスにより脳内モノアミンは減少するという報告[1][2][10][13]が多いが、我々の実験では脳幹のNA蛍光はむしろ増強している。これらの所見を如何に解釈するかについては、更に詳しい解析を必要とする。

〔文　献〕

1) Barchas, J.D. and Freedman, D.X. Biochem. Pharmacol. 12, 1232 (1963)
2) Bliss, E.L., Ailion, J. and Zwanziger, J. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 164, 122 (1968)
3) Brodie, B.B., Pletscher, A. and Shore, P.A. Science 122, 968 (1955)
4) Dahlström, A. and Fuxe, K. Acta physiol. Scand. 62 suppl. 232, 1 (1965)
5) Fuxe, K. Acta physiol. Scand. 64 suppl. 247, 39 (1965)
6) Falck, B., Hillarp,N.-Å., Thieme, G. and Torp, A. J. Histochem. Cytochem. 10, 348(1962)
7) Gordon, J.H. and Shellenberger, M.K. Neuropharmacol. 13, 129 (1974)
8) Kolf, J., Aghajanian, G.K. and Roth, R.H. Neuropharmacol. 12, 933 (1973)
9) Lichtensteiger, W. Progr. Histochem. Cytochem. 1, 185 (1970)
10) Maynert, E. W. and Levi, R. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 143, 90 (1964)
11) Richter, C.P. Biological Clock in Medicine and Psychiatry, springfield (1965)
12) Schildkraut, J.J. Am. J. Psychiat. 122, 509 (1965)
13) Stone, E.A. Psychosom. Med. 32, 51(1970)
14) 田中千賀子，藤原元始．生体の科学 22，284 (1971)
15) Urgerstedt, U. Acta physiol. Scand. Suppl. 367, 1 (1971)

6 ラットの睡眠に関与するトリプトファン代謝

渋谷治男・融　道男・渡部修三
島薗安雄
（東医歯大・医・精神）

〔要約〕

(I) ラットを用い，24時間の全睡眠遮断後に l-^{3}H-tryptophan (Trp) を腹腔内に注入し，短時間の睡眠を与えたのちに断頭し，血液中の^{3}H-Trp，および終脳，視床，視床下部，中脳＋橋＋延髄の^{3}H-Trp，^{3}H-5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA)を分離測定した。^{3}H-Trp 注入後，断眠ラットと等しい時間経過後断頭したものを対照とした。その結果断眠後睡眠させたラットの視床で^{3}H-5HT の形成が有意に高く，視床および終脳で^{3}H-5HIAAの形成が有意の増加を示した。同時に全脳部位で^{3}H-Trp のとりこみの顕著な増加がみられた。このことから断眠後の睡眠に際しては，視床および終脳において5HTの代謝が増大し，それに伴ない Trp の脳への取り込みが増加するものと考えられた。

(II) 明(7:00～19:00)/暗(19:00～7:00)の条件下で2週間以上飼育したラットの血漿中総Trp，遊離型Trp，脳中Trp，5HT，5HIAA，および行動量の概日リズムを調べた。行動量は昼間に少なく，夜間に多く午前2時に最高値を示した。血漿中の総Trp は午前2時に最高で18時に最低値をとるゆるやかなリズムを示した。血漿遊離型Trp は，午前10時で他の時刻より有意に高く，脳中 5HIAA はこれと有意な正の相関関係をもつリズムを示した。ラットにおいて活動の少ない時間帯の血漿遊離型Trp の高値は，睡眠に生体のTrp代謝が関与していることを推定させた。

睡眠・覚醒サイクルに脳内の serotonin 作動性ニューロン，catecholamine 作動性ニューロン，cholin作動性ニューロンが関与していることが推定されているが，本報告では tryptophan 代謝を中心に行なった実験について述べる。

（実験方法）

実験動物：Wistar 系成熟ラット雄（体重 250－400g）を使用。

I)全睡眠遮断実験

断眠動物の用意：24時間の全睡眠遮断のためにSkinner箱による回避行動を用いた[12]（刺激ー刺激間隔20秒，反応ー刺激間隔40秒，ショック 1mA，1秒間）。あらかじめ回避行動を習熟させたラットを午前9時30分にSkinner箱に移し，4時間毎に15分間自動的に器械を止め餌，水を摂取できるようにした。対照動物の餌は一昼夜を通じ断眠動物とほぼ同量に制限した。水は自由に与えた。実験に供する動物は光調節箱（明 7:00～19:00）中で2週間以上飼育したものを用いた。

l-^{3}H-tryptophan (Trp)の注入：24時間の全睡眠遮断後，15分間のちに，^{3}H-Trp (G) 250μl (250μci)を腹腔内に注入した。　^{3}H-Trp 注入後，短時間（約8分）の睡眠を与えたのちに断頭した。対照動物は　^{3}H-Trp注入後眠らないようにし，実験群と等しい時間経過後断頭した。

資料採取：断頭直後頸部血管よりヘパリン塗布したビーカーに血液を採取した。脳は断頭後直ちに砕氷上で，終脳(TE)，視床(TH)，視床下部(HY)および中脳＋橋＋延髄(MPM)の4部位に分けた。

^{3}H-Trpおよびその脳内代謝産物の分離測定：脳組織は 0.4N perchloric acid (PCA)

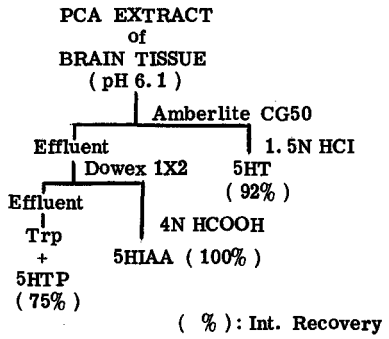


図 1.
ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY
of
INDOLAMINE SYSTEM

2.0 mlでホモジェネートし，13000 r.p.m. 10分間遠沈，沈渣をPCA 1.0 mlで洗い，得た上清を5N K_2CO_3 でPH6.1に合わせた．この上清からIchiyama ら[5]の方法を一部変法したカラム操作により ^{3}H-Trp代謝産物を分離・測定を行った．これらの溶出液の一部を取りscintillator（Trpは Bray 液，5-hydroxytryptamine (5HT)，5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA) は toluene-Triton X-100 液）を加え，liquid scintillation spectrometer で計測した．ヘパリン処理した血液は，その1.0 mlを0.4N PCA 3.0 mlと混じ13000 r.p.m. 10分間遠沈後上清を5N K_2CO_3 でPH6.1に合わせた．その上清を同様に2本のカラムに通し ^{3}H-Trp を分離・測定した（図1）．

II）概日リズムの実験

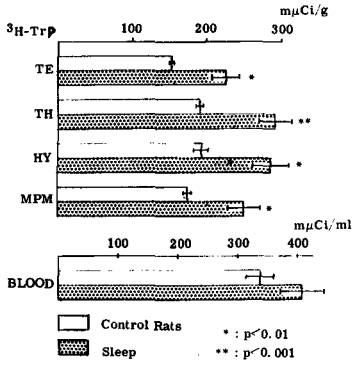
ラットは光調節箱の中で2週間以上飼育した。1ケージ6匹以上飼育し，この間水と固型飼料は自由に摂取できるようにした．ラットを24時間にわたり4時間毎に(10時，14時，18時，22時，2時，6時）断頭した．断頭時頸部血管よりヘパリン 0.05 mlを含む容器に採血した．直ちに3000 r.p.m. 10分間遠沈し血漿を分離。この血漿中のTrpをDenkla & Dewey の方法[1]により測定し，血漿総Trpとした．

血漿遊離型Trpの測定：血漿1.0 mlをMembrane ultrafilter CF 50A (Amicon)に取り2750 r.p.m.30分間室温で遠沈，得られた沪過溶液のTrpを測定し血漿遊離型Trpとした．

脳中Trp，5HT および5HIAAの測定：断頭後直ちに砕氷上で脳を取り出し，嗅球，松果体，小脳を除く全脳で測定を行った．脳中Trpは Hess & Udenfriend の方法[4]を一部変法，5HTおよび5HIAAは Giacalone & Valzelli の方法[3]により測定した．

（実験結果）

I. 24時間全睡眠遮断後，短時間睡眠させた場合：l-^{3}H-Trpを断眠ラットおよび対照ラットの腹腔内へ注射後，約30分経過した時の血中 ^{3}H-Trp値は断眠ラットで増加傾向はあったが有意な差はなかった．ところが脳中の ^{3}H-Trp蓄積量は，断眠ラットのTE, TH, HY, MPMの各部位で有意に増加しており，対照群に対する増



Accumulation of I. P. Injected ^{3}H-Tryptophan in Four Brain Areas and Blood

図 2.

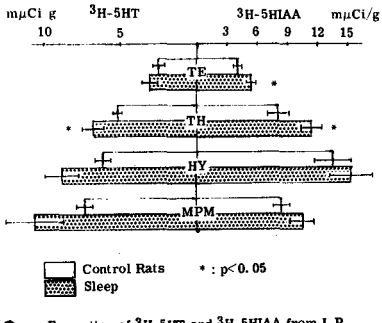


図 3. Formation of ^{3}H-5HT and ^{3}H-5HIAA from I. P. Injected ^{3}H-Tryptophan in Four Brain Areas

加率は46～55%であり，特にTHにおける差は顕著であった（図2）．脳中^{3}H-5HTは断眠ラットのすべての脳部位で対照ラットより高く，かつTHの変化は有意であった（図3）．脳中^{3}H-5HIAAは断眠ラットでTH，TEで有意な増加を認めた．

II．ラット血漿中Trp値および脳中Trp，5HT，5HIAAの概日リズム（表1）：ラットの行動量をAnimexで測定すると夜間多く，昼間は少ない．最も行動量の多いのは午前2時であった．血漿中の総Trp値は21.4～27.1 μg/mlの間にあり，深夜高く，昼間は低くなる傾向をもち，10時の値に比較した場合，午前2時は有意に高く（$P<0.02$），18時，22時は有意に低かった（$P<0.01$）．これに対し血漿中遊離型Trp値は，

表1．血漿総Trp，血漿遊離型Trp，脳Trp，脳5HT，脳5HIAAの概日リズム．

	2 時	6 時	10 時	14 時	18 時	22 時
血漿総Trp (μg/ml)	27.05±1.51**	25.56±1.56	24.89±1.04	23.44±0.93	21.40±1.10*	21.81±1.25*
血漿遊離型Trp (μg/ml)	1.20±0.11*	1.61±0.10***	3.24±0.68	1.28±0.15**	1.08±0.15*	1.04±0.17*
脳 Trp (μg/g)	3.28±0.44	2.87±0.58	3.39±0.19	3.34±0.49	3.25±0.49	2.69±0.37
脳 5HT (μg/g)	0.31±0.11	0.36±0.12	0.47±0.14	0.31±0.09	0.39±0.16	0.35±0.10
脳 5HIAA (μg/g)	0.38±0.12	0.29±0.09	1.01±0.40	0.20±0.06	0.20±0.04	0.40±0.07

平均±S.E.　10時の値との間に *：$p<0.01$，**：$p<0.02$，***：$p<0.05$

1.04～3.24 μg/mlであり，最高値は摂食して3時間後の午前10時であり，その4時間後には再び低い値を示し，その後の変化はわずかである．午前10時の遊離型Trp値は午前2時，18時，22時のそれに対し$P<0.01$，14時に対し$P<0.02$，午前6時に対し$P<0.05$でそれぞれ有意に高かった．脳中のTrp，5HTは明瞭なリズムは認めなかったが昼間高く，夜間低い傾向があった．脳中5HIAAは午前10時に最も高い値を示し，それは血漿遊離型Trpと有意な正の相関を認めた．

（考察）

ネコで青斑核側部あるいは峡のレベルでの上行性背側noradrenaline（NE）路を破壊すると，著明な過眠が生ずること[9]が知られている．この時，終脳と中脳においてNE量が減少し，終脳，間脳でTrpと5HIAAが増加することが確かめられている．このようなことから青斑核側から出たcatecholamine（CA）の神経終末が核側の縫線核に分布し，これが5HT作動性ニューロンの活動を直接的，あるいは間接的に抑制していることが推論されている．α-methyl-p-tyrosine（α-MT）によってCAの合成系を阻害した場合にも過眠と同時に5HIAAとTrpの増大によって示される5HT作動性ニューロンの賦活化が起こることが知られている[10]．

脳の5HT作動性ニューロンの活性を変動させる種々の実験により睡眠（NREMおよびREM）の生起する秩序に5HT作動性ニューロンが関与していることを示す事実がたくさん集まってきている．われわれは全睡眠遮断という特殊な実験条件を用いて24時間の全睡眠の遮断後に生じた短時間の睡眠時に間脳において内在性5HTならびに5HIAAが増加することを確かめた[12]．また^{3}H-Trpの腹腔内投与によって，視床にお

いて ^{3}H-5HT が増加し，視床および終脳において ^{3}H-5HIAA が増加するという今回の結果を考え合わせると，このような条件下における睡眠の起こる機序に視床を中心とした部位の5HT代謝の増加が関与していることが考えられる．

一方，脳に取りこまれた ^{3}H-Trp の量は視床を中心とした各部位で対照ラットに比し著しく高いことが見出された．この事実は5HT作動性ニューロンを支配するCA作動性ニューロンの廃絶に伴う5HTの代謝回転の増加時にみられたTrpの取りこみの増加と関連させて考えると，脳の5HTの生合成の過程においてTrpの脳内への取りこみが重要な役割を持っていることを示唆している。Trp水酸化酵素は脳では基質により飽和されていないと考えられている[2]．

最近われわれも biopterin を co-factor として $^{14}CO_2$ トラップ法[6]でラット脳幹部のTrp水酸化酵素のTrpに対する K_m を測定したところ，38μMであった．従って脳の5HT合成の律速段階はTrp水酸化酵素でなく脳内5HTニューロンにおけるTrpの濃度（availability）であると考えられる。　このようなことから，睡眠時に脳にTrpが集積するというわれわれの得た事実は，睡眠時に脳Trpのavailabilityを増加させるほかの機序が働いていることが推量される．

このTrpと脳内5HTの関係をさらに解明するためにラットの血中遊離型Trpの概日リズムについて調べたところ，午前10時に有意に高い値を得た．脳中の5HTの概日リズムについては，動物の活動休止期に高く，活動期に低いことが報告されている．ラットにおいてもQuay[9]は前頭皮質，視床下部，脳幹下部の外側部で昼間高く，夜間低いリズムを認めている．また最近Tagliamonteら[11]は血清中の遊離型Trpを脳の5HT代謝回転率の指標と考え，ヒトで深夜睡眠中に高い値を得たと発表している．ラットは午前中に極めて活動性が低く，同時に得られた遊離型Trpと相関する脳内5HIAAの高い値を活動のリズムと関係づけて考えることもできよう．しかし遊離型Trpのピークが夜間の活動期にあるという報告もあり[7]更に検討を続ける必要があると考える．

（文献）

1) Denkla, W.D., Dewey, H.K. : J. Lab. & Clin. Med. 69, 160 (1967)

2) Gessa, G.L., Tagliamonte, A. : Advances in Biochemical Psychopharmacology, 11, 119 (1974)

3) Giacalone, E., Valzelli, L. : Pharmacology, 2, 171 (1969)

4) Hess, S.M., Udenfriend, S. : J. Pharmacol. Exp. Ther. 127, 175 (1959)

5) Ichiyama, S., Nakamura, S., Nishizuka, Y., Hayashi, O. : Advances in Pharmacol. 6, 5 (1968)

6) 市山： 生化学 44, 825 (1972)

7) Morgan, W.W., Saldana, J. J., Yndo, C.A., Morgan, J. F. : Brain Res. 84, 75 (1975)

8) Petitjean, F., Sakai, F., Blondaux, C., Jouvet, M. : Brain Res. 88, 439 (1975)

9) Quay, W.B. : Life Scinece 4, 379 (1965)

10) Stein, D., Jouvet, M., Pujol, J.F. : Brain Res. 72, 360 (1974)

11) Tagliamomte, A., Gessa, R., Biggio, G., Vargiu, L., Gessa, G.L. : Life Science 14, 349 (1974)

12) 酒久，土屋，波谷，小林，島薗： 神経研究の進歩 14, 646 (1971)

7 ラット視床下部各核レベルにおけるcholine acetyltransferaseとacetylcholinesterase活性－その活性分布と情動行動変化にともなう活性の変化－

内村英幸・斉藤雅・平野誠
（国立肥前療養所）

〔要約〕

脳は構造的にも機能的にもheterogemousであるため，脳機能の解明には神経回路を背景にした各核レベルでの検討が必要である。情動行動の中枢的役割をもつ視床下部各核についてcholine acetyltransferase (ChAc)とacetylcholinesterase(AchE)について，凍結乾燥切片を用いて検討した。これらの活性分布は，N. posteriorで最も高い活性を示し，外側部も高い活性を示した。他方内側部は低い活性であった。ChAcとAchE活性は必ずしも平行していなかった。長期隔離飼育による情動行動変化では，①muricideラットで，視床下部後部のN. posterior, area lateralisでChAcの低下がみられた。②Irritable aggressiveラットでは，視床下部前部のN. anterior, area lateralisと中部のN. dorsomedialisでAchEが増加していた。③Indifferentラットでは特異的な大きな変化はみられなかった。他方隔離したすべてのラットに共通してN. periventricularisのChAcの増加がみられた。

これらの結果から，stressによって室周線維系のcholinergic systemは促進している。さらにmuricideでは後部核のcholinergic系の抑制，irritable aggressionでは前部核のcholinoceptive siteでのcholinergic系からの刺激の抑制がみられる。行動に対しては，これらの核でcholinergic系の脱抑制がかかんでいることを示唆している。以上のごとく，情動行動変化の種類によって各核の動きは異っていることを示した。

情動行動の中枢機構に関しては，脳生理学的分野で明らかにされてきており，特に視床下部はその中枢的な重要な役割を演じている。脳は構造的にも，機能的にもheterogenousなものであるため，情動行動の中枢機構の生化学的解明も脳生理学的に明らかにされてきている「核」レベルでの検討が当然必要である。[11] しかし現在まだこのような神経回路を背景とした微細レベルでの検討はなされていない。

情動行動変化は，神経伝達物質特に生体アミンとの関係で論じられてきた。しかし，最近predatory aggressionに関しては，cholinergic systemの関与が示唆されている。[12,13] このため，ラット長期隔離飼育(isolation)による情動行動変化を指標にして，視床下部各核レベルにおけるアセチルコリンの合成酵素であるcholine acetyltransferase (ChAc)と分解酵素であるacetylcholinesterase (AchE)活性の変化を検討した。ラット視床下部各核のChAcとAchEの活性分布とisolationによるこれらの酵素活性の変化について報告する。

実験方法

1) Isolationの条件と行動変化：Wister king雄ラットを離乳直後5匹ずつ1グループにして飼育し，生後8週目に1匹ずつ隔離して10週間飼育した。この間マウスに対する反応，handlingに対する反応を週1回観察記録した。Isolationにより，マウスを咬み殺すmuricideラット，マウス，handlingに対して攻撃的となるaggressiveラットとマウスやhandlingに対して反応しない無関心なindifferentラットが生じた。Isolationしたラットは，この3群にわけて検討した。

2) 凍結乾燥切片作製：[10] 断頭後直ちに脳をとり出し，氷上で視床下部の部分を切り

出し，液体N_2に投入した。クリオスタット（−15°C）で55μmと85μmの切片を作り，真空びんに入れ（−30°C），ドライアイスーアセトンの入ったトラップと連結し，真空ポンプで吸引し（10^{-3}mm Hg）凍結乾燥連続切片を作成した。試料は使用まで−20°Cに保存した。

3) 各核の摘出と重量測定：視床下部各核は，実体顕微鏡下でマイクロナイフ，ヘヤーループを用いて切り出した。切り出した各核は，electronic microbalance（Sartorius製）にdigital voltmeter（江藤電気製）を連結した装置で重量を測定した[10]。この天秤の感度は0.1μgである。3回測定しその平均値を各試料の重量とした。各試料の重さは，2～6 μgである。

4) 測定法：a) ChAc：Hommumの方法によった[2]。0.5% Triton X-100を含む0.05% BSA solutionを加え，0°C 30分 preincubationした（この処置でchAc活性は約20%増加した）。0.1mMの^{14}C-acetyl coenzyme A（48.6mci/mmoles，NEN.）を用いた。38°C，15分 incubationし，^{14}C-acetylcholine（Ach）は，kalignost solutionで抽出した。測定効率は68%であった。b) AchE：Hommumの方法を一部変更して用いた[2]。0.25% Triton X-100，0.05% BSAとiso-OMPA（1×10^{-5}M）のsolutionを加え，4°C 60分 preincubationした。1.0mM ^{14}C-Ach（3.84mci/mmoles，NEN），1×10^{-5}M iso-OMPAを用いて，30°C，10分間 incubationした。^{14}C-Achはkalignost solutionで抽出した。測定効率は，68%であった。

結果および考察

1) 視床下部のchAcとAchEの分布

chAcの分布については，すでに報告した[12]が，chAc，AchE共にN. posteriorで最も高い活性を示し，Area lateralis（medial forebrain bundle：MFB）も高い活性をもっている。他方，N. periventricularis，paraventricularis，ventromedialis，arcuatusの後部，area retrochiasmaticusでは低いchAc活性を示した。AchEの組織化学法で染まるN. periventricularis，arcuatus[7]でもchAc，AchE共に見い出された。

視床下部各核のAchE活性は，必ずしもchAc活性と平行していなかった。AchEとchAc比率は，大きく2つのグループにわけられる（AchE/chAc：μmoles/g dry wt/min. / μmoles/g dry wt/hr.：1.0～2.0と3.0～4.0）。前者（ratio 1.0～2.0）は，比較的高いchAc活性を示す核であり，後者（ratio 3.0～4.0）では，chAc活性が低い核である。末梢神経では異った神経でこのratioが異っていることが見い出されており[4]，これらのratioの違いは，innervateしているcholinergic fiberの違いを反映しているかもしれない。ところで，海馬の各層では，chAcとAchE活性は平行しており，AchEもcholinergic structureのmarkerになりうるとHommum ら[3][9]は述べているが，視床下部ではなく，AchE活性は，cholinergic elementのみでなく，cholinoceptive siteを反映している可能性が考えられる。

最近palkovits ら[6]は，視床下部のカテコールアミンの分布について報告しているがchAcとカテコールアミンの分布が逆の傾向を示すことは，コリン作働系とカテコールアミン作働系が拮抗的に作用している可能性があり，興味ある知見である。

2) Isolationによる情動行動変化における視床下部各核のchAcとAchE活性の変化.

Table 1

Choline acetyltransferase activities in hypothalamic nuclei of grouped and isolated rats.

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent
Pars anterior				
Nucleus anterior(A)	35.43 ± 4.77(5)	30.25 ± 2.48(4)	36.07 ± 1.12(4)	32.13 ± 2.10(4)
Area lateralis(L)	36.74 ± 5.02(5)	36.86 ± 2.45(4)	33.85 ± 1.39(4)	33.14 ± 3.44(4)
Nucleus paraventricularis(PA)	17.84 ± 3.20(4)	19.13 ± 1.96(4)	26.10 ± 2.76(4)	22.63 ± 1.71(4)
Area retrochiasmaticus(RC)	19.47 ± 3.12(4)	28.76 ± 3.88(4)	17.59 ± 0.95(4)	23.03 ± 4.02(4)
Pars medialis				
Nucleus ventromedialis(VM)	13.23 ± 1.16(4)	13.87 ± 3.22(4)	10.26 ± 1.06(4)	13.08 ± 1.30(4)
Nucleus dorsomedialis(DM)	32.77 ± 4.57(5)	36.39 ± 2.47(4)	43.94 ± 3.20(4)	35.07 ± 2.53(4)
Area lateralis(L)	38.49 ± 2.51(5)	42.24 ± 3.60(4)	32.42 ± 3.19(4)	36.95 ± 2.28(4)
Nucleus periventricularis(PE)	13.70 ± 0.91(5)	25.07 ± 2.69(4)**	23.07 ± 2.32(4)***	24.13 ± 2.44(4)***
Nucleus arcuatus(AR)	22.75 ± 4.30(4)	22.60 ± 4.20(4)	26.69 ± 3.99(4)	27.47 ± 5.14(4)
Pars posterior				
Nucleus posterior(P)	76.10 ± 3.26(4)	54.57 ± 4.23(4)**	61.73 ± 5.01(4)	70.22 ± 4.36(4)
Area lateralis(L)	50.62 ± 1.56(5)	44.56 ± 1.55(4)*	50.62 ± 2.58(4)	52.07 ± 0.69(4)
Nucleus premammillaris dorsalis(PD)	27.83 ± 1.55(5)	24.96 ± 2.71(4)	20.16 ± 1.61(4)**	35.60 ± 3.22(4)
Nucleus premammillaris ventralis(PV)	14.24 ± 1.69(5)	18.09 ± 2.88(4)	12.96 ± 1.17(4)	15.17 ± 4.38(4)
Nucleus arcuatus(AR)	10.00 ± 1.22(4)	10.08 ± 0.84(3)	13.80 ± 2.57(4)	13.38 ± 2.47(4)

The results are expressed as mean values ± S.E.M.(no of animals):

µmoles acetylcholine synthesed/g dry wt./hr.

*** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Table 2

Acetylcholinesterase activities in hypothalamic nuclei of grouped and isolated rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent	Grouped AchE/ChAc
Pars anterior					
Nucleus anterior	36.49 ± 2.58(5)	43.92 ± 2.99(4)	48.81 ± 2.91(4)**	44.87 ± 3.67(4)	1.03
Area lateralis	40.53 ± 3.53(5)	48.33 ± 3.27(4)	55.34 ± 2.94(4)**	40.06 ± 2.37(4)	1.10
Nucleus paraventricularis	61.90 ± 7.48(4)	67.93 ± 4.79(4)	56.60 ± 4.32(4)	60.20 ± 4.94(4)	3.47
Area retrochiasmaticus	31.02 ± 3.02(4)	29.47 ± 1.04(4)	32.16 ± 2.11(4)	32.16 ± 3.03(4)	1.59
Pars medialis					
Nucleus ventromedialis	43.29 ± 6.08(4)	45.15 ± 4.18(4)	46.38 ± 7.00(4)	39.63 ± 2.44(4)	3.27
Nucleus dorsomedialis	63.12 ± 6.27(4)	65.27 ± 6.28(4)	81.22 ± 1.13(4)**	61.79 ± 6.86(4)	1.93
Area lateralis	54.97 ± 6.89(4)	60.36 ± 4.78(4)	56.66 ± 4.13(4)	49.11 ± 2.35(4)	1.43
Nucleus periventricularis	42.87 ± 5.88(5)	42.02 ± 6.14(4)	35.33 ± 2.82(4)	28.70 ± 4.71(4)	3.13
Nucleus arcuatus	36.23 ± 4.09(4)	34.99 ± 1.70(4)	44.94 ± 4.02(4)	35.37 ± 4.88(4)	1.59
Pars posterior					
Nucleus posterior	96.29 ± 11.71(4)	74.05 ± 9.14(4)	101.90 ± 6.60(4)	81.63 ± 8.02(4)	1.27
Area lateralis	64.24 ± 3.37(4)	56.49 ± 3.00(4)	64.29 ± 5.35(4)	58.82 ± 0.87(4)	1.27
Nucleus premammillaris dorsalis	47.83 ± 5.10(4)	43.97 ± 3.18(4)	59.64 ± 3.97(4)	51.09 ± 7.78(4)	1.72
Nucleus premammillaris ventralis	45.38 ± 2.36(5)	38.11 ± 3.16(4)	49.42 ± 1.69(4)	37.40 ± 2.07(4)*	3.19
Nucleus arcuatus	40.02 ± 2.87(4)	42.22 ± 5.31(4)	45.88 ± 3.93(4)	33.94 ± 2.61(4)	4.00

The results are expressed as mean values ± S.E.M.(no of animals):

µmoles acetylcholine hydrolysed/g dry wt./min.

** $p < 0.025$, * $p < 0.05$

Isolationによって種々の異った行動が生じ，しかも生体アミンの代謝が，それぞれ異っていることは，Valzelli ら[13]によって報告されているが，この実験系統下でも3種類の異った情動行動が生じた。

a) Muricideラット：このラットでは，視床下部後部の N. posterior と area lateralis で chAc 活性の低下が特異的に見い出された。この理由はこれらの核の Ach の合成の低下すなわち cholinergic 系の抑制が起っていることを示唆している。他方，N. periventricularis の chAc は著明に増加しており，この核の cholinergic 系は促進していることを示している。Ach エは，いづれの核でも有意の変化はみられなかった。ただ，視床下部後部の N. posterior. と area lateralis で減少傾向を示していた。 b) aggressive ラット：この irritable aggression と思われるラットでは，特異的な変化として，視床下部前部の N. anterior と area lateralis，それに中部の N. dorsomedialis で Ach エ活性が有意に増加していることである。しかし，これらの核の chAc 活性の変化はみられなかった。この理由は解決しにくいが，chAc に変化がないため，cholinergic terminal の変化ではなく cholinoceptive site すなわち receptor site の Ach エ活性の増加を反映していると思われる。このため cholinergic 系より，cholinoceptive site への伝達が促進されている可能性が考えられる。chAc は，N. periventricularis で増加し，N. premammillaris dorsalis で低下していた。 c) Indifferent ラット：この刺激に対して無関心なラットでも，N. periventricularis の chAc 活性の増加がみられた。このラットでは他の核では変化なく，ただ N. premammillaris ventralis で Ach エの低下がみられた理由であった。

視床下部外側部 (area lateralis, MFB) への Ach, carbachol 注入実験で，predatory aggression が起るという報告[1)8)]と睡眠が起りこの部位は hypnotic system であるという報告[3)]がある。今回の結果は，isolation による muricide は，視床下部後部の核で cholinergic 系の脱抑制 (disinhibition) がからんでいることを示唆している。視床下部後部は海馬との関連が強く，海馬からの調節の変化が考えられる。他方 irritable aggression は，特に視床下部前部の核の cholinoceptive site で cholinergic 系からの影響が低下している可能性がある。視床下部前部は特に扁桃核と関連があることは知られており，扁桃核からの影響を考えなければならない。N. periventricularis すなわち室周線維系の cholinergic system の促進は，isolation によって異った情動行動を示す3群のラットに共通してみられるので，この変化はストレスによる一般的な変化を反映しているものと考えられる。情動行動変化によって視床下部各核の動きは異っており，視床下部と特に関連のある扁桃核，中隔，海馬などの中脳についても今後さらに検討し，情動行動の神経回路について生化学的なレベルで解明してゆきたいと考える。

文献

1)Bandler,R.J.:Brain Res.,20:409,1970. 2)Fonnum,F.:Biochem.J.,100:479,1966. 3)Fonnum,F.: J.Neurochem.,17:1029,1970. 4)Fonnum,F. et al.:J.Neurochem.,21:1109,1973. 5)Hernández-Poén,R. et al.:Exp.Neurol.,8:93,1963. 6)Palkovits,M. et al.:Brain Res.:77:137,1974. 7)Shute,C.C.D. et al.:Br.med.Bull.,22:221,1966. 8)Smith,D.E. et al.:Science,167:900, 1970. 9)Storm-Mathiesen,J.:J.Neurochem.,17:739,1970. 10)内村英幸他：脳神経，26:341, 1974. 11)内村英幸：精神医学，16:736, 1974. 12)Uchimura,H. et al.:Brain Res.,91:161,1975. 13)Valzelli,L. et al.:Neuropharmacol.,11:17,1972.

8 ラット視床下部各核レベルにおける5HT—MAOおよびtyramine—MAO活性 —その活性分布と情動行動変化にともなう活性の変化—

平野　誠・斉藤　雅・内村英幸
（国立肥前療養所）

〔要約〕

1）ラット視床下部各核におけるMonoamine Oxidase（MAO）活性を凍結乾燥切片を用いて検討した。基質としてserotonin（5HT-MAO）およびtyramine（tyramine-MAO）を用いた。その結果、視床下部内側部で高い活性を示し外側部では低い活性であった。5HT-MAOとtyramine-MAOの分布は必らずしも一致せず、特にN. arcuatusおよびN. periventricularisでは著しく高濃度のtyramine-MAOがみられた。これらから、視床下部各核においてもMAOのmultiplicityの存在が示唆され、type A-MAOとtype B-MAOの相対分布が異ることも明らかとなった。

2）更に、長期間隔離飼育することにより情動行動変化を来たしたラットについて検討した。(i) Muricideラットでは、視床下部後部のN. premammillaris dorsalis et ventralisでtyramine-MAOの減少がみられた。これはtype B-MAOの低下を示す。(ii) Aggressiveラットでは、視床下部前部のN. anteriorおよび中部のArea lateralisで5HT-MAOが減少し、他方tyramine-MAOは後部のN. posteriorおよびArea lateralisで増加した。これらは視床下部前中部ではtype Aの低下を、後部ではtype Bの増加を示す。(iii) Indifferentラットでは視床下部前部のN. anteriorで5HT-MAOが減少し、type A-MAOの低下が見出された。　これらの結果から、3つの情動行動変化の背景には異る神経回路が存在する可能性が示唆された。

攻撃行動と脳内生体アミンとの関連をみた報告は多い[13]。しかし情動の中枢と考えられている視床下部の各核レベルでそれらの諸物質の変動を検討した例は見あたらない。Monoamine Oxidase（MAO）は、神経伝達物質であるcatecholamineやserotonin（5HT）をニューロン内で酸化する重要な分解酵素である。現在では、MAOは、基質特異性によって2つのタイプに分けられており[4]、5HTおよびnorepinephrine（NE）はtype Aによって、benzylamineやβ-phenylethylamineはtype Bによって特異的に分解され、tyramineやdopamine（DA）, tryptamineは両タイプのMAOによって分解される。著者らは、最近、定量的組織化学法を用いたMAOの微量測定法を開発し[14]、視床下部、扁桃核各核のMAO活性分布については既に報告した[3]。今回、ラットを長期単独隔離飼育（Isolation）することにより生じたmouse-killing（muricide）を含む情動行動変化時の、視床下部各核のMAO活性を検討した。基質としては5HTおよびtyramineを用いた。

［実験方法］

1）実験動物およびIsolationの条件：　生後8週のWister King雄ラットを用いた。4匹を22×40×16 cmのケージに群居飼育したものを対照群とし、1匹づつIsolationしたものを実験群とした。Isolation期間は10週間とし、その間、マウスに対する反応およびhandlingに対する反応を観察記録した。Isolationによって、マウスを咬み殺すラット（Muricide）、マウスやhandlingに対して攻撃的となるラット（Aggressive）、マウスやhandlingに全く無関心なラット（Indifferent）が生じた。

2）凍結乾燥切片作製：　すべてのラットは17時に断頭器で断頭後、速やかに脳を摘出、氷上で視床下部を含む部位を切り出し、液体窒素に投入した。cryostat（-15°C）

で厚さ55μm，85μmの切片を作り、真空ビンに入れ、dry ice - aceton を入れたトラップを通して、真空ポンプで吸引し（10^{-3} mmHg）、凍結乾燥切片を作製した。切片は使用まで－20°Cに保存した。

3）各核の切り出しと重量測定：　実体顕微鏡下で、視床下部各核を自家製マイクロナイフで切り出し、試料とした。これらの重さは、Digital Voltmeter（江藤電気製）を装着した超微量電子天秤（Sartorius社製）を用いて測定した。この天秤の感度は0.1μgである。各酵素試量重量は2～6μgである。

4）MAO活性測定法：　McCaman[6]の方法を一部変更して行った。試料をmicrotubeに入れ、0.05% BSAを含む0.05% Triton X-100 2μlを入れ、0°C、15分 preincubationしたのち、基質緩衝液2μlを加え（最終濃度；5-Hydroxytryptamine binoxalate [2-^{14}C]（27.5 mCi/mmole, NEN）1.0 mM, phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2）、38°Cで15分間反応させた。次に反応生成物をethyl acetateで抽出し、0.3 N HClで洗ったのち、液体シンチレーションカウンターで測定した。測定効率は78%であった。tyramineを基質にした場合は、反応液中の最終濃度；1.5 mM [^{14}C] tyramine hydrochloride（10 mCi/mM, NEN），0.1 M phosphate buffer pH 7.95，incubation time 30分とした以外は、上記と同じ手順で行った。

［結果と考察］

(1) 視床下部のMAO活性分布：　表に示すように5HT-MAO，tyramine-MAOともに各核でかなりの濃度差があり、視床下部内側部で高く、外側部で低い傾向がみられた。tyramine-MAOは、N. periventricularis，N. arcuatusで特に高値を示し、これらの核ではtype B-MAOが高濃度に存在すると考えられる。Saavedra ら[8,10]による5HT, NE, DAの分布をMAO分布と比較すると、必ずしもこれら伝達物質の濃度分布とは一致しておらず、むしろ、5HT-MAOと5HTは逆相関的な濃度分布を示した。また、5HT-MAO／tyramine-MAOのratioをみると、各核で異り、0.33－1.46の巾をもつことがわかった。これは、視床下部各核においても、MAOのmultiple formの存在を示唆するとともに、5HT-MAOとtyramine-MAOの相対分布が異ることを示す。

(2) Isolationによる情動行動変化における視床下部各核のMAO活性の変化：

a). Muricideラット；　このラットではN. premammillarisでtyramine-MAOの減少がみられた。5HT-MAOは、中部N. arcuatusで増加した以外は変化がなかった。これらは、視床下部後部のtype B MAOが低下していることを示し、また線維連絡から、海馬との関連が考えられる。　b). Aggressiveラット；　このirritable aggressionと思われるラットでは、5HT-MAOは全体として低値を示し、N. anterior および中部のArea lateralisで有意に減少した。一方、tyramine-MAOは、N. posterior および後部のArea lateralisで有意に増加した他、Area retrochiasmaticusでも増加がみられた。これらから、視床下部前中部ではtype Aの低下が、後部ではtype Bの増加が考えられる。このように、aggressiveラットでは、A，B両タイプのMAOが、前中部と後部で逆の変動をすることが明らかとなった。又、線維連絡から、扁桃核および海馬両方からの影響が考えられる。　c). Indifferentラット；　このラットでは5HT-MAOは、N. anterior，Area retrochiasmaticusおよび後部N. arcuatusで有意に減少した。他方、tyramine-MAOはいずれの核においても有意の変化はなかった。このことは、Indifferentラットでは

TABLE I

5-HT-MAO Activities in Hypothalamic Nuclei of Grouped and Isolated Rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent
Pars anterior				
Nucleus anterior (A)	69.32 ± 4.72(5)	71.28 ± 5.73(4)	53.01 ± 3.16(4)*	50.45 ± 5.15(4)*
Area lateralis (L)	41.11 ± 3.76(5)	43.05 ± 6.57(4)	35.24 ± 0.97(4)	41.91 ± 5.18(4)
Nucleus paraventricularis (PA)	85.07 ± 6.76(5)	83.51 ± 8.55(4)	66.06 ± 5.00(4)	73.94 ± 9.45(4)
Area retrochiasmaticus (RC)	66.59 ± 5.55(4)	69.84 ± 5.23(4)	54.02 ± 5.29(3)	49.60 ± 1.91(4)*
Pars medialis				
Nucleus ventromedialis (VM)	91.90 ± 10.67(4)	80.29 ± 4.59(4)	65.45 ± 3.79(4)	71.31 ± 4.66(4)
Nucleus dorsomedialis (DM)	79.75 ± 9.58(4)	83.81 ± 5.86(4)	68.79 ± 3.19(4)	72.86 ± 4.63(4)
Area lateralis (L)	54.96 ± 3.33(4)	54.01 ± 3.70(4)	45.13 ± 1.04(4)*	46.48 ± 4.94(4)
Nucleus periventricularis (PE)	72.76 ± 9.47(4)	80.29 ± 4.95(4)	70.87 ± 4.51(4)	89.39 ± 2.36(3)
Nucleus arcuatus (AR)	53.43 ± 6.58(5)	71.52 ± 2.05(4)*	63.71 ± 4.59(4)	69.18 ± 3.00(4)
Pars posterior				
Nucleus posterior (P)	68.20 ± 5.96(4)	64.86 ± 2.95(4)	55.71 ± 1.60(4)	60.87 ± 4.90(4)
Area lateralis (L)	39.48 ± 3.64(5)	44.09 ± 3.00(4)	36.81 ± 1.87(4)	43.65 ± 5.85(4)
Nucleus premammillaris dorsalis (PD)	47.16 ± 4.52(4)	44.97 ± 5.43(4)	59.29 ± 5.95(4)	41.72 ± 5.04(4)
Nucleus premammillaris ventralis (PV)	88.08 ± 12.06(4)	75.82 ± 3.28(4)	64.83 ± 4.42(4)	72.89 ± 9.43(3)
Nucleus arcuatus (AR)	74.12 ± 6.23(5)	70.11 ± 4.66(4)	63.68 ± 1.00(4)	51.64 ± 5.25(4)*

The results are expressed as mean values ± S.E.M.(No. of animals);

μmoles 5-HT oxidized/g dry wt./hr.

* $p < 0.05$

TABLE II

Tyramine-MAO Activities in Hypothalamic Nuclei of Grouped and Isolated Rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent	Grouped control 5-HT-MAO/Tyramine-MAO
Pars anterior					
Nucleus anterior (A)	54.07 ± 4.64(5)	51.78 ± 4.28(4)	62.84 ± 2.56(4)	58.17 ± 2.58(4)	1.28
Area lateralis (L)	41.13 ± 4.05(5)	36.87 ± 2.56(4)	42.18 ± 1.40(4)	37.75 ± 3.63(4)	1.00
Nucleus paraventricularis (PA)	76.47 ± 8.31(4)	93.50 ± 4.76(4)	86.89 ± 3.40(4)	82.33 ± 5.82(4)	1.11
Area retrochiasmaticus (RC)	70.00 ± 4.97(4)	72.65 ± 10.72(3)	99.88 ± 10.67(4)*	81.51 ± 8.11(4)	0.95
Pars medialis					
Nucleus ventromedialis (VM)	78.53 ± 5.90(4)	76.22 ± 4.30(3)	74.21 ± 3.25(4)	77.11 ± 3.21(4)	1.17
Nucleus dorsomedialis (DM)	65.60 ± 10.39(4)	74.90 ± 3.46(3)	73.02 ± 3.40(4)	65.99 ± 2.44(4)	1.22
Area lateralis (L)	45.62 ± 2.80(4)	38.38 ± 3.83(3)	48.02 ± 2.91(4)	42.93 ± 1.15(4)	1.20
Nucleus periventricularis (PE)	201.35 ± 47.55(4)	181.96 ± 34.98(3)	134.98 ± 13.19(4)	180.17 ± 38.88(4)	0.36
Nucleus arcuatus (AR)	158.65 ± 16.71(4)	146.85 ± 16.21(3)	184.66 ± 6.54(4)	169.61 ± 24.83(4)	0.34
Pars posterior					
Nucleus posterior (P)	46.72 ± 5.20(5)	61.67 ± 8.17(4)	73.17 ± 0.33(4)***	59.39 ± 2.89(4)	1.46
Area lateralis (L)	37.25 ± 2.08(5)	36.44 ± 4.62(4)	48.19 ± 3.01(4)**	39.21 ± 2.58(4)	1.06
Nucleus premammillaris dorsalis (PD)	79.56 ± 6.27(5)	54.46 ± 3.80(4)**	95.49 ± 10.30(4)	62.21 ± 11.44(4)	0.59
Nucleus premammillaris ventralis (PV)	82.10 ± 1.95(4)	63.60 ± 3.50(4)***	97.36 ± 8.41(3)	88.59 ± 6.63(4)	1.07
Nucleus arcuatus (AR)	221.51 ± 24.79(5)	169.55 ± 30.70(4)	262.74 ± 25.99(4)	241.37 ± 35.78(4)	0.33

The results are expressed as mean values ± S.E.M.(No. of animals);

μmoles tyramine oxidized/g dry wt./hr.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.025$, *** $p < 0.005$

視床下部後部のtype A-MAOが低下したことを示し、扁桃核との関連が推定される。

上記の3つの情動行動変化における各核のMAO活性変動のうち、N. arcuatusやretrochiasmaticusの変化は、これらの核が下垂体を介した神経内分泌機構と関連の深い部位であることから、直接情動行動に結びついた変化というよりは、Isolationによる何らかのhormonalな影響を反映したものと考えられる。

さて、Isolationによる攻撃行動と生体アミンturnoverとの関連についてはValzelliらの研究がある[15,16]。彼らはIsolationによる行動変化として muricide, friendly, indifferent に分けている。5HT turnover は muricide および indifferent で低下し、NE turnover は muricide で増大し、indifferentでは変化がなかったと報告している。われわれのIndifferentラットにおける変化は彼らの結果と一致していたが、Muricideラットにおける5HTのturnover低下はみられなかった。その他、mouse-killingラット[2]や、isolation後、pairで戦わせたマウス[7]でNE turnoverの増大をみた報告もある。

一方、predatory aggressionがPCPA(5HT合成阻害剤)処理によって増強し[12]、逆に、5-hydroxytryptophan投与[5]によりpredatory aggressionおよびaffective aggressionが抑制されることから、functionalな5HTレベルの低下と攻撃行動を結びつけたものもある。更に、生体アミン合成酵素の変化としては、isolation stressにより、神経終末のある中隔でtryptophan hydroxylase(5HTの律速酵素)活性の低下、および中脳,線状体でtyrosine hydroxylase(NEの律速酵素)の上昇をみた報告がある[11]。

ところで、攻撃行動をMAO活性自体の変動として検討した例は多くない。isolation後、trained fighterと戦わせたマウスの視床下部、扁桃核などのMAOが減少する[1]、後部視床下部電極刺激による"rage"で尾状核MAOの低下がみられる[9]等の報告がある。

以上述べた従来の知見は、概括すればisolation stressを含む情動変化を脳内serotonergic systemの機能低下ないしadrenergic systemの機能亢進状態として説明するものと云えよう。しかしながら、脳全体或いは大まかな脳領域についての生化学的分析であるため、得られた結果の解釈が、複雑に分化統合した中枢神経の機能局在的側面を捨象した推論にとどまっているに過ぎない。今回のわれわれの実験は、異なる3つの情動行動変化において、MAO活性の動きが異ることを明らかにし、各々の行動の背景にある神経回路が異っている可能性を示唆し得た点に意義があろう。即ち、Muricideでは後部のtype Bの低下→DA, tryptamine turnoverの低下, Aggressiveでは、特に前部のtype Aの低下→5HTかNE turnoverの低下と後部におけるtype B増加→DA, tryptamine turnoverの上昇、さらにIndifferentでは前部で特異的にtype Aの低下→5HTかNE turnoverの低下が示唆される。このため、今後伝達物質そのもの(5HT, NE, DA)および合成酵素について、扁桃核,海馬を含めた神経回路について検討する必要がある。(分析についてはBrain Res.[印刷中]に発表した。)

[文献]

(1)Eleftheriou,B.E.& Boehlke,K.W.:Science,155:1663,1967. (2)Goldberg,M.E.& Salama, A.I.:Biochem.Pharmacol.,18:532,1969. (3)平野誠他:医学のあゆみ,94:50,1975. (4)Johnston, J.P.:Biochem.Pharmacol.,17:1285,1968. (5)Kulkarni,A.S.:Pharmacologist 10:180,1968. (6)McCaman,R.E.et al:J.Neurochem.,12:15,1965. (7)Modigh,K.:Acta Pharmacol.et Toxicol.,34:97,1974. (8)Palkovits,M.et al:Brain Res.,77:137,1974. (9)Reis,D.J.et al: Trans.Amer.Neurol.Associat.,95:104,1970. (10)Saavedra,J.M.et al:Brain Res.,77:157, 1974. (11)Segal,D.S.et al:Bihavioral Biology,8:47,1973. (12)Sheard,M.H.:Brain Res., 15:524,1969. (13)内村英幸:精神医学,16:736,1974. (14)内村英幸他:脳と神経,26:341,1974. (15)Valzelli,L.:Psychopharmacol,31:305,1973. (16)Valzelli,L.& Garattini,S.: Neuropharmacolgy,11:17,1972.

9 ラット脳内モノアミン変動状態におけるリチウムならびにデスメチルイミプラミン投与時の脳内セロトニン代謝および行動変化

中河原 通夫・堀 彰・渡辺 明子
仮屋 哲彦
（東医歯大・医・精神）

〔要約〕

ラットにα-MTとL-5HTPを注射し，脳内catecholamine低下，serotonin増加状態をつくり，その状態における lithiumとdesmetylimipramine(DMI)の作用を脳内部位別の5-HT代謝の変動と，動物の行動変化から検討した。

(1) α-MT 250mg/kg 注射11時間後にL-5HTP 50mg/kgを注射し，さらに1時間後の脳内5HT，5HIAAおよびcatecholamine濃度は，昨年の本学会で報告したが，このラットのAnimex内自発運動量は，0.9%食塩水注射群と比べ，L-5HTP注射後4時間にわたって有意に減少した。(2)α-MT注射10時間後にLiCl 3.5mEq/kgを注射し，さらに1時間後にL-5HTPを注射したラットでは，LiClのかわりに，0.9%食塩水を注射した対照群に比べ，L-5HTP注射1時間後の脳内5HTは，終脳，間脳，中脳＋橋＋延髄で，5HIAAは，間脳および中脳＋橋＋延髄で有意な増加を示した。一方，この条件下のAnimex内自発運動量は，L-5HTP注射2時間後において有意な増加を認めた。(3)α-MT注射10時間後にDMI 25mg/kgを注射しさらに1時間後にL-5HTPを注射したラットではDMIのかわりに0.9%食塩水を注射した対照群に比べ，L-5HTP注射1時間後の脳内5HTは終脳で，5HIAAは終脳，間脳，中脳＋橋＋延髄で有意な減少を示した。一方この条件下のAnimex内自発運動は，L-5HTP注射2時間後において有意な増加を認めた。(4)以上の結果について5HT代謝とcatecholamine代謝との相互作用に注目しながら考察を加えた。

われわれは，昨年の本学会でラットにα-methyl para tyrosine (α-MT)とL-5-hydroxytryptophan (L-5HTP)を組み合わせて注射することによりひきおこされる脳内catecholamine (CA)低下，serotonin (5HT)増加状態について報告した。[9] さらにそのような脳内monoamine変動状態における躁うつ病治療薬投与時の脳内monoamine代謝および行動変化について研究をすすめており，[6] 今回は，抗躁剤であるlithiumの他に，抗うつ剤のdesmethylimipramine (DMI)をとりあげて上記条件下におけるラット脳内5HT代謝および行動変化について検討した。

実験方法

動物はWistar系成熟ラットの雄(230g～250g)を用い，餌と水を十分に与えた。注射薬および，その投与量はα-MT 250mg/kg，L-5HTP 50mg/kg，LiCl 3.5mEq/kg，desmethylimipramine 25mg/kg，対照には0.9%食塩水を用い，すべてラットの腹腔内に注射した。注射および測定のスケジュールは，Fig 1に示す通りであり，α-MT注射11時間後にL-5HTPを注射し，ラットの脳内CA低下5HT増加状態をつくった。そのラットのL-5HTP注射1時間前にLiClあるいはdesmethylimipramineの注射を行った。断頭時刻は脳内amineの日内変動を考慮して常にL-5HTP注射1時間後の午前11時に行なった。断頭後直ちに氷上でラットの脳を解剖し，終脳，間脳，中脳＋橋＋延髄の三部位について，5HTおよび5HIAAをGiacaloneとValzelliの方法[4]により測定した。5HTおよび5HIAAの回収率はそれぞれ75%，95%であった。行動測定は，Animex S型を用い，上記条件下でL-5HTP注射後4時間にわたって，1時間毎のAnimexによる自発運動量を測定した。Animexはwalkingなどの粗大な動きをカウントするよう

にセットした。

実験結果および考察

α-MT注射11時間後にL-5HTPを注射し，さらに1時間後の脳内CA濃度は，昨年報告[9]したように，0.9%食塩水を注射した対照ラットに比べ，dopamineは終脳で，norepinephrine (NE)は，終脳および間脳以下で有意に減少していた。またα-MT＋0.9%食塩水＋L-5HTP注射ラットの脳内5HT，5HIAA濃度は，Table 1，Table 2.に示すように，0.9%食塩水を注射した対照に比べて，5HT，5HIAAともに終脳，間脳，中脳＋橋＋延髄のいずれの部位においても，危険率0.1%で有意な増加を示した。一方，α-MT注射11時間後にL-5HTPを注射したラットの行動変化は，Fig 2に示すように，L-5HTP注射後4時間にわたって，Animex内自発運動量の有意な減少を示した。α-MT注射10時間後にLiClを注射し，さらに1時間後にL-5HTPを注射し，さらに1時間後の脳内5HT濃度はTable Iに示すように，α-MT＋0.9%食塩水＋L-5HTP注射群に比べ，終脳，間脳，中脳＋橋＋延髄の三部位において有意な増加を示した。また同じ条件下でのラットのAnimex内自発運動量は，L-5HTP注射2時間後において，有意な増加を示した。Perez-Cruetら[10]は，LiCl 85mg/kgを1日2回5日間腹腔内に投与したラットの全脳で5HT濃度が15～20%，5HIAA濃度が80%共に有意に増加していることを認め，lithiumが脳内5HT合成率を高めることを報告している。しかし，Hoら[5]は，これとは異なった結果を出しており，ラットにLiCl 2 mEq/kgを28日間投与した場合の視床下部および脳幹における5HT濃度の有意な減少を報告している。このように実験条件により，結果は必ずしも一定していない。前駆物質

Fig. 1 Schedule of treatments

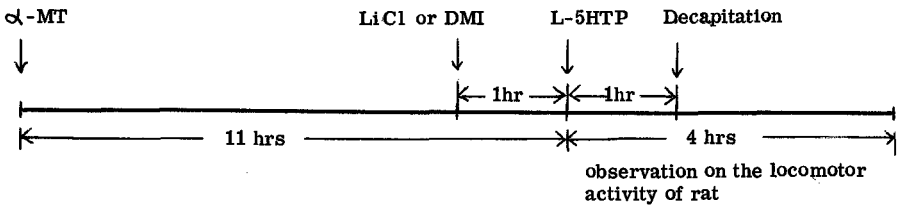


Table 1 Effect of lithium or desmethylimipramine on the accumulation of 5HT in rat brain induced by α-MT plus L-5HTP treatment.

5HT (μg/g)

	0.9% saline	α-MT +0.9% saline+L-5HTP	α-MT + LiCl + L-5HTP	α-MT + DMI + L-5HTP
TE	0.38 ± 0.03 (5)	0.86 ± 0.10 (7)	1.11 ± 0.15 (5)*	0.63 ± 0.09 (5)**
DI	0.72 ± 0.08 (5)	1.23 ± 0.20 (7)	1.90 ± 0.40 (5)**	1.00 ± 0.11 (5)
MPM	0.65 ± 0.07 (5)	1.17 ± 0.19 (7)	1.50 ± 0.14 (5)**	0.97 ± 0.07 (5)

mean + S.D. ( )= number of animals * $p<0.05$ ** $p<0.01$
compared with the α-MT + 0.9% saline + L-5HTP group

TE : Telencephalon , DI : Diencephalon , MPM : Mesencephalon + Pons + Medulla oblongata

を投与した実験にはSchubert[11]の実験がある。彼は、lithiumを慢性投与したラットに^{3}H-tryptophanを投与し、脳内^{3}H-5HTおよび^{3}H-5HIAAが対照群に比べ有意に増加することを認め、lithiumが前駆物質であるtryptophanの脳内へのとりこみを増加することを報告している。われわれのα-MTとL-5HTPを組み合わせて注射してひきおこされた脳内CA低下5HT増加ラットでもlithiumによる脳内5HT, 5HIAAの増加が認められ、このことはlithiumが5HTの前駆物質であるL-5HTPの脳内へのとりこみを増加した可能性が考えられる。またCorradiら[2]は、α-MT注射ラットにおいて、lithiumがNEのturnoverを増加することを報告しており、われわれの実験条件における脳内5HT, 5HIAA濃度の増加は、NEのturnoverの増加が関与しているのかもしれない。一方、脳内5HT濃度と動物行動については、いろいろの報告がある。マウスやラットにおいて、5HTP単独投与の場合、鎮静効果が認められるが、MAO阻害剤と併用した場合には、運動量の増加を伴った興奮および回旋痙攣がひきおこされたという[3]。またModigh[7]は、DL-5HTPとperipheral aromatic amino acid inhibitorであるMK-486を組み合わせて注射することによりラットの脳内5HT増加に伴なう多動状態を報告している。われわれの実験条件下でLiCl注射に

Fig 2. Effect of lithium or desmethylimipramine on the decreased locomotor activity induced by α-MT plus L-5HTP treatment

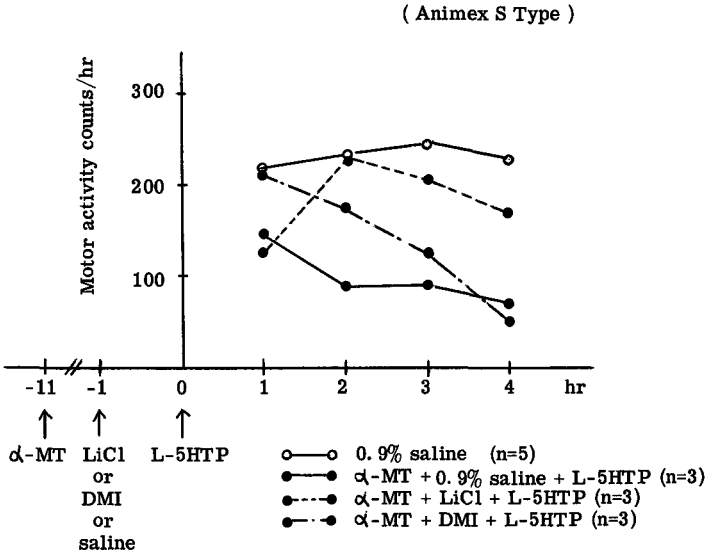


Table 2 Effect of lithium or desmethylimipramine on the accumulation of 5HIAA in rat brain induced by α-MT plus L-5HTP treatment

5HIAA (μg/g)

	0.9 % saline	α-MT + 0.9 % saline + L-5HTP	α-MT + LiCl + L-5HTP	α-MT + DMI + L-5HTP
TE	0.28± 0.03 (5)	1.90 ± 0.12 (7)	1.91 ± 0.21 (5)	1.01 ± 0.13 (5)***
DI	0.72 ± 0.12 (5)	3.67 ± 0.14 (7)	4.52 ± 0.67 (5)**	2.04 ±0.32 (5)***
MPM	0.42 ±0.06 (5)	3.14 ± 0.48 (7)	4.56 ± 0.62 (5)**	0.91 ± 0.14 (5)***

mean ± S.D. ( )= number of animals **p<0.01 ***p<0.001
compared with the α-MT + 0.9 % saline + L-5HTP group

TE : Telencephalon , DI: Diencephalon , MPM: Mesencephalon + Pons + Medulla oblongata

より，脳内5HTの増加が認められ，L-5HTP 注射2時間後のAnimex 内自発運動量の増加がみられた．このことは，脳内5HT濃度の変化が行動変化をひきおこした可能性を示唆している。しかし，α-MT注射による脳内CA の変化の関与も考える必要がある。 次に，Fig 1 のように，α-MT 注射10時間後にdesmethylimipramineを注射しさらに1時間後に，L-5HTP を注射したラットの注射1時間後の脳内5HT濃度はTable 1に示すように，desmethylimipramine のかわりに0.9% 食塩水を注射した群に比べて，終脳において有意な減少を示した。また5HIAA濃度もTable 2に示すように，終脳，間脳，中脳+橋+延髄の三部位において，いずれも有意な減少を示した。一方同じ条件下でのラットのAnimex 内自発運動量はFig 2に示すようにdesmethylimipramineのかわりに0.9%食塩水を注射した群に比較して，L-5HTP 注射2時間後において有意な増加を示した．Carlsson ら[1]は 4-methyl-α-ethyl meta tyramine を注射して，マウスの脳内5HT低下状態をつくり，種々の抗うつ剤について検討し，その結果三級アミンであるimipramine などは，5HT neurone の synapse における5HTのreuptakeを阻止するが，二級アミンであるdesmethylimipramine はその作用が弱いことを報告している．さらに彼ら[7]は 4α-dimethyl-meta-tyramine を注射しておこる脳内CA 低下状態において，desmethylimipramineがNE neuron のSynapse における NE のreuptakeを阻止するが，imipramine はその作用が弱いことを報告している。一方行動変化については，Modigh[8]の報告がある。彼はDL-5HTPとMK 486を組み合わせて注射したラットの脳内5HT増加に伴なう多動状態において，5HT neuron へのreuptake をより多く阻止する三級アミンのchlorimipramine はさらに行動の増加をひきおこすが，二級アミンである protriptyline は行動の増加をひきおこさないことを報告している．われわれの実験における α-MT + desmethylimipramine + L-5HTP 注射ラットでdesmethylimipramineのかわりに0.9% 食塩水を注射した対照群に比べて，L-5HTP 注射1時間後において，脳内5HTおよび5HIAA濃度が，有意に減少し，L-5HTP 注射2時間後においてAnimex 内自発運動量の増加がみられた．この結果は前に報告[6]したこの条件下における imipramine 投与時の5HT代謝および行動変化もあわせ考えると，desmethylimipramineによる5HT代謝の変化のみならず，NE neuron へのNE のreuptake の阻止も関連している可能性がある．

文 献

1) Carlsson, A. Corrodi, H. Fuxe, K. & Hökfelt, T. : Europ. J. Pharmacol. 5, 357 (1969)
2) Corrodi, H. Fuxe, K. Hökfelt, T. & Schou, M. : Psychopharmacologia 11, 345, (1967)
3) Garattini, S. & Valzelli, L. : In Serotonin, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 206 (1965)
4) Giacalon, E. & Valzelli, L. : Pharmacology 2, 171 (1969)
5) Ho, A.K.S. Loh, H.H. Craves, F. Hitzemann, R.J. Gershon, S. : Europ. J. Pharmacol. 10, 72 (1970)
6) 仮屋哲彦，中河原通夫，堤彰，新垣米子，渡辺明子，杉崎哲朗，脇坂道男，鳥居多磨：精神薬療基金研究年報 6，73 (1974)
7) Modigh, K. : Psychopharmacologia 23, 48 (1972)
8) Modigh, K. : J. Neural Transmission 34, 101 (1973)
9) 中河原通夫，堤彰，新垣米子，渡辺明子，杉崎哲朗，仮屋哲彦 : 神経化学 12，5 (1974)
10) Perez-Creut, J. Tagliamomte, A. Tagliamonte, P. Gessa, G. L. : J. Pharmacol. Exp. Therap. 178, 325 (1971)
11) Schubert, J. : Psychopharmacologia 32, 301 (1973)

10 L−5HTP，MK486併用投与時の脳および末梢臓器の5HT濃度

沼田吉彦・熊代永・金子元久
高橋志雄・星野仁彦・本多幸作
海野幸浩（福島医大・精神）
鈴木武彦（福島医大・薬理）

〔要約〕

末梢性脱炭酸酵素阻害剤であるMK486のL-5HTPに対する影響をみるため，われわれは，家兎にL-5HTP, MK486を投与して，脳および末梢臓器の5HT濃度を測定し，次の結果を得た。(1) MK486（10mg/kg, I.P.）単独投与群：脳各部位および末梢臓器の5HT濃度には大きな変化は認められなかった。(2) L-5HTP（50mg/kg, S.C）単独投与群：脳各部位の5HT濃度は投与1時間後では，終脳の3.6倍を最高に，間脳，中脳，小脳の順にいずれも有意に増加し，2時間後にはすでに増加のピークはすぎていた。末梢の5HT濃度は，臓器により それぞれ異なった消長を示したが，腎，肝では83倍，17倍と変化が大きく，血清，十二指腸では2.1倍，1.3倍と変化は小さかった。(3) L-5HTP, MK486併用投与群：脳各部位の5HT濃度は，投与1時間後ではL-5HTP単独投与群とほぼ同様の値を示したが，投与2時間後には，単独投与群の1.8～1.6倍の増加が認められた。末梢臓器では投与1時間後にMK486の抑制効果が強く認められたが，2時間後ではすでにピークはすぎていた。(4) L-5HTP, MK486併用投与2時間後の生存群と死亡群の5HT濃度：死亡群の脳内5HT濃度は，生存群に比し，ほぼ1.5倍の増加を示したが，末梢では逆に減少傾向を示した。(5) 以上より，MK486はL-5HTPに対して，投与1時間後では末梢で抑制作用を示し，投与2時間後では脳内5HTの増加を示すことを示唆した。

L-α-methyldopa hydrazine（MK486）は，末梢性Dopa脱炭酸酵素阻害剤といわれ，現在パーキンソン病の治療にL-Dopaと併用投与され，L-Dopaの末梢性の副作用を防止するとともにeconomizerとしての役割をはたしている。[1] 近年，L-5-hydroxytryptophan（L-5HTP）が内因性うつ病や精神分裂病などに対して有効であるという報告がなされ，このアミン前駆物質もL-Dopa同様臨床使用への期待がもたれている。しかし，L-5HTPは，これまでの臨床治験より副作用として悪心，下痢などの胃腸症状が認められ，[2] また，動物実験などで腎障害も推測されている。[3)4)] そこで今回われわれは，家兎にMK486とL-5HTPとを併用投与して，脳および末梢各部位の5HT濃度を測定し，MK486がL-5HTPの末梢での副作用を防止するか，また，economizerとしてどの程度の効果を有するかなどを検討したので報告する。

実験材料および方法

使用動物は3kg前後の家兎を用いた。薬物の投与方法については，L-5HTPは0.5%水溶液とし，50mg/kgを皮下注射で投与し，MK486は0.1N HCl液1mlに10mgの割合で溶解させ，10mg/kgを腹腔内注射で投与した。対照群はL-5HTP 50mg/kg投与群と同量の0.9% NaCl水を投与し，1時間後の5HT濃度を測定した。薬物投与群は，MK486群，L-5HTP群，L-5HTPとMK486併用群の3群に分類し，各群の終脳，間脳，中脳，小脳，血清，十二指腸，肝，腎など8部位の5HT濃度を測定した。これら各部位の5HT濃度の測定時刻については，MK486群は投与1時間30分後，2時間30分後，24時間30分後であり，L-5HTP投与群は投与1時間後，2時間後，24時間後である。L-5HTPとMK486併用群は，MK486投与30分後にL-5HTPを投与し，その後，1時間，2時間，24時間

後の5HT濃度を測定した。5HTの測定はBogdanski法[5]によったが，抽出までの手順は前報[3]のごとくである。実験頭数は各群により異なるが，最低4匹より最高8匹までである。各群の5HT濃度は平均値と標準誤差で示し，有意差検定はStudentのt検定法を用いた。

結果および考察

表1 L-5HTP(50mg/kg.S.C.), MK486(10mg/kg.I.P.) 併用投与時の5HT濃度 (μg/g,ml) 平均値±標準誤差(実験頭数)

		1時間後	2時間後	24時間後
終脳	対照群	0.31±0.02(6)		
	MK群	0.28±0.03(5)	0.28±0.03(4)	0.33±0.11(5)
	5HTP群	1.12±0.13(5)	0.83±0.05(4)	0.37±0.05(5)
	MK+5HTP群	1.02±0.06(5)	1.40±0.19(8)	0.46±0.05(5)
間脳	対照群	0.70±0.04(8)		
	MK群	0.57±0.08(5)	0.63±0.07(4)	0.60±0.07(5)
	5HTP群	1.86±0.16(8)	1.71±0.11(4)	0.69±0.07(5)
	MK+5HTP群	1.94±0.12(5)	3.08±0.40(8)	0.91±0.03(5)
中脳	対照群	0.96±0.04(8)		
	MK群	0.81±0.04(5)	0.94±0.52(4)	0.90±0.14(5)
	5HTP群	2.31±0.15(8)	2.12±0.15(4)	0.83±0.06(5)
	MK+5HTP群	2.34±0.15(5)	3.30±0.39(8)	1.19±0.08(6)
小脳	対照群	0.11±0.01(6)		
	MK群	0.11±0.01(5)	0.16±0.05(4)	0.10±0.04(5)
	5HTP群	0.19±0.02(5)	0.20±0.03(4)	0.09±0.03(5)
	MK+5HTP群	0.26±0.07(5)	0.36±0.06(8)	0.22±0.07(6)
血清*	対照群	4.85±0.67(8)		
	MK群	4.88±0.29(5)	6.54±1.74(4)	5.88±0.72(5)
	5HTP群	10.30±0.58(8)	9.14±1.05(4)	6.37±1.47(5)
	MK+5HTP群	8.92±1.27(5)	8.97±1.01(8)	7.99±1.48(5)
十二指腸	対照群	8.04±1.56(8)		
	MK群	6.07±0.69(5)	5.74±1.82(4)	7.12±1.14(5)
	5HTP群	8.27±0.50(8)	10.67±1.07(4)	7.95±1.07(5)
	MK+5HTP群	5.86±0.53(5)	8.97±1.06(8)	10.13±1.10(6)
肝	対照群	0.78±0.04(5)		
	MK群	1.20±0.23(5)	1.10±0.23(4)	0.90±0.11(5)
	5HTP群	8.53±0.64(5)	10.67±2.11(4)	1.64±0.39(5)
	MK+5HTP群	4.31±1.36(5)	6.23±0.71(8)	1.11±0.11(5)
腎	対照群	0.32±0.06(5)		
	MK群	0.28±0.02(5)	0.42±0.09(4)	0.47±0.07(5)
	5HTP群	26.65±4.02(5)	10.01±4.78(4)	1.96±1.44(5)
	MK+5HTP群	1.85±0.24(5)	16.80±2.81(8)	0.64±0.19(5)

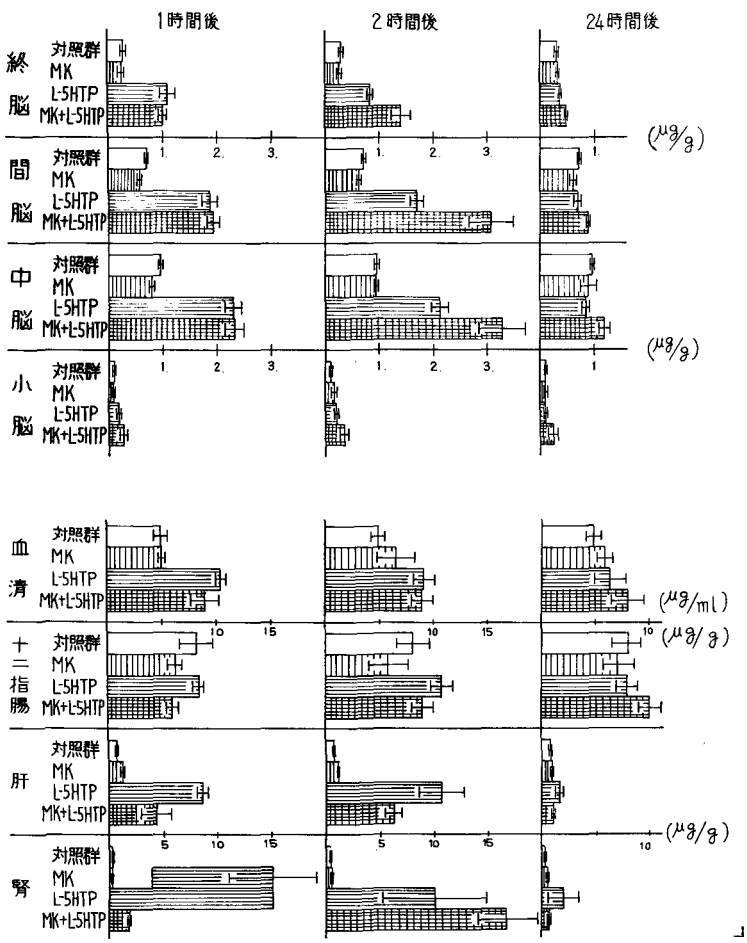
I. L-5HTP, MK486投与時の各部位の5HT濃度(表1, 図1)

1) MK486単独投与群：脳および末梢各部位の5HT濃度は，中脳および腎を除いては特別な変化は認められなかった。

2) L-5HTP単独投与群：脳各部位の5HT濃度は投与1時間後にいずれも有意に増加し，特に終脳が3.6倍と最大の変化を示し，次いで間脳，中脳，小脳の順にそれぞれ2.7倍，2.4倍，1.7倍という増加を示した。2時間後では，すでに終脳ではピークをすぎ，3.6倍から2.4倍に減少し，間脳，中脳でも減少傾向が認められた。24時間後では，各部位とも対照群とほぼ同じ濃度に戻った。

一方，末梢各部位をみると，5HT濃度の変化は各臓器によりそれぞれ異なった消長を示していた。すなわち，最大の変

図1　L-5HTP(50mg/kg.S.C.) MK486(10mg/kg.I.P.)
併用投与時の5HT濃度 (μg/g, ml)



化を示したのは腎で，投与1時間後に実に83.9倍という驚異的な増加が認められた。この変化ときわめて対照的なのは，生理的に大量の5HTが存在する十二指腸で，投与2時間後にわずか1.3倍の増加を示したにすぎなかった。肝は腎についで13.6倍という増加幅を示したが，他の臓器とは異なり，代謝が緩慢で24時間をすぎてもなお対照群の2.1倍という値を示した。

末梢各部位の中で，脳に最も似たような変化を示したのは血清であった。投与1時間後に2.1倍に増加し，次いで2時間後は1.9倍となり，24時間後にはもとに戻っていた。

3) L-5HTP, MK 486併用投与群：脳各部位の5HT濃度は，投与1時間後ではL-5HTP単独投与群とほとんど同様であった。しかし，2時間後では，L-5HTP単独投与群はすでにピークをすぎ減少傾向を示したが，併用投与では逆に増加を認めた。すなわち単独投与群に比し，1.8倍から1.6倍の増加であった。そして24時間後でもなお間脳，中脳では，それぞれ1.3倍，1.4倍と依然増加していた。

一方，末梢臓器では投与1時間後にMK486の抑制効果が認められた。すなわち，腎では単独投与群の1/10以下と著明であり，肝および十二指腸では1/2，2/3と軽度であった。そして，2時間以後ではこの抑制効果はピークをすぎていた。しかしこれらに対して，血清では有意差は認められなかった。

Ⅱ. L-5HTP, MK486併用投与2時間後の生存群と死亡群との5HT濃度（表2, 図2）
併用投与群の2時間値をしらべた8例中4例は直前に死亡し，4例は生存した。死

表2
L-5HTP(50mg/kg),MK486(10mg/kg) 併用投与2時間後の
生存群と死亡群の5HT濃度 (μg/g, ml)

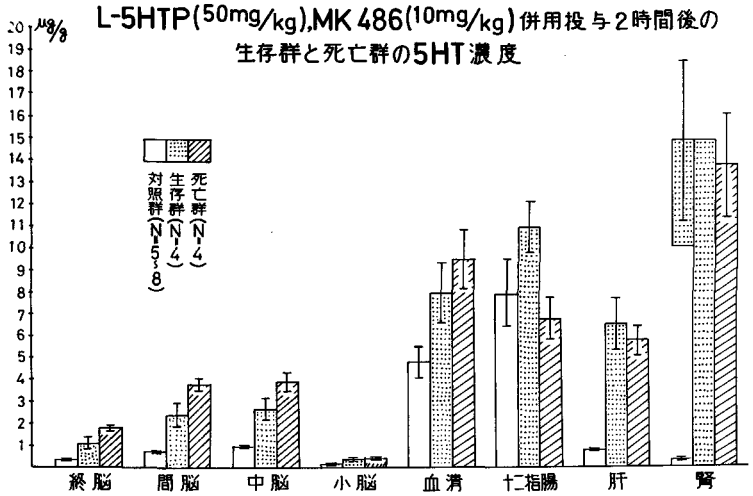
	終脳	間脳	中脳	小脳	血清	十二指腸	肝	腎
対照群	0.31 ±0.02 (N=6)	0.70 ±0.04 (N=8)	0.96 ±0.04 (N=8)	0.11 ±0.01 (N=6)	4.85 ±0.67 (N=8)	8.04 ±1.56 (N=8)	0.78 ±0.04 (N=5)	0.32 ±0.06 (N=5)
生存群(N=4)	1.06 ±0.26	2.37 ±0.54	2.66 ±0.49	0.33 ±0.05	8.04 ±1.40	11.06 ±1.16	6.60 ±1.21	19.73 ±3.77
死亡群(N=4)	1.75 ±0.14	3.80 ±0.27	3.93 ±0.43	0.38 ±0.11	9.57 ±1.35	6.87 ±0.98	5.86 ±0.71	13.88 ±2.41

死亡群では，脳の5HT濃度は終脳，間脳，中脳とも生存群へほぼ1.5倍の増加を示し，逆に末梢の十指腸では生存群の3/5に減少し，肝，腎でも減少傾向を示していた。すなわち，死亡群では投与2時間後の脳5HT増加との関係が考えられる結果であった。

文献

1) 大本泰史，岸川秀実 (1975) 脳と神経. 27, 225－233.
2) 佐野勇 (1971) 精神経誌 73, 809－815
3) 海野幸治，熊代永，金子元久，他 (1974) 神経化学 13, 21－24
4) 金子元久，海野幸治，熊代永，他 (1975) 脳研究会誌 1, 82－83
5) Bogdanski, D. F., Pletscher, A., Brodie, B. B., and Udenfriend, S. (1956) J. Pharmacol. Exptl. Therap. 117, 82－88

図2



11 脳内アミンのγ-グルタミル化：ヒスタミンからのγ-グルタミルヒスタミンの生成

小西博行 （阪大・医・高次研・神経）
柿本泰男 （愛媛大・医・精神）

〔要約〕

脳には種々のγ-グルタミルペプチドが存在する。またプトレスチンもγ-グルタミルアミドとして脳内に存在する。γ-グルタミルペプチドないしアミドはγ-グルタミルトランスペプチダーゼによって形成されると考えられる。以上の事実から脳内活性アミンもまたγ-グルタミルアミドを形成する可能性を考えた。

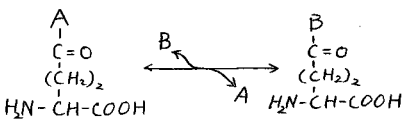
γ-グルタミルトランスペプチダーゼをラット腎および脳から部分精製し、種々のγ-グルタミルペプチドとヒスタミン、セロトニン、ドーパミン、p-チロシン、ノルアドレナリンとをインキュベートした結果、それぞれγ-グルタミル化合物を形成することを見出した。γ-グルタミル-ヒスタミン、-セロトニンおよび-ドーパミンは合成によって同定した。

γ-ヒスタミンをラット脳室内に注入したところ、γ-グルタミルヒスタミンが脳内で形成され、注射後30分で最高値に達しその後比較的速かに減少することを認めた。形成された化合物のγ-グルタミルヒスタミンとの同定は、イオン交換クロマトグラフィー、沪紙クロマトグラフィー、高圧沪紙電気泳動における合成品との一致、弱酸性条件で水解され易いことによった。

なお脳内にγ-グルタミルヒスタミンが存在するか否かを知ろうとする予備実験は出発材料が少なすぎたためか、不成功に終った。

脳におけるカテコールアミン、セロトニン、ヒスタミンなどの合成、代謝経路は1960年代前半において研究しつくされた観がある。実際現在までに明らかにされた経路でそれらの代謝は量的にほぼ説明しうる。われわれは脳内のアミノ化合物を分離同定する過程でかって7種のγ-グルタミルペプチド(1～5)を見出し、さらに最近プトレスチンの代謝の研究中プトレスチンからのγ-グルタミルプトレスチンの形成と脳内存在を見出した。(6)最近 Meister らはγ-グルタミルペプチドの形成に関与するγ-グルタミルトランスペプチダーゼがアミノ酸の膜透過に関係しているとの仮説を提唱した。(7) 以上のわれわれの実験事実と仮説に刺激され、アミンもγ-グルタミールペプチダーゼの基質となると考えその可能性を生体 in vitro の酵素実験で検討し、さらに in vivo で証明し得た。

γ-グルタミルトランスペプチダーゼは右のような反応を触媒し、グルタミン酸のγ位についたAをBにおきかえる。A,Bは普通アミノ酸である。



実験材料および方法

1) γ-グルタミルヒスタミンの合成　γ-グルタミルヒドラジド 1mモルを 1.5mlの2N塩酸に溶解し−5°に冷却、1mモルの $NaNO_2$ を0.5mlの水にとかして加え撹拌後直ちに NaOH で pH 8 としたヒスタミン塩酸塩水溶液 1mモルを加え、−5°で撹拌し、pHを8に保つよう 1N NaOH を加える。約20分反応後酢酸で弱酸性とする。溶液を Amberlite

IR 120, H^+, 100-200メッシュ, 1×10cm カラムに通し、カラムを100mlの水で洗い、1Nピリジン100mlで溶出し、減圧乾固する。乾固物をメタノール20mlにとかし Pd黒の存在下に水素添加を行なう。得られた液を沪過後 Amberlite IR-120, H^+型, 100-200メッシュ, 1×6cmに通し、100mlの水で洗い、さらに不純物を1Nピリジン50mlで洗い、目的の化合物を1Nアンモニア50mlで溶出し、溶出液を減圧乾固して、水、エタノール、アセトンから結晶175mg(83%收量)を得た。

2) γ-グルタミールセロトニンおよびγ-グルタミールドーパミンの合成　いづれも上記化合物に準じて合成したが、精製法は化合物の酸、アルカリに対する不安定さのために変更し、また難溶型で結晶しないため、p-ハイドロキシアゾベンゼン-p'-スルフォン酸塩として合成品を得た。

3) γ-グルタミルトランスペプチダーゼの精製　ラットの腎臓からOrlowskiおよびMeister(8)の方法で水可溶蛋白の除去、デオキシコール酸抽出、透析、アセトン分画、塩処理、デオキシコール酸処理のステップまで精製した。ラット脳からは水可溶性蛋白を除き、デオキシコール酸抽出をし透析後粗標品として用いた。

4) 酵素反応

γ-グルタミル基供与体(グルタチオンあるいはγ-グルタミルアミノ酸)	0.1M	0.03ml
γ-グルタミル基受容体(アミノ酸あるいはアミン)	0.1M	0.03ml
0.1M HCl-Tris緩衝液 pH8.0		0.03ml
酵素溶液(ラット腎の1場合 73μg蛋白)		0.03ml

を37°, 60分インキュベートし　3M酢酸0.3mlを加えて反応をとめた。

5) (Ring-2-^{14}C)ヒスタミンの精製　高圧沪紙電気泳動によりヒスタミン相当部位を抽出し 58mC/mM, 10μCi/10μlの水溶液を調製した。

6) ^{14}C-ヒスタミン注射後のラット脳内ヒスタミン代謝物質の分画　ラット脳摘出後直ちに5%トリクロール酢酸10mlでホモジネートとし、遠沈後、沈渣を再び10mlの同液に浮遊せしめ遠沈し、両上清をあわし、Amberlite IR 120, H^+型, 100-200メッシュ, 1×3cmカラムに通し、水洗する。ついで(1) 1Mピリジン20ml, (2) 1Nアンモニア20ml, (3) 0.2N NaOH 40mlと順次溶出する。(1)には中酸性代謝物質が、(2)にはγ-グルタミルヒスタミンその他の塩基性代謝物質が(3)にはヒスタミン、メチルヒスタミンなどがふくまれる。

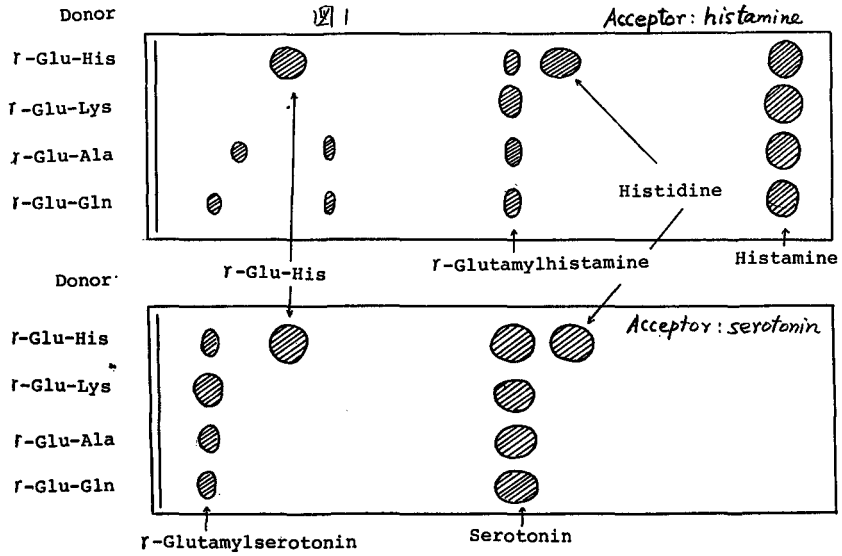
7) γ-グルタミルヒスタミンの精製と放射能測定　上の(2)の分画を減圧乾固した後、Amberlite IR 120, 200-400メッシュ, 1×20cmカラムを、あらかじめ8%ピリジン、2%酢酸混液で平衡化し、これに乾固物をチャージし同混液で溶出すると30mlを中心とし12から18mlの溶出液中に目的化合物が溶出される。この部分を減圧乾固後40μlにとかし10μlを高圧沪紙電気泳動にかけ、γ-グルタミルヒスタミンに相当する部分(予もってcoldの化合物を加えPauly反応で位置を知る)を50%エタノール2mlで溶出して液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する。

結果および考察

1) γ-グルタミルトランスペプチダーゼによるγ-グルタミルアミンの形成　グルタチオンあるいはγ-グルタミルグルタミン、γ-グルタミルアラニン、γ-グルタミールヒスチジン

γ-グルタミルリシンとアミン(ヒスタミン、セロトニン、ドーパミン)とのγ-グルタミル転移反応を行なわせて、高圧沪紙電気泳動、Pauly反応を行なうと図1のように、γ-グルタミルアミンの形成が確認される。沪紙クロマトグラフィーでも同様の結果が確認された。アミンの活性をアミノ酒反と比較すると約1/5である。p-チラミンも同様に反応し、ノルアドレナリンおよびプトレスチンは弱いが基質としての活性を示す。アドレナリンは基質とはならない。

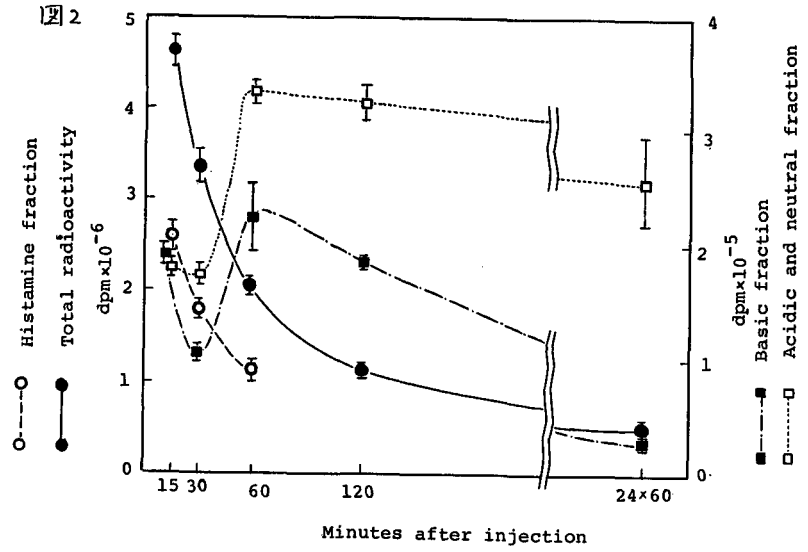
図1



2) ラット脳内におけるγ-グルタミルヒスタミンの形成

ラットの側脳室内に10μCiの^{14}C-ヒスタミンを注入後15分～24時間にラットを断頭し、各分画の放射能を測定したのが図2である。各分画の放射能は脳1gあたりの値を示し、各時点の値は3匹の実験値の平均値と標準誤差を示す。全放射能は1時間で約1/3となる。その代謝物質の放射能は注射後速かに減少するものと、増加し1時間で最高値に達し、漸減する物質とがある。

図2

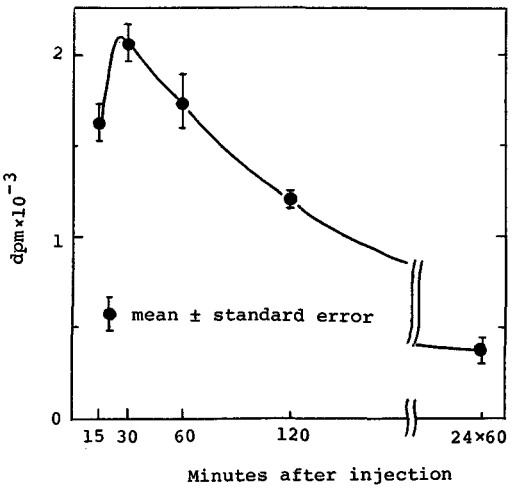


この中、塩基性分画をとり、イオン交換クロマトグラフィーおよび高圧沪紙電気泳動で精製したγ-グルタミルヒスタミンの放射能の経時変化は図3のようである。注射後約30分で最高値に達し、2時間で約半分に減少し、その後徐々に減少する。

3) γ-グルタミル-^{14}C-ヒスタミンの同定　合成品と電気泳動距離および4種の溶媒系による沪紙クロマトグラフィにおけるRF値が一値した。1NHCl, 105°で30分加水分解を行なうと約70%が水解されて^{14}C-ヒスタミンとなる。これはγ-グルタミルアミドの場合酸水解を受け易いという事実と符合する。

4) γ-グルタミルヒスタミンの脳内存在　以上の結果から脳内に本化合物が存在することが当然予想されたので、それを確めるために以下の実験を行なった。すなわち牛脳7.5kgからトリクロール酢酸の溶性分画をとり、Amberlite IR 120, H^+型カラムに吸着させ、水、ピリジンで洗った後、アンモニアで塩基性物質を含む分画をとり、減圧乾固せしめた。これに精製のマーカーとして、酵素反応で合成したγ-グルタミル-^{14}C-ヒスタミン(3.7×10^{4}c.p.m)を加えて①Amberlite IR 120.(ピリジン8%酢酸2%で平衡化し)同液で溶出 ②Amberlite IR 120, NH_4型、0.1Mアンモニアで溶出 ③Amberlite IR 120(ピリジン15%、酢酸5%で平衡化)、同液で溶出、④Dowex 50 ×8,(0.1M リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化)同液で溶出、⑤除塩後高圧沪紙電気泳動で精製した。しかしPaulyおよびニンヒドリン反応で同物質の存在を確認し得なかった。このことは予知できぬことではなく、普通脳内のγ-グルタミルアミノ酸とアミノ酸の量比は1000:1で、これがヒスタミンの場合も同様とすれば、ヒスタミン濃度は一般に50 μg/kgであり、7.5kgにふくまれると予想されるγ-グルタミルヒスタミンは0.4μgである。したがって存在を証明しようとすれば、さらに大量の材料を用いるか、感度のよい方法を考案しなければならないであろう。

図3
Change in Radioactivity of γ-Glutamylhistamine after Intraventricular Injection of ^{14}C-Histamine



脳内のアミンの1つヒスタミンから脳内でγ-グルタミルヒスタミンが合成されることを示したが、酵素実験の結果から考えると他のアミンも同様の代謝物質を形成している可能性は充分ある。Meisterら(7)のγ-グルタミルペプチド形成と分解がアミノ酸の能動輸送に関連しているという説がもし正しいとすれば、この考えはアミンの膜での能動輸送にも適用できるが、その当否は今後の研究に俟たねばならない。

文献　1) Kakimoto, Y., Nakajima, T., Kanazawa, A., Takesada, M., Sano, I., Biochim. Biophys. Acta, 93, 333 (1964) 2) Kakimoto, Y., Kanazawa, A., Nakajima, T., Sano I., Biochim. Biophys. Acta, 100, 426 (1965) 3) Kanazawa, A., Kakimoto, Y., Nakajima, T., Sano, I., Shimizu, H., Takesada, M., Biochim. Biophys. Acta, 97, 460 (1965) 4) Kanazawa, A., Kakimoto, Y., Nakajima, T., Sano, I. Biochim. Biophys. Acta, 111, 90 (1965), 5) Sano, I., Kakimoto, Y., Kanazawa, A., Nakajima, T., Shimizu, H., J. Neurochem. 13, 711 (1966), 6) Nakajima, T., Kakimoto, Y., Tsuji, M., Komishi, H., Sano, I., J. Neurochem. in press 1985, 7) Meister Science 180, 33, 1973, (8) Orlowski, M. and Meister, A., J. Biol. Chem. 240, 338 (1965)

12 ラット大脳皮質のシナプトゾームによるグルタミン酸のとり込みの特徴：ウァバインの効果

高　垣　玄吉郎　　（都神経研・神経生化）

〔要約〕

(1)シナプトゾーム分画でのグルタミン酸(Glut酸)のとり込みの double-reciprocal plot (図1)は大脳皮質切片でのとり込みと同様のパターンを示し，D-Glut酸はシナプトゾームでも affinity の低い single component でとり込まれる。(2)シナプトゾーム分画では，D-Glut酸とり込みの affinity は非常に低く，D-，L-Glut酸の affinity の相異は，皮質切片におけるよりも著しくはなはだしい。(3)シナプトゾーム分画へのL-Glut酸の high affinity uptake の time course は他の putative transmitters に比して特徴的である。さらに，シナプトゾーム分画へのD-Glut酸，GABAのとり込みはウァバイン($5\times10^{-5}M$)により強く阻害されるのに，L-Glut酸の high affinity uptake はウァバインに insensitive である。(4)ラット大脳の種々の部位の P_2 分画で，L-Glut酸は殆んど等しく活発にとり込まれる。P_2 分画で，グルタミン酸生成酵素活性はその分解(代謝)酵素活性に比べて著しく高い。(5)これらの成績は，シナプスにおけるグルタミン酸の機能が，典型的な伝達物質であるよりもむしろ，そのとり込み系に特別な意味があることを，示唆しているかもしれない。

伝達物質候補としてのグルタミン酸(Glut酸)の動態を解明するため，シナプトゾーム分画によるL-およびD-Glut酸のとり込みと放出の解析を試み，以下に記するような成績をえた。とくに，シナプトゾームによるL-Glut酸のとり込みに対するウアバインの効果について述べる。

〔方法〕シナプトゾームの調製には，ウィスター系のラット(200－250g)を，大脳皮質切片の実験には，モルモット(約250g)を用いた。実験方法の大要は次の如くである。(1)シナプトゾームおよび大脳皮質切片のインクベーションには，グリシル-グリシン(30mM)を含むリンゲル液(グルコース，5mM；pH 7.4)を用い，ガス相は空気。(2)ラベルしたD-Glut酸の調製：^{14}C-あるいは^{3}H-DL-Glut酸をGlut酸デカルボキシラーゼ(E. coli，協和醗酵)で充分処理したのち，イオン交換樹脂カラムでGlut酸を分離して調製。(3)Glut酸などの分離：Berl ら[1]のイオン交換樹脂カラムの方法をやゝ改良。(4)^{14}C-および^{3}H-放射能の測定：液体シンチレーションカウンター(パッカード3330)によりBray液を用いて測定。(5)シナプトゾームの調製：Whittakerらの方法[2]。P_2 分画およびその細分画(A, B, C)。(6)シナプトゾーム分画へのGlut酸などのとり込みと放出：ミリポアフィルター(DA, 0.65μ)を用いるNicholas ら[3]の方法により，インクベイトしたシナプトゾームの浮遊液から継時的に一定量をとり出し，ミリポアフィルターで口過・洗滌したのち，カウント。(7)蛋白定量：Lowry らの方法。(8)酵素活性の測定，(a)Glut酸デヒドロゲナーゼ：Balázs ら[4]の方法により，α-オキソグルタル酸からGlut酸の方向に25°Cで測定。その他の酵素活性は37°Cで測定。(b)Glut酸デカルボキシラーゼ：^{14}C-L-Glut酸(U)を用い，Baxter[5]に従って測定。(c)コ

リン・アセチルトランスフェラーゼ：Schrier ら[6]の方法を改良し，AG1×8，200－400 mesh のカラムで ^{14}C-アセチルコリンを分離してカウント。(d)グルタミン・シンテターゼ：Graham ら[7]の方法。(e)Na, K-ATPase：Bonting[8]の方法。

〔実験成績〕 (1) シナプトゾーム（P_2）による L-Glut 酸のとり込み系は，high affinity component と low affinity component から成るが（前者の Km は 3.37×10^{-5}M；後者の Km は 8.19×10^{-5}M），D-Glut 酸では affinity がさらに著しく低く，single component でとり込まれる〔$Km = 1.75\times10^{-3}$M〕。L-Glut 酸の low affinity component と D-Glut 酸のとり込みの Vmax は等しい（17.8 nmol/2 min/mg protein）。

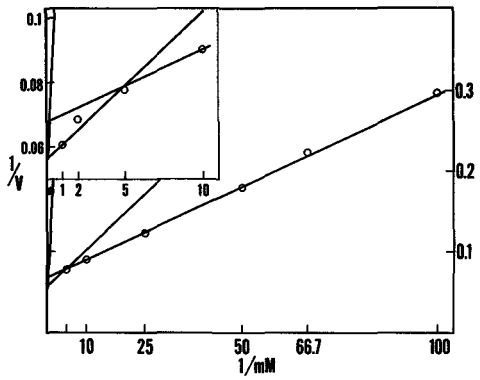


図1。ラット大脳皮質 P_2 分画への L-Glut 酸(○)および D-Glut 酸(●)のとり込みの double-reciprocal plot. V= nmol/2 min/mg protein

(2) シナプトゾーム（P_2）による L-Glut 酸（10μM）のとり込みはウアバイン（5×10^{-5}M）によって殆んど阻害されないが，D-Glut 酸（10μM）や GABA（10μM）のとり込みは強く阻害される。これらのアミノ酸は Na-free（コリン・クロリドで Na を置換）のリンゲル液中では，殆んどとり込まれない。（図2～4）伝達物質候補の輸送に対するウアバインの作用については，[9],[10]の文献がある。

(3) 大脳皮質切片（モルモット）によるうえのアミノ酸のとり込みに対するウアバイン（5×10^{-5}M）の効果もシナプトゾームの場合とにている。即ち，D-Glut 酸（0.5 mM および 10μM）および高濃度の L-Glut 酸（0.5 mM）のとり込みはウアバインにより強く阻害されるが，低濃度の L-Glut 酸（10μM）のとり込みは余り阻害されない。（図示せず）

(4) ウアバイン（5×10^{-5}M）の存在下でも，シナプトゾーム（P_2）からの L-Glut 酸の放出は殆んど阻害されないが，D-Glut 酸の放出は強く阻害される。（図示せず）

(5) P_2 による L-Glut 酸とり込みは，大部分 B 細分画（synaptosomal fraction）に回収される。（表1および図5） 低滲透圧処理した P_2 分画では，L-Glut 酸のとり込みは殆んど認められない。A, B, C 細分画での L-Glut 酸（10μM）とり込みの分布は，シナプトゾームに局在すると考えられている Glut 酸デカルボキシラーゼ，コリン・アセチルトランスフェラーゼ，および Na, K-ATPase の分布とほゞ一致し，L-Glut 酸とり込みの high affinity component が P_2 分画のうちシナプトゾームに局在することを示唆する。（表1）

(6) 大脳皮質の P_2 分画のほか，小脳，線状体，視床の P_2 分画について，L-Glut 酸を含む種々の putative transmitters のとり込みを調べたが，いづれの部位でも，L-Glut 酸のとり込みが最高で，コリンのとり込みは D-Glut 酸のとり込み以下である。小脳皮質の細胞下分画については，Balázs ら[11~12]の詳しい研究がある。種々の部位の P_2 分画での Glut 酸代謝に関与する酵素のうち，Glut 酸生成酵素の活性に比し，Glut 酸分解（代謝）

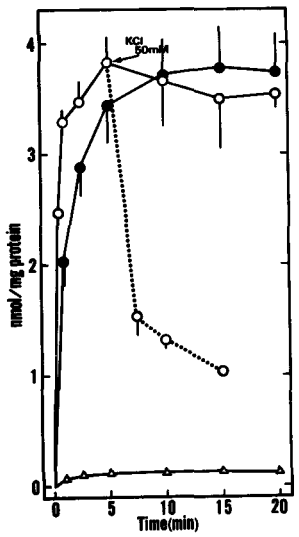


図2. ラット大脳皮質P_2分画へのL-Glut酸(○)とり込みのtime-course. 点線は50mM KCl添加後のtime course.
(●)ウアバイン(5×10^{-5}M)存在下.
(△)Na-free×ジウムでのL-Glut酸のとり込み.

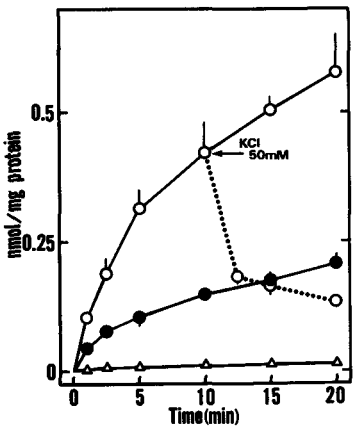


図3. ラット大脳皮質P_2分画へのD-Glut酸(○)とり込みのtime-course. その他, 図2と同様に表現.
(●)ウアバイン(5×10^{-5}M)存在下.
(△)Na-free×ジウムでのD-Glut酸のとり込み.

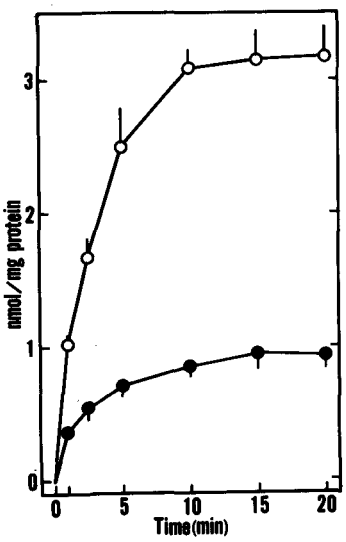


図4. ラット大脳皮質P_2分画へのGABAのとり込み(○)のtime-course.
(●)ウアバイン(5×10^{-5}M)存在下.

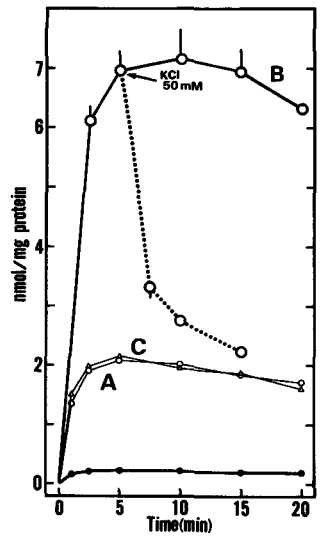


図5. ラット大脳皮質P_2分画のA, B, C細分画へのL-Glut酸とり込みのtime course. ●は低滲透圧処理をしたP_2分画でのL-Glut酸のとり込み.

酵素活性は著しく低い。Na, K-ATPase活性は, どの部位のP_2分画でもほぼ等しく高い。

〔考察〕 以上の成績から, 次のような考察が可能であろう。(1)シナプトゾームおよび大脳皮質切片を用いたとり込みの実験は, シナプトゾームのほか, グリヤ, 神経細胞体などでも, L-Glut酸のとり込みが行われることを示す。(2)L-Glut酸とり込みのhigh affinity componentは, シナプトゾームに特に局在し, ウアバインに抵抗性である。(3)シナプトゾームによるL-Glut酸のhigh affinity uptakeの特徴は, そのとり込み速度, また放出速度が著しく高いことである。(4)D-Glut酸のとり込みはlow affinity componentによるもので, ウアバインにより阻害される。(5)脳の種

Distribution of L-Glutamic Acid Uptake, Protein, and Enzymes in Subfractions of the Crude Mitochondrial Fraction(P_2 fraction) from Rat Cerebral Cortex

	Protein	L-Glutamic Acid Uptake		Glutamate Decarboxylase		Choline Acetyl-transferase		Na,K-ATPase	
		(nmoles in 5 min/mg protein)		(μmoles/mg protein/hr)					
P_2 fraction		3.82 ± 0.23		0.353 ± 0.014		0.0601 ± 0.0032		18.02 ± 1.22	
Recovery in subfractions (%)	104.4	130.8		101.9		123.9		95.2	
Subfractions	Distribution (%)	Uptake (nmoles in 5 min/mg protein)	Distribution (%)	Activity (μmoles/mg protein/hr)	Distribution (%)	Activity (μmoles/mg protein/hr)	Distribution (%)	Activity (μmoles/mg protein/hr)	Distribution (%)
A(myelin)	18.9	2.08 ± 0.17	7.8	0.158 ± 0.013	7.7	0.0559 ± 0.0032	14.0	11.54 ± 0.73	13.6
B(synaptosome)	59.6	6.96 ± 0.34	82.8	0.434 ± 0.038	78.7	0.0926 ± 0.0078	74.9	21.71 ± 1.01	76.9
C(mitochondria)	21.6	2.16 ± 0.16	9.3	0.229 ± 0.021	13.6	0.0375 ± 0.0006	11.1	7.35 ± 0.09	9.5

表1. ラット大脳皮質P_2分画のA, B, C細分画における L-Glut酸(10μM)のとり込み, 蛋白質, および酵素活性の分布. 酵素活性は37°Cで測定, μmol/mg protein/hrで表現.

その部位のP_2分画へのL-Glut酸のとり込み, 種々の putative transmittersのとり込み, さらにその関連酵素の活性などから考えると, グルタミン酸は典型的な伝達物質であるよりも, あるいはそのシナプトゾームへのとり込みに特別の機能を予想すべきであるようにも思われる。(6) GABAのとり込みはウァバインにより阻害される。

Enzymes and Uptake Activities in the P_2 Fractions obtained from Four Parts of Rat Brain

	Cerebral cortex	Cerebellar cortex	Striatum	Thalamus
A. Uptake	(nmoles in 5 min/mg protein)			
L-Glutamic Acid	3.83 ± 0.23	0.83 ± 0.07	3.46 ± 0.57	3.439;3.421
D-Glutamic Acid	0.31 ± 0.04	0.18 ± 0.03	0.180 ± 0.013	0.173;0.203
L-Aspartic Acid	1.79 ± 0.14	0.62 ± 0.09	1.78 ± 0.33	0.991;1.018
GABA	2.36 ± 0.21	0.66 ± 0.06	1.15 ± 0.08	2.098;2.354
Choline	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.164 ± 0.019	0.085;0.103
B. Enzymes	(μmoles/mg protein/hr)			
Glutamate dehydrogenase	14.23 ± 0.88	13.4 ± 0.90	11.63 ± 0.22	15.97 ± 0.64
Glutamate decarboxylase	0.353 ± 0.014	0.139 ± 0.014	0.336 ± 0.012	0.419 ± 0.021
Glutamine synthetase	0.883 ± 0.096	1.639 ± 0.088	0.649 ± 0.050	0.984 ± 0.082
Choline acetyl-transferase	0.062 ± 0.003	0.0042±0.0003	0.175 ± 0.015	0.041 ± 0.004
Na,K-ATPase	18.02 ± 1.22	16.85 ± 2.02	15.05 ± 0.97	19.87 ± 2.07

表2. ラット脳の種々の部位のP_2分画の酵素活性ととり込み活性.

(1) Berl, S., Takagaki, G., Clarke, D.D. & Waelsch, H.(1962): J.biol. Chem. 237, 2562-2569. (2) Whittaker, V.P. & Barker, L.A.(1972): Methods of Neurochem. 2, 1-52(ed. Fried, R.), Marcel Dekker, New York. (3)Nicklas, W.J., Puszkin, S. & Berl, S.(1973): J.Neurochem. 20, 109-121. (4) Balazs, R.(1965): Biochem.J. 95, 497-508. (5) Baxter, C.F.(1972): Methods of Neurochem. 3, 1-73(ed. Fried, R.), Marcel Dekker, New York. (6) Schrier, B.K. Shuster, L.(1967): J.Neurochem. 14, 977-985. (7) Graham, L.T.Jr. & Aprison, M.H.(1969): J. Neurochem. 16, 559-566. (8) Bonting, S.L.(1970): Membranes and Ion Transport, 1, 257-363(ed. Bittar, E.E.), Wiley-Interscience, London. (9) Bennett, J.P.Jr., Logan, W.J. & Snyder, S.H.(1973): J.Neurochem. 21, 1533-1550. (10) Osborne, R.H. & Bradford, H.F.(1957): J.Neurochem. 25, 35-41. (11) Hajos, F., Tapia, R., Wilkin, G., Johnson, A.L. & Balazs, R.(1974): Brain Research, 70, 261-279. (12) Tapia, R., Hajos, F., Wilkin, G., Johnson, A.L. & Balazs, R.(1974): Brain Research, 70, 285-299.

13 脳のγ-アミノ酪酸の代謝コンパートメントの証明

小西博行・中嶋照夫・佐野勇
（阪大・医・高次研・神経）
柿本泰男（愛媛大・医・精神）

〔要約〕

ラット脳室内に放射性プトレスチンを投与し，経時的に脳のグルタミン酸，γ-アミノ酪酸およびγ-アミノ酪酸とヒスチジンのジペプチドのホモカルノシンの比放射能を測定し，次の結果をえた。

1). グルタミン酸とγ-アミノ酪酸の比放射能の比較から，プトレスチンからγ-アミノ酪酸が生合成される事を確認した。

2). γ-アミノ酪酸とホモカルノシンの比放射能を比較した場合，常に後者の比放射が高いことから，脳のγ-アミノ酪酸の代謝コンパートメントの多様性を考えた。

この事を確かめる目的で，ラット脳室内に放射性グルタミン酸およびグルコースを投与した結果，γ-アミノ酪酸の比放射能はホモカルノシンのそれより高値を示した。

これらの知見から，脳のγ-アミノ酪酸に複数の代謝コンパートメントが存在する事が証明され，1つはγ-アミノ酪酸ジペプチド合成に関係したプールと，1つはγ-アミノ酪酸ジペプチド合成に利用され難い，おそらくエネルギー代謝に関係したプールとが少なくとも存在する。

昨年の本学会において，放射性プトレスチンを脳室内に投与し，脳のポリアミンの代謝動態を報告した。今回は前回の検討でえた，脳のγ-アミノ酪酸の代謝コンパートメントの多様性を示唆する知見を，γ-アミノ酪酸の代謝の種々の関連物質を用いて，確かめたので報告する。

実験材料および方法

(1). 放射性物質：^{14}C-1,4-プトレスチン·2塩酸塩（比放射能 50mCi/mmol）は New England Nuclear Co.より，^{14}C-U-グルコース（比放射能 > 230mCi/mmol），^{14}C-U-グルタミン酸（比放射能 > 225 mCi/mmol），および ^{14}C-U-γ-アミノ酪酸（比放射能 > 150mCi/mmol）は The Radiochemical Centre より購入した。

(2). 放射性物質のラット脳室内投与法： 昨年の本学会で報告した方法を用いた。

(3). 脳の酸性，中性およびイミダゾールアミノ酸分画の精製： 放射性物質を脳室内に投与したのち，経時的に脱血致死せしめ，すばやく脳を取り出し約2gの脳を10倍量の5%トリクロール酢酸でホモジネートとし，3,000rpm 10分間遠沈しトリクロール酢酸の溶性分画をえた。残渣をさらに10mlの5%トリクロール酢酸で洗い遠沈した。上清を合わせ 60mlのエーテルで2回トリクロール酢酸を抽出して除いた。水層を1×2.5cm Dowex 50×2（100-200 mesh，H^+型）に通し，樹脂を水洗したのち 20mlの1Mピリジンで酸性および中性アミノ酸を，ついで20mlの2Mアンモニア溶液で塩基性アミノ酸を溶出した。酸性および中性アミノ酸分画を減圧乾固したのち，1×2.5cm Dowex 1×8（100-200 mesh，酢酸型）に通し，カラムを20mlの水で洗い，流出液を集め中性アミノ酸分画とした。さらに20mlの2M酢酸で酸性アミノ酸分画を溶出した。

塩基性アミノ酸分画を減圧乾固したのち，1×2.5cm Amberlite CG 50 (100-200 mesh, NH_4^+型) に通し，樹脂を20mlの水で洗い，流出液を集めてイミダゾールアミノ酸分画とした。

(4). トーアミノ酪酸，ホモカルノシンおよびグルタミン酸の定量と放射能の測定：トーアミノ酪酸の定量は中性アミノ酸分画の一定量をピリジン－酢酸－水（5：50：945，pH 3.4）を緩衝液とし，70 volt/cm，30分間高圧沪紙電気泳動を行ない，ニンヒドリンで発色させたのち，トーアミノ酪酸の発色を50%エタノール溶液4mlで抽出し，570 mμの吸収を測定し定量した。トーアミノ酪酸の放射能は50%エタノール抽出液3mlをバイアルにとり，トルエン系シンチレータを加え，液体シンチレーションカウンターで測定した。同様にして，ホモカルノシンはイミダゾールアミノ酸分画，グルタミン酸は酸性アミノ酸分画の一定量を用いて，定量および放射能測定を行なった。

実験結果

ラット脳室内に，放射性プトレスチン，グルコース，グルタミン酸，トーアミノ酪酸をそれぞれ，10，50，10，2μCiを投与し，1時間，4時間，24時間後の脳のトーアミノ酪酸，ホモカルノシンおよびグルタミン酸の比放射能の経時変化を図示した。（図1）図1から明らかなように，プトレスチンを投与した場合のみ，ホモカルノシンの比放射能が最初からトーアミノ酪酸のそれより数倍高い。グルタミン酸の比放射能は常に低値を示していることから，生成されたトーアミノ酪酸はグルタミン酸を介して生合成されたとは考えられない。

一方，グルコース，グルタミン酸を投与した場合は，プトレスチンの場合とは異なり，トーアミノ酪酸の比放射能はホモカルノシンのそれより上まわっていて，比放射能の逆転を認めなかった。トーアミノ酪酸を投与した場合は，グルタミン酸投与時とプトレスチン投与時の中間の傾向を示した。

考察

トーアミノ酪酸は主として，グルタミン酸の脱炭酸[1]によって生じることが知られている。最近Seiler[2]らはプトレスチンからトーアミノ酪酸が生合成されることを報告し，著者らもこれを確認した。

代謝のコンパートメンテーションの概念は，脳のグルタミン酸の代謝研究から，Waelsch[3,4,5]らによって提唱された。Silversmith[6]らによれば一般的に，物質が1つの代謝プールで代謝されてゆく場合，放射性前駆物質を投与すれば，その比放射能が低下するにつれて，代謝産物の比放射能が上昇し，ついに両者の比放射能が等しくなる。しかし，代謝産物の比放射能が急激に前駆物質のそれよりも数倍高くなる場合，1つの代謝プールでは説明出来なく，少なくとも2つの代謝プールがあり，そのうち1つが代謝的に活性な小さなプールと考えられる。そして組織を抽出するさいに，このプールは代謝的に活性の低い大きなプールに希釈されるため，代謝産物の比活性よりも低くなると解釈される。

今回の実験で，放射性プトレスチンを脳室内に投与して生じたトーアミノ酪酸と，トーアミノ酪酸ジペプチドのホモカルノシンの比放射能を比較すると，後者の比放射能が常に前者より数倍高かった。このことはトーアミノ酪酸の代謝プールに，ホモカ

ルノシンの合成に優先的に利用されるプールが存在することを示している。放射性グルコース，グルタミン酸の投与によって，生合成されたトーアミノ酪酸およびホモカルノシンの比放射能を比較すると，トーアミノ酪酸の方が高い結果がえられた。すなわち，前駆物質と代謝生成物質との間で，比放射能の逆転は起らなかった。

これらの知見は，プトレスチンから生成されたトーアミノ酪酸は，優先的にトーアミノ酪酸ジペプチド合成に利用され，グルタミン酸から生成されたトーアミノ酪酸は，トーアミノ酪酸ジペプチドに利用され難いことを示唆している。今後，このトーアミノ酪酸の代謝プールの多様性を，脳の細胞レベルで研究してゆきたい。

References

(1) Roberts, E. and Frankel, S.: J.Biol.Chem., 187, 55 (1950)

(2) Seiler, N., Wiechman, M., Fisher, A. and Werner, G.: J.Neurochem., 20, 699 (1973)

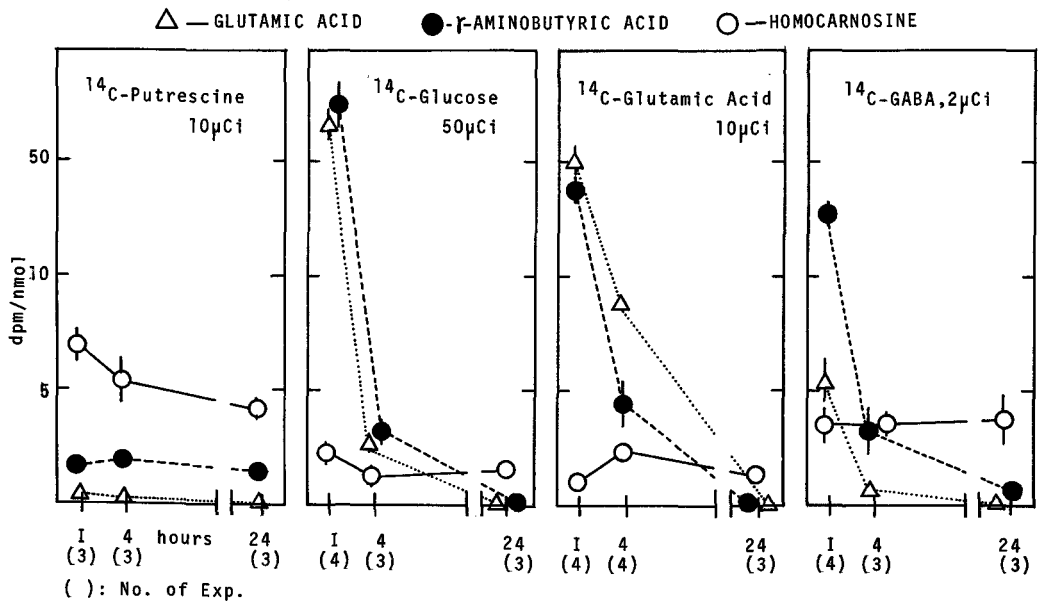
(3) Takagaki, G., Berl, S., Clark, D.D., Purpura, D.P. and Waelsch, H.: Nature, 189, 326 (1961)

(4) Waelsch,H.: Regional Neurochemistry; pp.57 Pergamon Press

(5) Waelsch, H.: Amino Acid Pools, pp.722 Elsevier Amsterdam

(6) Zilversmit, D.B., Entenman, C. and Fischer, M.C.: J.Gen.Physiol, 26, 325 (1943)

図 1 Specific Radioactivities of Glutamic Acid, γ-Aminobutyric Acid and Homocarnosine after Intraventricular Administration of Radioisotopes. Means ± S.E.



14 ウシ脳から精製したカルシウム結合タンパク質の諸性質

山縣文夫・笠井久隆・奥山典生
（都立大・理・化学）

〔要約〕

ウシ脳のホモジェネートから硫安分画法、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー、Sephadex G-75 ゲル沪過法により、カルシウム結合タンパク質が大量に、かつ高純度に精製された（脳9kgから、500～700mgが得られた）。

カルシウム結合能は $^{45}Ca^{2+}$ を用い、Sephadex G-25 によるゲル沪過法で測定した。

① 結合はタンパク質の濃度に依存するが、最適条件でタンパク質1分子当り、約3個のカルシウムイオンと結合し、うち約2個のカルシウムイオンの K_d 値は、$4\times10^{-5}M$ である。

② 結合には pH 依存性が見られ、pH 7～pH 10 で効率が良い。

③ 熱，尿素などによる変性を受けにくい結合が認められる。

④ EDTA，EGTA，リン酸基はカルシウムの結合を阻害する。

⑤ 2価金属イオンのうち、Mn^{2+} はカルシウムの結合を阻害するが、Mg^{2+} ではほとんど影響が認められない。

これらの結果と既報のカルシウム結合タンパク質と比較し、生理的意義を考察したい。

カルシウムは重要な生理機能を持っている。これと対応して、カルシウム結合能を有するタンパク質が存在することが報告されている。(1)(2)(4)(10)(11)(14)(15)

我々は数年来、ウシ脳の酸性低分子量タンパク質について研究してきたが、ウシ脳抽出物中に、S-100とは異なるタンパク質（PAP-II*）が存在し、カルシウムと強い結合能を持つこと、既報の(2)(15)カルシウム結合タンパク質と類似していることが明らかになったので、ここに報告したい。

【実験方法】

1. Ca^{2+} 結合タンパク質の精製(8)—— ウシ脳9kgを55%硫安と1mM EDTAとを含む4倍量のリン酸カリウム緩衝液（0.10M, pH 7.1）とホモジェナイズし、遠心分離した上清を85%飽和硫安，pH 4.7とし、得られた沈殿を遠心により集め、透析した後その上清をDEAE-Sephadex A-50 のカラムクロマトグラフィーにより分離；精製した。溶出は、各々 0.10M, 0.17M, 0.22M, 0.30M, 0.50M, NaCl と1mM EDTAとを含む、リン酸カリウム緩衝液（0.10M, pH 7.1）で段階的に行った。（図1）0.30M NaCl 分画のうち、PAP-II を含む画分を集め、さらに Sephadex G-75 のゲル沪過により再分画した。こうして、PAP-II、500～700mgを純粋標品として得た。（15%アクリルアミドゲル及、SDS電気泳動で単一バンド）タンパク質の同定には15%のアクリルアミドゲル電気泳動法(3)を用いた。

2. タンパク質の定量 —— 280nmにおける吸光度で定量した。

3. タンパク質と Ca^{2+} の結合の測定 —— PAP-II を同位体希釈した $^{45}Ca^{2+}$ と4°Cで

---

*タンパク質のU.V.スペクトルにフェニルアラニンのスペクトルが顕著に見られる。

図1. DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー

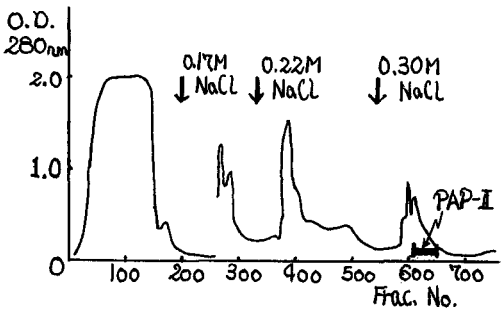


図2. タンパク質結合カルシウムの分離

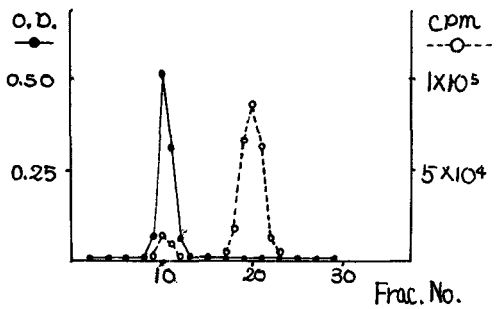


図3. 再クロマトグラフィー

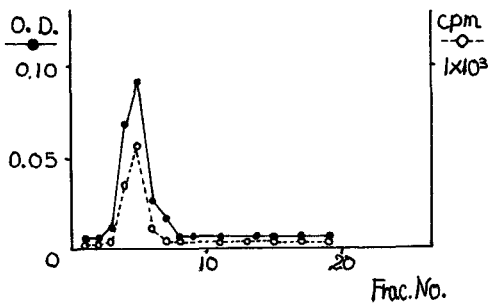
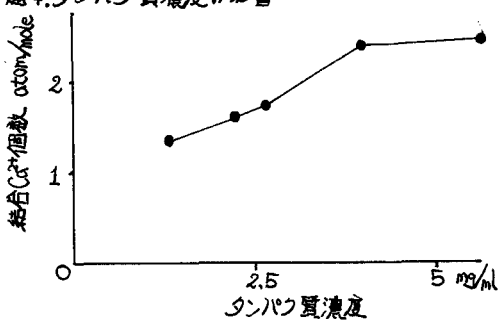


図4. タンパク質濃度の影響



30分間保持した後、Sephadex G-25のカラムによるゲル沪過法[5]により、非結合Ca^{2+}を除法した。$^{45}Ca^{2+}$を液体シンチレーション計数法により定量した。

【実験結果】

A. カルシウム結合測定に関する基礎的検討

1. Ca^{2+}結合タンパク質の分離 —— PAP-II: 11.25 mg/1ml, 塩化カルシウム: 2×10^{-5} mol/0.2ml, $^{45}Ca^{2+}Cl_2$: 1×10^5 cpm/10μl, を混合し、4°Cで30分間保持した後、Sephadex G-25のカラム(1.9×14 cm)でゲル沪過を行った。展開液にはトリス-塩酸緩衝液(50mM, pH 7.5)を用い、2mlずつ分取した。各フラクションの吸光度とradio activityを測定した結果が図2である。

$^{45}Ca^{2+}$によるradio activityのピークは2つに分離した。一方は高分子量域で、280 nmでの吸光度のピークと一致することからタンパク質に結合したカルシウム由来の、radio activityと考えられる。

PAP-IIの分子量を1.8×10^4、またO.D.=1(280nm)について、6.25 mg/mlとして、この比率から計算すると、PAP-II 1分子当り3.1個のCa^{2+}が結合しているものと考えられる。

2. Ca^{2+}結合タンパク質の再クロマトグラフィー —— 1.の様にして得られたCa^{2+}が結合したタンパク質画分を再び、同様のゲル沪過にかけた。(図3)

タンパク質1分子当りの結合カルシウム数は約30%減少したが、依然としてCa^{2+}と良く結合している。

3. タンパク質の濃度の影響 —— Ca^{2+}濃度、保持温度と時間を一定として、タンパク質濃度を変化させて結合Ca^{2+}量を測定した。(図4)

タンパク質濃度の低い時は、Ca^{2+}結合数は少なく(1.3個)、濃度の上昇とともに増加し、ほぼ一定値(2.5個)となる。

4. pH依存性 —— 所定のpHに調整し

あらかじめ4℃で15分間保持したPAP-Ⅱ：2.25 mg，塩化カルシウム：4×10^{-6} mol，$^{45}Ca^{2+}$：6×10^{5} cpmを混合し、再び所定のpHに調整した後、4℃で30分間再び保持した後にゲル沪過を行った。(図5)

図の様に、pH7～pH10の間でCa^{2+}とタンパク質との間には良好な結合が見られ、pH5以下、pH12以上では結合が見られなかった。

5.温度の影響 —— タンパク質とCa^{2+}を保持する際の温度の影響を調べた結果が図6である。

各温度で30分間保持した場合、37℃まで変化なく、100℃でも約半分の結合が見られた。したがって熱耐性の結合が1分子当り約1.4個存在すると推定される。

8.カルシウム結合の阻害

1.EDTAなどの影響 —— PAP-ⅡとCa^{2+}を保持する際にEDTAを加えて、その後ゲル沪過を行った結果が図7である。

高分子量域にradio activityのピークが見られない。このことはPAP-ⅡとCa^{2+}の結合がEDTAにより完全に阻害されたことを示している。また、Ca^{2+}結合タンパクをA-1の様にして分離し、そこにEDTAを加えて保持してから、再度ゲル沪過を行った場合にも同様の阻害が認められた。

また、EGTA，リン酸基の存在下でも同様の阻害が認められたが、6M尿素であらかじめ保持したタンパク質をCa^{2+}と保持した場合は、大きな影響はなかった。

2.他の2価金属イオンの影響 —— タンパク質濃度，Ca^{2+}濃度を一定にし、種々の2価金属イオンを加えて保持し、ゲル沪過を行った結果が表1である。

Mg^{2+}が結合に対して、ほとんど阻害を示さないのに比べて、Mn^{2+}は著しい影響を示し、PAP-Ⅱに対してCa^{2+}とほぼ同程度のaffinityを持つと推測される。

C.解離定数と結合カルシウムのアトム数

図5. pH依存性

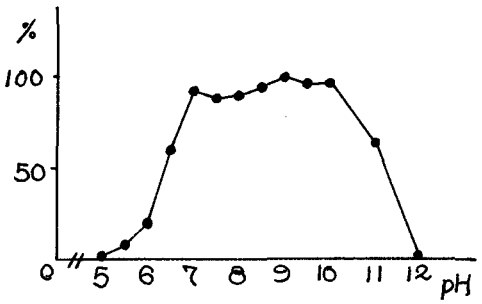


図6. 温度の影響

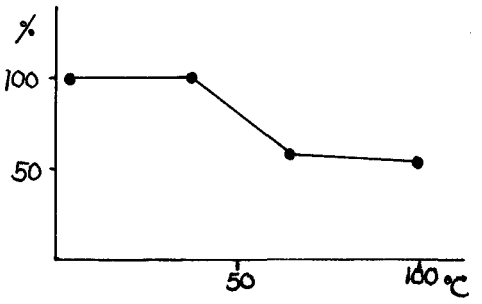


図7. EDTAの影響

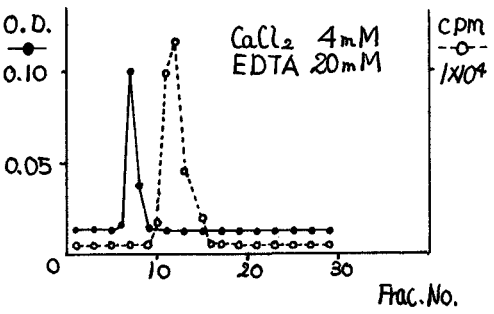
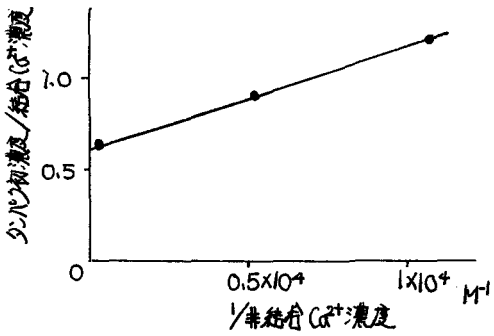


表1. 他の2価金属イオンの影響

金属種	濃　度	阻害率
Mn^{2+}	4×10^{-3} M	49 %
Mn^{2+}	20×10^{-3} M	73 %
Zn^{2+}	4×10^{-3} M	0 %
Mg^{2+}	4×10^{-3} M	2 %
Mg^{2+}	20×10^{-3} M	5 %

$CaCl_2$：4×10^{-3} M，PAP-Ⅱ 1.25×10^{-4} M

図8 解離定数



タンパク質とCa^{2+}を混合すると、この両者とCa^{2+}結合タンパク質の間には、

$$Protein + Ca^{2+} \underset{Kd}{\rightleftharpoons} Protein\text{-}nCa^{2+}$$

なる平衡が成立しているであろう。タンパク質濃度により結合Ca^{2+}数が変化するのでここでは比較的低濃度においてタンパク質濃度を一定とし、Ca^{2+}濃度を変化させて、その結果をreciprocal plotした。(図8)
図より解離定数Kd, 結合数nは
$Kd = 4\times10^{-5}M$, $n = 1.6$ となる。

【考察】

筋肉, 腸粘膜, 脳組織にはCa^{2+}と結合するタンパク質が存在する。特に脳については Siegel(2) Wolff(15)らが報告しているもの、Cheung(3), Kakiuchi(13)らの報告している環状リン酸ジエステラーゼのModulatorに相当するものなどがあり、この両者の相同性が現在議論の焦点ともなっている。

我々がウシ全脳から抽出精製したPAP-II画分(pI<4, M.W.=18,000, N末端は検出されない)は既に一次構造決定が進行しているが(7)今回このタンパク質が1分子当り最高約3個のCa^{2+}と結合する($Kd = 4\times10^{-5}M$)こと、およびCa^{2+}結合個数はタンパク質濃度に依存することが明らかとなった。よって、PAP-II画分はタンパク質化学的にも、Ca^{2+}結合性においても、既報のCa^{2+}-binding Proteinに属すると考えられる。

さらに、PAP-II画分はヒト脳(6)ニワトリ脳(8), ウシ肝(16)ウシ成熟赤血中(12)にも存在することが示されたことから、このタンパク質が動物のすべての臓器に存在し、種差を越えた基本的機能を有することが推定される。またウシ、ヒト、ニワトリ脳中に殊に多量に見いだされることは、このタンパク質が脳中でのCa^{2+}濃度の制御、特に神経伝達機能にも重要な寄与をする可能性が考えられよう。この点においてCa^{2+}結合個数がタンパク質濃度に依存することは非常に興味深い。

【文献】

(1)K. Arai, S. Watanabe, J. Biol. chem.,243, 5670(1968). (2)J. C. Brooks, F. L. Siegel, J. Biol. chem., 248, 4189(1973). (3)B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci.,121, 404(1964). (4)W. Drabekowski, E. Carafori, (Elsevior, 1974) Calcium-Binding Protein, (5)J. P. Hummel, W. J. Dreyer, Biochem. Biophys. Acta.,63, 532(1962). (6)S. Ito, H. Kasai, T. Okuyama, unpublished data. (7)Y. Kato, H. Kasai, T. Okuyama, 23rd Symposium on Protein structure (Maebashi, 1972)p17(in Japanese). (8)Y. Kato, H. Kasai, T. Okuyama, J. Biochem.,(in preparation). (9)Y. M. Lin, Y. P. Liu, W. Y. Cheung, J. Biol. chem.,249, 4943(1974). (10)D. H. Maclennan, P. T. S. Wong, Proc. Nat. Acd. Sci. U.S.A.,68,1231(1971). (11)B. W. Moore, Biochem. Biophys. Resear. Comm.,19, 739(1965). (12)M. Suzuki, H. Kasai, T. Okuyama, 46th Nihonseikagakukai sokai(1973). (13)Y. Teshima, S. Kakiuchi, Biochem. Biophys. Resear. Comm.,56, 489(1974). (14)R. H. Wasserman, R. A. Corradino, A. N. Taylor, J. Biol. chem.,243, 3978(1968). (15)D. J. Wolff, C. O. Brostrom, Arch. Biochem. Biophys.,163, 349(1974). (16)T. Yamanaka, Y. Kato, H. Kasai, T. Okuyama, J. Biochem.,(in preparation)

15 ウシ末梢神経ミエリンの塩基性蛋白の分布と構造上の特徴について

植村慶一・山中たか子・北村邦男
（埼玉医大・1生理）

〔要約〕

1)ウシ末梢神経ミエリンの主な塩基性蛋白(BF蛋白)に対する抗体をウサギに作成し、免疫反応より蛋白の分布を検討した。BF蛋白はウシ、ブタ、ウサギの末梢神経ミエリンに共通して存在するが、モルモットには存在しなかった。ウサギの臓器では、肝、筋肉、腎には存在せず、末梢神経、脊髄に多量に存在し、脳には極めて微量であった。
2)ウシ脊髄に存在するBF蛋白は主にミエリンに存在し、末梢神経系のものと、電気泳動移動度、アミノ酸組成、免疫反応が等しく同一蛋白であるが、末梢神経系の脊髄への浪入による可能性は少ないと考えられる。
3)精製BF蛋白の2次構造をCircular Dichroismによる分析で推定すると、α-Helixは極めて少なく、60%以上のβ-構造に富んだ蛋白であることが明らかとなった。β-構造の多い構造はpH 6~10の範囲で安定であり、pH2.0で不規則構造が増加し、1%SDS溶液中ではα-Helixの多いことを推定させるPatternを得た。
4)ウシ末梢神経ミエリンの微量成分であるBM蛋白画分は10%アクリルアミド-SDS系、7.5%アクリルアミドReisfeld系電気泳動ではほぼ単一bandを示すが、12.5%アクリルアミド-8M尿素系(pH7.0)で2本のbandを示す不均一性を示し、そのうち1本(BM-2)は中枢神経系のEAE蛋白と類似するが、BM-1はこれと異った新しい蛋白である可能性が示唆された。

ミエリン膜の蛋白は生体膜の構成蛋白として、また脱髄疾患の抗原性蛋白として興味ある研究対称である。我々は末梢神経ミエリンの構成蛋白に注目して、まずその分離精製の研究を行って来た。[7][9][10][11] ウシ末梢神経ミエリンには2種の主構成蛋白(BP, BF)が存在し、共に中枢神経系のミエリン蛋白とはその性質を異にしている。[7][10] 今回は、ウシBF蛋白に対するウサギ抗体の作成に成功したので、その蛋白の各動物種の末梢神経ミエリン中への存在の有無と動物の各臓器への分布、およびBF蛋白の脊髄における存在様式を検討した。またCircular Dichroismによる分析によってBF蛋白の2次構造上の特徴について若干の知見を得た。更にウシ末梢神経ミエリンの微量成分であるBM蛋白画分について分析をすすめ、この画分に中枢神経系の起脳炎性蛋白と類似の蛋白の他に、それと異った別種の蛋白の存在する可能性を示す結果を得たので報告したい。

[実験方法]

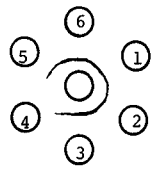
1)ミエリンの塩基性蛋白の精製；ウシ脳症神経部より既報の方法[7]によりミエリンを分離し、希酸抽出後、Sephadex G-75カラムによってBF, BM蛋白画分を得た。[7]
2)抗体の作成；1mgのBF蛋白と同量のSuccinylated Bovine Serum Albuminを0.5ml生食水に溶解、同量のDifco Freund's Complete Adjuvantを加えEmulsionを作った。3.0~3.5 kgのウサギの4肢padsの皮下に1mlのemulsionを注射し、7日後更に同量を同様の方法で注射した。最後の注射後2-3週目に血清抗体価の上昇をたしかめた後に、全血清を採取し、γ-Globulin画分を得た。この画分は中枢神経系の起脳炎性蛋白(EAE蛋白)とは反応しなかった。

3) Immunodiffusion ; 76.8 mM Tris - 120mM NaCl緩衝液(pH7.4) 0.85% Agarose 中で Immunodiffusion を行った。抗体として 50mg/ml の γ-Globulin 画分を用いた。

4) Disc 電気泳動 ; SDS系, Reisfeld系 Disc 電気泳動を行い、蛋白成分の検定に用いた。詳細は previous report の方法⑦に従った。

5) Circular Dichroism ; 蛋白の円偏光二色度の測定は JASCO model J-20 Spectro-polarimeter を用いて行った。測定は室温で、0.0147 cm 光路の U 型 cell を用いた。蛋白濃度は 0.02～0.1% の範囲で濃度効果を認めなかった。Slit は全波長で Spectral Band Width を 10nm にプログラムした。平均残基だ円率 [θ] deg·cm²/d mole は [θ = θobs·(MRW)/10·l·c] の関係より計算した。⑧ 平均残基分子量 (MRW) は BF 蛋白で 112, EAE 蛋白で 108 の値を用いた。l : light path length in cm, c = g/ml.

Fig.1.
Immunodiffusion against
Anti-bovine-BF protein Antibody



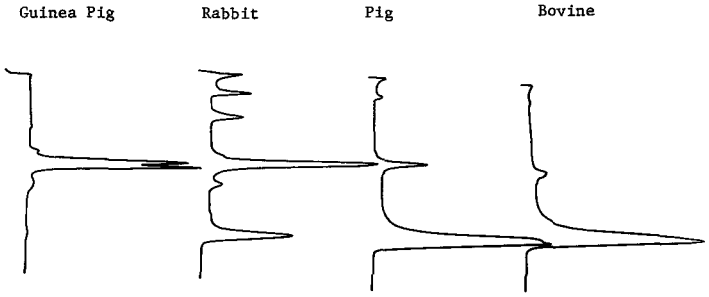
1) Acid extract of Rabbit peripheral Myelin (1mg/ml)
2) Acid extract of Bovine periphral Myelin (1mg/ml)
3) Bovine BF protein (0.14mg/ml)
4) Acid extract of Guinea pig peripheral Myelin (1mg/ml)
5) Acid extract of Pig peripheral Myelin (1mg/ml)
6) Bovine BF protein (0.14mg/ml)

[実験結果と考察]

1) BF 蛋白の分布 ; a) 各動物種の末梢神経ミエリンについて ; ウシ、ブタ、ウサギ、モルモットの末梢神経を大量にあつめ previous report の方法⑨によりそれぞれのミエリン画分を分離したのち希酸抽出によって塩基性蛋白画分を得た。これらの画分と抗 BF 蛋白抗体との反応を Immunodiffusion で検索した。(Fig1) 抗原性はウシ・ブタ・ウサギの抽出液に共通して存在するが、モルモットの抽出液とは反応しなかった。更に確かめるために各抽出液について、Reisfeld系 Disc 電気泳動法を行ったところ、Fig.2. に示すように BF と BM の蛋白比は動物によってかなり異なることが明らかになった。併しどの動物種においても末梢神経ミエリンの塩基性蛋白の主成分として BF・BM のいづれかが存在することは興味深い。このように BF 蛋白は哺乳動物の末梢神経ミエリンにかなり普遍的に存在する蛋白である。

b) ウサギ各臓器について ; ウサギ脳, 精巣, 末梢神経, 肝臓, 腎臓, 筋肉を 2～40g 採取し、それぞれの 5倍量の 0.03N HCl (pH 2.0) 中で Homogenize し抽出後、遠心上清について 30% 硫安分画を行い、その上清画分を透析・凍結乾燥して抗原として抗 BF 蛋白抗体と反応を行った。その結果は下表に示す如く、末梢神経および脊髄の蛋白画分は 1mg 蛋白で反応を示したが脳の画分は 1mg

Fig.2. Densitometric Profiles of Disc Electrophoregram of Acid Extracts of Peripheral Nerve Myelin Fractions. Gel System: pH 4.5 (Reisfeld)



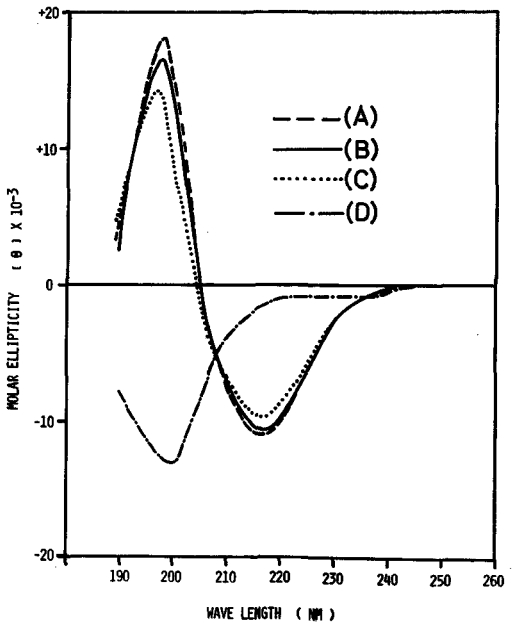
蛋白で(±)，その他の臓器（肝，腎，筋肉）では1mg蛋白でも(−)であった。この結果からBF蛋白は末梢神経と脊髄にかなり特異的に存在する蛋白であると考えられる。

Table 1. IMMUNOREACTIONS OF RABBIT TISSUE EXTRACTS AGAINST ANTI-BF PROTEIN ANTIBODY

TISSUE / PROTEIN (μg)	PERIPHERAL NERVE	SPINAL CORD	BRAIN	LIVER	KIDNEY	MUSCLE
1,000	+++	+++	±	−	−	−
500	+++	+++	−	−	−	−
250	+++	+++	−	−	−	−
40	+++	+++	−	−	−	−
20	+++	+++	−	−	−	−
10	+++	+++	−	−	−	−
5	+++	+++	−	−	−	−
2	++	++	−	−	−	−
1	+	+	−	−	−	−

2)脊髄のBF蛋白；ウシ脊髄細識又は脊髄ミエリン画分より，希酸抽出，CMセルロースbatch法，Sephadex G75カラムクロマトにより，BF蛋白を得た。この画分はReisfeld系，SDS系Disc電気泳動による移動度，アミノ酸組成分析，免疫反応による検索によって末梢神経系のものと同一であることを確かめた。得られたEAE蛋白とBF蛋白のゲルクロマト上でのPeakの比はウシの脊髄皮質全体を用いたときもミエリン画分を用いたときも1：0.13〜0.15を示した。このことはBF蛋白がEAE蛋白と同じくミエリン由来であることを示す。最近McPhersonらによってEAE抑制する蛋白として脊髄の0.1M NaCl抽出液よりSCP蛋白が精製された[12]が，この蛋白と我々の精製したBF蛋白が電気泳動，アミノ酸分析，免疫反応，ペプチドマップによる分析によって極めて類似していることをKiesらとの共同研究でたしかめた。[3] またEylarらはウシ脊髄を37℃，10〜24時間自然分解物より，EAE蛋白の分解物と異なるペプチドB1，B2を精製し，それが末梢神経のP-2蛋白と類似していると報告している[4]が，これは多分BF蛋白の分解物であろう。脊髄のBF蛋白は脳にこの蛋白が少ないことから末梢神経系の混入が考えられるが，これらの実験では非常に注意深く末梢神経系と脊髄を分離しており，また脊髄の末梢神経系入部（前角，後角につづく白質部）を除いた場合でも同程度のBF蛋白が回収されるので，それだけでは説明が困難である。

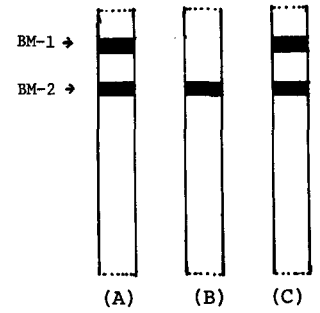
Fig.3. Circular Dichroism Spectra of the BF protein.



3)BF蛋白の構造；BF蛋白の分子量は13,800，アミノ酸残基数128，N末端はBlockされており，C末端はVal．アミノ酸組成ではHis(−)，Cys(2)を含むことが明らかとなった。[7][3] またこの蛋白は高いβ構造を含む可能性が示されているので[2][3] Circular Dichroismによる分析を行った。Sampleとして(A)ウシ末梢神経ミエリンの希酸抽出液より精製したBF蛋白，(B)ウシ末梢神経の0.1M NaCl抽出液よりCMセルロース，Sephadex G75によって得たBF蛋

白,(C)牛脊髄の希酸抽出液より精製したBP蛋白,(D)同じくEAE蛋白をpH6.0の純水中に落酔測定した。(第3図). poly-Lysineを標準にしてGreenfieldらの方法によりBP蛋白の二次構造を推定すると,α-Helix 0-5%, β構造 60-80%となる。(A)(B)(C)共に極めて高いβ構造を保持することを示唆した。酸を用いないで精製した場合(B)でも全く同じpatternが得られ,この構造が精製過程の人工産物である可能性を否定する。一方EAE蛋白(D)はα・β共に少なく不規則構造の多いことを示した。BP蛋白はpH 2.0では不規則構造が増加するが,pH 10.0ではpH 6.0の場合とほぼ同一であった。8M Urea中では測定範囲内で[θ]≒0であり,1% SDS中ではα-Helixの増加を示唆した。

Fig.4. 8M Urea-12.5%Acrylamide gel (pH 7.0) electrophoresis of the BM protein fraction.



(A):The BM protein fraction
(B):The EAE protein
(C): (A)+(B)

4) BM画分の不均一性;ウシ末梢神経ミエリンの微量蛋白成分BM画分はSephadex G75ゲルロカで1peak 7.5% Acrylamide-Reisfeld電気泳動ではほぼ1本のbandを示すが,pH 7.0・8M Urea-12.5% Acrylamide系電気泳動では明らかな2band (BM-1, BM-2)を示すことが明らかとなった。[10](Fig.4)EAE蛋白の移動度はBM-2の移動度と一致した。そこでDisc電気泳動を行ったのち,ゲルを含む各bandを切出し,アミノ酸組成の分析を行った。(第2表). BM-2は同様処理したEAE蛋白のアミノ酸組成とほぼ一致したが,BM-1はそれらとは明らかに異ったpatternを示した。Brostoffらはウサギ末梢神経ミエリンにEAE蛋白と同一の蛋白の存在を報告しているが[1],ウシ末梢神経ミエリンにはその他に新しい微量蛋白成分の存在する可能性を示唆する。

Table 2 →

A.A	Mole %		
	BM-I	BM-2	EAE
Lys	8.50	10.47	8.69
His	5.42	5.56	6.62
Arg	+	++	++
Asp	8.34	7.93	7.27
Thr	5.23	4.61	4.31
Ser	7.62	10.51	10.61
Glu	4.96	6.66	6.18
Pro	4.29	9.23	8.79
Gly	8.32	17.85	16.90
Ala	13.38	9.92	8.96
Cys	0	0	0
Val	7.78	0.71	0.75
Met	6.26	3.15	6.35
Ile	0.66	2.19	1.50
Leu	13.31	6.37	6.73
Tyr	1.37	+	1.69
Phe	4.57	4.84	4.67
Trp	N.D.	N.D.	N.D.

[文 献]

1) Brostoff,S.W. & Eylar,E.H.: Arch.Biochim.Biophys. 153 590 (1972)
2) Brostoff,S.W.,Sacks,H. & DiPaola,C.; J.Neurochem. 24 289 (1975)
3) Deibler,G.E.,Kies,M.W. & Uyemura,K.; Trans.Am.Soc.Neurochem.6 85 (1975)
4) Eylar,E.H. & Hashim,G.A.; J.Neurochem. 23 973 (1974)
5) Greenfield,N. & Fosman,G.D.; Biochemistry 8 4108 (1969)
6) Greenfield,S.,Brostoff,S.,Eylar,E.H. & Morell,P.; J.Neurochem.20 1207 (1973)
7) Kitamura,K.,Yamanaka,T. & Uyemura,K.; Biochim.Biophys.Acta 379 581 (1975)
8) Listowsky,I.,Blauer,G.,Englard,S. & Betheil,J.J.; Biochemistry 11 2176 (1972)
9) Uyemura,K.,Tobari,C.,Hirano,S. & Tsukada,Y.; J.Neurochem. 19 2607 (1972)
10) 植村慶一, 北村邦男, 山中たかよ; 蛋白質 核酸 酵素 19 1018 (1974)
11) 山中たかよ, 北村邦男, 植村慶一; 生化学 46 717 (1974)
12) Yo,S.L. & McPherson,C.F.C.; J.Immunol. 109 1009 (1972)

16 ラット脳のミエリン分画に存在するprotein kinase，可溶化とその性質について

宮本英七・樫葉明・垣内史朗
（大阪府立中宮病院）

〔要約〕

ラット脳から得たミエリン分画はprotein kinase活性を有し，ATP+Mg^{2+}の存在下で内因性基質蛋白質のリン酸化を認めた。ミエリンの内因性リン酸化反応はcyclic AMPによって刺戟をうけなかった。ミエリン分画の内因性リン酸化反応系に外から基質蛋白質，protein kinaseを添加してもリン酸のとりこみに変化を与えないかむしろ阻害し，ミエリン内に存在するprotein kinaseのcatalytic subunitと基質蛋白質は膜構造の中に組みこまれていると考えられた。このことはprotein kinase modulatorが効果をもたないことからも確められた。ミエリン内のcyclic AMP結合部位（酵素のregulatory subunit）へは外から与えたcyclic AMPが部分的に到達することが可能であった。

ミエリンをTriton X-100で処理するとprotein kinase活性が可溶化された。可溶化酵素は活性発現に基質蛋白質を必要とし，cyclic AMPによって活性化された。そのKmは約4×10^{-8}Mであった。cyclic AMP以外の種々の環状ヌクレオチドによっても活性化され，その特異性は脳の細胞上清分画酵素のそれに類似した。可溶化酵素の基質蛋白質特異性は細胞上清分画酵素のそれと異なり，特にプロタミンとEAE蛋白質（Experimental Allergic Encephalomyelitogenic Protein）へのリン酸のとりこみが著明であった。cyclic AMP結合活性がミエリン分画，Triton X-100処理後の沈殿分画，可溶化酵素のいずれにも認められ，cyclic AMPに対する結合定数は約2.5×10^{-9}Mであった。

われわれはEAE蛋白質（Experimental Allergic Encephalomyelitogenic Protein）のin vitroとin vivoにおけるリン酸化を認め（1,2），本学会において報告した（3,4）。今回はEAE蛋白質のリン酸化反応に関し，このものを触媒する酵素の側からしらべたので，報告したい。すなわち，ミエリンにともなったprotein kinaseの挙動を膜構造の中に存在する状態で検索し，界面活性剤を用いて可溶化した酵素活性の性質について脳の細胞上清分画酵素のそれと比較，検討した。

＜実験方法＞

ミエリン分画の精製：ミエリン分画はラット脳からUyemuraら（5）の方法を一部修正して（2）精製した。精製純度は電子顕微鏡による所見により検索した。他の膜成分の混入をわずかに認めたが，ほぼ均質なミエリン分画を得た。

protein kinase活性とcyclic AMP結合活性の測定：既報（6）の方法によった。

脳の細胞上清分画酵素の精製：脳の細胞上清分画酵素は既報（7）の方法に従い，ウシ脳からDEAE-セルロース-カラムクロマトグラフィーの段階まで精製した。

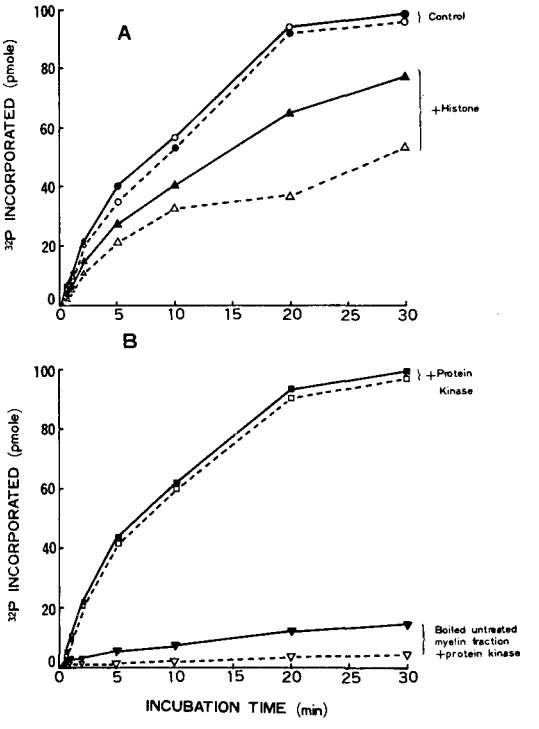
protein kinase modulatorの精製：Donnellyら（8）の方法に従い，ウシ脳の可溶性分画からTCA沈殿分画の段階まで精製した。

＜実験結果＞

基質蛋白質（ヒストン）とprotein kinaseのミエリン内因性リン酸化反応に対する効果：外から加えた基質蛋白質がミエリン内に存在するprotein kinaseの基質になり

得るかどうか及び外から加えた protein kinase がミエリン内に存在する基質蛋白質をリン酸化し得るかどうかをしらべる目的で行なった実験の結果を図1に示す。ミエリンの内因性リン酸化反応（ATP+Mg^{2+} と incubate し，ミエリン内の基質へのリン酸のとりこみをみるもので，外からの protein kinase，基質蛋白質を含まない反応）は cyclic AMP によって刺戟をうけなかった（図1A）。この内因性リン酸化反応系にヒストンを添加するとリン酸のとりこみはむしろ減少した。また，ヒストンが存在するとリン酸のとりこみが cyclic AMP によってわずかに刺戟された（図1A）。この反応系に別に精製した脳の細胞上清分画酵素を添加してもミエリンのリン酸のとりこみには対照と比較して上昇が認められなかった（図1B）。ミエリンをあらかじめ煮沸して脳の細胞上清分画酵素と incubate するとリン酸化を認め，この反応は cyclic AMP によって刺戟をうけた（図1B）。これらの結果は外から添加した基質蛋白質がミエリン内部に存在する protein kinase の基質にはならないだけでなく，むしろ酵素反応を阻害すると考えられる。また，外から加えた protein kinase はミエリン内に存在する基質蛋白質を利用することの出来ないことを示している。このことはミエリン内に存在する protein kinase の catalytic site 及び基質蛋白質が膜構造の中に組みこまれており，外から接近出来ないことを示唆している。

Fig. 1. Effect of histone (A) or the exogenous protein kinase from bovine brain (B) on the protein kinase activity of myelin fraction. The enzyme activity was assayed in the presence (——) or absence (-----) of 1 μM cyclic AMP. The values of activities of the samples to which the exogenous protein kinase was added have been corrected for those obtained only in the presence of the soluble enzyme preparation at each time indicated.



protein kinase modulator の protein kinase 活性に対する効果：ミエリンの内因性リン酸化反応，ミエリンの Triton 可溶化酵素（後述），細胞上清分画酵素に対する protein kinase modulator の効果をしらべた（表1）。Triton 可溶化酵素，細胞上清分画酵素の活性は modulator によって cyclic AMP 存在下，非存在下の両方で阻害されたのに対し，ミエリン分画の活性は阻害をうけなかった。protein kinase modulator が酵素の catalytic site に作用をおよぼす知見から考えて，これらの結果はミエリン内の酵素の catalytic site に modulator が接近出来ず，Triton X-100 の処理によってはじめて可能になったことを示している。このことは酵素の catalytic site が膜構造に組みこまれているという上にのべた結果と一致するものである。

Triton X-100 によるミエリンからの protein kinase 活性の可溶化：ミエリンを最終濃度 0.2 % の Triton X-100 で処理

したのち，その沈殿と上清について酵素活性を測定した（表2）。ミエリン分画，Triton 処理後沈殿のリン酸のとりこみには外からの基質蛋白質の添加を必要としない。基質蛋白質を添加しないもとでのリン酸のとりこみは沈殿と上清の合計がミエリン分画のそれの62%にすぎなかった。しかし上清の酵素活性はヒストンの添加によって著明に増加した。この時の沈殿と上清のリン酸のとりこみの合計はミエリン分画のそれの116%に達した。

表1. Protein kinase modulator の protein kinase 活性に対する効果

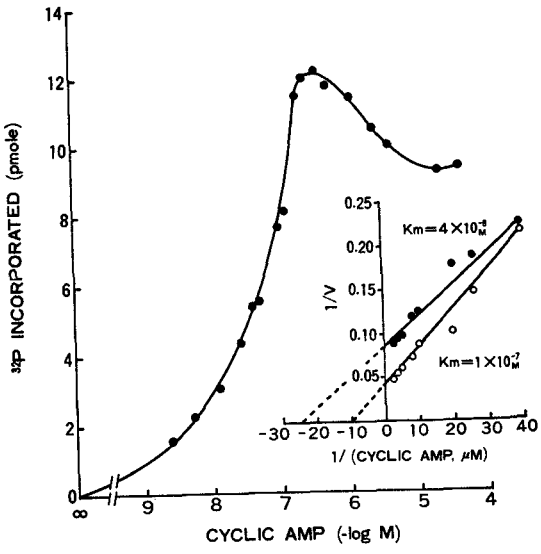
Modulator (量, μg)	Protein kinase 活性				
	ミエリン分画	Triton 可溶化酵素		脳可溶性酵素	
	-cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
	pmoles				
None	41.1	5.6	16.4	2.3	25.3
4	43.4	6.0	16.7	1.1	19.9
8	41.1	5.0	13.1	0.6	9.8
20	40.7	4.6	9.3	0.6	3.0

表2. Triton X-100 によるミエリン分画からの protein kinase 活性の可溶化

分画	Protein kinase 活性	
	-cAMP	+cAMP
	pmoles	
ミエリン分画	43.7	43.5
Triton 処理後		
沈殿	23.7	24.4
上清 ⊖ヒストン	2.5	2.7
上清 ⊕ヒストン	5.6	26.2

Triton X-100 によって可溶化された酵素（Triton 可溶化酵素）活性の性質．(a) cyclic AMP と種々の環状ヌクレオチドの効果：Triton 可溶化酵素活性に対する cyclic AMP の効果は図2に示す。cyclic AMP の存在により酵素活性は著明に増加した。最大活性は約 3.75×10^{-7} M の cyclic AMP によって得られ，この濃度をこえると酵素活性はむしろ減少した。酵素の cyclic AMP に対するみかけの Km は約 4×10^{-8} M であり，同時に測定した細胞上清分画のそれ（約 1×10^{-7} M）よりも低値を示した。ついで種々の環状ヌクレオチドの効果をしらべた。しらべた環状ヌクレオチドの中では 8-Oxo cyclic AMP, 8-Thio cyclic AMP, 8-Benzylthio cyclic AMP, monobutyryl cyclic AMP, cyclic IMP, cyclic GMP, cyclic UMP cyclic CMP の順で酵素を活性化し，環状ヌクレオチドの酵素活性に対する効果の順序は細胞上清分画酵素のそれとほぼ類似した。

Fig. 2. Effect of cyclic AMP concentration on the protein kinase activity of Triton-treated supernatant. The open circles (o–o) in the double reciprocal plot represent the values for the bovine brain soluble enzyme.

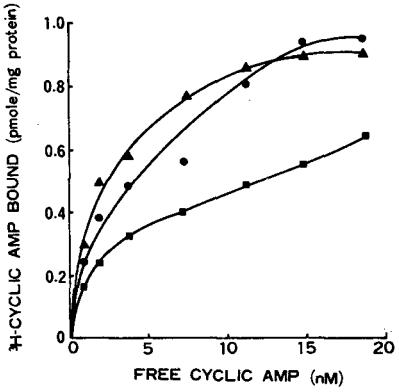


(b) 基質蛋白質の特異性：種々の基質蛋白質の Triton 可溶化酵素によるリン酸化の程度についてしらべた。混合ヒストンがもっともよい基質蛋白質として役立ち，プロタミン，EAE蛋白質，リシン性ヒストン，slightly lysine-rich histone，アルギニン性

ヒストン，カゼイン，オスビチンの順に効果があった。この基質蛋白質の特異性は細胞上清分画酵素のそれとはかなり異なっていた。

cyclic AMP 結合活性：ミエリン分画，Triton X-100 処理後の沈殿と上清における cyclic AMP結合活性を測定した（図3）。ミエリン分画の cyclic AMP結合活性は沈殿と上清の活性に比較して，しらべた cyclic AMP濃度の範囲内では低い値を示した。最大の結合活性の半分を得るに必要な cyclic AMP の濃度はいずれの分画にとっても約 2.5×10^{-9} M であった。これらの結果はミエリンに存在する cyclic AMP 結合部位（protein kinase の regulatory subunit）が他のミエリン構成々分によって覆われ，外から与えた cyclic AMP が部分的にしか結合出来ないことを示している。Triton X-100 の処理によって cyclic AMP結合部位が露出し，cyclic AMPの接近を可能にすると考えられる。

Fig. 3. Cyclic AMP-binding activity of myelin fraction (■—■), Triton-treated precipitate (▲—▲) and Triton-treated supernatant (●—●).



〈考　　察〉

これまでにすでに行なった報告（3,4）とあわせて，以上の結果から脳のミエリンには EAE蛋白質のリン酸化を触媒する酵素系の存在することが明らかとなった。最近，細胞の膜成分に存在する protein kinase による内因性基質蛋白質のリン酸化反応がその組織の作用と関連づけて注目されている。ミエリンは他の膜成分に比較して蛋白質成分がくわしく研究されている組織であることから，本研究は1つの単純系として他の系でのリン酸化反応の解明に役立ち得よう。

ミエリン分画の内因性リン酸化反応は cyclic AMP によって刺戟をうけなかった。このことは 1) cyclic AMPがミエリンに存在する protein kinase の regulatory subunit に充分に到達出来ないこと，2)ミエリンに存在する protein kinase の酵素蛋白が膜構造の中に組みこまれているために，たとえ cyclic AMP が部分的にしろ regulatory subunit に結合しても regulatory subunit と catalytic subunit に酵素蛋白を分離することが出来ず，酵素が活性型に転換出来ないことに基ずくのかもしれない。しかし，精製された EAE蛋白質が細胞上清酵素によって cyclic AMP依存性にリン酸化され（3），Triton X-100 によってミエリンから可溶化された酵素活性が cyclic AMP に依存性に EAE蛋白質をリン酸化することを考えると，適当な条件下においては（例えば内因性に cyclic AMPが上昇するような場合）ミエリンの内因性リン酸化反応が cyclic AMP によって刺戟をうけることは可能であろう。

〈文　　献〉

1. Miyamoto, E., Kakiuchi, S. and Kakimoto, Y.: Nature 249, 150 (1974).
2. Miyamoto, E. and Kakiuchi, S.: J.biol.Chem. 249, 2769 (1974).
3. 宮本栄七，垣内史朗：神経化学 12, 114 (1973).
4. 宮本栄七，垣内史朗：神経化学 13, 120 (1974).
5. Uyemura, K., Tobari, C., Hirano, S. and Tsukada, Y.: J.Neurochem. 19, 2607 (1972).
6. Miyamoto, E.: J.Neurochem. 24, 513 (1975).
7. Miyamoto, E., Petzold, G. L., Kuo, J. F. and Greengard, P.: J.biol.Chem. 248, 179 (1973).
8. Donnelly, T. E.,Jr., Kuo, J. F., Reyes, P. L., Liu, Y. P. and Greengard, P.: J.biol.Chem. 248, 190 (1973).

17 ニューロン，グリアおよび肝細胞分離核のクロマチンDNAの大きさとDNA合成

井上順雄・加藤尚彦
（東大・医・脳研・生化）
小野哲也・岡田重文
（東大・医・放射線基礎）

〔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、アルカリ性蔗糖密度勾配遠心法を用いて、クロマチンDNA鎖の大きさを測定した。そして分離核の *in vitro* でのDNA合成時におけるDNA鎖の大きさの変化を追跡した。

(1) 大脳皮質細胞核も肝細胞核も、原組織から分離する過程で、そのDNA鎖は短く切断され、DNA鎖の重量平均分子量は1/5～1/40に減少した。

(2) 分離核のDNA鎖の平均分子量は、"ニューロン核標品，P_{S1}"（ニューロン核51%：グリア核49%）；$5.8 \sim 8.8 \times 10^6$ dalton，"グリア核標品，P_3"（ニューロン核3%：グリア核97%）；$7.8 \sim 9.7 \times 10^6$ dalton，肝細胞核；$2.2 \sim 3.2 \times 10^6$ daltonで、グリア核≧ニューロン核＞肝細胞核の順であった。

(3) *in vitro* でDNA合成反応を起させると、P_{S1}核標品のDNA鎖は高分子化する傾向を示したが、P_3核標品ではDNA鎖の大きさに変化が認められなかった。これらに対し、肝細胞核では反応中に著明なDNA鎖の低分子化が起り、これはP_{S1}核に比べて25倍以上の高いDNase活性を持っていることに起因すると思われた。

(4) ニューロン・グリアおよび肝細胞核標品のいずれにおいても、合成されたDNA量は10^5 dalton以下のDNA鎖に顕著に多く見られた。

成熟後分裂能力を失ったニューロンも、その細胞核は核内のクロマチンDNAをテンプレイト・プライマーとして *in vitro* でDNAを合成し[11),(12)]、核内にDNAポリメラーゼ（4S，未変成DNA依存性が高い）を保持していることが報告されている[7),(10),(3)]。そこで、分離したニューロンとグリア核を用いてDNA合成を行ない、クロマチンDNAが合成反応にどのように利用されているか、また合成反応の結果DNAの大きさがどう変化するかを知る目的で、アルカリ性蔗糖密度勾配遠心法を用いてクロマチンDNAを分画測定した。同時に対照として肝臓細胞核を材料として比較検討した。

実験方法

分離核標品と細胞標品　成熟モルモット（雄，300 g）の大脳皮質から、既報[4)]の方法に従って"ニューロン核標品，P_{S1}"と"グリア核標品，P_3"を分離した。P_3核標品は粗核分画を高張蔗糖溶液（2.44 M）中に分散した後遠心してペレットとし得られるが、遠心上清からも核を回収し新たにニューロン核に富む標品P_{S5}を調製した[3)]。P_{S5}，P_{S1}，P_3核はそれぞれニューロン核55%，91%，3%を含み，残りは主にオリゴデンドログリア核からなっている。肝臓からはP_{S1}核標品と同じ方法で、肝細胞核標品を分離した。

細胞標品の調製には、大脳皮質をハサミで細片とし、Tris buffer中でパストゥールピペットを用いて吸入排出をくり返し、また肝細胞はBranster と Mortonの方法[1)]に従い、細胞の分散標品を得た。

DNA合成反応　200 μlの反応液（30 mM Tris-HCl，pH 7.5，5 mM $MgCl_2$，5 mM Dithiothreitol，1 mM ATP，各0.5 mMのdATP，dCTP，dGTP，10 μM ^{3}H-TTP（10 μCi））中で、5×10^6 個の分離核を37°Cで30

分反応させ、氷冷して反応を止めただちに蔗糖密度勾配遠心を行った。

アルカリ性蔗糖密度勾配遠心　既報[17]の方法に従い、分離核または細胞分散標品をアルカリ性溶液中で融解し、クロマチンDNAを一本鎖にした後、アルカリ性蔗糖密度勾配(34 ml; 5～20%)にかけて遠心し、2 mlずつ18分画を採取した。遠心条件は図の説明中に記した。分画中のDNA量は、各分画(³H-TMPを含むときは半量を使用)に、TCA溶液を加えDNAを酸不溶性にした後、蛍光法[18]で測定した。DNAにとり込まれた³H-TMPの放射能測定の為には、分画の半量中のDNAを酸不溶性にしてグラスファイバー炉紙上に集め、酸と有機溶媒で充分洗浄した後、バイアル中でToluene 350 (Packard, 1 ml)に溶解した。測定には液体シンチレーションカウンターを用いた。

DNase活性測定　160 μl の反応液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 145 μg/ml 仔ウシ胸腺DNA)中で、50 μg DNA相当の核標品を37℃, 30分反応させた。反応は過塩素酸溶液を加え止め、遠心上清中に可溶化されたDNA量を260 nmで吸光測定した。活性は反応中に可溶化されたDNA量(μg)で表わした。

実験結果

大脳皮質および肝臓から直接細胞の分散標品を調製し、そのクロマチンDNAを遠心分画すると、大脳皮質細胞(ニューロン・グリア・血管内皮細胞を含む)の方が、全体として大きなサイズを持っている(図1)。図よりDNAの重量平均分子量を計算すると、大脳皮質細胞では 2.7×10^8 dalton, 肝細胞では 7.6×10^7 daltonである。分離核では、そのDNA沈降パターンは右側に移動し、分離操作中にDNA鎖が切れ低分子化が起ることが示された(図1, 2)。P_3核とP_{51}核のパターンを比較するとP_3核がやや左側によっており、DNAの平均分子量もP_3核は 9.7×10^6 daltonで、P_{51}核の 7.7×10^6 daltonよりやや大きい(図2)。さらにP_3核と同じ分離過程を経るP_{55}核(平均分子量 8.3×10^6 dalton)とくらべても、P_3核のDNAは大きい。P_3, P_{51}, P_{55}各核標品のニューロン・グリア構成比を考慮すると、グリア核内のDNA鎖はより高い分子量をもつ事を意味するが、核標品により平均分子量にはばらつきが見られ、(P_3核, $7.8\sim9.7\times10^6$; P_{51}核 $5.8\sim8.8\times10^6$ dalton)、有意な差とは断言できない。肝細胞核は脳細胞核にくらべて、明らかに短いDNA鎖(平均分子量 $2.2\sim3.2\times10^6$ dalton)を持っていた。

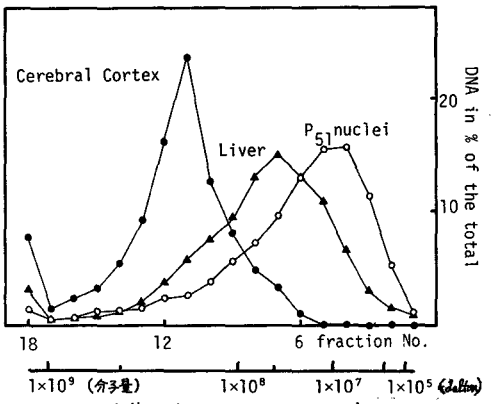


図1. 大脳皮質細胞、肝細胞、ニューロン核標品; P_{51} のDNA沈降パターン(遠心; 25,000 rpm, 165分)
P_{51}核標品の組成は"実験方法参照"、縦軸のDNA量は各分画のその和に対する割合である。

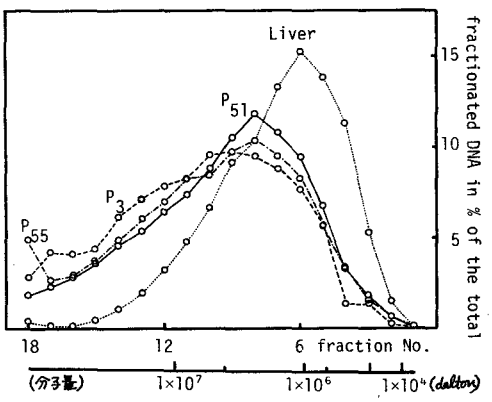


図2. 各種分離核のDNA沈降パターン(遠心; 25,000 rpm, 7時間) P_{51}, P_{55}: ニューロン核標品, P_3: グリア核標品。各標品の組成は"実験方法"参照。縦軸のDNA量は各分画のその和に対する割合である。

前記の条件下で分離核にDNAを合成させると、各核標品とも^{3}H-TMPは10^5dalton以下の短いDNA鎖に多量にとり込まれる(図3)。しかし、脳細胞核では肝細胞核にくらべて、10^6daltonのDNA鎖にもかなりのとり込みが見出された。各分画1の酸不溶性沈渣をDNase Iとホスホジエステラーゼで処理すると、放射能は可溶化されDNA中にとり込まれていることが確められた。DNA合成反応の結果、P_{S1}核ではDNA沈降パターンがやや左側に移動する傾向がみられるが、P_3核には認められない。他のP_{S1}核標品では、この左側への移動が目立った(データ、示さず)。肝細胞核では、反応後DNA沈降パターンは著しく右側に移動し、クロマチンDNAが切れて低分子化が起っていることが示された。DNA合成反応時に肝細胞核DNAが低分子化するのは、同時に核内のDNaseが作用すると思われたので、P_{S1}核と肝細胞核のDNase活性を測定した。肝細胞核は、0.0464単位(上記反応条件下で可溶化されたDNA量, μg)/μg核DNA, の比活性をもち、P_{S1}核の比活性, 0.0018単位/μg核DNA, に比べて25倍以上の値を示した。

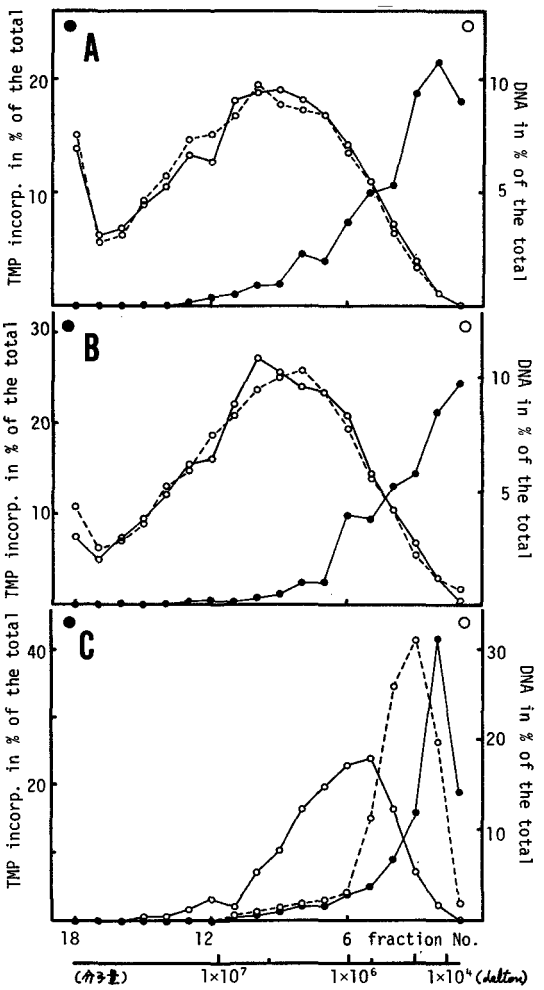


図3. DNA合成に伴なう各種分離核のDNA沈降パターンの変化と遠心分画1の放射能とり込み(遠心; 25000 rpm, 7時間)
A; P_{S1}: ニューロン核標品, B; P_3: グリア核標品, C; 肝臓核標品, 各標品の組成は"実験方法"参照。○—○; 分離核そのまま, ○---○; DNA合成反応を行った核標品, 反応条件は"実験方法"参照。●—●; DNA合成反応によりとり込まれた^{3}H-TMP量。右縦軸は分画中のDNA量を全体の和の割合として表わし、左縦軸は^{3}H-TMPのとり込みを、全体の和の割合として表わした。

考察

大脳皮質細胞のクロマチンDNAは、肝細胞に比べて3倍以上の平均分子量を持っている(図1)。しかし細胞標品調製時に、肝細胞核ではDNAがとくに高い活性のDNaseにさらされる可能性があり、必ずしもin vivoの状態を反映しているとはいえない。大脳皮質細胞のDNAの平均分子量, 2.7×10^8daltonは、仅の小脳顆粒細胞[13]や培養真核細胞[4]の値とほぼ同じであり、肝細胞核DNAがより小さな分子量をもつことはマウス肝でも見られている[4]。

分離核のDNAは原組織に比べて、P_{S1}, P_3核標品で40分の1, 肝臓細胞核では25分の1の大きさに切れている(図1,2)。この切断は核の分離過程で起ると考えられ、遠心力やホモジナイズ時のshearing force, 核内のDNaseの作用などによると思われる。P_3核のDNAは、P_{S1}核やP_{S3}核に比べて大きい分子量を示し(図2)、このことからグリア核内のDNase活性は低いと推定される。しかし上記の測定法の感度が不充分である為、大脳皮質核標品のDNase活性はまだ正確に測定されていない。

各種分離核のDNAの大きさは、グリア核≧ニューロン核＞肝細胞核の順であり(図2)この順に核内クロマチンの二本鎖DNAに切れ目(nick)が多く入っていると思われる。この切れ目の3'末端はDNA合成のプライマーとして機能するので、分離核でDNA合成を行った際のテンプレイト・プライマー活性の順は、DNA鎖の大きさの順と逆(肝細胞核＞ニューロン核≧グリア核)になると推定される。そして実際に、既に報告[11,13]したように、分離核内のDNAをテンプレイト・プライマーとして用い、DNA合成反応を行うと、分離核のDNA合成活性は肝細胞核＞ニューロン核＞グリア核の順であった。

P51核標品に保持されているDNAポリメラーゼは、ChiuとSungにより報告されたB型酵素の特徴を示し[3,11]、Stambolova等もニューロンを含む核標品に同型酵素が多く含まれると報告している[9,10]。このB型酵素は一般に分裂していない細胞に多く含まれ、DNA修復機能を担っていると推定されている[2,12]。前述のように P51核標品では、DNA合成反応後クロマチンDNAの泳動パターンが左側に移動する傾向を示し、一本鎖DNAが修復によりつながって高分子化する可能性が示唆された。小脳顆粒細胞と網膜の光受容細胞は[13]、in vivoでDNA修復を行うことが報告されているが、in vitroにおける分離核でのDNA修復現象はエールリッヒ腹水腫瘍細胞[6]についてのみ報告されている。この腫瘍細胞のDNA修復には細胞分画上清が必要であったが、P51核では上清の添加効果はほとんどみられなかった。DNA修復には、DNAポリメラーゼのほかに、DNAリガーゼが必要であり、リガーゼの作用によりDNAは再結合され高分子化する。肝細胞核にはリガーゼが存在し、in vivoではDNAの修復が見られるが、分離核では合成反応を行うとかえってDNA鎖は低分子化する(図3-C)。これはDNaseの作用しやすい実験系でのDNA修復現象の証明は困難を伴う事を示している。図3より、各分画のDNA量と分子量から、各分画中のDNA鎖の本数を計算し、さらに放射能からDNA鎖一本当りの^{3}H-TMPのとり込み量を求めると(計算値は示さず)、肝細胞核ではDNA鎖が長いほど著明に^{3}H-TMPがとり込まれている。これは肝細胞核では、DNA合成反応時にDNA修復と分解も同時に起っている事を意味すると思われる。P3核とP51核でもDNA鎖一本当り^{3}H-TMPは増加傾向を示し、DNA修復がニューロンやグリア核でも行われている可能性が考えられる。しかしDNA修復現象の存在を明確に示す為には、ここに用いた実験系でDNaseの作用を止めたり、また別にニューロン核内にリガーゼが存在する事を証明する必要があると思われる。

〔文　献〕

(1) Branster,M.V., and Hershey,A.D. (1957) Nature 180, 1283-1284 (2) Grisham,J.W., Kaufman,D.G., and Stenstrom,M.L. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 49, 420-427 (3) 井上順雄.鈴木修.加藤尚彦(in preparation) (4) Kato,T., and Kurokawa,M. (1967) J.Cell Biol. 32, 649-662 (5) Kissane,J.M., and Robins,E. (1958) J. Biol.Chem. 233, 184-188 (6) Matsudaira,H., and Furuno,I. (1972) Biochim.Biophys.Acta 272, 202-211 (7) Ono, T., and Okada,S. (1973) J.Radiat.Res.(Tokyo) 14, 204-207 (8) Ono,T., and Okada,S. (1974) Int.J.Radiat. Biol. 25,291-301 (9) Stambolova,M.A., Cox,D., and Mathias,A.P. (1973) Biochem.J. 136, 685-695 (10) Stambolova,M.A., Cox,D., and Mathias,A.P. (1974) Biochem.J. 140, 65-71 (11) 鈴木修.加藤尚彦(1973)神経化学 12,56-59 (12) Wargar,M.A., Burgoyne,L.A., and Atkinson,M.R. (1971) Biochem.J. 121, 803-809 (13) Wheeler, K.T., and Lett,J.T. (1972) Radiat.Res. 52,59-67 (14) Wheeler,K.T., and Lett,J.T. (1974) Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 71, 1862-1865 (15) Zimmerman,S.B., and Levin,C.J. (1975) 250, 149-155

18 ラット脳小胞体における膜とリボゾームとの関係

山上 栄・大西 博・森 浩一
切池信夫・川北幸男
（阪市大・医・神経）

〔要約〕

[^{14}C]-ロイシンを用いて，in vivoで短時間標識したラット脳の小胞体におよぼすdeoxycholate(以下ＤＯＣと略す)，TritonX-100，Lubrol-wx，Tween-40の作用を，蔗糖密度勾配遠心によって比較した。0.2％では，DOC，TritonX-100，Lubrol-wxの順序で，急速に膜の可溶化と，それに平行したリボゾームとnascent peptideの遊出を起す。さらに0.5％では膜の溶解は最大となり，それ以上濃度を増加させても，より多くの効果は期待できなかった。なお，Tween-40は1％でも著るしい膜の溶解を示さなかった。遊離型リボゾームを5mM EDTAで処理すると，nascent peptideを持つ大小亜粒子の分離がみられ，その量比は2：1であった。小胞体に対するＥＤＴＡの作用は，極めて僅かの小亜粒子の遊離を示したに過ぎなかったが，膜からDOCとTritonX-100で分離したリボゾームにＥＤＴＡを添加すると，遊離型と同じ量比の大小亜粒子の遊出がみられた。また小胞体をPuromycinと0.5M-KClで処理しても，やはり小亜粒子が僅かに出現したに止まった。これらの結果から，脳小胞体ではリボゾームとnascent peptideの遊出が膜の溶解と平行して進行することを示し，膜とリボゾームとの結合はかなり強固で，その結合にはリボゾーム大亜粒子が介在することを示唆するものである。

われわれは，前報[6]においてラット脳の膜結合型リボゾームが遊離型より効果的な蛋白合成能を持つことを指摘した。膜結合型リボゾームにみられる活発な蛋白合成の過程をより詳細に明らかにするには，膜，リボゾーム，nascent peptideの間の相関を追求することが必須となってくる。既に肝ではこの機構についてのかなりの解析[1)-5)]が進展しているが，脳ではいまだに十分な検討がなされていない。したがって，今回われわれは膜とリボゾームとの結合様式について多少の検索を行なったので報告する。

〔実験方法〕

1) [^{14}C]-ロイシンによるin vivoでの標識，実験動物としては，体重200gの雄ラットを用い[^{14}C]-ロイシンの注射は前報[6]に従って行ない，注射後15分に断頭し，脳髄を摘出して実験に供した。

2)小胞体と遊離型リボゾームの調製および小胞体からのリボゾームの分離，これらの調製は本質的には前報[6]に従った。ラット脳ホモジネートからのミトコンドリア上清を0.5Mと2Mの不連続蔗糖密度勾配上に乗せ，105,000g，18時間遠心して，0.5Mと2Mの蔗糖密度の境界面に小胞体を得るとともに，遊離型リボゾームを沈殿させた。さらに，リボゾームを除いた細胞上清で小胞体を懸濁し，ＤＯＣとTritonX-100を加えて，最終濃度をそれぞれ0.2％と0.5％とし，2分間撹拌後，10,000g，10分間遠心して膜切片を除いた。生じた上清を再度105,000g，120分遠心して，膜結合型リボゾームを沈殿させ

〔脚注〕a)ＴＫＭ緩衝液1；0.05 M Tris-HCl 緩衝液，pH 7.5，0.1M-KCl，0.01M-$MgCl_2$，0.01M-ジチオスレイトール，b)ＴＫＭ緩衝液2；0.05 M Tris-HCl 緩衝液，pH 7.8，0.05 M-KCl，0.02 M-$MgCl_2$，

た。

3) Detergent による小胞体の処理，小胞体をＴＫＭ緩衝液Ⅰに懸濁し，ＤＯＣ，Triton X-100，Lubrol-WX，Tween-40 などの detergent を別々に加え，最終濃度を0.04％から1％とし，これらdetergentsの小胞体におよぼす影響を蔗糖密度勾配によって分析した。

4)小胞体と遊離型リボゾームの蔗糖密度勾配による分析，小胞体を15％から50％の直線的蔗糖密度勾配上に乗せ，ＳＷ25ロータ－内で，63,586ｇ．２時間遠心し，遊離型は10％～40％の蔗糖密度勾配で同様に遠心した。遠心終了後260 nmにおける紫外部吸収の測定と放射能の計測を行なった。

5)小胞体と遊離型リボゾームからリボゾーム亜粒子の分離，

a)ＥＤＴＡ処理，ＥＤＴＡの小胞体，遊離型および結合型リボゾームにおよぼす作用はSabatini[5]らの方法に従って検討した。これらの分画を，ＴＫＭ緩衝液２に懸濁した後，0.1M-ＥＤＴＡ溶液を加えて，最終濃度を0.005Mとした。４℃，１時間振盪後，10.000ｇ，30分遠心して膜成分を除き，その上清を５％から20％の直線的蔗糖密度勾配上に乗せ，63,586ｇ，12時間遠心した。

b)高濃度 KCl と Puromycin 処理，リボゾーム－膜間の結合におよぼすKClとPuromycinの影響を調らべるには，Adelman[1]らの方法を参考とした。反応混液は，リボゾーム溶液（TKM緩衝液２に懸濁したもの）の0.5ml，0.005M-Puromycinの0.1ml，1.25 M-KCl 溶液（KCl以外はＴＫＭ緩衝液２と同一組成）の0.4mlを加え，混和した後，37℃，10分間インキュベートした。反応終了後，冷却し，10.000ｇ，30分間遠心して得た上清を15％から30％の凸形（Convex）蔗糖密度勾配上に乗せ，ＥＤＴＡの場合と同様に遠心した。

〔結果と考察〕

1)小胞体におよぼすdetergentの効果，４種のdetergentsの小胞体におよぼす作用を図１にまとめた。対照群では，膜分画は放射能と紫外部吸収の一致した鋭いピークを示す(図1a)。0.5％ＤＯＣを加えると，膜分画が消失し，リボゾームとnascent peptideの遊離がみられた(図1b)。同じ濃度のTriton X-100やLubrol-WXでもDOCと同様なパターンが見られるが，なお膜分画を残している(図1cとd)。またTween 40では対照群と類似したパターンを示した(図1e)。次に0.04％から0.5％における detergentの効果を紫外部吸収(図2a)と

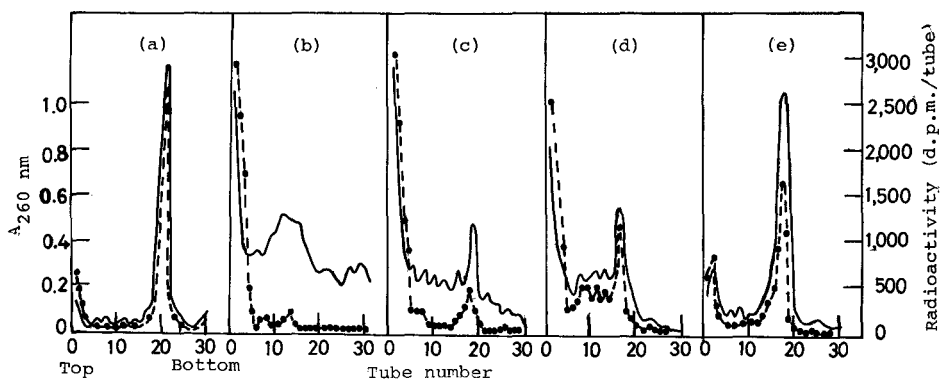


Fig. 1. Effect of DOC (b), Triton X-100 (c), Lubrol-WX (d) and Tween-40 (e) on the release of short-term labeled proteins and ribosomes from endoplasmic reticulum. (a) no detergent. —— $A_{260\ nm}$, ---[^{14}C]-leucine radioactivity.

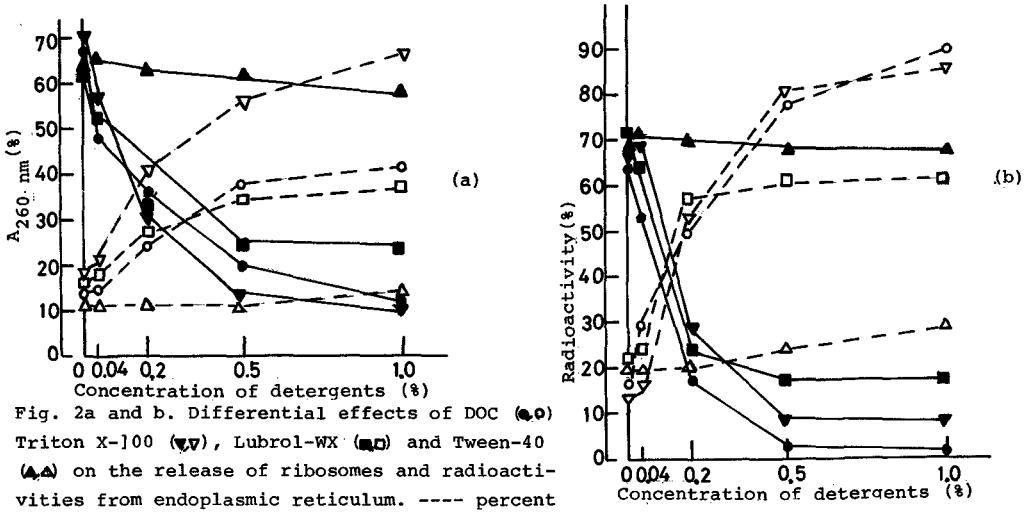


Fig. 2a and b. Differential effects of DOC (●,○) Triton X-100 (▼,▽), Lubrol-WX (■,□) and Tween-40 (▲,△) on the release of ribosomes and radioactivities from endoplasmic reticulum. ---- percent of total $A_{260\ nm}$ (a) and radioactivities (b) in first five fractions near the top of the gradients; —percent of total $A_{260\ nm}$ (a) and radioactivities (b) in seven fractions corresponding to the membrane band.

放射能(図2b)の分布について比較した。0.2%のDOC, Triton X-100, Lubrol-WXでは, 膜が可溶化し, リボゾームとnascent peptideの遊出が始まる。さらに0.5%では両者の遊出は最大となる。Tween-40は1%でもそれほど著しい影響が認められなかった。

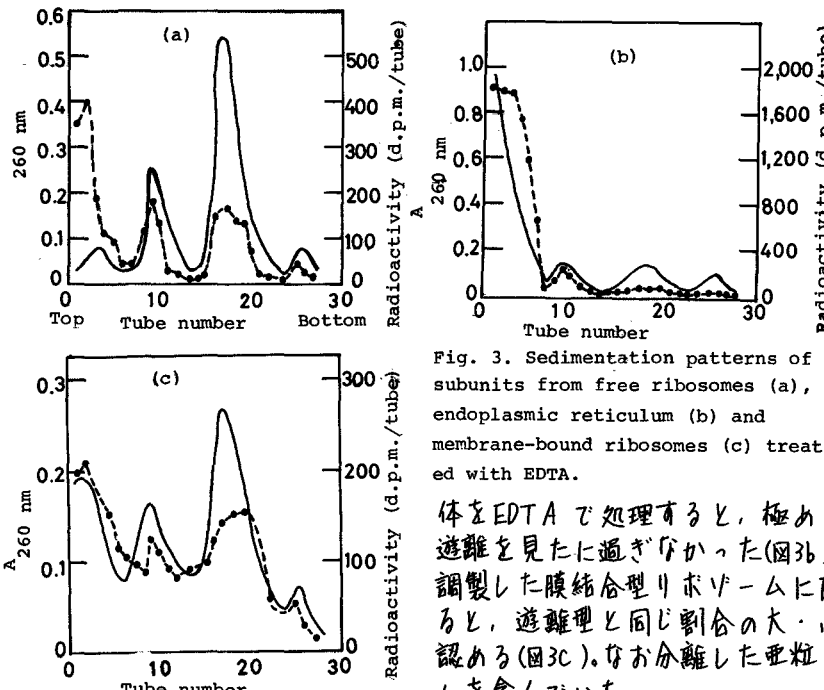


Fig. 3. Sedimentation patterns of subunits from free ribosomes (a), endoplasmic reticulum (b) and membrane-bound ribosomes (c) treated with EDTA.

2) 小胞体と遊離型リボゾームにおよぼすEDTAの効果, 遊離型リボゾームを5 mM EDTAで処理すると, 肝リボゾーム[5]の47Sと32Sに対応する大; 小亜粒子に分離することができ(図3a), その比は2:1であった。小胞体をEDTAで処理すると, 極めて僅かの亜粒子の遊離を見たに過ぎなかった(図3b)。他方小胞体から調製した膜結合型リボゾームにEDTAを作用させると, 遊離型と同じ割合の大・小亜粒子の遊出を認める(図3c)。なお分離した亜粒子はnascent peptideを含んでいた。

3)小胞体と遊離型リボゾームにおよぼすPuromycin と高濃度KCl の効果, Puromycin 存在下で, 遊離型リボゾームに0.5M-KClを加えると, 肝などと同じ60S と40S 亜粒子[1-5]の出現がみられた(図4a)。0.5M-KClだけでもこれら亜粒子の出現をみるが, なおかなりの80S 粒子の存在が認められる(図4b)。いずれも放射能はリボゾームより離れ, 可溶性分画に移行するが, 0.5M-KCl では多少80S 粒子に放射能が残っている(図4b)。小胞体を同様に処理すると, 40S 亜粒子が僅かに遊離を示した(図4c)。この傾向はKCl単独添加の場合でも同じである(図4d)。これらの結果から脳ではこれまで報告された肝[1-5]などと異なり, 小胞体膜からリボゾームが遊離し難いものと思われる。膜との結合は, 大亜粒子を介しているため, 小亜粒子の方が比較的分離し易いのであろう。

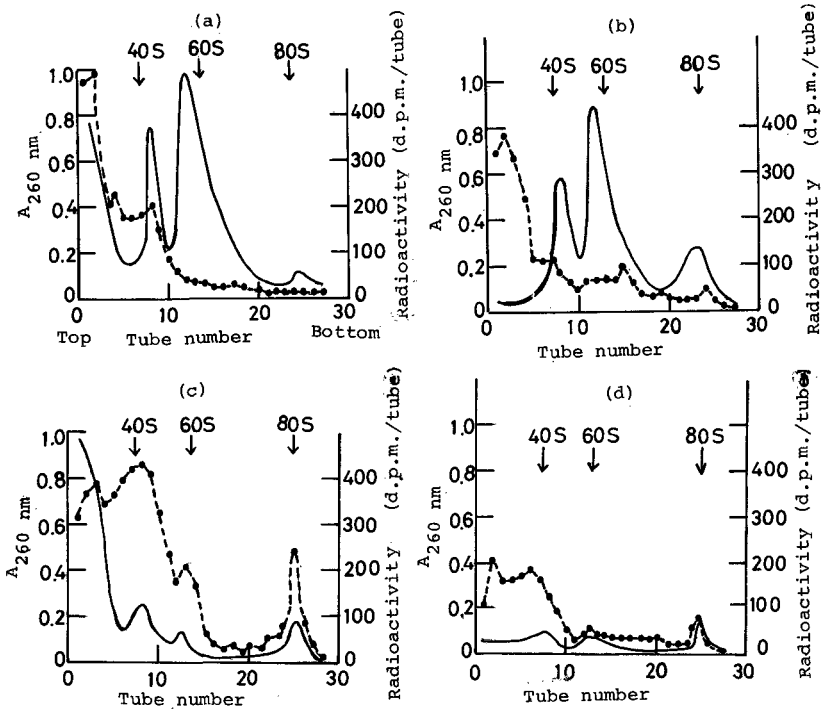


Fig. 4. Sedimentation patterns of subunits from free ribosomes and endoplasmic reticulum treated with puromycin at 500 mM KCl. a) Free ribosomes (0.5 mM puromycin, 500 mM KCl), b) Free ribosomes (500 mM KCl), c) Endoplasmic reticulum (0.5 mM puromycin, 500 mM KCl) and d) Endoplasmic reticulum (500 mM KCl).

(文献)

1) Adelman M. R., Sabatini D.D. & Blobel G. (1973) J. Cell Biol., 56, 206.
2) Blobel G. & Potter V. R. (1967) J. Mol. Biol., 26, 293.
3) Blobel G. & Sabatini D. D. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 390.
4) Kreibich G., Debey P. & Sabatini D. D. (1973) J. Cell Biol., 58, 436.
5) Sabatini D. D., Tashiro Y. & Palade G. E. (1966) J. Mol. Biol., 19, 503.
6) 山上 栄, 大西 博, 森塚一, 切池信夫, 川北幸男, (1974) 神経化学, 13, 108.

19 マウス脳のrapidly labelled DNA-like RNAにおける uridylate rich regionの存在

切池信夫・森浩一・山上栄・大西博
川北幸男
（阪市大・医・神経）

〔要約〕

1) 成熟マウス全脳から熱フェノール法でRNAを抽出しFr.-0, Fr.-0W, Fr.-40, Fr.--40, Fr.-55, Fr.-63, Fr.-85の6分画に分けた。塩基組成のG+C/A+U比はFr.-0より順次1.65,1.58, 1.42, 1.38, 1.29, 0.98でFr.-85がもっともDNA-likeの塩基組成を示しておりその収量は約3%である。一方約80%はFr.-0が占めている。しかしFr.-0の4S RNAはその塩基組成と^{3}H-uridineのとりこみからlow molecular weight nuclear RNAが含まれている可能性が考えられる。

2) 注射1時間後での^{3}H-uridineのとりこみはFr.-85がもっとも高い。specific radioactivityの比(Fr.-85を100とすると) Fr.-0より順次1.3, 0.6, 2.5, 13.2, 13.4, 100でFr-85はFr.-0より約77倍も高い,そして注射20時間後のspecific radioactivityではFr.-85のみが減少の傾向を示すのに対して,ほかの分画は全て増加傾向を示しており,Fr.-85には主にrapidly labelled DNA-like RNAが含まれていると考えられた。

3) Poly Aとのhybrid形成能の高い分画はFr.-85, -63, -55, でinput RNAの20-40%がメンブラン・フィルターに吸着され,Fr.-85がもっとも高いhybrid形成能を示した。

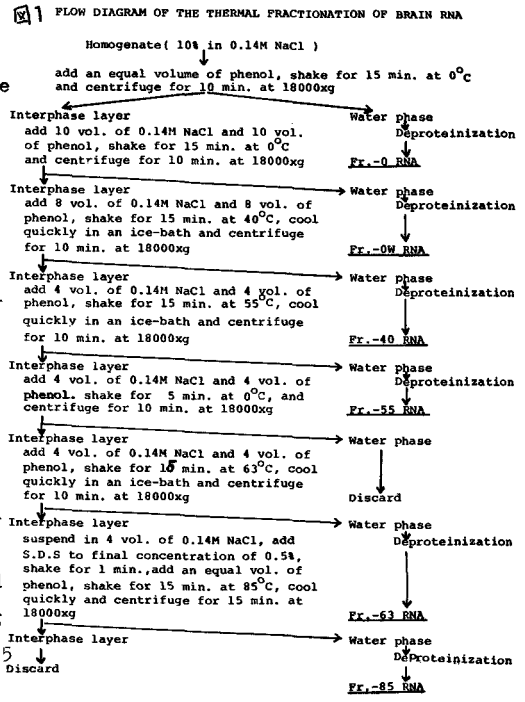
4) Sucrose density gradientで展開したRNAについてpoly A hybridizationで分析すると28Sより分子の大きいgiant RNAにpoly A hybrid形成能の80%がみられた。以上からマウス脳のrapidly labelled DNA-like giant RNAがuridylate rich regionを持つと考えられる。

最近, heterogeneous nuclear RNAのtopography すなわち5'末端よりpppGp-, oligo(U), double stranded region, messenger sequenceそして3'末端がpoly Aで終る,が明らかになって来ている。[6] そして,ラッテ脳においてもpoly A containing RNAが確認され,発育との関係が調べられた。[2] 今回rapidly labelled DNA-like giant RNAにuridylate rich regionが存在することを示唆する結果が得られたので報告する。

1) 実験方法

1-1) 熱フェノール法によるRNAの抽出：飼育繁殖させた生後100日前後のdd系マウス40匹の全脳から図1に示すように Markov[4] らの方法に従ってRNAを抽出した。抽出操作の順に各RNA分画をそれぞれFr.-0, Fr.-0W, Fr.-40, Fr.-55, Fr.-63, Fr.-85とする。抽出の過程で溶媒量を2-4倍にし,遠心力を18000xgに上げた点が原法と異なる。遠沈上清を0.5% S.D.S.にしてフェノール,クロロホルムー

図1 FLOW DIAGRAM OF THE THERMAL FRACTIONATION OF BRAIN RNA



イソアミルアルコールで除蛋白，エタノール沈殿のあと，さらに Fr.-O, -OW, -40 は Sephadex G25 を通し，Fr.-55, -63, -85 は DNase 処理(0.01M Tris pH 7.6, 0.01M $MgCl_2$, 15 ng DNase/ml, 25°C, 30分間インキュベート，0.01M EDTA にして反応を止めフェノールで除蛋白)して精製した。RNA の定量は紫外部吸収で行なった。Lowry 法および Burton 法の比色定量では蛋白質および DNA の混入は認められなかった。

1-2) ^{3}H-uridine のとりこみ：マウス当り 20 μl の ^{3}H-uridine(1mCi/ml, 3.3Ci/mM)を前法[7]に従って注射した。0.14M NaCl homogenate の一部の 0.4N 過塩素酸遠心上清を酸可溶性分画とした。放射能測定も前法と同じ方法でカウントした。

1-3) Sucrose density gradient analysis : 0.01M Tris(pH 7.6), 0.1M NaCl, 0.5% S.D.S. を含む 15-30% linear density gradient を作り，SW 25 で 23000 rpm, 20°C 12時間遠心した。

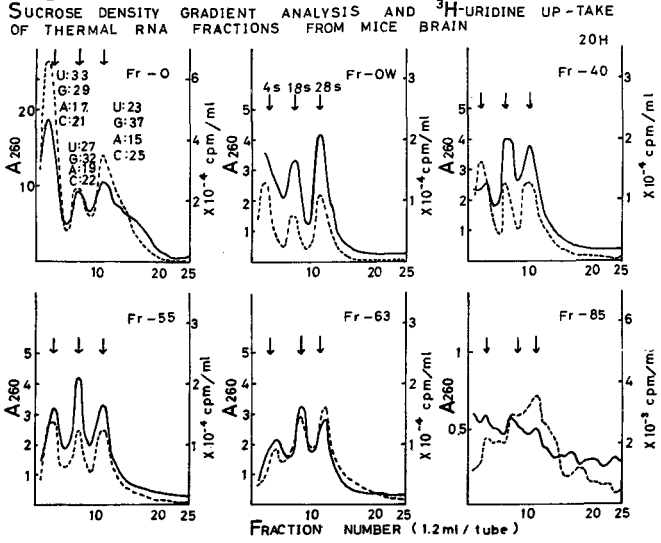
表1 YIELD AND BASE COMPOSITION OF THERMAL RNA FRACTIONS FROM MICE BRAIN

RNA Fraction	Yield(%)	Base composition Mole ratio(%) UMP	GMP	AMP	CMP	G+C/A+U	Pu/Py
Fr.-O	80.2	21.25	35.57	16.49	26.69	1.65	1.09
Fr.-Ow	4.4	18.20	31.60	20.50	29.70	1.58	1.09
Fr.-40	7.4	20.60	30.83	20.70	27.88	1.42	1.06
Fr.-55	3.8	21.49	33.93	20.00	24.14	1.38	1.17
Fr.-63	1.1	25.30	29.74	18.42	26.54	1.29	0.93
Fr.-85	3.1	28.43	29.32	22.02	20.24	0.98	1.05
	100.0						

Total yield: 1165.8 ng RNA/g wet tissue (Recovery:54%)

1-4) 塩基組成分析：Katz[3]らの方法で行なった。

1-5) Poly A hybridization による uridylate rich sequence の分析：Burdon[1]らの方法による。RNA 試料を 1mM Tris(pH 7.6)中で一昼夜透析したあと三分し，一つはアルブミンを担体として 0.5% TCA で RNA を沈降させフィルター上に集めてカウント，total radioactivity をもとめる。残りの二つは全量 1ml で 0.01M Tris(pH 7.6), 1xSSC とし 10 μg の poly A を添加または非添加で 30°C, 60 分間インキュベート。poly A と uridylate rich region containing RNA との hybrid を，cold の KTM buffer(0.5 M KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.01M Tris pH7.6)で 15倍に稀釈したあと ミリポアフィルター (HAWP02500)に吸着させ 20ml の KTM で2回洗浄，乾燥後カウントする。Hybrid 形成能はフィルターに吸着された radioactivity の total radioactivity に対する百分率として表わした。



2) 結果および考察

2-1) DNA-like RNA の抽出：熱フェノール法で抽出した RNA の収量と塩基組成が表1に示される。Fr.-85 がもっとも DNA-like の塩基組成をもち

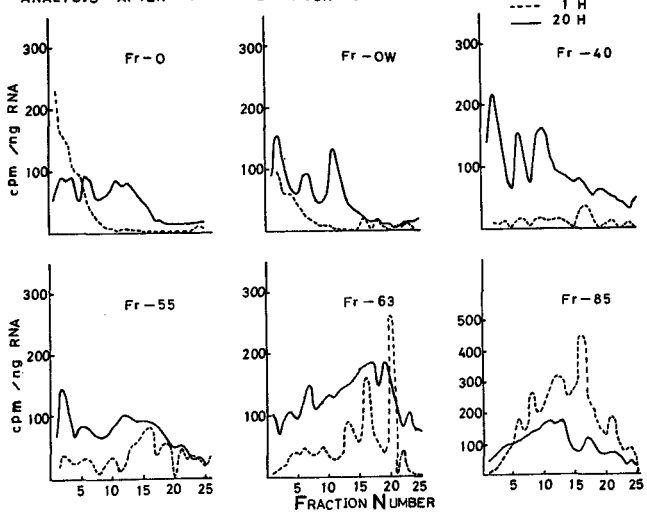
その収量は約3%である。反対にFr.-0はリボゾーム型の塩基組成でその収量も約80%を占める。しかし，図2でFr.-0のsucrose density gradientで分画したRNAの塩基組成で示されるように，4S RNAはDNA-likeであり，また ^{3}H-uridineのとりこみが18S, 28S RNAにはみられない注射1時間後ですでに4S RNAにとりこみがあることからも，Fr.-0の4S RNAにはKumar[5]の示したlow molecular weight nuclear RNAが含まれている可能性が考えられる。

表2 SPECIFIC RADIOACTIVITES OF THERMAL RNA FRACTIONS FROM MICE BRAIN AFTER 1 AND 20 HOURS INJECTION

RNA FRACTION	SPECIFIC RADIOACTIVITIES CPM/NG RNA	
	1 HOUR	20 HOUR
FR.-0	12.1	151.3
FR.-0W	5.5	119.0
FR.-40	23.1	207.9
FR.-55	121.0	214.5
FR.-63	123.2	328.2
FR.-85	919.4	621.1
ACID SOLUBLE FRACTION	CPM/G WET TISSUES 14.5×10^4	11.2×10^4

2-2) ^{3}H-uridineのとりこみ：注射1時間と20時間後の各RNAと酸可溶性分画にとりこまれたラベルのspecific radioactivityを表2に示してある。Fr.-85は注射1時間後で920 cpm/ng RNAと最も高いspecific radioactivityを示し，他の分画と比べるとFr.-0に対して約77倍，Fr.-55, -63, に対しては約7.7倍も高くとりこんでいる。一方注射20時間後では他のRNAへのとりこみが非常に増加しているのに対してFr.-85は620 cpm/ng RNAと減少さえしている。酸可溶性分画のとりこみを分母としたrelative specific radioactivityをみてもこの傾向に変わりない。したがって，先の塩基組成の結果を合わせ考えるとFr.-85はrapidly labelled DNA-like RNAの分画であると云えよう。次に各分画中のRNA分子の大きさとそれぞれへの ^{3}H-uridineのとりこみを調べてみた。図2は ^{3}H-uridine注射20時間後でのsucrose density gradient analysisで A_{260} とcpmで示している。ここで40°C以上の熱フェノールで抽出したRNAは4S, 18S, 28Sのピークをよく保持していることが分かる。図3には ^{3}H-uridine注射1時間と20時間後の各sucrose density gradient analysisで分画毎に計算したspecific radioactivityが同時に図示されている。Fr.-0, -0W, -40の18S, 28S RNAには注射1時間後ではラベルのとりこみがみられず，注射20時間後になるとそれぞれのピークに一致して増加する。一方Fr.-55, -63, -85はheterogeous なprofileで約6個のピークが認められ28 Sより大きいRNAへのとりこみは注射1時間後

図3 SPECIFIC RADIOACTIVITIES OF SUCROSE DENSITY GRADIENT ANALYSIS AFTER 1 AND 20 HOUR OF INJECTION



では，20時間後よりも高いとりこみを示す。28Sより小さいRNAのとりこみは20時間後で比較的に増加する傾向を示す。

2-3) Poly A hybridization：表3に示される結果よりFr.-55, -63, -85がpoly Aとのhybrid形成能が大で，とくにFr.-85は高いhybrid形成能を示しinput RNAの約20-40％に達している。他方poly A無添加の結果はpoly A containing RNAの含量を反映しているものと考えられFr.-85にはこのRNAも多いことがわかる。次にsucrose density gradientで展開したRNAのpoly A hybridizationを示したのが図4である。ここでpoly Aとのhybridを形成しよいuridylate rich RNAは28Sより大きいgiant RNAに多く含まれることが明らかでFr.-55, -63, -85のpoly A hybridの75-80％がこのgiant RNAによるものである。他方uridineの含量が高いFr.-0の4S RNAはpoly Aとのhybridizationをほとんど示さないことはpoly Aとhybridしよいuridylate rich sequenceが急速にnucleaseによって分解されることを示唆すると考えられる。

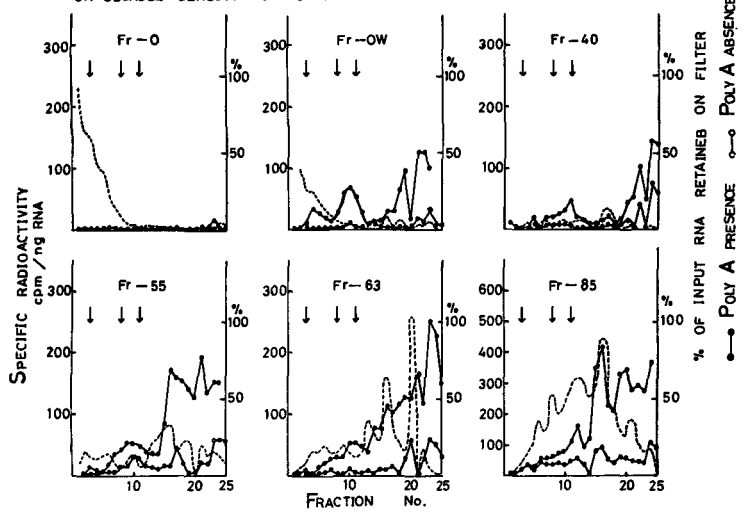
PERCENTAGES OF RADIOACTIVITY RETAINED ON FILTER AFTER HYBRIDIZATION OF THERMAL RNA FRACTION WITH POLY A

RNA Fraction	Percentages of radioactivity retained on filter	
	with poly A	without poly A
Fr.-0	3.1 %	0.9 %
Fr.-0w	6.2	0.9
Fr.-40	8.1	4.1
Fr.-55	18.6	4.8
Fr.-63	30.1	5.2
Fr.-85	39.6	13.0

われわれはuridylate rich regionを含んだrapidly labelled DNA-like giant RNAを得たと考えられるので，さらにpoly Aとspecificにhybridizationするuridylate rich sequenceそのものを得るためにT_1-RNaseで処理してpoly A-Sepharoseのaffinity chromatographyで分離し検討中である。

このuridylate rich sequenceの機能は未だ不明であるが3' end poly Aがposttranscriptional additionされることと異なり，DNAから直接に転写されるならばmessenger RNAのcodon毎に反復するところのredundant DNAに対応するものと考えられる。

図4 Specific activities and analysis of uridylate-rich brain RNA on sucrose density gradient



REFERENCE

1) Burdon, R. H. and Shenkin, A.; FEBS Letters 24, 11(1972)
2) DeLarco, J., Abramowitz, A., Bromwell, K. and Guroff, G.:J. Neurochem. 24,215(1975)
3) Katz, S. and Comb, D. G.: J. Biol. Chem.: 238, 3065 (1963)
4) Markov, G. G. and Arion, V. J.: Eur. J. Biochem. 35, 186 (1973)
5) Kumar, S.: Brain Res. 42, 455 (1972)
6) Weinsberg, R. A.: Ann. Rev. Biochem. 42, 329 (1973)
7) 森 浩一・切通信夫・山上 樂・大西 樹・川北章男：神経化学. 13, 100 (1974)

20 コリンアセチルトランスフェラーゼとアセチルコリンエステラーゼの酵素的微量測定法

加藤尚彦 （東大・医・脳研）

〔要約〕

数種の酵素反応を組合せて，新たにコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAc）とアセチルコリンエステラーゼ（AchE）の微量測定法を開発した。

(1) ChAc測定：生成されたAchをAchEにより水解し，生成した酢酸をacetate kinaseによりアセチル-Pにする。phosphatransacetylaseを用いて，充分量のCoASHの存在下で，アセチル-Pを定量的にアセチルCoAに転換し，アセチルCoAをCoAサイクリング（酵素的増幅測定法）を用いて定量した。測定反応液中に存在する高濃度の酢酸の大部分を，酵素反応によりあらかじめ取除いたが，残った部分が高いブランク値を与えた。この方法の測定感度は～20×10^{-12}molであり，マウス大脳の組織湿重量として0.7～5μgの範囲で充分な直線性が得られた。マウス大脳のChAc活性を測定し，2.88～6.13 mmol生成Ach/Kg湿重量/時(38°C)の値が得られた。

(2) ChE測定；生成物である酢酸を，ChAc測定法と同じ酵素反応を用いてアセチルCoAとし，CoAサイクリングにより増幅定量した。基質であるAchの非酵素的水解により，高いブランク値が得られた。この方法の測定感度は，～20×10^{-12}molで，マウス大脳組織湿重量として10～80ngの範囲でよい直線性が得られた。この方法によるマウス大脳のAchEの比活性は470～658mmol生成酢酸/kg湿重量/時(38°C)であった。

現在まで数多くのコリンアセチルトランスフェラーゼ（EC 2.3.1.6）[1),2),4),13),15)]とアセチルコリンエステラーゼ（EC 3.1.1.7）[3),4),11)]の活性測定法が考案され，また組織化学的な方法も繁用されている[5),6),10)]。しかし哺乳動物の単一神経細胞のこれらの酵素活性を定量的に測定する方法は，^{14}C-アセチルコリンを基質とするエステラーゼ測定法[14)]を除いては存在せず，とくにコリンアセチルトランスフェラーゼの高感度測定法はない。本報告では単一細胞の分析が可能である，両酵素活性の酵素を用いた測定法について述べる。

〔測定に用いる酵素反応系〕 コリンアセチルトランスフェラーゼ測定には，下記の反応(1),(2),(3)を，エステラーゼ測定には反応(2),(3)を用いて，生成されたAchまたは酢酸をアセチルCoAに転換する。このアセチルCoAを"CoAサイクリング"[8),9)]を用いて増幅測定する。

(1) アセチルコリン $\xrightarrow[(\text{AchE})]{\text{Acetylcholine esterase}}$ 酢酸 + コリン

(2) 酢酸 + ATP $\xrightarrow[(\text{AK})]{\text{Acetate kinase}}$ アセチル-P + ADP

(2') ADP + ホスホエノールピルビン酸 $\xrightarrow[(\text{PK})]{\text{Pyruvate kinase}}$ ATP + ピルビン酸

(3) アセチル-P + CoASH $\xrightarrow[(\text{PTA})]{\text{Phosphotransacetylase}}$ アセチルCoA + P_i

(4) アセチルCoA + オキザル酢酸 $\xrightarrow[(\text{CS})]{\text{Citrate synthase}}$ クエン酸 + アセチルCoA

〔試薬および酵素標品〕 Acetate kinase (AK, EC 3.1.1.7; E. coli), Pyruvate kinase (PK, EC 2.7.2.1; ウサギ筋), Phosphotransacetylase (PTA, EC 2.3.1.8; Clostridium kluiveri),Citrate synthase (CS, EC 4.1.3.7; ブタ心臓), Acetylcholine esterase (AchE; Electrophyrus electrics) は, Boehringer (Mannheim)から購入した。CoASHはBoehringerより入手し,アセチルCoAはCoASHと無水酢酸より合成した[6]。合成したアセチルCoAを7.5×1.4cmのSephadex G-15カラムにかけ,過剰の酢酸をとり除いて使用した。水は金属ガマで蒸溜し,使用直前に脱イオンして用いた(ヤマト科学,オートスチル・WA550型)。

〔コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAc)測定法〕 (a)酵素反応 (アセチルCoA+コリン ⟶ Ach + CoASH) (1)反応液組成; 100mMトリス-塩酸, pH7.5, 4.2mMコリン塩酸塩,430μMアセチルCoA, 200mM NaCl, 2mM DFD (diisopropylfluorophosphate).

(2)通常反応, 反応液53μlを, 9.5×5mmの試験管にとり氷冷する。38℃で10分予備加温後, 組織ホモジェネート3.34μl (ex. 6週令DDYマウス,雄の大脳, 40~400μg) を加えて反応を開始する。38℃, 1時間反応後, 1.38μlの1N HClを加えて(pH2)反応を止め, 続いて100℃, 5分加熱し組織中の酵素とDFDを破壊する。試験管を氷冷した後, 1.38μlの1N NaOH (あらかじめ前に加えた1N HClと等量混合すると, pHが中性近くなることを確かめておく) を加えて反応液のpHを7.5にもどし,その0.675μlを油井[4]中のパラフィン油の底に小滴としてとる。油井とはテフロン板に径2mm,深さ2mmの"井戸"を堀ったもので, 井戸にパラフィン油を満し微少量の反応液をその中に沈めて蒸発を防ぎ, 試験管の代りに用いるものである。

(3)微量反応, 0.675μlの反応液を, 20秒おきに油井中のパラフィン油の底に沈める。油井はホットプレート(屈曲した銅管に温度をコントロールした温水を流し, その上に銅板を置く; 手製)上で38℃に保つ。10分の予備加温後, 組織ホモジェネート 89.1nl (マウス大脳, 0.5~4.7μg)を加え反応を開始し, 1時間後に89.1nlの0.215N HClを加えて反応を20秒間隔でとめる。油井を95℃で15分加熱した後氷室で冷却し, 89.1nlの0.215N NaOHを加えてpHを再び7.5にもどす。

以上の処理により, 反応液中に生成されたAchと, 基質のアセチルCoA,生成されたCoASHを約95%保存したまま,次の反応の試料とする。Achスタンダードは, 油井中の0.675μlの小滴中に, 3~25×10^{-12}molになるよう加え, 測定試料と同様に処理する。

(b)ブランク除去反応, (1)反応液組成; 100mMトリス-塩酸, pH7.5, 2mM $MgCl_2$, 2mM NH_4Cl, 2.4mM ATP, 3.3mMホスホエノールピルビン酸, 4mMオキザル酢酸, 95μg/ml AK, 23.6μg/ml PK, 22μg/ml PTA, 25.6μg/ml CS.

(2)酢酸除去反応, 0.675μlの反応液を油井中のChAc測定反応液に加え, 38℃で3時間反応させる。この過程でアセチルCoAは前述の反応((4))により直ちにCoASHとなる。反応系列((1))~((3))によりAchを測定するとき, 酢酸はブランクとなるが, この段階では(a)と(b)の混合液中の酢酸(352μM)は反応((2)),((3))により, 反応((4))で生成されたCoASHを消費してアセチルCoAとなる。アセチルCoAは再び反応((1))によりクエン酸を生成し, CoASHとなり反応((3))に再利用される。すなわち反応系に混在する酢酸は, この反応過程で95%以上が安定なクエン酸となって除かれる。反応((2))ではATPが消費されるが, 反応((2))を補助的に行うことにより, ADPを除いてATPを生成し,反応((2))が進むようにする。反応

終了後油井を95℃で15分加熱し，反応液中の酵素とオキザル酢酸を破壊する。このときAchは約5%分解する。

(C), Ach測定反応　(1)反応液組成；50mMトリス-塩酸，1mM $MgCl_2$，1mM NH_4Cl，1.3mM ATP，157μg/ml AK，12.5μg/ml PTA，1.9μg/ml Ach E

(2)測定反応，反応液1.38μlを冷却した油井中の小滴に加え，38℃ 30分反応する。Achは反応(1)(2)(3)によりアセチルCoAに転換される。この反応に利用されるCoASHは，ChAc反応液由来のアセチルCoA（2.3×10^{-12} mol）から除去反応(d)で生成されたものである。またこの反応時にブランク除去反応時に一度加熱された反応液(b)が存在すると，Achは100%アセチルCoAに転換されず，また生成アセチルCoAが徐々に水解される。従って(C)以下の処理は迅速に行う。

(d), アセチルCoA測定　Ach測定反応で残ったCoASHは，89.1nlの5.87mM NEM (N-ethylmaleimide) を小滴に加えて38℃ 15分反応させ，thiol etherとしてとり除く。全反応液小滴をとり，20μMのGSHを含むCoAサイクリング液（PTA，1.6μg/ml；CS，3.3μg/ml）に加え，アセチルCoAを780倍に増幅して測定する。

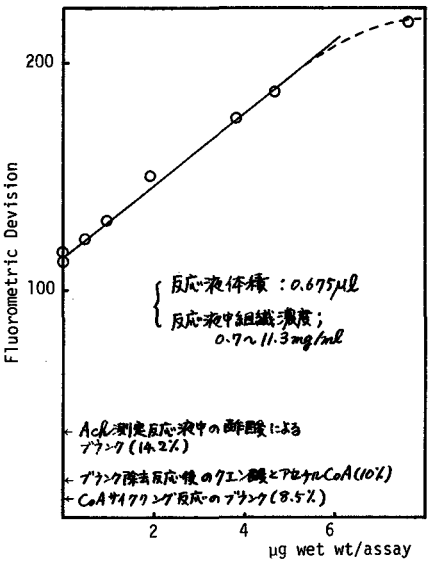


図1；コリンアセチルトランスフェラーゼ測定法の直線性，横軸はマウス大脳の組織湿重量．縦軸の100目盛は，18.7×10^{-12} molのAchに相当．

(e), ChAc測定法の特徴，0.675μlの反応液中では，測定値は5μg（7.3mg/ml）以下の範囲で組織量に比例する（図1）。この方法で測定したマウス大脳（四丘体上丘以上の脳幹を含む）のChAc活性は，2.88～6.13 m mol Ach/Kg 湿重量/時（4測定値）で従来の方法の報告値の範囲に一致する。同じ反応条件で生成されたCoASHをEllman[3]の方法で測定すると（詳細は省略），ChAc活性は3.62～6.73（上記と同じ単位）となった。この測定法は従来報告されている方法[4][5]とほぼ同程度の感度をもち，1図に示した直線性の範囲は，この測定法が神経組成の層構造（大・小脳の各層や網膜層）のChAc活性を測るのに充分な感度をもつことを示している。唯一のこの方法の弱点はブランクが高いことである。このブランクの64%はChAc反応液より由来し，反応液中の酢酸が除ききれなかったためである。したがって測定値のぶれを少くするためには，ChAc反応液量を正確にとらねばならない。

〔アセチルコリンエステラーゼ(AchE)測定法〕　(a), 酵素反応，（アセチルコリン ⟶ 酢酸＋コリン）　(1)反応液組成；50mMトリス-塩酸，pH7.5，300μM Ach，0.002% (W/v) ウシ血清アルブミン

(2)通常反応，ChAc反応に習って，53μlの反応液に0.675μlの組織ホモジェネート（マウス大脳，0.8～6.8μg）を加えて反応させる。38℃ 30分反応後，100mM硫酸エゼリンを0.675μl加え反応をとめる（最終濃度1mM）。反応液を100℃で2分加熱し組織中の酵素を破壊し，その0.675μlを油井中のパラフィン油内にとり次の反応にまわす。

(3)微量反応，ChAc測定法に従って，0.675μlの反応液を38℃の油井中にとる。組織ホモジェネート0.675μl(マウス大脳，10～80ng)を加えて反応を開始し，38℃1時間反応後，89.1nlの100mMエゼリンを加えて反応を止める。油井を95℃で15分加熱後，直ちに0℃に冷却する。

以上の過程でAchは組織内のAchEによって水解されるが，またこの条件下で非酵素的に水解されブランクとなる。スタンダードとしては，0.675μl中の反応液に3～30x10⁻¹²molの酢酸を加え，酵素反応試料と同様に処理する。

(b)酢酸測定反応，(1)反応液組成；50mMトリス-塩酸，pH7.5，1mM $MgCl_2$，1mM NH_4Cl，2.4mM ATP，3.8mMホスホエノールピルビン酸，163μM CoASH，160μg/ml AK，22.2μg/ml PTA，23.7μg/ml PK.

(2)測定反応，0.675μlの反応液を油井中の小瓶に加え，38℃30分反応する。この過程で前述の反応系列中(1)(2)(3)により酢酸は定量的にアセチルCoAに転換される。

(c)アセチルCoA測定，ChAc測定法の例に従って生成したアセチルCoAをCoAサイクリング[8)9)]を用いて増幅定量する。

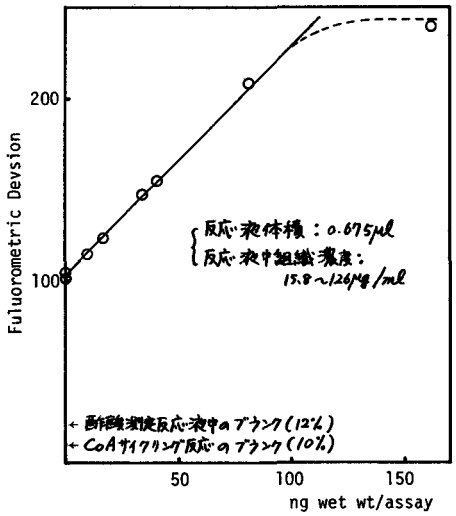


図2；アセチルコリンエステラーゼ測定法の直線性，横軸はマウス大脳の組織湿重量．縦軸の100目盛は15.6x10⁻¹²molの酢酸に相当．

(d)AchE測定法の特徴，0.675μlの反応体積中では，測定値は組織量80ngまで直線性をもつ(図2)。測定感度は従来工夫された最高感度の^{14}C-Achを用いる方法[4)11)]と同程度であり，単一神経細胞のAchE活性測定に使用できる。2図の例ではブランク値は高く，このブランクの78%はAchE測定反応液に由来し，基質のAchが非酵素的に分解して生じた酢酸が大部分をしめる。この方法で[3)]測定したマウス大脳のAchE活性は，470～658 m mol酢酸/kg湿重量/時で，Ellmanの変法(詳細省略)で測定した値，605～791(同単位)と一致した。

〔附言〕ここに述べた測定法はブランク値が高いという欠点をもつが，今まで得られなかった高感度が得られ，利用価値が高い。即ちCoAサイクリングにより生成されるNADPHを，更にNADPサイクリング反応[12)]を用いて20,000倍に増幅できるので(二重サイクリング)[8)]，とくに細胞レベルでChAc活性の測定が可能になると思われる。現在のところ組織化学的なChAc活性の染色法の特異性には問題があり[6)7)]，また免疫化学的方法が実用化されていないので，ここに述べた方法による中枢神経系のコリン作動性系細胞の分析がとくに期待される。

文　献

1)Bull,G.& Oderfeld-Nowack,B.(1971)J.Neurochem.18,935 2)Chao,L-P.& Wolfgram,F.(1972)Anal.Biochem.46,114 3) Ellman,G.L.et al.(1961)7,85 4)Fonnum,F.(1969)Biochem.J.115,465 5)Karnovsky,M.J.& Roots,L.(1964)J.Histochem. Cytochem.12,219 6)Kása,P.et al.(1970)Nature,266,812 7)Kása,P.& Morris,D.(1972)J.Neurochem.19,1299 8)Kato,T. (1975)Anal.Biochem.66,372 9)加藤尚志(1973)神経化学,12,44 10)Koelle,G.B.(1957)J.Pharmacol.Exp.Ther.103,153 11)Koslow,S.H.&Giacobini,E.(1969)J.Neurochem.16,1523 12)Lowry,O.H.et al.(1961)236,746 13)McCaman,R.E.& Hunt,J.M. (1965)J.Neurochem.12,253 14)Matschinsky,F.M.et al.(1968)J.Histochem.Cytochem.16,29 15)Schrier,B.K.& Schuster, L.(1967)J.Neurochem.14,977 16)Stadtman,E.R.(1957) in Methods in Enzymol.III p.931,Acad.Press,N.Y.

21 β-フェニルエチルアミンの新しい螢光測定法とその応用

鈴木　修・八木國夫
（名大・医・1生化）

〔要約〕

β-フェニルエチルアミン（PEA）がニンヒドリンと反応し、螢光物質を生成することを見出し、さらにL-ロイシル-L-アラニンを添加することによって、螢光強度が約20倍に増加することを知った。本ニンヒドリン反応は特異性が高く、PEAとセロトニン以外のアミンでは螢光を生じない。この反応を用いることによってラット脳の微量のPEAを定量することができた。正常のラットの脳のPEAは5mg/g湿重量であり、パージリンを投与することにより10倍以上に増加した。パージリンとフェニルアラニンを同時投与すると正常PEAの約100倍まで増加した。パージリンとフェニルアラニンを投与する前にレセルピンを投与しておくとPEAは減少し、フザリン酸カルシウムを前投与しておくと増加した。さらに本ニンヒドリン反応を用い基質であるPEAを定量することにより、B型モノアミン酸化酵素（MAO）の活性を測定する方法を考案した。酵素反応の特異性の指標としてパージリンがPEAの消失を完全に阻害することを認めた。また脳組織量（酵素量）とMAO活性の間に直線性を認めた。本MAO測定法を用いてラットならびにヒヨコの中枢神経のB型MAOの分布を調べ、A型MAOのそれと比較した。ラットにおいてはA型とB型MAOの分布が似ているが、ヒヨコにおいてはA型MAOの分布はB型MAOのそれと全く異なっていることが分った。ラットならびにヒヨコいずれにおいても脊髄のMAOはA型が多かった。

β-フェニルエチルアミン（PEA）は家兎の臓器に見出された生体モノアミンの一つである（10）が、その生理的意義ならびに代謝についての報告は必ずしも多くなかった。しかし、最近になってうつ病の患者の尿にPEAが欠如すること（1,4）が報告され、PEAが偏頭痛の病因に関係する可能性が示され（12）、さらにPEAがB型モノアミン酸化酵素（MAO）の特異的な基質であること（19）が見出され、関心を集める結果となった。それにもかかわらず現在までに報告されたPEAの種々の定量法（1,2,4,8,13）は特異性ならびに感度の点に欠点が多く、これらの点を克服するためにはきわめて複雑な方法（11,18）を用いなくてはならない。またB型MAOの活性についてはPEAの放射性同位体を用いて測定が行なわれているに過ぎない。われわれは簡易で特異性が高く、しかも感度の高いPEAの新しい螢光測定法を確立し、本法をB型MAO活性の測定にも用い、さらに神経化学の領域で新しい知見を得たので報告する。

実験材料ならびに定量法

われわれはPEAがニンヒドリンと反応し螢光物質を生成することを見出した（16,17）が、これにフェニルアラニンの定量法（7）のばあいと同様にL-ロイシル-L-アラニンを加えて反応させると螢光強度が約20倍増加することを認めた。このことによって脳内の微量のPEAを定量することが可能となった。溶液中のPEAを測定する標準的な方法は次のごとくである。PEA溶液，リン酸緩衝液（0.5M, pH 8.0），ニンヒドリン水溶液（50mM）およびL-ロイシル-L-アラニン水溶液（3mM）を2：5：2：1（v/v）の割合に混合し（5ml）、60℃に60分加熱する。加熱後冷却し、15分間室温に放置後、励起波長390nm，螢光波長495nmで螢光測定を行なう。図1に反応生成物の励起

ならびに蛍光スペクトルを示す。それぞれ390 nmと495 nmにピークを持つ。本反応の特異性を検討した結果を表1に示す。表に示すようにPEA，フェニルアラニンならびにセロトニン以外では殆んど蛍光が認められなかった。反応溶液の至適pHは8.0であった。反応時間は60分が適当であった。L-ロイシル-L-アラニン以外のジペプチドでも同様な蛍光の増強を認めたが、DL-アラニル-L-ロイシンが77%，DL-アラニル-L-アラニンが63%，L-ロイシルグリシンが30%の蛍光強度であった。図2にPEA量と蛍光強度との関係を示す。直線性がPEA 0.02～0.5 μg/tubeに認められ、測定限界は0.01～0.02 μg/tubeであった。脳のPEAの定量は次のようにして行なうことができる。脳のPEAをセロトニンから分離するためにMosnaimとInwang (8)の抽出法を用いた。この方法ではセロトニンは有機溶媒層へは抽出されない。脳を10倍量の0.4N過塩素酸水溶液でホモジナイズした後に遠沈（10000 rpm, 5分）し、上清の5 mlをガラス遠沈管に移し、0.5 mlの0.5N NaOH，1.5 gのNaClならびに10 mlのn-ヘプタンを加える。強く振とうした後に遠沈（3,000 rpm, 5分）し、上清の有機溶媒層を他のガラス遠沈管に移し、10 mlの0.1N NaOH溶液（NaClで飽和したもの）を加え同様に振とう遠沈することによって有機溶媒層を洗浄する。下層の水層を吸引除去し再び10 mlの0.1N NaOHを加え洗浄をくり返す。5 mlの上清の有機溶媒層をさらに他のガラス遠心管に移しかえ0.5 mlの0.1N HClを加え振とう遠沈（3,000 rpm, 5分）する。0.1N HCl層の0.2 mlを前述の標準的方法でPEAの定量に供する。なお、脳のホモジェネートに加えたPEAの回収率は90%以上であった。B型MAOの活性は本ニンヒドリン反応によって反応溶液中に残存するPEAを定量し、PEAの消失量を算出することにより測定した。MAO活性の特異性の指標としてパージリン0.4 mMで完全にPEAの消失を阻害した。脳を約10倍量の生理食塩水でホモジェナイズし、10～15 mg湿重量に相当する脳のホモジェネートに0.3 mlの0.3 Mリン酸緩衝液（pH 7.4），77 μgのPEA（終濃度0.2 mM）を加え全量を3 mlとする。37 ℃，30分反応させ、0.2 mlの60%過塩素酸液を加えて反応を止め、遠沈（3,000 rpm, 5分）し、上清の適当量をガラス遠沈管に移し、その後の操作は脳のPEAの定量と同様に行う。図3に脳組織量（酵素量）とMAO活性の関係を示す。図に示すように脳組織10～80 mgの

図1. 蛍光物質の励起ならびに蛍光スペクトル

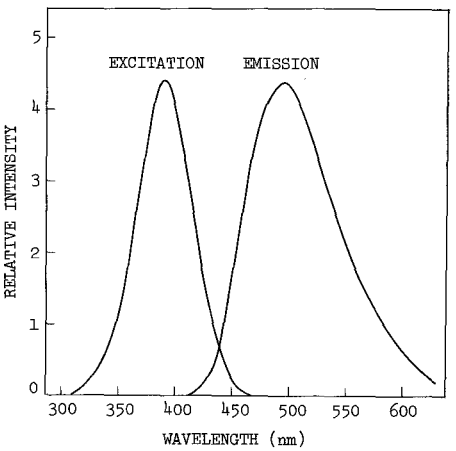


表1. 反応の特異性

Compound	Arbitrary Unit
PEA	100
DL-Phenylalanine	92.3
Serotonin	30.0
DL-β-Phenylethanolamine	1.0
5-Hydroxyindoleacetic acid	0.5

Compounds which gave no measurable fluorescence: L-tryptophan, tryptamine-HCl, 5-methoxytryptamine, N-acetyl-5-hydroxytryptamine, melatonin, tyramine-HCl, dopamine-HCl, DL-noradrenaline, DL-adrenaline, homovanillic acid, DL-3-methoxy-4-hydroxymandelic acid, histamine-2H_3PO_4, benzylamine, ethylamine-HBr and monoethanolamine. All compounds were tested at the final concentration of 4 μM.

図2. PEA量と蛍光強度

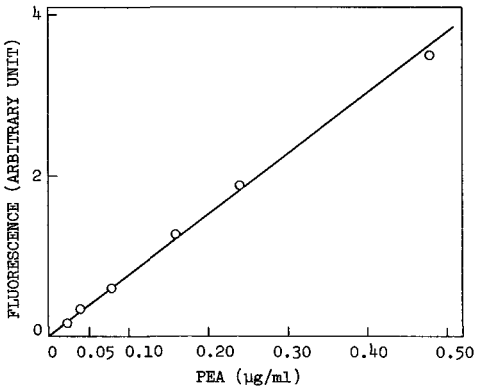
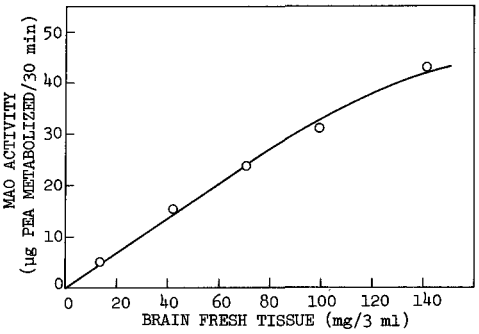


図3. 脳組織量とMAO活性



範囲で直線性を示した。A型MAOの活性測定はKarkiら(6)の方法を修正して行なった。

実験結果ならびに考察

雄ウィスター系ラット(100～150g体重)にパージリン，フェニルアラニン，レセルピン，フザリン酸カルシウムを表2に示したような組み合わせと方法で腹腔内に投与し脳のPEA濃度を前記の方法で定量した。無処置の脳は約10頭分(10～20g)を集めて測定した。他の実験群では1～2gの脳を用いた。結果を表2に示す。無処置の脳のPEA濃度はきわめて低く、Saavedra(11)ならびにWillnerら(18)の報告の値に近い。一方、Mosnaimら(9)ならびにFischerら(3)はわれわれの値より約100倍も高い数値を報告している。パージリンを投与することによってPEAは10倍以上も増加し、フェニルアラニンを加えて投与することによってさらに10倍増加している。パージリンとフェニルアラニンにレセルピンを加えるとPEAは減少した。このことはPEAが神経終末から放出されたことを示唆し、PEAが神経伝達物質として脳に存在する可能性を示しているものと思われる。フザリン酸カルシウムを投与したものではPEAが増加している。このことはPEAがMAOの他にドーパミン-β-水酸化酵素によっても代謝されることを示している。

最近MAOのMultiple型についての報告が多く、特にA型ならびにB型MAO(20)が注目を集めている。A型とB型MAOがそれぞれ異なった酵素タンパクを有するか否かは明らかではないが、基質特異性ならびに薬剤による特異的阻害などの観点からin vivoならびにin vitroでA型とB型の存在は広く認められるに至っている。そこでわれわれはMAOのMultiple型の生理的意義をさぐる一つの手がかりとしてラットとヒヨコの中枢神経のA型ならびにB型MAOの分布を前記の方法を用いて検索した。PEAを基質としたB

表2. ラット脳のPEA濃度

Treatment	PEA (ng/g wet weight)
None	5 ± 3 (3)
Pargyline	68 ± 18 (4)
Pargyline + DL-Phenylalanine	602 ± 134 (4)
Pargyline + DL-Phenylalanine + Reserpine	391 ± 176 (3)
Pargyline + DL-Phenylalanine + Calcium fusarate	1111 ± 213 (4)

Pargyline-HCl (100 mg/kg) and DL-phenylalanine (1 g/kg) were injected 2h before killing, and reserpine (5 mg/kg) and calcium fusarate (100 mg/kg) 5h before killing. Means ± S.D. are given. Number of experiments in parentheses.

型MAO活性の中枢神経における分布についての報告はまだ見当らない。結果を表3にまとめて示す。ラットの中枢神経ではA型活性の方が高く、B型MAOの分布はA型MAOのそれに似ている。しかし、ヒヨコのばあいはラットのばあいと異なり、中枢神経においてはB型MAO活性の方が脊髄を除いては高く、B型MAOの分布はA型MAOのそれとは全く異なっている。この分布のちがいは個体発育上でのちがいではなく動物の種類の差によるものと考えられる。事実われわれは、孵化直後のヒヨコの中枢神経のモノアミン代謝がすでに成熟動物のそれに近いことを認めている(14,15)。ラットと

表3. ラットとヒヨコの中枢神経におけるA型ならびにB型MAOの分布

Rat			Chick		
Regions	Type A (5-HT)	Type B (PEA)	Regions	Type A (5-HT)	Type B (PEA)
Spinal cord	3.18 ± 0.18	0.53 ± 0.16	Spinal cord	6.54 ± 0.47	2.41 ± 0.38
Cerebral hemisphere	4.82 ± 0.46	1.14 ± 0.25	Cerebral hemisphere	2.97 ± 0.47	7.78 ± 0.76
Cerebellum	4.24 ± 0.26	1.17 ± 0.15	Cerebellum	2.51 ± 0.54	3.09 ± 0.60
Medulla oblongata plus pons	4.18 ± 0.21	1.11 ± 0.11	Optic lobe	3.49 ± 0.55	4.52 ± 0.45
Brainstem	5.25 ± 0.51	1.36 ± 0.31	Brainstem	5.33 ± 0.44	10.05 ± 1.39

MAO activity is expressed as μmoles of substrate metabolized/g wet weight/30 min. The concentration of the substrates, 5-HT and PEA, in the reaction mixture for the estimation of type A and B MAO activities was 0.2 mM. Means ± S.D. are given. Each value was obtained from 4 experiments.

ヒヨコいずれのばあいも脊髄のA型MAOの活性がB型MAOのそれよりはるかに高いことは注目に値する。交感神経内のMAOがA型である(5)ことを考慮すると、脊髄のMAOは交感神経性のものが大部分を占めるのかも知れない。ヒヨコの大脳のB型MAO活性が比較的高いことはB型MAOの生理的意義を探索する上で興味深い所見であると思われる。

文献

1) Boulton, A. A. and Milward, L. (1971) J. Chromatogr. 57, 287.
2) Edwards, D. J. and Blau, K. (1973) Biochem. J. 132, 95.
3) Fischer, E., Spatz, H., Heller, B. and Reggiani, H. (1972) Experientia 28, 307.
4) Fischer, E., Spatz, H., Saavedra, J. M., Reggiani, H., Miró, A. H. and Heller, B. (1972) Biol. Psychiat. 5, 139.
5) Jarrot, B. (1971) J. Neurochem. 18, 7.
6) Karki, N., Kuntzman, R. and Brodie, B. B. (1962) J. Neurochem. 9, 53.
7) McCaman, M. W. and Robins, E. (1962) J. Lab. Clin. Med. 59, 885.
8) Mosnaim, A. D. and Inwang, E. E. (1973) Anal. Biochem. 54, 561.
9) Mosnaim, A. D. Inwang, E. E. and Sabelli, H. C. (1974) Biol. Psychiat. 8, 227.
10) Nakajima, T., Kakimoto, Y. and Sano, I. (1964) J. Pharmacol. Exp. Ther. 143, 319.
11) Saavedra, J. M. (1974) J. Neurochem. 22, 211.
12) Sandler, M., Youdim, M. B. H. and Hanington, E. (1974) Nature 250, 335.
13) Spatz, H. and Spatz, N. (1972) Biochem. Med. 6, 1.
14) Suzuki, O., Nagase, F. and Yagi, K. (1975) Brain Res. in press.
15) Suzuki, O. and Yagi, K. (1975) J. Neurochem. 25, 189.
16) Suzuki, O. and Yagi, K., Experientia in press.
17) 鈴木 修, 八木 國夫 (1975) 日本生化学会 第48回大会 抄録集, 印刷中
18) Willner, J., Lefevre, H. F. and Costa, E. (1974) J. Neurochem. 23, 857.
19) Yang, H.-Y. T. and Neff, N. H. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 365.
20) Yang, H.-Y. T. and Neff, N. H. (1974) J. Pharmacol. Exp. Ther. 189, 733.

22 インドールアミン酸素添加酵素と松果体におけるインドールアミン代謝

藤原元和・柴田正勝・貫和敏博・平田扶桑生
早石修（京大・医・医化）
水野昇（京大・医・解剖）

〔要約〕

トリプトファン，5-オキシトリプトファンを含むインドールアミン体に対し巾広い基質特異性を有し，そのピロール環を開裂するインドールアミン酸素添加酵素が，中枢神経系全汎に広く分布し，特に松果体，脈絡膜に活性が高いことを見い出した。本酵素活性測定にはアスコルビン酸及びメチレン青の存在が必要であるが，本酵素がin vivoで実際に機能しているか否かを調べるために，ウサギ松果体を^{14}Cトリプトファン(5×10^{-5} M)を含む培養液中で組織培養を行い，その代謝物をDEAE-セルロースカラム法，薄層クロマト法等により分析定量した結果，松果体において従来主代謝物と報告されているメラトニン，N-アセチルセロトニン，セロトニンは全投与量の1.0%，0.2%，1.4%であるのに比し，インドールアミン酸素添加酵素によるトリプトファンのピロール環開裂物質であるキヌレニンが全投与量の14%を占めることが判明した。また，この値はin vitroでトリプトファンを基質として測定した酵素活性の値と概略一致する。

トリプトファンから5-オキシトリプトファンを経て生合成されるセロトニンは，末梢においては平滑筋収縮を惹起し，中枢においては神経伝達物質として睡眠，情動等に関与するなど種々の生物活性を示す(1)。セロトニンの代謝は多くの組織では主として，モノアミン酸化酵素（MAO）により5-オキシインドール酢酸に代謝されるが，松果体においてはメラトニンの生合成に利用される。トリプトファンの一部は直接脱炭酸されトリプタミンを生じ，幻覚作用を持つN,N'-ジメチルトリプタミンに代謝される(2)。従来報告されているこれらのインドールアミン体の代謝経路ではインドール環は開裂しない。われわれは最近ウサギ小腸にトリプトファン，5-オキシトリプトファンばかりでなく，トリプタミン，セロトニン，メラトニンなどのインドールアミン体のピロール環を開裂するヘム酵素を見い出し，インドールアミン酸素添加酵素と命名した(3,4)。本酵素の反応様式は肝臓に存在するトリプトファン酸素添加酵素（ピロラーゼ）と類似するが，肝臓型のものがL-トリプトファンに特異的であるのに反し，D-,L-両体に作用すると共に，補因子としてメチレン青を要求するなどいくつかの点で区別される。今回，このインドールアミン酸素添加酵素が中枢神経系特に松果体に存在することを見い出し，松果体を^{14}Cトリプトファンの存在下にin vivoに近い状態において組織培養し，その代謝物を分析定量した結果，本酵素によるトリプトファンのピロール環開裂物質であるキヌレニンを分離同定しえたので報告する。

［実験方法］

実験動物及び材料　12時間の明暗サイクルを有する飼育室（25 ± 3°C）で飼育した体重

2.5 - 3 kg の雌ウサギを用いた。ペントバルビタール麻酔下に脱血後，全脳を摘出して各領域に分割し，湿重量の倍量の10 mM リン酸緩衝液を加えポッター型ホモジナイザーを用い粉砕した。10,000 X g，30分間遠心し，その上清を酵素活性測定に用いた。また，摘出した全脳から松果体を分離し，クモ膜を充分に剥離した後組織培養に用いた。

インドールアミン酸素添加酵素の測定法　酵素活性は表1に示した反応条件下で D,L-[2-^{14}C]-トリプトファンを基質とし，37°C で4時間反応後25% TCA (0.1 ml) で反応停止せしめ更に0.27 N HCl (0.3 ml) を加え生じた ^{14}C-ギ酸を補捉し，液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。ホルムアミダーゼはラット肝臓よりKnox の変法を用いて部分精製した(5)。

表1. 酵素活性測定の反応条件

1 M リン酸緩衝液 pH 7.0	0.02 ml
5 mg/ml カタラーゼ	0.02 ml
21.6 u/ml ホルムアミダーゼ	0.02 ml
1 M ギ酸ナトリウム	0.006 ml
0.5 mM メチレン青	0.02 ml
0.2 M アスコルビン酸	0.02 ml
3.9 mM DL-[2-^{14}C]-トリプトファン (90,000 cpm/0.01 ml)	0.04 ml
酵素標品	0.25 ml
水	0.004 ml
合計	0.400 ml

松果体の組織培養法　Eagle MEM 培地に 0.1% アスコルビン酸，0.1% グルコース，0.1% 牛血清アルブミンを添加した後pH を7.0 に調整した。1 ml の培養液中にウサギ松果体4個（約 100 mg）を添加し，37°C において [95% O_2 + 5% CO_2] 気相下で24時間培養した。

トリプトファン代謝物の分離法　培養終了後，松果体を取り出し，0.1 N HCl 90% エタノール (0.4 ml) 中で組織粉砕し，10,000 X g 30 分遠心して上清をとり，培養液と合わせた後，約1 ml に濃縮した。濃縮液を DEAE-セルロース（セルベ社 0.84 meq/g）のカラム (2.5 X 25 cm) に通した。DEAE-セルロースはあらかじめ 0.5 N NaOH で洗浄後ギ酸ナトリウムでギ酸型にし，トリエチルアミン-ギ酸緩衝液（1 ml, pH 4.0）で平衡化したものを用い，同緩衝液の連続勾配法（1 mM - 100 mM）によりトリプトファン代謝物の分離を行った(6)。

[実験結果]

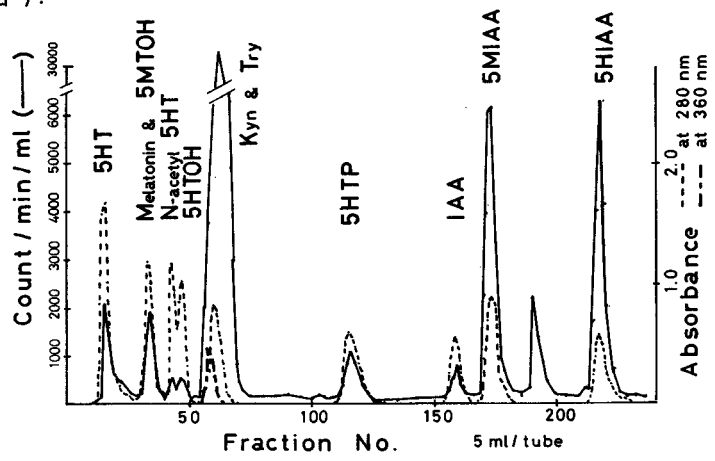
インドールアミン酸素添加酵素の脳内分布　表2にウサギ脳の各領域における酵素活性を示した。脳全汎に広く分布するが，特に比活性は，松果体，脈絡膜，クモ膜に高い。本酵素活性にはメチレン青及びアスコルビン酸が必要であり，これらが欠如すると活性は測定されない。

表2.

	nmole/hr/g protein
大脳皮質	7.5
線条体	10.8
海馬	15.3
嗅球	9.4
小脳皮質	10.8
小脳核	14.1
中脳網様体部	7.2
中脳被蓋及び外縁部	8.0
橋延髄の縫線部	10.1
橋延髄の外縁部	25.7
視床	12.1
脈絡膜及びクモ膜	74.0
松果体	88.9

トリプトファン代謝物の分離と同定法　本酵素が脳内で実際に機能しているか否かを調べる目的で，酵素活性の高い松果体を 5×10^{-5} M L-[メチレン3-^{14}C]-トリプトファン存在下で組織培養し，その代謝物を分離した。図1はDEAE-セルロースカラムの溶出パターンである。標準物質として加えたトリプトファン代謝物の溶出位置は 280及び 360 nm の吸光度で測定した。放射能は各分画の1 mlをガスフローカウンターで計測した。図2で示すように(a) 5HT, (b)

図 1.



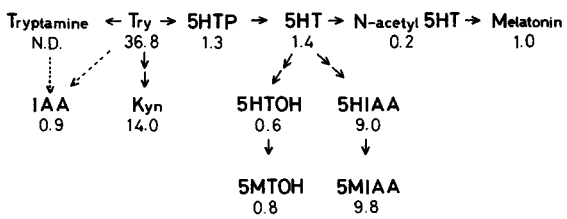
5-hydroxytryptamine (5HT), 5-methoxytryptophol (5MTOH) 5-hydroxy-tryptophol (5HTOH), N-acetyl 5-hydroxytryptamine (N-acetyl 5HT), kynurenine (Kyn), tryptophan (Try), 5-hydroxytryptophan (5HTP), indole-3-acetic acid (IAA), 5-methoxyindole-3-acetic acid (5MIAA), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5HIAA).

表 3.

高圧ロ紙電気泳動
Pyridine CH_3COOH, pH 6.4, 2,000 V 60 mA 2 hr

薄層クロマト	溶媒系
Polyamide	0.1 N HCl 10% NaCl
Silica gel	Acetone:chloroform:acetic acid:water 40:40:20:5 Benzene:acetone 9:1 Ethanol:isopropanol:water 65:24:1 一次元 Chloroform:methanol:acetic acid 93:7:1 二次元 Ethylacetate
Cellulose	20% KCl water n-Butanol:acetic acid:water 12:3:5 n-Butanol:acetic acid:water 4:1:5 n-Butanol:pyridine:water 1:1:5 Benzene:propionic acid:water 100:70:5 Isopropanol:ammonia:water 8:1:1

図 2.



5MTOH, メラトニン (c) N-アセチル-5HT, 5-HTOH (d)トリプトファン, キヌレニン (e) 5HTP (f) IAA (g) 5MIAA (h)未知物質 (i) 5HIAAの9分画に分離される。これらの各分画を集めて凍結乾燥後, 表3に示す方法で高圧ロ紙電気泳動法, 薄層クロマト法を用いて各代謝物を分析した。即ち表3の方法を組み合わせ, 標準物質に一致する放射能を測定する事により定量した。更に5HTPはブタ腎臓から得た脱炭酸酵素(ク)により5HTに転換させる方法を用い, キヌレニンは緑膿菌から得たキヌレニダーゼでアラニンに転換して測定する方法を併用したが, これらの値は表3による方法と概略一致した。図2は松果体におけるインドールアミン体の代謝経路と, その中間体の量を測定した結果を示す。投与したL-[メチレン 3-^{14}C]-トリプトファンの量を100%とし, 蛋白への取込量を除くと, メラトニン及びN-アセチル-5HTが約1%であるのに比し, トリプトファンのピロール環開裂物質であるキヌレニンが約14%も認められた。

[考察]

松果体におけるインドールアミンの代謝は図2で示すTrp→5HTP→5HT→N-アセチル5-HT→メラトニンが機能的にも代謝上でも主経路であると考えられている(8)。また，脳を含め他の組織での5HTの主代謝物は5HIAAであるが，松果体ではメラトニン生合成酵素が作用し，5MIAAともなる。これらMAOによる代謝物はラット松果体に比しウサギ松果体では多く，5HIAA，5MIAA，5HTOH，5MTOHを加えると約20%を占める。これに対し，主経路である5HTP，5HT，N-アセチル-5HT，メラトニンが各々1.3，1.4，0.2，1.0%と少量であるのは動物差によるためかも知れない。また，少量ではあるが，IAAが同定されることは，トリプタミンを介していることを示し，脳の他の部分と同様，松果体においてもトリプタミンが生成する可能性がある。更に興味深い事はトリプトファンがピロール環開裂したキヌレニンが全投与量の14%を占めTrp→5HTP→5HT→5HIAAの経路と同等の比重で作用している点である。このピロール環開裂は in vitro で酵素活性を測定した値から推定される量とほぼ一致する。この開裂酵素は肝臓のトリプトファンピロラーゼと異りメチレン青を活性に要求し，先にわれわれが報告したウサギ小腸から得たインドールアミン酸素添加酵素と類似する。このことからトリプトファンばかりでなく5-HTP，5HT，トリプタミン，メラトニンにも作用すると考えられるが，これらの開裂物質の存在については更に検討しなければならない。松果体におけるメラトニン生合成は種々の因子により修飾されることが報告されているので，これらの因子により，本酵素がいかに変動するか，あるいは他の開裂物質が生ずるか否かに興味がもたれ，現在検索中である。また現在の時点ではキヌレニンが更に代謝されたキヌレン酸，アントラニール酸，キサンツレン酸や3-オキシキヌレニンは有意には見い出されず，これらのキヌレニン系の代謝経路が存在するか否かは改めて問題となる。

[謝辞]

キヌレニダーゼを寄贈された左右田先生(京大食研)，5-オキシキヌレニン，5-オキシキヌレナミン，N-アセチル5-メトキシキヌレナミンを寄贈された徳山先生(大阪市大)，妹尾先生(サントリー研)に感謝致します。

[文献]

1. O. Eichler and A. Farah (1966) Handbook of Experimental Pharmacology Vol. XIX.
2. R. J. Wyatt et al. (1974). Serotonin New Vistas Vol. 2, 299.
3. F. Hirata and O. Hayaishi (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1112.
4. F. Hirata, O. Hayaishi, T. Tokuyama and S. Senoh (1974) J. Biol. Chem. 249, 1311.
5. W. E. Knox (1955) Methods Enzymol. 24b, 249.
6. M. C. Chen and R. K. Gholson (1972) Anal. Biochem. 47, 139.
7. J. G. Christenson et al. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 141, 356.
8. W. B. Quay (1974) Pineal Chemistry.

23 牛の松果体およびraphe nucleus regionにおけるtryptophan-5-monooxygenaseの細胞内分布

堀　真一郎・黒田洋一郎・大谷幸子
（都神経研・神経生化）

〔要約〕

牛の松果体及び raphe nucleus region の tryptophan-5-monooxygenase は dithiothreitol と2価鉄と共に，pH 8.5, N_2-gas下で処理することにより10倍以上の活性増強が観察された。この活性増強は殊に 105,000g 沈渣に於て著しかった。活性化処理後の酵素反応の至適pHは松果体，raphe nucleus region 共に 6.8 付近であった。

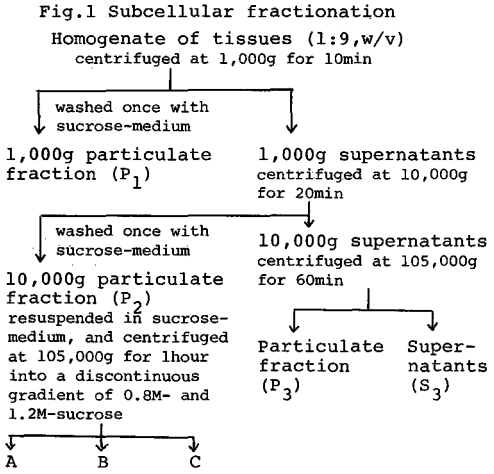
松果体の酵素は細胞分画法によると，P_2-C 画分に存在する様に思われる。一方，raphe nucleus region での酵素は P_2-C画分と P_3 画分に存在する様に思われる。

松果体及び raphe nucleus region の P_2-C画分は電顕的に mitochondria rich であった。

脳内 tryptophan-5-monooxygenase は化学伝達物質の1種と考えられているserotonin生合成の律速酵素であり，raphe nucleus region に存在する神経細胞体で合成され，軸索流により forebrain region に向って運ばれている(1) と考えられている。一方，松果体に於る本酵素は melatonin生合成の中間体としてのserotonin生合成の第1段階を触媒している(2,3)。これら異った役割をになうと思われるserotonin生合成機構の存在様式を比較しserotonin生合成調節機構解明の足がかりとするため細胞化学的検索を行った。

〔実験方法〕　牛の脳及び松果体は屠殺場で死後1~2時間のものを摘出し，氷中にて実験室に持ち帰った。raphe nucleus region は出口ら(4)により記載された方法により切り出した。秤量後0.5mM dithiothreitol(以下DTT) を含んだ0.32M sucrose(以下sucrose-medium)と共にPotter's homogenizer にて10 %(w/v) の濃度にhomogenize した。細胞分画はGray&Whittaker(5)の方法により行った。遠心条件及び各分画の名称はFig.1 に示す如くである。Tryptophan-5-monooxygenase 活性測定は原理的には先に報告した方法(6)によった。即ち，各分画を30mM DTT 及び50μM 2価鉄と共にpH 8.5(100mMTris-HCl), N_2-gas下で，25°C 30min,incubateすることにより活性化を行った後，その0.1mlを40μmoles KH_2PO_4-KOH, pH6.5, 25μg catalase, 1μmole DTT, 0.25μmoleDMPH$_4$ 及び20nmoles L-[1-^{14}C]-tryptophan(13,500 dpm/nmole)を含んだmixture 中に移すことによりmonooxygenase 反応を開始し，25°C,30min 空気中で反応を行った(反応液の全量は0.2mlである)。沸騰水中に1分間浸すことにより反応停止を行い，次いで豚腎より部分精製したaromatic L-aminoacid decarboxylase を含んだ液を注入し，生成された$^{14}CO_2$ をろ紙にしみこませたphenethyl-

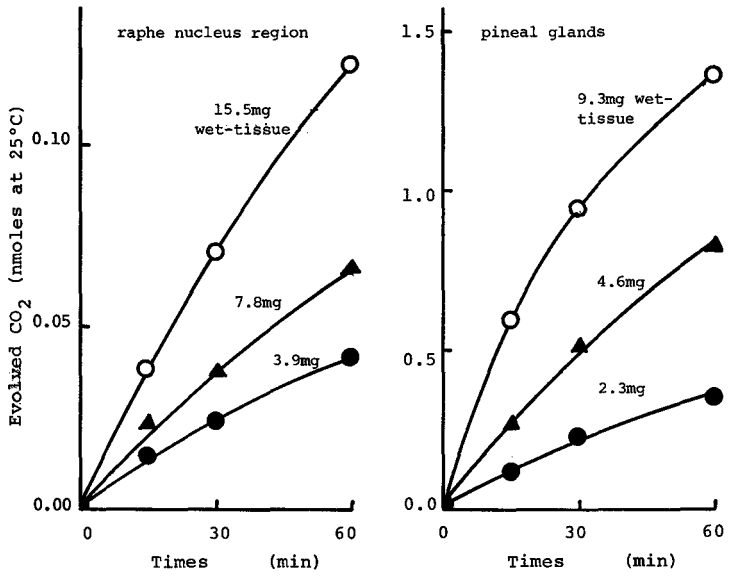
Fig.1 Subcellular fractionation



amine に捕獲定量した。この反応条件下ではboiled enzyme を使用した際とDMPH4無添加で反応させた際に放出される$^{14}CO_2$量は全く同じ値を示したので，酵素活性は$DMPH_4$添加時の$^{14}CO_2$生成量と$DMPH_4$無添加時に生成した$^{14}CO_2$量との差でもって表わした。Lactate dehydrogenase(以下LDH) fumarase 活性はWhittaker ら(7)により記載された方法によった。

〔実験結果及び考察〕　牛のraphe nucleus regionの本酵素はDTT と２価鉄との処理により，松果体酵素同様10倍以上の活性増強を認めた。なお，活性増強の程度は105,000g 上清に於るよりも沈渣画分に於て著しかった。活性化処理後の酵素標品では市ら(8)によりモルモットの脳幹で観察された様な沈渣画分による阻害効果に認められなかった。活性化処理後の酵素活性の至適 pH は raphe nucleus region に於ても松果体に於て先に報告(6)した如く，従来の報告と異なり 6.8 付近に認められた。酵素反応の time-course は 60 min にわたり直線的であり，酵素標品量と活性の間にもほぼ直線的関係が認められた(Fig.2)。酵素活性の 105,000g 上清と沈渣に回収される割合は組織ホモジネートの際の組織量とsucrose-medium との比により異なるという報告(9)があるが，牛のraphe nucleus region 及び松果体では組織重量に対するsucrose-mediumの比を1/2 から1/10まで変化させても回収率に有意の差は認めず松果体では上清に 18～24％，raphe nucleus region では 8.7～10.5％回収されるにすぎず大部分は沈渣に回収された。細胞分画法による各分画に回収される蛋白量，tryptophan-5-monooxygenase,LDH (cytoplasmic marker), fumarase(mitochondrial marker)の割合は Table 1 に示す如くである

Fig.2 Time-courses of tryptophan-5-monooxygenase reaction



。松果体の tryptophan-5-monooxygenase 活性は P_1,P_2 画分の様な重い画分に 76% 回収され，P_2 画分の再分画では C 画分に大部分(92.5%) が回収された。 ralative specific activity に於ても fumarase 活性とよく似た挙動を示した。 一方，raphe nucleus region では P_2 画分の再分画によって C 画分に回収される。 relative specific activity の値が fumarase に類似していることから C 画分の顆粒に結合して存在する酵素があると思われる。 更に，P_3 画分にもかなりの活性が回収(25.4%) され，relative specific activity に於ても 2.51 と高い値を示した。 その高回収が P_2 画分よりの遊脱ではないかと考えられるが，P_3 画分を P_2 画分の再分画に用いたと同じ sucrose 濃度勾配(0.8，1.2M)をもちいて再分画したところ，0.32～0.8M sucrose 部分(D 画分)に回収された。これらの知見からして，raphe nucleus region では mitochondria 画分の様な重い構造体に結合したものと，microsome 画分に回収されるより軽い構造体に結合したものがあるらしい。 なお，電顕による検索では raphe nucleus region 及び松果体に於ても P_2-C 画分には mitochondria rich な所見が得られた。 最近 Tong ら (10) は兎脳幹部より高度精製した酵素に於て，L-tryptophan に対するみかけの Km は 32μM であり，L-phenylalanine をも基質にすると報告している。 又，市川らは脳幹には2種の酵素が存在するのではないかと示唆している(11)。 今後，還元型 pteridine を助酵素とする phenylalanine monooxygenase 及び tryptophan-5-monooxygenase の性質の解明と共に，生体内での存在様式の実体と活性調節機構の解明が興味ある問題と思われる。

〔文献〕

1) M.J.Kuhar, R.H.Roth & G.K.Aghajanian, Brain Research, 35 167 (1971)
2) H.M.Ahein, R.J.Wurtman & J.Axelrod, Nature, 213 730 (1967)
3) T.Deguchi & J.Barchas, "Serotonin and behavior" Academic press,INC, New York &London p33-47,(1973)
4) T.Deguchi, A.K.Sinha & J.D.Barchas, J.Neurochem, 20 1329 (1973)
5) E.G.Gray & V.P.Whittaker, J.Anatomy, 96 79 (1962)
6) S.Hori, Biochem.Biophys.Acta, 384 58 (1975)
7) V.P.Whittaker & L.A.Barker, "Methods of Neurochemistry" vol.2 ed R.Fried p.1 (1972)
8) A.Ichiyama & H.Fujisawa, Protein,Nucleic acid & Enzyme 14 51 (1969)
9) D.G.Grahame-Smith, Biochem.J. 105 351 (1967)
10) J.H.Tong & S.Kaufman, J.Biol.Chem. 250 4152 (1975)
11) A.Ichiyama, C.Domoto & C.Thoyama, Seikagaku, 47 230 (1975)

Table 1 Distribution of tryptophan-5-monooxygenase, LDH, fumarase and protein in subcellular fractions of bovine pineal glands and Raphé nucleus region.

			Distribution of recovered protein and enzyme activities * (%)				Relative specific activity **		
			Protein	Tryp.-5-mono-oxygenase	LDH	Fumarase	Tryp.-5-monooxy-genase	LDH	Fumarase
Pineal glands	Homogenate	P_1	45.4±4.34(4)	42.4±2.60(5)	3.2±0.70(5)	14.6±2.15(4)	0.96±0.043(4)	0.07±0.014(4)	0.35±0.052(3)
		P_2	24.0±2.16(4)	34.5±2.04(5)	6.3±0.92(5)	49.1±3.48(4)	1.41±0.052(4)	0.25±0.048(4)	1.96±0.291(3)
		P_3	6.9±1.70(4)	6.1±1.03(5)	2.0±0.35(5)	7.0±2.33(4)	0.94±0.111(4)	0.36±0.032(4)	0.94±0.218(3)
		S_3	23.8±2.27(4)	17.1±1.40(5)	89.1±1.22(5)	29.3±4.40(4)	0.74±0.052(4)	3.85±0.317(4)	1.58±0.164(3)
	P_2	A	13.3±3.33(4)	1.7±0.79(5)	44.6±4.25(5)	1.3±1.06(3)	0.11±0.062(4)	3.79±0.764(4)	0 (2)
		B	15.0±3.45(4)	5.7±1.88(5)	19.2±1.87(5)	17.4±1.85(4)	0.32±0.096(4)	1.63±0.424(4)	0.97±0.132(3)
		C	71.9±6.58(4)	92.5±2.37(5)	36.2±4.14(5)	81.7±2.17(4)	1.32±0.096(4)	0.57±0.043(4)	1.28±0.128(3)
Raphé nucleus region	Homogenate	P_1	29.4±3.40(5)	26.5±3.19(5)	8.3±1.58(5)	17.4±7.09(3)	0.92±0.086(5)	0.28±0.035(5)	0.48±0.203(3)
		P_2	38.6±2.54(5)	25.0±1.28(5)	20.7±1.20(5)	55.8±5.10(4)	0.65±0.024(5)	0.56±0.069(5)	1.51±0.261(4)
		P_3	9.6±1.35(5)	23.1±2.11(5)	6.6±2.02(5)	7.8±1.54(4)	2.51±0.180(5)	0.70±0.061(5)	0.75±0.121(4)
		S_3	22.2±4.51(5)	25.4±4.82(5)	64.3±1.95(5)	23.4±2.99(4)	1.19±0.125(5)	3.48±0.591(5)	1.49±0.343(4)
	P_2	A	73.4±3.40(5)	24.5±1.32(4)	77.1±1.94(5)	0.0 (3)	0.35±0.035(4)	1.06±0.043(5)	0 (4)
		B	8.6±1.07(5)	17.5±3.07(4)	13.2±1.36(5)	20.1±7.65(4)	1.81±0.159(4)	1.56±0.114(5)	2.14±0.714(4)
		C	18.3±3.59(5)	58.1±3.71(4)	1o.2±2.74(5)	80.0±7.65(4)	3.38±0.678(4)	0.55±0.089(5)	5.15±0.919(4)
	P_3	D	71.6	57.9	72.3	0	0.81	1.01	0
		E	11.8	13.7	15.6	0	1.16	1.32	0
		F	16.7	28.4	12.1	100	1.70	0.72	5.99

* Recoveries of factors from homogenates of bovine pineal glands and Raphe'nucleus region in fractions $P_1+P_2+P_3+S_3$ were: protein, 92.5 (pineal glands) and 70.4 % (raphé nucleus region); tryptophan-5-monooxygenase, 77.9 and 93.3 %; LDH, 88.7 and 101.7 %; fumarase, 82.0 and 115.4 %. Recoveries of factors from fraction P_2 in fraction A+B+C: protein, 56.3(pineal glands) and 80.5 %(raphé nucleus region); tryptophan-5-monooxygenase, 56.5 and 90.8 %; LDH, 79.9 and 81.5 %; fumarase, 64.9 and 47.2 %. Recoveries of fractors from fraction P_3 of raphé nucleus region in fraction D+E+F: protein, 132.5 %; tryptophan-5-monooxygenase, 99.1 %; LDH, 94.7 %; fumarase, 79.6 %.

** Relative specific activity ; percentage of the total activity recovered in the fraction/percentage of the total protein recoved in the fraction.

24 培養松果体におけるエストラジオールの作用 — RNAポリメラーゼ活性, HIOMT活性への影響 —

溝部文夫・黒川正則
（東大・医・脳研）

〔要約〕

メスラットの松果体を培養し、そのRNAポリメラーゼ活性及びオキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼ(HIOMT)活性に対するエストラジオールの影響を調べた。

(1) 生理的濃度のエストラジオール(15nM)を含む培養液中で松果体を培養すると、ポリメラーゼA活性は1時間後に1.3倍に、B活性は2時間後に1.5倍に、それぞれ増加する。この増加の程度は、エストラジオールの濃度に依存する。

(2) クエン酸クロミフェン(抗エストロジェン剤)が同時に存在すると、B活性の増加はみとめられなくなる。

(3) エストラジオール存在下で2時間後にHIOMT活性もまた1.8倍に増加する。この増加の程度も濃度に依存する。

(4) HIOMT活性の増加はクエン酸クロミフェン、RNA合成阻害剤、タンパク質合成阻害剤によって抑制される。

以上の結果から、ステロイドホルモンの標的器官に一般的にみられる機構が松果体にも存在し、エストラジオール → リセプター → RNA合成 → タンパク質合成の経路によってHIOMT活性が増加するものと思われる。

松果体が *in vivo* 及び *in vitro* でエストラジオールをとりこむ事実が最近明らかにされた〔5, 11, 13, 14〕。このことは、松果体がエストラジオールの標的器官の一つであり、"リセプター"を持つことを示している。さらに、松果体においても、エストラジオールの作用が、他のステロイドホルモンの標的器官において一般的にみられる機構を通して、発現されている可能性を予想させる。

セロトニン → N-アセチルセロトニン → メラトニンは、松果体に特有な代謝経路である。この前半の反応を担うN-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)は、神経性の支配を受けていることが明らかにされている〔7〕。これに対して、後半を担うオキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼ(HIOMT)はホルモン性の支配を受けている可能性が考えられる。これは、エストラジオール投与により、ラット松果体のHIOMT活性が影響を受けるという報告がなされているからである〔3, 4, 8, 13, 16〕。

そこで、松果体におけるエストラジオールの作用機構を明らかにする目的で、培養松果体を用いて、RNAポリメラーゼA・B両型の活性及びHIOMT活性の変化を検討した。

実験方法

卵巣を摘出した成熟メスラットより、断頭後すみやかに松果体をとりだし、BGJ培養液、95%空気—5%CO_2の気相下、37°Cで培養した〔3, 6〕。2時間後エストラジオールを含んだ培養液に松果体を移し、さらに2時間培養後、RNAポリメラーゼ活性及びHIOMT活性を測定した。

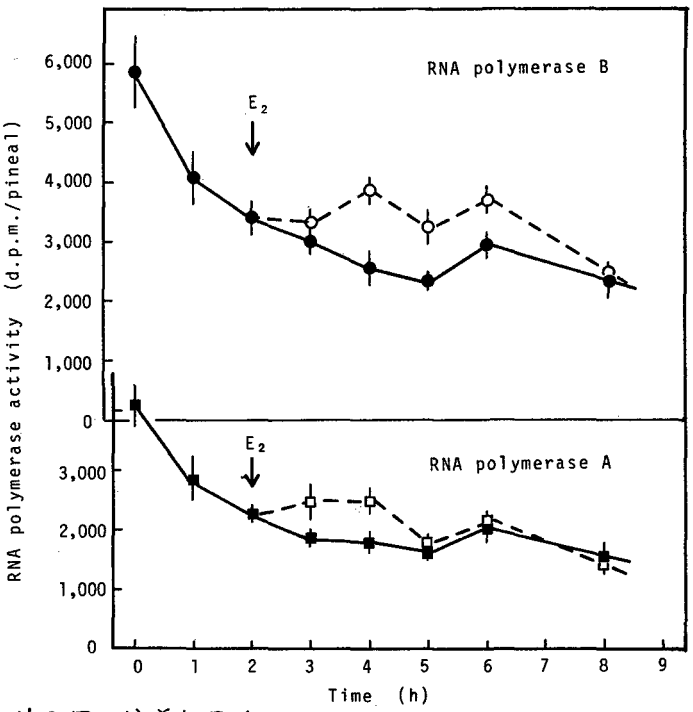
RNAポリメラーゼ活性は、反応液の入ったガラスホモジェナイザー内で松果体をホモジェナイズし、そのまま反応を行なわせて、^{3}H-UTPの酸不溶性分画へのとりこみ

量により測定した[12]。

HIOMT活性の測定には、N-アセチルセロトニンと^{14}C-S-アデノシルメチオニンを基質とし、メラトニンの生成量を測るAxelrodらの方法[2,9]を用いた。

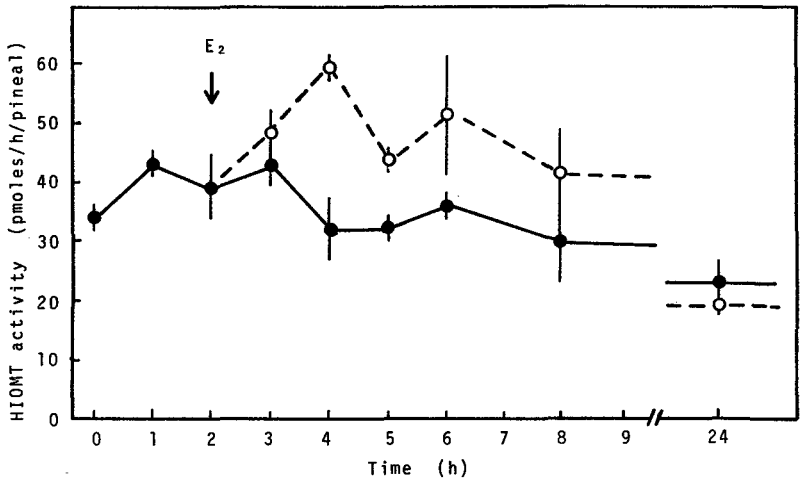
実験結果と考察

RNAポリメラーゼ活性　松果体のRNAポリメラーゼの活性は、培養中に急速に減少する。この際、オ1図の実線に示されているようにポリメラーゼA・B両酵素の活性は並行して減少する。しかし、培養2時間後エストラジオール(15nM)を含む培養液に移された松果体においては、一転して活性が増加する。オ1図の破線に示されているように、A型活性が1~2時間後に、対照値の1.3~1.4倍に増加し、それに続いて、B型活性が2~3時間後に、1.5~1.4倍に増加する。このB型活性増加は、培養液中のエストラジオールの濃度に依存する。すなわち、0.1nMでは増加効果はみられない。また、100nMまで高濃度にしても、1.5倍の活性化にとどまる。一方、高濃度のクエン酸クロミフェン(15×10^{-5}M)を培養液に加えておくと、エストラジオールによるB型活性の増加はみられなくなる。クエン酸クロミフェンは*in vivo*、*in vitro*で、子宮をはじめ種々の標的器官におけるリセプターとエストラジオールの結合を阻害する働きがあると報告されている[10,15,17]。培養松果体でも同様にエストラジオールのとりこみが阻害されて、B型活性の増加がみられなくなったものと解釈できる。



オ1図　培養松果体におけるRNAポリメラーゼ活性
——エストラジオール(15nM)による活性変化

HIOMT活性　HIOMT活性は培養中にそれほど減少せず、酵素タンパクが比較的安定に存在していることがわかる(オ2図)。このことは、オ1表に示されているように、タンパク質合成阻害剤の存在下で2時間培養しても、活性の減少がみられないことからも想像できる。培養2時間後に、松果体をエストラジオール(15nM)を含む培養液に移すと、HIOMT活性が増加する。その時間的経過はポリメラーゼB型酵素とほぼ並行しており、2~3時間後に1.8~1.4倍に増加する(オ2図破線)。またHIOMT活性の増加は、ポリメラーゼBの場合と同じく、エストラジオールの濃度に依存する。つまり、



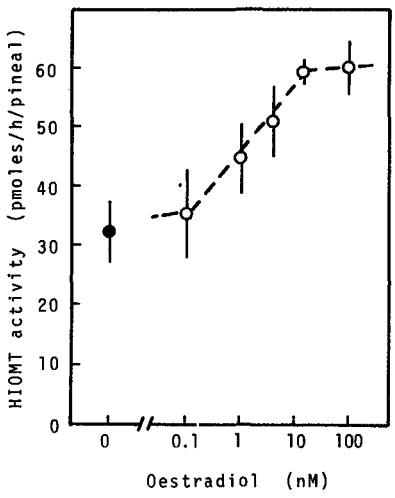
オ2図　培養松果体におけるHIOMT活性
——エストラジオール(15nM)による活性変化

0.1~15nMの間は、濃度に比例して増加するが、100nMではもはや15nM時以上の増加はみられない(オ3図)。

阻害剤の影響(オ1表)　クエン酸クロミフェン存在下では、HIOMTのエストラジオールによる活性増加は起こらない。

高濃度のアクチノマイシンD(10μg/ml)を添加してRNA合成を阻害すると、HIOMT活性の増加はみとめられなくなる。RNAポリメラーゼBを特異的に阻害するα-アマニチン(10μg/ml)、あるいは、ほぼRNAポリメラーゼAのみを阻害する低濃度のアクチノマイシンD(0.08μg/ml)によっても、エストラジオールの影響は打ち消される。これらの事実はエストラジオールによるHIOMT活性の増加には、RNAの新たな転写が必須であることを示すものと解釈できる。

また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(50μg/ml)やピューロマイシン(200μg/ml)を培養液に加えると、エストラジオールによるHIOMTの活性増加が打ち消される。すなわち、エストラジオールの作用で新たに転写されたRNAを使って、新たなタンパク質合成が行なわれ、HIOMT活性が増加す



オ3図　HIOMT活性増加へのエストラジオール濃度の影響

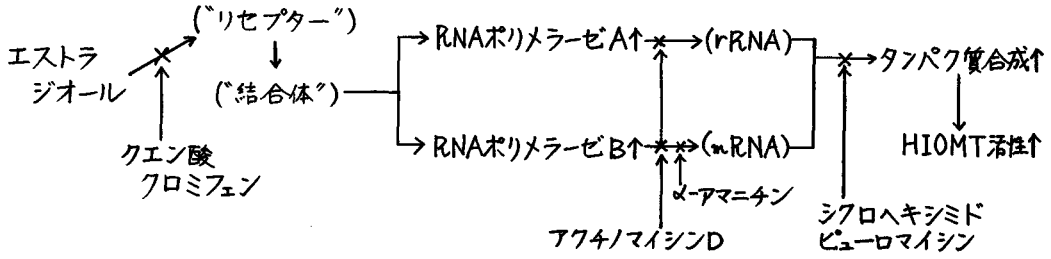
才1表 阻害剤存在下でのエストラジオールのHIOMT活性への影響

Inhibitors	Oestradiol (nM)	HIOMT activity (pmoles/h/pineal)	Ratio [15 nM/0 nM]	Relative values
None	0	42.8 ± 3.4 (7)	1.48	1.00
	15	63.5 ± 3.2 (8)		1.48
Clomiphene citrate (150 μM)	0	41.3 ± 2.1 (5)	1.11	0.97
	15	45.8 ± 6.9 (6)		1.07
Actinomycin D (10 μg/ml)	0	38.9 ± 6.2 (6)	1.19	0.91
	15	46.1 ± 6.4 (6)		1.08
Actinomycin D (0.08 μg/ml)	0	39.0 ± 4.6 (6)	1.17	0.91
	15	45.6 ±10.6 (6)		1.07
α-Amanitin (10 μg/ml)	0	44.0 ± 6.3 (6)	1.04	1.03
	15	45.8 ± 3.5 (6)		1.07
Cycloheximide (50 μg/ml)	0	44.9 ± 3.5 (5)	1.00	1.05
	15	45.1 ± 5.0 (5)		1.05
Puromycin (200 μg/ml)	0	42.6 ± 4.0 (5)	1.06	1.00
	15	45.3 ± 5.9 (6)		1.06

Mean ± S.E. (n)

るものと考えることができる。

培養松果体を用いた以上の実験結果から、松果体におけるメラトニン合成には、NAT活性を調節する神経性の経路のほかに、HIOMT活性を調節する木ルモン性の支配が推定される。その機構は、以下のように図式化できるであろう。



〔文　献〕

(1) Alexander N., Dowd A.J. & Wolfson A. (1970) Endocrinology 86, 1166-1168 (2) Axelrod J., Wurtman R.J. & Snyder S.H. (1965) J. Biol. Chem. 240, 949-954 (3) Biggers J.D., Gwatkin R.B.L. & Heyner S. (1961) Exp. Cell Res. 25, 41-58 (4) Cardinali D.P., Nagle C.A. & Rosner J.M. (1974) Hormone Res. 5, 304-310 (5) Cardinali D.P., Nagle C.A. & Rosner J.M. (1975) Life Sci. 16, 93-106 (6) Deguchi T. & Axelrod J. (1973) Mol. Pharmacol. 9, 612-618 (7) 出口武夫(1973) 代謝 10, 1203-1212 (8) Houssay A.B. & Barcelo A.C. (1972) Experientia 28, 478-479 (9) Hyyppä M.T., Cardinali D.P. & Wurtman R.J. (1973) Neuroendocrinology 11, 274-283 (10) Kahwanago I., Heinrichs W.L. & Herrmann W.L. (1970) Endocrinology 86, 1319-1326 (11) Marks B.H., Wu T.-K. & Goldman H. (1972) Res. Commun. Chem. Pathol. 3, 595-600 (12) Mizobe F., Tashiro T. & Kurokawa M. (1974) Eur. J. Biochem. 48, 25-33 (13) Nagle C.A., Neuspiller N.R., Cardinali D.P. & Rosner J.M. (1972) Life Sci. 11, Part II, 1109-1116 (14) Nagle C.A., Cardinali D.P. & Rosner J.M. (1973) Life Sci. 13, 1089-1103 (15) Rosy S., Mahesh V.B. & Greenblatt R.B. (1964) Acta Endocrinol. 47, 669-675 (16) Wurtman R.J., Axelrod J., Snyder S.H. & Chu E.W. (1965) Endocrinology 76, 798-800 (17) Wyss R.H., Karsznia R.H., Heinrichs W.L. & Herrmann W.L. (1968) J. Clin. Endocrinol. 28, 1824-1828

25 免疫螢光法と活性測定法によるドーパミン-β-水酸化酵素とチロシン水酸化酵素の軸索流について

永津郁子・近藤ゆかり
（名古屋保健衛生大・医・解剖）
永津俊治　（愛知学院大・歯・生化）

〔要約〕

チロシン水酸化酵素(TH)とドーパミン-β-水酸化酵素(DBH)のモルモット坐骨神経内輸送速度を神経結紮後の酵素の蓄積から測定した。また、DBHの軸索流についてラット坐骨神経の免疫螢光法で検索した解剖学的結果と、モルモット坐骨神経での生化学的結果とを比較した。

DBH免疫螢光は結紮後48時間まで結紮の中枢端3 mmに増大し、DBH活性もまた結紮の中枢端3 mmに著明に増大した。DBHやTHの逆行性軸索流の存在も、二重結紮実験で結紮後5時間目に認められたが、24時間後には見かけ上、上行性はなくなり下行性のみ認められた。モルモットの軸索流の流速はDBHが100 mm/dayであるのに対してTHが15 mm/dayであった。この結果からDBHとTHは異なった細胞内小胞に局在すると想像される。すなわちDBHは顆粒酵素として速い流れにより、またTHは大部分が細胞質酵素として中間の速度により軸索内を輸送されるらしい。

局所に注射したコルヒチンは、DBH, THともに有意に軸索流を抑制した。しかしモノアミン酸化酵素(MAO)や総蛋白量にはほとんど影響を与えなかった。コルヒチンのDBHやTHに及ぼす抑制効果は除々に回復するが、注射後64日目でもまだ認められた。この成績から DBH, TH の輸送にはともに微小管が関係していることが想像される。

酵素の軸索内流速は、酵素の局在により異なる。一般に顆粒酵素は速く、細胞質酵素は遅く流れる。ノルアドレナリン(NA)の生合成に関与する酵素の軸索流についてはいくつかの報告がある(12, 14)が、THとDBHの軸索流の流速については未決定である。細胞分画によればTHは末梢神経の軸索内では大部分可溶性で、ごく少ずつ顆粒分画に存在する(11)。しかし軸索内ではTHは顆粒のDBHとほぼ同じ速度で流れるという報告(5, 14)と、DBHより遅く流れるという報告(12)とが対立している。我々はTHとDBHの軸索内局在を解明する目的で、両酵素の軸索流速を詳細に検討した。著者の一人(I.N.)はラットの坐骨神経を結紮してDBHの蓄積の経過を免疫螢光法で解剖学的に明らかにした(9)ので、その成績と生化学的方法での活性測定の結果とを比較した。しかしモルモットのオバラットよりも坐骨神経の酵素活性がより高いので、活性測定にはモルモットを用いてDBH, TH活性を同一サンプルで測定し、ミトコンドリアに局在するMAO活性も対照として測定した。また微小管を破壊するコルヒチンのDBH, THの軸索流におよぼす影響も調べた。

実験方法

実験材料. ラットとモルモットの坐骨神経を結紮後5~72時間で断頭し神経をとり出し、反対側の坐骨神経を対照とした。コルヒチンは生理的食塩水に40 mg/mlになるよう溶解し、坐骨神経の外膜に1 μl注射した。注射部位より約12 mm下を注射後24時間目に結紮し、さらに24時間後神経を採集した。対照の神経には生理的食塩水1 μlを注射した。

生化学的測定法. モルモットの坐骨神経を3 mmづつ、結紮部位より同一の場所のものを10本集めてホモジナイズし600 μlにし、700 x g 10分の上清を酵素標品として、TH, DBH,

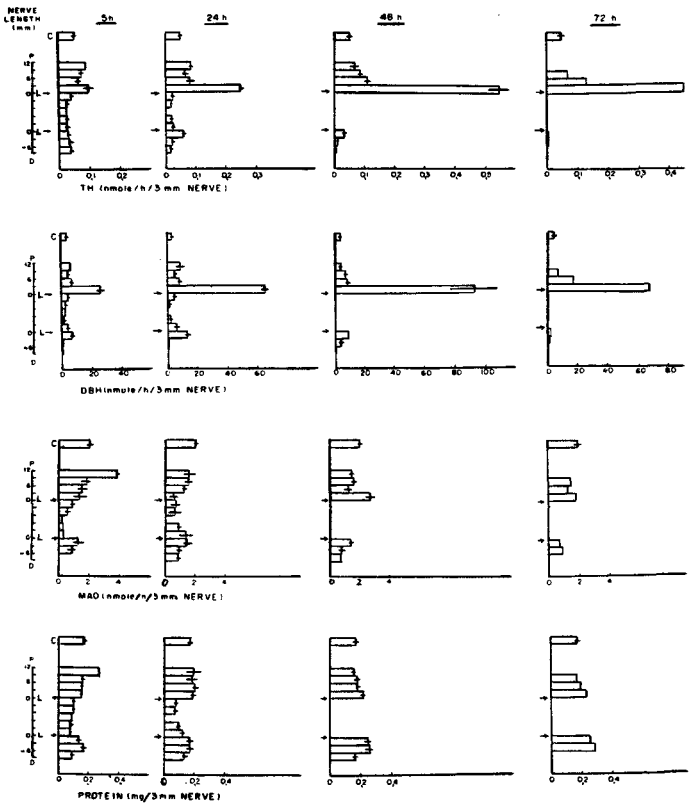
MAO 活性と総蛋白量を測定した。TH は L-^{14}C-tyrosine より生成した ^{14}C-DOPA の測定(10)により、DBH は tyramine から生成した octopamine の高感度二波長分光法による測定(6)により、MAO は kynuramine から生成した 4-hydroxyquinoline の螢光測定(7)より求めた。総蛋白量(4)も求めた。

免疫螢光法。坐骨神経内 DBH に対する免疫螢光法には間接法を用い、非特異螢光をできるだけ下げるよう努力した(3, 8, 9).

結　果　と　考　察

1。免疫螢光法によるラット坐骨神経結紮部の DBH の蓄積。結紮後 7, 24, 48, 96 時間目のラット坐骨神経で DBH 特異螢光の蓄積を調べた。結紮後 7 時間で結紮部の中枢側に 0.3 mm まで、末梢側にも少し DBH の蓄積をみた。24 時間後には中枢側の蓄積はさらに増えたが末梢側はやや減少した。48 時間後には中枢側 3.6 mm までも蓄積したが 96 時間後には著明に減少した。末梢側では 48 時間後にまだ少し螢光が残っているが 96 時間後には全く認められなかった。DBH の蓄積が結紮部の両側 3 mm 以内に認められるので測定する神経の長さを 3 mm とすれば手術も少なく、しかも DBH の蓄積のほぼ全部を含むと考えられる。結紮という方法は軸索流を研究するのによい方法であるが、軸索の傷害にもとづく流れの病的変化を無視することはできない。結紮後 24 時間、ことに 48 時間目の DBH 螢光を発する線維は太くなったり、軸索のところどころが破れて DBH 顆粒が細胞間隙にも出たりしたことが想像される。以上の解剖学的結果から、軸索流速は結紮後早期(24 時間以内)、また結紮の二次的効果の出る前に測定すべきであることがわかる。

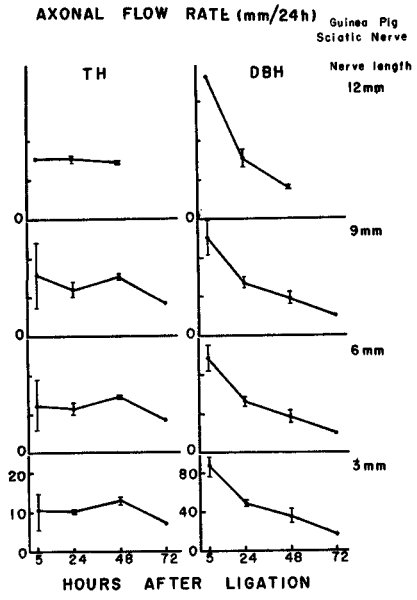
図　1



2。モルモット坐骨神経結紮部位における DBH, TH, MAO 活性の蓄積。従来の NA の螢光組織化学による軸索流の研究がすべてラットを用いている為に、成績を比較する上からラットを用いて DBH の免疫螢光を調べた。しかし DBH, TH の活性を生化学的に求める軸索流の研究には、ラットよりモルモットの方が活性が高く調べやすい為モルモットを用いた。モルモット坐骨神経を同時に 2 ヶ所で double ligation して、結紮部位での DBH, TH, MAO の活性と総蛋白量の蓄

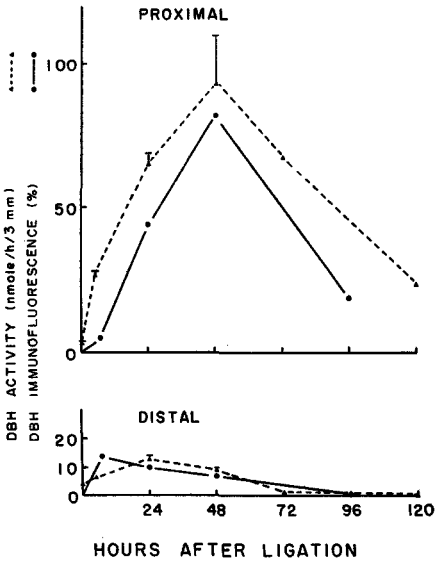
積を測定すると図1のようになった。結紮後5時間で DBH 活性は結紮部の中枢側3 mm に著明に増大し、末梢側では下行性より上行性の軸索流の方が大きかった。中枢側3 mm 内の DBH が結紮後48時間まで増加し72時間後になって減少してくることは、DBH の不活性化や破壊消退が48時間後にはじまることを想像させる。TH も DBH のように時間とともに蓄積するが、DBH よりゆっくり もっと中広くひまった。結紮部位での DBH, TH の蓄積の時間的空間的差異よりみて、TH の大部分は DBH の顆粒には存在しないと推定される。MAO や総蛋白量は48時間後にのみ少し蓄積を認めた。DBH, TH の蓄積の経過を比べると、TH は48時間後まで直線的に蓄積してくが、DBH は5時間までしか直線的に増えなかった。そこで結紮後5時間で初速度を求めると DBH は100 mm/day, TH は15 mm/day であった。結紮後24時間での平均の流速を測定すると DBH は 54 mm/day で初速度より低くなるのに、TH は 12 mm/day で初速度とほぼ同じであった。図2は結紮後の時間経過にともなう軸索流速の変化を、測定する神経の長さを変えて比べたものである。DBH の流速は5時間後が一番大きく後は減少するが、TH は48時間後までほとんど変らず72時間後減少する。DBH, TH の流速のちがいは神経内の酵素の分布のちがいを推定させる。DBH の流速 (100 mm/day) は速い流れに属しNA顆粒での存在を示すが、TH の流速 (15 mm/day) は中間の流れに属するから全く可溶性の酵素ではなくて、少くとも一部の TH は細胞内構造物に付着していると考えられる。最近の TH の免疫電顕によれば軸索内の微小管 (neurotubules)(13)に関係していると推定される。

図 2



3。<u>逆行性軸索流の存在</u>。DBH は結紮遠位端に逆行性軸索流によって蓄積することを免疫螢光法で証明してくが、生化学的測定法でも DBH と TH は結紮後24時間目まで上行性の流れがあることが出来かった。結紮後5時間では上行性が優位であるが、24時間では下行性の流れが優位となり見かけ上、下行性に変ってく。NA でも結紮遠位端に上行性蓄積があり24～48時間に消失すると報告されている(2)。このことは DBH の逆行性軸索流の存在を証明してく我々の免疫螢光の結果(9)と生化学的結果との一致を示している。もしも顆粒の少量が細胞体に向って速い速度で上行すると仮定すると、これが情報の末梢より細胞体へのフィードバック機構のよう

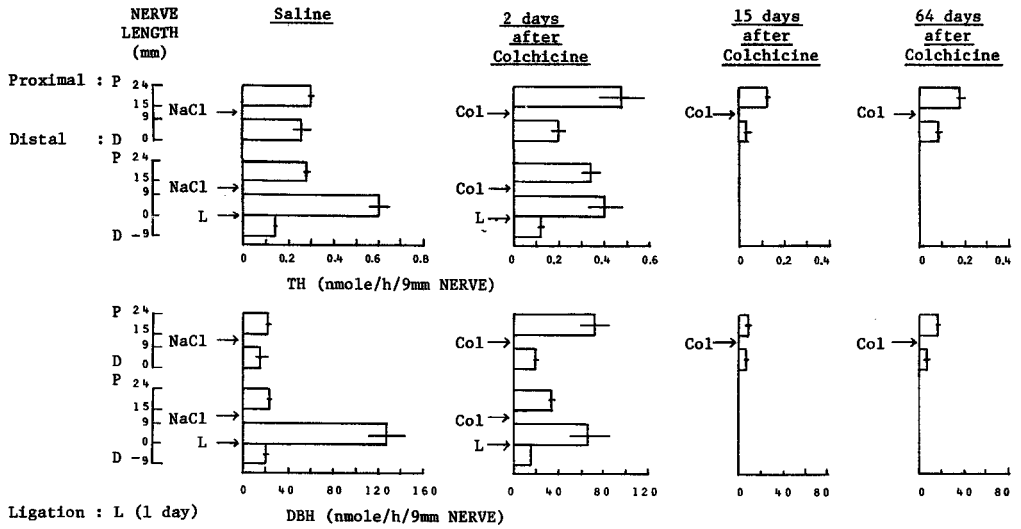
図 3



なメッセンジャーの機能をもつのではないかと推定される(1).

4. DBH 活性の蓄積と DBH 免疫螢光の蓄積の時間的経過の比較. 図3に示すように結紮の中枢側では DBH 活性と免疫螢光の蓄積の傾向は似ているが 末梢側になると結紮後7時間目のみ免疫螢光のほうが活性より高い蓄積を示した. この成績より不活性化

図 4. コルヒチン(Col)の TH, DBH の軸索流に及ぼす影響



された DBH が逆行性にまず輸送されることも考えられるがさらに今後の研究を要する.

5. モルモット坐骨神経内軸索流に及ぼすコルヒチンの影響. コルヒチンの投与後その急性的および慢性的効果を調べたのが図4である. 急性実験では, DBH, TH 活性はともにコルヒチン注射より中枢側に蓄積し, 末梢側には減少している. コルヒチン注射部より下 12 mm に結紮をほどこすと, DBH, TH の中枢側の蓄積は有意に減少した. MAO や総蛋白量は有意に変化を示さなかった. 慢性実験では, コルヒチン投与後15日で DBH, TH 活性はともに非常に減少した. MAO も活性が低下したが総蛋白量は変化しなかった. コルヒチン投与後64日では DBH, TH 活性は正常値に近づく傾向が認められたがまだ低かった. MAO はすでに正常値であった. 以上の成績は微小管が DBH, TH の輸送に関係するらしいこと, それでコルヒチンは長期に渡り DBH, TH の軸索流を抑制することを示している. この成績は DBH と TH は神経細胞軸索内局在は異なるが, その輸送機構には共に微小管がなんらかの関係をもつことを推定させる.

文 献 1. ABE,T.,HAGA,T.,AND KUROKAWA,M.(1974) FEBS Letters 47,272 2. DAHLSTROM,A.(1965) J.Anat.99, 677 3. HARTMAN,B.K.(1973) J.Histochem.Cytochem.21,312 4. HARTREE,E.F.(1972) Analytical Biochem.48,422 5. JARROTT,B.,AND GEFFEN,L.B.(1972) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69,3440 6. KATO,T.,KUZUYA,H.,AND NAGATSU,T.(1974) Biochem.Med.10,320 7. KRAML,M.(1965) Biochem.Pharmacol.14,1683 8. NAGATSU,I.(1974) Acta Histochem.Cytochem. 7,147 9. NAGATSU,I.,HARTMAN,B.K.,AND UDENFRIEND,S.(1974) J.Histochem.Cytochem.22,1010 10. NAGATSU,T.(1973) in Biochemistry of catecholamines. The biochemical method pp.158 11. NUMATA(SUDO),Y.,AND NAGATSU,T.(1975) J.Neurochem.24,317 12. OESCH,F.,OTTEN,U.,AND THOENEN,H.(1973) J.Neurochem.20,1691 13. PICKEL,V.M.,JOH,T.H., AND REIS,D.J.(1975) Brain Res.85,295 14. WOOTEN,G.F.,AND COYLE,J.T.(1973) J.Neurochem.20,1361

26 中枢ノルアドレナリンニューロンにおけるカテコールアミン合成酵素レベルのレセルピンによる増加

反町　勝・奥野幸子・片岡喜由
（愛媛大・医・1生理）

〔要約〕

レセルピン投与は、末梢組織におけるカテコールアミン合成酵素レベルを著明に増加させることはよく知られている。今回、ラット脳各部位における酵素レベルの変化を検討した。ドーパミン作動性ニューロンに富むA8-10、線状体のチロシン水酸化酵素活性は、レセルピン投与により、ほとんど変化が見られないが、青斑核(LC)をはじめとする橋、延髄内TH活性は著明に増加した。LCにおけるTHは、2日後に増加したが、DBH活性は5日後にはじめて有意に増加した。この事実から、LC内ノルアドレナリン作動性ニューロン細胞体に存在するTHが増加すると考えられたが、他方、両活性の増加時期が異なることより、他部位の細胞体に存在する、TH, DBHがレセルピンにより増加し、LC内終末に輸送され蓄積する速度が異なる可能性がある。従ってアドレナリン性細胞体が存在するといわれるC1, C2のTH, DBHおよびPNMT活性の変化を検討したが、いづれの活性も変化しないか、もしくは変化しても、LCにおけるTHの増加を説明するには不充分であった。これらの結果より、レセルピンに反応する細胞は、ノルアドレナリン性のものと思われた。これが事実とすると、中枢神経系におけるTH, DBH活性調節機構は末梢組織とことなり、THがより重要な律速酵素として機能することが示唆される。

各種のストレス（寒冷、拘束、水泳）あるいは、ある種の薬物の投与は、シナプス活動を介して、末梢交感神経系や副腎髄質において、ノルアドレナリン(NE)合成に関与する酵素であるチロシンおよびドーパミンβ水酸化酵素蛋白の増加をもたらすことはよく知られている。[1] 中枢神経系においても従来レセルピンの投与は、特定部位のチロシン水酸化酵素(TH)活性の増加を生じることが報告されているが、[2] 末梢組織における増加にくらべ、極めて少い。しかし最近、Zigmondらは、[3] 青斑核(LC)のTH活性が、寒冷ストレス、レセルピン投与により著明に増加する事実を見出し、中枢神経系においても細胞体の限局する部位では酵素活性が大きく変動する可能性を示唆した。その後、われわれの研究進行中にも、いくつかの研究室より同様の結果が報告されLC内ノルアドレナリン作動性ニューロンにおけるTH活性がレセルピン等に反応して増加するものと考えられている。[4] しかし、最近のフェナトールアミンN-メチル基転移酵素(PNMT)に関する免疫組織蛍光法によると、橋・延髄の特定部位に局在する細胞体より発する線維の一部は、LC内あるいは、LC近接して終末を作ることが報告されており、[5] したがってアドレナリンを伝達物質とするニューロンに存在するTH活性が、レセルピンにより増加している可能性が残る。今回、我々は、橋延髄各部位におけるカテコールアミン合成酵素系の変化を調べることにより、この可能性に検討を加えた。

実験方法

雄のウイスター系ラットを用いた。（体重250-350 gm） レセルピンは、皮下(2.5 mg/kg 1日1回, 3日間連続投与) あるいは、腹腔内(10 mg/kg, 2日目毎)に投与し、一定期間

後ち断頭した。氷冷下で脳各部位を分離し、重量測定後、10－40倍量の0.2% Cutscum を含む5 mM トリス・塩酸緩衝液(pH 7.4)で組織をホモジナイズし、ベックマン microfuge または通常の冷却遠心杵で遠心し、得られた上清を酵素活性測定の検体とした。TH 活性は、Tyrosine-1-^{14}C を基質とし、豚腎より部分精製した過剰量のドーパ脱炭酸酵素をカップルさせて発生する $^{14}CO_2$ を測定した。[6] ドーパミンβ水酸化酵素(DBH) 活性は、フェネチールアミンを基質とし、牛副腎髄質より部分精製した PNMT をカップルさせた Molinoff らの方法を用いて測定した。[7] 内在性阻害物質の除去には、至適の $CuSO_4$ を用いた。PNMT 活性は、Saavedra らによる高感度の方法を用いたが、[8] 基質(フェナトールアミン)濃度は0.2 mM を用いた。トルエン:イソアミルアルコール(3:2)抽出液は、バイアル内で約50°Cで蒸発乾固させた後 1 ml のエタノールを加えて放射活性を測定した。

橋延髄各部位の分離：小脳を除去し、第4脳室底を露出し、図1実線で示した部位で冠状切片を切り出した。切片(1)の左右各側を4等分し、腹外側部を C_1、背内側部を C_2 の尾側とし、残りの部位を R_1 とした。切片(2)の背内側部を C_2 の吻側とし、残りの部位を R_2 とした。一部の実験では、切片(1)(2)の部分より4つの1 mm巾の切片を得、切片の腹外側部および背内側部をそれぞれ C_1 の a, b, c, d (尾側より吻側に向かって)および C_2 の a, b, c, d とし、残りの部分を R の a, b, c, d とした。切片(3)は、R_3 とした。切片(4)は、尾側は sulcus limitans の陥凹部から、吻側1.5 mm の切片を意味する。これより Zigmond らの方法に準じて[3] LC を得、同じ切片の腹側部の残りを SC (Subcoeruleus) とした。

結果

(1) 橋、延髄各部位におけるカテコールアミン合成酵素レベル

Hökfelt らの免疫組織螢光法[5]および Jacobowitz and Palkovits[9] の組織螢光法の結果に基づいて実験方法に述べたように、カテコールアミン作動性細胞体に富む LC, A_{8-10}, C_1, C_2 を分離し、含まれる TH, DBH および PNMT 活性を測定した。(表1) 組織重量当り LC には最も高い TH (A_{8-10} を除き)、DBH 活性が見られたが、PNMT 活性は比較的低く、ノルアドレナリンニューロンの局在を裏づける。PNMT 活性は C_2 に最も高くみられたが、TH, DBH 活性は、LC やドーパミン作動性ニューロンに富む A_{8-10} に比ずとかなり低い。したがってこの表から TH, DBH, PNMT 活性は、それぞれドーパミン作動性、ノルアドレナリン作動性、アドレナリン作動性ニューロンの存在を強く反映する、いい換えると、これら酵素は、これらニューロンの指標となりうると考えられた。R_2 の PNMT 活性が予想以上に高いため、門(obex)1 mm 尾側より吻側に向って各1 mm 巾の切片を分離し、それぞれの腹外側部を尾側より C_1 の a, b, c, d とし、また背内側

図1.

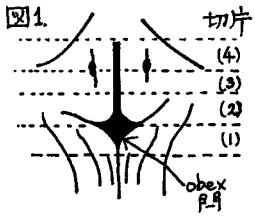


表1. (nmole/hr/g tissue)

	TH	DBH	PNMT
C_1	32±4(19)	190±18(12)	1.76±0.27(10)
C_2	33±2(21)	222±16(12)	5.05±0.41(10)
R_1	11±2(9)	91±27(4)	0.47±0.08(7)
R_2	11±2(10)	103±26(5)	1.91±0.12(7)
R_3	6±1(4)	-	0.50±0.04(10)
LC	78±6(13)	866±46(14)	0.86±0.09(12)
SC	10±1(7)	104±11(8)	0.37±0.06(6)
A_{8-10}	329±13(13)	-	-

PNMT

C_1	a	0.49±0.08(5)
	b	1.58±0.10(7)
	c	3.65±0.46(4)
	d	1.23±0.32(4)
C_2	a	1.07±0.16(4)
	b	3.90±0.56(4)
	c	5.35±0.52(4)
	d	2.19±0.42(4)
R	a	0.1(1)
	b	0.37(2)
	c	1.37(2)
	d	0.49(2)

部を C_2 の a, b, c, d とし、PNMT 活性を測定した。この結果 C_1 に高い活性が見られず、したがって R_2 に与えられた高い活性は、C_1 細胞体の混在によると考えられた。

(2) 橋・延髄における TH, DBH 活性の、レセルピンによる変化

表2に示したように、LC, SC における TH 活性は、2日～3日後に著明に増加し、また LC, SC 分離後の残りの部位でもわずかながら有意の増加が認められた。しかし、LC, SC 内ノルアドレナリン細胞体から出る線維の一部が終末を作る視床下部における TH 活性には有意の増加は見られなかった。また、ドーパミン作動性ニューロン細胞体の集まっている A_{8-10} 領域の TH 活性も変化しなかった。この事実より、レセルピンにより増加した TH は、ノルアドレナリンニューロン細胞体由来のものと考えられ、3つの部位における増加率のちがいは、それぞれ分離した組織内の細胞体密度のちがいによる可能性が考えられた。事実、DBH 活性は、LC において有意に増加した。しかし TH の場合とことなり、有意の増加は投与後5日ではじめて認められ、またその増加程度は軽度であった。SC においては、DBH の増加は少く有意ではなかった。恐らくは LC に比べて、細胞体密度がより低いことによると思われる。一方、副腎の両活性は、相伴って著明な増加を示すので、中枢・末梢両組織における TH, DBH 活性の調節機構の異っていることが示唆される。しかし、両酵素は、アドレナリン作動性ニューロンにも当然存在するので、レセルピンに反応して増加する酵素は、このニューロン内のものという可能性もある。とくに LC 内に、アドレナリン性神経終末の存在が認められており、LC における TH, DBH 増加時期にずれが見られるのは、両酵素のアドレナリン細胞体からの軸索輸送の速度のちがいを反映するかもしれない。

(表2)

	day	TH (%)	DBH (%)
LC	1	83 ± 8 (4)	90 ± 15(4)
	2	174 ±14 (4)*	98 ± 4 (4)
	4	279 ±27 (13)*	109 ± 8 (13)
	5	286 ±17 (11)*	140 ± 8 (10)*
	6	296 ±23 (13)*	138 ± 9 (10)*
SC	3-5	184 ±10 (20)*	
	6	259 ±27 (6)*	115 ± 8 (4)
P-M rest	3-5	138 ± 7 (18)*	107 ± 4 (18)
A_{8-10}	3-5	113 ± 4 (28)	-
	6	111 ± 4 (7)	-
Adrenal	1	208 ±19 (4)*	187 ± 17 (4)*
	4-5	214 ±14 (16)*	201 ± 15 (20)*
hypoth.	2.5-4	116 ± 4 (11)	87 ± 3 (14)

対照群の平均値の%です。* $P<0.01$

(3) C_1, C_2 における TH, DBH, PNMT 活性のレセルピン投与による変化

主な実験方法は述べた要領で分離した C_1, C_2 について酵素活性を測定したが、一部は表1の結果に従い分離法を変更した。即ち、表3の C_1^* は、表1の C_1 b, c を、C_2^* は C_2 b, c, d に相当する。いづれの場合にも C_1, C_2 における TH, DBH 活性は、レセルピン投与で変化しない。さらに PNMT 活性にも全く変化が見られない事実は、アドレナリン作動性ニューロンの細胞体は、少くとも酵素活性の点でレセルピンにより影響を受けないことを示している。他方、橋延髄残りの部分では、TH 活性の有意の増加が見られ、表1の P-M rest にみられた増加を反映すると考えられる。副腎の PNMT 活性は、従来の報告通り有意の増加が見られた。

(表3)

	TH	DBH	PNMT
C_1	108 ± 6(15)	105 ±13(6)	114 ± 8(17)
C_1^*	-	-	91 ±11(4)
C_2	112 ± 6(15)	96 ± 8(7)	102 ± 6(14)
C_2^*	136 ± 9(7)	84 ± 6(4)	107 ± 6(11)
R_1+R_2	145 ± 5(7)	86 ± 6(4)	89 ± 6(7)
LC	310 ±30(10)	-	93 ±10(11)
adrenal	-	-	132 ± 5(11)

考察

レセルピンは、橋、延髄の特定部位(とくにLC)のTH活性を著明に増加させるが、ドーパミン作動性細胞体の局在するA9-10のTH活性，アドレナリン作動性細胞体におけるTH，DBHおよびPNMTいづれの酵素活性にも影響を与えない。この結果は、LCに局在するノルアドレナリン作動性ニューロンが何らかの枠構でレセルピンに反応し、そのTH活性が増加することが考えられた。事実、LC内PNMT活性は変化しないが、DBH活性は有意に増加する。しかし，DBHの増加は、末梢組織に比して少く，また増加が見られる迄のlatent periodが長い。さらにSCおよびLC，SCW外の橋、延髄の他部位では，著明なTH活性増加にかゝわらず、DBH活性には変化が見られない。これらの事実は、中枢神経系ノルアドレナリンニューロンにおけるTH，DBH活性の調節枠構が、末梢組織と異っている、いいかえると、中枢神経では，THがより重要なrate-limiting enzymeとして枠能することを示唆する。

中枢神経系で、ストレス，レセルピンによる酵素の増加は，シナプス活動を介するかは現在のところ不明であるが、末梢組織と枠構が同じとすると、この現象は、LCに終末を作り、TH増加に関与する神経連絡系の研究に有力な手段と成り得るであろう。
(以上の結果は、Brain Research (印刷中)に発表した。)

References

1) Mueller,R.A.,Thoenen,H. and Axelrod,J. J.Pharmacol.exp.Ther. 169,74 (1969).
Thoenen,H., Mueller,R.A. and Axelrod,J. Nature(Lond.) 221,1264 (1969).
Thoenen,H., Mueller,R.A. and Axelrod,J. J.Pharmacol.exp.Ther. 169,249 (1969).
2) Segal,D.S., Sullivan,J.L., Kuczenski,R.T. and Mandell,A.J. Science 173,847-849 (1971).
Besson,M.J., Cheramy,A., Gauchy,C. and Musacchio,J.M. Eur.J.Pharmacol. 22,181 (1973).
3) Zigmond,R.E., Schon,F. and Iversen,L.L. Brain Research 70,547 (1974).
4) Reis,D.J., Joh,T.H., Ross,R.A. and Pickel,V.M. Brain Research 81, 380 (1974).
Brooke,S.M. and Fibiger,H.C. Brain Research 85, 532 (1975).
5) Hökfelt,T., Fuxe,K., Goldstein,M. and Johansson,O. Brain Research 62,461 (1973).
6) Waymire,J.C., Bjur,R. and Weiner,N. Anal.Biochem. 43,588 (1971).
7) Molinoff,P.B., Weinshilboum,R.W. and Axelrod,J. J.Pharmacol.exp.Ther. 178,425 (1971).
8) Saavedra,J.M., Palkovits,M., Brownstein,M.J. and Axelrod,J. Nature(Lond.) 248,695(1974).
9) Jacobowitz,D.M. and Palkowits,M. J.comp.Neurol. 157, 13 (1974).

27 ラット青斑核刺激による大脳皮質からの^{3}H—NAの遊離の証明

田中 千賀子・稲垣 千代子・藤原 寛
（京大・医・薬理）

〔要約〕

中枢神経系でのNoradrenaline (NA) の遊離を証明する目的で、ラット大脳皮質に ^{3}H-NA, ^{14}C-Inulinを直接に摂取させた 大脳皮質から 遊離する ^{3}H-NA, ^{14}C-Inulinを cortical cup法により集め、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

1) ^{3}H-NAの spontanous release は多相性を示し、40分後までには急速に減少し、(k= 0.07±0.002 min^{-1}, n=14, rapid decline), 120 分後からは単一指数函数にのって緩やかに減少した(slow decline)。一方、^{14}C-Inulin のspontanous release ではより急速なdeclineを示した。

2) ^{3}H-NA のspontanous release は麻酔薬および麻酔深度によって差がみられ、Nembutal での深麻酔では spontanous releaseは Urethan 麻酔によるものと比べて減少し slow decline は k= 0.008 ± 0.003 min^{-1} から k=0.005 ± 0.002 min^{-1}へまで変化した。

3)青斑核 (LC) を bipolar electrode で刺激すると4V, 5～30Hz, 2 msec, 刺激に対応して ^{3}H-NA が遊離した。LC-stimulated release は5～30Hzの間で frequency dependentであった。

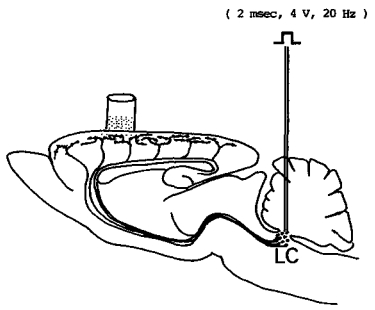
4)青斑核吻側部を刺激すると反対側の大脳皮質から ^{3}H-NAの遊離がみられた。

以上の結果は coerulo-cortical noradrenergic pathwayの存在を示し、大脳皮質でのNAの伝達物質としての役割に一つの有力な証拠を加えたものと考える。

青斑核に局在するNA含有細胞からの神経終末は、大脳皮質、海馬、視床、小脳などへ広汎な分布を示すことが知られている。[3,6,8,10] coerulo-cortical tractがmonosynaptic adrenergic pathwayであるという仮説には、更に生理学的、神経化学的、薬理学的証明が必要とされる。その一つとして、青斑核の刺激に対応して、果して、大脳皮質からNAが遊離するかどうかという問題がある。最近、青斑核の刺激に対応して、大脳皮質から、NAが減少することは示されたが[5]、直接に、青斑核の刺激に対応して遊離するNAを証明した報告はない。一般に endogenous NAの遊離を証明することは困難であり、放射性NAを用いて証明している。ウサギの嗅脳からの放射性NAの遊離が、cortical cup法により証明されている[2]。本研究では、cortical cup法を用いて[7]、大脳皮質から、遊離した ^{3}H-NA を集め、spontanous release の性格と、青斑核刺激の影響を検討した。

方法

ウィスター系雄性ラット (体重180-220g)を Urethan (25%溶液 6 ml/kg) または Nembutal (30mg/kg) で麻酔して用いた。ラットは、脳定位固定台に固定し、大脳皮質を露出し、内径 4.5 mm高さ 8 mm の円筒型プラスチックを、外科手術用接着剤で固定し、cortical cupを作った(図1)。 1-7-^{3}H NA hydrochloride



CORTICAL CUP TECHNIQUE Fig. 1

(8.2 Ci/mmole) および ^{14}C-Inulin (6.1 mCi/mmole) を Krebs phosphate 液(Krebs phosphate液に5 mM Ca^{2+}, EDTA 10 mg/l, Ascorbic acid 20 mg/lを附加し、5% CO_2, 95% O_2を飽和したもの) に溶かして、その 20 µlを cupに入れて 1時間 incubateした。incubate medium を cup から除き、50 µlの Krebs phosphate液で5回洗ったあと、10^{-4}M の dismethylimypramin (DMI)を加えた Krebs phosphate 液50 ulを加えて、10分間隔で集め、^{3}H-NA, ^{14}C-Inulin の radio activity を液体シンチレーションカウンターで測定した。電気刺激のための青斑核の座標は、螢光組織化学、および、ニッスル、ルクサール-ファーストブルー重染色で確めた。刺激電極は、直径 0.3 mm ステンレス製 bipolar electrodes を用い、電気刺激装置(日本光電 MSE-3R) によって 4V、2 msecの monophasic pulses での青斑核の刺激を行った。frequency 5-30 Hz と stimulation time 2-10分の間で変化させた。実験中の体温は、熱電対式サーモメーターで記録し、37-38 °C に保持した。

実験結果および考察

青斑核の局在： 青斑核は、橋被蓋から中脳尾側へかけて、上小脳脚の内側に密着して分布する最大のNA細胞群であるが、青斑核の脳定位座標を詳細に示した報告はなく、破壊および刺激実験を行っている研究者によって多少のずれがある。そこで Falck-Hillarp法[2]を用いて、ラット脳の前額断および矢状断標本において、青斑核や上行路の走行を観察し、マッピングした(図2)。

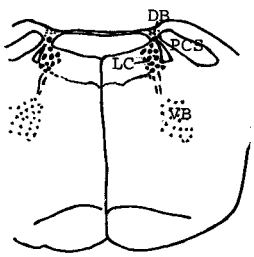


Fig.2a: frontal section
LC: locus coeruleus
DB: dorsal NA bundle
VB: ventral NA bundle
PCS: pedunculus cerebellaris

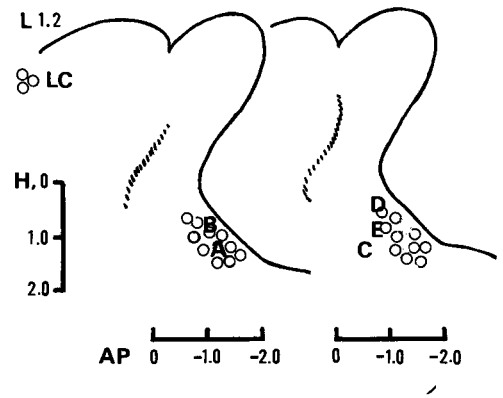


Fig.2b: Distribution of stimulation electrodes. The 2 parts of the figure represent sagittal section of the rat pontine tegmentum. left side; for fig.4, right side; for fig.5.

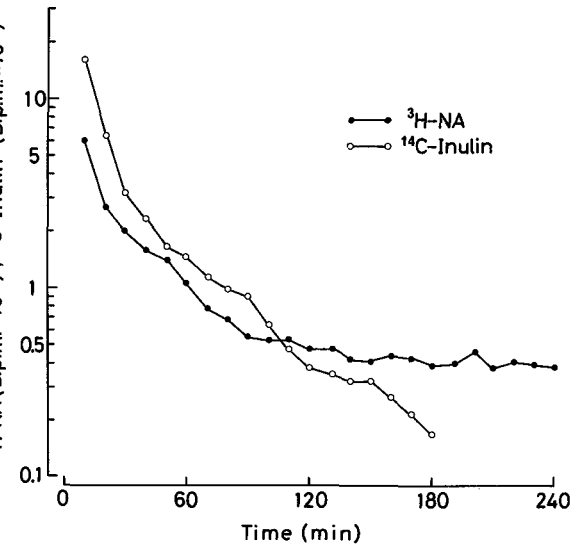


Fig.3: Spontanous efflux of ^{3}H-NA and ^{14}C-inulin

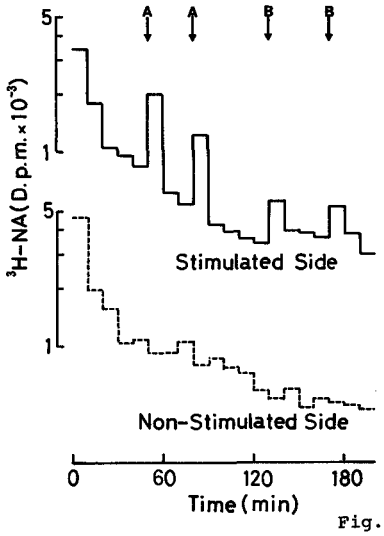


Fig. 4

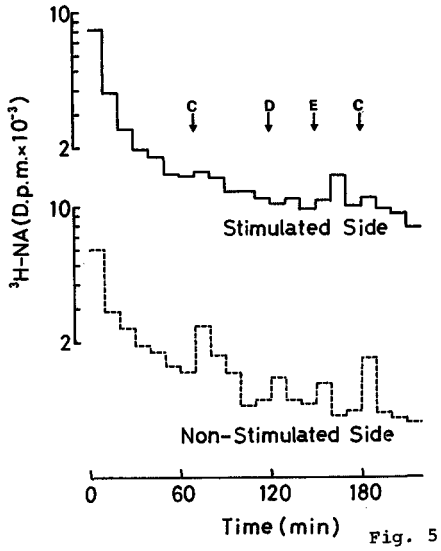


Fig. 5

その結果、AP -0.8～-1.7, L 1.0～1.3, H 0.2～1.4の間に分布することが明らかにされた。AP -0.6からは三叉神経中脳路に沿って dorsal bundle が上行し、その一部は、内方へ向って、内側縦束の小脳脚交叉の間で、交叉するものと思われる。

Spontanous release : ^{3}H-NA の spontanous release の減少は、多相性を示す。40分後までは、急速に減少し (k=0.07±0.002 min^{-1}) 120分後からは単一の指数函数曲線にのり、図に示されるように除々に減少した。^{14}C-Inulin の efflux rate は、^{3}H-NA と比べると、はるかに速く、120分以後では、細胞外へ摂取された ^{3}H-NA の影響は極めて少ないことがわかる。NA の spontanous release は、麻酔薬や麻酔深度によって影響をうけた。Nembutal 麻酔ラットの ^{3}H-NA の

Fig. 4: Release of ^{3}H-NA from the ipsilateral cerebral cortex following unilateral electrical stimulation of LC in the rat anesthetized with Nembutal 30 mg/kg. Arrows indicate electical stimulation (4V, 20Hz, 2 msec, 2 min).

Fig. 5: Release of ^{3}H-NA from the bilateral and contralateral cerebral cortex following unilateral electrical stimulation of the region close to LC.
The distribution of stimulation electrodes A, B, C, D and E are illustrated in Fig. 2b.

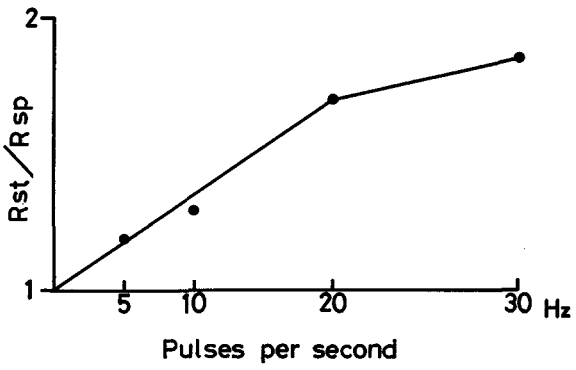


Fig.6: Increase of ^{3}H-NA efflux in response to LC stimulation at different frequencies (0, 5, 10, 20 and 30 Hz).

spontanous release の 180 分値は、Urethan 麻酔に比べて小さく、slow decline も抑制された。(Urethan: k=0.008 ± 0.003 min^{-1}, Nembutal: k=0.005 ± 0.0002 min^{-1}, n=14)

LC-stimulated release : 青斑核を bipolar electrode で刺激すると frequency dependent(5 30H_z) の ^{3}H-NA release がみられた。LC-stimulated release は spontanous release ほど麻酔の影響はうけなかった。4V, 20H_z, 2msec の刺激条件で、刺激部位を変化させて調べると、有効刺激部位の分布図のように(図)、限局された部位で、最大の ^{3}H-NA release がみられた。LC-stimulated release は、刺激側だけでなく、反対側でもみられた。特に青斑核内の吻背側部、青斑核の吻内側部に、反対側で著明な ^{3}H-NA release がみられた。

以上の結果から、ラット大脳皮質からの ^{3}H-NA spontanous release は、ウサギ嗅脳からの放射性NA の release とほぼ同じ多相性を示すことが明らかになった。青斑核の電気刺激により、大脳皮質から ^{3}H-NAが遊離することを証明した。青斑核の刺激によって大脳皮質からNA が減少すること[5]、turn overが促進して MHPC-sulfateが増加することなどの間接的NA遊離の証明に加えて[4,9]、これは coerulo cortical monosynaptic adrenergic pathwayの存在を直接的に証明するものの一つである。

更に一側の青斑核刺激により、両側大脳皮質からの ^{3}H-NA遊離がみられたことは、coerulo cortical pathwayは交叉することを示している。これは、組織化学的、神経解剖学的には、約20% の線維が交叉するといわれていることを裏付けるものである。

文　献

1 Brenells, A. B. (1974) J. Physiol. 240, 270-293

2 Falck, B., Hillarp, N.-Å., Thieme, G. and Trop, A. (1962) J. Histochem. Cytochem. 16, 348

3 Ishikawa, M., Shimada, S. and Tanaka, C. (1975) Brain Res. 86, 1-16

4 Korf, J., Agajinian, G. K. and Roth, R. H. (1973) Europ. J. Pharmacol. 21, 305-310

5 Korf, J., Roth, R. H. and Agajinian, G. K. (1973) Europ. J. Pharmacol. 23, 276-293

6 Maeda, T., Pin, C., Salvert, D., Ligier, M. and Jouvet, M. (1973) Brain Res. 57, 119-152

7 Mitchell, J. F. (1963) J. Physiol. 165, 98-116

8 Segal, M., Pickel, V. and Bloom, F. (1973) Life Sci. 13, 817-821

9 Walter, D. S. and Eccleston, D. (1973) J. Neurochem. 21, 281-289

10 Ungerstedt, U. (1971) Acta physiol scand. 367(Suppl.) 1-48

28 ネズミ大脳の"plain synaptic vesicle"による〔^{3}H〕dopamineのとりこみ

田中　亮・浅賀久照・竹田　稔
（名市大・医・生化およびRochester大・医・脳研）

〔要約〕

ネズミ大脳から，所謂"plain synaptic vesicle"を分離し放射性dopamineのとりこみを調査した。$MgCl_2$，$CaCl_2$，ATPをそれぞれ単独に加えても，とりこみに大きい変化はないが，Mg^{2+} + ATP添加では16倍，Ca^{2+} + ATPでは5.5倍の上昇が見られた。とりこみは0°では認められず，25°では1分以内，37°では30秒以内で，最高値の1/2のlevelに達した。とりこみのdopamineに対するみかけのKmは1.6×10^{-6} Mであった。Vesicleのとりこみ活性は，0°に保存して，7時間後には分離直後の1/2のlevelに下った。Nucleoside triphosphate中ではGTPがATP同様のとりこみ促進効果が有り，UTPは1/3有効，CTPは無効であった。Adenylyl imidodiphosphateは無効であるばかりか，ATPの促進効果を阻害した。ADP，AMPは共に無効であった。Reserpineは1×10^{-7} Mで50%阻害を示したが，colchicineとouabainは殆ど阻害しなかった。Na^+，K^+，Cl^-が基本反応中のionであったが，これらを庶糖で置換しても，とりこみに変化はなかった。

以上の結果は次の事を示唆する。(a) 脳神経終末のsynaptic vesicleのdopamineとりこみは，安定度，種々の因子に対する反応，energy要求などのpatternに関し，末梢神経幹のvesicleの化学伝達物質とりこみと大きく異る。また，神経終末の細胞膜を通してのとりこみとも異る。(b) とりこみは交換反応あるいはvesicle膜への吸着のような物理化学的過程によるものではない。

神経化学伝達物質はsynaptic vesicleに高濃度に含まれている事から，濃度勾配に逆らって伝達物質をとりこむ機構がvesicleの膜に在る事が推測される。しかしとりこみの機構は何らかのenergy源を必要とすると言う事以外，詳細はまだ明らかにされていない。脳のsliceあるいはsynaptosomeによる伝達物質のとりこみは，完全に作動しているATP産生系を必要とする，あるいはATPを使う系が関与すると，考えられている。Synaptosomeを使う実験では，神経終末の細胞膜を通しての伝達物質の能動輸送が主で，それにvesicle膜を通しての輸送その他が関与した結果が出るので，vesicleへのとりこみ機構は明らかにし難い。Vesicleの伝達物質とりこみのmodel系としてしばしば使われる腎上体髄質のchromaffin granuleの場合は，catecholamineのとりこみにATPとMg^{2+}が必要であると，されている(10, 12)。しかしここに得られた結果をそのままsynaptic vesicleに当てはめて考えるのは，誤った結論に到る危険がある。また，神経終末のvesicleには少くとも2種類のものが形態学的に認められて居り，vesicleの生活回転上2時期を代表するとりと考えられる(4)。従来の方法でこの2種のvesicleを一緒に分離して使う実験からは不明確な結論を導く可能性がある。最近Kadota & Kadota (6)はこの2種を分けて単離する方法を報告した。以上の様な背景の上で，我々はrat大脳から1種類のvesicleをかなり純粋な状態に分離し，伝達物質とりこみの機構を明らかにする研究の一部として，この実験では主にnucleotide，2価ion，その他の因子に対する反応に関し，〔^{3}H〕dopamineのとり込みを調査した。

方法：所謂"plain vesicle"(PV)分画を雄rat大脳からKadota & Kadota (6)の

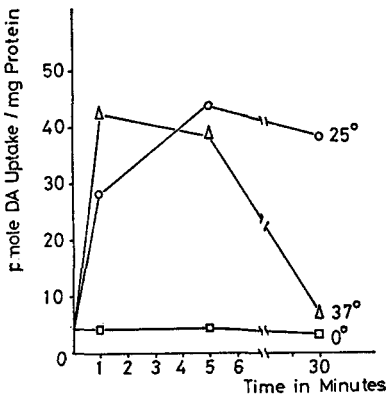
方法で分離した。最終洗殿を 156 mM KCl, 5mM NaCl を含む Tris buffer, pH 7.4 (Na,K-buffer) 中で遠心により洗った後, 少量の Na,K-buffer に懸濁し, PV分画として使った。分画は殆ど大部分が "plain vesicle" から成り, 僅に少数の "coated vesicle" が含まれていた。細胞膜, microsome, mitochondrion の破片は認められず, これは Na,K-ATPase, cyt c oxidase, glucose-6-Pase の活性が同分画には無いという生化学的所見と一致した。[^{3}H]Dopamine (DA) は 1×10^{-6}M (0.1 μCi), $MgCl_2$, $CaCl_2$, ATP はすべて 2mM を基本濃度とした。PV は Na,K-buffer 中, 25°, 5分の incubation 後, 遠心により集めその radioactivity を液体 scintillation counter で測定し, DAのとりこみ量を算出した。

結果: $MgCl_2$, $CaCl_2$ を単独に加えても DA の PV へのとりこみに大きい変化はないが, ATP の単独添加では 2.5 倍に増加した。Mg^{2+} と ATP とを同時に加えると, とりこみは 16 倍上昇した。Ca^{2+} と ATP の場合は 5.5 倍の上昇があった (表1)。ATP 依存性の DA とりこみは, 0.8mM の $MgCl_2$ で最高値に達した。0°でとりこみは認められなかった。25°では 1分以内に最高値の 1/2 になり, 5~10分で最高値を示した。37°ではとりこみの速度が約2倍に成るが, 最高値に到った後急速に下り, 30分ではとりこみを殆ど示さなかった (図1)。とりこみの DA に対するみかけの Km は 1.6×10^{-6}M であった (図2)。とりこみの活性は極めて不安定で, 0°に保存しても 7時間後には PV 分離後の活性の 1/2 に減少した (図3)。Nucleoside triphosphate 中では GTP が ATP 同様に効果があり, UTP は 1/3 有効, CTP は無効であった。Adenylyl imidodiphosphate (AMP-PNP) は無効であるばかりでなく, ATP のとりこみ促進効果を阻害した。ADP, AMP は共に無効であった (表2)。Reserpine は Mg^{2+} ATP 依存性とりこみを強く阻害し (50% 阻害 1×10^{-7}M) たが, colchicine と ouabain は共に 1×10^{-4}M の濃度に達するまで有意義な阻害を示さなかった (表3)。基本反応液は大量の K^+ に対し少量の Na^+ を含むが, この比を逆転してもとりこみに影響はなかった。NaCl, KCl を庶糖で完全に交換しても, 同様に無変化であった。これらを K-燐酸緩衝液で置換すると, とりこみは 1/2 に減った (表4)。

表1. DA とりこみに与える Mg^{2+}, Ca^{2+}, ATP の影響

Addition to Na,K,Tris buffer	Uptake (%)	(pmoles/mg protein)
None	100	
2 mM $MgCl_2$	143	1.91 ± 0.32
2 mM $CaCl_2$	185	3.74 ± 0.23
2 mM ATP	247	6.35 ± 0.35
2 mM ATP + 2 mM $MgCl_2$	1,570	63.7 ± 5.2
2 mM ATP + 2 mM $CaCl_2$	549	19.4 ± 1.2

図1 DA とりこみと温度, 時間の関係



考察: 末梢交感神経幹の vesicle を使った実験から, catecholamine のとりこみについていくつかの報告がなされた (7, 15)。しかし末梢神経幹の vesicle と脳神経終

図2. DAとりこみと濃度の関係

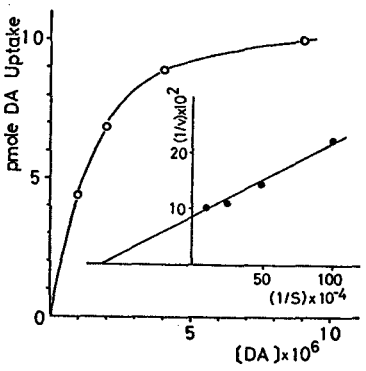
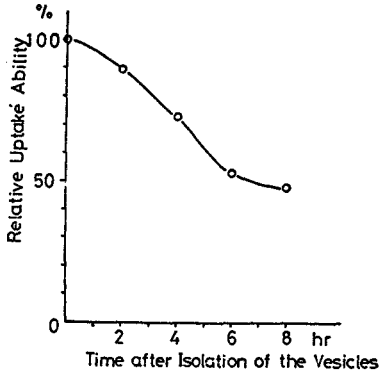


図3. DAとりこみ活性の経時的減少



末の vesicle とは，大きさ，形態，比重，化学的組成，酵素活性，生成過程，生理的機能などに於て大きく異る事が知られている（5, 13）。したがって神経幹 vesicle と終末 vesicle の化学伝達物質とりこみは，安定度，種々の因子に対する反応，energy 要求などの pattern に関し異る事が予期される。この実験で認められた差異は：(a) AMP ADP が神経幹 vesicle ではとりこみを促進するが（7, 15），終末 vesicle では無効であった。(b) CTP, ITP, UTP は神経幹 vesicle では ATP と同様に有効であるが，終末 vesicle では CTP は無効，GTP は ATP 同様に有効，UTP は 1/3 有効であった。(c) 神経幹 vesicle の catecholamine は 20°, 30分で 1/3 の level に下るが，終末 vesicle では 25° で 10% 下るのみであった。(d) 前者では catecholamine の濃度が 20μM に達するまでとりこみは認められぬが，後者では少くともその 1/100 以下の濃度でとりこみが認められた。

脳神経終末 vesicle への DA のとりこみは，以下のような理由で，交換反応あるいは vesicle 膜への吸着のような物理化学的過程ではないと考えられる。(a) 0° ではとりこみがなく，とりこみの DA に対する見かけの Q10 は約 2 であった。(b) 低濃度の GABA がその放出を誘導するという事実に基いて，放射性伝達物質のとりこみは交換反応によるみかけの現象に過ぎないという説が提出された（9）。しかし低濃度の catecholamine は synaptic vesicle から伝達物質の放出を促進しない。(c) とりこみは ATP + Mg^{2+} により 16倍に増加し，（ATP の近縁の analogue だが，種々の ATPase により分解されぬ）

表2. DAとりこみに及ぼす nucleotide の影響

Addition	Uptake (%)
ATP	100
GTP	106
UTP	32
CTP	4
ADP	2
AMP	5
AMP-PNP	0
ATP + 2 mM AMP-PNP	76
ATP + 4 mM AMP-PNP	32

表3. 薬品の DA とりこみ阻害作用

Addition	Uptake (%)
None	100
1×10^{-7} M Reserpine	51.7
1×10^{-6} M Reserpine	5.4
1×10^{-4} M Ouabain	87.5
1×10^{-4} M Colchicine	77.4

AMP-PNPは無効であったばかりでなくATPと共に加えるとATPのとりこみ促進作用を阻害した。

神経終末vesicleによるとりこみに対するDAの見かけのKmが，synaptosomeまたは脳sliceのとりこみに対するcatecholamineの見かけのKmの約4倍大きかった事は，生理的に有意義であると考えられる。Rat脳の種々の部分へのとりこみに関し，norepinephrineとDAの見かけのKmは $0.3-0.6 \times 10^{-6}$ Mと報告されている(2,3)。これに対しvesicleのとりこみはDAについてKm，1.6×10^{-6} Mである事が本実験で知られた。伝達物質のpostsynaptic作用を効率良く，急速に終らせる事がsynapseの正常な興奮に必要である事は明らかである。したがって，神経終末のcatecholamineに対するKmが低い事は当然期待される。伝達物質が一旦神経終末のcytosol中へ取入れられれば，伝達物質に対する競争はsynaptic vesicleと代謝酵素の間にしか無い。Vesicleへのとりこみに関し伝達物質のKmは，神経終末へのとりこみに関してのそれより小さい必要はないが，代謝酵素についてのKmよりは小さい方が生理的機能に適している。事実，ブタ脳のmonoamine oxidaseのtyramineに対するKmは 1.2×10^{-4} Mであると報告されている(14)から，vesicleのDAに対するKmはこれら2つの値の中間に来る。

VesicleへのDAのとりこみはNa^+, K^+, Cl^-により影響を受けない。Cl^-の濃度を固定して，Na^+とK^+の濃度比を1:31から31:1に変えてもDAのとりこみ量は変化しなかった。さらに，すべてのNa^+, K^+を蔗糖と置換しても，影響がなかった。神経終末の細胞膜を通しての伝達物質のとりこみには，正常に作動しているNa,K-pumpと，適正なNa^+, K^+濃度の必要である事が知られている(1,3,8)。したがってこの結果は2つのとりこみ機構が違うことを明らかに示している。また，colchicineが神経終末のとりこみを阻害する事が発表されている(11)が，vesicleへのDAのとりこみは阻害しなかった。もしactin様またはtubulin様蛋白質がsynapseでの伝達物質のとりこみに直接，あるいは間接に関係を持つとすれば，われわれの実験事実は，これらの蛋白質がvesicleへのとりこみ以外の段階に関与する事を示唆する。

表4. 各種ionのDAとりこみに与える影響

Buffer solutions	Uptake (%)
156 mM KCl, 5 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4	100
5 mM KCl, 156 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4	99.5
290 mM Sucrose, 10 mM Tris, pH 7.4	97.1
150 mM Potassium phosphate, pH 7.4	46.8

1. Baldessarini,R.J. & Vogt,M. (1971) J.Neurochem. 18, 951.
2. Colburn,R.W. et al. (1968) Biochem. Pharmacol. 17, 957.
3. Coyle,J.T. & Snyder,S.H. (1969) J. Pharmacol. Exptl. Ther. 170, 221.
4. Douglas,W.W. (1973) Progress Brain Res. 39, 21.
5. Heuser,J.E. & Reese,T.S. (1973) J. Cell Biol. 57, 315.
6. Kadota,K. & Kadota,T. (1973) J. Cell. Biol. 58, 185.
7. Klein,R.L. & Lagercrantz,H. (1971) Acta Physiol. Scand. 83, 179.
8. Kuriyama,K. et al. (1969) Brain Res. 16, 479.
9. Levi, G. & Raiteri,H. (1974) Nature 250, 735.
10. Lishajko,F. (1969) Acta Physiol. Scand. 76, 159.
11. Nicklas,W.J. et al. (1973) J. Neurochem. 20, 109.
12. Phillips,J.H. (1974a) Biochem. J. 144, 311; (1974b) ibid. 144, 319.
13. Smith,A.D. & Winkler,H (1972) Handbook Exptl. Pharmacol. 33, 538.
14. Tipton,K.P. (1971) Methods Enzymol. 17B, 717.
15. von Euler,U.S. & Lishajko,F. (1963a) Acta Physiol. Scand. 57, 468;(1963b) ibid. 59, 454; (1967) ibid. 71, 151; (1969) ibid. 77, 298.

29 脳組織のdopamine結合能とadenylate cyclase活性

御子柴 克彦・塚田 裕三
（慶大・医・生理）

〔要約〕

神経膜とドーパミン(DA)との識別機構を明らかにするため^{3}H-DAとミクロソーム膜，シナプス膜との結合様式を調べまたAdenylate Cyclase活性との関連も検討した。^{3}H-DAとの結合は10分以内の速い反応とそれ以降の遅い反応からなり、結合にはカテコール核を必要とした。脳各部位の膜成分とDAとの結合能はほぼ同じであり結合様式にも差はみられなかった。βブロッカーは影響なかったがαブロッカーはpreincubateすることにより約50%の抑制効果を示した。DA結合はCa^{++}, Mg^{++}添加により抑制された。EDTAは10^{-6}Mで著明な抑制効果を示したがEGTAは10^{-2}M以上で抑制効果がみられた。これらの効果はCa^{++}, Mg^{++}の添加により回復しなかった。Linewearver-Burk plot, Scatchard plotよりKm値及びdissociation constantの異る二種の反応よりなることが明らかとなった。Adenylate Cyclase活性は0.2mM EGTA存在下でDAにより活性上昇がみられた。Catechol, Isoproterenolでは活性の増加はみられずNEの促進効果はDAの約半分であった。EGTAはDAを添加しない時でもまた添加した時にもともに酵素活性を抑制した。Ca^{++}は酵素活性を著明に抑制し、EGTAとCa^{++}は相加的抑制効果を示した。EDTAでは10^{-3}Mで抑制効果がみられた。^{3}H-DAと膜成分との結合条件とAdenylate Cyclaseの活性化の条件が異る点を指摘した。

カテコールアミンの一種であるドーパミン(DA)は脳内の重要な化学伝達物質と考えられており脳の機能と密接な関連を有していることが知られている。そこで刺激に対応して遊離されたDAがどの様な機構で識別されるか，またその結果どの様な過程で生理的応答をひきおこすかを明らかにする為、DAと結合する受容体の分離を試み，また受容体とカップルしていると考えられるAdenylate Cyclase活性との関連も検討した。

実験材料及び実験方法

実験動物はWistar系ラット(200-250g)を用いた。神経膜の分離方法は，新鮮ラット脳の各部位をとり10倍量の0.32M sucroseを加え、クリアランス0.25mmのテフロンガラスホモゲナイザーで850 rpm 6往復ホモゲナイズし，1000g 10分遠心し，沈澱を再び0.32M sucroseで洗い遠心する。その上清を合わせ12000g 15分遠心した沈澱部分をCrude Mitochondrial fraction (P_2)とし、その上清を105,000g 120分遠心した沈渣をミクロソーム分画とした。P_2分画は0.32M sucroseでサスペンドし15% Ficoll, 0.32M sucroseと45% Ficoll, 0.32M sucroseを重層した上に更に重層しSW25 rotorで21,000g 30分遠心後15%及び45% Ficoll界面に得られたシナプトソーム分画を低張処理し1.2M, 1.0M, 0.8M, 0.6M sucroseで重層した遠心管の上にのせ50,000g 120分遠心し1.2M-1.0Mと1.0M-0.8M sucroseの界面に得られた膜成分をシナプス膜とした。これらの形態は電顕により確かめた。またミクロソーム分画を0.25%デオキシコール酸ソーダ(DOC)で0°C 30分処理した後105000g 120分の遠心により得られた上清をsolubilized microsomeとした。これら膜成分は−80°Cで保存した。

DAと膜成分との結合：incubation mixtureは0.5mlでTris-HCl(pH7.4) 50mM，膜成分2mg protein，^{3}H-DA(1.15 Ci/m mole) 2.8×10^{-7}Mを

含む。37°C 20分間反応後 直ちに氷冷しミリポアフィルターを沪過し 25mM Tris-HCl (pH7.4) 10ml で洗い、フィルターにトラップされたカウントを結合量として測定した。DOC 処理した膜成分は 0.25% DOC あるいは 0.025% DOC の条件で incubate した。Adenylate Cyclase 活性の測定: Greengard らの方法[3]に従い incubation mixture 0.5 ml 中に Tris-Maleate (pH7.4) 80mM, $MgSO_4$ 2.0mM, EGTA 0.2mM, Theophylline 10mM, ATP 0.5mM, 及び 40~200 μg protein の膜成分を含み 37°C で incubate し反応後、沸とう水中で3分間静置し反応を止め、氷冷後遠心しその上清を 0.05 ml 採取し Gilman の方法[2]に従い cAMP の測定を行った。(図中の棒線は測定値の範囲を示している。) 蛋白は Lowry 法[5]に従った。

Fig.1
Time course of binding of ^{3}H-DA.

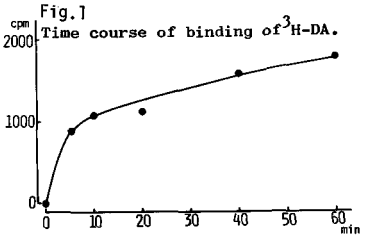
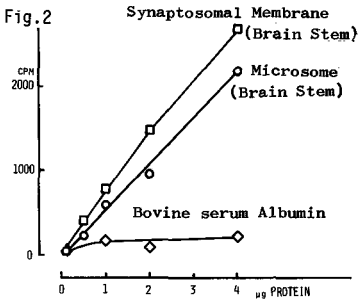


Fig.2



実験結果及び考察

脳幹部のミクロソームと ^{3}H-DA との結合をみると Fig1 のごとく時間とともにその結合を増したが10分以内の速やかな反応とその後ゆっくりと結合する反応からなり、また蛋白量を増すとともに linear に結合が増加した (Fig2)。牛血清アルブミンでは全く結合を示さなかった (Fig2)。脳の各部位よりミクロソームやシナプス膜を分離し結合能をみたがどの膜も同じように ^{3}H-DA との結合能を示した。膜成分と DA との結合様式を DA のアナローグを同時添加し inhibition curve より調べると (Fig3) カテコール核を有する Catechol, L-Dopa, D-Dopa, DL-Norepinephrine (NE), L-NE を添加することにより結合は著明に抑制された。しかしカテコール核をもたない Tyramine, Tyrosine, DL-Phenylephrine, DL-Normetanephrine では全く抑制効果を示さなかったことから DA との結合にはカテコール核が重要であると考えられた。また D型 L型での差はみられなかったことから D, L の識別機構はないものと考えられ、赤血球膜と ^{3}H-Isoproterenol との結合と同様の性質を示した[1]。一方 β ブロッカーである propranolol は全く結合に対しては影響を示さなかったが、

Fig.3 Inhibition of binding of ^{3}H-DA.

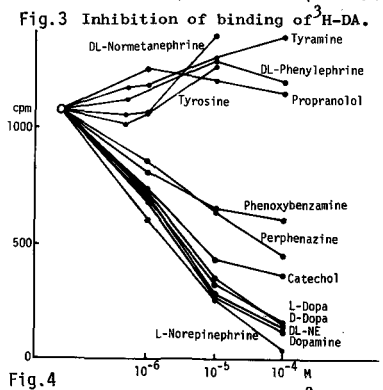
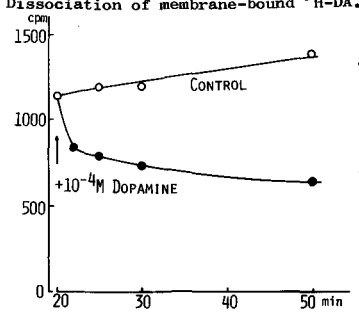


Fig.4
Dissociation of membrane-bound ^{3}H-DA.



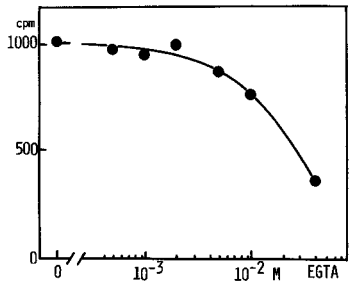
Tab.1 Effect of various drugs on binding of ^{3}H-DA.

none		1034 cpm
NaCl	10^{-4} M	1115
	10^{-3}	1172
	10^{-2}	1160
	10^{-1}	1266
	3×10^{-1}	1473
KCl	10^{-4} M	1017
	10^{-3}	982
	10^{-2}	1084
	10^{-1}	725
$CaCl_2$	10^{-4} M	704
	3×10^{-4}	721
	10^{-3}	603
	10^{-2}	312
$MgCl_2$	10^{-4} M	987
	10^{-3}	615
	10^{-2}	513
Ouabain	10^{-4} M	934
	2×10^{-4}	945
	4×10^{-4}	948

none		1031 cpm
EGTA	3×10^{-2} M	156
$CaCl_2$	10^{-2}	690
	3×10^{-2}	696
$MgCl_2$	10^{-2}	698
	3×10^{-2}	671
EGTA	3×10^{-2}	
+$CaCl_2$	10^{-2}	110
	3×10^{-2}	48
	6×10^{-2}	41
+$MgCl_2$	10^{-2}	421
	3×10^{-2}	283
	6×10^{-2}	137

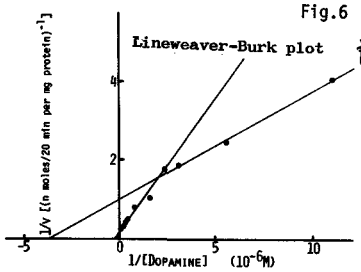
none		1174 cpm
EDTA	10^{-7}	1016
	10^{-6}	357
	10^{-5}	232
	10^{-4}	213

Fig.5 Effect of EGTA on binding of ^{3}H-DA.



αブロッカーである phenoxybenzamine や phentolamine は膜成分と20分間 preincubate した後 ^{3}H-DAを加え結合をみたところ、10^{-4}Mでほぼ結合が半分に抑えられたが 赤血球膜と^{3}H-Isop.との結合をβブロッカーのみが著明に抑えるのと対象的である[1]。但し preincubate しない場合には抑制効果はほとんどみられないことからαブロッカーの効果はゆっくりとした反応であると考えられた。大脳皮質、尾状核より得たミクロソーム膜シナプス膜についても同様の結合様式を示した。Fig4は^{3}H-DA と20分間反応後 10^{-4}M DAを添加した際の^{3}H-DA の dissociation をみたもので、速やかに解離、交換される可逆的な component と非可逆的な component からなることが示された。各種イオンの影響をみると(Tab.1) Na^+ は幾分促進傾向を示し K^+ は余り変化を示さなかったが Ca^{++} は低濃度で抑制効果を示し 10^{-2}Mで1/3に抑えられた。Mg^{++} もやはり抑制効果がみられた。EGTA は 10^{-2}M以上で抑制効果があらわれたが(Fig.5)、Ca^{++} や Mg^{++} を添加しても結合能の回復はみられず(Tab.1)かえって更に抑制される結果となった。これは心筋のミクロソームと^{3}H-NE との結合と異った結果を得た[4]。一方 EDTA は 10^{-6}Mで強力な抑制効果を示し Ca^{++} や Mg^{++} 添加で回復しなかった。またウワバインでは全く影響をうけなかった。DOCで可溶化した膜につき^{3}H-DA との結合を調べた結果 10分以内に速やかに DA と結合する time course を示し DAのアナローグで調べた結果、可溶化以前の膜とほとんど同様の結合様式を示し可溶化してもカテコール核の識別が認められた。この可溶化した膜成分につき Kinetics を調べた結果 Lineweaver-Burk plot より Km 値の異なる二つの反応からなり、また Scatchard plot[6] からは dissociation constant の異る二種の反応からなることが示された。しかしこれら二種の component が time course や dissociation の実験でみられた二つの component とどの様に対応するかはレセプターを精製する過程で明らかにしうるものと考えられる。

Fig.6



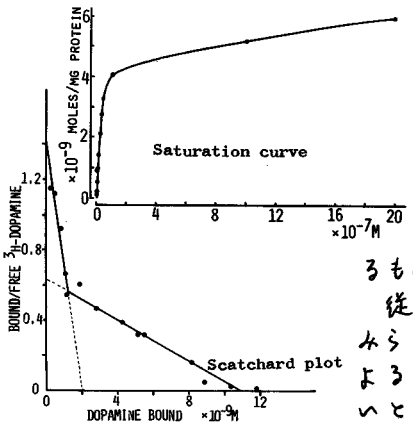


Fig.7

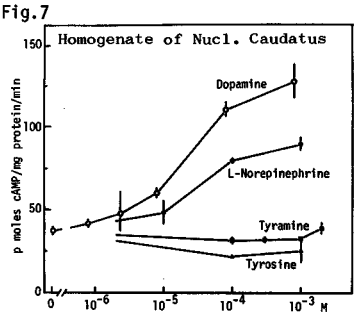
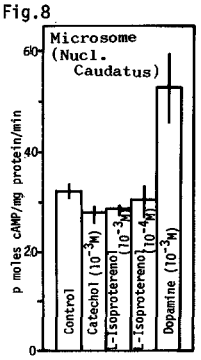


Fig.8



従来脳のホモジネートでは脳切片でみられるようなカテコールアミンによる Adenylate Cyclase 活性の上昇はないと云われていたが、Adenylate Cyclase

Fig.9 Effect of EGTA on adenylate cyclase activity.

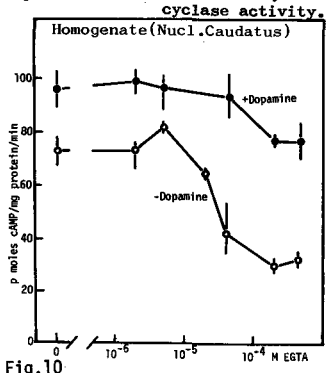


Fig.10 Effect of Ca^{++} on enzyme activity.

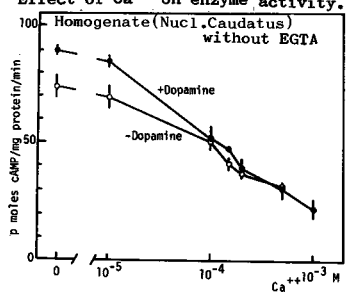
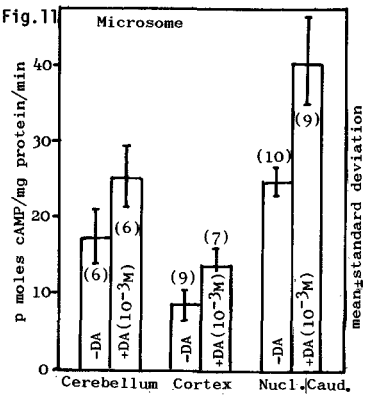


Fig.11



とDAとの関係を0.2mM EGTA存在下で調べたところ、DA添加量の増加により酵素活性は上昇し 10^{-3}M でほぼ飽和した。L-NEでは促進効果は弱かった(Fig 7)。DAとの結合を著明に抑えたCatecholやIsoproterenolは全く効果を示さなかった(Fig 8)。ホモジネートでもミクロソームでもDA及びそのアナローグの効果は同じであった。EGTA (2×10^{-4}M) はDAを添加しない時の活性を約1/2に抑え、この条件下でDA (10^{-3}M) を添加すると酵素活性は倍加するが、EGTA無添加のものに比し減少傾向を示した(Fig 9)。即ち0.2mM EGTA存在下ではDA無添加の際の活性が抑制されているため計算上は2倍活性が上昇したことになるが、EGTAの抑制作用がDAにより回復したとも考えることが出来る。Adenylate Cyclase活性に対して Ca^{++} はDAの有無に拘らず著明な抑制効果を示した(Fig 10)。EGTAの抑制効果は Ca^{++} によっても回復せず、かえってEGTAと Ca^{++} の相加的抑制効果を示した。EGTA無添加の条件でEDTAを加えると 10^{-3}M で抑制効果がみられたが、これは Mg^{++} を除去した結果と考えられる(Tab 2)。EDTAは 10^{-6}M でDAとの結合に対して著明な抑制効果を示したが、この濃度では酵素活性には変化がなかった。尾状核のホモジネートにみられるDAにsensitiveなAdenylate Cyclaseが、従来薬理学的にしられているDA受容体と性質が似ていることから、DA sensitive Adenylate CyclaseがDA受容体であるとする報告[3]がある。しかしDopaminergic fiberがなくDAによる促進効果もないと考えられている小脳でもDA添加により尾状核や大脳皮質と同様に、ホモジネート、ミクロソームともに活性上昇の傾向がみられ、EGTA存在下のDAの効果は特異的なものとは考えにくい。またAdenylate Cyclaseが膜酵素としてNaFやdetergentでもかなり活性化されることからもDA受容体とAdenylate Cyclaseとは単純に結びつかず、Adenylate CyclaseのDAを介する神経伝達機構への直接的な関与に疑義がもたれた。

Tab.2

		Enzyme Activity p-mole/mg prot./m.	
		-Dopamine	+Dopamine
control		82.8	
+EDTA	10^{-4} M	96.9	127.4
	10^{-3} M	36.4	43.4
	2×10^{-3}	22.3	15.3
$-Mg^{++}$		13.1	

References:

1. Bilezikian J.P. & Aurbach G.D. (1973) J. biol. Chem. 248 5575-5583
2. Gilman A.G. (1970) Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A. 67 305-312
3. Kebabian J.W., Petzold G.L. & Greengard P. (1972) Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A. 69 2145-2149
4. Lefkowitz R.J., Sharp G.W.G. & Haber E. (1973) J. biol. Chem. 248 342-349
5. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) J. biol. Chem. 193 265-275
6. Scatchard G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 660-672

30 軟体動物巨大神経細胞の膜電位ならびに膜抵抗に対するGABAとその関連物質の効果

竹内 宏・横井 功・森 昭胤
高坂睦年
（岡大・医・脳代謝研）

〔要約〕

1．アフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) 食道下神経節中に固定される自発発火を有する巨大神経細胞 TAN(tonically autoactive neurone)は，GABAにより抑制される。TANの細胞内誘導電位を指標として，GABAとその関連物質合計40種類をbath applicationで与えてこれら物質の構造活性連関を求めた。

2．TANに対する抑制作用はGABAがもっとも強く，その臨界濃度は 10^{-5} g/ml であった。4-amino-3-hydroxy butanoic acid(GABOB), 4-amino-2-hydroxy butanoic acid (GAAOB), 5-amino pentanoic acidもTANに抑制作用を示したが，それはGABAより弱かった。他の被検物質は効果がなかった。

3．GABAおよびその効果を有する関連物質をmicrodrop applicationで与えて，その効果が，TAN神経膜に対する直接的な過分極作用であることを証明した。

4．3つのconvulsive alkaloid (strychnine, picrotoxin, bicuculline)は，GABAおよびGABOBのTANに対する抑制作用をblockしなかった。

5．神経膜抵抗測定のために，長周期三角波（過分極——脱分極——過分極）を細胞内に通電してcurrent voltage relationship (I—V curve)を測定した。GABAにより過分極した時のTANのI—V curveは，生理的状態のI—V curveにfiring levelを基準にして重ね合わせると，広いpolarizationの範囲でよく一致した。

No.	Name	Chemical Structure	Examined concentration (g/ml)	Effect on TAN
1	glycine(1)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH$	10^{-4}	(-)
2	β-alanine(1)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	〃
3	4-aminobutanoic acid(2) (GABA)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	10^{-5}	I
4	DL-2-aminobutanoic acid(1)	$H_3C \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$	10^{-4}	(-)
5	DL-3-aminobutanoic acid(3)	$H_3C \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	〃
6	DL-2-amino-iso-butanoic acid(3)	$(CH_3)_2 \cdot C(NH_2) \cdot COOH$	〃	〃
7	DL-3-amino-iso-butanoic acid(3)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(CH_3) \cdot COOH$	〃	〃
8	(3S)-(+)-4-amino-3-hydroxybutanoic acid(4) (d-GABOB)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	SI
9	(3R)-(-)-4-amino-3-hydroxybutanoic acid(4) (l-GABOB)	〃	〃	I
10	4-hydroxybutanoic acid(5) (GOBA)	$HO \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	(-)
11	DL-4-hydroxy-3-aminobutanoic acid(5) (DL-GOBAB)	$HO \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	〃
12	DL-4-amino-2-hydroxybutanoic acid(6) (DL-GAAOB)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$	〃	I
13	N-acetyl-4-aminobutanoic acid(6) (N-acetyl GABA)	$CH_3 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	(-)
14	2-oxo-pyrrolidine(3) (GABA lactam)	$HN \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO$	10^{-4}	(-)
15	DL-2-oxo-4-hydroxypyrrolidine(4) (DL-GABOB lactam)	$HN \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot CO$	〃	〃
16	4-aminobutanoic choline chloride(7) (GABA choline)	$[H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COO \cdot CH_2 \cdot N^+ \cdot (CH_3)_3]Cl^-$	〃	〃
17	4-amino-3-hydroxybutanoic choline chloride(6)	$[H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot COO \cdot CH_2 \cdot N^+ \cdot (CH_3)_3]Cl^-$	〃	〃
18	butanoic acid (8)	$H_3C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	〃
19	5-amino pentanoic acid(3)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	I
20	pentanoic acid(9)	$H_3C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	(-)
21	6-amino hexanoic acid(1)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	〃
22	7-amino heptanoic acid(3)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$	〃	〃
23	DL-3-amino-2-hydroxypropane sulfonic acid(5)	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$	2×10^{-4}	〃
24	DL-3-hydroxy-2-aminopropane sulfonic acid(5)	$HO \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$	〃	〃
25	DL-3-bromo-2-aminopropane sulfonic acid(5)	$Br \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot SO_3H$	〃	〃

GABA (4-amino butanoic acid) はまず甲殻類 Stretch receptor neurone に対する抑制作用により注目され(9), ついで哺乳動物神経系のいくつかの神経細胞で, putative inhibitory synaptic transmitterとして考えられている(2)(8)。GABOB (4-amino-3-hydroxy butanoic acid) は Hayashi(6) によりその哺乳動物における抗痙作用が主張された。軟体動物巨大神経細胞では Gerschanfeld たち (5) また Walkerたち (13) により, GABA の興奮作用が報告された。

私たちはアフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) の食道下神経節に固定した自発発火を有する巨大神経細胞 (TAN. tonically autoactive neurone) の細胞内誘導電位を指標として, これに対する GABA とその誘導体40種を bath application で与えて効果を測定し, これらの物質の構造活性連関を求めた。ついで GABA をはじめ効果を有する物質を microdrop 法で TANに与えて, 効果を観察した。さらに strychnine, bicuculline, picrotoxin が GABA 及び GABOBの抑制作用を抑えるかどうか検定した。最後に三角波の細胞内通電により current-voltage relation-ships (I—V curve) を測定し, それに対するGABA の作用を調べた。

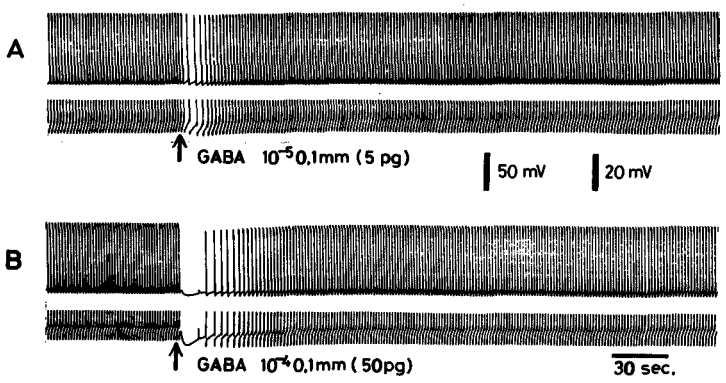
方　法

沖縄より空輸した Achatina fulica Férussac の食道下神経節を摘出し, 結合組織を除き, TAN (tonically autoactive neurone) を固定して, これにガラス毛細管微小電極を1本または2本 (I—V curve測定時) 細胞内に刺入した。TAN の biopotential は oscilloscope で観察し, またペン書き recticorder で直記した。自発発火数は spike counter(11) により, 自動的に毎分あたり記録された。被検物質は次の二方法により投与された。Bath application：被検物質をカタツムリ生理的溶液(10)に溶かして, 神経節に直接与えた。これは screening testに用いられた。microdrop application：ガラス毛細管の先端に直径100μm ほどの被検液の microdrop

26	DL-3-carboxy-2-aminopropane sulfonic acid(5)	$HOOC\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot CH_2\cdot SO_3H$	∮	∮
27	DL-sodium-3-amino-1-carboxypropane sulfonate(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CH(SO_3Na)\cdot COOH$	∮	∮
28	DL-3-amino-2-carboxypropane sulfonic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(COOH)\cdot CH_2\cdot SO_3H$	∮	∮
29	DL-1-amino-2-carboxypropane-2,3-disulfonic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SO_3H)\cdot CH_2\cdot SO_3H$	∮	∮
30	DL-2-aminopropane-1,3-disulfonic acid(5)	$HO_3S\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot CH_2\cdot SO_3H$	∮	∮
31	DL-1,3-diamino-2-sulfopropane(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SO_3H)\cdot CH_2\cdot NH_2$	∮	∮
32	DL-3,3'-dithio-bis-4-aminobutanoic acid(5)	$HOOC\cdot CH_2\cdot CH(CH_2\cdot NH_2)\cdot S\cdot S\cdot CH(CH_2\cdot NH_2)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
33	DL-4-amino-3-sulfonylbutanoic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SO_3H)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
34	DL-4-amino-3-phenylbutanoic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(C_6H_5)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
35	DL-4-amino-3-p-chlorophenylbutanoic acid(4)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(C_6H_4\cdot Cl)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
36	DL-4-amino-iso-hexanoic acid(5)	$(CH_3)_2\cdot C(NH_2)\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
37	DL-4-amino-3-methylthiobutanoic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SCH_3)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
38	DL-4-amino-3-ethylthiobutanoic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SC_2H_5)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
39	DL-4-amino-3-phenylthiobutanoic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SC_6H_5)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮
40	DL-4-amino-3-phenylsulfonylbutanoic acid(5)	$H_2N\cdot CH_2\cdot CH(SO_2C_6H_5)\cdot CH_2\cdot COOH$	∮	∮

第1表. GABA とその関連物質 (bath application) の TAN(tonically autoactive neurone) に対する効果。(−), 効果なし。I, 抑制効果。SI, 軽度な抑制効果。*, 効果を示すための臨界濃度。(1), 和光純薬。(2), 半一製薬。(3), 東京化成。(4), 小野薬品研究室より御恵与。(5), 科研化学研究室より御恵与。(6), われわれの研究室で合成。(7), 半一製薬研究室より御恵与。(8), 比山化学。(9), 半井化学。

をつくり, これをTAN表面に置いた。これにより物質の効果が, TAN神経膜に対し直接的なものであるかどうかを識別した。Current-Voltage relationship(I-V curve) 測定には2本の微小電極を細胞内に刺入し, その1本で TAN細胞膜を通して長周期三角波(12) (過分極 —— 脱分極, 2min/Cycle) を通電して測定した。この場合かならず通電された電流の強さを記録した。被検液の pH は 6.5～8.5 でありこの範囲内では pH の影響



第1図。 TAN自発発火に対するGABA (microdrop application)の効果。記録はペン書きrectigraphによる。各upper traceはfull spike記録。各lower traceはupper traceの高感度記録。この場合spike heightはvoltage slicerによりCutされた。A, GABA 10^{-5} (g/ml) 直径0.1mmのmicrodrop (GABA總量5pg)をTAN表面に滴下(矢印)。B, GABA 10^{-4}, 直径0.1mmのmicrodrop (GABA 50pg)と同様に滴下(矢印)。

はなかった。実験は23±1°Cでおこなわれた。

結果ならびに考察

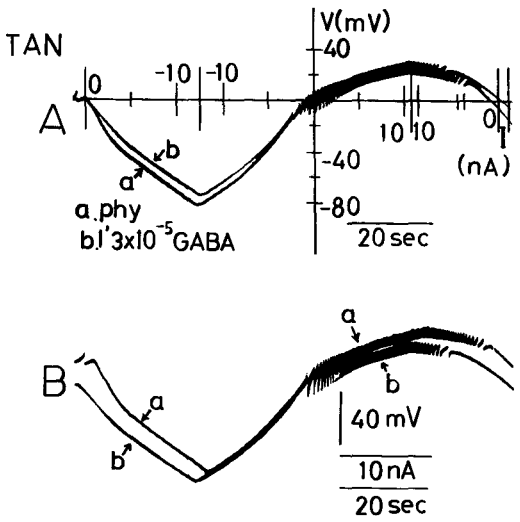
1. GABAとその関連物質のbath application。この実験結果を1表に要約した。試みに40物質のうち, TANに対してGABAの抑制作用がそつとも強かった。その臨界濃度は 10^{-5} g/ml程度であつた。ついで, (3R)-(-)-4-amino-3-hydroxy butanoic acid (1-GABOB), DL-4-amino-2-hydroxy butanoic acid, また5-amino pentanic acidも抑制作用を有するが, それはGABAよりも弱かつた(臨界濃度 10^{-4} g/ml)。d-GABOBの抑制作用は, 1-GABOBよりもさらに弱く, 不定であった。glycine, β-alanine, 4-hydroxy butanoic acid, 4-hydroxy-3-amino butanoic acid, N-acetyl GABA, GABA lactam (軟体動物神経節ではGABAの大部分はこの形で存在するという(4)) GABA choline(synaptic transmitterに想定する人がある(7)などは全くTANに作用を持たなかった。ある種のGABAの含硫誘導体が高等動物のmethionine sulfoximine痙攣を抑えるが, これらはTANにいかなる作用も持たなかった。

2. GABAとその関連物質のmicrodrop application。1図に見られるように, 總量5pgのGABAのmicrodrop applicationで, TANにはいくらかの過分極と, 自発発火spikeの頻度減少が見られる。50pgのGABA投与(同図B)では, 膜は明らかに過分極(10秒以上のsilent state)があらわれた。GABAによるこれらの変化は, すべてreversibleであった。これらの実験で, GABA投与によりsynaptic noiseが見られなかつたので, TANに対するGABAの抑制作用は, TAN神経膜に対する直接の過分極作用だと結論される。

3. Convulsine alcaloides (strychnine, picrotoxin, bicuculline)の同時投与。上記3物質のうち後2者は, ある細胞でGABAの抑制作用をblockすると報告されている(3)。私たちは, 10^{-4} g/mlのこれら3 alcaloidesが, 同濃度のGABAあるいはGABOBのTANに対する抑制作用をblockしないことを確認した。

4. TAN神経膜のI-V curveに対するGABAの作用。神経膜の電気抵抗はその polarizationによつて異なる(1)ので, この測定は広い polarizationにおけるもの, すなわち, I-V curveによらねばならない。2図は, 2つのI-V curve(a. 生理状態で測定。b, 3X10^{-5} g/ml GABA投与後1分に測定)を, initial level(通電直前の膜電位)を一致させて重ね合わせたものである。これで見ると, GABA投与により(b), 生理的状態の場合(a)よりも膜抵抗が減少し

ているように思われる。ところが同図面Bは，同じ2つのI—V curveをfiring levelを一致させて重ね合わせたものである。この場合depolarizing processに注目すると，I—V curveは広い範囲で一致する。故にGABAにより膜抵抗が変ったのではなく第2図Aのようにする GABAによるpolarizationの変化が膜抵抗変化を見せかけたのだと結論させる。



第2図。TAN神経膜のcurrent voltage relationship(I-V curve)に対するGABA(bath application)の影響。長周期三角波(過分極—脱分極—過分極，2min/cycle)の細胞内通電による。縦軸，膜電位のshift(mV)。横軸，与えられた電流の強さ(nA)。a.生理的状態におけるI—V curve。b，$3X10^{-5}$ g/ml GABA投与後1分のI—V curve，この場合，神経膜は過分極し，自発発火は停止した。A.2つのI—V curveをinitial level（膜通電の直前）を一致させて重ね合わせた。B.2つのI-V curveを，firing levelを一致させて重ね合わせた。

文　献

1) Arvanitaki, A. et al. (1967) C.R.Soc.Biol.(Paris) 161, 1629-1634.
2) Curtis, D.R. & Watkins, J.C. (1960) J.Neurochem. 6, 117-141.
3) Curtis, D.R. et al. (1970) Nature(Lond.) 226, 1222-1224.
4) Dolezalova, H. et al. (1973) Int.J.Neurosci. 5, 53-59.
5) Gerschenfeld,H.M. & Lasansky, A. (1964) Int.J.Neuropharmacol. 3, 301-314.
6) Hayashi, T. (1959) J.Physiol.(Lond.) 145, 570-578.
7) Howells, D.J. (1971) J.Pharm.Pharmacol. 23, 794-795.
8) Krnjević, K. & Schwartz, S. Nature(Lond.) 211, 1372-1374.
9) Kuffler, S.W. & Edwards, C. (1958) J.Neurophysiol. 21, 589-610.
10) Takeuchi, H. et al. (1973) C.R.Soc.Biol.(Paris) 167, 598-602.
11) Takeuchi, H. et al. (1974) C.R.Soc.Biol.(Paris) 168, 648-652.
12) Takeuchi, H. et al. C.R.Soc.Biol.(Paris) in press.
13) Walker, R.J. et al. (1971) Brain Research 33, 75-82.

31 動物体内における1－メチルヘプチル－γ－ブロモアセト酢酸の合成および動向について

柳沢　勇・山根基輝（東邦大・医・生化）
鳥居鎮夫・犬伏武生（東邦大・医・生理）

〔要約〕

先に柳沢らは人間の脳脊髄液から1-ナチルヘプチル-γ-ブロモアセト酢酸（γ-Brレ）を分離同定した。この度はネコおよびラットに1-^{14}C-酪酸を投与し30分後に各々の脳、血液、脳脊髄液を採取し、各組織からのエタノール抽出物を得、これにcarrierとして合成γ-Brレを加えるchemical trapping法によって精製分離したγ-Brレ中の^{14}C活性を追求し、またそのγ-Brレ分子内分布を調べた。1-^{14}C-酪酸の^{14}C活性は分離したγ-Brレの分子内に次の様に組み込まれた。

$$Br\,CH_2\overset{C.P.m.\ 0.26}{{}^{14}CO}\,CH_2\overset{C.P.m.\ 1.00}{{}^{14}CO}\,O\text{-}R$$

この結果から酪酸からその炭素骨格を崩さずにγ-Brレに合成される系の存在が推定される。また投与された^{14}C-酪酸の比放射能から計算されるγ-Brレ量はネコでは脳脊髄液中10～38 μg/ml、血液中0.002 μg/ml、脳（全体）では0.0004 μg/g、ラットで血液中0.034 μg/ml、脳では0.0069 μg/gであった（但しendogeniousの酪酸は計算していない）。また有機合成した$Br CH_2{}^{14}CO\,CH_2\,COO\text{-}R$を用いた実験ではγ-Brレは血液中から脳脊髄液中には移行するが、この反対方向には移行しなかった。前の実験と合せて考えるに、γ-Brレは血液中から脳脊髄液中に蓄積される様に思われる。

柳澤ら(1)は先に人間の脳脊髄液から臭素を含む化合物として1-ナチルヘプチル-γ-ブロモアセト酢酸（γ-Brレ）を分離同定した。次いで鳥居ら(2)はネコを用いた実験で、本化合物は0.0003 m mol/kgの静脈内投与で逆説睡眠誘発作用を有することを明らかにした。これより以前に生理的生体成分であって逆説睡眠を誘発する物質として低級脂酸、特に酪酸およびγ-ハイドロオキシ酪酸が知られている。しかし、これら低級脂酸の投与量は1.0 m mol/kgでγ-Brレに比して大量である。演者らはγ-Brレのγ-ブロモアセト酢酸部分と酪酸との構造上から生体内に於ける代謝関連性に着目して1-^{14}C-酪酸をネコおよびラットに投与してγ-Brレへの取込みを観察し得たことと併に、γ-Brレがネコおよびラットの体内にも存在することを明らかにし得たと思われるので報告する。

代表的実験例について記すれば、ネコ（2.5 kg）に1-^{14}C-酪酸ソーダの4ミリキユーリー（carrier 20 mg）を5 mlの生理的食塩水に溶解して腹腔内注入して30分後に、血液（120 ml）、脳（23.3 g）、脳脊髄液（3 ml）を採取し、脳は最小限の水を加えてホモジネートとし、他はそのままで各々に数倍量の冷エタノールを加え、同時にtrappingのcarrierとして合成γ-Brレ(1)を0.1～0.3 mlずつ加えてよく攪拌してから沪液をとり、低温減圧下で大部分の溶媒を溜去し、次いで凍結乾燥してからクロロホルム抽出を行う。クロロホルム抽出物はシリカゲルを用いて第1次カラムクロマトグラフィーをクロロホルムで展開し、γ-Brレの存在部分を$FeCl_3$反応でチエックし、その部分を集めてアルミナ或はシリカの薄層クロマトグラフィーをクロロホルム又は、四塩化炭素、或は両者の混合溶媒で展開してγ-Brレのケト型およびエノール型(1)とに分離し、各々を更にシリカの第3次クロマトグラフィーにかけてγ-Brレの精製を行なった。

Fig. 1 PRIMARY CHROMATOGRAPHY
(SiO_2 COLUMN)

Column size ; 12 X 90 mm
Developed by CCl_4 and $CHCl_3$

▲——▲ d.p.m.
○----○ Ferric chloride

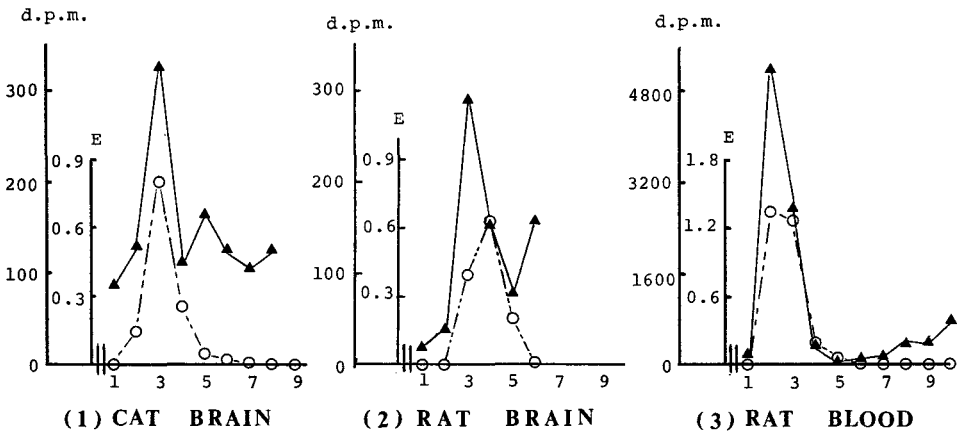


Fig. 2 SECONDARY CHROMATOGRAPHY
(THIN LAYER)
($CHCl_3$: CCl_4 = 1 : 2)

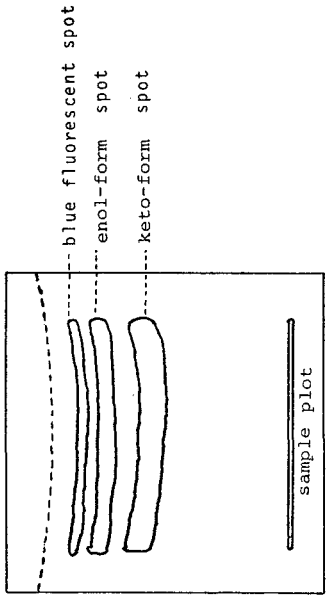


Fig. 3 THIRD CHROMATOGRAPHY
(SiO_2 COLUMN)
Column size ; 12 X 90 mm
CCl_4 and $CHCl_3$

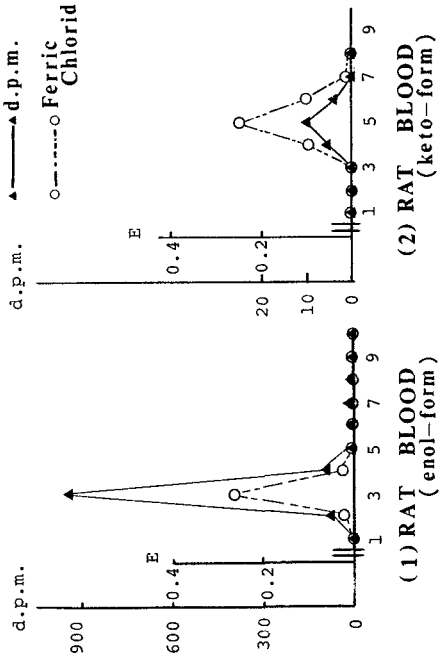
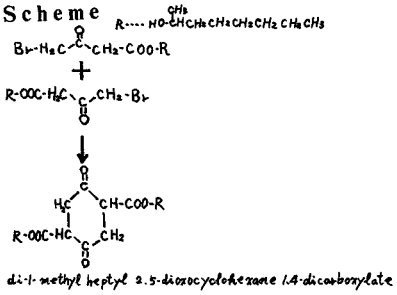


Fig. 1 は第一次カラムクロマトグラフを示す。この図にみる如く放射活性ピークとγ-Brの比色ピークとは完全には一致しない。その原因はγ-Brのケト型とエノール型との存在により、合成γ-Brでは後者は前者の十分の一位であり、エノール型が先に流出しケト型が後に続くがカラムクロマトでは両者の完全分離は難しい。これに対して生体内に存在する極微量の溶液状態でのγ-Brは殆どがエノール型として存在するらしく、この為に放射活性ピークと比色ピークとの不一致を来す如くである。すなわち、一次クロマトのピーク部分を集めて、これをさらにFig. 2に示す如く薄層クロマトにかけてエノール型とケト型とに分離することによって精製は完成する。Fig. 3はFig. 1-(3)に示すラット血液の一次クロマトのピーク部分を二次薄層クロマトにかけてエノール型およびケト型に分離したものを更に三次クロマトでチェックしたものである。二次薄層クロマトで分離抽出後の $FeCl_3$ 反応物の比色吸光度1.0当りの比放射能はエノール型で3630 d.p.m.，ケト型で44 d.p.m.であるが三次クロマト後には前者，3648 d.p.m.，後者で42 d.p.m.で変化がなく，且つ、三次クロマトの放射活性ピークと比色活性ピークは良く一致する。この比放射能は更に精製しても変化はなり。他のサンプルも同様にして二次薄層クロマトによってエノール型およびケト型に分離して実験を行った。

γ-Brのピークと一致した ^{14}C 活性物質がたしかにγ-Brの構造を有しているかどうかを確かめる為に更に次の実験を行なった。γ-Brは Scheme に示す様にその2分子から2HBrがとれてcyclohexane体を生ずる。この反応は有機溶媒中でも水溶液中でも自然に進行する。

Scheme



di-1-methyl heptyl 2.5-dioxocyclohexane 1.4-dicarboxylate

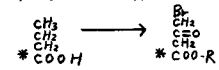
Table 1 は Fig. 3 の如くに精製したγ-Brのピーク部分からcyclohexane体を生ぜしめ、この中に ^{14}C 活性の物行することを証明したものである。cyclohexane体の分離法は前報(1)による。

さらに分離精製した ^{14}C-γ-Brについて ^{14}C 活性の分子内分布を調べた。Fig. 3 に示す様に精製分離したγ-Brのサンプルは溶媒除去後に 1 N. KOH 4 ml、ナフトール 2 ml と共に室温18時間放置してエステルを水解してからエーテル抽出を2～3回行なって未水解γ-Brを除去する。この際、未水解部分の除去を完全にする為に non labeled のγ-Br 0.1 ml を抽出除去の為の carrier として加える。残ったアルカリ性水層に水 60 ml、50 % H_2SO_4 の 1 ml、4N. H_2SO_4 に 10% 濃度で溶解した $HgSO_4$ の 14 ml を加えてバーナー上で沸騰させながら N_2 ガスを通じてγ-ブロモアセト酢酸の1位の炭素を CO_2 として遊離させて定量的にアルカリに捕捉した。$Br.CH_2CO.CH_3$ 部分は Hg 塩として定量的に沈澱す

Table 1

	the bromo-ester ⟶	the cyclic compound
Cat's sample	6760 d.p.m. room temp. 10 days in methanol	1344 d.p.m.
Rat's sample	31000 d.p.m. 18 hours in 1N KOH room temp.	1414 d.p.m.

るので、これを分取してクロム酸酸化してCO₂化してアルカリに捕捉し、各々について^{14}C活性を求めた。結果はTable 2に示す如く、1-^{14}C-酪酸の^{14}C活性の大部分がγ-ブロモアセト酢酸の1位の炭素に取込まれることを示すものである。このことは生体内に、



なる合成系の存在を示唆するものと考えられる。

Table 2 $BrCH_2COCH_2COOH$

1-N H_2SO_4
2 % $HgSO_4$
Reflux

	$(BrCH_2COCH_3)\cdot Hg$	CO_2	$\frac{(BrCH_2COCH_3)\cdot Hg}{CO_2}$
Rat No;1	65 d.p.m.	132 d.p.m.	0.49 / 1.00
Rat No;2	43 d.p.m.	166 d.p.m.	0.26 / 1.00

また1-^{14}C-酪酸の比放射能から計算したネコおよびラット体内のγ-Brの含有量はネコの脳脊髄液中10～38 μg/ml、脳中0.0004 μg/g血中0.002 μg/ml、ラットでは脳中0.0069 μg/g、血中0.034 μg/mlであった。但し、これらの算出には endogenious の酪酸量は計算していない。

有機合成した1-ナタルヘプタル-3-^{14}C-γ-ブロモアセト酢酸(3)を用いた実験ではγ-Brは血中から髄液中には移行するが、その反対方向には移行しない様である。

以上の実験結果から、人間の脳脊髄液中に存在するγ-Brがネコおよびラットの体内にも存在すること、および、これが酪酸から合成される系が存在するであろうことが推定されるに致った。但し、ネコおよびラットの場合にγ-Brのアルコール部分が1-ナタルヘプタノールであるかどうかについては、同一か或は非常に近似のものであろうと考えられるが同定を終っていない。

References

1. Yanagisawa, I. and Yoshikawa, H. A bromine compound isolated from human cerebrospinal fluid. Biochim. Biophys. Acta 379 : 283～294, 1973.
2. Torii, S., Mitsumori, K., Inubushi, S. and Yanagisawa, I. The REM sleep-inducing action of a naturally occurring organic bromine compound in the Encéphale isolé cat. Psychopharmacologia 29 : 65～75, 1973.
3. Yanagisawa, I. and Amano, H. Synthesis of 1-methylheptyl-γ-bromoacetoacetate-3-^{14}C. J. Med. Soc. Toho 21 : 476～477, 1974.

32 脳のtryptophan—oxalacetate transaminaseの精製，性質および同定

湊川洋介・野口知雄・城戸亮
（和医大・病生化）

〔要約〕

ラット脳の抽出液から，Tryptophan-oxalacetate transaminaseの精製と性質の検討を行った。その結果，等電点(pI) 6.2とpI 9.4の二種のTryptophan-oxalacetate transaminaseが存在することを認めた。pI 9.4 酵素は等電点，分子量，基質特異性及び電気泳動パターンからミトコンドリア型のAspartate-2-oxoglutarate transaminase (M-GOT)(Aromatic Amino Acid-2-oxoglutarate transaminase) と同定した。一方 pI 6.2 酵素は至適pHが8.0であり，L-Tryptophan, L-5-Hydroxytryptophan 及び L-Tyrosineの他に L-Aspartate に対しても高い活性を示し，L-Phenylalanine, L-Histidine には殆んど作用しなかった。本酵素のTryptophan-oxalacetate transaminase 活性が L-Glutamic acidによって強く阻害を受けること，さらに，Tryptophan-oxalacetate transaminase活性が等電点分画，及びDisc 電気泳動において，Aspartate-2-oxoglutarate transaminase (GOT) と同一挙動を示すことから，脳のpI 6.2 酵素は，おそらくは可溶画分型のGOT (S-GOT)と同一の酵素であると考えられる。

脳のAromatic amino acid transaminaseに関する研究はCatechol aminesやIndole aminesの生合成とその調節機構を解明するにあたって，重要な課題である(3)。Tangen(9)らはラット脳にはTyrosine, Phenylalanineに高い活性を示すTransaminase Ⅱ(2-Oxoglutarateに高い活性を示す)，Tryptophan, 5-Hydroxytryptophanに高い活性を示すTransaminase Ⅲ(Oxalacetateに高い活性を示す)，そしてDOPAに高い活性を示すTransaminase Ⅰ(2-Oxoglutarateに高い活性を示す)の少くとも三種のAromatic amino acid transaminaseが存在することを報告している。最近我々はラット脳のミトコンドリアからAromatic amino acidsに対して広い基質特異性を示すいわゆるAromatic amino acid-2-Oxoglutarate transaminaseを電気泳動的にほぼ単一まで精製し，この酵素がM-GOTと同一であることをすでに報告した(5,6)。又，本酵素はラットの脳，腸，肝にも存在することを見出している(8)。今回我々はラットの脳から5-Hydroxytryptophan, Tryptophanに高い活性を示し，Oxalacetateを最もよいamino acceptorとするTransaminaseを精製し，その性質について検討したので報告する。

実験方法

活性測定法－Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan, Tyrosine, Phenylalanine, Histidineのアミノ基転移反応の活性はGeorgeらの方法(2)により，又GOT活性はNisonoffらの方法(4)に従って測定した。反応液はいずれも6.5mM L-Amino acid, 5mM α-Keto acid, 40 μM Pyridoxal-5'-phosphate および0.1M 燐酸カリ緩衝液 pH8.07を含んでいた。

Tryptophan-oxalacetate transaminaseの精製－以下の操作は0-4℃で行い，緩衝液は燐酸カリ緩衝液pH8.07を用いた。

①脳抽出液の調製－80匹のDonryu系雄性ラット(60-80g)の脳(127.5g)を3倍量の5mM

緩衝液でホモジネートし，ついで，これを10 K cycleで5分間超音波処理を行い，10万Gで30分遠沈し，その上清を脳抽出液とした。

㊀ DEAE-cellulose クロマトグラフィー ― 脳抽出液を5 mM 緩衝液で平衡化したDEAE-celluloseのカラム(6×20 cm)に吸着させ，5 mM 緩衝液で溶出した。さらに上記操作を二度繰り返し，活性画分を集め，ダイアフィルターを用いて5 mlまで濃縮した。

㊁ First Sephadex G-150 クロマトグラフィー ― 200 μMのPridoxal-5'-phosphate を含む50 mM緩衝液(pH 7.5)で平衡化したSephadex G-150 (2.5×100 cm)に上記酵素液を10万Gで30分遠沈した後に吸着させ，同一緩衝液で溶出し，3 mlずつ分画した。活性画分(tubes 66-102)を集めダイアフィルターを用いて4 mlまで濃縮した。

㊂ 等電点分画 ― pH 3.5～10の範囲のアンフオラインを用い，Sucrose gradient 中で最終600 V で上記酵素液を等電点分画した。40時間後通電を止め，酸性側から2 mlずつ分画溶出を行った。pH 6.2 と 9.4 にピークを有する二種のTryptophan-oxalacetate transaminaseの活性パターンが得られ(図1)，各々はsymmetricな溶出パターンであった。又，GOT活性も全く一致した。pI 9.4 酵素は先に報告した(5,6) いわゆるAromatic amino acid transaminase (M-GOT)と同じ性質を有した。pI 6.2 酵素は直ちにダイアフィルターで3.75 mlに濃縮した。

㊃ Second Sephadex G-150 ― 濃縮したpI 6.2 酵素を上記の方法でSephadex G-150 (2.5×100 cm)にかけ活性画分(tubes 80-98)を得た。この画分を1.6 mlまで濃縮し，以下の諸性質を明らかにした。

㊄ ポリアクリルアミドDisc電気泳動 ― Davis (1) の方法に従い7% polyacrylamide，Tris-glycyn buffer pH 8.9，0.5×7.0 cm のガラスカラムを用い，2 mA/tubeで電気泳動を行った。泳動後直ちに4 mmの厚さに横方向に切断し，各切片を反応液に浸し，Tryptophan-oxalacetate transaminase及びGOT活性を測定した(図2)。

結果と考察

表1にTryptophan-oxalacetate transaminaseの精製の結果を示している。First Sephadex G-150まではほぼ100%の収量で約124倍精製された。等電点分画ではTryptophan-oxalacetate transaminaseは二種の活性ピーク(pI 6.2 と pI 9.4)に分離し，GOTと同一の活性

表1. Purification of tryptophan-oxalacetate transaminase from rat brain

Fraction	Protein	Specific activity	Total activity	Purification rate	Recovery
	mg	μmoles/h·mg	μmoles/h		%
Homogenate	10555	0.10	103.2	1	100
Extract	3723	0.024	89.0	2.4	86
First DEAE-cellulose	2604	0.035	90.5	3.6	88
Second DEAE-cellulose	1133	0.082	92.4	8.3	90
Third DEAE-cellulose	342	0.393	134.2	40.2	130
First Sephadex G-150	79.6	1.213	96.5	124.0	94
Isoelectric focusing pI 6.2	——	——	18.3	——	17.7
Isoelectric focusing pI 9.4	——	——	17.5	——	17.1
Second Sephadex G-150	5.81	2.667	15.4	272.7	15.0

パターンを示した(図1). pI 9.4 酵素は等電点，電気泳動パターンがM-GOTと同一であり，広い基質特異性を示し，Aspartateによって強く阻害を受けることからM-GOTであると同定した。pI 6.2 酵素は最終的に15%の収量で273倍精製された。本酵素の至適pHは8.0であり，広い基質特異性を示した(表2). L-Aspartate >> L-5-Hydroxytryptophan > Tryptophan > Tyrosine の順で活性を示し，L-Phenylalanine, L-Histidine にはほとんど作用しなかった。Amino acceptor として Oxalacetate に対して最も高い活性を示し，2-Oxoglutarate にも活性を示したが，Pyruvate にはほとんど作用しなかった(Oxalacetate : 2-Oxoglutarate : Pyruvate = 1 : 0.7 : 0.16)。本酵素の Tryptophan-oxalacetate transaminase 活性(Tryptophan濃度 6.5 mM) は 6.5 mM の Glutamate によって 52%阻害された。さらに本酵素活性は Polyacrylamide disc gel electrophoresis (pH 8.9, 7% gel) において陽極側に易動し，その泳動パターンはGOT活性と全く一致した(図2)，又，本酵素の Tryptophan-oxalacetate transaminase活性と，GOT活性の比は電気泳動後も同じであった。

図1. Isoelectric focusing profile of active fraction from a first Sephadex G-150 column.

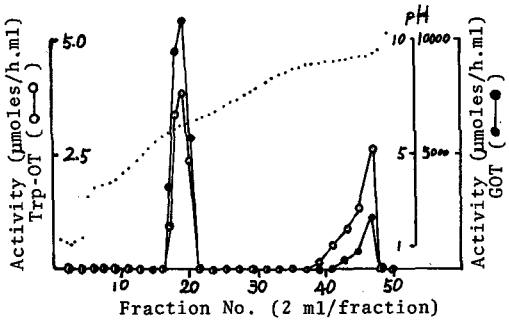
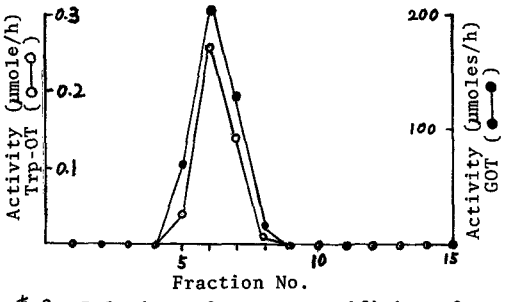


図2. Disc gel electrophoresis of active fraction from second Sephadex G-150 column.



以上のように pI 6.2 酵素が幅広い基質特異性を示し，L-Glutamate によって阻害を受けること，電気泳動パターン，及び等電点分画パターンがGOTと同一であること，又さらにM-GOTとは全く異った性質を示すことから，本酵素はおそらくはS-GOTであると考えられる。

以上のように脳の Aromatic amino acid のアミノ基転移反応がM-GOT(5,6)，あるいはS-GOTによって触媒されることから，これまで行われてきた脳の Aromatic amino acid transaminase に関する研究は再検討されなければならないと考えられる。

表2. Relative substrate specificity of tryptophan-oxalacetate transaminase with an isoelectric point of pH 6.2

	Relative activity (%)		
L-Amino acid	Oxalacetate	2-Oxoglutarate	Pyruvate
Tryptophan	100	100	100
5-Hydroxytryptophan	234	109	31
Tyrosine	61	49	149
Phenylalanine	2	15	44
Histidine	0	9	25
Aspartic acid	—	22026	—

文 献

1. Davis, B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 4040
2. George, H., Turner, R. and Gabay, S. (1967) J. Neurochem. 14, 841
3. 湊川洋介, 野口知雄, 城戸 亮 (1973) 臨床化学シンポジウム 13, 2
4. Nisonoff, A. and Barnes, Jr.F.W. (1952) J. Biol. Chem. 199, 713
5. Noguchi, T., Nakatani, M., Minatogawa, Y., Okuno, E. and Kido, R. J. Neurochem. in press
6. 野口知雄, 中谷正輝, 湊川洋介, 奥野悦生, 城戸 亮 (1974) 神経化学 13, 178
7. Noguchi, T., Nakatani, M., Minatogawa, Y., Okuno, E., Morimoto, M. and Kido, R. Biochem. J. in press
8. Okuno, E., Minatogawa, Y., Noguchi, T. and Kido, R. (1975) Life Sci. 16, 883
9. Tangen, O., Fonnum, F. and Haavaldsen, R. (1965) Biochim. Biophys. Acta 96, 82

33 中枢神経系における可溶性アセチルーCoA加水分解酵素の性質について

松田友宏・米原典史・吉田博
（阪大・医・1薬理）

〔要約〕

ラット脳の可溶性分画（S_3 分画）並びに神経終末内可溶性分画（O分画）におけるアセチル－CoA加水分解酵素（acetyl-CoA hydrolase, EC 3.1.2.1）活性について性質を比較検討した。S_3 分画の活性は 0.1％～1％ Triton X-100 で約50％阻害を受けるが、O分画の活性阻害は約10％であった。硫安画分では S_3 分画の活性は100％以上が0～55％飽和に回収されるのに対し、O分画の活性は約40％が回収されるのみであった。S_3 分画並びにO分画の0～80％硫安分画のセファデックスG-200カラムクロマトグラフィの結果、S_3 分画では活性の2つの大きなピークと1つの肩（分子量の大なるものから I, II, III と名付けた）が出現するが、O分画ではピークIIのみが認められた。これらのピークの本酵素活性に対するTriton X-100の阻害効果を調べると、ピークI活性の阻害がもっとも強く、50％阻害濃度は約0.08％であるのに対し、他のピークの活性の阻害は弱く、50％阻害濃度はその5～10倍も高い。以上の結果はラット脳可溶性分画には分子量あるいはTriton阻害に対する感受性の異なる2～3のアセチル－CoA加水分解酵素が存在し、神経終末部にはそのうちの1つが軸索輸送されて来ることを示唆するものである。

序論

アセチル－CoA加水分解酵素はアセチル－CoAを水解し、酢酸とCoAを形成する反応を触媒する。従って本酵素活性は組織のアセチル－CoAレベルを低下させ、CoA濃度を上昇させ、[アセチル－CoA]／[CoA]比を低下させる。一方、コリンアセチルトランスフェラーゼはアセチル－CoAを基質とするとともに、CoAにより著しく強く阻害され（K_i = 7～20 μM）、且つ[アセチル－CoA]／[CoA]比の低下により質量作用によりアセチルコリン合成方向が抑制される（2, 7, 8）。

従来我々はアセチル－CoA加水分解酵素は中枢神経系において広範に分布しており、可溶性分画にも顆粒分画にも存在することを報告した（4）。また神経終末部において高イオン強度下ではコリンアセチルトランスフェラーゼが顆粒結合型から可溶型に移行するのに対し、本酵素は移行性を示さないことから、本酵素のアセチルコリン合成抑制効果は局所のイオン強度の変化により変調される可能性があることを示した（5）。本酵素の顆粒結合型の脱顆粒現象の研究中、可溶型にもTriton X-100に対して感受性の異なる活性があることを見出したが（6）、今回はこの可溶型の本酵素活性について2・3の性質について検討したので報告する。

実験方法

ラット脳の細胞内分画はWhittakerらの方法に順じて行った（9）。アセチル－CoA加水分解酵素活性の測定はアセチル－CoA（1 mM）から形成されるCoAをEllman試薬で定量した（1）。硫安分画は常法に順った。但しpHの変化を少くするため、硫安分画に先立ち酵素溶液（0.6～2.7 mg/ml）にリン酸緩衝液（P.H 7.0）を添加し、0.1N NH_4OH

でpHを調整した(10)。セファデックスG-200カラム(2.2×100 cm)のゲル沪過には緩衝液として50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0), 0.1 M KClを用いた(溶出速度: 15 ml/hr., 分画容量4.8 ml)。Triton X-100による本酵素活性の阻害実験にはTritonと酵素を0°C, 90分インキュベートした後、基質を加え反応を開始した。蛋白質の定量はLowryらの方法によった(3)。

実験結果

1 S_3分画並びに0分画の硫安画分

結果は表1a, bに要約した。本酵素活性はS_3分画では0～55%飽和に100%以上回収されるにもかかわらず、0分画では約40%が回収されるのみである。各硫安分画の本酵素活性に及ぼすTriton X-100の阻害効果は表2a, bに示したように0～55%飽和では約50～70%阻害をうけるが、55%飽和以上では約10～40%阻害をうけるのみである。S_3分画の各硫安分画の方がTritonにより阻害されやすい(表2a)。活性回収率はS_3分画:約130%, 0分画: 75%。

2. S_3分画並びに0分画の0～80%硫安分画のゲル沪過

ゲル沪過の溶出像を夫々図1A, Bに示した。本酵素活性はS_3分画では2つの著明なピークと1つの肩(分子量の大きいものから、I, II, IIIと名付けた)が認められるが、0分画ではピークIIのみが著明である。ブルーデキストラン(MW 2×10^6), コリンアセチルトランスフェラーゼ(MW 65,000)のピークは図1のフラクションNo 23, 43に夫々出現した。活性回収率はS_3, 0分画で夫々約110%, 70%であった。

3. 各活性ピークのTriton X-100による阻害度の比較

ゲル沪過で得られた各ピークの本酵素活性に対するTriton X-100の阻害効果を濃度0.05%～1%の範囲で調べた。図2に示したようにピークIの活性はTriton X-100に対する感受性が高く、50%阻害濃度(I_{50})は0.08%(Triton X-100の平均分子量を632とすると, 1.3 μM)である。他のピークの活性のTritonに対する感受性は低く、ピークII, IIIではI_{50}が夫々0.72%, 0.38%であった。なおTriton X-100による阻害実験に用いた蛋白量はピークI, II, IIIでは夫々1.80, 0.26, 0.52 mg/tubeであり、本酵素活性は夫々3.81, 2.08, 1.15 n moles/min/tubeであった。

考察

ラット脳の可溶性分画(S_3分画)には分子量あるいはTriton X-100による阻害の感受性の異なる2～3のアセチル-CoA加水分解酵素があると考えられる。分子量はピークI < 2×10^6, ピークII > 65,000である。S_3分画の硫安分画操作あるいはゲル沪過の回収率は常に100以上であり、S_3分画に本酵素活性を抑制する物質があることを暗示している。神経終末内可溶性分画(0分画)では活性ピークIIのみが認められることから、可溶性分画中の複数の活性ピークの1つだけがニューロンの細胞体から神経終末部へ軸索輸送されるものと推測される。Triton X-100による阻害の生理的に意味するところは不明であるが、有効濃度が極めて低いことから生体内にある生理的界面活性物質の作用を反映しているものと思われる。

Table 1 Ammonium sulphate fractionation of acetyl-CoA hydrolase in the soluble fractions from rat brain

	Fraction	Acetyl-CoA hydrolase		Protein Recovery (%)
		Specific Activity (n moles/min/mg of protein)	Recovery (%)	
a	Cytoplasmic soluble fraction (S_3)	3.18 ± 0.82	100	100
	Ammonium sulphate fraction			
	0 - 55 %	5.33 ± 1.5	121.3 ± 5.5	73.6 ± 1.18
	55 % ~	1.47 ± 0.54	12.6 ± 2.5	29.8 ± 0.25
b	Intraterminal soluble fraction (O)	2.31	100	100
	Ammonium sulphate fraction			
	0 - 55 %	1.81	40.7	50.3
	55 % ~	2.32	34.0	33.9

Table 2 Inhibitory effects of Triton X-100 on acetyl-CoA hydrolase in the ammonium sulphate fractions

		Triton X-100		
		0.1 %	0.5 %	1.0 %
a	Cytoplasmic soluble fraction (S_3)	46	47	48
	Ammonium sulphate fraction			
	0 - 55 %	66	69	69
	55 % ~	23	25	43
b	Intraterminal soluble fraction (O)	13	6	8
	Ammonium sulphate fraction			
	0 - 55 %	50		
	55 % ~	13		

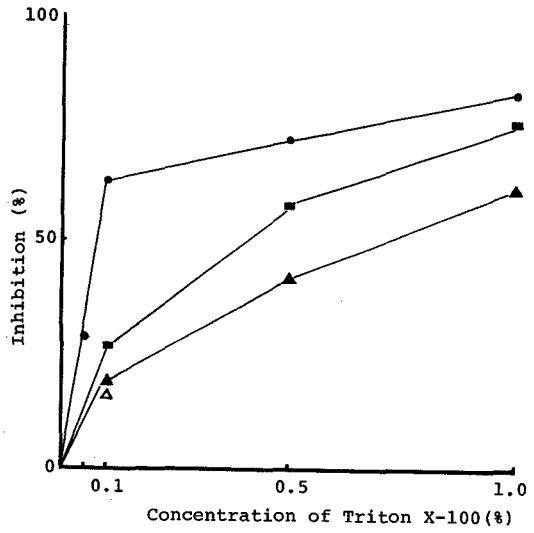


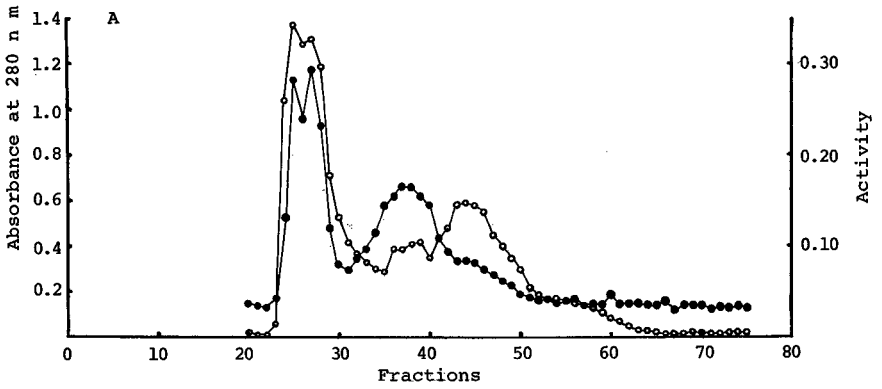
Fig. 2 Inhibitory effect of Triton X-100 on the activities of acetyl-CoA hydrolase in the three active fractions from gel filtration on Sephadex G-200.
●, ▲, ■: peak I, II, III from Fig. 1, A (cytoplasmic soluble fraction, respectively ; △: peak II from Fig. 1,B.

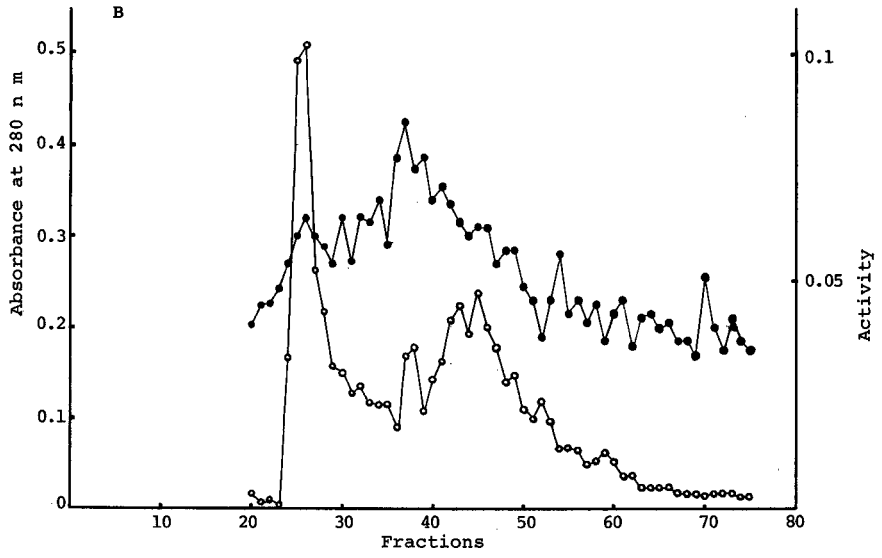
References

1) ELLMAN,G.L.(1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77
2) GLOVER, V.A.S. and POTTER, L.T. (1971) J. Neurochem. 18, 571 - 580
3) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
4) MATSUDA, T. and YOSHIDA, H. (1973) Shinkeikagaku, 12, 48 - 51
5) MATSUDA, T. and YOSHIDA, H. (1975) 6th International Congress of Pharmacology, Helsinki, Finland
6) MATSUDA, T. and YOSHIDA, H. (1975) Abstracts 48th Japanese Congress of Pharmacology, p 167, Kobe, Japan
7) WHITE, H.L. and CAVALLITO, C.J. (1970) Biochim. Biophys. Acta 206, 343 - 358
8) WHITE, H.J. and WU, J.C. (1973) J. Neurochem. 20, 297 - 307
9) WHITTAKER, V.R., MICHAELSON, I.A. and KIRKLAND, R.J.A. (1964) Biochem. J. 90, 293 - 303

Fig. 1 Gel filtration of acetyl-CoA hydrolase on Sephadex G-200 column. A : the ammonium sulphate fraction (0 - 80 %) of the cytoplasmic soluble fraction (fraction S_3); B : that of the intraterminal soluble fraction (fraction O); ● : acetyl-CoA hydrolase activity; ○ : absorbance at 280 n m.

10) WU, J.Y., MATSUDA, T. and ROBERTS, E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3029 - 3034





34 ビリルビン毒性に関する研究Ⅱ. 幼若ラット脳の解糖系におよぼす影響

仙波 りつ子・丹羽 富士子・柏俣 重夫
（愛知コロニー・発達障害研・生化）

〔要約〕

ビリルビン(Bil)脳障害の生化学的検索のひとつとして我々は脳の糖質代謝に及ぼすBilの影響を調べてきたが，これまでにGunnラットを用いたin vivoの実験系では少なくともTCA cycleの代謝産物およびヌクレオチドのレベルにはprimaryな影響がみられないことを報告している。[2,9] この際に観察されたピルビン酸減少の一要因として解糖系のBil阻害を考えin vivoでの検討を行った。未処置の15日目のGunnラットの解糖系物質のレベルの比較から，j/jラットではPFKのBil阻害を示唆する結果を得た。さらに血中BilのDisplacerであるノボビオシン(NB)投与によって脳内ビリルビン値を上昇させるとGlcのとりこみ，GAPDH活性の阻害も観察された。次にin vitroの系で解糖活性と解糖系のKey Enzymeである2~3の酵素系に対するBil の影響を調べた結果，解糖活性は2mM Glc存在下ではすべてのNAD濃度で阻害されたが，0.15mM Glc存在下では10μM以下でのみ顕著な阻害がみられたのに対し10μM以上では阻害されにくくなった。またFDPを基質として乳酸生成を検討した結果もBil阻害が観察された。解糖系Key EnzymeではPFK活性はATP, F6Pともに生理濃度で阻害されたのに対し，HK, GAPDH活性は低基質濃度(HKではATP, Glc, GAPDHではNAD)でのみ阻害され，PKに関しては全く阻害されなかった。以上のin vivo, in vitroの結果はBil脳障害の際には解糖系の障害が起りうることを示唆している。

実験方法

15日目のGunnラット(j/j, j/+)およびWistar系ラットを使用した。解糖系物質の調製と測定は次のように行った。200mg/kg NBを腹腔内に投与一時間後にwhole bodyを液体窒素により凍結し全脳を取り出し-80°Cに保存した。脳を-20°Cに戻し桑島[10]らの方法を少し改良して調製した。すなわち，アルミ箔に包んだ脳を-20°Cにおいて木づちで砕き乳鉢に移したのち，2ml の0.1N HClを含むメタノール溶液で1gの脳をペースト状になるまでホモゲナイズした。その後ペーストを4°Cに戻し6% PCAを脳1gに対して5ml加えてよく撹拌しさらにガラスホモゲナイザーでホモゲナイズした。ホモジェネイトを28,000×g, 15min遠沈し，その上清を0.5Mトリエタノールアミンを含む3N炭酸カリウムでpH6.5に調整し，沈殿物($KClO_4$)を1,000×g, 10min遠沈して取り除き，その上清を試料とした。グルコース(Glc)[4], グルコース6リン酸(G6P)[5], フラクトース6リン酸(F6P)[5], フラクトース1.6ジリン酸(FDP)[2], グリセロアルデヒド3リン酸(GAP), ジハイドロオキシアセトンリン酸(DAP)[2], ピルビン酸(Pyr)[1], 乳酸(Lac)[4]は酵素法により340mmのNADHおよびNADPHの増減から求め，グリセリン3リン酸(3PG)[11], グリセリン2リン酸(2PG)[11], ホスホエノールピルビン酸(PEP)[11], は同じく酵素法によりNADHのケイ光の増減から求めた。解糖系酵素標品の調製は0.25Mショ糖でホモゲナイズ後，10,5000×g, 30minの上清を20mMリン酸緩衝液pH7.4で平衡に達したSephadex G-25に通して行った。但しホスホフラクトキナーゼ(PFK)標品の場合には上記のすべての過程に1mM EDTAおよび1mM塩化マグネシウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液pH8.0を用いた。解糖活性の測定はGlazer & Weber[3]の方法を改良した。すなわち30mMリン酸緩衝液pH7.4,

30mMグリシルグリシン緩衝液pH7.4, 0.6mMATP, 1.2mMMgSO4, 600μMNAD, 2mMGlcを含むmediumで反応は直線性のある範囲内(15min)で行い、生成した乳酸はHohorst[6]の方法により測定した。ヘキソキナーゼ(HK)[7], PFK[5], グリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)[4]およびピルビン酸キナーゼ(PK)[3]活性はJoshi, Sols, Velick, Bücherの方法に従ってそれぞれ行った。タンパク定量にはLowry法[2]を用い、Bi1はMustafa[13]らの方法によって溶解し、6時間以内に使用した。

結果

Fig.1.はGunnラットのhhとhh+の全脳の解糖系物質レベルを比較したものである。Fig.1aは未処置のhhラットの解糖系物質レベルを同じく未処置のhh+ラットのそれぞれの平均値に対するパーセントで表わしたものであるが、G6P, F6Pの有意な増加(それぞれP<0.001, P<0.005)がみられるのに対し、DAP+GAPの有意な減少(P<0.001)も観察された。さらにNB投与によって脳内Bi1値を増加させると(約2倍)Fig.1bに示すようにGlcレベルをはじめとしてF6P, FDP, 3PG, Pyrのレベルは有意に減少していた(Glc, P<0.01, F6P, P<0.001, FDP, P<0.02, 3PG, P<0.05, Pyr, P<0.001)。次にin vitroの系で解糖系に対するBi1の影響を調べた結果を示すと、Fig.2.にみられるように2mM Glc, 0.6mM ATP存在下でおよび576μM NAD濃度での解糖活性のBi1阻害はいずれも平坦部をもつ二相性を示したが、低NAD濃度(3μM)のパターンの方がいくぶん二相性が消失する傾向を示しているように思われる。Table Iは解糖活性に対するBi1の影響をhhラットで3つのNAD濃度(3~4μM, ~20μM, ~600μM)に関して調べた結果を示したものである。0.5mM以上のGlcで最大

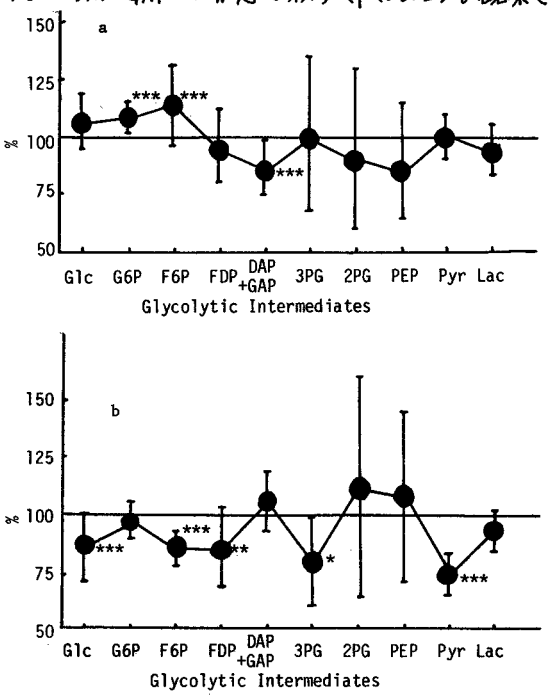


Fig.1. Brain glycolytic intermediate profiles of homozygous Gunn rats. Each value represents the mean + S.D. of 20 animals. Symbols, *, ** and *** indicate statistical significance, 0.05, 0.02 and 0.01, respectively. a) Novobiocin untreated. Results are expressed as percentage of control values(j/+). Control values(umoles/g): Glc; 1.069, G6P; 0.0808, F6P; 0.0186, FDP; 0.0916, DAP+GAP; 0.0309, 3PG; 0.0223, 2PG; 0.0016, PEP; 0.0034, Pyr; 0.0877 Lac; 1.128. b) Novobiocin treated. Results are expressed as the following . % = (mean of treated j/j/that of non-treated j/j)/(mean of treated j/+/that of non-treated j/+) x 100.

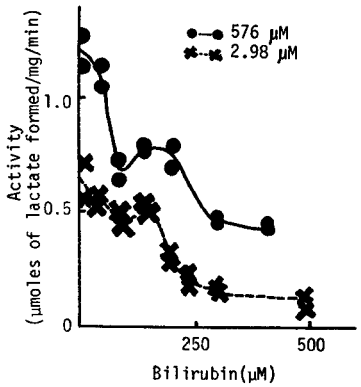


Fig.2. Bilirubin inhibition curves of cerebral glycolytic activity of homozygous Gunn rats at two different concentrations of NAD(576 and 2.98 μM).

Table I Effect of bilirubin on the glycolytic activity at various concentrations of glucose, ATP and NAD
The values show the mean ± S.D.

Substrate (No. of rats)	Inhibition(%) NAD 3-4 μM	~20 μM	~600 μM
Glc=2 mM			
ATP=0.6 mM(4)	41.2 ± 7.6***	33.0 ± 4.2***	32.7 ± 6.7***
1.0 mM(4)	32.0 ± 5.3***	32.5 ± 8.5***	24.2 ± 9.5***
2.0 mM(2)	18.5, 0	24.9, 7.2	11.0, 8.4
Glc=0.15 mM			
ATP=0.6 mM(3)	25.9 ± 7.1*	12.4 ± 5.3	8.3 ± 4.7
FDP=2 mM			
ADP=0.6 mM(4)	29.5 ± 9.3**	26.6 ± 6.8***	19.1 ± 8.9**

Bilirubin; 1.0-1.4 x 10^{-4}M, Symbols; *; P<0.05, **; P<0.02 ***; P<0.01

Table II Effects of bilirubin on the enzymic activities of HK, PFK, GAPDH and PK

	Bil (μM)	Inhibition(%)		
HK		Glc(mM)		
ATP(mM)		0.015	0.15	1.5
11.57	26.9	3.1	0	0
0.116	26.9	48.4	11.0	0
PFK		F6P(mM)		
ATP(mM)		0.02	0.2	2.0
1.93	30.0	42.4	51.2	22.8
0.187	26.0	71.7	56.8	32.9
GAPDH*		NAD(μM)		
GAP(μM)		8	24.1	103
365	19.6	32.8	10.7	7.1
PK		PEP(μM)		
ADP(mM)		5.68	56.8	568
1.23	60.4	10.1	6.0	3.3
0.123	60.4	0	0	3.9

* Wistar rats

活性が得られているので飽和量の2mMGlcを基質として0.6mMATP存在下におけるBil阻害は1×10^{-4}Mの濃度でいづれのNAD濃度においてもみられ、その阻害は~600μMで32.7%, 3~4μMでは41.2%であった。1mMATP存在下でも0.6mMATP存在下とほぼ同じ結果が1.2~1.4×10^{-4}M Bil存在下で得られ約42%のBil阻害が~600μMNAD濃度で観察された。しかしながら2mMATPになるとBilを含まないコントロールの解糖活性がATPによる阻害(約45%)をうけ、この条件下におけるBilの影響はほとんどみられなくなった(~600μMNADで約9%)。Glc濃度を0.15mM(ほぼKm値)にすると10μMNAD濃度におけるBil阻害は観察されたが、10μM以上のNADでは極めて阻害されにくくなった(約10%)。次にFDPを基質として乳酸生成を調べると、~600μMのNAD濃度で約20%のBil阻害がみられ、3~4μM, 20μMでは29.5, 26.6%の阻害がそれぞれ観察され 生理濃度に近いNADではその阻害はいくぶん弱い傾向を示していた。これらの結果については♂ラットでも♀ラットでも全く同様の結果が得られた。Table IIは解糖系のKey Enzymeとして知られているHK, PFK, GAPDH, PK活性に対するBilの影響を検討した結果の一例を示したものであるが、ここで顕著な事実はカップリングに用いた酵素には全くBil阻害がかからないのに対しPFK活性が2mMATP, 2mMF6P存在下でもBil阻害をうけることである。この場合にも2mMF6Pよりも生理濃度に近い方がBil阻害は増加する傾向があるように思われる(2mM F6P, 23%, 0.02mMF6P, 40%)。2mM F6P, 2mMATP存在下におけるBilの阻害様式はhyperbolicであった。HK, GAPDH活性はいづれも低基質濃度(HK活性では0.015mM Glc, 0.1mMATP, GAPDHでは10μM以下のNAD)でのみBil阻害がみられたがPK活性ではADP, PEP(Mg^{++})の濃度変化によっても全くBil阻害の傾向を示さなかった。これらの結果についても♂と♀ラット間の差は認められなかった。

考 察

先に報告したin vivoにおけるビルビン酸減少の原因を探る目的で、その一要因として考えられる解糖系に対するBilの影響を調べるために今回15日目のGunnラットを用いて解糖系物質のレベルの測定を行った。まず未処置の♂ラットと♀ラットの物質レベルの比較を行ったところ、PFK活性の阻害(G6P, F6Pの有意な増加, DAP+GAPの有意な減少)が示唆される結果を得た。未処置の♂ラット脳内にはすでに2nmoles/gのBilが移行している(ref)ことから、この事実は移行したBilに基づくであろうというこ

とが考えられる。さらに解糖活性，PFK活性がin vitroにおいて生理濃度の基質存在下でも有意に阻害されることが明らかになりin vivoの結果を強く支持するものと思われる。次にNB投与によって脳内Bi1値を上昇させ得られた結果からNBの直接効果を理論的に除去したプロット(Fig 1b)はBi1の阻害がGlcのとりこみの低下，GAPDH活性の阻害にあらわれてくることを示している。in vitroの系では0.6mM ADP存在下で2mM FDPを基質として乳酸生成を調べると1.2～1.4×10^{-4}M Bi1によって乳酸の生成が低下することが判明した。このことはPFK以降の解糖活性に対してもBi1阻害があることを示唆している。さらにPK活性は全く阻害を受けないのに対し，低NAD濃度(10μM以下)ではあるがGAPDH活性のBi1阻害(Table Ⅱ)も観察されており，これらの結果とin vivoの結果とを総合的に判断すれば，生体内ではGAPDH活性のBi1阻害も考えられ得ることが推定される。ところで未処置のよな，jhラットの解糖系物質レベルの比較において観察されたPFK活性の阻害がNB処理によって脳内Bi1が増加すると消失したようにみえるが，この理由としてはGAPDH活性のBi1阻害による前駆物質(DAP+GAP, FDP etc)の蓄積のために一見阻害がなくなったようにみえるのであろうと考えられる。G6Pの蓄積はこの条件下においてもPFKのBi1阻害があることを支持している。Glcを基質とした解糖活性において0.15mM Glcではnad濃度が高くなる(10μM以上)とBi1阻害を受けにくくなること(2mM Glcでは阻害される)，Bi1の解糖活性阻害のパターンが二相性を示すことについては現段階ではその理由をはっきり説明できない。さらにPK活性のBi1阻害についても 2PG PEPが微量なため測定精度に問題があること，in vitroでは全くBi1の影響を受けないこと，の2点からin vivoにおける阻害を現段階で判断するのはむづかしい。しかしながらよなラットにおけるin vivo, in vitroの実験結果は少なくともin vivoにおける解糖系にBi1障害がおきていることを示唆しており，その作用点はおそらくPFK, GAPDH, Glcのとりこみのmulti-Siteであろうと推定される。

References

1) Bücher, T., Czok, R., Lamprecht, W. and Latzko, E., in Bergmeyer, H.U.(Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965, p253. 2) Bücher, T. and Hohorst, H.J., in Bergmeyer, H.U.(Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965, p246. 3) Bücher, T. and Pfleiderer, G., in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(Eds.), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. I, 1955, p435. 4) Glazer, R.I. and Weber, G., Brain Res., 33, 439 (1971). 5) Hohorst, H.J., in Bergmeyer, H.U.(Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965, p124. 6) Hohorst, H.J., in Bergmeyer, H.U.(Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965, p266. 7) Joshi, M.D. and Jagannathan, V., in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(Eds.), Methods in Enzymology, Vol. IX, 1966, p371. 8) 第16回日本神経化学会抄録 Vol. 12, 12(1973). 9) Katoh, R., Kashiwamata, S. and Niwa, F., Brain Res., 83, 81(1975). 10) Kuwajima, J., Personal Commun. 11) Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X. and Schulz, D.W., J. Biol. Chem., 239, 18(1964). 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265(1951). 13) Mustafa, M.G., Cowger, M.L. and KING, T.E., J. Biol. Chem., 244, 6403(1969). 14) Slein, M.W., in Bergmeyer, H.U.(Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 1965, p117. 15) Sols, A. and Salas, M.L., in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(Eds.), Methods in Enzymology, Vol. IX, 1966, p436. 16) Velick, S.F., in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(Eds.), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. I, 1955, p401.

35 白鼠でのethylnitrosoureaによる実験的glioma の物質組成とアミノ酸代謝について

野田行文・辻本美恵子・平野修助（東邦大・医・2生理）
中井健而（東邦大・医・総合研）

〔要約〕

脳組織を構成する細胞の1つであるgliaの生化学的特徴を明らかにする事を目的として、実験的gliomaの組織について その組成とアミノ酸代謝に関して大脳皮質との比較検討を行った。妊娠中の白鼠にethylnitrosoureaを投与する事により、そのF1には100%近い割合で神経腫瘍が発生したが、その内の70%以上はgliomaであった。この組織は大脳皮質に比較すると湿重量当りのタンパク質はやや高く、脂質は低かった。乾燥重量はgliomaで低くsolid中に含まれる脂質の割合はやはり、gliomaで明らかに低かったがタンパク量は逆に高かった。RNA及びDNAは、いずれも大脳皮質よりgliomaで高くRNA/DNA比は逆に大脳皮質の1/3であり、腫瘍組織としての性質を明らかに示していた。一方gliomaでの遊離アミノ酸量には、極めて特異なパターンが見られた。即ち、グルタミン酸は対照に比べて著しく低く、グリシンは逆に高かった。しかしγ-アミノ酪酸は殆んど認められなかった。次に^{14}C-U-glucoseと^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$とを同時に投与して大脳皮質及びglioma中の遊離アミノ酸中への^{14}C放射能とアミノ窒素への^{15}Nの組み込みについて検討した。gliomaではグルタミン酸への^{14}C放射能の比活性が対照と同様に最も高かったが、アスパラギン酸、アラニンの値はgliomaでより高かった。一方^{15}Nについてはグルタミンへの組み込みが両組織とも、高値を示したが、グルタミン酸に対するグルタミンの^{15}N-Atom%は、gliomaで著しく、高値を示し、gliaでグルタミン合成系が強く働いている事を示した。

脳組織は、神経細胞と神経膠細胞とから成るheterogeneousな組織である事から、それらの細胞の特異性を明らかにする事が脳の代謝的或いは機能的特徴を明らかにする上に必要な事と考えられる。脳組織から純粋にこれらの細胞を分離して取り出す試みは、bulk-isolation[1][2]或いはmicrodissection[3][4]など、いくつか報告されているが、形態学や代謝上で、各々得失のある事も知られている。一方、自然発生した腫瘍組織やnitrosourea系化合物などの発癌物質による実験的gliomaについて、それらの細胞の特質を研究する報告も、いくつかある。[5][6] これら腫瘍組織でのgliaは、必らずしも脳組織中のそれと同一とは云えないにしても、その組織学的或いは生化学的特質から、gliaの性質の一端を示す事は明らかであり、gliaの生化学的特徴を捉える好適な材料とも考えられる。

そこで今回は、白鼠にethylnitrosoureaを投与する事により、実験的にgliomaを作製し、その組織の物質組成及びアミノ酸代謝について検索を進めた。

〔実験方法〕

1]実験的gliomaの作製：

約10週令のSprague-Dawley系の雌白鼠を交配させ、膣垢検査により交尾を確認して、その日を妊娠0日とした。妊娠14-19日目に半田ら[7]の方法に準じ、ethyl-nitrosoureaを体重1kg当り50mgを腹腔内に投与し、そのF1に生後4ヶ月頃より現われる神経症状を指標として腫瘍の発生を確認し、断頭瀉血により、屠殺した後、組織を採取して これを生化学的実験に用いると共に、その一部は標本を作製して、組織学的検査を行った。

2]生化学的定量法：

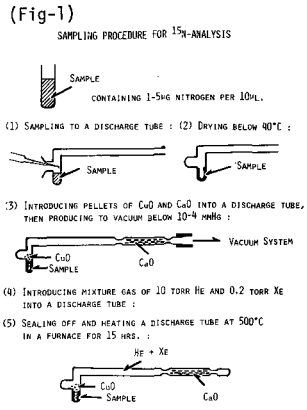
遊離アミノ酸、脂質、核酸の抽出はSchmidt-Thannhauser[8]の方法をHutchison[9]らによって改良し

た方法に従い、① 遊離アミノ酸の定量は、アミノ酸自動分析器(日立 034 liquid Chromatograph)で行った。②脂質の定量は、抽出液をアルミ箔に一定量取り注意深く乾燥して脂質量を求めた。③ RNA は、オルシノール法で、④ DNA は Dische[10] 及び Zamenhof[11] の方法、⑤タンパク量は、Lowry ら[12]の方法に従い定量した。⑥乾燥重量の測定は、組織を摘出し、アルミ箔上で湿重量を測定し、その後 110°C、3 時間注意深く乾燥し、乾燥重量を求めた。

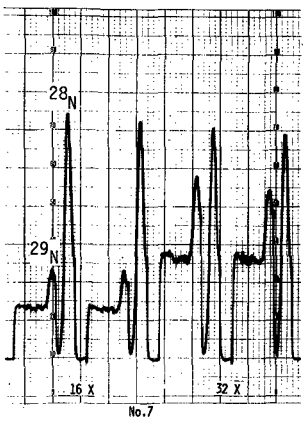
3] ^{14}C-U-glucose、^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$ 投与後における遊離アミノ酸中の ^{14}C-放射能及び ^{15}N-Atom% の測定法：

腫瘍の発生した白鼠の腹腔内に ^{14}C-U-glucose [Radiochemical Centre 284mC/mM] を体重 100g 当り、25μC を ^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$(光興業製、98.2 ^{15}N-Atom%) を体重 100g 当り 30mg-N を投与し、1 時間後に断頭浮血して屠殺した。その際血清を採取すると共に、可急的速やかに脳組織及び、glioma 組織を採取し試料とした。組織を 4% PCA で homogenize し、更に KOH で中和した上清をアミノ酸分析の試料とした。試料を濃縮し、Dowex 50W X4, H^+ form(200-400 mesh) を通して、水洗後 1M pyridine で酸性及び中性アミノ酸を得た。得られたアミノ酸溶液を乾燥し、更に一定量の蒸留水に溶かして TLC (Merck製 silicagel) 上に 2次展開により、各アミノ酸を分離した。展開溶媒は、n-butanol:acetic acid:H_2O=4:1:1 phenol:H_2O=4:1 を用いた。同一試料を 2 つの TLC 上に各々展開し、一方を ^{14}C-放射能とアミノ酸量の測定に使用した。即ち、0.15% ninhydrin-aceton 溶液を噴霧し、アミノ酸の各スポットを確かめ、その部分の silicagel を採取した。その一部を定量的にとり、液体シンチレーション計数器(島津製 LSG-12) により、放射能を測定した。残りを 60% EtoH で抽出し、アミノ酸の定量に用いた。アミノ酸の ^{14}C放射能は、ninhydrin 反応により一部 CO_2 として消失するものと考え、各アミノ酸について各々補正を行った。他の TLC は、^{15}N-Atom% の測定に使用した。即ち、ninhydrin 反応によって各アミノ酸の位置を確かめ、アミノ窒素量が 5.0μg 以上である場合は、その部の silica gel を採取し、60% EtOH 中で完全に抽出して、その一部を Fig-1 の方法に従って放電管内に封入した。アミノ窒素量が、1-5μg である場合は、熊沢[13]の方法に従い、アミノ酸のスポットに一致した silica gel を直接放電管中の石英綿に吸着させ、^{15}N の測定に用いた。^{15}N 測定用に用いる放電管の調製は、Fig-1 に示す如く、CuO、CuO 及び He,Xe ガスを封入した後、500°C で 15hrs 加熱する Dumma の方法に従い、^{15}N-Atom% の測定には、^{15}N-analyzer (日本分光社製、NIA-1)を使用した。その測定結果は、(Fig-2) に示す如く、^{15}N の濃度は、^{28}N と ^{29}N のバンドスペクトル ー 2976.8Å と 2982.9Å の強度比として求められた。^{15}N分析のための TLC は展開後、硫酸デシケーター中に保管し、特に留意して遊離のアンモニアの汚染を防いだ。

(Fig-1)



(Fig-2) PATTERN OF ^{15}N-ANALYSIS



〔実験結果及び考察〕

nitrosourea 系化合物による実験的神経腫瘍についての形態学的検索については、種々報告されている。[5][14] 本実験で行った ethylnitrosourea を用いる方法でも既に形態学的所見に関する報告もあるが、[7][15] その 70% 以上が glia である点では、我々も同様の結果を得た。実験的 Glioma 組織のタンパク量及び脂質量を正常の白鼠大脳皮質と比較すると(Table-1) glioma 組織で、湿重量 1g 当りタンパク量は稍々低く、脂質量は極めて低い事が示された。更に湿重量中に占める乾燥重量の割合は、はるかに、glioma 組織で低いため、solid 中に占めるタンパク量は、稍々高値を示し、脂質量が著しく低い事が認められた。 核酸量についてみると(Table-2)に示す如く、RNA、DNA 量共に、glioma 組織に高いが、RNA/DNA 比は、逆に glioma 組織で低く、明らかに細胞増殖を引き起こしている事を示している。

(Table-1) LIPID AND PROTEIN CONTENT IN BRAIN CORTEX AND GLIOMA TISSUE OF RAT

TISSUE		BRAIN CORTEX	GLIOMA TISSUE
DRY W./WET W. RATIO %		20.8±1.04(5)	14.4±1.89(5)
LIPID	MG/G-W.W	55.1±5.86(3)	29.0±2.78(6)
	% IN DRY W.	26.5	20.1
PROTEIN	MG/G-W.W	106.5±8.21(5)	98.1±18.0(8)
	% IN DRY W.	51.2	68.1

EXPERIMENTAL NUMBERS WERE GIVEN IN PARENTHESES.

(Table-2) NUCLEIC ACID CONTENT IN BRAIN CORTEX AND GLIOMA TISSUE OF RAT

TISSUE	EXP.NO.	RNA MG/G-W.W	DNA MG/G-W.W	RNA/DNA
BRAIN CONRTEX	5	1.82±0.15	0.75±0.05	2.42
GLIOMA TISSUE	12	2.53±0.67	3.86±0.88	0.68

一方、組織中の遊離アミノ酸量を調べたが、対照組織と著しく異ったパターンを示し、グルタミン酸は、対照に比べ著しく低値を示し、グリシンは、むしろ高かった。(Table-3)

glioma 組織内の各アミノ酸について考えると、グルタミン酸に比べ、グルタミンは、稍々高値を示し、グリシン、タウリンは、グルタミン酸とほぼ、同じ含有量で特異なアミノ酸パターンを持つ事が示された。特に、グリシンは、皮質中の含有量よりも高く、白鼠の間脳と、ほぼ同量の値を示した。[16] δ-アミノ酪酸については、殆んど認められなかったが、人の glioma 組織に、glutamic decarboxylase の活性が認められるとの報告もあり[17]、その存在を否定するわけにはいかない。次に ^{14}C-U-glucose, ^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$ を腫瘍を形成した白鼠の腹腔内に投与し、大脳皮質及び glioma 中の遊離アミノ酸への ^{14}C 放射能の組み込み及びアミノ窒素への ^{15}N の組み込みを調べ、アミノ酸代謝を炭素鎖及び窒素代謝の面から追究した。(Table-4) ^{15}N の分析は従来質量分析計で行っていたため、微量の窒素化合物についての分析が困難であった。glioma については、アミノ酸含有量が少なく、本実験においては、TLC による 2 次展開後の各アミノ酸スポットを直接 Dumma 法により発光法を用い分析した。従って各アミノ酸の分離精製に関しては、更に詳しく検討する必要があると考える。本実験についての TLC 上の各アミノ酸スポットは、標準アミノ酸と対比してその同定を行っ

(Table-3) FREE AMINO ACID CONTENT* IN BRAIN CORTEX AND GLIOMA TISSUE OF RAT

TISSUE / AMINO ACID	BRAIN CORTEX (μMOL/G-W.W.)	GLIOMA TISSUE (μMOL/G-W.W.) EXP.1	EXP.2
TAU	4.14	1.48	1.09
ASP	3.61	0.50	0.33
GLU(NH_2)**	4.35	2.37	2.09
GLU	8.39	2.02	0.97
GLY	0.96	1.61	1.87
ALA	0.48	0.87	0.42
VAL	0.29	0.51	0.21
LEU	0.07	0.09	0.09
GABA	3.12	<0.05	<0.05

* AMINO ACIDS WERE DETERMINED BY AUTO-ANALYSER.
** GLU(NH_2) : CONTAINING THREONINE, SERINE AND ASPARAGINE

(Table-4) ^{14}C AND ^{15}N INCORPORATION INTO FREE AMINO ACIDS FROM ^{14}C-U-GLUCOSE AND ^{15}N-AMMONIUM SULFATE

TISSUE / AMINO ACIDS	BRAIN CORTEX SP.AC DPM/μMOL	BRAIN CORTEX ^{15}N-ATOM EXCESS %	GLIOMA TISSUE SP.AC DPM/μMOL	GLIOMA TISSUE ^{15}N-ATOM EXCESS %
TAU	$1.70X10^2$	0.44	$3.86X10^2$	0.04
ASP	$10.6X10^2$	0.24	$13.1X10^2$	0.12
GLU(NH_2)	$12.3X10^2$	2.16	$13.4X10^2$	3.79
GLU	$12.9X10^2$	0.58	$17.6X10^2$	0.18
GLY	$2.90X10^2$	0.17	$1.72X10^2$	0.10
ALA	$5.57X10^2$	0.32	$8.85X10^2$	0.13
GABA	$12.1X10^2$	0.43	------	------

た。glioma 組織のグルタミン酸への^{14}C-放射能の比活性は、対照と同様に最も高かった。アスパラギン酸、アラニンについては、大脳皮質より、glioma 組織で比活性が高かったが、Rose[18]らの示した値程、著しい差は認められていない。一方、^{15}N アミノ窒素への組み込みを見ると、グルタミンへの組み込みが両組織で最も高かった。この事は、グルタミン中の^{15}N-atom excess% は、アミノ窒素及びアミド窒素を含めたものであり、グルタミン合成系による^{15}N アンモニアの処理の結果と考えてよいが、両組織を比較した場合、glioma でより高値を示した。更にグルタミン酸に対するグルタミンの^{15}N-atom % の比を考えると大脳皮質で 4 倍、glioma で 20倍と glioma で極めて高い値を示した。この事は、glioma 或いは、glia でグルタミン合成系が強く働いている事を示すものと考えられる。その他のアミノ酸についても更に検討を進めることによりグリア細胞の代謝的特徴が次第に明らかにされるものと考える。

終りに本研究に御協力を頂いた.金松知幸(東京学芸大・大学院)学士、菅谷英一(神奈川歯大・生理)博士に深謝致します。

〔文献〕

1) Norton, W.T.and Podulso, S.E.: Science, 167, 1144, (1970)
2) Rose, S.P.R.: Biochem. J. 102, 33, (1967)
3) Hyden, H.: In "The neuron" 179, (1967)
4) Lowry, O.H.:J. Histochem. Cyto. Chem. 1, 420, (1953)
5) Wechsler, W., Kleihues, P., Matsutomo, S., Zulch, K.J., Ivankovic, S., Pressmann, R.and Druckrey, H. : Annals. New York Acad. Sci. 159, 360, (1969)
6) Pauetti, E.G., Pauletti, P., Pezzotta, S., Schiffer, D.and Fabiani, A.:J.Neurosurg. 37, 580, (1972)
7) 半田肇, 半田譲二, 小山素麿: 日本臨床 30, 413 (1972)
8) Schmidt, G.and Thannhauser, S.J.: J.biol. Chem. 161, 83. (1945)
9) Hutchison, W.C.and Murno, H.N.: Analyst 86, 178, (1961)
10) Dische, Z.and Schwarz, K.: Microchim. acta 2, 13, (1937)
11) Zamenhof, S. Grauel, L., Marthens, E.and Stillinger, R.A.: J.Neurochem. 19, 61, (1972)
12) Lowry, O.H., Rosenbrough,N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J.biol.Chem. 193, 265, (1951)
13) 熊沢喜久雄 : 化学分析技術, Radioisotope 21, 37, (1972)
14) Thust, R. and Warzok, R.:Acta neuropath. 27, 25, (1974)
15) Lantos, P.L.: Acta neuropath. 30, 175, (1974)
16) Shaw, R.K. and Heine, T.D.: J.Neurochem. 12, 151, (1965)
17) Naber, B., Kuriyama, K. and Roberts, E.: Science, N.Y. 168, 598, (1965)
18) Rose, S.P.R.: Biochem. J. 102, 219, (1967)

36 hydrocortisone投与幼若ラット脳の蛋白代謝の研究

野口鉄也・須山田治彦・塚田裕三
(慶大・医・生理)

〔要約〕

われわれは昨年の本学会でHydrocortisone投与動物の脳DNA代謝に検討を加え，DNA合成の律速酵素Thymidine Kinaseの発育期の出現がHydrocortisone投与によって遅延し，さらにその活性の低下によって，発育後の脳内DNA含量が正常に比して低値であることを報告した。今回はさらに検索を進め，脳の発育と胸腺を含めた内分泌器管との関連を示唆する次の結果を得た。

1. Hydrocortisone，胸腺抽出物，cAMPはin vitroでThymidine Kinaseの活性になんらの効果ももたない。
2. Hydrocortisoneはin vivoに投与する時にのみ脳の蛋白合成を阻害する。
3. Hydrocortisone投与幼若ラット脳切片の阻害された蛋白合成は下垂体抽出物及びcAMPの添加で回復する。
4. したがってHydrocortisone投与動物のThymidine Kinase出現の遅延と活性低下は酵素蛋白のde novoの合成低下によるものと考えられる。
5. Hydrocortisone投与動物の脳CNP活性は低値で髄鞘形成不全を示し，学習能力の低下を認めた。
6. Hydrocortisone投与動物の胸腺の重量は減少し，皮質は退縮，Hassall小体は嚢状に拡張していた。これはDown症候群の胸腺を類似している。

実験材料と方法

動物：同日交配の数匹の妊娠Wistar-albino系ラットから生れた仔鼠を出生日に混合，二群に分け一群は0日から4日間1日1回Hydrocortisone acetate(HC)を40mg/kg肩部皮下に投与し，正常対照群には生食水を投与，それぞれ母乳で飼育実験動物とした。なおラットの副腎皮質からの糖質コルチコイドはCorticosteroneである(1)が，本実験の目的に関して，ラットに対しHydrocortisoneの効果はCorticosteroneと同一であり廉価の為前者を用いた。

Thymidine Kinase(TK)の測定：組織を10mM Tris buffer pH 8.0中でGlass Homogenizerでhomogenizeし，20,000g 60分遠沈，その上清につきThymidine-6-TをBasisとしてKLEMPERER & HAYNESの方法(2)で反応を行い，反応停止後遠沈，上清をDEAE paperに塗布，TAYLORらの方法(3)で活性を測定した。in vivoでのLeucineの酸不溶性分画へのとり込み：1μCi/0.1mlのDL-Leucine-1-C^{14}(SA. 1.4mCi/mmole)をラット腹腔に投与し，1時間後に屠殺，脳の各部位及び肝を剔出した。脳組織は0.32M庶糖溶液中で，肝は0.28M庶糖溶液中でTeflon Homogenizerを用いてhomogenizeし，それを800g 15分遠沈，核と細胞質に分け，さらに核を再度庶糖液中で洗い，その洗滌液は細胞質部分に加えた。ついで各部分を統濃度10%TCA溶液で処理し，酸可溶性分画と不溶性分画に分け，各分画中の放射能を測定した。脳切片でのLeucineの酸不溶性分画へのとり込み：成熟脳の切片は大脳皮質のみを，幼若脳は大脳全体を切片にし用いた。切片は0.1μCiのL-Leucine-4,5-T(32 Ci/mmole)の入った5.5mMブドウ糖を含むKrebs-Ringer Phosphate(pH7.2)中で37℃，1時間気相を空気として incubateした。反応を10%TCAで止め，homogenize後遠沈，酸不溶性分画を得，これを再度TCAで洗いこの中にとり込まれた放射能を測定した。下垂体，胸腺の抽出物：それぞれの組織を蒸溜水中でGlass

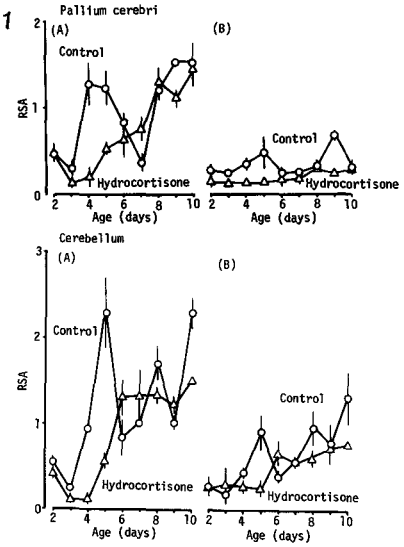
表1 Effect of Hydrocortisone, cAMP and Thymus Extract on the Activity of Thymidine Kinase from Rat Brain

Additions	Enzyme Sources: New-born Brain (2days of age) Activity	Change (%)	Adult Brain (2months of age) Activity	Change (%)
none	120±11	----	15.2±1.3	----
cAMP				
10^{-6}M	114±10	+5.0	13.4±0.8	-11.8
10^{-5}M	118±11	-1.7	14.1±1.1	-7.2
10^{-4}M	121±13	+0.8	14.4±1.1	-5.3
10^{-3}M	122± 4	+1.7	15.2±0.2	±0
Thymus Ext. (3days)				
12.5μg-prot./ml	117±10	-2.5		
25.0 〃	118± 8	-1.7		
50.0 〃	104±13	-13.3		
100 〃	108±15	-10.0		
Thymus Ext. (25days)				
12.5μg-prot./ml	127±14	+5.8		
25.0 〃	124±10	+3.3		
50.0 〃	125± 8	+4.2		
100 〃	125± 9	+4.2		
Hydrocortisone				
10^{-5}M	130± 4	+8.3	14.8±1.0	-2.6
10^{-4}M	127± 8	+5.8	16.1±2.1	+5.9
10^{-3}M	125± 6	+4.2	14.4±1.5	-5.3

mean ± S.D. of four samples

Activity: μmole/mg-protein/min.

図1



RSA: cpm in Cytoplasmic Insoluble Fract. / cpm in Cytoplasmic Soluble Fract.

RSA: cpm in Nuclear Insoluble Fract. / cpm in Cytoplasmic Soluble Fract.

Homogenizer で homogenize し, 105,000g 60分遠沈, その上清を用いた。なお in vitro の実験には Hydrocortisone phosphate を用いた。

CNP の測定：Kurihara & Tsukada の方法(4)によった。学習実験：当教室で行われている明暗弁別オペラント学習(5)によった。学習には正常対照群, HC群ともに生後2ヶ月の雄ラットを用いた。

結果と考察

TKに対する各物質の影響(表1) すでにわれわれは生下時より4日間のHC投与によって脳内DNA量が低下し, DNA代謝に関与する酵素のうち, DNA合成の律速段階である TK の活性の出現が強く抑えられることを報告した(6)。そこで TK に直接HCが影響を及ぼすかどうかをみる為に種々濃度のHC存在下で TK の活性変化をみた。高濃度にもかかわらず全く抑制効果をもたなかった。一方HC投与によって胸腺が退縮することが知られていることから, 胸腺抽出物及び cAMP をも添加したが著明な効果は認められなかった。

蛋白合成に対するHCの影響：発育期での TK 活性の上昇は酵素の de novo の合成によると云う考え方がある。そこで蛋白合成に及ぼすHCの影響を調べるため, HC群と正常対照群の in vivo での DL-Leucine の酸不溶性分画へのとり込みを比較した(図1)。正常群では大脳外套部, 小脳ともに細胞質蛋白へのとり込みも核蛋白へのとり込みも生後4, 5日に旺盛であるが, その時期で HC群は強い抑制を受けていた。しかし6日目で正常群に近ずき7日以降はほとんど差がなかった。この傾向は脳幹部, 肝にも認められた。BURDMAN ら(7)も生後8日のラットにHCを投与し, 最も早く影響を受けるのは acidic deoxyribonucleoproteins で, ついで脳全体の蛋白合成, TK, RNA で, DNA合成酵素には全く影響がなかったことを報告している。この in vivo に投与されたHCの影響は in vitro での蛋白合成にもみられ(表2), 幼若脳で最も著明に抑制を受け, 成熟脳のそれは極めて僅であることが確められた。脳の蛋白合成にHCが直接作用するか否かを調べる為, HC

表2
Effect of Hydrocortisone Treatment on the Incorporation of L-Leucine-T into the Acid-insoluble Fraction of Brain Slices (cpm/mg wet wt. tissue/hour)

Age	1day old	4days old
Period of Administration	0&1st days	0.1st,2nd&3rd days
Normal Control	2273 ± 252	938 ± 66
Hydrocortisone	1863 ± 69	493 ± 29

Age	Adult	Adult
Period of Administration	2days	4days
Normal Control	480 ± 88	468 ± 21
Hydrocortisone	590 ± 27	387 ± 14

mean ± S.D. of four samples
40mg/Kg of Hydrocotisone acetate was daily administered. Rats were sacrificed after 2 hours of the last administration.

存在下での切片に於けるLeucineのとり込みをみた。表3にみるごとく何らの影響も認められない。一方生後24時間以内にラットにHCを投与すると胸腺の退縮が認められ，この動物の視床下部ではGH releasing activityが欠除し，下垂体でのGH，TSHが減量している(8)。そこで胸腺及び下垂体抽出物を直接切片に与えてLeucineのとり込みに対する影響をみた(表3)。下垂体抽出液は幼若正常脳では低濃度で効果を示めさないが，幼若HC脳では低濃度で20%の促進を認めた。これに反し胸腺抽出液はいずれの脳に対しても抑制効果をもっていた。この点に関しての機序は全く不明である。またcAMPをMedium中に添加すると幼若正常脳は10^{-5}M，10^{-4}Mで効果を示めさないが，幼若HC脳ではこの濃度で著明なとり込みの促進効果をもち，HC脳で低下していた蛋白合成能がcAMPによってほぼ正常のレベルに回復した。一方成熟脳でも10^{-4}McAMP下で38%の増加が認められたが，10^{-3}Mという高濃度では幼若HC脳のみに促進効果があり，幼若正常脳と成熟脳では逆に抑制効果を示した。PERKIN & MOORE (9)はラット大脳皮質のAdenyl cyclase活性が生後4～12日にかけて上昇し，28日以降減少することを報告している。この実験からも成熟脳でcAMPが生理的に不足していることが推定され，また幼若HC脳の蛋白合成がcAMP添加で幼若正常脳のレベルまで回復し，さらに下垂体抽出液で同じ傾向を示すことからHC脳でのcAMP量の低下が考えられる。胸腺と下垂体との間には何らかの相互作用のあることは推定されているが(10,11)いずれがHCによる一次変化であるかは決定出来ない。しかしHC脳でのTK活性の出現遅延と活性の低下は蛋白のde novo合成の低下によることが示唆され，その結果生後のDNA量減少に至るものと思われる。

表3 Effect of Hydrocortisone, Pituitary and Thymus Extracts and cAMP on the Incorporation of L-Leucine-T into the Acid-insoluble Fraction of Brain Slices

Age	New-born Brain (5days of age)				Adult Brain (2months of age)	
Treatment	Normal Control		Hydrocortisone		Normal Control	
Additions	Incorporated	Change (%)	Incorporated	Change (%)	Incorporated	Change (%)
none	140± 9	----	92± 8	----	46.0±3.8	----
Hydrocortisone						
10^{-5}M	150±15	-7.1				
10^{-4}M	132± 7	-5.7				
10^{-3}M	144± 7	+2.8				
Pituitary Ext.						
3μg-prot./ml	145±10	+3.6	111± 6	+20.7		
30μg-prot./ml	141±15	+0.7	110±18	+19.6		
300μg-prot./ml	125± 3	-10.7	73± 5	-20.7		
Thymus Ext. (25days)						
1μg-prot./ml	109±12	-22.1	66± 6	-28.3		
10μg-prot./ml	95±10	-32.1	61± 7	-33.7		
100μg-prot./ml	53± 3	-62.1	40± 3	-56.5		
cAMP						
10^{-5}M	143±13	+2.1	136±11	+47.8	51.5±2.8	+12.0
10^{-4}M	146±25	+4.3	126±18	+37.0	63.5±3.7	+38.0
10^{-3}M	108±14	-22.9	124±16	+34.8	43.2±4.1	-6.1

mean ± S.D. of four samples
Incorporated amount of radioisotope: cpm/mg wet wt.tissue/hour

CNP活性の変化(表4)

髄鞘合位酵素CNPの活性を正常脳とHC脳で比較した。髄鞘形成の旺盛な16日では大脳外套部で単位蛋白当りの活性に40%の減少を認めた。小脳では湿重量の減少が認められるが蛋白当りの活性は正常であった。このことはおそらく大脳外套部と小脳のグリア細胞の分裂時期の差によるもので，HC投与によって大脳ではオリゴデンド

図2

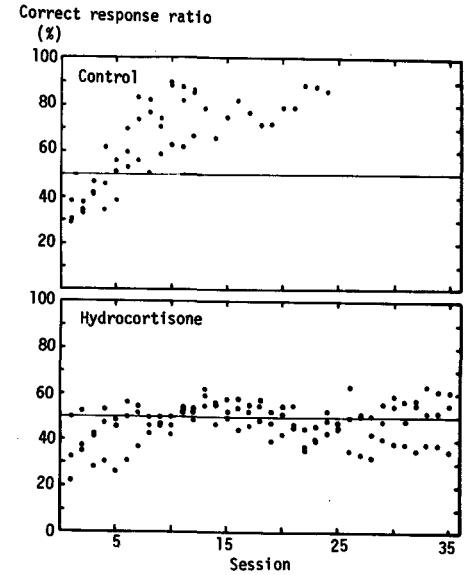


表4

2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase Activity in the Developing Brain

		Control		Hydrocortisone	
		U/mg-prot.	U/g-w.w.	U/mg-prot.	U/g-w.w.
16th day	Pallium Cerebri	0.72	68.3	0.43	38.3
	Cerebellum	1.34	143	1.36	129
	Brain Stem	1.78	171	2.00	184
47th day	Pallium Cerebri	3.02	435	2.74	372
	Cerebellum	2.68	360	2.43	383

ログリアの分裂が抑制され髄鞘形成も障害されるものと考えられる。小脳ではグリア細胞の分裂は胎生期に完了している(12,13)ために小脳でのオリゴデンドログリアによる髄鞘形成は正常に進行するものと理解することが出来る。野村と塚田(5)が報告しているごとく,クレチンラットの大脳CNPは発育の各時期で低値を示してあり,GH投与で回復することが認められている。

学習実験(図2). 生後2ヶ月の正常群,HC群につき明度弁別オペラント学習を行った。正常群は10 sessionsを至るとほぼ学習が完成されるが,HC群では35 sessionsに至るも明度の弁別が全く出来ず高度の学習能力の低下を示した。

組織知見：HC群の胸腺重量は正常群の20%に減少し,組織学的検索では胸腺皮質が脂肪浸潤を伴う高度な萎縮を示し,Hassall小体が嚢状に強く拡張,相互融合し,Hassall小体そのものに著しい角化亢進の像がみられた。これと同じ像はヒトに副腎皮質ホルモンを大量に投与した際にみられ,またDown症候群の胸腺像もこれに酷似している(14.15)。しかし後者ではHassall小体が異常に大形化することが特徴とされているが,本動物では軽度の大形化で数の増加がみられた。

胸腺はSelf-regulating Mechanismをもち,個体のagingと同じプログラムで進行する胸腺自身のageをもつであろうと云われている。脳の発育とその結果としての機能の発現が胸腺あるいはそれを含む内分泌器管によって制御されている可能性が示唆される。

病理学的知見は慶大医学部病理学教室 細田泰弘助教授の御助言をいただいた。また実験に際して宇津陽子,青木エミ子,川畑孝子諸嬢の御援助をいただいた。ここにつつしんで感謝の意を表します。

文献

(1) Bush I.E. J.Endocr.,9,95,1953 (2) Klemperer H.G.&Haynes G.R. Biochem.J. 108,541,1968 (3) Taylor A.T., Stafford M.A.&Jones O.W. J.biol.Chem. 247, 1930,1972 (4) Kurihara T.&Tsukada Y. J.Neurochem.14, 1167, 1967 (5) 野村正彦,塚田裕三 神経化学 12, 24, 1973 (6) 野口欽也,須田治彦,塚田裕三,神経化学 12, 190, 1974 (7) Burdman J.A.,Jahn G.A.&Szijan I. J.Neurochem. 24, 663, 1975 (8) Sawano S.,Arimura A.,Schally A. V.,Redding T.W.&Schapiro S. Acta Endocrinol. 61, 57,1969 (9) Perkins J.P.&Moore M.M. J.biol.Chem. 246, 62, 1971 (10) Pierpaoli W.&Sorkin E. J.Immunol. 101,1063,1968 (11) Pierpaoli W.,Bianti E.&Sorkin E. Clin.Exp. Immunol. 9,889,1971 (12) Altman J. J.comp.Neurol.137,433,1969 (13) Fujita S. in"Evolution of the Forebrain" ed.Hassler R.&Stephan H.1966 (14) Benda C.&Strassman G.S. J.Ment.Defic.Res. 9,109,1965 (15) 秦順一,清水幸一,最新医学 28, 1298, 1973.

37 マウス脳のカテコールアミン ー 系統による脳内含有量の相違と痙攣発現機序に関係して

森　昭胤・平松　緑・小林清史
高坂睦年　（岡大・医・脳代謝研）

〔要約〕

1．KawaiおよびTamuraら（1,2,3）の方法に準拠して，さらに前処理操作に若干の改良を加え，脳組織Catecholamineをtrifluoroacetyl化したのち，gaschromatography（ECD）により，dopamine，norepinephrineおよびepinephrineを分離定量した。

2．11系統すなわち，Rf，El，ddS，CBA，C57Bl，C58，A(Strong)，RIII，AKR，D103，およびC3H5/Biの脳組織のdopamine，norepinephrineおよびepinephrineについて分析を行なった結果，つぎのごとき系統特異性による脳Catecholamine値の相違を見出した。(a) 脳内dopamine値の比較的高い系　：　Rf，El，CBA系
脳内dopamine値の比較的低い系　：　C57Bl系
(b) 脳内norepinephrine値の比較的低い系：　Rf，El，ddS，C57Bl系
(c) 脳内epinephrine値の比較的高い系　：　CBA，Rf系

3．El系mouseを放り上げ運動により痙攣発作をおこさせるよう条件ずけした場合には，安静時においても脳内dopamine値が約½に減少していた。さらに放り上げ運動により痙攣を誘発させた場合は，痙攣直前にdopamineおよびnorepinephrineがさらに減少を示した。これらの事実は，dopamineおよびnorepinephrineが痙攣発現機構と直接関係していることを示唆している。

Scudder，Karczmar，Everett，Gibsonおよび Rifkin（5）はmouse脳のDopa，dopamine，norepinephrine，epinephrineおよびserotonin値は，その属および系統により異ることを最初に報告したが，彼らの報告によると，脳内高dopamine値を有する系のmouseはnorepinephrine，epinephrine及びserotonin値も高いこと，およびこれらの脳内amine値と電激痙攣閾値とは関係があり，amine値の低い系のmouseは電激痙攣に対する潜時が短く，amine値の高い系のものは潜時が長いという。

われわれは痙攣準備性を有するEl-系mouseを含めて11系統のmouse脳catecholamineをgaschromatography（ECD）により分析した結果，Scudder（5）の報告のごとく，dopamine高値の系が必ずしも他のamineも高濃度であるとはかぎらず，系統により脳内catecholamine patternはかなり変化していることを見出すとともに，特に著変の認められた系の1つであるEl-系について，痙攣準備性と脳内catecholamine値との相関関係について検討を行なった。

実験方法

1．実験動物：Rf，CBA，C57Bl，C58，A(Strong)，RIII，AKR，D103およびC3H5/Bi系は岡大医学部実験動物室系統維持部門より，ddS系は藤井医化学試験扱所（神戸）より入手した。El-系は当施設にて系統保存しているものである。これらはいずれも雌雄を問わず，生後2～4ヶ月のものを使用した。

2．Catecholamine分析方法

Kawaiおよび Tamuraらの方法（1，2，3）に準拠して行なったが，生体試料分析のために若干の改良を試み（4），脳組織については，大略下記のごとくに前処理

を行うって，gaschromatography（ECD）による分析を行っている。

脳組織よりcatecholamine 抽出：mouseを液体窒素中に投入後，大脳を摘出し，秤量後，氷冷した0.4N過塩素酸7mlにてhomogenizeし，除蛋白後，再び同量の過塩素酸で洗條，これらを合せたのち，氷冷ether–benzen（5:2）にて脱脂を行うった。この試料は2分して，そのうち1本には既知濃度のcatecholamineを加え回収率算定の指標とした。

アルミナ吸着：上記試料に0.1M EDTA Na_2 1 mlを加え，氷冷下で4N-ammonia水でpHを5~6に調整し，精製アルミナ0.2gを加え，1N-ammoniaでpHを8.4-8.5に調整，5分間撹拌後，さらに5分間靜置したのち，cold room中にて9mm×25cm columnに流しこみ，蒸溜水20mlで洗條したのち，0.2N酢酸methanol 3.5 mlで20mlナス型フラスコに溶出した。

TFA化：上記溶出液を凍結乾燥装置を用いて乾固したのち，acetonitrile 0.1 mlを加え，ついでtrifluoro-acetic acid anhydrate（TFAA）2滴を加え，50~60°Cにて15分間TFA化したのち，100 mg/mlの内標準物質（heptachlor epoxide）を含むbenzen 3 mlで希釈し，1~2 μlをgaschromatographに注入した。

Gaschromatographyの條件：Yanaco G80-EC（$^{63}_{28}Ni$）を使用した。充填剤 2% XF-1105, Gaschrom P 60-80 mesh. glass columm 内径3mm，長さ2.25m. Column 温度 180°，注入および検出温度 225°，Carrier gas N_2（99.999% over），Carrier gas pressure 1.4 Kg/cm².

GC-MS測定：日立RMU-6MGを使用した（山之内製薬中研の協力による）。

実験成績

Mouse脳組織のcatecholamine分析例をFig. 1に示すが，epinephrine，dopamineおよびnorepinephrineが分離定量できるほか，未同定のpeakも認められた。これらのpeakはいずれもGC-MSにより確認された（図：省略）。

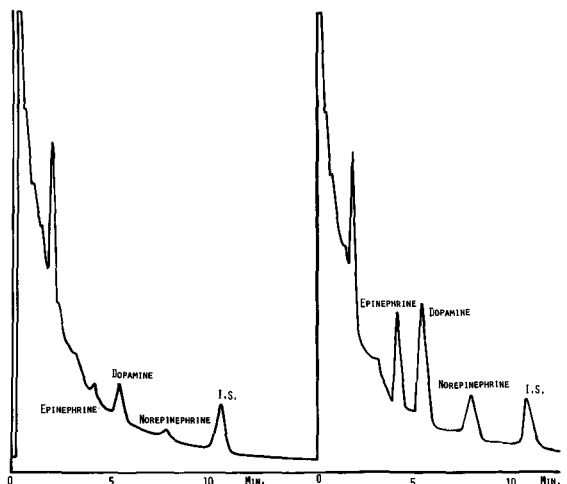


FIG.1.A. CHROMATOGRAM OF MOUSE BRAIN CATECHOLAMINE (C_5H_6/B_1)

FIG.1.B. CHROMATOGRAM OF MOUSE BRAIN CATECHOLAMINE (C_5H_6/B_1) AND ADDED AUTHENTIC SUBSTANCES

つぎに，11系統のmouse脳についての分析結果をTable 1に統括して示すが，系統特異的と考えられるcatecholamine値の著しい相違が認められた。すなわち，（a）Rf，ElおよびCBA系ではdopamine値が他系に比して高く，$C_{57}Bl$系では低いこと，（b）Rf，El，ddS，$C_{57}Bl$系ではnorepinephrine値が他系に比して低いこと，（c）CBA，RF系ではepinephrineが他系に比し高いこ

とが認められた。

つぎに，大きな変化が認められた系の1つであるEl-系mouseを放り上げ運動により痙攣を起こさせるよう條件ずけしたものについて，痙攣にともなう変化を検索した。その結果はTable 2に示すが，El-系mouseは痙攣を誘発できるよう條件ずけした場合には，脳内dopamine値は約1/2にまで減少し，norepinephrineも減少の傾向があること，およびepinephrineは逆に増加することが認められた。ついで，放り上げ運動により痙攣を誘発せしめると，痙攣直前期（痙攣を必ず起こす放り上げ回数の2/3に相当する時期）にはdopamine値はさらに減少し，norepinephrineも同様に減少すること，および，痙攣中にはdopamineはすでに対照（安静時）の値にまで回復し，痙攣1時間後にはdopamineとnorepinephrineは，安静時よりやや高い値を示すことなどが観察された。

Table 1 Catecholamine levels in mouse brain (μg/g)

Strain	Experimental Number	Dopamine	Norepinephrine	Epinephrine
R_F	8	1.447 ± 0.333	0.268 ± 0.098	0.063 ± 0.017
El	7	1.305 ± 0.187	0.286 ± 0.05	0.037 ± 0.003
DDS	8	0.98 ± 0.13	0.281 ± 0.037	0.026 ± 0.003
CBA	8	1.48 ± 0.17	0.307 ± 0.02	0.081 ± 0.015
$C_{57}Bl$	8	0.495 ± 0.074	0.251 ± 0.02	0.031 ± 0.002
C_{58}	8	0.717 ± 0.091	0.308 ± 0.034	0.023 ± 0.002
A(STRONG)	8	0.72 ± 0.083	0.393 ± 0.033	0.046 ± 0.005
R_{III}	8	1.022 ± 0.07	0.357 ± 0.03	0.029 ± 0.002
AKR	7	0.881 ± 0.077	0.313 ± 0.025	0.035 ± 0.002
D_{103}	8	0.714 ± 0.053	0.428 ± 0.055	0.031 ± 0.002
C_3H_F/Bl	8	0.794 ± 0.05	0.377 ± 0.03	0.05 ± 0.003

Table 2 Catecholamine levels in El-mouse brain(μg/g)

		DA	NE	E
Normal control	n=7	1.305±0.187	0.286±0.05	0.037±0.003
Convulsive disposition				
resting	n=6	0.693±0.056††	0.258±0.009†	0.053±0.021††
pre-convulsion	n=6	0.342±0.059**	0.134±0.055**	0.046±0.015
during convulsion	n=6	0.600±0.194	0.202±0.058**	0.050±0.01
1 hr. after convulsion	n=6	0.758±0.096*	0.327±0.063**	0.032±0.022

sig. vs normal control † $P<0.01$ †† $P<0.001$

sig. vs resting(with convulsive disposition) * $P<0.01$ ** $P<0.001$

考按

生体試料中のcatecholamineの分析は，catecholamineが比較的不安定で酸化されやすいため，抽出操作，アルミナ吸着，あるいはacyl化を含めて，前処理過程に種々の問題点があった．われわれはアルミナ量を最小必要量（0.2g）とし，アルミナからの脱着を0.2N酢酸-methanolにて行なうことにより，回収率を40～50%増加することができた（回収率 dopamine：86±4%，norepinephrine：87±6%）．また，凍結乾燥装置を使用して，試料の安定化と完全乾固をはかるほか，希釈溶媒はbenzenが最適であることなどを知った．その他，gaschromatographyのpeakの同定にGS-MS測定を行ない，dopamine，norepinephrine，epinephrineのそれぞれのpeakが他の物質とoverlapすることなく，単一のものであることを確認した．

11系統のmouseについての脳組織のcatecholamine値には大きな相違が認められ，特にdopamine値の最高のもの（CBA）と最低のもの（C57Bl）とでは約3倍も相違していることは興味深いが，このような系統間の大きな変化についてはScudder（5）が既に報告しているところである．しかし，彼らのいうごとく，dopamineが高い系のものは，他のamineも高く，dopamineが低い系のものは，他のamineも低いという傾向は一般には認められなかった．

El-系mouseはdopamine値が著しく高いが，放り上げ運動により痙攣発作を起こすようになったものでは，安静時においてもdopamine値が対照（放り上げ運動により痙攣をおこすよう條件ずけしていないもの）の約1/2に減少し，痙攣直前期にはdopamineとnorepinephrineがさらに減少することも興味深く，脳内dopamineおよびnorepinephrineまでのamineの少ない系統のmouseは電気痙攣閾値が低いというScudder（5）の報告と考え合せると，これらのamineが，何らかの形で痙攣発現機序と結びついるものと推定される．

文献

1. Imai, K., Sugiura, M. and Tamura, Z., Chem. Pharm. Bull. 19, 409－411, 1971
2. 今井一洋，田村善蔵，臨床化学 1，428－433，1972
3. Kawai, S. and Tamura, Z., Chem, Pharm. Bull. 16, 699-701, 1968
4. 森昭胤，岸川秀実，臨床化学 4，1－8，1975
5. Scudder, C. L., Karczmar, G.M., Everett, G. M., Gibson, J.E. and Rifkin, M. Int. J. Neuropharmacol. 5, 343-351, 1966

38 脳白質ガングリオシド分析法の再検討

河村成子・武富保
（信大・医・順応研・生化）

〔要約〕

常法のFolch[1]分配は極性の低いガングリオシドを見のがしがちである。我々はFolch法を用いないでガングリオシドを定量的に分離することを試み、特に脳白質のガングリオシド組成の再検討の為に応用した。ヒト(23才)脳白質よりCHCl3-CH3OH(C-M)2：1及び1：1で抽出した総脂質は、Silica Guhr G－Silica Gel G混合カラムクロマト(C-M-Ammoniaで調製)にかけ、非ガングリオシド脂質成分をまずC-M-Ammonia(32：8：1, v/v/v)で溶出後(FrI)、総ガングリオシドをC-M－水(60：35：8, v/v/v)で溶出した(FrII)。FrIIは弱アルカリメタノリシス処理、中和後、透析し前回同様のAmmonia性のカラムクロマトにのせて、ガングリオシド画分を精製した(FrIII)。

FrIIIはSilica Guhr G含有の調製用薄層クロマトにて個々のガングリオシド成分に分離された。個々のガングリオシドのジヒドロスフィンゴシンの占める割合は同程度に低いのを確認して、オゾン酸化・還元によって得られるfatty alcoholのガスクロ分析によるガングリオシドの定量を行った。その結果、GM1(50.9%)、G7(24.8%)、GD1a(13.7%)、GM2(5.1%)、GD1b(3.9%)、GT1(1.2%)のような構成であり、Folch法ではみのがされたG7が高比率で得られた。また、この定量法はnmol量のガングリオシドに対し再現性ある検量線を与えた。別にG7を単離精製分析したところ、その構造はceramide-galactose(3←2)シアル酸であり、その脂肪酸、スフィンゴシン塩基は白質ガラクトセレブロシドのそれに類似しG7は白質に特有なガングリオシドであるのが示唆された。

実験方法

材料：　分裂病患者(23才)脳白質(特に白質部の異常はみられていない)を使用した。

総脂質の抽出：　白質を10容のC-M(2：1, v/v)でホモジナイズし沪別する。残渣は再度C-M(1：1, v/v)で抽出する。両抽出液を合わせ蒸発乾固する。3容のC-M(1：1, v/v)を加え数時間、室温に放置し脂質を充分に溶解させたのち、遠心して上清を分取し沈澱を更にC-M(1：1, v/v)で洗う。抽出液を合わせて総脂質とした。

総ガングリオシドの分離：　総脂質を少量のC-M-Ammonia(32：8：1, v/v/v)に溶解し、Silica Guhr G(Merck AG. Darmstadt, Germany)－Silica Gel G(1：1, w/w)カラム(同様のアンモニア系溶媒にて調製)にのせる。非ガングリオシド脂質を同様のアンモニア系溶媒で溶出した後(FrI)、総ガングリオシドはC-M－水(60：35：8, v/v/v)で溶出された(FrII)。FrIには、ガングリオシドは全く検出されない。一方FrIIにはしばしば少量の他の脂質が混入してくるので、弱アルカリメタノリシス(室温反応)を行い、メタノール性酢酸で中和後、反応液を4°C, 脱イオン水中で2～3日透析する。透析物を蒸発乾固し、再びアンモニア系溶媒で調製されたSilica Guhr G含有のカラムにのせる。同様にして非ガングリオシド脂質成分を溶出後、精製ガングリオシド画分が溶出された(FrIII)。

個々のガングリオシドの分離：　次のような調製用薄層プレート板が使用された。Silica Guhr G－Silica Gel G(1：1, w/w)混合プレートを使用前、110～120°C, 60分加熱して使用した。C-M－2.5N Ammonia(60：40：9, v/v/v)混合溶媒中、2回展開

し、ブロムクモールブルー試薬を噴霧してガングリオシドスポットを検出した。各スポットをかきとり、C-M-水(60:35:8, v/v/v)混合溶媒にてガングリオシドを溶出した。一方、スフィンゴシン塩基の量を測定してガングリオシドを定量する場合は、吸着剤存在下で次の様にして行なわれた。

ガングリオシド組成の決定：　薄層クロマトにて分離された個々のガングリオシドにC-M(2:3, v/v)混合溶媒を加え、一定量の内部標準物質(C19 methyl ester)を加えてO_3を10分間(室温)通じた。軽く遠沈して上清を得、沈澱を同溶媒で更に洗った。上清を合わせ、充分量の$NaBH_4$を加えた。20～30分後、水と$CHCl_3$を加え、遠心によって2層を分離した後、下層(fatty alcoholとC19 methyl esterを含む)を蒸発乾固し、更にtrimethylsilyl(TMS)誘導体としてガスクロマト分析(GLC)を行った。3% SE-30カラムを使用し、170°CでGLC分析した。

その他の分析：　個々のガングリオシドのスフィンゴシン塩基組成は、上述のfatty alcoholのGLC分析よりC16 fatty alcoholとC14 fatty alcoholのピーク面積比を求めてC20 sphingosineとC18 sphingosineの比(C20S/C18S)として示した。脂肪酸組成は、3% HCl-メタノールにてメタノリシス後、脂肪酸メチルエステルとしてGLC分析した(17% EGSカラム、カラム温度175°C)。

特にGg(Sialocyl galactosyl ceramide)の単離と分析：　上述の"総ガングリオシドの分離"の操作中、Fr III溶出前にC-M-水(65:25:4, v/v/v)を流出すると、総Ggと少量の他のガングリオシド成分が溶出された。このC-M-水(65:25:4 v/v/v) Frは再クロマト(Mallinckrodt; silicic acid)し、C-M(7:3, v/v)でGgを溶出させた。2～3回、同様にして再クロマトを繰り返した後、完全にpureなGgを単離することが出来た。Ggに関して次の様な種々の分析を行った；(1). ギ酸(1M, 90°C, 1hr 水解)による脱シアル酸反応分析 (2). 完全メチル化反応(箱守法) (3). 赤外分光分析(Hitachi infrared spectrophotometer model 285) (4). 脂肪酸組成分析 (5). 長鎖塩基組成分析 (6). 糖構成の分析(メチルグリコシドのTMS誘導体のGLC分析、3% SE-30カラム、170°Cにて分析)

実験結果

I　Gg(Sialocyl galactosyl ceramide)の分析　メチルグリコシドのGLC分析から、糖部分はgalactoseとN-acetyl neuraminic acid 1:1 (molビ)の構成であった。完全メチル化の分析の結果、比較の為に同時に行ったsulfatideと同一のGLCパターンが示されて、methyl-β 2,4,6-tri-O-methyl galactoside, methyl-α 2,4,6-tri-O-methyl galactosideの2ピークが得られたことから、N-acetyl neuraminic acidはgalactoseのC-3位に結合しているのが示された。ギ酸による脱シアル酸の結果は、図-1に示されてあるように対照の白質より調製されたガラクトセレブロシドにRf値が一致した。しかも2スポットを示したが、これは後で述べる如く、脂肪酸構成の差(直鎖酸とオキシ酸)によるものであった。これらの結果から、Ggはceramideーgalactose(3←2)N-acetyl neuraminic acidの構造であることが決定された。図-2はGgの赤外吸収スペクトルである。Ggの脂肪酸は直鎖酸とオキシ酸から構成されており、各々の組成は

表-1の如くである。スフィンゴシン塩基組成は主としてC18 sphingosineからなり、C20 sphingosineは殆んど検出されなかった。これらの結果からG7の脂酸及びスフィンゴシン塩基の組成は、白須がラクトセレブロシドのそれに極めて類似しているのが注目された。

図-1. G7のギ酸による脱シアル酸生成物。
C-M-水 (65:25:4, v/v/v)で展開。
anthrone-H_2SO_4でスポットを検出。
G7 / ギ酸水解後 / CMH, CSE } Standard

図-2.

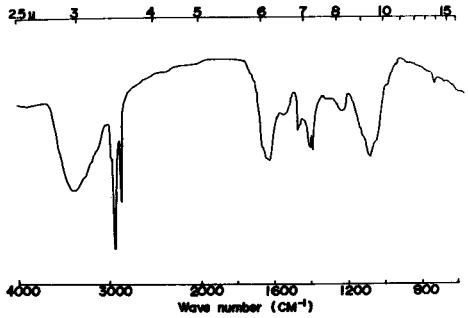


表-1. G7の脂酸組成 (%)

	C14	C16	C18	C18:1	C20	C22	C23	C24	C24:1	C25	C25:1	C26	C26:1
遊離脂酸	tr.	13.6	24.5	2.7	1.9	3.0	5.9	9.6	30.1	1.1	3.9	1.1	2.4
オキシ酸					0.4	3.4	11.5	45.8	23.7	6.0	3.8	2.3	3.3

II 白須ガングリオシドの分析

白須ガングリオシド量は、236μg シアル酸/g湿組織として示された。白須ガングリオシドの薄層クロマト(Silica Guhr G-Silica Gel G混合plateを使用)を図-3aに示した。主としてGM1, G7, GD1a, GD1b, GT1, GM_2 の6成分からなり、Folch法によって調製された白須ガングリオシドと比較してみると(図-3b)、Folch法ではみのがされていたG7成分が高濃度に存在するのが確認された。

白須ガングリオシドの組成は"実験方法"に示されている方法に沿って、スフィンゴシン塩基の量を測定して決定されたが、表-2に示されているようにG7はむしろmajorであるのが明らかである。

これらガングリオシドの脂酸組成はG7(表-1)以外のものは相互によく似通っており、GM1: C16 (6.3%), C18 (75.6%), C20 (2.3%), C22 (2.3%), GD1a: C16 (10.9%), C18 (63.3%), C20 (1.1%), C22

図-3. 白須ガングリオシドの薄層クロマト。
G7
GM_2
GM1
GD1a
GD1b
GT1
Silica Guhr G-Silica Gel G (1:1, w/w)混合plateを使用。
C-M-2.5N Ammonia (60:40:9, v/v/v)溶媒中、2回展開。
スポットはBial試薬にて検出。
a b (Folch法にて調製したもの)

表-2. 白須ガングリオシドの構成。(スフィンゴシン塩基の量を測定して定量された)

	(%)
G7	24.8
GM_2	5.1
GM1	50.9
GD1a	13.7
GD1b	4.0
GT1	1.2

(2.9%)のような組成であった。表-3.は個々のガングリオシドのスフィンゴシン塩基組成をC20 sphingosine / C18 sphingosine の比(C20S/C18S)として示したものである。C20S/C18S比はmonoシアル酸含有ガングリオシドよりも、むしろpolyシアル酸含有ガングリオシドにおいて高いようにみうけられた。

表-3. 個々の白質ガングリオシドのスフィンゴシン塩基組成(C20S/C18Sの比として分析された).

	C20S/C18S
G7	(C18Sのみ)
GM2	0.429
GM1	1.261
GD1a	1.925
GD1b	2.980
GT1	3.100
(total 白質ガングリオシド	0.864)

考察

最近、Ledeenら[3]は、Folch法を用いずに、myelinからガングリオシドを調製しG7の存在を確認した。われわれは神経組織及びその他の組織のガングリオシド組成の再検討の為にガングリオシドの分離及び分析法を検討し、次の3点を工夫して特に白質ガングリオシドに応用したところ、Ledeenらのそれにほぼ似通った結果が得られた。(1).薄層クロマト用にSilica Guhr Gを混合させることによって、薄層クロマト上移動度の低いpolyシアロガングリオシドはよく分離された。Silica Guhr Gをカラムクロマトにも応用した。(2).Ammonia性に調製されたカラムを用いることによって、ガングリオシドは非ガングリオシド脂質から容易に分離された。(3).ガングリオシド定量は一般にはシアル酸含量を測定して行なわれるが、われわれは個々のガングリオシドのジヒドロスフィンゴシンの含有量が同程度に低いのを確認後、オゾン酸化・還元によってC20 sphingosine及びC18 sphingosineからそれぞれ得られるC16 fatty alcohol及びC14 fatty alcoholのTMS誘導体のGLC分析によるガングリオシドの定量を行った。本法は図-4の如くlinearな検量線を与えた。本法は水解操作を必要としないので、水解条件の影響・副産物の生成を伴う等の問題は解消された。スフィンゴシン塩基は全てのスフィンゴリピドに共通して含まれているのでガングリオシド以外のスフィンゴリピドにも適用出来る。特に正確に相互のスフィンゴリピドの比を求める時は、まずオゾン分解法によって"sphingosine-containing sphingolipid"の量を決定し、次に別法にて、sphingosineとdihydrosphingosineの比を測定し、両方の結果を合わせて、全スフィンゴリピドの量を算出した。

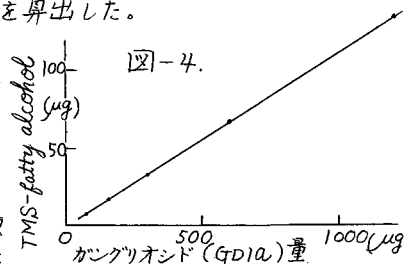


図-4.

G7に関しては、今までに主としてKlenk[2], Ledeen[3]らによってその一部が報告されているが、今回大量の白質からpureなG7を単離、分析しLedeenらのそれにかなりよく類似した結果が得られた。G7の脂肪酸、スフィンゴシン塩基は他のガングリオシドのそれとは全く異り、白質ガラクトセレブロシドのそれに極めて類似していることより、G7は白質構成脂質として存在し、白質ガラクトセレブロシドの代謝に何らかの役割りを果たしており、むしろ、他のガングリオシドとは全く異った代謝・機能を営んでいるように思われる。灰白質ガングリオシドに比べて白質のそれは殆んど研究されていない。更に実験を続け明らかにしたい。

文献、(1) Folch, J. et al (1951) J.B.C., 191, 833 (2) Klenk, E., Georgias, L., (1967) Hoppe Seiler's Z. Phys. Chem., 348, 1261 (3) Ledeen, R.W., Yu, R.K., Eng, L.F. (1973) J. Neurochem., 21, 829

39 スフィンゴリピドβ－ガラクトシダーゼ

遠藤晴久・飯田静夫・山川民夫
（東大・医・1生化）

〔要約〕

我々はヒト腎において lactosyl-ceramide β-galactosidase が gel filtration にて2つのピークに分かれることに注目し，この両者の違いおよび他の β-galactosidase との相互関係および，臓器による違い等につき検索した。ヒト腎の 4-MU-, lact-cer-, GM1-β-galactosidase の Sephadex G200 からのクロマトグラフィーの elution pattern はほぼ完全に一致し，4-MU-, lact-cer-β-galactosidase については electrophoretography での profile もほぼ一致した。Sephadex G200 からの溶出順に Peak I, Peak II とすると Peak I, II の 4-MU β-galactosidase は collogel 電気泳動でも，分離できた。Peak I の 4-MU-, lact-cer-, gal-cer β-galactosidase は heat stable で Peak II の 4-MU-, lact-cer-β galactosidase は heat labile であった。Lact-cer β-galase の Peak II は Peak I に比し Crude Na-taurocholate, NaCl でより activate され，この点で Peak I は Tanaka[1] らのいう脳型に，Peak II は肝型に相当すると思われた。もし仮定のいうとおり脳型 lact-cer β-galase が gal-cer β-galase と同一の酵素であるならば，Krabbe 病において Peak I の lact-cer β-galase は gal-cer β-galase と同程度に低下，もしくは消失するはずである。この点につき調べると，Krabbe 病の腎，脳では Peak I の lact-cer β-galase は低下しているが gal-cer β-galase の著しい低下たくらべるとかなり弱，ており，肝ではむしろ増量していた。又腎と肝では lact-cer と 4-MU β-galase は正常と Krabbe 病での Peak I, II の量比はよく相関したが脳では逆の関係が見られた。

スフィンゴグリコリピドの中で非還元末端に β-ガラクトシド結合をもつものは現在少くとも7種知られ，そのうちガラクトシルセラミド（gal-cer），ラクトシルセラミド（lact-cer），GM_1 ガングリオシド（GM_1）の3つにつきそれぞれに特異的な β-galactosidase 欠損症が報告されているが，これら3種の β-galactosidase の相互関係については今だに不解決の問題が多々有り，特に lact-cer β-galactosidase について最近2つの研究所から全く相反する見解が発表された。即ち Wenger ら[4] は gal-cer β-galactosidase と lact-cer β-galase は同一の酵素であるといい Tanaka ら[3] は lact-cer β-galase には2つの components が有り，1つは gal-cer β galase と同一，他は none-specific β-galase と同一のものであるという。我々は第47回日本生化学会[3]でヒト胎盤の lact-cer β-galase がゲル3過法により2つのピークに分かれることを発表したが今回さらにヒト正常及び Krabbe 病の腎，脳，肝を用いて主として lact-cer β-galase につき検索した。

〔実験方法〕

酵素の抽出，分画 …… 組織を9倍量の 1mM EDTA を含む 10mM リン酸緩衝液でホモジナイズし，凍結融解と超音波処理したものを total homogenate とし，さらにその 100,000×g 上清を酵素活性に応じて適当に濃縮したものを Sephadex G200 のカラムに分け 1mM EDTA, 0.1M NaCl を含む 10mM (pH 7.4) リン酸緩衝液で溶出した。

基質 …… 合成基質としては 4-MU gal. 天然基質としてはブタ脳より得た gal-cer, GM_1, ヒト赤血球より得た lact-cer を Klarke の法によりエ場を用いて精製したものを使用した。**Collogel 電気泳動** …… 20mM CPB (pH 6.0) 5mA/6cm にて 60分泳動 4-MU gal にて酵素活性を検出

酵素活性の測定

1) 4-Methylumbelliferyl-β-galactosidase : 2mM 4-MUβ-gal 200μl, 0.2M Citrate-phosphate buffer 100μl, NaCl 溶液, 酵素液を加え全量 425μlとする。pHは腎,脳,肝でそれぞれ 4.2, 4.4, 4.2, NaClは腎, 脳, 肝でそれぞれ 20, 30, 20mM。37°C, 30分間反応させ 0.2M Glycine-NaOH, pH 10.6 2mlを加え, 遊離した4MU量を螢光々度計で定量した。

2) Galactosylceramide-β-galactosidase : ほぼRadinの方法[2]に準じた。反応後クロロホルム-メタノール(2/1)を加え, Folch法で分配した水層の放射活性を測定した。

3) GM1-β-galactosidase ; ^{3}H-GM1 15nmol (4400cpm/nmol) 15mM pure Na-taurocholate, 0.1M citrate-phosphate buffer pH 4.2, 酵素液を加え全量 50μl。37°C, 20分間反応後, 2分間100°Cに加熱。ガラクトース溶液(0.1mg/ml) 1ml, Dowex 50 (H^+), Amberlite CG (OH^-) それぞれ 200mgを加え混和し, 遠心上清の 400μlをとり放射活性を測定する。

4) Lactosylceramide-β-galactosidase : ^{3}H-lactosylceramide 32nmol (2800cpm/nmol), Citrate-phosphate buffer で全量 250μlとする。個々の反応条件については表Iを参照されたい。37°C, 30分間反応後クロロホルム-メタノール(2/1) 5ml, ガラクトース溶液(0.1mg/ml) 1mlを加え混和 遠心し上層の放射活性を測定。

5) 熱安定性; 4-MU-, lact-cer-, gal-cer-, β-galactosidaseにつき行った。いずれもcitrate-phosphate buffer pH 4.4に前2者には 16.7mM, 後者には 50mMのNaClを加え, 43°C, 又は 55°Cで一定時間加熱後酵素活性を測定した。

Table I Characterization of lact-cer β-galactosidase

			Kidney				Brain	Liver
			Total homogenate	100,000×g sup	Peak I	Peak II	100,000×g sup	100,000×g sup.
pH optimal	Citrate phosphate buffer.		4.4	4.4	4.4	4.2	4.4	4.2
	Sodium citrate buffer		N.D	N.D	4.6	4.4	4.6	4.4
optimal Na-taurocholate concentration		Crude mg/ml	4	8	4	4	8	6
		Pure mg/ml	8	12	8	8	6	8
optimal Sodium chloride concentration mM			75	75	225	150	45	75
Relative activities to crude Na-taurocholate only was used at optimal concentration ("crude" system)								
(1) Pure Na-taurocholate at optimal concentration ("pure" system)			0.88	1.21	0.96	1.21	0.78	0.73
(2) Tirton X-100 62.5μg to	"crude" system		1.29	2.98	1.13	2.60	1.14	1.57
	"pure" system		N. D.				0.99	0.93
(3) Oleic acid 62.5μg to	"crude" system						1.37	0.87
	"pure" system		1.36	1.94	1.39	2.26	1.98	1.17
(4) Sodium chloride at optimal concentration to "crude" system			1.42	1.24	1.34	1.98	1.003	2.14

N.D — not determined

〔結果〕

Cellogel電気泳動 …… ヒト腎 total homogenate の 4-MUβ-galáce は 2 つの spots に分かれ陽極側へ早く泳動されるものが major component で Peak II に相当し minor component が Peak I に相当した。(Fig 1)

Lact-cer β-galactosidase …… 腎, 脳, 肝のいずれも pH 4.2～4.6 付近にほとんど活性はかあるなりが使用した buffer で pH optimal が異予異っていた。Na-taurocholate の crude と pure では pure のものが 1.5～2 倍位必要であったが maximum activity は限して有意差はなかった。Kidney の Peak I と II で Crude Na-taurocholate 0.8g/dl と 2mg/ml とで比較すると Peak I では 2mg/ml で 1.3 倍であるが Peak II では 6.6 倍にまで activate される。同様に NaCl の 0 と 75mM で比較すると, Peak I で 1.1 倍 Peak II では 1.7 倍まで上昇した。Triton X-100 は Na-taurocholate の crude と; oleic acid は pure のものと同時に用いるとより効果があった。(Table I)

Sephadex G 200 ガラムクロマトグラム 4-MU-, lact-cer-β-galáce は腎, 脳, 肝いずれも 2 つに分かれ GM1-β-galáce は腎のみ測定したが同様に 2 つに分離され, gal-cer β-galáce は Peak I にのみ存在した。Krabbe 病では腎, 脳で 4-MU-, lact-cer-β-galáce (腎では GM1-β-galáce も) の Peak I の減少が見られ肝では逆に 4-MU-, lact-cer-β-galáce ともに増量していたが 4-MU と lact-cer β-galáce の減少又は増量の程度は腎ではよく相関したが脳では左程相関しなかった。(Fig 2)

熱安定性 腎の 4-MU-, lact-cer, β-galáce の Peak I は gal-cer β-galáce は heat stable で 4-MU-, lact-cer β-galáce の Peak II は heat labile であり Krabbe 病の腎の Peak I, II でも左程同様な所見であった。腎, 脳, 肝の total homogenate の 4-MU β-galáce の heat stability は gel filtration での Peak I と Peak II の 4-MU β-galáce の量比をよく反映していた。(Fig 3)

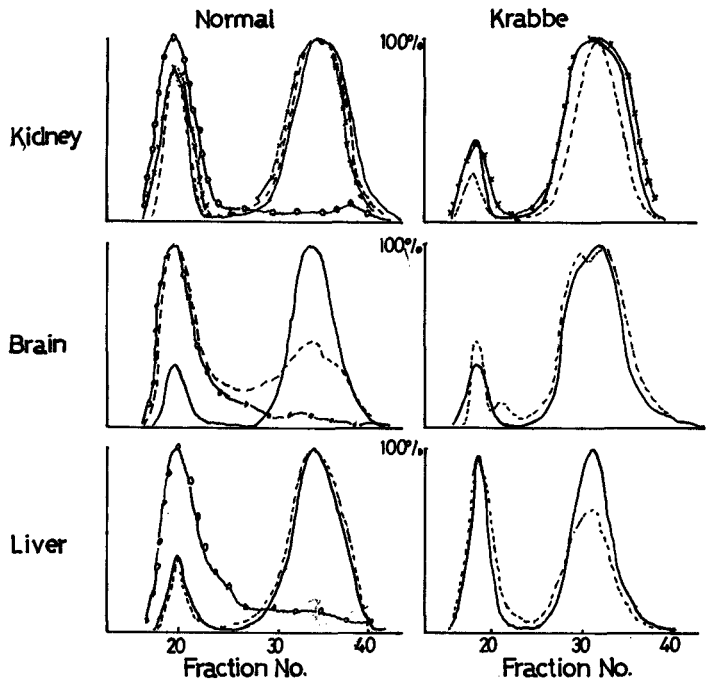


Fig. 2.
Sephadex G 200 カラムクロマト

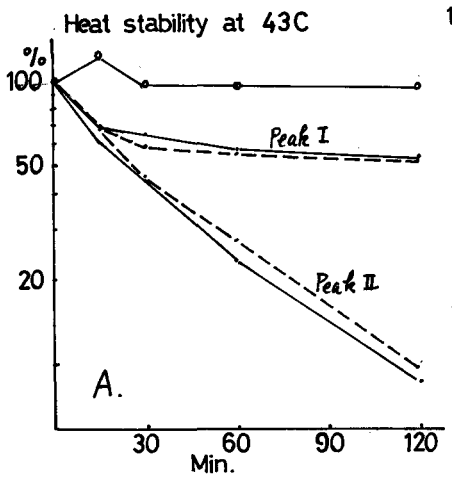
4-MU-β-galactosidase

Lact-cer β-galactosidase

Gal-cer β-galactosidase

GM1 β-galactosidase

活性はそれぞれの酵素活性の最高値を 100 とした値で表現した.



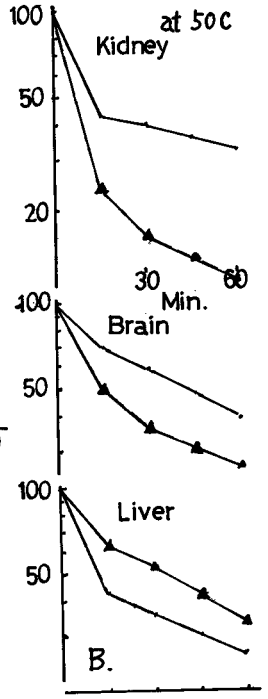


Fig. 3. 熱安定性 A. 正常ヒト腎
—○— Total Homogenate
Gal-cer β-galactosidase
Peak I } —— 4MU-β-galactosidase
Peak II } ---- Lact-cer β-galactosidase

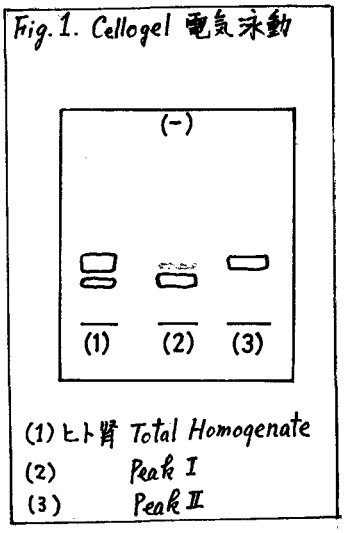


Fig. 3. B.
4MU-β-galactosidase
—— 正常
—▲— Krabbe病

[考 察]

ヒト正常腎において 4MU-, lact-cer-, GM_1-β-galactosidase の gel filtration の elution pattern は、ほぼ完全に一致しており又、gal-cer-β-galase は Peak I にのみ存在した。Peak I の 4-MU-, lact-cer-, gal-cer β-galase は heat stable で Peak II の 4MU-, lact-cer β-galase は heat labile でその decay curve はそれぞれ Peak I, Peak II でよく相関していた。Peak I の lact-cer β-galase の Crude Na-taurocholate, および NaCl に対する態度より Peak I の lact-cer β-galase は Tanaka らのいう脳型 lact-cer β-galase に相当すると思われる。そこで Tanaka らの仮説に従えば Krabbe 病では Peak I の gal-cer-, lact-cer β galase が消失することが期待される。さらに 4MU と lact-cer-β-galase は heat stability, gel filtration の elution pattern でよく相関するので Total homogenate を用い 4MU β-galase の heat stability を調べればある程度、Krabbe 病の診断も可能性と思われた。しかし normal と Krabbe 病では有意差が見られたが Peak I の成分がかなり残っていることを示唆する結果がでた。事実 Krabbe 病の kidney の gel filtration で Peak I に 4MU β-galase は 15.8%, lact-cer β-galase は 11.6% 残存していた。Krabbe 病の脳の Peak I の 4MU β-galase は 23% しか減少しておらず heat stability の結果とよく相関した。肝ではむしろ Peak I の 4MU-β-galase は Krabbe 病で増量していて heat stability でも逆転が見られた。

(文献) (1) 遠藤晴久, 飯田静夫, 山川民夫: 生化学 46, 630 (1974)
(2) Radin, N.S.: Methods in Enzymology Vol. 28 p. 834-839 (1972)
(3) Tanaka, H. and Suzuki K.: J. Biol. Chem. 250 2324-2332 (1975)
(4) Wenger, D.A.: Chem. Phys. Lipids 13, 327-339 (1974)

40 神経組織の部位別脂質組成について － 特にα－hydroxy cerebrosideを中心として

石部　武・山本　章
（阪大・医・2内）

〔要約〕

正常動物の神経組織を部位別に脂質分析し、以下の成績を得た。

1) セレブロシド（CER）の脂肪酸のNon-Hydroxyに対するα-Hydroxy脂酸の比（$^{OH}/_{ON}$）は、個体発生的に新しい領域に高い。また白質に比べ灰白質に高い値をとる。

2) 兎の脊髄の側索と後索の間の$^{OH}/_{ON}$は、後索に於て高い。この関係は牛ではみられなかった。

3) 脳神経や脊髄の中でも、神経により、また部位によって$^{OH}/_{ON}$は、かなり異る。

4) Galactolipid/Sphingomyelin比も$^{OH}/_{ON}$と同じ様な傾向を有するが、脳幹部に於て高値を示すところが特異である。

5) 発育に伴うα-OH-CERの増加は、より強固な安定したミエリンの形成に関与しているものと考えられる。

神経疾患を有する患者を診る時、その発症時期や時間的経過と共に、罹患部の定位診断を行うのが普通である。その際系統疾患であれ、そうでない場合でも、複雑な機能単位の集りである神経組織を対象とする以上、その系統的また個体発生的分化を考慮しなければならない。

神経脂質、中でも髄鞘の脂質として セレブロシド(CER)が特異的な存在であるが、これは更にα-Hydroxy脂肪酸を含有する点で極めて特徴的であり、我々はこの点に注目して、発育に伴う変化について研究して来た。　α-OH-CERは通常の脂肪酸からのα酸化によって作られるとする報告(5,6)から、中間代謝産物とも考えられるが、その大量に存すること、また欠損症が重篤な症状を呈すること(4)からしても、必須の構成物質とみなすのが妥当であろう。　CERはミエリンに特有とされていたが、軸索中にも存在するとの報告(2)もあり、機能分化からみた軸索とミエリンとの相互作用を考慮すれば、CERの組成は神経の機能によってかなり大きな影響をうけることが予測される。今回の研究に於てはまず初段階として、軸索と髄鞘の分離は行わず、軸索とミエリンを一括した神経組織として取り扱うこととした。

加令によるCER脂酸の変化はこれまでにも種々報告されている。加令に伴い長鎖、不飽和及び奇数個炭素脂肪酸の増加が知られており、α-OH-CERも増加する。(10, 12)しかし脳の部位別の分析では、ミエリンの脂質分画としてCERの含量は測定されているが(11)、脂肪酸組成についての報告はない。また細胞画分を分離しない神経組織中のα-OH-CER含量についてはRadinの報告(8)があるが、分析は完全とはいいがたい。我々はこれまでに正常神経織の脂質分析を行い、部位別の分析結果も一部報告(14)し

たが、この点を中心に更に詳細な検索を続けた結果を以下に報告する。

[方法]

実験材料として、生後13日目の幼若及び体重2.4~3kgの成熟家兎と、3本の牛及び体重3kgのカニクイ猿を使用した。これらを断頭屠殺後、脳・神経組織を髄膜や血管の混入を可及的避けて取り去し、各部を切離した。脳神経及び脊髄神経根は脳及び脊髄を去て硬膜を貫通する近の部位をとり、坐骨神経は骨盤腔内にて採取した。灰白質と白質との分離や、脊髄の前側及び後索の分離は、凍結組織を約2mmの厚さに輪切りにして、メス刀をもって他組織の混入を避ける様に注意して切離した。取りおした各神経組織は、20倍量のC/M:2/1で3回以上抽出し、窒素気流下に乾燥・除蛋白し、一定量のC/M:2/1に溶解、検査に供した。

各脂質の分離は全てTLCにて行い、燐脂質及びスフィンゴ脂質はRouser+Yamamoto(9)のC/M/NH3:130/70/10及びC/Aceton/M/HAc/Water:100/40/30/20/12の二次元展開で、コレステロールはPetroleumether/Diethylether:100/100の展開溶媒を使用した。総脂質はCAHNのMicrobalanceで秤量、コレステロールはHanel+Dam(3)及びZurkowski(15)法で、スフィンゴ脂質はYammoto-RouserのTNBS法(13)で、燐脂質はChe等の方法(1)で測定した。

[結果及び考察]

幼若並びに成熟家兎の神経系の各部分の脂質組成を(表1)に示した。加令と共にCH/CNは全て上昇するが、各部分を比較すると大脳に近づくほど、即ち分化の新しい領域で、より高い値を示す。小脳は大脳についで灰白質に富む為か、燐脂質/スフィンゴリピド比及びレシチン含量が高いが、CH/CN比は中脳におとる。末梢の坐骨神経は、CH/CNが一番低いが、脳神経はより高値で、視神経は殊に高く、脊髄の値を越える。CER/Sulfatide比は有意の差が見られない。大脳の中でも灰白質と白質を比較すると(表2)、灰白質の方がCH/CNが高い。他の脂質分画にも相違を認めるが、これは細胞成分の多少に比例しているものと考えられる。

(表3)で、兎の脊髄を知覚と運動の機能によって分けてみると、後索の知覚野でCH/CNが高い。しかしこの関係は(表4)に示した如く牛の脊髄ではみられない。これは生下時以後の開眼・歩行等の発育の状態の違いによるものと考えられる。牛ではむしろ胸腰髄間に差があるようである。このことや、三叉・視神経間に差があることは、神経の使用頻度又は訓練と何らかの関係があるのではないかと推測される。また(表4)で後根神経で、総脂質中のスフィンゴミエリンが少いが、これは知覚神経の髄鞘が運動神経より少い為ではないかと考えられる。

一方Galactolipid/sphingomyelin比をみると(表5)、CH/CNと同じ様な傾向を示し、視神経で高い。尚この値は脳幹部に於て高値を示す点が特異である。これらの傾向は、動物種(兎・猿・牛)の如何にかかわらず同様である。

以上見て来た様に、発生学的に分化の進んだ組織にα-OH-CERが高い。最近コレステロールとCERの結合に際して、OH-酸の方がより安定した膜を作るとの報告(7)があり、発育に伴うOH-脂肪酸の増加も、より強固な安定したミエリンの形成に与っているのであろうかと考えられる。

Table 1 Rabbit

	Chol. free	Sphingolipid Total	CN	CH	S	Sph	CH/CN, CER/S	Phospholipid Total	PC	PE	Sph	PS
① Young												
Cerebrum	37.6	6.13	1.15	1.26	1.31	2.41	(1.09, 1.81)	70.0	29.4	21.4	2.7	7.1
Cerebellum	38.1	9.84	2.17	2.75	1.93	2.99	(1.27, 2.55)	60.9	24.8	18.4	3.0	5.7
Midbrain	37.9	6.90	1.46	1.80	0.87	2.77	(1.23, 3.76)	72.2	28.4	23.5	3.8	7.3
Pons + Medulla obl.	43.8	15.32	4.34	4.46	2.66	3.86	(1.06, 3.31)	64.0	22.0	23.0	5.3	7.4
Spinal Cord	49.1	17.42	5.15	5.25	2.76	4.26	(1.02, 3.76)	42.2	13.5	15.4	4.4	5.1
② Adult												
Cerebrum	47.8	16.84	1.65	7.56	2.72	4.91	(4.58, 3.39)	57.2	19.7	20.7	5.1	6.3
Cerebellum	49.3	18.43	2.44	7.04	3.07	5.88	(2.88, 3.09)	46.6	14.1	15.6	5.1	5.9
Midbrain	52.4	24.08	3.17	11.71	4.14	5.06	(3.69, 3.60)	46.5	13.4	17.7	5.0	5.7
Pons + Medulla obl.	56.4	35.47	6.87	14.60	6.47	7.53	(2.13, 3.32)	44.4	10.8	17.5	6.3	6.3
Spinal Cord	54.2	26.44	5.71	9.64	3.65	7.44	(1.69, 4.21)	42.1	8.5	16.0	7.9	6.4
Optic Nerve	49.7	20.74	3.60	7.78	4.50	4.86	(2.16, 2.53)	41.7	11.1	15.1	5.6	6.2
Trigeminal Nerve	51.7	28.50	5.19	9.34	3.98	9.99	(1.80, 3.65)	50.1	6.4	18.5	10.7	8.9
Sciatic Nerve	32.3	14.30	2.44	3.59	1.36	6.91	(1.48, 4.44)	31.3	3.0	11.1	5.2	6.1

(μMol/100 mg Total Lipid)

Table 2 Gray and White Matter of Rabbit Cerebrum

	Chol. free	Sphingolipid Total	CN	CH	S	Sph	CH/CN, CER/S	Phospholipid Total	PC	PE	Sph	PS
① Gray Matter	29.2	10.07	0.88	3.74	1.16	4.29	(4.25, 4.00)	57.7	20.7	19.9	3.9	8.1
White Matter	47.0	24.97	3.77	13.16	3.77	4.27	(3.49, 4.49)	52.3	11.5	17.9	5.4	12.4
② Gray Matter	37.9	9.83	0.67	2.70	1.93	4.53	(4.00, 1.75)	57.6	22.2	19.8	3.9	7.1
White Matter	56.4	31.73	5.45	14.76	5.06	6.46	(2.71, 3.99)	43.4	12.3	18.9	5.8	7.4

Table 3 Regional Survey of Rabbit Spinal Cord

		Chol. free	Sphingolipid Total	CN	CH	S	Sph	CH/CN, CER/S	Phospholipid Total	PC	PE	Sph	PS
① Ant. Pyramidal Tr.		58.1	34.34	10.38	10.84	4.51	8.61	(1.04, 4.76)	51.7	8.9	19.5	9.5	8.1
Post. Fasciculus		56.0	31.82	8.28	11.22	4.34	7.98	(1.36, 4.49)	51.1	10.1	19.1	8.9	7.7
② Lat. Pyr. Tr.	Cervical	56.1	29.81	8.55	10.06	4.15	7.05	(1.18, 4.48)	48.5	8.5	19.6	9.8	8.1
	Lumbal	51.7	29.38	9.22	9.22	3.87	7.07	(1.00, 4.77)	51.1	8.1	18.1	10.7	8.3
Post. Fasc.	Cervical	55.3	30.06	7.31	10.51	4.52	7.72	(1.44, 4.44)	51.4	9.6	20.3	9.6	8.3
	Lumbal	55.6	26.52	5.76	10.65	2.81	7.28	(1.85, 5.78)	48.6	8.4	19.5	9.2	7.6

Table 4 Ox Spinal Cord, Root Nervous Tissue and Optic Nerve

		Chol. free	Sphingolipid Total	CN	CH	S	Sph	(CH/CN, CER/S)	Phospholipid Total	PC	PE	Sph	PS
① Spinal Cord													
Thoracal	Lat. Pyr. Tr.	61.7	37.52	10.02	12.71	5.87	8.92	(1.27, 3.87)	50.5	9.4	21.9	8.6	7.3
	Post. Fasc.	63.2	36.57	9.89	12.37	5.21	9.10	(1.25, 4.27)	49.2	9.4	21.4	7.9	7.1
Lumbal	Lat. Pyr. Tr.	63.7	36.96	8.70	13.53	5.94	8.79	(1.56, 3.74)	46.8	9.5	19.8	8.7	7.0
	Post. Fasc.	62.0	37.07	9.13	12.14	5.11	8.69	(1.33, 4.16)	47.8	9.5	20.6	8.3	6.9
② Root Nervous Tissue													
Thoracal	Ant. R.N.T.	57.5	32.59	4.56	6.64	4.66	16.73	(1.46, 2.41)	61.8	11.1	19.9	18.1	9.1
	Post. R.N.T.	59.8	31.32	4.86	6.30	4.67	15.49	(1.29, 2.39)	61.0	12.4	19.1	15.0	9.5
Cauda equina	Ant. R.N.T.	56.0	31.15	4.12	7.14	4.02	15.87	(1.73, 2.80)	61.3	10.9	19.2	18.6	9.9
	Post. R.N.T.	58.0	27.86	3.94	6.28	3.79	13.85	(1.59, 2.70)	62.8	13.1	19.3	16.2	9.9
③ Optic Nerve		56.8	34.24	6.37	15.22	5.47	7.18	(2.39, 3.95)	50.4	9.9	18.1	8.6	7.7

Table 5. Galactolipid/Sphingomyelin Ratio

	① Rabbit Young	① Rabbit Adult	② Monkey	③ Ox
Cerebrum	1.54	2.43	3.37	
Cerebellum	2.29	2.13	3.37	
Interbrain	1.86	3.52	4.08	
Midbrain	1.49	3.76	4.40	
Pons+Medulla obl.	2.97	3.71	4.10	
Spinal Cord	3.08	2.55	3.00	3.18
Optic Nerve		3.27	4.01	3.77
Trigeminal N.		1.85	1.42	
Sciatic N.		1.07	1.37	0.98

[文献]

1) Che et al Anal. Chem. 28 1756 (1956)
2) DeVries, G.H. and Norton, W.T. J. Neurochem. 22(2) 251, 259 (1974)
3) Hanel, H.K. and Dam, H. Acta Chem. Scand. 9 677 (1955)
4) Martin, J.J. et al J. Neurol. Sci. 21(3) 251 (1974)
5) Mead, J.F. and Lewis, G.M. Biochem. Biophys. Res. Comm. 9(3) 231 (1962)
6) do. 11(4) 319 (1963).
7) Mickel, H.S. and Hill, P.L. Lipids 7(11) 733 (1972)
8) Radin, N.S. and Akahori, Y. J. Lipid Res. 2(4) 335 (1961)
9) Rouser, G. et al. in "Lipid Chromatographic Analysis" Vol I Chap 3 (1967)
10) Rouser, G. & Yamamoto, K. in "Handbook of Neurochemistry" Vol I. chap 8 (1969)
11) Smith, M.E. J. Lipid Res. 14(5) 541 (1973)
12) Svennerholm, L. and Vanier, M-T. Brain Res. 55 413 (1973)
13) Yamamoto, A. and Rouser, G. Lipids 5(4) 442 (1969)
14) 山本章他. 神経研究の進歩 17巻3号 441頁, 昭和48年.
15) Zurkowski, P. Clin. Chem. 10 451 (1964)

41 髄膜腫の脂質構成について

久保田　勝・水谷　弘（都立府中病院・脳外）
宇尾野公義（都立府中病院・神経内）
武富　保（信大・医・順応研・生化）

〔要約〕

ヒト髄膜腫(Meningioma)の脂質構成については，多くの報告がある。中でも中性脂質[1]，リン脂質[2]は詳細な研究がなされているが糖脂質については微量のためしかるべき結果を得ないのが現状である。今回，演者らは，3症例の髄膜腫を手術摘出する機会を得たので脂質構成について臨床面，組織像から良性型，悪性型に分け比較検討をしたので報告する。

脂質抽出は，Folch法で行い，分離精製は，カラムクロマトグラフィーを，定性定量に薄層クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーを使用した。

1) 中性脂質では正常脳に見られないCholesterol esterが存在し他にTriglyceride, Free fatty acid, Cholesterolが Detect された。Ester結合しているFatty acidsパターンは，悪性型で $C_{18:1}$ の不飽和脂酸が相対的に多い。 2) リン脂質はphosphatidyl-ethanolamine, lecithine, sphingomyelineが存在した。 3) 中性糖脂質はCerebrosideとLactosylceramideが主成分でCerebrosideはglucosylceramideであり，Cerebrosideとlactosylceramideの Fatty acid composition は $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ が主成分であった。 4) Gangliosideは，Hematosideが main で，臨床面，組織像で悪性型はHematosideのみ，良性型では，これに更に糖鎖が延びたGM_2, GM_1, GD_{1a}が存在し悪性型において糖鎖不全がおきていると考えられる。

ヒト髄膜腫の脂質組成は，膜の構造と電荷の面で注目されつつある。中でも糖脂質は，最近，金沢ら[4]により glucosylceramide と lactosylceramideが存在することが判った。一方 gangliosideは Seifert[3]らはHematosideが主成分と考えているが未だ確認されていない。これら脂質の他に中性脂質，リン脂質についても，悪性型と良性型の脂質組成の比較検討を行った。

方法と結果

(材料) 症例1はConvexより発生し前頭骨まで浸潤する腫瘍で組織像ではSarcomatous Typeに近く，組織培養でも悪性像と示した。症例2，3は，いずれも組織像はMeningothelial Typeで臨床経過から見ても他組織への浸潤もなく良性型である。

(抽出) 手術摘出した新鮮腫瘍組織は抽出まで−20℃のDeep freezerに保存した。抽出はFolch法に従いChloroform−Methanol (C-M比) (2:1, v/v) の20倍量を加えWaring blenderでHomogenateし口過後エバポレーターでdrynessにしTotal lipidsを得た。これをアセトン・エーテルで溶媒分画を行い，アセトン可溶の中性脂質分画とエーテル処理によりエーテル可溶のグリセロリン脂質分画と不溶の粗スフィンゴリピドを得た。

	Wet weight	total lipids	acetone soluble	crude sphingolipids
Case 1.	40 g.	1.525 g.	0.505 g.	0.252 g.
Case 2.	20 g.	0.340 g.	0.090 g.	0.050 g.
Case 3.	40 g.	1.724 g.	0.340 g.	0.270 g.

(中性脂質分画) アセトン可溶分画について Hexane - Ethylether - Acetic acid (80:20:1, v/v/v) でTLC展開を行い cholesterol ester, Triglyceride, Free fatty acid, Cholesterolに一致するSpotを得た。これらをTLC上でかきとり, 5%塩酸メタノールで3時間100℃で methanolysis を行い石油エーテルで fatty acid methyl-ester を抽出し, 17%EGS, 172℃でガスクロマトグラフィー (GLC) を行った。表1に示す様に cholesterol ester は $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ が main で $C_{18:2}$ は少ない。Triglyceride は $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, Free fatty acid は $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ が主な成分である。又悪性型に $C_{18:1}$ の相対的増加が見られた。

(リン脂質分画) エーテル可溶のグリセロリン脂質分画について Chloroform — Methanol — Water (C:M:W) (65:25:4, v/v/v) でTLC展開し, モリブデンブルーでリンの発色を行い, Phosphatidyl ethanolamine, lecithine, sphingomyeline が主な成分であり, fatty acid composition は phosphatidyl ethanolamine と lecithine は $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ が main で sphingomyeline は $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ が main であった。

(糖脂質分画) エーテル不溶の crude sphingolipids を関東化学のケイ酸でカラムクロマトグラフィーを行った。溶媒系は, chloroform - methanol の系を使用し溶出パターンは中性糖脂質は C-M-W (65:25:4, v/v/v) で展開し anthrone 硫酸で発色した。Ganglioside は C-M-W (60:35:8, v/v/v) で展開し Orcinol reagent でシアル酸の発色を見た。中性糖脂質は C-M (9:1, v/v) に cerebroside が C-M (8:2, v/v) に lactosyl-ceramide が溶出された。

Ganglioside は, Case 1 において Hematoside が C-M (6:4, v/v) に

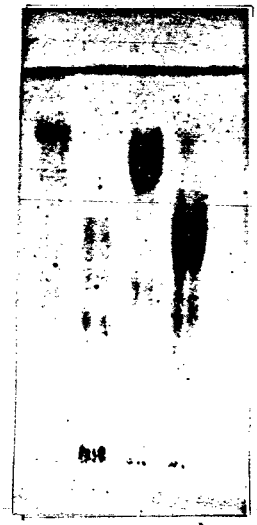
Table 1)

Fatty acid composition of neutral lipids (%)

	Cholesterol ester			Triglyceride			Free Fatty Acid		
case	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C. 14:0	2.5	8.8	3.1	5.5	4.4	1.9	4.1	5.4	2.5
16:0	22.3	20.5	23.3	40.4	56.9	38.8	32.8	46.9	37.3
16:1	6.0	6.8	4.6	3.0	1.6	2.1	3.5	5.7	3.0
18:0	6.4	6.0	6.5	24.6	24.3	17.1	24.6	19.7	26.9
18:1	53.4	43.5	49.6	24.2	10.9	28.2	29.5	17.4	18.7
18:2	10.4	14.4	13.0	2.4	1.9	7.8	5.4	5.9	11.5

Fig. 1)

TLC of cerebroside



1 2 3

1. Cerebroside (meningioma)
2. glucosyl ceramide
3. galactosyl ceramide

Borax-impregnated plate

C-M-W = (60:35:8, v/v/v)

Fig 2).

TLC of ganglioside

Case. 1.



1 2 3 4 5

1. Fr. 1. (C-M, 6:4)
2. Fr. 2. (C-M, 4:6)前半
3. Fr. 3. (C-M, 4:6)後半
4. Hematoside
5. Tay-Sachs ganglioside

C-M-W (60:35:8, v/v/v)

orcinol reagent

Case. 2.



1 2 3 4 5 6 7 8

1. Fr. 1. (C-M, 6:4)
2. Fr. 2 (C-M, 4:6)前半
3. Fr. 3 (C-M, 4:6)後半
4. CMH + CSE
5. Hematoside
6. Tay-Sachs ganglioside
7. GM1. ganglioside
8. GD1a. ganglioside

Case 2, 3 では GM2, GM1, GD1a が C-M (4:6, v/v) に溶出された. (Fig 2). Case 1 では C-M (4:6, v/v) 以下の fraction にシアル酸の発色は見られない。

一方 Cerebroside と lactosyl ceramide の分画を更にフロリジルカラムでグリセロリン脂質を除き, Fig 1 に示す様にホウ酸添加薄層プレートで C-M-W (60:35:8, v/v/v) で展開し glucosylceramide と galactosyl-ceramide の分離を試みた。髄膜腫の Cerebroside は glucosyl-ceramide であった。又 fatty acid composition は $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ が主成分であり, CDH においても同様の結果が得られた. (Table 2)。これは脳に存在する glucosylceramide が $C_{18:0}$ が大部分であることより臓器由来と考える.

Ganglioside は, C-M-W (60:35:8, v/v/v) で TLC 展開し Orcinol reagent で Sial 酸の発色を行い Densitometer で定量した. Case 1 では Hematoside が大部分で Case 2 3 では GM3 以外に GM2, GM1. GD1a が少量 (10~20%) 含まれていた.
又 TLC で Hematoside の部分をかきとり methanolysis し GLC 分析を行うと $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ と長鎖の脂酸を持ちやはり脳由来の ganglioside 系とは異っている. その他 Sulfatide, CTH, Ggal, GM3 に更に NANA が結合した spot は得られなかった.

考按

髄膜腫の中性糖脂質について cerebroside が主成分であることが以前より判っていたが, 金沢[4]らの報告で CDH も存在し, 又 cerebroside の糖組成が glucose であること

が判った。そして fatty acid composition も長鎖脂酸を含み，脳由来で少量だが存在する glucosyl ceramide は $C_{18:0}$ が大部分であることから，この CMH, CDH は臓器由来のものと考える。

一方 ganglioside については，これまで Seifert[8] らによると GM3 の他に，これに NANA がついた物質を見ているが今回これに一致する spot はなく，又 Kostić[5] らは Ggal, GM1, GD1a が主成分だと報告しているが Ggal なる成分は detect されない。この3症例で悪性型（Case 1）は GM3 のみで良性型（Case 2, 3）は GM3 以外に更に糖鎖の長い GM2, GM1 ganglioside が含まれていた。そして，この GM3 の脂酸もやはり長鎖脂酸を持ち臓器型の性質を示しており，cerebroside, CDH を含めてこの ganglioside も同系の代謝経過にあると考える。又これらシアル酸を含む ganglioside は腫瘍細胞の膜の電荷に影響するといわれているが，最近箱守[3]らが培養細胞を悪性化しその細胞の糖脂質を抽出し検索した所，悪性化細胞は良性型より糖鎖が短くなったものが多いことを報告しており，悪性化による糖鎖不全現象が注目されつつある。本実験において悪性型で糖鎖の長い GM2, GM1 ganglioside が見られないことは，この糖鎖不全の反映かもしれない。中性脂質の fatty acid composition は悪性型で不飽和脂酸（$C_{18:1}$）が相対的に増加しているが，膜の構造上，悪性化となんらかの関係があるかもしれない。以前和達[7]が本会で髄液の脂質分析を報告した。中性糖脂質，Ganglioside いずれも脳の脂質組成を反映していた。髄腫の糖脂質が臓器由来の特長を利用し，髄腫種を髄液脂質組成を検索することにより診断可能になるかもしれない。

Table 2)

Fatty acid composition of neutral glycolipids (%)

	CMH		CDH
	case. 1	case. 2	case. 1
C. 14:0	1.8	1.3	1.9
15:0	4.3	1.1	1.5
16:0	21.1	16.5	8.4
16:1	1.4	2.1	1.5
18:0	10.1	10.2	6.1
18:1	2.9	4.6	2.3
20:0	1.9	2.3	1.3
20:1	1.1	2.6	0.5
22:0	15.8	13.7	19.3
23:0	1.7	2.2	1.1
24:0	21.0	25.6	34.0
24:1	6.8	19.8	9.2

文　献

1) Christensen Lou. H. O, Clausen J. and Bierring. F.: J. Neurochem. 12, 619-627, 1965
2) Gopal K, Grassi, E, Paoletti, P and Usardi M: Act Neurochim 11, 333-347, 1963.
3) Hakomori S and Murakami, W.T.: Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 254-261, 1968.
4) Kanazawa I and Yamakawa T.: Jap. J. Exp. Med. 44, 379-387, 1974.
5) Kostić D and Buchheit, F.; Life sci. 9, 589-596, 1970.
6) Kubota. M: Jap. J. Exp. Med. 42, 513-526, 1972.
7) 久保田，丸山，宇尾野，武富：Bulletin of the Jap. Neurochemical Society. 12, 80-83, 1973.
8) Seifert H and Uhlenbruck G.: Naturwissenschaft 52, 190, 1965.
9) Stein H.A., Opalka, E. and Rosenblum I.: J. Neurosurg. 20, 435-438, 1963.

42 ラット小脳のguanylate cyclaseの特異性

中沢欽哉・佐野　護
（愛知コロニー・発達障害研）

〔要約〕

ラット脳内の顆粒結合性及び可溶性のGuanylate Cyclaseの分布を検討したところ、大脳では本酵素の殆が可溶性であるのに対し、小脳では逆にその殆が顆粒結合性であった。この顆粒結合性酵素は反応液に1%Triton X-100を添加することにより著しく活性化された。小脳の顆粒結合性及び可溶性酵素の性質を比較検討するに、両者共にMn^{2+}の至適濃度は約3mMであり、又Ca^{2+}の影響についても、共に効果が認められなかった。Ca^{2+}の効果については、大脳など他の組織の本酵素反応が、Mn^{2+}の共存下でCa^{2+}によって促進されるとの報告があり、同時に追試したところ確かに小脳と異り促進効果が認められた。しかし顆粒結合性酵素の場合、1%Triton X-100で活性化するとMn^{2+}の至適濃度は1mMに下り、Ca^{2+}による阻害が認められるようになった。これらの実験結果は、1%Triton X-100による本酵素の可溶化は、顆粒結合性酵素の本来の性質を変化させることを示唆している。　小脳をWhittakerの方法に従って細分画を行なったところ、顆粒結合性酵素の80%以上がミトコンドリア分画に回収された。この分画を蔗糖密度勾配遠心法でさらに細分画すると、本酵素の活性は、0.32Mと0.8Mおよび0.8Mと1.2Mの濃度境界に対応する部位に集る細分画に回収され、比活性については後者の方が高かった。夫々の細胞分画の細胞学的組成、さらに小脳における細胞分画法自体に関しても現在検討中である。

小脳のcyclic GMP濃度は肺臓と並んで、他の哺乳動物組織に比べて著しく高いことが知られ(1,2)、またアセチルコリン(1)や脱分極剤(3)投与によって、小脳内のcyclic GMPが増量することが報告されている。最近Harmalineによるtremorの誘発と小脳のcyclic GMP増加の関係も指摘されている(4)。これらの知見はcyclic GMPが小脳の神経生理的機能に何らかの関連を持つことを示唆するものと考えられる。

我々は既に報告(5,6)した如く、cyclic GMPの合成酵素であるGuanylate Cyclaseの活性測定方法を開発し、ラット全脳より本酵素を部分精製し、その酵素学的性質を検討した。その際可溶性分画にある酵素活性としては、終脳が一番高く、小脳はその約半分の活性しか検出出来ないことを報告した。今回は顆粒結合性のGuanylate Cyclaseに着目し、組織内の顆粒結合性酵素と可溶性酵素の割合が脳の部位により異なり、小脳では本酵素の全活性の2/3以上が顆粒結合性酵素として回収された。今回の報告では、ラット小脳の顆粒結合性酵素の細胞内局在、及び小脳の可溶性酵素との酵素学的性質の比較検討を行う。

〔実験方法〕

本実験には、成熟した雄性ラットを用いた。1～3匹のラットより採取した小脳を、その湿重量の10倍量の0.32M蔗糖液(10mMメルカプトエタノールを含む)で、Potter-Elvehjemテフロン硝子ホモゲナイザーを用いて緩やかにhomogenizeした。本文中で特記しない場合は、このhomogenateを1,000×g 10分間遠心沈澱した後、105,000×g 60分間遠心沈澱して得た沈澱分画を顆粒結合性の酵素標品とし、他方その上清を可溶性の酵素標品とした。

Guanylate Cyclase 活性の測定は既報の方法 (6) を少し改良して，用いた。標準反応液としては，[8-^{3}H] GTP 1 mM (3,000～6,000 cpm/nmole)，cyclic GMP 2.5 mM，Creatine phosphate 15 mM，Creatine phosphokinase 40 μg，塩化マンガン 3 mM，2-Mercaptoethanol 10 mM，トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7) 25 mM，酵素標品 100～150 μg 蛋白，Triton X-100 を添加する場合は 1% の割に加えて，全量を 0.20 ml とした。30°C で 15～20 分間 incubate した後，1N 塩酸 20 μl を加えて，沸騰水浴中で 2 分間加熱することにより反応を停止させた。中和後反応液を Alumina－Dowex 1×2 (塩酸型) カラム (6) の Alumina 部分に載せ，カラムを洗滌後，0.5N 塩酸により，Dowex カラムから ^{3}H-cyclic GMP を溶出した。

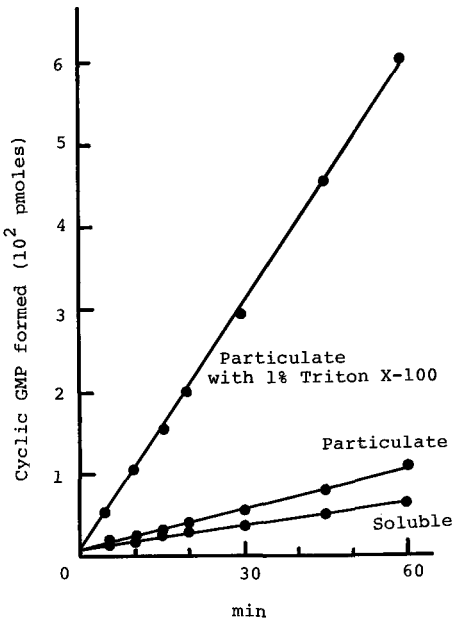


Fig. 1 Formation of cyclic GMP by soluble and particulate enzymes in rat cerebellum.

〔結果及び考察〕

我々の本酵素活性測定法の再学性に関しては，既に報告した (6) ところであるが，粗酵素標品を扱う目的で，又測定法の感度を高める為に，さらに活性測定条件の検討を加えた。改良点としては主として，十分な基質 GTP 濃度の維持と ^{3}H-cyclic GMP の溶出方法などの点を改良した。その結果，ラット小脳の酵素標品を ^{3}H-GTP と incubate すると，図1. に示した如く，いづれの酵素標品の場合も cyclic GMP の合成は少くなくとも 60 分まで直線的に増加した。顆粒結合性酵素の場合，反応液に 1% Triton X-100 を添加することにより，著しい活性化が認められた。この活性化は，顆粒結合性酵素が表面活性剤により可溶化されることに基づくものであることを確かめた。

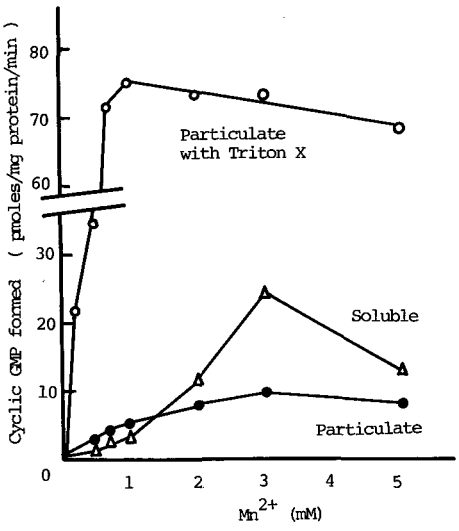


Fig. 2 Effects of Mn^{2+} on guanylate cyclase in rat cerebellum.

I. 顆粒結合性及び可溶性酵素に対する二価イオンの効果

ラット小脳の顆粒結合性及び可溶性酵素に対する Mn^{2+} イオンの効果を調べたのが図2である。Triton X-100 を添加しない場合，顆粒結合性酵素も可溶性酵素も Mn^{2+} の至適濃度は約 3 mM で，我々がラット全脳より部分精製した酵素の場合の至適濃度とよく一致する (6)。しかし顆

粒結合性酵素に1% Triton X-100を加えて測定すると著しい活性化と同時に，Mn^{2+}に対する至適濃度は1 mMになった。これらいづれの酵素反応にもMn^{2+}は必要で，Ca^{2+}やMg^{2+}によっては代り得なかった。

また本酵素はMn^{2+}共存下でCa^{2+}によりstimulateされると云う報告(5-9)が多いが，種々なるCa^{2+}濃度とMn^{2+}濃度を用いて小脳の酵素に対するCa^{2+}の影響を検討したが，図3に示した如く，至適濃度又は低濃度のMn^{2+}共存下では，小脳の顆粒結合性及び可溶性酵素の活性はCa^{2+}の影響を全く受けなかった。1か1% Triton X-100を添加した場合の顆粒結合性酵素は3 mM Ca^{2+}の存在により，その活性が阻害された。他方ラット大脳の可溶性酵素の活性は，至適濃度のMn^{2+}の共存下でも，3 mM Ca^{2+}でstimulateされた。

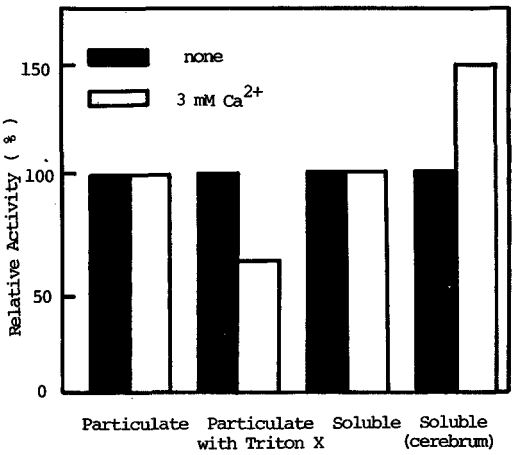


Fig. 3 Effects of Ca^{2+} on guanylate cyclase in rat brain in the presence of Mn^{2+} : the optimum concentration was used.

最近哺乳動物組織の本酵素は顆粒結合性と可溶性の二つの型があり，この二つの型はMn^{2+}の至適濃度，及びCa^{2+}により前者が阻害され，後者がstimulateされると云う点で区別されることが報告されているが(8,9)，我々の上記の結果では，この二つの相異点はTriton X-100による酵素の可溶化の影響に基づくのであって，顆粒結合性及び可溶性酵素の本質的な相異ではないことを示唆している。

Ⅱ．ラット脳内の顆粒結合性及び可溶性酵素の分布

ラット脳を表1のように各部位に分け，〔実験方法〕の項に記した如く，homogenizeし，それぞれのhomogenatesを直接105,000×g 60分間遠心沈澱し，その上清分画と沈澱分画の本酵素の活性を測定した(表1)。homogenatesの活性に関しては，小脳は終脳に匹敵し，小脳ではその2/3の活性が顆粒結合性で，終脳では逆にその2/3の活性が可溶性であることが分った。また顆粒結合性酵素の活性としても，我々の測定した脳位の中では，小脳が一番高かった。

Table I Guanylate cyclase activity in rat brain.

Regions	Cyclic GMP formed		
	Homogenate	Supernatant	Pellet
	nmoles/min/g tissue		
Telencephalon	1.69	1.46	0.77
Diencephalon	1.43	1.10	0.58
Midbrain	1.37	0.94	0.58
Cerebellum	1.61	0.54	1.02
Pons and medulla oblongata	1.17	0.58	0.60
Spinal cord	0.69	0.32	0.48

Ⅲ．小脳の顆粒結合性酵素の細胞内分布

ラット小脳をWhittakerの方法(10)に従って，細胞分画を行い，1% Triton X-100の添加又は無添加の条件で，本酵素の活性を測定すると，表2及び表3の如くになる。Triton X-100無添加の場合は比活性，全活性共に，105,000×g上清分画が一番高くなるが，表面活性剤を添加して，本酵素を可溶化して測定した場合は，17,000×g及び105,000×gの沈澱分画の比活性が著しく高くなり，全活性では

Table II Subcellular distribution of guanylate cyclase in rat cerebellum.

Fraction	Cyclic GMP formed			
	Specific Activity units*/mg protein		Total Activity units/g tissue	
	none	Triton X-100	none	Triton X-100
Homogenate	12.0	36.6	1,768	5,383
1,000xg precipitate	7.5	17.8	330	783
17,000xg precipitate	13.7	88.2	670	4,307
105,000xg precipitate	13.5	95.3	73	514
105,000xg supernatant	33.2	27.3	805	656

* one unit; 1 pmole/min.

Triton X-100 によって活性化される酵素の80%以上は17,000xg沈殿分画に回収される。この分画をさらにWhittakerの方法(10)に従って，蔗糖密度勾配法により分画すると，表3の如く，A(0.32Mと0.8Mの間)とB(0.8Mと1.2Mの間)の二つの分画に本酵素の活性の大部分が回収され，殊にB分画の比活性が一番高くなった。このB分画は一般には神経末端顆粒分画と云われる分画で，小脳の場合もNerve ending particlesを多く含む分画と考えられるが，細胞分画上大脳と小脳ではかなり異なる面もあると考えられるので(11)，小脳の細胞分画法自体を，形態学的及び生化学的に現在検討中である。

また顆粒結合性のGuanylate Cyclaseの場合は，Adenylate Cyclaseとの関係が問題となり，その点に関しても現在検討中である。

Table III Subfractionation of crude mitochondrial fraction from rat cerebellum.

Fraction	Cyclic GMP formed			
	Specific Activity units*/mg protein		Total Activity units/g tissue	
	none	Triton X-100	none	Triton X-100
17,000xg precipitate	8.9	58.9	524	3475
A**	9.0	82.7	126	1158
B	11.2	124.2	112	1252
C	11.0	30.5	150	415

* One unit; 1 pmole/ min.

** The fractionation described by Whittaker.(10)

(文献)

1) Kuo, J.F., et al., (1972) J. Biol. Chem., 247, 16
2) Steiner, A.L., et al., (1972) J. Biol. Chem., 247, 1121
3) Ferrendelli, J.A., et al., (1973) Mol. Pharmacol., 9, 445
4) Mao,C.C., et al., (1975) Brain Research, 83, 516
5) Nakazawa, K., and Sano M., (1973) Abstracts of the Fourth International Meeting of the International Society for Neurochemistry, Tokyo, p.57
6) Nakazawa, K., and Sano, M., (1974) J. Biol. Chem., 249, 4207
7) 佐野譲，中沢敏哉 (1973) 生化学 45, 621
8) Kimura, H., and Murad, F., (1974) J. Biol. Chem., 249, 6910
9) Chrisman, T.D., et al., (1975) J. Biol. Chem., 250, 374
10) Gray, I.G., and Whittaker, V.P., (1962) Life Science, 7, 605
11) Hajós, F., et al., (1974) Brain Research, 70, 261

43 ラッテ脳におけるguanyl cyclaseの細胞内分布と活性化について

天野恵美子・斉藤光生・中根正樹
出口武夫
（都神経研・神経医化）

〔要約〕

(1) cyclic GMP は興奮性神経伝達物質の second messenger であろうという考えが支配的になって来た。cyclic GMP を生合成する guanyl cyclase活性は肺でも脳でも可溶性分画に存在すると報告されている。この報告は cyclic GMP が神経刺激伝達に関与するという考え方と矛盾するもののように思われる。最近，心臓と肺で，顆粒分画中にも高い guanyl cyclase活性があり，これは Tritonにより活性化されるという報告が現われた。この知見の上に立って，脳の guanyl cyclase活性の細胞内分布を再検討した。

(2) Tritonのない条件下で測定すると，guanyl cyclase活性のうち$\frac{2}{3}$は可溶性分画に，$\frac{1}{3}$は顆粒分画中に認められた。0.5%のTriton 存在下で活性を測定すると，顆粒分画中の guanyl cyclase活性は8～10倍も活性化されるのに対し，可溶性分画中のguanyl cyclase は殆んど活性化されなかった。Triton 存在下では全活性の$\frac{2}{3}$が顆粒分画中に回収され，可溶性分画には$\frac{1}{3}$しか検出できなかった。

(3) 細胞分画を行ってみると，顆粒分画中の guanyl cyclase活性は大部分が粗 mitochondria分画にあり，更に分画すると synaptosome 分画に集中して回収されることが判った。顆粒分画の中では synaptosome 分画が最も高い比活性を示していた。

(4) 脳の guanyl cyclaseには可溶性分画に局在するものと，synaptosome に局在するものの少なくとも2種類の酵素があるものと考えられる。

---

cyclic GMP は cyclic AMP とならんで，"second messenger" としての役割が注目されるようになった。脳，殊に小脳では cyclic GMP の含有量は非常に高い。また脳の cyclic GMP は acetylcholine，glutamic acid および脱分極剤によって著しく増加することが明らかになり，[2,3,7] 神経伝達と cyclic GMP の関連性が注目されるようになった。

cyclic GMP は GTP から guanyl cyclase によって生合成される。guanyl cyclase 活性は哺乳動物では肺にその活性が高く，脳の cyclase 活性は肺の約$\frac{1}{10}$であると報告されている。[10] 肺では guanyl cyclase活性は専ら可溶性分画に検出されると報告されたが，中沢と佐野は，脳でも guanyl cyclase活性の 90%は可溶性分画にあると報告している。[8] Gordis & Morgan も guanyl cyclase の比活性は可溶性分画が高いと報告しているが，酵素活性の表示も，また活性の%分布の表示もないので，guanyl cyclase の脳細胞内分布の状況を判断する資料とはならない。[4]

guanyl cyclaseが専ら可溶性分画に回収されるという事実は，cyclic GMP が神経伝達に関与するという仮説と矛盾するように思われる。神経伝達物質は Neuron の細胞膜に作用するものであるから，guanyl cyclase は細胞膜に局在し，伝達物質の作用を細胞内へと伝達すると考えられるのである。この機構は norepinephrine－adenyl cyclase system については確立されている。

Ishikawa ら[5] は小腸の guanyl cyclase 活性が Tritonにより3倍活性化されると報告した。最近 Kimura & Murad は心臓の guanyl cyclase はその 80%が顆粒分画にあり，Tritonにより活性化されることを明らかにした。[6] Chrisman らは肺の

guanyl cyclase についても同様の現象を報告している。[1] 我々は，Triton による guanyl cyclase の活性化という新知見の上に立って，脳における guanyl cyclase の細胞内分布について再検討する必要があると考えた。

〔実験方法〕

guanyl cyclase 活性の測定　反応条件は〔表I〕に示してある。37°Cで10分間反応させたのち，0.05 M acetate buffer (pH 4.0) を 0.4 ml 加えたのち，沸とう水中で2分間加熱し反応を停止させた。ついで 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) を 2 ml 加えたのち，蛋白を遠心除去した。その上清について，生成した cyclic GMP を alumina Oxide カラムと Dowex 1 カラムで分離し，[8] その放射能を測定した。cyclic GMP の回収は 90 ～ 95 % であった。またこの反応条件下では蛋白量にして 200 μg まで酵素活性は直線的に増加した。

Table I　Assay condition of guanyl cyclase activity

Tris-HCl, pH 7.6	7.5 μmoles
$MnCl_2$	0.75 μmoles
Dithiothreitol	15 nmoles
Creatine phosphate	0.75 μmoles
Creatine kinase	0.5 U
Theophylline	1.2 μmoles
Cyclic GMP	0.5 μmoles
GTP-^{3}H	37.5 nmoles
±Triton X-100 final conc.	0.5%
Total Volume	150 μl

細胞分画法　ラット大脳皮質を9倍量の 0.32 M sucrose で homogenize し Whittaker の方法で，P_1 (Nuclei)，P_2 (crude mitochondria)，P_3 (microsome) および soluble fraction に分けた。P_2 分画は2～3倍量の 0.32 M sucrose で homogenize し，1.2 M と 0.8 M sucrose を重層した上におき，53000 g 2時間遠心分離し，A (myelin)，B (synaptosome) および C (mitochondria) の分画を得た。

〔実験結果〕

ラットの大脳皮質を等張 sucrose で homogenize し，105,000 g 60分の遠心により上清と顆粒分画とに分け，guanyl cyclase 活性を測定した（表II）。Triton のない条件下では全活性の $\frac{1}{3}$ が顆粒分画に認められるに過ぎないが，Triton の存在下では全活性の $\frac{3}{4}$ が顆粒分画に検出された。Triton により顆粒分画の guanyl cyclase は 8～10 倍活性化されるのに対し，上清分画の cyclase は 30 % 程度の活性上昇を示すにすぎなかった。蛋白当りの比活性でみると，Triton のない条件下では顆粒分画の比活性は上清の $\frac{1}{10}$ 程度であるが，Triton の存在下では顆粒分画の比活性は上清の比活性にほぼ匹敵するまでに増加していたのである。

Table II　Distribution of guanyl cyclase activity after homogenization with isotonic (0.32M) sucrose

Fraction	Total guanyl cyclase activity (nmoles/min/g)		Specific guanyl cyclase activity (pmoles/min/mg prot)	
	-Triton	+Triton	-Triton	+Triton
Homogenate	3.57	13.00	28.6	104.0
Pellet	1.17	9.15	12.3	95.9
Supernatant	2.39	3.16	105.3	139.2

Table III　Distribution of guanyl cyclase activity after homogenization with hypotonic (0.05M) buffer

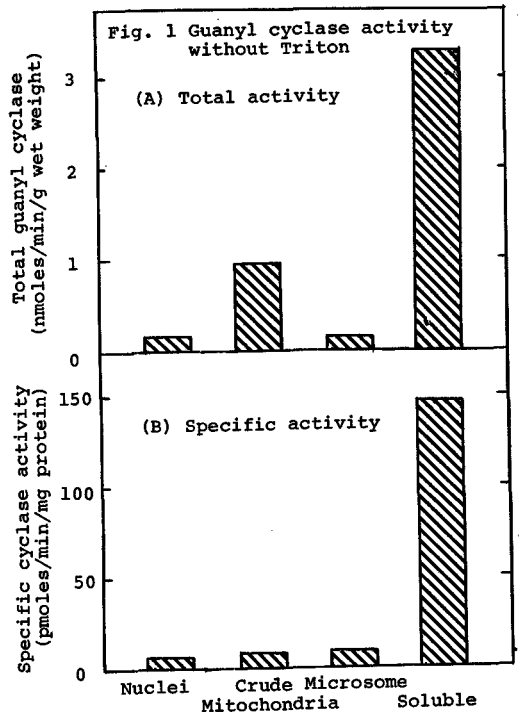
Fraction	Total guanyl cyclase activity (nmoles/min/g)		Specific guanyl cyclase activity (pmoles/min/mg prot)	
	-Triton	+Triton	-Triton	+Triton
Homogenate	4.11	13.11	32.9	104.9
Pellet	1.13	7.97	13.5	95.3
Supernatant	3.07	4.46	109.3	158.7

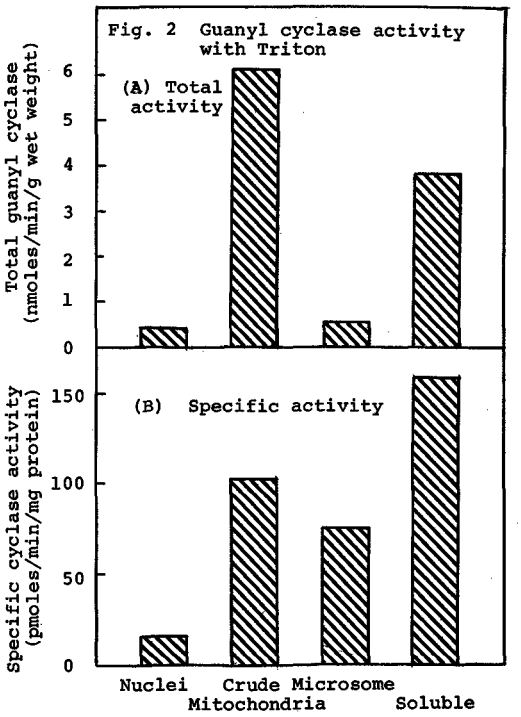
低張の buffer で homogenize した場合には〔表II〕に示すように，上清部分に来る活性が増加する。Triton のない条件下では全活性の$\frac{1}{4}$が沈渣部分に認められるが，Triton の存在下では全活性の約$\frac{2}{3}$が沈渣に認められた。沈渣分画の guanyl cyclase は Triton によって 7〜8 倍の活性化を受けていた。

顆粒分画に存在する guanyl cyclase がどの細胞内成分に局在しているかを調べるために，Whittaker の方法で細胞分画を行った。Triton のない条件下での活性分布が〔図1〕に示してあるが 全活性の 72% が可溶性分画に，ついで 21% が粗 mitochondria 分画に回収された。比活性は可溶性分画が圧倒的に高い値を示し顆粒分画中の比活性はいづれの場合も非常に低かった。

Triton の存在下では〔図2〕全活性の約 60% が粗 mitochondria 分画に検出され，36% が可溶性分画に認められた。Triton により粗 mitochondria 分画の cyclase は 7 倍近く活性化されていたのである。これに対し可溶性分画の酵素は殆んど活性増加を示さなかった。比活性は可溶性分画が最も高く，次いで粗 mitochondria 分画が高い。mitochondria 分画の比活性は nuclei 分画の比活性の 3 倍以上にも達する。

粗 mitochondria 分画を sucrose density gradient で myelin，synaptosomal，mitochondria およびその中間層（A−B と B−C）に分画し cyclase 活性を測定した。Triton のないときにはいづれの分画も極めて低い活性しか示さなかったが，Triton により（Triton 存在下で）5〜10 倍の活性化が認められた。全活性の 60% が synaptosomal 分画に認められ，その周辺（A−B，と B−C）を合計すると全活性の 85% にも達する。（図3）。比活性も

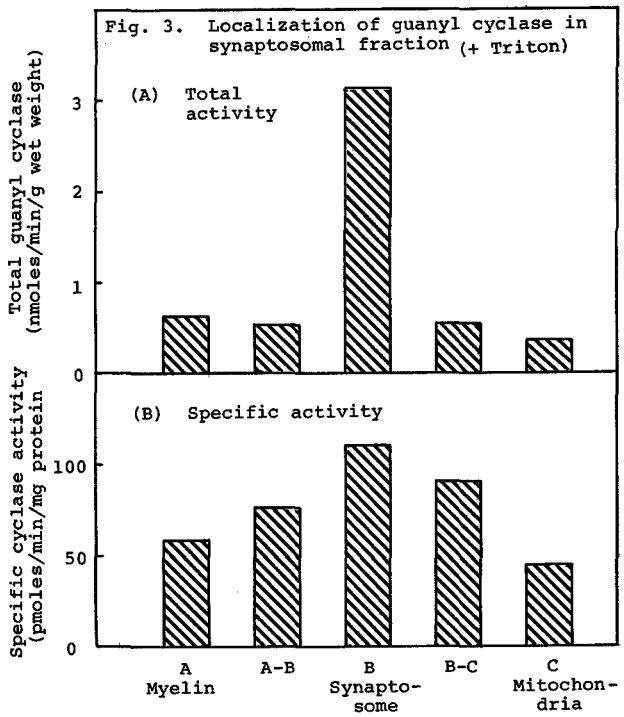




synaptosomal fraction が最も高い値を示していた。

〔考　察〕

以上の実験結果から，脳でも guanyl cyclase 活性の大部分（$\frac{2}{3}$～$\frac{3}{4}$）は顆粒分画に存在し，それは Triton によって著しく活性化される。hypotonic buffer で homogenize した場合でも約$\frac{1}{3}$が沈渣部分に回収されるので，cyclase は不溶性成分と可なり強く結合しているものと考えられる。顆粒分画中の guanyl cyclase は大部分が粗 mitochondria 分画に回収され，更にそれは synaptosomal fraction に集中していることが明らかとなった。synaptosome のうちのどの部分に cyclase が局在しているかについても検索している。また，可溶性の cyclase と顆粒結合型の cyclase が酵素学的に，また機能的にどのような相異を示すかについても検討を加えている。Triton による活性化に比較しうるような活性化が，もっと natural な条件のもとで起り得るものかどうか，殊に cyclic GMP を増加させる神経伝達物質と顆粒結合 guanyl cyclase（の活性化）との関連性など，今後追求さるべき問題であろう。



Acetylcholine や glutamic acid が脳中の cyclic GMP を増加させるという事実，また最近 Bloom らによって大脳皮質のニューロンの電気活性が acetylcholine または cyclic GMP によって異常されるという報告など[9]，cyclic GMP と神経伝達の深い関連性が次第に明らかになりつつある。その中にあって，guanyl cyclase が専ら可溶性分画に回収されるという報告は，最も大きな矛盾として議論されて来た。これに報告した成々の実験結果は，この矛盾を解明する手掛りを与えたものと考える。

REFERNCES

1. Chrisman, T.D., Garbers, D.L., Parks, M. A. & Hardman, J.G., J. Biol. Chem., 250, 374, 1975.
2. Ferrendell, J.A., Kinscherf, D.A. & Chang, M.M., Mol. Pharmacol., 9, 445, 1973.
3. Ferrendelli, J.A., Chang, M.M. & Kinscherf, D.A., J. Neurochem., 22, 535 1974
4. Gordis, C & Morgan, I.G, FEBS letters, 34, 71, 1973.
5. Ishikawa, E., Ishikawa, S., Davis, J.W. & sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 244, 6371, 1969.
6. Kimura, H. & Murad, F., J. Biol. Chem., 249, 6910, 1974.
7. Lee, T.P., Kuo, J. F. & Greengard, P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3287, 1972.
8. Nakazawa, K. & Sano, M., J. Biol. Chem., 249, 4207, 1974.
9. Stone, T.W., Taylor, D.A. & Bloom, F.E., Science, 187, 845, 1975.
10. White, A.A. & Aurbach, G.D., Biochim, Biophys. Acta, 191, 686, 1969.

44 Ca^{2+}, Mg^{2+}依存性ホスホジエステレースとそのactivator蛋白の脳における細胞内分布

上西圀宏・山崎礼子・手島佳子
樫葉明・宮本英七・垣内史朗
（大阪府立中宮病院）

〔要約〕

ラット大脳皮質をDe Robertisらの方法に従って分画して，原分画（NUC, MIT, MIC, SUP），MITの低浸透圧処理後の分画（M_1, M_2, M_3＝上清），またM_1の庶糖密度勾配法による5つのsubfractionを得た。phosphodiesterase（PDE）並びにそのactivator蛋白は，可溶性区分（SUP＋M_3）に全活性の約65％が分布し，残りの活性は顆粒区分に回収された。PDE，activator蛋白共に可溶性区分に最も高い比活性が見い出された（SUP≒M_3）。3mM cAMPを基質にしてPDE活性を測定した場合に，SUPとM_3にCa^{2+}とactivatorによる賦活を認めたが（約3倍），顆粒区分では殆んどそれを認めなかった。しかし，0.4μM cGMPを基質にした場合には，可溶，顆粒の両PDEにCa^{2+}とactivator蛋白による賦活を認め，仲でもMIC分画のPDEはこの条件で約10倍に活性が上昇した（全分画中最大の賦活効果）。MIC分画は，顆粒区分中で最高のPDE活性（0.4μM cGMPとCa^{2+}, activator蛋白存在下に測定）とactivator蛋白の活性を示し，また夫々の比活性もSUP, M_3に次いで高かった。MIC分画のPDEは内因性のactivator蛋白によっても賦活される。M_1から庶糖密度勾配法によってシナプス膜に富む分画を得たが，そのPDEはMIC分画に次ぐ比活性を示した。しかしこの分画のPDEはCa^{2+}とactivator蛋白によって弱くにしか賦活されず，またactivator蛋白の比活性も比較的低かった。

現在哺乳動物の組織に，少なくとも3種の異ったcyclic 3′,5′-nucleotide phosphodiesterase（以下PDE）の存在することが認められている（表1）。但しType 1, 2, 3, の呼び名は，ここでの便宜上のものである。Thompson, Appleman ら[1-3]によれば，Type 1とType 2が可溶性であり，Type 3が顆粒性であるといわれる。Type 1-PDEの活性は次式の如くにコントロールされる[4,5]。

$$\text{Activator蛋白} + Ca^{2+} \rightleftharpoons \text{Activator蛋白}\cdot Ca^{2+}$$

$$(\text{酵素})_{\text{inactive}} + \text{Activator蛋白}\cdot Ca^{2+} \rightleftharpoons (\text{酵素}\cdot\text{Activator蛋白}\cdot Ca^{2+})_{\text{active}}$$

Type 1-PDEとActivator蛋白の組織分布は，最近調らべられた[6]。ここでは，この両者の脳における細胞内分布について報告する。

〔実験方法〕 Sprague-Dawley種ラット（40～60日令，♂）の大脳皮質を，De Robertisらの方法に従って[7]分画した（図1）。電顕サンプルは各分画のpelletを，Kanovsky液中にて前固定，続いて1％オスミウム酸にて固定し，アルコール脱水後

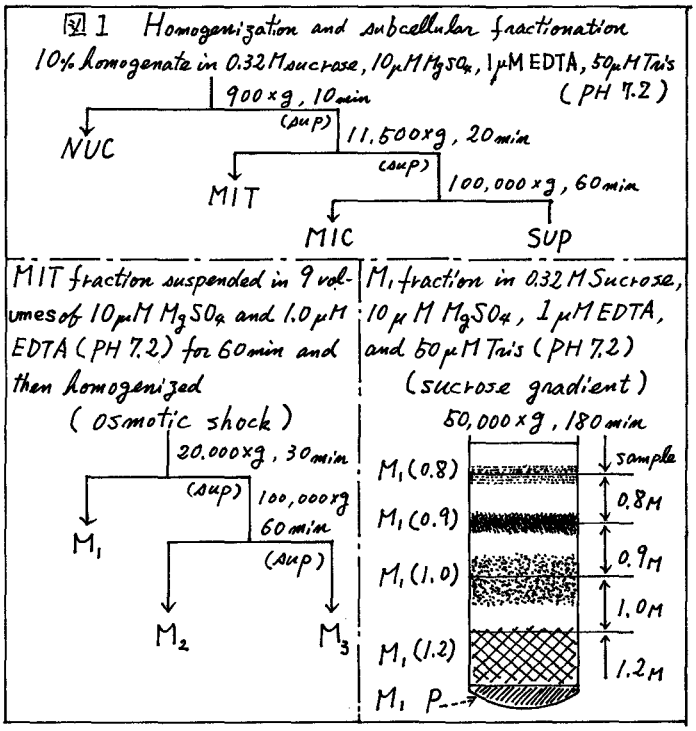
表1 PDEの種類

		K_m (cAMP)	K_m (cGMP)
Type 1	Ca^{2+}とactivator蛋白によって賦活される。Kakiuchi ら[6,7]のFII酵素（Ca^{2+}, Mg^{2+}依存性PDE）。Appleman ら[1,2]のDE I酵素。	10^{-5}～10^{-6} M	1～5×10^{-6} M
Type 2	基質によってPositive cooperativeなControlをうける（従ってcGMPによってcAMPの分解が促進される）。Appleman[1,2]らのDE II酵素	3～6×10^{-5} M	2～3×10^{-5} M
Type 3	基質によってnegative cooperativeなコントロールをうける。cAMP-specific。Appleman ら[1,2]のDE III酵素	4～6×10^{-6} M	——

にEponに包埋した。

PDE活性並びにそのactivator蛋白の定量は，Kakiuchi ら[6]の報告に依った。PDE活性の測定時に添加するactivator蛋白は，ブタ脳の可溶性区分より，Teo ら[9]の方法を modify して精製した。蛋白はLowry ら[10]の方法により，またsuccinic dehydrogenase（SDH）はMaeno ら[11]の報告に依り定量した。

図1 Homogenization and subcellular fractionation



〖結果〗 表2で，SUPとM_3の和が，可溶性区分を代表するが，全体の半分以上のPDE活性並びに，activator蛋白の活性がこの区分に回収され，その比活性も，夫々について，最も高い値を示した。この可溶性PDEは，基質の種類や濃度のいかんにかゝわらず，常にCa^{2+}とactivator蛋白によって賦活された。顆粒状PDEについては，基質の種類や濃度によって，異なる結果が得られた。先ず，3 mM cAMPを基質にした場合には，酵素活性は主にMIT分画に見られ，MIC分画がそれに次ぐ。前者のosmotic shock処理後には，顆粒状PDE活性は，M_1（1.0）及びその近辺の分画に回収され，その比活性は，顆粒区分の中では最も高い。電顕像で，MIT分画がミトコンドリアの他に神経終末を多く含むこと，また，M_1（1.0）分画が，シナプス膜に富むことが確認されたので，この実験結果は，従来の報告[12,13]にほぼ一致するといえる。しかし，これらの顆粒状PDE活性は，いづれもCa^{2+}とactivator蛋白によって賦活されない。 0.4 μM cGMPを基質に用いた場合には，顆粒状酵素活性はMIC分画に見られ，MIT分画の活性がそれに次ぐ。しかし後者の大半はM_3（可溶性区分）に由来すると考えられる。MIC分画の活性は，Ca^{2+}とactivator蛋白によって，全分画中で最も強く賦活され（約10倍），またその比活性は，顆粒区分中では最高である。顆粒性のactivator蛋白もまた主にMIC分画に分布し，MIT分画がそれに次ぐ。比活性もMIC分画が顆粒区分中最高である。MIC分画の酵素活性は，他からactivator蛋白を加えなくても，この内因性のactivatorとCa^{2+}によっても賦活される（図2）。 MIC分画は，電顕的に，種々の膜構造，ERの他に，小型の神経終末とミトコンドリアを含むことが示された。

〖考察〗 PDEの活性を，生理的濃度に近い基質濃度において測定した場合には，基質飽和のもとに測定したのとは幾分異なった結果が得られる。脂肪組織や肝臓のPDEに対するインスリンの効果は，低濃度cAMPを用いた場合にのみ観察され[3,14]，また肝臓

，肾臓等のPDE活性に対する Ca^{2+} とactivator蛋白による賦活は，低濃度cGMPを用いて，はじめて良く観察される[6]。一般にType 1-PDE（Ca^{2+}, Mg^{2+} 依存性PDE）の活性は，低濃度のcGMPを基質とし，それに Ca^{2+} とactivator蛋白を添加したときに，最も良く発現される[6,7]。今回われわれは，0.4μM cGMPを基質として，Type 1-PDEとそのactivator蛋白が，可溶性分画と並んでMIC分画に高濃度に存在することを，明らかにし得た。従来の報告によれば，脳の顆粒状PDEは，主に神経終末（従ってMIT分画）に分布し[3,12]，MIT分画のOsmotic shock処理後には，それが主としてシナプス膜を含む分画（従ってM$_1$(1.0)）に回収されているが[3]，これは飽和濃度のcAMPを基質とし，且つ Ca^{2+} やactivatorを添加せずに酵素活性を測定したものである。われわれのdata（0.4μM cGMP使用）では，M$_1$(1.0)の比活性はMICのそれよりも低く，且つ Ca^{2+} とactivatorによる賦活の程度も弱い。また，Thompson - Appleman ら[1-3]の報告に基いて，一般に，cAMP-PDE（Type 3-PDE）は顆粒性であり，cGMP-PDE（Type 1-PDE）は可溶性であ

図2　MIC fractionの活性（0.4μM c·GMP）の Ca^{2+} による賦活

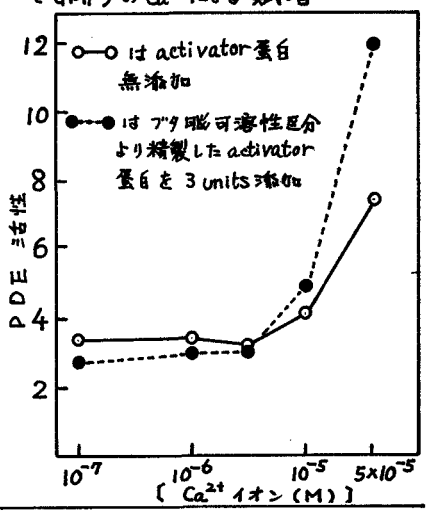


表2．PDE活性とactivator蛋白の分布

	PDE（3mM cAMP）				Activator蛋白			SDH
	活性	比活性	%分布	Ca^{2+}/EGTA	活性	比活性	%分布	RSA
NUC	0.09±0.01	0.020±0.001	1.9	1.25±0.03	11.2±1.6	2.65±0.50	1.6	0.81±0.21
MIT	1.30±0.10	0.036±0.004	28.1	1.30±0.11	121±24	3.22±0.62	17.5	1.69±0.10
MIC	0.89±0.01	0.041±0.002	19.3	1.25±0.06	185±33	8.63±1.81	26.8	0.65±0.07
SUP	2.34±0.13	0.139±0.003	50.6	3.49±0.15	374±14	22.2±1.30	54.1	0.00
total	4.62 ←原分画（5.03±0.22）の92%				691 ←原分画（755±76）の92%			
M$_1$	0.72±0.03	0.028±0.003	42.6	1.03±0.07	47.9±4.4	1.89±0.39	27.9	1.28±0.03
M$_2$	0.09±0.01	0.039±0.002	6.5	1.01±0.05	7.8±0.9	3.38±0.26	4.5	0.27±0.02
M$_3$	0.88±0.07	0.160±0.013	52.1	1.76±0.12	116±2.6	21.0±0.74	67.6	0.00
total	1.69 ←原分画（1.26±0.06）の134%				172 ←原分画（118±21）の146%			
M$_1$(0.8)	0.090±0.012	0.014±0.001	22.1	1.03±0.04	0.9±0.9	0.12±0.12	4.6	0.00
M$_1$(0.9)	0.060±0.001	0.052±0.003	14.7	0.97±0.03	3.57±1.57	2.99±1.23	18.4	0.00
M$_1$(1.0)	0.104±0.008	0.058±0.004	25.5	0.95±0.06	4.87±1.07	2.70±0.60	25.1	0.13±0.03
M$_1$(1.2)	0.103±0.011	0.032±0.002	25.2	0.95±0.11	8.30±2.76	2.59±0.79	42.8	1.11±0.05
M$_1$(P)	0.051±0.005	0.011±0.003	12.5	1.04±0.03	1.80±0.32	0.40±0.03	9.3	2.97±0.16
total	0.408 ←原分画（0.659±0.033）の62%				19.4 ←原分画（48.4±4.1）の40%			

数字は3回のfractionationの平均±SE．PDE活性はactivator蛋白（1.25 units）と $CaCl_2$（50μM）を添加して測定した。但し Ca^{++}/EGTA比は，Ca^{++} 添加時とEGTA（0.5mM）添加時の活性の比率である。PDEの単位はμmol/min·g tissue（3mM基質）又はnモル/min·g tissue（0.4μM基質）．比活性はmg蛋白当りの活性。↗

るという概念が生じているが，今回のわれわれの data では，MIC 分画に，可溶性分画に次ぐ高い cGMP-PDE (Type 1-PDE) の活性並びに比活性が見られた。この MIC 分画の Type 1-PDE は，可溶性分画から精製した activator 蛋白のみならず，内因性の（従って MIC 分画の）activator 蛋白と Ca^{++} によっても賦活される。

REFERENCES

(1) Thompson, W.J., and Appleman, M.M. (1971) Biochemistry, 10, 311-316.; J. Biol. Chem. 246, 3145-3150. (2) Russell, T.R., Terasaki, W.L., and Appleman, M.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1334-1340; see also Appleman, M.M., and Terasaki, W.L. in G.I. Drummond, P. Greengard, and G.A. Robison (Editors), Advances in cyclic nucleotide research, vol 5, Raven Press, New York, 1975, p. 153. (3) Thompson, W.J., Little, S.A., and Williams, R.H. (1973) Biochemistry 12, 1889-1894. (4) Teshima, Y., and Kakiuchi, S. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 489-495; see also Kakiuchi, S. Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K., and Miyamoto, E. in G.I. Drummond, P. Greengard, and G.A. Robison (Editors), Advances in cyclic nucleotide research, vol 5, Raven press, New York, 1975, p. 163. (5) Teo, T.S., and Wang, J.H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5950-5955. (6) Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K., and Miyamoto, E. (1975) Biochem. J. 146, 109-120. (7) Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., and Uenishi, K. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 3526-3530. (8) De Robertis, E., Rodriguez De Lores Arnaiz, G., Alberci, M., Butcher, R.W., and Sutherland, E.W. (1967) J. Biol. Chem. 242, 3487-3493. (9) Teo, T.S., Wang, T.H., and Wang, J.H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 588-595. (10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275. (11) Maeno, H., Johnson, E.M., and Greengard, P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 134-142. (12) Cheung, W.Y., and Salganicoff, L. (1967) Nature 214, 90-91. (13) Loten, E.G., and Sneyd, G.T. (1970) Biochem. J. 120, 187-193,; see also Manganiello, V., and Vaughan, M. (1973) J. Biol Chem. 248, 7164-7170.

LDH	PDE (0.4μM cGMP)				PDE (0.4μM cAMP)			
RSA	活性	比活性	%分布	Ca^{++}/EGTA	活性	比活性	%分布	Ca^{++}/EGTA
0.46±0.15	1.21±0.11	0.29±0.04	1.4	4.58±0.74	0.37±0.02	0.088±0.011	2.2	2.03±0.47
0.50±0.10	19.22±2.31	0.51±0.05	21.7	4.58±0.21	5.31±0.34	0.14±0.01	31.9	2.15±0.31
0.50±0.05	23.33±1.16	1.07±0.07	26.3	10.73±1.19	4.66±0.08	0.21±0.01	28.0	2.42±0.27
2.88±0.13	44.88±7.42	2.68±0.50	50.6	6.69±0.28	6.32±0.72	0.40±0.05	37.9	2.69±0.12
	88.64 ←原分画(84.56±15.47)の105%				16.66 ←原分画(18.24±3.46)の91%			
0.36±0.05	5.41±0.83	0.20±0.02	29.3	2.40±0.62	2.32±0.49	0.085±0.005	44.1	1.59±0.23
2.42±0.43	0.66±0.17	0.27±0.03	3.6	2.39±0.36	0.32±0.06	0.14±0.01	6.1	1.36±0.16
3.38±0.11	12.41±1.79	2.24±0.31	67.2	3.53±0.38	2.62±0.33	0.48±0.07	49.8	2.31±0.24
	18.48 ←原分画(17.38±1.44)の106%				5.26 ←原分画(5.62±0.64)の94%			
	0.77±0.09	0.12±0.02	21.5	2.28±0.27	0.29±0.03	0.085±0.002	19.9	1.25±0.09
	0.55±0.05	0.48±0.05	15.4	3.03±0.32	0.19±0.02	0.17±0.02	13.0	1.50±0.25
	0.90±0.11	0.50±0.06	25.1	3.10±0.27	0.36±0.05	0.20±0.02	24.7	1.58±0.13
	0.91±0.09	0.29±0.02	25.4	2.87±0.08	0.41±0.09	0.12±0.01	28.1	1.43±0.09
	0.45±0.07	0.10±0.01	12.6	1.88±0.05	0.21±0.05	0.046±0.009	14.4	1.24±0.15
	3.58 ←原分画(4.85±0.52)の74%				1.46 ←原分画(1.76±0.12)の83%			

↗ activator 蛋白は units/g.tissue 又は units/mg 蛋白（比活性）であらわした。SDH. LDH はその分画の活性の%分布／その分画の蛋白の%分布（RSA）で表示した。

45 牛下垂体cyclic 3',5'—AMP phosphodiesterase Ⅱ：塩濃度による association と dissociation

日高弘義・荘加ふみ子
（愛知コロニー・発達障害研・生化）

〔要約〕

下垂体の cyclic 3',5'-monophosphate（cAMP）phosphodiesterase（PDE）は，すでに報告したように，分子量 240.000（6.2S）と，分子量 180.000（3.1S）の二つの形で存在すると考えられたが，これらの cAMP-PDE は塩濃度により著しい影響を受けることが判明した。牛下垂体前葉を水でホモゲナイズして，水および種々の濃度の KCl 中で Sucrose density gradient centrifugation を行うと，水では cAMP-PDE の活性の大半が Bottom に見出されたが，KCl 濃度を増加させると，低分子側へ移動し 3.1S の部分の活性増加が著しかった。また，同じ 105.000×g 上清を Sepharose 6B カラムにかけ種々の濃度の KCl で溶出すると，水で溶出した場合活性はすべて Void の部分に出現し塩濃度により活性は低分子側に移動した。次に 105.000×g 上清，および Sepharose 6B カラムから水で溶出した cAMP-PDE と 1M で溶出した分子量 180.000 付近の PDE を，それぞれ DEAE-cellulose カラムにかけると，三者とも同じ Fraction に活性が出現することが解った。これらのことから，牛下垂体前葉の 105.000×g 上清の cAMP-PDE は，実験操作中の塩濃度で微妙に dissociation-association を起すことが示唆された。牛大脳の cAMP-PDE は DEAE-cellulose カラムで下垂体とは明らかに異なる分画に溶出される二つの酵素があることがわかったが，Sepharose 6B での挙動も下垂体の酵素とは必ずしも同一の挙動は示めさなかった。

下垂体は，種々の Tropic Hormone の分泌器官として，他の内分泌臓器に大きな影響を与えている重要な組織である。我々は，下垂体での cyclic nucleotide の役割を知る目的で，その代謝酵素の一つである phosphodiesterase（PDE）について検討を進めて来た[1,2]。昨年度の本学会で，牛下垂体の cyclic nucleotide phosphodiesterase の multiple form について報告したが，今回我々は，下垂体の PDE が塩濃度により association-dissociation の関係にあり，その挙動は牛大脳のそれと必ずしも同一ではない等をみつけたので報告する。

〔材料および方法〕

牛下垂体，および牛大脳は，屠殺後数時間以内に分離し，下垂体は分離後直ちに肉眼的に前葉と後葉にわけ，使用するまで −80℃ のフリーザーに保存した。大脳および下垂体組織の一定量を 6 倍量の蒸留脱イオン水で Homogenize し 105.000×g で 90 min 遠心し，その 105.000×g 上清を以下の実験に用いた。

試料を Sepharose 6B カラム（2.6×90 cm）にかけ，蒸留水，および 50mM Tris-HCl Buffer（pH 7.4, 1mM Mg^{++} Ca^{++}）に 1M の KCl を加えた溶液を使用して，流速 16ml/hr で溶出を行った。

Sucrose Gradient 溶液は，0，10mM，100mM，1M の KCl を含んだ 5～20% Sucrose を使用した。Sucrose Gradient study は上記 105.000×g 上清を使用した。遠心は，日立 65P を使用し，RPR 50 のローターで 40.000 rpm 16 時間行なった。

DEAE-cellulose chromatography は，50mM Tris-Acetate Buffer（pH 6.0）で Bufferize した 1.5×17 cm のカラムに 105.000×g 上清をかけ，同じ Buffer で

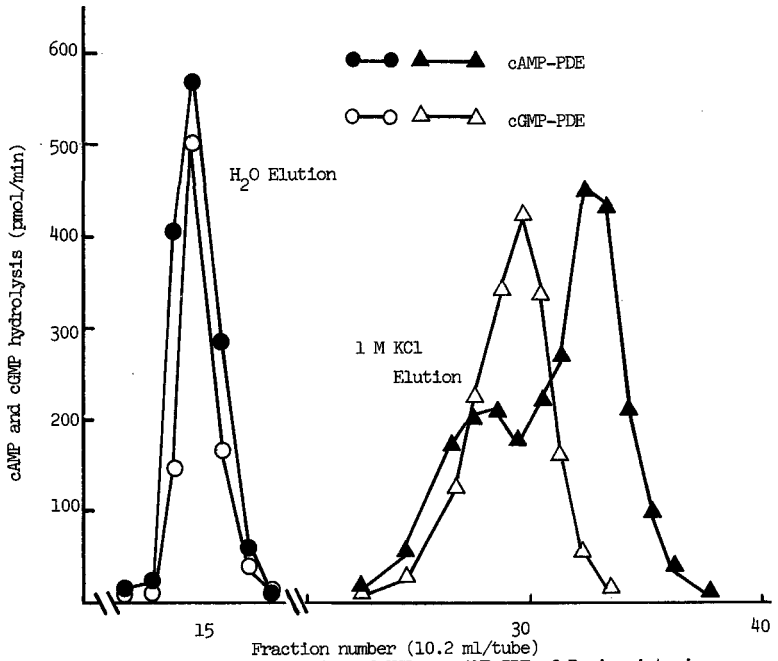


Fig. 1. Effect of Concentration of KCl on cAMP-PDE of Bovine Anterior Pituitary (Sepharose 6B)

充分洗ったのち吸着している酵素蛋白を、0～1M Sodium Acetate で Gradient Elution を行った。活性測定は、0.4μM ^{3}H-cyclic 3',5'-Adenosine monophosphate (cAMP) を基質として、Hidaka and Shibuya[3] の方法で行った。

〔実験結果〕

牛下垂体を、蒸留脱イオン水（蒸留水）で Homogenize し、105.000×g 上清を Sepharose 6B カラムにかけ、蒸留水、および 1M KCl を含む 50mM Tris-HCl Buffer で溶出すると、cAMP-PDE の溶出パターンは、図1に示めすようになる。水のみの時、cAMP-PDE および cGMP-PDE はすべて Void に溶出されるが、KCl の存在で dissociation することがわかる。すなわち cAMP-PDE については、KCl 添加量を増加させることにより、低分子量の PDE の活性が増加する。

更に詳細な実験を Sucrose Density Gradient で行うと、図2にみられる様に 105.000×g 上清を、水 Sucrose Gradient にかけたものでは、cAMP-PDE の活性は、半分以上 Bottom に出現するが、KCl 濃度を増加させるにつれて、3.1S の部分の活性が上昇してくることがわかる。

次に、この塩濃度による変化が同一の酵素の dissociation-association であることを証明するために、Sepharose 6B より水で溶出した Fraction と、1M KCl で溶出された低分子量の PDE を、DEAE-cellulose chromatography にかけ、0～1M Sodium Acetate で gradient Elution を行うと、図3のごとくまったく同一の部分に溶出されてくる。また 105.000×g 上清を DEAE カラムにかけると、その 90% 以上の活性は Sepharose 6B カラムで分離された preparation と同一の部分に溶出されることが解った。この結果より、下垂体の 105.000×g 上清の cAMP-PDE の活性の大部分は、精製操作中の塩濃度の影響等で multiple form をとる可能性が大であると考えられる。他方、牛大脳 105.000×g 上清の cAMP-PDE は、下垂体と必ずしも同一の挙動を示めさず、水で溶出してもそのわずか一部分のみが Void に溶出されるのみであった。さらに、この 105.000×g 上清を DEAE カラムにかけると、あきらかに異る分画に、

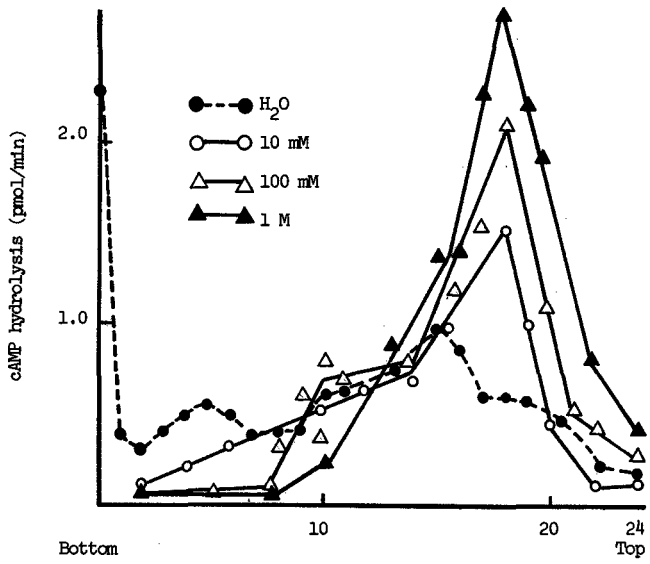


Fig. 2. Effect of Various Concentrations of KCl on cAMP-PDE of Bovine Anterior Pituitary (Sucrose Gradient)

二つのピークが得られた。

〔考察〕

我々は、下垂体において、Sepharose 6B カラムで multiple form の存在をみつけたが、これは、その後 Sepharose 6B カラムでの溶出時に塩濃度を変化させることにより変化するものであることを知った。

牛大脳の cyclic nucleotide phosphodiesterase が Mg^{++}, 塩, cyclic AMP などによって、その分子量を変えることは、Schröder ら[4]が、報告しているが、我々も同様な結果を得た。しかし、牛大脳の PDE の塩濃度の変化は、下垂体の PDE とは著しく異なっており、DEAE-cellulose カラムによる PDE 溶出パターンも下垂体のそれとは、明ら

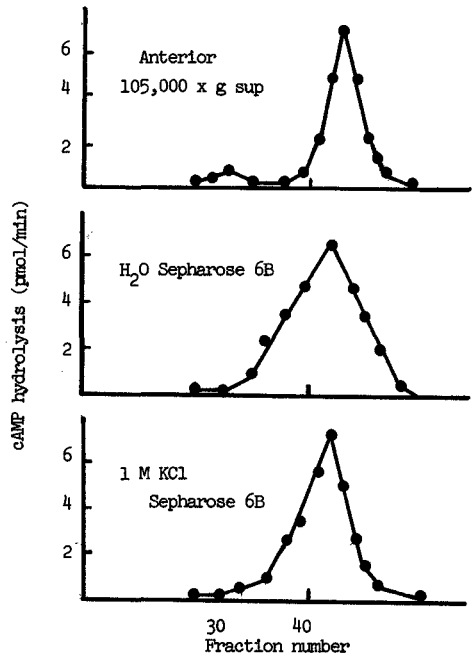


Fig. 3. DEAE-Cellulose Chromatography

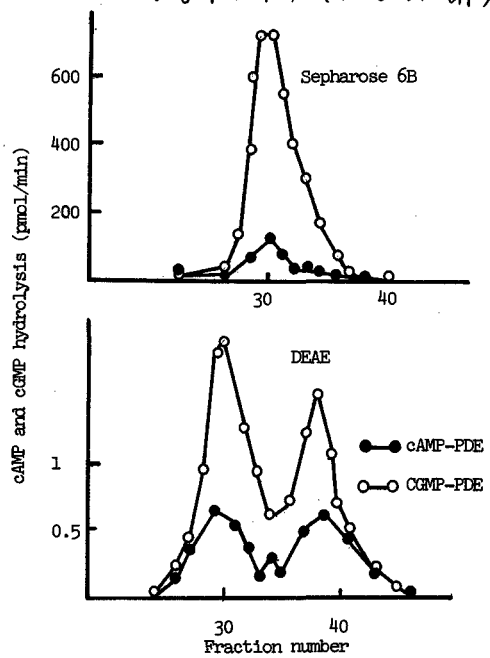


Fig. 4. Sepharose 6B and DEAE-Cellulose Profile of Bovine Cerebrum

かに異っていた（図4）。

しかし、これらの結果から、大脳のcAMP-PDEはmultiple formで存在し，下垂体前葉のcAMP-PDEは一種類しかないということは早計であろう。ただし、下垂体のcAMP-PDEは塩濃度により，微妙に影響を受けることは明らかであろう。PDEのmulliple formについては、数多くの報告があり、事実それらのうちいくつかのformが種々の方法で分離されている(5.6)。それらの報告にも述べられている様に組織によりこのmultiple formの数や性格は，著るしく異っているので、各々の臓器で個別に検討されるべき問題で，一概にすべての組織でmultiformの存在を否定したり，肯定したりするのは、充分慎重でなければならないと考えられる。

〔文献〕

1 日高弘義、原ふみ子，渋谷正人、杉田慶一郎（1974）第17回神経化学会抄録集.
2 HIDAKA AND SHOKA F. (1975) Jap. J. Pharmacol. in press.
3 HIDAKA AND SHIBUYA M. (1974) Biochem. Medicine 10, 301-311
4 SCHRODER J. AND RICKENBERG H. V. (1973) Biochem. Biophys. Acta. 302, 50-63
5 UZUNOV P. WEISS B. (1972) Biochim. Biophys Acta 284, 220-226
6 RUSSELL T. R., TERASAKI W. L. AND APPLEMAN M. M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1334-1340

46 脳細胞膜の脱分極とcyclic AMPの形成Ⅳ：仲介物質に対する特異的阻害剤

清水宏俊　（日本ロシュ研）

〔要約〕

脳内cyclic AMP調節機構としては脱分極効果とneurohormone（広義）の2つが重要な因子として指摘されているが，前者は後者の仲介によるとの考えが支配的である。この仮説の立証には，仲介可能neurohormonesの探索と，各仲介物質に選択的な阻害物質を用いての結抗実験が必要である。昨年の発表以降，次の知見が得られた。

(1) 仲介可能性物質のアデノシン（およびATP）の選択的阻害剤（antagonist）として，2'-（または3'-）Deoxyadenosineが用いられること。

(2) Methylxanthine類による脳cyclic AMP抑制は非特異的で，「Theophyllineはアデノシンのantagonist」とする従来の概念は再考を要すること。

(3) 別の一群の仲介物質であるω-acidic α-amino acids（グルタミン酸等）のantagonistとして，α,ω-diamino carboxylic acids（2,3-Diamino propionate等）が見出されたこと。

(4) 電気生理学的にグルタミン酸に拮抗するとされているGABA, Taurine, Glycine Methionine-sulfoximine, Glutamate-ethylester等には，グルタミン酸依存性cyclic AMP形成を抑制する能力は無いこと。

(5) Deoxadenosineと Diaminopropionateはそれぞれ単独で脱分極効果およびアデノシンとグルタミン酸との相加効果（共にcyclic AMPに対する）を阻害し，両antagonistの併用はさらに阻害効果を増す。

1970年の本学会以来われわれは，脳細胞膜の持続的脱分極が脳切片内のcyclic AMP値を著しく上昇させること（第1報），この脱分極効果はpre-labeling法で標識された細胞内ATP-^{14}Cプールからのcyclic AMP-^{14}C形成を促進するのみならず，それに比例して切片内総cyclic AMP値をも上昇させること，またこの脱分極効果にはヒスタミン，カテコラミン，アデノシン等の遊出，仲介が関与しているらしいこと（第2報），さらにこれらneurohumorsに加えてグルタミン酸等のω-acidic α-amino acidsも仲介的役割を担っていること（第3報）を報告して来た。これまでの研究は主として，これらadenylate cyclaseに関連したreceptor agonistを用いた実験であったが，最近われわれはアデノシン類およびグルタミン酸類にそれぞれ特異的なantagonistを見出したので，これらantagonistを用いて，脱分極によるcyclic AMP上昇を仲介する各種neurohumorの相対的役割を検討した。

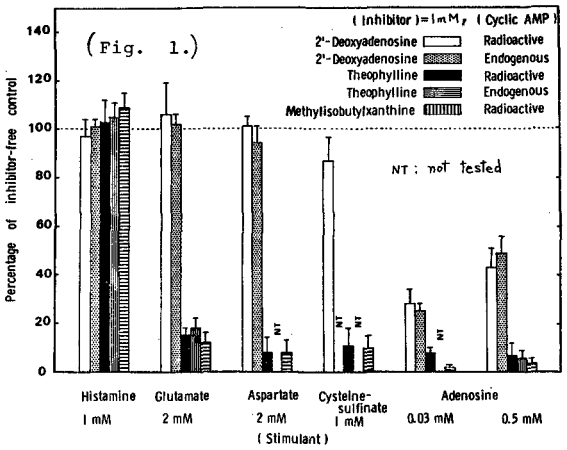
〔実験方法〕

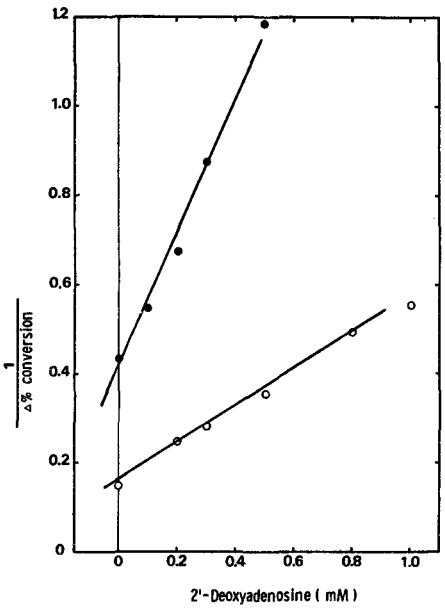
脳切片は全てモルモット大脳皮質及白質部を用いた。各種薬物のcyclic AMP値への影響測定はpre-labeling法[1]および総cyclic AMP定量法（protein binding assay）[2]を併用した。実験の詳細は他誌に報告した[3]。阻害剤は刺激剤の2分前に添加した。

〔結　果〕

(1) アデノシンantagonist —— アデノシンreceptorのantagonistとしてはtheophylline等のmethylxanthine類が考えられていたが[4]，これらはアミノ酸効果をも阻害し[3]，特異性に欠

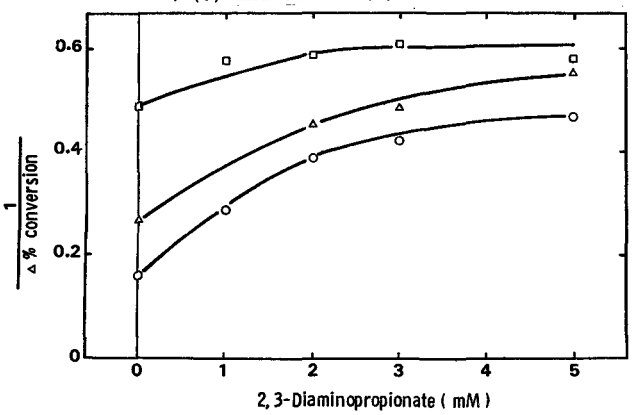
ける との報告もある。[5] これに反し 2'(または3')-deoxyadenosine はアミンや酸性アミノ酸効果は阻害せず(図1), アデノシン効果のみを選択的に阻害し, その様式はほぼ競合的なものであった(図2)。(詳細は文献 6 に発表)





(Fig. 2) Dixon plot of 2'-deoxyadenosine inhibition of adenosine-elicited accumulation of radioactive cyclic AMP. Adenosine concentrations were 0.03 mM (●) and 0.1 mM (○).

(2) グルタミン酸 antagonist —— グルタミン酸の電気生理学的亢奮性に拮抗するものとしては, γABA, β-alanine, taurine, glycine, glutamate-γ-ethylester, methionine-sulfoximine 等が報告されているが, これらはいずれもグルタミン酸による脳 cyclic AMP 上昇に対しては阻害効果を示さなかった。調べられた 30余の化合物のうち, 酸性アミノ酸に対して強力な阻害を示したものは 2,3-diamino propionic acid で, その阻害様式は Dixon plot で上限(hyperbolic)を示す部分結抗剤的なものであった(図3)。(詳細は文献6,7,に発表)。表1示された如く, 2,3-diamino propionate の阻害作用は ω-acidic α-amino acid に特異的で, アデノシンやヒスタミン, ヒスタミンとノルエピネフリンの相乗作用等には何等阻害作用を示さなかった。



(Fig. 3) Dixon plot of 2,3-diaminopropionate inhibition of glutamate-elicited accumulation of radioactive cyclic AMP. Formation of cyclic [^{14}C]AMP was expressed as "per cent conversion". Average control value of 0.27% was subtracted from each value before plotting. Incubation was for 8 min with L-glutamate (0.8mM, □; 2 mM, △; and 5 mM, ○).

(3) 各 antagonist による脱分極効果の抑制 若し脱分極や脱分極剤による cyclic AMP

値の上昇が，アミン類，アデノシン類，酸性アミノ酸類等を介しているのならば，これら仲介性物質の特異的 antagonist は単独で，また協同で，cyclic AMP 値に対する脱分極効果を抑制するはずである。種々の脱分極剤を用いて各 antagonist による抑制的効果を内因性総 cyclic AMP 量に関して検討した。アデノシンとグルタミン酸の相加作用は，ほぼ脱分極効果の最高値に匹敵する[3]ので，この相加作用に対する各 antagonist の阻害作用も同時に調べた（表2）。その結果，diaminopropionate も deoxyadenosine も共に脱分極効果を 30～50 %阻害し，両阻害剤を合わせると更に阻害効果は強まったが，70 % 以上の阻害は得られなかった。表2では典型的な実験例の数値のみを示したが，Pre-labeling 法を用い，各5例の平均で示した場合にも，表2と同様な結果が得られた（図4）。

（表 1）

Stimulant	Inhibitor: None	2,3-Diamino-propionate	2,4-Diamino butyrate
	per cent conversion		
None	0.2±0.1 (5)	0.3±0.2 (5)	0.2±0.1 (3)
L-Glutamate, 2 mM	4.3±0.3 (13)	2.3±0.4 (4)	1.9±0.4 (4)
L-Glutamate, 5 mM	5.8±0.6 (4)	2.4±0.5 (3)	-
L-Aspartate, 2 mM	4.3±0.7 (3)	2.5±0.5 (3)	1.8±0.5 (3)
L-Cysteinsulfinate, 2 mM	10.9±1.3 (5)	5.4±0.9 (4) 4.6±0.5[a] (3)	5.1±1.2 (4) 3.9±0.8[a] (3)
Adenosine, 0.03 mM	2.4±0.4 (5)	2.5±0.6 (5)	-
Adenosine, 0.5 mM	5.9±0.5 (6)	5.8±0.4 (4)	4.3±0.3[b] (5) 6.1±0.4[c] (4)
Histamine, 0.1 mM	2.1±0.3 (4)	2.0, 1.9 (2)	2.1±0.4 (3)
Histamine, 1 mM	2.7±0.5 (6)	2.8±0.3 (4)	3.0±0.5 (3)
Histamine, 1 mM + norepinephrine, 0.5 mM	8.0±1.0 (3)	7.9±0.8 (3)	7.8±0.8 (3)

Table 1 Effect of 2,3-diaminopropionate and 2,4-diaminobutyrate on formation of cyclic [^{14}C]AMP elicited by various stimulants.

Formation of cyclic [^{14}C]AMP in the presence and absence of the inhibitor, 2 mM, was measured. Results of separate experiments were normalized to the average effect of 2 mM L-glutamate, which was included in each experiment as a reference. The normalized values were then expressed as the mean±S.E. Numbers in parenthesis refer to the number of experiments performed.

a The concentration of the inhibitors were 5 mM, instead of 2 mM.

b Lower than control, $p < 0.05$.

c Concentration of the inhibitor was 0.2 mM.

〔考　察〕

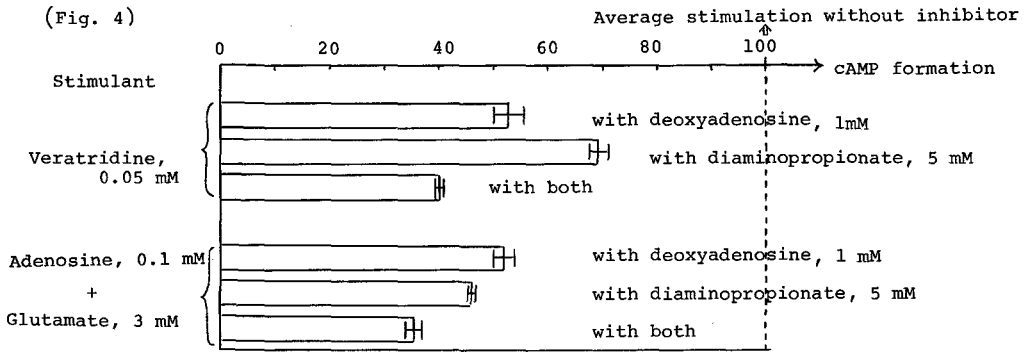
Theophylline 等 methylxanthines はその化学構造類似性から adenosine-sensitive adenyl cyclase の antagonist と考えられて来たが，よりアデノシンに構造の近いアデニンには結抗作用がないこと[4]，methylxanthines は酸性アミノ酸の効果も抑えること[3]，さらに Ca^{++} の移動等と関連して種々の薬理作用を有すること等から，adenosine antagonist としては特異性に乏しく，むしろ deoxyadenosines の方が適当であると思われる（図1）。

2,3-diaminopropionate 等短鎖塩基性アミノ酸が，acidic amino acid-sensitive cyclase の特異的阻害剤として見出されたが，partial antagonist 的性格のもので（図3），グルタ

Table 2 Inhibition of depolarization-elicited accumulation of cAMP by 2,3-diaminopropionate and 2'-deoxyadenosine

Stimulator	Inhibitor	p mole cAMP/mg protein (Per Cent Inhibition)		
	None	Diaminopropionate 5 mM	Deoxyadenosine 1 mM	Diaminopropionate + Deoxyadenosine
None	17	18	15	-
Veratridine 0.05 mM	1213 (0)	588 (51.5)	733 (39.6)	471 (61.2)
Ouabain 0.05 mM	1091 (0)	791 (27.5)	452 (58.6)	348 (68.1)
KCl 80 mM	541 (0)	-	-	319 (41.0)
Adenosine, 0.1 mM + Glutamate 3 mM	1335 (0)	900 (32.6)	811 (39.2)	538 (59.7)

(Fig. 4)



ミン酸効果を完全に抑制することはない(6,7, および図3)。脱分極剤による cyclic AMP 上昇が deoxyadenosine と diaminopropionate の併用でも 60～70 % 程度しか阻害し得なかったのも, 後者の部分阻害剤的性質に負うところ大と思われる。しかし脱分極効果が両阻害剤で相当抑えられることと, アデノシン(前駆体を含む)と酸性アミノ酸の内因性濃度の高いことから, 両者の伸介物質として関与は確実らしい。

1 Shimizu,H.,Daly,J.W., & Creveling,C.R.,(1969) J. Neurochem., 16 1609
2 Gilman,A.G.,(1970) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 67 305
3 Shimizu,H.,Ichishita,H., & Odagiri,H.,(1974) J. biol.Chem. 249 5955
4 Sattin,A. & Rall, T.W.(1970) Mol.Pharmac. 6 13
5 Lake,N.,Jordan,L.M., & Phillis,J.W.,(1973) Brain Res. 60 411
6 Shimizu,H.,Ichishita,H., & Umeda,I.,(1975) Mol. Pharmacol. in press
7 市下治子、清水宏後 (1975) 第48回 日本生化学会

47 小脳切片におけるcyclic nucleotidesの含量増加に対するcytochalasin Bの抑制効果

斉藤光生・出口武夫
（都神経研・神経医化）

〔要約〕

[1] モルモット小脳切片において cytochalasin B は Veratridine, norepinephrine adenosine, high K^+ による cAMP の増加をほぼ完全に抑制する。又、Veratridine による cGMP の増加も抑制する。

[2] その抑制効果は可逆的で cytochalasin B 除去後短時間で回復する。

[3] 抑制効果は 0.1μg/ml ～ 10μg/ml の濃度で認められ、10μg/ml 以上でほぼ完全な抑制効果を示す。

[4] cytochalasin B はモルモット小脳切片内の ATP 濃度には、顕著な影響は与えない。

[序] 大脳及び小脳切片において各種試薬による刺激で cAMP, cGMP の含量が変動することが知られている。(2,3,4,6,10) しかしながら、脳内での cAMP, cGMP の役割が不明であることとあわせてその変動の意味及び機構は未だ明らかではない。我々は、その生体における意味及び機構を調べる目的で小脳切片を用いて cyclic nucleotides の含量の変動を解析している際に、ある種のカビの産生物である cytochalasin B が、各種刺激による cyclic nucleotides の増加を抑制することを発見した。cytochalasin B は、培養細胞系及び組織培養系において細胞の形態、運動性に影響を与えること (5,13) 細胞内への hexose の取り込みを阻害すること(12,9,14)等、様々な機能を有していることが報告されているが、cyclic nucleotides の含量の変動に対する効果に関する報告はない。cytochalasin B による cyclic nucleotides 増加の抑制の機構は未だ追求中であるが、このものが有効な研究手段となる可能性があるものとして今回報告する。

[実験方法] モルモット仔の小脳切片（0.3 × 0.3 × 0.3 mm）を約100倍量の、10mM glucose を含む Krebs-Ringer-bicarbonate buffer 中で 37°C, O_2 (95%) CO_2 (5%) の混合ガスをバブリングしながらインキュベートする系を用いた。cAMP, cGMP は Steiner 等の方法によって定量した。(11) 但し radioimmunoassay に用いる放射性化合物は ^{125}I-Succinyl-cyclic nucleotides の代りに ^{3}H-cyclic nucleotides を用いた。定量用のサンプルは 5%TCA で除蛋白後、エーテル抽出により TCA を除いた後、凍結乾燥にかけたものを用い、更に精製することなしに直接 assay にかけた。

［実験結果］小脳切片を30分間プレインキュベーション後，新しい培地に換え，更に30分間インキュベートする。このとき小脳切片を4群に分け，1群はプレインキュベーションと同一組成の培地で，1群は1mMのcolchicineを，1群は10μg/ml (20.8μM)のcytochalasinBを含むように加える。もう1群はcolchicineとcytochalasinBの混液（前記と同一濃度）を加える。30分後，各薬剤存在下のまま Veratridine を最終濃度 10μM となるように加え，加えてから15分後にサンプリングして cAMP，cGMP を定量した。(Fig. 1) その結果，veratridine によって2倍以上上昇する cAMP も（veratridine 刺激以前の base level に比較して）8倍近く上昇する cGMP も cytochalasinB 及び CytochalasinB と colchicine との混液によってほとんど base level にとどまることが見出された。colchicine のみではほとんど影響がないことからこの抑制は cytochalasinB によるものと考えられた。次にこの抑制効果が不可逆的なものかどうかを見る為に，前記実験と同様に cytochalasinB 処理後 cytochalasine を含まない培地で3回洗浄し，洗浄後，直ちに Veratridine で刺激する実験を行った。その結果(Fig.2) veratridine により，cytochalasin B 処理しないものとほぼ同様の cAMP，cGMP の上昇がみられ，抑制効果は可逆的であることが判った。cytochalasine B による抑制効果は，Adenosine，norepinephrine，high K^+ 等による cAMP の増加の場合にも認められた。Fig. 3 に最終濃度 1mM の norepinephrine による

Fig. 1.

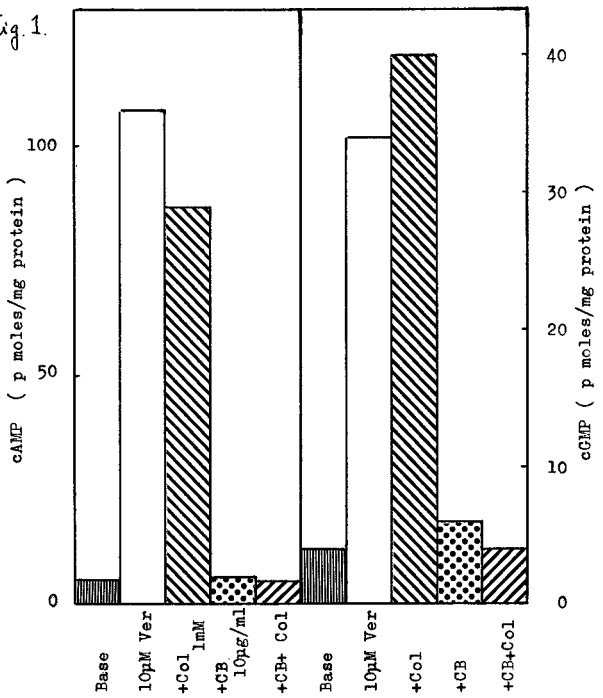
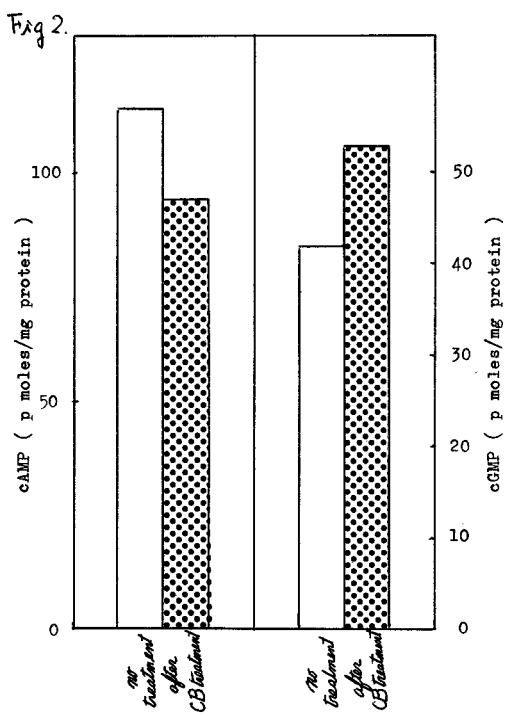
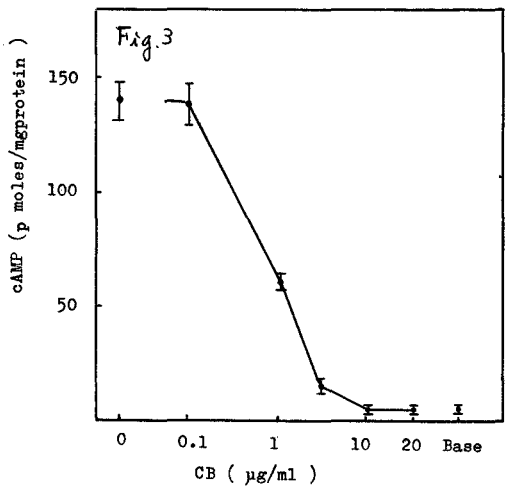
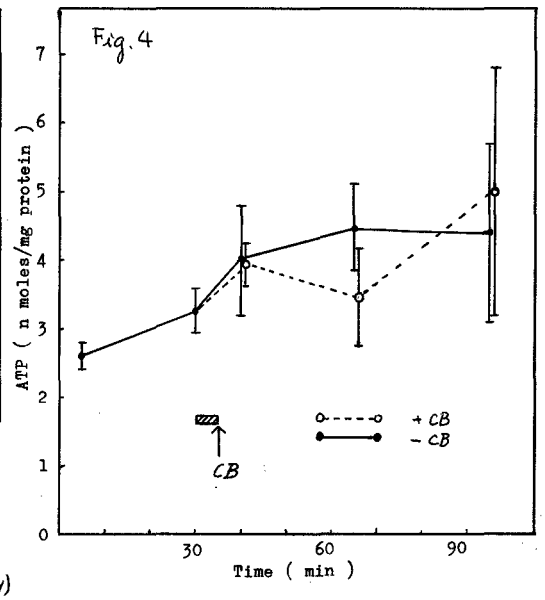


Fig 2.







cAMPの増加をcytochalasin Bがどの濃度で抑制するかを示した。0.1μg/ml (0.208μM)ではほとんど抑制せず，10μg/ml (20.8μM)でほぼ完全に抑制する。次にこの抑制の機構を知る目的で切片内のATP含量を測定した。cytochalasin Bは培養細胞系等でhexoseのtransportを阻害することが知られているので，エネルギー源としてのglucoseが止められることによるATPの減少が抑制の原因かもしれないと考えた為である。プレインキュベーションの30分間を新しいcytochalasin Bを含む培地中での60分間，経時的にATP含量を追跡してみた結果がFig.4.である。図にみられるように，cytochalasin Bを含む培地中の切片も，含まない培地中の切片とほぼ同様のATP含量を維持していた。

［考察］　今回報告したcytochalasin Bの効果は，かなり低濃度で効果を示すこと，回復が速かであること（cytochalasin Bを除去するのに10分を要したので，長くとも10分以内に回復していることになる）等hexoseのtransport阻害の場合と類似した点があり，抑制の機構がglucoseの取り込みの阻害によるものである可能性があった。しかし，小脳切片中のATP濃度はあまり変化がみられないので(cf.(2))他の機構である可能性が強いと考えられる。現在，直接cyclic nucleotide合成系に作用するかどうか，glucose以外の代謝産物でインキュベートした場合はどうか等，いくつかの可能性を検討している。cytochalasin Bはtyrosine aminotransferaseの誘導阻害等(1)いくつかの，glucose取り込み阻害だけでは説明できない機能を有しているので，組織内cyclic nucleotidesの変動と関連する研究においても有効な手段となる可能性が強いと思われる。

[文献]

1. Butcher, F.R., and Perdue, J.F.; J. Cell. Biol., 56, 857 – 861 (1973)
2. Ferrendelli, J.A., Kinscherf, D.A., and Chang, M.M.; Brain Res., 84, 63-73 (1975)
3. 〃 ; Molec. Pharmacol., 9, 445–454 (1973)
4. Forn, J. and Krishna, G.; Pharmacology, 5, 193 – 204 (1971)
5. Godman, G.C., Mirand, A.F., Deitch, A.D. and Tanenbaum, S.W.; J. Cell. Biol., 64, 646–667 (1975)
6. Kakiuchi, S. and Rall, T.W.; Molec. Pharmacol. 4, 367 – 378 (1968)
7. Kletzien, R.F., Perdue, J.F. and Springer, A.; J. Biol. Chem., 247, 2964–2986 (1972)
8. Migel, S.B. and Wilson, L.; J. Biol. Chem. 247, 4102 – 4105 (1972)
9. Nakazato, Y. and Douglas, W.W.; Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 1730 – 1733 (1973)
10. Shimizu, H., Creveling, C.R. and Daly, J.; Proc. Nat. Acad. Sci., 65, 1037–1040 (1970)
11. Steiner, A.L., Parker, C.W. and Kipnis, D.M.; J. Biol. Chem., 247, 1106–1124 (1972)
12. Warner, D.A. and Perdue, J.F.; J. Cell. Biol., 55, 242 – 244 (1972)
13. Yamada, M.K. and Wessells, N.K.; Developmental Biol., 31, 413 – 420 (1973)
14. Zigmond, S.H. and Hirsch, J.G.; Science 176, 1433 – 1434 (1972)

MEMO

MEMO

MEMO

神経化学　Vol. 14

第 18 回　日本神経化学会抄録集

昭和50年11月13日（木）

14日（金）

15日（土）

日本都市センター本館講堂（東京）