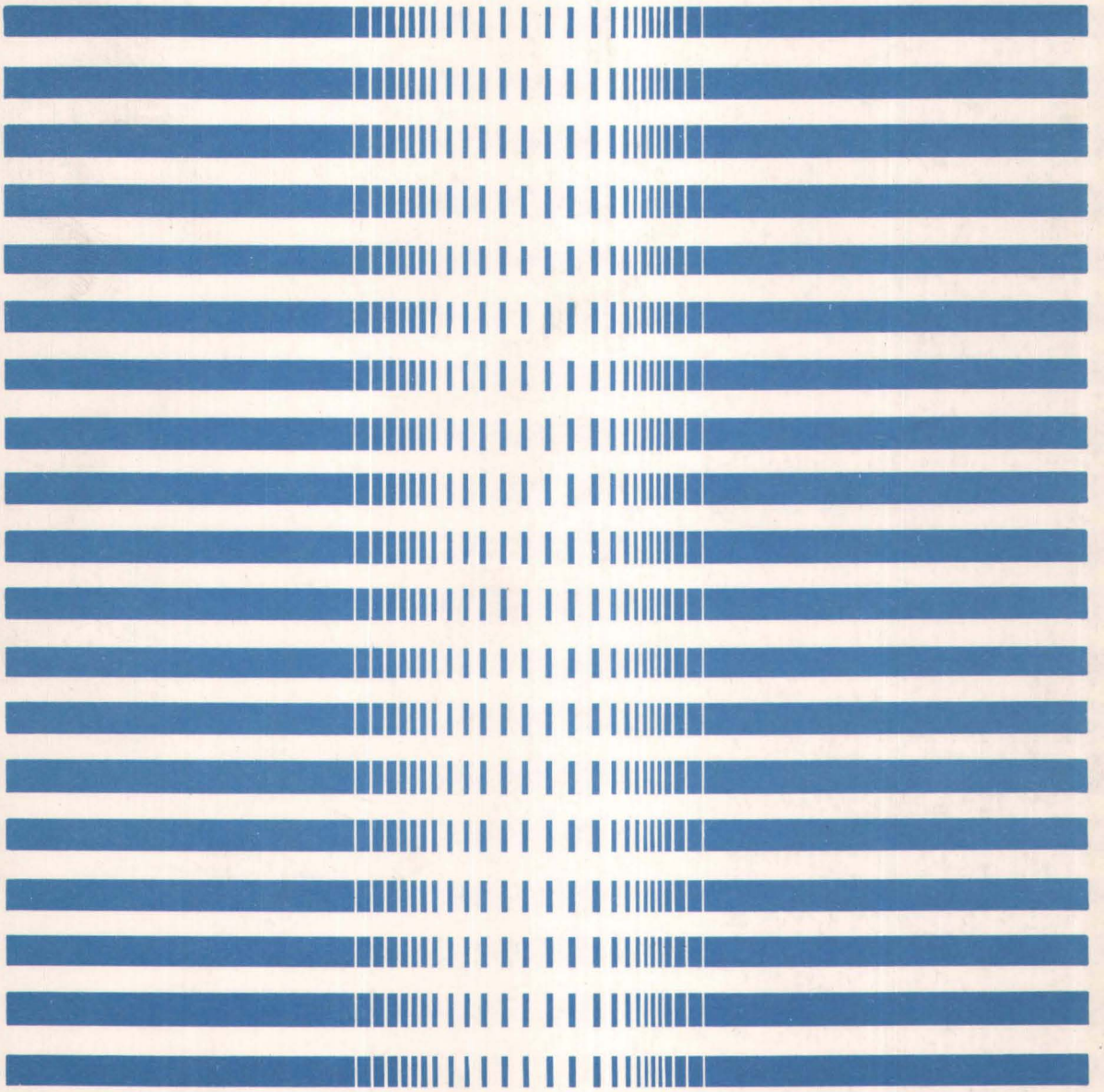
神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第20回　日本神経化学会抄録集



Vol. 16, 1977

日本神経化学会

神経化学

第20回日本神経化学会抄録集

PROCEEDINGS OF THE 20TH ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 大 阪

10月27日(木), 10月28日(金), 10月29日(土)

Vol. 16 1977

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1. L－5HTPとMK486投与ウサギの発熱時における
脳と末梢の5HTおよびc－AMP濃度 …… 1

本多幸作・沼田吉彦
新国　茂・金子元久
高橋志雄・星野仁彦
熊代　永
（福島医大・神経精神）
中畑弘則・鈴木武彦
（福島医大・薬理）

2. 大脳半球の梗塞における，体液中cyclic AMP濃度の経時変動 …… 5

冨永詩郎・村上松太郎
阿部憲男
（秋田県立脳血管研究センター・内科）

3. 遅発性ジスキネジア患者の髄液アミン代謝物質と環状ヌクレオチド
－Di-n-propylacetic acidおよびcyproheptadineの影響－ …… 9

長尾卓夫・大下俊則
光信克甫・佐藤光源
大月三郎
（岡大・医・精神）

4. 躁うつ病者のトリプトファン，チロシン，コルチゾールの
血中濃度の変動とその臨床的意味 …… 13

岸本英爾・浜　由紀
（横浜市大・医・精神）

5. 躁うつ病における髄液中cyclic AMP濃度について …… 17

庄田秀志・小片　寛
（信大・医・精神）

6. 痙攣準備状態及び全身痙攣と脳内アミン
－Kindling preparationによる研究－ …… 21
大下俊則・長尾卓夫
佐藤光源・光信克甫
大月三郎
（岡大・医・神経精神）

7. 異常運動発現におけるγ－アミノ酪酸（GABA）と
Dopamineの相互関係について …… 25
中村重信・亀山正邦
（京大・医・老年医学）
池田研二・難波益之
（岐阜大・医・神経精神）

8. ラット及びサルによる学習行動と脳内モノアミン量との相関について …… 29
高坂新一・永井克子
塚田裕三
（慶大・医・生理）

9. 2－(7'-indenyloxymethyl)morpholine hydrochloride
（YM－08054－1）の抗うつ作用の生化学的機序 …… 33
原田正富・野崎順久
前野弘夫
（山之内製薬・中研）

10. ラット辺縁系各核レベルにおけるCholine acetyltransferase,
Acetylcholinesterase及びMonoamine oxidase活性 — 情動行動変化
に伴う活性の変化 — …… 37
内村英幸・平野　誠
金　長寿・斉藤　雅
松本　孝
（国立肥前療養所）
中原辰雄
（九大・理・化学）
伊藤正敏
（九大・医・精神）

11. テトラベナジン投与ラットの脳内モノアミン代謝および行動変化
におよぼすイミプラミンの影響 — セロトニン代謝を中心にして — …… 41
堀　　彰・中河原　通　夫
渡　辺　明　子・仮　屋　哲　彦
（東医歯大・医・精神）

12. 高フェニールアラニン血症動物の脳における Tyrosine hydroxylase,
Tyrosine decarboxylaseにおよぼすインスリンの影響 …… 45
沖　田　美佐子・金　行　孝　雄
庄　盛　敏　廉・高　坂　睦　年
（岡大・医・脳代謝研・病態生化）

13. 胎生期における高フェニールアラニン血症ラッテの発達過程に伴う
脳内酵素活性の変化について …… 49
金　松　知　幸・高　木　芳　夫
平　野　修　助
（東邦大・医・2生理）
中　井　健　而
（東邦大・医・総合研）

14. 脊髄ノルエピネフリン作働性ニューロンの血圧制御について …… 53
丹　羽　正　美・*河　野　輝　昭
*藤　田　雄　三・尾　崎　正　若
（長崎大・医・2薬理　*脳外）

15. MAM投与の時期を異にする実験的小頭症ラットにおける神経化学的研究 …… 57
松　谷　天星丸・永　吉　道　子
田　丸　政　男
（保健衛生大・医・総医研・発達生理）
野　村　正　彦
（保健衛生大・医・生理）
塚　田　裕　三
（慶大・医・生理）

16. 線条体モノアミン性シナプス小胞に対するChlorpromazinの作用 …… 61
貝谷壽宣・岩田　毅
池田研二・森内　巌
吉村　剛・難波益之
（岐阜大・医・神経精神）

17. 新生仔期ハイドロコーチゾン投与ラットの脳発育におよぼす成長ホルモンの効果 …… 65
野口鉄也・高坂新一
青木エミ子・塚田裕三
（慶大・医・生理）

18. ラット大脳切片のビリルビンに対する親和性について …… 69
鈴木富士子・仙波りつ子
柏俣重夫
（愛知県コロニー・発達障害研・生化）

19. 脳切片における解糖系及び細胞内Cl^-の取込みに対するK^+-rich mediumの効果：
その発育に伴う変化について …… 73
阿相皓晃・野田行文
石沢　弘・平野修助
（東邦大・医・2生理）

20. ラット大脳シナプトゾーム分画へのD－アスパラギン酸のとり込み機構 …… 77
高垣玄吉郎
（都神経研・神経生化）

21. シナプトソームおよびニューロン，グリア細胞群へのD-glucose anomerの
取り込みの特異性について …… 81
難波経篤・安藤正人
永田　豊
（保健衛生大・医・生理）

22. 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-Phosphohydrolase (CNPase)の
高速液体クロマトグラフィーによる微量・迅速定量法と部分精製について …… 85
塚田裕三・永井克子
須田治彦
（慶大・医・生理）

23. アイソトープを用いないアセチルセロトニンメチル基転移酵素の活性測定法 …… 89
鈴木修・八木國夫
（名大・医・1生化）

24. 種々の年令におけるヒト大脳皮質のモノアミン酸化酵素のMultiple form …… 93
鈴木修・八木國夫
（名大・医・1生化）

25. 血小板モノアミン酸化酵素の性状：酵素反応におよぼす酸素および温度の影響 …… 97
小林清史・高坂睦年
（岡大・医・脳研・病態生化）
S. Eiduson
（UCLA・U.S.A.）

26. モノアミン酸化酵素（type A，type A＋B，type B）の
ラット視床下部神経核別分布と年齢変化 …… 101
国元憲文・挾間秀文
（鳥取大・医・神経精神）

27. ラット視床下部，青斑核部におけるドーパミン-β-水酸化酵素活性の日内変動 …… 105
大宮司信・三国雅彦
浅野裕・斉藤嘉郎
山下格
（北大・医・精神）
岡田文彦
（北大・保健管理センター）

28. ラットの松果体におけるTryptophan-およびTyrosine-水酸化酵素の日周リズム …… 109
融　道男・渡部修三
渋谷治男
（東医歯大・医・精神）

29. ウシの副腎髄質のチロシン水酸化酵素の細胞内分布と性質 …… 113
山内　卓・藤沢　仁
（旭川医科大・生化）

30. 牛松果体特異抗体の精製と抗体アフィニティークロマトグラフィーによる
ＨＩＯＭＴの精製 …… 117
桑野良三・高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

31. 脳の酸性タンパク質ＰＡＰＩ－ａ，ＰＡＰＩ－ｂ（Ｓ－１００）の化学構造 …… 121
礒辺俊明・奥山典生
（都立大・理・化）

32. ラット小脳チミジンキナーゼの分子種について …… 125
沢崎嘉男・山田則子
中島　熙
（東医歯大・難研・遺伝生化）

33. ヒト末梢神経ミエリン蛋白の精製 …… 129
鈴木　勝・北村邦男
植村慶一
（埼玉医大・１生理）

34. 小脳プルキンエ細胞の特異蛋白の神経化学的研究 …… 133
御子柴克彦
（慶大・医・生理）
J.-P. Changeux
（パスツール研究所）

35. 培養松果体にたいするエストラジオールの作用 — エストラジオールによる蛋白の誘導 — …… 137
溝部文夫・黒川正則
（東大・医・脳研）

36. 分岐軸索における蛋白輸送の非対称性 …… 141
小宮義璋・森　啓
黒川正則
（東大・医・脳研・生化）

37. 神経原性および筋原性筋萎縮を伴う疾患における蛋白代謝
— 尿中メチルアミノ酸を指標として — …… 145
井上良一・三宅正治
柿本泰男
（愛媛大・医・精神）

38. 初老期・老年期痴呆における脳蛋白の変化(IV)— Intermediate filamentsの変化 …… 149
播口之朗・西村　健
多田国利・金子仁郎
（阪大・医・精神）

39. 幼若ラット脳に存在するシトリルグルタミン酸の単離と構造決定 …… 153
三宅正治・柿本泰男
（愛媛大・医・精神）
反町　勝
（愛媛大・医・1生理）

40. バゾプレッシンの脳圧降下作用に関する研究 …… 157
能登　直・田中哲徳
中嶋照夫
（阪大・医・高次研）
佐治美昭・名川雄児
（武田薬品・中研・医薬研）

41. ミエリンのちぢみ現象(III)(Shrinking phenomenon)
— ミエリンのCa^{2+}ATPaseの存在について — …… 161
八杉悦子・阿部敏明
山川民夫
(東大・医・1生化)

42. 幼若ラット大脳のNaI処理ミクロゾーム($Na^{+}+K^{+}$)依存性ATPase：Mg^{2+}阻害，
Na^{+}, K^{+}および温度による活性化へのビリルビンの効果 …… 165
柏俣重夫・後藤滋二
仙波りつ子・鈴木富士子
(愛知県コロニー・発達障害研・生化，*名大・医・産婦人)

43. Tay−Sachs脳のガングリオシド組成 — 特にGD_2およびN−アセチル
ガラクトサミニルGD_1aガングリオシドについて — …… 169
岩森正男・永井克孝
(都老人研)

44. 亜急性海綿脳症に見られた脳ガングリオシドの長鎖塩基組成の異常
— Creutzfeldt-Jakob型とHeidenhain型について — …… 173
玉井洋一
(北里大・医・生化)
大谷義夫・三浦貞則
(北里大・医・精神)
成田洋夫
(国立東二・精神)
岩田毅・貝谷壽宣
難波益之
(岐阜大・医・神経精神)

45. 脳組織の燐脂質N−含有塩基並びにスフィンゴ脂質長鎖塩基の代謝について …… 177
武富保・湯沢松子
上村敬一
(信大・医・順応研・生化)

46. ラット脳ミクロソーム細分画膜の化学構成 …… 181
勝田公雄・佐武　明
藤田省三・渡辺達雄
（新潟大・脳研・神経化学）
玉井洋一
（北里大・医・生化）

47. ラット小脳の発育に伴うRNase H活性の変化 …… 185
沢井保子・和田健司
塚田欣司
（東医歯大・難研・病態生化）
沢崎嘉男・中島　熙
（東医歯大・難研・遺伝生化）

48. ラット脳のDNA－リガーゼとそれの発育に伴う活性の変化 …… 189
塚田欣司・寺岡弘文
（東医歯大・難研・病態生化）
沢崎嘉男・中島　熙
（東医歯大・難研・遺伝生化）

49. Eℓ系マウス脳におけるポリゾームRNAの代謝 …… 193
山上　栄・森　浩一
大西　博・切池信夫
川北幸男
（阪市大・医・神経）

50. Eℓ系マウス脳のNuclear oligo (A), poly (A) 代謝におよぼす痙攣の影響 …… 197
大西　博・森　浩一
山上　栄・切池信夫
川北幸男
（阪市大・医・神経）

51. 神経系由来の培養細胞中のサイクリックAMP量に対するアデノシン関連物質の影響 …… 201
黒田洋一郎・
J・Ciesielski-Treska
P.Mandel
(Centre de Neurochimie du CNRS, Strasbourg, FRANCE)

52. β受容体とアデニルサイクレースの物理化学的性質 …… 205
芳賀達也*・
A.G.Gilman
(Virginia大・薬理・*現・浜松医大・生化)

53. Dopamine-sensitive adenylate cyclaseの再構成 …… 209
佐野健治・勝田公雄
前野弘夫
(山之内製薬・中研)

54. ラット線条体及び中隔ー側坐核のDopamine sensitive adenylate cyclaseに対するChlorpromazineの影響 …… 213
金野滋・渡部修三
融道男・島薗安雄
(東医歯大・精神)

55. 神経芽細胞NIE115におけるGuanosine 3′, 5′-monophosphate濃度の調節機構について …… 217
斎藤光生・出口武夫
(都神経研)
天野武彦
(三菱化成生命研)

56. カエル網膜杆体細胞外節のGuanylate cyclaseについて …… 221
三木直正・吉川和明
栗山欣弥
(京府医大・薬理)

57. ラット脳のシナプトゾーマルソルブルフラクションにおけるグアニレート
サイクレースの精製とその性状について …… 225
中根正樹・斎藤光生
出口武夫
（都神経研）

58. Affinity columnによるc－AMPホスホジエステラーゼの精製…… 229
酒井庸禎・堀　悦子
田中　亮・牧野秀夫
笠井久隆
（名市大・医・生化，保健衛生大・内，都立大・理・化学）

59. 脳における膜結合性Modulator蛋白について…… 233
手島佳子・山崎礼子
安田誠治・樫葉　明
（大阪府立中宮病院）

60. シナプス小胞画分とドパミンの結合について …… 237
都築紀宏・田中　亮
（名市大・医・生化）

61. マウス脳におけるα－ブンガロトキシン結合部位の局在性：光学顕微鏡的および
電子顕微鏡的オートラジオグラフィーによる研究 …… 241
有松靖温・瀬戸章子
天野武彦
（三菱化成生命研）

62. 中枢神経系のムスカリニックレセプター：ラット脳シナプス膜へのAChおよび
Atropine結合 …… 245
内田修次・竹安邦夫
吉田　博
（阪大・医・1薬理）

63. 前シナプス性アセチルコリン受容体によると思われるアセチルコリン遊離の制御 …… 249
米原典史*・石田甫
斉藤喜八・松田友宏
吉田博
（阪大・医・1薬理，*阪大・歯・薬理）

64. Myelin fragments 由来のHydrophobic proteins に対する5－HTの結合について …… 253
石谷良一・宮川明久
戸張芳昭・岩本多喜男
（城西大・薬・薬理）

65. ウサギ中枢神経系における substance P の分布とシナプス膜への特異的結合 …… 257
仲田義啓・日下歓子
瀬川富朗
（広大・医・総合薬）

66. ラット脳コリンアセチルトランスフエラーゼとアセチルCoAとの反応について …… 261
松田友宏・野口豊
米原典史・吉田博
（阪大・医・1薬理）

67. 単一神経細胞体とアセチルCoA合成酵素活性 …… 265
林秀明・加藤尚彦
（東大・医・脳研）

68. 脳内ヒスタミンの代謝：Nーアセチルヒスタミンの生成 …… 269
小西博行・平井基陽
中嶋照夫
（阪大・医・高次研）

69. プトレスチンからγーアミノ酪酸の形成に関する研究 …… 273
辻元宏・祖谷江憲治
中嶋照夫
（阪大・医・高次研）

70. シナプトゾームにおけるＧＡＢＡ代謝と痙攣誘発との関係 …… 277
松田　誠・安部美耶子
（慈恵医大・医化学）

71. バルビタール依存ラットおよびEℓ系マウスのけいれんと脳内タウリン含量の変動 …… 281
松田敏夫・山上　悟
李　英培・前田定秋
馬場明道・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

72. 神経組織におけるAcetylcholineおよびNorepinephrineの放出と
Calcium結合におよぼすTaurineの影響 …… 285
垣田清人・村松　信
栗山欣弥・中川一夫
（京府医大・薬理）

73. 中枢神経内タウリンの微細分布 …… 289
米田幸雄・徳永尚司
栗山欣弥
（京府医大・薬理）

74. 小脳の生化学的研究：小脳ミュータント及び分離した分子層，顆粒層の生化学的研究 …… 293
御子柴克彦
（慶大・医・生理）
J.-P. Changeux
（パスツール研究所）

75. Hexamethonium（C_6）耐性の形成に伴う神経化学的変化について …… 297
村松　信・垣田清人
栗山欣弥
（京府医大・薬理）

76. 脊椎動物の脳におけるLysineよりのPipecolic acid, Cadaverine, Piperidineの生合成 …… 301

野 村 靖 幸
（広大・医・薬）
Thomas Schmidt-Glenewinkel
Ezio Giacobini
（Connecticut 大・精神神経薬理）

1　L-5HTPとMK486投与ウサギの発熱時における脳と末梢の5HTおよびc-AMP濃度

本多幸作・沼田吉彦・新国　茂
金子元久・高橋志雄・星野仁彦
熊代　永　（福島医大・神経精神）
中畑弘則・鈴木武彦　（福島医大・薬理）

〔要　約〕

ウサギにL-5HTPを大量投与すると発熱がみられる。また、Endotoxinによる発熱時には脳脊髄液中のc-AMPが増加することが知られ、c-AMPは体温調節のmediatorの1つと考えられている。そこで今回、まず、L-5HTPによる発熱時の脳および末梢の5HT濃度とc-AMP濃度を調べ、次に、この発熱に対するL-DOPAの拮抗作用を検討した。ウサギに末梢性脱炭酸酵素阻害剤、MK486（10 mg/kg, i.P.）を前処置し、30分後にL-5-HTP（50 mg/kg, s.c.）、L-DOPA（50mg/kg, s.c.）などを投与した。すなわち、5 HTP群、MK+5HTP群、MK+5HTP+DOPA群に分け、それぞれの群の体温、脳および末梢の5HT濃度とc-AMP濃度などを測定した。MK+5HTP群の23例中15例（65%）で著明な発熱が認められ、発熱例は50~120分の間に死亡した。発熱死亡群の間脳の5HT濃度は対照群の5.6倍にも達し、非発熱群との間に有意差（$p<0.05$）を認めた。また、発熱死亡群のc-AMP濃度は脳各部位では変化なかったが、脳脊髄液では2.3倍と有意な増加（$p<0.05$）を認めた。これに対して非発熱群は、脳および脳脊髄液のいずれでも有意な変化を認めなかった。次に、MK+5HTP+DOPA群では発熱は認められず、脳内5HT濃度は発熱死亡群の1/2であり、その増加は抑制されていた。（c-AMP濃度については現在検討中）以上の結果より、L-5HTPによる発熱には間脳の5HT増加とc-AMPの関与が示唆された。

ウサギに5-hydroxytryptophan（5HTP）を大量投与すると発熱することが知られている[5]。さらに、この発熱は、MAO阻害剤や末梢性脱炭酸酵素阻害剤の前処置で増強されるところから、中枢性のserotonin（5HT）の増加によって起こることが推測されている[6]。現在、体温の変化については、体温調節中枢の5HTとcathecholamineの相対的濃度が重要であり、両アミンが拮抗的に作用するとされている[4]。また、最近では、Endotoxin（E.coliなど）による発熱はprostaglandin E1およびadenosine 3'5'-cyclic monophosphate（c-AMP）を介して発現することが考えられており[10]、この場合のc-AMPの増加はmonoaminergic systemを介することが示唆されている[8]。そこで今回、まず、末梢性脱炭酸酵素阻害剤、MK486（L-α-methyldopa hydrazine，以下MKと略す）前処置ウサギにL-5HTPを投与し、発熱時における脳および末梢の5HT濃度とc-AMP濃度を測定し、次に、この発熱にL-DOPAがどのように作用するかを検討したので報告する。

＜実験方法＞

使用動物は3 Kg前後のウサギを用いた。薬物の投与方法は、まず、MK（10 mg/kg, i.p.）を前処置し、30分後にL-5HTP（50 mg/kg, s.c.）単独、あるいは、L-DOPA（50 mg/kg, s.c.）と併用投与した。MKは0.1 N HClの溶解液、L-5HTPは0.5%水溶液、L-DOPAは村山らの方法[9]によるアルカリ液とした。薬物投与後の症状観察は室温を22±2°Cとし、ケージに入れて頭部を固定し、体温、心拍数、呼吸数、瞳孔直径などを測定した。体温の測定は42°Cまではthermisterにより直腸温を持続的に記録し、42°C以上は水銀体温計を用いて、10分毎に測定した。心拍数および呼吸数はpolygraphを用いて測定し、瞳孔直径の測定はスケールを用いた。次に、5HTおよびc-AMP濃度の測定は、L-5HTP投与2

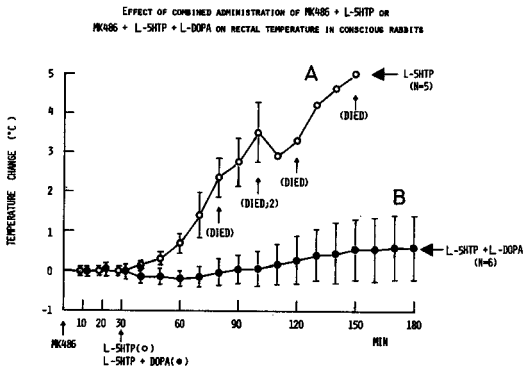
時間後、あるいは発熱死七直後に行なった。5HTの測定はBogdanski法[1]で行ない、c-AMP濃度の測定はbinding protein法を用いたが、この際、血漿および脳脊髄液はToveyらの方法[12]に、また、脳および肝はYajimaらの方法[13]に準じて測定した。なお、脳脊髄液は大槽より、血漿は右心室より、それぞれ採取した。

<実験結果>

(1) 体温、心拍数、呼吸などの変化

まず、MK無処置のL-5HTP投与群では、体温は低下傾向を示す例も認められたが、有意な変化はなかった。また、全身状態も軽度のshivering、呼吸困難、散瞳などが認められたにすぎなかった。次に、MK前処置後のL-5HTP単独投与群では、多くの例で著明な発熱を認めた。すなわち、発熱例では、体温は図1のAに示したごとく、著明な上昇が認められ、いずれも43°C以上の発熱であった。また、この発熱に伴い、高度のshivering、興奮、散瞳、頻脈、呼吸困難(呼吸数の減少と呼吸深度の増大)なども認められ、L-5HTP投与後、50～120分の間に死七した。こうした例は23例中15例(65%)に認められたが、一方、発熱しない例では、随伴症状も軽度であり、死七例はなかった。次にMK前処置後のL-5HTP、L-DOPA併用投与群であるが、図1のBに示すごとく、体温の上昇は著明に抑制され、shivering、興奮などは認められず、また、瞳孔、心拍数、呼吸などの変化も認められなかった。すなわち、この群は、MK前処置後のL-5HTP単独投与群に認められた症状がL-DOPAによって完全に打消されるという結果であった。そして、これらの群は24時間経過後も死七例はなかった。次に、これら各群の脳および末梢の5HT濃度とc-AMP濃度を示す。(表1)

(図1)



(2) 脳および末梢の5HT濃度

まず、体温調節中枢の存在する間脳の5HT濃度をみると、表1に示すごとく、発熱死七群では、著明な増加が認められた。すなわち、対照群の実に5.4倍に達しており、発熱しなかった各群と比較した場合、有意な高値($p<0.05$)を示していた。次に、L-5HTP、L-DOPA併用群では対照群に比べれば、2.5倍の増加であるが、発熱群に比べれば、その増加は1/2に抑制され

L-5-HTP, MK486 併用投与ウサギの発熱時における脳および末梢の5-HT濃度

	終脳	間脳	中脳	小脳	血清***	十二指腸	肝	腎
対照群 N=5～8	0.31 ±0.02	0.70 ±0.04	0.96 ±0.04	0.11 ±0.01	4.85 ±0.67	8.04 ±1.56	0.78 ±0.04	0.32 ±0.06
5-HTP* (非発熱) N=5	0.89 ±0.06	1.78 ±0.10	2.25 ±0.17	0.22 ±0.02	9.04 ±0.84	10.55 ±0.86	9.72 ±1.83	10.46 ±4.05
MK+5-HTP* (非発熱) 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
MK+5-HTP** (発熱死亡) N=5	1.74 ±0.13	3.75 ±0.25	3.88 ±0.39	0.37 ±0.10	9.34 ±1.23	6.32 ±1.04	5.77 ±0.64	13.89 ±4.18
MK+5-HTP+DOPA* (非発熱) N=5	1.03 ±0.17	1.80 ±0.25	2.01 ±0.25	0.22 ±0.05	9.41 ±1.29	6.74 ±0.43	4.53 ±0.94	14.57 ±2.44

L-5-HTP投与2時間後*，または発熱死亡時**(1.5～2時間後)における測定値、(平均値±標準誤差 μg/g, ml***) MK486(10mg/kg i.p.)は、L-5-HTP(50mg/kg s.c) L-DOPA(50mg/kg s.c.)投与30分前に投与した。

ており、ここでもL-DOPAの拮抗作用が認められた。次に、各群のその他の脳各部位の5HT濃度の変化であるが、これはほぼ間脳と同じような変化であった。また、末梢臓器の変化では、発熱死亡群の十二指腸の5HT濃度の増加が他の群に比べて抑制されている傾向を認めた。以上の結果から、発熱時には脳内5HTの著明な増加が認められること、また、L-DOPAはこの5HTの増加を抑制し、体温上昇も抑制することがうかがわれた。（表2）

(3) 脳および末梢のc-AMP濃度

表2に示すごとく、まず、MK無処置のL-5HTP群では、脳および脳脊髄液中のc-AMP濃度の変化はなく、血漿で僅かな増加傾向をみたにすぎなかった。次に、MK前処置後のL-5HTP投与群では、発熱群、非発熱群とも脳内c-AMP濃度は変化しなかった。しかし、脳脊髄液においては、発熱群には有意な増加（$p<0.005$）が認められた。すなわち、対照群の2.3倍の増加を認め、発熱時における脳内c-AMPの増加を示唆する結果であった。次に、血漿のc-AMP濃度であるが、これはMK前処置後のL-5HTP単独投与群では、発熱群、非発熱群とも有意に増加しており、発熱と関連したものではなかった。以上の結果では、L-5HTP投与による発熱時には脳脊髄液中のc-AMPの増加が目立った。

L-5-HTP, MK486併用投与ウサギの発熱時における脳および末梢のcyclic AMP濃度

	終脳	間脳	中脳	髄液***	血漿***	肝
対照群 N=6～8	2.98 ±0.61	0.96 ±0.12	0.93 ±0.15	16.0 ± 3.5	46.6 ± 5.2	0.73 ±0.05
L-5-HTP * (非発熱) N=5	3.08 ±1.07	0.90 ±0.13	0.92 ±0.12	14.5 ± 1.8	72.2 ±13.6	0.72 ±0.07
MK+5-HTP * (非発熱) N=4	3.22 ±0.96	1.11 ±0.13	1.06 ±0.18	25.8 ± 6.7	135.5 ±11.1	0.79 ±0.16
MK+5-HTP ** (発熱死亡) N=4～5	2.45 ±0.28	0.94 ±0.13	1.13 ±0.21	36.6 ± 4.3	110.5 ± 5.9	0.73 ±0.10

L-5-HTP投与2時間後*，または発熱死亡時**(1.5～2時間後)における測定値（平均値±標準誤差 P mole/mg, ml(***) MK486(10mg/kg i.p)はL-5-HTP(50mg/kg s.c.)投与30分前に投与した。

＜考察＞

末梢性脱炭酸酵素阻害剤前処置後の5HTの投与が著明な発熱をもたらすということは諸氏の研究より明らかにされている。われわれは、MKとL-5HTPとを用いて同様の結果を得、しかも、この時、脳内5HT濃度の著明な増加を認めた。これは、L-5HTPがMKにより、末梢の脱炭酸が抑制され、脳内でより多くの5HT合成が行なわれたものと考えられる。次に、5HTと体温の関係については、Canal and Ornesei[3]や他の研究者により報告されているが、脳内のL-5HTPから5HTへの合成は発熱の重要な因子とされている。今回の実験でも特に間脳における5HT濃度が対照群の実に5.3倍の増加が認められ、これまでの報告を支持するものと思われる。次に、MK前処置後のL-5HTP投与による発熱と、これに伴う頻脈、呼吸困難、散瞳などはL-DOPAの併用投与により抑制されることを認めた。そしてこのときの脳の5HT濃度もL-DOPAでその増加は抑制されていた。このことは、L-5HTPそのものが発熱をひきおこすものでなく、合成された5HTの増加が発熱作用を有することを示すものであり、かつ、L-5HTPとL-DOPAが拮抗的に働らくことを示唆するものと思われる。現在、両アミン前駆物質の体温に対する拮抗作用は次の5つの可能性が考えられている。(1). 両アミンの相対的濃度によって体温が変化する。(2). dopaminergic あるいは noradrenergic neuron の活性化により、serotonergic neuron が抑制される。(3). 両アミン酸が脳内の脱炭酸過程で競合的に拮抗する。(4). 5HTPが脳内に入る際、DOPAと競合する。(5). 細胞内で5HTがdopamineと置換

し．dopamineが遊離される。さて、今回の実験からは上記の可能性のうち．主に(3)，(4)，(5)などを支持するものと思われる。次に．5HTとc-AMPとの関連については．5HTは．ウサギ[7] ヒト[11]などの大脳切片で恒常的にadenyl cyclaseを活性化することや．serotonergic neuronの活性化によって．neuron末端のc-AMPが増加するという報告もあり[2]．5HTとc-AMPの関連性が示唆されている。また．発熱とc-AMPとの関連については．先にも述べたように．ウサギにEndotoxinやProstaglandin E_1を投与すると．発熱がみられ．この時．脳脊髄液中のc-AMPの増加がみられることが報告されている。しかしながら．脳内．特に視床下部のある間脳における5HT増加による発熱とc-AMPとの関連については．これまでのところ報告されていない。今回の実験結果では．脳内5HTの著明な増加をみた発熱ウサギにおいて．脳脊髄液中のc-AMPの増加を認めた。これに対して．5HT増加が少ない非発熱ウサギではc-AMP濃度の有意な増加はみられなかった。これより．脳内5HT増加が関与する発熱時にも、Endotoxinや Prostaglandin E_1による発熱時と同様に、脳内c-AMPが増加することが示唆された。

文献

1) Bogdanski, D.F., Pletscher, A., Brodie, B.B. and Udenfriend, S., J.pharmacol. Exptl. Therap., 117, 82 (1956)
2) Brunelli, M., Castellucci, V. and Kandel, E.R., Science, 194, 1178 (1977)
3). Canal, N. and Ornesi, A., Atti. Accad. Med. Lomb., 16, 64 (1961)
4) Feldberg, W. and Myers, R.D., J. physiol. Lond., 173, 226 (1964)
5) Horita, A. and Gogerty, J.H., J. pharmacol. Exptl. Therap., 122, 195 (1958)
6) Horita, A. and Hamilton, A.E., J. pharm. pharmac., 22, 389 (1970)
7) Kakiuchi, S. and Rall, J.W., Mol. pharmacol. 4, 367, 369 (1968)
8) Laburn, H.P. Rosendorff, C., Willies, G. and Woolf, C., J. physiol. 240, 49p, 50p (1974)
9) 村山，佐野，ドパゾール，文献集，基礎編，第一製薬，54 (1971)
10) Phillipp-Dormston, W.K., Pflügers Arch., 362, 223 (1976)
11) Skolnick, P., Huang, M., Daly, J. and Hoffer, B., J. neurochem., 21, 237 (1973)
12) Tovey, K.C. Oldhan, K.G. and Whelan, J.A.M., Clin. Chem. Acta, 56, 221 (1974)
13) Yajima, M. and Ui, M., Am. J. physiol., 228, 1053 (1975)

2　大脳半球の梗塞における，体液中 cyclic AMP濃度の経時変動

冨永詩郎・村上松太郎
阿部憲男
（秋田県立脳血管研究センター・内科）

〔要　約〕

大脳半球の梗塞で，ごく軽症な患者では，末梢静脈血漿の cyclic AMP濃度は，14日間の経時的観察中，正常範囲（8～18 picomoles/ml）にとどまった。　一方，なんらかの意識障害を有し，神経脱落症状も明らかな症例では，発症から数日以内に，正常範囲以下に降下する群と，この範囲内にとどまる群とがあった。　後者では，発症から約2週間後に撮影した脳シンチグラム上の異常範囲が，前者にくらべて大きかった。　臨床所見によって，後者とごく軽症な症例とを区別することは容易であった。　従って，末梢脈血漿の cyclic AMP濃度の測定によって，脳梗塞の障害の程度を早期に評価することが可能である。

麻痺側と健側から同時に末梢静脈血を採取して，経時的に比較したが，両者は同様の変動を示したので，上肢の神経支配の健否によって左右する変化ではない。　末梢静脈血の血漿 cyclic AMP濃度と血清の cyclic nucleotide phosphodiesterase（PDE）活性を測定して，経時変動を追跡すると，ほぼ鏡像を呈した。　従って，末梢静脈血の cyclic AMP濃度の変動は，血清のPDE活性が何らかの理由で変動することによって左右されるものであると考えられる。　今後，体液中のPDE活性の変動の臨床的意義が解明されれば，臨床検査の一項目として有用なものとなることが期待される。

末梢静脈血漿（以下**PVP**と略す）中の cyclic AMP 濃度が，脳血管障害の病型によって異なった経時変化を示し(6,7)，脳梗塞ではこの変化が，脳シンチグラム上の異常範囲の大きさと関連していることを，我々はすでに示唆した(7,8)。　さらに詳細な報告を目下投稿中であるが(9)，その概要を示した上で，内頸静脈血漿，動脈血漿，脳脊髄液（以下**CSF**）や24時間尿などの体液中での cyclic AMPの変動について述べ，cyclic AMPの経時変化をひきおこすと考えられる cyclic nucleotide phosphodiesterase（以下**PDE**）活性の変動についても言及する。

対　象：　発症から3日以内に入院した大脳半球の梗塞患者15例を対象とした。　確定診断は，神経学的ならびに一般的検査のほか，全例で脳血管造影を施行して下した。　脳卒中において，生命に関する重症度や予後のよい目安となるのは意識レベルであると考えられるので，表1には，入院時の意識レベルの軽い方から順に患者を列記して臨床データを示した。　脳血管造影は，4例を除いて発症から3日以内に施行した（4例は6～8日後に施行）。　患者G,N,Oでは，入院時から明らかな脳浮腫がみられた。　血管造影の追試によって，患者G,Kでは塞栓が末梢に移動し，H,Iでは閉塞血管が再開通して脳浮腫が著明となったことが判明した。

方　法：　PVPは肘窩の静脈から，内頸静脈血は内頸静脈球，動脈血は大腿動脈から，またCSFは腰椎穿刺によって採取し，ただちに0.5 M EDTA-2Na 入りの試験管に，EDTAの最終濃度が5～50 mMとなる量を加えて攪拌した後，すみやかに遠心して上清を得た。　24時間尿は，約10 mlの 6 N HClを加えたカメに貯え，よく攪拌した後に一部を採取した。　尿を適当量の蒸溜水で希釈したほかは，これらの

表1. 対象の臨床データ

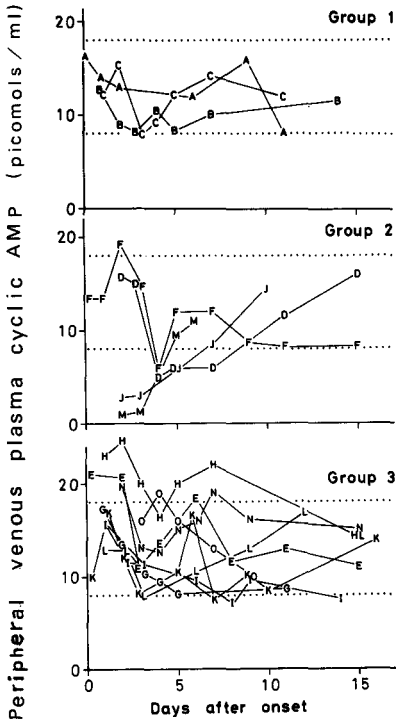
患者	性	年令	入院時臨床所見 意識*	麻痺の程度	言語障害	その他	§閉塞血管	脳浮腫	発症からシンチグラフィーまでの日数	合併症と主な使用薬剤 ( )内は発症してからの日数
A	男	65	N	左下肢脱力	構語		NF	−	17	閉塞性動脈硬化症(右大腿動脈)
B	男	55	N	右上下肢脱力			NF	−	14	肺癌(無症状)
C	男	60	N	左上下肢脱力			NF	−	17	十二指腸憩室, (1~7)経口降圧剤
D	男	66	L			左同側半盲	NF	−	18	——
E	女	60	L	左不全片麻痺	構語		NF	−	15	(0) Reserpine 0.5 mg 皮下注
F	男	55	L	右不全片麻痺		左同側半盲	PCE	−	19	湿性胸膜炎, (0~2)低分子デキストラン 500 ml
G	男	55	L	右不全片麻痺	全失語		MCA	+	12	一過性心房細動
H	女	79	L	左不全片麻痺	構語		MCA	±	18	(1) Reserpine 0.5 mg 皮下注, (1~6)低分子デキストラン 500 ml
I	女	72	L	左不全片麻痺	構語		MCA	±	33	一過性心房細動, (3,6,7) Reserpine 1mg 皮下注
J	男	61	L	右完全片麻痺	全失語		ACA, MCA	−	15	本態性高血圧, (5~)経口降圧剤
K	男	68	S	右完全片麻痺	運動性失語		ICA	−	15	本態性高血圧, (0~5) Dexamethasone 10 mg より漸減
L	女	68	S	右完全片麻痺	全失語		MCA	−	22	(1~5)低分子デキストラン 500 ml
M	女	58	S	右不全片麻痺	運動性失語		ACA	−	15	本態性高血圧, 糖尿病(軽症)
N	男	71	S	右不全片麻痺	全失語		ICA	+	14	(2~14) Dexamethasone 16 mg より漸減, (2-5) Mannitol 300 ml, (6~7) Citicoline 200 mg
O	男	49	S	右完全片麻痺	全失語		ICA	++	36	(3~8) Dexamethasone 10 mg より漸減, (3~5) Mannitol 600 ml

*N 正常, L 嗜眠, S 昏迷; § NF なし, ACA, MCA, PCA, ICA はそれぞれ前, 中, 後大脳動脈, 内頸動脈

検体になんらの特殊な処置を加えることなく, Radiochemical Co. 製の"cyclic AMP assay kit"を用いて, protein binding 法で cyclic AMP を測定した。 末梢静脈血清の PDE 活性は, ^{3}H-labeled cyclic AMP を基質として, Hidaka & Shibuya (3) の方法によって測定した。 脳シンチグラフィーは, ^{99m}Tc pertechnetate を用いて, 3例を除いて発症から約2週間後(3例はそれぞれ 19, 33, 36 日後)に施行し, 脳シンチグラム上の異常摂取範囲の面積を測定して、側面像・正面像ともに, 頭蓋内腔の横断面積に対する比で表わした。 全例に入院当初から数日以上にわたって抗生物質を投与した。 その他の主な使用薬剤は表1に示した。

結果と考察

PVP の cyclic AMP 濃度 : 患者 A, B, C は軽度の構語障害や, 握力の測定で確認できる程度の脱力を有する軽症の脳梗塞である。 PVP の cyclic AMP 濃度は, 14日にわたる観察期間中, 正常範囲(8~18 picomoles/ml)にとどまった(図1の Group 1)。 この群では, 脳シンチグラム上に異常を認めなかった(図2)。 入院時になんらかの意識障害を有し, 神経脱落症状も Group 1 にくらべて明らかな症例では, 発症から数日以内に cyclic AMP 濃度が正常範囲より降下する群(Group 2)と, 正常範囲にとどまる群(Group 3)とに分けることができた(図1)。 1例の例外を除いて, Group 3 に属する症例では, 脳シンチグラム上の異常範囲が, Group 2 にくらべて広範であった。 この事は, 側面像と正面像を総合して, 障害部を立体的に構築すれば, さらに明らかなものとなる。 例外の患者 E は, 異常範囲は狭かったが, その部位は大脳基底核領域に限局しており, 意識の経過は良好であったが, 麻痺は進行して高度



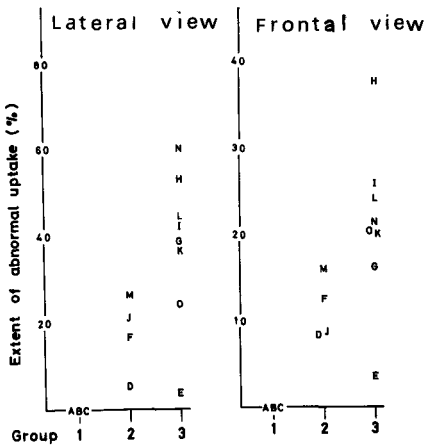


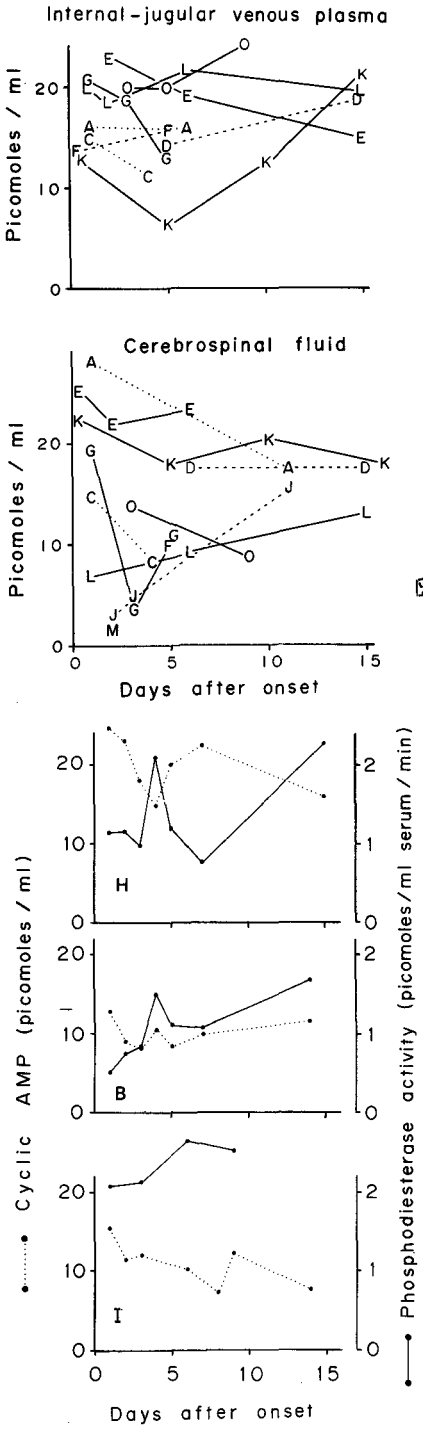
図2. 各グループの脳シンチグラム上の異常範囲。 図1参照。

図1. 末梢静脈血漿 cyclic AMP 濃度の経時変化。 点線の間が正常範囲。 記号は表1の患者を表わす。 Group の定義は本文参照。

に固定した。 PVP 中の cyclic AMP の経時変化の型は，Group 1 と 3 と類似していたが，臨床症状から両群を区別することは前述したように容易であった。 従って，脳梗塞患者の PVP の cyclic AMP 濃度を発症から数日の間経時的に測定することによって，障害範囲の大きさを早期に評価できるものと考えられる。 2例の患者で麻痺側と健側の両肘窩静脈から経時的に採血して比較したが，両者はほぼ同様の変動を示した。 従って，PVP の cyclic AMP の変動は，上肢の神経支配の健否によるものではないといえる。

その他の体液中の濃度 ： 内頸静脈血漿の cyclic AMP 濃度は，動脈血漿のそれよりも高値を示すので，障害脳から cyclic AMP が血中に漏出しているものと考えられる。しかしながら，内頸静脈血漿中の cyclic AMP 濃度も，CSF 中の濃度も，重症度や障害範囲の大きさとの間に関連が認められなかった（図3）。 同様に，cyclic AMP の動脈血中濃度や，尿中への24時間排泄量にも，臨床的に有意義な変化を認めることができなかった。

血清の PDE 活性 ： cyclic AMP は流血中では labile で，この基質の血中への放出量に比較すれば，血清の PDE 活性は高い上，腎（10）や肝（5）からの排泄によって，PVP の cyclic AMP 濃度はきわめて低いレベルに動的平衡を保っているものと考えられる（2）。 そこで PVP の cyclic AMP 濃度と血清 PDE 活性との関連が問題となる。 肘窩静脈より採取した血液を二分して，両者を測定すると，その関係は経時的にほぼ鏡像を呈した（図4）。 このことは，血清 PDE 活性が PVP の cyclic AMP 濃度を規定していることを示唆し，PDE 活性の変動が，臨床的により一層重要な意義を有するものと



想像され，有用な検査項目の一つとなるものと期待される。　しかしながら，現在一般に用いられているPDE活性の測定法は，ルーチンの臨床検査として用いるには煩雑であるので，簡便な方法の開発が望まれる。

薬物や合併症の影響：治療薬がPVPのcyclic AMP濃度に影響を与えている可能性がある。　脳梗塞で繁用される薬物である抗生物質，urokinase，20% mannitol，dexamethasoneの静脈内投与は，ほとんど作用を示さなかった(4)。　ただし，カテコラミン類の静脈内投与でPVPのcyclic AMP濃度が増加し，propranololがこの反応を抑制するので(1)，これらの薬剤を使用した場合には考慮に入れる必要がある。　phentolamineにはこのような抑制作用はないという(1)。

図3．内頸静脈血漿(上)ならびにCSF(下)中のcyclic AMP濃度の経時変化。　実線，破線，実線は，それぞれGroup 1, 2, 3を表わす。　記号は表1の患者を示す。

文献：(1) Ball, J.H., Kaminsky, N.I., Hardman, J.G., Broadus, A.E., Sutherland, E.W. and Liddle, G.W. (1972), J. clin. Invest. 51, 2124-2129. (2) Broadus, A.E., Kaminsky, N.I., Hrdman, J.G., Sutherland, E.W. and Liddle, G.W. (1970) J. clin. Invest. 49, 2222~2236. (3) Hidaka, H. and Shibuya, M. (1974) Biochem. Med. 10; 301~311. (4) Murakami, M., Tominaga, S. and Watanabe, K. (1977) Jap. J. Pharmacol. 27 (Suppl.), 頁未定. (5) Strange, R.C. and Percy-Robb, I.W. (1975) Biochem. J. 146, 509~512. (6) 冨永詩郎，小嶋俊一，田川皓一，鈴木敏巳，中村隆(1976)，医学のあゆみ 98; 668~670. (7) Tominaga, S., Murakami, M., Kojima, S., Suzuki, T. and Nakamura, T. (1976) Tohoku J. exp. Med. 120, 151~158. (8) 冨永詩郎，小嶋俊一，村上松太郎，中村隆(1977) 医学のあゆみ 100, 735~738. (9) 冨永詩郎，小嶋俊一，村上松太郎，上村和夫，鈴木敏巳，中村隆(1977) 脳と神経 29 (9)，頁未定. (10) Wehmann, R.E., Blonde, L. and Steiner, A.L. (1974) J. clin. Invest. 53, 173-179.

図4．末梢静脈の血漿cyclic AMP濃度と血清PDE活性の経時変化。　実線はcyclic AMP，実線はPDE活性。　記号は表1の患者を示す。

3 遅発性ジスキネジア患者の髄液アミン代謝物質と環状ヌクレオチド
—— Di-n-propylacetic acidおよびcyproheptadineの影響 ——

長尾卓夫・大下俊則・光信克甫
佐藤光源・大月三郎　（岡大・医・精神）

〔要　約〕

Tardive Dyskinesia（TD）を伴う慢性分裂病患者に、Di-n-propylacetic acid（DPA）, Cyproheptadineを投与し、その効果を観察すると共に、髄液中のHomovanillic acid（HVA）、5-hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol（MHPG）、cyclicAMP、cyclic GMPを測定し、TDを伴わない慢性分裂病患者、及び振戦を伴う慢性分裂病患者と比較検討した。(1)TD群と、TDを伴わない群では髄液中HVA、5HIAA、MHPG、cAMP, cGMPのいづれも差は認めなかったが、振戦群では、両者に比してHVA、5HIAAの低値、cAMPの高値が、有意の差で認められた。(2)TD群においてDPA, 又はcyproheptadine投与前に比べ投与3週后では、両者共にHVAの低下、cAMPとcGMPの上昇が有意の差で、認められた。これらのアミン代謝産物、cAMP、cGMPの変動と臨床効果とは、一致しなかったが、HVA低下、cGMP上昇は、hyperdopaminergic-hypocholinergicを是正する方向と一致するものかもしれない。又薬物投与によるHVA低下とcAMP上昇、そして振戦群でのHVA低値とcAMP高値という両者の関係から、cAMPがpostsynaptic DA recepter sensitivityを示す一つの指標になるとも考えられる。(3)Carbamazepine服薬者がMHPGの異常高値を示すことが判り、てんかん患者も含めて比較したところ、服薬群と非服薬群に明らかな差が認められた。

長期にわたる向精神薬治療による副作用の一つとして、近年Tardive Dyskinesia（TD）が注目され、その病因としてDopaminergic Hypersensitivity, Cholinergic Hypofunction（3,4,8）などが説えられている。われわれも、脳内アミン系、アセチルコリン（Ach）系などの神経伝達系の不均衡が原因ではないかと考え、TDに有効と報告されたDi-n-propylacetic acid（DPA）（11）とCyproheptadine（6）による治療を試み、治療効果の観察と共に脳内Dopamine（DA）, Norepinephrine（NE）, Serotonine（5HT）の主要代謝産物である髄液中のHomovanillic acid（HVA）、3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol（MHPG）, 5-Hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）とAchの動態を反映すると云われているcyclicGMP, 及びcyclicAMPを測定し、TDを伴わない群、振戦を伴う群と比較すると共に薬物投与前后での変化を追い、それらの相互関係からTDのより有効な治療を追求できるのではないかと考えた。

〔方法と対象〕

対象は罹病期間10年以上の慢性分裂病患者で、少なくとも1年以上前にTD（oral region）が出現している13名（男3、女10）、TDを伴わない15名（男6、女9）（以下コントロール群）、手足又は舌の振戦運動を有する5名の男性慢性分裂病者（振戦群）の3群について、同意を得て行った。TD群については、投薬中の向精神薬、抗コリン剤等の薬物は全て同量継続したままで、DPAは1週目400mg/日、2～3週目は600mg/日、Cyproheptadineは、1週目8mg/日、2週目16mg/日、3週目24mg/日の投与を行い、投与前と投与3週間后について、TD、精神症状の評価、髄液採取を行った。腰椎穿刺は、前夜から安静臥床させ、am 8:30～9:30の間に側臥位で行い、最初の流出する5mlをHVA

MHPG、5HIAAの測定に、次の2mlをcAMP、cGMP、総蛋白量の測定に使用した。髄液はそのまま可及的速やかに-20°Cに凍結保存した。
HVA、MHPG、5HIAAはKorf等の方法(9)により抽出測定したが、MHPGについては、抽出液に塩化ナトリウム、塩酸、ギ酸を加え、Korf等(10)の抽出液組成に近づけ、その測定法に準じて蛍光法で測定した。HVA, MHPG, 5HIAAの回収率は、各々平均75%、83%、100%であった。cAMP, cGMPはYAMASA、Assay Kitによるradioimmunoassay法で測定した。薬物投与による効果判定は、8ミリフィルム、又はビデオテープに集録し、着明に回数、大いさの減少したもの(著効)、著明ではないが減少の認められたもの(有効)、効果のみられなかったもの(無効)に分類した。精神症状はBrief Psychiatric Rating Scale(BPRS)(12)によって評価した。調査時服薬中の向精神薬量は、クロルプロマジン量に換算した(14)。
尚髄液検査にて、総蛋白量、髄液圧、細胞数は全例正常域にあった。

〔結果〕

(Table 1参照) 薬物投与前のTD群と、コントロール群の間には、HVA, 5HIAA, MHPG, cAMP, cGMPのいづれにおいても有意の差はなかった。TD群には2例において、2～25年間向精神薬の非服用者があったが、これを含めても、除いても差はなかった。コントロール群で3名、TD群で1名のMHPGの異常高値を示したものがあり、この4名については、MHPG検定より除外した。これについては後述する。

振戦群では、コントロール群、TD群の両者に比し、HVA、5HIAAが有意に低く、cAMPは有意な高値を示した。cGMPは低い傾向はみられたが有意ではなかった。振戦群の年令差を考慮して、コントロール群より同年令群(37～48才 43.3±4.1 N=7)をとって比較したところ、HVAは、67.7±34.3対40.4±18.2(0.1<P<0.2)、5HIAAは22.3±5.3対10.1±3.7(P<0.001)、cAMPは17.5±1.5対26.5±11.7(0.05<P<0.1)であり5HIAAのみが有意に低かった。

コントロール群、TD群、振戦群の向精神薬量には差は認めなかった。

(Table 2参照) DPAは、TD群7名に投与され、その効果は、著効1名、有効2名無効4名であった。HVAは不変1例を除いて減少し、cGMPは2例の不変を除いて増加、cAMPは全例増加を示し、各々の前后の増減差は有意であったが、MHPG、5HIAAには一定の傾向は認めなかった。又BPRS値はやや低下の傾向はあったが有意ではなかった。

(Table 3参照) Cyproheptadine投与6名では、有効2、無効4であった。この群では、向精神薬が2～25年間中断している2名を含んでいる為、それを含めた全例と服薬例のみとのそれぞれについて前后の差について検定した。両者共に、HVA低下、cGMPとcAMPの上昇が有意にみられた。MHPGは非服薬者1例で非常な上昇を示したが、服薬者だけでは有意な低下がみられた。5HIAAは、DPAと同様一定の傾向はみられなかった。BPRS値もほとんど変動はみられなかった。

DPAやCyproheptadine投与によるアミン代謝産物、cAMP、cGMPの変化と、臨床効果との間には一定の傾向を示すものはみられなかった。抗コリン剤はTD群で3例と振戦群で1例のみ投薬されていなかっただけであった。DPA, Cyproheptadine

Table 1　T.D.を伴わない Control, T.D., Tremorの各群の髄液アミン代謝物,cAMP, cGMP

	No.	Age	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5-HIAA ng/ml	cAMP pmoles/ml	cGMP pmoles/ml	Neuro-leptics mg/day
Control	15 (9)	49.3±7.6	70.8±22.5	13.2±4.1	22.5±5.6	18.6± 4.3	3.17±1.43	968±723
T.D.	13 (10)	62.5±6.0	82.5±30.3	13.5±4.4	22.1±4.3	18.1± 6.2	3.07±1.13	461±457
Tremor	5	42.0±3.1	40.4±18.2**	12.1±2.6	10.1±3.7***	26.5±11.7*	2.07±0.79	734±129

mean±S.D.　*:p<0.05　**:p<0.02　***:p<0.001
( )は対象者の女性の数を示す　HVAの男性１例 cAMP, cGMP の女性１例は測定できなかったので N=14
Control の男性２例 女性１例 T.D. の女性１例は Carbamazepine 服用者で MHPG について除外しており 各々 N=12となっている

Table 2　DPA投与による髄液アミン代謝物,cAMP, cGMP 及びBPRSの変化

	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5-HIAA ng/ml	cAMP pmoles/ml	cGMP pmoles/ml	BPRS
投与前	84.4±24.9	15.4±4.9	23.5±4.7	14.7±5.1	2.58±1.07	34.9±5.6
投与后	67.3±16.6	16.7±3.8	23.4±5.3	17.1±4.8	3.55±1.42	32.4±3.9
前后の差	17.1± 5.7*			2.5±0.5**	0.97±0.37*	

mean±S.D.　*:p<0.025　**:p<0.0025
対象者は男性３名 女性４名の計７名　但しMHPGは Carbamazepine 投与の女性１名を除いた。

Table 3　Cyproheptadine投与による髄液アミン代謝物, cAMP, cGMP, BPRS の変化

	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5-HIAA ng/ml	cAMP pmoles/ml	cGMP pmoles/ml	BPRS
投与前	80.3±38.1 (99.0±29.8)	9.9± 3.4 (9.8± 3.2)	20.4±3.5 (22.6±1.3)	22.1±5.0 (22.1±6.3)	3.64±0.97 (3.87±1.15)	41.7±2.8 (41.0±3.4)
投与后	63.9±20.4 (73.9±16.7)	16.6±22.2 (7.7± 2.8)	21.9±4.6 (21.8±5.5)	26.9±6.9 (26.1±8.6)	5.10±1.50 (5.26±1.91)	41.2±4.1 (40.3±4.9)
前后の差	16.4± 2.3* (25.1± 7.4**)	(2.4± 0.3***)		4.8±1.1° (4.1±1.6*)	1.46±0.28°° (1.39±0.42**)	

mean±S.D.　*:p<0.05　**:p<0.025　***:p<0.01　°:p<0.005　°°:p<0.0025
対象者は全員女性の６名　( )内は向精神薬服薬者４名だけの値
MHPG について投与后測定不能となった服薬者１例は除外した

Table 4　Carbamazepine服薬者と非服薬者のMHPG

	MHPG ng/ml
服薬者　(Epilepsy 3, Schizophrenia 5)	62.3±16.8
非服薬者　(Epilepsy 8, Schizophrenia 30)	12.5± 4.3

mean±S.D.

投与中、DPAで2例の食欲不振を起こした他は、特に副作用は認めなかった。

MHPGの異常高値を示す症例4例について検索したところ、全例についてCarbamazepineを服用していることがわかり、てんかん患者(posttraumaticも含む)11例、分裂病者35例について調べたところ、Carbamazepine服薬者と非服薬者の間で、著明な差が認められた。(Table4)

〔考察〕

DPAはγ-amino-butylic acid(GABA)transaminaseあるいはsuccinic semialdehyde dehydrogenaseを阻害する形で脳内GABAを増加させるといわれており(5)、GABAは、DAのフィードバック機構に関与していると考えられている(7.15)。Cyproheptadineには、抗ヒスタミン、抗セロトニン作用があるとされているが、その薬理機序は、はっきりしていない。DPA, Cyproheptadine投与後には、HVA減少、cGMP増加が共通して認められ、これはDA代謝の減退、Ach系の機能増加を示すものと考えられTDにおける、DA系-Ach系の不均衡を是正する方向に働いていると考えられるかもしれない。しかしこの傾向と臨床効果とが、必ずしも一致しなかった事は、他の神経伝達系や、その他の要因が複雑に関わっていると考えられる。

振戦群は、向精神薬によるパーキンソン症状と考えられ、3例には筋強剛も認められた。この群では、HVA、そして特に5HIAAの低値が認められ、5HIAAは、同年令群と比較しても有意な低値である事から、この振戦症状には、5HT系の関与が大きい事を示唆していると思われる。

cAMPはDA系の機能だけを反映するのではないが、われわれの結果では、振戦群でのHVA低値の場合、cAMPが高値を示し、DPA, Cyproheptadineの両者の投与によりHVA減少がおこり、cAMP上昇がおこるという逆の関係にあった。この事はDAによるadenylate cyclase活性化の結果cAMPが上昇するというのでは説明できない。われわれの結果は、cAMPがpostsynaptic DA receptorのsensitivityの指標になる可能性があることを示唆している。なおPandey等は血小板のadenylate cyclase活性が分裂病で増加している事をプロスタグランジンE1刺激で示しており(13)、Biederman等は髄液cAMP高値の分裂病者の治療効果が良くなかった例を報告(1)している一方、Bowers等はprobenecid法による髄液HVA蓄積の低いものは予後不良であったと報告(2)している。これ等は、分裂病者のpostsynaptic DA receptorのsensitivity亢進を示唆するものであろう。

CarbamazepineとMHPGの関係については、その詳細は別に発表する予定である。

文献;
1) Biederman, J. et al., Brit. J. Psychiat., 130:64-67, 1977.
2) Bowers, M. B., Arch. Gen. Psychiat., 31:50-54, 1974.
3) Fann, W. E. et al., Psychopharmacol., 37:101-107, 1974.
4) Gerlach, J. et al., Psychopharmacol., 34:21-35, 1974.
5) Godin, Y. et al., J. Neurochem., 16:869-873, 1969.
6) Goldman, D., Psychopharmacol., 47:271-272, 1976.
7) Kim, J. S. et al., Exp. Brain Res., 14:95-104, 1971.
8) Klawans, H. L., Am. J. Psychiat., 130:82-86, 1973.
9) Korf, J. et al., Biochem. Pharmacol., 20:659-668, 1971.
10) Korf, J. et al., Europ. J. Pharmacol., 21:305-310, 1973.
11) Linnoila, M. et al., Brit. J. Psychiat., 129:114-119, 1976.
12) Overall, J. E. and Gorham, D. R., Psychol. Reports, 10:799-812, 1962.
13) Pandey, G. N. et al., Am. J. Psychiat., 134:518-522, 1977.
14) Seeman, P. and Lee, T., Science, 188:1217-1219, 1975.
15) Yoshida, M. and Precht, W., Brain Res., 32:225-228, 1971.

4　躁うつ病者のトリプトファン，チロシン，コルチゾールの血中濃度の変動とその臨床的意味

岸本英爾・浜　由紀　（横浜市大・医・精神）

〔要　約〕

1　うつ病者の病相期には，血漿遊離型トリプトファン濃度，チロシン濃度のいずれにも変化が見られ，それらの濃度は相互に相関（$r=0.70$, $P<0.001$）を持って変化する。

2　午前10－11時には血漿遊離型トリプトファン濃度はうつ病期では低値（$P<0.001$）回復期には正常値を示し，躁病期では高値（$P<0.01$）を示す。血漿チロシン濃度はうつ病期で低値（$P<0.001$）を，躁病期，回復期では正常値を示す。

3　血漿コルチゾール濃度はうつ病期で高値（$P<0.001$），躁病期で低値（$P<0.001$）を示すが，その濃度は血漿遊離型トリプトファン，チロシン濃度とは相関を示さない。

4　遊離型トリプトファン濃度に影響を及ぼすとされる血漿総蛋白，アルブミン，NEFA濃度はうつ病者で変化は見られないが，血漿5-HT，5-HIAA濃度は低値（$P<0.001$）を示す。

5　日内変動についてみると，うつ病期には遊離型トリプトファン濃度は午前中低値（$P<0.001$）を示し，午后には回復する。一方躁病期では高値を示し，精神症状の日内変動との相関がうかがわれる。また総トリプトファン濃度，チロシン濃度はうつ病期には一日中低値を示し，それぞれの日内変動のリズムは類似する。

6　三環系抗うつ剤が著効を示す症例では，2週間以内に血漿遊離型トリプトファン濃度及びチロシン濃度がほぼ正常値に回復するものが多い。また抗うつ剤 Imipramine は，*in vitro*，*in vivo* で血漿遊離型トリプトファン濃度を増加させる。

内因性躁うつ病の生物学的研究は最近20年間に大きく進歩し，カテコールアミン，インドールアミン，内分泌，電解質代謝等に注目されながら多面的に進められている。

カテコールアミン学説[11]，インドールアミン学説[2]は躁うつ病を中枢神経系におけるそれぞれのアミンの増減によって説明しようとする学説であるが，最近ではその双方を統一的に説明しようとする試みもなされている[9]。

著者らは今回，脳のインドールアミン及びカテコールアミンのそれぞれの前駆アミノ酸であるトリプトファン及びチロシンの血中濃度，さらにそれらの血中濃度に影響を及ぼすとされている血漿コルチゾール，遊離脂肪酸（NEFA），アルブミン濃度，及び血漿5-HT，5-HIAA濃度を躁うつ病患者で測定し興味深い結果を得た。又血中アミノ酸濃度に及ぼすImipramineの作用についても同様に新しい知見を得たのでここに報告する。

研究対象及び方法

研究対象　当大学病院精神科に受診（初診）した内因性うつ病患者82名（男42名，女40名）及び躁病患者8名（男4名，女4名）を研究対象とした。日内変動について検索を行った症例は全て入院患者（男4名，女5名）で，いずれも測定時正常の病院食（蛋白 80g，糖質 400g，脂肪 50g，熱量 2400cal）を摂取していた。内因性うつ病，躁病の診断は2人以上の医師により，独立してなされ，診断が一致したものを対象としている。

正常対照群は健康な職員21名（男11名，女10名）で，平均年令では患者群と正常対照群の間に差を認めない（$P<0.05$）。尚採血にあたっては患者の了解を得ている。

測定方法　血中アミノ酸濃度の日内変動と食事の影響を考慮して，入院患者は8時30分，12時30分，16時30分に食事を摂らせ，8，12，16，20，24時に，外来初診患者は

午前10へ11時の間に5mlずつHeparin(Novo Heparin 21.U./ml)採血を行なった。採取した血液は直ちに20°C, 1500g, 10分間遠沈し血漿分離を行ない、分離した血漿の内、一部を血漿総トリプトファン、総チロシン、コルチゾール、NEFA、アルブミン、総蛋白測定に使用した。一部(1.0ml)はMembrane Ultrafilter CF50A(Amicon)を用い、20°C、800g、30分遠沈し、得られた沪液中のトリプトファン、チロシンを測定し、血漿遊離型トリプトファン(総トリプトファン濃度の約10%)、遊離型チロシン(総チロシンと同濃度)とした。

血漿蛋白アルブミンに結合しているトリプトファンに対するImipramineの影響を調べる実験では、各種の濃度のImipramineの入った試験管に1mlの血漿を加え、20°C、30分ゆっくり振盪した上で上記と同様に分離し、遊離型トリプトファン、チロシンを測定した。

トリプトファンはDenckla & Deweyの方法[13]を改良したEcclestonの方法[3]により、チロシンはWoalkes & Udenfriendの方法[4]によって蛍光法で、コルチゾールはRuderらの方法[10]によりRadioimmunoassayで、NEFAはLaurell & Tibbling[11]の方法により、総蛋白はGornallらの方法[6]により比色法で、アルブミンは電気泳動法[5]で、5-HT, 5-HIAAはFischerらの方法で蛍光法で測定した。

結果

1 うつ病期、躁病期及び回復期の血漿総トリプトファン濃度、遊離型トリプトファン濃度、総チロシン濃度

午前10へ11時に調べたうつ病期、躁病期及び回復期におけるそれぞれの濃度をFig 1に示した(M.±S.D. 以下同様)。総トリプトファン濃度はうつ病期、躁病期、回復期ともに正常値を示すが、遊離型トリプトファン濃度はうつ病期では低く($p<0.001$)、躁病期には高い値($p<0.01$)を示し、また回復期には正常値を示す。総チロシン濃度はうつ病期では低く($p<0.001$)、躁病期、回復期には正常値を示す。

2 血漿遊離型トリプトファン濃度、総トリプトファン濃度、総チロシン濃度、コルチゾール濃度の日内変動

入院患者を対象としてそれぞれの濃度の日内変動を調べた。Fig 2に示すように、正常者の血漿遊離型トリプトファン濃度の日内変動を見ると午前8時に最高値を示し、午後4時に最低値を示す。一方うつ病者では午前8時、12時共に正常者に比し有意の差($p<0.001$)をもって低値を示すが午後4、8、12時では有意の差は見られなかった。この所見はうつ病者に見られる午前中の気分の悪さ、午後になって軽快、回復するという気分の日内変動との関連を考える時興味深い。躁病者ではFig 3に示すごとく遊離型トリプトファン濃度の著明な高値を認めた。入院後この傾向は改善を示し、退院時(5/17)には日内変動は正常型となった。Fig 4, 5

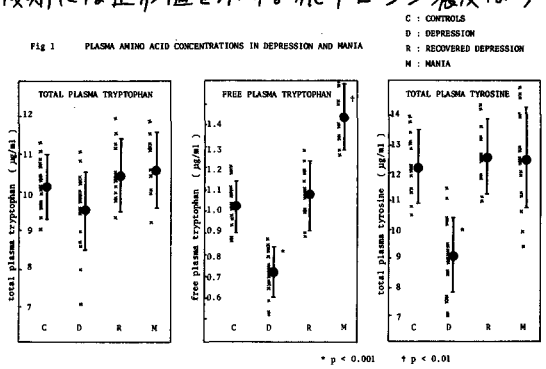


Fig 1 PLASMA AMINO ACID CONCENTRATIONS IN DEPRESSION AND MANIA

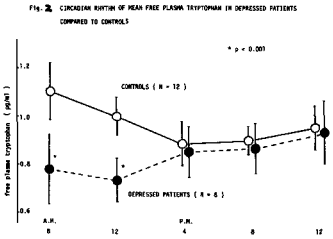


Fig. 2 CIRCADIAN RHYTHM OF MEAN FREE PLASMA TRYPTOPHAN IN DEPRESSED PATIENTS COMPARED TO CONTROLS

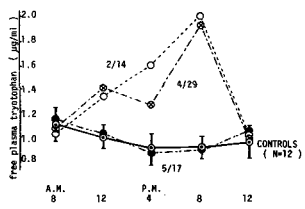


Fig 3 CIRCADIAN RHYTHM OF FREE PLASMA TRYPTOPHAN IN MANIA

に示す様に正常者の血漿総トリプトファン、総チロシン濃度の日内変動をみると午後8時に最高値を示し、正午に最低値を示す。一方うつ病者の日内変動のリズムは正常者とほぼ同様であるが、その濃度は正常者に比べ一日中低い値を示した。Fig6に示す様にうつ病者のコルチゾール濃度の日内変動のリズムは正常者の午前8時に最高値を、夜12時に最低値を示す日内変動のリズムとほぼ同様であったが、その濃度はうつ病者では正常者に比べ、一日中有意の差($p<0.001$)を持って高い値を示した。

3 血漿総蛋白量、アルブミン、遊離脂肪酸、5-HT、5-HIAAの濃度

午前10－11時に調べたうつ病患者におけるそれぞれの濃度をFig7,8に示した。血漿総蛋白量はうつ病期でも正常値で、血中でトリプトファン、Imipramineと結合するといわれるアルブミンも正常値を示した。又アルブミンと結合して血漿遊離型トリプトファンの濃度を増量すると言われるNEFAも正常値を示した。一方血漿5-HT, 5-HIAAの濃度はうつ病者で著明な低下($p<0.001$)を示した。

4 血漿遊離型トリプトファンとチロシン濃度との相関

Fig9に示す様にうつ病者で午前10－11時に調べた血漿遊離型トリプトファン濃度とチロシン濃度との間には相関($r=0.70$, $p<0.001$)が認められた。一方血漿コルチゾール濃度と遊離型トリプトファン濃度($r=-0.02$, $t=0.09$)、血漿コルチゾール濃度とチロシン濃度($r=-0.26$, $t=1.51$)、血漿遊離脂肪酸濃度と遊離型トリプトファン濃度($r=-0.02$, $t=0.09$)との間には相関は認められなかった。

5 Imipramineと血漿遊離型トリプトファン、チロシン濃度

Fig10にin vitroでのImipramine濃度と血漿遊離型トリプトファン、チロシン濃度との関係を示した。この結果は血中イミプラミン濃度が増加すれば血漿遊離型トリプトファン濃度も増加することを示している。一方血漿遊離型チロシン濃度にはこの傾向は

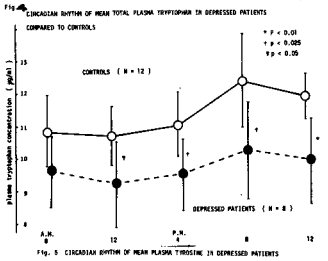
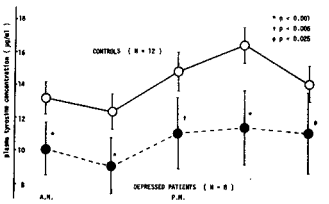
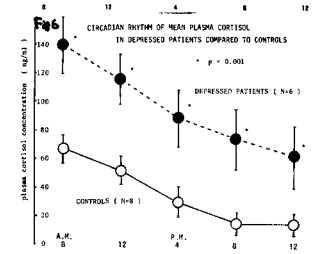
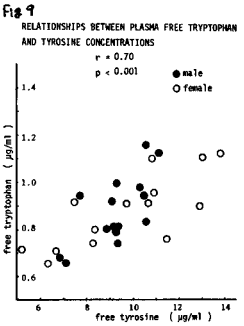
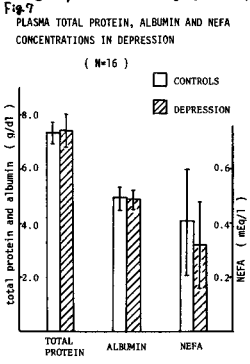


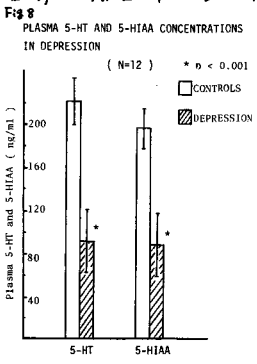
Fig. 5 CIRCADIAN RHYTHM OF MEAN PLASMA TYROSINE IN DEPRESSED PATIENTS COMPARED TO CONTROLS

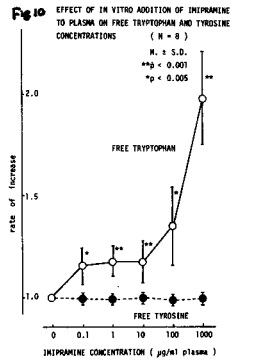


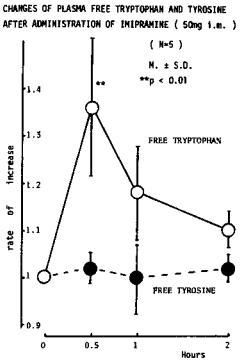












認められない。in vivo で Imipramine 50mg を筋注投与した場合にも Fig11 に示す様に同様の結果が得られ、投与30分後に遊離型トリプトファン濃度のみ増加が見られた。

6 臨床経過と血漿遊離型トリプトファン濃度及び チロシン濃度

Imipramine 75mg/日 の投与で抑うつ状態が改善され良い臨床経過を示す症例群と、Imipramine に反応せず臨床的に抑うつ状態が続く症例群とに分け、それぞれの血漿遊離型トリプトファン、チロシン濃度を Imipramine 投与前の値と比較しながら経時的に午前10～11時の採血でその値の変化をみた。Fig12 に示す様に Imipramine の効果の見られない症例群では血漿遊離型トリプトファン、チロシン濃度は初診時と同様に低値をとり続けるのに対し、抑うつ状態が著明に改善される症例群では有意の差（$p<0.01$）をもって血漿遊離型トリプトファン、チロシンの濃度が上昇し、投薬開始後約2－3週間で血漿遊離型トリプトファン チロシン濃度はほぼ正常値となった。

Fig 12 EFFECTS OF IMIPRAMINE (75mg/day per os) ON PLASMA FREE TRYPTOPHAN AND TYROSINE CONCENTRATIONS AND CLINICAL IMPROVEMENT

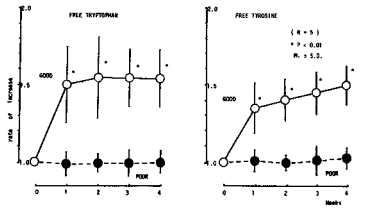
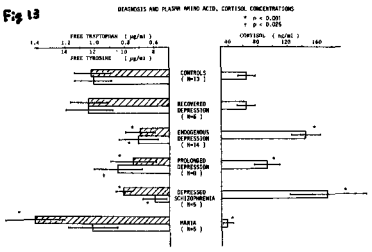


Fig 13 DIAGNOSIS AND PLASMA AMINO ACID, CORTISOL CONCENTRATIONS



7 各種の精神疾患と血漿遊離型トリプトファン、チロシン、コルチゾール濃度

各種の精神疾患で午前10－11時に調べたそれぞれの濃度を Fig13 に示した。内因性うつ病、遷延うつ病抑うつ状態を示す精神分裂病者ではいずれも血漿遊離型トリプトファン、チロシン濃度が有意の差（$p<0.001$ ～0.025）で低い値を示した。又コルチゾールは内因性うつ病、遷延うつ病、抑うつ状態を示す分裂病者で高い値（$p<0.001$）を示し、躁病者では低い値（$p<0.001$）を示した。

考察

Tagliamonte[12]、中島[8]らは血中遊離トリプトファン濃度が脳のセロトニン代謝を、Wurtman[14]らは血中チロシン濃度が脳のカテコールアミン代謝を規制するものとして重視している。Prange[9]は躁うつ病者ではインドールアミンもカテコールアミンも変化するが、病相はカテコールアミンによって決められるとの仮説を提出している。著者らの結果は血漿遊離型トリプトファン濃度がうつ病者で低値を、躁病者で高値を示し、又その濃度の日内変動は臨床症状と良く平行して変化した。一方血漿チロシンはうつ病期でのみ低値を示し躁病期では変化を示さなかった。従って著者らの結果はむしろトリプトファン従ってインドールアミンが病相と共に変化していることを示している。これらのアミノ酸の血中濃度に影響を及ぼす種々の因子についても検討を加え新しい知見を得たが、いずれにしても上述の諸結果は今後内因性躁鬱病の病因を解明する上で新しい指標となるものと考えられる。

文献

1. Brackenridge,C.J.: Anal.Chem.32,1353(1960) 2. Coppen,A.: J.Psychiat.Res.9,163(1972) 3. Denckla,W.D. and Dewey,H.K.: J.Lab.Clin.Med.69,160(1967) 4. Eccleston,E.G.: Clin. Chim.Acta 48,269(1973) 5. Fischer,C.A.,Kariya,T. and Aprison,M.H.: Comp.Gen.Pharmac.1,61(1970) 6. Gornall,A.G. et al : J.Biol.Chem.15,53(1966) 7. Laurell,S. and Tibbling,G.: Clin.Chim.Acta 16,57(1967) 8. 中島良彦ら：神経化学 ,13,9(1974) 9. Prange,A.J. et al : Arch.Gen.Psychiat.30,56(1974) 10. Ruder,H.J. et al : J.Clin.Endocrinol.Metab.35,219(1972) 11. Schildkraut,J.J.: Amer.J.Psychiat.122,509 (1965) 12.Tagliamonte:Life Sci.12,277(1973) 13.Waalkes:J.L.Cl.Med.50,733(1957) 14.Wurtman:Sci,185,183(1974)

5　躁うつ病における髄液中 cyclic AMP 濃度について

庄田秀志・小片　寛　　（信大・医・精神）

〔要　約〕

1. 入院治療を必要としたうつ病相患者12例，躁病相患者7例について治療開始前に腰椎穿刺をおこない，髄液中 cyclic AMP 濃度を測定した。神経症，てんかん等を含めた9例をこの対照例とした。　2. これら躁うつ病患者中検査協力を得た7例について退院直前時腰椎穿刺をおこない，同 cyclic AMP 濃度を測定した。いずれも炭酸リチウム療法による症状改善例である。平均量は 600～800 mg であった。　3. 測定法として，protein binding assay 法を用いた。　4. 測定値はうつ病相例 31.9 ± 7.55，躁病相例 37.3 ± 4.68，対照例 49.8 ± 15.5 pMol/ml であり，躁うつ病相で対照例より低い cyclic AMP 濃度を示した。分散分析による3グループ間の有意差検定の結果，躁病相例うつ病相例を合せた測定値は1％水準で対照例より有意に低く，又うつ病相例は 0.5％ 水準で，対照例より有意に低い値を示した。7例の炭酸リチウム療法による改善例でそれぞれ，症状改善後の cyclic AMP 濃度上昇傾向がみられた。　5. 躁うつ病相，特にうつ病相で対照例より低い髄液 cyclic AMP 濃度を示したところから，一つにはこの nucleotide が躁うつ病病態の身体的側面に関係している可能性がある。又炭酸リチウム療法による髄液中 cyclic AMP 濃度の上昇は，リチウムの薬理作用による治療効果の結果と考えられる。

〔はじめに〕従来よりヒト尿中に大量の cyclic AMP が存在することは知られていた[4]。躁うつ病との関連では最初 Abdulla ら[2]が，うつ病者で尿中 cyclic AMP 排泄が少なく，回復と共に増加することを報告した。続いて躁うつ病の病相期や治療効果と尿中 cyclic AMP 排泄との関係を検討したいくつかの報告[2,3,11,17,20,22,23]がみられるが，その結論は必ずしも一致していない。Paul ら[23]は無治療下で躁うつ病における尿中 cyclic AMP 排泄量を経時的に調べ，うつ状態から躁状態へと移行するいわゆる switch day に一過性の大量 cyclic AMP 排泄をみたとし，cyclic AMP と switch mechanism の関係を推定した。

しかしながら尿中 cyclic AMP は血液中 cyclic AMP のみでなく腎実質で産生される cyclic AMP をも大量に含み[7]，しかもこれが諸種のホルモンバランスに左右される[18,19]ことが知られているので，その生成排泄過程についての意味づけは困難である。我々も躁うつ病における尿中 cyclic AMP の変動を縦断的に追跡し対照群のそれとの比較で検討を試みているが，現在のところ病相移行期の switch mechanism を思わせる尿中 cyclic AMP 大量排泄をみた症例を追試できない。

今回症例数は不充分ながら，入院治療を必要とした躁うつ病について治療開始前に腰椎穿刺をおこない，躁うつ両病相における髄液中 cyclic AMP 濃度を対照例と比較した。併せて，症状改善により退院可能と判断した時点で再度腰椎穿刺をおこない得た数例について，髄液中 cyclic AMP 濃度を前後で比較した。

〔対象と方法〕

1. 入院治療を必要とした躁うつ病19例について，治療開始前に腰椎穿刺をおこなった。

診断や臨床症状の評価については、専門医の症候学的判断の他に、杖元[4]らによる rating scale を併せ用いた。上記19例中うつ病相12例（うち bipolar type 3例、unipolar type 9例）、躁病7例（うち bipolar type 6例、unipolar type 1例）である。

腰椎穿刺の日は朝より安静を命じ、午前10時より11時の間に施行した。最初の5mlを ルーチン検査に、続く5mlを cyclic AMP 測定用に凍結（-20°C）保存した。

対照例として神経症、てんかん等を含む9例の髄液を用い、脳炎、脳血管障害、老年痴呆等明らかな脳器質疾患と考えられるものを除外した。

Table 1. cyclic AMP protein binding assay

1. cyclic AMP standard sol. and sample ...100μl
2. ^{3}H-cyclic AMP ...100μl
3. binding protein ...100μl

↓ incubation at 0°C for 60 min.
↓ ←1.5ml dextran coated charcol
↓ incubation at 0°C for 15 min.
↓ centrifuged at 3000 rpm for 15 min.
↓ supernatant
of it 1ml is transfered into 10ml counting vial medium
↓ counting

2. 上記19例中検査協力を得た7例（うつ病相6例、躁病相1例）で退院可能と判断した時点で再度腰椎穿刺をおこない、その髄液を病相期髄液中 cyclic AMP 濃度との比較に用いた。いずれも炭酸リチウムによる症状改善例で、与薬量は600mg - 800mg である。

3. 測定法。protein binding assay による cyclic AMP 測定のため、Kumon[5]らの方法を多少改変し、protein keinase を取り去した。即ち実用上の理由から、calcium phosphate に吸着した protein を potassium phosphate buffer で透析する際に原法で用いる potassium phosphate buffer の1/3量とし、続く TMG buffer による透析後の crude なものを assay 用に凍結(-20 C)保存した。この protein keinase は assay のつど 50mM acetate buffer にて約5倍に希釈して用いた。assay 法の概略は表1に示す通りである。この assay のため髄液はあらかじめ5分間 boiling によって除タンパクし、3000回転5分間遠沈分離した上清を用いた。

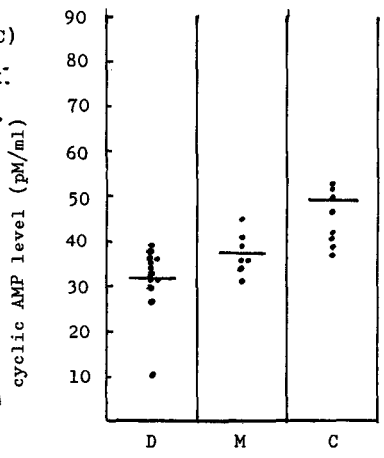


Fig. 1. cyclic AMP concentration in CSF in endogenous depressions, manias and controls. D; depressions M; manias C; controls

【結果】

1. うつ病相例、躁病相例、対照例における髄液中 cyclic AMP 濃度の分布は、図1に示す通りである。測定値は、うつ病相例 31.9 ± 7.75、躁病相例 37.3 ± 4.68、対照例 49.8 ± 15.5 pMol/ml であった。分散分析による3グループ間の有意差検定の結果、躁病相例うつ病相例を合せた測定値は1%水準で対照例より有意に低く、又うつ病相例は0.5%水準で、対照例より有意に低い値を示した。

2. 図2は治療前の病相期と炭酸リチウム療法による症状改善後の髄液中 cyclic AMP 濃度を比較し得た7例の結果である。即ち、躁病相1例、うつ病相6例それぞれにつ

いて，髄液中cyclic AMP濃度上昇傾向がみられた。

【考察】

adenylate cyclase - cyclic AMP系に関与する諸酵素が哺乳動物脳では他臓器に比し最も高く[6,30]、この系への神経ホルモン[12,13,15]や向精神薬の影響を調べた数多くの知見が報告されている。結果の多くは、cyclic AMPの中枢神経系における重要な生理生化学的働きを示唆[23]するものであり、Sutherlandの2-messenger学説を具体的に裏付けている。

5-HTの代謝産物である髄液中5-HIAAがうつ病例では対照例に比して有意に低値との報告は数多くみられ[3,6,8,24,25,26]、indolamine学説の根拠の一つになっている。この神経ホルモンがin vitro実験下で脳組織切片中のcyclic AMP濃度に影響を与えることが知られており[12]、我々は目下、髄液中5-HIAAについても検討中である。学会発表の時点で触れたい。

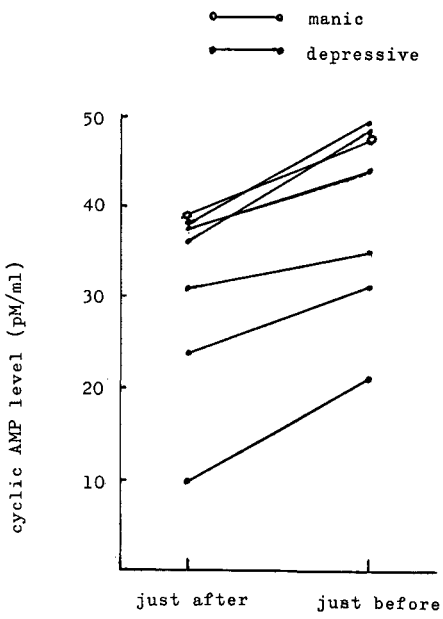


Fig. 2. cyclic AMP concentration of lumbal CSF in manic and depressive patients, just after inhospital and just before outhospital.

Robison[27]らは先に、神経疾患、てんかん、うつ病、躁病患者の髄液中cyclic AMP濃度を測定し、その差は正常人髄液中cyclic AMP濃度の個体差変動をこえるものではないと報告している。測定値を見ると、てんかん＞神経疾患＞うつ病＞躁病の順で低くなっているが、標本数や標準偏差、統計処理法等には触れていない。又この Robisonらの報告は一回限りの横断的比較で終っている。

我々の結果では、治療前のうつ病相例髄液が対照例に比し有意に低いcyclic AMP濃度を示していた。又炭酸リチウム療法による症状改善後の髄液中cyclic AMP濃度が、うつ病相例躁病相例とも上昇傾向を示していた。

このことは、一つには躁うつ病病態の身体的側面が脳のこのnucleotideの変化と関係している可能性を示唆するものである。

一方リチウムの脳内adenylate cyclase - cyclic AMP系への影響については充分な考慮がなされねばならない。動物実験の結果では2 - 100mM程度のリチウムイオン[9,10,31]が脳cortexのadenylate cyclase活性を抑制することが報告されている。Walkerは治療量の炭酸リチウムがヒト脳で示す0.5mM濃度をrat brainにつくり、部位別にadenylate cyclase活性を調べている。その結果、小脳、脳幹を除くあらゆる脳部位で、adenylate cyclase活性が阻害されていたという。逆にリチウムがcyclic AMP形成に影響しない[21]、促進する[28]などの報告もみられる。脳におけるリチウムの影響が電解質代謝、活性アミン代謝、adenylate cyclase - cyclic AMP系へと多岐にわたるところから、躁うつ両病相期の症状改善後にみられた髄液cyclic AMPの上昇はリチウムの薬理作用による治療効果の結果とも考えられる。

〔文　献〕

1) 村元源智太，豊原耀昌，藤谷豊，佐々木邦幸，精神医学，6；313，1964.

2) Abdulla, Y.H. and Hamada, K., Lancet, 1; 378, 1970.

3) Ascroft, G.W., Crawfort, T.B.B., Eccleston, D., Sharman, D.F., MacDougall, E.J., Stanton, J.B. and Binns, J.K., Lancet, 12; 1049, 1966.

4) Butcher, R.W. and Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237; 1244, 1962.

5) Brown, B.L., Salway, J.G., Albano, D.M., Hullin, R.P. and Ekins, R.P., Brit. J. Psychiat., 120; 405, 1972.

6) Coppen, A., Prange, A.J., Whybrow, P.C. and Noguera, R., Arch. Gen. Psychiat., 26; 474, 1972.

7) Chase, L.R. and Aurbach, G.D., Science, 159; 545, 1968.

8) Dencker, S.J., Malm, U., Roos, B. and Werdinius, B., J. Neurochem., 13;1545,1966.

9) Dousa, T. and Hechter, O., Lancet, 834; 245, 1974.

10) Forn, J. and Valdecasas, F.G., Biochem. Pharmac., 20; 2773, 1971.

11) Hullin, R.P., Salway, J.G., Allsopp, M.N.E., Barnes, G.D., Albano, J.D.M., and Brown, B.L., Brit. J. Psychiat., 125; 457, 1974.

12) Kakiuchi, S. and Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4; 367, 1968.

13) Kakiuchi, S. and Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4; 379, 1968

14) Kumon, A., Yamamura, H. and Nishizuka, Y., Biochem. Biophys. Commun.,41;1290,1970.

15) 宮本英七，代謝，8；225，1971.

16) Murad, F. and Charles,Y.C., New England J. Med., 286; 1382, 1972.

17) Moyes, R.B. and Moyes, I.C.A., Brit. J. Psychiat., 129; 173, 1976.

18) 永田道一，代謝，8；165，1971.

19) 永田道一，代謝，8；171，1971.

20) Naylor, G.J., Stansfield, D.A., Whyte, S.F. and Hutchinson, F., Brit. J. Psychiat., 125; 275,1974.

21) Palmer, G.C., Robison, G.A., Manian, A.A. and Sulser, F., Psychopharmacologia, 23; 201, 1972.

22) Paul, M.I. and Goodwin, F.K., Arch. Gen. Psychiat., 24; 327, 1971.

23) Paul, M.I. and Bunny, W.E., Science, 171; 300, 1971.

24) Papeschi, R. and McClure, D.J., Arch. Gen. Psychiat., 25; 354, 1971.

25) Praag, H.M. van, Korf, J. and Puite, J., Nature, 225; 1259, 1970.

26) Praag, H.M. van and Korf, J., Psychopharmacologia, 19;148, 1971.

27) Robison, G.A., Coppen, A.J., Whybrow, P.C. and Prange, A.J., Lancet,14;1028,1970.

28) Shimizu, H. and Daly, J.W., European J. Pharmacol., 17; 240, 1972.

29) Sutherland, E.W., Robison, G.A. and Butcher, R.W., Circulation, 37; 279, 1968.

30) Sutherland, E.W., Rall, T.W. and Menon, T., J. Biol. Chem., 237; 1200,1962.

31) Walker, J.B., Biol. Psychiat., 8; 245, 1974.

6　痙攣準備状態及び全身痙攣と脳内アミン
—— Kindling preparationによる研究 ——

大下俊則・長尾卓夫・佐藤光源
光信克甫・大月三郎　（岡大・医・神経精神）

〔要　約〕

痙攣準備状態及び全身痙攣と脳内アミンとの関連を研究する為、猫の扁桃核刺激によるKindling preparationを用いて、脳内各部位の5-hydroxytryptamine（5-HT），5-hydroxy-indoleacetic acid（5-HIAA），homovanillic acid（HVA）の濃度を測定した。又、reserpine, para-chlorophenylalanine（PCPA）を投与し、発作間発射（inter-ictal discharge，IID）に及ぼす影響を脳波で観察した。結果は次の通りである。

1)痙攣準備状態において、刺激部位である扁桃核で5-HIAAの上昇を認めた。5-HT, HVAの変化は見られなかった。

2)全身痙攣直後において、扁桃核と視床下部にHVAの上昇を認めた。この変化は24時間後には消失していた。5-HT，5-HIAAの変化は見られなかった。

3)Reserpine，PCPA投与により5-HT，5-HIAAを減少させると、IID頻度の増加が見られた。

4)以上の結果より、痙攣準備状態又は痙攣後における脳内アミンの変動は、アミン・レベルそのものに反映されるものではなく、むしろアミンは痙攣準備状態の修飾因子であろうと考察した。

脳内アミンと痙攣との関係を示唆する最初の文献は、1954年のChenら(1)のものである。その後様々な実験てんかん動物について脳内アミンの研究が行われたが、未だ統一的な結論は得られていない。これは実験てんかんモデルの差，使用された動物の種族差，とらえられている痙攣の時期の差などによると考えられる。

近年新しい実験てんかんモデルとして、kindling preparationが注目をあびている(9)。それはこのモデルがいくつかの利点をもつ為であり、なかでも脳に器質的変化を伴うことなく永続性の痙攣準備状態が形成される事(10)が重要である。従ってこのモデルを利用すれば、永続する痙攣準備状態と全身痙攣の発現を明確に区別して捉えることが可能である。今回我々はこのモデルを用いて、5-HT，5-HIAA，HVAの濃度を脳内各部位において測定し、脳内アミンと痙攣準備状態及び全身痙攣との関係を捉えようと試みた。

（実験方法）

体重2.0～4.8 kgの雌雄成熟猫36匹を用いた。ペントバルビタール25㎎/kgで麻酔し、東大脳研型脳定位固定装置を用い、Jasper & Ajmone-Marsanの猫間脳図譜(3)に従って、左扁桃核外側核に電極を挿入固定した。不関電極は左右の前頭洞部に固定した。術後1週間以上をへて、佐藤とWada(7)によって報告された方法により、60 Hz正弦波，通電時間1秒，後発射（after-discharge）閾値を刺激強度として24時間間隔で単極刺激を行い、kindled catsを作製した。

脳切片の切り出しは、猫をペントバルビタール25㎎/kgで麻酔し、0℃の生理的食塩水で脳を灌流した後、直ちに脳を取り出して行った。切り出した切片は、尾状核(CD)，

嗅結節(OT), 側坐核(Acb), 扁桃核(AM), 海馬(HIPP), 視床下部(HT), 視床(Th), 橋(Pons), 延髄(Med), 小脳皮質(CC), 前頭葉皮質(FC)の//部位である。

5-HT, 5-HIAA の測定は同一脳について、Curzon & Green の方法(2)で、HVA は別の脳で Korf らの方法(4)を一部修正して行った。

実験動物を次のように分けた。

表1 Kindling と全身けいれんの脳 5-HT, 5-HIAA, HVA濃度に及ぼす影響

		Control [I]	1W after Kindling [II]	Post-convulsive state [III]	24H after convulsion [IV]
CD	5-HT	1.04±0.23 (6)	0.92±0.11 (3)	0.84±0.13 (3)	0.94±0.17 (3)
	5-HIAA	0.58±0.10 (4)	0.76±0.15 (3)	0.51±0.11 (3)	0.50±0.16 (3)
	HVA	5.43±0.74 (5)	5.45±0.20 (3)	5.28±0.79 (3)	5.19±0.79 (3)
OT	5-HT	2.06±0.49 (6)	2.59±0.69 (3)	2.14±0.28 (3)	2.09±0.28 (3)
	5-HIAA	0.81±0.16 (4)	0.84±0.33 (3)	0.98±0.31 (3)	0.65±0.12 (3)
	HVA	1.96±0.18 (4)	1.86±0.39 (3)	2.44±0.42 (3)	1.89±0.05 (3)
Acb	5-HT	1.84±0.45 (6)	2.73±1.33 (3)	1.90±0.33 (3)	1.86±0.54 (3)
	5-HIAA	1.05±0.11 (4)	1.19±0.49 (3)	1.19±0.18 (3)	1.09±0.43 (3)
	HVA	3.80±0.41 (5)	3.09±1.14 (3)	3.80±0.80 (3)	4.26±0.66 (3)
AM	5-HT	1.32±0.27 (6)	1.54±0.22 (3)	1.52±0.35 (3)	1.51±0.28 (3)
	5-HIAA	0.93±0.16 (4)	1.22±0.08* (3)	1.17±0.55 (3)	0.92±0.35 (3)
	HVA	1.08±0.14 (5)	1.05±0.11 (3)	1.71±0.24** (3)	1.12±0.38 (3)
HIPP	5-HT	0.67±0.20 (6)	0.70±0.07 (3)	0.70±0.07 (3)	0.65±0.06 (3)
	5-HIAA	0.37±0.05 (4)	0.58±0.20 (3)	0.40±0.09 (3)	0.37±0.13 (3)
	HVA	0.48±0.23 (3)	0.50 (2)	0.48±0.12 (3)	0.39±0.14 (3)
HT	5-HT	1.96±0.25 (4)	1.87±0.40 (3)	1.65±0.06 (3)	1.59 (2)
	5-HIAA	0.93±0.23 (3)	1.16±0.18 (3)	1.10±0.16 (3)	0.98 (2)
	HVA	1.01±0.21 (3)	0.91±0.04 (3)	1.09±0.07*** (3)	0.69 (2)
Th	5-HT	0.95±0.38 (6)	0.97±0.09 (3)	0.99±0.24 (3)	0.77±0.16 (3)
	5-HIAA	0.70±0.06 (4)	0.61±0.25 (3)	0.80±0.26 (3)	0.56±0.34 (3)
	HVA	0.32±0.09 (4)	0.36±0.06 (3)	0.38±0.12 (3)	0.24±0.07 (3)
Pons	5-HT	0.56±0.06 (6)	0.49±0.12 (3)	0.53±0.10 (3)	0.50±0.05 (3)
	5-HIAA	0.57±0.17 (4)	0.55±0.10 (3)	0.63±0.23 (3)	0.58 (2)
	HVA	0.33±0.09 (5)	0.34±0.05 (3)	0.38±0.17 (3)	0.25±0.05 (3)
Med	5-HT	0.61±0.09 (6)	0.58±0.15 (3)	0.59±0.11 (3)	0.61±0.10 (3)
	5-HIAA	0.46±0.08 (4)	0.45±0.05 (3)	0.49±0.20 (3)	0.39 (2)
	HVA	0.25±0.03 (5)	0.29±0.02 (3)	0.28±0.08 (3)	0.20 (2)
CC	5-HT	0.18±0.06 (4)	0.16 (2)	0.17±0.08 (3)	0.13±0.01 (3)
	5-HIAA	0.10±0.01 (4)	0.12±0.04 (3)	0.09±0.01 (3)	0.07±0.04 (3)
	HVA	-	-	-	-
FC	5-HT	0.26±0.06 (5)	0.23±0.04 (3)	0.23±0.04 (3)	0.19±0.03 (3)
	5-HIAA	0.19±0.04 (4)	0.20±0.03 (3)	0.16±0.05 (3)	0.16±0.04 (3)
	HVA	0.17±0.04 (4)	0.22±0.01 (3)	0.21±0.06 (3)	0.14 (2)

Mean±S.D. (μg/g brain)
* :p<0.05 I vs II
** :p<0.005 I vs II , p<0.02 II vs III
***:p<0.02 II vs III
( )内は例数

〔I〕対照群(Control)として、電極植込み手術をほどこさなかった猫の5-HT, 5-HIAA, HVA を測定した。次いで kindling effect の完成後、/週間刺激を行なわないでおいた猫で、〔II〕そのまゝ刺激を行なわずに脳を取り出したもの(/W after kindling)、〔III〕再び刺激し、全身痙攣をおこした直後に脳を取り出したもの(postconvulsive state)、〔IV〕再刺激による全身痙攣の24時間後に脳を取り出したもの(24H after convulsion)に分け、5-HT, 5-HIAA, HVA を測定した。〔V〕さらに kindling effect 完成後/週間目の猫4匹の脳波を記録し、次いで内2匹に 0.2㎎/㎏ の reserpine を、残り2匹に 200㎎/㎏ の PCPA を投与し、各々 48, 24 時間後に脳波を記録し、reserpine 又は PCPA 投与前の脳波と比較した。脳波記録終了後直ちに脳を取り出し、5-HT, 5-HIAA を測定した。

(実験結果)

対照群及び〔II〕,〔III〕,〔IV〕群の5-HT, 5-HIAA, HVA濃度は表1.の通りである。〔I〕群(Control)を見ると、5-HT, 5-HIAA, HVA とも各部位で明らかな濃度差を認めた。すな

図1　Reserpine の IID に及ぼす影響

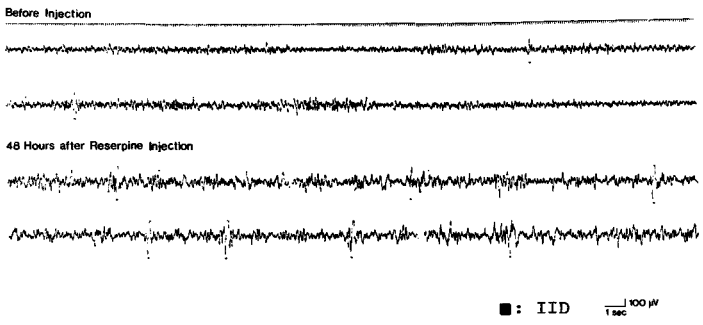
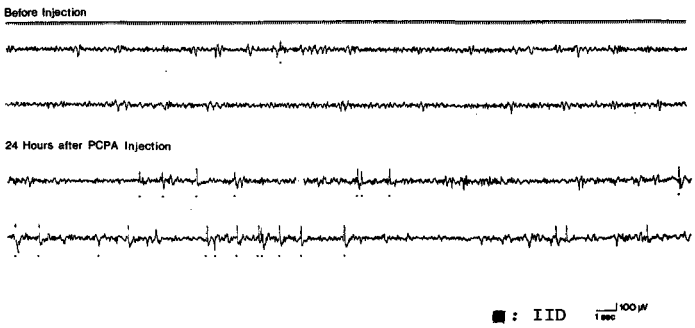


図2　PCPA の IID に及ぼす影響



わち5-HT, 5-HIAA は嗅結節, 側坐核, 扁桃核, 視床下部などで高く、HVA は尾状核が非常に高く、次いで側坐核, 嗅結節, 扁桃核, 視床下部で高かった。一方小脳, 前頭葉は5-HT, 5-HIAA, HVAとも低濃度であり、小脳のHVAは測定不能であった。〔II〕群(1W after kindling)においては、対照群に比し扁桃核の5-HIAAの上昇が見られ、これは統計的有意差であった($p<0.05$)。5-HT, HVA では対照群との差は見られなかった。〔III〕群(postconvulsive state)で

図3　Reserpine, PCPA の脳 5-HT 濃度に及ぼす影響

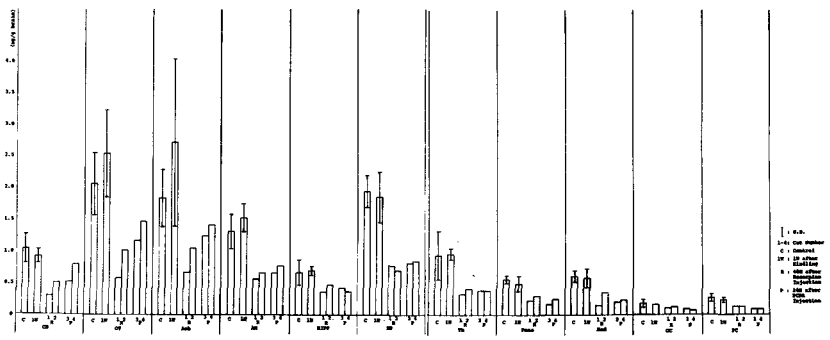
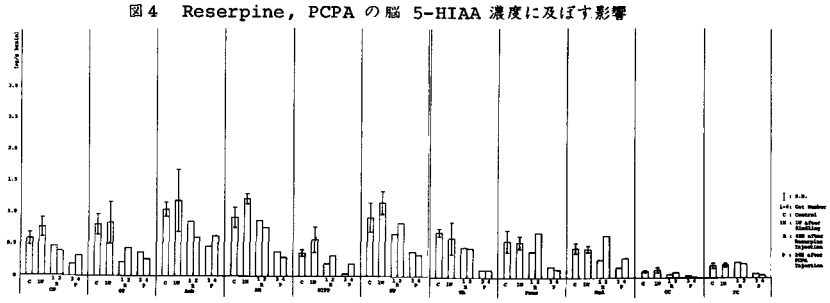


図4　Reserpine, PCPA の脳 5-HIAA 濃度に及ぼす影響



は扁桃核のHVA が対照群に比し著明に増加していた($p<0.005$)。これは〔II〕群に比しても統計的有意差であった($p<0.02$)。又視床下部のHVA が〔II〕群に比し有意に上昇していた($p<0.02$)。5-HT, 5-HIAAは対照群, 〔II〕群と比較し有意差はなかった。〔IV〕群(24 H after convulsion)では 5-HT, 5-HIAA, HVAとも対照群, 〔II〕群に比し有意差はなかった。

reserpine 又は PCPAの投与前後の脳波を図1., 図2.に示す。両者とも投与後でIIDの著明な増加を認めた。又投与後の5-HT, 5-HIAA の変化を図3., 図4.に示す。全部位において5-HTの著明な減少を見、ほとんどの部位において5-HIAAの減少を認めた。

(考察)

〔II〕群は kindling effect が完成し、全身痙攣による直接の影響がなくなった状態であり、電気生理学的に永続性の痙攣準備状態が確認されている(10)時期である。この状態で扁桃核における5-HIAAの上昇が見られた。岡田(5)は rat のタングステン酸ゲルによる初期の痙攣中に、前頭部皮質, 扁桃核, 線状体における5-HIAAの上昇を認めているが、今回の結果は、痙攣準備状態においても刺激部位である扁桃核に5-HT代謝の促進が存在することを示唆するものである。しかしながら広汎な脳部位に二次てんかん原性焦点が形成されている(9)この時期に、刺激部位だけの5-HIAA変化にとどまったことは、この変化が痙攣準備状態に対応した変化ではなく、反復刺激によるものである可能性を示唆している。

全身痙攣の脳内アミンに対する影響を見る為、〔III〕, 〔IV〕群を〔I〕群と比較すると、痙攣直後の HVAの扁桃核と視床下部における上昇を認めた。この変化は痙攣後24時間目には消失していた。これは rat に電気痙攣をおこすとHVA が上昇するという Papeschi らの報告(6)と一致したものであるが、変化は刺激部位を含むごく限られた部位にしか見られていない。従って、激烈な全身痙攣にもかゝわらずほとんどの部位で 5-HT, 5-HIAA, HVA の変動を認めなかったことがより重要であろう。

IID は形成された痙攣準備性をよく反映する指標であると考えられる。reserpineにより脳内インドールアミン, カテコールアミンの両者を枯渇させると、IID頻度の増加を認めた。同様のことが5-HTの合成阻害剤であるPCPAを投与した際にも認められた。従って定量でも確認されたインドールアミンの低下が、痙攣準備性の増強をひきおこすといえる。一方佐藤ら(8)は、カテコールアミン合成阻害剤である α-metylpara-tyrosine を投与した時も同様のIID頻度の増加を報告しており、カテコールアミン低下と痙攣準備性増強の関係を示唆している。

以上のような結果より、痙攣準備状態又は全身痙攣後における脳内アミンの変動は、アミン・レベルそのものに反映されるようなものではなく、むしろインドールアミン, カテコールアミンとも痙攣準備性を修飾する抑制的な因子と考える事が妥当であろう。

(文献)

1)Chen,G. et al.:Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,86;507,1954. 2)Curzon,G. & A.R.Green:Brit.J. Pharmacol.,39;653,1970. 3)Jasper,H.H. & C.Ajmone-Marsan:A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. National Research Council of Canada,Ottawa,Canada,1954. 4) Korf,J. et al.:Anal.Biochem.,40;187,1971. 5) 岡田文彦 : 精神経誌,75;397,1973. 6)Papeschi,R. et al.:Psychopharmacologia,35;159,1974. 7) 佐藤光源 ,J.A.Wada: 脳と神経 , 27;257,1975. 8) 佐藤光源ら : 脳と神経 ,28;471,1976. 9)Wada,J.A. & M.Sato:Neurology,24; 565,1974. 10)Wada,J.A. et al.:Epilepsia,15;465,1974.

7　異常運動発現におけるγ-アミノ酪酸(GABA)とDopamineの相互関係について

中村重信・亀山正邦　（京大・医・老年医学）
池田研二・難波益之　（岐阜大・医・神経精神）

〔要　約〕

パーキンソン病患者にL-DOPAを過剰投与するとchorea様運動が出ることがあり，choreaはL-DOPA投与により悪化する。その原因の一つとしてL-グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)がDOPA，Dopamine，Noradrenalinで阻害されることが考えられる。L-DOPAはL-グルタミン酸とnoncompetitiveに阻害をするがピリドキサール燐酸(PALP)を10倍に増量しても阻害は回復しなかった。Tryptophan，serotonin，adrenalin，vanilyl mandelic acidには阻害作用は認められなかった。ラット脳基底核より分離したsynaptosomesを用いた場合はDOPAにより最も強い阻害を受けた。

L-DOPA 100mg/Kgを40日間投与したラットでは基底核-間脳でGAD活性が低下していた。活性低下は顆粒状態で反応させた場合に著明で，Tritonで可溶化した状態では低下は著明でなかった。L-DOPAまたはDopamineがsynaptosome中に高濃度にあるための活性低下で，酵素量には大きな変化はないと考えられる。

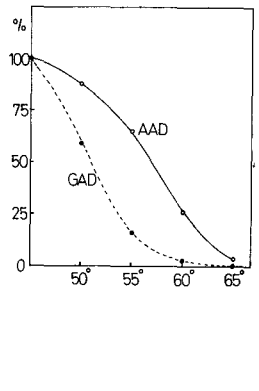
γ-アミノ酪酸(GABA)，Dopamineがtransmitterとして作用する時GAD或いはL-アロマティック・アミノ酸脱炭酸酵素(LAAD)がsynaptic vesicleより放出されることより，chorea患者血清GAD及びLAADを測定した。chorea患者では血清GADが低下した者が多かったが，rigidityが強くchoreic movementの少いものでは低下は認められなかった。一方LAADはchorea患者全例で著明に低下していた。

異常運動疾患のうちchoreaとパーキンソン病は鏡像をなすものである。パーキンソン病は佐野[7]の指摘したごとくDopamineの減少が原因であり，L-DOPA投与により改善する。chorea患者は逆にL-DOPAにより悪化し，脳黒質のγ-アミノ酪酸(GABA)含量が減少している。[6]今回われわれはchorea，パーキンソン病に関係すると考えられるGABA，Dopamineの合成，放出について検討したので報告する。

〔実験方法〕

酵素測定法：L-グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)はSuszら[8]の方法を改良して行った。L-グルタミン酸-^{14}C(200,000 cpm，10μmoles)にゴム管より燐酸カリ(pH 6.6) 100μmoles，ピリドキサール燐酸(PALP) 0.1μmole，Aminoethylisothiuronium bromide 1μmole及び酵素液を加え，37°Cにて窒素ガス中で反応を行わせた。反応は硫酸にて停止させ$^{14}CO_2$をGliemann[2]の方法にて測定した。L-aromatic amino acid decarboxylase(LAAD)はグルタミン酸の代りにL-DOPA-^{14}C(100,000 cpm，10μmoles)を加えてGADと同様に測定した。

Fig. 1



血清中の酵素測定法としては精製GAD，LAADの熱失活がFig. 1のごとくであることから，それぞれ60°，65°C 10分間熱処理血清をコントロールとして用いて測定した。

細胞分画法：Whitaker[9]の方法を改良して行った。ラット脳基底核-間脳部分よりcrude mitochondria分画を得，それを0.8-1.2 Mショ糖密度勾配遠沈によりsynaptosomal fractionを分離し，更にsynaptic vesicleを分離した。

GADの精製：synaptosomal fractionを0.5% Tritonにて可溶化し，5mM リン酸カリ(pH7.3)中で透析した後遠沈上清をDEAE-celluloseにかけGAD-Iを精製した。[8] ホモジェネートに比し約150倍の比活性を持つ精製酵素標品を得た。

LAADの精製：市山[3]の方法により脳基底核より精製した。

ラットのL-DOPA投与：胃管によりL-DOPAを10mg/Kg，20mg/Kg，50mg/Kg各4日間づつ漸増し，100mg/Kg/dayを40日間連続投与した。

症例：症例1－3例は同一家系に属するHuntington choreaであり，進行した状態でrigidityの強い症例であった。第4例，5例は孤立型のchoreaであり，第6例は脳血管障害によるhemiballismを来しているものであった。

〔実験結果〕

精製GADのDOPAによる阻害：ラット脳基底核より精製したGADにTable 1に示す物質を加え，GAD活性を測定した。L-DOPA，Dopamine，Noradrenalinにより強い阻害を受けたが，Tryptophan，5-Hydroxytryptophan，Serotonin，Adrenalin，Vanilylmandelic acid (VMA)，5-Hydroxyindol酢酸(5OHIAA)による阻害は著明ではなかった。L-グルタミン酸10mM，PALP 0.1mM存在下で，L-DOPA，Dopamineの濃度と阻害度をFig. 2に示した。L-DOPAは3×10^{-3}Mで，Dopamineは5×10^{-4}Mで50%阻害を示した。L-DOPA(2mM)添加によるL-グルタミン酸濃度，PALPと$^{14}CO_2$放出の関係を調べたのがFig. 3である。Lineweaver-Burkの方法でKmを求めるとL-DOPA非存在下では3.2×10^{-3}Mであり，L-DOPA存在下では2.1×10^{-3}Mであった。PALPを0.1mMより1.0mMに増加しても阻害を回復させ得なかった。

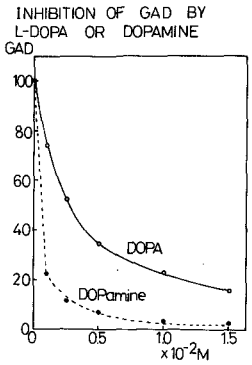
Table 1

INHIBITION OF PURIFIED GAD

Addition	μmole	Rate
None	0.29	100
Tryptophan	0.25	86
5Hydroxytryptophan	0.23	78
Serotonin	0.25	85
DOPA	0.10	34
DOPamine	0.02	8
Noradrenalin	0.04	14
Adrenalin	0.19	60
VMA	0.24	82
5OHIAA	0.17	58

Conc. 5×10^{-3}M

Fig. 2



Synaptosomes GAD活性のDOPAによる阻害：ラット基底核－間脳部を前述の方法により分画しGAD活性，LAAD活性を測定した。(Fig. 4) 縦軸は比活性を，横軸は蛋白量を表わしており，活性はTritonで可溶化して測定した。C.D.はCell Debris，MyはMyelin，Synは Synaptosomesを，Mtは Mitochondriaを，Mcは Microsomesを示し，点でぶしたものは Synaptosomesより分離した Synaptic vesicle中の活性を表わしている。両酵素とも Synaptosomes

Fig. 3

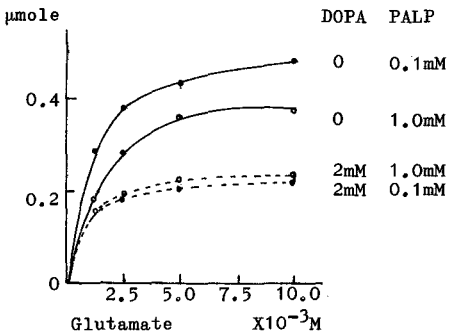
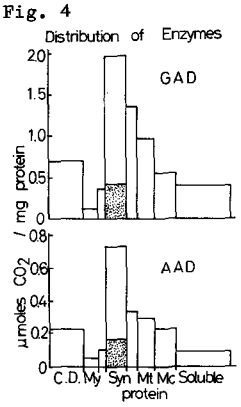


Fig. 4



分画に最大の比活性を示し，synaptic vesicleにも存在した。Synaptosomesをisotonicの状態(0.32 M ショ糖中)でGAD活性を調べた。(Table 2) DOPAは3×10^{-3} Mで50%阻害を示したが，Dopamineの阻害はDOPAに劣り，Adrenalin，Noradrenalin，Tryptophan，Serotonin，5OHIAA，VMAによる阻害はほとんど認められなかった。Tritonで可溶化すると約4倍の活性上昇を示した。

Table 2
INHIBITION OF GAD
(Synaptosomes)

Addition	Conc.	μmoles	Rate
None		0.45	100
Tryptophan	5×10^{-3}M	0.44	98
DOPA	1×10^{-2}M	0.16	35
〃	5×10^{-3}M	0.21	45
〃	2.5×10^{-3}M	0.24	54
〃	1.0×10^{-3}M	0.32	71
DOPamine	5×10^{-3}M	0.24	53
5OHIAA	5×10^{-3}M	0.41	92
VMA	5×10^{-3}M	0.37	82
Triton	1%	1.75	390

L-DOPA投与ラットのGAD活性：ラット脳を基底核及び間脳，中脳及び四丘体，橋－延髄部分に分けて50倍量の0.32 M ショ糖中でホモゲナイズした。基底核及び間脳部分のhomogenateよりsynaptosomesを分離した。Homogenateのまま isotonicの状態及びTritonを加えて可溶化した状態でGAD活性を測定した。(Table 3)数字は各4匹づつの平均をμmoles/mg蛋白で表わしたものであるが，L-DOPA投与群では基底核－間脳で特に活性の低下がみられた。可溶化したGAD活性より，isotonicの状態で測定したGAD活性がより著明な低下を示していた。

Table 3 Effect of L-DOPA Administration on GAD

	DOPA(+)		DOPA(−)	
	Triton(+)	(−)	Triton(+)	(−)
Basal Ganglia) Diencephalon	1.49	0.25	1.99	0.51
Midbrain Corpora Quadrigemina)	1.45	0.33	1.65	0.41
Pons Medulla Oblongata)	0.82	0.19	1.07	0.24
Synaptosomes	6.19	1.03	7.57	1.94

Chorea患者血清GAD及びLAAD活性：Chorea患者におけるGABA，Dopamineのsynaptic vesicleからの放出を調べるため，同時に放出されるGAD，LAAD活性を血清を用いて測定した。(Fig. 5, Fig. 6) Chorea患者6例中5例については2病日について測定した。(Fig. 5) 症例4－6ではGADは低値であったが，症例1，2では正常範囲であり，症例3はやや低値を示した。L-DOPA服用患者ではGADは低値のものもあったが，正常人と有意の差はなかった。

Fig. 5

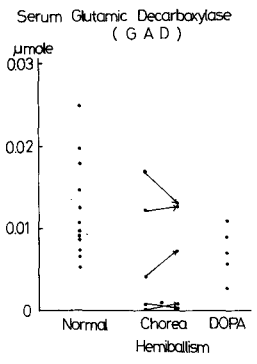
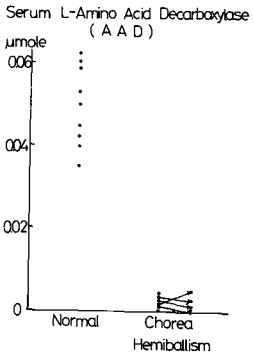


Fig. 6



LAADの血中濃度はchorea全例で低値を示した。(Fig. 6)

〔考察〕

異常運動疾患のうちchoreaとパーキンソン病はいずれも脳基底核に病変を持ちながら，対称的な病像を呈している。佐野[7]及びPerryら[6]の研究より，両疾患発現にはDopamineとGABAとのバランスが重要な意義を持っていることが明らかになって来た。L-DOPA投与によりchoreaが悪化したり，chorea様運動が出現することは知られているが，その原因は不明である。そのメカニズムを明かにするため精製GAD-Iを用い

て検索したところL-DOPA, Dopamine, Noradrenalinにより阻害されることが見出された。この阻害様式はα-ketoglutarate, glutarateのようなcarboxylic acidによるcompetitive inhibition[5]とは異なり, noncompetitive typeであった。10倍量のPALP添加によりGAD活性は影響を受けないところから, PALPを介する阻害以外の可能性があり, 酵素に対する直接の阻害を考えたい。

Intactなsynaptosomesのレベルで GAD活性を測定すると, Serotonin合成の場合に認められたとおり[4] PALPの要求性が認められず, 阻害はDOPAに最も強く認められた。精製酵素の阻害との差違はsynaptosomeへのDOPA, Dopamine, Noradrenalinの取り込みの差によるものと考えられる。

L-DOPA投与ラットではTritonで可溶化した場合GAD活性に大きな低下が認められなかったが, 顆粒の状態ではGADは1/2に減少していた。顆粒内ではDOPA, Dopamineの濃度が高いためと考えられ, GADの酵素含量はchorea疾患患者脳と違って[1]低下は著明でなかった。

GABAのchemical transmitterとしての作用を知るためにGABAの放出を, 同じsynaptic vesicle内に含まれるGADの血中濃度を指標にして推察した。Rigidityが強く, 変性が進んでほとんど異常運動をしなくなった症例1, 2を除いてGADの血中濃度は低値を示していた。血清中GAD活性は剖検時脳中GADより患者のその時点でのGABAの作用を知る上に重要であるが, 血清中にGAD阻害物質が存在するため, コントロールを十分注意してとる必要がある。一方, 血中LAADは予想に反して低値を示したが, LAADはGADと異り, 脳以外にも存在することから, 更に検討を加える必要があると考えられる。

Chorea患者脳基底核のGAD含量の低下があるりという報告に, 今回酵素レベル, Synaptosomeレベルで DOPAがGADを阻害すること及びchorea患者ではGABAの放出低下の可能性があることを追加した。

〔文献〕

1) Bird, E.D. and Iversen, L.L., Brain (1974) 97, 457.

2) Gliemann, J. Diabetes (1965) 14, 643.

3) Ichiyama, A. and Nakamura, S. (1970) in Methods in Enzymology (H. Tabor and C.W. Tabor, eds.) Vol. 17A, pp.449, Academic Press, New York and London.

4) Ichiyama, A., Nakamura, S., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O.,(1967) Advan. Pharmachol. 6, 5.

5) Lupo, M., and Halpern, Y.S. (1970), Biochim. Biophys. Acta 206, 295.

6) Perry, T.L., Hansen, S. and Kloster, M. (1973) New Engl. J. Med., 288, 337.

7) 佐野勇 (1959) 神経研究の進歩 5, 42.

8) Susz, J.P., Haber, B. and Roberts, E. (1966) Biochemistry, 5, 2870.

9) Whitaker, V.P., Michaelson,I.A. and Kirkland, R.J.A. (1964) Biochem. J. 90, 293.

8 ラット及びサルによる学習行動と脳内モノアミン量との相関について

高坂新一・永井克子
塚田裕三　（慶大・医・生理）

〔要　約〕

ラット及びサルを用いて明暗弁別学習又は時間弁別学習を行なわせ、この学習行動に対して脳内モノアミン含量の変化がいかなる効果を有するかを検討した。L-DOPA (320mg/kg) 投与2時間後のラット脳内では、DAの増加及びNEの減少を認めたが 5-HT, 5-HIAAには変化はみられなかった。5-HTP (25mg, 100mg/kg) 投与では、5-HT, 5-HIAAの増加が認められDA及びNEは減少した。レゼルピン (2mg/kg) 投与24時間後では、5-HT, DA, NEは著明に減少したが、5-HIAAは増加の傾向を示した。レゼルピン投与22時間後にL-DOPA (320mg/kg) を投与すると、2時間後にDAの増加を認め、5-HTP (100mg/kg) 投与では5-HT, 5-HIAAの増加が認められた。学習完成基準達成後のラットにL-DOPA (80~360mg/kg), 又は5-HTP (25mg, 50mg/kg) を投与しても、反応数、正反応率いずれにも変化はみられなかった。しかし5-HTP (100mg/kg) 投与によっては、反応数の減少が認められた。又、レゼルピン (2mg/kg) 投与により反応数の著明な減少が認められた。これにL-DOPA (320mg/kg) 又は5-HTP (100mg/kg) を投与しても、この反応数の減少は回復しなかった。一方L-DOPA (200mg/kg) 又は5-HTP (50mg/kg) を連日投与しながら学習を行なわせても、学習完成には影響を与えなかった。又、サルの時間弁別学習においてもL-DOPA (200mg/kg), 5-HTP (50mg, 100mg/kg) は全く効果を示さなかった。これらのことから、脳内モノアミン含量を変化させても学習行動には全く影響を与えないことが明らかとなった。

脳内モノアミンは、体温調節[1]、睡眠[2]、ホルモンの分泌調節[3]、錐体外路系の運動[4]等多くの基本的な脳の機能に関与していることが報告されている。更に近年になり、精神活動等の脳の高次機能との関連性が着目されており、実験動物を用いた逃避学習やT迷路学習が行なわれ、これらの学習成績が脳内モノアミン含量の変化により影響を受けるとする報告が数多く見られる[5~9]。そこで我々はラット及びサルに明暗弁別学習及び時間弁別学習を行なわせ、アミン前駆体やレゼルピン投与による脳内モノアミン含量の変化が、これら学習行動にいかなる変化を与えるかを観察することにより、脳内モノアミン含量と高次神経活動との関連性を検討した。

〔方　法〕

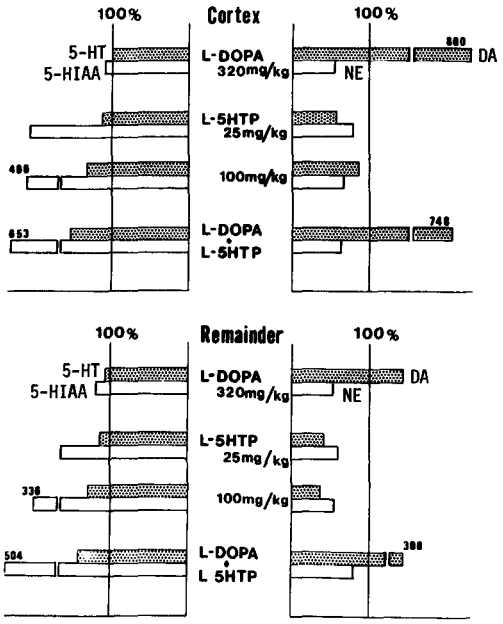
[1] 実験動物：生後4か月のWistar系雄アルビノラット及び生後約4年の雄日本ザルを用いた。いずれの動物も、餌を自由に摂取させた場合の体重の85%になるよう餌の摂取量を制限しながら、学習実験又は脳内モノアミン含量の測定に供した。

[2] 脳内モノアミン含量の測定：ラットを午後1時に断頭し直ちに脳を剔出した。氷上にて大脳皮質 (Cortex) 及び脳幹部 (Remainder) の両部位に分け、各々のモノアミン含量を測定した。ドーパミン (DA) 及びノルエピネフリン (NE) はTaylor ら[9]の方法で抽出分離し、Changら[10]の方法に従って定量した。セロトニン (5-HT) 及びヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) はFischerら[11]の方法に従って定量した。

[3] 薬物投与法：脳内モノアミン含量を増加させるために、学習実験又はモノアミン含量測定の2時間前に5-HTP (25~100mg/kg) 又はL-DOPA (80~360mg/kg) を2%トラガントゴム溶液に懸濁させ胃管を用いて投与した。脳内モノアミン含量を減少させるためには、レ

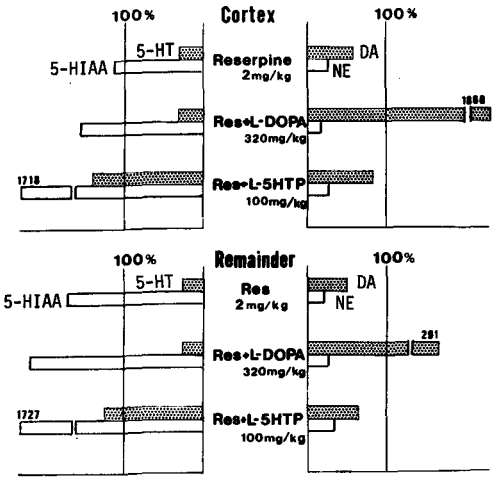
ゼルピン(2mg/kg)を学習実験又はモノアミン含量測定の24時間前に筋注により投与した。又このレゼルピン投与による脳内モノアミン含量の減少を回復させるために、レゼルピン投与22時間後、即ち学習実験又はモノアミン含量測定の2時間前に5-HTP(100mg/kg)又はL-DOPA(320mg/kg)を投与した。

〔図1〕



(4)学習実験。ラットを用いて明暗弁別学習を行なった。スキナー箱内ルームランプの点灯を正刺激(S^+)、消灯を負刺激(S^-)とした。S^+呈示中のレバー押し反応は、変間隔強化スケジュール(VI-15秒)に従って餌が導出され、S^-呈示中のレバー押し反応には餌は導出されない。1セッション中、S^+,S^-は30秒間,20回ずつランダムに呈示し1日1セッション行なった。S^+呈示中の反応数(R^+),S^-呈示中の反応数(R^-)から正反応率($\frac{R^+}{R^+ + R^-}$)を求めて学習成績を判定した。又、正反応率85%以上連続3日間をもって学習完成基準とした。日本ザルでは見本時間付長潜時分化強化スケジュール(DRLLS)に従って時間弁別学習を行なった。スキナー箱前面に左右2つのパネルを設置し、左側パネルへ見本時間(Sample time)として赤色光を3秒間又は10秒間呈示した後、右側パネルへ緑色光を呈示する。この後3~6秒又は10~20秒の間に右側パネルへ反応した場合は餌が導出され、それ以外の時間後に反応した場合には餌は導出されない。これを1施行とし見本時間3秒間を50施行、10秒間を50施行行なって1セッションとし1日1セッション行なった。それぞれの50施行における待ち時間を平均して平均反応潜時(mean latency)を求めた。

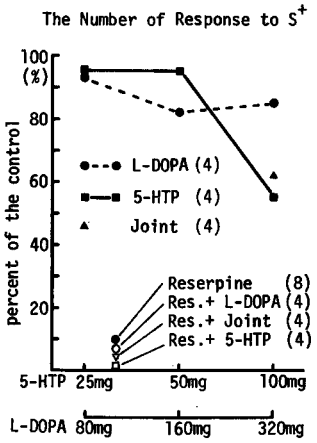
〔図2〕



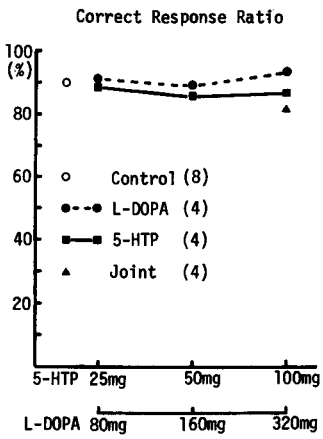
〔結果及び考察〕

(1)脳内モノアミン含量。L-DOPA, 5-HTP投与2時間後のラット大脳皮質及び脳幹部のモノアミン含量を測定した(最低3例以上)(図1)。L-DOPA(320mg/kg)投与では大脳皮質及び脳幹部いずれの部位でも5-HT, 5-HIAA含量には変化はないが、DAの著明な増加が認められた。又この時点ではNEは減少した。これは増加したDAによりNEが放出置換されるものと考

〔図3〕



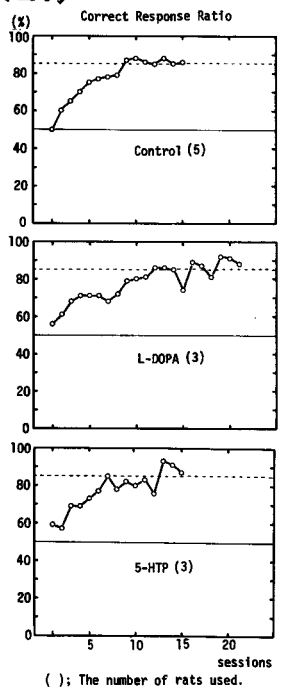
〔図4〕



( ); The number of rats used.

えられる。[13] 5-HTP(25mg/kg)投与では5-HTは増加の傾向を示したにすぎないが、100mg/kg投与では明らかに増加した。5-HIAAはいずれの場合にも著明に増加した。これは5-HTP投与により合成される5-HTは直ちに5-HIAAまで分解され脳内に蓄積されていると考えられる。一方DA、NEは5-HTP投与によりいずれも減少した。これはDOPA脱炭酸酵素が5-HTPにより競合阻害を受けているか、[12] あるいはDA、NEが5-HTPヌは5-HTにより放出置換されていること[13]が考えられる。L-DOPA(320mg/kg)と5-HTP(100mg/kg)の同時投与(Joint)では5-HT、5-HIAA、DAの増加とNEの減少が認められた。次にレゼルピン投与の影響を検討した(図2)。レゼルピン(2mg/kg)投与24時間後では、大脳皮質、脳幹部いずれの部位でも5-HT、DA、NEは著明に減少した。5-HIAAはむしろ増加ヌは増加の傾向を示したが、これはレゼルピンにより放出された5-HTが分解され5-HIAAの形で脳内に蓄積されているものと考えられる。レゼルピンを投与して22時間後にL-DOPAヌは5-HTPを投与し、更に2時間後のモノアミン含量を測定した(図2)。L-DOPA(320mg/kg)投与によりDAの著明な増加が認められたが、この時点ではNEは減少したままであった。5-HTP(100mg/kg)投与によっては5-HTおよび5-HIAAの増加が認められた。以上の如く、L-DOPA、5-HTP、レゼルピン投与により脳内モノアミン含量は大きく変化しており、この状態での学習行動を検索した。

〔図5〕

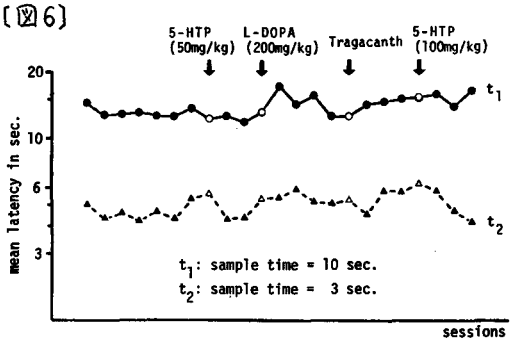


( ); The number of rats used.

〔2〕明暗弁別学習完成後の脳内モノアミン変動の効果。ラットに明暗弁別学習を行なわせ、学習完成基準に達した後も約2週間過剰学習を行なった。過剰学習中の正反応率は約90%を維持し、反応数(R^+)も約300前後で安定する。この後L-DOPA、5-HTP、レゼルピンを投与して、反応数(R^+)(図3)と正反応率(図4)への効果を検討した。L-DOPA(80mg, 160mg, 320mg/kg)投与では反応数、正反応率いずれも変化を示さなかった。一方5-HTP(25mg, 50mg/kg)投与でも反応数、正反応率には変化はないが5-HTP(100mg/kg)投与によっては反応数が約50%減少した。しかしこの場合にも正反応率には変化は認められなかった。ヌ、L-DOPA(320mg/kg)、5-HTP(100mg/kg)の同時投与でも反応数は減少したが、正反応率には変化はなかった。レゼルピン(2mg/kg)投与では反応数は著明に減少し、これにL-DOPA(320mg/kg)

又は5-HTP(100mg/kg)を投与しても反応数の減少は回復しなかった。以上のことから学習が完成した後では、脳内モノアミン含量を変化させても学習成績には全く影響を与えないことが明らかとなった。しかし5-HTP(100mg/kg)投与により反応数の減少が見られたことから、脳内5-HT含量の増加と行動活性の抑制とは関連性があるかも知れない。又レゼルピン投与による行動活性の抑制は、5-HT.DAの減少を回復させても依然として認められることから、脳内NE含量の減少が関与していることも考えられる。

[図6]



[3]明暗弁別学習過程での脳内モノアミン変動の効果。L-DOPA(200mg/kg)又は5-HTP(50mg/kg)を連日投与しながら学習実験を行ない、弁別学習が形成されてゆく過程での脳内モノアミン変動の効果を検討した。図5の如く、L-DOPA投与群、5-HTP投与群いずれも21セッションまでには学習完成基準に達した。このことから、学習してゆく過程に於いても脳内アミン含量の変化は効果を与えなかった。

[4]サルの時間弁別学習に及ぼす脳内モノアミン変動の効果。サルを用いて、より高度な時間弁別学習への効果を検討した。見本時間10秒間を100試行行なう学習を約2週間行ない平均反応潜時が10~20秒の間に安定した後、10秒間と3秒間2種類の見本時間を呈示する時間弁別学習を開始した。約3週間の学習により平均反応潜時はそれぞれ.10~20秒,3-6秒の間で安定し、時間弁別が可能となる。この後約3週間過剰学習を行ない、L-DOPA又は5-HTPを投与した。L-DOPA又は5-HTP投与によるサル脳内モノアミン含量の変化は岸本ら[14]が既報で報告した。図6の如く、L-DOPA(200mg/kg)、5-HTP(50mg,100mg/kg)いずれの投与によっても、それぞれの平均反応潜時には変化はなく、又3秒間と10秒間の時間弁別能力も保たれていた。又5-HTP(100mg/kg)投与ラットでみられた行動の抑制も、サルでは認められなかった。

以上のことから、ラット、サルいずれの学習成績も脳内モノアミン含量の変化によっては影響を受けないことが明らかとなった。一方Aprisonら[15,16]はL-トリプトファンの大量投与によりハトのpecking行動が抑制されることを報告しており、今回の5-HTP(100mg/kg)投与ラットでみられた結果と一致しているが、これは脳内5-HT含量の増加は、ある種の動物の行動活性の抑制あるいはmotivationには関与していることを示唆するものである。従って従来報告されていた学習行動と脳内モノアミンを論じているものは、行動活性の変化によっているのかもしれない。

〔文献〕

(1)Feldberg,W.et al:J.Physiol.195,245,1968 (2)Jouvet,M.:Science 163,32,1969 (3)Azmitia,E.C.et al:Science 169,201,1970 (4)Hornykiewicz,O.:Pharmacol.Rev.18,925,1966 (5)Dismukes,R.K.and Rake,A.V.:Psychopharmacol. 23,17,1972 (6)Ahlenius,S.:Pharmacol.Biochem.Behav.1,347,1973 (7)Narotzky,R.et al:Exp.Neurol.38,218,1973 (8)Engel,J.and Modigh,K.:Adv.Biochem.Psychopharmacol.11,405,1974 (9)Taylor,K.M.and Laverty,R.:J.Neurochem. 16,1361,1969 (10)Chang,C.C.:Int.J.Neuropharmacol.3,643,1964 (11)Fischer,C.A.et al:Comp.Gen.Pharmacol.1,61, 1970 (12)Musacchio,J.M.:in "Handbook of Psychopharmacol."Vol.3,1975 (13)Butcher,L.L.et al:Brain Res.41,387, 1972 (14)岸本.永井.土屋田：神経化学.11,13,1972(15)Smith,J.E.et al:J.Neurochem.26,537,1976 (16)Smith,J.E.et al: J.Neurochem.27,747,1976

9 2-(7'-indenyloxymethyl) morpholine hydrochloride (YM-08054-1)の抗うつ作用の生化学的機序

原田正富・野崎順久
前野弘夫　（山之内製薬・中研）

〔要　約〕

2-(7'-indenyloxymethyl) morpholine hydrochloride (YM-08054-1) が動物実験において強力な抗reserpine作用ならびにmethamphetamine増強作用等を示し抗うつ薬としての特性を有することがすでに明らかにされた。本化合物の作用機序を生化学的に解明する目的でserotonin (5-HT), noradrenaline (NA) およびdopamine (DA) のuptakeならびにrelease, 5-HTおよびβ-phenylethylamine (β-PEA) のdeaminationに対するYM-08054-1の作用をin vitroで検討し，対照薬の三環系抗うつ薬 (TAD) あるいは類似構造のviloxazineと比較した。YM-08054-1は5-HTおよびNAのラット脳シナプトゾームへのuptakeを強力に阻害し，その効力はamitriptylineと同等であり，iprindoleやviloxazineより強かった。ラット脳スライスからの5-HTおよびNAの遊出作用においてはYM-08054-1およびamitriptylineは弱い促進を示したが，同条件下でmethamphetamineおよびtyramineは強力な促進作用を示した。YM-08054-1のMAO-AおよびMAO-Bに対する阻害作用は弱かったが，MAO阻害薬 (pargyline, tranylcypromineおよびsafrazine) は両酵素を強力に阻害した。これに対してTADはMAO-Bを強く阻害した。以上の結果は生化学的特性においてYM-08054-1が類似構造を有するviloxazineとは全く異っており，むしろ三環系化合物であるamitriptylineと類似していることを示唆していると考えられる。

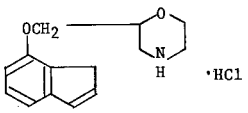
うつ病の治療にはTADとMAO阻害薬が用いられているが，いずれも効力の発現に2～3週を要するとともに肝臓，循環器等に対する副作用のあることが知られている (4, 5)。最近野崎らによってTADとは構造的に異るYM-08054-1 (特開昭52-78883号) が抗うつ薬としての各種のスクリーニング法において特に有効であることが示されたが，本物質には抗choline作用のないことも明らかにされている。今回はYM-08054-1の生化学的な作用機序について報告する。

〔実験方法〕

1) 実験動物：Wistar系雄性ラット (8～10週令) を用い，断頭後直ちに氷上で全脳を取り出し線条体，海馬あるいは視床下部を得た。

2) uptake of biogenic amines：^{14}C-5-HT uptakeの場合はラット全脳を0.32 M sucroseでホモジナイズし遠心分離によってミトコンドリア分画 (P_2分画) を得，これを0.32 M sucroseで洗浄したものを粗シナプトゾームとして使用した。uptakeの測定はSchacht等の方法 (7) に従い，37°C 2.5分間incubation後反応液をWhatman glass fiber disk GF/Fで汎過して洗浄後diskの放射能を測定しシナプトゾームに

YM-08054-1 : 2-(7'-indenyloxymethyl)-morpholine hydrochloride.



$C_{14}H_{17}O_2N \cdot HCl$: 267.76

取り込まれた ^{14}C-5-HT量とした。^{14}C-NA uptakeの場合は海馬より，また^{14}C-DA uptakeの場合は線条体より得た粗シナプトゾームを使用して同様に測定した。

c) release of biogenic amines：ラット視床下部，海馬および線条体のスライスにそれぞれ^{14}C-5-HT，^{14}C-NAあるいは^{14}C-DAを取り込ませた後十分に洗浄した。このスライスを0.1 mM iproniazid，10 mM glucose，1.14 mM ascorbic acidおよび1.27 mM $CaCl_2$を含有するKrebs-Henseleit bicarbonate bufferを用いて37°Cで灌流し，20分後に被験薬を加えたbufferに切換えてさらに20分間灌流を続けた。薬物存在下に遊出した放射能を，灌流開始時にスライスに含まれた総放射能に対する百分率で表し，これをcontrolの値と比較して薬物のamine release活性とした。

d) MAO activity：ラット視床下部から調製した粗ミトコンドリア分画をMAO標品として使用した。MAO活性の測定はGoridis等の方法(3)に従った。樹脂はDowex 50W×8を用いた。

〔結果と考察〕

1) some pharmacological characteristics：YM-08054-1は薬効薬理的にはamitriptylineに比較的似ており(6)，このうちreserpine低体温に対する拮抗作用およびmethamphetamine常同行動の増強作用について Table. 1 に示した。

Table 1. Effects on reserpine-induced hypothermia in mice and potentiation of methamphetamine-induced stereotypy in rats.

Drugs	Reserpine antagonism ED 1.5 (mg/kg p.o.)[a]	Methamphetamine potentiation ED_{50} (mg/kg i.p.)[b]
YM-08054-1	1.8	4.8
Amitriptyline	0.9	6.3
Imipramine	4.1	3.7
Viloxazine	1.4	> 30

a) ED 1.5 (mg/kg p.o.), the dose to increase rectal temperature by 1.5°C, was obtained from the dose-response curve.

b) ED_{50}, the dose to elicit biting behavior in 50 % of rats, was calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon.

Table 2. IC_{50} values (M) of ^{14}C-amine uptake by rat brain synaptosomes.

Drugs	5-HT (Whole Brain)	NA (Hippocampus)	DA (Striatum)
YM-08054-1	7.1×10^{-7}	2.6×10^{-7}	1.4×10^{-5}
Amitriptyline	7.0×10^{-7}	2.3×10^{-7}	8.1×10^{-6}
Chlomipramine	7.3×10^{-8}	3.6×10^{-7}	5.1×10^{-6}
Imipramine	4.2×10^{-7}	1.1×10^{-7}	1.0×10^{-5}
Desipramine	3.3×10^{-6}	1.2×10^{-8}	1.2×10^{-5}
Iprindole	2.0×10^{-5}	6.3×10^{-6}	9.2×10^{-6}
Viloxazine	6.6×10^{-5}	1.0×10^{-6}	6.3×10^{-5}

IC_{50} values were calculated from logarithmic probability plots of percentage inhibition.

2) inhibition of uptake : ^{14}C-5-HT uptake は YM-08054-1, amitriptyline, imipramine および chlomipramine によって強力に阻害された (Table. 2)。一方 desipramine, zimeldine の 5-HT uptake 阻害作用は弱く, YM-08054-1 に化学構造の類似した viloxazine の 5-HT uptake 阻害作用も弱かった。^{14}C-NA uptake は YM-08054-1, amitriptyline, imipramine および desipramine によって強力に阻害されたが, zimeldine および viloxazine による阻害は比較的弱かった。^{14}C-DA uptake に対する阻害作用についても検討を加えたが今回使用した被験薬はいずれも作用が弱かった。以上の結果は YM-08054-1 の amine uptake 阻害作用が全般的にみて amitriptyline の効果と非常に類似していることを示している。

3) stimulation of release : YM-08054-1 および amitriptyline は 10^{-5} M および 10^{-4} M において ^{14}C-5-HT release を促進したが methamphetamine はこれらよりはるかに強い作用を示した (Table. 3)。^{14}C-NA release は 10^{-5} M および 10^{-4} M の tyramine, methamphetamine および amitriptyline により促進された。YM-08054-1 も ^{14}C-NA release を促進したがこれらの濃度における作用は有意ではなかった。5-HT および NA 両アミンの release に対する viloxazine および imipramine の促進作用は他の被験薬に比べ弱かった。^{14}C-DA release に対する作用は methamphetamine と比較するといずれの薬物も弱かった。

Table 3. Effects of test compounds on the release of ^{14}C-amines from brain slices

	The release of ^{14}C-5-HT		The release of ^{14}C-NA	
	Drug Concentration (M)			
Drugs	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}
YM-08054-1	1.73 ± 0.15[b]	1.70 ± 0.24[b]	2.25 ± 0.47	1.87 ± 0.44
Tyramine			4.72 ± 1.28[b]	5.58 ± 0.88[a]
Methamphetamine	2.18 ± 0.21[a]	3.25 ± 0.57[b]	2.45 ± 0.36[b]	2.27 ± 0.24[a]
Viloxazine	1.30 ± 0.29	1.88 ± 0.21[b]	1.37 ± 0.22	1.66 ± 0.40
Amitriptyline	2.16 ± 0.47[c]	1.99 ± 0.11[b]	2.01 ± 0.31[c]	2.95 ± 0.58[c]
Imipramine	1.00 ± 0.11	1.41 ± 0.26	1.40 ± 0.40	1.68 ± 0.26

The release in the presence of drug was presented as the ratio to the release in the absence of the drug and the mean value with S.E. of three experiments was given.

a) : $p < 0.01$ b) : $p < 0.05$ c) : $p < 0.10$

4) inhibition of MAO : MAO には A および B type の酵素が知られており, MAO-A の基質として 5-HT および NA, MAO-B の基質として β-PEA を使用した。Table. 4 に示す様に両酵素に対する YM-08054-1 の阻害作用は比較的弱かった。一方 TAD では MAO-A に対する阻害作用は YM-08054-1 と同程度であったにもかかわらず MAO-B に対しては強い阻害作用を示した。pargyline, tranylcypromine, phenelzine および safrazine の如き MAO 阻害薬は非常に強い阻害作用を示した。

抗うつ薬の治療効果はシナプス間隙における神経伝達物質の利用度の増加と密接に関係しているといわれるが (1, 5), これには神経伝達物質の reuptake 阻害, MAO 阻害および神経伝達物質の release 促進の三つの作用機序が考えられている (4)。今

Table 4. IC_{50} values (M) of ^{14}C-amine deamination by rat hypothalamic mitochondrial MAO.

Drugs	Substrate		
	5-HT	NA	β-PEA
YM-08054-1	1.1×10^{-4}	9.0×10^{-5}	2.6×10^{-4}
Pargyline	1.2×10^{-6}	2.1×10^{-6}	6.4×10^{-8}
Tranylcypromine	6.4×10^{-7}	6.8×10^{-7}	2.6×10^{-7}
Phenelzine	1.1×10^{-7}	2.0×10^{-7}	4.9×10^{-7}
Safrazine	4.5×10^{-7}	8.5×10^{-7}	1.0×10^{-6}
Amitriptyline	1.5×10^{-4}	1.0×10^{-4}	1.1×10^{-5}
Chlomipramine	3.9×10^{-5}	6.9×10^{-5}	7.8×10^{-6}
Imipramine	3.6×10^{-3}	2.4×10^{-3}	8.1×10^{-6}
Desipramine	1.1×10^{-4}	1.4×10^{-4}	1.7×10^{-5}
Iprindole	1.8×10^{-4}	1.2×10^{-4}	1.9×10^{-5}
Viloxazine	1.9×10^{-3}	1.6×10^{-3}	7.0×10^{-4}

IC_{50} values were calculated from logarithmic probability plots of percentage inhibition.

回の実験結果からYM-08054-1は5-HTおよびNA uptake阻害作用が特に強く，DA uptake阻害，MAO阻害および脳スライスからのamine release促進作用が弱いことが明らかになった。このことは動物実験でみとめられたYM-08054-1の強力な抗うつ活性が5-HTおよびNAのreuptake阻害にもとづくsynaptic receptor部位における神経伝達物質利用度の増大によるものであることを示唆していると考えられる。

〔文献〕

1) Berger, F.M. (1975) Clin. Pharmacol. Ther. 18, 241-248

2) Byck, R. (1975) in The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman, L.S. and Gilman, A., ed) 5 th ed., pp. 174-187, Macmillan Publishing Co., Inc., New york

3) Goridis, C. and Neff, N.H. (1971) Brit. J. Pharmacol. 43, 814-818

4) Goth, A. (1974) in Medical Pharmacology : Principles and Concepts, 7 th ed., pp. 235-241, The C.V. Mosby Company, Saint Louis

5) Kannengiesser, M.H., Hunt, P. and Raynaud, J. -P. (1973) Biochem. Pharmacol. 22, 73-84

6) Nozaki, Y., et al. in preparation

7) Schacht, U., and Heptner, W. (1974) Biochem. Pharmacol. 23, 3413-3422

10 ラット辺縁系各核レベルにおけるCholine acetyltransferase, Acetylcholinesterase及びMonoamine oxidase活性 —— 情報行動変化に伴う活性の変化 ——

内村英幸・平野 誠・金 長寿・斉藤 雅・松本 孝(国立肥前療養所)
中原辰雄 (九大・理・化学)
伊藤正敏 (九大・医・精神)

〔要 約〕

長期隔離飼育によって情動行動変化を来たしたラットの大脳辺縁系諸核におけるCAT、AchE、5HT-MAO及びtyramine-MAO活性の変化を検討した。各情動行動変化によって辺縁系皮質、海馬、中隔及び扁桃核の特異な核での上記酵素活性の変化が見い出された。特に扁桃核において、muricideラットではn. lateralis posteriorでCATの低下、n. corticalisで5HT-MAOの増加、piriform cortexでCATの低下及びtyramine-MAOの増加、n. basolateralisでAchEの増加がみられ、aggressiveラットではn. corticalisでCATの低下、n. centralisで5HT-MAOの増加、n. basolateralisでtyramine-MAOの低下がみられ、indifferentラットではn. lateralis posteriorでCATの低下、piriform cortexで5HT-MAOの増加、n. basomedialisでtyramine-MAOの低下がみられた。このように扁桃核の特異な核でのcholinergic系およびmonoaminergic系の変化は、isolation stressが個体にとっていかなる情動行動の動機になり得るか扁桃核で選択される神経過程の一面を反映していると考えられる。さらに、辺縁系皮質、海馬、中隔および視床下部の特異な核での活性変動の違いは、各情動行動変化の背景にある神経回路が異っていることを示唆している。

長期隔離飼育(isolation)により情動行動変化を来たしたラットについて、今回は、視床下部と並んで情動行動の調節機構に重要な役割をもつ大脳辺縁系の諸核におけるcholine acetyltransferase(CAT)、acetylcholinesterase(AchE)およびmonoamine oxidase(5HT-MAO、tyramine-MAO)の活性変動を検討した。

〖実験方法〗 1) Isolationの条件と行動変化：前報と同じ方法で行った[5)8)9)]。Wister-King雄性ラットを用い、10週間隔離飼育を行った。Isolationしたラットは、マウスに対する反応性によって、マウスを咬み殺すラット(muricide)、攻撃的となるラット(aggressive)及び無関心なラット(indifferent)の3群に分けた。2) 凍結乾燥切片の作製：17時に断頭後、脳はcryostat(-15°C)で100μmの連続切片にし、真空ビンに入れ(-30°C)、真空ポンプで吸引(10^{-3}mmHg)し、凍結乾燥切片を作った。3) 各核の切り出しと重量測定：実体顕微鏡下で辺縁系諸核を切り出した。海馬の各分野はLorente de Nóの分類に従い[7)]、層構造別に切り出した。各試料はelectronic microbalance(感度0.1μg)で重量測定した。4) 測定法：a) CAT；Fonnumの方法によった[2)]。基質は0.2mM ^{14}C-acetyl-coenzyme A(55.0mCi/mmole, NEN)を用いた。b) AchE；Fonnumの方法を一部変更して用いた[9)]。基質には1.0mM ^{14}C-acetylcholine(3.84mCi/mmole, NEN)を用い、nonspecific cholinesterase inhibitorとしてiso-OMPA(1×10^{-5}M)を使用した。c) MAO；McCamanらの方法を一部変更して行った[5)]。基質として1.0mM-[2-^{14}C]5-hydroxytryptamine(48.5mCi/mmole, NEN)および1.5mM[^{14}C]tyramine(9.2mCi/mmole, NEN)を用いた。

〖結果と考察〗 1) Isolationによる CAT と AchE活性の変化：a) muricideラット；piriform cortex、扁桃核のn. lateralis posterior、中隔のn. lateralis、海馬CA3b fieldのpyramidal

Table 1. CAT activities in limbic nuclei of grouped and isolated rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent
Limbic cortex:				
Ci3	38.89 ± 0.68(4)	45.69 ± 2.96(4)	42.20 ± 2.18(4)	41.42 ± 2.19(4)
Ci5	26.17 ± 0.88(5)	31.23 ± 0.80(4)***	31.61 ± 2.09(4)*	30.10 ± 0.79(4)**
Pi	102.22 ± 3.00(5)	88.80 ± 4.56(5)*	111.70 ± 8.42(4)	101.03 ± 4.14(4)
CE	118.16 ± 7.51(4)	130.09±10.42(4)	110.76 ± 8.62(4)	126.06 ± 6.20(4)
Hippocampus:				
CA1 field				
o	36.13 ± 2.54(4)	36.30 ± 2.82(4)	38.58 ± 3.38(4)	35.23 ± 2.83(4)
p	76.39 ± 2.26(5)	80.04 ± 4.73(4)	72.01 ± 3.81(4)	78.78 ± 2.51(4)
r	37.84 ± 1.22(5)	42.27 ± 3.13(4)	39.34 ± 1.01(4)	38.05 ± 2.83(4)
lm	41.16 ± 1.94(4)	52.59 ± 4.38(4)	35.05 ± 3.64(4)	52.55 ± 6.63(4)
CA2-CA3a field				
o	48.05 ± 3.56(5)	41.85 ± 3.51(4)	46.75 ± 1.68(4)	45.02 ± 2.36(4)
p	67.64 ± 6.49(5)	72.26 ± 1.33(4)	66.59 ± 4.61(4)	57.30 ± 5.46(4)
r	40.32 ± 3.64(5)	33.91 ± 1.37(4)	33.23 ± 2.93(4)	30.69 ± 3.68(4)
CA3b field				
o	23.32 ± 2.05(5)	26.90 ± 1.78(5)	30.40 ± 1.90(4)*	18.99 ± 1.74(4)
p	50.02 ± 1.90(4)	40.81 ± 2.15(5)**	42.61 ± 3.22(4)	45.60 ± 2.63(4)
r	30.67 ± 2.91(5)	29.94 ± 3.50(4)	30.65 ± 1.52(4)	28.12 ± 2.44(4)
CA4 field				
p	51.01 ± 1.97(4)	48.58 ± 3.54(4)	45.97 ± 2.04(4)	46.84 ± 2.78(4)
Rostral limbic nuclei:				
TU	255.07±19.99(5)	235.44±20.27(4)	213.51±15.57(4)	229.49±21.81(4)
td	199.62±14.37(5)	154.36±20.91(4)	175.90±22.66(4)	153.31±19.45(4)
a	64.00 ± 1.76(5)	67.41 ± 7.83(4)	60.11 ± 6.11(4)	63.40 ± 4.63(4)
sd	30.40 ± 3.66(4)	23.43 ± 3.20(4)	27.89 ± 4.25(4)	25.69 ± 4.28(4)
sm	41.65 ± 3.27(4)	45.96 ± 4.93(4)	29.63 ± 4.13(4)	40.87 ± 3.47(4)
sl	30.65 ± 2.65(5)	20.88 ± 2.13(4)*	28.65 ± 3.23(4)	31.45 ± 4.34(4)
sf	48.09 ± 4.29(6)	52.78 ± 1.72(4)	72.97 ± 3.18(4)***	59.29 ± 3.82(4)
Amygdaloid nuclei:				
am	16.88 ± 1.26(5)	15.91 ± 0.79(4)	16.35 ± 1.12(4)	15.12 ± 0.60(4)
ac	57.11 ± 5.07(5)	58.44 ± 3.58(4)	62.49 ± 4.89(4)	50.90 ± 3.04(4)
aco	91.14 ± 2.71(6)	91.67 ± 2.46(4)	56.72 ± 3.09(4)***	88.37 ± 4.56(4)
abm	83.84 ± 6.85(5)	85.57 ± 3.68(4)	68.79 ± 4.05(4)	89.51 ± 5.58(4)
abl	100.88 ± 7.10(5)	114.75±12.06(4)	96.64 ± 7.12(4)	104.60 ± 7.87(4)
alp	509.22 ± 7.30(6)	363.41±10.50(4)***	498.75±20.90(4)	343.40±15.53(4)***
Hypothalamic nuclei:				
ME	129.16±11.23(4)	122.51±10.25(4)	102.16 ± 4.62(4)	117.11 ± 4.78(4)

The results are expressed as mean values(μmoles acetylcholine synthesized/ g dry wt./h) ± S.E.M.(No. of animals). Abbreviations: Ci3 & Ci5, cingulate cortex, 3rd & 5th layer; Pi, piriform cortex; CE, entorhinal cortex; o, stratum oriens; p, stratum pyramidale; r, stratum radiatum; lm, stratum lacunosum-moleculare; TU, tuberculum olfactorium; td, n. tractus diagonalis; a, n. accumbens; sd, n. septalis dorsalis; sm, n. septalis medialis; sl, n. septalis lateralis; sf, n. septalis fimbrialis; am, n. amygdaloideus medialis; ac, n. amygdaloideus centralis; aco, n. amygdaloideus corticalis; abm & abl, n. amygdaloideus basalis, pars medialis & pars lateralis; alp, n. amygdaloideus lateralis, pars posterior; ME, median eminence. *$p<0.05$, **$p<0.025$, ***$p<0.005$.

Table 2. AchE activities in limbic nuclei of grouped and isolated rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent	AchE/CAT
Limbic cortex:					
Ci3	15.98 ± 0.80(6)	19.15 ± 0.78(4)*	17.72 ± 0.55(4)	18.45 ± 0.60(4)	24.7
Ci5	12.52 ± 0.96(5)	15.50 ± 0.78(4)	12.72 ± 0.36(4)	12.32 ± 1.98(4)	28.7
Pi	34.00 ± 1.93(5)	32.22 ± 1.21(4)	30.41 ± 2.85(4)	36.14 ± 0.69(4)	20.0
CE	33.14 ± 2.36(5)	34.61 ± 3.48(4)	32.83 ± 2.26(4)	36.65 ± 1.62(4)	16.8
Hippocampus:					
CA1 field					
o	16.55 ± 1.31(5)	17.87 ± 1.59(4)	17.84 ± 1.92(4)	16.72 ± 0.80(4)	27.5
p	37.34 ± 2.88(5)	39.68 ± 3.02(4)	38.19 ± 4.14(4)	35.55 ± 1.33(4)	29.3
r	18.53 ± 0.91(4)	19.34 ± 1.18(4)	19.73 ± 0.98(4)	19.09 ± 1.23(4)	29.4
lm	14.06 ± 1.03(5)	18.25 ± 2.46(5)	18.85 ± 1.66(4)	21.14 ± 4.54(4)	20.5
CA2-CA3a field					
o	22.33 ± 2.24(5)	23.78 ± 1.89(4)	26.74 ± 1.38(4)	22.18 ± 1.20(4)	27.9
p	36.04 ± 2.24(5)	31.58 ± 1.72(4)	31.32 ± 0.55(4)	33.25 ± 2.08(4)	32.0
r	19.37 ± 1.16(5)	19.91 ± 2.11(4)	17.65 ± 1.24(4)	16.20 ± 1.04(4)	28.8
CA3b field					
o	14.95 ± 1.16(6)	11.22 ± 1.45(5)	18.35 ± 2.62(4)	12.19 ± 1.82(4)	38.5
p	25.77 ± 1.39(5)	23.64 ± 1.35(4)	23.37 ± 0.71(4)	22.59 ± 2.20(4)	30.9
r	14.90 ± 1.46(4)	15.84 ± 0.92(4)	18.19 ± 1.18(4)	14.80 ± 1.12(4)	29.1
CA4 field					
p	21.00 ± 1.78(5)	26.14 ± 2.11(4)	22.67 ± 1.96(4)	23.50 ± 1.06(4)	24.7
Rostral limbic nuclei:					
TU	232.61±29.51(5)	195.94±32.03(4)	182.10±20.19(4)	202.83±17.37(4)	54.7
td	87.79±10.69(4)	63.68 ± 7.25(4)	57.91 ± 7.04(4)	71.32 ± 5.11(4)	26.4
a	52.46 ± 3.54(5)	64.88 ± 8.11(4)	59.22 ±10.18(4)	64.39 ± 8.17(4)	49.2
sd	21.08 ± 2.58(5)	15.26 ± 2.15(4)	14.99 ± 0.58(4)	16.46 ± 2.09(4)	41.6
sm	32.91 ± 2.39(5)	19.30 ± 3.24(5)**	18.66 ± 1.74(4)***	22.58 ± 3.17(4)*	47.4
sl	24.22 ± 3.94(5)	16.20 ± 1.04(4)	21.64 ± 1.09(4)	14.48 ± 1.24(4)	47.4
sf	28.49 ± 2.05(5)	25.71 ± 1.34(4)	24.82 ± 2.56(4)	33.57 ± 1.80(4)	35.6
Amygdaloid nuclei:					
am	16.25 ± 0.83(4)	15.93 ± 0.76(4)	16.83 ± 0.59(4)	16.13 ± 0.52(4)	57.8
ac	24.51 ± 1.83(4)	27.25 ± 2.16(4)	29.60 ± 1.89(4)	29.14 ± 1.07(4)	25.8
aco	32.23 ± 1.68(5)	29.32 ± 1.26(4)	27.79 ± 5.18(4)	30.59 ± 1.38(4)	21.2
abm	30.48 ± 1.42(5)	30.34 ± 2.17(4)	33.76 ± 0.88(4)	33.26 ± 2.10(4)	21.8
abl	35.43 ± 2.20(5)	43.21 ± 2.21(4)*	38.21 ± 1.15(4)	34.52 ± 2.74(4)	21.1
alp	151.37±12.20(5)	147.86±15.79(4)	169.94 ± 6.51(4)	168.59 ± 7.02(4)	17.8
Hypothalamic nuclei:					
ME	10.60 ± 0.79(5)	12.25 ± 0.86(4)	10.80 ± 1.11(4)	10.57 ± 0.75(4)	4.9

The results are expressed as mean values(μmoles acetylcholine hydrolysed/g dry wt./min) ± S.E.M.(No of animals). *$P<0.05$, **$P<0.025$, ***$P<0.005$.

Table 3. 5HT-MAO activities in limbic nuclei of grouped and isolated rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent
Limbic cortex:				
Ci5	34.60 ± 0.94(5)	28.51 ± 1.65(5)**	30.20 ± 2.22(4)	35.99 ± 1.01(4)
Pi	39.24 ± 2.32(5)	40.13 ± 2.54(4)	44.72 ± 3.98(4)	47.83 ± 2.59(4)*
CE	43.88 ± 1.49(5)	47.63 ± 2.50(5)	52.67 ± 2.16(4)**	51.78 ± 3.74(4)
Hippocampus:				
CA1 field				
o	26.43 ± 1.37(4)	27.15 ± 1.97(4)	23.48 ± 2.14(4)	26.03 ± 2.49(4)
p	38.34 ± 2.04(4)	32.71 ± 2.98(4)	32.78 ± 3.71(4)	39.15 ± 1.64(4)
r	37.59 ± 2.71(5)	36.56 ± 3.29(4)	40.99 ± 2.43(4)	40.64 ± 2.61(4)
lm	38.96 ± 1.57(4)	43.14 ± 1.74(4)	38.11 ± 3.29(4)	41.52 ± 3.57(4)
CA2-CA3a field				
o	30.12 ± 2.48(5)	32.28 ± 1.99(4)	32.51 ± 0.27(4)	29.42 ± 1.00(4)
p	38.93 ± 2.30(5)	40.91 ± 0.90(4)	38.81 ± 2.27(4)	42.76 ± 2.51(4)
r	35.99 ± 2.65(5)	33.46 ± 4.42(4)	38.13 ± 1.27(4)	40.07 ± 1.89(4)
CA3b field				
o	26.60 ± 2.20(4)	30.46 ± 2.27(4)	27.53 ± 1.27(4)	24.35 ± 1.81(4)
p	40.74 ± 1.97(5)	43.66 ± 1.70(4)	46.29 ± 2.34(4)	44.10 ± 3.18(4)
r	37.24 ± 2.02(5)	41.51 ± 1.74(4)	37.75 ± 2.00(4)	38.55 ± 2.74(4)
CA4 field				
p	46.49 ± 2.39(5)	44.82 ± 1.14(4)	47.05 ± 1.73(4)	48.20 ± 2.99(4)
Rostral limbic nuclei:				
TU	34.16 ± 1.99(5)	36.68 ± 1.67(4)	36.24 ± 0.97(4)	37.25 ± 3.05(4)
td	27.88 ± 3.72(5)	23.27 ± 2.39(4)	22.27 ± 2.36(4)	27.91 ± 1.75(4)
a	51.52 ± 5.17(5)	48.05 ± 3.35(4)	54.86 ± 1.55(4)	49.95 ± 6.78(4)
sd	25.10 ± 2.12(5)	30.15 ± 1.52(5)	27.59 ± 0.99(4)	29.65 ± 2.20(4)
sm	27.09 ± 1.60(5)	27.86 ± 0.64(4)	25.52 ± 1.56(4)	26.86 ± 1.95(4)
sl	35.82 ± 1.15(5)	38.14 ± 1.32(4)	43.68 ± 1.34(4)***	38.85 ± 3.25(4)
sf	19.38 ± 0.88(5)	19.03 ± 0.81(4)	20.11 ± 1.25(4)	19.41 ± 1.38(4)
Amygdaloid nuclei:				
am	51.41 ± 2.55(5)	51.42 ± 3.60(4)	52.99 ± 4.31(4)	58.71 ± 3.00(4)
ac	50.44 ± 2.74(5)	50.60 ± 2.40(4)	59.56 ± 1.43(4)*	51.37 ± 4.29(4)
aco	41.05 ± 2.08(5)	50.19 ± 2.36(4)**	43.85 ± 2.07(4)	44.03 ± 2.40(4)
abm	42.73 ± 1.93(5)	44.61 ± 1.65(4)	47.76 ± 1.57(4)	48.53 ± 2.67(4)
abl	36.22 ± 3.87(5)	35.15 ± 4.07(4)	42.56 ± 4.97(4)	41.18 ± 3.41(4)
al	36.22 ± 2.74(5)	38.74 ± 2.73(4)	40.08 ± 1.93(4)	36.92 ± 2.44(4)
Hypothalamic nuclei:				
ME	48.44 ± 4.19(4)	46.54 ± 2.03(4)	48.53 ± 5.01(4)	49.46 ± 2.40(3)

The results are expressed as mean values(μmoles 5HT oxidized/ g dry wt./h) ± S.E.M.(No. of animals). Abbreviations: Ci5, cingulate cortex, 5th layer;Pi, piriform cortex; CE, entorhinal cortex; o, stratum oriens; p, stratum pyramidale; r, stratum radiatum; lm, stratum lacunosum-moleculare; TU, tuberculum olfactorium; td, n. tractus diagonalis; a, n. accumbens; sd, n. septalis dorsalis; sm, n. septalis medialis; sl, n. septalis lateralis; sf, n. septalis fimbrialis; am, n. amygdaloideus medialis; ac, n. amygdaloideus centralis; aco, n. amygdaloideus corticalis; abm & abl, n. amygdaloideus basalis, pars medialis & pars lateralis; al, n. amygdaloideus lateralis; ME, median eminence. *$p<0.05$, **$p<0.025$, ***$p<0.005$.

Table 4. Tyramine-MAO activities in limbic nuclei of grouped and isolated rats

Nucleus	Grouped control	Muricide	Aggressive	Indifferent	5HT-MAO /tyramine-MAO
Limbic cortex:					
Ci5	36.98 ± 1.11(5)	42.39 ± 3.03(5)	38.13 ± 1.44(4)	38.29 ± 1.13(4)	0.94
Pi	36.05 ± 1.26(6)	43.22 ± 3.02(5)*	33.41 ± 3.86(4)	41.11 ± 2.75(4)	1.09
CE	45.41 ± 2.75(5)	42.25 ± 2.42(5)	41.16 ± 4.07(4)	44.90 ± 1.39(4)	0.97
Hippocampus:					
CA1 field					
o	33.19 ± 2.83(4)	34.34 ± 2.29(4)	37.43 ± 3.08(4)	33.43 ± 1.60(4)	0.80
p	40.60 ± 2.75(4)	41.15 ± 1.75(4)	31.01 ± 1.52(4)**	40.23 ± 2.53(4)	0.94
r	39.06 ± 1.40(4)	39.55 ± 1.95(4)	35.88 ± 1.53(4)	39.92 ± 2.24(4)	0.96
lm	54.63 ± 2.78(4)	48.83 ± 2.81(4)	47.95 ± 3.21(4)	51.72 ± 2.23(4)	0.71
CA2-CA3a field					
o	35.38 ± 2.01(4)	37.17 ± 2.62(4)	29.05 ± 1.16(4)*	33.80 ± 0.65(4)	0.85
p	35.91 ± 1.87(5)	31.88 ± 3.72(4)	34.96 ± 0.43(4)	33.80 ± 2.94(4)	1.08
r	37.82 ± 2.47(5)	35.33 ± 2.26(4)	35.73 ± 1.92(4)	37.41 ± 1.30(4)	0.95
CA3b field					
o	33.89 ± 1.82(4)	29.87 ± 2.32(4)	30.11 ± 0.79(4)	34.02 ± 3.05(4)	0.78
p	38.67 ± 1.21(5)	40.67 ± 1.80(4)	38.61 ± 1.29(4)	39.99 ± 1.74(4)	1.05
r	38.53 ± 2.19(5)	41.73 ± 4.03(4)	39.81 ± 1.11(4)	45.25 ± 3.21(4)	0.97
CA4 field					
p	45.71 ± 2.93(5)	42.94 ± 1.63(4)	45.74 ± 4.82(4)	45.16 ± 2.25(4)	1.02
Rostral limbic nuclei:					
TU	39.35 ± 1.97(5)	38.18 ± 1.41(4)	36.61 ± 1.48(4)	42.99 ± 2.86(4)	0.87
td	25.31 ± 1.62(4)	25.99 ± 1.67(4)	26.19 ± 2.94(4)	32.34 ± 1.58(4)**	1.10
a	51.38 ± 3.93(5)	57.27 ± 2.64(4)	53.40 ± 2.42(4)	59.15 ± 1.37(4)	1.00
sd	35.74 ± 1.50(5)	37.29 ± 4.05(4)	32.51 ± 3.04(4)	37.96 ± 1.95(4)	0.70
sm	38.41 ± 2.01(5)	35.86 ± 1.51(4)	34.71 ± 2.55(4)	34.86 ± 2.16(4)	0.71
sl	58.45 ± 3.23(5)	56.83 ± 3.03(4)	42.19 ± 4.46(4)**	55.90 ± 4.41(4)	0.61
sf	22.97 ± 0.63(4)	23.20 ± 1.61(4)	21.69 ± 1.07(4)	23.76 ± 0.21(4)	0.84
Amygdaloid nuclei:					
am	48.05 ± 2.61(6)	48.04 ± 4.18(5)	47.27 ± 3.22(4)	54.57 ± 3.02(4)	1.07
ac	47.51 ± 4.16(4)	50.52 ± 3.47(4)	48.49 ± 3.37(4)	53.02 ± 3.81(4)	1.06
aco	38.98 ± 1.29(5)	39.98 ± 2.54(4)	40.35 ± 1.60(4)	35.86 ± 2.29(4)	1.05
abm	41.83 ± 1.00(5)	42.04 ± 2.95(4)	45.22 ± 3.82(4)	50.61 ± 0.29(4)***	1.02
abl	41.98 ± 1.04(5)	39.41 ± 3.05(4)	36.65 ± 1.05(4)**	38.19 ± 1.80(4)	0.86
al	43.09 ± 3.44(4)	38.81 ± 2.41(4)	41.94 ± 3.28(4)	38.77 ± 2.16(4)	0.84
Hypothalamic nuclei:					
ME	130.58 ± 9.56(6)	105.59 ± 8.79(4)	106.11 ± 4.56(4)	129.80 ± 9.12(4)	0.37

The results are expressed as mean values(μmoles tyramine oxidized/ g dry wt./h) ± S.E.M. (No. of animals). *$p<0.05$, **$p<0.025$, ***$p<0.005$.

cell layerでCATの低下がみられた。他方、AchEは、cingulate cortex 半3層で有意に増加し、半5層でも増加傾向を示し、扁桃核のn. basolateralisで増加した。b) aggressiveラット；扁桃核では、n. corticalisでCATは有意に減少し、n. basomedialisでも減少傾向がみられた。中隔ではn. fimbrialisでCATは増加し、n. medialisで減少傾向を示した。海馬ではCA3b fieldのstratum oriensでCATは増加し、pyramidal cell layerで減少傾向を示した。他方AchEは特異な変化を示さなかった。c) indifferentラット；扁桃核のn. lateralis posteriorでCATが減少した以外に特異的な変化はみられなかった。以上の結果以外に、cingulate cortex半5層のCATの増加とn. septalis medialisのAchEの低下は、3群のラットに共通した変化であり、muricideラットではcingulate cortex半3層でもCATの増加傾向がみられた。2) Isolationによる MAO活性の変化：a) muricideラット；5HT-MAOは扁桃核のn. corticalisで増加、cingulate半5層で減少した。tyramine-MAOはpiriform cortexで増加した。b) aggressiveラット；5HT-MAOは中隔のn. lateralis、扁桃核のn. centralis及びentorhinal cortexでいずれも増加した。他方、tyramine-MAOは中隔のn. lateralis、扁桃核のn. basolateralis及び海馬CA1 fieldのpyramidal cell layer、CA2-CA3a fieldのstratum oriensでいずれも減少した。c) indifferentラット；5HT-MAOはpiriform cortexで増加し、tyramine-MAOは扁桃核のn. basomedialis及びn. tractus diagonalisで増加した。ところでMAOは2つのtypeに分類されており[6]、5HTはtype Aに特異的な基質であり、tyramineは、type A及びtype Bに共通の基質であると云われている。上記のMAO活性変化は、5HT-MAO及びtyramine-MAOが互いに異る部位であること、又、同一部位でも(aggressiveラット、n. septalis lateralisの場合)変化の方向が逆であることから、それぞれ、5HT-MAO変化はtype Aの、tyramine-MAO変化はtype Bの変化を反映すると考えられる。

これらの結果から、核レベルでは、CAT、AchE及びMAO(type A, type B)活性の変化が各情動行動変化によって異った動きを示すことは興味深い。一般に情動行動の中枢である視床下部に対して中隔は抑制的に、扁桃核はその内部構造によって促進的及び抑制的に作用することが知られている[1]。更に、外界からの刺激が行動の動機(motivation)になり得るか評価する場所として扁桃核は重要である[3)4)]。即ち、isolationという環境刺激は、嗅球などから嗅結節(各情動行動変化に共通してtyrosine hydroxylaseが増加する[8)])を経て扁桃核に至る。今回の各情動行動変化による扁桃核の特異な核での活性変化は、環境刺激変化が、個体にとって、いかなる情動行動の動機になるか扁桃核において選択される際の神経通経に関与していることが考えられる。更に、中隔、海馬及び視床下部の特異な核におけるcholinergic系とmonoaminergic系に変化を生じさせ、これらの神経回路の変化の差が各情動行動変化を引きおこす生物学的背景の一面を物語っていると解釈できよう。

〔文献〕

1) Carmine,D. et al.(1973) Ann. Rev. Physiol. 35,329. 2) Fonnum, F.(1975) J. Neurochem. 24, 407. 3) Fuster, M. J. et al.(1971) Electroenceph. clin. Neurophysiol. 30, 281. 4) Gloor, P. (1960) In Handbook of Physiology(Edited by Field, J. et al.), Sect. 1, 1395. Amer. Physiol. Soci., Washington. 5)平野誠他(1975)神経化学14, 29. 6) Johnston, J. P.(1968) Biochem. Pharmac. 17, 1285. 7) Lorente de No, R.(1934) J. Psychol. Neurol. 46, 113. 8)斉藤雅他(1976)神経化学15, 64. 9)内村英幸他(1975)神経化学14, 25.

11 テトラベナジン投与ラットの脳内モノアミン代謝および行動変化におよぼすイミプラミンの影響
—— セロトニン代謝を中心にして ——

堀　　彰・中河原通夫
渡辺明子・仮屋哲彦　（東医歯大・医・精神）

〔要　約〕

Imipramine の作用機序を明らかにする目的で，tetrabenazine を投与した鎮静ラットに対する imipramine の影響を，行動変化とともに，脳内 monoamine 代謝，とくに，serotonin（5HT）代謝を中心に検討し考察を加えた。

1) tetrabenazine 30mg/kg 投与により約10時間つづく鎮静が得られた。tetrabenazine 投与2時間後の脳内 5HT, norepinephrine（NE），dopamine（DA）は有意に減少し，脳内 5-hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）は有意な増加を示した。　2) imipramine 20mg/kg と tetrabenazine 30mg/kg を投与するとラットに多動状態が出現した。　3) α-methyl-para-tyrosine を前処置すると imipramine と tetrabenazine による多動状態が抑制され，一方 para-chlorophenylalamine を前処置すると imipramine と tetrabenazine による多動状態がさらに増強された。　4) tetrabenazine 単独投与に比較して，imipramine と tetrabenazine の併用投与の場合には，脳内 5HT は，とくに変化を認めなかったが，脳内 5HIAA 濃度は脳脳において有意な減少を示した。　5) これらの結果より，imipramine と Tetrabenazine による多動状態の出現には，NE および 5HT 代謝が重要な役割をはたしていることが考えられる。とくに 5HT 代謝については，imipramine による 5HT の前シナプスにおける再とりこみの抑制のみならず，5HT 合成の阻害が，重要であることが強く示唆された。

Imipramine は三環系抗うつ剤の代表的なものとして臨床的にひろく用いられているが，その作用機序については catecholamine の関与[6),9)]あるいは serotonin（5HT）の関与[4),6)]の重要性が指摘されている。MAO 阻害剤あるいは三環系抗うつ剤と tetrabenazine の併用によってひきおこされる動物の多動状態は従来 reversal[8)] と呼ばれて注目されてきた。MAO 阻害剤と tetrabenazine の併用については，行動変化のみならず脳内 monoamine の変動も詳しく報告[1)]されている。しかし imipramine と tetrabenazine の併用に関しては，その行動変化はかなり検討されているにもかかわらず，脳内 monoamine 代謝の変化については，ほとんど報告されていない。そこでわれわれは imipramine の作用機序を明らかにする目的で，tetrabenazine を投与した鎮静ラットに対する imipramine の影響を，行動変化とともに脳内 monoamine 代謝，とくに 5HT 代謝を中心に検討した。

〔実験方法〕

動物は Wistar 系成熟ラットの雄（200～300g）を用い，午前6時より午後6時までを明期とし，午後6時より翌日の午前6時までを暗期とした。tetrabenazine 30mg/kg を午後7時にラットの腹腔内に注射し，その1時間前に imipramine 20mg/kg を同様に注射した。行動測定は Animex S 型を用い，午後6時より翌日の午前8時まで行なった。脳内 monoamine の定量はすべて tetrabenazine 投与2時間後の午後9時に断頭し，部位脳について測定した。脳内 5HT，5-hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）は終脳，間脳，中脳＋橋＋延髄の3部位について，Giacalone & Valzelli の方法[3)]により定量した。脳内 norepinephrine（NE），dopamine（DA）は，終脳，間脳＋中脳＋橋＋延髄の2部位

3

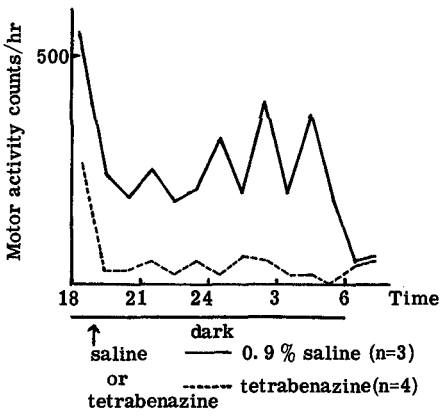
について、karasawa らの方法[5]に準じて定量した。なお行動測定の実験においては、imipramine と tetrabenazine の投与の前処置として、tyrosine hydroxylase 阻害剤である α-methyl-para-tyrosine (α-MT) 250 mg/kg を imipramine 投与10時間前に、また tryptophan hydroxylase 阻害剤である para-chlorophenylalamine (PCPA) 250mg/kg を、imipramine 投与22時間前に、それぞれ腹腔内に注射してその影響についても検討を加えた。

〔実験結果および考察〕

Tetrabenazine投与によるラットの鎮静は Fig.1 に示すとうりである。図には1時間毎の総運動量の変化が示してあり、鎮静は tetrabenazine 注射後約10時間つづいた。tetrabenazine投与後のラットの暗期の1時間あたりの平均運動量は 29±21 counts (M±S.D., n=4) で、0.9%食塩水を注射した対照群の 249±103 counts (M. ±S.D, n=3) に比較して有意に減少を示した。一方 tetrabenazine 注射2時間後の脳内 5HT, NE および DA 濃度は、Table 1に示すように、脳各部位でいずれも有意に減少し、脳内5HIAA濃度は脳各部位で有意に増加した。高橋ら[10][11]はテトラベナジン・モデルによるうつ病の生化学的研究の中で tetrabenazine 注射後のラットの行動変化とともに、脳内 monoamine の変動を報告しているが、われわれの結果も類似の傾向を示した。

そこでわれわれは、tetrabenazine投与1時間前に、imipramine を投与し行動の変化を検討した。その結果 Fig. 2 に示すような多動状態が出現した。この場合、多動状態の開始時刻や持続時間にはかなり個体差が認められたが、脳内 monoamine の定量を行なった時点、すなわち tetrabenazine 注射2時間後の時点では、ほとんどのラットにおいて多動状態が認められた。なお tetrabenazine投与後のラットの暗期の1時間あたりの平均運動量は imipramine と tetrabenazine を併用投与した場合には 305±214 counts (M.±S.D. n=6) で、tetrabenazine 単独投与の場合の 29±21 counts (M.±S.D., n=4)に比較し有意な増加を示した。

Fig. 1 Effect of tetrabenazine on spontaneous locomotor activity



次に、この多動状態の出現に対して、catecholamine と 5HT がどのような役割をはたしているかを検討するために以下の実験を行なった。α-MT を前処置して脳内 catecholamine を減少させておき imipramine と tetrabenazine を投与すると、Fig.3 の破線で示したように多動状態は出現しなかった。tetrabenazine投与後のラットの暗期の1時間あたりの平均運動量は imipramine と tetrabenazine を投与した場合は 305±214 counts (M.±S.D., n=6)であるが、α-MT 前処置により 24±18 counts (M.±S.D., n=3)に減少した。われわれが前に本学会で報告[7]したようにα-MT投与12時間後では DA の減少よりも NE の減少が著明であり、この NE の減少が imipramine と tetrabenazine投与による多動状態をおさえるのに重要な役割をはたしたと考えられる。一方 PCPA を前処置して脳内 5HT を減少させておき

imipramine と tetrabenazine を投与すると，Fig.3の点線で示したように運動量がさらに増加した。この場合の暗期の1時間あたりの平均運動量は707±241 counts (M.±S.D., n=3)で，PCPA前処置をしなかった場合の運動量305±214 counts (M.±S.D., n=6)と比較し有意な増加を示した。このように，PCPA前処置によりさらに運動量が増加したことは，imipramine と tetrabenazine による多動状態の出現にとって，NEのみならず5HT代謝も重要な関与を有していると考えられる。

Table 1 Effect of tetrabenazine on the concentrations of 5HT, 5HIAA, DA and NE in brain parts of rat

		0.9 % saline	tetrabenazine
5HT	TE	0.39 ± 0.03 (7)	0.01 ± 0.01 (4) *
	DI	0.75 ± 0.07 (7)	0.01 ± 0.01 (4) *
	MPM	0.62 ± 0.09 (7)	0.06 ± 0.04 (4) *
5HIAA	TE	0.27 ± 0.03 (7)	0.51 ± 0.06 (4) *
	DI	0.65 ± 0.09 (7)	1.68 ± 0.16 (5) *
	MPM	0.46 ± 0.09 (7)	1.35 ± 0.33 (5) *
NE	TE	0.31 ± 0.08 (4)	0.06 ± 0.01 (3) *
	DI+MPM	0.64 ± 0.09 (3)	0.14 ± 0.06 (3) *
DA	TE	1.17 ± 0.15 (6)	0.03 ± 0.02 (3) *
	DI+MPM	0.21 ± 0.06 (6)	0.04 ± 0.04 (3) *

Mean (μg/g) ± S.D., ( ) : number of animals
TE : Telencephalon, DI : Diencephalon,
MPM : Mesencephalon + Pons + Medulla oblongata
* : $p<0.01$ compared with 0.9 % saline group

そこで imipramine と tetrabenazine を投与して，tetrabenazine 投与2時間後に多動状態の出現したラットについて，脳内5HTおよび5HIAA濃度について検討を加えた。その結果は Table 2 に示す通りである。tetrabenazine 単独投与群に比較して，imipramine と tetrabenazine の併用投与群の場合には，脳内5HT濃度はとくに変化を認めなかったが，脳内5HIAA濃度は間脳において有意な減少を示し，他の部位においても減少の傾向を示した。

Fig. 2 Effect of imipramine on the decreased locomotor activity induced by tetrabenazine treatment

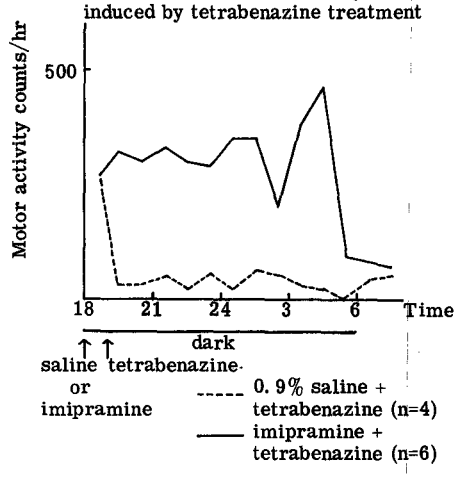
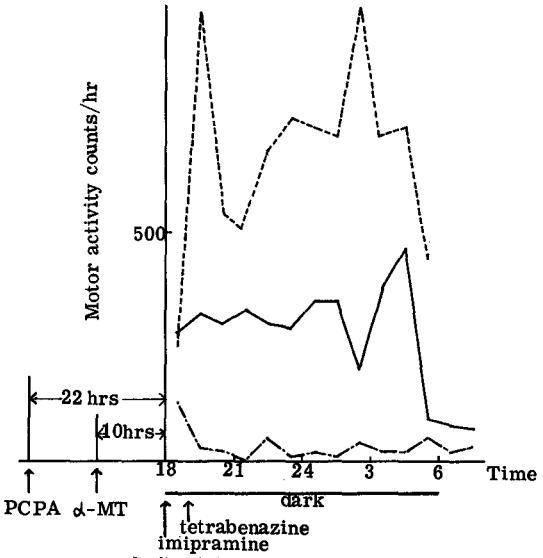


Fig. 3 Effect of α-MT or PCPA on the locomotor activity in rats injected with imipramine and tetrabenazine.



Imipramineをはじめとする三環系抗うつ剤はmonoamineの前シナプス膜への再とりこみを阻害することにより作用をあらわすと考えられている。そしてCarlssonら[2]はimipramineは5HT neuronのシナプスにおける5HTの再とりこみをより強く阻害し，一方desmethylationされたdesipramineは、NEの再とりこみをより強く阻害することを報告している。われわれの実験結果において、tetrabenazine単独投与に比較してimipramine前処置により，間脳で脳内5HIAA濃度が減少したことは、5HTの前シナプス膜への再とりこみの阻害により、MAOによる5HTの分解が減少したことが考えられる。しかしこのimipramineとtetrabenazineを併用投与した条件において、PCPAを前処置し、5HT合成を阻害した際には、imipramineとtetrabenazineによる多動状態がさらに強められた。このことから、imipramineとtetrabenazineによる多動状態では、imipramineが5HT合成に対して，抑制的に作用したことも強く示唆された。

Table 2 Effect of imipramine pretreatment on the concentrations of 5HT and 5HIAA in brain parts of the tetrabenazine injected rat

		0.9% saline + tetrabenazine	imipramine + tetrabenazine
5HT	TE	0.01 ± 0.01 (4)	0.01 ± 0.01 (4)
	DI	0.01 ± 0.01 (4)	0.02 ± 0.02 (4)
	MPM	0.06 ± 0.04 (4)	0.13 ± 0.13 (4)
5HIAA	TE	0.51 ± 0.06 (4)	0.42 ± 0.05 (4)
	DI	1.68 ± 0.16 (5)	1.22 ± 0.19 (5) *
	MPM	1.35 ± 0.33 (5)	1.03 ± 0.19 (5)

Mean (μg/g) ± S.D. , ( ) : number of animals
TE : Telencephalon, DI : Diencephalon,
MPM : Mesencephalon + Pons + Medulla oblongata
* : $p<0.01$ compared with the 0.9% saline + tetrabenazine group

なお、この条件における脳内catecholamineの変動については現在検討中であるが、tetrabenazine単独投与群に比較して，imipramineとtetrabenazineの併用投与群では、脳内DA濃度は変化しないが、脳内NE濃度の増加の傾向が得られており、このことも注目される。

謝辞：最後に本研究に御協力いただいた俣賀宣子，古川和子の両氏に感謝いたします。なお本研究に用いたimipramineは日本チバガイギー社，tetrabenazineは武田薬品の供与によった。

〔文献〕

1) Aprison, M. H., Kariya, T., Hingtgen, N. & Toru, M. : J. Neurochem., 15 : 1131 (1968)
2) Carlsson, A., Corrodi, H., Fuxe, K. & Hökfelt, T. : Europ. J. Pharmacol., 5 : 357 (1969)
3) Giacalone, E. & Valzelli, L. : Pharmacology 2 : 171 (1969)
4) Himwich, H. E. : In "Biochemistry, schizophrenias and affective illness" edited by Himwich, H. E., The Williams & Wilkins Co. Baltimore, (1970)
5) Karasawa, T., Furukawa, K., Yoshida, K. & Shimizu, M. : Japan. J. Pharmacol., 25 : 727 (1975)
6) Koe, B. K. : In "Antidepressants" ed. by Fielding, S. & Lal, H., Futura Publishing Co. (1975)
7) 中河原通夫，堀 彰，新垣米子，渡辺明子，杉崎哲郎，保屋普彦：神経化学，13：5（1974）
8) Niemegeers, C. J. E. : In "Antidepressants" ed. by Fielding, S. & Lal, H., Futura Publishing Co. (1975)
9) Schildkraut, J. J., Schanberg, S. M., Breese, G. R. & Kopin, J. J. : Amer. J. Psychiat., 124 : 600 (1967)
10) 高橋 良，Aprison, M. H. & Tachiki, K. H. : 日本臨床，34：2712（1976）
11) 立石紀昭，仲村永徳，永山治男，桜井征彦，高橋 良，：精神薬療基金年報，5：82（1973）

12 高フェニールアラニン血症動物の脳におけるTyrosine hydroxylase, Tyrosine decarboxylaseにおよぼすインスリンの影響

沖田美佐子 ・ 金行孝雄
庄盛敏廉 ・ 高坂睦年
（岡大・医・脳代謝研・病態生化）

〔要 約〕

われわれは高Pheに対するインスリンの効果を検索中であるが，今回はWistar系ラットにインスリンを注射してTyrからカテコラミン及びTyramineへの代謝に及ぼす影響をカテコラミン値及びTyrosine Hydroxylase（TH），Tyrosine Decarboxylase（TD）活性の変化から検討した。また，ラットにPheを1週間注射して高フェニールアラニン血症状態とした場合のインスリンの作用についても同様に検討した。

(1). 正常ラットにインスリンを注射すると血漿中のDA，NEは減少し，Eおよび Tyramineは増加した。脳では有意差を認めることはできなかったが血漿中の値の動きと同様な変化を示した。

(2). 脳のTH活性はインスリンを注射すると正常ラット，高フェニールアラニン血症ラットいずれにおいても有意な活性値の高まりを示した。また，高フェニールアラニン血症ラットは正常ラットに比べてTH活性が有意に増加した。

(3). 脳のTD活性は，正常ラットではインスリン注射群が有意な高値を示したが，高フェニールアラニン血症ラットではインスリン注射による活性値の変化は認められなかった。高フェニールアラニン血症ラットは正常ラットに比べTD活性は高い。肝においても同様な結果を得た。

(4). 以上，正常ラットでは，インスリンによりTH，TD共に活性が高まり，カテコラミン，Tyramine合成の増加が推測されるが，DA，NEが増加していない点からDA以下の代謝経路の賦活化も示唆すると考えられた。

フェニールケトン尿症治療の試みとして患者にインスリンを注射した結果，血漿中カテコラミンの増加する例やTyramineが一時的に著明に増加する例を認めた。また，正常人においてもインスリン注射後，尿中HVA排泄量の増加することを知り，インスリン注射がカテコラミン及びチラミン合成を促進するのではないかと推測された。[1] そこで今回は脳内のTH及びTD活性に及ぼすインスリン注射の影響について検討した。

実験方法

1．実験動物

Wistar系雄ラットで体重80~100gのものを使用した。高フェニールアラニン血症の作成にはL-Pheを Triton X-100を用いて水に懸濁させたものを50 mg/100g体重，1日2回，7日間腹腔内に投与した。正常群にはTriton X-100を含む生理食塩水を投与した。8日目に高フェニールアラニン血症群には100 mg/100g体重のL-Pheを，正常群には生理食塩水を投与し，その60分後に，インスリン投与群にはレギュラーインスリン0.1 IU/100g体重を筋注した。更に60分経過後，断頭して採血，頭部は液体窒素中で数秒間固定した後，脳をとり出し，同時に肝も摘出し，それぞれ氷冷生理食塩水で洗浄したものを実験に供した。

2．測定法

TH活性の測定は脳striatumを用いてCoyleら[2]の方法により行った。血漿中カテコラミンの測定は岸川[3]の方法によった。Phe，Tyrは蛍光法により測定した。

TD活性の測定方法はChristensonら[4]の方法を改変したものである。L-(1-^{14}C)-Tyr (specific activity 54.6 mC/mmol, New England Nuclear) はアルミナ処理後 Amberlite IRC-50

(Na^+)カラムにより精製した。組織は5倍量の生理食塩水（0.2% Triton X-100を含む）でホモジナイズして10,000 x g 10分間遠沈した上清を酵素液として使用した。side armを有する内径18mm，長さ10cmの試験管を用いて，緩衝液，2mM Pyridoxal phosphate 300mM 2-Mercaptoethanol及び酵素液（蛋白量 約4mg）を入れ 37°C．10分間 pre-incubationを行ったのち，L-Tyr 及び L-[1-^{14}C]-Tyr（100,000 cpm）を加え，side armには35% TCAを入れる。一方，沪紙片（15x25mm）をNCSで湿らせたものを試験管内につるして密栓する。37°C で120分間反応させた後 side armより TCA を加えて反応をとめ，次いで37°C で30分間振盪して，発生したCO_2を沪紙片に吸着させる．この沪紙片をトルエンシンチレーターに浸して液体シンチレーションカウンターで測定した．酵素活性はTyrより生成したCO_2の量で表わした。

実験結果及び考察

1．血漿及び脳内 Phe，Tyr 値

Phe投与ラットの血漿中 Phe 値は正常ラットの約30倍に，Tyr 値も約3倍に増加した。インスリンを注射すると，高フェニールアラニン血症ラットの血漿中 Phe値は有意に低下し（$P<0.025$），Tyr値は有意に増加した（$P<0.005$）。(図1)　脳(Cortex)でも Phe投与群の Phe値は正常群の約8倍に増加，Tyr 値も明らかに増加した。インスリン注射は高フェニールアラニン血症ラットの脳内 Phe値を有意に低下させる（$P<0.005$）とともにTyr 値を有意に増加させた（$P<0.005$）。(図2)　このようにインスリンは，高フェニールアラニン血症ラットにおける Phe から Tyr への代謝を促進するということが認められた。

2．カテコラミン，チラミン値

正常ラットにインスリンを注射してカテコラミン，Tyramine 値を測定した結果，血漿では DA（$P<0.025$），NE（$P<0.005$）が低下し，E（$P<0.005$）が増加，Tyramineも増加した（$P<0.005$）。脳では有意差を認めることはできなかったが，血漿と同様な

図1. PHENYLALANINE AND TYROSINE LEVELS IN RAT PLASMA

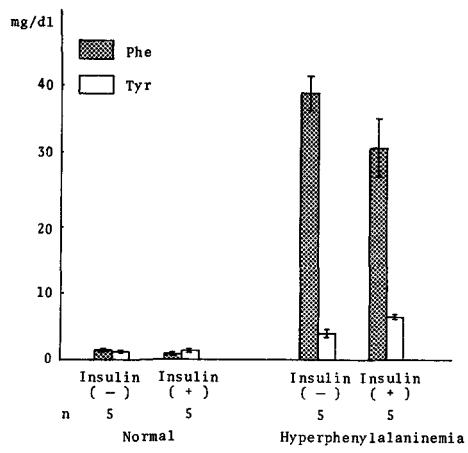
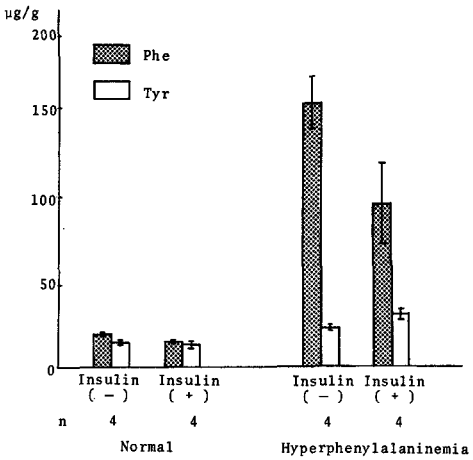


図2. PHENYLALANINE AND TYROSINE LEVELS IN RAT BRAIN



傾向であった。(表1)

3. Tyrosine Hydroxylase 活性

高フェニールアラニン血症群の TH 活性は正常群に比べて有意に高い。インスリンは正常群，高フェニールアラニン血症群いずれの群でも，有意に活性値を高めた。(図3)

4. Tyrosine Decarboxylase 活性

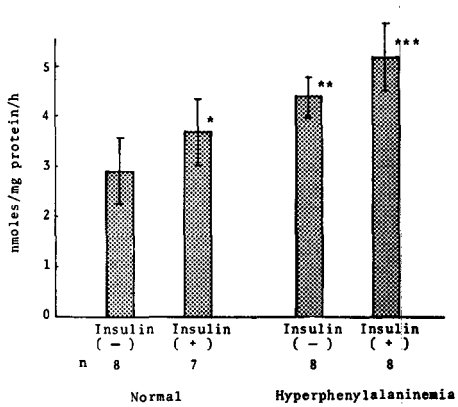
Aromatic Amino acid Decarboxylase に関する文献の中で Tyr の Decarboxylase に関するものは少なく，脳におけるこの酵素の性格は明らかでない。そこでまずこの酵素について検討した結果，至適 pH は 7.8，基質濃度は Tyr が水に難溶のため，5×10^{-4}M 以上には濃度をあげることができなかったが，検討した濃度範囲内では 5×10^{-4}M で最も高い活性を示した。脳部位別分布では striatum (207.8 n moles CO_2/g protein/h)，次いで diencephalon (158.4)，brain stem (69.8)，cortex (61.7) cerebellum (34.3) であった。また，組織別分布では，脳 (striatum + diencephalon): 228.5 ± 10.5 n moles CO_2/g protein/h，肝: 3411.0 ± 179.5 n moles CO_2/g/h，腎: 2463.0 ± 128.8 n moles CO_2/g/h であった。

表1. 血漿および脳内 Catecholamine, Tyramine 値

	Plasma (ng/ml)		Brain (μg/g)	
	Insulin (−)	Insulin (+)	Insulin (−)	Insulin (+)
n	12	6	8	6
Dopamine	1.36 ± 0.23	0.53 ± 0.10	0.774 ± 0.101	0.469 ± 0.071
Norepinephrine	3.23 ± 0.50	0.42 ± 0.09	0.075 ± 0.013	0.024 ± 0.004
Epinephrine	1.82 ± 0.29	5.69 ± 0.51	0.003 ± 0.001	0.007 ± 0.002
Tyramine	3.56 ± 0.55	8.56 ± 1.13	0.003 ± 0.001	0.021 ± 0.004

Mean ± S.E.M.

図3. TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT BRAIN



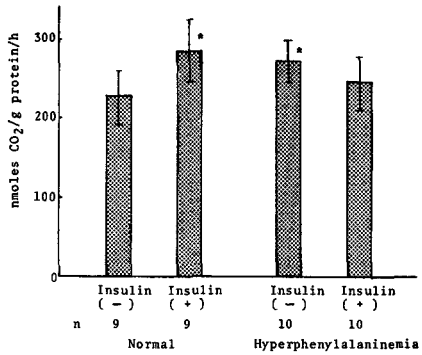
*p < 0.05, **p < 0.005 ; compared to Normal Insulin (−) group

***p < 0.025 ; compared to Hyperphenylalaninemia Insulin (−) group

そこで，TD 活性の測定は，脳は striatum と diencephalon 部分を合せて用い，pH 7.8，L-Tyr 5×10^{-4}M の条件下で行った。肝も同条件とした。結果は，高フェニールアラニン血症群では正常群に比べて有意に TD 活性が上昇していた。インスリン注射により，正常群は明らかに活性が高まった。しかし，高フェニールアラニン血症群ではインスリンによる活性の変化は認められなかった。このことは，脳，肝いずれも同じ結果であった。(図4，5)

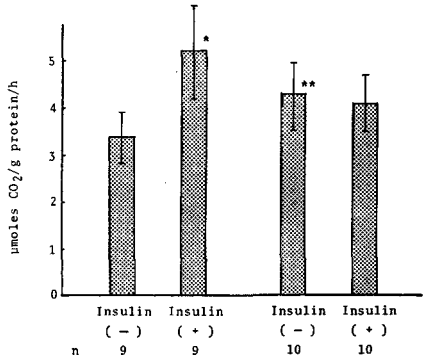
以上の結果より，インスリンが正常ラットの TH 及び TD の活性を明らかに高めることを認めた。TD 活性が増加していることは，同時に DOPA Decarboxylase の活性も増加していることを推測せしめ，DA 生成は増加するものと考えられる。今回作成した高フェニールアラニン血症ラットは血漿中 Phe のみならず Tyr も上昇しているため，人におけるフェニール

図4. TYROSINE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN RAT BRAIN



*p < 0.005 ; compared to Normal Insulin (−) group

図5. TYROSINE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN RAT LIVER



*p < 0.005, **p < 0.025 ; compared to Normal Insulin (−) group

ケトン尿症の状態とはかなり異なっている。
フェニールケトン尿症では高レベルの Phe によって TH が阻害を受け，カテコラミン生成が低下するのではないかという報告もある[5,6]が，Phe 過剰投与により作成した高フェニールアラニン血症における本実験結果では，血漿 Phe 値の上昇により，逆に酵素活性は高まり，Tyr 以下の流れは増加していると考えられた。また，David ら[7,8]は血漿中 Tyr 値が高くなれば decarboxylation がその主要代謝経路になるのではないかといっており，われわれの結果でも高フェニールアラニン血症状態では明らかに TD 活性は高まっていた。しかし，インスリンによっては もはや活性の変化はなく，TD 活性の促進には Tyr 濃度の影響は大であるが限界があるようであった。いずれにしても，インスリンが TH 及び TD 活性を高めることは事実である。

文　献

1. 沖田美佐子，岡山医誌，88 : 697-708, 1976.
2. Coyle, J.T., Biochem. Pharmacology, 21 : 1935-1944, 1972.
3. 岸川秀実，岡山医誌，87 : 451-462, 1975.
4. Christenson, J.G., Dairman, W. and Udenfriend, S., Arch. Biochem. Biophys., 141 : 356-367, 1970.
5. Fellman, J.H., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 93 : 413-414, 1956.
6. De Rapp, R.S., Brain Res., 2 : 323-332, 1966.
7. David, J.C., Dairman, W. and Udenfriend, S., Arch. Biochem. Biophys., 160 : 561-568, 1974.
8. David, J.C., Dairman, W. and Udenfriend, S., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71 : 1771-1775, 1974.

13 胎生期における高フェニールアラニン血症ラッテの発達過程に伴う脳内酵素活性の変化について

金松知幸・高木芳夫・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母親から生まれた子供は，フェニールアラニン（Phe）水酸化酵素に異常がないにもかかわらず，精神薄弱を残す例はしばしば報告されている。このことは胎生期の高 Phe 血症が生後の脳組織の発達を阻害することを示唆している。そこで，発達過程における物質代謝の異常の有無を検討する目的で脳組織，特に酵素活性の変化について研究を行なった。

実験動物の作成は血中の Phe 濃度を長時間高濃度に持続させること，低栄養の影響を避けることの2点に留意し，Wistar系ラッテを用い，妊娠10日目よりゾンデによる強制負荷と高 Phe 含有飼料により，L-Phe を体重 100g 当たり1日平均約 400mg を負荷し，出産後の仔ラッテ8匹を，正常に飼育した出産直後の母ラッテに養育させた。

胎生期に Phe 負荷を受けた仔ラッテの生後の発達過程に従って全脳と外套部の重量および脳内酵素の活性量を調べ，次の結果を得た。①．Phe 負荷群で全脳は生後1日目より20日目の間は正常値より低下の傾向が認められたものの有意の差は認められなかった。また外套部においては，生下時と生後15日目に有意の減少が認められた。②．脳組織の ChAc の活性は全発育過程を通じ，Phe 負荷群と正常群の間に差は認められなかったが，AdE および CNPase においては生後15日目に Phe 負荷群において有意の減少が認められた。

フェニールケトン尿症の母親から生まれた子供は，Phe 水酸化酵素に異常がないにもかかわらず，精神薄弱を残す例はしばしば報告されている。[5,2,3] このことは胎生期の高 Phe 血症が生後の脳組織の発達を阻害することを示唆している。第18回日本神経化学会において[10]，我々は妊娠ラッテを用い実験的に胎生期後半のみを高 Phe 血症にし，その母ラッテから生まれた仔ラッテが生後6ヶ月目で知能遅滞を生じていることを示した。今回は，発達過程における物質代謝の異常の有無を検討する目的で脳組織，特に酵素活性の変化について研究を行なった。

〔実験方法〕

(1) 実験動物；動物は Wistar系の確定妊娠ラッテを用い膣内に精子の存在を認めた日を0日とし，妊娠10日目より20日目まで以下の方法で Phe 負荷を行なった（表-1）。

10～20％の L-Phe の suspension をゾンデを用いて，経口的に投与した。午前10時と午後3時にラッテの体重 100g 当たり 100mg の Phe を負荷すると共に，午前10時から午後8時の間は正常の固形飼料（オリエンタル酵母製）を飼料として与え，午後8時より翌朝10時の間は7％の L-Phe を含む固形飼料（日本クレア製）で飼育を行なった。Phe 負荷群より出生した仔ラッテは，

Table 1. DIAGRAM OF METHOD FOR EXPERIMENTAL GROUPS

Experimental Group	Gestation Period (10 Days of Gestation ——— Birth)		Type of	Cross-Fostering at Birth	Postnatal Period	
					Number Litter	Feeding to 21st Day
Control	Normal Diet ad lib.		C	------	8	Normal Diet (from Birth)
High Phe	Day	Normal Diet, ad lib. + L-Phe Loading *	P	P —— C	8	Normal Diet (from Birth)
	Night	7% L-Phe Diet ad lib.				

* AM 10:00—PM 8:00 : 100mg of L-Phe per 100g-body weight was administered by tube feeding at intervals of 5hrs, twice a day.

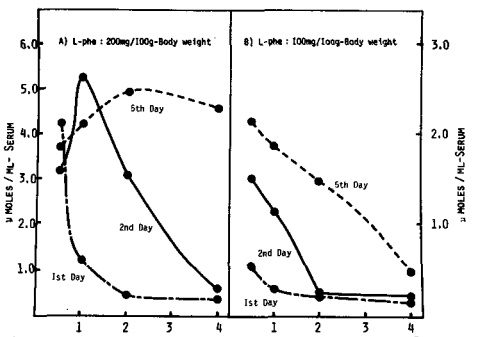
正常の飼料で飼育した出産直後の母ラッテに移し，正常の母乳で養育させた。[10]

〔2〕 化学定量；1). 遊離アミノ酸の定量：Pheおよび Tyrの定量は主に Paul W.K. Wong[7]らの方法に従った。2). タンパク量は Lowry[4]らの方法に従い定量した。3). Ach 合成酵素（ChAc）並びに分解酵素（AchE）の活性測定：これらは各々 McCaman[6] および Fonnum[11]の方法に従い，基質は Acetyl-1-^{14}C CoA（NEN：52.4mCi/m mole）および〔1-^{14}C〕Acetyl choline chloride（NEN：10.2mCi/m mole）を用いた。4). 2', 3' cyclic nucleotide 3' phosphohydrolase（CNPase）の測定：CNPaseは Kurihara, Tsukada[3]らの方法に従い測定した。

〔結果および考察〕

高 Phe 血症動物の作製は従来て% L-Phe を含む固形飼料で飼育することにより行なわれていた。[10] 胎生期の一定期間のみ高 Phe 血症状態を継続させるためには，可及的速やかに血中 Phe 値を上昇させる必要がある。ラッテは夜行性であり夜間の飼料の摂取量が多いと考えられるので，表-1に示すようにゾンデによる L-Phe の強制負荷と正常飼料の摂取とを併用させるようにした。ラッテに体重 100g 当たり 200mg あるいは 100mg の L-Phe を負荷し，上記に述べた飼育方法を続けた場合，母を通うにつれ負荷後の血中 Phe 濃度の時間的変化がどのように変わるかを調べてみると（図-1），L-Phe 200mg を初回負荷した場合，投与後30分で Phe は正常の約5倍の 4.3μmoles/ml を示し，その後急激に減少し，4時間後にはほぼ正常値に達した。しかし，2回目，5日目では血中濃度の最高値を示す時点は各々投与後1時間30分，3時間と遅くなると共に，投与後4時間の値も各々正常の7倍，6.0倍と次第に高値を示すようになる〔図-1-a〕。

Fig.1. PHENYLALANINE CONTENTS IN RAT SERUM AFTER PHENYLALANINE LOADING



以上の結果は，この方法で高 Phe 血症動物を作りうることを示している。L-Phe 100mg 投与の場合も 200mg 投与群程ではないが，投与後4時間目で5日目の血中 Phe 値は2日目の2倍を示しており，100mg 投与の場合も充分高 Phe 血症を継続させ得ることを示唆した。〔図-1-b〕。今回の実験群の作製は表-1に示すように 100mg 負荷の方法を用いてつるが，このことは 200mg 投与の場合では，妊娠後期10日間の負荷によって，妊娠の継続および出生後の生長が困難となったことに基づいている。この実験群から生まれた仔ラッテの生下時の血液中および脳組織内の遊離アミノ酸の値は，表-2に示した。脳組織の遊離 Phe および Tyr 濃度は各々正常値の約1.5倍，6倍であり，血中の Phe および Tyr 濃度はともに約2倍であった。妊娠母ラッテは出産前後にほとんど餌の摂取を行なわない上，Phe の強制負荷も出産当日は行なわないことなどから，脳および血中の phe 値は高値を示さなかったと思われる。以上のことを考え合わせると，この方法

Table 2. PHENYLALANINE AND TYROSINE CONTENTS IN SERUM AND BRAIN TISSUE OF MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIC RAT

CONDITION		PHE	TYR
SERUM μ moles/ml	CONT	0.07	0.06
	HIGH PHE	0.12	0.13
BRAIN μ moles/g	CONT	0.09	0.05
	HIGH PHE	0.12	0.29

によって胎生期に高 Phe 血症を呈しているものと考えられた。

一方，Phe を負荷した母ラットの体重の変化を妊娠経過を追って3例の群について調べると，負荷を始めた妊娠10日目を1.0とした場合，出産前日の妊娠20日目は1.15±0.09であり，正常群における1.26±0.06と比べると前回の報告[10]程負荷による母ラットの体重増加率の減少は認められなかった。このことは L-Phe の負荷と正常食の摂取とを併用した結果，飼料の摂取量が比較的増加したためと思われる。ちなみに日中と夜間の飼料摂取量を調べてみると，その1日平均摂取量は次のようであった。日中 Phe 100mg を2回にわけて負荷した例で，体重100g当り日中6gの正常食を，夜間4gの7% L-Phe 含有飼料を摂取していた。

Table 3. WEIGHTS OF BRAIN PARTS OF NEW BORN AND 15 DAYS OLD RAT IN MATERNAL PHENYLALANINEMIA

Condition	New Born			15 Days		
	Exp. No.	Whole Brain (mg)	Mantle (mg)	Exp. No.	Whole Brain (g)	Mantle (g)
Control	14	235.5±22.9	122.6±12.9	10	1.20±0.06	0.76±0.03
High Phe	15	210.8±22.7	106.7±14.4	6	1.13±0.06	0.70±0.03

Phe 負荷群の生後の脳組織における発育過程の変化をみると（表-3）生下時の全脳重量は低下の傾向を示したが，有意の差としては認められなかった。しかし，外套部においては生下時および生後15日目に Phe 負荷群で有意の低下を示した。外套部は脳の細胞構築の面から胎生期で特に注目される部分であり，胎生期の Phe 負荷の影響は特にこの外套部におよんでいると思われる。そこで実験群より生まれた仔ラットの脳外套部について単位タンパク当りの酵素活性の変化を追求した。〔表-4〕

Table 4 DEVELOPMENTAL CHANGES OF ENZYME ACTIVITIES IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIC RAT BRAIN

Days after Birth		1	5	10	15	20
ChAc nmol./h/mg-Protein	Cont	2.06±0.97 (7)	3.00±1.77 (7)	5.58±1.05 (8)	16.7±2.5 (5)	20.0±5.0 (8)
	High Phe	1.37±0.58 (11)	2.46±0.78 (11)	6.35±1.54 (11)	15.7±2.6 (11)	23.2±6.5 (8)
Ach E μmol./h/mg-Protein	Cont	0.70±0.16 (7)	1.55±0.30 (7)	2.41±0.36 (9)	3.48±0.80 (6)	4.34±1.04 (9)
	High Phe	0.66±1.42 (11)	1.31±0.27 (11)	2.09±0.56 (11)	2.89±0.35 (11)	4.20±0.60 (8)
CNPase μmol./min/mg-Protein	Cont	0.26±0.09 (6)	0.25±0.06 (6)	0.34±0.07 (6)	2.20±0.33 (5)	2.79±0.55 (6)
	High Phe	0.13±0.04 (11)	0.17±0.03 (11)	0.31±0.08 (11)	1.24±0.30 (11)	2.49±0.50 (8)

* Experimental numbers were given in parentheses.

神経細胞の指標として Ach 合成酵素の変化をみると，生後10日目より20日目にかけて大きく増加するが，実験群では正常群に比べ生後5日目まで低値を示してはいるが，発達過程の各時点で有意の差を認めることはできなかった。

また，Ach E の活性は生後20日目まで Phe 負荷群で低値の傾向があり，特に15日目で有意の低値を示し，外套部当たりの活性においても同様な結果を示した。〔図-2〕

Ach E は神経細胞以外に局在することが知られているが本酵素活性の低下，特に15日目で有意の低値を示すことは神経膠細胞などの発達障害と関連することを示唆する。

ミエリンの指標酵素で，oligodendroglia にも局在すると言われている CNPase の酵素活性は生後10日目より20日目にかけて急激に増加することが知られているが，Phe 負荷群においては，生後15日目で有意の減少が認められ，20日目でもなお低値を示していた。この場合も，外套部当りの活性はやはり15日目で有意の低下を示し，胎生期の Phe 負荷によって，活性増加の立ち上がりに遅れが生じることが認められた〔図-3〕。

塚田ら[7,8,11]は，実験的甲状腺機能低下症など，知能低下を示す代謝異常症を用いて，知能の遅滞とCNPaseの活性低下とが，密接に関連することを示唆している。

Fig. 2 DEVELOPMENTAL CHANGES OF AchE ACTIVITY OF MANTLE IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIC RAT BRAIN

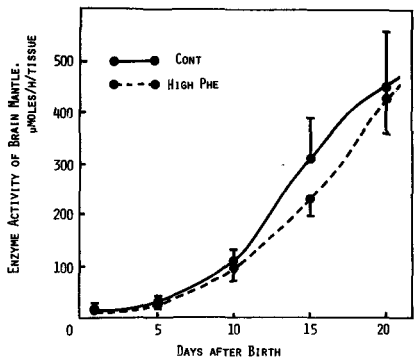
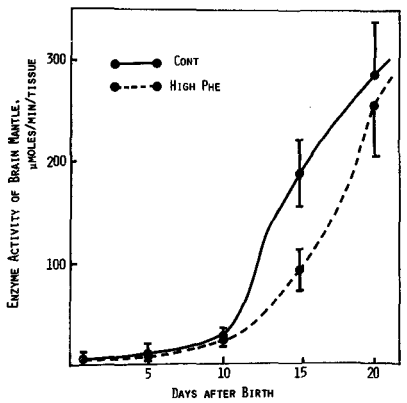


Fig. 3 DEVELOPMENTAL CHANGES OF CNPase ACTIVITY OF MANTLE IN MATERNAL HYPERPHENYLALANINEMIC RAT BRAIN



本実験における胎生期phe負荷群も，生後6ヶ月目で知能遅滞を起こしていることを確かめているが，CNPaseの活性低下，特に生後15日目の急速に脳の発達が起こる時期で，その低下が有意の差で認められたことは，胎生期のphe負荷が脳の発達障害特に，神経膠細胞と関連していることを示唆するもので，今後生後の脳発達におよぼす胎生期の影響について多面的に追求を進めて行くつもりである。

終わりに本研究に御協力を頂いた鳥谷部祐子研究員に深謝します。

〔文献〕

1. Fonnum,F. ; Biochem.J., 115, 465, (1969).
2. Kurihara,T. and Tskada,Y. ; J.Neurochem. 14, 1167, (1967).
3. L.J.H.Arthur,M.B.,M.R.C.P., and J.D.Hulme,S.R.D. ; Pediatrics, 46, 235, (1970).
4. Lowry,O.H., Rosenbrough, N.I., Farr, A.L. and Randall, R.J. ; J.Biol.Chem. 193, 265, (1951).
5. Mabry,C.C., Denniston,J.C., Nelson,T.L. and Son,C.D. ; New England J.Med. 269,1404, (1963).
6. McCaman,R.E. and Hunt,J.M. ; J.Neurochem. 12, 253, (1965).
7. 野口，須田，塚田；神経化学，14，140，(1975)
8. 野村，塚田；神経化学，12，24，(1973)
9. Paul w.K.Wong, Margaret E.O'Flynn, and Tohru Inouye. ; Clin.Chem. 10, 1098, (1964).
10. 辻本，永吉，平野，中井；神経化学，14，9，(1975)
11. 塚田裕三；蛋白質・核酸・酵素，22，833，(1977)

14 脊髄ノルエピネフリン作働性ニューロンの血圧制御について

丹羽正美・*河野輝昭
*藤田雄三・尾崎正若
（長崎大・医・2薬理 *脳外）

〔要　約〕

特くに背髄における血圧制御機構としての　.カテコールアミン(CA)ニューロンの生化学的側面を探るために6-hydroxydopa(6-OHDOPA)を高血圧自然発症ラット(SHR)の胎生19日目と21日目に作用させた。生後12週令で脳各部位CA含有量を測定するとドーパミン(DA)量には変化はなく　延髄・橋，小脳でノルエピネフリン(NE)が増加し．背髄において著明な減少をみた。これらラットの血圧は12週令までには対照群と同程度の高血圧状態を示した。　50～60週令にα-methyldopaを投与すると対照群に比して降圧効果が著明に抑制され．この現象は背髄内のα-methylnorepinephrineの著明な減少によく一致していた。　さらに背髄C4レベルに6-hydroxydopamine(6-OHDA)を注入し注入部位尾側のCA含有量が減少したSHRでもα-MDPの降圧効果が抑制されたことから α受容体を介する血圧下降中枢とされる孤束核以外に　背髄に血圧下降に関係するNE性の機構の存在が示唆された。又．6-OHDOPA投与後再生される背髄内カテコールアミンニューロンは機能的回復をともなわないことが示唆された。

近年　中枢ノルエピネフリン作働性ニューロンの機能の異常が病態生化学的立場から論じられている。実験的高血圧症の領域においても血管運動中枢の生化学的側面がNEニューロンとの関連において検索されはじめている(1)。今回，我々は中枢NEニューロンを破壊した高血圧自然発症ラット(SHR)ではα-methyldopa(α-MDP)の降圧効果が現われにくいことに注目しつつ，これら実験動物におけるα-MDPの代謝物であるα-methyldopamine(α-MDA) α-methylnorepinephrine(α-MNE)を内因性カテコールアミン(CA)と同時に電子捕捉装置を用いたガスクロマトグラフィー(GC-ECD)で測定することによって背髄内NEニューロンの代謝と機能(血圧下降作用)に対して検討を加えた。

<実験方法>

SHRの胎生19日目と21日目に母体開腹下に6-OH-DOPA 50μg/gを直接皮下に投与した。対照群には溶解液(生理的食塩水．含0.1%アスコルビン酸)のみを注入した。血圧はplethysmographによって測定した。　背髄内6-OH-DA投与実験には　雄20～25週令のSHRを用い　ネンブタール麻酔下でC4頸椎弓切除後　定位脳手術的に中心より両側1mm，深さ1mmに　それぞれ2μg(1μl)ずつ3分間で注入した。対照群には溶解液のみを1μlずつ注入した。α-MDPおよびMK-486は0.2% CMC-生理的食塩水溶液に懸濁し腹腔内に投与した。12週令の胎生期6-OHDOPA処置および溶解液注入SHRの．内因性CAはSchellenbergerとGordonの方法(5)に準じた。α-MDP投与後　4時間の組織CA α-MDA．α-MNEはGC-ECDによって同時定量した。この時　組織からのCA抽出は．Wang, M-T. et al(6)の方法により，抽出されたCAをPFPA誘導体に転じた。GC-ECDのガラスカラムには2% OV-105 chromosorb W. DMCS.を充填した。

Fig.1

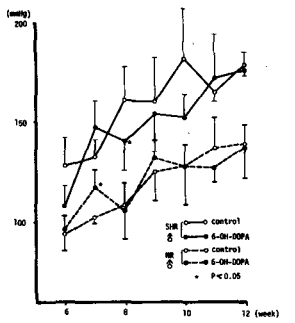
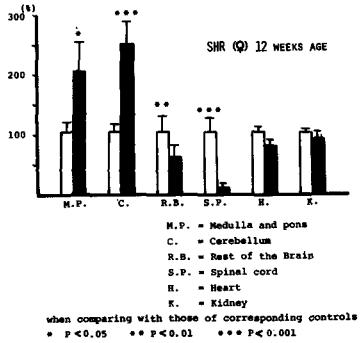


Fig.2



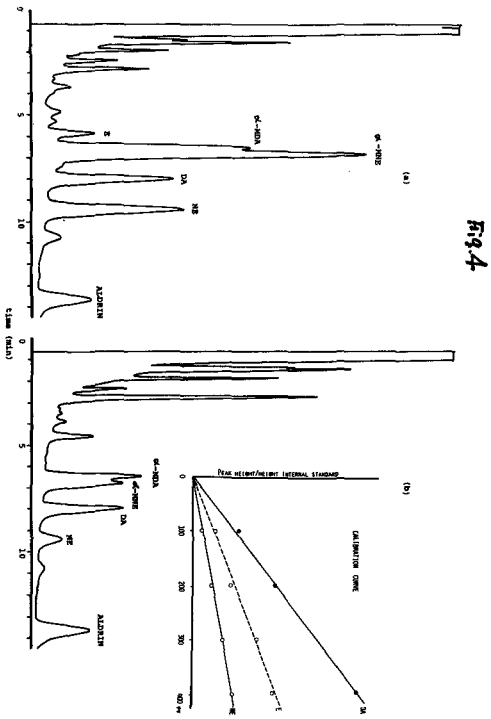
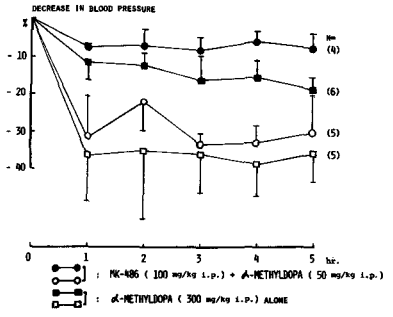


Fig.4

<実験結果>

SHR胎生末期6-OHDOPA処置で生後 血圧はFig.1に示すように高血圧発症前期(6~8週令)で動揺する傾向を示すが 12週令に至って対照群と同程度の高血圧状態に達する。(6-OHDOPA群176±4mmHg,対照群179±6mmHg) この時期 組織NE含有量は延髄-橋.小脳で著明な増加 背髄 残脳部で著明な減少を示し同時に測定した心臓および腎臓のNEには有意な変化は観察されなかった。(Fig.2) これらのラットは以降. 恒常的に高血圧状態を維持し50~60週令でα-MDP 300 mg/kg 腹腔内(i.p.)に投与すると対照群(□—□)では初期値の約40%前後の降圧効果が見られるのに対して 6-OHDOPA群(■—■)では約16%前後の降圧効果をみるにすぎなかった。(Fig.3) さらにα-MDP投与1時間前にMK-486 100 mg/kg i.p. 投与後 α-MDP 50 mg/kg i.p投与すると対照群(○—○)で300mg/kg単独投与と同程度の降圧効果が見られるのに比して 6-OHDOPA群(●—●)ではさらに降圧効果が抑制された。(8.6%)(Fig.3)

Fig.3 EFFECT OF α-METHYLDOPA ON SYSTOLIC BLOOD PRESSURE



α-MDP 300 mg/kg i.p.投与後 最大の降圧が得られる4時間後におけるα-Mdpの代謝物であるα-MDAとα-MNEを内因性(Aと同時に測定した結果がTable 1,2である。Fig.4はα-methyl誘導体を含くんだ(Aのガスクロマトグラムで a)は authentic amines b)は ラット視床下部より抽

出したCAの測定例を示している。Table 1に示したようにα-MDAはいずれの部位でも有意な差はなく それに反して α-MNEは 延髄-橋で増加、背髄で著明に減少していた。(6-OH DOPA群は対照群の約15%程度しか存在していなかった) 内因性CAの変動については Table 2に示す通り 視床下部、背髄と副腎において、DAが、対照群にα-MDP投与したもの(control-αMDP)と対照群にVehicle投与したもの(control-Vehicle)の間に有意な差を認めた以外、著明な変動を認めることはできなかった。背髄(4髄内6-OH-DA投与ラットでは投与後5日目におけるα-MDP 300 mg/kg i.p. 投与で血圧下降が見られず、内因性NEおよびDAが著明に減少していた。

<考察>

血圧制御に関して中枢CAニューロンが深く関与することは種々の報告で明らかである。その1として Nucleus tractus solitarius (NTS) には密なNEニューロンの終末が認められ(2)(3)、NEがα受容体を介して促進的に血圧下降をきたしめると考えられている(3)。胎生末期 6-OH DOPA投与SHRでは対照群と同等の高血圧状態が発展持続する。又、α-MDPによる血圧下降効果が著しく減少していることから、これらのラットに血圧の下降に関与するNE神経の障害が 6OH DOPA 投与により惹起されたことが示唆される。α-MNEによるNTSを介する血圧下降が報告されているが(7) 胎生期6-OH DOPA処置ラットではNTSを含む延髄-橋のCA含有量はむしろ増加しており、かつ、背髄のCA含有量が著明に減少していることからNTS以外に NE作働性血圧下降機構が、より尾側の背髄に存在している可能性を示唆している。しかしNTSにCA線維を送る細胞体を含む脳幹本分割であるから たとえ 6-OH DOPA投与により軸索の変性が起っていても 細胞体には

Table 1 Accumulation of α-methyldopamine and α-methylnorepinephrine in brain regions and organs 4hr after α-methyldopa administration.

tissue	α-MDA (μg/g)		α-MNE (μg/g)	
	6-OH-DOPA treated	Control	6-OH-DOPA treated	Control
Hypothalamus	2.00 ± 0.36	2.19 ± 0.36	1.26 ± 0.26	1.17 ± 0.33
Medulla-Pons	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.04	*1.19 ± 0.05	0.56 ± 0.18
Spinal cord	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.07	*0.05 ± 0.01	0.34 ± 0.06
Heart	0.89 ± 0.09	0.96 ± 0.11	0.33 ± 0.05	0.26 ± 0.02
Adrenal gland	24.90 ± 10.40	13.70 ± 5.60	41.70 ± 10.00	34.30 ± 2.10

Values are mean ± s.e.m. for 4 animals.
Rats were received α-methyldopa (300 mg/kg i.p.) dissolved in 0.2% CMC solution.
6-OH-DOPA treated : Rats had been treated subcutaneously directly with 6-OH-DOPA on 19th and 21st days of gestation in a dose of 50 μg/g.
* $P < 0.05$ compared with control rats.

Table 2 Concentration of endogeneous catecholamines in various tissues 4hr after α-methyldopa administration

	DA (ng/g)			NE (ng/g)		
	6-OH-DOPA (αMDP)	Control (αMDP)	Control (Vehicle)	6-OH-DOPA (αMDP)	Control (αMDP)	Control (Vehicle)
Hypothalamus	*341±110	*457±203	*1172±356	1426±157	1604±163	1209± 92
Medulla-Pons	36± 4	36± 6	48± 9	579± 61	420± 34	537±126
Spinal cord	24± 9	*17± 5	*41± 3	162± 26	193± 26	271± 54
Heart	28± 3	10± 2	22± 5	496±137	378± 66	458±178
Adrenal gland (μg/g)	17.1±4.1	*12.7±0.8	*20.3±2.8	360± 85	327± 79	363± 30

Values are mean ± s.e.m. for 4 animals.
Rats were received α-methyldopa (300 mg/kg i.p.) dissolved in 0.2% CMC solution.
6-OH-DOPA treated : Rats had been treated subcutaneously directly with 6-OH-DOPA on 19th and 21st days of gestation in a dose of 50 μg/g.
* $P < 0.05$ compared with control rats.

CAが貯留することから 結果としてこの分割のCA含有量が増加して測定される可能性が残る。NTSに近接してCA細胞体が存在することからNTSとCA細胞体とを分離して標本を分割しCAを定量することは極めて困難であるため直接的に6-OH DOPA投与によるNTS血圧下降機能の障害の有無を生化学的に証明することが困難となる。6-OHDAを背髄C4レベルの髄内に投与し，このレベル以下のCAを減少させるとα-methyldopaの血圧下降がほとんど見られなくなる。このことはNTSを介さないα-MNEの血圧下降作用部位がC4レベル以下に存在することを裏付けている。即ちC4以下背髄にCAニューロンを介する血圧下降機構が存在すると思われる。

極めて興味深いことは6-OH DOPA投与ラット50~60週では延髄・橋のα-MNEと内因性NEの比は対照群と同じでありα-MDPの代謝がほぼ正常に保たれており一方背髄では内因性CAは軽度の減少のみに比し，α-MNEは極めて微量であることから背髄NE神経の再生の可能性がうかがわれ，しかもそれら再生したNE線維は機能の回復を伴っていないことが示唆された。

<文献>

1) Chalmers, J.P.: Circ. Res. 36, 469 (1975)
2) Dahlström, A. and Fuxe, K.: Experimentia. 21, 409 (1965)
3) Kobinger, W and Pichler, L.: Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.: 286, 371 (1975)
4) Loizou, L.A.: Brain Res. 15, 563 (1969)
5) Shellenberger, M.K. and Gordon, J.H: Anal. Biochem. 39. 356 (1971)
6) Wang, M-T, Imai, K., Yoshioka, M. and Tamura, Z.: Cli. Chim. Acta. 63, 13 (1975)
7) Zandberg, P. and De Jong, W.: Neuropharmacology, 16, 219 (1977)

15 MAM投与の時期を異にする実験的小頭症ラットにおける神経化学的研究

松谷天星丸・永吉道子・田丸政男
(保健衛生大・医・総医研・発達生理)
野村正彦 (保健衛生大・医・生理)
塚田裕三 (慶大・医・生理)

〔要 約〕

私共は妊娠15日目の母ラットにMAM投与による実験的小頭症ラットの大脳半球で、5HT, dopamine(DA)の含量が対照に比して有意に高いことを見出し、小頭症ラット脳でモノアミン作働性シナプス形成の異常が示唆されることを報告してきた。今回は妊娠11、13、15、17、19、21日目にMAMを一回投与し異なる小頭症を作り、脳内5HT、DA含量の変化と、行動面について検討した。(1)小頭症の出現の度合の強さは脳重では15、13、17、19、11、21日群の順であった。15、13日群は特に大脳半球の減少度が他の実験群より強かった。(2)大脳半球のDNA含量は15日群は対照の60%, 13日群は77%, 17日群は82%, 11、19日群は90%, 21日群は97%で大脳半球重量の減少と等しい傾向を示し、湿重量当りのDNA, RNA量及びRNA/DNAは各実験群とも対照群と有意差を示さなかった。(3)15日群の大脳半球で、湿重量当り5HTは対照の約1.6倍、DAは約3倍の増加を示し、15日目より早いか遅い時期の実験群では5HT、DAの増加も軽度で、脳重、DNA量の減少率と5HT、DAの増加率との間に逆の関係が示された。(4)CNPase活性は13、15、17日群で何れも対照との間に差はなく、この時期の投与ではミエリン形成には異常はないものと考えられた。(5)明度弁別学習は何れの実験群でも完成可能であった。しかし、11、13日群は他の実験群より完成までにやや多い日数を要した。

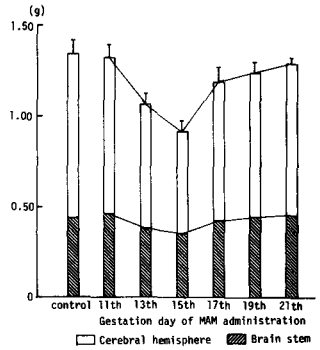
私共は大脳皮質の組織発生期の障害に基づく脳発達障害のモデルとして、MAM[1]投与による実験的小頭症ラットを用いて、脳内物質と行動面の変化を妊娠15日目MAM投与のものについて検討し、モノアミン、transmitterの候補とみなされる遊離のアミノ酸(グルタミン酸, グリシン, アスパラギン酸, GABA)及びcholine acetyltransferaseの活性の測定から、大脳半球でモノアミンのうち5HT, DAが有意の、及びNEの含有量の増加を見出し、小頭症ラット脳におけるモノアミン作働性シナプスの形成異常が示唆されることを報告した。[2][3] 今回はMAM投与の時期の違いによって生後の大脳皮質の細胞構築及び細胞数の異なる小頭症を作り、機能面の変化を検討すると共に胎生期に幼若神経細胞が障害をうけ脱落し、神経細胞が減少したまま成熟した脳でのシナプス形成を追求することを目的とし、脳内DNAの減少と5HT、DAの増加の関係を各種の小頭症で検討した。

〔実験方法〕

(1)実験動物はWistar-Imamich系白鼠を用い、腟スメアー中の精子確認日を妊娠1日目と起算し、妊娠11、13、15、17、19、21日目(以下、妊娠11日目投与群を11日群と略す)の母ラットの腹腔内に1回MAM-*Acet.(ASH. Inc. Detroit)の20 mg/kgを午前10時に投与し、自然分娩させ成熟後3~4ヶ月令のものを使用した。対照の母ラットには実験群と同一日に腹腔内に生食水を投与し、モノアミンの測定には屠殺を午前10時にそろえ瀉血断頭によった。

* Methylazoxymethanol(MAM)

図1 BRAIN WEIGHTS OF MAM-TREATED RATS



(2)脳内物質の測定　DNA, RNAはSchmidt-Thannhauserの変法により抽出を行い、前学会の報告[4]と同様の方法で、DNA, RNA, Proteinを比色定量した。5HTはCurzon & Green[5]らの方法で螢光測定し、DAはTaylor & Laverty[6]らの方法で抽出し、Atack & Magnusson[7]らの方法で螢光測定した。CNPaseはkurihara & Tsukada[8]らの方法で測定した。摘出脳は大脳半球(CH)と脳幹部(BS)-大脳基底核、橋、延髄を含む-に分け物質測定に供した。

表1
DNA AND RNA CONTENTS IN MAM-TREATED RAT BRAINS

		Control	Gestation day of MAM administration					
			11th	13th	15th	17th	19th	21th
DNA	Cerebral hemisphere mg/g wet wt.	0.72 ±0.03(8)	0.69 ±0.02(3)	0.73 ±0.03(5)	0.74 ±0.05(5)	0.71 ±0.03(5)	0.76 ±0.05(3)	0.76 ±0.02(3)
	Cerebral hemisphere total mg	0.65 ±0.03(8)	0.59 ±0.01(3)	0.50 ±0.02(5)	0.41 ±0.03(5)	0.53 ±0.02(5)	0.60 ±0.04(3)	0.63 ±0.02(3)
	Cerebral hemisphere change (%)	(100)	(91)	(77)	(63)	(82)	(92)	(97)
	Brain stem mg/g wet wt.	0.71 ±0.07(8)	0.68 ±0.08(4)	0.73 ±0.05(5)	0.73 ±0.05(4)	0.76 ±0.06(5)	0.75 ±0.07(3)	0.65 ±0.01(3)
	Brain stem total mg	0.43 ±0.05(8)	0.40 ±0.05(4)	0.39 ±0.02(5)	0.36 ±0.02(4)	0.45 ±0.03(5)	0.44 ±0.04(3)	0.42 ±0.01(3)
	Brain stem change (%)	(100)	(93)	(91)	(84)	(105)	(102)	(98)
RNA	Cerebral hemisphere mg/g wet wt.	2.02 ±0.22(8)	2.04 ±0.40(3)	2.23 ±0.25(5)	2.29 ±0.21(5)	2.21 ±0.28(5)	2.24 ±0.21(3)	2.23 ±0.17(3)
	Brain stem mg/g wet wt.	1.95 ±0.21(8)	1.77 ±0.32(3)	1.57 ±0.21(5)	1.61 ±0.20(4)	1.85 ±0.35(5)	2.09 ±0.15(3)	2.21 ±0.11(3)
RNA/DNA	Cerebral hemisphere	2.80	2.95	3.06	3.09	3.12	2.94	2.93
	Brain stem	2.74	2.60	2.15	2.20	2.44	2.78	3.41

(M ± S.D.)

(3)明度弁別学習テストは前回[2]と同様に行い、一群5匹以上の雄を用い正反応率(正反応数/総反応数)85%以上連続3日のものを学習完成とした。Shapingは連続強化にセットし40回の強化が3分以内になるまで行った。消去は1 sessionの総反応数10回以下になったものを消去完成とした。有意差検定はt検定を用いた。

〔実験結果及び考察〕

脳重：図1はMAM投与の時期の異なる小頭症ラットの大脳重量の変化をCHとBSに分けて示したもので、今回行った実験では小頭症出現の度合は異なっても全て対照のものより脳重は小さい値を示した。15日群が最も小頭症出現の度合が強く、これより早いものは遅い時期にMAMを投与したものより脳重減少の度合が大きかった。それぞれの大脳全体に対するBSの占める割合は15、13日群では対照及び他の実験群に対しやや大きく、従って15、13日群はCHの減少が他の実験群より著しかった。小頭症の出現の度合はMAMにより障害される分裂期にある幼若神経細胞の数が発生の時期により異なることを示すと考えられる。

核酸：細胞数の生化学的指標となるDNA量は、CH当りで15日群が対照の63%、13日群が77%、17日群は82%、11、19日群が約90%、21日群は97%で、大脳重量の減少と等しい傾向を示した。しかし、湿重量当りのDNA量、RNA量、及びRNA/DNAの比でみると、各実験群とも対照群と有意差はなく各小頭症ラット脳の細胞密度には変化はないものと考えられた。(表1)

5HTとDA含有量：図2-(a)は各MAM投与脳の湿重量当りの5HT含量を示し、CH当りのDNA量の減少の著しいものほどCHの5HTの増加は強く、15日群で対照の約1.6倍、13日群では約1.2倍の増加を示した。一方、BSはCHで示されたような著しい増加はみられなかった。これをCHあるいはBSの有する総5HT量として図2-(b)に示すと、各実験群ともCHではほとんど対照との間に差は認められなくなった。図3-(a)は各MAM投与脳のDA含量を湿重量当りで示したもので5HTと同じように15日群が最も増加は著しく対照の約2.9倍、13日群で約2.1倍、17日群で約1.4倍の増加を示した。図3-(b)はCH, BS, 当りのDA含量であるが、CHのDA含量は5HTに比べると対照に対し高い値を示した。図2-(c)、図3-(c)は5HT, DAのDNA当りの値を示したもので、仮にCHやBSの細胞当りの持量を表わすものと考えると細胞数の変化によって5HT、DAの増加の程度が変動することを示し、5HT、DA共に15, 13, 17の順に低い値を示した。しかし、5HTよりもDAの増

図2 5HT CONTENTS IN MAM-TREATED RAT BRAINS

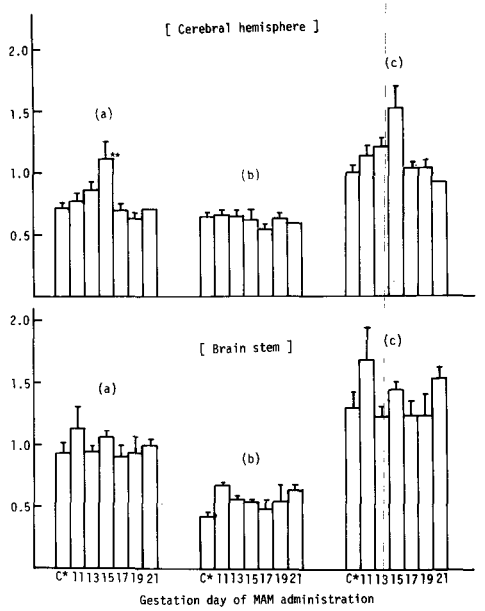
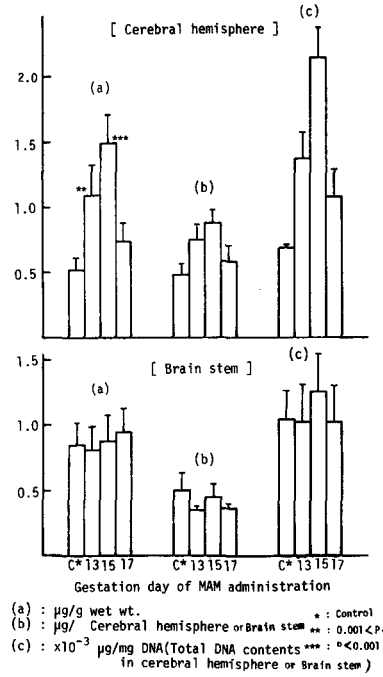


図3 DOPAMINE CONTENTS IN MAM-TREATED RAT BRAINS



加率の方が高かった。

CNPase活性：ミエリンのmaker enzymeであるとされているCNPase活性は、既に15日群においては対照との間に差がないことを報告したが、13，17日群の値も対照との間に殆んど差はみられず、13，17日群も15日群と同様ミエリン形成は対照と変わりなく進行していることが示された。(表2)

明度弁別学習能力：図4は明度弁別学習Test完成に要した日数を一群の平均値で示したものである。前の学会[2]で15日群において、脳重が約60%しかない割には学習能力が比較的よく保たれていることを報告したが、今回行った実験でも、何れの実験群でも明度弁別学習は完成可能であった。しかし、学習Test完成までに要する日数は対照群の平均15日を要するのに対し、11、13、15、17、19、21日群でそれぞれ平均24、25、20、15、19日を要し、11、13日群では脳重の減少が15日群より軽度であったにもかかわらず、他の実験群に比して、学習完成までにより多くの日数を要する傾向が認められた。したがって、この学習成績の差は細胞数の減少よりも、MAMにより障害され脱落した細胞、即ち、大脳皮質の細胞構築の質の違いによるためかもしれない。又、モノアミン量の増加と学習成績との間に直接関連性は示されなかった。又学習Testに先立って行うshapingは対照に比しMAM投与群では何れもやや長い傾向がみられMAM投与ラットでは学習開始までの準備期間

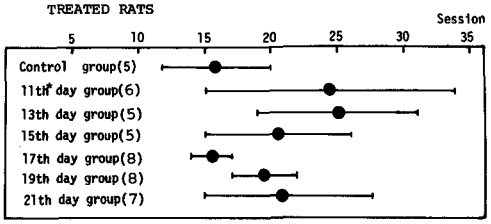
表2 2',3'-CYCLIC NUCLEOTIDE 3' PHOSPHOHYDROLASE(CNPase) ACTIVITY IN MAM-TREATED RAT BRAINS

(M ± S.D.)

	Control	Gestation day of MAM administration		
		13th day	15th day	17th day
Cerebral hemisphere	3.58 ± 0.09 (4)	3.81 ± 0.35 (3)	3.66 ± 0.29 (3)	3.50(2)
Brain stem	6.99 ± 0.51 (4)	6.90 ± 0.39 (3)	6.70 ± 0.06 (3)	6.70(2)
Spinal cord	7.59 ± 0.03 (3)	7.71 ± 0.29 (3)	7.21 ± 0.31 (3)	7.50(2)

に対照より多くの時間を要する如くみられた。一方、消去に要した回数は対照に対して各実験群とも有意差は示さなかった。(表3)

図4 THE NUMBER OF SESSION OF CORRECT RESPONSE RATIO MORE THAN 85% CONSECUTIVELY FOR 3 DAYS IN MAM-TREATED RATS



( ) : Numbers of animals ●: M ± S.D.
★ : Gestation day of MAM administration

DNAの減少とモノアミンの増加との関係：以上の結果をCHのみについてまとめたものが図5である。DNAのdecrease%は対照のCHの総DNA量を100とし、それに対する各実験群の減少の度合を示したもので、5HT及びDAのincrease%は対照のCHにおけるDNA当りの5HT又はDAの値を100とした場合の各実験群のそれぞれの増加の度合を示したものである。DNAの減少率と5HT及びDAの増加率は逆の関係を示した。

表3
THE SCORES OF SHAPING AND EXTINCTION FOR DISCRIMINATION LEARNING TEST OF BRIGHTNESS ON MAM-TREATED RATS

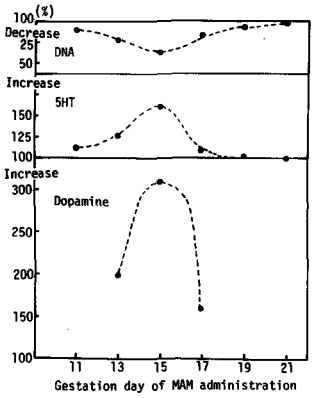
Group / Condition	Control	Gestation day of MAM administration					
		11th	13th	15th	17th	19th	21th
Shaping (min.)	51.7 ±11.1(5)	58.6 ±20.9(6)	63.6 ±20.4(5)	72.1 ±12.1(5)	77.0 ±32.5(8)	68.9 ±15.6(8)	60.5 ±29.2(7)
Extinction (Sessions)	10.9 ±1.1(5)	12.2 ±2.8(6)	10.8 ±5.7(5)	13.8 ±5.0(5)	9.4 ±2.0(8)	8.3 ±2.1(8)	10.9 ±1.6(7)

( ) : Numbers of animals (M ± S.D.)

以上の結果は、MAM投与小頭症ラットでは、大脳半球のモノアミン含量が高く、この含有量の増加はDNA量の減少、即ち、細胞数の減少と関係があり細胞数の減少の度合により5HT, DAの増加量も変動することを示したものである。

Raisman[9][10]の電子顕微鏡によるラットの中隔核における発芽によるシナプス形成や、Moore[11]らによるラットのSeptal areaにおけるmechanical lesionによりadrenergic terminalの再生事実の組織化学的な方法での証明が報告されているが、これらの発芽による新しいシナプスの形成はneuronの軸索の損傷されている状態下で見出されたものである。今回の私共の結果は、神経芽細胞が障害され死滅したために遺伝的にきめられているneuronの数が減少したまま成熟している大脳において、残っている健全なneuron間のシナプス形成に関しmonoaminergic synapseの形成が細胞数の少ない場合の脳で何らかの代償的役割を担っているかもしれないということを神経化学的に示唆するものである。

図5 THE RELATIONSHIP BETWEEN DECREASE OF DNA AND INCREASE OF MONOAMINE IN CEREBRAL HEMISPHERE OF MAM-TREATED RATS



今後、更にneuronとgliaの分布比及び大脳半球で増加していたモノアミン含量の存在様式を検討したい。

終りに堀有美子研究技術員の御協力に感謝します。

文献
(1) Spatz M. and Laqueur G.L. (1968) Proc. Exptl. Bio. Med., 127, 281
(2) 松谷天晴丸, 岡田澄子, 永吉通子, 野村正彦, 塚田裕三 (1973) 神経化学, 12, 28
(3) 松谷天晴丸, 岡田澄子, 永吉通子, 田丸政男, 塚田裕三 (1974) 神経化学, 13, 198
(4) 松谷天晴丸, 塚田裕三, 松山春雄, 高屋菜穂 (1972) 神経化学, 11, 48
(5) Curzon G. and Green A. (1970) Brit. J. Pharmacol., 39, 653
(6) Taylor K.M. and Laverty R. (1969) J. Neurochem., 16, 1361
(7) Atack C.V. and Magnusson T. (1970) J. Pharm. Pharmacol., 22, 625
(8) Kurihara T. and Tsukada Y. (1967) J. Nerochem., 14, 1167
(9) Raisman G. (1969) Brain Res., 14, 25
(10) Raisman G. (1973) Brain Res., 50, 241
(11) Moore R.Y., Björdlund A. and Stenevi U. (1971) Brain Res., 33, 13

16 線条体モノアミン性シナプス小胞に対するChlorpromazineの作用

貝谷壽宣・岩田　毅・池田研二
森内　巌・吉村　剛・難波益之
(岐阜大・医・神経精神)

〔要　約〕

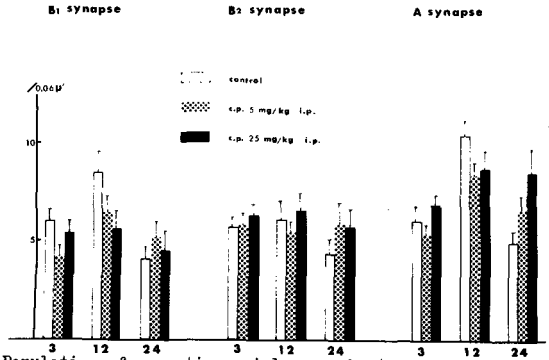
抗精神病薬の脳内モノアミンに対する作用は種々検索されているが、多くは生化学的定量研究であり急性実験である。本研究ではChlorpromazineの機能直前にある神経伝達物質に及ぼす影響を調べるため電子顕微鏡によりラット線条体モノアミン性ブトンのシナプス小胞数と直径を計測した。ラット9匹を生食群、CP 5mg/kg i.p.群、CP 25mg/kg i.p.群に分け、投与3時間、12時間および24時間後にpreparationした。我々がすでに細胞化学的にその微細構造を明らかにしたモノアミン性シナプスを計測の対象とした。A型シナプスは神経終末がdendritic spineに接し比較的大きく糸粒体を1~2個含む。シナプス膜はGray I型であり、シナプス小胞は丸型でブトン内に散在している。B型のブトンは小さく後シナプス側突起の方が大きい。シナプス膜はGray II型である。本研究では更にB1, B2型と分けた。40,000倍の写真でシナプス小胞はブトン内の全シナプス数をブトン面積で割ったものと、シナプス膜に接した1cm平方の正方形内のものとを数えた。投与12時間まではシナプス小胞数に有意差はなく、CP投与群でやや減少傾向をみ、シナプス小胞は大型化していた。24時間後にはCP投与群ではシナプス小胞数は増加し、小胞は小型化した。コントロール群のシナプス小胞数は日内変動を示し午後11時に増加していた。

抗精神病薬の作用機構は内因性精神病研究の重要な一部門となってきている。従来までの研究によれば抗精神病作用は脳内ドーパミン(DA)受容体遮断作用であり、それはDAの代謝回転率の亢進という生化学的研究結果から導びきだされている(7)。ノイロン内のモノアミンの分布をみると、細胞体には低~中濃度(10~100μg/gw.w)、軸索では非常に低く終末部には高濃度(1000~3000μg/gw.w)に存在すると言われている(5)。生化学的定量実験ではモノアミンのこのような不均一な分布を考慮せず一まとめにその結果を考察していることになり、実際に機能直前にある神経伝達物質の状態を知ることはできない。このような問題を解決するために我々はすでに視床下部腹内側核シナプス小胞がChlorpromazine(CP)3日間投与により増加する事実を電子顕微鏡による計量形態学から明らかにした(8)。最近我々はDAが大量に含まれる線条体のモノアミン性ブトンの微細構造を細胞化学的に明らかにしたので(10)、今回は線条体モノアミン性シナプス小胞に対するCPの作用を経時的に検索し抗精神薬の作用機構の一端を明らかにしたい。

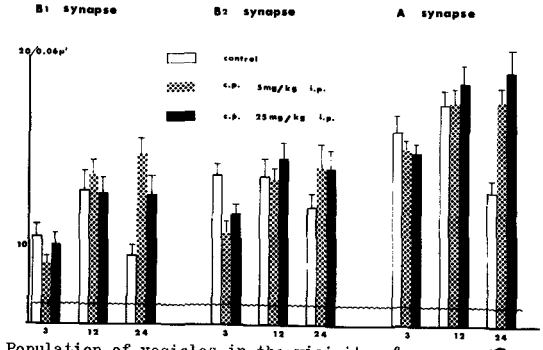
〈実験材料と方法〉

白ねずみ、雄、180~200g 9匹を3匹ずつ3群にし自然光下で飼育。毎日午前11時に生食5ml/kgの腹腔内注射を1週間続け、注射に馴れさせた後、第I群には生食5ml/kg、第II群にはCP 5mg/kg、第III群にはCP 25mg/kgを各々午前11時に腹腔内投与した。CP投与後、3, 12, および24時間後に各群より1匹ずつとり出しエーテル麻酔下で断頭した。素早く脳髄をとり出し、前交連の出現し始める部で前額断した切片を作り、氷冷したDalton溶液で1時間固定した。その後型の如く脱水、包埋し、約75mμの超薄切片を作製した。酢酸ウラニウム

染色は70%アルコール脱水中にブロック染色し，燐酸鉛で切片染色を施し，JEM T7にて検鏡した。3人の研究者が各々同時期にpreparationされた各群より1頭ずつ計3動物を担当し、一個体当り最終倍率40,000倍の写真を100枚作製した。シナプスの分類：モノアミン性神経終末は$KMnO_4$固定で，A,B 2型に分類されたが，本研究ではオスミウム固定であり、B型は更にB_1，B_2型に分類できた。A型は神経終末がdendritic spineに接し，比較的大きく糸粒体を1~2個含む。シナプス膜はGray I型である。シナプス小胞は丸型で直径60~80nmであり，ブトン内に散在している。B型のブトンは小さく後シナプス側突起の方が大きく，bouton en passantを呈する。大部分のブトンは糸粒体をもたず、シナプス膜はGray I型である。B_1型ではシナプス間隙の拡大がやや著明であり、シナプス膜にくびれがあり、後シナプス側に膜様構造物がある。B_2型のシナプス膜は目立たなく，後シナプス膜近傍の突起内に特別な細胞小器官はない。



Population of synaptic vesicles per bouton area 図1



Population of vesicles in the vicinity of synapse 図2

計測方法：計測はすべて研究主旨が知らされていない技術員によってなされた。まず対象シナプス内の全シナプス小胞を数え、糸粒体を除くブトン面積をプラニメーターで計測し、単位ブトン当りの小胞数を算出した。次にシナプス膜に接し1cm平方のます目（実際には$0.06\mu^2$）を置きその中の全シナプス小胞数を数えた。シナプス小胞直径はその枠内の任意の10個について最終目盛0.2mm（実際には5nm）のルーペ付ものさしで測定した。

〈結　果〉

ブトン全域においてもシナプス膜近傍でもコントロール動物のシナプス小胞の日内動態はほぼ同様な傾向を示した。すなわちどの型のシナプスでも午後11時に小胞数はピークを示し，午前11時に減少していた（図1,2），シナプス小胞の直径はその反対に午前11時に最大となっている（図3）。CPの影響をみると，投与3時間および12時間後では統計的有意差はなくやや減少傾向にある。24時間たつとシナプス小胞数は増加しており、これはとくにシナプス膜近傍の小胞を測った時に明らかであり、とりわけB_1，A型シナプスにおいて著明であった（図2）。シナプス小胞直径は小胞数と逆比例し、CPにより小胞数が増加すると小型化した（図3）。これら定量的所見以外に，CP投与動物ではそのシナプス膜が汚れ電子密度の高い物質が付着しているのが時に見られた。

〈考　察〉

本研究において電顕でみたシナプス小胞数変動はCPが化学伝達そのものに及ぼして

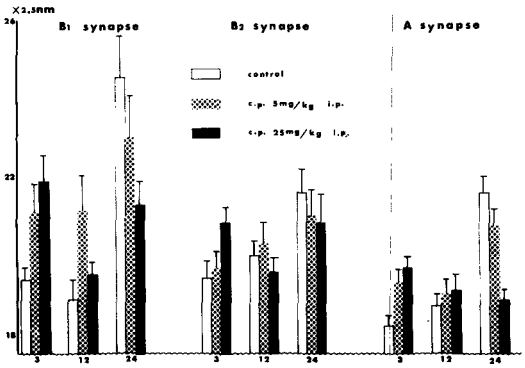


図3

いる直接的作用によるものなのか，それとも非特異的効果かをまず検討する必要がある。CP服用脳の神経病理所見として脳組織の収縮や浮腫、神経細胞急性腫脹および色素融解(2)が報告されているが，死後変化の可能性は否定できない。CPは血液電解質には大きな影響はないと言われている(12)。Seeman(13)によればCPは膜安定化作用があり物質輸送を阻害するという。しかし同様な作用のあるpromethazineでは我々が前回示したように(9)シナプス小胞の著明な増減はひきおこされず，本研究でみられたシナプス小胞数の変動はCPの化学伝達に対する影響を反映していると考えてさしつかえないであろう。尾状核はDA以外にセロトニンや少量のノルアドレナリンを含有すると言われているが，ここでとりあげたA，B_1，B_2型シナプスと各神経伝達物質との対応は完全ではなく(10)、本研究では一応モノアミン性としておく。

コントロール動物で示された夜間活動期の小胞数増加は，尾状核のカテコールアミンレベルのcircadian rhythmとよく対応している(4)。CP投与12時間までの変化は，シナプス膜付近においても全ブトンでも小胞数に有意差はなくやや減少傾向にあった。この結果を支持する所見が2,3提出されている。螢光組織化学による半定量的研究において種々neuroleptica は尾状核DA神経終末のtyrosine hydroxylase阻害剤による螢光減少を促進させるという(1)。またFarneboら(3)は^{3}H-DAを取り込んだラットのstriatal sliceの電気刺激による^{3}H-DA放出をCPは12%増加させることを観察した。以上の事実はCP投与後3～5時間は尾状核のhomovanilic acidが増加し，DA turnoverが亢進しているという生化学的見解(7)と一致するものである，投与24時間後にみられたシナプス小胞の増加はCPの臨床効果を考察する上で非常に興味ある事実である。シナプス小胞の増加は放出が抑制されているのか，再吸収が活発なのか，放出の割合よりも神経伝達物質の合成が上昇しているかの1つである。ところがCPはsynaptosomeへのモノアミンの取り込みを阻害し(11)，neuroleptica によるDA turnover は24時間後には元に戻っているという(6)報告があるから，24時間後にみられた小胞数増加は放出が

POPULATION OF SYNAPTIC VESICLES PER BOUTON AREA (X 16.7/μ^2)

	3 hours after treatment (2 PM)			12 hours after treatment (11 PM)			24 hours after treatment (11 AM)		
	control	5mg/kg	25mg/kg	control	5mg/kg	25mg/kg	control	5mg/kg	25mg/kg
B 1 synapse	6.0±0.7 (16)	4.1±0.3 (25)	5.3±0.6 (12)	8.4±1.1 (12)	6.4±0.4 (14)	5.6±0.5 (16)	4.0±0.3 (21)	5.2±0.6 (9)	4.5±0.6 (14)
B 2 synapse	5.7±0.4 (42)	5.8±0.4 (36)	6.3±0.4 (40)	6.1±0.5 (18)	5.4±0.5 (10)	6.6±0.4 (30)	4.3±0.6 (15)	5.9±0.6 (23)	5.8±0.7 (23)
A synapse	6.0±0.5 (24)	5.2±0.3 (30)	6.9±0.4 (23)	10.3±0.9 (10)	8.4±0.6 (21)	8.7±0.5 (11)	5.0±0.6 (17)	6.6±0.6 (22)	8.6±1.0 (12)

POPULATION OF SYNAPTIC VESICLES PER 0.06μ^2 ALONG SYNAPTIC COMPLEX

B 1 synapse	10.5±0.6 (31)	9.0±0.5 (28)	10.1±0.6 (29)	12.9±1.0 (11)	13.7±0.8 (17)	12.7±0.8 (16)	9.5±0.4 (20)	14.8±0.8 (11)	12.7±1.0 (10)
B 2 synapse	13.7±0.5 (46)	10.7±0.6 (40)	11.7±0.5 (35)	13.6±0.9 (19)	13.5±0.6 (14)	14.5±0.8 (30)	12.0±0.7 (20)	14.1±1.2 (16)	14.0±1.0 (26)
A synapse	16.2±0.8 (29)	15.1±0.5 (60)	14.8±0.5 (37)	17.4±0.7 (22)	17.5±0.7 (24)	18.5±0.9 (19)	12.8±0.6 (40)	17.5±0.7 (24)	19.1±1.2 (23)

DIAMETER OF SYNAPTIC VESICLES (X 2.5 nm)

B 1 synapse	19.3±0.4 (34)	21.1±0.7 (29)	21.8±0.6 (27)	18.9±0.5 (10)	21.2±0.8 (17)	19.5±0.3 (16)	24.5±1.0 (20)	23.0±1.0 (11)	21.3±0.6 (10)
B 2 synapse	19.4±0.4 (46)	19.7±0.3 (37)	20.8±0.3 (29)	20.0±0.3 (19)	20.3±0.5 (12)	19.6±0.3 (30)	21.6±0.6 (20)	21.6±0.6 (16)	20.8±0.7 (26)
A synapse	18.2±0.2 (29)	19.3±0.3 (57)	19.7±0.2 (37)	18.4±0.2 (23)	19.0±0.3 (23)	19.1±0.8 (19)	21.5±0.4 (40)	20.7±0.4 (24)	18.8±0.2 (23)

抑制されていると考えることができる。すなわちCPが前シナプス膜を遮断しているとみなすこともできる。シナプス小胞の直径は，小胞数増減と逆比例の傾向をとり、小胞数が増加すると小胞径は小さくなる。すなわち化学伝達の活動低下状態では小さくなり、turnover 亢進時には大きくなると考えることができる。

CPの抗分裂病効果は通常連続服薬して数日後に初めて明らかになり、投与後数時間の変化が臨床効果と対応するかどうかは疑問である。Glowinski(6) らは12日間毎日1回thioproperazine, haloperidol, pipothiazine を各々投与し，最終投与3時間後にはDA合成は軽度に亢進していたが，24時間後には明らかに減少しているのを観察した。本研究で示した24時間後の変化はシナプスの化学伝達機能が低下している状態であり，このような変化が臨床効果とより密接な関係をもつ可能性が考えられる。

〈文　献〉

(1) Andén,N. E., Butcher,S. G., Corrodi, H., Fuxe, K. and Ungerstedt, U.(1970) Europ. J. Pharmacol. 11 , 303-314

(2) Ejik, R. van and Bots G. Th, A. M. (1970) Ned. Tijdschr. Geneesk. 114, 1253-1258

(3) Farnebo, L. O. and Hamberger, B. (1971) Acta physiol. scand. Suppl. 371, 35-44

(4) Friedman, A. H. and Walker, C. A. (1968) J. Physiol. 197, 77-85

(5) Fuxe, K. and Hökfelt, T. (1973) Medical Sandoz 1, 105-115

(6) Glowinski, J. (1975) in Biology of the Major Psychoses. ed. D. X. Freedman, pp. 233-246, Raven Press

(7) Guldberg, H. C. and Yates, C. M. (1969) Br. J. Pharmac. 36, 535-548

(8) Kaiya, H., Iwata, T., Moriuchi, I. and Namba, M. (1977) Biological Psychiatry 12, 323-330

(9) 貝谷久宣，池田研二，岩田　毅，森内　巌，池田澄江，吉村　剛，加藤秀明，森　俊憲，曽根啓一，難波益之。(1976) 精神薬療基金研究年報 8, 19-24

(10) 貝谷久宣，岩田　毅，難波益之。　医学のあゆみ投稿中

(11) Pollard, H. B., Barker, J. L., Bohr, W. A. and Dowdall, M. J. (1975) Brain Research 85, 23-31

(12) Ramos, L., Giesbrecht, A. M., Caldeira, J. A. F. and Ramos, A. O. (1969) Opthalmologica 157, 279-284

(13) Seeman, P. (1972) Pharmacological Reviews 24, 583-655

17 新生仔期ハイドロコーチゾン投与ラットの脳発育におよぼす成長ホルモンの効果

野口鉄也・高坂新一・青木エミ子
塚田裕三　（慶大・医・生理）

〔要　約〕

生下日より4日間Hydrocortisoneを投与された仔ラットの脳内蛋白合成の低下はウシ下垂体成長ホルモン(bGH)を投与することによって早期に回復することも昨年の本学会で報告した。この効果がその後の脳の発育にどのような影響をおよぼすかを検討し，次の結果を得た。

(1) Hydrocortisone投与群(HC群)に生下日より離乳日まで10mg/kgのbGHを投与することにより(HC+bGH群)，体重，脳重，脳内DNA含量の増加は10日目よりHC群を陵駕した。

(2) HC群では，生後1日目から11日目に見られる大脳Ornithine decarboxylase(ODC)の活性上昇は見られなかった。

(3) bGHを投与することにより生後4日目の脳内ODC活性を上昇させたが，2日目のHC群には効果がなかった。

(4) HC+bGH群のThymidine Kinase活性は大脳，小脳でHC群に比して，有意に高値を示し変動した。

(5) 学習実験終了後に測定したHC+bGH群のCNPase活性はHC群より有意に高値であった。

(6) 明度弁別学習実験でHC+bGH群は正常群と全く同程度の学習能力を示した。

以上のことから，Hydrocortisoneにより障害された脳の発育を成長ホルモンが回復させる効果をもつことが示された。

実験材料と方法

動物：　同日交配のWistar系ラットから生れた仔鼠を出生日に三群に分け，オ1群は生理的食塩水（正常群），オ2群は生下日より4日間Hydrocortisone acetateを40mg/Kg肩部皮下に投与した(HC群)。オ3群はオ2群と同じ処置を施し，加えて10mg/kgの牛下垂体成長ホルモン(bGH)(Miles)を生下日より離乳日まで連日投与した(HC+bGH群)。オ1群よりオ3群までいずれも母乳で飼育し実験動物とした。発育の日を追って海血断頭，脳の部位による発育の差を考慮し，Cerebrum(大脳外套部)，Cerebellum(小脳)，Brain stem(残りの部)に分けた。DNAの測定：Schmidt & Thannhauserの方法(1)で抽出し，Burton法(2)により定量した。Thymidine Kinase(TK)の測定：組織を10mM Tris Buffer pH 8.0でホモジェナイズし，20,000g 60分遠沈，その上清についてThymidine-6Tを基質としてKlemperer & Haynesの方法(3)で反応を行い，反応停止後，遠沈上清をDEAE沪紙に塗布，Taylorらの方法(4)で活性を測定した。Ornithine decarboxylase(ODC)の測定：Warburg用Reaction vesselを用い，Russell & Snyderの方法(5)により放出される$^{14}CO_2$をCenter well内のProtosol®にトラップし，活性を測定した。2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase)活性の測定：塚田ら(6)の方法によった。

学習実験：　8000Luxと8Luxの明度弁別オペラント学習を生後2ヶ月半の上記三群につき行った。なお学習の完成基準は正反応率($R^+/R^+ + R^-$)が3日間連続85%以上とした。

結果と考察

体重の変化(図1)：　HC群とHC+bGH群との間には既報(7)通り生後10日目までは有意の差は認められなかったが，10日を過ぎると，HC+bGH群の体重はHC群に比して有意の

差をもって増加し，正常群とHC群の中間に位置するようになった。脳重の変化(図-2)：脳重の増加は大脳，小脳いずれの部位でも正常群とHC群の間に有意の差を示す。HC群とHC+bGH群との間には有意の差は認められないが，いずれの部位でも常にHc+bGH群の脳重がHC群より大きかった。脳内DNA含量の変化(図-3)：脳重の変化と全く同じ変動をした。このことは既報(7)のごとくHydrocortisoneによって脳当りの細胞数が減少し細胞の大きさには変化のないことが示めされ，実験的甲状腺機能低下症に見られる細胞成長の抑制(8)とは異なるものと考えられた。

図1

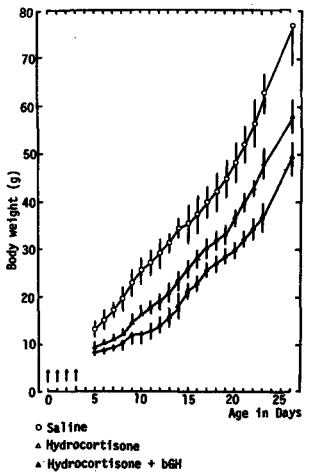
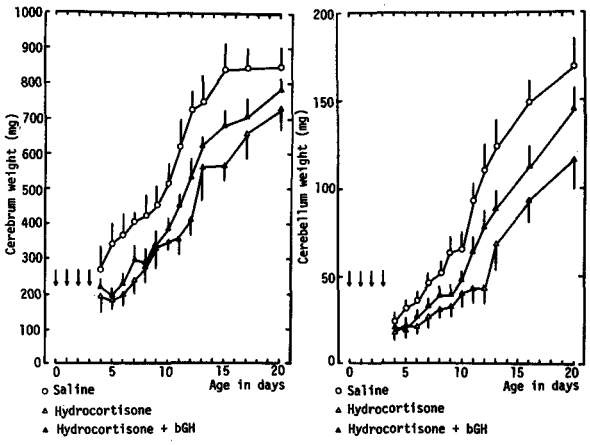


図2



Ornithine decarboxylaseの変化。 中枢神経系でのポリアミン合成の調節機構については未だ不明の点が多いが，発育期の胎仔，新生仔の脳では活性上昇が著しいことが知られている(9)。そこで正常群とHC群につき発育に伴うODCの活性変動をみると(図-4)，脳全体(大脳，小脳，脳幹)として正常群では生後1日目から11日目にかけて活性の上昇が認められるが，HC群では5日を経て上昇が始り，11日目にピークをもつ変動を示す。部位別に見ると，大脳の活性は生後1日目で高く12日目にかけて下降する変化を示すが，小脳では5日目から上昇し11日目にピークをもつ変化をする(図-4A)。これに反しHC群では大脳に於ける活性上昇は全く認められず，小脳のみ正常群に比して活性値は低いが，11日目をピークとする変化を示した(図-4B)。また正常群での脳内ODCの変化はAnderson & Schanbergの報告(9)と良く一致していた。次いで生後2日目のラットにHydrocortisone acetateを40mg/kg肩部皮下に一回投与し，脳内ODCの変化をみると(図-5)，注射後2時間で活性の低下が見られ，24時間後には対照の30%以下に減少していた。このことはHydrocortisoneがTurnoverの極めて短いODCのde novoの合成を抑制した結果と考えられ，既報の脳内の蛋白合成の低下が注射後3日目に観察され

図3

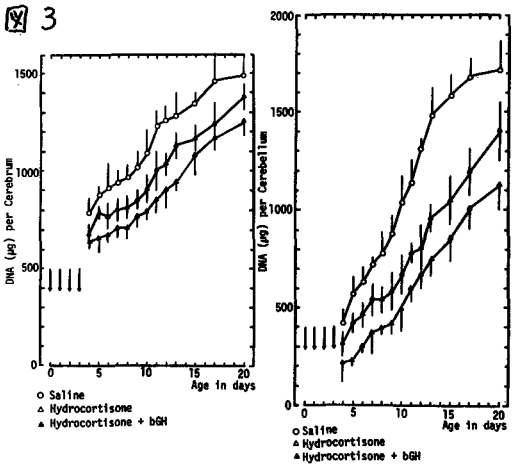


図4

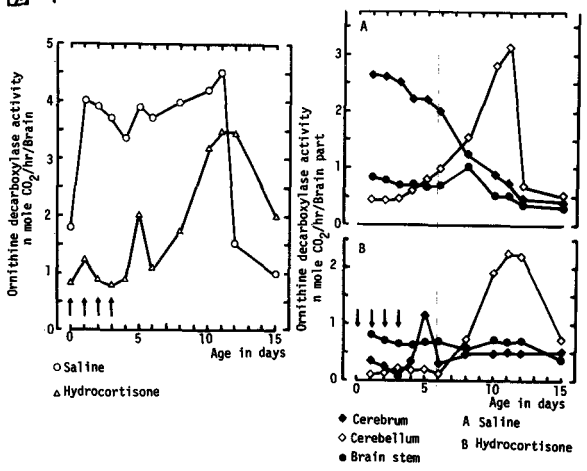
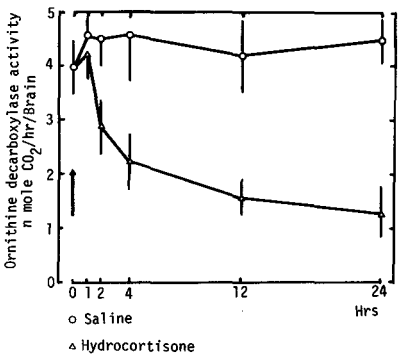


図5



たが(7), 実際にはこれより早く注射後2時間以内に脳内蛋白合成が抑制されていることが分る。

脳内Ornithine decarboxylaseに対するbGHの効果: ODCはin vivoに投与されたGHによって肝臓内で活性が上昇することが知られている(10)。そこで正常群, HC群の生後2日目, 4日目のラットにbGHを10mg/kgを背部皮下に投与し, 脳内ODCの活性変化をみた(図-6)。正常群では2日目, 4日目のものいずれに於いても活性の上昇が認められるが, HC群では2日目(Hydrocortisoneが未だ投与されている時期)のものは, 活性上昇は起らず, Hydrocortisone投与完了後1日を経た4日目のものでは活性が上昇した。Roger(11)らも腹腔内, 大槽内いずれの注入によっても脳内ODC活性が上昇することを見出している。一方Autoradiography法によってbGHはラット脳内に入り得ないことから(12), この効果はGHの二次ホルモン(ソマトメジン?)あるいはGHのフラグメント(13)によるものと考えられている。またGHの効果がHydrocortisone投与期間中は全く見られないことは, 脂肪組織でのGHのTK活性上昇をHydrocortisone

図7

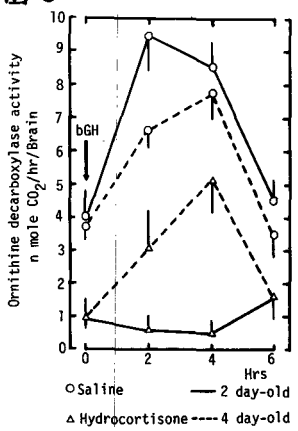
が抑えることと良く似ている(14)。

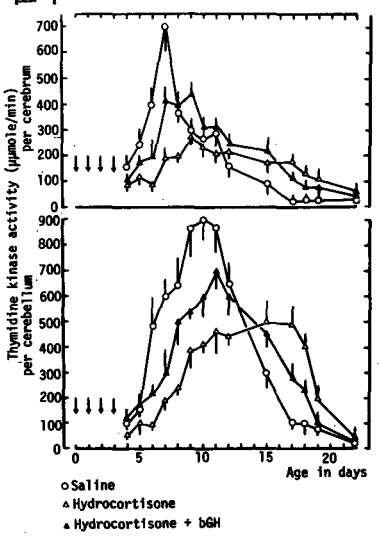
脳内Thymidine Kinaseに対するbGHの効果(図-7):

正常群および HC群の脳

図6

内TKの変動は既報(7)のものと全く変らない。しかしHC+bGH群ではHC群に比して有意の差をもって活性が上昇し, 正常群の値に近ずいた。したがって前記のDNA含量の増加がbGHによって回復することはDNA合成の律速段階であるTKの活性回復によるものと理解される。





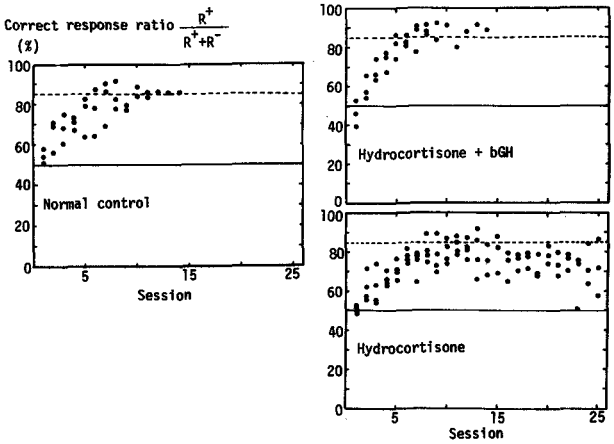
表

2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase Activity in Rat Cerebrum (4 Month-old)
(U/mg-protein)

Control	HC + bGH	HC
3.09 ± 0.15 (3)	2.79 ± 0.04 (3)	2.34 ± 0.11 (3)
p:	<0.025	<0.005

Mean ± S.D.

図8



CNPase 活性に対するbGHの効果：学習実験終了後(生後4ヶ月)の三群につき大脳CNPase活性を測定した(表)。既報の如く(15), HC群は正常群に比して有意差をもって減少していた。またHC+bGH群はHC群に比して有意の差をもって増加し正常群の値に近ずいた。このことはHC群の髄鞘形成不全がbGHによって改善されたことを示している。

学習実験：生後2ヶ月半の三群につき明度弁別学習を行った(図8)。正常群, HC+bGH群はいずれも10Sessionを経るとほぼ学習基準に達したが, HC群では25Sessionに至るも学習基準に達することがなかった。したがって, Hydrocortisone投与による学習能力の低下をbGHが明らかに回復させたと考える。下垂体組織処見：正常群, HC群の脳下垂体を電子顕微鏡で検索した。生後2日目のHC群下垂体ではGH細胞に顆粒の増加傾向が見られ, 5日目に至ってその顆粒は著しく増加しGH細胞内がほとんど顆粒で埋め尽くされ細胞体の拡張する像が得られた。他の分泌細胞には著変はなかった。Hydrocortisone投与によって視床下部でのGH放出因子が欠除することが知られている(16)ことから, 組織処見での顆粒の増加はこれによるものかも知れない。

ラット大脳では出生後グリアの分裂増殖が盛んに行なわれている(17)。Hydrocortisoneを出生直後に投与することは, この時期に行なわれる蛋白合成を低下させることで, ODC活性の著明な減少がこれを示している。未だポリアミンと細胞増殖との関係は明確でないが一般に細胞分裂の初期反応としてとらえられている。bGHが発育期の脳内ODC活性を上昇させることは, 何らかの経路をへてGHが脳内蛋白合成を促進させる作用を示すもので, GHの不足した状態と考えられるHC群(16.18)にbGHを投与することは低下した脳内蛋白合成を回復の方向に進ませ, TKの合成を行い, グリアの分裂増殖を盛んにし, その結果として髄鞘形成を促進させ(CNPase活性の上昇), 学習能力が回復に至ったものと考えられる。

文献

(1) Schmidt,G. & Thannhauser,S.J. J.biol.Chem. 161,83,(1945) (2) Burton,K. Biochem.J. 62,315,(1956) (3) Klemperer,H.G. & Haynes,G.R. Biochem.J. 108,541,(1968) (4) Taylor,A.T. et al. J.biol.Chem. 246,1930,(1972) (5) Russell,D.H. & Snyder,S.H. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A. 60,1420,(1968) (6) 塚田,永井,須田 神経化学 16 (1977) (7) 野口鉄也,塚田裕三 神経化学 15,8,(1976) (8) Eayrs,J.T. & Horn,G. Anat.Rec. 121,53,(1955) (9) Anderson,T.R. & Schanberg,S.M. J.Neurochem. 19,1471,(1972) (10) Murphy,B.J. & Brosnan,M.E. Biochem.J. 157,33,(1976) (11) Roger,L. et al. Endocrinol. 95,904,(1974) (12) Mayberry,H.E. et al. Endocrinol. 88,1309,(1971) (13) Yamasaki,N. et al. J.biol.Chem. 247,3874,(1972) (14) Epstein,S. et al. Biochim.Biophys.Acta. 186,280,(1969) (15) 野口鉄也,塚田裕三,塚田裕三 神経化学 14,140,(1975) (16) Sawano,S. et al. Acta Endocrinol. 61,57,(1969) (17) Dobbing,J. In Himwich,W.A. (ed) "Developmental Neurobiology",C.C.Thomas, p.250,(1970) (18) Mosier,H.D.Jr. et al.Endocrinol. 99,580,(1976)

18 ラット大脳切片のビリルビンに対する親和性について

鈴木富士子 ・ 仙波りつ子 ・ 柏俣重夫
（愛知県コロニー・発達障害研・生化）

〔要 約〕

14～16日令のWistar King Aラット大脳切片を用いてビリルビン(Bil)の取り込みに及ぼすpH、Na、トリス、尿素の影響を検討し以下の結果を得た。

1、大脳切片へのBil取り込みは37°Cでのincubationで20分まで直線性があった。

2、非結合型ビリルビン(Bu)濃度と取り込み速度の関係をみると、pH7.2では正常の双曲線型飽和曲線を示し、Vmax, 1.5 units/g slice、Km, 240μMが得られたが、pH6.9では二相性となり、Vmaxは0.4と2.7 units/g sliceとKmは31と830μMの2つの値が得られた。

3、Bilが80μM、ウシ血清アルブミン(BSA)が60μMのときのpH6.9における取り込み速度はpH7.4の約3倍であった。このことは、BilとBSAとの相互関係(pH6.9、7.2、7.4の結合定数はそれぞれ13μM^{-1}、34μM^{-1}、57μM^{-1})からは説明しにくく、むしろ取り込みの動力学的解析(Bu濃度が低い場合(0.1mM以下)、pH7.2のKmはpH6.9のそれより10倍大きい)からpHが低くなると切片とBilの親和性が増加したことによると考えられる。

4、Bil取り込み過程はNa濃度に依存しなかった。

5、トリス濃度の増加はBil取り込み速度を増加させた。

6、低濃度の尿素はBil取り込み速度を減少させ、そのI_{50}は100mMであった。

Bil脳障害の成立に関与する重要な因子の一つとして臨床的にacidosisが考えられている。in vitroの実験からpHが低くなるとBilはミトコンドリアに取り込まれやすくなると報告されている(6)。これはpHの低下がBilをアルブミンから解離しやすくすることによると従来解釈されてきたが、Nelsonらは L-929細胞を用いてBil取り込みを調べ、Bilとアルブミンの結合定数は生理的pH範囲内で不変であり、従ってBu濃度も変化しないことからpH低下によるBil取り込みの増加は細胞側のBilに対する感受性がpHにより異なるためであろうと示唆した(5)。そこで我々は、より直接的かつ定量的にこの問題を解明するために大脳切片を用いてBil取り込みにおよぼすpH、イオンなどの影響を切片とBilおよびBSAとBilの相互作用の両面から検討した。

〈実験方法〉

切片の調製とBil取り込み実験：14～16日令のWistar King Aラットを断頭後、大脳を取り出しY.H.スライサーで前後方向に切って0.3mmの厚さの切片を調製し、その約100mgを5mM glucoseを含むKrebs-Ringerリン酸塩溶液(pH 7.4；2.5ml)中で37°C、45分間preincubationした。標準条件としては、preincubation終了後Krebs-Ringerリン酸塩溶液(pH 7.2)、5mM glucose、Bil(80μM)、BSA(60μM)を含む溶液に切片を移したのち、37°C、20分間incubationを行なった。incubation終了後、冷したKrebs-Ringerリン酸塩溶液(pH7.4)で二度切片を洗い、ガラス壁で切片表面の水分を取り除いた(9)。切片の重さを測り、9倍量の0.25Mショ糖を加えてホモジェナイズし、そのホモジェネート中のBilを定量した。

Bilの定量：ホモジェネートのBilはVan Royらの方法(8)を用いて測定した。

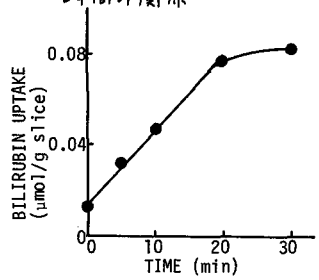
incubation 溶液中のBuは、Jacobsenの方法(4)で求めたBilとBSAの結合定数を用いて、溶液中の総Bil濃度とBSA濃度から計算した。

その他： 切片中のイヌリン、Na^+、K^+は、incubation終了後、4mlの6%TCAでホモジェナイズしホモジェネートを3000rpm、10分間遠心し、沈殿物を5mlの6%TCAで洗った後、再び遠心しその上清と先の上清を合わせて測定した。イヌリンはVaronとMallwainの方法(9)で、Na^+、K^+はPerkin-Elmer model 403原子吸光光度計で測定した。イヌリンスペースは、incubation後40.4±3.8μl/100mg slice (n=6)で各実験条件による差はなかったのでデーターはイヌリンスペースによる補正は特に行わなかった。また、実験に用いられた大脳切片の細胞機能保持の指標(1)として測定された若干の生物学的活性値は以下の通りであった。Na^+、K^+はそれぞれincubation前136±26 μegiv/g slice (n=6)、42±3 μegiv/g slice (n=6)、incubation後144±22 μegiv/g slice (n=8)、47±6 μegiv/g slice (n=8)でincubation前と後で有意差はなかった。酸素消費量(Beckman Field Lab Oxygen Analyzer使用)はincubation後で58±16 μmol/g slice/h (n=3)、ATP量は、preincubation前0.34 μmol/g slice、preincubation後0.83 μmol/g slice、incubation後0.89 μmol/g sliceであった。尚、5mM glucoseを含むKrebs-Ringerリン酸塩溶液(pH 7.2)の浸透圧(Advanced Osmometer model 3L使用)は269 mosmol/kg H_2Oであった。

〈結果および考察〉

Bil取り込みの経時的変化： 図1に標準条件下におけるBil取り込み量とincubation時間の関係を示した。incubation開始直後にかなりのBil取り込みがあるが、20分までは直線性があり、一方向の取り込みを示している。従ってこの実験では、Bil取り込み初速度1 μmol/20 min/g sliceを1 unit/g sliceで表示した。

図1. Bil取り込み量とincubation時間の関係



Bu濃度とBil取り込み速度： 標準条件下でBu濃度を増加させていくと、取り込み速度はMichaelis-Menten型となり(図4b)、逆数プロットをするとVmaxは1.5 units/g slice、Buに対するKmは240μMの値が得られた(図4a)。

Bil取り込み速度およびBilとBSAの結合に及ぼすpHの影響： incubation mediumのpH以外は全て標準条件にしてBil取り込み速度とpHとの関係を調べた(図2)。pH 7.2より酸性側で急激にBil取り込み速度は増加し、pH 6.7～6.9ではpH 7.4の約3倍になった。pHの変化がBilとBSAの結合に影響を与えるか否かを調べるために、pH 6.9、7.2、7.4の場合について76mMリン酸塩緩衝液25°Cでperoxidase法(4)によってBuを測定しScatchard plotから解析した。図3から各pHでBSA 1分子当り少なくとも1個のBilが結合することがわかった。結合定数はpH 7.4で57 μM^{-1}となり、この値はBlauerと

図2. Bil取り込み速度のpHによる変化

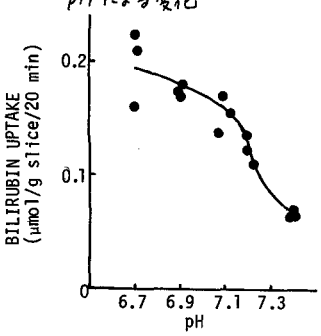


図3. Scatchard plots

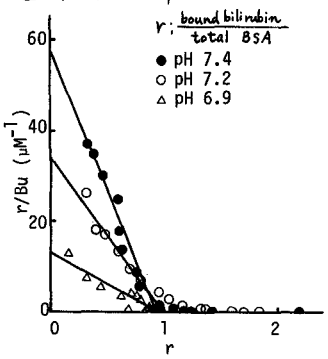
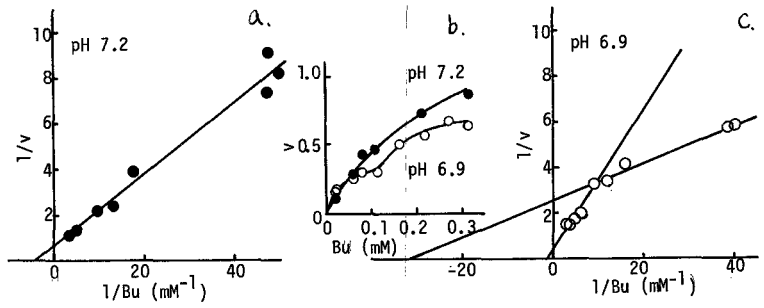


図4、pH 7.2 と 6.9 における Bu飽和曲線(b)と逆数プロット(a, c)



King が ORD で測定した値とよく一致している(2)。また、pH 7.2, 6.9 ではそれぞれ 34 μM^{-1}, 13 μM^{-1} となり pH が低くなるに従い結合定数が小さくなる傾向があったが、これらの値を用いて計算したメジウムの Bu 濃度は pH によってほとんど差がなかった。実際にメジウムの Bu 濃度を Sephadex 法(3)を用いて測定しても pH の変化による Bu 濃度の増減はまったくなかった。図4に pH 7.2 と pH 6.9 での Bil 取り込みを動力学的に調べた結果を示す。pH 6.9 の飽和曲線は二相性を示し pH 7.2 とはまったく異なる取り込み様式になった。図4c に示すように、pH 6.9 では二つの V_{max} と K_m をもち、Bu 濃度が低い場合(0.1 mM 以下)は V_{max} が 0.4 units/g slice、K_m が 31 μM、高 Bu 濃度(0.1 mM 以上)では V_{max} が 2.7 units/g slice、K_m が 830 μM であった。従って図2の条件下で pH の低下が Bil の脳切片への取り込みを上昇させる要因は切片側の Bil に対する親和性の増加と考えられるが、pH 6.9 では BSA の Bil binding capacity が pH 7.2 より小さいこと(pH 6.9 では第二の結合部位が存在しない)も考慮する必要があるかもしれない。

Bil 取り込み速度に及ぼすトリスの効果：　ラット小腸の Bil 取り込みは Na^+ 濃度に依存するという報告(7)があるので Na^+ の代わりにトリスを用いて Bil 取り込み速度を標準条件下で調べた結果を表1、2に示す。10 mM リン酸ナトリウムの代わりに 10 mM トリス塩酸を用いると取り込み速度が若干増加し、Na^+ をすべて $Tris^+$ に置き換えると取り込み速度は2倍になった(表1)。また表2に見られるように、50 mM トリス塩酸溶液で KCl を NaCl の代わりに加えた時の取り込み速度は 107 mM の NaCl を含むメジウムのそれとほぼ同じであった。以上のことから取り込み過程は Na^+ に依存しないこと、またトリス自身が取り込み速度を増加させることが考えられる。事実、76 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)、25°C での Bil-BSA の結合定数は 31 μM^{-1} であり、トリスが Bil-BSA の結合定数に影響を与え Bu を増加させたためではないことが判った。Bil 取り込み速度のトリスによる増加は尿素によって阻害され、その尿素濃度は通常蛋白変性をおこすのに用いられる濃度より十分低い。マニトールは尿素のような効果は示さなかった。

表1、Bil取り込みに及ぼす Na^+ と $Tris^+$ の効果

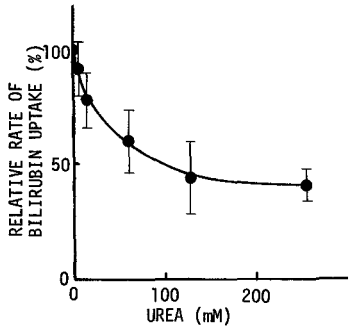
Buffered with	NaCl (mM)	$Tris^+$ (mM)	Relative rate of bilirubin uptake (%)
10 mM Sodium phosphate	127	0	100
10 mM Tris-Cl	127	10	130
147 mM Tris-Cl	0	147	203

表2、Bil取り込みに及ぼすトリス、KCl、尿素、マニトールの影響

Buffered with	NaCl (mM)	KCl (mM)	Other addition (mM)	Relative rate of bilirubin uptake (%)
10 mM Sodium phosphate	127	5.1	-	100
50 mM Tris-Cl	107	5.1	-	146
50 mM Tris-Cl	0	112	-	165
50 mM Tris-Cl	0	5.1	Urea, 214	101
50 mM Tris-Cl	0	5.1	Mannitol, 214	134

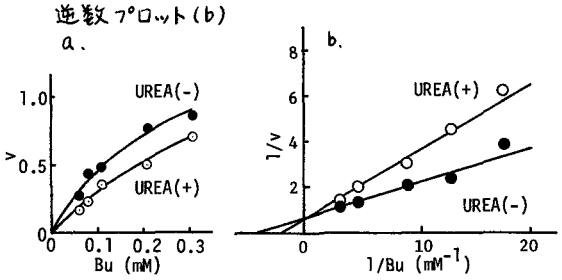
Bil 取り込み速度に対する尿素の阻害：　Bil 取り込みにおける低濃度の尿

図5、Bil取り込み速度と尿素濃度の関係



素の阻害効果をさらに詳細に検討した。尿素による阻害実験では、同一浸透圧にするために尿素の増加に伴いNaClを減らした。図5は尿素濃度とBil取り込み速度との関係を尿素無添加時(100%)の相対速度で示した。取り込みの阻害度は尿素濃度が増加するにつれて大きくなっていくことがわかる。50%阻害を起こす尿素濃度(I_{50})は約100mMであった。この濃度は通常蛋白変性を起こさしめる濃度よりもかなり低いが、BSA、Bilあるいはその両方のconformationに変化を与えることによってBilとBSAの結合に影響することも考えられるので、133mMの尿素の存在下で76mMリン酸塩緩衝液(pH 7.4)、25°Cで結合定数を求めた。Scatchard plotsは尿素のない場合とほとんど変わらず、結合定数は58μM^{-1}であった。127mM尿素存在下でのBil取り込みのkineticsは図6に示した。尿素添加はcompetitiveな阻害をもたらし、Kmは530μMになった。構造の非類似性から考えて尿素とBilが切片上の同じ部位で拮抗するとは断定しがたいが、低濃度の尿素は切片のBilに対する親和性を低下させることが明らかになった。

図6、尿素存在下と非存在下のBu飽和曲線(a)と逆数プロット(b)



以上述べたように、pHの変化、トリス、尿素は大脳切片のBil取り込みに大きな影響を与え、特にpHの低下は大脳切片(細胞)側のBilに対する親和性を著明に増加させることが明らかになった。このことは新生児の核黄疸成立におよぼす血液pHの効果を説明する一助になると考えられる。

〈文献〉

1. Bachelard, H. S., Campbell, W. J., and McIlwain, H. (1962) Biochem. J., 84, 225-232
2. Blauer, G., and King, T. E. (1970) J. biol. Chem., 245, 372-381
3. Chunga, F., and Lardinois, R. (1971) Acta pediat. scand., 60, 27-32
4. Jacobsen, J. (1969) FEBS Lett., 5, 112-114
5. Nelson, T., Jacobsen, J., and Wennberg, R. P. (1974) Pediat. Res., 8, 963-967
6. Odell, G. B. (1965) Pros. Soc. exp. Biol. Med., 120, 352-354
7. Serrani, R. E., Corchs, J. L., and Garay, E. A. R. (1973) Biochim. biophys. Acta, 330, 186-191
8. Van Roy, F. P., Meuwissen, J. A. T. P., De Meuter, F., and Heirwegh, K. P. M. (1971) Clin. chim. Acta, 31, 109-118
9. Varon, S., and McIlwain, H. (1961) J. Neurochem., 8, 262-275

19 脳切片における解糖系及び細胞内 Cl^- の取込みに対する K^+-rich medium の効果：その発育に伴う変化について

阿相皓晃・野田行文・石沢　弘
平野修助　（東邦大・医・2生理）

〔要　約〕

ラット脳組織切片を用いて発育過程における K^+-rich medium の影響を代謝活性の面と ^{36}Cl の取込みの面から検討した。解糖系では newborn で hexose monophosphate pathway [HMP] が強く働き Adult になるに従って Embden-Meyerhof parnas pathway [EMP] が強く働いていることはすでに知られているが，生後3日目で特に HMP が強い。K^+- 効果による HMP と EMP の metabolic pattern の変化は10日目以降から Adult でみられる様相を呈した。即ち K^+- 効果によって HMP の方へ強い作用が現われてくることを示している。細胞内外の Cl^- の濃度比は生後3日目までとその後に変化がみられる。それが明確になるのは15日以降であり低値を示す。また Cl^- の細胞内取込みに対する K^+- 効果が現われてくるのは15日目以降でありそれは Carbonic Anhydrase 活性の変化の上昇と HCO_3^--stimulated ATPase 活性の上昇 pattern と平行する。

脳発育の様子を形態的，化学的，機能的面から観察してゆくことは神経系研究上重要なことである。ラット脳組織の発育に伴う形態学的変化は神経細胞及びグリア細胞の発育期の差異によること(13)から発育に伴う代謝変化を追究することは，脳を構成する各種の細胞の代謝特性を考察する上で興味あることと考えられる。今回我々は発育段階をおってその脳切片を用い解糖系，及び ^{36}Cl の取込みに対する K^+- 効果の影響について追究を進めた。

〔実験方法〕

1) 実験動物；Wistar系ラットを用い生れた日を0日とし発育段階での脳の外套部を使用した。

2) 組織切片による K^+- 効果の実験；切片は外套部の皮質切片を用い，酸素消費は Warburg flask により Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4)，酸素気中，37°C で行なった。K^+- rich Medium の場合は KCl を 54mM，NaCl 98mM，に調整し等浸透圧下で行なった。基質のブドウ糖を 2.8mM としその測定は Anthron 法(18)により，乳酸形成量は Lactic dehydrogenase による DPNH 生成量を測定して算出した。また解糖系における hexose-monophosphate pathway [HMP] と Embden-Meyerhof parnas pathway [EMP] の代謝活性を測定する場合には [1-^{14}C]-D-glucose [NEN: 8.72mCi/mmol]，或いは [6-^{14}C]-D-glucose [NEN: 4.87 mCi/mmol] をそれぞれ基質として用いその際発生する $^{14}CO_2$ を $BaCO_3$ として捕捉しそれをミリポアフィルター上でトラップしその放射能を液体シンチレーション計数器 (Sarle-Analytical製 MarkII) で測定した。

3) 酵素活性の測定；① Carbonic Anhydrase の活性は K.M. Wilbur (21) らの方法に

従って測定した。(iii) HCO_3^--stimulated Mg^{++}ATPaseの測定はH. K. Kimelberg (12) らの方法に準じて行なった。

4) Cl^-の細胞内取込みに関する実験；Inulin AssumptionによるExtracellular Spaceの算出と^{36}Clの細胞内取込みの測定はT. H. Gill (9) らの方法に準じて行なった。すなわち[^{3}H]-Inulin [R.C.C. 2.5ci/m mol] と $Na^{36}Cl$ [NEN. 71.3μCi/ml] を2mlのKrebs-Ringerにそれぞれ0.1μCi, 0.02μCiを入れて37°Cでincubationした後，切片をミリポアフィルター上に乗せ，乾燥重量は80°Cで3時間乾燥してその値が一定になってから測定した。またDual isotope sampleの放射能は液体シンチレーションを使用して測定した。(^{36}Clの^3Hに対する干渉は約1%であり^3Hの^{36}Clに対する干渉は無である。)

[実験結果及び考察]

解糖系におけるhexose monophosphate pathway [HMP] とEmbden-Meyerhof parnas pathway [EMP] の代謝活性とK^+-効果による変化を発育段階で調べた。(表1, 表2.) すでによく知られているように(20). (10). (14). 発育過程による各pathwayの活性変化は，newbornとAdultでは著しく異なっている。つまり前者ではHMPが強く働いているのに比べて，後者ではEMPの方が強く働いている。metabolic pathwayは15日以降になるとほぼAdult typeとなってくる。さらに興味のあることは生後3日目の脳ではHMPが非常に強くむしろ[6-^{14}C]glucoseの利用が抑制されるような傾向にあり，このことは昨年の本学会で報告した(11) glioma (Astroglioma) での成績と似ている。K^+-効果によるHMPとEMPとの代謝活性の変化が発育過程でどのように変化するかを明らかにするため，K^+-効果におけるHMPとEMPの比(Ratio.) に対するControl MediumのRatio比を示したのが(図1)のK^+-Stimulation Effectである。生後10日目を境としてAdultまでその比は急激に増加し，少なくとも生後10日目以降でAdult typeに移行する。そしてK^+の効果は相対的にみるとHMPの方に強く働く。またK^+-効果によりブドウ糖消費も，乳酸形成も15日以降著しく増加する。(表2)

Fig. 1.

DEVELOPMENTAL CHANGES OF K^+-EFFECT ON METABOLIC ACTIVITIES OF HMP AND EM PATHWAY

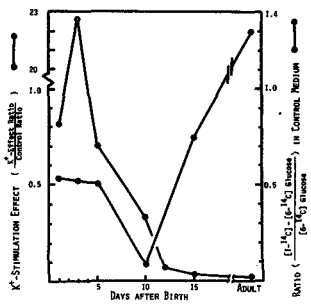


Table 1.

METABOLIC CHANGES OF [1-^{14}C] AND [6-^{14}C] GLUCOSE TO CO_2 IN CORTEX SLICES OF DEVELOPMENTAL RAT BRAIN

Age of Rat (Day)	Exp. No.	$^{14}CO_2$ production (10^4 x DPM/g-w.w./hr.) 1-^{14}C-Glucose	6-^{14}C-Glucose	Ratio*	Glucose Utilization (μmoles/g-w.w./hr.)	Lactate Formation (μmoles/g-w.w./hr.)
1	3	2.12±0.18@	1.17±0.08	0.82	12.9±1.60	8.12±1.71
3	3	2.13±0.11	0.90±0.05	1.37	12.1±1.90	8.11±1.10
5	3	2.40±0.61	1.41±0.21	0.70	13.8±1.61	9.63±0.89
10	3	4.77±0.12	3.59±0.18	0.33	16.6±1.63	10.8 ±1.61
15	4	6.66±0.51	6.42±0.59	0.04	17.6±2.58	11.1 ±1.14
Adult	4	9.59±1.39	9.46±0.84	0.01	18.7±1.83	16.1 ±0.75

* Ratio values were calculated from the relationship; $\frac{[1-^{14}CO_2]-[6-^{14}CO_2]}{[6-^{14}CO_2]}$

@ Values were expressed as mean ± S.D.

Table 2.

K^+-EFFECT ON METABOLIC CHANGES OF [1-^{14}C] AND [6-^{14}C] GLUCOSE TO CO_2 IN CORTEX SLICES OF DEVELOPMENTAL RAT BRAIN

Age of Rat (Day)	Exp. No.	$^{14}CO_2$ production (10^4 x DPM/g-w.w./hr.) 1-^{14}C-Glucose	6-^{14}C-Glucose	Ratio*	Glucose Utilization (μmoles/g-w.w./hr.)	Lactate Formation (μmoles/g-w.w./hr.)
1	3	2.67±0.71@	1.87±0.46	0.43	18.0±1.71	10.1 ±1.92
3	3	2.62±0.11	1.52±0.08	0.72	17.8±0.81	9.82±1.84
5	3	3.16±0.49	2.33±0.40	0.36	19.9±2.12	11.3 ±2.10
10	3	6.94±0.32	6.72±0.46	0.03	20.8±2.53	15.8 ±2.43
15	4	14.5 ±1.59	14.0 ±1.75	0.03	23.6±1.62	16.7 ±2.53
Adult	4	45.7 ±5.32	37.3 ±4.54	0.23	43.4±3.20	48.0 ±5.65

* Ratio values were calculated from the relationship; $\frac{[1-^{14}CO_2]-[6-^{14}CO_2]}{[6-^{14}CO_2]}$

@ Values were expressed as mean ± S.D.

さて，脳切片でmedium中のK^+－濃度を高くするとmetabolic rateの増加だけでなく，細胞膨化も増大し(2)(3)(4)またanion transport，特にCl^-の細胞内取込みが盛んになるということ(5)そしてこれを担っているのがAstrocyteであるということ(9)が報告されているので発育過程における脳切片での^{36}Cl取込みとK^+－効果の影響について調べた。(表3，表4)細胞内外のChloride濃度比を単位水分(ml)中の放射能の比(Ratio)としてみると(表3)生右3日目までは内外の比は等しいが，その後は小さくCl^-は細胞内に取込まれ難いことを示し，Chlorideに対するBarrierが作られ始められることを示唆している。

Table 3. INTRACELLULAR CHLORIDE SPACE OF DEVELOPING RAT BRAIN CORTEX SLICES

AGE OF RAT (DAY)	EXP. NO.	IC-H_2O * (ML/G-DRY W.)	IC-^{36}CL (10^4 X CPM/G-DRY W.)	RATIO OF CL-CONC. (IC / EC) **
1	2	6.20 @	5.63	0.91
3	2	6.99	7.65	1.09
5	2	7.73	6.26	0.81
10	2	7.99	6.16	0.77
15	3	5.15±0.13	4.13±0.22	0.80
ADULT	4	5.21±0.22	3.57±0.31	0.68

* INTRACELLUAR SPACE WAS CALCULATED BY INULIN ASSUMPTION.

** EXTRACELLULAR ^{36}CL CONCENTRATION : 10^4 CPM / 136 μ MOLES/ML-MEDIUM

@ VALUES WERE EXPERESSED AS THE MEAN OR MEAN ±S. D.

Table 4. EFFECT OF K^+-RICH MEDIUM ON ^{36}CL INCORPORATION INTO INTRSCELLULAR SPACE* OF DEVELOPING BRAIN CORTEX SLICES

AGE OF RAT (DAY)	EXP. NO.	CONTROL 10^4 X CPM/G-DRY W.	K^+-RICH ** 10^4 X CPM/G-DRY W.	RATIO (K/C)
1	2	5.63	5.67	1.01
3	2	7.65	7.58	0.99
5	2	6.26	5.46	0.89
10	2	6.16	6.22	1.01
15	3	4.13±0.22	4.42±0.09	1.07
ADULT	4	3.57±0.31	4.25±0.34	1.19

* INTRACELLULAR SPACE WAS CALCULATED BY INULIN ASSUMPTION.

** K^+-RICH MEDIUM : K = 54 MM, NA = 94.3 MM

次に発育段階での^{36}Clの取込みに対するK^+－効果をみると効果が現われるのは10日以降で明確になるのは15日目以降である。これらはK^+－rich mediumによるHMPとEMPの比がAdult typeへ移行してゆく時期とよく似た傾向を示している。表には示してないがInulin Assumptionによる細胞内水分量はnormal Mediumに比べて約10～20%の増加を示し，これまでの報告と一致する。(7)(3)(17)

K^+－効果などによるK^+－依存性Cl^-輸送がK^+－induced swellingに依存していること(7)(17)やCarbonic Anhydraseのspecific inhibitorであるAcetazolamideによって輸送系が抑制されることからこのSwellingはHCO_3^-の取込みとも関係していることを示唆している。(16)一方Anionの能動輸送系の存在するところにHCO_3^--Stimulated ATPase活性が高いということ(6)(12)から発育過程でのCarbonic AnhydraseとHCO_3^--Stimulated ATPaseの活性を測定した。(表5，表6)

Carbonic Anhydrase活性は3日目で急激にふえて15日目以降で急峻に増加している。これはK^+－効果で^{36}Clの取込みが増加する時期に等しい。HCO_3-Stimulated ATPase活性(表6)においてもK^+－効果によるのがみられるのは15日以降で40～50%の顕著な増加をみた。このこともK^+－効果による^{36}Clの取込みが増加する時期と一致することから，HCO_3^--Stimulated ATPaseがAnion transportに重要なかかわりあいを持つことを示唆している。Cation transportに関連のあるNa^+-K^+ ATPaseもこの時期にAdult typeになるということ(15)もあり，発育過程においてmetabolic rateの増大やswellingとionの取込みの増加を引き起こすようなK^+－効果は生右15日以降に顕著に出ており，脳の組織構造の完成時期と関連する。

Table 5.

DEVELOPMENTAL CHANGES OF CARBONIC ANHYDRASE IN RAT BRAIN

AGE OF RAT (day)	EXP. NO.	CARBONIC ANHYDRASE* (Unit/mg-Protein)
1	3	0.57±0.07 @
3	3	0.89±0.07
5	3	0.91±0.06
10	3	1.11±0.26
15	4	1.74±0.15
ADULT	4	7.39±0.65

* Enzyme activities were assayed at 4°C by colorimetric method.
@ Values were expressed as mean±S.D.

Table 6.

DEVELOPMENTAL CHANGES OF HCO_3^- STIMULATED ATPase IN RAT BRAIN

AGE OF RAT (day)	EXP. NO.	Mg-ATPase (μmoles of Pi released/mg-Protein/hr.)	$Mg\text{-}HCO_3^-$-ATPase	STIMULATION %*
1	4	1.67±0.17 @	2.07±0.15	24.0
3	4	1.79±0.18	2.27±0.17	26.8
5	4	2.14±0.18	2.77±0.22	29.4
10	4	2.91±0.20	3.65±0.38	25.4
15	4	3.70±0.44	5.21±0.58	40.8
ADULT	4	4.76±0.41	7.33±0.58	54.0

* Stimulation values were calculated from the relationship: $\frac{[Mg\text{-}HCO_3^-]-[Mg]\ ATPase}{[Mg]\ ATPase}$
@ Values were expressed as mean±S.D.

ラットの脳組織は生下時で神経細胞の成熟化が進む時期であり，それに伴いグリア細胞の分化が起こり次いでミエリンの形成が始まることが知られている。このように脳組織を構成する各種細胞の成熟分化の時期が異なっていることと，今回の成績とを考え合わせると生右3日目における解糖系や^{36}Clの取込みの特異なパターンはグリア細胞の分化と関連するのかもしれない。

またK^+効果が10日及至15日目頃からAdult patternになってくることは，脳におけるK^+効果は成熟した細胞構成を持つ脳の代謝的特徴と言える。すなわちイオンによる代謝的調節機構はNeuron，gliaの相関のもとでひき起こされるものであり得ると言えよう。さらに生右3日目にmetabolic patternが大きく変化することを重視し，脳特異蛋白でglial originと言われている(8) S-100 proteinのdistributionやAstrogliaに局在すると言われているglial fibrillary acidic protein [GFAP] (1)を発育段階で調べているのでこれも合せて報告するつもりである。

終りに本研究に御協力を頂いた若林薫研究員に深謝致ます。

REFERENCES:

1. Bignami,A.,Eng,L,F.,Dahl,D.,and Uyeda,C,T.,Brain.Res.,43,429(1972).
2. Bourke,R,S.,and Tower,D,B.,J.Neurochem.,13,1071(1966a).
3. Bourke,R,S.,and Tower,D,B.,J.Neurochem.,13,1099(1966b).
4. Bourke,R,S.,Exp.Brain.Res.,8,219(1969).
5. Bourke,R,S.,and Nelson,K,M.,J,Neurochem.,19,663(1972a).
6. Bourke,R,S.,and Nelson,K,M.,J.Neurochem.,19,1225(1972b).
7. Bourke,R,S.,and Kimelberg,H,K.,J.Neurochem.,25,323(1975).
8. Cicero,T,T.,Cowan,W,M.,Moore,B,W.,and Suntzeff,V.,Brain.Res.,18,25(1970).
9. Gill,T,H.,Young,O,M.,and Tower,D,B.,J.Neurochem.,23,1011(1974).
10. Guerra,R,M.,Melgar,E.,and Villavicencio,M.,Biochem.Biophys.Acta.,148,356(1967).
11. 平野，野田，金松，阿相，神経化学，15，172(1976).
12. Kimelberg,H,K.,and Bourke,R,S.,J.Neurochem.,20,347(1973).
13. 松谷，塚田，神経の変性と再生(医学書院) 63～84 p. (1975).
14. O'Neil,J,J.,Simon,S,H.,and Shreeve,W,W.,J.Neurochem.,12,797(1965).
15. Samson,F,E.,Dick,H,C.,and Balfour,W,M.,Life.Sci.,3,511(1964).
16. Samson,F,E.,and Quinn,D,J.,J.Neurochem.,14,421(1967).
17. Schousboe,A.,and Hertz,L.,J.Neurochem.,18,67(1971).
18. Scott,T,A.,and Melvin,E,H.,Anal.Chem.,25,1656(1953).
19. Tower,D,B.,and Young,O,M.,J.Neurochem.,20,269(1973).
20. Villee,C,A.,and Loring,J,M.,Biochem.J.,81,488(1961).
21. Wilbur,K,M.,and Anderson,N,G.,J.Biol.Chem.,176,147(1948).

20 ラット大脳シナプトゾーム分画へのD-アスパラギン酸のとり込み機構

高垣玄吉郎　（都神経研・神経生化）

〔要　約〕

(1)さきに著者は，D-[^{3}H]グルタミン酸がラット大脳皮質シナプトゾーム分画に親和性の低い単一な系(K_m=0.80mM)でとり込まれることを示したが，D-[^{14}C]アスパラギン酸は親和性の高い単一な系(K_m=15.1μM)によりとり込まれる。D-アスパラギン酸とり込みのV_{max}は，L-アスパラギン酸の親和性の高いとり込み系のV_{max}より大きい。D-[^{14}C]アスパラギン酸は，シナプトゾーム分画(P_2)により in vitro で殆んど代謝されない。(2)D-[^{14}C]アスパラギン酸のP_2分画へのとり込みのこの様な成績は，ラット大脳切片へのとり込みの特徴(Davies & Johnston, 1976)に一致している。(3)D-[^{14}C]アスパラギン酸のP_2分画へのとり込みの種々の特徴を解析した成績は，D-，L-アスパラギン酸とグルタミン酸が共通なcarrierにより輸送されることを示し，L-グルタミン酸のとり込みが親和性の異なる2つの系によると云う一般に信じられている考えを疑わせる。(4)D-アスパラギン酸のP_2分画へのとり込みに伴なう，アスパラギン酸およびグルタミン酸の濃度変化を double isotope dansylation 法により測定したところ，見かけ上，グルタミン酸が交換して放出されることが示された。この成績は，このとり込み系の生理的意義を考察する場合，重要なものであろう。

〔方法〕：①ラット大脳皮質からWhittakerの方法によりP_2分画(粗シナプトゾーム分画)を調製した。②D-[^{14}C]アスパラギン酸は，DL-[4-^{14}C]-アスパラギン酸からそのβ-デカルボキシラーゼ(*P. dacunhae*より精製。田辺研・千畑一郎博士より供与。)[4]を用いて調製した。③D-[^{14}C]アスパラギン酸などラベルしたアミノ酸のP_2分画によるとり込みの測定は，Millipore filterを用いる方法によった。④P_2分画とメジウムのグルタミン酸とアスパラギン酸の濃度の測定は，イオン交換樹脂カラムクロマトと double isotope dansylation法[3]を組合せた方法によった。その大略を図1に示した。⑤P_2分画をインクベートするメジウムの組成は，128.1mM-NaCl; 5.0mM-KCl; 2.7mM-$CaCl_2$; 1.2mM-$MgSO_4$; 1.2mM-Na_2HPO_4; 30mM-グリシルグリシン，pH 7.4 (NaOHで中和); 5mM-グルコース; で，インクベーションはすべて空気中(好気的)で行なった。⑥その他の実験方法は，従来の方法[6]によった。

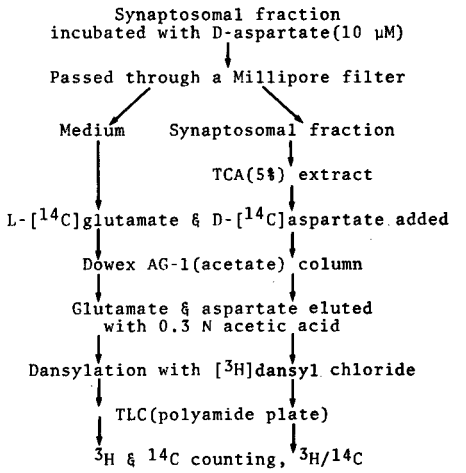


図1：シナプトゾーム分画とメジウムのグルタミン酸とアスパラギン酸の測定。

〔成績と考察〕(A)D-[^{14}C]アスパラギン酸のP_2分画へのとり込み(図2)。

L-グルタミン酸やL-アスパラギン酸は，P_2分画に親和性の異なる2つの輸送系でと

り込まれることが知られている。著者はさきに，D-[^{3}H]グルタミン酸がP_2分画に親和性の低い単一の系(K_m=0.80 mM)でとり込まれることを示した。[6] ところが，D-[^{14}C]アスパラギン酸は親和性の高い単一の系(K_m=15.1 μM)によりとり込まれる(図2)。D-アスパラギン酸とり込みのVmaxは，L-アスパラギン酸とり込みの親和性の高い系のVmaxよりも大きく，L-グルタミン酸とり込みの親和性の高い系のそれにほぼ等しい。D-[^{14}C]アスパラギン酸はP_2分画(in vitro)で殆ど代謝されない。D-アスパラギン酸のP_2分画へのとり込みのこのような成績は，ラット大脳皮質切片へのD-アスパラギン酸のとり込みの特徴に一致している(Davies & Johnston, 1976)。[2] 彼等はこの成績にもとづき，D-アスパラギン酸を用いて親和性の高いとり込み系の機構を解析しうる可能性を示唆した。

D-[^{14}C]アスパラギン酸のP_2分画へのとり込みは，次のような特徴を示す。①メジウムにNa^+が存在することが必要で，他のイオンでは代理されない。②メジウムのNa^+濃度を低くするとKmは大きくなるが，Vmaxは変化しない。③Na^+はD-アスパラギン酸輸送系のco-substrateであることが示唆される。④メジウムのK^+を除くと，D-アスパラギン酸のとり込みは(アスパラギン酸と)拮抗的に阻害される。⑤ウアバインはD-アスパラギン酸のとり込みを拮抗的に阻害する(図2)。⑥P_2分画のNa-K ATPase活性では，メジウムのK^+はTl^+, Rb^+, NH_4^+で代理されるが，D-アスパラギン酸のとり込みでは，K^+はRb^+によってのみ代理される。

これらの①～⑥の特徴は，L-グルタミン酸，L-アスパラギン酸，D-グルタミン酸のとり込みでも同様に認められ，GABAのとり込みの特徴とは著しく異なっている。

(B) D-[^{14}C]アスパラギン酸とり込みの構造類似物質による阻害(表1)。

アスパラギン酸と構造の関連した物質のうちでは，L-グルタミン酸のほか，システイン酸とシステイン・スルフィン酸が強い阻害を示す(表1)。この成績は，大脳皮質切片でのL-グルタミン酸のとり込みについての報告[1]に一致する。D-グルタミン酸，D-システイン酸，L-ホモシステイン酸は，D-[^{14}C]アスパラギン

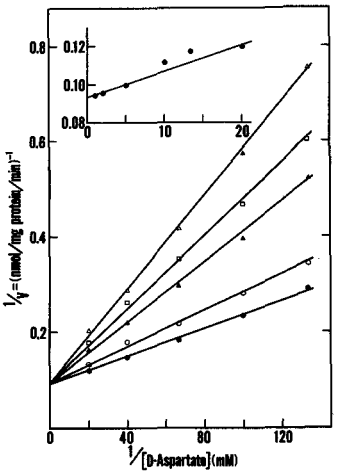


図2：D-[^{14}C]アスパラギン酸とり込みのLineweaver-Burk plots.

●, control medium, Na^+, 137.8 mM;
○, Na^+, 84.2 mM; □, Na^+, 31.0 mM;
▲, 5 x 10^{-5}M ouabain;
△, 5 x 10^{-4}M ouabain.

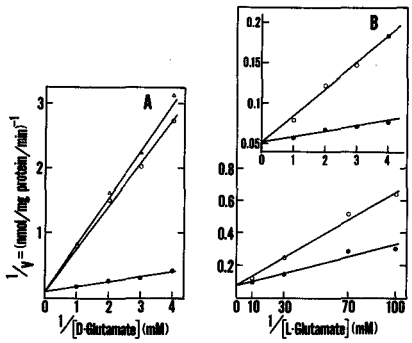


図3：L-および D-[^{14}C]グルタミン酸とり込みのLineweaver-Burk plots.

(A): ●, control; ○, + 0.25 mM-D-aspartate
△, + 0.25 mM-L-aspartate.
(B): ●, control; ○, + 25 μM-D-aspartate;
○, (上部挿入) + 0.25 mM-D-aspartate.

表1：D-[^{14}C]アスパラギン酸などのとり込みの構造類似物質による阻害。

Compounds	Rate of Uptake of: D-Aspartate (10 μM)	L-Glutamate (10 μM)	D-Glutamate (10 μM)	GABA (10 μM)
	(nmol/mg protein/min)			
Control (without addition)	4.41 ± 0.40	3.82 ± 0.34	0.151 ± 0.018	1.34 ± 0.08
(100 μM)	(percent of control)			
D-Aspartate		18.4	16.5	96.8
L-Glutamate	28.6		26.5	93.6
L-Cysteate	16.8	14.8	13.8	93.7
D-Cysteate	87.0	87.7	58.0	94.9
DL-Homocysteate	101.3	95.7	87.1	97.4
L-Homocysteate	92.7	86.5	82.0	
L-Cysteine Sulfinate	15.3	13.2	10.5	95.0
Taurine	95.9	90.2	110.6	
L-Asparagine	93.4	86.3	105.1	
N-Acetyl-L-Aspartate	95.8	92.6	86.9	96.9
GABA	84.1	88.4	104.7	
L-Glutamine	95.5	93.8	91.9	90.4
L-Glutamate-γ-Methyl Ester	86.2	85.3	86.3	94.7
Kainate	77.1	73.8	60.0	93.4

6-8例の実験の平均値を示す。

酸のP_2分画へのとり込みを阻害しない。親和性の低いD-グルタミン酸のとり込みも，阻害物質による影響はD-アスパラギン酸のとり込みと同様である。GABAのとり込みは，これらの物質により全く影響をうけない。

(C) L-およびD-[^{14}C]グルタミン酸とり込みのD-アスパラギン酸による阻害(図3)。

L-グルタミン酸とり込みの親和性の高い系も親和性の低い系も，D-アスパラギン酸により拮抗的に阻害される。親和性の低い単一の系によるD-グルタミン酸のとり込みも，D-アスパラギン酸，L-アスパラギン酸により拮抗的に阻害される。

(A)～(C)の成績は，L-およびD-グルタミン酸とアスパラギン酸が共通のcarrierにより輸送されることを示し，L-グルタミン酸のとり込みが親和性の異なる2つの系によるという考えを疑わせる。

(D) D-アスパラギン酸のとり込みとグルタミン酸の放出(表2)。

D-[^{14}C]アスパラギン酸を用いた実験では，そのとり込みと高濃度のKCl(50mM)による放出の差引計算は明瞭に正確に示される。ところが，Leviら[5]が指摘したように，この見かけのとり込み・放出は内在のアスパラギン酸との交換によるもので，正味のとり込み・放出ではないかもしれない。表2は，P_2分画をD-アスパラギン酸(10μM)とインクベートしたのちP_2分画とメジウムを分離し，それぞれアスパラギン酸とグルタ

表2：D-アスパラギン酸のとり込みに伴なうアスパラギン酸とグルタミン酸の濃度変化。

	Medium		P_2 fraction	
	Aspartate	Glutamate	Aspartate	Glutamate
	(nmol/ml)		(nmol/mg protein)	
Without addition				
0 min	5.88 ± 1.88	11.55 ± 2.57	23.68 ± 2.50	48.86 ± 3.20
5 min	6.89 ± 1.92	12.94 ± 2.88	24.30 ± 2.48	47.87 ± 4.07
10 min	6.83 ± 1.07	12.21 ± 0.96	23.97 ± 1.80	44.69 ± 3.56
20 min	7.91 ± 1.22	11.99 ± 1.62	23.84 ± 1.43	39.72 ± 2.05
With 10 μM-D-aspartate				
1.5 min	12.08 ± 2.69	15.23 ± 2.43	27.14 ± 1.60	44.92 ± 3.67
5 min	10.77 ± 1.70	15.31 ± 2.12	28.91 ± 2.22	42.77 ± 4.28
10 min	8.60 ± 1.07	11.62 ± 1.46	31.88 ± 1.71	45.69 ± 2.37
20 min	10.76 ± 1.69	13.81 ± 2.37	29.04 ± 3.06	41.70 ± 2.81
With 10 μM-D-aspartate for 7.5 min, then 50 mM-KCl added, and incubation continued further for 12.5 min.	33.60 ± 2.62	38.60 ± 2.82	9.76 ± 1.21	13.66 ± 1.37

Mean ± S.D.
6-8例の平均を示す。

ミン酸を定量した成績を示したものである。アスパラギン酸濃度がP_2分画で増加し，メジウムで減少するのに伴ない，グルタミン酸がメジウムで増加し，P_2分画で減少する。すなわち，アスパラギン酸とグルタミン酸が交換すると理解される。高濃度のKClによっては，アスパラギン酸もグルタミン酸も，メジウムでの濃度が増加し，P_2分画での濃度が減少する。

このような成績は，グルタミン酸・アスパラギン酸の活発なとり込み系の生理的意義を考察する場合，重要なものになるだろう。

〔文献〕(1) Curtis, D.R. & Johnston, G.A.R.(1974): Rev.Physiol. 69, 97-188. (2) Davies, L.P. & Johnston, G.A.R.(1976): J.Neurochem. 26, 1007-1014. (3) Joseph, M.H. & Halliday, J.(1975): Analyt.Biochem. 64, 389-402. (4) Kakimoto, T., Kato, J., Shibatani, T., Nishimura, N. & Chibata, I.(1969): J.biol.Chem. 244, 353-358. (5) Levi, G. & Raiteri, M. (1976): Int.Rev.Neurobiol. 19, 51-74. (6) Takagaki, G.(1976): J.Neurochem. 27, 1417-1425.

21 シナプトソームおよびニューロン，グリア細胞群へのD-glucose anomerの取り込みの特異性について

難波経篤・安藤正人・永田　豊
（保健衛生大・医・生理）

〔要　約〕

脳活動の基本的なエネルギー源のD-glucoseは、水溶液中ではα-D-glucoseとβ-D-glucoseとが各々36.5%と63.5%の割合で混在している。我々はラット大脳皮質よりシナプトソーム，ニューロンおよびグリア細胞群を分離し，^{3}H-D-glucoseを用いてα-およびβ-anomerの取り込みをin vitroで比較し，さらに脱分極条件ならびに膜輸送阻害剤の影響を調べた。

生理溶液中で短時間(5分間)のincubationでは、シナプトソーム，ニューロンおよびグリア細胞群ともα-anomerよりもβ-anomerがより優先的に取り込まれた。シナプトソームへのD-glucoseの取り込みは、mediumのCa^{2+}を除去すると，α-anomerの取り込みがより増加したが、Na^{+}除去あるいはphlorizinおよびouabainの添加では，よりβ-anomer取り込みの抑制効果がみられた。

発育脳より分離した細胞群のD-glucose anomerの取り込み優先性は，グリア細胞群では20日令以降α-anomerよりβ-anomerに認められたが，ニューロン分画では30日令以降差異が生じた。分離脳細胞群のin vitro-incubationの際，脱分極条件では両細胞群ともα-anomerの取り込み増加がβ-anomerよりはっきり認められ，これは特にニューロン分画で顕著であった。一方，糖の膜輸送系が抑制された条件では，anomer levelでのD-glucose取り込みの減少に，明確な差異が認め難かった。

脳活動に必須なエネルギー基質のglucoseは水溶液中では二種の変旋光異性体(anomer)，α-D-glucoseとβ-D-glucoseとがそれぞれ約36.5%と63.5%の平衡状態で混在していることが知られている。[11][12] 生体組織を用いてのglucoseの取り込みあるいは代謝に関するin vivoあるいはin vitroの研究は、この両anomerが平衡状態で混在しているD-glucoseを使用しており anomer levelでの解析は殆んどなされていない。そこで極めて高いglucose取り込みと利用のみられる脳組織で、何れのanomerがより優先的に取り込まれ利用されているかを、脳機能と関連させて調べることは興味深くかつ重要な課題であると考えられる。

我々は昨年の本学会で[9]、主としてラット大脳皮質切片へβ-D-glucoseの方がα-D-glucoseより優先的に取り込まれ利用されるというanomeric specificityについて報告した。また脱分極条件として知られる、溶液中にKClの添加あるいはCa^{2+}の除去を行なうとα-anomerの取り込みがβ-anomerより増加傾向が認められる反面、膜の輸送阻害剤であるphlorizin、ouabainの添加、あるいはNa^{+}の除去を行なうとβ-anomerの取り込みがより抑制傾向を示すことをも明らかにした。

今回我々はラット大脳皮質より分離したシナプトソームおよび分離ニューロンおよびグリア細胞群を用いて、D-glucose取り込みのanomeric specificityならびに種々の溶液のイオン組成の変動や阻害剤の影響について検討し、脳切片の場合と比較した。

〔実験材料および方法〕

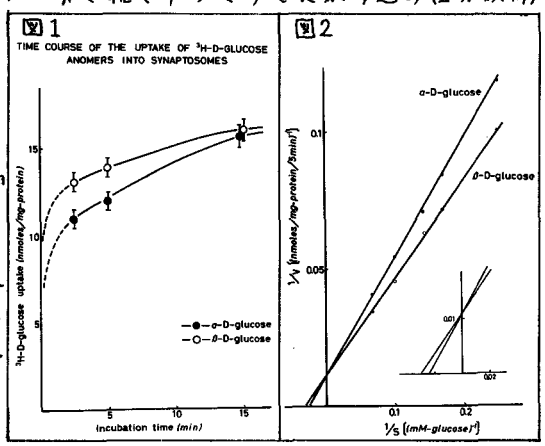
体重200~250gのウィスター系成熟ラットの大脳を生食水で灌流後摘出した。発育脳は出生日を0日とし、出生後の該当日数のものを用いた。シナプトソームの分離は、Whittaker & Barker[15]の方法によるP_2分画から得たB分画を用いた。ニューロンとグリア細

胞群の分離は、Nagata ら[8]の Bulk-Separation 法に従った。incubation には終濃度 118mM-NaCl, 4.7mM-KCl, 2.5mM-$CaCl_2$, 1.2mM-$MgSO_4$, 1.2mM-Na_2HPO_4 および 35.5mM-Glycyl-Glycine, pH7.4 (以下 SBS と略す) を用いた。放射性 glucose anomer (α-D-[1-^{3}H]-glucose および β-D-[1-^{3}H]-glucose) は Miwa らの方法[7]によって調製した。2-deoxy-D-[^{3}H]-glucose は Radiochemical Centre (Amersham, England) より購入した。分離されたシナプトソーム，ニューロンあるいはグリア細胞群への ^{3}H-glucose の取り込みは、予め5分間の pre incubation (37°C) の後、直前に冷 SBS で溶解した α- または β-D-[1-^{3}H]-glucose を添加 (終濃度 100mg%) し、更に一定時間 (主として5分間) の好気的 incubation を続けた。incubation 終了後溶液の一定量をミリポアフィルター (D.A.0.65μm) にのせ，吸引沪過，0.9%NaCl で洗浄して細胞外成分の contamination を除いた後フィルターを乾燥させ、10 ml の Bray's scintillation fluid mixture に入れ液体 Scintillation Spectrometer (Packard, Tri-carb, Model 2650) で計数した。細胞内に取り込まれた glucose 量は、外液の放射能を計数して算出した。2-deoxy-D-[^{3}H]-glucose の脳細胞内への取り込みも同様に行なった。蛋白の定量は Lowry らの方法[6]で測定した。

脳に取り込まれた D-glucose は速やかに分解されて細胞内濃度が減少すると考えられる。そこで組織内では代謝・分解を受けない 2-deoxy-D-[^{3}H]-glucose を用いて、脳切片およびシナプトソームへの取り込みを観察したが，極く短時間 (5分間) 以内では ^{3}H-D-glucose の取り込みと殆んど差異が認められず、大部分 D-glucose の形で細胞内に留まっていることが推測された。

〔実験成績ならびに考察〕

シナプトソーム分画への D-glucose anomer 取り込みの時間経過 (図-1) は、glucose 添加直後の非常に速い取り込み (約2分以内) 過程とそれに引き続くゆっくりした取り込み (2分以降) とを示し、2つの component が想定された。この glucose の取り込みは 2.5分および5分間の短時間の incubation で既に β-anomer の方が α-anomer より明らかに優先的に取り込まれることを示しているが、15分間の incubation では anomer の spontaneous mutarotation が進み[4][9]、従って両 anomer 間に取り込みの差は見られなくなったものと理解される。つまり、incubation を開始して5分後には既に、α-anomer は約30%が β-anomer へ、β-anomer は約20%が α-anomer へと変旋光を来たしている[9]。SBS 中では、5分間の incubation の間に D-glucose は α-anomer よりも β-anomer が約17%より多く取り込まれた (図-1, 表-1)。したがって、もし mutarotation が全く起らないとすれば、このβ/αの取り込み比はさらに大きな値となるはずである。



β-anomer の取り込みの優先性は、既に大脳皮質切片[9]，人の脳循環[13]，単離膵島細胞[7]，人赤血球膜[1][3]，あるいは Ehrlich 腹水癌細胞等[4]で報告されているが、その生理学的意義について未だ不明である。しかし最近，Niki ら[10]、Grodsky ら[5]は単離したラット膵島よりのインスリン分泌は α-anomer によって特に有効に促進されるが、一方 β-anomer は主に細胞のエネルギー源として利用されうると報告しており，D-glucose の取り込みと代謝が anomer level で生理的機能を異にする点に注目している。　図-2 はシナプトソームへの5分間の D-glucose

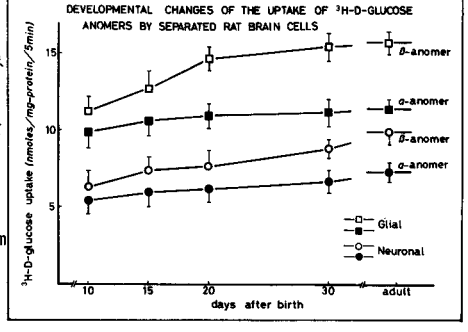
anomerの取り込みについてのLineweaver-Burk plotで、見かけのKm値はα-anomerでは33.3mM, β-anomerでは41.6mMであった。このことは、細胞表面膜には、α-anomerとβ-anomerを識別し得る機構あるいは構造が存在しており、おそらく同一のcarrierで取り込みが行なわれ得る可能性が示唆された。細胞膜の脱分極を起す条件のCa^{2+}-free medium中でシナプトソームをincubateすると、D-glucoseは脳切片の場合と同様、α-anomerの方がβ-anomerより多く取り込まれる傾向が示された。しかしmedium中のK^+を70mMに増大させた時には、D-glucoseの取り込みの増加は見られず、またanomer levelでの差も認め難く、切片標本とは異なる事が示された。一方、glucoseの細胞内への輸送を阻害する条件すなわちNa^+-free medium, phlorizinあるいはouabainの添加medium中でのincubationでは、シナプトソーム内へのD-glucose anomer蓄積の抑制は、α-anomerよりむしろβ-anomerに著明に認められた。例へばphlorizinによるD-glucose anomerのシナプトソームへの取り込み抑制は、見かけのKmがα-anomerのものとβ-anomerのものと明らかに異っており、細胞膜表面での識別機構の差異が推測される。発育脳より分離したニューロンおよびグリア細胞群へのD-glucose anomerの取り込みをみると(図-3)、グリア細胞群の方がニューロン群より高い取り込みが示された。そして分離グリア細胞群では生後20日令においてすでにβ-anomerの方がα-anomerより優先的に取り込まれたにもかかわらず、分離ニューロン群においては30日令以降になって初めて同様なanomerの取り込み差が認められた。このD-glucose anomer取り込みの特異性の発現は、脳切片でみられるK^+効果の発現時期より稍おくれており[14]、しかもグリアの方がニューロンよりも早期にanomer取り込みの識別が示されたことは、グリア細胞群がglucoseの機能代謝系に重要な意義をもつことが推測される。分離ニューロンおよびグリア細胞群のglucose anomerの取り込みは(表-2)、SBS中でのincubationではα-anomerよりβ-anomerがニューロンでもグリア細胞群でもほぼ同様(36-37%)明らかに優先的に取り込まれた。脳切片の場合と同様、KCl-70mM(経濃度)添加(K^+効果)[2]あるいはCa^{2+}除去という脱分極条件では、ニューロンおよびグリア細胞群へのα-anomerの取り込み増加がβ-anomerよりも多いことが示された。しかし細胞膜のglucoseの輸送を抑制すると考えられるNa^+-free choline medium, phlorizin, ouabain添加medium中ではニューロンおよびグリア細胞群分画へのD-glucoseの取り込みは、

表1
EFFECTS OF IONIC CHANGES AND INHIBITORS ON D-GLUCOSE ANOMER UPTAKES BY SYNAPTOSOMAL FRACTIONS FROM RAT BRAINS

	α-D-glucose	change(%)	β-D-glucose	change(%)	β/α ratio
S B S	11.88±0.48 (15)		13.96±0.52 (15)		1.17
K^+-rich (70 mM)	12.45±0.77 (10)	+ 4.8	14.00±0.85 (10)	+ 0.2	1.12
Ca^{2+}-free	14.63±0.73 (10)	+23.1	16.45±0.79 (10)	+17.8	1.12
Na^+-free	7.99±0.69 (10)	-32.8	7.87±0.41 (10)	-43.6	0.98
phlorizin 1.5mM	8.66±0.39 (10)	-27.1	8.70±0.46 (10)	-37.7	1.00
0.5mM	11.16±0.60 (10)	- 6.1	10.65±0.45 (10)	-23.7	0.95
ouabain 1 μM	9.63±0.59 (10)	-19.0	9.27±0.36 (10)	-33.6	0.96
IAA 1mM	11.80±0.30 (10)	- 0.7	11.31±0.34 (10)	-19.0	0.96

nmoles D-glucose uptake/mg-protein/5min
D-glucose concentration in the medium : 100mg%

図3



明らかに抑制されたけれども、anomer levelでの特異的識別は特に明瞭に示されなかった。また解糖系の阻害剤のモノヨード酢酸(IAA)を作用させた場合、むしろα-anomerの取り込みがβ-anomerより強く抑制される傾向が示されたが、この現象の解釈には解糖系諸酵素の段階でのanomer特異性をも考慮する必要があることを示唆している。

さらに今後、シナプトソーム、ニューロンおよびグリア細胞群などのglucose anomerの取り込み機構のみならず、細胞内における代謝経路等についてもD-glucose anomer特異性の面から脳機能とも考え合せながらさらに詳細に検討する必要があろう。

表2

EFFECTS OF IONIC CHANGES AND INHIBITORS ON D-GLUCOSE ANOMER UPTAKES BY BULK-SEPARATED NEURONAL AND GLIAL FRACTIONS FROM RAT BRAINS

neuronal fraction	α-D-glucose	change(%)	β-D-glucose	change(%)	β/α ratio
S B S	7.31 ± 0.35 (15)		9.95± 0.59 (15)		1.36
K^+-rich(70mM)	8.90 ± 0.43 (9)	+21.7	11.86± 0.56 (9)	+19.2	1.33
Ca^{2+}-free	9.08 ± 0.59 (6)	+24.2	11.99± 0.68 (6)	+20.5	1.32
Na^+-free	5.39 ± 0.22 (6)	−22.3	7.67± 0.21 (6)	−23.0	1.42
phlorizin 1.5 mM	1.37 ± 0.15 (6)	−81.3	1.48± 0.10 (6)	−85.2	1.08
0.5 mM	3.46 ± 0.33 (6)	−52.7	3.57± 0.28 (6)	−64.2	1.03
ouabain 1μM	6.72 ± 0.42 (6)	− 8.1	7.10± 0.43 (6)	−28.7	1.05
IAA 1mM	3.43 ± 0.38 (6)	−53.1	6.25± 0.36 (6)	−37.2	1.82
glial fraction	**α-D-glucose**	**change(%)**	**β-D-glucose**	**change(%)**	**β/α ratio**
S B S	11.44± 0.49 (15)		15.72± 0.76 (15)		1.37
K^+-rich(70mM)	13.34± 0.62 (6)	+16.6	17.46± 0.60 (6)	+11.6	1.31
Ca^{2+}-free	13.31± 0.79 (6)	+16.3	17.45± 0.82 (6)	+11.0	1.31
Na^+-free	10.65± 0.46 (6)	− 7.0	13.89± 0.38 (6)	−11.7	1.30
phlorizin 1.5 mM	2.81 ± 0.14 (6)	−75.5	2.76 ± 0.19 (6)	−82.5	0.98
0.5 mM	5.20 ± 0.38 (6)	−54.6	6.87 ± 0.54 (6)	−56.3	1.32
ouabain 1μM	9.92 ± 0.58 (6)	−13.3	9.82 ± 0.46 (6)	−37.6	0.99
IAA 1mM	6.25 ± 0.49 (6)	−45.5	10.21 ± 0.75 (6)	−35.1	1.63

nmoles D-glucose uptake/mg-protein/5min
D-glucose concentration in the medium : 100mg%

〔文献〕

(1) Barnet, J.E.G., Holman, G.D. and Munday, K.E. (1973) Biochem. J. 131: 211-221
(2) Bradford, H.F. and Rose, S.P.R. (1967) J. Neurochem. 14: 373-375
(3) Faust, R.G. (1957) J. Biol. Chem. 224: 649-662
(4) Fishman, P.H. and Bailey, J.M. (1974) Am. J. Physiol. 226: 1007-1014
(5) Grodsky, G.M., Fanska, R., West, L. and Manning, M. (1975) Science 186: 536-538
(6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275
(7) Miwa, I., Okuda, J.,Niki, H. and Niki, A. (1975) J. Biochem. 78: 1109-1111
(8) Nagata, Y., Mikoshiba, K. and Tsukada, Y. (1974) J. Neurochem. 22: 493-503
(9) 永田 豊, 難波経篤, 安藤正人, 三輪一智, 奥田 潤 (1976) 神経化学 15: 176-179
(10) Niki, A., Niki, H., Miwa, I. and Okuda, J. (1974) Science 186: 150-151
(11) Okuda, J. and Miwa, I. (1973) in Methods of Biochemical Analysis, ed. D. Glick, 21: 155-187, John Wiley
(12) Pigman, W. and Isbell, H.S. (1968) in Advance in Carbohydrate Chemistry, eds. Wolfrom, M.L. and Tipson, R.S. 23: 11-57, Academic Press
(13) Sacks, W. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 123: 507-513
(14) Takagaki, G. (1974) J. Neurochem. 23: 479-487
(15) Whittaker, V.P. and Barker, L.A. (1972) in Methods of Neurochemistry, ed. R. Fried, 2: 1-52, M. Dekker

22 2′, 3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase (CNPase) の高速液体クロマトグラフィーによる微量・迅速定量法と部分精製について

塚田裕三・永井克子・須田治彦
(慶大・医・生理)

〔要　約〕

ミクロ高速液体クロマトグラフィー(日本分光FAMILIC-100)により1μlの試料でCNPase活性を迅速かつ正確に定量し得る方法を開発した。カラムはテフロンチューブ(0.5mm×10cm)にシリカゲルSN-01-NH_2を充填したものを用い25mM K_2HPO_4：25mM KH_2PO_4 = 1：1溶媒を移動相とし、流速8μl/minで環状2′,3′-AMPと2′(3′)-AMPの分離定量を行った。測定に要する時間は一検体10分程度である。

次にラット全脳からのミエリン分画を用い、CNPaseの可溶化と部分精製を試みた。ミエリンをn-butanol, acetone, etherで処理した後0.3％DOCでCNPaseを抽出した。この段階ではTriton X-100添加によるCNPaseの活性化は認められなくなった。次いで、DOC分画にethanol(10％)とethyleneglycol(30％)を加え、トリス緩衝液で透析しDOCを除くとCNPase活性は沈渣部分に回収された。この沈渣を1.0M塩酸グアニジン(GuCl)で抽出するとCNPaseは可溶化された。このGuCl抽出液を0.2M GuCl Sepharose 6Bカラムで分画し、さらに、これをGuClを含まないSepharose 6Bカラムで再分画すると、単一と思われる分画が得られ、CNPaseの比活性は脳ホモジネートの約100倍、ミエリンの約10倍になった。7.5％アクリルアミド電気泳動ではRf = 0.8の部分に単一のバンドを認めた。

CNPaseの活性測定法は電気泳動[1], ペーパークロマト[2], pHスタット[3], 比色法[4]などすでに多くの方法が報告されている。吾々はミクロ高速液体クロマト装置(日本分光FAMILIC-100)を利用して微量試料につき2′(3′)-AMP量を分離定量する方法を開発した。また、ラットミエリン分画より有機溶媒、界面活性剤、塩酸グアニジンを用いてCNPaseの可溶化と部分精製を試み、CNPaseの酵素化学的性質を検討した。

実験材料及び方法

1. 実験材料

ウィスター系成熟白鼠の大脳及び大脳皮質の蒸留水ホモジネートをCNPase標品として測定条件の検討に用いた。CNPase精製にラット全脳のミエリン分画を用いた。

2. ミエリン分画法

全脳を1.0M蔗糖で10％ホモジネートにし、0.8M蔗糖濃度となるよう調整し、0.32M蔗糖を上層して105,000g 90分遠心後、ミエリン層を得た。これを蒸留水で3回洗った後0.8M蔗糖に懸濁し、0.32M蔗糖を上層し、105,000g 90分遠心後ミエリン層を得る。これを蒸留水で3回洗いミエリン分画とし、凍結乾燥後保存した。

3. 反応条件及び測定試料の作製

CNPaseの反応条件は0.1ml 0.2M Na_2HPO_4-0.1Mクエン酸緩衝液(pH 6.2), 0.1ml 0.5％ Triton X-100に0.1ml酵素標品を添加、37°C 5分予備振盪後、基質0.1ml(終濃度1mM～50mM)を加え37°Cで一定時間(5分～20分)振盪する。1.2mlエチルアルコールを添加攪拌し、反応を停止させた後1.2mlクロロホルムを加え3000rpm

10分遠心後上清の水相1μlを高速液クロの試料として用いた。

4. カラムと測定機器

ミクロ高速液体クロマトグラフィー（日本分光FAMILIC-100）を用い1μlの試料で分析した。カラムはテフロンチューブ（0.5mm × 10cm）にポーラス型シリカゲルSN-01-NH_2（粒径10μ）を充填し、これにペリキュラー型陽イオン交換ゲルCV-01-SO_3^-（粒径25～35μ）のプレカラム（0.5mm × 1.5cm）を接続した。移動相溶媒は25mM K_2HPO_4：25mM KH_2PO_4 = 1：1 を用い、流速は8μl/minである。分離溶出された環状2',3'-AMP, 2'(3')AMPは日本分光UVIDEC-100 を用い254nmの吸収を記録計に導き定量した。この場合の測定Rangeは0.16（Range 1/6～32x可変），記録紙速度2mm/minとした。但し、この溶媒では2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP を分離することは不可能であった。

5. Sepharose 6B カラムクロマト

10mm × 60cm のカラムで流出液は2mM β-メルカプトエタノール，10mMトリス緩衝液 pH 7.4 を用い、0.2M GuClでカラムを飽和した。但し再カラムを行うときにはGuCl を含まない条件で行った。流速は約7ml/時間とした。

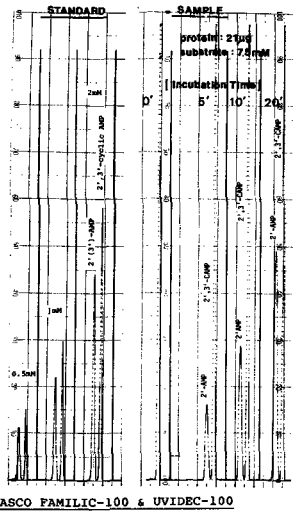
6. 蛋白の測定はLowry法[5]によった。

実験結果及び考察

1. 高速液クロによるCNPase 活性の測定

図1aに示す様に、環状2',3'-AMP と2'(3')AMPの分離は極めてよく定量性も良好であった。同一カラムを用いる限り、検量線は常に一定の値を与える。図1bは実際の酵素反応液について行った記録で反応時間とともに2'-AMP の量は増加している。これより計算された活性値は従来のペーパー法と良く一致した。本方法の特徴は試料検体が微量で、かつ10分以内に分離定量できることである。またカラムは約100 検体まで使用に耐え、基質濃度を20mMにしても2'-AMP の分離に影響を与えない。

図1a　　b

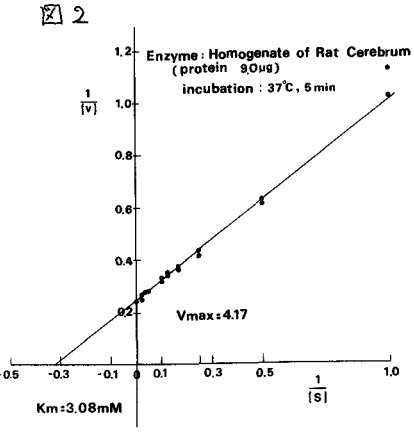


JASCO FAMILIC-100 & UVIDEC-100
sample: 1μl water solution (nucleotides)
column: 10cm×0.5mm SN-01-NH_2
precolumn: 1.5cm×0.5mm CV-01
soluvent: 25mM K_2HPO_4: 25mM KH_2PO_4 = 1:1
flow rate: 8μl/min under room temperature
wave length: 254 nm, range: 0.16
chart speed: 2mm/min

2. CNPase 活性の基礎的検討

ラット大脳の蒸留水ホモジネートを酵素標品とし、5分振盪したときのLine-weaver-Burk プロットを取ると図2の様に$K_m = 3.08 \times 10^{-3}$ Mであった。このK_mの値は大脳アセトン末，或はミエリンを用いても同じであり、後述の部分精製した

図2



酵素でもほぼ同一の値となった。西沢等[4]はBTBを用いる分光学的測定でウシ白質のCNPaseのKm＝0.25 mMと報告しており、吾々の得た値と大きく異なっている。
次に反応時間と反応速度の関係を調べたのが図3で反応時間が長くなるに従って急速に反応速度が減少することを示しており、基質濃度が7.5 mM，20 mM共に同様であった。更に酵素量と反応速度との関係を調べてみると図4に示す様に酵素量を増すと反応速度は徐々に低下し、基質濃度を変えても同様であった。これは本酵素が高い基質濃度を必要とすることを示しており、単に酵素量と基質濃度の比として説明することはできない。従ってCNPaseは反応条件により活性値が異ることになりこの点は注意を要する。

図3.

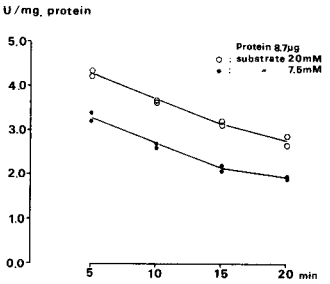
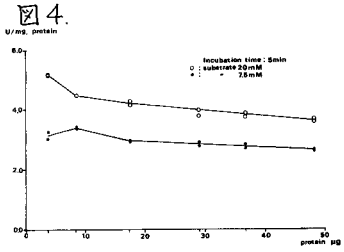


図4.



3. ミエリンからのCNPaseの部分精製

i) 有機溶媒による処理

ミエリン乾燥重量10 mg当たり1 mlの冷却n-butanolで45分2回撹拌後冷却acetoneで同様に2回、次いで冷却etherで2回処理後直ちに凍結乾燥した。CNPaseを活性化させる有機溶媒はtoluene, n-butanol, etherであるが単独の有機溶媒でミエリンを処理するよりもこの方法で処理すると次に述べるDOC処理によるCNPase抽出が非常に良くなる。

ii) 界面活性剤による処理

有機溶媒で処理した後0.3% DOCを含む10 mM トリス緩衝液pH 8.0で4°C 60分撹拌し25,000g 60分遠心すると、上清にCNPase活性の90%以上が回収される。この段階ではTriton X-100添加によるCNPaseの活性化効果は認められなくなった。

iii) 透析によるDOCの除去

DOC処理後の上清にethanolは10%，ethyleneglycolは30%となるよう加え、10 mM トリス緩衝液で20時間透析するとDOCの95%以上が除去できる。これを25,000g 60分遠心するとCNPase活性の90%以上が再び沈渣に回収された。

iv) 塩酸グアニジン(GuCl)処理

DOC処理の上清を透析し、得られた沈渣に1.0 M GuClを含む10 mM トリス緩衝液pH 7.4を加え4°C 60分撹拌し、25,000g 60分遠心すると上清にCNPaseの95%が回収された。GuCl 1.0 M～6.0 Mを用いればCNPase活性の80%以上が上清に回収される。しかし、2.0 M以上では酵素の失活がみられる。Urea 1.0 M～2.0 Mでは可溶化は認められなかった。1.0 M GuCl処理上清を透析によりGuClを除くとCNPase活性は沈渣に約50%回収され凝集と考えられた。

v) Sepharose 6B カラム

0.2 M GuCl中で可溶化されたCNPase分画を0.2 M GuClを含むSepharose 6Bカラムで分画すると、CNPaseはV$_0$部分と低分子部分に活性が分かれて認められた(図5)。この低分子分画のCNPaseはGuClを除いても沈澱となることはなかった。この低分子分画をGuClを含まないSepharose 6Bで再クロマトすると低分子分画に280 nmの

吸収と一致してCNPase活性のある単一分画が得られた(図6)。この再クロマトで得られた分画のCNPase比活性は約200で、ミエリンの約10倍，脳ホモジネートの約100倍であった。この標品を7.5%ディビス系アクリルアミド電気泳動にかけるとRf=0.8に単一バンドを示した。

以上の方法でCNPaseを可溶化し、部分精製を試みた結果を表1に示した。

表1.

STEPS IN THE SOLUBILIZATION AND PURIFICATION OF CNPase

		Specific activity	Recovery	Distribution of protein
	Rat brain homogenate	2.56 (0.21)	- - -	- - -
1	Myelin	22.61 (8.93)	100.0%	100.0%
2	n-butanol,acetone,ether treated myelin	18.24 (9.99)	70.6	87.5
3	Supernatant of 0.3 % DOC extraction	24.88 (29.46)	65.2	59.2
	Precipitate of 0.3 % DOC extraction	1.35 (3.34)	1.7	28.4
4	Precipitate after dialysis of DOC supernatant	30.45 (53.16)	62.4	46.3
	Supernatant after dialysis of DOC supernatant	4.91 (5.99)	2.8	12.9
5	Supernatant of 1.0 M GuCl extraction	39.78	45.2	20.6
	Precipitate of 1.0 M GuCl extraction	0.33	0.3	25.7
6	0.2 M GuCl sepharose 6 B	201.4	- - -	- - -
7	Rechromatography	221.1	- - -	- - -

( ) : Tritone x-100 was absent in the reaction mixture.

図5.

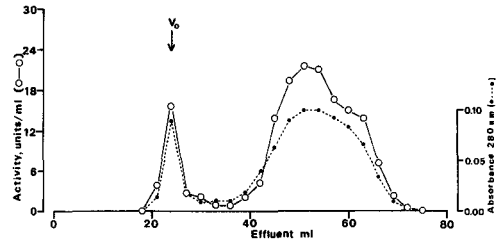
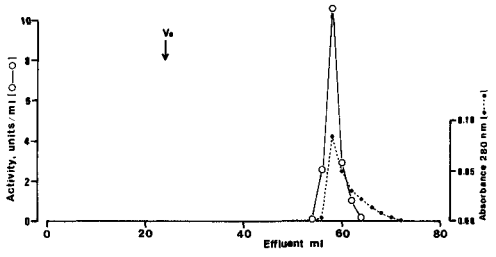


図6.



DRUMOND等[1]の報告に述べている様に有機溶媒処理でCNPaseの活性化は認められるが可溶化は起らなかった。また界面活性剤のみによってもCNPaseの可溶化は起らなかった。GUHA等[6]の報告したGuClはCNPaseの可溶化に非常に有効であった。しかし吾々の追試したところでは硫安分画によりCNPaseは不溶化し、これ以上の精製が不能となった。吾々はGuCl処理後Sepharose 6Bカラムにより精製し、可溶化した分画を得ることができた。

以上の結果からCNPaseはミエリンに組み込まれており、他の膜酵素と同様に可溶化が非常に困難であるが、GuClを用いることにより膜から分離できると考えられる。しかし、GuClが2.0M以上となるとCNPase活性を低下させる点は注意を要する。

参考文献

1) G.I.Drummond,N.T.Iyer and J.Keith:J.Biol.Chem. 237 3535 (1962)
2) T.Kurihara and Y.Tsukada:J.Neurochem. 14 1167 (1967)
3) T.Kurihara and Y.Tsukada:J.Neurochem. 20 719 (1973)
4) 西沢・栗原・高橋：神経化学, 15, 184 (1976)
5) O.H.Lowry,N.J.Rosebrough,A.L.Farr and R.J.Randall:J.Biol.Chem. 193 265 (1951)
6) A.Guha and S.Moore:Brain Res. 89 279 (1975)

23 アイソトープを用いないアセチルセロトニンメチル基転移酵素の活性測定法

鈴木　修・八木國夫　（名大・医・1生化）

〔要　約〕

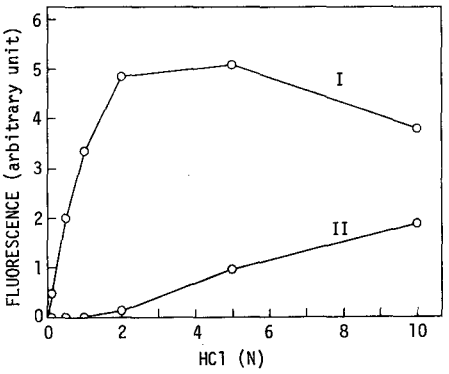
アセチルセロトニンメチル基転移酵素（ASMT）活性の測定法に関しては、本酵素の生理的意義の重要性にも拘らず、アイソトープを用いる方法以外には報告がない。今回、われわれはアイソトープを用いないで、きわめて容易に、しかも感度よくASMT活性を測定する方法を開発し、その詳細を設定した。本法の原理はASMTによって生成したメラトニンをオルトフタルジアルデヒド（OPT）と反応させ、蛍光測定するものであるが、基質であるN-アセチルセロトニンとOPTとの反応を抑えるために、反応を1N HCl中で行なわせるものである。なお、1N HCl中で本酵素反応の生成物であるメラトニンとOPTを反応させたばあい、メラトニンの量と蛍光強度との間の直線性が悪いことがわかったが、反応直前に窒素ガスを通気することによって望ましい直線性を得ることができた。ASMT活性はラット松果体の組織量0.5～2.0 mg/1.25 mlの範囲で組織量との間に直線性を示し、反応時間とも60分以内では直線性を示した。本法は従来のアイソトープを用いる方法に比べて次のような利点がある。1）高価な放射性S-アデノシルメチオニン（AMe）を用いないので、経済的である。2）アイソトープを用いる方法ではブランクを低くするために、酵素をAMeで飽和させていないが、本法では十分に飽和させることができる。3）抽出溶媒を洗浄する必要も、蒸発乾固させる手間もいらないので、操作がより簡単である。

アセチルセロトニンメチル基転移酵素（EC 2.1.1.4）（ASMT）は高等動物の松果体ならびに網膜に存在し、メラトニン合成に関与することが知られている。また本酵素の日内変動に関する報告は数多い。ASMTの生理的意義の重要性にも拘らず、本酵素活性の測定法に関しては放射性S-アデノシルメチオニン（AMe）を用いる方法(1)以外には報告されていない。今回の実験では、アイソトープを用いないで、簡易にしかも感度よくASMT活性を測定する方法を考察し、その詳細を設定したので報告する。

実験材料ならびに定量法

ASMT活性をN-アセチルセロトニンを基質として測定するには、反応生成物であるメラトニンを定量すればよいが、オルトフタルジアルデヒド（OPT）を用いて従来の条件で蛍光測定する限りにおいては、基質であるN-アセチルセロトニンも同様にOPTと反応し蛍光の強い物質を生成する(5)。このことは、酵素反応液よりメラトニンを有機溶媒にて抽出分離しても、N-アセ

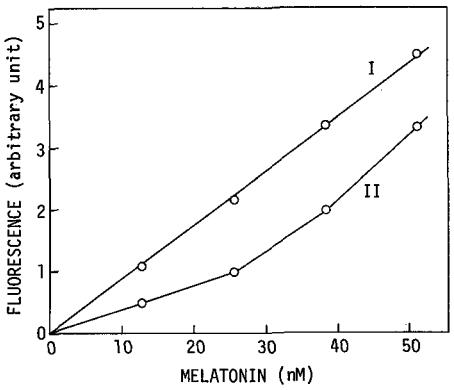
図1　OPT反応に及ぼす反応液のHCl濃度の影響



I: melatonin; II: N-acetylserotonin. To 2 ml of HCl solution, were added 0.1 ml of the solution which contained 0.2 nmole of the indole compound and 0.1 ml of 0.2% OPT solution in methanol. The reaction mixture was gassed with N_2 just before the incubation. The incubation was made at 60°C for 60 min.

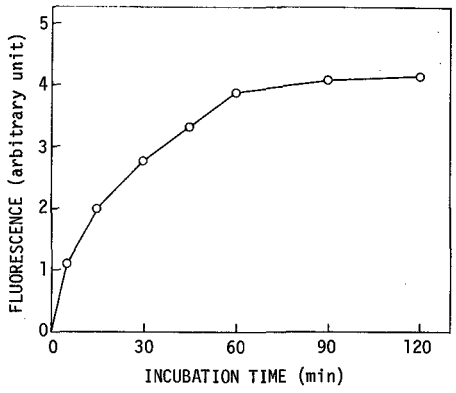
チルセロトニンが相当量混在するために、ブランクを極めて高くし、比較的低いレベルのASMT活性の測定を不可能にしている。最近、deLeiva と Schwartz (4) はインドール物質とOPTを反応させるばあい、反応液のHClの濃度を希釈していくとメラトニンではある濃度まで蛍光強度が増加するのに対して、セロトニンでは蛍光強度が著しく減弱していくことを見出した。そこでわれわれはASMTの基質であるN-アセチルセロトニンに関して同様にOPT反応に対するHClの濃度の効果を検討したところ、図1に示すように、N-アセチルセロトニンもセロトニンと同様にHClの濃度を下げることによって著しく蛍光強度が弱められることを認めた。それ故、メラトニンによる蛍光がさほど低くなく、N-アセチルセロトニンによる蛍光が十分に抑えられるためには1NのHClの濃度でOPTと反応させるのが最も適当であることがわかった。このことによってASMT活性のブランクの蛍光を極めて低くすることができるので、低いレベルの酵素活性測定が可能となった。しかしながら1NHCl中で反応を行なったばあい、メラトニンの濃度と蛍光強度との間に直線関係が欠如していることを見出した(図2, II)。このことを克服するために種々の酸化還元剤，すなわちメルカプトエタノール，システィン，アスコルビン酸ならびに塩化オニ鉄を添加したり、窒素ガスや酸素ガスを反応直前に反応液に通気することを試みたところ、窒素ガスを通気させることが蛍光をかなり増加させ、メラトニンの濃度と蛍光強度が直線関係になることを見出した(図2, I)。窒素ガス通気以外のものでは蛍光強度はすべて減弱した。60℃にて加熱する時間に関して検討した結果を図3に示す。加熱時間は60分間で蛍光強度がほぼ最大値に達することを知った。以上のデータをもとにしてASMT活性の測定法を次のように設定した。すなわち、組織を0.9% NaCl溶液でホモゲナイズする。酵素反応は小試験管内で行なう。0.5mlのホモジェネートに0.25mlの0.5Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.9)，0.25mlの0.1% AMe-HCl(東京化成工業製)溶液(終濃度 0.46mM)ならびに0.25mlの0.04% N-アセチルセロト

図2　蛍光に及ぼす窒素ガス通気の影響



I: gassing with N_2; II: without gassing. The concentration of HCl was 1 N. Except for the concentration of HCl and melatonin, the procedure was the same as that spcified in Fig. 1.

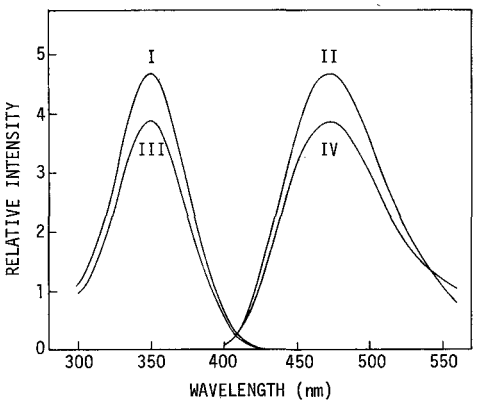
図3　加熱時間と蛍光強度



The procedure is described in Fig. 1. The concentration of HCl and melatonin were 1 N and 0.1 μM, respectively.

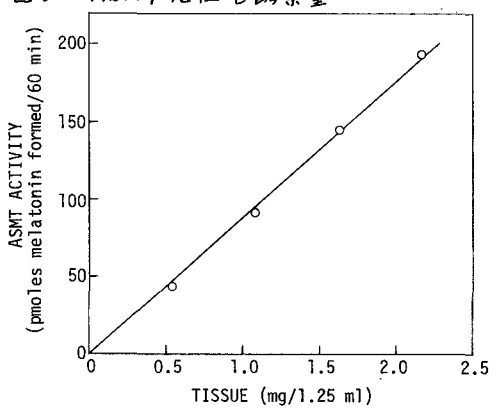
ニン溶液（終濃度，0.37 mM）を加え全量を1.25 mlとする。37°C，60分間反応させ、0.5 mlの1N NaOHを加え反応を止め、2 mlのクロロホルムを加え、小試験管にシリコンキャップで栓を施し、強く振盪し、遠沈（3,000 r.p.m.，5分）する。遠沈後上清の水層を吸引除去する。クロロホルム層の1 mlを他の小試験管に移し、2.5 mlの1N HClと4 mlのn-ヘプタンを加え強く振盪し、再び遠沈（3,000 r.p.m.，5分）する。上清の有機溶媒層を吸引除去し、HCl層の2 mlを他の試験管に移し、0.1 mlの0.2% OPTメタノール溶液を加える。パスツールピペットを用いて1～2分窒素ガスを通気し、直ちにパラフィルムで封をし、60°C，60分間加熱する。加熱後約10分間室温に放置し、励起波長350 nm，蛍光波長475 nmで蛍光測定を行なう。ブランクとしては基質を加えずに、37°C 60分間加温し、0.5 mlの1N NaOHを加えた後に基質を加えたものを用いる。酵素反応溶液に加えたメラトニンの回収率は

図4　蛍光物質の励起ならびに蛍光スペクトル



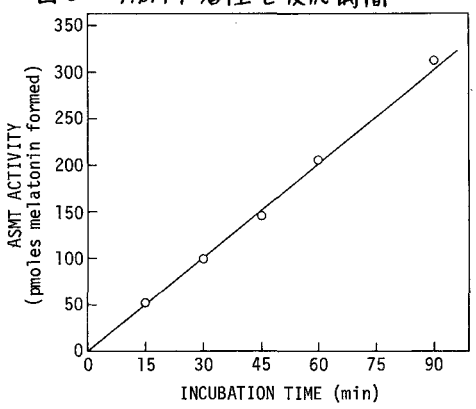
I: excitation spectrum of the product of authentic melatonin; II: emission spectrum of the product of authentic melatonin; III: excitation spectrum of the product of the enzyme reaction; IV: emission spectrum of the product of the enzyme reaction.

図5　ASMT活性と酵素量



The homogenate of rat pineal body was used as an enzyme source.

図6　ASMT活性と反応時間



The reaction mixture contained 1.7 mg of tissue of rat pineal body.

いずれのばあいも100%に近かったので、外部標準をとることで十分目的を達する。ラット松果体を酵素源としたばあいに得られる生成物の蛍光スペクトルと、メラトニンより生成する物質の蛍光スペクトルを測定し、その結果を図4に示す。酵素反応生成物より生じた蛍光物質の励起ならびに蛍光スペクトルはメラトニンより生じた蛍光物質のそれと一致し、それぞれ350 nmと475 nmにピークを持つ。さらにASMTの

AMeに対する拮抗型阻害剤であるS-アデノシルホモシステイン（終濃度1.0mM）(3)を添加することによって92.5%の酵素反応の阻害を認めた。図5にASMT活性と酵素量との関係を示す。図に示すように、0.5～2 mg/1.25 mlの範囲で直線性を示した。図6にASMT活性と反応時間との関係を示す。少なくとも60分以内で直線性を示した。

表1　種々の組織中のASMT活性

Tissue	ASMT activity (nmoles melatonin formed /g wet weight/h)	
Rat pineal body	107 ± 13	(3)
Chick pineal body	2240 ± 180	(3)
Chick retina	12.8 ± 2.5	(3)
Frog retina	37.7 ± 5.9	(3)
Frog brain	1.5 ± 0.3	(3)
Human pineal body	102	(1)

Tissues were obtained at noon except that of the human. Means ± S.D. are given. The number of experiments is in parentheses.

実験結果ならびに考察

本法を用いて種々の組織中のASMT活性を測定した結果を表1に示す。最も強い活性はニワトリの松果体に認められた。高等動物の脳ではASMT活性は認められないが、食用ガエルの脳ではわずかに活性が認められた。最近メチル基転移酵素類のメチル基供与体としてAMe以外にN-メチルテトラヒドロ葉酸（MTHF）の存在が注目されている(2)が、それに対する反論も多い(6)。少なくともASMTにおいてMTHFをメチル基供与体として用いた報告はないので、AMeの代わりにMTHF（終濃度 0.46 mM）を用いて、ラットならびにニワトリの松果体ホモジェネートを酵素源として反応させたところ、ラットのばあいには、AMeを用いたときの21.4%，ニワトリのばあいは3.9%の活性を認めるにすぎなかった。また、AMe-HClの代わりに沃化AMe（Calbiochem.製）を用いたばあいにはASMT活性は約40%に減少するのが認められた。それ故本酵素活性の定量にはAMe-HClを用いるのが望ましい。今回の方法の感度は従来のアイソトープを用いる方法(1)に比べさほど劣らず、反応液中に生成した最低10 pmolesのメラトニンを定量できる。ラット松果体1個でASMT活性を十分測定できる。しかも本法は従来の方法に比べて次のような利点がある。1）高価な放射性AMeを用いないので経済的である。2）アイソトープ法ではブランクを低くするために酵素をAMeで飽和させていないが、本法では十分飽和させることができる。3）メラトニンを抽出した有機溶媒を洗浄する必要も、蒸発乾固させる必要もないので、操作がより簡単である。

文献

1) Axelrod, J. and Weissbach, H. (1961) J. Biol. Chem. 236, 211.

2) Banerjee, S. P. and Snyder, S. H. (1974) in Serotonin — New Vistas, Advances in Biochemical Psycopharmacology (Coster, E., Gessa, G. L. and Sandler, M., eds.) Vol. 11, p. 85, Raven Press, New York.

3) Deguchi, T. and Barchas, J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3175.

4) de Leiva, A. and Schwartz, S. (1976) Clin. Chem. 22, 1999.

5) Maickel, R. P. (1972) in Methods of Neurochemistry (Fried, R., ed.) Vol. 2, p. 101, Marcel Dekker, Inc., New York.

6) Meller, E., Rosengarten, H., Friedhoff, A., Stebbins, R. D. and Silber, R. (1975) Science 187, 171.

24 種々の年令におけるヒト大脳皮質のモノアミン酸化酵素のMultiple form

鈴木　修・八木國夫　（名大・医・1生化）

〔要　約〕

種々の年令におけるヒト大脳皮質モノアミン酸化酵素（MAO）のmultiple formについて、基質特異性ならびに阻害剤に対する感受性の観点より検討を加えた。セロトニン（5-HT）、キヌラミンならびにβ-フェニルエチルアミン（PEA）を基質としたばあいの成人大脳皮質のMAO活性は胎児のそれより高く、活性の増加はキヌラミンに関して最も顕著であり、PEAを基質にしたばあいの活性の増加の程度は、5-HTを基質にしたばあいの増加の程度より大であった。成人大脳皮質においては、加令に伴なうMAO活性の増加が特にキヌラミンとPEAに関して認められた。キヌラミンを基質としてデプレニルによるMAO阻害を検討したところ、10^{-7}Mのデプレニルによって胎児大脳皮質のMAO活性の約50％が阻害され、小児ならびに成人大脳皮質では80～90％の活性が阻害された。成人大脳皮質では、デプレニルによる阻害の程度は加令と共に増加した。以上の結果は、ヒト大脳皮質のB型MAOの割合が発育ならびに加令に伴なって増加することを示している。キヌラミンを基質としたばあいの胎児大脳皮質のMAOの至適pHは成人大脳皮質のそれと一致した。キヌラミンに対するKm値も胎児ならびに成人大脳皮質で大差を認めなかった。胎児全脳より得た粗ミトコンドリア画分をトリトンX-100を用いて可溶化したところ、A型MAOは消失し、B型MAOのみが回収された。

最近モノアミン酸化酵素（MAO）のmultiple formに関する報告が多く、特にA型ならびにB型MAOの存在が注目されている（2, 17, 18）。MAOに関して生理学的に特に興味ある知見の一つとして、脳のA型とB型MAOの活性が異なった発育変化を示すことがラットならびにマウスを用いて報告されている（3, 7）。それ故今回の実験では種々の年令におけるヒト大脳皮質のMAOのmultiple formについて検索したので報告する。

実験材料ならびに方法

ヒト胎児の脳は名古屋掖済会病院産婦人科丸山，松浦両博士より寄贈を受けた。胎児脳はいわゆる治療的流産の際に採取したものである。小児ならびに成人の大脳皮質は脳腫瘍で死亡した患者の剖検の際（死後5-14時間）に正常な前頭葉より採取した。脳組織は採取直後にドライアイス上にて凍結させ1週間以内に分析に供した。MAOの死後変化に関してラット脳を用いて検討した結果，脳を24時間室温に放置しても活性には変化がなく、デプレニルの阻害効果にも変化がないことを確認した。5-HTを基質としたばあいのMAO活性はアイソトープを用いる方法（8），キヌラミンを基質とするばあいにはKraml（4）による蛍光法を用い、PEAを基質としたばあいは既報の方法（13, 14）にて測定した。デプレニルによるMAOの阻害実験はキヌラミンを基質としてSquiresの方法（11）に従って行なった。タンパクの定量はビューレット法（5）ならびにLowryらの方法（6）を用いた。胎児脳のMAOのmultiple formに及ぼす可溶化の影響をしらべるために、次のような実験を行なった。すなわち、胎児全脳を0.25M蔗糖液にてホモゲナイズし、1,500g，5分間遠沈した。得られた上清をさらに18,000g，20分間遠沈し、粗ミトコンドリア画分を得た。再び粗ミトコンドリア画分を蔗糖液に懸濁さ

せ、18,000 g, 30分間遠沈し、得られたペレットを 10 mM のリン酸緩衝液(pH 7.2)に懸濁させた。ベンジルアミンを、終濃度 3 mM になるように加え、90分間超音波処理を施した(Sonifier B-10, Branson Sonic Power Company, 60 ワット)。処理中は検体を氷で冷した。これらの操作の後にトリトン X-100 を終濃度 2% (w/v) になるように加え、超音波処理をさらに 10 分間続けた。処理後 160,000 g, 90分間遠沈し、得られた上清をセファデックス G-25 のカラム(1.8 × 20 cm)にかけ、ベンジルアミンやトリトン X-100 を除いた。得られた標品をデプレニルによる MAO の阻害実験に用いた。

実験結果ならびに考察

種々の年令におけるヒト大脳ホモジェネートの、5-HT, キヌラミンならびに PEA を基質としたばあいの MAO 活性を表1に示した。胎児の MAO 活性の各平均値を成人のそれと比較すると、湿重量当りでも、蛋白量当りでも、活性増大はキヌラミンに最も著明であり、PEA を基質にしたばあいの活性の増加の程度は、5-HT を基質としたばあいの増加の程度より大であることが認められた。B型 MAO の特異的阻害剤であるデプレニルを用いて、大脳皮質ホモジェネートの MAO の阻害実験を行なった結果を図1に示す。図にみるように、デプレニルの 10^{-7} M の濃度のあたりに明らかなプラトーが認められた。それ故 Johnston (2) ならびに Squires (11) の定義によれば、胎児大脳皮質のB型 MAO は約 50% を占めることになる。小児(3才)の MAO は成人のそれに近い阻害パターンを示した。成人大脳皮質のB型 MAO は 80-90 % であった。全サンプルの 10^{-7} M デプレニルによる MAO の阻害のパーセントを表2に示した。表にみるように、成人では阻害の程度が加令に伴って増加することが認められた。以上の結果はヒト大脳皮質において、B型 MAO の割合が発育ならびに加令に伴ない増加することを示しているものと考えられる。脳の MAO の発育に伴なう変動に関しては Jourdikian ら(3) ならびに Mantle ら(7) によって、ラットやマウスにおいて発育初期にはA型 MAO の割合が大きく、発育に伴なってB型 MAO の比率が増加してくることが報告されているので、われわれのヒトにおける結果はラットやマウスの結果に一致するものと言える。しかし、ブタ

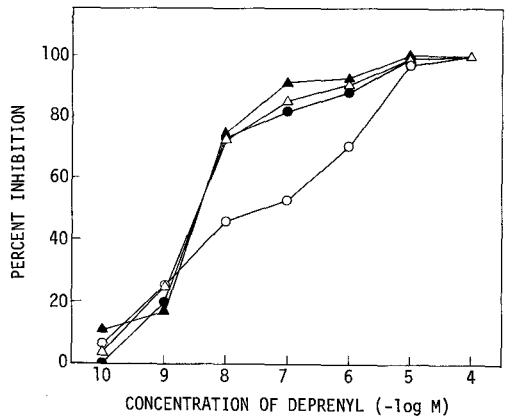
表1 種々の年令におけるヒト大脳皮質の MAO 活性

Subject	Age	Sex	MAO activity					
			5-HT		Kynuramine		PEA	
			μmoles/g wet weight/30 min	nmoles/mg protein/30 min	μmoles/g wet weight/30 min	nmoles/mg protein/30 min	μmoles/g wet weight/30 min	nmoles/mg protein/30 min
Fetus 1	18 weeks of gestation	–	0.165	3.15	0.166	3.17	0.158	3.02
Fetus 2	18 weeks of gestation	–	0.700	13.0	0.340	6.32	0.424	7.88
Fetus 3	20 weeks of gestation	–	0.340	8.40	0.202	3.91	0.104	2.56
Fetus 4	20 weeks of gestation	–	0.165	3.30	0.097	1.66	0.085	1.82
T. H.	3 years	M	1.79	20.5	3.05	37.6	1.05	12.0
F. H.	24 years	F	1.58	14.5	3.82	35.1	1.56	14.3
M. S.	29 years	F	1.75	22.6	4.53	54.6	1.17	15.1
T. M.	54 years	F	3.04	29.3	5.14	55.6	1.72	18.8
T. K.	76 years	F	1.77	20.3	5.56	56.6	1.88	21.6

The homogenates of the cerebral cortices were used as enzyme sources. The concentrations of the substrates, 5-HT, kynuramine and PEA were 250 μM, 82 μM and 250 μM, respectively.

(12)やニワトリ(15)の脳では発育に伴ない必ずしもB型MAOの比率が増加しないので，脳の発育におけるA型，B型MAOの生理的意義に関してはさらに検討を要するものと思われる。加令に伴なうMAOの変動に関しては、ラットやマウスでは加令に伴ない脳のMAO活性は変動しないことが知られている。ヒト脳では加令と共にMAO活性が増大することが報告されている(9,10)が，MAOのmultiple formに関しては考慮されていない。図2にキヌラミンを基質としたばあいの胎児ならびに成人大脳皮質ホモジェネートのMAO活性に及ぼすpHの影響を示す。胎児と成人において同様にpH 9附近に最大活性が認められる。胎児ならびに成人大脳皮質ホモジェネートに関して，キヌラミンを基質としてみかけのKmならびにVmaxを求めたところ，Kmはそれぞれ38.5 μM，24.5 μMであり，Vmaxはそれぞれ0.106 μmol/g wet wt/30 min，4.20 μmol/g wet wt/30 minという結果を得た。MAOのmultiple formに及ぼす可溶化の影響をしらべるために、胎児脳より得た粗ミトコンドリア画分ならびにそれを前述の方法で可溶化して得た標品を用いて、キヌラミンを基質としてMAO活性に対するデプレニルの阻害効果を検討した結果を図3に示す。図に示すように、粗ミトコンドリア画分の阻害パターン

図1 各種濃度のデプレニルによるヒト大脳皮質のMAOの阻害



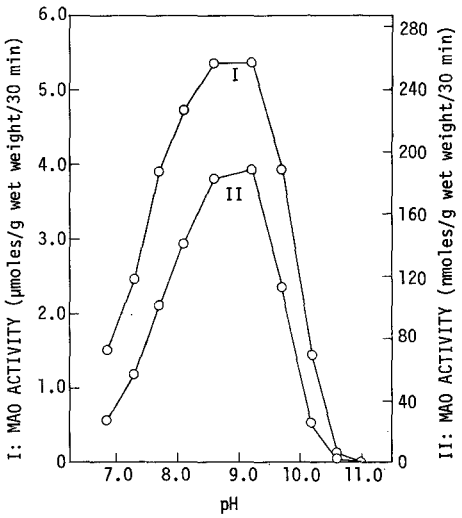
○: fetus at 20 weeks of gestation; ●: male child at the age of 3 (T. H.); △: female adult at the age of 29 (M. S.); ▲: female adult of the age of 76 (T. K.).
The concentration of kynuramine was 82 μM. Homogenate of the cerebral cortex was preincubated with deprenyl at 37°C for 10 min.

表2 10^{-7}M デプレニルによるヒト大脳皮質のMAOの阻害

Subject	Age	Sex	Percent inhibition
Fetus 1	18 weeks of gestation	–	47.7
Fetus 2	18 weeks of gestation	–	44.5
Fetus 3	20 weeks of gestation	–	52.6
Fetus 4	20 weeks of gestation	–	58.8
T. H.	3 years	M	81.7
F. H.	24 years	F	81.3
M. S.	29 years	F	85.0
T. M.	54 years	F	85.8
T. K.	76 years	F	90.9

The concentration of the substrate, kynuramine was 82 μM. The homogenate of the cortex was preincubated with 10^{-7} M deprenyl at 37°C for 10 min. Each value represents the mean obtained from duplicate determinations.

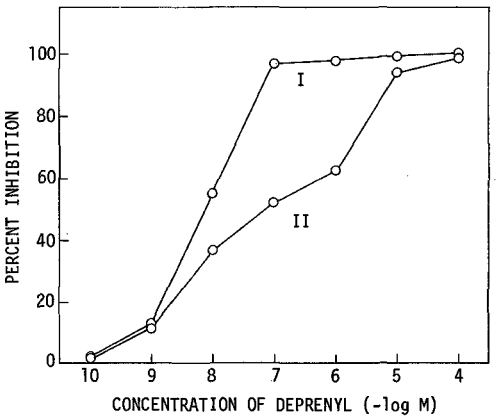
図2 MAO活性に対するpHの効果



Homogenates of the cerebral cortices were used as enzyme sources.
I: the adult cortex; II: the fetal cortex.

はホモジェネートのそれ（図1）にほぼ一致している。一方可溶化標品では粗ミトコンドリア画分に比べて著しくデプレニルに対する感受性が高く、10^{-7} Mのデプレニルの濃度ではほぼ100％活性が阻害される。すなわち可溶化した標品中のMAOはほとんどB型であることを示している。Tiptonら(16)はMAOを過塩素酸ナトリウムで処理することによりA型MAOの消失を認め、この現象をA型MAOのB型MAOへの移行であるとしている。またEkstedtとOreland (1)はラット肝ミトコンドリアをエタルメチルケトンで処理した結果、A型活性が消失し、B型MAOのみが回収され、このばあいA型MAOからB型への移行はないと結論づけている。今回のわれわれの実験では、粗ミトコンドリアの可溶化の際MAO活性が39％に落ちることを認めているので、A型MAOのB型への変化というより、A型MAOの失活を考えるのが妥当であると思われる。

図3　デプレニルによるヒト胎児脳MAOの阻害に及ぼす可溶化の影響



I: solubilized enzyme preparation; II: crude mitochondrial preparation. The concentration of the substrate, kynuramine was 82 μM. The enzyme preparation was preincubated with deprenyl at 37°C for 10 min.

文　献

1) Ekstedt, B. and Oreland, L. (1976) Biochem. Pharmacol. 25, 119.
2) Johnston, J. P. (1968) Biochem. Pharmacol. 17, 1285.
3) Jourdikian, F., Tabakoff, B. and Alivisatos, S. G. A. (1975) Brain Res. 93, 301.
4) Kraml, M. (1965) Biochem. Pharmacol. 14, 1684.
5) Layne, E. (1957) in Methods in Enzymology (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.) Vol. III, p. 447, Academic Press, New York.
6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
7) Mantle, T. J., Garrett, N. J. and Tipton, K. F. (1976) FEBS Letters 64, 227.
8) McCaman, R. E., McCaman, M. W., Hunt, J. M. and Smith, M. S. (1965) J. Neurochem. 12, 15.
9) Robinson, D. S., Davis, J. M., Nies, A., Colburn, R. W., Davis, J. N., Bourne, H. R., Bunney, W. E., Shaw, D. M. and Coppen, A. J. (1972) Lancet i, 290.
10) Robinson, D. S., Davis, J. M., Nies, A., Ravaris, C. L. and Sylwester, D. (1971) Arch. Gen. Psychiat. 24, 536.
11) Squires, R. F. (1972) in Monoamine Oxidases — New Vistas, Advances in Biochemical Psychopharmacology (Costa, E. and Sandler, M., eds.) Vol. 5, p. 355, Raven Press, New York.
12) Stanton, H. C., Cornejo, R. A., Mersmann, H. J., Brown, L. J. and Mueller, R. L. (1975) Arch. int. Pharmacodyn. 213, 128.
13) Suzuki, O., Noguchi, E. and Yagi, K. (1976) Biochem. Pharmacol. 25, 2759.
14) 鈴木 修，野口悦子，八木國夫（1976）神経化学 15, 100.
15) Suzuki, O. and Yagi, K. unpublished result.
16) Tipton, K. F., Houslay, M. D. and Garrett, N. J. (1973) Nature, New Biol. London, 246, 213.
17) Yang, H.-Y. T. and Neff, N. H. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 365.
18) Yang, H.-Y. T. and Neff, N. H. (1974) J. Pharmacol. Exp. Ther. 189, 733.

25 血小板モノアミン酸化酵素の性状：酵素反応におよぼす酸素および温度の影響

小林清史・高坂睦年
（岡大・医・脳研・病態生化）
S. Eiduson （UCLA, U.S.A.）

〔要　約〕

モノアミン酸化酵素（MAO）の物理化学的性質を明らかにするため、ヒト血小板MAOに対する酸素と温度の影響を検討した。反応液中に100%酸素を添加したときにみられるMAO活性上昇の比率は、用いた基質（benzylamine、tryptamineおよびβ-phenylethylamine (PEA)）と反応温度によって著しく異なり、そのcatalytic site(s)が種々の条件下で異なる反応を呈することが示唆された。しかし、この成績は基質濃度の差による相違である可能性を残している。基質阻害実験では、benzylamineとtryptamineとが互いに拮抗的阻害作用を示す一方、PEAはbenzylamineの分解を非拮抗的に阻害することを確認した。この際、溶液中の酸素分圧を高めると、benzylamineとtryptamineとの阻害様式に変化は認められなかったが、PEAによるbenzylamine阻害様式は拮抗的阻害に変化することがわかった。一方、上記の3基質を用い、20～47°C間の6段階の反応温度で求めたArrheniusプロットでは、tryptamineの場合は直線を呈したが、benzylamineでは26°Cで、PEAでは37～42°C間で上方への凸型折線を示した。以上の成績は、ヒト血小板MAOには活性化エネルギーを異にする少くとも2つの型のMAO（あるいはcatalytic sites）が存在することを示唆するものと思われる。

慢性分裂病患者では、血小板MAO活性の低下がみられることが報告され(9)、さらにこの変化が分裂病への罹病性に対する遺伝的指標である可能性が示唆された(14)ことから注目されている。血小板MAOは、神経細胞内MAOのB型と極めてよく似た性質を示す(11)。しかし、他臓器のMAOとは異なり、血小板のそれは電気泳動により単一泳動帯として検出されることから(1)、アイソザイムの型では存在しないものと考えられてきた。他方、Edwardsら(3,4)は血小板MAOには少くとも2つ以上のcatalytic sitesがあることを報告しているが、MAOの物理化学的性質の解明はなお十分とはいえない。われわれは、ヒト血小板MAOに対する酸素分圧および反応温度の影響を調べた実験から、その多型性（あるいはmultiple catalytic sites）の存在を示唆しうる成績を得たので報告する。

〔実験方法〕

新鮮静脈血より分離し、−20°Cに保存した血小板を、MAO活性測定前に蒸留水に浮遊させたのち、5秒間超音波破壊を行なって酵素標品（蛋白量約1mg/ml）とした。MAO活性測定はWurtmanらの方法(13)を準用し、基質として〔methylene-^{14}C〕-benzylamine hydrochloride、〔2-^{14}C〕-tryptamine bisuccinateおよびβ-phenylethylamine-〔1-^{14}C〕hydrochlorideの3種を用いて行なった。反応温度は主に20、37および42°Cの3段階とした。0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）中の酵素を対応する温度であらかじめ20分間preincubateしたのち、最後に各基質を加えて空気中で5～20分間反応させた（最終反応液量1ml）。酸素の影響をみる実験では、基質添加直後に100%酸素を反応液中に5秒間bubbleし、直ちにキャップをして同様の操作を行なった。なお、酵素を加えないで同処理をした

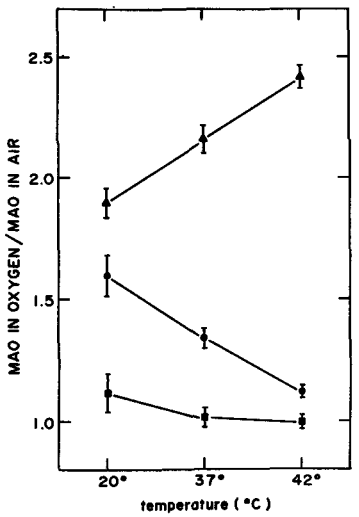


Fig. 1 The ratio of MAO activity obtained in oxygen to that in air when assayed with the substrates benzylamine (■—■), tryptamine (●——●) and PEA (▲——▲) at three temperatures. Substrate concentrations: 1.2 x 10^{-5} M.

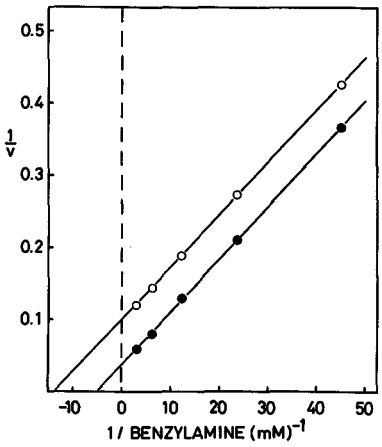


Fig. 2 Lineweaver-Burk plot for benzylamine deamination in air (○——○) and in elevated oxygen concentrations (●——●) at 37°C for 20 min.

ものをそれぞれのブランクとした。蛋白定量は、Lowry 法(8)で行なった。

［ 結果と考察 ］

Fig. 1 は、酸素添加時の MAO 活性と空気中での反応から えられた MAO 活性の比率を、20、37および42°C の3温度で求めた成績を示す。各基質濃度は 1.2×10^{-5} M、反応時間は5分間である。基質として PEA を用いたときには、酸素添加によって MAO 活性は約2倍高くなり、しかも温度が高いほど比率が上昇した。他方、benzylamine を基質として用いた場合には、いずれの温度でも酸素添加による MAO 活性の変化は認められなかった。さらに tryptamine を用いた場合には、前2基質の中間的比率を示したが、PEA とは逆に温度の上昇とともにその比率は低下した。すなわち、酸素添加による MAO 活性の変化は、用いた基質により まったく異なり、さらに同一基質を用いても反応温度によって酸素効果に差が認められた。測定環境中の酸素分圧を高めると、肝臓、心臓や脳の MAO 活性が上昇することがすでに報告されている(6, 7, 10)。Novick (10) は、酸素による MAO 活性上昇の程度が、用いた動物や臓器の種類および基質の種類によって明らかに異なることを示した。酸素分圧による MAO 活性の変化が、MAO の複数性を示唆する所見であるとする見解(7)があるが、Fig. 2 に示すように、酸素効果は基質濃度によっても差があるようであり、現在この点について検討中である。

Fig. 2 は、benzylamine を基質として用いた場合の、空気中および酸素添加時の反応から えられた Lineweaver-Burk プロットである。2本の直線は互いに平行となり、血小板 MAO の酵素反応も ping-pong 機構(5)により進行することを示している。

さて、Edwards ら(4)は、ヒト血小板 MAO に対して基質として PEA を用いたときには、その分解が benzylamine あるいは tryptamine によって非拮抗的阻害を受けること、および benzylamine と tryptamine とは互いに拮抗的阻害作用を示すことを報告した。この成績から彼らは、血小板 MAO には少くとも2つの interacting catalytic sites が存在することを主張している。そこでわれわれは、空気中および酸素分圧を高めた状態での基質阻害実験を行なった。空気中の反応では、

benzylamine と tryptamine とが、相互に拮抗的阻害作用を示すことを確認したが、この阻害様式は酸素添加時にも変化しないことを知った。しかしながら、benzylamine と PEA とを用いたときには、Fig. 3 に示したように空気中での benzylamine の分解は、PEA によって非拮抗的阻害を受けたが、酸素添加時の反応では、Fig. 4 のごとく PEA による拮抗的阻害作用が認められた。すなわち、反応液中の酸素分圧の差によって、阻害様式の変化が認められたのであるが、この成績は Roth (12) がヒト脳 B 型 MAO を用いて行なった同様の実験結果と一致している。彼はこのような阻害様式の変化は、MAO 反応が前述した ping-pong 機構により進行することに基ずくものであって、multiple catalytic sites の存在を示す所見ではないとした。この説の正否については、なお検討を要するものと思われる。

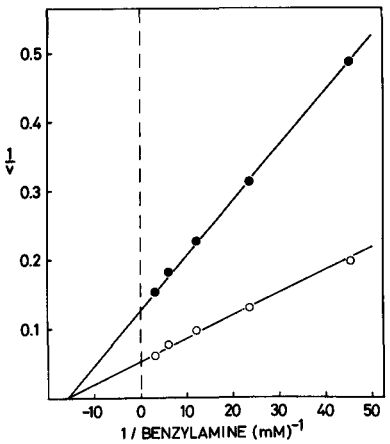


Fig. 3 Lineweaver-Burk plot for inhibition of benzylamine deamination by PEA. Varing amounts of [^{14}C] benzylamine were incubated in the absence (○——○) or presence (●——●) of 2μM PEA at 37°C for 20 min.

つぎに、ヒト血小板 MAO におよぼす温度の影響を調べた。基質濃度を 1.2×10^{-5} M とし、反応温度を前記 3 温度としたときの Arrhenius プロットでは、benzylamine および tryptamine を基質として用いたときには、同じ勾配をもつ互いに平行な直線を呈したが、PEA では 37°C で上方凸の折線を示した。Fig. 5 は Edwards ら (4) が求めた 3 基質の Km 値に基づいて benzylamine, tryptamine および PEA 濃度をそれぞれ 1.62×10^{-4} M, 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M とし、反応温度を 20～47°C 間の 6 点に設定し、反応時間を 10 分間として求めた Arrhenius プロットである。tryptamine を用いたときには、この温度範囲で直線を呈したが、benzylamine では 26°C で上方凸の折線を示した。さらに、PEA では 37～42°C 間でやはり上方凸の折線を呈した。これら 2 実験系を比較すると、基質濃度を変えたことによって、benzylamine のプロットに変化が認められたが、tryptamine と PEA のそれには変化はなかった。Arrhenius プロットにおける勾配は、ある活性中心における触媒過程に関係した活性化エネルギーを反映しているから、えられた勾配は異なる基質に関係なく一定である (2)。プロットが折線となるのは、遷移温度で活性化エネルギーの値が変わったことを示すが、その原因としては温度係数の異なる 2 種の活性中心による並進反応をとる場合や、酵素に 2 つの型があり、それらの

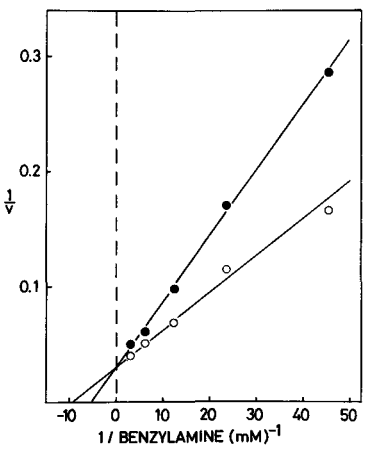


Fig. 4 Lineweaver-Burk plot for inhibition of benzylamine deamination by PEA at elevated oxygen concentrations. Experimental condition are as described in Fig. 3.

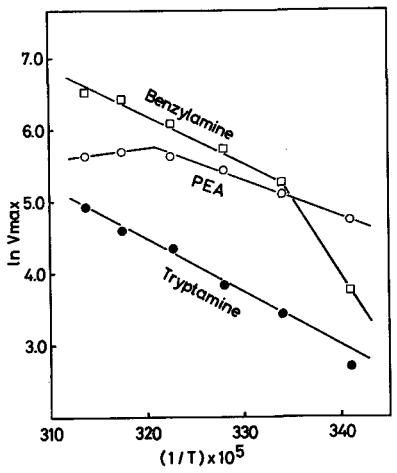


Fig. 5 Arrhenius plot of ln Vmax vs 1 / T when assayed with the substrates benzylamine (1.62×10^{-4} M), tryptamine (2×10^{-5} M) and PEA (4×10^{-6} M) for 10 min.

活性が異なる場合などがあげられている(2)。したがって、本実験成績はtryptamine(さらにはbenzylamine)の酸化的脱アミノ反応を触媒するMAO(あるいはcatalytic site)が存在する一方、PEAに対してのみ作用する少くともう一つの型のMAO(あるいはcatalytic site)があることを示唆するものであろう。PEAは異なる活性化エネルギーや明らかに異なる温度係数を有する2つの型のMAO(あるいはcatalytic sites)によって触媒される可能性も考えられる。このような場合2型のMAOとは、酸化型のものと還元型のものであってもよいはずであるが、benzylamineとPEAとがともに還元型MAOに結合するとするRoth(12)の説とは合致しないようである。

以上、ヒト血小板MAOの多型性あるいはmultiple catalytic sitesの存在を示唆しうる成績について報告した。冒頭に述べた分裂病と血小板MAO活性低下との関係については、現在賛否両論がある。もしヒト血小板MAOに多型性あるいはmultiple catalytic sitesの存在があるとするならば、疾病とMAOとの関係を追究する際には、一基質を用いたtotal activityの測定では不十分である可能性も考えられ、MAOの化学的性質を考慮に入れた検討が必要であるように思われる。

本研究の一部は、Ralph E. Smith Foundationおよび NIMH Grant 19734-06の援助を受けた。
実験に協力いただいたMs. R. Chang、平井尚子、林尾和子嬢に感謝する。

References

1. Collins, G.G.S., and Sandler, M. (1971) Biochem. Pharmacol. 20, 289-296
2. Dixon, M., and Webb, E.C. (1958) in Enzymes, Academic Press, New York
3. Edwards, D.J., and Burns, M.O. (1974) Life Sci. 15, 2045-2058
4. Edwards, D.J., and Chang, S.-S. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 1018-1025
5. Houslay, M.D., and Tipton, K.F. (1973) Biochem. J. 135, 735-750
6. Kohn, H.I. (1937) Biochem. J. 31, 1693-1704
7. 黒沢正亮 (1974) 昭和医学会雑誌 34, 301-306
8. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.S. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
9. Murphy, D.L., and Wyatt, R.J. (1972) Nature (Lond.) 238, 225-226
10. Novick, W.J. (1966) Biochem. Pharmacol. 15, 1009-1012
11. Robinson, D.S., Lovenberg, W., Keiser, H., and Sjoerdsma, A. (1968) Biochem. Pharmacol. 17, 109-119
12. Roth, J.A. (1976) J. Neurochem. 27, 1107-1112
13. Wurtman, R.J., and Axelrod, J. (1963) Biochem. Pharmacol. 12, 1439-1441
14. Wyatt, R.J., Murphy, D.L., Belmaker, R., Cohen, S., Donnelly, C.H., and Pollin, W. (1973) Science 179, 916-918

26 モノアミン酸化酵素(type A, type A+B, type B)のラット視床下部神経核別分布と年齢変化

国元憲文・挾間秀文 (鳥取大・医・神経精神)

〔要 約〕

ラットの視床下部について，神経核部位別にモノアミン酸化酵素 (MAO) type A , type A+B および type Bの活性分布ならびに年齢発達にともなう活性変化を調べた。type A には 5-hydroxytryptamine を，type A+B には dopamine をそれぞれ基質とし，type B には dopamine を基質とし clorgyline を in vitro に作用させて測定した。

(1) type A MAO 視床下部内側部分に活性が高く，視床下部外側部分に低い傾向を示す。生後7日目にすでにかなりの活性を示し，15日目には成熟レベルに達するが，この時点では神経核部位別の活性差は小さく，30日で差異が明確となる。

(2) type A+B MAO N.suprachiasmaticus, N.arcuatus などに強い活性が認められ，type A と同様に視床下部外側部では活性が低い。生後15日目には成熟レベルに達し，部位別の差異も明確である。30日目・45日目ではむしろ成熟レベルより強い活性を示す傾向にある。

(3) type B MAO 第三脳室周辺部分に活性が強く，この傾向は type Aよりも著しい。ほとんどの神経核が type Aより低い活性を示す中で，N. arcuatus だけは type A と同等以上の強い活性を示す。活性の発達は type Aよりややおそく，30日で成熟レベルに達するとともに部位別の差異も明確となる。N. arcuatus は急速に活性が増加し，その他の神経核ではそれより遅れて成熟レベルに達する。

〔はじめに〕

近年，各種脳内アミンやその合成・分解酵素の脳神経核レベルでの分布が明らかにされつつある。さらにこれら物質の精動行動にともなう変化や神経薬理学的検索なども，脳の枝能別の構造を基盤として行なわれている。脳内アミンの主要分解酵素である MAO は，主に type A と type B とに分類され[2)6)]，それぞれやや異った意味を有するものと考えられている[8)]。われわれはすでに，type A MAO のラット視床下部神経核別分布と発達の概略を報告したが，今回はさらに，type A+B , type B MAO の分布と発達を測定し，これらについて総合的に検討を加えたので報告する。

〔実験方法〕

Wistar系雄ラットを群居飼育して生後7日，15日，30日，45日および成熟ラットとして90日のものを使用した。断頭により摘出した脳を液体窒素固定し，Lowry[9)]の方法に従い cryostat 内で厚さ 40～70 μM の連続凍結乾燥切片を作成した。この切片から各神経核を構造別に切り出し，電子微量天秤で重量を測定して試料とした。

MAO 活性の測定は McCaman ら[10)4)8)]の方法を一部改変して行なった。最終濃度がそれぞれ 0.05% の BSA と Triton X-100 を含む 0.1M, pH7.2 phosphate buffer 2 μl を試料に加え 0° C, 20 分間 preincubation の後，2 μl の substrate-buffer solution を加えた。(基質最終濃度：type A; 1.1mM[2-^{14}C]5-hydroxytryptamine binoxalate, 45 mCi/ mM.
type A+B, type B; 1.0mM[2-^{14}C]dopamine ethylamine, 60 mCi/ mM, New England Nuclear Co.)
type B MAO の測定には同上の buffer 1 μl と 10^{-5}M clorgyline 溶液 1 μl を加えて pre-incubation 後 substrate-buffer solution を加えた。この反応液を 38°C, 45 分間 incubate

し反応生成物をethyl acetateで抽出して液体シンチレーションカウンターで放射能活性を測定した。測定効率は86％であった。

凍結乾燥切片ホモジネートを用いた予備実験で，Fig. 1に示す如く，10^{-5}M clorgyline 1 μl を用いた場合，5-hydroxytryptamineを基質とするMAO活性は約96％が阻害されるのに反し，dopamineを基質としたMAO活性は約40％が阻害されるのみであり，この結果は他の報告[13]ともほぼ一致しておりこの時のMAO活性はtype B MAO活性を表わしているものと判断される。

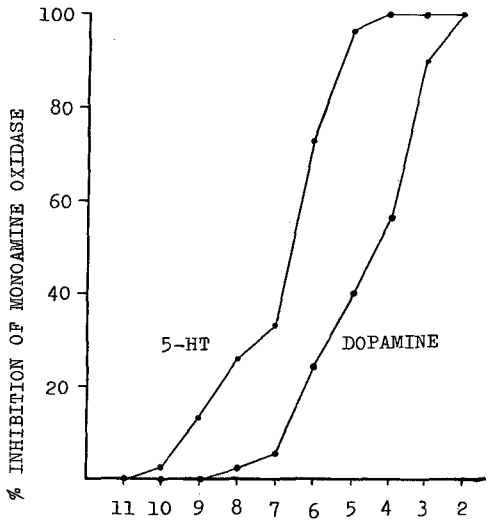


Fig. 1 Inhibition of the deamination of 5-hydroxytryptamine and dopamine by increasing concentrations of clorgyline

〔結果と考察〕

(1) type A MAO Table I に示す結果を得た。成熟ラットにおける分布は，視床下部内側の部分に比較的高い活性が認められるのに反し，視床下部外側部では活性が低い傾向にある。これは，これまでの報告[5]とほぼ同様の傾向である。活性値は，生後7日目では成熟期のレベルよりやや低いもののすでにかなり発達しており，15日目で成熟レベルに達している。MAO活性の発達について全脳ホモジネートを用いた従来の報告[1)(7)]の結果は一定しておらず，成熟値に達する時期を20日程度とするものや生後すでに成熟レベルより高いとするものがある。神経核別の発達について報告されたものはない。本研究において視床下部の神経核部位別活性の差異が明確になるのは30日目であり，神経核別分化の成熟は，絶量としての活性値成熟よりも遅れるものと考えられる。

(2) type A+B MAO Table II に示す結果を得た。type Aと同様に，視床下部内側に活性が高く外側に低い傾向がある。ことに，N. arcuatus，N.suprachiasmaticus で強い活性が認められ，これはN. arcuatusのドパミンニューロン分布との関連も考えられる。しかし視床下部諸核におけるtype A+B MAO分布とdopamine分布[11]とは相関性はないようである。全体的にはtyramineを基質としたMAO活性分布[5]と類似した分布傾向を示すが，各神経核ごとのtyramine-MAOとdopamine-MAOの相対比にはかなりのばらつきがある。Harada ら[3]によると，脳の大きい部位別ホモジネートでの基質特異性の差は小脳以外ではないとされているが，視床下部神経核単位では基質特異性に差のあることが推測される。年齢発達にともなう変化は，type A MAOとは異なり生後15日目には成熟レベルを示すと同時に，神経核部位別の活性の差異も明確に認められる。また，30日目・45日目ではむしろ成熟レベルより強い活性を示す傾向にある。

(3) type B MAO Table III に示す結果を得た。N. arcuatusに特に強い活性が認められ，次いでN.premamillaris ventralis, N. supraopticus に強い活性を認める。全体に，

Table I Distribution and development of monoamine oxidase (5-HT) in rat hypothalamus
Mean ± S.E.M. μ moles/g dry wt./h.

days after birth	7 days (N)	15 days N=5	30 days N=5	45 days N=5	Adult N=5
pars anterior					
N. anterior	56.6± 13.3 (4)	71.9± 6.1	69.1± 3.8	59.9± 3.2	65.7± 7.0
A. lateralis	54.5± 1.9 (4)	64.9± 4.2	57.6± 3.7	61.5± 5.3	52.4± 1.9
N. paraventricularis	61.7± 17.9 (3)	77.2± 6.7	79.4± 3.3	80.5± 8.0	85.1± 7.2
N. supraopticus		63.8± 6.7	76.6± 2.5	60.4± 10.1	64.1± 9.7
N. suprachiasmaticus		60.0± 4.6	64.0± 5.9	64.5± 8.4	75.9± 5.6
pars medialis					
N. ventromedialis	46.7± 5.5 (3)	85.0± 4.3	87.0± 3.8	77.0± 5.0	81.7± 3.9
N. dorsomedialis	55.8± 6.6 (3)	82.3± 2.1	84.4± 4.1	86.2± 9.8	89.2± 4.1
A. lateralis	56.0± 5.9 (4)	88.3± 3.3	60.8± 6.3	44.0± 6.9	47.6± 2.4
N. periventricularis	44.0± 6.4 (4)	81.6± 5.2	72.5± 8.4	72.0± 9.6	96.3± 2.7
N. arcuatus	41.0± 8.9 (3)	87.3± 8.1	89.0± 4.6	69.9± 5.1	96.6± 9.7
pars posterior					
N. posterior	46.9± 3.9 (3)	73.5± 9.3	71.2± 3.7	61.3± 4.0	74.6± 3.8
A. lateralis	42.7± 4.3 (3)	71.5± 3.9	68.3± 6.8	49.6± 2.1	54.3± 1.6
N. premamillaris dorsalis	42.0± 13.9 (3)	59.4± 4.2	91.0± 5.7	87.4± 14.6	99.5± 10.7
N. premamillaris ventralis	48.7± 8.3 (4)	61.2± 5.8	101.1± 7.8	102.8± 9.9	72.3± 6.1
N. arcuatus	52.9± 3.0 (4)	71.8± 7.8	95.4± 12.8	81.5± 6.8	79.1± 11.1

Table II Distribution and development of monoamine oxidase (Dopamine) in rat hypothalamus
Mean ± S.E.M. μ moles/g dry wt./h. N=5

days after birth	15 days	30 days	45 days	Adult
pars anterior				
N. anterior	72.0 ± 2.3	72.3 ±10.4	64.8 ± 6.8	80.1 ±16.1
A. lateralis	59.8 ± 5.0	55.2 ± 3.0	43.2 ± 2.8	44.5 ± 5.0
N. paraventricularis	94.8 ± 2.8	118.8 ±11.4	76.1 ±13.1	64.2 ±10.0
N. supraopticus	86.7 ± 5.7	82.6 ±10.3	70.7 ± 9.3	84.6 ± 5.1
N. suprachiasmaticus	101.2 ±10.4	125.6 ±12.5	121.6 ± 9.9	106.8 ±22.3
pars medialis				
N. ventromedialis	105.4 ± 4.3	100.8 ± 9.0	86.1 ± 4.8	70.5 ± 8.8
N. dorsomedialis	87.0 ± 3.2	86.1 ± 6.0	80.6 ± 3.3	87.3 ±12.2
A. lateralis	78.6 ± 5.9	70.6 ± 4.7	60.0 ± 3.2	65.4 ± 8.2
N. periventricularis	108.3 ± 6.9	134.9 ±12.1	106.0 ± 9.6	86.0 ±13.6
N. arcuatus	152.1 ±19.1	159.0 ± 8.6	184.9 ±13.5	113.0 ±11.8
pars posterior				
N. posterior	78.4 ± 5.5	73.0 ± 6.9	72.9 ± 5.0	88.8 ± 8.8
A. lateralis	71.2 ± 8.2	54.9 ± 8.5	54.1 ± 4.4	63.3 ± 6.9
N. premamillaris dorsalis	95.6 ±10.0	84.9 ±13.2	78.3 ±10.5	72.0 ±13.5
N. premamillaris ventralis	95.3 ±11.3	111.2 ±11.3	93.1 ± 8.7	94.0 ± 9.3
N. arcuatus	146.8 ±20.8	200.6 ±21.9	187.0 ±24.3	167.3 ±23.2

Table III Distribution and development of monoamine oxidase (Dopamine+clorgyline) in rat hypothalamus
Mean ± S.E.M. μ moles/g dry wt./h. N=5

days after birth	15 days	30 days	45 days	Adult
pars anterior				
N. anterior	2.8 ± 0.7	13.0 ± 3.4	10.3 ± 1.7	19.0 ± 1.5
A. lateralis	2.4 ± 0.1	11.4 ± 3.1	10.6 ± 2.8	12.9 ± 0.9
N. paraventricularis	4.2 ± 1.3	27.5 ± 4.8	23.4 ± 3.6	36.2 ± 6.6
N. supraopticus	7.7 ± 1.9	32.9 ± 9.6	49.1 ± 5.7	53.4 ± 7.3
N. suprachiasmaticus	8.8 ± 1.7	34.9 ± 7.9	23.6 ± 4.4	39.6 ± 3.9
pars medialis				
N. ventromedialis	5.9 ± 1.2	15.6 ± 3.4	27.2 ± 5.9	20.0 ± 1.9
N. dorsomedialis	3.3 ± 0.8	19.5 ± 4.8	15.8 ± 2.6	21.9 ± 2.8
A. lateralis	1.9 ± 0.4	10.2 ± 2.5	12.5 ± 2.9	17.0 ± 0.9
N. periventricularis	10.5 ± 1.8	44.3 ± 8.9	60.8 ± 3.4	37.0 ± 2.8
N. arcuatus	18.7 ± 4.1	82.4 ±13.2	95.8 ± 7.3	95.3 ±18.4
pars posterior				
N. posterior	4.5 ± 0.7	13.6 ± 3.2	21.5 ± 4.9	20.2 ± 1.5
A. lateralis	3.2 ± 0.3	11.8 ± 2.8	15.0 ± 3.0	16.7 ± 1.9
N. premamillaris dorsalis	3.6 ± 0.9	22.4 ± 7.2	27.1 ± 6.8	29.3 ± 2.3
N. premamillaris ventralis	7.5 ± 2.6	15.8 ± 5.7	20.2 ± 5.2	57.6 ± 8.2
N. arcuatus	45.1 ± 6.2	113.8 ±23.8	97.2 ±12.2	106.5 ±14.2

type A MAO より活性の低い神経核が多い中で，N. arcuatusのみは type A MAO と同等以上の活性を示している。また視床下部内側，ことに第三脳室周辺部分に活性が強く，この傾向はtype A の場合よりもさらに著しい。N. paraventricularis や N. supra-opticus は下垂体後葉ホルモン産生を行ない，また，N. arcuatusはドパミンニューロンを持ち視床下部ホルモン分泌調節を行なう部位として知られているが，これらの部位で特にtype B MAO 活性が高いことは大変興味深いことである。すなわち，神経内分泌系構にドパミンのみならず，β-phenylethylamine など，type B MAO の substrate となるアミンが積極的に関与していることを示唆しているのかも知れない。今後，β-phenylethylamine などの神経核別分布と，それらを基質とする type B MAO 分布との関係について検討を重ねる必要があろう。Williams ら[12]は，5-hydroxytryptamine を基質とした組織化学的方法での研究で，clorgyline に阻害されないいわゆる type C MAO が第三脳室周辺部に存在するとしているが，われわれの方法で確認を行なったところ，第三脳室周辺の各部位においても，10^{-6}M clorgyline を用いた時の MAO 活性はほぼ100%近く阻害され，type C MAO の存在については疑義があると思われる。ともあれ，今回の type B MAO 活性値に type C MAO 活性値が混入している可能性は少ないと考えられる。活性の成熟は type A MAO よりやや遅く，30日程度で成熟レベルに達するとともに部位別の差異も明確となる。これは，全脳ホモジネートを用いた従来の報告[1][7]とほぼ一致する結果である。発達について特に注目される点は，N. arcuatus では15日程度ですでに他の神経核よりかなり高い活性を示し，30日目までさらに急速に活性が増加することと，それに反してその他の第三脳室周辺部の神経核では，N. arcuatus の活性発達より遅れてしだいに活性が増加してくる傾向があることである。これらの点に関する詳しい意味づけは今回の実験だけからは不可能であり，type B MAO の積極的な性能上の意義については，神経内分泌系構との関連も含めて今後の検討を要するところであろう。

〔文献〕

(1) Bourgoin,S., Artaud,F., Adrien,J., Hery,F., Glowinski,J. and Hamon,M. (1977) J.Neurochem. 28.415-422

(2) Goridis,C. and Neff,N.H. (1971) Neuropharmac. 10.557-564

(3) Harada,M., Kondo,Y., Kuzuya,H. and Nagatsu,T. (1975) J.Neurochem. 24.193-195

(4) Hazama,H. and Ito,M. (1976) Yonago Acta Med. 20.221-224

(5) Hirano,M., Uchimura,H. and Saito,M. (1975) Brain Research, 93.558-563

(6) Johnston,J.P. (1968) Biochem. Pharmac. 17.1285-1297

(7) Jourdikian,F., Tabakoff,B. and Alivisatos,S.G.A. (1975) Brain Research, 93. 301-308

(8) 国元寛文，挟間秀文 (1977) 脳研究会会誌，3.120-121

(9) Lowry,O.H. (1962-3) Havey Lecture, 58.1-19

(10) McCaman,R.E., McCaman,M.W., Hunt,J.M. and Smith,M.S. (1965) J.Neurochem. 12.15-23

(11) Versteeg,D.H.G., Gugten,J.V.D., Jong,W.D. and Palkovits,M. (1976) Brain Research, 113.563-574

(12) Williams,D., Gascoigne,J.E. and Williams,E.D. (1975) Brain Research, 100.231-235

(13) Yang,H.Y.T. and Neff,N.H. (1974) J.Pharmacol.Exp.Ther. 189.733-740

27 ラット視床下部，青斑核部におけるドーパミン-β-水酸化酵素活性の日内変動

大宮司　信・三国雅彦・浅野　裕
斉藤嘉郎・山下　格　（北大・医・精神）
岡田文彦　（北大・保健管理センター）

〔要　約〕

視床下部及び青斑核部はDBH活性の高い部位であり，組織学的に薬理学的に相互関係をもっていることがしられている．我々は満8週令の雄性ラットのみを用いて，これらの部位のDBH活性に関して日内変動の有無につき検索した。青斑核部では昼間に高い活性を示し，しだいに低下し，暗時のはじめ頃に最低値を示した。前視床下部では逆に暗時のはじめ頃に最高値を示し，暗時のおわり頃に最低値を示した（いずれも $P<0.001$ にて有意）。しかし後視床下部では有意な日内変動はみとめられなかった。前視床下部の日内変動はNAの場合と一致しており，DBHがNA合成の最終段階の酵素であるところから，NAの日内変動との相関が想定される。しかし，後視床下部NAにも前部とは若干異なる日内変動が存するといわれ，これと関係づけられるようなDBH活性の日内変動の存在が期待されたが，そうしたものは見出せなかった。こうした点より視床下部のDBH活性は前部，後部で若干その動態を異にするのかもしれない．青斑核部でのDBH活性の日内変動の意義に関しては十分には明らかにしえないが，いずれにしても，これら部位での種々のDBH活性の検索を行うに際しては，こうした日内変動の存在は留意すべきと考えられる．

視床下部及び青斑核部はDBH活性に富んだ部位であるといわれている．この部位でDBH活性の日内変動の有無につき検討した．

〈実験方法〉　実験はすべてWister-King-Aptekman系雄性ラットを用い，本実験のために特別に調整された動物室にて繁殖，飼育及び実験が行われた。本動物室は実験者のみ出入り出来，外部と完全に隔離されている．室内は温度（22～25℃），湿度（50～60%）が一定に調整され，雑音から遮断されている．照明は一定の人工照明を用い，午前6時30分点燈，午後6時30分消燈とした。飼料（オリエンタル固型飼料）及び水分の補給は1日おきに点燈時間内に特定の時間をさけて行い，自由に摂取させた。繁殖及び飼育に伴う室内

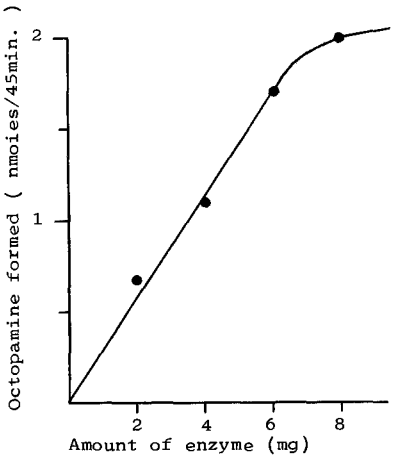


Fig.1 The effects of different amount of rat LC homogenate on DBH activity.

Abbreviations
DBH = Dopamine-beta-hydroxylase
aHt = Anterior hypothalamus
pHt = Posterior hypothalamus
LC = Locus coeruleus　NA = Noradrenarine

作業もこの時に同時に行った。ラットは生後7日目までに雌雄の選別を行い，雄のみを残し，さらに生後21日目に母親より分離してケージあたり2～4頭づつ群棲飼育を行った。生後8週目まで一定の手順で飼育し，この間十分なハンドリングを行った。このように飼育したラットを生後9週目の1週間以内に体重を測定し（体重：274±3g，平均値±標準誤差）8，12，16，20，0，4，8時の各時点で計7回2～4頭づつ断頭し，ヘパリン加採血を行った。断頭後1時間以内に5℃の恒温室内で脳を取り出し，Glowinski and Iversen（4）の方法にて視床下部をとり出し，Manshardtら（8）の方法にならい視交叉より2mm尾側で垂直な割を入れ，前後2部分に分割した。さらにReisら(11)にならって青斑核部分をとり出した。これら3部分の湿重量は，前視床下部26.6±0.6mg，後視床下部35.2±0.7mg，青斑核部18.7±0.5mg（いずれも平均値±標準誤差）である。これら試料に対して界面滑性剤を含む0.1 M燐酸緩衝液を1mgにつき10μlの割合で加え十分にホモジナイズし，－70℃にて測定まで保存した。なお血液は900 G，10分間遠沈して血漿を分離し，同じく－70℃にて測定まで保存した。DBH活性の測定はKato and Nagatsuら（6）による高感度二波長吸光測定法を用いて行った。我々の方法で得た試料ではFig. 1に示す通り0～6mgにおいて直線性がみとめられ，実際の測定には4mgを用いて行った。血漿コーチコステロンの測定はZenker & Bernstein(15)の変法を用いた。なお各時点のラットの頭数は10頭であり，DBH活性値は生成オクトパミンにつきnmoles/min./gで示した。

〈結果〉 Fig. 2にDBHの部位別の活性値を示す。いずれも午前8時のラット10頭の平均の活性値である。LCで最も高値を示しaHtがこれに次ぎ，pHtが最も低い。Fig. 3は血漿コーチコステロンの日内変動を示す。朝方に低値をとり，夜間高値をとる正常な日内リ

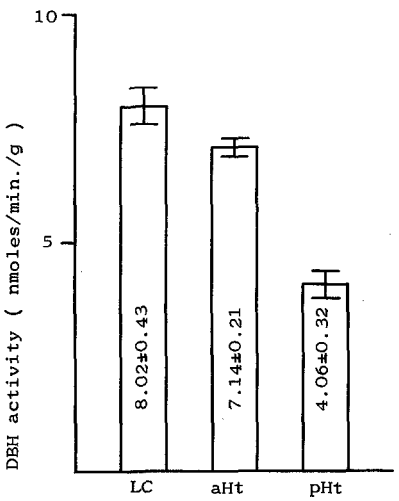


Fig.2 DBH activity of LC, aHt and pHt of rat at 8:00 A.M.
(mean ± S.E. , n=10)

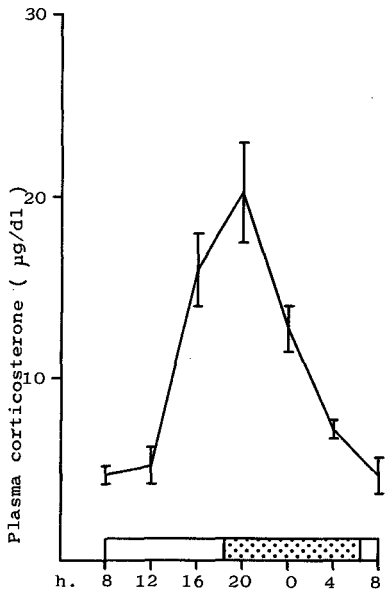


Fig.3 Diurnal changes of plasma corticosterone. (mean±S.E.)

ズムを呈している。Fig. 4 はLCでのDBH活性の日内変動を示す。昼12時に最高値を示し，しだいに下降，夜間の20時に最低となり，以後再び上昇している。Fig. 5 は aHt でのDBH活性値を示す。夕刻よりしだいに上昇し，夜間20時で最高値となり以後しだいに減少している。Fig. 6 は pHt におけるDBH活性値を示す。日中，夜間ともほとんど一定であり有意な日内変動はみとめられなかった。

〈考察〉 1)実験方法について。

ラット脳内DBH活性はCoyle ら(3)によれば週令による増加があるといわれている。従って活性値を比較するためには同じ週令のラットを用いることが必要と考えられる。さらにDBHと密接な関係を有するといわれているNA の脳内での日内変動は浅野ら(1)によれば生後5週以降に出現するといわれている。こうした点を考慮し，我々は満8週令の雄性ラットのみを対象として実験を行った。次に我々の設定した条件下でラットに正常な生活の日内リズムが存在することを確認する一手段として我々は血漿コーチコステロンの日内変動について検討した。Fig. 3 に示す如く夜間に高く，早朝ないし午前中に低下する正常の日内リズムについて確認しえ，望ましくないストレスの影響はないものと考えた。

2)青斑核部及び視床下部DBH活性の日内変動について。

DBHは中枢神経系においてはDopaminergic neuron には存せず Noradrenergic neuron に選択的に存在するといわれている(5)。脳内モノアミンの存在は部位的にかなりの特異性があり，青斑核部や視床下部ではNA に富み，視床下部ではとくに前視床下部に多いといわれている(8)。DBH活性もこうした部分に高く(10)，(11)，また偽伝達物質としてNA の作用を阻害するといわれるα-methyl-tyrosine によってDBH活性が低下すること(7) などからDBHがNA とその動態を同じくすることが想定される。一方青斑核部の破壊により視床下部DBH

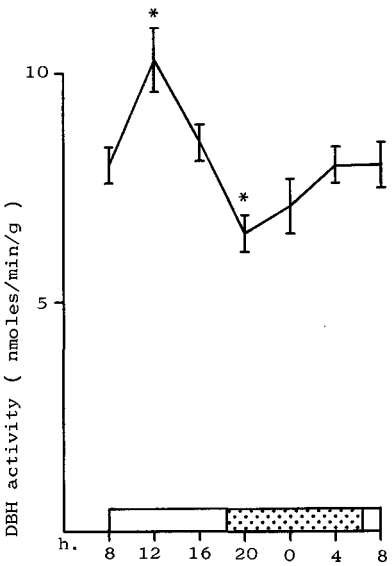


Fig.4 Diurnal changes of DBH activity of locus coeruleus.
(mean±S.E.,n=10,*p<0.001)

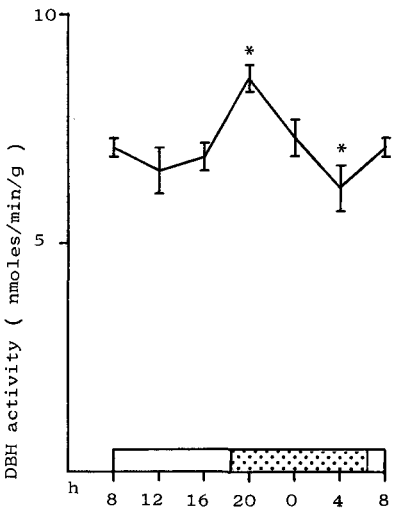


Fig.5 Diurnal changes of DBH activity of anterior hipothalamus.
(mean±S.E.,n=10,*p<0.001)

活性の低下が知られており(12)，逆に視床下部の破壊により青斑核部DBH活性の低下が認められる(11)．こうした点は視床下部と青斑核部間の密接な関係が想定される．

従来我々は精神疾患や情動との関係において視床下部に着目し，さらに情動の動きと体内の諸物質の変動の関連のうち，とくに日内リズムとその異常について検討してきた(13)．今回こうした研究の一環として視床下部及びこれと関係の深い青斑核部のDBH活性につきその日内変動の有無について検討した．

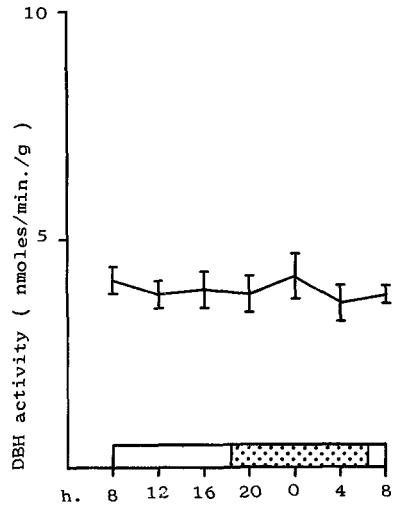


Fig.6 Diurnal changes of DBH activity of posterior hypothalamus (mean±S.E., n=10)

視床下部DBH活性値については，我々と同じ方法で測定したLoon (7) の結果とほぼ一致している．我々の測定した三部位では青斑核部で最も高く，視床下部ではaHtがpHtの約2倍近く高くなっていた．Manshardtら(8)によれば視床下部の前後でNAの含量が異っているとされているが，我々のDBH活性の差異もこれとよく一致している．

視床下部NAの日内リズムについては活動期の夜間に高値をとり，早朝ないし午前中に低値をとるという日内変動が知られている(2)(9)(14)．またManshardtら(8)によればaHt，pHtとも夕刻，暗期に入ったころ最高値をとりaHtでは早朝に，pHtでは真夜中に低値をとるとされている．我々の結果ではaHtはほぼNAの日内変動に一致するもののpHtでは日内変動がみとめられず、NAの動態と異っている．一方青斑核部でのDBH活性はaHtより約8時間ずれており，昼に最高値を示していた．こうした所見はこれらの部位のDBH活性の検討を行う時に十分留意してゆく必要があると考えられる．

謝辞：DBH活性測定をはじめ，種々御教示下さいました東京工大永津俊治先生に感謝いたします．

References

(1) 浅野裕，諸治隆嗣(1972) 脳と神経，24，1145-1151
(2) 浅野裕(1974)精神経誌，76，741-756
(3) Coyle,J.T.and Axelrod,J.(1972) J.Neurochem.19,449-459
(4) Glowinski,J., and Iversen,L.L.(1966) J.Neurochem.13,655-669
(5) Hartman,B.K.(1973) J.Histochem.Cytochem. 21,312-332
(6) Kato,T.,Kuzuya,H., and Nagatsu,T.(1974) Biochem.Med. 10,320-328
(7) Loon,G.R.(1976)In:Usdin,E.et al.,ed. Catecholamines and Strees.Oxford, Pergamon Press, 77-87
(8) Manshardt,J., and Wurtman,R.J.(1968) Nature 217,574-575
(9) Reis,D.J.,Weinbren,M.,and Corvelli,A.(1968)J.Pharmac.exp.Ther.164,135-145
(10)Reis,D.L.,and Molinoff.P.B.(1972)J.Neurochem.19,195-204
(11)Reis,D.J.,and Ross,R.A.(1973)Brain Research,57,307-326
(12)Ross,R.A.,and Reis,D.J.(1974)Brain Research 73,161-166
(13)Suwa,N.,and Yamashita,I.(1974)Igaku-Shoin, Tokyo
(14)武部和夫(1973)最新医学，28，1050-1058
(15)Zenker,N.,and Bernstein,D.E.(1958)J.biol. Chem. 231,695-701

28 ラットの松果体における Tryptophan- および Tyrosine- 水酸化酵素の日周リズム

融　道男・渡部修三・渋谷治男
（東医歯大・医・精神）

〔要　約〕

成熟ラットを7～19時を明期として飼育し、10時から4時間毎に松果体の tryptophan 水酸化酵素活性を測定した。活性は明期に低く，暗期に入ると明期の1.5倍以上に増加し、高活性は暗期の間持続した。暗期の各値と明期の各値の間の差は有意であった（$p<0.0005$）。9日間の恒明条件で飼育したラットでは22時の値は10時に比し上昇を示さなかったが、恒暗条件で飼育した場合は標準明暗条件のリズムがそのまま存続した。1-propranolol を暗期に入る直前に注射したラットでは22時の活性の上昇はみられず、また19～22時を明条件においたラットでも活性の上昇は生じなかった。cycloheximide を19時に与えた場合も暗期に入ってからの活性の上昇はなかった。この松果体の tryptophan 水酸化酵素のリズムは内因性のサーカディアンリズムであると考えられ，N-acetyltransferase，N-acetylserotonin，melatonin のリズムと同位相で，serotonin とは逆位相であり、melatonin 合成と最も深い関係があると考えられる。薬物や明暗条件の変更に対する本酵素の反応は、N-acetyltransferase の反応と類似していることから，serotonin の N-acetylation を介して二次的に生じている可能性がある。またけっ歯類の計時機構と考えられている視交叉上核および視索前野で tryptophan 水酸化酵素のリズムは見出されなかった。従来明期に低く暗期に高いリズムをもつといわれた松果体の tyrosine 水酸化酵素について検討した結果，そのレベルには　リズムが認められなかった。

けっ歯類では網膜からの光刺激は視神経を通って視交叉上核に達し、そこから内側前脳束を経て胸髄の側索から上頸神経節にいたる。さらに松果体神経を通って小脳背側面から松果体に達する。光刺激が松果体における melatonin の合成を抑制する生化学的機制について解明されつつあるが、網膜から松果体にいたる回路の神経伝達物質についてはその一部しか知られておらず、松果体における melatonin 合成系の明白なリズムを調節する神経伝達機構にも不明の部分が多い。

この研究では松果体における melatonin 合成の最初のステップを媒介する tryptophan 水酸化酵素が melatonin 合成系と同じ位相のサーカディアンリズムをそなえているという所見について報告したい。一方、松果体でのリズムの存在が信じられ、松果体におけるカテコールアミン支配の基礎をなすと考えられていた tyrosine 水酸化酵素について調べたところ、明瞭なリズムは見出されなかった。また近年けっ歯類で有力な計時機構と目されている視交叉上核およびその近傍の tryptophan 水酸化酵

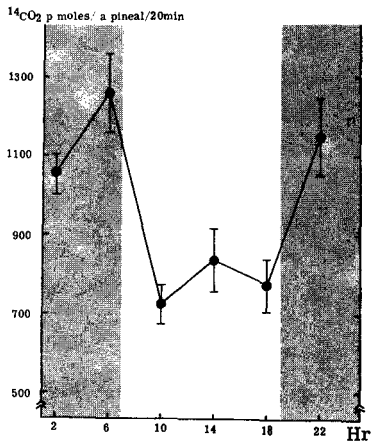


Fig. 1. Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in rat pineals *

*** Differences between each value during light hours and dark hours are all significant ($p<0.0005$). The vertical lines above and below each mean (n=8) represent 1S.E.**

素の日周性についても検索したので報告する。

方法

実験当日に200~300gになる同日生れの雄性Wistar系ラットを7時から19時までを明期とした光調節箱で3週間飼育した。箱は蛍光灯を用いて照明し、ケージの底の照度は100~120ルックスであった。飼料にはオリエンタルMF（蛋白質24.6%, tryptophan 0.22%）を用い、水とともに自由に摂取させた。ラットは10時から4時間毎に断頭し、暗期には動物を淡赤色光下に処理した。断頭後直ちに0°Cに調節した冷凍箱中で松果体および脳をとり出し、tryptophan水酸化酵素（TrH）測定には大部分の実験では松果体1コを0.08m1の冷却した1% Lubrol-WX含有0.01 M Tris-酢酸バッファー（pH 7.4）で、tyrosine水酸化酵素（TH）は2コを0.2% Triton X-100含有50mM Tris-塩酸バッファー（pH 6.0）0.12m1でホモジナイズし、TrH活性は市山らの方法[8][20]により、TH活性は渡部，市山らの方法[22][23]により、補酵素としてtetrahydrobiopterineを用いて測定した。視交叉上核（SC）および視索前野（PO）は冷凍室（4°C）の砕氷上で、SCは視神経の一部をつけたままとり出し（平均重量±SE：2.16±0.07mg, n=48）2匹分を合わせ，POは1匹分（3.24±0.08 mg, n=47）を0.06m1のバッファーでホモジナイズし、TrHを測定した。

結果

I. TrHの日周性

1) 松果体のTrH活性は明期に低く、

Table 1 Effects of 9-day continuous light (LL) or continuous darkness (DD) on pineal tryptophan hydroxylase activity in rats *

Treatment	0200	0600	1000	1400	1800	2200 Hr
LD			1129±141 (3)			1959±138 (4)
LL			969±62 (5)			1027±237 (6)
DD	1479±168 (4)	2158±315 (5)	820±177 (4)	915±154 (4)	812±62 (5)	1335±248 (4)

* mean ± SE ($^{14}CO_2$ pmoles / a pineal / 20 min).
Numbers in parentheses indicate numbers of experiments.

Table 2 Effects of various treatments on pineal tryptophan hydroxylase activity in rats *

Treatment	Percent activity (mean±SE)
No treatment (at 18:00)	100 ± 7 (3)
Saline **	142 ± 18 (3)
l-Propranolol (30mg/kg, i.p.) **	91 ± 7 (4) ***
19:00 to 22:00 in light	71 ± 20 (3) ***

* Rats were killed at 22:00.
** Injected at 19:00 and immediately placed in darkness.
*** $p < 0.025$ compared with saline control.

Table 3 Effects of cycloheximide (30mg/kg, i.p.) on pineal tryptophan hydroxylase activity in rats

Time after injection *	Percent activity (mean±SE)
0 min	100 ± 13
10	93 ± 6
60	62 ± 1
120	39 ± 2
180	30 ± 1

* Injected at 19:00 and immediately placed in darkness. n=3

Table 4 Daily variations of tryptophan hydroxylase activity (mean ± SE) in suprachiasmatic nuclei (SC) and preoptic areas (PO) in rats

	0200	0600	1000	1400	1800	2200 Hr
SC ($^{14}CO_2$ pmoles/ a pair of SC/20min)	38±11 (4)	51±6 (4)	47±4 (4)	51±5 (4)	50±3 (4)	34±7 (4)
PO ($^{14}CO_2$ pmoles/ g/20min)	25427±3085 (6)	27496±4427 (6)	27239±1496 (6)	28145±2248 (5)	25385±2855 (6)	28932±3385 (6)

暗期に入ると明期の1.5倍以上に上昇し、高活性は暗期の間持続した(Fig. 1)。暗期の各値と明期の各値の間の差は有意であった($p<0.0005$)。標準明暗条件(LD)で飼育した後に9日間恒明条件(LL)においたラットでは22時の値は10時の値に比し上昇を示さなかった。同じ期間恒暗条件(DD)で飼育した場合はLD時のリズムがそのまま存続した(Table 1)。l-propranolol (30mg/kg, i.p.)を暗期に入る直前の19時に与えたラットでは活性の上昇はみられなかった(Table 2)。また暗期に入る19時から22時まで明条件においたラットも22時の測定で活性の上昇を示さなかった。cycloheximide (30mg/kg, i.p.)を19時に与えたラットでは暗期に入ってからの活性の上昇はみられず、3時間後の22時には元の活性の30%にまで低下した(Table 3)。

Table 5 Daily variations of pineal tyrosin hydroxylase activity in rats*

0200	0600	1000	1400	1800	2200 Hr
52±3	51±4	56±4	58±4	58±5	60±7

* mean± SE ($^{14}CO_2$ pmoles/a pineal/10min). n=10

2) SCにおいてTrH活性の日周リズムは明期暗期に対応した有意な変動を示さなかった(Table 4)。

3) POにおいてTrH活性の日周リズムは明期暗期に対応した変動を示さなかった(Table 4)。

II. THの日周性

松果体においてTH活性の日周リズムは明期暗期に対応した有意な変動を示さなかった(Table 5)。

考察

松果体におけるTrHのサーカディアンリズムについての研究は少なく、これまでの報告[4]ではリズムの存在は否定されていた。今回感度のよい方法[8][9]を用いることにより松果体のTrH活性に日中低く夜間に高い明白な日周リズムを見出したことは、他のいくつかの脳部位ではリズムが見出されなかった[20]ことから考えて、この酵素が松果体と他の脳部位で異なる性質をもっているという点[4]からも興味がもたれる。

松果体ではserotonin(5HT)が日中に高く夜間に低い日周リズムを有することがQuay[16]によって確かめられている。このリズムは松果体におけるN-acetyltransferase (NAT)[12] N-acetylserotonin[1][13] melatonin[17]のもつ明瞭なリズムと昼夜の位相が逆転したリズムである。この5HTの逆位相リズムは、そのN-acetylationの速度に5HTの合成が常に合わないために生じたものと解釈されている[12]。

9日間LL条件で飼育したラットでは測定した2時点で明期暗期の差は消失したにもかかわらず、DD条件においた場合はLD条件の時と同じパターンのリズムが存続した。この事実から松果体における TrH活性のリズムは内因性のサーカディアンリズムであることが推測される。一方β遮断剤1-propranololにより暗期の活性増加が遮断され、蛋白合成阻害剤cycloheximideによっても暗期の活性増加が抑制された。これらの明暗条件の変化あるいは薬剤に対するこの酵素の反応は、Deguchi & Axelrod[3]によって示されたNATの反応とよく似ている。松果体のNAT活性は松果体に分布している交感神経終末から遊出されるnoradrenaline (NE)により制御されていると信じられており、Klein ら[11]はNEにより刺激された松果体のcyclic AMPがNATの合成を増加させると考えている。TrHの反応のNATとの類似性は、NATの変化が一次的なもので、NATの活性の変化が基質5HTの増減をひきおこすという形でTrH活性の変化を導いていると

考えることもできる。Shein5[19]は培養した松果体組織においてNEがtryptophanの水酸化を促進する事実を示しているので，NEのTrHへの直接作用についても検討する必要があろう。しかし両側の上頸神経節切除により松果体の5HTのリズムが消失し[5]この時NATのリズムもなくなること，および5HTはNATに対して直接作用をもたないことなどから1-propranololのTrHへの作用はNATへの作用を介して生じている可能性が強い。

いずれにせよ，松果体におけるTrHは他の脳部位と異なり，melatonin合成の最初のステップをになう酵素として存在しているものと考えられる。

近年，ラットのSCの破壊により，松果体のNAT[15]，水飲み行動[21]，睡眠・覚醒[17]などのサーカディアンリズムが消失することが報告されている。この部位は高濃度の5HTを含有し[18]，5HT作動性ニューロンが濃厚に分布している[6]。縫線核破壊により睡眠・覚醒リズムの乱れが生ずるという実験事実を考え合わせ，ラットのさまざまな行動の日周性を支える計時機構の生化学的背景として，この小部位におけるTrH活性のサーカディアンリズムを想定して実験を行なったが明暗期に対応するリズムは見出されなかった。この実験ではSCを視索とともにとり出したため若干の他の組織の混入があることを今後検討せねばならない。POも5HTニューロンが豊富に分布し，睡眠・覚醒に関係深い部位として知られている[10]。この部位ではかなり高いTrH活性が得られたが，現在までのところサーカディアンリズムは認められない。

松果体におけるTHの日周リズムについても研究は少なく，McGeer5[14]が昼間に低く夜間に上昇するリズムを報告し，このリズムはmelatonin系のリズムを維持するカテコールアミン遊出を司る機構として信じられて来た。この研究ではMcGeerらの方法と異なり，pteridine補酵素を使用し，感度をよくした条件下で測定した結果，従来信じられていたようなTHのレベルについてリズムを証明することができなかった。松果体においてはNEのリズムがあるといわれる[24]が，必ずしもmelatonin系のリズムと対応するものではないので，松果体でのNE遊出のリズムは夜間の代謝回転の増加という形でしかとらえられていない。[2]今後交感神経節をも含めて合成分解系酵素の活性を測定して検討を加える必要があろう。

謝辞：ご協力を頂いた宮田定穎，保科晶子，高橋公雄，渡辺昭子の諸兄姉に感謝いたします。なお1-propranololはICIファーマの供与による。

文献

(1) Brownstein, M., Saavedra, J. M. & Axelrod, J.;Mol. Pharmacol., 9:605, 1973. (2)Brownstein, M. & Axelrod, J.;Science, 184:163, 1974. (3) Deguchi, T. & Axelrod, J.;Proc. Nat. Acad. Sci., 69:2547, 1972. (4) Deguchi, T. & Barchas, J.;IN,Serotonin and Behavior, Academic Press, 1973, p. 33. (5) Fiske, V. M.; Science, 146:253, 1964. (6) Hökfelt, T.;Z. Zellforsch., 91:1, 1968. (7) Ibuka, N. & Kawamura, H.;Brain Res., 96:76, 1975. (8) 市山新；生化学, 44:825, 1972. (9) Ichiyama, A., Hasegawa, H., Tohyama, C., Dohmoto, C. & Kataoka, T.;IN,Iron and Copper Proteins, Plenum, 1976, p. 103. (10) Jouvet, M.;Ergeb. Physiol., 64:165, 1972. (11) Klein, D. C., Berg, G. R. & Weller, J.;Science, 168:979, 1970. (12) Klein, D. C. & Weller, J.;Science, 169:1093, 1970. (13) Klein, D. C. & Weller, J.;Exerpta Med. Int. Congr. Ser., 256:52, 1972. (14) McGeer, E. G. & McGeer, P. L.;Science, 153:73, 1966. (15) Moore, R. Y. &Klein, D. C.;Brain Res., 71:17, 1974. (16) Quay, W. B.;Gen. Comp. Endocrinol., 3:473, 1963. (17) Ralph, C. L., Mull, D., Lynch, H. J. & Hedlund, L.;Endocrinol., 89:1361, 1971. (18) Saavedra, J. M., Palkovits, M., Brownstein, M. & Axelrod, J.;Brain Res., 77:157, 1974. (19) Shein, H. M. & Wurtman, R. J.;Life Sci. (I)10:935, 1971. (20) Shibuya, H., Toru, M. & Watanabe, S.;Brain Res., in press. (21) Stephan, F. K. & Zucker, I.;Proc. Nat. Acad. Sci., 69:1583, 1972. (22) 渡部修三，片岡徹，市山新；生化学, 47:229, 1975. (23) 渡部修三，融道男，金野滋，渋谷治男，鼻薗安雄；神経化学, 15:56, 1976. (24) Wurtman, R. J., Axelrod, J., Sedvall, G. & Moore, R. Y.;J. Pharmacol. exp. Ther., 157:487, 1967.

29 ウシの副腎髄質のチロシン水酸化酵素の細胞内分布と性質

山内 卓・藤沢 仁 (旭川医科大・生化)

〔要 約〕

チロシン水酸化酵素の活性調節機構を明らかにする目的で、ウシの副腎髄質の酵素の細胞内分布を調べ、粒子結合型酵素と可溶性酵素の性質を比較した。1)ウシの副腎髄質のチロシン水酸化酵素は様々な条件でホモゲナイズした場合にも可溶性画分に45~66%存在するが、粒子画分にも26~38%存在した。2)粒子画分の酵素の細胞内分布はミトコンドリアの酵素、モノアミン芳香族アミン基質デカルボキシラーゼやクロマフィン顆粒の酵素、ドーパミン-β-水酸化酵素とは異り、ミクロゾームの酵素、グルコース-6-ホスファターゼの分布と類似した。3)粒子画分の酵素は粒子結合型酵素として得られ、凍結融解、界面活性剤によっては可溶化されず、キモトリプシン処理によって特異的に可溶化された。4)可溶性酵素と粒子結合型酵素の補酵素6-メチルテトラヒドロプテリンに対するKmは、それぞれ、180 μM, 330 μMであった。両酵素の活性のpH依存性に差があった。5)可溶性および粒子結合型酵素は、酵素的リン酸化の条件、リン脂質ホスファチジルセリン、ムコ多糖ヘパリン、あるいは界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウムによって活性化されたが、活性化にともない、両酵素の間では、酵素活性のpH依存性に差が認められた。以上の結果は、チロシン水酸化酵素が細胞内ではミクロゾーム画分の膜に結合する粒子結合型酵素と、細胞質の可溶性酵素の二つの型で存在することを示す。

チロシン水酸化酵素はホルモンや神経伝達物質としてカテコールアミン生合成の律速酵素であり(1)、その活性は極めて複雑な調節を受けている。本酵素の調節機構を明らかにするためには本酵素の細胞内分布を知ることが必要である。副腎髄質では永津ら(2)、Petrackら(3)により本酵素は主に粒子結合型と報告され、一方、Ladueronら(4)、Wurtzbergerら(5)により酵素は主として可溶性であると報告されている。われわれは可溶性酵素と粒子結合型酵素に対するリン脂質のような活性化因子の効果に差があることを見出し(6)、両者は細胞内での分布が異ると考えた。そこで本酵素の細胞内分布を再検討した結果、チロシン水酸化酵素は可溶性酵素の他に、ミクロゾーム画分にも膜に結合して存在することが明らかとなったので報告する。

[実験方法]

細胞分画 ウシの死後5~15分で副腎を摘出し氷につける。2~3時間以内に髄質をとり出し直ちに5倍容の0.3M sucrose-10mM Tris pH7.3でホモゲナイズする。回転速度は600~900 rpmとし4~5回上下する。ホモジネートを800×g, 10分, 10,000×g, 10分, 24,000×g, 10分, 105,000×g 60分の分別遠心を行う。10,000×gと105,000×gの間に存在する粒子結合型酵素は0.3M Sucrose-10mM Tris pH7.3にけん濁(1g組織/2ml)させ5mlを1.0から2.2M sucroseを含む10mM Tris pH7.3の密度勾配の上に重層し129,000×g, 3hr遠心分離する。

チロシン水酸化酵素 粒子結合型酵素はShimanらの方法(7)で調製した。可溶性酵素は105,000×g上清画分よりp-ヨードチロシン-セファロース4Bカラムを用いたアフィニティークロマトによって約10倍精製した。

測定方法 チロシン水酸化酵素は6-メチルテトラヒドロプテリン(6-MPH4)を補酵素と

し 3,5-^{3}H-チロシンより $^{3}H_2O$ の生成で(8), ドーパ脱炭酸酵素(DDC)は DL-[1-^{14}C]-ドーパより $^{14}CO_2$ の生成で(9), ドーパミンβ-水酸化酵素はチラミンを基質とし Wallace らの方法(10)で, フェニルエタノールアミン-N-メチル基転移酵素(PNMT)はフェニルエタノールアミンと $^{14}CH_3$-S-アデノシルメチオニンを基質として Axelrod の方法(11)で, モノアミンオキシダーゼ(MAO)はベンジルアミンを基質として McEwen の方法(12)で, アセチルコリンエステラーゼ(AchE)はアセチルチオコリンを基質として Ellman らの方法(13)で, グルコース-6-ホスファターゼ(G-6-Pase)は Swanson の方法(14)により生成する Pi の測定(15)で, それぞれ活性を測定した。タンパクは Lowry らの方法(16), カテコールアミンはアルミナ処理なしにトリヒドロキシインドール法(17), 底糖はオルシノール法(18)によって測定した。細胞分画の各画分は酵素の阻害物質や測定妨害物質を除くために 20倍容の 10mM Tris. pH7.3 を加えた後 80% 硫安処理した標品について活性を測定した。

表1. 可溶性画分(A)と粒子画分(B)に存在するチロシン水酸化酵素(TH)とタンパク, カテコールアミン, Marker Enzyme の比較

Fraction	Homogenization Medium	TH	Protein	DDC	PNMT	AchE	DBH	Catecholamine
					%			
A	0.3M Sucrose, pH7.3	55	36	93	87	21	15	17
	0.15M KCl, pH7.3	66	48	95	90	23	17	26
	0.02M KPB, pH6.5	47	47	92	88	27	47	85
	0.1% Triton X-100, pH6.5	45	60	85	82	32	48	85
B	0.3M Sucrose, pH7.3	29	40	4	5	62	77	80
	0.15M KCl, pH7.3	26	35	2	4	58	66	68
	0.02M KPB, pH6.5	38	29	4	6	48	44	5
	0.1% Triton X-100, pH6.5	35	24	5	7	46	42	4

[結果と考察]

チロシン水酸化酵素の細胞内分布はホモゲナイズの条件によって異った結果が得られている。しかし副腎髄質の細胞分画法が確立していないためチロシン水酸化酵素の局在を調べるためには指標となる物質や酵素の活性を測定しそれらの分布と比較することが必要である。そこで先ず, 組織を様々な条件でホモゲナイズして分画を行い粒子画分(800×g から 105,000×g 画分)と可溶画分(105,000×g, 上清)についてチロシン水酸化酵素とカテコールアミンや Marker Enzyme の分布の割合を調べた(表1)。その結果チロシン水酸化酵素はいずれの条件でも可溶性酵素(DDC や PNMT)と異り可溶画分に 45~60 % しか得られなかった。KCl の場合にやゝ活性が増加するが核画分の活性が移ったものであり, Triton X-100 でも可溶性画分に得られた活性は少い。一方, 粒子画分にも 29~38 % の活性が得られた。そこで粒子画分の酵素の分布を調べるため細かく分別遠心を行うと, クロマフィン顆粒に含まれる DBH やカテコールアミンの約 40 % が 10,000×g, 10 分で沈殿するが, チロシン水酸化酵素, ミトコンドリア, ミクロゾームはほとんど沈殿しないことを見出した。10,000×g 上清を 105,000×g, 60分遠心した沈殿をさらに庶糖密度勾配遠心を行った(図1)。膜に結合したチロシン水酸化酵素を調べるため各画分に 20 倍容の 10mM Tris pH7.3 を加え低張処理し 105,000×g, 60分遠心して, カテコールアミンと可溶性タンパクを除いた沈殿の活性を測定した。チロシン水酸化酵素の分布は DBH や MAO の分布とは異り, ミクロゾームの酵素 G-6-Pase と類似していた。しかし原形質膜の酵素 AchE とは少し異った分布を示した。この結果はミクロゾーム画分にチロシン水酸化酵素が存在することを示す。この画分の酵素は粒子結合型酵素として得られ, 凍結融解や界面活性剤

表2. 粒子結合型チロシン水酸化酵素の可溶化

Treatment	TH in sup. %	Protein in sup. %
Washing	0	6
Freezing, Thawing	3	20
0.1% TritonX-100	8	35
0.05% SDS	3	41
ChymoTrypsin	89	29

では可溶化されずキモトリプシンによって特異的に可溶化された(表2)ことから酵素は膜に結合することが示唆された。

チロシン水酸化酵素は可溶性酵素の他にもミクロソーム画分の膜に結合する粒子結合型酵素が存在することから両者の性質を比較した。チロシンに対するKmは50μM, 6-MPH4を用いたときのノルアドレナリンのKiは30μM, 3-ヨードチロシンのKiは0.3μMと差はなかった。しかし, 6-MPH4に対するKmは可溶性酵素の180μM, 粒子結合型酵素の330μMで有意の差があった。酵素の至適pHはいずれも6.1であるが, 可溶性酵素の方が少ない pH範囲で活性があり粒子結合型とは異っていた(図2. none)。酵素の性質のちがいをさらに調べるために種々の活性化因子の効果を比較した(図2)。可溶性チロシン水酸化酵素はリン脂質ホスファチジルセリン(PS), ムコ多糖ヘパリン, 界面活性剤SDSによって活性化された。このとき6-MPH4に対するKmが40~50μMに低下し見かけのVmaxも2.5~4倍増大した。ヘパリン, SDSでは至適pHがアルカリ側に移動しそれぞれ6.5, 6.8となった。またATPとcAMP存在下プロテインカイネースと反応させると活性化され至適pHも移動した。一方, 粒子結合型酵素もヘパリンやSDSで活性化され, 6-MPH4に対するKmがそれぞれ120μM, 170μMに低下し, 見かけのVmaxもそれぞれ2倍, 1.4倍増大した。しかし, 可溶性酵素と異りPSによる活性化は小さい。ヘパリンによって至適pHが移動するが, SDSでは変化しない。また可溶性酵素と異り粒子結合型酵素はプロテインカイネースを加えなくてもATPとcAMPで前処理すると活性化された。

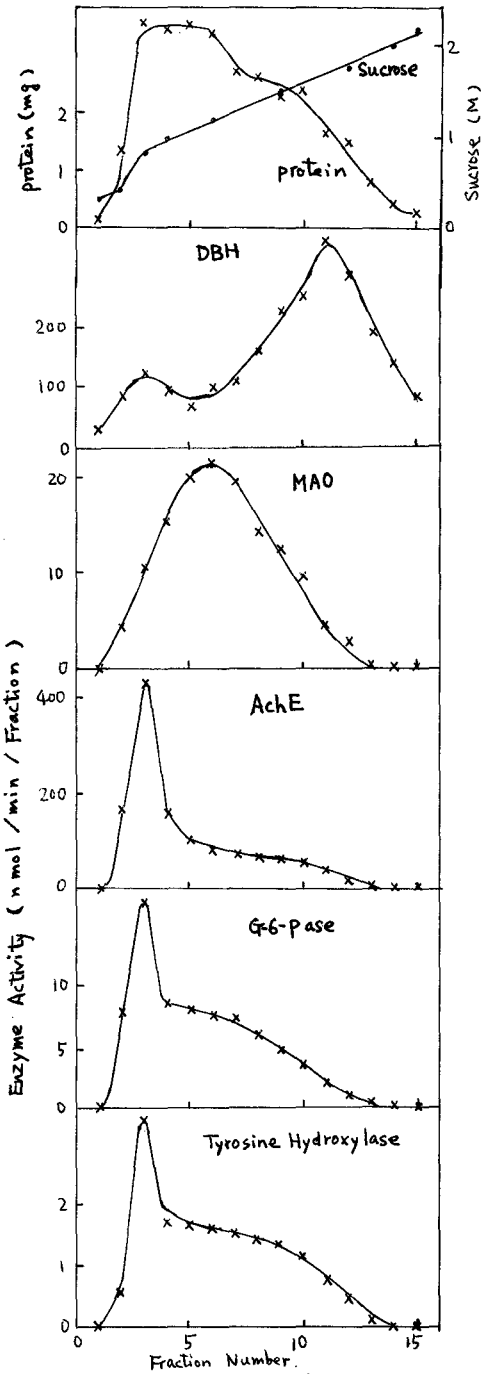


図1. 粒子画分の庶糖密度勾配遠心分画。

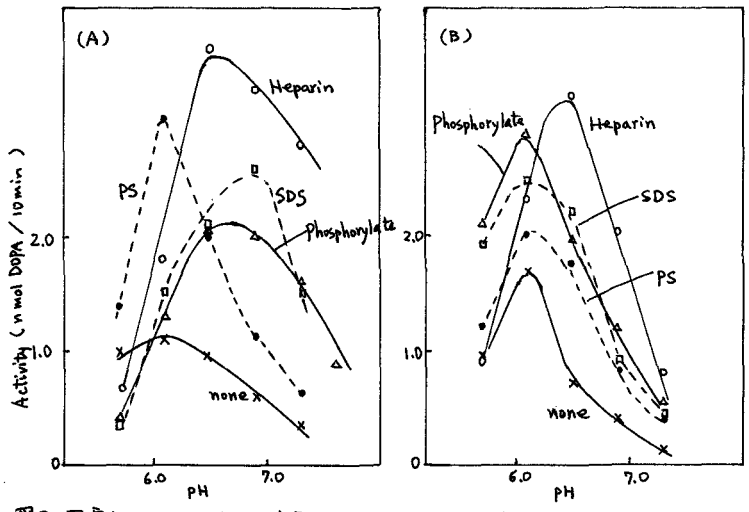


図2. 可溶性(A)および粒子結合型(B)チロシン水酸化酵素の活性化に対するpH依存性

チロシン水酸化酵素の細胞内分布は動物や組織ごとに異った結果が得られている。ウシの副腎髄質では粒子結合型酵素が報告されている(3,7)が，Wurzbergerら，なと(4,5)により酵素は可溶性であると結論され，現在ではこの考えが一般に受け入れられている。われわれの実験から，チロシン水酸化酵素は可溶性酵素の他にミクロゾーム画分の膜にも存在することが示唆された。ミクロゾーム画分での局在性については，さらに検討することが必要である。

〔文献〕

1. Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfreind, S. (1965) J. Pharmacol. Exp. Ther. 148, 1-8.
2. Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfreind, S. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2910-2917
3. Petrack, B., Sheppy, F., Fetzev, V. (1968) J. Biol. Chem. 243, 743-748
4. Laduron, P., Beipaire, F. (1968) Biochem. Pharmacol. 17, 1127-1140
5. Wurzberger, R.J., Musacchio, J.M. (1971) J. Pharmacol. Exp. Ther. 177, 155-168
6. 山内卓，中田裕康，藤沢仁 (1976) 生化学，48, 580
7. Shiman, R., Akino, M., Kaufman, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1330-1340
8. Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfreind, S. (1964) Anal. Biochem. 9, 122-126
9. Christenson, J. G., Dairman, W., Udenfreind, S. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 141, 356-367
10. Wallace, E.F., Krantz, M.J., Lovenberg, W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2253-2255
11. Axelrod, J. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1657-1660
12. McEwen JR., C.M. (1971) Method in Enzymol. 17B, 692-698
13. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Anders JR., V., Featherstone, R.M. (1961) Biochem. Phamacol. 7, 88-95
14. Swanson M.A. (1955) Method in Enzymol. 2, 541-543
15. Ames R.N. (1966) Method in Enzymol. 8, 115-118
16. Lowry, O.H., Rosebrugh, N.J., Farr, A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
17. von Euler, U.S., Floding, I. (1955) Acta Physiol. Scand. 33, Suppl. 118, 45-56
18. Hewitt, L.F. (1937) Biochem. J. 31, 360-366

30 牛松果体特異抗体の精製と抗体アフィニティークロマトグラフィーによるHIOMTの精製

桑野良三・高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

牛松果体10万×g上清蛋白を用いて家兎に免疫した所，可溶性蛋白のうちHydroxyindole O-methyltransferase（HIOMT）（EC 2.1.1.4）だけが松果体に対して特異的な抗体を産生することを観察した。牛松果体を除く大脳可溶性蛋白をCNBr活性化Sepharose 4Bに不溶化したカラムで家兎血清を吸収させると蛋白化学的免疫学的に単一な抗体が得られた。簡単にHIOMTに対する特異抗体が精製されることがわかったので抗体アフィニティークロマトグラフィーを工夫した。抗体アフィニティーでワンステップに単離されたHIOMTの比活性は2427 nmoles/hr/mg 回収率84%であった。SDS電気泳動に於て単一であり分子量38,000であった。又本酵素の蛋白化学的酵素学的免疫学的性質を調べた。

松果体の生物学的機能を研究するに特異蛋白やペプチドを検索することは一つの方法である。免疫学的，電気泳動的に松果体特異蛋白の存在が知られ又種々のペプチドが知られていた。Axelrodら[1]はN-acetylserotoninをメチル化しMelatoninを生成する反応を触媒するHydroxyindole O-methyltransferase（HIOMT）（EC 2.1.1.4）を発見し松果体に局在することを報告した。Jacksonら[2]，Karahasanoğlu[3]らによってHIOMTの精製がなされ，Jacksonらは精製牛松果体HIOMTが抗体産生すると報告した。今回我々は本酵素を精製せずに牛松果体可溶性画分そのものを家兎に注射してHIOMTに対する抗体を簡単に得ることができた。この特異抗体を用いての抗体アフィニティークロマトグラフィーで単一なHIOMTの精製に成功した。

実験方法

〔実験材料〕牛の脳，松果体及びその他の臓器は屠殺後直ちに採取し氷入ジャーに入れて研究室に持ち帰ったものを使用した。各々の臓器を4倍量の0.25 M Sucrose 0.02 Mリン酸緩衝液pH7.3でホモジェナイズし105,000×g 60分遠心後得た可溶性画分を抗原，免疫吸着体の調製，酵素精製の出発材料とする。

〔HIOMTのAssay〕HIOMT活性測定はAxelrodらの方法に従いN-acetylserotonin ^{14}C S-adenosylmethionineを基質としてリン酸緩衝液pH7.9，総量0.3 mlで37°C，30分インキュベートし生成された^{14}C melatonin量を測定した。

〔電気泳動〕Disc電気泳動はDavisらの方法，SDS電気泳動はWeberらの方法を用いた。

〔免疫学的方法〕ベロナール緩衝液pH8.6イオン強度0.05，1.2%寒天中で免疫電

気泳動．Ouchterlony 二重拡散を行なった。

〔アミノ酸分析〕 HIOMTをSephadex G25でゲル沪過を行ない 70%硫安沈殿によって濃縮したものを 5.7N HCl 110°C 20時間．48時間．水解し自動アミノ酸分析計で測定した。

〔免疫吸着体の調製〕 Sepharose 4Bは March[14]らの方法に従い CNBr-アセトニトリル溶液によって活性化する。松果体上清（30ml）を炭酸水素ナトリウム緩衝液に透析後 低温室で CNBr活性化 Sepharose4B（20ml）にカップリングさせ 0.38M Tris-glycine pH8.3で 残存活性基をブロックする。非共有結合の蛋白を除くため 充分量の炭酸水素ナトリウム緩衝液pH10，2M Urea，酢酸pH4.0で洗浄する。同様の操作2回分の可溶性松果体上清蛋白をカラム（2.0×13cm）につめる（P-Sepharose と呼ぶ）。

同様に 松果体を除く大脳（血液．クモ膜は除かない）を活性化 Sepharose4Bに不溶化する。3回分を集めてカラム（2.6×34cm）につめる（B-Sepharoseと呼ぶ）。

結果と考察

〔特異抗体の精製〕

Step 1 免疫 牛松果体上清5mg蛋白を同量の Freund's Complete Adjuvant (DifCo) で乳濁させ 家兎の皮下に2週間毎に注射する。2度目の注射後 松果体に特異的な抗体が観察されたが 3度目の注射後8日目に大量採血し血清を分離した。

Step 2 粗抗血清 血清を½硫安飽和を3回繰り返し 抗体精製の出発材料とする。

Step 3 P-Sepharose クロマトグラフィー 粗抗血清（6ml，0.4g）をP-Sepharoseカラムに吸着させ 0.15M リン酸緩衝液pH7.3 0.5M NaClで充分洗い流し 吸着した抗体を 0.2M glycine-HCl pH2.4 0.5M NaCl（図1矢印A）で溶出する。（PII画分）。溶出後直ちに リン酸緩衝液で洗えば（図1矢印B）数ヶ間使用可能である。

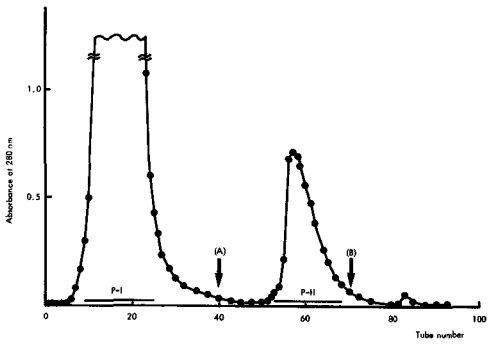


図1 P-Sepharose chromatography

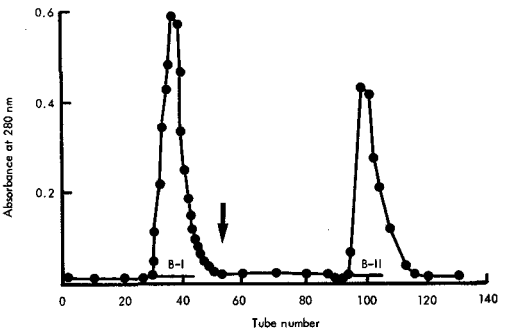


図2 B-Sepharose chromatography

Step 4 B-Sepharose クロマトグラフィー PII画分を合わせ（6回分 130mg）B-Sepharoseで吸収を行ない 吸着しない素通り画分を集める（BI画分）。非特異抗体を除くため このBI画分をB-Sepharoseで繰り返し吸収させる（図2）。

各ステップで 免疫電気泳動法 Ouchterlony法で 抗体の特異性を検討した。粗抗血清を用いて免疫電気泳動を行なうと 松果体及び大脳皮質に対して共に数多くの沈降線がある そのうちに松果体に対して特異的な沈降線が観察された（図3上）。ところが，粗抗血清をB-Sepharose で吸収させると 松果体に対する沈降線は唯一本あり

それと相対応する沈降線は大脳皮質に対しては存在しない（図3中）。松果体上清と粗抗血清との間に形成された特異的な沈降線は抗体アフィニティーで精製されたHIOMTに対しての沈降線と同じ位置にあった（図3下）。同様にOuchterlony二重拡散法に於て特異抗体は肝大脳皮質とは反応しないが松果体可溶性画分や精製HIOMTとは完全にfugeする沈降線が認められた（図4）。

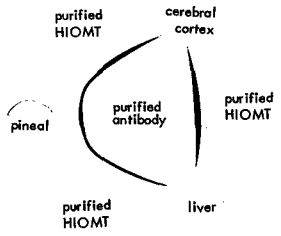


図4 Immunodouble diffusion test

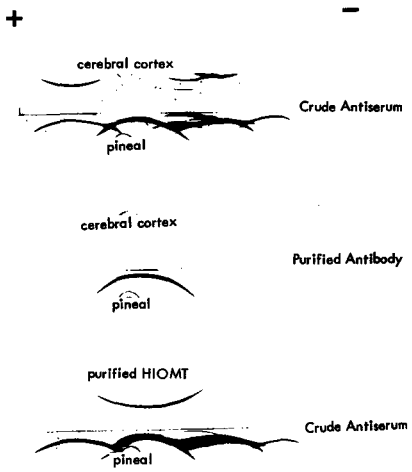


図3 Immunoelectrophoresis

〔抗体アフィニティークロマトグラフィー〕精製特異抗体（7.6mg）をCNBr活性化Sepharose4B（2ml）に結合させ抗体-Sepharoseカラム（1.0×2.5cm）を調製した（Ig-Sepharoseと呼ぶ）。牛松果体10万×g上清蛋白を63mg Ig-Sepharoseに吸着させ流出液のOD280nmがゼロになるまで充分に洗った後0.2M glycine-HCl pH2.4 0.5M NaClで（図5矢印）抗体に結合した蛋白を溶出する。第2の蛋白ピーク（6ml）を2.0mlのリン酸緩衝液（0.5M, pH7.9）含有試験管に集めpHを中性に調整する（図5）。

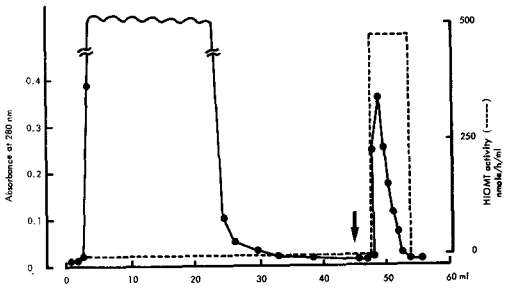


図5 Ig-Sepharose chromatography

抗体アフィニティーで得られた松果体特異抗原はSDS電気泳動上或は免疫学的に（図3,4）単一であり HIOMT活性を持っていた。HIOMTの抗体アフィニティーによる精製の要約は表1に示した。

表1 Purification of HIOMT from Crude Extract of Bovine Pineal Gland

	Total protein (mg)	Specific activity (nmoles/h/mg)	Purification	Total activity (nmoles/h)	Recovery (%)
Pineal extract	63 (100%)	54	1	3402	100
Pure HIOMT	1.18 (1.87%)	2427	44.9	2864	84.2

本酵素は酸性条件下で比較的安定である。例えば0.2M glycine-HCl pH2.4 0.5M NaCl下で 0 time（100%） 1hr（91%） 3hr（85%） 6hr（67%）活性があった。抗体アフィニティーカラムからの溶出には約20分しかかからないので酵素活性の低下は殆んどない。実際に我々の得た酵素の比活性は2427 nmoles/hr/mgでAxelrodらやJacksonらより高かった。

又酵素蛋白はSDS電気泳動で単一であり サブユニットの分子量は38000であった（図6）。松果体上清蛋白（200μg）及び精製HIOMT（90μg）をDisc電気泳動を行なった後直ちに −80°Cに凍結し 1.5mm−1.7mmにカットし 200μlのリン酸緩衝液（0.5M, pH7.9）

中 4°C で一晩溶出した。各試験管より 100μl 取り出し HIOMT活性を測定した（図7）。酵素活性ピークに一致して 非常に近接した3本のバンドが認められた。SDS電気泳動では 単一な蛋白のバンドを示すから HIOMTは均一なペプチドから構成されるオリゴマーであり分子の重合したもの 或は蛋白の荷電の異なるものなど Multiple form enzyme であると考えられる。

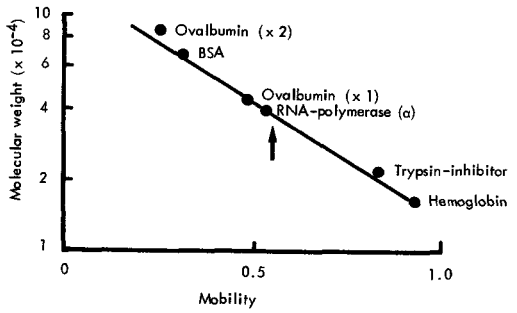


図6 SDS gel electrophoresis

表2

Amino Acid Composition of HIOMT

	Residues / mole protein	
Asp	21.5	22
Thr	13.9	14
Ser	21.8	22
Glu	37.0	37
Pro	14.3	14
Gly	32.7	33
Cys*	9.3	9
Val	23.0	23
Met	4.0	4
Ile	10.6	11
Leu	48.3	48
Try	13.8	14
Phe	14.0	14
Try	1.5	2
Lys	10.3	10
His	6.6	7
Arg	27.6	28

* cysteinic acid

本酵素は 松果体上清でも 精製酵素標品でも至適pHは 7.9～8.4 であり 二価金属イオン，EDTA，DTT等の影響は殆んどなかった。又 Km値は N-acetylserotonin に対しては 1.76×10^{-5} M で S-adenosylmethionine に対しては 5.59×10^{-6} M であった。

アミノ酸組成は 表2に示した通りであった。

上述の様に 我々は簡単な方法で HIOMT特異抗体アフィニティーにより HIOMTの精製に成功した。このような抗体の精製と酵素の精製方法は 他の場合にも応用することが出来るだろう。

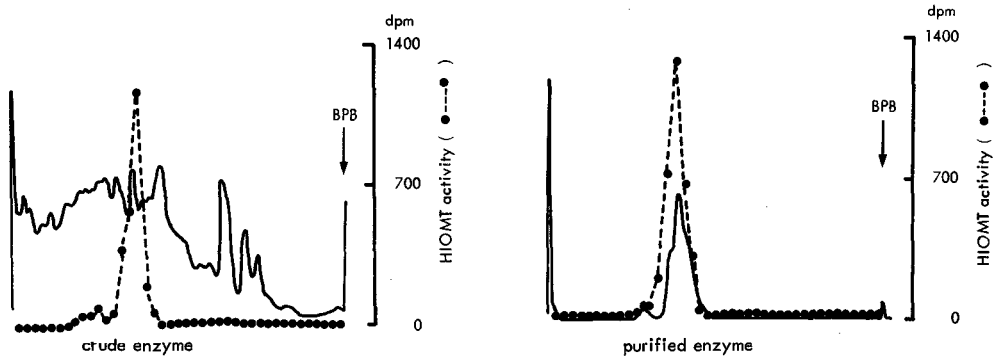


図7 Densitometric profile of Disc electrophoresis (7.5%, pH 8.9) and HIOMT activity

文献

1. Axelrod, J. and Weissbach, H. (1961) J. Biol. Chem. 236, 211-213. 2. Jackson, R.L. and Lovenberg, W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4280-4285. 3. Karahasanoğlu, A.M. and Özand, P.T. (1972) J. Neurochem. 19, 411-430. 4. March, S.C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149-152.

31 脳の酸性タンパク質 PAPI-a, PAPI-b (S-100) の化学構造

礒辺俊明・奥山典生　（都立大・理・化）

〔要　約〕

神経系に特異的な酸性タンパク質 S-100 の二成分；ＰＡＰＩ－ａ，ＰＡＰＩ－ｂのサブユニット構造およびＰＡＰＩ－ｂの全一次構造を明らかにし，
（１） S-100 は水溶液中では従来報告のあるような三量体ではなく，二量体として存在すること
（２） ＰＡＰＩ－ａ，ＰＡＰＩ－ｂは今回その一次構造が決定されたサブユニット［β］を共通に含み，模式的にＰＡＰＩ－ａ［α･β］，ＰＡＰＩ－ｂ［β･β］で示される化学構造を有すること
（３） βサブユニット中に，心筋トロポニンＣに類似で，カルシウム結合タンパク質特有の構造：Tuftyと Kretsinger のいわゆる“ＥＦ hand”モデルに適合する構造が存在することを示した。

以上の結果から，ＰＡＰＩ－ａ，ＰＡＰＩ－ｂ（S-100）がカルシウム結合タンパク質であり，カルシウムを介して制御されるような神経系内過程を調節する機能をもつ可能性を示唆した。

ウシ脳可溶性画分には主として３種の強酸性タンパク質（ＰＡＰＩ-ａ，ＰＡＰＩ-ｂ，ＰＡＰⅡ）が存在し，これらは硫安分画，DEAE-セファデックス，セファデックスG-75，およびエタノール系緩衝液を用いるDEAE-セファデックス再クロマトグラフィーにより分離・精製可能である(3,4)。精製された３種の酸性タンパク質はそれぞれ phe 残基による特異な紫外吸収スペクトルを示す他，分子量，アミノ酸組成などの点で類似の性質を示し，特にＰＡＰＩ-ａ，-ｂでは一部の一次構造が共通であることがペプチドマップから示唆された(4)。免疫化学的方法および電気泳動法(12)での検討で，PAPI-a，-ｂは神経系に特異的なS-100タンパク質(8)の二主成分であることが示された(4)。一方ＰＡＰⅡは，いわゆるCa-結合タンパク質であり，3′:5′-環状ヌクレオチド・フォスフォジエステラーゼを活性化する性質をもつことが明らかになった(7)。

本学会では主としてS-100成分ＰＡＰＩ-ａ，-ｂのＳＤＳ-尿素ゲル電気泳動の結果およびＰＡＰＩ-ｂの全一次構造決定について報告する。得られた結果から１）ＰＡＰＩ-ａ，-ｂが従来報告のある三量体(2)ではなく，それぞれ［α･β］，［β･β］で示される二量体であること　２）両タンパク質に共通のサブユニットβの構造中に，ＰＡＰⅡ，トロポニンＣ，パルブアルブミンなどのCa-結合タンパク質に特有の“Ca-結合部位”(11)が存在することが明らかになった。

実験材料と方法

ＰＡＰＩ-ａ，-ｂはウシ脳可溶性画分より既報の方法(3,4)で分離精製した。ＳＤＳ-尿素ゲル電気泳動はSwankとMunkresの方法(10)の変法で，ゲル口過による分子量決定はAndrewsの方法(1)でそれぞれ行なった。ＰＡＰＩ-ｂの一次構造は４種のCNBr

分解ペプチドと14種のトリプシン分解ペプチドを基礎に決定した。これらのペプチドは分別沈澱法，SP-セファデックス，セファデックスG-50，バイオゲルP-6などを用いるクロマトグラフィーで精製した。ペプチドの構造はエドマン分解法，カルボキシペプチダーゼ法を用い，詳細はIsobeらの記述(5,6)に従って決定した。

結果と考察

(I) PAP I-a,-bの分離

3種の強酸性タンパク質 PAP I-a,-b,-IIは脳組織の2.66M硫安-0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.1)抽出液を透析脱塩後，そのまま20%ゲルディスク電気泳動法で分析することにより分離・同定可能である。Fig. 1は本法をウシ脳について適用した例である。脳可溶性画分中の多くのタンパク質中，3種のタンパク質は最も陽極(酸性)側に移動する3本の主バンドとして検出される。

PAP I-a,-b混合物(PAP I)とPAP IIをDEAE-セファデックス上で分離し，セファデックスG-75ゲル口過で精製した後(3.4)，得られたPAP I標品(S-100)を再度DEAE-セファデックスカラム(0.95×75cm)に添加し，0.15M食塩-1mM EDTA-5%エタノールを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.1)で連続的に溶出を続けるとPAP I-a,-bが分離される(Fig. 2)。分離された両タンパク質は20%ゲルディスク電気泳動法，Uyemuraらのポリアクリルアミドゲル電気泳動法(12)などで均一であり，それぞれS-100タンパク質のFMC(PAP I-b)，SMC(PAP I-a)成分に対応した(4)。PAP I-a,-bの特異な紫外吸収スペクトル，アミノ酸組成などの類似性については既報(4)の通りである。特にトリプシン分解物のペプチドマップ上での類似性は，PAP I-a,-b分子中に共通の一次構造が存在することを強く示唆した。このことは，結果(II)と(III)で記述するようにPAP I-a,-bがβサブユニットを共有することから理解された。

(II) PAP I-a, PAP I-bのサブユニット構造

PAP I-a,-bの水溶液中での分子量はともに，超遠心分析(沈降平衡法)で16500，ゲル口過法(セファデックスG-75)で20000であり，S-100についての報告(2.9.12)と一致していた。

一方，PAP I-a,-bを各々8M尿素-1%メルカプトエタノール-2%SDS溶

Fig. 1. 20 % gel disc electrophoresis of bovine brain extract

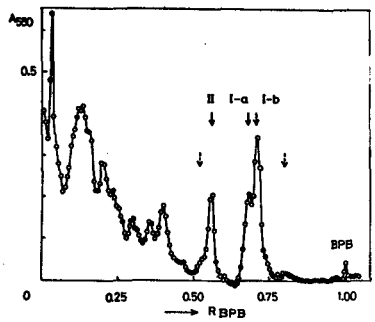
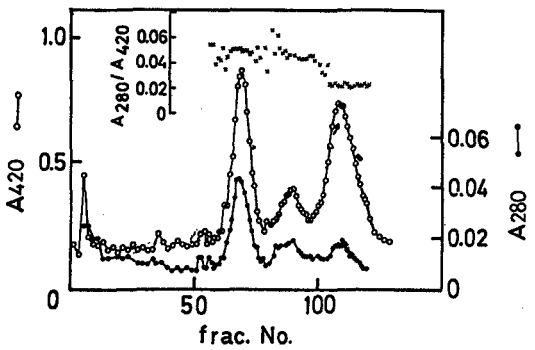


Fig. 2. Isolation of PAP I-a and PAP I-b



液中で60°，10分間処理し、6M尿素－0.1％SDSを含む12.5％ポリアクリルアミドゲル（1.25％ビス-）中で電気泳動を行なった（Fig.3）。PAPI-aは等量比の2本のポリペプチドバンド（α鎖，β鎖）を与えた。PAPI-bは移動度がβ鎖に一致する単一バンドを与え、α鎖に対応するバンドは検出されなかった。この結果は，PAPI-aが2種の異なるサブユニットα鎖，β鎖から構成され，PAPI-bがβ鎖のみから構成されるタンパク質であることを示唆している。

チトクロームcのCNBrペプチドの電気泳動移動度からα鎖．β鎖の分子量はそれぞれ6500．4800と計算された。これらのサブユニット分子量は、S-100（PAPI-a+b）についてのStewartの値（9；5300、4100）あるいはDanniesとLevine（2）が三量体モデルの基礎とした値（7000）に類似していたが．アミノ酸分析からの最低分子量（PAPI-b；10431）およびPAPI-bの一次構造から計算された分子量（10507）に比べると著しく低い値であった。この矛盾はSDSゲル電気泳動の際のα鎖・β鎖の異常な高移動度に帰因するものと考えられる。

(Ⅲ) PAPI-b（β鎖）の全一次構造

SDS－尿素ゲル電気泳動の結果から，PAPI-bはβ鎖のみから構成されていると考えられたので その一次構造解析を行なった。決定されたPAPI-b（β鎖）の全アミノ酸配列をFig.4に示す。 β鎖はブロックされたN末端Glp（3）からC末端Gluまで91残基を含む分子量10507のポリペプチド鎖であった。従って，水溶液中での分子量（20000）を考慮すると，PAPI-bは2本のβ鎖から成る二量体であると考えるのが妥当である。一方PAPI-aは1本のβ鎖と1本のα鎖から成る二量体と考えられる。α鎖の構造は未知であるが，PAPI-aのアミノ酸組成（4）から一残基のTrp残基を特徴的に含みβ鎖とは異なったアミノ酸配列をもつ分子量約1万のポリペプチドであろうと推定される。

β鎖はPAPI-a,-bの酸性タンパク質としての特徴を反映して14の過剰なカルボキシル基を含んでいるが、その配列は分子中央で性質が異なる、特徴ある2つの部分から成っている。すなわちN末端側部分（$^{1}Glp \rightarrow {}^{48}Lys$）は弱酸性で，$^{20}Arg \rightarrow {}^{33}Lys$ に塩基性アミノ酸、$^{4}Leu \rightarrow {}^{17}Tyr$ に疎水性アミノ酸のclusterが存在する。C末端側部分（$^{49}Glu \rightarrow {}^{91}Glu$）は多くの酸性アミノ酸を含むのに対して塩基性アミノ酸は1残基のみ（^{55}Lys）で強酸性である。$^{58}Glu \rightarrow {}^{72}Glu$ の酸性アミノ酸、$^{73}Phe \rightarrow {}^{80}Ile$ の疎水性アミノ酸の

Fig. 3.



1. PAP I-a
2. PAP I-b
3. PAP I-a&b

Fig. 4. The Complete Amino Acid Sequence of PAP I-b

```
1                   5                  10                  15
Glp-Ser-Glu-Leu-Lys-Ala-Val-Val-Ala-Leu-Ile-Asp-Val-Phe-His-
                   20                  25                  30
-Gln-Tyr-Ser-Gly-Arg-Glu-Gly-Asp-Lys-His-Lys-Leu-Lys-Lys-Ser-
                   35                  40                  45
-Glu-Leu-Lys-Glu-Leu-Ile-Asn-Asn-Glu-Leu-Ser-His-Phe-Leu-Glu-
                   50                  55                  60
-Glu-Ile-Lys-Glu-Gln-Glu-Val-Val-Asp-Lys-Val-Met-Glu-Thr-Leu-
                   65                  70                  75
-Asp-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Glu-Cys-Asp-Phe-Gln-Glu-Phe-Met-Ala-
                   80                  85                  90
-Phe-Val-Ala-Met-Ile-Thr-Thr-Ala-Cys-His-Glu-Phe-Phe-Glu-His-

-Glu-OH
```

Fig.5. Structural Homology between PAP I-b and Bovine Cardiac Muscle Troponin C (TN-C)

```
        61                                                  73
PAP I-b; Asp-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Glu-Cys-Asp-Phe-Gln-Glu-Phe-
        65                                                  77
TN-C   ; Asp-Glu-Asp-Gly-Ser-Gly-Thr-Val-Asp-Phe-Asp-Glu-Phe-
```

Table 1.The calcium-binding finger in the PAP I-b sequence (11)

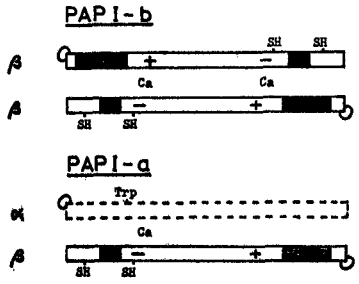
	E	L'		L'	L'		L'	D		D'		D'G		I	D'		E	L'		L'	L'		L'
PAP I-b;	K	E	Q	E	V	V	D	K	V	M	E	T	L	D	S	D	G	D	G	E	C	D	F	Q	E	F	M	A	F	V	A	M	I	T
TN-C 1 ;	E	M	I	A	E	F	K	A	A	F	D	M	F	D	A	D	G	G	G	D	I	S	V	K	E	L	G	T	V	M	R	M	L	G
TN-C 2 ;	P	T	K	E	E	L	D	A	I	I	E	E	V	D	E	D	G	S	G	T	I	D	F	D	E	F	L	V	M	V	R	Q	M	K
TN-C 3 ;	K	S	E	E	E	L	A	E	C	F	R	I	F	D	R	N	A	D	G	Y	I	D	A	E	E	L	A	E	I	F	R	A	S	G
TN-C 4 ;	V	T	D	E	E	I	E	S	L	M	K	D	G	D	K	D	N	D	G	R	I	D	F	D	E	F	L	K	M	M	E	G	V	Q
Parv 1 ;	K	S	A	D	D	V	K	K	A	F	A	I	I	D	Q	D	K	S	G	F	I	E	E	D	E	L	K	L	F	L	Q	N	F	K
Parv 2 ;	L	T	D	G	E	T	K	T	F	L	K	A	G	D	S	D	G	D	G	K	I	G	V	D	E	F	T	A	L	V	K	A		
														X		Y		Z		-Y		-X			-Z										

cluster が特徴である。こうした分子の"分極"は二分子が"逆向き"に配向するような二量体形成に有利なように思われる(Fig.6 参照)。

(IV) カルシウム結合タンパク質との類似性

PAPI-b の一次構造は構造既知の他のいずれのタンパク質の構造とも異なっている。しかしその一部がウシ心筋のトロポニン C (TN-C) の1つの Ca-結合部位の構造(13)に類似していることが見出された。事実 Fig.5 に示した 13 残基の配列のうち 8 残基は両タンパク質に共通である。残りの5残基中4残基(Ser↔Glu. Asp↔Ser. Glu↔Thr. Gln↔Asp) は類似の性質のアミノ酸への変化とみなすことができる。更に、Fig.5 の構造部分を含む周辺の配列は Ca-結合タンパク質に特有の立体構造;"EF hand"(11)を形成するための配列にほぼ完全に合致している(Table1)。即ち EF hand 形成のための 16 残基の配列のうち、6つの Ca配位酸性残基を含む 14 残基を満足している。このことは、β鎖を含む PAPI-a,-b がともに TN-C, parvalubumin, PAPII など一群の Ca結合タンパク質に類縁のタンパク質であり、例えばTN-C が Caとの結合を介して筋収縮を調節するように、PAPI-a,-b が Caを介して制御されるような神経系内過程を調節する機能をもつ可能性を示唆しているように思われる。以上のまとめとして Fig.6 に PAPI-a,-b の化学構造を模式的に示した。

Fig. 6. Structure of PAP I-a,b



refs: 1) Andrews,P.(1964) Biochem.J. 91,222. 2) Dannies,P.S.& Levine,L.(1971) J.Biol.Chem. 246,6276. 3)藏迫・興山(1971)神経化学10,39. 4) Isobe,T.,Nakajima,T. & Okuyama,T.(1977) Biochim.Biophys.Acta, in press 5) Isobe,T.,Black,L.W.& Tsugita,A.(1976) J.Mol.Biol. 102,349. 6) Isobe,T.,Black,L.W.& Tsugita,A.(1977) J.Mol.Biol. 110,168. 7)筐井山縣・興山・手島・恒内 (1976)神経化学 15,28. 8) Moore,B.W.(1965) Biophys.Biochem.Res. Commun. 19,739. 9) Stewart,J.A.(1972) Biophys. Biochem.Res.Commun. 46,1405. 10) Swank,R.T.&Munkres, R.H.(1971) Anal.Biochem. 39,462. 11) Tufty,R.M.& Kretsinger,R.H.(1975) Science 187,167. 12) Uyemura, K.,Vincendon,G.,Gombos,G.& Mandel,P.(1971) J.Neurochem. 18,429. 13) van Eerd,J-P.& Takahashi,K.(1976) Biochemistry 15,1171.

32 ラット小脳チミジンキナーゼの分子種について

沢崎嘉男・山田則子・中島　熙
（東医歯大・難研・遺伝生化）

〔要　約〕

ラット小脳チミジンキナーゼの細胞内分布は，発育に伴って著明に変化し，神経細胞の増殖の盛んな生後6日ではその55%が上清分画に回収されるが，増殖の殆ど終了したadult小脳，および生後6日またはadultの大脳皮質では，酵素活性の60～80%がミトコンドリア分画に分布した．また，小脳および皮質の上清分画の本酵素活性は，その発育段階によってdCTPによる影響を異にし，生後6日の小脳上清ではdCTPによる抑制をうけないが，adult小脳，6日およびadult大脳皮質の各上清では著明な抑制が認められた．dTTPは，これらのいづれもの活性を抑制した．

小脳上清のチミジンキナーゼ活性は，硫安塩析後のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにより，生後6日では溶出順にA,B,C,Dの4分画，adultではC,Dにほぼ一致した2分画に分離された．これら4分画はdTTPによって活性が抑制されたがA,Bはd CTPによっては抑制されず，Aでは逆に30%の活性上昇が認められた．C,DはdCTPにより抑制をうけた．また，Triton X-100により溶出されたadult小脳ミトコンドリア分画の本酵素は，同様な処理によりC,Dに類似する位置に活性ピークを示した．以上から，ラット小脳のDNA合成に関与するチミジンキナーゼは，その上清分画の酵素であり，さらに，DEAEセルロースカラムで溶出された分画AないしBの分子種がそれに相当することが示唆された．

チミジンキナーゼには，いくつかの分子種が存在することが再生肝や肝癌などで報告されているが[3,4,7]，それらの意義については明らかではない．また，細胞内では上清分画に存在するとされているが，少なからぬ活性がミトコンドリア分画でも認められている．これまで，脳チミジンキナーゼは脳DNA合成の調節および障害を知る指標として調べられてきたが[8-10]，細胞増殖の停止後もかなりの活性を認めることから，特定の分子種が細胞増殖に関与し，他が残存活性を示すと推定されている．そこで，生後に神経細胞増殖をおこなうラット小脳について，発育に伴うチミジンキナーゼの細胞内分布の変化を検討した．また，本酵素の分子種をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにより分離し，それらの性質について比較検討した．

（実験方法）

1）動物は生後6日およびadult（300～400 g）の雄Wistarラットを用いた．

2）細胞分画：　断頭後，分離した小脳および大脳皮質を10 volのA buffer（0.25 M Sucrose, 2.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1mM mercaptoethanol）でTeflon homogenizerによりhomogenizeし，4重のガーゼで沪過した後，600 g, 10分間遠心して沈渣と上清に分け，沈渣を粗核分画とした．この沈渣に12 volの2.4 M Sucrose, 3mM $MgCl_2$, 1mM mercaptoethanolを加え，homogenize後，40,000 g, 60分遠心し，沈渣を精製核分画とした．600 g上清は10,000 g, 10分遠心，沈渣をミトコンドリア分画とし，上清はさらに105,000 g, 60分遠心して沈渣（microsome分画）と上清とに分けた．各々の沈渣はA bufferに懸濁させ，諸酵素活性の測定に用いた．

チミジンキナーゼはTaylorらの方法[7], monoamine oxidaseは^{14}C-tryptamineを用いて測定した．タンパク量の測定はbiuret反応で行った．

3) 小脳チミジンキナーゼ分子種のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによる分離：生後6日およびadultラット小脳は，10 vol.の50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanolでhomogenizeし，105,000 g, 60分遠心後，上清を分離する．この上清に50%飽和になるように飽和硫安溶液を加え，撹拌後，6,500 g, 20分遠心，沈渣に少量のbufferを加えて溶解し，Sephadex G-25カラムを通して脱塩後，5 mM Tris-HCl pH 7.5, 20% glycerin, 1 mM $MgCl_2$で平衡したDEAEセルロースカラムに吸着させた．溶出は，まず0 M NaCl，次いで0から0.25 M NaClのlinear gradientで行ない，その後，0.25 M NaClおよび0.4 M NaClでstepwiseに行なった．チミジンキナーゼ活性の測定は各分画の一部を用い，タンパク量は280 nmの吸光度から測定した．ミトコンドリアのチミジンキナーゼは，adult小脳のミトコンドリアからTriton X-100 (0.9%)で可溶化後，上記と同様な方法で溶出した．

(実験結果および考察)

1) 小脳チミジンキナーゼの細胞内分布の発育に伴う変化：生後6日の小脳チミジンキナーゼ活性は，その55%が上清分画に回収されたが(Tab. 1)，同時期の大脳皮質では65%の活性がミトコンドリア分画に分布し，比活性も同分画で最高値を示した．また，adultでは，小脳，大脳皮質ともに本酵素活性の60~80%はミトコンドリア分画に分布し，上清分画には活性が殆ど認められなかった．以上のミトコンドリア分画のチミジンキナーゼ活性は，Triton X-100 (0.9%)処理によって200~300%に上昇した．

生後6日目のラット小脳では，活発な神経細胞増殖がみられ，チミジンキナーゼ活性も最高値を示す[8,9]のに対して，大脳皮質では神経細胞の増殖は殆ど終了している[1]．また，adultでは，小脳，皮質ともに増殖は完了している．これらの事実から，

Table I Subcellular distribution of thymidine kinase in developing rat brain

	6 days			adult		
	(%)	specific activity*	MAO (%)	(%)	specific activity*	MAO (%)
cerebellum						
homogenate	100	38.8	100	100	2.5	100
nuclei (crude)	(11.7)		(8.5)	(24.4)		(15.1)
(purified)	8.9	35.7	1.1	0.8	1.4	0.1
mitochondria	8.8	17.0	64.7	66.2	6.2	69.8
microsome	8.2	20.0	10.5	1.6	0.4	11.0
supernatant	55.8	105.1	14.9	4.4	0.7	0
recovery	84.5		97.8	96.6		96.5
cerebral cortex						
homogenate	100	4.5	100	100	2.8	100
nuclei (crude)	(8.5)		(22.6)	(13.6)		(17.4)
(purified)	1.1	1.8	1.3	0	0	0.4
mitochondria	64.7	11.2	45.2	82.9	5.3	69.0
microsome	10.5	2.0	15.4	3.1	0.6	10.6
supernatant	14.9	2.7	1.0	1.6	0.3	0
recovery	97.8		83.7	101.2		97.0

*pmole/mg protein/min

神経細胞におけるDNA合成と上清分画のチミジンキナーゼ活性との間の密接な相関が示された．この結果は，再生肝におけるこれまでの報告とよく一致する[2]．

Table 2 は，ラット小脳および肝の上清分画におけるチミジンキナーゼ活性へ及ぼすdTTPおよびdCTPの効果を示す．肝では，これまでの報告のように[7]，胎児肝（妊娠18~20日）の本酵素活性はdCTPによる抑制を受けない．同様に，6日目の小脳での活性は，dCTPによって全く阻害されないが，adultでは著明な阻害が認められた．以上から，小脳上清分画のチミジンキナーゼにはその性質を異にするいくつかの分子種が存在し，dCTPによる阻害を受けないタイプが，DNA合成に関与していると推定される．

Table 2 Inhibition of thymidine kinase activity in cytosol by nucleotides

	nucleotide	% inhibition of original activity 0.01	0.1	1.0 mM
cerebellum				
6 days	dTTP	8	96	100
	dCTP	0	0	0
adult	dTTP	47	84	97
	dCTP	19	47	91
liver				
fetal	dTTP			100
	dCTP			0
adult	dTTP			100
	dCTP			75

2) DEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによる上清分画のチミジンキナーゼ分子種の分離： 生後6日のラット小脳上清のチミジンキナーゼ活性は，DEAEセルロースカラムによって，4ないし3活性分画が得られた．溶出順に各ピー

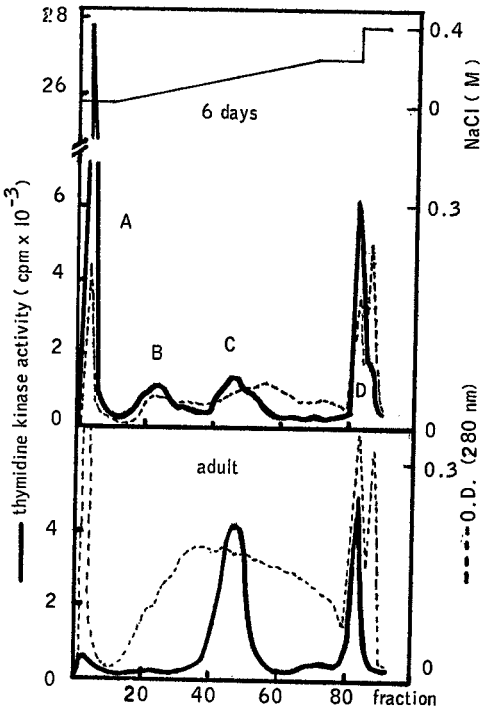


Table 3 Inhibition of thymidine kinase activity by nucleotides in DEAE eluate

Peak No.		% inhibition 1 mM dTTP	1 mM dCTP
6 days	A	98.9	0 (+31.0)
	B	100	0 (+ 2.3)
	C	96.4	54.1
	D	98.1	31.1
adult	C	92.4	71.0
	D	90.7	69.5

Fig. 1 Chromatography of cerebellar thymidine kinase on DEAE-cellulose. The enzyme preparation obtained by ammonium sulfate fractionation was applied to a column (1 x 10 cm) of DEAE-cellulose. Enzyme was eluted by gradient of NaCl (0-0.4 M) in 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20% glycerin, 1mM $MgCl_2$.

クをA,B,C,Dとすると(Fig.1)，大部分の活性はAに分布し，次いでDに比較的高い活性を認めた．これに対し，adultではAに相当する活性は非常に低く，またBは認められず，殆んどの活性はC,Dの2分画に回収された．

以上のA,B,C,D各活性分画に対するdCTP, dTTPの効果をしらべると(Table 3) dCTPによる抑制の有無によって，A,BおよびC,Dの2群に大別される．すなわち，A,Bは1mM dCTPによって全く抑制されず，特にAでは逆にその活性が約30%上昇した．他方，C,D分画は，6日目およびadultともにdCTPによって抑制された．再生肝の上清のチミジンキナーゼも，DEAEセルロースカラムにより2分画に分けられ，低イオン強度で溶出される分画が，同様にdCTPによる抑制を受けず，細胞増殖の経過と一致した挙動を示すと報告されている[4]．しかし，dCTPによる本酵素活性の上昇は，再生肝を含めて動物細胞では報告がなく，E. coliで著明な活性化が知られている[5]．この意味で，分画Aでの所見は興味深い．

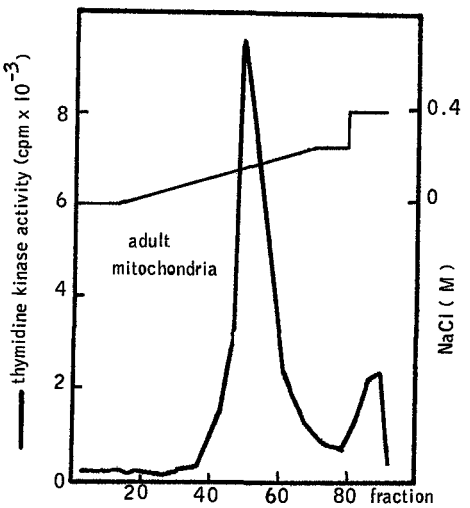


Fig. 2 Chromatography of mitochondrial thymidine kinase in adult rat cerebellum on DEAE-cellulose. Triton X-100 extract of cerebellar mitochondrial fraction was applied to a DEAE-cellulose column and enzyme was eluted as in Fig. 1.

Fig.2は，adult小脳のミトコンドリア分画から，Triton X-100によりチミジンキナーゼを可溶化し，DEAEセルロースカラムによって分画した結果を示す．Fig.1におけるC,Dに類似した活性ピークが認められた．また，高ビリルビン血症による小脳DNA合成障害を示すGunn rat[6]では，小脳チミジンキナーゼ活性が発育の早期から低下するが[8]，その活性低下は分画Aに著明であった．

以上から，ラット小脳のDNA合成に関与するチミジンキナーゼは，その上清分画の酵素であり，さらに，Fig.1で示される分画AないしBの分子種がそれに相当することが示唆された．これらの結果をもとにすれば，salvage酵素ではあっても，チミジンキナーゼを指標として脳のDNA合成とその調節について検討できると考えられる．

[文　献]

1) Altman, J. (1969) J. Comp. Neurol. 136, 269
2) Baugnet-Mahieu, L., Goutier, R., and Semal, M., (1968) European J. Biochem. 4,323
3) Lee, L.S.,and Cheng, Y.C. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2600
4) Nawata, H., and Kamiya, T.(1975) J. Biochem. 78, 1215
5) Okazaki, R., and Kornberg, A. (1964) J. Biol. Chem. 239, 275
6) Sawasaki, Y., Yamada, N., and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. 27, 577
7) Taylor, A.T., Stafford, M.A., and Jones, O.W. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1390
8) Yamada, N., Sawasaki, Y., and Nakajima, H. (1977) Brain Res. 126, 295
9) Yamagami, S., Mori, K., and Kawakita, Y. (1972) J. Neurochem. 19, 369
10) Weichsel, M.E., and Dawson, L. (1976) J. Neurochem. 26, 675

33 ヒト末梢神経ミエリン蛋白の精製

鈴木　勝・北村邦男・植村慶一
（埼玉医大・1生理）

〔要　約〕
1）ヒト馬尾神経よりショ糖密度勾配遠心法によってミエリン画分を得た。ミエリン画分の酸処理上清より2種の塩基性蛋白画分（BF-P2蛋白およびPB画分）を，酸処理沈渣より3種の糖蛋白画分（BR-PO，Yおよびpas-II蛋白）を得た。
2）BF-P2蛋白（分子量1.3万）は，ウシBF-P2蛋白ときわめて類似していたが，アミノ酸組成および塩基性度に若干の相異がみられた。PB画分には中枢神経系に対して脱髄活性をもつCNS-BP（1.8万）と共に，ほぼ同じ分子量をもつ未知の蛋白が含まれていることが示唆された。
3）BR-PO蛋白（2.8万），Y蛋白（2.2万），PAS-II蛋白（1.3万）は2%SDSを含む緩衝液を用いたSephadex G-200カラムによるゲル口過によって精製された。BR-POおよびPAS-II蛋白はウシをはじめ，ブタ，ウサギ，モルモット，ニワトリ等の末梢神経ミエリンに広く存在する糖蛋白であるが，ヒトにおいても同様に存在し，ウシとの比較においてアミノ酸組成もほぼ一致することが確かめられた。Y蛋白はヒト末梢神経に著明に見られる糖蛋白で，BR蛋白とのアミノ酸組成の類似から，由来の密接な関係が示唆された。

ミエリンの膜蛋白は生体膜の構成蛋白として興味ある研究対象である。また脱髄疾患の起炎性物質として中枢神経系の塩基性蛋白（CNS－BP）が注目され研究が進展したが，末梢神経ミエリン蛋白についてはようやく基礎的な成績が蓄積されつつある段階である。最近の研究結果によれば，末梢および中枢神経ミエリンは形態的な類似性にかかわらず，それらの構成蛋白にはかなり大きな差異のあることが明らかになって来た[2)3)6)7)8)13)]。

末梢神経系の神経疾患，即ちギランバレー症候群などの脱髄疾患や各種Neuropathyなどとの関連において，ヒトの末梢神経ミエリンの構成蛋白の種類を知り，それらを精製して分析を行うことは興味深くまた重要な問題であり，将来の臨床の種々の研究に寄与できると考えられる。しかし現在までヒト末梢神経ミエリン蛋白の業績は非常に少ない[1)9)11)]。そこで今回は，従来我々の研究室で行って来た主にウシ末梢神経ミエリンの塩基性蛋白および糖蛋白分析技術[6)7)13)]を応用して，正常ヒト末梢神経ミエリンの構成蛋白の精製，分析を行ったので報告する。

［実験方法］

1）ヒト末梢神経ミエリン蛋白の分画：ヒト馬尾神経および腓骨は，神経疾患のない患者の死後数時間以内の剖検例より得た。神経組織は使用時まで－80℃で保存した。ミエリン画分は，神経組織を0.85Mショ糖溶液中でホモゲナイズしたのちUyemuraらの方法[13)]に従ってショ糖密度勾配遠心法で調製した。得られたミエリン画分は，Kitamuraらの方法[7)]によりpH 2で希酸抽出し，酸可溶性画分と酸不溶性画分を得た。
2）酸可溶性蛋白の精製：ミエリンの希酸抽出液は蒸留水に対して4℃，24時間透析

し凍結乾燥ののち，Sephadex G-75カラム（2.64×90cm）で分画した。蛋白量80mgの試料は，0.15M食塩を含む0.03N塩酸3mlに溶解した。カラムの平衡化および溶出には上記の溶液を用い，流速30ml/hで溶出した。

3)酸不溶性蛋白の精製：ミエリンの酸抽出残渣はKitamuraらの方法[6]に従い，クロロホルム-メタノール(2:1,v/v)で中性で脱脂後風乾した。脱脂残渣70mgは，10%SDS，1%2-メルカプトエタノールを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)2mlを加え，45℃60分の可溶化処理後，Sephadex G200カラム（2.64×90cm）で分画した。カラムの平衡化および溶出には2%SDSを含む0.1Mリン酸緩衝液pH 7.2を用い，流速10ml/hで溶出を行った。

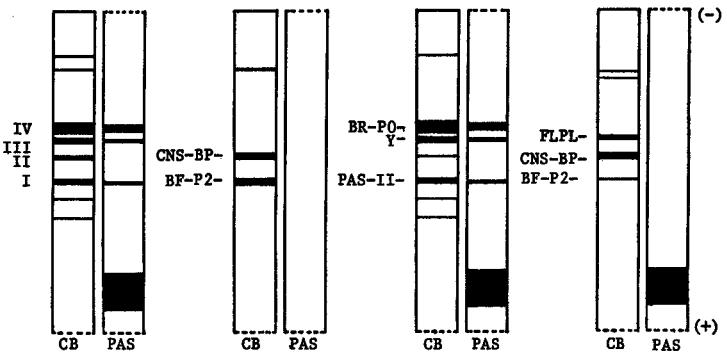
4)ポリアクリルアミドゲル電気泳動：a)15%ポリアクリルアミドゲル，pH 4.5電気泳動はReisfeldらの方法[10]に従った。b)10%ポリアクリルアミドゲル-1%SDS pH 7.2電気泳動はKitamuraらの方法[7]に従った。Coomassie Blue（CB）染色ならびに過ヨウ素酸-シッフ試薬（PAS）による糖染色はFairbanksらの方法[4]を用いた。

5)アミノ酸分析：蛋白約0.5mgを定沸点塩酸1mlに溶解し，110℃，22時間減圧下で水解後，JLC-6AH（日本電子）による1カラム法で分析した。

[結果及び考察]

1)ミエリンの蛋白構成：ヒト末梢神経ミエリンをSDSで可溶化し，SDS電気泳動を行った結果，4本の蛋白バンドI（分子量1.3万）II（1.8万）III（2.2万）IV（2.8万）が観察され，PAS染色ではI，III，IVの3本が染色された(図1-A)。これらの蛋白バンドは，ミエリンを酸処理して酸可溶性画分と酸不溶性画分に分けると，酸可溶性画分には蛋白バンドI，IIが見出されたが，これらは共にPASでは染色されなかった(図1-B)。酸不溶性画分には蛋白バンドI，III，IVが見出され，いずれもPASで染色された(図1-C)。既報のウシ末梢神経ミエリン蛋白の分類[5,6]に従うと，酸可溶性バンドIおよびIIは，塩基性蛋白BF-P2蛋白およびCNS-BP[3]に対応し，酸不溶性の蛋白バンドI，IVは糖蛋白であるPAS-II，BR-PO蛋白にそれぞれ対応すると考えられた。バンドIIIに対応する糖蛋白はウシに比べ，ヒトに多量に存在することが認められたが，Greenfieldらの Protein(Y)[5]に相当することからY蛋白とした。中枢神経ミエリンには，Folch-Lees タイプのプロテオリピド[14]とCNS-BPが主なバンドとして観察され，さらにBF-P2蛋白もわずかに認められた(図1-D)。そこで，末梢神経ミエリン酸可溶性画分から塩基性蛋白を，酸不溶性画分から糖蛋白を精製することを試みた。

Fig.1. Comparison of myelin proteins on SDS-gel electrophoresis.



A: Whole PNS myelin proteins
B: Acid-soluble proteins in PNS myelin
C: Acid-insoluble proteins in PNS myelin
D: Whole CNS myelin proteins

2) ミエリン塩基性蛋白の精製：末梢神経ミエリン酸可溶性画分より，Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーによってPA，PB，PC画分が得られた(図-2)。i) PC画分はSDSおよびpH 4.5電気泳動のいずれでも均一であった。アミノ酸組成は，親水性アミノ酸特にGlu，Lysを多く含む親水性の高い蛋白で，ウシBF-P2蛋白にきわめて類似していた(表-1)。この画分は抗ウシBF-P2蛋白抗体と反応し，ウシBF-P2蛋白と共通の沈降線を形成した。SDS電気泳動においてもウシBF-P2蛋白と等しい移動度を示したが，pH 4.5電気泳動ではわずかに大きい移動度をもつことが観察された。これらのことから，PC画分はBF-P2蛋白をpureに含むことが確かめられた。pH 4.5電気泳動におけるウシとヒトの移動度の差は，SDS電気泳動で両者のバンドが一致することから，両者の塩基性度の差に由来するものと考えられた。一方，アミノ酸組成に着目すると，酸性アミノ酸の占める割合はほぼ等しく，塩基性アミノ酸(His, Lys, Arg表-1)では逆に移動度の小さいウシBF-P2蛋白の方が大きな割合を占めていることから，両者はアミド含量に差があることが予想された。

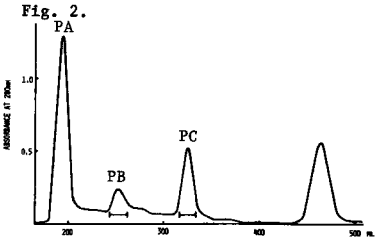
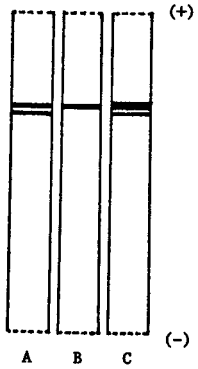


Fig. 2.

Fig. 3. Comparison of PB fraction and CNS-BP on pH 4.3 gel electrophoresis.



A: PB fraction B: CNS-BP
C: PB fraction + CNS-BP

ii) PB画分はSDS電気泳動ではCNS-BPと等しい移動度をもつ単一バンドを示したが，pH 4.5電気泳動ではほぼ等量の2本のバンドに分離した。CNS-BPと同時に泳動を行うと，PB画分の2バンドのうち移動度の小さい方がCNS-BPと一致し，他方はそれらとは異る移動度を示した(図-3)。PB画分は，CNS-BPに比較的類似したアミノ酸組成を示したが，Ser, Glu, Gly, Cysの含量について有意の差が認められた(表-1)。このことは，PB画分には2つの蛋白が存在し，一方はCNS-BPと同一で，他方はそれとは別の未知の蛋白である可能性を示唆する。PB画分の新しいバンドがCNS-BPに由来する可能

Table 1. Amino acid composition of myelin basic proteins

Amino acid*	Human PB fraction (3)	Human BF-P2 protein (5)	CNS-BP**	Bovine BF-P2 protein*** (6)
	Amino acid composition [moles/100 moles]			
Asp.	7.9 ± 0.3	9.4 ± 0.2	6.4	9.8 ± 0.2
Thr.	5.3 ± 0.1	9.7 ± 0.3	4.7	9.7 ± 0.4
Ser.	9.2 ± 0.6	7.2 ± 0.3	11.1	6.1 ± 0.2
Glu.	7.5 ± 0.6	11.0 ± 0.6	5.2	10.3 ± 0.1
Pro.	6.6 ± 0.2	2.4 ± 0.4	7.0	2.0 ± 0.1
Gly.	12.8 ± 1.1	9.5 ± 0.2	15.2	7.5 ± 0.1
Ala.	8.6 ± 0.3	5.0 ± 0.2	7.0	4.2 ± 0.1
Cys.	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.3****	0	0.3 ± 0.4****
Val.	4.4 ± 1.2	6.3 ± 0.6	2.3	7.9 ± 0.2
Met.	1.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1	1.1	2.4 ± 0.1
Ile.	2.0 ± 0.1	4.4 ± 0.4	2.3	5.2 ± 0.1
Leu.	6.3 ± 0.2	7.2 ± 0.4	4.7	8.0 ± 0.2
Tyr.	2.7 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.3	1.5 ± 0.1
Phe.	4.6 ± 0.3	4.3 ± 0.4	5.2	4.0 ± 0.1
His.	5.9 ± 0.1	1.5 ± 0.2	5.8	0
Lys.	7.6 ± 0.5	11.7 ± 0.6	7.0	14.7 ± 0.6
Arg.	6.9 ± 1.0	5.5 ± 0.2	11.1	5.6 ± 0.2

Values are given as mean ± S.D. for several determinations. The numbers of determinations are shown in parentheses. * Tryptophan was not determined. **Data of Carnegie[1] (1971) *** Data of Kitamura et al.[2] (1975) **** About two moles/mole protein of cysteine was detected after performic acid oxidation.

性が考えられるが，ヒトの脳髄よりCNS-BPを同様の操作によって精製した場合にはこのバンドは見出されないことから，その可能性は少いと考えられる。現在，これらバンドの単離法を検討中である。

3)ミエリン糖蛋白の精製：脱脂した末梢神経ミエリン酸不溶性画分から，2%SDSを含む緩衝液を用いたSephadex G-200カラムクロマトグラフィー[6]により，図4の溶出パターンが得られた。F-aからBR-PO蛋白，F-dからPAS-II蛋白が得られ，F-bおよびF-Cの再クロマトグラフィーによってBR-PO蛋白，およびY蛋白が得られた。BR-PO，PAS-II両糖蛋白は，末梢神経ミエリンに特異的で，かつウシ，ブタ，ウサギ，モルモット，ニワトリ等[6)12)]に広く存在すること，またニワトリに関してはさらに，両糖蛋白が，発生段階で坐骨神経のミエリン形成と並行して増加する[12)]ことを我々は確かめたが，これら2種の糖蛋白がヒト末梢神経ミエリンにも存在し，すでに報告したウシBR-PO，PAS-II蛋白とアミノ酸組成の点でも一致していることが明らかとなった(表-2)。Y蛋白は，ヒトに特徴的に多くみられる糖蛋白で，アミノ酸組成はBR-PO蛋白にきわめて類似しており，N末端アミノ酸は共にIleであった(表-2)。このことは，Y蛋白がBR-PO蛋白と密接な関係をもち，BR-PO蛋白に由来することも考えられる。一方，PAS-II蛋白はBR-PO蛋白とかなり異なるアミノ酸組成をもち，糖組成も異る[6)]ことからも，BR-PO蛋白の分解物ではなく，BF-P2蛋白とは分子量は同じだがアミノ酸組成が異るので，そのglycosylated-derivertiveではないと考えられる。

Fig. 4.

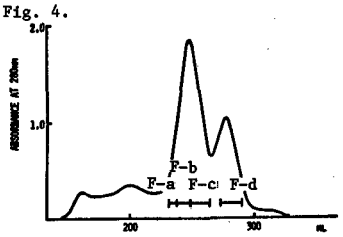


Table 2. Amino acid composition of myelin glycoproteins

Amino acid*	Human			Bovine**	
	BR-PO protein	Y protein	PAS-II protein	BR-PO protein	PAS-II protein
	Amino acid composition [moles/100 moles]				
Asp.	8.9	9.1	7.7	8.4	6.6
Thr.	5.6	5.4	6.9	6.2	6.8
Ser.	7.5	6.9	10.2	6.8	10.2
Glu.	8.8	8.4	8.9	8.4	8.5
Pro.	4.1	4.6	2.2	3.7	2.0
Gly.	9.9	10.3	7.1	10.1	8.4
Ala.	5.9	5.2	6.8	6.4	6.8
Cys.	0.5	1.4	1.4	0.9	1.0
Val.	8.7	9.2	6.9	8.6	8.0
Met.	1.3	0.9	1.8	1.2	2.4
Ile.	4.3	5.1	6.4	4.3	4.8
Leu.	7.2	7.2	13.0	7.5	11.1
Tyr.	4.8	5.5	3.8	5.5	3.7
Phe.	3.6	4.3	6.3	3.6	6.3
His.	3.0	3.2	3.3	3.1	2.8
Lys.	7.7	6.4	4.0	8.7	6.6
Arg.	8.3	7.0	3.3	6.8	4.0

* Tryptophan was not determined. ** Data of Kitamura et al.[6)].
Values are given as mean of two different determinations.

我々はヒト末梢神経ミエリンからこれらの蛋白を分離精製したが，今後はこれらの蛋白の脱髄活性および神経疾患との関係について検討してゆきたい。

[文献]

1)Ansari,K.A.& Komanduri,V.(1974)Neurology,24,94 2)Brostoff,S.,Buenett,P.& Eylar,E.H.(1972)Nature,New Biol., 235,210 3)Carnegie,P.R.(1971)Biochem.J.,123,57 4)Fairbanks,G.,Steck,T.L.& Wallach,D.F.H.(1971)Biochemistry, 10,2606 5)Greenfield,G.,Brostoff,S.,Eylar,E.H.& Morell,P.(1973)J.Neurochem.,20,1207 6)Kitamura,K.,Suzuki,M. & Uyemura,K.(1976)Biochim.Biophys.Acta,455,806 7)Kitamura,K.,Yamanaka,T.& Uyemura,K.(1975)Biochim.Biophys. Acta,379,582 8)Mehl,E.& Wolfgram,E.(1969)J.Neurochem.,16,1091 9)Palo,J.,Savolainen,H.& Haltia,M.(1972)J. Neurolo.Sci.,16,193 10)Reisfeld,R.A.,Lewis,V.J.& Williams,D.E.(1962)Nature,195,281 11)Spritz,N.,Singh,H.& Geyer,B.(1973)J.Clin.Invest.,52,520 12)Uyemura,K.,Kitamura,K.& Suzuki,M.(1977)Abstr.,6th.Int.Meet.Soc. Neurochem.,in press 13)Uyemura,K.,Tobari,C.,Hirano,S.& Tsukada,Y.(1972)J.Neurochem.,19,2607 14)Vacher-Lepretre,M.,Nicot,C.,Alfsen,A.,Jolles,L.& Jolles,P.(1971)Biochim.Biophys.Acta,240,323

34 小脳プルキンエ細胞の特異蛋白の神経化学的研究

御子柴克彦 （慶大・医・生理）
J.-P. Changeux （パスツール研究所）

〔要 約〕

小脳の mutant である nervous や staggerer mutant に欠損ないしは減少している蛋白は(P400). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis より apparent molecular weight は 400,000 の蛋白であり、分離したプルキンエ細胞に多く含まれていることが報告されている。この蛋白につき検討を加え、次の結果を得た。1) この蛋白は小脳以外の組織(大脳, 脾臓, 心筋, 骨格筋, 腎臓, 肝臓)にはみられず臓器特異性がみられた。2) ごく最近みいだされたプルキンエ細胞のほぼ完全な変性を伴う pcd mutant でこの蛋白は欠損していた。3) この蛋白は電気泳動ゲルの Coomasie Blue staining により調べた所、半小脳より分離した分子層(プルキンエ細胞体はこの層に付着して得られる)にのみみられ、顆粒層や白質にはみられなかった。またプルキンエ細胞体を除いた樹状突起のみ含む分子層にもこの蛋白がみられたことから、プルキンエ細胞体、樹状突起の両方に存在すると考えられた。4) この蛋白はプルキンエ細胞の樹状突起が増す時期に一致して増加を示した。5) 糖分析や ^{125}I-Concanavalin A との結合実験の結果 ^{125}I-Con A とよく結合する糖蛋白であることが知られた。6) この蛋白をうさぎに注射して得た抗体は、分離顆粒細胞とは反応せず、分離プルキンエ細胞とのみ indirect Peroxidase 反応を示した。

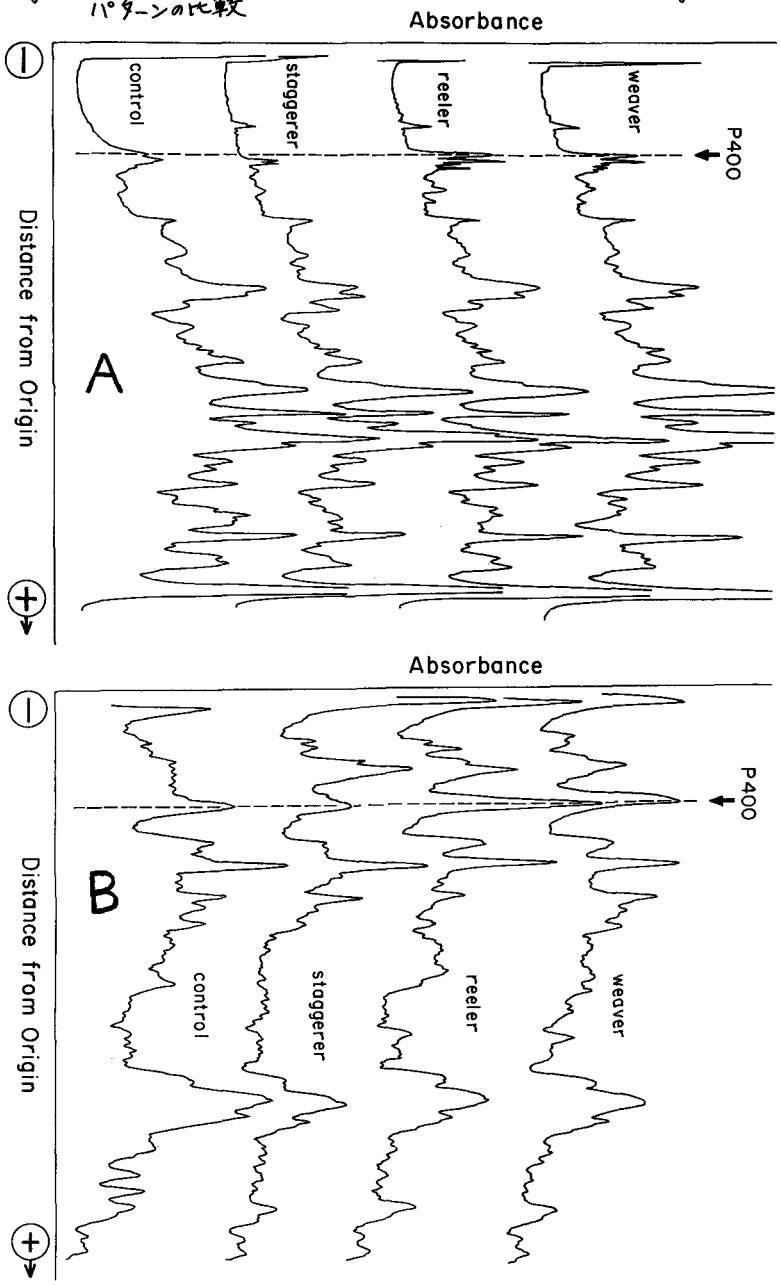
小脳は形態学的によく調べられ[9]、電気生理的にも細胞相互の連絡など明らかにされており[3]、中枢神経系の生化学的研究にとって良い材料と考えられる。更に小脳の mutant は小脳の生化学的研究を容易なものとしている[2-16,8]。ここでは Mallet ら[5]により報告されたプルキンエ細胞に特徴的な蛋白の性質につき報告する。

[実験材料及び方法]

動物はパスツール研究所で飼育されているマウスの小脳 mutant を使用した。SDS-polyacrylamide gel 電気泳動は Ames らの方法[1]に従った。Concanavalin A 等の lectin のヨードラベルは chloramine-T 法[4]に従い、SDS gel との lectin binding は Tanner et al[17], Robinson et al[10], Burridge[2] の方法を modify した方法を用いた。即ち、5-15% linear polyacrylamide SDS ゲル電気泳動後、ゲルより SDS を除き、ヨードラベルした lectin と incubate した。Unbound の lectin を除いた後、Brilliant Coomasie Blue で染色し、そのゲルを乾燥後、autoradiography を行った。プルキンエ細胞、顆粒細胞の分離は Sellinger らの方法[11]を modify した方法を用いた。プルキンエ細胞に特異な蛋白(P400 と名づけられている)の精製はラット小脳を 0.32 M sucrose 中でホモゲナイズ後、遠心により得た 12000×g 15分の上清(P_3 + sup)を更に 0.8M-1.2M sucrose discontinuous gradient にのせ 0.32M-0.8M interphase に得られる分画(P_{31})を 2% Triton (50 mM Tris-HCl pH 8.0) 20°C 1hr 処理後の沈渣を更に 20% Na. Cholate (50 mM Tris-HCl pH 8.0) 20°C 1 hr 処理し、Beckman RP 65 rotor 10,000 rpm 10分遠心後の sup を 105000×g 2hr 遠心後の pellet を得た(P_{31} T.C. pellet)。P_{31} TC pellet または P_{31} 分画を 5% SDS polyacrylamide の分離用ゲルを用いて P400 のバンドに相当するゲルを切

りとった。これを用いてアミノ酸、糖の分析を行った。抗体の作製はゲルのバンドあるいは P31TC pellet 分画に Freund の complete adjuvand を加え乳化后うさぎに注射し抗血清を得た。抗血清を更に硫安分画、DEAE Sephadex により IgG を得た。小脳の分画方法は 10mM リン酸 Buffer (pH7.4) でホモゲナイズ後の小脳を Beckman 社 2 microfuge で 4分遠心後 pellet を low speed pellet (LSP) とし (粗核分画に相当)、上清を 105000g 60分遠心の沈渣を high speed pellet (HSP) とした。[5,6,7]

Fig 1. 各 mutant の 全膜蛋白 (A) 及び 糖蛋白 (B: ConA binding protein) パターンの比較



[結果及び検討]

ごく最近報告された プルキンエ細胞のほぼ完全な変性をきたす pcd mutant[8] (Purkinje Cell Degeneration) と control の小脳を既法の方法[5-7]により分画し SDS-polyacrylamide gel で比較すると、pcd では分子量 400,000 に相当するバンドが完全に消失していた。pcd 程完全な変性をおこさない nervous[5,8,9] (約30%は正常のまま残っている) よりも著明な結果を得た。

この蛋白は小脳以外の組織 (大脳、脾臓、心筋、骨格筋、腎臓、肝臓) にはみられなかった (Brilliant Coomasie Blue stain 及び ConA の binding pattern は当日供覧)

Fig 2 pcd (pcd/pcd) mutant と control (+/+) との蛋白パターンの比較

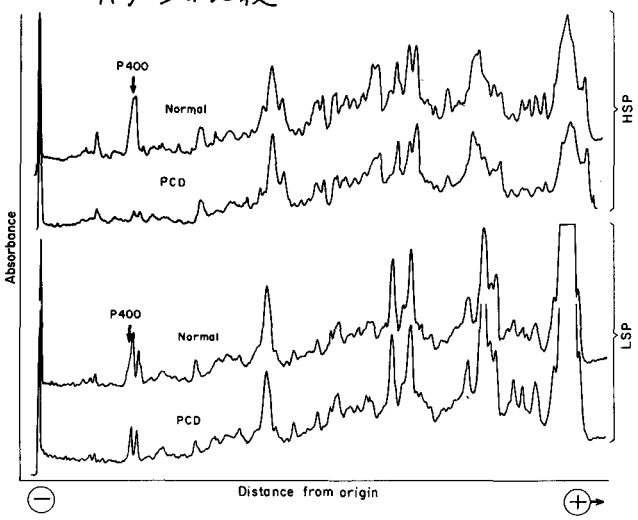
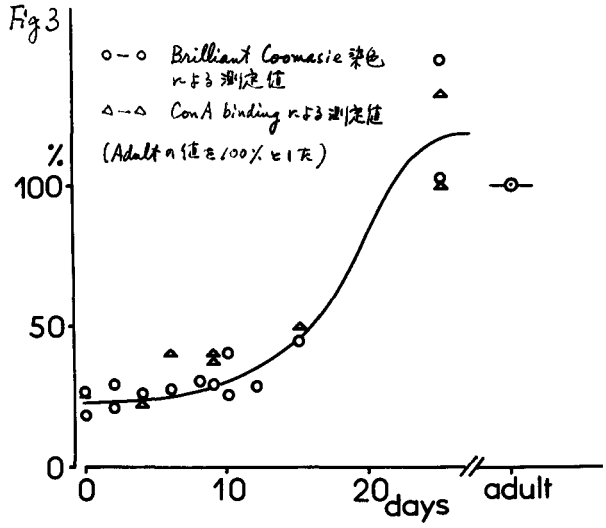


Fig 3



Tab 1. Sugar composition of P400

	No 1.	No 2	Sugar / S+Protein
Fucose	0.493	0.485	≒43%
Galactose	0.990	0.988	
Mannose	1.999	2.042	
Glucose	2.641	1.714	
N-Acetyl glucosamine	1.000	1.000	
N-Acetyl galactosamine	0	0	
N-acetyl-neuraminic acid (Glcnac に対するモル比)	0.522	0.493	

SDS polyacrylamide gel 電気泳動の結果から、実体顕微鏡下にて分離した小脳の分子層（プルキンエ細胞体は分子層に付着して得られる）にこの蛋白はみられ分離した顆粒層にはみられなかった(図4)。

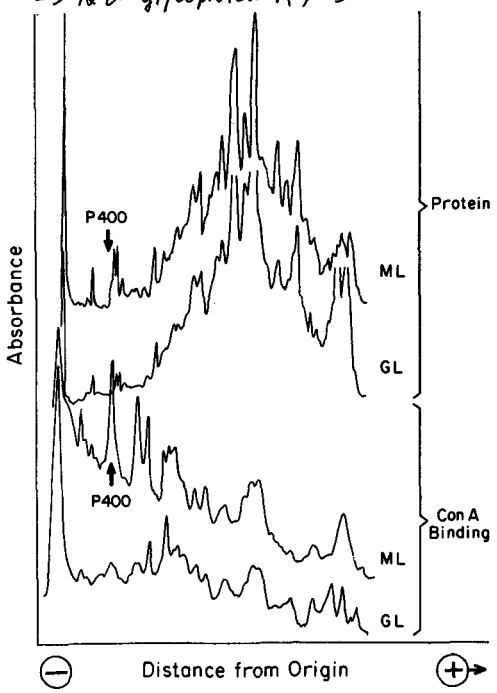
更に顕微鏡下でプルキンエ細胞体を取り除いた分子層にもこの蛋白が存在することから[文]、樹状突起にも存在することが明らかとなった。

糖の分析の結果 大量に Mannose や glucose などの糖を含む糖蛋白であり、糖の割合は全蛋白の43% を占めていた(表1)。電気泳動後のゲルとヨードラベルした lectin との binding により糖蛋白をゲル上で直接確認しうる方法[2,10,17]が報告されている。この方法を用いて P400 蛋白と ConA との結合をしらべたところ、非常に良く結合し、他の蛋白のバンドよりも binding activity は強いことが知られた。この ConA binding による方法は Brilliant Coomasie Blue 染色よりも感度がよく、B.C.B でほとんど検知されない様な蛋白濃度でも糖蛋白ははっきりとみとめられた。この方法により P400 が顆粒層(図4)や顆粒細胞(data not shown)にはほとんど含まれていないことがより厳密に確かめられた。小脳を HSP, LSP の両分画に分けると P400 は両分画にわかれるため蛋白量を定量的に比較することが困難である。そこで、従来のように分画せず、全膜蛋白を gel に apply して蛋白パターンおよび ConA binding パターンを比較した。[11] ConA binding の結果から P400蛋白は staggerer は control の 62% と減少し、weaver では 22%, reeler では 42% control に比し増加していた。

5% polyacrylamide ゲルにより、出生後の wet weight

当りの変動をみると出生後既にP400蛋白はみられ、15日頃から急速に増加する(図3)。この増加は樹状突起のarborizationによるものと考えられる。アミノ酸組成(表2)からhydrophobicなアミノ酸が約30%もめるが、必ずしもこの蛋白のhydrophobicityは説明つかない。大部分は糖によるものと考えられる。P400蛋白はchloroform-methanol(2:1), n-Butanol, acetone, etherなどに対してもほとんど影響をうけなかったが、トリプシンに対して非常にsensitiveで他の蛋白がほとんど変化をうけない濃度でもバンドの著明な減少を示した(data not shown)。この蛋白の抗体は分離プルキンエ細胞とのみindirect Peroxidase反応を示し、免疫学的にもプルキンエ細胞に特異なものと考えられた(当日供覧)。staggerer mutantでは形態学的にプルキンエ細胞とparallel fiberとのシナプスが大部分欠損していることと、今回得られた結果よりP400蛋白が、プルキンエ細胞のシナプス形成に重要な関係のあることが示唆される。現在小脳のprimary cultureなどのin vitro系で、この抗体を用いてシナプス形成への影響を検討中である。

Fig4 小脳の分子層(ML)と顆粒層(GL)の蛋白パターンおよびglycoproteinパターン



(追) これらのデータの一部は国際生理学会(1977)および国際神経化学会(1977)に於て発表した。

Tab 2. Amino Acid Composition of P400 protein

Asp	11.98%	His	3.61 %
Thr	5.57	Arg	4.62
Ser	9.43	Lys	3.98
glu	14.55		
gly	13.83		
Ala	7.74		
Val	6.03		
Ile	5.07		
Leu	9.64		
Phe	3.91		

[Reference]

1. Aneo, G.F.C. J. Biol. Chem. (1974) 249 638-644
2. Burridge, K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 4457-4461
3. Eccles, J. Ito, M. & Szentagothai, J. The cerebellum as a neuronal machine, Springer-Verlag, Berlin 1967
4. Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. (1962) Nature 194 495-496
5. Mallet, J., Huchet, M., Pougeois, R. & Changeux, J.P. Brain Res. 103 (1976) 291-312
6. Mariani, J., Crepel, F., Mikoshiba, K., Changeux, J.P., Sotelo, C. Philosophical Transactions of the Royal Society (London) in press
7. Mikoshiba, K. & Changeux, J.P. Brain Res. in press
8. Mullen, R.J., Eicher, E.M. & Sidman, R.L. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 208-212
9. Palay, S. and Chan-Palay, V. Cerebellar Cortex. Springer-Verlag, Berlin 1974
10. Robinson, P.J. Bull, F.G., Anderson, B.H. & Reith I.M. (1975) FEBS Letters 58 330-333
11. Sellinger, O.Z. Legrand J. Clos, J. and Ohlsson, W.G. (1974) J. Neurochem. 23 1137-1144
12. Sidman, R.L. Green, M.C. and Appel, S.H. Catalog of the Neurological Mutants of the House, Harvard Univ.
13. Sidman, R.L. "The Cell Surface in Development." Wiley, New York 1974 221-253 Moscona (ed).
14. Sotelo, C. (1974) Brain Res. 96 19-44
15. Sotelo, C. & Changeux J.P. Brain Res. (1974) 67 519-526
16. Sotelo, C. & Changeux, J.P. Brain Res. 77 (1974) 77 485-491
17. Tanner, M.J.A. & Anstee, D.J. (1976) Biochem. J. 153 265-270

35 培養松果体にたいするエストラジオールの作用
—— エストラジオールによる蛋白の誘導 ——

溝部文夫・黒川正則　（東大・医・脳研）

〔要　約〕

ラットの培養松果体におけるRNAポリメラーゼ活性およびオキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼ(HIOMT)活性は、生理的濃度のβ-エストラジオールによって促進される。その反応機構を分析する過程で以下の事実を見出した。

(1) 蛋白へとりこまれるアミノ酸の総量は、エストラジオールによって影響されない。
(2) しかし、エストラジオールは松果体においてある種の蛋白合成を誘導する。この蛋白のみかけの分子量は97,000である。
(3) 同一の泳動系でえられるHIOMTのみかけの分子量は、120,000であり、したがって、誘導された蛋白がHIOMTそのものである可能性はほぼ除外できる。
(4) エストラジオールの標的器官(殊に子宮)において報告されている誘導蛋白と、松果体における誘導蛋白との異同について検討中である。

セロトニン→N-アセチルセロトニン→メラトニンの反応は、松果体に特有な代謝経路である。この反応の前半を担う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ることが明らかにされている[1]。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)の活性はホルモン性に調節されている可能性が強い[5,6]。ラット松果体をエストラジオール(15nM)の存在下で培養すると、HIOMT活性は2時間後に1.5-1.8倍に増加するが、この増加は蛋白合成の阻害剤によって抑制される(表1)。このことから、ある種の蛋白の合成がHIOMT活性の増加に必須なステップであることが推定される。

本実験では事実、エストラジオールが松果体においてある種の蛋白合成を誘導することが明らかになった。

表1　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
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

実験方法

卵巣を摘出した成熟ラットより、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2時間予備培養の後、エストラジオール(15nM)と[^{3}H]Leu(100μCi), Ile(50μCi)を含む液、またはエストラジオールを含まず[^{14}C]Leu(40μCi), Ile(24μCi)を含む液内でさらに2時間培養した。その後[^{3}H]松果体と[^{14}C]松果体を合せて1%NP-40内でホモジェナイズし、105,000g(60分)の遠心上清をポリアクリルアミドディスクゲル内で電気泳動し(Ornstein-Davisの変法[8])、染色後2-3mmの小片に切り、各切片内の[^{3}H]蛋白, [^{14}C]蛋白の放射能を計測した。

また遠心上清を上と同様に泳動後、ゲル切片(2-5mm)を465μlの反応液内でホモジェナイズし、N-アセチルセロトニンと[^{14}C]S-アデノシルメチオニンからのメラトニン生成量としてHIOMT活性を測定した[6]。

実験結果と考察

培養松果体において、[^{3}H], [^{14}C]-Leu, Ileの酸不溶性分画へのとりこみは、シクロヘキシミドにより96%抑制される。これら放射性アミノ酸のとりこみ量は、蛋白全体でみる限り、エストラジオールによる影響は受けない。しかし、1%NP-40可溶性蛋白をディスク電気泳動で分画すると、エストラジオールで処理した松果体と処理してない松果体との間にわずかではあるが違いが見出される(図1)。この違いは、各切片の[^{3}H]と[^{14}C]の比をプロットすることによってはっきりする(図2a)。

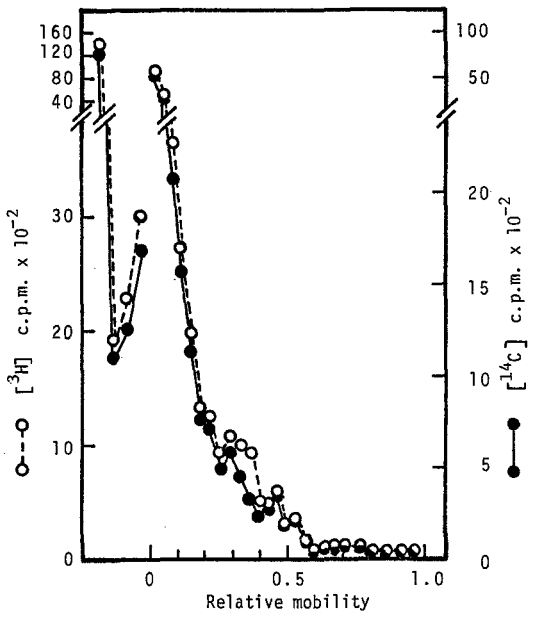


図1　1%NP-40可溶性蛋白のディスク電気泳動図(7.5%ゲル)。[^{3}H] o—o がエストラジオール処理松果体。[^{14}C] •—• はエストラジオールで処理していない松果体。

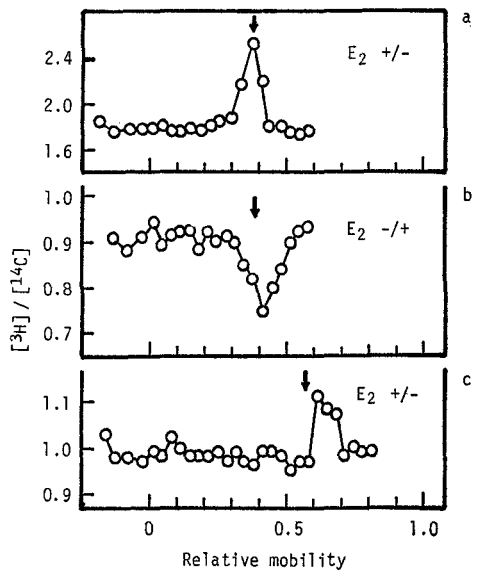


図2　新生可溶性蛋白電気泳動図—各ゲル切片における[^{3}H]/[^{14}C]比。a, bは7.5%ゲル, Cは5.0%ゲルでの泳動。↓はBSA monomerの位置。

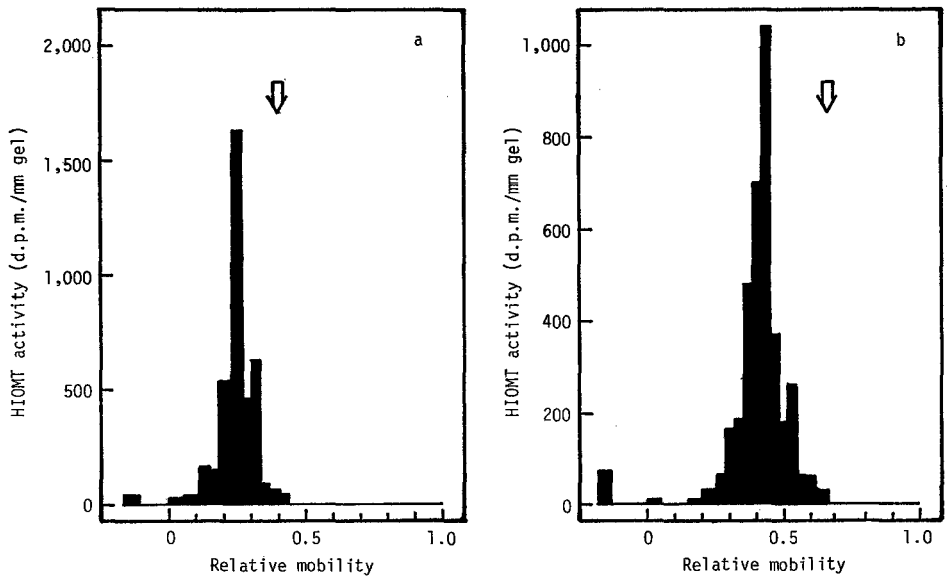


図3　HIOMT活性のディスク電気泳動図

a. 7.5%ゲル。 b. 5.0%ゲル。

⇩は誘導蛋白の位置

このピークの出現は、エストラジオールによってある種の蛋白が特異的に誘導合成されることを示している。エストラジオールを含む培養液のアミノ酸の核種を逆にすると、[^{3}H]/[^{14}C]のピークも逆転する(図2b)。

異なる濃度のポリアクリルアミドゲルにおける移動度(Rm)の違いから、次式によって、蛋白の分子量を知ることができる[3]。

$\log(Rm[5.0]/Rm[7.5]) \propto M.W.$

図2cは5.0%ゲル内で泳動した場合の移動度Rm[5.0]を示す。Rm[7.5]、Rm[5.0](図2)および標準曲線(図4)から計算すると、この誘導蛋白のみかけの分子量は97,000である。

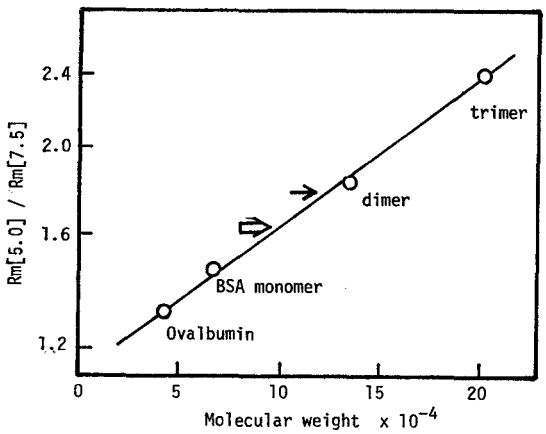


図4　分子量の標準曲線

⇨は誘導蛋白.

→はHIOMT活性

この誘導蛋白がHIOMT酵素そのものである可能性について検討した。HIOMT活性は95%以上が1%NP-40によって溶出される。これを同じ泳動系で分画して酵素活性を測定した結果、活性は、誘導蛋白とは違う位置に見出され(図3)、みかけの分子量

は120,000と計算された(図4)。したがって、この分析法の感度でみる限り、HIOMT自身がエストラジオールによって誘導されている可能性は乏しい。

松果体において誘導される蛋白は酸性蛋白であり、ディスク電気泳動上の移動度は牛血清アルブミン(BSA)とほぼ同じである(図2)。ラット子宮においてエストラジオールにより誘導されるいわゆる"Induced Protein (IP)"[2]は、やはり酸性蛋白でありBSAとほぼ同じ移動度を示すことが報告されている[4,7]。したがって、エストラジオールの標的器官における誘導蛋白の異同について、今後の検討が必要である。

文献

1) 出口武夫(1973) 代謝 10, 1203-1212

2) GORSKI J., DENARI J.H., EILON G., FROLIK C. & SLABAUGH M. (1975) J. Steroid Biochem. 6, 459-460

3) HEDRICK J.L. & SMITH A.J. (1968) Arch. Biochem. Biophy. 126, 155-164

4) MAYOL R.F. & THAYER S.A. (1970) Biochemistry 9, 2484-2489

5) 濱部文夫, 黒川正則 (1975) 神経化学 14 92-95

6) MIZOBE F. & KUROKAWA M. (1976) Eur. J. Biochem. 66, 193-199

7) SÖMJEN D., SÖMJEN G., KING R.J.B. KAYE A.M. & LINDNER H.R. (1973) Biochem. J. 136, 25-33

8) WILLIAMS D.E. & REISFELD R.A. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 373-381

36 分岐軸索における蛋白輸送の非対称性

小宮義璋・森　　啓・黒川正則
（東大・医・脳研・生化）

〔要　約〕

後根神経節ニューロンの中枢枝（後根）と末梢枝（坐骨神経内知覚繊維）における軸索内輸送の異同を検討し，以下の結論を得た。

1) 遅い軸索流の速度は末梢枝では1.0 mm/日，中枢枝では0.4 mm/日で著るしく非対称的である。流量は中枢枝においてやや多く中枢枝/末梢枝の比は1.17である。

2) 速い軸索流については，中枢枝と末梢枝の間に速度の違いはないが，流量は末梢枝において明らかに多い（この知見は従来の報告の再確認である）。

3) 速い軸索流の内容に関して，中枢枝と末梢枝の間に明らかな差があり，特に分子量10～15万近辺の違いが顕著である。

後根神経節ニューロンの軸索は中枢枝(後根)と末梢枝(坐骨神経内知覚繊維)に分岐している。この二つの軸索枝における物質輸送が同一か否かを調べたこれ迄の報告によると，速い軸索内輸送に関して流速は同一であるが，流量は末梢枝の方が多いとされている。[2,8,13] しかし量的に軸索内輸送の70%以上を占める遅い軸索流については，中枢枝側の検討が全く行なわれていない。

我々は速い軸索流の流速，流量に関して従来の知見を確認すると共に，輸送されるものの内容が中枢枝と末梢枝で異なること，また遅い軸索流については中枢枝と末梢枝の流速が著るしく異なることを見出したので，これらの点を中心として分岐軸索における輸送の非対称性を問題にしたい。

＜材料および方法＞

1) 軸索内輸送の測定：ウィスター系ラットの雄(体重250～300g)を用いた。エーテル麻酔下に第5腰髄神経節(L_5)を露出し，ガラス毛細管(先端の直径20~50μm)を通して放射性前駆体を注入した。速い軸索流の検討には生理的食塩水にとかした L-[U-^{14}C]-ロイシン (300 mCi/m mole) 0.8μCi (0.2μl) または L-[^{35}S]-メチオニン (800 Ci/mmole) 100~200μCi (0.2μl) を，遅い流れの検討にはそれぞれ1.5μCi (0.4μl) または200~400μCi (0.4μl) を注入した。速い軸索流については1～7時間後，遅い流れの場合には1～10週間後に断頭し，L_5神経節，坐骨神経，後根，脊髄の一部をとり出し，3mmの長さの連続小片に切断後，各切片を5%冷トリクロル酢酸，99% エタノール，n-ヘキサンで順次洗った後，0.2mlのソルエン350に溶かし，トルエン系シンチレーターを加えて放射能を測定した。[1,6]

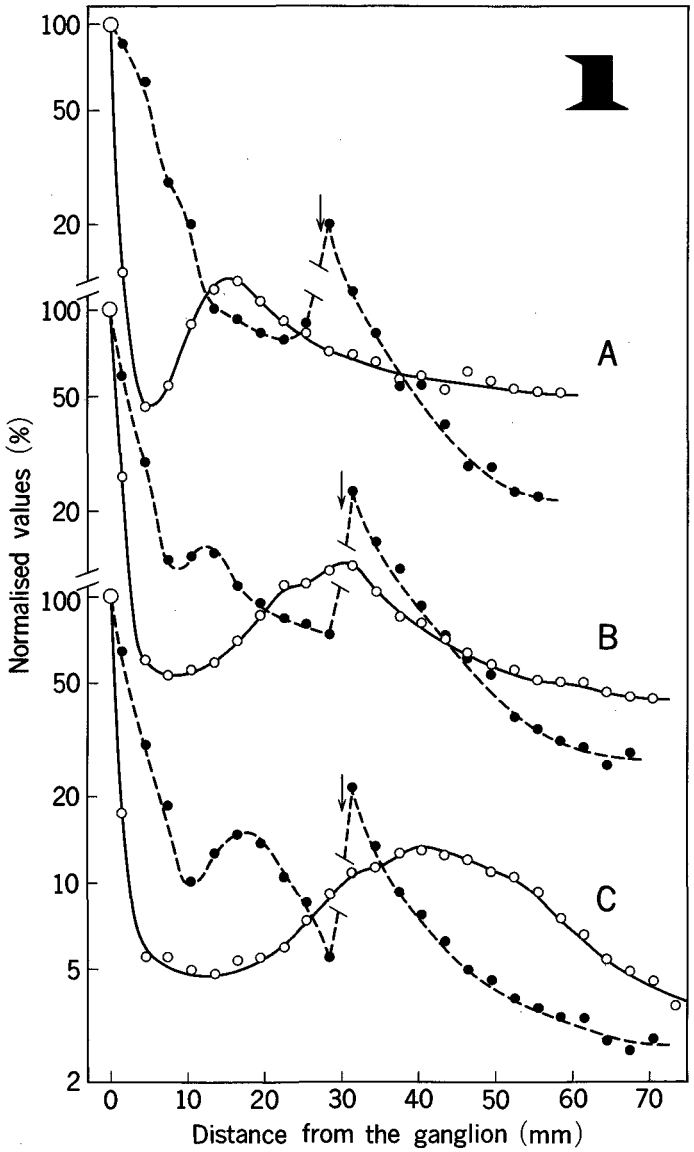


図1　遅い軸索内輸送　A：投与後2週間，B：4週間，C：6週間．
○：末梢枝，●：中枢枝
Normalized value = $\frac{cpm/3\,mm\,切片}{cpm/神経節} \times 100$

2) SDSポリアクリルアミド電気泳動：電気泳動には L-[^{35}S]-メチオニンで標識した試料を用いた。速い流れの場合には，アイソトープ投与3時間後にピークに相当する3個の切片(長さ9mm)をとるか，或は投与2時間後に神経節から約30mmの部位と結紮し，更に4時間おいた後結紮部位の近位側4.5mmの切片をとって試料とした。遅い流れの場合には，投与6週間後にピークに相当する3個の切片(長さ9mm)をとって試料とした．試料を8M尿素，5mMメルカプトエタノール，1%SDSを含む溶液で処理，透析後，SDSポリアクリルアミド(10%ゲル)電気泳動を行なった。

3) 流速および流量の計算：速い流れについては放射能の先端の移動を，遅い流れについてはピークの移動をそれぞれ投与後の時間に対してプロットし，その傾斜から流速を計算した。また速い流れについては投与3時間後，遅い流れについては6週間後にピークの位置にある1個の切片(3mm)に含まれる放射能を計測し，これから流量比を計算した。

<実験結果>

1) 遅い軸索内輸送：遅い流れのパターンを図1に示す。末梢枝では投与後2週間ですでに放射能のピークが認められ，これは時間と共に遠位側に移動する。その流速は図2より1.0 mm/日と計算される。中枢枝では投与4週間後にはじめてピークが認められ

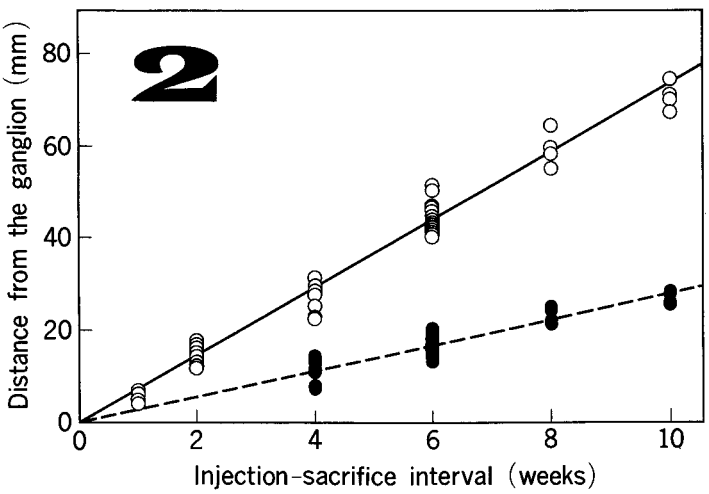


図2　遅い軸索内輸送の流速
○：末梢枝　1.0 mm/日
●：中枢枝　0.4 mm/日

る。この流速は0.4 mm/日で末梢枝よりも明らかに遅い。

中枢枝と末梢枝のピークの高さの比は1.17±0.04 (n=12)である。末梢枝においてはピークの巾が時間と共に広くなり，2～3個の峯に分かれる傾向がある。神経節から約30 mmのところにある中枢枝の鋭い放射能の山は後根が脊髄に進入する部位に相当する。

2) 速い軸索内輸送：速い流れのパターンを図3に示す。その流速は350 mm/日であり中枢枝と末梢枝の間に差がない(図4)。

末梢枝のピークの高さは常に中枢枝より高く，中枢枝と末梢枝のピークの比は0.37±0.04 (n=12)である。以上の結果を表1に要約した。

3) 輸送されるものの内容：速い流れで輸送される蛋白については，電気泳動像で中枢枝と末梢枝の間に明らかな差が見出される。特に分子量10～15万近辺の差異が著明である。遅い流れの内容についても差が認められるが，詳細はなお検討中である。

＜考　察＞

表1に要約した結果から偽単極性ニューロンの分岐軸索の間に軸索内輸送の非対称性が存在することは明らかである。速い軸索流では輸送量が異なるのに対して，遅い軸索流では輸送速度の違いが顕著である。

Ochsは種々の太さと長さの軸索について検討した結果，速い軸索流の速度は軸索の径および長さとは無関係であることを結論している。[13] しかし遅い軸索流に関してはその速度が軸索の径や長さ(実際には軸索の容量であるかも知れないが)によって影響されることを示す根拠が2つある。第1は左右の長さが違うヒラメの視神経におけるMurrayの観察であり，[12] その結論によると長い軸索では短い軸索よりも遅い軸索流の速度が速い。第2は表1に示した我々の資料であり，遅い軸索流の速度が中枢枝において低いという事実は，中枢枝における無髄軸索が末梢枝の無髄軸索より著るしく細く，またこの無髄軸索が中枢枝における軸索全体の60～70%を占めるという観察[5, 14, 15]と関連づけて考えることができる。

速い軸索流がシナプス機構に必要な分子の輸送を主目的とするのに対して，遅い軸索流が軸索そのものの成長，維持を主な役割としていることは今日一般的に受入れられている見解である。[4] 中枢枝の再生速度が末梢枝よりも遅いという事実[10, 11]は，中枢枝における遅い軸索流の速度が末梢枝に比べて遅いという我々の観察と無関係ではな

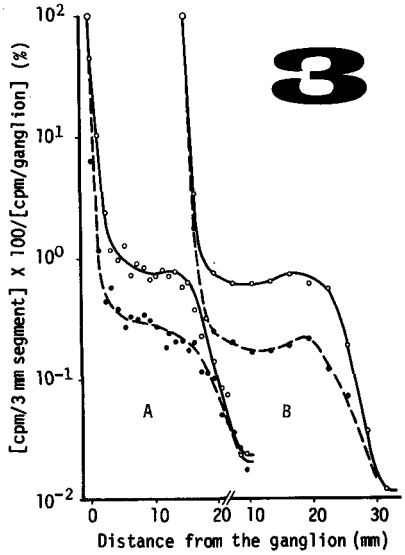


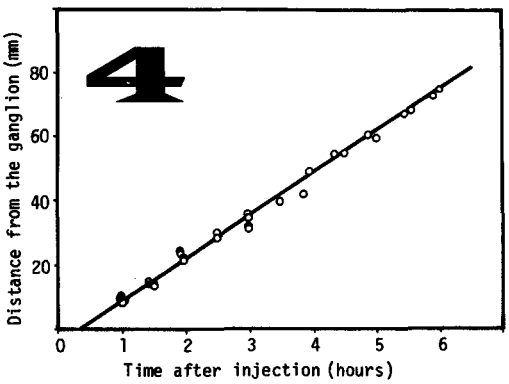
図3 速い軸索内輸送
A：投与後2時間，B：3時間
○：末梢枝
●：中枢枝

いであろう。

最近Lasek & Hoffman[9]は脊髄前角ニューロン軸索内の遅い流れのなかに，遅い相(1~2mm/日)と速い相(3~4mm/日)を識別し，軸索の再生に対して主要な役割を果すのは後者であることを指摘している。

図1には傾向としてしか現われていないが，他の実験では末梢枝の遅い流れが明らかな3峯に分離する(スライドで提示)。このうち第2峯が最も高く，1mm/日で初動する。第1峯の流速は1.2mm/日，第3峯は0.8mm/日程度でいずれにせよ中枢枝における流速とは明確に区別できる。

中枢枝における微小管の密度は末梢枝に比べて低いことが観察されており[16,18]速い軸索流量が中枢枝では少ないことを低い微小管密度と関係づける考えがある[3,17]しかし遅い軸索流に関してこの考えがあてはまらないことは，中枢枝における流量が末梢枝よりもむしろ多い事実(表1)からみて明らかである。ただ微小管の主要な構成蛋白であるチューブリン自身が遅い軸索流のかなりの部分を占めている事実から，微小管ないしチューブリンの中枢枝，末梢枝間の比較はそれ自身が興味のある問題である。



	FLOW RATE (mm/DAY)	RELATIVE FLOW AMOUNT
SLOW		
PERIPHERAL	1.0	1
CENTRAL	0.4	1.17 ± 0.04 (12)
FAST		
PERIPHERAL	350	1
CENTRAL	350	0.37 ± 0.04 (12)

表1 本実験の要約

図4 速い軸索流の流速 ○：末梢枝，●：中枢枝 350mm/日

<文 献>

[1] ABE T., HAGA T. & KUROKAWA M. (1973) Biochem. J. 136, 731-740 [2] ANDERSON L.E. & McCLURE W.O. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1521-1525 [3] BARKER J.L., NEALE J.H. & GAINER H. (1976) Brain Res. 105, 497-515 [4] DROZ B., KOENIG H.L. & DI GIAMBERARDINO L. (1973) Brain Res. 60, 93-127 [5] HATAI S. (1902) J. Comp. Neur. 12, 107-124 [6] KOMIYA Y. & AUSTIN L. (1974) Exptl. Neurol. 43, 1-12 [7] LAEMMLI U.K. (1970) Nature 227, 680-685 [8] LASEK R. (1968) Brain Res. 7, 360-377 [9] LASEK R.J. & HOFFMAN P.N.(1976) *In* Cell Motility (GOLDMAN R., POLLARD T. & ROSENBAUM J., eds) pp. 1021-1049, Cold Spring Harbor Laboratory [10] LUBIŃSKA L. (1964) *In* Prog. Brain Res. Vol. 13 (SINGER M. & SCHADÉ J.P., eds) pp. 1-66, Elsevier, Amsterdam [11] MOYER E.K., KIMMEL D.L. & WINBORNE L.W. (1953) J. Comp. Neur. 98, 283-308 [12] MURRAY M. (1974) Exptl. Neurol. 42, 636-646 [13] OCHS S. (1972) J. Physiol. 227, 627-645 [14] RANSON S.W. (1911) Am. J. Anat. 12, 67-87 [15] RANSON S.W. & DAVENPORT H.K. (1931) Am. J. Anat. 48, 331-353 [16] SMITH R.S. (1973) Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 798-806 [17] ZENKER W. & HÖGL E. (1976) Cell Tiss. Res. 165, 345-363 [18] ZENKER W., MAYR R. & GRUBER H. (1975) Experientia 31, 318-320

37 神経原性および筋原性筋萎縮を伴なう疾患における蛋白代謝
—— 尿中メチルアミノ酸を指標として ——

井上良一・三宅正治・柿本泰男
(愛媛大・医・精神)

〔要約〕

ある種の体蛋白は、メチル化をうけ、メチル化をうけた蛋白は、メチルアミノ酸の種類及び含量において、それぞれ特異なパターンを示し、その分解に伴ない、メチルアミノ酸は放出され、蛋白合成に再利用されることなく尿中に排泄される。したがって、メチル化をうけるある種の蛋白の量や代謝回転に著明な変化があれば、尿中のメチルアミノ酸量が一定の変化を示すはずである。我々は、筋ジストロフィー症(Duchenne型8名その他の型5名)、運動神経疾患(進行性脊髄性筋萎縮症3名、Kugelberg-Welander型4名、その他3名)など筋萎縮を伴なう疾患において、その筋蛋白の代謝を知る試みとし、これらの患者の尿中メチルアミノ酸を測定した。そして次の結果を得た。

1、筋ジストロフィー症患者は、対照に比し、3-メチルヒスチジンが著明に減少し、同時にジメチルリシン、$N^G N^{G'}$ジメチルアルギニンもやや減少の傾向を示した。その他のメチルアミノ酸には差がなかった。

2、運動神経疾患の患者は、対照に比し、3-メチルヒスチジンの尿中排泄が著明に減少し、ジメチルリシンの排泄は増加傾向を示し、その他のメチルアミノ酸の排泄量には差がなかった。

Armstrong ら[1]、Johnson ら[2]は、3-MeH*がアクチン、ミオシンの成分であり、尿中の3-MeHは体蛋白に由来すると示唆した。柿本ら[3]は、ヒトの尿中から$N^G N^G$DMA*、$N^G N^{G'}$DMA*、MML*、DML*、TML*を同定し、ウシ脳蛋白からMMA*を同定した[4]。その後、これらのメチルアミノ酸は、種々の臓器蛋白質に存在することが明らかとなった。一方、柿本、三宅ら[5]は、1)ヒトの尿中メチルアミノ酸は、食餌条件によって変化しないこと、2)蛋白合成直後に塩基性アミノ酸残基がメチル化され、蛋白分解に伴ない、メチルアミノ酸は細胞より放出され、尿中へ排泄されることから、尿中メチルアミノ酸は、体蛋白由来であると推定した。3)また、メチルアミノ酸は、細胞内で蛋白合成に再利用されず、更に腎尿細管で再吸収されることなく尿中へ排泄されること、4)メチル化をうける蛋白は、メチルアミノ酸の種類及び含量においてそれぞれ特異なパターンを示すことから、尿中メチルアミノ酸を測定すればそれらの蛋白の代謝回転のあらましを推定できるのではないかと考えた。ヒトの蛋白中最も量の大きいのは、線維組織と筋の蛋白であり、前者の主成分であるコラーゲンはメチルアミノ酸を含まない[6]。筋のアクチンは3-MeHを、ミオシンは3-MeH、DML、TML、$N^G N^G$DMAを含み、中でも全身の組織蛋白で3-MeHを含む蛋白は筋蛋白に限られると考えられる。そこで、尿中のこれらメチルアミノ酸量は筋蛋白、特にアクチン、ミオシンの代謝回転を反映する可能性があり、我々は、筋ジストロフィー症や運動神経疾患の筋萎縮における蛋白代謝の状態を知る試みとして、それらの患者の尿中メチルアミノ酸を測定した。

---

*MML:Monomethyllysine, DML:Dimethyllysine, TML:Trimethyllysine, MMA:N^GMonomethylarginine, N^G, N^GDMA:N^G, N^GDimethylarginine, N^G, N'^GDMA:N^G, N'^GDimethylarginine, 3-MeH:3-Methylhistidine

〈対象及び実験方法〉

筋ジストロフィー症患者13名、運動神経疾患の患者10名、対照に相当年令の子供21名、成人14名を選んだ。内科医、精神神経科医、整形外科医の診察及び症例検討により、診断の明確なもののみを選んだ。

一回尿の場合、普通クレアチニン当量で尿中濃度を表わすが、筋ジストロフィー症の場合、クレアチニンが減少し、クレアチンが増加するため、両者の和を基準とし、その定量はJaffe反応[7]、メチルアミノ酸の定量は柿本の方法[3]、3-MeHの定量はSpackmanの方法[8]によった。

〈結果〉

1、疾患別メチルアミノ酸量：疾患別に各患者の尿中クレアチニン、クレアチン、

表1　筋ジストロフィー症及び運動神経疾患患者の尿中メチルアミノ酸量

Subjects		Age	Sex	Creatine/Creatinine	Methylamino acids (μmole/g Creatine+Creatinine) Dimethyl-lysine	Trimethyl-lysine	N^G,N^G-Dimethyl-arginine	N^G,N'^G-Dimethyl-arginine	3-Methyl-histidine
Duchenne	1	2	M	4.2	71	48	51	34	94
	2	6	M	5.8	26	34	28	12	77
	3	8	M	2.5	20	34	49	34	76
	4	9	M	3.4	60	34	44	32	61
	5	9	M	3.2	40	81	45	40	40
	6	9	M	1.1	29	32	51	55	113
	7	12	M	4.7	45	40	37	22	73
	8	19	M	5.0	32	48	69	47	61
Mean±SE					40±6.2	44±5.8	47±4.2	34±4.8	74±7.8
L-G	1	40	M	0.7	23	52	32	27	108
FSH	1	58	F	1.8	47	29	22	16	110
Distal Myopathy	1	56	M	0.4	60	59	39	36	95
	2	56	M	1.0	46	68	44	32	57
CMD	1	4	F	3.3	35	24	33	63	86
Motor Neuron Disease									
ALS	1	69	M	0.3	76	80	37	30	138
SPMA	1	24	F	0.0	61	28	39	37	83
	2	33	F	0.2	18	32	22	17	89
	3	73	F	0.8	45	23	36	40	62
CMT	1	16	M	0.2	48	35	30	26	99
	2	24	F	0.3	9	25	30	33	105
K-W	1	6	F	1.9	49	52	24	22	121
	2	7	F	1.3	36	25	57	35	78
	3	23	M	0.6	40	41	46	44	120
	4	58	M	0.4	18	34	35	34	75
Mean±SE					39±8.1	37±6.4	34±2.5	33±3.0	96±8.7
Control (Mean±SE)									
Child					47±4.5	41±3.9	46±2.5	41±2.9	161±17.8
Adult					25±2.2	37±3.1	32±2.2	32±1.9	107-308

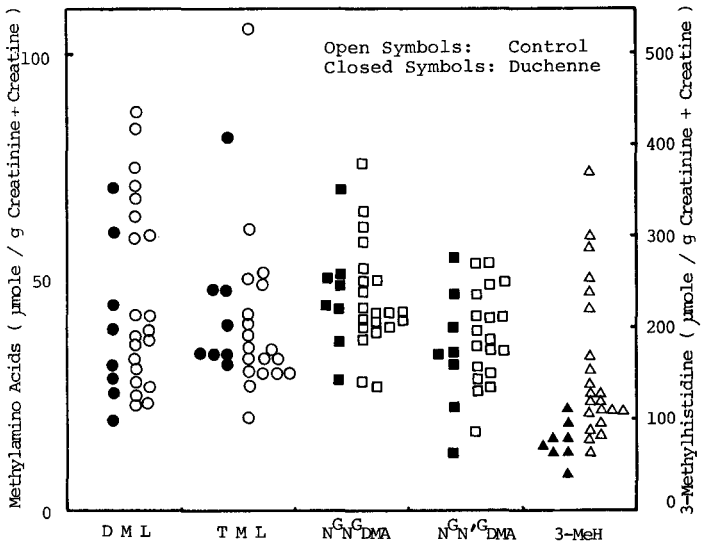
L-G:Limbgirdle,FSH:Facioscapulohumeral,CMD:Congenital Muscular Dystrophy,ALS:Amyotrophic Lateral Sclerosis,CMT:Charcot Marie Tooth,K-W:Kugelbeg-Welander

メチルアミノ酸量をまとめ、表1に示した。

筋ジストロフィー症患者のうち、Duchenne型の患者では、対照に比し、すべてクレアチンとクレアチニンの比が高かった。DML、N^GN^GDMA量は対照に比し、低い傾向にあるが有意差はなかった。TML、N^GN^GDMA量は差がなかった。これに比し、3-

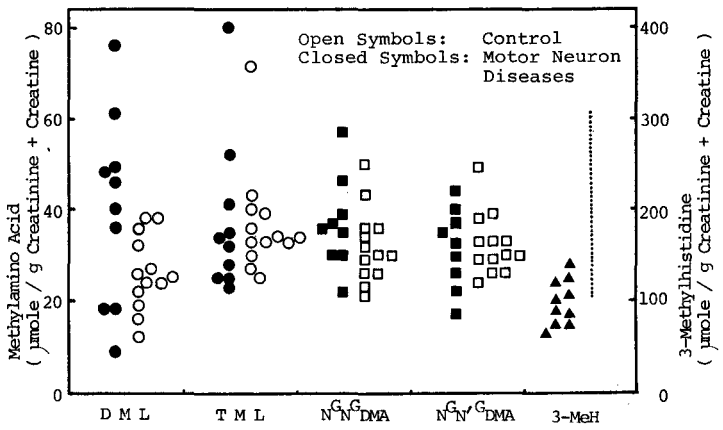
MeH量は平均値で正常の約46%に減少している点が注目された(図1)。Duchenne型以外の患者でも同様の結果がみられる。すなわち、上記の変化は筋ジストロフィー症に共通した所見と思われる。

図1　Duchenne型患者の尿中メチルアミノ酸量



運動神経疾患の患者では一次ニューロン、二次ニューロンの疾患4種を疾患群とした。これらを群として扱うのには疑問があるが、一応、神経原性の筋萎縮としてまとめると、図2のようになる。全体としてみるとDML量は高い傾向にあるが有意差はなかった。3-MeH量は未だ実測値を得ていないので問題はあるが、報告値[9] 107-308 μmole/g Creatinine と比べると、有意に低い。疾患別にみると、ALSでDML、TML量が高いが一例にとどまる。SPMAでは特に3-MeHが低いようである。

図2　運動神経疾患患者尿中のメチルアミノ酸量



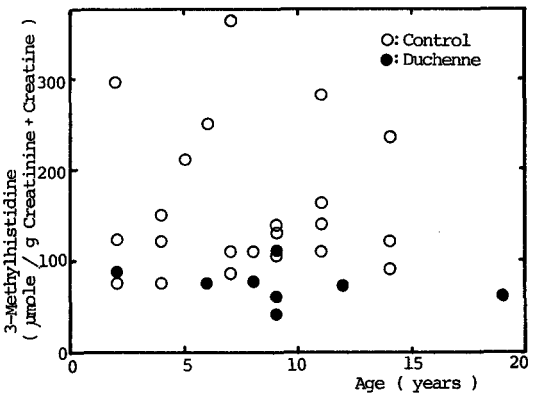
2、年令と尿中メチルアミノ酸との関係：ラットのミオシン中の3-MeH含量が成長に伴ない増加し、$N^{G}N^{G}$DMA含量が減少すると報告されているので[10]、ヒトの尿中でも変化する可能性も考え、年令別にその値を図示した(図3)。健康児でも、筋ジストロフィー症患児でも、尿中3-MeH量と年令との間に相関はみられなかった。その他のメチルアミノ酸についても年令との間に相関はみられなかった。

〈考察〉

本研究で明らかになったことは、筋ジストロフィー症でも、神経原性筋萎縮でも共に尿中の3-MeHの排泄量が低下していることである。尿中の3-MeHの起源は、筋肉組織のアクチン及びミオシンと考えられる。したがって、その原因として1)筋蛋白量の減少、2)筋蛋白の代謝回転の減少、3)筋蛋白のヒスチジン残基のメチル化の減少が考えうる。1)の筋蛋白量の減少があることは確かであろうが、筋ジストロフィー症のDuch-

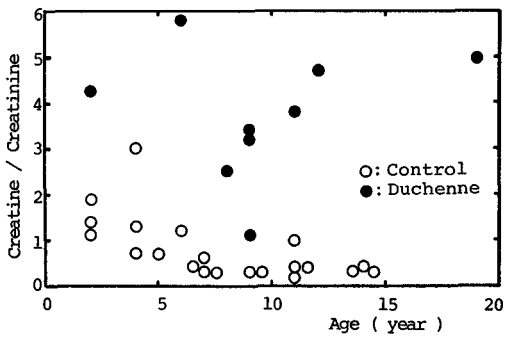
enne型で発病初期でも進行の極期に達したものでもいずれも同年令の対照に比べてその減少比は不変であり(図3)、また筋蛋白の他のメチルアミノ酸の尿中濃度が不変であることなど説明しがたい。2)の代謝回転の減少は、戸塚ら[11]のジストロフィーマウスでの筋細胞あたりの蛋白合成能は正常であるとの報告、Rourke[12]のジストロフィーチキンでのミオシンの分解は亢進しているとの報告とは合致しない。3)の説明については、矛盾する研究結果も、支持する成績もない。いずれにしても今後剖検例などで筋肉中のメチルアミノ酸残基を直接測定する必要があろう。また、神経原性の筋萎縮では神経切断動物、筋ジストロフィーではジストロフィーマウスなどでの筋組織蛋白の分析や代謝回転のin vivoでの測定が必要と思われる。

図3　年令と尿中3-MeH量の関係



今回の研究で24時間尿を集めて測定するべきであったが、ほとんど在宅療養中の患者の検診で採尿したので一回尿を用いた。そして筋萎縮の患者ではクレアチニン量が減少し、クレアチンが増加するため、基準物質の選択に迷った。そして両者の和を一応の基準とした。筋萎縮の患者はその両者の和が正常人での和にほぼ等しいか低い。低い場合には、3-MeHの一日の排泄量が正常と変わらないとすると、この基準では高い値をとるはずである。しかし、本研究では低い値を示し、24時間尿を集めて測定した場合、正常との差は、さらに大きくなると考えられ、本研究での結論は変わらない。また、他のメチルアミノ酸量が不変であることは、上記の基準のとりかたは一応妥当であることを示している。

図4　年令と尿中クレアチン/クレアチニンの関係



(本論文に示した患者の診察にあたり鹿児島大学医学部整形外科野島教授、精神神経科佐藤医師、徳島大学内科川井講師に御協力いただき謝意を表する)

〈文献〉

1)Asatoor A.M.andArmstrong M.D.(1967)Biochem.Biophys.Res.Commun.26,168 2)Johnson H.P.andPerry S.V.(1967)Biochem.J.105,361 3)Kakimoto Y.andAkazawa S.(1970)J.Biol.Chem.245,5751 4)Nakajima T. Matsuoka Y.andKakimoto Y.(1971)Biochim.Biophys.Acta.230,212 5)Miyake M.andKakimoto Y.(1976)Metabolism 25,885 6)柿本安男,三宅正治(1974)代謝 11,1303 7)Jaffe M.(1886)Physiol.Chem.10,339 8)Spackman D.H. Stein W.H.andMoore S.(1958)Anal.Chem.30,1190 9)Soupart P.(1959)Clin.Chim.Acta.4,265 10)Reporter M.andCorbin J.L.(1971)Biochem.Biophys.Res.Commun.43,644 11)Haverberg L.N. Omstedt P.T. Munro H.N.andYoung V.R.(1975)Biochim.Biophys.Acta.405,67 12)Hayashi Y. Suzuki H.andTotsuka T.(1975)J.Biochem.77,761

38 初老期・老年期痴呆における脳蛋白の変化（Ⅳ）
Intermediate filamentsの変化

播口之朗・西村　健・多田国利
金子仁郎　（阪大・医・精神）

〔要　約〕

Alzheimer病（2例），老年痴呆（1例），Creutzfeldt-Jakob病（2例）など初老期，老年期の痴呆性疾患患者の脳について intermediate filaments（neurofilament，astrocytic fibre）の変化をしらべ次のような結果を得た．

1) Alzheimer病，老年痴呆患者の大脳水不溶性画分からは対照脳に認められない neurofilament様 neurofibril が多量に分離された．この neurofibril を蔗糖密度勾配法による分画を反復して精製した．

2) neurofilament様 neurofibril は SDS 濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動で4本の major bands に分れる．それらの分子量はそれぞれ約 54000，41000，36000，30000 である．前2者は neurofilament との関連が推測される．分子量 36000 のものは対照脳で認められない neurofibril に特有のバンドである．

3) Alzheimer病，老年痴呆，Creutzfeldt-Jakob病で増生する astrocytic fibre の構成蛋白は溶解性が低く水溶性画分では證明されない．

4) これらの所見は初老期，老年期痴呆の脳では intermediate filament に共通した病態が生じていることを示唆する．

Alzheimer病，老年痴呆，Creutzfeldt-Jakob病などの初老期，老年期に重篤な痴呆をきたす疾患の脳では，それぞれの疾患に特徴的な病理組織学的変化が認められる．

Alzheimer病や老年痴呆では老人斑や神経原線維変化が，Creutzfeldt-Jakob病では海綿状態や星状グリアの増生などが代表的な病理所見として挙げられる．これらの明瞭な形態学的変化にともなって脳蛋白に変化が生じまであろうことは容易に推測される．

われわれは，これまでにこれらの初老期，老年期痴呆患者の脳では水溶性蛋白の溶解性が著明に低下していることを示し，その変化が神経原線維変化や老人斑などの神経病理学的変化に対応するものである可能性を示唆した．

今回は intermediate filament（Shu-Hui Yen）に属する径約 10 nm の線維性蛋白 ── neurofilament，astrocytic fibre ── の痴呆患者脳における変化につき報告する．

I. 材料と方法：　a) 材料：患者材料は死後剖検時採取された．対照人脳は事故死者の司法解剖に際して得られたものである．いづれも使用時まで −20°C に保存した．

b) ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAAE）：通常の 7.5% PAAE は Davis & Ornstein の方法に従った．SDS 濃度勾配 PAAE には Pharmacia 製 GE-4 電気泳動装置及び gradient gel PAA 4/30 を使用した．

c) neurofilament の精製は Shelanski[1] の方法に従った．microtubule protein は Shelanski の方法でモルモット脳より粗精製した．

d) anti-astroprotein は阪大第二外科森武貞博士，阪大脳神経外科森本一良博士の御好意により提供して頂いたものを使用した．

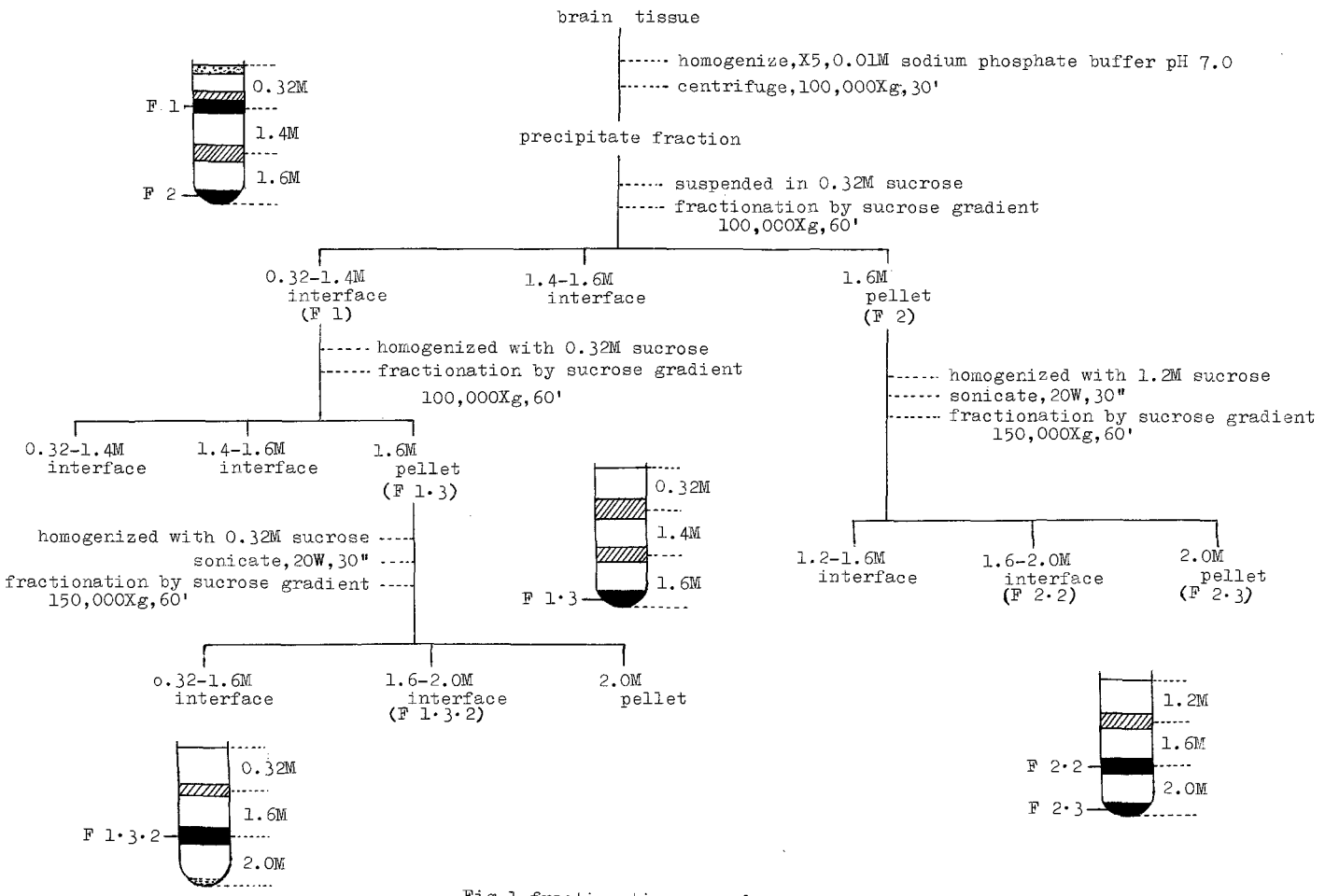


Fig.1 fractionation procedure

Ⅱ 結果：

1) Neurofibrilの分離：Alzheimer病及び老年痴呆の脳の最も重要な所見は老人斑と神経原線維変化である。このうち神経原線維変化は多量の神経原線維(neurofibril)がneuron内に蓄積するもので，神経細胞の核周辺では径約20nmのtwisted tubuleが大部分をしめ，軸索内では径約10nmのneurofilament様のfibrilが増生している。われわれは[3]，さきに蔗糖密度勾配法で神経原線維変化に富む画分を分離したが　今回はそれを更に精製することを試みた。その順序をFig 1にまとめた。全過程は4°C下に行った。

Alzheimer病あるいは老年痴呆患者の脳(大脳皮質と皮質下白質)に4倍量の緩衝液を加え乳鉢でゆるやかに摩砕した後，冷凍庫内で凍結し，再融解しながら徐徐にホモジネートとした。100,000×g，30分間遠沈し，沈渣を0.32M蔗糖を含む緩衝液に浮遊させ蔗糖密度勾配法で分画する。得られたミエリン層(0.32～1.4M interface)を凍結融解しつつ乳鉢で強く擦り潰し再び前回と同じ勾配の蔗糖層で分画する。最下層(1.6M pellet)を0.32M蔗糖リン酸緩衝液に浮遊させ，20W，30秒間超音波処理したのち分画遠沈すると1.6～2.0M interfaceに細かい線維状の画分が得られる(Fr 1·3·2)。この線維を電顕で観察すると径約10nmのneurofilament様の細線維で構成されている。この画分の精製度は高いが僅かに破砕膜や無構造の顆粒が混在している。この線維性画分(Fr 1·3·2)はAlzheimer病と老年痴呆の脳からは多量に得られるのに対して，対照脳からは痕跡程度しか得られない。従ってFr 1·3·2はAlzheimer病や老年痴呆の軸索内のneurofilament様，neurofibrilを集めたものと考えられる。Fr 2·2にはtwisted tubuleより成る神経原線維変化が集められる。しかしこの画分をさらに精製してtwisted tubuleのみを集めることは困難で未だ成功していない。Fr 2·3には細胞核や細かく破砕されたtwisted tubuleが含まれる。

次に精製されたneurofilament様のfibril(以下nf様fibril)を構成する蛋白をSDS濃度勾配PAAEでしらべた。Fig 2.に泳動パタンを模式的に示した。nf様fibrilは図のように明瞭な4本のバンドに分れる。最も陰極側のバンド(a)の位置はneurofilament fractionのmain bandと一致する。さらにbもneurofilamentのsubmajor bandの1つと一致した位置にある。バンドdの位置には対照脳の水溶性，不溶性画分のどちらにもバンドが認められる。これに対してバンドcに相当する位置には対照脳ではバンドを欠いており，バンドcはnf様fibrilに特有のバンドである可能性がある。これら4本のバンドの分子量を泳動距離から概算するとa：54000，b：41000，c：36000，d：30000である。Igbal's[4]も

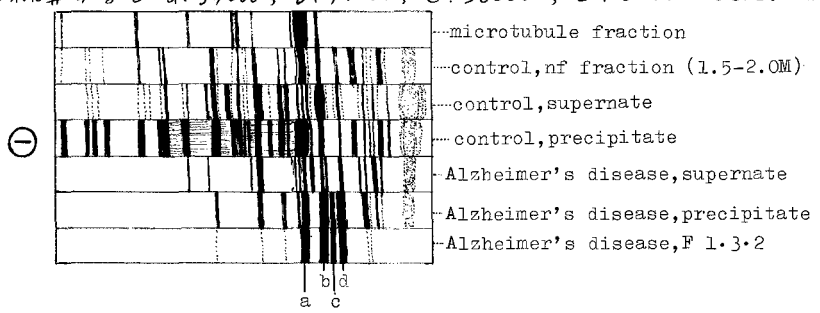


Fig.2 gradient SDS polyacrylamide gel electrophresis of brain proteins.

Alzheimer病患者の脳でnf様fibrilを分離して分析を試みたが明確な結論が得られなかった。

以上の結果はAlzheimer病，老年痴呆のnf様fibrilが単一のsubunitのみから成るのではなく，neurofilament及びそれよりも低分子量の2，3の蛋白より成ること，それらの蛋白のうち一つは対照脳に存在しないものである可能性を示唆している．

2) Astrocytic acidic protein：Alzheimer病，老年痴呆，Creutzfeldt-Jakob病などではneuronのみでなくgliaの変化も著明である．とくにastrocyteが増殖しastrocytic fibreが増生する．なかでもCreutzfeldt-Jakob病脳のastrocyte増殖は特に高度である．そこでastrocytic fibreの構成蛋白であるastrocytic acidic proteinがこれらの疾患患者脳の水溶性画分で増加していることを予測した．まず対照成人脳の水溶性蛋白について7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた免疫電気泳動を行い，astroproteinのゲル上での位置と反応を確認した．Fig. 3のようにanti-astroproteinとの沈降線はわれわれの命名によるB-11と呼ばれるバンドの僅かに陰極側でピークを示す．つぎにAlzheimer病，老年痴呆，Pick病，Creutzfeldt-Jakob病の患者脳の水溶性画分について同様の免疫電気泳動を行ったところ予想に反して沈降反応は全く現れなかった．そこで患者脳を

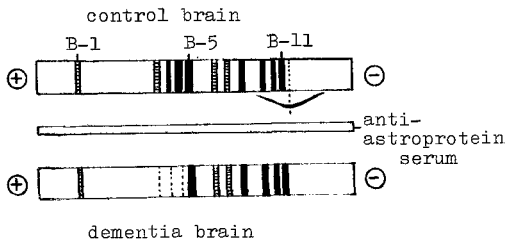


Fig. 3 immunoelectrophoretic demonstration of astroprotein.

0.01 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)でホモジナイズし100,000×g，30分遠沈した沈渣を更に2回同じ緩衝液で洗ってから1% SDS，1mM EDTA，1% 2-mercaptoethanol，10mM Tris塩酸緩衝液(pH 8.0)と混じ3分間沸騰水中で熱したのちOuchterlony法の変法(Shu-Hui Yen[5])でanti-astroprotein serumとの反応をしらべた．その結果はFig. 4のようにAlzheimer病，老年痴呆，Creutzfeldt-Jakob病の水不溶性画分はanti-astroproteinとの間に明瞭な沈降線を生じる．逆に対照成人脳は反応を示さない．以上の成績はAlzheimer病，老年痴呆，Creutzfeldt-Jakob病の脳ではastrocytic fibreは増生しているが，正常脳のastrocytic fibreとは異なり水溶性を減じているため水溶性画分に抽出されないのではないかと推測される．因みにastrocytomaの水溶性画分は免疫電気泳動法で強い沈降反応を示すから，この点からは痴呆脳のastrocytic fibre proteinはastrocytomaのfibre proteinと異るものである．

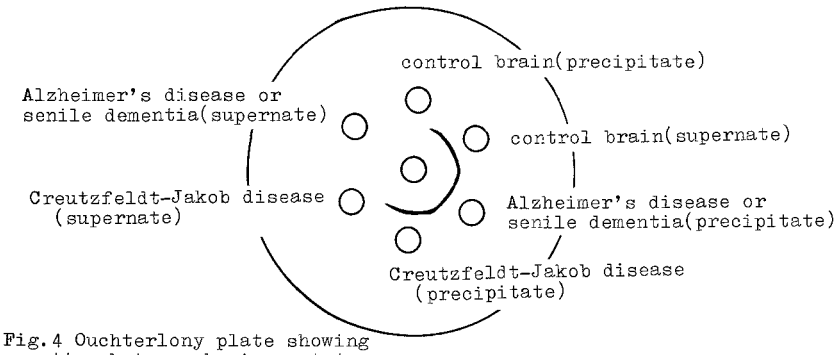


Fig. 4 Ouchterlony plate showing reaction between brain proteins and antiserum against astroprotein.

Ⅲ. 結語：neurofilamentとastrocytic fibreは最近免疫学的，生化学的類似性からintermediate filamentとしてまとめられた[5]．ここで得られた成績でも初老期，老年期の痴呆性疾患の脳でneuronとgliaの両者のintermediate filamentが共に増生し，構成や性状に類似の変化が生じていることが示唆された．

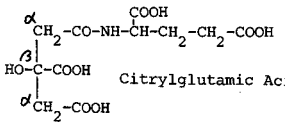
文献：1) Shelanski, M.L., Albert, S., De Vries, G.H. and Norton, W.T. (1971) Science 174, 1242. 2) Shelanski, M.L., Gaskin, F., Cantor, C.R. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 765. 3) 播口之朗，西村健，金子仁郎(1971) 神経化学 10, 51. 4) Iqbal, K., Wisniewski, H.M., Iqbal, I.G., Korthals, J.K. and Terry, R.D. (1975) J. Histochem. Cytochem. 23, 563. 5) Shu-Hui Yen (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 529.

39 幼若ラット脳に存在するシトリルグルタミン酸の単離と構造決定

三宅正治・柿本泰男　（愛媛大・医・精神）
反町　勝　（愛媛大・医・1生理）

〔要　約〕

幼若哺乳動物の脳に特異的に存在する未知化合物を単離し，構造をほぼ確定した。この物質はニンヒドリン反応陰性の酸性物質で酸水解でグルタミン酸と有机酸とを生じる。①精製：生後1～5日目のラット脳185～384コからアルコール抽出，脱脂後，イオン交換クロマトグラフィーの組合せにより精製し，オ1回の実験ではBa塩として20mg，オ2回目には旋離で12mgの結晶を得た。②構造推定：本物質はC,H,N Oからなる化合物で，赤外線吸収スペクトルから，カルボキシル基と酸アミド結合とを持つと推定した。メチルエステル化した本物質の質量分析から，分子量377を得た。グルタミン酸のアミノ基が酸性糖あるいはポリカルボン酸でアシル化された化合物を考え，糖や有机酸の呈色反応を本物質およびその酸水解物について行った結果シトリルグルタミン酸と構造を推定した。この化合物のテトラメチルエステルの分子量は377と一致する。また質量分析のフラグメントはこの構造で説明できた。③合成：さらに本物質をクエン酸ジメチルエステルからN-ヒドロキシ無水コハク酸法で合成し，物理化学的性質および質量分析スペクトルが一致した。（ただし本化合物にはα-シトリルおよびβ-シトリルグルタミン酸があり，両者の合成を試みたが，そのいずれかと決定するに至っていない。）



Citrylglutamic Acid

かつてわれわれが脳内N-アセチルアスパルチルグルタミン酸について，脳内分布や成長に伴なう変化を検索した際，幼若ラット脳抽出液の酸性分画を酸水解するとこの化合物以外にグルタミン酸を生じる物質が存在することを認めた。この未知物質の精製を試みたが単離するに至らず，またその物理化学的性質から推定しうるフォルミルグルタミン酸やサクシニールグルタミン酸など数種を合成したが一致しなかった。構造決定への手がかりも得ぬまま放置していた（宮本，柿本，中嶋未発表）。

この物質は脳以外に見出せなかったし，生後1～3日目には1μモル/g組織とかなり高濃度であるが生後2週前後にはほとんど消失した。脳の成長に関連ある物質として興味を抱きつづけ，今回再びその分離を試みた。幸いにして単離に成功し，さらに構造もほぼ明らかにすることができたので報告する。

〈実験方法および結果〉

1）精製・単離

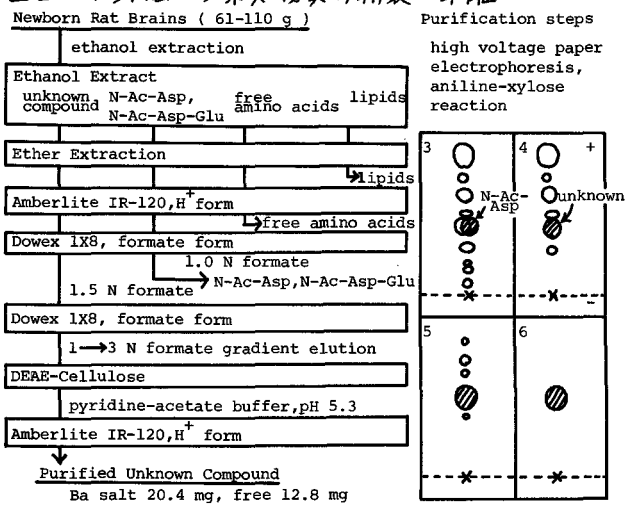
生後1～5日目のラット185および384匹の脳6lおよび112.4gを出発材料として，図1に示した方法に従って精製した。未知物質は精製ステップ4は0.1N HCl，100℃，1時間水解でグルタミン酸のみを生じる分画を集め，その後は高圧沪紙電気泳動上酸性物質の検出に用いられるアニリン-キシロース反応を行い，陽性スポットの中酸水解でグルタミン酸が生じるスポットを目印として集めた。図1右に示したように最終精製物は高圧沪紙電気泳動で単一のスポットとして得られ，さらに沪紙および薄層クロマトグラフィー（表1参照）でも単一であった。オ1回目の実験では，旋離の型で結晶化を試みたがよい溶媒系を見いだせず，Ba塩として水-メタノールより約20.4mgの結晶を

得た。第2回目の実験では遊離の型で，アセトン－塩化エチレンより結晶化に成功し，12.8 mg の結晶を得た。

2）構造推定

1)で得たBa塩を主に構造推定に用いた。本物質は紫外部にほとんど吸収がないことから，芳香族および多重結合構造は存在しないと考えた。元素分析値は C：18.17，H：1.62，N：3.38，O：40.27 Ba：36.56％で，PおよびSは検出されなかった。非常に強い酸性物質でOが多いことから，リン酸，硫酸およびカルボキシル基の存在を予想したが，PおよびSがなく前2者の存在を否定した。

図1　ラット脳から未知物質の精製・単離



赤外線吸収スペクトルでは，1410，1570および1650 cm^{-1} に強い吸収が見られ，3000－3650 cm^{-1} に中程度の幅広い吸収が見られた。1410および1570 cm^{-1} の強い吸収からカルボキシル基，1650 cm^{-1} の吸収から酸アミド結合，3000－3650 cm^{-1} の吸収から水酸基の存在を予想した。本物質はニンヒドリン反応陰性，弱酸水解でグルタミン酸を生じることから，その構造を2種考えた。①グルタミン酸のアミノ基はアシル化されているが，カルボキシル基は遊離である。②アミノ基がアシル化され，カルボキシル基もエステルあるいは酸無水物構造をとっている。しかし赤外吸収スペクトルで，エステルあるいは酸無水物構造に特徴的な吸収はなく，しかも本物質はアルカリ水解で不変であることから第2の可能性は否定した。

本物質をジアゾメタンでメチル化したのち，イソブタンを用いた化学的イオン化法で質量分析を行い，分子量は377であることがわかった。グルタミン酸のジメチルエステルの分子量は175であることから，分子量200前後の酸性物質がグルタミン酸のアミノ基にアシル結合した構造を想定した。このことは本物質を弱酸水解すると，グルタミン酸以外にかなり酸性度の強い化合物が生じる（図2）ことから確めた。そこでこの酸性物質を酸性糖あるいはポリカルボン酸ではないかと考えた。まず酸性糖の可能性を検討した。本物質あるいはその弱酸水解物について，試験管内あるいは沪紙電気泳動上で糖の呈色反応を行った。糖の一般的検出反応，ウロン酸，ヘキソサミンおよびシアル酸の特異的検出反応を試みたがすべて陰性であった。酸性糖の可能性を放棄した。

残る可能性はポリカルボン酸である。メチルエステで分子量377と一致するポリカルボン酸を検索する作業の中で，クエン酸あるいはイソクエン酸を考えついた。そこで本物質を酸水解して，クエン酸あるいはイソクエン酸が生じるかどうか検討した。図2に示したように本物質を酸水解すると，主成生物は化合物AおよびCで，Bは微量形成され，その出現は酸水解の条件で異なっていた。Aがグルタミン酸であること

は以前より確かめていた。そこでまずCがクエン酸かイソクエン酸かを高圧沪紙電気泳動，沪紙および薄層クロマトグラフィーで検討した。表1に示したように化合物Cの泳動距離およびRf値はクエン酸のそれと完全に一致した。さらにTCAサイクルのメンバーやAroyl-Glycineに特異的な呈色反応である p-ジメチルアミノベンズアルデヒド－無水酢酸反応[1]で，クエン酸と同様のピンク色を呈した。これらの結果から化合物Cをクエン酸と推定した。また未水解の本物質も前記反応で同じ色を呈した。これらのことから，本物質の構造をシトリルグルタミン酸と推定した。

図2 未知物質の酸水解パターン

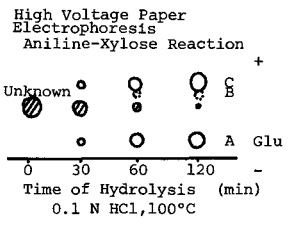


表1 未知物質およびその酸水解物のクロマトグラフィー

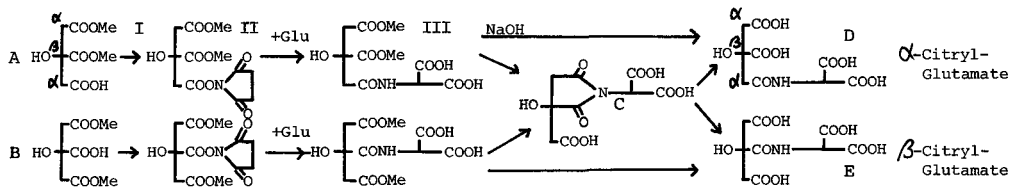
Compounds	High Voltage Paper Electrophoresis pH 3.4 4000 V, 30 min	Paper Chromatography solvent 1	solvent 2	Thin Layer Chromatography solvent 3 (silicagel G)	solvent 4 (cellulose)
Unknown Compound	12.1 cm	0.56	0.45 Rf	0.36	0.43 Rf
Unknown Compound A	3.0	0.27	0.31	0.33	0.45
Acid Hydrolysis C	14.8	0.53	0.42	0.30	0.36
Citric Acid	14.8	0.53	0.42	0.30	0.36
Isocitric Acid	12.3	0.53	0.42	0.30	0.33
Glutamic Acid	3.0	0.27	0.31	0.33	0.45
Synthesized Citrylglutamate	12.1	0.56	0.45	0.36	0.43

Solvent ; 1; n-BuOH:Acetate:Water=60:15:25 2; n-BuOH:Pyridine:Water=1:1:1
3; n-BuOH:Aceton:Acetate:Water=70:70:20:40 4; Phenol:Water:Formate=75:25:1

3）合成

2)で推定した構造を確認するため有機化学的にシトリルグルタミン酸を合成しようと試みた。構造から考えて本化合物には2種の異性体α-シトリルおよびβ-シトリルグルタミン酸が存在する。（図3）。したがって両者を合成しなければならない。

図3 α-シトリルおよびβ-シトリルグルタミン酸の合成



最初α-シトリルグルタミン酸はα,β-ジメチルクエン酸[2]（図3,A）を出発材料として，混合酸無水物法で，β-シトリルグルタミン酸はβ-モノメチルクエン酸[2]あるいはαβ-ジメチルクエン酸[3]（図3,B）を出発材料として，それぞれアジド法，混合酸無水物法で合成を試みたが成功しなかった。そこで図3に示したようにα体は化合物A，β体は化合物Bを出発材料として，N-ヒドロキシ無水コハク酸法で合成を試みた。図3のステップIIで合成された化合物は，高圧沪紙電気泳動で異なった化合物であったが，ステップIIIのアルカリで脱メチル化する段階で，両出発材料から，それぞれ2種類の化合物（便宜上Aから合成されたものをa,b，Bからのものをa',b'とする）が合成された。a,a',b,b'とも水解するとグルタミン酸とクエン酸を生じ，aとa'，bとb'とは高圧沪紙電気泳動，沪紙および薄層クロマトグラフィーで全く区別できなかった。反応機構上図3のステップIIIに示したような経路が考えられるが，現在a,a',b,b'と化

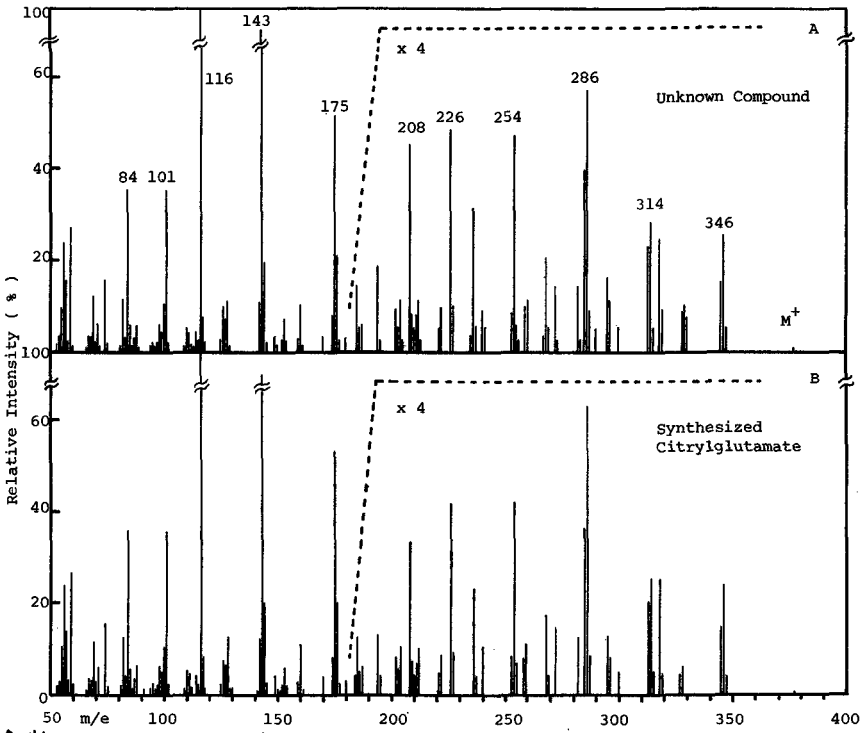


図4
未知物質および合成シトリルグルタミン酸の質量分析スペクトル
試料はジアゾメタンでメチルエステルとし，EI法で測定した。

測定条件

Filament A
4.4 A
Emission A
0.36 mA
Ionization A
300 μA
Ionization V
70 eV
Chamber Temp.
165 °C
Prove Temp.
40 °C
Model;
JEOL,JMS-D-300

合物C．D，Eとの関係は不明である。現在NMRあるいは酵素的，化学的方法で検討中である。しかしαおよびα'と脳からの未知物質とは，表1に示したように高圧沪紙電気泳動，沪紙および薄層クロマトグラフィーで完全に一致し，さらに図4に示したように質量分析スペクトルも一致した。またα，α'および未知物質の融点はともに150-151°Cであった。化合物Cはメチルエステル化しても分子量が377にならないので，αおよびα'は化合物Dあるいは Eと考えられる。図2で生じた化合物Bは，図3の化合物Cではないかと考えている。α体，β体の区別は保留したいが，脳からの単離物質がシトリルグルタミン酸であることは明らかである。

〈考　察〉

本物質は従来未知の物質で，脳に限局して存在し，しかも生後初期に高濃度で，神経細胞の増殖の低下とともに減少する。脳の発育に密接に関係している可能性が考えられる。また脳が嫌気性から好気性解糖に移る時期に多く，クエン酸とグルタミン酸の結合した物質が見出されたことは生化学的にも極めて興味がある。

（本研究の一部は第26回中国，四国精神神経学会で発表した）

N-ヒドロキシ無水コハク酸を提供していただき，合成法に有益な助言をいただいた阪大理学部芝教授，質量分析に協力していただいた愛大・医・生理2須田氏に感謝します。

〈文　献〉

1) Seakins J.W.T.& Ersser R.S.,Chromatographic & Electrophoretic Techniques(ed. by Smith I.& Seakins J.W.T.) vol.1,259,Heinemann,1976 2) Pearce K.N.&Creamer L.K.,Aust. J. Chem.,28,2409,1975 3) Schroeter G.&Schmitz L.,Ber.,35,2085,1902

40 バゾプレッシンの脳圧降下作用に関する研究

能登　直・田中哲徳・中嶋照夫
(阪大・医・高次研)
佐治美和・名川雄児(武田薬品・中研・医薬研)

〔要　約〕

髄液中のバゾプレッシンの役割について，とくに脳圧との関連について検討した。
1) バゾプレッシンを150μU 以上家兎側脳室に投与した場合，脳圧の下降が起こることを明らかにした。脳圧の降下量と投与したバゾプレッシン量との間にはっきりした dose response は認められなかった。
2) バゾプレッシンが髄液の産生系に働くのか排泄系に働くのかを検討するために髄液の産生を抑えることが知られているアセタゾールアマイドとの相互作用を調べた。この結果バゾプレッシンはアセタゾールアマイドの脳圧降下作用に対して相加効果のあることが認められた。
3) このことからバゾプレッシンの脳圧降下作用は髄液の排泄促進による可能性があると考え，トリチウム水を用いて排泄を検討した。バゾプレッシンを投与した場合，脳室内に注入したトリチウム水の排泄が促進していることがわかった。
以上の知見からバゾプレッシンは髄液の排泄を促進して脳圧を下げる作用を有していることを明らかにした。

最近脳背髄液(髄液)中に下垂体後葉ホルモン活性ならびにホルモンのキャリヤー蛋白であるニューロヒジンの存在することが相続いで報告されている。[1)2)3)4)5)] Robinson ら[5)] は髄液中のニューロヒジンおよび後葉ホルモンの役割について次のような仮説を立てている。つまり髄液中のニューロヒジンおよび後葉ホルモンが上衣細胞より吸収され下垂体門脈路にはいり，下垂体前葉機能を調節しているという説である。一方われわれは髄液中にバゾプレッシンおよびニューロヒジンが存在することから，バゾプレッシンの役割の1つとして脳背髄液圧(脳圧)の調節作用を考えた。脳圧は血圧により受動的にコントロールされていると考えられているが，それだけでなく脳自身が必ず自己コントロールしているという考えに基ずき，今回の実験を行った。

〔実験材料および方法〕

1) 実験動物および材料

実験動物は2800gr前後の雄家兎を用いた。バゾプレッシンはピトレッシン(三共-パークデービス)および合成アルギニンバゾプレッシン(シグマ)を用いた。アセタゾールアマイドNa塩はダイアモックスNa塩(武田-レダリー)を用いた。トリチウム水(New England Nuclear Co)は比活性を38.8μCi/μlにして使用した。

2) 脳定位固定および側脳室への生理的食塩水，バゾプレッシンおよびトリチウム水の投与

家兎気管内にエーテル麻酔下でカニューレを挿入し，筋弛緩剤(ガラミン，16mg)を注射後人工呼吸器に接続した。人工呼吸下の家兎を前頂(Bregma)がランダ(Lambda)より1.5mm高くなるように東大脳研式脳定位固定台(家兎用)に固定した。ついで

C.H. Sawyer の脳図譜[6]に従って左側脳室（A 1.0, L 2.8, H 5.5 mm）に外径 0.6mm のステンレス製カニューレを挿入し，アロンアルファにて固定した。このカニューレよりマイクロインジェクターおよびマイクロシリンジにて生理的食塩水，バゾプレッシン，トリチウム水を投与した。カニューレが側脳室内へ入っていることはカニューレ上端の髄液が呼吸に同期してゆれていること，および実験終了後メチレンブルーをカニューレより注入することにより確めた。

3) アセタゾールアマイドの投与

アセタゾールアマイドは 10mg を 0.5ml の生理的食塩水に溶かして耳静脈より投与した。

4) 脳圧の測定

先端が鋭利なステンレス製のカニューレを大脳槽に刺入し，これを水マノメーターに接続して，脳圧をプリアンプを介してレクチコーダーにて記録した。

5) 血圧の測定

右大腿動脈を露出して末梢側を結紮し，中枢側へヘパリンを満した外径 0.8mm のポリエチレン製のカニューレを挿入し，これを水銀マノメーターに接続して，血圧をプリアンプを介してレクチコーダにて脳圧と同時記録した。

6) 右内頸静脈よりの採血

エーテル麻酔下で鎖骨下静脈，肩甲横静脈を結紮し，ついで外頸静脈の頭側を結紮したのち，心臓側へ向ってヘパリンを満した外径 0.8mm，長さ 6.5mm のポリエチレン製のカニューレを外頸静脈と内頸静脈の交わるところまで挿入し，0.2ml づつ採血した。

7) 血漿中の放射能の測定

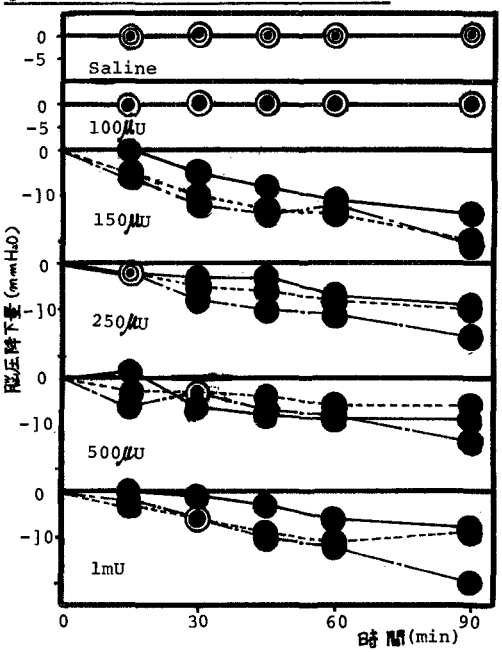
ヘパリン処理して採取した血液 0.2ml を 3000 回転，2 分間遠沈して血漿を得た。50 μl の血漿をバイアルに秤し，ノニオン系シンチレーターに溶かして液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した。

〔結果〕

1) バゾプレッシンの脳圧におよぼす効果

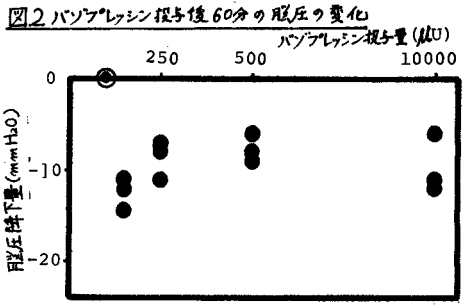
家兎の脳圧は今回の実験条件下では 0～60 mmH$_2$O の間にあり個体差が著じるしく，また呼吸に同期して 8～30 mmH$_2$O の圧幅をもって変動した。脳圧は血圧に依存的な動きを示すことが知られているので血圧を同時記録し，血圧の下がった例は除いた。生理的食塩水およびバゾプレッシン投与後の脳圧の経時的な変化を示したのが図 1 である。生理的食塩水およびバゾプレッシンの投与は脳圧，血圧が安定するのを待って行った。生理的食塩水を投与した場合は一過

図 1 バゾプレッシン投与による脳圧の変化



性の脳圧の上昇がみられ，以後は元の脳圧に戻り，下降はみられなかった。バゾプレッシンは100μU，150μU，250μU，500μU，1mUの量を投与した。100μUでは脳圧に全んど変化はなかったが，150μU以上の量では脳圧の下降が認められた。バゾプレッシンの投与量と脳圧の降下量がどのような関係にあるかをはっきりさせるため，投与後60分のバゾプレッシンの投与量に対する脳圧の降下量を示したのが図2である。この図からバゾプレッシンの投与量と脳圧の降下量の間には相関関係は認められないことが判明した。

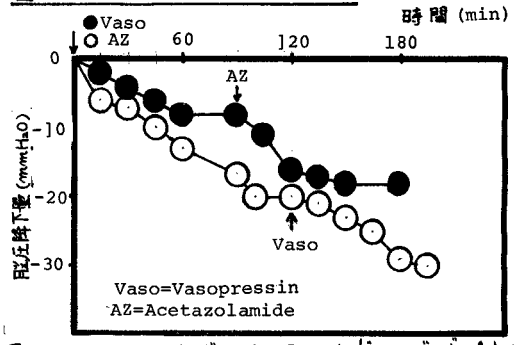
図2 バゾプレッシン投与後60分の脳圧の変化



2)バゾプレッシンとアセタゾールアマイドの相互作用

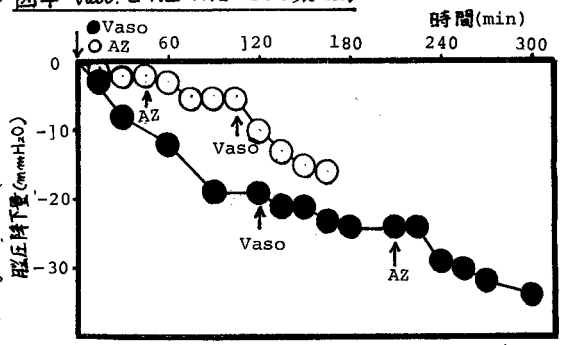
つぎに髄液の産生を抑えて脳圧を下げることが知られているアセタゾールアマイド[7][8]とバゾプレッシンの相互作用を検討した。10mgのアセタゾールアマイドの静脈内投与につづいて1mUのバゾプレッシンを投与した例と逆の順序で投与した例を図3に示した。アセタゾールアマイドとバゾプレッシンはどちらの投与方法においても，脳圧降下に関して相加効果が認められた。

図3 Vaso. とAZの相加効果(I)



つぎにバゾプレッシン，バゾプレッシン，アセタゾールアマイドという順序で投与した例とアセタゾールアマイド，アセタゾールアマイド，バゾプレッシンという順序で投与した例を図4に示した。前の例のバゾプレッシンの追加投与よりもアセタゾールアマイドの投与の方が，またあとの例のアセタゾールアマイドの追加投与よりもバゾプレッシンの投与の方が脳圧をよく下げることがわかった。つまりバゾプレッシンはアセタゾールアマイドとは異った作用機序で脳圧を下げている可能性，すなわち髄液の排泄を促進して脳圧を下げている可能性が考えられた。

図4 Vaso. とAZの相加効果(II)

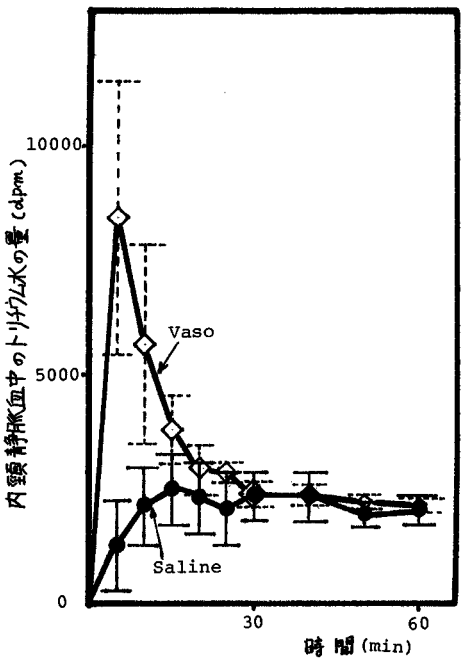


3)バゾプレッシンの髄液排泄におよぼす効果

バゾプレッシンの髄液排泄におよぼす効果を調べるため，トリチウム水を側脳室に注入し内頸静脈より採血し，トリチウム水の排泄を検討した。すなわち側脳室へのトリチウム水投与10分前に1mUのバゾプレッシンあるいは10μlの生理的食塩水を投与し，投与後30分までは5分毎に，以後60分までは10分毎に静脈血を0.2ml採取した。生理的食塩水投与群3例，バゾプレッシン投与群5例の間には明らかな相違が認めら

れた（図5）。すなわちバゾプレッシン投与群ではトリチウム水の血中への排泄が初期で非常に促進していた。このことよりバゾプレッシンは髄液の排泄を促進することが推察された。なおこの実験中も脳圧と血圧を記録したが，やはりバゾプレッシン投与群と生理的食塩水投与群では図1に示したのと全んと同じような傾向が認められた。

図5 バゾプレッシンの髄液排泄促進作用



〔考察〕

髄液は主に脳室脈絡叢で産生され[9)10)]，主にArachnoid Villiより排泄されている[11)]。K.Welch & V. Friedmanは Arachnoid Villi は99くの細管よりできており，Cross sectionでは腎糸球体と非常によく似ていると報告している[11)]。またクモ膜下腔から静脈洞への髄液の灌流実験において，脳圧が20～50 mmH₂O以上になると髄液が静脈洞へ排泄されるが，20～50 mmH₂O以下では排泄されないことも合わせて報告している。髄液の排泄は静脈洞圧と脳圧の相互関係によるものである。つまり脳圧は血圧により受動的に調節されていると考えられてきた。しかし今回の実験でバゾプレッシンが髄液の排泄を促進して脳圧を下げることを明らかにしたことにより，脳圧の少なくとも一部分は下垂体後葉ホルモンを介して脳自身が自己調節していると考えられる。今後バゾプレッシンの作用部位，作用機序を生化学的に明らかにしたい。

〔文献〕

1) Heller, H., et al., J. Endocrinol., 41, 273 (1968)
2) Gupta, K.K., Lancet, 1, 581 (1969)
3) Vorherr, H., et al., Endocrinology, 83, 246 (1968)
4) Pavel, S., J. clin. Endocr., 31, 369 (1970)
5) Robinson, A.G., and Zimmerman, E.A., J. clin. Invest., 52, 1260 (1973)
6) Sawyer, S.H., et al., J. comparative Neurology, 101, 801 (1954)
7) Tschirgi, R.W., et al., Proc. Soc. Exper. Med., 87, 373 (1954)
8) Dawson, H., and Luck, C.P., J. Physiol., 137, 279 (1957)
9) Bering, E., In: cerebrospinal fluid and regulation of Ventilation, P396, McC. Brooks (Eds), oxford. Blackwell. (1965)
10) Cserr, H.F., Physiological Reviews, 51(2), 273 (1971)
11) Welch, K., and Friedman, V., J. Physiol., 170, 195 (1964)

41 ミエリンのちぢみ現象（III）(Shrinking phenomenon)
—— ミエリンのCa^{2+}ATPaseの存在について ——

八杉悦子・阿部敏明・山川民夫
（東大・医・1生化）

〔要　約〕

①ラット脳より、Nortonらの方法でミエリンを分離し、ミエリンのちぢみ現象に関与している可能性のあるCa^{2+}あるいはMg^{2+}ATPaseを測定したところ、活性が認められた。

②分離ミエリンのNa^+-K^+ATPase, Ca^{2+}ATPase, Mg^{2+}ATPase, 5'-nucleotidase, CNPase, acetylcholinesterase, cholinesteraseの活性測定し、他の細胞膜画分の各酵素活性と比較した。

③ミエリンのCa^{2+}ATPaseの至適pHは8.9で、Km値は、4.3×10^{-5}Mであった。基質特異性は厳密でなく、ITPでも反応する。alKaline phosphataseの活性は、pH 8.9付近では、ほとんど認められなかった。シナプトゾーム画分のCa^{2+}ATPaseのKm値は、8.2×10^{-5}Mであった。

④Ca^{2+}ATPase活性は、EDTA, EGTAの両方で完全に阻害されるが、Mg^{2+}ATPaseの場合、EDTAでは約65%阻害されるが、EGTAでは約3倍活性が上昇する。

⑤分離ミエリンのNa^+-K^+ATPase, CNPase, 5'-nucleotidase活性は、無機水銀を添加することにより阻害され、半阻害濃度はそれぞれ10^{-6}M, 10^{-3}M, 3×10^{-7}Mであった。

ラット脳より分離したミエリン浮遊液に、2価イオンを添加するとミエリンはちぢみ現象を起こし、このちぢみはEDTAを添加する事により回復する。[1] 又、有機水銀中毒症ラットのミエリンの場合、ちぢみ現象が正常に比して減少している事を先に報告した。[2] このミエリンのちぢみ現象を検討するにあたって一つの可能性として、ミエリン膜のCa^{2+}あるいはMg^{2+}ATPaseが関与しているのではないかと考え、ミエリンのCa^{2+}あるいはMg^{2+}ATPaseを測定したところ、活性が認められたので、この酵素の特性と併わせて報告する。

実験方法　材料は、ウィスター系ラット生後7～8週令を用いた。脳の各細胞膜画分の分離法は、昨年の日本神経化学会で報告した。[2] たんぱく質定量はLowryらの方法に従った。[9] Ca^{2+}あるいはMg^{2+}ATPase活性の測定法は、Na^+-K^+ATPase (EC 3.6.1.3) を測定したSchwarzらの方法[11]を用いて、Ca^{2+}, Mg^{2+}の濃度を変化させた。無機リンの定量は、Fiske-Subba Row法を用いた。[6] 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) はEmmelotらの方法[5]、2', 3'-CNPaseはKurihara らの方法[8]、acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7), cholinesterase (EC 3.1.1.8) はEllmanらの方法[4]、alKaline phosphatase (EC 3.1.3.1) は、Cotmanらの方法[3]に従った。

実験結果　各画分の酵素活性：　ラット脳から表1に示す各画分を分離し、それぞれについて、細胞膜に存在するとされ、SH酵素であるNa^+-K^+ATPase, Ca^{2+}ATPase, Mg^{2+}ATPase, 5'-nucleotidase, ミエリンに局在するといわれる2', 3'-CNPase, シナプトゾームに含まれるacetylcholinesterase, グリア細胞に局在するcholinesteraseなど諸酵素の活性の測定結果を表1に示す。ATPase活性

表 1　Enzyme Activity of Subcellular Fraction from Rat Brains

	Na^+-K^+ ATPase*	Ca^{2+} ATPase*	Mg^{2+} ATPase*	5'-Nucleotidase*	CNPase**	Acetylcholine esterase***	Choline esterase***
Homogenate	5.7	4.1	2.5	3.2	6.1	2.5	0.7
Nuclei	5.6	3.2	2.1	1.1	1.2	0.8	0.2
Mitochondria	5.5	2.6	8.9	0.8	1.1	1.8	0.2
Synaptosomes	8.3	4.0	9.4	1.6	1.9	4.7	0.3
12000-14000g	5.6			3.3	1.5		
Microsomes	7.2			3.5	1.3		
Supernatant	0			1.2	0.3		
Myelinated axon	11.3	5.2	12.4	4.5	6.7	4.8	0.3
Myelin(nuclei)	1.4	0.5	1.2	4.1	10.0	1.1	0.3
Myelin(mitochondria)	3.5			5.1	11.5		

* μ mol. Pi/hr/mg protein
** μ mol. Pi/min/mg protein
*** μ mol. substrate/hr/mg protein

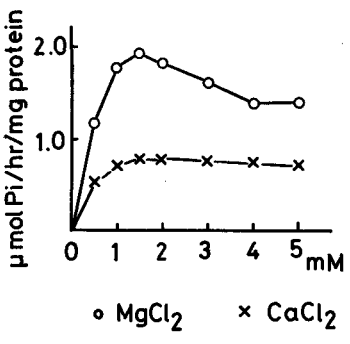
は、myelinated axon で一番高く、次にシナプトゾーム画分であり、ミエリン画分の活性は低い。5'-nucleotidase 活性は、myelinated axon, ミエリン画分で高くなっている。　2',3'-CNPase は、ミエリン画分に多く含まれている。　acetylcholinesterase 活性は、シナプトゾーム, myelinated axon で高く、cholinesterase は各画分であまり活性のちがいはみられなかった。　表1にあるシナプトゾーム, myelinated axon, ミエリン(核)画分の ATPase 活性について、Na^+-K^+ ATPase 活性を100として、Ca^{2+} ATPase, Mg^{2+} ATPase 活性の割合を示したものが表2である。Na^+-K^+ ATPase に対する Ca^{2+}, Mg^{2+} ATPase の比率が、シナプトゾーム画分, myelinated axon と比較するとミエリン画分では低値を示している。

表 2　ATPase Activity of Subcellular Fraction

	Na^+-K^+ATPase	Ca^{2+}ATPase	Mg^{2+}ATPase
Synaptosomes	100	48	113
Myelinated axon	100	46	110
Myelin(nuclei)	100	34	86

Ca^{2+} と Mg^{2+} の効果：　ミエリン画分(核)を用いて、Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} の濃度をかえて ATPase 活性を測定すると、図1のような結果が得られる。　金属イオンを加えない場合、ATPase 活性は認められないが、Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を加えると ATPase 活性が上昇し、1.5 mM の濃度で最高となり、それ以上高濃度にすると活性はむしろ低下する。Mg^{2+} を加えた方が効果が大きい。

図 1　Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on ATPase activity



至適 pH：　ミエリン画分中の Ca^{2+} ATPase (Ca^{2+} 濃度 3 mM)は、アルカリ側で高

表3 Liberation of Pi from Nucleotides by Myelin Enzyme

Substrate	Inorganic phosphate liberated (μ mol. Pi/hr/mg protein)
ATP	0.8
ADP	0.3
AMP	1.2
ITP	0.6

く、至適pHは、8.9であった。一方、ミエリン画分のalkaline phosphatase活性を測定したところ、pH10で活性があったが、pH8.9付近では、非常に低い活性しか認められなかった。

Km値：Ca^{2+}の濃度を3mM、pHを7.5として、基質であるATPの濃度を変化させた結果を図2に示す。ATPの濃度に従って遊離する無機リンの量は多くなり、ATPの濃度10^{-3}Mで平衡に達する。この結果からLineweaver and Burkの逆数プロット法により、Michaelis定数を求めると4.3×10^{-5}Mとなった。シナプトゾーム画分のCa^{2+} ATPaseのKm値は、同じ条件下で8.2×10^{-5}Mであった。

図2. Effect of varying concentration of ATP

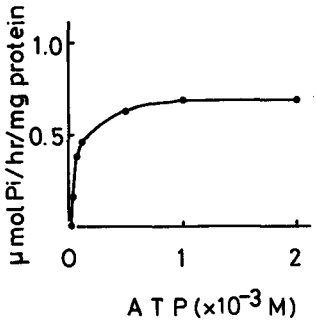


表4 Effect of EDTA and EGTA

Additions	Inorganic phosphate liberated (μ mol. Pi/hr/mg protein)						
	None	EDTA 1mM	EDTA 3mM	EDTA 5mM	EGTA 1mM	EGTA 3mM	EGTA 5mM
Ca^{2+} (1.5mM)	0.8	0.1	0	0	0.3	0	0
Mg^{2+} (1.5mM)	2.2	1.5	0.7	0.6	3.7	5.8	7.0

ADP, AMP, ITPの効果：表3にみられるようにATPのかわりに、ADPを基質とした場合(Ca^{2+}濃度3mM)、活性は約半分におちるが、AMPでは逆に高くなる。これは、5'-nucleotidase活性がミエリンに含まれるためであろうと思われる。ITPを基質とした場合、ATPの場合よりは活性が低いが、かなり分解される。

EDTA, EGTAの効果：Ca^{2+}, Mg^{2+}をそれぞれ1.5mMにし、EDTA, EGTAを1mM, 3mM, 5mMの各濃度添加した結果を表4に示す。Ca^{2+}存在下では、EDTA, EGTAの両方で阻害される。Mg^{2+} ATPaseの場合、EDTAでは活性が抑えられるが、EGTAでは逆に活性化される。

無機水銀による阻害：分離ミエリンのNa^+-K^+ ATPase, 5'-nucleotidase, 2',3'-CNPaseは、塩化第二水銀を添加すると阻害がみられる。それぞれの酵素活性に対する半阻害濃度を表5に示す。2',3'-CNPase活性は、塩化水銀に対する感受性が一番高く、次にNa^+-K^+ ATPaseで、5'-nucleotidaseは一番感受性が低かった。

表5. Effect of $HgCl_2$

Enzymes	Concentration of 50% inhibition
Na^+-K^+ATPase	10^{-6}M
5'-nucleotidase	1.1×10^{-3}M
CNPase	3.0×10^{-7}M

考察　ラット脳ミエリン画分のCa^{2+}またはMg^{2+} ATPaseについては、従来の細胞膜画分分離法によって考えられた結果から、その存在が疑問視されてきた[9]。我々は、最近開発されたNortonらの分画法[10]に基いて、比較的他画分の混入の少ないミエリン画分を得、

それについて Ca^{2+} または Mg^{2+} ATPaseを測定することができた。このATPaseは、これまで我々が報告してきたミエリンのちぢみ現象において関与している可能性も考えられる。

参考文献

1. 阿部敏明，松木考澄，山川民夫，長嶋和郎（1976）生化学 48, 615.
2. 阿部敏明，八杉悦子，山川民夫，西垣進，大井玄（1976）神経化学 15, 180-182.
3. Cotman,C.W. and Matthes,D.A. (1971) Biochim.Biophys.Acta, 249, 380-394
4. Ellman,G.L., Courtney,K.D., Andres,V.Jr. and Featherstone,R.M. (1961) Biochem.Pharmacol., 7, 88-95.
5. Emmelot,P., Bos,C.J., Benedetti,E.L. and Rumke,P.H. (1964) Biochim.Biophys.Acta, 90, 126-145.
6. Fiske,C.H. and SubbaRow,Y. (1925) J.Biol.Cem., 66, 375-400.
7. Hosie,R.J.A. (1965) Biochem.J., 96, 404-412.
8. Kurihara, T. and Takahashi,Y. (1973) J.Neurochem., 20, 719-727.
9. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem., 193, 265-275.
10. Norton,W.T. and Poduslo,S.E. (1973) J.Neurochem., 21, 749-757.
11. Schwartz,A., Bachelard,H.S. and McIlwain,H. (1962) Biochem.J., 84, 626-637.

42 幼若ラット大脳のNaI処理ミクロゾーム ($Na^+ + K^+$) 依存性ATPase：Mg^{2+}阻害，Na^+, K^+および温度による活性化へのビリルビンの効果

柏俣重夫・*後藤溍二・仙波りつ子
鈴木富士子
（愛知県コロニー，発達障害研・生化，*名大・医・産婦人）

〔要　約〕

幼若ラット大脳ミクロゾームから調製された ($Na^+ + K^+$)-ATPase（以下ATPase）および K^+-p-nitrophenylphosphatase（以下PNPPase）活性におよぼすビリルビン（以下Biln）の効果を過剰の Mg^{2+} による阻害、Na^+, K^+, および温度による活性化との関連において検討し以下の結果を得た。(1) ATPase, PNPPase 活性とも過剰の Mg^{2+} により阻害される。(Mg·ATP) および (Mg·PNPP) 複合体の結合常数から求めた遊離 Mg^{2+} に対する活性の Dixon プロットより、阻害常数 (K_i) は ATPase で 45 mM、PNPPase で 14 mM であったが、Biln の存在下では著るしく K_i は減少した。このことは Biln が遊離 Mg^{2+} に対する酵素の親和性を増し阻害をうけやすくする効果をもつことを示している。しかしATPaseの遊離ATPに対する阻害常数は変化しなかった。(2) Na^+ による ATPase のアロステリックな活性化における Hill 係数 (n) は Biln により影響され若干増加する傾向を示したが、K^+ による活性化には Biln は著明な効果をもち、そのシグモイド型飽和曲線 ($n=1.40$) はほぼ正常化された ($n=1.06$, 60 と 100 μM Biln 存在下）。PNPPase の K^+ による活性化の Hill 係数は Biln 濃度上昇に伴ない減少したが、シグモイド型飽和曲線の正常化は少くとも 60μM Biln まではみられなかった。(3) ATPase の Arrhenius プロット (10 - 40℃) は Biln によって新たに2つの屈曲点が生じ、低温側での活性化エネルギーが増加することを示した。このことは Biln と酵素活性に関与する脂質との間に相互作用が存在することを示唆している。

昨年の本学会で幼若ラット大脳の Na 工処理ミクロゾーム ($Na^+ + K^+$) 依存性 ATPase（以下 ATPase）および K^+ 依存性 p-Nitrophenylphosphatase（以下 PNPPase）活性のビリルビン（以下 Biln）による阻害機構を明らかにするために基質および Mg^{2+} に関しての反応動力学的解析を行なった結果を報告した(1)が、その後さらに解析をすすめ、過剰の遊離 Mg^{2+} による阻害、Na^+, K^+, および温度による活性化におよぼす Biln の効果を検討したので報告する。

実験材料と方法

酵素源として 13 - 23 日令、一部 5 - 6 日令の幼若ラットの大脳を用い、前報と同じ方法(1)により酵素標品の調製および活性測定を行なった。ATPase 活性に関しては一部 Martin-Doty 法の Swanson らによる変法(2)を使用した。pH測定は Hitachi-Horiba F-7ss pH メーターを用い、複合電極 (No.6028) で2点調整（標準リン酸およびホウ酸緩衝液使用）して行なった。(Mg·ATP) 複合体の結合常数は Watanabe らの求めた値 40,000 M^{-1}(3) を Burton (4) および O'Sullivan と Perrin (5) に従ってイオン強度、温度、pH、$Na{\cdot}ATP^{3-}$、$K{\cdot}ATP^{3-}$ などに関して補正した値 15,000 M^{-1} を使用した。(Mg·PNPP) 複合体の場合は Robinson の報告した 170 M^{-1} (6) を用いた。活性表示は前報(1)に従い、Biln 溶液の調製も前報(1)通りで使用直前に調製し遮光して氷中に保存し1時間以内に使用した。なお本文中の $(\ )_F$, $(\ )_C$, $(\ )_T$ はおのおの（）内物質の反応混合液中の、遊離イオン、複合体、全体の濃度を示すものとした。

実験結果と考察

$(Mg^{2+})_F$ による活性阻害におよぼす Biln の効果——前報(1)で ATPase、PNPPase 両活性とも過剰

の Mg^{2+} により阻害されること、また ATPase 活性の至適 $(Mg)_T/(ATP)_T$ モル濃度比は之前後の値から Bilm 存在下では 1 に近ずくことをしめした。この点を更に詳しく解析してみた。

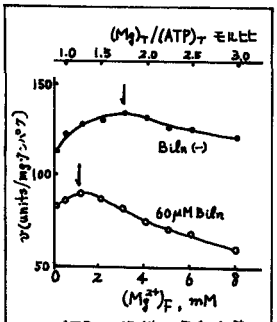


図1. ATPase 活性の遊離 $(Mg^{2+})_F$ による阻害におよぼす Biln の効果。$MgCl_2$ 濃度以外は標準条件(1)

図1は $(Mg\cdot ATP)_C$ の結合常数 $15{,}000\,M^{-1}$ を使って求めた $(Mg^{2+})_F$ に対して ATPase 活性を Bilm 存在非存在下で調べたものである。前報通り至適 $(Mg)_T/(ATP)_T$ モル比は対照の 1.75 から 60μM Bilm 存在下で 1.25 と 1 に近ずいたが、この理由を明らかにするため $(Mg^{2+})_F$ に対する阻害常数を kinetical に求めた。図2aと2bに異なる2つの $(ATP)_T$ 濃度を用いて $(Mg^{2+})_F$ に対する Dixon プロットを Bilm 0 と 100μM で行なった結果を示す。共に横軸上の一点で交叉する単純な非競争型阻害であった。PNPPase での実験結果および ATPase の $(ATP)_F$ 阻害におよぼす Bilm の効果も合せて表1にまとめた。ATPase の $(Mg^{2+})_F$ および $(ATP)_F$ による阻害常数と阻害形式は Robinson の報告によく一致する(7)。表1にみられるように Bilm は両反応とも $(Mg^{2+})_F$ に対する K_i を減少させる効果を示す。つまり遊離の $(Mg^{2+})_F$ の酵素への親和性は Bilm により著るしく高まることが明らかになった。これに反して $(ATP)_F$ に対する阻害常数は Bilm により殆んど影響されないことが示された。

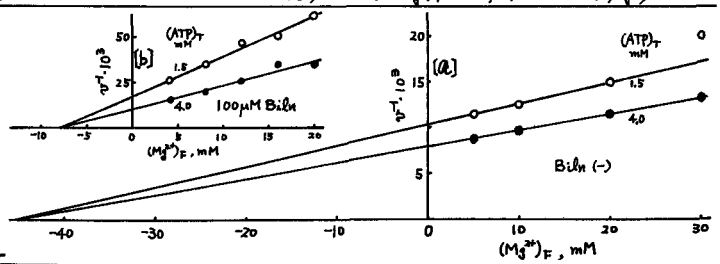


図2. ATPase 活性の $(Mg^{2+})_F$ による阻害。Dixon プロット。ATP, $MgCl_2$ 濃度以外は標準条件(1)。[a], Biln 非存在下；[b], 100μM Biln 存在下。

表1. ATPase および PNPPase における遊離の $(Mg^{2+})_F$, $(ATP)_F$ の阻害常数と阻害形式

反応	Biln 濃度 (μM)	K_{iapp} $(Mg^{2+})_F$ (mM)	K_{iapp} $(ATP)_F$ (mM)	阻害形式 (基質に対して)
PNPPase	0	14		非競争型
	20	6.4		
	60	2.5		
ATPase	0	4.5		非競争型
	60	11		
	100	7.9		
ATPase	0		5.2	競争型
	100		4.9	

Na^+, K^+ による活性化におよぼす Bilm の効果——K^+ 濃度を一定(20mM)にした時 Na^+ による ATPase の活性化におよぼす Bilm の効果を図3に示した。Allosteric な Na^+ による活性化で Bilm は Na^+ 結合部位間の相互作用を増強させる傾向を示した。このことは Hill 係数(n)が対照の 1.58 から Bilm を 60, 100μM と増加させると 1.89, 2.02 (図3では省略) と増えることから知ることが出来る。これに対して K^+ による活性化に与える Bilm の効果は著るしかった。よく知られているように K^+ 活性化は Na^+ 同様 Allosteric であり、図4に示す逆数プロットは上に凹の曲線となる。この Hill プロット(挿入図)は $n=1.40$, $S_{0.5}=1$mM を与えた。Bilm の反応液への添加は K^+ の Sigmoid 型飽和曲線(省略)を殆んど正常化させ双曲線型曲線に変化させたが、これは逆数プロットおよび Hill プロットから知ることが出来る。後者から $n=1.06$, $S_{0.5}=2.2$mM が得られた。なほ 100μM Bilm の時の n は 60μM の時と変らず 1.06、$S_{0.5}$ は 2.6mM であった。逆数プロットは縦軸上の一点に収斂し見掛け上 K^+ に対して競争型阻害を示した。HeLa 細胞などの Na ポンプ部位での Ouabain の結合や、ラット脳ミクロゾーム ATPase の Ouabain 阻害が K^+ と競争する形で起る(8,9)ことを考えると

Bilnの作用との類似性がうかがえて興味深い。

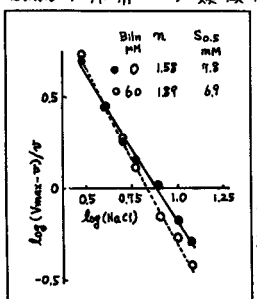


図3. ATPaseのNa^+活性化におよぼすBilnの効果。$(ATP)_T$ 4mM, $(Mg)_T$ 4mM, NaCl以外は標準条件(1)。

PNPPaseのK^+による活性化におよぼすBilnの効果は表2に示した。PNPPaseの場合もK^+はAllostericな活性化を起し、nは1.74であったが、Bilnの添加はATPaseの場合のようには顕著な影響を与えなかった。しかしBilnの濃度増加は明らかにK^+部位相互間の作用を弱める傾向を示した。ATPaseとPNPPaseとのこの違いは何に起因するか現在の所不明であるが、Na^+とK^+間の相互作用、基質やMg濃度の影響など(6,10)が考えられるのでその背景は可成り複雑であると思われる。

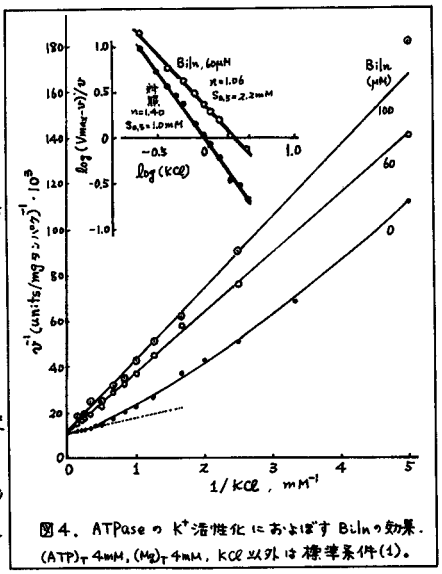


図4. ATPaseのK^+活性化におよぼすBilnの効果。$(ATP)_T$ 4mM, $(Mg)_T$ 4mM, kCl以外は標準条件(1)。

表2. PNPPaseのK^+活性化パラメーターにおよぼすBilnの効果〔kCl濃度以外は標準条件(1)〕

Biln (μM)	Hill係数 (n)	$S_{0.5}$ (mM)
0	1.74	3.8
20	1.51	4.7
60	1.46	5.1

温度による活性化におよぼすBilnの効果——ATPase活性に果たす酸性リン脂質の役割は温度による活性化の研究を通じてよく解析されている(11-14)。一方脂溶性であるBilnの脂質との相互作用はBilnの細胞毒性を理解する上で重要であることが示唆されている(15)。そこでBiln存在下でATPaseの温度による活性化を調べた。本実験に使用されたTris-Cl緩衝液のpHは温度により変動することは日常経験する所であり、従って温度によるpH、更に活性の補正を行わなければ結果の正確さは期し難い。図5に実験に使用した反応混合液のpHと温度との関係を示した。10°→40°Cの温度変化は0.87 pH単位(8.71→7.81)の減少を生じた。こうしたpHの温度による変動は当然酵素活性に影響すると考えられるので一定温度で調製された5種類のTris-Cl緩衝液を含む反応混合液を用いてpH活性曲線を作製したのが図6である。至適pHは温度によりやや異なるが、至適pHよりアルカリ側での活性の減少は特定温度条件下の狭いpH範囲内(約0.7 pH単位)で直線的であることが判った。そこで10°-40°Cの温度範囲で直線関係内に入いると見做されるpH 8.20を補正の基準点としその比活性を100%とした時の各測定温度における相対比活性として図6の実線部分を再プロットすると図7に示すように各点はほぼ同一直線上にのる。これにより実測活性値をpH 8.20における活性値に補正することが可能であり、Arrhenius プロットをしたのが

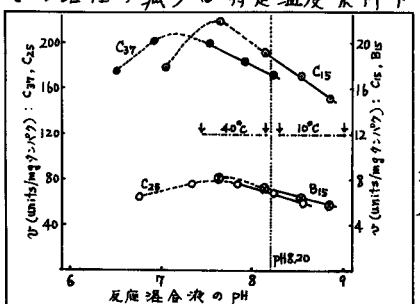


図6. ATPaseのpH活性曲線。C_{37}, C_{25}, C_{15}はBiln非存在下でおのおの37°, 25°, 15°Cで、B_{15}は120 μM Biln存在下で15°Cで測定したもの。矢印は40°, 10°Cにおける直線範囲。

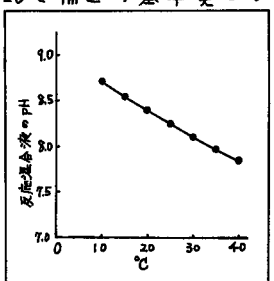


図5. 反応混合液pHの温度による変化

図8である。図には5-6日令ラット大脳よりの標品についてのプロット(図6,7と同様に処理)も含めた。13-23日令標品と5-6日令のを比べると、後者の比活性は低いがほぼ同じ活性化パターンを示し、25°-26°C附近に屈曲点がみられる。後者の活性化エネルギーは高温側で前者と大体等しく低温側では若干低い程度であった。ATPaseでの屈曲点の出現には酸性リン脂質が関与し(11)、またTanakaとTeruyaが明らかに示したように屈曲点の温度、活性化エネルギーはリン脂質を構成する脂肪酸鎖の種類に依存して酵素源(酵素タンパクの由来)には無関係である。従って異なる日令の幼若ラット大脳から調製されたATPase標品には活性に関与する脂質環境の質的な違いは多分ないだろうと想像される。Bilnは温度による活性化パターンを明らかに変化させた。Bilu非存在下にみられた屈曲点は消滅し、新たに2つの屈曲点の出現をみた。活性化エネルギーは高温側では殆んど変化せず、低温側になるとBilu濃度に依存して増加する傾向を示した。屈曲点を境として脂質の相転移が生ずる(13)から、Bilnによる新たな屈曲点の出現はBilnの膜脂質との結合により相転移温度が変化したことを示すものと考えられ、従って脂質とBilnの相互作用を介して膜の流動性や酵素タンパクのConformation(14)に変化が生ずるであろうことを示唆している。既述した過剰の$(Mg^{2+})_f$による阻害のBilnによる増強も脂質との相互作用を背景に検討する必要もあろうと思われる。Mg^{2+}はリン脂質の相転移に影響すると報告されている(11)。

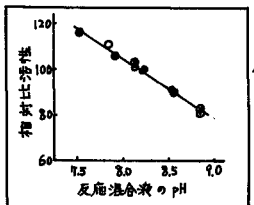


図7. pH 8.20のATPase比活性を100%とした時の相対比活性(図6実線部分の再プロット)

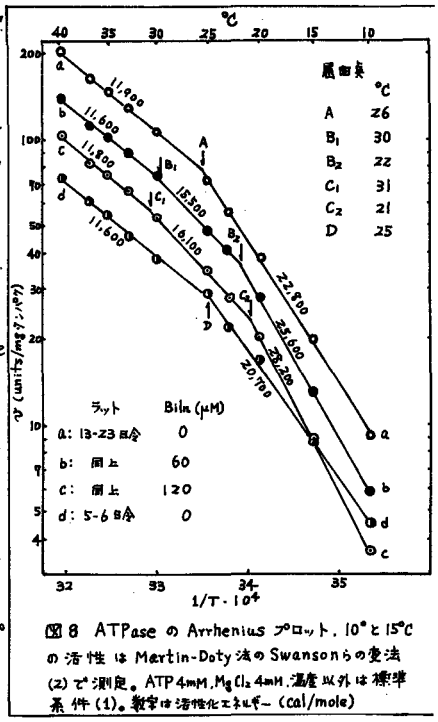


図8 ATPaseのArrheniusプロット。10°と15°Cの活性はMartin-Doty法のSwansonらの変法(2)で測定。ATP 4mM, $MgCl_2$ 4mM, 温度以外は標準系件(1)。数字は活性化エネルギー(cal/mole)

文献

1. 柏俣重夫, 後藤清二, 柚須りつ子, 井利富士子 (1976) 神経化学, 15, 4-7
2. Swanson, P.D., Bradford, H.F., and McIlwain, H. (1964) Biochem. J., 92, 235-247
3. Watanabe, S., Troper, T., Lynn, M., and Evenson, L. (1963) J. Biochem., 54, 17-24
4. Burton, K. (1959) Biochem. J., 71, 388-395
5. O'Sullivan, W.J., and Perrin, D.D. (1964) Biochemistry, 3, 18-26
6. Robinson, J.D. (1969) Biochemistry, 8, 3348-3355
7. Robinson, J.D. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 341, 232-247
8. Baker, P.F., and Willis, J.S. (1970) Nature, 226, 521-523
9. Akera, T., and Brody, T.M. (1969) Mol. Pharmacol., 5, 605-641
10. Robinson, J.D. (1967) Biochemistry, 6, 3250-3258
11. Kimelberg, H.K., and Papahadjopoulos, D. (1974) J. Biol. Chem., 249, 1071-1080
12. Tanaka, R., and Teruya, A. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 323, 584-591
13. Grisham, C.M., and Barnett, R.E. (1973) Biochemistry, 12, 2635-2637
14. Charnock, J.S., Dotty, D.M., and Russel, J.C. (1971) Arch. Biochem. Biophys., 142, 633-637
15. Mustafa, M.G., and King, T.E. (1970) J. Biol. Chem., 249, 1071-1080

43 Tay-Sachs脳のガングリオシド組成
—— 特にGD_2およびN-アセチルガラクトサミニルGD1aガングリオシドについて ——

岩森正男・永井克孝　　(都老人研)

〔要　約〕

先に我々が報告した全ガングリオシドスペクトルを分析するガングリオシドマッピング法をTay-Sachs脳中のガングリオシド組成を分析する手段として用いたところ，GM2のほか，GM1, GD3, GD2, GD1a ; GD1a-GAN, GD1b, GT1がそれぞれ検出された。正常脳中では極めて少量成分であるGD2, GD1a-GANガングリオシドは化学分析および酵素処理により，その構造を確認した。Tay-Sachs脳中においても代表的な脳ガングリオシドGM1, GD1a, GD1b, GT1の相対的量比は正常脳のそれとほぼ同一であり，末端にN-アセチル-β-D-ヘキソサミンを含有するGM2, GD2, GD1a-GANがGD1a含量との比較において増大していることが観察された。おそらく，GM2ヘキソサミニダーゼがGD2, GD1a-GANをも触媒するのであろう。ちなみに，サザエヘキソサミニダーゼはGM2, GD2 GD1a-GANをほぼ同一の比活性(40～45 picomole/mg protein/hr)とKm(3.2～3.7)で分解する。Tay-Sachs脳より単離した個々のガングリオシドの脂肪酸成分は正常脳のそれと変わらないが，長鎖塩基成分を調べると，C-20 sphingosine含量が正常脳に比べ，いずれもやや低い値を示した。また，C-20 sphingosineとC-18 sphingosineの量比をとってみると，正常脳ではGM2<GM1<GD1a<GD1a-GAN<GD1b<GT1であり，この関係はTay-Sachs脳中でも観察された。しかし，GD2, GD3の長鎖塩基はほとんどがC-18 sphingosineで占められていた。

ガングリオシドの精製，構造解析，機能分析の指標として非常に有効なガングリオシドマッピング法を報告し[2]，動物種間，組織間のガングリオシドスペクトルを検索する目的に用いているが，今回，Tay-Sachs病脳中のガングリオシド分析にも応用した。Tay-Sachs病中に欠損しているヘキソサミニダーゼAはGM2ガングリオシドを触媒することが^3HラベルしたGM2を用いて証明されている[5,9]。また，ヘキソサミニダーゼAおよびBが共に欠損しているSandhoff病にはGM2のほかグロボシドの蓄積も観察され[8]，末端ヘキソサミンとガラクトースの間の結合様式を認識する酵素の存在が予測されている。しかし，Aが欠損していてもGM2ヘキソサミニダーゼ活性が検出されたり[6]，逆にGM2ヘキソサミニダーゼが欠損しているにもかかわらずヘキソサミニダーゼAが存在したりする患者も発見されていて[7]，酵素の基質特異性に関しては不明の点が非常に多い。ヘキソサミニダーゼの基質特異性を理解する上にも，また，ガングリオシドの代謝経路を把握する上にも，遺伝性代謝異常病患者の個々の成分を詳細に検索することが重要であろうと思われる。

＜実験方法＞

実験材料：正常脳(3才，5才)は東大医学部山川先生より供与していただいた。

ガングリオシドの抽出：脳を冷アセトン中でホモジナイズし，Acetone-dried powderとした後，45°Cでクロロホルム-メタノール(C-M)-水 20:10:1, C-M 1:1, C-M 1:2で抽出し，Folchの方法[1]でガングリオシドを上層に回収した。上層は濃縮後，凍結乾燥しUpper phase solidsとした。

ガングリオシドマッピング：DEAE-セファロースの特性を応用した本方法は既報の方

法で[2]酢酸アンモニウムの濃度勾配を用いて行った。

定量分析：シアル酸はレゾルシノール法，又はD-マンニトールを内部標準として用いGLCで定量した。内部標準に対するシアル酸の1モル当りのResponseは1.112±0.008であった。ステアリン酸はC-19酸を内部標準としてGLCで定量した。(Response 1.037±0.001)

個々のガングリオシドへのシアル酸の分布はTLC上諸種溶媒系でガングリオシドを展開後，レゾルシノール試薬を噴霧し，120℃，15分間加熱発色後，島津クロマトスキャナーを用い測定した。対照光路は700 nm，試料光路は570 nmであった。

ガングリオシドの単離：DEAE-セファロースとケイ酸(Iatrobeads, Silica gel 60)カラムを繰り返し用い精製した。その純度は次のような展開溶媒を用いTLCで調べた。C-M-2.5 N-アンモニア 60:40:9，C-M-水 65:35:8，n-プロパノール-水 7:3，C-M-0.25% KCl 60:35:8，ブタノール-ピリジン-0.55% KCl 6:3:2。

ガングリオシドの構造：構成糖は1Nメタノール性塩酸100℃，3時間Methanolysis後，メチル化糖をTMS誘導体としてGLC(3% OV-1)で100℃から240℃まで3℃/分で昇温分析した。代表的なガングリオシドは上記展開溶媒を用い，標準品とTLC上でRf値を比較した。また，正常脳中では微量成分であるGD2，GD1a-GANはアルジトールアセテートとしてGLC-MSを用い，さらには酵素処理(N-アセチルヘキソサミニダーゼおよびイラミニダーゼ)を行ってTLCで検索した。酵素を作用させる際にはタウロコール酸を界面活性剤として用い(1mg/ml)，サザエから調製されたN-acetyl-β-D-hexosaminidase(生化学工業)およびV. choleraeのNeuraminidase (Calbiochem.)をpH4.2およびpH6.5でそれぞれ作用させた。

脂肪酸および長鎖塩基成分：試料を1Nメタノール性塩酸中，100℃，3時間加熱後，生成した脂肪酸メチルエステルをヘキサンで抽出し，3% OV-1またはDEGSカラムを用いてGLCで分析した。一方，長鎖塩基は試料をメタノール-塩酸-水82:8.6:9.4中[4]，70℃，18時間分解後，氷水中1N NaOH添加でpH12に調整し，エーテルで抽出した。エーテル抽出物はSilica gel 60カラムで分画し，脂肪酸を除去した後，長鎖塩基をC-M 1:1，C-M 1:4で回収した。TLC上単一の長鎖塩基はさらに四酢酸鉛を用いてアルデヒド[3]に変えGLC-MSで分析した。

<結果および考察>

ガングリオシドの回収およびガングリオシドマッピング：表1に示すように，Folch法によるガングリオシドのupper phaseへの回収は正常脳で湿重量当り2.3-2.5 nanomoleシアル酸であるのに対し，Tay-Sachs脳では2.97 nanomoleであり，やや高い値を示した。正常脳Lower phaseを検索すると電荷が低く，極性の小さなGT1, GM3, GM2が一部混在しており，Tay-Sachs脳中の主なガングリオシドがGM2である点を考慮すれば，ガングリオシド結合性シアル酸量は正常脳よりかなり高い値を示すと思われる。正常脳(3才)およびTay-Sachs脳より得たupper phase solidsの215mgおよび234mgをDEAE-セファロースカラムで分画した時のシアル酸の溶出曲線を図1に示した。各ピー

表1. ガングリオシドの回収

	Normal		Tay-Sachs
Age at death (years)	2.6	5.0	2.4
Acetone-dried powder (mg/g wet tissue)	163.44	176.45	180.60
Upper phase solid (mg/g wet tissue)	2.19	2.00	2.31
NANA (ug/mg upper phase solid)	337.50	340.98	380.12

図1. DEAE-セファロースカラムからのシアル酸溶出曲線

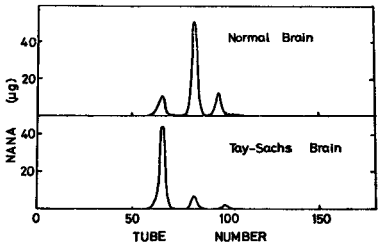


表2. DEAE-セファロースカラムで分画後、各ピークへのシアル酸の分布(%およびモル比)と、ステアリン酸に対するモル比.

Fraction	NeuNAc / Stearic acid		NeuNAc distribution (%)		Molar ratio	
	N	TS	N	TS	N	TS
Monosialo-	1.01	1.05	15.51	85.71	0.46	15.30
Disialo-	1.98	2.06	67.41	11.12	1.00	1.00
Trisialo-	2.86	2.98	15.07	2.19	0.15	0.13
Tetrasialo-	3.89	-	0.87	-	0.01	-
Others	-	-	1.14	0.97	-	-

クの定量値を調べた表2と比較すると、それぞれのピークがモノ-、ジ-、トリシアロガングリオシドより構成されていることがわかる。Tay-Sachs脳では86%のシアル酸がモノシアロガングリオシド画分に分布している。ガングリオシドマッピングパターンを調べると、Tay-Sachs脳ではGM2が主な成分であることを示し、その他にもGM3, GM1, GD3 GD2、GD1a-GAN, GD1b、GT1および未知成分一種が検出された。

ガングリオシドの構造：それぞれのガングリオシドをDEAE-セファロースとケイ酸カラムを繰り返し用いて精製した。GD2は正常脳には極めて少なく単離できなかった。また、Tay-Sachs脳においてはGD3は少量成分であり単離することができなかった。Tay-Sachs脳より単離したガングリオシドの構成糖を表3に示す。GM2, GM1, GD1a, GD1b, GT1は構成糖からも、また、TLC上での標準試料との比較からもその構造が確認された。一方、GD2, GD1a-GANからは、タウロコール酸存在下、ヘキソサミニダーゼ処理によりGD3, GD1aが生成される点およびノイラミニダーゼ処理により、GD2からはGM2が、またGD1a-GANはノイラミニダーゼ処理を受けないが、あらかじめヘキソサミニダーゼ処理を行った後、ノイラミニダーゼの作用によりGM1を生成する点、およびアルジトールアセテートとしての分析結果からGD2; Ceramide-Glc-Gal(NANA-NANA)-GalNAc, GD1a-GAN; Ceramide-Glc-Gal(NANA)-GalNAc-Gal(NANA)-GalNAcと決定された。表4にも示すように、サザエヘキソサミニダーゼの作用は比活性、Kmともに酸性のGM2, GD2, GD1a-GANに対して等価であり、中性糖脂質のアシアロGM2とは異っていた。おそらくシアル酸の有無が基質と酵素の活性部位の親和性に大きく影響しているものと思われる。

表3 Tay-Sachs脳より単離したガングリオシド構成糖

Ganglioside	Glucose	Galactose	N-acetylgalactosamine	NeuNAc
GM2	1.00	0.94	0.90	1.08
GD2	1.00	0.99	0.92	2.11
GM1	1.00	2.03	0.91	2.10
GD1a	1.00	2.00	0.90	2.10
GD1a-GAN	1.00	2.01	1.96	2.09
GD1b	1.00	2.01	0.89	2.10
GT1	1.00	2.01	0.90	3.07

表4. サザエヘキソサミニダーゼの比活性とKm

Ganglioside	Specific activity (pmole/mg protein/hr)	Km (uM)
GD2	43.8	3.2
GM2	45.2	3.4
GD1a-GAN	40.6	3.7
asialoGM2	314.8	25.4

ガングリオシドの含量：一次元TLCでupper phase solidsを観察すれば、Tay-Sachs中にはGM2が高純度に存在し、他のガングリオシドは濃度を高くしない限り検出できない程である。図2はTay-Sachs脳モノシアロガングリオ画分のクロマトスキャナーによるパターンであるが、ほとんどがGM2で占められている。またGM3, GM1も検出するこ

図2. モノシアロガングリオシド画分

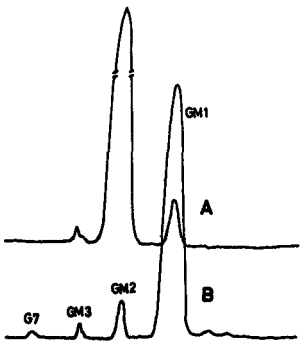


図3 ジシアロガングリオシド画分

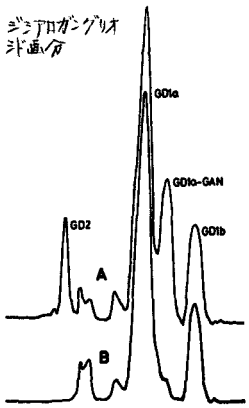


表5. GD1aと比較したガングリオシド成分のモル比

Ganglioside	Normal brain	Tay-Sachs brain
G7	0.63	0.01
GM3	1.02	1.5
GM2	2.51	3508.6
GM1	85.2	90.6
GD3	0.9	0.6
GD2	0.1	13.3
GD1a	100.0	100.0
GD1a-GAN	2.8	40.9
GD1b	29.4	27.6
GT1	20.7	23.4

とができる。しかし、TLCへの添加量をいくら上げてもG7ガングリオシドは検出されない。G7はミエリン局在性が示されているが、Tay-Sachs脳のミエリン脱落を反映していると思われる。図3はジシアロガングリオシド画分である。正常脳とは、そのパターンが非常に異っている。Tay-Sachs脳中では、GM2があまりに多いので、クロマトスキャナーにより求めた定量値をGD1a含量と比較してみたのが表5である。代表的ガングリオシドGM1, GD1a, GD1b, GT1の量比は両者でほぼ同一の値を示し、GD2, GD1a-GANの増量が明らかになった。末端にN-アセチルヘキソサミンを持ったGM2, GD2, GD1a-GANはおそらく同一の酵素により触媒されるものと想像される。また、ガングリオシド分子種の代謝回転の違いがGM2の圧倒的増量を導き、GD2, GD1a-GANについては急激な増量を導かないと想像される。

表6. ガングリオシドの長鎖塩基成分

Aldehyde	Parent base	GM2 N	GM2 TS	GD2 TS	GD3 N	GM1 N	GM1 TS	GD1a N	GD1a TS	GD1a-GAN N	GD1a-GAN TS	GD1b N	GD1b TS	GT1 N	GT1 TS
14:0	16:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
14:1	16:1	0.6	0.5	0.4	0.5	0.7	0.6	0.4	0.6	0.5	0.6	0.7	0.4	0.6	0.7
15:0	17:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
15:1	17:1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2
16:0	18:0	3.0	2.7	3.2	3.3	2.9	2.5	1.7	3.2	2.8	3.1	2.5	2.3	2.3	2.1
16:1	18:1	80.5	91.2	95.3	94.6	66.0	77.6	39.0	61.3	36.5	50.8	31.4	38.8	29.7	41.7
17:0	19:0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
17:1	19:1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1
18:0	20:0	0.6	0.4	0.1	0.1	0.7	0.3	0.4	0.3	0.5	0.5	0.7	0.6	0.6	0.4
18:1	20:1	14.4	4.6	0.7	1.0	28.7	18.2	57.8	35.0	60.8	44.2	62.9	56.4	66.1	54.5
Ratio of 20:1/18:1		0.18	0.05	0.01	0.01	0.43	0.23	1.48	0.57	1.67	0.87	2.00	1.45	2.23	1.31

脂肪酸および長鎖塩基成分：正常およびTay-Sachs脳とそれに構成脂肪酸はほとんど同一であった。たとえば、Tay-Sachs脳GD1aではパルミチン酸3.5%, ステアリン酸84.5%, オレフィン酸8.7%, ベヘニン酸1.2%であった。長鎖塩基は表6に示すように、いずれのガングリオシドにおいても、90%かC18 sphingosineとC-20 sphingosineで占められ、正常脳ではC-20/C-18比がGM2<GM1<GD1a<GD1a-GAN<GD1b<GT1の順に増大している。同様の関係はTay-Sachs脳においてもみられるが、全体にC-20 sphingosine含量は少ない値を示した。GD3, GD2ガングリオシドはほとんどがC-18 sphingosineであり上記関係にあてはまらないことが示された。

<文献>

1. Folch J., Lees M & Sloane-Stanley GH, 1957 J.Biol. Chem., 226, 497
2. 岩森正男, 永井克孝, 1977 脂質生化学研究 19, 257
3. Karlsson KA & Martensson E 1968 Biochim.Biophys. Acta, 152, 230
4. Karlsson KA 1970 Lipids, 5, 878
5. Kolodny EH, Brady RO & Volk BW 1969 Biochem. Biophys.Res.Commun., 37, 526
6. Navon R., Padeh B & Adam A 1973 Am.J.Human Genet. 25, 287
7. Sandhoff K.,Harzer K. Wasslew W & Jatzkewitz H 1971 J.Neurochem. 18, 2469
8. Snyder PD, Krivit W. & Sweeley CC 1972 J.Lipid Res. 13, 128
9. Tallman JF & Brady RO 1972 J.Clin.Lab.Invest. 51,2333

44 亜急性海綿脳症に見られた脳ガングリオシドの長鎖塩基組成の異常
——Creutzfeldt-Jakob 型と Heidenhain 型について ——

玉井洋一(北里大・医・生化), 大谷義夫・三浦貞則(北里大・医・精神)
成田洋夫 (国立東二・精神)
岩田 毅・貝谷壽宣・難波益之(岐阜大・医・神経精神)

〔要 約〕
亜急性海綿脳症の中の Creutzfeldt－Jakob 型（以下Ｃ－Ｊ）と Heidenhain 型の患者大脳からガングリオシドを抽出し，その長鎖塩基組成について詳細な検索を行つた。Ｃ－Ｊ脳の総ガングリオシド量は湿重量当り 10.7 μg NANA／100 mg（灰白質），3.2 μg（白質）で対照老人脳の５～６分の１に減少していた。ガングリオシドパターンには大きな変化は観察されなかつたが，長鎖塩基組成の分析でＣ20スフインゴシンが著しく減少していることが明らかにされた。Ｃ20／Ｃ18 比は対照老人脳の 0.84（Ｎ－acetyl 化法），1.32（アルデヒド化法）に対し，Ｃ－Ｊ脳灰白質 0.06～0.13，同白質 0.11～0.17，Heidenhain 脳前頭葉 0.71，後頭葉 0.48～0.60（いずれも灰白質）であつた。GM1，GD1a，GD1b，GT1のいずれにおいてもＣ－Ｊ脳灰白質のＣ20／Ｃ18 比は 0.2～0.3 の範囲内にあり，Ｃ20スフインゴシンの減少は各ガングリオシドに共通して起つていることがわかつた。成人脳におけるガングリオシド長鎖塩基組成の変化は家族性黒内障性白痴以外には類例のない知見である。以上の実験結果からガングリオシドと本疾患の病因，病態につき若干の考察を行つた。

亜急性海綿脳症は Gajdusek らの研究(4,5)によりその病因は slow virus infection であるとの考えが確立したかに見える。とくに virus の活性発現と細胞膜との関係が示唆され(7)，電子顕微鏡的にも神経細胞膜の変化が観察されている(3,7)にもかかわらず，感染 agent の本態は云うまでもなく，本疾患の中枢神経組織における生化学知見は皆無に近い状態である。演者らは先にＣ－Ｊ脳灰白質，白質にコレステロールエステルが蓄積することを報告し(10)，また２例のＣ－Ｊ脳でガングリオシドの著減に加え，Ｃ20スフインゴシンが低下していることを観察した(11)が，今回別のＣ－Ｊ例および亜急性海綿脳症の一型と考えられる Heidenhain 例について，脳ガングリオシド組成について，詳細な検索を行つた結果，Ｃ20スフインゴシンの減少は本疾患群に共通する生化学的知見であることを観察し，この生化学的知見と神経病理学的知見との関連性，Ｃ－Ｊ型と Heidenhain 型との関係，更に virus infection としての病因論をガングリオシド組成の変化から考察することを試みた。

実験材料と方法

〔実験材料〕

○岐阜Ｃ－Ｊ例　59才女性。58才の時不眠，易疲労感等の神経衰弱様症状で発症，以後痴呆症状，歩行障害も出現，８ケ月後には失外套症候群の状態となり全身衰弱により死亡。全経過は約１年４ケ月。脳重量825 g。神経病理所見としては皮質の高度の萎縮，皮質，白質ともにアストログリアの増生が著明で，神経細胞の脱落は部位により差はあるが平均して中程度。試料は剖検後２％ Glutaraldehyde，４％ Paraform in 0.1M phosphate buffer に４℃，７時間保存した後，一晩水洗して分析まで冷凍保存した。

○ Heidenhain 例　48才女性。性格変化，変形視，錯視を初発症状とし，以後精神運動興奮，ミオクローヌス，筋強剛，意識障害も加わり，呼吸器感染で死亡。全経過は6ケ月半。脳重量1370g，大脳，小脳全般に亘り海綿状態，アストログリアの増生，神経細胞の萎縮および脱落が見られるが特に後頭葉，基底核はこれらの所見が顕著である。試料は分析まで約1年間ホルマリン固定で保存されていた。（本例の神経病理所見は第16回日本神経病理学会，1975年，で報告されている）。対照として用いた老人脳は神経症状を有しない患者の剖検により得られた凍結保存脳である。

〔分析方法〕

○ ガングリオシド画分の調製　脳湿重量の20倍量のクロロホルム－メタノール(C－M)(2：1)，(1：1)および(1：2)混液で総脂質を抽出し，抽出液は一度乾固した後C－M(2：1)に可溶なものについてFolch分配を2度行つた。得られた上層画分にはかなりの下層脂質成分の混在が見られたので，Kawamuraらの方法[6]に従い，Kiesel gel G－Kiesel guhr G(1：1)の小カラムで総ガングリオシドを精製した。本法はガングリオシドを精製する手段として極めて有効であることを確認したが，溶出速度が遅いという欠点がある。演者らは前記の吸着剤の代りにイヤトロビーズを用い，前法と同一組成の溶媒でガングリオシドを他脂質と明瞭にかつ速やかに分離し得た。溶媒組成，回収率等については現在検討中である。

ガングリオシド各画分は調製用TLC(precoated Kiesel gel G，C－M－0.25％$CaCl_2$(120：74：16)で展開)を行い，C－M－W(60：40：9)で4回抽出して得た。Lipid－NANAの定量はチオバルビツール酸法[12]に依つた。

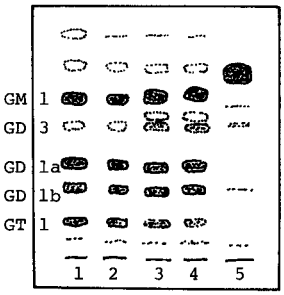
○ ガングリオシド長鎖塩基組成の分析　ガングリオシドは水性メタノール塩酸(濃塩酸1.6 ml，CH_3OH 8.0 ml，水0.4 ml)で85℃，3時間水解し，得られたスフインゴシンはCarter and Gaver法[2]でN－acetyl－O－TMS誘導体としてGLC分析(4％OV－1 on Celite 545，1.5 mガラスカラム，235℃)すると共に，Sweeley and Moscatelli法[9]でスフインゴシンをアルデヒドとしてからGLC分析(15％EGS on Celite 545，190℃)を行つた。

実験結果

表1に総ガングリオシド値を示す。岐阜C－J例灰白質では既報の症例と同様，NANA量として対照の6分の1に減少し，白質においても著明な減少が認められた。これは神経細胞の萎縮，脱落を反映するものであり，他の研究室からの報告[18]とも合せC－J脳に共通する事実であることを確認した。ガングリオシドのパターン(図1)は症例により軽度の相違があるようである。演者らは既に定性的にGD_3相当画分の増加とGDIb又はGT_1の減少傾向のあるもの2例を観察しているが[11]，本実験ではEF412例に同様の傾向があつた。一方岐阜例ではGD_3画分が二つのバンドに分れる傾向を示した他は，定量的にも対照脳に近い分布を示した(表2)。

総ガングリオシドの長鎖塩基組成のGLCパターンが図2に，C20/C18比が表3に示されている。N－acetyl－O－TMS誘導体として分析した場合，老人脳ではC20/C18比は1よりやや低い値を示すが，岐阜例では灰白質，白質ともに対照の10分の1に近い値であつた。Heidenhain型では病変の軽い前頭葉で比較的対照に近く，病変の強度な後頭葉では対照のほぼ2分の1であつた。スフインゴシンを過ヨード酸ソーダでアルデヒド化して分析した結果でも同じ結果が得られた。また一般にアセチル化法ではアル

Fig. 1 TLC of brain ganglioside



1, Old patient's gray matter. 2, EF412 gray matter. 3, Gifu gray matter. 4, Gifu white matter. 5, GM2 from Tay-Sachs' brain.
Precoated Kiesel gel G, $CHCl_3$-CH_3OH-0.25%$CaCl_2$(60-35-8)

Table 1
Ganglioside content in brains*

	Gray m.	White m.
Old patient	67.0	18.0
Gifu case	10.7	3.2
C-J 1**	10.0	8.0
2**	12.0	13.0

*μgNANA/100 mg wet wt.
**Tamai et al.(11)

デヒド化法に比しC20スフインゴシンが低いことも観察されたので以下の実験はアルデヒド化法によつて行つた。個々のガングリオシドにおける長鎖塩基の分布が図3，表4に示されている。C－J脳におけるC20スフインゴシンの減少は各画分に等しく観察され，特定のガングリオシド種による変化でないことが明らかになつた。

Table 2 Ganglioside composition in patients' gray matter

	Old patient	Gifu case
GM3	1.0	5.4
GM2	3.1	2.9
GM1	24.2	19.7
GD1a(+GD3)	38.4	30.1
GD1b	15.0	19.0
GT1(+GQ)	19.3	22.8

Values are expressed as NANA%.

考　　察

神経細胞表面に特に高濃度に分布しているガングリオシドについては，神経細胞機能との関係が早くから示唆されている。ガングリオシド長鎖塩基組成はC20スフインゴシンを含む点で複雑であり，C20/C18比が加令と共に変化することや家族性黒内障性白痴ではこの比の低下が発症と関係があることはよく知られている（例えば文献6）。亜急性海綿脳症は初老期に発症し，数ケ月から1～2年の経過で死に至る疾患で，いわゆる先天性の脂質代謝異常症とは病因，病態とも全く異なる範疇に属するものであ

Table 3
The ratio of C20 to C18 of long chain bases in gangliosides from brains of old patient, C-J and Heidenhain cases.

	N-acetyl-O-TMS	Aldehyde
Old patient, gray	0.84	1.32
Gifu case, gray	0.06	0.13
white	0.11	0.17
Heidenhain		
frontal, gray	0.71	-
occipital, gray	0.48	0.60
C-J 1, gray*	0.04	-
C-J 2, gray*	0.23	-

*Tamai et al.(11)

Fig.2 GLC of N-acetyl-O-TMS derivatives of ganglioside long chain bases

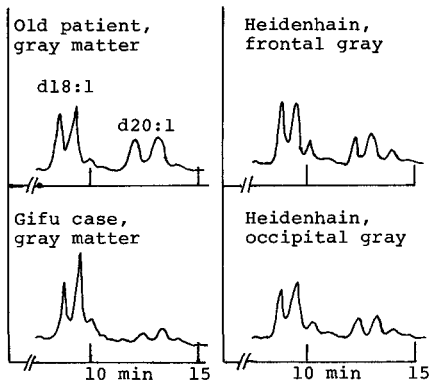


Fig.3 GLC of long chain bases in individual gangliosides from the C-J brain

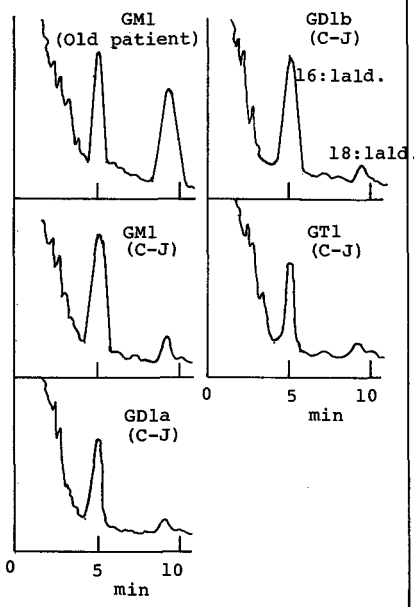


Table 4 C20/C18 ratio of long chain bases in individual gangliosides from old and C-J patients' brains

	GM1	GD1a	GD1b	GT1
Old patient	1.5	2.3	2.0	-
Gifu case	0.29	0.19	0.22	0.19

るにもかかわらず，長鎖塩基組成の異常が共通する生化学的所見として明らかにされたことは本疾患の病因ならびに病態を解明する上で重要な情報を提供するものであると云えよう。即ち成人脳におけるC20スフインゴシンの低下は先天性の脂質代謝異常症を別にすれば他に例がない。またガングリオシドはある種の細菌やビールス毒素のレセプターとしての役割が証明されているが，virus infection の観点から本疾患の病因を考える時，ガングリオシドの変化は興味深い。Heidenhain 例ではC20/C18比の低下がC－J例に比し軽度であつたが，これは臨床経過の短いことに基づくものか，或いは他に本質的な理由があるのかは現時点では論じ難い。更に症例を重ねる必要があろう。尚本研究では長鎖塩基組成の分析を二つの方法で行い分析結果の正確を期したが更に質量分析によつてもデータの確認を検討中である。

（対照老人脳の提供を受けた河野林博士・東京都監察医務院に感謝します）

References

(1) Bass, Hess, Pope(1974) Arch. Neurol., 31, 174
(2) Carter and Gaver(1967) J. Lipid Res., 8, 391
(3) Dumas(1971) Acta Neuropath., 19, 343
(4) Gajdusek and Gibbs(1971) Nature, 230, 588
(5) Gibbs, Gajdusek, Asher, Alpers, Beck and Mattews(1968) Science, 161, 388
(6) Kawamura and Taketomi(1977) J. Biochem., 81, 1217
(7) Lampert, Gajdusek and Gibbs(1972) Amer. J. Path., 68, 626
(8) Suzuki and Chen(1969) J. Neuropath. exp. Neurol., 25, 396
(9) Sweeley and Moscatelli(1959) J. Lipid Res. 1, 40
(10) 玉井, 小嶋, 生田 (1974) 神経化学, 13, 45
(11) Tamai, Kojima, Ikuta and Kumanishi, J. Neurol. Sci., in press
(12) Warren(1959) J. Biol. Chem., 234, 1971

45 脳組織の燐脂質N-含有塩基並びにスフィンゴ脂質長鎖塩基の代謝について

武富　保・湯沢松子・上村敬一
（信大・医・順応研・生化）

〔要　約〕

ミエリン形成の活発な生後2週目の若いマウス腹腔中に、DL-^{15}N-serineを投与すると、24時間以内に、phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, plasmalogen, cerebrosideへの^{15}Nの取込みの経時的変化が明らかに認められた。更に、DL-^{15}N-serineの投与量を増して、48時間に亘って観察すると、sphingomyelinとganglioside への長鎖塩基へも有意義な^{15}Nの取込みが認められた。しかしながら、いずれの場合にもphosphatidylcholineへの^{15}Nの取込みは殆ど認められなかつた。次に、^{15}N-ethanolamineを十分量投与すると、phosphatidylethanolamineに圧倒的に^{15}Nの取込みが見られる他に、plasmalogenにもかなり多い^{15}Nの取込みが認められたが、この場合にもphosphatidylcholineへの有意義な^{15}Nの取込みは認められなかつた。^{15}N-cholineを投与すると、phosphatidylcholineに活発に取込まれる他に、sphingomyelinへも取込まれることができた。以上の結果と更に、脳と肝の各燐脂質への^{15}Nの取込みの相違点などを比較検討して、脳組織ではethanolamineからcholineへとphosphatidylethanolamineからphosphatidylcholineへの合成は行われ得ないものと推論された。なほ、phosphatidylserineからphosphatidylethanolamineへの脱炭酸反応の作用は明らかに認められた。serineからsphingosineへの合成も脳組織で可能であり、生後2週目マウスではcerebroside合成はsphingomyelineおよびganglioside合成に比して一層活発であることが見られた。

脳組織の燐脂質N-含有塩基およびスフィンゴ脂質長鎖塩基の代謝については、今日、なほ、必ずしも明らかにされてはいない。私共は最近^{15}N-分光アナライザーを脂質代謝に応用できるのではないかと試みて来ている[1]。今回、安定同位体元素^{15}Nでラベルされたserine, ethanolamine, cholineを用いて、これら脂質塩基の代謝を研究し、若干興味ある知見を得ることができたので報告したい。

実験方法

実験I. 生後2週目の同腹マウス5匹を1群として、4群を用い、DL-^{15}N-serine (51.6 atom%, 光興業社製)を50 mg/mlで生食に溶かし、一回で(1匹当り)総量20 mgを腹腔中に投与した。投与後母親から離して、2, 4, 15, 24時間で屠殺した。直ちに各種臓器に分けて脂質抽出を行つた。実験II. 生後2週目の同腹マウス4匹に、^{15}N-ethanolamine (95.2 atom%, Prochem社製)を10 mg/mlの濃度に生食に溶かし、致死量を考慮して(1匹当り)1日1回 0.2 mlを4回、総量8 mgを投与した。なほ、投与期間中は授乳を続け、最後の投与後1時間は絶食させて屠殺した。実験III. 生後2週目の同腹マウス4匹に、^{15}N-choline chloride (92.3 atom%, 光興業社製)を10 mg/mlの濃度に生食に溶かし、やはり致死量を考慮して、1匹当り1日1回、0.4 mlを4回、総量5.6 mgを投与した。この場合も、投与期間中は授乳を続け、最後の投与後1時間は絶食させて屠殺した。

臓器組織からの脂質の抽出及び分離同定：　マウスの各臓器の総脂質はFolch法[2]により、C-M (2:1, V/V)の20倍量で抽出された。その抽出液の1/5量の水を加えて、分画漏斗を行い、上層と下層に分離され、下層のクロロホルム層は減圧濃縮して、gangliosidesを除く

総脂質が得られた。上層はごく一部を残して、他はセロファンチューブ中に入れ、水流透析後、凍結乾燥が減圧乾固して粗 gangliosides を得た。総脂質は一部を残して、他は更に acetone 可溶部、ether 可溶部、ether 不溶部に溶媒分画した。ether 可溶の燐脂質は1M-Na_2CO_3と含む Silica Gel G プレートで C-M-Acetic acid-W (25:15:4:2, V/V/V/V) の展開溶媒で、phosphatidylethanolamine (PE) 分画、phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC) に分離同定された。なお、脳の PE 分画中の plasmalogen は、PE 分画を TLC プレートにつけた後、HCl 蒸気に曝して風乾して、C-M-W (65:25:4, V/V/V) で展開して、PE と plasmalogen 由来の 2-acyl-lyso PE に分離して同定した。ether 不溶の粗スフィンゴ脂質は前アルカリ処理後、C-M-W (65:25:4, V/V/V) で展開して、cerebroside, sulfatide, sphingomyelin に分離同定された。

化学分析：総脂質及び各種燐脂質の総 Pi 量は Bartlett 法[3]によって定量、また、各種燐脂質中に取込まれた ^{15}N-量は ^{15}N-分光アナライザーによって既報[1]の如く分析された。なお、cerebroside, sphingomyelin 及び ganglioside の ^{15}N-量は無水 5% HCl-CH_3OH でメタノリーシス後、sphingosine 部分を抽出して、その sphingosine 中の ^{15}N を測定して分析された。sulfatide は少量のため分析されなかった。各種燐脂質の脂肪酸組成はメタノリーシス後、脂肪酸メチルエステルを GLC によって分析することによって得られた。

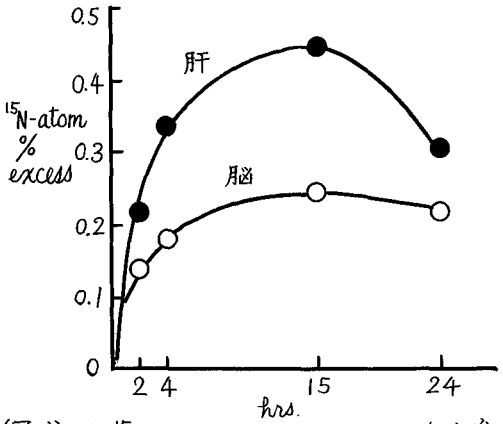
実験結果

DL-^{15}N-serine の投与

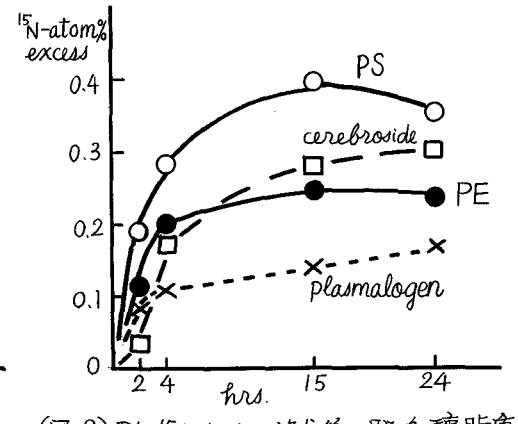
生後2週目マウス腹腔中に DL-^{15}N-serine (51.6 atom %) 20 mg を投与後、2, 4, 15, 24 時間の脳、肝の総脂質への ^{15}N の取込みの経時的変化を比較したものが図-1に示されている。ここで脳総脂質への ^{15}N の取込みは肝のそれに比して約68%であるが、かなり著しい取込みがなされていることが注目される。既報[2]の如く成熟マウスでは殆ど有意義な取込みは認められなかった。次に脳総脂質のうち各種脂質への経時的な ^{15}N の取込みの様子が図-2に示されている。PS への ^{15}N の取込みが最も活発で、次に PE に取込まれているが、Cerebroside への取込みは最初少し時間的遅れが見られるが、次第に PE に匹敵する以上に増加しているのが注目される。また、plasmalogen へも確実に ^{15}N の取込みが認められたが、PE に匹敵する程までの増加は見られなかった。次に DL-^{15}N-serine の投与量を3倍増加して、48時間に亘って観察したところ、脳の sphingomyelin と gangliosides の sphingosine へも、それぞれ 0.17 atom % excess, 0.24 atom % excess の有意義な ^{15}N の取込みが確認された。以上の結果は serine は脳内で phosphatidylserine に組込まれることができること、そして、phosphatidylserine の脱炭酸反応によって、phosphatidylethanolamine に変換されうることを示唆した。また、serine は脳で明らかに sphingosine の合成に利用され、sphingosine から ceramide を経て、cerebroside, sphingomyelin, gangliosides が合成されるうちで、生後2週目マウス脳では cerebroside が最も活発であることが確かめられた。

^{15}N-ethanolamine 及び ^{15}N-choline の投与

生後2週目マウス腹腔中に実験方法において述べられたように、^{15}N-etholamine 及び ^{15}N-choline を投与して、脳、肝の総脂質及び各種燐脂質への ^{15}N の取込みの結果は表-1に纏められている。^{15}N-ethanolamine は PE と plasmalogen に活発に取込まれることが



(図-1) DL-^{15}N-serine 投与後の脳、肝総脂質への^{15}Nの取込みの経時的変化



(図-2) DL-^{15}N-serine 投与後の脳各種脂質への^{15}Nの取込みの経時的変化

(表-1) ^{15}N-ethanolamine 及び ^{15}N-choline 投与後の脳、肝の総脂質と各種燐脂質への^{15}Nの取込み

(^{15}N-atom% excess)		総脂質	PE	Plasmalogen	PC	PS	Sphingomyelin
脳	^{15}N-ethanolamine	4.98	7.89	4.86	0.08	0.11	0.07
	^{15}N-choline	2.31	0.15	0.01	3.31	0.18	0.71
肝	^{15}N-ethanolamine	8.93	13.00	−	1.43	0.18	1.05
	^{15}N-choline	4.26	0.63	−	6.66	0.57	1.19

きたが、他の脂質へは有意義な取込みは見られなかった。なお、肝ではPEへの圧倒的な^{15}Nの取込みの他にPCとsphingomyelinにも有意義な取込みが認められ、ethanolamineの脳と肝における代謝の違いが明らかにされた。^{15}N-cholineの投与では、脳ではPCとsphingomyelinへの取込みが認められる以外、他の脂質への有意義な^{15}Nの取込みは認められなかった。肝ではやはりPCとsphingomyelinへ圧倒的な^{15}Nの取込みが見られるが、脳と違って、PEとPSへも若干有意義な^{15}Nの取込みがあることが認められた。

これらの結果は、脳ではcholineからPC, sphingomyelineへの合成は行われ得る、また、ethanolamineからPE, plasmalogenの合成も可能であるが、肝において示唆されるようなethanolamineからcholineが合成されて、更にPCやsphingomyelinになる合成経路、若しくはPEからPCへ行くBremer & Greenberg合成経路[5]は脳には存在しないのではないかと示唆された。

考察

本実験で、脳で従来から問題とされている幾つかの代謝経路について明らかにされた。先ず、serineは他臓器におけるようにphosphatidylethanolamine + serine ⇌ phosphatidylserine + ethanolamineの塩基交換反応によってphosphatidylserineの合成に利用される。そして、phosphatidylserine → phosphatidylethanolamine + CO_2の脱炭酸反応によってphosphatidylethanolamineの合成へも関与することが明らかにされた。これらの事実は表-2に示されている脳のPEとPSの脂酸組成が極めて類似していることからもうなづけるようにも思われた。また、肝ではethanolamine → choline →

PC及びsphingomyelinの合成経路とethanolamine → PE → PCの合成経路が考えられるが脳ではいづれの経路も殆ど認められなかった。しかしながら最近、Kewitzら[6]は脳でethanolamineからcholineが合成され、acetylcholineやPCの合成にとって重要であると指摘しているだけに一層の検討が必要と思う。表-2で脳と肝のPCの脂酸組成が著しく相違していることは、やはり脳と肝でのPCの合成経路が違っていることの証拠ではないかとも思われる。次に、^{15}N-serine, ^{15}N-ethanolamine, ^{15}N-cholineの脳と肝の総脂質への^{15}Nの取込み率の相対的な差異を図-1、表-1、表-3からのデータに基いて概算したものが表-4に示されている。この場合、D-^{15}N-serineは生体で利用されないものとして計算から省かれている。

表-4から、^{15}Nラベルのすべての前駆体に対して肝総脂質が脳のそれに比して若干^{15}Nの取込みが高いことがわかる。また、^{15}N-cholineが肝脳共に利用率が高く次が^{15}N-ethanolamineであり、^{15}N-serineは前二者に比すると利用率は低いがPSとスフィンゴ脂質長鎖塩基の合成に極めて重要なものであることが明らかにされた。

(表-2) 脳、肝の各種燐脂質の脂酸組成(%)

	脂酸	C16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:0	20:4	others
脳	PE	15.7	−	49.2	17.4	1.9	−	15.9	−
	PS	16.3	2.1	49.8	16.7	0.8	2.1	12.2	−
	PC	61.9	4.8	6.5	18.8	1.2	1.2	4.6	−
肝	PE	24.3	−	42.5	5.7	4.0	−	23.5	−
	PS	12.7	−	57.0	3.3	1.8	−	25.2	−
	PC	17.1	1.9	21.5	12.2	22.7	3.2	14.1	7.3

(表-3) 生後2週目マウス脳肝の1匹当りの総脂質量とそのP含量(%)並びに各種燐脂質の百分率組成

	総脂質量	P含量	PE	PS	PC	Sphingomyeline
脳	13.2mg	2.69%	38.5*	14.7	41.0	5.8
肝	10.2mg	2.84%	31.8	10.8	55.2	2.0

* 脳PEはplasmalogenとも含む

(表-4) DL-^{15}N-serine, ^{15}N-ethanolamine, ^{15}N-choline の投与^{15}N総量に対する脳・肝総脂質への最高の^{15}N取込み量の割合(%)

	脳	肝
DL-^{15}N-serine	0.13%	0.19%
^{15}N-ethanolamine	1.03%	1.48%
^{15}N-choline	1.63%	2.44%

文献

1) 武富保、上村敬一、河村成子：脂質生化学研究 18, 191 (1976)
2) Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.A.: J. Biol. Chem., 226, 497 (1957)
3) Bartlett, G.R.: J. Biol. Chem., 234, 466 (1959)
4) 武富保、上村敬一、湯沢松子、河村成子：脂質生化学研究 19, 265 (1977)
5) Bremer, J. & Greenberg, D.M.: Biochim. Biophy. Acta, 37, 173 (1960)
6) Kewitz, H. & Pleul, O.: Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2181 (1976)

46 ラット脳ミクロソーム細分画膜の化学構成

勝田公雄・佐武　明・藤田省三
渡辺達雄　（新潟大・脳研・神経化学）
玉井洋一　（北里大・医・生化）

〔要　約〕

著者等は、先にラット脳ミクロソームを蔗糖密度勾配遠心法で更に互に化学構成および酵素活性の異なる三種類の亜分画に分け、電子顕微鏡像に基づいて比重の軽い順に light smooth-surfaced microsome (LSM), heavy smooth-surfaced microsome (HSM) および rough-surfaced microsome とした。本報告では上記三種の分画のうち、唯一のcerebroside含有分画であるLSMの膜構造を明らかにするために天然の膜成分である lysolecithin を detergent として用い、反応條件を検討した後 lysolecithin 可溶分画と不溶分画とに分けた。電顕上、不溶分画は膜構造を失い均一な顆粒構造を示した。この顆粒状不溶分画に LSM蛋白の 30%，外在性燐脂質の10%，脂質 NANA の 10%，cerebroside の 50%，および cholesterol の 20% が回収されていた。不均一な可溶化は燐脂質の組成および蛋白質においても認められ、LSM の SDS-ゲル電気泳動上認められる約50種の蛋白のうち10種が特異的に可溶化され、2種はほとんど可溶化されなかった。可溶化反応の完了した状態において認められたこの様な不均一な脂質、蛋白の可溶化は、元の LSM 膜内での分子配列を反映している可能性が考えられる。

哺乳動物脳幹からの分離神経細胞体および無脊椎動物神経組織の脂質を分析して得た結果は、cerebroside は細胞体内に量的に検出し得る程には含まれていないことを示唆するものであった。[5,8] そこでラット脳を用いてミクロソーム分画の再検討を行ったところ、比重を異にする三種の膜成分に分画することが出来た。[9] これ等の分画は蛋白、脂質の構成、酵素活性に於て異なっていたが、特に糖脂質の構成において著しく異なっていた。著者等は三種の膜のうち2つの smooth-surfaced microsome の細胞内局在と、各膜について分子の膜内配列を知ることを目的に実験を進めているが、本報告では、唯一のcerebroside含有分画であるLSMの構造を明らかにする目的で detergent として lysolecithin を用い半可溶化を試み、不溶性、可溶性の両分画を得、その化学構成を分析した。

実験方法

Wistar 系雄ラット約 200 g の大脳を用い、玉井等の方法[9]に従ってミクロソームの三亜分画を得、更に 25% - 45% の蔗糖密度勾配上、67,000 x g, 16 h の遠心を行ってLSMを精製した。lysolecithin (Siqma) は palmitic acid, stearic acid を主な脂酸とし、薄層クロマト上単一であった。各膜分画は遠心分離後溜水に対して3日間透析してから脂質の抽出等に供した。[3] 脂質は Folch 等の方法に準じて抽出し分配を行った。但し、分配[1]は抽出液を一旦乾固し、溶解後に行った。ganglioside 量は Warren 及び Aminoff[10] の方法、燐脂質量は Bartlett 法[2]、脂質分画は Skipski[7] 法で展開後 Keenan 等の方法[4]で定量した。cerebroside は薄層クロマトグラフ上展開後、硫酸-加温による黒化度を測定した。[12] cholesterol 量は Zak[13] の方法で測定した。SDS-ゲル電気泳動のため、資料のうち不

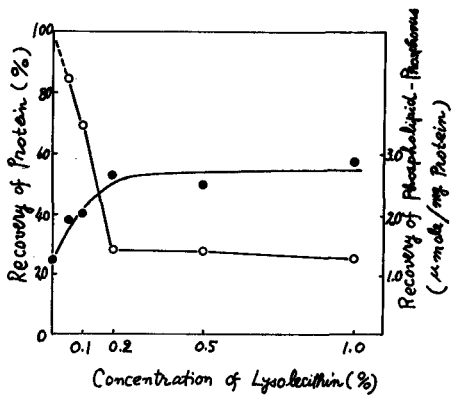
溶性のものはSDS試料緩衝液に95°C,3－4分、加温溶解し、lysolecithin可溶のものはTCAで沈殿させ、更にエーテルで充分洗滌後、Laemmliの方法[6]でアクリルアミド7.5%－15%濃度勾配平板の上で電気泳動を行い、0.1% coomassie/50% TCAで染色後、595 nmで測光した。電子顕微鏡観察のための試料はO_sO_4で固定し、常法に従って処理した。

実験結果

1) lysolecithinによる可溶化の条件。

lysolecithin濃度と反応時間について検討し、次の結果を得た。a) lysolecithin濃度。図1,2。図1はLSMを蛋白として1 mg含む1 ml 0.23 M蔗糖液中のlysolecithin濃度を変え、37°C 10分間処理した後、反応液を0.5 M蔗糖液の上に重層、10^5 x g, 90分間遠心して得られる沈澱に回収された蛋白および燐脂質燐の量を示したもので、図2は反応液を10－45%蔗糖濃度勾配の上に重ねて遠心分析したものの紫外吸収図型である。これ等の結果からlysolecithin濃度0.2%以上では、不溶性分画に回収される蛋白と燐脂質の量が一定になること、すなわち溶解反応が完了したことが明らかとなった。

図1.



b) 反応時間。図3。lysolecithin濃度を0.5%に固定し、反応時間を変えて図3の結果を得た。10分で蛋白、燐脂質燐の沈澱への回収はほぼ一定となり、反応が完了したことが示された。

以上の結果から、溶解の條件を

図2.

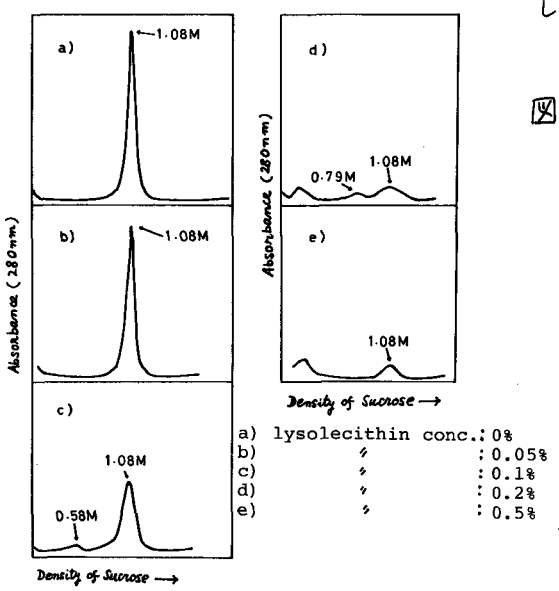
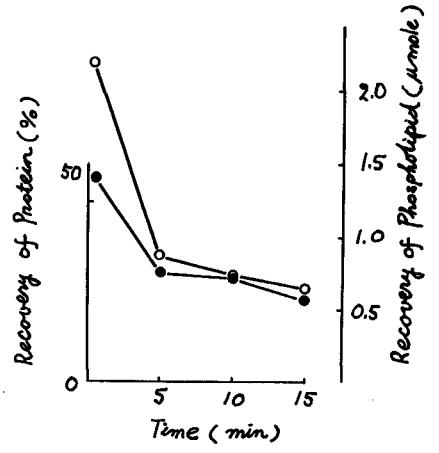


図3.



0.5% lysolecithin, 0.23 M蔗糖，反応液 1 ml当り LSM を蛋白として 1 mg 含む條件で 37°C, 10 分間処理し、反応液を倍に水で稀釈後 0.5 M蔗糖液の上に重ねて遠心 (10^5 x g, 90分) して可溶分画と不溶分画とに分けた。不溶分画は更に溜水中ホモゲナイズ後遠心洗滌した。

2) lysolecithin 可溶分画および不溶分画の化学構成。

a) SDS-ゲル電気泳動像：可溶分画に約 50本、不溶分画に約 40本の染色帯が検出され、可溶化前の LSM に約 50本の帯が認められる。可溶分画と不溶分画の相対応する蛋白染色帯の間でかなりのものに、濃度の差を認めた。

b) 脂質 (表1, 表2)。蛋白当り、可溶性分画に不溶性分画の 5倍量の内在性燐脂質 (全燐脂質 − lysolecithin), 3倍量の ganglioside, 2倍量の cholesterol が含まれており、これに反し、可溶性分画の 2倍量の cerebroside が不溶性分画に含まれていた。phosphatidylethanolamine と phosphatidylserine + phosphatidylinositol は不溶性分画に多く、phosphatidylcholine と sphingomyelin は可溶性分画に多い。この他に、不溶性分画には多量の lysolecithin が取り込まれていて (全燐脂質燐の 80%)、水洗によって除去し得なかった。

3) 電子顕微鏡像：精製した LSM は直径 0.1 μ から 0.5μ に亘る膜小胞構造を示すが lysolecithin 不溶分画はその脂質/蛋白比が元の LSM とほとんど同じであるにもかかわらず、膜構造を失って、ほぼ均一な小顆粒構造を示していた。

表 1. 蛋白当りの脂質含量

	Phospholipid			Cholesterol	Lipid-NANA	Cerebroside
	Total	Endogenous	Lysolecithin			
	μmoles/mg protein				nmoles/mg protein	
LSM	0.99	0.99	0	0.85	40.8	68.0
Lysolecithin insoluble fraction	1.79	0.29	1.50	0.48	12.7	94.6
Lysolecithin soluble fraction	10.33	1.33	9.00	0.88	40.1	41.0

表 2. 各燐脂質の内在性燐脂質に対する割合 (%)

	PE	PS.PI	PC	SM
LSM	23.7 ±3.7	11.8 ±1.1	53.8 ±2.9	9.1 ±1.1
Lysolecithin insoluble fraction	20.9 ±4.4	15.1 ±2.4	53.0 ±5.8	11.1 ±1.5
Lysolecithin soluble fraction	13.5 ±2.1	10.1 ±0.59	62.0 ±2.0	14.4 ±2.36

考察

先に Wiegand[11] は ganglioside の分布に基づいて脳ミクロソーム膜の不均一性を示唆した。著者等はラット大脳のミクロソームを化学構成特に糖脂質組成の著しく異なる三つの分画に分けた[9]。そのうちの light smooth-surfaced microsome は ganglioside の他に cerebroside も含み、著者等の他の実験結果[5,8,9]に基づく考察すなわち、「cerebroside は神経細胞体の構成脂質ではないし、更に脳内の神経細胞以外の細胞においても ER の構成成分ではないらしい」ことから LSM は神経細胞以外の脳細胞の ER 以外の膜に由来しているか、或は含んでいる可能性が考えられる。本実験では、この膜の化学構造-分子配列を知る目的で、可及的に穏和な detergent として、天然に膜成分として存在する lysolecithin を、反応條件を検討した後使用した。その結果、LSM を構成する分子が不均一に可溶化され、不溶性分画には lysolecithin が組み込まれた状態で可溶化反応が停止することが明らかとなった。膜内での蛋白粒子の可動性と、本実験で見られた lysolecithin 可溶性、不溶性の間に何らかの相関が考えられるが今後実証さるべき問題と考える。（以上の結果の一部は昭和51年度生化学会（日本）に於て発表した。）

文献

1. Aminoff,D.(1961) Biochem. J. 81,384-392
2. Bartlett, R.(1959) J. Biol. Chem.,234,466-468
3. Folch,J.,Lees,M. and Sloane-Stanley(1957)J. Biol. Chem.226,497-509
4. Keenan,R.W.,Schmidt,G. and Tanaka,T.(1968) Anal. Biochem.23,555-566
5. Komai,Y.,Matsukawa,S. and Satake,M.(1971) J. Biochem.70,367-369
6. Laemmli, U.K.(1970) Nature 227,680-685
7. Skipski, V.P.,Peterson,R.F. and Barclay,M.(1964) Biochem.J. 90,374-378
8. Tamai,Y.,Matsukawa,S. and Satake,M.(1971) Brain Res.26, 149-157
9. Tamai,Y.,Matsukawa-Araki,S.,Katsuta,K. and Satake,M.(1974) J. Cell Biol.63,749-758
10. Warren,L.(1959)J. Biol. Chem. 234, 1971-
11. Wiegandt,H.(1967) J. Neurochem. 14,671-674
12. 堀田立二、宗田靖二、永井克孝(1974) 生体膜実験法上巻-蛋白質、核酸、酵素 共立出版 205頁
13. Zak,B.(1959) Amer. J. Clin. Pathol.27,584-588

47 ラット小脳の発育に伴うRNaseH活性の変化

沢井保子・和田健司・塚田欣司
（東医歯大・難研・病態生化）
沢崎嘉男・中島　熙
（東医歯大・難研・遺伝生化）

〔要　約〕

ラット脳を小脳と非小脳部分に分けてそれぞれのRNase Hの活性を測定した。至適pHは8.0－9.0にあり二価金属としてMg^{2+}又はMn^{2+}を要求するがMg^{2+}の方が高い活性を示した。p chloromercuribenzoateにより阻害されたが過剰のSH剤により再び活性は回復した。この酵素は一重鎖RNAを分解せず熱によって失活した。これらの性質は小脳，非小脳部分両者について全く同じであり，胸腺及び肝臓のRNaseHと異なっていた。小脳のRNaseH活性は生後増加しはじめ，6日目で最大になり以後成長につれて減少した。これらの活性の変化は[^{3}H]-thymidineの取り込み，DNA ligase，DNA polymerase及びthymidine Kinaseの活性の変化と極めて一致している。RNAのみを基質とするRNaseの活性を同じ材料で測定した。小脳及び非小脳部分におけるその活性は極めて低くp-chloromercuribenzoateでRNase inhibitorを失活させ全RNase活性を測定すると両者について活性が増加し，非小脳部分では生後の変化はみられなかった。しかし小脳では生後幼若の時高く，成長に従って減少し8日以後はその活性を持続した。

以上の結果からRNase HはDNA合成と密接な関係があり，DNA合成にみられるRNA primerを除去する作用を有しているものと理解される。

DNA-RNAハイブリッドのRNAを特異的に分解する酵素であるRNase Hは，1970年HausenとStein(5)によって子牛胸腺より初めて発見されて以来，生物界に広く存在することが確かめられている(2,6,12,14,15,21)。大腸菌におけるDNA合成に際し，Okazaki fragmentはRNA primerから合成されDNA polymerase Iの5'→3'exonuclease活性によってRNA primerが除去されると同時にそのgapが埋められ，最終的に短鎖DNAがsealされ長鎖DNAへと成長すると考えられている(3,8,17,18,20)。最近Mölling らはavian myeloblastosis virusのDNA polymeraseとRNase H活性が共に精製されることから，RNA依存のDNA合成に際しDNA polymeraseによってDNAが合成されるに従ってtemplateであるRNA鎖が除かれるという可能性を指摘している(7,12)。動物細胞でのDNA合成にもRNA primerの存在が考えられているが，従来まで精製されている動物のDNA polymeraseには5'→3' exonuclease活性は全く含まれていない。そこで細菌のDNA polymerase I o exonucleaseに相当すると思われるRNA primerを切る酵素がRNase Hかどうかを知る目的で増殖の盛んな小脳についてこの酵素活性の変動及びその性質について検討した。

〔実験方法〕

生後の幼若なラットから脳を取り出し，小脳と非小脳部分に分け10倍量の0.25M sucrose，0.1M Tris-HCl(pH8.1)，3mM $CaCl_2$，0.5M KCl，5mM 2-mercaptoethanolで摩砕し105,000×g 60分間の遠心後に得た上清を0.025M Tris-HCl(pH7.7)，5mM 2-mercaptoethanolで3時間透析し酵素液とした。

基質となる[^{3}H] RNA-DNAは熱処理した子牛胸腺DNAをtemplateとし，大腸菌 RNA polymeraseを用いて Staviranopoulousの方法(16)に従って調製した。

RNase H及びDNA polymeraseの活性はそれぞれ Fig 1, Fig. 2 の方法に従って測定した。RNase及びRNase inhibitorの活性は Moriyama らの方法(11)に従って測定した。

Fig. 1

Assay for RNase H

Tris-HCl buffer (pH 8.0)	50 μmoles
$MgCl_2$	5 μmoles
Bovine serum albumin	50 μg
2-mercaptoethanol	1 μmole
Substrate (6,000 cpm)	
NaCl	50 μmoles
Enzyme	
Total volume	0.5 ml

Incubated at 25°C for 15 min.
↓
The reaction was stopped by addition of 0.1 ml of 0.1 M EDTA (pH 7.0) and then 0.4 mg of bovine serum albumin as carrier.
Added 0.5 ml of cold 10% TCA.
↓
Sup.
↓
Counted in Triton X-100-toluene scintillation fluid.

Fig. 2

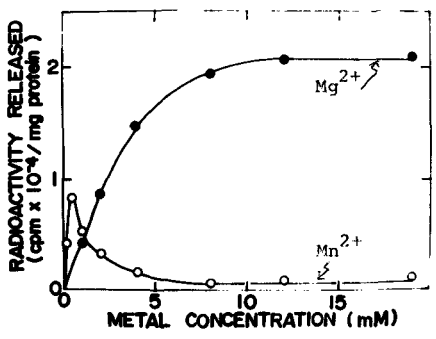
Assay for DNA polymerase

Tris-HCl buffer (pH 8.5)	30 μmoles
Mercaptoethanol	5 μmoles
ATP	0.2 μmole
$MgCl_2$	1 μmole
dATP, dGTP and dCTP	20 nmoles of each
[^{3}H]-dTTP (2 Ci/nmole)	20 nmoles
Activated DNA	100 μg
Enzyme	
Tatal volume	0.25 ml

Incubated at 37°C for 30 min
↓
The reaction was stopped by addition of 1.5 ml of cold 5% TCA (2.5% celite) and washed with cold 5% TCA, acetone, ethanol and ether on filter
↓
Heated in Hyamine
↓
Counted in toluene scintillation fluid.

Fig. 3

The effect of varying concentration of Mg^{2+} or Mn^{2+} on the activity of RNase H from cerebellum.



〔実験結果及び考察〕

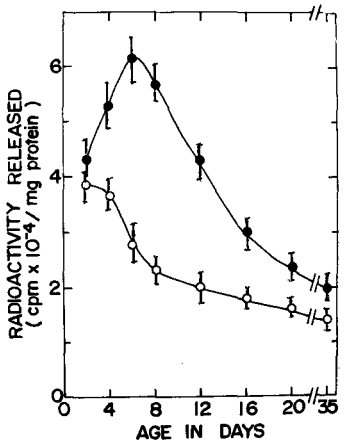
粗酵素液によるRNase Hの測定条件で反応は20分以上直線的に進行し，又全基質の50～60%が分解されるまでは酵素量と共に直線的に活性が増加した。至適pHは8.0-9.0にあり，Fig3に示す如く小脳のRNase Hは二価金属を要求しその至適濃度はMg^{2+}では8-12mM，Mn^{2+}では0.4mMである。Mn^{2+}存在下での活性はMg^{2+}存在下でのそれの30%であった。Table Iに示す如く反応系から2-mercaptoethanolを除いてp-chloromercuribenzoateを加えると活性の著しい低下がみられるが2-mercaptoethanol存在下ではp-chloromercuribenzoateによる活性の低下がみられなかった。この酵素は熱処理後の基質を分解せず，ハイブリッド構造のRNA-DNAのRNA部分のみを特異的に分解する。これらの性質は非小脳部分のRNase Hに関しても全く同様であり又肝，胸腺等の他の組織から分離されたRNase Hと非常に性質が類似している。

ラット小脳は生後急速に発育しそのDNA合成は生後6日目で最も高く，のち成長と共に減少してくることが知られている(1, 9, 19)。しかし非小脳部分ではDNA合成は

Table 1
Requirements for RNase H in rat brain.

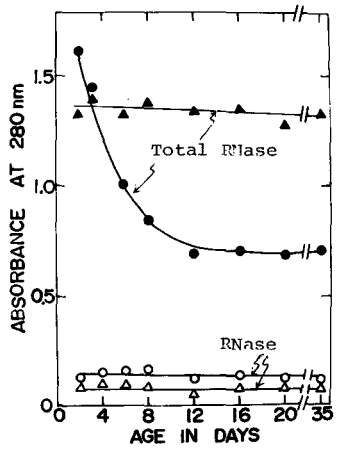
Components	Cerebellum	Non-cerebellar part
	Activity (cpm/mg protein)	
Native substrate		
Complete	6020	4100
-enzyme	0	0
$-Mg^{2+}$	90	82
-mercaptoethanol	5704	4090
-mercaptoethanol +*p*-chloromercuribenzoate (0.2 mM)	52	40
+mercaptoethanol (10 mM) +*p*-chloromercuribenzoate (0.2 mM)	5690	4108
+boiled enzyme	0	0
Denatured substrate		
-enzyme	35	42
-enzyme	40	50

Fig. 4
Postnatal change in RNase H activity of rat brain.



●, Cerebellum
o. Non-cerebellar part

Fig. 5
Postnatal change in RNase and total RNase (active + latent, as estimated after treatment with *p*-chloromercuribenzoate) activities.

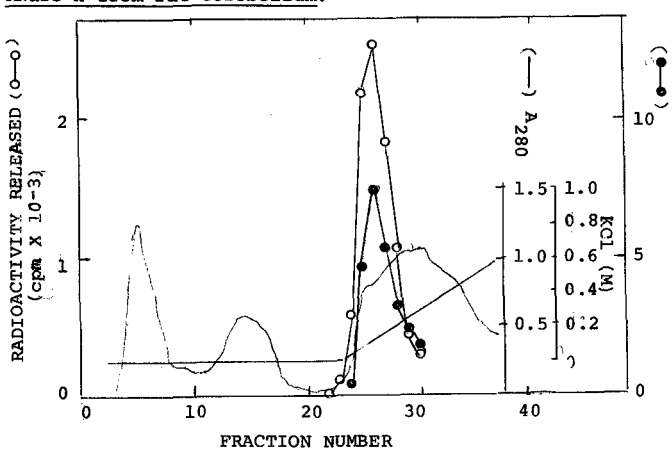


○, ●; Cerebellum
△, ▲; Non-cerebellar parts

僅かに認められるに過ぎない(10, 19)。生後幼若ラットの成長に伴う脳のRNase H活性を測定すると，Fig.4にみられる様に，小脳のRNase H活性は出生後上昇しはじめ6日目にピークを有し成長するに従って減少した。非小脳部分のRNase H活性は出生後成長するに従って除々に減少した。これらのRNase H活性の変動は[^{3}H] thymidine の取り込み(10)，DNA polymerase 活性(4) DNA ligase 活性(13)及び thymidine kinase 活性(22)の変化とよく一致することからRNase Hは DNA合成と密接に関係していることが伺われる。

RNAを分解する酵素であるRNaseの活性の変化を小脳，非小脳部分で測定すると，Fig.5に示される如く，両者共比較的活性が低く，尚且つ成長に伴う活性の変化は全くみられなかった。従来生体内においてRNaseはRNase inhibitorと結合しており，p-chloromercuribenzoate でRNase inhibitorを失活させることによって全RNaseの活性を測定することが出来る。全RNase活性を測定すると顕著な増加がみられ，非小脳部分では生後全く活性の変化がみられないが，小脳では幼若時には活性が高く以後多日目までに減少しそれ以後は活性

Fig, 6. DEAE-cellulose chromatography of DNA polymerase and RNase H from rat cerebellum.



Enzyme preparations from rat cerebellum submitted to a column (1X10 cm) were eluted with 100 ml of a linear gradient from 0 to 1 M KCl in 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0)- 3 mM mercapto-ethanol. Fractions (3 ml) were collected and assayed.

の変化はみられない。

小脳の粗酵素液をDEAE-celluloseに吸着させKCl濃度で溶出させると，0.08M KClでRNase Hが溶出されるが，この画分にDNA polymeraseの活性も存在しその各画分の比活性が一致していた。DNA polymeraseはβに相当しRNase Hとassociateしているものと考えられるがそれについては詳細な研究を要する。

以上RNase H活性はDNA合成期に誘導されることにより DNA合成に密接に関連していることが理解されるが DNA合成に必要なRNA primerを除去してDNA polymerase, DNA ligaseが相補的なDNAを合成しやすいような状態を準備しているものと想像される。

本研究に御協力を頂いた斉藤順子(東京理大・理学部学生)氏に深く感謝致します。

〔文 献〕

(1) Altman, J. (1966) J. Comp. Neurol. 128, 431-474
(2) Banks, G. R. (1974) Eur. J. Biochem. 47, 499-507
(3) Brutlag, D., Schekman, R. & Kornberg, A. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2826-2829
(4) Chiu, J. F. & Sung, S. C. (1970) Biochim. Biophys, Acta. 209, 34-42
(5) Hausen, P. & Stein, H. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 278-283
(6) Henry, C. M., Ferdinand, F. -J. & Knippers, R. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun, 50, 603-611
(7) Keller, W. & Crouch, R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3360-3364
(8) Lark, D. G. (1972) J. Mol. Biol. 65, 47-60
(9) Margolis, F. L. (1969) J. Neurochem. 16, 447-546
(10) McIlwain, H. (1966) Biochemistry and the Central Nervous System pp. 270-299, J. & A. Churchill Ltd.
(11) Moriyama, T., Umeda, T., Nakashima, S., Oura, H. & Tsukada, K. (1969) J. Biochem. 66, 151-156
(12) Mölling, K., Bolognesi, D. P., Bauer, H., Busin, W., Plassman, H. W. & Hausen, P. (1971) Nat. New Biol. 234, 240-243
(13) Nakaya, N., Sawasaki, Y., Teraoka, H., Nakajima, H. & Tsukada, K. (1977) J. Biochem., (Tokyo) 81, 1575-1577
(14) Roewekamp, W. & Sekeris, C. E. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 405-413
(15) Stavrianopoulos, J. G. & Chargaff, E. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1959-1963
(16) Stavrianopoulos, H. G., Karkas, H. D. & Chargaff, E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2609-2613
(17) Schekman, R., Wickner, W., Westerfaard, O., Brutlag, D., Geider, K., Bertsch, L. L. & Kornberg, A. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2691-2695
(18) Sugino, A. Hirose, S. & Okazaki, R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1863-1867
(19) Sung, S. C. (1969) Can. J. Biochem. 47, 47-50
(20) Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R. & Kornberg, A. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 965-969
(21) Wyers, F., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1973) Eur. J. Biochem. 35, 270-281
(22) Yamagami, S., Mori, K. & Kawakita, Y. (1972) J. Neurochem. 19, 369-376

48 ラット脳のDNA-リガーゼとそれの発育に伴う活性の変化

塚田欣司・寺岡弘文
（東医歯大・難研・病態生化）
沢崎嘉男・中島　熙
（東医歯大・難研・遺伝生化）

〔要　約〕

ラット脳を小脳と非小脳部分にわけて，それぞれのDNAリガーゼの成長に伴う活性の変化およびその性質について検討した。

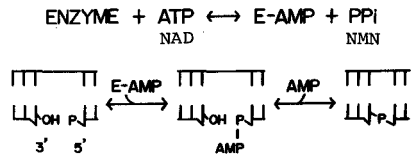
両者のDNAリガーゼについて至適pHは7.5～8.0に存在した。二価イオンとしてMg^{2+}又はMn^{2+}を要求し，補酵素としてATPが必須で，NADでは効果がみられなかった。パラクロロ安息香酸水銀で完全に阻害されるが，メルカプトエタノールを加えることにより，再び活性は恢復した。

小脳のDNAリガーゼの活性は，生後増加し始め，6日目で最大に達し以後成長と共に活性が減少した。非小脳部分では，小脳のリガーゼにくべて活性も低く，生後成長と共に緩々に減少の傾向がみられた。

生後6日目の小脳のDNAリガーゼは，セファローズ6Bによるゲル沪過で，分子量の異る，I，5×10^5，II，3×10^5，III，1.2×10^5の3つのピークに分離された。しかし同じ酵素液を，4°Cで24時間放置後，セファローズ6Bでゲル沪過したものではIが減少して IIの増加がみられた。4°C，24時間放置する際，蛋白分解酵素の阻害剤であるphenylmethylsulfonylfluorideを入れておくと，その現象が抑制されることより，分子種の分離は，in vitroでの分離操作によって生じたもので，生体では，分子量の大きな状態で存在するものと推測された。

1967年に，Gellert (6)によって，大腸菌よりDNAリガーゼが，初めて発見されて以来，この酵素は，生物界に広く存在することが報告され，この酵素のDNA合成に果す役割が明らかにされて来た。DNAリガーゼは，DNAの二重鎖構造の中に含まれる一重鎖DNA切断部位の3'-OH末端と，それに隣接する5'-P末端を結合させ，3'-5'-ジリン酸結合の形成に与っている(11)。この反応の補酵素として，大腸菌ではNAD (5,6,13)を，ファージ感染若(2,26)，動物(9,23)および植物組織(8,25)ではATPを必要とすることが明らかにされている(図1)。バクテリアのリガーゼは単一蛋白に近い状態まで精製され一つのペプチドからなっていることが示された(10,14)。一方動物細胞のDNAリガーゼは，最初Lindahl (9)によって兎の骨髄細胞より精製され，その後種々の動物臓器より精製されている(3,16,20)が精製が進むにつれていくつかの分子種から成り立つものと考えられるに至った(3,16,17,20,28)。DNAリガーゼの生理作用に関しては，DNA合成に見られる岡崎フラグメントを結合するものとして，DNA合成期にこの酵素活性の増加が報告されている(12,23)。神経細胞におけるこの酵素に関しての報告は少く(7)神経作用の発現と此の酵素活性との関連を知る目的で，幼若ラット脳の発育段階におけるDNAリガーゼの活性の変化，およびその性質について検討した。

Fig. 1
Mechanism of the reaction catalyzed by DNA ligase



〔実験方法〕

生後の幼若ラットの脳を取り出し小脳と小脳以外の部分に分け，0.05 M トリス緩衝液(pH 7.4)－0.5 M KCl，0.5 mM ジチオスレイトール，0.1M EDTA（Buffer A）で磨砕し，それ 105,000 × g，60分の遠心上清を得，更に Buffer A で，2～3時間透析したものを粗酵素液とした。リガーゼの反応は図2に示す如く，仔牛胸腺のDNAを少量の膵 DNase でニックを入れアルカリフォスファターゼで処理後，ラット肝の核より部分精製した DNA キナーゼ(19) と ATP-γ-^{32}P で基質となる nicked 5'-^{32}P-DNA を作りこの基質をリガーゼと反応後，フォスファターゼにて処理し，それに抵抗性の ^{32}P のカウントを測定してリガーゼの酵素活性とした。酵素活性は，図3に示した反応条件下で行った。

Fig. 2 SCHEME FOR THE PREPARATION OF ^{32}P-NICKED DNA AND ASSAY FOR POLYNUCLEOTIDE LIGASE

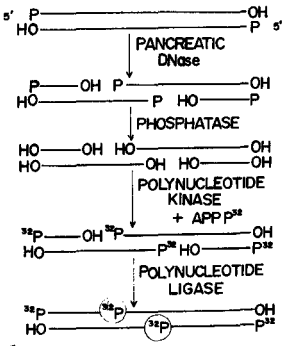


Fig. 3

Assay for DNA ligase

Tris-HCl buffer (pH 8.0)	15 μmol
$MgCl_2$	3 μmol
ATP	0.04 μmol
2-mercaptoethanol	2 μmol
5'-[^{32}P]-nicked DNA(8,000-15,000 cpm)	5 μg
Crude enzyme preparation (100 μg of protein)	

total volume 0.2 ml

↓ 30°C, 30'

0.1 ml of 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) was added

↓ Boiled at 100°C, 10'

↓ Chilled quickly in ice

3 μg of alkaline phosphatase (1 unit) was added

↓ 65°C, 20'

0.1 ml of 0.1 M sodium pyrophosphate

↓ 5% TCA

↓ Acetone

↓ Ethanol

↓ Ether

↓ Hyamine

Counted in a Packard Tri-Carb liquid Scintillation Spectrometer

〔実験結果〕

ラットの脳を小脳と非小脳部分にわけ，その粗酵素液を用いて，それぞれの性質を示したのが表1である。両者のリガーゼについて，その活性には，Mg^{2+} または Mn^{2+}，および ATP が必須として要求される。SH剤の存在しない時，パラクロロ安息香酸水銀(pCMB)によって完全に失活するが過剰のメルカプトエタノールによって再び活性は恢復する。小脳のリガーゼの至適 pH は，ともに 8.0 に存在する（図4）が非小脳部分についても全く同様である。これらの性質は，動物の他の臓器より分離されているDNAリガーゼの性質と極めてよく一致している。

ラットの小脳では，生後数日間細胞分裂が盛んであ

Fig. 4 pH optimum of the DNA ligase from rat cerebella

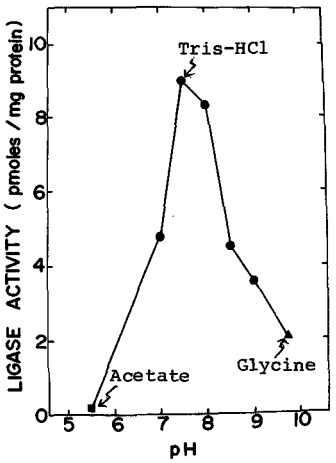
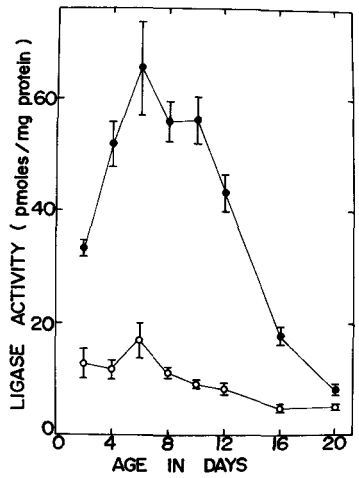


Table 1
DNA ligase activity from adult rat brain

Components	^{32}P resistant to phosphatase (pmoles/mg protein) in following cell fractions	
	Cerebellar part	Non- cerebellar part
Complete system	8.3	5.1
- enzyme	< 0.1	< 0.1
- ATP	< 0.1	< 0.1
- ATP, + NAD (0.2 mM)	< 0.1	< 0.1
- Mg^{2+}	0.1	0.1
- Mg^{2+},+ Mn^{2+} (1 mM)	2.3	1.5
- mercaptoethanol	3.4	3.0
- mercaptoethanol + PCMB (0.5 mM)	0.2	0.1
+ PCMB (0.5 mM),+ mercaptoethanol (10 mM)	8.4	5.2
Single stranded DNA	< 0.1	< 0.1
Boiled enzyme	< 0.1	< 0.1

Fig. 5
Postnatal change in DNA ligase activity of rat brain



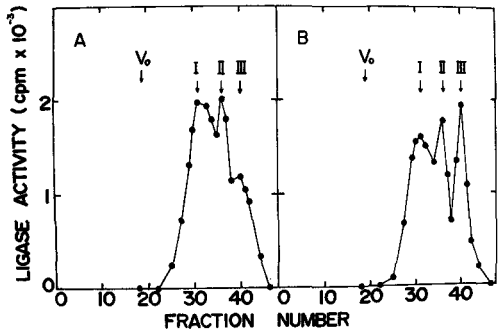
●, Cerebellum
○, Non-cerebellar parts

るが，生后ラットの小脳と非小脳部分のリガーゼ活性を測定すると，小脳では，生后6日目で最高になり，その后日と共に次第に減少していく（図5）。このような活性の変化が酵素標品中に含まれる阻害又は賦活因子によるものかどうかを知るため，生后6日と20日目の小脳の酵素液を加えて活性を測定すると，全く相加的に活性が見られたことから，DNA-リガーゼの生合成による結果と判断された。非小脳部分のリガーゼの活性は，小脳に比べて低く，発育と共に減少していく。

動物のDNAリガーゼに二つの異る分子種が存在するという報告があることから，小脳でのリガーゼの活性の変化と分子種との問題について検討した。生后6日目の粗酵素液をセファロース 6B でゲル沪過を行った。その結果図6Aに見られる如く，I (Ve/Vo, 1.6), II (Ve/Vo, 1.85) および III (Ve/Vo, 2.1) の3つのピークが溶出された。それぞれの見かけ上の分子量は I, II, III, について約 5×10^5, 3×10^5 1.2×10^5 に相当していた。これらのピークは，実験毎にいつも同じ比率で現われる訳ではなく，時にはピーク III が消失している場合も観察された。図6Bで用いた同じ標品を，4°C で24時間放置后，セファロース 6B でゲル沪過すると図6Bにみられる如く，ピーク I が減少しピーク III が増加していた。4°C で放置する際 phenylmethyl sulfonyl-fluoride を入れておくとセファロース 6B で分析后 図6A とほぼ同様の結果が得られた。これらの結果より，ピーク III は in vitro における操作過程で得られたものと結論される。

Fig. 6

Sepharose 6B chromatography of a crude enzyme preparation of rat cerebella



A:The enzyme preparation(0.2ml) was applied onto a column of Sepharose 6B(0.85 x 19cm, Vo=11ml) equilibrated with Buffer A and eluted with same buffer. 0.2 ml fractions were collected and assayed for enzyme activity according to the assay methods. B:The enzyme preparation used in A was stored for 24 h at 4°C and analyzed on a Sepharose 6B as described in A. Vo, void volume.

〔考察〕

ラットの小脳は，生後約2週間で急激に成長する。生後6日目にH-チミジンによるとりこみ(10)，チミジンキナーゼ(21)，DNAポリメラーゼ(4)等のDNA合成に関与する酵素活性は最大に達し，以後成長と共に減少していく。非小脳部分は，神経細胞の分裂は生まれた時に完成しており，ミクロニューロンやグリア細胞によるDNA合成が僅かに認められるに過ぎない(10)。脳におけるDNAリガーゼの活性の変化も，H-チミジンのとりこみ，DNA合成に関与する酵素と全く同様の挙動を示しており，DNA合成と密接な関連を保つことが示された。再生肝(21,23)，癌細胞(22,24)においても同様の現象が認められている。動物細胞のリガーゼには，分子量の大きいものと小さいものの2種について報告されており(17,20)，前者はDNA複製に関係するといわれている。脳のリガーゼにも，数種の分子種の存在することが示されたが，生体内では分子量の大きい形で存在しており，それが酵素分離の過程で，蛋白分解酵素により崩壊をうけて見かけ上小さいものが現われたものと解される。

本研究に終始，御協力を頂いた妻和紀子(旧姓,中谷)氏に深く感謝致します。

〔文献〕

(1) Altman, J. (1966) J. Comp. Neurol. 128, 431. (2) Becker, A., Lyn, G., & Hurwitz, J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 1996. (3) Bertazzoni, U., Mathelet, M., & Champagnari, F. (1972) Biochim. Biophys. Acta 287, 404. (4) Chiu, J-F., & Sung, S. C. (1972) Biochim. Biophys. Acta 269, 364. (5) Gefter, M. L., Becker, A., & Hurwitz, J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 240. (6) Gellert, M. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 148. (7) 井上順雄，加藤尚志，(1976) 神経化学 15, 183. (8) Kesseler, B. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 330. (9) Lindahl, T., & Edelman, G. M. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 680. (10) Mcllwain, H. (1966) Biochemistry and the Central Nervous System pp. 270, J. & A. Churchill Ltd. (11) Modrich, P. & Lehman, I. R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7502. (12) Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K. et al (1968) Cold. Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 33, 129. (13) Olivera, B. M., & Lehman, I. R. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1426. (14) Panet, A., Van de Sande, J. H., Loewen, P. C., et al (1973) Biochemistry 12, 5045. (15) Pedrali Noy, G. C. F., Spadari, S., Giarrocchi, G., et al (1973) Eur. J. Biochem. 39, 343. (16) Söderhall, S., & Lindahl, T. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 910. (17) Soderhall, S., & Lindahl, T. (1975) J. Biol. Chem. 250, 149. (18) Sung, S. C. (1969) Can. J. Biochem. 47, 47. (19) Teraoka, H., Mizuta, K., Sato, F., Shimoyochi, M., & Tsukada, K. (1975) Eur. J. Biochem. 58, 297. (20) Teraoka, H., Shimoyachi, M., & Tsukada, K. (1975) FEBS Lett. 54, 217. (21) Tsukada, K. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 758. (22) Tsukada, K., Hokari, S., Hayasaki, N., & Ito, N. (1972) Cancer Res. 32, 886. (23) Tsukada, K. & Ichimura, M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun, 42, 1156. (24) Tsukada, K., & Ito, N. (1972) J. Biochem. 72, 1299. (25) Tsukada, K., & Nishi, A. (1971) J. Biochem. 70, 541. (26) Weiss, B., & Richardson, C. C. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1021. (27) Yamagami, S., Mori, K., & Kawakita, Y. (1972) J. Nerochem. 19, 369. (28) Zimmerman, S. B., & Levin, C. J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 149.

此の論文の一部は，第49回日本生化学会(於札幌)，J. Biochem., 81, 1575(1977)で発表した。

49 El系マウス脳におけるポリゾームRNAの代謝

山上　栄・森　浩一・大西　博
切池信夫・川北幸男　（阪市大・医・神経）

〔要　約〕

El系とdd系マウスの脳内に[^{3}H]-オロチン酸の20μciを注射した後，経時的に断頭して，ポリゾームRNAを調製した。しょ糖密度勾配による分析では，Elは注射後1，3時間で，28Sより重い分画に最も高い放射能の分布が見られたが，ddはこの領域に放射能が認められず，むしろ28Sと18Sに広範囲な分散を示した。さらにRNAをしょ糖密度勾配でFr1(5S)，Fr2(18S)，Fr3(28S)，Fr4(>28S)の4分画に分け，ポリ(U)セファロースのカラムによって，ポリ(A^-)RNA，ポリ(A^+)RNA，オリゴ(A^+)RNAに分別し，これらRNA分子種への放射能の分布を注射後3時間で調らべると，ポリ(A^+)RNAは，ElではFr4に多く，ddではFr2に最多である。Elについて，ポリ(A^+)RNAの相対比放射能の変化を追求すると，Fr4のみが注射後3時間で最大となり，以後緩徐な減少を示し，他分画とは異なったパターンを示した。Fr4のポリ(A^+)RNAの塩基組成はAU richでDNAに類似していた。[^{3}H]-アデノシンでラベルしたポリ(A)のヌクレオチド鎖長は，ddとElとでともに200～110で，オリゴ(A)は約10であった。これらの結果から，Elマウス脳ポリゾームにはddに見当らない28Sより大きなrapidly labelled RNAの存在が示唆され，このRNAはDNA類似の塩基組成を持つポリ(A^+)mRNAと考えられる。

われわれは，既に遺伝性痙攣素質を持つEl系マウス脳が，常時用いられているdd系マウスに比べて異なった転写制御機構を持つ可能性を示唆してきた。[3] この点をさらに詳細に検討するためにEl系マウス脳よりポリゾームを分離し，その中に含まれるポリ(A^+)mRNAを中心に，ポリ(A^-)RNAやオリゴ(A^+)RNAなどの代謝を，dd系マウスと比較したので報告する。

〔実験方法〕

1) マウス脳内への[^{3}H]-オロチン酸の注射：El系およびdd系マウスの脳内に[^{3}H]-オロチン酸の20μciを注射し，1，3，20時間後にそれぞれ断頭して実験に供した。

2) ポリゾームの調製：マウス全脳を氷冷した250mM-しょ糖，50mM-Tris-HCl，pH 7.5，100mM-KCl，10mM-$MgCl_2$（TKM緩衝液）と1mM-ジチオスレイトールを含む溶液の3倍容中でホモジナイズし，前報[7]に従ってミトコンドリア上清を分離し，これに1%DOC-Naを加えた後，0.5Mと1.8Mのしょ糖の不連続密度勾配上にのせ，105,000×g，4時間遠心し，ポリゾームをペレットとして回収した。

3) ポリゾームRNAの調製：ポリゾームからRNAの抽出はSDS-フェノール法を用いて行なった。[3][6]

4) しょ糖密度勾配によるポリゾームとそのRNAの分析：ポリゾームをTKM緩衝液に懸濁し，前もって遠心管内に作製した10%から40%の直線的しょ糖密度勾配上に乗せ，RPS 25Aローターを用いて，63,586×g，2時間遠心した後，ISCO社製density gradient fractionatorで254nmの吸収をChartに記録するとともに，1.2mlずつを分取して27分画を得た。各分画の放射能は，牛血清アルブミン1mgと10%TCA 1mlを加え

て沈澱させた後，Whatman GF/Cのフィルター上に集め，PPO:4g，POPOP:0.2g，トルエン1lを含むシンチレーター溶液の10mlを加えて，Packard Tri-Carb Scintillation Counterで計測した。

ポリゾームRNAは，15%から30%のしょ糖密度勾配溶液（100mM-NaCl，0.5%SDS，10mM-Tris-HCl緩衝液pH7.4，1mM-EDTAの溶媒にしょ糖を溶解して作製した）中で，ポリゾームの場合と同じ遠心力で，4℃，12時間遠心した。遠心後，紫外部吸収をChartに記録し，各分画の0.2mlをとりSoluene-350の1mlを加えて溶解させ，シンチレーター溶液10mlを加えて放射能を計測した。

5)<u>ポリゾームRNAのポリ(U)セファロースによるアフィニティー・カラムクロマトグラフィー</u>，しょ糖密度勾配によってRNAを分画後，図1aに示すように，5S(I)，18S(II)，28S(III)，>28S(IV)の4分画に細分し，2.5倍量のエタノールを加え-20℃，18時間保持した後，遠心によってRNAを回収した。調製した各RNAを400mM-NaCl，10mM-EDTA，10mM-Tris-HCl緩衝液，pH7.4，0.2%SDSの溶液に溶かし，ポリ(U)セファロースのカラムにかけると図1bに示すようにポリ(A^-)RNAは最初に流出する。他方，カラムに吸着されたポリ(A^+)RNAは，1%から85%にホルムアミドの濃度を直線的に上昇させると，50%～60%の濃度で溶出される。なお，オリゴ(A^+)RNAは，3%～5%のホルムアミド溶液で溶出した。

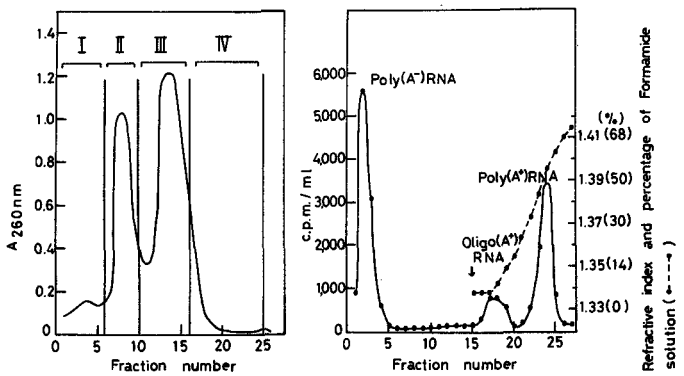


図1. a. Sedimentation Pattern of RNA divided into four fractions.
b. Column chromatography of these RNA fractions on poly(U) sepharose.

6)<u>ポリ(A)とオリゴ(A)のヌクレオチド鎖長の測定</u>，マウス脳に[^{3}H]-アデノシンの20μCiを注射した後，上で述べた方法に従って，ポリゾームRNAを調製し，10mM-Tris-HCl緩衝液，pH7.4，5mM-$MgCl_2$，300mM-NaCl，T_1RNase:50unit，RNaseA:5μgを含む溶液に溶解し，37℃，30分間インキュベートして，RNAを消化した。これからSDS-フェノール法でポリ(A)とオリゴ(A)を抽出した。ポリ(U)セファロースカラムによってポリ(A)とオリゴ(A)とを分離した後，8M尿素と15%ポリアクリルアミドのゲル（長さ10cm）を用いて5mA/ゲル，2時間電気泳動を行なった。泳動後ゲルを1mmの切片として切り出し，Soluene-350で溶解させ，シンチレーター液を加えて放射能を計測した。泳動距離よりヌクレオチド鎖長を決定した。[5]

7)<u>塩基組成の分析</u>，RNAを0.3N-KOHで37℃，18時間インキュベートした後，6N-PCAを加えて中和し，遠心して上清を分離した。この上清をKatz & Comb[7]の方法を用いて塩基組成分析を行なった。

〔結　果〕

1)<u>ポリゾームとそのRNAへの[^{3}H]-オロチン酸の取り込み</u>，図2にddとElマウス脳についてポリゾームのしょ糖密度勾配のパターンを比較したが，紫外部吸収では両者

の間でそれほど著しい相違は認められなかった。[³H]-オロチン酸の注射後3時間では，ddはElより比較的重いポリゾームに高い放射能の分布を示した。ポリゾームRNAへの[³H]-オロチン酸のとり込みをしょ糖密度勾配で分析したのが図2である。注目されることは注射後1，3時間においてElマウスでは28Sより重い分画に高い放射能がみられることである。これに対してddではこのような放射能が認められず，一般に放射能は28Sや18SにPolydisperseな傾向を示している。なお20時間では，El，ddともにラベルは紫外部吸収の28S，18S，5Sなどに一致していた。

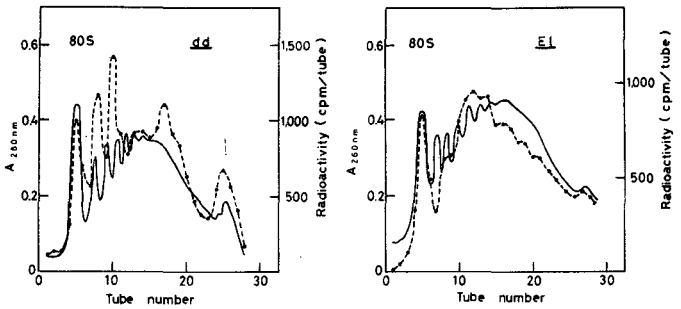


図2. Sedimentation Patterns in sucrose density gradients of brain polysomes, labelled for 3hr. with [³H]-orotic acid, from dd and El mice.

2) ポリゾームRNA中のポリ(A⁺)，ポリ(A⁻)，オリゴ(A⁺)などのRNA分子種の分布，ポリゾームRNAのしょ糖密度勾配遠心後，図1aに従い4分画に細分し，さらにポリ(U)セファロースでポリ(A)RNA，ポリ(A⁺)RNA，オリゴ(A⁺)RNAに分別して，注射後3時間における各RNA分子種への放射能の分散の程度をElとddとで比較したのが表1である。ポリ(A⁺)RNAは，ElではFr3に多いのに対して，ddではFr2で最多であった。ポリ(A⁺)RNAの回収率は全体として7%前後で，ddとElとの間で相違は認められなかった。ポリ(A⁻)RNAはdd，Elともに Fr3で最多であったが，両者を比較すると，Fr2ではElがやや多く，Fr4ではddが優っていた。なおオリゴ(A⁺)RNAはddとElとの間で目立った差異は認められなかった。

3) Elマウス脳の各RNA分子種への[³H]-オロチン酸のとり込み，ポリ(A⁺)RNAで注目されることは，Fr4が他の分画と異なり，注射後3時間まで急速な[³H]の取り込みを示し，その後徐々に減少を示すことである。その他の分画ではいずれも20時間まで持続的な増加傾向を示している（図4）。ポリ(A⁻)RNAでもFr4とFr3は短時間で急速な取り込みを示すのに対して，Fr1とFr2などの低分子RNAは12時間までlagを認める。ポリゾームRNAへの[³H]のとりこみは20時間まで直線的な増加を示し，Fr3やFr4などのRNAの動きを反映するようである。

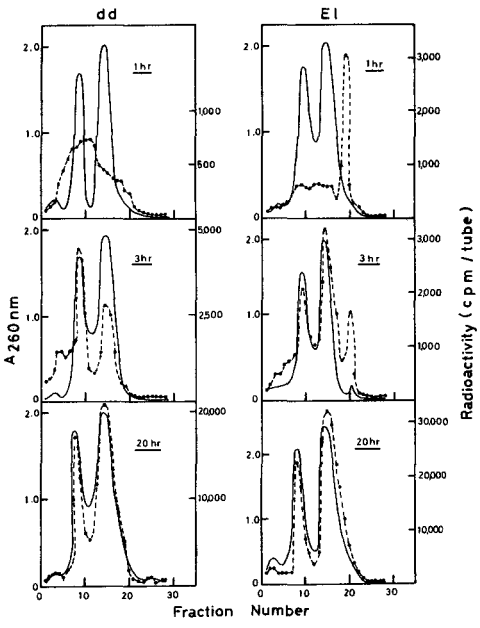


図3. Change of Sedimentation Patterns of RNA from brain polysomes of El and dd mice.

4) 塩基組成．El系マウス脳におけるポリ(A⁺)mRNAのうちFr4の塩基組成はA:G:C:U = 25.8 : 24.9 : 25.0 : 25.3 で，G+C/A+U 比は0.98 で，比較的AU優位のDNA-likeを示したが，ポリ(A⁻)RNAはいずれの分画もGC優位で，典型的なリボゾーム型を示した。

表1. Comparison of percentage distribution of ^3H in Poly(A⁻), Oligo(A⁺) and Poly(A⁺)RNAs of brain polysomes from dd and El mice.

Fractions	Poly(A⁻)RNA		Oligo(A⁺)RNA		Poly(A⁺)RNA		Total	
	dd	El	dd	El	dd	El	dd	El
Ⅰ	7.1	7.2	0.4	0.2	0.7	0.5	8.2	7.9
Ⅱ	20.9	25.3	0.6	0.4	3.3	1.7	24.8	27.4
Ⅲ	40.5	42.6	0.5	0.6	2.1	3.2	43.1	46.4
Ⅳ	8.8	3.7	0.4	0.3	1.2	2.2	10.4	6.2
Recovery	77.3	78.8	1.9	1.5	7.3	7.6	86.5	87.9

5) ポリ(A)とオリゴ(A)の鎖長，Elとdd系マウスでともに，ポリ(A)は233から110のヌクレオチド鎖長を示し，オリゴ(A)は約10であった。これは，ddとElとでポリ(A)やオリゴ(A)の形成には差異がないことを示唆している。

(考　察)

これらの結果は，Elマウス脳では28Sより重い分画に短時間で急速にラベルされ，3'末端にポリ(A)を含み，塩基組成もDNAに類似したmRNAの存在を示唆しているように思われる。このRNAは普通に用いられるdd系マウスには認められないので，Elマウス脳に特徴的なものと考えてよいであろう。Cupello & Hydén[1]もこれを同じような46Sのミクロゾーム RNAをラット脳で記載している。しかし，一般にポリ(A⁺)mRNAはrRNAと容易にaggregateし易いことが指摘されているため[4]，ここで見られた高分子RNAも分画操作中に二次的に生じた可能性も否定し得ない。事実，脳のポリ(A⁺)mRNAは，ある種の条件でdenatureさせると，低分子化する傾向があるので[2]，HeLa細胞[4]などに比べてrRNAとよりaggregateし易い性質を持つのかも知れない。この問題については，denatureの条件を種々検討し直すことによって漸次明らかにする積りである。いずれにしてもElマウスの遺伝性痙攣素質とこの高分子mRNAとの関係は興味が持たれるところである。

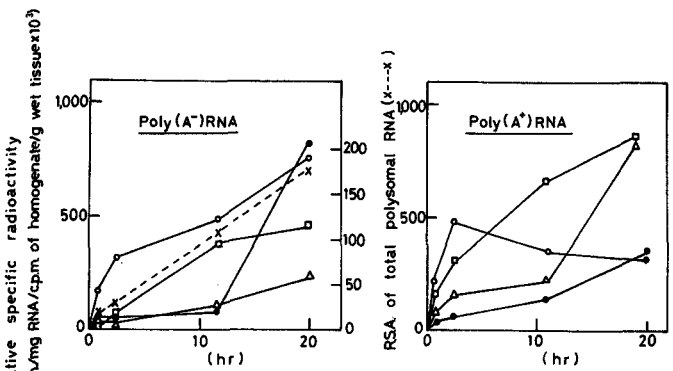


図4. Change of the relative specific radioactivities in poly(A⁻)RNA and Poly(A⁺)RNA from El mouse brains
(●—●:Fr1, △—△ Fr2, ○—○ Fr3, ●—●; Fr4, x···x Polysomal RNA)

(文　献)

1) Cupello A. & Hydén H. (1975) J. Neurochem., 25, 399 - 406. 2) Heikkila J. J. & Brown I. R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 474, 141 - 153. 3) 森浩一, 切池信夫, 山上栄, 大西博, 川北晋男 (1974) 神経化学, 13, 100-103, 4) Murphy W. I. & Attardi G. (1977) Biochim. Biophys. Res. Comm., 74, 291 - 299. 5) 大西博, 森浩一, 切池信夫, 山上栄, 川北晋男 (1974) 神経化学 15, 136-137, 6) Perry R. P., LaTorre J., Kelley D. E. & Greenberg J. R. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 262, 220 - 226. 7) 山上栄, 大西博, 森浩一, 切池信夫, 川北晋男 (1974) 神経化学 13, 108-111

50 El系マウス脳のNuclear oligo (A), poly (A)代謝におよぼす痙攣の影響

大西　博・森　浩一・山上　栄
切池信夫・川北幸男　（阪市大・医・神経）

〔要　約〕

1) Elマウスを痙攣群，ddマウスを対照群とし，痙攣直後に^{14}C-アデノシンを，対照群に^{3}H-アデノシンを頭蓋内に注射し，所定時間後に断頭，全脳の細胞分画，RNAの抽出を行ない，各RNAの$^{3}H/^{14}C$比からRNAへのアデノシンのとりこみにおよぼす痙攣の影響を調べた。核RNAおよび細胞質RNA（粗ミトコンドリア，リボゾーム，細胞上清－pH5）はいずれも10－30%の範囲内での減少を示し，注射後2時間で対照群とほぼ同一の水準にまで回復する。

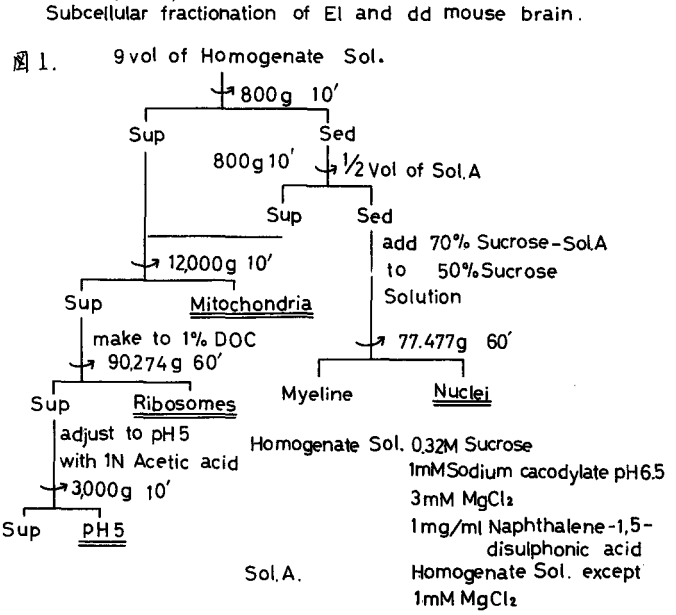
2) 対照群の核RNAの比放射活性は注射後1時間で急速に増加して最高値に達し，5時間迄その値を維持する。痙攣群は注射後2時間で対照と同じ最高値に達し遅れを示した。核RNAのpoly (A)含量は注射後漸増しつづけるが，oligo (A) 含量は注射後1時間で最高値を示し，以後急速に減少し2時間で半減，代謝回転の速さを示した。

3) 痙攣のoligo (A)，poly (A)におよぼす影響を$^{3}H/^{14}C$比で検討すると，oligo (A) は注射後1時間迄約15%の減少を示し，その後急速に回復する。poly (A)は約10%の減少を示すが回復は緩徐で，注射後5時間で対照と同じ水準に戻る。この結果は核RNAの転写の抑制とpolyadenylationの抑制とが，痙攣による影響に関与することを示唆する。

4) 痙攣はoligo (A)，poly (A) のヌクレオチド鎖長に対して影響を示さない。

脳のRNA代謝におよぼす痙攣の影響について，従来，種々の実験動物に電気ショック[(2)(3)(6)]をかけるか，あるいは痙攣誘発物質を投与[(1)(5)(7)]して研究されてきている。そして，脳のRNA量の減少，RNAへの放射性前駆物質とりこみの減少がみられるとされている。Wynter[(7)]らはflurothyl痙攣により痙攣後15分で核RNAへのオロチン酸のとりこみは27%迄減少，その後急速に回復して1時間半では逆に124%に増加を示し，この傾向は痙攣後6時間迄持続するとしている。そしてまた，細胞質RNAへのとりこみ減少は核RNAと比べて著るしく，痙攣後6時間迄減少傾向を維持しつづけるという結果を示し，痙攣の脳RNA代謝におよぼす影響の主なものは核RNAのprocessingの抑制であろうと考察している。そこで，さらに核RNAのprocessingの機構を調べる

図1. Subcellular fractionation of El and dd mouse brain.



ためには，核RNAのoligo(A)とpoly(A)の変化を，追究する方法が考えられる。またEl マウスの癌腫を利用することにより，癌腫誘発物質によるRNA代謝への直接の影響は除外され，癌腫そのものの影響を追究できる。それでEl系マウスを実験動物として用い，癌腫群に^{14}C，対照群に^{3}Hのアデノシンを投与する二重標識を行ない，前報で報告した方法に従って核RNAのoligo(A)，poly(A)についての検討を加え，その結果，癌腫のoligo(A)とpoly(A)代謝におよぼす影響が異なるという結果を得たので以下に報告する。

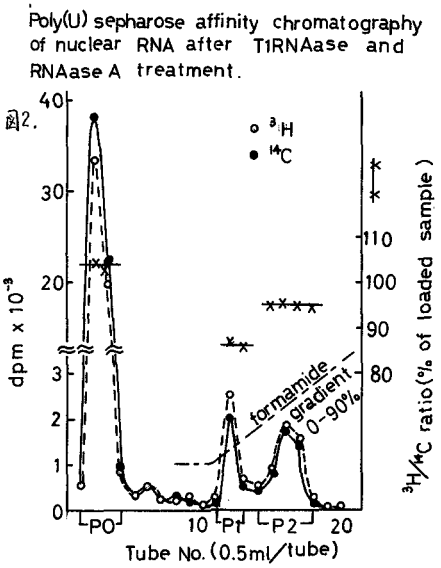
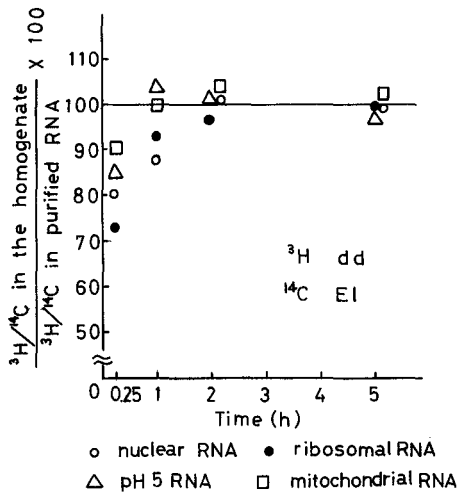


図2.

1) 実験方法

1-1) 実験動物とアイソトープ投与法：生後100日前後のEl，dd系マウス10匹ずつを同一ケージ内で上下振動させ，El系マウスに癌腫を誘発させた。癌腫後直ちに^{14}C-アデノシン5μci(20μl)を無麻酔で，眼窩裂から脳内に注射し，dd系マウスも同様に^{3}H-アデノシン20μci(20μl)を注射し，^{14}Cと^{3}Hで二重標識を行った。 1-2) 細胞分画法：図1による。 1-3) 核酸の抽出と，核RNAの精製：核分画は，0.14M NaClに溶かし，SDS-熱フェノール法により，85°Cで核RNAを抽出した。[5] ミトコンドリア，リボソーム，pH5分画は0.14M NaCl-0.05% polyvinyl sulphate, 0.5% SDSで冷フェノール法により各RNAを抽出した。核RNAは25μg/mlのpronaseを加え，37°C，30分インキュベートした後除蛋白し，エタノール沈殿させ，45μg/mlのDNAaseで，25°C，30分インキュベートし，さらにpronase処理を行い，除蛋白後エタノール沈殿させた。 1-4) T1RNAase，RNAase A処理：DNAase, pronase処理後の核RNAを0.05M Tris pH7.6, 0.05M KCl, 0.001M $MgCl_2$に溶かし，500μgの核RNAあたり100 unitのT1RNAaseと2μgのRNAaseAを加え37°C，30分インキュベート後，除蛋白し，エタノール沈殿させた。 1-5) Poly(U) Sepharose Affinity Chromatography：図2に示す様に，Molloyら[4]の変法[2]に従った。 1-6) 8M Ureaを含むPolyacrylamide Gel Electrophoresis：8M Ureaおよび0.275% bisを含む6%と15%のpolyacrylamide gel (φ5mm x 10mm)を作り，8M Ureaを含むE buffer (0.04M Tris pH7.8, 0.02M Na acetate, 0.002M EDTA)を用い，15%ではbromphenol blue (BPB)と4SRNA，モノヌクレオチドをマーカーとし，6%ではBPBと18S，4SRNAをマーカーとしてそれぞれ2.5時間，2時間泳動した。泳動後ゲルを石英管に入れ，ISCOのGel Scanner Model 1310を用いて，Model UA-5 Absorbance Monitorでチャートした。radioactivityはゲルを2mm間隔でスライスし，0.5mlのSoluene350を加えて37°C，15時間インキュベートした後トルエン系シンチレーターを加えて測定した。マーカーに対する移動距離より分子量を計測し，ヌクレオチド鎖長を求めた。 1-7) 放射能測定：^{3}Hと^{14}Cで二重標識したサンプルの放射活性の測定はPackard Tri-Carb Model 3385を用いQuick Channel Selectionで測定した。^{3}Hのstandard efficiencyは46.0%，^{14}Cのstandard efficiencyは68.1%で，^{3}Hへの^{14}Cのspill-overは12.5%である。

図3. Kinetics of relative persentage change of RNA synthesis in the subcellular fractions of El mice recovering from convulsions.



2) 結果および考察

2-1)痙攣によるRNA合成の経時的変化：図3にEl系マウスの痙攣後の変化を，dd系マウスを対照として^{14}Cと^3H-アデノシンの二重標識を用いてsubcellular fractionのRNAについて，経時的に表示した。痙攣後，15分ではEl系マウス脳の各分画のRNA合成が低下し，リボゾームRNAでは73%に，核RNAでは80%に，pH5，ミトコンドリアRNAではそれぞれ85%，90%に低下した。1時間では核RNAで88%，リボゾームRNAで93%の低下を示し，他の分画のRNAは正常に回復した。2時間で4分画のRNAとも対照群とほぼ等しくなり以後5時間でも同様の傾向を示す。ここではWynterら[7]が認めた核RNAのreboundは認められなかったが，これは薬剤を使って誘発させた痙攣と，El系マウスの比較的緩和な痙攣との差異によるのではないかと考えられる。又15分でのリボゾームRNAへのとりこみの減少は，ポリゾームのメッセンジャーRNAの合成阻害の反映であろうと考えている。変化の著るしい85℃で抽出した核RNA (rapidly labelled DNA-like RNA)[8]のprocessingの機構を追究するため，以後の実験を行った。

2-2)痙攣による核RNAのOligo(A), Poly(A)の変化：DNAase, pronase処理後の精製した核RNAをT1RNAaseとRNAase Aで消化し，そのnuclease resistant coreをpoly(U)sepharoseに吸着させホルムアミドの直線勾配で溶出した（実験方法 図2）。POはカラムに吸着しない部分であり，P1はoligo(A)，P2はpoly(A)を含む分画であることは既に報告した[8]。図4に精製した核RNAのhomogenateに対する相対比放射活性と，poly(U) sepharoseによって分離したoligo(A)とpoly(A)の核RNAに対するdpmの百分率を表示した。対照群の核RNAへのラベルのとりこみは，注射後1時間で最高値に達し，5時間迄ほぼ同じ値を維持する。痙攣群では最高値に達するのは注射2時間後に認められ，対照群に対し遅れがみられた。この事は図3でみられた痙攣群の核RNAの15分，1時間での合成阻害を反映しているものと考えられる。次に核RNA中のpoly(A)は注射後15分から5時間迄漸増するが，痙攣群では1時間から2時間の間でややlagが認められる。oligo(A)は1時間でピークに達し，以後急速

図4. Changes of relative specific radioactivity and Oligo(A), Poly(A) content of nuclear RNA after radioactive precursor injection.

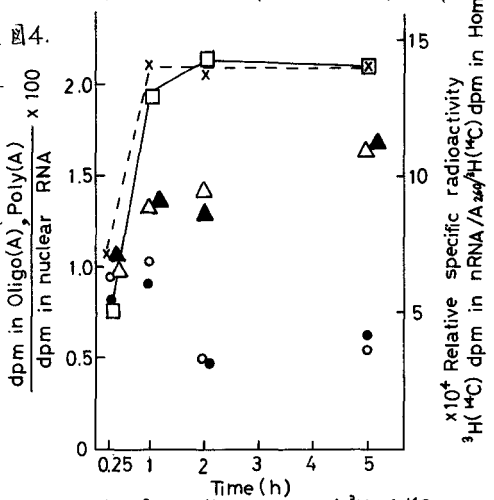
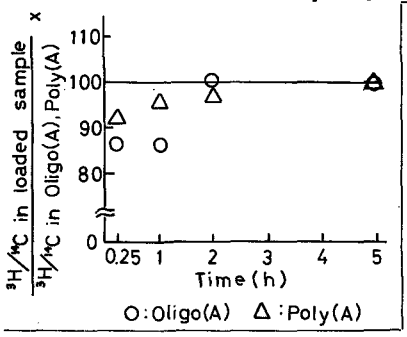


図5. Kinetics of reletive persentage change of nuclear Oligo(A), Poly(A) synthesis



に減少し2時間で半減して核RNA中0.5%前後を示し，5時間迄ほぼ同じ値を維持する。この事はoligo(A)の代謝回転の速さを示唆する。さらに，oligo(A)，poly(A)に対する痙攣の影響を調べるため，poly(U) sepharoseに吸着させる前のサンプルを分子とした$^3H/^{14}C$比で表わすと(図5) oligo(A)は，痙攣後1時間迄14%の減少を示しその後急速に回復し，2時間で対照群と等しくなる。poly(A)は15分で8%の減少を示し，以後5時間迄後徐々に回復する。これらの結果は，痙攣により，核RNAの転写とpolyadenylationは共に抑制されるが，前者は短時間で回復し，後者はより持続的に阻害される事を示唆する。痙攣により合成の抑制されたoligo(A)，poly(A)が対照群と比べて質的に異なるものかどうかを，ヌクレオチド鎖長によって検討した。poly(U) sepharoseにより分離した核RNAのoligo(A)とpoly(A)をそれぞれ15%，6%のpolyacrylamide gelを用いて，電気泳動を行い移動距離よりヌクレオチド個数を計算した（図6，7）。oligo(A)は大きいものから順次70個，33個，17個のヌクレオチドを含む事が示され，^3Hと^{14}Cのピークの位置は一致し，痙攣によりヌクレオチド鎖長に変化は認められなかった。同様に，poly(A)も360個，240個，150個のヌクレオチドを含み，鎖長の変化は認められなかった。以上の結果より，痙攣によって核RNAの転写の抑制と3'末端のpoly(A)の合成抑制が認められるが，質的なヌクレオチド鎖長の変化は認められなかった。さらに細胞質よりoligo(A) poly(A)を含むRNAを分離して核RNAとの相関を検討している。

図6. 15% Polyacrylamide gel electrophoresis profile of nuclear Oligo(A)

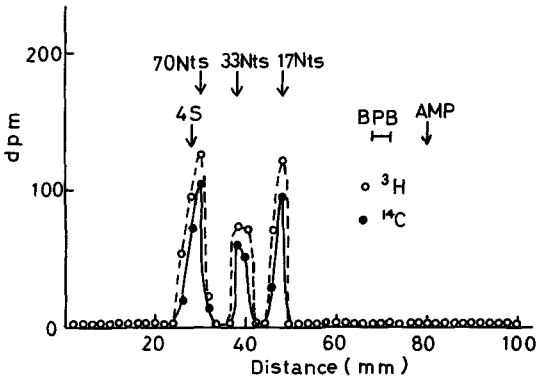
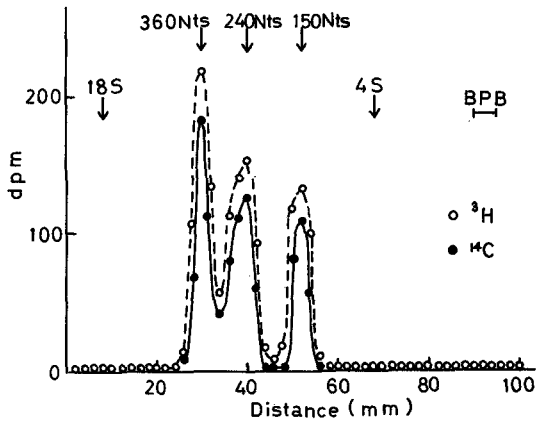


図7. 6% Polyacrylamide gel electrophoresis profile of nuclear poly(A)



reference
1) Chitre, V.S., Chopra, S.P.& Talwar, G.P.: J. Neurochem. 11, 439 (1964)
2) Essman, W.B.: Semi. Psychiatr. 4, 67 (1971)
3) Mihailovic, L., Jankovic, B., Petrovic, M.& Isakovic, K.: Experientia 14, 144 (1958)
4) Molloy, G.R., Jelinek, G.M., Salditt, M.& Darnell, J.E.: Cell 1, 43 (1974)
5) Pevzner, L.Z.& Sandergen, E.D.: Acta. Histochem. 39, 101 (1971)
6) Vesco, C.& Giuditta, A.: J. Neurochem. 15, 81 (1968)
7) Wynter, C.V.A., Ioannou, P.& Mathias, A.P.: Biochem. J. 152, 449 (1975)
8) 大西 博，森 浩一，切池信夫，山上 栄，川北幸男，神経化学 15, 136 (1976)

51 神経系由来の培養細胞中のサイクリックAMP量に対するアデノシン関連物質の影響

黒田洋一郎・J. Ciesielski-Treska・P. Mandel
(Centre de Neurochimie du CNRS, Strasbourg, FRANCE)

〔要 約〕

アデノシン関連物質は嗅脳皮質切片において観察される後シナプス電位に抑制作用をもち，かつ切片中のサイクリックAMP（cAMP）量を顕著に増大させ，その脳中での生理作用が注目されつつある。多種の細胞からなる脳切片を用いることの複雑さをさける一つの手段として，各種神経系由来の培養細胞を用い，細胞中のcAMP量に対するアデノシン関連物質の影響を調べた。用いた3種のニューロブラストーマではcAMPの増加はたかだか2倍以下であった。2種のグリア由来のクローン化した細胞では増加はみられず，そのうちの1種ではアデノシンによってcAMPはやや減少した。新生ラット脳のprimary culture（16日間培養）では，ニューロンは消滅してしまい大部分がアストロブラストからなっているが，cAMP量はアデノシンの添加によって顕著に増大した。脳切片で観察されたcAMP量のアデノシンによる増大のかなりの部分は，ある種のグリア細胞に由来することが示唆された。

アデノシン関連物質（アデノシン，AMP，ADP，ATP）は大脳皮質切片中のcAMP量を著明に増加させることが知られていたが（8,9）その脳中での生理作用は長い間不明であった。最近これらの物質が嗅脳皮質切片から観察される後シナプス電位（10）を抑制し（6），かつ，切片中のcAMP量をも増加させ（4），さらにこれら2つの作用は細胞膜外側にある，非常に類似した性質をもった，それぞれの"アデノシン・リセプター"を通じて生じていることも明らかになった（5）。後シナプス電位抑制作用に関しては，前シナプス部からの神経伝達物質の遊離抑制の可能性を含めて，そのリセプターはニューロンの細胞膜にあるであろうことが予想できるが，cAMP量の増加がどの細胞種によるものかは，より検討を要する課題である。

この課題の解決への一つの手段として，神経系由来の培養細胞を用いることが考えられる。すでに多種の細胞からなる脳切片の複雑さをさけ，培養細胞を用いてこの現象のモデル・システムを探索する方向の試みが個別にあり，ヒトのアストロサイトーマがアデノシンに良く反応することが知られ（3），またcAMP量の上昇は"アデノシン・リセプター"に連動したアデニル・サイクレースの活性化によるものであるという示唆（1,7）も行われているが，著者らは，アデノシン添加によるcAMP量の変動を多種の培養細胞において脳切片と同一条件で比較検討し，脳切片中でcAMP増加に寄与している細胞種を推察しようと試みた。

〔方法〕

ハムスター正常アストロブラスト（NN）とラット・グリオブラストーマ（C6）は，それぞれ North American Biologicals Inc. と American Type Culture Collection

から得られた。ニューロブラストーマ（N18，NIE-115）は Nirenberg 博士（NIH）から提供されたものである。ニューロブラストーマ（M1）は Centre de Neurochimie でクローン化された。新生ラット脳の primary culture は Booher らの方法（2）によってつくられた。

細胞は10% foetal Calf serum，50ユニットのペニシリンGナトリュウム塩，25 μg/ml の streptomycin sulfate を添加した Dulbecco の改良による Eagle 培地中で，37°C，高湿度の5%炭酸ガス，95%空気の混合気下で培養された。クローン化された細胞はサブカルチャー開始後3～4日，primary culture は開始後16日で実験に使用した。

実験は培養液を除き，プラスチック容器の底に付着している培養細胞を Krebs-Ringer-bicarbonate-glucose 培地（KRBG培地）で3回洗い，さらに新らたに適量のKRBG培地（薬品添加，または無添加）を加え，それを所定時間，37°Cでインキュベーションすることによって行った。インキュベーション終了後，KRBG培地を除き，1Mの過塩素酸を加えて，細胞と共に回収し，ホモジネートとし，遠心後（1300g，20分），上清はcAMP定量に，沈澱は蛋白定量に用いた。cAMPの定量には Binding assay 法に基づく市販のキットを用いた。ある実験ではインキュベーション後のKRBG培地に1/10量の1M過塩素酸を加え，cAMP量の定量に用いた。

［結果］

表1に，各種培養細胞のcAMP量のアデノシン（100μM）添加による変化を示す。ニューロブラストーマはいずれも増加はするが 50～89% 増にとどまり，インキュベーション時間の長短，加えたアデノシン濃度の変更によっても，それ以上の増加は得られなかった。フォスフォジエステレースの阻害剤であるIBMXまた

表 1　培養細胞中のサイクリックAMP量のアデノシン添加による変化

細胞種	インキュベーション時間（分）	サイクリックAMP量 アデノシン無添加（pmole/mg蛋白）	アデノシン（100μM）添加	% （無添加=100）
ニューロブラストーマ				
M1	10	6.9	11.3 *	164
N18	10	5.6	8.4 *	150
NIE-115	10	4.4	8.3 *	189
グリア由来クローン化細胞				
NN	10	5.5	4.5 *	82
C6	10	7.6	6.7	88
新生ラット脳 primary culture（16日間培養）	2	5.7	59.3 ***	1040
嗅脳皮質切片（文献5）	5	15.6	85.9 ***	551

* 統計学的に有意；$P < 0.05$　　*** 同；$P < 0.001$

は papaverine の添加によってアデノシンの作用は増強されたが，2mMのテオフィリンの添加によってはアデノシンの作用は部分的にしか阻害を受けなかった。

グリア由来のクローン化細胞では，いずれも増加はみられず，反対にNNでは有意な減少がみられた。この減少はIBMXや papaverine の添加によっては変化を受けない。また，アデノシン添加によって細胞内のcAMPが外へ遊離したためでもない。

新生ラット脳の primary culture は2週間以上の培養によりニューロンが消滅し大部分がアストロブラストからなっている。表1にアデノシン添加によるcAMP量変化の一例を示したが，平均約10倍の顕著な増加を示した。時間経過を細胞内と培地中のcAMP量を同時に測定して示したのが 図1である。細胞内cAMPは約2分で最大量に達し，その後急速に減少し約15分でほぼ添加前のレベルにもどる。それに対し，培地中のcAMP量はやや遅れて増加し，15分後もほぼ増加したままのレベルを保っている。フォスフォジエステレースの阻害剤であるIBMXや papaverine の添加によってアデノシンの作用は増強されなかった。2mMのテオフィリンの添加によってアデノシンの作用はほぼ完全に阻害された。100μMのATPの添加は有意な増加を示したが，その大きさは同濃度のアデノシンに比較して，はるかに小さかった。アデノシンの dose による変化は 10μM から有意な増加がみられ，300μM で極大に達し，1mMでは，やや 300μM に比し少ない増加を示した。

［考察］

アデノシン添加によるcAMP量の変化には，用いた培養細胞の範囲内では3つの Type があることが判明した。

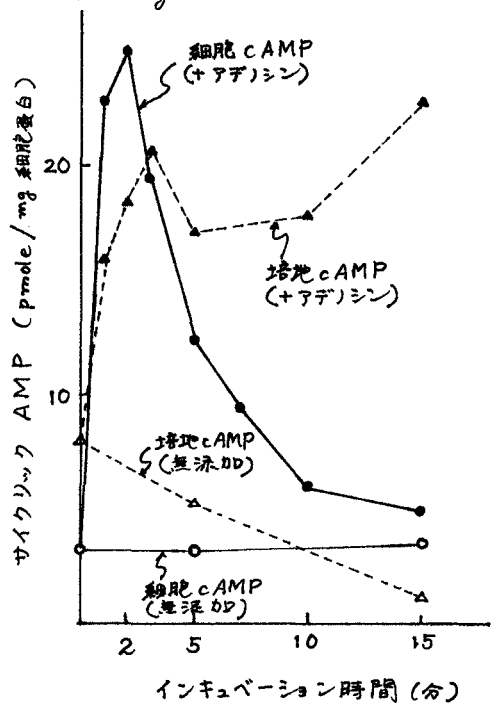
Type 1 ; ニューロブラストーマ；
（M1，N18，NIE-115）
増加はたかだか2倍以内。

Type 2 ; グリア・クローン化細胞
（NN，C6）
増加せず，むしろ減少。

Type 3 ; 新生ラット脳 primary culture
増加，著るしい。

これら3つの Type のなかでは primary culture のみが脳切片のcAMPの増加を説明するに足る増加を示した。他の細胞種が少量混入している可能性は否定できず，それが数千倍に及ぶcAMPの増加を示していることも考えうるが，アストロサイトーマのデータも考えあわせ

図1 primary culture でのcAMP変化



ると，これらの増加はアストロブラストによるものと考えるのが妥当である。4週間以上の培養期間を経たprimary cultureもほぼ同程度のcAMPの増加を示したことも，ごくわずかに残ったニューロンによるものとする可能性を否定している。

テオフィリンによって，ほぼ完全に増加が阻害されること，IBMXによって，アデノシンの作用が増強されないことなどは，嗅脳皮質切片によるデータと類似している。興味あることに，脳切片で観察された現象とは2つの相異点がある。1つは，脳切片ではATPもアデノシンと同様な変化をcAMP量に及ぼすのに対し，培養細胞では，ATPによる増加はアデノシンに比較してはるかに少ないことである。さらに脳切片では5分後にcAMPの量は極大に達し，その後20分以降まで減少しないが，primary cultureでは2分後の極大を過ぎると急速に減少することである。この減少の少くとも一部はcAMPの培地への流出で説明できる。

これらの結果から，脳切片で観察されたアデノシンによるcAMPの増加のかなりの部分は，ある種のグリア細胞に由来することが示唆される。

［文献］

1. Blume, A.J., and Foster, C.J., (1975) J. Biol. Chem., 250, 5003-5008.
2. Booher, J., and Sensenbrenner, M.,(1972) Neurobiology, 2, 97-105.
3. Clark, R.B., and Gross, R., (1974) J. Biol. Chem., 249, 5296-5303.
4. Kuroda, Y. and Kobayashi, K., (1975) Proc. Japan Acad., 51, 495-500.
5. Kuroda, Y., Saito, M., and Kobayashi, K., (1976) Brain Res., 109, 196-201.
6. Okada, Y., and Kuroda, Y., (1975) Proc. Japan Acad., 51, 491-494.
7. Penit, J., Huot, J., and Jard. S., (1976) J. Neurochem., 26, 265-273.
8. Sattin, A., and Rall, T.W., (1970) Mol. Pharmacol., 6, 13-23
9. Shimizu, H., Creveling, C.R., and Daly, J. (1970) Proc.Nat. Acad. Sci. (Wash.) 65, 1033-1040.
10. Yamamoto, C., and McIlwain, H. (1966) J. Neurochem., 13, 1333-1343.

52 β受容体とアデニルサイクレースの物理化学的性質

芳賀達也*・A.G.Gilman
(Virginia大・薬理, *現・浜松医大・生化)

〔要 約〕

1. 培養リンパ球(S49 Lymphoma cells)のβ受容体とアデニルサイクレースをルブロールPXで可溶化し、それらの流体力学的性質をゲル3過法とH_2OとD_2O中の庶糖密度勾配遠心法で調べた。両者は共有結合で結ばれていない異なる実体である事が直接的に示された。分子量は、β受容体75,000、アデニルサイクレース220,000と算出された。

2. β受容体とアデニルサイクレースに結合しているルブロールPXの量は、それぞれ、0.8, 0.2 g/g蛋白質と算出された。β受容体とリガンドの結合はルブロールで可溶化後トリプシンの作用を受け易くなるが、アデニルサイクレースに対するトリプシンの作用は可溶化の影響を受けない。これらの結果に基づいて、膜とβ受容体とアデニルサイクレースの相互作用について考察する。

3. 膜の可溶化物を37°Cで60分保温するとアデニールサイクレースは失活する。これにアデニルサイクレースのない変異種の膜、又は膜可溶化物を加えると活性が再び現われる(E.M.Ross, A.G.Gilman 発表準備中)。この熱処理した試料中の活性再現に必要な成分の流体力学的性質を調べ、140,000という分子量を得た。これはアデニルサイクレースの一成分と考えられる。

ノルエピネフリンは末梢神経系の伝達物質であり、中枢神経系でも伝達物質として働くと考えられている。ノルエピネフリンの受容体は、αとβの2種が薬理学的に区別され、β受容体はアデニルサイクレース(Aサイクレース)と連関している。しかし、受容体の分子としての性質についての知見は乏しい。その理由の一つは、β受容体を定量する適当な方法がなかったことによるが、その点は最近立体特異的な標識化合物が開発され解決された(1,8)。他の理由は、アセチルコリン受容体に於ける電気器官のような適当な材料のない事に由来する。最近、β受容体とAサイクレースの関係を研究するモデル系として、カエルや七面鳥の赤血球、各種培養細胞が使われている。ここでは培養リンパ球(S49 lymphoma cells)のβ受容体とAサイクレースの流体力学的性質を、ゲル3過法と庶糖密度勾配遠心法で調べた結果を報告する。この細胞は細胞内のcAMPが増加する条件が致死的という性質を持ち、これを利用してβ受容体ーAサイクレース系の変異種が得られるという利点がある[3,6,7]。Aサイクレースの流体力学的性質は腎臓の系について調べられている(11,12)。β受容体の可溶化はカエル赤血球について報告されているが(5,9)、分子の大きさ等についての詳しい報告はなされていない。

〈実験方法〉

S49リンパ球は10%ウマ血清を含むDulbecco's modified Eagles溶液で2~3×10^6細胞/mlの密度まで培養した。培養液1.6lから、分別遠心、庶糖密度勾配遠心で膜分画(収量30~50mg蛋白質)を精製し、-90°Cに保存した(14)。膜分画を、β受容体に特異的な(^{125}I)ヨードハイドロキシベンジルピンドロール(IHYP, 50-80 pM)(1,10)、と

Aサイクレースを不可逆的に活性化するGpp(NH)p (50μM)と30°C 30分反応させた。反応後遊離のIHYPの大部分を活性炭とSephadex G 50を通して除き、膜分画をルブロール溶液(0.1%ルブロールPX, 20mM HEPES, 2mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 150mM KCl, pH 8)で可溶化した。最初の反応液中のAサイクレースの50%, 結合IHYPの80%がルブロール液に見出され、そのうちそれぞれ70%と90%が膜残渣遠心後の上清に回収された。上清を限界ろ過で濃縮後、ゲルカラム(Ultrogel AcA 34, 4%アガロース, 3%アクリルアミド, 0.9×27cm, 溶出液ルブロール溶液)と庶糖密度勾配(5%-20%庶糖, ルブロール溶液, H_2O又はD_2O)にかけて分析した。遠心は通常43,000rpmで13時間行なった。分子の大きさを定める標準物質として、βガラクトシダーゼ, フマラーゼ, カタラーゼ, 乳酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素, チトクロームCを試料液に加え、同時にカラム又は遠心操作を行なった。活性測定は常法に依った(2)。それぞれのストークス半径(a)、沈降定数($s_{20,w}$)として下記の値を採用した。a: 6.84, 5.27, 5.21, 4.75, 3.69, 1.87(nm); $s_{20,w}$: 15.93, 9.09, 11.3, 7.3, 4.32, 1.71(S)。Aサイクレースは、α-^{32}P ATPを基質としてSalomon (15)の方法で^{32}P-cAMPを分析した。可溶化したβ受容体に結合したIHYPは、ポリエチレングリコールを用いる以下の方法で定量した。ゲルろ過又は庶糖密度勾配遠心後の分画100-200μlに60μlのγ-グロブリン(1%), プロプラノロール(2mM), リン酸緩衝液(20mM, pH 8), 1mM $MgCl_2$を加え、更に1.2mlのポリエチレングリコール6000 (10%), リン酸緩衝液20mM (pH8), $MgCl_2$ (3mM), KCl (100mM)を加えた後0°Cで20分放置する。この液をミリポアフィルターに通し、5mlのポリエチレングリコール液で洗浄後、フィルターに回収される^{125}Iをγカウンターで測定する。

〈実験結果と考察〉

ゲルろ過の結果を図1に示す。標準蛋白質のストークス半径と$\frac{V-V^0}{V^t-V^0}$として定義されるKdの間の関係(図2)より、Aサイクレースとβ受容体のストークス半径(a)を算定した(図2, 表1)。(ここでV^t, V^0, Vはそれぞれ DNPグリシン, ブルーデキストラン, 個々の蛋白質の溶出液量である)。庶糖密度勾配遠心の結果を図3, 図4に示す。標準蛋白質の$s_{20,w}$と界面よりの移動距離(Y)との間には比例関係がある(図5)。この関係より算出される見掛けの$s_{20,w}$は、Aサイクレース, β受容体共に媒質としてH2Oを用いた時の方がD_2Oを用いた時より大きい(図5)。この事は、両蛋白質の偏比容($\bar{v}$)が標準蛋白質のそれより大きい事を示しており、高い偏比容($\bar{v}=0.958$)を持つルブロールが結合している結果と考えられる。$\bar{v}$と真の$s_{20,w}$は、H_2OとD_2Oで得られた2つの結果を用いて計算することができる(5)。表1に得られた$\bar{v}$と$s_{20,w}$の値, a, $\bar{v}$, $s_{20,w}$より得られる分子量, 摩擦比の値をまとめてある。更に、$\bar{v}$の値が蛋白質の$\bar{v}$(0.71-0.76)とルブロールの$\bar{v}$の平均であると仮定する事により、蛋白質部分の分子量とルブロールの結合量を計算した(表1)。

以上の結果は、β受容体とAサイクレースが共有結合で結ばれていない、裸なる実体である事を直接的に示している。同様の結論が、可溶化後のゲルろ過(9)、又は細胞融合法(13)を用いた実験結果から得られている。

水溶性蛋白質は界面活性剤と殆んど結合しないが、膜蛋白質は結合する。その結合部位は、本来膜の他の成分と疎水結合する部位であると考えられている(16)。界面活

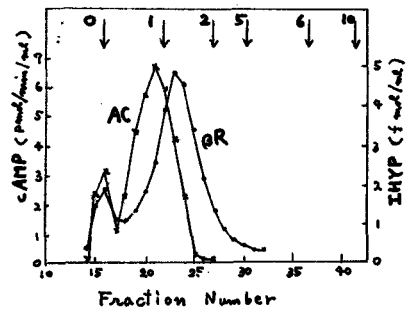
性化剤が単量体として蛋白質に結合している場合には、その結合量が蛋白質の疎水性の表面積の尺度と考えられる。この仮定のもとでは、蛋白質重量あたりより多くのルブロールと結合しているβ受容体は、Aサイクレースに比べて表面の中で疎水性部位の占める割合が多く、より膜に組み込まれていると考えられる。他方、ルブロールがミセルとして蛋白質に結合している可能性もある。Aサイクレースとβ受容体に結合しているルブロールの数は1ケのミセルの分子数(10⁸)と同程度と算出されるので、Aサイクレースとβ受容体にはミセルと結合する特殊化した疎水性部位があるという説明も可能である。これに関連してルブロールによる可溶化の有無でトリプシンの効果に差があるか否かを調べた。Aサイクレースは、可溶化の有無に拘らず同一濃度のトリプシンで活性化されるが、β受容体は可溶化後トリプシンの影響を受け易くなる。この結果は、Aサイクレースの活性部位は細胞質中に、β受容体の結合部位は膜内部にあるという可能性をより考え易くする。

S49リンパ球について、Aサイクレースもβ受容体も持つが、βアゴニストによりAサイクレースの活性化されない変異種(UNC, uncoupled variant)が見出された(6)。この変異種のAサイクレースとβ受容体の分子サイズは、野性型のものと同じであった。これを説明する最も単純な仮説は、Aサイクレースとβ受容体以外にカップリングに必要な成分を仮定することであるが、現在のところその直接的な証拠は得られていない。

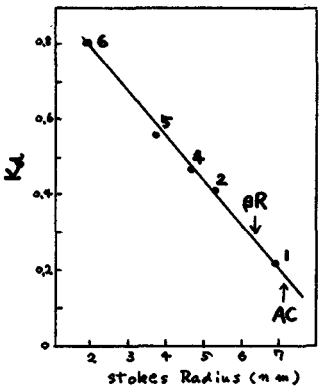
野性型のS49リンパ球から可溶化されたAサイクレースを37℃で60分処理するとAサイクレースの活性が失われる。この熱処理した標品に、Aサイクレースの活性のない変異種(AC^-)の膜標品又はAC^-の様の可溶化物を加えると、F^-又はGppCNHpで活性化されるAサイクレース活性が再び現れる(E.M. Ross, A.G. Gilman 発表準備中)。この事実は、Aサイクレースが熱安定性の異なる2つの成分から成っている事を示唆する。比較的熱に安定な成分の分子サイズを同様な方法で測定し、下記の結果を得た。a = 6.4nm, $\bar{v}$ = 0.74 ml/g, $s_{20,w}$ = 4.9S, 分子量137000, f/f_0 = 1.9。

〈文 献〉

1. Aurbach, G.D., Fedak, S.A., Woodard, C.J., Palmer, J.S., Hauser, D., and Troxler, F. (1974) Science 186, 1223-1224.
2. Biochemical Information (1973) Boehringer Mannheim Corp., Mannheim, West Germany.
3. Bourne, H.R., Coffino, P., and Tomkins, G.M. (1975) Science 187, 750-752.
4. Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2374-2384.
5. Clarke, S. (1975) J. Biol. Chem. 250 5459-5469.
6. Haga, T., Ross, E.M., Anderson, H.J. and Gilman, A.G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2016-2020.
7. Insel, P.A., Maguire, M.E., Gilman, A.G., Bourne, H.R., Coffino, P., and Melmon, K. L. (1976) Mol. Pharmacol. 12, 1062-1069.
8. Lefkowitz, R.J., Mukherjee, C., Coverstone, M., and Caron, M.G. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 703-709.
9. Limbird, L.E., and Lefkowitz, R.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 779-802.
10. Maguire, M.E., Wiklund, R.A., Anderson, H.J., and Gilman, A.G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1221-1231.
11. Neer, E.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6527-6531.
12. Neer, E.J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5831-5834.
13. Orly, J., and Schramm, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4410-4414.
14. Ross, E.M., Maguire, M.E., Sturgill, T.W., Biltonen, R.L., and Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252, *in press*
15. Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974) Anal. Biochem. 58, 541-548.
16. Tanford, C., and Reynolds, J.A. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457, 133-170.

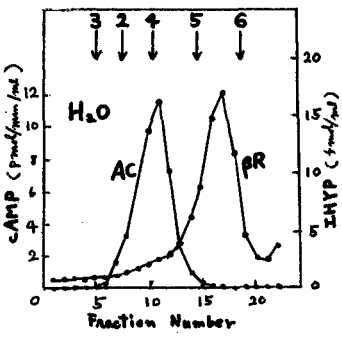


<図 1>

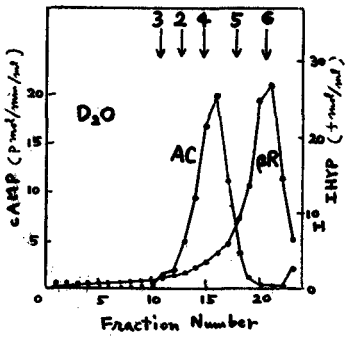


<図 2>

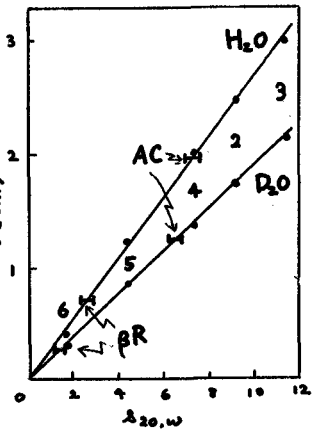
<略号>
AC：Aサイクレース
βR：β受容体
1：β-ガラクトシダーゼ
2：フマラーゼ
3：カタラーゼ
4：乳酸脱水素酵素
5：リンゴ酸脱水素酵素
6：チトクロームC
0：ブルーデキストラン
10：DNP グリシン



<図 3>



<図 4>



<図 5>

<表 1>

パラメーター	アデニルサイクレース	β-受容体
ストークス半径 (a, nm)(a)	7.1 ± 0.04 (3)	6.4 ± 0.03 (3)
偏比容 (v̄, ml/g) (a)	0.78 ± 0.01 (7×6)	0.83 ± 0.01 (7×6)
沈降定数 ($s_{20,w}$, S)(a)	7.5 ± 0.3 (7×6)	3.1 ± 0.3 (7×6)
分子量	270×10^3	130×10^3
摩擦比(b)	1.6	1.8
ルブロール結合量(c) (g/g蛋白質)	0.2 (0.4 − 0.1)	0.8 (1.0 − 0.6)
(mol/mol蛋白質)	90 (120 − 40)	100 (110 − 80)
蛋白質部分の分子量(c)	220×10^3 ($200\text{-}250 \times 10^3$)	75×10^3 ($68\text{-}85 \times 10^3$)

(a)結果は、平均値 ± S.D.(実験数) として示されている。H_2O と D_2O 中での遠心は7回と6回行ない、42ケの組み合せについて v̄ と $s_{20,w}$ を計算した。
(b)水和は無視して計算した。
(c)蛋白質の v̄ を 0.735 と仮定した時の値を示す。カッコ内は、v̄ を 0.71 と 0.76 と仮定した時得られる値である。

〔この研究の一部は Fed, Exp, Biol. U.S.A (1977)に発表し、J. Biol. Chem. に投稿中である〕

53 Dopamine-sensitive adenylate cyclaseの再構成

佐野健治・勝田公雄・前野弘夫
（山之内製薬・中研）

〔要　約〕

Lubrol PX で可溶化した犬尾状核のシナプス膜成分を Sephadex G-200 でゲル沪過すると dopamine-insensitive adenylate cyclase(M.Wt.,約260,000) と [^{3}H]dopamine binding protein(M.Wt.,約35,000) とに分れた．分離した adenylate cyclase の活性は10 mM NaF により basal の約3 倍に上昇した．また，分離した[^{3}H]dopamine binding protein の dopamine に対する Kd (1.26×10^{-6} M)，catecholamine や抗精神分裂病薬に対する affinity はシナプス膜分画(M_3)で得られた結果と良く一致した．この様に分離した adenylate cyclase と，[^{3}H]dopamine binding protein を混合して再構成した dopamine-sensitive adenylate cyclase は，M_3 で得られた結果と同様の dopamine に対する Ka(1.55×10^{-6} M)，basal の約3倍の最大活性，抗精神分裂病薬による阻害等を示した．

catecholamine-sensitive adenylate cyclase のホルモン受容部と酵素触媒部位が同一分子上にあるか否かについては統一した見解に未だ達していない。Stellwagen and Baker (4)は，牛脳の両 units が同一分子内に存在することを，また，Limbird and Lefkowitz (2)は蛙赤血球膜で両 units が分離されることを，最近，それぞれ報告した．

我々は犬の尾状核からシナプス膜分画(M_3) を作成し，可溶化した後，Sephadex G-200 でゲル沪過し，[^{3}H]dopamine binding protein と dopamine-insensitive adenylate cyclase に分離し，得られた両units から，dopamine-sensitive adenylate cyclase の再構成に成功したので報告する．

〔実験方法〕

M_3 は De Robertis の方法(1)により作成した．可溶化は Stellwagen and Baker の報告(4)に従った．M_3 (蛋白量，約750 mg) を 5 mM NaF と 2% Lubrol PX を含む buffer A (100 mM Glycylglycine , pH 7.4, 0.25 M sucrose, 5mM $MgSO_4$, 1mM EDTA, 3 mM dithiothreitol) 100 ml に懸濁し，氷水中に20分間放置後，105,000 g , 60 分遠心し，上清を実験に使用した。この上清(12.3-14.0 mg/3.5 ml) をあらかじめ buffer A で平衡にした Sephadex G-200 にかけ，同じ buffer で溶出した．

adenylate cyclase 活性は Clement-Cormier et al の方法(1)に従って測定した．[^{3}H]dopamine binding 活性はM_3 に関しては既に報告した方法(3)により，可溶化したM_3 に関しては Sephadex G-50 によるゲル沪過法により，それぞれ測定した．

〔結果と考察〕

1) [^{3}H]dopamine binding protein と adenylate cyclase の分離

可溶化したM_3 について，Sephadex G-200 によるゲルクロマトグラフィを行ったところ，

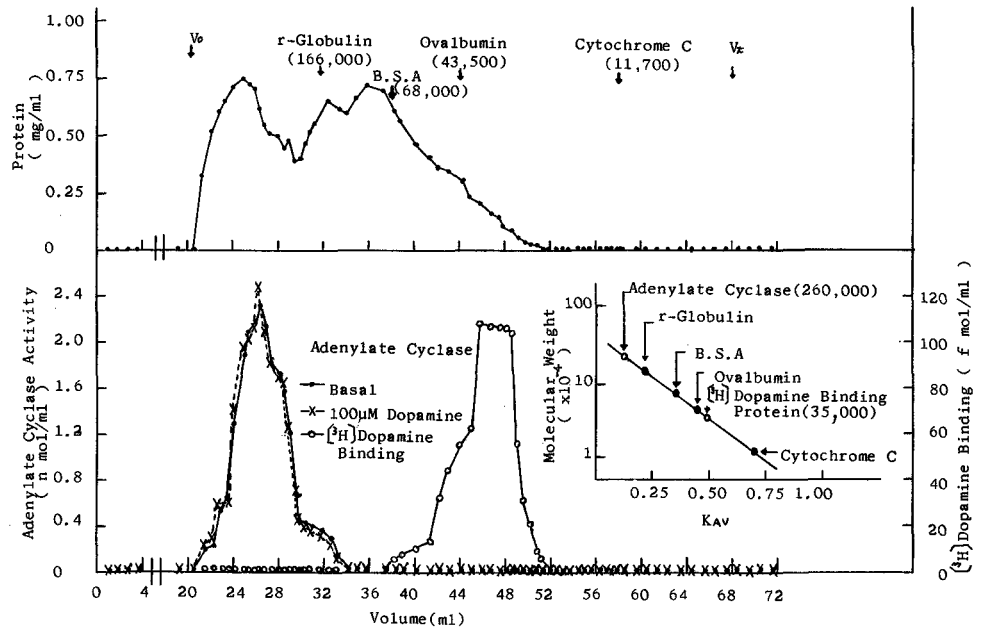


Fig.1 Sephadex G-200 chromatography of solubilized adenylate cyclase and dopamine receptor

Fig.1 に示す様に，dopamine-insensitive adenylate cyclase(M.Wt.，約 260,000)と[3H]dopamine binding protein(M.Wt.，約35,000)がきれいに分離された。

2) 可溶化した[3H]dopamine binding protein の性質

熱処理(60°，4 分)または pronase 処理により，完全に失活するので，[3H]dopamine binding 活性を示すものは蛋白と考えられる。phospholipase A および C は影響しないので，活性に燐脂質は関与しないものと推測される。

生物活性アミンによる影響は，Fig.2 に示す様に非放射 dopamine により特異的に阻害された。Fig.3 の如く，dopamine の Kd (1.26x10⁻⁶ M) および Hill 係数 (n=0.97)は M₁ の結果(3)と一致した。

antagonist による影響は Fig.4 に示す如くで，Kd を求めると M₁ の結果(3)と一致した。また，β-遮断剤，dopamine の代謝酵素の阻害剤により影響されなかった。

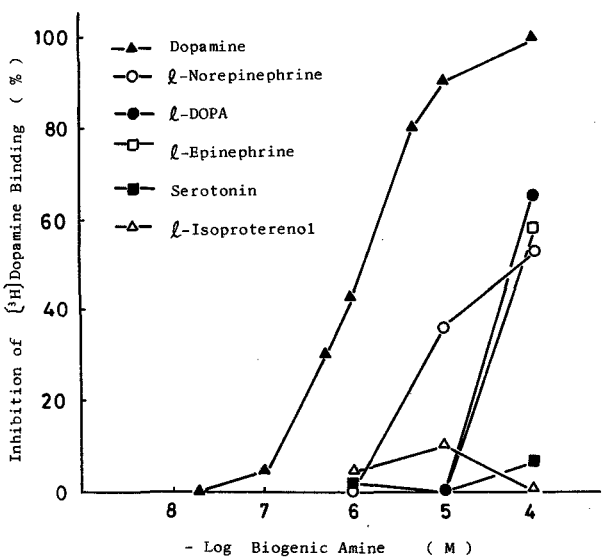


Fig.2 Competition of biogenic amines in the binding of [3H]dopamine

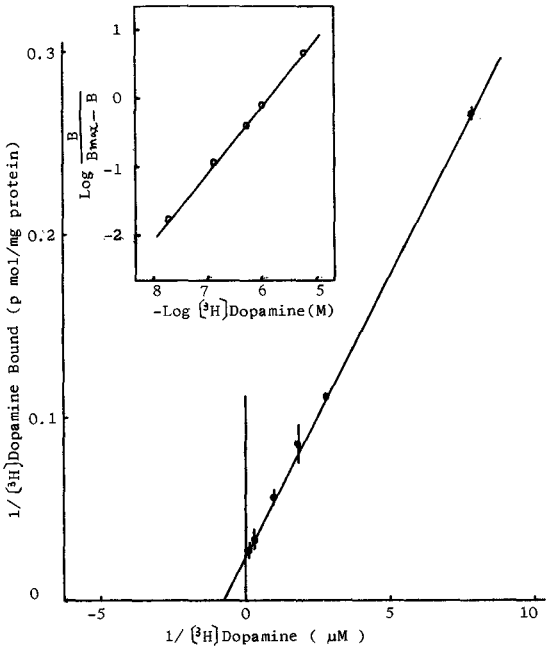


Fig.3 Lineweaver-Burk plot of [3H] dopamine binding

3) dopamine-sensitive adenylate cyclase の再構成

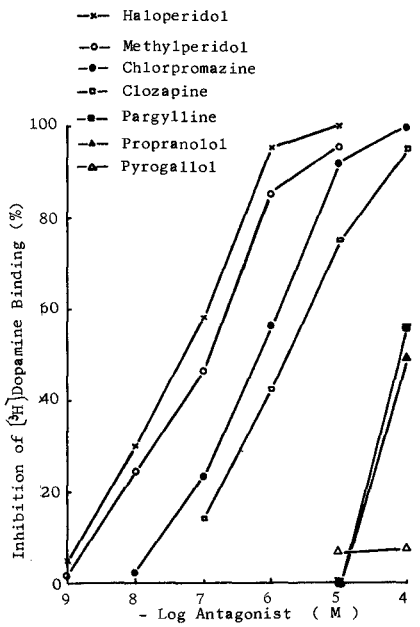


Fig.4 Effects of dopamine antagonists and some other inhibitors on the binding of [3H]dopamine

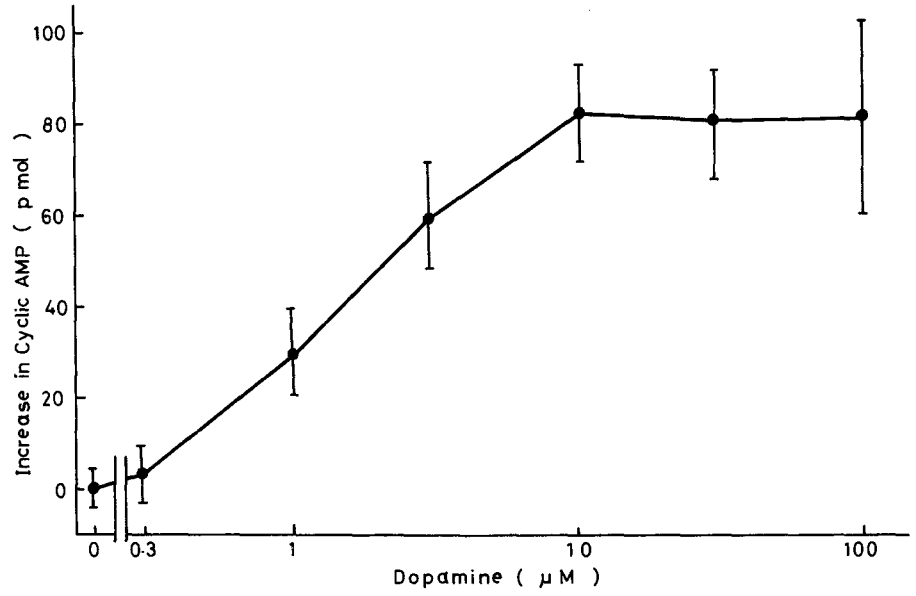


Fig.5 Effect of dopamine concentration on reconstituted dopamine sensitive adenylate cyclase

(In the absence of added dopamine, 65.1±4.6 pmol of cyclic AMP was formed)

分離した adenylate cyclase の一定量に [3H]dopamine binding protein の量を種々変えて，混合し

Table 1. Reconstitution of dopamine-sensitive adenylate cyclase

	Addition		Adenylate Cyclase			[3H]Dopamine Binding
	Adenylate Cyclase Fraction	[3H]Dopamine Binding Fraction	Basal	100 μM Dopamine	Stimulation	
	μg	μg	p mol	p mol	%	f mol
A)	0	19	N.D*	N.D	——	14.1 ± 0.521
	17	0	34.7 ± 2.86	32.3 ± 3.94	93.1 ± 11.4	N.D
	17	4.8	33.0 ± 4.05	30.4 ± 4.44	92.2 ± 13.4	3.27 ± 0.166
	17	9.5	30.3 ± 4.21	43.0 ± 4.85	142 ± 16.0	6.98 ± 0.329
	17	19	34.9 ± 3.74	61.1 ± 5.72	175 ± 16.4	13.3 ± 0.230
B)	0	80	N.D	N.D	——	——
	21	0	40.4 ± 3.83	37.6 ± 4.99	93.1 ± 12.4	——
	21	40	39.9 ± 5.94	120 ± 20.5	302 ± 51.4	——
	21	80	47.5 ± 5.29	126 ± 20.3	265 ± 42.7	——

* Not Detectable

, 0° で 30分間incubate後, dopamine-sensitive adenylate cyclase を測定すると, Table.1 に示す様に, 100 μM dopamine により basal の約3倍の最大活性を示した。Fig.5 に示す様に, dopamine に対する K_a (1.55×10^{-6} M) は M_1 と同様の値 (3) を示し, 40 μM dopamine による活性は 1 μM の chlorpromazine および haloperidol により強く阻害された。

以上の結果から [3H]dopamine binding protein は dopamine-sensitive adenylate cyclase の調節蛋白であると考えられる。

〔文献〕

(1) Clement-Cormier,Y.C.,Parrish,R.G.,Petzold,G.L.,Kebabian,J.W.,and Greengard,P.(1975) J.Neurochem. 25,143

(2) Limbird,L.E.,and Lefkowitz,R.J.(1977) J.Biol.Chem.252,799

(3) Sano K.,and Maeno,H.(1976) Biochem.Biophys.Res.Commun.73,584

(4) Stellwagen,E.,and Baker,B,S.(1976) Nature.261,719

54 ラット線条体及び中隔－側坐核のDopamine sensitive adenylate cyclaseに対するChlorpromazineの影響

金野　滋・渡部修三・融　道男
島薗安雄　（東医歯大・精神）

〔要　約〕

分裂病のdopamine(DA)活動過剰仮説との関連のもとに、脳内dopamine sensitive adenylate cyclase(DA-ACase)のDAによる活性の増加が抗精神病剤で抑制されることが注目されている。この所見は、従来in vitroで得られたものであるが、われわれはこれをin vivoで検討した。また、抗精神病剤の慢性投与に対するこの酵素の反応の部位差、特に薬物耐性出現の部位差の有無を検索した。ラット脳を線条体、中隔＋側坐核、嗅結節＋前頭葉眼窩面、海馬＋扁桃領野＋帯状回＋梨状葉、視床、視床下部の6部位に分け、それぞれchlorpromazine(CP)、promethazine(PM)を投与した際のDA-ACase活性を測定した。6部位のうち線条体、中隔＋側坐核、嗅結節＋前頭葉眼窩面でDA-ACase活性が高かった。急性投与実験ではCP($10^{mg}/_{kg}$)投与群の中隔＋側坐核でDA-ACaseのDAに対する反応がPM($10^{mg}/_{kg}$)投与群に比べ有意に抑制されていた。14日間のCP($10^{mg}/_{kg}$/day)投与の24時間後、1週間後に中隔＋側坐核で同様にDA-ACaseの有意な抑制が認められた。一方、線条体ではこの慢性投与の24時間後にDA-ACaseのDAに対するsupersensitivityが生じており、この傾向は1週間後にも認められた。CP慢性投与後に認められた線条体DA-ACaseのsupersensitivityが、抗精神病剤投与によって出現するtardive dyskinesiaの薬理学的基盤である可能性、及び、線条体と中隔＋側坐核でのこの酵素のCP投与に対する反応の差について考察した。

抗精神病剤がdopamine-sensitive adenylate cyclase(DA-ACase)のdopamine(DA)に対する反応を抑制するというin vitro実験の結果は、分裂病のDA活動過剰仮説を支持する所見の一つと考えられている[3]。また、DA-ACaseの分布も線条体のみならず、辺縁系[8]、前頭葉皮質[17]などで証明されてきている。しかし、これまで抗精神病剤のDA-ACaseに対する作用はin vitroで、しかも線条体の酵素活性を主として指標とした方法によってなされてきた。この研究はin vivoで抗精神病剤が、精神活動に関連した部位を含んだ脳部位のDA-ACaseに対し、どのように作用するか探索し、その影響の部位差から抗精神病剤の作用点の検討を行うことを目的としたものである。抗精神病剤としては手はじめに、promethazine(PM)という抗精神病作用のない類似構造薬物を対照にできるchlorpromazine(CP)を選んだ。

方法　Wistar系♂ラット(200～300g)を用いた。急性実験はPM $10^{mg}/_{kg}$、CP $10^{mg}/_{kg}$をCPの注射用溶媒で溶解して腹腔内投し、2時間後に断頭した。慢性実験はPM-HCl、CP-HCl注射薬をそれぞれ$10^{mg}/_{kg}$/day、14日間腹腔内投与したあと24時間後、1週間後、2週間後に断頭した。断頭後0°Cに保持した冷凍箱内の砕氷上で開頭し取り出した脳は直ちにCO_2ガスで凍結し、冷凍室内で厚さ1mmの脳スライスを作製し、実体顕微鏡下で脳を分割した。取り出した脳部位は、線条体、中隔＋側坐核、海馬＋帯状回＋扁桃領野＋梨状葉、嗅結節＋前頭葉眼窩面、視床、視床下部の6部位である[18]。得られたサンプルをKebabianの方法[7]に従い2mM EGTAを含む2mM Tris-maleate buffer(pH7.3)で線条体は50倍容、その他の部位は20倍容でホモジナイズし、酵素活性測定まで-80°Cで凍結保存した。DA-ACase活性測定はKebabianの方法[9]を一部改変して行った。反応は80mM Tris-maleate buffer(pH7.3)、2mM $MgSO_4$、10mM theophylline、0.5mM EGTA、1mM ATP（いずれも最終濃度）を含む溶液にホモジネート50μlを加え（最終

反応液量500μl）で行い基礎活性とし DA 100μM の添加で DA による活性増加をみた。反応液を遠沈後に清を用いて生成した cyclic AMP (cAMP) 量を測定した。cAMP 測定はベーリンガーマンハイム社の cAMP 測定キットのうち、standard cAMP, ^{3}H-cAMP, binding protein を用い、Tovey の方法[16]に従って活性炭で binding protein と結合した ^{3}H-cAMP を分離して取り出し、triton X-toluene シンチレーション液を加えて放射能活性を測定した。基礎活性に対する DA 添加条件での cAMP 生成量から DA による % stimulation を求めた。

結果 急性投与実験 (Table 1) では、中隔＋側坐核で DA-ACase の DA による活性増加が、PM 投与群に対し CP 投与群で有意 ($P<0.005$) に減少していた。CP による抑制傾向は線条体、嗅結節＋前頭葉眼窩面でも認められたが有意の差はなかった。中隔＋側坐核について CP 腹腔内投与量を 20 mg/kg, 40 mg/kg と増量した実験でも同様に有意 ($P<0.02$) の抑制を認めたが CP 投与量による差は、この範囲の量最関では得られなかった。

14日間の CP および PM 慢性腹腔内投与のあと、24時間後、1週間後、2週間後の3群に分け、それぞれ線条体、中隔＋側坐核の DA-ACase 活性を測定した結果 (Fig. 1)。24時間後では急性投与の場合と同様に、CP 投与群で DA による活性増加の抑制が PM 投与群に対し有意 ($P<0.05$) に認められた。線条体では、逆に CP 投与群で DA による DA-ACase の活性増加が有意 ($P<0.005$) に増加していた。1週間後の結果では、中隔＋側坐核で CP 投与群に抑制が有意 ($P<0.05$) に存在した。線条体では CP 投与群で24時間と同様に DA に対する DA-ACase 活性増加率の増加傾向が認められたが有意差はなかった。2週間後では、中隔＋側坐核、線条体ともに PM 投与群、CP 投与群の間に有意の差はなかった。

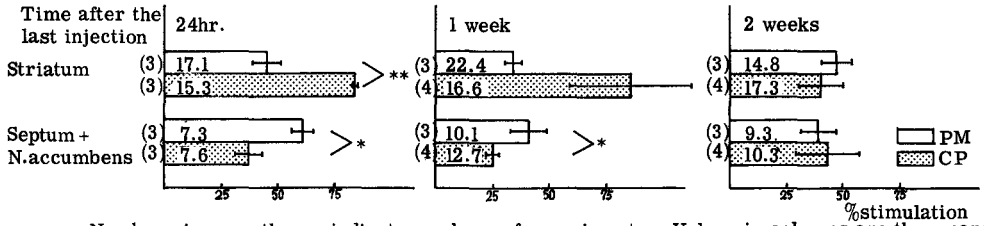
考察 今回使用した assay system には ATP regenerating system を用いていないので cAMP 生成量は従来の報告よりやや低かったが、DA による % stimulation は大差なく、DA による % stimulation を指標とした今回の実験目的に支障はないと考える。butyrophenone 系の薬物については、その薬効と DA-ACase 抑制効果の間に相関関係が明確でないこと[3]や、慢性投与を行っても線条体 DA-ACase の supersensitivity が得られなかったとの報告[11][14]がある。そのため、対照薬物として PM がある phenothiazine 系の CP を選んで用いた。ただし、CP には noradrenaline 遮断作用もあり、この作用を抗精神病作用の薬理学的基盤とする立場[2]もあるが、今回は、測定した

Table 1) Dopamine sensitive adenylate cyclase activity in several brain areas of rats acutely treated with chlorpromazine and promethazine.

		Striatum	Septum+ N. accumbens	Hippocampus+ Cingulate cortex +Amygdala+ Entorhinal cortex	Olfactory tubercle + ventral part of frontal cortex	Thalamus	Hypothalamus
PM	DA(-)	19.5±1.0(3)	7.8±1.0(3)	6.0±1.0(3)	8.0±1.4 (4)	5.3±0.2(3)	6.7±1.3(3)
	DA(+)	30.2±4.0(3)	13.3±1.0(3)	6.7±1.2 (3)	9.4±1.4 (4)	6.1±0.2(3)	8.5±2.5(3)
	%stimulation	54±12	74±9	13±10	61±14	16±7	22±13
CP	DA(-)	19.0±4.4 (4)	9.2±0.7(8)	5.7±1.1 (3)	8.3±1.4 (3)	4.4±0.8(3)	6.8±1.3(3)
	DA(+)	23.8±4.8 (4)	12.0±1.1 (8)	6.4±1.0 (3)	12.6±3.4 (3)	5.8±1.0(3)	7.9±2.2(3)
	%stimulation	27±5	29±4 *	28±14	48±14	32±8	14±17

Values of DA(-) and DA(+) are expressed as mean±S.E. (cAMP p moles/mg tissue/2.5min) with the numbers of experiments in parentheses. Percent stimulation presents the mean percent increase in enzyme activity induced by DA(100μM) over respective basal activity.
* $p<0.005$ compared with PM treatment.

Fig. 1) Effects of 14-day Chlorpromazine or Promethazine Treatment on Dopamine Stimulation of Adenylate Cyclase in Rat Striatum and Septum+N.accumbens.



Numbers in parentheses indicate numbers of experiments. Values in columns are the means of basic activity of adenylate cyclase(cAMP p moles/mg tissue/2.5min.).
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ ⟷ : S. E.

DA-ACase活性を中心に考察を加えたい。脳におけるDAneuronの分布が黒質－線条体路、中脳－辺縁路、隆起漏斗、網膜以外に前頭葉皮質、帯状回、類扁桃皮質などに存在することが証明される[6]とともに、これらの部位のDA-ACaseの存在も次第に明らかになってきた。これまで、抗精神病剤がDA-ACaseを抑制するという事実はin vitro実験をもとにして報告されている。Clement-Cormier[3], Horn[8], Miller[10]らは、ほぼ時を同じくして、ラットの線条体、側坐核、嗅結節のホモジネートでphenothiazine系、butyrophenone系、dibenzodiazepine系の抗精神病剤がDA-ACaseのDAによる活性増加を抑制することを示した。同時に抗精神病作用を持たない類似構造薬物では、この抑制作用が極めて弱いことを示し、抗精神病剤の薬理学的作用基盤としてこの抑制作用の関与を強調した。そして、これらの薬剤の錐体外路作用は線条体、抗精神病作用は辺縁系のDAneuronの抑制と関連していると推論した。しかし、phenothiazine系薬剤では、臨床的力価とDA-ACase抑制作用の間に比例関係が成り立つが、haloperidolなどのように、この関係から逸脱する薬剤もあり、DA-ACase抑制作用だけで抗精神病作用を説明できるものではないであろう。こういった研究はほとんどin vitro実験で行われており、in vivoでの薬物に対する反応をそのまま反映していない可能性も考えなければならない。Heal[5]らはCP 100mg/kg腹腔内投与後のラット線条体でDA-ACaseのDAによる活性増加が抑制されることをin vivoで示した。われわれもin vivoでの実験を行った結果、Healらの大量投与に比べ臨床使用量の範囲といってもよいCP10mg/kgの急性投与後2時間でCPによるDA-ACaseのDAによる活性増加の抑制を認めることができた。CP10mg/kgという量は、投与後2時間で脳内homovanilic acid(HVA)量を増加させること[2]からも抑制効果をおこすに充分な量だと考えられる。われわれの得たCPによる抑制効果が中隔＋側坐核で認められたということは、in vivo実験であることも含めて新しい知見であるといえよう

14日間のCP慢性投与を行ったラットの線条体では、投与終了後24時間でDA-ACaseのDAに対する反応性の有意の増加(supersensitivity)が生じており、一週間後でも有意差はないがこの傾向が認められた。また、側坐核ではCP慢性投与後24時間でDA-ACaseのDA反応性の抑制が認められ、1週間後でもこの抑制は有意に認められた。臨床使用経験から、抗精神病剤の作用の特徴として、Parkinson症状を代表とした錐体外路症状が必発することが知られている。これは黒質－線条体系のDA受容体の遮断と、これら薬物があわせ持つcholinergic neuronへの影響との関連のもとに生ずると考えられているが、この症状に対する耐性は比較的早期に出現する。これも黒質－線条体系のDAneuronのfeed back機構によって得られる耐性と考えられており、ヒトに抗精神病剤を投与した場合におこる、主と

して線条体に由来する髄液中のHVA増加が、3週間後に元に戻ることも線条体で耐性が生じたためと考えられる[12]。さらに抗精神病剤の長期投与や中断によって、舌・口部・躯部・頸部の不随意運動(tardive dyskinesia)が出現することがある。この症状はl-Dopaの投与で増悪することなどから抗精神病剤のDA遮断作用に対して代償的におこるDAの受容体のsupersensitivityによるものと考えられている。Friedhoff[4]は28日間trifluperazine 2.5 mg/kg/dayを投与したあと24日後のラット線条体のスライスで、DA-ACaseの基礎活性とDAに対する反応性の両方で著明な活性増加がおこることを示し、DA受容体のsupersensitivityが生じたものと推定し、これをtardive dyskinesiaのモデルと考えた。われわれのCP慢性投与線条体で認められたDAに対するDA-ACaseのsupersensitivityはFriedhoffの所見を支持するものと考えられる。

一方、抗精神病剤の抗精神病作用が耐性を生じにくいことから、薬理学的に耐性を呈しない部位が抗精神病作用の発現に関わっていると考えることもできる。Stevens[15]は生理学的知見をもとに側坐核を中心とした辺縁系の一部をlimbic striatumと呼び、この部位の機能的乱れを分裂病の成因と考えた。側坐核は線条体の吻側、中隔の下部に位置し、扁桃核、黒質、視床、線条体などより線維をうけ、中隔、帯状回、前頭葉に線維を送っている[2]。DAneuronに富んだ部位でDA-ACase活性も高い。最近、抗精神病剤の薬理作用研究の対象部位として側坐核を用いた報告が散見される。われわれは、今回のin vivo実験でCP急性投与のみならず、慢性投与後でも中隔＋側坐核でDA-ACaseのDAによる活性増加に対する抑制が続いているという知見を得た。これは、この部位で耐性が生じていないことを示唆するものかもしれないが、この見方を支持するHVAを指標とした側坐核"の研究は見あたらない。

いずれにしても、DA-ACaseに富んだ2部位で、CP慢性投与により一方でDA-ACaseのsupersensitivity、一方で抑制が認められるという結果については、末梢で投与したCPの脳内集積に部位差がある可能性や、それぞれの部位のDAneuronに関与する他のneuron機構に差異がある可能性、またはDA-ACaseの性質自体に差異がある可能性などが考えられる。さらに線条体でのsupersensitivityに対してはDA受容体の増加、DA-ACase自体の性状の変化なども考えられる。今後、これらの部位でDA-ACaseのkineticsの検討が必要であると考える。

謝辞：この研究に対する石福恒雄先生のご援助と薬物を供与して下さいました吉富製薬のご好意に感謝いたします。

文献

1) Blumberg, J. B., Vetulani, J., Stawarz, R. J. and Sulser, F., Eur. J. Pharmacol., 37, 357 (1976)
2) Bowers, M. B., Jr. and Rozitis, A., 26, 743 (1974)
3) Clement-Cormier, Y. C., Kebabian, J. W., Petzold, G. L. and Greengard, P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 1113 (1974)
4) Friedhoff, A. J., Bonnet, K. and Rosengarten, H., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmac., 16, 411 (1977)
5) Heal, D. J., Green, A. R., Boullin, D. J. and Grahame-Smith., Psychopharmac. 49, 287 (1976)
6) Hökfelt, T., Ljungdahl, Å., Fuxe, K. and Johanson, O., Science, 184, 177 (1974)
7) Horn, A. S., Cuello, A. C. and Miller, R., J. Neurochem., 22, 265 (1974)
8) Horn, A. S. and Phillipson, O. T., Eur. J. Pharmacol., 37, 1 (1976)
9) Kebabian, J. W., Petzold, G. L. and Greengard, P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2145 (1972)
10) Miller, R. J., Horn, A. S. and Iversen, L. L., Mol. Pharmacol., 10, 759 (1974)
11) Palmer, G. C. and Ryan Wagner, H., Res. Commun. Psych. Psychiat. Behav., 1, 567 (1976)
12) Powell, E. W. and Leman, R. B., Brain Res. 105, 389 (1976)
13) Post, R. M. and Goodwin, F. K., Science, 190, 488 (1975)
14) Roufogalis, B. D., Thornton, M. and Wade, D. N., Life Sci., 19, 927 (1976)
15) Stevens, J. R., Arch. Gen. Psychiatry, 29, 177 (1973)
16) Tovey, K. C., Oldham, K. G. and Whelan, J. A. M., Clinica. Chemica. Acta, 56, 221 (1974)
17) Von Hungen, K. and Roberts, S., Eur. J. Biochem., 36, 391 (1973)
18) 渡部，鰤，金野，法谷，島薗，神経化学，15，56 (1976)

55 神経芽細胞NIE115におけるGuanosine 3', 5'-monophosphate濃度の調節機構について

斎藤光生・出口武夫　（都神経研）
天野武彦　（三菱化成生命研）

〔要　約〕

guanosine 3', 5'-monophosphate の神経細胞内濃度の調節機構を知る目的で，神経芽細胞 NIE115 を用い，各種薬剤及び条件の差による，細胞内濃度変化を調べた。この細胞では，既に報告のある carbamylcholine，prostaglandin 類の他に，calcium conophore A23187，脱分極剤 ouabain，及び sodium azide，N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine が guanosine 3', 5'-monophosphate を一過性に増加させることが認められた。

又，カルシウムイオンを培地中から除去すると，細胞内の guanosine 3', 5'-monophosphate の濃度は急速に低下し約10%にまでなるが carbamylcholine，prostaglandin E1 によって増加する性質は残っており，これ等の薬剤による増加には細胞外カルシウムを必要としないと思われる。又，calcium conophore A23187 を用いた場合にも，細胞外カルシウムイオンのない条件で guanosine 3', 5'-monophosphate の増加が認められることから，カルシウムイオンがこの濃度調節機構に直接関係しないか，関係するとすればカルシウムイオンの細胞内から細胞外への流出もしくは，細胞内での移動が重要であると思われる。

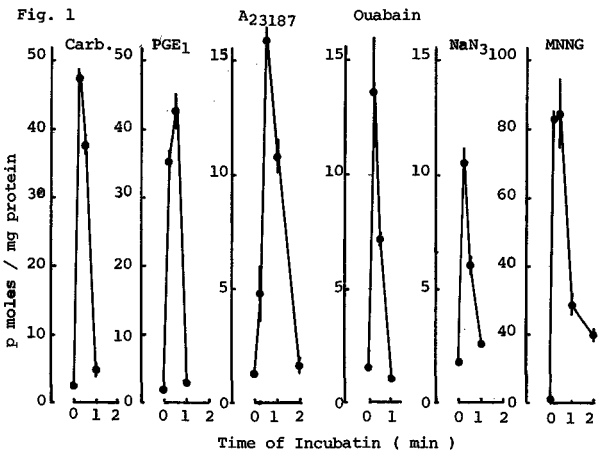
---

guanosine 3', 5'-monophosphate（cyclic GMP）の細胞内濃度の増加に細胞外カルシウムイオンの存在が不可欠であることが，脳切片の系[4]平滑筋の系[7]等で報告されており cyclic GMP の濃度調節機構にカルシウムイオンが重要な役割を果していると推測されてきた。しかし，最近，膵臓の外分泌細胞[2]腸の繊の動脈[3]等で細胞外カルシウムイオンを必要としない cyclic GMP の増加が報告され，カルシウムイオンの役割について見直す必要にせまられている。我々は，神経系においてカルシウムイオンが cyclic GMP の濃度調節にどのように関係しているかを調べる為に，できるだけ単純化された系として，培養細胞系を選び実験を行った。培養細胞 NIE115 はクローン化された神経芽細胞として確立されており[1]松沢等によって carbamylcholine，prostaglandin 類によって cyclic GMP 濃度が顕著に増加することが報告され[6] cyclic GMP の濃度調節機構を知る為にはよい系と思われたので，実験は全てこの細胞を用いて行った。

［実験方法］　NIE115 細胞は 10% fetal bovine serum を含む DMEM（Dulbecco-Vogt modification of Eagle's minimal essential medium）培地で 10% CO_2，90% Air 37°C の条件下　7日～10日間培養し使用した。培養後，培地を，$NaHCO_3$ を 25mM HEPES buffer（pH7.4）に変えた DMEM で置換し 37°C の水浴上30分放置後，実験に使用した。薬剤は，使用時の100倍の濃度の溶液として添加するか，もしくは，薬剤を含む培地に置換することによって作用させた。反応は培地を吸引除去後 5% TCA 溶液を加えることによって止め，細胞をかきとって遠心する。上澄はエーテル抽出後 cyclic GMP の定量にかけ，沈澱は 2N NaOH に溶解して蛋白質の定量にかける。

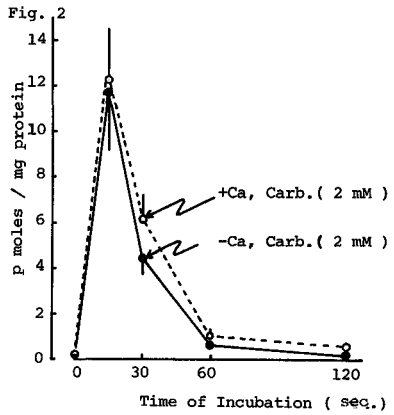
cyclic GMP は Steiner 等の開発した radioimmuno assay[8] を Zimmerman 等が改良した方法[9] を用い定量した。蛋白量の測定は Lowry 等の方法によった。[5]

Fig. 1



[実験結果] Fig. 1 で示したように carbamylcholine, prostaglandin (PGE_1) 以外に脱分極剤である Ouabain, calcium conophore である A23187, 細胞外カルシウムイオンを必要とせずに cyclic GMP 濃度を増加することが知られている sodium azide (NaN_3), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) に反応して cyclic GMP 濃度を増加させる。ここでみられるように, 薬剤によって経時的変化のパターンに差があるものの, すべて一過性の増加であり, 遅くともえ～3分以内にもとの濃度近くにもどり, どの薬剤に対しても, 増加後, 速かに減少させる機構が存在することを示していると思われる。次に, 細胞外のカルシウムイオンの必要性をみる為に, 通常の DMEM 培地中で放置後, カルシウムイオンを含まず 3mM の EGTA を含む DMEM 培地に置換し更に 30分後 carbamylcholine による増加を調べた。対照として carbamylcholine と同時に 4.9mM の $CaCl_2$ を加えたものをとり比較してみると, Fig. 2 に示したように, 共に cyclic GMP は増加し carbamylcholine による cyclic GMP 濃度の増加には細胞外カルシウムイオンが必要ないと思われた。

Fig. 2



他の薬剤について同様の実験を行い, 各薬剤について, 薬剤添加後それぞれに最高の増加を示す時間で反応を調べてみると, Table 1 に示したように carbamylcholine 以外に PGE_1, NaN_3 等でやはり細胞外カルシウムイオンを必要としない増加が認められた。前記の実験では, カルシ

Table 1

The Elevations of cyclic GMP in the presence or in the absence of calcium ions

	cyclic GMP (p moles/mg protein)	
	$-Ca^{++}$,+3mM EGTA	4.9mM Ca^{++},+3mM EGTA
none	0.52 ± 0.10 (6)	0.45 ± 0.08 (4)
Carbamylcholine (2mM)	11.70 ± 1.32 (6)	12.32 ± 1.42 (6)
PGE_1 (10μM)	3.35 ± 0.30 (6)	5.52 ± 0.56 (6)
NaN_3 (1mM)	3.13 ± 0.41 (4)	3.44 ± 0.39 (6)

ウムを含まない培地に変換してから 30分後の反応をみているが，次に変換後の時間の影響を調べた。 Fig. 3 の白丸のグラフで示したように，細胞内の cyclic GMP の濃度は，変換すると急速に減少し；カルシウムが存在するときの約10%になるが carbamylcholine (2mM) に対する反応性は，黒丸のグラフで示したように，カルシウムイオン存在時の約40%で5分以降，経時的変化はほとんど認められなかった。即ち，細胞外カルシウムを除くことにより，carbamylcholine に対する反応性は減少はするものの，なお 数十倍に増加する性質を有しかも経時的に安定であった。このような現象は calcium ionophore A23187 を用いた場合にも認められ，カルシウムイオンを除去し，3mM EGTA を添加した DMEM 培地中で30分放置した後 10μM の A23187 を加えると，Fig. 4 で示したように顕著な増加を示し，カルシウムのない状態にさらしても，明確な反応性を保持していた。細胞外カルシウムイオンを必要とせずに cyclic GMP 濃度を増加させる薬剤として知られている MNNG を用いて Fig. 3 と同様の実験を行うと，この薬剤に対する反応性は，細胞外カルシウムイオンを除去しても低下しないことから前記の反応性の低下は少くとも細胞内合成系への直接の影響ではないと思われる。

Fig. 3

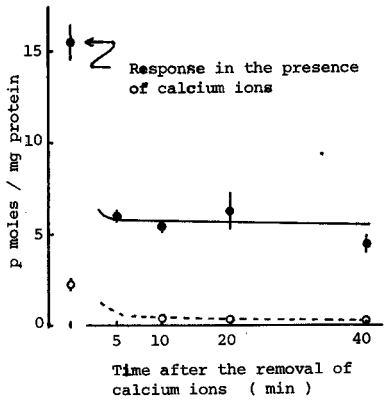
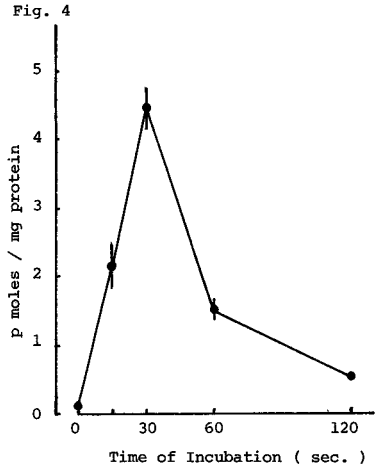


Fig. 4



［考　察］　以上の実験結果において NIE115 細胞では，細胞外カルシウムイオンのない状態で carbamylcholine，PGE，A23187 に反応して cyclic GMP 濃度を増加することが認められ，神経系の細胞においても，細胞外カルシウムイオンを必要としない場合があることがわかった。従って，これ等の cyclic GMP の増加にはカルシウムイオンが関係しないか，関係するとすれば，細胞内カルシウムイオンの細胞外への流出，もしくは，細胞内カルシウムイオンの極在性の変化であると思われる。カルシウムイオンに対する calcium ionophore A23187 の特異性がかなり高いとすれば，後者の二つの場合のいずれかである可能性が強いと思われる。

Fig. 3，で認められた，細胞外カルシウムイオン除去による反応性の減少は，細胞外カルシウムイオンを必要とする cyclic GMP の増加も存在することを示すのか，それとも　カルシウムイオンを除去したことによる細胞の他の機能の低下に伴う二次的な効果なのか　結論づけることはできないが，Fig. 2　で認められたように，一度，細胞外カルシウムイオンのない状態にさらした細胞に carbamylcholine を作用させる

際，同時に充分量の $CaCl_2$ を添加しても添加しない場合と同様の結果を示すことから後者である可能性が強いと思われる。ただ，MNNG に対する反応性は変化しないことから，細胞内の cyclic GMP 合成活性に直接影響を与えるような変化ではないと思われる。細胞外カルシウムに依存性のある平滑筋の系においても，一度カルシウムのない状態にさらすと，後にカルシウムを添加して反応をみても反応の程度が著しく低くなる結果も報告されているので[7]このような現象はかなり一般的であるのかもしれない。

以上の実験結果から cyclic GMP の濃度の調節機構におけるカルシウムイオンの役割を知る為には，二次的効果をできるだけさける意味でなるべく単純化された系を用いて見直す必要があると思われる。

なお，prostaglandin E_1 を分与下さった小野薬品工業株式会社に感謝いたします。

REFERENCES

1. Amano, T., Richelson, E., and Nirenberg, M. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69, 258-263
2. Christophe, J. P., Frandsen, E. K., Conlon, T. P., Krishna, G. and Gardner, J.D. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4640-4645
3. Clyman, R. I., Blacksin, A. S., Manganiello, V. C., and Vaughan, M. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 3883-3887
4. Ferrendelli, J. A., Rubin, E. H., and Kinsherf, D.A. (1976) J. Neurochem. 26, 741-748
5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
6. Matsuzawa, H., and Nirenberg, M. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 3472-3476
7. Shultz, G., Hardman, J. G., Shultz, K., Baird, C. E., and Sutherland, E. W. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70, 3889-3893
8. Steiner, A. L., Parker, C. W., and Kipnis, D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1106-1113
9. Zimmerman, T. P., and Winston, M. S., and Chu, L. C. (1976) Anal. Biochem. 71, 79-95

56 カエル網膜杆体細胞外節のGuanylate cyclaseについて

三木直正・吉川和明・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

〔要 約〕

カエル網膜杆体細胞外節には，光とATPにより著明に活性化されるcyclic GMP-phosphodiesteraseが存在する。今回，カエル杆体細胞外節のGuanylate Cyclaseについて，光およびNO基に対する反応性の面から検討を加えた。

1）杆体細胞外節（ROS）には比活性の高いGuanylate Cyclase（GC）が存在し，大部分が膜分画に局在を示した。

2）約1分間の光照射により，GC活性の最大阻害（約40%）が認められた。

3）マウスおよびカエル大脳GCを著明に活性化するCatalase-NaN_3およびMethylnitrosoureaはROSのGCを活性化しなかった。また大脳GCの活性化を阻害するHemoglobinもROSのGC活性を阻害しなかった。

4）以上のことより，視細胞外節のGCは①他の組織のGCとは異り，非常に高い比活性を有しているが，NO基に対する反応性を有しないこと，②暗所で最大活性を示し，光により比較的ゆっくりと阻害をうけることを特徴とし，光感受性のphosphodiesteraseと協調して，視細胞内の光によるcyclic GMP濃度の調節に重要な役割をしているものと考えられる。

大脳GCはカタラーゼの存在下でNaN_3により著明に活性化される(8)。またニトロソ化合物（たとえばMethylnitrosourea）やNOガスによる大脳GCの活性化にはカタラーゼの存在を必要としない。さらに，これらの物質による大脳GCの活性化はヘモグロビンにより著明に抑制されることより，NO基がGCを活性化することが考えられる(10)。カエル網膜の視細胞外節（ROS）にはATPの存在下に，微量の光により活性化されるPhosphodiesterase（PDE）が存在する(1,4,6,7)。一方，ウシの視細胞外節には比活性の高いGCが存在し，光により阻害がおこることが報告されている(5,12)。今回，私達はカエル杆体細胞外節のGCについて，光およびNO基に対する感受性を調べたので報告する。

〈実 験 方 法〉

マウスおよびカエル大脳を20倍量の0.32M蔗糖液によりhomogenizeした。食用ガエル（Rana Catesbiana）を12時間暗順応させ，赤外影像鏡を用いて網膜を剥離し，前報のごとく，杆体細胞外節を得た(9)。これを20mM Tris-HCl buffer（pH7.4）に懸濁したものを円板膜標品とした。Adenylate cyclaseおよびGuanylate Cyclase活性は[^{3}H]-ATPおよび[^{3}H]-GTPを基質として，以前に報告した方法により測定した(8)。

〈実 験 結 果〉

1）光によるROSのGC活性の阻害

ウシROSのGC活性は光により阻害されるが，最大阻害には5－10分間の光照射が必要であるとされている(5,12)。しかしGC活性の測定に際し，PDEが光とATP（

またはGTP）により活性化されることには十分な注意が払われていないようである。本研究ではカエルROSを低張処理した後，0.5mM EDTAを含む20mM Tris-HCl buffer (pH7.4) で洗い，PDEを円板膜より取り除いたものを酵素標品とした。10分間蛍光灯下で光照射した円板膜標品のGCは約40%の活性低下を示した。なおcyclic GMPの回収率は未照射，照射時ともに93%以上であった(表1)。このことより，光によるGC活性低下はPDEが活性化されたためではなく，GCそのものの変化であると考えられる。GCが最大活性阻害を示すのにどれだけの時間が必要であるかを調べたところ，約1分間の光照射によりほぼ最大阻害が得られた(図1)。

表1. Light-Induced Inhibition of GC in ROS

	Dark	Light
GC Activity (p moles/ mg prot/min)	1,650	1,050
Recovery of Added [^{3}H]-cGMP (1.2 p moles)	93%	98%

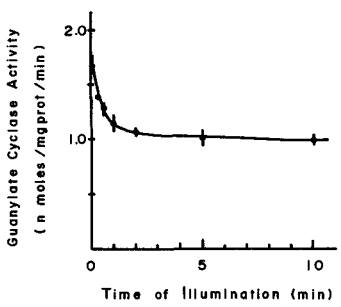
Disc membrane preparations were exposed to a fluorescent lamp for 10 min and then subjected to the assay for GC activity.

表2. Distribution of GC in ROS

	Homogenate	105,000×g Particulate	105,000×g Supernatant
ROS	100%	> 95%	N.D.
Mouse Cerebral Cortex	100%	8%	92%

Each homogenate was centrifuged at 105,000×g for 60 min.

図1. Inhibition of Guanylate Cyclase in ROS by Light



2）ROSにおけるGCの分布

大脳GCは大部分可溶性分画に存在するが，ROSのGCはほとんど円板膜を含む膜分画（ロドプシンを含む分画）に存在した。PDEと異り(7)，EDTAで洗ってもGCは膜から遊離してこなかった(表2)。

3）活性化物質および阻害物質について

マウス大脳GCはNO基により活性化され，この活性化はヘモグロビンにより阻害される(10)。しかし，光照射したROSおよび未照射ROSのGC共に，Catalase-NaN_3やMethylnitrosoureaにより活性化されなかった。またヘモグロビンもROSのGC活性を阻害しなかった(表3)。Nitromin（Nitrogen mustardのN-Oxide）は大脳GCおよびROSのGC活性を5mMで80%以上阻害した。一方，Nitrogen mustardは5mMで約20%のGC阻害を示したが，その他のアルキル化剤のCyclophosphamideおよびBismethylenchloronitrosourea（BCNU）は阻害効果を示さなかったことより，Nitrominによる GC活性の阻害はアルキル基によるものではないと考えられる

(図2)。なお，Nitrominの GC 活性阻害機式は複雑で求めることはできなかった。Methylnitrosoureaまたは Catalase-NaN_3 による大脳GCの活性化能は，40 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) + 1mM $MgSO_4$ にて 18 時間透析を行った大脳標品では認められなくなってしまうが，ROSのGCは同条件下の透析後も高い活性を維持した。

表3. Effect of NO Radical on GC in Frog ROS and Cerebral Homogenate

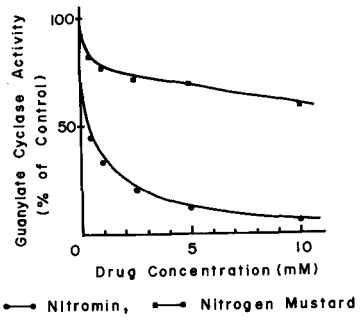
Agents	GC Activity (p moles /mg prot /min)			
	Unbleached Frog ROS	Bleached Frog ROS	Frog Brain	Mouse Brain
None	1,670 ± 50	1,050 ± 40	1.32	20 ± 2
Catalase-NaN_3	1,700	—	32.0	252 ± 11
Methylnitrosourea (MNU)	1,680	1,040	47.9	245 ± 10
Hemoglobin (Hb)	1,700	1,100	—	18 ± 1
Catalase-NaN_3 and Hb	—	—	—	40 ± 2
MNU and Hb	—	1,050	—	45 ± 2
Nitromin	—	320	—	10 ± 1
MNU and Nitromin	—	315	—	50 ± 2

Catalase (5 μg)-NaN_3(2 mM), Methylnitrosourea (2 mM), Hemoglobin (25 μg), Nitromin (1.0 mM).

4) ROSの Adenylate Cyclase (AC) について

ROSの AC 活性は GC 活性の約 1/10 であった。Mittal と Murad (11) は肝臓上清中の GC が NaN_3 - 高分子因子や NO 基を含む物質の存在下で，ATP から cyclic AMP 産生反応を catalyze することを見い出した。大脳上清中の酵素も Catalase-NaN_3 や Methylnitrosourea の存在下で，ATP からの cyclic AMP 産生増加を示したが，ROS 標品では NO 基による ATP からの cyclic AMP 産生に対する促進効果は認められなかった(表4)。

図2. Inhibition of Guanylate Cyclase Activity in ROS by Nitromin



〈考　察〉

視細胞外節は cyclic GMP 系が cyclic AMP 系に比してはるかに優勢な組織である (1)。光による GC の活性阻害および PDE の活性化は「光により外節の cyclic GMP 濃度が急減する」という報告 (2,3) をよく説明しうる。しかし，PDE の光による活性化反応にくらべて，GC の光による阻害反応はずっとゆっくりとした反応である。またカエルROSのGCの光に対する感受性はウシROSのGCにくらべて約10倍高いようである。ROSのGCは暗所で非常に高い活性を示すが，この活性はヘモグロビンの添加により阻害をうけないこと，また光照射により活性阻害をうけたGCはNO基の添加によっても活性の回復を認めないこと，円板膜標品は Catalase-NaN_3 および Methylnitrosourea の添加により ATP からの cyclic AMP 産生反応を促進しないことなど，他の組織の GC とはかなり異った性質を持っている。Nitrominによる GC 活性の阻害機作についてはさらに検討を必要とするが，少なく

ともヘモグロビンとは異った作用を持つことは明らかである。現在どのようなメカニズムでROSのGCが光により活性阻害をうけるのかは不明であるが，光によるGC活性の調節機構の解明は，cyclic GMPの生理機能を明らかにする一つの有力な手がかりを与えるものと考えられる。

表4. Adenylate Cyclase Activity in ROS

Agents	Adenylate Cyclase Activity (p moles /mg prot /min)	
	Frog ROS	Mouse Brain 105,000×g Sup.
None	126	4.7
NaF	210	5.0
Methylnitrosourea	124	26.3
Catalase-NaN_3	125	37.6

NaF; 10 mM, Methylnitrosourea; 2 mM,
Catalase (5 μg)-NaN_3 (2 mM).
ROS preparation was fully bleached and washed with 20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) containing 0.5 mM EDTA.

〈文　献〉

1) Bitensky, M.W., Miki, N., Keirns, J.J., Keirns, M., Baraban, J.M., Freeman, J., Wheeler, M., Lasy, J. and Marcus, S.R. (1975) Ad. Cyclic Nucleotide Res. 5, 213.
2) Fletcher, R.T. and Charder, G.J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 70, 1297.
3) Goridis, C. and Virmaux, N. (1974) FEBS letters 49, 167.
4) Keirns, J.J., Miki, N., Bitensky, M.W. and Keirns, M. (1975) Biochemistry 14, 2760.
5) Krishna, G., Krishnan, N., Fletcher, R.T. and Charder, G.J. (1976) J. Neurochem. 27, 717.
6) Miki, N., Keirns, J.J., Marcus, F.R., Freeman, J. and Bitensky, M.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3820.
7) Miki, N., Baraban, J.M., Keirns, J.J., Boyce, J.J. and Bitensky, M.W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6320.
8) Miki, N., Nagano, M. and Kuriyama, K. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 952.
9) Miki, N. and Bitensky, M.W. (1976) Shinkei-kagaku 15, 252.
10) Miki, N., Kawabe, Y. and Kuriyama, K. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 75, 851.
11) Mittal, C.K. and Murad, F. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3136.
12) Pannbacker, R.C. (1973) Science 182, 1138.

57 ラット脳のシナプトゾーマルソルブルフラクションにおけるグアニレートサイクレースの精製とその性状について

中根正樹・斎藤光生・出口武夫
(都神経研)

〔要 約〕

1.ラット脳組織のsynaptosomal soluble 分画(M3)に高濃度に存在するGuanylate cyclaseを、pH 5.2沈殿、Sepharose 4Bによるゲルロ過、GTP affinity クロマトグラフィーにより、約1000倍にまで精製し、比活性 約15,000 pmol/min/mg prot. の標品を得た。さらに、DEAE-Sephadexにかけると 多くの夾雑蛋白が除かれたがおそらく失活のために、比活性はあがらなかった。

2.精製の各過程において、調整標品に対する種々の活性化剤の影響を検討したところ、Lubrol PX、NH_2OH、NaN_3 は、Homogenate、W分画に対しては、活性化を示すが、M3分画, pH5.2沈殿分画に対しては むしろ阻害に、そしてGTP-affinityカラムを通した標品に対しては、全く影響を与えなかった。それに対し、NaN_3 + catalase、およびMNNG、Nitroprusside などのニトロソ化合物は、GTP affinity カラムを通した酵素標品に対しても、顕著な活性化を示した。

3.この精製酵素標品を用いて、GTPとGMP-PCPの基質特異性を比較したところ、Vmaxは、両者とも同じ値を示し、Kmは、GMP-PCPの方が約10倍であった。種々の活性化剤の影響では、Lubrol PX, NH_2OH, NaN_3 は、GMP-PCPを用いた場合、阻害を示したが、ニトロソ化合物などは、どちらを用いても、顕著な活性化を示した。

4.逆反応(cGMP→GTP)を調べたが、ほとんどおこらなかった。

cGMPを合成するguanylate cyclase(以下G-cyclaseと略す)は、E.Coli(9)、ウニの精子(4)などから、高純度に精製されているが、哺乳動物組織からは、G-cyclase活性があまり高くないこと、失活しやすいことなどから、未だ十分な精製がなされていない。そのためG-cyclaseの種々の解析も、不十分な精製標品を用いて行なわれているのが現状である。我々は、G-cyclaseが哺乳動物では、肺と並んで脳にその活性が高く、その大部分がsynaptosomal soluble分画(M3)に存在することを見出した(1)。そこで我々は、このsynaptosomal soluble分画におけるG-cyclaseの活性化調節機構をさぐり、神経伝達におけるcGMPの役割りを明らかにするため、ラット脳のM3分画に存在するG-cyclaseの精製も試み、高い比活性をもつ標品を得ることができたので、その酵素の種々の性質とあわせて ここに報告する。

〔実験方法〕

(1) G-cyclase活性の測定： 正反応は、すでに記載した方法に従い行なった。(1,2) また、逆反応の測定は次のように行なった。50mM Tris·HCl(pH7.6), 5mM $MnCl_2$, 8mM Theophylline 0.1mg/ml BSA, 0.5mM Sodium Pyrophosphate, 0.5mM・1μCi ^3H-cGMP および酵素を含む150μlを反応液とし、37°C 60分間 反応させた後、沸とう水浴中で2分間加熱して反応を止めた。ついで2mlの50mM Tris·HCl(pH7.6)を加え、蛋白を遠心除去し、その上清中のGTPをDowex 1×8カラムで分離し、そのradioactivityを測定した。(2)蛋白の定量： 中尾らの方法(14)に従い、Amidoblack 10Bを用いて定量した。

〔結果および考察〕

(1) G-cyclaseの精製： 精製の過程をTable Iに示した。ラット脳、約150gを9倍量の0.32M Sucroseで homogenizeし、Whittaker と Barkerの方法(16)に従って、P2分画

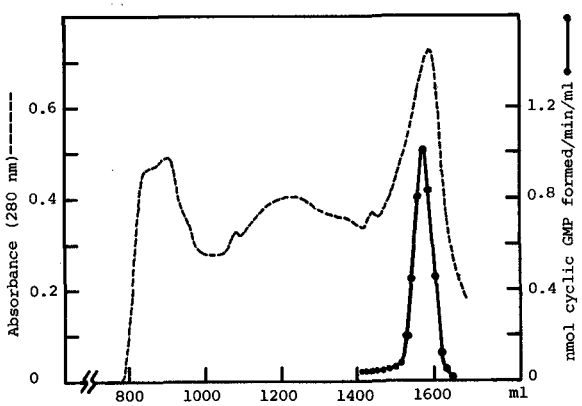
(crude mitochondria)を得た。さらに、それを 6ml/g wet tissue の氷冷蒸留水で Homogenize し、(W分画) 105,000g、60分間遠心した上清を M3 分画 (synaptosomal soluble fraction) とした。M3分画には、すでに報告したように(1,3)

Table I Purification of rat brain guanylate cyclase

Fraction	Protein	Guanylate cyclase activity		Purification
		total activity	specific activity	
	mg	pmol/min	pmol/min/mg prot.	-fold
Homogenate	34,453	526,620	15.3	1.0
W	7,740	270,900	35.0	2.3
M3	1,238	4,207,500	3,400	222
pH 5.2 ppt.	1,080	388,100	359	23.5
Sepharose 4B	49.5	53,400	1,079	70.5
Mn(-) GTP column	46.2	47,806	1,036	67.7
Mn(+) GTP column	2.1	30,612	14,453	945
DEAE-Sephadex A-25	0.67	2,760	4,107	268

内在性活性化因子が放出されているので、みかけ上、活性が非常に高く現われ、W分画をはるかに上回る活性が回収されてくる。従って、ベースの cyclase 活性は、Table の値の 1/10 以下であると思われる。この M3 を 2N 酢酸で pH 5.2 とし、生じた沈殿を集め、pH 8.1 の buffer に再び溶解して、pH 5.2 沈殿分画とした。この分画においても、なお全活性が W 分画をうわまわっているが、これは、内在性活性化因子が一部まだ除かれずに残っているためだろう。この pH 5.2 沈殿分画を、Sepharose 4B カラムにかけ、ゲル口過を行なった。そのパターンを Fig. 1 に示す。G-cyclase 活性は、1600ml 付近の蛋白のピークとほぼ一致してシャープに溶出されてくる。この活性部分を集め、GTPase 活性を抑えるため、最終 10mM になるように NaN_3 を加えた。G-cyclase は、Mn^{++} 存在下でのみ GTP と affinity を持つので、この性質を利用して、GTP affinity カラムを次に行なった。Garbers の方法 (4) により調整した GTP-affinity カラムに pH 8.1, $MnCl_2$ (-) の状態で apply すると、G-cyclase は素通りし、Mn^{++} independent に GTP に affinity を持つ蛋白が除かれる。続いて、素通りした分画に、最終 2mM になるように、$MnCl_2$ を加え、pH を 7.4 にし、今度は Mn^{++} 存在下で GTP affinity カラムに apply すると、G-cyclase は吸着され、GTP に affinity を持たない蛋白が除かれる。Buffer で洗った後、0.5M NaCl, 5mM EDTA を含む Buffer で溶出すると、シャープなピークとして G-cyclase が得られる。(Fig. 2) このステップで、G-cyclase はかなりよく精製され、比活性 約 15,000 pmol/min/mg prot., homogenate からみて、約 1000倍 精製された。この分画を Sephadex G-25 で脱塩を行ない、DEAE-Sephadex A-25 カラムにのせ、0-0.5M NaCl linear gradient により溶出を行なった。(Fig. 3) 図のように、かなり効果的に夾雑蛋白が除かれ、蛋白としてきれいになっているが、おそらく蛋白濃度の低下に起因する失活のため、比活性の増大はみられ

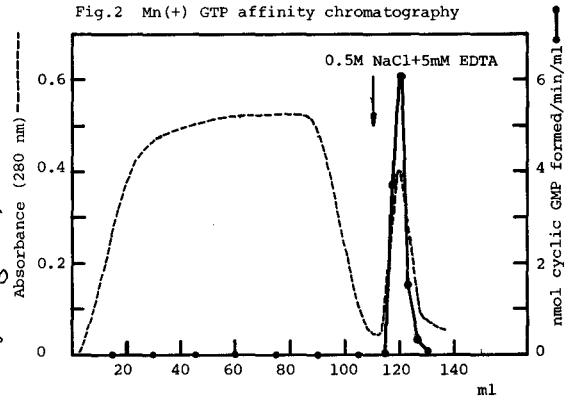
Fig.1 Sepharose 4B column chromatography



なかった。こうして得られた酵素は、なおSDS-ポリアクリルアミド電気泳動において、複数のバンドを示し cGMP-phosphodiesterase 活性およびGTPase活性をわずかながら有する。

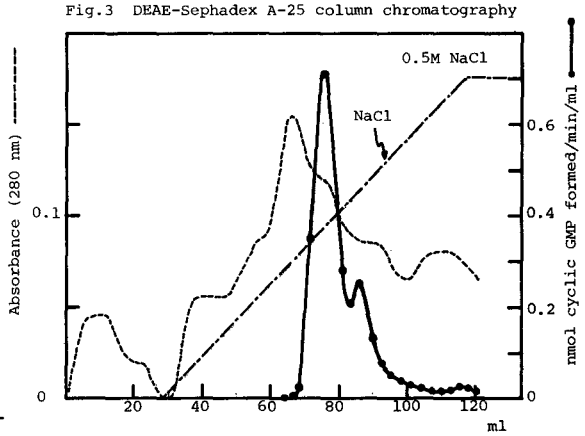
以後の実験においては精製酵素として、Mn(+) GTP カラムの溶出分画を Sephadex G-25 で NaCl, NaN_3 を除き、Amicon XM300 membrane により濃縮したものを用いた。

Fig.2 Mn(+) GTP affinity chromatography



(2)活性化剤の影響：　精製の各ステップの標品を用いて、G-cyclase を活性化するといわれている種々の薬剤の影響をみた。(Table II)　Lubrol PX は、homogenate, W分画では、G-cyclase を活性化するが、これは顆粒結合性酵素の可溶化による活性化だと思われる。またM3, pH 5.2 沈殿分画では阻害に働くが、これは M3 分画に存在する内在性活性化因子による活性化の完全な阻害(3)がおこっているためと考えられる。そして精製が進んだ分画では、全く Lubrol PX の添加効果はみられなかった。　NH_2OH, NaN_3 は、homogenate, W分画では顕著な活性化を示すが、精製がすすむにつれ、活性化が全くみられなくなる。これは、NH_2OH, NaN_3 がその cyclase の活性化に、catalase などの高分子が必要であり(2, 8, 10, 12, 13)その高分子が精製の過程で除かれたことによるものと考えられる。また、M3、pH 5.2 沈殿分画では、活性を阻害しているが、これは、Lubrol PX と同様、内在性活性化因子による cyclase の活性化を阻害した(3)ためだろうと思われる。　それに対して、NaN_3 + catalase, MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), Nitroprusside などは、最も精製した分画(Mn(+) GTP カラム分画)においても顕著な活性化を示した。このことは、これらがニトロソ基を介して、それぞれ直接 cyclase を活性化しているという考え(6, 11)を支持するものと思われる。

Fig.3 DEAE-Sephadex A-25 column chromatography



(3)基質特異性：　次に、この精製した酵素を用いて、基質特異性を検討した。基質として、GTP のかわりに、GMP-PCP (Guanylyl-(β,γ-methylene) diphosphonate) を用いると、Table III のように、基質濃度を 0.25mM で測定した場合、反応は GTP を用いた場合の約 30 % であった。また、活性化剤の影響を調べてみると、Lubrol, NH_2OH, NaN_3 を添加すると、GTP を基質にした場合、全く影響されないのに対して、GMP-PCP を基質に用いた場合、かなり反応が阻害された。この違いが何によるのか、現在のところ不明である。その他、NaN_3 + catalase, MNNG, Nitroprusside などは、GMP-PCP を基質にした場合でも、顕著な活性化をおこした。

GTP を基質とした場合、Vmax は 6.9 nmol/min/mg prot., Km は 63μM、GMP-PCP

を基質にした場合、Vmax は 6.8 n mol /min/mg prot., Km は 670 μM であった。Vmax はほとんどかわらないのに対して、Km が GMP-PCP を基質にすることにより、約10倍になったことから、GMP-PCP は GTP よりも cyclase に対する affinity がかなり弱いものと考えられる。

Table II Effect of agents on guanylate cyclase activity

Fraction	no addition	Lubrol PX	NH_2OH	NaN_3	NaN_3+ Catalase	MNNG	Nitro-prusside
		0.5%	2mM	1mM	1mM+10ug	0.1mM	1mM
	Guanylate cyclase activity (% of no addition)						
Homogenate (10 ul)	100	320	1,172	227	2,910	1,469	1,311
W (10 ul)	100	161	995	1,649	1,734	1,808	1,683
M3 (10 ul)	100	23	33	88	221	191	156
pH 5.2 ppt. (0.5 ul)	100	84	77	70	283	116	89
Sepharose 4B (10 ul)	100	179	112	122	834	656	549
Mn(+) GTP column (10 ul)	100	101	100	103	1,015	550	539

(4)逆反応性： 精製した酵素を用いて逆反応がどの程度いくか調べたが 正反応の 1/1500 程度の活性しか検出されず、cGMP → GTP の反応は ほとんど おこらなかった。これは、バクテリアから精製された adenylate cyclase が 正反応の 1/25 ～ 1/30 程度 逆反応とも触媒する (5, 7, 15) のとは 対照的である。

Table III Substrate specificity of guanylate cyclase activity

Substrate	Guanylate cyclase activity			
	GMP-PCP		GTP	
	nmol/min /mg prot.	(%)	nmol/min /mg prot.	(%)
No addition	1.98	(100)	6.32	(100)
+Lubrol PX 0.5%	0.45	(22)	6.41	(101)
+NH_2OH 2mM	1.08	(55)	6.33	(100)
+NaN_3 1mM	1.11	(56)	6.50	(103)
+NaN_3 1mM & Catalase 10ug	27.0	(1362)	64.1	(1015)
+MNNG 0.1mM	14.1	(714)	34.7	(550)
+Nitroprusside 1mM	11.6	(588)	34.1	(539)

REFERENCE

(1) Deguchi,T.,Amano,E.,and Nakane,M. (1976) J.Neurochem.27,1027-1034
(2) Deguchi,T.(1977) J.Biol.Chem.252, 596-601
(3) Deguchi,T.(1977) J.Biol.Chem.in press
(4) Garbers,D.L.(1976) J.Biol.Chem.251, 4071-4077
(5) Hayaishi,O.,Greengard,P.,and Colowick, S.(1971) J.Biol.Chem.246,5840-5843
(6) Katsuki,S.,Arnold,W.,Mittal,C.,and Murad,F.(1977) J.Cyclic Nucreotide Res. 3,23-35
(7) Khandelwal,R.L.,and Hamilton,I.R. (1971) J.Biol.Chem.246,3297-3304
(8) Kimura,H.,Mittal,C.K.,and Murad,F. (1975) J.Biol.Chem.250,8016-8022
(9) Macchia,V.,Varrone,S.,Weissbach,H., Miller,D.L.,and Pastan,I.(1975) J.Biol. Chem.250,6214-6217
(10) Miki,N.,Nagano,M.,and kuriyama,K. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun. 72,952-959
(11) Miki,N.,Kawabe,Y.,and Kuriyama,K. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun.75,851-856
(12) Mittal,C.K.,Kimura,H.,and Murad,F.(1975) J.Cyclic Nucreotide Res.1,261-269
(13) Mittal,C.K.,Kimura,H.,and Murad,F.(1977) J.Biol.Chem.252,4384-4390
(14) 中尾昭弘、中尾真. 生化学実験法講座 "酵素研究法 上" 東京化学同人
(15) Takai,K.,Kurashina,Y.,Suzuki,C.,Okamoto,H.,Ueki,A.,and Hayaishi,O.(1971) J.Biol.Chem. 246,5843-5845
(16) Whittaker,V.P.,and Barker,L.A.(1972) in Method of Neurochemistry (Fried,R.,ed.) Vol.2, pp 1-52 Marcel Dekker Inc.,New York

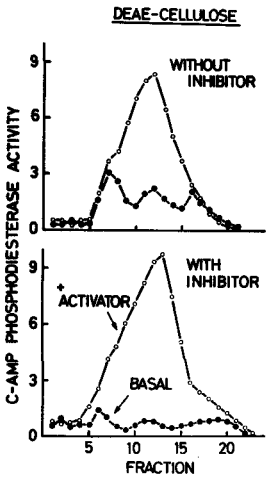
58 Affinity columnによるc-AMPホスホジエステラーゼの精製

酒井庸禎・堀　悦子・田中　亮
牧野秀夫・笠井久隆
（名市大・医・生化，保健衛生大・内，都立大・理・化学）

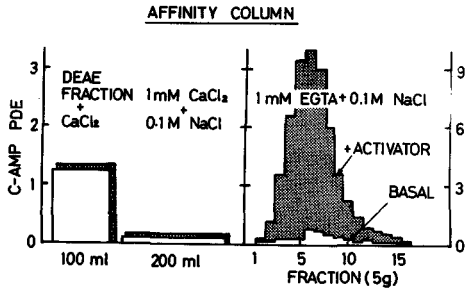
〔要　約〕

ブタ大脳よりCa^{2+}-Activator protein 依存性 cyclic AMP phosphodiesterase を精製した。精製法は(1)ブタ大脳250gを0.32M Sucrose，10^{-3}M EGTAをふくむBufferで等質化したのち、その105,000×gをうる。(2) 0.07M Acetate buffer，pH 6.5，で平衡化したDEAE-Celluloseカラム（150mℓ）にapplyし、0.2M Acetate buffer で溶出されるCa^{2+}-Activator protein依存性酵素部分をあつめる。(3) Ca^{2+}存在下でSepharose 2BとBrCN法でActivator proteinを結合させたAffinity columnを作製した。このAffinity columnにStep(2)の酵素をCa^{2+}の存在下で吸着させ，0.1M KClをふくむ1mM EGTA溶液でActivator protein依存性酵素を溶出する。(4)溶出された酵素をSephadex G-200によるゲル濾過を行い活性部分をあつめる。以上4段階からなる精製法により、酵素はDise電気泳動上単一のPeakとなった。またこのPeak部分のスライスにcyclic AMP phosphodiesterase 活性を認めた。この酵素はcyclic AMPのみならずcyclic GMPをも加水分解し、基質1μMではcyclic AMPに比してcyclic GMPを4～8倍よく分解した。精製された酵素は不安定であるが、30%のEthylene glycolの存在下で安定であった。また酵素はActivator proteinレX外にも低い濃度のtrypsin処理，又はビタミンE誘導体の一種であるα-Tocopheryl phosphateによっても活性化をうけた。これらの事実は，酵素は生体内で潜在型で存在している可能性を示している。

〈序文〉脳可溶性分画には大量のcyclic Nucleotide phosphodiesteraseが存在していることが知られている。この酵素はDEAE-セルロース[1]，ゲル濾過[1,2,3]，Isoelectric focusing[4]等により多様性(Multiple form)が確認されている。又酵素の一部はCa^{2+}Activator protein[5,6]によって活性化される事が知られている。この多様性酵素は元来組織中に存在するものなのか，単一酵素から由来する人工的産物なのか議論も多い。今回はActivator protein-Sepharoseよりなる Affinity columnを使用して，多様性酵素のうちのActivator proteinによって活性化をうける酵素を精製した。この酵素はActivator protein レX外にもTrypsin等によるプロテアーゼの消化によって強く活性化されること，ならびに組織ホモジエネートを作る時にEGTA，プロテアーゼ阻害剤を加える事により、潜在型酵素の収量が増加することから、組織内では潜在型酵素が主体となり，Ca^{2+}イオン等によりすばやく活性型酵素に転換される可能性あると思われる。



(図1)



(図2)

〈実験方法〉 1. Phosphodiesterase活性。基質1μMで、Boudreau-Drummond[7]の方法によっている。 2. Affinity columnの作製。Activator proteinはKatohら[8]の方法によって精製した。この精製Activatorと Sepharose-2Bを Horigomeら[9]の方法に従ってBrCNで結合させた。このゲル1mlは4mg Activator protein/mlゲルのタンパクを結合している。 3. DEAE-Cellulose column。0.07M Acetate buffer, pH6.5, cont. 10^{-3}M EGTAで平衡化した150mlのDEAEを使用した。酵素は70mM-1M Acetate buffer, pH6.5, の直線勾配で溶出した。[10]

〈実験結果と考察〉

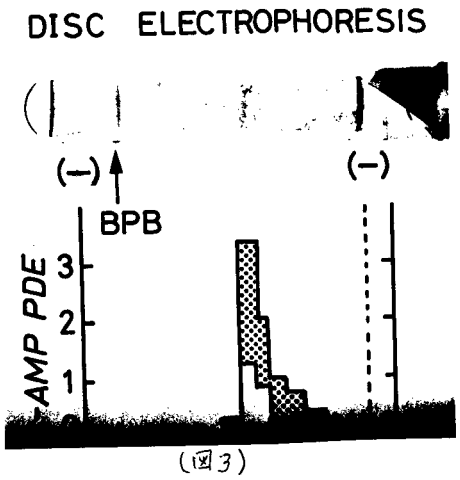
1. DEAE-Cellulose column。図1上段の溶出曲線はEGTA-プロテアーゼ阻害剤(トラジロール)を加えない場合，下段はその存在下で脳ホモジネート液を作製した場合を示す。阻害剤存在ではBasal activityの低下が認められる。図1上段から明らかな様に第2番目のピークがActivator proteinの存在によって活性化が起る。この部分をあつめて次のAffinity columnに吸着させた。

2. Affinity column。Activator protein-Sepharose 2Bカラム(20ml)を70mM Acetate buffer, pH6.5, cont. 10^{-3}M $CaCl_2$で平衡化した。このカラムにDEAE-セルロース活性部分を吸着させた。(図2)。Activator proteinによって特異的に活性化される酵素は0.1M NaCl-1mM EGTAによってはじめて溶出された。しかしながらこの活性部分のタンパク質はSDS-Disc電気泳動上主要なタンパク部分(phosphodiesteruse)の他に5個ぐらいのバンドを認めた。これらのタンパク質はCa^{2+}を介して特異的にActivator proteinに吸着していることから、逆にActivator proteinの生理的な役割を推測ができよう。すなわちActivator proteinはPhosphodiesteraseの活性化タンパクであるのみならず、脳可溶性分画に存在するAdenylate cyclaseを活性化する作用をもっている[11]。またMicrotubule-TubulinにもPhosphodiesterase活性を有する[12]。

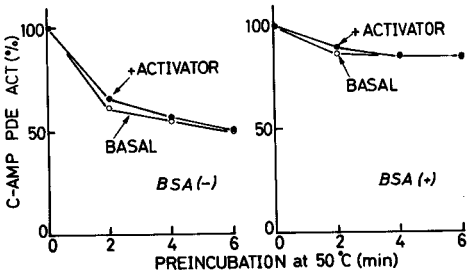
この事実は、Activator protein自体, Ca^{2+}のCarrier proteinとして多様な作用を有していると思われる。

又トランキライザーの一種であるTrifluoperazineはActivator proteinによるPhosphodiesteraseの活性化を特異的に阻害すると同時にAffinity columnへの酵素の吸着をも阻害した。

3. 精製酵素の諸性質。Sephadex G-200によって最終的に精製した酵素のDisc電気泳動上のパターンを図3に示す。Disc電気泳動上単一のバンドに染色される。このゲルのスライスを均質化し、Phosphodiesterase活性を測定した。図3に示すごとく酵素は電気泳動後もActivator proteinによって活性化をうけるものの、その程度は低く、潜在型酵素が泳動中に活性化されたと推定された。図4は精製酵素の熱安定性を調べたものである。Activator proteinの存在、非存在にかかわらず、熱安定性は同じで、BSAを存在することにより、いずれの場合も熱に安定となった。



(図3)



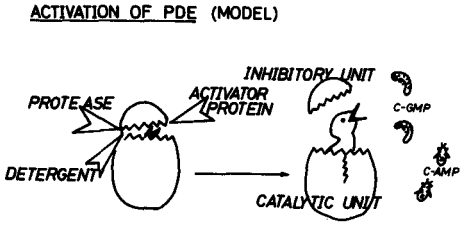
(図4)

酵素精製のまとめを表1に示した。すなわちcyclic AMPを基質にした場合、比活性は約250倍に増加した。各々の段階で約70%の回収したのにもかかわらずこの比活性の低さは精製中の失活の結果と思われる。又全体の回収は約2%と低い(表1)。これら精製中の酵素の失活をふせぐ為30% Ethelyene glycolを加えて精製した所、酵素活性は安定した。

基質をcyclic GMPとした時も同様に回収は2%で、各ステップでの比活性もほぼcyclic AMPを基質にした時と同様の比を示した。これらの事実はActivator proteinによって活性化をうけるこの酵素はcyclic AMPとcyclic GMPを共に基質とする酵素であることを示している。またこの酵素はcyclic AMPまたはcyclic GMPを基質にした時も、Activator proteinによってbasal活性の15~20倍の活性化を示した。この活性化に伴いKmの減少とVmaxの増加をもたらした。

	Volume (ml)	Protein (mg)	c-AMP PDE (Spcific)	Ttl Act ($\times 10^{-6}$)	Recovery (%)	Ratio (+/-Act)
1. 10,000-g Sup	980	10,780	1.45	16.0	100	1.67
2. DEAE-cellulose	105	420	7.31	3.07	19.1	10.5
3. Affinity Column	60	9.6	77.3	0.74	4.6	15.2
4. Sephadex G-200	30	1.2	237	0.28	1.8	16.9

(表1)



(図 5)

Affinity chromatography を使用した Phosphodiesterase の精製法は Watterson and Vanaman[13] および Miyake ら[14,15] によって報告されている。いずれの場合も Sepharose 4B と Activator protein の結合には Ca^{2+} の存在を必要としているものの、このカラムのみで蛋白化学的に純粋な酵素を精製するに至っていなかった。さらに前者の報告[13]ではこのカラムで精製した後も酵素は activator によって活性化されたが、後者[14,15]では Activator による活性化の程度はこのカラムに通じたのちでは著明に低下することを報告している。

図5に Phosphodiesterase の活性化モデルを示した。酵素は Catalytic unit とその活性を阻害している Inhibitory unit から成りたっていると考えられる。この酵素の活性化に際しては (1) Activator protein, (2) Protease および (3) Detergent によって、Inhibitory unit が遊離するものと考えられる。目下このモデルを実証すべく各 unit の単離を試みている。

〈謝辞〉本研究に対して御助言をいただいた垣内史朗博士に深謝します。

References

1. Sakai, T., Yamanaka, H., Tanaka, R., Makino, H. and Kasai, H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 483, 121-134
2. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K. and Miyamoto, E. (1975) Biochem. J. 146, 109-102
3. Thompson, W. J. and Appleman, M. M. (1971) Biochemistry 10. 311-316
4. Pledger, M. T., Stancel, C. M., Thompson, M. J. and Strada, S. J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 370, 240-248
5. Cheung, W. Y. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2859-2869
6. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y. and Uenishi, K. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 70, 3526-3530
7. Boudreau, R. J. and Drummond, G. I. (1975) Anal. Biochem. 63, 388-399
8. Kato, Y., Kato, T., Kasai, H., Okuyama, T. and Uemura, K. (1977) J. Biochem 82, 43-51
9. Horigome, T., Kasai, H. and Okuyama, T. (1974) J. Biochem. 75, 299-307
10. Terasaki, W. L. and Appleman, M. M. (1975) Metabolism 24, 311-319
11. Brostrom, M. A., Brostrom, C. O., Breckenridrige, B. M. and Wolff, D. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4744-4750
12. Watanabe, K., Lan, J. S., Williams, E. F., Stoifer, D., Sun, D. and West, W. C. (1977) Third International Conference on Cyclic Nucleotides. Abstract p. 65
13. Watterson, D. M. and Vanaman, Y. C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 40-46
14. 三宅正治, Daly, J. W. and Creveling, C. R. (1976) 神経化学 15, 260
15. Miyake, M., Daly, J. W. and Creveling, C. R. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 181, 39-45

本発表の一部は第二回サイクリックAMP懇話会(昭和52年7月・賢島)において発表しました。

59 脳における膜結合性 Modulator 蛋白について

手島佳子・山崎礼子・安田誠治
樫葉　明　（大阪府立中宮病院）

〔要　約〕

ラット大脳皮質より低張処理して得られる沈殿分画に，膜結合性の modulator 蛋白が存在する。g組織当り 500μg 存在する遊modulator蛋白の内200μg以上が沈殿分画中にみい出され，そのうちの約⅔（144 μg）が Ca^{2+} に依存して可逆的に膜成分に結合していることをみい出した。この量は Soluble modulator の量の略36%を占める。この Ca^{2+} 依存性の膜結合modulatorの特色は，1) modulatorの膜への結合は生理的濃度の Ca^{2+} によって可逆的に起こる。2) microsomal fractionにその比活性が最も高い。3) この結合は温度とmodulator濃度に依存しており，modulatorにより飽和される。mg膜蛋白当り 4.5 μg の modulatorが結合する。4) この結合部位はトリプシン処理に不安定である。5) この結合活性は，トリプシン処理や超音波処理に対する安定性の違いから Ca^{2+} 依存性phospho-diesterase活性とは別のものであると思われる。6) 沈殿区分中には，この他に Ca^{2+} 非依存性の顆粒結合性modulatorもいくらか存在する。この方はトリプシン処理に比較的安定である。

わたくしたちは以前に Cyclic nucleotide phosphodiesterase の活性が生理的濃度の Ca^{2+} によって賦活され(1,2)，この Ca^{2+} 依存性の賦活は組織中に存在する modulator 蛋白を介して行われることを報告した(2,3)。この modulator 蛋白の研究は他のいくつかの研究室においても行われ(4-6)，その結果 Cheung(7,8)によって哺乳動物組織より発見された activator 蛋白と同じものであることが現在認められている。最近この同じ蛋白が脳の adenylate cyclase活性を Ca^{2+} 依存性に賦活すること(9,10)，また再構成した骨格筋アクトミオシン ATPase活性をも同じく Ca^{2+} 依存性に賦活することが報告された(11,12)。これらの報告はすべて Soluble の modulator蛋白を用いて行われている。一方またこの蛋白がいくつかの組織で沈殿区分にも結合していることが最近報告された　15)。わたくしたちは今回，この particulate の modulator 蛋白の性質を明らかにすることを目的に実験を行い，いくらかの知見を得たので以下に報告する。

〔実験方法〕　Sprague-Dawley系雄ラットの大脳皮質を DeRobertis(16)等の方法に従って nuclear (P_1), mitochondrial (P_2), microsomal (P_3), supernatant, に分画し低張処理のために P_2 と P_3 画分を9倍量の 1mM Tris·HCl (PH 7.5) で homogenize した。homogenate を 60分間 4°C に保った後終末 1mM に EGTA を添加し 10万×g 60分間遠心し沈渣（P_2P と P_3P）と上清（P_2S と P_3S）に分け，沈渣は 20mM Tris·HCl (PH 7.5)，1mM $MgSO_4$，0.5mM dithiothreitol，a05mM EGTA，100mM NaCl の medium に suspend した。別にラット大脳皮質を9倍量の 5mM Tris·HCl (PH 7.5)，1mM $MgSO_4$，0.2mM dithiothreitol で homogenize し，60分間 4°C に保った後終末 0.32M に sucrose を加え 7,000×g 12分間遠心し，沈渣は再 homogenize し上記と同様に遠心した。上清を combine し 10万×g 60分間遠心し沈渣を 10mM Tris·HCl (PH 7.5)，1mM $MgSO_4$，

0.2mM dithiathreitol, 150 mM NaCl に suspend し 10万×g 60分間遠心した。この沈渣を上記 medium に disperse したものを microsomal 分画として用いた。Modulator 蛋白は Kato等 (17) の方法で調製し 15% polyacrylamide gel disc electrophoresis 上均一であった。PDE活性は Drummond (18) の方法，蛋白は Lowry (19) の方法に依った。Modulator は Kakiuchi 等 (20) の方法で行ったが膜結合 modulator 蛋白は Lubrol PX で前処理して用いた。particulate 分画と modulator 蛋白の結合は次の様に行った。膜標品と遠剤の modulator 蛋白を 0.05mM $CaCl_2$ を含んだ medium 中で 30°C 45分間 incubate した後 10万×g 60分間遠心し，未反応の modulator を除き，沈渣は 0.1mM EGTA を含む medium に disperse し modulator 活性を測定した。次に 30C incubation 後に 0.5mM EGTA を加え 10万×g 60 分間遠心後の沈渣を 0.1mM EGTA を含む medium に disperse し modulator 活性を測定した。Ca^{2+} 依存性 modulator binding は前者と後者の差で求めた。

〔結果〕 表1に示す様に Modulator 蛋白は g 脳当り約 500 units (500μg) みいだされ，EGTA入りの medium で homogenize するとその内の約 80% が上清区分にみいだされる。Ca^{2+} medium の場合には約 60% が上清区分にみいだされる。しかしながら蛋白と PDE活性はどちらの条件によってもその%分布に差異は認められない。この translocation は 0.03mM の Ca^{2+} 濃度で起こり 1mM の濃度まで distribution に変化はない。表2は microsome に結合した modulator の 60% が EGTA の添加によってのみ solubilize され，2M KCl, NaCl によっては Solubilize されないことを示している。2M KCl, NaCl によって蛋白は 20% 近くが solubilize される。膜結合性PDE活性は EGTA や塩によって影響を受けない。この Ca^{2+} 依存性の modulator の microsome への結合は可逆的である (図1)。

Table 1. Effect of Ca^{2+} on the distribution of protein modulator between the supernatant and particulate fractions.

Medium	Fraction	Protein (mg/g of tissue)	(%)	Modulator (unit/g of tissue)	(%)	cAMP-hydrolysis (nmol/min·g of tissue)	(%)	cGMP-hydrolysis (nmol/min·g of tissue)	(%)
Ca^{2+}	Supernatant	30.2	31.8	285	58.3	22.9	49.0	92.5	73.1
	Particulate	64.9	68.2	204	41.7	23.8	51.0	34.0	26.9
	Total	95.1	100	489	100	46.7	100	127	100
EGTA	Supernatant	28.8	30.9	379	77.7	22.7	51.0	87.0	74.2
	Particulate	64.3	69.1	109	22.3	21.8	49.0	30.2	25.8
	Total	93.1	100	488	100	44.5	100	117	100

Table 2. Effect of EGTA and salts upon solubilization of modulator and enzyme from the microsomes.

Addition	Percent solubilized			
	Protein	Modulator	cAMP-phospho-diesterase	cGMP-phospho-diesterase
$CaCl_2$	3.6	negligible	2.2	2.2
EGTA	4.4	60.8	2.2	2.2
KCl	18.9	negligible	4.5	4.5
NaCl	16.5	negligible	4.1	4.1

この様にparticulate へのmodulatorの結合には Ca^{2+} 依存性とresidual binding (非依存性)の二つのタイプが存在する。表3ではsubcellular distributionをみしている。microsome分画に Ca^{2+} 依存性のmodulator結合の比活性が最も高いが，この分画は又residual bindingのmodulatorも多い。脳の1重量当りの膜結合modulatorは214μgでその2/3が Ca^{2+} 依存性の結合である。電顕ではこの分画にmembrane fragment, ribosome, endoplasmic reticulume, small-size synaptosomeとvesicleが認められる。modulatorの Ca^{2+} 依存性結合は飽和性である(図2)。このデーターよりmg microsome当りmodulator 4.5μgが結合する。又この Ca^{2+} 依存性結合は温度依存性をみし60分間のincubationを行うと4°Cでは30°Cに比べその結合能は56%であった。Ca^{2+} 依存性，residualどちらの場合にもmicrosomal分画にPDE活性がみいだされる。modulatorの Ca^{2+} 依存性PDEという可能性を調べるために表4にみす様な実験を行った。microsomeのトリプシン消化によって Ca^{2+} 依存性結合部位が完全に消失するのに対しPDE活性はcAMP, cGMPどちらを基質にした場合にも約半分消失するのみである。一方microsomal分画を Ca^{2+} 入りmediumにsuspendし超音波処理を行うと Ca^{2+} 依存性結合部位は6%消失するのに対し，PDEはcAMP, cGMP各々86%，67%もその Ca^{2+} 依存性活性を失う。これらの結果より Ca^{2+} 依存性結合部位と Ca^{2+} 依存性PDE活性は別々のものと推測される。又modulatorの Ca^{2+} 依存性結合とresidual bindingも

Fig. 1

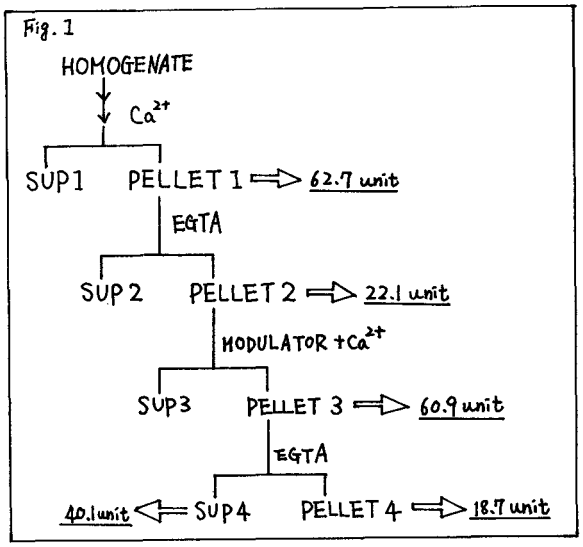


Fig. 2

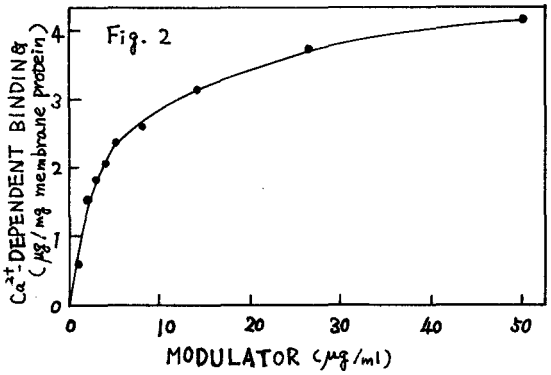


Table 3. Subcellular distribution of modulator-binding activity.

Fraction	Ca^{2+}-dependent binding		Residual binding		Total bound modulator
	(unit/g of tissue)	(unit/mg of protein)	(unit/g of tissue)	(unit/mg of protein)	(unit/g of tissue)
P_1	5.65	0.86	1.79	0.27	7.44
P_2P	66.7	1.95	9.6	0.28	76.3
P_3P	71.3	4.05	58.6	3.33	130
Total	144	—	70.0	—	214

Results are averages of two separate experiments.

区別できる。後者はトリプシン消化に抵抗性をおすが超音波処理には比較的不安定であるからである。

Table 4. Effects of trypsin digestion and sonication on the modulator-binding activity and phosphodiesterase activity of the microsomes

Treatment	Modulator-binding activity (% of the untreated sample)		cAMP-hydrolysis (% of the untreated sample)		cGMP-hydrolysis (% of the untreated sample)	
	Ca^{2+}-dependent binding	Residual binding	Ca^{2+}-dependent activity	Residual activity	Ca^{2+}-dependent activity	Residual activity
Trypsin digestion	0	90	55 (26)	22 (50)	44 (3)	49 (18)
Sonication in the presence of 0.05 mM Ca^{2+}	94	35	14 (16)	82 (14)	33 (18)	76 (37)
Sonication in the presence of 0.33 mM EGTA	60	28	15 (0)	81 (22)	32 (23)	65 (41)

〔考察〕この顆粒区分えのCa^{2+}依存性のmodulator結合は次の点より して生理的なものであろうと推定される。即ち(a)その結合が生理的濃度のCa^{2+}によって可逆的に生じること。(b)結合はmodulatorの濃度に依存しておこり且つ飽和すること。(c)結合が温度依存的であること。この現象の生理的意義は未だ明らかではないが，次の二つの可能性が考えられる。(1)この結合が細胞内のfreeのmodulatorの濃度の調節に役立っている可能性，脳ではSoluble modulatorの実に36%近くがこのようにして膜に結合しうる。(2) modulatorを結合した膜成分が酵素作用等の何らかの機能を発揮する可能性。この(2)の一つとしてそれが顆粒状のPDEやadenylate cyclaseである可能性も考えられるが，それだけでは量的に充分ではない。(Ca^{2+}依存性の結合体の量がはるかに多い)。又耐熱性等においても異る点がみられる等の理由により否定的である。従ってこの結合体の意義について他の可能性を考えてそれを目下追究中である。

〔謝辞〕本研究に対して御助言，御指導いただきました阪大医学部高次研教授垣内史朗博士に深謝します。

〔文献〕

1) Kakiuchi,S.& Yamazaki,R. (1970)Proc.Jap.Acad. 46, 387-392. 2) Kakiuchi,S.& Yamazaki,R. (1970)Biochem.Biophys.Res.Commun. 41,1104-1110. 3) Kakiuchi,S.,Yamazaki,R.& Nakajima,H. (1970)Proc.Jap.Acad. 46, 587-592. 4) Teo,T.S.& Wang,J.H. (1973) J.Biol.Chem. 248, 5950-5955. 5) Lin,Y.M.,Liu,Y.P.& Cheung,W.Y. (1974) J.Biol.Chem. 249, 4943-4954. 6) Wolf,D.J.& Brostrom,C.O. (1974) Arch.Biochem.Biophys. 163, 349-358. 7) Cheung,W.Y. (1970)Biochem. Biophys.Res.Commun. 38, 533-538. 8) Cheung,W.Y. (1971)J.Biol.Chem. 246, 2858-2869. 9) Brostrom,C.O.,Huang,Y.C.,Breckenridge,B.M.& Wolf,D.J. (1975)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 64-68. 10) Brostrom,M.A.,Brostrom,C.O.,Breckenridge,B.M.&Wolff,D.J. (1976)J.Biol.Chem. 251, 4744-4750. 11) Amphlett,G.W.,Vanaman,T.C.& Perry,S.V. (1976)FEBS Lett. 72, 163-168. 12) Dedman,J.R.,Potter,J.D.& Means,A.R. (1977) J.Biol.Chem. 252, 2437-2440. 13) Cheung,W.Y., Lin,Y.M.,Liu,Y.P.& Smoake,J.A. (1975) in Cyclic Nucleotides in Disease ed.Weiss,B. (University Park Press, Baltimore),pp 321-350. 14) Gnery,M.E.,Costa,E.& Uzunov,P. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 352-355. 15) Watterson,D.M.,Harrelson,W.G.,Keller,P.M., Sharief,F.& Vanaman,T.C. (1976) J.Biol.Chem. 251, 4501-4513. 16) De Robertis,E.,De Lores Arnaiz,G.R.,Alberici,M.,Butcher,R.W.& Sutherland, E.W. (1967) J.Biol.Chem. 242, 3487-3493. 17) Kato,Y.,Kato,T.,Kasai,H.,Okuyama,T.& Uyemura,K. (1977) J.Biochem. Tokyo, in press. 18) Boudrean,R.J.& Drummond,G.I. (1975) Anal.Biochem. 63, 388-399. 19) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J.,Farr,A.L.& Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275. 20) Kakiuchi, S.,Yamazaki,R.,Teshima,Y.,Uenishi,K.& Miyamoto,E. (1975) Biochem.J. 146, 109-120.

60 シナプス小胞画分とドパミンの結合について

都築紀宏・田中　亮　（名市大・医・生化）

〔要　約〕

牛脳尾状核・レンズ核・視床より調製したシナプス小胞画分とドパミンの結合について研究した。0°, pH7.8, 14 h 反応後のドパミン結合量はラングミュアの吸着式で表わされ飽和性を示した。蛋白 a5～a6mg 当りの結合量は全添加ドパミン(1.52n-mole)の3～5%(a05～a08n-mole)であった。結合量は強い pH 依存性を示し水素イオン濃度〔H^+〕に反比例した。ATP を加えてもドパミン結合は促進されずむしろ減少する傾向を示した。ATP は又、pH依存性にも影響を与えなかった。Na^+, K^+, Ca^{++} の影響は各イオン種に特異的ではなく、イオン強度(0-0.3M)の増大につれて、結合量は20%低下した。レセルピンはドパミン結合を抑制したが、これは結合速度を低下させると言うよりも、一旦結合したドパミンを遊離させる作用を示した。この作用はATPが存在しないと殆ど認められなかったが、作用様式から考えて、ATP 依存性のドパミン結合の存在を示唆するものではない。ATP を加えずにドパミン結合後シナプス小胞画分を蔗糖密度勾配遠沈すると蛋白及び〔^3H〕ドパミンの殆どが0.4M 蔗糖層上部に回収された。この部分は昨年報告した様にATPase 活性を示さなかった。以上の結果は、ATPase 活性を持たないシナプス小胞があるという我々の考えを支持した。

序；神経伝達物質の放出機構を研究する際，伝達物質がシナプス小胞から直接細胞外へ放出されるのか、或いは、これ以外の細胞内プールから放出されるのかを明らかにする事はこの機構解明の一助となるであろう。それにはシナプス小胞の役割が伝達物質の合成貯蔵のみにあるのか、更に何か特殊な放出機構を備えているのかについてもっと明らかにする必要がある。我々は昨年の本大会(新潟)でATPase 活性を現わさないシナプス小胞について報告した。今回はこのシナプス小胞画分のドパミン結合能について実験し、pH, ATP, Na^+, K^+, Ca^{++}の影響，レセルピンの作用等について検討したので報告する。

実験材料及び方法

シナプス小胞(以下S.V.と略す)画分　はKadotaらのdifferential遠沈法(5)に基づいて牛脳尾状核・レンズ核・視床より調製した(11)。蔗糖密度勾配遠心分画はWhittakerらの方法(0.4～1.2M蔗糖，59000×g，120分遠心)に沿って行なった(12)。[ring-G-^3H] dopamine-HCl (500mCi/m-mole)は20mM アスコルビン酸中76μM液として貯蔵・作用した。S.V.画分とドパミンの結合は 1.1ml 反応液に a5-a6mg S.V. 蛋白と 1.52n-mole〔^3H〕ドパミンを加え、反応後冷却buf.で11倍に希釈し110,000×g，40min，2°C にて遠沈した。ペレット部分を切り取り液シンバイアル中で a2ml SDS(2.5%)にsuspendし、4.0ml Bray sol.(ジオキサン系)を加えて液シン測定した。ATPase 活性は 25mM ATP, 5.0mM $MgCl_2$ を含む 75mM Tris-maleate buf., pH 7.8, a9mlにS.V. 蛋白 10-20μgを加え30°C，30min 反応後，遊離したPiをMartin & Doty法で比色定量した。Reserpine

（本研究の一部は本年度の日本生化学会で発表する予定です）。

は18mgを0.2ml/クロロホルムに溶かし10ml buf.中で充分攪拌後、上清buf.を使用した(2~5μM)。対称用buf.もクロロホルムで同様に処理して使用した。蛋白はLowry法で定量した。

結　果

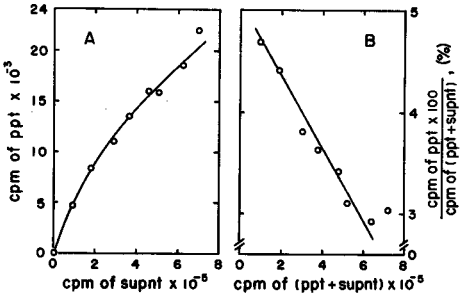


図1. S.V.とドパミンの結合平衡化。反応液10mlに50mM Tris-HCl, pH7.8, 2mM $MgCl_2$, 0.57mg S.V.蛋白, 0.38-3.04n moles ^3H-dopamineを含む。0°C, 14h後pptとsupnt(20μl)のカウント測定。supntのcpm(counts per min)は500倍値が記入してある。

低張下でのシナプス小胞とドパミンの結合平衡; S.V.とドパミンの結合様式を調べる目的で、一定量のS.V.蛋白と種々濃度のドパミンをATPを加えずに、低張下0°Cで14h反応させ、ペレット(ppt)と上清(supnt)20μlの[^3H]ドパミンを測定した。図1Aに示した様に結合量はドパミン濃度が増すにつれて飽和する性質を示した。ドパミン結合量は0.57mg S.V.蛋白当り、pH7.8で全ドパミンの3-5%(0.05-0.08 n-mole)であった。又ドパミン結合量はラングミュアの吸着式で表わすとよい直線性を示したのでこの結合は吸着現象に似ているものと考えられる(ラングミュアplotはB図たて軸の分子・分母を入れ換えた表示にほぼ等しい)。ATP依存性のドパミン結合が存在するならば、ATPによってこの値以上に促進されなければならない。

pHの影響; このS.V.画分とドパミンの結合は図2Aに示した様に非常に強いpH依存性を示し、pH6.5以下では殆ど結合しなかった。2.5mM ATPを加えてもドパミン結合が促進される事や、pH依存性が変化することはなかった。0°Cの場合pH8.3以上ではATPの有無に拘らず結合の低下が見られたが現在の所理由は不明である。同Bの様にたて軸をlog表示にするとドパミン結合量はpHに比例した。この結果は結合が水素イオン濃度[H^+]に逆比例することを示している。図3は0°C pH8.3でS.V.とドパミンを結合後pHを変化(0°C)させたものである。図からわかるようにこの結合は可逆的で[H^+]に比例してドパミンの遊離がみられた。

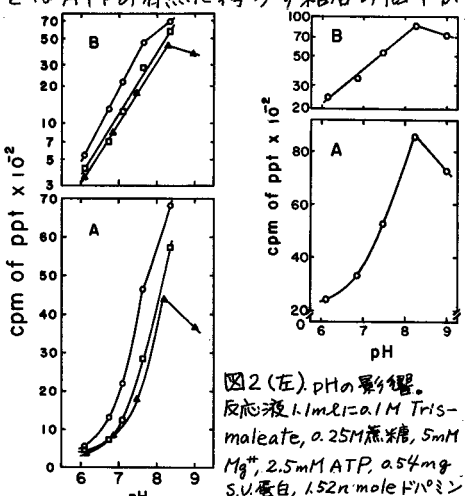


図2(左). pHの影響。反応液1.1mlに0.1M Tris-maleate, 0.25M蔗糖, 5mM Mg^{++}, 2.5mM ATP, 0.54mg S.V.蛋白, 1.52n moleドパミンを含む。0°, 又は30°, 11分反応名pH buf.で希釈後pptをつくる。—●— 30°ATP(−); —○— 30°ATP(+); —△— 0°ATP(−). 図3. 反応液2.2mlに0.1M Tris-maleate, pH8.25, 0.25M蔗糖2.7mg S.V.蛋白, 16.7n moleドパミンを含む。0°, 40分後0.4mlを各pH buf. 90mlに加え、0°, 20分後遠沈。pHは各温度でチェックした。

ATPの影響; 図2と図4に示した様にS.V.とドパミンの結合は2.5mM ATP存在下でも促進されず却って結合量の低下が見られた。これはTris-HCl(図4)よりもTris-maleate(図2)を使用した場合に著しく見られた。図4のように結合は10 minほどで最大に達し、その後低下する場合もあった。又、5.0mM $MgCl_2$の有無は結合量に影響を与えなかった。

Na^+, K^+, Ca^{++}の影響; これらのイオンがドパミンの結合にどの様な影響を及ぼすかを0.125M Tris-HCl-0.2M sucrose, pH7.8中で調べた。図

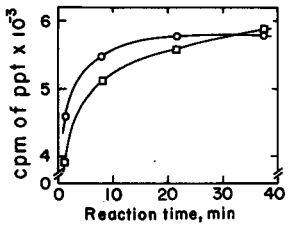


図4. ATPの影響。反応液 1.1ml に 0.1M Tris-HCl, pH 7.8, 0.25M蔗糖, 5mM Mg^{++}, 1.52n mole ドパミン, 0.6mg S.V. 蛋白を含む。30°にて反応後同buf.で希釈, —○— ATP(−), —□— ATP(+)。

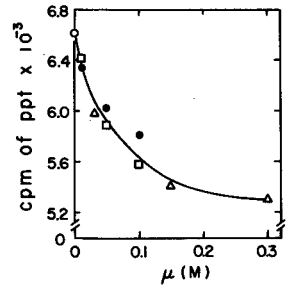


図5. Na^+, K^+, Ca^{++}の影響。反応液は図4.と同じ。各イオンを 10, 50, 100mM加えた。反応; 30°, 11分。各イオンを含むbuf.で希釈。μは添加イオンについてのみ。

5に示した様に各イオン種間の差異は認められず、イオン強度(μ)の増加につれてドパミン結合量は約20%低下した。

Reserpineの影響が図6に示してある。AはATP存在下, BはATP非存在下での実験である。図から判るようにレセルピン(2-5μM)はATPが存在しないと殆ど作用を示さなかった。又、レセルピンの作用はドパミンの結合速度を低下させるのではなく、最初の 1-2 min に結合したドパミンをS.V.から遊離させる(剥ぎ取る)感じの作用でかなり遅効性であった。

蔗糖密度勾配分画; 我々のシナプス小胞画分は既報(11)の様にミクロソーム画分を含んでいるのでドパミンがどの画分と結合しているかを調べるために、ATP不在下でドパミン結合後シナプス小胞画分の蔗糖密度勾配分画を試みた(11)。図7に示した様に蛋白の殆どは fraction 9 (0.4M蔗糖層上部)の白濁帯に回収され、ミクロソームは fraction 7 (0.6M層)に回収された。fraction 4, 5 は plasma membrane, 10, 11は透明層で可溶性蛋白を含む。Mg^{++}-ATPase活性は fraction 7に見られ, 8, 9には殆ど認められなかった。[^{3}H]ドパミンのカウントは0.4M蔗糖層上部のシナプス小胞画分に主として見られ, fraction 6, 7 のミクロソーム分画にはあまり見られなかった。この様にドパミン結合のピークと Mg^{++}-ATPase活性のピークは一致せず fraction 9 のシナプス小胞画分はATPase活性を持たなくてもドパミン結合能を持つ画分であることが示された。

考　察

シナプス小胞への伝達物質の取込・放出はいかなる機構でなされているのか。S.V.画分には Mg^{++}-ATPaseが存在するという報告(4)もあるが、その取込・放出機構にどの様に関与しているかは不明である。Kuriyama ら(7)はマウス脳 S.V. と GABA の結合は Na^+ 依存性であるがエネルギー依存性ではない、と報告している。Marchbanks (8) はモルモット S.V. を使用して Ach の交換性を調べたが、ATP存在下でも殆ど認められなかった(2-3%)。Kuriyama らの報告では添加GABA の 6-8 % が mg. protein 当り結合しているが我々のドパミンの値もこの値に近いものであった(図1)。図4に示した様に高張下でもエネルギー依存性の結合が見られないことや, 結合量が吸着式で表現できることから考えて、この結合は吸着現象と思われる。ATPを加えるといつも結合量の低下がみられた。理由は明らかでないが、phosphate が S.V. とセロトニンの結合を低下させる例もある(3)し カテコラミンとATPは complex を作り易い(2)のでこれらが原因かも知れない。ドパミンの結合が可逆的に、水素イオン濃度に比例して結合し難くなる事は興味深い。セロトニンの結合にガングリオシドが関与しているという報告(3)やpHを低下(pH 4.0, 1-2 min)させるとS.V.からAChが遊離するという報告(12)と矛盾しない。pH変化が取込・放出機構の調節に関与している可能性もある。K^+, Ca^{++}は神経伝達物質のニューロン外の放出に関与している重要なイオンである。Kuriyama らは上述の S.V. と

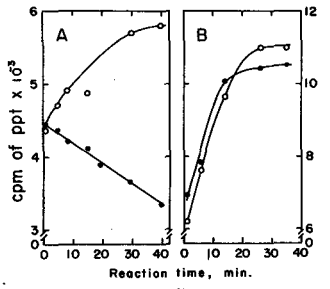


図6. レセルピンの作用。
反応液は図4と同じ。レセルピン, 2-5μM; 反応, 30°; (A)0.55mg S.V. 蛋白, ATP(+), Mg^{++}(+); (B)0.65mg S.V. 蛋白, ATP(−), Mg^{++}(−); —o— レセルピン(−); —●— レセルピン(+)

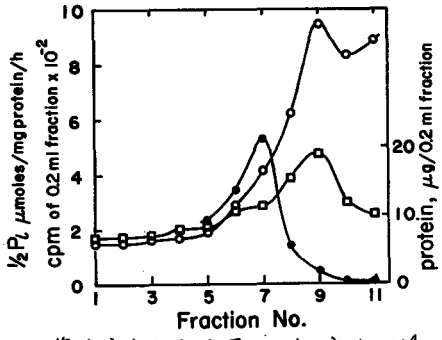


図7. 蔗糖密度勾配分画: 反応液 5.0ml は0.1M Tris-maleate, pH 8.25, 0.25M蔗糖 2.8mg S.V. 蛋白, 7.6mg ドパミンを含む。0°, 1時間後水で1倍に希釈し遠沈。pptを50mM Tris-maleate −0.125M蔗糖 buf., pH 8.0, 4.0mlでホモジェネートし, 30mM Tris-maleate, pH 8.0にとかした蔗糖液中で密度勾配分画した。—o— cpm; —□— 蛋白, —●— Mg^{++}-ATPase

GABAのNa^+依存性の他に, AChとS.V.の結合はNa^+, K^+の濃度増加で低下すると報告している。我々の実験ではNa^+, K^+, Ca^{++}の作用にはイオン種による特異性は見られず, イオン強度の増大はドパミン結合を低下させた。Tanakaら(10)のイオン依存性の報告と矛盾していない。Transmitterの放出にはCa^{++} influxが必須であるが、現結果からはCa^{++}がS.V.に特異的に作用しているとは考えられない。Reserpineはカテコラミンのuptake, storageを低下させることはよく知られている(1,6,10)が、我々の場合、ATPが含まれていないとS.V.とドパミンの結合は殆ど影響を受けなかった。その作用は一旦結合したドパミンをS.V.から離脱させる様な作用で、いわゆる酵素活性を阻害した際に見られるkineticsではなかった。同じ様な作用が、diazepamについてマウス脳SynaptosomesとGABAの間で観察されている(9)。エネルギー依存性のドパミン取込みがあって、これをレセルピンがblockするという様な作用ではない。我々の標品には既報(11)の様にミクロソーム画分を含んでいるが図7に示した様にドパミンの殆どは0.4M上層部に回収されS.V.画分に結合している事が知られた。ミクロソーム画分にはあまり結合能は見られない。しかしこのS.V.画分はATPase活性を示さないので, ATPase活性を持たないシナプス小胞が存在するという既報を支持する結果となった。

文　献

1) Breakefield, X. O. (1975) J. Neurochem. 25, 877-882
2) Colburn, R. W. and Maas, J. W. (1965) Nature 208, 37-41
3) Deul, D. H., Haisma, J. A. and Van Breemen, J. F. L. (1968) Prog. Brain Research 29, 125-134
4) Hosie, R. J. A. (1965) Biochem. J. 96, 404-412
5) Kadota, K. and Kadota, T. (1973) J. Cell Biol. 58, 135-151
6) Kirshner, N. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2311-2317
7) Kuriyama, K., Roberts, E. and Vos, J. (1968) Brain Research 9, 231-252
8) Marchbanks, R. M. (1968) Biochem. J. 106, 87-95
9) Olsen, R. W., Lamar, E. E. and Bayless, J. D. (1977) J. Neurochem. 28, 299-305
10) Tanaka, R., Asaga, H. and Takeda, M. (1976) Brain Research 115, 273-283
11) Tsudzuki, T. and Tanaka, R. (1976) Bul. Jap. Neurochem. Soci. 15, 164-167
12) Whittaker, V. P., Michaelson, I. A. and Kirkland, R. J. A. (1964) Biochem. J. 90, 293-303

61 マウス脳における α-ブンガロトキシン結合部位の局在性：光学顕微鏡的および電子顕微鏡的オートラジオグラフィーによる研究

有松清温・瀬戸章子・天野武彦
（三菱化成生命研）

〔要　約〕

骨格筋のニコチン性アセチルコリンリセプター（AChR）に特異的に結合することがしられているα-ブンガロトキシン（α-BGT）を ^{125}I で標識し，マウス脳における α-BGT 結合部位の局在性を光学顕微鏡的および電子顕微鏡的オートラジオグラフィーによって調べた。未固定および4%パラホルムアルデヒドで固定した脳切片の光学顕微鏡的オートラジオグラフィーによって，マウス脳における α-BGT 結合部位の部域的特異性が示された。高い密度の α-BGT 結合部位はアセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性の強い部域中の一定部域に限局して存在した。しかし，AChE 活性の強い部域中には，余り多くの結合がみられない部域も存在した。[^{125}I]α-BGT 結合部位の分布は，未固定およびパラホルムアルデヒド固定切片において同様であり，ともにd-ツボクラリンによって阻害された。2%グルタールアルデヒドで固定した切片には多量の非特異的な [^{125}I] α-BGT の結合がみられた。ついで，光学顕微鏡レベルで多量の [^{125}I]α-BGT の結合がみられた脚間核外側部と後部内側扁桃核について，電子顕微鏡的オートラジオグラムを作製して超微構造レベルにおける α-BGT 結合部位の局在性を調べた。多くの現像銀はシナプス部位に現れ，多くの [^{125}I]α-BGT がシナプス部位に結合していることが確められた。

脊椎動物の中枢神経系におけるニコチン性アセチルコリンリセプター（AChR）の存在は多数の電気生理学的な実験により示されている（2）。最近いくつかの研究室において，α-ブンガロトキシン（α-BGT）に結合する物質がラットやマウスなどの脳より抽出され，それが発電器官や骨格筋のニコチン性AChRの生化学的薬理学的性質ときわめて類似した性質を持つことが明らかになった（7, 9, 13）。そこでα-BGTを ^{125}I で標識し，マウス脳内におけるその結合部位の局在性を光学顕微鏡的および電子顕微鏡的オートラジオグラフィーによって調べた。

〔材料と方法〕

1）動物および [^{125}I]α-BGT の調製　成熟雄マウス（DDY および C57BL/6J strain）を用いた。α-BGT の Bungarus multicinctus の毒腺成分よりの抽出・精製および ^{125}I 化は既報のとおり行った（14）。

2）脳切片の作製　未固定および固定した脳切片を作製した。前者としては，断頭した脳をドライアイス－エタノールで冷却したイソペンタンで凍結しクリオスタットにて厚さ 10 μm の新鮮凍結切片を得た。後者としては，4%パラホルムアルデヒド（PFA），2%グルタールアルデヒド（GA），過ヨウ素酸－リジン－パラホルムアルデヒド（PLP；8）のいずれかで還流固定した脳をさらに同固定液で7時間固定し，厚さ 10 μm の凍結切片を得た。電子顕微鏡的オートラジオグラフィー用としては PLP 固定の脳を Sorvall TC2 Sectioner で厚さ 80 μm の切片を作製した。

3）脳切片への [^{125}I]α-BGT の結合　未固定および固定した切片を 5 nM [^{125}I]α-BGT 溶液中で，23°C，30～180分インキュベートした後，4°C のリン酸緩衝生理食塩水で6回

（各10分）洗った。 一部の切片は 10^{-7}～10^{-4}M d-ツボクラリン（dTC）あるいは 2.5×10^{-6}M の非放射性 α-BGT であらかじめ 23°C, 30分処理した後 [^{125}I]α-BGT を加え，さらに 23°C, 30分インキュベートした。

4) 光学顕微鏡的オートラジオグラフィー [^{125}I]α-BGT とインキュベートした切片を 95% エタノールで後固定した後，オートラジオグラフィー用乳剤 Sakura NR-M2 でコートし，4°C で 2～8週間露出した。現像後，ニッスル染色をほどこして，明視野および明視野顕微鏡で観察した。α-BGT 結合部位の分布は KarnovskiとRoots(11)の方法によって検出したアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性の分布と比較した。

5) 電子顕微鏡的オートラジオグラフィー [^{125}I]α-BGT とインキュベートした切片を 2% GA と 1% OsO_4 で後固定し，Epon 812 に包埋，超薄切片を得た後，Sakura NR-H2 乳剤を用いて SalpeterとBachmann (12)の方法に従って電子顕微鏡的オートラジオグラムを作製した。露出は 4°C で 2～3 ヶ月行った。

〔結果と考察〕

1) 未固定および固定した切片への [^{125}I]α-BGT の結合，およびその特異性

未固定切片および PFA で固定した切片への [^{125}I]α-BGT の結合量はインキュベーションの時間とともに増加し，2時間後には飽和に達した（Fig. 1.）。未固定切片，4% PFA 固定切片，PLP 固定切片においては [^{125}I]α-BGT の結合は d-TC によって阻害され その阻害の割合は上記3種の切片についてほぼ同一であった（Fig. 2.）。10^{-4}M dTC で阻害されない約20%の結合は，大過剰の非放射性 α-BGT を加えた時の結合量とほぼ等しく，非特異的結合と考えられる。2% GA で固定した切片への [^{125}I]α-BGT の結合は dTC で全く阻害されなかった。

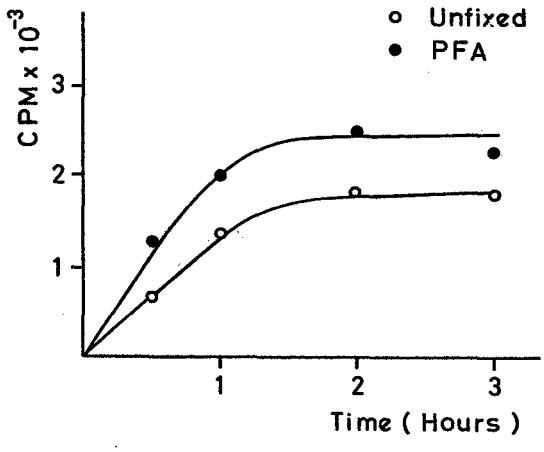


Fig. 1. Time course of [^{125}I]α-bungarotoxin binding to sections of mouse brain. Frozen sections of mouse brain were incubated with 5 nM [^{125}I]α-bungarotoxin at 23°C.

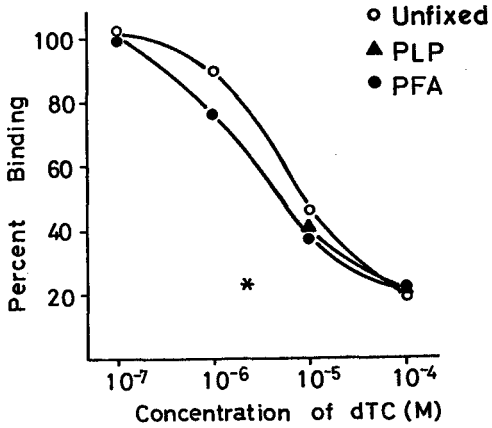


Fig. 2. Inhibition of [^{125}I]α-bungarotoxin binding to sections of mouse brain by d-tubocurarine. Frozen sections of mouse brain were incubated with d-tubocurarine for 30 min at 23°C. 5 nM [^{125}I]α-bungarotoxin was then added and the incubation was continued for 30 min. *, inhibition of [^{125}I]α-bungarotoxin binding of paraformaldehyde-fixed tissues by 500-fold excess of nonradioactive α-bungarotoxin.

2) 光学顕微鏡的オートラジオグラフィーによる [^{125}I]α-BGT 結合部位の局在

未固定およびPFA固定したマウス脳全域にわたる光学顕微鏡的オートラジオグラムによって [^{125}I]α-BGT結合部位には部域的特異性が存在することがわかった。結合部位の分布は未固定切片およびPFA固定切片についてほぼ同一であった。高い密度の結合部位はneupopilに強いAChE活性が認められた部域にみられた(Table1)。これらの部域のうちある部分はラットにおけるα-BGT結合部位として報告されている(11)。いくつかの部域(例えば線条体など)では強いAChE活性を存するにもかかわらず，多くの [^{125}I]α-BGTの結合はみられなかった。

Fig.3Aは光学顕微鏡的オートラジオグラムの一例で，現像銀粒子は脚間核の外側部に集中しているのが認められる(20~25 grains/100 μm^2)。10^{-4}M dTCで処理した隣接切片においてはこの部位の銀粒子の密度は15%以下(2.0~3.5 grains/100 μm^2)で

Table 1. Regions exibiting the high concentration of [^{125}I]α-bungarotoxin binding sites

Nuc. tr. olfactorii lateralis
Nuc. amygdaloideus medialis posterior
Hilus fasciae dentatae
Stratum zonale colliculi anterioris
Stratum griseum superficiale colliculi anterioris
Nuc. interpeduncularis
Nuc. parabigeminalis
Nuc. ventralis lemnisci lateralis
Nuc. raphe dorsalis
Nuc. centralis superior
Colliculus posterior
Nuc. dorsalis tegmenti (von Gudden)
Nuc. prepositus hypoglossi
Nuc. dorsalis n. vagi
Nuc. parvocellularis copactus

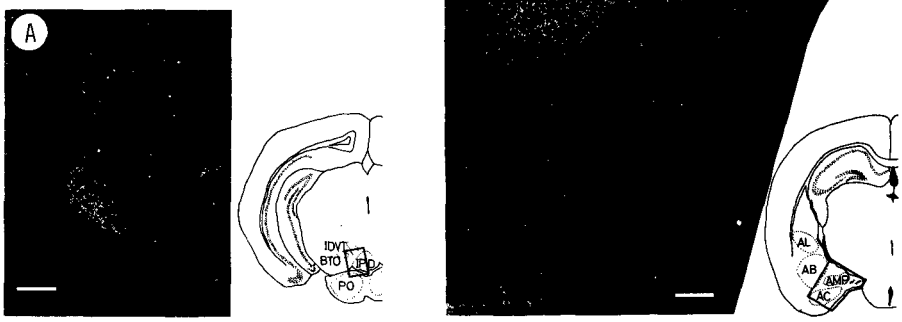


Fig. 3. Darkfield photographs of light microscopic autoradiograms of mouse brain incubated with [^{125}I]α-bungarotoxin. Initial specific activity was 60 Ci/mmole. Exposure time was 57 days. Bars represent 100 μm. Insets in line drawing of brain sections correspond to photographs. A) Section through the nucleus interpeduncularis (IPD). B) Section through the nucleus amygdaloideus medialis posterior (AMP).

あった。 脚間核は哺乳類において最も強いAChE活性（6）とコリンアセチルトランスフェラーゼ活性（10）を示す部位として知られている。 ネコにおける電気生理学的な研究においては，脚間核におけるムスカリニックなAChRの存在が報告されているが，ムスカリン性AChRに特異的に結合するといわれる3-quinuclidinyl benzilateはラット脚間核には比較的少量しか結合しない（3，4）。 今回の実験によって示された[^{125}I]α-BGTのマウス脚間核への特異的結合は，脚間核におけるニコチン性AChRの存在を強く示唆している。 Fig. 3Bは海馬に続く後部内側扁桃核に限局してみられた[^{125}I]α-BGTの結合を示している。（20～30 grains / 100 μm^2）。 扁桃核の他の部位，例えば強いAChE活性を示す基底核や外側核には，多くの結合はみられなかった（4.0～5.0 grains / 100 μm^2）。 扁桃核のAChE陽性部位における α-BGT 結合能のこのような違いは扁桃核内のコリン作動システムにおける機能的分化を反映していると思われる。

3) 電子顕微鏡的オートラジオグラフィーによる[^{125}I]α-BGT結合部位の局在

電子顕微鏡的オートラジオグラムは光学顕微鏡レベルで強くラベルされた脚間核外側部，後部内側扁桃核などについて作製した。 現像銀粒子は多くシナプス部位に現れ，[^{125}I]α-BGTは多くシナプス部位に結合していることがわかった。

以上，[^{125}I]α-BGTはマウス脳に特異的に結合することが光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルで示された。 α-BGT結合部位は強いAChE活性を示す部域中の一定部域に局在し，しかも，多くシナプス部位に限局して存在した。 このことは他の生化学的薬理学実験データとともに「中枢神経系におけるα-BGT結合物質はニコチン性AChRである」という仮説を支持するものである。

[文献]

1 Karnovski, M.J., and Roots, L., (1964) J. Histochem. Cytochem., 12, 219-221.

2 Krnjević, K., (1975) in Handbook of Psychopharmacology, (L.L. Iversen, S.D. Iversen, and S.H. Snyder eds.) Vol.6, PP.97-126, Plenum Press, New York.

3 Kuhar, M.J., Dehaven, R.N., Yamamura, H.I., Rommel-spacher, H., and Simon, J.R., (1975) Brain Research, 97, 265-275.

4 Kuhar, M.J., and Yamamura, H.I., (1976) Brain Research, 110, 229-243.

5 Lake, N., (1973) Exp. Neurol., 41, 113-132..

6 Lewis, P.R., and Shute, C.C.D., (1967) Brain, 90, 521-540.

7 Lowy, J., McGregor, J., Rosenstone, J. and Schmidt, J., (1976) Biochemistry, 15, 1522-1527.

8 McLean, I.W., and Nakane, P.K., (1974) J. Histochem. Cytochem., 22, 1077-1083.

9 Moor, W.M., and Brady, R.N., (1976) Biochem. Biophys. Acta, 444, 252-260.

10 Palkovits, M., Saavedra, J.M., Kobayashi, R.M., and Brownstein, M., (1974) Brain Research, 79, 443-450.

11 Poltz-Tejera, G., Schmidt, J., Karten, J.J., (1975) Nature (Lond.), 258, 349-351.

12 Salpeter, M.M., and Bachmann, L., (1972) in Principles and Techniques of Electron Microscopy, Biological Applications (M.A. Hayat ed.) Vol.2, PP.221-278, Van Nostrand Reinhold, New York.

13 Seto, A., Arimatsu, Y., and Amano, T., (1977) Neurosci. Letters, 4, 115-119.

14 Seto, A., Arimatsu, Y., and Amano, T., (1977) J. Biochem., in press.

62 中枢神経系のムスカリニックレセプター：
ラット脳シナプス膜へのAChおよびAtropine結合

内田修次・竹安邦夫・吉田　博
（阪大・医・1薬理）

〔要　約〕

ラット脳シナプス膜への^{3}H-アセチルコリン(ACh)と^{3}H-アトロピン(Atr)の結合を調べた。シナプス膜は，両者に対して可逆的で高親和性の結合部位を持っており，K_D値は，ACh:20nM，Atr:1nMであった。最大結合量は，ACh:0.8-1.2pmoles，Atr:1.5pmoles/mg蛋白であった。Achの特異的結合はほとんど全てAtrで阻害された。両者の結合に対してイオンの影響は認められなかったが，Caアンタゴニストである D-600はAtr結合を阻害した。

5,5'-Dithiobis(2-nitro benzoic acid.)は，Achの最大結合量を増加させ約1.5pmoles/mg蛋白としたが，Atr結合には何ら影響を与えなかった。また，Atr結合に対するAChの阻害作用は約10倍強められた。

ムスカリニックアゴニストはACh結合を強く阻害するが，Atr結合の阻害作用は弱かった。一方，アンタゴニストは両者の結合を強く阻害した。

以上の結果より，アゴニストとアンタゴニストが同時に1つのレセプターに結合した状態が考えられ，このことは，ムスカリニックレセプターがアゴニストとアンタゴニストに対して別々の結合部位を持っているというAriensの仮説を支持している。

中枢神経系において，種々の抗ムスカリン剤が作用を有していること，抗ムスカリン剤の結合実験で特異的な親和性の高い結合部位が存在することよりムスカリニックアセチルコリンレセプターの存在が示された。[13] また，近年，古典的レセプター理論では説明されない事実が報告されている。[1,9,13] Ariensらは，種々のレセプターで，アゴニストとアンタゴニストがレセプターの別の部位に結合する可能性を示し，ムスカリニックレセプターにおいても同様であると主張している。[1] 我々は，脳シナプス膜へのアセチルコリン(ACh)およびアトロピン(Atr)の結合を調べ，その性質および両者の結合の差について若干の知見を得たので報告する。

［実験方法］

シナプス膜は，小脳および橋を除いたラット脳からWhittakerら[15]の方法に準じて[10]調製したのち-80°Cにて保存し，調製後10日以内に実験に使用した。[^{3}H]-ACh(200mCi/mmoles)および[^{3}H]-Atr sulfate(880mCi/mmoles)の結合は，100mM·NaCl，50mM·Tris-HCl(pH 7.4)，1mM·$CaCl_2$，約300μg蛋白のシナプス膜を含む溶液中で0°C，1hr，インキュベートした後，メンブランフィルター(0.45μ，13mmφ)にて沪過し，フィルターをBray液中で30-60minカウントすることにより測定した。なお，フィルターは洗浄しなかった。界面活性剤処理およびコンカナバリン·A処理の実験は，平衡透析を用いて行った。非特異的結合は，1000-10000倍のCold AChもしくはCold Atrを加えて測定し，これと総結合量との差をもって特異的結合とした。

［結果および考察］

—AChおよびAtr結合の性質—

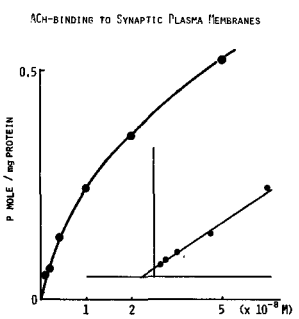


Fig. 1. CONCENTRATION OF ACh

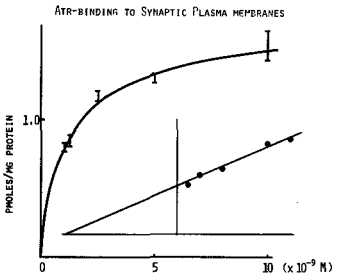


Fig. 2. CONCENTRATION OF ATROPINE

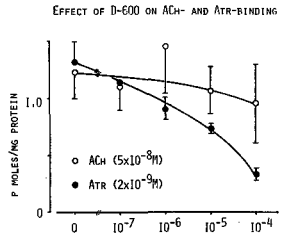


Fig. 3. CONC. OF D-600 (M)

両者の結合は完全に可逆的で，0℃，40分で平衡に達した。図1，2は，両者の結合がこの濃度範囲ではそれぞれ単一な結合であることを示している。表1に両者の結合の定数をまとめた。AChの最大結合量はAtrのそれより少なく，試料によって変動が大きかった。AtrのK_DはAChのそれの約1/20であった。ACh結合は，図8に示すようにほとんどAtrで阻害されるので，ムスカリニックな結合と考えられる。脳のニコチニックレセプター量はムスカリニックレセプター量の約1/10と考えられ[11]，また，末梢神経系でのAChの作用強度より考えると，そのK_Dもムスカリニックレセプターより小さいと思われる。従って，我々の用いた濃度ではニコチニックレセプターへの結合は検出できなかったものと考えられる。

表2に種々の処理による結合の変化を示した。トリプシン処理(0.1mg/1mg蛋白)，ホスホリパーゼ C 処理(50unit/6mg蛋白)には，それぞれ37℃ 30分，60分処理後，遠心により回収した膜を用いた。界面活性剤処理，コンカナバリン A 処理(5×10^{-5}M)は，4℃10時間の平衡透析中に各薬物を共存させた。トリプシン処理，コール酸処理により結合は阻害されるが，ホスホリパーゼ C 処理，コンカナバリン A 処理によってはあまり影響をうけなかった。他の界面活性剤，Triton X-100，Lubrol PX，Lubrol WX，DOCは，0.1%で強く結合を阻害した。

ニコチニックレセプターではCa^{2+}がAChに拮抗することが知られている。[7,14]また，ムスカリン様作用は膜のCa^{2+}透過性を上昇させることにより発現している可能性がある。[8] しかし，今回の実験では，AChおよびAtrの結合に対してCa^{2+}, La^{3+}, Mn^{2+}は全く影響を及ぼさなかった。一方，Caアンタゴニストである D-600は，図3のようにAtr結合を強く阻害したがAChの結合には大きい効果はなかった。しかし，この D-600 の作用は，Ca^{2+}の有無に全く影響されなかった

Table 1

Comparison of ACh- and Atr-binding to Synaptic Membrane

	ACh	Atr
K_D	2×10^{-8}M	1×10^{-9}M
Maximum binding	0.8-1.2x10^{-12}M mol/mg protein	1.5x10^{-12}M mol/mg protein

Table 2

Treatment	% binding of ACh (5×10^{-8}M)	% binding of Atr (2×10^{-9}M)
Phospholipase C	87	102
Trypsin	46	58
Concanavalin A	-	87
Cholic Acid 0.1%	-	92
0.2%	-	73
0.5%	-	8

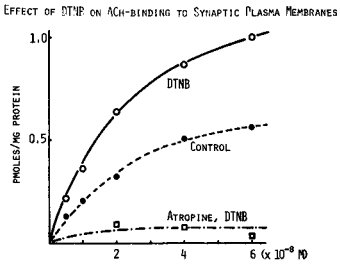


Fig. 4.

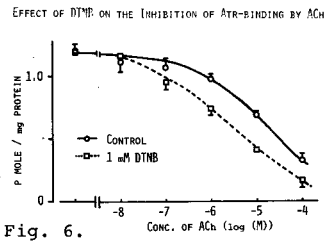


Fig. 6.

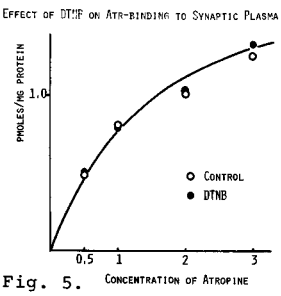


Fig. 5.

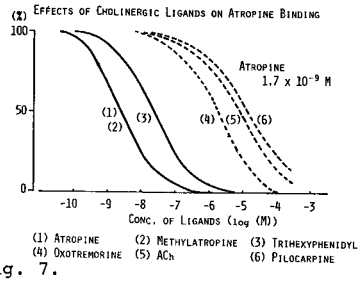


Fig. 7.

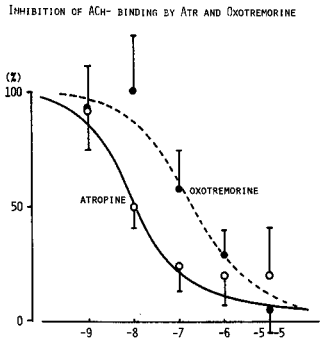


Fig. 8.

のでCaアンタゴニストとしての作用ではないかも知れない。

Snyderらは，1価のカチオンがモルヒネレセプターに影響を及ぼすことを示したが，[12] AChやAtrの結合はNa^+をLi^+, K^+に置換しても有意の差は見られなかった。

－SH試薬の影響－

1mMの5,5'-dithiobis(2-nitro benzoic acid)(DTNB)で37°C20分前処理することによりAChの結合量は図4のように増加し，最大結合量は1.5 p moles/mg蛋白とAtrのそれに近い値となる。この時，K_Dは変化しなかった。一方，Atrの結合はDTNBによって全く影響されない(図5)。AChによるAtr結合の阻害はDTNBによって約10倍強められる(図6)。これらのDTNBの効果は0.1mMでも同様に認められた。Dithiothreitolは，DTNBの効果を阻害して，ACh結合量をDTNB存在下の約50%にした。これらの結果より，ムスカリニックレセプターもニコチニックレセプター同様S-S結合を持っている可能性があるが，[6] 他のSH酸化剤(Cystine，酸化型Gultathione)はACh結合に効果を持たなかったことより，DTNBの作用はそれ自体の結合により生じている可能性もある。[2] しかし，いずれにしろ，SH基がムスカリニックレセプターのACh結合部位に重要な役割を果しているものと思われる。PCMB, NEMは，ACh, Atr両者の結合を阻害した。

－Cholinergic Agentsによる結合の阻害－

図7にAtr結合に対するいくつかのアゴニスト，アンタゴニストの阻害効果を示した。1.7×10^{-9}M Atrの結合に対する50%阻害の濃度は，Atrおよびmethyl-Atr 2×10^{-9}M, Trihexyphenidyl 2×10^{-8}M, Oxotremorine 2×10^{-6}M, ACh 1×10^{-5}M(DTNB存在下では1×10^{-6}M), Pilocarpine 2×10^{-5}Mであった。d-Tubocurarine, Hemicholinium-3, Eserineは，10^{-5}Mで20%以下の阻害しか示さなかった。SnyderらがQuinuclidinyl Benzilate

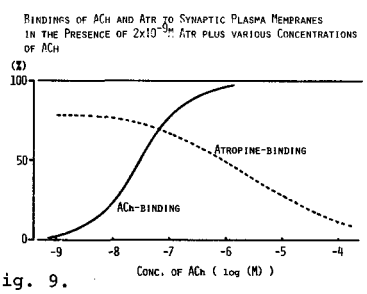


Fig. 9.

を用いた実験で示したと同様[03]、本実験の場合もアゴニストによる阻害は、その末梢神経系での作用強度およびすでに述べたAChn結合のK_Dに比較して非常に弱い。アンタゴニストの阻害作用は、その末梢作用とよく一致している。一方、図8のようにAChn結合に対するアゴニスト・アンタゴニストの阻害の強さは、Atr結合に対する場合とは異なり、それらの末梢での作用強度およびAtr結合のK_Dとよく一致する。これらの阻害作用はDTNBの有無によって変化しない。

以上の結果は、一つの結合部位でのアゴニストとアンタゴニストとの拮抗という従来のレセプター理論では説明し難いように思われる。図9は、2×10^{-9}M Atrと種々の濃度のAChnが共存するときのAChn・Atrの結合を一つの図にまとめたものである。たとえば、5×10^{-8}M AChnの点では、両者の結合の和は明らかに100%を越えている。これは、一つのレセプター上に同時にアゴニストとアンタゴニストが結合していることを示している。このこと、および、両者の結合に対するDTNB, D-600の作用の差は、アゴニストとアンタゴニストが1分子のレセプター上の異った部位に、しかも同時に結合し得ることを示唆している。このような場合、中枢神経系での各薬物の作用強度が末梢と同じだと仮定すると、アゴニストの結合がレセプター分子の構造変化に対してアンタゴニストより優位であると考えられる。

[文献]

1) Ariëns, E.J. and Beld, A.J. (1977) Biochem. Pharmacol., 26, 913 - 918
2) Bartels-Bernal, E., Rosenberry, T.J. and Chang, H.W. (1976) Mol. Pharmacol., 12, 813 - 819
3) Birdsall, N.J.M. and Hulme, E.C. (1976) J. Neurochem., 27, 7 - 16
4) De Robertis, E. and Rodrigurz de Lores Arnaiz, G. (1969) Handbook of Neurochemistry Vol.2, p 365 (A. Lajtha, ed), Plenum Press, New York
5) Farrow, J.T. and O'Brien, R.D. (1973) Mol. Pharmacol., 9, 33 - 40
6) Karlin, A. and Bartels, E. (1966) Biochem. Biophys. Acta, 126, 525 - 535
7) Martinez-Carrion, M. and Raftery, M.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 1156 - 1164
8) Rasmussen, H. (1975) Cell Membrane (ed. Weissman, G. and Claibarne, R.) p 203, HP Publishing Co., Inc., New York
9) Rosen, G.M., Rauckman, E.J. and Abou-Donia, M.B. (1976) Biochem.PPharmacol., 25, 2761 - 2764
10) Saito, K., Uchida, S. and Yoshida, H. (1972) Japan. J. Pharmacol., 22, 787 -798
11) Salvaterra, P.M., Kahler, H.R. and Moore, W.J. (1975) J. Biol. Chem., 250, 6469 - 6475
12) Simantov, R. and Snyder, S.H. (1976) Mol. Pharmacol., 12, 987 - 998
13) Snyder, S.H., Chang, K.J., Kuhar, M.J. and Yamamura, H.I. (1975) Fed. Proc. 34, 1915 - 1921
14) Taylor, D.B. (1973) J. Pharmacol. Exptl. Therap., 186, 537 - 551
15) Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. and Kirkland, R.J.A. (1964) Biochem. J., 90, 293 - 305

63 前シナプス性アセチルコリン受容体によると思われるアセチルコリン遊離の制御

米原典史・*石田　甫・斉藤喜八
松田友宏・吉田　博
（阪大・医・1薬理，*阪大・歯・薬理）

〔要　約〕

McCaman らにより確立されたEnzymatic radioassay 法を用いて大脳皮質切片から遊離されたアセチルコリン（ACh）の量を測定し，AChの遊離調節機構について検討した。本法は感度が良く 10mg前後の中枢神経組織中の ACh と コリン（Ch）が測定でき，これにより得られた大脳皮質切片中の ACh 量は，24.6±1.1 nmoles/g，15分間 incubation による切片から遊離される量は，9.9±0.6 nmoles/gslices であった。

この方法を用い脳切片からのACh遊離調節機構について検討した。muscarinic antagonistであるatropineはhigh K^+条件下でAChの遊離を促進した。至適濃度は K^+ 35mM，atropine 5×10^{-6}M であった。この atropine の効果は，muscarinic agonist である oxotremorine により拮抗された。nicotinic antagonist である d-tubocurarine，hexamethonium には，atropine 様作用は認められなかった。high K^+ medium での atropine の ACh 遊離増強作用は tetrodotoxin（TTX）では抑制を受けなく，TTX 存在下，8-brom-cyclic-GMPにより抑制を受けた。

以上のことは，pre-synapse において，muscarinicな性質をもつ ACh 受容体が存在し ACh 遊離を抑制していると考えられ，この調節機構に cyclic-GMP が関与することを示唆している。

近年，神経末端での神経伝達物質の遊離調節機構の一つとして pre-synapse における遊離調節部位（pre-receptor）の存在が注目されつつある。(4,7,9) しかしながら，その詳細な調節機構に関しては，まだ不明な点が多い。我々は，中枢神経系でのアセチルコリン(ACh)遊離調節部位に注目し，その存在，性質について検討を行った。さらに脳切片への muscarinic agonist 添加，(5) 脱分極刺激により cyclic-GMP が上昇し (6)，またラットの cerebral cortex の pyramidal cell への c-GMP の electrophoretical な投与により ACh の muscarinic 作用と類似した作用が表われる(10)等の報告があるため，ACh遊離調節機構への c-GMP の関与についても検討を行なった。

〔実験方法〕

実験動物は SD系ラット（♂雄，体重150～200g）を使用した。断頭後，脳を摘出，Stadie-Rigg's slicer を用い大脳皮質より厚さ 0.3～0.4mm の切片を作製した。得られた切片（100～80mg）を eserine 50μM を含む Krebs-Ringer 重炭酸液 3ml 中で好気的条件下，37℃ で 15分間 pre-incubation を行なった後，薬物を含む medium（eserine 50μM を含む Krebs-Ringer 重炭酸液 3ml）に移しかえ，さらに 15分間 incubation を行なった。incubation 終了後 medium 200μl を ACh の測定に使用した。

ACh の抽出，及び測定方法

tetraphenylboron（TPB）/3-heptanone（10mg/ml）の溶液 150μl で medium（200μl）中の ACh とコリン（Ch）を抽出後，130μl の TPB 層を 0.4N-HCl 130μl 含む試験管に移しかえる。塩酸酸性で ACh と Ch を抽出して，抽出液を蒸発乾固し，得られた検体を McCaman の方法(2)（図1）に従って ACh の測定に用いた。cholinekinase は brewer's yeast（sigma YBB）から

McCamanの方法(8)により比活性3mmoles/g protein/hr以上のものを得た。acetylcholinesterase (eel Type5, Sigma, 1000μmolar units)は5mMリン酸緩衝液(PH.8.0)に溶解し使用した。^{32}P-ATPはGlynn-Chappellの方法(3)を改良することにより比活性3~5Ci/mmoleのものを合成使用した。AChの抽出，測定に対する使用薬物の影響はinternal standardを入れることにより補正した。

ENZYMATIC RADIOASSAY

ACh + Ch —(Cholinekinase, ATP, 38°C 15min)→ ACh + P-Ch

の反応でChをP-Chに変換した後，残ったAChを以下の方法で定量する

ACh —(ACh-esterase)→ Ch + Acetate

Ch —(Cholinekinase, γ-^{32}P-ATP, 38°C 15min)→ ^{32}P-PCh

得られた^{32}P-PChをBio-Rad (1X8)で分離後カウントする

(図1) PCh: Phosphorylcholine

〔実験結果〕

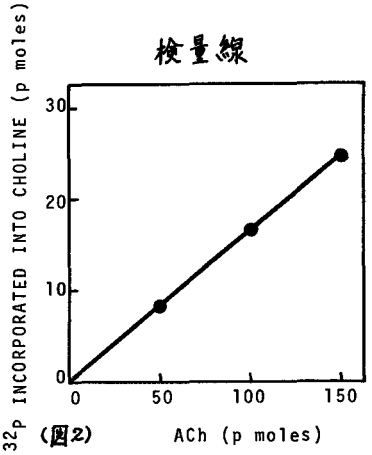
図1の方法でAChを定量した結果を図2に示すが^{32}P-ATPからの^{32}PのChへのincorporationはAch濃度に比例し，定量限界は25~30pmoleであった。なお実験に使用したmediumおよび脳切片からのAChの回収率はそれぞれ60%, 80%であった。この方法によって得られた大脳皮質切片中のAch量は24.6±1.1nmoles/gslices, 15分incubationによる切片からの遊離量は9.9±0.6 nmoles/gslicesであり文献値とほぼ一致する。

脳切片からのACh遊離に対するhigh K^+の影響及びアトロピンとの併用効果

incubation medium中のK^+の濃度を上げる(5-45mM)とAChの遊離に増加がみられる。この際アトロピン(Atr) 5×10^{-6}Mが共存すると，medium中のK^+濃度が25mM以上になった時に，high K^+単独の場合以上のACh遊離がみられ，K^+ 35mMの時，最大のAtrの効果がみられた。Atrのみでは何ら影響は認められなかった。(図3)

high K^+(25mM)およびhigh K^+とAtrの併用によるACh遊離の経時変化

K^+(5mM, 25mM)およびK^+(25mM)とAtr(5×10^{-6}M)を含むmedium中でのAChの遊離の経時変化について検討を行なった。(図4) high K^+のmediumでは20分後においても遊離の著明な増加が続き，さらにhigh K^+の状態にAtrを共存させると，high K^+単独に比べてさらに著るしい遊離促進効果が認められ，Atrの効果は一過性でなく持続傾向を示した。



(図2)

high K^+によるACh遊離に対するAtr, ツボクラリン, およびhexamethoniumの濃度依存性

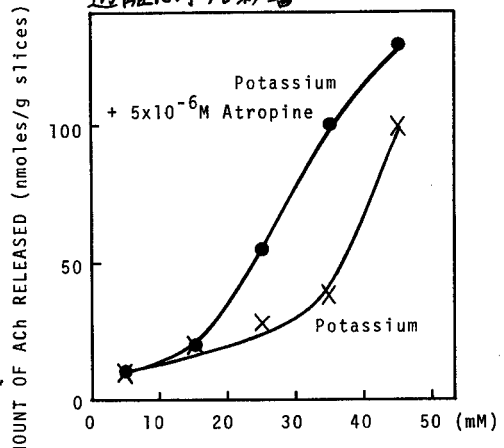
図5にmediumのK^+の濃度を25mMとし，Atri濃度を変化させた場合の反応曲線を示す。Atr濃度が5×10^{-6}M迄は，濃度に依存したACh遊離促進効果を示した。それ以上の濃度ではやや抑制される傾向が認められた。nicotinic antagonistであるツボクラリン，hexamethonium (C_6)によってはほとんど影響が認められなかった。

Oxotremorine (Oxt), tetrodotoxin (TTX), および8-brom-cyclic-GMPの効果

muscarinic agnistであるOxt (5×10^{-5}M, 5×10^{-4}M)は，high K^+ (25mM)でのAtrのACh遊離促進作用をそれぞれ約40%, 50%抑制した。逆にOxt単独では，わずかであるがAch

遊離の増加が認められた(図6)。TTX(2×10^{-7} M)の添加により normal medium (K^+ 25mM)ではAChの遊離には変化は認められなかったが, high K^+ (25mM)の効果は抑制された。一方 high K^+, Atr 併用によるAch遊離促進作用には全く影響が認められなかった。TTX存在下でC-GMPの効果について検討を行なったところ, 8-bromo-cyclic-GMP (1mM) は, high K^+, Atr 併用によるAch遊離促進作用を約40%抑制した。(図7) 8-bromo-cyclic-GMP 単独ではほとんど影響は認められなかった。

K^+ と K^+・アトロピンの共存におけるAch遊離に対する影響

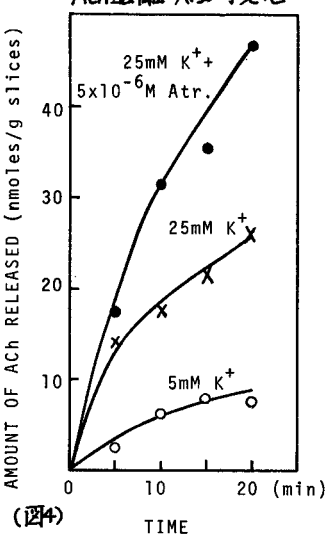


(図3)

〔考 察〕

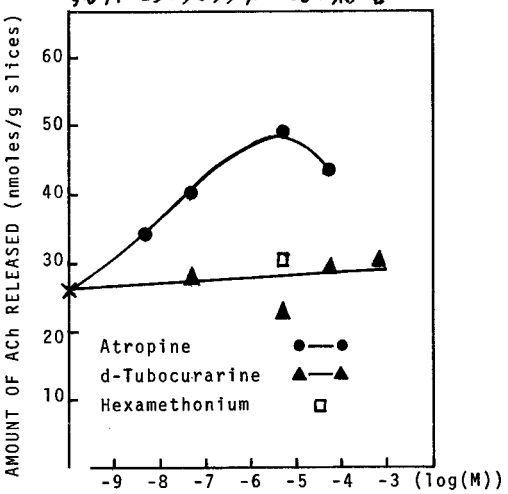
今回, 我々が行った実験結果では, Polackらの報告と同様 muscarinic antagonist であるAtrによりAch遊離促進効果が認められた。この遊離促進作用には脱分極が必要であり, このことはAtrの効果が発現するには, ある膜構造をとること, あるいはイオン透過性に変動を起すことが要求されるのかもしれない。さらにまた脱分極により遊離されるAChが feed back inhibition をかけ, Atr はこのAChの作用に拮抗するものと思われる。又 Na-channel の遮断薬であるTTXがAtrの遊離促進効果を抑制しないことからAChの feed back inhibition 部位は, pre-synapse部位に存在し, nicotinic antagonistのツボクラリン, C_6で影響がなく, muscarinic antagonistであるOxtで抑制されることより, muscarinicな性質を有するものと思われる。さらに8-bromo-cyclic-GMPがAtrの遊離促進効果を抑制したが, これはOxtの作用と類似している。最近 muscarinic 受容体の反応として cyclic-GMP の増加することが報告されており(1), 今回の私共の実験結果は presynaptic な muscarinic receptor が, 同様に cyclic GMP の増量を介してAChの遊離を抑制している可能性

AChの遊離の経時変化



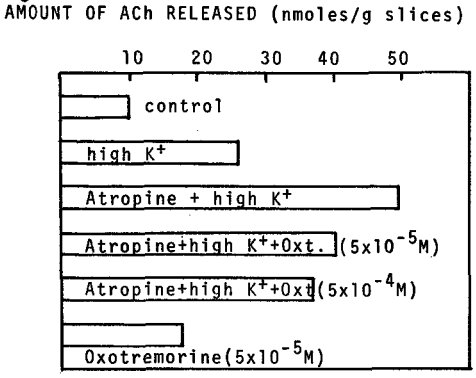
(図4)

High K^+ (25mM) medium でのAch遊離に対するアトロピン・ツボクラリン・C_6の影響



(図5)

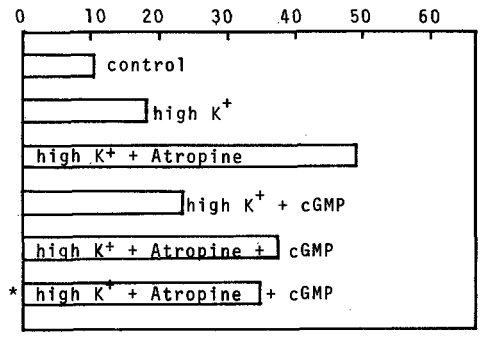
High K⁺(25mM)アトロピン共存でのACh遊離に対するOxtの効果



(図6)　Oxt.: Oxotremorine

を示唆するものである。

High K⁺(25mM)アトロピン共存でのACh遊離に対するc-GMPの効果



Incubation mediumはTTX(2×10^{-7}M)を含む

*Preincubation時にcGMPを添加

(図7)　cGMP: 8-bromo-cGMP (10^{-3}M)

〔文　献〕

1) Ferrendelli, J.A., Steiner, A.L., McDougal,Jr., D.B. and Kipnis, D.M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1061 - 1067
2) Goldberg, A.M. and McCaman, R.E. (1973) J. Neurochem. 20, 1 - 8
3) Glynn, I.M. and Chappell, J.B. (1964) Biochem. J. 90, 147 - 149
4) Hadházy, P. and Szerb, J.C. (1977) Brain Res. 123, 311 - 322
5) Kuo, J.F., Lee, T.-P., Reyes, P.L., Walton, K.G., Donney, T.E. and Greengard, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 16 - 22
6) Kinscherf, D.A., Chang, M.M., Rubin, E.H., Schneider, D.R. and Ferrendelli, J.A. (1976) J. Neurochem. 26, 527 - 530
7) Molenaar, P.C. and Polak, R.L. (1970) Br. J. Pharmacol. 40, 406 - 417
8) McCaman, R.E., Dewhurst, S.A. and Goldberg, A.M. (1971) Analyt. Biochem. 42, 171 - 177
9) Starke, K., Taube, H.D. and Borowski, E. (1977) Biochem. Pharmacol. 26, 259 - 268
10) Stone, T.W., Taylor, D.A. and Bloom, F.E. (1975) Science 187, 845 - 847

64 Myelin fragments 由来のHydrophobic proteins に対する 5-HT の結合について

石谷良一・宮川明久・戸張芳昭
岩本多喜男　（城西大・薬・薬理）

〔要　約〕

(1) ラット脳幹部の myelin fragments を水-飽和ブタノールにて抽出し hydrophobic proteins を得た。このものを，C^{14}-5-HT (5×10^{-7}M) にて室温で 20 min インキュベートした後，Sephadex LH20 による gel-filtration 法にて protein，lipid phosphorus および C^{14}-5-HT の溶出パターンを検討した。Protein と lipid phosphorus は chloroform および chloroform-methanol (CH) 6:1 と 4:1 にてピークが認められた。C^{14}-5-HT は CH 4:1 にて protein のピークに相当する位置に2つのピーク (peak I と II) として出現した。5×10^{-7}M の C^{14}-5-HT に対する peak I と II の mg proteolipid protein 当りの結合 5-HT 量は，それぞれ 23.4 と 102 n moles であった。C^{14}-5-HT に対して 1,000 倍の非放射性 5-HT にて 30 min 間 pre-incubation 後，C^{14}-5-HT に対する結合能を同様に gel-filtration 法にて検討した結果，peak II のみが 100% 近く消失している事が判明した。この事から，5-HT に対して peak I は非特異的な，peak II は特異的な binding protein であると考えられる。

(2) Myelin fragments 由来の hydrophobic protein が 5-HT に対して結合能を有する事が明らかとなったが，この結合に対して種々の化合物の影響を検討したところ，acetylcholine と dopamine が 50% の抑制を示した。他方，reserpine，LSD，vinblastine および colchicine は抑制効果を示さなかった。さらに，この binding protein が ether にて特異的に沈澱する proteolipid 様物質か否かについて検討し，proteolipid と挙動を異にする事が判明した。

Proteolipids は Folch-Pi & Lees(6) により発見された特異な hydrophobic proteins であり，chloroform-methanol または butanol-water には可溶性であるが，水に不溶性の物質である。近年，proteolipids に関して，この物質が刺激伝達物質に対する receptor protein としての機能を有する事が示唆されている(2,4,5,11,14)。ラット脳幹部由来の hydrophobic proteins に関して，Godwin & Snedden(7) は 5-HT に対する receptor protein としての可能性を報告したが，著者らは前報(8) にて彼達が用いた particulate fraction には相当量の myelin fragments が存在する事，さらにラット脳幹部の myelin fragments より得られた hydrophobic proteins が 5-HT に対して結合能を有する事を報告した。今回は，myelin fragments 由来の hydrophobic proteins の 5-HT に対する結合能について，詳細に検討したのでその結果を報告したい。

実験材料および方法

○. Butanol extracts (TE) の調整：Wistar 系雄ラット (150-200g) を断頭後，脳幹部を摘出し，0.32M sucrose にて 10% homogenate とした。Homogenate より Whittaker(18) らの方法にて myelin fragments-rich fraction を得た。この分画を等量の水にて希釈後，1×10^5g 30 min 遠沈し pellet を得た。Pellet を 50% sucrose (2ml/g stem) に懸濁後，10 倍量の水-飽和ブタノールにて室温で 2h 抽出した。得られた有機相を N_2 下 1/4 に濃縮し butanol extracts (TE) とした。なお，myelin fraction については電子顕微鏡にて形態学的考察を行った。

○. 結合実験：TE に一定容量 (14%) の水を添加し不溶化後，5×10^{-7}M の C^{14}-5-HT にて室温で 20 min インキュベートした。反応終了後，Sephadex LH20 による gel-filtration 法にて，protein，lipid phosphorus および C^{14}-radioactivity の溶出パターンを検討した。溶出には，chloroform 100ml ついで chloroform-methanol (CH) 15:1，10:1，6:1 各50

mlとし，最後に CM 4:1 120 mlによる stepwise 法を用いた。Protein は Lees & Paxman (10)らの方法にて，lipid phosphorus については Chen ら(1)の方法にて測定した。C^{14} radioactivity は emulsion phosphor にて計測した。

結果

1. Mylin fragments 由来の hydrophobic protein に対する 5-HT の結合：ラット脳幹部の myelin より得られた TE を 5×10^{-7} M の C^{14}-5-HT とインキュベートし，Sephadex LH20 による gel-filtration 法にて protein, lipid phosphorus および C^{14}-5-HT の溶出パターンを検討した。その結果を Fig. 1 と 2 に示したが，chloroform にて 44.5% の protein と 72.2% の phosphorus が溶出した。さらに溶出溶媒の polarity を増大させると，CM 6:1 と 4:1 に protein と phosphorus のピークが認められた。C^{14}-5-HT は 70% が CM 4:1 にて，それぞれが protein のピークと一致した位置に 2 つのピークとして溶出した。5×10^{-7} M の C^{14}-5-HT に対する peak I と II の mg proteolipid 当りの結合 5-HT 量は，それぞれ 23.4 と 102 n moles であった。なお，Godwin & Sneddon (7) の particulate fraction (stem を水にて 5% homogenate とし，3×10^4 g 15 min の遠沈にて得られる pellet 部分) について追試し，同一の結果を得たが C^{14}-5-HT のパターンについてのみ Fig. 2 に記載した。Particulate fraction より得られる hydrophobic protein の 5-HT に対する結合能は，24.9 n moles / mg proteolipid であった。

2. C^{14}-5-HT に対する結合の特異性：Myelin fragments 由来の hydrophobic protein が 5-HT に対して結合能を有する事が判明したが，その結合の特異性について検討した。TE を 5×10^{-4} M の非放射性 5-HT にて 30 min pre-incubation 後，5×10^{-7} M の C^{14}-5-HT とインキュベートした。反応終了後，Sephadex LH20 による gel-filtration にて C^{14}-5-HT の結合を検

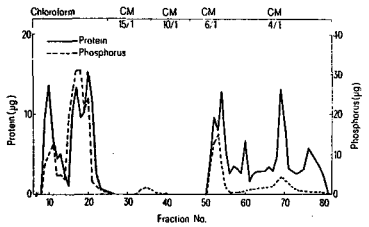


Fig. 1. Elution pattern of protein and phosphorus of a butanol extract (TE) from myelin fraction. TE was passed through a Sephadex LH_{20} column and eluted with the following solvents: 100 ml of chloroform, 50 ml each of chloroform-methanol (CM) 15/1, 10/1 and 6/1, and then 120 ml of CM 4/1. Aliquots of 4 ml were collected in each fraction.

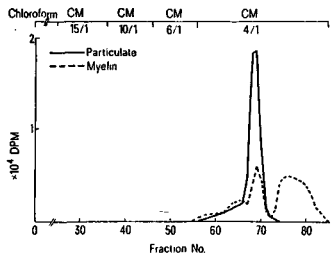


Fig. 2. Elution patterns of radioactivity of butanol extracts from particulate and myelin fraction. Both extracts were incubated with C^{14}-5-HT (5×10^{-7} M). The discontinuous elution system described in figure 2 was used. Aliquots of 4 ml were collected in each fraction.

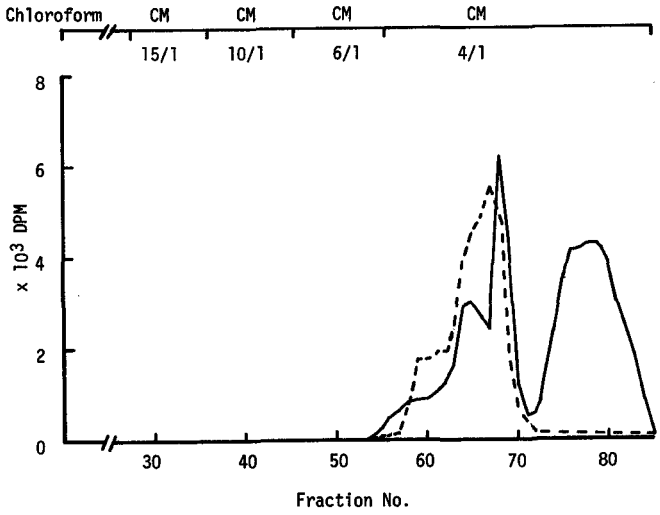


FIG. 3. Elution pattern of radioactivity of a butanol extract (TE) from myelin fragments. TE was incubated with 5×10^{-7}M of C^{14}-5-HT in the presence of 1,000 fold unlabeled 5-HT (short-dashed line) or absence (solid line). The discontinuous elution system described in figure 1 was used.

討した。Fig.3にその結果を示した。1,000倍の非放射性5-HTにてpre-incubationを行うと，peak IIのradioactivityが消失し，peak Iにのみ若干broadなradioactivityが認められた。この事はpeak IIに相当するbinding proteinは5-HTに対して特異的であり，myelin fragmentsより得られたhydrophobic proteinsには少くとも5-HTに対して特異的と非特異的な2種類のbinding proteinが関与している事を示唆している。

3. C^{14}-5-HTの結合に対する種々の化合物の影響：神経終末における刺激伝達物質のuptake，releaseおよびbindingに対して特異的に作用する薬物が知られている。Reserpineはsynaptosomesのcytoplasmに存在する5HT binding proteinに対して抑制的(16)に，LSDは5-HTのpost-synaptic receptorへの結合に対して同様に抑制的に作用する(15)と報告されている。Vinblastineとcolchicineはneurotubulinと特異的に結合すると報告されている(17,16)。本実験では，上記薬物とCNSにおける刺激伝達物質と考えられているacetylcholine，GABA，noradrenalineおよびdopamineと，myelin fragmentsを由来のhydrophobic proteinsが示した5-HTに対する結合能向との相関関係について検討した。TEと一定濃度の各化合物を，室温にて30 min pre-incubationは，5×10^{-7}MのC^{14}-5-HTにてインキュベートした。反応終了後，Sephadex LH_{20}によるgel-filtration法にて結合5-HT量を測定した。Table1にその結果を示したが，結合5-HTに関してはCH 4:1で溶出されるpeak IIすなわち特異的結合のみを対称とした。各種の刺激伝達物質の内，acetylcholineとdopamineが高い抑制率を示した。Reserpine，LSD，Vinblastineおよびcolchicineは何んらの作用も示さなかった。

4. Ether処理：5-HTに対して結合能を有するbinding proteinsがetherにて選択的に可溶するproteolipid様の物質か否かについて検討した。TEを5×10^{-7}MのC^{14}-5-HTにてインキュベート後，Hokrasch (13)の方法に従い4倍量のice-cold etherにて4°Cで2h振盪後，1000 g 20 min遠沈し上清部と可溶部を得た。両分画中のC^{14} radioactivity，proteinおよびlipid phosphorusを計測しTable2に示す結果を得た。上清部には82%のlipid phosphorusが認められたが，proteinは6%であり大部分がpelletに回収された。かゝる条件下において，C^{14}-5-HTはその92%が上清部に存在し，pelletには殆んど認められなかった。

TABLE 1. Inhibition of C^{14}-5-HT binding by various compounds

Compound	Concentration (M)	% Inhibition
Acetylcholine	5×10^{-4}	43.9 ± 4.9
GABA	5×10^{-4}	None
Noradrenaline	5×10^{-4}	None
Dopamine	5×10^{-4}	49.3 ± 3.6
Reserpine	1×10^{-4}	None
LSD	1×10^{-4}	None
Colchicine	1×10^{-4}	None
Vinblastine	1×10^{-4}	None

Butanol extracts from myelin fragments were pre-incubated with various agents for 30 min and then 5×10^{-7}M of C^{14}-5-HT was added. After incubation, the mixtures were chromatographed through a Sephadex LH_{20} column as described in figure 1 and the bound radioactivity was measured (means ± S.E. of 5 experiments).

考察

本実験にてmyelin fragmentsより水-飽和ブタノールにて抽出されるhydrophobic proteinsについて詳細に検討を試みた結果，このものは5-HTに対して結合能を有することと並びにその結合には特異的と非特異的の2種類のbinding proteinsが関与している事が明らかとなった。

他の刺激伝達物質との相互関係については，acetylcholineとdopamineがC^{14}-5-HTの結合を抑制する事から，上記のhydrophobic proteinsは5-HT以外の刺激伝達物質とも何んら

かの親和性を有するものと思われる。さらに，vinblastine や colchicine が C^{14}-5-HT の結合を抑制しない事から，この binding proteins は tubulin-like proteins では無い事が示唆された。Mokrasch (13) は ether 処理にて proteolipid が特異的に残留する事を報告しているが，著者らが得た hydrophobic proteins を C^{14}-5-HT とインキュベートは，同様に ether 処理したところ，C^{14}-5-HT は proteolipid と同一の挙動を示さなかった。この結果から：① 5-HT の結合に関与している binding proteins は proteolipid-like proteins では無い，或いは② 5-HT は比較的弱い状態で proteolipid と結合している事が考えられるが，SDS-Urea gel electrophoresis による予備的実験からは②の考えを支持する結果が得られた。

TABLE 2. Distribution of C^{14}-5-HT, protein and lipid phosphorus after ether treatment

	Supernatant	Pellet
C^{14}-5-HT (%)	91.7 ± 0.8	8.3 ± 0.2
Protein (%)	6.1 ± 0.2	93.9 ± 5.2
Phosphorus (%)	82.1 ± 1.2	17.9 ± 0.5

Butanol extracts from myelin fragments were incubated with 5×10^{-7}M of C^{14}-5-HT. After incubation, the mixtures were treated with 4 vol of ice-cold ether. Samples were then centrifuged and supernatant decanted. The proportion of radioactivity, protein and phosphorus was calculated in both fractions (means ± S.E. of 5 experiments).

著者らは，Godwin & Sneddon (7) らが用いた particulate fraction には相当量の myelin fragments が含まれており，従ってこの分画由来の hydrophobic proteins を刺激伝達物質に対する receptor protein と考えるには問題が在る事を指摘した (8)。Marchbanks (12) および Fisser & De Robertis (3) らも 5-HT に対する receptor protein としての proteolipid を報告している。しかし，用いた分画が particulate fraction である事を考えると，同様に myelin fragments 由来の hydrophobic proteins の関与を否定出来ない。なお，著者らは比較的高純度の synaptic membranes より n-酪酸ブタノールにて得られる hydrophobic proteins が C^{14}-5-HT に対して親和性を示さないと言う結果 (9) を得ているが，この点についても論じたい。

文献

1) Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) Analyt. Chem. 28, 1756
2) De Robertis, E. and Fiszer De Plazas, S. (1976) J. Neurochem. 26, 1237
3) Fiszer, S. and De Robertis, E. (1969) J. Neurochem. 16, 1201
4) Fiszer De Plazas, S. and De Robertis, E. (1975) J. Neurochem. 25, 547
5) Fiszer De Plazas, S. and De Robertis, E. (1976) J. Neurochem. 27, 889
6) Folch-Pi, J. and Lees, M. (1951) J. biol. Chem. 191, 807
7) Godwin, S.F.R. and Sneddon, J.M. (1975) J. Neurochem. 25, 283
8) Ishitani, R., Miyakawa, A., Saito, R. and Iwamoto, T. (1977) Experientia in press
9) Ishitani, R., Miyakawa, A. and Iwamoto, T. (1977) Life Sci. in press
10) Lees, M.B. and Paxman, S. (1972) Analyt. Biochem. 47, 184
11) Lowney, L.I., Schulz, K., Lowery, P.J. and Goldstein, A. (1974) Science 183, 749
12) Marchbanks, R.M. (1966) J. Neurochem. 13, 1481
13) Mokrasch, L.C. (1967) Life Sci. 6, 1905
14) Ochoa, E. and De Robertis, E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 528
15) Schie, J.C., Eiduson, S., Geller, E. and Costa, E. (1974) Adv. Biochem. Psychopharmac. 11, 101
16) Tamir, H., Klein, A. and Rapport, M.M. (1976) J. Neurochem. 26, 871
17) Weisenberg, R. and Timasheff, S. (1969) Biophys. Soc. Abstr. 9, 174
18) Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. and Kirkland, R.J.A. (1964) Biochem. J. 90, 293

65 ウサギ中枢神経系における Substance Pの分布とシナプス膜への特異的結合

仲田義啓・日下歓子・瀬川富朗
(広大・医・総合薬)

〔要 約〕

SubstancePの中枢神経系での役割を検討するため、ウサギを用いて脳内分布を調べ更に、[^{3}H] substancePを用いて、シナプス膜への特異的結合について調べた。SubstancePは、中脳，間脳，線条体に多く存在し、しかも、神経終末部を含む粗ミトコンドリアP$_2$画分に局在していた。脊髄においては、背側半部に腹側半部の4倍以上局在していた。脳幹より得たシナプス膜を用いた実験により、高親和性，特異的，飽和性の[^{3}H] substancePの結合の存在を確認した。この結合の見かけの最大結合量は、約95.7fmole/mg protein で、解離恒数は、約2.7$\times10^{-9}$Mであった。特異的結合は、間脳，線条体，中脳に多く、以下、海馬，大脳皮質，橋，延髄の順に低下した。また、脊髄においては、背側半部に腹側半部の約1.8倍存在した。

SubstancePの分布が脳内部位によって異なり、神経終末部に高濃度局在することは、これが神経機能と関係のある物質であることを物語っている。また、シナプス膜との特異的結合が、内因性substancePと類似の分布を示すことから、substancePが作動神経の機能と密接に関係したものであるといえる。

最近substancePが、中枢神経系の伝達物質であることの可能性を示唆する報告が多い。われわれは、substancePが、今までの伝達物質の様には、神経終末部や、グリア細胞に再とりこみされないことを発見した(1,2)。このことは、substancePが、伝達物質であるとしても、シナプス部での動態が、今までの伝達物質とは違ったものであることを想像させる。

今回、われわれは、ウサギ中枢神経組織を用いて、substancePの分布を調べると共に、トリチウムガス促進曝露法によって標識化した[^{3}H] substancePを用いて、シナプス膜への特異的結合と、その分布について調べ、中枢神経系でのsubstancePの役割について知ろうと試みた。なお、実験結果の一部は、第48回日本薬理学総会(1976)で報告した。

実験方法

実験材料 体重1.6～3.2kgの雌雄のウサギを瀉血後、全脳及び脊髄を摘出し、各部位に分割した。細胞分画の必要なときは、0.32Mショ糖溶液で、ガラス-テフロンホモジナイザーで、10%-ホモジネートとし、Segawa & Kuruma(3)の方法で、粗ミトコンドリアP$_2$画分を得た。

SubstancePの抽出 及び 精製

分割した組織、又はP$_2$画分より、Chang & Leeman(4)の方法に準じ、substancePを抽出し、SephadexG 15 及び、SP-Sephadex C-25(ピリジン型)で精製した後、モルモット回腸を用いて定量した(Fig.1)。

粗シナプス膜の調製

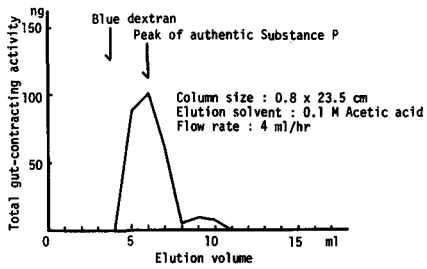
Simon たち(5)の方法に準じて行なった。P_2画分を氷冷蒸留水に懸濁し、polytronで破壊したのち、8,000g × 20min で遠心し、更に、上澄部を48,000g × 20min で遠心し粗シナプス膜画分を得た。画分は、使用時以外は、凍結して貯蔵した。

[³H] substance P の精製

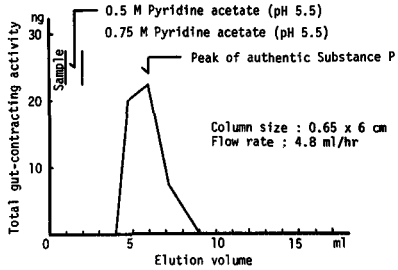
トリチウムガス促進曝露法で標識化した[³H] substance P は、凍結乾燥を繰り返して余分な[³H]を完全にとり除いた。その後、Sephadex G-15カラムを用いて、authentic substance P と同位置に溶出された[³H] substance Pを得た。これのモルモット回腸収縮活性は、authentic substance P に比べて、約80%であった。

更に、この[³H] substance P をSephadex G-25カラムで精製し、シリカゲルG-plateで展開し(展開溶媒 n-butanol, pyridine, acetic acid, water 30 : 20 : 6 : 24 v/v)、fluorescamine及び TLC-scannerで確認した。

その結果、[³H] substance P は、authentic substance P と同じRf値を示しかつ、[³H]活性も同じ位置にみとめられ、しかもsingle peakであった。このことより、この[³H] substance P には、不純物は含まれないものと断定した。このようにして精製した[³H] substance P は、モルモット回腸収縮については、ほぼauthentic substance P と同じであり、比活性は187 μCi/n mole であった。



Gel chromatography of rabbit mesencephalic P_2 extract on Sephadex G-15



Ion chromatography of rabbit diencephalic extract on SP-Sephadex C-25 after gel filtration

Fig. 1. Purification of substance P.

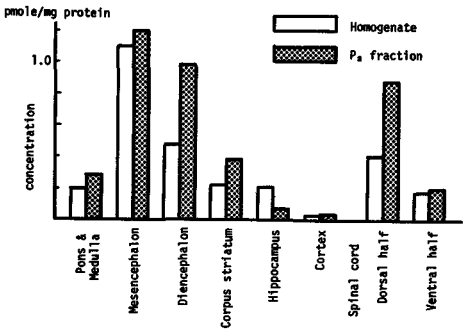


Fig.2. Regional distribution of substance P in rabbit central nervous system.

特異的[³H] substance P 結合の定量

粗シナプス膜に蒸留水を加え、室温下で40min 放置して、内因性substance P の遊離を促した後、再び48,000g×10min で遠心し、得られたpelletを、50mM Tris-citric acid buffer(pH7.0)で、150～250μg protein/ml になる様に希釈した。この懸濁液0.8ml に、蒸留水または、非放射性substance P 溶液(最終濃度30μM)0.1mlを加え、0°Cで1min インキュベートした後、Fig.4,5に示す最終濃度になるように、種々の濃度の[³H] substance P(187μCi/n mole)0.1mlを加え、さらに1minインキュベートした。その後、ただちに、millipore filter(0.45μ)で減圧下、30sec 以内に3過し、約10mlのbufferで

洗浄したのち、filterにトラップされた放射能を結合量として測定した。なお、特異的結合量は、全結合放射能から、大量の非放射性substance P 存在下の結合放射能を差引いて、求めた。

実験結果 及び 考察

ウサギ脳 及び脊髄から、Chang & Leeman(4)の方法で得た活性物質は、Fig.1に示すようにSephadex G-15, SP-Sephadex C-25の両カラム共に、authentic substance P と同位置に溶出された。更に、この物質は、ラット血圧降下作用、唾液分泌作用を示し、キモトリプシン処理で失活することから、substance P と断定した。

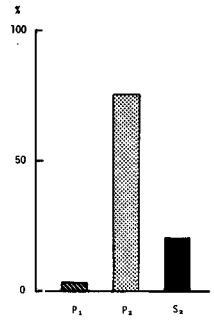


Fig.3. Subcellular distribution of substance P in rabbit brain.

伝達物質と考えられているものは、中枢神経系内で部位別に不均一な分布を示すがsubstance Pも、ウサギ中枢神経内で、中脳，間脳，線条体に多く存在し、しかもP2画分に高濃度局在していた(Fig.2,3)。脊髄では、一次知覚ニューロンのシナプスのある背側半部に腹側半部の4倍以上局在していた。

Substance Pが、神経機能と疼痛に関係のある物質であれば、作用すべき受容体の存在が考えられる。Fig.4は、受容体の存在の有無を調べるために、特異的結合とsubstance Pの濃度との関係を調べたものである。特異的結合は、飽和性であったが、非特異的結合は、濃度の増加に比例して直線的に増加した。Fig.5は、特異的結合をScatchard plotであらわしたものである。この結合の、見かけの最大結合量(apparent maximal number of binding site)は95.7 f mole/mg protein、解離恒数は2.74 nMであった。見かけの最大結合量は、今までの報告に見られるhigh Kで遊離されるsubstance Pの量から考えて、妥当なものと思われる。

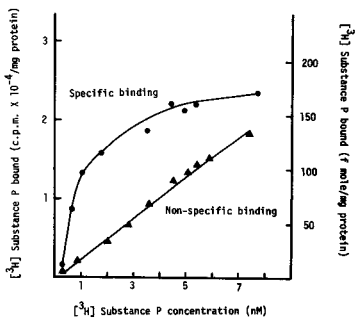


Fig.4. Binding of [^{3}H] substance P to synaptic membrances from rabbit brain stem.

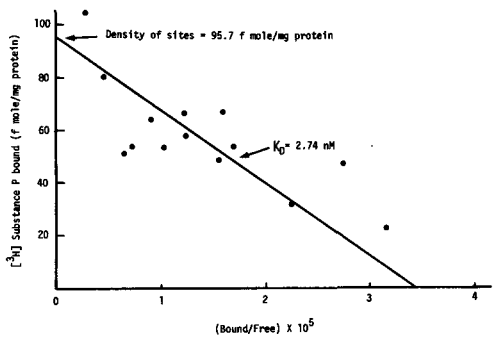


Fig.5. Scatchard plot of specific [^{3}H] substance P to synaptic membrances from rabbit brain stem.

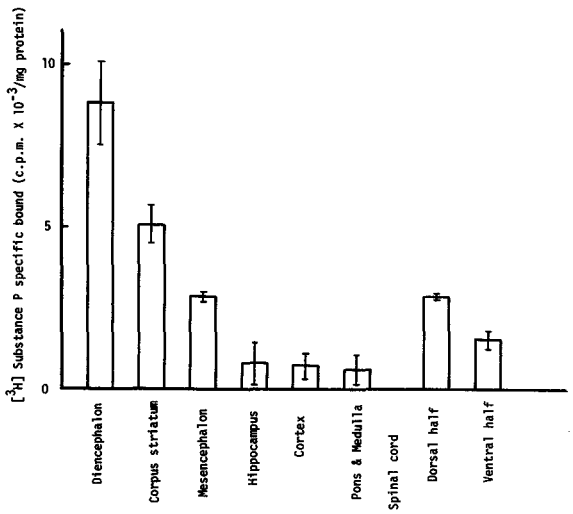


Fig.6. Regional distribution of specific [^{3}H] substance P in rabbit brain and spinal cord.

特異的結合は、間脳，線条体，中脳の順に多く、海馬，大脳皮質，橋，延髄には少なかった。また、脊髄では、背側半部に多かった(Fig.6)。この順位は、中脳を除いて、内因性substance P 量のそれに類似していた。従って、中枢神経系substance P 作動神経の機能と密接に関係しているものといえる。中脳に関しては、さらに細かい部位での検討が必要である。

以上の実験結果より、ウサギ中枢神経系内に、高親和性、特異的，飽和性substance P 結合部位が存在し、内因性substance P 量とだいたい相関関係にあることがわかった。今後、この特異的結合の諸性質を詳細に検討し、受容体との関係について知見を得たい。

文　献

1) Segawa, T., Nakata, Y., Nakamura, K., Yajima, H. & Kitagawa, K.: Japan. J. Pharmacol. 26, 757 (1976).

2) Segawa, T., Nakata, Y., Yajima, H. & Kitagawa, K.: Japan. J. Pharmacol. 27, 593 (1977).

3) Segawa, T. & Kuruma, I.: J. Pharm. Pharmac. 20, 320 (1968).

4) Chang, M. M. & Leeman, S. E.: J. Biol. Chem. 245, 4784 (1970).

5) Simon, J. R., Contrera, J. F. & Kuhar, M. J.: J. Neurochem. 26, 141 (1976).

66 ラット脳コリンアセチルトランスフェラーゼとアセチルCoAとの反応について

松田友宏・野口　豊・米原典史
吉田　博　（阪大・医・1薬理）

〔要　約〕

脳アセチルコリン合成調節を酵素レベルで解明する目的で、ラット全脳よりコリンアセチルトランスフェラーゼを約150～250倍に精製した標品を用いて本酵素の反応中間体について研究した。酵素標品と基質アセチル-CoA（1-^{14}C）とを反応させると放射能の蛋白への結合が認められた。この放射能結合蛋白の形成反応は温度依存性、熱不安定性を示し酵素的な反応であることが強く示唆された。この反応はアセチル-CoAの構造類似体CoAにより完全に拮抗され、放射能結合蛋白は1-[^{14}C]アセチル-CoAに依存した蛋白への放射能の結合、即ちアセチル-CoA・蛋白かアセチル-蛋白かであることを示していた。6M塩酸グアニジン存在下では蛋白結合放射能は約1/2となり、共有結合性のアセチル-蛋白と、非共有結合性のアセチル-CoA・蛋白とがそれぞれ約50%であることを示していた。アセチルコリン合成能とこの放射能結合蛋白との関係を調べたところ、ゲル沪過ではコリンアセチルトランスフェラーゼ活性のピークと蛋白結合放射能のパターンとは著しく異にし、電気泳動の結果本酵素活性のピークに蛋白結合放射能は認められなかった。さらにこの放射能結合蛋白にコリンを反応させても^{14}C-アセチルコリンの合成を認めることが出来なかった。以上の結果よりラット脳コリンアセチルトランスフェラーゼの反応中間体としては安定なアセチル-CoA・酵素あるいはアセチル-酵素は形成されず、実験操作中に破壊される程度の不安定なものと推測される。

脳における化学伝達物質候補の一つであるアセチルコリンは酵素コリンアセチルトランスフェラーゼによりアセチル-CoAとコリンとから合成される。ウシ脳の本酵素蛋白はアセチル-CoAと反応し安定なアセチル-中間体が形成されることが示唆されてきた(6,7)が、最近これに対する反論も出されている(3)。我々は従来ラット脳におけるアセチルコリンの動態について研究して来た(4)が、今回アセチルコリン合成調節を酵素レベルで解明する目的で、ラット脳コリンアセチルトランスフェラーゼの反応中間体について検討し、二三の知見を得たので報告する。

Table 1　Purification of choline acetyltransferase from whole rat brains (24 brains).

Step	Protein	Enzyme activity Speficif activity	Recovery
	mg	n mol/min/mg	%
Homogenate	5702	0.402	100
pH 8 Supernatant	1504	0.445	29.2
Extract of pH 5 precipitate	176.9	3.41	26.3
0-55 % Ammonium sulfate fraction	64.1	8.06	22.5
CM-Sephadex	3.78	60.9	10.0

実験材料と方法

ラット脳コリンアセチルトランスフェラーゼの精製。SD系ラット全脳よりPotterら(5)の変法により、ホモジェネートの比活性の約150～250倍に精製し（表1）以下の実験に用いた。酵素標品とアセチル-CoAとの反応。本酵素標品とアセチル-CoAとの反応液Aの組成は：酵素標品，0.3～0.5 mg蛋白；リン酸カリウム緩衝液（

pH 7.0), 25 mM; 1-[^{14}C] アセチル-CoA (純度: 98.6 ～ 99.5 %, 放射比活性: 51 ～ 53 Ci/mol), 0.1 mM; フィゾスチグミン, 0.1 mM; KCl, 50 mM; EDTA, 0.1 mM; 添加物。全量 200 μl とし、通常 38 °C 15 分間反応させた。コリンアセチルトランスフェラーゼ活性測定。Potter らの方法(5)により測定した。但し、合成されたアセチルコリンの分離は Schrier and Shuster の方法(8)によった。

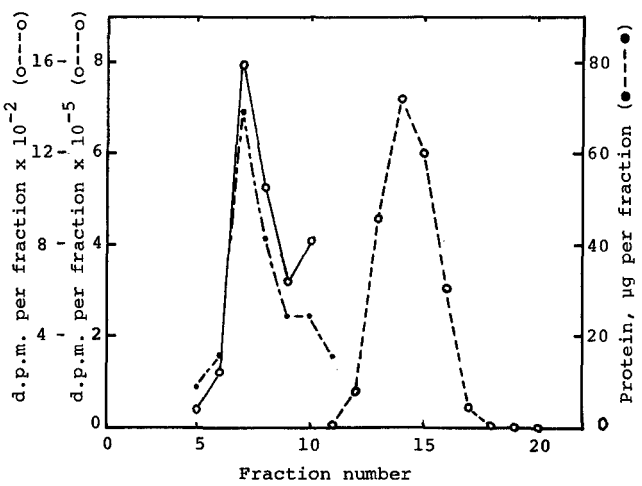


Fig. 1 Sephadex G-50 column chromatography of the reaction mixture A. o, ^{14}C radioactivity; ●, protein.

各種カラムクロマトグラフィ。セファデックス G-50 カラム (fine, 1 × 20 cm) クロマトグラフィは Roskoski の方法(6)によった。但し緩衝液の pH を 7.0 にした。セファデックス G-200 カラム (fine, 1.5 × 63 cm) は 0.1 mM EDTA, 0.1 M NaCl を含む 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡にした後、反応液A 200 μl に酵素溶液 500 μl (2.70 mg 蛋白) を添加し、全量をカラムにかけ、同じ緩衝液で溶出した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動。Davis の原法(1)にしたがった。但し、7.5 % 分離ゲルのみを用い、酵素活性阻害物質を除去するため反応液A泳動前に泳動用 5 mM トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.6) のみであらかじめ泳動した。酵素活性測定用ゲルは 4 °C で 2 mm の切片に切り、その細片から酵素を溶出した。放射能測定用ゲルは蛋白染色・脱色後、2 mm の切片に切った。

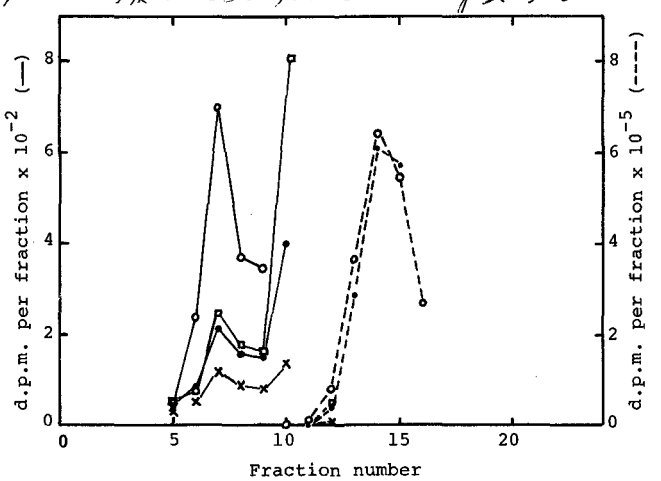


Fig. 2 Gel filtration of the reaction mixture A on Sephadex G-50 column. o, 38°C, 15 min; ●, 0°C, 15 min; □, enzyme preparation treated at 50°C, 10 min; ×, 10 mM CoA.

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。Weber and Osborn の原法(9)にしたがった。酵素標品は 5 % メルカプトエタノールを含む 1 % SDS 中で 100 °C 5 分間処理した。放射能測定には上と同様ゲルを 5 mm の切片にした。ゲル切片の放射能の測定。全自動試料燃焼装置 (アロカ社, ASC-112) により測定した。蛋白定量。Lowry

ら(2)の方法によった。

実験結果と考察

酵素標品とアセチル-CoAとの反応。酵素標品と1-[^{14}C]アセチル-CoAとを38°C 15分間作用させた反応液A 200μlのセファデックスG-50カラムクロマトグラムを図1に示した。蛋白のピークに一致した放射能のピーク(以下ピークIと呼ぶ)が認められた。ピークIをコロジオンバックで濃縮した外液に現われる放射能はピークIの全放射能の9%以下であり、ピークIの大部分が蛋白結合放射能であることが確認された。ピークIの出現には反応液A中の酵素標品の存在が必要であり、その放射能は反応温度を0°Cにした場合すらびに酵素標品をあらかじめ50°C 10分間前処理した場合に著しく低下し(図2)、この結合反応が酵素的なものであることが強く示唆された。反応液Aにアセチル-CoAの構造類似体としてCoA(10 mM)を添加することによりピークIが完全に消失した(図2)。これはこの蛋白結合放射能が1-[^{14}C]アセチル-CoAに依存したもの、即ちアセチル-CoA・蛋白かアセチル-蛋白かであることを示し この試薬中にコンタミネートする放射性物質の蛋白への非特異的な結合を除外するものである。ピークIの放射能の蛋白への結合の性質を調べるため、セファデックスG-50カラムを6M塩酸グアニジンで平衡させ、反応液Aのカラムクロマトグラフィを行った(図3)ところ、ピークIが約1/2に低下した。これは共有結合性のアセチル-蛋白と非共有結合性のアセチル-CoA・蛋白がそれぞれ約50%であることを示している。

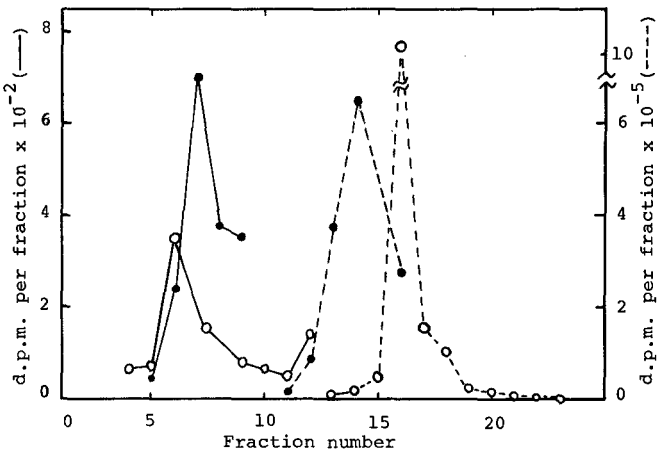


Fig. 3 Sephadex G-50 column chromatogram of the reaction mixture A. o,6 M guanidine-HCl elution; ●,phosphate buffer elution.

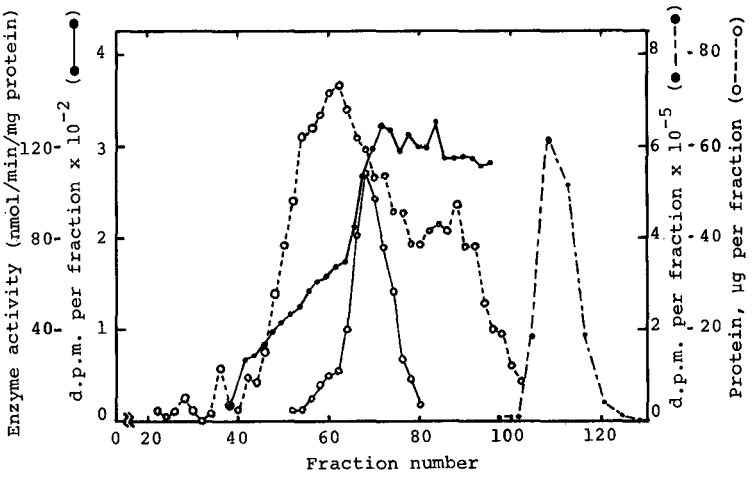


Fig. 4 Sephadex G-200 column chromatography of reaction mixture A. o——o, enzyme activity; o---o, protein; ●, ^{14}C radioactivity.

アセチルコリン合成能と蛋白結合放射能との関係。酵素活性と蛋白結合放射能との関係を明らかにするため、反応液Aを、(i)セファデックスG-200でゲル沪過を行ったところ、図4に示すように本酵素活性の鋭いピークとは対照的に蛋白結合放射能はやや広い山脈状のパターンを示し、明らかに両者は異なったものであったが、まだ本酵素活性ピークにおける放射能結合蛋白の存在が否定できなかった。放射能結合蛋白の多様性はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動においても認められた(図5B)。(ii)反応液Aをポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合、複数の蛋白結合放射能のピークを認めたが、本酵素活性に一致するものは認められなかった(図5A)。ピーク1に本酵素の反応中間体が含まれるかどうか検討するため、ピーク1にコリン(10 mM)添加後38°C 15分間反応させた後、(a)高圧沪紙電気泳動、あるいは(b)AG-1カラムにかけ、アセチルコリンを分離したが、いずれも放射性アセチルコリンの合成を認めることが出来なかった。以上の実験結果よりラット脳コリンアセチルトランスフェラーゼの反応中間体としては安定なアセチル-CoA・酵素あるいはアセチル-酵素は形成されず、実験操作中に破壊される程度の不安定なものと推測される。蛋白質のアセチル化はリン酸化、メチル化と並んで生化学的修飾の一つであるが、本酵素標品中に見い出されたアセチル化反応は脳組織に酵素的にCoA阻害をうける蛋白のアセチル化反応が存在することを強く示唆するものである。その詳細については目下検討中である。

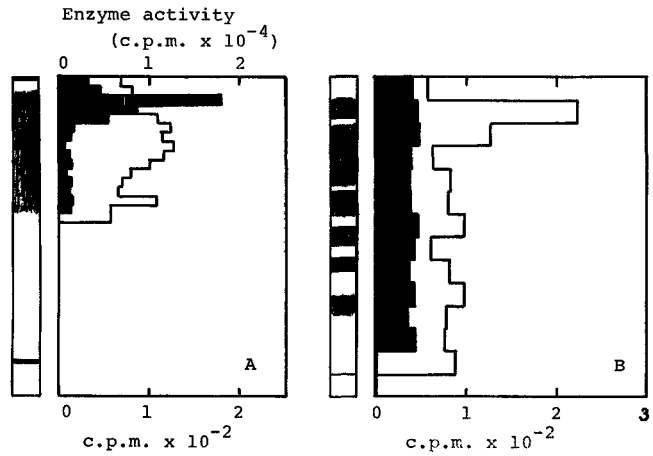


Fig. 5 Poly-acrylamide gel electrophoresis. (A) disc gel electrophoresis of the reaction mixture A, pH 8.6; ■, enzyme activity; □, ^{14}C radioactivity (B) SDS gel electrophoresis, 0.1 % SDS; □, the reaction mixture A; ■, bovine serum albumin.

文献

(1) Davis, B.J. (1964) Ann. N. Y Acad. Sci. 121, 404 - 427.

(2) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265 - 275.

(3) Malthe-Sørenssen, D. (1976) J. Neurochem. 27, 873 - 881.

(4) Matsuda, T., Yonehara, N., Ichida, S., and Yoshida, H. (1977) J. Neurochem. in press

(5) Potter, L.T., Glover, V.A.S., and Saelens, J.K. (1968) J. biol. Chem. 243, 3864 - 3870.

(6) Roskoski, R. (1973) Biochemistry 12, 3709 - 3714.

(7) Roskoski, R. (1974) J. biol. Chem. 249, 2156 - 2159.

(8) Schrier, B.K. and Shuster, L. (1967) J. Neurochem. 14, 977 - 985.

(9) Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. biol. Chem. 244, 4406 - 4411.

67 単一神経細胞体とアセチルCoA合成酵素活性

林　秀明・加藤尚彦　（東大・医・脳研）

〔要　約〕

ウサギの脊髄前角細胞，後根神経節細胞の細胞体；小脳の3層（分子層，顆粒層，白質），およびマウスの小脳の3層，大脳皮質，線状体につき，5種類のアセチルCoA合成酵素（Pyruvate Dehydrogenase Complex,PDC; Citrate Synthase,CS; Carnitine Acetyltransferase,CAT; Acetyl-CoA Synthetase,AcCoAS; ATP Citrate Lyase,ACL）の活性を測定した。

(1) CoAサイクリング法（酵素を用いる増幅測定法）を用い，5種の酵素により生成されるアセチルCoAを分別・増幅定量する方法を確立した。(2) CAT活性はアセチルカルニチン（D,L型の混合物，L型として4mM以上）により基質阻害をうけた。(3) CS活性はATPにより阻害され，14mMでプラトーに達し，阻害率は60%であった。(4) ACL活性はMg^{2+}により活性化され，16mMでプラトーに達し活性化は約6倍に達した。(5)脊髄前角細胞のACL活性（134 m moles（生成アセチルCoA）/Kg（乾燥重量）/時(38℃)）は，後根神経節細胞の2倍以上高く，逆に後根神経節細胞のCAT(656)とAc CoAS(89.8)活性は，前角細胞の2倍以上高かった。(6) 一つ一つの前角細胞のACL活性のばらつきは，後根神経節細胞より広く，またばらつき方は不均一で低活性の細胞が多く，高活性の細胞はまばらであった。(7) 線状体は大脳皮質や小脳の3層にくらべて，高いACL活性(80.0)をもっていた。

神経系においてはアセチルCoAは脂肪酸合成に関与する以外に，神経伝達物質のアセチルコリン(Ach)合成の基質となり，神経機能の維持にも重要な物質であると思われる。そこで周知のドグマ（1つのニューロンは唯一種の伝達物質を持つ，Dale-Feldbergの法則）に従えば，コリン作動性ニューロンは他のニューロンと異なり，Ach合成のためにアセチルCoAを特別に必要とするはずであり，アセチルCoA自体も固有の代謝パターンにより生成されているのではないかと推測される。ここではコリン作動性および非コリン作動性細胞の代表として，脊髄前角細胞と後根神経節細胞を摘出し，アセチルCoAを合成する5種類の酵素活性を調べた。同時に中枢神経系内の層構造のうち，コリン作動性要素を種々の程度に含むと思われる部分をえらび，そのアセチルCoA合成酵素活性を測定した。

実験方法

〔単一細胞および層構造試料〕　白ウサギ（雄，3Kg）の脊髄および後根神経節の凍結乾燥切片(20μm)から，前角細胞と後根神経節細胞を顕微鏡下で切り出し，その重さ（3～10ng）を水晶系バランス（感度±330pg）で秤量後[22,97]，そのまま試料とした。また白ウサギの小脳の3層（分子層，顆粒層，白質）と，マウスの小脳の3層，大脳皮質および線状体切片(20μm)から，その一部を切り出し試料(20～45ng)とした。ホモジェネートはマウス大脳から[37,65]調製した。さらにホモジェネートからミトコンドリア分画（C分画）を分離調製し，50mM Tris-HCl, pH8.0中で超音波による破砕後，遠心して得られた上清を抽出液とした。

酵素	反応液組成	反応体積 反応時間	直線範囲 (乾燥重量)
Pyruvate Dehydrogenase Complex (略記号 = PDC)	0.39 mM CoASH;0.46 mM NAD^+;0.9 mM Pyruvate; 0.58 mM thiamine pyrophosphate;1 mM $MgCl_2$; 0.1 mM L-cysteine;0.05 % Triton X-100; and 100 mM Tris-HCl,pH 8.0	372 nl 30 min	~ 27 µg/ml
Citrate Synthase (EC 4.1.3.7, CS)	0.45 mM CoASH;2.6 mM citrate;0.05 % Triton X-100;and 100 mM Tris-HCl,pH 7.5	372 nl 30 min	~ 80 µg/ml
Carnitine Acetyltransferase (EC 2.3.1.7, CAT)	0.49 mM CoASH;1.0 mM L-acetylcarnitine; 1 mM EDTA;0.05 % Triton X-100;and 100 mM Tris-HCl,pH 8.5	372 nl 30 min	~ 27 µg/ml
Acetyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.1, AcCoAS)	0.46 mM CoASH;3.2 mM acetate;1.8 mM ATP; 1.9 mM $MgCl_2$;178 mM KCl;0.05 % Triton X-100;and 100 mM Tris-HCl,pH 8.5	191 nl 60 min	~120 µg/ml
ATP Citrate[§] Lyase (EC 4.1.3.8, ACL)	0.46 mM CoASH;3.6 mM citrate;14 mM ATP; 16.3 mM $MgCl_2$;and Tris-HCl,pH 8.0	953 nl (176 nl)[#] 60 min	~250 µg/ml

表1，反応液組成。 §ブランクはMg^{2+}を除いて反応；#ACL反応の場合単一細胞に用いた体積

〔酵素反応〕

表1に5種の酵素とそれらの略記号，反応液組成，反応体積および時間を示す。反応により生成されるアセチルCoAを"CoAサイクリング"[8]を用いて数千倍に増幅し測定した。反応は組織量に比例する範囲（表1）で行い，活性はmmoles（生成アセチルCoA）/Kg（乾燥重量）/時（38℃）で表わした。テフロン板に径3mm×深さ2mmの"井戸"を多数穿ち，その中に流動パラフィンを満し，微少量の反応液を井戸の底に沈めて（油井法[9]），直接顕微鏡下で試料を加えて反応を行った。テフロン板は予熱の恒温板（銅板の表面温度を一定に保つよう循環水で加温する）上に置き，反応液を38℃に保った。

各反応につき問題となる点は，(1) CS活性は，クエン酸を分解する方向（逆反応）の活性を示す；(2) CAT反応の基質はD,L-アセチルカルニチンの混合物であり，L-カルニチンを市販のCAT標品（Boehringer, Mannheim）を用いて定量し，基質濃度を規定した；(3) ACL活性は，16mM Mg^{2+}により活性化される部分（表1,2, 図2参照）を示す，などである。またホモジェネートやミトコンドリア抽出液の反応は50µlの反応液中で行い，その1/38µlを用いて細胞体の場合と同様に処理し測定した。

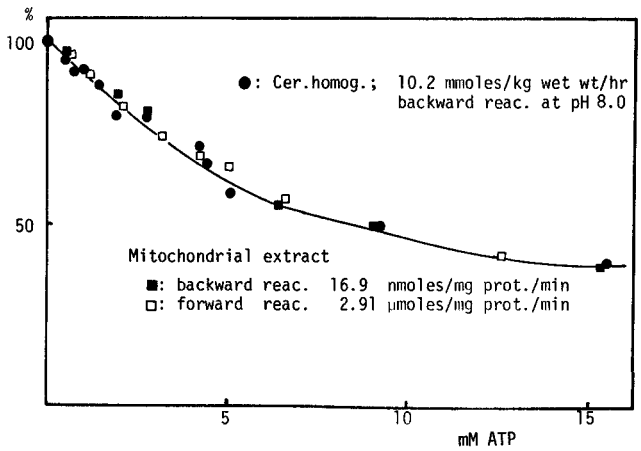


図1，クエン酸合成酵素(CS)活性のATPによる阻害。
反応(クエン酸+CoASH→アセチルCoA+オキザル酢酸)，残存活性を%で縦軸に示す。反応条件はpH 8.0以外表1に示す。

実験結果

〔酵素反応の二三の特徴〕大脳ホモジェネートのCAT活性と，ハト胸筋から部分精製されたCAT標品（Boehringer）は，L-アセチルカルニチン4mM以上で阻害される。この基質阻害はL-型によるものか，基質に混在するD-型によるものかは明らかでない。

大脳ホモジェネートとミトコンドリア抽出液のCS活性は，ATPにより阻害をうける（図1）。阻害は正、逆両反応とも

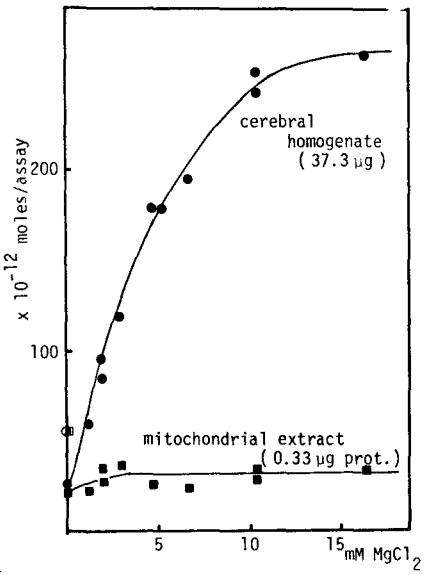


図2，ATPクエン酸リアーゼ(ACL)のMg^{2+}による活性化．反応(ATP＋クエン酸＋CoASH→アセチルCoA＋オキザル酢酸＋ADP＋Pi)，反応条件はMg^{2+}以外表1に示す。

同程度にみられる。CS反応の基質にATPが加わると，ACL反応の基質と等しくなる。ACL反応にはMg^{2+}が必要であるので，1図のATP 4mM添加の条件下でMg^{2+}を加えると，ミトコンドリア抽出液のアセチルCoA合成活性はほとんど活性化されないが，ホモジェネートは著しく活性化される(図2)。図1はミトコンドリアに局在するCSがATPにより阻害されることを意味し，図2はミトコンドリアにはほとんど存在せず，細胞質可溶性部分に存在するACLがMg^{2+}により活性化されることを意味すると思われる。そこで前述のようにMg^{2+}による活性化部分をACL活性とした。

〔単一細胞の酵素活性〕 CAT活性は全酵素中最も高く，最も低いCS活性の10倍以上の値を示した(表2)。後根神経節細胞は前角細胞に較べて，CATとAcCoAS活性が高かった。前角細胞は逆に2倍以上のACL活性を示した。比較の便のため表2を図式化すると，各細胞が特徴的な酵素パターンを持つことがわかる(図4，右側)[7]。

細胞一つ一つのACL活性をプロットすると，後根神経節細胞に較べて前角細胞の活性は広く分布する(図3)。その分布の仕方は高活性のものほどまばらで，低活性の点は集合する傾向にあり，前角細胞群中にはACL活性の高い細胞がまばらに存在することがわかる。ACL活性が細胞膜附近と，膜に付着する他のニューロンからのシナプスに存在する可能性を調べるため，前角細胞体試料の周囲を切除(トリム)した。その結果の活性分布(図3，右)の平均(116±12)と，トリムしない細胞体の平均活性(142±9)との間には有意な差はなく，ACLは細胞体自身に含まれると思われる。

酵素(省略名)	脊髄前角細胞	後根神経節細胞
	[mmoles/kg(dry wt.)/hr(38°C) ± S.E.M.	
Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC)	120 ± 14 (18)	110 ± 8.6 (18)
Citrate Synthase (CS)	42.6± 1.4 (23)	43.7± 3.5 (15)
Carnitine Acetyltransferase (CAT)	397 ± 27 (18)	656 ± 38 (23)*
Acetyl-CoA Synthetase (AcCoAS)	43.1± 3.5 (30)	89.8± 5.8 (33)*
ATP Citrate Lyase (a - b) (ACL)	134	61.5
a (with 16 mM Mg^{2+})	143 ± 9.1 (52)*	72.8± 4.4 (42)
b (blank, without Mg^{2+})	8.9 ± 0.5 (25)	11.3± 1.5 (21)

表2，単一細胞体の酵素活性．*はP<0.01で有意，( )内には測定した細胞数を示す。

〔層構造の酵素活性〕 単一細胞体の場合と同様に活性値を図式化すると(図4，左側)，マウス，ウサギの小脳各3層は類似の活性パターンを示す。白質はACLを除いて他の活性は著しく低い。マウスの大脳皮質はCS，AcCOASの活性が高く，線状体はCS，CAT活性が高いのが特徴である。ACL活性は，線状体(80.0)が大脳皮質(18.2)に較べて有意($P<0.05$)に高かった。

考察

神経組織中にはAcetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1)が含まれ[11]，5種類の酵素によ

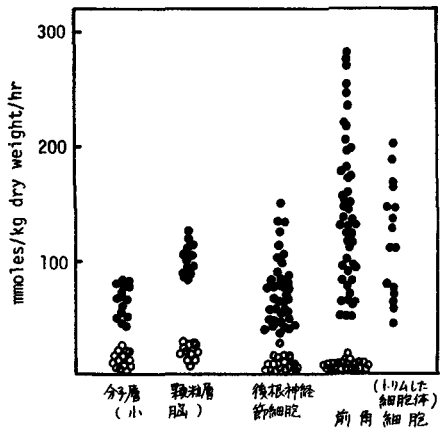


図3，神経細胞体のATPクエン酸リアーゼ(ACL)活性．前角細胞の周囲の細胞膜とシナプスを切除した試料の活性を示す(右側のプロット)．●はMg^{2+}添加，○はMg^{2+}なしで測定．

り生成されるアセチルCoAを水解する。そのため従来はこれら酵素の測定は困難であった。しかし表1の条件下では組織濃度が低いので生成されるアセチルCoA濃度は低く，基質のCoASHの1%以下である。このためアセチルCoAの水解速度も小さく，生成速度に較べて無視することができる。このような低濃度で微少量(10^{-12} moles)のアセチルCoAの測定は"CoAサイクリング"[8]を用いてはじめて可能であり，ここに述べたように組織のような未純化の酵素試料を用いても，これら酵素の測定が正確に行えるようになった。

Choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6，ChAc)をコリン作動性要素の標識酵素として測定する従来の方法によると，線状体はコリン作動性の介在ニューロンが含まれていると推定され[2),13),14)]，その細胞体やシナプスに富むと思われる。線状体は大脳皮質や小脳の3層に較べてACL活性が高く(図4)，脊髄前角細胞は最高の活性値を持つ(表2，図4)ことから考えると，Ach合成の基質としてのアセチルCoAはACLにより供給されている可能性が強いと思われる。ACLは細胞質の可溶性部分に存在し[6)]，同様に可溶性部分やシナプス小胞の膜に存在すると思われるChAcにアセチルCoAを供給するためには，合目的的な位置にある。Achのアセチル基部分がどのような前駆体から由来するかという点については未だ議論があるが[5),18)]，ここに述べた結果からクエン酸が前駆体となるとすると，ミトコンドリア内でPDCにより合成されるアセチルCoAは，一度CSによりクエン酸となり，クエン酸がミトコンドリア膜を通過して細胞質の可溶性部分に達する[1)]，という経路がAch合成には重要であると思われる。

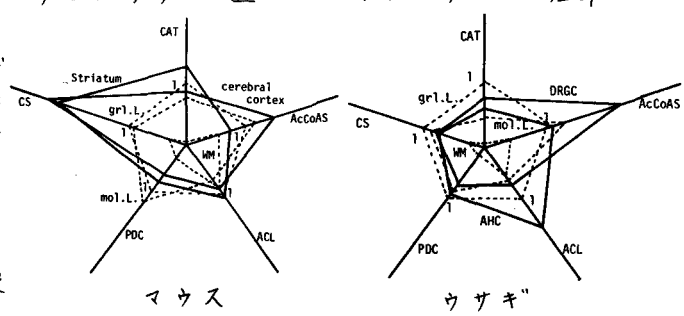


図4，細胞体および層構造の酵素活性．
小脳の顆粒層(grl.)の活性を1とし他の活性を相対値化し，各軸上に中心からの距離として表わす。WM，小脳白質；mol.L.，小脳分子層；AHC，前角細胞；DRGC，後根神経節細胞．

文　献

(1)Browning,E.T.(1975)in Biology of Cholinergic Function(Goldberg,A.M.and Hanin,I.,ed)pp.187-201 (2)Butcher, S.G.and Butcher,L.L.(1974)Brain Res.71,167-171 (3)Eichberg,J.,Whittaker,V.P.and Dawson,R.M.C.(1964)Biochem. J.92,91-100 (4)Fonnum,F.(1968)Biochem.J.109,389-398 (5)Fonnum,F.(1970)J.Neurochem.17,1095-1100 (6)Gray,E.G. and Whittaker,V.P.(1962)J.Anat.London 96,79-88 (7)Kato,T.and Lowry,O.H.(1973)J.Neurochem.20,151-163 (8)Kato, T.(1975)Anal.Biochem.66,372-392 (9)Lowry,O.H.(1953)J.Histochem.Cytochem.1,420-428 (10)Matschinsky,F.M., Passonneau,J.V.and Lowry,O.H.(1968)J.Histochem.Cytochem.16,29-39 (11)Matsuda,T.and Yoshida,H.(1976)J.Neurochem.26,817-822 (12)McCaman,R.E.,Rodriguez de Lores Arnaiz,G.and De Robertis,E.(1965)J.Neurochem.12,927-935 (13)McGeer,E.G.,Wada,J.A.,Terao,A.and Jung,E.(1969)Explt.Neurol.24,277-284 (14)McGeer,P.L.,McGeer,E.G., Fibiger,H.C.and Wickson,V.(1971)Brain,Res.35,308-314 (15)Sollenberg,J.and Sörbo,B.(1970)J.Neurochem.17,201-207 (16)Tucek,S.(1967)J.Neurochem.14,531-545 (17)Tucek,S.(1967)J.Neurochem.14,519-529 (18)Tucek,S.and Chen, S.-C.(1974)J.Neurochem.22,893-914

68 脳内ヒスタミンの代謝：N-アセチルヒスタミンの生成

小西博行・平井基陽・中嶋照夫
（阪大・医・高次研）

〔要　約〕

脳内ヒスタミンの代謝は1)ヒスタミナーゼによってイミダゾール酢酸，ついでイミダゾール酢酸リボシドになる経路と，2)ヒスタミンメチル転位酵素によって，1,4メチルヒスタミンになる経路が主なものである。In Vitro の実験でセロトニン，ヒスタミンがアセチル化を受け，N-アセチルセロトニン，N-アセチルヒスタミンとなる報告がある。さらに尿中にN-アセチルヒスタミンが排泄されている。このような知見より，脳内ヒスタミンの代謝にN-アセチルヒスタミンの経路を推定し実験を行ない，次の結果をえた。

1)ラット脳室内に放射性ヒスタミンを注入後，イオン交換クロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動によってN-アセチルヒスタミンを精製した。精製物は合成品 cold N-アセチルヒスタミンと，イオン交換クロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動上での性質ならびに沪紙クロマトグラフィのR_f値が一致した。さらに弱酸水解によりヒスタミンを生じることによりN-アセチルヒスタミンと同定した。

2)N-アセチルヒスタミンの経時変化を検討した。^{14}C-ヒスタミン注入後30分で最高値に達し，その後比較的ゆっくり減少することを認めた。

3)一般に哺乳動物では，N-アセチルヒスタミンの生成はないと考えられていたが，ラット脳内でN-アセチルヒスタミンが生成されることを明らかにした。

第18回神経化学会においてアミンのよーグルタミル化として，よーグルタミルヒスタミンの生成を発表[2]した。よーグルタミルヒスタミンはイオン交換クロマトグラフィ上ではイミダゾール分画に位置する。しかしイミダゾール分画の総放射能をよーグルタミルヒスタミンのそれでは量的に説明出来ない。この分画にはN-アセチルヒスタミン，ヒスタミノールが含まれる。今回N-アセチルヒスタミン，ヒスタミノールへの放射能の取り込みを検討し，放射性N-アセチルヒスタミンが生成されていることが明らかとなった。

実験材料および方法

1)N-アセチルヒスタミンの合成：Merweの方法で合成し[4]た。合成品の融点は143℃で報告値と一致した。

2)^{14}C-ヒスタミンの脳内投与法：

[ring-2-^{14}C]ヒスタミンは The Radiochemical Centerより入取した。比放射能 59.7 mCi/mmol，99% purity。S.D.系雄ラット(200-250g)脳室内へのヒスタミンの投与法は第17回神経化学で報告した方法[7]を用いた。

3)^{14}C-ヒスタミン注入後のラット脳内ヒスタミン代謝物質の分画：

^{14}C-ヒスタミンの脳室内投与後，15分，30分，60分，120分，6時間後にラット脳を摘出し直ちに10%トリクロール酢酸(TCA) 20mlでホモジネートとし，遠沈後，沈渣を再び同液で浮遊させ遠沈する。両上清をあわせ Amberlite IR 120，100-200メッシュ H型，1×5cmカラムに分け，水洗する。ついで(1)1Mピリジン30ml，(2)3Mアンモニア60mlで順次溶出する。1Mピリジンには中酸性代謝物質が含まれる。3Mアン

モニア溶出液を減圧乾固し，Amberlite CG 50，100-200メッシュ，NH_4^+型，1×3 cmのカラムに通し，通り抜けおよび20mlの水洗いをあわせてイミダゾール代謝物質分画とし，吸着物質を3Mアンモニア20mlで溶出し塩基性代謝物質分画とした。イミダゾール分画にはトーグルタミルヒスタミン，N-アセチルヒスタミン，ヒスタミノールが含まれる。塩基性分画に1-4メチルヒスタミン，ヒスタミンが存在する。

4) N-アセチルヒスタミンの精製と放射能の測定：

イミダゾール分画を減圧乾固した後，Amberlite IR 120，100-200メッシュ，1×24cmカラムを前もって1Mピリジン-1M酢酸（10:7 V/V）(pH5.0)の混液で平衡化し，これに乾固物をチャージし同混液で溶出する。N-アセチルヒスタミンは56mlから80mlの間に溶出される。この分画を減圧乾固し50μlに溶かし10μlを高圧沪紙電気泳動（ピリジン-酢酸-水=50:5:945）(pH3.4) 80 volts/cm 25分間かける。N-アセチルヒスタミンに相当する部分を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。

5) N-アセチルヒスタミンの同定：

イオン交換クロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動で精製した物と，合成品 cold N-アセチルヒスタミンの沪紙クロマトグラフィーにおけるRFの一致，6N HCl，105℃ 14時間の完全水解において放射性ヒスタミンが生じること，0.5N HCl boiling Water 1時間の弱酸水解で50%の放射能がヒスタミンに移動することによって同定した。

6) N-アセチルヒスタミン，ヒスタミン，トーグルタミルヒスタミン，ヒスタミノールは Pauly反応によって発色した。

結果

1) 脳内ヒスタミンの各分画への放射能の分布

表1に ^{14}C-ヒスタミン投与後30分の各分画への放射能の分布を示した。

(表1) The distribution of radioactivity from ^{14}C-histamine into the various fractions

Fractions	dpm x 10^{-3}/g wet weight
TCA extract	5,751 ± 709
Effluent	30 ± 6
Neutral acidic histamine metabolites	444 ± 73
Imidazole histamine metabolites	612 ± 142
Basic histamine metabolites	3,701 ± 491

N-アセチルヒスタミンの含まれるイミダゾール分画は，総放射能の約10%を占めている。

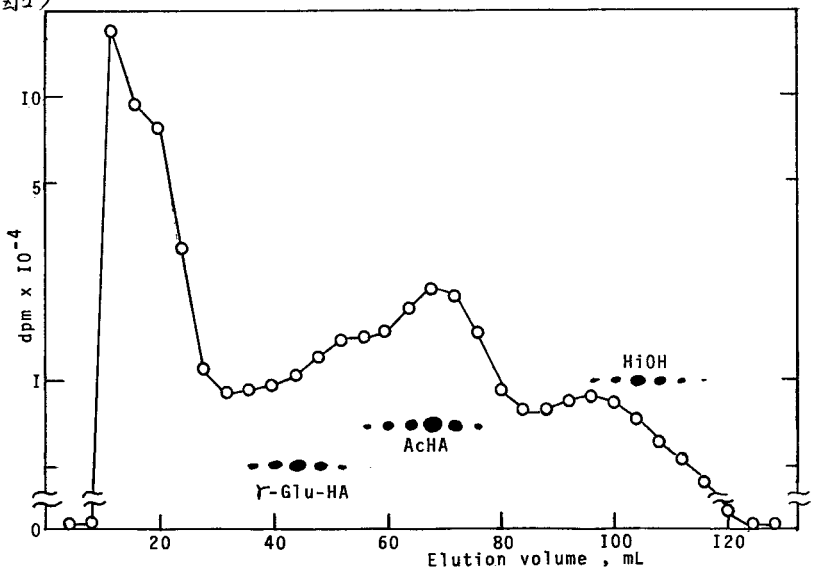
2) N-アセチルヒスタミンの精製および同定

イミダゾール分画を Amberlite IR 120，100-200メッシュ 1×24cmカラムを1Mピリジン-1M酢酸=10:7，pH 5.0の混液で平衡化したものにチャージし，同混液で溶出を行なった結果を図1に示した。縦軸に放射能を，横軸に cold トーグルタミルヒスタミン，N-アセチルヒスタミン，ヒスタミノールの溶出位置を示した。N-アセチルヒスタミンに相当する位置にピークがあり，この分画を（56～60ml）集め減圧乾固した。

減圧乾固物を50μlの水に溶き10μlを高圧沪紙電気泳動（酢酸-ピリジン-水=50:5:945）pH3.4にかけ 80 volts/cm，25分間泳動した。図2はその結果を示した。cold N-アセチルヒスタミンに一致した放射能を認めた。のこりの溶液を同様に高圧沪紙電気泳動にかけ，N-アセチルヒスタミンに相当する部位を切り出し水にて

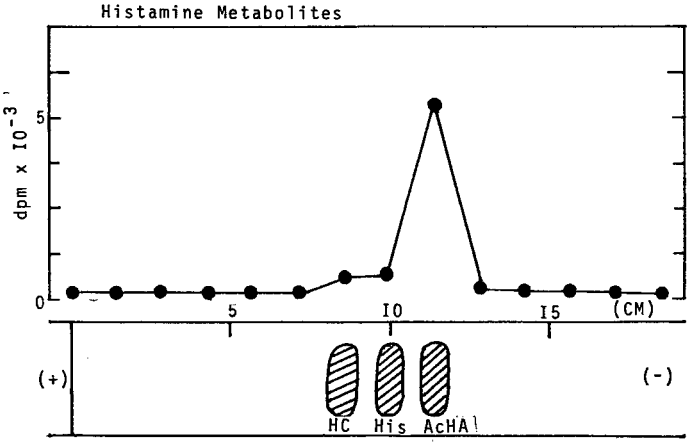
抽出した，減圧乾固後適当量の1mg/ml Cold N-アセチルヒスタミン溶液で溶き，4種類の沪紙クロマトグラフィーを行なった結果，放射能はCold N-アセチルヒスタミンに一致した。N-アセチルヒスタミンのRf値を表2に示した。さらに精製物質を6N HCl, 105℃ 14時間の完全水解にかけると，放射能はヒスタミンに移動した。0.5N HCl boiling water 1時間の弱酸水解によって50%の放射能がヒスタミンに移動した，以上の結果より放射性をN-アセチルヒスタミンと同定した。

(図1) Chromatography of Radioactive Imidazole Histamine Metabolites



3) N-アセチルヒスタミンの経時変化：イミダゾール分画を，イオン交換クロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動で精製しN-アセチルヒスタミンの放射能を測定し，経時変化を示したのが図3である。各点は3匹のラット脳の平均(gあたり)とS.D.を示している。注入後30分に最高値に達し，2時間後でも最高値の約80%を示し比較的ゆっくりした代謝回転を示した。

(図2) Paper Electrophoretogram of N-Acetylhistamine Fraction Prepared from Radioactive Imidazole Histamine Metabolites



4) ヒスタミノールへの放射能は少量であり，沪紙クロマトグラフィーを行うに十分な放射能がえられなかったため固定実験は出来なかった。

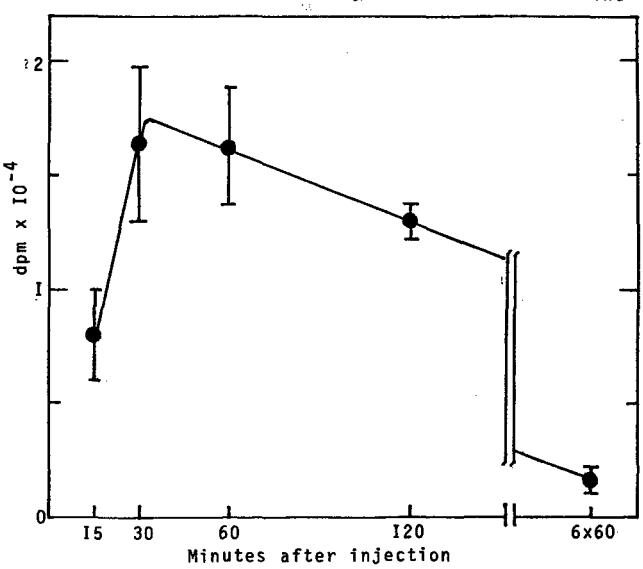
表2. N-アセチルヒスタミンのRf値

溶媒	Rf値
イソプロパノール-クロロホルム-アンモニア水(65:25:10:10)	0.78
n-ブタノール-ピリジン-水(1:1:1)	0.79
n-ブタノール-酢酸-水(2:1:1)	0.77
イソプロパノール-ギ酸-水(8:1:1)	0.73

考察

脳内ヒスタミンの神経伝達物質としての役割は，カテコールアミン，セロトニンの生体アミンに比較して，重要視されていない。しかし近年ヒスタミンも神経伝達物質として，注目されている。[11] 私達はすでにヒスタミンの代謝物質として，1-メチルヒスタミン[9]，ヒスタミノール[8]を分離同定，1-グルタミルヒスタミンの生成を報告している。[3] 今回^{14}Cヒスタミンを脳室内に注入し放射性N-アセチルヒスタミンを精製し，精製物と合成品との種々の性質の一致によってN-アセチルヒスタミンと同定した。ヒスタミンの代謝はSchayerが詳述しており[10]，N-アセチルヒスタミンの代謝経路は細菌にはあるが，哺乳動物にはないとされている。ヒスタミンを負荷した際，尿中に遊離ヒスタミンと，生物学的に不活性なヒスタミン抱合体が排泄され，後者は酸水解によってヒスタミンになると報告され[1]，この尿中のヒスタミン抱合体をUrbachがN-アセチルヒスタミンと同定した。[13] Taborが犬の尿よりN-アセチルヒスタミンを分離同定している。[12][13] Urbachは腸内細菌によって形成された，N-アセチルヒスタミンが吸収され尿中に排泄されると考え，尿中N-アセチルヒスタミンは腸内細菌によるものと結論している。[13] しかしMillicanが腸摘出ラットにおいてもN-アセチルヒスタミンの尿中排泄があること[5]，家兎，Pigeonの肝臓スライスでN-アセチルヒスタミンの形成があること[6]，セロトニンのN-アセチル化を行う酵素標品がヒスタミンを基質にする[14]，これらの知見より，腸以外でのN-アセチルヒスタミン生成の可能性が十分に考えられる。今回の実験は，脳内ヒスタミン代謝に新しい経路を追加したとともに，哺乳動物にもN-アセチルヒスタミンの生成があることを明らかにした。N-アセチルヒスタミンは生物学的に不活性とされているが，脳において機能があるかどうかは今後の研究を待たなければならない。

(図3) Change in Radioactivity of N-Acetylhistamine after Intraventricular Injection of ^{14}C-Histamine



文献 (1) Amrap, G.V., Ayadi, M.S. and Barsoum, G.S., J. physiol., 103, 155 (1944) (2) 小西善介, 林孝男, 神経化学 18, 41 (1975) (3) Konishi, H. and Kakimoto, Y., J. Neurochem., 27, 1461 (1976) (4) Merwe, P. van DER, Z. physiol. Chem., 177, 300 (1928) (5) Millican, R.C., Arch. Biochem. Biophys., 42, 399 (1953) (6) Millican, R.C., Rosenthal, S.N. and Tabor, H., J. Pharm. exp. Ther., 97, 4 (1949) (7) 中嶋照夫, 林孝男, 北元憲, 小西善介, 佐野勇, 神経化学 13, 174 (1974) (8) Nakajima, T. and Sano, I., Biochim. Biophys. Acta, 82, 260 (1964) (9) Nakajima, T., Wolfgram, F. and Clark, W.G., J. Neurochem., 14, 1113 (1967) (10) Schayer, R.W., Physiol. Rev. 39, 116 (1959) (11) Schwartz, J.C., Life Sciences 17, 503 (1975) (12) Tabor, H. and Mosettig, E.J., J. Biol. Chem. 180, 703 (1949) (13) Urbach, K.F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 146 (1949) (14) Weissbach, H., Redfield, B.G. and Axelrod, J., Biochim. Biophys. Acta 54, 190 (1961)

69 プトレスチンからγ-アミノ酪酸の形成に関する研究

辻　元宏・祖谷江憲治・中嶋照夫
（阪大・医・高次研）

〔要　約〕
哺乳動物の脳におけるポリアミンとくにプトレスチン(Put)の代謝動態の研究でPutからγ-アミノ酪酸(GABA)が形成されること，このGABAはグルタミン酸(Glu)から形成されたものとは異なった代謝プールをもつことおよび神経細胞の成熟分化の時期に合成活性が高いことを明らかにした。今回このPutからのGABAの形成について反応に関与する酵素の性質，活性の動物体内分布などについて検討し以下の知見をえた。
1) ラットおよび家兎の臓器　GABAの含量を測定し，このγ-アミノ酪酸が低濃度ではあるが脳以外にも各臓器に分布していることを明らかにした。
2) GluからのGABAの形成は脳に特異的と考えられるがPutからのGABA形成は各臓器に普遍的であることを明らかにした。
3) PutからGABAの形成に関与する酵素を精製し，その性質からジアミン酸化酵素たぶんヒスタミナーゼであることを明らかにした。
4) この酵素活性をラットの臓器において検討し，小腸に最も高いことおよび弱い活性ながら各臓器に分布していることを明らかにした。

ラットの脳におけるポリアミンとくにプトレスチン(Put)の代謝動態の研究でPutがスペルミジン(Spd)およびスペルミン(Sp)に代謝される以外に，γ-アミノ酪酸(GABA)およびγ-グルタミルプトレスチンに代謝されることが明らかになった。[1] さらにPutから形成されるGABAはグルタミン酸(Glu)から形成されるGABAとは異なった代謝プールを形成すること[2]およびPutからのGABAの形成は神経細胞の成熟・分化の時期に高いこと[3]を明らかにした。今回PutからのGABAの形成の生理的意義を探究する研究の一環としてこの反応系に関与する酵素について検討したので報告する。

〔実験材料および方法〕
1) 放射性物質―[^{14}C]-プトレスチン・2HCl (sp. act., 50mCi/mmol), [^{14}C]-スペルミジン・3HCl (sp. act., 10.34mCi/mmol), [^{14}C]-スペルミン・4HCl (sp. act., 61.9mCi/mmol) および[^{14}C]-カダベリン・2HCl (sp. act., 4.8mCi/mmol) は New England Nuclear より，[^{14}C-U]-グルタミン酸 (sp. act., 225mCi/mmol) および[^{14}C]ヒスタミン・2HCl (sp. act., 59.7mCi/mmol) は The Radiochemical Center より購入した。[^{14}C]モノアセチルプトレスチンは放射性Putをアセチル化して合成した。
2) ラットの腹腔内への放射性Putあるいは Gluの投与―成熟雄ラット(200-250g)の腹腔内にそれぞれ20μCiの放射性Putあるいは Gluを注射し，注入後30分で脱血致死せしめ，各臓器をとり出した。
3) 臓器の中性アミノ酸分画およびGABAを含む分画の精製―約1g当量の臓器のトリクロロ酢酸抽出液を1×3cmのAmberlite IR-120, H$^+$型カラムに通し，水洗したのち10倍量の1Mピリジン溶液で酸性および中性アミノ酸を溶出した。この分画を減圧乾固した

のち，1×3 cmのDowex 1×8，酢酸型カラムを用いて酸性アミノ酸分画と中性アミノ酸分画に分けた。中性アミノ酸分画をさらに1.1×15cmのAmberlite IR-120，ピリジン型に通し，120mlの水で洗ったのち，36mlの0.5Mピリジンで GABA を溶出した。溶出液を減圧乾固し GABA 分画とした。

4) GABA の定量および放射性GABA の測定－ GABA の定量は GABA 分画を用いアミノ酸自動分析器で行なった。放射性 GABA の測定は中性アミノ酸分画の一部を pH 3.4 のピリジン-酢酸緩衝液中で高圧沪紙電気泳動を行ない，沪紙上の GABA に相当する部分を切りとりキシレン-ノニオン系シンチレーター中で液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を測定した。

5) Put から GABA の合成に関与する酵素の精製－ラットの小腸のアセトン粉末(20g)を20倍量の50mMリン酸緩衝液，PH 7.4，で24°C，1時間撹拌したのち4°Cに冷却し，13,000g 30分間遠沈した。上清(450ml)を硫安40%飽和とし遠沈した。さらにえられた上清を硫安で60%飽和としたのち13000g 60分間遠沈した。沈渣を小量の50mMリン酸緩衝液，PH 7.4に溶かし，2×88cmのSephadex G-200 カラム上で同じ緩衝液を用いて展開した。この操作で内在していたアルデヒドデヒドロゲナーゼが除去された。溶出液105.6～211.2mlを集め硫安で70%飽和とし遠沈した。沈渣を小量の10mMリン酸緩衝液に溶かしSephadex G-25カラムを用いて硫安を除去したのち，10mMリン酸緩衝液，PH 7.4，で平衡化した2.5×23cm CM-Celluloseに通した。120mlの同じ緩衝液でカラムを洗い流出液を集めた。これをさらに10mMリン酸緩衝液，PH 7.4，で平衡化した2×30cm DEAE-Celluloseカラムに通し，50mM，ついで100mMのリン酸緩衝液，PH 7.4，で展開した。活性は50mMの緩衝液で溶出されるのでこの部分を集めた。上記の操作で酵素の比活性は130倍に上昇した(表1)。

表1. PutからGABA合成に関与する酵素の精製

酵素精製過程	Total Activity (n moles)	Total Protein (mg)	Put. S.A. (n moles/mg)	Cad. S.A. (n moles/mg)	H.A. S.A. (n moles/mg)
アセトンパウダー上清	3,600	3,146	0.88		
40～60%硫安	4,288	1,715	2.50		
Sephadex G-200	2,288	207	11.02	11.02	17.42
CM-Cellulose	1,611	147	10.95	10.13	16.91
DEAE-Cellulose	2,049	18	115.09	105.14	274.59

6) GABA 形成酵素活性の測定－ GABA 形成活性の測定は放射性 Put の放射性 GABA への変化により測定した。すなわち反応液は Put，0.422mM(0.1μCi)；NAD，2mM；ニコタナマイド，4mM；アルデヒドデヒドロゲナーゼ(Blair[4]らの方法でラットの肝臓より部分精製したもの)，100μg；酵素標品；終末容量0.3mlで37°C，30～60分反応させた。反応は50%トリクロロ酢酸を0.01mlかえて止め，遠沈後その上清0.2mlを0.2mlのAmberlite IR-120，H型カラムに通し中性アミノ酸分画を精製した。これを高圧沪紙電気泳動で分離したのち，放射性 GABA を測定した。

7)蛋白定量－ビューレット法[5]あるいはLowry法[6]で行なった。

〔結果〕

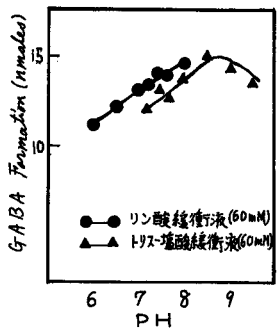
1)ラットおよび家兎の各臓器の GABA の含量－表2にラットおよび家兎の種々の臓器の GABA の含量を示した。脳に高濃度に存在する以外に小腸，肝臓，腎臓にも比較的高濃度に存在していた。

2) Putあるいは Glu からの GABA の形成－ラットの腹腔内にそれぞれ20μCiの放射性 Putあるいは Glu を注射し，注射後30分で脱血致死せしめ，各臓器をとりだし，放射性

GABAの形成を検討した。表2に示したごとくPutからのGABAの形成は各臓器にみられ小腸が最も高いことが判明した。Gluからの GABAの形成はこの実験条件では脳のみにみられた。

3) Putからの GABA 形成に関与する酵素の性質 - 130倍に精製された酵素標品を用いてその性質を検討した。 a)至適pH: 図1より至適pHは8.5附近にあることが判明した。

図1, 至適pH



b)酵素蛋白量と GABAの形成が比例すること(図2), およびPutの減少とGABAの形成量との関に Stoichiometric な関係のあることを確かめた(表3)。c)補酵素：アルデヒドデヒドロゲナーゼがないとGABAの形成がみられないことから精製酵素はアミン酸化酵素であることが推察された。d)阻害剤：ジアミン酸化酵素の阻害剤であるアミノグアニジンとモノアミン酸化酵素の阻害剤であるβ-フェニールイソプロピールヒドラジンを用いて阻害実験を行った。図3より明らかなように前者が低濃度で反応を抑制することからこの酵素はジアミン酸化酵素の範疇に入れられることが推察された。

表2. 各臓器のGABAの含量とGABAの形成

臓器	Putよりの GABAの形成(dpm/g)	Gluよりの GABAの形成(dpm/g)	GABAの量(ラット) (nmoles/g)	GABAの量(猿) (nmoles/g)
脳	596±195	1,151±78	2,339.45±70.70	1,970.86±480.91
心臓	6,113±1,163	n.d.	5.36±0.33	3.00±0.82
肺臓	19,298±5,187	n.d.	7.30±0.67	15.00±7.12
肝臓	21,803±3,089	n.d.	32.19±2.63	42.57±13.71
小腸	270,866±39,065	n.d.	67.04±2.94	97.83±54.22
脾臓	33,381±11,734	n.d.	3.36±0.17	3.00
腎臓	7,177±2,105	n.d.	21.27±1.11	42.75±12.04
筋肉	1,010±123	n.d.	0.68±0.14	16.43±4.65
睾丸	2,862±128	n.d.	0.61±0.15	
血液	4,282±128	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.：検出不能

表3. Putの減少とGABAの形成

時間 (min)	GABAの形成 (n.moles)	Putの減少 (n.moles)
20	8.16	8.41
30	10.96	11.52
60	20.44	20.87
120	32.16	32.47

図2 タンパク量とGABA形成

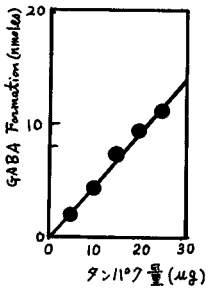


図3 阻害剤の効果

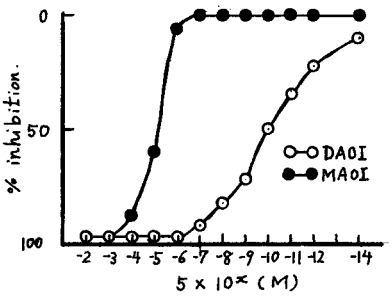


表4 各臓器のH活性

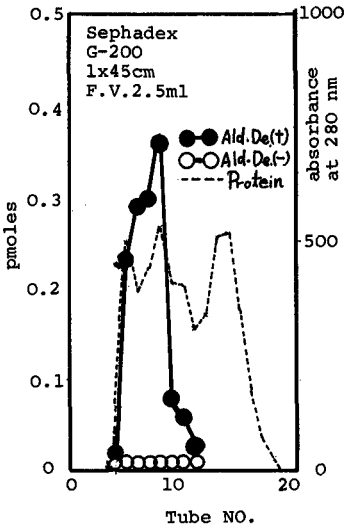
臓器	S.A. (pmoles/mg)
脳	299±8
心臓	804±139
肺臓	160±19
肝臓	202±119
小腸	8660±2463
脾臓	1611±825
腎臓	447±116
筋肉	155±38
睾丸	150±83

e)基質特異性： 4mM(0.1μCi)の Put, カダベリン(Cad.), ヒスタミン(H.A.), Spd, Sp, およびモノアセチルプトレスチンを用いて基質特異性を検討した。活性は反応生成物を高圧沪紙電気泳動で分離し生成物の放射能を測定した。表1に示すごとくH.A.がついで Put., Cad.がよい基質であり, Spd, Sp およびモノアセチルプトレスチンは基質とならないことが判った。以上の結果精製酵素はヒスタミナーゼであることが推察された。

4)ラットの各臓器の Putからの GABA 形成 - 9種のラット臓器のアセトン粉末を50mMリン酸緩衝液, pH7.4, で抽出し,

15000g 30分間遠沈した。上清をSephadex G-200カラムに通し，アルデヒドデヒドロゲナーゼを除去したのち活性部位を集め凍結乾燥し酵素標品とした(図4)。表4に示すごとく活性は小腸に高く1/10～1/50程度の活性が各臓器においても検出された(表4)。

図4．脳のPut→GABA形成酵素のSephadex G-200上の溶出パターン



〔考察〕

GABAの哺乳動物の体内分布とその形成反応を検討しGABAが哺乳動物の各臓器に分布していることGluからGABAの形成は脳に特異的であるが，Putからの GABAの形成は各臓器に普遍的であることを明らかにした。さらにPutからのGABAの形成に関与する酵素はジアミン酸化酵素たぶんヒスタミナーゼであろうと推察された。最近Seiler[7]らはPutがアセチル化され，モノアセチルプトレスチンとなり，これがモノアミン酸化酵素によりアセチルGABAになり，ついで脱アセチルをうけてGABAが形成されると報告している。今回の著者らの研究結果はPutが酸化的脱アミノをうけてアルデヒドになりついでアルデヒドデヒドロゲナーゼによりGABAが形成される可能性を示唆している。Putからの GABAの形成は蛋白質代謝が高いと考えられる小腸，脳の成長の盛んな時期に高いこと[3]から蛋白代謝と関連している可能性がある。今後この点に関して研究を進めPut-GABA系の生理的意義を明らかにしたい。

〔参考文献〕

1) 中嶋照夫，柿本泰男，辻 元宏，小西博行，佐野 勇，神経化学，13，174，1974
2) Konishi, H., Nakajima T., Sano-I., J. Biochem., 81, 355, 1977.
3) 祖父江憲治，能登直，平井基陽，中嶋照夫，神経化学，15，146，1976
4) A.H. Blair, F.H. Bodley, Can. J. Biochem. 47, 265, 1969
5) Weichselbaum, Am. J. Clin. Path., (Tech. Sect.) 10, 40, 1946
6) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951
7) Seiler, M.J. Al-therib, Biochem. J. 144, 29, 1974

70 シナプトゾームにおけるGABA代謝と痙攣誘発との関係

松田　誠・安部美耶子　（慈恵医大・医化学）

〔要　約〕

AntivitaminB$_6$であるペニシラミン（PeA），チオセミカルバジド（TSC），ヒドラジン（Hyd）などをマウスに投与して痙攣を誘発させ，その際の全脳および脳細胞下分画についてγ-アミノ酪酸（GABA）代謝，とくにGABA量，グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD），GABAトランスアミナーゼ（GABA-T）活性を測定した。またアミノオキシ酢酸（AOAA）によってGABA増量状態をつくり，AOAAの痙攣阻止作用とGABA代謝との関係を全脳および細胞下分画について検討した。(1)全脳ではanti B$_6$の種類によってGABA量の変化はことなりPeAの場合には不変，TSCの場合には減少，Hydの場合には逆に増加した。GAD，GABA-Tの活性は減少傾向を示すが，その程度には著しく差があった。しかし(2)細胞下分画についてみると，いづれの場合にもシナプトゾーム分画におけるGAD活性の低下とGABA量の減少が痙攣時にみとめられた。また(3)これらの痙攣をビタミンB$_6$投与で阻止した場合にはシナプトゾームにおけるこのようなGAD活性，GABA量の変動はみとめられず，正常値に近い値を示した。さらに(4)AOAAの痙攣阻止能をもつ時間帯ではTSCによって痙攣が誘発されないことと平行して，シナプトゾームにおけるGABA代謝にも変化はみとめられず，反対に痙攣阻止能力を失った時間帯では全脳GABA量はまだ増加しているにもかかわらず，TSCによって痙攣は誘発されシナプトゾームにおけるGABA量も減少した。

一般に脳内GABAが減少したとき動物は痙攣誘発に対して敏感になるといわれているが，必らずしも脳内GABAの変化と痙攣誘発とは平行しない。例えば同じように痙攣を起こすsemicarbazideはGABA量を減少させるが，hydrazideはかえって増加させる。またGABA量を著しく上昇させるAOAAは，その投与初期には頭部通電による痙攣に対して阻止能をもつが，GABA増加がピークに達する時期には，かえって抗痙攣作用がみとめられない(5)。これら矛盾する現象に対して多くの可能性が考えられるが，その一つは脳全体でなく特定の神経細胞部分，例えば神経終末ではそのGABA量の変動と痙攣の誘発との間に相関性があるのではないかということである。

われわれは痙攣誘発剤として抗B$_6$（PeA，TSC，Hydなど）をマウスに投与し，痙攣発現時の全脳および細胞下分画を用いてGABA代謝の異常，とくにそのparameterとしてGABA量，GAD活性，GABA-T活性の変動を検索した。

実験方法

動物は雄マウス（体重20g）を用い，注射投与量はPeA 3.3 mmol/kg，TSC 0.16 mmol/kg，Hyd 3.0 mmol/kgで，対照には0.9%食塩水を用い，すべて腹腔内に注射した。痙攣発現時（平均PeA 131分，TSC 53分，Hyd 22分）で断頭し，全脳を直ちにhomogenizeし，あるいはさらに細胞分画に供した。B$_6$（1.5 mmol/kg）で痙攣を予防した群は，それぞれの平均痙攣発現時に断頭した。

細胞下分画はGray & Wittaker(4)の方法によって行った。

GABA量の測定は材料を75%エタノールで抽出し(8)，高圧沪紙電気泳動でGABAを分離

した後，ninhydrinで発色定量した。

GADの活性は反応で生成するGABAの量を上と同様な方法で比色定量した(1)。M/15 リン酸buffer pH 6.2 に suspend した酵素液 1.5ml，1.1M 基質液 0.15 ml を 37°，20分反応させた。

GABA-T 活性は反応で α- ketoglutarate より生成する glutamate を酵素法(6)によって測定した。0.1M リン酸 buffer pH 8.0 に suspend した酵素液 0.75ml，0.5M GABA 0.15ml，0.1M α-KG 0.15ml および同 buffer 0.45 ml を 37°，20分反応させた(1)。

acetylcholinesterase (AChE) および succinic dehydrogenase (SDH) はそれぞれ DeRobertis ら(2)および Ellman ら(3)の方法にならって行った。

結果と考察

痙攣時の全脳でのGABA代謝をみると(Table I)，GABA量については PeA 投与群では対照と変らず，TSC群では約20%減少し，Hyd群では反対に約40%増加していた。GADについては Hyd群のように強く阻害するもの，PeA群のように中等度阻害(30%)，TSC群のように軽度(15%)阻害するもの，その程度はさまざまであった。またGABA-Tに対する阻害作用は一般に弱く，中では Hyd が強かった。痙攣を pyridoxine (PN) で予防した場合の変化も用いた痙攣誘発剤の種類によって異なり，GADは一般に回復傾向を示すが，GABA量はTSCのように回復傾向はみられずかえって減少する場合もあった。GABA-Tに対しては一般にPNの影響は小さいものであった。

Table I. GABA metabolism in the brain of mice at the onset of seizures induced by antivitamin B_6.

Treatment (mmol/kg)	Time of decapitation (min)	GABA	GAD	GABA-T
Control		100±2(78) (2.78±0.06)*	100±5(51) (19.0±0.4)**	100±1(51) (54.2±0.9)**
PeA(3.3)	At seizures(131±2)	97±2(44)	69±2(34)	88±1(38)
PeA(3.3)+PN(1.5)	131 (177)	101±3(20)	107±5(20)	90±2(21)
TSC(0.16)	At seizures(53±1)	82±4(11)	85±3(13)	97±4(12)
TSC(0.16)+PN(1.5)	53 (141)	65±8(6)	96±4(6)	86±6(6)
Hydrazine(3.0)	At seizures(22±2)	147±7(5)	37±4(5)	76±1(5)
Hydrazine(3.0)+PN(1.5)	22 (30)	175±20(5)	43±3(5)	77±3(5)

Values are given as percent of control; mean ± S.E.M; the number of animals in parentheses.
* μmole/g brain. ** synthesized-GABA and -glutamate μmole/g brain/hr, respectively.

このように全脳についてはGABA代謝の parameter に共通する変化がみとめられないので，各細胞下分画についてGABA代謝の異常を検索した。Wittaker らの方法で得られた各分画はその marker enzyme の局在性からほぼ満足すべきものと考えた。SDH活性は crude mitochondria (粗 Mit) に約80%が局在し，これを subfraction するとその約60%が mitochondria (Mit) に移行した。また AChEは同じく粗 Mit に約45%，これを subfraction するとその約60%が synaptosome (Syn) に移行した。GABA代謝に関与する parameter を各分画について分析すると Table II に示すように GABA含量は 10^5_g supernatant

Table II. Subcellular distribution of GABA, GAD and GABA-T

Fraction	Protein (mg/g brain)	GABA (%)	GAD (%)	GABA-T (%)
Primary fractions				
Nuclei	34.9	5.7	3.3	11.0
Crude Mitochondria	53.7	27.0	47.0	63.0
Microsomes	21.1	13.3	8.7	5.3
10^5 g supernatant	27.0	55.7 (69.6)[a]	41.0 (206)[b]	21.0 (414)[b]
Submitochondrial fractions				
Myelin	8.6	16.0	12.0	1.7
Synaptosomes	26.1	78.3 (14.8)[a]	62.0 (88)[b]	30.3 (225)[b]
Mitochondria	17.5	6.0 (8.5)[a]	26.3 (114)[b]	67.7 (785)[b]

a, GABA content expressed with μmol/g protein.
b, GAD and GABA-T activity expressed with μmol/g protein/hr.

に約56%が，次いで粗Mitに27%局在したが，これをsubfractionするとその80%近くがSynに移行した。GADについてはその約50%が粗Mitに局在し，そのうちの約60%以上がSynに集中した。またGABA-Tについて63%が粗Mitに局在していたがsubfractionでMitに70%近くが集中した。これらの値は異なった方法で得られた細胞下分画についてしらべられたSalganicoffら(7)のGAD，GABA-Tの相対的分布にほぼ一致した。

GABA代謝のparameterのこのような分布からSalganicoffら(7)も推定したように，glutamateからGADによるGABA産生部位は神経終末であり，GABAはここからpostsynaptic neuronに働き抑制をかけるとともに，このneuron内に移行したGABAはMit局在のGABA-Tによって分離をうける　という仮説が成り立つ。

Table III. GABA metabolism in subcellular fractions from mice treated with some antivitamin B_6

Treatment	Fractions	GABA	GABA + PN	GAD	GAD + PN	GABA-T	GABA-T + PN
PeA	10^5g Supernatant	96±3(10)	106±5(10)	65±4(7)	89±10(5)	89±2(11)	90±3(3)
	Synaptosomes	79±8(7)	101±10(5)	64±3(7)	127±8(5)	99±4(7)	103±4(4)
	Mitochondria	100±24(6)	107±13(4)	81±3(7)	109±8(5)	98±2(7)	106±3(5)
TSC	10^5g Supernatant	95±4(9)	83±2(4)	97±7(9)	120±26(4)	102±6(9)	107±6(4)
	Synaptosomes	81±3(12)	93±4(4)	67±1(12)	125±4(4)	108±8(9)	112±12(4)
	Mitochondria	84±8(9)	101±15(4)	74±1(9)	114±7(4)	94±4(9)	95±3(4)
Hydrazine	10^5g Supernatant	117±6(3)		58±11(3)		103±19(3)	
	Synaptosomes	78±1(3)		24±6(3)		86±8(3)	
	Mitochondria	93±12(3)		70±4(3)		66±9(3)	

All values are expressed as per cent of the control in each experiment
(mean ± S.E.M. for the number of experiments in parentheses).

そこでGABA代謝と関係深い10^5g Sup，Syn，Mitをえらび，抗B_6剤による痙攣とこれら分画におけるGABA代謝との関係を検索した。結果はTable IIIに示すように注目すべき点は，どの痙攣剤の場合でも痙攣発現と，Synにおけ るGABA量の減少（約20%）とが平行していることである。とくにHydの場合には10^5g Supでは全脳と同様にGABA量がむしろ増加傾向を示すのに，Synでは減少していることは興味がある。いずれの場合にもSynにおけるGABA量の減少はSyn局在のGAD活性の低下によることは表1から明らかである。またPNで痙攣を予防した場合はSynにこのような変化はみとめられず，GAD活性

は対照値（あるいはそれ以上）に回復すると同時に、GABA量も対照値に復する傾向がみとめられた。これらの事実は上述の仮説が正しいことを示すもので、抗B_6投与によるSynのGAD活性の低下は、そこのGABA量を減少させ、ひいてはpostsynaptic neuronに対する抑制効果を失ない、異常興奮としての痙攣を誘発することになるのではないかと考えられる。

これらのことを基礎にしてAOAAの痙攣阻止現象について検討を加えてみた。AOAA 0.23 mmol/kg を注射した後、脳内GABA量と、各時点でTSCを追加注射して痙攣の発現率をしらべたのがFig 1である。TSCによる痙攣はAOAA注射後約3時間までは完全に阻止されるがGABA量がpeakに達する8時間頃から痙攣阻止能力を失ない始め、17時間頃はまだGABAが対照の3倍近く存在するにもかかわらず完全に消失する。

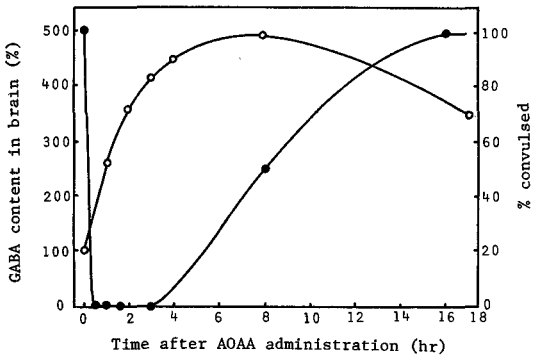


Fig 1. Time course of GABA content in brain and seizure-induction by TSC after AOAA treatment. —o— GABA content, —●— % convulsed.

TSCに対して痙攣を阻止している2時間目と阻止能を失なってTSCによって痙攣をおこした17時間目の脳について細胞下分画を行ない、そのGABA代謝を検討した。結果はTable Ⅳに示すように17時間目のSynにおけるGABA量はAOAA単独投与群よりAOAA+TSC群（つまり痙攣群）の方が減少していた。すなわちこの場合にもTSCによってSynのGABAが減少することが痙攣をおこす原因になっているのではないかと考えられる。

Table IV. GABA metabolism in brain of mice treated with AOAA and TSC

	GABA			GAD			GABA-T		
	0	2	17 hr	0	2	17 hr	0	2	17 hr
Hom.									
AOAA	100±3 (14)	359±10 (6)	330±17 (8)	100±5 (17)	89±9 (5)	84±6 (6)	100±2 (17)	31±2 (5)	56±5 (6)
AOAA		352±9[a] (3)	327±20[b] (8)		86±6[a] (6)	73±10[b] (6)		37±2[a] (6)	55±5[b] (6)
+TSC									
Sup.									
AOAA	100±5 (17)	346±57 (10)	239±12 (7)	100±3 (17)	202±22 (10)	108±6 (6)	100±2 (17)	75±5 (10)	87±6 (7)
AOAA		398±55[a] (10)	241±12[b] (7)		185±22[a] (10)	70±2[b] (7)		73±3[a] (10)	80±7[b] (7)
+TSC									
Syn.									
AOAA	100±3 (17)	180±13 (10)	161±8 (7)	100±3 (17)	111±6 (10)	92±7 (7)	100±2 (17)	47±4 (10)	61±2 (7)
AOAA		182±13[a] (10)	135±5[b] (7)		93±7[a] (10)	86±6[b] (7)		44±2[a] (10)	62±2[b] (7)
+TSC									
Mit.									
AOAA	100±6 (17)	157±5 (10)	107±8 (7)	100±3 (17)	82±7 (10)	82±3 (7)	100±1 (17)	32±3 (11)	48±2 (7)
AOAA		155±22[a] (10)	87±6 (7)		75±12[a] (10)	76±3[b] (7)		27±1[a] (10)	52±2[b] (7)
+TSC									

Values represent mean ± S.E.M for the number of experiments in parentheses.
a; animals were decapitated 1 hr after TSC supplement. b; animals were decapitated at convulsions (66±2 min after TSC supplement).

References

1) Abe, M. Matsuda, M.: J. Biochem.: 80, 1165-1171 (1976). 2) DeRobertis, E. Pellegrino De Iraldi, A. Rodriguez, De Lores, Arnaiz, G. Salganicoff, L.: J. Neurochem.: 9, 23-35 (1962). 3) Ellman, G. L. Courtney, K. D. Andres, V. Featherstone, R. M.: Biochem Pharmaco.: 7, 88-95 (1961). 4) Gray, E. G. Wittaker, V. P.: J. Anat.: 96, 79-88 (1962). 5) Kuriyama, K. Roberts, E. Rubinstein, M. K.: Biochem. Pharmac.: 15, 221-236 (1966). 6) Schousboe, A. Wu, J. Y. Robert, E.: Biochem.: 12, 2868-2873 (1973). 7) Salganicoff, L. De Robertis, E.: J. Neurochem.: 12, 287-309 (1965). 8) Tsukada, Y. Nagata, Y.: Seikagaku: 33, 51-55 (1961).

71 バルビタール依存ラットおよびEl系マウスのけいれんと脳内タウリン含量の変動

松田敏夫・山上　悟・李　英培
前田定秋・馬場明道・岩田平太郎
（阪大・薬・薬理）

〔要　約〕

脳内タウリンとけいれんの関係を明らかにする目的で、バルビタール依存ラットおよびEl系マウスの脳内タウリン含量について検討した。まず予備実験として脳内タウリン含量の日内変動について検討し、脳内タウリン含量が午前0－2時に最高値をそして午後2時に最低値を示すことが明らかになったので、本実験においては動物の屠殺を午前10－11時に行なった。バルビタールの慢性投与により小脳タウリン含量は有意に増加した。そしてその休薬により大脳皮質タウリン含量は増加し、小脳のそれは正常値にまで減少した。このような変化は、他の組織ではみられず脳に特異的であった。他のアミノ酸についても検討してみると、バルビタール投与により大脳皮質、脳幹GABA含量の減少を認めた。また休薬により、このGABA含量は正常値に回復し、そして大脳皮質アスパラギン酸は有意に減少した。El系マウスにおいては、いずれの部位においてもタウリン含量はけいれんにより増加した。そして大脳皮質、脳幹のそれは、けいれん後速やかに正常値まで減少したが、小脳のタウリン含量は3時間後も有意に増加していた。以上、けいれん時には必ずしも脳内タウリン含量が減少していないことが示され、また脳内タウリンは、バルビタール依存ラットの禁断症状の発現およびEl系マウスのけいれんに関係していることが示唆された。

タウリンは、種々の薬物（cobalt（1-3）、ouabain（4）、pentylenetetrazole（5、6）、penicillin G（7）等）によってひきおこされる動物のてんかんモデルに対して抗けいれん作用を示すことが知られている。Van Gelderら(1,3,8)は、てんかん患者やcobalt誘発性のepileptic focusにおいてグルタミン酸、タウリンの減少とグリシンの増加を、そしてその大脳皮質全体においてはGABA、アスパラギン酸の減少を認めている。一方、Perryら（9,10）は、てんかん患者のepileptogenic fociではGABA、タウリンは逆に増加しているということを報告しており、てんかん患者にタウリン投与が有効であるという考えに反論している。タウリンの抗けいれん作用の機構の解明には、今までけいれん誘発剤によるけいれんが多く用いられている。この場合、その薬物は脳内に存在しており、タウリン投与によりそれらの相互作用が考えられ、タウリンの抗けいれん作用を論ずる上で問題となるように思われる。

本研究において我々は、けいれんと脳内タウリン含量の関係を明らかにする目的で、バルビタール依存ラットおよびElマウスを用い、脳内に薬物が存在しない時のけいれん時における脳内タウリン含量の変動について検討した。また本研究を始めるにあたり、脳内GABA含量が日内変動を示すという報告（11）を考慮して、脳内タウリン含量の日内変動についても検討したので報告する。

1．実験方法

1）動物

バルビタール依存ラットは、柳浦ら（12）の方法に従い、体重90-100 gのS.D.系雄

性ラットに、異なった比率でバルビタールナトリウムが混入されている2種類の粉末飼料を約40日間与えることにより作製した。

ddY系マウスは与研より分与を受け、大日本製薬株式会社総合研究所で自家繁殖した4－8週令の雄性のものを用い、約2か月間の訓練（30回の垂直抛りあげ操作を1週間に1度行なうと、約5週目からその操作によりけいれんを起こし始める）をした後、本実験に用いた。このマウスは、約15回の抛りあげでけいれんを起こした。対照としてはddY系の雄性マウスを用いた。

なお、動物は一定の条件下（午前8時から午後8時を明、21±1℃）で飼育し、その屠殺は午前10時から11時の間に行なった。

2) アミノ酸の定量

組織内タウリンは、岩田ら（13）の方法により抽出、精製し、*fluorescamine* を用いて測定した（14,15）。GABA、グルタミン酸、アスパラギン酸は、Graham ら（16）の方法に従い測定した。

3) バルビタールの定量

組織および血清中バルビタール量は、Brodie ら（17）の方法により測定した。

2、実験成績

1) ラット脳内タウリン含量の日内変動について

4週令のラットを午前6時から午後6時までを明とした12時間周期の明暗の部屋で、3週間飼育し、それぞれの時間の脳内タウリン含量を検討した（Fig. 1）。大脳皮質、脳幹、小脳といずれの部位においても、タウリン含量は午前0時から2時に高く、そして午後2時に低い値を示した。従って以下の実験においては、屠殺は午前10時から11時の間に行なった。

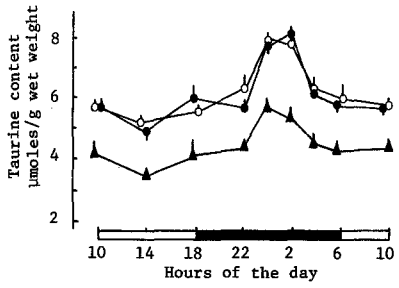


Fig 1. Circadian periodicity of taurine in the cerebral cortex (●), brain stem (▲) and cerebellum (○) of rats. Points are means of values in 4 animals ± S.E..

2) バルビタール依存ラット

バルビタール混入飼料を与えることにより作製したバルビタール依存ラットは、休薬により著しい体重減少を示し、又すべてのラットにおいて休薬後48時間以内に自発けいれんが認められた。このけいれんは、休薬後24時間から48時間の間に最も多くみられた。各組織および血清中のバルビタール量は、バルビタールの投与により増加したが、休薬後は速やかに消失した。このようなバルビタール依存ラットの脳内タウリン含量の変動を検討したのがTable 1である。小脳タウリン含量は、バルビタールの投与により有意に増加したが、大脳皮質、脳幹のタウリン含量は有意な変化を示さなかった。一方休薬により、小脳タウリン含量は正常値にまで減少し、また大脳皮質のそれは有意に増加した。禁断症状が回復している休薬11日目においては、いずれの部位のタウリン含量も対照群と同じ値を示していた。なおバルビタール依存ラットのタウリン含量の変化は、他の組織においてはみられず、脳に特異的な現象であった。

他のアミノ酸についても、同様に検討し、バルビタールの投与により大脳皮質、脳幹のGABA含量の減少を認めた。この減少は休薬により正常値に回復する傾向を示した。また、休薬により大脳皮質アスパラギン酸の減少も認めたが、グルタミン酸に関してはいずれの部位においても有意な変化は認められなかった。

Table 1. Brain taurine content of barbiturate-dependent and control rats

	Numbers of animals	Time after withdrawal (day)	Taurine content (μmoles/g wet weight) Cerebral cortex	Brain stem	Cerebellum
Control	15		5.8 ± 0.2	4.3 ± 0.2	5.6 ± 0.3
Barbiturate-dependent	9	0	6.3 ± 0.2	4.9 ± 0.5	7.3 ± 0.5*
	5	1	6.4 ± 0.9	5.0 ± 1.0	5.3 ± 0.8†
	10	2	7.6 ± 0.5*†	4.8 ± 0.3	5.8 ± 0.5†
	10	11	6.3 ± 0.5	4.4 ± 0.4	5.5 ± 0.4†

Each value is the mean ± S.E. * P<0.01, compared with control.
† P<0.05, compared with 0 time after withdrawal.

3) El系マウス

El系マウスの脳内タウリン含量は、いずれの部位においてもddY系マウスのそれと同様な値を示したが、けいれん発現時の脳内タウリン含量はいずれの部位においても増加していることが認められた（Table 2）。また、大脳皮質、脳幹におけるタウリン含量のけいれんによる増加は、けいれん後速やかに正常値に回復したが、小脳のそれは3時間後もなお有意な増加を示していた。

3. 考察

バルビタール依存動物の禁断けいれんを生化学的に解明する目的で、今までいくつ

Table 2. Brain taurine content of ddY and El mouse

	Time after convulsion (hr)	Taurine content (μmoles/g wet weight) Cerebral cortex	Brain stem	Cerebellum
ddY mouse		8.5 ± 1.2 (5)	6.1 ± 0.4 (5)	6.3 ± 0.7 (5)
El mouse				
non-convulsive		8.9 ± 0.5 (12)	6.4 ± 0.4 (13)	5.6 ± 0.4 (13)
convulsive	0	11.1 ± 0.7*(10)	7.9 ± 0.3**(10)	9.4 ± 0.5**(9)
	0.5	10.4 ± 0.7 (8)	7.6 ± 0.6 (8)	9.2 ± 0.5**(7)
	1	9.0 ± 0.4 (5)	6.9 ± 0.6 (5)	10.1 ± 0.5**(5)
	3	8.9 ± 0.4 (8)	7.2 ± 0.4 (8)	9.4 ± 0.7**(8)

Each value is the mean ± S.E. and the number in parenthesis indicates the number of animals. * P<0.02, ** P<0.01, compared with non-convulsive.

かの報告がなされている。Essig (18)は、アミノオキシ酢酸の投与によりこのけいれんが改善されることを示し、バルビタール依存動物の禁断けいれんが脳内GABA含量の低下に起因すると推論している。また最近、Nordberg ら（19）はバルビタール慢性投与により脳内アセチルコリン含量の減少を、そしてMorgan ら（20）はカテコールアミン含量の変動を報告している。ところが、脳内GABA含量に関しては今までに、バルビタール慢性投与によりわずかであるが有意に減少しているというTzeng ら（21）の成績と、変化しないというCrossland ら（22）やSutton ら（23）の成績があり、Essig の仮説は未だ十分支持されるに至っていない。

我々は本実験において、バルビタール慢性投与の脳内タウリン、GABA、グルタミン酸、アスパラギン酸含量に対する作用について検討した。なお、バルビタールの慢性投与は柳浦ら（12）の方法に従い、バルビタール混入飼料を長期間与えることにより

行なったが、休薬後の禁断けいれんおよび体重減少の程度から、本実験に用いたバルビタール依存ラットはその依存度が高いものと思われた。バルビタールの慢性投与により小脳タウリン含量は増加し、また大脳皮質、脳幹GABA含量は減少した。そしてその休薬により大脳皮質タウリン含量は増加し、大脳皮質、脳幹GABA含量および小脳タウリン含量は正常値に回復した。また休薬により大脳皮質アスパラギン酸含量は減少することが示された。このような脳内アミノ酸含量の変動の機作は現在不明であるが、バルビタール慢性投与により脳内GABA含量が減少するという成績はEssig(18)の仮説と一致していた。Nordbergら(19)やMorganら(20)そして我々の成績を考慮すると、GABAのみならず、アセチルコリン、カテコールアミン、タウリンそしてアスパラギン酸も、バルビタール依存ラットの禁断けいれんに関与しているものと思われる。

Ed系マウスは1959年今泉(24)により報告され、諸種の体位変換刺激によりけいれん発作をおこす特殊な系統のマウスで、けいれん研究の好個の素材としてよく用いられている。本実験においては、けいれんと脳内タウリンの関係を解明する目的で、Ed系マウスのけいれん前後の脳内タウリン含量を経時的に測定することにより検討した。Ed系マウスの脳内タウリン含量はddY系マウスのそれと有意な差を示さなかったが、けいれん発現時のEd系マウスの脳内タウリン含量は有意に増加していた。特に小脳のそれは他の部位に比べ、著明に増加しており、またけいれん後3時間たってもなお増加していた。このような増加の機作は現在不明であるが、神経系におけるタウリンの役割を解明する上で、今後検討すべき問題と思われる。

本発表論文の一部は、「タウリンと神経疾患」に関する国際シンポジウム(アメリカ、1977年3月)にて発表した。

謝辞　バルビタール依存ラットの作製に関して御指導を頂いた星薬科大学柳浦才三教授、田頭栄治郎博士に深謝致します。またEd系マウスを提供して頂いた大日本製薬株式会社総合研究所に深謝致します。

引用文献

1. Van Gelder, N. M. (1972) Brain Res. 47, 157-165 2. Koyama, I. (1972) Cna. J. Physiol. Pharmacol. 50, 740-752 3. Van Gelder, N. M., and Courtois, A. (1972) Brain res. 43, 477-484 4. Izumi, K., Donaldson, J., Minnich, J., and Barbeau, A. (1973) Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 885-889 5. Izumi, K., Igisu, H., and Fukuda, T. (1974) Brain Res. 76, 171-173 6. Izumi, K., Igisu, H., and Fukuda, K. (1975) Brain Res. 88, 576-579 7. Mutani, R., Bergamini, L., Gariello, R., and Delsedime, M. (1974) Brain Res. 70, 170-173 8. Van Gelder, N. M., Sherwin, A. L., and Rasmussen, T. (1972) Brain Res. 40, 385-393 9. Perry, T. L., Hansen, S., Sokol, M., and Wada, J. A. (1972) Clin. Res. 20, 949 10. Perry, T. L., and Hansen, S. (1976) in Taurine (Huxtable, R. and Barbeau, A., eds), pp.275-281, Raven Press, New York 11. Piepho, R. W., and Friedman, A. N. (1969) The Pharmacologist 11, 255 12. Yanaura, S., Tagashira, E., and Suzuki, T. (1975) Japan. J. Pharmacol. 25, 453-463 13. Iwata, H., Baba, A., and Yoneda, Y. (1976) in Taurine (Huxtable, R., and Barbeau, A., eds), pp. 85-90, Raven Press, New york 14. Yoshikawa, K., and Kuriyama, K. (1976) Japan. J. Pharmacol. 26, 649-654 15. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., and Weigele, M. (1972) Science 178, 871-872 16. Graham, L. T. Jr., and Aprison, M. H. (1966) Anal. Biochem. 15, 487-497 17. Brodie, B. B., Burns, J. J., Mark, L. C., Lief, P. A., Bernstein, E., and Papper, E. M. (1953) J. Pharmac. exp. Ther. 109, 26-34 18. Essig, C. F. (1963) Int. J. Neuropharmac. 2, 199-204 19. Nordberg, A., and Wahlström, G. (1977) Eur. J. Pharmacol. 43, 237-242 20. Morgan, W. W., Pfeil, K. A., and Gonzales, E. G. (1977) Life Sci. 20, 493-500 21. Tzeng, S., and Ho, I. K. (1977) Biochem. Pharmac. 26, 699-704 22. Crossland, J., and Turnbull, M. J. (1972) Neuropharmac. 11, 733-738 23. Sutton, I., and Simmonds, M. A. (1974) Biochem. Pharmac. 23, 1801-1808 24. Imaizumi, K., Ito, S., Kutsukake, G., Takizawa, T., Fujiwara, K., and Tutikawa, K. (1959) Jikken-Dobutsu (Bull. exp. Animals) 8, 6-10

72 神経組織における Acetylcholine および Norepinephrine の放出と Calcium 結合におよぼす Taurine の影響

垣田清人・村松　信・栗山欣弥
中川一夫　（京府医大・薬理）

〔要　約〕

哺乳動物の中枢神経系，上頸神経節および副腎髄質におけるタウリンの生理作用に関し，acetylcholine(ACh)および norepinephrine(NE)の取り込みと遊離，および Ca^{++} の動態に対する影響の面から検討を試みた。In vivo および in vitro の投与条件下において，タウリンは大脳皮質切片および上頸神経節への ACh および NE の取り込みには影響を与えないが，高濃度の K^+ 添加による遊離促進を著明に抑制した。また副腎髄質の chromaffin granules および大脳皮質より得た粗 synaptosome (P_2) 分画では，NE の遊離がタウリン投与により，著明に抑制をうけた。尚同一濃度のロイシンおよびメチオニンには，この様な遊離抑制効果は認められなかつた。上記の ACh および NE の遊離は Ca^{++} 依存性のものであり，又タウリンは脳 mitochondria からの ^{45}Ca の遊離を著明に抑制することから考えて，細胞内 Ca^{++} の濃度と分布の変化を介して　神経伝達物質の遊離を抑制し，神経興奮の調節因子としての機能を発揮する可能性が考えられる。

哺乳動物の中枢神経系に多量に存在するタウリン(2-aminoethanesulfonic acid)は，現在なお，その生理作用の解明されていない含硫アミノ酸の一つである。神経系における機能についても不明の点が多いが，今日まで主として，神経伝達候補物質，あるいは興奮性膜の modulator としての可能性について種々の検討がなされてきた。今回我々は　中枢および末梢神経系におけるタウリンの神経伝達候補物質(ACh, NE)の取り込みと遊離におよぼす影響を検索するとともに，神経の興奮性に大きな役割を有するとされている Ca^{++} の synaptosome, mitochondria への取り込みと遊離機構へのタウリンの作用について若干の検討を試みた。

〔方法〕 脳および上頸神経節（SCG），副腎髄質は，Wistar 系ラット（体重 150-200g）より得た。粗 synaptosomal(P_2)，synaptosomal(P_2-B)，mitochondrial(P_2-C) の各分画は，Gray and Whittaker[3] の方法により分離した。副腎髄質の chromaffin granules の分離には，Greenberg と Sabelli[4] の方法を用いた。In vivo における タウリンの投与は，3% タウリン水溶液を 3 日間経口的に投与する方法によつた。放射活性は　10 ml の Bray's scintillator[1] を用い，Packard Tri-Carb Liquid Scintillation spectrometor, Model 3390 を用いて測定した。DL[7-^{3}H]norepinephrine(^{3}H-NE) の取り込みと遊離の測定：大脳皮質切片(厚さ: 0.35-0.4mm) あるいは，細切した SCG を nylon mesh に包み　10μM pargyline および 16.5mM の Tris-HCl(pH7.4) を含有する Krebs-Ringer 液中で preincubation(37°C) を行なつたのち，0.1-0.2 mmoles ^{3}H-NE(S.A:12Ci/mmol) 加え，大脳皮質切片では 30 分，SCG の場合は 60 分の incubation を行なつた。同一の medium を用い洗浄後　2 ml の同一 medium に移し，経時的に ^{3}H-NE の遊離を測定したのち，最後に残りの組織を Hyamine により可溶化し，遊離総量と組織の放射活性の和を総取り込み量とした。高 K^+ 刺激を行う場合には，同濃度の Na^+ と置換した medium を

用いた。P_2への取り込みを測定する場合には，40nM ^{3}H-NE，10μM pargyline を含む Krebs-Ringer, Tris-HCl (pH 7.4) 中で 37°C, 10分間の incubation を行ない，遠沈法(17,000 × g 10分間)により，沈渣を回収し，洗浄，再遠沈後，2ml, 0.32M sucrose に懸濁した。一部を Hyamine により可溶化し，総取り込み量とした。1.9mlの同一 medium に 0.1ml の懸濁液を加え(最後の蛋白含有量；105-225μg/ml)，37°Cで経時的に incubation を行ない，遠沈法にて上清と沈渣に分離し，総取り込み量との比により，遊離量を算定した。副腎髄質顆粒からの Epinephrine (Epi) 遊離の測定：Chromaffin granules を含む上清液層を 30°C, 20分間 incubate したのち 0.5M sucrose に重層し，2°C，20,000 × g の遠沈を行ない顆粒と上清液を分離，各分画について Chang 法[2]で Epi を抽出し，Häggendal 法[3]により分光蛍光的に測定を行った。又遊離率は，上清液中に出現した Epi の総量に占める百分率により算出した。Acetyl[N-methyl-^{14}C]choline chloride (^{14}C-ACh) の取り込みと遊離の測定：大脳皮質切片および SCG について，^{3}H-NE の場合と同様の方法により測定を行なった。尚本実験の場合には，50nmoles の ^{14}C-ACh (S.A. 20.4mCi/mmol) を使用した。^{45}Ca の取り込みと遊離の測定：P_2, P_2-B および P_2-C の各分画について，^{45}Ca の取り込みと遊離を測定した。反応には 150mM NaCl, 5mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 1.24mM KH_2PO_4, 10mM glucose, および 30mM (pH 7.4) Tris-HCl, 0.01-1.0mM $^{14}CaCl_2$ (S.A. 3×10^6 cpm/μmole) を含む溶液を用い，6mM ATP の存在下 30°C, 3分間の incubation を行い，取り込みを測定した。^{45}Ca 遊離を測定する場合には，30°C, 8分間の incubation により ^{45}Ca を取り込ませた後，3mM ATP および 0.01mM $CaCl_2$ を含む前記 medium 中で 30°C, 8分間の incubation を行った。細胞下粒子の回収には，millipore filter (孔径: 0.45μm) を用いた。Ca^{++} の定量：0.5ml HNO_3-H_2SO_4 により P_2 分画を灰化したのち 原子吸光光度計 (N_2O-C_2H_2 flame, 波長: 422.7 nm) にて Ca^{++} 含有量を測定し，^{45}Ca の比活性を算定した。蛋白，タウリンの定量：蛋白の定量は Lowry[6] ら，タウリンの定量は，Yoneda[7] らの方法によった。

〔実験成績および考察〕 ^{14}C-ACh および ^{3}H-NE の取り込みと遊離におよぼすタウリンの影響：大脳皮質切片および SCG において，30mM taurine の添加あるいは 経口投与 (4-7g/Kg/day, 3日間は，^{14}C-ACh および ^{3}H-NE の非刺激下の遊離に影響することなく，高 K^+ 刺激による遊離

Table 1. Effects of taurine on neurotransmitter release

[I] Catecholamines (Epi, NE)

Release of Epinephrine from Adrenal Medullary Granules

	%Released ± S.E.		
	In vivo	Taurine added	In vitro
Control	59.3± 3.9		55.3± 5.1
		0.5	50.6± 4.3
Taurine treated°	43.4± 1.6*	1.0	47.1± 2.8
		5.0	43.8± 2.3*
		10.0	43.7± 1.1*

Release of ^{3}H-NE from Crude Synaptosomal (P_2) Fraction of Brain

	%Released ± S.E.		
time	6	10	20min.
Control	49.6± 3.6	51.9± 3.9	64.6± 3.7
Taurine added (30 mM)	43.0± 4.4*	46.9± 3.4**	57.1± 3.2***

Release of ^{3}H-NE from Cerebral Cortical Slices

	KCl(24mM) Stimulated Release (% Increase±S.E.)	$T_{1/2}$max ± S.E.# (min)
Control	457 ± 20	2.92 ± 0.14
Taurine added (30 mM)	351 ± 15*	3.50 ± 0.18

[II] Acetylcholine (ACh)

Release of ^{14}C-ACh from Cerebral Cortical Slices

	KCl(60mM) Stimulated Release (% Increase±S.E.)	$T_{1/2}$max ± S.E.# (min)
Control	90 ± 2	4.53 ± 0.05
Taurine added (30 mM)	58 ± 2*	4.10 ± 0.17

Release of ^{14}C-ACh from Superior Cervical Ganglion

	KCl(60mM) Stimulated Release (% Increase±S.E.)	$T_{1/2}$max ± S.E.# (min)
Control	482 ± 25	10.10 ± 1.28
Taurine treated°	360 ± 23*	10.53 ± 0.07
Taurine added (30 mM)	221 ± 22**	11.40 ± 0.20

° Taurine was given orally, 4-7g/Kg/day for 3 days.
Time required for declining to the half value of the maximum release of each neurotransmitter evoked by addition of KCl.
* P <0.05 ** P <0.02 *** P <0.01 N = 4-5

Table 2. Effects of taurine, Leucine and methionine on K-stimulated release of ^{14}C-ACh and ^{3}H-NE

Superior Cervical Ganglion		
^{14}C-ACh	%Increased by KCl(60mM)±S.E.	T½max(min)± S.E.
Control	482 ±25	10.10 ±1.28
Taurine treated °	360 ±23*	10.53 ±0.07
Taurine added(30mM)	221 ±22**	11.40 ±0.20
Taurine added(10mM)	333 ±84	10.35 ±0.18
Leucine added(30mM)	449 ±74	10.10 ±0.54
Methionine added(30mM)	395 ±57	9.15 ±1.09
Crerbral Cortical Slices		
^{14}C-ACh	%Increased by KCl(60mM)±S.E.	T½max(min)±S.E.
Control	90 ± 2	4.53 ±0.07
Taurine added(30mM)	58 ± 2*	4.10 ±0.17
^{3}H-NE	%Increased by KCl(24mM)±S.E.	T½max(min)±S.E.
Control	457 ±20	2.92 ±0.14
Taurine added(30mM)	351 ±15*	3.50 ±0.18
Leucine added(30mM)	443 ±18	3.50 ±0.17

N = 3-6, for °, #,*and**, See the footnote of Table 1.
Taurine contents in superior cervival ganglion from control and taurine treated rats were 3.91±1.22 and 5.62±0.25 moles/gw.w., respectively.

Table 3. Effects of taurine on uptake of neurotransmitters

	^{3}H-NE	^{14}C-ACh
Cerebral Cortical Slices (pmol/mg w.w./30min ±S.E.)		
Control	0.15 ± 0.02	38.7 ± 2.0
Taurine added (30 mM)	0.13 ± 0.01	35.9 ± 1.3
Crude Synaptosomal Fraction (pmol/mg prot./10min S.E.)		
Control	9.71 ± 1.20	
Taurine added (30 mM)	9.09 ± 0.43	
Superior Cervical Ganglion((pmol/SCG/30min ± S.E.)		
Control	0.16 ± 0.04	89.1 ± 7.8
Taurine added (30 mM)		84.1 ± 12.5
Taurine treated °	0.17 ± 0.03	91.9 ± 10.0

N = 4-8,
For °, see the footnote of Table 1.

Table 4. Effect of in vitro addition of taurine on Ca^{++}content, ^{45}Ca uptake and specific activity for Ca^{++}in P2 from brain

	Control	Taurine Added(30mM)
Ca^{++}Content(nmol/mg prot.)±S.E.	48.6 ±6.4	57.8 ±11.5
^{45}Ca Uptake(cpm/mg prot. 10^{-4})±S.E.	4.28±0.19	4.24 ±0.19
Specific Activity(cpm/nmol)	881	733

N = 4, The endogenous Ca^{++}content in P_2 fraction before subjecting to the uptake experiments was 17.3±4.3 nmol/ mg prot.
Incubation: 30°C, 3 min.
$^{45}CaCl_2$ used: 1 mM.

Table 5. Uptake of ^{45}Ca by purified synaptosomal and mitochondrial fractions of the brain

	^{45}Ca uptake (nmoles/mg prot./min)		
Ca^{++}conc. (mM)	Synaptosomal(I)	Mitochondrial(II)	Ratio(II/I)
0.01	0.33	4.73	14.3
0.1	1.35	15.95	11.8
1.0	2.91	13.62	4.7

The averages obtained from 2 closely checking experiments are shown. Incubation: 30°C, 3 min. $^{45}CaCl_2$ used: 1 mM.

を有意に抑制した(Table 1)。また副腎のchromaffin granules からのEpiの遊離に対しても，5-10 mM のタウリン添加および経口投与は著明な抑制効果を示した。又これらの遊離はincubation medium よりのCa^{++}の除去，EGTA処理，20mM $MgCl_2$の添加，1 mM verapamilの添加により，抑制され，明らかにCa^{++}依存性の遊離であつた。又同一濃度ロイシンあるいは，メチオニンの添加時にはタウリンでみられた抑制効果を認めなかった(Table 2)。一方，同濃度のタウリンは^{14}C-ACh，^{3}H-NEの取り込みに対しては，影響を与えなかつた(Table 3)。尚P_2分画においては，30 mM タウリン添加による^{3}H-NEの非刺激下の遊離の有意な抑制が認められた。以上の結果よりタウリンは中枢および末梢神経組織，あるいは，副腎髄質において，Ca^{++}依存性のAChあるいはNEの遊離に対し抑制効果を持つものと考えられる。

Ca^{++}の取り込みと遊離におよぼすタウリンの作用：P_2は3-9 mM ATPの存在下で温度依存性と非依存性のCa^{++}取り込み能を示し，例えば1 mM $^{45}CaCl_2$および3 mM ATPの存在下では，incubation(30°C) 開始後3分間までは，P_2への^{45}Caの取り込みおよびCa^{++}含有量の増加に直線性がみられた(Table 4)。この^{45}Caの温度依存性の取り込みに対し，30 mM タウリンは影響を与えなかったが(Table 4)，P_2よりの^{45}Ca遊離は30mM タウリンの添加により著明に抑制された(Fig.1)

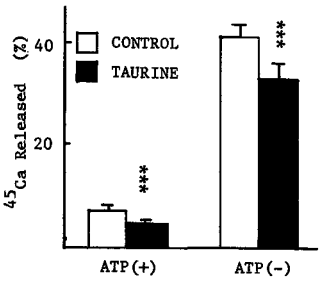


Fig. 1. Effect of in vitro addition of taurine on ^{45}Ca release from crude synaptosomal(P_2) fraction from brain. Incubation: 30°C, 8 min. $CaCl_2$ used: 0.1 mM. N = 4, *** $P < 0.01$

尚この温度依存性の^{45}Ca取り込みがP_2に含まれるいずれの細胞下粒子に起因するのであるかを検討したが，主として，mitochondriaによることが明らかであつた (Table 5)。従ってタウリンによる^{45}Caの遊離抑制は，主として，mitochondriaにおいてみられる現象ではないかと考えられる。これらの結果を総括すると，タウリンはmitochondria内のCa^{++}保持機構と相互作用を持ち，細胞内の遊離Ca^{++}濃度を減少せしめることにより，神経伝達物質の遊離抑制を惹起し，神経興奮の調節因子の一つとして重要な機能を持つのではないかと考えられる。

〔文献〕

1) Bray, G.A.; Analyt. Biochem. 1, 279 (1960)
2) Chang, C.C.; Int. J. Neuropharmacol. 3, 643 (1964)
3) Gray, E.G. and Whittaker, V.P.; J. Anat. (Lond) 96, 79 (1962)
4) Greenberg, R. and Sabelli, H.C.; Proc. Soc. Exp. Biol. 116, 705 (1964)
5) Häggendal, J.; Acta. Physiol. Scand. 59, 242 (1963)
6) Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.; J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
7) Yoneda, Y., Takashima, S., Hirai, K., Kurihara, E., Yukawa, Y., Tokunaga, H. and Kuriyama, K.; Jap. J. Pharmacol. in press.

73 中枢神経内タウリンの微細分布

米田幸雄・徳永尚司・栗山欣弥
(京府医大・薬理)

〔要 約〕

タウリンの化学伝達物質としての可能性を中枢神経内微細分布の面から検討する目的で、タウリン及びその合成系酵素の1つであるcysteine sulfinate decarboxylase (CSD) 活性の微量定量法を開発した。タウリンの定量はフルオレスカミン(Fluorescamine)を螢光プローブとするカラムクロマトグラフィー法により行ない、25-1000pmolesのタウリンに螢光の直線性が認められた。CSD活性の測定は、DL-[1-^{14}C]-cysteine sulfinic acidからの$^{14}CO_2$生成を定量化する事により行ない、5μg蛋白量のラット全脳ホモジネート中のCSD活性が測定可能であった。上記二つの定量法を用いて、ラット脳におけるタウリンの部位的分布及び微細分布について検討した。更に、タウリンで得られた結果と比較検討する目的で、GABA及びその合成酵素であるGAD活性についても同様の検索を行なったところ、タウリン、GABA共に部位的には不均一な分布を示し、タウリンでは嗅球、線条体等に、またGABAでは視床下部、中脳等にそれぞれ高い値が認められた。次いで、脊髄における微細分布を検討したところ、GABA及びGAD活性は不均一な分布を示し、共に後角後部に高い値が認められたのに対して、タウリンは脊髄全体に均一に分布しており、特に灰白質部に高い値を示す場所の存在は認められなかった。視床においても、脊髄と同様の結果が得られ、少なくともラット脊髄及び視床においては、タウリンの化学伝達物質としての可能性は少ないのではないかと考えられる。

哺乳動物の中枢神経系(CNS)には含硫アミノ酸の1つであるタウリン(2-aminoethane-sulfonic acid)が大量に見出されるが、その機能的及び生理的意義に関しては不明の点が多い。今回は特に、抑制性の化学伝達物質としての可能性[2),10),13)]について検討を加えた。化学伝達物質としての可能性を考える場合、タウリン自体は勿論、その産生酵素系の機能的な局在(特に灰白質部における局在)が証明されなければならない。従ってタウリン及びその合成酵素の1つであるcysteine sulfinate decarboxylase (CSD: EC 4.1.1.29)の微量定量法を開発し、ラット中枢神経系における部位的分布(regional distribution)及び微細分布(microdistribution)について検討した。特に、脊髄[9),12)]及び視床[15)]においては、アミノ酸系化学伝達候補物質の中でも最有力視されているγ-aminobutyric acid (GABA)の機能的局在が証明されているので、GABAと比較検討する目的で、ラットの脊髄及び視床におけるタウリンの微細分布について検討を加えた。更に、我々は既にmorphineの鎮痛作用と、GABA系との関連性について報告しているので[14)-16)]、タウリンについても同様な観点から若干の検討を加えた。

実験方法:

タウリンの定量にはDowex 50W × 8樹脂(200-400 mesh, H^+型)を直径6 mmのカラムに120 mmの高さで充填し、用時4N HClでH^+型に変換し、水で充分洗浄ののち試料を載せ、水で溶出した。溶出液の1.6-2.2mlの分画を「タウリン分画」として蒸発乾固させ、20μlの0.5Mホウ酸緩衝液(pH 9.5)に溶解後、10μlのフルオレスカミン(w/v, アセトン溶液)を加えて螢光を測定した(λex = 390mμ, λem = 470 mμ)。CSD活性測定は特別に作製したmicro-incubation vesselを用いて行ない、反応液は全量70μl中に140mM phosphate buffer (pH 7.2),

50mM L-cysteine sulfinate, 1.65mM AET, 0.144mM pyridoxal phosphate, 0.11% Triton X-100, 0.05μCi DL-[1-^{14}C]-cysteine sulfinate (11mCi/mmole) を含むものを用いた。生成した $^{14}CO_2$ をハイアミン塩基でトラップし、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した[17]。

組織試料の作成は既報の方法[8]に準じて行ない、脊髄については厚さ480μm及び800μmの切片を更に500 × 500μmに細断し、視床については、320μmの切片を750 × 750μmに細断した各ブロックを定量に供した。ラット脳の部位的分別はGlowinski & Iversenの方法[4]に準じて行ない、GABAの測定はGraham & Aprisonの方法[5]、GABA合成酵素である1-glutamate decarboxylase (GAD: EC 4.1.1.15) 活性の測定はKimura & Kuriyamaの方法[7]により行なった。

結果及び考察：

ラット全脳のextractを^{14}C-タウリンと共にカラムに通用して溶出液を0.1 mlずつ集めると、void volumeである10番前後と、18～20番に螢光のピークが認められた(Fig.1 A)。後者のピークは^{14}C-タウリンのカウントのピークと一致したので、16～22番の分画を「タウリン分画」とした。またこのタウリン分画は高圧沪紙電気泳動装置で泳動しても単一のスポットを示し、このタウリン分画に存在するフルオレスカミン陽性物質は、タウリンのみであると考えられる。更に、^{14}C-タウリンのこのタウリン分画への回収率はほぼ100%であった。この方法により検量線を作成すると、25-1000pmolesのタウリンに螢光の直線性が認められた(Fig.1 B)。次いで、CSD活性の微量定量法については、Fig.2 Aに示す様に、嫌気的条件下で反応を行なうと好気的条件下よりも生成する$^{14}CO_2$量も多く、またその生成量は120分迄、反応時間と共に増加する事が認められた。この様な嫌気的条件下では、ラット全脳ホモジネートの場合、5μg蛋白量中のCSD活性を正確に測定する事が可能であった(Fig.2 B)。

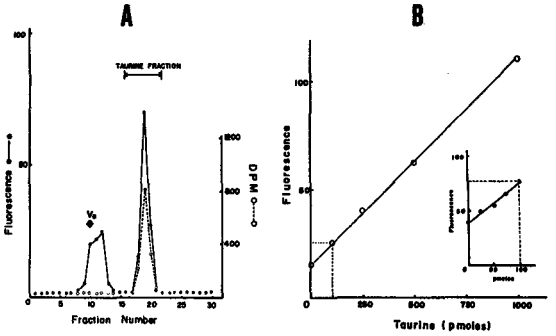


Fig.1 (A) Elution pattern of rat brain extract in column chromatography
(B) Standard curve for taurine determination

これらの微量定量法を用いて、ラット脳のタウリンの部位的な含量をGABAと比較してみると(Table 1)、タウリン、GABA、共に不均一な分布状態を示し、タウリンは、嗅球、大脳皮質、線条体、海馬に高い値を示すのに対して、GABAは視床下部、嗅球、中脳に高い含量を示した。

次に、灰白質部における局在を検討する目的で、脊髄を用いてタウリンの微細分布を測定した。GABAについては不均一な分布が見られ[12]、灰白質部、特に後角後部に高い含

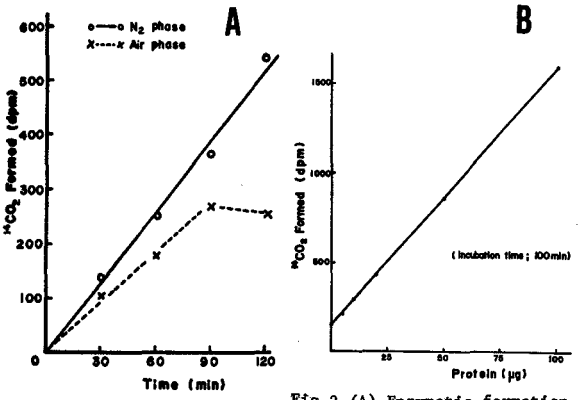


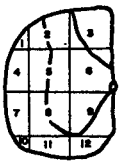
Fig.2 (A) Enzymatic formation of $^{14}CO_2$ from DL-[1-^{14}C]-cysteine sulfinate (B) Relationship between CSD activity and enzyme preparation (rat brain homogenate) added to the assay system

量が認められた。一方、タウリンについては脊髄全体に均一に分布しており、特に灰白質部に高い含量を示す場所の存在は認められなかった(Fig.3)。更に、CSD活性及びGAD活性についても脊髄を用いて同様の検索を行なったところ、両酵素活性共に不均一な分布が見られ、後角後部に高い活性が認められた(Fig.4)。すなわち、脊髄においては、GABA含量とGAD活性の分布は相関性を示すのに対して、タウリン含量とCSD活性の分布は一致しない事が認められた。

Table1 Regional distribution of GABA and taurine in rat CNS.

	OB	CX	ST	HPC	MB	HT	MP	CB	SC
	(μmoles/g wet wt.)								
GABA (5)	3.60 ±0.17	1.94 ±0.13	3.21 ±0.25	2.26 ±0.27	3.61 ±0.27	4.61 ±0.48	1.87 ±0.22	1.39 ±0.11	0.98 ±0.16
TAURINE(4)	9.51 ±0.26	7.18 ±0.45	9.07 ±0.47	6.50 ±0.08	3.30 ±0.27	3.74 ±0.60	2.34 ±0.05	5.55 ±0.48	1.70 ±0.18

Abbreviations used are: OB, olfactory bulb; CX, cortex; ST, striatum; HPC, hippocampus; MB, midbrain; HT, hypothalamus; MP, medulla & pons; CB, cerebellum; SC, spinal cord.

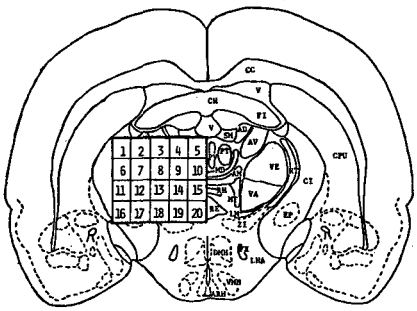


No.	GABA (5)	TAURINE (4)
1	0.41 ± 0.15	2.44 ± 0.27
2	1.77 ± 0.30	2.28 ± 0.30
3	0.98 ± 0.13	2.18 ± 0.15
4	0.83 ± 0.29	1.81 ± 0.29
5	1.13 ± 0.26	1.99 ± 0.15
6	1.02 ± 0.42	1.96 ± 0.34
7	0.44 ± 0.25	1.81 ± 0.37
8	0.45 ± 0.19	2.27 ± 0.21
9	0.67 ± 0.20	2.02 ± 0.29
10	0.46 ± 0.30	2.14 ± 0.69
11	0.32 ± 0.13	1.49 ± 0.27
12	0.08 ± 0.08	1.32 ± 0.21

(nmoles/mm³)

Fig.3 Distribution of GABA and taurine in rat spinal cord (L_2-L_3)

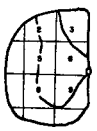
視床におけるタウリンとCSD活性の微細分布を、de Groot の interaural line[3] から5.4 mm 前方部(A5.4)の切片を用いて検討したところ(Figs.5, 6)、脊髄の場合と同様に均一な分布状態を示し、特に高い含量及び活性を示す場所を検出することは出来なかった。一方、GABAについては既報[15]の通り、脚内核(EP)、再会核(RE)、腹側核外腹側部(VM)に一致して高い含量が認められた(Fig.5)。またGAD活性はGABAと同様に、EP, RE, VMの近傍に高い活性を示す場所が認められた(Fig.6)。



No.	GABA (9)	TAURINE (8)	No.	GABA (9)	TAURINE (8)
1	1.51 ± 0.09	4.95 ± 0.65	11	1.98 ± 0.30	4.66 ± 0.54
2	1.40 ± 0.22	4.95 ± 0.54	12	1.47 ± 0.24	4.76 ± 0.41
3	1.45 ± 0.22	4.88 ± 0.40	13	1.51 ± 0.11	4.84 ± 0.64
4	1.57 ± 0.22	4.85 ± 0.65	14	1.48 ± 0.22	4.44 ± 0.48
5	1.73 ± 0.31	4.57 ± 0.22	15	2.11 ± 0.24	4.39 ± 0.36
6	1.87 ± 0.43	4.50 ± 0.36	16	3.49 ± 0.42	4.78 ± 0.34
7	1.57 ± 0.18	4.41 ± 0.43	17	2.44 ± 0.16	4.12 ± 0.29
8	1.38 ± 0.21	4.50 ± 0.52	18	2.05 ± 0.12	4.22 ± 0.69
9	1.72 ± 0.17	4.37 ± 0.50	19	2.39 ± 0.18	4.72 ± 0.76
10	2.42 ± 0.22	4.71 ± 0.86	20	2.93 ± 0.24	4.27 ± 0.80

(nmoles/mm³)

Fig. 5 Distributions of GABA and taurine in rat thalamus (A 5.4)

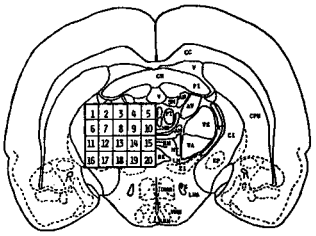


No.	GAD (9) ψm	GAD (9) ψm³	CSD (8) ψm	CSD (8) ψm³
2	107.6 ± 7.2	15.3 ± 0.8	99.6 ± 25.5	26.1 ± 6.2
3	75.6 ± 15.0	13.2 ± 2.7	130.8 ± 42.3	33.8 ± 5.8
5	57.0 ± 13.1	9.2 ± 2.2	69.8 ± 24.4	13.6 ± 6.9
6	107.9 ± 18.2	18.4 ± 0.8	82.4 ± 22.9	19.7 ± 5.6
8	23.5 ± 9.9	4.8 ± 1.3	29.4 ± 13.6	6.5 ± 2.4
9	41.3 ± 10.7	5.9 ± 1.4	11.6 ± 6.8	2.8 ± 1.9

Fig.4 Comparison of the distribution profiles of GAD and CSD activities in rat spinal cord (L_2-L_3)
U: nmoles of $^{14}CO_2$ formed / hr

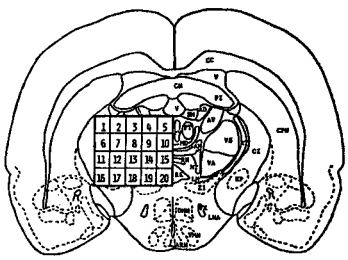
上記の結果から、タウリンは脊髄及び視床において均一に分布しており、少なくともこれらの神経組織において、化学伝達物質として作働している可能性は少ないのではないかと思われる。しかしながら最近、ラット小脳[10]及びネコ網膜[11]等においてタウリンの特異的な局在が証明されており、それらの結果を考慮すると、タウリンは中枢神経内の部位により、異なった微細分布と機能を持つ可能性が考えられる。また、脊髄においてはタウリンの分布と

CSD 活性の分布は一致しなかったが、これは、タウリン生合成経路の複雑さ[6]を考えると当然の結果と言えるかもしれない。事実、ラット胎児の脳中タウリン含量は発育に伴って減少するにもかかわらず、CSD 活性は増加することが報告されている[1]。最後に、痛覚伝導路の二次ニューロンが終る部位とされる視床について morphine 30mg/kg, i.p. 投与の影響を検討したが、GABA に対する効果とは異なり、タウリンの分布には著明な変化は認められなかった(Fig.7)。従って、アミノ酸系化学伝達物質の中でも GABA は morphine の鎮痛作用に何らかの形で関与している可能性があるのに対し、タウリンは少なくとも視床において morphine の鎮痛作用には関係していない様に思われる。



No.	GAD (6)	CSD (4)
1	—	184.5 ± 85.9 / 27.5 ± 10.5
2	—	198.7 ± 85.1 / 26.3 ± 11.3
3	—	185.1 ± 59.2 / 25.3 ± 8.3
4	184.9 ± 56.7 / 14.2 ± 2.6	126.3 ± 42.4 / 17.5 ± 3.3
5	122.5 ± 11.8 / 12.8 ± 4.0	120.4 ± 33.1 / 19.2 ± 5.0
6	127.2 ± 32.6 / 15.2 ± 10.6	128.6 ± 33.0 / 24.8 ± 7.7
7	183.1 ± 62.4 / 35.4 ± 10.0	161.1 ± 31.3 / 25.6 ± 2.5
8	68.3 ± 7.7 / 8.6 ± 0.4	125.0 ± 51.9 / 23.6 ± 9.9
9	141.4 ± 42.5 / 14.8 ± 4.4	139.1 ± 33.0 / 25.9 ± 7.7
10	109.6 ± 13.7 / 13.8 ± 9.0	185.7 ± 40.9 / 32.9 ± 9.6
11	173.0 ± 61.7 / 32.0 ± 15.0	138.5 ± 28.7 / 28.0 ± 6.4
12	137.5 ± 31.7 / 46.4 ± 19.6	125.6 ± 25.4 / 21.6 ± 6.2
13	146.7 ± 21.0 / 18.2 ± 8.0	90.4 ± 21.8 / 17.6 ± 5.0
14	146.9 ± 8.6 / 24.0 ± 2.6	141.1 ± 30.1 / 25.0 ± 5.5
15	185.3 ± 26.3 / 27.8 ± 13.2	138.6 ± 28.9 / 25.0 ± 5.9
16	235.1 ± 45.1 / 24.0 ± 5.6	194.8 ± 59.5 / 27.4 ± 7.9
17	260.3 ± 35.3 / 34.2 ± 7.4	191.8 ± 48.8 / 32.7 ± 9.7
18	205.0 ± 25.9 / 28.6 ± 5.6	185.5 ± 59.9 / 23.6 ± 11.6
19	180.5 ± 23.7 / 24.8 ± 5.8	158.4 ± 47.0 / 28.9 ± 6.9
20	239.6 ± 29.3 / 34.8 ± 7.8	125.9 ± 48.6 / 24.0 ± 10.1

Fig.6 Comparison of the distribution profiles of GAD and CSD activities in rat thalamus (A5.4)
U: nmoles of $^{14}CO_2$ formed / hr



No.	GABA Saline (9)	GABA Morphine (6)	TAURINE Saline (7)	TAURINE Morphine (6)
1	1.51 ± 0.09	2.06 ± 0.20	4.84 ± 0.46	5.25 ± 0.42
2	1.40 ± 0.22	1.97 ± 0.22	5.07 ± 0.61	4.94 ± 0.99
3	1.45 ± 0.22	1.75 ± 0.20	5.08 ± 0.61	4.22 ± 0.68
4	1.57 ± 0.22	2.22 ± 0.24	5.08 ± 0.71	4.67 ± 0.47
5	1.73 ± 0.31	2.47 ± 0.42	4.46 ± 0.23	4.44 ± 0.48
6	1.87 ± 0.43	1.98 ± 0.18	4.37 ± 0.39	4.76 ± 0.56
7	1.57 ± 0.18	2.52 ± 0.59	4.42 ± 0.49	4.66 ± 0.72
8	1.38 ± 0.21	1.88 ± 0.13	4.47 ± 0.57	4.52 ± 0.60
9	1.72 ± 0.17	2.47 ± 0.36	4.35 ± 0.55	4.72 ± 0.43
10	2.42 ± 0.22	2.94 ± 0.41	4.16 ± 0.36	4.31 ± 0.28
11	1.98 ± 0.30	2.75 ± 0.28	4.66 ± 0.54	4.53 ± 0.64
12	1.47 ± 0.24	2.28 ± 0.52	4.53 ± 0.37	4.41 ± 0.70
13	1.51 ± 0.11	2.41 ± 0.15	4.25 ± 0.31	4.04 ± 0.28
14	1.48 ± 0.22	2.70 ± 0.32	4.41 ± 0.56	4.28 ± 0.58
15	2.11 ± 0.24	2.64 ± 0.94	4.59 ± 0.43	4.70 ± 0.65
16	3.49 ± 0.42	7.36 ± 0.61 #	4.50 ± 0.22	5.02 ± 0.41
17	2.44 ± 0.16	5.60 ± 0.52 #	4.08 ± 0.42	4.70 ± 0.38
18	2.05 ± 0.12	4.77 ± 0.51 **	4.25 ± 0.79	4.56 ± 0.35
19	2.39 ± 0.18	4.22 ± 0.59 **	5.09 ± 0.77	4.21 ± 0.60
20	2.93 ± 0.24	4.94 ± 0.60 **	4.53 ± 0.88	4.56 ± 0.92

(nmole$/mg m^3$)

Fig.7 Effect of morphine administration on GABA and taurine contents in rat thalamus (A5.4) ** P<0.02, # P<0.01, compared with respective saline values.

References

1) Agrawal, H.C., Davison, A.N. and Kaczmarek, L.K.: Biochem. J., 122, 759 (1971)
2) Davison, A.N. and Kaczmarek, L.K.: Nature, 234, 107 (1971)
3) De Groot, J.: Verh. Kon. Ned. akad. wetensch. Afd. natuurk. Tweeke Reeks, 2, 1 (1959)
4) Glowinski, J. and Iversen, L.L.: J. Neurochem., 13, 655 (1966)
5) Graham, L.T.Jr. and Aprison, M.H.: Analyt. Biochem., 15, 487 (1966)
6) Jacobsen, J.G. and Smith, L.H.Jr.: Physiol. Rev., 48, 424 (1968)
7) Kimura, H. and Kuriyama, K.: Japan. J. Pharmacol., 25, 189 (1975)
8) Kimura, H. and Kuriyama, K.: J. Neurochem., 24, 903 (1975)
9) Kuriyama, K., Yoneda, Y. and Kurihara, E.: Taurine in Neurological Disorders, Raven Press, New York, in press.
10) Nadi, N.S., McBride, W.J. and Aprison, M.H.: J. Neurochem., 28, 453 (1977)
11) Orr, H.T., Cohen, A.I. and Lowry, O.H.: J. Neurochem., 26, 609 (1976)
12) Otsuka, M. and Konishi, S.: GABA in Nervous System Function, Raven Press, New York, pp.197 (1976)
13) Pasantes-Morales, H., Urban, P.F., Klethi, J. and Mandel, P.: Brain Res., 51, 375 (1973)
14) Yoneda, Y., Takashima, S. and Kuriyama, K.: Biochem. Pharmacol., 25, 2669 (1976)
15) Yoneda, Y., Kuriyama, K. and Kurihara, E.: Brain Res., 124, 373 (1977)
16) Yoneda, Y. and Kuriyama, K.: Shinkeikagaku, 15, 224 (1976)
17) Yoneda, Y., Takashima, S., Hirai, K., Kurihara, E., Yukawa, Y., Tokunaga, H. and Kuriyama, K.: Japan. J. Pharmacol., in press.

74 小脳の生化学的研究：小脳ミュータント及び分離した分子層，顆粒層の生化学的研究

御子柴克彦 （慶大・医・生理）
J.-P. Changeux （パスツール研究所）

〔要 約〕

小脳は構成細胞種も少なく，細胞構築は比較的層構造も明確な為，脳の生化学的研究の材料に好適である。我々は新鮮牛小脳より凍結せずに分子層，顆粒層，白質を分離することに成功した。DNAは顆粒層が他層に比して10倍多かったがRNAはそれ程著明な差はなかった。Acetylcholinesteraseは顆粒層に活性が高くまたtrue Acetylcholinesteraseの全活性に対する割合も高く，Mossy fiber中にcholinergic fiberがある可能性が示唆された。小脳mutantのwv, sg, nl, nr, pcdのcontrolに対するAcetylcholinesteraseの活性比と，Choline Acetyltransferaseの活性比とに差がみられた。顆粒細胞の消失あるいは減少しているwvやsgの小脳では他の遊離アミノ酸に比べて，グルタミン酸濃度がcontrolの半分に減少していた。Total homogenateでの分子層へのグルタミン酸の取り込みは顆粒層の約10倍近く高かった。小脳でグルタミン酸とGABAの取り込み後のsucrose density gradientのパターンを比較した所，main peakに著明な差がみられwvとcontrolでグルタミン酸／GABA比を比較した所，両者に明らかな差が得られた。以上の結果より顆粒細胞のneurotransmitterはグルタミン酸である可能性及びparallel fiber（顆粒細胞の軸索で分子層中に存在）の分離の可能性が示唆された。

小脳は数種の細胞からのみ構成されており[1]しかも各細胞間の連絡は電気生理学的に明らかにされている[2]。Inputはmossy fiberとclimbing fiberの二種でoutputはプルキンエ細胞の軸索のみであり，まことに非常に明確な層構造を形成している。凍結せずに新鮮牛小脳より分離した分子層，顆粒層及びマウスの小脳mutantより得られた生化学的特徴につき報告する。

［実験材料及び方法］

と殺場にて得た新鮮牛小脳をすみやかに氷冷し，切片を作製，凍結せずに10^{-4}M PMSF (protease inhibitor) 2% sodium azideを含む0.32M Sucrose中で実体顕微鏡下にて，分子層，顆粒層，白質の三層を分離した。プルキンエ細胞は分子層についたままはくりされる。酵素活性測定の為には各分離された層はドライアイスで急冷後，液体N$_2$中で保存した。小脳mutantマウスはパスツール研究所で飼育されているものを使用し，断頭後すみやかに小脳を秤量し液体N$_2$中に保存した。小脳，特に顆粒層にはglomerulusというheterogeneousなエナプスがある為[3]なるべく破壊しない様にテフロンがラスホモゲナイザーを用いて手で50回上下し，mildにhomogenizeした[15]。アミノ酸の取り込みは10^{-5}Mの^{14}C-GABA, ^{3}H-L-glutamate存在下でKrebs Ringer Tris-HCl (pH 7.4)存在下で行った。Acetylcholinesterase (AChE)活性はEllmanの方法[4]に従い，non specific activityを除く為，Mipafox 10^{-4}Mを用いた[5]。Cholineacetyl transferase (ChAT)はFonnumの方法[6]を改変したRossierの方法[7]に従った。

［結果及び検討］

分離した牛脳分子層，顆粒層，白質のDNA，RNA並びにAChE活性を表1に示した。

顆粒層はDNAが他層よりも10倍近く多く形態学的に顆粒細胞が密集している所見と一致した。AChEは顆粒層が他層よりも活性が高くまたtotal AChEに対するtrue AChEの割合も高かったことから、小脳のinputの一つであるmossy fiber中にcholinergic fiberがあり顆粒細胞のdendriteとシナプスを作っている可能性が示唆された。AChE活性はmutantの値をcontrolと比較すると、比活性でsg, rl, PCD, nrいずれでも活性が高かったが、顆粒細胞が完全に欠損しているwvでは活性比は1であり、かつ小脳当りでみるとcontrolに比し、活性が小脳mutant中一番低かった。ChATはいずれのmutantでも比活性がcontrolより高くAChEと差を示した。ChATはpresynaptic sideの酵素であるが、wv, sg mutantは小脳当りの活性は他のmutantより低いのは、targetである顆粒細胞欠損によるretrograde degenerationによるものと考えられる。wvはsgに比して更に活性は低いが、wvでは顆粒細胞がmigration以前に消失する為、シナプス形成出来ず変性するのに対し、sgではmigrateし一旦顆粒細胞とシナプス形成した後に変性する為、変性の割合がwv程激しくおきない為と考えられる。

各mutantのアミノ酸分析結果(表4)より特にグルタミン酸が著減していることが知られた[8]。sg, rlいずれも顆粒細胞が減少しており、wvは顆粒細胞が完全に欠損していることより[9-12]グルタミン酸が顆粒細胞のneurotransmitterである可能性が考えられる。分離した各層でグルタミン酸とGABAのuptakeをみるとMLが他層に比して高かった(図1)。グルタミン酸の濃度はML, GLでほとんど同じであるが、^{63}Hのuptakeでこの様な差がみられたのはGL中の顆粒細胞体は、ホモゲナイズする事により破壊され、ML中のparallel fiber(顆粒細胞のaxon)のみreseal後uptake活性をもったものと考えられる。crude mitochondria分画に^{14}C-GABA, ^{3}H-glutamateをuptakeさせた後、Ficoll gradientでdistribution patternを調べてみると、GABAの取り込みは20% Ficoll濃度あたりにmaximal peakがみられるがglutamateはより低濃度の部分にpeakがみられた。これはgranule cellのparallel fiberはnon-myelinated

表1 a) DNA, RNA and Protein Content of Molecular & Granular L.

	DNA (mg tissue)	RNA (μg tissue)	Protein (mg/g wet weight)
ML	0.578±0.179	1.692±0.468	70.62±1.69
GL	5.135±1.232	3.578±0.245	80.28±4.80
WM	0.390±0.145	0.284±0.064	89.27±3.95

b) Acetylcholinesterase activity of the Isolated Layers. (μ moles/min/g wet weight)

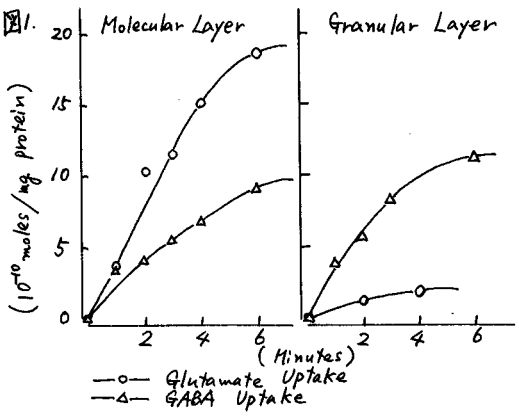
	No inhibitor	10^{-4}M Mipafox	% inhibition (by Mipafox)
ML	1.782±0.505	0.905±0.320	49.2
GL	7.665±2.168	6.768±0.850	11.7
WM	1.664±0.605	—	—

表2. Acetylcholinesterase of cerebellum of mutants

	age (days)	number of animals	Specific Activity μmole/min/wet w.	Specific activity % of control	Total Activity nmol/min/cerebellum	total activity
wv	23	6	4.2±0.6	102	54±17	35
Cont.	23	7	4.1±0.3	100	168±22	100
sg	23	7	10.0±1.2	233	88±13	50
Cont	22	4	4.3±0.2	100	176±16	100
nr	63	4	5.4±0.3	138	180±16	88
Cont	88	6	3.9±0.2	100	205±26	100
rl	43	6	7.0±1.6	167	147±30	68
Cont	44	7	4.2±0.2	100	216±20	100

(注) DNAはBurtonの方法に従い2'deoxyadenosineをstandardに用い、RNAはMejbaumの方法に従いyeast RNAをstandardに用いた。

図1.



axonであるが、fiber構造の為、いわゆるシナプトソームとは分布が異なる為ではないかと推定される。又 sucrose gradient でも同様の結果が得られているが、wv mutant の小脳で P_2 分画を得て sucrose density gradient pattern を調べた所、agranular の小脳と、control で glutamate と GABA の ratio のパターンに著明な差がみられた(図2)

これらの事実は parallel fiber が glutamate を neurotransmitter としている可能性を裏づけるものと考える。現在各 mutant の homogenate を使って glutamate, GABA 等につき、uptake を検討中である。

又、Ficoll gradient と sucrose gradient を組み合わせて、顆粒細胞の non-myelinated axon の分離を検討中である。

図2.

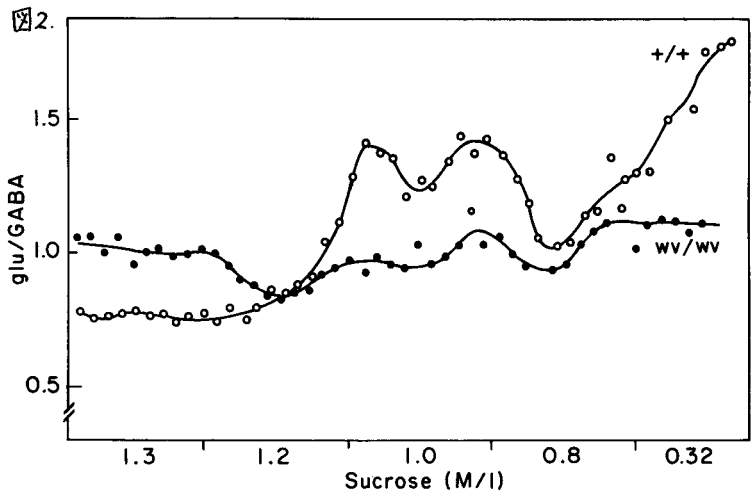


表3. Choline acetyltransferase of cerebellum of mutants

	age (days)	no. of animals	specific activity p mole/min/mg wet w.	specific activity % control	total activity p mole/min/cerebellum	total activity % control
wv	23	6	16.5±2.4	142	213±34	50
Cont	23	6	11.6±3.1	100	428±87	100
sg	22	6	34.0±4.4	276	320±51	59
cont.	23	7	12.3±1.6	100	539±106	100
nr	63	4	17.9±1.1	185	591±50	96
Cont	88	6	9.7±2.1	100	618±60	100
rl	43	6	25.4±6.0	213	534±122	86
cont	43	7	11.9±0.8	100	620±119	100
PCD	300	4	17.7±2.1	175	479±23	94
Cont	300	4	10.1±0.6	100	511±12	100

wv: weaver
sg: staggerer
rl: reeler
nr: nervous
pcd: Purkinje cell degeneration

(追) これらのデータの一部は国際生理学会(1977)及び国際神経化学会(1977)に於て発表した。

表 4

	Weaver (8, 4) 21 days	control (6, 8) 21 days	staggerer (6, 3) 20 days	control (3, 6) 20 days	Nervous (4, 5) 45 days	control (5, 10) 50 days
Phosphoserine	0.39±0.06	0.30±0.11	0.43±0.25	0.29±0.10	0.30±0.08	0.22±0.05
Phosphoglycero-ethanolamine	0.14±0.07	0.15±0.04	0.36±0.12	0.19±0.12	0.20±0.03	0.21±0.09
Phosphoethanol-amine	0.39±0.11	0.45±0.11	0.73±0.18	0.74±0.18	0.61±0.05	0.63±0.13
Taurine	9.87±1.00	9.17±2.26	9.21±0.81	11.31±2.01	7.90±0.57	7.19±0.67
Aspartate	1.75±0.17	1.82±0.32	1.59±0.29	2.10±0.60	1.98±0.24	2.18±0.71
Glutamate	3.70±0.37	6.76±1.16^{+}	3.30±0.23	7.58±1.51^{+}	7.25±1.52	7.54±2.21
Glycine	1.61±0.35	0.94±0.22$^{\#}$	2.42±0.61	1.08±0.44^{+}	1.36±0.24	0.85±0.28
Alanine	0.56±0.10	0.96±0.32$^{\#}$	1.09±0.43	0.83±0.03	1.00±0.07	0.84±0.23

Data are given in μ moles/g wet tissue weight. Numbers in the parentheses represent the number of animals used and the number of amino acids analysis performed. Statistically significant differences between values for normal and mutant animals are as follows: $^{+}p<0.005$ $^{\#}p<0.02$ $\#p<0.05$

[References]

1. Palay, S., and Chan-Palay, V. Cerebellar Cortex, Cytology and Organization, Springer, Berlin 1973
2. Eccles, J.C., Ito, M. and Szentágothai, J. The cerebellum as a neuronal machine, Springer Berlin 1967
3. Wilson, J.E. Wilkin, G.P. and Balazs, R. (1976) J. Neurochemistry 26 957-965
4. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Anders, V., Robert, Jr. and Featherstone, R.M. (1961) 7 88-95
5. Koelle, G.B. "Cholinesterase and anticholinesterase agent" in "Handbuch der experimentellen pharmacologie XV" Springer-Verlag, Berlin (1963)
6. Fonnum, F. (1966) Biochem. J. 100 479-484
7. Rossier, J. Bauman, A. & Benda, P. FEBS Letters (1973) 32 231-234
8. Nadi, N.S., McBride, W.J. and Aprison, M.H. (1977) J. Neurochem. 28 453-455
9. Sidman, R.L. Cell interactions in developing mammalian central nervous system "Cell interactions" North-Holland Publ., Amsterdam. 1972 1-13
10. Sidman, R.L. Green, M.C. and Appel, S.H. Catalog of the Neurological Mutants of the Mouse, Harvard University Press, Cambridge Mass 1965
11. Sotelo, C. (1974) Brain Res. 94 19-44
12. Sotelo, C and Changeux, J.P. (1974) Brain Res 32 484-491
13. Nadi, N.S, McBride, W.J. and Aprison, M.H. (1977) J. Neurochem. 28 453-455
14. Berger, S.J. Carter, J.G. and Lowry, O.H. (1977) J. Neurochem. 28 149-158
15. Mikoshiba, K. & Changeux, J.-P. Brain Research in press

75 Hexamethonium (C_6) 耐性の形成に伴う神経化学的変化について

村松　信・垣田清人・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

〔要　約〕

節遮断薬の連続投与による耐性形成の発現機構を神経化学的に追求し，次の結論を得た。(1) hexamethonium (C_6) の連続投与により7日目には降圧作用は著しく減弱し，耐性形成が認められた。mecamylamine (Mec) にはこの様な耐性形成能は認められなかった。(2) 上頸神経節 (SCG) の tyrosine hydroxylase (T-OH) および adenylate cyclase (A.c) の活性上昇が C_6 連続投与3日目に認められたのに対し，Mec の連続投与時には3日目に T-OH，7日目に A.c に著しい活性低下が認められた。自律神経中枢の存在する視床下部および末梢平滑筋（腸間膜血管，輸精管）においては，これらの酵素活性に著変は認められなかった。(3) C_6 および Mec の連続投与は，SCG による ^{14}C-ACh および ^{3}H-NE の取り込みに対し著変を与えなかった。(4) C_6 連続投与の初期には，SCG からの ^{14}ACh，^{3}H-NE の spontaneous release および 60 mM KCl による放出増加の抑制が見られたが，耐性形成と共にこれらの効果は減弱した。(5) C_6 連続投与の初期には，Epinephrine (0.1 mM) 添加による SCG 内の cyclic AMP 含量の増加は低下の傾向を示したが，耐性形成と共にこの効果は減弱した。以上の結果より，節遮断薬により節遮断効果がみられる条件下では Nicotinic receptor レベルにおける ACh 作用遮断の外に① 節後ニューロンにおける T-OH および A.c の活性低下 ② ACh および NE の放出抑制などの変化を伴うが，これらの節遮断作用に伴う神経化学的変化の消失が C_6 耐性発生の主因をなすのではないかと考えられる。

薬物耐性発現機序を論ずる場合，生体内の薬物代謝能の亢進に起因するいわゆる代謝耐性と，その薬物の作用点あるいは作用機構における機能変化に基づく機能耐性のいずれが主役をなすかがまず問題となる。今回我々はラットに節遮断薬の連続投与を行なった場合，降圧作用に耐性を生じ易かった C_6 と耐性を生じ難かった Mec を選び，C_6 耐性の発現機序について自律神経節，自律神経中枢および末梢平滑筋における神経伝達物質関連酵素の活性変化，SCG を用いてのシナプス伝達機構の機能変化の重要な指標と考えられている神経伝達物質の放出，取り込みおよび SCG の生体アミンレセプターと末梢平滑筋に於ける感受性の変化の諸点から検討を加えた。

〈実験方法〉

実験には Wistar 系雄性ラット（体重150-230g）を使用し，血圧は pentobarbital 麻酔下頸動脈圧を圧トランスジューサーを介して記録した。末梢摘出平滑筋の収縮は Magnus 法により等張性収縮を煤煙紙上に記録した。<u>酵素活性の測定</u>　SCG および副腎はその homogenate を，脳の場合には Segal & Kuczenski の方法[6] により部位的分割を行なった組織の homogenate を，また末梢平滑筋は homogenize した後50,000 × g で 30 min 遠心しその上清を，それぞれ enzyme preparation とした。ChAc 活性は Fonnum の方法[1] に従い，T-OH 活性については SCG および副腎は Hendry らの方法[3] により，他は Hendry らの方法を batch 法に modify してそれぞれ測定を行なった。A.c 活性の測定は Krishna らの方法[4] によった。<u>^{14}C-ACh および ^{3}H-NE の放出の測定</u>　SCG および副腎を細片にして nylon mesh に包み，^{14}C-ACh の実験の場合には 4 μM の DFP を含み，^{3}H-NE の場合には 10 μM の pargyline HCl を含む Krebs-Ringer Tris-HCl buffer (pH 7.4) 液 1.0 ml 中で 37°C, 10 min preincubate した後，^{14}C-ACh (50

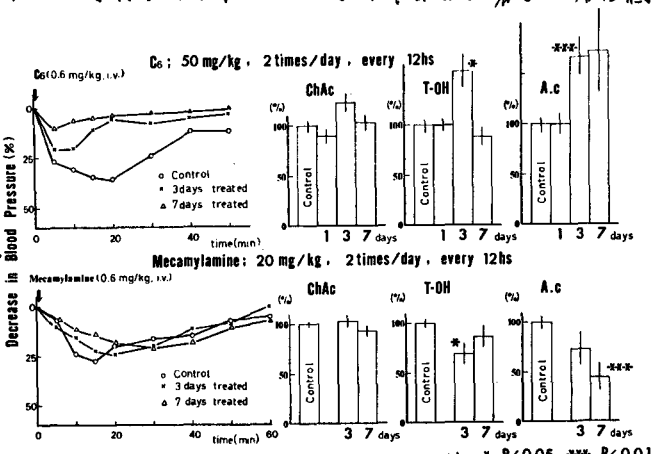
nmoles) および ^{3}H-NE (0.2 nmoles) を加えてそれぞれ60 min incubate を行なった。Krebs-Ringer Tris-HCl buffer 液で洗浄した後、再び2.0 ml Krebs-Ringer Tris-HCl buffer 液に2 min 間隔で移し、反応液中に放出された放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

^{14}C-ACh および ^{3}H-NE 取り込みの測定　上記の放出実験と同一の条件下で 60 min incubate した後放射能測定を行ない、組織内量と同一重量の反応液中に含まれる含有量との比により算出した。

Epinephrine 添加により誘発される cyclic AMP 量変化の検討　細片とした SCG を nylon mesh に包み、Krebs-Henseleit 液 (20mg/100ml の ascorbic acid を含み、pH 7.4) に入れ、O_2 95% + 5% CO_2 の気相下で 10 min preincubate した後、0.1 mM Epinephrine を加えて 3 min incubate した。6% TCA 添加により反応を停止した後、homogenize し、遠心により得られた上清から TCA を ether で除去し凍結乾燥した後、Gilman の方法[2] により cyclic AMP の定量を行なった。蛋白の定量は Lowry らの方法[5] によった。

〈実験結果および考按〉

C_6 50mg/kg を1日2回 12 hr毎に皮下投与していくと、7日目には C_6 の 0.6mg/kg 静脈内投与時にみられる降圧作用は著しく減弱し、明らかに C_6 に対する耐性形成がみられた。一方、Mec 20mg/kg を1日2回 12 hr毎に皮下投与し、7日目に Mec 0.6mg/kg を静脈内に投与しても無処置の場合と同様著しい降圧作用がみられ、耐性形成は認められなかった (Fig.1)。SCG の ChAc, T-OH および A.c 活性について C_6 連続投与の影響をみると、C_6 投与開始後3日目には T-OH および A.c ともに著しい活性上昇を示し、ChAc 活性にも上昇傾向がみられた (Fig.1)。Mec 連続投与の場合、ChAc 活性には変化はなかったが T-OH および A.c 活性とも低下を示し、特に T-OH では3日目に、A.c では7日目に著しい活性低下がみられた (Fig.1)。尚、この C_6 投与3日目にみられた T-OH 活性の上昇は蛋白合成阻害剤である cycloheximide (0.9mg/kg 1日1回3日間) の同時投与により完全に抑制されることから考えて、酵素誘導によるものと思われる。また、Mec 投与時にみられたこれら T-OH および A.c の活性低下は神経節の節前線維を切断した場合と同一傾向の変化であり、おそらく連続的節遮断に伴う典型的な節後ニューロン内の生化学的変化と考える。一方、自律神経中枢としての視床下部 (Table 1 A) のほか、青斑核、尾状核一被蓋、黒質および扁桃核、また末梢の腸管膜血管および輸精管においては (Table 1 B)、C_6 および Mec の連続投与による T-OH および ChAc 活性の変化を認めなかった。^{14}C-ACh と incubate することにより prelabel した SCG よりの ^{14}C-ACh の放出に対する C_6 連続投与の影響をみると、3日目に slow component の半減期 ($t_{1/2}$) における著しい延長がみられた。しかし7日目においてはこの $t_{1/2}$ の延長はほぼ対照のレベルにまで回復した。一方 Mec 3日間投与時にも、



(Calculated Per SCG)　* P<0.05, *** P<0.01

Fig.1 Effect of repeated administration of ganglionic blocking drugs on blood pressure and enzyme activities in rat SCG

C_6 3日間投与時と同様な $t_{1/2}$ の延長を示し、7日目においても延長の傾向がみられた (Table 1)。次に高濃度 (60mM) KCl 添加により誘発される ^{14}C-ACh の放出促進効果に対する C_6 連続投与の影響をみると、3日間投与後には SCG からの K^+ 依存性の放出促進が有意に抑制を受けたが、7日目には著変はみられなかった (Fig.2)。更に同一条件下で SCG からの ^{3}H-NE の放出に対する節遮断薬の影響をみると、spontaneous release に関しては ^{14}C-ACh の場合と同様な傾向であったが (Table 2)、高濃度 KCl 添加に対する著明な放出促進反応は認められず、また C_6 連続投与時にも一定の変化傾向を見い出すことはできなかった。尚、SCG による ^{14}C-ACh および ^{3}H-NE の取り込みに関しては、C_6 および Mec 投与時共に著変を認めなかった。

Epinephrine 誘発性の SCG 内 cyclic AMP 産生増加に対する節遮断薬連続投与の影響をみると、C_6 連続投与3日目において Epinephrine (0.1 mM) 添加による SCG 内の cyclic AMP 含量の増加は低下傾向を示したが、7日目においては対照のレベルにまで回復しており、また Mec 連続投与時には Epinephrine の刺激効果に著しい変化はみられなかった (Fig.3)。これらの結果は cyclic AMP 産生酵素である A.c の活性に対する C_6 および Mec 連続投与の影響、即ち C_6 連続投与の初期段階における A.c 活性の著しい上昇、Mec 投与による A.c 活性の低下と相反するものであり (Figs.1,3)，恐らく C_6 を連続投与した場合、初期の段階では Epinephrine に対する反応性の低下があり、その後漸次これが回復に向かうものであるが、一方 Mec 連続投与時には A.c 活性の低下に対応する代償性の Epinephrine receptor の感受性の増加があるのではないかと考えられる。未梢摘出平滑筋の薬物感受性に対する節遮断薬連続投与の影響については C_6 および Mec 連続投与3日目に摘出回腸の ACh に対する感受性は亢進の傾向を示し、7日目には有意に感受性上昇が認められた (Fig.4)。一方、摘出輸精管の NE に対する感受性は節遮断薬連続投与により変化しなかった。本実験条件下で耐性を生じた C_6 と耐性形成のみられなかった Mec が未梢平滑筋の薬物感受性に対し同一の影響を与えること

TABLE 1

Effect of repeated administration of ganglionic blocking drugs on activities of hypothalamic T-OH and peripheral muscular ChAc in rats

	(A) T-OH activity (pmoles/mg prot./hr)	(B) ChAc activity (μmoles/mg prot./hr)	
	Hypothalamus	Mesenteric Vessels	Vas Deferens
Control	52.2 ± 5.1	0.33 ± 0.09	0.54 ± 0.05
C_6 3 days	68.4 ± 8.4	0.12 ± 0.01	0.40 ± 0.05
C_6 7 days	59.0 ± 5.5	0.66 ± 0.30	0.62 ± 0.17
Mec 3 days	61.2 ± 4.8	0.24 ± 0.09	0.77 ± 0.22
Mec 7 days	57.4 ± 5.6	0.35 ± 0.08	0.86 ± 0.10

N = 2-10

TABLE 2

Effect of repeated administration of ganglionic blocking drugs on spontaneous release of ^{14}C-ACh and ^{3}H-NE from SCG

	$t_{1/2}$ rapid comp.	$t_{1/2}$ slow comp.
^{14}C-ACh Control	2.12 ± 0.08	19.2 ± 2.3
C_6 3 days	1.60 ± 0.11***	37.2 ± 5.5**
C_6 7 days	1.79 ± 0.18	24.7 ± 3.9
Mec 3 days	1.13	32.4
Mec 7 days	2.11	29.5
^{3}H-NE Control	2.12 ± 0.02	17.7 ± 0.9
C_6 3 days	2.84 ± 0.25	24.9 ± 4.2
C_6 7 days	2.12 ± 0.01	19.5 ± 1.4
Mec 3 days	2.32	16.4
Mec 7 days	2.30 ± 0.04	23.2 ± 4.4

N = 1-5, ** P < 0.02, *** P < 0.01

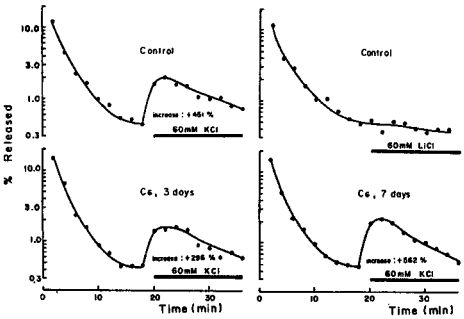


Fig.2 Effect of repeated administration of C_6 on K -induced release of ^{14}C-ACh from SCG

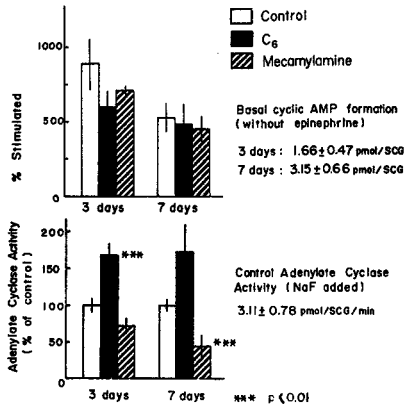


Fig.3 Alterations of stimulatory effect of Epinephrine on cyclic AMP formation in SCG following repeated administration of C_6 or mecamylamine

から考えて、末梢平滑筋レベルにおける薬物感受性の変化の面から耐性の発現機構を説明することは困難であると考えられる。

〔文献〕

1) Fonnum, F., J. Neurochem. 24 407 (1975)
2) Gilman, A.G., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67 305 (1970)
3) Hendry, I.A. and Iversen, L.L., Brain Res. 29 159 (1972)
4) Krishna, G., Weiss, B. and Brodie, B.B., J. Pharmacol. Exp. Ther. 163 379 (1968)
5) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193 265 (1951)
6) Segal, D.V. and Kuczenski, R., Brain Res. 68 261 (1974)

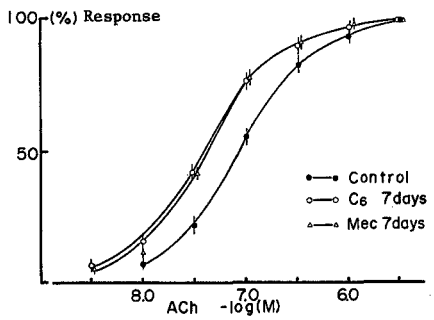


Fig.4 Effect of repeated administration of C_6 or mecamylamine on ACh sensitivity of rat ileum

76 脊椎動物の脳におけるLysineよりのPipecolic acid, Cadaverine, Piperidineの生合成

野村靖幸 (広大・医・薬)
Thomas Schmidt-Glenewinkel ・ Ezio Giacobini
(Connecticut大・精神神経薬理)

〔要 約〕

Nicotine様作用を有し、脳内に存在するPiperidineの生理的役割およびその脳内での由来を明らかにすることを目的に、脳を含むマウス諸器官およびニワトリ脳でのPiperidineのLysineよりの生合成をin vitroで検討し、つぎの成績を得た。

1) Lysineより発生するCO_2は、少くとも脳、腎においては、ほとんどが、α-keto-adipic acidよりGlutaryl CoAに至る酸化的脱炭酸による。

2) Lysineからの Piperidineの生合成は、pipecolic acidを経て起こる。これはマウス脳における唯一のpiperidine生合成経路であると考えられる。

3) Cadaverineは Lysineより生合成される。マウス脳でのLysineよりのCadaverine生合成は、今回初めて示された。ニワトリ胚は、孵卵初期(オ3～5日目)に高いLysineよりのCadaverine生合成活性を示す。

4) 腸内細菌は、Lysineより Cadaverine, Pipecolic acid, Piperidine を生合成する。Lysineよりの Piperidine 生合成の経路は、Pipecolic acid, Cadaverineを経るのでなく 5-Aminopentanal, Δ-Piperideineを経ると推定される。

近年、中枢神経系に見出される Piperidine (Pip)が、Cholinoceptive neuroneのシナプスに対しModulatorとして働くこと、脊椎、無脊椎の両動物において、睡眠や冬眠を調節する機序に関連することが示唆されている(5, 9)。

Pipまたは Pip核は、細菌や植物においてLysine代謝の中間産物として生ずる(1, 10)。一方、動物においては、Kaséら(6, 7, 8)は Pipが脳で Pipecolic acid (Pipac)より生合成されること、Nordenstrøm(11)や Dolezalovaら(4)は、L-Lysineおよび Cadaverine (Cad)より Pipが合成されることを示しているが、動物における Pipの生合成機序に関しては不明の点が多い。

Pipの脳における生理的役割およびその由来を明らかにすることを目的に、今回はL-Lysineより、Pip, Pipac, Cadの生合成について、脳を含む諸器官で検討した。

〈実験材料および方法〉

a) 実験動物：体重20～25gの雌雄の成熟マウス(C57/BL6)および各発育期におけるニワトリとその胚を使用した。

b) $^{14}CO_2$発生の測定：0.1μM Pyridoxal phosphate (PAL), 10μM Dithiothreitol (DTT)を含む0.06M Na-phosphate buffer (pH 7.4)で組織ホモジネートを調整し、0.35μCiのL-[U-^{14}C] Lysineまたは0.5μCiの D,L-[1-^{14}C] Lysine, D,L-[6-^{14}C] Lysineを添加、全量を0.5mlにし、200μlのHyamineを入れた小試験管をおいた反応バイアルは、ゴムキャップで密閉し、30分間、37.5°Cで Incubateした。2M $HClO_4$ 0.5 mlにて反応を停止後、さらに2時間、振盪し、Hyamineを含む小試験管を、10mlの Toluene scintillatorに移し、Radioactivityを測定した。

c) [³H]Pipac, [³H]Pip生合成の測定：0.1μM PAL, 10μM DTT, 300μM NADPを含む0.06M Na-Phosphate buffer (pH 7.4) で組織ホモジネートを調整し、10μCiのL-[³H] Lysine (最終濃度 0.55μM) を加え、全量1.0mlとし37.5°C下、1時間Incubateし、40μlの70% HClO₄で反応を停止した。この後、3.5ml Acetoneと Dinitrofluorobenzene (50μmole) を加え、弱アルカリ性下、55°Cで30分間、振盪反応した後、DNP-Pipは5ml Benzeneにて抽出し、水層はHCl酸性にした後、3mlのDiethyletherにて2回、DNP-Pipacを抽出した。両抽出液は、濃縮を蒸発後、Thin layer chromatographyにかけ、DNP-pipはBenzeneにて2回展開、DNP-Pipacは Methylenechloride - Acetic acid (100:1) にて3回展開し、DNP-pipおよびDNP-pipacに対応するzoneのRadioactivityをToluene scintillator中で測定した。

d) [³H] Cad生合成の測定：c)と同じ組織ホモジネート0.35mlに10μCi ³H-[L] Lysineを加え、37.5°Cにて1時間Incubateした後、40μlの2M HClO₄を添加・1,000g × 20min遠心し、上清60μlをSilicagel plateにかけ、0.1M Citrate buffer (pH 3.8) 中、20V/cmにて1時間50分、電気泳動し、³H-Cadに対応するzoneをかきとり、それに0.2M HClO₄ 500μlを加え、Seiler & Schmidt-Glenewinkel (13) の方法にてDansyl化し、Di-Dans-[H]Cadをつぎのように2次元クロマトした。1次元：Cyclohexane - Butylacetate (100:60) 1回。
2次元：Benzene - Methanol (90:10) 1回。

〈実験成績および考察〉

1) マウス諸器官での[¹⁴C]Lysineよりの¹⁴CO₂生成

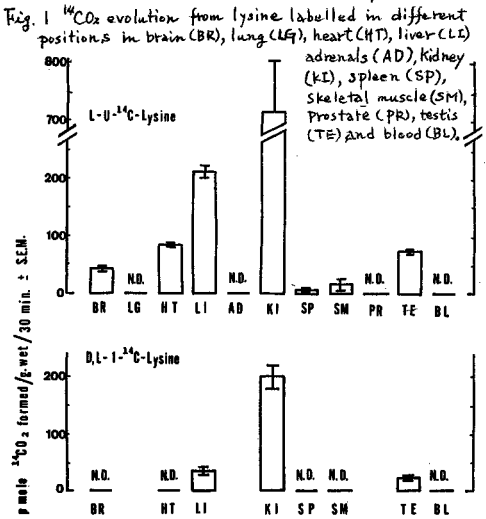


Fig. 1 ¹⁴CO₂ evolution from lysine labelled in different positions in brain (BR), lung (LG), heart (HT), liver (LI)

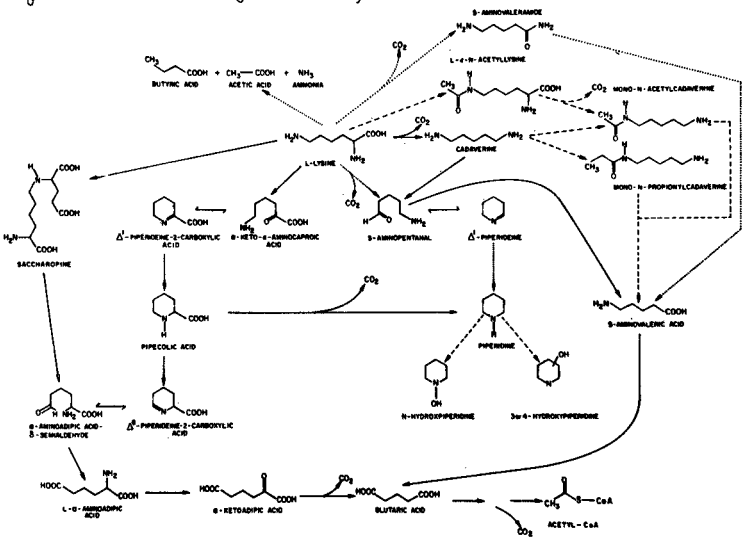
Lysineより、Cad, Pipの生成には脱炭酸が伴う。D,L-[1-¹⁴C]Lysineより¹⁴CO₂の生成は、腎、肝、睾丸、大腸において認められたが、脳、心では認められなかった (Fig. 1)。L-[U-¹⁴C]Lysineを基質とした場合、¹⁴CO₂は腎、ついで肝、大腸において多く発生した。大腸はよく洗浄されると¹⁴CO₂発生は認められず、またNeomycin, Bacitracin処置動物よりの大腸内容物では、¹⁴CO₂生成が、対照の47%に減少した。異なった位置の炭素がラベルされた3種のLysineよりの¹⁴CO₂発生を比較すると、¹⁴CO₂の大部分は、Lysineの1の位置の炭素に由来すると推定される。

2) L-[U-¹⁴C]Lysineよりの¹⁴CO₂発生に対する嫌気、α-Aminoadipic acid (α-AA) およびGlutamic acid (GA) の影響

嫌気下で反応させると、[¹⁴C]Lysineよりの¹⁴CO₂生成が、脳では対照より54%、腎では42%減少した。さらに、脳、腎において、0.1MのGA, 0.1Mのα-AAの添加は、

著るしく $^{14}CO_2$ の発生を抑制した。この成績は、[^{14}C] Lysineより生成した $^{14}CO_2$ のほとんどが、Lysineのα-ketoadipic acidを経るGlutaryl CoAへの酸化的脱炭酸によることを示唆する（Fig. 2）。

Fig. 2 Schematic diagram of lysine metabolism.



3) L-[^{3}H] Lysineより[^{3}H] Pipacの生成

Table Iの中3欄に示したように、Pipacの生成は、血液を除くすべての器官において認められた。Chang（3）は、ラット脳に、Lysineを脳室内投与すると、Pipacの生成することを報告しているが、我々はマウス脳におけるLysineよりのPipac生合成を確認した。脳においては、Lysineの代謝は、Saccharopineを経よいで、Pipacを経る（肝とは異なる）と推定される（Fig. 2参照）。

TABLE I : In Vitro Formation of Piperidine, Cadaverine and Pipecolic Acid from L-Lysine.

a: Amount of radioactive product formed expressed in pmoles/g tissue w.w./h (mean ± S.D.). b: Number of experiments. c: Percent radioactivity of precursor converted into product in the incubation mixture. *incubated under nitrogen. N.D. = not detectable.

Organ	Piperidine Formation			Cadaverine Formation			Pipecolic Acid Formation		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Brain	N.D.	8		1.7* ± 0.3	3	0.015	2.4 ± 0.6	10	0.23
Liver	N.D.	10		1.3* ± 0.2	3	0.01	2.3 ± 0.5	6	0.22
Heart	N.D.	5					0.7 ± 0.1	4	0.06
Kidney	N.D.	8		1.1* ± 0.1	3	0.01	5.9 ± 1.6	7	0.57
Blood	N.D.	5					N.D.	5	
Large Intestine	N.D.	14		0.24 ± 0.03	3	0.02	1.6 ± 0.8	12	0.15
Large Intestine with content pH 7.4				3.3* ± 0.5	3	0.03			
Large Intestine with content pH 6.0				3.8* ± 0.4	3	0.035			
Content of Large Intestine	6.4 ± 1.2	21	0.6	3.5 ± 0.6	3	0.03	10.1 ± 4.4	14	0.97

4) L-[^{3}H] Lysineより[^{3}H] Cadの生成

Cadの生合成は、調べた脳，肝，腎および大腸のすべてにおいて認められた（Table 1の中2欄）。Cadは、細菌および植物において生ずることは知られている。一方、Stepita-klauco と Dolezalova（14）は無菌マウス脳でのCadの存在を報告したが 食餌由来を否定できない。我々は、今回、Lysineより Cadがマウス脳において生合成されることを初めて示した。

5) L-[^{3}H] Lysineより[^{3}H] pipの生成

L-Lysineより pipの生成は、脳をはじめ各器官では起こらず、大腸内容物においてのみ生じた（Table Iの中1欄）。Neomycin と Bacitracin 処置マウスの大腸内容物

では、Pipの生成が完全に抑制されたので、Lysineよりの Pipの生成は腸内細菌によると推定される。

6) D,L-[^{3}H] Pipacより[^{3}H]Pipの生成

脳，肾，大腸のみが、極めて小さい活性を示した。kaséら(6,7,9)は、ラット脳および腎において、Pipacよりの Pip生成を示した。

Table II: The influence of aminoguanidine (AG) on pip or cad formation from L-lysine in the large intestine.

	Pip formation from L-lysine				Cad formation from L-lysine			
	a	b	c	d	a	b	c	d
Control	10.04 ± 0.28	4	100	—	2.27 ± 0.44	3	100	—
AG 10^{-4}M	10.05 ± 0.43	4	100.1	N.S.	1.18 ± 0.43	3	51.9	P<0.01

a: Product formed (pmoles/g.w.w./hr)
b: Number of experiments c: Per cent of control
d: Significance

7) [1,5-^{14}C] Cadより ^{14}C-Pip の生成

脳においては認められず、大腸においてのみ極めて高い活性が認められた。これは抗生物質処理により、有意に抑制されたので 腸内細菌によると推定される。

8) 大腸での L-Lysineよりの Pip生成，L-Lysineよりの Cad生成および Cadよりの Pip生成におよぼす Aminoguanidine (AG) の影響

Diamine oxidase の inhibitor のAG 10^{-4}Mは、大腸における L-Lysineよりの Pip生成に影響を与えなかった(Table II)が，L-Lysine → Cad (Table II) および Cad → Pip を有意に抑制した(Table III)。

Table III: The influence of aminoguanidine (AG) on pip formation from cadaverine in the large intestine.

	Pip formation from cad			
	a	b	c	d
Control	936.97 ± 31.89	5	100	—
AG 10^{-4}M	393.10 ± 8.88	5	42.0	P<0.01

a: Product formed (pmoles/g.w.w./hr)
b: Number of experiments
c: Per cent of control
d: Significance

以上の1)～8)の成績より、a) 脳および腎における L-Lysineよりの Pipの生成は Pipacを経るが、Pipac → Pipは極めて小さい、b) 大腸内細菌では L-Lysineよりの Pip生成は、Cad，Pipacを経ず、5-Aminopentanal，Δ^1-Piperideineを経ると推定した。

9) 発育期ニワトリ肝およびニワトリ脳における L-[^{3}H]Lysineより[^{3}H]Cadの生成

孵卵開始後3日目の肝ですでに高い Cad生合成を認め、5日目で最高の活性を示し以後孵化まで次第に減少した。Putrecine含量(2)，および Ornithine decarboxylase 活性(12)が、孵卵5日目にピークを示すという知見も考えると、増殖成長しつつある脳で Cadも、おそらく核酸と相互作用し、その発育成長を調節していると推定される。

Table IV: Developmental change of cadaverine formation from L-lysine in the brain of chick embryo and chick.
* d.i. = days of incubation

Age	Tissue	Cadaverine formation	
3 d.i.*	Whole embryo	3.14 ± 0.58	(4)
5 d.i.	Whole embryo	6.05 ± 0.74	(3)
5 d.i.	Head	5.34 ± 0.58	(3)
7 d.i.	Whole embryo	2.12 ± 0.30	(3)
7 d.i.	Head	2.20 ± 0.10	(3)
11 d.i.	Brain	1.64 ± 0.16	(4)
15 d.i.	Brain	0.73 ± 0.33	(3)
19 d.i.	Brain	0.60 ± 0.14	(3)
After hatch			
1 days	Brain	0.97 ± 0.28	(3)
4 days	Brain	0.86 ± 0.25	(3)
16 days	Brain	1.72 ± 0.51	(3)
30 days	Brain	1.30 ± 0.08	(3)
30 days	Large intestine	4.37 ± 0.41	(3)

(以上のうち、一部、第8回アメリカ神経化学会(1977.3, Denver)，第6回国際神経化学会(1977.8, Copenhagen)に発表)

〈文献〉
1) Battershy,A.R. (1961) Quart. Rev. 15 259. 2) Caldarera,C.M. et al.(1965) Biochem. J. 97 84. 3) Chang,Y.F. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 174. 4) Dolezalova,H et al. (1974) Brain Res. 72 115. 5) Giacobini,E. (1976) Advances in Biochemical Psychopharmacol. 15 17. 6) Kasé, Y.et al. (1967) Life Sci. 6 2427. 7) Kasé,Y. et al. (1970) Life Sci. 91 1381. 8) Kasé,Y. et al. (1974) Life Sci. 14 785. 9) Kasé,Y. and Miyata,T. (1976) Advances in Biochemical Psychopharmacol. 15 5. 10) Leistner,E. and Spenser,I.D. (1973) J. Ame. Chem. Soc. 95 4715. 11) Nordenstrom,B.E.W. (1951) Acta pharmacol. toxicol. 1 287. 12) Russel,D. and Snyder,S.H. (1968) Pro. N. A. S. 60 1420. 13) Seiler, N. and Schmidt-Glenewinkel,T. (1975) J. Neurochem. 24 791. 14) Stepita-Klauco,M. and Dolezalova,H. (1974) Nature 252 158.

神経化学　Vol.　16

第 20 回　日本神経化学会抄録集

昭和52年10月27日(木)

28日(金)

29日(土)

大阪商工会議所（大阪）