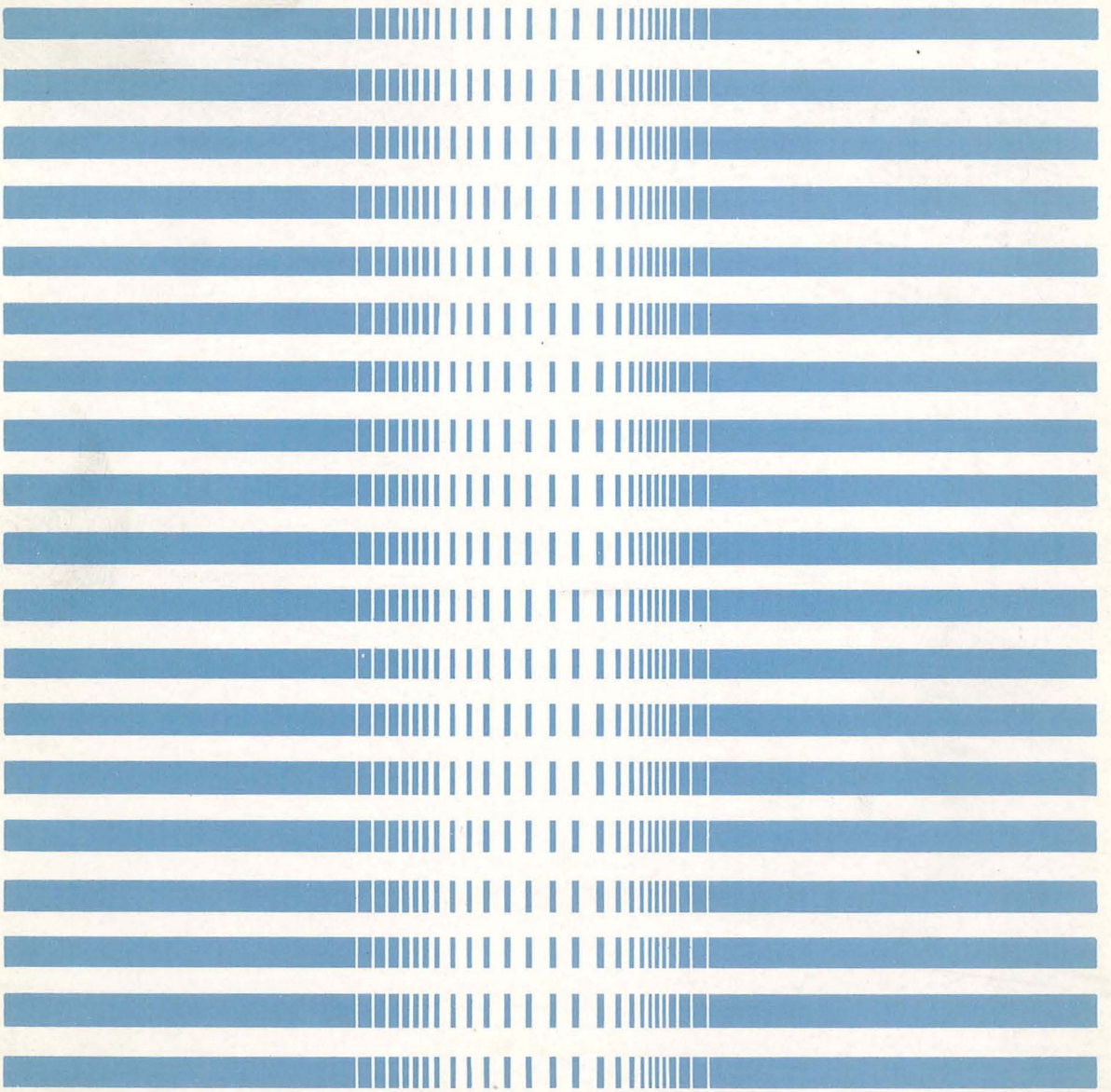
神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第22回　日本神経化学会抄録集



Vol. 18, 1979

日本神経化学会

神経化学

第22回日本神経化学会抄録集

PROCEEDINGS OF THE 22nd ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　東　京

11月16日(金), 11月17日(土)

Vol. 18 1979

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1. ラット脳内多様性ＭＡＯの基質特異性について …… 16

杵鞭宏育・和久井淑子
林　誠夫・豊島良枝
上條一也
（昭和大・医・薬理）

2. A型B型モノアミン酸化酵素に対するフェニルエタノールアミンの基質特異性・基質濃度の影響 …… 20

鈴木　修・服部秀樹
（浜松医大・法医）

3. ラット視床下部各核レベルにおけるモノアミン酸化酵素活性の日内変動 …… 24

釜瀬春隆・挾間秀文
国元憲文・川原隆造
水川六郎
（鳥取大・医・神経精神）

4. Tryptophan 5-monooxygenaseの活性化と新しい活性化物質の作用機作 …… 28

堀　真一郎・大谷幸子
（都神経研）

5. ラット脳幹のトリプトファン水酸化酵素の活性化と細胞質タンパクのリン酸化におけるCa^{2+}－Dependent Regulator Proteinの役割 …… 32

山内　卓・藤沢　仁
（旭川医大・Ⅰ生化）

6. ラットにおけるmethamphetamine常同行動の逆耐性現象に対応する脳内tyrosine水酸化酵素の変動 …… 36

西川　徹・渡部修三
高嶋瑞夫・融　道男
（国立神経センター）

7. ^{3}H－ジヒドロエルゴクリプチンの結合実験によるラット脳α受容体サブタイプの同定 …… 40

芳賀達也・芳賀和子

（浜松医大・生化）

8. dopamine受容体とspiroperidol受容体の差異 …… 44

山脇泰秀・小川紀雄

大藤　真

（岡大・医・Ⅲ内）

9. 中枢セロトニン・レセプターの感受性と抗うつ剤 …… 48

水田　正

（日本ケミファ研）

野村靖幸・瀬川富朗

（広大・医・総合薬）

10. 脳内モノアミン代謝に対するクロルプロマジンの作用 …… 52

三船和史・盛政忠臣

土井　亨・庄盛廉敏

（岡大・医・脳研）

11. 拘束ストレス状況におけるラット脳内各部位のNoradrenaline代謝の変化 …… 56

田中正敏・河野康子

中川良一・戸島信夫

長崎信行

（久留米大・医・薬理）

12. 中枢各ドーパミン・ニューロン系（A8~A14）のHVA濃度とhaloperidolの影響 …… 60

松本　孝・内村英幸

平野　誠・金　長寿

（国立肥前療養所）

中原辰雄　（九大・理）

13. 3,4-Dihydroxyphenylethylene glycol（DOPEG）及びその硫酸抱合体の螢光定量法と脳内NE代謝系における意味について …… 64

古川　清・唐沢忠彦
吉田耕一・清水当尚
（大日本製薬総研）

14. ミクロゾームによるハイドロキシインドール化合物の代謝とその代謝産物の膜蛋白への不可逆的結合 …… 68

植村富彦・嶋津　孝
堀田直樹
（都精神研）

15. Radioreceptor assay によるベンゾジアゼピン血中濃度の測定 …… 72

清水宏俊・本田雅子
小田切　脩
（日本ロシュ研）

16. 中枢catecholamine 神経系synapse 機能の発生，発育とmethamphetamine の作用 …… 76

野村靖幸・大木恵子
四元郁子・瀬川富朗
（広大・医・総合薬）

17. ラット小脳の2種のRNase Hとそれらの機能 …… 80

塚田欣司・斉藤順子
沢井保子・沢崎嘉男
中島　熙
（東医歯大・難研）

18. ラット小脳チミジン・キナーゼ・アイソザイムと分離プルキンエ細胞における特異性 …… 84

沢崎嘉男・山田則子
関　啓子・中島　熙
（東医歯大・難研）

19. E1マウス脳ポリゾームのポリ(A^+)-RNA合成におよぼす痙攣の影響 …… 88
山上　栄・大野京介
森　浩一・辻　正記
川北幸男
（阪市大・医・神経精神）

20. Dihydropteridine ruductase 欠損症 …… 92
成沢邦明・多田啓也
（東北大・医・小児）

21. 分離ニューロンおよびグリア細胞群の環状ヌクレオチド合成酵素の活性化の相違 …… 96
安藤正人・難波経篤
永田　豊
（保健衛生大・医・生理）
北島哲子・中沢欽哉
（愛知コロニー）

22. ラット脳Guanylate Cyclase の性質について …… 100
— ニトロソグアニジンに対する反応性の差異について —
吉川和明・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

23. 牛脳可溶性Guanylate Cyclase の精製とそれに対する抗体の生成とその性質について …… 104
中根正樹・出口武夫
（都神経研・医化）

24. ラットの松果体におけるcyclic AMP含量の日内変動 …… 108
三国雅彦・斉藤嘉郎
小山　司・岡　五百理
松原繁宏・加沢鉄士
浅野　裕・山下　格
（北大・医・精神）

25. てんかんとモノアミン代謝及び環状ヌクレオタイド …… 112
長尾卓夫・藤本　明
山本光利・秋山一文
大月三郎
（岡大・医・精神）

26. 各種神経疾患髄液中のモノアミン代謝物質と環状ヌクレオチド …… 116
山本光利・長尾卓夫
藤本　明・秋山一文
大月三郎
（岡大・医・精神）
早原敏之・難波玲子
（国立岡山療養所）

27. 脳腫瘍組織及び切截脳におけるLysosome酵素の変動とDBc－AMPの効果に関する研究 …… 120
柴田家門・清水義勝
松元幹郎・長沢貞継
高須信美
（東邦大・医・脳外）
阿相皓晃・平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）

28. ラット脳のadenosine kinaseについて …… 124
山田裕一・後藤治子
小笠原信明
（愛知コロニー）

29. 脳のアデノシン結合蛋白（Ⅱ） …… 128
小田切　脩・逸見順子
清水宏俊
（日本ロシュ研）

30. シナプス伝達におけるアデノシン関連物質の生理作用とその分子機構（Ⅱ）
— 神経終末部におけるサイクリックAMPの上昇を介する神経伝達の
facilitationの可能性 …… 132
黒田洋一郎・小林和夫
（都神経研・生化）

31. Ca^{2+} 生体膜リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の活性化様式 …… 136
川原康洋・水口龍次
吉川潮・森光寿
岩佐寧・岸本明
高井義美
（神大・医・Ⅱ生化）

32. ラット大脳シナプス膜画分からの酸性カルシウム結合タンパク質の
単離とその性質 …… 140
中村泰治・中浜隆之
中谷一泰
（昭和大・薬・生物）
竹田稔
（昭和大・医・生化）

33. 脳の顆粒性モジュレーター結合蛋白の可溶化と部分精製 …… 144
祖父江憲治・村本芳彦
垣内史朗
（阪大・医・高次研）

34. 視細胞杆体細胞への ^{45}Ca の取り込み …… 148
— ATP-induced ATP-dependent Ca-uptake —
郭哲輝・林要喜知
秋山万里子・三木直正
（金大・がん研・薬理）

35. 牛脳のPhosvitin kinase FⅡについて …… 152
公文明・小沢雅子
（都精神研・神経化学）

36. 糖液による副腎髄質ホルモンの開口放出：外液Caイオン依存性 …… 156
反町　勝
（愛媛大・医・生理）

37. シナプス小胞分画のプロトン（H^+）ポンプ機構について …… 160
都築紀宏
（名市大・医・生化）

38. シビレエイ電気器官の神経終末におけるコリン輸送 …… 164
阿部輝雄・西須英雄
藤田省三
（新大・脳研・神経化学）

39. Synaptosome形質膜のNa, K-ATPase活性に対するascorbateの
阻害作用 …… 168
後藤香糸子・田中　亮
（名市大・医・生化）

40. 虹彩のムスカリン様アセチルコリン受容体の生理機能と遮断薬の
特異的結合について …… 172
松田友宏・樋口宗史
吉田　博
（阪大・医・Ⅰ薬理）

41. ミエリン塩基性蛋白の酵素イムノアッセイについて …… 176
四宮由美子・加藤進昌
今澤正興・宮本侃治
（国立神経センター）

42. ミエリンよりの塩基性蛋白－酸性脂質複合体の単離・同定・生物活性 …… 180
国下龍英・武富　保
（信大・順応研・生化）

43. ウシ末梢神経ミエリンのPASⅡ糖蛋白より得られた糖ペプチドについて …… 184
北村邦男・鈴木　勝
植村慶一
（埼玉医大・Ⅰ生理）

44. 末梢神経ミエリン糖蛋白の脂質中間体経由のグリコシル化について …… 188
植村慶一・堀江賀与子
北村邦男
（埼玉医大・Ⅰ生理）

45. 2′, 3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase の可溶化，精製および精製標品の性質…… 192
栗原正・西沢芳子
高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

46. 培養小脳組織によるミエリン形成の神経化学的研究 …… 196
長池一博・塚田裕三
（慶大・医・生理）

47. Shiverer ミュータントマウスの神経系のミエリン形成と 2′, 3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase 活性との相関について …… 200
御子柴克彦・長池一博
高坂新一・高松研
塚田裕三
（慶大・医・生理）

48. Snell 下垂体性こびと症マウスの神経化学的研究 …… 204
野口鉄也・杉崎哲朗
塚田裕三
（慶大・医・生理）

49. S-100 タンパク質の化学構造と分子進化 …… 208
礒辺俊明・石岡憲昭
奥山典生
（都立大・理・化）

50. 培養 rat glioma (C-6) 細胞の cyclic AMP induced differentiation における S-100 蛋白質量の経時的変化 …… 212
古田知久・則兼博
守屋芳夫・坪井雅弘
田渕和雄・西本詮
（岡大・医・脳外）

51. 実験的梗塞脳におけるS-100 protein の経時的変化 …… 216
守屋芳夫・古田知久
原田泰弘・岸川秀実
田渕和雄・西本詮
（岡大・医・脳外）

52. ブタ脳中に存在する新しい酸性タンパク質 …… 220
石岡憲昭・礒辺俊明
奥山典生
（都立大・理・化）
野又康博・和田博
（阪大・医・Ⅱ薬理）

53. 脳におけるプロスタグランジンD_2の代謝と機能 …… 224
清水孝雄・渡部紀久子
早石修
（京大・医・医化）
水野昇
（京大・医・解剖）
天野武彦
（三菱生命研）

54. スケトウダラ神経組織における糖脂質組成の特異性 …… 228
玉井洋一・堀地肇
（北里大・医・生化）
斉藤信太郎
（国立武蔵療養所）

55. 脳燐脂質分子種に関する研究 …… 232
荻野広太郎・木野稔
近藤哲夫・蒲生昌仁
里内清・斉藤国彦
（関西医大・医化）

56. galactocerebrosidase（EC 3.2.1.46）の酵素的微量測定法 …… 236
加藤尚彦
（東大・医・脳研）
鈴木義之
（東大・医・小児）

57. ヒト脳およびラット脳における lipase 活性について …… 240
関口　茂・衛藤義勝
（慈恵医大・小児）

58. GM_3 ガングリオシドシアリダーゼに関する研究 …… 244
田端葉子
（自治医大・神経内科）
山田剛通・有賀敏夫
宮武　正
（都臨床医研）

59. 正常並びにKrabbe 病脳に於けるHexadecanoyl 4-nitrophenyl-β-galactosidase 活性に関する研究 …… 248
衛藤義勝
（慈恵医大・小児）

60. 脱コレステロール剤AY9944で処理したラット新生仔中のスフィンゴミエリナーゼ活性変化の年令依存性と可逆性 …… 252
渡辺和行・桜川宣男
有馬正高
（国立神経センター）

61. 脳可塑性の生化学的研究－大脳半球摘除ラット神経組織のNA，5HTの変化について …… 256
外山　孚・村上直人
亀山茂樹・植木幸明
（新大・脳研・脳外）
佐武　明
（新大・脳研・神経化学）

62. ラット脳の外套，小脳，脳幹の可溶性蛋白質の発育過程における組成変化・二次元電気泳動による分析 …… 260
吉田　豊・高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

63. 網膜内ドーパミン作働性ニューロンの成長過程に関する螢光組織化学的研究・
正常および遺伝盲動物における比較検討を中心として …… 264
加藤　聖・根岸晃六
（金大・医・神経情報研）

64. ヒヨコ網膜の発育に及ぼす光遮断の影響 …… 268
高坂新一・高松　研
御子柴克彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

65. トリプトファンのラット脳内インドールアミン代謝系及び弁別学習能力に
およぼす影響 …… 272
野村正彦
（保健衛生大・医・生理）

66. 6－ハイドロオキシドーパミンの新生仔期投与の対照及びMAMラットにおける
脳内カテコールアミン量と成長に及ぼす影響 …… 276
田丸政男・永吉道子
中原　務・松谷天星丸
（保健衛生大・医・総医研）
塚田裕三
（慶大・医・生理）

67. 老齢ラットの脳内モノアミンに与えるMeclofenoxate hydrochloride 及び
Citicoline の影響 …… 280
土井　亨・盛政忠臣
三船和史・庄盛敏康
（岡大・医・脳研）

68. 発生中のニワトリ骨格筋におけるアセチルコリンリセプターの等電点 …… 284
石川裕二・嶋田　裕
（千大・医・解剖）

69. マウス扁桃体におけるα－ブンガロトキシン結合活性の性差およびその生後発生 …… 288
有松靖温・瀬戸章子
天野武彦
（三菱生命研）

70. 筋細胞から遊離される脊髄成長促進因子 …… 292
田中英明・小幡邦彦
（群大・医・薬理）

71. ニューロブラストーマ・グリオーマ雑種細胞の分裂増殖とシナプス形成に対するグリア成長因子の効果 …… 296
東田陽博
（名大・環研）
加藤泰治
（名市大・医・生化）
三宅彰英
（岐大・医・反射研）
田中恭子
（愛知ガンセンター）
田中亮
（名市大・医・生化）
田中達也
（愛知ガンセンター）

72. ニューロブラストーマ・グリオーマ雑種細胞のα-アドレナリン性受容体 …… 300
東田陽博
（名大・環研）
杉山博之
（生理研）
芳賀和子・芳賀達也
（浜松医大・生化）

73. ラットグリオーマ由来の細胞（C-6）におけるN^G, N^G-ジメチルアルギニンを含む蛋白質の合成と分解 …… 304
平井基陽・中嶋照夫
（阪大・医・高次研）

74. アルブミン結合型ビリルビンの培養神経系細胞に対する毒性 …… 308
加藤泰治・*鬼頭秀行
福井陽子・田中亮
（名市大・医・生化，*小児）

75. Gunnラット小脳の神経化学的研究 …… 312
御子柴 克 彦・高 坂 新 一
高 松 研・塚 田 裕 三
（慶大・医・生理）

76. 高ビリルビン血症Gunnラット：小脳の2′,3′-cyclic nucleotide-3′-phosphohydrolaseと小脳低形成によるタンパクパターンの変化について …… 316
仙 波 りつ子・青 野 幸 子
青 木 英 子・柏 俣 重 夫
（愛知県コロニー）

77. Cytosine Arabinoside 投与による小脳形成不全マウスの脳内物質の変化と組織化学 …… 320
辻 元 宏・岩 瀬 則 文
佐 藤 啓 二・高 橋 三 郎
（滋賀医大・精神）
島 田 司 己
（滋賀医大・小児）

78. フェノバルビタール依存ラット部位別脳におけるアミノ酸量の変化 …… 324
青 木 公 子・黒 岩 幸 雄
（昭和大・薬・毒物）

79. β-シトリルグルタミン酸のエネルギー代謝における役割 …… 328
三 宅 正 治・柿 本 泰 男
（愛媛大・医・神経精神）
反 町 勝
（愛媛大・医・生理）

80. ラット錐体外路系へのカイニン酸の局所微量投与に伴う神経化学的変化について …… 332
栗 原 悦 雄・米 田 幸 雄
栗 山 欣 弥
（京府医大・薬理）

81. ラット網膜からのGABAの放出：特にglutamateの影響について …… 336

鎌田芳夫・水野有武
（慈恵医大・眼科）
朝倉正
（慈恵医大・RI研）
松田誠
（慈恵医大・医化）

82. ラットCrude synaptic membraneのNa^+依存性γ-アミノ酪酸結合サイトの性質 …… 340

栗岡晋・松田誠
（慈恵医大・医化）

83. ラット脳粗シナプス膜分画への^3H-muscimolの結合とその内在性阻害物質について …… 344

米田幸雄・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

84. D-フェニルアラニンによる針鎮痛有効性個体差の消失 …… 348

蜂須貢・村居真琴
田中正明・久光正
羅昌平・武重千冬
（昭和大・医・I生理）

85. 培養神経細胞の生産するSubstance P-like Immunoreactivity …… 352

畠中寛・天野武彦
（三菱生命研）

86. Substance P C-末 heptapeptideの生成酵素とその生理的意義 …… 356

加藤武・浜登希子
中野完・小島幸一
永津俊治
（東工大・総合理工）

87. 中枢神経組織へのSubstance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11)
SPのとりこみ機構の存在について …… 360

仲田義啓・日下敏子
瀬川富朗
（広大・医・総合薬）

88. ラット中枢神経TRH受容体の性状 …… 364
小川紀雄・山脇泰秀
大藤　真
（岡大・医・Ⅲ内）

89. 発達過程における脳のポリペプチド延長因子 …… 368
村上一行・宮本侃治
（国立神経センター）

90. 神経細胞における10nmフィラメント（ニューロフィラメント）の単離，精製とその蛋白構成 …… 372
森　啓・黒川正則
（東大・医・脳研）

91. 分離ニューロンにおける細胞骨格タンパク質の合成 …… 376
中山　孝・黒川正則
（東大・医・脳研）

92. コルヒチンによるチューブリン輸送の選択的阻害 …… 380
小宮義璋・黒川正則
（東大・医・脳研）

93. Neurofilament 構成成分の螢光抗体法による脳内分布状態の検討とAlzheimer原線維変化との関連について …… 384
羽賀誠一・石井　毅
徳武　哲
（都精神研）

94. 筋萎縮における筋蛋白の構造変化 …… 388
井上良一・佐久間長信
三宅正治・柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神）

人名索引 …… 392

1　ラット脳内多様性MAOの基質特異性について

杵鞭宏育・和久井淑子・林　誠夫
豊島良枝・上條一也
（昭和大・医・薬理）

〔要　約〕

Type A、type B MAO の種々濃度の特異的基質を使用し、それらの特異的 MAO 阻害剤による阻害作用よりラット脳内両type MAO の基質特異性を検討した。clorgyline、deprenyl による阻害作用よりラット脳内 mitochondria には type A、type B 両 MAO が存在するが、tyramine はいかなる濃度の場合も両type MAO により酸化され、serotonin は type A MAO のみにより酸化される事が明らかとなった。しかし、type B MAO の特異的基質とされている β-phenylethylamine (PEA) は濃度によりそれぞれ type A、両type または type B MAO により酸化され、その基質特異性は濃度に依存して変化することが明らかとなった。すなわち、低濃度 (0.01 mM) では type B、高濃度 (10 mM) では type A MAO の選択的基質であるが、両濃度の中間濃度では両type MAO により酸化された。また中間濃度での基質 PEA に対する clorgyline、deprenyl による double sigmoid 型阻害曲線より求めた両type MAO の割合は tyramine の場合とは相違した。また、PEA の MAO 阻害剤による sigmoid 型阻害曲線は使用する PEA 濃度の増加に伴い、type A の割合の増加、反対に type B の減少へと大きく変化した。この PEA 濃度の変化に伴う両type MAO の割合の変化は type B にのみ見られた高濃度PEA による基質阻害作用に起因するものと思われる。これらの成績は特異的 MAO 阻害剤による MAO の多様性の研究に際して使用する基質濃度に充分留意する必要性を示唆している。

Johnston (7)、Neff and Yang (12) らにより Monoamine oxidase (MAO) [EC 1.4.3.4] の多様性 (type A および type B) 説が提唱されて以来、各種臓器内でのこれら両type MAO の存在が多くの研究者により報告されている (1,5,6,12)。しかしながら、最近この type A-type B MAO 説に基質特異性の点でしばしば合致しない実験成績が報告されるにつれ (10,11)、この MAO 多様性説の再検討、または再編成の必要性がさけばれている (4)。

今回、われわれは MAO の多様性について基質特異性の面から再検討を試み、興味ある結果を得たのでその成績を報告する。なお、本研究の一部は既に先の MAO symposium (1979年 7月、Michigan, U.S.A.) で発表した (8)。

〔実験材料および実験方法〕

実験には体重 200g 前後の健康な Wistar 系雄性ラットを使用した。

(1)　酵素標品の作製

ラットを断頭後、速やかに全脳を摘出し、氷冷下 0.32 M sucrose + 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4) 溶液で 10 % homogenate を作製し、遠心分離により全脳 crude mitochondria 分画を採取しこれを酵素標品として実験に使用した。

(2)　MAO 活性の測定

MAO 活性の測定は Wurtman and Axelrod radiometric assay 法 (15) に準じて行った。基質としては ^{14}C-serotonin binoxalate (44 mCi/m mol)、^{14}C-tyramine hydrochloride (56.2 mCi/m mol) および ^{14}C-β-phenylethylamine (PEA; 50.98 mCi/m mol) を非放射性各基質溶液で稀釈して使用した。酵素反応は 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4) および上記ラット脳 mitochondria [25 µl; 50 mg/ml 蛋白量、Biuret の改良法 (16) にて測定] で全量を 275 µl とし

た incubation mixture に上記基質溶液 25 µl を添加し、38 °C、20分間 incubation を行った。反応を 2 N HCl で停止後、反応生成物を有機溶媒で抽出し、Packard Tri-Carb 液体シンチレーションカウンターで反応生成物の d.p.m. を計測した。

MAO 阻害作用の実験では種々濃度の MAO 阻害剤を添加後、38 °C、30分間の preincubation を行い残存 MAO 活性を前記 radiometric assay 法で測定した。

〔実験成績〕

ラット脳 mitochondria MAO に対する type A MAO 阻害剤 clorgyline および type B MAO 阻害剤 deprenyl の影響を基質として 0.5 mM serotonin, tyramine, PEA を使用し検討し、その結果を第1図に示した。clorgyline による MAO 阻害作用は serotonin の場合に最も強力で、その阻害曲線は single sigmoid 型を示した。しかし、tyramine、PEA の場合、両阻害曲線はいずれも double sigmoid 型であった。また、tyramine の阻害曲線より求めた両 type MAO の割合は type B が約 70 %, type A が 30 % であった。しかし、PEA の double sigmoid 型曲線より求めた場合にはそれぞれ 40-50 % (type B) および 50-60 % (type A) となり両基質では両 type MAO の割合は明らかに相違していた。

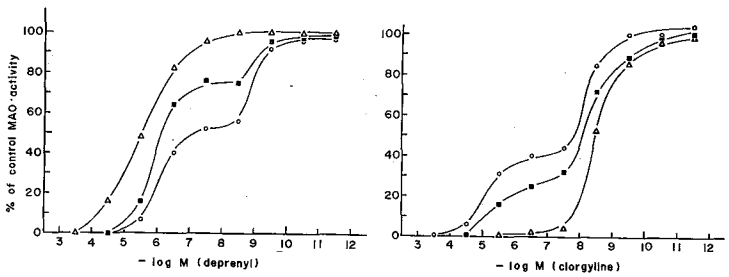


Fig. 1. Inhibition of MAO activity towards PEA, tyramine and serotonin by various concentrations of clorgyline and deprenyl. The remaining activity is expressed as per cent of control MAO activity in absence of clorgyline (right) or deprenyl (left). -o- : 0.5 mM PEA; -●- : 0.5 mM tyramine; -Δ- : 0.5 mM serotonin.

一方、deprenyl による MAO 阻害作用は clorgyline の場合とは正反対で PEA で最も強くその阻害曲線は clorgyline の場合と同様 double sigmoid 型であった。また tyramine でも同様に double sigmoid 型を示したが serotonin では single sigmoid 型であった。さらに 0.5 mM PEA の場合の clorgyline による阻

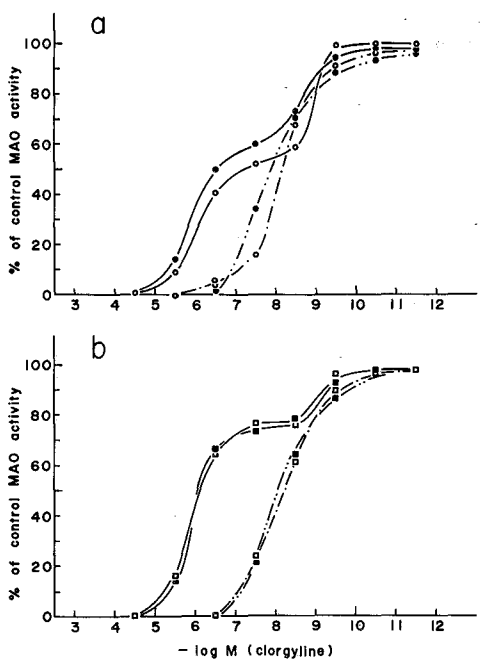


Fig. 2. Effect of clorgyline on MAO activity in untreated and deprenyl-treated rat brain mitochondria. (a); untreated mitochondria with 0.5 mM (o—o) and 1.0 mM PEA (●—●); deprenyl-treated mitochondria with 0.5 mM (o--o) and 1.0 mM PEA (●--●). (b); untreated mitochondria with 0.5 mM (□—□) and 1.0 mM tyramine (■—■); deprenyl-treated mitochondria with 0.5 mM (□--□) and 1.0 mM tyramine (■--■).

害作用は 1 mM semicarbazide または KCN 存在下でも対照の場合と同様の阻害曲線を示した。これは PEA がラット脳内 mitochondria では type A、type B 両 MAO により酸化される可能性を示唆している。

この可能性を確認するためラット脳内 type B MAO を deprenyl (3.3×10^{-8} M) で選択的に阻害した後、0.5 mM および 1.0 mM tyramine, PEA を基質として clorgyline による阻害作用を検討した。その結果、いずれの基質、またいずれの濃度の場合も deprenyl 処置後では clorgyline に対してより高い感受性が認められ阻害曲線はいずれも single sigmoid 型へと変化した（第2図）。この傾向は clorgyline 処置後の mitochondria に対する deprenyl によっても認められ、この場合にも deprenyl に対していずれの場合も高い感受性が認められ、また阻害曲線は single sigmoid 型へと変化した。これらの結果から tyramine および PEA はラット脳 mitochondria ではいずれも両 type MAO により酸化され、従って両 type MAO 阻害剤により double sigmoid 型の阻害曲線を示したものと思われる。続いて PEA、tyramine の濃度を種々変化させ clorgyline、deprenyl による阻害作用を検討した（第3図）。PEA の場合、基質濃度を 0.1 mM および 0.05 mM と低濃度へ変化させた場合、clorgyline による阻害曲線は 0.5 mM の場合と同様に double sigmoid 型を示したが、その double sigmoid 型曲線は PEA 濃度の低下に伴って軽微となり、また clorgyline に対する感受性も減弱した。しかし、PEA を 1.0 mM または 5.0 mM と高濃度へ変化した場合には阻害曲線はいずれも double sigmoid 型を示したが、それら阻害曲線より求めた type B と type A の割合は PEA の濃度の増加と共に大きく増大し、type B MAO の割合は減少した。一方、PEA 0.01 mM および 10 mM の場合、その阻害作用は前者の場合は deprenyl により、後者では逆に clorgyline により強く阻害され、いずれの場合も阻害曲線は single sigmoid 型であった。しかし、tyramine の場合はその濃度を種々変化させても clorgyline による阻害曲線はいずれも double sigmoid 型であり、また両 type MAO の割合にはまったく変化は認められなかった。PEA を基質とした場合の clorgylile または deprenyl 処置、および未処置ラット脳 mitochondria MAO に対する Km 値を Lineweaver-Burk plot 法により求めた結果、それぞれ 7.0, 40, 17.3 μM の値が得られた。また未処置および clorgyline 処置 mitochondria MAO では高濃度の PEA により基質阻害がみられたが、deprenyl 処置を行った mitochondria ではこのような基質阻害は認められなかった。

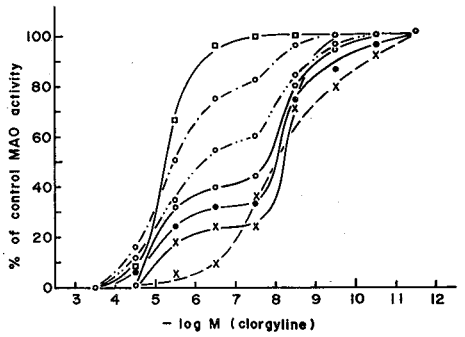


Fig. 3. Inhibition of MAO activity towards various concentrations of PEA by clorgyline. The experiments were carried out as described in the legend for Fig. 1 except using various concentrations of PEA : □——□ : 0.01; o-·-o: 0.05; o-···-o: 0.1; o——o: 0.5; ●——●: 1.0; ×——×: 5.0; ×-·-×: 10.0 mM.

〔考　察〕

MAO の多様性説によれば、MAO の基質特異性は "type A"、"type B" および "両 type MAO に共通" の基質、計3種類に分類されている (12)。しかし、MAO の多様性に関する研究の際、使用する基質の濃度に対して充分な注意が払われている場合は少ない。近年、MAO の多様性に関してしばしば相反する結果が報告

されているがその一因としては使用する基質濃度の影響が考えられる(2,3,9,13,14)。本実験で明らかなように、tyramine ではいずれの濃度の場合もその阻害曲線は double sigmoid型を示し、従来の説と一致して本基質が両 type MAO により酸化されることを示唆している。しかし、従来より type B MAO の特異的基質とされ、繁用されている PEA は本実験で明らかなように、mitochondria MAO に対して中等度の基質濃度では clorgyline, deprenyl により double sigmoid型阻害曲線を示したが、deprenyl 処置後では更に添加された clorgyline に対し、clorgyline 処置後では deprenyl に対してより高い感受性を示し、またその際の阻害曲線はいずれも single sigmoid型へと変化した。このことはラット脳 mitochondria で PEA は type A, type B両 type MAO により酸化されることを示唆している。一方、PEA の高濃度、または低濃度では阻害曲線はいずれも single sigmoid型であり、また前者では clorgyline に対し、後者では deprenyl に対して高い感受性がみられた。従って高濃度 PEA は type A MAO により、反対に低濃度では type B MAO により酸化されるものと思われる。以上の結果は PEA は濃度により両 type MAO に対する基質特異性が変化するものと思われ、従来の type A-type B MAO の基質特異性(12)とは相反する結果であった。さらに基質 PEA における double sigmoid型阻害曲線は基質濃度の増加と共に曲線のパターンも変化し、type A の割合の増加と共に反対に type B MAO の減少が見られた。この原因としては高濃度 PEA による type B MAO にのみ見られた基質阻害作用に起因するものと考えられる。従って基質 PEA のある濃度を使用して測定した両 type MAO の割合は単にその際の両 type MAO の活性を示しているにすぎず、ある基質を用い得られた double sigmoid型曲線より両 type MAO の割合を測定する際には基質によっては濃度による影響を充分考慮する必要がある。またこのことが種々基質を使用してそれらの double signoid型曲線より求めた type A / type B MAO の割合にしばしば相違がみられる原因と考えられる。以上の諸成績は MAO の多様性の研究に際しては使用する基質濃度の影響を充分考慮する必要性を示唆している。

[References]

(1) Egashira, T., Ekstedt, B., Kinemuchi, H., Wiberg, Å. and Oreland, L. (1976) Med. Biol. 54, 272.
(2) Ekstedt, B. and Oreland, L. (1976) Arch. int. Pharmacodyn. 222, 157.
(3) Ekstedt, B. (1976) Biochem. Pharmacol. 25, 1133.
(4) Fowler, C. J., Callingham, B.A., Mantle, T. J. and Tipton, K. F. (1978) Biochem. Pharmacol. 27, 97.
(5) Houslay, M. D., Tipton, K. F. and Youdim, M. B. H. (1976) Life Sci. 19, 467.
(6) Jain, M. (1977) Life Sci. 20, 1925.
(7) Johnston, J. P. (1968) Biochem. Pharmacol. 17, 1285.
(8) Kinemuchi, H., Wakui, Y., Toyoshima, Y., Hayashi, N. and Kamijo, K. (1979) Monoamine oxidase: structure, function and altered functions. Satellite Symposium of 11th International Biochemical Congress, Abstract p. 12, July 1979. Michigan, U.S.A.
(9) Kinemuchi, H., Wakui, Y. and Kamijo, K. submitted for publication.
(10) Lyles, G. A. and Callingham, B. A. (1974) J. Pharm. Pharmacol. 26, 921.
(11) Mantle, T. J., Houslay, M. D., Garrett, N. J. and Tipton, K. F. (1976) J. Pharm. Pharmacol. 28, 667.
(12) Neff, N. H. and Yang, H. -Y. (1974) Life Sci. 14, 2061.
(13) Toyoshima, Y., Wakui, Y., Kinemuchi, H. and Kamijo, K. (1978) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 17, 165.
(14) Toyoshima, Y., Kinemuchi, H. and Kamijo, K. (1979) J. Neurochem. 32, 1183.
(15) Wurtman, R. J. and Axelrod, J. (1963) Biochem. Pharmacol. 12, 1439.
(16) Yonetani, T. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1680.

2　A型B型モノアミン酸化酵素に対するフェニルエタノールアミンの基質特異性・基質濃度の影響

鈴木　修・服部秀樹
（浜松医大・法医）

〔要約〕
ラット脳のミトコンドリアを用いて，A型B型モノアミン酸化酵素（MAO）に対するフェニルエタノールアミン（PEOA）の基質特異性について検索したところ，基質濃度に従って基質特異性が変動することを見出した。すなわち12.5 μMではPEOAはB型MAOの特異的な基質であるが，125 μMならび1250 μMではA型B型両方の基質となることを見出した。比較のためにオクトパミンとベンジラミンについても同様な実験を行ったが，そのような著明な変動は見られなかった。PEOAに見られた現象を分析するためにLineweaver - Burk plotsを行ったところ，高濃度の基質領域で下方に折れ曲った特徴的なパターンが得られ，2成分より成っているものと考えられた。すなわち，Kmが22.7 μMでVmaxが6.90 n moles/mg protein / 30 minであるhigh affinity componentとKmが465 μMでVmaxが19.2 n moles / mg protein / 30 minであるlow affinity componentに区別できた。さらに酵素を10^{-6}Mのクロルジリンで前処理し，同様にplotしたところlow affinity componentが消失し，10^{-6}Mデプレニルで前処理したものではhigh affinity componentが消失するのが認められた。このことはhigh affinity componentはB型MAOに属し，low affinity componentはA型MAOに属していることを示している。以上の結果より，基質濃度によってPEOAの基質特異性が変動する現象は，PEOAのA型とB型MAOに対する親和性が著しく異っていることによって起るものと考えられる。

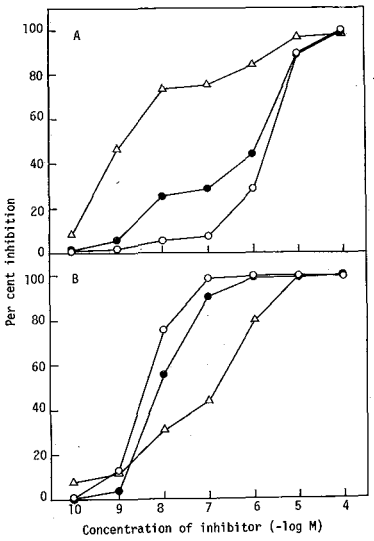
最近の10年間，モノアミン酸化酵素（MAO）のA型B型について広く研究が行われている。セロトニンやノルエピネフリンはA型MAOの特異的な基質であり，β-フェニルエチルアミン（PEA）やベンジラミン（BA）はB型MAOの特異的な基質とされている。われわれは最近，基質濃度が十分に低いばあいにはPEAはB型MAOの特異的な基質であるが，基質濃度が高いばあいにはA型B型両方の基質になることを報告した（1,2）。Kinemuchiらも同様な結果を報告している（3）。今回の実験では，脳の微量アミンとして知られるフェニルエタノールアミン（PEOA）においてもPEAと同様な現象が認められることを見出し，そのメカニズムを検討したので報告する。比較のためにPEOAの類似物質であるオクトパミン（OA），ならびにB型MAOの特異的な基質の一つであるBAに関してもあわせて報告する。

実験材料ならびに方法

SD系ラット全脳より粗ミトコンドリア画分を分離し，MAO標品とした。MAO活性はGuilbaultら(4)ならびにSnyderとHendley(5)の蛍光法で測定した。クロルジリンとデプレニルのいずれも蛍光物質の生成を阻害しなく，また蛍光をquenchしないことを確かめた。阻害実験では基質を加える前に10分間加温した。クロルジリンまたはデプレニルで前処理した酵素標品を用いてkineticsを行うために次のような操作を行った。クロルジリンまたはデプレニルを終濃度10^{-6}Mで酵素と30分間反応させ遠沈（18000 g，10分）し，さらにこの操作を2回くり返し，完全に酵素を洗浄した後にMAO活性の測定に供した。タンパク質の定量はビューレット法(6)を用いた。

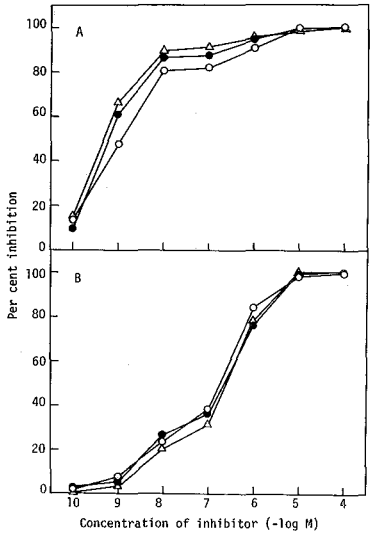
本研究はBiochemical Pharmacologyに印刷中である。

図1 種々の濃度のPEOAを基質として用いたばあいのラット脳MAOのクロルジリンとデプレニルによる阻害



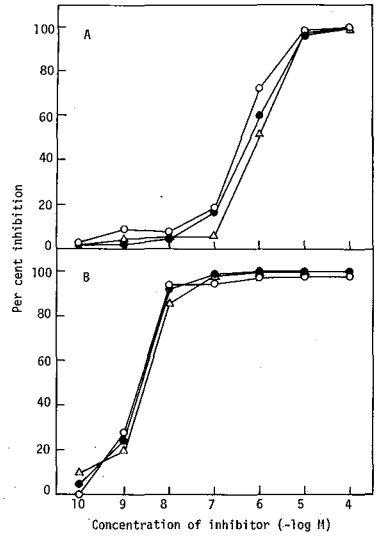
Key: clorgyline (A), deprenyl (B); 12.5 μM (O—O); 125 μM (●—●); 1250 μM (Δ—Δ).

図2 種々の濃度のOAを基質として用いたばあいのラット脳MAOのクロルジリンとデプレニルによる阻害



Key: clorgyline (A); deprenyl (B); 12.5 μM (O—O); 125 μM (●—●); 1250 μM (Δ—Δ).

図3 種々の濃度のBAを基質として用いたばあいのラット脳MAOのクロルジリンとデプレニルによる阻害



Key: clorgyline (A); deprenyl (B); 12.5 μM (O—O); 125 μM (●—●); 1250 μM (Δ—Δ).

実験結果ならびに考察

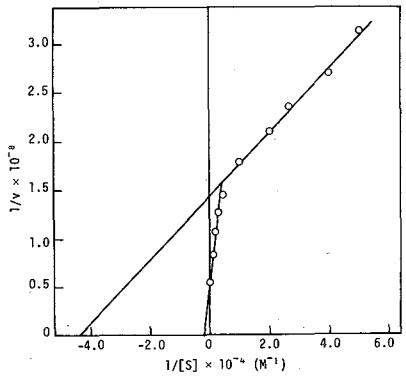
図1にPEOAを基質として用いた阻害実験の結果を示す。基質濃度のちがいで阻害パターンは著しく変動するのが認められた。すなわち12.5 μMでは両方の阻害剤について *single sigmoidal* でありPEOAがB型MAOの特異的な基質であることを示している。ところが基質濃度を125 μMに上げるとクロルジリンの 10^{-8}～10^{-7} Mの濃度に明らかなプラトーが認められ，この濃度ではA型B型両方の基質になることを示した。さらに基質濃度を1250 μMに上げると，クロルジリンに対するMAOの感受性はさらに高まり，一すデプレニルに対する感受性は低くなるのが認められた。すなわちPEOAに対するMAO活性の大半がA型MAOによるものとなった。図2にOAについて同様な実験を行った結果を示す。クロルジリンとデプレニルの両方について明らかなプラトーが認められ，OAがA型B型両方の基質であることを示している。この結果はLylesの報告(7)と一致する．12.5 μMのOAが他の高い濃度のOAに比してクロルジリンに対する感受性が多少低いのが認められる以外は基質濃度の変化によって阻害パターンには殆ど変動はなかった。図3にBAを基質としたばあいの阻害結果を示す。いずれの阻害パターンも *single sigmoidal* であり広い基質濃度範囲でB型MAOの特異的な基質であることが分った。基質特異性の

表1　PEOA, OAならびにBAを基質としたばあいのラット脳MAOのMichaelis恒数

Substrate	K_m (μM)	V_{max} (nmoles/mg protein/30 min)
PEOA		
High affinity	22.7	6.90
Low affinity	465	19.2
Clorgyline-treated*	11.4	6.28
Deprenyl-treated*	1490	5.56
OA	455	90.9
BA	161	63.7

*The procedure of the treatment is given in the text.

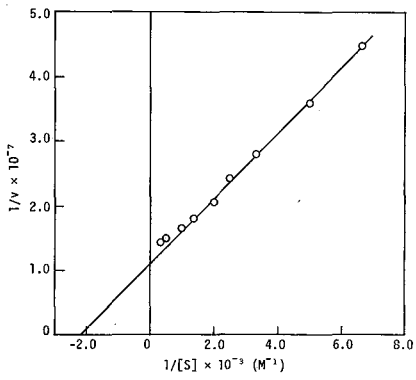
図4　PEOAを基質として用いたばあいのラット脳MAOのLineweaver-Burk plots



Each point represents the mean obtained from duplicate determinations; v: moles H_2O_2 formed/mg protein/30 min.

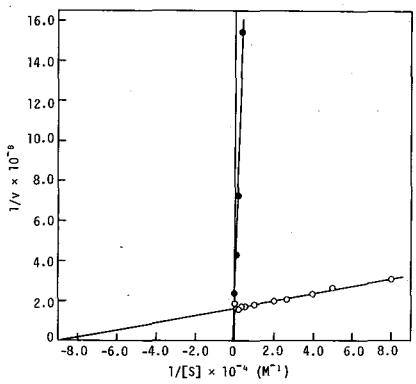
変動のメカニズムを検索するためにPEOAを基質としてLineweaver-Burk plotsを行った結果を図4に示す。高基質濃度領域で下方に折れ曲りを示す特徴的なパターンが得られ，2成分に区別することができるものと考えられた。それぞれの成分の直線よりMichaelis恒数を求めた結果を表1に示す。図5にOAを基質としたばあいのplotsを示す。高基質濃度領域にわずかな基質阻害が見られる以外は見かけ上単一成分であった。PEOAにおいて見出されたhigh affinityとlow affinityの2成分をさらに検討するために，酵素を10^{-6}Mクロルジリンまたはデプレニルで前処理した後に，Lineweaver-Burk plotsを施した結果を図6に示す。クロルジリンの前処理によってlow affinity componentが消失し，デプレニルの前処理でhigh affinity componentが消失するのが認められた。このことはlow affinity componentがA型MAOに属し，high affinity

図5　OAを基質としたばあいのラット脳MAOのLineweaver-Burk plots



Each point represents the mean obtained from duplicate determinations; v: moles H_2O_2 formed/mg protein/30 min.

図6　PEOAを基質としたばあいのクロルジリンとデプレニルで前処理されたラット脳MAOのLineweaver-Burk plots



Key: 10^{-6} M clorgyline (O—O); 10^{-6} M deprenyl (●—●); v: moles H_2O_2 formed/mg protein/30 min.

component がB型 MAO によるものであることを示している。表1に阻害剤で前処理した MAO のそれぞれの Km値と V_{max} 値を示した。クロルジリン処理後の酵素の PEOA に対する Km は *high affinity component* の Km より低く，デプレニル処理後の Km は *low affinity component* の Km より高かった。以上の結果より，基質濃度によって基質特異性が変動する現象は，PEOA のA型B型 MAO に対する親和性のちがいによって起るものと考えられる。すなわち PEOA の低濃度では *high affinity* のB型 MAO 活性が現われ，高濃度にすると，*affinity* は低いが V_{max} がはるかに高いA型 MAO 活性が現われるものと推察される。この結果はA型B型 MAO のそれぞれの活性中心が異った位置にあるとする考え(8)を強く支持するものである。OA や BA については基質特異性の著明な変動は認められなかったが，これはおそらくこれらの基質に対するA型B型両方の Km値が近い値であることによるものと思われる。基質濃度による基質特異性の著明な変化は目下 PEA と PEOA について見出されたが，他の基質や酵素源についても同様の現象が見られる可能性がある。A型B型 MAO を阻害剤感受性で検索するばあいには基質濃度に特に留意する必要があるものと思われる。

文　献

1) Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M. and Matsumoto, T. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 953.

2) Suzuki, O., Katsumata, Y. and Oya, M., in Monoamine Oxidase: Function and Altered Functions (Singer, T. P., Von Korff, R. W. and Murphy, D. L., Eds.) Academic Press, New York, in press.

3) Kinemuchi, H., Wakui, Y., Toyoshima, Y., Hayashi, T. and Kamijo, K., in Monoamine Oxidase: Function and Altered Function (Singer, T. P., Von Korff, R. W. and Murphy, D. L., Eds.) Academic Press, New York, in press.

4) Guilbault, G. G., Brignac, P. J., Jr. and Juneau, M. (1968) Anal. Chem. 40, 1256.

5) Snyder, S. H. and Hendley, E. D. (1968) J. Pharmacol. exp. Ther. 163, 386.

6) Suzuki, O., Noguchi, E. and Yagi, K. (1977) Brain Res. 135, 305.

7) Lyles, G. A. (1978) Life Sci. 23, 223.

8) White, H. L. and Wu, J. C. (1975) J. Neurochem. 25, 21.

3 ラット視床下部各核レベルにおけるモノアミン酸化酵素活性の日内変動

釜瀬春隆・挾間秀文・国元憲文
川原隆造・水川六郎
(鳥取大・医・神経精神)

〔要約〕

明暗条件と恒暗条件下で飼育した雄成熟ラットを、前者は4時間ごとに6時点、後者は3時点で断頭して脳の凍結乾燥切片を作成し、視床下部神経核および関連諸核のモノアミン酸化酵素(MAO)活性の日内リズムを検討した。その結果、serotonin (5-HT)を基質としたMAO活性については、明暗条件下ではN. suprachiasmaticus (sc), N. supraopticus (so)をはじめ幾つかの視床下部神経核および中脳のstratum griseum superficiale colliculi superioris (SGS)が暗期に比し明期で高値を示す有意な変動を見い出し($p<0.01\sim0.05$)恒暗条件下でも同様にscを含む幾つかの神経核がやはり明期に高値を示す有意な変動、すなわち日内リズムを見い出した($p<0.01\sim0.05$)。scについては同調因子となる光の存在しない恒暗条件下でも明暗条件下と類似した日内リズムを示しており、近年、同部位が特に哺乳類の内因性日内リズムのペースメーカーとして注目されている点からも興味深い。中脳のSGSは明期の早期に一過性の有意な増加を示すが、恒暗条件下では変動はなく、網膜の光刺激と関連した変化として興味深い。β-phenylethylamine (β-PEA)を基質としたMAO活性を一部の神経核について検討したところ、sc、soでは5-HT MAOの場合と異なり明期に比し暗期に有意に増加するという結果が得られた($p<0.01\sim0.05$)。これらの神経核では神経伝達物質に依存して関連酵素活性に日内リズムの存在することが推定される。

動物の日内リズムについては、その中枢における調節機構に関心が寄せられ、脳内モノアミンや関連酵素についてもその日内リズムに対する種々の報告がなされている。内因性日内リズムのペースメーカーの脳内局在に関する研究には、神経生理学的破壊法や放電活動の記録のほか、大まかな脳部位を対象とした神経化学的測定が従来用いられてきたが、いまだ充分な結論は得られていない。今回、われわれはモノアミン酸化酵素(MAO)の微量測定法を用いて、ラット視床下部各核および関連諸核のMAO活性の日内リズムを検討した。

〈実験方法〉

実験には12週令のWistar系雄性ラットを1ケージ、6～7匹群居飼育して用いた。飼育室は温度、湿度ともにほぼ一定に保たれ、外部より完全に隔離され、人工照明を用いて室内の明暗をコントロールした。最初の2週間は午前8時点灯、午後8時消灯の12時間サイクルの明暗条件下で飼育した後、午後10時(D_2)、午前2時(D_6)、午前6時(D_{10})、午前10時(L_2)、午後2時(L_6)および午後6時(L_{10})の6時点でそれぞれ6匹ずつ断頭した。残りのラットは引き続き恒暗条件とした室内でさらに3週間飼育した後、午後10時(D_2)、午前10時(L_2)および午後2時(L_6)の3時点でそれぞれ6匹ずつ断

脚注: Abbreviation used: sc, N. suprachiasmaticus; so, N. supraopticus; fp, N. paraventricularis; ha, N. anterior; hl, A. laterlis; Rl, Recessus infundibuli; ar, N. arcuatus; hpv, N. periventricularis, hdd, N. dorsomedialis; hvm, N. ventromedialis; hl, A. lateralis; hp, N. posterior; hl, A. lateralis; a, N. acumbens; cp, N. caudatus putamen; Gp, Globus pallidus; A , Area A ; SGS, stratum griseum superficiale colliculi superioris; p, pineal body.

頭した。摘出した脳を液体窒素で固定、Lowryの方法[4]に従ってクリオスタット内で60μmの連続凍結乾燥切片を作成した。神経核は自家製のマイクロナイフを用いて実体顕微鏡下で構造別に切り出し重量測定を行なった。試料重量は0.6～8.0μgであった。(なお測定部位は脚注のとうりである。) MAO 活性の測定は McCamanらの方法を一部改変して行なった[3][6]。type A MAO の基質としては ^{14}C-5-hydroxytryptamine、type B MAO の基質としては ^{14}C-β-phenylethylamine をそれぞれ用いた。血漿コルチコステロンは断頭時採血したものにつき螢光測定法により測定した。またラットの行動量はオートメックスを用い、1時間毎の運動量として測定した。

<結果>

1)行動量の日内リズム：2週間明暗条件下で飼育したラットの行動リズムは暗期に一致して著明な運動量の亢進を示し、明期になると低下した。さらに3週間恒暗条件下で飼育したラットでは明暗条件下とほぼ同様の日内リズムを示した(Fig. 1)。

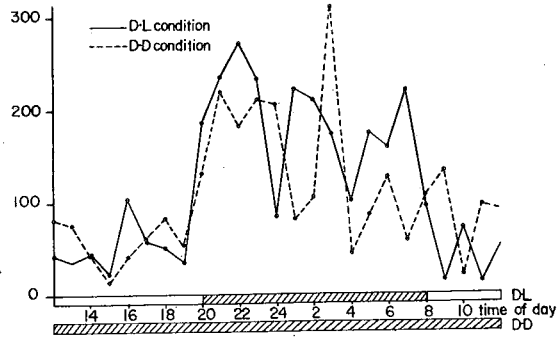


Fig. 1 The diurnal variations of motor activity

2)血漿コルチコステロンの日内リズム：明暗条件下のラットでは午後6時(L_{10})で最高値を示し、午前10時(L_2)で最低値を示すという正常の日内リズムを示した。恒暗条件下のラットでは、午後2時(L_6)で最高値を示したが、3時点の測定であり日内リズムの位相の変化の有無は明らかでない。

3) MAO 活性の日内リズム：明暗条件下での 5-HT MAO 活性には明らかな日内変動の認められる部位と変動の認められない部位とがあった(Fig. 2)。視床下部前部では N. supraopticus (so) がL_2で、N. supraopticus (so) および N. anterior (ha) がL_6で最高値を示し暗期に比べ有意な増加を示した($p<0.01\sim0.05$)。視床下部中央部では N. arcuatus (ar)、N. periventricularis (hpv)、N. dorsomedialis (hdd) において同じく暗期に比し明期で有意な高値が認められた($p<0.01\sim0.05$)。視床下部後部では N. posterior (hp) で明期有意な増加が認められ($p<0.05$)、視床下部以外の領域では中脳の stratum griseum superficiale colliculi superioris (SGS) において明期早期における有意な増加が認められた($p<0.05$)。恒暗条件下においても一部の神経核で 5-HT MAO に日内変動が認められた(Fig. 3)。統計的に有意な変動が認められた部位は視床下部前部の sc、so のほか、中央部で hpv、後部で ar、hp であった($p<0.01\sim0.05$)。

β-PEA MAO 活性測定は、明暗条件下の視床下部神経核の一部について試みられた。その結果、視床下部前部の sc、so においてはD_{10}に最高値が認められ、その変動は有意であった($p<0.01\sim0.05$)。中央部の ar については極めて高い MAO 活性を示したが日内リズムは明らかでなかった。

<考察>

5-HT MAO活性については明暗条件下で視床下部の sc、so のほか、幾つかの神経核および中脳の SGS で暗期に比し明期で有意に増加する変動、つまり日内リズムが認められ

た。恒暗条件下に移した後もso、scでは明暗条件下と同様の日内リズムが認められた。恒暗条件下での変動は同調因子と思われる光の影響が除外されており、いわゆる内因性の日内リズムと考えることができると思われる。scについては、その破壊実験により各種の生体リズムがいずれも消失することが知られており[(a)(m)(s)(H)]、現在scは哺乳動物の日内リズムを同調させるもっとも有力な中枢部位と考えられている。今回の研究でこの部位に5-HT MAOのfree running rhythmが認められたことは興味深い。soは下垂体後葉ホルモン産生を行なう部位とされ、scと同様に日内リズムとの関係で注目されている部位である。内因性日内リズムとの関連では松果体もまた重要であるが、今回の実験では松果体実質細胞中のMAOとは親和性の低い5-HTを基質として用いたこともあり、低活性値を示し、日内リズムは見い出しえなかった。そのほか内因性のペースメーカーの局在として注目されている部位に、摂食との関係でN. ventromedialis (hvm) とArea lateralis (hl) があげられるが、今回の実験では、これらの両核では著明なMAO活性の変動は見い出せなかった。

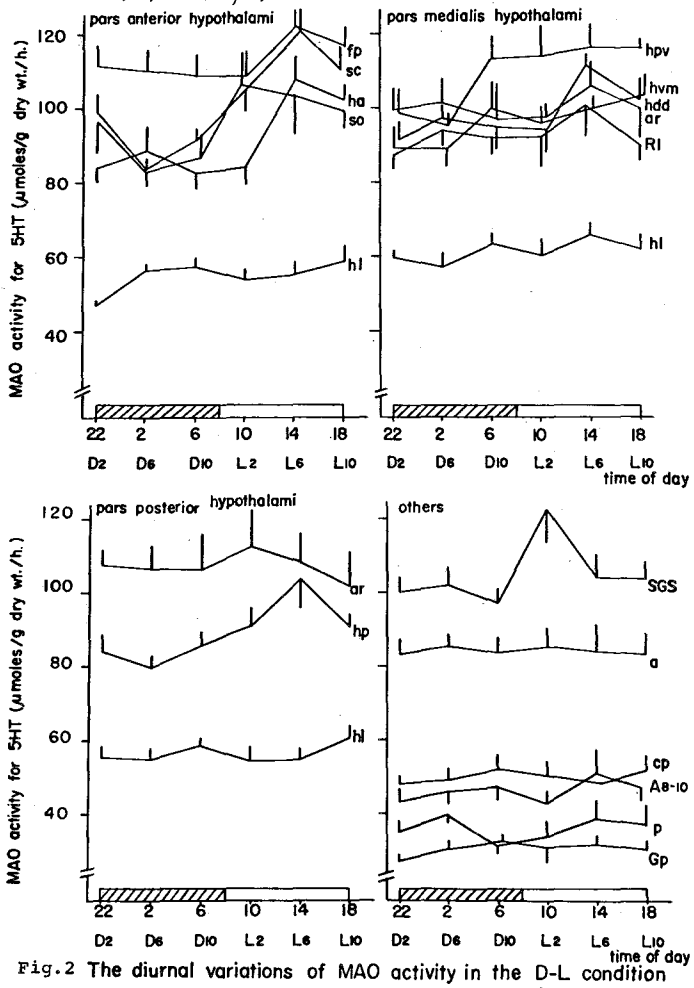


Fig.2 The diurnal variations of MAO activity in the D-L condition (Mean ± S.E.)

今回の実験結果の中で、中脳のSGSは明暗条件下でL2のみでMAO活性の有意な増加を示し、恒暗条件下では目立った変動がないという所見を得たが、この結果は網膜における光刺激と関連し、視覚路におけるモノアミン系の何らかの役割を示唆するものであろう。

β-PEAを基質としたMAO活性の測定はsc、so、arなどの限られた神経核について行なった。その結果は5-HT MAOの結果と異なり、sc、soともにD10で最高値を示し、明期に比し暗期で有意に高いという日内リズムを認めた($p<0.01\sim0.05$)。このことは、sc、soにおいてMAO基質特異性の異なる神経伝達物質がそれぞれ異なる日内リズムをもっていることを示唆している。

本実験の5-HT MAO活性の日内リズムは、総じて明期に高く、暗期に低いという傾

向を示しており、これまで報告された視床下部における5-HTの日内リズム[9]の結果と一致する。Noradrenalineについては5-HTと逆位相で暗期に高く、明期に低いと報告されている[5]。関連酵素としてDopamine-β-hydroxylase活性は、視床下部前部で暗期で有意に高いとの報告がされている[1]。脳内MAO活性の日内リズムについての報告は極めて少ない。庄盛らはtyramine MAO活性は肉脳では暗期(D_2)に比し明期(L_2,L_6)で有意に低い日内リズムを認めたとしている[10]。Phenylethylamine MAO活性については肉脳では有意な変動は見い出されていないが、D_6、D_{10}で高値を、L_2で最低値を示しており[10]、sc、soについてのβ-PEA MAO活性の結果と類似しており興味深い。しかしながら、これらの報告は脳の大まかな部位別の結果であり、ただちに今回の結果と比較することはできない。

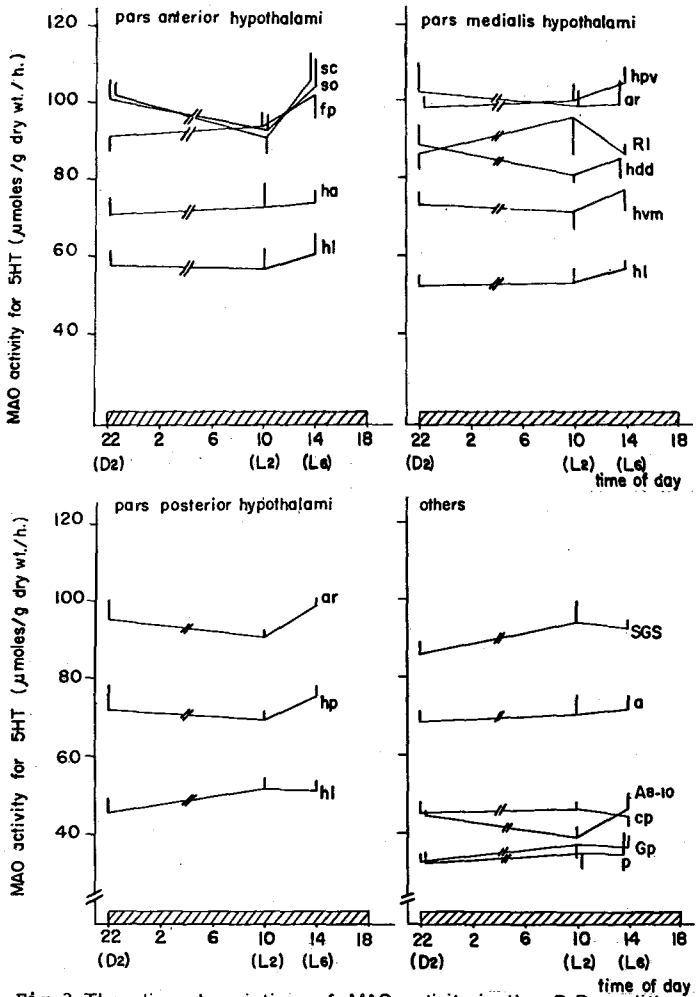


Fig.3 The diurnal variations of MAO activity in the D-D condition (Mean ± S.E.)

[文献] (1) Daiguji,M., Mikuni,M., Okada,F. and Yamashita,I. (1978) Brain Res., 155, 409.

(2) Ibuka,N. and Kawamura,H. (1975) Brain Res., 96, 76.

(3) Kunimoto,N., Hazama,H. and Kamase,H., Brain Res., In press.

(4) Lowry,O.H. (1962) Havey Lecture, 58, 1.

(5) Manshardt,J. and Wurtman,R.J. (1968) Nature, 212, 574.

(6) McCaman,R.E., McCaman,M.W., Hunt,J.M. and Smith,M.S. (1965) J. Neurochem., 12, 15.

(7) Moore,R.Y. and Eichler,V.B. (1972) Brain Res., 42, 201.

(8) Moore,R.Y. and Klein,D.C. (1974) Brain Res., 71, 13.

(9) Quay,W.B., Am. J. (1968) Physiol., 215, 1448.

(10) 庄盛、土井、中野、沖田、高坂 (1978) 神経化学 17, 177.

(11) Stephan,F.K. and Zucker,I. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 1583.

4 Tryptophan 5-monooxygenaseの活性化と新しい活性化物質の作用機作

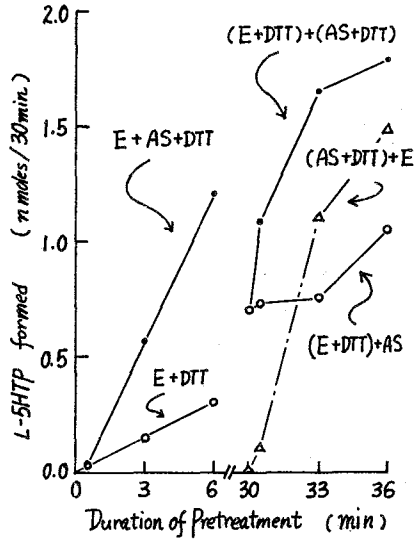
堀　真一郎・大谷幸子
（都神経研）

〔要　約〕

Serotonin 生合成の初一段階を触媒するTryptophan 5-monooxygenaseは大部分顆粒分画に存在し，SH剤により活性化される。　アルカリpH，高塩濃度，超音波処理により可溶化した酵素標品中に，従来報告された活性化因子である牛血清アルブミン，隣脂質及びヘパリンとは異なる活性化物質がみいだされた。　酵素は活性化物質とDithiothreitolと共にアルカリpHで25℃ 30分処理することにより活性を増大した。　活性化の初速度の解析から，活性化物質による酵素活性化の過程には　酵素及び活性化物質両者のDithiothreitolによる還元と，還元された両者の相互作用が存在することが示唆された。酵素のみかけのK_mは活性化物質の存在によって変化しなかった。　Reduced Biopterin及び$DMPH_4$に対するみかけのK_mはそれぞれ80μM，280μMであり，L-Tryptophan及び酸素に対するみかけのK_mはReduced Biopterinを用いた場合，それぞれ8.8μM，6.4%であり，$DMPH_4$を用いた場合，それぞれ10.4μM，8.4%であった。　L-Tryptophan及び酸素による基質阻害はReduced Biopterinを用いた場合に，著るしかったが，$DMPH_4$を用いた場合には　それぞれ0.5mM，及び20%の濃度に於て基質阻害はみられなかった。　みかけのV_{max}は活性化物質によって1.5~2.3倍増大した。　このことは酵素に活性化物質が関与する活性型と不活性型があることを示唆する。　活性化物質はトリプシン分解により，活性化作用を著しく失った。　このことより，活性化物質はペプチド性のものであると思われる。

[Introduction]　脳，松果体のSerotonin 生合成の初一段階を触媒するTryptophan 5-monooxygenaseはDithiothreitol，2-Mercaptoethanol，Cysteine，Cysteamine及びReduced Glutathioneの様なSH剤により活性化される(1,2,5)。　この活性化により脳幹及び松果体に於るこの酵素の細胞内分布をしらべたところ，顆粒分画にかなりの活性が回収された(3)。顆粒結合酵素はアルカリpH，高塩濃度及び超音波処理により可溶化された。　更に，可溶化酵素標品から酵素活性を増強する物質がHydroxylapatite Column Chromatographyによって分離された。　この活性化物質は　従来この種の酵素の活性化因子として報告されている牛血清アルブミン，隣脂質，ヘパリンとは異なるものであることが示唆された(4)。　ここでは　この活性化物質の作用機作及び酵素と基質との関係におよぼす作用について得られた知見を報告する。

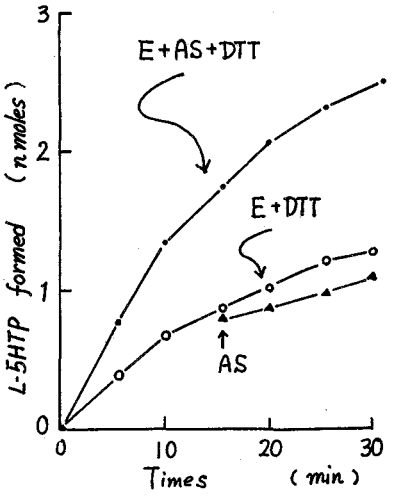
図1 Activation Velocities of Tryptophan 5-monooxygenase



[Methods]　Tryptophan 5-monooxygenase及びその活性化物質は　先に報告した如く調整した(4)。

酵素活性の測定； L-Tryptophan から生成された 5-hydroxytryptophan を Fluorometric に定量した。Phosphate Buffer, pH6.5, 72 μmoles ; L-Tryptophan, 0.18μmol.; DMPH4, 0.36μmol.; Dithiothreitol, 10.8μmol. (終濃度として); Pargyline, 0.36μmol.; NSD1034, 0.36μmol.; Catalase, 25μg; 活性化した酵素液 0.15ml を含む反応液 0.36 ml で, 25℃, 30分反応した後, 50% Perchloric acid 40μl を加え, 酵素反応を停止し, 遠心により生じた上清 200μl に 3.46N HCl 1.3ml を加えて, 励起波長 296nm による放出波長 540nm での螢光強度を測定した。各測定ごとに, L-Tryptophan の変りに D-Tryptophan を加えたものを Blank として, 差を酵素活性とした。

図2 Time-Courses of 5HTP-formation



酵素の活性化； 酵素活性の測定に先立って, 酵素標品を Tris-buffer, pH8.5, 150 mM ; Dithiothreitol, 50mM と共に, N_2 gas 中で 25℃, 30分 保つことによった。

助酵素 Biopterin, DMPH4 は 水素ガス下で, Platinum oxide の存在下に還元し, 265nm の吸光度から, それぞれ分子吸光係数 16 及び 4.13 を使用して, 濃度を決めた。

[Results and Discussion] 酵素活性化の初速度 図1 に示す如く Dithiothreitol により処理しない場合の酵素標品は低い酵素活性しか示さないが, Dithiothreitol との反応後 3分及び 6分に於る酵素活性はそれぞれ 0.146 及び 0.31 nmol./30分であった (E+DTT)。 活性化物質を加えた場合, 0.5, 3 及び 6分後の酵素活性は 0.07, 0.57 及び 1.21 nmol./30分 (E+AS+DTT) であった。 活性化物質を前もって Dithiothreitol と 25℃ 30分処理した後, 酵素標品を加えて, 0.5, 3 及び 6分に於る酵素活性はそれぞれ 0.11, 1.11 及び 1.48 nmol./30分であった ((AS+DTT)+E)。 酵素活性化反応開始後 3分での酵素活性で比較すると, 酵素の活性化速度は 活性化物質を前もって Dithiothreitol で処理しておいた方が, しない場合に比して 1.9 倍, 酵素標品を Dithiothreitol のみで処理した場合に比すると 7.6 倍速い。

図3

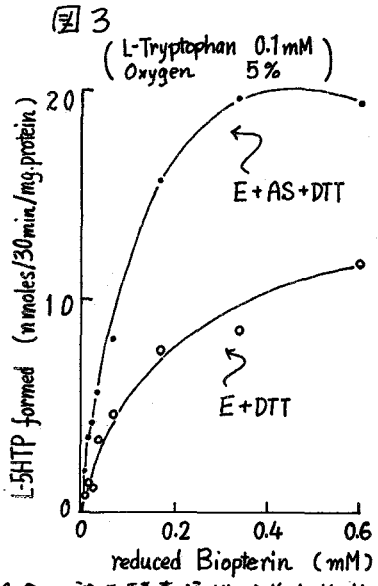
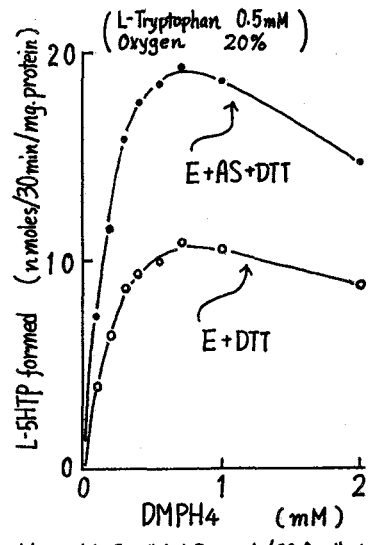


図4



とになる。 更に，前もって酵素標品及び活性化物質をそれぞれ別々にDithiothreitolと共に25℃ 30分処理した後，両方を混和した後 0.5，3及び6分での酵素活性はそれぞれ1.09，1.65及び1.77 nmol./30分であった ((E+DTT)+(AS+DTT))。 即ち，混和後0.5及び3分の間に於る酵素活性の増強は それぞれ0.38及び0.94 nmol./30分であり，活性化速度は 前もって活性化物質のみを Dithiothreitol で処理した場合 ((AS+DTT)+E)よりも速かった。 さて，前もって酵素標品をDithiothreitolで25℃ 30分処理した後，活性化物質を加えた場合の添加直後，3及び6分に於る酵素活は それぞれ0.71，0.76 及び1.01 nmol./30分であり，酵素活性は3～6分の遅延をもって増強した((E+DTT)+AS)。 これらの結果からして，活性化物質による酵素活性の過程には 酵素のみならず活性化物質のDithiothreitolによる還元が必要であることが示唆される。

図5

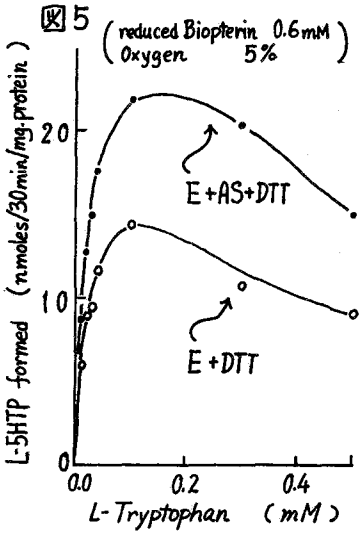


図6

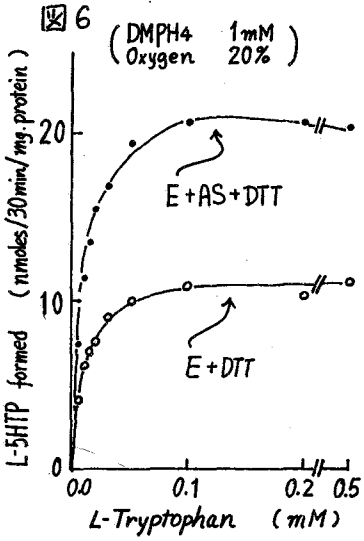


図7

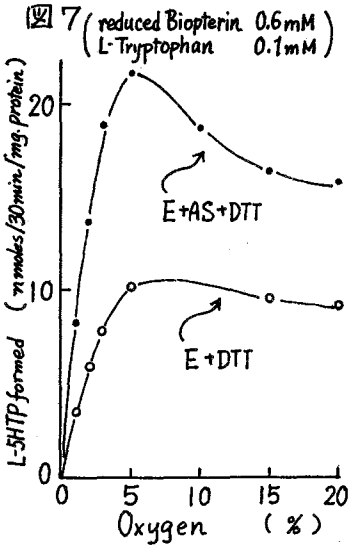
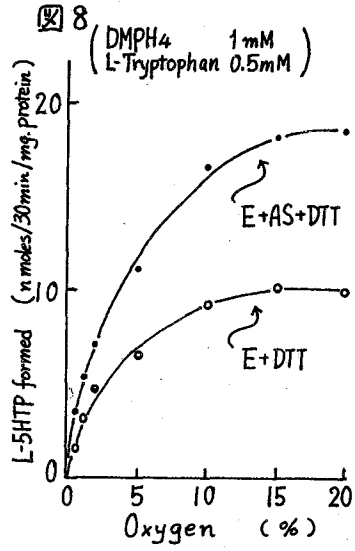


図8



Monooxygenase反応に及ぼす活性化物質の作用

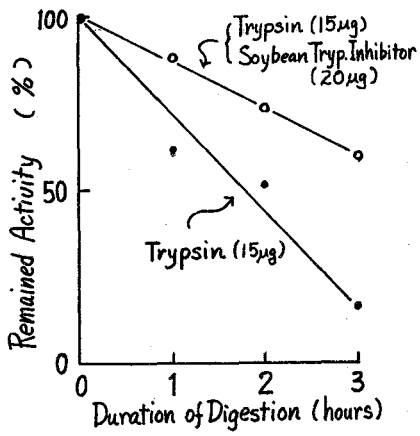
A Monooxygenase反応のTime-Course 図2に示す様に5HTPの生成速度は 酵素標品を前もって処理したか否かにかかわらず，漸次減少した。 活性化物質を Monooxygenase 反応の途中で添加しても，その反応速度の漸次減少の傾向は変らなかった。 このことから，活性化物質による酵素の活性化は Monooxygenase の酵素反応の経過中に 助酵素あるいは基質であるL-Tryptophan及び酸素との間の直接的相互作用によるとするよりも，むしろ Dithiothreitol 存在下に酵素と活性化物質を処理することにより，酵素自身が活性化されていることを示す。 この点を更に検索するため，酵素と基質との関係を動的に解析した。

B monooxygenase 反応の動的解析　図3～8 に示す様に 助酵素である Reduced Biopterin 又は DMPH4 及び基質である L-Tryptophan，酸素の反応液中の濃度の変化に対する 5HTP 生成の速度は Michaelis-Menten 型であった。 Reduced Biopterin を助酵素として使用した場合，Friedman らにより先に報告された如く 基質である L-Tryptophan に対し顕著な基質阻害がみられた。 酸素に対しても Reduced Biopterin を助酵素とした場合，基質阻害が著しかった。 よって，Reduced Biopterin を助酵素として使用するときには 酸素 5% (図3，5)，L-Tryptophan 0.1mM (図3．7) を使用して基質阻害をさけた。 Double reciprocal plots から推定された みかけ上の Km 及び Vmax は表1の如くであった。 Reduced Biopterin に対する Km は合成助酵素である DMPH4 の Km に比較して 従来報告された如く小さかったが，L-Tryptophan，酸素に対する Km は Reduced Biopterin を使用した場合と，DMPH4 を使用した場合の間に 著しい差はみられなかった。 活性化物質は いずれの基質及び助酵素のみかけの Km を変化させなかったが，Vmax を 1.5～2.3 倍増大させた。 このことから，Tryptophan 5-monooxygenase には 活性化物質の関与した活性型と不活性型が存在することが示唆された。

表1 Tryptophan-5-monooxygenase のみかけの Km 及び Vmax

Substrate	Co-enzyme	Km	Vmax (nmoles/30min/mg.protein)	
			AS(+)	AS(−)
Reduced Biopterin	—	80μM	24.8	11.0
DMPH4	—	280μM	26.3	14.3
L-Tryptophan	Reduced Biopterin	8.8μM	24.4	16.5
	DMPH4	10.4μM	20.0	9.1
Oxygen	Reduced Biopterin	6.4%	27.0	11.9
	DMPH4	8.4%	23.8	13.9

図9 Trypsin-Digestion of The Activating Substance.



活性化物質のトリプシン処理　図9は活性化物質をトリプシンで 0，1，2 及び3時間分解した後，酵素活性を増強する作用について調べたものであるが，トリプシン分解時に Soybean の Trypsin Inhibitor を添加してある対照に比して，著しく酵素活性化作用は弱められた。 このことから，活性化物質はペプチド性のものであろうと思われる。

(研究の一部は 堀が 1977.10～1979.9 の間 Visiting Scientist として，米国NIH に留学中になされた。 ここに記載した一部は 1979年4月 Dallas に於て開催された 63rd Annual Meeting of FASEB で発表された。)

参考文献　1 Hamon, M., Bourgoin, S., Héry, F., and Simonnet, G. (1978) Neurochem. Research. 3 585-598.　2 Hori, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 384 58-68.
3 Hori, S., Kuroda, Y., Saito, K., and Ohotani, S. (1976) J. Neurochem. 27 911-914.
4 Hori, S., and Ohotani, S. (1978) J. Neurochem. 31 663-671.　5 Ichiyama, A., Hori, S., Mashimo, Y., Nukiwa, T., and Makuuchi, H. (1974) FEBS Lett. 40 88-91.

5 ラット脳幹のトリプトファン水酸化酵素の活性化と細胞質タンパクのリン酸化における Ca^{2+}-Dependent Regulator Proteinの役割

山内 卓・藤沢 仁
(旭川医大・I生化)

〔要 約〕

ラット脳幹細胞質のトリプトファン水酸化酵素は生理的濃度の Ca^{2+} の存在下にATP, Mg^{2+} と反応させると約2倍活性化された。そこでこの酵素の活性化の機構を明らかにするために，トリプトファン水酸化酵素と活性化因子の分離を試みたところ，ラット脳幹の抽出液にEGTAを加えて硫安分画を行うと，トリプトファン水酸化酵素と活性化因子が分離された。すなわち，トリプトファン水酸化酵素は25-55%飽和硫安画分（Fr.I）に，活性化因子は55-90%画分（Fr.II）に得られた。Fr.IIに存在する活性化因子は，Ca^{2+}-Dependent Regulator Protein（CDR）によって完全に置き代えることができた。このCDRによるトリプトファン水酸化酵素の活性化も生理的濃度の Ca^{2+} とATP, Mg^{2+} を必要とした。このことはトリプトファン水酸化酵素がCDR-依存性のプロテインキナーゼの作用によって活性化されること，及び，Fr.Iにはトリプトファン水酸化酵素とCDR-依存性プロテインキナーゼが存在することを示唆している。そこで，脳幹細胞質タンパクのリン酸化がCDRによって促進されるかどうか調べると，いくつかの細胞質タンパクのリン酸化がCDRと生理的濃度の Ca^{2+} が共存するときにのみ促進されたことから，脳幹細胞質にはCDR-依存性プロテインキナーゼが存在することが明らかになった。以上の結果は，ラット脳幹のトリプトファン水酸化酵素の活性化が Ca^{2+}, ATP, Mg^{2+} の存在下にCDR-依存性プロテインキナーゼにより調節されていることを示している。

トリプトファン水酸化酵素はセロトニン生合成の律速酵素であり，本酵素の活性調節機構を明らかにすることは生体内のセロトニン合成の調節を知るために極めて重要である。最近いくつかの研究室から本酵素がATP, Mg^{2+} 存在下に生理的濃度の Ca^{2+} によって活性化されることが報告された(9,11,13)。我々はこのATP, Mg^{2+}, Ca^{2+} による本酵素の活性化が，可逆的であり，Ca^{2+} の有無によって本酵素が活性の高い状態と低い状態とに相を変換されることから，本酵素の活性化がタンパクのリン酸化反応を介して調節されていることを示した(18)。さらに，この活性化に関与するタンパク成分を明らかにするために，トリプトファン水酸化酵素と活性化因子の分離を試み，ラット脳幹抽出液にEGTAを加えて硫安分画を行うことにより分離に成功した。そして，本酵素の活性化因子は Ca^{2+}-Dependent Regulator Protein（CDR）であり，CDRによる本酵素の活性化はCDR-依存性プロテインキナーゼの作用によるタンパクリン酸化反応を介していること(19)，および脳の細胞質タンパクの Ca^{2+} 依存性のリン酸化はほとんどすべてCDR-依存性のプロテインキナーゼによるものであることが明らかとなったので報告する。

[実験方法]

トリプトファン水酸化酵素と活性化因子の調製　ラットの脳幹を4倍容の2mM DTTを含む50mM Tris/Acetate buffer, pH 7.6 でホモゲナイズし 39,000×g で30分間遠心した。遠心上清にそれぞれ終濃度が5mMと1mMになるようトリプトファンとEGTAを加え硫安分画した。25-55%飽和硫安画分（Fr.I）と55-90%画分（Fr.II）を得，20mM Tris/Acetate buffer, pH 7.6, 2mM DTTに透析し以下の実験に用いた。トリプトファン水酸化

酵素は Fr.I に，活性化因子は Fr.II に存在した。

ラット脳の CDR は Wang and Desai の方法(24)で精製した。

トリプトファン水酸化酵素活性の測定　酵素活性は 6-メチルテトラヒドロプテリン (6-MPH$_4$)を補酵素とし，トリプトファンより生成した 5-オキシトリプトファンを蛍光法(10)によって測定した。トリプトファン水酸化酵素の活性化反応は，反応中に酵素が不活性化されることをさけるため，トリプトファン水酸化反応と同時に行った。反応液は 0.4 ml とし，標準反応液には 50 mM Hepes buffer, pH 7.1, 500 μM ATP, 5mM $MgCl_2$, 100 μM $CaCl_2$, 100 μM EGTA, 3.5 μg ラット脳 CDR, 400 μM トリプトファン, 300 μM 6-MPH$_4$, 2 mM DTT, 50 μg カタラーゼ，および，酵素を加え 30°C で 20 分間反応させ，生成した 5-オキシトリプトファンを測定した。

細胞質タンパクのリン酸化　ラット脳幹を 4 倍容の 0.32 M Sucrose- 0.01 M Tris/Acetate buffer, pH 7.6 でホモゲナイズし，105,000 ×g で 60 分間遠心して得た上清を Bio Gel P-10 カラムにかけ低分子物質を除き，細胞質画分として用いた。細胞質タンパクは，1mM EGTA を加えて硫安分画し，25-55% 飽和硫安画分 (Fr.I) と 55-90 % 画分 (Fr.II) に分画した。リン酸化反応は，70 μl の反応液で行い，標準反応液には 50 mM Hepes buffer, pH 7.1, 100 μM [γ-^{32}P]ATP, 5mM $MgCl_2$, 100 μM $CaCl_2$, 100 μM EGTA, 5mM NaF, 0.7 μg CDR, およびラット脳幹の細胞質タンパクを加えて行った。30°, 10分間反応した後，タンパクへの ^{32}P のとり込みを Corbin and Reimann の方法(3)で測定し，あるいは，SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動にかけ分析した。

電気泳動　ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Davis の方法(6)で行った。

SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動は Maizel の方法(14)に従い，0.1 % SDS を含む 10 % ポリアクリルアミドゲル (14×15×0.2 cm) で，18 mA, 30 分間，ついで，25 mA, 5 時間泳動を行った。泳動後ゲルを染色，脱色した後，ゲルを 5% グリセリンに浸したセロファン紙にはさみ，乾燥させ，リン酸化されたタンパクをオートラジオグラフィーによって分析した。

タンパク測定　タンパクはウシ血清アルブミンを標準として Lowry の方法(12)で測定した。

[実験結果]

我々はラット脳幹細胞質のトリプトファン水酸化酵素が生理的濃度の Ca^{2+} の存在下に 0.5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ と反応させると約 2 倍活性化されることを報告した(18)。この活性化は反応時間とともに大きくなり 5～10 分で最大に達した。また，この活性化は可逆的であり，Ca^{2+} の有無によって活性の高い酵素と低い酵素とに相互変換されたことから，Ca^{2+} によるトリプトファン水酸化酵素の活性化はタンパクのリン酸化反応を介すことが示唆された。そこでトリプトファン水酸化酵素とその活性化因子の分離を試みた結果，ラット脳幹の抽出液に EGTA を加え硫安分画を行うことにより，両活性が分離された(Table 1)。トリプトファン水酸化酵素は Fr.I に存在し，Fr.II には活性がない。

Table 1. Effect of activator on activity of tryptophan 5-monooxygenase

Fraction	Tryptophan 5-monooxygenase unit	Activation
Fr.I	0.045	1
Fr.II	0.00	0
Fr.I + Fr.II	0.126	2.80
Fr.I + CDR	0.123	2.74
Fr.I + Fr.II + CDR	0.130	2.89

Fr.Iのトリプトファン水酸化酵素はATP, Mg^{2+}, Ca^{2+}と反応させても活性化されなかった。しかし，この反応液にFr.IIを加えると酵素は2.8倍活性化された。Fr.IIを7.5%ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動にかけると，活性化因子はBPB色素とほぼ同じ位置に一つのピークとして泳動され，活性化因子がCDRである可能性が考えられた。Fr.IIの代りに精製したCDRを加えるとFr.Iのトリプトファン水酸化酵素は活性化された(Table1)。CDRとFr.IIを同時に加えた場合にも酵素の活性化はCDRのみを加えた場合と同じであった。CDRによるトリプトファン水酸化酵素の活性化は生理的濃度のCa^{2+}の他に，ATPとMg^{2+}が必要であった(Table2)。これらの結果は，トリプトファン水酸化酵素のCa^{2+}による活性化はCDR-依存性プロテインキナーゼの作用によること，およびFr.Iにこのプロテインキナーゼが存在することを示している。

そこで脳幹の細胞質タンパクのリン酸化がCDRの存在する場合に促進されるかどうか調べることにした。最近我々は，脳組織において細胞質タンパクのリン酸化が生理的濃度のCa^{2+}によって促進されることを見出しており(18)，細胞質タンパクを[γ-^{32}P]ATP, Mg^{2+}と反応させるとタンパクのリン酸化はCa^{2+}によって約2倍増大した。しかし，細胞質をFr.IとFr.IIの二つの画分に分離すると，それぞれの画分のみではタンパクのリン酸化はCa^{2+}によって促進されなかった(Table3)。Fr.IとFr.IIを混合するとタンパクのCa^{2+}によるリン酸化は元に回復し約2倍増加した。この反応液のFr.IIの代りに精製したCDRを加えて反応させると，タンパクのリン酸化はCa^{2+}によって，Fr.IIを加えた場合と同様に促進された。CDRとFr.IIを同時に加えてもCa^{2+}によるタンパクのリン酸化反応の促進効果は，それぞれ単独に反応させた場合と同じであった。また，Fr.IIにCDRを加えた場合はタンパクのリン酸化はほとんどみられなかった。これらの結果は，Fr.IにはCDRによって活性化されるプロテインキナーゼと，そのプロテインキナーゼの作用でリン酸化されるタンパクが含まれていることを示している。CDR存在下にリン酸化されたタンパクをオートラジオグラフィーによって分析すると，分子量45,000と60,000のポリペプチドおよび分子量55,000～66,000の数種のタンパクが特異的にリン酸化されることが明らかとなった。

以上の結果，ラット脳幹の細胞質にはCDR存在下にCa^{2+}によって活性化されるプロテインキナーゼが存在すること，このプロテインキナーゼの作用でリン酸化されるタンパクが存在すること，および，トリプトファン水酸化酵素がCDR-依存性プロテインキナーゼの作用によって活性調節されていることが明らかとなった。

Table 2. Requirements for activation of tryptophan 5-monooxygenase

System	Tryptophan 5-monooxygenase unit	%
Complete	0.113	254
- ATP	0.046	103
- $MgCl_2$	0.043	96
- $CaCl_2$	0.045	100
- CDR	0.045	100

Table 3. Effect of CDR on Ca^{2+}-dependent protein phosphorylation in rat brain cytosol

Fraction	^{32}P Incorporation + Ca^{2+}	- Ca^{2+}
	cpm	
Cytosol	15672	8388
Fr.I	10215	10499
Fr.II	136	152
Fr.I + Fr.II	18255	10267
Fr.I + CDR	18782	10195
Fr.I + Fr.II + CDR	17608	9732

[考察]

カルシウムイオンは神経組織の機能，とくに神経伝達物質の分泌と生合成に重要な役割を果していると言われている。最近脳のトリプトファン水酸化酵素が Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼの作用で活性化される可能性が報告され(9,11,13,18)，神経伝達物質の生合成の調節における Ca^{2+} の役割が注目されている。我々は今回の実験により，Ca^{2+} によるトリプトファン水酸化酵素の活性化は，CDR-依存性プロテインキナーゼの作用によること，および，Ca^{2+} による脳幹細胞質タンパクのリン酸化はCDRを必要とすることを明らかにした。　CDRは最初，ホスホジエステラーゼの活性化タンパクとして見出された(1,10)が，その後，Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼにもCDRを必要とする酵素が報告されている(2,4,5,16,17,23)。また，神経組織の膜タンパクの Ca^{2+} によるリン酸化反応がCDRによって促進されることが報告され(7,15)，タンパクのリン酸化反応におけるCDRの役割が注目されはじめた。我々の今回の実験から，CDR-依存性プロテインキナーゼがトリプトファン水酸化酵素の活性化と，細胞質タンパクのリン酸化に関与することを明らかにしたが，これは神経機能に重要な役割を果す Ca^{2+} の作用機作を解明する手がかりになる。　我々は，すでにカテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素がcAMP依存性プロテインキナーゼとホスホプロテインホスファターゼの作用でリン酸化-脱リン酸化される調節機構を報告した(20-22)。神経伝達物質のカテコールアミンやセロトニンの生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素とトリプトファン水酸化酵素はいくつかの共通した性質をもっているが，今回，トリプトファン水酸化酵素がリン酸化反応を介して活性調節されることが明らかとなり，このことはチロシン水酸化酵素の活性調節機構を考え合せると，興味深い。これらのリン酸化-脱リン酸化反応による律速酵素の調節機構はセロトニンやカテコールアミンの生合成の短時間の調節に対応するものと考えられる。

[文献]

1. Cheung, W. Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 533-538
2. Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J. G., Cohen, P. T. W., Vanaman, T. C. & Nairn, A. C. (1978) FEBS Lett. 92, 287-293
3. Corbin, J. D. & Reimann, E. M. (1974) Methods Enzymol. 38, 287-290
4. Dabrowska, R., Sherry, J. M. F., Aromatorio, D. K. & Hartshorne, D. J. (1978) Biochemistry 17, 253-258
5. Dabrowska, R. & Hartshorne, D. J. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1352-1359
6. Davis, B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427
7. DeLorenzo, R. J., Freedman, S. D., Yohe, W. B. & Maurer, S. C. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1838-1842
8. Friedman, P. A., Kappelman, A. H. & Kaufman, S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4165-4173
9. Hamon, M., Bourgoin, S., Hery, F. & Simonnet, G. (1978) Mol. Pharmacol. 14, 99-110
10. Kakiuchi, S., Yamazaki, R. & Nakajima, H. (1970) Proc. Jap. Acad. 46, 587-592
11. Kuhn, D. M., Vogel, R. L. & Lovenberg, W. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 759-766
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
13. Lysz, T. W. & Sze, P. Y. (1978) J. Neurosci. Res. 3, 411-418
14. Maizel, J. V., Jr. (1971) Methods Virol. 5, 179-246
15. Schulman, H. & Greengard, P. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5432-5436
16. Srivastava, A. K., Waisman, D. M., Brostrom, C. O. & Soderling, T. R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 583-586
17. Yagi, K. Yazawa, M., Kakiuchi, S., Ohshima, M. & Uenishi, K. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1338-1340
18. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. Arch. Biochem. Biophys. in press
19. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press
20. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 514-517
21. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 503-507
22. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6408-6413
23. Waisman, D. M., Singh, T. J. & Wang, J. H. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3387-3390
24. Wang, J. H. & Desai, R. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4175-4184

6　ラットにおけるmethamphetamine常同行動の逆耐性現象に対応する脳内tyrosine水酸化酵素の変動

西川　徹・渡部修三・高嶋瑞夫
融　道男
（国立神経センター）

〔要　約〕
ヒトで精神分裂病類似の症状を発現させるmethamphetamine(MAP)をラットに反復投与しMAPに対する感受性が増大（逆耐性現象）した時点で脳内各部位を対象としてtyrosine水酸化酵素(TH)の活性を継時的に測定した。逆耐性現象の指標としては1回投与では常同行動をおこさない少量のMAP(2mg/kg)を1回投与した際の常同行動を観察した。MAP 6 mg/kg/dayを腹腔内投与する場合、1回のみの投与で逆耐性現象が形成され、15日間反復投与すると100日以上この現象が持続した。MAP 6 mg/kg/dayを3日間反復投与し、投与終了1日と8日後に逆耐性現象の生じている時点で、線条体，黒質，中脳辺縁領域などをとり出し、6-methyltetrahydropterineを飽和した条件でTH活性の酵素学的性質について検討した。6 mg/kg MAP 3日間投与後、線条体のTH活性は24時間後に基質tyrosineに対するみかけのVmaxは対照群に比しわずかに増加したが、8日後には対照の80%に減少した。中脳辺縁領域ではみかけのVmaxが24時間後から増加し、8日後には126%となった。両部位ともKmの変化はほとんどなかった。9 mg/kg MAP 7日間投与、8日，21日後ともに黒質では対照群と差が認められなかった。以上の結果は、MAP反復投与後の逆耐性現象に対応して中脳辺縁領域でTHの誘導が生ずる可能性を示唆するものであり、精神分裂病のモデルと考えられるMAP投与動物に見られる生化学的変化として重要な意味があるとおもわれる。

d-methamphetamine(MAP)あるいはd-amphetamine(AMP)の慢性中毒はヒトで精神分裂病類似の症状を惹起し、その後は長期間休薬しても少量の再投与によって同様の症状が再燃するため分裂病の研究モデルとして注目されている。[1,2] ラットではMAP反復投与により常同行動の発現に関してMAPに対する長期間にわたる感受性増大（逆耐性現象）が生ずることが明らかにされている。この現象はdopamine(DA)の後シナプス受容体を遮断すると考えられている抗精神病剤や前シナプス側のmonoamineを枯渇させるreserpineの前処置によって抑制され、MAP以外のDAアゴニストの再投与でもひきおこされる（交差逆耐性現象）。従って逆耐性現象の発現には脳内のDA作動性ニューロンが深く関与していることが推測される。この実験はラットにMAPを反復投与したのち、逆耐性現象の生じている時点で、脳内DA作動性ニューロン各部位におけるtyrosine水酸化酵素(TH)の酵素学的性質の変化について研究したものである。

〔方法〕　常同行動の評価：雄性Wistar系ラット(200～300g)を1ケージに5匹ずつ入れ、7時～19時を明期とする明暗条件のもとで飼育した。ラットの行動評価はBorison ら[3]の作成した表を参考とし、用量を展開した急性投与実験にもとづいて次のような8段階の尺度で評定した。0；常同行動なし，1；軽度の探索行動，2；断続的なにおい嗅ぎ行動，3；頭を左右に振るが一ヵ所にとどまらない，4；一ヵ所にとどまるのは5分以内，5；一ヵ所にとどまって頭を左右に振る，6；頭を振りながらケージの床をなめる，かじる，7；前肢の異常運動が加わる，8；運動失調，前肢の内反。　薬物の投与法：MAPはmethamphetamine hydrochloride注射液を用い、1回の投与で運動失調を伴わないで常同行動を生ずる6 mg/kg/dayまたは9 mg/kg/dayを反復投与した。対照として同容量

の生理的食塩水を用い、1日1回一定時刻（10時～11時）に腹腔内に投与した。行動観察：1回の投与では常同行動を生じない MAP 2 mg/kg を1回再投与した時に明らかな常同行動（評価4以上）がおこれば逆耐性現象とみなした。はじめに投与日数と逆耐性現象の関係を調べる目的で MAP 6 mg/kg を1日，3日，7日，15日間反復投与したラットで投与終了後一定期間後に MAP 2 mg/kg を投与して行動を観察した。また 9 mg/kg を7日間反復投与したラットについても逆耐性現象の発現を観察した。TH活性の測定：MAP 6 mg/kg を3日間反復投与した後、1日と8日後．9 mg/kg を7日間投与した後8日、21日後．一定時刻に断頭し、0°C以下に保持した冷凍箱内で開頭後　冷凍室内（4°C）の砕氷上で脳スライスを作製し、直視下で線条体，黒質を切り出し[4]中脳辺縁領域として側坐核，嗅結節と少量の中隔を含む部分をとり出した。脳組織は脳部位によって3～7匹分をプールし、一部の実験（黒質）では1匹ずつの組織を、Coyle[5]の方法にならって、0.2% Triton X - 10 を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.0) の10倍容でホモジナイズした後、10,000 g 0°C で10分間遠心分離してその上清を測定まで－80°Cで保存した。TH活性は、渡部・市山ら[6]の方法により測定した。補酵素として飽和量の 6-methyltetrahydropterine を用い、その再成システムとして NADH と、dihydropteridine 還元酵素を用い二価鉄及び catalase などの存在下で L-1-^{14}C-tyrosine を基質として pH 6.6，37°C でインキュベートした。生じた L-1-^{14}C-DOPA に芳香族L－アミノ酸脱炭酸酵素を更に37°C下で作用させ生ずる $^{14}CO_2$ を KOH に吸着捕捉し Triton-toluene シンチレーターを加え放射能測定した。

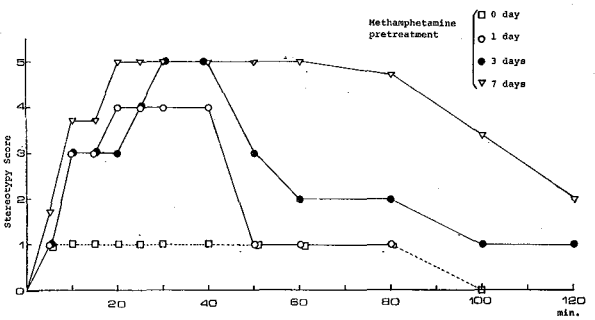


図1　MAP（6mg/kg/day, i.p.）反復投与後 24時間における MAP（2mg/kg）再投与によるラットの常同行動

〔結果〕(1)常同行動の観察（図1）

i)中毒量（6 mg/kg）の MAP 1回投与の24時間後に非中毒量（2 mg/kg）を与えたところ明らかな常同行動を生じた。ii) 6 mg/kg 3日投与群では1，8日後に、15日投与群では8，15，60，100日後に、9 mg/kg 7日投与群では8，21日後に2 mg/kg を投与し、あきらかな常同行動の再現をみた。

(2) TH活性の変化

i) 6 mg/kg MAP 3日間投与後、線条体の TH活性は24時間後に基質 tyrosine に対するみかけの Vmax は対照群に比しわずかに増加していたが、8日後に

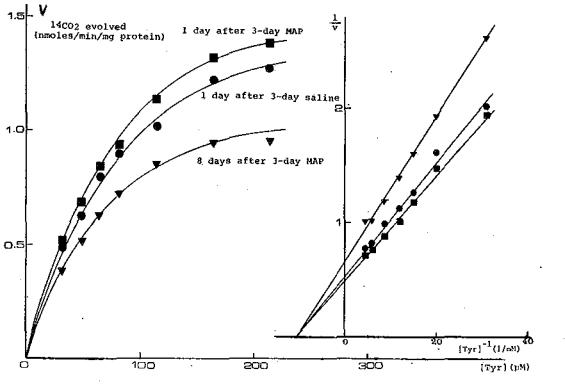


図2　MAP（6mg/kg/day, i.p.）3日間投与後、1日，8日における ラット線条体のTH活性

は対照の80％に減少した。みかけのKmにはほとんど変化はみられなかった（図2）。ii) 6 mg/kg MAP 3日投与後、中脳辺縁領域では24時間後にみかけのVmaxが対照群に比し、118％に増加し、8日後には126％になり、Vmaxの増加が続いていた。この部位でもKmはほとんど変化しなかった（図3）。iii) 9 mg/kg MAP 7日間投与後、黒質で個々の動物についてTHの活性を測定したが、8日、21日後いずれも対照群と有意な差は認められなかった（表1）。また、8日後についてはプールした黒質について酵素学的性質を調べたが対照との間に差はみられなかった(図4)。

表1 MAP（9mg/kg/day, i.p.）7日間投与後8日、21日におけるラット黒質のTH活性*

	Saline	MAP
8 days after injection	0.73±0.10 (4)	0.69±0.14 (4)
21 days after injection	0.73±0.03 (4)	0.68±0.06 (4)

* $^{14}CO_2$ evolved (nmoles/min/mg protein)

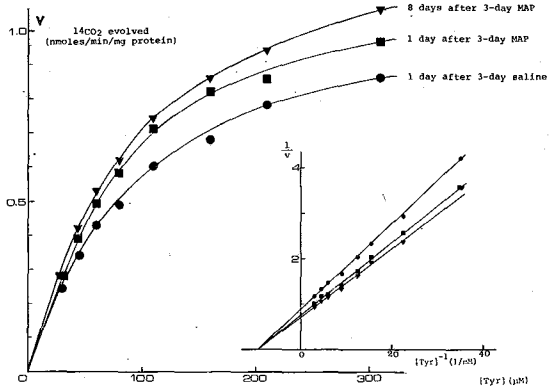


図3 MAP（6 mg/kg/day, i.p.）3日間投与後 1日、8日におけるラット中脳辺縁領域におけるTH活性

〔考察〕逆耐性現象はMAPやAMPばかりでなく、多くのDAアゴニストの反復投与によっても生ずることが知られており[7]、この発現はDA作動性ニューロンを介していると推測されているが、その生物学的機序については解明されるに至っていない。

ラットの常同行動の観察から明らかなように、逆耐性現象は急速に形成され、一旦完成すると長期間にわたって持続する特徴をもっている。われわれは中毒量MAP（6 mg/kg）を1回投与したラットで24時間後に非中毒量投与によって常同行動が生ずることを認め、6 mg/kgを15日間反復投与したラットでは100日以上この現象が継続するのを観察した。Klawansら[8]は、モルモットでAMP反復投与後にDA受容体を直接刺激するapomorphineに対する感受性が増すことから、逆耐性現象に後シナプス機構が関与していると考えた。しかしMullerら[9]はAMPおよびapomorphineを慢性投与したラットの線条体でreceptor assayを行い、前シナプス機能を反映するといわれる^{3}H-apomorphine bindingが有

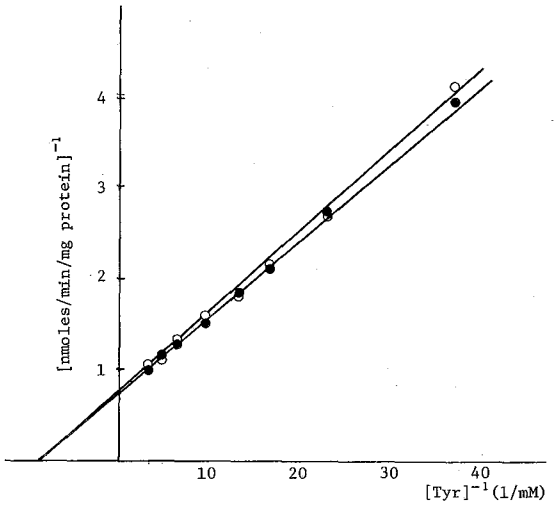


図4 MAP(9mg/kg/day, i.p.) 7日間投与後8日におけるラット黒質のTH活性

意に減少し、後シナプス機能を示すといわれる ^{3}H-haloperidol bindingでは対照群と差がないことを認めた。このことからMuller らは逆耐性現象の発現機構に前シナプス受容体の数の減少が関与していると考えた。われわれはこの現象は前シナプス側に過剰な DA 活動を生ずる準備状態が存することを想定してMAPを反復投与したラットの脳内 DA ニューロン各部位で TH 活性を測定した。その結果、常同行動の反応性増大が持続している時点で線条体における TH 活性は減少しており、黒質では変化が認められなかった。一方中脳辺縁領域ではMAP反復投与による常同行動の増強に対応して TH のみかけの Vmaxの持続的増加を認め対照との間にみかけのKmの変化がないことから TH の誘導が生じている可能性が示唆された。常同行動の発現に関しては、従来黒質線条体路の DA 作動性ニューロンの過剰活動に結びつけて考えられてきたが、Pijnenburg ら[10]は DA 拮抗剤の注入実験にもとづいてAMPにより誘発される常同行動に側坐核も関与していることを示し、Mckenzie[11]は破壊実験から嗅結節の関与を示唆し、中脳辺縁領域の変化も関連づけて考える動向も生じている。一般にAMPの急性投与により線条体のTHは減少することが知られており、慢性投与でも線条体における TH 活性が投与中より低下し、投与終了後 110日でも有意な低下を示したと報告されている。[12] kaneno ら[13]はラットを用い、chlorpromazine の抗精神病作用の作用部位が側坐核・中隔を含む中脳辺縁領域にある可能性を論じたが、抗精神病剤が常同行動に拮抗的に働くことから、Pijnenburg やMckenzieらの研究と合わせて考えると、MAPによる逆耐性現象が中脳辺縁領域の DA 作動性ニューロンの機能変化と結びついている可能性がある。慢性ヒロポン中毒や分裂病は屢々再発をくり返すが、動物にみられるMAPによる逆耐性現象を、このような疾患の症状を再燃させる準備状態のモデルと考えることもできる。この研究で見出された中脳辺縁領域に長期間持続する TH 誘導現象がこのような準備状態に対応する生物学的基礎の一面を示している可能性がある。更に分裂病はストレスによって再発することが知られているので、この点ではストレスによって TH が誘導されることも関連づけて研究を進める必要があろう。

〔文献〕

1) 台弘：現代精神医学大系 10B，精神分裂病II（台，村上，島薗編）p.177，中山書店，東京，1978
2) 佐藤光源：精神経誌，81：21，1979
3) Borison, R.L., Havdala, H.S., Diamond, B.I.: Life Sci., 21:117, 1977
4) 渡部，融，金野，浜谷，島薗：神経化学，15：56，1976
5) Coyle, J.T.: Biochem. Pharmacol., 21:1935, 1972
6) 渡部，片岡，市丸：生化学，47：229，1975
7) Post, R.M.: Psychopharmacology. (Lipton, M.A., Dimascio, A., Killam, K.F., ed.), p.1323, Raven Press, New York, 1978
8) Klawans, H.L., Margolin, D.I.: Arch. Gen. Psychiat., 32:725, 1975
9) Muller, P., Seeman, P. : Eur. J. Pharmacol., 55:149, 1979
10) Pijnenburg, A.J.J., Honig, W.M.M., Van Rossum, J.M.: Psychopharmacol., 45:65, 1975
11) Mckenzie, G.M.: Psychopharmacol., 23:212, 1972
12) Ellison,G., Eison, M.S., Huberman, H.S.: Science, 201:276, 1978
13) Kaneno, S., Watanabe, S., Toru, M., Shimazono, Y.: Brain Res., 152:396, 1978

7 ^{3}H-ジヒドロエルゴクリプチンの結合実験によるラット脳α受容体サブタイプの同定

芳賀達也・芳賀和子
(浜松医大・生化)

〔要約〕
(³H)ジヒドロエルゴクリプチン(³H-DHE)との結合実験により、ラット脳のアドレナリン性α受容体のサブタイプを同定した。
(1)材料としてシナプス膜を用い、1μMフェントラミンで阻害される結合を、α受容体への特異的結合とした。特異的結合は、$R+{}^3H\text{-}DHE \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} R\cdot{}^3H\text{-}DHE$ という単純な式で表わされた。k_1は、$5\sim7\times10^7 min^{-1}M^{-1}$, k_2は、$0.03\sim0.04 min^{-1}$, 解離定数は、k_2/k_1より0.4～0.8mM, Scatchard Plotより0.6～1mM. 結合部位の数は、1pmol/mg蛋白質と算出された。
(2)³H-DHEの特異的結合は、プラゾシンにより2相性に阻害され、プラゾシンに親和性の高い部位(P Site)と低い部位があることを示した。更に後者は、ヨヒンビンに親和性の高い部位(Y Site)と低い部位(X Site)から成る可能性が考えられた。各部位は全て、αアドレナリン性受容体の性質を示し、その比率は、P 25%, Y 25%, X 50%と見積られた。
(3) P, Y, X Site への各種リガンドの親和性を、一定濃度のプラゾシンヌはヨヒンビン存在下で、リガンドによる³H-DHE結合の阻害効果を解析することにより求めた。XとY Siteはよく似た親和性を示し、α_2型に、P Siteはα_1型に属すると考えられた。X, Y SiteはP Siteに比べアゴニストに対して親和性が高い。各サブタイプ内でも、種又は臓器による特異性の違いがあるものと推定された。

カテコールアミン受容体は、α, β, ドパミンの3種に分類されているが、最近α_1とα_2, β_1とβ_2, D1とD2というサブタイプへの細分類が提唱されている。β受容体は、β_1, β_2共にアデニレートサイクレースと連関しており、その分子的機構の研究が進展しているが、α受容体の場合は連関している反応がまだ同定されておらず、α_1とα_2で別の形の反応と結びついている可能性も考えられる。α_1とα_2は、最初ポストシナプスとプレシナプスに局在するものという形で分類されたが[3]、最近ではα_2型の受容体がポストシナプスや非神経組織にも存在すると報告されている[1]。

脳のα受容体については、Snyderグループが³H-WB4101で標識されるアンタゴニストに高い親和性を持つ状態と³Hクロニジンなどで標識されるアゴニストに高い親和性を持つものの2つの状態があると提案した[2]。一方、Miachらは標識化合物として³H-ジヒドロエルゴクリプチン(³H-DHE)を用い、α_1とα_2受容体の特異的なアンタゴニストであるプラゾシンとヨヒンビンの阻害効果を調べた結果から、脳にも末梢と同様α_1型とα_2型の受容体の存在を示唆した[4]。我々はMiachらの結果の一部を確認すると共に、その方法を一歩進め、プラゾシンとヨヒンビン存在下での³H-DHE結合に対する各種リガンドの効果を解析し、脳に存在する2種以上のα受容体サブタイプに対する各種リガンドの親和性を求めることが出来た。得られた結果を、³H-WB4101と³Hクロニジンを用いて得られた結果、末梢器官のα_1, α_2受容体について得られた結果と比較検討した。

〈実験方法〉

シナプス膜分画：約100gの雄ラットの全脳(約1.4g)を10倍容の0.32M庶糖溶液中で

ホモジェナイズした後、1,000g 15分、25,000g 20分の分画遠心で粗ミトコンドリア分画を得た。この分画を低張溶液(5mM トリス緩衝液 pH 7.7)中でホモジェナイズし、1.1M と 0.5M の庶糖重層液にのせ 25,000g で 90分遠心した。1.1M と 0.5M 庶糖溶液の中間にくる分画を、2倍容の水で稀釈後遠心し、沈渣を 0.32M 庶糖溶液に懸濁させてシナプス膜標品とし -80°C に保存した。ラット一匹より蛋白質として約10mg 得られた。

<u>3H-DHE 結合実験</u>：シナプス膜標品(通常蛋白質として約 85μg を使用)と 3H-DHE(1~2nM, 10,000 ~ 20,000 cpm, 溶液全量 0.5ml)を 30°C で 30分反応させた後、洗液 3ml を加えて沪過し、3ml の洗液で3回洗浄後、沪紙(Whatman GF/C ガラス繊維沪紙)を 80°C で2時間乾燥し、トリトン-トルエン系溶媒で 3H を計測した。反応液の組成は、20mM リン酸緩衝液(pH 7.5), 1mM $MgCl_2$, 0.1mg/ml ウシ血清アルブミン, 0.2mM アスコルビン酸, 32mM 庶糖, 1% エタノールである。非特異的結合の測定には、1μM フェントラミンを反応溶液に加えた。洗液は、20mM リン酸緩衝液, 1mM $MgCl_2$, 10μM フェントラミンである。実験は常に duplicate で行なった。

〈結果と考察〉

<u>3H-DHE 結合の平衡及至速度論的解析</u>：3H-DHE 濃度と結合量(1μM フェントラミン存在時の結合量を差し引いた特異的結合量)の関係を図1に示す。平衡定数(Kd)は約 1nM, 結合容量(R+)は 1pmol/mg 蛋白質である。3H-DHE が単純に $R + {}^3H\text{-}DHE \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R\cdot{}^3H\text{-}DHE$ という反応で結合するとすれば、結合量 Bt は $B_t = B_\infty(1 - e^{-(k_2 + k_1[DHE])t})$ という形で表わされる。適当な変形をして実験結果をプロットすれば、k_1 と k_2 を求めることができる。このような操作をすると結合の時間経過は実験誤差内でこの式に合致した(図2,3)。図2の実線は、この式に従って計算した結果である。求められた k_1 と k_2 の比 k_2/k_1 は、平衡定数 K_D とほぼ等しい(表1)。このことは一つの均一な結合部位があり、最も単純な反応で結合することを示している。この結果は後に述べる2種以上の 3H-DHE 結合部位という結果と矛盾するように見えるが、3H-DHE はこれらに共通する構造部分に結合し、各種の薬物はそれぞれの特異的部分を認識するという可能性が考えられる。

Table I. Kinetic and Equilibrium Constants of ^{3}H-DHE Binding.

Methods	k_1(min^{-1}nM^{-1})	k_2(min^{-1})	k_2/k_1(nM)	Kd(nM)
Dissociation Rate		0.028 0.034	0.4-0.7	
Binding Rate	0.046 0.067	0.038 0.036	0.6 0.8	
Binding Equilibrium				1.05 0.55

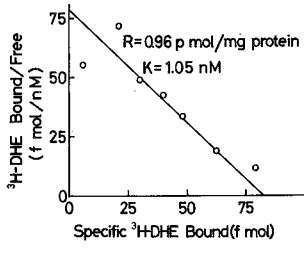


Fig.1 Scatchard Plot of Specific ^{3}H-DHE Binding.

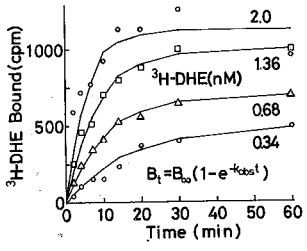


Fig.2 Time Course of Specific ^{3}H-DHE Binding.

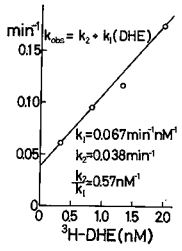


Fig.3 Analysis of Time Course of ^{3}H-DHE Binding.

2 及至 3 種の ^{3}H-DHE結合部位：末梢臓器の α_1 と α_2 それぞれの特異的なアンタゴニストであるプラゾシンとヨヒンビンによる ^{3}H-DHE結合の阻害曲線を図4,5に示す。プラゾシンによる阻害は明らかに2相性であり、約25%の結合部位がプラゾシンに高い親和性を持っている(P Site)。ヨヒンビンによる阻害曲線は、Miach らの報告と異なり明白な2相性を示さない。しかし、単一の阻害曲線と考えるには緩やかな曲線なので、2種の阻害曲線の和と考えて解析すると、ヨヒンビンに高い親和性を持つ部位(Y Site)が25%と計算された。低濃度のプラゾシン(図4)又は低濃度のヨヒンビン(図5)による阻害は、^{3}H-DHEの結合を約25%阻害する30mMヨヒンビン又は100mMプラゾシンの存在により影響を受けない。これはP Site はヨヒンビンに、Y Site はプラゾシンに親和性が低いことを示す。プラゾシン、ヨヒンビン双方に親和性の低い成分をX Site とすると、約50%の結合部位がX Site ということになる。各部位への ^{3}H-DHEの結合を阻害する濃度 IC_{50} は、プラゾシンの場合 0.5mM(P) と 4μM(Y, X)、ヨヒンビンの場合 18mM(Y) と 220mM(P, X) と計算される。

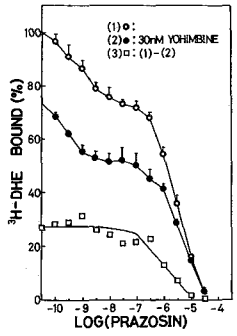


Fig.4 Displacement of ^{3}H-DHE Binding by Prazosin in the Absence (○) and Presence (○) of 30 nM Yihimbine.

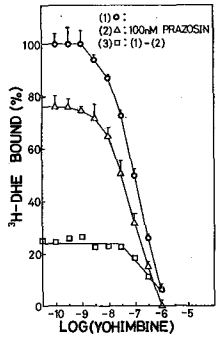


Fig.5 Displacement of ^{3}H-DHE Binding by Yohimbine in the Absence (△) and Presence (△) of 100 nM Prazosin.

リガンドの親和性の測定：図6(a)は、ノルアドレナリンによる ^{3}H-DHE結合の阻害曲線を(1)他のリガンドが無い時、(2)100mMプラゾシンが存在する時、(3)30mMヨヒンビンが存在する時、(4)両者が存在する時に調べたものである。(1)-(2)と(3)-(4)の平均を図7(b)に示してある。この曲線は、P Siteへの ^{3}H-DHEの結合に対するノルアドレナリンの阻害を示している。一方(1)-(3)と(2)-(4)の平均は、主としてY Siteへの ^{3}H-DHE結合に対するノルアドレナリンの効果を示す。図7(b)に示された結果は、ノルアドレナリンがY Siteに対しより高い親和性を持つことを示している。一方メトキサミンは両部位に対し等しい親和性を示し(図6(d))、インドラミンはP Siteにより高い親和性を持っている(図6(f))。

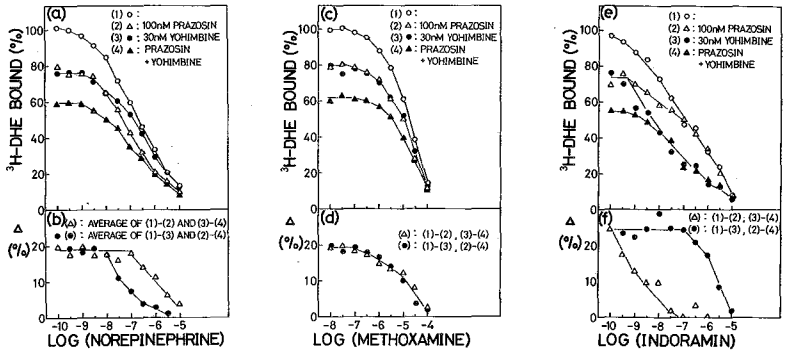


Fig.6 Displacement of ^{3}H-DHE Binding by Norepinephrine (a,b), Methoxamine (c,d) and Indoramin (e,f) in the Absence (1,○), Presence of 100 nM Prazosin (2,△), 30 nM Yohimbine (3,○) or Both 100 nM Prazosin and 30 nM Yohimbine (4,△). The average of (1)-(2) and (3)-(4) (△) and of (1)-(3) and (2)-(4) (○) are plotted in fig. (b), (d) and (f).

各Siteの性質: リガンドの親和性を示す尺度として、各Siteへの^{3}H-DHEの結合を50%阻害する濃度IC_{50}をとり、表2にまとめた。X Siteに対するIC_{50}は100mMプラゾシンと30mMヨヒンビン存在下の阻害曲線から求めた。P, Y, X Siteは全て、フェントラミンに高い親和性を持ち、イソプロテレノールに比べアドレナリンやノルアドレナリンに高い親和性を持つという点でαアドレナリン性受容体の性質を示す。又^{3}H-DHEの同族体であるジヒドロエルゴクリスチンに対しほぼ等しいIC_{50}を示す。これは、速度論的解析で見掛け上1つの結合部位であったことに対応する。^{3}H-DHEはドパミン受容体にも結合することが知られているが、各Siteともドパミン, スピロペリドール, アポモルフィンなどのドパミン性薬物に対する親和性が、ドパミン受容体に対するよりも低く、フェントラミンに親和性の高いことと合せて、ドパミン受容体の寄与は無視しうることを示す。

Table II IC_{50} Values of Adrenergic Agents for Inhibition of ^{3}H-DHE Binding

Agent	P Site	Y Site	X Site
	(nM)	(nM)	(nM)
Agonist			
Clonidine	390	11	39
Adrenaline	1000	23	41
Noradrenaline	1300	65	260
Phenylephrine*	2700	450	2800
Methoxamine*	11000	8900	15000
Oxymetazoline	15	2.4	9.1
Isoproterenol	42000	59000	29000
Antagonist			
Yohimbine**	210	18	210
Phentolamine	12	8	13
Prazosin*	0.5	4300	4300
Indoramin*	2.3	1700	260
Dihydroergocrystine	0.83	0.71	1.2
Others			
Dopamine	22000	830	580
Serotonin	58000	13000	3000
Spiroperidol	32	1100	830
Apomorphine	3800	210	34

PSiteは、X, Y Siteに比べアゴニストに対する親和性が低く、そのIC_{50}値は^{3}H-WB4101を用いて測定された結果と良く一致した。又P Siteはプラゾシン, インドラミンなどのα_1に特異的な薬物に高い親和性をもつので、α_1型に属する受容体と考えられる。一方、Y Siteはアゴニストに高い親和性を持ち、そのpIC_{50}値は^{3}Hクロニジンを用いて測定された値と高い相関関係があった(r 0.88, P Siteの場合 0.47)。又Y Siteは、薬理学的に調べられたプレシナプスのα_2受容体とも良く似た薬物親和性を示し、α_2型に属すると考えられる。以上の結果は、従来1種のα受容体の2つの状態(アゴニスト状態, アンタゴニスト状態)と解釈されたものが、末梢系と同様な2つのサブタイプに対応していることを示している。この結論は、ごく最近のSnyderグループによる結論と一致する。[5] ただし、2種の同一の受容体が各器官にあるのではなく、同一のサブタイプに属していても薬物特異性は受容体毎にかなり異なっているように思われる。X Siteはヨヒンビンに対する親和性という面ではα_2型と考えにくいが、アゴニストに対し高い親和性を持つこと、pIC_{50}値がY Siteと高い相関を持つこと(r 0.92, P Siteとはr 0.6)から、Y Siteと同じα_2型に属し薬物に対する特異性が少し異なっている可能性が考えられる。ただし現在の段階ではXとYが別の受容体であると断定することは難かしい。

α_1, α_2という薬理学的基準による分類が、受容体と連関している反応の違いに対応しているのかというのが今後に残された興味ある問題である。

References 1] S.Berthelsen & W.A.Pettinger: Life Sci. 21,595-606(1977). 2] D.A.Greenberg & S.H.Snyder: Mol. Pharm. 14,38-49(1978). 3] S.Z.Langer: Biochem. Pharm. 23,1793-1800(1974) 4] P.J.Miach, J.P.Dausse & P.Meyer: Nature 274,492-494(1978). 5] D.C.U'Prichard & S.H.Snyder: Life Sci. 24,79-88(1979).

アドレナリン性薬品の原末を御供与下さった、日本ベーリンガー, 日本チバガイギー, 日本新薬, サンド薬品, 台糖ファイザー, 長生堂, 中外製薬, エイザイの各社に感謝致します。この研究の一部は、精神薬療基金研究年報(1978)に発表した。

8　dopamine受容体とspiroperidol受容体の差異

山脇泰秀・小川紀雄・大藤　真
（岡大・医・Ⅲ内）

〔要　約〕

dopamineの受容体と，向精神薬であるspiroperidolの受容体とが全く同一のものであるか否かを明らかにするために，〔^{3}H〕－dopamineと〔^{3}H〕－spiroperidolとをそれぞれtracerとし，rat脳をreceptor siteとするradioreceptor assay系を確立し，比較検討した。dopamine radioreceptor assayにおいては，向精神薬であるhaloperidolは全く交叉反応を示さず，chlorpromazine も極めてわずかなdisplacementを示したにすぎなかった。一方，spiroperidol radioreceptor assay系においては，haloperidol及びchlorpromazineは極めて強い交叉反応性を示したが，dopamineは極めてわずかな交叉反応性しか示さず，両assay系における特異性には大きな差異がみられた。その他数種の中枢神経作用薬の交叉反応性も両radioreceptor assayで異っていた。更に，〔^{3}H〕－dopamineあるいは〔^{3}H〕－spiroperidolをそれぞれの受容体に結合させた後，Triton X－100で可溶化しSepharose 6Bカラム上で溶出すると，dopamine受容体結合物とspiroperidol受容体結合物とは全く異った分画に溶出され，前者の分子量は約20万，後者の分子量は約12万であった。以上のように，radioreceptor assay の特異性の差，受容体の分子量の差から，dopamine受容体とspiroperidol受容体とは異ったものであると考えられる。

向精神薬はdopamine(DA)受容体を遮断することにより，その作用を発揮するという仮説に従って，この数年，標識向精神薬をtracerとしたradioreceptor assay(RRA) が行われ，その得られた成績がDA受容体を具現しているものとして論じられてきた(5)(6)(7)。しかしながら，向精神薬は数種の（内因性物質に対する）受容体に作用するという報告が増しつつあり(1)(4)，tracerとして向精神薬を用いた場合の受容体結合が果してDA受容体結合と同じものであるかどうかに，疑問が持たれ始めている。我々は向精神薬がDA受容体に結合するか否かを明確にする為に，〔^{3}H〕－DA及び，〔^{3}H〕－spiroperidol（SP）をtracer とする2種のRRA系を確立し，薬理学的並びに生化学的に検討を加え，DA受容体とSP受容体とは異ったものであることを明らかにしたので報告する。

方　　法

1) dopamine radioreceptor assay（DA－RRA）及びspiroperidol radioreceptor assay（SP－RRA）：SD系雄ラット（体重200～250 g）を断頭屠殺後，脳線条体をとり出し，150容量の氷冷Tris-buffer（50 mM Tris／HCl buffer 125 μM nialamide，および12.5 μM disulfiram含有，pH7.6）を加え，Brikman Polytron PT－10でhomogenateした。50,000×g，4℃で20分間遠心後pelletをTris bufferでresuspendし，37℃の温浴中で30分間振盪しながらincubateし，再び50,000×g，4℃で20分間遠沈して，そのpelletをTris bufferでresuspendしたものをreceptor preparationとした。その0.5 mlと，0.3 mlのTris buffer，0.1 mlの試料，0.1 mlの〔^{3}H〕－DA（specific activity 14.78 Ci／mmole；最終濃度3.7×10^{-9}M）又は〔^{3}H〕－SP（specific activity 20.0 Ci／mmole；最終濃度3.5×10^{-9}M）と混じ，氷水中で90分間incubateした後，mediumをglass fiber filter（Whatman GF／C）にのせて吸引濾過し，3 mlの氷冷Tris bufferで2回洗滌し，filterごとcounting vialに入れscintillatorを加えてβ－counterにより測定した。過量の非標識DA（1 mM）（あるいは100 mMの非標識SP）の存在下と非存在下での〔^{3}H〕－DA（又は〔^{3}H〕－SP）の線条体homogenateへの結合の差を特異的結合（specific binding；SB）とし，DA受容体活性（又はSP受容体活性）の指標とした。測定はtriplicateで行ったが，バラツキは12％以下で

あり，結果は平均値で示した。

2) 中枢神経系各部におけるDA受容体の分布：断頭屠殺したラットの脳，脊髄をすみやかにとり出し脳については Glowinski & Iversen の方法(2)に準じて大脳皮質，線条体，視床下部，海馬，小脳の各部を切り出して，標準DA−RRA系と同様の方法で，脳各部位と脊髄とを homogenate ，遠心後，それぞれの pellet を receptor site としてDA−RRAを行い，SBの分布を検討した。

3) DA受容体及びSP受容体の薬理：表3に示すような各種の中枢神経作用薬を最高1 mMとなるように種々の濃度4～6点でこのDA−RRA系（又は，SP−RRA系）に入れ，tracer の受容体結合への阻害をみた。結果は log − probit analysis により tracer の結合を50％阻害する濃度（IC_{50}）で表示した。また，DA−RRA系（又はSP−RRA系）で作用のみられた薬剤については別の日に実験をくりかえし，同様の結果が得られることを確認した。

4) DA 受容体及びSP受容体の可溶化：SD系雄 rat 前脳を用い，Gray &Whittaker の方法(3)に準じて得られた P_2 分画を氷冷 Tris buffer（50 mM Tris／HCℓ buffer ，pH 7.6）で再 homogenize し，15,000×g，4℃で20分間遠心し，その pellet を receptor preparation とした。この P_2 分画懸濁液5 mℓに，0.5 mℓのTris buffer もしくは0.5 mℓのDA（final 1 mM）（SP−RRAの場合は final 100 μMのSP），7.5×10^{-9} Mの〔^{3}H〕−DA（又は 3.5×10^{-9} Mの〔^{3}H〕−SP）を加え，氷水中で90分間 incubate し，Triton X−100を50 μℓ加え，スターラーを用いて4℃で30分間攪拌して可溶化後，200,000×g，4℃で60分間遠心し，上澄3 mℓを Sepharose 6B カラム（1×70 cm）に apply し，0.1％ Triton X−100を含む50 mM Tris／HCℓ buffer（pH 7.6）で溶出した。その溶出液0.1 mℓに scintillator を加えてβ− counter により測定し，可溶化受容体の溶出パターンを比較検討した。更に同一のカラムに7種の既知のマーカー蛋白を apply してその溶出 volume を調べた結果と比較して，可溶化受容体の分子サイズを決定した。

Fig.3

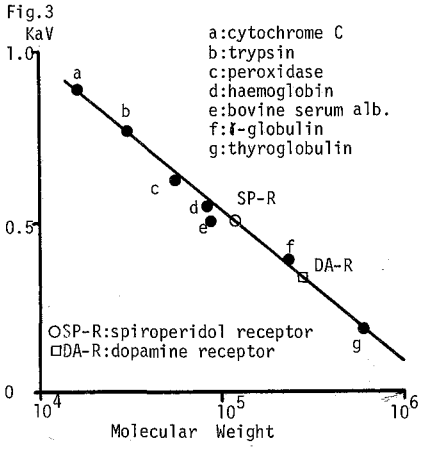


Table 1. Regional distribution of dopamine receptor in rat Central Nervous System.

resion (N)		dopamine receptor density [^{3}H]-DA specifically bound. (dpm/6mg tissue)
striatum	(7)	6,450
hipocampus	(5)	4,030
hypothalamus	(5)	3,970
cerebral cortex	(5)	3,820
cerebellum	(3)	3,710
spinal cord	(3)	3,680

Table 2. Effect of various CNS acting drugs on the specific binding of [^{3}H]-dopamine and [^{3}H]-spiroperidol to rat striatum.

	[^{3}H]-dopamine IC_{50}(uM)	[^{3}H]-spiroperidol IC_{50}(uM)
psychoanaleptics		
methylphenidate	-	
CDP-choline	-	-
neuroleptics		
chlorpromazine	100	1
haloperidol	-	0.02
spiroperidol		0.002
pimozide	-	1000
antidepressants		
imipramine	-	4
antianxietics		
diazepam	-	-
hypnotics		
phenobarbital	-	
pentobarbital	-	
ketamine	-	
antiparkinson drugs		
l-dopa	2	-
amantadine	-	-
methixene hydrochloride	-	4
apomorphine	0.5	100
bromocriptine	-	
dopamine	0.5	100

-: no effect at 1mM

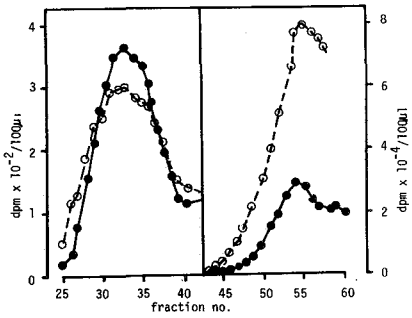


Fig. 1 Distribution of solubilized dopamine receptor after gel filtration on Sepharose 6B.

●——● dopamine(-)
○——○ dopamine(+1mM)

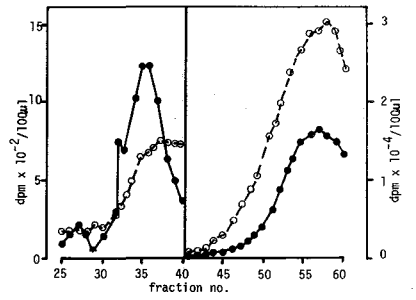


Fig.2 Distribution of solubilized spiroperidol receptor after gel filtration on Sepharose 6B.

●——● spiroperidol(-)
○——○ spiroperidol(+100μM)

結　　果

1) radioreceptor assay（RRA）の基礎的検討：RRAの基礎的条件決定のための実験はDA－RRAで行った。すなわち，受容体としての rat 脳線条体 homogenate の添加量に比例して，SBは増加したが，直線的に増加する範囲内の略中央である6 mg／ tube（約0.6 mg protein／tube）を標準 assay 系として使用した。氷水中で incubate するとSBは時間と共に増加し，60分以后は plateau となり以后3時間までは不変であった。標準 assay では90分間 incubate した。また受容体の量を一定とし，添加する〔^{3}H〕-DAの量を段階的に増すとSBはある程度以上には増大せず，DAの結合は可飽和であった。SP－RRAは比較しやすいように，DA－RRAの条件と全く同様にした。

2) 中枢神経系各部におけるDA受容体の分布：上述の方法で rat 中枢神経系各部におけるDA受容体の分布をSBの大小で調べたが，DAのSBは線条体において最も大きく，次いで海馬，視床下部，大脳皮質，小脳，脊髄の順であった。（Table 1）。

3) DA受容体及びSP受容体の薬理：〔^{3}H〕-DA を tracer とするDA－RRA系において，tracer の結合を50％阻止する中枢神経作用薬の濃度（HC_{50}）はTable 2に示すようにchlorpromazineは100 μMであったが，haloperidol は全く交叉反応を示さなかった。又，apomorphine の IC_{50} は500 nMでDAと極めて強い交叉反応を示し，l-dopa は2 μMであり，Table 2に示したその他の薬剤は，全く交叉反応を示さなかった。一方，〔^{3}H〕－SP を tracer とする assay 系においては，chlorpromazine の IC_{50} は10 μMであり，haloperictol の IC_{50} は1 μMと強い交叉反応性が認められたが，DAの交叉は0.5％にすぎず，apomorpline も同等であった。その他，DA－RRAで全く交叉反応を示さない imipramine，pimozide，methixene HCl も交叉反応が認められたが，逆にDA－RRAで交叉反応を示した l－dopa には交叉反応は認められなかった。

4) DA受容体及びSP受容体の可溶化：〔^{3}H〕－DA を tracer としたRRA系と，〔^{3}H〕－SP を tracer としたRRA

系それぞれにおいて，chlorpromazine，haloperidol，DAそれぞれの交叉反応が全く異ることから，〔^{3}H〕−DAをtracerとした場合の受容体と，〔^{3}H〕−SPをtracerとした場合の受容体と異っていると考えられるため，各種の受容体の性状をより詳しく調べるために，受容体の可溶化を試みた。Fig 1は可溶化DA受容体の溶出パターンを示すが，fraction number 33と，54の2つの位置にpeakが認められ，1 mMのDAの添加により抑制されることより，前の小さいpeakがDA受容体結合物と思われ，Fig 3に示すようにして分子量を計算すると，約20万であった。同様にFig 2にはSP受容体の溶出パターンを示すが，fraction number 36と54の2つの位置にpeakが認められ，100 μMのSPの添加によりpeakが抑制されることより，前の小さいpeakがSP受容体結合物と思われ，DA受容体の場合と同様にして分子量を計算すると，分子量は約12万であった。以上のように，DA受容体とSP受容体とは分子サイズが全く異っていた。

考　　按

従来，向精神薬はDA受容体を遮断することによって，その作用を発揮すると考えられて来た。しかし，〔^{3}H〕−DAをtracerとした真の意味でのDA−RRAにおいて，chlorpromazineは，ほとんど交叉反応を示さず，haloperidolは全く交叉反応がないことから，これらの向精神薬はDA受容体に結合して作用を発現しているのではなさそうである。実際に，向精神薬は数種の内因性物質に対する受容体に影響するらしいことを示唆する報告が増しつつある(1)(4)。今回，我々は，〔^{3}H〕−DA及び〔^{3}H〕−SPを受容体に結合させた後に可溶化するという新しい方法で，DA受容体結合物と，SP受容体結合物を取り出しゲル濾過により分子サイズを決定することに初めて成功した。DAやSPの分子量は今回得られた分子量と比較すれば無視しうるので，DA受容体は分子量約20万，SP受容体の分子量は約12万であると考えられる。

以上のように，各種の中枢神経作用薬の交叉反応性に関する薬理学的検討からも，また，生化学的手法による分子サイズの点からも，DA受容体とSP受容体とは全く異った受容体である可能性が示唆された。

文　　献

1) Creese, I., Prosser, T. and Snyder, S. (1978). Life Sci., 23: 495−500.
2) Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966). J. Neurochem., 13: 655−669.
3) Gray E. G. and Whittaker V. P. (1962). J. Anat., 96: 79−87.
4) 小川紀雄，山脇泰秀，大藤眞. (1979). 第20回日本神経学会総会抄録集，Abstr. no. 143.
5) Schwartz, R., Fuxe, K. and Gustafsson, J. (1978). Life Sci., 23: 465−470.
6) Seeman, P., Tedesco, J., Brown, G. et al. (1978). Fed. Proc., 37: 130−136.
7) Seeman, P., Woodruff, G. N. and Poat, J. A. (1979). Europ. J. of Pharmaco., 55: 137−142.

9　中枢セロトニン・レセプターの感受性と抗うつ剤

水田　正　（日本ケミファ研）
野村靖幸・瀬川富朗
（広大・医・総合薬）

〔要　約〕

うつ状態と中枢アミン・ニューロンの活性との関係についての従来の説は、その大部分が前シナプス部の活性との関連性を示唆したもので、後シナプス部のレセプターの感受性との関係についてはほとんどふれられていない。本研究ではわれわれは、うつ状態と中枢セロトニン・レセプターの感受性の変化との関係についてしらべた。ラット脳より分離した粗シナプス膜を、[³H]-5-HTとインキュベートすると、二つの親和性をもつ特異的結合がみとめられた。この結合は、5,6-dihydroxytryptamine の側脳室内投与によって影響されず、5-HT，トリプタミン誘導体、5-HT拮抗物質によって置換されたので、5-HTと後シナプス部のセロトニン・レセプターとの特異的結合と考えられた。イミプラミンに代表される三環性抗うつ薬の1回投与はこの結合に影響しなかったが、3週間の連続投与は結合の解離恒数に影響することなく、最大結合数を有意に減少した。一方、強制水泳によってえられたうつ病モデルのラット脳より分離した粗シナプス膜では、最大結合数が有意に増加していた。以上の実験結果より、中枢セロトニン・レセプターの感受性の亢進が、うつ病の発生原因の一つであり、抗うつ薬の作用機序は、セロトニン・ニューロンの終末部において、5-HTの再とりこみを抑制することによって、セロトニン・レセプターの感受性を低下するものであることがわかった。

従来、うつ病と中枢アミン・ニューロンとの密接な関係を示唆したいわゆる"アミン仮説"に関する研究は非常に多い。なかでも、中枢セロトニン・ニューロンの活性低下をその発性原因とする説が、多くの研究者によって支持されてきた。しかし、一方において、この説に矛盾する様な実験結果もかなり報告されている。また、これらの説は、大部分が前シナプス部の活性との関連性を示唆したもので、後シナプス部のレセプターの感受性との関係についてはほとんどふれられていない。われわれは、うつ状態と中枢セロトニン・レセプターの感受性との関係をしらべるため、ラット脳より粗シナプス膜を分離し、[³H]-5-HTの特異的結合を定量するとともに、三環性抗うつ薬の投与が、この結合にどの様に影響するかをしらべた。さらに、実験的にうつ病モデル動物を作成し、この動物の脳より分離した粗シナプス膜への[³H]-5-HTの特異的結合の変化についてもしらべた。

実　験　方　法

1．粗シナプス膜画分の分離　Nakata ら[2]の方法に従った。Wistar 系雄ラット全脳（小脳を除く）よりえた粗ミトコンドリアP₂画分をポリトロンで細切、均一化し、8,000g で20分間遠心後、上清部を再度48,000g で20分間超遠心し、沈渣に粗シナプス膜画分をえた。えられた画分は、フリーザーで凍結保存した。

2．[³H]-5-HT特異的結合の定量　Pert ら[3]、Fillon ら[4]の方法によった。Tris-HCl Buffer にけん濁した粗シナプス膜を、最終濃度の1～5×10⁻⁹Mの[³H]-5-HT（12.4 Ci/mmol）と0°C、10分間インキュベートし、5×10⁻⁶Mの非放射性5-HT，又は蒸留水とさらに10分間インキュベートした。その後、ミリポアフィルターで濾過し、フィルタ

一上の放射能を測定した。粗シナプス膜に対する特異的結合は、全結合から 大量の非放射性5-HT存在下の非特異的結合を差引いて求めた。

3. 三環性抗うつ薬の効果 イミプラミンに代表される数種の三環性抗うつ薬をラットに投与し、特異的結合を定量することにより セロトニン・レセプターの感受性の変化をしらべた。

4. うつ病モデル動物の作成 Prosolt ら[5]の方法に準じて行なった。Wistar系雄ラットを、直径18cm, 高さ27cm の円筒形のガラスビーカーに、16.5cmまで25°Cの水を入れたなかに入れ、15分間強制水泳させた。この操作を毎日1回繰返し、動物の不動化を指標としてうつ病モデルを作成した。この動物の全脳より分離した粗シナプス膜への[³H]-5-HTの特異的結合を定量した。

実験結果

1. 粗シナプス膜への[³H]-5-HTの特異的結合 [³H]-5-HTの粗シナプス膜への非特異的結合は、メジウム中の[³H]-5-HTの濃度に比例して直線的に増加した(Fig.1)。一方、全結合より非特異的結合を差引いて求めた特異的結合は、[³H]-5-HTの用いた濃度の範囲内で2つの飽和性を示した(Fig.1)。従って、これをScatchard plotに変換して解析すると2本の直線にわかれた(Fig.2)。われわれは、この2つの特異的結合を、それぞれ低親和性、高親和性の結合と名付けた。なお、特異的結合はpH 7.4附近で最も多く、また、粗シナプス膜けん濁液のタンパク量が約200 μg/0.8 ml でかなりの結合量がえられ、ミリポアフィルターによる濾過にも支障をきたさなかったので、以後この条件下で実験を行なった。

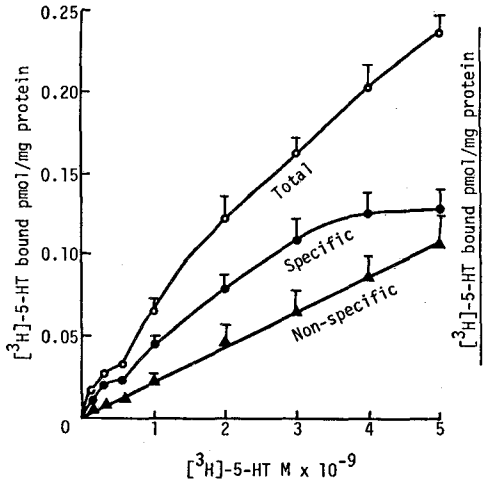


Fig. 1. Binding of [³H]-5-HT to rat brain synaptic membranes.

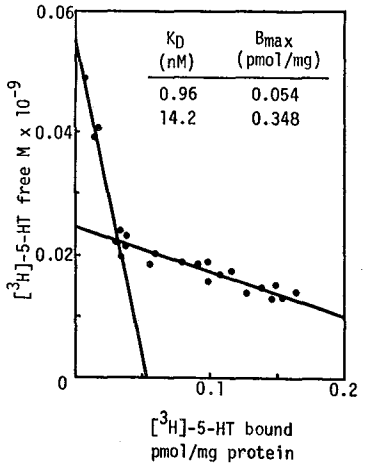


Fig. 2. Scatchard plot of specific [³H]-5-HT binding to rat brain synaptic membranes.

次に、この結合の生物学的特異性をしらべるため、薬理効果の知られている5-HT agonistとantagonistの結合に対する阻害効果をしらべた。その結果、agonistの効果が最も強く、antagonistがこれにつづいた。このことから、われわれが観察している特異的結合が、セロトニン・レセプターとの結合であると考えられた。一方、イミプラミン、アミトリプチリン、デシプラミン、ジメタクリンなどの三環性抗うつ薬は、特異的結合に影響しなかった。従って、三環性抗うつ薬は、セロトニン・レセプターに直接作用しないことがわかった。

次に この結合が、前シナプス膜上のレセプターとの結合を含んでいる可能性も考えられるので、あらかじめ、5,6-dihydroxytryptamine 50μgを側脳室内に投与し、10日後に断頭致死したラット脳シナプス膜を用いて結合の定量を行なった。その結果、対照群と比較して結合のパラメーターに有意差はなかった。従って、特異的結合には、前シナプス部との結合は含まれないことがわかった。

2、特異的結合に対する三環性抗うつ薬投与の影響 ラットに三環性抗うつ薬イミプラミン、アミトリプチリン、デシプラミンの何れかを30 mg/kg、又はジメタクリン 80mg/kg を1回腹腔内投与し、一定時間後にシナプス膜を分離して結合の定量を行なった。Fig.3 に示す様に、イミプラミン投与30分後に[³H]-5-HT 4×10^{-9} Mの濃度で調べた特異的結合は、saline投与の対照群に比較して約20%抑制されていたが、有意差はなかった。しかも、投与後の時間経過とともに、結合は急速に対照値にもどった。他の3種の抗うつ薬についても同様の傾向の変化が観察された。

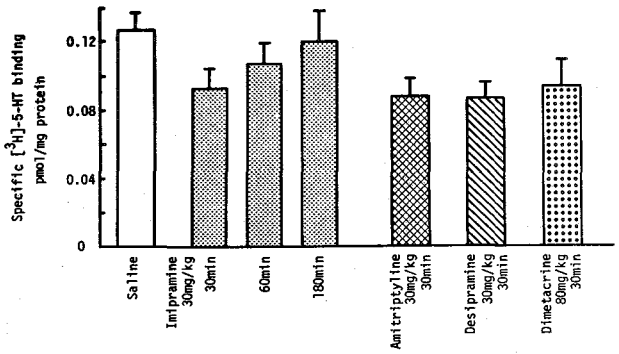


Fig. 3. Effect of single adiministration of antidepressants on [³H]-5-HT binding to rat brain synaptic membranes.

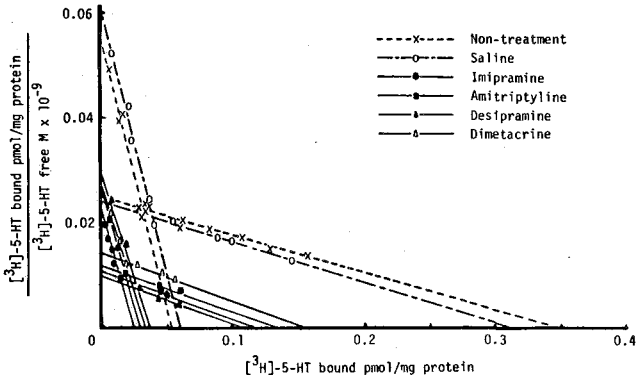


Fig. 4. Scatchard plot of [³H]-5-HT binding to brain synaptic membranes from rat treated chronically with antidepressants.

一般に抗うつ薬は、臨床上の効果が期待されるまでに、少なくとも3週間の長期間投与が必要とされている。そこで、イミプラミン、アミトリプチリン、デシプラミン 10 mg/kg、ジメタクリン 25mg/kg を1日2回、3週間腹腔内に投与し、最後の投与より30分、180 分後にシナプス膜を分離し、結合の定量を行なった。Fig.4 は最終投与30分後の結果をScatchard plotであらわしたもので、Table 1 は30分、180 分後の結果をScatchard plotで解析した値である。三環性抗うつ薬の3週間連続投与は、高親和性、低親和性の両特異的結合の K_D 値に影響することなく、結合数のみを有意に抑制した。ただし、デシプラミン投与180 分後には、低親和性結合の結合数が、対照群と有意差のないレベルにまで回復していた。

3、うつ病モデルラットにおける特異的結合の変化

実験方法に記した強制水泳を10日間繰返し、自発運動量の低下したラットの脳よりえられたシナプス膜を用い、特異的結合の定量を行なった。

Table 1. Scatchard analysis of [^{3}H]-5-HT binding to brain synaptic membranes from rat treated chronically with antidepressants.

Brain preparation	Time before killing	High affinity K_D (nM)	High affinity B_{max} (pmol/mg)	Low affinity K_D (nM)	Low affinity B_{max} (pmol/mg)
Non-treatment		0.96±0.06	0.054±0.004	14.2±1.6	0.348±0.042
Control (Saline)	30min	0.94±0.08	0.058±0.004	13.3±1.9	0.313±0.052
	180min	0.97±0.06	0.055±0.004	13.0±1.9	0.311±0.047
Imipramine 10mg/kgx2 for 3 weeks	30min	1.09±0.13	0.025±0.003***	12.0±1.2	0.120±0.021***
	180min	0.96±0.12	0.035±0.003**	12.1±1.2	0.188±0.028*
Amitriptyline 10mg/kgx2 for 3 weeks	30min	1.10±0.11	0.029±0.003**	13.4±1.8	0.137±0.037***
	180min	—	—	—	—
Desipramine 10mg/kgx2 for 3 weeks	30min	1.21±0.11	0.034±0.002**	11.9±1.3	0.114±0.028***
	180min	1.18±0.16	0.039±0.004*	13.2±1.6	0.228±0.033
Dimetacrine 25mg/kgx2 for 3 weeks	30min	1.16±0.15	0.031±0.003**	12.0±1.4	0.158±0.029**
	180min	1.01±0.14	0.035±0.003**	11.5±1.4	0.184±0.030*

*;P<0.05 **;P<0.01 ***;P<0.001

Fig. 5 に示す Scatchard plot からわかる様に、うつ病モデルラットにおいては、高、低親和性結合が何れも右側に平行移動した。従って、K_D 値には変化がなく、結合度が増加したことになる。統計的には、うつ病モデルにおいて、高親和性特異的結合の結合数のみが、正常動物に比較して有意に増加していた。

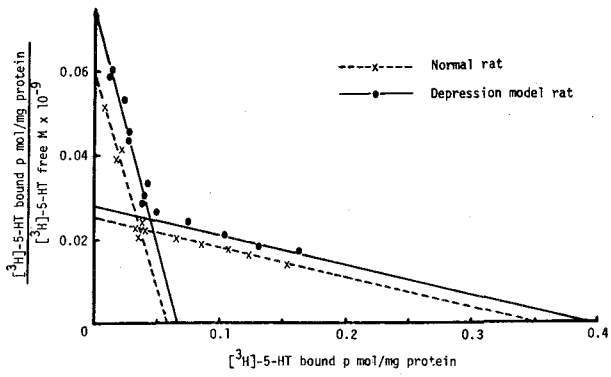


Fig. 5. Scatchard plot of [^{3}H]-5-HT binding to depression model rat brain synaptic membranes.

考 察

本実験では、まず、中枢セロトニン・レセプターの感受性の変化を直接観察するため、ラット脳より粗シナプス膜を分離し、[^{3}H]-5-HT とインキュベートすることによって、特異的結合を定量した。その結果、高、低両親和性の2つの結合を見出したが、この結合はセロトニン agonist, antagonist で置換され、前シナプス部を破壊しても変化しないことから、大部分が後シナプス膜上のセロトニン・レセプターとの結合であると考えられた。一方、三環性抗うつ薬の3週間連続投与は、特異的結合の解離恒数に影響することなく、最大結合数を有意に減少した。さらに、ラットの強制水泳によってえられたうつ病モデルにおいては、最大結合数が有意に増加していた。以上の実験結果は、中枢セロトニン・レセプターの感受性の亢進が、うつ病の発生原因の一つであることを示唆するもので、Takahashi ら[6]、Aprison ら[1]の最近の説を支持するものといえる。

本研究の一部は、第52回日本薬理学会総会、第55回日本薬理学会近畿部会で発表した。また、一部は Eur. J. Pharmacol に印刷中である。

引 用 文 献

1) Aprison, M. H., Takahashi, R. & Tachiki, K.: Neuropharmacology and Behavior, eds. Haber, B. & Aprison, M. H. (Plenum Publishing Corporation, New York) P. 23 (1978).
2) Nakata, Y., Kusaka, Y., Segawa, T., Yajima, H. & Kitagawa, K.: Life Sci. 22, 259 (1978).
3) Pert, C. B. & Snyder, S. H.: Science, 179, 1011 (1973).
4) Fillion, G., Fillion, M.-P., Spirakis, C., Bahers, J.-M. & Jacob, J.: Life Sci. 18 65 (1976).
5) Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N. & Jalfre, M.: Eur. J. Pharmacol. 47, 379 (1978).
6) Takahashi, R., Tachiki, K. H., Nishikawa, K., Nakamura, E., Tateishi, T. & Nagayama, H.: Folia Psychiat. Neurol. Japon. 30, 207 (1976).

10 脳内モノアミン代謝に対するクロルプロマジンの作用

三船和史・盛政忠臣・土井　亨
庄盛敏廉
（岡大・医・脳研）

〔要　約〕

ラット腹腔内にクロルプロマジン（0，1，5，10，30，60 mg/kg）を投与した後、脳を海馬、間脳、脳幹、扁桃、線条体、大脳皮質の6部位に分け、各部位のドパミン（DA）、ノルアドレナリン（NA）、セロトニン（5HT）含量を測定し、クロルプロマジンの脳内アミン代謝に対する影響を比較検討した。

1．DAは、間脳、扁桃で有意に増加したがその他の部位では逆に減少傾向を示した。

2．NAは、間脳、脳幹、扁桃、大脳皮質で有意の増加を示し、海馬、線条体では、少ない投与量では減少、大量では増加の傾向を示した。

3．5HTは、海馬、脳幹、線条体、大脳皮質において有意の増加を示し、間脳、扁桃においても増加の傾向を示した。

間脳と扁桃では、DAとNAが共に増加し、脳幹と大脳皮質ではNAと5HTが共に増加を示した。DAと5HTが共に増加を示す部位は認められなかった。以上、クロルプロマジンの脳内アミン代謝におよぼす効果は、脳の部位および、アミンの種類によって異なるという結果を得た。

抗精神病薬クロルプロマジンは、脳内モノアミン代謝に影響をおよぼし、DA、NA、5HTの含量には変化を与えないが[3]、それらの代謝回転を促進すること[1),6)]が報告されている。

一方、アミン代謝には日周変化のあることはよく知られており、さらにその変化は、脳部位とアミンの種類によって特徴的なパターンを示す[2)]ことが報告されている。

この研究では、日周変化を考慮に入れ、ラット脳内DA、NA、5HT含量に対するクロルプロマジンの影響を、上記脳6部位それぞれについて比較検討を加えた。

〔実験方法〕

ウィスター系雄ラット（12週令、体重317±22g（n=60）、実験時）を用いた。ラットは、実験に用いるまで、12時間ごとの明暗周期の人工照明下、恒温恒湿室で3週間以上飼育したものを用いた。明転後8.5時間目に、ラット腹腔内に塩酸クロルプロマジンの生理食塩水溶液を腹腔内投与した。投与量は、0，1，5，10，30，60 mg/kg体重とし、1匹あたりの注射量が0.5～1.0 mlとなるように希釈したものを用いた。薬物投与1.5時間後（明転10時間目）に、ラットをTakahashi，Aprison[8)]のnear-freezing methodに従って、液体窒素中に約8秒間固定した後断頭開頭し、氷上でSchubertら[7)]およびGlowinskiら[4)]の方法を参考にして、小脳を除く全脳をhippocampus（海馬）、diencephalon（間脳）、brain stem（脳幹）、amygdala（扁桃）、striatum（線条体）、cortex（大脳皮質）を含む6部位に分けた。脳試料は、測定まで-80°Cで凍結保存し、採取後4週間以内にモノアミンの測定を行なった。片側脳各部位を用いて、DA、NA、5HTを同時に測定した。測定は、既報[2)]により、螢光法で行なった。

Table 1. monoamine contents (μg/g) in six regions of rat brain after chlorpromazine administration (mg/kg body weight)

	dose	DA	NA	5HT
hippocampus	0	0.49±0.25	0.18±0.08	0.77±0.13
	1	0.44±0.14	0.13±0.07	1.20±0.61*
	5	0.39±0.08	0.17±0.13	1.04±0.31*
	10	0.39±0.05	0.16±0.08	0.89±0.09*
	30	0.55±0.19	0.20±0.08	0.97±0.09***
	60	0.43±0.10	0.27±0.10	1.10±0.27***
brain stem	0	0.38±0.12	0.05±0.02	1.18±0.24
	1	0.34±0.08	0.08±0.02**	1.27±0.11
	5	0.29±0.04	0.07±0.02	1.27±0.29
	10	0.29±0.04	0.08±0.02*	1.38±0.18*
	30	0.40±0.10	0.06±0.03	1.45±0.13**
	60	0.36±0.06	0.11±0.06*	1.62±0.30***
striatum	0	13.6±3.6	0.23±0.08	1.22±0.15
	1	13.6±2.5	0.20±0.06	1.42±0.21*
	5	11.9±2.8	0.24±0.06	1.55±0.37*
	10	9.9±3.2*	0.22±0.02	1.19±0.21
	30	14.1±1.6	0.29±0.07	1.41±0.14*
	60	13.0±1.9	0.33±0.17	1.54±0.14***

	dose	DA	NA	5HT
diencephalon	0	0.61±0.10	0.09±0.01	1.43±0.38
	1	0.72±0.38	0.12±0.03*	1.63±0.28
	5	0.63±0.11	0.13±0.03***	1.67±0.36
	10	0.73±0.16	0.14±0.04***	1.64±0.40
	30	0.89±0.36*	0.20±0.08***	1.77±0.23*
	60	0.84±0.16***	0.19±0.04***	1.74±0.57
amygdala	0	1.09±0.32	0.23±0.13	1.70±0.34
	1	1.39±0.24*	0.37±0.11*	1.83±0.26
	5	1.37±0.24*	0.36±0.10*	2.01±0.41
	10	1.79±0.21***	0.39±0.20*	1.76±0.27
	30	1.73±0.42***	0.38±0.11*	1.93±0.18
	60	1.58±0.37**	0.44±0.07***	1.91±0.28
cortex	0	0.87±0.26	0.14±0.06	0.90±0.12
	1	0.75±0.15	0.19±0.05	1.02±0.12*
	5	0.78±0.18	0.18±0.03	1.16±0.09***
	10	0.67±0.12*	0.22±0.02***	1.12±0.16***
	30	0.83±0.17	0.23±0.06	1.14±0.07***
	60	0.83±0.19	0.21±0.04*	1.15±0.13***

Values are represented as mean ± SD
*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.005

〔実験結果と考察〕

Table 1には、クロルプロマジン投与後の各部位における、DA、NAおよび5HT量を、薬物投与量別に示す。

DAは、扁桃においては投与量1mg/kg以上で有意に増加を示し、間脳においても1mg/kg以上で増加の傾向、30mg/kg以上で有意に増加の傾向を示した。その他の部位では、逆に全て減少の傾向を示した。特に、線条体、大脳皮質では、共に10mg/kgで有意な減少を示し、この投与量を中心に、減少→増加という二相性の変化を示した。

NAは、間脳、脳幹、扁桃、大脳皮質では、少ない投与量でも有意の増加を示した。海馬、線条体では、少ない投与量では変化はないが、30mg/kg以上では増加の傾向を示した。

一方、5HTは、海馬、線条体、大脳皮質では1mg/kg以上で有意の増加を示し、脳幹では、10mg/kg以上で有意の増加を示した。間脳、扁桃においては、増加傾向を示

Table 2. Effects of chlorpromazine (mg/kg) on rat brain monoamines. Values are presented as mean ± SD (μg/g brain hemisphere without cerebellum)

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.005

dose	DA	NA	5HT
0	1.58±0.10	0.12±0.03	1.13±0.19
1	1.56±0.10	0.16±0.03*	1.24±0.08
5	1.46±0.21	0.16±0.02*	1.32±0.16*
10	1.58±0.14	0.17±0.02**	1.34±0.16*
30	1.75±0.10**	0.23±0.04***	1.30±0.12*
60	1.60±0.13	0.25±0.03***	1.42±0.18**

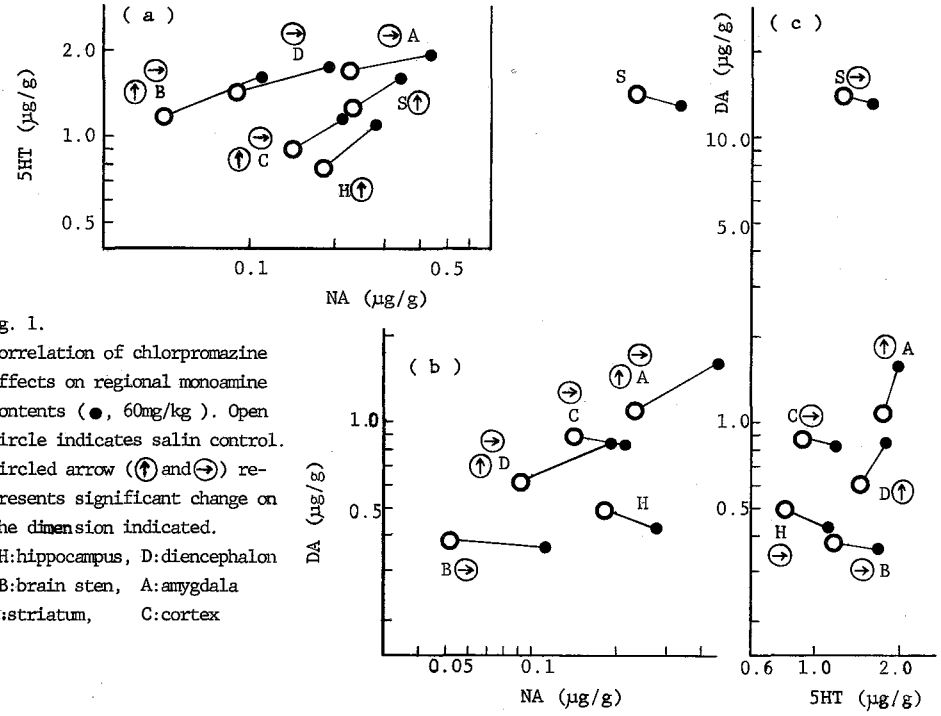


Fig. 1.
Correlation of chlorpromazine effects on regional monoamine contents (●, 60mg/kg). Open circle indicates salin control. Circled arrow (↑and→) represents significant change on the dimension indicated.
H:hippocampus, D:diencephalon
B:brain sten, A:amygdala
S:striatum, C:cortex

した。

Table 2は、得られた各アミン量について、各脳部位を個体脳ごとに加算し、小脳を除く片側脳についてクロルプロマジンの影響を比較したものである。その結果、DAは30mg/kgでのみ有意の増加を示した。NAは全ての投与量で有意の増加を示し、5HTは5mg/kg以上で有意の増加を示した。

脳内アミン含量に対するクロルプロマジンの影響については、1960年前後に相ついで報告されて[2),5)]、内在性アミン量に対しては何ら変化を与えないものとされてきた。これらと本研究との相異点を見ると、Gey と Pletscher[3)]は、DA、NA、5HTの測定のため、それぞれラット二匹分の全脳を用いた。これに対し、本研究では、片側各脳部位それぞれについて、DA、NA、5HTを同時に測定した点にある。また、脳内DA、NA、5HT含量は、脳部位によりそれぞれ異った特徴的な日周変化を示す[4)]ことから、本実験では、日周の一定時刻を用いた点である。

クロルプロマジンによるアミン含量の変化の様式を、それぞれのアミンの間で比較すると、Fig.1.に示す如くである。ここでは、対照群（生食水投与）と60mg/kg投与を比較した。2点間を結ぶと、クロルプロマジン投与によるアミン変化量はベクトルで表わされる。60mg/kg以下においてもそれぞれプロットが得られるが、ベクトルに大きな相異は認められなかった。Fig.1.(a)は5HTとNA代謝の相関を示す。i)海馬と線条体では5HTに有意の増加、ii)間脳と扁桃ではNAに有意の増加が認められる。iii)脳幹と大脳皮質においては両アミンに有意の増加が認められる。これらのことから、クロルプロマジンのアミン代謝に対する作用機構は、脳部位によって

相異なることが示唆される。さらに、海馬、線条体ならびに脳幹、大脳皮質においては、アミン含有量の「不均衡」が生じており、その結果これら部位における機能の特定な変化を生じる可能性が示唆される。Fig. 1. (b) においても同様なことが示唆される。間脳および扁桃ではDA、NA両者とも増加しており、アミン含有量については均衡を保っているが、その他の部位ではNAが増加しているにも拘ず、DAが減少傾向を示し、両アミン含量に大きな不均衡を生じさせている。Fig. 1. (c) はDAと5HTのアミン代謝の相関を示す。同様に、線条体、大脳皮質、海馬、脳幹ではいずれもDA減少傾向と5HTの有意の増加を示す。一方、扁桃、間脳では逆の現象を示し、いずれの部位においても、これら両アミン含量に不均衡を生じた。

以上、アミン相互の関係により、クロルプロマジンのアミン代謝におよぼす影響は脳部位により大きく異なることが示されたが、クロルプロマジンの薬理作用を論ずるにはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

現在、アミン測定に用いた反対側脳の各部位を用いて、投与したクロルプロマジンおよびその代謝産物を測定しているので、これらの関係についても追加して検討を加える予定である。

データの統計的処理の段階で御教示頂いた出宮一徳教授に謝意を表する。

〔文献〕

1) Andén, N.-E., Corrodi, H. & Fuxe, K. (1972), J. Pharm. Pharmac. 24, 177-182.

2) 土井亨 (1979), 岡山医学会雑誌 91, 379-396.

3) Gey, K. F. & Pletscher, A. (1961), J. Pharmacol. exp. Therap. 133, 18-24.

4) Glowinski, J. & Iversen, L. L. (1966), J. Neurochem. 13, 655-669.

5) Holzor, G. & Hornykiewicz (1959), Arch. Exp. Pathol. Parmakol. 237, 27-33.

6) Nybäck, H. & Sedvall, G. (1968), J. Pharmacol. exp. Therap. 162(2), 294-301.

7) Schubert, J. & Sedvall, G. (1972), Eur. J. Pharmacol. 17, 75-80.

8) Takahashi, R. & Aprison, M. H. (1964), J. Neurochem. 11, 887-898.

11 拘束ストレス状況におけるラット脳内各部位のNoradrenaline代謝の変化

田中正敏・河野康子・中川良一
戸島信夫・長崎信行
(久留米大・医・薬理)

〔要約〕

拘束ストレス状況下における脳内各部位のnoradrenaline(NA)代謝の変化について検討した。体重200g前後のWistar系雄性ラットを金網で拘束し，拘束前から拘束後180分の各時点で断頭し脳を8部位に分割し，各部位のNAならびにその主要代謝産物とされる3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulphate(MHPG-SO_4)含有量を螢光法で同時定量した。更にprobenecidでMHPG-SO_4のtransportを阻害した状況で拘束後の各部位のMHPG-SO_4のaccumulationを調べた。その結果，hypothalamus, thalamus, amygdala, hippocampus, cerebral cortex, pons+med. obl.でNAの減少とMHPG-SO_4の増加とがみられたが，その中でhypothalamusが最も顕著な変化を示した。StriatumのNAは拘束後増加し，MHPG-SO_4は一過性の減少を示し他の部位と異なった反応を示した。Probenecid投与直後から拘束した場合と，90分間拘束後probenecidを投与し更に拘束を続けた場合とでは，hypothalamus, amygdalaでは前者の方がMHPG-SO_4のaccumulationが著明であり，pons+med. obl.では後者の方が著明であった。これらの結果から，hypothalamus, amygdala, thalamus, cerebral cortex, hippocampus, pons+med. obl.で拘束ストレスによりNAのturnoverが亢進すること，その際hypothalamusで最も顕著なNA turnoverの亢進がみられ，しかもamygdalaとともに特に拘束の初期に著明であること，各部位のNAニューロンの反応は，それぞれの部位の特異性を反映しつつ，ストレス状況の時間経過とともに変化していることなどが示唆された。

ストレス状況下における中枢モノアミンの変化については数多くの報告がある。Catecholaminesに関しては各種のストレス状況下で，ラットの特にhypothalamusを中心とした脳各部位でnoradrenaline(NA)のturnoverが亢進することや(5,6,7,8,12,13,14,16)，adrenalineの減少(4,9)も報告されている。ラットに胃粘膜損傷を惹起することで知られている拘束ストレス状況の脳内各部位のNA代謝の経時的変化について検討した報告は少ない。今回，演者らはラット脳内各部位のNAならびにその主要代謝産物とされる(10,11)3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulphate(MHPG-SO_4)含有量を測定することにより，拘束ストレス状況下のNA代謝の変化について検討を加えた。

〔方法〕

実験I(拘束後のNAならびにMHPG-SO_4の経時的変化)

体重200g前後のWistar系雄性ラットを金網で拘束固定した。拘束前，拘束後15, 30, 60, 120, 180分の各時点で断頭し，採血するとともに速かに脳を摘出し氷上でGispenらの方法(1)により，hypothalamus, cerebral cortex, amygdala, hippocampus, pons+med. obl., midbrain, thalamus, striatumの8部位に分割しただちにdry ice上で凍結し測定まで-45℃で保存した。各部位の

Table 1. Change of the plasma corticosterone level after immobilization stress in the rat.

Time after immobilization (min)	0	15	30	60	120	180
Plasma corticosterone level (μg/dl)	18.0 ± 1.65	31.2 ± 1.36***	32.4 ± 1.43***	38.5 ± 1.90***	31.4 ± 2.12***	30.8 ± 2.79**

Each value is shown as a mean ± S.E.M. of 6-8 rats. Statistical significance,** P < 0.01, *** P < 0.001, compared with the control (0 min).

Table 2. Changes in the levels of NA and MHPG-SO_4 in the various brain regions of the rat after immobilization stress.

Time after immobilization (min)	0	15	30	60	120	180
Hypothalamus						
NA	1.571 ± 0.069	1.340 ± 0.062*	1.391 ± 0.043^{+}	1.208 ± 0.075***	1.195 ± 0.050***	1.148 ± 0.049***
MHPH-SO_4	0.249 ± 0.013	0.292 ± 0.018^{+}	0.341 ± 0.022**	0.430 ± 0.011***	0.418 ± 0.026***	0.342 ± 0.025**
Cerebral Cortex						
NA	0.191 ± 0.003	0.178 ± 0.009	0.185 ± 0.008	0.180 ± 0.011	0.176 ± 0.006*	0.167 ± 0.006**
MHPG-SO_4	0.090 ± 0.003	0.085 ± 0.004	0.092 ± 0.003	0.110 ± 0.002***	0.097 ± 0.005	0.090 ± 0.005
Amygdala						
NA	0.593 ± 0.009	0.549 ± 0.030	0.508 ± 0.039^{+}	0.476 ± 0.028**	0.424 ± 0.033***	0.453 ± 0.022***
MHPG-SO_4	0.251 ± 0.014	0.242 ± 0.007	0.251 ± 0.012	0.320 ± 0.020*	0.322 ± 0.028*	0.270 ± 0.013
Hippocampus						
NA	0.357 ± 0.020	0.341 ± 0.016	0.330 ± 0.041	0.347 ± 0.025	0.279 ± 0.013**	0.299 ± 0.020^{+}
MHPG-SO_4	0.177 ± 0.007	0.184 ± 0.008	0.200 ± 0.008^{+}	0.241 ± 0.018**	0.244 ± 0.015**	0.248 ± 0.017**
Pons + Med.obl.						
NA	0.655 ± 0.032	0.612 ± 0.022	0.666 ± 0.023	0.535 ± 0.030*	0.587 ± 0.029	0.654 ± 0.019
MHPG-SO_4	0.188 ± 0.008	0.169 ± 0.009	0.188 ± 0.005	0.214 ± 0.009*	0.247 ± 0.008***	0.204 ± 0.012
Midbrain						
NA	0.459 ± 0.010	0.466 ± 0.011	0.488 ± 0.026	0.453 ± 0.020	0.444 ± 0.025	0.453 ± 0.023
MHPG-SO_4	0.216 ± 0.009	0.202 ± 0.009	0.207 ± 0.008	0.219 ± 0.007	0.236 ± 0.013	0.214 ± 0.012
Thalamus						
NA	0.555 ± 0.011	0.543 ± 0.015	0.567 ± 0.007	0.524 ± 0.014	0.473 ± 0.022**	0.501 ± 0.011**
MHPG-SO_4	0.263 ± 0.013	0.277 ± 0.015	0.305 ± 0.016^{+}	0.327 ± 0.024*	0.344 ± 0.020**	0.320 ± 0.022*
Striatum						
NA	0.161 ± 0.005	0.189 ± 0.008*	0.196 ± 0.014*	0.205 ± 0.007***	0.210 ± 0.010***	0.225 ± 0.015***
MHPG-SO_4	0.138 ± 0.009	0.110 ± 0.003*	0.110 ± 0.004*	0.136 ± 0.008	0.152 ± 0.009	0.149 ± 0.006
DA	2.161 ± 0.083	2.621 ± 0.077**	2.621 ± 0.089**	2.838 ± 0.130***	2.569 ± 0.175*	2.667 ± 0.096**

Each value indicates a mean ± S.E.M.(μg/g wet wt.). N = 6-8. Each value was compared with that of the control(0 min) using Student's t test(two-tailed). Statistical significance: + P < 0.10, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Abbreviations: NA = Noradrenaline, MHPG-SO_4 = 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulphate.

NAならびにMHPG-SO_4含有量を河野らの方法(23)で螢光法により同時定量した。血液は血漿に分離後van der Viesの変法(15)により corticosterone 含有量を定量した。実験は午前10時から午後5時の間に行った。

実験II(Probenecidによる検討)

Probenecidは400mg/kgを腹腔内投与とし次の8群を設定した。A：無処置control群，B：probenecid投与45分後に断頭，C：probenecid投与90分後に断頭，D：probenecid投与直後より拘束し45分後に断頭，E：probenecid投与直後より拘束し90分後に断頭，F：90分間拘束したのみで断頭，G：90分間拘束後probenecidを注射し，その後さらに45分間拘束し断頭，H：90分間拘束後probenecidを注射し，その後さらに90分間拘束し断頭。これらのラットの実験Iのmidbrainを除く脳内各部位のMHPG-SO_4含有量を測定した。

[結果と考察]

Table1に示すように血漿corticosterone量は拘束15分後より有意な増加を示し，60分後でピークに達し，その後は拘束前値にくらべると有意な増加を示すが60分後の値にくらべると減少していた。拘束後の脳内各部位のNAならびにMHPG-SO_4含有量の経時的変化を

Table 2に示す。もっとも変化の著しかった部位はhypothalamusで，NAは15分後より有意な減少を示し，60分後には更に程度は強くなり，60，120，180分とそれぞれ拘束前の23，24，27％の減少を示した。Hypothalamusの$MHPG\text{-}SO_4$は15，30，60分とそれぞれ拘束前値の17，37，73％とほぼ直線的な増加を示し，60分後をピークとしてその後増加の程度は減少するが拘束前値にくらべて有意差がみられた。Hypothalamusと比較的類似した反応を示したのはamygdalaであるが$MHPG\text{-}SO_4$増加の程度はhypothalamusとくらべて少なかった。Thalamusの変化も類似していたがNAの減少が軽度であり，cerebral cortex，pons+med. obl.ではNAの減少，$MHPG\text{-}SO_4$の増加が一過性にみられた。HippocampusではNAの減少が少し遅れ，$MHPG\text{-}SO_4$の増加もhypothalamus，amygdalaが120分にくらべて180分で減少するのに対してほぼ同じ値を示し，この部位の反応は少し遅れることが示唆された。これらの部位と異った変化を示したのはstriatumで拘束後NAが有意に増加し，$MHPG\text{-}SO_4$は15，30分と有意な減少を示し，拘束状態では同部位のNAニューロンの反応性が他の部位と異っていることが示唆された。Midbrainでは有意な変化はみられなかった。拘束ストレスにより多くの部位でNAの減少，$MHPG\text{-}SO_4$の増加がみられたが，その中で最も顕著な変化を示したのはhypothalamusであり，拘束により同部のNAのturnoverが著しく亢進することが示唆された。また，hypothalamus，amygdala，cerebral cortexの$MHPG\text{-}SO_4$の増加は拘束60-120分後にピークに達し拘束の持続にもかかわらず拘束180分後には拘束前の値に戻る傾向がみられ，拘束下で尾に電撃を加えるという強大なストレス状況下で$MHPG\text{-}SO_4$が180分後も増加し続けるの(6)とは異なっており，持続するストレス状況に対して各部位のNAニューロンの反応が経時的に変化していることが示唆された。各部位のNA含有量は減少を示した後一定の値を維持し続けた。

Probenecidでtransportを阻害した状態で検討してみると，Fig. 1に示すようにhypothalamusでは拘束

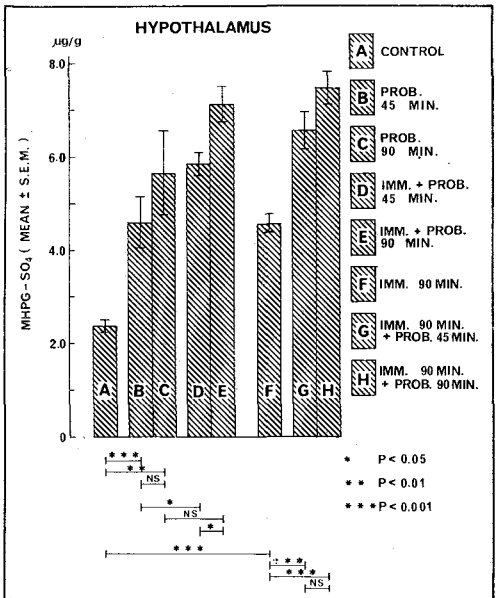


Fig. 1. Change in the level of $MHPG\text{-}SO_4$ in the hypothalamus by immobilization stress after probenecid treatment in the rat. N = 7-8.

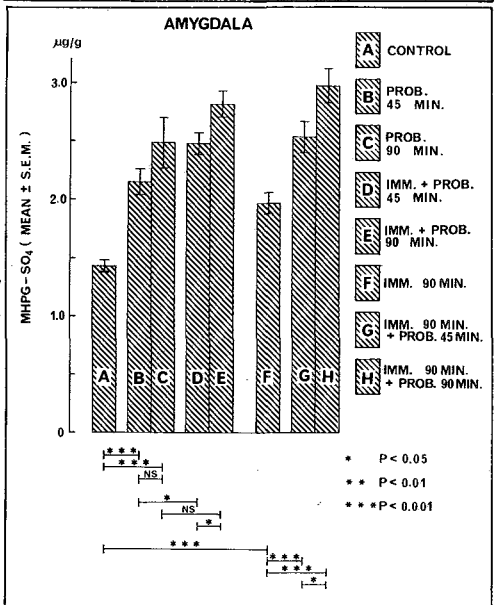


Fig. 2. Change in the level of $MHPG\text{-}SO_4$ in the amygdala by immobilization stress after probenecid treatment in the rat. N = 7-8.

の比較的初期である拘束45分で最も顕著なMHPG-SO4のaccumulationがみられ，拘束90分後にprobenecidを投与しその後更に45分間拘束した際の増加はprobenecidのみ投与45分後の増加とほぼ同程度であった。同様の変化はamygdalaでもみられ(Fig. 2)，同部位でも拘束の初期の変化が大きいことが示唆された。これに対してpons+med. obl.ではFig.3に示すように，拘束の最初の45,90分より，拘束90分後にprobenecidを投与し更に90分拘束を続けた方がMHPG-SO4のaccumulationは大きく同部のNA turnoverの亢進は少し遅れることが示唆された。Thalamus, hippocampus, cerebral cortexでは拘束の初期と90分後とではあまり大きな差はみられなかった。Striatumでは拘束の初期では拘束+probenecid群とprobenecidのみの群との間に差はみられなかったが，180分後には著明なMHPG-SO4のaccumulationがみられた。以上の結果から，hypothalamus, amygdala, thalamus, cerebral cortex, hippocampus, pons+med. obl.で拘束ストレス時にNAのturnoverが亢進すること，これらの部位のNAニューロンの反応性は，それぞれの部位の特異性を反映しつつ，ストレス状況の時間的経過とともに変化していること，ストレスにより減少したNAは，多くの部位でストレス状況が持続していても180分までの観察では一定の値に維持されていること，各部位の中でhypothalamus, amygdalaのNAニューロンが特に拘束ストレスの初期に関与していることなどが示唆された。これらの結果は自律神経中枢やhypothalamo-pituitary-adrenocortical systemの一環としてのhypothalamusの役割りと結びつけて考えると興味あるものであるがこの点に関しては更に検討が必要である。

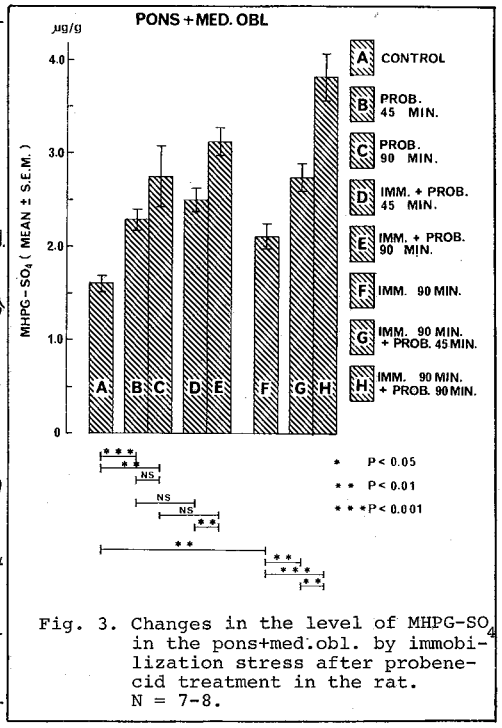


Fig. 3. Changes in the level of MHPG-SO4 in the pons+med.obl. by immobilization stress after probenecid treatment in the rat. N = 7-8.

[文献]

1. Gispen,W.H., Schotman,P. and de Kloet,E.R.(1972) Neuroendocrinology, 9:285-296
2. 河野康子,中川良一,戸島信夫,田中正敏(1978) 神経化学, 17:161-164
3. Kohno,Y., Matsuo,K., Tanaka,M., Furukawa,T. and Nagasaki,N.(in press) Anal. Biochem.
4. Kvetňanský,R., Kopin,I. and Saavedra,J.M.(1978) Brain Res., 155:387-390
5. Korf,J., Aghajanian,G.K. and Roth,R.H.(1973) Neuropharmacology, 12:933-938
6. 中川良一,田中正敏,河野康子,西川正,戸島信夫,長崎信行,野田哲彦, (1979) 脳研会誌, 5:36-37
7. Palkovits,M., Kobayashi,R.M., Kizer,J.S., Jacobowitz,D.M. and Kopin,I.J.(1975) Neuroendocrinology, 18:144-153
8. Ritter,S. and Pelzer,N.L.(1978) Brain Res., 152:170-175
9. Saavedra,J.M., Kvetnansky,R. and Kopin,I.J.(1979) Brain Res., 160:271-280
10. Schanberg,S.M., Breese,G.R., Schildkraut,J.J., Gordon,E.K. and Kopin,I.J.(1968) Biochem. Pharmacol., 17:2006-2008
11. Schanberg,S.M., Schildkraut,J.J., Breese,G.R. and Kopin,I.J.(1968) Biochem. Pharmacol. 17:247-254
12. Stone,E.A.(1973) J. Neurochem., 21:589-601
13. Stone,E.A.(1973) Amer. J. Physiol., 224:165-169
14. Thierry,A.M., Javoy,F., Glowinski,J. and Kety,S.S.(1968) J. Pharmacol. exp. Ther., 163:163-171
15. van der Vies(1961) Acta Endocrinol., 38:399-406
16. Vellucci,S.V.(1977) Brit. J. Pharmacol., 60:601-605

12 中枢各ドーパミン・ニューロン系(A8～A14)のHVA濃度とhaloperidolの影響

松本　孝・内村英幸・平野　誠
金　長寿　(国立肥前療養所)
中原辰雄　(九大・理)

〔要　約〕

われわれは、di-PFP誘導体と反応ガスクロマトグラフィー法を併用したGC/MS法による脳内DAの代謝産物の1つであるHVAの微量定量法を確立した。今回，この方法でラット脳内各DA neuron系に対するhaloperidolの影響をHVAを指標にして検討を加えた。

HVAの部位別濃度については，CP(8.180±0.412 ng/mg protein)，AC(6.070±0.228)，TO(4.409±0.292)は今までに報告されている値と一致した。FC(0.445±0.015)は，Scattonらだけがラット脳を用いて報告しているが，その約$\frac{1}{2}$であった。これまでに報告されていない部位としてFCM(0.874±0.037)，ACC(0.515±0.021)，Septum(1.256±0.058)，Preo-A(0.468±0.031)，DM(0.897±0.051)，ARC-ME(1.221±0.074)，Amygdala(0.368±0.017)の値を得た。

Haloperidol(0.1mg/kg, s.c.)投与によるHVAの増加率は，FC(196.6%)が最大で，Septum(183.3%)，CP(169.2%)，Amygdala(145.4%)，AC(144.2%)，ACC(136.7%)，TO(134.1%)，Preo-A(121.3%)の順であった。最大増加率に達する時間は、FC, Amygdalaが3時間，他はすべて2時間であった。DM(5-10%)，ARC-ME(20－35%)であるが有意の差はなかった。この結果から，抗精神病薬の主な作用部位は皮質・辺縁系，特にFCが注目される。

部位別のHVA増加率の経時変化をみると，上記の最大増加率ピーク時間の違いおよび1時間での増加率の違いがある。この結果は，投与した抗精神病薬haloperidolの時間的分布状態を知る1つの目安となると考えられる。

抗精神病薬がdopamine(DA)受容体を遮断することは、かなり明らかになった。また、DA代謝産物の1つであるhomovanillic acid(HVA)は、DA受容体遮断によりfeedback機構によってDA neuronのDA代謝が高まる結果増加すると考えられている。しかし，A_8～A_{14}の各DA neuron系にどのように影響するか充分に明らかにされていない。それ故，抗精神病薬の各DA neuron系への影響を検討するのに，HVAの変化は有効な指標になると考える。

しかし、脳内HVAを定量するには，現在の螢光法，ガスクロマトグラフィー(GC)法があるが感度や特異性に問題が残っている。他方、特異性の高いgas chromatography-mass spectrometry(GC/MS)法による測定法が発展してきたが，感度が不十分である。そこで、われわれはGC/MSを用いて、より感度の高い方法を検討した結果10 pg以下を含む試料の測定が可能となった(8)。そこで、A_8～A_{14}の各DA neuron系への抗精神病薬haloperidol(HPD)の影響を、HVAの変化を指標にして検討を加えた。

〔実験方法〕雄性Wistar-Kingラット(体重350-400g，生後1年)を用い、HPD(0.1mg/kg, s.c.)投与1～4時間後に断頭した(p.m. 1:00)。対照にはsalineを投与。断頭後すばやく脳を摘出、-80℃で1時間凍結し、クリオスタット(-12℃)で300μmの連続切片を作った。-20℃のplate上におき、実体顕微鏡下でmicroknifeを用いKöning & Klippelのアトラス(4)によって、FC(A12760-A10500)、FCM(A10500-A10050)、ACC(A8920-A7890)、AC(A9410-A8620)、TO(A9820-A7890)、Septum(A7890-A7470)、CP(A7690)、Preo-A(A7020-A5340)、DM(A4890-A4110)、ARC-ME(A4890-A4110)、Amygdala(A4890-A4110)を切り出した。各試料を-45℃に冷却したmicrohomogenizerに入れ試料の融解を完全に防ぎ，各々に0.1N塩酸500～1000μlを加えホモジェナイズした。各試料のprotein量はLowryら(6)の方法で測定した。ホモジェネートを冷却遠心(15000g×40分)し、

上清200μlに内部標準物質HVA-d_5(6ng)を加え酢酸エチル500μlで抽出した。さらに酢酸エチル300μlを加え再度抽出し，抽出液を反応バイヤルに入れ，N_2ガスで蒸発乾固した。乾固後，Friら(2)の方法でHVA-di-PFP誘導体にして，反応ガスクロマトグラフィー(RGC)法(7,8)を用いてラット脳内HVAを測定した。

[結果及び考察] 現在までに報告されたラット脳内HVAを測定する方法には、螢光法(1)，GC法(17)，GC/MS法(12)などがあるが測定感度2~5ngであった。このためHVAが高濃度に存在するCP, AC, TOで検討されてきたが，他のDA neuron系についての検討は十分なされていない。これらのneuron系のHVA定量には，さらに高感度の定量法が必要である。HVA-di-PFP誘導体とRGC法を併用すると，Fig.1に示すごとく，10pg以下を含む試料の測定が可能である。またGC/MSの測定条件，使用フラグメント及び保持時間もFig.1に記載した。この方法の開発で今まで測定できなかった部位の測定に成功した。

Table 1にHPD(0.1mg/kg, S.C.)投与1~4時間後の脳内各DA neuron系のHVA変化を示した。saline control値の平均は各時間毎の値が有意な差がないことを確かめて求めた。Preo-Aだけ有意な差があった。HVA量はCPで最も高く，AC, TO, Septum, ARC-MEの順に高く，amygdalaで最も低かった(CPの約4%)。HPD投与により各DA neuron系のHVAの増加率は異なり，最高増加率に達するに要する時間はFC, Amygdalaが3時間，他は2時間であった。FCの最高増加率は2時間目の増加率とは有意な差がなかった。HVA増加率はFC(3時間)で最大，DMのそれが最低であった。

今までに報告されている脳内HVA量は，CP: 0.6-1ng/mg, AC: 0.5-0.7ng/mg, TO: 0.4-0.5ng/mgである(16,17,18)。今回の結果はこれらの値とよく一致していた。ラットFCのHVAは，わずかにScattonら(11)が報告しているが，今回の結果はその約$\frac{1}{2}$の値であった。以前報告したFC値(14)は，Scattonらの値と一致していたが，他のCP, AC, TO値は約4~7倍高い値であった。この原因は，その時点では試料の切り出し方，ラットの年令及びstrainの違いによる可能性があると考え，死後変化については、Wieselら(15)がCPを摘出し，4°Cで6時間放置するとHVA量が約3倍に増加するとの報告及びMolemanら(9)は断頭後2.5~20分でHVAの死後変化はないと報告しているので説明困難であった。しかし，今回脳摘出後-80°Cで凍結し，各試料を切り出す時に完全に試料を融解させないようにした結

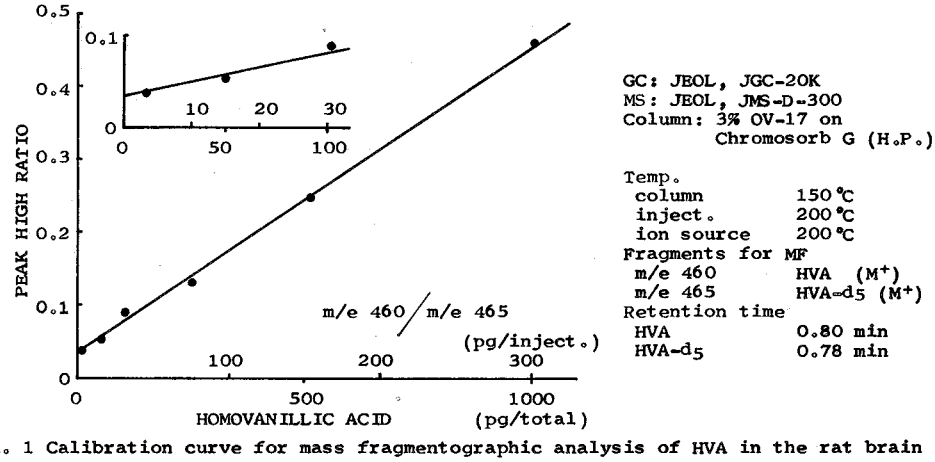


Fig. 1 Calibration curve for mass fragmentographic analysis of HVA in the rat brain

Table 1 Effect of haloperidol(0.1 mg/kg, s.c.) on HVA contents in dopaminergic neuron systems of the rat brain

		saline control	haloperidol	% control
A. Mesocortical dopaminergic terminals				
1. frontal cortex (FC)	1hr	0.480±0.040 (6)	0.678±0.017 (6)**	162.2± 4.2 (6)
	2hr	0.450±0.016 (6)	1.252±0.046 (8)**	278.3± 4.7 (8)
	3hr	0.408±0.029 (6)	1.187±0.031 (6)**	296.6±16.9 (6)
	4hr	0.442±0.008 (4)	0.926±0.014 (4)**	209.4± 3.1 (4)
	mean	0.445±0.015 (22)		
2. frontal cortex medial field (FCM)	1hr	0.899(0.940,0.858)	0.963(1.041,0.884)	106.9(110.7,103.0)
	2hr	0.888±0.098 (4)	1.982±0.108 (4)**	223.2±12.2 (4)
	3hr	0.847±0.011 (4)	1.562(1.576,1.548)**	184.5(186.1,182.8)
	mean	0.874±0.037 (10)		
3. anterior cingulate cortex (ACC)	1hr	0.571±0.048 (4)	0.778±0.043 (3)*	136.6± 7.5 (3)
	2hr	0.502±0.014 (4)	1.721±0.201 (6)**	236.7± 9.8 (6)
	3hr	0.472±0.028 (4)	0.743(0.753,0.733)**	157.4(159.5,155.3)
	mean	0.515±0.021 (12)		
B. Mesolimbic dopaminergic terminals				
1. nucleus accumbens (AC)	1hr	6.342±0.444 (4)	13.090±0.512(3)**	206.4± 8.1 (3)
	2hr	5.895±0.429 (4)	21.057±0.269(3)**	244.2± 3.1 (3)
	3hr	6.012(6.006,6.018)	10.883(10.29,11.47)**	181.0(171.2,190.8)
	mean	6.070±0.228 (10)		
2. tuberculum olfactorium (TO)	1hr	3.722±0.361 (3)	6.280±0.297 (4)**	176.5± 2.4 (4)
	2hr	4.243±0.374 (5)	9.244±0.726 (4)**	234.1± 7.6 (4)
	3hr	4.880(4.799,4.960)	6.205(6.018,6.392)*	127.2(123.3,131.0)
	mean	4.409±0.292 (10)		
3. septum	1hr	1.310±0.119 (4)	3.116±0.311 (4)**	238.5±12.0 (4)
	2hr	1.309±0.060 (4)	3.839±0.433 (4)**	283.3±18.8 (4)
	3hr	1.134(1.059,1.204)	1.656(1.449,1.862)*	142.0(136.8,154.1)
	mean	1.256±0.058 (10)		
4. amygdala	1hr	0.377±0.049 (4)	0.572±0.072 (4)*	153.0± 6.3 (4)
	2hr	0.334(0.328,0.339)	0.819±0.053 (6)**	193.9±11.2 (6)
	3hr	0.344±0.012 (6)	0.972±0.089 (4)**	245.4± 4.9 (4)
	4hr	0.456(0.473,0.438)	0.729(0.771,0.689)*	159.9(163.0,156.8)
	mean	0.368±0.017 (14)		
C. Nigrostriatal dopaminergic terminals				
1. nucleus caudatus putamen (CP)	1hr	8.182±0.383 (4)	18.664±0.931(4)**	228.1±11.4 (4)
	2hr	8.476±0.773 (4)	25.391±1.228(8)**	269.2± 7.4 (8)
	3hr	7.585(7.798,7.372)	18.774(19.29,18.26)**	247.5(247.5,247.5)
	mean	8.180±0.412 (10)		
D. Incerto hypothalamic dopaminergic neurons				
1. anterior part of periventricularis, nucleus preoptic medialis, nucleus anterior (Preo-A; A_{14} dopaminergic neurons)	1hr	0.582±0.004 (4)	0.648±0.040 (6)	109.3± 2.4 (4)
	2hr	0.463±0.026 (6)	1.022±0.069 (6)**	221.3±10.0 (6)
	3hr	0.313(0.324,0.302)	0.590(0.646,0.533)*	188.0(199.4,176.5)
	mean	0.468±0.031 (12)		
2. medial zona incerta, nucleus dorsomedialis (DM; A_{13} dopaminergic neurons)	1hr	0.961±0.060 (4)	0.934±0.101 (6)	104.1±11.2 (4)
	2hr	0.740±0.034 (3)	0.916±0.074 (6)	108.7± 4.7 (6)
	3hr	1.007(1.113,0.900)	1.120(1.138,1.102)	111.2(113.0,109.4)
	mean	0.897±0.051 (9)		
3. nucleus arcuatus, median eminence (ARC-ME; A_{12} dopaminergic neurons)	1hr	1.308±0.141 (6)	1.768±0.128 (4)	135.1± 9.8 (4)
	2hr	1.026±0.074 (5)	1.234±0.042 (4)	120.3± 4.1 (4)
	3hr	1.334±0.118 (4)	1.823±0.104 (3)	136.6± 7.8 (3)
	mean	1.221±0.074 (15)		

The results were expressed as the mean (ng/mg protein) ± S.E.M.(number of determinations). *$p < 0.05$, **$p < 0.005$.
The saline control value of each time was not significant when compared with each other in all regions except for Preo-A.

果、今までに報告されている値と一致した。これから断頭後脳を切片にすると短時間でもHVAの死後変化が起こることが示唆される。Scattonらの値[11]との違いは、ラット

の種類の違い，螢光法の測定感度・特異性の問題性に問題があるのかもしれない。他の部位(ACC, Septum, Preo-A, DM, ARC-ME, Amygdala)でのHVAを測定した報告はない。

最近の研究で，種々の抗精神病薬に対するmesocorticalとnigrostriatalDA系の活性の違いが示唆された。これは抗精神病薬に対するDA受容体の違いによるものであると考えられていた。DA感受性adenylate cyclaseを指標にした研究で，DA受容体の薬理学的性質に部位的な差はないが，HPDはin vivoではCPのDA感受性adenylate cyclaseよりFCのそれを強く阻害する(10,13)。これは，FCのDA受容体がCPの受容体よりHPDにより有効に阻害される可能性を示唆している。ヌLaduronら(5)は，HPD(0.08 mg/kg, s.c.)をウサギに用いた実験で，HVAを指標にして同様な結果を得て，FCが抗精神病薬の主な抗精神病作用部位ではないかと報告している。今回のラットを用いてHVAを指標にした実験でも，表1に示すごとくHPDは，mesolimbic, nigrostriatal DA neuron系よりFCのmesocortical DA neuron系に有効に作用することが示唆される。この結果から，FCが抗精神病薬の主な作用部位として注目される。

mesolimbic DA系では、AC, TOで測定されているだけであったが，今回SeptumとAmygdalaの検討も行なった。Septumが最大に増加し，増加率もFCと同程度であった。Amygdalaもかなり増加していた。このように，情動に関係する辺縁系もかなり抗精神病薬の作用に関与しているのは興味深い。

Incerto hypothalamic DA neuron系のDM(A_{13} DA neuron)とARC-ME(tuber infundibular DA neuron, A_{12} DA neuron)のHPD投与によるHVAの増加率は前者5-10%，後者20-35%にすぎず，saline controlと有意な差がなかった。Gudeiskyら(3)は，α-methyltyrosineを用いてDA turnover rateを検討した結果，A_{12} DA neuronはHPD(2.5 mg/kg)投与2時間目では変化なく，16時間目にturnoverが高まるため，他のmesolimbic, nigrostriatal DA neuronと異なり，HPDの影響はゆっくりしたhormonal-neuronal-feedback loopによるものだと報告している。今回の結果HPD投与2時間目では約20%増加していたが，有意な差はなかった。情動・内分泌の中枢がある視床下部のDA neuron系については，HPDによるDA受容体の直接遮断による影響は少ないと考えられる。この点については，今後さらにHPD投与量とHVAの変化の検討が必要である。

部位別のHVA増加率の経時変化をみると，1時間目の増加率はCP, AC, TO, Septumのような高い増加率のグループと，Amygdala, ACC, FC, FCMのような低い増加率のグループに分けられる。これらの結果は，投与した薬物HPDの時間的分布状態を知る1つの目安となると考えられる。

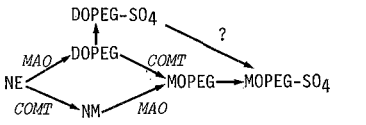
1) Bartholini,G. et al.(1975) J.Pharm.Pharmac. 27,439. 2) Fri,C.G. et al.(1974) Life Sci. 14,2469. 3) Gudelsky,G.A. et al.(1977) J.Pharmacol.Exp.Ther. 202,149. 4) Köning,J.F.R. & Klippel,R.A.(1963) The rat brain,Williams & wilkins Co. Bartimore. 5) Laduron,P. et al. (1977) Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 296,183. 6) Lowry,O.H. et al.(1951) J.Biol. Chem. 193,257. 7) 松本孝 他 (1978)第3回医用マス研究会 3,243. 8) 松本孝 他(1979) 第4回医用マス研究会 印刷中 9) Moleman,P. et al.(1977) J.Neurochem. 29,175. 10) Nakahara,T.(1978) J. Neurochem. 31,1335. 11) Scatton,B.(1977) Europ.J.Pharmacol. 46,363. 12) Sjöquist,B. et al. (1975) Life Sci. 13,1655. 13) 内村英幸 他 (1977) 精神薬療基金年報 9,46. 14) 内村英幸 他 (1978) 精神薬療基金年報 10,29. 15) Wiesel,F.-A. et al.(1974) Brain Res. 65,547. 16) Wiesel,F.-A. (1975) Europ.J.Pharmacol. 30,364. 17) Wilk,S. et al.(1975) Europ.J.Pharmacol. 30,117. 18) Wilk,S.(1976) Europ.J.Pharmacol. 37,203.

13 3,4-Dihydroxyphenylethylene glycol (DOPEG)及びその硫酸抱合体の蛍光定量法と脳内NE代謝系における意味について

古川　清・唐沢忠彦・吉田耕一
清水当尚　（大日本製薬総研）

〔要　約〕
脳内norepinephrine(NE)の主代謝物と考えられている3,4-dihydroxyphenyl-ethylene glycol(DOPEG)及びその硫酸抱合体(DOPEG-SO4)の蛍光分析法を開発し，この方法を用いて若干の実験を行ない，動物の脳内NE代謝経路におけるこれら代謝物の役割り及び意味について考察した。DOPEG, DOPEG-SO4の脳組織からの抽出には過塩素酸(PCA)を用い，抽出された両代謝物は，QAE-Sephadex, Dowex 50W などのイオン交換樹脂及びアルミナのカラムを用いて精製・濃縮したのち蛍光法により分析した。蛍光分析には，catechol化合物がethylenediamineと縮合して強い発蛍光体を生成する反応を利用した。本定量法の特異性は，最終精製物質の薄層クロマトグラフィー，蛍光スペクトル及び本定量法に適用した種々のDOPEG類似化合物が与える蛍光の読み，更には，本法によりマウス，ラットの脳の部位別に測定したDOPEG, DOPEG-SO4様物質の濃度分布とNE神経の分布がよく一致している事実などから確認された。全操作を通しての回収率は75-80%と高く，また同一試料を同時に分析した際の測定値間の変動は少なく，良好な再現性を示した。NE代謝に影響を与える二三の薬物をマウス，ラットに投与して脳内DOPEG, DOPEG-SO4濃度に及ぼす作用を検討した結果，DOPEGはマウスの脳内では速やかに代謝され，ラットの脳におけるDOPEG-SO4とは異った代謝的意味をもつことが示唆された。

現在，動物の脳内NEは，主としてFig. 1に示す径路で代謝されると考えられている。一方，脳内モノアミン神経系の活動性の変化は，シナプスにおけるアミンの遊離動態の変化を介して，そのアミンに由来する代謝物濃度に影響を与えることが知られている。従って，脳内モノアミン代謝物の濃度を測定することにより，薬物や生理条件の変化が脳内モノアミン神経系に如何なる影響を与えるかを間接的に知ることが可能である。Fig. 1に示すNE代謝物の中で，NM[2]，MOPEG-SO4[3]に関しては既に簡便な蛍光定量法が確立され，上述の如き目的に利用されている。又，最近，MOPEG[1]の蛍光定量法も開発された。しかしながら，DOPEG及びDOPEG-SO4に関しては，簡便な定量法がなく，NE代謝におけるこれらの代謝物の役割り，意味は明らかでない。そこで演者らは，この両代謝物の簡便な分析法の開発を試み，一応満足できる方法を確立したので報告する。更に，この定量法を用いて行なった実験から，DOPEG, DOPEG-SO4の代謝に関して若干の知見を得たので併せて報告する。



NM: normetanephrine
MOPEG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol
MAO: monoamine oxidase
COMT: catechol-O-methyltransferase

Fig. 1.

〔定量方法〕
(1)抽出：脳組織は，少なくとも5倍量(V/W)の0.4N PCAでhomogenizeし，遠沈して澄明な抽出液を得る。
(2)精製・濃縮：PCA抽出されたDOPEG, DOPEG-SO4の精製・濃縮操作は，夫々，Fig. 2及び3に示すとおりである。PCA上清液のカラムapplyに先立って行なう中和操作で

生ずる $KClO_4$ は，氷冷により析出させ遠沈除去する。QAE-Sephadex(AcO^-) 0.7×6.5cmカラムにおけるDOPEGの挙動はFig. 4 に示すとおりである。DOPEGはこのカラムに弱く結合し，0.002 M酢酸で図のようなパターンで溶出する。一方，DOPEGの蛍光定量を妨害する酸性カテコール化合物(DOPAC, DOMA等)はこの樹脂に強固に吸着され溶出しない。又，別種の妨害物質であるアミン及びアミノ酸系カテコール体(NE, L-DOPA等)はDowex 50Wに吸着され除去される。DOPEG-SO_4のQAE-Sephadex A-25(Cl^-) 0.7×6.5cmにおける挙動はFig. 5 に示すとおりである。この挙動はMOPEG-SO_4の挙動とほぼ同じであ

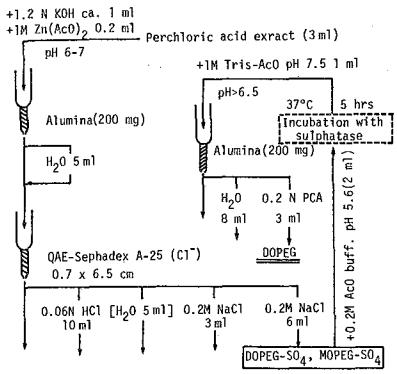


Fig. 3. DOPEG-SO_4の精製・濃縮

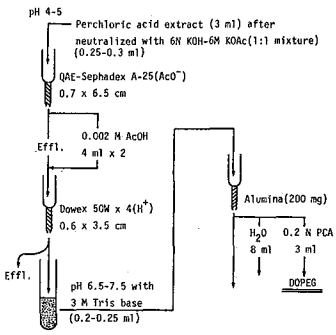


Fig. 2. DOPEGの精製・濃縮

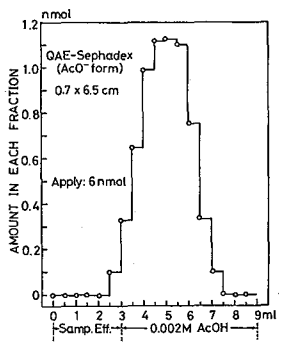
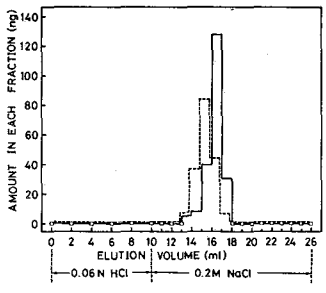


Fig. 4. DOPEGの溶出曲線

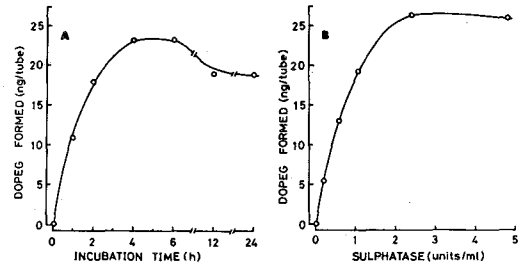
1) 両者ともに0.2M NaClにより溶出される。このDOPEG-SO_4溶出液は，pH 5.6に調節後，sulphatase(30unit)を加え37°C 5h incubationしてDOPEG-SO_4を遊離型に水解する。この酵素的加水分解条件はFig. 6 に示す実験結果に基づいて決定したものである。

(3)蛍光分析：上述の精製・濃縮操作により最終的に得られたDOPEGのアルミナカラム溶出液3mlに，1N HClと20% ethylenediamine溶液を夫々1mlずつ加え，よく混和後，60°C 20分間加温する。加温終了後，氷水溶中で十分冷却し，生成したDOPEG蛍光体の蛍光強度を0°Cで測定する(励起波長：420 nm，蛍光波長：510 nm)。



Chromatographic behaviour of endogenous DOPEG-SO_4 (——) and MOPEG-SO_4 (------) on a column of QAE-Sephadex A-25, Cl^- form (0.7 × 6.5 cm, bed volume 2.5 ml). Both substances were extracted from brains of rats injected i.p. with probenecid (200 mg/kg) and levomepromazine (30 mg/kg) 2 and 1 h before death, respectively.

Fig. 5.

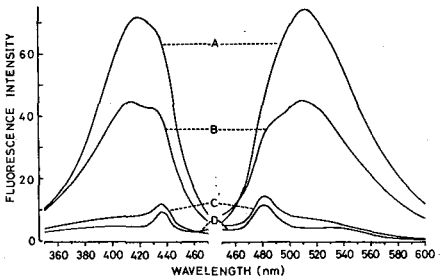


Conditions for enzymatic hydrolysis of DOPEG-SO_4 isolated from rat brains. The DOPEG-SO_4-containing eluates (6 ml) from QAE-Sephadex columns were incubated with a purified preparation of sulphatase from *Helix pomatia* as described in Methods under the various conditions of incubation time and enzyme amount. A: Incubation time was varied with a fixed enzyme amount of 5 units/ml. B: Enzyme amounts were varied with a constant incubation time of 5 h.

Fig. 6.

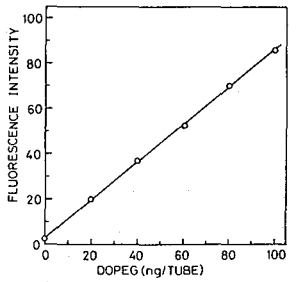
〔実験結果及び考察〕

(1) DOPEGの蛍光体生成反応：ethylenediamineと縮合して生成するDOPEGの蛍光体の蛍光スペクトルは，Fig. 7のAに示すごとく420及び510 nmに最大励起及び最大蛍光波長を有していた。定量方法の項で述べた縮合反応条件下で生成する蛍光体量は，Fig. 8に示すごとく，DOPEG濃度に直線的に依存しており，blankの2倍の蛍光の読みを与えるに必要なDOPEG量は約5ng/tubeであった。しかしTable 1に示すように，この反応条件下で他のカテコール体もかなりの蛍光を発し，これらの化合物の存在下ではDOPEGの蛍光測定は妨害を受けることが示唆された。



Fluorescence spectra of fluorophore derived, by condensation with ethylenediamine, from authentic DOPEG and from the compound isolated from rat brain. A normal rat brain (1.8 g) was homogenized in 5 ml of 0.4 N-perchloric acid. A 3 ml portion of the supernatant from the homogenate was used for the assay as described in Methods. The activation spectra were obtained with the emission at 510 nm; the emission spectra with the activation at 420 nm. A: Authentic DOPEG (100 ng/tube), B: Brain sample, C: Enzyme blank, D: Reagent blank.

Fig. 7.



Relationship between DOPEG concentration (ng/tube) and fluorescence intensity.

Fig. 8.

(2) 本定量法により定量される物質の同定：DOPEG，DOPEG-SO4の蛍光分析法に関しては現在までに報告がなく，本法が最初であるので，本法によって定量される物質がDOPEG及びDOPEG-SO4であることを確認する必要がある。まずDOPEG-SO4の同定を行なった。ラットの脳のPCA抽出液から本法によって精製・定量される物質の蛍光スペクトルは，Fig. 7 Bに示すように，DOPEG標準品のそれと一致した。次に，この物質がDOPEGであることを薄層クロマトグラフィーで確認した。大量のラットの脳のPCA抽出液を本精製法により処理し，最終的に得られたアルミナカラム溶出液を酢酸エチルで抽出し，N_2気流中で溶媒を蒸発濃縮後，セルロース薄層プレートにapplyした。展開後，プレート上のセルロース層を展開方向に添って1cm幅毎に削り取り，水で抽出後ethylenediamineと反応させて蛍光物質のクロマトグラムを調べた。Fig. 9に示すように，用いた二種類の溶媒系のいずれにおいても，ethylenediamine反応物質は単一のピークとして認められ，その位置は，同じプレート上で並行して展開したDOPEG標準品の位置と一致した。一方，この物質は，精製操作からsulphatase処理過程を省くと，全くdetectされなかった。従って，この物質は，QAE-Sephadex溶出液中では，sulphate抱合体として存在しているものと思われる。この推察は，本物質がQAE-Sephadex(Cl^-)カラムにおいてMOPEG-SO4と類似の

RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITY DEVELOPED FROM STRUCTURALLY RELATED COMPOUNDS

Compound	Relative intensity
DOPEG	100
MOPEG	0
DOPAC	33.3
3,4-Dihydroxymandelic acid	40.9
Homovanillic acid	0
Vanylmandelic acid	0
Norepinephrine	75.1
Dopamine	11.8
L-3,4-Dihydroxyphenylalanine	5.8
Normetanephrine	0
3-Methoxytyramine	0
5-Hydroxyindoleacetic acid	0
5-Hydroxytryptamine	0

Each compound (1 μg) was subjected to the ethylenediamine reaction, as described in Methods, and fluorescence intensity was measured at 420/510 nm.

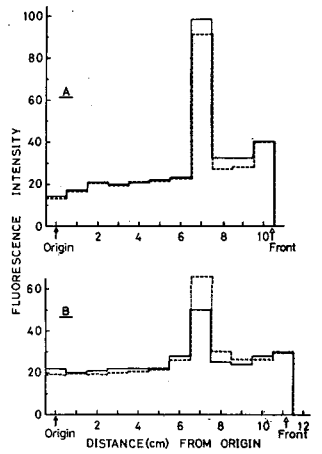
Table 1.

等動を示す事実からも支持される。一方，DOPEG定量法の特異性は，マウスの脳から本法によって精製される物質の蛍光スペクトル及び本定量法に適用した種々のDOPEG類似体が全く蛍光の読みを与えないこと等から確認された。

(3)脳内DOPEG，DOPEG-SO4 の正常値：本法を用いて定量した脳内DOPEG濃度の正常値は，マウス，ラット，モルモットにおいて，夫々，0.24，0.31，0.17 nmol/g（平均 n=7）であった。DOPEG-SO4は，ラットの脳において 0.47nmol（平均 n=5）であったが，マウス，モルモットの脳では検出されなかった。

(4) DOPEG，DOPEG-SO4の脳内分布：Table 2は，COMT 阻害剤 tropolone（50mg/kg）＋ reserpine（5mg/kg）を i.p. 投与したマウスの脳内7部位におけるDOPEG濃度を示す。Table 3 は正常ラットの脳の各部位で測定した DOPEG-SO4 の濃度を示す。両代謝物の脳内分布は，NE 神経の分布とよく一致していた。

(5) reserpine(R)，levomepromazine(L)のマウス脳内DOPEG濃度に及ぼす影響：脳内NE の代謝を亢進することが知られているR，Lは，ラットの脳内DOPEG-SO4 を増加させるにも拘らず，マウスの脳内DOPEG濃度にはほとんど影響を及ぼさなかった(Table 4)。しかしながら，COMT 阻害条件下では，R及びLは脳内DOPEGを著るしく増加させた。これらの結果から，DOPEGはマウスの脳内では極めて迅速にMOPEGに代謝され，ラットの脳におけるDOPEG-SO4とは異った代謝的意味をもつことが示唆される。



Thin-layer chromatography of authentic DOPEG (----) and of the compound isolated from normal rat brains (——). For details of method, see text. A: isobutanol–methanol–1 N-formic acid (60:20:20, by vol), B: chloroform–methanol–1 N-ammonium hydroxide (60:35:5, by vol).

Fig. 9

Rigional distribution of DOPEG in the brain of mice pretreated with tropolone & reserpine

Brain region	Weight/mouse (mg)	DOPEG (nmol/g)
Cerebellum	57 ± 0.66	0.749 ± 0.035
Medulla oblongata	59 ± 0.86	1.327 ± 0.049
Hypothalamus	18 ± 0.55	1.820 ± 0.061
Striatum	26 ± 1.60	0.644 ± 0.064
Midbrain	53 ± 2.70	1.059 ± 0.091
Hippocampus	30 ± 1.70	0.990 ± 0.052
Cortex	145 ± 1.2	0.701 ± 0.016

Values are mean + S.D. 1.5 hr after tropolone (50 mg/kg i.p.) and reserpine (5 mg/kg i.p.)

Table 2.

(1) Adér, J.-P. and Korf, J. (1979) J. Neurochem. 32, 1761-1768.

(2) Karasawa, T., Furukawa, K., Yoshida, K. and Shimizu, M.(1975) Jap. J. Pharmac. 25, 727-736.

(3) Meek, J.L. and Neff, N.H. (1972) Br. J. Pharmac. 45, 435-441.

Treatment	Brain DOPEG (nmol/g)
Saline	0.214 ± 0.015
Reserpine(5mg/kg i.p.)	0.262 ± 0.034
Levomepromazine(10mg/kg i.p.)	0.284 ± 0.011
Tropolone(50mg/kg i.p.)	0.640 ± 0.079
Reserpine + Tropolone	1.370 ± 0.081
Levomepromazine + Tropolone	1.090 ± 0.227

Values are mean ± S.D. (n=5) Mice were killed 1.5 h after drug administration.

Table 4.

Regional distribution of DOPEG-SO4 in rat brain

Brain region	Weight/rat (mg)	DOPEG-SO4 (nmol/g)
Cerebellum	249 ± 4	0.153 ± 0.036
Medulla oblongata	206 ± 9	0.521 ± 0.018
Hypothalamus	61 ± 6	1.242 ± 0.091
Striatum	99 ± 8	0.484 ± 0.061
Midbrain	202 ± 15	0.900 ± 0.062
Hippocampus	117 ± 11	0.590 ± 0.070
Cortex	547 ± 28	0.361 ± 0.037

Values are mean ± S.D.

Table 3

本発表の一部は，J. Neurochem. 30, 1525 (1978)に公表した。

〔参考文献〕

14 ミクロゾームによるハイドロキシインドール化合物の代謝とその代謝産物の膜蛋白への不可逆的結合

植村富彦・嶋津　孝・堀田直樹
（都精神研）

〔要　約〕

肝および脳ミクロゾームに存在するＮＡＤＰＨ酸化酵素活性は，５位又は６位に水酸基をもつインドール化合物の添加により著明に促進し，ＮＡＤＰＨ酸化に伴い酸素消費も著しく促進することが判明した。^{14}Cでラベルした5-ハイドロキシトリプタミン(5-ＨＴ)および5-ハイドロキシトリプトファン(5-ＨＴＰ)を酸素とＮＡＤＰＨ存在下にインキュベートした処，ミクロゾーム膜蛋白に不可逆結合する代謝産物を見い出した。膜結合放射性代謝産物の形成は，ＧＳＨ，ビタミンＣ，スーパーオキシド・ディスムターゼ(ＳＯＤ)の添加により著しく抑制されたが，チトクロームＰ-450のリガンドであるＣＯやフェニールイソシアナイドは軽度(約20%)の阻害効果を示すにすぎなかった。従って，この反応にはチトクロームＰ-450の関与はあったとしてもごく僅かなものであると考えられ，フラボプロティン(ＮＡＤＰＨ-チトクロームｃ還元酵素)のレベルで作られるO_2^-(スーパーオキシドアニオンラジカル)による5-ＨＴおよび5-ＨＴＰの酸化が示唆された。

[序論] インドールアルキルアミンの分解経路に関しては，モノアミン酸化酵素(ＭＡＯ)による酸化的脱アミノ反応が主経路である事はほぼ確立されている(7)。インドール核の変化については，最近報告されたインドールアミン・ディオキシゲナーゼ(8)による核の開裂反応の他，フェノール性水酸基をもつハイドロキシルインドール類のセルロプラスミン(14)，無脊椎動物に存在するハイドロキシルインドール酸化酵素(2)，チトクローム酸化酵素(18)などによる酸化，およびヘモグロビン(3)，酸化型チトクロームｃ(1)や化学酸化剤(6)による非酵素的酸化反応が報告されている。我々は，肝ミクロゾームによるＮＡＤＰＨの酸化反応と酸素消費が，ハイドロキシインドール類を添加する事により著明に促進される事を最近報告した(16,17)。今回は，脳ミクロゾームおよびシナプトゾーマル・エンドプラスミック・レティクルムによる5-ＨＴと5-ＨＴＰのＮＡＤＰＨ依存性代謝とその代謝産物の膜蛋白への不可逆結合を中心に，反応に関与する酵素系に検討を加えた。

[実験方法] 実験動物は，*Sprague-Dawley* 又は *Wistar* 系ラットを用いた。肝ミクロゾームは，1.15% KCl 又は，0.25 M *Sucrose* を用いて従来確立されている方法により調製した。シナプトゾームは *Booth and Clark* の方法(4)により調製し，シナプトゾーマル・エンドプラスミック・レティクルムは，*Lai and Clark* の方法(10)を多少 *modify* して調製した。ＮＡＤＰＨ酸化酵素活性は，３４０ｎｍの吸光度の減少により測定した。酸素消費は，クラーク型電極(ＹＳＩ 53型)で測定した。^{14}C-5-ＨＴおよび^{14}C-5-ＨＴＰの膜結合性代謝産物は，既に報告した方法(16)により測定した。なお上記三反応はすべて36°Cで行った。ＮＡＤＰＨ-チトクロームｃ還元酵素(fp_2と略す)は，武居，大村の方法(13)に従

い，ミクロゾームをトリプシン処理して精製した。蛋白定量は Lowry 法(11)で行った。

[結果] ミクロゾームによるNADPHの酸化と酸素消費に対する種々のインドール類の効果: 図1は，肝ミクロゾームによるNADPH酸化と酸素消費に対する5-HTの促進効果を，KCN存在下(System A)と非存在下(System B)に比較したものである。肝ミクロゾームにNADPHを加えると，ゆるやかな酸素消費(a', b')を伴ったNADPHの酸化(a, b)が見られる。(dash は酸素消費を，a, b はKCNの有無を示す。)これらは，5-HTの存在下では著明に促進され，酸素消費(A', B')は，KCN存在下(A'- 約270 n moles/8分/mg protein)では無添加時(B'-約135 n moles/8分/mg protein)に比べて約2倍に促進される。一方5-HT依存性NADPH酸化酵素活性(A, B- 258 n moles/8分/mg protein)には，シアンによる影響は見られない。従って，NADPH酸化量と酸素消費量との比は，シアン無添加時には2:1となり，シアン存在下には1:1となる。

表1は，肝ミクロゾームによるNADPH酸化と酸素消費に対する様々なインドール類の効果を示したものである。5位に水酸基を持つインドール類は，側鎖の如何に拘らず両反応を促進した。興味ある事には，6位に水酸基をもつ6-ハイドロキシトリプタミン(6-HT)も5-HT同様有効であった。5位又は6位のいずれにも水酸基をもたぬトリプトファン，トリプタミンやインドールの添加は，コントロール(インドール類無添加)とほぼ同様のNADPH酸化と酸化消費を示し，また5位の水酸基がメトキシ基で置換されたメラトニンもコントロールと同様であった。更にインドール環の5および6位以外の他の位置に水酸基を持つような化合物，例えば4-HTや7-HTに関しては，V. Erspamer (Roma 大学) よりこれらの化合物をいただき目下検討中である。

ミクロゾームによる5-HT依存性NADPH酸化と酸素消費に対するSODの効果: 図2に示す如く，反応系に予めスーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)を加えておくと，加えないコントロール(C: 酸素消費，c: NADPH酸化)に比べ，酸素消費(A)ならびにNADPH酸化(a)はほぼ完全に抑制され，5-HTを加えない endogenous な酸素消費(D)やNADPH酸化(d)とほぼ同様の時間経過を示した。反応経過中にSODを加えると，酸素消費(B)は抑制されたがNADPH酸化(b)は抑制されなかった。これらの結果は，好気性条件下では，NADPHとミクロゾームで作り出される O_2^- を使って5-HTが未知の代謝産物に変化している事を示唆している。

膜蛋白結合性代謝産物の生成とその反応様序の解析: 表2の Complete System に示す如く，NADPHの存在下では，放射性5-HTおよび5-HTPの代謝産物が肝ミクロゾームに不可逆的に結合することが見い出された。NADPH非存在下では，結合能はわずか10-20%にすぎなかった。この代謝産物の結合反応は，チトクローム P-450 のリガンドである CO やフェニールイソシアナイドでは殆んど阻害されない(僅か20%の阻害)ことから，この反応にチトクローム P-450 が関与している可能性は少い。O_2^- scavenger である SOD ではほぼ完全に阻害され，O_2^- の Chemical Scavenger である Tiron でも程度は弱いが明らかに阻害された。その他，アスコルビン酸や GSH でも明瞭な阻害が見られ，これらの阻害効果は，カテコールアミン類のNADPH依存性ミクロゾーム膜への不可逆結合の場合(5, 15)と酷似する。結合反応はほぼ30分まで直線性があるので，KCN存在下では約1 n moles/min/mg の膜結合性代謝産物が生成された

ことになる。一方，酸素消費の初速度は約 100 nmoles/min/mg (図1，2より算出)であるので，酸素消費量の約 1/100 しか膜結合性代謝産物の生成がないことになる。

脳ミクロゾームおよびシナプトゾーマル・エンドプラスミック・レティクルムによる結合反応：表3に示す如く，全脳から調製したミクロゾームでも肝臓の場合とほぼ同様に，5-HTおよび5-HTPはNADPHに依存して代謝され，その代謝産物がミクロゾーム膜に不可逆的に結合することが判明した。なおシナプトゾーム分画そのものを用いた場合には，結合反応にはNADPHの添加効果が見られず，NADPHを加えない場合との間に有意差が見られなかった。しかし，シナプトゾームを低張処理して得られるシナプトゾーマル・エンドプラスミック・レティクルム分画を用いると，NADPH依存性があるようであり，現在この点について検討中である。

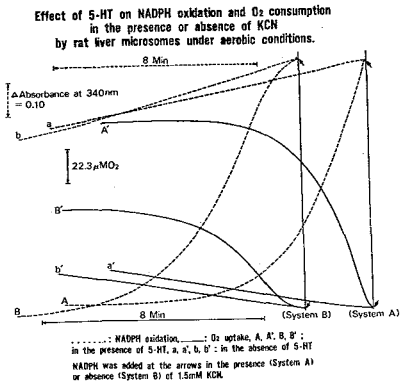
NADPH-チトクロームC還元酵素(fp_2)による5-HT依存性NADPH酸化と酸素消費：米国のグループは，α-メチルドーパのNADPHと酸素依存性結合反応にチトクロームP-450の関与を示唆した(5)。一方ドイツのグループは，ドーパ，ドーパミンのNADPHと酸素依存性結合反応にチトクロームP-450は不可欠のものではなく，むしろフラボプロテイン(fp_2)が関与している事(15)を示した。我々も肝ミクロゾームをトリプシン処理する事により t-fp_2 を約120倍に精製した。この精製した fp_2 を用いるとミクロゾームを用いた時と同様に，5-HT依存性のNADPH酸化と酸素消費が見られた(図3)。

6-ハイドロキシインドール類のNADPH及び酸素依存性代謝：ミクロゾームを用いた場合，6-HTも5-HT同様有効である結果(表1)は興味ある事であり，更にこれを確認するため，6-ハイドロキシメラトニン(6-HM)を用い，精製したフラボプロテイン(t-fp_2)でNADPH酸化酵素活性および酸素消費が促進されるか否かを検討した。図4に示す如く，6-HMも6-HT同様，NADPH酸化および酸素消費を著しく促進した。メラトニンの代謝に関しては，最近平田等(8)により報告された5-メトキシ-N-アセチルキシヌレナミン生成経路以外に，従来から，肝ミクロゾームで6位に水酸化を受け，生じた6-HMは直ちに硫酸又はグルクロン酸抱合される(9)と考えられてきた。しかしながら，抱合反応以外に，ここで述べたミクロゾーマル fp_2 によるNADPHと酸素に依存した代謝経路も可能であり，目下この点についても検討中である。

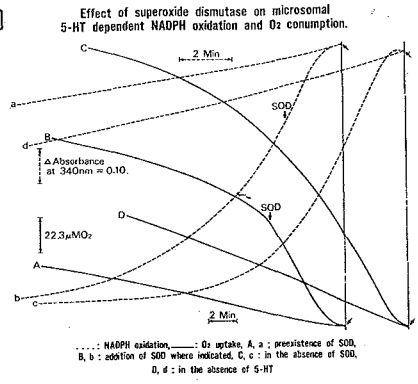
[考察] 本研究で見い出されたミクロゾームによるハイドロキシインドール化合物の代謝反応は既知の水酸化反応と異なり，酸素原子自身は，5-HT分子内に組み込まれない。このことは，反応の *Stoichiometry* からも明らかで，*Mixed Function Oxidase* 特有のNADPH/O_2/*product* の比が 1/1/1 (12) にはならない。恐らくこの反応はNADPHとミクロゾーマルフラボプロテイン(fp_2)により酸素が一電子還元されて生じた O_2^- が，酸化剤として働いてハイドロキシルインドール類を酸化して，セミキノン又はキノンイミンに変え，O_2^- 自身は更に還元されて過酸化水素を生じるものと考えられる。このことはNADPH/O_2比が，シアン無添加時には 2/1 でシアンが存在すると 1/1 になる事や，反応途中でシアンを加えると酸素消費が約2倍にすみやかに促進される事から支持される。膜蛋白結合性代謝産物の化学構造に関しては目下検討中である。

ハイドロキシインドール類の膜結合性代謝産物の生成に関する生理的意義は，今後の課題である。

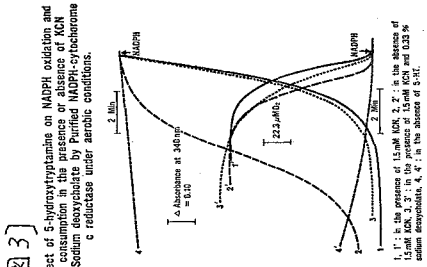
[図1]



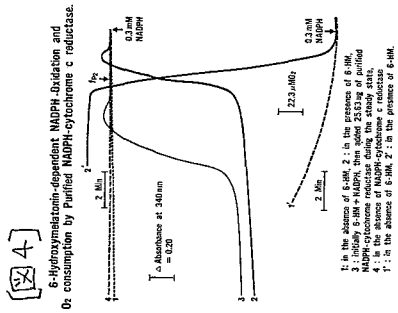
[図2]



[図3]



[図4]



[表1] Dependencies of the stimulation of NADPH oxidation and O_2 consumption by rat liver microsomes on various indole compounds.

	NADPH Oxidation	O_2 Consumption
	nmoles NADPH oxidized/8min/mg protein	nmoles O_2/8min/mg protein
None	36.2	56.9
5-HT	242.0	277.5
N-Acetyl-5-HT	213.6	316.1
Bufotenine	217.0	310.7
5-HTP	215.7	289.3
5-HI	235.6	291.4
5-HIA	178.1	267.8
6-HT	278.3	321.1
Tryptophan	36.2	53.6
Tryptamine	27.6	41.8
Melatonin	35.8	48.2
Indole	38.2	42.9

[表2] Irreversible binding of [^{14}C] 5-HT and [^{14}C] 5-HTP metabolites to rat liver microsomal protein and the effects of various binding conditions.

		5-HT		5-HTP	
		nmoles/mg protein/30min	%	nmoles/mg protein/30min	%
Complete System		28.81±2.52 (8)	100	19.94±3.73 (6)	100
−NADPH generating system		3.18±0.34 (3)	11	3.40±0.42 (3)	17
CO/O_2	(80/20)	21.89±3.82 (3)	76	15.41±0.45 (3)	77
Phenylisocyanide	1.0 mM	23.04±1.88 (3)	80	17.24±3.49 (4)	86
Tiron	1.0 mM	13.40±3.62 (4)	47	6.28±1.72 (3)	31
SOD	75 μg/ml	1.45±0.03 (3)	5	1.11±0.06 (3)	6
GSH	1.0 mM	3.17±1.25 (3)	11	2.41±0.87 (3)	12
Ascorbic Acid	1.0 mM	1.18±0.22 (3)	4	0.81±0.22 (3)	4

Values are expressed as mean± S.D. from separate experiments.

[表3] Irreversible Binding of [^{14}C] 5-HT and [^{14}C] 5-HTP Metabolites to Rat Brain Microsomal Protein

	5-HT	5-HTP
	nmoles/mg protein/30min	nmoles/mg protein/30min
Complete System	27.58±2.46	65.06±7.04
−NADPH generating System	3.79±1.35	13.52±1.28

Values are expressed as mean±S.D of 4 separate experiments.

[文献]

(1) Alivisatos,S.G.A. & Williams-Ashman,H.G. (1964) Biochim.Biophys.Acta 86, 392-395. (2) Blaschko,H. & Milton,A.S. (1960) Brit.J.Pharmacol.15, 42-46. (3) Blum,J.J. & Ling,N.S. (1959) Biochem.J.73, 530-535. (4) Booth,R.F.G. & Clark,J.B. (1978) Biochem.J.176, 365-370. (5) Dybing,E.,Nelson,S.D.,Mitchell,J.R., Sasame,H.A. & Gillette,J.R. (1976) Mol.Pharmacol.12, 911-920. (6) Eriksen,N.,Martin,G.M. & Benditt,E.P. (1960) J. Biol.Chem.235, 1662-1668. (7) Erspamer,V. (1954) Pharmacol.Rev.6, 425-487. (8) Hirata,F.,Hayaishi,O., Tokuyama,T. & Senoh,S. (1974) J.Biol.Chem. 249, 1311-1313. (9) Kopin,I.J.,Pare,C.M.B., Axelrod,J., & Weissbach,H. (1961) J.Biol. Chem.236, 3072-3075. (10) Lai,J.C. & Clark, J.B. (1976) Biochem.J.154, 423-432. (11) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L. & Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem.193, 265-275. (12) Mason,H.S. (1965) Ann.Rev.Biochem.34, 595-634. (13) Omura,T., & Takesue,S. (1970) J.Biochem.67, 249-257. (14) Porter,C.C., Titus,D.C.,Sanders,B.E. & Smith,E.V.C. (1957) Science 126, 1014-1015. (15) Scheulen,M., Wollenberg,P.,Bolt,H.M.,Kappus,H. & Remmer, H. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun.66, 1396-1400. (16) Uemura,T.,Matsushita,H., Ozawa,M.,Fiori,A. & Chiesara,E. (1979) FEBS Lett.101, 59-62. (17) 植村富彦, 松下浩司, 嶋津孝 (1979)第52回日本生化学総会 (18) Wessbach,H. In Discussion cited by Udenfriend,S. (1958) 5-Hydroxytryptamine p.43-49.

15 Radioreceptor assayによるベンゾジアゼピン血中濃度の測定

清水宏俊・本田雅子・小田切 脩
(日本ロシュ研)

〔要 約〕
ベンゾジアゼピン系薬物服用後の血中有効成分を測定する為の，単純，高感度の radioreceptor assay 法を確立した。 原理は，ラットの脳の P_2 分画膜標品への特異的な ^3H-diazepam 結合に対する，血中有効成分による定量的阻害による。 diazepam 投与後の血中濃度を本法とガスクロマトグラフィー法とで比較したところ，類似のプロフィールが得られた。 medazepam は体内に7ヶ以上の代謝物が存在する可能性があるが，各代謝物の相対薬理活性（P_n）を上記 ^3H-diazepam 結合に対する阻害度から算出し，medazepam 服用後の各代謝物の濃度（C_n）をガスクロマトグラフィーで測定して，血中総有効力価（$\Sigma C_n \cdot P_n$）の経時変化を調べたところ，そのプロフィールは radioreceptor assay によるものと極めて類似した。 活性代謝物の多いベンゾジアゼピンの臨床作用持続時間等の判定には，真の力価が測定される本法が，有用な測定手段となるであろう。

Benzodiazepine (BD) 系薬物は，抗不安，催眠，その他種々の目的で臨床において汎用されている。 BD系薬物を内服すると体内で種々の有効代謝物が生ずるので，化学的に測定した血中濃度を臨床効果と対応させることが困難な場合もある。 最近，ヒトを含む種々の哺乳動物の脳で見出された BD 結合蛋白は[1,3]，薬効に比例した親和性で種々の BD 系化合物と結合することが知られている。 そこでこの BD 結合蛋白を利用して，BD 服用後の血中有効成分を測定する方法を考案した。

〔方 法〕

BD結合蛋白の分離 ラット大脳より灰白質部を切截し，20 倍量の 0.32 M 蔗糖溶液中でホモゲナイズした後 crude synaptosomal P_2 分画を得る。得られた分画を 15 mM Krebs-Tris buffer で希釈し，最終濃度を 10 mg protein/ ml に調整した後，使用時まで凍結保存する。

血液からの試料の作成 ヘパリン処理により作成した血漿 1 ml に，飽和 Na_3PO_4（pH 12.6）を 2 ml 加え，さらに10 mlのベンゼン／ジクロルメタン(9:1) 混合液を加えて BD およびその代謝物を抽出する。抽出液の 7ml はガスクロマトグラフィー による定量に用いる。残りの 2 ml を窒素気流下で乾固し，乾固物を 50 μl のエタノールに溶解し，その 10 μl を radioreceptor assay 用の試料とする。

Radioreceptor assay 表 1 に示した組成の混合液を，4°C, 30 分間インキュベートし，

表1　Incubation mixture for benzodiazepine binding

15 mM Krebs-Tris buffer, pH 7.4,	1.8 ml
^{3}H-Diazepam (1.2 x 10^{5} dpm, 2.9 nM) in water,	0.05 ml
Binding protein, 1 mg protein in the buffer,	0.1 ml
Test compound in 20% MeOH,	0.05 ml
Total	2.0 ml

5 mlのbufferで希釈した後，直ちにフィルター上（Whatman GF/B）で沪過する。フィルターは洗條後，Soluene－350，1 mlを含む15 mlのBrayシンチレーター中で，^{3}H放射活性を測定する。

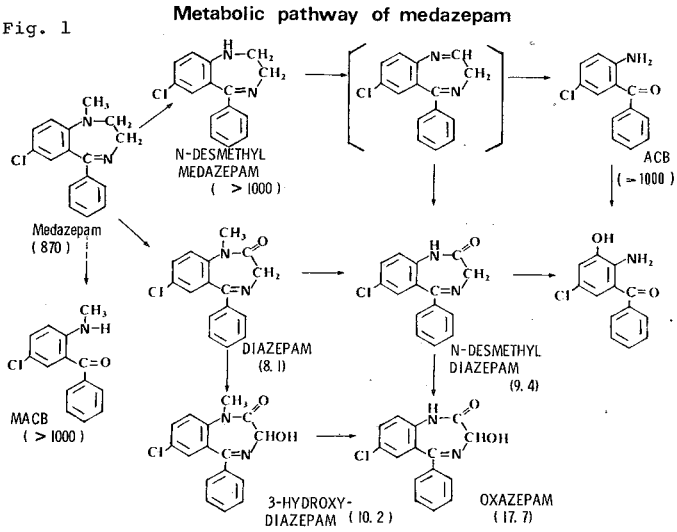
ガスクロマトグラフィーによる定量　島津4CM－PFE型の電子捕獲検出器付ガスクロマトグラフを用いた。カラムは3% OV-17（60/80 mesh, Gas Chrom Q），径3 mm，長さ2 m，温度は注入口290°，カラム225°，検出部290°。保持時間はmedazepam，22分diazepam 50分，N-desmethylmedazepamとoxazepamは33分，N-desmethyldiazepam 78分，3-hydroxydiazepamは約150分である。

〔結果と考察〕

得られたBD結合蛋白の特性　SD系ラットから上記の方法で得たBD結合蛋白のdiazepamに対する解離定数 $K_D \fallingdotseq 8$ nM であり，表1に示した条件での $IC_{50} \fallingdotseq 13$ nM diazepam（26 pg）である。このため，表1の条件において，1 nMから100 nMまでのdiazepam（2 pg～200 pg）が，^{3}H-diazepamとの結合部位での競合により定量可能である。最大結合容量は約350 pg/mg protein，解離速度の半減期は約10分（0～2°C）で，これらは文献値とほぼ一値する。(1,7)

^{3}H-diazepam結合に対する各種BDの影響　barbituratesやmeprobamateなどの古典的睡眠薬が本アッセイを阻害しないことは，報告通り，(3) われわれの標品でも確認された。各種BDが^{3}H-diazepamの結合を阻害する際の IC_{50} や K_i 値が，それらの薬効（potency）にほぼ比例することは，既に報告されているものの他，(1,3) 約150種のBD系化合物で認められている。(4,5) BD系薬物の中には，生体内代謝物が薬効の本態と思われるものも多く，diazepam（$K_i = 8.9$ nM）の代謝物と考えられるdesmethyldiazepamは $K_i = 8.8$ nM，oxazepamは $K_i = 49$ nMと報告されている。(1) われわれはMöhler & Okada (3)の報告した臨床薬効と K_i 値との相関図において，medazepam（ノブリウム，レスミット）が薬効に比して異常に高い K_i 値を示すことに注目し，その代謝物の IC_{50} 値を表1の条件で検討した。medazepam代謝物としては，図1に示した少なくともクケが知られており，(6) その中でdiazepamが最も低い IC_{50}（8.1 nM）を示した。medazepamの IC_{50} は870 nMで，その薬効は無視し得ると思われるが，N-desmethyldiazepam (IC_{50} = 9.4 nM) 3-hydroxydiazepam (IC_{50} = 10.2 nM) およびOxazepam (IC_{50} = 17.7 nM) は，若し脳内に存在

Fig. 1



すればかなりの活性を有すると思われる。

次に，２種以上のBDが共存する場合，^{3}H-diazepamとの競合が相加的に生ずるか否かを検討するため，種々の濃度の非放射性diazepamによる^{3}H-diazepamの結合阻害率を，oxazepam 20nMの存在下と非存在下とで測定した（図2）。oxazepamの共在により，一定範囲内の濃度のdiazepamによる阻害は相加的に強められた。

Radioreceptor assayにおける血漿の阻害的影響　薬物の血中濃度測定に際し，全血，血清，血漿などを直接の試料とし，抽出操作を含まずに測定できれば，大変便利である。ところが，BD結合蛋白を用いたradioreceptor assayにおいて強い阻害を示す物質が血漿中に存在することがわかった（図3）。したがって，臨床用量で投与されたBD系薬物の血中濃度測定には，前処理としての有機溶媒抽出が必要となる。今回用いた溶媒（ベンゼン／ジクロルメタン）は，阻害物質を抽出することなく，BD系薬物を75～90％回収する。

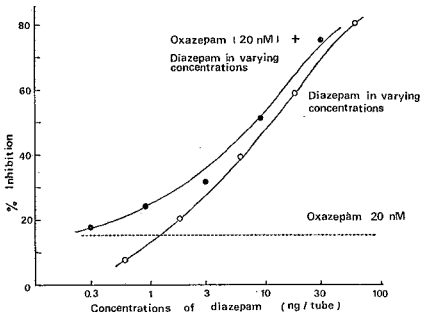


Fig. 2.
Inhibition of ^{3}H-diazepam binding by varying concentrations of diazepam in the presence (●) and absence (○) of oxazepam 20 nM.

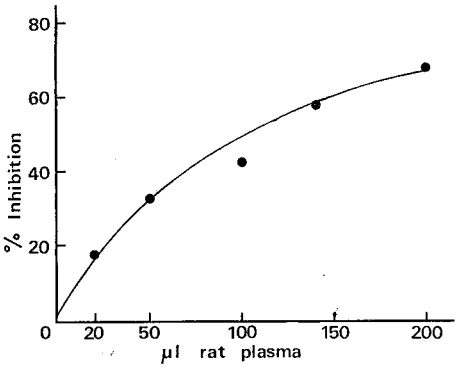
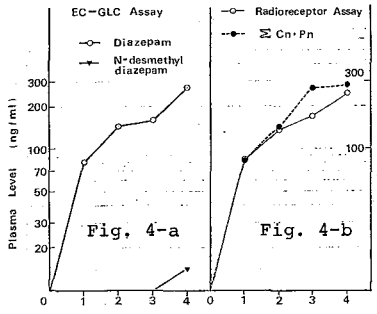


Fig. 3.
The inhibitory effect of rat plasma on the binding of ^{3}H-diazepam to BD-binding protein.

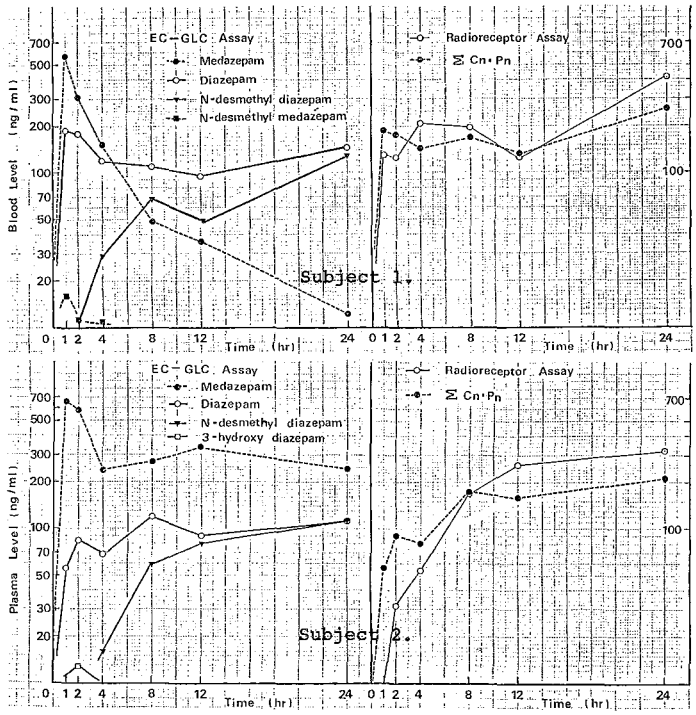
Diazepam服用後の血中濃度　diazepam 5mg内服後の血漿について，薬物由来の成分をガスクロマトグラフィー（図4-a）と，radioreceptor assay（図4-



Blood level profiles in a man after diazepam 5 mg p.o.

b) との2つの方法で測定した。活性代謝物としては desmethyldiazepam のみが，僅かに認められた。先に得られた IC50 値から，diazepam の potency (P) を 1.0 とした際の desmethyldiazepam の P は 0.86 と概算されるので，化合物の濃度 (Cn) に P を乗じたものを化合物の全て (1,2……n，但し図4の場合は n=2) に関して加算し (Σ Cn·Pn)，各時点毎に図4-b に合せてプロットした。radioreceptor assay は元来，理論的に Σ Cn·Pn を (diazepam 当量として) 示しているはずであるが，化学的に測定した Cn を用いて算出した Σ Cn·Pn のプロフィール と似た経時変化が認められた。

Medazepam 服用後の血中濃度　30 mg の medazepam を内服した2人の被検者につき，血漿中の medazepam 由来物質を GLC 法 と radioreceptor 法とで測定し，また図1に示した活性比を用いて Σ Cn·Pn を算出し，diazepam 当量として図4と同じ方法で下図に示した。4種の化合物が GLC 上測定され，親化合物である medazepam の血中濃度は速かに低下したが，活性代謝物は 24 時間以上存続した。その結果，化合測定を基に算出した Σ Cn·Pn と radioreceptor assay は，共に長時間持続の類似の経時変化を示した。以上の結果から，BD 系薬物血中濃度の radioreceptor assay は，薬効持続時間の客観的判定上，脳波の速波化や[2] 光眼輪筋反射の変化[8] と共に，極めて有効な測定手段になり得ると思われる。



〔文　献〕

1. Braestrup, C., and Squires, R.F. (1978) Brit. F. Psychiat. 133, 249-260.
2. Fink, M., Irwin, P., Weinfeld, R.E., Schwartz, M., and Conney, A.H. Clin. Pharmacol. Therap. (1976) 20, 184-191.
3. Möhler, H., and Okada, T. (1978) Brit. F. Psychiat. 133, 261-268.
4. Möhler, H., and Okada, T. personal communication.
5. Odagiri, H., and Shimizu, H. unpublished observation.
6. Schwartz, M.A., and Carbone, J.J. (1970) Biochem. Pharma. 19, 343-361.
7. Speth, R.C., Wastek, G.J., and Yamamura, H.I. (1979) Life Sci. 24, 351-358.
8. Tanaka, M., Isozaki, H., and Inanaga, K. (1977) J. of Clin. Pharma. 8, 445-451.

16 中枢catecholamine神経系synapse機能の発生，発育とmethamphetamineの作用

野村靖幸・大木恵子・四元郁子
瀬川富朗　（広大・医・総合薬）

〔要約〕
中枢catecholamine神経系のシナプス機能の個体発生，生後発育について知ることを目的に，今回methamphetamineの発育期ラットの行動に対する作用，新生期および成熟期における noradrenaline (NA), dopamine (DA) の synaptosome へのとりこみにおよぼすmethamphetamineの影響，脳切片からのNA，DA遊離機能の高K，methamphetamine感受性の生後変化を検討し，以下の成績を得た。

1) methamphetamine 0.5, 1, 2 mg/kgの腹腔内投与は，生後1日の動物の運動量を有意に増加させ，3，7日とその作用は強くなり20日でピーク，35，70日で減弱した。

2) 間脳のL-[³H]NAとりこみに比し，線条体の[³H]DAとりこみの生後変化は大きかった。methamphetamineは，新生期でも成熟期でも[³H]DAとりこみ抑制を，L-[³H]NAとりこみ抑制より強く示した。この[³H]DAとりこみ抑制作用は新生期と成熟期でほぼ同程度であったが，L-[³H]NAとりこみ抑制作用は成熟期で新生期の約2倍強かった。

3) 50 mM Kは，新生期の全脳切片より，両amineを Ca^{2+} 依存的に遊離させた。methamphetamine 10^{-6} Mは，新生期でも成熟期でも，両脳切片よりL-[³H]NAを遊離させず，[³H]DAを3日，7日，70日で遊離させた。

以上より，ラットでは生後直後に，中枢NA，DA神経系は機能しており，新生期にもmethamphetamineはDA神経系のシナプス前部に作用し運動量を増加すると推定した。

中枢dopamine (DA), noradrenaline (NA) 神経系のシナプス機能の個体発生は，ラットにおいて，その胚後期あるいは生後すぐ生ずるという可能性は，脳神経終末におけるNAとりこみのオンセット(1)，能力(2)，特異性(3)，NA，DAによる脳adenylate活性の増加(4)，さらに，新生期ラットに対するclonidine (中枢α-agonist) の運動量増加作用(5)，spiroperidol (中枢DA agonist) のcatalepsy惹起作用(6)などの神経化学的，行動薬理学的研究により示唆されている。amphetamine, methamphetamineの発育期ラットに対する作用は，生後10～13日に運動量増加作用を示すとの報告(7, 8)があるが，その詳細は明らかでない。さらにその発育期動物に対する作用の神経化学的機序も，はっきりしていない。そこで，今回，発育期ラット行動に対するmethamphetamineの作用を調べ，ついで，新生期ラット脳の線条体，間脳におけるL-[³H]NA，[³H]DAのとりこみ，遊離機能に対するmethamphetamineの相互作用を調べ，成熟期におけるそれらと比較検討したので報告する。

〔実験材料および方法〕

a) 実験動物：発育期の雌雄のWistar系ラットを使用した。22-23日に離乳した。

b) 動物の運動量の測定：1匹づつ，プラスチックケージ(24×18 cm)内でANIMEX運動量測定装置により，methamphetamineを腹腔内投与後，10，30，50，70，90分後に10分間づつ測定し，運動量はそれらの和 (counts/50 min) で表わした(5)。

c) L-[³H]NA，[³H]DAのとりこみ：新生期および成熟期動物の線条体および間脳のP₂画分へのL-[³H]NA，[³H]DAのとりこみを，methamphetamineを加えて37°Cで10分間preincubate後，10^{-7} M (最終濃度) のL-[³H]NA，または[³H]DAを加え，37°C

で10分間 incubate してとりこみ量を調べた。

d) L-[³H]NA, [³H]DA の脳切片からの遊離：あらかじめ，L-[³H]NA を負荷した間脳切片，[³H]DA を負荷した線条体切片からの 50 mM K⁺ または methamphetamine 10^{-6} M による L-[³H]NA, [³H]DA の環流液中への遊離を調べた。環流液の Krebs-Ringer 液より Ca^{2+} を除去し，かつ EGTA 2 mM を添加したメジウムを環流し，amine 遊離の Ca^{2+} 依存性を調べた（9）。

［実験成績］

1) 発育期ラットの運動量および行動におよぼす methamphetamine の影響

Fig. 1 に示したように methamphetamine 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg は，生後1日の動物に対し，前向きに這う運動（crawling）を起させ，運動量を有意に増加させた。この methamphetamine による運動量の増加は，3日，7日と次第に強くなり，20日で最強となり，35日，70日では弱くなった。なお7日までは，不明瞭であったが，14日以後，明らかに，methamphetamine は，動物に常同行動 sniffing を起させた。

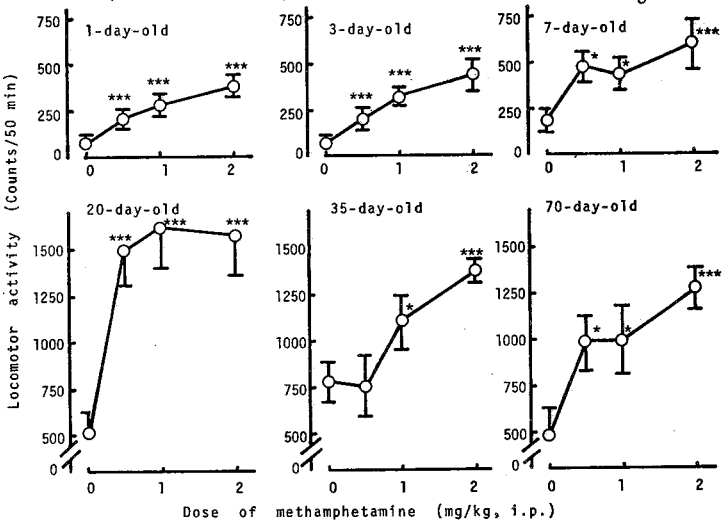


Fig. 1. Methamphetamine-induced locomotor stimulation in the developing rat. Significance *** $P<0.001$, * $P<0.05$.

2) 新生期および成熟期における間脳への L-[³H]NA，線条体への [³H]DA とりこみと methamphetamine の影響

Table I に示したように L-[³H]NA の間脳へのとりこみ量は，タンパクあたりにして，新生脳より成熟脳で高かったが有意差はなかった。一方，[³H]DA の線条体へのとりこみは，新生脳に比し，成熟脳で有意に増加した。Table II に示したように，methamphetamine は，[³H]DA とりこみ抑制を L-[³H]NA とりこみ抑制より，新生期で約 1/3 の濃度，成熟期では，約 1/1.5 の濃度で示した。さらに，新生期，[³H]DA とりこみに対する methamphetamine の 50% 抑制濃度は，成熟期におけるそれと有意差を認めなかったが，L-[³H]NA とりこみに対する 50% 抑制濃度は，新生期で

TABLE I. Comparison of the L-[^{3}H]NA uptake into the diencephalon and [^{3}H]DA uptake into the striatum between neonatal and adult rats.

	Uptake (pmol/mg protein)				
	L-[^{3}H]NA		[^{3}H]DA		
7-day-old	1.19 ± 0.11 (4)	--	6.56 ± 0.42	(3)	
70-day-old	1.30 ± 0.11 (4)	NS	14.30 ± 1.04	(3)	$P<0.005$

The number of exp. is shown in parenthesis. NS, not significant.

TABLE II. Comparison of the effect of methamphetamine on the L-[^{3}H]NA uptake into the diencephalon and [^{3}H]DA uptake into the striatum between neonatal and adult rats.

	IC_{50} of methamphetamine (10^{-7} M)				
	L-[^{3}H]NA		[^{3}H]DA		
7-day-old	35.7 ± 5.9 (3)	--	11.1 ± 0.7	(3)	--
70-day-old	18.2 ± 1.2 (3)	$P<0.05$	12.0 ± 1.7	(4)	NS

は、成熟期の2倍と有意に高かった。

3) 新生期ラット脳切片からの高K^+によるCa^{2+}依存性 L-[^{3}H]NA, [^{3}H]DA遊離

Fig. 2に示したように、50mM K^+は、新生期(生後2~3日)脳切片から、L-[^{3}H]NAと、[^{3}H]DAを遊離させた。この高K^+による両amineの遊離は、環流液をnormal Krebs-Ringer液よりCa^{2+}除去、EGTA 2mM添加液にした場合、ほぼ完全に抑制された。これら高K^+によるCa^{2+}依存性の両amineの遊離は、成熟期脳切片におけるとのをきわめてよく似ていた(成績省略)。

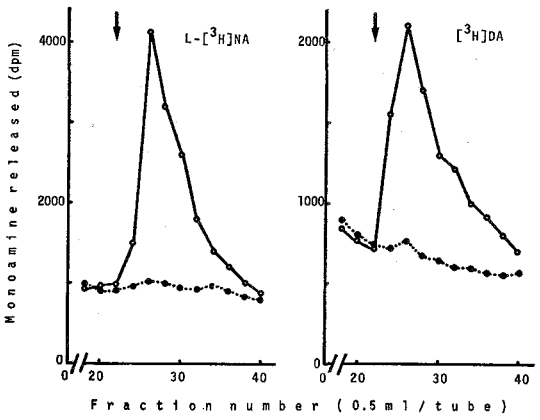


Fig. 2. A high K^+-induced, Ca^{2+}-dependent release of L-[^{3}H]NA and [^{3}H]DA from striatal slices of the neonatal rat. o——o, Control, •·····•, Ca^{2+} free and EGTA.

4) methamphetamineの発育期動物間脳切片よりのL-[^{3}H]NA遊離作用および線条体切片よりの[^{3}H]DA遊離作用

methamphetamine 10^{-6}Mは、7日および成熟期ラット間脳切片より、L-[^{3}H]NA遊離作用を全く示さなかった(成績省略)。一方、Fig. 3に示したように、methamphetamine 10^{-6}Mは、線条体切片より、[^{3}H]DAを、7日では、遊離させなかったが、3日で初めて遊離させ、7日、70日では明らかに遊離させた。

[考察]

methamphetamineは、生後1日のラットに対し、crawlingを起させ運動量を用量依存的に増加させ、以後20日にいたるまでその発育に伴ない、運動量増加作用が強くなった。この成績は生れてすぐmethamphetamineの運動量増加作用に関与する中枢神経系の生理的機序が、すでに機能していることを示唆している。35日および成熟動物でその増加作用が低いのは、20~30日に、行動的に抑制性の機能を有する中枢acetylcholineニューロンが機能的成熟に達することによるかもしれない(10)。

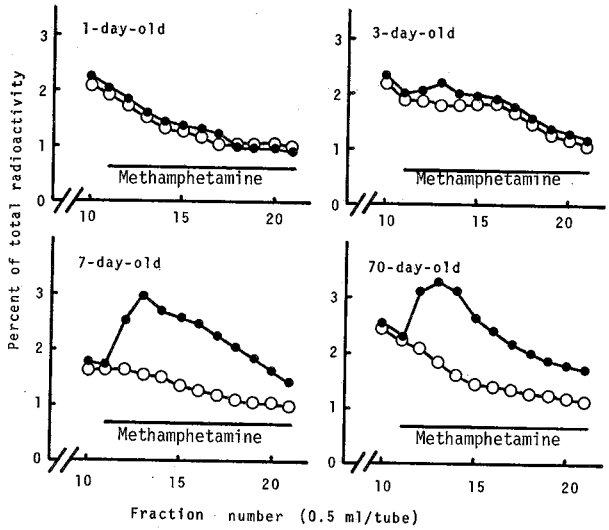


Fig. 3. Methamphetamine-induced [^{3}H]DA release from striatal slices in the developing rat. o——o, spontaneous release, •——•, methamphetamine 10^{-6} M.

methamphetamineによる常同行動惹起作用は、その運動量増加作用よりも遅く、14日以後認められたので、常同行動に関与する中枢機序はやや複雑と考えられる。

線条体P_2画分への[^{3}H]DAとりこみは、7日より成熟期で、約2.2倍(比活性で)

増加したのに対し、間脳でのL-[^{3}H]NAとりこみは増加傾向を示したのみであった。線条体において、DAニューロンの投射が、生後強く生ずると考えられ、線条体における内因性DA含量の急速な増加(2, 11)と一致する。一方、生後2～3日の全脳切片より、高Kによる脱分極性刺激が、成熟期におけるそれと同様、Ca^{++}依存性に、L-[^{3}H]NA, [^{3}H]DAを遊離させた。したがって、とりこまれた両amineの一部は、生理的機能を有する"pool"にとりこまれていること、NA, DAは、生後すぐ化学伝達物質として機能しており、さらに中枢NA, DA神経系も機能していることが推定される。

新生期においても成熟期においても、methamphetamineは、L-[^{3}H]NAとりこみ抑制よりも、[^{3}H]DAとりこみを強く抑制したこと、さらにmethamphetamine 10^{-6}MはL-[^{3}H]NA遊離作用を示さず、一方、3日以後成熟にいたるまで、[^{3}H]DA遊離作用を示した。この成績は、methamphetamineの運動量増加作用等の中枢興奮作用は、相対的にDA神経系が強く関与していることを示している。methamphetamineの[^{3}H]DAとりこみ抑制作用は、新生期と成熟期と同程度であった(約10^{-6}M)が、L-[^{3}H]NAとりこみ抑制作用は、成熟期の方が新生期の約2倍を示した。成熟期におけるmethamphetamineの行動作用に、NA神経系が新生期におけるよりも関与している可能性を示している。methamphetamineに対するDA神経終末よりのDA遊離の感受性は、生れて一週間のうちに急速に進むと推定される。

[文献]

1) Coyle, J. T. & Axelrod, J., J. Neurochem., 18, 2061 (1971).
2) Nomura, Y., Naitoh, F. & Segawa, T., Brain Res., 101, 305 (1976).
3) Nomura, Y., Tanaka, Y. & Segawa, T., Japan. J. Pharmacol., 28, 501 (1978).
4) Von Hungen, K., Roberts, S. & Hill, D. F., J. Neurochem., 22, 811 (1974).
5) Nomura, Y. & Segawa, T., Brit. J. Pharmacol., 66, 531 (1979).
6) Baez, L. A., Eskridge, N. K. & Schein, R., Europ. J. Pharmacol., 36, 155 (1976).
7) Campbell, B. A., Lytle, L. D. & Fibiger, H. C., Science, 166, 635 (1969).
8) Miller, R. & Sahakian, B., Brain Res., 81, 387 (1974).
9) Nomura, Y., Okuma, Y., Segawa, T., Schmidt-Glenewinkel, T. & Giacobini, E., J. Neurochem., 33, 803 (1979).
10) Nomura, Y. & Segawa, T., Europ. J. Pharmacol., 50, 431 (1978).
11) Nomura, Y. & Segawa, T., Japan. J. Pharmacol., 29, 306 (1979).

17 ラット小脳の2種のRNase Hとそれらの機能

塚田欣司・斉藤順子・沢井保子
沢崎嘉男・中島　熙
（東医歯大・難研）

〔要　約〕

ラット脳を小脳と非小脳部分にわけ，Mg^{2+}およびMn^{2+}依存性のRNase Hの活性を測定した。小脳のRNase H活性は，その両者について生後増強と共に活性を増加し，6日目で最大になり以後生長と共に減少した。非小脳部分では，生後増強につれて，両者の活性は，減少する傾向がみられた。これらMg^{2+}およびMn^{2+}依存性のRNase H活性は，3H-チミジンのDNAへのとりこみ，その他DNA合成に関与する諸酵素の活性の変化とほぼよく一致していた。生後，6，12および35日目の小脳の粗酵素液を，ホスホセルロースカラムにかけると，Mn^{2+}-RNase Hは0.2MのKClで，Mg^{2+}-RNase Hは0.4MのKClで溶出され，その比活性の変化は，粗酵素液で測定したものとよく一致していた。両者の酵素を，ホスホセルロース，ブルーセファロース等で部分精製し，その両者の性質を比較検討した。その結果Mg^{2+}-RNase Hは，分子量，35,000，S値3.0，至適pH，9.0であり，Mn^{2+}-RNase Hは，分子量150,000，S値5.5S，至適pH 8.0でした。その他，両者の酵素に関して，パラクロロ安息香酸水銀，塩，ピロリン酸，ポリアニオンに対する効果は著るしく異っていた。両者の酵素共RNA-DNAのRNA部分のみを特異的に水解し，基質に対してエンドヌクレアーゼとして作用し，5'-P末端，3'-OH末端を有するオリゴヌクレオチドを生成した。以上の結果より，両者の酵素共，DNA合成に関係する機能を有するものと結論された。

Ribonclease H（RNase H）は，有核細胞や動物組織においては，分子種を異にする状態で存在していることを示すいくつかの論文が報告されている（2, 5, 11, 17）。その多様性の存在意義については，現在まで全く不明である。われわれは，ラット肝の核抽出液より，Mg^{2+}およびMn^{2+}に関して，全反応の要求性を異にする，全く性質の異った二種のRNase Hの存在することを報告した（16）。その後ラットの大脳にも同様の状態でRNase Hの存在することを認めた（21）。われわれは，先にラットの小脳のDNA合成期に，小脳のMg^{2+}で測定したRNase H活性が，DNA合成と全く同様の挙動で変化することを報告した（12）。今回は，Mg^{2+}およびMn^{2+}依存性の二種のRNase Hの機能を知る目的で，小脳のDNA合成期における二種のRNase Hの活性の変化，およびそれらの性質の差異について検討した。

〔実験方法〕

生後動物のラットの脳を取り出し，小脳と非小脳部分にわけ，10倍量の0.25Mショ糖，0.1M Tris HCl（pH 8.1），3mM $CaCl_2$，0.5M KCl，5mM 2-mercaptoethanolで磨砕し，105,000×g，60分の遠心上清を，0.025M Tris HCl（pH 7.7），5mM 2-mercaptoethanolで3時間透析し酵素液とした。

基質である^{3}H-RNA·DNAは仔牛胸腺の単鎖のDNAをtemplateとし，^{3}H] poly(A)·poly(dT)は，poly(dT)をtemplateとして，大腸菌のRNA polymeraseと^{3}H] UTPおよび^{3}H-ATPを用いて，以前に記述した方法に従って，それぞれ調製した（15）。

RNase Hの活性は，Fig. 1に従って，それぞれ測定した。

〔実験結果及び考察〕

Fig. 1

Assay for RNase H

Tris-HCl buffer (pH 8.0)	50 umoles
$MgCl_2$	5 umoles
or $MnCl_2$	0.2 umoles
Bovine serum albumin	50 ug
2-mercaptoethanol	1 umole
Substrate (10,000cpm/150pmol)	
NaCl	50 umoles
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.

酵素源による RNase H の測定条件で，両者の酵素とも，反応は 20分 以上直線的に進行し，全基質の 50～60 % が分解されるまで，酵素量と共に，直線的に活性が増加した。

ラットの小脳では，生後数日間細胞分裂がさかんで，その DNA 合成は生後 6 日目で最も高く，後生長と共に減少していくことが明らかにされている（1, 7, 19）。しかし非小脳部分では，DNA 合成は，生後減少する傾向にある（8, 19）。生後初若ラットの成長に伴う脳の Mg^{2+} および Mn^{2+} 依存性の RNase H の活性の変化を示したのが Fig. 2 である。小脳の両者の RNase H の活性は，生後上昇し始め，6日目にピークを有し，生長するに従って減少した。又非小脳部分の RNase H の活性は，両者共生後成長するに従って減少した。生後 6日目の小脳の Mn^{2+} 依存性の活性は，Mg^{2+} 依存性の活性の変化に比べて高く，即ち DNA 合成時には，Mn^{2+} 依存性の RNase H の活性の顕著な増加が観察される。

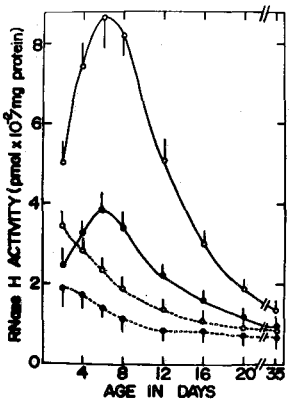


Fig. 2. Postnatal change in RNase H activity of rat brain. Preparation of enzyme extracts and the conditions of assay are described in Experimental Procedures. Each point shows the mean ± S.D. from 5 to 7 rats. ○, Mn^{2+}-dependent RNase H; ●, Mg^{2+}-dependent RNase H. ——, cerebellum; -----, non-cerebellar parts.

これらの RNase H の活性の変動は，ポリメラーゼ活性（4），DNA リガーゼ活性（10）および，チミジンキナーゼ活性の変化(22)とよく一致していることから，RNase H は，DNA 合成と密接に関係した機能を有することを示している。

生後，6日，12日，35日における小脳の粗酵素液を，それぞれホスホセルロースカラムに吸着させ，KCl で RNase H を溶出させたのが Fig. 3 である。いづれの場合にも，非吸着部分に少量の活性が認められるが，KCl で溶出させることにより，0.2 M で Mn^{2+} 依存性 RNase H が，0.4 M で Mg^{2+} 依存性 RNase H の活性が溶出される。生後 6日で両者の活性が最も高く，12日，35日と減少していく。その活性の変化の比率は，Mn^{2+} の方が，Mg^{2+} に比べてより顕著であることを示している。

ラットの成熟した小脳部分を取り出し，顆粒層，ホスホセルロースカラムに吸着させ，図3に示した方法によって Mn^{2+} および Mg^{2+} 依存性の RNase H の活性を持つ部分に分け，これらの各々の画分を集めて，電顕的，ゴルージファロース

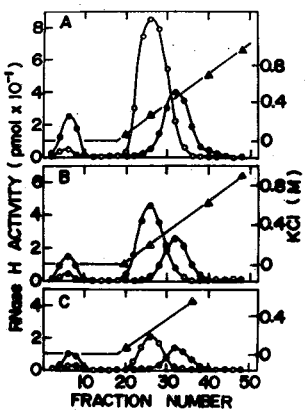


Fig. 3 . Phosphocellulose column chromatography of RNase H of rat cerebellum. The enzyme extracts from 1 g of cerebellum were dialysed against 5mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 5mM 2-mercaptoethanol and 10% glycerol (Buffer A) for 5 h. The dialysed extracts were loaded onto Phosphocellulose (p 11) column (1.0 x 6cm) that had been previously equilibrated with Buffer A. After washing the column with 3 vols. of the same buffer, the elution was carried out with a linear gradient of KCl from 0 to 0.8 M containing Buffer A. Fractions of 1.2ml were collected and 100ul aliquots were taken to detemine both Mn^{2+}- and Mg^{2+}-dependent RNase H activitis by using the same assay conditions described in Experimental Procedures. The salt concentration was determined by conductance measurements. ○ , Mn^{2+}-dependent RNase H; ●, Mg^{2+}-dependent RNase H; ▲ , KCl concentration.
A; 6th day after birth, B; 12th day after birth, C; 35th day after birth.

のカラムに吸着させると，両者の活性は 0.5M KCl の濃度で溶出される。この特徴で 5日令以上に精製された。この両者の酵素標品を用いて性質を検討し，それらを纏めたのが表1である。表に示される如く，分子量及び他酵素と異っている。至適 pH は Mg^{2+} はりであり Mn^{2+} 依存性のそれのほぼである。その他，ホスホセルロースカラムよりの溶出濃度，塩による影響，p-CMB による阻害の強度，ポリアミンの影響，PPi による阻害等，著るしく異った性質を示している。非小脳部分から部分精製した Mg^{2+} および Mn^{2+} 依存性の RNase H に関しても小脳のそれと非常に類似した性質を示している。

RNase H の作用に関しては，Mölling らにより，Avian myeloblastosis virus の逆転

Table I Properties of RNase H from rat brain (cerebellum)

Properties	RNase H Mg^{2+}-dependent	RNase H Mn^{2+}-dependent
Molecular weight (gel filtration)	35,000	150,000
Sedimentation velocity[a]	3.0 S	5.5 S
Conditions for maximal activity		
pH optimum	9.0	8.0
Metal optimum (mM)	10-15	0.4
Elution M. from Phosphocellulose	0.4	0.2
Effect of Salts (0.2 M)	Activated (150%)	Inhibited (90%)
Endoproducts	(pA)3-10	(pA)3-10
Substrate [^{3}H]-poly(A)poly(dT)		
Mode of cleavage	endonucleolytically	
	RNase H activity (nmol/mg protein)	
Native substrate		
Complete	20	15
Omit 2-mercaptoethanol	4	13
Plus p-CMB (0.2 mM)	1	12
Plus p-CMB (0.2 mM) plus 2-mercaptoethanol	21	15
Spermine (2 mM)	18	7
Spermidine (2 mM)	20	10
Pi (1 mM)	21	16
PPi (0.2 mM)	21	4
Denatured substrate		
Complete	1	4

p-CMB: p-chloromercuribenzoate

a; Sedimentation coefficients were estimated in a 5 to 20% (v/v) sucrose gradient containing 0.05 M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 3 mM 2-mercaptoethanol and 0.3 M KCl without glycerol. Sedimentation was carried out in a 50.1 rotor at 38,000 rpm for 17 h. Protein molecular weight markers, bovine liver catalase ($S_{20,w}$=11.3), lactate dehydrogenase ($S_{20,w}$=7) and bovine serum albumin ($S_{20,w}$=4.4) were sedimented simultaneusly in parallel tubes.

特に RNase H の活性の存在することから，DNA合成との関連が指摘されていたが（9）その作用機構については不明であった。しかし，動物細胞において，RNase H は DNA複製に関与している報告もあり（3,13,14），又一方では，RNA合成に関与している可能性も指摘されている（3,6,9,18,20）。発癌物質である2-アセチルアミノフルオレンをラット腹腔内に投与すると，投与後 24時間までに RNA ポリメラーゼ I の活性とほぼ並行して Mg^{2+}依存性の RNase H の活性が増加し，Mn^{2+}依存性の RNase H は変化しないことから Mg^{2+}依存性の RNase H は，確かに RNA合成に関与していることが示された（20）。無蛋白食でラットを飼育すると，日と共に RNA ポリメラーゼ I の活性と，Mg^{2+}依存性 RNase H の活性が除々に増加し，4日後には両者共，約2倍の比活性にまで増加する。このような状態で，トリヨードサイロニンと5-FU カゼインを与えると，投与後，15～20時間後に，3H-チミジンのとりこみによる DNA 合成が急激に増加する。この DNA合成と共に，核の Mn^{2+}依存性の RNase H の活性も増加すると共に，Mg^{2+}依存性の RNase H の活性も更に増加することが認められた（未発表データ）。以上の結果より Mg^{2+}と Mn^{2+}依存性の RNase H は，生理的に異った役割を営んでいることを示している。即ち Mg^{2+}依存性の RNase H は，リボゾーム RNA の合成と DNA 合成に関与し，Mn^{2+}依存性の RNase H は，DNA合成に関与している可能性を示唆している。ラット新生児における小脳の発達に伴う両者の RNase H の活性の変化も，上記の可能性を指示するものと思われる。

本研究の一部は，文部省科学研究費（がん特別研究）によって遂行された。

REFERENCES

1. Altman, J. (1966) J, Compt. Neurol. 128, 431-474
2. Büsen, W., and Hausen, P. (1975) Eur. J. Biochem., 52, 179-190
3. Büsen, W., Peters, J. H., and Hausen, P. (1975) Eur. J. Biochem., 74, 203-208
4. Chiu, J. F., and Sung, S. C. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 209, 34-42
5. Cooper, R. J., Duff, P. M., Olivier, A., Craig, R. K., and Keir, H. M. (1974) FEBS Lett., 45, 38-43
6. Doenecke, D., Marmaras, V. J., and Sekeris, C. E. (1972) FEBS Lett., 22, 261-264
7. Margolis, F. L. (1969) J. Neurochem, 16, 447-546
8. McIlwain, H. (1966) Biochemistry and the Central Nervous System pp. 270-299, J. and A. Churchill Ltd.
9. Mölling, K., Bolognesi, D. P., Bauer, H., Plassmann, H. W., and Hausen, P. (1971) Nature New Biol., 234, 240-243
10. Nakaya, N. Sawasaki. Y, Teraoka, H. Nakajima, H., and Tsukada, K. (1977) J. Biochem. 81, 1575-1577
11. O'Cuinn, G., Persico, F. J., and Gottlieb, A. A. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 324, 78-85
12. Sawai. Y. Sawasaki, Y. and Tsukada, K. (1977) Life Sciences, 21, 1351-1356
13. Sawai, Y. Sugano, N., and Tsukada, K. (1978) Biochem, Biophys. Acta, 518, 181-185
14. Sawai, Y., and Tsukada, K. (1977) Biochem, Biophys. Acta, 479, 126-131
15. Sawai, Y. Uchida, S., Saito, J., Sugano, N., and Tsukada, K. (1979) J. Biochem. 85, 1301-1308
16. Sawai, Y. Unno, M., and Tsukada, K. (1978) Biochem. Bioghys. Res. Commun. 84, 313-321
17. Sekeris, C. E., and Roewekamp, W. (1972) FEBS Lett., 23, 34-36
18. Sekeris, C. E., and Roewekamp, W. (1972) FEBS Lett., 24, 27-34
19. Sung, S. C. (1969) Can. J. Biochem, 47, 47-50
20. Tsukada, K., Sawai. Y., Saito, J., and Sato, F. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 280-286
21. 塚田收司，青葉順子，沢井保子．(1978) 神経化学，17，93-96
22. Yamagami, S., Mori, K., and Kawakita, Y. (1972) J. Neurochem. 19, 369-376

18 ラット小脳チミジン・キナーゼ・アイソザイムと分離プルキンエ細胞における特異性

沢崎嘉男・山田則子・関　啓子
中島　熙
（東医歯大・難研）

〔要　約〕

ラット小脳のチミジンキナーゼ活性は、DEAE-セルロース　カラムクロマトグラフィーにより、4分画（C_1～C_4）に分離され、DNA合成との相関は、C_1およびC_2に認められる。そこで、これらの主要な分子種であるC_1およびC_3を、さらにBlue-セファロースCL-6Bカラムクロマトグラフィーにより精製し、ディスク電気泳動上で単一bandとした。この両者に糖鎖の存在は認められなかった。

また、これらの分子種の生理的意義をさらに明らかにする目的で、DNA合成が未だ残存している生後18日のラット小脳から、分化した細胞であるプルキンエ細胞を単離し、そのチミジンキナーゼ分子種について、DEAE-セルロース　ミクロカラムを用いて検討した。その結果、生後18日の小脳では、チミジンキナーゼ活性は、C_1およびC_3にほぼ1：1の分布を示した。これに対して、この小脳から分離したプルキンエ細胞体では、チミジンキナーゼ活性はC_1には認められず、C_3にほとんどの活性が分布した。

以上から、ラット小脳のチミジンキナーゼ分子種では、C_1がDNA合成に関与することがさらに確認された。

これまで、ラット小脳のチミジンキナーゼは、上清分画に存在し、4種の分子種（C_1～C_4）が存在することを報告した[12,7]。これらのうち、C_1[6,11]、C_2とC_3、C_4は互に性質が異なり、C_1,C_2は小脳DNA合成障害を示すGunnラットで選択的に低下することなどから、DNA合成に関与する分子種であると考えられた。

本報告では、小脳チミジンキナーゼの主要な分子種であるC_1およびC_3について、さらにBlue-セファロースカラム　クロマトグラフィーにより精製し、その性質について検討した。また、これらの分子種の生理的意義をさらに明らかにするために、幼若ラット小脳から、非増殖細胞であるプルキンエ細胞を単離し、その細胞体のチミジンキナーゼ分子種について検討を加えた。

〔実験方法〕

小脳チミジンキナーゼの精製　幼若および成熟ラット小脳（20g）を10倍量の0.25 M sucrose, 50mM Tris-HCl（pH 7.5）, 1mM EDTA, 5mM mercaptoethanol（A buffer）でhomogenizeし、105,000g 60分遠心後に得た上清に飽和硫安を加え（50%飽和）、その沈着を50mM Tris-HCl（pH7.5）, 20% glycerin, 1mM $MgCl_2$（B buffer）に透析後、同bufferで平衡化したDE-52（Whatman）カラムに吸着させ、NaCl濃度勾配により溶出して、各分子種を得た。次に、C_1はB bufferで平衡化したBlue-セファロースCL-6Bカラムに吸着させ、NaCl濃度勾配により溶出し、さらに再クロマトグラフィーを行った。またC_3は、0.2M NaClを含むB bufferで平衡化したBlue-セファロースカラムに吸着させ、同bufferで非吸着部分を溶出後、1mM ATPによる溶出を行った。

プルキンエ細胞の分離とそのチミジンキナーゼ分子種の分画　プルキンエ細胞体は生後18日のラット小脳(50コ)から、Sellingerの方法[9]にしたがい分離した。得られた細胞は、0.5 mlのA bufferでhomogenizeし、105,000 g 60分の遠心により上清を分離した。この上清をB bufferで平衡化したDE-52ミニカラム(0.5×3.0 cm)に吸着させ、0, 0.2, 0.4 M NaClでstepwiseに溶出した。

チミジンキナーゼ活性の測定はTaylorらの方法[10]により行い、タンパク量はLowryらの方法[3]により測定した。

[実験結果および考察]

前回報告したように、ラット小脳のチミジンキナーゼ活性は、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより溶出順にC1－C4の4分子種に分画される(Fig.1)。DNA合成が殆んど終了したadult小脳では、C1およびC2は殆んど認められず、また、小脳のDNA合成障害を示すGunnラットではC1, C2が選択的に低下するところからこれらはDNA合成に関与すると考えられる。以上の主要な分子種であるC1およびC3について Blue-セファロースを用いて、さらに精製をおこなった(Fig.2)。C1, C3のいずれもBlue-セファロースに吸着され、C1はNaCl濃度勾配により溶出され、再度のクロマトグラフィーにより約300倍に精製された(Tab.1)。一方、C3はNaCl濃度勾配では溶出されず、ATPにより溶出され、約1,500倍に精製された。両者いずれもディスク電気泳動で単一バンドを示し、PAS染色(－)であった。これらの性質についてまとめたのがTab. 2である。

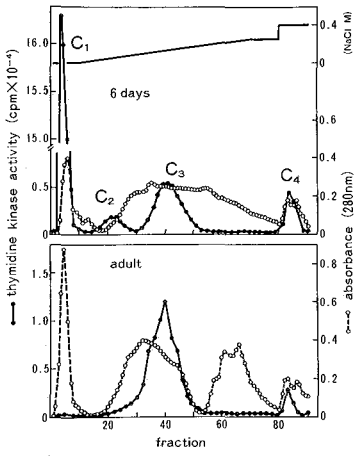


Fig. 1. Elution pattern of DEAE-cellulose column chromatography of thymidine kinase activity in neonate and adult rat.

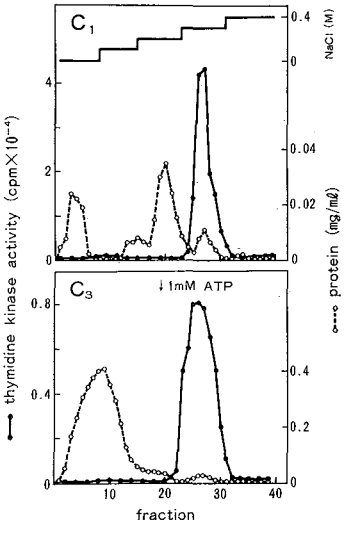


Fig. 2. Elution pattern of Blue-Sepharose CL-6B column chromatography of thymidine kinase activities (C1 and C3).

Table 1. Purification of cerebellar thymidine kinase

procedure	total protein (mg)	specific activity (pmole/min/mg pro)	total activity (pmole/min)	recovery (%)	purification
C1					
homogenate	897	27.9	25,026	100	1
cytosol	249.6	99.4	24,810	99.1	3.6
$(NH_4)_2SO_4$	103.2	109.9	11,342	45.3	3.9
DE-52	12.9	474.9	6,126	24.5	17.0
Blue Sepharose 1st	0.42	2,808.7	1,180	4.7	100.7
2nd	0.12	8,699.7	1,044	4.2	311.8
C3					
homogenate	2,455	0.65	1,596	100	1
cytosol	696	1.38	960	60.2	2.1
$(NH_4)_2SO_4$	200	3.99	798	50.0	6.1
DE-52	14.0	52.5	733	46.0	80.8
Blue Sepharose	0.3	967.3	292	18.3	1488.0

Table 2. properties of cerebellar thymidine kinase

	C1	C3
inhibition by dCTP	-	+
dTTP	+	+
Km (x 10^{-6}M)	2.7	5.7
optimal pH	8.0	8.0
heat stability	stable	labile
molecular weight	84,000	40,000
correlation with DNA synthesis	+	-

Tab.2 に明らかなように、C1, C3はその性質を異にする。これまで、胎児の肝[10]、肝癌[9]、再生肝[4]などでチミジンキナーゼの分子種が想定ないし報告され、dCTPで阻害をうけぬ分子種がDNA合成に関連するとされている。このことからC1のDNA合成への関与がさらに示唆される。セファロース CL-6B カラムによる分子量は、C1が84,000、C3が40,000であったが、他の組織での本酵素の分子量については知見に乏しいが、再生肝では約100,000[4]、吉田肉腫では70,000前後と報告されている[2]。またラットの子宮でもチミジンキナーゼ分子種が存在するが、ここでのC1, C3に相当する分子種の分子量はそれぞれ125,000および100,000であった。

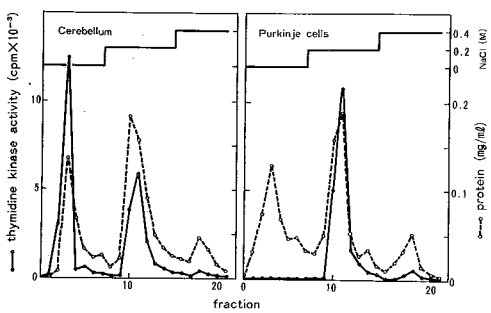


Fig. 3 Elution patterns of DEAE-cellulose column chromatography of thymidine kinase activity in cerebellum and Purkinje cells of 18 day-old rats.

以上のように、本酵素の分子種における機能の差異が推定されたが、この差異は小脳の増殖細胞と非増殖細胞で検討すれば、最も明確になると予想される。

そこで、分化した細胞であるプルキンエ細胞体を分離し、そのチミジンキナーゼの分子種について調べたのが Fig. 3 である。

図に明らかなように、生後18日目の小脳では、チミジンキナーゼ活性は、C1およびC3に相当する分画にほぼ1:1に分布した。生後18日目では、小脳の増殖細胞である外顆粒細胞はかなり残存しているので、C1活性の存在はそれに由来すると考えられる。これに対して、分離したプルキンエ細胞体では、C1は認められず、ほとんどの活性はC3に相当する分画に分布した。プルキンエ細胞の

Table 3. Localization of thymidine kinase activity of Purkinje cells in C3 fraction in DE-52 column chromatography

		protein (mg)	activity (p mole/hour)
cytosol of Purkinje cells		0.56 (100)*	5.6 (100)
DE-52	total	0.57 (102)	7.3 (130)
	C3	0.26 (46)	7.1 (127)

enzyme activity and protein in total and C3 fraction were determined from Fig. 3. * % recovery

Table 4. Effect of dCTP and dTTP on C3 fraction of thymidine kinase activity in Purkinje cells

	Purkinje cells	total cerebellum*	
	C3	C1	C3
Control cpm	184,000		
1 mM dCTP cpm	2,260		
inhibition (%)	(87.8)	(activated)**	(54.1)
1 mM dTTP cpm	1,320		
inhibition (%)	(92.8)	(98.9)	(96.4)

* cerebellum of 6 day-old rat. ** +31.0%

純度は100%に近く、わずかに他の大型神経細胞や顆粒細胞を認めるのみであった。プルキンエ細胞の収量は50個の小脳から 17.5×10^6 個であった。Table 3は、Fig 3から分画によるタンパク量、酵素活性の回収率を求めた結果を示すが、プルキンエ細胞上清の本酵素活性はC3に局在した。また、C3分画の比活性は0.7 pmole/mg pro./min に相当し、成熟ラット小脳上清の比活性にほぼ等しい（Tab. 1）。プルキンエ細胞の分離過程で高分子量のC1のみが失なわれたことは考えにくい。さらに、プルキンエ細胞の分離の前段階の、顆粒細胞がプルキンエ細胞の約10倍混入している段階で分子種の分離を行ったところ、C1活性が認められたことから、プルキンエ細胞でC1活性が失活により失なわれる可能性は低いと思われた。Table 4はプルキンエ細胞のC3活性の性質を調べた結果で、全小脳の場合と同様に、dCTPで阻害された。

以上から、ラット小脳のチミジンキナーゼ分子種では、C1がDNA合成に関与し、C3はそれとの関連は薄く、DNAの修復などの機能を果していると考えられた。これまでラット小脳は生後に急速な神経細胞増殖を示すところから[1]、種々のDNA合成系の酵素について検討され、それらの分子種の機能についても調べられている[5]。プルキンエ細胞は、比較的簡単に純度よく分離できることから、分化した細胞のモデルとして有用であると思われる。

References

1) Altman, J., and Das, G.D. (1966) J. Comp. Neurol., 126, 337-390
2) Hashimoto,T., Arima,T., Okuda, H., and Fujii,S. (1972) Cancer Res., 32, 67-73
3) Lowry,O.H.,Rosebrough, N.J., Farr, A.L.,and Randall, R.J. (1951) J.Biol. Chem., 193, 265-275
4) Nawata, H., and Kamiya, T. (1975) J. Biochem., 78, 1215-1224
5) Sawai, Y., Sawasaki, Y., and Tsukada, K. (1977) Life Science, 21, 1351-1356
6) Sawasaki, Y., Yamada, N., and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem., 27, 47-50
7) 沢崎嘉男，山田則子，中島 熙（1977）神経化学 16，125-128
8) Sellinger, O.Z., Legrand, J., Clos, J., and Ohlsson, W.G.(1974) J. Neurochem., 23, 1137-1144
9) Stafford, M.A., and Jones, O.W. (1972) Biochim. Biophys. Acta., 227, 439-442
10) Taylor, A.J., Stafford, M.A., and Jones, O.W. (1972) J. Biol. Chem., 247, 1930-1935
11) Yamada, N., Sawasaki, Y., and Nakajima, H. (1977) Brain Res., 126, 295-307
12) Yamada, N., Sawasaki, Y., and Nakajima, H. (1979) Brain Res., 168, 393-397

19 Elマウス脳ポリゾームのポリ(A⁺)-RNA合成におよぼす痙攣の影響

山上　栄・大野京介・森　浩一
辻　正記・川北幸男
(阪市大・医・神経精神)

〔要　約〕

Elマウスを放り上げ運動によって痙攣を誘発させた後、調製したポリゾームを蔗糖密度勾配によって分析し、安静時のパターンと比較した。痙攣後急速に重いポリゾームが崩壊し、モノソームの増大することが確認された。痙攣後のポリゾームRNA合成の変化を〔³H〕-オロチン酸で1時間ラベルした後、ゲル電気泳動を用いて調べた。Elマウスでは安静時に見られる32Sのラベルのピークが痙攣後18S以下に変移するのが認められた。ベメグリドによる痙攣では、ラベルのピークはさらに18Sと5Sの間まで変移を示した。一方ddマウスでは安静時に18Sに高いラベルの集中が見られるが、ベメグリド痙攣では、全体のラベルの低下のみに止まった。ポリゾームRNAを蔗糖密度勾配によって、Fr 1 (<5S)、Fr 2 (18S)、Fr 3 (28S)、Fr 4 (>30S)の4分画とし、各分画からポリ(U)セファローズのカラムを用いて、ポリ(A⁺)-mRNAを調製した。安静時のElマウスでは、ポリ(A⁺)-mRNAの合成はFr 4が最も活発であるが、痙攣後急速に阻害される。他方ddではベメグリド痙攣で、RNA合成はいずれの分子種も平行して阻害された。これらの結果は、Elマウス脳の新生32Sのポリ(A⁺)-mRNAのかなりの部分が痙攣素因と相関することを示唆した。

(はじめに) われわれは最近、Elマウス脳ポリゾームから特異的な32Sのポリ(A⁺)-mRNAを分離し、その諸性質を明らかにした。[5][6] しかし、このmRNAが実際に痙攣素因と密接に相関するかどうかは別個の問題である。この点を明確にするには、痙攣によって、このmRNAがどのように変化するかを調べることが必要となってくる。そのため今回は、痙攣後Elマウス脳ポリゾームのパターンの変化と、同時に惹き起されるポリ(A⁺)-mRNA合成の動向に検討を加え、合わせてddマウスのベメグリド賦活による痙攣の場合と比較し得たので報告する。

(方法) 1. 実験動物の作製, Elマウスの痙攣は常法に従って、ケージの中で30回程度放り上げ運動を繰返すことによって誘発させた。ベメグリドによる痙攣は、市販されているメチバール注射液をマウス腹腔内に注射して誘発させたが、その投与量はElでは、20 mg/kg 体重を、ddでは25 mg/kg体重であった。痙攣直後に〔³H〕-オロチン酸の20 μCiをマウス脳内に注射し、1時間後に断頭して脳を摘出し、実験に供した。ここで注射後1時間を選択したのは、前報[5][6]で述べたように、この時間でElマウス脳の32Sのラベルが最高となり、痙攣後のポリゾームRNAの合成がなお大きな影響を受けるからである。

2. ポリゾームの調製, 大体前報[3][5]に従ったが、ホモジネートのメジウムに0.25%のトリトンX-100を加え、その上にActinomycin Dの10 μg/mlを加えた。後者の添加は分画調製中にさらにRNA合成が進展することを阻むためである。[2]

3. ポリゾームRNAの抽出, ポリゾームを前報[5][6]のpH7.4メジウムに懸濁し、SDS-phenolを加えて抽出し、次いでpH9.0のメジウムで抽出した。このようにして調製したRNAを

pH7.4のメシウム中で63℃，5分間加熱した後、直ちに冷却し、RNAがaggregatesを形成するのを防いだ。[2]

4．ポリゾームRNAのゲル電気泳動による分析，RNAの分析はアガロースを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて、前報[1][6]に従って行なった。

5．ポリゾームとそのRNAの蔗糖密度勾配による分析．ポリゾームは前報[5][6]に従って10％と40％の蔗糖溶液を用い、RNAは15％と30％の溶液でそれぞれ密度勾配を作製し、分析した。遠心後、5S以下（Fr.1），18S（Fr.2），28S（Fr.3）および30S以上（Fr.4）の4分画に分け，各分画のRNAはエタノール沈澱によって回収した。

6．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，前報[5]に従ってラベルされたRNAをポリ（U）セファロースのカラムを通過させると、ポリ（A）を含まないRNAは吸着されないで流出されてくるが、吸着されたポリ(A)RNAはホルムアミドの直線的濃度勾配に従って50－60％のホルムアミド溶液で溶出された。この分画をエタノール沈澱で集め、放射能の計測とRNA量を260 nmの紫外部吸収によって測定した。[4] ポリ（A^+）-mRNAとポリ（A^-）-RNAの相対比放射能（RSA）はdpm per mg RNA／dpm／湿重量g×10^{-3}で表わした。

（結果および考察）1）Elマウスの痙攣直後における脳ポリゾームの変化，Elマウスを放り上げ運動によって痙攣を惹き起させた後、直ちに断頭してポリゾームを調製した。そのポリゾームを蔗糖密度勾配で分析し、そのパターンを安静時のElマウス脳ポリゾームと比較したのが図1である。痙攣直後に重いポリゾームが減少し，逆にモノソームの増大が認められた。このポリゾームの変化を、その面積より数量的に表わしたのが表1である。小さなポリゾーム対モノソームの比は約½に減少し、大きなポリゾーム対モノソームの比は約⅓に低下をきたした。このことは痙攣によって1）mRNA合成が抑制される．2）ポリゾームからmRNAが遊離する，3）ポリゾームを構成しているリボゾーム自体の性状が変化するのいずれかであろうと推測される。

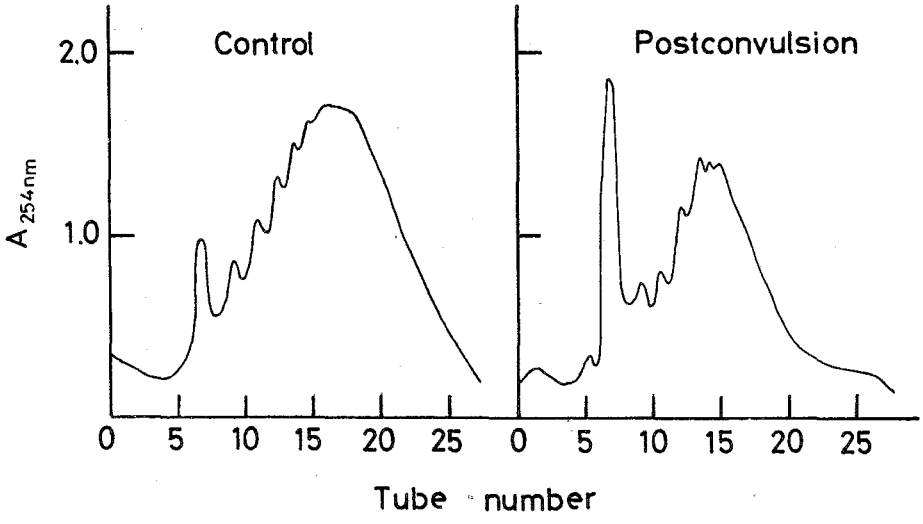


図1．Elマウス脳のポリゾームにおよぼす痙攣の影響

表1．Elマウス脳ポリゾーム／モノゾーム比に対する痙攣の影響

		Control	Postconvulsion
Small polysomes / Monosomes	ratio	2.69 ± 0.38(3)	1.49 ± 0.24(3)
Large polysomes / Monosomes	ratio	9.41 ± 1.22(3)	3.07 ± 0.35(3)

Mean values + S.E.M. for the number of separate experiments in parenthesis.

2)痙攣によるポリゾームRNAの変化．〔H^3〕-オロチン酸の注射1時間後におけるElマウス脳ポリゾームRNAにおよぼす痙攣の影響を，ddマウスのベメグリド痙攣の場合とゲル電気泳動を用いて比較した（図2）。安静時においてElマウスでは32SのRNAに高いラベルの集中が認められるが（図2a），痙攣後ではそのラベルが全体に低くなり，ラベルのピークも18S以下に変移するのが観察された(図2b)。さらにElマウスのベメグリド注射による痙攣では，全体のラベルが低下し，ピークも18Sと5Sの間まで変移するのが認められる（図2c）。他方，ddマウスの安静時には18Sやそれ以下に高いラベルの集中が認められるが（図2d），ベメグリド痙攣でも確かにラベル全体が低下する。しかしピークの位置には変化が見られなかった(図2e)。これらの結果は痙攣によって，RNA合成はdd，El共に抑制されるが，Elマウスでは新生された大きなRNAが急速に分解されるか，あるいはまたより小さなRNA分子種しか合成されないかのいずれかであろうと思われる。

3)ポリ（A^-）RNAとポリ（A^+）-mRNAの合成におよぼす痙攣の影響．これら両RNAの合成の変化を1時間ラベルの各分子種について相対比放射能で比較したのが表2である。Elマウスのポリ（A^-）RNA合成は放り上げ運動とベメグリド注射後の痙攣によって，Fr 3（28S）を除いていずれの分画も軽度の減少を示す（表2A）。ポリ（A^+）-mRNAの合成は，安静時にはFr 4（>30S）が最も活発で，次いでFr 1，2，3の順序であった（表2A）。しかし，放り上げ刺激の痙攣によっていずれの分画も合成が阻害され，なかでも最も大きな影響を受けるのはFr 4（>30S）で，68.8％の減少を呈した。ベメグリド痙攣でも同様な合成の減少傾向を示したが，Fr 4の低下は60.4％とやや少なかった。他方ddマウ

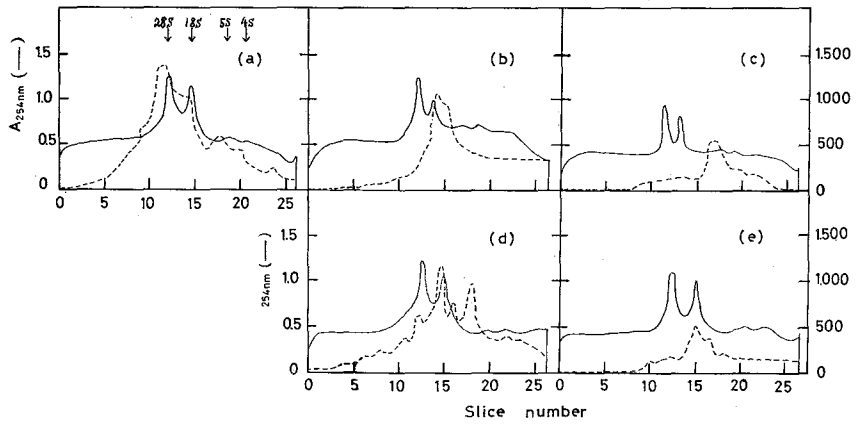


図2．痙攣によるポリゾームRNAの変化．a)Elマウスの安静時におけるRNAパターン．b)Elマウスの放り上げ運動による痙攣後のパターン．c)Elマウスのベメグリド痙攣後のパターン．d)ddマウスのRNAパターン．e)ddマウスのベメグリド痙攣後のパターン

表2. dd、Elマウスのポリ（A^-）とポリ（A^+）RNA合成への痙攣の影響

A) El mouse

RNA fractions	Control		Convulsion by throwing-up		Convulsion by Bemegride	
	Poly(A^-)	Poly(A^+)	Poly(A^-)	Poly(A^+)	Poly(A^-)	Poly(A^+)
Fr.1(<5S)	19.9(3)	112(3)	14.8(4)	92(4)	13.2(2)	96(2)
Fr.2(18S)	5.4(3)	74(2)	4.4(3)	73(4)	4.8(4)	58(4)
Fr.3(28S)	6.0(3)	61(3)	6.0(4)	58(3)	6.9(4)	44(4)
Fr.4(>30S)	6.3(2)	185(2)	4.8(3)	57(2)	3.6(3)	73(3)

Mean values for the nember of separate experiments in parenthesis.

B) dd mouse

	Control		Convulsion by Bemegride	
	Poly(A^-)	Poly(A^+)	Poly(A^-)	Poly(A^+)
Fr.1	11.3(2)	56(2)	9.9(2)	32(2)
Fr.2	3.4(3)	110(3)	1.8(3)	66(3)
Fr.3	5.4(3)	118(3)	3.2(3)	61(3)
Fr.4	16.6(3)	75(3)	9.2(3)	60(3)

スの場合には（表2B）、ポリ（A^-）とポリ（A^+）の両RNA合成ともにいずれの分画もベメグリド痙攣によって抑制されるが、その阻害は50%を越えることはなかった。これらのことからElマウスの30S以上のポリ（A^+）-mRNAが痙攣によって特異的に阻害され、このmRNAが痙攣素因と密接に相関すると考えられた。しかしこのmRNA分子のうちでも痙攣によって影響を受けない32%ほどは痙攣素因と余り関係のない情報を持つmRNAと推察される。

（文献）

1. 大西 博、森 浩一、山上 栄、切池信夫、川北幸男，神経化学，16，197（1977）
2. Wynter, C.V.A., J. Neurochem., 32, 495 (1979)
3. Yamagami, S. & Mori, K., J. Neurochem., 17, 721 (1970)
4. Yamagami, S., Kiriike, N. & Kawakita, Y., Acta Neurol. Scan., 56, 205 (1977)
5. 山上 栄、大野京介、辻 正記、森 浩一、大西 博、川北幸男．神経化学 17．97（1978）
6. 山上 栄、森 浩一、大西 博、川北幸男．最新医学 34、1346（1979）

（脚註）

mRNA : messenger RNA, ポリ(A⁺)-mRNA : polyadenylic acid containing messenger RNA, ポリ(A⁻) RNA : polyadenylic acid free RNA.

20 Dihydropteridine ruductase欠損症

成沢邦明・多田啓也
（東北大・医・小児）

〔要約〕

軽度の高フェニールアラニン血症にもかかわらず、重篤な進行性の中枢神経症状を呈した兄弟例を報告する。培養線維芽細胞を用いてのdihydropteridine reductase活性は2例とも著明に低下しており、dihydropteridine reductase欠損症と診断された。髄液の5-hydroxyindol-acetic acid (5-HIAA) およびhomovanillic acid (HVA)は対照群に比して著明に低下しており、更に血中serotonine，尿中5-HIAAの低下が認められた。これらの知見はdihydropteridine reductase欠損にともなって、phenylalanine hydroxylase，tyrosine hydroxylase，およびtryptophan hydroxylase活性が低下し、それによってneurotransmitterの生成が障害されていることを示唆している。一方、血清、髄液の葉酸値は著明に低下しており、dihydropteridine reductase欠損が葉酸代謝に障害をもたらすことを示唆している。

以上の結果から、本症の中枢神経障害の発現にはneurotransmitterの生成障害と脳の葉酸欠乏が関与していることが考えられ、その治療には、血清フェニールアラニンのコントロールとともに、髄液5-HIAAおよびHVAを指標にしたL-Dopa，5-hydroxy-tryptophanおよびcarbidopaの投与，髄液葉酸値を指標にした十分量の葉酸投与が望まれる。

最近PKUのマススクリーニングが普及するにつれて、高フェニールアラニン血症を呈する数つかの亜型が発見されている。[1] これら亜型は早期より低フェニールアラニン食療法が開始されたにもかかわらず、重篤な中枢神経障害が進行する疾患群で悪性高フェニールアラニン血症としてまとめられている。

これら亜型の障害はdihydropteridine reductase (DPR)欠損およびプテリン合成障害に基ずいたテトラヒドロビオプテリン(BH4)の欠損にある。BH4の欠損はフェニールアラニン水酸化反応のみでなく、脳におけるチロジンおよびトリプトファンからのmonoamine neurotransmitterの生成をも障害する。これらのneurotransmitterの欠乏が本症にみる中枢神経障害を惹起する要因となっていると推測されている。[2]

我々は軽度の高フェニールアラニン血症にもかかわらず、重篤な中枢神経症状を呈したDPR欠損症の兄弟例を検討する機会を得たので報告する。

症例：M.S. 男子。いとこ同志の両親の第2子である。第1子は高フェニールアラニン血症で10才の時、死亡している。乳児期は無症状に経過し、13カ月で歩行可能、15カ月で単語を話すことが出来た。3才頃から知能発育遅延に気ずかれている。6才の時、先天的に高フェニールアラニン血症であったことから、血清フェニールアラニンを測定し、1.12mg/dlと正常であった。9才時からけいれんが頻発し、進行性の運動障害および知能の荒廃を呈してきた。この頃の血清フェニールアラニン値は5.0～8.0mg/dlであった。脳波には頂後性の1.5～2.0Hzの比較的律動性のあるsharp and wave complexesが出現している。脳のCTスキャンでは基底核と前頭部に石灰化像を認めた。症例：K.S. 男子。上の症例の弟である。生後3カ月頃よりけいれん発作が

現われ、4カ月目に当科入院。血清フェニルアラニン値 12.4 mg/dl であった。たえずに低フェニルアラニン値を2-3 mg/dl にコントロールしたが精神運動機能の発達は芳しくなく、現在11才で IQ 24である。けいれんは頻発しており、脳波には択発性の1.5-2.0 Hzの不規則な sharp and wave complexes 或は spike and wave complexes が出現している。CTスキャンでは基底核部と動頭部から後頭部にかけて石灰化像がみられた。

方法；　培養皮膚線維芽細胞及び白血球の DPR 活性は peroxidase 及び H_2O_2 で作られた quinonoid-dihydropterin を基質として NADH の減少でみる Hillstien らの方法[3]及び NADH の存在下で ferri-cytochrome c の還元をみる Katoh らの方法[4]によった。髄液の Homovanillic acid (HVA) 及び 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) の測定は春木 Anden ら[5]、及び Korf ら[6]の方法に準じた。血清及び髄液葉酸値は Lactobacillus casei を用いて測定した。

結果；　1) DPR 活性 (表1)

皮膚線維芽細胞での dihydropteridine reductase 活性の測定はすでに Hillstien らにより確立され、本症の診断に有用であることが報告されている。我々も彼らの方法に準じて、症例 M.S., 及び K.S. の線維芽細胞の DPR 活性を測定した。両症例とも DPR 活性は認められなかった。更に Katoh らの方法で試みたが同様の結果を得、患者が DPR 欠損症であることを確認した。

2). 血清及び尿中のモノアミン　(表2)

症例 K.S. で検討された。血清セロトニン 0.03 μg/ml, 尿 5-HIAA 0.8 mg/24hr. と著明に低下していた。一方、尿のカテコールアミンをみると、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、HVA ともに正常範囲にあった。

3). 髄液の 5HIAA 及び HVA (表3)

症例 M.S., K.S. において、neurotransmitter の代謝物である 5-HIAA 及び HVA が著明に低下していた。

4). 血清及び髄液の葉酸値 (表4)

DPR 欠損時における葉酸代謝を検討するために血清及び髄液の葉酸値を測定した。2症例において、血清、髄液とも著明な葉酸の低下を認めた。

考察；

フェニールアラニン水酸化酵素は補酵素として BH_4 が必須である。BH_4 は体内で生合成されるとともに、BH_4 から酸化されたキノノイド型 BH_2 が DPR によって再還元されて維持される。従って、DPR 欠損或はビオプテリン生成障害は BH_4 の欠如をきたし、高フェニールアラニン血症が生じてくる。BH_4 は脳においてドーパ、エピネフリン、セロトニンの合成にも関与しているため、本症ではこれら neurotransmitter の減少が予想される。我々の症例で髄液中の 5HIAA, HVA が低値を示したことはかかる推測を裏づけている。血清セロトニン値及び尿中 5-HIAA 値の低下も又 BH_4 の欠如にもとずく tryptophan hydroxylase の低下によって説明しうる。

血清葉酸及び髄液葉酸値は症例 M.S., 及び K.S. で共に著明に低下していた。Pollock ら[7]は DPR 欠損症の脳生検材料の葉酸値を測定し、コントロール脳の 2.6% と著減しているのを見ているところから、葉酸欠乏は本症にみる共通の所見と考えられる。

本症にみられる重篤な脳障害の発生機序にneurotransmitterの生成障害が関与していることは当然予想され、従来から指摘されてきたことである。[12] 事実、本症の治療にneurotransmitterの前駆体、L-Dopa及び5-hydroxytryptophanの使用によって著効を得たとの報告がある。一方、本症にみられた脳の葉酸欠乏と中枢神経障害とのかかわりに関する論議は未だないようである。しかし、脳の葉酸欠乏が脳の発育なら機能に悪い影響を与えることは先天性葉酸代謝異常症[9),10)]や実験的研究[11)]によって明らかにされており、本症の中枢神経障害に脳の葉酸欠乏が一因をなしている可能性は無視出来ない。以上の考察から、本症の治療には血清フェニルアラニンのコントロールとともに、髄液5-HIAA及びHVAを指標としたL-dopa, 5-HTP及びcarbidopaの投与、髄液葉酸値を指標にした十分量の葉酸投与が必要であろう。

文献

1. Danks, D.M., and others. (1978) J. inher. metab. Dis. 1, 49-53.
2. Koslow SH, Butler JJ. (1977) Science 198, 522-523.
3. Milstien, S., Holtzman, N.A., O'Flynn, M.E., Thomas, G.H., Butler, I.J., and Kaufman, S. (1976) J. Pediatr. 89, 763-766.
4. Katoh, S., Nagai, M., Nagai, Y., Fukushima, T., and Akino, M. (1970) in Chemistry and Biology of Pteridines (Iwai, K., Akino, M., Goto, M., and Iwanami, Y., eds.) pp 225-234. International Printing, Tokyo.
5. Anden, P.E., Roos, B.E., Werdinius, B. (1963) Life Sci. 2, 468-458.
6. Korf, J., Valkenburgh-Sikkema, T. (1969) Clin. Chim. Acta 26, 301-306
7. Pollock R.J. and Kaufman, S. (1978) J. Neurochem 31, 115-123.
8. Kaufman, S. Holtzman, N.A., Milstien, S., Butler, I.J. and Krumholz, A. (1975) N Engl J Med 293, 785-790.
9. Narisawa, K (1978) in Folic acid in Neurology, Psychiatry and Internal Medicine. (Botez M.I. and Reynolds E.H. eds.) pp 391-400.
10. Lanzkowsky, P (1970) Am J Med 48, 580-583.
11. Arakawa, Ts (1970) Am J. Med 48, 594-598.

表1. Dihydropteridine reductase activities in fibroblasts

	Method 1	Method 2
Patient M.S	N D*	N D
Patient K.S	N D	N D
control (16)		
mean ± SD	31.7 ± 13.4	37.2 ± 11.2
range	15.0 ~ 58.3	21.5 ~ 64.9

Method 1 : Milstien's method
n moles NADH oxidized per min. per mg of prot.
Method 2 : Katoh's method
n moles cytochrome C reduced per min per mg of prot.
* not detected.

表2 患者 M.S における血清及び尿中の monoamine

Serum	
serotonine	0.03 μg/ml (0.7-0.62)
Urine	
5-HIAA	0.8 mg/ml (1.6 - 6.4)
adrenaline	12.7 μg/24 hr. (1.0-11.0)
noradrenaline	43.2 μg/24hr (10.0-90.0)
dopamine	221.5 μg/24hr (70 - 650)
HVA	2.88 mg/24hr (3.0 - 8.0)

( ) : normal range

表3 脳脊髄液中の 5-HIAA 及び HVA (ng/ml)

	患者 M.S.	患者 K.S	control
5-HIAA	6.6	5.0	43.5 ± 23.5
HVA	25.0	22.5	79.7 ± 30.6

表4 血清及び脳脊髄液中の葉酸値 (ng/ml)

	血清	脳脊髄液
患者 M.S	1.8	6.0
患者 K.S	1.7	8.4
control (mean)	16.3	45.7
range	4.0 - 86.0	12.3 - 120.0

21 分離ニューロンおよびグリア細胞群の環状ヌクレオチド合成酵素の活性化の相違

安藤正人・難波経篤・永田　豊
(保健衛生大・医・生理)
北島哲子・中沢欽哉
(愛知コロニー)

〔要　約〕

Rat大脳皮質より bulk separation 法によってneuron細胞体と glia 細胞群とを分離して、それらの環状 nucleotide 合成酵素[adenylate(A)-cyclaseとguanylate(G)-cyclase] 活性を著明に増大させる諸因子，殊にNaFおよびNaN_3 の効果について調べた。

1) 分離neuronおよび glia 細胞群の細胞内 cAMP level は，NaF(10mM)添加により明瞭に増大したが、一方 cGMP 量はNaN_3(1mM)により著しく増加した。

2) NaFによるA-cyclaseの活性化は濃度依存性であり、neuron分画で明瞭に示された。

3) NaN_3 によるG-cyclaseの活性化はneuron分画よりも glia 分画で著明に示された。

4) 幾つかの nucleophilic compounds のうち、NaN_3とN-nitrodiethylamine は glia 分画のG-cyclase活性をneuron分画のものより著しく増大させた。しかし hydroxylamine は前者とは逆に glia よりneuron分画のG-cyclaseを強く活性化するのが認められた。

5) NaN_3 によるG-cyclase活性化はneuronおよび glia 分画で soluble 分画には全く認められず particulate分画でのみ明瞭に示された。

このようにNaFによるA-cyclase活性化とN-compoundsによるG-cyclase活性化とがneuron分画とglia分画とで明らかに相違する興味ある成績が得られた。このことは、脳細胞を構成するneuronと glia の機能差と関連させて更に検討すべき問題である。

脳機能発現の生化学的背景を探るためには、その主な構成要素であるneuronと glia 細胞とがそれぞれどんな割合で機能代謝系に関与しているかを知る必要がある。我々は既に、rat大脳皮質よりneuron細胞体と glia 細胞群とを分離するbulk separation法を開発し、集めた細胞群について生化学的検索をおこない両種の細胞の代謝的特徴を明らかにしてきた。(6)

細胞機能の調節の 2nd messenger として働いていると考えられる環状 nucleotide[cyclic AMP (cAMP)およびcyclic GMP (cGMP)]は特に動物脳組織に多く含まれ、しかも神経伝達物質の作用によって著明に変動することから、これら環状nucleotide と神経機能との密接な関連が推測されている。(1)(9) 脳における環状nucleotide の生理的役割を細胞 level で明らかにする目的で，昨年度は先ず分離したneuronと glia 細胞群について環状nucleotide の合成系ならびに分解系酵素活性の分布を調べた。今年度は特に環状nucleotide 合成酵素 [adenylate(A)-cyclase およびguanylate(G)-cyclase] の性質のうち、特にNaFがA-cyclaseを、NaN_3 がG-cyclaseを活性化する様相を分離neuronと glia 細胞群とで比較検討し、細胞機能との関連について考察した。

〔実験材料ならびに方法〕

(1) neuronおよび glia 細胞群の分離：　体重 200-300g の Wistar系成熟ratをether麻酔下に心臓より生食水を灌流して後断頭後、大脳皮質を摘出、細切して10%Ficoll溶液に浮遊させて開口 400μm から 50μm の nylon mesh をゆっくり通過させて脳組織をほぐした。この細胞浮遊液を遠沈管に作った sucrose-Ficollの密度勾配層の中間に重層して高速遠沈を行ない、層状に集まったneuron細胞体と glia 細胞群を得た。(6) 各細胞群の cAMP および cGMP 含有量の測

定にあたっては、分解酵素(phosphodiesterase)活性を抑制するために細胞分離過程に使用する溶液すべてに3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)1.5mMを添加した。酵素の細胞内局在を調べるために、分離脳細胞群を0.32M等張sucrose溶液中でTeflon-glass micro homogenizerでhomogenizeしたのち、105.000×g/60min遠沈して、沈渣(precipitate:ppt)と上清(supernatant:sup)とに分離した。

(2) cAMPおよびcGMP量の測定：　分離脳細胞群をIBMXを含む生理的溶液中で種々の試薬を加えて37℃/5min好気的incubationを行った後、TCAを加えて反応を止めhomogenizeした除蛋白上清を、水飽和etherで数回洗ってTCAを除去した水層に、0.3M imidazole buffer(pH6.5)を加えてsuccinylationをおこない、ヤマサcAMPおよびcGMP radioimmunoassay kitを用いて環状nucleotide量を測定した。(2)(11)

(3)環状nucleotide合成酵素(cyclase)活性の測定：　酵素活性測定の標準反応液の組成は全量0.20ml中に1mM[2-^{3}H]-ATPまたは[8-^{3}H]-GTP(各5Ci/mol)，1mM cAMPまたはcGMP，15mM creatine phosphate，40μg creatine kinase，3mM $MnCl_2$，1mM DTT，1.5mM IBMX，25mM Tris-HCl buffer(pH7.7)および酵素標品として約100μgの細胞蛋白を含んだものを用いた。これを37℃/20min好気的incubationを行った後、1N HCl 40μlを加え、沸騰水浴中で2 min加熱して反応を停止させた。これをTris-baseで中和した後、alumina-Dowex 1×2(HCl型)複合型columnを通過させて[^{3}H]-cAMPと[^{3}H]-cGMPとを分離して溶出し、さらにTritonX-100を含むscintillatorを混合して放射活性を液体scintillation counterで測定した。(7)

(4)蛋白定量：　分離脳細胞試料の蛋白量はLowry et alの方法で測定した。(5)

〔実験成績ならびに考察〕

(1)分離脳細胞群による環状nucleotide生成：　先づ、環状nucleotide分解系(PDE)を抑制するIBMXを添加した条件で分離脳細胞群に種々の薬物を作用させて、環状nucleotide生成量を測定した(図1)。分離neuronおよびglia細胞群によるcAMP生成はNaF(10 mM)添加によって明らかに増大するのが示された。一方、cGMP生成量はNaN_3(1mM)添加で著明に増大す

図1: Effect of various agents on cAMP & cGMP levels in neuronal & glial fractions.

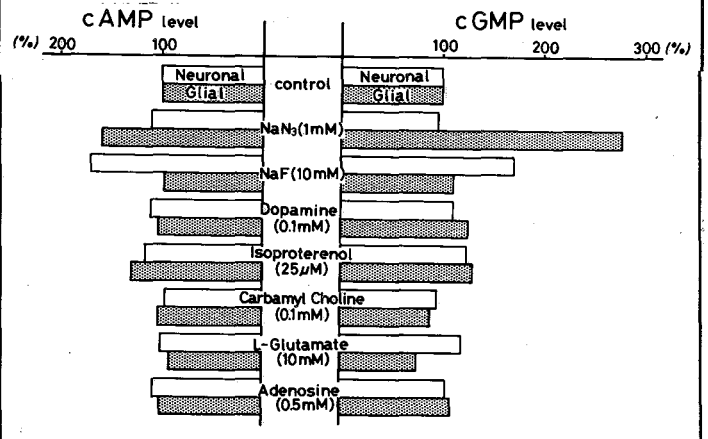


表1: Enzymic Properties of Adenylate- and Guanylate-Cyclases in Neuronal and Glial Fractions.

	Adenylate Cyclase		Guanylate Cyclase	
	Neuronal	Glial	Neuronal	Glial
Specific activity (nmol./mg-prot./20min)	4.10	9.69	1.22	1.69
Effect of Ca^{2+} (0.1 mM)	- 23 %	± 0 %	+ 16 %	+ 21 %
EGTA (0.2 mM)	- 33 %	- 50 %	- 22 %	+ 18 %
NaF (10 mM)	+315 %	+200 %	+ 16 %	+ 21 %
NaN_3 (1 mM)	+ 2 %	+ 5 %	+392 %	+557 %

ることが認められた。しかし，一般に神経伝達物質候補と考えられているような物質はcAMPおよびcGMP生成量に対しては，特に大きな変動を与えなかった。

(2)分離neuronならびにglia細胞群のA-cyclaseおよびG-cyclase活性化の差異：　既に一部報告した如く[8]，両種の分離脳細胞のA-cyclaseおよびG-cyclaseはその活性発現に際し共にMg^{2+}よりMn^{2+}を要求し，至適pHは7.0-7.7であった。またそれらの比活性はneuronよりもglia細胞群に高く，特にA-cyclase活性は顆粒結合性であるが，G-cyclaseはsolubleおよびparticulate両分画に含まれていた。これらの性質は他の組織のcyclaseのものと同様であった。分離脳細胞群のA-cyclase活性はNaFを反応液に添加した場合著明な活性化が見られた(表1)。添加NaF濃度を増加させると，A-cyclaseの活性化は次第に増加するがNaF濃度が10mM以上では飽和状態に近づくのが見られた。そして，NaF濃度が5mM以上の場合にはglia分画よりもneuron分画において活性化が著しく見られたのが特徴的であった(図2-a)。

細胞のA-cyclaseにはhormoneが膜の受容器と結合して起こる生理的反応の他に，非選択的に酵素分子の触媒部分に作用して起こると考えられているNaFの効果が報告されている[10]。しかし，このNaFによるA-cyclase活性化機構は未だ不明で，その生理的意義も明らかにされていないが，hormoneによる活性化機構とも全く無関係とは言い切れない。またこのようなneuronとgliaとの活性化の差異が何に由来するのかについて，今後更に詳細な研究が必要であろう。

一方，分離脳細胞群のG-cyclase活性はA-cyclaseの場合と異なりNaFではなくてNaN_3添加によって著しく増強させられるのが示された(表2)。そしてこのG-cyclase活性は反応液へのNaN_3添加濃度を増加させると，わずか0.1mMでも急速に増大し，0.5-1mM以上の濃度では

図2:(a) Effect of NaF on A-cyclase from neuronal & glial fractions.

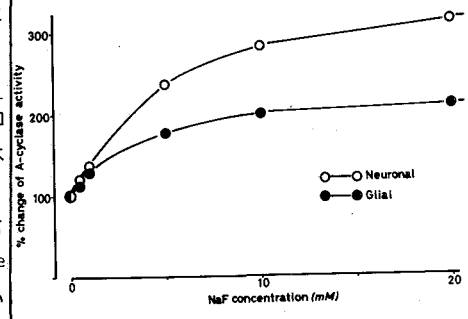


図2:(b) Effect of NaN_3 on G-cyclase from neuronal & glial fractions.

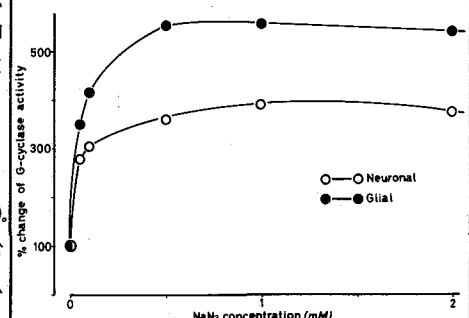
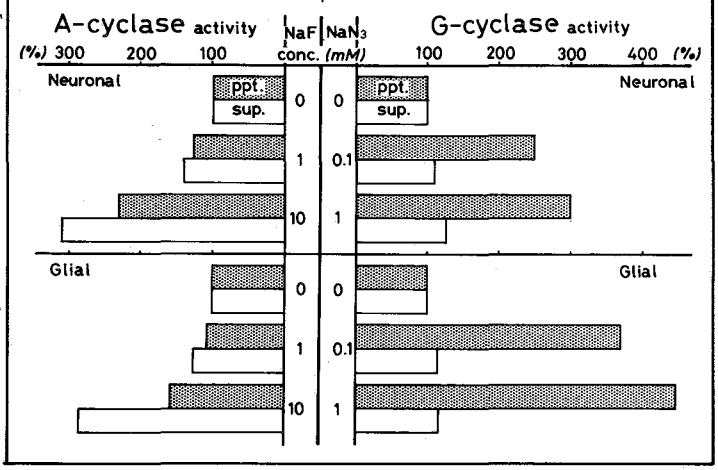


図3:(a) Effect of NaF on soluble & particulate A-cyclase from neuronal & glial fractions.

図3:(b) Effect of NaN_3 on soluble & particulate G-cyclase from neuronal & glial fractions.



飽和に達してそれ以上の上昇が認められなかった。この場合、A-cyclaseとは逆にG-cyclase活性はneuron群よりglia細胞群で大きな活性化が示された点興味深い(図2-b)。

表 2: Effect of Some N-Compounds on Adenylate- and Guanylate-Cyclase Activities from Separated Neuronal and Glial Fractions.

	Adenylate Cyclase		Guanylate Cyclase	
	Neuronal	Glial	Neuronal	Glial
Sodium azide (1 mM)	+ 2 %	+ 5 %	+392 %	+557 %
Sodium nitroprusside (1 mM)	- 22 %	- 33 %	+ 44 %	+ 20 %
Methylnitrosourea (1 mM)	- 1 %	± 0 %	+ 42 %	+125 %
N-Nitrodiethylamine-HCl(1 mM)	+ 35 %	± 0 %	+523 %	+709 %
Hydroxylamine-HCl (1 mM)	- 2 %	- 4 %	+188 %	+ 17 %

(3)G-cyclase活性におよぼす数種の因子： NaN_3による分離脳細胞群のG-cyclase活性の増加はかなり著明であるので、幾つかのN-compoundsについてその効果を調べてみた(表2)。Na-nitroprusside は両種脳細胞群に対してわずかしか活性増強効果を与えなかった。methyl-nitrosourea と N-nitrodiethylamine は共にneuron分画よりもglia分画のG-cyclase活性を増加させるのが認められたが、後者の効果は前者よりも大きかった。一方、hydroxylamineのG-cyclase活性化効果はgliaよりもneuron分画で著明であった。このような差異が何によって生ずるのかは極めて興味ある問題である。 G-cyclase活性を増加させるこれらN-compoundsの作用機作は現在不明である。しかし、何れも細胞核に作用して細胞分裂の異常や癌化傾向を起こす薬物であるので[3]、これらの諸点を充分考慮しながらneuronとgliaの細胞機能の差異とG-cyclase活性化の相違とがどのように関連しているのか解明していきたい。一方、これらN-compoundsはA-cyclase活性に対しては何れも著明な効果を示さず、Na-nitroprussideはむしろ抑制的に働くことが示された。

(4)NaFによるA-cyclase活性化と NaN_3 によるG-cyclase活性化の細胞内局在： NaFによる脳分離細胞群のA-cyclaseの活性化は、低濃度(1mM)ではsolubleおよびparticulate分画共に殆んど認められなかったが、10mMでは両細胞群とも活性化が示されparticulate分画よりもむしろsoluble 分画で明瞭であった(図3-a)。一方、G-cyclase活性を増大させる NaN_3 の効果は、木村ら[4]が脳切片で報告したようにかなり低濃度(0.1mM)からparticulate分画にのみ認められ、soluble 分画ではその効果は全く示されなかった(図3-b)。 これらの成績を考慮して、細胞内におけるA-cyclaseとG-cyclaseとの活性化の局在とその機能との関連について手がかりを得るために、細胞分画法によって得られた各分画や，膜がintactに保たれている培養細胞群などについても環状nucleotide 合成系の活性化条件について実験をおこない更に検討する必要があろう。

〔文　献〕

(1) Goldberg,N.D. & Haddox,M.K.(1977) Ann.Rev.Biochem. 46:823-896
(2) Honma,M.,Satoh,T.,Takezawa,J. & Ui,M.(1977) Biochem.Med. 18:257-273
(3) Kimura,H.,Mittal,C.K. & Murad,F.(1975) J.Biol.Chem. 250:8016-8022
(4) Kimura,H.,Mittal,C.K. & Murad,F.(1975) Nature, 257: 700-702
(5) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.S.,Farr,A.L. & Randall,R.J.(1951) J.Biol.Chem. 193:265-275
(6) Nagata,Y.,Mikoshiba,K. & Tsukada,Y.(1974) J.Neurochem. 22:493-503
(7) Nakazawa,K.,Sano,M. & Saito,T.(1976) Biochim.Biophys.Acta, 444:563-570
(8) 難波経篤,安藤正人,永田豊,北島智子,中沢欽哉(1978)神経化学,17:37-40
(9) Nathanson,J.A.(1977) Physiol.Rev. 57:157-256
(10) Perkins,J.P. & Moore,M.M.(1971) J.Biol.Chem. 246:62-68
(11) Steiner,A.L.,Parker,C.W. & Kipnis,D.M.(1972) J.Biol.Chem. 247:1106-1113

22 ラット脳Guanylate Cyclaseの性質について
—— ニトロソグアニジンに対する反応性の差異について ——

吉川和明・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

〔要約〕

ラット小脳の細胞下分画を行ない，各分画のGuanylate Cyclase(GC)のN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)に対する反応性を検討した。

MNNGの非存在下では，粗ミトコンドリア分画(P2)と100,000×g上清分画(S)に50%と25%のGC活性が回収されたが，MNNGの存在下では，Sに50%以上の活性が回収された。P2の低張処理後に再分画を行うと，P2の可溶性分画(P2-Soluble)のGCはP2に較べて全活性，比活性とも高値を示したが，MNNGによって約1.5倍に活性化されるにすぎなかった。一方，P2の膜分画(P2-Membrane)のGCはMNNGに反応を示さなかった。

SのGCの基質GTPに対するkineticsはMichaelis-Menten型で，Km値は，MNNGの有無にかかわらず0.13 mMであったが，本酵素反応の至適温度は，MNNGによって活性化された場合には低温側に移行した。P2-SolubleのGCは，活性化されたSのGCと類似の性質を示した。ヘモグロビンやビタミンA類は，MNNGによって活性化されたSのGCとP2-SolubleのGCとを共に著明に阻害したが，MNNG無添加時のSのGCやP2-MembraneのGC活性には影響を与えなかった。

以上の結果より，小脳にはMNNGに対する感受性を異にするGCが存在すること，またP2-SolubleのGCはMNNGによる活性化と類似の機序で活性化されていることが推定される。

神経系において種々のホルモンやアセチルコリンをはじめとする伝達物質は，組織中のCyclic GMP含量を上昇させることが知られているが，これらの物質は無細胞系でGuanylate Cyclase(GC)を活性化することはない。一方，NaN_3 + catalase (7, 9) やN-ニトロソ化合物(3)は無細胞系でもGCを著明に活性化し得ることから，GCはNOラジカルに反応することが推定されている。カエル視細胞外節中のGCは，殆んどが膜結合型であり，ニトロソアミンによって活性化を受けない(10)が，ラット大脳や小脳の顆粒結合型GCはNaN_3のみで活性化されること(7)が知られており，可溶型と膜結合型とのGCのNOラジカル感受性については明確な結論が得られていない。今回，この可溶型と膜結合型のGCを有するラット小脳を用いて，ニトロソ化合物の一つであるMNNGに対する反応性の面から，両型のGCの性質を検討した。

<実験方法>

小脳の細胞下分画　雄性Wistar系ラットの小脳を9倍量の0.32M sucroseでhomogenizeしこのhomogenateについてRodriguez de Lores Arnaiz らの方法(12)で細胞下分画を行った(P1: 900×g 10分沈渣，P2: 11,500×g 20分沈渣，P3: 100,000×g 60分沈渣，S: 100,000×g 60分上清)さらにP2については低張処理(W)をし，二次分画を行った。(M1: 20000×g 30分沈渣，M2: 100,000×g 60分沈渣，M3: 100,000×g 60分上清)なおWを直接100,000×g 60分遠沈した沈渣について超音波処理(30秒)を行い，再度100,000×g 60分遠沈した標品をM1+2とした。

Guanylate cyclase(GC)活性の測定　50mM Tris-HCl buffer(pH 7.7)，4mM $MnCl_2$，0.1mM [^{3}H]GTP (0.5 Ci/mmol)，0.5mM IBMX，10mM theophylline，3mM cyclic GMP，15mM Creatine phosphate，20μg creatine kinase および酵素標品を含む反応液を10分間37°Cで反応させ

生成した [3H] cyclic GMP を PEI セルロース薄層クロマトグラフィーによって分離(6)し，その放射活性を測定することによりGC活性を算出した．なお蛋白定量は Lowry らの方法(8)により，また catalase 活性は Bonnichsen の方法(1)によりそれぞれ測定した．

< 実験結果 >

1) 小脳における GC 活性の細胞下分布

Table 1 に MNNG (1mM) の存在下および非存在下で測定した GC 活性の細胞下分布を示した．

MNNG を添加しない場合には，全活性の約50%が P_2 に，約25%が S に分布した．これに対し MNNG を添加すると S の GC が著明に活性化(約11倍)され，全活性の50%以上が S に回収された．次に P_2 分画を低張処理し同様に活性を測定したところ，M_3 の GC は MNNG によって約1.5倍に活性化されるのみであったが比活性，全活性共に低張処理前の P_2 あるいは W 分画よりも高い値を示した．以下 S, M_{1+2}, M_3 を各々 "Cytosol", "P_2-Membrane", "P_2-Soluble" と呼び，各分画中の GC の性質について検討した．

Table 1 Subcellular distribution of guanylate cyclase in rat cerebellum

Fraction	Protein	Guanylate Cyclase Activity			
		Total Act.		Specific Act.	
		− MNNG	+ MNNG	− MNNG	+ MNNG
	(mg/g wet wt.)	(nmoles/min/g wet wt.)		(pmoles/min/mg prot.)	
		(Primary fractions)			
Homogenate	102.5	2.48	11.32	24.7	115.4
P_1	17.7	0.33	0.68	18.3	40.1
P_2	51.3	1.29	3.24	24.2	60.2
P_3	13.4	0.28	0.30	20.2	21.8
S	26.4	0.60	6.63	22.8	252.9
Recovery (%)	105.7	102.3	96.2	—	—
		(Submitochondrial fractions)			
W	54.2	1.43	2.95	25.8	52.2
M_1	35.3	0.79	0.93	23.2	27.5
M_2	5.1	0.08	0.09	18.1	20.5
M_3	15.2	2.53	3.82	168.5	250.3
Recovery (%)	103.2	243.5	166.4	—	—

Each value represents the mean of 3 separate experiments.

2) 活性化物質に対する反応性について

Table 2 に MNNG, NaN_3 および NaN_3+Catalase の，各酵素標品に対する反応性を示した．MNNG は Cytosol の GC を著明に活性化するが P_2-Soluble の場合ではわずかであり，P_2-Membrane の GC には全く影響を与えなかった．MNNG の濃度と各酵素標品の反応性との関係を Fig. 1 に示した．

Table 2 Effect of MNNG, NaN_3 and NaN_3 plus catalase on rat cerebellar guanylate cyclase

	Guanylate Cyclase Activity (pmoles/min/mg prot.)		
	Cytosol (S)	P_2-Soluble (M_3)	P_2-Membrane (M_{1+2})
Control	24 ± 1.5	182 ± 12.3	28 ± 3.2
MNNG (1 mM)	301 ± 28.4*	280 ± 19.5*	29 ± 4.0
NaN_3 (1 mM)	28 ± 3.2	278 ± 18.1*	30 ± 2.9
NaN_3 + Catalase (1 mM) (1 μg)	310 ± 33.5*	283 ± 20.3*	29 ± 4.2

* Significant at $p < 0.01$, Compared with each control value.

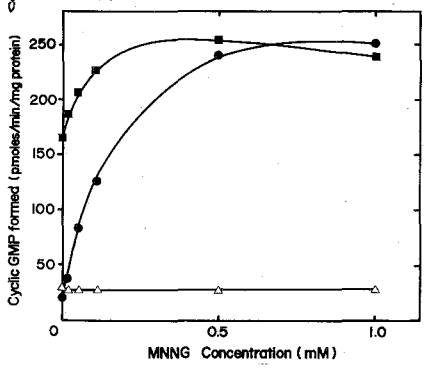


Fig.1 Effect of MNNG on guanylate cyclase (GC) activities of rat cerebellum
●:Cytosol(S) ■:P_2-Soluble(M_3) △:P_2-Membrane(M_{1+2})

次に，NaN_3 は Cytosol や P_2-Membrane の GC には影響を与えないが，P_2-Soluble の GC に対しては MNNG と同程度の活性化を示した．ところが，NaN_3 と Catalase とを共に添加したところ Cytosol の GC は著明に活性化されたが，P_2-Membrane の GC は影響を受けず，P_2-Soluble の GC の場合には NaN_3 単独の場合と同程度の活性化しか示さなかった．この P_2-Soluble と Cytosol の GC の NaN_3 に対する反応性の有無の原因を検討するため各分画中の Catalase 活性を測定したところ P_2-Soluble にのみ

6.0×10^{-3} Kobs/mg protein の活性が検出された．これらの結果より，NaN_3 は P_2-Soluble中の内在性 catalase によって NO ラジカルを生成し，MNNGと同程度の活性化を示したと考えられる．

3) 基質 GTP に対する kinetics

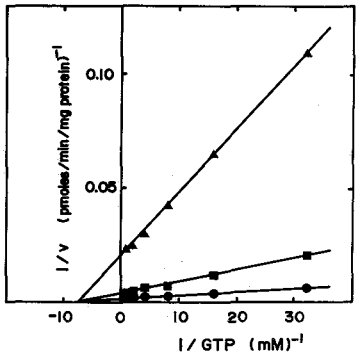


Fig.2 Double reciprocal plots of the kinetics for GTP of soluble GC from rat cerebellum
▲:Cytosol(S),-MNNG ●:Cytosol(S),+MNNG
■:P_2-Soluble(M_3)

可溶性 GC (Cytosol および P_2-Soluble の GC) の基質 GTP に対する kinetics を検討した．(Fig.2) これらの GC はいずれも Michaelis-Menten 型の kinetics を示し，Km 値は 0.13mM であった．P_2-Soluble の GC は MNNG によって活性化された Cytosol と類似の kinetics を示した．すなわち P_2-Soluble の GC は Cytosol の GC の basal 活性と較べた場合，Km 値は同じで Vmax 値のみ上昇したものであった．一方，P_2-Membrane の GC の kinetics は Michaelis-Menten 型を示さず，S 字状を示した．

4) 酵素反応に及ぼす温度の影響

Cytosol GC の反応に関する至適温度は，MNNG の非存在下では 52.5°C であったが，活性化された場合には，47.5°C と低温側に移行した．ところが P_2-Soluble の GC の至適温度は，42.5°C であった．(Fig.3) この至適温度の面からも P_2-Soluble の GC と MNNG によって活性化された Cytosol の GC は類似した性質を持つことが推察される．P_2-Membrane の GC は，これら可溶性の GC と異なり，至適温度が 35°C から 45°C の範囲にわたり可溶性の GC の場合のように単一のピークを示さなかった．

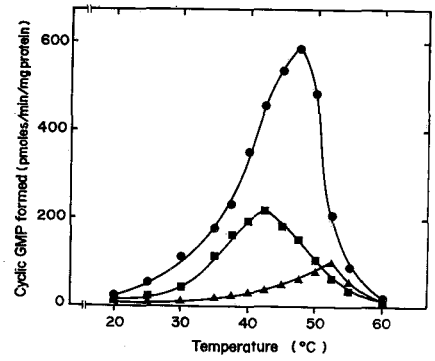


Fig.3 Effect of temperature on activities of soluble GC from rat cerebellum
▲:Cytosol(S),-MNNG ●:Cytosol(S), +MNNG
■:P_2-Soluble(M_3)

5) 阻害物質の影響

ヘモグロビンおよびビタミンA類はニトロソ化合物による GC の活性化を阻害すること (11, 2) が知られているので，次にこれらの物質の影響を検討した．ヘモグロビンは Cytosol GC (MNNG 非存在下) や P_2-Membrane の GC には影響を与えなかったが MNNG によって活性化された Cytosol GC や P_2-Soluble GC に対しては著明な阻害効果を示した．(Fig.4) 一方，ビタミンA類はヘモグロビンと同様に MNNG によって活性化された Cytosol および P_2-Soluble の GC の活性を著明に阻害した．(Table.3) これらの阻害物質の影響の面からも P_2-Soluble の GC は MNNG による活性化と類似の機序で活性化されていることが示唆された．

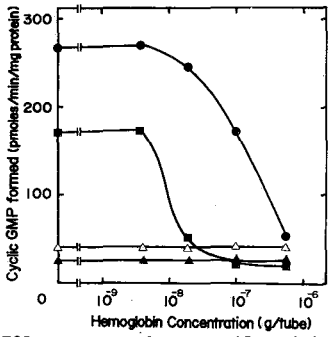


Fig.4 Effect of hemoglobin on GC activities of rat cerebellum
▲:Cytosol(S),-MNNG ●:Cytosol(S),+MNNG
■:P_2-Soluble(M_3) △:P_2-Membrane(M_{1+2})

6) 熱処理を行ったP2-Solubleの各酵素標品への影響

P2-Soluble分画中にSoluble GCを活性化し得る熱安定性の内在性物質が存在するか否かを確めるため，P2-Solubleを80°C 5分間熱処理を行い，これを各酵素標品に加えたところ，P2-SolubleのGCは約75%に活性が低下し，CytosolおよびP2-MembraneのGCはあまり影響を受けなかった。

Table 3 Effect of vitamin A derivatives on guanylate cyclase activities in rat cerebellum

Compound (1 mM)	Guanylate Cyclase Activity (pmoles/min/mg prot.)			
	Cytosol (S)		P_2-Soluble (M_3)	P_2-Membrane (M_{1+2})
	- MNNG	+ MNNG		
Control	24 ± 2.1	297 ± 28.4	179 ± 12.7	31 ± 4.1
Retinal	25 ± 2.8	81 ± 12.0*	17 ± 1.9*	22 ± 2.3
Retinol	23 ± 2.7	43 ± 5.6*	9 ± 0.6*	25 ± 1.8
Retinoic acid	27 ± 3.0	77 ± 8.2*	11 ± 1.2*	27 ± 2.4

* Significant at $p < 0.001$, Compared with each control value.

< 考 察 >

神経系においても，GCには可溶型と膜結合型の両型が存在することが知られているがNaN_3に対する反応性は顆粒結合型GCの特徴であるかのように考えられてきた。今回のP2分画を用いた実験の結果では，顆粒分画のGCがNaN_3に反応すると考えられたのは，NaN_3が顆粒分画中に存在するCatalaseによってNOラジカルを生成し，これが同分画中の"可溶型酵素"を活性化したためであると考えられる。一方，視細胞外節や小脳の膜結合型GCはNOラジカルに感受性を示さないという一般的性質をもっていることが推定され，このことは，可溶型と膜結合型の両酵素を最も明確に区別し得る相異点と思われる。

出口らは大脳粗ミトコンドリア分画の可溶性酵素は，内在性の低分子活性化因子によって活性化されていることを報告している。(4，5) 今回の実験で，小脳でもP2分画中の可溶型酵素は高い活性を有し，活性化されたCytosolのGCと類似の性質を示すことが判明した。このことより，P2-SolubleのGCはNOラジカルによる活性化機構と類似の機序で内因性に活性化されていることが示唆されるが，その詳細については現在のところ不明である。熱処理をしたP2-Solubleを添加してもMNNGに感受性をもつP2-SolubleやCytosolのGCは活性化されないことから，この活性化は単なる可逆的な遊離の活性化因子によるというより，GCの分子のNOラジカル受容部位がすでに"活性化状態"にありヘモグロビンやビタミンA類等のラジカル反応(消去)物質によってのみ"基底状態"に戻り得るという機序も考えられる。このようなP2-Soluble GC活性の内在性調節機構の解析はCyclic GMPのシナプス伝達における意義を解明する上で重要な意義をもつものと考えられる。

< 文 献 >

1) Bonnichsen,R.K.(1947) Arch.Biochem.12,83-93 2) Craven,P.A.and DeRubertis,F.R.(1977) Cancer Res.37, 4088-4097 3) DeRubertis,F.R. and Craven,P.A.(1976) Science 193, 897-899 4) Deguchi,T.(1977) J.Biol.Chem. 252, 7617-7619 5) Deguchi,T.,Amano,E.and Nakane,M.(1976) J.Neurochem.27, 1027-1034 6) Keirns,J.J., Wheeler,M.A.and Bitensky,M.W.(1974) Anal.Biochem.61, 336-348 7) Kimura,H.,Mittal,C.K.and Murad,F.(1975) J.Biol.Chem.250, 8016-8022 8) Lowry,O.H.,Rosenbrough,N.J.,Farr,A.L.and Randall,R.J.(1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275 9) Miki,N.,Nagano,M.and Kuriyama,K.(1976) Biochem.Biophys.Res.Commun.72, 952-959 10) Miki,N.,Yoshikawa,K.and Kuriyama,K.(1977) Shinkei-Kagaku 16, 221-223 11) Miki,N.,Kawabe,Y.and Kuriyama ,K.(1977) Biochem.Biophys.Res.Commun.75, 851-856 12) Rodríguez de Lores Arnaiz,G., Alberici,M.and DeRobertis,E.(1967) J.Neurochem.14, 215-225

23 牛脳可溶性Guanylate Cyclaseの精製とそれに対する抗体の生成とその性質について

中根正樹・出口武夫
(都神経研・医化)

〔要約〕

牛脳可溶性分画から guanylate cyclase を、pH 5.2 沈殿、硫安分画、Phenyl Sepharose DEAE-Sepharose, Sephacryl S-300, GTP affinity カラムを用いて精製した。その結果、homogenate から、約 12,700 倍の精製、比活性約 236 nmol/min/mg protein, 電気泳動的にほぼ単一の標品を得た。

この標品をウサギに免疫したところ、牛脳 guanylate cyclase に対する抗体が得られた。この抗体による guanylate cyclase 活性の阻害を調べたところ、牛脳上清では、約 900 μg の抗血清により、完全に guanylate cyclase 活性が抑制された。ラット脳上清の場合もほぼ同様の阻害曲線が得られ、ラットと牛の可溶性酵素は、抗原性の上から、ほとんど同一であることが明らかとなった。抗血清によるラット各臓器の guanylate cyclase 活性の阻害を調べたところ、上清の酵素活性は著しく阻害するのに対して、Triton X-100 で可溶化した顆粒結合性酵素の活性は、抗血清を加えてもなお 3/4 以上の活性が残った。以上の点から、可溶性 guanylate cyclase と顆粒結合性 guanylate cyclase は、抗原性の点において異なる蛋白であると考えられる。

脳において、Acetylcholine により、cGMP が増加することが明らかになって以来、Acetylcholine による神経伝達と cGMP の関連が注目されてきた。我々は、cGMP を合成する Guanylate Cyclase (以下 G-cyclase と略す) が脳組織中のシナプス可溶性分画に特に多く存在することを見出し(3)、神経伝達と cGMP との関連を示唆した。さらに histochemical な方向から研究を進めるため、G-cyclase の抗体をつくるべく、ラット脳を用いて、G-cyclase の精製をすすめてきたが(8,9)単一蛋白にまですることができず、不十分なものであった。その後、材料をより大量に入手できる牛脳を用い、精製法を改良して精製をすすめた結果、ほぼ単一蛋白にまですることができた。また、その標品をウサギに免疫し、牛脳可溶性 G-cyclase に対する抗体を得ることに成功したので、ここに報告する。

〔実験方法〕

(1) G-cyclase 活性の測定：すでに記載した方法に従い、行なった。(3,9)

(2) 電気泳動：Williams らの方法(12)に従い、アクリルアミド濃度 7.5%, pH 7.5 で行なった。

(3) 免疫方法：精製酵素 200μg を Freund's Complete Adjuvant (Difco) と混合し、ウサギの皮下に注射した。3週間後、および5週間後に booster を注射し、最後の注射後 14日目に採血し、血清も分離した。血清は、1/3 硫安飽和も3回くり返し、生理食塩水に透析後、30mg/ml に濃度を調節した。別に免疫していないウサギの血清も同様に処理した。

(4) 血清の検定：免疫電気泳動、Ouchterlony 二重拡散法は、常法によりベロナール緩衝液 pH 8.6, イオン強度 0.05, 1.2% アガロース・アガー混合プレート上にて行なった。

〔結果と考察〕

(1) 牛脳可溶性分画からの G-cyclase の精製

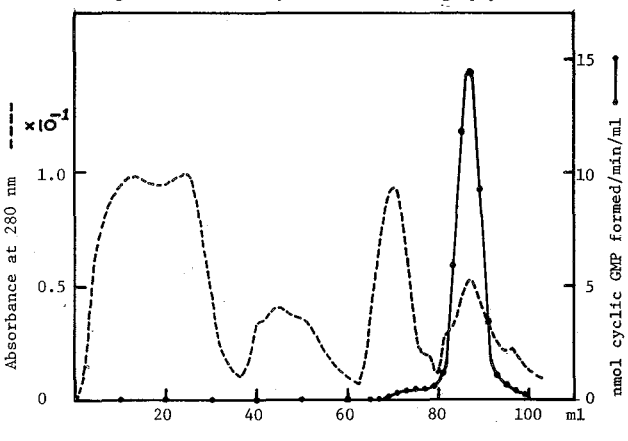
精製過程は、Table I に示した。以前報告した、ラット脳を用いての精製 (8, 9) と比べ、Phenyl Sepharose による hydrophobic chromatography を加えた点、GTP affinity column の溶出を linear gradient により行なうことにより、効果的に他の蛋白を除いた点などが主に異なる。

牛脳 1.0 kg を 3 倍量の 25mM Tris-HCl (pH 7.6)・1mM DTT・0.1mM EDTA (Buffer A) で homogenize し、(Homogenate)、105,000g 60分の遠心により、上清を得、沈査を 3 倍量の Buffer A で homogenize して、遠心により再び上清を得て、二回の上清をあわせて、supernatant とする。2N 酢酸にて pH を 5.2 とし、生じた沈殿を集めて、Buffer に溶解して、pH を 7.6 にあわせた後、(pH 5.2 ppt)、硫安分画を行ない、25–45% 飽和分画をとる (Ammonium Sulfate fr.)。45% 飽和で生じた沈査を 25mM Tris-HCl (pH 7.6)・1mM DTT・0.1mM EDTA・20% Glycerol (Buffer B) に溶解後、遠心で沈殿を除き、Phenyl Sepharose CL 4B (4.4 × 15cm) に結合させ、Buffer B, 7.5% Propylene glycol, Buffer B で順次洗った後、1% Lubrol PX の入った Buffer B で、G-cyclase を溶出する (Phenyl Sepharose fr.)。この分画を DEAE-Sepharose CL 6B (2.6 × 15cm) にのせ、Buffer B, 0.13M NaCl で洗った後、0.13–0.30 M NaCl の linear gradient により溶出を行なう (DEAE-Sepharose fr.)。活性ピーク部分を 60% 飽和硫安にて濃縮し、Sephacryl S-300 superfine (2.5 × 100cm) にのせ、ゲル口過を行なう (Sephacryl S-300 fr.)。つづいて、活性ピーク部分を、10mM NaN_3, 1mM $MnCl_2$ 存在下で GTP affinity カラムに結合させる。十分カラムを洗った後、0–0.5M NaCl・5mM EDTA の linear gradient により溶出を行なうと、G-cyclase 活性は、最後の蛋白ピークと重なって、溶出されてくる (Fig. 1)。この分画を Buffer B に対して透析して、NaN_3、NaCl などを除き、最終標品とする (GTP affinity column fr.)。この段階で、約 236 nmol/min/mg protein の比活性を有し、Homogenate から、約 12,700 倍

Table I Purification of bovine brain guanylate cyclase

Fraction	Protein	Guanylate cyclase activity		Purification
		total activity	specific activity	
	mg	nmol/min	nmol/min/mg prot.	-fold
Homogenate	132800	2464	0.019	1.0
Supernatant	31626	914	0.029	1.6
pH 5.2 ppt.	6720	1924	0.286	15.4
Ammonium Sulfate	2750	2035	0.740	39.8
Phenyl Sepharose	658	729	1.11	59.5
DEAE-Sepharose	43.9	349	7.95	427
Sephacryl S-300	5.4	155	28.7	1540
GTP-affinity column	0.58	45.3	236	12700

Fig. 1 GTP-affinity column chromatography



の精製である。この比活性の値は、他の臓器から、ほぼ単一にまでG-cyclaseを精製したという報告(11, 1, 6)に匹敵し、かなりの純度の標品であると考えられ、事実、得られた標品は、Disc電気泳動上、ほぼ単一のバンドを示し、G-cyclase活性もこのバンドと一致して認められた(Fig. 2)。しかし、メインバンドがbroadであるので、他の蛋白がわずかに混入している可能性も残っている。

(2) G-cyclase特異抗体の産生

G-cyclaseの精製標品(GTP affinity column fr.)を実験方法で述べたようにウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清は、Ouchterlony二重拡散法において、牛脳上清および精製したG-cyclase (Sephacryl S-300 fr.)と、完全に fuge する沈降線が1本のみ認められ、また免疫電気泳動法においても、牛脳上清および精製したG-cyclase (Sephacryl S-300 fr.)に対して、共に1本の沈降線が同じ位置に認められた。

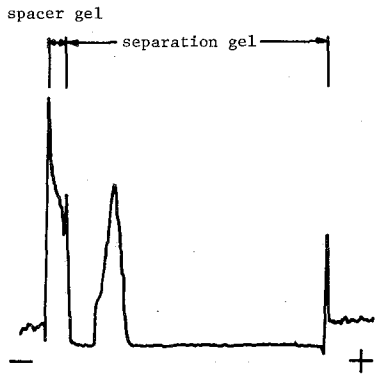
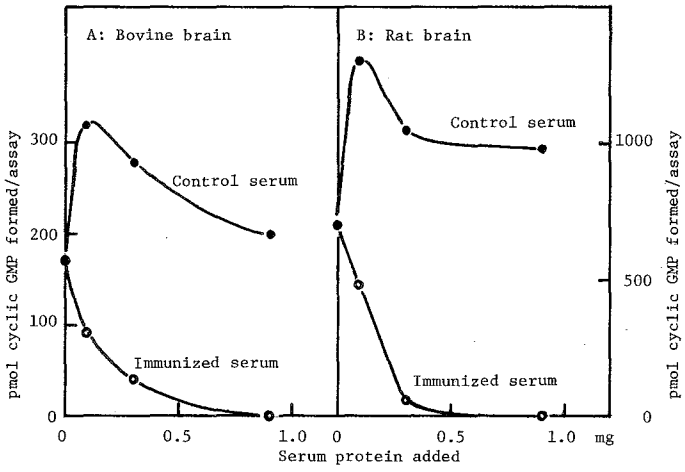


Fig. 2 Disc gel electrophoresis of purified G-cyclase

(3) 特異抗体によるG-cyclase活性の阻害

牛脳の105,000g上清と、抗血清を4℃ 12時間incubateし、さらに2μg/μg抗血清の抗ウサギIgG (Miles製)を加えて4℃ 1時間incubateした後、105,000g 60分遠心して抗原抗体complexを除去後、その上清のG-cyclase活性を測定した。その結果、約900μgの抗血清を加えることにより、G-cyclase活性は、完全に抑制された(Fig. 3A)。しかし、抗ウサギIgGを加えないと、900μgの抗血清によっても、約40%の活性が残った。従って、G-cyclaseに抗体が結合するだけでは、おそらくG-cyclaseの活性部位のかなりの部分がブロックされずに残り、その結果、活性は部分的にしか阻害されないと考えられる。同様の実験をラット脳の105,000g上清について行なったところ、ほとんど同じ活性阻害曲線が得られた(Fig. 3B)。よって、牛脳上清のG-cyclaseとラット脳上清のG-cyclaseは、抗原性の上からは、ほぼ同一と考えられた。

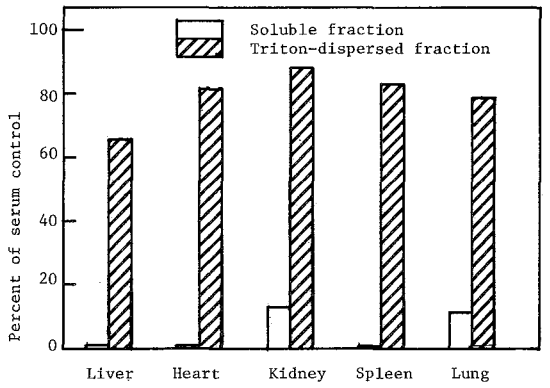
Fig. 3 Inhibition of soluble G-cyclase by antibody



次にラットを用いて、各臓器の上清分画、および Triton X-100 で可溶化した顆粒分画におけるG-cyclase活性の阻害の程度を調べた。抗血清は、脳の上清分画の酵素活性を完全に阻害する900μgを用いた。上清分画におけるG-cyclase活性は、肝臓、心臓、脾臓ではほぼ完全に抗血清により阻害され、腎臓、肺においても著しい阻害をうけた。それに対し、Triton X-100で可溶化した顆粒分画のG-cyclaseの活性は、各臓器とも、3/4以上の活性が残った(Fig. 4)。今まで可溶性G-cyclaseと、顆粒結合性G-cyclaseは、カイネティクス、メタル要求性、見かけの分子量、ヌクレオチドによる影響などの点で

かなり異なる性質を示し、異なる酵素ではないか、といわれてきている（4, 7, 2, 10）。また、Garbersは、ウニ精子の顆粒結合性G-cyclaseに対する抗体は、ラット臓器の可溶性酵素とは全く交叉せず、顆粒結合性酵素とも部分的にしか交叉しないと報告しているが(5)、今回の我々の上清酵素に対する抗体を用いた結果からも、抗原性の点において可溶性酵素と顆粒結合性酵素とは性質の異なる蛋白であると考えられる。

Fig. 4 Inhibition of soluble and particulate G-cyclase by antibody



我々の得た抗体は、哺乳類動物組織のG-cyclaseから初めて得られたものであり今後、哺乳類動物組織でのhistochemistryに応用することにより、cGMPと神経伝達の関連を明らかにする上で、重要なアプローチとなり得ると考えている。

この研究は一部 文部省科学研究費補助金（No. 348124）の援助によって行なわれたものである。

REFERENCE

1. Braughler,J.M., Mittal,C.K.,and Murad,F.(1979) Proc.Natl.Acad.Sci. 76, 219-222
2. Chrisman,T.D., Garbers,D.L., Parks,M.A.,and Hardman,J.G.(1975) J.Biol.Chem. 250, 374-381
3. Deguchi,T., Amano,E.,and Nakane,M.(1976) J.Neurochem. 27, 1027-1034
4. Garbers,D.L., Hardman,J.G.,and Rudolph,F.B.(1974) Biochemistry 13, 4166-4171
5. Garbers,D.L.(1978) J.Biol.Chem. 253, 1898-1901
6. Garbers,D.L.(1979) J,Biol.Chem. 254, 240-243
7. Kimura,H.and Murad,F.(1974) J.Biol.Chem. 249, 6910-6916
8. 中島正樹、香取光生、松口武夫（1977）神経化学 16, 225-228
9. Nakane,M.,and Deguchi,T.(1978) Biochim.Biophys.Acta 525, 275-285
10. Neer,E.J.,and Sukiennik,E.A.(1975) J.Biol.Chem. 250, 7905-7909
11. Tsai,S-C., Manganiello,V.C.and Vanghan,M.(1978) J.Biol.Chem. 253, 8452-8457
12. Williams,D.E.,and Reisfeld,R.A.(1964) Ann.New York Acad.Sci. 121, 373-381

24 ラットの松果体におけるcyclic AMP含量の日内変動

三国雅彦・斉藤嘉郎・小山　司
岡五百理・松原繁宏・加沢鉄士
浅野　裕・山下　格
（北大・医・精神）

〔要　約〕

松果体におけるcyclic AMPは、NAの支配下にあって、N-アセチル転移酵素（NAT）活性を変動させるが、NA含量，NAT活性に日内変動が存在することなどから、従来よりcyclic AMPの日内変動の存在如何についても検討が加えられている。しかしcyclic AMP含量は，断頭後の虚血状態で急速に増加するという実験手技上の猛路があるため、いまだに説得力のある成績が得られていない。そこでより正確を期するために．microwave法によってcyclic AMPの代謝に関与する酵素を急速に不活化し、松果体cyclic AMP含量の日内変動の有無について検討した。人工照明下で飼育した（0630～1830を明期）各々頭ずつの成熟ラット頭部に4KW 2秒間のmicrowaveを照射し（0800，1400，1800，1900，2000，0200，0600，0700に施行）松果体を採取の上、cyclic AMP含量の測定を行なった。cyclic AMP含量は明期に低く、暗期に入ると増加傾向に転じて、0200にピークを示す（$P<0.05$）。さらに明期に移ると再び急激に低下した。これはNA含量、NAT活性の日内変動とよく一致している。暗期の最大値は明期のそれの約3倍量に相当する。しかしこれらは従来の報告より全体的に低値である．^{3}H-alprenolol binding siteの数は明期に増加し、暗期に移ると減少すると報告されているが、β受容体機能の指標であるcyclic AMP含量の日内変動とは逆転しており、したがってbinding siteの数は必ずしも細胞内の機能を反映していないものと考えられた。

ラット松果体中のホルモン，神経伝達物質，およびその代謝に関与する各酵素には著明な日内変動の存在が知られている。松果体には大量のセロトニン（5HT）が含まれるが、その含量は、日中に高値を示し、夕方暗くなると急激に減少して夜間に低値となる（Quay[11]）。5－HTはN－アセチル転移酵素（NAT）によりアセチルセロトニンになり、ついでヒドロキシインドール－O－メチル転移酵素（HIOMT）によりメラトニンに変るが、このメラトニン含量にも日中に低値、夜間に高値を示す日内変動がQuay[12]により報告されている。またNAT活性はKlein[6][7]らにより、HIOMT活性はAxelrod[1]らにより、夕方より活性が上昇し、夜間に高値をとり、日中低下する日内変動が見出された。またNAT活性に関して、明－明条件では酵素活性の上昇がなく、交感神経からノルアドレナリン（NA）を減少させるレゼルピン，β-アドレナリン遮断薬のプロプラノロール，蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミドなどの処置により夜間時の活性上昇がみられなくなることから、この酵素活性が交感神経からのNA放出によりβ-受容体を介して変化すること、酵素活性の上昇は新しい酵素分子の合成によることが想定されている[3][4]。一方松果体のNA含量にも明らかな日内変動が知られており、Wurtman[16]の成績によるとラットでは夜暗くなると上昇しはじめ、早朝明るくなる直前に最高値を示し、その後急速に低下する。

このように松果体を支配する神経線維の末端から放出されるNAには規則正しい日内変動があって、それがNAT活性を支配し、5HTからメラトニンを合成する代謝機構の日内変動を調節していると考えられる。さらにこのNAのsecond messengerであるcyclic AMPと光刺激との関連が従来より検討されているが、松果体におけるcyclic

AMPの日内変動の存在はこれまで実験的に否定されてきた。今回micro wave法によりcyclic AMPに関連する酵素を不活化し松果体におけるcyclic AMP含量の日内変動を検索したので報告する。

〈実験方法〉

実験動物は体重250～350gのWistar-King系雄ラットを用い、25°Cに空調した室内で、12時間ごとの明暗条件下（明期は0630－1830）において、40Wの蛍光灯から約50cmはなれたケージに3頭ずつ入れ、飼料と水は随時十分摂取できる状態で飼育した。

今回は松果体を断頭後に採取する従来の方法を改め、microwave照射法を用い、諸治[9]の報告を参照して照射条件を検討した。ラット頭部にmicrowave 2KW 2秒間照射後と、4KW, 2秒間照射後に、松果体を30秒以内に採取し、0°Cの0.1NHCl 0.3mlに入れてhomogenateを作製し、15000Gで1分間遠心し、上清100μlをsuccinyl化して、cyclic AMP含量を測定し比較した。

次に各7頭のラット群について、頭部に4KW 2秒間の照射を、0800, 1400, 1800, 1900, 2000, 0200, 0600, 0700に施行して松果体を採取し、cyclic AMP含量の測定を行なった。cyclic AMPの測定は、本間[5]らによるradio-immunoassay法を用いた。

〈結果〉

表－1のように低エネルギーのmicrowave照射後の松果体cyclic AMP含量は、高エネルギーのmicrowave照射に比べて約18倍高く、cyclic AMPに関連する酵素活性が残存していたものと考えられる。4KW 2秒間の照射後の松果体のcyclic AMP含量は、1.02±0.22 P mol/a pinealで、従来の報告より著しく低値となっている。

2 KW for 2 sec	4 KW for 2 sec
18.30 ± 4.5 p mol/a pineal	1.02 ± 0.22 p mol/a pineal

Table-1　microwave 照射条件の比較
n = 4
p<0.01

図－1は松果体におけるcyclic AMP含量の日内変動を示す。暗期に入ってから30分で上昇傾向があらわれ、0200には明期の含量に比べて5％で有意な上昇を示し、明期に移って30分後には急速に下降している。明期におけるcyclic AMP含量は低値（0.7 Pmol/a pineal）にとどまるが、暗期のピーク値は2.3 Pmol/a pinealと3倍以上に上昇している。

〈考察〉

従来より脳内cyclic AMP含量が断頭後の虚血状態で増加することが知られており[3]、検索上の難路となっていたが、今回のmicrowave照射条件の検討でも明らかなように、高エネルギーのmicrowaveの照射でcyclic AMPの代謝に関与する酵素を不活化することにより、生理的状態に近いcyclic AMP含量の測定が可能となったと考えられる。Romero[13]らは、断頭後のcyclic AMP含量の上昇が断頭後30秒以内にhomogenizeすることにより防止できるとみなしたうえで、松果体におけるcyclic AMP含量に日内変動はみ

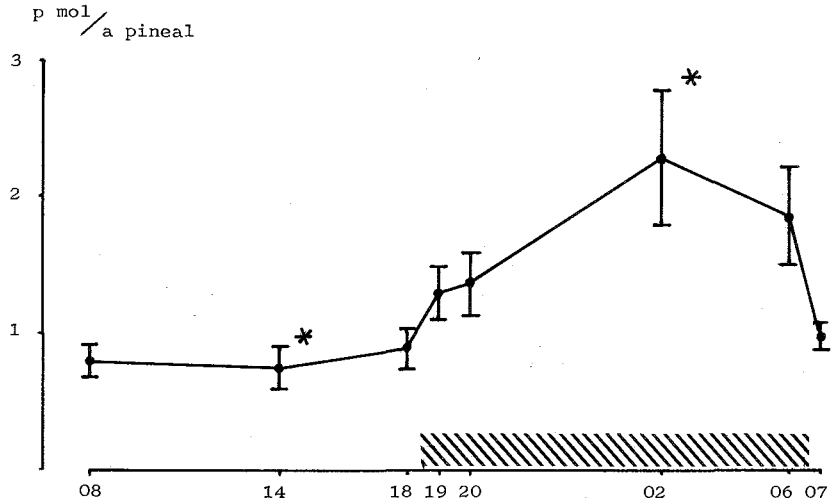


Fig. - 1　ラット松果体における cyclic AMP 含量の日内変動　n = 7　$p<0.05$

られないと報告している。しかし彼らの報告では松果体1個あたりの cyclic AMP 含量は約10 P mole で、演者らの測定値よりも著しく高い値を示している。このことは断頭後の cyclic AMP 含量の上昇により、cyclic AMP 含量の日内変動がおおい隠されていた可能性があると考えられる。Weiss[13]らも断頭後の cyclic AMP 含量の増加は、明条件下の方が暗条件下よりも大きいとしている。

ここで観察された cyclic AMP 含量の日内変動は、NA含量、cyclic nucleotide phosphodiesterase 活性[10]、NAT活性、およびメラトニン含量の日内変動とよく一致しており、従来から推測されていた松果体の日内変動が、NA - Adenylate cyclase - cyclic AMP 系により支配されていることを示唆するものである。

Romero[11]らは松果体の ^{3}H-alprenolol binding site の数の日内変動を検索しているが、それによれば NA の日内変動と異なり明期に次第に増加し、暗期に入ってから減少する。また Isoproterenol を投与して10分後の松果体の cyclic AMP 含量の増加と明暗条件の変化との相関についても、やはり暗期に比べて明期の増加量が多いとし、明条件下で交感神経活動が抑制された結果 Isoproterenol に対する反応性が増大したものと考察している。[14] NA 含量と cyclic AMP 含量の日内変動がともに暗期に高いことから、内因性の NA 含量の変化はβ受容体機能の指標となる cyclic AMP 含量の変化と一致していると考えられ、^{3}H-alprenolol binding site の数は NA と結合していない receptor の数をみている可能性があり、NA 含量、cyclic AMP 含量が増加している暗期では ^{3}H-alprenolol binding site の数は減少していることになる。結局日内変動に関して、binding site の数は細胞内の機能を反映していない可能性がありこの点が興味がもたれるところである。

次に細胞内 cyclic AMP の機能は、暗期の NAT 活性上昇の維持に関与しているのか、あるいは cyclic AMP 含量の急激な低下が NAT 活性の低下をひき起すのかが問題となるが、Klein[8] は松果体培養細胞系で、*l*-propranolol による NAT 活性の低下は half time 6～8分、cyclic AMP 含量の低下は half time 3分であることを確認した上、細胞内 cyclic AMP 含量の急激な低下により NAT 活性の低下は 'turn off' 現象としてみられると推測した。ここで観察された cyclic AMP 含量の日内変動からも、明→暗の変化より、暗→明の変化の方が急激で大きなものであることからすると、細胞内 cyclic AMP 含量の急激な減少は NAT 活性の 'turn off' 現象にも関与していると考えられる。

〈結論〉

microwave 法によりラットの松果体における cyclic AMP 含量の日内変動の有無を検索し、明期で低く、暗期に入ると増加傾向に転じて 0200 にピークに達するが、明期に移るとともに急激に低下する日内変動を観察した。これは従来から推測されている松果体ホルモン、神経伝達物質、その代謝に関与する酵素の日内変動などが、NA-cyclic AMP 系を介するという仮説を支持するものである。また ^{3}H-alprenolol binding site の数の日内変動はβ受容体の活性の指標である cyclic AMP 含量と逆相関する可能性についても若干考察したが、さらに恒明条件、恒暗条件、頸部交感神経節 block 等による cyclic AMP 含量の日内変動の変化についても検討中である。

(1) Axelrod,J., Wurtman, R.J., Snyder, S.H. J. Biol. Chem. 240 949 1965

(2) Axelrod, J. Recent Prog. Horm. Res. 31 1 1975

(3) Breckenridge, B. McL. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 52 1580 1964

(4) Deguchi, T., Axelrod, J. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 69 2547 1972

(5) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, T., Ui, M. Biochem. Med. 18 257 1977

(6) Klein,D.C., Weller, J.L. Science 169 1093 1970

(7) Klein, D.C., Weller, J.L., Moore, R.Y. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 68 3107 1971

(8) Klein, D.C., Buda, M.J., Kapoor, C.L., Krishna, G. Science 199 309 1978

(9) Moroji, T., Takahashi, K., Ogura, K., Toishi, T., Arai, S.
J. Microwave Power 12 273 1977

(10) Minneman, K.P., Iversen, L.L. Nature 260 59 1976

(11) Quay, W.B. Gen. Comp. Endocrinol. 3 473 1963

(12) Quay, W.B. Proc. Soc. Exp. Biol Med. 115 710 1964

(13) Romero, J.A., Zatz, M., Kebabian, J.W., Axelrod, J. Nature 258 435 1975

(14) Romero, J.A., Axelrod, J. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 72 1661 1975

(15) Weiss, B., Strada, S.J., Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1 357 1972

(16) Wurtman, R.J., Axelrod, J., Sedvall, G., Moor, R.J., J. Pharmacol. Exp. Ther. 157 487 1967

25 てんかんとモノアミン代謝及び環状ヌクレオタイド

長尾卓夫・藤本　明・山本光利
秋山一文・大月三郎
（岡大・医・精神）

〔要　約〕

dopamine, norepinephrine, serotoninの主要代謝物質であるHVA, MHPG, 5HIAAと，二次メッセンジャーと考えられているcyclic AMP, cyclic GMPの髄液内濃度をてんかん患者について測定し，正常対照者と比較するとともに，てんかんの臨床的病態とも合わせて検討した。1)てんかん患者を正常対照群と比較すると，てんかん患者ではcyclic AMPが有意に高値を示した。HVAは有意の差はないが低い傾向がみられた。　2)てんかんの発作型別ではprimary generalized epilepsy, partial seizure, partial complex seizureの三群の間ではいずれも有意な差はみられなかったが，partial complex seizure群では5HIAAが低い傾向が認められた。　3)抗てんかん薬による治療群と未治療群の間では，治療群のcyclic AMPが有意の高値を示した。　4)腰椎穿刺の前日にてんかん発作をおこしたものは，他の患者に比べて有意にcyclic AMPの高値を示した。　5)発作頻度の多い群では，cyclic GMPが有意な高値を示した。

これらの結果から，てんかん患者の一部ではdopamine系，serotonin系の機能障害を示すものがあることが示唆される。cyclic AMPはてんかん発作自体によって上昇し，cyclic GMPはてんかん発作の準備状態と関係あることが示唆される。

てんかん発作発現に脳内モノアミンや，二次メッセンジャーと考えられている環状ヌクレオタイドが関与していることが示唆されている。

神経伝達物質であるdopamine(DA), norepinephrine(NE), serotonin(5HT)の中枢神経系における代謝の動態はそれぞれの主要代謝物質であるhomovanillic acid(HVA), 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol(MHPG), 5-hydroxyindoleacetic acid(5HIAA)の髄液内濃度を測定することで知ることができると考えられる。

われわれは，てんかん患者の髄液内HVA, MHPG, 5HIAAおよびcyclic 3',5'-adenosine monophosphate(cAMP), cyclic 3',5'-guanosine monophosphate(cGMP)を測定し，てんかんの病態との関係を明らかにする目的でこの研究を行った。

〔対象と方法〕

対象は岡山大学附属病院精神科に入院したてんかん患者25名(男16名，女9名)と対照群として健康正常者8名(男3名，女5名)である。

腰椎穿刺は同意を得たうえで，前夜より安静臥床にして，午前8時30分～9時30分の間に行い，最初の5mlをHVA, MHPG, 5HIAAの測定に，次の0.5～2mlをcAMP, cGMPの測定に用いた。髄液はcAMP, cGMP用にはEDTAを最終濃度5mMになるように加え速やかに－70°Cに凍結保存した。HVA, MHPG, 5HIAAはKorf[7]らの方法を一部修正して行った。[12] cAMP, cGMPはラジオイミュノアッセイ法(YAMASA Assay kit)で測定した。

てんかん患者の発作型は，primary generalized epilepsy(tonic-clonic)(GE) 6名, partial seizure(PS) 9名(内secondarily generalized 6名), partial complex seizure(PC) 10名(内secondarily generalized 2名)であり，この中で，抗てんかん薬による治療をうけていな

い未治療者は6名であった。抗てんかん薬服薬者は、服薬継続のまま行った。
なお、髄液検査にて、髄液圧、総蛋白量、細胞数は全例正常域であった。

〈結果〉

てんかん患者を正常対照群と比較すると、HVAは低い傾向を示すものゝ、有意な差はみられなかった。cAMPはてんかん患者で有意の高値を示したが、MHPG, 5HIAA, cGMPには差を認めなかった。(Table 1)

cAMPとcGMPは5例において測定を行っていない。またcarbamazepine(CBZ)服用者では、CBZの干渉により偽のMHPG高値を示すためCBZ服薬の10名はMHPG検定から除外した。

発作型別ではPS, PCのいづれも症章の全般化によって差は認めなかったので全般化したものもしないものも共に含めて検討した。PCにおいて5HIAAは低い傾向を示したが有意の差は認めなかった。(Table 2)

発作頻度との関係は表3に示した。発作頻度が平均週に1度以上ある患者群をA群月に2~3度から2~3ヶ月に1度程度をB群、年に2~3度以下をC群とするとA群ではB.C群に比して、cGMPが有意に高値であった。cAMPは、A.B群はC群より高値を示した。(Table 3)

最終発作との関係では、前日に発作を起こした3例(PS, PC, GE各1例)では、cAMPが30 pmole/ml以上を示し、他の患者群(21.1±4.9 pmole/ml)との間で有意の差がみられた($P < 0.005$)。

抗てんかん薬による治療を現に受けている治療群と未治療群では、治療群のcAMPが有意に高値を示した。治療群のMHPG, 5HIAAが低く、cGMPが高い傾向はみられたが有意の差はなかった。(Table 4)

HVAと5HIAAの間には正の相関($r = 0.423$, $P < 0.05$)を認めたが他の物質間には相関関係はみられなかった。

〈考察〉

脳内モノアミンと症章との関係は、様々な研究によって示唆されている。ヒト髄液では、てんかん患者のHVA, 5HIAAが低値とする報告が多い。[1][5][16] また側頭葉てんかん、レノックス症候群でのHVA, 5HIAAの低値とする報告がみられる。[6][14]

われわれの結果では、統計学的に有意ではないが正常対照群に比して、HVAが低値であり、PCの患者群では5HIAAが低値の傾向を示したことは従来のてんかん患者のHVA低値、側頭葉てんかんの5HIAA低値の報告を支持するものであろう。

Table 1. CSF Monoamine Metabolites and Cyclic Nucleotides in Epileptic Patients and Normal Controls

	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5HIAA ng/ml	cAMP pmole/ml	cGMP pmole/ml
Elilepsy	38.6±11.8 (25)	10.9±6.5 (15)	17.9±7.3 (25)	22.7±6.0* (20)	3.79±1.80 (20)
Normal Controls (8)	46.6±18.1	12.5±7.4	16.9±4.3	15.8±5.2	3.55±1.20

Mean±SD. *: $P < 0.01$ Numbers in parenthesis

Chadwick ら[12]は、抗てんかん薬による治療群で、HVA, 5HIAAが高値であると報告しているが、今回の結果は、これとは逆に未治療群の5HIAA高値の傾向がみられた。抗てんかん薬の血中、髄液内濃度は測定していないため抗てんかん薬との関連は詳細には分析できなかった。

モノアミンとてんかん発作との間には明確な関係は見い出せなかったが HVA, 5HIAA 低値のものがあることから、一部にはDA, 5HT代謝が減退していることが示唆される。

Table 2. CSF Monoamine Metabolites and Cyclic Nucleotides in The Patients grouped on Seizure Type.

Seizure Type	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5HIAA ng/ml	cAMP pmole/ml	cGMP pmole/ml
I	36.7± 8.4 (6)	14, 6 (2)	20.0±7.1 (6)	23.5±6.6 (4)	3.60±0.14 (4)
II	38.3±14.3 (9)	9.3±5.8 (7)	20.2±7.6 (9)	20.3±6.9 (6)	3.85±1.84 (6)
III	40.1±12.2 (10)	13.2±7.9 (6)	15.3±7.1 (10)	23.8±5.4 (10)	3.83±2.23 (10)

Mean±SD. I: Primary Generalized Epilepsy (Tonic-Clonic)
II: Partial Seizure and Partial Seizure Secondarily Generalized
III: Partial Complex Seizure and Partial complex Seizure Secondarily Generalized
Numbers in parenthesis

Table 3. CSF Monoamine Metabolites and Cyclic Nucleotides grouped on Seizure Frequency

Seizure Frequency	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5HIAA ng/ml	cAMP pmole/ml	cGMP pmole/ml
A more than 1/week	37.1±11.1 (7)	5.3±3.2 (3)	17.0±9.5 (7)	26.4±4.8 (7)	5.43±1.90 (7)
B 2-3/month ~ 1/2-3months	36.0±12.1 (8)	9.8±3.6 (6)	17.0±6.2 (8)	24.0±5.4 (6)	2.91±1.33* (6)
C less than 2-3/year	41.6±13.3 (10)	14.8±8.0 (6)	19.3±7.0 (10)	17.9±4.5*** (7)	2.90±0.61** (7)

Mean±SD. *: P<0.05 A vs B **: P<0.01 A vs C ***: p<0.005 A vs C
Numbersin parenthesis

Table 4. CSF Monoamine Metabolites and Cyclic Nucleotides in Treated and Untreated Epileptic Patients

	HVA ng/ml	MHPG ng/ml	5HIAA ng/ml	cAMP pmole/ml	cGMP pmole/ml
Treated	38.8±11.3 (19)	9.2±3.7 (9)	16.9±7.5 (19)	24.6±5.3* (14)	4.26±1.73 (14)
Untreated (6)	38.2±14.7	13.5±9.2	21.0±6.2	18.2±5.1	2.68±1.56

Mean±SD. *: P<0.05 Numbers in parenthesis

cAMPはDA,NE,5HT,histamine等による神経伝達を細胞内に伝えるニ次メッセンジャーと考えられている。cGMPもコリン系の伝達に関与していると云われており，また，GABAと逆相関的関係にあるとも云われている。

環状ヌクレオタイドが，てんかん原性に何らかの役割を果たしていることは，dibutyryl cAMPの脳室内投与や脳皮質への添加実験や，痙攣惹起剤によって in vivo及び in vitroでcAMP，cGMPが上昇し，抗てんかん薬がその上昇を阻止すること，実験的皮質焦点部位でcAMPが上昇していることなどから示唆されている。[3][8][17]

われわれの結果で，cAMPが発作翌日の例で高値を示したことは，Myllylä ら[11]の発作後3日以内のてんかん患者ではcAMPが高値であったという報告を支持するものであろう。脳内や髄液内cAMPが痙攣発作で上昇することは動物実験でも知られている。このcAMP上昇は痙攣そのものによる変化でなく，痙攣に伴随した細胞内酸素欠乏によるものとも考えられている。[9][15] しかしFerrendelli ら[3]はマウスを使い，呼吸が抑制されないmyoclonic twitchesやclonic seizureでもcAMPが上昇することを認め，cAMPの上昇は，神経伝達物質もしくは，神経調整物質の遊離作用によるものではないかと考えている。今回の結果において，cAMP高値の発作翌日の3例中2例は痙攣の全般化を伴わないPS，PCであった事は，Ferrendelliらの報告を支持するものと考えられる。大下[13]はネコのkindling preparationにおいて，痙攣直後にのみ扁桃核と視床下部でHVAが上昇することを認めており，このHVA上昇とcAMPとの関係は興味深い。しかし今回の結果ではHVAとcAMPとの間に相関関係はみられず，またcAMPがDA系だけを反映するものでないことから，てんかん発作でのcAMP上昇の秩序については今後の研究の課題である。

cGMPも痙攣発作時に上昇することが示されている。しかしcGMPの上昇は，痙攣発作の始まる以前から既におこっていること[3]，痙攣惹起剤の痙攣閾値下量の投与によってもcGMP上昇が認められること[10]，更に眼前房移植の海馬錐体細胞がcGMPにより発作性放電をおこすこと[14]などからcGMPが痙攣準備状態と関係があるのではないかと考えられている。[3] われわれの結果でも，発作頻度の高い群でcGMP高値を示したことは，痙攣準備性との関連を示唆するものかもしれない。

cGMPとコリン系もしくはGABA系との関連から，てんかん発作の準備状態にはコリン系の機能増大，もしくはGABA系の機能低下があることも考えられる。

文　献

1) Barolin,G.S.und Hornykiewicz,o. Wien Klin. Wschr.,44,815-818, 1967.
2) Chadwick,D.,Jenner,P. and Reynord,E.H. Ann. Neurol., 1,218-224, 1977.
3) Ferrendelli,J.A. and Kinscherf, D.A. Epilepsia, 18,525-531, 1977.
4) Hoffer,B.,Seiger,A.,Freeman,R.,Olson,L. and Taylor,D. Brain Res.,119,107-132,1977.
5) 小林靖史，江角やよい，加川靖，奥藏，脳と神経 28，371－377，1976.
6) 児玉荘一，瀬尾明，根岸宏邦，荻野仁志，伊坂稔，脳と発達，5，59-67，1973.
7) Korf,J.,van Praag,H.M. and Sebens,J.B. Biochem.Pharmacol., 20,659-668, 1971.
8) Lewin,E. and Bleck,V. Epilepsia, 18, 237-242, 1977.
9) Lust,W.D.,Goldberg,N.D. and Passonneau,J.V. J. Neurochem., 26, 5-10, 1976.
10) Mao,C.C.,Guidotti,A. and Costa,E. Brain Res., 79,510-514, 1974.
11) Myllylä,V.V.,Heikkinen,E.R.,Vapaatalo,H. and Hokkanen,L. Europ. Neurol., 13, 123-130, 1975.
12) Nagao,T.,Ohshimo,T.,Mitsunobu,K.,Sato,M.and Otsuki,S. Biol.Psychiatry, 14, 509-523, 1979.
13) 大下俊則，精神経誌，80，519－534，1978.
14) Papeschi,R.,Molina-Negro,P.,Sourkes,T.L. and Erba,G. Neurology,22,1151-1159, 1972.
15) Sattin,A. J. Neurochem., 18, 1087-1096, 1971.
16) Shaywitz,B.A.,Cohen,D.J. and Daly,J. Proc.Natl.Acad.Sci. USA,65,1033-1040, 1970.
17) Walker,J.E.,Lewin,E.,Sheppard,J.R. and Cromwell,R. J.Neurochem.,21,79-85, 1973.

26 各種神経疾患髄液中のモノアミン代謝物質と環状ヌクレオチド

山本光利・長尾卓夫・藤本　明
秋山一文・大月三郎（岡大・医・精神）
早原敏之・難波玲子（国立岡山療養所）

〔要約〕

脊髄小脳変性症23例，運動ニューロン疾患19例，パーキンソン病4例，ハンチントン舞踏病3例，シャルコー・マリー・トゥース病1例，重症筋無力症4例，対照群10例において安静時の髄液中 homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA), cyclic AMP, cyclic GMPの測定を行った。脊髄小脳変性症と運動ニューロン疾患の一部においてはpreliminaryにProbenecid負荷を試みた。

1) HVA濃度はパーキンソン病，脊髄小脳変性症，運動ニューロン疾患で有意に低下していた。

2) 5HIAA濃度はパーキンソン病，重症筋無力症にて有意に低下していた。脊髄小脳変性症では一部において低値を示すものがあり，全体として低値傾向であった。

3) cyclic AMP, cyclic GMP濃度は共に，各疾患とも有意の変化は認めるかった。cyclic AMPは運動ニューロン疾患で高値の傾向を示した。

4) Probenecid負荷では，運動ニューロン疾患では脊髄小脳変性症よりも，HVA，5HIAA，cyclic AMP，cyclic GMP共に蓄積が少い傾向がみられた。

5) 以上より，パーキンソン病，脊髄小脳変性症，運動ニューロン疾患で，中枢神経系におけるdopamine系ニューロンの障害が，また，パーキンソン病，重症筋無力症，脊髄小脳変性症の一部にserotonin系ニューロンの障害が示唆された。

髄液中の各種アミン代謝物質を測定することは中枢神経系内のアミン系ニューロンの代謝機能を知るに有力な手段である。アミン代謝物質の一つであるhomovanillic acid (HVA) はdopamineの主要代謝物質であり，5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) はserotoninの主要代謝物質として知られ，髄液中のHVA, 5HIAAは中枢神経系のdopamine系，serotonin系ニューロンの代謝機能を反映していると考えられている。一方，adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP)，guanosine 3',5'-monophosphate (cyclic GMP) はホルモンや神経伝達物質の作用発現に際して細胞内で働くsecond messengerと考えられており，中枢神経系には高濃度に存在しており，髄液中にも，その存在が認められている。髄液中のcyclic AMP, cyclic GMPも中枢神経系の代謝機能を反映していると考えられているが，その意味するところは未知な面も多い。今回，これらHVA, 5HIAA, cyclic AMP, cyclic GMPを，従来，知見に乏しい変性性神経疾患を中心として測定を行ったので報告する。一方，HVA, 5HIAA, cyclic AMP, cyclic GMPの髄液から血液への移行を阻止するProbenecidを一部にて投与し，そのturnoverの測定を試みたのであわせて報告する。

〔対象〕

対象は脊髄小脳変性症23例，男14例，女9例，平均年令44.5才。運動ニューロン疾患19例，男11例，女8例，平均年令53.8才。パーキンソン病4例，男1例，女3例，平均年令47.6才。ハンチントン舞踏病3例，男1例，女2例，平均年令51才。シャルコー・マリー・トゥース病1例，男，29才。重症筋無力症4例，男1例，女3例，平均年令36.3才。対照群として中枢神経系に異常のない健康人10例，男7例，女3例，平均年令23.9

文。

〔方法〕

髄液採取は、前夜より安静臥床を10～12時間続け、翌朝午前9時に側臥位にて腰椎穿刺した。患者、対照群共に中枢神経系に影響を及ぼす薬剤は1週間以上にわたり服薬していない。Probenecid 投与例では腰椎穿刺直後と3時間後、6時間後に各1g経口投与し、第1回の腰椎穿刺後9時間後に再穿刺した。この間、患者は引き続き安静臥床を続けた。髄液は最初に流出する5mlをHVA, 5HIAA測定用、次ぎに流出する0.5mlをcyclicAMP, cyclicGMP用とした。cyclicAMP, cyclicGMP用はあらかじめ採取用試験管にEDTAを添加しておいた。採取髄液は直ちに、測定まで−70°Cにて凍結保存した。HVA, 5HIAAの測定はKorfの方法(9)により抽出し蛍光法で測定した。HVA, 5HIAAの平均回収率は、それぞれ75%, 100%であった。cyclicAMP, cyclicGMPはYAMASA assay 社によるラジオ・イムノアッセイ法で測定した。

〔結果〕

(表1参照)(cyclicAMP, cyclicGMPは一部において測定していないものがあるためHVA, 5HIAAの測定数と一致しない。)HVA濃度はパーキンソン病で14.5±3.3 ($P<0.005$)、脊髄小脳変性症で33.3±13.0 ($P<0.02$)、運動ニューロン疾患で36.6±10.4 ($P<0.05$) (ng/ml, mean±SD)で、それぞれ対照群の47.8±17.4 ng/mlに比較し有意に低かった。脊髄小脳変性症では小脳症状が優勢に出現する晩発性皮質小脳萎縮症で24.0±12.9 ($n=5$)、オリーブ橋小脳萎縮症33.5±10.1 ($n=4$)、と脊髄障害が優勢である家族性痙性対麻痺で26.3±15.3 ($n=3$)と低値傾向であった。5HIAA濃度はパーキンソン病で9.3±5.0 ng/ml ($P<0.001$)と重症筋無力症で12.3±2.9 ($P<0.05$)と有意に低かった。脊髄小脳変性症で13.4±7.1 ($0.05<P<0.1$)と低値傾向であった。脊髄小脳変性症では、晩発性皮質小脳萎縮症で7.0±1.7 ($n=5$)、オリーブ橋小脳萎縮症で9.8±5.7 ($n=4$)、であった。cyclicAMP濃度は各疾患共に有意の変化はなかったが、運動ニューロン疾患、ハンチントン舞踏病で高値の傾向にあった。cyclicGMP濃度も各疾患群共に有意の変化がなかった。

表1

	AGE (YEARS)	HVA (NG/ML)	5HIAA (NG/ML)	CYCLIC AMP (PMOLE/ML)	CYCLIC GMP (PMOLE/ML)
脊髄小脳変性症	44.5±14.5	33.3±13.0(23)^{C}	13.4± 7.1(23)	19.6±6.1(22)	4.2±1.0(22)
運動ニューロン疾患	53.8±10.7	36.6±10.4(19)^{D}	16.9± 6.3(19)	22.6±9.8(17)	3.6±1.1(17)
パーキンソン病	47.6±19.8	14.5± 3.3(4)^{B}	9.3± 5.0(4)^{A}	18.28 (2)	5.8,3.4(2)
ハンチントン舞踏病	32,61,60,	11,50, (2)	11,21, (2)	22.3±12.9(3)	3.5±1.6(3)
シャルコー・マリートゥース病	29	21, (1)	11 (1)	12, (1)	3.0 (1)
重症筋無力症	36.3±11.8	28.7±10.3(3)	12.3± 2.9(3)^{D}	19.5±6.7(4)	3.3±1.2(4)
対照群	23.9±10.2	47.8±17.4(10)	18.4± 5.0(10)	16.3±4.8(10)	3.6±1.1(10)

MEAN±SD　A: $P<0.001$, B: $P<0.005$, C: $P<0.02$, D: $P<0.05$.

( ): 症例数

Probenecid は運動ニューロン疾患5例，脊髄小脳変性症7例にて投与した。結果は図1に示す。対照群がないので有意差検定は行っていない。

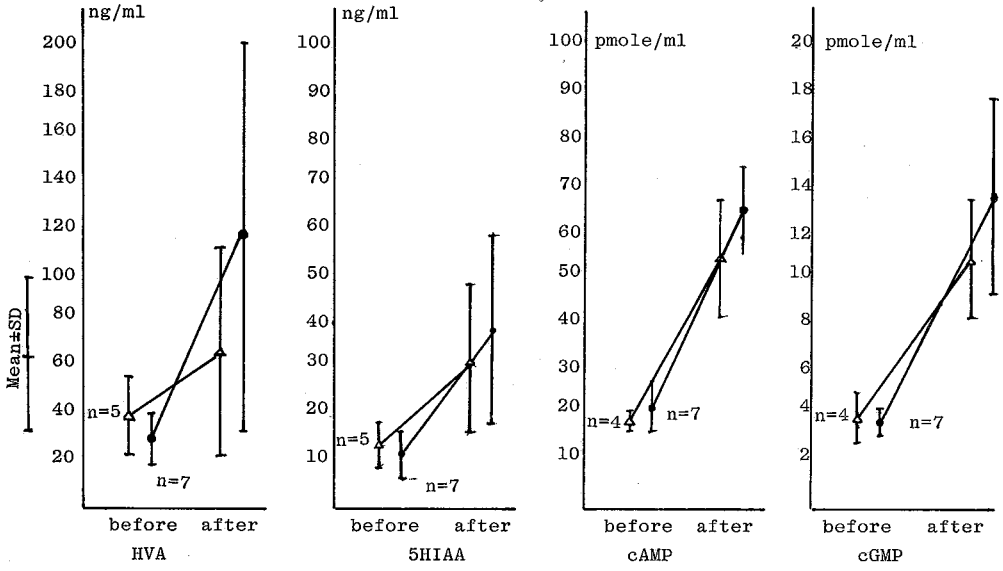


図1. プロベネシッド負荷試験
△：運動ニューロン疾患，●：脊髄小脳変性症　n＝症例数

〔考察〕

髄液中のHVAは殆ど尾状核より脳室内へ移行すると考えられている。(12)。パーキンソン病髄液中のHVA濃度の低値はよく知られており(4)，今回も同様であった。運動ニューロン疾患については欧米ではいくつか報告があり(5,7)，HVAの低値が認められており，今回の成績はそれらと合致するものであるが，運動ニューロンの中にdopamineが含まれているとの知見はなく(8)，その意味するところは不明である。脊髄小脳変性症におけるHVAについての報告は，水野らの報告(10)，があまにすぎず知見に乏しい。脊髄小脳変性症ではHVAも有意に低下していたが，晩発性皮質小脳萎縮症やオリーブ橋小脳萎縮症，家族性痙性対麻痺で低値傾向を認めた。このことは脊髄小脳変性症全体ではなく，一部の群においてdopamine系ニューロンの障害が示唆される。小脳へのdopamine系ニューロン支配は知られてなく(13)，なお，錐体外路症状のない晩発性皮質小脳萎縮症や家族性痙性対麻痺においてHVAが低値るのかは不明である。多発性硬化症やハンチントン舞踏病でもHVAの低値が報告されている(7)。一方，脳の各部位には多少なりともdopamineが含有されているとの報告もあり(1)，広汎な脳障害が存在すればHVAが低下してくることも考えられよう。

5HIAAに関してはパーキンソン病と重症筋無力症で有意に低下していた。パーキンソン病における5HIAAの低下は既に報告があるが(3)，その意義はよく分っていない。重症筋無力症においても，今回低値であったが，その意義はよく分らず，症例数も少ないので今後の検討が必要と思われた。脊髄小脳変性症は有意ではないが低値傾向を示し，なかでも，晩発性皮質小脳萎縮症とオリーブ橋小脳萎縮症で低値であった。このこ

とは、これら両疾患においてserotonin系ニューロン障害の可能性を示唆するものである。小脳とserotoninとの関係はあまり知られておらず、今後とも症例数を増しての検討を行う必要があると考えられる。

髄液中のcyclic AMP, cyclic GMPに関しての神経変性疾患での報告は少なく、運動ニューロン疾患でcyclic AMPが低値であった(4)との報告や脊髄小脳変性症、パーキンソン病等では有意の変化はなかった(6)との報告がみられる。今回、各疾患とも、cyclic AMP, cyclic GMPでは有意の変化はなかった。cyclic AMP, cyclic GMPは細胞内に存在しているが、細胞の崩壊や細胞膜の変化により、髄液中への出現が考えられる。運動ニューロン疾患ではcyclic AMPがやや高値の傾向にあったことは、細胞変性の過程を反映している可能性があるかもしれない。小脳には脳内他部位に比較しcyclic GMPは高濃度に存在しているが(11)、脊髄小脳変性症においては有意の変化は認めなかった。神経変性疾患の髄液中のcyclic AMP, cyclic GMPについての知見はきわめて少なく、その意義づけはまだ十分なされているとはいい難く、今後も、ひき続き検討して行きたい。

最後に、Probenecidは HVA, 5HIAA, cyclic AMP, cyclic GMPの髄液から血液への移行を阻止し、これら諸物質のTurnoverを知るのに有用な手段である。今回はpreliminaryで計照群が得られているないが、運動ニューロン疾患では、脊髄小脳変性症と比較し、各物質ともturnoverが低かった。今後症例を増して検討を加えたい。

[文献]

1. Adolfson,R. et al (1979) J.Neural Transm. 45,81.
2. Bernheimer,H. et al (1961) Klin.Wschr. 39,1056.
3. Bernheimer,H. et al (1966) Wien. Klin. Wschr. 78,417.
4. Brooks,B.R. et al (1970) UCLA Forum Med. Sci. 19,101.
5. Brody,T.A. et al (1970) N.Engl.J.Med. 282,947.
6. Cramer,H. et al (1973) Arch. Neurol.29,197.
7. Curzon,G. et al (1973) Proc.roy.Soc.Med. 66,873.
8. Fuxe,K. et al (1967) Acta Physiol. Scand. suppl.247,37.
9. Korf,J. et al (1971) Biochem.Pharmacol. 20,659.
10. 水野ら (1979)臨床神経 19,367.
11. Steiner,A.L. et al (1972) Brain.Biol.Chem. 247,1121.
12. Sourkes,T.L. (1973) J. Neural Transm. 34,153.
13. Ungerstedt,U. (1971) Acta Physiol.Scand. suppl. 367,1.

27 脳腫瘍組織及び切截脳におけるLysosome酵素の変動とDBc-AMPの効果に関する研究

柴田家門・清水義勝・松元幹郎
長沢貞継・高須信美（東邦大・医・脳外）
阿相皓晃・平野修助（東邦大・医・II生理）

〔要約〕

Lysosome酵素は細胞障害，細胞分裂時に活性上昇がみられる。一方，脳腫瘍の治療薬としてDBc-AMPが効果を持つことが報告されている。本研究はEthylnitrosourea誘発脳腫瘍組織，実験的外傷脳及び老化脳組織について lysosome酵素活性変化を追求し，併せて，DBc-AMP投与の影響を明らかにした。lysosome酵素活性は組織を0.32M sucroseで homogenateした直後(free activity)と0.05% TritonX-100をassay mediumに加えた場合(total activity)とについて調べた。total activityの最も増加するものは腫瘍組織であるが，出生後初期及び老化時(生後18ヶ月後)，外傷後急性期にも高値を示していた。total activityの高値を示す中でfree activityのtotal activity中に占める割合(free activity%)からみると腫瘍脳，出生後初期脳で70~80%と対照(生後2ヶ月から10ヶ月頃までが定値を示すのであるので対照とした。free activity%は50%であった。)に比し高値を示した。外傷脳初期ではfree activity%がやゝ低値を示すので炎症時のtotal activity増加は主にtotal-free＝bindingactivityによるもので，腫瘍など細胞分裂に伴うtotal activityの増加は主にfree activityの増加に基くと考えられる。DBc-AMPの効果は腫瘍脳，外傷脳について，total activityを減少させるが，free activity%には影響を与えなかった。老化脳ではtotal，free共に変化を示さない。以上の如く，脳細胞は種々の条件下でfree activity及びDBc-AMPの反応パターンが必ずしも同一でないことが判明した。

ライソゾーム酵素は種々の細胞環境の変化や病態変化に伴って多様な変化を示す。外傷脳の急性期にはrepairing enzymeとして活発に活動し，正常脳組織[1]や悪性脳腫瘍[2]組織における細胞分裂・増殖に際しても著明な増加を示している[3]。著者らはオ17回本学会に外傷脳におけるライソゾーム酵素の活性変動につき報告したが[4]，今回はさらにライソゾーム酵素の役割を特に脳組織の細胞分裂・増殖時および細胞の発育・加令段階における変化の面より検討し，細胞の損傷時における活性変化と比較することにより，3つの異なった細胞環境における同一酵素活性変動をβ-glucuronidase（β-gluと略す）およびacid-phosphatase[1][2]（A-Pと略す）の2酵素について検討した。

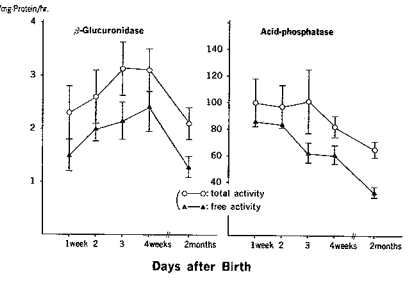
またALLEN，ALLISONらはin vivoおよびin vitroで悪性腫瘍細胞の異常増殖をdibutyl cyclic AMP（DBC-AMPと略す）が抑制し，より分化した細胞に変化させると報告しているが，このDBC-AMPがライソゾーム酵素に対してstabilizerとして代表的なステロイドホルモンとは異なった影響を外傷脳組織におよぼしていることが明らかとなったので各種病態時におけるDBC-AMPのライソゾーム酵素への影響を検討した。

方法：　1)実験動物：　実験動物としてはethylnitrosourea（ENUと略す）経胎盤投与により[5]誘発した実験的脳腫瘍ラット(SD系)と実験的外傷脳ラット(既に作製方法は本学会で報告[4])およびSD系ラット生後1，2，3，4週目より生後2年目までのラット脳を使用し酵素標品とした。[6]　2)酵素活性の測定：①ライソゾーム酵素の測定はβ-glu.はKatoの変法[7]，acid-P.はKing-Armstrongの変法[8]によった。すなわち組織を0.32 M sucroseでhomogenateした直後に得られる活性（free activityと名付ける）は凍結融解を繰り返すか，超音波処理または種々のdetergent，薬剤を添加することによって完全に活性化された活性値

(Total activityと名付ける)を示すようになる。従ってライソゾーム酵素は酵素活性の面でfree activityとtotal activityからfree activityを差引いた活性(binding activityと名付ける)の2つの存在様式があると思われる。そこでtotal activityの測定には才17回本学会で報告したように、Assay mediumに最終濃度0.05% Triton X-100を加えた溶液を使用した。②Choline acetyltransferase(ChAc)およびAcetylcholin esterase(AchE)の活性：ChAcはMcCAman[15]らの方法に準じて、10倍(W/V)の蒸留水によるhomogenateを酵素標品として使用し、AchEはFonnunの方法[8]に従って同じく蒸留水による組織のhomogenateを使用した。③2'(3')-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNP)活性：Kurihara & Tsukadaの方法[17]に準じて0.32M sucroseによる組織のhomogenateを酵素標品として使用した。④Carbonic anhydrase(CA)活性：CA活性は蒸留水でhomogenateしたものを酵素標品として使用し、^{14}C-Sodiumbicarbonate(0.225 μmol/ml)を基質に0.25M phosphate buffer(pH6.8)、25℃の条件下で発生してくる$^{14}CO_2$の速度炭化から酵素活性を算出する方法[8]で行なった。⑤ATPaseの活性：Mg^{++}-ATPase, およびNa^+-K^+-ATPaseはGibbsらの方法[1]に準じ、組織を蒸留水でhomogenateしたものを使用し、Mg^{++}-ATPaseはtotal ATPaseに5×10^{-4}M Ouabainを加えた時の活性値とし、Na^+-K^+-ATPaseはtotal ATPaseからMg^{++}-ATPaseを差し引いた値として求めた。3)薬剤投与法：DBc-AMPは実験的脳腫瘍ラットには症状出現後、2mg/kgを連日5日間皮下注射にて投与し実験的外傷脳ラットには切創手術日より連日5日間同量を投与した。Steroid hormoneとしてはdexamethasome 1mg/kgを同一条件下で投与した。

結果：生後2～3ヶ月の正常のラット脳の酵素活性は(図-1)に示す如く、β-glu：2.06±0.32 μg/mg-protein/hr(total activity)、1.27±0.18(free activity)、A-P：65.1±5.50(total)、33.2±3.52(free)であり、両酵素ともfree activityのtotal activity中に占める割合は(以下free activity %と名付ける)ほぼ50%であり、total activityおよびfree activity %は生後10ヶ月頃迄ほぼ一定値を維持している。

図-1 Developmental changes of Lysosomal enzyme activities in rat brain Tissue



生後1週目よりの経時的な正常脳組織の発育に伴う変動を見ると(図-1)β-gluは生後3～4週目には明らかな活性上昇がみられるが、その後急速に下降し生後2ヶ月頃よりほとんど変動を示さない。しかも3～4週目の活性上昇期にfree activity %は、70～80%を占めていたが、生後2ヶ月以降になると50%になる。A-Pでは多少上昇傾向が異なり、生後1週目ですでにtotal activityは2ヶ月後の2倍近くの高値を示し、生後4週目頃まで維持され、以後急激に下降する。しかしfree activity %の上昇傾向は全くβ-gluと同様であった。ラットの平均寿命は18ヶ月～2年であるので、老令ラットは18～24ヶ月長期生なさせたラットを用いており(表-1)の如く明らかに生後2ヶ月頃のものに比べtotal activityが高値を示した。(β-gluでは、total activityで生後2ヶ月目の2倍以上。)しかし、free activity %は発育初期と異なり30-40%に減少する傾向がみられた。この傾向はA-Pではβ-gluほど

著明ではないが同様の傾向を示した。Aging脳でtotal activityが増加するので、lysosome酵素活性のstabilizerとして知られるsteroidの影響を検討すると（表－1）totalの活性はやや減少するがfree activity%は変化を受けなかった。腫瘍脳組織のlysosome酵素に対しsteroidがstabilizer効果を示すことを報告（第17回）したが、同様の効果を持つDBc-AMPについてもaging脳に対しその影響を検討したところやはりtotal activity, free activity %共にSteroidとほぼ同様の効果があった。

表-1 Changes of Lysosomal enzyme activities on aging rat brain

β-Glucuronidase Activity

Conditions	Aging rat	Steroid treated	DBC·AMP treated
Total activity (μg/mg-Protein/hr.)	4.49±0.35	3.52±0.10	4.00±0.26
Free activity (μg/mg-Protein/hr.)	1.61±0.23	1.26±0.21	1.44±0.16

Acid-phosphatase Activity

Conditions	Aging rat	Steroid treated	DBC·AMP treated
Total activity (μg/mg-Protein/hr.)	74.2±7.31	70.4±12.4	74.9±13.1
Free activity (μg/mg-Protein/hr.)	31.8±6.30	30.3±4.21	32.2±5.56

実験的脳腫瘍組織はENU誘発により生後6～8ヶ月の実験群であるが、腫瘍組織の諸酵素活性は（表-2）に示すように正常組織に比べ、AchE, 及びCAは高く、ChAc及びNa^+-K^+ ATPaseは低く、CNPaseも活性が認められnon-neuromalなglia系の腫瘍組織と考えられる。この組織のlysosome酵素の活性は正常脳（生後2ヶ月の脳）に比し著明な高値を示し、free activity %が明らかに増加し、80%以上を占めていた。この傾向はβ-glu, A-P ともに同様であった。DBc-AMPを投与すると（表-4）の如く、実験的脳腫瘍組織では明らかに活性値が非投与群（表-3）に比べ低下するが、total activityで両酵素ともなお正常の数倍以上の高値を示し、さらにfree activity%は全く変化せず80%以上を示していた。実験的外傷脳組織では（表－5, 6.）の如く、切截手術後の急性期における脳腫脹・浮腫の現象に一致して急激な活性上昇がみられ、術後5日目にピークを示した。生後2ヶ月目の活性と比べ、total activityではβ-gluは約5倍, A-Pで2倍の上昇がみとめられ、この時期のfree activity %も両酵素ともに正常脳に比し、術後3日目で急激に増加し、free activity %は50%以上になるがその後むしろ下降傾向を示し5～7日目には50%以下となり、gliosisが完成される。60日目以降ではほとんど正常値に復した。また、実験的外傷脳の急性期ではDBc-AMP投与が、lysosome酵素活性のstabilizerであるSteroid hormoneと同様に著明な抑制効果を示し、急性期の初期には特にbinding activity %の上昇に対する抑制効果が強く、free activity %への効果が遅れる傾向がみられた。

表-2 ENZYME ACTIVITY IN ENU-TUMOR

Enzyme	ENU-tumor	Brain Cortex
CNPase activity (Units/mg-protein)	2.58 ± 0.15 (3)*	2.95 ± 0.11 (4)
Carbonic Anhydrase activity (μmoles/mg-protein/hr)	13.2 (2)	5.44 ± 1.05 (3)
ChAc activity (nmoles/mg-protein/hr)	0.37 ± 0.11 (3)	25.9 ± 0.42 (5)
Ach E activity (μmoles/mg-protein/hr)	20.6 ± 7.71 (3)	1.43 ± 0.05 (4)
Na^+-K^+-ATPase (μmoles Pi/mg-protein/hr)	0.53 ± 0.01 (4)	12.4 ± 0.17 (4)
Mg^{++}-ATPase (μmoles Pi/mg-protein/hr)	5.58 ± 0.05 (4)	9.35 ± 0.12 (4)

* Each value represents the mean ± SE and number of experiments are shown in parentheses.

表-3 Lysosomal enzyme activity in experimental brain tumor

Conditions	Total activity (μg/mg-Protein/hr.)	Free activity (μg/mg-Protein/hr.)
β-Glucuronidase	33.6～117.6	26.9～94.1
Acid-phosphatase	167.4～243.0	117.2～194.4

2 months after birth, normal rat:
β-Glucuronidase Total= 2.06 ± 0.32 Free= 1.27 ± 0.18
Acid-phosphatase Total=65.1 ± 5.50 Free=33.2 ± 3.52

考察：Lysosome[3),4),8)]酵素活性は炎症や細胞分裂時に増加する。我々は酵素活性の変化をtotal activity free activityの両面から検討した。total activityを考えれば、外傷後の3～5日目の受傷初期におけ

表-4

EFFECT OF DBc-AMP ON EXPERIMENTAL BRAIN TUMOR

CONDITIONS	TOTAL ACTIVITY (μG/MG-PROTEIN/HR)	FREE ACTIVITY (μG/MG-PROTEIN/HR)
β-GLUCULONIDASE	8.24--80.4	6.59--68.3
ACID-PHOSPHATASE	123.8--197.2	91.3--163.8

表-5 **Changes of β-glucuronidase activity**

Conditions		Total activity	Free activity
3 days	non treat	6.30±0.36	4.34±0.64
	steroid	4.50±0.61	2.83±0.93
	C-AMP	3.43±0.58	2.87±0.23
5 days	non treat	9.52±0.84	4.61±0.42
	steroid	7.76±0.47	2.84±0.23
	C-AMP	5.98±0.76	3.07±0.46
7 days	non treat	5.21±0.42	2.16±0.19
	steroid	3.80±0.37	2.94±0.38
	C-AMP	4.36±0.36	3.10±0.16
30 days	non treat	2.81±0.42	2.14±0.30
	steroid	2.73±0.20	1.89±0.28
	C-AMP	3.12±0.54	2.22±0.20

2 months after birth, normal rat:
β-Glucuronidase Total= 2.06 ± 0.32 Free= 1.27 ± 0.18
Acid-phosphatase Total=65.1 ± 5.50 Free=33.2 ± 3.52

る増加は炎症時の活性増加によると考えられる[6]。出生初期脳，外傷後の1ヶ月目にみられるgliosis進行期の脳，腫瘍脳組織の活性上昇は細胞分裂時の活性増加によるものと考える[1)2)]。老化に伴ってもtotal activityは生後2ヶ月の時期に比べ約2倍増加する。しかし，free activity%でみると，出生初期は75%，老化時は35%である。free activity%は生後2ヶ月目では約50%であり，腫瘍組織やgliosis組織では各々85%，75%で共に50%以上である。これに反し外傷初期脳のfree activity%は48%と正常ラットの2ヶ月頃と近似している。従って炎症時のtotal activity増加は主にbinding activityの増加によるものであり細胞分裂による増加は主にfree activityの増加に基づくと思われる。DBc-AMPは培養腫瘍細胞の分裂増殖を抑制すると報告[10),11)]されて以来，臨床的に脳腫瘍の治療薬として注目されており実験的腫瘍細胞のtotal activityもDBc-AMPにより，減少する。しかしfree activity%は94%と高く投与前と変化がない。外傷脳初期のtotal activityはDBc-AMPにより低下し正常値に近づくが，free activity%は投与前と変らず50%と正常脳と同じ傾向を示す。

また Aging ではtotal activity，free activity %はともに投与前と変化せず，しかもfree activity %が正常の50%以下を示していることが特徴と思われる。以上のようにlysosome酵素活性増加があった場合でも，free, binding activity %の変化及びDBc-AMPに対する両者の反応状態は，種々異なったパターンを示す。このことは，種々の条件でlysosome酵素の細胞内での存在様式が異なっていることを示しており種々の病態に即応した異った機能を現わすことにも関連するものと思われる。

表-6 **Changes of acid-phosphatase activity**

Conditions		Total activity	Free activity
3 days	non treat	90.00±13.52	51.15±4.19
	steroid	54.23±6.51	51.85±5.13
	C-AMP	53.20±6.80	50.90±4.20
5 days	non treat	128.05±20.48	51.10±4.08
	steroid	95.53±12.51	62.41±6.85
	C-AMP	65.24±7.82	56.35±5.02
7days	non treat	111.73±17.78	17.40±1.44
	steroid	74.45±8.19	21.00±1.95
	C-AMP	61.40±4.91	21.70±2.06
30 days	non treat	66.50±5.98	26.20±3.02
	steroid	71.12±6.97	35.56±3.86
	C-AMP	71.19±7.04	37.40±4.12

(μg/mg-Protein/hr.)

文献: 1. Allen,N.:Neurology,11,578,(1961) 2. Allisom,A.C.et al.:Lancet,2,1371,(1964) 3. Allison,A.C.: Lysosomes in biology in pathology,2,178,(1969) 4. De Duve,C. et al.:Ann.Rev.Physical,28,435,(1966) 5. Elens, A. et al.:Exp.Geront.,4,131,(1969) 6. Fonnun,F.:Biochem.J.,115,465,(1969) 7. Gibbs,R. et al.:J.Biol.Chem., 240,2181,(1965) 8. Hirano,S. et al.:Analy.Biochem.(in Press.) 9. Hochschild,R.:Exp.Geront.,6,153,(1971) 10. Hsie,A.W. et al.:Proc.Acad.Sci.,68,358,(1971) 11. Johnson,G.S. et al.:Proc.Nat.Acad.Sci.,68,425,(1971) 12. Kato,K. et al.:Chem.Pharmac.Bull.,8,239,(1960) 13. King,E.J. & Armstrong,A.R.:Canad.M.A.J.,31,376,(1934) 14. Kurihara,T. et al.:J.Neurochem.,14,1167,(1967) 15. McCaman,R.E. et al.:J.Neurochem.,12,253,(1965) 16. 柴田家門ほか: 神経化学, 17, Suppl. 202-205,(1974) 17. Verity,M.A. et al.:J.Neurochem.,15,69,(1968) 18. Weissmann, G.:Biochem.Pharm.,14,525,(1965)

尚，これらの生化学的変化をうらづける組織化学的所見が得られているので当日供覧したい。

28 ラット脳のadenosine kinaseについて

山田裕一・後藤治子・小笠原信明
(愛知コロニー)

〔要約〕

脳でのadenosineの代謝は，adenosineがadenylate cyclaseを活性化したり，シナプス後電位抑制作用をもつという点から，またPurinergic nerveでのadenosine関連物質の再利用という点からも興味がもたれる。今回adenosineを代謝する酵素の一つであるadenosine kinaseをラット全脳よりほぼ単一たんぱくまで精製し，その性質を検討した。

精製は硫安分画(40~80%飽和)，AMP-Sepharoseに吸着後，adenosineで溶出するaffinity chromato.，Sephadex G-100のゲル沪過，DE-52のcolumn chromato.により，SDS存在，非存在下の電気泳動でhomogeneousと考えられる酵素標品を得た。Specific activityは7.8μ moles/min/mg proteinであった。Nativeな酵素の分子量はゲル沪過から38,000，SDS gel電気泳動からは41,000であった。従って酵素はmonomericな構造をもつ。sharpな至適pHがpH5.5にあり，7付近で活性は低いが，7.5~8.5で再びpeakを作る二相性の至適pHを示す。Ribo-，deoxyribo nucleosideのうちでadenosineとdeoxyadenosineのみがリン酸化された。Deoxyadenosineに対する活性はadenosineに対する活性の約10%であった。Adenosineに対するKmは0.2μMと非常に小さい。Adenosine濃度が高いと活性は強く阻害される。ATPに対するKmは0.02mMであり，Mg^{2+}に対するKmは0.1mMであった。酵素は塩濃度が低いと急速に失活するが，0.15MKCl存在下では安定である。肝には脳に比べて約20倍の酵素活性が存在するが，両組織の酵素間での差は現在のところ認められない。

脳でのadenosineの代謝は，adenosineが単にATPの前駆物質であるというだけでなく，purinergic nerveでのadenosine関連物質の再利用(1)という点から，またadenosineがadenylate cyclase活性化の作用(4,5)やシナプス後電位抑制の作用(2)をもつということから，特に脳組織で興味がある。

一方，他の組織においてもadenosine deaminase欠損症や，purine nucleoside phosphorylase欠損症の発見から免疫不全との関係でadenosineの代謝は多くの興味をよんでいる。

脳でのAdenosine Kinaseについてはこれまで Shimizu等の報告(6)があるのみである。最近ウサギの肝のAdenosine KinaseはMiller等によりSDS-acrylamide gel電気泳動で単一になるまで精製され，その性質が検討されている(3)。今回，我々はラット全脳から，AMP-Sepharoseを用いるaffinity chromatoを利用することにより，ほぼhomogeneousな酵素標品を得た。

Table 1. Purification of Adenosine Kinase (AR, adenosine ; AdR, deoxyadenosine)

	Total V. ml	Total Act. units	Total Prot. mg	Specific Act. units/mg	AdR/AR
1. Extract	140	1,963	974.4	2.0	
2. Ammonium sulfate	20	2,235	276.0	8.1	
3. AMP Sepharose	6	1,422	1.15	1,236.5	0.11
4. Sephadex G-100	30	1,416	0.25	5,664.0	0.10
5. DE-52	9	1,090	0.14	7,785.7	0.10

〔実験方法〕

Adenosine Kinase の活性は一般に次のようにして測定した。64mM Tris-HCl pH7.5, 180mM KCl, 0.5mM $MgCl_2$, 8mM ammonium sulfate, 1mM ATP, 0.5mM phosphoenol pyruvate, 5units/ml pyruvate Kinase, 1μM 8-C^{14}-adenosine, 全量0.1mlで30°C, 5分反応後, boiling water中1分で反応を停止し, 反応液50μlをDE81に塗布, 乾燥後, 3mM ammonium formate, pH7.0で未反応のadenosineを洗浄した後, 沪紙を乾燥, C^{14}をカウントした。

Fig. 1. Chromatography on AMP-Sepharose

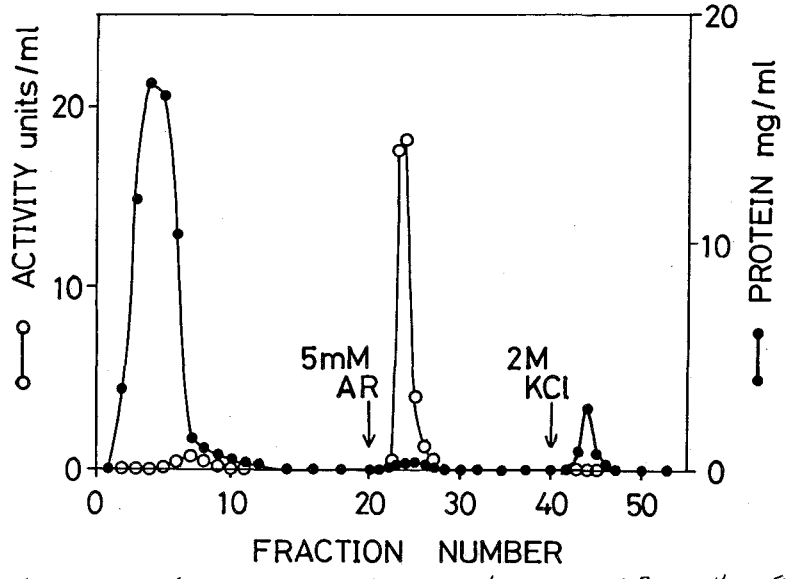


Fig.1での活性は, 上記の反応液から8-C^{14}-adenosineを除き, 25μM adenosine, 0.1mM NADH, 13.5units/ml lactate dehydrogenaseを加えて全量1mlで340nmの吸光度の減少から測定した。Deoxyadenosine Kinaseの活性もこれと同条件で1mM deoxyadenosine存在下に測定した。

1unitは1分間に1n moleのAMPを生成する酵素量と規定した。

Fig. 2 Sephadex G-100 gel filtration

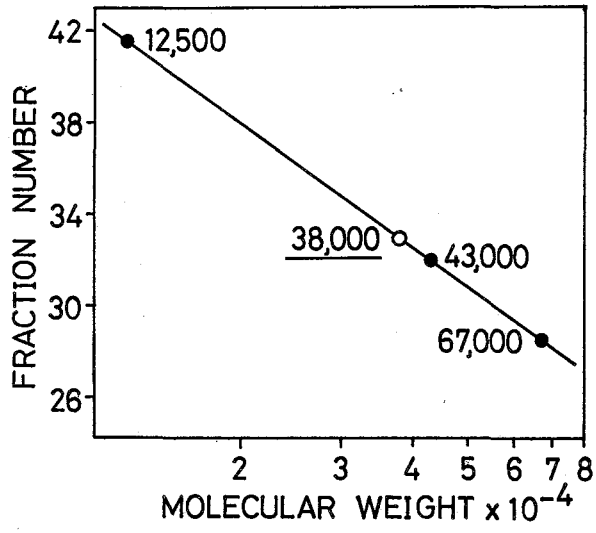
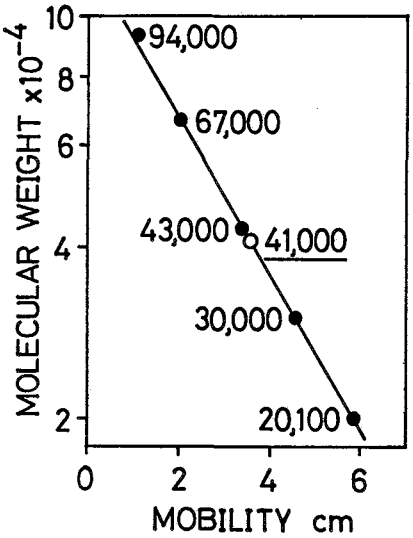


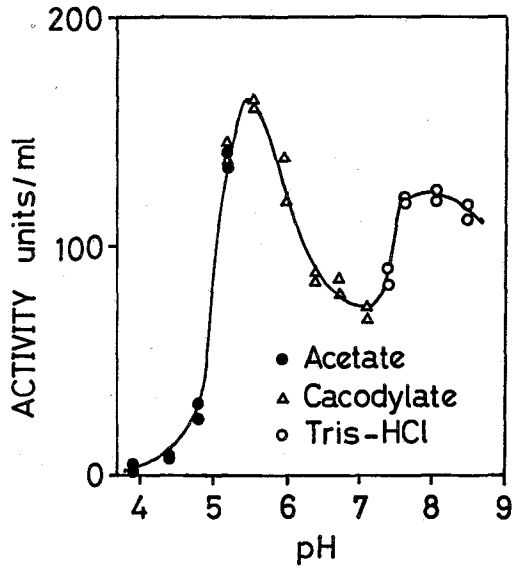
Fig. 3 SDS gel electrophoresis



〔結果と考察〕

〔精製〕 50g ラット全脳を 150ml の 10mM Tris-HCl pH7.5, 0.15M KCl を含む液で homogenize し 20,000g 上清を得た。硫安 40% 飽和で生じた沈殿を遠心除去後，硫安 80% 飽和とし，沈殿を遠心であつめ，10mM KPO_4, pH7.0, 1mM DTT の液に透析後，同じ液で平衡した AMP-Sepharose 4B column (0.75cm² × 10cm) に apply した。この条件では大部分のたんぱくは AMP-Sepharose を素通りするが，adenosine Kinase は吸着する。 5mM adenosine を含んだ buffer を加えると adenosine Kinase の活性は溶出されてくる (Fig 1)。更に 2M KCl を含んだ buffer によりかなりのたんぱくが溶出されるが adenosine Kinase 活性はない。Kinase 活性をもつ部分をとり，10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15M KCl で平衡した Sephadex G-100 (52cm² × 45cm) に apply し同じ buffer で溶出した。活性部分をとり，10mM Tris-HCl, pH7.5 に透析後，DE52 column (0.7cm² × 5cm) に apply し KCl の濃度を 0 から 100mM まで直線的に上昇させた。酵素活性は約 40mM KCl 濃度で溶出されてくる。

Fig. 4 Effect of pH



精製のまとめは Table 1 に示した。最終標品の specific activity は 7.8μmole / min / mg protein で 56% の収量であった。

〔標品純度〕 精製された酵素は SDS 存在下，非存在下の acrylamide gel 電気泳動で単一バンドを示し，homogeneous と考えられる。

〔分子量〕 native な酵素の分子量は Sephadex G-100 のゲル沪過法より 78,000 であり (Fig 2)，SDS gel 電気泳動法による分子量は 41,000 であった (Fig 3)。このことはこの Kinase が monomeric な構造をもつことを示している。Miller ら (3) の報告によればウサギ肝の native な酵素は 74,500 の分子量，SDS gel 電気泳動では 51,000 の分子量をもつ。

〔pH の影響〕 sharp な optimum が pH 5.5 にある。

Fig. 5 Effect of Adenosine

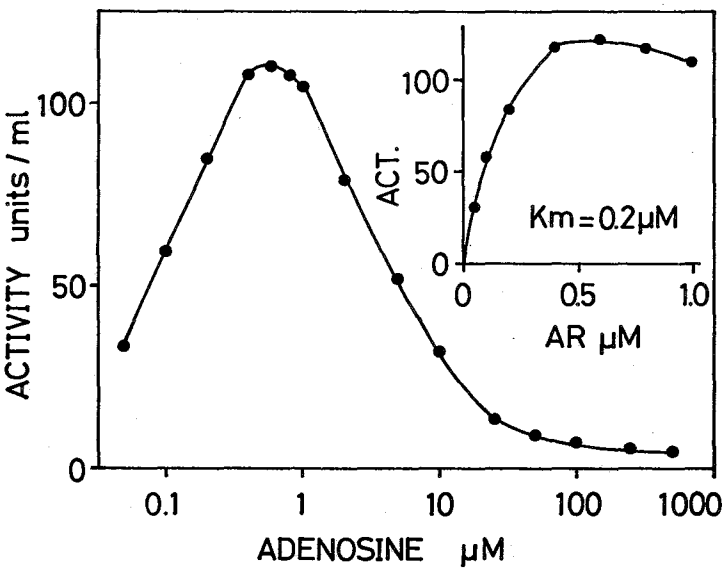


Fig. 6 Effect of ATP

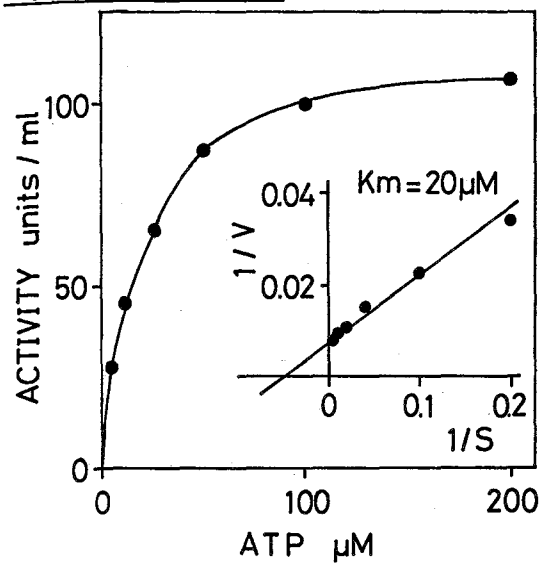
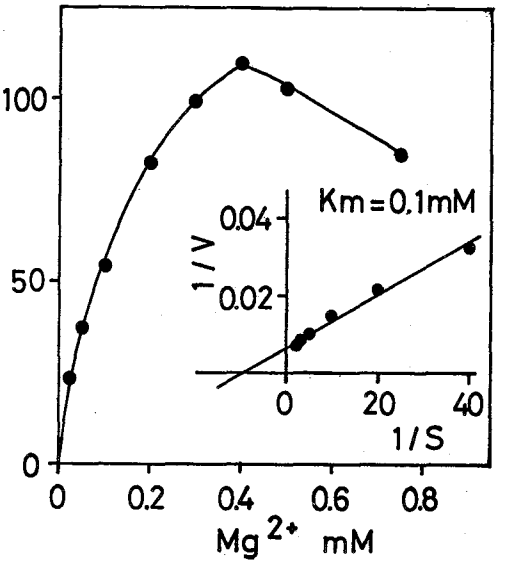


Fig 7 Effect of Mg^{2+}



5.5から7.0まで活性は下るが，更にpHが高くなると活性は再び高くなり7.5-8.5でもう一つのpeakを作る二相性の至適pHを示す(Fig 4)。

〔Kinetics〕 adenosineは高濃度では酵素活性を強力に阻害する。adenosineに対するKm値は0.2μMと非常に小さく0.5μMで最高の活性を示す。5μM，50μMでの活性は最高活性のそれぞれ50%，10%しかない(Fig 5)。

ATPに対するKmは0.02mMである(Fig 6)。

Mg^{2+}に対するKmは0.1mMである(Fig 7)。0.4mMで活性は最も高く，更に高い濃度のMg^{2+}ではかえって阻害がかかる

〔基質特異性〕 adenosineの他にdeoxyadenosineが基質となるが10%の活性しかない(Table 1)。guanosine, deoxyguanosine, cytidine, deoxycytidine, uridine, deoxyuridine, thymidineはリン酸化しない。

〔その他〕 最終酵素標品は0.15M KCl存在下0~5°Cでは非常に安定である。塩濃度が低い条件下では急速に失活するが，新にDTTを含むbufferに透析すると活性は完全にもどる。

ラット肝から上記の精製法でほぼhomogeneousな標品が得られるが，肝には脳と比べて湿重あたりで約20倍の酵素活性が含まれている。これまでのところ分子量，Kinetics，基質特異性等には，脳と肝のKinaseの間に差を認めていない。

〔文献〕

1) Kuroda, Y., and McIlwain, H. (1974) J. Neurochem. 22, 691-700
2) Kuroda, Y., Saito, M., and Kobayashi, K. (1976) Brain Res. 109, 196-201
3) Miller, R. L., Adamczyk, D. L., and Miller, W. H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2339-2345
4) Sattin, A., and Rall, T. W. (1970) Mol. Pharmacol. 6, 13-23
5) Shimizu, H., Daly, J. W., and Creveling, C. R. (1969) J. Neurochem. 16, 1609-1619
6) Shimizu, H., Tanaka, S., and Kodama, T. (1972) J. Neurochem. 19, 687-698

29 脳のアデノシン結合蛋白（II）

小田切 脩・逸見順子・清水宏俊
（日本ロシュ研）

〔要 約〕

ラット全脳より、アデノシンと高親和性（Kd＝80ｎM）、飽和性で、特異的に結合する蛋白性の因子を見出した。この脳のアデノシン結合蛋白の分子量は500,000 ～ 1,000,000と考えられ、これまで他臓器で見出されたアデノシン結合蛋白のどれよりも大きな分子サイズを有する。肝、リンパ球、胎盤など他臓器で見出されたアデノシン結合蛋白は、過去一年の間に、全てhomocysteine hydrolaseと同一であることが報告されたが、我々の得た脳アデノシン結合蛋白は本酵素活性から分離されていた。調べた23ヶのアデノシン関連物質中purinergic agonistと思われる7ヶおよびantagonistと目される3ヶはアデノシン結合を阻害し、c-AMP形成反応からみてagonistにもantagonistにも属さないと思われる11ヶはアデノシン結合を阻害しなかった。以上の結果は、今回得られた脳アデノシン結合蛋白と脳c-AMP形成促進に働くアデノシン受容体が同一である可能性を示唆するものと思われる。

〈序論〉

微量作用物質としてのアデノシン（Ado）の役割が種々の組織で次第に認知されつつある(1)。Adoの中枢神経での役割を神経化学的に解明する一つの手段として、演者らは脳のAdo結合蛋白の検索を進めており、昨年の本学会でその一部を報告し、今回は、昨年の報告と同一蛋白（P-4）について、その後に明らかとなった性質を報告する。

〈方法〉

(1) P-4分画の精製ならびにAdo結合活性の測定は、昨年の報告通りである。(4)

(2) S-adenosyl homocysteine hydrolase活性の測定は、Uelandの報告（8）に従った。150mMリン酸緩衝液（pH 7.3）中で、3mM DL-homocysteineと^{14}C-adenosine（10μM）とを、酵素蛋白存在下で、37°C 60分間 incubate 後、PEI-cellulose TLC（Solvent system: i-butanol—ethanol—water ＝2：1：1）にて、S-adenosylhomocysteineを分離し、その放射活性を測定した。

〈結果〉

(1) Ado関連酵素との異同

P-4分画には、adenosine deaminase、adenosine kinase、adenosine phosphorylase 5'-nucleotidase等の活性は認められないことは、昨年報告した。一方、これまでAdo結合性蛋白、またはcyclic AMP-Ado結合蛋白として知られていたものが、実はS-

adenosylhomocysteine hydrolase と同一であることが過去一年の間に、ヒト胎盤（3）、リンパ芽細胞（3）、肝臓（6,8）等で示されている。われわれが、ラット脳から精製したP-4について、この点に関して検討したところ、最終段階で用いたSephadex G-200 カラム（1.1×140 cm）において、Ado結合活性と、S-adenosyl homocysteine hydrolase活性とは、完全に分離することが証明された（図1）。

(2)分子サイズ

脳のAdo結合蛋白は、Sephadex G-200（1.1×140 cm）ゲル沪過において、apoferritin（M.W. 450,000）と、blue dextran（M.W. 2,000,000）のほぼ中間で、β-galactosidase（M.W. 540,000）と、ほぼ同一位置に溶出される。

(3)他剤との拮抗

purine誘導体との拮抗については、昨年の日本生化学会[5]および本学会[4]で報告した。つまり、adenine nucleotide について調べたところ、その阻害活性の強さは Ado > AMP > ADP > ATP で、この順番はBurnstockの提唱するP1 purinergic receptor（2）に対するagonistの作用順位に一致した。一方、inosine, adenine には作用が無くadenosineのアミノ基，および ribose が活性を示す上で必須であることが示された。

今回新たに、10 種類の化合物についてその作用を調べた（表1）。その結果 adenosineのpurine環のN^6位置換体（6-benzylaminopurine riboside, 6-furfurylaminopurine riboside, Ado-EtONO_2）や2位のハロゲン置換体（2-Cl-adenosine）でも強い阻害活性を示し、1位（1-methyladenosine）や8位（8-Br-adenosine）

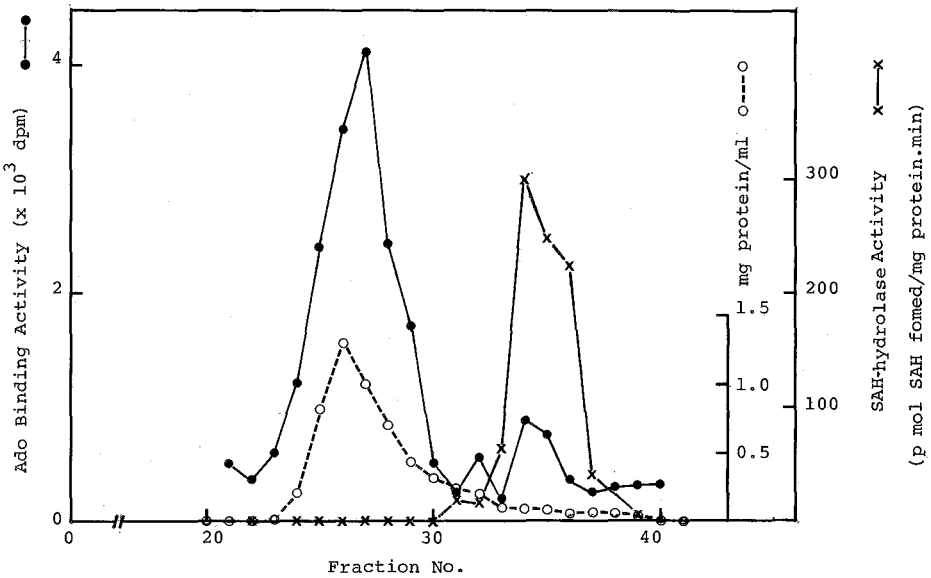


Fig. 1. Separation of ^{3}H-Ado binding protein from S-adenosylhomocysteine hydrolase on a gel filtration column. A 1-ml portion of the concentrated P-4 fraction was applied on a 1.1 X 140 cm column of Sephadex G 200 equilibrated with 20 mM Tris HCl, pH 7.5, containing 1 mM DTT and eluted with the same buffer. In each fraction (2.9 ml), ^{3}H-Ado binding, S-adenosylhomocysteine hydrolase activity and protein were assayed.

の置換では活性が消失した。N^6位置換体で活性があり、また活性を示すためにriboseが必須であることは、Ado-$EtONO_2$とadenine-$EtONO_2$との比較によっても示された。これらの結果はモルモット大脳皮質切片を用いて調べた際のC-AMP形成効果のagonistに於ける構造活性相関とよく一致する。一方、脳切片系でのadenosine作用のagonistとなるためには、2', 3'位の水酸基はcisであることが必要であり、trans体(9-β-D-arabinofuranosyl adenine)や、deoxy体(2'-deoxyadenosine, 3'-deoxyadenosine)はantagonistとして知られているが、これらの化合物は、^{3}H-Ado結合とよく競合した。

Table 1. Inhibition of ^{3}H-Ado binding

Compound added	% Inhibition at 3 μM	9 μM	30 μM
Adenosine	95		
AMP	67		
ADP	40		
ATP	20		
Adenine	NI	NI	NI
c-AMP	NI	NI	NI
Inosine	NI		
Guanosine	NI	NI	NI
6-Benzylaminopurine ribose	45		
6-Furfurylaminopurine ribose	36		
Ado-$EtONO_2$	78		
Adenine-$EtONO_2$	NI	NI	
2-Cl-Adenosine	75		
1-Methyladenosine	19		
8-Br-Adenosine	15		
9-β-D-Arabinofuranosyl adenine	32		
2'-Deoxyadenosine	45		
3'-Deoxyadenosine	41		
Theophylline	NI	NI	
Isobutylmethylxanthine	NI		
Diazepam	NI		
Tetranitroadenosine	NI		
N^6-Phenyladenosine	NI	NI*	10

NI: Not inhibited *: Tested at 15 μM

〈考察〉

我々はラット全脳より、high affinityで^{3}H-Adoを特異的に結合する成分を始めて見い出し(昨年の本学会[4])、それがトリプシン感受性であること等(昨年の生化学会[5])から蛋白性のものであることを明らかにした。

この結合は^{3}H-adenosine、蛋白量に対してsaturableで、反応時間、温度、pHに依存的である[6]。

また、このAdo結合蛋白はadenosine代謝酵素活性、つまり、adenosine kinase, adenosine phosphorylase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase活性を欠いている。今回新たにS-adenosyl homocysteine hydrolade活性とは分離し得ることが示された。

一方、肝臓、赤血球でadenosine結合蛋白、C-AMP/adenosine binding proteinが報告されてきたが、この蛋白質は①分子量が約18万であること ②^{3}H-adenosine結合活性をC-AMP, adenineが阻害する点 ③ゲル電気泳動的に単一になった蛋白がS-adenosyl homocysteine hydrolase活性を有する点、の3点で、今回我々の得た脳のAdo結合性蛋白質とは全く性質を異にしていると言える。

脳のAdo結合性蛋白の生理的意義は、①細胞質中のadenosineのreservoir ②細胞表層のadenosine受容体、などの可能性が考えられるが、その決定的証拠は現在得られていない。

調べた23種類の化合物のうち、大脳切片のC-AMP形成系でのpurinergic agonistと思われる7ヶおよびantagonistと思われる3ヶは^{3}H-AdO結合を阻害したが、どちらの作用も有しない化合物11ヶは阻害しなかった。これらの知見は、我々の分離した脳AdO結合蛋白とC-AMP形成に関与する受容体が同一である可能性を示唆しているように思われる。

薬理学的レベルにおいて、theophylline等methylxanthineはadenosine antagonistと考えられる場合も多いが、脳切片でのC-AMP形成の系では、必ずしもadenosine receptorに選択的とは考え難く(7)今回得られた脳のAdO結合蛋白には作用しない。他の唯一の例外として、N^6-phenyl adenosineは脳C-AMP形成の著明な促進作用があるにもかかわらず、AdO結合蛋白に対しては高濃度でわずかな阻害作用を示したにすぎなかった。

<文献>

1) Baer, H.P., & Drummong, G.I. (1979) "Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides", Raven Press, New York.

2) Burnstock, G. (1972) Pharmacol. Rev., 24, 509.

3) Hershfield, M.S., & Kredich, N.M. (1978) Science, 202, 757.

4) Odagiri, H., Henmi, J., & Shimizu, H. (1978)
第21回 日本神経化学会 抄録集 pp.145

5) Odagiri, H., & Shimizu, H. (1978)
第51回 日本生化学会 抄録集 pp.792

6) Saebo, J., & Ueland, P.M. (1978) FEBS Letters, 96, 125.

7) Shimizu, H. Ichishita, H., & Umeda, I. (1975) Mol. Pharmacol., 11, 866.

8) Ueland, P.M., & Saebo, J. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 585, 512.

30 シナプス伝達におけるアデノシン関連物質の生理作用とその分子機構（II）
—— 神経終末部におけるサイクリックAMPの上昇を介する神経伝達のfacilitationの可能性

黒田洋一郎 ・ 小林和夫
（都神経研・生化）

〔要約〕

1．モルモット嗅脳皮質切片をアデノシンとともにインキュベートした後，アデノシンを速やかにmedium中から除くと，観察されるシナプス後電位はcontrolよりも大きくfacilitationがみられた。
2．サイクリックAMPのアナローグもシナプス後電位をcontrolよりも大きくした。
3．嗅脳皮質切片から調製したシナプトゾーム中のサイクリックAMP量はmedium中のアデノシンにより増加した。このことは神経終末に"アデノシン・リセプター"とcoupleしているサイクリックAMP合成機構が存在することを示す。
4．以上のことから，シナプス間隙に増加したアデノシンは神経終末部のサイクリックAMP量を増加させることによって，長い時間経過（分の単位）をもったfacilitationを起させている可能性が示唆された。
5．ATPが他の伝達物質（Ach，NEなど）と共に，常にシナプス伝達に伴って放出されると考えられているところから，「その分解物であるアデノシンによる神経終末でのサイクリックAMPの上昇が，その後の刺激に対する伝達物質の放出量を増加させうる」という仮説は，Post-tetanic potentiation，Hetero-synaptic facilitationを説明する一般的モデルとなり得る。

種々の神経系において，ATPが他の神経伝達物質とともに刺激によって遊離され，その分解物であるアデノシン関連物質（アデノシン，5'-AMP，ADP，ATP）がシナプス間隙に増加する現象が知られている。哺乳動物の脳においても，ATPプールを^{14}Cで標識したシナプトゾームから，電気刺激，高カリウム刺激により，Ca^{2+}依存性の^{14}C-アデノシン関連物質の遊離がみられた（1.）。神経伝達に伴ってシナプス間隙中に増加したアデノシン関連物質による，短い時間経過をもつ（秒以下）神経伝達抑制作用については，カルシュウム・イオン関与の可能性を含めて，前年度の本大会などで報告した（2，3）。

一方，アデノシンは脳切片中のサイクリックAMP量を増加させる強い作用をもつが（4，5），アデノシンによって増加したサイクリックAMPの脳内細胞下分布，その生理的意義については，ほとんど報告がない。今回は，アデノシンが神経終末部のサイクリックAMPを増加させることを中心に，そのサイクリックAMPの増加が比較的長い時間経過（分のオーダー）をもつ神経伝達のfacilitationを起している可能性を検討した。

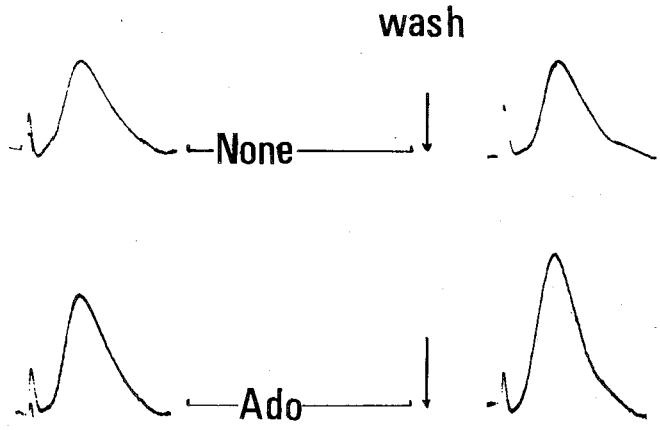
［実験方法］

嗅脳皮質切片（モルモット）はYAMAMOTO & McILWAIN（6）の方法に従って調製し，切片表面よりシナプス後電位を記録した。薬物添加前の安定した電位をcontrolとして，変化を%で表示した。嗅脳皮質切片からのシナプトゾームの調製はKURODA & McILWAINの方法（7）［GRAY & WHITTAKERの方法を改変（8）］に従い，シ

ナプトゾームのpelletをKrebs-Ringer-bicarbonate-glucose mediumにsuspendし，37℃で10分間preincubation後，5分間薬物を添加してincubationを続け，氷冷後30秒以内に遠心により mediumを除いた。シナプトゾーム中のサイクリックAMPは6%TCA抽出後，ラジオイミュノアッセイで定量した（9）。蛋白はTCA抽出残渣をMILLERの方法により定量した（10）。

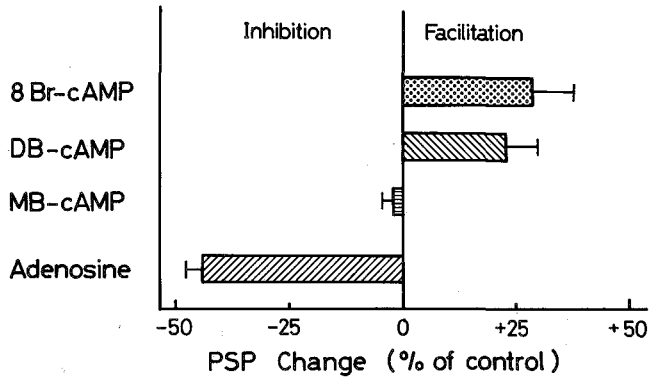
［実験結果と考察］

モルモット嗅脳皮質切片を100μMのアデノシンとともに10分間インキュベートし，そのあと速やかにmediumを除き2～3回新鮮なアデノシンを含まないmediumで切片を洗って，直ちにシナプス電位を記録すると通常20～30%の電位の上昇がcontrolに比してみられた。［図1］アデノシンによるシナプス伝達のfacilitation アデノシンを添加せずに，全く同様な操作をしても，そのような変化はみられなかった［図1］。Facilitation効果は30秒から数分間継続した。



嗅脳皮質切片を100μMのDibutyryl-cyclic AMP，Monobutyryl-cyclic AMP，8-Bromo-cyclic AMPなどのcyclic AMPのアナローグと共に5分間インキュベートし，シナプス後電位を観察したところ，100μMのアデノシンが顕著な抑制を示すのに比し，Dibutyryl，8-Bromo-cyclic AMPの場合は，facilitationを起した。［図2］

嗅脳皮質切片からシナプトゾーム分画を調製し，Krebs溶液中で充分な酸素の供給下でインキュベートすると，ATPのレベルは回復した。このシナプトゾームをアデノシン分解酵素であるアデノシン・デアミナーゼと共にpreincubateしたところ，シナプ



［図2］サイクリックAMPアナローグの効果

トゾーム中のサイクリックAMPは減少した。これにアデノシン・デアミナーゼ耐性であるアデノシンのアナローグ，2-クロロアデノシン（100μM）を添加すると，サイクリックAMP量は50%以上増加した［表1］。シナプトゾーム分画には当然アデニル・サイクラーゼを含む膜分画が混入しているが，このような膜分画は基質となるATPを持たない。従って，外からATPを与えないで測定したシナプトゾーム分画のサイクリックAMP量の変化は，(基質ATPを高濃度含み，かつ閉じた膜系をもっておりサイクリックAMPをすぐには外に放出しない)神経終末がreseal したシナプトゾームにおいて起った変化と考えられる。ATPを高濃度含んだシナプトゾームからは常に一定量のアデノシン関連物質が遊離されている（1）。したがって表1に見られる，アデノシン・デアミナーゼの効果は，通常のincubationの過程でmedium中にaccumulateしたアデノシンが，すでにシナプトゾーム中のサイクリックAMPを上昇させてしまっており，それがmedium中のアデノシンがデアミナーゼで分解されたことにより，basalなサイクリックAMPレベルにもどったと考えられる。デアミナーゼで分解されない2-クロロアデノシンによって，再びサイクリックAMPが増加したことは，シナプトゾームの表面膜（おそらく，シナプス前膜）に，サイクリックAMPの増減を起す機構（おそらく，アデニル・サイクラーゼ）とcoupleした"アデノシン・リセプター"が存在することを再に支持している。2・クロロアデノシンはほとんど膜を通過しない証拠がある。

Preincubation	Addition	Cyclic AMP (pmole/mg protein)
Krebs-Ringer only	None	11.5 ± 0.8
Adenosine Deaminase	None	8.2 ± 0.5
Adenosine Deaminase	2-Cl-Adenosine	12.4 ± 1.1

［表1］ アデノシン・アナローグによるシナプトゾーム中のサイクリックAMPの変化

［討論］

以上の結果は，シナプス間隙に増加したアデノシンがシナプス前膜にある"アデノシン・リセプター"を通じて神経終末中のサイクリックAMP量を増加させ，それによって，長い時間経過をもったfacilitationを起こしている可能性を示唆している。サイクリックAMPのアナローグによって，遊離される神経伝達物質の量の増加がみられるという知見（11，12）もこの仮説を支持している。

電気生理学での知見で，まだ物質レベルの説明がほとんど行われていない興味ある現象にPost-tetanic potentiation，Heterosynaptic facilitationがある。これらの現象は，ATPが，ほとんどすべてのシナプスにおいて，他の伝達物質（たとえばAch，NE）と共に放出されると考えられているところから，上記のアデノシン⇒サイクリックAMP⇒facititationの仮説によって一般的に説明が可能である。すなわち，高頻度刺激ではアデノシンの神経終末部での再取り込みによる不活

化が間に合わなくなり，シナプス間隙にアデノシンがaccumulateして，神経終末のサイクリックAMPを上昇させ，次にくる刺激による伝達を増強させると考えればPost-tetanic potentiationは説明がつく。また，隣接した2つのシナプスの片方が刺激されたとき，遊離されたアデノシンがdifuseして，他のシナプス前部のサイクリックAMPを上昇させれば，たとえその経路が刺激されていなくても，次のただ1つの刺激に対してもfacilitationを起すはずで，それがHetero synaptic facilitationであると考えれば良い。今回はATPの遊離が一般的であり，かつ神経終末部にサイクリックAMP上昇を起すことが証明されたのがアデノシンだけであるため，一次メッセンジャーとしてのアデノシンを強調したが，もちろん，他の系では神経伝達物質それ自身，あるいは他のmodulatorが一次メッセンジャーとなっている可能性は高い。従来，potentiation，facilitationは神経終末部でのカルシュウムの動きで説明されてきたが，神経終末中でのCa^{2+}濃度の調節機構とサイクリックAMP，（あるいはサイクリックGMP）の関係は，今後残された大きな課題の1つである。また前回報告した短い時間経過をもつアデノシンによる抑制効果との関係も異った時間経過をもつ，一見相反した二つの作用という点で，興味深い。

＊この研究の一部は第2回日本神経科学協会学術講演会で発表した。

References

1)Kuroda,Y. & McIlwain,H. (1974) J. Neurochem., 22 691-700.

2)Kuroda,Y. (1978) J. Physiol. Paris 74, 463-470.

3)黒田洋一郎，小林和夫（1978）神経化学 17，149-152.

4)Shimizu,H, Daly,J.W. & Creveling,C.R. (1969) J. Neurochem. 16, 1606-1619.

5)Sattin,A. & Rall, T.W. (1970) Mol. Pharmacol. 6, 13-23.

6)Yamamoto,C. & McIlwain,H. (1966) J. Neurochem. 13, 1333-1343.

7)Kuroda,Y. & McIlwain,H. (1973) J. Neurochem. 21, 889-900.

8) Gray,E.G. & Whittaker,J.P. (1962) J. Anat. 96, 79.

9)Kuroda,Y. & Kobayashi,K. (1978) Proc. Japan Acad. 54, Ser.B, 243-247.

10)Miller, G.L. (1959) Analyt. Chem. 31, 964.

11)Wooten,G.F., Thoa,N.B., Kopin,I.J. & Axelrod J. (1973) Mol. Pharmacol. 9, 178-183.

12)Cubeddu,L. ,Barnes,E. & Weiner,N. (1975) J. Pharmaco. Exp. Ther. 193, 105-127.

31 Ca^{2+}生体膜リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の活性化様式

川原康洋・水口龍次・吉川　潮
森　光寿・岩佐　寧・岸本　明
高井義美　（神大・医・II生化）

〔要　約〕

アセチルコリン（ムスカリン作用）やエピネフリン（α作用）などの作用時、標的組織細胞膜のイノシトールリン脂質が急速な代謝回転を受けるが、現在その役割については不明である。最近、我々は新しい種類の蛋白質リン酸化酵素（C酵素）を見い出したが、この酵素は通常細胞の可溶性分画に不活性型で存在し、生理的濃度のCa^{2+}によって生体膜のリン脂質に可逆的に結合して活性化される。C酵素の活性化に最も有効なリン脂質はイノシトールリン脂質とセリンリン脂質である。中性脂質や糖脂質は単独ではC酵素を活性化しない。しかし、不飽和脂肪酸を含有するジグリセリドには特異的にC酵素の反応速度を高め、必要なCa^{2+}濃度を顕著に低下させる効果がある。飽和脂肪酸からなるジグリセリドやその他のグリセリド、コレステロールにはこのような効果は認められない。細胞膜のイノシトールリン脂質が分解すると不飽和脂肪酸を含有するジグリセリドが生成されるが、このジグリセリドがC酵素の活性化を促進すると考えられ、C酵素はアセチルコリンやエピネフリンなどが作用した際のイノシトールリン脂質の代謝回転に共役して活性化されている可能性が強い。この機序ではCa^{2+}に対する親和性が著しく高まるため細胞内Ca^{2+}濃度が変化しなくてもC酵素は活性化されうる。活性化されたC酵素はラット大脳では膜分画に多くの基質を有し、中でも分子量20000前後の2種の蛋白質を最もよくリン酸化する。

Ca^{2+}はアセチルコリン（ムスカリン作用）やエピネフリン（α作用）など種々の神経伝達物質の作用発現に重要な役割を果している（1）。一方、細胞膜のリン脂質、特にホスファチジルイノシトール（PI）はこれらの神経伝達物質によって急速な代謝回転を受けており、この代謝回転は刺激の受容伝達に密接に関連していると考えられている（2）。我々は先にCa^{2+}と生体膜リン脂質によって活性化される蛋白質リン酸化酵素（C酵素）が体内各種臓器に広く分布しており、特に大脳に圧倒的に多く存在することを見い出した（3－5）。そこでラット大脳を用いてこのC酵素についてさらに詳細に解析したところ、本酵素の活性化には細胞内Ca^{2+}濃度の変化以外に、細胞膜のPIの代謝回転が直接に関与する可能性が明らかになった。今回はこのC酵素の活性化様式を中心に報告する。

〔実験材料と方法〕

C酵素はラット大脳から井上らの方法（6）で調整した。C酵素の活性は5×10^{-4}M Ca^{2+}と一定量のリン脂質の存在下で〔γ-^{32}P〕ATPからウシ胸腺H_1ヒストンへの^{32}Pの転移で測定した。脂質は薄層クロマトグラフィーでシングルスポットまで精製したものを用いた。なお、リン脂質は一部京都薬科大学の藤井達三先生、東京大学の山川民夫先生、群馬大学の林浩平先生から恵与していただいた。

Table I
Activation of C-kinase by Ca^{2+} and phospholipid

	Kinase activity (cpm/tube)
Complete system	17,900
" - C-kinase	0
" - Phospholipid*	540
" - Ca^{2+}	990

*Phospholipid was prepared from rat brain synaptic membrane as described previously (4).

Table II
Specificity of divalent cation for activation of C-kinase

Cation at 5×10^{-5} M	Kinase activity (%)
Ca^{2+}	100
Sr^{2+}	8
Mg^{2+}	0
Mn^{2+}	0
Co^{2+}	0
Zn^{2+}	0

Table III
Relative activities of various phospholipids on activation of C-kinase

Phospholipid added	Kinase activity (%)
Phosphatidylinositol	100
Phosphatidylserine	100
Phosphatidic acid	33
Phosphatidylethanolamine	8
Phosphatidylcholine	<1
Sphingomyelin	<1
Diphosphoinositide	<1
Triphosphoinositide	<1

〔実験結果〕

1) C酵素の活性化様式 —— C酵素の活性化にはCa^{2+}とリン脂質の両者が必要である（表1）。Ca^{2+}以外の2価金属イオンは無効である（表2）。リン脂質の中ではPIやホスファチジルセリン（PS）などの酸性リン脂質が最も有効であり、その他のリン脂質の効力は乏しい（表3）。リン脂質の代りに生体膜を用いてもC酵素は活性化される。この活性化の様式をシナプス膜を用いて解析した。10^{-4}M Ca^{2+}存在下とEGTAによってCa^{2+}を除いた状態でC酵素とシナプス膜を混ぜ合わせた後に10万×g，60分遠心分離し、上清と沈渣のC酵素活性を比較した。その結果を表4に示しているが、Ca^{2+}が存在しないとC酵素はほとんど上清に回収されるのに対して、Ca^{2+}が存在するとそのほとんどがシナプス膜に結合して沈渣に回収される。Ca^{2+}存在下でシナプス膜に結合したC酵素はEGTAでCa^{2+}を除くと再び上清に回収される。一方、ゲル沪過法を用いてC酵素とリン脂質の複合体形成の有無を調べた実験でもC酵素はCa^{2+}存在下で可逆的にリン脂質に結合して複合体を形成する。従って、C酵素は表4上段に示すようにCa^{2+}の存在下でシナプス膜のリン脂質に可逆的に結合して活性化されると結論される。

中性脂質や糖脂質は単独ではC酵素を活性化しないが、中性脂質の一種であるジオレインに

Table IV
Reversible attachment of C-kinase to membrane in the presence of Ca^{2+}

$$\underset{\text{inactive form}}{\boxed{\text{Enzyme}}} + Ca^{2+} + \text{Membrane} \rightleftarrows \underset{\text{active form}}{\boxed{\text{Enzyme-}Ca^{2+}\text{-Membrane}}}$$

	C-kinase in soluble fraction	C-kinase bound to membrane
$-Ca^{2+}$ (+EGTA)	92%	8%
$+Ca^{2+}$ (10^{-4}M)	7%	93%

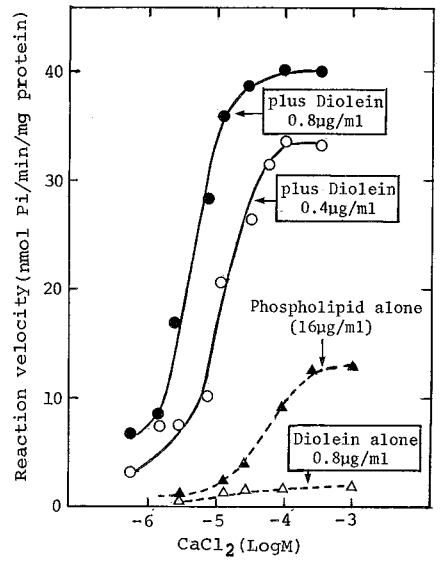


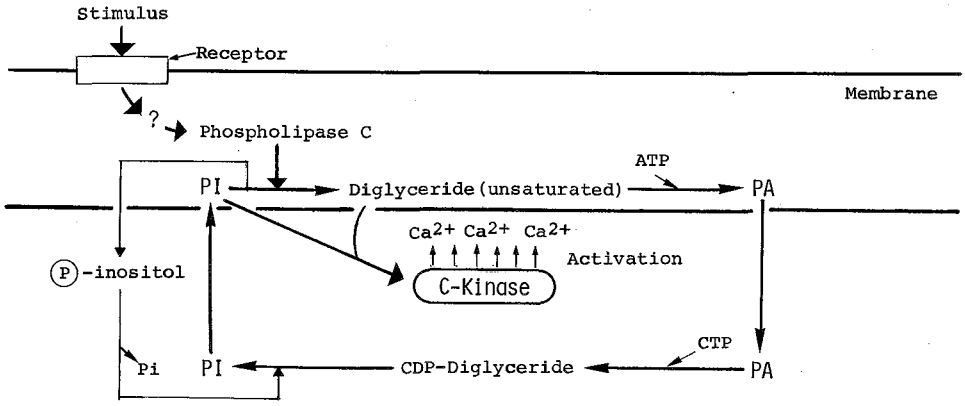
Fig.1 Effect of diolein on activation of C-kinase

はC酵素の活性化に必要なCa^{2+}濃度を顕著に低下させ、その反応速度を高める効果がある。図1にこのようなジオレインの効果を示した。リン脂質単独の場合Ca^{2+}に対するKaは7×10^{-5}Mであるのに対して微量のジオレインが共存するとCa^{2+}に対するKaは4×10^{-6}Mと低下し、反応速度は著しく促進される。表5に種々の合成グリセリドについてC酵素の活性化におけるCa^{2+}とリン脂質の有効性を高める効果を比較したが、ジオレインのみが有効であり、他のグリセリドやコレステロールは無効である。細胞膜のPIは通常アラキドン酸やオレイン酸などの不飽和脂肪酸を含んでいる。このPIが分解するとこれらの不飽和脂肪酸からなるジグリセリドが生成されることを考えると、C酵素の活性化反応として図2に示したような機序が考えられる。すなわち、アセチルコリンやエピネフリンなどの作用によって標的組織の細胞膜のPIが分解し、その代謝回転が促進するが、PIの分解によって生じるジグリセリドがCa^{2+}と未分解のPI、あるいはその他のリン脂質によるC酵素の活性化を促進する機序である。この場合C酵素の活性化に細胞内Ca^{2+}濃度の上昇を必ずしも必要としない点はきわめて重要であろう。

Table V
Specificity of neutral lipid for enhancement of phospholipid-dependent activation of C-kinase

Neutral lipid added		Ka for Ca^{2+} (10^{-6}M)	Reaction velocity*
Phospholipid alone	(16 μg/ml)	70	16
" + Triolein	(0.8 μg/ml)	70	18
" + Diolein	(0.8 μg/ml)	4	40
" + Monoolein	(0.8 μg/ml)	70	18
" + Tripalmitin	(0.8 μg/ml)	60	11
" + Dipalmitin	(0.8 μg/ml)	60	12
" + Monopalmitin	(0.8 μg/ml)	60	12

*nmol Pi/min/mg protein



PI: Phosphatidylinositol
PA: Phosphatidic acid

Fig.2 A possible mode of C-kinase activation

2) C酵素の作用点——図3にラット大脳をもちいてC酵素とcyclic AMP依存性蛋白質リン酸化酵素（A酵素）の基質蛋白質の細胞内分布を比較して示した。両酵素とも可溶性分画より膜分画をよくリン酸化するが、C酵素は特に膜分画を好んでリン酸化する。リン酸化した膜分画をSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後にオートラジオグラフィーを行って解析したところ、C酵素は多数の蛋白質をリン酸化し、中でも分子量20,000前後の2種の蛋白質を最もよくリン酸化する。

〔考察〕

現在、エピネフリン（β作用）やグルカゴンなどのペプチドホルモンはcyclic AMPをセカンドメッセンジャーとして、A酵素を介してその生理作用を遂行していることが明らかにされている（7）。一方、アセチルコリン（ムスカリン作用）やエピネフリン（α作用）においては、Ca^{2+}が細胞内伝達物質と考えられている（1）。またこれらの作用によって標的組織の細胞膜のPIが急速に代謝回転することが古くから注目されている（2）。しかし、Ca^{2+}の作用機構やPIの代謝回転の役割については現在なお明らかでない。我々の見い出したC酵素はその活性化にCa^{2+}とリン脂質の両者を必須とするが、今回の解析によってC酵素はこれらの神経伝達物質の作用時のPIの代謝回転に共役して活性化される可能性が示された。従来からこれらの作用時にはCa^{2+}が細胞内に流入し、細胞内Ca^{2+}濃度が上昇することによってその生理作用を遂行するのであろうと推測されている（2）。しかし、C酵素は一定量のCa^{2+}が存在すれば細胞内のCa^{2+}濃度が必ずしも変化しなくても活性化されうるので、これらの神経伝達物質はPIの代謝回転とC酵素の活性化を介して、Ca^{2+}の細胞内への流入を伴うことなく、その生理作用を遂行しうる可能性がある。もちろんC酵素は細胞内Ca^{2+}濃度の上昇によっても活性化されうる。またPIの代謝回転と細胞内Ca^{2+}濃度上昇の両者が相乗してC酵素を活性化する可能性もある。

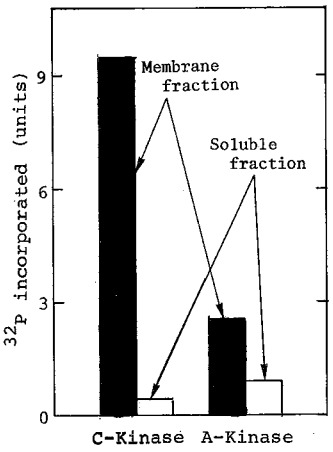


Fig.3 Phosphorylation of membrane and soluble fractions of rat brain

PIの代謝回転はPIを最初に分解するホスホリパーゼCによって調節されていると考えられている（2）。今後ホスホリパーゼCおよびC酵素の脂質との関係を解析することが、この種の受容伝達機構の解明にきわめて重要であることを提起したい。

〔文献〕

1. Rasmussen, H., and Goodman, D.B.P. (1977) Physiol. Rev. 57, 422-509
2. Michell, R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147
3. 森 光寿，岩佐 尊，川原康洋，山本正博，岸本 明，高井義美 (1978) 神経化学17, 13-16
4. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3692-3695
5. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979) J. Biochem. 86, 575-578
6. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., and Nishizuka, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7610-7616
7. Nimmo, H.G., and Cohen, P. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8, 145-266

32 ラット大脳シナプス膜画分からの酸性カルシウム結合タンパク質の単離とその性質

中村泰治・中浜隆之・中谷一泰
(昭和大・薬・生物)
竹田　稔　(昭和大・医・生化)

〔要約〕

ラット大脳皮質のシナプス形質膜リッチ画分から、カルシウムと結合能がある酸性タンパク質を単離した。シナプス膜リッチ画分を Lithiumdiiodosalicylate で可溶化し、50% フェノールで抽出した後、水層部分を Sephadex 6B でゲル沪過することにより、SDS-PAGE および等電点電気泳動で単一なバンドを示すタンパク質を得た。このタンパク質のアミノ酸組成は modulator protein と類似しているが、プロリン含量が2倍、セリン、グリシンが多く、アルギニンが少ない。分子量は、SDS-PAGE から23000で、これは modulator の分子量18000より大きい。N末端アミノ酸は、ブロックされていた。等電点は4.3であった。タンパク質1モルあたり3.3モルのカルシウムと結合し、その解離定数は $3.46\times10^{-5}M$ であった。また、フォスホジエステラーゼの活性化能がある。このタンパク質は、同じ方法により、脳の粗シナプトゾーム画分からも得られるが、脳の可溶性画分あるいは rat liver のホモジェネートからは得られなかった。以上の結果より、今回単離した酸性タンパク質と modulator protein との関連性について検討する。

Ca^{2+}-dependent regulator protein(modulator protein or calmodulin)は、脳のホスホジエステラーゼの活性化因子として垣内ら(1)および Cheung ら(2)により1970年、別々に発見されたがその後このタンパク質は種々の組織において、脳アデニレートサイクレース(3)等各種の Ca^{2+} 依存性酵素の regulator として働いていることが明らかになった。このタンパク質は細胞質に存在する soluble protein であるが、垣内らは最近、細胞の顆粒部分に reversible に結合すること(4)、また、さらに EGTA で solubilize されない膜結合型 modulator も存在することを示した(5)。

我々は、シナプス形質膜のタンパク質を単離し、その構造と機能を知る目的で研究をはじめたが、今回、シナプス膜から Ca^{2+} との結合能があり、ホスホジエステラーゼを活性化する分子量23000の酸性タンパク質を単離したので、その化学的物理的性質について報告する。

〈実験方法〉

(1) Synaptic plasma membrane fraction の調製

Abood らの方法(6)を簡略にして行なった。ラット大脳を 0.32M sucrose 中でホモジナイズし、低速遠心で核を除き、15000×g、20分間遠心して粗シナプトゾーム・ミトコンドリア画分(P2)を得た。P2を低張処理したのち、sucrose 1.2M、1.0M、0.8M、0.6M、0.4M に重層し、88000×g、75分間遠心した。各境界面の沈渣について marker enzyme の活性の測定と電子顕微鏡検査を行なった結果、sucrose 0.8M と 1.0M の界面の沈渣が最も多くシナプス膜を含むことを認めた。

(2)酸性タンパク質の分離

上記のシナプス膜リッチ画分を0.3M Lithiumdiiodosalicylate(LIS)、0.05Mトリス塩酸(pH7.5)に混合(タンパク質25mg/ml)し、室温15分間、さらに2倍容の精製水を加えて4°Cで10分間撹拌して膜を可溶化した。これを17000×g、30分間遠心後、上清に50%フェノールを加え撹拌後遠心し、その水層部をとって水に対して透析し、凍結乾燥後、エタノールで洗浄してLISを除いた。これを25mM NaCl、5mMリン酸緩衝液に溶解後、Sepharose 6Bカラムでゲル沪過を行った。

(3)酸性タンパク質の化学的、物理的性質の分析

アミノ酸分析はタンパク質を6N塩酸で加水分解後、KLA5B日立アミノ酸自動分析器で行った。N末端アミノ酸の分析はダンシル法(7)で行った。等電点の測定はアンフォラインを用いた等電点電気泳動によって行った。ホスホジエステラーゼ活性は、Kobayashiら(8)の方法によって測定した。カルシウムの結合数と解離定数はWongの方法(9)に従って平衡透析により決定した。

〈結　果〉

(1) Ca^{2+}結合タンパク質の単離

シナプス膜画分のタンパク質の90%以上が、0.3MLISにより可溶化された。この溶液を50%フェノールで抽出し、水層のタンパク質をSDS-PAGEで分析した結果majorな1種のタンパク質とminorな数種のタンパク質が含まれていた(図2b)。これを、さらにSepharose 6Bカラムでゲル沪過すると溶出液のタンパク質は図1の様に、3つのピークに分けられた。各ピークを採取し、精製水に対して透析後、SDS-PAGEを行った。その結果、ピークⅠは凝集した高分子量のタンパク質であり、ピークⅡはPASで染色される2本のバンドを含む7種類のタンパク質を含み、ピークⅢはPASに染色されない単一のタンパク質のみを含むことがわかった(図2C)。その分子量は23000であった。また、このタンパク質はP2画分からも直接、同じ方法で収量よく(脳100gあたり10mg)単離することができたので、カルシウムの結合実験にはこのタンパク質を用いた(図2a)。

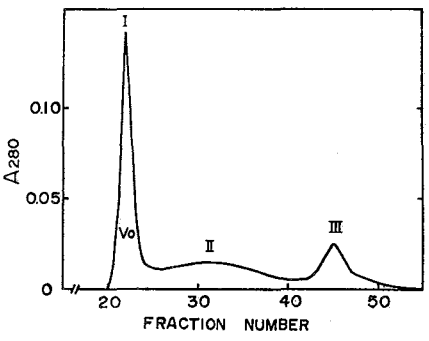


図1. シナプス膜画分をLIS-フェノール法で処理して得られたタンパク質のSepharose-6Bによるゲル沪過。カラムは2×95cm、溶出液は25mM NaClを含む5mMリン酸緩衝液。Voはvoid volume。

第3図には、大脳細胞希画分および肝ホモジネートをLIS-フェノール法で同様に処理して得られたタンパク質試料をSDS-PAGEで分析した結果を示した。図に示した様に、ピークⅢのタンパク質に相当するタンパク質は、シナプス膜以外にはほとんど検出されなかった。

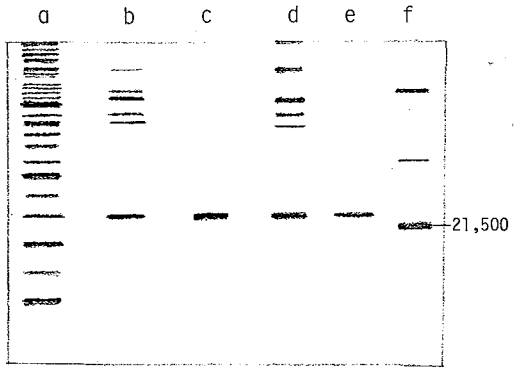


図2. 精製の各ステップにおける試料のスラブゲル電気泳動のパターン。a, シナプス膜画分 b, シナプス膜をLIS-フェノール処理したもの c, シナプス膜画分から単離したタンパク質 d, P2画分をLIS-フェノール処理したもの；e, P2画分から単離したタンパク質；f, 標準タンパク質。電気泳動は15%アクリルアミド、0.1% SDSを用いLaemmliの方法(10)で行なった。ゲルは3mA/gelで泳動後、クマシブルーで染色した。

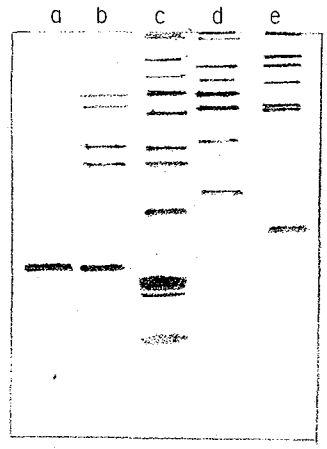


図3. 各細胞画分からLIS-フェノール法で調製した試料のスラブゲル電気泳動のパターン。a, 単離した酸性タンパク質；b～e, それぞれ、シナプス膜(b), 可溶性画分(c), 核(d), 肝ホモジェネート(e)をLIS-フェノール処理して得られた試料。電気泳動の条件は図2と同じ。

(2)アミノ酸分析と等電点

本タンパク質のアミノ酸組成をmole%で表1に示した。modulator proteinとアミノ酸組成が非常に類似しているが、Proが2倍多いほか、Ser. Glyも多くArgが少ない点が異なっている。N末端アミノ酸はダンシル法で調べたがブロックされていた。また、このタンパク質の等電点は4.3であった。

(3) Ca^{2+}結合活性およびホスホジエステラーゼの活性化

単離したタンパク質に対するカルシウムの結合数と解離定数を平衡透析法により求めた。各カルシウム濃度におけるカルシウム結合量をKlotzの式に従ってプロットすると図4の直線が得られた。これより求めたprotein 1分子あたりのカルシウムの最大結合数は3.3個で、その解離定数は、$3.46\times10^{-5}M$であった。また、このタンパク質は脳ホスホジエステラーゼ活性をカルシウム存在下で活性化した。

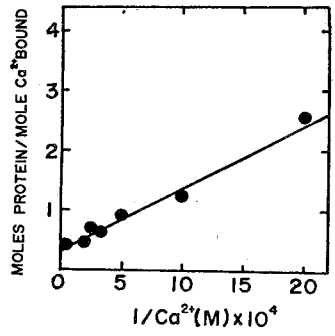


図4. 酸性タンパク質によるカルシウムの結合のKlotzのプロット。測定は平衡透析法で行なった。

表1. 各種カルシウム結合タンパク質のアミノ酸組成

(mol %)

Amino acid	Present study	Bovine brain modurator protein (11)	Chick brain CBA Ⅱ (12)	Bovine brain S-100 (13)	Rat brain Ⅸ (6)	Rabbit muscle troponin C (14)
Lys	4.2	5.0	5.8	9.5	2.4	5.7
His	0.6	0.6	0.7	4.2	0.8	0.6
X		0.6				
Arg	2.6	4.4	4.1	1.1	1.8	4.4
Asp	15.7	15.1	16.7	11.6	11.6	13.9
Thr	6.7	7.5	7.6	3.7	7.3	3.8
Ser	4.4	3.1	2.9	5.8	9.3	4.4
Glu	19.2	18.2	18.7	18.9	14.7	19.6
Pro	2.6	1.3	1.7	0	1.2	0.6
Gly	10.0	7.5	7.3	5.3	12.1	8.2
Ala	7.4	7.5	7.3	6.3	9.4	8.2
Half Cys	0	0	0	2.1	0.7	0.6
Val	6.0	5.0	4.8	7.9	7.4	4.4
Met	5.1	6.3	5.3	2.6	0.8	6.3
Ile	4.8	5.0	5.0	3.2	5.3	5.7
Leu	5.3	6.3	5.9	9.5	9.9	5.7
Tyr	1.0	1.3	1.1	1.6	2.3	1.3
Phe	4.5	5.0	5.1	6.3	3.7	6.3
Trp	0	0	0	0.5		0

X; trimethyllysine

〈考　察〉

シナプス膜リッチフラクションから単離した酸性タンパク質は、Caイオンと結合し、かつホスホジエステラーゼを活性化するので、これまでに報告されている *modulator protein* との関連性が問題である。同じ点としては（上記の生理活性の他に）アミノ酸組成が類似していること、N末端アミノ酸がブロックされていること、等電点が等しいことであるが、異なる点としてはアミノ組成のうちプロリン、セリン、グリシンの含量が多く、アルギニンが少なく、分子量が *rat* の *modulator protein* の1800(15)より大きいことである。また、細胞質画分にはなく、膜分画からのみ分離された点も異なっている。したがって、今回、単離した酸性タンパク質が①従来報告されている *modulator protein* と異なったタンパク質であるのか、②垣内らの報告している *membrane bound modulator* と何らかの関係があるのか、あるいは、③調製法に起因する違いが出てきたのかという可能性が考えられ、現在、これらについて検討を行なっている。

〈文献〉

(1) Kakiuchi, S. et al (1970) Proc. Jap. Acad. 46, 589-592 (2) Cheung, W. Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 533-538 (3) Cheung, W. Y. et al. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1055-1062 (4)寺島佳子 et al. (1977) 神経化学 16, 233-236 (5) Teshima, Y. et al. (1973) J. Cyclic Nucleotide Res. 4, 219-231 (6) Abood, L. G. et al. (1976) Biochim. Biophys. Acta 443, 414-427 (7) Gray, W. R. (1972) in Methods in Enzymology vol. 25, p 128 (8) Kobayashi, R. et al. (1978) Biochim. Biophys. Acta 539, 411-419 (9) Maclennan, D. H. et al. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1231-1235 (10) Laemmli, U. K. et al. (1970) Nature 227, 680-685 (11) Watterson, D. M. et al. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4501-4513 (12) Kato, Y. et al. (1977) J. Biochem. 82, 43-51 (13)Cannies, P. S. et al. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6276-6283 (14) Collins, J. H. et al. (1973) FEBS Lett. 36, 268-292 (15) Miyake, M. et al. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 181, 39-45

33 脳の顆粒性モジュレーター結合蛋白の可溶化と部分精製

祖父江憲治 ・ 村本芳彦 ・ 垣内史朗
(阪大・医・高次研)

〔要 約〕

Ca^{2+}-dependent Modulator Protein (MP)は，Ca^{2+}受容体蛋白の一つとしてCa^{2+}の生理機能をmediateするものと考えられているが、この蛋白は脳に殊に多量に存在する。我々は、脳に存在するMPの25～40%がCa^{2+}依存性に脳顆粒分画に結合することを見い出している。今回、[^{3}H]-MPを使用してこの顆粒性Modulator Binding Protein (MBP)を可溶化し、その部分精製を行った。

脳顆粒分画を0.6M KCl→Triton X-100→デオキシコール酸→グアニジンにて順次抽出した。Triton X-100により顆粒性MBPの約50%、次いでグアニジンにより残りの50%が可溶化された。Triton X-100抽出液をDEAE-celluloseならびにCM-Sephadexにより、4種類(この4種類を併せて全顆粒性MBPの7%)のMBPを分離し得た。グアニジン抽出液はゲルクロマトグラフィーにより14～15,000 dalton と 2～30,000 dalton の2種のMBPを分離し得た。2種のMBPの収量は、全顆粒性MBPの約50%であった。

このMBPがCa^{2+}とMPによって活性化される蛋白あるいは酵素である可能性が考えられ、現在検討中である。

Ca^{2+}-dependent Modulator Protein (MP)は、脳組織よりphosphodiesterase のCa^{2+}-依存性活性化因子として発見された[9),2)]。その後の研究により、この蛋白はadenylate cyclase[1)]，赤血球膜及び脳シナプス形質膜の(Ca^{2+}+Mg^{2+})-ATPase[6),8),14)]を活性化することが見い出された。また、骨格筋と平滑筋のmyosin light chain kinase[12),18)]及び骨格筋のphosphorylase b kinaseのcomponent[3)]であることも示された。stoichiometricな見地からみて、上記の諸酵素とinteractするMPの量は、脳における全MPのごく一部で充分である。このことから、MPとinteract (bind)する未知の蛋白あるいは酵素の存在が、脳において特に強く示唆されて来た。最近、Wang et al とKlee et alの2つのグループが可溶性Modulator Binding Protein (MBP)を分離精製した[12),13),10)]。一方、我々の研究室では、可溶性分画の25～40%のMPが脳顆粒分画へCa^{2+}依存性に結合することを見い出し[17)]、さらに[^{3}H]-MPを合成しその結合様式を検討して昨年の本学会で報告した[15)]。今回、リガンドとして[^{3}H]-MPを使用して、脳顆粒分画よりMBPを可溶化し部分精製を行ったので報告する。

<実験方法>

1．[^{3}H]-MPの合成

昨年の本学会で報告したと同様の方法で合成した[15)]。

2．脳顆粒分画の調整

顆粒性MBPの組織分布では、大脳・副腎が最も多く、また大脳の細胞内分布では、シナプトゾーム分画ことにシナプス形質膜に多いことがわかった[16)]。そこで、脳顆粒性

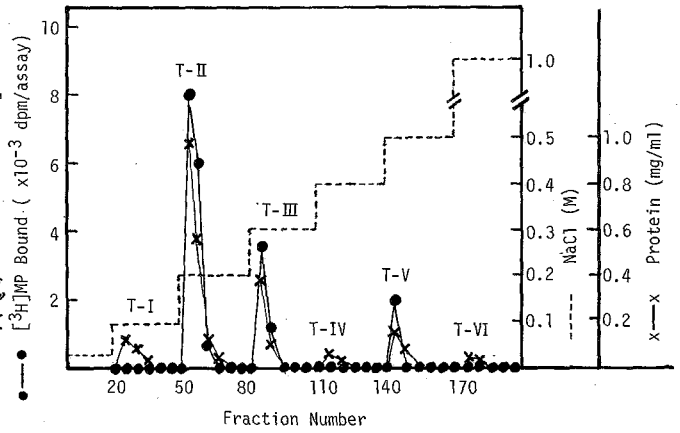
画分の調製は、昨年本学会で報告した調製法を改良し、シナプトゾーム・ミクロゾームそれにミエリン分画の一部を得る方法を用いた。

牛脳を7倍量の10mM Tris·HCl (pH7.5), 10mM 2-mercaptoethanol, 0.5mM $MgSO_4$, 1mM EGTAに pepstatine A及び PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)を含む buffer にてホモゲナイズし、3000gで15分間遠心し上清をえた。この上清を105,000gで60分間遠心し沈殿を得、上記bufferにて懸濁し、再度105,000gで60分間遠心した。この操作をもう一度くり返して、脳105,000g顆粒分画を得た。

3. 脳顆粒性MBPの可溶化

種々の界面活性剤を使用して、顆粒性MBPの可溶化を試みた(Triton X-100, Lubrol PX, デオキシコール酸, 0.6M KCl, 0.6M KI, 尿素, グアニジン)。可溶化率は、グアニジン > 尿素 > Triton X-100 ≫ Lubrol PX の順であり、デオキシコール酸, 0.6M KCl, 0.6M KIでは可溶化しなかった。そこで、上記界面活性剤を組み合わせて、0.6M KCl → Triton X-100 → デオキシコール酸 → グアニジンの順に段階的に可溶化を行った。可溶化は全て4°Cにて、0.6M KClは一昼夜、Triton X-100 (2%), デオキシコール酸(1~3mg/mg protein), グアニジン(6M, pH5.5)は2時間行った。

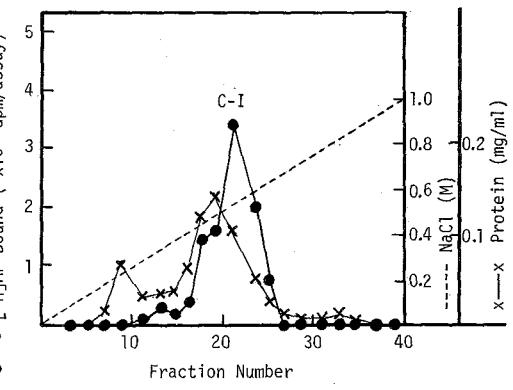
Fig. 1 DEAE-cellulose column chromatography of MBP solubilized with Triton X-100



4. 可溶化したMBPの定量法

可溶化したMBPは、界面活性剤を除去するためTriton X-100による抽出物では、DEAE-celluloseあるいはCM-Sephadex A-50によりTritonを除去し、溶出されたMBP分画をサンプルとした(以下Tritonサンプルと略)。グアニジン抽出物は、Sepharose CL-6Bにてゲルクロマトグラフィーを行い各分画に分け、透析後105,000gにて遠心し得られた上清をサンプルとした(グアニジンサンプル)。可溶化したMBPの定量法には、Polyethylene glycol (PEG)法及びゲル濾過法を試みた。

Fig. 2 CM-Sephadex column chromatography of MBP solubilized with Triton X-100



両者ともによく一致した結果を得たが、便宜上PEG法を用いて定量を用った。使用したPEG濃度はTritonサンプルで12%, グアニジンサンプルで9%である。本法による定量法で、各サンプル中のMBPに対する[3H]MPの結合は、Ca^{++}依存性であり過剰のnative MPにより displaceされる。

5. その他

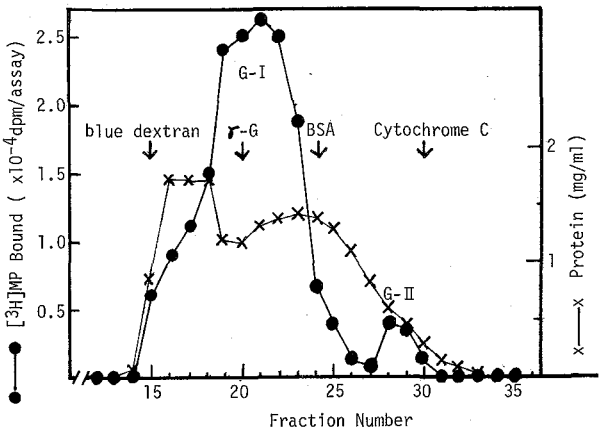
蛋白は Lowry 法により定量した[11]。但し、MP は、micro-builet 法により定量した[7]。顆粒分画及び可溶化各段階での沈渣への [³H]-MP の結合は、昨年の本学会で発表した方法により定量した[15]。

<結果>

脳顆粒分画を 0.6M KCl にて一昼夜 4°C で処理しても、extrinsic protein は除去されるが、顆粒性 MBP は可溶化されない (Table I)。

次いで、2% Triton X-100 にて 4°C で2時間処理すると、40% の蛋白と 50% の MBP が可溶化される。この Triton 抽出物を DEAE cellulose でカラムクロマトグラフィーした (Fig. 1)。MBP は、200, 300, 500 mM NaCl にて溶出される (各々のピークを T-II, T-III, T-V とした)。T-II は全顆粒性 MBP の 2.6%, T-III は 0.9%, T-V は 0.6% であった。さらに DEAE-cellulose の通り抜け分画と 30mM NaCl washing 分画を phosphate buffer (pH 7.4) に透析後、CM-Sephadex A-50 でカラムクロマトグラフィーを行い、MBP の単一ピークをえた (C-I) (Fig. 2)。C-I は MBP の 2.7% を占める。

Fig. 3 Sepharose CL-6B column chromatography of MBP solubilized with 6M guanidine·HCl(pH 5.5)



Triton X-100 処理後の残渣をデオキシコール酸処理しても、蛋白は可溶化されるが、MBP は可溶化されない (Table I)。

さらに、デオキシコール酸処理後の残渣を 6M グアニジン (pH 5.5) で処理し、Sepharose CL-6B カラムでゲルクロマトグラフィーを行った (Fig. 3)。各分画の透析・遠心後の上清中の MBP を定量した結果、G-I (全顆粒性 MBP の 44.2%) と G-II (3.0%) の2つのピークをえた。

以上の結果をまとめたのが Table I である。Triton X-100 により可溶化された約 50% の MBP のうち、DEAE-cellulose と CM-Sephadex で回収された MBP は 10% に満たず、残りの約 40% は Triton X-100 存在下でカラムに吸着されないが、一度吸着したものがカラムから溶出されないか、Triton X-100 により MBP の MP に対する結合能が消失したかあるいは、PEG 法による定量で MBP-[³H]MP complex が検出しえないかのいずれかであるが、現在これらの可能性を考慮して検討中である。グアニジ

Table I. Summary of solubilization and partial purification of particulate MBP from bovine brain

samples	protein mg (% of control)	specific activity of MBP ug[³H]MP bound/mg prot.	total MBP ug[³H]MP bound (% of control)
None (control)	246.5 (100)	1.41	347.6 (100)
0.6M KCl pellet	228.0 (92.1)	1.64	373.9 (107.6)
Triton X-100 pellet	129.6 (52.6)	1.34	173.7 (50.0)
T-II			9.0 (2.6)
T-III			3.0 (0.9)
T-V			2.0 (0.6)
C-I			9.5 (2.7)
DOC	99.9 (40.5)	1.62	161.8 (46.5)
guanidine treatment			
G-I			153.7 (44.2)
G-II			10.6 (3.0)

ンにより可溶化されたMBPは、ゲルクロマトグラフィー後全量回収された。G-Iは推定分子量が約14～150,000 dalton であり、G-II は2～30,000 dalton である。

Table II Amount of MP and MBP in bovine brain

Protein	Molecular weight	Amount (mg/kg)
modulator protein a)	17,500	300-400
particulate MBP(G-I) b)	14－150,000	350-400
MBP(heat-labile) c)	85,000	52
MBP(heat-stable) c)	70,000	0.2
phosphodiesterase c)	150,000	10

a) From Teshima et al. (17)
b) Calculated from our results
c) From Sharma et al. (12)

〈考察〉

MP は単細胞生物から哺乳類に至るまで広くその存在が確認されている。化学構造上筋肉のTroponin Cに極めて類似することより、両者の分子進化上の類縁が示唆されている。またMPの組織分布では脳にその含量が最も多い。前述の如く、MPは細胞内で種々の生物作用を示すことが知られているが、これら全ての活性に必要なMPは脳を例に上げれば、ほんの一部にすぎない。このようにごく最近まで、MPの生物学的意義については不明な点が多かった。最近、Wang et al.[2][3]とKlee et al[10]は、脳可溶性画分よりMBPを分離精製した。Wang et al. の計算によるとこの2種類のMBPは合せて52.2 mg protein/kg bovine brain である。一方、我々の見い出した顆粒性MBPのうちグアニジンで可溶化されるG-I (M.W. 14-150,000)は、350-400 mg/kg bovine brain と計算され、今までに知られたMBPのうちで最大の値である。

現在、可溶化したMBPの結合様式についての検討と分離精製を行い、既知の蛋白及び酵素類との同一性を検討中である。

〈文献〉

1) Brostrom, C.O. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 64-68, 1975
2) Cheung, W.Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 533-538, 1970
3) Cohen, P. et al: FEBS Lett., 92, 287-293, 1978
4) Dobrowska, R. et al: Biochemistry, 17, 253-258, 1978
5) Desbuquois, B. & Aurbach, G.D.: J. Clin. Endocr., 33, 732-738, 1971
6) Gopinath, R.M. & Vincenzi, F.F.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 1203-1209, 1977
7) Itzhaki, R.F. & Gill, D.M.: Anal. Biochem., 9, 401-410, 1964
8) Jarrett, H.W. & Penniston, J.T.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 1210-1216, 1977
9) Kakiuchi, S. et al: Proc. Japan Acad., 46, 587-592, 1970
10) Klee, C.B. & Krinks, M.H.: Biochemistry, 17, 120-126, 1978
11) Lowry, O.H. et al: J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951
12) Sharma, R.K. et al: J. Biol. Chem., 254, 4276-4282, 1979
13) Sharma, R.K. et al: Can. J. Biochem., 56, 598-604, 1978
14) Sobue, K. et al: FEBS Lett., 99, 199-202, 1979
15) 祖父江ら：神経化学， 17, 29-32, 1978
16) Sobue, K. et al: FEBS Lett. in press, 1979
17) Teshima, Y. & Kakiuchi, S.: J. Cyclic Nucl. Res., 4, 219-231, 1978
18) Yagi, K. et al: J. Biol. Chem., 253, 1338-1340, 1978

34 視細胞杆体細胞への^{45}Caの取り込み
—— ATP-induced ATP-dependent Ca-uptake ——

郭　哲輝・林　要喜知・秋山万里子
三木直正　（金大・がん研・薬理）

〔要　約〕

食用ガエルより調整した杆体細胞外節ディスク膜を用いて^{45}Ca-uptakeを検討し、次の様な知見を得た。

1）ディスク膜へのCa-uptakeは、ATP濃度、$CaCl_2$濃度を変える事により、各々、高親和性と低親和性の二つの成分を認めた。

2）ATP以外に、GTP, CTP, UTPもCa-uptakeを促進した。

3）ディスク膜を4°C、あるいは−20°Cで保存すると^{45}Ca-uptake能は、著明に減少するが、この際ATPを共存させておくとCa-uptake能は、保持されるのみならず再活性化が認められた。

4）この再活性化（ATP-induced ATP-dependent Ca-uptake）は、ATP, Mg^{++}存在下4°Cで数分間プレインキュベイションすると起こり、可逆的であった。又、ATP, AMP以外のヌクレオタイドには、再活性化能はなかった。

以上の結果は、視細胞におけるATPがエネルギー源として働いている以外に、Ca^{++}の動きを調節している可能性を示唆するものである。

視細胞外節内のディスク膜に存在する光受容物質（ロドプシン）が、光刺激を受けると視細胞は、脱分極状態より過分極状態に移行する。この際、電気生理的には、Na^+流入の減少が認められている。[6,17]

視細胞形質膜は、形態的にはディスク膜と不連続である。そこで、ディスク膜が受け取った光刺激が、どの様な様式により形質膜でのNa^+流入の抑制を引き起こすのかが問題となっている。視細胞内に二つの媒介物質が考えられており、現在のところ、次の様な可能性が提唱されている。一つは、細胞内c-GMP含有量の変動であり、光によりディスク膜上のphosphodiesteraseが活性化されること[14,18]、他の一つは、"Ca-説"で、光によりディスク膜より放出されたCa^{++}が、Na^+の流入を抑えるという考えである。[3,5,9,11,13] 主として、前者は生化学的実験より、後者は電気生理的実験より支持されている。我々は、ディスク膜が多量のCa^{++}を含むこと[7]、さらに、光刺激により視細胞内のATPやGTP含有量が低下するという報告等より[1,2,4]カエル杆体細胞外節ディスク膜を用いて^{45}Caの動きについて検討を行った。

—実験方法—

暗順応させた食用ガエル（*Rana Catesbiana*）よりディスク膜を次の様にして調整した。[15] 剥離した網膜を43%(w/w)庶糖中で振トウ後、80,500×g, 40分間遠心し、その浮遊物を20mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)にけん濁し、さらに、13,000×g, 5分間の遠心で得られる沈渣を20mM Trisでホモゲナイズし標品として使用した。

Ca-uptake：　ディスク膜を50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100mM KCl, 50μM Ouabaine, 2mM $MgCl_2$, 1mM ATP-Tris, 10^{-5}M $CaCl_2$（^{45}Ca, 0.5μCi/2ml of tube）の反応条

Fig.1 Effects of ATP and GTP on Ca-uptake by R.O.S.

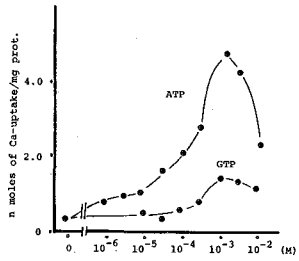


Fig.2 Effect of $CaCl_2$ on Ca-uptake by R.O.S.

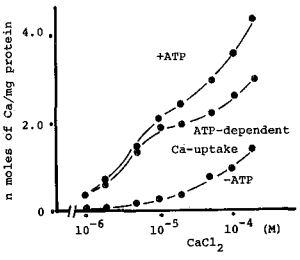


Fig.3 Effects of phosphate compounds on Ca-uptake by R.O.S.

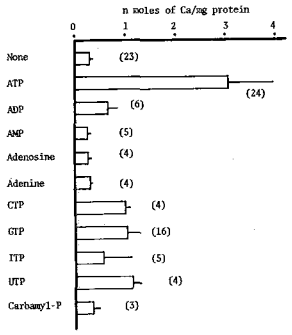
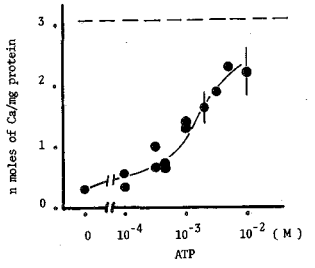


Fig.4 Protecting effect of ATP on Ca-uptake by frozen R.O.S.



件下に添加し，37°C，5分間インキュベイション後 ^{45}Ca-uptake量を，[10] ミリポァフィルター法で測定した。

ディスク膜への Ca-uptake 能の保持と再活性化：

Ca-uptake 能の保持の場合は，ディスク膜を10mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) と種々の濃度の ATP と，再活性化の場合は，さらに，2mM $MgCl_2$ を添加し，4°C，5分間放置後，Ca-uptake 能を調べた。たん白量は，Lowry 法に基づいた。[12]

すべての操作は，暗赤色光の下で行った。

—実験結果—

1) ディスク膜への Ca-uptake 能の性質

ディスク膜への Ca-uptake は，約2~3分間のインキュベイションで最大値に達し，5分間では完全に定常状態に達した。(3.057±0.941 nmoles of Ca/mg prot.) Fig. 1 は，Ca-uptake 量と ATP 濃度との関係を示したもので少なくとも二成分を示した。各々，約 10^{-5} M (GTP と競合的拮抗を示す)，1mM が飽和濃度であった。一方，2mM 以上の ATP は著明な Ca-uptake の阻害を示した。GTP も Ca-uptake を引きおこすが，ATP に比べその効果は約 1/4 で，一成分からなっていた。Ca-uptake と Ca^{++} 濃度について示したのが Fig. 2 である。ディスク膜への ATP-dependent Ca-uptake は，Ca^{++} に対して高親和性 ($Km \fallingdotseq 3\mu M$) と低親和性 (Km は 100μM 以上) の二つが存在する。又，$MgCl_2$ の至適濃度は，2mM であった。

ATP 及びその関連物質の Ca-uptake に対する影響を調べたのが Fig. 3 である。CTP，GTP，UTP の効果は，ATP に比べ弱いが有意に Ca-uptake 量を増加させた。なお，ディスク膜への ATP-dependent Ca-uptake と Mg^{++}-Ca^{++}-ATPase 活性との相関関係は，今のところ得られていない。

2) ディスク膜の Ca-uptake 能の保持

−20°C，4時間凍結するとディスク膜への ^{45}Ca-uptake 能は，ほぼ完全に消失するが，この際，ATP を共存させると Ca-uptake 能は保持され，その効果は，ATP 濃度に依存していた (Fig. 4)。一方，10^{-4}M $CaCl_2$ 1mM $MgCl_2$，10^{-4}M DTT 等は，無効であった。

3) ディスク膜の Ca-uptake 能の再活性化

Fig. 5 に示すように，ディスク膜への ^{45}Ca-uptake 能の減少は，4°C で保存してもみられるが，この際

Fig.5 Reactivating effect of ATP on the decreased ATP-dependent Ca-uptake in R.O.S. by aging

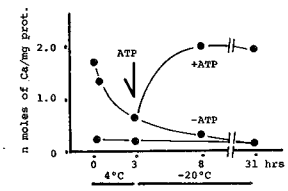


Fig.6 ATP-induced ATP-dependent Ca-uptake

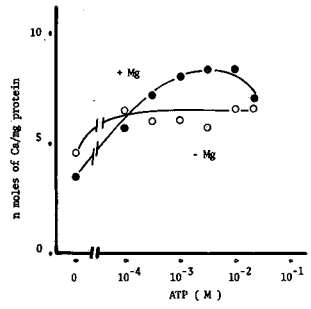


Fig.7 Time courses of ATP-induced ATP-dependent Ca-uptake and its reversibility

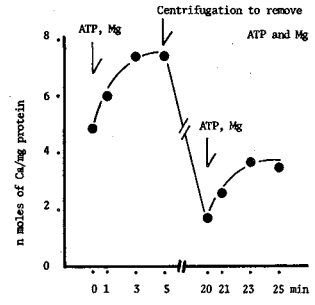
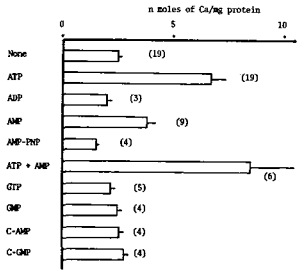


Fig.8 Reactivating effect of various nucleotides on ATP-dependent Ca-uptake by R.O.S.



10mM ATPを添加し，-20°C で凍結後，そのCa-uptake能を調べたところ，ディスク膜へのCa-uptake能の再活性化が認められた（ATP-Induced ATP-dependent Ca-uptake）。ディスク膜とATPを4°C で5分間プレインキュベイションするだけでCa-uptake 能の再活性化がみられるが，これに2mM $MgCl_2$ が存在すると，ATPの効果は強められ，約1mMで最大値を示し，そのKm値は，約10^{-4}Mであった（Fig.6）。4mM 以上のMg^{++}は，逆に阻害が認められた。

2mM $MgCl_2$，1mM ATP存在下，ディスク膜へのCa-uptakeの再活性化は，4°C ですみやかに起こり，約3~5分間のプレインキュベイションで，ほぼ最大となる。続いて，ATP，Mg^{++}を13,500×g，5分間の遠心により除去するとCa-uptake能は著明に減少するが，この時再びATP，Mg^{++}の存在下でディスク膜をプレインキュベイションすると再活性化が認められた（Fig.7）。Fig.8は，ATP以外のヌクレオタイドによるCa-uptake の再活性化を調べたもので，ATP，AMP以外のヌクレオタイドは無効であった。

—考察—

光刺激による視細胞興奮をc-GMP 含有量の変化あるいは，Ca^{++} の動きから説明されようとしているが，各々欠点がある。視細胞内に高濃度局存するc-GMP 含有量は，光によりすみやかに減少するが，それに伴う電気生理学的変化には，未解決の問題も多い[14]。他方，細胞内へのCa^{++}，EGTA の注入は，光刺激に対応した電気生理学的知見と一致するが，生化学的には，Ca^{++} の貯蔵部位と考えられているディスク膜から光により十分量のCa^{++} が放出されないという報告が多い[3,5,9,11,13]。

我々は，"Ca-説"の立場からディスク膜でのCaの動きについて調べた。標品として使用したディスク膜を，さらに庶糖密度勾配法で分画した。ロドプシンを95%以上含む分画にのみ^{45}Ca-uptake能がみられたことより　本実験での^{45}Caは，ほとんどディスク膜そのものへ取り込まれていると考えられる。この様なディスク膜へのATP-dependent Ca-uptakeは，Fig.1,2.より少なくとも二成分が存在する。又，生理的濃度内のGTPでもCa-uptake が促進されること（シ

ナプス膜では、ATPのみに見られる[3]は、視細胞の特徴を示すものと考えられる。

我々は、ディスク膜へのCa-uptake量が標品によりばらつくこと、さらに活性が保存中（4°C, -20°C）急速に減少することを認めたので、それを解決する条件を検討した。ATPの添加は、Ca-uptake 能の保持（Fig.4）のみならず、ATP, Mg^{++}存在下で強い再活性化を示すことを見い出した（Fig.6）。この再活性化（ATP-induced ATP-dependent Ca-uptake）は、1) ATP存在下ですみやかに起こり、ATP濃度に依存する（Fig.6,7）2) 可逆的である（Fig.7）。3) ATP, AMP 以外のヌクレオタイドは無効である（Fig.8）ことから、ATPが視細胞内のCa^{++}の動きを調節している可能性を示唆する。

最近、Azeredo 等[1]やCarretta等は[4]、光刺激により視細胞内のATPやGTP含有量が急激に、かつ可逆的に減少する事を報告している。光刺激により、エネルギー源としてのATP, GTPの減少が、Ca^{++}-uptake量を減少させるのみならず、視細胞の膜特性にも変化を与え、その結果ディスク膜内や、細胞質中でのCa^{++}濃度を調節している可能性が考えられる。

現在、"ディスク膜に結合したATPがCa^{++}輸送を調節している"という作業仮説に基づき、ATPによる再活性化及びその生理的意義について検討中である。

一文献一

1) F.A.M. de Azeredo, W.D.Lust and J.V. Passonneau. (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 85, 293-300 2) E.Bignetti and A.Cavaggion. (1977) J.Physiol. 270, 705-711 3) J.E.Brown, J.A. Coles and L.H. Pinto (1977) J.Physiol. 269, 707-722 4) A.Carretta and A. Cavaggion (1976) J.Physiol. 257, 687-697 5) H.Gilbert Smith, Jr.Roger S.Fager and Burton J.Litman (1977) Biochemistry 16, 1399-1405 6) W.A.Hagins. R.D.Penn and S.Yoshikami (1970) Biophys.J. 10, 380-412 7) Kari Hemminki (1975) Vision Res. 15, 69-72 8) Seiji Ichida, Che-Hui Kuo, Shuji Uchida, Kazuo Nagai and Hiroshi Yoshida (1976) Japan.J.Pharmacol. 26, 551-558 9) Ulrich B. Kaupp and Wolfgang Junge (1977) FEBS Lett. 81, 229-232 10) Che-Hui Kuo, Seiji Ichida, Fumiaki Hata and Hiroshi Yoshida (1978) Japan.J.Pharmacol. 28, 339-343 11) P.A. Liebman (1974) Invest.Opthalmol. 13, 700-701 12) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275 13) W.T. Mason, R.S. Fager, E.W. Abrahamson (1974) Nature 247, 562-563 14) N.Miki, J.J.Keirns, F.R.Marcus, J.Freeman and M.W.Bitensky (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70, 3820-3824 15) A.H.Neufeld, W.H.Miller and M.W.Bitensky (1972) Biochem.Biophys.Acta. 266, 67-71 16) Grant D. Nicol and William H. Miller (1978) Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75, 5217-5520 17) T.Tomita (1970) Quart,Rev.Biophys. 3, 179-222 18) Robert Yee and Paul A. Liebman (1978) J.Biol.Chem. 253, 8902-8909

35 牛脳のPhosvitin kinase FIIについて

公文　明・小沢雅子
（都精神研・神経化学）

〔要　約〕

1. ウシの脳にもTroponin Tを燐酸化する酵素活性が在り、ウサギ骨格筋からのTroponin T Kinase同様Phosvitin及びCaseinをも基質にした。

2. 脳のTroponin T KinaseをPhosphocellulose, Phosvitin-Sepharose 4B・DE-52・及びHydroxylapatite Column Chromatographyにより単一の酵素蛋白質にまで精製純化した。

3. 本酵素のSubunitは分子量46,000(α), 41,000(α′), 及び24,000(β)の三種からなり、α α′及びβのモル比は1.0/1.3/2.0であった。またβSubunitはAutophosphorylationを受けた。

4. 0.4M食塩存在時には、本酵素のHoloenzymeの分子量は160,000であり、$\alpha\alpha'\beta_2$の酵素蛋白質の構造が考えられる。

5. 低塩濃度の条件下では、このKinaseの分子量は320,000であり、$(\alpha\alpha'\beta_2)_2$の構造が考えられる。

6. これらの性質は、肝臓の核や網状赤血球のPhosvitin KinaseII又はCasein KinaseIIと同じである。

7. ウシ脳からのPhosvitin Kinase FIIとはSubunitの数で差が見られた。

ウサギ骨格筋のTroponin Tは、Phosphorylase b Kinase[1,2]及びTroponin T Kinase[3]により燐酸化されることが知られている。後者の酵素活性は、脳（ウサギ及びウシ）でも認められる。Troponin T Kinaseは、Troponin Tの他にPhosvitin及びCaseinの様な酸性蛋白質をも良い基質にするため[3]、本酵素が従来報告されているPhosvitin Kinase（又はCasein Kinase）と同じ酵素である可能性が残されている。

他方、哺乳動物のPhosvitin Kinaseは、脳[4-8]をはじめ多くの他の臓器に分布するが、このうち最も活性の高いPhosvitin Kinaseについては、脳（ウシ）[8]、肝臓（ラット）[9]、網状赤血球（ウサギ）[10]、赤血球（ヒト）[11]、及びNovikoff腹水腫瘍（ラット）[12]から単一酵素にまで精製純化されている。脳と赤血球からの酵素は二個のSubunitから、他の臓器からの酵素は三個のSubunitから構成されていることが知られており、いずれの場合にも一個のSubunitがAutophosphorylationを受ける。そして三個のSubunitからなる酵素のHoloenzymeは、四量体（$\alpha\alpha'\beta_2$）ではないかとされている。

本報告の目的は、精製分離した脳（ウシ）由来のTroponin T Kinaseの酵素蛋白質のSubunitの種類、構成比、及びAutophosphorylationの有無等を調らべることにより、既に知られているPhosvitin Kinaseとの関連を究明することである。

実　験　方　法

A. 酵素の精製法：以下の操作は、全て4°Cで行った。新鮮なウシの脳五個（1,870 g）を二倍量の1 mM EDTAを含むBuffer A（50 mM Tris-塩酸, pH7.5, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0.02%アジ化ナトリウム）でHomogenizeし10,000 gで60分遠心して3,250 mlの上清を粗抽出液として得た。粗抽出液に57 gの食塩を加えたのち、予め0.3M食塩を含むBuffer Aで

平衡化した20 g相当のPhosphocellulose を添加し、60分攪拌した。その後懸濁液を沪過し、更に0.3M食塩を含むBuffer A,1.5 lで Phosphocellulose層を洗った。洗滌後のPhosphocellulose を 3.2 cm直径のColumnに充填し0.3-1.0 M食塩で 200 ml の Linear Gradient Column Chromatographyを行った。食塩濃度0.6M付近にPhosvitinの燐酸化酵素活性を認め活性部分をPhosphocellulose(1)分画(620 ml)として集めた。この分画のpHを1 M燐酸溶液にて6.8 に調整したのち1,240 ml のBuffer B(25mM燐酸カリウム, pH 6.8, 10 mM 2-Mercaptoethanol及び 0.02%アジ化ナトリウム)を加え、予めBufferで平衡化したPhosphocellulose Column(2.2x11 cm) に通し、200 mlのBuffer B でColumnを洗い、0.2-1.1 M食塩による600 ml のLinear Gradient Column Chromatographyを行った。Phosvitin燐酸化酵素活性は食塩濃度0.98 M を中心に溶出され、活性部分をPhosphocellulose(2)分画(186 ml) として集めた。この分画を1 M Tris を用いてpH 7.5に調整したのち、600 mlのBuffer A を加えてPhosvitin-Sepharose 4B Column(1.5x9.5cm) に通し、0.25-0.75M 食塩による200 ml のLinear Gradient Column Chromatographyを行った。Phosvitin燐酸化酵素活性は、食塩濃度0.47 M付近に溶出され活性部分をPhosvitin-Sepharose4B分画(69 ml)として集めた。この分画に350 ml のBuffer A を加えたのち、予めBuffer Aで平衡化したDE 52 Column(3.5x15 cm)に通し0.10-0.35M 食塩による1,400 ml のLinear Gradient Column Chromatographyを行った。食塩濃度0.19 M付近にPhosvitin燐酸化酵素活性が溶出され、活性部分をDE 52分画(390 ml として集めた。この分画を予めBuffer Bで平衡化したHydroxylapatite Column(2.2x5cm)に通し、0.15-0.35 M燐酸カリウム, pH6.8による200 mlのLinear Gradient Column Chromatography を行った。その結果を図1に示した。Phosvitin Kinase活性は少なくとも二つのPeak として溶出され、同時にTroponin Tの燐酸化活性も検出される。10-40本目の活性部分を最終Step の分画(62 ml)として集め、更にFicoll を用いて1.6 mg蛋白質/ mlにまで濃縮し以下の実験に使用した。

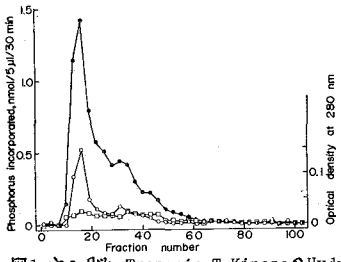


図1. ウシ脳 Troponin T KinaseのHydroxyapatite Column Chromatography. (□)と(●)はTroponin T 及び"Phosvitin燐酸化酵素活性を示す。(○)は 280 nmでの吸収。

B.酵素活性測定法：70 µlの反応液[3 µmol Tris塩酸, pH8.0, 0.5 umol 塩化マグネシウム, 10 nmol ATP-γ-^{32}P(300,000-1,000,000 cpm), 100 µg Phosvitin, α-Casein, Histone, Protamine又は75 µg Troponin T及び酵素溶液] を30°Cで Incubate し、50 µlの反応液を2x2 cm の沪紙上に滴下したのち Corbinら[13]の方法で測定した。C.Polyacrylamide Gel電気泳動法：酵素の純度の検定にはGabrielの方法[14]に従い、6%Gelを用いて泳動したのち、対照GelをCoomassie Blue で蛋白質の染色を行うと共に、泳動Gel のSlice(1.7 mm 巾) を 60 mM Tris-塩酸, pH 8.0 溶液 200 µl に48時間浸し、抽出液50 µlの酵素活性を測定した。Holoenzyme の分子量を知るための一つの方法としては、Hedrickら[15]の方法を用いた。Subunitの分析は、予め精製酵素標品を30 µlの反応液[5 µmol Tris塩酸, pH8.0, 0.5 µmol 塩化マグネシウム, 7 nmolATP-γ-^{32}P(25,500,000cpm), 及び16 µg酵素] で60 分Preincubate し、その後8 %のGelを用いてSDS存在下に定法[16]に従い泳動した。染色後、Gelを切片に切り放射能を測定した。D. Gel 沪過法による分子量の検討：Buffer A 又は0.4M食塩を含むBufferAで平衡化したSephadex G-200(1x94 cm)を用い、Gel沪過を行い2 ml ずつ集めた。E. 実験材料：ATP-γ-^{32}P, Troponin T, 及び"Phosvitin-Sepharose4Bは、それぞれGlynnら[17] Greaserら[18] 及び

Cuatrecasas[19] の方法に従って調整した。

実験結果

A. 酵素の基質特異性：酵素精製の結果を表1に示した。本報ではPhosvitinを基質にして活性測定を行いつゝ精製を進めたが、表に見る様にTroponin T燐酸化酵素活性もほゞ平行して精製された。粗抽出液の比活性を1とした際に、最終StepのTroponin T及びPhosvitin燐酸化活性は、872倍及び1,674倍となり、収率は3-6%であった

表1. 脳Troponin T Kinaseの精製概要

Steps	Total protein	Total activity Troponin T	Phosvitin
	mg	unit*/step	
Crude extract	57,418	10,205	3,947
P-Cellulose(1)	124	2,383	1,697
P-Cellulose(2)	37	1,588	1,444
Phosvitin-sepharose 4B	15	1,288	1,095
DE-52	10	1,000	559
Hydroxylapatite	2	325	241

*1 unit=1 nmol phosphorus incorporated/min

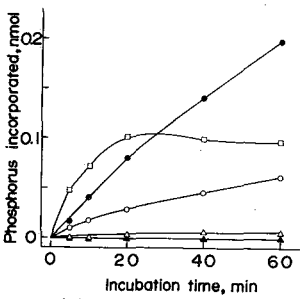


図2 精製酵素標品のTime Course: 基質・Troponin T(□), Phosvitin(●), α-Casein(○), Histone(△), Protamine(▲) : 酵素80ng/assay.

図2は種々の基質を用いた場合のTime Courseである。Troponin T, Phosvitin, 及びα-Caseinは良い基質となるのに反しHistone及びProtamineは基質とならず、Cyclic NucleotideやCa^{++}は無効であった。Troponin Tを基質にした場合には、反応初速度は最も速かであるが、20分後には燐酸化反応は停止する。従って長時間のIncubationでは、Troponin Tへの燐酸の取込みはPhosvitinやα-Caseinへの取込みより悪くなる。

B. 精製酵素標品の純度：6% Polyacrylamide Gelで精製標品を泳動した結果を図3に示した。泳動距離1 cm付近に蛋白質のPeakを認めるが、これに一致してTroponin TとPhosvitinの燐酸化酵素活性を認めることより、酵素標品はほぼ純化されたと見做すことが出来る。ウシ血清アルブミンを標準にその分子量をHedrick ら[15]の方法で求めると320,000であった(図4)。

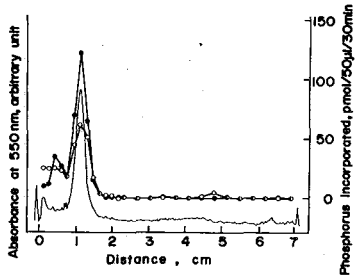


図3. 6% Polyacrylamide Gel電気泳動: ——は550 nmでの吸収(○)と(●)はTroponin T及びPhosvitinの燐酸化活性。

C. 酵素の凝集：図5は酵素のGel沪過Patternに対する食塩の影響を見た結果である。酵素活性は、溶出液に食塩を含まない時(図5-A)にはV₀に溶出されるのに対して、食塩を含む時(図5-B)には、17本目(分子量160,000)に溶出された。図5の結果は、食塩のない状態では、本酵素が凝集体を形成することを示唆している。

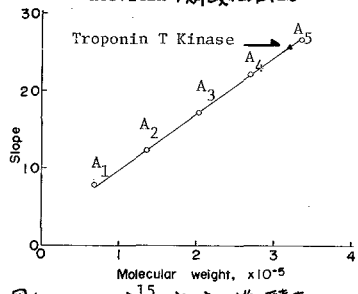


図4. Hedrick ら[15]の方法に従い酵素16μgを4.8-8.4%Gelにて泳動。$A_1 \rightarrow A_5$の(○)で示したのはBovine Serum Albuminの Monomer⟶Pentamer。

D. Subunit 構造：図6は、予め酵素をMg^{++}と ATP-γ-^{32}Pで Incubate したのち、SDS存在下に Polyacrylamide Gel 電気泳動した結果である。三

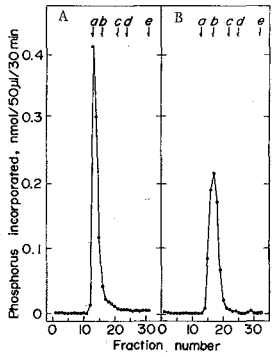


図5. Sephadex G-200によるGel沪過：酵素160 μgをBuffer A(A)及び0.4M食塩を含むBuffer A(B)で溶出した。(●)はPhosvitinの燐酸化酵素活性。Blue Dextran(分子量, > 2,000,000), γ-Globulin, Bovine Serum Albumin, Ovalbumin及びCytochrome cは、それぞれa,b,c,d, 及びeの位置に溶出された。

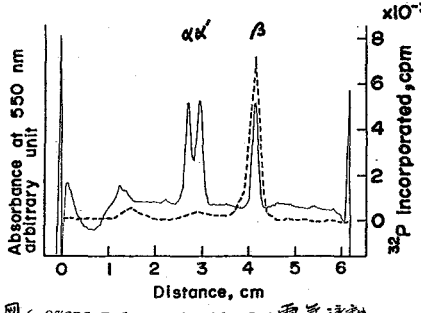


図6.8%SDS Polyacrylamide Gel電気泳動 :—, $OD_{550\ nm}$; ---, 取込まれた放射能/Slice

4個の蛋白質Bandの分子量は大きい方から順に46,000(α),41,000(α'),及び24,000(β)であり、全ての蛋白質Bandが Coomassie Blueにより同じ染まり方をすると仮定すればα, α', 及びβのモル比は1.0:1.3:2.0であった。同時にβの位置にATP-γ-^{32}Pからの^{32}Pの取込みを認めた。

考　　察

精製酵素のHoloenzymeの最少の大きさは、160,000(図5-B)であり、三個のSubunitから構成されていることが判明したことよりαα'β_2の四量体の酵素蛋白質構造が考えられる。またβSubunitが Autophosphorylationをうけることも明らかとなった。これらのことより、脳の TroponinT Kinaseは、肝臓核からのPKNII[9]、網状赤血球のCKII[10]、及び腹水腫瘍細胞のPKII[12]と基本的に同一構造を有すると思われる。同じウシ脳から精製された FII Kinase[8]は、二個のSubunit(分子量 41,000及び26,000)から構成されるが、本報告と既報[8]との差が何に由来するかは今のところ不明である。二個のSubunit構造をもつ Phosvitin Kinaseについては、最近報告されたヒトの赤血球Phosvitin Kinase[11]の例があり、また私達もウサギの骨格筋に$\alpha'_2\beta_2$型が存在することを見出している(未発表)。

Holoenzymeの最小単位は、分子量160,000のものと考えているが、Polyacrylamide Gel電気泳動法の結果は分子量320,000であり$(\alpha\alpha'\beta_2)_2$の構造が考えられる。ウサギ赤血球のPhosvitin Kinase[20]の分子量は950,000と1,300,000であると報告されているが、これら巨大分子はここに報告した160,000前後の酵素の凝集した結果である可能性が残されている。

最後に図1で得られたHydroxylapatite Column Chromatography での溶出Patternの多様性について付言すれば、各溶出液中の酵素の基本的なSubunitは全てα, α'及びβであったことから、多様性の原因は異種の酵素蛋白質によるとは考え難い。この場合にも凝集程度の差ではないかと考えている。

文　　献

1.Perry,S.V.,and Cole,H.A.(1974)Biochem.J.,141,733-743
2.Moir,A.J.G.,Cole,H.A.,and Perry,S.V.(1977)Biochem.J.,161,371-382
3.Kumon,A, and Villar-Palasi,C.(1979)Biochim.Biophys.Acta,566,305-320
4.Rabinowitz,M.,and Lipmann,F.(1960)J.Biol.Chem.,235,1043-1050
5.Rodnight,R.,and Lavin,B.E.(1964)Biochem.J.,93,84-91
6.Matsui,H.,Orikabe,E.,Ishikawa,S.,and Shimazono,N.(1965)J.Biochem.,57,131-141
7.Desci,L.,and Rodnight,R.(1965)J.Neurochem.,12,791-796
8.Wålinder,O.(1973)Biochim.Biopys.Acta,293,140-149
9.Thornburg,W.,and Lindell,T.J.(1977)J.Biol.Chem.,252,6660-6665
10.Hathaway,G.M.,and Traugh,J.A.(1979)J.Biol.Chem.,254,762-768
11.Boivin,P.,and Galand,C.(1979)Biochem.Biophys.Res.Commun.,89,7-16
12.Dahmus,M.E.,and Natzle,J.(1977)Biochemistry,16,1901-1908
13.Corbin,J.D.,and Reimann,E.M.(1974)Methods Enzymology,38,287-290
14.Gabriel,O.(1971)Methods Enzymology,22,565-578
15.Hedrick,J.L.,and Smith,A.J.(1968)Arch.Biochem.Biophys.,126,155-164
16.Weber,K.,and Osborn,M.(1969)J.Biol.Chem.,244,4406-4412
17.Glynn,I.M.,and Chappell,J.P.(1964)Biochem.J.,90,147-149
18.Greaser,M.L.,and Gergely,J.(1973)J.Biol.Chem.,248,2125-2133
19.Cuatrecasa,P.(1970)J.Biol.Chem.,245,3059-3065
20.Kumar,R.,and Tao,M.(1975)Biochim.Biophys.Acta,410,87-98

36 糖液による副腎髄質ホルモンの開口放出：外液Caイオン依存性

反町　勝　（愛媛大・医・生理）

〔要　約〕

ネコ副腎を，Caイオンを添加しない人工液で静脈側より逆行性に灌流し，無Na液(糖置換)によるカテコールアミン(CA)放出機構を検討した。このCA放出は，ドーパミンβ水酸化酵素の放出を伴うが，細胞質酵素の放出を伴わないことより，開口放出機構によることが確認された。CA放出量は糖の種類によって異なり，又L形糖がD形糖より有効という立体特異性を示した。種々の陽イオンを糖液に添加したところ，アルカリ金属イオンは20 mM以上で，他方Na^+，Li^+は10 mMで著明な分泌阻害を示したので，CA放出には少くとも，イオン強度の著しい低下が関与することが示唆された。CA放出は，10 μM以上のEGTAによって可逆的に抑制され，またCa^{++}チャンネル阻害剤により著明に抑制されることから，外液に混入しているμMレベルのCa^{++}が糖液によって細胞内に流入し，充分大きな分泌をひきおこすものと考えられた。そこで自身では分泌を生じない量のCa^{++}を糖液に添加したところ，添加量に依存して反応は著明に増強された。また，外液Ca^{++}欠乏による膜のCa^{++}透過性増大が分泌に関与する可能性は，糖による分泌が外液Ca^{++}の存在によって著明に抑制されることから示唆された。結論として，糖液の存在によって著しくCa^{++}流入の効率が増加するか，又は，Ca^{++}受容部位のCa^{++}に対する親和性が著しく増大することが分泌に密接に関与すると考えられた。

〔序〕

中枢神経系における伝達物質放出機構は，取扱いの困難さから，交感神経終末や内・外分泌細胞からの伝達物質やホルモン物質の放出をモデルとして推定されている。なかでも副腎髄質は研究材料として種々の利点をもち，カテコールアミン(CA)放出機構について多くの研究がなされてきた(4)。生理的伝達物質であるAChは，髄質細胞を興奮させるが(2,3)，同時にCaイオンの細胞内流入を促進し，その結果生じた細胞内Caイオンの上昇がひきがねとなり，CA放出がひきおこされると考えられている。他方，外液にCa^{++}が殆んど存在しない条件下でもCAが放出される(5,8)ことから，細胞内Ca^{++}は外液Ca^{++}の流入以外に，細胞内でも供給されると考えられている。特に外液のNaClを等浸透圧の庶糖で置換した時に見られるCA放出は，開口放出(exocytosis)であることが証明されており(5)，興味深くこの放出機構について検討を加えた。

〔実験材料と方法〕

成熟ネコ(♀♂)をネムブタールで麻酔した。左側副腎を露出し，下大静脈を介して左副腎膵部静脈に，ペリスタルティックポンプに接続したポリチューブを挿入固定する。直ちに副腎を周囲組織より切り離し，灌流をはじめる。表面の結合織を一部切りとると，比較的低い灌流圧で静脈側より逆行性に灌流できる。流量は，0.6 ml/分に固定した。灌流液組成は，NaCl 150 mM，KCl 5 mM，tris-HCl buffer 5 mM (pH 7.3)，glucose 11 mMであり，$CaCl_2$は必要時添加した。NaClを0.3M庶糖又はその他の糖で置換した無Na液を，25分間に1回5分間灌流することにより分泌を刺激した。流出液は6N酢酸0.05 mlを含む試験管に5分間毎に集めた。ドーパミン-β-水酸化酵素(DBH)活性を測定

する場合は流出液を2分し，一方は酢酸を加えCA測定用とし，他方には牛血清アルブミンを5mg加え，DBH測定用とした。後者は，2mM tris-HCl buffer (pH 7.4) 3~5 lに対し，24~48時間，数回液をとり換えて透析した後凍結乾燥した。CAは分離精製することなく，蛍光法(1)で測定し，DBHはMolinoffらの方法(7)によった。DBH阻害物質除去に用いられるCuSO4の添加は，活性をさらに増加させなかった。

〔結果と考察〕

無Na^+液によるCA放出：灌流液にCa^{++}を添加しない条件下でも，NaClを庶糖で置換すると，CAとDBHの著明な放出がみられる。DBH放出のピークは，CAの場合に比し，時間的に遅れるが，他の分泌刺激剤によっても同じ現象がみられる(10)。細胞質局在のphenylethanolamine-N-methyltransferaseは，流出液内に検出されないので，このCA放出は開口放出によると考えられる。Na^+をLi^+, K^+, choline で置換した場合にはCA放出はみられないので，無Na^+液による放出は，庶糖自身によるものと考えられる。

種々の糖類によるCA放出：庶糖以外の糖あるいは糖アルコールでNaClを置換しても同じように開口放出がみられる。しかしCA放出量は，明らかに糖の種類によって多寡がみられ，さらに同一糖ではD形よりL形の方がCA放出効果が大きい(図1)。中でもL-arabinoseは，時に10分間に，20~40μgものCAを放出させることがあり，これはCa^{++} 2mM 存在下でKCl 60mMによって放出されるCA量に匹敵する。図1に含まれない糖で分泌を刺激するものとして，maltose, lactose, D-fructose, D-mannose, D-galactose, D-ribose, D-mannitol がある。

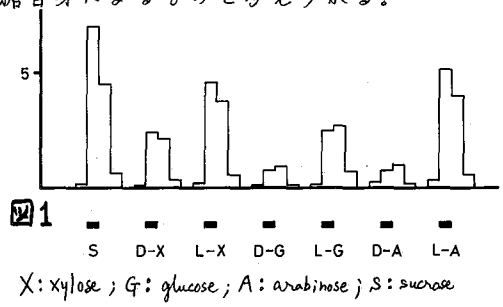


図1

X: xylose ; G: glucose ; A: arabinose ; S: sucrose

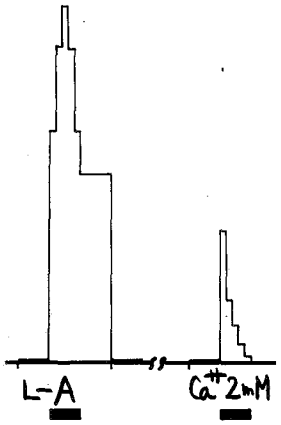


図2．柱の高さは，1分間当りのCA放出量を示す。

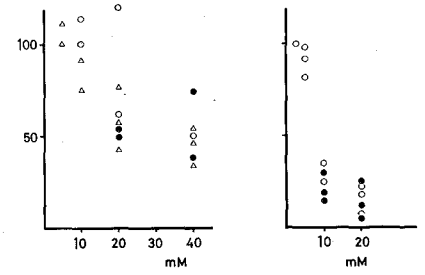


図3．庶糖又はL-arabinoseに種々の濃度の陽イオンを加えた時の反応の大きさを，イオンを加えぬ時の反応(前・後に見る)と比較した。浸透圧は一定にした。
(左図) △ K^+, ○ Cs^+, ● Rb^+　(右図) ○ Na^+, ● Li^+,　縦軸は%。

CA放出速度：流出液を1分間毎に集め，放出速度を見たものが図2である。Ca^{++}を添加しない液よりCa^{++} 2mMを含む液に切り換えた時見られる放出は，はじめの1分間

にピークがみられ、5分で刺激前に近低下するが、糖による放出はより長く持続することがわかる。細胞からの Ca^{++} efflux rate は、外液 Na^{+} 及び Ca^{++} に依存する(9)ので、細胞内 Ca^{++} の有効濃度がより長く維持されることが原因かもしれない。

外液イオン強度の影響：糖液に種々の陽イオンを添加した時の分泌反応を添加しない時と比較したものが図3である。イオンを添加しない反応を測定し、次いでイオン存在下の反応を見る。さらにイオン無添加の反応を見、2番目の反応の大きさを、1, 3番目の反応の平均値で割ったものを%表示した。通常イオンを含まぬ場合2番目の反応の大きさは、1, 3番目の反応の中間程度である。アルカリ金属類の添加では、20 mM以上で反応は半分程度になるが、Na^{+}, Li^{+} では10 mM添加で著明な抑制がみられる。Li^{+} は、Na-Ca exchange において Na^{+} の代用をしない(9)ので、特に Na^{+}, Li^{+} による抑制の原因はよくわからない。

外液 Ca^{++} の必要性：糖による反応は、Ca^{++} キレート剤の添加により消失する。10 - 15 μM EGTAは反応を抑制するが、EGTA除去により直ちに反応は回復する(図4)。分泌を刺激する前に1分程度EGTAを灌流しておくだけで抑制は著明であるが、他方EGTA処理をしても、糖液にEGTAを添加しない場合には反応は存続する。これらの事実は、EGTAが、細胞膜の Ca^{++} をキレートすることによって抑制するというより、外液 Ca^{++} レベルをさらに低下させることによって作用することを示唆する。

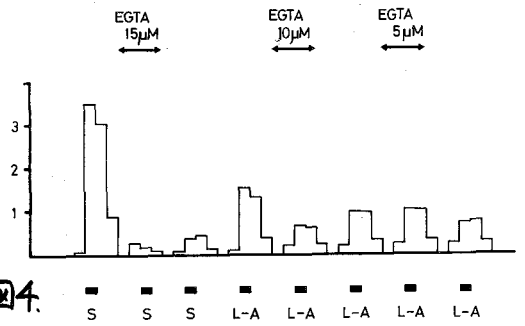


図4.

Ca^{++} チャンネル阻害剤の影響：有機阻害剤であるD600 (methoxyverapamil) 及びtetracaineによる抑制を示したものが図5である。D600による抑制はかなり長く持続するが、後者では反応の回復は早い。重金属である Mn^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Zn^{++}, Mg^{++} も糖液に加えただけで低濃度で阻害を示す(表1)。

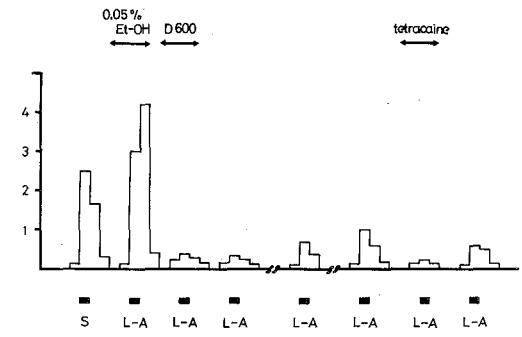


図5. D600は0.08 mM, tetracaineは、0.33 mMを用いた。

糖液への Ca^{++} 添加の影響：以上の結果は、原子吸光測定によると、2 - 3 μM程度にすぎない外液 Ca^{++} が糖による分泌に必要であることを示唆している。そこで糖液に Ca^{++} を添加したところ、図6に示すように、それ自身では分泌を生じない濃度の Ca^{++} 添加によって反応は著明に増強された。0.1 mM Ca-EGTA bufferによって含まれる Ca^{++} 量を調節した糖液による反応を図7に示した。明らかに分泌は Ca^{++} 量に依存する。

表1

		% of mean of 1st and third response
Mn	0.5 mM	8, 37
Co	0.5 mM	26, 13
	0.1 mM	32,
Ni	0.1 mM	5, 32
	0.5 mM	0, 0
Zn	0.1 mM	0, 14
	0.05 mM	43,
Mg	1.0 mM	0,
	0.5 mM	8, 0

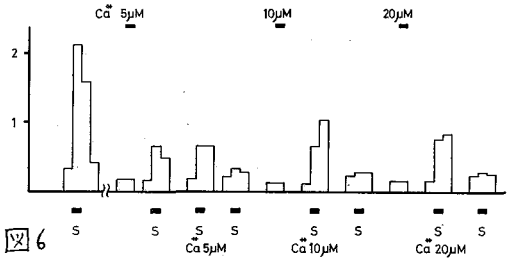


図6

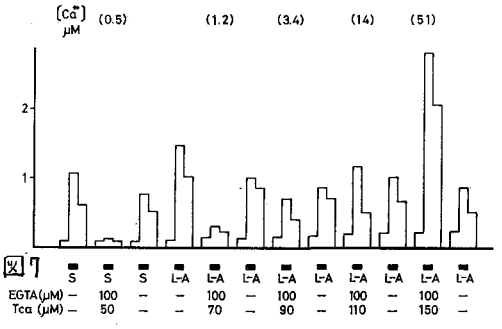


図7

外液Ca^{++}の影響：Ca^{++}の欠乏した条件下では、細胞膜のイオン透過性が亢進すると考えられる(6)。従って低濃度のCa^{++}存在下でCA放出が充分観察されるのは、膜のCa^{++}透過性増大が糖による分泌反応に必要と考えられる。種々のCa^{++}量を添加した液で15分以上灌流した後Ca^{++}を添加しない糖液による反応を観察すると、約μM以上のCa^{++}の存在で反応は阻害される。図8には、Ca^{++} 2.2 mMでの例を示した。他方、糖液が等量のCa^{++}を含む場合、Ca^{++}が0.1－0.5 mMの範囲では、Ca^{++}の欠乏した条件で見られるものより大きな反応が観察された。従って、細胞膜が比較的高濃度のCa^{++}により安定しているときには糖による分泌は阻害をうけ、比較的低濃度のCa^{++}存在下では、外液Ca^{++}に依存した分泌が見られることが示唆された。

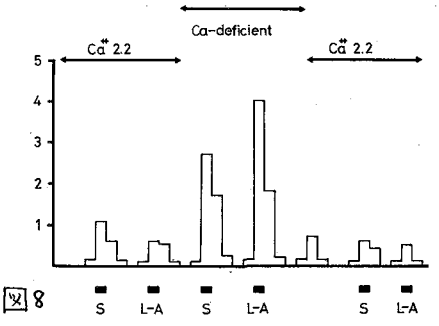


図8

以上の結果より糖による分泌機構を推定した。細胞内Ca^{++}が局所的にμM以上になると分泌がはじまると推定されているが、外液Ca^{++}がμMレベルの条件下では、自発的なCA放出は増加しないので膜のCa透過性が増大しているとしても、細胞内外のCa^{++}が平衡化するとは考えられない。従って糖の存在又はイオン強度の低下が細胞膜に可逆的変化をもたらし、その結果Caチャンネルが活性化されると考えると、外液Ca^{++}レベルに応じたCA放出が見られることは説明できる。しかし、Caチャンネルの活性化によってCA放出を示すと考えられるACh等の刺激剤は、外液Ca^{++}がμMレベルでは効果を示さないので、糖による活性化が、Ca^{++}流入に対し、はるかに効果的であるか、あるいは細胞内のCa受容器のCa^{++}に対する親和性が増大することを仮定しなければならないであろう。

謝辞：D600を提供して頂いた山津清実博士(エーザイ・薬理研)に厚く感謝致します。

(1) Anton,A.H. & Sayre,D.F.(1962) J.pharmacol.exp.Therap. 178 425-431. (2) Biales,B. et al(1976) J.Physiol. 262 743-753. (3) Brandt,B.L. et al(1976) J.Physiol. 263 417-439. (4) Douglas,W.W.(1975) Handbook of Physiology, section 7, vol 6, p.367-388. (5) Lastowecka,A. & Trifaró,J.M.(1974) J.Physiol. 236 681-705. (6) Manery,J.F.(1966) Fed.Proc. 25 1804-1810. (7) Molinoff,P.B. et al(1971) J.pharmacol.exp.Therap. 178 425-431. (8) Rahman,R.G. et al(1973) J.pharmacol.exp.Therap. 184 106-118. (9) Rink,T.J.(1977) J.Physiol. 226 297-325. (10) Sorimachi,M. & Yoshida,K.(1979) Br.J.Pharmac. 65 117-125.

37 シナプス小胞分画のプロトン(H^+)ポンプ機構について

都築紀宏

(名市大・医・生化)

〔要約〕

1。牛脳尾状核・レンズ核のシナプス小胞分画はチロシン水酸化酵素，ドーパミンβ水酸化酵素の活性を示し，少くともチロシン水酸化酵素はシナプス小胞と結合している可能性が示唆された。　2。シナプス小胞へのカテコラミンの取込機構としてプロトン(H^+)ポンプ　(小胞内へH^+を汲入れΔpHを形成するATPase)の　可能性を検討した。　現小胞分画にはATP依存性のH^+-ポンプが認められたが，活性は低かった。又この標品にはADPで阻害され，DNPで活性化されるATPaseが約20％含まれていた。しかし現標品はミトコンドリア分画より調製しているので，これらの活性は亜ミトコンドリア粒子の混在による可能性が強くシナプス小胞自身に由来するものとは断定できなかった。　3。シナプス小胞への^3H-ドーパミンの取込はATPを加えなくても充分認められ，*NEM*による阻害も認められた。*NEM*阻害のみでATPaseがカテコラミン取込に関与しているとは言えない。むしろカテコラミンキャリアの存在が考えられる。

4。H^+-ポンプのモデルとして　亜ミトコンドリア粒子への^3H-ドーパミンの結合を検討したが，ATPの添加で却って結合量は減少した($\fallingdotseq$ pH 7.0)。　粒子とドーパミン$^{\oplus}$とは反発する結果となり，このモデルではΔpHがカテコラミン取込の駆動力になっているとは思われなかった。

副腎髄質クロマフィン顆粒やシナプス小胞にはカテコラミン(以下CAと略す)，アセチルコリンなどの(神経)伝達物質が高濃度に貯えられている。CAの取込機構に関してはクロマフィン顆粒で広く研究され2-3の説が提唱されている(1-6)。レセルピンや*NEM*(*N-ethylmaleimide*)などによるCA取込の阻害度がATPase活性阻害度と並行しないなどの理由よりCAの取込は顆粒膜のH^+-ポンプによる間接的能動輸送であろうと言う説が最近注目されている(7-18)。シナプス小胞の場合も同様であろうと考えられている。我々は先に，シナプス小胞分画に含まれるATPaseについて分析しシナプス小胞にはどんなATPase活性も見られないという結果を報告した(19,20)。この結果と対比して上述のH^+-ポンプ機構について実験を行なったので，その結果を報告します。

実験材料と方法

シナプス小胞分画。牛脳尾状核・レンズ核の粗ミトコンドリア分画を低張処理後，門田ら(21)の方法に従って調製した(電顕写真はref. 22参照)。　蔗糖密度勾配分画。シナプス小胞分画を更に密度勾配遠心し分画Ⅰ~Ⅲを得た(図1)。日立RPS-25ローターを用い2-4°，25,000 rpmで2h遠心した。ミトコンドリア可溶性ATPaseは*Pullman*ら(23)の方法を参考にし，亜ミトコンドリア粒子は*Löw & Vallin*(24)に従って夫々ラット肝ミトコンドリアより調製した。超音波処理は*Branson Sonifier B-12*を用い0°，100 watsで5分間行なった。ANS(*8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid*)の蛍光測定。日立204S蛍光々度計を用いAzziら(25)の方法で測定。励起光370nm，蛍光470nm；10×10 mmセル使用。^3H-ドーパミンの取込測定。^3H-ドーパミン(終濃度0.2μM；1.2μCi；54,000 cpm)と小胞分画(約0.5 mg蛋白)を反応後150,000g，40分　遠心しその沈渣の放射活性を液シン測定した。

チロシン水酸化酵素活性は永津ら(26)の方法(^{14}C-チロシンを基質にし生成したCAをアルミナで分離する)で測定した。ドーパミンβ水酸化酵素活性は加藤ら(27)の方法(チラミンを基質にして生成したオクトパミンをp-ヒドロキシベンズアルデヒドに酸化して分光測光)で測定した。

結　果

シナプス小胞分画のチロシン水酸化酵素とドーパミンβ水酸化酵素。 電顕では直径400-500Åの小胞はすべてシナプス小胞に見えてくるので、尾状核・レンズ核のシナプス小胞分画の *marker enzyme* としてこれらの酵素活性を測定した。図1の如くシナプス小胞分画を更に密度勾配遠心(0.4～1.2 M 蔗糖)し,分画Ⅰ,Ⅱ,Ⅲを得た。Ⅱにはミクロソームの混入があった。Ⅲは捨てた。シナプトソーム,シナプス小胞分画には表Ⅰの如くチロシン水酸化酵素活性が認められた。分画Ⅱは Ⅰより強い比活性を示したが全活性ではⅠの方が高い値を示した(酵素活性は図1の分画を更に超遠沈し、その沈渣について測定した)。ドーパミンβ水酸化酵素活性は分画Ⅱの方が強い値を示したが活性は低く測定感度の下限であった。この様に尾状核・レンズ核のシナプス小胞分画Ⅰ,Ⅱはかなり強いチロシン水酸化酵素活性を示し、この酵素がシナプス小胞と結合している可能性を示唆した。

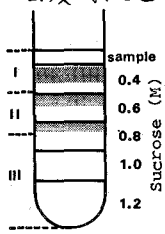


Fig. 1 & Table I

Activities of Tyrosine Hydroxylase & Dopamine beta-Hydroxylase

Fraction	Specific nmol dopa/ mg prot/h	Total Specific x Total prot	Specific**** nmol octopam. /mg prot/h	Total Specific x Total prot
Synaptosomes	3.38*	---	---	---
Synap. vesicles as isolated	5.12*	---	0.6	---
Fraction I	4.5**	75.3	0.3	2.31
Fraction II	8.2**	47.2	0.72	5.8
Human plasma			4.5-6.0***	

*, At 27°; **, at 20°; ***, expressed in (per 0.1 ml) instead of mg protein; ****, mean values of 6 determinations at 37°.

ANSのATP依存性蛍光変化。 図2の如くシナプス小胞分画に加えられたANSの蛍光強度は2mMATP添加によって増大(2-3%)し, H^+ *ionophore* であるFCCP(*carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone*)を加えて H^+ を *leak* させると蛍光強度は減少した。又この蛍光増大は1mM NEM で阻害された。これらの結果より,この蛍光増大の一部は少くともATP依存性の H^+-ポンプによると考えられる(K^+などの小胞内への流入によってもANSの蛍光増大は見られる(18,28))。しかしこのATP依存性蛍光増大がシナプス小胞の H^+-ポンプに由来するのか否かは不明である。なぜなら現シナプス小胞分画の調製は粗ミトコンドリア分画を低張処理しているし,神経端自身もミトコンドリアを含むので,亜ミトコンドリア粒子が混入している可能性がある。もし混入しているならば亜ミトコンドリア粒子は同じ様構でANSの蛍光増大を示すはずである(25)。

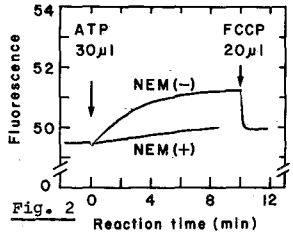


Fig. 2 シナプス小胞-ANSの蛍光変化: 反応液2ml組成,50mM Tris-maleate, pH 7.0, 0.2M蔗糖, 2.4mg蛋白, 20μM ANS, 2mM ATP, 3.3mM Mg^{++}, 1μM FCCP, 1mM NEM, Temp. 20°

シナプス小胞分画へのミトコンドリア可溶性ATPase(F_1)混入の可能性。 F_1-ATPase は DNP(*2,4-dinitrophenol*)で活性化されADP(*adenosine diphosphate*)で阻害される(23)ので,シナプス小胞分画の Mg^{2+}-ATPase(s)に対するADPとDNPの影響を調べた(表Ⅱ)。ADPでは約20-24%阻害されDNPで約17%活性化された。F_1-ATPase はDNPで約100%(2倍に)活性化されるので(23)この小胞分画には約17%の F_1-ATPase が含まれることになる。ADP阻害より求めた値とよく一致している。しか

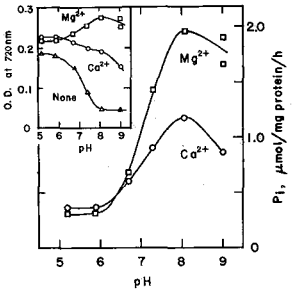
しこの内のどれ程が亜ミトコンドリア粒子と結合して含まれるかは推定できない。　シナプス小胞分画の調製法と同じ操作でラット肝ミトコンドリアを処理すると図3に示した様なATPase活性を示す分画が得られた。このATPaseは至適pHを8.0に示しMg^{2+}, Ca^{2+}で活性化され，活性のpH profileはPullmanら(23)の可溶性ATPaseのそれとよく一致した。この結果はシナプス小胞分画にミトコンドリアの可溶性ATPase F1が混入する可能性を示している。シナプス小胞分画のMg^{2+}-ATPaseは至適pHを6.5−6.7に示しCa^{2+}では殆ど活性化されない(20,22,33)。又このATPaseはアクトミオシン様蛋白に由来し全体の75-80%の活性を占める(20,22)。

Effects of ADP & DNP on Mg^{2+}-ATPase of bovine synaptic vesicle fraction

Addition	Activity (%) at pH 6.7	pH 8.1
None	100*	100*
ADP (2.5 mM)	78-80	74-78
DNP (0.8 mM)	115-119	106-108

*2.9 & 3.1 μmol P_i released/mg protein/h at pH 6.7 & 8.1, respectively at 31° C.

Table II & Fig. 3



ラット肝ミトコン可溶性ATPase：反応液1ml組成，0.1 M Tris-maleate, 0.28 mg蛋白，2.5 mM ATP，5mM Mg^{2+} or $CaCl_2$。金属を必要としないATP分解あり。None：2mM EDTA含む(挿入図)。

<u>シナプス小胞分画による^{3}H-ドーパミンの取込。</u>　現シナプス小胞分画には起源がいずれにせよH^+-ポンプの存在が認められた。図4に^{3}H-ドーパミンのシナプス小胞への取込が示してある。ATP存在下では一旦取込(又は結合)があり，その後ドーパミンの遊離が見られた。そしてこの取込はFCCP, NEMで完全に抑えられた。しかしATPを加えなくても20-30分後には，mg蛋白当り，加えたドーパミンの5-6%が結合したので，ATP存在下での取込が，ATPaseの関与による取込か否かはっきりしない。又、ATPを加えない場合でも^{3}H-ドーパミンの結合はNEMで完全に抑えられた(図5)。この結果はATP存在下でのNEMによるCA取込阻害が必ずしもATPaseの活性阻害によるものでないことを示している。CAキャリア蛋白の存在を示唆しているとも考えられる。

<u>亜ミトコンドリア粒子におけるATP依存性のANS蛍光変化が</u>図6に示してある。この蛍光増大はFCCPで減少し，レセルピン(40μM)によっても阻害された(29)。図7に亜ミトコンドリア粒子と^{3}H-ドーパミンの結合が示してある。この場合ATP添加によってドーパミンの結合は著しく抑えられ0°Cの場合よりも結合量は減少した。これはpH 7 附近ではCAは殆ど⊕に荷電しているので，$ANS^{\ominus}$の場合とは逆に，反発現象が起っているとも考えられる。他の緩衝液でも同様であった。

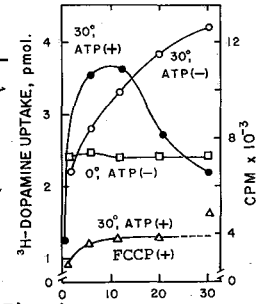


Fig. 4 小胞分画のドーパミン取込：反応液1ml組成，0.1 M Tris-maleate, pH 7.0, 0.2M蔗糖，2.5mM ATP, 3.3mM $MgCl_2$, 0.2μM ^{3}H-dopamine-HCl, 0.675mg蛋白。

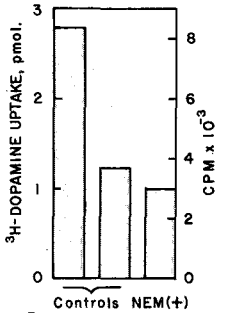


Fig. 5 ATP非存在下におけるドーパミン取込のNEM阻害：組成は左と同じ，NEM, 1mM；小胞蛋白，0.36mg，反応時間20分。たて軸値両図共添加量当り。

考　察

ドーパミンβ水酸化酵素はシナプス小胞内に含まれると報告(30)されているが、チロシン水酸化酵素の細胞内分布ははっきりせず細胞質内(31)とも，シナプス小胞内(32)とも言われている。チロシン水酸化酵素の細胞内分布の解明はシナプス小胞の生理機能や神経伝達機構の解明に重要な意義があると思われる。Whittaker(33)は密度勾配分画法で

得たモルモット脳シナプス小胞分画にはDNPで活性化されるミトコンドリアのATPaseは含まれない事を報告している。金関・門田(34)は彼らのシナプス小胞標品には微粒子の結合したシナプス小胞があると報告しているが,これは亜ミトコンドリア粒子に酷似している。その後斯様な報告は無い(?)し現在の小胞調製法を考えるとこれは亜ミトコンドリア粒子と思われる。こんな訳で現実験のH^+- ポンプは亜ミトコンドリア粒子の混入による可能性が強い。CAの取込機構についてはまだはっきりしない。H^+- ポンプの重要性を報じたグループ(10)は,ATPを加えてもΔpHの変化が無い事を確認した(15)。ATPがなくてもCAが取込まれるという報告(6,16)もある。K^+の拡散電位によっても取込まれるが取込は短命であるとの報告(18)もあり、我々の結果(図4)もよく似ている。この様にΔpHではなく膜電位Δψを取込の駆動力とするとCA分子は⊕荷電状態で取込まれる事も考えられる。顆粒内pHは5.5~5.7と言われている(10,13,35)が,これはH^+-ポンプに起因するのではなくATP(1)や酸性多糖類(36)が含まれる事によるとも考えられる。CAの生合成と貯蔵が共役している可能性もあり得る。

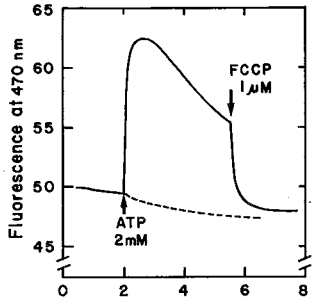


Fig. 6 亜ミトコンドリア粒子-ANSの蛍光変化: 50mM Tris-maleate, 0.25M 蔗糖, 3.3mM $MgCl_2$, 0.77mg 蛋白/ml, 17μM ANS, 40μM レセルピン(---)存在下。Temp. 25°。

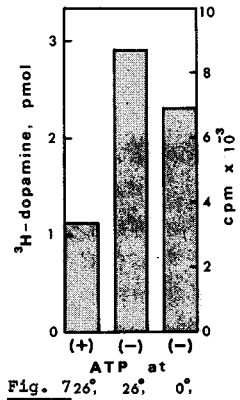


Fig. 7 亜ミトコン粒子のドーパミン取込。50mM PIPES, pH 6.8 使用, 0.47mg 蛋白, 反応 26°, 3min。その他は図4と同じ。

(1) Hillarp,N.-Å.(1958)Acta physiol.scand.42,321-332 (2) Carlsson,A.,Hillarp,N.-Å.,& Waldeck,B.(1963)Acta physiol.scand.59,Suppl.215 (3) Kirshner,N.(1962)J.Biol.Chem.237,2311-2317 (4) Colburn,R.W.& Maas,J.W.(1965)Nature 208,37-41 (5) Granot,J.& Rosenheck,K.(1978)FEBS Lett.95,45-48 (6) Uvnäs,B.& Åborg,C.-H.(1977)Acta physiol.scand.99,476-483 (7) Flatmark,T.& Ingebretsen,O.C.(1977)FEBS Lett.78,53-56 (8) Bashford,C.L.,Radda,G.K.,& Ritchie,G.A.(1975)FEBS Lett.50,21-24 (9) Nichols,J.W.& Deamer,D.W.(1976)Biochim.Biophys.Acta 455,269-271 (10) Johnson,R.G.,Carlson,N.J.,& Scarpa,A.(1978)J.Biol.Chem.253,1512-1521 (11) Toll,L.,Gundersen,Jr.,C.B.,& Howard,B.D.(1977)Brain Res.136,59-66 (12) Toll,L.& Howard,B.D.(1978)Biochem.17,2517-2523 (13) Njus,D.,Sehr,P.A.,Radda,G.K.,Ritchie,G.A.,& Seeley,P.J.(1978)Biochem.17,4337-4343 (14) Schuldiner,S.,Fishkes,H.,& Kanner,B.I.(1978)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75,3713-3716 (15) Johnson,R.G.& Scarpa,A.(1979)J.Biol.Chem.254,3750-3760 (16) Ingebretsen,O.C.& Flatmark,T.(1979)J.Biol.Chem.254,3833-3839 (17) Holz,R.W.(1978)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75,5190-5194 (18) Njus,D.& Radda,G.K.(1979)Biochem.J.180,579-585 (19) Tsudzuki,T.,Fujii,T.,& Tanaka,R.(1977)J.Biochem.82,709-717 (20) Tsudzuki,T.(1979)J.Biochem.85,567-574 (21) Kadota,K.& Kadota,T.(1973)J.Cell Biol.58,135-151 (22) Tsudzuki,T.(1979)J.Biochem.86,777-782 (23) Pullman,M.E.,Penefsky,H.S.,Datta,A.,& Racker,E.(1960)J.Biol.Chem.235,3322-3329 (24) Löw,H.& Vallin,I.(1963)Biochim.Biophys.Acta 69,361-374 (25) Azzi,A.,Chance,B.,Radda,G.K.,& Lee,C.P.(1969)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 62,612-619 (26) Nagatsu,T.,Levitt,M.,& Udenfriend,S.(1964)J.Biol.Chem.239,2910-2917 (27) Kato,T.,Kuzuya,H.,& Nagatsu,T.(1974)Biochem.Med.10,320-328 (28) Jasaitis,A.A.,Kuliene,V.V.,& Skulachev,V.P.(1971)Biochim.Biophys.Acta 234,177-181 (29) Schwartz,A.& Lee,K.S.(1960)Nature 188,948-949 (30) Cimarusti,D.L.,Saito,K.,Vaughn,J.E.,Barber,R.,Roberts,E.,& Thomas,P.E.(1979)Brain Res.162,55-67 (31) Laduron,P.& Belpaire,F.(1968)Nature 217,1155-1156 (32) Fahn,S.,Rodman,J.S.& Cote,L.J.(1969)J.Neurochem.16,1293-1300 (33) Whittaker,V.P.(1966)Ann.N.Y.Acad.Sci.137,982-998 (34) Kanaseki,T.& Kadota,K.(1969)J.Cell Biol.42,202-220 (35) Pollard,H.B.,Shindo,H.,Creutz,C.E.,Pazoles,C.J.,& Cohen,J.S.(1979)J.Biol.Chem.254,1170-1177 (36) Stadler,H.& Whittaker,V.P.(1978)Brain Res.153,408-413

38 シビレエイ電気器官の神経終末におけるコリン輸送

阿部輝雄・西須英雄・藤田省三
(新大・脳研・神経化学)

〔要約〕
日本産シビレエイ(Narke japonica)電気器官より調製した神経終末(nerve terminal sac)におけるコリン輸送を測定し、ラット大脳シナプトソームの場合と比較した。
(1)この神経終末には、高親和性(K_m 約2 μM)および低親和性(K_m 約50 μM)の2種類の輸送系が存在する。
(2)高親和性輸送によって取り込まれたコリンのうち、アセチルコリンに転換される割合は20%以下であり、ほとんどコリンとして存在している。
(3)高親和性輸送はヘミコリニウム-3、α-ブンガロトキシン、デカメトニウム等により強く抑制されるが、α-ブンガロトキシン、DFP等によってはほとんど阻害されない。
(4)高親和性輸送はNa、K、Clに依存し、ウアバイン、2,4-ジニトロフェノール、アジ化ナトリウム等のエネルギー代謝阻害剤に対して強い抵抗性を示す。
(5)以上の結果から、シビレエイ電気器官の神経終末にはラット大脳の場合と基本的に同様な高親和性のコリン輸送系が存在することが示された。

中枢神経系はコリンをde novoで合成できないと考えられている[4]。したがって、コリン作動性神経終末においては、コリンは主として外液から吸収され、コリンアセチルトランスフェラーゼによってアセチルコリンが合成される。この吸収を担うのが高親和性のコリン輸送系であり、コリン作動性神経終末に特異的に存在するものと考えられている[11]。神経終末における伝達物質の合成、貯蔵、放出の制御というシナプスにおける重要な問題を解くためには、コリンの高親和性輸送機構およびその制御を理解することが必要である。この輸送系はcarrierによることが示唆されているが、その分子機構は全く不明である。本研究ではその分子機構解明への第一歩として、純コリン作動性のシビレエイ電気器官におけるコリンの輸送を検討した。

[方法]

神経終末の調製　日本産シビレエイ(Narke japonica)(体重300~500g)電気器官(20~40g)よりIsraelらの方法[10]にしたがって、神経終末分画(Fraction C)を調製した。電子顕微鏡による観察から、この分画は主として神経終末からなっているが、空胞も含まれていることがわかった。また、ヒルの筋肉を用いた測定の結果、60-90 n mole/mg protein(n=3)のアセチルコリンを含んでいた。

コリン輸送の測定　神経終末分画を蔗糖を含まないシビレエイリンゲルで2倍に希釈し、その1mlを測定に用いた。25℃、15分プレインキュベーション後、10 μlの^{3}H-コリン(最終濃度0.5 μM~100 μM、1 μCi)を加え、5~60分インキュベートした後、Millipore filter(HAWP 02500, 0.45 μm)を用いて沪過し、3mlの氷冷リンゲルで3回洗っ

た後，filterをバイアルに移し，10 mlのPCS (Radiochemical Centre) を加え，室温に一夜放置後，放射能を測定した。なお，コリン輸送に対する諸薬剤の影響をみる場合，いずれもプレインキュベーション時に添加した。高親和性輸送の測定には，1 μMの ^{3}H-コリンを用いた。

コリン代謝産物の分析　Millipore filterをバイアルに入れ，4 mlの氷冷2 mM酢酸緩衝液，pH 4.0を加え，100℃，10分加熱後，液体を除き，filterを1 mlの酢酸緩衝液で洗う。この操作により filter上のカウントの97%以上が抽出された。抽出液（洗液を合わせたもの）の1 mlをとりPCS 10 mlを加えてカウントを測定し、残りをBarkerらの方法[6]によって分画し，ペーパークロマトグラフィー（溶媒；アセトン－0.2M酢酸アンモニウム 4：1，v/v）を行い，コリンとアセチルコリンを分離し，各スポットの放射能を測定した。

イオン依存性の検討　神経終末分画を庶糖を除いたリンゲルで2倍に希釈後，12,000gで30分遠心して得られた沈殿を1 Mの庶糖に懸濁する。その50 μlをとり，各組成のリンゲル0.95 mlを加えて，コリンの取り込みを測定した。シビレエイリンゲルの組成（単位 mM）は NaCl：280，KCl：3，$MgCl_2$：1.8，$CaCl_2$：3.4，$NaHCO_3$：5，リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.8，グルコース：5.5，尿素：300，庶糖：100である。Na-freeリンゲルでは，NaClを倍モル量の庶糖で，$NaHCO_3$を$(NH_4)HCO_3$で，リン酸ナトリウム緩衝液をトリス－リン酸緩衝液でそれぞれ置換した。K-freeリンゲルではKClを除いてNaClを283 mMにした。また，Clの影響をみるため，NaClをCH_3COONaまたはNaIで置換した。

ラット大脳シナプトソームにおけるコリン輸送の測定　ラット大脳を0.32 M庶糖中でホモジナイズし，P_2分画（1,000g×10分上清→10,000g×20分沈殿）を得，0.32 M庶糖で2回洗う。P_2の0.32 M庶糖懸濁液50 μlをとり，0.95 mlのクレブス－リンゲル－リン酸緩衝液[5]（KRP）を加える。37℃で15分プレインキュベート後，1 μMの ^{3}H-コリン（0.5 μCi）を加え，37℃で8分間インキュベートする。これに6 mMの非標識コリンおよび0.1 mMのネオスティグミンを含む氷冷KRP 2 mlを加えて反応を止め，20,000g，20分遠心し，沈殿を5 mlの0.9% NaCl－0.1 mMネオスティグミンで一回洗う。この沈殿に1 mlのSoluene－350 (Packard)を加えて室温で溶解後，10 mlのトルエン系シンチレーターおよび40 μlの氷酢酸を加え，室温で一夜放置後，カウントを測定した。

［結果と考察］

2種のコリン輸送系　各コリン濃度における輸送量をLineweaver-Burkプロットしたのが図1である。高親和性（K_m 約2 μM）および低親和性（K_m 約50 μM）の2種の輸送系が存在することが明らかである。これはラット大脳の場合（K_m，1～3 μM，40 μM）[9,15]と良く一致している。V_{max}はそれぞれ，約0.3，約1.5 n moles/mg protein/30 minである。

高親和性コリン輸送　高親和性輸送を測定するため，1 μMの[^{3}H]-コリン存在下での輸送を調べた。この濃度では低親和性の寄与はきわめて少ない。

(1)アセチルコリンへの転換――図2に示すように1 μMのコリン存在下ではコリン輸送は少なくとも1時間は直線的である。各時間における取り込まれた全カウントに占めるアセチルコリンの割合はいずれも20%以下である（図2白丸）。フォスフォリルコリン分画のカウントは全体の10%以下であり，残りはコリンであった。このアセチ

ルコリンへの転換率はラット大脳シナプトソームの場合(60-70%)[9,10]と比較してきわめて低いが，その理由は不明である。しかし，欧州産シビレエイ(*Torpedo marmorata*)でも同様な結果が得られており[9,10]，シビレエイ電気器官に共通のものと思われる。

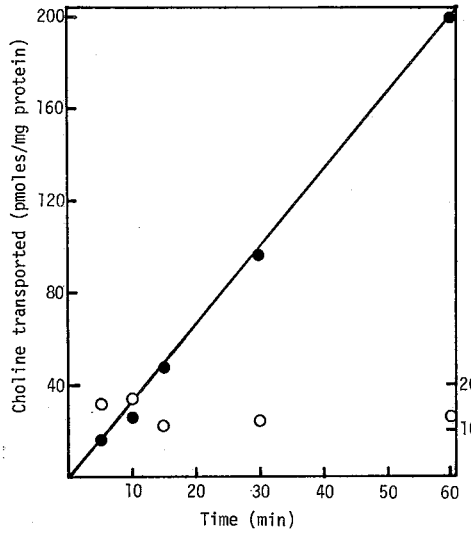


図2 高親和性コリン輸送
^{3}H-コリン，1μM.

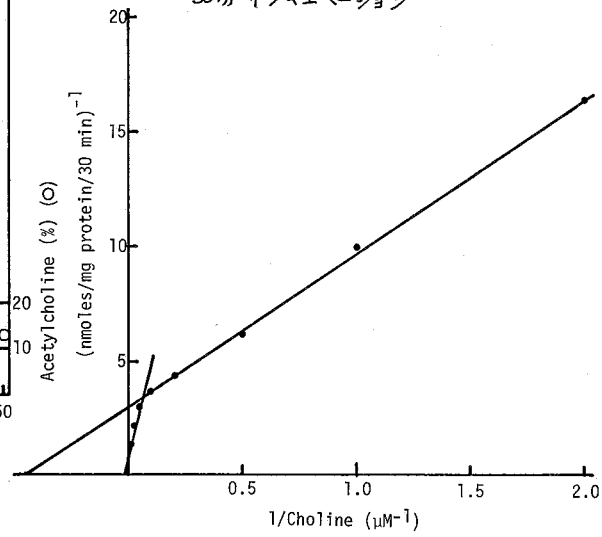


図1 Lineweaver-Burk プロット
30分インキュベーション

(2)薬剤の影響——図3に幾つかの薬剤の効果を示す。ヘミコリニウム-3はラット大脳シナプトソームにおいても強い阻害剤として知られている[9,10]。シビレエイの場合，50%阻害濃度(I_{50})は約0.1μMである。ヘミコリニウム-3はコリンと拮抗するので，K_iは約70nMとなる。β-ブンガロトキシン(以下β-BuTX)はここで試した薬剤のうち最も強力な阻害剤であり，I_{50}は約5nMである。β-BuTXはフォスフォリパーゼA_2活性を持ち，神経筋接合部の神経末端に作用して，アセチルコリンの放出を阻止するヘビ毒由来の神経毒である。β-BuTXをp-ブロモフェナシルブロミド(以下pBPB)で処理すると，フォスフォリパーゼ活性はほぼ完全に失われ，アセチルコリン放出阻止能もなくなる[2]。pBPBで処理したβ-BuTXは高濃度においても，高親和性輸送をほとんど阻害しない(図3,□)。このことはβ-BuTXによる高親和性輸送の阻害にはフォスフォリパーゼ活性が必要であることを示唆する。β-BuTXによる高親和性コリン輸送の阻害の結果から，β-BuTXの作用部位がコリン輸送系である可能性も指摘されているが[9,13]，神経筋接合部におけるβ-BuTXの複雑な作用[1,2]を考慮すると，コリン輸送系が模的ではな

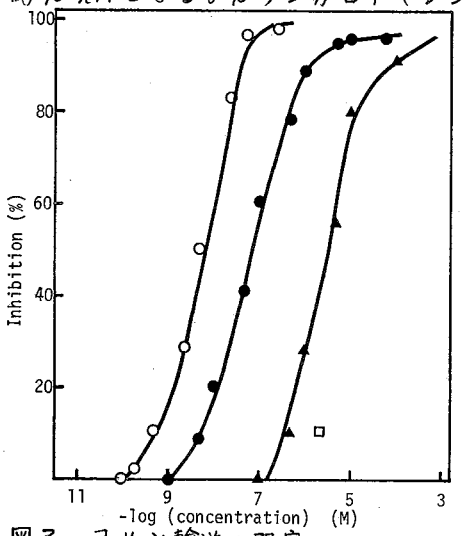


図3 コリン輸送の阻害
^{3}H-コリン，1μM，30分インキュベーション．○；β-BuTX，●；ヘミコリニウム-3，▲；デカメトニウム，□；pBPB-β-BuTX.

表1　高親和性輸送に対する薬剤の影響　25℃，30分インキュベーション。対照の%として表示。

薬剤	濃度	シビレエイ	ラット
DFP*	0.1mM	96	106
α-ブンガロトキシン	6 μM	99	101
ウアバイン	0.1mM	84	36
2,4-ジニトロフェノール	0.2mM	94	51
アジ化ナトリウム	0.5mM	89	90

* ジイソプロピルフルオロフォスフェート

表2　高親和性輸送のイオン依存性　正常リンゲルに対する%として表示。

リンゲル	シビレエイ	ラット
正常	100	100
Na除去	7.0	7.9
NaCl→CH_3COONa	39	46
NaCl→NaI	53	64
K除去	14	29

く，β-BuTXによって神経末端の形質膜のPerturbationが起き，コリン輸送系も影響を受けるものと考えられる。デカメトニウム（I_{50}，約4μM）もかなり強い阻害剤である。

表1にシビレエイ神経終末およびラット大脳シナプトソームにおける高親和性コリン輸送に対する薬剤の影響を示す。両者ともα-ブンガロトキシン，DFPによってほとんど影響を受けない。シビレエイの場合，ラット大脳と異なり，ウアバイン，2,4-ジニトロフェノールの両エネルギー代謝阻害剤に対して強い抵抗性を示す。

(3)イオン依存性 ── 表2は高親和性輸送のイオン依存性を示す。Naを含まないリンゲル中ではシビレエイ神経終末での輸送はほとんど完全に抑えられる。またK，Clにも依存する。このイオン依存性はラット大脳シナプトソームの場合[14]ときわめて似ている。

以上の結果から，アセチルコリンへの転換，エネルギー代謝阻害剤に対する感受性等において若干の相違はあるが，シビレエイ電気器官の神経末端にはラット大脳の神経末端の場合と同様な高親和性のコリン輸送系が存在することが示された。したがって，高親和性コリン輸送系に関して，シビレエイ電気器官はラット大脳のモデルとして役立つものと考えられる。

シビレエイを飼育していただいた新潟水族館の方々に感謝する。また，アセチルコリンを定量して下さった東京大学脳研の田代明子博士に感謝する。

〔文献〕

(1) Abe, T., Limbrick, A. R. and Miledi, R. (1976) Proc. R. Soc. Lond. B 194, 545-553
(2) Abe, T., Alemà, S. and Miledi, R. (1977) Eur. J. Biochem. 80, 1-12
(3) Abe, T. (1979) in Integrative Control Functions of the Brain (Ito, M., ed) Vol. 2 in press.
(4) Ansell, G. B. and Spanner, S. (1967) J. Neurochem. 14, 873-885
(5) Barker, L. A. (1976) Life Sci. 18, 725-732
(6) Barker, L. A., Dowdall, M. J. and Whittaker, V. P. (1972) Biochem. J. 130, 1063-1081
(7) Dowdall, M. J. (1978) in Cholinergic Mechanisms and Psychopharmacology (Jenden, D. J., ed)pp. 359-375, Plenum Press, New York
(8) Dowdall, M. J., Fohlman, J. P. and Eaker, D. (1977) Nature 269, 700-702
(9) Haga, T. and Noda, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 291, 564-575
(10) Israel, M., Manaranche, R., Mastour-Frachon, P. and Morel, N. (1976) Biochem. J. 160, 113-115.
(11) Kuhar, M. J. and Murrin, L. C. (1978) J. Neurochem. 30, 15-21
(12) Morel, N., Israel, M., Manaranche, R. and Mastour-Frachon, P. (1977) J. Cell Biol 75, 43-55
(13) Sen, I., Grantham, P.A. and Cooper, J. R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2664-2668
(14) Simon, J. R. and Kuhar, M. J. (1976) J. Neurochem. 27, 93-99
(15) Yamamura, H. I. and Snyder, S. H. (1973) J. Neurochem. 21, 1355-1374

39 Synaptosome形質膜のNa, K-ATPase活性に対するascorbateの阻害作用

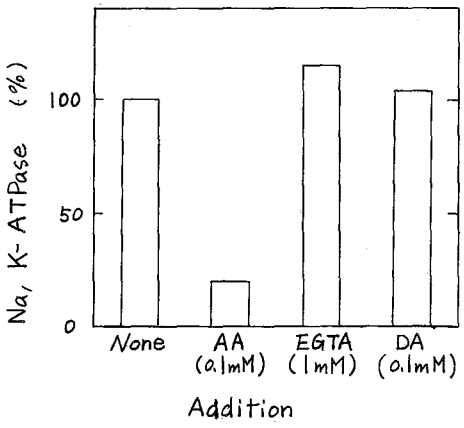
後藤香糸子 ・ 田中　亮
（名市大・医・生化）

〔要　約〕

ラット脳のsynaptosome形質膜のNa, K-ATPase活性に対するascorbic acid (AA)の阻害作用を、その機構を明らかにすることを目標として、調べた。実験には比抵抗$9\times10^6\Omega$/cm以上の水を、ガラス蒸留器で再留したものを用いた。

1) AAはATPaseを著しく阻害するが、EGTAまたはdopamine (DA)をあらかじめ入れておくと、阻害しなかった。2)膜とAAをPreincubateした後、EGTAまたはDAを入れてもantagonizeしなかった。3)膜とAAをincubateしても脂質の過酸化はおきなかったが、そこにATPをかえると過酸化を起した。4) AAのATPase阻害作用はsuperoxide anion (SOD), catalase, dimethylfuran (DMF), mannitol, ethanol, dimethylsufoxide (DMSO)では、antagonizeされなかったが、ラジカル消去剤であるdimethylnitrosoaniline (DMNA)によってantagonizeされた。5) bufferおよびATPをChelex 100で処理すると、AAとATPで過酸化されなくなったが、ATPaseは阻害された。以上の結果より、AAのATPase阻害作用は、膜の過酸化とは関係なく、AAラジカルそのものに阻害作用があり、そのラジカルがDMNAにより消去されると考えられる。可溶性画分はAAと同様に、ATPaseを阻害するが、膜の過酸化はおこさなかった。

図1. Na, K-ATPaseに対するAA, EGTA, DAの作用



〈序　文〉

脳のNa, K-ATPase活性を阻害する物質が脳のcytosolに含まれ、それがCa^{2+}及びAAであると言われている[3][4][11][13]。Ca^{2+}はさておきAAの作用機構は、微量の金属（特に鉄）の存在下に、膜脂肪酸を過酸化するためと、説明されている[3][11][13]。又一般に脂肪酸の過酸化は、superoxide anion (O_2^-)が生じる系で、Haber-Weiss反応[5]によって、singlet oxigen ($^1O_2$)及びhydroxyl radical (OH·)が出来、それらが過酸化を引き起こすと考えられている[7][8]。（かし最近AAはO_2^-を生じないという報告[6]があるので、ATPaseに対する阻害作用は、今まで言われているように脂肪酸の過酸化を介しているのかどうかについて調べた。又cytosolの作用が、どこまでAAのそれとparallelであるかについて、検討中である。

〈実験材料及び方法〉

水：比抵抗$9\times10^6\Omega$/cm以上のものを、ガラス蒸留器でさらに蒸留した。Synaptosome形質

膜：ラット脳を用い、Lee & Phillis[9]の方法を少し改良した。特にsynaptosome内のcytosolを出来るだけ除くために、次のようにした。すなわち、0.8M/1.2Mの蔗糖密度勾配遠心分画した後、synaptosome画分を150～300ml/g脳の水に入れて、150,000g 30分の遠心で沈殿させ膜画分とした。可溶性画分：ラット全脳を4倍量の水ではげしくhomogenateし、150,000g 30分の遠心上清を用いた。ATPase活性：120mM NaCl, 10mM KCl, 4mM $MgCl_2$ 及びその他の必要な試薬、50mM Imidazole－HCl buffer (pH. 7.4) のmediumに上記膜画分を加え37°C, 5～10分preincubateし、final 4mMになるようにATPを加えて反応開始(final volume 1ml)。10分後氷冷した0.42M $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$/0.5N H_2SO_4 1.5mlを入れ、aminonaphtolsurfonic acid溶液0.1mlを加え、卓上遠心機で遠心。約20分後に上清の760nmの吸光度を読んだ。ouabainとDAが拮抗するという報告がある[10]ので、Mg-ATPase活性はNaCl及びKClを除いた時の値とし、Na, K-ATPase活性はTotal ATPase活性からMg-ATPase活性を差引いたものとした。脂肪質の過酸化：ATPase活性の測定の時と同じmediumで膜画分を37°C 15分incubate後、10% TCA 1.5mlを加え、2% thiobarubituric acid 0.1mlを入れて、沸騰水浴上で15分加熱、氷冷後、卓上遠心機で遠心。上清の532nmの吸光度を読んだ。Chelex 100処理：bufferのChelex処理はカラム法で行い、濃いbufferを通過させ、水洗いによって濃度を合わせた。ATPの処理は、ATP自身金属とキレートする(binding constantはそれ程大きくはないが)ので、バッチ法で、低温で行い、数回Chelexを変え、最後は時々撹拌しながら数日間放置した。

〈実験結果〉

AAによるNa, K-ATPase活性の阻害及びEGTA, DAの作用：脳のhomogenateをそのままつかうか又はLee & Phillisの原法[9]のように、形質膜標品からcytosolを充分に除かない場合は、あるいは比抵抗の低い($1\times10^6\Omega$/cm以下)

図2　AAのNa, K-ATPase阻害作用に対するEGTA, DAのantagonism

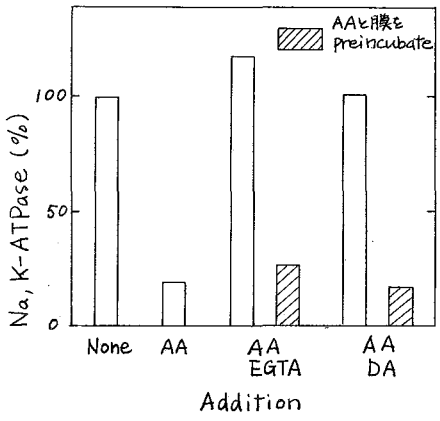


図3　形質膜脂質の過酸化

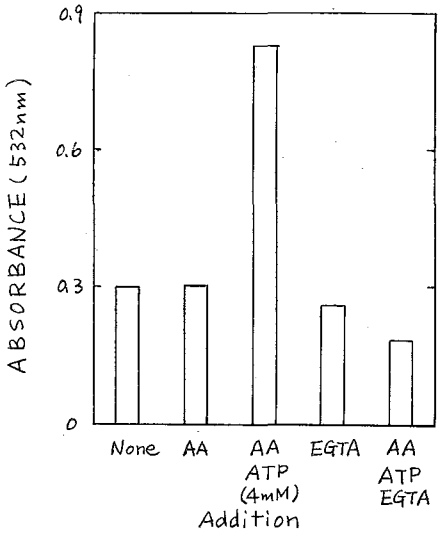


図4. 形質膜脂質の過酸化

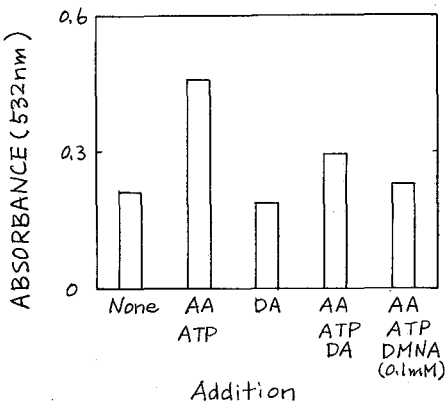
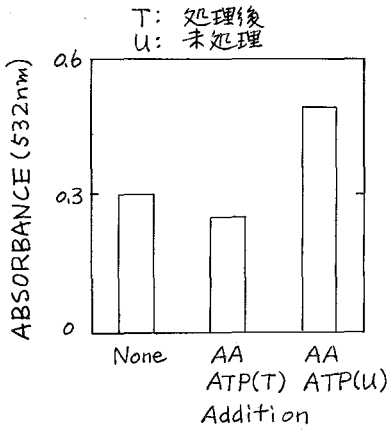


図5 Chelex 100 処理したATPとAAによる形質膜の過酸化



水を使った時は、いずれもEGTAまたはDAを反応混液に加えると、Na, K-ATPase活性が上がる(データは示していない)。しかし上記方法により、cytosolを出来るだけ除くようにし、純水を用いると、図1のように、EGTA, DAはNa, K-ATPase活性に、ほとんど影響を与えなかった。AAは活性を強く阻害したが、図2のようにあらかじめEGTAまたはDAとincubateしておくと、AAによる阻害作用はantagonizeされた。しかし膜とAAをpreincubateしてからEGTAまたはDAを入れ、次いでATPを加え反応を始めると、antagonizeされなかった。

膜の過酸化：一般に不飽和脂肪酸はAAによって過酸されると言われている[3][12][13][14][15]が、今回行った条件では、図3に示すように、AAのみでは過酸化は起きなかった。AAとATPを同時に作用させると、はじめて過酸化された。EGTAと同様、DAやDMNAも、AAとATPによる過酸化を阻害した(図4)。

活性酸素及びラジカル消去剤による作用：O_2^-, $^1O_2$, H_2O_2のそれぞれの消去剤であるSOD, DMF, catalaseはいずれもAAのATPase阻害作用を取除かなかった。しかしOH·の消去剤でもあるDMNA[2]は阻害作用を完全に打ち消した。ただし、他のOH·の消去剤であるethanol, DMSO, mannitolはantagonizeしなかった。

Chelex 100 処理による影響：水は上記の様に精製したので、ほとんど純水と思われるが、ATPにはモル比で10^{-3}程度の金属(特に鉄)を含むと言われている[16]。そこで金属を除去するためATPとbufferをChelex 100で処理した。処理試薬を使うと、形質膜脂質のAAによる過酸化は起きなくなった(図5)にもかかわらず、AAによるNa, K-ATPaseの阻害作用は、変わらなかった(図6)。

可溶性画分による過酸化及びATPaseへの影響：図7は可溶性画分を50μl/ml加えた時の膜の過酸化とATPase活性をみたものであるが、AAと同様に可溶性画分だけでは、過酸化を増大しないが、ATPase活性は阻害した。

〈考　察〉

2·3の研究室で[3][1][3] Na,K-ATPaseのAAによる阻害は、AAによる脂肪酸の過酸化が原因で、しかもBoxall & Phizackerley[3]はNa,K-ATPase活性に必須な脂質が過酸化されるためではないかと推論している。今回出来るだけ金属イオン（特に鉄）を除いた系で実験したところ、脂質の過酸化が起きなくても、ATPaseは不可逆的に阻害された。この阻害作用は各種活性酸素の消去剤のうちOH·の消去剤とも言われるDMNA[2]で打ち消されたが、他のOH·消去剤であるethanol, DMSO及びmannitolでは打消されなかった。この系でOH·が出来るとは考えにくいし、DMNAは他にRH·ラジカルも消去する[1][2]ので、ここではAAラジカルを消去しているのではないかと思われる。ATPの金属イオンを完全に除くことは、非常にむづかしいので、EGTA及びDAのantagonize作用が、金属キレート剤として、AAラジカルを出来にくくしているのか、あるいは出来たAAラジカルを消去するように働いているのかは明らかでない。可溶性画分の作用は、現在のところAAの作用とparallelのように見えるが、さらに検討を重ねる。

図6. Chelex100処理ATPによるNa,K-ATPase

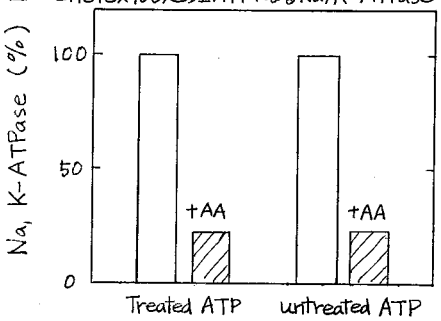
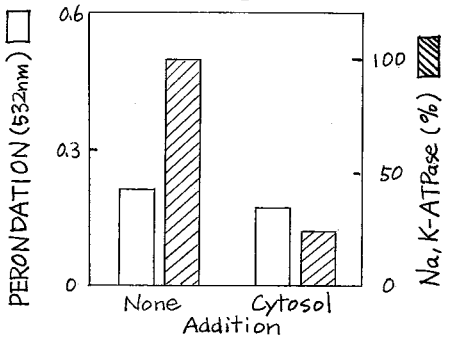


図7. 可溶性画分の影響



〈文　献〉

1. Baxendale, J. H., and Khan, A. A. (1969) Int. J. Radiat. Phys. Chem. 1, 11-24
2. Bors, W., Michel, C., and Saran, M. (1979) Eur. J. Biochem. 95, 621-627
3. Boxall, R. R., and Phizackerley, P. J. R. (1973) Biochem. Soc. Trans. 1, 129-131
4. Godfraind, T., Koch, M. -C., and Verbeke, N. (1974) Biochem. Pharmacol. 23, 3505-3511
5. Haber, F., and Weiss, J. (1934) Pro. R. Soc. Lond. Ser. A147, 332-351
6. Halliwell, B., and Foyer, C. H. (1976) Biochem. J. 155, 697-700
7. Kellogg, III, E. W., and Fridovich, I. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8812-8817
8. King, M. M., Lai, E. K., and McCay, P. B. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6496-6502
9. Lee, S. L., and Phillis, J. W. (1977) Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 961-964
10. Logan, J. G., and O'Donovan, D. J. (1976) J. Neurochem. 27, 185-189
11. Matsuda, T., Maeda, S., Baba, A., and Iwata, H. (1979) J. Neurochem. 32, 443-448
12. Ottolenghi, A. (1959) A. Biochem. Biophys. 79, 355-363
13. Schaefer, A., Komlos, M., and Seregi, A. (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 1781-1786
14. Sharma, O. P., and Murti, C. R. K. (1976) J. Neurochem. 27, 299-301
15. Wilbur, K. M., Bernheim, F., and Shapiro, O. W. (1949) A. Biochem. Biophys. 24, 305-313
16. 郭 哲輝, 畑 文明, 吉田 博 (1978) 神経化学 17, 125-128

40 虹彩のムスカリン様アセチルコリン受容体の生理機能と遮断薬の特異的結合について

松田友宏・樋口宗史・吉田　博
(阪大・医・I薬理)

〔要　約〕

ウサギ虹彩中心部の輪状方向の瞳孔括約筋(副交感神経支配)標本と、虹彩の放射状方向の瞳孔散大筋(交感神経支配)標本に対するアセチルコリン(ACh)の作用を調べた。これら平滑筋は生理的には拮抗筋であるにもかかわらず、AChによりいずれも一過性に収縮され、濃度依存的な脱感作様現象がみとめられた。しかし、AChのED_{50}は括約筋では7×10^{-7}M, 散大筋では3×10^{-5}Mであり、括約筋に対する親和性の方が約40倍大であった。

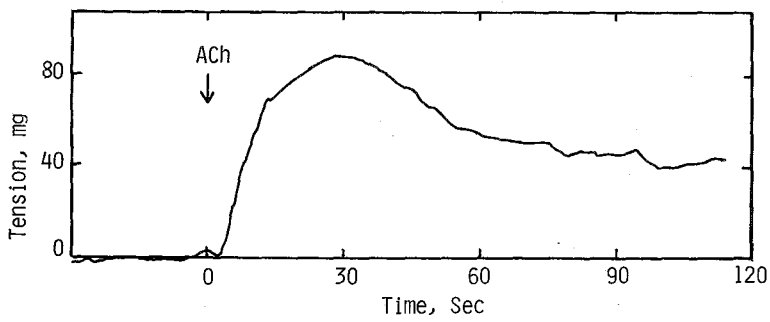
次に虹彩を括約筋が局在する中心部と散大筋が存在する周辺部に二分し、これらの膜分画へのムスカリン様遮断薬[^{3}H]QNB(キヌクリジニルベンジレート)の特異的結合を調べた。いずれの部位においても[^{3}H]QNBの結合曲線は双曲線状であり、Scatchardプロットではほぼ一直線となった。[^{3}H]QNB結合の蛋白当りの最大結合量ならびに親和性は中心部と周辺部でほとんど変らず、解離定数K_Dはそれぞれ1×10^{-10}, 0.7×10^{-10}Mであった。

以上の結果は、生理的に副交感神経終末より遊離されるアゴニスト、AChは主として瞳孔括約筋に作用して縮瞳させるのに対し、ムスカリン様遮断薬QNBは実際には括約筋にも散大筋にも同程度に結合するが、薬理作用としては括約筋のムスカリン様ACh受容体へのAChの作用を遮断し散瞳作用として発現されることを示している。

表1. 各種アゴニストの括約筋及び散大筋への作用とそのED_{50} (mean±S.E.(例数))

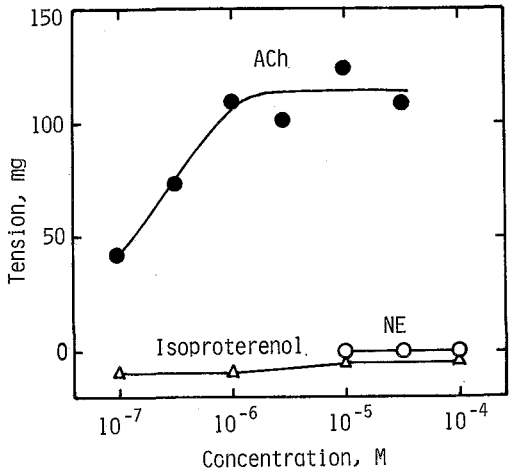
	瞳孔括約筋	瞳孔散大筋
アセチルコリン	収縮 $(6.5\pm3.4)\times10^{-7}$M(4)	収縮 $(2.5\pm1.8)\times10^{-5}$M(4)
ノルエピネフリン	作用なし	収縮 $(9.5\pm2.2)\times10^{-6}$M(5)
イソプロテレノール	弛緩 $<10^{-7}$ M(2)	収縮 $(8.5\pm5.9)\times10^{-5}$M(4)

図1. AChによる括約筋収縮の時間経過



高等動物において、光受容器(眼)に入る光量は瞳孔の大きさに依存しており、これは瞳孔を形成する虹彩irisの二種の平滑筋により調節されている。平滑筋の一つは瞳孔括約筋M. sphicter pupillaeであり、これは虹彩中心部に位置し、瞳孔を輪状にとりまいており、毛様神経節からの副交感神経節後線維(伝達物質はACh)の支配を受けている。他は瞳孔散大筋M. dilatator pupillaeであり、虹彩中心部から周辺へ放射状に走行し、上頸神経節からの交感神経節後線維(伝達物質はノルエピネフリン, NE)

図2。括約筋のAChによる収縮

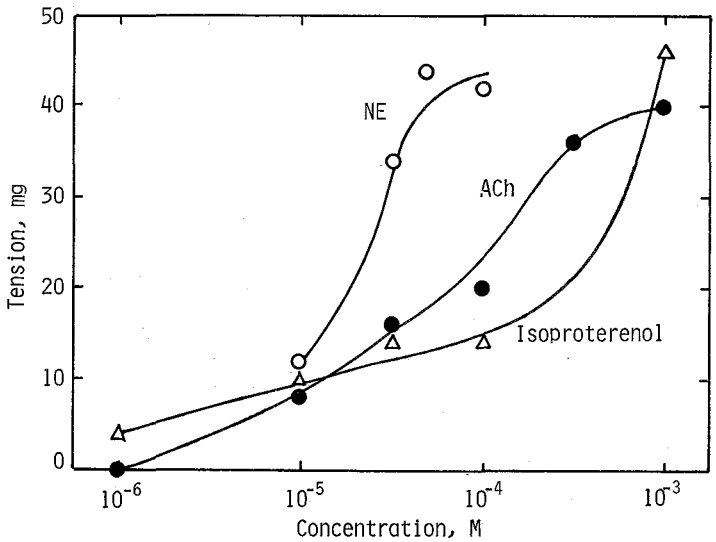


の支配を受けている[3]。従来我々は中枢神経系におけるAChの合成、貯蔵、遊離[5]、受容体[6]について研究して来たが、今回は瞳孔の大きさを支配するこれら平滑筋のムスカリン様ACh受容体について、筋収縮と遮断薬の特異的結合をマーカーとして検索し、二三の知見を得たので報告したい。

（実験材料と方法）

動物はウサギ（体重2～3 kg）を用いた。動物を空気塞栓により致死せしめ、眼球を摘出し、虹彩を中心部と周辺部に二分した。平滑筋収縮実験は生理的眼房水を模したリンゲル溶液（NaCl, 118; $NaHCO_3$, 25; KH_2PO_4, 1.19; KCl, 4.06; $MgSO_4$, 0.78; $CaCl_2$, 1.7; グルコース, 5.56; アスコルビン酸, 1.25; いずれもmM）10 ml中、37°Cで通気し、一定張力（約40 mg）下に行った。AChは physostigmine, 10^{-4}～10^{-5} M前処理後に作用させた。収縮張力は圧力変位トランスデューサー（日本光電, SB-1T）を用い、ポリグラフで測定した。膜分画の調製、[^{3}H]-QNB特異的結合実験はYamamuraらの方法[8]に順じた。ポットロンで破壊されない結合組織様の粗大浮遊物はナイロンメッシュで除去した。特異的結合は 10^{-5} Mアトロピン存在、非存在下の結合の差より求めた。蛋白定量はLowryら[4]によった。

図3。散大筋のAChによる収縮

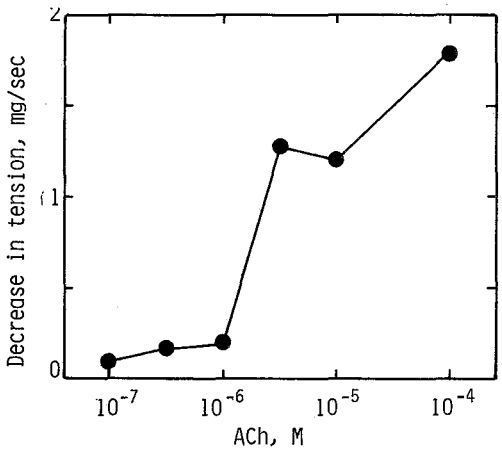


（実験結果と考察）

1) 括約筋に対するAChの作用：瞳孔括約筋はAChにより著明に一過性に収縮した（図1）。ACh濃度と最大収縮張力との作用曲線は図2に示す（ED_{50} は $(6.5 \pm 3.4) \times 10^{-7}$ M）。NEは無効、イソプロテレノール（10^{-5}）はやや弛緩させた[7]。これらは括約筋収縮（縮瞳）のコリナージックの優位を示すものであった。

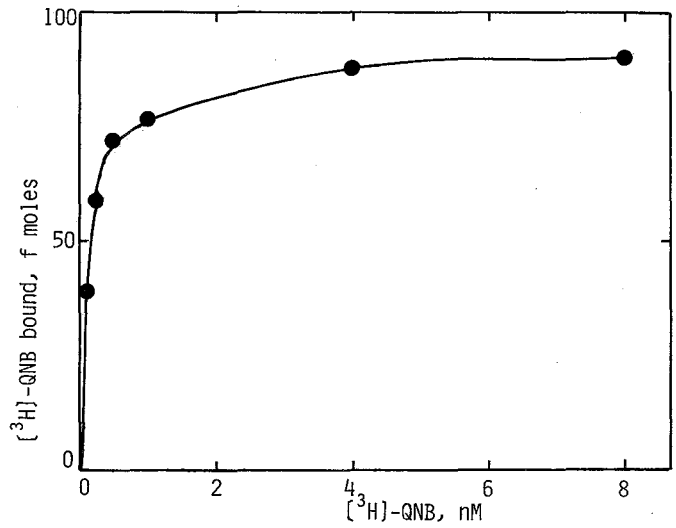
2) 散大筋に対する

図4. AChの脱感作様現象の濃度依存性



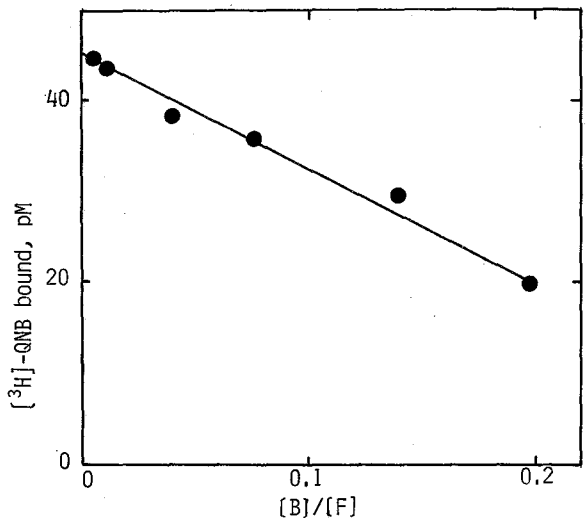
AChの作用：括約筋の括抗筋である瞳孔散大筋もAChにより収縮した（図3）が、AChのED_{50}は$(2.5 \pm 1.8) \times 10^{-5}$ Mであり、親和性は括約筋の約1/40であった。NE, Isoによっても収縮し、ED_{50}はそれぞれ$(9.5 \pm 2.2) \times 10^{-6}$ M, $(8.5 \pm 5.9) \times 10^{-5}$ Mであり、散大筋収縮（散瞳）における NE作働性の優位を示していた。括約筋、散大筋のAch収縮はアトロピンにより遮断され、クラレは無効であることから、これらのAch受容体はムスカリン様であることを示していた。表1に要約したように、Achは括約筋、散大筋ともに収縮させるが、親和性は括約筋において著しく大であるので生理的には縮瞳をひき起こす。一方、NE（α-アゴニスト）は散大筋のみを収縮させ、Iso（β-アゴニスト）は括約筋を弛緩させるとともに、散大筋を収縮させることになり、散瞳に対して協同的に作働していることになる。3) Achによる脱感作様現象：図1の括約筋の最大収縮張力の減少はAch濃度に依存しており、特に10^{-6}M以上において著明にあらわれた（図4）。これはアゴニスト高濃度存在下の受容体の脱感作様現象と思われるが[2]、NE収縮では認められず、収縮は持続的であった。

図5. 虹彩中心部膜分画への[^{3}H]-QNBの結合曲線



4) 虹彩膜分画への[^{3}H]-QNBの特異的結合の性質：図5は虹彩中心部膜分画への[^{3}H]-QNBの双曲線状の結合曲線を示し、図6はこのScatchardプロットがほぼ一直線上にのることを示している。[^{3}H]-QNBの解離定数K_Dは$(9.8 \pm 2.5) \times 10^{-11}$であった。周辺部についても同様の結合の性質を示し、K_Dは$(7.3 \pm 1.2) \times 10^{-11}$ Mであり、虹彩各部位の[^{3}H]-QNB結合親和性はほぼ等しかった。5) 虹彩における[^{3}H]-QNB結合の分布：中心部と周辺部の膜分画へ

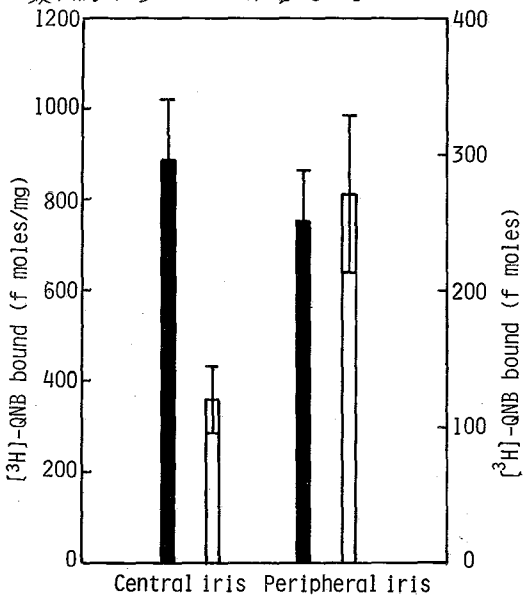
図6．虹彩中心部膜分画への[³H]－QNBの結合のScatchardプロット



の[³H]－QNBの蛋白mg当りの最大結合量（比活性）は有意差なく700～900 fモル/mgであった。最大結合の総量は周辺部は中心部の約2倍大であった（図7）。

以上の結果は副交感神経終末から遊離される生理的なアゴニストAChは主として瞳孔括約筋に作用して縮瞳させるのに対し、ムスカリン様遮断薬[1]QNBは実際には括約筋にも散大筋にも同程度に結合するが、薬理作用としては括約筋のムスカリン様Ach受容体へのAchの作用を遮断した縮瞳作用として発現されることを示している。

図7．虹彩中心部及び周辺部の膜分画における[³H]－QNB結合の蛋白mg当りの最大結合量（■）と総量（□）



（文献）

1) Albanus, L. (1970) Acta pharmacol. toxicol. 28, 305-326.
2) Changeux, J.-P. et al. (1976) The Synapse, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XL, pp.211-230.
3) Koelle, G.B. (1975) The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman, L.S. and Gilman, A., eds) pp.404-444, MaCmillan Publishing Co., New York.
4) Lowry. O.H. et al (1951) J. biol. Chem. 193, 265-275.
5) Matsuda, T. et al. (1979) Neurobiology of Chemical Transmission (Otsuka, M. and Hall, Z. eds) pp.77-89, John Wiley & Sons, New York.
6) Matsuda, T. (1979) Abstracts of Symposium on Drugs acting on the Autonomic Nervous System, p.2, Kyoto.
7) van Alphen, G.W.H.M. (1976) Invest. Ophthalmol. 15, 502-505.
8) Wastek, G.J. and Yamamura, H.I. (1978) Mol. Pharmacol. 14, 768-780.

41 ミエリン塩基性蛋白の酵素イムノアッセイについて

四宮由美子・加藤進昌・今澤正興
宮本侃治
(国立神経センター)

〔要約〕

1)ミエリン塩基性蛋白(MBP)の酵素イムノアッセイによる定量法を確立した。まず成熟ニワトリ脳より精製した電気泳動的に均一なMBPを抗原として，ウサギより抗体を得た。次にMBPにワサビペルオキシダーゼ(HRP)をラベルしたconjugateを調整した。本法は抗体に対し，測定すべきMBPとconjugateを競合して結合させ，抗体と結合した，conjugate中のHRPの酵素活性を蛍光測定することにより，MBPを定量するという原理を用いた。また不溶化ヤギ抗体(Sepharose 4B-抗ウサギIgG)を使用するニ抗体固相法を採用した。

方法の測定範囲は1.6×10^{-13}～2.7×10^{-11}mole(3～500ng)で，変動係数は15%以内であった。またニワトリ脳のMBPに対する抗体は，ウシ脳MBPと交叉反応を呈するが弱く，また代表的な生体塩基性蛋白であるヒストンとは交叉しなかった。

2)この方法を用いて，ニワトリ発達過程，特にミエリン形成期のMBPを測定した。孵卵す3週からMBPの増加が著しくなり，ミエリン形成にほぼ平行して増量することを認めた。MBP量はミエリン形成前と考えられる孵卵14日目では2μg/脳にすぎないが，ミエリン形成の始まった後の孵卵17日，21日ではそれぞれ10μg/脳，166μg/脳と増量し，孵化後10週では7.3mg/脳(3.3μg/mg脳湿重量)となった。この値は，電気泳動，RIAにより成熟ラット脳で報告された値と比較し得るものであった。

ミエリン形成に伴い，セレブロシド，スルファチド，イノシチド，プラスマローゲン，2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNP)活性，ミエリン塩基性蛋白(MBP)などが増量することは従来から報告されている。このうちMBPは，電気泳動後の光学的手段により定量されてきたが，定量性には乏しかった。最近，MBPのラジオイムノアッセイ(RIA)[2)3)]が開発され，ngレベルでの測定が可能となった。しかしRIAを行なう場合には，ラベルに用いるアイソトープの種類による半減期(^{125}Iでは60日)，ラベル体を合成するための取扱い施設などの規制の多いことが不利な点である。

そこで上記のRIAの欠点をさけるため，酵素イムノアッセイ(EIA)を採用することとし，著者の一人が報告した甲状腺刺激ホルモンのEIA[4)]を応用して，MBPのEIAによる測定法を確立したので報告する。またこの方法を用いてミエリン形成に伴う脳のMBPを測定したのであわせて報告する。

この測定法はオリゴデンドログリアにおけるMBPの生成などの生化学的研究，またはMSなどの疾患研究にも応用できると考えられる。

実験材料と方法

1)MBPの精製：成熟ニワトリ脳から前報[6)]に準じてミエリンを得，凍結乾燥後，クロロホルム－メタノール(2:1 V/V)(乾燥ミエリン100mgあたり30ml)で室温，30分抽出した。不溶物を遠心(1500×g，30min，4°C)により除去した後，上清に$\frac{1}{20}$容の1N塩酸を加え，0°C，1時間撹拌したのち，同量のメタノールを加えて遠心(1500×g，15min，4°C)，沈殿を得た。これを少量の上記と同組成の溶媒で洗浄した後，水に対し透析，凍結乾燥したものをMBP標品とした。このMBPは0.1%SDS，12%アクリルアミドスラブゲル電気泳動

(20mA, 3.5hr, pH 8.3)により，単一バンドであることを確認した。また乾燥重量1gのミエリンより約20mgのMBPを得た。

2)ワサビペルオキシダーゼ(HRP)－MBP conjugateの調整：HRPを用いたconjugateの調整法はNakane[7]らに準じた。ただし本法の目的であるMBPは，NakaneらがIgG等に用いた炭酸緩衝液には難溶であるため，我々はtriethanolamine－acetate(TEA)緩衝液を用いた。すなわちHRP(type Ⅲ, 290U/mg, Sigma)水溶液5mg/mlに，0.1M $NaIO_4$ 0.2mlを加え，室温，20分撹拌してHRP-アルデヒドとし，1mM TEA緩衝液(pH5.0)に対し，4°Cで一夜透析した。このHRPアルデヒド4mgに精製したMBP 1mg(モル比，HRP：MBP＝約2：1)を加え，14mM TEA緩衝液(pH8.5)2.2ml中で室温，3時間反応させた。これに0.1M $NaBH_4$ 0.1mlを加え，4°C，2時間撹拌して反応を停止し，結合を安定化した後，50mM Tris-acetate緩衝液(pH7.3)に対して透析した。さらにSephadex G-100カラム(1.6×84cm)を用い，溶出液：50mM Tris-acetate緩衝液(pH7.3)，flow rate：0.1ml/minの条件でゲル濾過した。溶出液(2ml/tube)は280nmで蛋白量を，403nmでHRP量を測定した。さらにHRP－MBP conjugateとして溶出された画分には，BSAを終濃度1%に添加し，0.1mlずつ分注して−30°Cで保存した。

3)MBP抗体の作成：生食に溶解したMBP(2mg/ml)に，同容量のFreundの完全アジュバントを加えてエマルジョンとし，ウサギ(3kg，3羽使用)の頸部および背部，約100ヶ所に皮内注射した。1羽につき，初回の免疫にはMBP 1mg，その後2週間間隔で0.5mgずつ4～5回追加免疫した。今回の実験には，4回目の免疫後2週間経て耳動脈より採血した抗血清を−30°Cで保存し使用した。

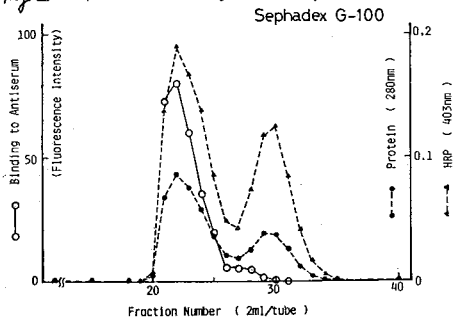
4)不溶化ヤニ抗体としてのSepharose 4B－抗ウサギIgGの調整：抗ウサギIgG抗血清(ヤギ)(生化学工業)を用い，硫安34%飽和による沈殿をIgG粗分画とした。さらにAxénら[1]により，Sepharose 4 BをBrCNにより活性化し，上記粗分画IgGを結合させ，0.2M Tris-acetate緩衝液(pH7.3)に懸濁したものを4°Cで保存し，用時25倍希釈して用いた。

5)酵素イムノアッセイ：まず密栓付ポリステレンチューブ(1.1×8.2cm)に，試料溶液100μl，MBP抗血清100μl，不溶化ヤニ抗体500μl，0.5% BSAを含む0.2M Tris-acetate緩衝液(pH7.3)(EIA緩衝液)500μlを加え，4°C，18時間，回転させながら反応を行なった。次にHRP-MBP conjugateを100μl加え，4°C，3時間回転，遠心後，沈殿をBSAを含まないEIA緩衝液(4°C)で3回洗浄してヤニ抗体に結合したconjugateを得た。このconjugateのHRP量の測定には，BSAを含まないEIA緩衝液800μl，0.5% p-hydroxyphenyl propionate 50μl，0.01% H_2O_2 50μlを用い室温，60分の反応を行なった。次で1.25% KCN 50μlおよび1N NaOH 50μlで反応を停止し，遠心した上清に存在するp-hydroxyphenyl propionateのdimerを励起波長320nm，蛍光波長405nmで蛍光測定した。

6)発達過程のニワトリ脳のMBP測定：孵卵14，17，21日のニワトリ胚脳，孵化後1，3，5，10週の脳(いずれも小脳を除去)の湿重量約1gを用い，おのおの19倍容のクロロホルム―メタノール(2:1 v/v)によりホモジナイズし，遠心(1400×g, 10min)した。沈殿をさらにアセトンにより洗浄した後，窒素気流中で乾燥した。これを0.01N塩酸5ml/g脳湿重量(胚脳はMBP含量が少ないと考えられたため2ml/g脳湿重量)により抽出(4°C，1時間)，遠心した上清部をMBPの試料とした。遠心の不溶物をさらに2回洗浄して，前記上清部分に合わせた。

結果および考察

Fig. 1 Separation of the synthetic conjugate Sephadex G-100

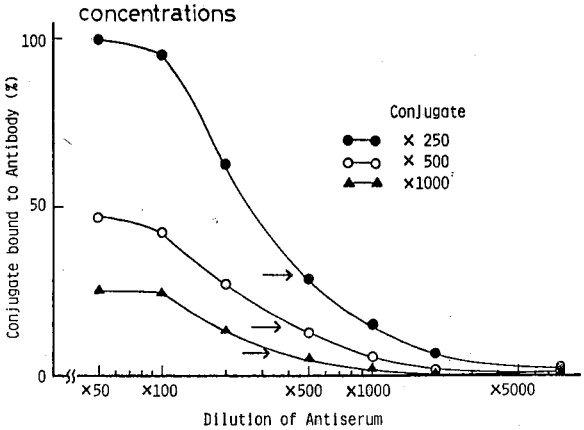


1) HRP-MBP conjugateの調整：調整されたconjugateはSephadex G-100カラムにより二つのピークに分離された(Fig. 1)。このうち，早く溶出されたピーク，すなわちフラクション番号21～26が抗体との結合能を示し，目的としたconjugateのピークとされた。フラクション番号27～35は抗体との結合がほとんど認められず，かつ，溶出位置がHRP標準品と一致することから，未反応のHRP-アルデヒドとされた。そこで今回の実験には以後，フラクション番号22(OD_{280nm}：0.087)を用いた。

2)抗体希釈とconjugate濃度の選択：RIAの場合には，まずラベル抗原のアイソトープ量を測定に便利なように希釈し，次に抗体希釈度を定める。そのために測定物質(非ラベル抗原)量が0の場合，ラベル抗原の約30%が結合するように抗体希釈度を設定することが，標準曲線の勾配を高め，測定感度をあげる一つの目安とされている。

Fig. 2には，異なったconjugate希釈度のそれぞれについて，conjugate結合量と抗体希釈度の関係を示した。それぞれの系列の最大結合量の30%の値を示す抗血清濃度を求めたところ，350～500倍希釈がそれにあたることを認めた。一方，EIAの場合のconjugate量については，抗体への結合量が少ない場合にもHRPの蛍光測定値が十分に読み得ること，安定していることが必要である。また調整するconjugateの経済性も考慮しなければならない。これらの条件を加味したconjugate量が原液の500倍希釈であった。そこで，今回得られた抗血清を500倍希釈，調整されたconjugateを原液の500倍希釈として，以下の実験を行なった。

Fig. 2 Effects of antiserum dilution and conjugate concentrations



The original conjugate solution (OD_{280nm}:0.087) was diluted as indicated in the figure. The line corresponding to X250 dil. of conjugate was expressed as 100, and the other two lines were shown in the relative values. The arrows indicated the 30% values of each maximum binding.

3)酵素イムノアッセイによる定量：Fig. 3に今回得られた抗血清とconjugateを上記のように希釈して用いた場合のMBP測定の標準曲線を示した。縦軸はconjugateの結合量をHRP活性で測定してB/B_0で表わし，横軸にはMBP量をlog目盛でとったsemilog表示のものである。今回我々が用いた抗体，conjugateでの測定範囲は1.6×10^{-13}～2.7×10^{-11} mole(3～500 ng)であり，イムノアッセイとしては非常に良いとは言い難いが，Engら[3]によって報告されたRIAと同程度の値であった。またFig. 3には標準偏差を示してあるが，変動係数は15%以下($n=10\sim15$)であった。

この方法による測定感度は，我々の実験目的には十分であったが，Cohen ら[2]は 2～10 ng という狭い範囲でのみ測定可能であるという RIA の方法を報告している。

Fig. 3 Standard curve of enzyme immunoassay

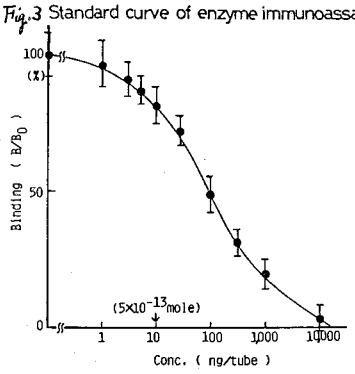
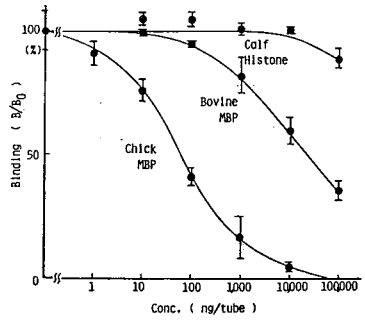


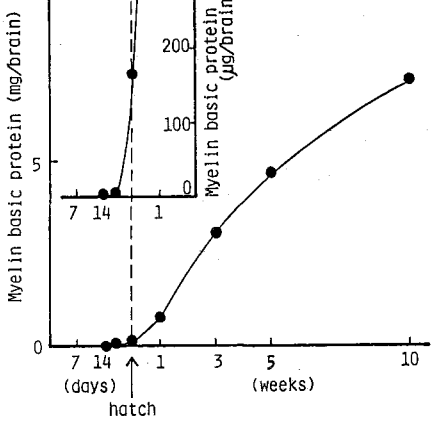
Fig. 4 Cross reaction of antiserum to chick myelin basic protein (MBP)



4) MBP 抗体の交叉反応：Fig. 4 に示すように，ウシ脳から得られた MBP も我々の抗体と交叉反応は示したが，conjugate の抗体への結合に対する競合阻害能はニワトリ脳 MBP に比して低く，50 % 阻害に要する量はニワトリ MBP の約 450 倍であった。一方ヒストン (type II，仔牛胸腺 Sigma) は 10 ng～100 μg の範囲では交叉反応を示さなかった。このように我々の用いた抗体は，ニワトリ MBP に特異性が高いものであることが認められた。

5) 発達過程におけるニワトリ脳の MBP：Fig. 5 に示したように孵卵後 3 週から急激な増加率を示し，これは前報[6]の CNP 活性の上昇よりやや遅れて平行し，ミエリン形成に伴って増加することを確認した。しかしミエリン形成前と考えられる孵卵 14 日目には 2 μg/脳にすぎず，これが，ミエリン形成の始まった後の孵卵 17 日目，21 日目になると 10 μg/脳，166 μg/脳と急激に増加した。また孵化後 10 週の脳では 7.3 mg/脳 (3.3 μg/mg 脳湿重量) にまで達するが，これは成熟ラット脳における電気泳動法による測定[5] (2.6～3.9 μg/mg 脳湿重量)，および RIA による測定[2] (2.5 μg/mg 大脳皮質湿重量) と相応する値であった。

Fig. 5 Myelin basic protein of developping chick brain



酵素イムノアッセイ法について，種々の御助言をいただき，さらに蛍光試薬その他を提供下さった昭和大学，薬学部，分析化学教室，辻章夫教授，ならびに，ウシ脳の MBP を提供下さった東京大学，脳研究所，池田和彦氏に厚く感謝する。

文献

(1) Axén,R., Porath,J., and Ernback,S. (1967) Nature 214, 1302
(2) Cohen,S.R., McKhann,G.M., and Guarnieri,M. (1975) J. Neurochem. 25, 371
(3) Eng,L.F., Lee,Y-L., Williams,K., Fukayama,G., Gerstl,B., and Kies,M. (1978) Myelination and Demyelination, Advances in Experimental Medicine and Biology 100, 329 Plenum, New York
(4) 加藤進昌 (1979) 日本内分泌学会雑誌 55, 720
(5) Martenson,R.E., and Gaitonde,M.K. (1969) J. Neurochem. 16, 333
(6) 宮本帆治，倉田孝一，池田佳子 (1975) 精神薬療基金研究年報 7, 35
(7) Nakane,P.K., and Kawaoi,A. (1974) J. Histochem. Cytochem. 22(12), 1084; and personal communication (1979)

42 ミエリンよりの塩基性蛋白—酸性脂質複合体の単離・同定・生物活性

国下龍英・武富　保
(信大・順応研・生化)

〔要　約〕

犬乾燥ミエリンを n-propanol-n-hexane (P-H, 2:3 V/V) で抽出し，その抽出残渣をさらに chloroform-methanol (C-M, 2:1 V/V) で抽出すると、proteolipid protein 様物質と酸性脂質が特異的に得られた[1]。すなわち，酸性脂質は主に Sulfatide と Phosphatidyl serine から成り，それぞれ脂質の 63.5%，26.1% (重量%) であった。また蛋白の主成分はミエリン塩基性蛋白 (分子量 18300 dalton) であることが，SDS-スラブ電気泳動により確認された。今回，これら脂質と蛋白がイオン結合により複合体を形成していることが GONZALES-SASTRE の方法[2]を適用して確認されたので報告する。この際，脂質成分として上記以外に GM1 ganglioside が有意義に，特異的に存在することも認められた。また塩基性蛋白－酸性脂質複合体画分によって引き起こされたモルモットの実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) は塩基性蛋白によって引き起こされた通常の場合より臨床的発症率が低く (2/5, 1/6)，発症までいくぶん長い期間を必要とした (21-36日)。組織化学的には，発症モルモットでは血管壁周辺への単核、多核白血球浸潤が脊髄で強く，大小脳，脳幹では散在的であったが、播種性アレルギー性脳脊髄炎であることは間違いなかった。

犬乾燥ミエリン P-H 抽出残渣の C-M 抽出物に酸性脂質と蛋白が含まれており，蛋白はアミノ酸分析，スラブゲル電気泳動によりミエリン塩基性蛋白であることが確認された。我々は，この複合体の結合様式を解明すると同時に，天然より得られた塩基性蛋白－酸性脂質複合体による EAE 発症実験を行ない，C-M 抽出物による EAE 発症の事実を明確にすることを試みた。また，酸性脂質の中に GM1 ganglioside が特異的に存在することが確認されたので，P-H 溶媒の gangliosides 抽出能力などにも検討を加えた。

〔実験材料および方法〕

○実験材料　犬大脳白質，灰白質を用いた。ミエリンは犬脳白質より Sun & Sun[3]の方法により調整した。EAE 発症実験には，ハートレー系モルモット (♀) 体重 486-544g (A group; 5匹)，526-862g (B group; 6匹) を用いた。

○抽出および精製　ミエリンの脂質および蛋白の抽出は Fig. 1 に示したごとく行なった。GONZALES-SASTRE の方法は乾燥ミエリン P-H 抽出残渣の C-M 再抽出物について適用し，電解質として 1N KCl を用いた。常法どうり，析出した蛋白を遠心分離によって得た。上清部は DEAE-Sephadex A-25[4], Sephadex A-25 処理の後、TLC, GLC により酸性脂質を検索した。P-H 溶媒の gangliosides 抽出能力の検索には，脳白質，灰白質について，組織量に対し 20 倍量の溶媒 (P-H または C-M) を用いて行ない，二度のカラムクロマトグラフィー (Kieselgel 40-Kieselgur G; 1:1 W/W)[5]とアルカリ加水分解 (chloroform-methanolic 0.2N NaOH; 2:1 V/V) で精製して検討した。

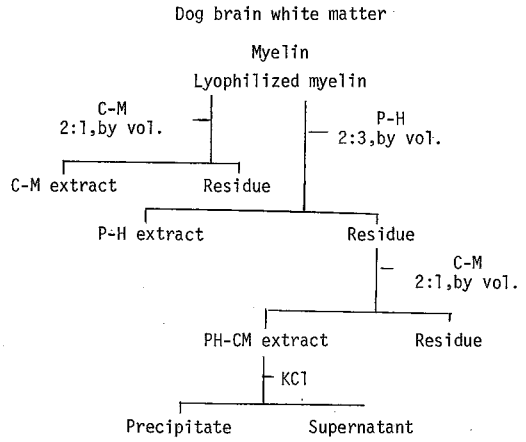


Fig.1 Solvent extraction of myelin lipids and proteins

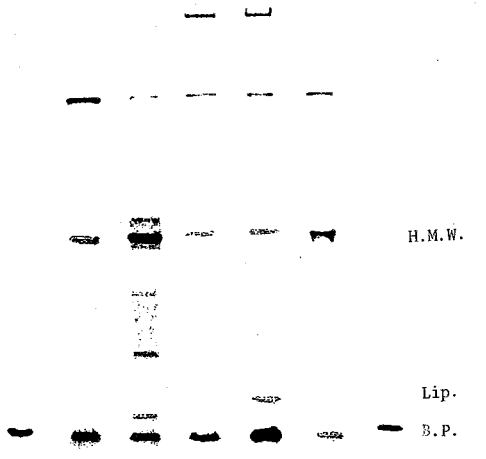
○分析および定量　リン脂質は Bartlett 法[6]，Cholesterol は Zak の方法[7]，糖脂質は Methanolysis 後 GLC（2% OV-7，2m，160℃ および 140-220℃ 昇温）でマニトールを内部標準として定量した。gangliosides は Resorcinol-塩酸法[8]により，また各 ganglioside 組成は TLC 展開後（C-M-2.5N ammonia；60:35:8，C-M-0.25% KCl；60:35:8，by vol），ヨウ素発色し，同 Resorcinol 法[9]，上記 GLC で定量した。13% polyacrylamide－0.1% SDS スラブ電気泳動（ゲル厚 1.5 mm，25mA 定電流）は Laemmli の方法[10]によった。試料はそれぞれ蛋白量として約 20μg 使し，染色は Coomassie Brilliant Blue R-250 / 酢酸－isopropanol で行なった。ミエリン抽出物中の蛋白と脂質の比率は Carrier として ^{15}N-硫酸アンモニウム（^{15}N；99 atom%）を用い ^{15}N-analyzer による ^{15}N の希釈法によって求めた。その他の場合の蛋白量は Marjorie らによる Lowry の変法[11]で牛血清アルブミンを対象として決定した。

○EAE 実験　ミエリンから得られた蛋白－脂質溶液（蛋白量として 20,64μg/ml）を用い，Saline，Freund Complete Adjuvant（FCA；5mg/ml の Mycobacterium bovis 含）の emulsion を作成した。この液を各モルモットの footpad に 0.15－0.2ml（蛋白量として 77.4－82.5μg）注入した。発症は体重減少（80% 以下），下肢麻痺，下肢衰弱，失禁で判定した。実験は感作時より 60 日間飼けた。

○発症モルモットの組織化学的観察　発症モルモットの中枢神経を PBS（pH 7.4）中 10% ホルマリン固定し，大脳から馬尾に至る 13 ケ所の切片について，Hematoxylin-Eosine，Luxol fast blue－kresyl violet 染色した（信州大学医学部精神科神経科に依頼）。

〔結果〕

○ミエリン P-H 抽出残渣の C-M 抽出物（PH-CM 抽出物）中の脂質と蛋白　脂質（gangliosides 画分を除く）は主として Sulfatide と Phophatidyl serine から成り，それぞれ脂質中 63.5%，26.1%（重量%）を占めた。その他 Sphingomyelin（7.2%），Cholesterol（3.0%）が存在した。蛋白は Fig. 2 に示したごとく，ほとんどが塩基性蛋白で，その他微量の高分子蛋白（Wolfgram 蛋白が主成分）と Lipophiline（分子量 2,3000 dalton）が存在していた。またこの泳動の結果は，PH-CM 抽出物中に塩基性蛋白が特異的に存在し，PH-CM 抽出残渣にはあまり存在していないことを示した。さらにミエリンの C-M 抽出物中でほぼ唯一の蛋白も塩基性蛋白であった。蛋白に対する脂質の重量比は 0.39 で，これは蛋白をすべて塩基性蛋白と仮定すると，モル比で 8.8 と計算された。PH-CM 抽出物に Gonzales-Sastre の方法を適用して得られた蛋白は塩基性蛋白で，塩を含

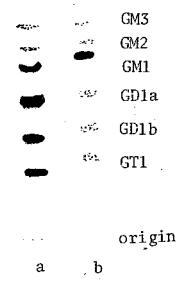


a; pig basic protein, b; myelin protein,
c; C-M residue protein, d; C-M extracted protein
e; PH-CM extracted protein,
f; PH-CM residue protein,

H.M.W.; high molecular weight protein,

Lip.; lipophiling, B.P.; basic protein,

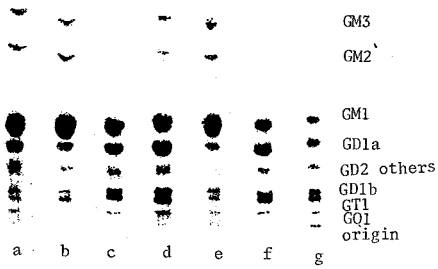
Fig. 2 Polyacrylamide electrophoresis of myelin protein



a; control gangliosides,
b; Myelin gangliosides,

Fig. 3 Myelin gangliosides of PH-CM extract

んだ C-M 可溶部には，Sulfatide, Phosphatidyl serine の他に GM1，その他微量の GD1a，GD1b，GT1，GM2，GM3 gangliosides が見い出された（Fig. 3）。この画分の脂質結合性シアル酸は NANA で Sulfatide に対し 0.46 molar ratio であった。他の酸性脂質とともにこの画分に gangliosides が得られたことが，蛋白との複合体形成の結果なのか，あるいは，単に P-H 溶媒の抽出能力によるものなのかを検討するために，以下の実験を行なった。



white matter : a; C-M extract,
b; P-H extract, c; PH-CM extract,
grey matter : d; C-M extract,
e; P-H extract, f; PH-CM extract,
g; control dog brain gangliosides

Fig. 4 TLC pattern of gangliosides extracted from dog brain

○ P-H, C-M 各溶媒による gangliosides 抽出能力の比較　Fig. 4 に示したごとく，P-H, C-M ならびに PH-CM 抽出による結果は，P-H 抽出が monosialosyl gangliosides 以上の極性を持つ gangliosides の抽出には適していないことを示した。P-H 抽出残渣を C-M 再抽出することにより，di, tri, tetra sialosyl gangliosides は高濃度で回収された。一方，ミエリン乾燥物に同様の操作を行なった場合には，P-H 抽出物中にほとんど gangliosides は存在せず，PH-CM 抽出物中に回収された。従って，ミエリンの PH-CM 抽出物中に得られた gangliosides の一部は，P-H の持つ抽出能力の限界のために抽出されずに残された可能性も否定できない。

○ EAE　発症率は Table 7 に示したごとく，2つの group において低かった（2/5, 1/6）が，塩基性蛋白単一で感作した場合より，発症までの日数および発症より死亡までの日数が長くなっていた。また臨床的にも，ほとんどの場合下半身のみの衰弱が目立った。

○ 発症モルモットの病理組織学的所見　中枢神経系内に細胞浸潤と血管周囲性肉芽

	A group		B group
感作時体重 (g)	486-544		526-862
感作タンパク量 (μg)	82.5		77.4
発症率(麻痺時)	2/5		1/6
発症までの日数 (days)	21	28	17
死亡までの日数 (days)	32	36	21
死亡時の体重減少 (%)	-32.4	-31.1	-25.4
症状	下半身麻痺 衰弱 ソシャク不能 失禁	下半身衰弱 うずくまり ソシャク不能 失禁	下半身麻痺 ソシャク不能 失禁

Table 1 Clinical signs of the guinea pigs with EAE

性変症が見られた。浸潤細胞はリンパ球が主で，脊髄では多核好中球の浸潤がかなり強かった。変化は脊髄（特に馬尾，腰髄）に最も強く，脳幹，大小脳にも散在していた。髄膜，血管周囲，脈絡膜に変化が見られ，灰白質よりも白質に好発していた。しかし，病変の周囲に脱髄の拡がる傾向は見られなかった。

〔 考 察 〕

乾燥ミエリン p-H 抽出残渣の C-M 再抽出物に，塩基性蛋白と酸性脂質が特異的に存在したことは，ミエリン中にこれらの物質が複合体の形で存在していることを示唆した。今回の抽出法でこの複合体を変化なく高収量で取り出すことが出来たのではないかと考えられた。pH-CM 抽出物中の複合体がイオン結合を中心として，塩基性蛋白と酸性脂質が結合して形成されたものであることは Gonzales-Sastre の方法によって確かめられた。ここで得られた蛋白の存在しない C-M 可溶部には，Sulfatide，Phosphatidyl serine の他，GM1 ganglioside を主成分とする脂質（その他微量の gangliosides）も新たに見い出されたので，GM1 ganglioside が複合体形成に関与する可能性も示唆された。また脂質と蛋白のモル比は 8.8:1 であり，monolayer，bilayer system での実験で得られている比率（30:1[12]，19:1[13]，20-23:1[14]）よりは低いものの，抽出操作などが加わっているので妥当な値と考えられた。この蛋白－脂質複合体によって引き起こされた EAE は臨床的な発症および発症から死亡までが，それぞれ 17-28日，4-11日と長くなっていた。この結果は永井によって MS のモデルとして行なわれたモルモットの発症結果[15]（Sulfatide で前感作した後，Sulfatide と塩基性蛋白よりなる FCA で感作）と類似したものであったが，我々の実験では酸性脂質による前感作は必要としなかった。

〔 文 献 〕

1) 風下龍英，武富保：脂質生化学研究，20，257-260，1978
2) GONZALES-SASTRE,F. : J.Neurochem., 17, 1049-1056, 1970
3) SUN,G.Y. and SUN,A.Y. : Biochim.Biophys.Acta., 280, 306-315, 1972
4) YU,R.K. and LEDEEN,R.W. : J. Lipid Res., 13, 680-686, 1972
5) KAWAMURA,N. and TAKETOMI,T. : J.Biochem., 81, 1217-1225, 1977
6) BARTLETT,R. : J.Biol.Chem., 234, 466-468, 1959
7) ZAK,B. : Amer.J.Clin.Pathol., 27, 583-588, 1957
8) SVENNERHOLM,T. :Biochim.Biophys.Acta., 24, 604-611, 1957
9) MIETTINEN,T. and TAKKI-LUUKKAINEN,I.T. : Acta.Chem.Scand., 13, 856-858, 1959
10) LAEMMLI,U.K. : Nature, 227, 680-685, 1970
11) MARJORIE,B.L. and PAXMAN,S. : Anal.Biochem., 47, 184-192, 1972
12) DEMEL,R.A. et al. : Biochim.Biophys.Acta., 311, 507-519, 1973
13) BANIK,N.L. and DAVISON, A.N. : Biochem. J., 143, 39-45, 1974
14) PALMER,F.B. and DAWSON,M. : Biochem.J., 111, 629-636, 1969
15) NAGAI,Y. : "MULTIPLE SCLEROSIS IN ASIA" Proceeding of the Asian Multiple Sclerosis Workshop, Ed. by Japan Medical Research Foundation, pp 207-223, 1975, University of Tokyo Press, Tokyo

43 ウシ末梢神経ミエリンのPASII糖蛋白より得られた糖ペプチドについて

北村邦男・鈴木　勝・植村慶一
(埼玉医大・I生理)

〔要　約〕

ウシ末梢神経ミエリンの14K糖蛋白(PASII蛋白)の糖鎖結合部のアミノ酸配列を決定し、末梢ミエリン主要糖蛋白である28K糖蛋白(P0蛋白)の糖鎖結合部と比較した。精製PASII蛋白をプロナーゼで消化すると、Asx, Thr, Ser, Glx およびCys各1モルを含有する糖ペプチド一種が得られ、PASII蛋白の糖鎖は一本であると考えられた。この糖ペプチドのN末端はマスクされており Edman法によるアミノ酸配列分析が出来なかったので、カルボキシペプチダーゼA消化, アミノエチル化後のトリプシン消化ペプチドの分析, ^{14}C-S-カルボキシメチル化糖ペプチドのピログルタミン酸アミノペプチダーゼ消化後のEdman分解、等の方法を用いた結果、PASII蛋白の糖鎖結合部のアミノ酸配列は.

Carbohydrate
↓
Glx-Asn-Cys-Ser-Thr

と決定された。糖鎖はAsnにN-アスパルチルグリコシラミン型結合していると考えられ、この種の糖鎖結合認識部構造とされているAsn-X-Thr(またはSer)構造をもつことが示された。又、PASII蛋白の糖鎖結合部構造はP0蛋白のGly-Asp-Asn(糖鎖)-Gly-Thrとは明らかに異なっており。この事実によりPASII蛋白がP0蛋白の分解産物であるという考えは完全に否定された。

末梢神経ミエリンには分子量2.8万(28K)のP0蛋白および14KのPASII蛋白の2種の糖蛋白が存在する。これらの糖蛋白は種々の動物に共通して存在しており、ミエリン形成とほぼ平行して増加することからミエリン形成における役割が注目されている[6]。我々はこの2種の糖蛋白を精製し、アミノ酸組成, 糖組成などを報告してきたが[2]、Eylarらのグループ はPASII蛋白がP0蛋白の分解産物であろうとの考えを示している[1]。この点について昨年度の本学会にて、ミエリンおよびP0蛋白のトリプシン消化物のSDS電気泳動法による分析を行い彼らの考えを否定する結果を示した[3]。今回はPASII蛋白とP0蛋白の糖鎖結合部のアミノ酸配列を比較し、その違いをもってPASII蛋白がP0蛋白の分解産物ではないとの確証を得たので報告する。

[実　験　方　法]

(1)糖ペプチドの精製; 昨年度に報告した方法[3]に従い精製PASII蛋白のStreptomyces griseusプロテアーゼ消化物よりSephadex G25なるびにG50を用いて糖ペプチドを精製した。

(2)カルボキシペプチダーゼA消化; 40 nmoleの糖ペプチドに対し1.6 nmole のDFP処理CPase Aを用い、0.2M N-エチルモルホリン-酢酸(pH8.5)中で0, 30, 60および120分間消化を行った。

(3)アミノエチル化; 糖ペプチド0.41 μmoleを0.27 mlの6M尿素, 0.2mM EDTA, 0.7M Tris-酢酸(pH8.6)に溶かし、2.5 μlのβ-メルカプトエタノールを加え室温にて5時間還元した後、5, 2.5, 2.5 μl のエチレンイミンを10分間隔で加えた。反応液は室温にて1時間放置後、0.05Mピリジン-酢酸を溶出液とするBio-Gel P2カラム(1×45cm)により脱塩した。

(4) アミノエチル化糖ペプチドのトリプシン消化；アミノエチル化糖ペプチド0.39 μmole を0.3 mlの0.1 M N-エチルモルホリン-酢酸(pH8.0)中で10μgのTPCK処理トリプシンで37°C 6時間、更に10μgのトリプシンを加え14時間消化した。消化物は上記のBio-Gel P2カラムで分画した。

(5) ^{14}C-Sカルボキシメチル化；80 nmoleの糖ペプチドを0.3 mlの4M尿素，5mM EDTA，0.5Mトリス-塩酸(pH8.6)中3.8 μmoleのβ-メルカプトエタノールで室温にて4時間還元後、0.18 μmoleの^{14}C-モノヨード酢酸(54 μCi/μmole)を含む3.8 μmoleのモノヨード酢酸でカルボキシメチル化した。室温にて10分間の反応の後Bio-Gel P2カラムに通しカルボキシメチル化糖ペプチド(Cm-GP)を得た。

(6) Cm-GPの脱ピログルタミン酸；Cm-GP(42 X 10^3 dpm)を0.2 mlの5mM EDTA，5mMメルカプトエタノール，5%グリセリン，0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)中25μgのピログルタミン酸アミノペプチダーゼで4°C 9時間処理後、更に25μgの酵素を加え室温にて14時間消化した。消化物は0.05Mピリジン-酢酸を溶出液とするSephadex G50 (1.5 x 96 cm)で分画した。

(7) アミノ酸組成ならびにアミノ酸配列分析；糖ペプチドは5.7 N塩酸中で110°C 18時間分解の後アミノ酸分析を行った。アミノ酸組成分析にはNa系，CPase消化遊離アミノ酸の分析はLi系で行った。手動Edman分解はポリブレン1 mgを加え既報の方法[4]で行った。PAS II蛋白およびP0蛋白のN末端部配列分析はシークエネーター(JAS47K)を用い0.25M Quadrol系で行った。PTHアミノ酸の同定は10% SE30 on Gaschrom Qを用い240°CにてのガスクロマトおよびPartigil 5を用いた高速液体クロマトにて行った。

[結果と考察]

(1) 糖ペプチドの精製；精製PAS II蛋白の5日間のStreptomyces griseusプロテアーゼ消化物より得られた糖ペプチドは一種のみであり、そのアミノ酸組成は既報[3]のごとくAsx, Thr, Ser, Glx, Cys各1分子より成るペンタペプチドであった。この事からPAS II蛋白の糖鎖は一本であると考えられた。

(2) CPase A消化；精製糖ペプチドを1/25(mole/mole)のCPase Aで消化すると、2時間でThr 0.97, Ser 0.73 mole/mole of peptideのアミノ酸が遊離し、それらの経時的変化から糖ペプチドのC末端部配列はSer-ThrCOOHと考えられた(図1)。

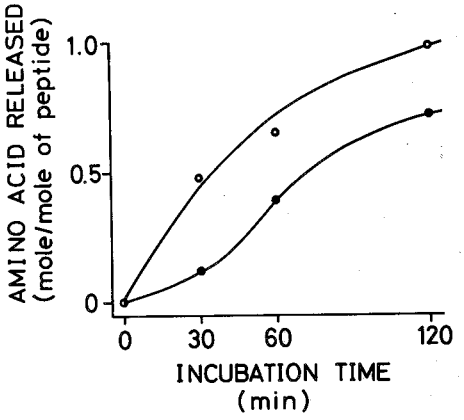


Fig.1. CPase A digestion of the glycopeptide derived from PAS II protein.
(o); Thr, (●); Ser

(3) アミノエチル化ならびにトリプシン消化；この糖ペプチドのN末端はほとんどブロックされており Edman法が適用出来なかったのでCysを含んでいることを利用してCysのアミノエチル化後のトリプシン消化を行った。アミノエチル化糖ペプチドをトリプシンで消化したものをBio-Gel P2で分画すると2つのペプチドピーク(T1, T2)に分離された(図2)。フラクション29のピークは加水分解後でもアンモニアのみしか見い出されなかったので反応液中のアンモニアによるピークと考えられた。2つの

Table 1. Amino acid compositions of tryptic peptides of aminoethylated-glycopeptide.

	Asx	Thr	Ser	Glx	AeCys*
T1	0.95	0.36	0.48	0.86	0.38
T2	0	0.36	0.43	0	0

The values were expressed as mole/mole of peptide used(390nmole).
*aminoethylcystein

ペプチドピークのアミノ酸組成は表1に示した様にT2はThrとSerより成るペプチドで、Asx, Glx, アミノエチル化Cys(AeCys)はT1にのみ存在した。T2はEdman分解の結果Ser-Thrであったのでcpase消化の結果を考え合わせると、糖ペプチドは(Asx,Glx)-Cys-Ser-Thrの配列をもつと考えられた。T1におけるAeCysが0.38moleと低値を示すが、これはアミノエチル化が完全でなく約40%のCysが修飾されたものと考えられる。その為トリプシン消化後のT1には(Asx,Glx)-AeCysに加えて未消化物の(Asx,Glx)-Cys-Ser-Thrが溶出されたと思われ、T1中にSerおよびThrが0.4～0.6mole存在することは説明し得る。

(4) ^{14}C-カルボキシメチル化; 糖ペプチドを直接Edman分解を行うとN末端はほとんどマスクされていたが微量のPTH-Glnが検出された。そこでN末端の大部分はピロ化しているものと考え、^{14}C-Sカルボキシメチル化糖ペプチドを直接あるいはピログルタミン酸アミノペプチダーゼで脱ピログルタミン酸を行った後、Edman分解を行い各cycleのチアゾリノン分画中の放射能を測定した(図3)。酵素処理を行わない糖ペプチドでは3cycle目に使用した放射能(1×10^4dpm)の約10%が検出された(図3A)。すなわち3段目にカルボキシメチル化Cys(CmCys)の存在を示す。一方、脱ピログルタミン酸処理することにより2cycle目に使用放射能の約30%が検出された(図3B)。すなわち脱ピログルタミン酸は約30%進行し、その結果2段目にCmCysが存在することを示す。以上の結果はN末端にピログルタミン酸(Pyr)が存在し(一部Glxとして)、3段目にCysが存在することを示し、この糖ペプチドのアミノ酸配列はPyr-Asx-Cys-Ser-Thrであることが解った。

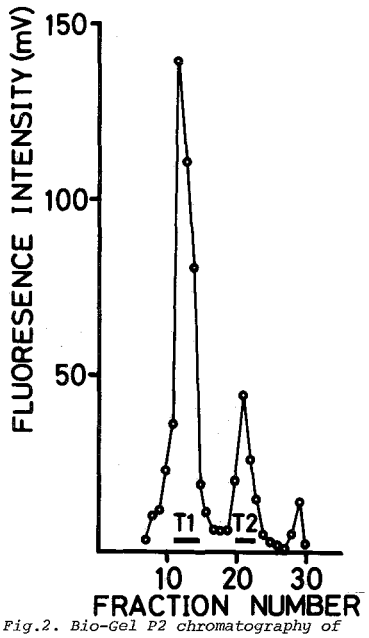


Fig.2. Bio-Gel P2 chromatography of tryptic digests of aminoethylated-glycopeptide.
A 50μl portion of each fraction(0.95ml) was reacted with o-phthalaldehyde.

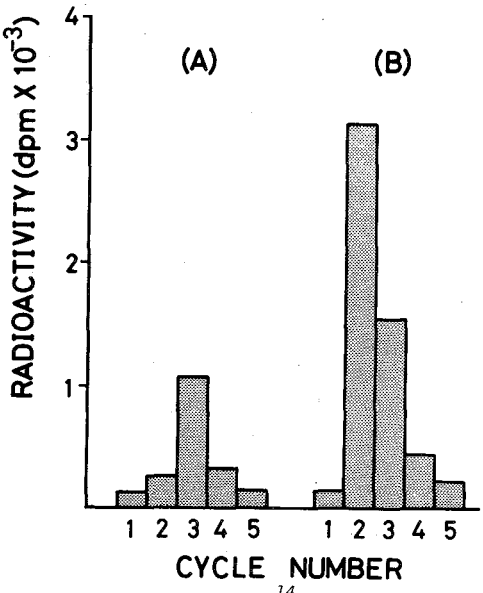


Fig.3. Edman degradation of ^{14}C-carboxymethylated-glycopeptide(Cm-GP).
(A); ^{14}C-Cm-GP(1×10^4 dpm) was used. (B); ^{14}C-Cm-GP (1×10^4 dpm) was used after pyroglutamate aminopeptidase digestion.

この糖ペプチドはガラクトサミンは含有せずグルコサミンが3～4 mole/mole of peptide含有していたことから、この糖ペプチドの糖鎖結合方式はN-アスパルチルグリコシラミン型で、AsxはAsnとして存在し、このAsnに糖鎖が結合しているものと考えられた。又、この糖ペプチドには、この種の糖鎖結合をするための認識部アミノ酸配列とされているAsn－X－Thr（またはSer）構造[5]を有していることからもこの結合方式が示唆された。

carbohydrate
PAS-II protein Glx-Asn-Cys-Ser-Thr
carbohydrate
P0 protein Gly-Asp-Asn-Gly-Thr

Fig.4. Amino acid sequence of carbohydrate-attached site of PAS-II and P0 protein.

(5)PASⅡ蛋白およびP0蛋白のN末端部アミノ酸配列；PASⅡ蛋白をEdman分解すると、初段にはMetのみでPTH-GluもPTH-Glnも全く検出されなかった。PASⅡ蛋白のN末端部アミノ酸配列は表2に示した様にMetより始まり非極性のアミノ酸が続く特徴的な配列であった。従って、上記の糖ペプチドがPASⅡ蛋白のN末端に存在するとは考えられず、糖ペプチドの精製過程でペプチドのN末端Glxがピロ化したものと考えられ、PASⅡ蛋白の糖鎖結合部のアミノ酸配列は図4に示したものと考えられた。

PASⅡ蛋白より得られた糖ペプチドのアミノ酸配列は既報[4]のP0蛋白の糖鎖結合部のアミノ酸配列とは異なっており、又、P0蛋白からはGlx-Asn-Cys-Ser-Thrの配列をもつ糖ペプチドは得られていないことから、PASⅡ蛋白がP0蛋白の分解産物であるとの考えを完全に否定した。しかしながら、Eylarらの報告しているTPO（ミエリンのトリプシン消化によりP0蛋白から遊離すると考えられる分子量1.8～1.9万の糖蛋白）のN末端部アミノ酸配列[1]はPASⅡ蛋白と全く同一であった。これは、彼らの報告しているTPOの精製は精製P0蛋白のトリプシン消化物より成されたものではなく、ミエリンの酸不溶性蛋白画分のトリプシン消化物よりSDSゲル口過法にて成されたものであり[1]、SDSゲル口過法では分子量1.8～1.9万のもの（TPO）と1.3～1.4万のもの（PASⅡ）の分離は不完全であることを考えると、彼らのTPO標品にPASⅡ蛋白が混入しているものと推定された。

Table 2. N-termial sequence of PAS II and P0 proteins

	1	10	17
PAS II	Met-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Gly-Ile-Ile-Val-Leu- X -Val-Ala-Val-Leu-Val-		
P0	Ile-Val-Val-Tyr-Thr-Asp- X - X -Val- X -Gly-Ala-Val-Gly-Ala-Leu-Val-		

[文　献]

1)Eylar, E.H. and Roomi, M.W.(1978) in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Palo,J.,ed.) Vol.100, pp307-328, Plenum Press, New York.

2)Kitamura, K., Suzuki, M. and Uyemura, K.(1976) *Biochim. Biophys. Acta*,455, 806-816

3)北村，鈴木，植村(1978)神経化学,17, 61-64

4)Kitamura, K., Suzuki, A., Suzuki, M. and Uyemura, K.(1979)*FEBS Letters*,100, 67-70

5)Marshall, R.D.(1972)*Ann. Rev. Biochem.*, 41, 673-702

6)Uyemura, K., Horie, K., Kitamura, K., Suzuki, M. and Uehara, S.(1979)*J. Neurochem.*,32,779-788

44 末梢神経ミエリン糖蛋白の脂質中間体経由のグリコシル化について

植村慶一・堀江賀与子・北村邦男
(埼玉医大・I生理)

〔要約〕

末梢神経ミエリン膜の糖蛋白，P0 (分子量 2.8 万) と PASII (分子量 1.4 万)，の糖鎖が脂質中間体を経由して転移される可能性を検討した。

1) [^{3}H]-glucose の UDP-glucose から glucolipid への転移活性は、ミエリン形成期の鶏胚坐骨神経膜画分では成鶏の同じ画分より，10 倍以上高く，この活性はEDTA 添加でほぼ完全に抑制され、外因性 dolichol monophosphate の添加により 3 -5 倍活性化された。

2) [^{3}H]-glucose の転入の時間経過をみると，glucosyl phosphoryl dolichol および oligosaccharide-lipid へは急速に転入され，糖蛋白へはそれより遅れて転入された。

3) label された糖蛋白を分解して得た glycopeptide と oligosaccharide-lipid より得た oligosaccharide は gel filtration でほぼ同じ位置に溶出された。

4) label された糖蛋白を SDS-PAGE によって分析すると，P0 と PASII に一致する分子量の位置に有意の活性ピークを認めた。

5) N-acetyl glucosamine の UDP-N-acetyl glucosamine から脂質中間体および糖蛋白への転入は Tunicamycin の添加によって明らかに抑制された。

以上の結果は末梢神経ミエリン糖蛋白の糖鎖が脂質中間体経由で生合成され，蛋白へ転移される可能性を強く支持する。

末梢神経ミエリン膜に中枢神経系に存在しない糖蛋白が存在することが，報告されている。[1) 17)] この糖蛋白 (P0) 蛋白の命名については文献 2) 参照は末梢神経ミエリン蛋白の 50 %以上を占め，[3)] 末梢神経系のミエリン形成に伴って急速に増加することが確かめられており，[12)] ミエリン膜構造の中で重要な役割を果していると考えられる。最近我々は SDS 溶液によるゲルロ過法によって末梢ミエリン膜の 2 種の糖蛋白の精製に成功した。[6) 10) 14)] P0 蛋白は 1 分子あたり 1 個の糖鎖 (Gal:Man:Fuc:GlcNAc:Sialic acid = 1:3:1 : 3: 1) をもち，Asn-N-glycosyl 結合によって蛋白部分と結合している。[5)] PASII 蛋白についても同じ結合をもつことが明らかとなった。[7)] 最近 Asn-N-glycosyl 結合をもつ糖蛋白の糖鎖が脂質中間体 (dolichol 化合物) を経て転移される可能性がいくつかの研究によって示唆されている。[8) 9) 16)] 今回末梢神経ミエリン糖蛋白のグリコシル化について検討したので報告する．本研究の 1 部は preliminary に既に報告した。[4) 13)]

[実験材料及び方法]

UDP-[6-^{3}H]N-acetyl-D-glucosamine,(GlcNAc) および UDP-[1-^{3}H]glucose,(Glc)は New England Nuclear 社より，Streptomyces griseus pronase，dolichol monophosphate は Sigma 社より入手し．Tunicamycin は東大田村善造教授および米国 Lilly 社より贈与をうけた。

鶏末梢神経膜画分の調製；成鶏又は鶏胚(孵温 20 日目)より既報の方法によって[12)] 坐骨神経を得る．0.32M 蔗糖液中でホモゲナイズし，100,000g-60min 遠心沈渣を膜画分とした。また必要に応じてミエリン画分，非ミエリン画分を得た。[15)]

Endogenous acceptor への転入の分析；原理的に Scher らの方法[11)] によった。

Incubation medium (0.1ml) は 80mM Tris-HCl buffer(pH 8.2),100mM Sucrose,1mM EDTA,3mM AMP,

10mM $MgCl_2$, 2uM UDP-[^{3}H]-Glc (1μCi) 及び 1mg 膜蛋白を含み, 37°C, 5-60min. Incubate した。UDP-GlcNAc を用いる場合は70mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM Sucrose, 18mM $MnCl_2$, 25mM NaCl, 1μCi UDP-[^{3}H]-GlcNAc, 1mg 膜蛋白の条件で Preincubate した後, UDP-Glc を cold のもの におきかえた上記の Incubation Mixture で Incubation を行った。

Incubation の後, label された Products は次の様に分離した。まず 20 倍量の $CHCl_3$-CH_3OH (2:1) で 2 回抽出し, 脂質抽出液と残渣に分離し, 脂質抽出液は 1/5 量の 0.9% NaCl 液を加え Partition によって水層(A)と脂質層に分離した後脂質層を洗うと [Glucolipid] を含む(B)画分を得た。脂質抽出残渣は更に 0.9% NaCl, H_2O で 2 回づつ洗ったのち, $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O (10:10:3) 液で抽出, 抽出液を(C)画分 [Oligosaccharide lipid を含む] と残渣に分離, 残渣は充分透析後(D) [Glycoprotein] 画分とした。 Unisil および DEAE Cellulose column chromato は Scher らの方法[11], SDS Disc 電気泳動法(SDS-PAGE) は北村らの方法[6]によった。

[実験結果と考察]

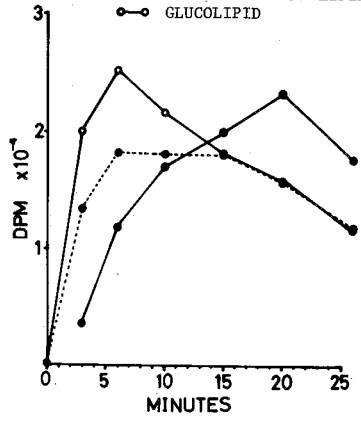
1) UDP-Glc より Glucolipid への Glc の転入活性: ミエリン形成期の鶏胚20日目と成鶏の坐骨神経膜画分の本活性を control medium で比較すると 表1表に示すように鶏胚の方に約 10倍高い活性が認められた。更にこの活性は Mg^{++} の除去, EDTA の添加で著明な低下がみられ, Dolichyl monophosphate の添加で著明に (3-5倍) 増加した(表1表)。この結果は末梢神経のミエリン形成期に Glucosyl-phosphoryl-dolichol が活発に合成されていることを示唆する。

2) Endogenous acceptor への Glc の転入の時間経過: 鶏胚末梢神経膜画分を用いて, Endogenous acceptor (B,C,D画分)への UDP-Glc よりの Glc の転入の時間的経過を検討した。表1図に示すように, B画分への転入は急速に増加し, 6 分の Incubation で peak を示した。C 画分への転入も急速な増加を示すが, 6-15 分の間で平坦なカーブを示した。また, D 画分への転入はかなり遅れる傾向で 20分で peak を示した。これらの結果は B,C画分と D画分の間に precursor-product の関係がある可能性を示す。

TABLE 1. Effect of Dolichyl Monophosphate on the Transfer of [^{3}H]-Glucose from UDP-[^{3}H]-Glucose into [^{3}H]-Glucolipid.

Medium	ADULT	EMBRYO	
Control	5,698	61,124	
-Mg +EDTA(10mM)	840	2,842	
+Dol-P(70nmol.)	13,608	270,592	d.p.m.
+Dol-P(135nmol.)	17,766	245,266	/mg protein

FIG. 1. Time Course of Incorporation



3) B および C画分の放射性物質の characterization: $CHCl_3$-CH_3OH (2:1) に可溶性の B 画分には glucosyl phosphoryl dolichol (Dol-P-Glc) の他に glucosylceramide が含まれる。この画分は Unisil column によって, アセトン溶出性の glucosyl-ceramide とアセトンで溶出されず $CHCl_3$-CH_3OH (1:1) で溶出される Dol-P-Glc に分離出来る。表1図の時間的経過を追って得た B画分を Unisil column によって分離し, カウントを比較したのが表2 表である。B画分のカウントの ほとんどは Dol-P-Glc に由来し, glucosylceramide の関与は極めて

わずかであった。Dol-P-Glc 画分の放射性物質は mild alkaline metanolysis [0.1N KOH in CH_3OH-Toluene (3:1),0°C,60min.] で安定で，mild acid hydrolysis [0.1N HCl in 50% propanol,50°C] では t 1/2 =15min. の速度で分解された(第2図)。この条件で可溶性になる放射性物質は Glc であることを paper chromato (n-butanol-ethanol-H_2O =10:1:2) によって確かめた。また Dol-P-Glc 画分および C 画分のそれぞれを DEAE cellulose column に apply して ammonium acetate 濃度勾配によって溶出すると，Dol-P-Glc画分の放射能は 2mM, C画分は 20mM ではじめて溶出された。C画分は 0.1N HCl in 80%tetrahydrofuran,50°C の条件で t 1/2 = 14min.の速度で分解された。以上の諸性質は Dol-P-Glc画分には label された Dol-P-Glc, C画分に label された oligosaccharide pyrophosphoryl dolichol が含まれていることを強く示唆する。

FIG.2.Mild Acid Hydrolysis of the Glucolipid Fraction

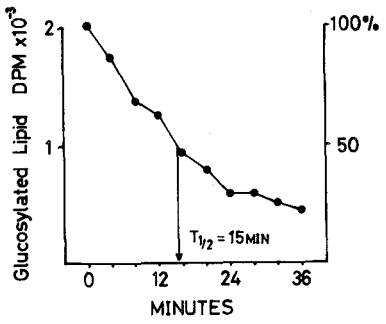


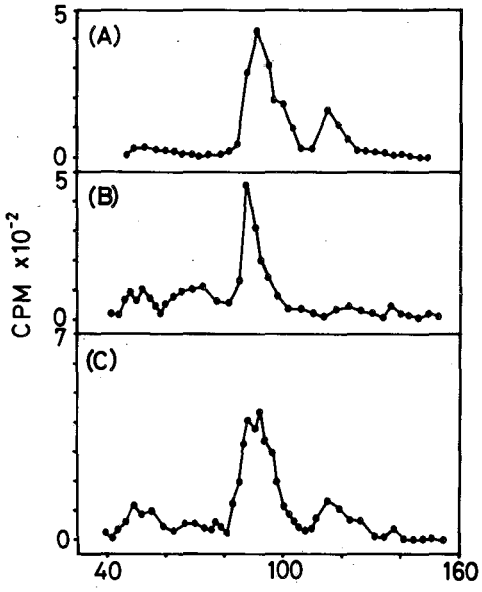
TABLE 2.Separation of [^{3}H]-Glucolipids by Unisil Column.

Incubation Time	Radioactivity (d.p.m.) GLUCOSYLCERAMIDE	GLUCOSYLPHOSPHORYL -DOLICHOL
3(min)	380	18,627
6	495	24,005
10	693	20,307
15	682	16,354
20	756	13,540
25	739	10,252

4) Oligosaccharide lipid oligosaccharide と糖蛋白の glycopeptide の比較：C 画分を N_2下で乾燥し mild acid hydrolysis によって oligosaccharide 画分[a] を得た。また D 画分に pronase を蛋白/酵素比:10/1 の割合で加え 37°C,120 時間分解し，分解物[b]を得た。[a],[b] および[a+b] について，ゲルロカ (Sephadex G-50) で分離して放射能の分布を比較した。(Fig.3 (A),(B),(C))

(A)と(B)の peak の位置はほぼ一致するが分子量は(B)の方が(A)よりやや大きい。この結果は[a]と[b]の糖鎖がほぼ同じであることを示し，pronase digest 中に glycopeptide が含まれる事実とよく一致する。また C，D 画分を強酸(3N HCl,100°C,6 時間 処理して得られる可溶性放射活性は共に paper chromato で完全に Glc と一致した。

FIG.3. Chromatographic Comparison of Pronase Digests of [^{3}H]Glycoprotein Fraction and [^{3}H]Oligosccharide released from Carrier Lipid by mild acid hydrolysis.



5) Oligosaccharide lipid の糖鎖の糖蛋白への転移：[^{3}H]-Glc で label された oligosaccharide lipid(20x10^{3}d.p.m.)を 1mg 膜蛋白と 20分間 incubate した後，各画分への放射能の分布をみると，A 画分 4,791 d.p.m.(21.1%),

B 画分 4,679 d.p.m.(20.5%), C 画分 3,714 d.p.m. (16.3%), D 画分 9,570 d.p.m.(42.1%)となった。このことはoligosaccharide lipidは分解されやすいが，放射能の40% 以上が糖蛋白画分へ転移していることを示し，糖鎖が oligosaccharide lipid を経て糖蛋白へ転移される可能性を強く支持する。

6) labelされた糖蛋白の分析：labelされた糖蛋白の数と分子量について情報を得るために膜蛋白画分をSDSで可溶化して，SDS-PAGEによって分析した。第4図に示したようにいくつかの蛋白種がlabelされるが，その中で分子量 2.8万に相当するmain peak と 1.4万に相当する minor peak が認められた。これらは末梢神経ミエリンの糖蛋白，P0 とPASII，の分子量に一致し，末梢神経ミエリンの糖蛋白が脂質中間体を介して glycosylate される可能性を示唆した。

7) Tunicamycin の影響：[^{3}H]-UDP-GlcNAc の GlcNAc の脂質中間体および糖蛋白への取込に対する Tunicamycin (10μg/ml)の影響を調べた。(Fig.5) Tunicamycin は GlcNAc の B,C,D 画分への取込をそれぞれ 55, 35, 25%程度抑制することが示された。Tunicamycin は糖蛋白の脂質中間体経由の糖鎖の生合成の特異的な阻害物質であると考えられており，この結果は末梢神経の糖蛋白が脂質中間体経由で glycosyl 化されるという仮定を更に支持するものである。

FIG.4.SDS-PAGE of the Glycoproteins labeled with UDP-[^{3}H]-Glucose

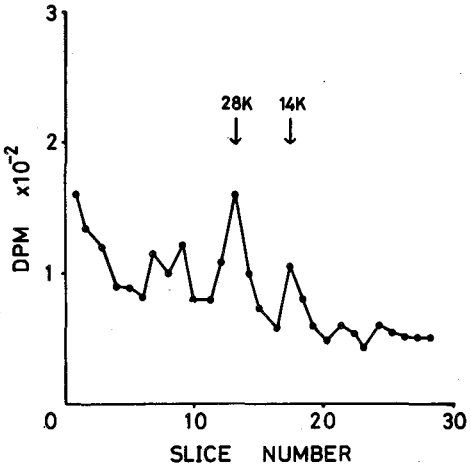
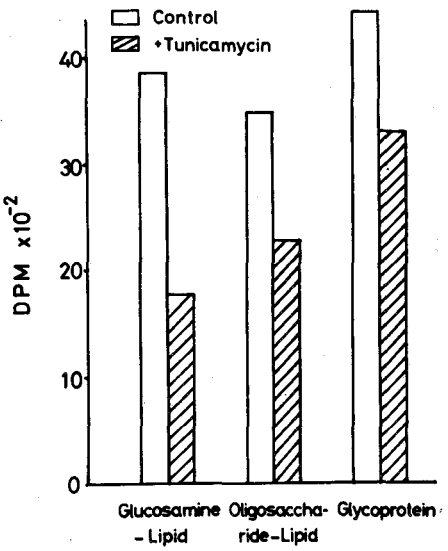


FIG.5.Effect of Tunicamycin on Incorporation of [^{3}H]-N-acetyl glucosamine



[文 献]

1) Everly J.L., Brady R.O., and Quarles R.H. (1973) J.Neurochem. 21,229-334
2) Eylar E.H., Uyemura K., Brostoff S.W., Kitamura K., Ishaque A., and Greenfield S. (1979) Neurochemical Res. 4,289-293
3) Greenfield S., Brostoff S.W., Eylar E.H., and Morell P. (1973) J.Neurochem. 20,1207-1216
4) 堀江賀与子，鈴木 勝，北村邦男，植村慶一 (1979) 第56回 日本生理学会大会予稿集 130
5) Kitamura K., Suzuki A., Suzuki M., and Uyemura K. (1979) FEBS Letters 100,67-70
6) Kitamura K., Suzuki M., and Uyemura K. (1976) Biochim.Biophys.Acta 455,806-816
7) 北村，他。 神経化学発表予定
8) 木幡 陽(1979)蛋白質 核酸 酵素 24，119—130
9) Lennarz W.J. (1975) Science 188,986-991
10) Roomi M.W., Ishaque A., Khan N.R., and Eylar E.H. (1978) Biochim.Biophys.Acta 536,112-121
11) Scher M.G., Lochen A., and Waechter C.J. (1977) Biochemistry 16,5037-5044
12) Uyemura K., Horie K., Kitamura K., Suzuki M., and Uehara S. (1979) J.Neurochem. 32,779-788
13) 植村慶一，堀江賀与子，鈴木 勝，北村邦男 (1978) 日本生化学大会抄録号 50，9。1017
14) Uyemura K., Suzuki M., and Kitamura K. (1978) in Advanced in Experimental Medicine and Biology (Palo J., ed.) Vol.100 pp95-116 Plenum Press, New York.
15) Uyemura K., Tobari C., Hirano S., and Tsukada Y. (1972) J.Neurochem. 19,2604-2614
16) Waechter C.J., and Lennarz W.J. (1976) Ann.Rev.Biochem. 45,95-112
17) Wood J.G., and Dawson R.M.C. (1973) J.Neurochem. 21,717-719

45 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesteraseの可溶化，精製および精製標品の性質

栗原　正・西沢芳子・高橋康夫
（新大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

1) 2′:3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase (EC 3.1.4.37, CNP) をウシ脳白質から次のような手順で可溶化精製した．i) 白質脱脂粉末をhexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) で可溶化し，HTAB存在下にSepharoseゲルのクロマトグラフィーで部分精製した．ii) 部分精製標品からエタノール処理でHTABを除くとCNPは不溶性の沈殿となるが，この沈殿をエラスターゼ(EC 3.4.21.11)で消化して再可溶化した．iii) エラスターゼ可溶化標品はDEAE-Sephadexに通したのち，8-(6-aminohexyl)amino-2′-AMP-Sepharoseのアフィニティークロマトグラフィーで精製した．

2) 精製CNPはpH 4.3のポリアクリルアミドゲル電気泳動および還元状態でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを与えた．精製CNPはSephadex G-150のゲル ろ過で分子量31,000，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量29,000に相当していた．したがって精製CNPは分子量約3万のmonomericのタンパクである．

3) 精製CNPは希釈・凍結融解・ピペッティングのくりかえしで失活し，酵素反応が直線的に進行するにはアルブミンまたはHTABの共存を必要とした．2′:3′-環状AMPに対するKmおよび4つの2′:3′-環状ヌクレオチドに対する相対的活性は精製過程で変化していなかった．

4) 最近Drummondらが報告した精製CNPと比較検討する．

2′:3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase (EC 3.1.4.37, CNP*) は中枢神経系の髄鞘と密接な関係を有することが知られて[1-5]以来多くの研究者が取上げるようになった．しかしCNPの生理的役割・タンパクの本体・局在位置などについて不明な点・あいまいな点を残している．CNPは脳白質の膜構造にかたく結合していて可溶化精製が困難である．CNPの可溶化には塩酸グアニジン[6]，Triton X-100/酢酸ナトリウム[7]などが用いられているが，われわれの経験ではhexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) が効果的にCNPを可溶化した．一方われわれはエラスターゼ(EC 3.4.21.11)による消化がCNPの可溶化に有効であることを見出した．HTABで可溶化後部分精製したCNP標品はHTABを除くと会合して不溶性の沈殿になってしまう．しかしエラスターゼはこの沈殿を収率よく可溶化し，DEAE-Sephadexを通したのち8-(6-aminohexyl)-amino-2′-AMP-Sepharose (2′-AMP-Sepharose) のアフィニティークロマトグラフィーを行うと，CNPは分子量3万の単一タンパクとして分離された．最近Drummondら[8]はCNPを塩酸グアニジンで可溶化後ほぼ均一な標品になるまで精製しえたと報告しているので，われわれが得た精製標品と比較して検討したい．

〈材料と方法〉

ウシ脳白質の脱脂粉末は前報[9]の方法で調製した．精製に用いた脱脂粉末は凍結乾燥前に水溶性タンパクを除去してある（図1）．エラスターゼは2回再結したブタ膵臓エラスターゼをDEAE-Sephadexに通し[10]脱塩濃縮して用いた．CNP活性は既報[9,11]

*略称：CNP, 2′:3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase；HTAB, hexadecyltrimethylammonium bromide (cetyltrimethylammonium bromide)；2′-AMP-Sepharose, 8-(6-aminohexyl)amino-2′-AMP-sepharose CL-4B；PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

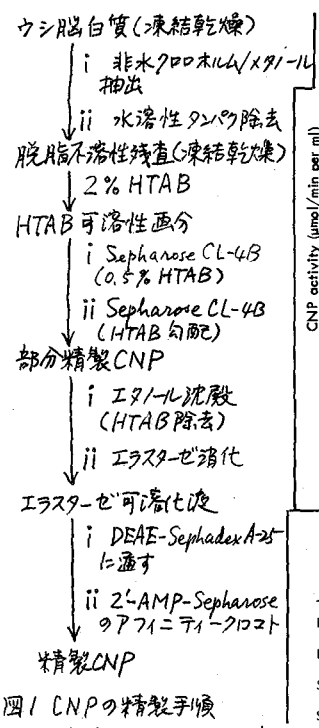


図1 CNPの精製手順

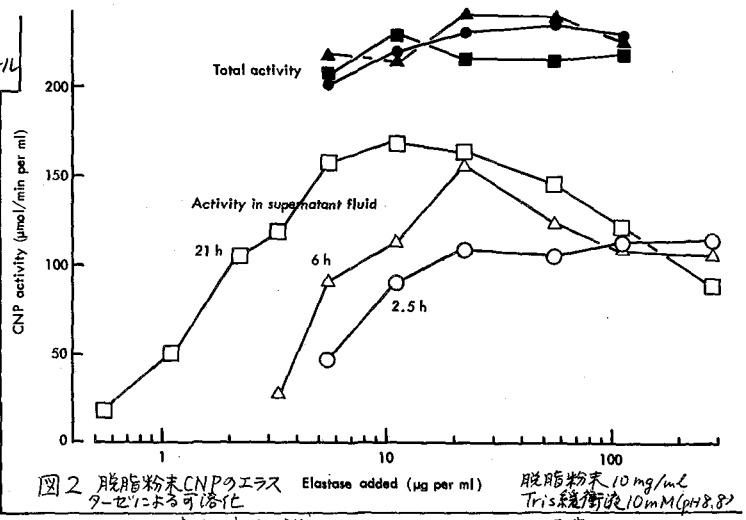


図2 脱脂粉末CNPのエラスターゼによる可溶化 (脱脂粉末 10 mg/ml, Tris緩衝液 10 mM (pH 8.8))

表1 部分精製CNPのエラスターゼによる可溶化

	Volume (ml)	CNP activity (μmol/min per ml)	Protein (mg per ml)	Specific activity (μmol/min per mg of protein)	Total activity (μmol/min)	Yield (%)
Eluate from Sepharose 4B-CL	70	352	1.8	196	24600	100
Precipitate by ethanol	15.4	1640	6.8	241	25200	102
Solubilization by elastase	15.5	1630	6.8	240	25300	103
Supernatant fluid	15.0	1640	6.8	241	24600	100

の分光学的方法で測定し，μmol/min に換算した．CNP 1 unit はこの測定条件で 1 分間に 1 μmol の 2':3'-環状 AMP を水解する量として定義した．2'-AMP-Sepharose は Lee ら[12]の方法を改変して調製した．

<結 果>

CNP の部分精製　HTAB で可溶化後 HTAB 存在下に Sepharose ゲルクロマトグラフィーを行い，この主画分を再び Sepharose カラムにアプライして HTAB の勾配で溶出することにより，CNP を部分精製することができた(図1，表2)．比活性は脱脂不溶性残渣の 10 倍程度になっており，CNP は最後に HTAB の勾配に乗って濃縮されて溶出されてきて好都合であった．界面活性剤の勾配をゲル内につくっておいてからサンプルをアプライし，界面活性剤の勾配で溶出させるクロマトグラフィーは，ミトコンドリアの不溶性酵素を分割するために Swanljung[13] が考え出した方法である．

プロテアーゼ処理による CNP の可溶化　トリプシン，エラスターゼ，キモトリプシンおよびパパインで白質脱脂粉末に対して CNP の可溶化をテストしたところ，トリプシンとエラスターゼに可溶化能が認められた．トリプシンは失活作用も強いが，エラスターゼは高濃度でも CNP の失活をほとんど起さなかった．エラスターゼについてさらに処理条件をしらべたところ，イオン強度を下げて pH を 8.6 付近に保ち，粉末 1 mg に対してエラスターゼ 1～1.5 μg 程度を長時間作用させると可溶化率を上げることができた(図2)．HTAB で可溶化後部分精製した CNP 標品は，エタノール処理で HTAB を除くと不溶性の沈殿になってしまう．しかしこの沈殿に上記の条件でエラスターゼを作用させると，短時間の処理で 100% の活性が再可溶化されることが判明した(表1)．

CNPの精製単離　そこでHTABで可溶化後部分精製した標品をエラスターゼで再可溶化してさらに精製を進めるという手順を踏むことにした(図1)．エラスターゼで再可溶化したCNPはDEAE-Sephadex A-25に通したのち，2'-AMP-Sepharoseのアフィニティークロマトグラフィー(図3)で精製した．2'-AMP-Sepharoseから2'-AMPで溶出したCNPはpH 4.3のpolyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)および還元状態でのSDS-PAGEで単一であり，pH 4.3のPAGEではCNP活性がタンパクバンドの位置に一致していた．CNP精製の一例を表2にまとめてある．

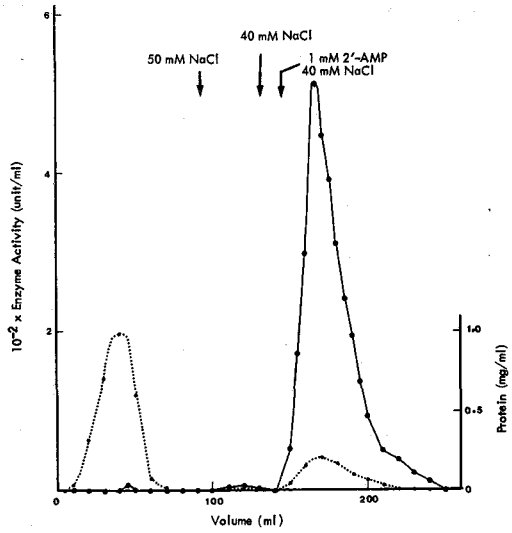


図3　CNPのアフィニティークロマトグラフィー

精製CNPの分子量　精製CNPの分子量はSephadex G-150のゲル ろ過で31,000，還元状態でのSDS-PAGEで29,000であった．還元剤がない場合のSDS-PAGEでは2本のマイナーバンドが現われるが，これはSDSで変性される際に還元剤がないために生じた人工産物と思われる．

精製CNPの安定性　精製CNPは4°Cで保存すると安定であったが，希釈・凍結融解・ピペッティングのくりかえしで失活した．精製CNPはガラス面をはげしく流れる際に失活するらしく，試験管・ピペットなどすべてプラスチック製で扱うようにした．またかくはんはなるべく避けた．

表2　CNPの精製

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg of protein)	Yield (%)
Delipidated white matter		8 700	215 000	24.7	100
HTAB-soluble fraction	150	3 090	162 000	52.4	75
Sepharose CL-4B (0.5% HTAB)	440	924	98 900	107	46
Sepharose CL-4B (HTAB gradient)	88	274	72 800	266	34
Ethanol precipitation	7.5	232	47 400	204	22
Supernatant after elastase digestion	30	230	46 700	203	22
DEAE-Sephadex A-25	40	45	21 300	473	10
8-(6-aminohexyl)amino-2'-AMP-Sepharose CL-4B	60	7.4	19 800	2 680	9

この精製例では表1に示した例と異なりエタノール沈殿の際にかなりの失活がみられた．そのために比活性は一時的に低下している．

このような失活は0.1%程度のアルブミンを共存させると防ぐことができた．

精製CNPの酵素反応におよぼすアルブミン，HTABなどの影響　図4はpHスタット法[14]で精製CNPの酵素反応を追ったもので，アルブミン，HTABあるいはTriton X-100が共存しないと反応が急速に低下していくことがわかる．ルーチンに用いている分光学的測定法[9,11]では反応液にHTABがはいっていて，反応速度が時間とともに低下して

いくことを防いでいたわけである。

精製CNPの基質特異性　精製CNPについて4つの2':3'-環状ヌクレオチドに対するKm値をおめた。HTAB存在下のKmはAMP, GMP, CMP, UMPの順に0.22, 0.57, 5.6, 8.3 mMであった。アルブミン存在下のKmはこれらの値よりそれぞれ低く出た。HTAB存在下2':3'-環状AMPに対するKmは白質ホモジネートのKm(0.25 mM)と同じで、精製過程でKmは変化していない。4つの2':3'-環状ヌクレオチドに対する相対的活性を精製標品と白質脱脂粉末で測定(既報[4]の比色法を改変)して比較したところ、精製標品と白質脱脂粉末で変らず、基質特異性は精製過程で変化していないことがわかった。

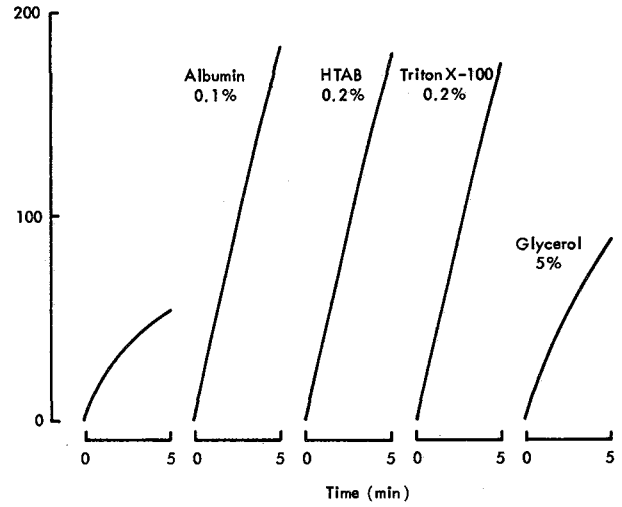


図4　精製CNPの酵素反応におよぼすアルブミン, HTABなどの影響

〈考　察〉

Drummondら[8]は塩酸グアニジンによる可溶化とそれに続く精製[6]を発展させて、ほぼ均一とみられるCNPタンパクを得た。このタンパクはSephadex G-200のゲル3過で分子量10万、還元状態でのSDS-PAGEで分子量5万、したがって2つの同じsubunitsからなる分子量10万のタンパクであると推定された。われわれが得た精製CNPは彼らが得た標品よりも均一であったが、monomericで分子量3万である点大きなくい違いを見せた。これはわれわれの標品がプロテアーゼ処理を経たものであることに主な原因があると思われる。Drummondら[8]とわれわれの解釈がともに正しいと仮定すると、CNPタンパクについて図5のようなモデルが考えられよう。

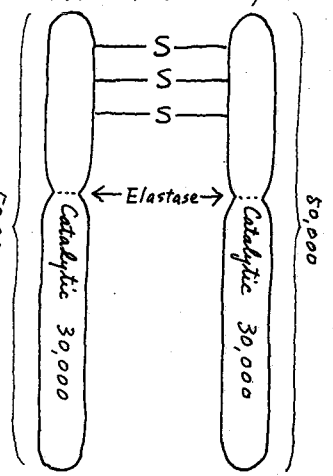


図5　CNPタンパクのモデル

〈文　献〉

1) Kurihara & Tsukada (1967) J. Neurochem. 14, 1167
2) Kurihara & Tsukada (1968) J. Neurochem. 15, 827
3) Kurihara et al. (1969) Brain Res. 13, 401
4) Kurihara et al. (1970) J. Neurochem. 17, 993
5) Kurihara et al. (1971) Life Sci. Part II 10, 421
6) Guha & Moore (1975) Brain Res. 89, 279
7) 狸田, 塚田 (1978) 神経化学 17, 57
8) Drummond et al. (1978) J. Neurochem. 31, 891
9) Kurihara et al. (1979) Biochem. J. 165, 135
10) Sampath Narayanan & Anwar (1969) Biochem. J. 114, 11
11) 西沢ら (1976) 神経化学 15, 184
12) Lee et al. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 163, 561
13) Swanljung (1971) Anal. Biochem. 43, 382
14) Kurihara & Takahashi (1973) J. Neurochem. 20, 719

46 培養小脳組織によるミエリン形成の神経化学的研究

長池一博・塚田裕三
(慶大・医・生理)

〔要約〕

1) 胎生16日から生后2日までの小脳をとりだし、組織培養を行なった所いずれの発育期からの培養組織でも生体内での9日目に相当する時期からミエリン形成が開始し、培養下においても生体内のタイムスケジュールが充分に保持されることが判明した。
2) 1)の培養にDNA合成阻害剤・サイトシンアラビノシッド・ブロモデオキシウリジン・メチルアゾキシメタノールを添加した実験から、小脳のオリゴデンドログリアの分裂は胎生18日に終了していることを知った。
3) 培養中の神経細胞の自発放電を停止する目的でテトロドトキシンを添加した培養ではミエリン形成が培養液中の濃度に依存して低下し、培養5へ9日に感受性が高かった。
4) プロテオリピッドプロテイン、タンパク合成、糖タンパク合成、セレブロシド含量、合成、グルコース消費はミエリン形成とともに上昇した。EAE血清(自質抗血清)、抗セレブロシド血清の添加はミエリン形成を抑制し、セレブロシド含量・合成、グルコース消費が低下していた。しかし、糖タンパク・タンパク合成に関しては、同一条件で作制したEAE血清であっても糖タンパク合成・タンパク合成両者を抑制するものとタンパク合成のみを抑制するものがあり、抗セレブロシド血清は糖タンパク合成のみを抑制した。このことから、EAE血清と抗セレブロシド血清はミエリン形成抑制型式が異なることが示唆された。
5) ツニカマイシン(糖タンパク合成阻害剤)、サイクロヘキシミド(タンパク合成阻害剤)添加、低グルコース濃度培養液による培養はいずれもミエリンの形成率が低下していた。

中枢ミエリンの形成初期の検索は良いモデル系が得にくいため詳種の問題が残されている。我々は培養小脳組織を材料とし、直視下でミエリンの形成を観察しながら生化学的検索を行ない、あわせてミエリン形成のみを特異的に抑制するEAE血清、抗セレブロシド血清の作用を検討し、ミエリン形成機構を解明しようとするものである。

〔実験方法〕

1) 組織培養；胎生期からの培養はWistar系白鼠を他はddY系マウスの小脳を矢状断にし、コラーゲン膜をはったカバーグラスに植えつけ、マキシモダブルカバースリップ法によって組織培養した。[1] 培養液は30%牛胎児血清、70% Eagle's MEM、終濃度10μg/ml牛生長ホルモン、600mg%グルコースを用いた。培養温度は35.5℃、液交換は3日毎にした。
2) 形態観察；ミエリンの形成は40倍長焦点対物レンズを用い生体観察した。ミエリン形成率は植えつけ時の小脳1つあたり、(ミエリンの見られる組織片数/植えつけた組織片数)×100%として示した。他の形態学的検索は通常用いられる方法を使用した。
3) 生化学的検索；タンパク、PLP含量・DNA含量・セレブロシド含量の定量はHESSらの変法した各種の方法を主に用いた。[2][3] 各種アイソトープのとりこみはEagle's MEMから加えるアイソトープの同物質を除くか、減じたものにアイソトープを添加、インキュベーション後、必要とする物質を部分精製し、プロトゾールとトルエン系シンチレーターEIIを放射能を液シンにて計測した。グルコースの定量はグルコスタット法を用いた。
4) EAE血清の作製；EAE-1,-2血清はモルモット脊髄白質0.1gを0.1mlのGey's BSSでホモジェナイズし、0.2mlのcomplete adjuvantを加え抗原として四肢に0.1mlずつ注射し、3週間後に採血した。AC(抗セレブロシド血清)は5mgのセレブロシドと5mg

の牛血清アルブミンを0.2mlのGey's BSSに懸濁し、さらに0.2mlのComplete adjuvantを加えたものを抗原として作製した。

〔実験結果ならびに考察〕

発育各時期の小脳の培養（図1）；胎生期、16日、18日、20日、出生直後、生後2日いずれの時期から培養を始めてもミエリンの形成が観察される時期は、in vivoでの生後9日目（±1）に一致していた。このことは培養期間の長短にかかわらずミエリン形成開始の時期が決定されていることを示しており、本培養が生体のタイムスケジュールを変化させないことを示している。各種DNA合成阻害剤を培養各時期で培養液中に添加し、ミエリン形成との関係を追求したところ胎生18日以後ではどの時期においてもミエリン形成に影響を与えることはなく、小脳のオリゴデンドログリアは胎生18日以前に分裂しおわり、生後9日にオリゴデンドログリアの成熟又、神経細胞の成熟等小脳内の内的要因が満されることによってミエリンの形成が開始されるものと考えられた。

神経細胞の自発放電とミエリン形成の関係（図2）；培養組織から細胞外誘導によって自発放電を見たところ培養組織においても確かに自発放電のあることを認めた（培養12日）。ナトリウムチャンネルを特異的にブロックするといわれるテトロドトキシンを培養液中に10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}Mの各濃度で培養5日から添加したところ濃度に依存してミエリンの形成が抑制された。しかし、テトロドトキシンを除去しても、その後のミエリン形成率の上昇を認めることはできなかった。培養5日からの添加は7日からのものより効果が弱く、5日から9日がテトロドトキシンのミエリン形成抑制時期と考えられ、この時期からみてシナップス形成に何らかの影響を与えていることが示唆されたが、光顕レベルでの（鍍銀等）検索では、コントロ

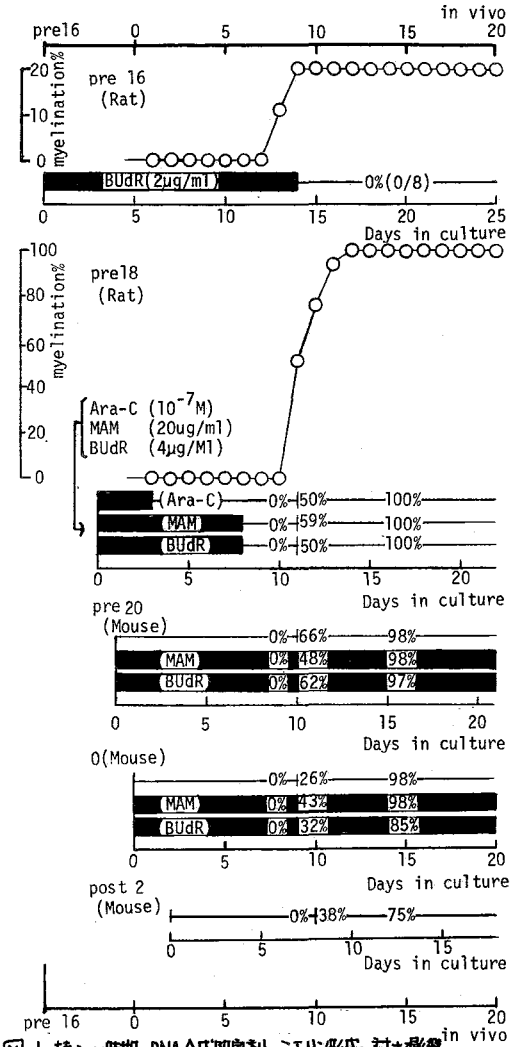


図1：植えつけ時期とDNA合成阻害剤のミエリン形成に対する影響

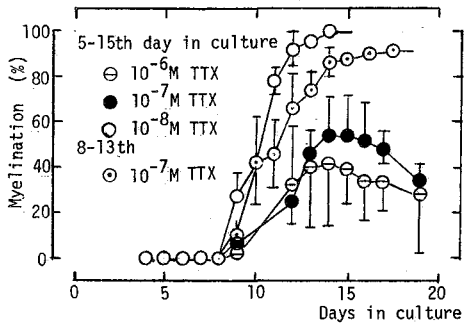


図2：テトロドトキシンのミエリン形成に対する影響

ールの培養と大きな差異はなかった。

プロテオリピッドプロティン(図3)；培養組織中のプロテオリピッドプロティンは若干遅れ気味ながらミエリン形成とほぼ一致して上昇した。プロテオリピッドプロティンの合成を"Cロイシンの lower phase へのとりこみとしてみた所ミエリン形成時に上昇した。しかし、"Cロイシンのとりこみとして検索したため、他の階質等へのとりこみも含まれていることが予想され、プロテオリピッドプロティン含量より早く合成が生じるような曲線となった。EAE血清(4%)は含量を低下せしめ"Cロイシンのとりこみも低下する傾向にあり、セレブロシド抗体も低下傾向を示した。

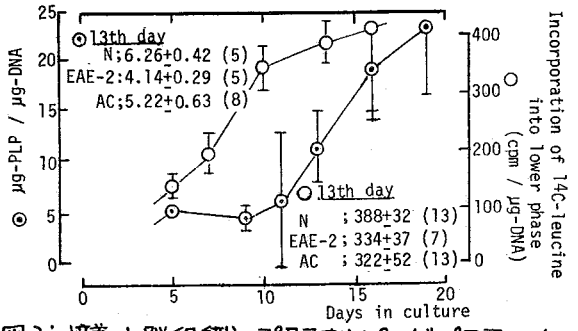


図3；培養小脳組織のプロテオリピッドプロティン

タンパク・糖タンパク合成(図4)；すでに報告したようにタンパク合成・ConA結合性タンパク合成はミエリン形成とともに上昇するがフコースのとりこみにおいても同様のことが示された。今回使用したEAE血清(EAE-2)はミエリン形成を完全に抑制するにもかかわらずフコースのタンパク分画へのとりこみには変化を与えずタンパク合成のみが抑制された。このことはEAE血清(白質抗体)のミエリン形成抑制作用が糖タンパクの合成に起因するものではないことを推測させた。抗セレブロシド抗体は糖タンパク合成のみが抑制されており従来「培養組織に対するEAE血清の脱髄やミエリン形成抑制作用はセレブロシド抗体による」という考え方に一考を要する結果となった。

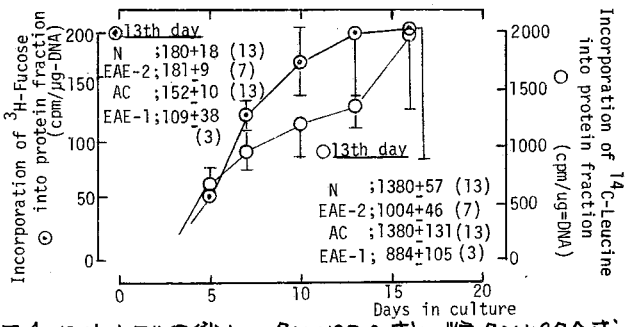


図4；培養小脳組織中のタンパク合成と糖タンパク合成

セレブロシド(図5)；セレブロシド含量ならびにユニホームラベ

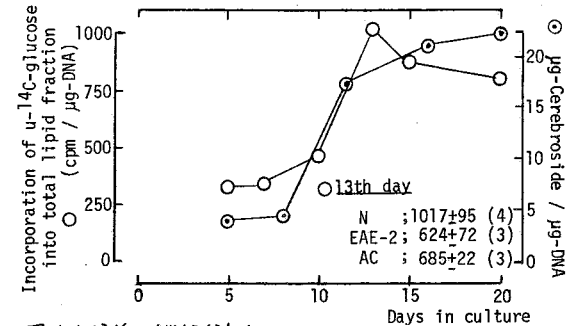


図5；培養小脳組織中のセレブロシドとセレブロシド合成

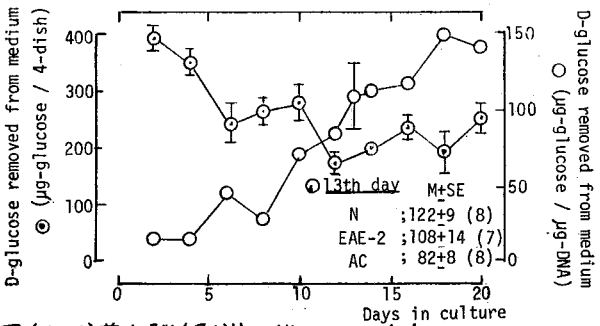


図6；培養小脳組織のグルコース消費

ルでグルコースのメータルリピッド分画（Lowerphase 乾燥再溶解）へのとりこみはミエリン形成に一致して上昇し、ミエリン形成を特異的に抑制するEAE血清、抗セレブロシド血清添加の培養では低下していた。

グルコース消費（図6）；グルコースの消費量は培養日数とともに上昇し、ミエリン形成を抑制した培養では低値であった。ミエリン形成には多量のグルコースの消費を伴なっていた。

前述の実験結果からミエリン形成は富豊なグルコース消費をしつつ脂質の合成、タンパク、糖タンパク合成をしながら形成されていくことが知られたが、これらを各種阻害剤等を用いて抑制した場合のミエリン形成の状態を検索した。

ツニカマイシンの効果（図7）；ある種の糖タンパクの合成阻害剤であるツニカマイシンを培養液中に添加したところ電子顕微鏡的にプルキニエ細胞やシナップスにはおかされ影響を与えず、アストログリアの変性を伴なってミエリンの形成を抑制した。

サイクロヘキシミドの効果（図8）；タンパク合成阻害剤のサイクロヘキシミドを添加したところ、被ミエリン形成細胞であるプルキニエ細胞の変性死が生じた（PA；プルキニエ細胞の存在率）。しかし、無添加培養ではその存在率にほぼ一致したミエリン形成がみとめられるにもかかわらず、サイクロヘキシミド添加培養ではその存在率まで、ミエリン形成率は到達しえなかった。

低グルコース濃度（図9）；組織培養中にミエリンの形成をみるためには通常400～1000mg%のグルコースを要するが、200mg%あるいは100mg%のグルコース濃度ではミエリン形成が著るしく低下していた。

以上から前記の要件の一つが欠けてもミエリンの形成は進まないことが明らかになった。

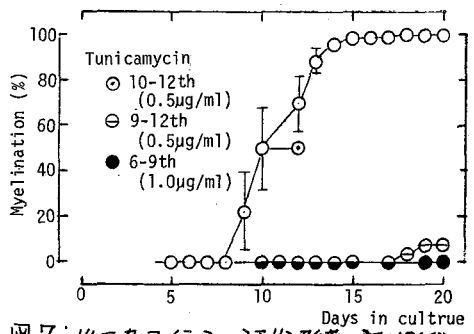


図7；ツニカマイシンのミエリン形成に対する影響

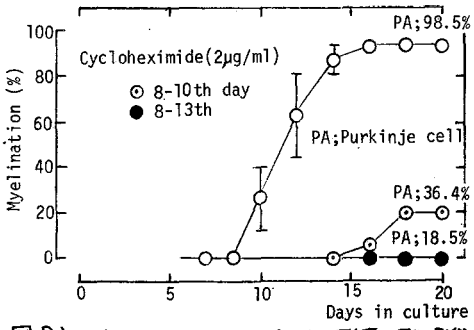


図8；サイクロヘキシミドのミエリン形成に対する影響

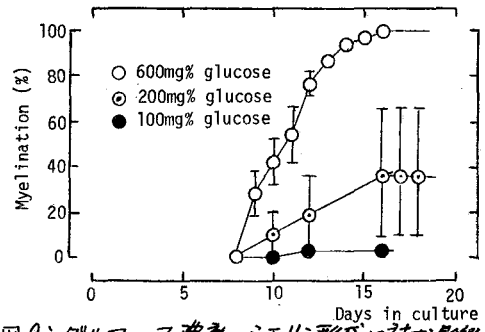


図9；グルコース濃度のミエリン形成に対する影響

－文献－

1) M.B.Bornstein;Lab.Invest.7,134(1958)
2) H.H.Hess and C.Thalheimer;J.Neurochem.12.193 (1965)
3) H.H.Hess and E.Lewin;J.Neurochem.12.205(1965)
4) 長池・野田・塚田；神経化学 15 (1976)
5) G.W.Hart and W.J.Lennarz;J.Biol.Chem.253.5795 (1978)

－謝辞－
ツニカマイシンをいただいた米国リリー研究所に感謝いたします。

47 Shiverer ミュータントマウスの神経系のミエリン形成と 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase 活性との相関について

御子柴克彦・長池一博・高坂新一
高松　研・塚田裕三
(慶大・医・生理)

〔要　約〕

形態学的にミエリン形成不全を伴う shiverer ミュータントマウスにつき検索を加え以下の結果を得た。 1) 中枢神経系各部位のホモジネートの CNPase 活性は対照と差がなかった。 2) 精製したミエリンを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べたところ small BP, large BP, intermediate protein がほぼ欠損し、PLP は著明な減少を示したが、Wolfgram 蛋白には差をみとめなかった。精製ミエリンの CNPase 活性は対照とほぼ近い高い値を示した。 3) 細胞下分画法により shiverer ミュータントの CNPase 活性の分布を調べた結果、P_2A 分画のみならず、P_2B, P_3 分画にも高い CNPase の活性がみられたが、上清には活性を認めなかった。P_2A 分画への回収率は対照に比べて 1/2 であった。P_2+P_3 分画を連続密度勾配遠心 (1.3M–0.32M) により調べた結果、対照に比べて CNPase 活性は非常に中広い分布を示した。 4) ミエリン形成不全は in vivo ばかりでなく培養系に於ても確認された。 5) 末梢神経のミエリンのラメラ形成は電顕によっても対照とほとんど差がないにもかかわらず、BP, P2 等の蛋白の欠損を認めた。P0 蛋白は減少を認めなかった。

はじめに：　ミエリン形成は中枢ではオリゴデンドログリアが、末梢ではシュワン細胞の膜成分が軸索を密にとりかこむ過程である。最近の神経化学の進歩の結果、ミエリンの構成成分についての研究は数多く報告され、それら成分の同定、精製も進んできた。[1)] ミエリンの構成成分である蛋白および脂質が、どの様にして分子集合し、膜形成を行なってゆくかを明らかにすることは、一般的な生体膜形成の過程を明らかにする上でも一つの良いモデルとして興味深いものと考える。近年みいだされた劣性遺伝様式をとる shiverer ミュータントマウスは、[1,2,3)] 形態学的にミエリン形成不全を伴い、Basic protein (BP) を欠損することが報告されている。shiverer ミュータントマウスを用い、2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase (CNPase) を中心に神経化学的検索を加えた結果、ミエリン形成に関し、新しい知見を得たので、ここに報告する。

方法および材料：　動物　Baumann 博士より供与されたものを当研究室で飼育繁殖したものを使用した。通常 shi/+ の雌雄の交配により homozygote (shi/shi) を得る。培養の場合には、shi/shi の雌雄の交配により得た出生直後の shi/shi を用いた。形態学的観察　マウスを 1% グルタールアルデヒドで灌流後、オスミウム固定し、電顕により観察した。またこの 1μ 切片をトルイジンブルーで染色し、光顕で観察した。CNPase 活性　Tsukada らの方法に従い高速液体クロマトグラフィーにより測定を行なった。細胞下分画法　新鮮脳組織 (小脳を除く) を出発材料として Whittaker の方法を一部改変した方法を用いた。すなわち P_1 分画の上清の 12000×g 15分遠心沈渣を P_2 分画とした。ミエリンの分画は Norton & Podulo の方法に従った。連続蔗糖密度勾配遠心は P_1 分画の上清を 105000×g 60分遠心し、その沈渣 (P_2+P_3 分画) を 0.32M 蔗糖に浮遊させ、1.3M

0.32 M 蔗糖の linear gradient を作製し、SW 25 rotor で 22.5000 rpm 90 分遠心後、チューブの底よりサンプルを分取した。電気泳動 既報の方法に従った。[5,6]
培養 小脳の primary culture は既報の方法に従った。[8]

結果および考察：

大脳外套部、脳幹部、小脳、脊髄の組織オモジネートを用いて CNPase 活性を測定したところ、全部位で shiverer では対照に比して活性に差をみとめなかった。[1] またその各部位の particulate fraction の蛋白パターンを SDS-polyacrylamide gel 電気泳動により分析し small BP, large BP, intermediate protein はほぼ完全に shiverer で認められず、proteolipid protein (PLP) は著明な減少を示した。形態学的には主に脊髄、視神経を調べたが、オスミウム固定後の 1μ 切片を光顕で調べてもミエリン形成はほとんどみられなかった。電顕では、ミエリンのラメラは数層以下であった。そこで shiverer の脳よりミエリン分画を得てその蛋白パターンを比較したところ、small BP, large BP, intermediate protein は、ほぼ完全に欠損していたが、PLP は著明な減少を示し、組織 particulate fraction で認めた結果と一致した。[1,2] Baumann らのグループは BP の欠損を強調しているが、[3] 今回我々は PLP が著明に減少していることを見い出した。Wolfgram protein については差はみられなかった。また CNPase 活性も対照とほとんど差がない程度の高い活性を示した。以上の結果から shiverer では、ミエリン形成に於て、CNPase 分子、Wolfgram protein 分子の合成には異常なく、BP, PLP, intermediate protein は上清にも顆粒分画にもみいだされなかったことから、de novo の合成に障害があるものと考えられる。quaking や jimpy では、組織オモジネートでも、精製されたミエリンでも全構成蛋白は著明に減少し、

表 1

Region	CNPase (μmol/min/mg protein)	
	shi/shi	+/?
Pallium cerebri	1.78 ± 0.20	2.06 ± 0.21
Brain Stem	4.55 ± 0.28	4.31 ± 0.20
Striatum	2.53 ± 0.31	2.68 ± 0.08
Hypothalamus	2.18 ± 0.89	2.54 ± 0.95
Thalamus	3.86 ± 0.46	3.64 ± 0.65
Midbrain	3.86 ± 0.55	3.92 ± 0.28
Pons	5.60 ± 0.36	5.76 ± 0.27
Medulla	6.79 ± 0.32	6.89 ± 0.63
Cerebellum	2.35 ± 0.39	2.59 ± 0.19
Spinal Cord	7.20 ± 0.31	6.97 ± 0.44
Bulbus Olfactorius	1.02 ± 0.19	1.40 ± 0.09
Nervus Opticus	9.61 ± 1.67	10.63 ± 1.39

+/?: +/+ or +/shi mean ± S.D. (4 animals)

表 2

Subcellular Fractions		Protein mg	CNPase μmol/min/mg protein	CNPase μmol/min/fraction
P_1	+/?	17.0	2.37	40.3
	shi/shi	15.5	0.67 (28%)	10.3 (26%)
P_2	+/?	51.2	2.73	139.8
	shi/shi	43.1	2.58 (94%)	111.2 (80%)
P_{2A}	+/?	3.6	16.44	59.2
	shi/shi	0.6	14.84 (90%)	8.5 (14%)
P_{2B}	+/?	7.8	0.70	5.5
	shi/shi	8.7	3.17 (452%)	27.4 (498%)
P_{2C}	+/?	9.7	0.14	1.4
	shi/shi	9.6	0.21 (150%)	2.0 (142%)
P_3	+/?	24.5	1.10	26.9
	shi/shi	29.5	3.72 (338%)	109.6 (407%)
S	+/?	7.3	0.04	0.3
	shi/shi	9.6	0.04 (100%)	0.3 (100%)

[( ) 内の値は +/? より得た各分画の値に対するパーセントを示す。]

しかもCNPase活性も減少していることから(文献12) quakingとjimpyはミエリンの構成成分が全体的に障害をうけているものと考えられる。

脳の湿重量についてshiverと対照とで差がなく、CNPase活性に関しても差がみられなかったため、脳組織内でのCNPaseの局在を明らかにするため、細胞下分画法を行ない、各分画のCNPase活性の測定を行なった(表2)。対照のマウスより得たP1, P2両分画で比活性が高く、ほとんどの活性が両分画に回収されたが、shiverでは、P1分画には、活性は低く、P2, P3の両分画でCNPaseの比活性が高く、ほとんどの活性が、両分画に回収された。P2分画を更に蔗糖密度勾配遠心により分画したところ、P2A分画では、shiverでも対照でも比活性は、ほぼ同じであったが、

図1 CNPase activities after linear sucrose density gradient centrifugation of the (P_2+ P_3) fraction

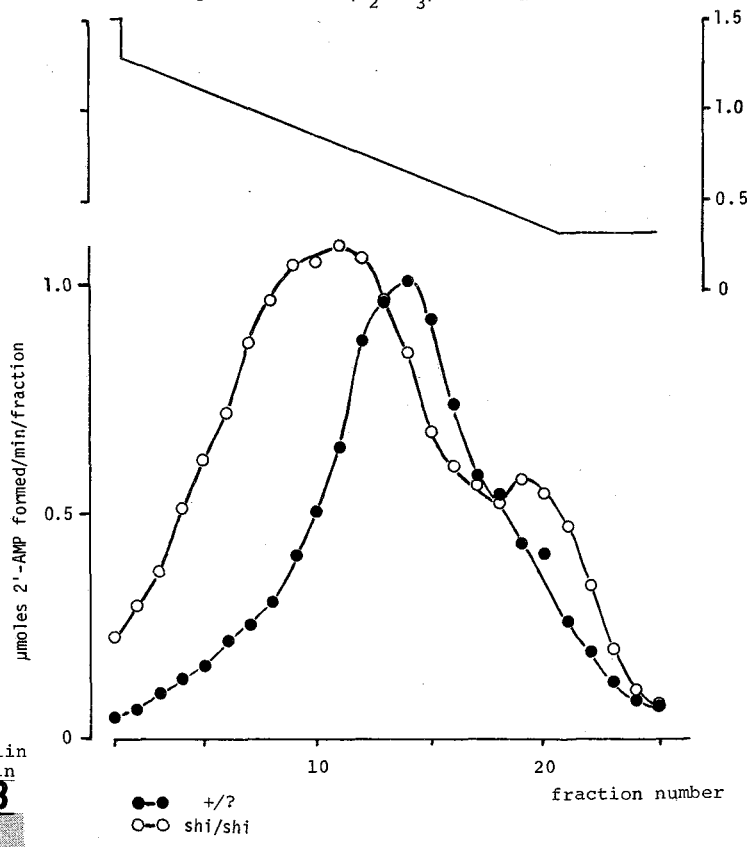


図2 purified myelin from the brain

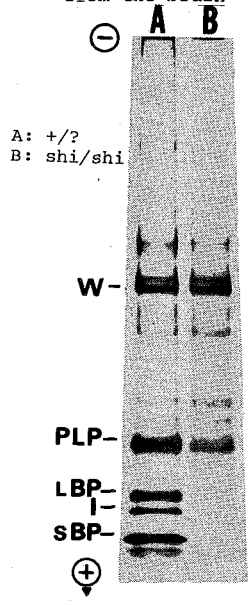
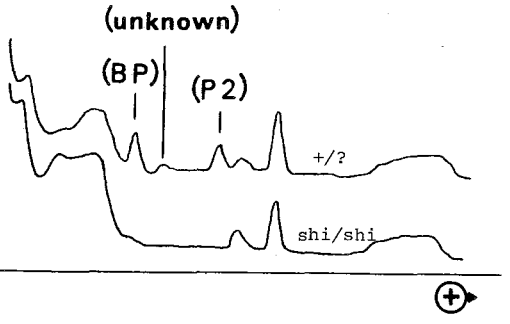
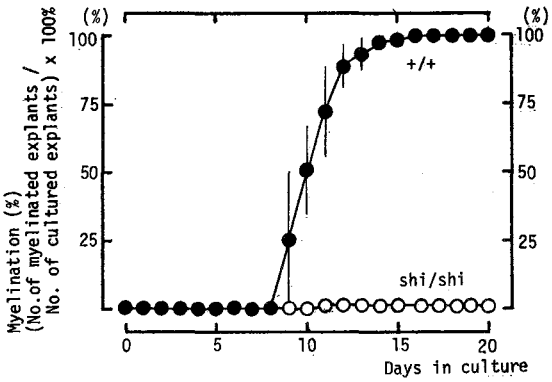


図3 Densitometric scan of the partially purified myelin from the peripheral nerves.



shiverer の P_2A 分画への回収率は19%と低かった。P_2B 分画では shiverer で対照に比べて比活性、回収率ともに高い値を示した。shiverer では P_2 と P_3 分画両方に活性が回収されたため、1.3M-0.32M の linear sucrose gradient にかけて分画後、活性を測定した。対照では、活性分布は一峰性のピークを示したが、shiverer ではその分布は対照の場合よりもモル濃度の低い部分と高い部分両方にまたがっていた。活性は水溶性分画には認められなかった。この広範囲な活性分布を示したことは既に報告されている脂質の減少の影響によるのか[3]、成熟時のミエリンに到らない、いわゆる premyelin の状態でミエリン形成が停止しているのか、あるいは、ミエリンとは無関係な膜成分に CNPase が組みこまれている結果である可能性など考えられるであろう。

図4



Myelination in tissue culture of the cerebellum of the shiverer mutant and the wild type control mice.

shiverer ミュータント同志のかけ合わせにより得た出生直後の仔より得た小脳の explant を用いて in vitro での shiverer のミエリン形成を調べた結果、quaking の小脳に於てみられたと同様に[7]、ミエリン形成は観察されなかった(図4)。

末梢神経系ではミエリンのラメラの数は対照とほとんど差がないにも拘わらず、3本の蛋白バンド(BP, P2, 他の不明なバンド)の欠損がみられた[8]。P0 蛋白には差がみられなかった。CNPase 活性についても差がみられなかった。

以上の結果より、中枢神経系では shiverer はミエリン構成蛋白のうち small BP, large BP, intermediate protein が欠損し、PLP が著明に減少するが、CNPase, Wolfgram 蛋白に変異のこないミュータントであること、即ち、ミエリン形成に際して CNPase, Wolfgram 蛋白が正常でも、BP, PLP が欠損ないし減少することによりミエリン形成が障害されることが明らかとなった。しかし末梢神経系では蛋白欠損がみられてもミエリン形成がみられたことは、中枢と末梢の差を明らかにする上でも良い材料になるものと考える。

文献

1) Biddle,R.,March,E. & Miller,J.R. (1973) Mouse News Lett. 48 24
2) Chernoff,G.,March,E. & Miller,J.R. (1974) Mouse News Lett. 5 12
3) Jacque,C.,Privat,A.,Dupouey,P.,Bourre,J.M.,Bird, T.D.,& Baumann,N. Proc. Europ. Soc. Neurochem. I 131 (1978)
4) Matthieu,J.-M.,Quarles,R.H.,Webster,H.de F.,Hogan E.L. & Brady,R.O. (1974) J. Neurochem. 23 517
5) Mikoshiba,K. & Changeux,J.-P. (1978) Brain Res. 142 487
6) Mikoshiba,K.,Huchet,M. & Changeux,J.-P. (1979) Developmental Neuroscience in press
7) Mikoshiba,K.,Nagaike,K.,Aoki,E. & Tsukada,Y. (1979) Brain Res. in press
8) 長谷, 野口, 塚田 (1976) 神経化学 15 16
9) Norton,W.T. & Poduslo,S.E. (1973) J.Neurochem. 21 749
10) Palo,J.(1978) Myelination & Demyelination. Plenum Press. Adv. Exp. Med & Biol. 100
11) 塚田, 永井, 須田 (1977) 神経化学 16 85
12) Waehneldt,T.V.,Fagg,G.E.,Matthieu,J.-M.,Baumann,N. Neuhoff,V.(1979) J.Neurochem. 32 1679

48 Snell下垂体性こびと症マウスの神経化学的研究

野口鉄也・杉崎哲朗・塚田裕三
(慶大・医・生理)

〔要約〕

in vivoに投与された成長ホルモンは発育期の脳内Ornithine Decarboxylase活性を上昇させることが知られて居り(1,2)，このことから成長ホルモンは直接または間接(活性フラグメントあるいはソマトメジンなど)に脳に作用していることが示唆される。そこで，われわれは下垂体前葉の成長ホルモン分泌細胞と甲状腺刺激ホルモン分泌細胞を欠損しているSnell Pituitary Dwarf Mice (dw) (3)を用い，脳発育に及ぼすこれらのホルモンの効果を検討し次の結果を得た。

(A) ホモ接合体dw/dwの大脳でのみCNPase活性，S-100蛋白含量の低下がみられ，さらにThy-1抗原含量も著しく減少していた。このことはdw/dwの大脳ではグリア細胞の減少，ミエリン形成不全，さらにシナップス形成と神経突起の伸展の減少を示すものと考えられた。

(B) ホルモン投与による回復実験の結果，CNPase活性の低下はbGH単独投与によって約75%，bGH+T_4投与によって完全にその回復が得られたが，TSH単独投与では全く回復をみなかった。

これらのことから，下垂体成長ホルモンは，脳とりわけ大脳の発育に必須のホルモンであることが強く示唆された。

実験材料と方法

(A) 動物：自家繁殖したSnell Pituitary Dwarf Mice (dw)を用い，生下日より40日間牛下垂体成長ホルモン(bGH) 10μg/g，牛下垂体甲状腺刺激ホルモン(TSH) 0.2IU，L-サイロキシン(T_4) 0.25μgを単独，併用皮下投与し，生後40日目の脳各部位の諸酵素活性，諸物質の含量を測定した。なお，dw系ホモ接合体(dw/dw)の確定は下垂体組織処見によった。

(B) 酵素活性測定：2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase (CNPase)の活性測定は塚田らの方法(4)，Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH)の活性測定はYoung & Paceの方法(5)，によった。

(C) 物質含量測定：蛋白含量はLowryらの方法(6)，S-100蛋白は50%溶血法による定量的補体結合反応(7)，Thy-1抗原含量はAKR-anti-C_3H血清(Searle)を用い，C_3Hマウス胸腺細胞のCytotoxicity Test (8)により測定した。なお，S-100抗体はDr.Levine (Brandeis Univ.)，S-100蛋白標準試料は磯辺博士(都立大)より恵贈されたものを用いた。セロトニン(5-HT)，ドーパミン(DA)，ノルエピネフリン(NE)含量測定は高速液体クロマトグラフィー法(9,10)によった。

結果と考察

(A) dw/dwの神経化学的変化(表1)

体染色体劣性遺伝形式をとるdw系マウスホモ接合体(dw/dw)では下垂体前葉の酸好性成長ホルモン分泌細胞と甲状腺刺激ホルモン分泌細胞が欠損している。(11) このためdw/dwは成長ホルモン，甲状腺ホルモンの脳発育に及ぼす効果を追及するに好適な材

料である。脳発育がほぼ完成した40日目の大脳，脳幹，小脳はいずれも正常対照群(+/?: 体型と下垂体処見からは +/+ と +/dw とは全く区別は出来ない)より湿重量は減少していたが，単位湿重量当りの蛋白含量，DNA 含量(12)には差がなく，dw/dw では脳当りの細胞数が減少していることが知られる。グリア細胞に特徴的に存在する(13) S-100 蛋白含量は dw/dw の大脳に於いてのみ減量していたが，アストログリアに存在すると云われる(14) GPDH 活性は小脳でのみ低下していた。また Reier ら(15)が報告した CNPase 活性の全脳での低下は S-100 と同様に大脳でのみ見られ，脳幹，小脳では変化がなかった。シナップス，神経突起を含む神経細胞表面に存在する Thy-1 抗原(16,17,18)は大脳で +/? の約20% に減量し，脳幹，小脳では約 50% の減量にとどまっていた。5-HT, DA, NE は大脳，脳幹で +/? と全く差は認められなかった。以上のことから GH と TSH を欠損する dw/dw では発育期脳の細胞分裂が不活発となり，細胞数が減少すると考えられる。細胞分裂の低下は出生後のグリア細胞の分裂期に強く起ることが考えられ，生後にグリア細胞分裂の盛んな大脳では S-100 蛋白含量が減少し，グリア細胞の一つであるオリゴデンドログリアによるミエリン形成も不全に陥るものと考えられ，また Thy-1 抗原の減少はこの時期に起る神経突起の伸展とシナップス形成の減少を示すものであろう。GPDH はクローン培養でのアストログリアに存在していることが報告され(19)，グリアの成熟と一致して活性上昇を示すことから S-100 蛋白と同様にグリア細胞の Marker Enzyme として利用されて来たが，dw/dw では明らかに S-100 蛋白の含量変動と一致していない。また組織化学的検索から GPDH はグリア細胞以外の細胞にも分布することが知られ(20)，また反応性にその活性が増加すること(21)などから，グリア細胞の Marker と

表 1

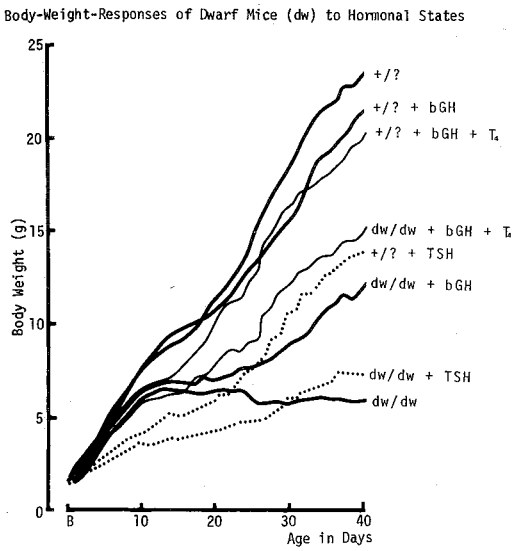
Some Neurochemical Characteristics of Snell Dwarf Mice (dw)

	P. Cerebri		Brain Stem		Cerebellum	
	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw
Tissue wet weight (mg)	229±5(21)	162±3***(21)	127±5(21)	98.0±3.5***(21)	54.2±1.5(21)	37.7±0.9***(21)
Protein (mg/g wet wt)	131±6(21)	130±3(21)	131±4(21)	131±4(21)	149±6(21)	150±7(21)
CNPase (μmole/min/mg protein)	1.53±0.07(12)	0.902±0.052***(12)	4.01±0.17(12)	3.66±0.16(12)	1.64±0.07(12)	1.66±0.13(12)
GPDH (nmole/min/mg wet wt)	5.56±0.09(6)	5.62±0.03(3)	4.36±0.24(6)	3.50±0.10(3)	12.7±0.4(6)	6.77±0.15**(3)
Thy-1 antigen (% of +/?)	100	21.5(2)	100	60.3(2)	100	42.9(2)
S-100 protein (μg/g wet wt)	79.9(2)	45.2(2)	258(2)	208(2)	165(2)	160(2)
5-HT (ng/g wet wt)	589±84(3)	697±49(3)	915±79(3)	1018±193(3)	---	---
DA (ng/g wet wt)	1168±218(3)	915±104(3)	1558±312(3)	1271±185(3)	---	---
NE (ng/g wet wt)	244±35(3)	325±73(3)	758±36(3)	849±103(3)	---	---

Significant differences from normal controls (+/?) are indicated; **:p<0.005, ***:p<0.001

The mean values ± standard error are indicated and the number of animals is given in parentheses.

図



はなり得ないと考えることが妥当であろう。しかし小脳での活性減少については目下検討をすすめている。Thy-1 抗原はシナップス分画に多量に含まれていることから，5-HT，DA，NE 含量を測定したが，変化は全く見られず，Thy-1 抗原が他の神経伝達物質を含むシナップスと一致する可能性も考えられる。

(B) bGH，T_4，TSH 投与による回復実験．

(a) 体重（図）：40日間の諸ホルモン投与により，体重の回復は bGH + T_4 により最も良く得られ，+/? の約70% に達したが，TSH のみでは dw/dw とは差はなく効果は全く認められなかった。bGH 単独投与では +/? の約50% までに増加していた。一方 +/? に bGH，bGH+T_4 を投与しても体重の増加は認められず，さらに TSH 投与では +/? の体重の50% にまで減少してしまった。

(b) 脳湿重量（表2）：dw/dw で減少していた脳各部位重量はホルモン投与による回復が認められ，bGH+T_4 により最も良く回復した。この傾向は大脳，脳幹，小脳で同様であった。しかし TSH 単独投与では dw/dw で回復は全くみられず，逆に +/? の脳重も減少していた。

(c) CNPase 活性（表3）：dw/dw の大脳で減少していた CNPase は bGH 単独投与により +/? の75%にまで回復したが，bGH+T_4 投与により完全に回復することが認められた。しかし TSH 投与では全く回復していなかった。

(d) GPDH 活性（表4）：dw/dw の小脳で減少していた GPDH 活性は bGH 単独投与では全く回復せず，bGH+T_4 によりその回復が認められたが，未だ +/? のレベルには達し得なかった。

dw/dw マウスの甲状腺は未熟で，沪胞の形成は乏しく，大きさも小さい。bGH 投与によって甲状腺は組織学的に全く改善はみられず，TSH 投与によって正常化する。この表2

Response (Brain weight mg wet wt) of Snell Dwarf Mice (dw) to Various Hormonal States

	P. Cerebri		Brain Stem		Cerebellum	
Treatments	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw
None	229±5(21)	162±3***(21)	127±5(21)	98.0±3.5***(21)	54.2±1.5(21)	37.7±0.9***(21)
bGH	212±18(6)	184±5**(6)	123±15(6)	95.0±3.5*(6)	51.2±6.1(6)	40.0±2.5**(6)
bGH + T_4	210±14(7)	190±11*(5)	125±14(7)	120±17(5)	51.3±2.9(7)	45.2±1.9(5)
TSH	183±12(3)	174(2)	104±16(3)	86.0(2)	39.0±5.0(3)	33.0(2)

Significant differences from non-treated normal controls (+/?) are indicated; *:$p<0.01$,**:$p<0.005$, ***:$p<0.001$.

The mean values ± standard error are indicated and the number of animals is given in parentheses.

Response (CNPase activity μmole/min/mg protein) of Snell Dwarf Mice (dw) to Various Hormonal States 表3

	P. Cerebri		Brain Stem		Cerebellum	
Treatments	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw
None	1.53±0.07(12)	0.902±0.052***(12)	4.01±0.17(12)	3.66±0.16(12)	1.64±0.07(12)	1.66±0.13(12)
bGH	1.50±0.13(7)	1.15±0.06(5)	4.20±0.18(3)	3.36±0.08(3)	1.52±0.06(3)	1.41±0.06(3)
bGH + T_4	1.65±0.03(7)	1.45±0.05(5)	3.33±0.19(7)	3.29±0.07(5)	1.48±0.07(7)	1.57±0.11(5)
TSH	1.33±0.08(3)	1.00(2)	3.44±0.20(3)	3.31(2)	1.80±0.04(3)	1.78(2)

Significant differences from non-treated normal controls (+/?) are indicated; ***:$p<0.001$.
The mean values ± standard error are indicated and the number of animals is given in parentheses.

Response (GPDH activity nmole/min/mg wet wt) of Snell Dwarf Mice (dw) to Various Hormonal States 表4.

	P. Cerebri		Brain Stem		Cerebellum	
Treatments	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw	+/?	dw/dw
None	5.56±0.09(6)	5.62±0.03(3)	4.36±0.24(6)	3.50±0.10(3)	12.7±0.4(6)	6.77±0.15**(3)
bGH	5.80±0.04(5)	5.72±0.03(3)	4.23±0.04(5)	3.62±0.04(3)	10.6±0.1*(5)	6.99±0.06**(3)
bGH + T_4	5.98±0.23(7)	5.96±0.17(5)	4.44±0.09(7)	4.56±0.14(5)	11.5±0.3(7)	9.04±0.29***(5)
TSH	5.93±0.09(3)	5.49(2)	4.30±0.22(3)	4.29(2)	9.51±0.23*(3)	6.81(2)

Significant differences from non-treated normal controls (+/?) are indicated; *:$p<0.01$,**:$p<0.005$, ***:$p<0.001$.
The mean values ± standard error are indicated and the number of animals is given in parentheses.

ことはbGH投与は甲状腺を経由せず，脳の神経化学的変化を改善するものと云える。すなわち，下垂体成長ホルモンは，脳とりわけ大脳の発育に必須のホルモンであることが強く示唆される。

また，dw/dwマウスは自発活動量が減少し，その日内変動も消失していたが，bGH単独投与により自発活動量が増加し，日内変動が著明となり，機能的回復も認められた。

文献

(1) Roger,L.J.,Schanberg,S,M.,Fellow,R.E.:Endocrinol.,95,904 (1974) (2)野口,高坂,青木,塚田.神経化学 16, 65 (1977) (3) Snell,G.D.:Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,15, 733 (1929) (4) 塚田,永井,須田神経化学16,85 (1977) (5) Young,H.L.,Pace,N.:Arch.Biochem.Biophys. 75, 125 (1958) (6) Lowry,OH.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.C.,Randall,R.J.:J.Biol.Chem.193,265 (1951) (7) Moore,B.W.,Perez,V.J.,Chering,M.:J.Neurochem.15,265 (1968) (8)張,西岡.移植 5, 277 (1971) (9) Ponzio,F.,Jonsson,G.:J.Neurochem.32,129 (1979) (10) Felice,L.J.,Felice,J.D.,Kissinger,P.T.:J.Neurochem.31,1461 (1978) (11) Bartke,A.:Anat.Rec.149, 225 (1964) (12) Winick,M.,Grant,P.:Endocrinol.83,544 (1968) (13) Perez,V.J.,Olney,J.,Cicero,T.J.,Moore,B.W.,Bahn,B.A.:J.Neurochem.17,511 (1970) (14) de Vellis,J.,Kukes,G.:Texas Rep.Biol,Med.31,3 (1973) (15) Reier,P.J.,Matthieu,J-M.,Zimmerman,A.W.:J.Neuropath.Exp.Neurol.XXXIV,465 (1975) (16) Barclay,A.N.,Hyden,H.:J.Neurochem.31,1375 (1978) (17) Barklay,A.N.:J.Neurochem.:32 1249 (1979) (18) Barklay,A.N.,Hyden,H.:J.Neurochem.32,1583 (1979) (19) de Vellis,J.,Inglish,D.,Sato,G.:p151, 2nd ISN Meeting Abst. (1969) (20) Felgenhauer,K,Stammler,A.:Z. Zellforsch.58, 219 (1962) (21) de Vellis,J.,Inglish,D.,Cole,R.,Molson,J.:Influence of Hormones on the Nervous System. Ford,D. ed., pp25, (1971)

49 S-100タンパク質の化学構造と分子進化

礒辺俊明・石岡憲昭・奥山典生
(都立大・理・化)

〔要約〕

脳神経系に特異的に存在するタンパク質S－100の一成分であるS－100aタンパク質のサブユニット構造および一次構造を決定し，既知のS－100bタンパク質の構造と比較した。得られた結果は以下のようであった。

(1) S－100a，S－100bタンパク質はそれぞれ〔α・β〕，〔β・β〕で示されるサブユニット構造をもっている。すなわち，2種類のS－100タンパク質は分子中にβ鎖を共有している。

(2) α鎖（93残基，分子量10400）とβ鎖（91残基，分子量10500）は相互に58%の構造上の類似性をもち，かつ類似のCa結合部位を1分子中に1モル有する分子進化的類縁性の深いポリペプチド鎖である。

(3) α鎖，β鎖はともにトロポニンC，モジュレータータンパク質等を含むCa結合タンパク質群の中に分類されるべき構造を有する。構造上の類似性は小腸に存在する"ビタミンD依存性"Ca結合タンパク質との間で特に顕著であった。

以上の結果を基礎にして，S－100タンパク質の分子進化過程，およびそれから推定される機能について記述した。

S－100a，S－100bタンパク質（従来のPAPIa，PAPIbタンパク質に対応）は脳神経系に特異的に存在する酸性タンパク質S－100の主成分である[4]。S－100タンパク質の生理活性，神経系内機能は不明であるが，その生合成が微小管形成と何らかの関係があることがグリア系腫瘍細胞C6を用いた実験から示唆されている。組織化学的研究は。S－100が主としてグリア細胞（astrocyte）の可溶性画分に，一部が神経細胞内に分布していることを示している。

S－100a，S－100bタンパク質は分子量約20000で，生化学的諸性質の類似したタンパク質である[4]。S－100bタンパク質の一次構造解析の結果は，S－100bが91残基。分子量10500のサブユニットから構成される二量体であることを明らかにすると同時に，これが筋トロポニンC，モジュレータータンパク質などと分子進化的な類縁性をもつCa結合タンパク質であることを示唆した[5,6]。

本報告ではS－100aタンパク質の化学構造について記述し，S－100a，S－100bタンパク質の一次構造の上での比較と，小腸に存在するCa結合タンパク質との構造類似性，およびS－100タンパク質の分子進化について考察する。

実験材料と方法

S－100aタンパク質はウシ脳抽出液より既報の方法[4]で分離精製した。SDS－尿素ゲル電気泳動は12.5%ポリアクリルアミドゲル（1.25%ビスアクリルアミド）を用いSwankとMunkresの方法[9]の変法で行なった。α鎖の一次構造は3種のブロムシアン分解ペプチドと11種のトリプシン分解ペプチドを基礎にして決定した。これ

らのペプチドはDEAE－セファデックスA－25，セファデックスG50，バイオゲルP6などを用いるカラムクロマトグラフィーで精製し，得られたペプチドの構造は主としてエドマン分解直接法およびカルボキシペプチダーゼ法で決定した。構造分析法の詳細は，S－100bタンパク質の構造決定に関する既報の方法[6]に準拠している。一次構造の"homology"分析はGibbsらの"diagonal method"[2]により行なった。

結果と考察

1　α鎖の分離

S－100aタンパク質は二種の異なるサブユニット（α，β鎖）より成る二量体であることが，S－100aの分子量測定，SDS－尿素ゲル電気泳動の結果から示唆されていた[5]。これらのサブユニットはアミノエチル化したS－100aを25％ギ酸に溶解し（タンパク質濃度1％），10％ギ酸を溶出液とするセファデックスG75クロマトグラフィーにより分離された（図1）。得られたα，β鎖はSDS－尿素ゲル電気泳動でそれぞれ単一バンドを示した（図2）。またα，β鎖のアミノ酸組成の和は，実際のS－100aタンパク質の分析値とよく一致していた。

S－100aより得たβ鎖の一次構造は，既知のS－100b単量体の構造[6]と同一であることが，アミノ酸組成やブロムシアンペプチドの部分一次構造などから確かめられた。したがって，S－100a，bタンパク質は二量体中に一方のサブユニット（β鎖）を共有していることになる。

2，　鎖の一次構造

決定されたα鎖の一次構造を図3に示した。α鎖はマスクされたN末端SerまたはGly（未決定）からC末端Serまで93残基を含む分子量10400のポリペプチド鎖であった。S－100aに1モル含まれるTrp残基はα鎖のC末端付近（90Trp）に存在する。S－100b（β鎖）の構造中にはトロポニンCなどのCa結合タンパク質と類似のCa結合部位が存在する[5,6]。同様のCa結合部位がα鎖中にも見出された（図3下線）。

Fig. 1. Separation of α and β Subunits on Sephadex G-75 (superfine)

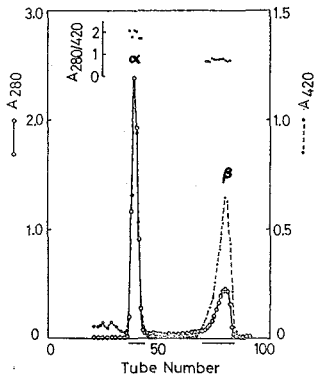
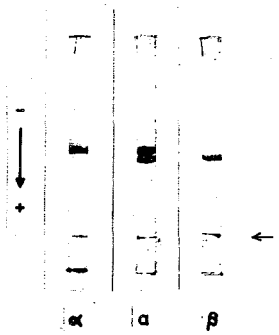


Fig. 2. SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis of α and β subunits



3，α鎖とβ鎖の比較

α鎖とβ鎖の一次構造を比較して図4に示した。（●）で示したのはα鎖とβ鎖で同一のアミノ酸残基，（○）は異なる残基である。構造を二列（1－48，49－93）に示したのはα，β鎖が構造の類似した2つの

"domain"よりなる"2－domain"構造をもっていると考えられることに対応している（後述）。α鎖の残基数（93）はβ鎖（91）に比べて2残基多いが，これらはN末端および残基番号90（Trp）に位置するものと考えられる（β鎖では上記2残基が欠損している）。図4から明らかになったようにα鎖の93残基中53残基がβ鎖と共通であり，α鎖とβ鎖の構造類似性は57％であった。またα，β鎖のCa結合部位に存在する6つのCa配位残基（＋）にはまったく変異が認められなかった。以上の結果はα，β鎖の類似した分子進化過程を示すものである。

4，S－100と小腸のCa結合タンパク質

S－100は脳神経系にのみ存在していると考えられるが[8]，決定されたα鎖およびβ鎖の一次構造は，小腸に存在する"ビタミンD依存性"Ca結合タンパク質（ICaBP）の構造[3]と顕著な類似性を示すことが見出された。図4に模式的に示したICaBPの構造中。（●）はα鎖およびβ鎖の対応する残基と共通のアミノ酸残基を，（⊗）はα鎖またはβ鎖の一方と共通の残基を示している。図に示した"alignment"を基礎にすると，ICaBPは80残基中α鎖と32残基，β鎖と30残基の共通残基をもち，α鎖またはβ鎖と共通の残基（⊗）を加えると39％（93残基を基礎に計算）の構造類似性を示した（表1）。こうした構造の類似性はS－100とICaBPが一連のCa結合タンパク質群の中でもとりわけ分子進化的類縁性の深いタンパク質であることを示している。

5，S－100タンパク質の分子進化

分子進化の上でS－100タンパク質と類縁関係があると考えられるタンパク質を表2にまとめた。表に示した6種類のタンパク質のうち，ミオシンライト鎖はさらに構造の異なる3種類のポリペプチド鎖に分類される（12）。

Fig. 3. The Amino Acid Sequence of Alpha Subunit

```
                5                  10                  15                  20
B-(Ser,Gly)Glu-Leu-Glu-Thr-Ala-Met-Glu-Thr-Leu-Ile-Asn-Val-Phe-His-Ala-His-Ser-Gly-
               25                  30                  35                  40
-Lys-Glu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Lys-Leu-Ser-Lys-Lys-Glu-Leu-Lys-Glu-Leu-Leu-Gln-Thr-Glu-
               45                  50                  55                  60
-Leu-Ser-Gly-Phe-Leu-Asp-Ala-Gln-Lys-Asp-Ala-Asp-Ala-Val-Asp-Lys-Val-Met-Lys-Glu-
               65                  70                  75                  80
-Leu-Asp-Glu-Asp-Gly-Asp-Gly-Glu-Val-Asp-Phe-Gln-Glu-Tyr-Val-Val-Leu-Val-Ala-Ala-
               85                  90          93
-Leu-Thr-Val-Ala-Cys-Asn-Asn-Phe-Phe-Trp-Glu-Asn-Ser-OH
```

Fig. 4. Comparison of S-100 Protein and ICaBP

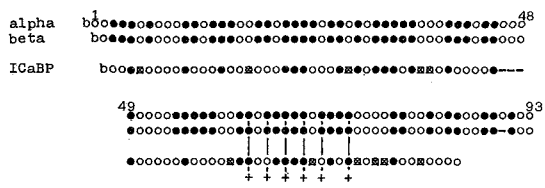


Table 1. Comparison of S-100 Protein and ICaBP

	identities	%(/93 residues)
alpha vs. beta	53	57
alpha vs. ICaBP	32	34
beta vs. ICaBP	30	32
alpha or beta vs. ICaBP	36	39
among all three proteins	25	27

以上のタンパク質は，いずれもその基本的な構造がCa結合部位を1つ含む分子量約4000の"domain"の繰り返しとして理解できることから，これに対応する祖先遺伝子の遺伝子重復によって由来したのではないかと考えられている（1，7，11）（図5）。さらに進化過程で，心筋トロポニンC，パルブアルブミン，ミオシンライト鎖中のあるdomainはCa結合能を失ない[7，10，12]，パルブアル

ブミンの第1 domainは欠損し[7]（図5），またモジュレータータンパク質の第3 domain中のLys残基は"post-translational"にメチル化を受ける[11]などして機能の分化が行なわれているように見える。

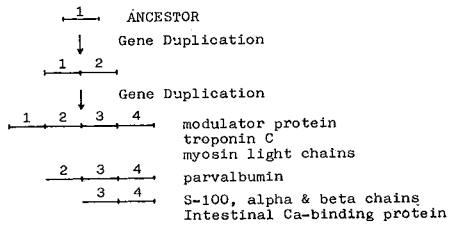
前述したように，S－100タンパク質（α鎖とβ鎖）の構造は2－domain構造と考えることができるが，その分子進化過程は，（1）上記Ca結合タンパク質と共通の祖先遺伝子の2度の重復による4－domain構造の形成　（2）第1，第2 domainの欠損　（3）第3 domainのCa結合能の消失（または親和性の低下）のように推定される。ICaBPの構造からも，S－100と同様の分子進化過程が推察され，S－100とICaBPの分岐（divergence）が他のCa結合タンパク質との分岐に比べて比較的最近起こったことが推定される。

Table 2. List of a Ca-Binding Protein Family

Protein	Localization	Function
S-100a,b	Brain	unknown
Modulator Protein (PAP II, CDR)	Various organs	regulation of cAMP level etc.
Troponin C	Muscle	regulation of muscler contraction
Parvalbumin	Muscle	〃 (?)
Myosin Light Chains	Muscle	〃
ICaBP	Intestine	regulation of Ca and phosphate level (?)

表2に掲げたタンパク質の生理機能はいずれも十分理解されているとはいえない。しかし現在までに得られている知見から，これらのタンパク質の共通した性質は，他のタンパク質（あるいは酵素）に作用して，そのタンパク質の関与するタンパク質間相互作用（あるいは酵素活性）を調節することであるように思われる。S－100の生理活性，機能は未解決の興味ある課題であるが，化学構造研究の結果はS－100がある神経系内過程の調節タンパク質であることを示唆している。

Fig. 5. Evolutionary Process of Ca-Binding Proteins



REFERENCES

1. Collins,J.H. (1976) Nature 259, 699-700.
2. Gibbs,A.J. & McIntyre,G.A. (1970) Eur.J.Biochem. 16, 1-11.
3. Hofmann,T. et al. (1977) in "Ca binding protein and Ca function" (Wasserman,R.H. et al eds) North Holland, New York, pp. 373-375.
4. Isobe,T. et al. (1977) Biochim.Biophys.Acta 494, 222-232.
5. 磯辺・奥山 (1977) 神経化学 16, 121-124.
6. Isobe,T. & Okuyama,T. (1978) Eur.J.Biochem. 89, 379-388.
7. Moews,P.C. & Kretsinger,R.H. (1975) J.Mol.Biol. 91, 201-228.
8. Moore,B.W. (1965) Biochem.Biophys.Res.Commun. 19, 739-744.
9. Swank,R.T. & Munkres,K.D. (1971) Anal.Biochem. 39, 462-477.
10. van Eerd,J-P. & Takahashi,K. (1976) Biochem. 15, 1171-1180.
11. Vanaman,T.C. et al. (1977) in "Ca binding protein and Ca function" (Wasserman,R.H. et al eds) North Holland, New York, pp. 107-116.
12. Weeds,A.G. & McLachlan,A.D. (1976) Nature 252, 646-649.

50 培養rat glioma (C-6) 細胞のcyclic AMP induced differentiationにおける S-100蛋白質量の経時的変化

古田知久・則兼　博・守屋芳夫
坪井雅弘・田渕和雄・西本　詮
(岡大・医・脳外)

〔要　約〕

培養rat glioma(C-6)細胞を用い、cyclic AMP(c-AMP)およびdibutyryl cyclic AMP(dbc-AMP)投与により誘導された細胞形態の分化に伴う神経組織特異S-100蛋白質量の経時的変化をmicro-complement fixation法により検索した。非投与control群においては、細胞あたりのS-100蛋白質量はlogarithmic growthの時期には低く、stationary growthの時期にはほぼ一定値を示した。c-AMP 1mM あるいはdbc-AMP 1mMいずれの投与群でも細胞増殖の抑制と形態学的変化に伴い細胞あたりのS-100蛋白質量はstationary growthに未だ達しない早期から増加し始めcontrol群のそれぞれ4.5および8.5倍に達した。また水溶性蛋白質量に対するS-100蛋白質量の変化も同じ傾向を示した。一方、細胞の形態学的変化はdbc-AMP 1mM投与後24時間以内にみとめられたにも拘らず、S-100蛋白質量の増加はdbc-AMP投与後72時間以後に始まり、著明に増加するのは11日目以降であった。dbc-AMP 1mM投与群のうち11日目以後medium中よりdbc-AMPを除去した群では、除去後24時間で形態の変化が起り始め、48時間目には細胞あたりのS-100蛋白質量が著しく減少した。以上の結果よりc-AMPおよびdbc-AMPがS-100蛋白質の産生に関与し、細胞を形態学的のみならず生化学的にも分化させうるが、前者と後者との間には48時間以上の時間的隔りがあること、また少なくとも10日目まではこれらの変化はreversibleであることが示された。

1968年のRyan and Heidrick の報告以来[14]、cyclic AMPによる培養腫瘍細胞の増殖抑制と形態学的分化の誘導については種々の研究がなされているが、その生化学的分化についての報告は少ない。一方、1965年Mooreら[9]によって発見された神経組織特異蛋白質のひとつであるS-100蛋白質は主としてglia細胞に存在すると考えられており、ヒトgliomaにおいては一般に形態学的により分化したものほどS-100蛋白質が多いことなどよりglioma細胞の分化の指標となると考えられる[10]。そこで我々は、培養rat glioma(C-6)細胞を用い、c-AMPおよびdbc-AMPにより誘導された形態学的分化とS-100蛋白質量を指標とする生化学的分化との関連を検索し興味ある結果を得たので報告する。

(実験材料および方法)

培養細胞は、N-methyl nitrosoureaによりWistar ratに誘発されin vitroで継代されているglioma細胞株(C-6)を用いた[1]。培養は、10% fetal calf serum(Gibco)添加Eagle's minimum essential medium(Gibco)を使用し、37°C, 5% 炭酸ガス培養器中で行なった。なお抗生物質はpenicillin G 50u/ml, streptomycin 50ng/mlを加え、pHの調整は$NaHCO_3$にて行なった。直径100 mmのplastic dish(Falcon製)に1 dishあたり5×10^5個のC-6細胞を植え込み、上記mediumのみで培養したものをcontrol群, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate(c-AMP, Sigma), N^6, O^2-dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate(dbc-AMP, Sigma)を各々medium中に最終濃度1mMとなるように加えた群をそれぞれc-AMP投与群, dbc-AMP投与群とし、2日目毎にmedium交換を行ないながら17日間培養を行なった。各々の投与群につき、sub-

culture 後毎日 dish 2枚の細胞を別々に 0.05 % trypsin 処置で分離した後 Veronal 緩衝食塩水（pH= 7.3）に浮遊し、その一部より生細胞数を算定し平均値より増殖曲線を求めた。残りは急速凍結融解を3回行なった後、低温遠沈（20000 xg, 30分間）を行ないその上清を S-100 蛋白質量および水溶性蛋白質量の測定に使用した。S-100 蛋白質の定量は、Levine らの micro-complement fixation 法に準じて行なった[10]。水溶性蛋白質量の測定は Lowry らの方法に従って行なった[7]。以上の方法で plastic dish 1枚より得られた資料では、control 群は7日目まで、c-AMP投与群は9日目まで、dbc-AMP投与群は12日目までがそれぞれ micro-complement fixation 法による測定可能範囲にはいってこなかったので、plastic dish の数を増やし、これから得られたすべての細胞を合せて S-100 蛋白質量と水溶性蛋白質量の測定を行なった。さらにこの dbc-AMP 投与群の一部は11日目以降 medium 中より dbc-AMP を除去し、その形態学的変化，増殖曲線，S-100 蛋白質量，水溶性蛋白質量を同様に測定した。なお、培養細胞の観察は位相差顕微鏡にて行なった。

（結果）

(1) 形態学的変化；c-AMP および dbc-AMP いずれの投与群においても control 群に比べ細胞体の延長，細胞突起の増加と延長さらには細胞突起による network の形成等がみとめられた。これらの変化は dbc-AMP 投与後4時間目には一部の細胞ですでにみとめられ始め、24時間後には85%以上，48時間後にはほぼ100 %の細胞にみとめられた。またc-AMP投与群に比して dbc-AMP 投与群により著明にみとめられた。dbc-AMP 投与群のうち dbc-AMP 投与を11日目以降中止した群では投与中止後24時間以内に95%の細胞で細胞体および細胞突起の短縮がみられ始め、投与中止後3日目にはほぼ control 群と類似の形態となった。

(2) 増殖曲線：図1は上から control 群，c-AMP 投与群，dbc-AMP 投与群の片対数グラフによる増殖曲線である。各点は2枚の dish より得られた細胞数の平均値を示している。この図にみられる如く、c-AMP投与群および dbc-AMP 投与群では control 群と比較して細胞の増殖が抑制され、logarithmic growth の時期における doubling time は control 群 19.8 時間，c-AMP 投与群 66.7 時間，dbc-AMP 投与群 82.6 時間と dbc-AMP 投与群が c-AMP 投与群より細胞増殖がより著明に抑制された。図2には、plastic dish の数を増して行った dbc-AMP 投与群（黒の四角）と dbc-AMP 投与を11日目以降中止した群（白の四角）との増殖曲線の比較を示す。後者は前者に比して細胞数がより増加し、中止後4日目には control 群とほぼ同数に達した。

(3) S-100 蛋白質量の経時的変化；control 群では細胞あたりの S-100 蛋白質量は logarithmic growth の時期を通して低く、subculture 後6日目より増加し始めた。stationary growth の時期にはほぼ一定の値を示し、細胞あたりの S-100 蛋白質量は 0.005 ± 0.001 pg，水溶性蛋白質 1mg あたりの S-100 蛋白質量は 5.77 ± 0.95 ng であった。c-AMP 投与群では、細胞あたりの S-100 蛋白質量は測定可能となった10日目以降経時的に増加し、17日目には 0.023 pg（control 群の約4.5倍）に達した。また水溶性蛋白質 1mg あたりの S-100 蛋白質量も同じ傾向を示し、17日目には 22.3 ng（control 群の約4倍）に増加した。dbc-AMP 投与群では、測定可能となった13日目には、細胞あたり 0.042 pg（control 群の約8.5倍）と著明な増加を示したが、その後はやや減少傾

向を示した。しかし、水溶性蛋白質量に対するS-100蛋白質量は経時的にやや増加傾向を示した。図3はcontrol群(黒丸)およびplastic dishの数を増やして行ったdbc-AMP投与群(黒の四角)における細胞あたりのS-100蛋白質量を示したものである。control群に比べてdbc-AMP投与群では4～8日目に増加がみとめられたが、10日目には一旦control群と同程度の値まで低下した。しかし、11日目からは著明に増加し、15日目には0.050 pgとcontrol群の約10倍に達した。11日目以降dbc-AMP投与を中止した群においては(白の四角)，中止後24時間目では細胞あたりのS-100蛋白質量は有意差を示さなかったが、48時間目にはdbc-AMP投与群の半分以下に低下し、その後はほぼ一定の値(0.012±0.002 pg)を示した。また水溶性蛋白質量に対するS-100蛋白質量もほぼ同様の傾向を示した。

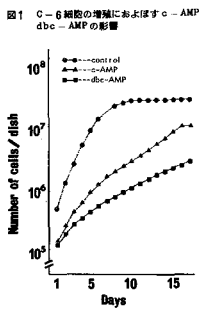


図1 C-6細胞の増殖におよぼすc-AMP，dbc-AMPの影響

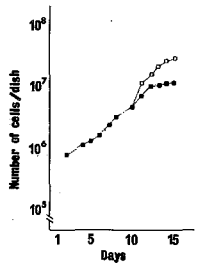


図2 dbc-AMP投与中止後の増殖曲線の変化

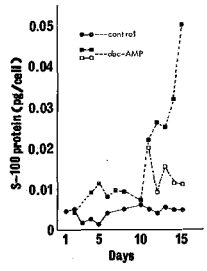


図3 C-6細胞におけるS-100蛋白質の経時的変化

(考察)

神経組織特異蛋白質のひとつであるS-100蛋白質は、一般にglia細胞の分化の指標となりうると考えられており[4)10)]、最近、そのsubunitのひとつのアミノ酸配列が決定されるに至っているが[3)]、S-100蛋白質の生物学的役割はほとんど解明されていない。S-100蛋白質の細胞内における産生について、Labourdetteら[5)]はC-6細胞を用いて経時的検索を行ない、logarithmic growthの時期にはS-100蛋白質量が減少しstationary growthの時期には増加することなどよりintercellular contactがS-100蛋白質の産生に関与している可能性を推測しており、我々もcontrol群において彼らと同様の結果を得た。一方Marksら[8)]はmicrotubulesの阻害剤であるcolchicineなどの投与によりC-6細胞におけるS-100蛋白質の産生が阻害されることなどから、細胞膜表面よりの情報がmicrotubular networkを介してS-100蛋白質の産生を制御しているのであろうと考えている。またBürkら[2)]がintercellular contactが細胞膜に存在するadenyl cyclaseを活性化し、細胞内のc-AMPを増加させると報告していることより、今回c-AMPあるいはdbc-AMP投与によりC-6細胞におけるS-100蛋白質量の増加がみられたことは、intercellular contactにもとづくS-100蛋白質の増加にはadenyl cyclaseの活性化によるc-AMPの増加が関与している可能性を示唆するものと考えられる。一方、c-AMPおよびdbc-AMPが培養細胞の増殖を抑制し、形態学的変化を誘導することはこれまでよく知られており、この増殖抑制・形態学的変化は分化すなわち良性化を意味すると考えられている。さらにPuck[13)]はこの良性化はc-AMPによる細胞質におけるmicrotubular networkの修復によるとしているが、前述のMarksらの

報告とも考えあわせc-AMPあるいはdbc-AMPによるS-100蛋白質の増加もこのmicrotubular networkの修復に関連していると推測され、いずれにしてもC-6細胞におけるS-100蛋白質の産生にc-AMPが深くかかわっていることが考えられる。

永井ら[11]はC-6細胞にdbc-AMP 1mMを投与した実験で形態学的変化が3-12時間のうちに始まり24-36時間で完成すると報告しているが、我々の実験結果もこれとよく一致した。しかし、生化学的分化の指標と考えられるS-100蛋白質量の増加はdbc-AMP投与開始後3日目以降にみられ始め、著明な上昇は11日目以後にみとめられた。この11日目以後のS-100蛋白質量の増加は光顕下にintercellular contactが著明になる時期に一致すると考えられるが、それ以前の4-8日目におけるS-100蛋白質量の増加との関係については今後その機序についての詳細な検索が必要であろう。いずれにせよC-6細胞におけるc-AMPによる形態学的変化の発現とS-100蛋白質量の増加との間には少なくとも48時間以上の時間的隔りが存在した。このような形態学的変化と生化学的変化との時間的隔りはPrasadら[12]のc-AMP投与による培養neuroblastoma細胞におけるtyrosine hydroxylase活性の検索に際して、またLimら[6]のglia maturation factorによるglioblastの分化に伴うS-100蛋白質量の変動の検索においてみとめられている。この時間的隔りは、形態学的変化をきたした細胞が成熟細胞としての機能を獲得するまでの時間ではなかろうかと考えているが、これについても電顕的検索を含めてさらに詳細な形態学的検索を要するであろう。

また前述の永井らは、このc-AMPにより誘導されたC-6細胞の形態学的変化が2週間目以後はirreversibleになると報告している。我々は11日目以降dbc-AMPをmedium中より除去したが、その3日後には大多数の細胞がcontrol群と同様の形態になり、これに伴ってS-100蛋白質量も減少した。このことは少なくともdbc-AMP投与開始後10日目においては、形態学的変化のみならず生化学的変化もreversibleであることを示している。しかし、dbc-AMP投与によりC-6細胞の生化学的変化がirreversibleになる時期，一旦増加したS-100蛋白質が減少する機序，dbc-AMP投与中止後の形態学的変化と生化学的変化の間に時間的隔りが少ない理由等については今後さらに検索をすすめて行きたい。さらに、今回の検索はすべて水溶性のS-100蛋白質のみを対象にしており、膜結合性S-100蛋白質の変化については現在検討中である。

<文　献>

(1) Benda,P.,Lightbody,J.,Sato,G.,Levine,L. and Sweet,W. (1968) Science,161,370　(2) Bürk,R.R. (1968) Nature,219,1972　(3) Isobe,T. and Okuyama,T. (1978) Eur.J.Biochem.,89,379　(4) Kolber,A.R.,Perumal,A.S., Goldstein,M.N. and Moore,B.W. (1978) Brain Res.,143,513　(5) Labourdette,G.,Mahony,J.B.,Brown,I.R. and Marks,A. (1977) Eur.J.Biochem.,81,591　(6) Lim,R.,Turriff,D.E.,Troy,S.S.,Moore,B.W. and Eng,L.F. (1977) Science,195,195　(7) Lowry,O.H.,Rosenbrough,N.J.,Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem., 193,256 (8) Marks,A. and Labourdette,G. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.,74,3855　(9) Moore,B.W. (1965) Biochem.Biophys. Res.Commun.,19,739　(10) 守屋芳夫，古田知久，坪井雅弘，田渕和雄，西本　詮. (1978) 神経化学，17，265　(11) 永井政勝，寺岡　暉，降旗俊明，野村和弘，松谷雅生. (1974) 脳神経外科，2，511　(12) Prasad,K.N. and Kumar,S. (1975) Cancer,36,1338　(13) Puck,T.T. (1977) Proc. Natl.Acad.Sci.,74,4491　(14) Ryan,W.L. and Heidrick,M.L. (1968) Science,162,1484

51 実験的梗塞脳におけるS-100 proteinの経時的変化

守屋芳夫・古田知久・原田泰弘
岸川秀実・田渕和雄・西本詮
(岡大・医・脳外

〔要約〕

神経組織に特有で主としてグリア細胞に存在するS-100 proteinの機能については不明な点が多い。今回，我々は，S-100 proteinの機能の一端を探る目的で，実験的梗塞により，ラット脳に虚血性変化をおこさせ，その際のS-100 proteinの経時的変化を検索し興味ある知見を得たので報告する。ラット右内頸動脈より微小炭素粒子を注入，microembolism作成後，摘出脳組織について，water soluble S-100 protein，total water soluble protein，water content等を測定し，主として脳浮腫とS-100 protein量との関連を検討した。その結果，①血漿0.07ml注入による対照群では，S-100 protein量の変化を認めなかった。②脳浮腫は，8時間後に最も著明となり，水分量で2.8%（体積で14.2%）の増加をみたが，24時間後には，ほぼ対照値に復した。③S-100 protein量はsoluble protein量が変動を示さないにもかかわらず，8時間後に対照値の37%に減少したが，24時間後には，ほぼ対照値に復した。④完全虚血脳組織（脳摘出後，37℃に加温）中のS-100 protein量は8時間後においてさえ，対照値の46.1%に減少したにすぎなかった。即ちmicroembolism作成後のS-100 protein量は，梗塞脳における脳浮腫の発現，消褪と密接に関連して変化し，脳浮腫の最も著るしい8時間後に最低値を示す。この減少は単に梗塞脳の水分量の増加，血液脳関門の破綻による流出等に基づくものとは考え難く，S-100 proteinの持つ何らかの生物学的機能の結果(膜透過性に関与?)のためと考えられる

S-100 proteinは神経組織に特有な蛋白質の一つであり，1965年Mooreにより初めて分離精製されている。S-100 proteinは主としてグリア細胞内に水溶性の形で分布しているが，一部は膜結合の形で存在している。又，neuronの核内にも存在することが知られている。S-100 proteinは，2種のsubunitより成るdimerであることは既に知られていたが，1978年Isobeらにより，subunitの一方のアミノ酸配列が決定された。それによると，分子量10507（dimerで21014）でphenylalanine等の酸性アミノ酸に富みその acidicな部分にcalcium-binding siteを持つことが判明している。一方，S-100 proteinの持つ神経生物学的役割については不明な点が多いが，わずかに，神経系の機能あるいは発達に関与しているとする報告，Ca^{++}存在下に細胞膜の透過性を高めるとする報告が散見される。一方，虚血脳における，グリア細胞の変化は，脳虚血早期より認められることが病理組織学的にも知られており，今回，我々は，脳虚血早期における脳内S-100 protein量の経時的変化より，その生物学的機能の一端を探る目的で，以下の実験を行なった。

〈実験方法〉①microembolismの作成：平均体重350gのSprague-Doubleラット右内頸動脈内に，PE-50ポリエチレンチューブを押入，他のラット血漿0.07mlに浮遊させた直径35μの微小炭素粒子0.14mgを徐々に注入することにより，microembolismを作成した。microembolism作成後，5分，2時間，4時間，8時間，24時間，48時間の各時間毎に，エーテル麻酔下にラットを断頭，梗塞大脳半球（右側）を摘出した（実験は各群10匹を用い，さらに同数のラットに対し，ラット血漿0.07mlを同様の方法にて注入した sham operation群を作り，対照群とした。②water soluble S-100

protein, total water soluble protein の測定：摘出した大脳半球に4倍量の Veronal buffer を加えた後，glass homogenizer にて処理，20000×g，30分間の遠沈の後，上清について測定した。water soluble S-100 protein（以下 S-100 protein と略記）の定量は Plescia 5 の方法に従って当教室にて作成した抗ウシ S-100家兎血清を用いて microcomplement fixation 法で行なった。total water soluble protein（以下 soluble protein と略記）の定量は Lowry 5 の方法を用いた。③脳内水分量，組織内 Na^+ K^+濃度の測定：水分量は，乾燥重量法，Na^+，K^+濃度は flame fluorophotometer で測定した。④摘出完全虚血ラット脳内 S-100 protein 量の自然減少実験：各群5匹の平均体重 400 g の Sprague-Douly ラットをエーテル麻酔下に断頭，大脳半球摘出後，左側は対照群とし右側は実験群として，37°C 加温を，それぞれ4時間，8時間，24時間行なった後，各実験脳，対照脳ともに前記と同様の処理を行ない，S-100 protein，soluble protein を測定した。S-100 protein は μg/mg soluble protein，soluble protein は μg/mg wet tissue として算出した。

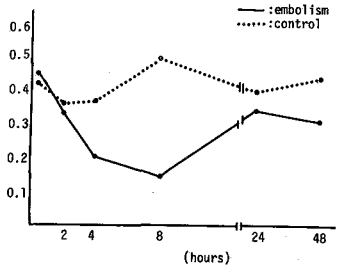
Table 1.

Water Soluble S-100 Protein
(μg/mg soluble protein)

	embolism	control
5 min	0.46±0.14	0.43±0.11
2 h	0.34±0.15	0.37±0.11
4 h	0.21±0.11	0.38±0.14
8 h	0.15±0.05	0.51±0.17
24 h	0.35±0.15	0.41±0.09
48 h	0.32±0.10	0.45±0.16

(mean±standard deviation)

Fig.1.



〈結果〉① water soluble S-100 protein の経時的変化（Table 1，Fig. 1）：embolism 作成5分後の S-100 protein 量は実験群 0.46±0.14（平均値±標準偏差），対照群 0.43±0.11 とほぼ同程度の値を示していたが，Fig. 1 中実線にて示した実験群においては，梗塞形成2時間後 0.34±0.15，4時間後 0.21±0.11 と減少を続け，8時間後に，最低値 0.15±0.05 となり 対照群に比し，有意に低い値を示した。また，この値は microembolism 作成5分後の値と比較しても，有意（$p<0.01$）に低く，63％の減少を示している。これに対し破線で示した対照群における S-100 protein 量は，48時間を通じていずれも有意の変動はなかった。embolism 作成後，8時間以後は，S-100 protein 量は，回復傾向を示し，24時間後で 0.35±0.15 まで回復，以後は，48時間後で 0.32±0.10 とほぼ横ばいの値を示した。24時間，48時間のいずれも対照群との間に有意の差を認めなかった。

② total water soluble protein の経時的変化（Table 2，Fig. 2）：soluble protein 量は，実験群，対照群ともに経時的には有意の変動を認めなかった。しかし，実線にて示す実験群においては全経過を通じ，対照群に比して，約 15 μg/mg wet tissue 程度，高い値を示し，各時間における両群の差を比較すると，8時間後に有意の差を認めた。しかし，既に述べた如くに，各群を経時的に検討した結果では，soluble protein 量に有意の差は無く，従って embolism 作成後の S-100 protein 量の減少は soluble protein の増加に起因するものでは無いと言える。

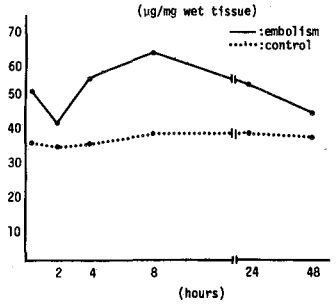
Table 2.

Total Water Solluble Protein
(μg/mg wet tissue)

	embolism	control
5 min	52.09±16.55	36.80±7.51
2 h	41.67± 7.85	34.77±3.70
4 h	56.41±20.44	36.14±2.23
8 h	64.34±10.82	39.39±9.57
24 h	54.43± 8.00	39.06±9.45
48 h	44.98±18.31	38.06±8.00

(mean±standard deviation)

Fig.2.



③脳内水分量，脳組織内 Na^+，K^+濃度の経時的変動（Table 3，Fig. 3，4）：各群9匹のラットについて検討を行なった。

Fig. 3 に示す如く脳内水分量は、対照群の 77.6 ± 0.01% に比し、5 分後には、81.0 ± 0.6% と一過性に上昇するが、1 時間後には 77.6 ± 0.02% とほぼ対照群と同じ程度にまで回復する。しかし、その後、再度徐々に増加し、8 時間後に 80.4 ± 0.4% と脳浮腫は著明となる。8 時間以後は脳内水分量は徐々に減少し、24 時間後 78.7 ± 0.2%, 48 時間後 77.9 ± 0.02% となり、48 時間後にはほぼ対照群と同じになることが認められた。脳内水分量と同様、脳組織内電解質濃度の変動を調べた結果、Fig. 4 に示す如く、microembolism 作成後 8 時間で Na^+ は 316.7 ± 14.2 mEq/kg dry weight, K^+ は最低値 460.8 ± 2.6 mEq/kg dry weight を示した。すなわち脳内水分量の増加に一致して、Na^+ は増加、K^+ は減少していた。この結果からも、我々の作成した microembolism における脳浮腫の発現は、8 時間後に最も顕著となり、48 時間後には、ほぼ正常に復するものと考えられる。

Table 3.

Water Content and Electrolyte
(% and mEq/kg dry weight)

	H_2O	Na^+	K^+
control	77.6±0.01	210.8± 2.7	498.7± 2.8
5 min	81.0±0.6		
1 h	77.6±0.02		
4 h	78.6±0.02	300.0±10.0	476.0± 2.5
8 h	80.4±0.4	316.7±14.2	460.8± 2.6
24 h	78.7±0.2	322.9±21.1	470.6±10.6
48 h	77.9±0.02	230,250	480,500

(mean±standard deviation)

Fig.3.

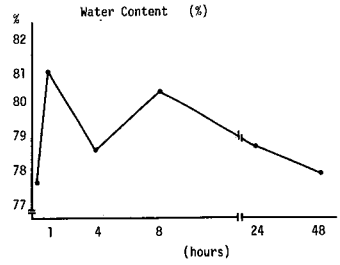
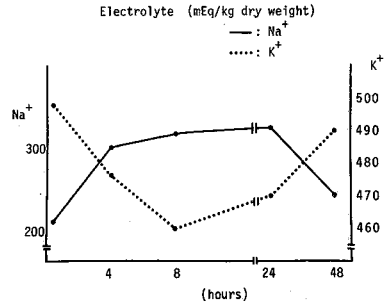


Fig.4.



④ 摘出完全虚血ラット脳内 water soluble S-100 protein 量の自然減少実験（Table 4, 5, Fig. 5, 6）：37°C 加温、4 時間、8 時間、24 時間の各群について、5 匹のラットを用いて、S-100 protein 量の減少程度を検討した。4 時間群においては、0.50 ± 0.21 と、対照群に比して約 124.7% と S-100 protein 量は軽度増加していたが、8 時間では、0.18 ± 0.11 と対照群の 46.1% に減少した。しかし、それ以後の減少は軽度で、24 時間でも 0.21 ± 0.10 と対照群の 45.8% の S-100 protein が存在していた。この各時間毎における soluble protein には有意の変動は認められなかった。

Table 4.

Water Soluble S-100 Protein
in complete ischemic brain
(μg/mg soluble protein)

	exp.	control
4 h	0.50±0.21	0.40±0.16
8 h	0.18±0.11	0.36±0.13
24 h	0.21±0.10	0.38±0.22

(mean±standard deviation)

Fig.5.

Water Soluble S-100 Protein
in complete ischemic brain
(μg/mg soluble protein)

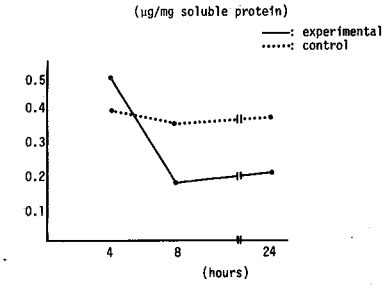


Table 5.

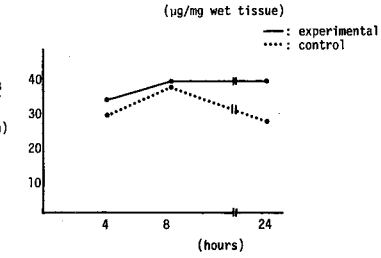
Total Water Soluble Protein
in complete ischemic brain
(μg/mg wet tissue)

	exp.	control
4 h	34.70±0.92	30.33±5.71
8 h	39.38±3.34	38.53±2.08
24 h	40.06±9.44	27.95±5.57

(mean±standard deviation)

Fig.6.

Total Water Soluble Protein
in complete ischemic brain
(μg/mg wet tissue)



〈考察〉以上の結果より micro-embolism により作成した、ラット虚血脳の S-100 protein は、8 時間後に有意の減少を示し、24 時間で、ほぼ対照群と同程度まで回復する。これは脳浮腫が 8 時間後に最も強くなり、やはり 24 時間後に回復するという結果とよく一致する。このことより、S-100 protein 量と脳浮腫とは何らかの因果関係を有するものと推定される。また、37°C 加温

における摘出脳組織中の S-100 protein 量の変動をみた実験の結果より，完全脳虚血状態における，8～24時間の脳加温においてさえも，S-100 protein 量の減少は 53.9 % であるのに反し，それよりは軽度の条件である microembolism による脳虚血において，8時間で，63 % の S-100 protein が減少した事実は，極めて興味深く，著者らは，S-100 protein のもつ何らかの生物学的機能と関連したための減少であろうと考えたい。S-100 protein 減少の機序は種々のものが考えられる。即ち，a)脳内水分量の増加に伴う減少：microembolism 作成8時間後に脳浮腫は最も強くなり，乾燥重量法による水分量の増加は，2.8% であり，これを体積換算すると，14.2 % の増加に相当する。しかし，この増加率では，63 % という S-100 protein の減少を説明するには不十分であり，単に希釈された結果であるとすることは出来ない。 b) total water soluble protein の増加：前述の如く実験群と対照群との各時間における比較に際して，8時間後に有意の差が認められるが，各実験群を相互に経時的に比較すると有意差は認められないことから，S-100 protein の減少は soluble protein の増加に起因するものとは考えられない。 c) S-100 protein 産生障害：脳虚血により，S-100 protein の産生が障害されたため，S-100 protein が減少したと考えるには，S-100 protein の turn over が16日であるとする報告もあり，減少，回復があまりにも急速すぎる点で説明が出来ない。 d) water soluble S-100 protein の血中への流出：脳浮腫に伴って血液脳関門の破綻が生じたため S-100 protein が脳組織より血中に流出したと考えるには，microembolism 作成後，8時間では，Evans blue の血管外への流出は全く認められず，24時間で血管外への流出が認められることと一致しない。従って現在のところ，S-100 protein 減少の機序として考えられるのは，e)脳虚血の条件下では，S-100 protein は容易に変性し，その抗原性を失ってしまうか，f)脳浮腫の発現あるいは，その進展に際し，何らかの理由で water soluble S-100 protein が膜と結合した membrane bounded type へと移行するため，water soluble S-100 protein が減少する可能性等が考えられるが，いずれも推測の域を出ない。今回我々の実験より明らかとなった，microembolism 時における脳浮腫と一致した water soluble S-100 protein の減少の機序の解明には，membrane bounded S-100 protein の定量，あるいは，電顕レベルでの S-100 protein の局在に関する研究を併せて行なう必要があると考えている。

Reference

1) Calissano,P. & Bangham,A.D. (1971) Biochem.Biophys.Res.Commun.,43,504-509

2) Cicero,T.J. & Moore,B.W. (1970) Science,169,1333-1334

3) Cicero,T.J.,Cowan,W.M. & Moore,B.W. (1970) Brain Research,24,1-10

4) 原田泰弘， unpublished data

5) Isobe,T. & Okuyama,T. (1978) Eur.J.Biochem.,89,379-388

6) 岸川秀実，田渕和雄，大本堯史，西本 詮．(1978) 神経化学，17，221-224

7) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L. & Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem.,193,265-275

8) Moore,B.W. (1965) Biochem.Biophys.Res.Commun.,19,739-744

9) 守屋芳夫，古田知久，坪井雅弘，田渕和雄，西本 詮．(1978) 神経化学，17，265-268

10) Plescia,O.J.,Braun,W. & Palczak,N.C. (1964) Proc.Natl.Acad.Sci.,52,279-285

52 ブタ脳中に存在する新しい酸性タンパク質

石岡憲昭・磯辺俊明・奥山典生
(都立大・理・化)
野又康博・和田　博
(阪大・医・II薬理)

〔要約〕

ウシ脳S−100タンパク質およびモジュレータータンパク質の分離精製法をブタ脳に適用して抽出液中より3種の酸性タンパク質画分を得た。各画分は7.5%ゲルディスク電気泳動でそれぞれ単一バンドを示した。得られた画分を二次元電気泳動法，アミノ酸組成分析，免疫化学的方法などで分析した結果。第一の画分はS−100 aおよびS100 bタンパク質を含むいわゆるS−100タンパク質画分であり，第二の画分はモジュレータータンパク質であることが確められた。第三の画分は上記いずれのタンパク質とも異なる新しい酸性タンパク質であった。この酸性タンパク質はグルタミン酸残基を異常に多く含む（49%）構造上の特徴からGlutamic acid−rich Protein（GluP）と命名された。

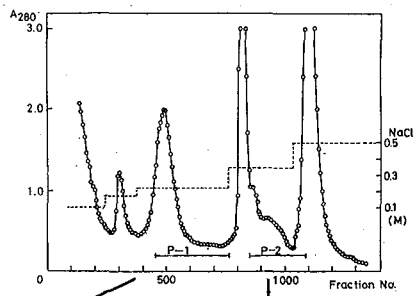
二次元電気泳動法およびSDSゲル電気泳動法により，GluPは分子量56,000　58,000，等電点4.6の酸性タンパク質であった。さらにSDSゲル電気泳動の結果はGluPが分子量23,000のサブユニットからなる可能性を示唆していた。アミノ酸分析，紫外吸収スペクトルはS−100，MPとは全く異っていた。N−末端アミノ酸配列は，エドマン分解法によりAsp−Glu−Pro−Pro−Ser−Glu−Gly−と同定された。また免疫拡散法により，ヒト，ウシ，イヌ，ネコ，ウサギ，ヤギの各種動物脳，さらにウシ肝臓，ウサギ腎臓にも検出された。

1965年Mooreが，クロマトグラフィーと電気泳動を組み合せる方法で脳の可溶性タンパク質を分析し，脳組織のみに特異的に存在するタンパク質（S−100）を分離して以来(6)，14−3−2タンパク質(10)，嗅球特異タンパク質(5)など脳特異的タンパク質について多くの報告がなされている。我々の研究室においても，数年来ウシ脳可溶性酸性タンパク質中の特にS−100タンパク質とカルシウム結合タンパク質であるモジュレータータンパク質（MP）について研究を行ってきた。その結果S−100タンパク質が，主としてS−100 a，S−100 bからなること(2)や，MP，トロポニンCなどと分子進化上類縁のタンパク質であることなどを上記2種のタンパク質の一次構造決定から示すことができた(3)。今回，ウシ脳酸性タンパク質の分離精製法をブタ脳に適用し，可溶性酸性タンパク質の分離精製を行った。その過程でS−100やMPと異なるグルタミン酸を特徴的に多く有する（50%）タンパク質を分離精製することができた。そこでこのタンパク質をGlutamic acid−rich protein（GluP）と命名し，生化学的諸性質の検討を行ったのでその結果を報告する。

実験方法

ブタ脳抽出液の調製と酸性タンパク質の分画は，ウシ脳S−100タンパク質の分離精製に関する既報の方法(2)に従って行った。すなわち，ブタ脳（20 Kg）の50%飽和硫安抽出液を硫安分画（85%飽和pH4.7）して得た可溶性タンパク質画分をDEAE−セファデックスA−50カラム（8.5×23 cm）に添加し，0.1 M食塩，1mMEDTAを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.1）で洗浄後，吸着したタンパク質を1mMEDTAを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液中の食塩濃度を0.17 M，0.22 M，0.35 M，0.50 Mと段階的に

Fig.1 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography of porcine brain extract



Column : DEAE-Sephadex A-50
(8.5 23 cm)
Elution buffer :
0.1M potassium
phosphate, pH 7.1
containing 1mM EDTA
0.10M, 0.17M, 0.22M,
0.35M and 0.50M NaCl
Flow rate : 200 ml/h

Fig.5 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography of P-1 fraction

Column : DEAE-Sephadex A-50
(1.0 X 42 cm)
Elution buffer :
0.1 M potassium
phosphate, pH 7.1
containing 1mM EDTA
0.15 M NaCl and
10 % EtOH
Flow rate : 3 ml/h

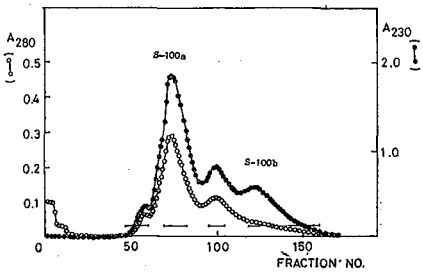
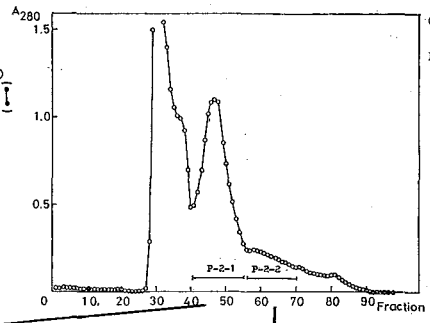
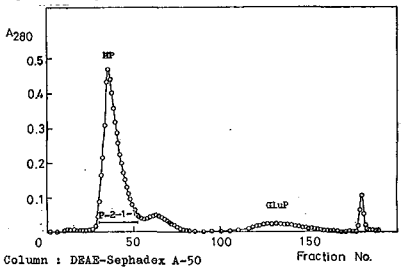


Fig.2 Sephadex G-75 gel filtration of P-2 fraction



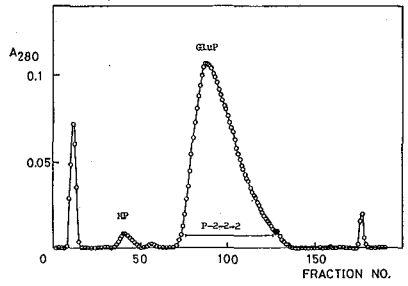
Column : Sephadex G-75
(4.5 X 90 cm)
Elution buffer :
0.1 M potassium
phosphate, pH 7.1
containing 1mM EDTA
Flow rate : 36 ml/h

Fig.3 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography of P-2-1 fraction



Column : DEAE-Sephadex A-50
(1.0 X 42 cm)
Elution buffer :
0.1 M potassium
phosphate, pH 7.1
containing 1mM EDTA
and 0.28 M NaCl
Flow rate : 3 ml/h

Fig.4 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography of P-2-2 fraction



Column : DEAE-Sephadex A-50
(1.0 X 30 cm)
Elution buffer :
0.1 M potassium
phosphate, pH 7.1
containing 1mM EDTA
and 0.28 M NaCl
Flow rate : 3 ml/h

Fig.6 7.5 % gel electrophoresis (a) and SDS gel electrophoresis (b) of GluP

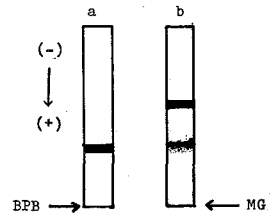


Fig.8 Estimation of the molecular weight of GluP

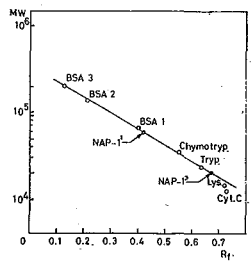
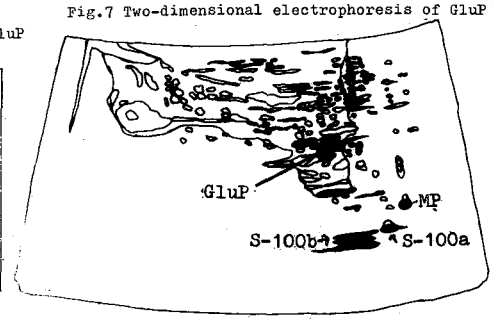


Fig.7 Two-dimensional electrophoresis of GluP



上昇させる方法で溶離した。各酸性タンパク質画分のゲルクロマトグラフィーは，セファデックスG－75カラム（4.5×90 cm）で行った。GluPとMPは，DEAE－セファデックスA－50カラム（1.0×30 cm）を用い，0.28 M食塩，1mMEDTAを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.1）を溶離液として分離した。7.5％ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動は，OrnsteinとDavisの方法(8)(1)により行った。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は，1％SDSを含む5％ポリアクリルアミドゲルを用い，0.1 Mリン酸ナトリウム（pH7.2）緩衝液中でマラカイトグリーンをマーカーとして行った。試料は，8 M尿素－2％SDS－0.01％2－メルカプトエタノール－0.02 Mリン酸ナトリウム緩衝液中で60 ℃ 10分間処理した。アミノ酸組成分析は，タンパク質（0.2－1.0 mg）を6 N塩酸（0.5 ml）中で110 ℃，24時間加水分解後，日立アミノ酸分析器KLA5により常法(11)で行った。N末端アミノ酸配列は，既法のエドマン分解直接法(3)により決定した。二次元電気泳動によるタンパク質マップは，Manabeらの方法(4)により，一次元目をポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動（pH3.5－10），二次元目をポリアクリルアミド濃度勾配（4－21％）スラブゲル電気泳動により作成した。免疫化学的分析は，精製ブタ脳GluPに対するウサギ抗GluP血清を用いOuchterlonyの〝agar cloublle diffusion〟法(9)により行った。

結果と考察

I。GluPの分離精製：　図1は，ブタ脳抽出液のDEAE－セファデックスA－50クロマトグラフィー溶離図である。溶離液を7.5％ゲルディスク電気により検討した。その結果BPBと同一移動度を示すタンパク質分画P－1と，主としてBPBと同一移動度を示すタンパク質とBPBに対する相対移動度（R_{BPB}）0.66を示すタンパク質の2種を含む分画P－2を得た。本学会で述べる酸性タンパク質GluPは，P－2分画中に相対移動度0.66を与えるタンパク質バンドとして検出された。P－2分画は，硫安濃縮後，セファデックスG－75カラムに添加しゲルクロマトグラフィーを行った。その結果図2に示したように，主としてBPBと同一移動度を示すタンパク質からなる分画P－2－1と相対移動度0.66を示すタンパク質からなる分画P－2－2が得られた。それぞれの分画は，さらにDEAE－セファデックスA－50カラムに添加しイオン交換クロマトグラフィーにより精製した（図3，図4）。図4中P－2－2－2分画に得られた酸性タンパク質（GluP）は，7.5％ゲル電気泳動で単一バンドを与え，（R_{BPB}＝0.66　図6－a），アミノ酸分析，N末端分析でも純粋であった。図3中P－2－1－1分画に得られた酸性タンパク質は，20％ゲル電気泳動を含む同様の分析で純粋であり，ウシ脳タンパク質との比較からモジュレータータンパク質（MP）であることが分った。一方P－1分画（図1）については，硫安法で濃縮後，セファデックスG－75ゲルクロマトグラフィーにより精製した。精製タンパク質は，アミノ酸分析，紫外吸収スペクトル，20％ゲルディスク電気泳動の結果と抗S－100血清に対する反応性などから，S－100タンパク質であることが分った。ここで得られたブタ脳S－100標品は，ウシ脳タンパク質の場合と同様DEAE－セファデックスA－50再クロマトグラフィーによりさらにS－100 aとS－100 bタンパク質に分離された（図5）。(2)

II．GluPの生化学的性質：　P－2－2－2分画に得られた酸性タンパク質GluPについて生化学的性質を検討した。1)二次元タンパク質マップ上でのGluPの同定：　図7はブタ脳可溶性タンパク質の二次元電気泳動像である。精製したGluPを同じ方法で泳動し，pIおよびBPBに対する相対移動度を比較検討することによりマップ上でのGluPの位置

を同定した。GluPは，pI4.6，分子量56,000の位置（図7→）にスポットを与えた。2)SDS電気泳動法による分子量測定：　GluPのSDSゲル電気泳動像を図6−bに示した。GluPは，マラカイトグリーンに対する相対移動度0.42の位置に主バンド。0.64の位置に幅の広い不鮮明なバンドを与えた（図参照）。この結果は，GluPのSDS処理時間を変えても不変であった。上記2本のバンドの分子量は，それぞれ58,000および23,000と計算された（図8）。二次元電気泳動法により得られた分子量（56,000）を考慮すると，GluPは天然の状態では，分子量56,000〜58,000のポリペプチド鎖として存在すると考えられる。また分子量23,000のバンドの存在はGluPが2〜3のサブユニットから構成されていることを示唆しているのかもしれない。3)紫外吸収スペクトル：　図9にGluPの紫外吸収スペクトルを示した。270〜290 nmにトリプトファン残基に特徴的な吸収が見られ，S−100タンパク質やモジュレータータンパク質（MP）などのカルシウム結合タンパク質に見られるようなフェニルアラニン残基由来の特徴的な微細吸収帯(2)は観察されなかった。4)アミノ酸組成とN末端配列：　GluPのアミノ酸組成とN末端配列を表1に示した。GluPは，グルタミン酸を異常に多く含み，（49.4 %），これにアスパラギン酸を加えた酸性アミノ酸の総和が54.9 %にも達する特徴的なアミノ酸組成を示した。一方極性アミノ酸（Lys, His, Arg, Asp, Thr, Ser, Glu）が全体を占める割合が71.3 %で，GluPがhydrophilicな性質をもつことを示唆していた。システェイン残基およびアミノ糖（$GlcNH_2$, $GalNH_2$）は検出されなかった。エドマン分解法より決定したGluPのN末端配列は，Asp−Glu−Pro−Pro−Ser−Glu−Glyであった。以上の結果は，1976年に野又と和田が報告したヒト脳中の酸性タンパク質に関する結果(7)と類似しておりGluPがヒト脳中にも存在していることを示唆している。5)免疫拡散：　精製GluPに対するウサギ抗GluP血清を用いて種特異性を検討した結果，ヒト・ウシ，イヌ，ネコ，ウサギの各種動物脳に存在した。臓器についてはウシ肝臓，ウサギ腎臓で検出されたがウシ心臓，小腸では検出されなかった（図10）。

Table I

N-terminal

Asp-Glu-Pro-Pro-Ser-Glu-Gly-

AMINO ACID COMPOSITION

Amino acid	GluP
Lys	10.4
His	0.3
Arg	0.5
Asp	5.5
Thr	2.5
Ser	2.7
Glu	49.4
Pro	2.1
Gly	10.4
Ala	12.4
Cys	0.0
Val	1.0
Met	0.2
Ile	0.8
Leu	1.0
Tyr	0.3
Phe	0.6

(molar %)

Fig.9 Ultraviolet absorption spectrum of GluP

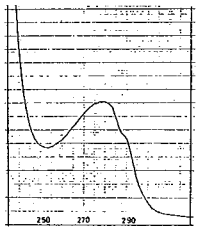
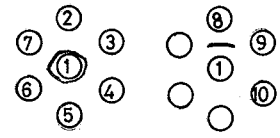


Fig.10 Immunodiffusion tests



1. Antiserum against GluP.
2. Human
3. Porcine
4. Bovine
5. Dog
6. Cat
7. Rabbit
8. Bovine liver
9. Bovine hert
10. Bovine small intestine

（二次元電気泳動法に関する有益な御助言をいただいた真鍋敬博士（都立大・理・化）に深謝します。）

REFERENCES

1 Davis, B. J. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-427
2 Isobe, T., Nakajima, T., Okuyama, T. (1977) Biochem. Biophys. Acta. 494, 222-232
3 Isobe, T., Okuyama, T. (1977) Eur. J. Biochem. 89, 379-388
4 Manabe, T., Tachi, K., Kojima, K., Okuyama, T. (1979) J. Biochem. 85, 649-659
5 Margolis, F. L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash) 69, 1221-1225
6 Moore, B. W. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739-744
7 野又康博、和田 博 (1976) 生化学 48(7), 666
8 Ornstein, L. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 321-349
9 Ouchterlony Handbook of Experimental Immunology (1967) (Weir, D. M., ed.) pp. 655-706, A. David Co., phil., Pa.
10 Roda, G. et.al. (1977) Brain Research 124, 509-522
11 Spackman, D. H. Stein, W. H. (1958) Anal. chem. 30, 1190-1206

53 脳におけるプロスタグランジンD_2の代謝と機能

清水孝雄・渡部紀久子・早石　修（京大・医・医化）
水野　昇（京大・医・解剖）
天野武彦（三菱生命研）

〔要　約〕

脳におけるプロスタグランジン(PG)D_2の代謝と作用について検討し次の結果を得た。

1．PGD合成酵素の組織分布および脳内分布

ラットの全身組織の活性を調べると脳，脊髄に特に高く，ついで小腸・胃に活性が認められた。脳を11の部分にわけ測定すると髄膜，白質を除いてほぼ全域に分布するが，視床下部，視床は他の部位と較べて2－3倍比活性が高い（$P<0.01$）。また，neuroblastomaの2種の細胞は，glioma細胞に対し，10－20倍の活性を示した。

2．PGD分解酵素の単離・精製

従来，PGD_2の分解酵素の報告はないが，我々はブタ脳の高速遠心上清に，PGD_2を良い基質とし$NADP^+$の存在下に15位の水酸基をケト基に変える脱水素酵素を見出した。硫安分画，カラムクロマトにより数百倍精製された酵素は，PGD_2に特異的に作用し，脳内で本物質の不活性化に寄与していると思われる。

3．Neuroblastoma細胞に対するPGD_2の作用

NIE-115細胞に対し，PGD_2は10^{-8} Mで細胞内のcyclic AMPを10－20倍増加させた。この増加は約1分で最大に達した。しかし，PGE_2，$F_{2\alpha}$は全く無効であった。

これらすべての結果は，PGD_2が中枢神経系において活発に代謝され，重要な調節因子として働いている可能性を示すものである。

種々のPGやトロンボキセンは，必須脂肪酸に2分子の酸素添加反応がおこった結果生成されたPG endoperoxidesを共通の中間体として各組織で合成される。これらは，わずかな構造の違いにより全く異なる生物活性を示し，血液凝固・炎症などの生体防御反応や，血圧の調節などホメオスターシスの維持に働いている。PGD_2は，従来，組織分布や生理活性などに関する知見は乏しいが，我々はラット脳における酵素的合成を証明し（15, 16），神経系との関わりに注目した。今回，PGD_2の神経系における役割を明らかにする一歩として，PGD合成酵素の全身分布，脳内分布の検討，およびPGD分解酵素の脳よりの単離，さらにneuroblastoma細胞を用いてPGD_2の生物活性を調べた。

〔実験方法〕

PGD合成酵素の活性測定 ――― 雄ウイスター系ラット（体重300-350 g）をペントバルビタール深麻酔下に，上行大動脈より4°C生食200 mlを用いて全身灌流し，脳および各臓器をすばやく摘出した。各組織は0.5 mM dithiothreitolを含む10 mMリン酸緩衝液（pH 6）でホモジナイズし，1万×g，20分の遠心上清を酵素源とし，既述の方法（15, 16）で活性測定をした。NIE-115，NS-20，C6 BU-1の各培養細胞(1)はBranson Sonifierで破砕後，同様に遠心上清をえた。

PGD脱水素酵素の活性測定 ――― [1-^{14}C]PGD_2は[1-^{14}C]アラキドン酸より生合成した(16)。0.1 Mトリス塩酸（pH 9）中で，50 μMの基質，200 μM $NADP^+$，1 mM dithiothreitolと酵素を含む50 μlの反応液を24°Cでインキュベートし，酸性エーテルで抽出後，エーテル／メタノール／酢酸（90：2：0.1）の系で薄層クロマトを行なった。

分光学的には、415 nm の吸収増加より反応初速度を求めた。

PGD_2の分解産物の同定――反応産物をシリカゲルプレートより酢酸エチルで抽出し、メチルエステル化、TMS化、メトキシム化した後、GC-MSで同定した。

細胞内 cyclic AMP の測定――NIE-115 細胞は 60 mm Petri dish で 10% fetal calf serum を含む DME培地で 10% CO_2, 90% air 中で静置培養し、confluent に達した後 (1.6×10^6 cells/dish) serum を除いた培養液で洗い、0.5 mM IBMX を添加して 30分プレインキュベートした。反応は PG 添加で開始し、7% TCA で停止した。cyclic AMP は精製し(14)、Honma らの方法(7)で radioimmunoassay で測定した。

その他――非標識 PG は小野薬品中央研究所の提供による。

〔結果〕

Ⅰ. PGD合成酵素の分布

表1に示す様にPGD合成酵素の比活性は脳、脊髄に高く、ついで小腸、胃に高い。一方、肺、肝、脾にも有意の活性が認められるが、これらの組織は、Habig らの方法(6)で測定すると GSH-S-transferase 活性が強く、また 1-Cl-2.4-dinitrobenzene (1 mM)が PGD_2産生を 7-80%阻害することなどから、大部分はこの酵素によるみかけの PGD 合成活性と思われる。ラット脳内の活性分布を調べると、髄膜や白質(0.24, 0.36 munits/mg)を除いて、脳のほぼ全域に分布していることがわかる(表2)。この中でも視床下部、視床は他の部位と較べて2-3倍高い比活性が認められる。他の哺乳類の脳組織の比活性はマウス(2.8 munits/mg)、モルモット(2.5)、ウシ(1.4)ブタ(1.3)、ウサギ(0.8)、ネコ(0.3)で、これらはいずれも2-5匹の平均値である。

脳内の活性が主にニューロン由来か、グリア由来かを明らかにする目的で、neuroblastoma と glioma の培養細胞の活性をみたのが図1である。Adrenergic clone (NIE-115), cholinergic clone (NS-20) の PGD 合成活性は glioma と比較すると 10-20 倍高い。この活性は PCMB (1 mM)で完全に阻害されること、反応至適 pH は 8 前後であることなどラット脳より精製した PGD 合成酵素と類似した性質を示した(16)。

Ⅱ. PGD脱水素酵素の精製

PGD_2は、E_2, $F_{2\alpha}$ と異なり、NAD^+依存性 PG 脱水素酵素の基質とならず(13, 17)、このため分解

表1 PGD合成酵素の臓器分布

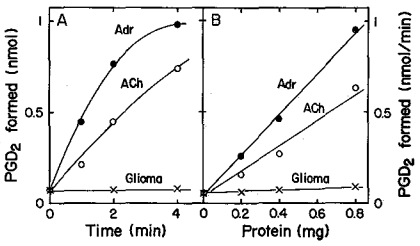
Tissue	Specific activity
	pmol/min/mg of protein at 24°C
Whole brain	2,535±98
Spinal cord	1,987±76
Lung	388±34
Heart	34±4
Liver	192±35
Stomach	427±39
Intestine	838±61
Kidney	25±5
Spleen	143±9
Adrenal gland	18±2
Vesicular gland	33±4

表2 PGD合成酵素の脳内分布

Region	Specific activity	
	munits/mg of protein	munits/g of tissue
Cerebral neocortex	2.95±0.11	29.5±3.1
Cerebellum	1.61±0.15	18.1±2.1
Pons and Medulla oblongata	2.59±0.15	26.2±2.4
Midbrain	2.02±0.15	27.5±1.1
Hypothalamus	5.44±0.47	110.6±4.7
Thalamus	3.15±0.19	53.5±4.4
Bulbus olfactorius	1.53±0.09	29.2±2.1
Hippocampus	2.04±0.22	31.0±2.7
Caudoputamen	1.64±0.14	20.2±1.7
Pineal body[a]	2.22, 2.39	28.4, 29.5
Meninges[b]	0.11, 0.13	0.6, 0.6
Cauda equina[b]	0.38, 0.26	4.3, 3.1

All values are means±S.E.M. of five experiments. In each experiment five rats were used.
a/ Two experiments (30 rats/each)
b/ Two experiments (5 rats/each)

図1 培養細胞におけるPGD_2合成活性



経路は不明であった。ブタ脳の10万5千×g，60分の遠心上清を硫安分画し、[1-^{14}C]PGD_2と反応させたのが図2である。PGD_2は$NADP^+$の存在時に、より極性の低い物質に転換しているのがわかった。この物質をシリカゲルプレートより抽出して分析すると、15-keto-13,14-dihydro-PGD_2に一致するマススペクトルムがえられた(図3)。一方、反応を分光学的に追うと、図4Aに示す様に、415 nmに特徴的なピークが一過性にあらわれ、さらに長時間の反応でこの吸収は減少した。また$NADPH$を加えると、この吸収は減少した(データ略)。415 nm増加初速度は酵素量に比例し、また$NADP^+$を絶対的に要求した(図5)。また、pH9で見られたピークは酸性にすると消失し(図4B)この反応は可逆的であった。これは化学合成した15-keto-PGD_2の分光学的特性(9)と一致した。以上から、PGD_2はブタ脳に存在する15位脱水素酵素でいったん15-ケト体となった後，生じた$NADPH$により13位の二重結合が還えされたものと考えられた(図6)。硫安分画の後に2ステップのカラムクロマトで数百倍精製された酵素は、基質としてはPGD_2に特異的に作用する点で、従来のPG脱水素酵素とは異なる新たな酵素と思われる。

図2 ブタ脳酵素(硫安分画)と[1-^{14}C]PGD_2の反応 →

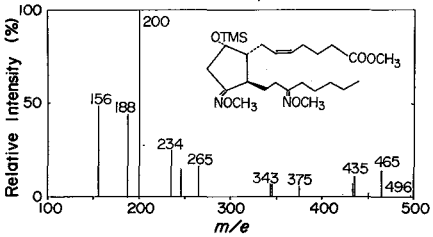


図3 反応産物(15-keto-13,14-dihydro-PGD_2)のマススペクトルム

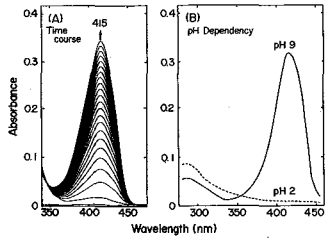
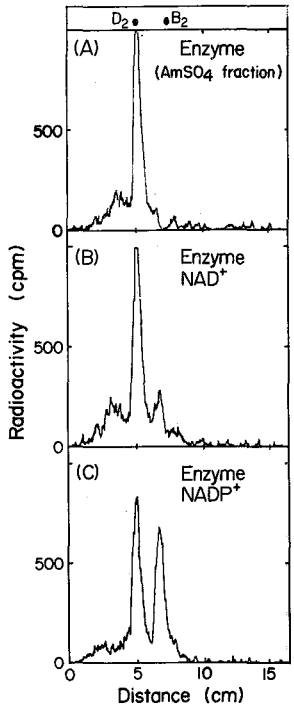


図4 PGD_2分解産物の分光学的特性



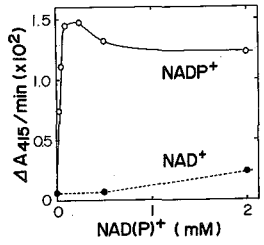


図5 反応の$NADP^+$要求性

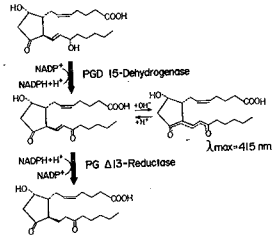
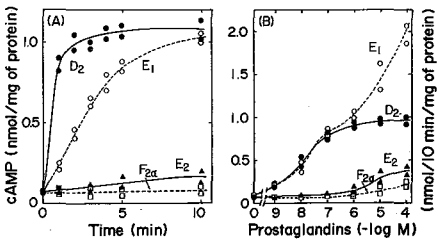


図6 PGD_2の推定代謝経路

III. N1E-115細胞に対するPGD_2の効果

PGD_2の神経系に対する作用の基礎的検討として、N1E-115細胞のcyclic AMP生成に対する効果を検討した。図7Aに示す様にD_2，E_1は3 μMで細胞内cyclic AMPを20倍程度増加させた。E_2，$F_{2\alpha}$はほとんど効果を示さなかった。D_2の効果はほぼ1分で最大に達する点でE_1と対照的であった。濃度依存性をみると，D_2は10^{-8} Mですでに有意の活性を示し10^{-6} Mで最大に達した(図7B)。

図7 N1E-115細胞のcyclic AMP濃度に対するPGの効果



E_2, $F_{2\alpha}$は高濃度で弱い活性が認められるにすぎなかった。PGE_1は10^{-6}M以上でも濃度に比例してcyclic AMPを上昇させた。

[考察]

ラット脳に加えて、種々の組織や培養細胞でPGD_2が産生される(3.4.8)。今回、我々はPGD合成酵素の分布をはじめて定量的に示し、本酵素活性が中枢神経系と消化器系に高いことを明らかにした。脳内では視床下部、視床に活性が高いが、これらのどの核に高く、それが間脳機能といかに結びついているのかは、今後、組織化学的手法も含めて検討したい。neuroblastoma cellがglioma cellと較べて10－20倍比活性が高いのは、PGD_2の神経活動における重要な役割を示唆しているが、これが自然のニューロン、グリアにどう分布しているかは、一層重要な問題であろう。

脳で生合成されたPGD_2は、D_2に特異的な脱水素酵素で分解される。従来、PG脱水素酵素はNAD^+を補酵素とし、E_2, $F_{2\alpha}$を基質とするI型と、$NADP^+$を補酵素とし、主に$F_{2\alpha}$を基質とするII型に便宜的に区分されていたが(12)、脳内にD_2を特異的に基質とする第3の酵素が存在することは、脳内D_2のレベルが、合成、分解の両面で特異的な酵素で調節をうけていることを意味する。種々のホルモンや薬剤が両酵素の活性にどのような影響をもつかを検討したい。

NIE-115細胞に対し、PGD_2(3μM)はほぼ1分で細胞内cyclic AMPを約20倍増加させる。強力なphosphodiesterase inhibitor (0.5 mM IBMX)を添加してあるので、この増加は、主にadenylate cyclaseの活性化によるものと考えられる。PGE_1も強力な活性化剤であるが、cyclic AMPの増加はやゝ緩徐であり(図7A)、その上、脳内には前駆体の脂肪酸(eicosatrienoic acid)がないため(2, 10)天然には存在せず、従って非生理的現象と考えられる。中枢神経系のmodulatorの多くは、presynapticあるいは、postsynaptic膜のadenylate cyclaseを活性化することが知られており(5)、また上頸部交感神経節を10Hzで電気刺激すると約1分間で細胞内cyclic AMPが最大値に達すると報告されている(11)。今後、種々の神経伝達物質やその阻害剤との関連のなかで、このcyclic AMP増加の生理的意義を検討したい。

尚、本研究の一部は第52回日本生化学大会(1979)で発表予定である。

[文献]

(1) Amano, T., Richelson, E., and Nierenberg, M.(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 258-263 (2) Barker, R. R., and Thompson, W.(1972) Biochim. Biophys. Acta 270, 489-503 (3) Christ-Hazelhof, E., and Nugteren, D. H.(1979) Biochim. Biophys. Acta 572, 43-51 (4) Fitzpatrick, F. A., and Stringfellow, D. A.(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1765-1769 (5) Greengard, P.(1976) Nature 260, 101-108 (6) Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jackoby, W.B.(1974) J. Biol. Chem. 249, 7130-7139 (7) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J., and Ui, M.(1977) Biochem. Med. 18, 257-273 (8) Jakschick, B. A., Parker, C. W., and Needleman, P.(1978) Fed. Proc. 37, 384 (9) Jones, R. L., and Wilson, N. H.(1978) J. Chem. Soc. Perkin I, 209-214 (10) Lunt, G. G., and Rowe, C. E.(1968) Biochim. Biophys. Acta 152, 681-693 (11) McAfee, D. A., Schorderet, M., and Greengard, P.(1977) Science 178, 310-312 (12) Principles of Biochemistry(1978) 6th Ed.(White, A., Handler, P., Smith, E. L., Hill, R. L., and Lehman, I. R. eds.) pp 640-641, McGraw-Hill, Kogakusha (13) Rücklich, M. F., Schlegel, W., and Jung, A.(1976) FEBS LETT. 68, 59-62 (14) Sharma, S. K., Nierenberg, M., and Klee, W. A.(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 590-594 (15) 清水孝雄, 山本尚三, 甲石 修(1978) 神経化学 17, 241-244 (16) Shimizu, T., Yamamoto, S., and Hayaishi, O.(1979) J. Biol. Chem. 254, 5222-5228 (17) Sun, F. F., Armor, S. B., Bockstanz, V. R., and McGuire, J. C.(1976) Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 1, 163-169

54 スケトウダラ神経組織における糖脂質組成の特異性

玉井洋一・堀地　肇
（北里大・医・生化）
斉藤信太郎　（国立武蔵療養所）

〔要約〕
スケトウダラの脳，嗅神経，視神経，脊髄から糖脂質を単離し，その構成分の特徴を明らかにした。またコイ脳の糖脂質とも比較した。1）タラ神経組織の主要糖脂質はCMH，CSE，MGDG，SGG および Est-CMH である。グリセリド型糖脂質がスフィンゴ糖脂質にほぼ匹敵するほど豊富に含まれる。Est-CMHの含有量も多い。一方コイ脳はCMHとCSEを主要糖脂質とし，MGDGは少量で，SGGとEst-CMHは微量である。2）タラ神経組織CMHとEst-CMHの構成糖はガラクトースとグルコースで，とくにグルコースを25～55%も含んでいる。3）タラのスフィンゴ糖脂質の構成脂肪酸は直鎖酸のみでハイドロオキシ脂肪酸を含まない。主要脂肪酸は24:1で，24:0は微量である。グルコセレブロシドはガラクトセレブロシドと殆んど同一の脂肪酸組成を示す。4）MGDGとSGGの主要脂肪酸は16:0，16:1，18:1である。5）スフィンゴ糖脂質の長鎖塩基はd18:1が90%以上を占める。6）タラ神経組織にはこの他，未同定の糖脂質が少くとも2つ検出された。7）以上の諸点においてタラ神経組織は，魚類の中でも極めて特異な糖脂質組成を示すことを明らかにした。

脊椎動物神経組織に豊富に含まれる糖脂質はその分布や組成が，動物の種や部位，発育の程度などにより大きく変動することが知られているが，一般に成熟動物脳に共通する糖脂質分布の特徴として次のことが指摘できる。1．ガングリオシドを除く主要糖脂質はガラクトセレブロシドおよびその硫酸エステルであり，グルコセレブロシドは極微量に検出されるのみである。2．構成脂肪酸はC24あるいはC26に至る長鎖の飽和，不飽和型である。3．脂肪酸の1/3～2/3はα-ハイドロオキシ脂肪酸である。
さて，神経組織における糖脂質の存在意義を探る上からも本物質の系統発生学的研究は重要であると思われるが，下等脊椎動物神経系についての報告は極めて少ない(1,2,5)。ここに報告するタラ神経組織の糖脂質分布は上に指適したような“脊椎動物神経組織の糖脂質分布の一般的知見”とは著しく異なるユニークなもので，他の魚類(例えばコイ)のそれとも異なることを示している。また神経組織の発生，分化と糖脂質組成との関係を探る意味から，脳，嗅神経，視神経，脊髄についても比較検討した。なおここで扱う糖脂質はFolch下層画分に分配されるものである。(脚註参照)

〔実験材料と方法〕

脚注1　本研究の一部は第21回脂質生化学研究会(富山，1979)で発表したが，本報告ではその後得られたデータも追加してある。

脚注2　糖脂質の略称　Est-CMH, ester cerebroside; MGDG(又はDGDG), mono(又はdi-)galactosyl diglyceride; CMH, ceramide monohexoside; SGG, sulfated glycosyl glyceride; CSE, cerebroside sulfuric ester

実験材料　タラ（スケトウダラ）は氷中保存のものを鮮魚店より，コイは釣堀より入手し，氷中冷却下で脳，背髄，視神経，嗅神経を採取した。

脂質の抽出と糖脂質の分離，精製　総脂質はクロロホルム－メタノール（C-M, 2:1），(1:1) および C-M-W (1:2:0.3) で抽出し，数回にわたり濃縮，乾固と C-M (2:1) 混液の再溶解を反復した後，C-M (2:1) 可溶画分について Folch 分配（0.88% KCl 含有）を行った。Folch 下層脂質をフロリシルカラムクロマトグラフィーにより糖脂質を大別した。更に中性糖脂質はイアトロビーズカラムクロマトグラフィーにより精製し，酸性糖脂質は DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー（4）およびイアトロビーズカラムクロマトグラフィーの併用により精製した。とくに酸性糖脂質のイアトロビーズカラムによる精製は C-M-W (93:7:0.5) → (69:29:4) の linear gradient 法（2）で行い，SGG, CSE, および未知糖脂質を夫々単一物質に精製した。カラムからの溶出液は全て TLC によりモニターされた。精製糖脂質の同定は IR スペクトル，TLC で標準品と比較することなどによった。構成糖の分析は TMS 化メタル糖として GLC で，脂肪酸は塩酸メタノール（アミド結合）または CH_3ONa（エステル結合）によりメタルエステルとして GLC で分析した。

〔実験結果と考察〕

図1 (a-c) にタラの各神経組織から単離された全糖脂質の TLC パターンを示す。主要糖脂質は各組織に共通して Est-CMH, MGDG, SGG, CSE である。更に背髄には

図1　タラ神経組織糖脂質の TLC (Br, 脳; Olf, 嗅神経; Opt, 視神経; Spc, 背髄)

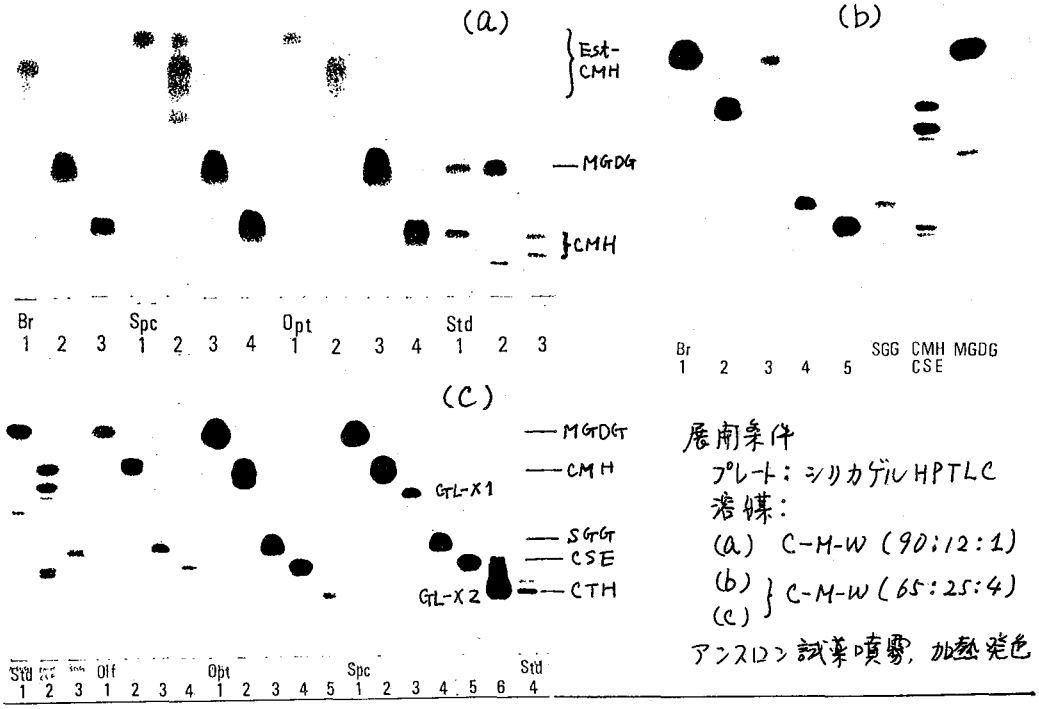
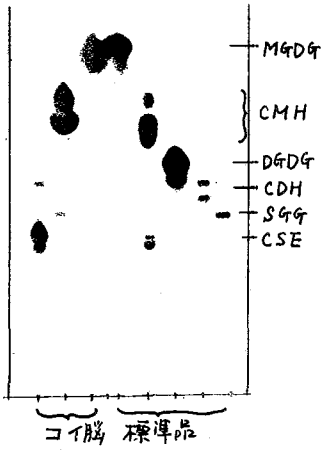


図2　コイ神経組織
糖脂質のTLC



展開条件は図1bと同じ

未同定の糖脂質が2種（GL-X1とGL-X2）検出された（図1c）。Est-CMHは哺乳類脳（6）と同様主要画分は4つで各組織とも二番目に極性の低いバンドが最も多い（図1a）。CMHはケラシンに相当するバンドとそれよりやや上方に移動するバンドより成りフレノシンに一致するバンドが認められない（図1a-c）。SGGはboar testisのSGGと同じRf値を示した（図1b,c）。一方コイ脳から単離された糖脂質はCMHとCSEを主要成分として，少量のMGDGを含んではいるがEst-CMH，SGGは痕跡程度に検出されるに過ぎない（図2）。また他の多くの脊椎動物同様，CMHにはフレノシンも存在している。

タラ神経組織中の主要糖脂質の定量値を表1に示した。総脂質量はタラ脳で11.5%（湿組織当り），コイ脳で11.0%である。注目すべきは糖脂質の組成である。即ちMGDGとSGGを加えたグリセロ糖脂質（GL）の含有量はスフィンゴ糖脂質（SL）にほぼ匹敵する。またEst-CMHの含有量も高等脊椎動物にCE糖脂質中の相対CEがきわめて高いことなどこのような糖脂質組成はすでに指適した脊椎動物糖脂質組成の一般知見と異る著しい特徴の一つである。

次に糖脂質の糖組成を表2に示す。注目すべきはスフィンゴ糖脂質の25～55%にグルコースが含まれていることである。またグルコースを持つest-CMHはこれまで神経組織には観察されていない。これもまた一般知見と異るタラ神経組織の才2の特徴と云える。

次に各糖脂質の脂肪酸組成を表3-5に示す。特徴を列挙すると，①スフィンゴ糖脂質の脂肪酸は全て直鎖酸より成りオキシ酸を含まない。②スフィンゴ糖脂質の主要脂肪酸（アミド結合）は24:1で24:0は微量にしか含まれない。③グルコセレブロシドはガルクトセレブロシドと殆ど同一の脂肪酸組成を示す。④グリセロ糖脂質は16:0，16:1，18:1を主要構成脂肪酸とする。スフィンゴ糖脂質についてはこれら脂肪酸組成と糖組成の特徴はTLC上の挙動（図1）と符合することがわかる。ところで一般に脊椎動物神経組織にはオキシ酸が豊富に含まれているが，タラでは直鎖酸のみであること，また脳のグルコセレブロシドは脳ガングリオシド同様，18:0を主要脂肪酸に持つがタラ脳では24:1が80%も存在することはオ3，オ4の特徴として指適できる。SGG，MGDGに18:0が少ないことは18:0を豊富に持つラット脳，MGDGやSGGとは大きく異っている（2）。

表1　タラ神経組織中の糖脂質量

	Brain	Olfactory	Optic n.	Spinal c.
		mg/g wet wt		
Total lipid	115	63	190	177
		nmol/g wet wt		
Ester-CMH	53.2	n.d.	203.4	397.8
MGDG	718.3	98.4	1300.4	1885.0
CMH	1150.0	166.7	1360.7	5397.7
SGG	458.9	186.9	1130.7	1319.4
CSE	271.7	73.7	656.6	889.4
SL/GL	1.25	0.84	0.91	2.09

n.d., not determined

表2　各糖脂質の構成糖（Gal%/Gal+Glc）

	Brain	Olfactory	Optic	Spinal
Ester-CMH	62.5	n.d.	55.6	52.8
MGDG	100	100	100	100
CMH	66.5	45.1	74.9	55.5
SGG	100	100	100	100
CSE	100	100	100	100

未同定の糖脂質について　GL-X1のIRスペクトルはカルボニルエステル，酸アミドの存在を示しているが，微量のためこれ以上の解析は行っていない。
GL-X2は ① DEAE-Sephadexで酸性糖脂質画分に溶出される，② TLC検索ではC-M-Wの溶媒系でCTHと同一のRf値を示し（図1C），C-M-NH4OH系ではCTHより移動度は大きい（図3），③ IRスペクトルはカルボニルエステル，硫酸エステルの存在を示し，酸アミド結合の破及はない，④ジオキサン中のSolvolysis（2）の結果は100°C，1hrの条件で反応産物はTLC上DGDGと同一のRf値を示す，⑤脂肪酸は主として16:0，16:1，18:1より成りグリセリド型である（表6），糖はガラクトースのみである。この他GL-X2の詳しい分析は進行中である。

表3　タラ神経組織のCMHとCSEの脂肪酸組成

	CMH				CSE			
	Brain	Olf	Opt	Spc	Brain	Olf	Opt	Spc
16:0	2.1	7.3	6.6	1.6	3.0	14.6	3.5	3.7
16:1	0.3	1.5	0.9	0.3	0.4	3.9	0.6	1.1
18:0	6.9	6.3	18.1	10.4	5.6	10.8	8.9	7.6
18:1	1.1	5.9	2.2	1.0	1.1	26.9	1.5	1.1
22:0	1.1	0.9	1.7	1.3	1.0	tr	0.9	1.5
22:1	6.4	5.3	10.1	8.1	7.0	5.1	11.9	8.6
24:1	82.2	72.8	60.6	77.4	82.2	38.7	72.7	76.4

	Gal-CMH			Glc-CMH		
	Brain	Opt	Spc	Brain	Opt	Spc
14:0	0.7	0.5	0.1	0.2	0.4	0.1
16:0	0.7	4.9	1.5	2.1	4.5	1.4
16:1	0.1	0.4	0.2	0.4	0.3	0.2
18:0	4.0	15.5	7.0	6.9	14.8	7.6
18:1	0.1	1.7	0.7	0.9	1.2	0.8
20:0	0.2	0.3	0.2	1.8	0.5	0.3
22:0	0.8	1.6	1.5	0.9	1.2	0.8
22:1	7.7	11.8	12.1	5.3	9.2	5.9
24:0	0.5	2.4	0.5	0.2	-	-
24:1	85.1	61.0	76.1	81.4	67.9	82.8

表4　タラ神経組織のEst-CMHの脂肪酸組成

	Ester-linked			Amide-linked		
	Brain	Opt	Spc	Brain	Opt	Spc
14:0	0.1	0.5	0.6	2.1	0.7	1.0
16:0	38.8	26.0	33.1	13.6	5.1	6.8
16:1	5.9	8.8	8.3	4.4	0.8	1.2
18:0	10.8	6.6	8.5	15.2	11.5	13.9
18:1	33.2	42.0	36.4	4.5	1.0	2.6
20:0	tr	tr	tr	0.8	0.5	0.8
20:1	4.0	4.9	5.9	1.6	tr	0.6
22:0	tr	tr	tr	2.0	1.7	2.5
22:1	0.9	1.1	1.0	4.7	7.3	15.4
24:0	tr	3.2	1.9	0.5	0.4	tr
24:1	6.3	7.0	4.4	46.2	70.4	54.5

表5　タラ神経組織のグリセロ糖脂質の脂肪酸組成

	SGG				MGDG			
	Brain	Olfact.	Optic.	Spinal	Brain	Olfact.	Optic.	Spinal
14:0	0.6	0.4	0.3	1.5	0.9	0.2	0.5	0.8
16:0	28.6	22.0	18.9	28.1	36.8	36.1	24.2	31.5
16:1	12.1	8.9	15.0	18.1	12.8	7.6	13.7	11.5
17:0	0.8	1.4	0.9	0.8	tr	0.3	0.6	0.9
18:0	2.6	5.8	3.1	1.5	2.1	2.8	3.6	3.1
18:1	44.5	49.2	47.7	37.9	35.1	40.8	42.4	40.8
20:1	7.6	7.5	8.2	7.6	8.1	9.3	8.1	8.7
Others	3.2	4.9	5.9	4.5	4.3	3.0	6.9	2.6

図3　GL-X2のTLC

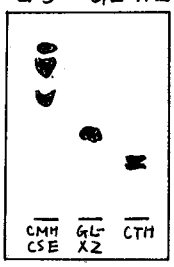


表6 GL-X2の脂肪酸と糖の組成

14:0	0.6%
16:0	33.5
16:1	10.1
18:0	4.5
18:1	43.5
20:1	7.7
Others	0.1
Galactose	

以上タラ神経組織の糖脂質組成の特徴を報告したが，他の硬骨魚類や板鰓類の脳でもこのような観察はされていないのでしょう，魚類の中でもタラ神経組織は極めて特異な糖脂質構成を有すると云えよう。また脳，嗅神経，視神経，背髄の間には糖脂質組成に関する限り，本質的な相異は見出すことなかった。

1: Galli et al, J.Neurochem.,15,35(1968) 2: Ishizuka, et al, J.Biol.Chem.,253,898(1978) 3: Kreps et al, Comp.Biochem.Physiol.,52B,293 (1975) 4: Ledeen et al, J.Neurochem.,21,829(1973) 5: Reinisova et al, Com.Biochem.Physiol.,581(1966) 6: Tamai, Jpn.J.Exp.Med., 38, 65(1968)

【謝辞】SGGは石塚稔夫先生，CDHとCTHは河端一生より恵与されました。小嶋久子嬢，阿部久美子嬢，脳嗅一部元の技術協力を感謝します。

55 脳燐脂質分子種に関する研究

荻野広太郎・木野　稔・近藤哲夫
蒲生昌仁・里内　清・斉藤国彦
(関西医大・医化)

〔要約〕

大脳のコリン燐脂質(PC)とエタノールアミン燐脂質(PE)を、次の事項と関連して分子種レベルで研究した。

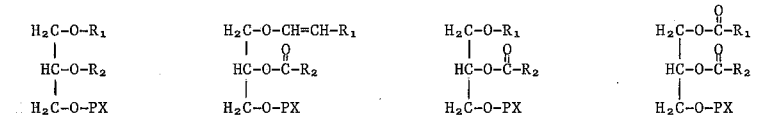
ラット大脳の発育に伴う経時的変化：コリン燐脂質分子種ではPC32:0 (16:0/16:0 ジパルミトイルコリン燐脂質)、PC34:1 (16:0/18:1)、PC34:0 (16:0/18:0) などが主であり、PC32:0は胎仔から成熟まで全経過を通じ約40%を占める。PC34:1は生後一時減少するが、ミエリン形成と共に再び上昇し30%に達する。

ミエリン画分について：成熟ラット大脳のミエリン画分はコリン燐脂質ではPC34:1 PC36:1が主であり、エタノールアミン燐脂質ではエーテル型のPE34:2, PE36:3, PE36:2が主である。ジアシル型の分子種は少ない。この所見は全大脳、ミクロゾーム画分と比べ全く異ったものである。

部位的差異について：人大脳約20ケ所のコリン燐脂質を分析したが、各部位での差はなく、灰白質ではPC32:0, PC34:1が、白質ではPC34:1, PC36:1が主なものであった。

分子種の分析法は、これら燐脂質から酵素的に調製した"ジグリセリド"をトリメチルシリル(TMS)またはt-ブチルジメチルシリル(t-BDMS)誘導体とし、ガスクロマトグラフ質量分析計、特にマスクロマトグラフィ法を用いて行った。

グリセロ燐脂質は蛋白質と共に生体膜の主要構成々分である。その水溶性部分の差によりいくつかの種類が知られているが、一般にはコリン燐脂質とエタノールアミン燐脂質が主なものである。然しながら一方、脂溶性部分もまた構成する高級脂肪酸やアルコールの組合せにより次の4つに大別され、さらにそれらの炭素数や不飽和度に



(I) 1,2-Dialkyl type　(II) 1-Alk-1'-enyl 2-acyl type　(III) 1-Alkyl 2-acyl type　(IV) 1,2-Diacyl type

より極めて多数の分子種が存在する。これら多数の燐脂質分子種はそれぞれ物理化学的性質が異り、ひいては生体膜の多様な生理化学的機能の発現に関与しているものと思われる。

今回我々は神経組織のコリン及びエタノールアミン燐脂質の発育に伴う変化、ミエリンとの関係、部位的差違に基く変化などを主に分子種レベルで明らかにしようと考えて研究を行なった。

〔実験材料及び方法〕

実験動物にはWister系ラットを用い，妊娠17，19，21日目，生後3，6，12，24日および成熟ラットの大脳を実験に供した。ミエリン画分はNorton等の方法(1)に従ってラット大脳より調製した。成人大脳については神経系に異常の認められなかったものを本学法医学教室より入手した。

分析法の大要は図1に示した通りである。既報の通り(2,3,4)得られた"ジグリセリド"のTMSヌはt-BDMS誘導体をガスクロマトグラフ質量分析計，特にマスクロマトグラフィにて分子種の同定を行った。

装置はShimazu GC-MS PAC 300，充填剤は1% OV-1，イオン源の温度は310°C，イオン化エネルギーは22.5eVであり，スキャンスピードは12秒であった。

分子種の同定には(1)分子量，(2)脂肪酸及びアルコール残基に特有なフラグメントイオン，および(3)ベースピークを選び行った。各分子種の相対比はそれぞれの面積をコンピューターにて計算して得られたものである。

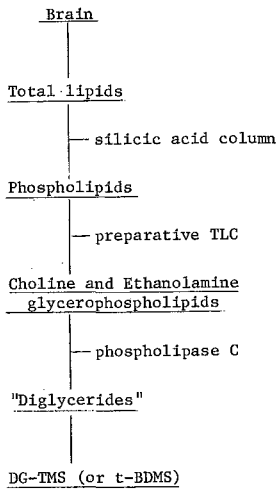


図1

〔実験結果〕

I. ラット大脳ユリングリセロ燐脂質分子種の発育に伴う経時的変化

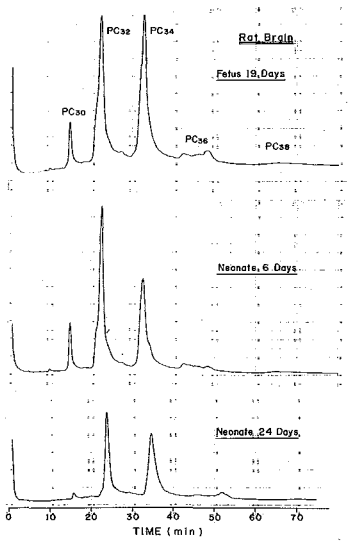


図2

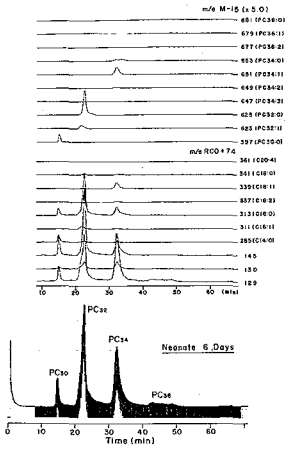


図3

図2に見られる様に、主なピークはPC30, PC32, PC34, PC36 でありこれらの相対比は妊娠19日，生後6，24日で異っている。各ピークの分子種をマスクロマトグラフィにて分析すると（図3）主なものは $PC_{30:0}$ ($^{14:0}/_{16:0}$)，$PC_{32:0}$ ($^{16:0}/_{16:0}$)，$PC_{32:1}$ ($^{16:0}/_{16:1}$)，$PC_{34:0}$ ($^{16:0}/_{18:0}$)，$PC_{34:1}$ ($^{16:0}/_{18:1}$) などであった。

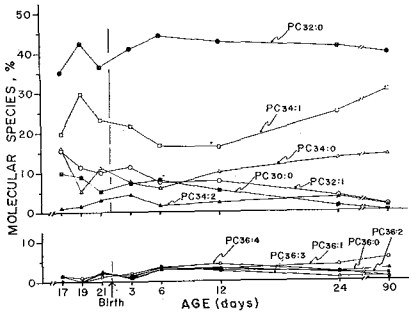


図4

図4はこれら個々の分子種の経時的変化を示したものであるが，主な特徴は $PC_{32:0}$ が全経過を通じ約40％を占めていること，$PC_{34:1}$ は生後一時減少するが，10日頃より漸次増加し90日の成熟ラットでは約30％に達すること，量的にはこれより少いが $PC_{34:0}$ も大体 $PC_{34:1}$ と似た経過を辿っていることなどである。

II. 人大脳コリン燐脂質分子種の部位的差違

大脳機能の局在性との関連において人大脳約20ケ所についてその分子種レベルにおける分析を行った結果，各部位での差はなく、皮質灰白質では PC_{32}，PC_{34} が主であり，白質では PC_{34}，PC_{36} が主でありエーテル型も少量存在し，皮質下核ではむしろ白質に近い所見が得られた。（図5）

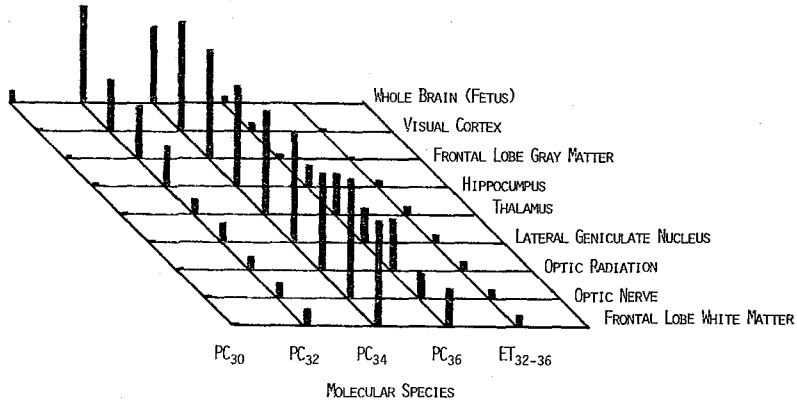


図5

Ⅲ．ラット大脳ミエリン画分のコリン及びエタノールアミン燐脂質の分子種

ミエリン画分ではコリン燐脂質は $PC_{34:1}$，$PC_{36:1}$ が主であるが、エタノールアミン燐脂質ではエーテル型の $PE_{36:3}$，$PE_{36:2}$，$PE_{34:2}$ が主なものである。一方成熟ラット全脳及びミクロゾーム画分においては、コリン燐脂質は比較的炭素数の少ない分子種が多く、その主なものは $PC_{32:0}$，$PC_{34:1}$ であるが、エタノールアミン燐脂質では比較的長鎖のもの及びエーテル型が多い。（図6）

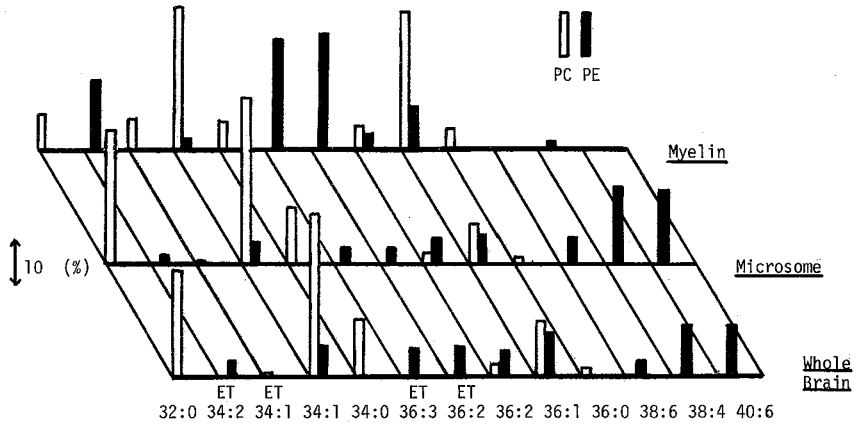


図 6

〔考察〕

脳における燐脂質の機能を考える時分子種レベルの(5)研究は従来の方法に比べ遥かに多くの知見を与えるものである。例えば、ジパルミトイルコリン燐脂質は肺サーファクタントと関連して重要視されているが、もっと広く考えられるべきものと思われる。ガスクロマトグラフ-質量分析計による分析法は特に多不飽和分子種の同定、定量法など留意すべき点があるが、微量試料を用い精度高く且つ迅速に分析できる点で極めて有効な方法と考えられる。

〔文献〕

(1) Norton, W. T., and Poduslo, S. E. (1973), J. Neurochem. 21, 749-757.

(2) Satouchi, K., Saito, K., and Kates, M. (1978), Biomed. Mass Spectrom. 5, 87-88.

(3) Satouchi, K., and Saito, K. (1979), Biomed. Mass Spectrom. in press.

(4) Ogino, H., Matsumura, T., Satouchi, K., and Saito, K. (1979), Biochim. Biophys. Acta 574, 57-63.

(5) Holub, B. J., and Kuksis, A. (1978), Adv. Lipid Res. 16, 1-125.

56 galactocerebrosidase (EC 3. 2. 1. 46)の酵素的微量測定法

加藤尚彦 (東大・医・脳研)
鈴木義之 (東大・医・小児)

〔要約〕

酵素反応を利用する増幅反応"NADサイクリング"を応用し，galactocerebrosidase の微量測定法を開発した。本酵素は先天性代謝性脱髄疾患であるKrabbe病の患者臓器中の細胞に欠損しており，新測定法は有力な高感度診断法である。

本方法の特徴および新しい所見としては，

1）従来の[^{3}H]-基質を用いる測定法の630倍の測定感度をもつ。

2）従来の放射能測定法では，その[^{3}H]-基質が脳や腎などの試料に含まれる内在基質（ガラクトセレブロシド）によって希釈され，測定値は低い値となる。本方法では内在および添加基質の両方から水解生成されるガラクトースを測定するため，正しい測定値が得られる。

3）本方法によっても従来の所見（Krabbe病の酵素欠損）が確認された。

4）Krabbe病の患者腎（2例）と患者胎児肝（1例）では，ガラクトース含有濃度が著しく高く，Krabbe病の病態の一部として，ガラクトース代謝回転の異常が示唆された。

本方法は以上の特徴の外，放射性物質を使用しないため放射能による汚染の心配がなく，安全な測定法として実用価値が高いと思われる。

先天性脱髄疾患であるKrabbe病患者の臓器では，galactocerebrosidase が欠損する[11]ことが知られて以来，生化学的診断のために患者の各臓器（脳，肝，腎など），白血球，培養線維芽細胞などを試料とし，この酵素活性が調べられて来た[12,14]。この酵素は天然基質であるガラクトセレブロシドを特異的に水解するため，非特異的 β-galactosidase 活性測定の場合のように，その生成物が螢光を発する人工基質を用いられない[2,13]。したがって自分でガラクトセレブロシドのガラクトース基を[^{3}H]で標識し，水解により水溶性となる放射能を測定する方法が従来用いられて来た[1,3,6]。一方臓器試料や，とくに培養細胞などの人体試料は少量しか得られず，測定法の感度は高ければ高いほど好ましい。そこで市販のガラクトセレブロシドをそのまま基質とし，酵素反応によって生成されるガラクトースを，酵素を用いる増幅反応である"NADサイクリング"[9]を利用して増幅測定する，高感度測定法を開発した[10]。

実験方法

〔測定試料〕Sprague-Dawly ラット（雄，230g）の大脳，肝，腎を電動のホモジナイザーを用いて，20mM-トリス塩酸，pH8.0中で完全に破砕分散し，20%ホモジェネートを調整した。−20°Cに保存されたKrabbe病患者および対照（非Krabbe病）患者の剖検臓器（脳，肝，腎）から，同様にして10%ホモジェネートを調製した。またラット大脳の20%ホモジェネートを氷冷したまま1分間超音波を用いて破砕し，10,000g 10分遠心して得た上清（従来診断試料として用いられている）を調製した。全ての試料は直接反応液に加え，その活性を測定した。

〔測定法〕 ガラクトセレブロシドより水解生成されるガラクトースを，galactose dehydrogenase を用いて定量的にNADHに転換する。そしてNADHを増幅した後，螢光測定を行った。4.68 μlの試料を42.1 μlの氷冷した測定反応液〔最終濃度 100 mM クエン酸ーリン酸緩衝液，pH 4.1；165 mM トリス塩基；200 μM ガラクトセレブロシド（165 μg/ml，牛脳より精製・Serdary Res. Lab.,Ontario,Canada）；2.35 mM オレイン酸；3.72 mM 粗タウロコール酸ナトリウム（東京化成）；1.0 mg/ml Tween 20；0.5 mg/ml Myrj（Atlas Chem. Industries,Wilmington,Delaware,USA.）〕に加え，38°Cで2または3時間反応させる。反応液は6×75 mmのガラス小試験管底にとり，振盪せずに加温した。ブランクとしては試料の代わりに20 mM トリス塩酸，pH 8.0を，スタンダードとしては適当量のガラクトースを，20 mM トリス塩酸，pH 8.0に溶解した5種の濃度レベルの溶液を，酵素試料と同時に加えて処理した。反応を止めるため10.4 μlの1 M NaOHを加えてpHを5.8～6.6とし，その混合液を氷冷する。続いて62.6 μlの galactose dehydrogenase反応液（200 mM トリス塩酸，pH 9.0；0.1 mM GSH；100 μM NAD^+；100 μg/ml galactose dehydrogenase（EC 1.1.1.48,*Pseudomonas fluorescence*,Boehringer,Mannheim,Germany）を加え，38°Cで30分反応させた後，31.9 μlの1 M NaOHを加えてその混合液のpHを11～12に合わせる。混合液を70°Cで30分加熱し，生成されたNADHを保存したまま未反応の NAD^+ を完全に破壊した後，1.38 μlの混合液をとり，41.1 μlのNADサイクリング反応液[9]に加え，NADHを6,000～10,000倍に増幅して測定する。

実験結果

〔反応条件〕 測定条件はラット大脳ホモジェネートを試料としたときの至適条件である。Tween 20とMyrjはBowenとRadin[3]に従って濃度を決め，従来報告されている活性値との比較を容易にした。タウロコール酸とこれら2つの界面活性剤は，非水溶性のガラクトセレブロシドのミセルを形成し，このミセルが反応基質となる。大脳ホモジェネートを反応条件下で30分加温し，混合液を150,000 g 30分遠心すると，全活性の97%が沈澱に回収された。これは上記3種の界面活性剤によって酵素が可溶化されないことを示している。測定反応は，ラット臓器の4 mg/ml 湿重量以下で，5%の誤差範囲内で試料の量と比例する（図1）。人体臓器は保存の情況により含水量が一定せず，タンパク質当りで試料の量を表わすと：大脳白質，0.3 mg/mlタンパク質（以下同じ）；腎，0.4 mg/ml；肝，0.4 mg/ml；大脳皮質，0.5 mg/ml 以下で反応は試料の量に比例した。全ての測定はこの直線範囲で行ない，通常は1.7 mg/ml 組織湿重量を用いた。

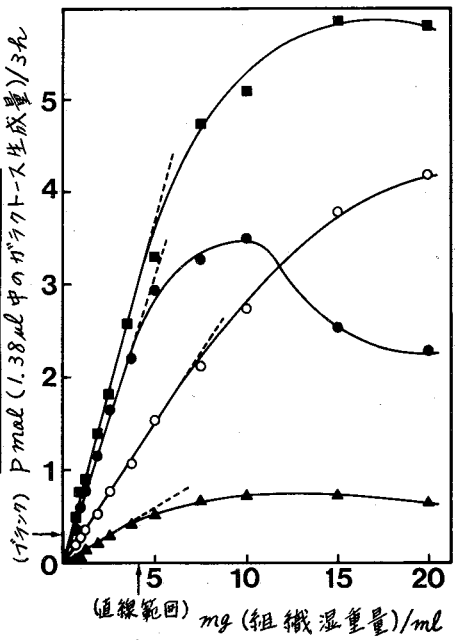


図1. 反応の直線性．右記の反応条件でラット臓器試料を反応させた。●，大脳ホモジェネート；○，大脳上清；■，腎ホモジェネート；▲，肝ホモジェネート

従って測定に必要な試料は約80μg湿重量となり、従来の放射能測定法の63倍の感度が得られた。

〔微量測定法〕　上記の通常の測定法を1/10にスケールダウンするため、ガラス小試験管の代わりに使い捨てのプラスチック製ミクロチューブ(Eppendorf, Hamburg, Germany)を用い、試料の量を0.475μl(8μg組織湿重量)にした。各測定段階の溶液の体積は：酵素測定反応液，4.41μl；中和のための1M NaOH，1.13μl；galactose dehydrogenase反応液，6.59μl；NAD^+を破壊するために加える1M NaOH，3.45μlであり、最終混合液の1.38μlをとりNADHを増幅測定する。測定反応の3時間にわたる加温中反応液の蒸発を防ぐため、チューブの壁に密着し液面すれすれになるように、テフロン棒をチューブ内にさし込んで蓋をするよう工夫した。この微量化により、測定感度を従来の方法の630倍に上げることができた。

〔ラット臓器の酵素活性〕　腎の活性が最も高く、肝の活性が最も低い(表1，左列)。大脳上清は、ホモジェネートの49%の活性を示し、約半分の活性は重い細胞顆粒成分に含まれていた。ガラクトセレブロシドを基質として添加しなくても、脳や腎試料では内在性の基質が利用され活性が測定された(表の中間の列)。従来の放射性基質を添加する測定法では，内在性の基質が添加基質を希釈し，測定値は真の値より低くなる。肝を用いるかぎり，この問題は起きない。新方法では内在および添加両基質より水解生成されるガラクトースを測定するので，この希釈は全く問題とならず，正確な測定値が得られる。また新方法ではブランクとして試料内のガラクトースが測定され，腎は高濃度のガラクトースを含むことが明らかとなった(右列)。

	ガラクトセレブロシド 添加	ガラクトセレブロシド 非添加	ガラクトース濃度
	μmol/kg(湿重量)/時 ± S.E.M.		μmol/kg(湿重量) ± S.E.M.
大脳ホモジェネート	439 ± 8.0 (9)	263 ± 16.2 (6)	*
大脳上清	215 ± 3.7 (6)	67.6 ± 3.2 (6)	*
肝ホモジェネート	95.3 ± 3.8 (6)	0 (6)	*
腎ホモジェネート	539 ± 14.5 (6)	26.3 ± 5.1 (6)	37.9 ± 2.9 (6)

表1. ラット臓器の galactocerebrosidase 活性．大脳上清は"方法"に説明したやり方で、ホモジェネートより調整した。(　)内の数字は試料の数を示す。各測定は一試料につき二回行って結果を平均した。各臓器の活性値の差は基質添加の有無にかかわらず $P<0.01$ で有意。また基質添加，非添加のそれぞれの場合の活性差も、各臓器試料について $P<0.01$ で有意。
*は本方法でも測定不能であることを意味する。

〔Krabbe病および対照人体試料の分析結果〕　galactocerebrosidase 活性はKrabbe病患者の各臓器では低く、従来の結果を確認した(図2)。また溶血性尿毒症患者の腎で低い活性がみられた。さらに新しい所見として，Krabbe病患者の腎(2例)と患者胎児の肝(1例)では高濃度のガラクトースが見出された(データ示さず)。他の患者臓器では対照と同様に，ガラクトース濃度は低かった。これらの結果はまだ分析例数が少く、最終的結論とはできない。しかし高濃度のガラクトースが患者臓器に含まれているという事実は，Krabbe病ではガラクトースの代謝回転にも異常があることを示唆しており、その病態を特徴づける所見と思われる。

考察

同種のラット脳を試料とし、肝リパーゼで活性化し，また透析で内在基質を除去した

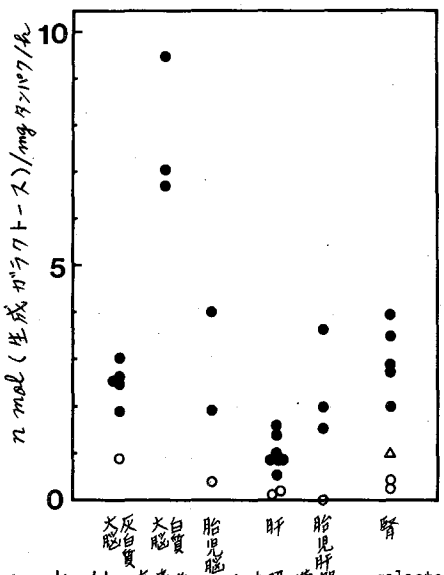


図2. Krabbe 病患者および対照臓器の galactocerebrosidase 活性。○, Krabbe病; ●, 対照; △, 溶血性尿毒症.

報告値に較べ[3] 本報告の活性値(表1)は約86%の値を示し，重い細胞顆粒成分内の酵素は一部測定されていない事を示している。反応速度は試料組織量に対して厳密には比例せず(図1)，ここでは近似的に反応の直線部分を用いているが，正確な反応初速度ではない。この非直線性は，酵素が可溶性でないこと，また基質がミセルであることのために起ると考えられ，正しい反応速度を得るためには内在基質を考慮に入れた新しい反応速度論的解析が必要であるが，ここでは詳細は省略する(詳しくは本年度生化学会で発表予定)。

近年新しく galactocerebrosidase により特異的に水解され，呈色生成物を遊離する人工基質が合成されており，これを用いた呈色測定反応が工夫された[4]。しかし測定感度は従来の方法に較べても著しく低い。生成されたガラクトースを酵素的に測定する方法としては，オリゴヘキソシルセラミドを基質とした非特異的 β-galactosidase 測定法が試みられ[5,8]，また galactocerebrosidase の測定についても，直接ガラクトースをNADHに転換したときの螢光を測定することが試みられた[7]。しかしこれらの方法では，ホモジェネートやその上清のような粗酵素標品を試料とするときは，その活性が低いため多量の試料を用いねばならず，試料中の他の物質によるブランクが非常に高くなり，正確な測定値が得られなかった。本方法では目的のガラクトースを特異的に増幅するため，上記のブランクは全く問題とならず，また放射性基質を用いるより630倍の高感度を得ることができた。この高感度のため，本方法は将来極微少量の試料を用いる羊水細胞の生化学診断に応用され，出生前診断に役立つものと思われる。本方法の原理はそのまま，α-galactosidase や glucosidase の欠損疾患(Fabry病やGM1ガングリオシドーシス)の診断に応用できる用途の広いものである。また本方法は，酵素的サイクリングの応用により放射性物質による汚染をさけることができ，今後大いに利用されるべき安全な測定法の例として，重要な意味をもつものと考えられる。

文献

(1)Bowen D.M. and Radin N.S.(1968a)Biochim.Biophys.Acta,*152*,587-598. (2)Bowen D.M. and Radin N.S.(1968b) Biochim.Biophys.Acta,*152*,599-610. (3)Bowen D.M. and Radin N.S.(1969)J.Neurochem.*16*,501-511. (4)Gal A.E., Brady R.O.,Pentchev P.G.,Furbish F.S.,Suzuki K.,Tanaka H. and Schneider E.L.(1977)Clin.Chim.Acta,*77*,53-59. (5)Gatt,S.(1970)Biochim.Biophys.Acta,*218*,173-175. (6)Hajra A.K.,Bowen,D.M.,Kishimoto Y. and Radin N.S.(1966) J.Lipid Res.*7*,379-386. (7)Handa,S. and Yamakawa,T.(1971)J.Neurochem.*18*,1275-1280. (8)Jungalwala F.B. and Robins E.(1968)J.Biol.Chem.*243*,4258-4266. (9)Kato T.,Berger S.J.,Carter J.A. and Lowry O.H.(1973)Anal.Biochem.*53*,86-97. (10)Kato T. and Suzuki Y.(1979)Proc.Jpn.Acad.Sci.*55*,*Ser.B*.69-74. (11)Suzuki K. and Suzuki Y. (1970)Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.*66*,302-309. (12)Suzuki Y. and Suzuki K.(1971)Science,*171*,73-74. (13) Suzuki Y. and Suzuki K.(1974)J.Biol.Chem.*249*,2105-2108. (14)Wenger D.A.,Sattler,M.,Clark C. and McKelvey,H.(1974)Clin. Chim.Acta,*56*,199-206.

57 ヒト脳およびラット脳におけるlipase活性について

関口　茂・衛藤義勝
（慈恵医大・小児）

〔要　約〕

天然基質として（9,10-^{3}H(N)）triolein，（carboxy-^{14}C）triolein を，人工基質として4 methylumbelliferyl-palmitate を用いてヒトおよびラット脳のリパーゼ活性を測定した。

1，ヒト脳リパーゼ活性：^{3}H-triolein を基質とした場合，pH4.0と6.0に至適pHを認めた。pH4.0では sodium deoxycholate 200μg/tube の添加で対照の約320%活性化され，pH6.0では同濃度の Triton X-100 の添加が対照の約260%活性化された。脳内 triglyceride の分解過程を検討するため，ヒト脳リパーゼによる^{3}H-triolein の分解産物の同定を行ったが，pH4.0では，1-monoolein が incubation time とともに経時的に増加し，1,2-diglyceride が incubation time 30分をピークに経時的に上昇した。pH6.0では，monoolein，dioleinはほとんど出現せず，oleic acid のみ増加した。

4 methylumbelliferyl-palmitate を基質とした場合，pH3.5に至適pHを認め中性領域には活性のピークを認めなかった。

2，ラット脳リパーゼ活性：^{14}C-triolein を基質として測定したが，pH4.5，6.5，7.5に至適pHを認めた。また，ラット精製ミエリンのリパーゼ活性を測定したが，同様の至適pHを認めた。それぞれのpHでの specific activity は，pH4.5では2.4倍，pH6.5では3.7倍，pH7.5では3.3倍精製ミエリンにおいて高く，pH6.5の中性リパーゼはミエリンに局在すると思われた。

I，はじめに

triglyceride，diglyceride，monoglyceride などの中性脂質は哺乳動物脳では微量成分であり，その生化学的機能も不明である。しかし，アイソトープでラベルされた脂肪酸の脳内注入実験により，triglyceride が活発に合成されていることが明らかにされている。演者らは，脳内中性脂質の機能を知る目的でヒト脳およびラット脳の triglyceride lipase 活性を測定した。脳の中性脂質リパーゼに関する報告は少く，Vyvoda[1] らがモルモット脳の神経末端部に，Cabot[2] らがラット脳のミクロソーム分画に存在する中性脂質リパーゼを報告している程度である。ヒト脳に存在する中性脂質リパーゼは演者らの報告が最初と思われるので，ラット脳 triglyceride lipase 活性と比較して，その測定方法ならびに酵素学的性質について報告する。

II，実験方法

1，材料

ヒト脳組織は神経疾患の認められない，死後すぐ剖検された成人脳を1～3年間凍結保存し，5回の実験に用いた。

ラット脳組織は体重約300gの Wister 系ラットを断頭し，直ちに酵素活性測定に用いた。

2，酵素活性測定法

1)天然基質としてアイソトープでラベルされた triolein を使用した場合

ヒト脳 triglyceride lipase 活性の測定には（9,10-^{3}H(N)）triolein（比活性100～150μCi/mμmole）を，ラット脳 triglyceride lipase 活性の測定には（carboxyl-^{14}C）tri-

olein （比活性 40～100mCi/mmol）を使用した。^{3}H-triolein あるいは ^{14}C-triolein は New England Nuclear 社より購入し，酵素活性測定直前に Horning[3] らの方法により精製した。それぞれ cold triolein を加え，^{3}H-triolein は 3.6nM/μCi に，^{14}C-triolein は 3.6nM/0.1μCi に希釈した。

1試験管あたり 3.6nM の ^{3}H-triolein あるいは ^{14}C-triolein をとり，窒素気流で乾燥し，acetone 100μl と 0.1M citrate-phosphate buffer または 0.1M phosphate buffer を 0.2ml 加えよく攪拌したものに，10%ヒト脳ホモジェネートあるいはラット脳ホモジェネートを 0.1ml 加え 1時間から3時間 incubation した。Chloroform : methanol (2:1 V/v) を 3.5ml 加え反応を停止するとともに脂質成分を抽出し，silica Gel G chromatography を hexane : ether : acetic acid (80:20:1 V/V/V) の系で展開し oleic acid を分離した。oleic acid 部分を薄層クロマトからかき取り，chloroform : methanol (2:1 V/V) 1ml で3回抽出し，toluen を含んだシンチラント (POP 7g, dimethyl-popop 0.6g/L toluen) を用いて，oleic acid に含まれる放射能活性を測定し酵素活性とした。

脳ホモジェネートによる triglyceride の分解過程は経時的に Incubation し，ヒト脳 triglyceride lipase により分解された ^{3}H-triolein の分解産物である diolein, monoolein の isomer の放射能活性を経時的に測定した。

ラット脳ミエリンのリパーゼ活性は Norton & Poduslo の方法に従って，約3g のラット新鮮脳より分離した。前述の方法で，蛋白量 0.1～0.3mg を使用し酵素活性を測定した。

2), 4-methylumbelliferyl-palmitate（以下 4MU-pal と略す）を基質に用いた脳リパーゼ活性測定法

benzen に溶解した 10^{-2}M 4MU-pal 0.1ml と 16mM egg lecithin 0.1ml を小試験管に取り，窒素ガス気流で乾燥し 0.2% Sodium taurocholate 1ml を加え sonication したものを基質とした。この基質 0.1ml に 0.1M acetate buffer または citrate buffer 0.3ml と 10% ヒト脳ホモジェネート 0.1ml 加え，30分～1時間 incubation した。pH 0.8 0.2M Tris-Sodium Carbonate buffer 1ml を加え反応を停止し，遊離した 4MU の蛍光を蛍光光度計（Turner, Model 110）で測定し，酵素活性とした。

III, 結果

1, ヒト脳リパーゼ活性

A, ^{3}H-triolein を基質とした場合

1), pH の影響（図1）

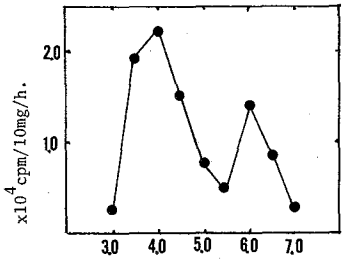
pH4.0 と pH6.0 に至適 pH を認めた。

2), 界面活性剤の影響（表1）

イオン系および非イオン系界面活性剤のリパーゼ活性に与える影響を検討するため，試験管あたり 200μg の濃度の界面活性剤を添加し，酵素活性を測定した。

pH4.0 の酸性リパーゼは Sodium deoxycholate の添加により対照の約320%活性化された。pH6.0の中性リパーゼ活性は Triton X-100 の添加により対照の約260%活性化された。

図1,



ヒト脳リパーゼ活性に与える pH の影響

3), ヒト脳リパーゼによる^{3}H-trioleinの分解過程（図2,3）

脳内triglycerideの分解過程を見るため，ヒト脳triglyceride lipaseによる^{3}H trioleinの分解産物であるMonoolein, Dioleinのisomerのまたは2-monoolein, 1,2-または1,3-dioleinを経時的に測定した。pH4.0では1-monooleinがincubation timeとともに増加し，1,2-dioleinはincubation time 30分をピークにして経時的に活性の上昇がみられた。一方pH6.0では monoolein, dioleinはほとんど出現せずoleic acidのみ出現した。

表1，ヒト脳リパーゼ活性に与える界面活性剤の影響

detergents	acid pH (4.0)		neutral pH (6.0)	
	activity	%	activity	%
acetone	1.07	100	0.96	100
triton X-100	2.88	269	2.47	257
sodium taurocholate(crude)	2.00	187	1.04	108
sodium deoxycholate	3.45	322	1.20	125
sodium taurodeoxycholate	1.32	123	1.44	150
sodium cholate	1.71	160	0.67	70
Myriji	0.76	71	0.43	45

Activities are expressed as 10^4 cpm/10mg tissue per hour and determined as a mean of duplicate values. 200 ug of each detergent was added into incubation mixture.

図2，ヒト脳triglycerideの分解過程（pH 4.0）

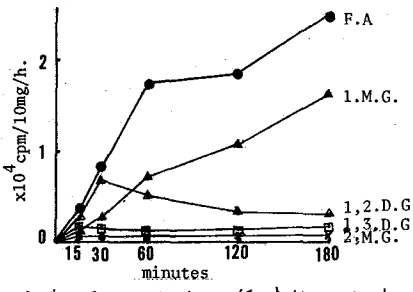
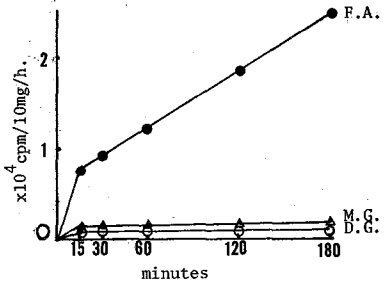


図3，ヒト脳triglycerideの分解過程（pH 6.0）



B，4-MU-palを基質とした場合

1)，pHの影響（図4）pH3.5に至適pHを認め，中性領域では活性のピークは見られなかった。

2)，界面活性剤の影響（図5）

イオン系，非イオン系界面活性剤を200μg/tube添加し，リパーゼ活性に与える影響を検討した。sodium taurocholate，triton X-100の添加により最も活性化された。

図4，ヒト脳リパーゼに与えるpHの影響（4MU-pal基質）

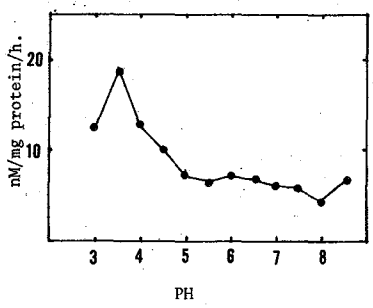
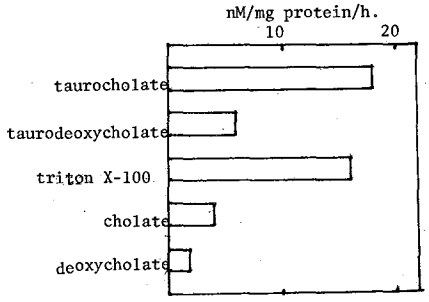


図5，ヒト脳リパーゼに与える界面活性剤の影響（4MU-pal基質）



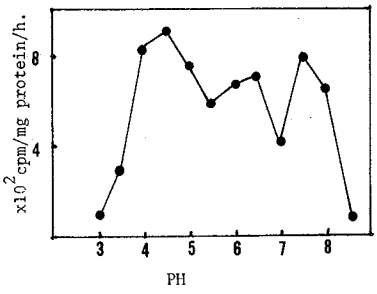
2，ラット脳リパーゼ活性（図6）

^{3}H-trioleinを基質として，ラット脳リパーゼ活性を測定した。

pH 4.5，6.5，7.5に至適pHを認めた。精製したラットミエリンの至適pHも同様の至適pHを認めたが，それぞれのpHでのspecific activityを比較すると，pH4.5では精製ミエリンが2.4倍，pH6.5では3.7倍，pH7.5では3.3倍全脳ホモジェネートに比

べて高く，pH 6.5の中性リパーゼ活性はミエリンにも局在するものと思われる。

図6，ラット脳リパーゼに与えるpHの影響



五，考按

ヒト脳およびラット脳のtriglyceride lipase活性を測定したが，^3H-trioleinを基質として測定すると，pH4.0とpH 6.0に至適pHを認め，両pHにおける界面活性剤の影響，trioleinの分解様式の異る2つの酵素活性が存在すると考えられる。更に，酸性リパーゼは1(3)-monoolein を生ずる，酵素活性と，1,2(2,3)-dioleinを生ずる少くとも2つの酵素活性より成ると考えられる。中性リパーゼ活性は，trioleinの1,2,3位のacyl esterを同時に加水分解するtriacyl ester hydrolaseと考えられる。

ラット脳triglyceride lipase 活性はpH 4.5，6.5，7.5に至適pHを認め，そのうちpH6.5の中性リパーゼ活性はミエリン分画に最も比活性が高かった。

哺乳動物脳の中性脂質リパーゼに関する研究は，数少いが，演者らが示したようにヒト脳およびラット脳のtriglyceride lipaseは非常に高い活性を有している。つまり，哺乳動物脳ではアイソトープでラベルされた脂肪酸の脳内注入実験により，活発にtriglyceride が合成されることが示されていることから，脳内triglycerideのturn overは非常に速いことが想象される。

脳以外の組織のtriglyceride lipaseに関しては多くの研究がなされているが，Wolman等で欠損していると考えられている酸性リパーゼは，pH4付近に至適pHがあり，Lysosomeに存在する。ヒト脳およびラット脳の酸性リパーゼは，やはりLysosome由来の酵素と考えられる。一方，中性リパーゼに関しては，肝においてもplasma membrane，microsomeなど，さまざまな局在を示しているが，Eto[4]らは，至適pH6.4のcholesterol ester hydrolaseがラット脳ミエリンに局在することを明らかにしており哺乳動物脳の中性リパーゼの細胞内局在ならびにcholesterol ester hydrolaseとの関係は今後の興味ある問題と考えられる。

六，文献

1. Vyvoda O.S. and Rowe C.E. (1973) Biochem.J. 132,233-248.
2. Cabot M.C. and Gatt S. (1976) Biochim.Biophys.Acta 431, 105-115.
3. Horning M.G. et al. (1960) J.Lipid Res. 1, 482-490.
4. Eto Y. and Suzuki K. (1973) J.Biol.Chem. 248, 1986-1991.

58 GM_3ガングリオシドシアリダーゼに関する研究

田端葉子　（自治医大・神経内科）
山田剛通・有賀敏夫・宮武　正
（都臨床医研）

〔要　約〕

GM_3 ガングリオシドは神経系の膜成分に存在して、ある種の先天性代謝障害の神経系に蓄積されることから、その分解酵素である GM_3 ガングリオシドシアリダーゼが重要となってきた。今回、我々は GM_3 ガングリオシドの *sphingosine base* をトリチウムラベルしたものを基質として、白血球における GM_3 ガングリオシドシアリダーゼの特性を検討し、標準酵素測定法を確立した。

① 至適pHは4.8、Km値は 3.1×10^{-5} M であった。Na-*taurocholate* を1.2 mg/ml加えることにより活性が3倍に上昇した。反応は8時間まで直線的に変化した。酵素蛋白濃度は0.8 mg/ml まで直線的に変化した。

② 以上の結果より、GM_3 ガングリオシドシアリダーゼ標準アッセイシステムとして、^{3}H-NANA-GM_3 6.8 n moles, *sodium taurocholate* 0.12 mg, 約80 μg の *protein* を含む酵素溶液, 10 n moles *citrate phosphate buffer* (pH 4.8) を含む100 μl の反応系を確立した。

③ 20 KHz, 30秒の *sonication* により活性は30％に低下した。また、50 °C 30分間の加熱で活性は11.5％に低下した。熱変性及び *sonication* の影響を *sialyllactitol sialidase* と比較したところ、両者に差を認めた。

GM_3 ガングリオシドは生体膜に広く分布するが、その中でも自律神経系に属する副腎髄質、特にその *chromaffin* 顆粒に高濃度に存在する。(1)(2) この顆粒に含まれるカテコールアミンが血中に放出される機序として、Ca^{2+} とこのガングリオシドの結合が注目されるにいたり、この生理的役割が重要視されるようになった。(6) したがって、このガングリオシドの代謝に関与する GM_3 シアリダーゼが注目されてきた。

一方、GM_3 ガングリオシドは *adult type neuronal storage disease* (4) や *Mucopolysaccharidosis* III (9) で中枢神経の神経細胞に蓄積されるため、これらの疾患における神経障害の病態を調べる上で、GM_3 ガングリオシド分解酵素である GM_3 ガングリオシドシアリダーゼが問題になる。

これまで、このシアリダーゼ活性測定法は Tallman ら (8) により、生合成法で ^{14}C-NA-GM_3 (NANA-GM_3) を合成して基質として用いた *assay* 法が報告されている。今回、我々は、GM_3 ガングリオシドの *sphingosine base* の二重結合の部位にトリチウムラベルした基質を用いる新しい方法を開発し、ヒト白血球を用いる測定法を確立し、この酵素の特性について検討した。

〈実験方法〉

(1) 酵素溶液の調整：健康人の静脈より採血し、デキストラン沈殿法により白血球を分離する。蛋白濃度が約2 mg/ml になるように分離白血球に蒸留水を加え、Dounce のガラスホモゲナイザーでホモゲナイズして酵素溶液とした。

(2) 基質の調整：GM_3 ガングリオシドはウシ副腎髄質より単離精製した。

ウシ副腎髄質約10 kg よりアセトンパウダーを作成し、それより C-M (2:1) 及び (1:1) で

粗脂質を抽出する。これよりLedeen ら(3)の方法でDEAE-sephadexにより粗ガングリオシドを分離し さらにイアトロビーズカラムクロマトグラフィを行ない、NA-GM_3及びN-glycolyl-GM_3を単離した。

(3) GM_3ガングリオシドのトリチウムラベル法：GM_3ガングリオシドは駒井らの方法(7)により 白金を触媒とし トリチウムガスを用いて、GM_3ガングリオシドのsphingosine baseの二重結合を還元してトリチウムラベルした。この方法でトリチウムラベルすると、放射性を持ったGM_3以外の化合物が生成されるため、薄層クロマトグラフィを用いて単離精製した。

(4) ^3H-NA-GM_3の純度：このようにして得た^3H-NA-GM_3を薄層クロマトプレートにつけ、① C-M-2.5N NH_4OH(60:35:8)及び C-M-W (65:35:8) で展開した。シンチレーションカウンターで測定した結果、①では total count の 97.9% ②では 98.2% のradio-activityがGM_3ガングリオシドのRfに一致する部分に回収された。また、精製^3H-NA-GM_3をCl. perfringens のシアリダーゼで処理した結果、すべてが^3H-CDHになった。(図1)

(4) 標準酵素測定法

^3H-NA-GM_3 8 μg/tube に Na-taurocholate 0.12 mg/tube を加え、窒素ガスで乾燥させる。これに 0.2 M Citrate phosphate buffer, pH 4.8 を、50 μl/tube 加えてsonication及び撹拌を行ない、これを基質溶液とする。50 μl酵素溶液に50 μl基質溶液を加えて、37°C で 8時間 incubation する。incubation後、0.5 ml の C-M (2:1) を加えて反応を停止させる。次にこの反応液中にCDH 5 μg を carrier として加える。よく撹拌後遠心し、上層を取り除く。下層を薄層クロマトプレートにつけ、C-M-W (65:25:4) で展開し、ヨード蒸気でCDHのバンドを検出し、その部分をかき取り、C-M (2:1) 2 ml で溶出し、イアトロビーズのミニカラム (0.5cm × 3cm) にかけ、バイアルにうけ溶媒を 90°C のオーブンで乾燥させる。トルエンをベースとしたシンチラント (7g 2.5-diphenyloxazole, 0.6g dimethyl-1,4-bis-2-(4 methyl-5 phenyloxazolyl) benzene を tolueneでとかして 1 l にしたもの) を 10 ml加えてシンチレーションカウンターで測定する。

Fig.1 Degradation of ^3H-GM_3 by Cl. perfringens neuraminidase.

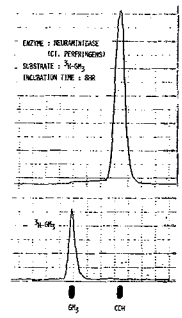


Fig.2 Effect of pH on hydrolysis of ^3H-GM_3.

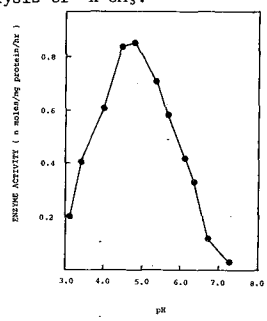


Fig.3 Hydrolysis of ^3H-GM_3 according to amount of the enzyme sourses.

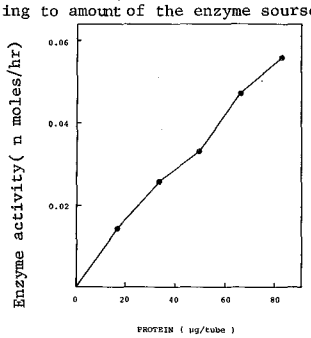


Fig.4 Hydrolysis of ^3H-GM_3 according to incubation time.

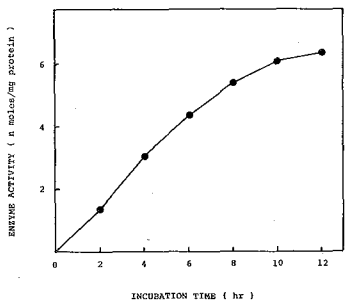
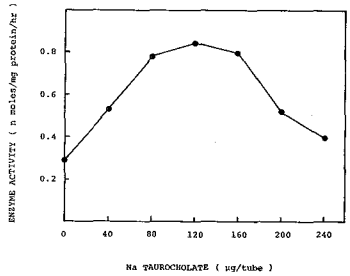


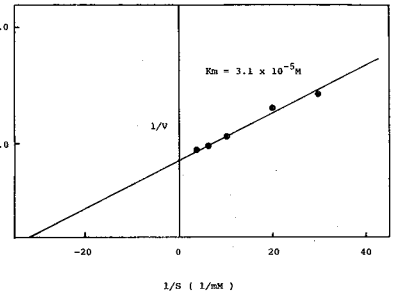
Fig.5 Effect of Na taurocholate on hydrolysis of ^3H-GM_3.



〈結果及び考察〉

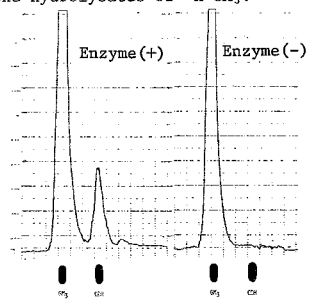
(1) 至適pHは4.8であった。(図2) 酵素蛋白濃度を変化させassayした結果、酵素活性は80μg/tubeまで直線的に増加した。(図3) また、反応は8時間まで直線的に変化した。(図4) Na-taurocholateの至適濃度は0.12mg/tubeであった。(図5) 酵素蛋白濃度を一定にし、基質濃度を変化させて得たLineweaver-Burk plotは図6のごとくであり、このグラフより求めたKmの値は、3.1×10^{-5} Mであった。したがって標準酵素測定法として pH4.8、反応時間は8時間、Na-taurocholate 0.12mg/tube、基質はKm値の2倍、8μg/tubeを用いた。

Fig.6 Lineweaver-Burk plot for human leucocyte GM_3 ganglioside sialidase.



(2) 反応産物の同定：標準酵素測定法の3倍量の反応溶液を用いて8時間incubationする。反応液の下層を薄層クロマトプレートにつけ、C-M-W (65:25:4) で展開後、薄層スキャナーでスキャンしたところ図7のごとく、最終産物はCDHのみであり、enzyme (-) ではCDHは出現しなかった。このようにして、この酵素反応の最終産物はCDHであることが確認された。

Fig.7 Thin layer chromatogram of the hydrolysates of ^{3}H-GM_3.



(3) 酵素の安定性：酵素液を50°Cで熱変性させ、熱安定性を検討した結果、この酵素は50°C 10分間の加熱で活性は75%に低下した。一方、sialyllactitol sialidaseは31%まで低下した。両sialidaseの間には差がみられた。

酵素液をBranson Sonifier Model 200, 20 KHzで0.5sec × 20回 × 3 氷水中でsonicationした。その結果、表1のごとく他のglycosidaseの活性の低下は認められなかったが、GM_3 ガングリオシドシアリダーゼは31%に活性が低下した。

Table 1 Effects of sonication on sialidase and lysosomal enzymes

Enzyme	Sonicated cells(%)
Sialidase	
with GM_3	31
with sialyllactitol	61
α-galactosidase	84
β-galactosidase	98
N-acetyl-β-glucosaminidase	97

現在までGM_3 ガングリオシドシアリダーゼに関しては、G. Tettamantiが脳のGM_3シアリダーゼを、Tallmanが Hela細胞のシアリダーゼを測定している。これらのシアリダーゼを比較してみると、Km値はHela細胞では 7.5×10^{-5} Mである。一方、Tettamantiは Particulate sialidaseと Soluble sialidaseに分けて測っているが、Particulate分画のKm値は 1.0×10^{-5} Mであった。我々のKm値は 3.1×10^{-5} Mであり、3種の臓器におけるKm値は類似した値を示した。また、至適pHはTallmanが5.0 Tettamantiが4.9 我々が4.8でよく似た値である。

GM_3 シアリダーゼは他のglycolipid glycosidaseと同様に、detergentを要求する。Na-taurocholateでは1.2mg/mlで最高の活性が得られた。

これまでの報告によると、sialidaseというのは膜構造を破壊すると、活性が極度に低下するとされている。Thomasらは Fetuin及び sialyllactoseを基質として、皮膚線維芽細胞の sialidase活性について調べているが、sonicationによって21～27%までに活性低下が認められている。我々は白血球で同様の条件の下でsonicationの影響をみたが、GM_3

ガングリオシドシアリダーゼは31%に活性が低下しており，線維芽細胞とほぼ同様であった。白血球の sialyllactitol sialidase 活性は比較的安定で61%であった。以上のごとく，我々は GM_3 シアリダーゼの assay 条件を確立し，その特性を検討したわけだが少なくとも sialyllactitol sialidase とは sonication の影響，熱安定性に関して差を認めた。

最近，Wenger ら[10]は mucolipidosis の患者の皮膚線維芽細胞において，sialyllactitol sialidase の欠損を認めているが，GM_3 ガングリオシドシアリダーゼの活性の低下はないとしている。我々も adult type neuronal storage disease において同様の結果を得ている。[5] したがって，線維芽細胞においては両者のシアリダーゼは異なったものということができる。しかし，我々の adult type neuronal storage disease の白血球では GM_3 ガングリオシドシアリダーゼのみならず，sialyllactose，及び sialyllactitol sialidase 活性は低下しておらず，種々の臓器におけるシアリダーゼのアイソザイムについては今後の検討が待たれる。

終わりに貴重なサンプルを提供していただいた国立予防衛生研究所放射線部，駒井博士に深謝致します。

〔文献〕

(1) Dreyfus, H., Aunis, D., Harth, S. and Mandel, P. (1977) Biochim. Biophys. Acta 489, 89-97.

(2) Ledeen, R., Salsman, K. and Cabrera, M. (1968) Biochemistry 7, 2287-2295.

(3) Ledeen, R., Yu, R.K. and Eng, L.F. (1973) J. Neurochem. 21, 829-839.

(4) Miyatake, T., Atsumi, T., Obayashi, T., Mizuno, Y., Ando, S., Ariga, T., Matsui-Nakamura, K. and Yamada, T. (1979) Ann. Neurol. in press.

(5) Miyatake, T., Yamada, T., Suzuki, M., Pallmann, B., Sandhoff, K., Ariga, T. and Atsumi, T. (1979) FEBS Letters 97, 257-259.

(6) Rahmann, H., Rosner, H. and Breer, H. (1976) J. Theor, Biol. 57, 231-237.

(7) Seyama, Y., Yamakawa, T. and Komai, T. (1968) J. Biochem. 64, 487-497.

(8) Tallman , J.F., Fishman, P.H. and Henneberry, R.C. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 556-562.

(9) Wallace, B.J., Kaplan, K. and Adachi, M. (1966) Arch.Path. 82, 462-473.

(10) Wenger, D.A., Tarby, T.J. and Wharton, C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 589-595.

59 正常並びにKrabbe病脳に於けるHexadecanoyl 4-nitrophenyl-β-galactosidase活性に関する研究

衛藤義勝 （慈恵医大・小児）

〔要 約〕

要約：Hexadecanoyl-4-nitrophenyl-β-galactosidase（HN-galと略す）活性に関して，ヒト脳に於て検討した。脳肝共に至適pHは4.0で，種々のbile saltsの添加ではtaurocholateにより最も活性化された。HN-gal活性はtaurocholateの濃度に依存し，1～2mg/tubeでmaximumの値が得られた。基質濃度では250μg/tubeで最も活性化され，それ以上の濃度ではプラトーないしは基質による阻害がみられた。オレイン酸の添加は効果が少く，又Na，Ba，Mgイオン，EDTA，Con A添加等のHN-gal活性に対する効果は少かった。HN-gal活性の等電点はpH 4.5であり，4MU-β-galactosidase活性と近似していた。
Krabbe病患者脳肝組織ではHN-gal活性はいずれのpHに於ても残存酵素活性がみられず；又患者白血球，培養皮膚線維芽細胞に於ても著明な活性低下がみられた。又本基質によるKrabbe病の出生前診断への応用も試みた。Krabbe病患者組織又は細胞に於てHN-gal活性が欠損又は低下していたことは，HN-gal活性がcerebroside β-galactosidase活性と同一酵素であることを暗示した。

緒言

Krabbe病は乳児期に高度の中枢神経系の障害（けいれん，錐体路症状等）を来し，生後1-2年で死亡する遺伝性汎化性脱髄疾患であり[1]，1970年米国のSuzuki等[2]により本症の発症原因は脳ミエリンに多く局在するgalactocerebrosideの分解過程を営るcerebroside β-galactosidaseの酵素欠損によることが明らかにされた。

本症の診断は従来云われる通常の4-methylumbelliferone又はp-nitrophenol誘導体によるβ-galactosidase活性の測定では診断が可能でなく，天然基質のgalactocerebrosideまたはlactosylceramideを用いることにより診断が可能であったが[2]，Gal ら[3]により ^{3}H-galactocerebrosideに代る酵素活性測定の為の基質として2-hexadecanoyl-4-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideが合成され，このchromogenic substrateにより，Krabbe病の診断が可能であると報告している。しかしながら本基質を用いてのβ-galactosidase活性の酵素学的諸性質に関しては十分に検討されておらず；本論ではヒト脳に於ける酵素学的性質並びに本基質を用いてのKrabbe病脳，肝，白血球，培養皮膚線維芽細胞に於けるHexadecanoyl-4-nitrophenyl β-galactosidase（以下HN-β-galと略す）活性の診断への応用に関して報告する。

材料並びに方法

ホモジェネートの作成：Krabbe病患者脳肝は-40°Cに1～2年凍結保存されたものを使用した。脳，肝をハサミで細片とし，distilled water 10倍容を加え，ガラスホモジェナイザーでホモジェネート後凍結融解を5回くり返し，超音波50k cycleを1分間処理したもの

とホモジェネートとした。白血球は Snyder らの方法[4]により ヘパリン血 10ml より分離し 1.0ml の蒸留水を加え組織と同様の方法にて，凍結融解，超音波処理を行った。培養皮膚線維芽細胞並びに羊水細胞は 10%仔牛血清を含む F-10 培地で 5% CO_2 培養条件下で 50ml Falcon dish で数週間培養後 細胞を rubber policeman でとり，遠心分離し，ホモジェネートは白血球と同様の操作で作成した。

HN-gal 活性の測定：Hexadecanoyl-4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside は Calbiochem-Behring Corp.（シノテスト商事）より購入し，10検体測定分として基質 2mg に Sodium taurocholate（crude, Sigma社）10mg, tween-20, Myriji 各々 5mg を加え，1ml の蒸留水を加え超音波処理を行いこれを 100μl とり，これに 80μg オレイン酸（tris に溶解）1M クエン酸 Buffer（pH 4.0），50μl ホモジェネート（蛋白量は培養細胞 100-200μg，白血球 200-400μg，組織 400-500μg）を加えた後 37°C 72～24時間インキュベーションした。インキュベーション終了後 0.1M glycine-NaOH（pH 10.0）0.4ml を加え反応を止め，ethanol 0.8ml を加え hexadecanoyl p-nitrophenol を抽出し，410mμ で吸光度を測定する。

HN-gal 活性の可溶化：HN-gal 活性の可溶化は 4MU-β-gal 活性と異り，通常の H_2O 又は Buffer 抽出法では 30-40% 程度のみしか可溶化されないことから，0.1% tritonX-100 を含む 0.05M citrate-phosphate buffer（pH 6.0）により 70～75% の可溶化がみられた。triton X-100 抽出上清を isoelectric focusing により分画した。

Isoelectric focusing：Isoelectric focusing は，Ampholyte pH 3.5～10（LKB, Sweden）を用いて，Vesterberg らの[5]方法に従って行い，0.5ml ずつ分画後 pH と酵素活性を測定した。

その他の酵素活性の測定：cerebroside β-galactosidase 活性は ^{3}H-galactocerebroside（東京医科歯科大学 生化学 飯田静夫教授の御好意による）を用いて，Suzuki らの[3]方法に従い cerebroside β-galactosidase 活性を測定した。又 β-galactosidase，N-acetyl-β-glucosaminidase，α-mannosidase 活性は 4-methylumbelliferone 誘導体を用いて測定した[6]。蛋白は Lowry らの[7]方法に従った。

結果

図1は対照脳，肝及び Krabbe 病患者脳肝の HN-gal 活性の至適 pH である。HN-gal 活性の至適 pH は 脳肝共に pH 4.0 であり，4-MU-β-galactosidase 活性は脳では pH 4.3～4.5，肝では pH 5.0 とは異っていた。Krabbe 病患者脳では 脳肝共に HN-gal 活性は いずれの pH に於てもほとんど活性がみられなかった。

次に HN-gal 基質の濃度を変えて HN-gal 活性を測定すると至適基質濃度は 250μg/tube で maximum であった。これ以上の濃度では活性はプラトー又は低下の傾向にあった（図2）。

図3はオレイン酸の添加の影響を示した。cerebroside β-galactosidase 活性と異り，HN-gal 活性はオレイン酸

図1. Hexadecanoyl p-nitrophenyl-β-D-galactosidase in normal and Krabbe's brain and liver

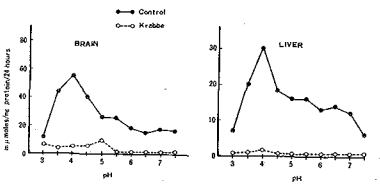


図2. EFFECT OF THE ADDITION OF SUBSTRATE

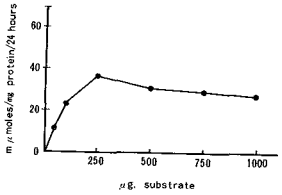
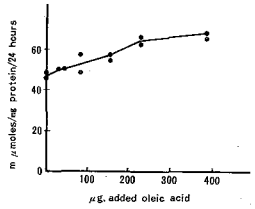


図3 EFFECT OF THE ADDITION OF OLEIC ACID



添加により120～150%程度の活性化がみられ，オレイン酸添加の効果は余り著明ではなかった。又種々のdetergentの効果では表1にみられる如く，taurocholate，cholic acid，deoxycholic acid，litocholic acid，chenodeoxycholic acid，glycochenodeoxy cholic acid，lithocholic acidを各々500μg/tubeの濃度で添加すると，taurocholateが最も活性が高かった。又taurocholateの濃度を変えてtaurocholateの至適濃度を検索すると HN-gal活性はtaurocholateの濃度の増加と共に活性は高くなり，1～2mg/0.26ml incubation mixtureで最も活性が高かった（図4）。蛋白濃度では図5にみられる如く 0.5mg/0.26ml incubation mixtureで直線的に反応した。

表1 Effects of various bile salts on HN-gal activity

detergents +	activity *	% of standard assay
sodium taurocholate	38.0	100.0 %
sodium cholate	25.3	66.7
sodium deoxycholate	4.3	11.3
litocholic acid	10.9	28.6
chenodeoxycholic acid	5.4	14.3
glycochenodeoxy cholic acid	27.1	71.4
lithocholic acid	0	0

+ each 500 μg/tube was added. * m μmoles/mg protein/24h.

図4 EFFECT OF THE ADDITION OF SODIUM TAUROCHOLATE

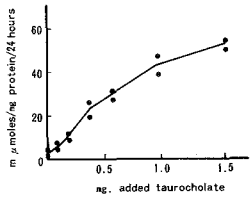
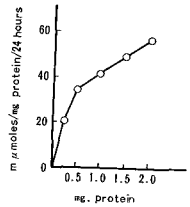
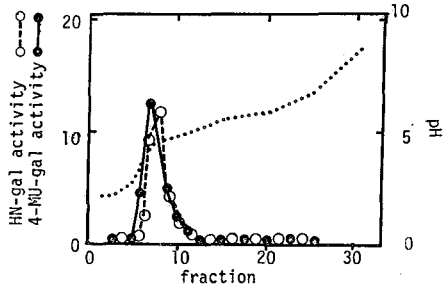


図5 EFFECT OF PROTEIN CONCENTRATION



種々のイオン添加の影響では，0～150mM いずれの濃度の Na，Ba，Mg イオンの添加で HN-gal活性は活性化されず，又 0～5mM EDTAの添加でも活性の高値は示さなかった。又 Con-A 添加は 4MU-β-galactosidase活性を活性化するが，HN-gal活性は活性化されなかった。図6は HN-gal 活性の isoelectric focusingのパターンと4MU-β-gal活性を対比して検討した図である。4MU-β-gal，HN-gal活性共に等電点は pH 4.5であり，両者の活性は区別出来なかった。一方 Krabbe病の診断として，剖検組織以外で白血球，培養皮膚線維芽細胞，羊水細胞に於て HN-gal 活性を測定したところ，白血球では，Krabbe病患者では対照の20%以下と低値を

図6. ヒト肝臓 HN-gal活性の Isoelectric focusing



示した(表2)。又Krabbe病患者培養皮膚線維芽細胞では，HN-gal活性は，白血球と同様に対照の10%以下であり，cerebroside β-galactosidase活性と共に低値を示した。Krabbe病患者のhigh riskの培養羊水線維芽細胞でHN-gal活性を測定したところ，cerebroside β-galactosidase活性の欠損がみられず，同時にHN-gal活性も正常であったことから，正常胎児であると診断した症例である(表3)

表2. HN-gal activity in leukocytes of a patient with Krabbe's disease

leukocytes	β-Hex *	β-Gal *	α-Mann *	HN-gal *
control 1	677	79	115	0.63
2	631	83	133	0.75
3	637	83	212	0.49
4	764	77	110	0.56
krabbe's disease	669	111	146	0.13

Abbreviation used; β-Hex; N-acetyl-β-glucosaminidase, β-Gal; β-galactosidase, α-Mann; α-mannosidase, HN-gal; hexadecanoyl-4-nitrophenyl--galactosidase * mμmoles/mg protein/h

表3. HN-gal activities in cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells

cells	β-Gal	β-Hex	cerebroside β-gal	HN-gal
(a) fibroblasts				
control 1	188	2657	1.7	14.9
2	268	2905	0.8	14.2
Krabbe's disease	188	2071	0.28	1.4
(b) amniotic fluid cells				
control	620	4630	3.02	20.6
Krabbe, pregnant at risk	536	3736	2.85	19.8

Abbreviations used same as in leukocytes.
the activities are expressed as m μmoles/mg protein/h.

考察

Galらにより galactocerebrosideに基質の化学構造上出来るだけ近似のp-nitrophenyl誘導体を合成しcerebroside β-galactosidase活性測定の為の人工基質として合成されたが，その酵素学的諸性質に関しては報告が少い。今回ヒト脳に於けるHN-gal活性を検討し，至適pHは4.0，taurocholateの添加により活性が測定され，種々のbile saltsの添加ではtaurocholateにより最も活性化される。又オレイン酸の添加は従来のcerebroside β-galと異り，活性化作用は弱く，NaClの添加，その他のイオンの添加による効果はHN-gal活性にはほとんど影響なりかむしろ阻害効果を有していた。又種々の濃度のConAの添加の影響も少いことから4MU-β-gal活性とも異っていた。HN-gal活性の等電点はpH 4.5~4.8で4MU-β-galと同様であったが，ピークの幅のずれを認めた。以上の結果からHN-gal活性はcerebroside-β-gal-actosidase活性と酵素学的諸性質が多少異っているが，これは基質の溶解性が異っているものか今後検討する必要がある。Krabbe病患者組織，培養細胞，白血球等でHN-gal活性が極めて低下していたことは，HN-gal活性の測定条件がcerebroside β-galactosidase活性を特異的に測定していることを示し，云ゆるnon specific β-galactosidase活性を測定している条件ではないことを示している。従ってKrabbe病の診断はcerebroside β-galactosidase活性を測定することなく容易に診断が可能であり，出生前診断にも応用が可能である。今後更に種々の酵素分画法によりHN-gal活性を分画し，天然基質との相関性を検討する予定である。

文献

1) 衛藤義勝 (1979) 代謝 15: 53-59. 2) Suzuki K. and Suzuki Y. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66: 302-305. 3) Gal A.E., Brady R.O. et al. (1970) Clin. Chim. Acta 77: 53-59. 4) Snyder R.A. and Brady R.O. (1969) Clin. Chim. Acta 25: 33-36. 5) Vesterberg O. and Svensson H. (1966) Acta Chem. Scand. 20: 820-834. 6) Eto Y., Owada M., et al. (1979) J. Neurochem. 32: 397-405. 7) Lowry O.H., Rosebrough N.J. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275.

60 脱コレステロール剤AY9944で処理したラット新生仔中のスフィンゴミエリナーゼ活性変化の年令依存性と可逆性

渡辺和行・桜川宣男・有馬正高
(国立神経センター)

〔要約〕

7-dehydrocholesterol reductaseの阻害剤であるAY9944 (50mg/kg体重)をラット新生仔に生後2日目より、連続8日間腹腔内投与すると、各種臓器中の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性が特異的に減少する。この活性減少が酵素分子生合成のどのレベルの障害に基ずくかを明らかにする研究の一環として、薬物作用の年令依存性、可逆性を調べると伴に、スフィンゴミエリナーゼisozyme分布に与える影響を調べた。生後2日目および10日目より薬物投与を開始したラットでは、同程度の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の減少が観察されたが、生後25日目より薬物投与を開始したラットでは、調べたすべての臓器中で同酵素活性の減少率が軽度となり、その傾向は特に脳で顕著であった。Mg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ、および酸性ホスホジエステラーゼ活性は、薬物処理による影響をほとんど受けなかった。生後2日目より連続8日間薬物処理し、一度酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を低下させたラットを、その後10日間放置すると、同酵素活性は、腎臓を除きコントロール値の90~115%まで可逆的に回復した。

生後10日目のラット脳および肝臓酸性スフィンゴミエリナーゼは、等電点分画法により数種の活性ピークに分離された。AY9944処理した同年令ラットの等電点分画パターンは、脳、肝臓共にコントロールで見られるすべての活性ピークにおいて活性減少が観察された。

先天的脂質代謝異常症であるNiemann-Pick病は、ライソゾームの酸性スフィンゴミエリナーゼの欠損がその本態と考えられ、基質であるスフィンゴミエリンが種々の臓器、組織中に蓄積し、精神運動機能低下、肝脾肥大、眼底の"cherry-red spot"、末梢血中の"form cell"などの臨床像を呈する。Crocker[3]は、Niemann-Pick病を臨床面から5つの亜型に分類したが、それらの酵素学的背景および発生機序に関しては不明な点が多い。

最近、桜川ら[7]は7-dehydrocholesterol reductaseの阻害剤であるAY9944 (trans-1,4-bis-[2-chlorobenzylaminomethyl] cyclohexane)をラット新生仔に投与すると、種々の臓器および組織中の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性が特異的に減少し、スフィンゴミエリンの蓄積および組織学的にも細胞内封入体が生ずるなどNiemann-Pick病に酷似の症状を呈する事を見出した。また同様の阻害剤であるBoxidineでラットを処理しても類似の効果が得られたと報告した。[8]これらの薬物によるスフィンゴミエリナーゼ活性の減少は、酵素自体の生合成阻害によるものと現在考えられており、その分子的背景を明らかにする事は、Niemann-Pick病の発生機序を理解すると伴に治療面においても有用な知見を与えてくれるものと考えられる。今回、我々はAY9944によるスフィンゴミエリナーゼ活性低下の機序を明らかにする研究の一環として、薬物作用の年令依存性、効果の可逆性およびスフィンゴミエリナーゼisozyme分布に与える影響などについて調べたので報告する。

〔方法および手段〕 ラットのAY9944処理(年令依存) Wistar系ラット一腹仔を2群に分け、処理群には生理食塩水に溶解したAY9944を体重1kg当り50mg、コントロール群には生理食塩水のみを、生後2日目,10日目,25日目よりそれぞれ毎日一回、連続8日間腹腔内投与し、投与終了の翌日屠殺した。臓器は使用するまで-80°Cにて保存し

た。（可逆性）ラットに生後2日目より AY9944（50mg/kg/体重）を連続8日間投与後、薬物の投与を中止し、その後10日目（生後19日）に屠殺した。

酸性スフィンゴミエリナーゼおよび酸性ホスホジエステラーゼ活性の測定　組織からの酵素溶液の調製は Pentchev の方法[6]に従がって行なった。酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の測定は、〔14C-コリン〕スフィンゴミエリンを基質とし Pentchev の方法[6]に従がって行なった。酸性ホスホジエステラーゼ活性の測定は、ビス-P-ニトロフェニルリン酸を基質とし Callahan の方法[1]に準じて行なった。酵素溶液中のタンパク質量は、ヒト血清アルブミンを標準とし Lowry らの方法[5]に従がって測定した。

Mg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ活性の測定　組織からの酵素溶液の調製は Spence の方法[9]に従がって行なった。活性の測定は山口らの方法[11]に準じて行なった。〔14C-コリン〕スフィンゴミエリン 60nmole〔$CHCl_3$：MeOH＝2：1(V/V)〕10μl およびトリトン X-100〔10mg/ml $CHCl_3$：MeOH＝2：1(V/V)〕10μl をミクロ試験管内で混合し、N_2 気流中 40°C にて乾燥した。残渣に 100mM トリス-malate 緩衝液（pH7.0）150μl を加えて溶解し、37°C、10分間孵置した。次いでこのものに氷冷下、40mM EDTA：10μl、100mM $MgCl_2$ 12μl、酵素溶液、H_2O を加えて混合し（全量 200μl）、37°C、水浴上、1時間孵置した。後処理は酸性スフィンゴミエリナーゼ活性測定の場合と同様に行なった。

等電点分画　等電点分画に用いた酵素溶液の調製は山口らの方法[10]に準じて行ない、次いで氷冷下、pH 5.0で30分間処理し、生じた沈殿を 100,000×g、1時間遠沈して除去後、上清の pH を 7.2 に戻し約200倍容の1% グリシン-0.1% トリトン X-100 に対し一晩透析した。等電点分画は、LKB 8100 アンフォリンカラム（110ml）を用い、0.1%トリトン X-100、2% アンフォリン〔pH4-6, pH3.5-10＝4：1(V/V)〕存在下、5～50% 庶糖密度勾配中、2°C、500V、5W、40-44時間の条件下で行なった。等電点分画終了後、約 1ml ずつ分画し、各分画中のスフィンゴミエリナーゼ活性の測定、および pH の測定を行なった。

〔結果および考察〕　AY9944 効果の再令依存性　表1に生後2、10および25日目より

表1　AY9944 処理およびコントロールラットのスフィンゴミエリナーゼ活性および酸性ホスホジエステラーゼ活性

tissue	sphingomyelinase activity (2 to 9 day)*1		(10 to 17 day)*1		(25 to 32 day)*1		acid PDase activity (2 to 9 day)*1	
	C (7)	E (7)	C (4)	E (5)	C (5)	E (6)	C (7)	E (7)
brain (frontal lobe)	76.5±5.1 (100)*2	36.4±3.9 (47.6)*2	58.9±1.4 (100)	26.4±1.6 (44.8)	53.4±6.2 (100)	60.6±2.9 (113)	112±8 (100)	113±10 (101)
	96.1±1.5*3 (100)	45.5±6.2*3 (47.5)	----	----	----	----	----	----
(neutral)*4	265±29 (100)	224±28 (84.4)	----	----	----	----	----	----
liver	179±33 (100)	22.1±5.6 (12.1)	135±16 (100)	13.2±3.9 9.74)	183±13 (100)	64.5±6.9 (35.2)	218±8 (100)	169±11 (77.5)
	203±38*3 (100)	21.1±5.6*3 (10.3)	----	----	----	----	----	----
kidney	54.0±2.4 (100)	19.0±2.8 (35.2)	70.1±1.4 (100)	18.6±0.4 (26.7)	52.1±3.0 (100)	23.2±1.6 (44.5)	175±5 (100)	173±11 (98.9)
spleen	45.0±3.9 (100)	14.6±3.2 (32.4)	37.8±5.2 (100)	12.3±0.6 (32.5)	33.5±5.4 (100)	20.7±2.0 (61.8)	134±14 (100)	134±6 (100)

*1 AY9944 で処理した日数を示した。　*4 Mg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ
*2 相対活性
*3 酵素溶液を山口の方法に準じて調製した　酵素活性は nmoles/hr/mg proteim で表現した。

AY9944を投与したラットの各種臓器中のスフィンゴミエリナーゼ活性と酸性ホスホジエステラーゼ活性をコントロール値と比較して示した。　生後2日目より薬物処理したラットでは、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の減少率は肝臓で最も顕著であり、以下、脾臓、腎臓、脳の順であった。　10日目から薬物処理したラットでは同酵素活性の低下率は2日目からの場合と同様の傾向であったが、25日目からの処理では、調べたすべての臓器中で活性減少率が軽減した。　この傾向は脳において最も顕著であり、まったく薬物の影響をうけなかった。　この時期におけるAY9944に対する耐性がどのような機序で獲得されるかに関して　今後さらに検討が必要であると思われる。

Mg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ活性および酸性ホスホジエステラーゼ活性におよぼすAY9944の効果　Gatt[4]らは、Niemann-Pick病typeAの患者脳中で、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性がほとんど欠損しているのに対し、isozymeであるMg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ活性は正常であったと報告している。　AY9944処理およびコントロールラットのMg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ活性を比較すると、AY9944処理群で軽度の活性減少が観察された。　山口ら[10]はヒト脳より精製した酸性スフィンゴミエリナーゼが、Mg存在下、pH7付近に新たに活性ピークを示すと報告しており、我々が得た結果は、AY9944の作用でMg依存性中性スフィンゴミエリナーゼの活性が減少したのではなく、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の減少が中性付近の活性値に影響を与えたことによると考えられた。　従がって、AY9944は酸性スフィンゴミエリナーゼ活性のみを選択的に減少させ、Mg依存性中性スフィンゴミエリナーゼ活性は減少させないことが明らかになった。酸性ホスホジエステラーゼ活性は　AY9944処理群で、肝臓でのみ約20%の減少が観察されたのみで、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性測定への影響はほとんど無視できると考えられた。

AY9944投与中止後の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の回復　生後2日目より連続8日間AY9944処理したラットをその後10日間放置して　一度減少した酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の回復がみられるか否かについて検討した。(表2)

表2　AY9944処理ラットの酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の可逆性(表1参照)

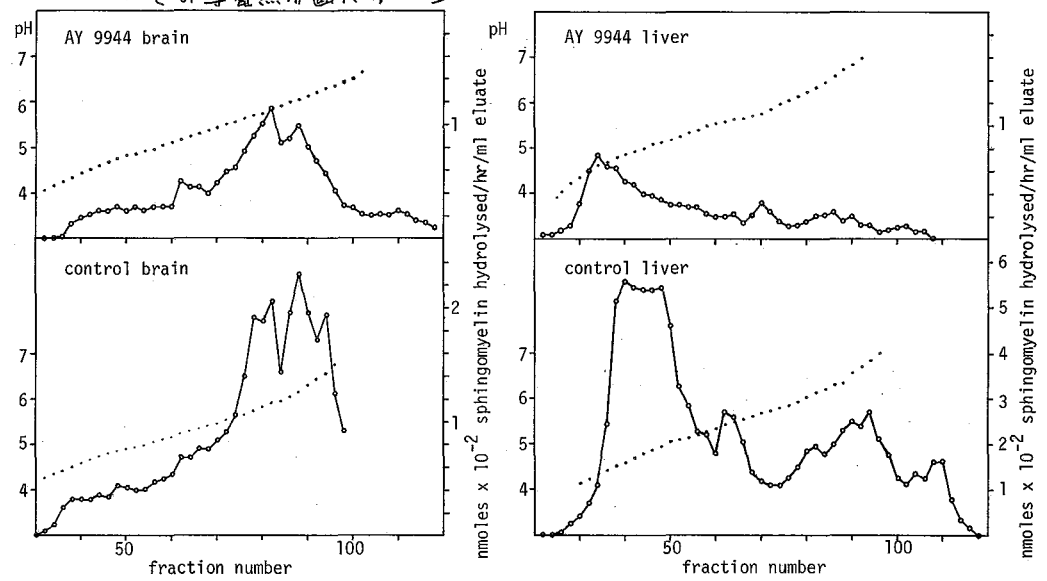
Tissue	sphingomyelinase activity (nmoles/hr/mg protein)	
	C (3)	E (4)
brain (frontal lobe)	60.0±1.1 (100)	69.8±3.3 (115)
liver	130±6 (100)	122±18 (93.3)
kidney	71.9±3.6 (100)	44.3±7.9 (61.6)
spleen	32.5±1.9 (100)	29.2±4.3 (89.8)

腎臓を除くすべての臓器で酵素活性は　コントロール値の90～115%まで可逆的に回復し、AY9944の効果はほとんど一過性であると考えられた。

AY9944の酸性スフィンゴミエリナーゼisozyme分布に与える影響　酸性スフィンゴミエリナーゼには数種のisozymeが存在する事が示唆されている。　山口ら[10]はヒト脳より分子量などの性質の異なる2種の酸性スフィンゴミエリナーゼを分離精製した。　またCallahanら[2]は、種々のヒト組織より得たスフィンゴミエリナーゼ画分が　等電点分画法により数種の活性ピークに分離され、Niemann-Pick病typeCの患者組織中では、特定のピークのみが欠損していると報告した。　AY9944による酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の減少は　単に量的変化なのか　または特定のisozymeのみ選択的に欠損をまねいて

いるのかを検討する目的で等電点分画法による isozyme の分析を行なった。(図1)

図1　AY9944 処理およびコントロールラット脳および肝臓酸性スフィンゴミエリナーゼの等電点分画パターン



生後10日目のコントロールラット脳および肝臓の等電点分画パターンでは、スフィンゴミエリナーゼ活性は数種のピークに分離され、主ピークは肝臓ではpH4.9付近に、脳よりのものではpH6付近にあった。AY9944で処理した同年令のラットの脳および肝臓の等電点分画パターンは、コントロールラットのものに比較して、全体的な活性減少であり、特定の活性ピークの欠損ではなかった。この結果は、もしラットに何種類かの酸性スフィンゴミエリナーゼ isozymeが存在すると仮定すると、AY9944による酵素分子生合成阻害はそれらに共通のレベルで起こることを示すものかも知れない。現在この点を明らかとする目的で、別法による isozyme の分析を検討中である。

〔文献〕

1. Callahan,J.W., Lassila,E.L., and Phillippart,M. (1974) Biochem.Med. 11, 250-261
2. Callahan,J.W., Khalil,M., and Gerrie,J. (1974) Biochem.Biophys.Res.Commun. 58, 384-390
3. Crocker,A.C. (1961) J.Neurochem. 7, 69-80
4. Gatt,S., Dinur,T., and Kopolovic,J. (1978) J.Neurochem. 31, 547-550
5. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.H. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275
6. Pentchev,P.G., Brady,R.O., Gal,A.E., and Hibbert,S.R. (1977) Biochim.Biophys.Acta 488, 312-321
7. Sakuragawa,N., Sakuragawa,M. Kuwabara,T., Pentchev,P.G., Barranger,J.A., and Brady,R.O. (1977) Science 196, 317-319
8. Sakuragawa,N., Watanabe,K., Takada,K., Nonaka,I., and Arima,M. (1979) The Proceedings of the International Meeting of a Multidiciplinary Approach to Brain Development. Elsvier/North-Holland Publ Co, Amsterdam (in press)
9. Spence,M.W., and Burgess,H.K. (1978) J.Neurochem. 30, 917-919
10. Yamaguchi,S., and Suzuki,K. (1977) J.Biol.Chem. 252, 3805-3813
11. Yamaguchi,S., and Suzuki,K. (1978) J.Biol.Chem. 253, 4090-4092

61 脳可塑性の生化学的研究 — 大脳半球摘除ラット神経組織のNA, 5HTの変化について

外山 孚・村上直人・亀山茂樹
植木幸明 (新大・脳研・脳外)
佐武 明 (新大・脳研・神経化学)

〔要 約〕

前回我々は，成熟ラットに大脳半球摘除を行ない術後経時的にシナプス関連物質であるnoradrenaline (NA), serotonin(5HT), acetylcholine 分解酵素であるacetylcholine esterase(AChE)活性を計測する事により，生化学的な面から中枢神経組織に変性→再生機構が働いている可能性を報告した[15]。中枢神経損傷を受けた時，幼若動物は成熟動物に比べ，あまり大きな欠陥を残さずに回復する事を我々はよく経験する。幼若な中枢神経組織には代償機構がより多く働いていると考えられる。今回我々は，出生直後のラットに大脳半球摘除を行ない，残存神経組織のNA, 5HT含量，AchE 活性，粗シナプトゾームへのNA, 5HT の取り込み，glyoxylic acid (GA)を利用したカテコールアミンの組織化学検索により，半球摘除残存中枢神経組織でアミンニューロンの変化を認めた。

1, NA含量は術後2～3ヶ月で脳幹部及び小脳で増加，視床下部で減少していた。2, 5HT 含量は術後3ヶ月で視床下部で増加し，他の部位では大きな変化はみられなかった。3, 脳幹部で ^{3}H-NAの粗シナプトゾーム分画への取り込みの増加を認めた。4, GA による組織化学で小脳皮質，脳橋で螢光物質の蓄積を認めた。以上の所見は大脳半球摘除により，脳幹部及び小脳に於てNAニューロンのcollateral accumulation又は，collateral sproutingがひきおこされたことを示す所見と考えた。

I 実験方法及び測定方法

実験動物として，生後24時間以内のWistar ratを無麻酔下に開頭し，右大脳半球を吸引摘除。止血後頭皮を縫合した。手術したラットは8～12匹ずつ母親の所へもどし母親に飼育させた。術後1ヶ月で母親と別のケージに移し，飼料及び水分は自由に与え，自然光のもとで飼育した。術後2，3，5ヶ月後に生化学的検索に供した。試料の採取は日内変動を考慮して午後2～4時の間にエーテル麻酔下で断頭した。脳の測定部位は，ほぼGlowinski and Iversen の方法[2]に従がって左大脳皮質，視床下部，尾状核＋被殻，小脳，脳幹部，延髄＋上部頸髄，胸腰髄に分画した。

AchE活性はEllman 5[5]のthiocholine 法を用い，NA, 5HT含量はCox5[2]の螢光比色法に従がった。^{3}H-NA, ^{3}H-5HTの粗シナプトゾームへの取り込みはLogan and Snyder[10]の方法に従がい，組織を10倍又は20倍の0.32M蔗糖溶液中でホモゲナイズし，低速遠心によって核分画を除いた上清を材料とした。各々高親和性取り込みのある10^{-7}～10^{-8}M間の2～3点で取り込みを調べた。Km 及びVmax をグラフより求め比較した。各々の検索値の有意差検定にはStudent's t 検定を行なった。GAによるカテコールアミンの組織化学は生後3ヶ月及び術後3ヶ月のラットにnialamide 200 mg/kg 腹腔内投与2時間後，ネンブタール40 mg/kg 麻酔下で開胸。左心室にHGアトム針を刺し，右心耳を切開。95% O_2: 5% CO_2 飽和 2% GA/pH 7.4 Krebs-Ringer炭酸塩緩衝液を灌流した。以下はde la Torre 5[4]の方法に準じ，灌流後すぐ断頭し脳幹部及び小脳を冠状及び矢状断し，組織を凍結固定。クリオスタットで切片を作製。2% GA/pH 7.4 Krebs-Ringer炭酸塩緩衝液中に浸し，過剰の液を除去後エアードライヤーで乾燥。80℃ hot

plate 上で6分30秒加熱した。Nikon 螢光顕微鏡 HBO-50で Kodak Tri-X フィルムを使用し連続撮影した。

II 結果

a) AchE 活性（表1）：左右脳幹部で術後3ヶ月で対照に比べ増加傾向を認めたが有意の差は得られなかった。その他の測定部位では対照と差異は認めなかった。

AChE Activity in Various Regions of the Central Nervous System of 3 Month Old Rat Hemispherectomized Neonatally (μmole hydrolysed/min/g wet weight)

	Control (n=5)	Hemispherectomy (n=7)
Left cerebral cortex	7.71 ± 1.59	7.69 ± 1.03
Left caudate-putamen	18.51 ± 3.66	17.69 ± 3.59
Hypothalamus	8.70 ± 1.26	8.47 ± 2.77
Cerebellum	2.91 ± 0.68	2.56 ± 0.54
Left brain stem	8.41 ± 1.23	9.05 ± 0.83
Right brain stem	8.65 ± 0.89	9.26 ± 1.30
Medulla oblongata	5.01 ± 0.81	5.52 ± 1.25

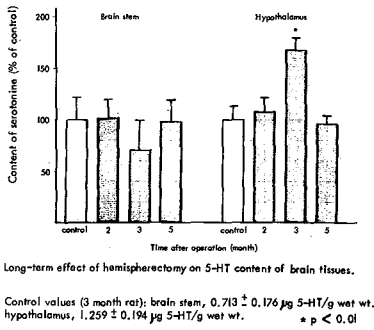
表1

b) NA, 5HT 含量（図2,3）：1)視床下部：NAは術後2，3ヶ月で，生後3ヶ月の対照に比べ減少傾向を示したが統計的有意差は認めず，5ヶ月で有意の減少を認めた。一方5HTは術後3ヶ月で有意の増加を認めた。

2)脳幹部：NAに著明な変化を認め，術後2ヶ月で161.2%，3ヶ月で210.8%に増加していたが，5ヶ月で対照の値に復した。5HTは術後3ヶ月で減少傾向を示したが有意差は認めず，他の計測点でも差異は認めなかった。

3)小脳：NAは術後2ヶ月で増加傾向を示し，3ヶ月で200%に増加していた。5ヶ月では減少傾向を認めた。他の計測部位では対照と差異はなかった。

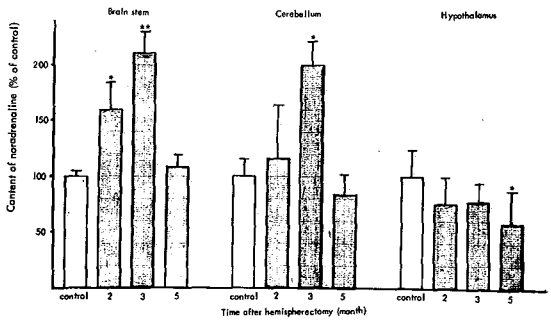
c)粗シナプトゾーム への取り込み（表4）：^{3}H-NA，^{3}H-5HT の粗シナプトゾームへの取り込みを，NA，5HT含量に有意差を認めた脳幹部及び視床下部で，術後3ヶ月に検索し，脳幹部で^{3}H-NA の取り込みが各濃度で138%～154.8%と対照に比べ有意の増加を示すことを認めた。視床下部で^{3}H-5HT の取り込みは増加傾向を示したが有意差は得られなかった。^{3}H-NA の脳幹部粗シナプトゾームへの取り込みの Km をグラフより求めると（図5），対照 $2.01 \pm 0.31 \times 10^{-7}$，半球摘除 $2.04 \pm 0.35 \times 10^{-7}$ と両者に差は認めず，一方 Vmax は，対照 0.452 ± 0.069 mμ mole of NA/g pellet/4 min. 半球摘除 0.836 ± 0.092 mμ mole of NA/g pellet/4 min. と著しい差を認めた。



Long-term effect of hemispherectomy on 5-HT content of brain tissues.

Control values (3 month rat): brain stem, 0.713 ± 0.176 μg 5-HT/g wet wt. hypothalamus, 1.259 ± 0.194 μg 5-HT/g wet wt. * $p < 0.01$

図2



Long-term effect of hemispherectomy on NA content of various regions of rat central nervous system. Control values (3 month rat): brain stem, 0.415 ± 0.021 μg NA/g wet wt, cerebellum 0.172 ± 0.029 and hypothalamus, 2.070 ± 0.578. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図3

d)組織化学：半球摘除群，対照群ともNA含量に増加のみられた脳幹部，小脳を中心に検索した。大脳半球摘除のされ方に多少違いがある為，結果にばらつきはあるが，

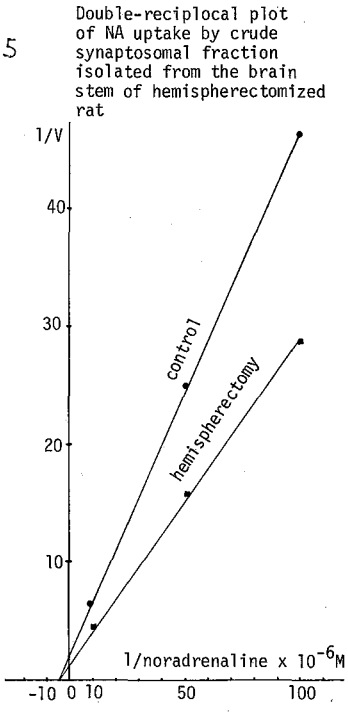
Uptake of ^{3}H-NA and ^{3}H-5-HT into the Crude Synaptosomal Fraction from the Brain Stem of Hemispherectomized Rats 3 months after the Operation (mμmole/g pellet/4 min, mean ± S.D.)

		Brain stem		Hypothalamus	
		Control (n=6)	Hemispherectomy (n=7)	Control (n=6)	Hemispherectomy (n=5)
NA	1.0×10^{-7}M	0.160 ± 0.036	0.221 ± 0.014*	0.458 ± 0.089	0.473 ± 0.112
	2.0×10^{-8}M	0.042 ± 0.007	0.065 ± 0.006**		
	1.0×10^{-8}M	0.022 ± 0.002	0.033 ± 0.004**	0.049 ± 0.009	0.056 ± 0.016
5-HT	1.0×10^{-7}M	1.255 ± 0.099	0.898 ± 0.331	1.794 ± 0.233	2.149 ± 0.727
	2.0×10^{-8}M	0.252 ± 0.042	0.239 ± 0.042		
	1.0×10^{-8}M	0.133 ± 0.034	0.135 ± 0.033	0.193 ± 0.031	0.219 ± 0.049

* $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

表4

図5



半球摘除側の A_9, A_{10}[3] の細胞体は著しくその数が減少し，代りに substantia nigra pars lateralis に著明な螢光物質の蓄積を認めた。半球摘除群の dorsal tegmental bundle[12] は両側とも螢光が減少していた。しかし A_6[3] では螢光の強さ，細胞体の大きさ，核の偏在等に対照群と差は認めず，半球摘除群の左右の A_6 の間にも差は認めなかった。脳橋で nucleus tractus spinalis trigemini, nucleus originis nervi trigemini で螢光物質の蓄積を認めた。小脳皮質では分子層に螢光物質が増加している印象を受けた。

III 考察

NA の主含有核である locus coeruleus では，ラット人胎生13～14日に組織化学的に NA 含有細胞が認められ，[11] 生後12～14日まで分裂をつづける。それらの神経終末は，視床下部，大脳皮質，線状体，小脳に胎生16～18日ですでに認められるが，[9] 主に生後発達し，3週目までが最も著明である。[9] 一般に幼若な中枢神経に損傷が加わると，その軸索は逆行変性に陥り，時には細胞体も含めて，多くは消失する。従って損傷時に影響を受けなかった神経細胞，又は分化していなかった神経芽細胞より新たな軸索の新生が起こり，成熟した中枢神経の場合は，損傷された軸索より再生されるという報告がある。[16]

本実験で出生直後に右大脳半球摘除されたラット残存中枢神経組織をみると一匹一匹多少の違いはあるが，中脳より吻側では視床の一部，視床下部，大脳正中部にある大脳辺縁系の一部を残してすべて摘除されていた。従って NA，5HT の上行路は medial forebrain bundle を一部含めて，その神経終末は，右側では，ほとんど摘除されたと考えられる。術後，主に脳幹部で NA，5HT 含量の増減がみられ，他に小脳，視床下部に於て統計的に有意差のある動きがみられた。脳幹部の NA 含量は，術後2～3ヶ月で有意の増加を示し，粗シナプトソームへの ^{3}H-NA の取り込みも3ヶ月の点で，NA の各濃度で有意の増加を示していた。半球摘除，対照の Km に変化はなく，V_{max} は半球摘除で有意の増加を示した。従って NA に対する神経終末での取り込み

様式には変化なく，恐らく取り込む場所の増加を示すものと考えた。小脳に於ても，術後2，3ヶ月で含量の増加がみられるが，これも同様のことを意味しているものと思える。組織化学でも脳橋，小脳皮質で上記の所見を支持すると思われる所見が得られた。

NA ニューロンに対する神経毒である 6-hydroxydopamine，又は 6-hydroxydopa を生後一定期間内に投与すると5週～13ヶ月後には NA 含量及び ^{3}H-NA のシナプトゾーム への取り込みが脳幹部及び小脳で増加することが報告されている。[8,13] 組織化学でも上記の所見が証明されており，[8] collateral accumulation 又は collateral sprouting と考えられる。我々の結果も同様の事実を示す所見と考えられる。

術後2～3ヶ月で増加を示した脳幹部及び小脳の NA 含量は5ヶ月では対照と同値にもどっていた。これは損傷初期に過剰のシナプスが作られ，発育途上で直接脳の機能又は環境に合した有用なものだけ選択的に結合を強め，不用のものは退化してゆく為とも推測される。

一方 AchE 活性は，必ずしもコリン作動性ニューロンの活性を示す最もよい示標ではないが，術後3ヶ月で測定した各部位で対照と有意差は得られないが，左右脳幹部で軽度の増加を示した。locus coeruleus は NA を含有しているのみならず AchE 活性も高い。[12] 上記の所見は NA ニューロンの変化による二次的変化とも考えられる。

前回我々は生後6ヶ月の成熟ラットに右大脳半球摘除を施行。NA，5HT 含量は左大脳皮質，視床下部，脳幹部，小脳とも術後2週，1ヶ月では対照に比べ減少。術後6ヶ月でそれぞれ対照と同値又は増加がみられた。[17] シナプトゾームへの取り込みも同様の結果が得られた。特に脳幹部，小脳に於て両者とも統計的有意差がみられた。NA ニューロンに関しては今回の幼若ラットの成績と同じ傾向を示したが，5HT ニューロンは成熟ラットで前記の様に可塑性を示唆する所見が得られたにかかわらず，幼若ラットでは視床下部の 5HT 含量が術後3ヶ月で増加したのみで，粗シナプトゾームへの取り込みには有意差はなく 5HT の accumulation のみを示す所見と考えた。AchE についても同様に成熟ラットの脳幹部で術後1～6ヶ月に可塑性を示唆する所見がみられた[15]が，幼若ラットでは各部位で大きな変化はみられなかった。一般に幼若動物の方が機能的には代償機能が強いと考えられているが，我々の生化学的所見からはむしろ逆の印象を与える。一つには測定された時間的な問題があず考えられる。次いで collateral sprouting は脳の機能面と無関係である可能性，[16] 又先に触れた幼若中枢神経と成熟中枢神経の損傷に対する修復過程の違い[16]が関係している可能性がある。

1.Björklund A. & Stenevi U.(1972)Science, 175, 1251 2.Cox R.H.Jr. & Perhach J.L.Jr.(1973)J.Neurochem, 20, 1777 3.Dahlström A. & Fuke K.(1964)Acta.physiol.scand.(suppl), 232, 1 4.de la Torre J.C. & Surgeon J. W.(1976)Histochemistry, 49, 81 5.Ellman G.L. et.al.(1961) Biochem.pharmacol., 7, 88 6.Glowinski J. & Iversen L.L.(1966)J.Neurochem., 13, 655 7.橋本寿之 他(1977)解剖学の雑誌,52, 75 8.Jonsson G. et.al.(1974) J.Neurochem., 22, 419 9.Loizou L.A.(1972)Brain Res.,40, 395 10.Logan W.J. & Snyder S.H.(1971)Nature, 234, 297 11.前田敏博・清水信夫(1978)脳神経,30, 235 12.Palkovitz M. & Jacobowitz D.M.(1974)J.comp.Neur.,157, 29 13.Sachs C. & Jonsson G.(1975)Brain Res.,99, 277 14.Stenevi V. et.al.(1973)Brain Behav.Evol., 8, 110 15.外山 多(1974)神経化学,13, 194 16.Windle W.F.(1956)Physiol.Rev.,36, 427

62 ラット脳の外套，小脳，脳幹の可溶性蛋白質の発育過程における組成変化・二次元電気泳動による分析

吉田　豊・高橋康夫
(新大・脳研・神経薬理)

〔要　約〕

ラット脳の3部位(外套、小脳、脳幹)の可溶性蛋白質の発育過程における組成変化をO'Farrellの二次元電気泳動法により分析した。この電気泳動法により可溶性蛋白質は100-150個のスポットとして分離され再現性も良好であった。多くのポリペプチド・スポットのうち量的な比較が容易な35個の主要なスポットについてその発育過程における変化を調べた。35個の主要ポリペプチドのうち大半は3部位に共通に存在したが、いくつかのものは特定の部位にしか見出されなかった。主要ポリペプチドのうち約半数はいずれの部位においても発育過程で同様な量的変化を示した。一方残りの半数のポリペプチドは各部位で特徴的な量的変化を示した。したがって3部位の電気泳動像は調べた発育過程の各時期で明らかに異っていた。しかし胎児(16-17日)では、新生児以降に比べ相似性が高く、電気泳動像の相違は主に生後に生じることを示した。さらに分離検出された全ポリペプチド・スポットの数は3部位において生後顕著に増加し、可溶性蛋白質の成分が生後複雑になることを示唆した。

脳の可溶性蛋白質の発育過程における組成変化はこれまでにも、等電点電気泳動、disc-電気泳動、SDS-電気泳動等の方法で電気泳動的に分析されてきた。しかし、これらの方法は脳の可溶性蛋白質のような非常に複雑な蛋白質の混合物を分析するには分離能が不十分であり、得られた結果は断片的なものにすぎなかった。最近O'Farrellによって発表された(2)、二次元電気泳動法は一次元目にポリアクリルアミド・ゲル中での等電点電気泳動(IEF)、二次元目にSDS-平板ゲル電気泳動を用いたもので、これまでの電気泳動法に比べ非常に高い分離能を有し、複雑な蛋白質の混合物の分析に特に有用である。本研究では、この二次元電気泳動法をラット脳の3部位(外套、小脳及び脳幹)の可溶性蛋白質の発育過程における組成変化の分析に用いた。特に可溶性蛋白質を対象とした理由は、i)可溶性蛋白質の調製が容易なこと、ii)可溶性蛋白質がこの電気泳動法により、極めて良く分離され、かつ再現性も高いことからである。

実験方法

1. 実験動物　以下の発育段階のWistar系ラットを用いた。胎児(16-17日)、新生児(1日)、幼若ラット(10日)、成熟ラット(3ヶ月)。

2. 電気泳動用試料の調製　ラットを断頭後olfactory lobeを除く全脳を取り出し、抽出用緩衝液(0.32M sucrose、20mM Tris-HCl、pH 7.4)で洗浄後、血液髄膜等を取り除き、外套(cerebral mantle)、小脳、脳幹の3部位に分けた。各組織を5倍量の抽出用緩衝液中でhomogenateとした。homogenateを105,000×g 90min. 遠心分離して得られた上清を可溶性蛋白質画分とした。以上の操作は全て0-4℃で行った。可溶性蛋白質画分の蛋白質濃度は牛血清アルブミンを標準としてLowry法により決定した。得られた蛋白質画分は蛋白質の変質を避

けるため、調製後直ちに「lysis buffer」(9.5M urea, 2.0%(w/v) Nonidet P-40, 5.0%(v/v) 2-mercaptoethanol 2.0%(w/v) Ampholine (LKB社, 1.6% pH range 5-7, 0.4% pH range 3-10))により 1:1 に希釈し、尿素を9.5Mになるように加え、尿素溶解後直ぐに −80°C で凍結保存した。

血液蛋白質の混入の程度を知るために、0.15M NaCl で cardiac perfusion により洗浄した成熟ラットの脳から試料を調製した。また蛋白質分解酵素による分解が起きていないことを知るため 0.4mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む抽出用緩衝液で試料を調製したが、電気泳動像はPMSF非存在下で調製したものと同一であった。

3. 二次元電気泳動　二次元電気泳動は O'Farrell により記載された方法(2)に若干の変更を加えて行った。一次元目の等電点電気泳動(IEF)は O'Farrell の用いたガラス管(2.5×130mm)より内径の大きいもの(4.0×130mm)を用いた。この変更により 200μg までの蛋白質を分離能の低下を起こさずにアプライできた。一次元目の IEF は 400V×12hr. さらに 800V×1hr. 通電した。IEF ゲルは通電終了後直ちに「SDS-sample buffer」(10%(v/v) glycerol, 5%(v/v) 2-mercaptoethanol 2.3%(w/v) SDS, 0.0625M Tris-HCl, pH 6.8) 中で 60min. 室温で平衡化後直ぐに −80°C で凍結保存した。IEF ゲルの pH 勾配を測定する場合、通電終了後のゲルを 10mm 切片にし、2ml の 9.2M urea 中で 2 hr. 室温放置後、pH メーターにより測定した。

二次元目の SDS-平板ゲル電気泳動は分離用ゲルとして 10% acrylamide ゲルを用いた。凍結保存しておいた IEF ゲルを室温で解凍後、O'Farrell の方法に従い二次元目の平板ゲルにアプライし、20mA で BPB の先端がゲルの底に達するまで泳動した。蛋白質の染色は Coomassie Brilliant Blue R-250 を用い O'Farrell の方法に従った。分離された蛋白質の分子量は bovine serum albumin, ovalbumin, γ-globulin を分子量マーカーとして用いて決定した。

実験結果

分離検出されたポリペプチド・スポットの数は3部位のいずれでも、胎児(16-17日)及び新生児において 100-120個であり、幼若及び成熟ラットでは 140-150個であった。この数の増加は可溶性蛋白質がいずれの部位においても生後成分が増し複雑なものになることを示唆する。

多くのスポットのうち我々はスポット・サイズが大きく、濃く染色された35個のポリペプチド・スポットについてその発育過程における量的変化を調べた。これらの主要ポリペプチドの量的変化は視覚的に容易に知ることができるからである。Fig.1 にこれらの35個の主要ポリペプチド・スポットを図示した。このうちスポット 1-32は3部位に共通して存在するものであり、スポット 33及び34は主に脳幹にしかみられず、スポット 35は小脳にしかみられなかった。Fig.1 に IEF ゲルの pH 勾配が示してあるが、この pH 値から分離されたポリペプチドの pI 値を正確に決定できないことに注意してほしい。高濃度に存在する尿素(9.5M)が、IEF ゲルの pH 値及びポリペプチドの pI 値を変化させている可能性があるからである。

血液からの混入蛋白質　血液からの混入蛋白質を同定するため、0.15M NaCl で cardiac perfusion により洗浄した成熟ラットの小脳から試料を調製し、電気泳動像を灌流しないものと比較したところ、スポット 9 (Fig.1) のみが著しく減少した。スポット 9 はラットの血清アルブミンと同一の位置に泳動されることから、血清アルブミンと同定された。この結果は血液からの混入蛋白質はアルブミン以外には無視できることを示す。

3部位で同様な量的変化を示すポリペプチド　35個の主要ポリペプチドのうち約半数はいずれの部位でも同様な量的変化を示した(Fig.2)。このようなポリペプチドを表1にまとめた。

部位別に異った量的変化を示すポリペプチド　他の半数は部位により特徴的な量的変化を示した(表2)。スポット20及び21はShelanski et al(4)の方法により精製したラット脳tubulinのα-, β-subunitと同じ位置に泳動し、かつ2mM vinblastinを可溶性蛋白質画分に加えることにより消失したことから、それぞれα-, β-tubulin subunitと同定された。β-subunit(スポット21)は成熟ラットではいずれの部位でも、0.06-0.07 pH単位酸性側に移動していた(Fig.2)。この結果はGozes & Litteur(1)の報告に一致する。スポット25は濃度、pI値、分子量からactinと考えられる。スポット33-35のポリペプチドはある特定の部位にしかみられず特に興味深い。

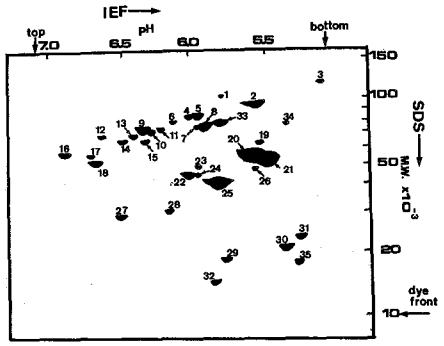


Fig.1 異った発育段階のラット脳の3部位(外套、小脳、脳幹)の可溶性蛋白質の二次元電気泳動像にみられる主要ポリペプチド。

再現性　脳幹の胎児から成熟ラットまでの4種の試料を2回にわけて電気泳動したところ、個々のポリペプチドのIEF方向の位置に少し異動があったものの、発育過程での量的変化は同一であった。また成熟ラットの小脳から数回試料を調製し同時に泳動したところ、電気泳動像はほとんど同じであった。以上の実験は我々の結果が再現性あることを十分に示していると考えられる。

表1. 部位にかかわらず発育過程で同様な量的変化をするポリペプチド

スポットNo	発育過程における量的変化
1	胎児、新生児、成熟ラットで同濃度、幼若ラットで一時的に増加する。
4-6	胎児で高濃度。生後急速に減少して成熟ラットでは消失。
7.27.28	しだいに増加する。
8.13.19	ほとんど変化せず。
14	幼若ラットまでほとんど変化せず成熟ラットで減少する。
18	幼若ラットまでほとんど変化せず成熟ラットで増加する。
22	新生児で一時的に減少するが幼若ラットまで大きな変化せず成熟ラットで非常に増加する。
23	幼若ラット以後に同濃度存在。新生児までは低濃度
24	成熟ラットで非常に増加。幼若ラットまでは低濃度。

表2. 部位により発育過程で特徴的な量的変化をするポリペプチド

スポットNo	発育過程における量的変化
2	小脳、脳幹ではほとんど変化せず。外套では新生児において一時的に減少する。
3	外套で胎児、新生児、幼若ラットに出現するが、小脳で新生児、幼若ラット、脳幹で胎児、新生児にしか出現しない。
10.11	外套でほとんど変化せず。小脳で除々に減少。脳幹で幼若ラットまで変わらず成熟ラットで減少する。
12	外套で脳幹で幼若ラットまで変わらず成熟ラットで非常に増加する。小脳では幼若ラットですでに増加する。
15	外套、脳幹で幼若ラットまで増加。小脳では除々に減少。いずれの部位も成熟ラットで消失。
16	外套でほとんど変化せず。小脳、脳幹で幼若ラットまで変わらず、成熟ラットで非常に減少する。
17	外套、脳幹ではほとんど変化せず。小脳では幼若ラットまで変わらず成熟ラットで消失する。
20.21	tubulinサブユニット(20-α, 21-β)。小脳、脳幹で幼若ラットまで変わらず成熟ラットで減少。外套ではほとんど変化しない。
25	actinと考えられる。小脳、脳幹で幼若ラットまで変わらず成熟ラットで減少。外套では新生児で減少して以後変わらず。
26	外套、脳幹で新生児以前にはほとんど無く幼若ラットで増加し成熟ラットでさらに増す。小脳で幼若ラットまでほとんど無く成熟ラットで非常に増加する。
29	外套、脳幹で大きな変化なく、小脳では幼若ラットまで大きな変化なく成熟ラットで減少する。
30	外套、脳幹では幼若ラットで増加し以後変わらず。小脳でも同様だが成熟ラットでさらに増加する。
31	外套、脳幹ではほとんど変わらず。小脳で幼若ラットまで変わらず成熟ラットではかなり減少する。
32	幼若、成熟ラットで、外套において他の部位より明らかに濃度が高い。
33	脳幹に特異的。胎児にしかみられない。
34	他の部位にも低濃度で存在するが脳幹に特に多い。幼若ラット、成熟ラットに存在し新生児以前にはほとんど無い。
35	小脳に特異的。幼若ラットで出現し成熟ラットで非常に増加する。

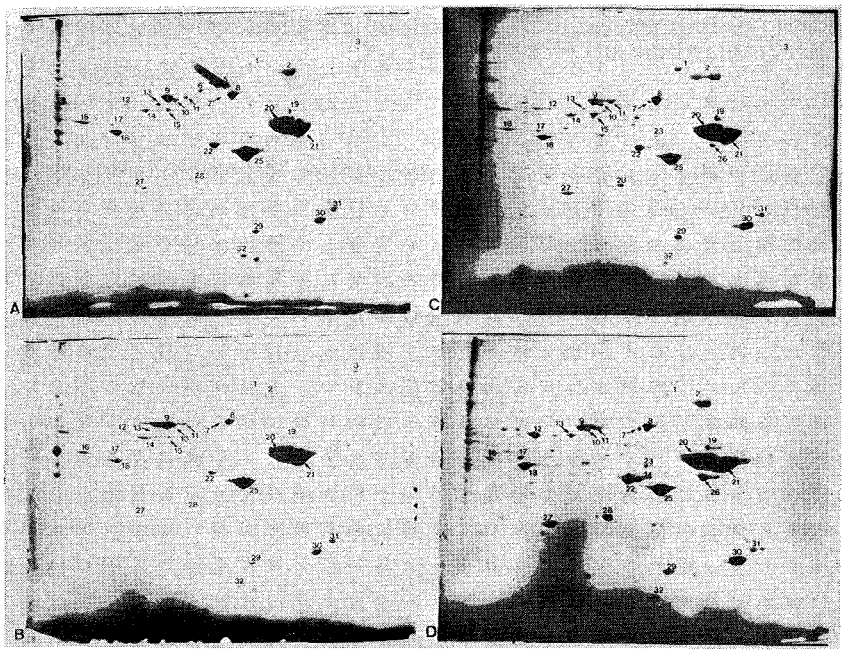


Fig.2. 外套可溶性蛋白質の二次元電気泳動像. A. 胎児(16-17日) B. 新生児(1日) C. 幼若ラット(10日) D. 成熟ラット(3ヶ月). 全て160μgの蛋白質をアプライした。小脳、脳幹の二次元電気泳動像はスペースの都合で割愛した。

考察

O'Farrellの二次元電気泳動法を用いることにより、可溶性蛋白質は非常に良く分離され、これまでの一次元の電気泳動法では明瞭ではなかった脳可溶性蛋白質の発育過程における組成変化が詳細な点で明らかになった。但し注意しなければならないのは、一次元目のIEFのpH rangeが5-7と狭く、それ以外のpIを持つポリペプチドが分離されていないことである。これらのポリペプチドは種類も量も少ないと思われるが、最近発表されたnonequilibrium pH gradient electrophoresis(3)を一次元目に用いれば同時に分離できるであろう。35個の主要ポリペプチドのうち約半数は部位によらず量的変化が同様であった。これらのポリペプチドは部位の構造機能の分化には関らない基本的な機能を持つものかもしれない。他の半数は部位により特徴的な変化をみせ、結局各部位の電気泳動像は全ての時期で異っていた。しかし胎児での各部位のそれは新生児以降に比べ明らかに相似性が高く、各部位の電気泳動像、即ち可溶性蛋白質の組成の相違は、主に生後に生じることを示した。このことはニューロン突起の成長、グリアの分裂、ミエリン化など中枢神経系の細胞の特異性を決定する変化がラットでは主に生後に起こりかつこれらの変化が部位により異ることを反映していると考えられる。

文献

1. Gozes, I., and Littauer, U.Z. (1978) Nature 276. 411-413
2. O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250. 4007-4021
3. O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., and O'Farrell, P.H. (1977) Cell, 12. 1133-1142
4. Shelanski, M.L., Gaskin, F., and Cantor, C.R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70 765-768

63 網膜内ドーパミン作働性ニューロンの成長過程に関する蛍光組織化学的研究・正常および遺伝盲動物における比較検討を中心として

加藤　聖・根岸晃六
(金大・医・神経情報研)

〔要　約〕

蛍光組織学的方法を用い、新生ラットをdiurnal lighting (LD)、reversed lighting (DL)、constant lighting (LL)、continuous dark (DD) の四群に分け飼育し、網膜内ドーパミン含有細胞（DA-cells）の生後発育を検索した。上記いずれの群においても、生後10～11日目ではじめて、弱い黄緑色の蛍光をもったDA-cellsの細胞体がアマクリン細胞層にごく少数観察できた。その後次第に細胞体の数は増し、14～15日で一定数に達した。また、開眼（14日前後）を境として、LD、DL、LL群のDA蛍光はますます増強し、16～17日目にはその突起にもDA蛍光が観察できた。その後さらに蛍光は強度を増し、また突起の数も増加し、4～6週令ではほぼ成熟タイプの像（豊富な突起を内網状層に側性にのばしたDA-cells）を呈した。一方、DD群ラットでは細胞体突起の蛍光も弱く、また突起の発育もやや貧弱のように見え、明らかに光環境飼育群とは異なった成長パターンを呈した。次いで、photoreceptor cellを欠落した遺伝盲C3Hマウスで同様の実験を行なったが、DA-cellsの出現は細胞体突起ともに、ラットのそれより1～2日早く、またその後のDA-cellsの成長パターンにはいずれの飼育群にても差異はなく、ラットLD、LL群とDD群の間で見られた特徴ある蛍光像の差は、C3Hマウスでは観察できなかった。これらの結果より、網膜DA-cellsでのDA合成の開始には光は直接的な影響をもたず、その後の正常な発育成長にはphotoreceptor cellを介した光の受容が必要なのであろうと思われる。

脊椎動物網膜には汎くドーパミン含有細胞（DA-cells）の存在が知られている。Falck-Hillarp組織蛍光法によれば、その細胞体は内顆粒層の最内側、アマクリン細胞層に位置し、豊富な突起を内網状層にのばしている（1、2）。その細胞数については全アマクリン細胞の3～5％と云われている。DA-cellsの機能的意義については、すでに魚類網膜を用いたHedden & Dowling (3)、根岸ら（8、9）の電気生理学的研究が報告されている。一方、最近Iuvoneら（4）により、ラット網膜においてDA生合成の律速酵素であるチロジン水素化酵素/（T-OH）が光により活性化され、DA含量も増加することが見いだされた。しかしながら、網膜DA-cellsの発生成長に関する研究は未だ皆無であり、わずかにDA-sensitive adenylate cyclaseの生後発育についての神経化学的研究があるにすぎない（6）。そこで今回我々は、新生ラットを種々の光環境下で飼育し、それぞれの条件下でのDA-cellsの発育成長過程を蛍光組織学的方法をもちい、とらえるとともに、同様な実験を遺伝盲であるC3Hマウス（photoreceptor cell欠除網膜）で行ない比較検討した。

実験方法

動物　Wistar系白色ラットおよびC3H strainマウスを使用した。なおC3Hマウスに対する対照としては、DBAマウスを使用した。妊娠後期のラットとマウスを購入し、正常なlight-dark cycle（LD 12：12）で飼育し、出生後直ちに母親と共に仔を1）正常light-dark（LD）、2）reversed light-dark（DL）、3）持続的light（LL）、4）暗室（DD）条件下の四群に分けそれぞれプラスチックケージの中で0～8週にわたり飼育した。発育条件を一定にするため、仔の数をラットでは8～10匹に、マウスでは6～8匹に限り実験に供した。仔の体重増加パターンや開眼時期にはいずれの光条件下で飼育しても

差異はなく、ラット、マウスともに開眼は生後13～14日目であった。なお生後4週にて母親との離乳を行なった。光の条件は暗室を除き、白色蛍光燈のもとに飼育した(300～400 luxケージ内)。頸椎脱臼により仔を死亡せしめ、眼球を摘出した後、眼球前半部を除去し眼杯標本を作製した。なお手術はすべて1：30 pm に行なった。暗室での操作は、すべて写真の安全燈下で行ない、各飼育室は室温21°C前後に保った。

組織学的方法　DA-cellsの蛍光組織法としては、Falck-Hillarp 原法による高温のホルムアルデヒドガスを用いる方法ではなく、アルデヒド＋高張庶糖溶液を用いるFGS法(5、7)に拠った。種々の発育時期での網膜眼杯標本を上記固定液にて、固定し一晩放置した後凍結し、コールドトームで厚さ18 μ に縦断し、その連続切片を作製して透過型蛍光顕微鏡(Olympus BH型)により観察した。

実験結果

1．ラット

LD条件下：生後10日目ではじめて弱い黄緑色の蛍光をもったDA-cellsの細胞体のみがアマクリン細胞層にきわめて少数(2～4個／全切片中)出現した。その後2～3日経過すると、殆どすべての切片に0～4個／1切片中見い出された。この細胞数はその後増加せず一定であった。一方、DA-cellsの蛍光強度は開眼とともに増加し、生後16～17日目ではじめてその突起も見られるようになった。その後蛍光は細胞体、突起ともに増強し、また突起の数も増加し4週令でほぼ成熟ラットと同じ像を呈した。また連続切片の作製により全網膜野のDA-cellsのサンプリングを行なったが、網膜各領野における形態学的差異(特に蛍光強度)は特に見い出せなかった。ただ、細胞体の数については各切片まちまちであった。DL条件下：昼夜を逆転して飼育してもnormal LD ラットの場合と結果は同じであった。生後10～11日目で、弱い蛍光をもった細胞体(DA-cells)が出現した。LL条件下：LLラットにおいても、DA-cellsは生後10～11日目で出現し、16～17日目で突起が出現し、4週令で成熟型に達した。以上LD、DLおよびLL群ラットのDA-cellsの成長パターンの間には4週の時点では有意の差異は見い出せなかった。DD条件下：暗室で飼育したラットのDA-cellsでは、細胞体や突起の出現時期は上記の3種の光環境群と同じであったが、その後の蛍光強度の増加は遅延し、8週令においてもなお光環境群と比較し弱い蛍光像を呈した。DDに見られる特徴あるDA-cellsの蛍光像は、仔ラットと同様、成熟ラットを2～4週DD条件下に飼育しても見られた。LDとDD条件の相互変換の影響：生後4週令までLD下で飼育した仔ラット群の半数をLDからDDに移し、残り半数をそのままLD下で飼育、一方、4週令DDラット群の半数をDDからLDに移し、残り半数をそのままDD下に1～3日間飼育し、それぞれのDA-cellsを観察すると、DD環境下に移されたLDラットのDA-cellsは、明らかに対照のLDラットのそれと比して蛍光の減弱を招来し、一方、LD環境下に移されたDDラットでは、対照のDDラットに比し、明らかにDA蛍光を増加した。

2．遺伝盲 C3H マウス

C3H マウスの実験に先立ち、正常網膜をもつDBAマウスをLDおよびDD環境下で飼育すると、ラットの場合と同様DD群マウスのDA-cellsの蛍光が有意に減弱した。次いで新生C3HマウスをLD、LLおよびDDの三群に分け飼育し、ラット同様そのDA-cellsの発育成長過程を観察した。いずれの群でもDA-cellsはラットの場合より、1～2日早く出現

し、細胞体は8～9日令、また突起は13～14日令で観察できるようになった。H-E染色で見る限り、生後13～14日までphotoreceptor層は存在したが、その後急速に変性脱落し、3週令ではいずれの飼育群でもphotoreceptor層は消失していた。一方、DA-cellsでは3週令までその蛍光は次第に増強したが、photoreceptor欠落後は、細胞体の蛍光は殆ど増加せず、わずかに突起の数が増加するにとどまり、ほぼ一定のレベルに到達し、8週令まで追跡するも変わらなかった。またLD、LLおよびDD群での発育パターンに著明な差異は見られず、ラットとは様相を異にした。また、成熟C3HマウスをDD環境下に3～4週飼育しても、何らDA-cellsの蛍光に変化はなかった。

考察

新生ラットを種々の光条件（LD、DL、LLおよびDD）で飼育し、網膜内DA-cellsを蛍光顕微鏡下で観察した。DA-cellsの最初の出現時期はほぼ生後10日前後であり、いずれの飼育群でも同じであった。また開眼（生後14日前後）を契機としてDA-cellsの蛍光は次第に増強し、内網状層におけるDA-cellsのシナプトゲネーシスもこのころに完成されるように思われた。しかしDD群では、DA-cellsの蛍光は8週令においてもなお光環境群と比較し未発達のように思われた。一方、発育初期にphotoreceptorを欠落するC3HマウスではいずれのDA-cellsの出現は、ラットより1～2日早く、photoreceptor変性脱落後も若干の蛍光の増加をきたし、ある一定レベルの蛍光強度に落ち着いた。しかも、その蛍光強度は、ラットや正常DBAマウスのDD群で見られる弱い蛍光像より明らかに増加していた。以上のラットおよび遺伝盲C3Hマウスの結果より網膜内DA-cellsにおけるDA合成の起始は光とは無関係に決定され、恐らくは遺伝的にプログラムされているものと思われる。しかしながら、その後の正常なDA-cellsの発育成長にはphotoreceptor cellを介したシナプス活動に基づく光の受容が必要なのであろう。

参考文献

1) Ehinger, B. (1976) In: Transmitters in the visual process (S. L. Bonting, ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 145～163.

2) Häggendal, J., and Malmfors, T. (1965) Acta Physiol. Scand. 64: 58～66.

3) Hedden, W. L., and Dowling, J. E. (1978) Proc. Roy. Soc. Lond. B., 201: 27～55.

4) Iuvone, P. M., Galli, C. L., Garrison-Gund, C. K., and Neff, N. H. (1978) Science 202: 901～902.

5) Kato, S., Nakamura, T., and Negishi, K. (1979) J. Comp. Neurol. (in press).

6) Makman, M. H., Brown, J. H., and Mishra, R. K. (1975) In: Advances in Cyclic Nucleotide Res. (G. I. Drumond, P. Greengard, and G. A. Robison, eds.) Raven Press, New York, Vol. 5, pp. 661～679.

7) Nakamura, T. (1979) Acta Histochem. Cytochem. 12: 182.

8) Negishi, K., and Drujan, B. D. (1979) Neurochem. Res. (in press).

9) Negishi, K., and Drujan, B. D. (1978) Sensory Processes 2: 388～395.

64 ヒヨコ網膜の発育に及ぼす光遮断の影響

高坂新一・高松　研・御子紫克彦
塚田裕三　（慶大・医・生理）

〔要約〕

光刺激の遮断が発育過程にあるヒヨコ網膜に、いかなる影響を与えるかを神経化学的に検討した。孵化直後、ヒヨコの右眼瞼を縫合し、30日目に左右の網膜組織を得た。蛋白含量及びCAT活性は、対照側と光遮断側で差異はなかったが、GAD活性は光遮断側で有意に減少した。網膜の水可溶性蛋白の電気泳動パターンでは、CBB染色により光遮断側で2本の蛋白バンドの欠損がみられた。しかし水可溶性蛋白への^{14}C-leucineの取り込みパターンには、対照側及び光遮断側の間に差異は認められなかった。又、欠損した2本の蛋白バンドへのleucineの取り込みは認められなかった。水不溶性分画では，CBB染色及びleucineの取り込みパターンに差異はなかった。網膜より得たミエリン分画は高いCNPase活性を示したが、このミエリン蛋白は電気泳動上，CNS及びPNSのミエリンとは全く異なるパターンを示した。発育をおって網膜のCNPase活性を調べてみると、孵卵19日目から孵化後4週目にかけて急速に活性上昇がみられた。網膜のCNPase活性は、孵化後30日目に於いて、光遮断側では対照側に比し有意に高い値を示した。

以上の結果より、長期間にわたる光刺激遮断は、網膜に於いて特にGABAergic neuronの発育、蛋白代謝、ミエリン形成，あるいはミエリン形成グリア細胞の代謝等に大きな影響を与えていることが示唆された。

神経系の発育は遺伝的に強く制約されていると同時に、感覚刺激、ホルモン、栄養状態等の環境因子によっても大きく影響されることが知られており、後者は特に神経系の可塑性とも呼ばれている。感覚刺激が神経系の発育にいかなる影響を与えるかを検討する上で、刺激を容易にコントロールできる網膜は恰好の材料と考えられる。そこで我々はヒヨコを用い、長期間にわたる光刺激の遮断が発育過程にある網膜にいかなる影響を与えるかを神経化学的に検討した。

〈実験動物及び方法〉

実験動物：　白色レグホン系受精卵を自動転卵孵化器（温度37.6°C，湿度60％）で18日間孵卵し、その後孵化用孵卵器（温度37.6°C，湿度70％）に移し孵化させた。この間光は完全に遮断した。孵化直後、暗緑色光のもとで右眼瞼を縫合し、その後12時間明12時間暗の状態で30日間飼育した。孵化後30日目に断頭後眼球を摘出し、硝子体及び色素上皮の混入を除き網膜組織を得た。

網膜内諸酵素活性及び蛋白含量：　Choline acetyltransferase（CAT；EC 2.3.1.6）はRossierらの方法[10]で、又 Glutamic acid decarboxylase（GAD；EC 4.1.1.15）はMorin & Westerlainの方法[7]で活性を測定した。2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphohydrolase（CNPase；EC 3.1.4.37）活性はTsukadaらの方法[11]で測定した。蛋白定量はLowryらの方法[5]によった。

SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動：　網膜組織を10倍量の脱イオン水でホモゲナイズし、100,000g. 60分遠心し、水可溶性分画と水不溶性分画とを得た。各々の試料（蛋白量で40μg）をMikoshiba & Changeuxの方法[6]に従い7.5~20％ linear gradient

ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルを25%イソプロパノール10%酢酸で固定し、クマシーブルー(CBB)で染色した。又、右眼瞼を縫合しないで正常に飼育した3か月令のヒヨコ大脳視蓋部、視神経、網膜及び座骨神経から得たミエリン分画(蛋白量で10~40μg)は10~20% linear gradient ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動に供した。

^{14}C-leucineの網膜蛋白への取り込み:
L-^{14}C(U)-leucine (270 mCi/mmol) 10μCiを孵化後1か月令のヒヨコの対照側及び光遮断側の眼球内に注入し、2時間後に網膜をとり出し上記の方法で電気泳動に供した。CBB染色後ゲルを加熱吸引により乾燥させ、コンタクトオートラジオグラフィーに供した。フジ工業用X-ray filmを用い、冷暗所で2か月半露光した。

ミエリン分画の調整法: 右眼瞼を縫合しないで正常に飼育した3か月令のヒヨコ大脳視蓋部、視神経、網膜、及び座骨神経から、Norton & Poduslo の方法[8]に従ってミエリン分画を得た。但し、網膜からのミエリン分画の調整では、Osmotic shock 後、12,000g、10分遠心のところを17,000g、10分遠心した。

〈結果及び考察〉

網膜内諸酵素活性及び蛋白含量

GABA, AChは多種の動物の網膜内で脳内濃度に相当する量が存在しており[3]又、microdissection[4]、オートラジオグラフィー[12]等によって網膜内の特に内網状層及び内顆粒層に多く存在することも知られている。これらのことはGABA, AChが網膜内で神経伝達物質として作用していることを強く示唆している。そこで我々は、これらの物質の合成酵素であるGAD及びCAT活性を測定した(表1)。湿重量あたりの蛋白含量には、対照側及び光遮断側の間に有意の差はみられなかった。又、CAT活性に

〔表1〕

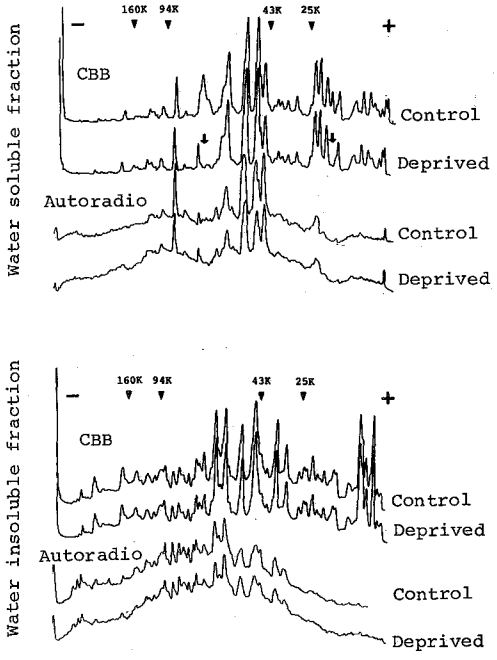
Protein concentration, and activities of CAT, GAD and CNPase in 30-day-old chick retina.

		Control	Deprived
Protein	(a)	32.2±2.8	29.4±3.8
CAT	(b)	147.4±4.3	143.6±13.8
GAD	(b)	97.8±8.4	77.2±9.4**
CNPase	(c)	0.74±0.15	1.00±0.12*

Mean±S.D. of 5 experiments.
(a) ; mg/g wet weight.
(b) ; nmol/mg protein/hr.
(c) ; μmol/mg protein/min.
* ; P<0.01, ** ; P<0.005.

〔図1〕

SDS-polyacrylamide gel electrophoretic and autoradiographic profiles of water soluble and water insoluble fractions from 30-day-old chick retina.



も両者の間に全く差は認められなかった。しかしGAD活性は光遮断側で有意に減少していた。このことから、孵化後の光刺激は網膜内の特にGABAergic neuronの発育に重要な役割を果しているものと考えられた。

電気泳動パターン及び^{14}C-leucineの取り込み

図1に網膜の電気泳動上及びオートラジオグラフィー上の蛋白パターンを示した。網膜蛋白のCBB染色では、水可溶性分画に50-60本のバンドが認められた。光遮断側では矢印で示した20Kと75K dalton付近の2本の蛋白バンドが完全に欠損していた。しかし水可溶性分画への^{14}C-leucineの取り込みには、対照側及び光遮断側の間に差異は認められなかった。又、光遮断側で欠損していた2本の蛋白バンドへのleucineの取り込みはほとんど認められなかった。このことから欠損した2本の蛋白バンドは、turn overの速いTublin、Actin様蛋白、Neurofilament等ではなく、よりturn overの遅い蛋白であることが考えられた。一方水不溶性分画では、CBB染色により60~70本の蛋白バンドが認められ、対照側と光遮断側の間に差異はみられなかった。又、leucineの取り込みにも差は認められなかった。上記の水可溶性分画で欠損した蛋白が網膜内でいかなる機能に関与しているかは現在更に検討中である。

〔表2〕

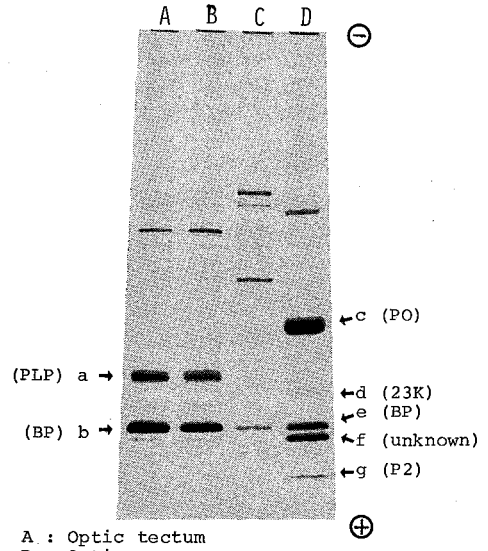
CNPase activity (μmol/mg protein/min) in the homogenate and purified myelin fraction from 3-month-old chick.

Region	Homogenate	Purified myelin	Enrichment
Optic tectum	9.31±0.51	19.1	2.1
Optic nerve	18.40±0.81	25.9	1.5
Retina	0.83±0.09	11.4	13.7
Sciatic nerve	2.09±0.07	2.3	1.1

CNPase activity in the homogenate was expressed in mean±S.E. of three experiments and other values were means of two experiments.

〔図2〕

SDS-polyacrylamide gel electrophoretic profiles of purified myelin fractions from 3-month-old chick.



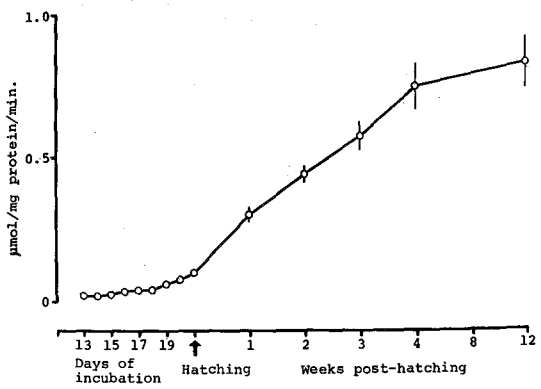
A : Optic tectum
B : Optic nerve
C : Retina
D : Sciatic nerve

網膜内ミエリンのCNPase活性及び蛋白パターン

ヒヨコ網膜では、視神経線維層内で明らかにミエリン様構造が形態的に認められている[9]。しかしこのミエリンが中枢性(CNS)か末梢性(PNS)かについては今だ不明である。そこでまず網膜組織からNorton & Poduslo の方法[8]に従いミエリン分画を調整し、そのCNPase活性を測定した。表2に示した如く、網膜ホモジネートのCNPase活性は非常に低値を示したが、ミエリン分画では、視蓋部及び視神経から得たミエリン分画とほぼ同等の高い値を示した。このことか

〔図3〕

Developmental change of CNPase activity in the chick retina.



Each point represents the mean value of two or three experiments and vertical lines represent S.E.M.

ら、網膜内ミエリンは少なくともCNPaseに関してはCNSのミエリンに類似しているものと考えられた。次に網膜より得たミエリン分画の蛋白電気泳動パターンを検討した。図2に示した如く、網膜ミエリン分画の低分子領域では，CNS及びPNSに共通と思われる塩基性蛋白(BP)は存在するものの、CNSに特異的に存在するFolch-Lees proteolipid protein (PLP)[2]及びPNSに特異的に存在するPO, 23K, P2等の蛋白[1]は認められなかった。このことから、ヒヨコ網膜内のミエリンは、oligodendroglia又はSchwann細胞いずれとも異なる別種のグリア細胞により形成されていることが示唆された。次に網膜ホモジネートのCNPase活性を発育段階をおって検討した。図3の如く、網膜CNPase活性は、孵卵16日目より出現し、孵卵19日目から孵化後4週目にかけて急速に増加した。このことは、網膜内ミエリンは主に孵化後約1か月の間に形成されていることを示している。そこで、この孵化後のミエリン形成に光遮断がいかなる影響を与えているかを検討するため、30日令のヒヨコの対照側及び光遮断側の網膜CNPase活性を測定した。表1に示した如く、CNPase活性は光遮断側に於て、約30%の増加を示した。このことは、網膜内でミエリンが過形成されているのか、あるいは、ミエリンを形成するグリア細胞内で、光遮断により反応性の代謝変化が生じていることを考えさせるが、その意義については検討中である。

〈結論〉

以上の結果より、発育期に於ける光刺激の遮断は、Hubel, Wiesel[13,14]を始めとして数多くの研究者によって報告されている如く、外側膝状体、大脳皮質視覚領野の機能障害を引きおこすばかりでなく、網膜レベルに於いても、特にGABAergic neuronの発育、蛋白代謝、ミエリン形成、あるいはミエリン形成グリア細胞の代謝等にも大きな影響を与えていることが示唆された。しかし、これらの変化が、網膜の情報処理機能にまで影響を与えているかは、今後更に検討する必要がある。

References (1) Eylar E.H., Uyemura K., Brostoff S.W., Kitamura K., Ishaque A. & Greenfield S., Neurochem. Res. 4, 289-293, 1979 (2) Folch J. & Lees M., J. biol. Chem. 191, 807-817, 1951 (3) Graham L.T., in "The Eye, Vol.6", pp.283-342, Academic Press, 1974 (4) Kuriyama K., Sisken B., Haber B. & Roberts E., Brain Res. 9, 165-168, 1968 (5) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Landall R.J., J. biol. Chem. 193, 265-275, 1951 (6) Mikoshiba K. & Changeux J-P, Brain Res. 142, 487-504, 1978 (7) Morin A.M. & Westerlain C.G. J. Neurochem. 31, 371-373, 1978 (8) Norton W.T. & Poduslo S.E., J. Neurochem. 21, 749-757, 1973 (9) Rager G., Proc. R. Soc. Lond. B. 192, 331-352, 1976 (10) Rossier J., Bauman A. & Benda P., FEBS letters 32, 231-234, 1973 (11) Tsukada Y., Nagai K. & Suda H., Neurochem. Res. 3, 662-663, 1978 (12)Voaden M.J., Exp. Eye Res. 18, 467-475, 1974 (13) Wiesel T.N. & Hubel D.H., J. Neurophysiol. 26, 978-993, 1963 (14) Wiesel T.N. & Hubel D.E., J. Neurophysiol. 26, 1003-1017, 1963

65 トリプトファンのラット脳内インドールアミン代謝系及び弁別学習能力におよぼす影響

野村正彦　（保健衛生大・医・生理）

〔要約〕

脳内セロトニンは神経伝達物質の一つとして種々の神経活動に密接な関連性のあることが知られている。セロトニンの代謝基質であるトリプトファンを動物が餌から摂取する量を制限して，出生直後より生育させた時，この動物のセロトニン作動神経系にどのような変化を認めるかを調べた。

脳内インドールアミン代謝系の変化は代謝基質であるトリプトファン摂取量に依存しており，トリプトファン欠乏飼育ラットの血中トリプトファンは対照の37％を示し，脳内では25％であった。これに対しトリプトファン欠乏餌に0.1％のトリプトファンを添加して回復させた場合は，血中トリプトファンは54％と尚低い値を示したが，脳内では83％とほゞ対照に近い値まで回復を示した。脳内セロトニン量はトリプトファン量と正の相関性を持ち，欠乏時約70％で回復させた場合は87％とかなり高い値を得た。脳内5Hydroxyindoleacetic acid量は欠乏時約43％で，回復させてもなお72％と低い値を示した。

学習行動の変化はオペラント型明度弁別学習を行い，学習能力の差を調べた。トリプトファン欠乏ラットは対照ラットに比較して，明らかに弁別学習完成が遅延しており，回復飼育ラットではほゞ対照に近い結果を得た。即ちトリプトファンの脳内インドールアミン変化と学習行動におよぼす影響は密接な相関のあることが示唆された。

神経伝達物質として考えられているセロトニンは精神神経疾患特にうつ状態の病因や睡眠[4,6]及びホルモンの調節[5]に関与している。セロトニンの代謝基質であるトリプトファン（TRY）を餌からの摂取制限した条件下で飼育したラットの脳内セロトニン及び代謝産物の含有量と，これら動物の示す弁別学習能力との相関の有無を検討して，セロトニンの持つ神経伝達物質としての役割を調べた。

〔方法〕

実験動物：Wistar - Imamichi系雄ラットを自家繁殖させ，出生直後の新生仔を種々の条件下で飼育して使用した。飼育方法は，オリエンタル酵母製ラット飼料で飼育したものを対照群（NORMAL飼育群）とした。また，出生直後より対照群飼料のほゞ8％しかTRYを含まないトウモロコシ（CORN）を基本にして作製した飼料で飼育したものをCORN飼育群，さらにCORN飼料に0.1％のTRYを添加した飼料で飼育した群をCORN＋TRY飼育群として，それぞれの群の雄を3ヶ月令まで飼育成育させた。

血中と脳内TRY.及び脳内インドールアミンの定量：

3群に分けた条件下で飼育したラットは3ヶ月令時に断頭採血後，血中TRY.の定量を行った。脳は剔出後，終脳（Telencephalon:Tela）と近隣を含む脳幹部（Diencephalon, Mesencephalon, Pons, Medulla oblongata：DMPM）の2つの部分に分けて[9]それぞれ半脳づつを脳内TRY定量にDenckla & Deweyの方法[3]に準じて測定し，他の半脳はセロトニン及び5Hydroxyindoleacetic acid（5HIAA）の定量にCurzon & Greenの方法[2]を用いて螢光比色定量に用いた。

2′,3′-cyclic Nucleotide 3′-phosphohydrolase 活性値の測定：

Kurihara & Tsukada の原法[6]に準じて脳の2部位を，それぞれ Homogenige 後酵素活性値を測定した。たん白質含有量は Lowry らの方法[7]を用いた。

学習実験：

NORMAL飼育群，CORN飼育群及びCORN＋TRY飼育群の3種類のラットが，3ヶ月令に生育した時，飽食時の体重の85％になるよう餌を制限し，体重を減少させてから学習を開始した。 1．SHAPING 過程。暗室内に設置したスキナー箱内にあるレバーをラットが押せば，餌ペレットを得られるようにして，40個の餌ペレットを連続して得る時間が4分以内になった時 SHAPING 完成として，そこに至るまで要した時間(分)で比較した。

2．弁別学習過程。スキナー箱前面にある光呈示窓に明度が1000分の1になる Kodak Filter を挿入して，1000：1 の2つの明度条件を呈示し，明るい明度呈示時(S^+)にレバーを押せば，平均15秒間に1回 (Variable Interval：VI-15″)の割合で餌ペレットが出て強化(R^+)がおこなわれるが，1000分の1の暗い明度が呈示されたとき(S^-)には，レバーを押しても餌ペレットが出ないという条件で学習させた。それぞれの刺激は Gellerman 系列に従って明・暗それぞれ25秒間，各20回ずつ呈示し，その間5秒間の blackout を挿入しておこなったものを1 session として，1日1-Session づつ連日おこなった。正反応率 ($R^+/R^+ + R^-$) は野村＋塚田[10]に従って85％以上3日間連続した時点で学習完成としたが，完成に達しないものでも30 session までおこなって終了した。3．消去過程：弁別学習と同一刺激を用いるが，強化因子(餌)のみ与えないで学習させたとき，総反応数が20回以下になった時消去完成とした。

〔結果及び考察〕

1．体重の変化：図1に示すように生後1ヶ月令の体重の変化は，NORMAL 群に対してCORN群は35.1％，CORN＋TRY 群は45％ を示した。生後3ヶ月令では CORN 群は26.7％，CORN＋TRY群は49.1％ を示し，両者とも生育に大きな障害を示した。

図1 THE CHANGES OF BODY WEIGHT ON NORMAL AND CORN DIET WITH OR WITHOUT TRYPTOPHAN(0.1%) IN RATS

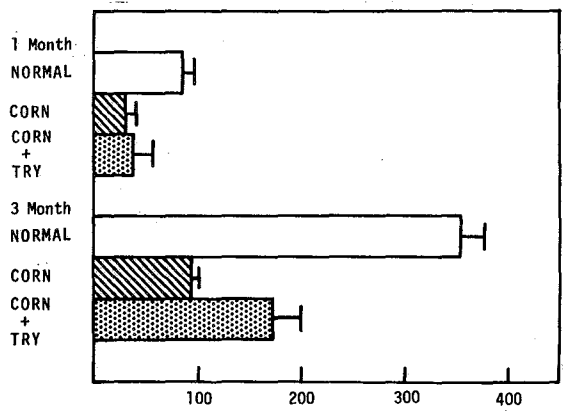


表1. THE CHANGES OF BRAIN WEIGHT ON NORMAL AND CORN DIET WITH OR WITHOUT TRYPTOPHAN(0.1%) IN RATS

CONDITION	CEREBRUM	TELENCEPHALON	D.M.P.M.
NORMAL (40)	1,580.4 ± 77.8	982.2 ± 63.1	598.5 ± 56.4
CORN (40)	1,170.1 ± 74.1*	748.6 ± 57.2*	420.9 ± 38.6*
CORN + TRY (10)	1,321.5 ± 98.4*	836.4 ± 88.3*	485.1 ± 70.3

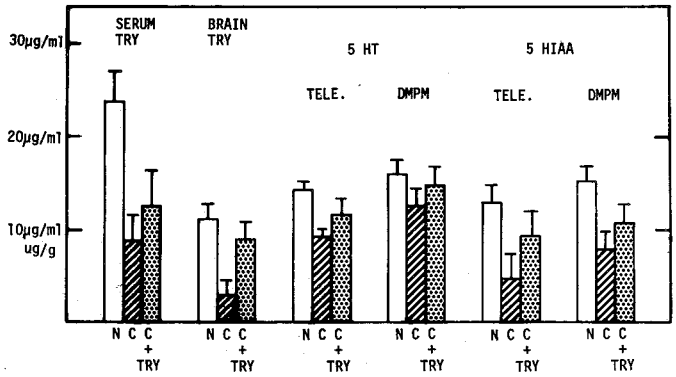
The number of rats in each group is indicated in parentheses
wet.wt. mg. means ± s.d.
* $p < 0.001$

2．脳重の変化：表1に示すように3ヶ月令での脳重量はNORMAL群に対して，CORN群は74.1％，CORN+TRY群は83.6％を示し，体重のみならず脳重にも大きな変化を認めた。

3．血中TRY．脳内TRY・セロトニン及び5HIAA含有量：図2に示すように血中TRY．はNORMAL群に対して，CORN群は36.6％，CORN+TRY群は54.0％を示し，明らかに全身的TRY欠乏を示す結果を得た。次に脳内TRY．値は同様にCORN群で24.6％と著明に低く，血中のTRY低値を反映している結果を得た。また脳内TRY値はCORN+TRY群では82.6％とかなりNORMAL群に近づいた値を示し，血中のわずかな増加にもかかわらず，脳内には積極的に取り込まれていることを示唆する結果を得た。脳内セロトニン量はTele.で65.1％，DMPMで79.2％を示したCORN群がCORN+TRY群では，それぞれ80.1％，93.9％とセロトニンレベルもTRY添加でかなりの回復を示す結果を得た。脳内5HIAA量はCORN群でTele 35.1％，DMPMで52.2％とやはり低値を示し，CORN+TRY群ではTele.で74.1％，DMPMで71.9％と低く，代謝基質の欠乏はセロトニン含有量よりもおそく，代謝産物である5HIAA量に著明な変化を与えた。

図2

TRYPTOPHAN,5HT AND 5HIAA CONTENTS OF SERUM AND BRAIN ON NORMAL AND CORN DIET WITH OR WITHOUT TRYPTOPHAN(0.1%) IN RATS



The activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in brain of NORMAL and CORN FED RATS

CONDITION	TELENCEPHALON	D.M.P.M.
NORMAL (10)	3.14 ± 0.18	4.96 ± 0.23
CORN (5)	1.01 ± 0.13*	1.57 ± 0.16*

The number of rats in each group is indicated in parentheses

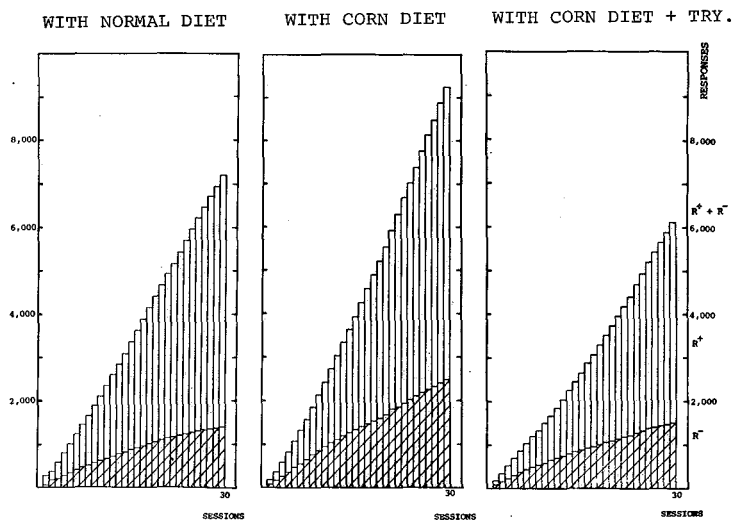
Unit/ mg.protein, means ± s.d.

* $p < 0.001$

4．2',3'-cyclic Nucleotide 3'-phosphohydrolase Activity：ミエリンのmarker enzymeとして知られているこの酵素活性を脳の部位で見ると表2のように，対照の31～32％の活性値しかCORN群では認められなかった。即ちTRY欠乏によるミエリン形成不全を示唆する結果を得た。

5．学習成績：表3に示すように1) SHAPING過程ではCORN群及びCORN+TRY群ともにNORMAL群の2倍以上の時間を必要とした。これはスキナー箱内での餌を得る適応が悪いことを示している。2) 明度弁別学習過程では正反応率の規準到達がNORMAL群の21.4 sessionに対し，CORN群は28.7 session要し，CORN+TRY群

CUMULATIVE RESPONSE TO R^+ AND R^- IN BRIGHTNESS DISCRIMINATION LEARNING TEST



は25.2 Sessionとかなり NORMAL群に近づく結果を得た。この弁別学習過程を更にくわしく知る為に30 Session間の反応数をそれぞれ累積して図3に示した。即ちCORN群のみが異常な反応数の増加と，なかでも R^- の増加を認め，学習不全を示した。

3) 消去過程：これもCORN群に於てのみ消去の完成が約2倍のSession数を要し，学習不全を更に支持する結果を認めた。

以上より必須アミノ酸の一つであるTRY. を出生直後より欠乏条件下で飼育生育させたラットは，脳内TRYおよびセロトニン・5HIAAの減少とミエリン形成不全を示した。一方弁別学習成績はTRY欠乏飼育ラットでは著明な低下を示したが，餌にTRYを添加することによって，その脳内レベルはかなり回復し，また学習行動の正常化をも認めた。このことから，脳内セロトニン作動性神経系が，動物の学習行動の一面を支えているのかも知れないことが示唆された。

表3

THE SCORES OF BRIGHTNESS DISCRIMINATION LEARNING TEST IN RATS ON NORMAL AND CORN WITH OR WITHOUT L-TRYPTOPHAN

CONDITION	SHAPING (min.)	BRIGHTNESS DISCRIMINATION (session)	EXTINCTION (session)
NORMAL (10)	71.0 ± 32.6	21.4 ± 2.1	4.2 ± 1.5
CORN (10)	149.3 ± 55.4*	28.7 ± 3.9*	8.2 ± 1.5*
CORN + TRY(12)	158.4 ± 36.2*	25.2 ± 3.7**	3.6 ± 0.5

The number of rats in each group is indicated in parentheses
means ± s.d. *$p<0.001$
**$0.02 < p < 0.05$

〔文 献〕

1. Clemens, J.A. (1978) Ann.N.Y.Acad. 305.399.
2. Curzon, G & Green, A.R. (1970) Brit. J.Pharmac. 39.653.
3. Denckla, W.D. & Deway, H.K. (1967) J. Lab.Clin.Med. 69.160.
4. Growdon, J.H. (1978) Ann.N.Y.Acad. 305.510.
5. Jouvet, M. (1969) Science.163.32.
6. Kurihara, T. & Tsukada, Y. (1967) J.Neurochem.14.1167.
7. Lowry, O.H., Rosenbergh, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951) J.biol. Chem.193.265.
8. Messing, R.B. (1978) Ann.N.Y. Acad. 305.480.
9. 野村・永田 (1978) 神経化学 17, 213
10. 野村・塚田 (1973) 神経化学 12 24.

66 6－ハイドロオキシドーパミンの新生仔期投与の対照及びMAMラットにおける脳内カテコールアミン量と成長に及ぼす影響

田丸政男・永吉道子・中原　務
松谷天星丸　（保健衛生大・医・総医研）
塚田裕三　（慶大・医・生理）

〔要　約〕

MAMラット(胎生15日目MAM投与による実験的小頭症ラット)及び無処置ラットへ、生后1日目より連続5日間、6-ハイドロオキシドーパミン(6-OHDA)を100mg/kg/day皮下注射し、それぞれの脳各部位におけるNE, DA, 5-HT量の変化と成長の違いを比較した。実験は無処置ラット(C群)、無処置ラットに6-OHDA投与(C6群)、MAMラット(M群)、MAMラットに6-OHDA投与(M6群)の4群を構成し、以下この略称を用いて述べる。(1) M6群はM群に対し体重増加抑制はないが、C6群はC群に対し生后50日の体重は有意に低下し、従来新生仔期の末梢性の6-OHDA投与では成長抑制は起こらないとされていたが[2]、今回，末梢性投与でも成長抑制が見られた。又C6群はC群に比して脳重増加の抑制傾向が見られた。(2)大脳半球のNE量は生后8日で，C6群はC群に，M6群はM群に比して著明に減少し、その後発育と共に増加するが、生后50日でC6群はC群の19.4%、M6群はM群の25%の含有量を有するに止まった。脳幹部及び橋-延髄のNE量は生后50日で、C6群はC群に、M6群はM群に比して何れも大きな増加を示し、その増加はM6群よりC6群で大きく、又その増加量は脳幹部より橋-延髄で大きかった。DA量は生后50日の脳幹部においてのみC6群で有意の増加を示した。5-HT量は何れの投与群、何れの部位でも殆ど変化がなかった。以上の結果からM6群もC6群と同様に6-OHDAの投与により，大脳半球のNE量の減少を来たしたが、6-OHDAの投与量が等しくともその減少値には差が見られた。

私共はMethylazoxymethanol(MAM)又はCytosine arabinoside(ara-C)投与による実験的小頭症ラットの特に大脳半球で、脳重及び大脳半球当りのDNA量が対照の約60%に減少しており、一方化学伝達物質の検索からnorepinephrine(NE), dopamine(DA)及び5-hydroxy-tryptamine(5-HT)が有意に増加していることを見出し本学会に報告した[10][11]。又DNA量の減少の度合の強いもの程モノアミン量の増加も多く[11]、このモノアミン量の増加はMAMラットの蛍光組織学的検索によって、varicocity及び蛍光線維の増数及びvaricocityの蛍光の増強が大脳皮質全層にみられ、特に表層に近づくに従い増強の度合が強いことが確認されており[13]、胎生期における脳細胞産生障害にもとづく成長后の脳細胞の数的減少のために小頭症ラット脳では、モノアミナージックシナプスの濃縮像がみられるものと考えられた。MAMラットについては、オペラント弁別学習[6][11]、迷路学習[6][7][8]、睡眠リズム等[14]について機能面での検索が集積されてきているが、この脳内モノアミン量の増加とそれが機能面に及ぼす役割についてはまだ不明の点が多い。Breese & Traylor[1]は生后7日のラットに6-OHDAを投与し、発育の抑制のあることを示し、これは成長ホルモンのreleaseに関与していると考えられるcentral adrenergic fiberの6-OHDA投与による障害のための影響かも知れないと報告している。

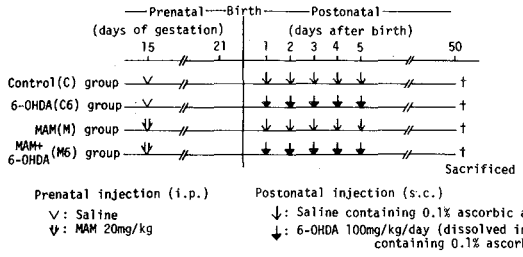
そこで今回はカテコールアミンニューロンの終末を長期的に障害するとされている6-OHDAの投与に対して、MAMラット脳内のカテコールアミンがどう変動するか、又それが成長の上にどう影響するかを検索した結果を報告したい。

〔実験方法〕

(1)動物はWistar－Imamichi系白鼠を用い、妊娠15日目の母ラットにMAM-acetate

ASH Inc. Detroit U.S.A) 20mg/kg を、無処置ラットには同容量の生食水を腹腔内に一回投与した。出生后の無処置群及びMAM群の新生仔ラットを Fig. 1 に示す如く4群に分け、C6群及びM6群に 6-OHDA 100mg/kg/day[5] (0.1%アスコルビン酸生食水に溶解)を、C群及びM群には、0.1%アスコルビン酸生食水を同一容量、生后1日目より連続5日間、皮下注射し、生后50日において浮血断頸により午前10時にそろえて屠殺した。

Fig. 1 EXPERIMENTAL SCHEDULE



(2) 脳内物質の測定

摘出脳はすみやかに氷冷しながら大脳半球(CH)，脳幹部(BS)－大脳基底核，中脳，前脳を含む－及び橋-延髄(PM)の各部位に分け生化学的測定を行った。NE，DA，5-HTの定量は Karasawa 5[4] の方法によりモノアミンの抽出分離を行い蛍光測定を行った。

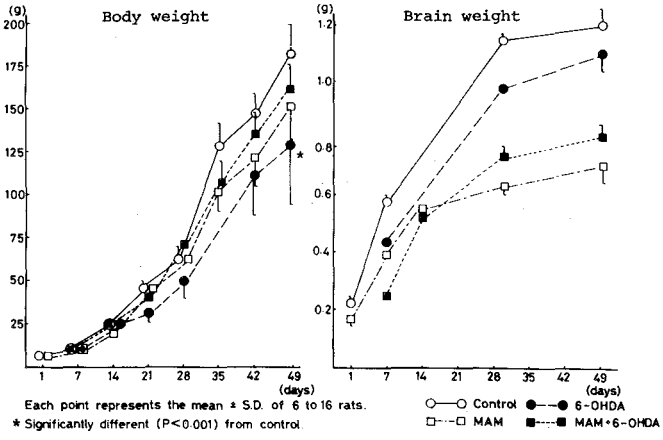
〔実験結果〕

体重及び大脳重量の変化：

C6群はC群に対し，6-OHDA投与の2週間后より体重増加抑制がみられ、生后50日では有意の低値を示した。M6群はM群に対し発育に伴う体重増加の抑制はみられなかった。(Fig. 2)

脳重は生后8日でC6群はC群に対して約25%の，M6群はM群に対して約40%の増加の抑制がみられ、以后発育と共に増加を示すが50日目でC6群はなおC群の約90%の重量であった。M6群は14日でM群の値まで追いつき、大脳重量が50日で小頭症のためにC群の約60%しかないM群よりむしろ増加の傾向を示した。(Fig. 2)

Fig. 2 EFFECT OF 6-OHDA INJECTION TO NEONATAL RATS ON BODY AND BRAIN WEIGHTS DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

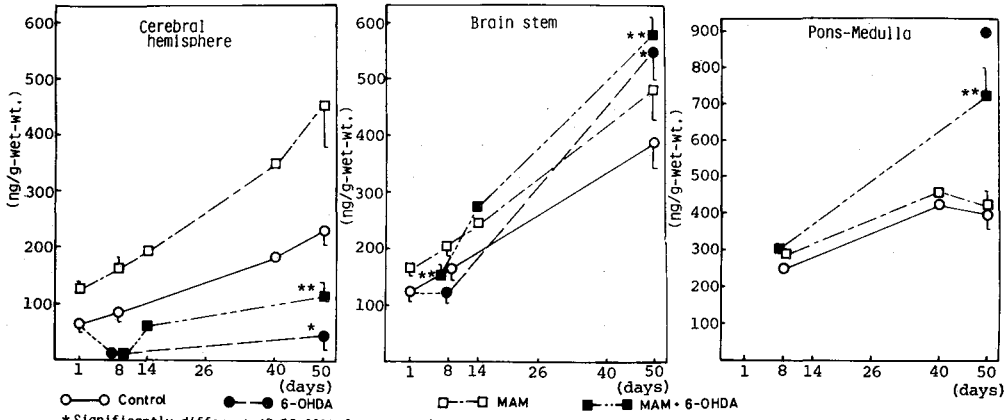


脳内モノアミン量に対する6-OHDA投与の影響：

脳内モノアミン量はC6群はC群，M6群はM群に対してそれぞれ何れの部位でも、NE量に大きな変化がみられ、DA量はNE量程著明な変化はなく、5-HT量は殆ど変化なかった。NE量についてみると、Fig. 3 に示すように、生后8日でC6群，M6群は大脳半球で著明な減少がみとめられ、M6群では痕跡程度のNE量の存在がみとめられたが、C6群では測定出来なか

った。脳幹部ではC6群はC群、M6群はM群に対して生后8日でそれぞれ約25%の減少がみられた。大脳半球では発育と共に再びNE量は増加するが、50日でもC6群はC群の19.4%、M6群はM群の25%を有するに止まった。脳幹部の50日において、C6群はC群の1.41倍、M6群はM群の1.20倍の増加を示した。橋-延髄の50日では、

Fig. 3 EFFECT OF 6-OHDA INJECTION TO NEONATAL RATS ON NOREPINEPHRINE LEVELS IN VARIOUS BRAIN REGIONS



C6群はC群の2.28倍、M6群はM群の1.73倍であった。(Fig. 3)

DA量はTab. 1に示すように、大脳半球の生后50日でC6群がC群に比してやや増加を示し、M6群はM群とほとんど変化なく(おしろやや低下)、脳幹部の生后8日で、C6群はC群、M6群はM群に対してそれぞれ有意の減少を示した。その后発育と共に増加し生后50日のC6群ではC群に対して有意の増加を示したが、M6群ではM群に近い値に増加するに止まった。5-HT量はTab. 1にみられるように脳のどの部位においてもまた発育のどの段階でも6-OHDA投与による変化はみられなかった。

Tab. 1 EFFECT OF 6-OHDA INJECTIONS TO NEONATAL RATS ON DOPAMINE AND 5-HYDROXYTRYPTAMINE LEVELS IN VARIOUS BRAIN REGIONS

Brain region	Days after birth	Control	6-OHDA	MAM	MAM + 6-OHDA
Dopamine (ng/g-wet-wt.)					
Cerebral hemisphere	50	311±50 (13)	363±32 (4)	531±76 (11)	506±62 (5)
Brain stem	8	335±18 (3)	237±38 (*4)	423±21 (6)	251±45 (**4)
	50	1273±125 (7)	1569±132(*4)	1790±114(12)	1692±93 (8)
5-hydroxytryptamine (ng/g-wet-wt.)					
Cerebral hemisphere	8	182±10 (4)	190±6 (4)	270±2 (4)	284±16 (3)
	50	256±25 (7)	288±35 (4)	436±48 (7)	403±51 (7)
Brain stem	8	261±9 (3)	275±14 (3)	323±21 (6)	306±27 (4)
	50	345±27 (7)	376±29 (4)	504±42 (7)	505±38 (9)
Pons-Medulla	50	359±42 (3)	393 (2)	454±50 (6)	397±40 (6)

Results are the mean ± S.D. and numbers in parentheses indicate the number of animals.
* Significantly different (P<0.01) from control.
** Significantly different (P<0.001) from MAM.

〔考察及び結論〕

今回の実験でC6群にみられた6-OHDA投与によるC群に対する有意の成長抑制が、Breese5[1]の示唆するように、もし成長ホルモンのreleaseに関与していると考えられるcentral adrenergic fiberが6-OHDAで障害されたた

めであるとすれば、MAMラットは脳内の高濃度に存在するNE量が、6-OHDA投与によってもなお残存するため、M6群で成長ホルモンのreleaseのコントロールが保持出来たので、M群と同じ成長が出来たのかも知れない。一方 Smith S[2] はラット新生仔期の大槽内への6-OHDA投与による成長抑制が、脳内DA量の減少による摂食の低下のためであると述べている。しかし今回の実験では、脳内のDA量が生后8日でC6群はC群に、M6群はM群に対して低下しているが、C6群とM6群の残存量はほぼ等しいこと、及び生后50日においては両者とも増加を示して来ており、成長抑制の要因をDA量の減少と関連づけて考えることは出来ないであろう。いずれにしてもMAM脳に存在する増加しているNE量は生理的に意味あるものと考えられる。又大脳半球における6-OHDA投与后なお残存するNE量がM6群ではC6群より高いために、大脳皮質でおこるモノアミンニューロンの終末の障害脱落に対して、反応的に橋-延髄でおこるとされている側枝分芽[3]によるNE量の増加(collateral accumuration)がM6群はC6群より少ないのではないかと考える。6-OHDAの幼若期における大槽内投与によって脳内のNE、DA量の低下を来すこと[1][3]、又成熟ラットの脳室内投与によって注射后16－25日で中枢神経系のあらゆる部位で広くNE、DA量の低下することが報告されている[9]。今回行った皮下投与ではNE量は大脳半球で減少、脳幹部，橋-延髄では増加であり、その結果生じる機能の現われ方についての意味づけは複雑となる。しかし6-OHDAの脳への移行をMAMと無処置脳で比較する意味もあって今回は皮下投与を行いNE量を主とする変動がとらえられた。

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) Breese,G.R. and Traylor,T.D. (1972) Br.J.Pharmac. 44, 210
(2) Smith,R.D., Cooper,B.R. and Breese,G.R. (1973) J.Pharmacol.Exp.Ther. 185, 609
(3) Jonsson,G., Pycock,C.H., Fuxe,K. and Sachs,C. (1974) J.Neurochem. 22, 419
(4) Karasawa,T. Furukawa,K., Yoshida,K. and Shimizu,M. (1975) Jap.J.Pharmacol. 25,727
(5) Peterson,D.W. and Laverty,R. (1976) Psychopharmacol. 50, 55
(6) Rabe,A. and Haddad,R.K. (1972) Federation Proceedings 31, 1536
(7) Haddad,R.K., Laqueur,G.L., Spatz,M. and Valsamis,M.P. (1969) Science 163, 88
(8) Ciofalo,W.B., Latranyi,M. and Taber,R.I. (1971) Communications in Behav.Biol. 6, 223
(9) Iversen,L.L. and Uretsky,N.J. (1970) Brain Res. 24, 364
(10) 松谷天皇丸，岡田澄子，永吉通子，堀田裕三 (1973) 神経化学 12, 28
(11) 松谷天皇丸，永吉通子，田丸政男，野村正彦，堀田裕三 (1977) 神経化学 16, 57
(12) 松谷天皇丸、田丸政男，永吉通子，堀田裕三 (1978) 神経化学 17, 209
(13) 佐藤啓二、佐久本哲郎，清水信夫、松谷天皇丸 第20回医学会総会，総合医学展示ガイドブック(1979，東京) P.126
(14) 清野茂博、瀬尾美佐子，芝垣正夫 (1976) 日本生理誌，38，114

67 老齢ラットの脳内モノアミンに与えるMeclofenoxate hydrochloride及びCiticolineの影響

土井　亨・盛政忠臣・三船和史
庄盛敏廉
(岡大・医・脳研)

〔要　約〕

加齢の中枢神経系に及ぼす影響を脳内アミンを示標として調べた。そして、その影響に対する脳代謝賦活剤の効果を調べた。Wistar　系雄性ラットを用いた。若齢対照群として16週齢（Y群）、老齢群（A群）として約80週齢のラットを用いた。12時間週期の明暗サイクルで飼育し、生理的変化を調べるため、4時間毎に脳を採取した。脳はAmygdala(Amy.),Striatum(St.),Crebral Cortex(Cor.),Hippocampus(Hip.),Diencephalon(Die),Brain Stem(B.S.)　の6部位に分別し、それぞれの部位毎にドーパミン（DA)、ノルエピネフリン(NE)、セロトニン(5-HT)の濃度を測定した。その結果、DAは St.,Die.,B.S.　でA群で減少しており、NE は、B.S. でA群が増加し、5-HT は、St.でA群で減少、Cor.でA群が増加していた。

次に、両群のラットにSaline,Meclofenoxate hydrochloride(M.H.)25mg/kg,Citicoline(C.C.)25mg/kgをIP投与し、これらの薬剤の効果を同様の方法で調べた。その結果Y群では、Saline　群と比較して、ほとんど変化はみられなかったが、A群では　C.C. 投与群で、DA は St.で増加し、Cor.で減少、NE は　St.,Cor.,B.S.　で有意に増加し、5-HTはSt.で増加、Cor.で減少していた。M.Hでは DA,5-HT量は変化せず、NE 量が　St.,B.S.で増加していた。

以上の結果加齢の脳内アミンに対する影響は、DA の減少、NE の増加、5-HT は増加する部位と減少する部位のあること等であるといえる。この影響に対しC.C.はかなりの部位で、老齢群におけるモノアミンの変化を、若齢群に近づける効果をもたらした。

加齢の中枢神経系に及ぼす影響は、まだそれほど知られていない。特に脳内神経伝達物質についての研究は、まだごくわずかなものしか報告されていないように思われる。今回著者らは、老若2群のラットを用い、脳部位別モノアミン濃度を測定し、脳内モノアミンよりみた加齢の影響を調べた。さらにいわゆる脳代謝賦活剤を老若2群のラットに投与し、加齢によるアミンの変化に対するこれら薬剤の効果を検討した。

＜実験方法＞

Wistar系雄性ラットを用いた。若齢群（Y群）として16週齢、老齢群（A群）として約80週齢のラットを用いた。実験動物は12時間毎の明暗周期の人工照明下で温度24℃、湿度55%の恒温恒湿室で飼室した。Y群は5週間、A群は5か月間上記条件で飼育したのち実験に用いた。

〔実験Ⅰ〕Y、A両群のラットを暗転後2、6、10時間(D2.D6.D10)、明転後2、6、10時間（L2.L6.L10）の6時点で、1時点につき6~8匹をTakahashi[1]のNear freezing methodを用いて殺した。断頭後脳を採取し、Glowinski[2]の方法を参考にして、Amygdala(Amy)、Striatum(St)、Cerebral Cortex(Cor)、Hippocampus(Hip)、Diencephalon(Die)、Brain Stem(BS)の6部位に分別した。それぞれの部位について蛍光法[3]を用いて、ドーパミン(DA)、ノルエピネフリン(NE)、セロトニン(5-HT)の3種のモノアミンを測定した。

〔実験Ⅱ〕Y、A両群のラットをそれぞれ3群(1群は6匹)に分け、暗転0.5時間後に各群のラットにSaline、Meclofenoxate hydrochroride(MH)25mg/kg、あるいはCiticoline（CC）25mg/kgをIP投与し、さらに暗転2時間後に実験Ⅰと同様方法でラットを殺

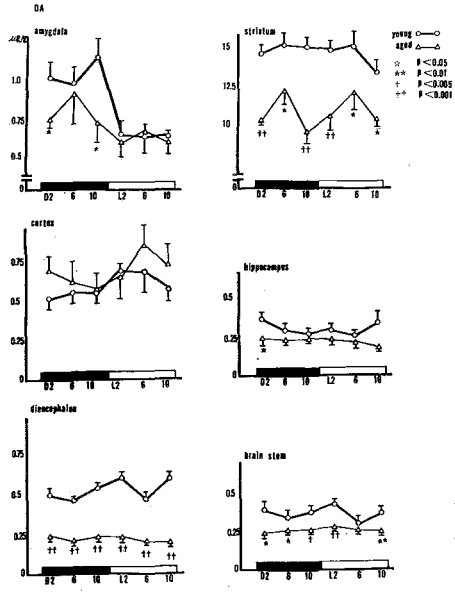


Fig.1 DA contents in regional brain
Vertical bars represent SEM

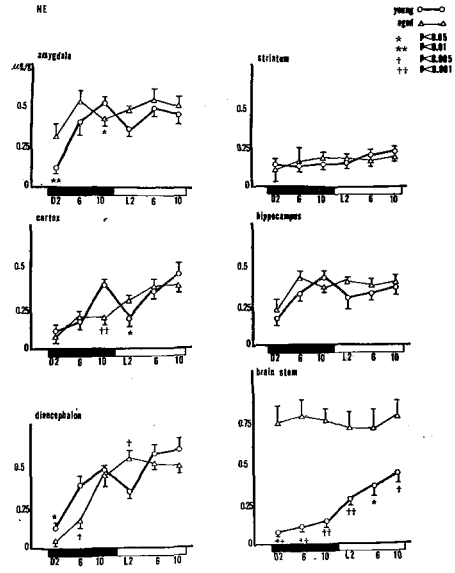


Fig.2 NE contents in regional brain
Vertical bars represent SEM

し、脳を部位別に採取し、各部位毎に3種のモノアミンを測定した。

データの統計的解析にはStudent-t testと分散分析を用いた。

＜結果＞〔実験Ⅰ〕a) Fig.1にDA量の変動を示した。AmyのD2、D10、Stの全時点、Hipの D2、Dieの全時点、BSのL6を除く全時点でA群においてDA量の統計的有意の低下が認められた。Corでは見かけ上A群のDA量が大きくみえるが、統計的有意差はなかった。

b) Fig.2にNE量の変動を示した。Y、A両群間で統計的有意差を認めた部位、時点がいくつかあった。AmyではD2でA群が高値を、D10で逆転し低値を示した。Corでは、D10でA群低値、L2で高値を示した。Dieでは、D2、D6でA群低値、L10で高値を示した。しかし、上記3部位と、St、Hipでは全時点を通じて比較するとほとんど差がないと思われた。ところが、BSでは6時点を通じてA群が有意に高値を示していた。

c) Fig.3に5-HT量の変動を示した。Y、A両群間においていくつかの部位、時点で統計的有意差を認めた。Stでは全時点を通じてA群における5-HT量の減少が認められた。CorではStとは逆に全時点でA群における5-HT量の増加が認められた。HipのD2ではA群における減少、DieのL6でもA群における減少が認められ、BSではD6、D10でA群における増加が認められた。

〔実験Ⅱ〕a) Y群 MHは全部位の全アミンに影響を与えなかった。CCは、Hipの NE・5-HT量、Dieの5-HTを有意に($P<0.05$)増加させた。

b) A群 DA量のMH、CCによる変化をFig.4に示した。MHは、St.Cor、DieでDA量を

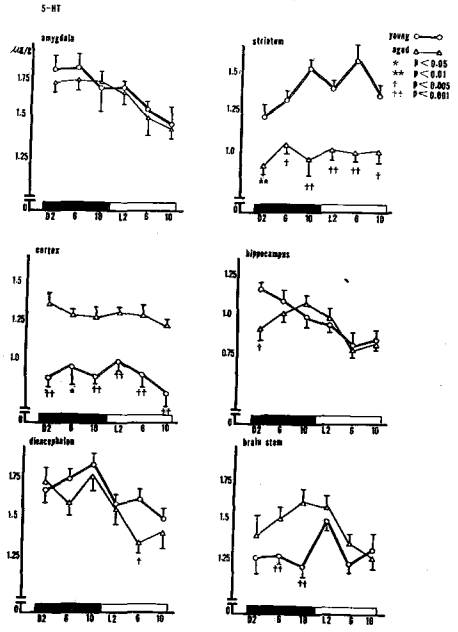


Fig.3 5-HT Contents in regional brain
Vertical bars represent SEM

増加させているようにみえるが、分散が大きく統計的有意差は認められなかった。CCはStにおいて有意に増加させ、Corでは有意に低下させていた。

ii) NE量のMH、CCによる変化をFig. 5に示した。MHはSt、BSのNE量を有意に増加させ、CCはSt、Cor、BSのNE量を有意に増加させた。

iii) 5-HT量のMH、CCによる変化をFig. 6に示した。MHはいずれの部位の5-HT量にも統計的有意な変化をもたらさなかった。CCは、Stで5-HT量の有意な増加、Corで有意の減少を示した。

＜考察＞

加齢の脳内伝達物質に及ぼす影響を調べた研究はあまり多くない。DA量の変化については、ヒト脳を用いた研究では、Thalamus、Hypothalamusで、加齢と負の相関の傾向があったとしている[10]。また、StのDAが減少し、StのDAの代謝回転の低下[1]

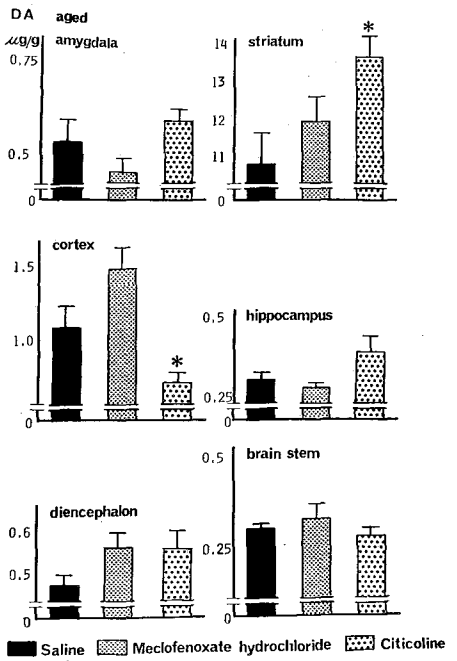


Fig.4 Effects of MH and CC on DA
Vertical bars represent SEM

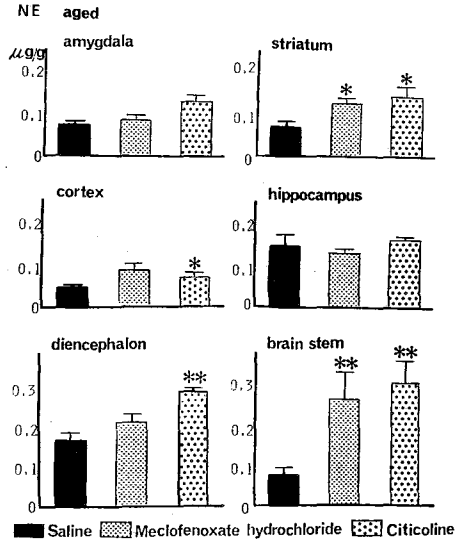


Fig.5 Effects of MH and CC on NE
Vertical bars represent SEM

hypothalamus、St のsynaptosomeによるDAの取りこみの低下[4]等が報告されている。著者らの結果では、DA量の加齢による変化はSt 、Die 、BS での低下で特徴づけられ、他の部位ではほぼ変化がないと考えられ、A群での増加を示した部位はみられぬことであった。

NE量の加齢に伴う変化については、ヒトのhind brain で加齢とNE量に負の相関がある[10]としたものや、マウス脳では、変化がない[1]という報告がある。著者らの結果では、NE量は1日のうちで相当大きな変動を示すものでありそのため、ある時点をとればA群が有意に減少、別の時点をとれば増加といった相反する結果がおこってくる可能性が強い。したがって、加齢による部位別脳内のNE量の変化は、BS を除く5部位ではほぼ差がないと考えてさしつかえないと思われ、その特徴はBS のみで増加していることであると思われる。

5-HTについては、ヒトでは加齢による変化はない[9]としたものがある程度である。著者らの結果では、St におけるA群の減少、Corでの増加としてとらえられ、3種のアミン量が、それぞれ特徴をもった変化を示したことは興味深い。

次にいわゆる脳代謝賦活剤が、脳内アミンにどのように影響を及ぼすか調べてみた。MH については、5-HT量を増加させる[2]、あるいは、Monoamine Neuron の蛍光を増加させる[3]等の報告がある。また、CCについては、マウス及び老ラット全脳のDAの増加等の報告がある[6,8]著者らの結果では、Y群ではMH、CC共ほとんど変化を起こさなかった。これは生理的条件が整っているために変化しにくいことのためであると考えられる。一方、A群では、MHはNE量をSt、BSで増加させた他は、有意な変動を示さなかったが、CCは3種のアミンをかなりの部位で増減させている。特にDAのSt、5-HTのSt、Cor における変化は、実験上の生理的背景としての脳内アミンの加齢による変化を、若齢群のアミンの状態に近づける変化を示しており、これはCCの一つの特徴であるかもしれない。MHについて、その作用機序は脳内血流量の増加、グルコースの脳内移行の促進等がいわれてきているが、今回の実験では、少くともこの薬用量では直接脳内アミンに影響を及ぼさないことが示唆された。

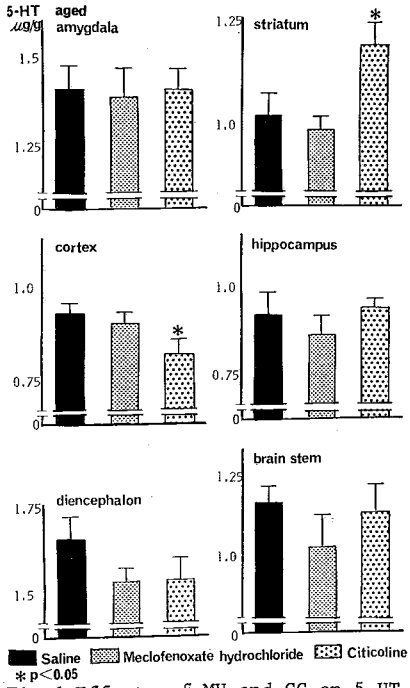


Fig.6 Effects of MH and CC on 5-HT
Vertical bars represent SEM

本研究の一部は第5回脳研究会で発表した。
本研究は昭和53年度文部省科学研究費奨励Aによった。

文献 1) Finch,C. E. : Brain Research 52,261- 276,1973 2) Glowinski,J. et al : J. Neurochem 13,655- 669,1966 3) 石原一郎他：環研年報 XXV 141- 145,1974 4) Jonec,V. et al : Brain Research 91, 197- 215,1975 5) Karasawa,T. et al : Japan J. Pharmacol 25,727- 736,1975 6) 木下ゆか子他：米子医誌 25,296- 299,1974 7) 古賀利枝：日薬理誌 72,397- 402,1976 8) 葛谷文男他：薬理と治療 2,41- 42, 1974 9) Robinson,D. S. : Fed Proc 103- 107,1975 10) Robinson D. S. et al : Arch Gen Psychiatry 34,89- 92,1977 11) Takahashi, R. and Aprison,M. H. : J. Neurochem 11,887- 898,1964

68 発生中のニワトリ骨格筋におけるアセチルコリンリセプターの等電点

石川裕二・嶋田　裕
（千大・医・解剖）

〔要　約〕

ニワトリ骨格筋のアセチルコリンリセプター(AChR)を蛇毒神経毒と結合させ，その複合体の等電点を調べた。

正常の筋からのAChR-毒複合体を等電点電気泳動すると，筋の種類および筋型に関係なくpH 5.6±0.05（酸性AChR-毒複合体）に主なピークが見出され，また支配神経を切断した筋からのものではpH 5.8±0.1（塩基性AChR-毒複合体）に主なピークが見出された。すなわち，ラットにおける場合[1]と同様に，ニワトリ骨格筋においても，わずかに異なる等電点をもつ2種類のAChRを見出した。

つぎに発生中の筋におけるAChRの等電点を調べたところ，8日胚の筋にはすでに酸性AChRが存在していることがわかった。以後いずれの時期の胚の筋においても，そのAChRは主に酸性AChRであった。神経支配の存在しない培養筋について調べてみると，培養の初期には2種類のAChRが同程度存在し，後期には塩基性AChRが多く存在するようになった。

以上の結果は，AChRの等電点は，AChRの局在性[2]および代謝的安定性[3]の変化とは別の時間的経過をもって分化することを示す。さらに培養筋における結果から，未分化の筋は2種類のAChRを合成していて，発生が進むにつれ，神経のあるなしにより，どちらかを主に合成するようになるのではないかと考察した。

AChRは正常の成体の筋では神経接合部に局在しているのに対し，支配神経を切断した筋および胚の筋では接合部以外に散在している。この接合部AChR(J-AChR)と接合部外AChR(EJ-AChR)の諸性質は互いに類似している[1]が，次の諸点では相違することが報告されている。① J-AChRはEJ-AChRより代謝的に安定である[5]。② J-AChRはα-tubocurarineに対してEJ-AChRより強い親和性をもつ[1]。③ J-AChRによるchannel open timeはEJ-AChRのものよりも短い[4][16][19]。④ AChRはある種の蛇毒神経毒と特異的に結合して複合体を生ずるが，J-AChR-毒複合体はEJ-AChR-毒複合体より，わずかながら酸性の等電点をもつ[1]。

われわれは神経筋接合の形成にともなって，AChRの性質がどのように分化してくるかに興味をもち，ニワトリ骨格筋とその細胞培養を用いて，AChRの等電点の変化について追求した。

方　法

材料　十分成長したニワトリ骨格筋として孵化後5-12週のニワトリ後広背筋（PLD），前広背筋（ALD），縫工筋，眼筋および孵化2週の胸筋を用いた。支配神経を切断した筋としては，孵化後7週のPLDについてその支配神経を切断し，6日後に筋を採取した。ニワトリ胚の筋としては孵卵後8-20日の胚の胸筋を用いた。培養筋としては，孵卵後12日胚の胸筋より得られる解離した筋原細胞（$1.5\text{-}3\times10^5$個）をFalconの培養皿（直径60 mm）にて1-7日間細胞培養（Shimada et al.[12]）したものを用いた。

蛇毒神経毒の放射能ラベル　AChRに特異的に結合する蛇毒神経毒の1つであるα-bungarotoxin（α-BGT）を粗毒（Miami Serpentarium Labs）より精製しそれに^{125}Iをラベ

ル (Seto et al.[11]) した。それより di-iodo 体 (^{125}I-α-BGT) を分離して (Vogel et al.[13]) 用いた。

毒の結合と AChR-毒複合体の抽出　筋あるいは培養筋を 8 nM ^{125}I-α-BGT を含む培養液中で，1.5-18 時間 incubate した後，Tyrode's solution で洗って，筋の AChR を ^{125}I-α-BGT でラベルした。これに 0.1-1 ml の可溶化液 (4% Triton X-100 と蛋白分解酵素阻害剤 aprotinin 250 U/ml を含む 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2) を加え，1.5-18 時間 撹拌して AChR-毒複合体を可溶化した。これを遠心 (30000 g × 1 時間) して上清を得，AChR-毒複合体として用いた。放射能は well 型の γ-counter を用いて直接測定した。上清には，筋に結合した ^{125}I-α-BGT の 57-86% までが回収された。

等電点電気泳動　AChR-毒複合体を Brockes と Hall[1] に従い，polyacrylamide gel を支持体として用い，等電点電気泳動した。泳動後，ゲルを 1.2 mm のスライスにして，それぞれの放射能を測定した。一方，1ml の蒸留水を各スライスに加え，24-48 時間後 Corning pH meter 130 で，その抽出液の pH を室温で測定した。

結　果

正常な筋と神経切断した筋における AChR-毒複合体

いろいろな局所より採取した正常な筋 (PLD, ALD, 縫工筋，眼筋，胸筋) を用いて，その AChR-毒複合体の等電点を調べた所，筋の型 (速筋，遅筋) あるいはその局所的位置の相違に関係なく，いずれの場合とも主要なピークは pH 5.6 ± 0.05 に見出された。図1にその若干の例を示す。

これに対し，神経を切断した PLD においては，pH 5.8 ± 0.1 に主要なピークが現われ，pH 5.6 には小さい肩が見られるのみであった (図1. C)。

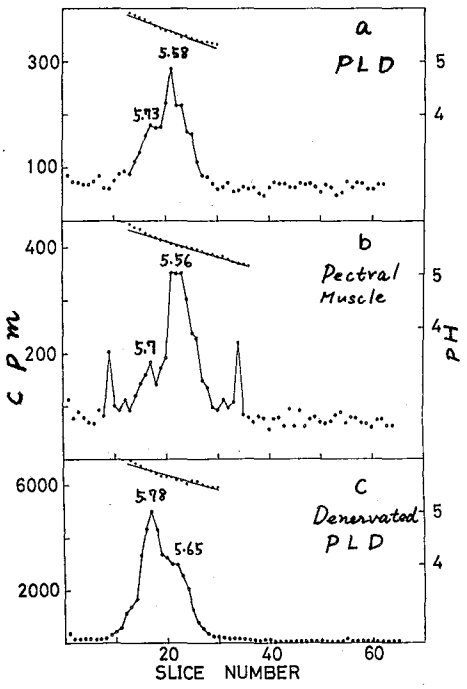


図1. 正常の筋と支配神経を切断した筋の AChR-毒複合体の等電点電気泳動

このことから，ラットにおける場合[1]と同様に，ニワトリ骨格筋においても，等電点の異なる少くとも2種類の AChR が存在することがわかった。

in vivo で発生中の筋における AChR-毒複合体

ニワトリ胚 (孵卵 8-20 日) の胸筋の AChR-毒複合体の等電点を調べた。いずれの時期においても，pH 5.6 と pH 5.8 を中心とする2つのピークが見出された (図2) が，孵卵 8 日目という早い時期も含めて，酸性 AChR-毒複合体のピークは塩基性 AChR-毒複合体のピークより常に高かった。

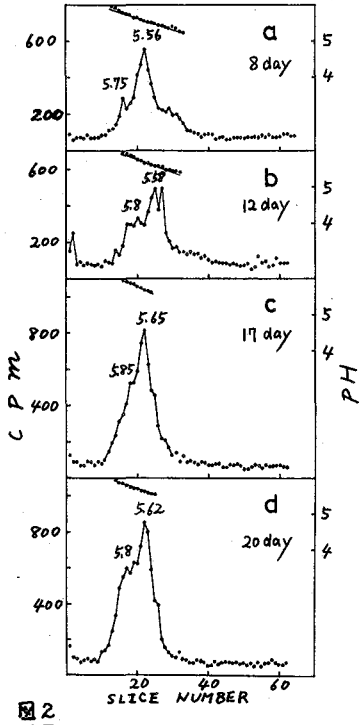


図2. *in vivo* で発生中の胚胸筋における AChR-毒複合体の等電点電気泳動

in vivo で発生中の筋における AChR-毒複合体

神経支配を受けていない *in vivo* の筋（孵卵5日胚の筋はすでに神経支配を受けていると考えられる[Lilly]。）を採取することは，技術的に困難であるので，その代わりに筋細胞の培養を用いた。筋細胞のみを細胞培養した場合，培養皿当りの AChR 量は図3のように発生してくる。すなわち筋原細胞の融合がほぼ完了する時期（培養3日目）より少し後に，AChR 量はその最大値に達し，以後横紋が多数の筋管に見られる時期になると，それは常に減少した。

この培養筋の AChR-毒複合体の等電点を培養日数を追って調べた（図4）。培養の初期には（1-3日），2つの明瞭なピークが pH 5.8 と pH 5.6 を中心に現われる（図4, a, c）が，後期

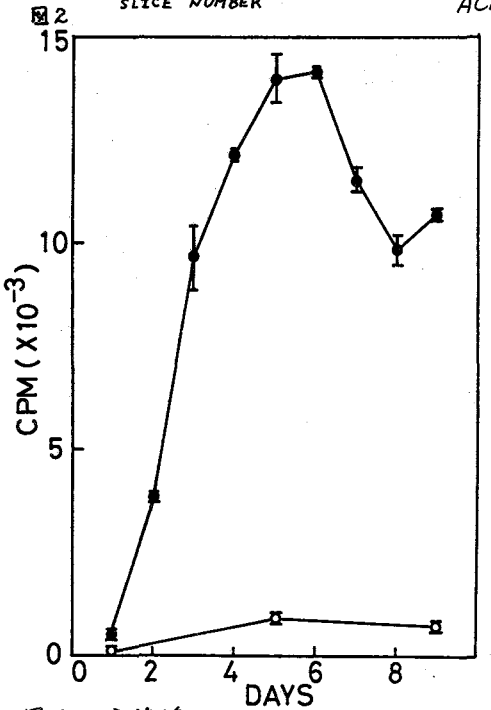


図3. 培養筋における AChR の発生

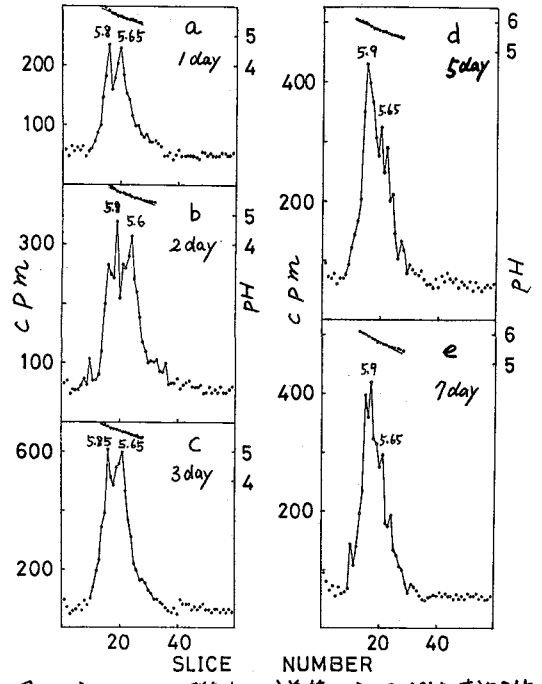


図4. *in vitro* で発生中の培養筋における AChR-毒複合体の等電点電気泳動

(5-7日)になると，酸性のピークは著明ではなくなった(図4, C, d)。

考察

本研究において，ニワトリ骨格筋においては等電点の異なる2つのAChR(pH 5.8±0.1とpH 5.6±0.05)，が存在することを示した。BrockesとHall[1]はラット横隔膜において正常の筋のJ-AChRは神経切断後のE-AChRより等電点がpH 0.15だけ酸性であると報告している。本研究での酸性AChRは正常のニワトリ筋では主成分であるのに対し，塩基性AChRは神経切断後の筋での主成分であることから，酸性AChRは彼らのJ-AChRに，塩基性AChRはE-AChRにそれぞれ相当するものと思われる。

ニワトリ骨格筋においては，神経筋接合部とAChRの性質は次のように発生することが今日までに知られている。①孵卵5日胚の筋は機能的に神経支配を受けている[7][10]。②AChRの接合部への局在は孵卵10日目頃から始まり，孵化5週後までにほぼ完了する[2]。③接合部に局在するAChRは孵化3週後に代謝的に安定になる[3]。ニワトリ骨格筋におけるAChRの等電点を，胚の筋を用いて調べたところ，孵卵8日目に，すでに酸性AChRが出現していることをわれわれは見出した。それ故，ここでみられた酸性AChRは接合部以外に散在し[2]，しかも代謝的に不安定なもの[3]であると考えられる。このことより，AChRの諸性質の分化は別々の時間的経過をもっていることが示唆される。

筋の諸性質の分化に神経支配が影響することは当然想像されているところである。AChRの等電点に対する支配神経の影響を探るために，神経支配を受けてない筋について調べる必要があるが，そのような早期の筋を摘出するのは技術的に困難であるので，1つの方法として，神経の影響のない状態下で筋を分化させて，そのAChRの等電点の変化を調べることを行った。その結果，神経支配を受けていない未分化の培養筋は酸性AChRと塩基性AChRとを同程度もっていることを見出した。この酸性AChRは，培養の材料とした12日胚の筋に既に存在していたものが，そのまま現われたのではなく，培養中に新たに合成されたものであることは図3から明かである(培養筋のAChR量は主にAChRの合成によって調節されている[5])。材料とした筋のもっていた酸性AChR合成能が培養系でも発現された可能性を否定し切れないが，酸性AChRの最初の出現は神経支配に依存しないようである。

従って，神経支配を受けていない未分化の胚の筋も同様に両種のAChRを同時に同程度合成していることが示唆される。筋が神経の影響なしに分化すると，2つのうち主として塩基性AChRを合成するようになり(培養後期の培養筋の場合)，神経支配を受けつつ分化すると主として酸性AChRを合成するようになる(8日以後の胚の筋，正常の筋の場合)と考えられる。胚には多種のタイプの同種蛋白が存在し，その中から成体のタイプの蛋白のみが選ばれて残ること，が分化の過程で起ることはいくつかの蛋白の発生においてすでに報告されている[8]ところである。

《文献》

(1) Brockes, J.P., and Hall, Z.W. (1975) Biochemistry 10, 2100 (2) Burden, S. (1977) Develop. Biol. 57, 317 (3) Burden, S. (1977) Develop. Biol. 61, 79 (4) Dreyer, F., Walther, C., and Peper, K. (1976) Pflügers Arch. 366, 1 (5) Fambrough, D.M. (1979) Physiol. Rev. 59, 165 (6) Katz, B., and Miledi, R. (1972) J. Physiol. (London) 224, 665 (7) Landmesser, L., and Morris, D.G. (1975) J. Physiol. (London) 249, 301 (8) Masaki, T., and Yoshizaki, C. (1974) J. Biochem. 75, 1193 (9) Neher, E., and Sakmann, B. (1976) J. Physiol. (London) 258, 705 (10) Ripley, R.P., and Provine, K.L. (1972) Brain Res. 45, 127 (11) Seto, A., Arimatsu, Y., and Amano, T. (1977) J. Biochem. 82, 1019 (12) Shimada, Y., Fischman, D.A., and Moscona, A.A. (1967) J. Cell Biol. 35, 445 (13) Vogel, Z., Sytkowski, A.J., and Nirenberg, M.W. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3180

69 マウス扁桃体におけるα-ブンガロトキシン結合活性の性差およびその生後発生

有松靖温・瀬戸章子・天野武彦
(三菱生命研)

〔要約〕

性機能に深く関連した部域であると考えられているマウスの扁桃体の一部，後部内側扁桃核には，ニコチン性アセチルコリンレセプターの候補であるα-ブンガロトキシン結合物質が多く含まれている。この後部内側扁桃核は雌雄においてそれぞれ異った機能を持っている可能性があるので，この部位のα-ブンガロトキシン結合活性をオートラジオグラフィーおよび生化学的方法によって雌雄別々に測定した。^{125}Iで標識したα-ブンガロトキシンを用いたオートラジオグラフィーによって，成熟した雄マウスの後部内側扁桃核におけるα-ブンガロトキシンの結合密度は雌のそれより有意に高いことが明らかとなった。また特異的結合量のScatchard plotによって，α-ブンガロトキシンの結合量の雌雄差が結合の解離定数の違いによるのではなく結合部位の数によっていることがわかった。また成熟した雄マウスの生殖腺を除去すると，有意にα-ブンガロトキシンの結合密度が減少したが，雌の生殖腺を除去した場合は有意な差は検出できなかった。後部内側扁桃核のα-ブンガロトキシン結合物質は出生直後にすでに検出されるが，その中心部の結合密度は生後の早い時期に上昇して7~14日頃最大に達し，その後除々に減少することがわかった。出生直後を除く生後発生の全時期を通じて，雄における結合密度の方が雌におけるそれよりも高かった。結合の量が最大に達する14日令においても，その結合の解離定数は雌雄とも成熟マウスと同様の値を示した。

〔序〕

最近我々はマウスの後部内側扁桃核において，ニコチン性アセチルコリンレセプター（nAChR）の候補であるα-ブンガロトキシン（α-BGT）結合物質が多量に存在することを見出した（1）。この部域を含む扁桃体の皮質－内側核群はエストラジオールやテストステロンの様な性ステロイドをとり込むニューロンを数多く含み（4,6），またその電気化学的刺激やカルバミルコリンの植込みによって排卵を誘発させることができる（2,7）ことなどから，性機能に深く関連した場所であると考えられる。そこで成熟マウスの雌雄において，後部内側扁桃核のα-BGT結合活性をオートラジオグラフィーおよび生化学的方法により比較し，またその生後発生過程における変化を調べた。

〔実験材料と方法〕

1) オートラジオグラフィー

実験材料　成熟した正常マウス（C57BL/6J）の雌雄と，その生殖腺を除去して3週間経過したもの，および生後0~35日の正常な幼若マウスの雌雄を用いた。

実験方法　動物の心臓より4%パラホルムアルデヒドで還流固定し，脳をとり出してさらに同固定液で14時間固定した。クリオスタットで厚さ16μmの凍結切片を作製して，25°Cの5nM[^{125}I]α-BGTを含む溶液中で30分間インキュベートした。対象群としては，隣接した切片を上記溶液に10^{-4}M D-ツボクラリンを加えたものでインキュベートした。4°Cのリン酸緩衝生理食塩水（pH7.2）で6回，計30分間洗い，95%エタノールで後固定し，さらに充分乾燥させた後，オートラジオグラフィー用乳剤Sakura

NR-M2を用いてオートラジオグラムを作製した。後部内側扁桃核を含む切片は80μm毎にその中心部を暗視野顕微鏡にて写真撮影して1600μm²あたりの現像銀粒子数を計測し，その平均値をもってその個体のα-BGT結合密度とした。

2) 生化学的測定

実験材料　成熟に達した正常マウスおよび生後14日の幼若マウスの雌雄を用いた。

実験方法　クリオスタットで脳の新鮮凍結切片を作製し（厚さ 120 μm），ヘヤードライヤーを用いてスライドグラス上で急速に乾燥させた。これらの切片から後部内側扁桃核を含む部域を実体顕微鏡下で切り出してホモゲナイザーに集めた。切り出しの際には後部内側扁桃核に続く海馬領域（この部域もα-BGT結合活性がある）を含めないように留意した。また，成熟マウスは5個体分，14日令マウスは4個体分をプールして使用した。集めた材料にphenylmethylsulfonylfluoride，NaN_3を含むリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.2）250 μl を加え，氷中でホモゲナイズした後分注した。分注した試料に，牛血清アルブミン（BSA，2mg/ml）を含む緩衝液，あるいは同緩衝液にとかした標識されていないα-BGT（5μl）を加え，25°C で15分インキュベートした後，種々の濃度の[^{125}I]α-BGT溶液（10μl）を加えた。25°C でさらに20時間インキュベートした試料に，氷冷したBSAを含む緩衝液1 ml を加え，EGWP フィルター（Millipore）上でろ過した。用いた試験管を1 mlずつ2回洗い，その洗液を同様にろ過した後，フィルターを2 mlの同緩衝液で4回洗った。加えた[^{125}I]α-BGTの量およびフィルター上の結合量は，ベックマンのオートガンマーで測定した放射能（dpm）と各時点における比放射能より算出した。標識されていないα-BGT存在下で結合した量を非特異的結合として，非存在下における結合量から差し引き，それを特異的結合とした。

〔結果〕

1) オートラジオグラフィー

既報のように（1），正常な成熟雄マウスの後部内側扁桃核には大きなα-BGT結合活性が認められた（Fig. 1-A）。この部域はラット等における，ScaliaとWinans（1975）のB₃領域，KrettekとPrice（1978）の扁桃ー海馬野に相当し，海馬領域に続いている。雌の後部内側扁桃核にも[^{125}I]α-BGTの結合がみられたが（Fig. 1-B），その中心部の結合密度は雄のそれよりも有意に低かった（Fig. 2）。また雄の生殖腺を除去するとα-BGTの結合密度が有意に低下したが，雌の場合，生殖腺除去によって有意の差は検出できなかった。生殖腺を除去しても，依然として雌雄差が存在した（Fig. 2）。

後部内側扁桃核のα-BGT結合活性は雌雄ともに出生直後にすでに存在しているが，加令とともに結合量を増し，生後14日頃に最大に達するのが観察された（Fig 1-C, D）。中心部の密度も同様に上昇するが，雄の方が雌よりも早くピークに達する（Fig. 3）。その後除々に結合の量および密度を減じて，生後28～35日には成熟マウスのレベルに達する。中心部の結合の密度は出生直後では雌雄差がないが，7日以後はずっと，雄における結合密度の方が雌におけるそれよりも高い値を示した。

以上の実験で使用したすべての動物の後部内側扁桃核において，[^{125}I]α-BGT の結合は 10^{-4}M のローツボクラリンで阻害された。

2) 生化学的測定

後部内側扁桃核を含む部域を種々の濃度の[^{125}I]α-BGT とインキュベートした時の特

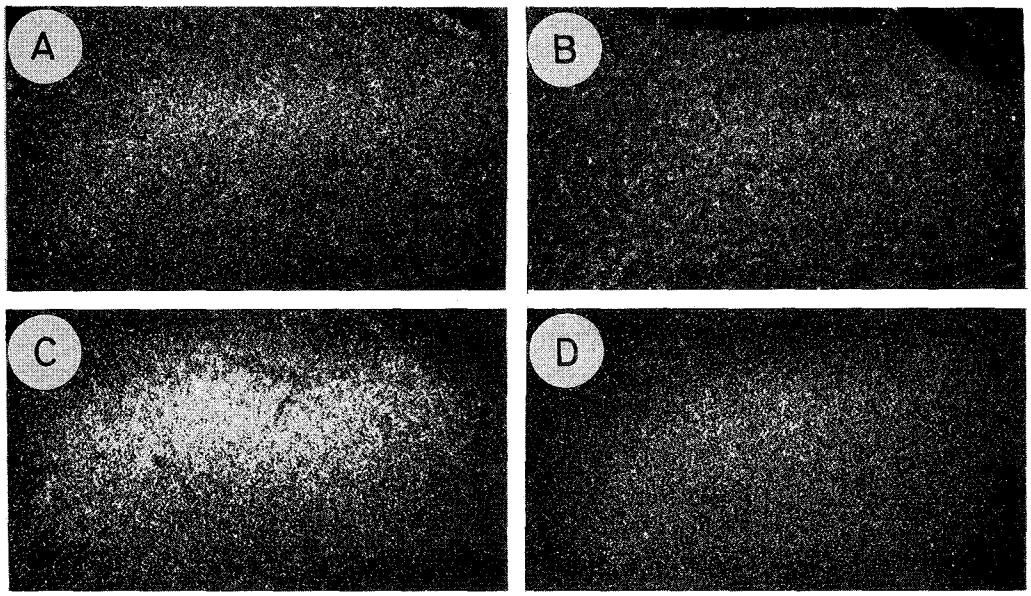


Fig.1 マウス後部内側扁桃核における[^{125}I]α-ブンガロトキシン結合部位のオートラジオグラム。 A, 成熟雄; B, 成熟雌; C, 14日令雄; D, 14日令雌。初めの比活性, 150 Ci/m mole。露出時間, 28日。倍率, x200。

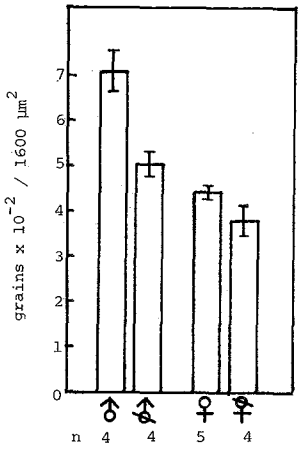


Fig.2 マウス後部内側扁桃核における[^{125}I]α-ブンガロトキシンの結合密度。♂,正常雄; ♀正常雌; ⊗生殖腺除去雄; ♀生殖腺除去雌。I, 標準誤差。♂ vs ♀, P<0.001; ♂ vs ⊗, P<0.01; ⊗ vs ♀, P<0.02

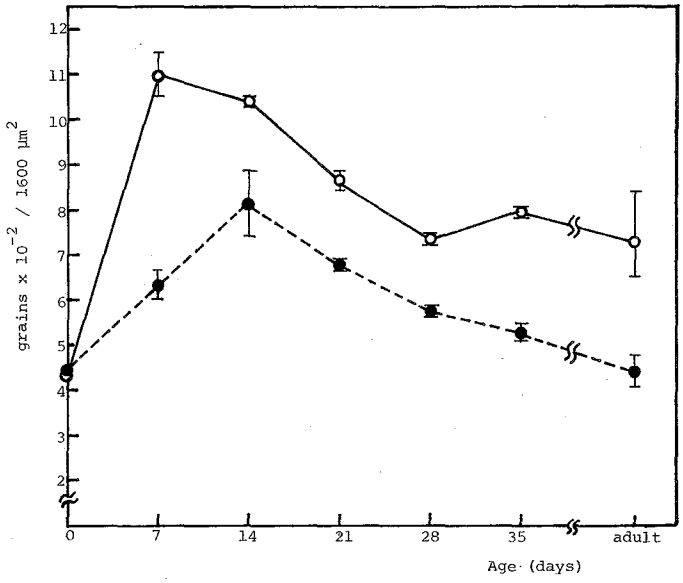


Fig.3 マウス後部内側扁桃核における[^{125}I]α-ブンガロトキシンの結合密度の生後発生過程における変化。o-o, 雄; •---•, 雌。0~35日令(n=2); adult(n=4)。I, 最大(小)値。

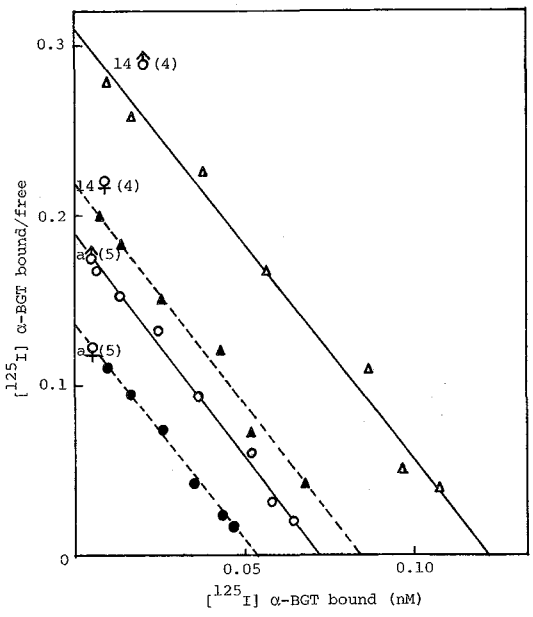


Fig.4 後部内側扁桃核に対する[^{125}I]α-ブンガロトキシンの結合のScatchardプロット。生後14日マウスの雌（14♀,▲），同雄（14♂,△），成熟マウスの雌（a♀,●），同雄（a♂,○）。（ ）内の数字は，1回のホモジネートに使用した個体数である。

異的結合量のScatchardプロットの図（Fig.4）から算出される解離定数は，生後14日マウスの雌雄，成熟マウスの雌雄，いずれにおいても3.8～4.1×10^{-4} Mで，有意の差はなかった。それに対して，結合物質の数は，1個体あたりの数，およびmg蛋白あたりの数で
14日令雌，12.6 fmole (57.3 fmole/mg蛋白)
14日令雄，18.5 fmole (84.1 fmole/mg蛋白)
成熟雌，6.7 fmole (25.8 fmole/mg蛋白)
成熟雄，8.6 fmole (33.1 fmole/mg蛋白)
であった。

〔考察〕

正常成熟マウスの後部内側扁桃核のα-BGT結合活性（結合の親和性ではなく，結合部位の数による）に雌雄差があることから，この部位の性機能にnAChRが関与していることが予想される。雄マウスにおいては，このnAChR様物質は生殖腺を除去することによって変動することから，性ホルモンによって調節されていることが明らかになった。出生後0～14日におこるα-BGT結合活性の著しい上昇の個体にとっての意味は現在のところ不明であるが，シナプス形成に関連していることも充分予想される（8）。またこの時期に雌雄差が生ずることから，この頃雌雄の神経回路網の分化がおこると思われる。この点，げっ歯類の脳の性分化が周生期の性ホルモンによって決定されるとする従来からの知見を考えあわせると興味深い。

〔文献〕

1 Arimatsu,Y., Seto,A. and Amano,T. (1978) Brain Res. 147, 165
2 Beltramino,C. and Taleisnik,S. (1978) Brain Res. 144, 95
3 Krettek,J.E. and Price,J.P. (1978) J.comp.Neurol. 178, 225
4 Sar,M. and Stumpf,W.E. (1972) Experientia 28, 1364
5 Scalia,F. and Winans,S.S. (1975) J.comp.Neurol. 161, 31
6 Stumpf,W.E. and Sar,M. (1971) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 136, 102
7 Velasco,M.E. and Taleisnik,S. (1969) Endocrinology 84, 132
8 Vogel,Z. and Nirenberg,M. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 73, 1806

70 筋細胞から遊離される脊髄成長促進因子

田中英明・小幡邦彦
(群大・医・薬理)

〔要約〕

骨格筋、心筋細胞の培養に使用した培養液(Conditioned Medium, CM)を脊髄等の培養に加えると神経突起の成長が促進されることを見出した。この促進効果は脊髄，網膜，視蓋ならびに毛様体、上頸，後根神経節に対してみられ、組織片(explant)の培養と単離ニューロンの培養で同様であった。一方小脳、大脳の神経細胞にはこの効果はみられず、また脊髄において背側半に比べ腹側半の成長が顕著であった。CMの効果は神経成長因子(NGF)の抗血清で影響されず、アルカリ処理で失われること等からNGFによるものではない。CMはまた非神経性細胞の増殖を促進した。CMの脊髄成長促進因子はニワトリとラットの間に種特異性がなく、塩析される高分子物質であり、たぶん蛋白質と考えられる。Sepharose 6Bによりゲル濾過を行うと5つの分画に活性がみられた。最も活性の高い第II分画はDEAE-Sephadexを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより比活性が約10倍上った。

培養系において交感，感覚由神経節細胞の成長には神経成長因子NGFが必要であり[3]，最近，組織抽出液や他の細胞の培養に用いた培養液(Conditioned Medium, CM)がNGFに代りうることも示されている。[1),4)] 一方中枢神経細胞はNGFを加えなくてもある程度成長し、NGFは影響しない。培養において中枢神経系の成長が不十分であるのは，これらの細胞に特異的な成長因子が欠けているためであるとも考えられている[3]。われわれは骨格筋と心筋細胞によるCMによりニワトリ胚脊髄等の神経突起の成長が著しく促進されることを見出した。[5)] ここではCMの各種細胞に対する効果と活性因子の生化学的性質について報告する。

〔実験方法〕

1) Conditioned Medium(CM)の作製

骨格筋はふ卵10～12日目ニワトリ胚の胸筋、大腿筋、新生ラットの大腿筋を、心筋はニワトリ胚，新生ラットの心室をとり、これを0.25%トリプシンで処理して分離された細胞を組織培養用フラスコ(Falcon 75cm²)を用い、ウシ胎児血清(Flow Laboratories 10%)を加えたEagleのMEMで培養した。培養液の交換は3～4日おきに行い、細胞がフラスコ全面に成長した後のもの(2回目以後)を集めてCMとした。また2回目より血清を加えないMEMを用いて培養を続け、集めたCMを無血清CMとした。骨格筋によるCMをMCM，心筋のものをHCMとよぶ。

2) 神経組織の培養

ニワトリ胚，ラット胎児から得た神経組織を組織片(explant)または単一ニューロンにして，コラーゲンを塗布した培養皿(Falcon 35mm)で培養した。培養液として

血清入りCMはそのまま用い，無血清CMにはウシ胎児血清10%を加えた。コントロールには新鮮なMEM(10%ウシ胎児血清添加)を用いた。脊髄からの神経突起成長はexplantから300μm以上伸びた突起を数え、0本をスコア0，1～10本をスコア1，10本以上をスコア2としてexplant当りの平均を求めた。

3) ゲル濾過，イオン交換クロマトグラフィー

CMを凍結乾燥し少量の蒸留水に溶解してゲル濾過のサンプルとした。グルコース，フェールレッドを含まないEarle液($NaCl$ 117mM，KCl 5mM，NaH_2PO_4 1mM $MgSO_4$ 1mM，$CaCl_2$ 2mM，$NaHCO_3$ 15mM)で平衡化したSepharose 6B(2cm×45cm)を用い同液で溶出した。蛋白質量は280nmの吸光度を用いて表わした。各分画にアミノ酸，ビタミン，グルコースを加えMEMと同じ組成にし濾過滅菌後，脊髄に対する成長効果を上の方法でアッセイした。イオン交換クロマトグラフィーを行う場合はサンプルを10mMリン酸緩衝液(pH 7.4)を用いて透析した。同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex(1cm×10cm)に添加しNaCl濃度勾配により溶出した。各分画はMEMで透析し濾過滅菌後アッセイした。

〔実験結果及び考察〕

1、脊髄に対する効果

コントロールにおける6～8日目ニワトリ胚脊髄explantからの神経突起の成長は20～24hrで100～150μm，2日後で200～600μmに達するが，その先端はゆず，遊走する非神経性細胞に付着していた。また神経突起の多くは集まり束を形成していた。一方CMでは状況はまったく異る。多くの神経突起は非神経性細胞を伴なうことなく伸びた。20～24hrで500μm以上，2日後には1000μmに達し，各神経突起の先端は束状にならずに個別に成長した。また非神経性細胞の遊走は同様かむしろ抑えられているようであった。20～24hr後のMCMによる成長を表1に示す。MCMでは約60%のexplantがスコア1または2であり，CMのサンプルごとの平均値は0.4～1.4であった。8日目ニワトリ胚脊髄の腹側，背側半を比較すると腹側半からの成長が良好であった。10～12日目ニワトリ胚のexplantでは成長を開始する時間が遅れ，突起の数も少ないが、同様な促進効果がみられた。また培養2日目にコントロールからCMに変えた場合にも有効で、3日目に効果がみられた。分離した単一ニューロンでも有効であった。ふ卵6日目の脊髄をトリプシンにより単一細胞に分離し、低い細胞密度(1～2×10^{5}個/35mm培養皿)で培養した場合，コントロールでは突起を出すことなく変性消失したが、CMでは生存し突起を伸ばしてネットワークを作った。

Table 1. Neurite outgrowth in culture from explants of 6 d, 8 d embryonic chick spinal cord.

Embryo age days		Medium	No. of experiments	No. of culture dishes	No. of explants tested	No. of explants with score 0	1	2	Mean score per explant
6	whole cord	fresh MEM	5	8	78	78	0	0	0.00
	whole cord	MCM	5	10	156	51	54	51	1.00
8	whole cord	fresh MEM	2	2	11	11	0	0	0.00
	whole cord	MCM	2	2	34	17	11	6	0.68
	ventral part		2	2	32	13	6	13	1.00
	dorsal part		2	3	20	15	3	1	0.25

2、脊髄以外の神経組織

6～8日目ニワトリ胚の網膜，視蓋にも数は少ないが同様に神経突起の成長がみられた。しかし6～10日目ニワトリ胚小脳，大脳に対しては効果がなかった。

10日目ニワトリ胚からの毛様体，後根神経節はコントロールの培養液でNGFを加

えなくても非神経性細胞の遊走に伴われて神経突起を伸ばし、CMにより脊髄と同様その突起成長は著しく促進された。

10～14日目胚からの上頸神経節と7～8日目胚からの後根神経節はNGFが存在しないコントロールでは僅かに神経突起を出すのみであり、NGF (Collaborative Research) 5～50 U/ml を加えることによりこれらの神経節は多数の神経突起を出した。この場合多くは非神経性細胞の遊走に付随していた。CMはNGFを加えた場合，加えない場合ともこれらの神経節において成長する神経突起の長さと数を増加させた。CMの促進効果は網膜，視蓋，神経節から分離された単一ニューロンでも認められた。

3、NGFとの比較

培養骨格筋から少量のNGFが放出されていることが知られているが[4] 次のことからCMの効果はNGFとは別の因子によることを示す。 1) NGFによる神経節の神経突起は束をなし非神経性細胞に付着している。一方CMによる神経突起は分離して成長し細いネットワークを作った。2) 神経節からの成長はNGFの量に依存し、高濃度では飽和する。NGFで飽和に達した成長がCMによりさらに促進された。3) CMの活性は酸処理 (pH1.5 1 hr) により変化せず、アルカリ処理 (pH12.8 1hr) により失活した。NGFの安定性はこの逆である。[2] 4) 1/200 に希釈した抗NGF抗血清 (Collaborative Research) は 50 U/ml NGFによる後根神経節からの突起成長を阻止し、CMによる後根神経節及び脊髄からの突起成長は 1/200～1/50 に希釈した抗血清で阻止されなかった。

4、その他のCM

HCMはMCMと同様に有効であったが、ニワトリ胚の脊髄，小脳，大脳の細胞培養で得られたCM及びラット褐色細胞腫PC12によるCMは脊髄からの神経突起成長に無効であった。またニワトリ胚抽出液 (2.5～10%)，ニワトリ血清 (5～10%) も無効であった。ラットの筋細胞を培養して得たMCM，HCMもニワトリ胚脊髄に有効であった。ニワトリのMCM，HCMは13～17日目ラット胎児から得た脊髄に有効であり、神経突起の成長に関し種特異性はニワトリとラットの間でみられなかった。

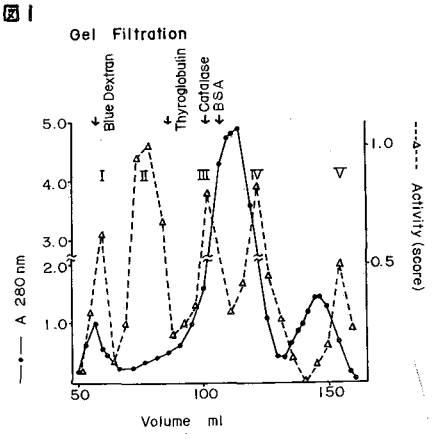
5、非神経性細胞に対する効果

CMはまた次の細胞の増殖を促した。ニワトリ胚胸筋の筋原細胞と線維芽細胞，ニワトリ胚心筋の拍動している心筋細胞と線維芽細胞，12日目ニワトリ胚脊髄のグリア細胞。脊髄の培養において、10^{-5}M cytosine arabinoside で非神経性細胞の増殖を抑えた場合、ニワトリ血清の添加で増殖をさらに促進した場合とも、神経突起の成長に差はみられなかった。したがって神経成長は非神経性細胞の増殖による二次的効果ではないと考えられる。

6 MCMに含まれる脊髄成長促進因子の性質

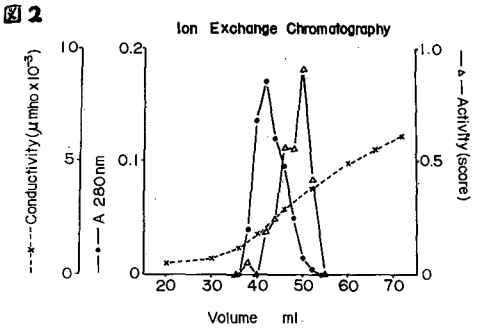
この因子は熱処理 (56°C 30 min) により失活

図1



し、60～80%飽和硫安により塩析され、透析されなかった。アミコンダイアフロー膜XM-300（分画分子量30万）を通過しない高分子物質であり、たぶん蛋白質と考えられる。凍結乾燥しても活性が残りpH12.8で1時間処理すると失活するがpH1.5で1時間では失活しなかった。また4°Cで2～3ヶ月保存しておいても失活しないことから安定性の高い物質と考えられる。無血清CMに含まれる蛋白量は約50μg/mlであった。

図2



血清入りMCM 100mlを凍結乾燥により濃縮し、Sepharose 6Bを用いてゲル濾過した結果を図1に示す。分子量の目安としてBlue Dextran 2000, thyroglobulin（分子量669,000）Catalase（232,000）ウシ血清アルブミン（67,000）についてもゲル濾過を行った。活性はI～Vの5つの分画に分かれ、最も比活性の高いIIの分画は分子量約100万に相当する。無血清MCMも同様な5つのピークに分かれた。

IIの分画についてDEAE-Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。活性因子は吸着され300mM NaCl（Conductivity 3.5m mho）近くで主蛋白と分離して溶出された。これにより比活性は約10倍高くなった。さらに精製を試みるとともに、他の活性分画との関係を検討中である。またCMは神経以外の神経突起成長の促進，非神経性細胞の増殖促進などの効果をもっており、これが単一の因子によるのかどうか今後明らかにしなければならない。

山下尊、保坂公平博士の御助言に深く感謝する。

〔引用文献〕

[1] Burnham P., Raiborn C. & Varon S. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3556 (1972).
[2] Helfand, S. L., Riopelle, R. J. & Wessells, N. K. Exp. Cell Res. 113, 39 (1978).
[3] Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P. U. Physiol. Rev. 48, 534-569 (1968) and in Growth of the Nervous System, A Ciba Foundation Symposium (eds Wolstenholme, G. E. W. and O'Connor, M.) 126-147 (Churchill, London, 1968).
[4] Murphy, R. A., Singer, R. H., Saide, J. D., Pantazis, N. J., Blanchard, M. H., Byron, K. S. Arnason, B. G. W. & Young, M. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4496-4500 (1977).
[5] Obata K. & Tanaka H. Submitted.

71 ニューロブラストーマ・グリオーマ雑種細胞の分裂増殖とシナプス形成に対するグリア成長因子の効果

東田陽博(名大・環研),加藤泰治(名市大・医・生化),三宅彰英(岐大・医・反射研)
田中恭子(愛知ガンセンター),田中　亮(名市大・医・生化),田中達也(愛知ガンセンター)

〔要　約〕

ニューロブラストーマ(N18TG2)とグリオーマ(C6BU1)との雑種細胞NG108-15の細胞増殖と分化におよぼすグリア細胞成長因子(GMF)の効果を調査した。GMFはウシ大脳から抽出し、DEAE-Sephadexステップまで部分精製した。この標品を用い、N18TG2, C6-BU1, NG108-15の細胞分裂増殖に対する効果を5%血清下で比較検討した。GMFは、C6BU1とNG108-15に影響をおよぼし、30~110%の細胞数増加をもたらしたが、N18 TG2には無効果であった。NG108-15の細胞増殖とオートラジオグラフィーでみたDNA合成に対する効果はGMFの濃度に依存していた。したがって、GMFはグリア細胞に特異性を持ち、その性質はNG108-15に受けつがれ、形質として表現されていることが明らかになった。

GMF刺激後1~3日間、分化に特徴的な形態変化はNG108-15には観察されなかった。NG108-15の培養横紋筋とのシナプス形成の割合はGMF存在下では抑えられ、Bt₂-cAMP処理群とは対照的であった。GMFがNG108-15の細胞を分裂させ未分化な状態にとどめておくためと理解される。

一方染色体分析により、NG108-15に両親細胞由来の染色体の存在が確認された。

以上の結果は、両親細胞由来の遺伝子構成からなるNG108-15の細胞膜構成はマウスとラットのモザイクで、膜表面にGMFの受容体様分子が存在することを示唆している。

ニューロブラストーマN18TG2とグリオーマC6BU1との細胞融合の結果得られたNG108-15細胞はマウスとラットの異種間雑種細胞で、双方からの遺伝子を保持している[1,5]。通常仔牛血清存在下で増殖し、約24時間で倍化する。この細胞を1mM Bt_2cAMPで1週間処理すると正常神経細胞様の分化した細胞になる。活動電位を発生し[5][9]、Ca^{++}の存在下80mM K^+の還流でアセチルコリン(ACh)を遊離し[8]培養横紋筋とシナプスを形成する[11][10]等、神経機能研究に好適である。

ブタ脳より抽出されたグリア成長因子(GMF)はグリア細胞の成長を促す因子としてLimらにより発見され[7]糖タンパク質であることが明らかにされた[6]。GMFがグリア細胞に作用するなら、グリア細胞由来の雑種細胞の増殖にも効果があるのではないかとの前提に立って実験した結果、NG108-15の細胞増殖を刺激することが判明した。今回新たに、ウシ大脳よりGMFを部分精製し、この標品で両親細胞とNG108-15の分裂と分化におよぼす影響を調査した。

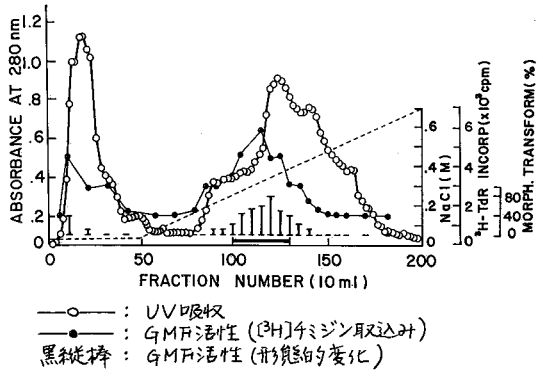
〈実験材料と方法〉

N18TG2, C6BU1とNG108-15は米国NIHのNirenberg研究室から分与された。これらの細胞は10%CO_2と90%空気中で、10%FCSを加えたDMEM(GIBCO)で培養した。NG108-15には0.1mMヒポキサンチン、16μMチミジンに1μMアミノプテリン(HAT)を添加した。増殖実験はCaとMgを除いたリン酸緩衝液で洗った後1万~30万個の細胞を35ないし60mmの皿に移し、1日後血清量を5%に落したメディウムに0.01~0.3mlのGMFを加え刺激した。細胞数をコールターカウンターで計測した。シナプス形成と電気生理学的実験はPuroとNirenbergの方法によった[11]。

〈結　果〉

GMFの部分精製　ウシ脳500gに0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)を加え、25%(w/v)のホモジェネートを作り、この遠心上清を粗脳抽出液とした。透析、凍結乾燥した粗脳抽出液を冷却エタノール(100%)で処理後、0.02Mトリス塩酸緩衝化食塩水で16時間抽出した。抽出液のNaCl濃度を下げるため、一旦、0.02Mトリス緩衝液で5倍に希釈後DEAE-Sephadex A-50に吸着させた。0.05M NaCl含有トリス緩衝液で十分洗った後NaClのlinearグラジエントで溶出した。GMF活性は0.02～0.40M NaClに溶出された(図1)。GMF活性は培養グリア芽細胞の分裂増殖能([^{3}H]チミジンのDNAへのとりこみ)と細胞自体の形態的変化観察(扁平グリア芽細胞が多極性のグリア突起を形成する)の2つの方法で測定した。精製の結果は表1に示す通りである。

図1. DEAE Sephadex溶出パターン



GMF効果の血清依存性　C6BU1で粗抽出液の細胞増殖刺激効果と血清依存性を検討した。粗抽出液(150μg/ml)を加えてから4日後の細胞数は血清0.1, 1, 5および10%存在下で対照群に比べ、それぞれ179, 176, 245, 79%であった。この結果、細胞分裂増殖のGMF効果は5%血清で最も顕著であることが観察され、以後測定は5%血清下で行った。

GMFの特異性　GMFの細胞増殖刺激効果を3種類の細胞で比較調査した。粗抽出液(150～300μg/ml)で刺激し、1～4日後の細胞数はC6BU1とNG108-15で29～110%(平均28と38%)増加した。同じ条件下のN18TG2は0～15%(平均7%)の減少を示した。

表1.

PURIFICATION OF GMF ON MITOGENIC ACTIVITY

FRACTION	SPECIFIC ACTIVITY (cpm/mg prot.)	PURIFICATION FOLD	RECOVERY (%)
CRUDE BRAIN EXTRACTS	1,470	1	100
DEAE-SEPHADEX	60,000	41	22.2

表2. DEAE-分画GMF刺激による細胞数の変化

Cell line		Cells per 60-mm dish x 10^{-3}		% Increase
		Control	GMF(+)	
Neuroblastoma	N18TG2	132	141	7
Glioma	C6Bu1	41	55	36
Hybrid cell	NG108-15	20	26	31

DEAE分画GMFによっても同様の結果を得た。表2は20μg/mlのGMF刺激後24時間目に計測した結果で、C6BU1とNG108-15では30%以上の増加がみられたが、N18TG2では誤差範囲内の7%の変動しかなかった。

濃度依存性　DEAE分画GMFの濃度を変え、NG108-15に対する細胞増殖効果を調べた。図2に示すように、20～500mg/mlまでは効果がなく、2μg/ml付近で刺激があらわれ、最高69%の増加がみられた。C6BU1でも同じ濃度(4μg/ml)で刺激効果が観察された(図では示さない)。

オートラジオグラフィー　NG108-15のDNA合成に対するGMFの効果をみるため^{3}H-サイミジンの取りこみをGMFとBt_2-cAMPで比較した(表3)。3uCi/mlの^{3}H-サイミジンと細胞をそれぞれの条件下で18時間インキュベートし、DMEMで2回洗い、固定の後オートラジオグラフィーの処理をした。粗抽出液によりラベルされた細胞のされないものに対する割合は濃度依存的に増え、300μg/mlでは対照群より24%多かった。Bt_2cAMP処理細胞群ではラベルされた細胞の割合は32%で対照群に比べ半分の52%にすぎなかった。

分化におよぼす影響　GMFは初代培養グリア細胞に突起を持つ成熟グリア細胞様の形態変化を生じさせることが報告されている[7]。事実、GMF刺激により、C6-BU1は球形から細長い突起を持つ細胞に変化した。NG108-15は刺激後1～3日間で、凝集状態が少くなり、皿底によく付着し、増殖期に出現する小突起をもつ細胞になった。また細胞分裂も頻発し、分化の徴候は認められなかった。

一方、NG108-15は培養横紋筋とシナプスを形成するので、シナプス形成を分化の指標としてGMFの効果を検索した。3日間Bt_2cAMP存在下でcocultureした結果約30%の筋線維からAChによるシナプス性反応が検出されたが、粗抽出液存在下ではシナプス反応は記録できず、対照群以下であった(表4)。

染色体分析　細胞をコルセミドで処理して分裂中期像を集め、低張KClで膨潤した後染色体を調査した。N18-TG2の染色体のmodal number1は61でマーカーとなる大型メタセントリック染色体を7個前後持つことが明らかとなった。NG108-15の染色体は120～160に広がり、特に140前後にピークがみられた。なおマーカー染色体を11～12個

図2. NG108-15細胞の増殖のGMF濃度依存性

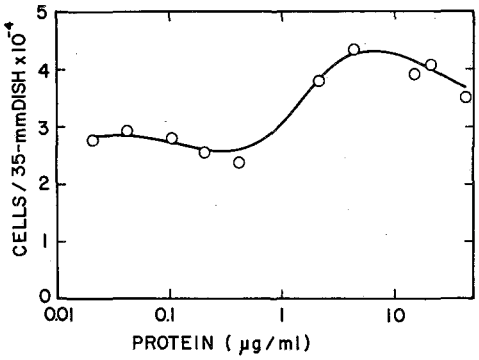


表3

Effect of various conditions on percent of NG108-15 cells labeled with ^{3}H-thymidine

Condition	Concentration	%Labeled cell	Ratio (%)
None	-	62	100
GMF	3 μg/ml	68	110
GMF	300 μg/ml	77	124
Bt_2cAMP	1 mM	32	52

表4.

Effect of GMF and Bt_2cAMP on synapse formation of NG108-15 cells with rat myotubes

Condition	% Muscle cells with synapses	Mean frequency of mepps (events/min)
None	9	4
GMF	0	0
Bt_2cAMP	27	10 ± 8.6

ラット新生児の後肢を0.1%トリプシンで30分間処理し、筋芽細胞を集め、コラーゲンでコートした35mmの皿に約百万個まいた。DMEMに10%FCSと10%HSを加えた液で3～4日培養後、0.1mM Uridine と0.01mM 5fluorodeoxyuridineを添加し、分裂細胞を除きよくfuseした筋線維のみにした。この上に、別のフラスコで培養していたNG108-15を皿あたり10～30万個cocultureし、10%HSにそれぞれ300μg/ml粗抽出液、1mM Bt_2cAMPを添加し、3日間 incubateした。NG108-15と接触している筋線維の細胞内電位を誘導し、AChの自発性遊離にともなうシナプス性電位(mepps)の有無でシナプスの存在を判定した。

持つものが多いことから、マウスニューロブラストーマ由来の染色体が半数以上を占めることが推測された。一方、C6BU1の染色体数は42で核型は極めて安定している。雑種細胞にこれらラットグリオーマ由来染色体の存在も確認された。

〈考察〉

GMFはグリア細胞あるいはグリア細胞との雑種細胞に作用し、細胞のDNA合成と分裂を促進することが明らかになった。しかしニューロブラストーマにはこれらの効果が観察されなかったことから、その作用はグリア細胞に特異的であると考えられる。上皮細胞の増殖因子であるEGFは細胞表面に特異的な受容体をもち[4]、EGFと受容体との複合体として細胞内にとりこまれて効果を発揮することが知られている[2]。GMFの特異性もこのようなGMFに対する受容体を想定すると容易に説明できる。

NG108-15のACh合成、遊離やシナプス形成能は両親細胞には見いだせず、雑種細胞で表現された形質である[5][8][10]。膜興奮性はニューロブラストーマからすでに存在している形質である[5][9][11]。GMFに反応するNG108-15の結果は、従って、グリオーマ由来のGMF受容体様分子がNG108-15の細胞膜表面に存在することを強く示唆している。このことは、NG108-15の膜構造がマウス－ラットのモザイクから成ることを暗示しているように思える。染色体分析の結果もこの推測とは矛盾しない。

シナプス形成の実験はGMFがNG108-15の分裂を促進し細胞が幼若化し、未分化な状態にあるためシナプスが形成されなかったと理解される。筋芽細胞の増殖を刺激する線維芽細胞成長因子(FGF)が筋細胞の分化の程度を示す融合(fusion)とAch受容体の出現を遅らせるという報告とよく一致する結果である[3]。

〈文献〉

1. Amano, T., Hamprecht, B., and Nirenberg, M. 未発表論文
2. Das, M. and Fox, C. F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2644-2648
3. Gospodarowicz, D. et al. (1976) J. Cell Biol. 70, 395-405
4. Haigler, H. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3317-3321
5. Hamprecht, B. (1977) Intnatl. Rev. Cytol. 49, 99-170
6. 加藤他(1978)本誌 17, 261-264
7. Lim, R. and Mitsunobu, K. (1974) Science 185, 63-66
8. McGee, R. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1314-1318
9. Nelson, P. G. et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 123-127
10. Nirenberg, M. (1979) Fed. Proc. 38, 626
11. Puro, D. G. and Nirenberg, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3544-3548

72 ニューロブラストーマ・グリオーマ雑種細胞のα-アドレナリン性受容体

東田陽博 (名大・環研)
杉山博之 (生理研)
芳賀和子・芳賀達也 (浜松医大・生化)

〔要約〕
1) ニューロブラストーマとグリオーマの雑種細胞NG108-15のα-アドレナリン性受容体を[3H]-ジヒドロエルゴクリプチン([3H]-DHE)との結合実験により同定した。この受容体はα_2型の薬物親和性を示し，受容体の数は粗膜分画の蛋白質1mgあたり250fmol，細胞あたり1~2×10⁴ケであった。アゴニストと受容体の結合に対してGTPの効果が見られた。
2) NG108-15の細胞内電位を記録した。広い濃度範囲の(−)ノルエピネフリン(NE)の投与刺激に対して，Na, K, Clイオンの透過性増大を反映する膜電位変化はみられなかった。アセチルコリン(ACh)，セロトニン(5HT)，とドーパミン(DA)は脱分極させ，ヒスタミン，アデノシンとモルフィンは膜電位に影響しなかった。
3) 以上の結果は，NG108-15のα-アドレナリン性受容体はGTPと関係するタンパク質と直接カップルし，イオンチャネルとは機能的カップリングを持たないことを意味する。他の神経伝達物質受容体のカップリングの様式を検討し，中枢神経シナプスや他の部位での受容体の性質を考察した。

ニューロブラストーマとグリオーマのセンダイウィルスによる細胞融合により得られた雑種(ハイブリッド)細胞NG108-15は膜興奮性を持ち活動電位を発生し(1)，オピエト(2)やACh*(3)で，A-サイクレース活性を抑制し，細胞内でAChを合成遊離し(4)，培養筋細胞とシナプスを形成する(1,5,6)など多くの神経機能を有し，分子レベルでのシナプス研究の良いモデル細胞である。最近，SabolとNirenberg(7)はNEによりNG108-15のA-サイクレース活性が抑制されることを報告したので，我々はαアドレナリン性受容体を特異的なリガンドで標識し証明すると共に，NEの膜電位に及ぼす影響を調べ，NG108-15のαアドレナリン性受容体がどのような反応とカップルしているかを検討した。NG108-15の5HTなど他の神経伝達物質のカップリングの様式とも比較し，シナプスでの受容体の機能を考察した。

《実験材料および実験方法》

NG108-15細胞は米国NIHのNirenbergとVirginia大学のGilman研究室より得た。培養は10%CO_2-90%Air中，DMEMと10%FCS(GIBCO)に，0.1mMヒポキサンチン，1μMアミノプリアン，16μMチミジンを加えた液を使用しプラスコ中で行った。CaとMgを除いたphosphate buffer salineで細胞をはがし集め，結合実験には細胞を5mMトリス緩衝液(pH7.7)で摩砕後，3000g 5分，25000g 30分の分画遠心で得られた粗膜分画を用いた。通常35枚のガラス皿の細胞(2×10⁸, 100mg蛋白質)から出発し，蛋白質として約20mgの標品を得た。膜標品使用時まで−80°Cに保存した。結合は粗膜標品(通常蛋白質として約100μg)と1~1.5nM [3H]-DHEを30°Cで30分反応させた後，ガラス繊維濾紙で濾別−洗浄し，濾紙上に残るカウントを測定した。反応液の組成は20mM HEPES

*略語：ACh，アセチールコリン；A-サイクレース，アデニレート サイクレース；5HT，セロトニン；DA，ドーパミン；3HDHE，[3H]-ジヒドロエルゴクリプチン；NE，ノルエピネフリン；FCS，仔牛血清

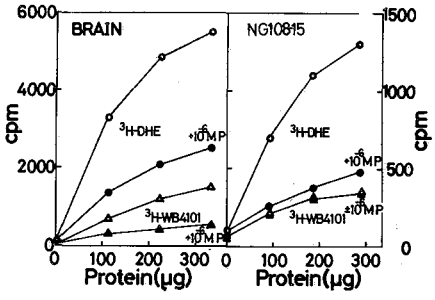
(pH 7.5), 2mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 0.1mg/ml 牛血清アルブミン, 0.2mM アスコルビン酸で GTP の効果をみるときは GTP を 0.1mM 添加した. 1μM フェントラミン存在下の結合を差し引いたものを特異的結合とした。

電気生理学的実験には細胞を 35mm の皿にまき，血清を 5% にし，1mM ジブチリル cAMP を加えた液で 1 週間以上培養した細胞を使用した。3M KCl を満した抵抗 10-100MΩ のガラス微小管で細胞内に刺入し，電位の測定はネルソンらの方法によった(1,5)。投与に用いた 5HT 溶液は使用直前につくり，ACh·Cl, DA; と当モルの HCl でとかした NE は 1M あるいは 10mM 溶液を -20°C で凍結保存のものを使用した。

〔結果〕

1. ^{3}H-DHE の結合　図 1 は膜標品の量を変えて ^{3}H-DHE と ^{3}H-WB4101 との結合をみたものである。^{3}H-WB4101 は α_1 型受容体，^{3}H-DHE は α_1 と α_2 の両方の受容体に結合すると言われている(8)。NG108-15 細胞の場合，^{3}H-DHE では 1μM フェントラミンで阻害される特異的な結合がみられるが，^{3}H-WB4101 では特異的結合が見られない。α_1, α_2 両方の受容体を持つと考えられるラット脳シナプス膜ではいずれのリガンドにも特異的結合が見られる。この結果は，NG108-15 が α_2 型の受容体を持つことを示唆している。表 1 にまとめた各種薬物の ^{3}H-DHE 結合の阻害効果の結果は，α_2 型の受容体と共通する薬物親和性を持つことを示している。表 1 の結果は更に次の 2 つの事実を示す。(1)アゴニストに特異的な GTP の効果が見られること。(2) Hill 定数がアンタゴニストで 1 に近く，アゴニストで 0.5~0.6 であること。NE とフェントラミンの場合について濃度－阻害曲線を図 2 に示す。この結果は，α_2 受容体がサイクレース系の GTP 結合蛋白質と連関していることを反映するものと考えられる。

図 1 ^{3}H DHE と ^{3}H-WB4101 の結合量と膜蛋白質量の関係



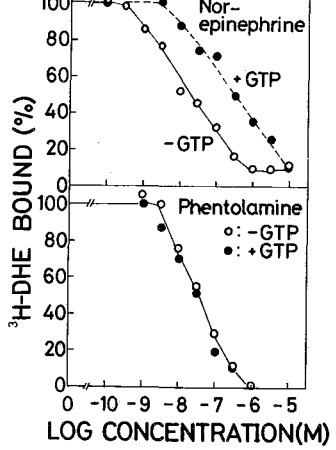
10^{-6}M P は 10^{-6}M フェントラミン存在下での結合量を示す。

表 1

Inhibition of ^{3}H-DHE binding to membranes of NG108-15 cells by various agents

Agent	IC_{50} (nM)			Hill coefficient	
	-GTP (A)	+GTP (B)	(B)÷(A)	-GTP	+GTP
Clonidine	6.6	34	5.2	0.59	0.63
Oxymetazoline	11	57	5.4	0.59	0.47
(-)Norepinephrine	24	280	11	0.58	0.51
(-)Epinephrine	30	93	3.1	0.47	0.48
Phenylephrine	870	2300	2.6	0.50	0.64
Methoxamine	960	2100	2.2	0.59	0.56
Isoproterenol	2200	5700	2.5	0.58	0.58
Dihydro-ergocrystine	1.2	1.4	1.2	0.85	0.99
Yohimbine	9.2	6.2	0.7	0.89	1.16
Phentolamine	13	12	0.9	0.98	1.0
Prazosin	51	31	0.6	0.81	1.0
Indoramin	1200			0.85	
Propranolol	18000			0.83	
Serotonin	19000			0.76	
Dopamine	270	3200	12	0.48	0.41
Spiroperidol	48	24	0.5	0.85	0.99
Apomorphine	65	64	1.0	0.82	0.76

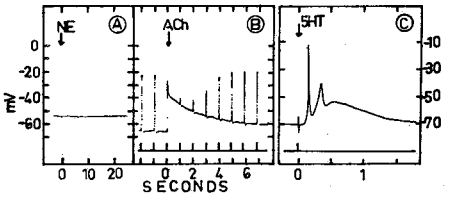
図 2. ^{3}H DHE 結合の NE とフェントラミンによる阻害



2. 膜電位応答　NG108-15細胞の膜電位に対するNEの反応をACh. 5HT, DA, ヒスタミン, アデノシン, モルフィンと共にテストした。典型的な電位応答を図3に, まとめを表2に示した。NE, ヒスタミン, アデノシンとモルフィン投与では脱分極性の反応も過分極性の反応も全く検出できなかった(図3A)。　ACh, 5HT, DAのdrop applicationで, 3-10秒続く最高26~30mVの脱分極が得られ, 反応の立ちあがり部分で, 1~3個の活動電位を観察した(図3B)。　イオントフォレーシスでも同様の脱分極が誘起されることを確認した。図3のCに5HTによる反応を示した。

脱分極性反応の大きさは刺激に使った滴下液の濃度に依存していた(図3)。2μl(最終平衡濃度は1/1000)を使用した場合, 最低必要濃度はACh 1μM以上, 5HTとDAで10μMであった。50%反応を生じる濃度はおおよそAChで数μM, 5HTで10数μM, DAで100μMのオーダーであった。NEは, ACh. 5HT. DAが反応を誘発できたどの濃度範囲の刺激に対しても反応しなかった。

図3　NE, ACh, 5HTに対する膜電位応答



2mlの培養液の入った35mmの皿を倒立顕微鏡のステージに固定した。テレサーモメーターと連動させたヒーターにて培養液は36°Cに保った。細胞内にガラス電極を刺入し, 細胞内通電により活動電位発生を確認した。

A. ストックしたNEを150mM NaClで10倍希釈し, 1mMのワーキング溶液とし, 天秤のところでベルンテセンのマイクロピペットにて2μlを記録細胞上の水面に滴下した。膜電位には変化が認められなかった。

B. 70μM AChを2μl滴下した。早い立ちあがりとゆっくりした回復期をもつ反応が得られた。0.8nAの通電により生じていた活動電位はAChによる脱分極反応中おさえられた。

C. 25mM 5HTをガラス微小管につめ, 1msec, 100nA電極側十のパルスにて電気泳動的に下線のシグナルのところでかえた。ゆっくりした脱分極の上に2個の活動電位が誘発された。

図4　刺激反応曲線

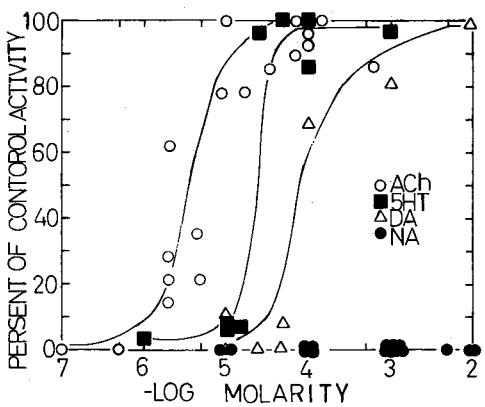


図2Aで示した実験方法で, 得られた結果をプロットしたもの。各濃度溶液は150mM NaClで希釈したものを使った。ここで示した濃度はdrop applicationに使った刺激溶液の濃度で, 最終平衡濃度ではない。

表2

Effect of neurotransmitters on membrane potential level

Effector	Cells tested	positive responses per trials	(%)	Maximum response (mV)	Minimum effective dose (mM)	ED_{50} (mM)
ACh	12	20/21	(95)	+28	0.002	0.003
DA	16	8/19	(42)	+26	0.01	0.1
NE	9	0/18	(0)			
5HT	15	16/27	(59)	+30	0.01	0.02
Histamine	7	0/14	(0)			
Adenosine	5	0/10	(0)			
Morphine	2	0/10	(0)			

【考察】

αアドレナリン性受容体がどのような反応とカップルしているかは多くの議論の対象であるが，受容体のサブタイプによってカップルの仕方が異なる可能性が考えられる。α_1受容体はCa^{++}の透過性に関係していると推定されている(9)。α_2受容体の場合は定説がなかった。

今回の結果はNG108-15細胞がα_2受容体を持つが，Na^+, K^+, Cl^-のイオンチャネルとは機能的にカップルしていないことを示している。しかも，α_2受容体へのアゴニストの結合に対するGTPの効果が観察されたことは(図2)，α_2受容体とGTP結合蛋白質が直接インターラクションしていることを意味する。従って，PGE$_1$添加と無添加時のA-サイクレース活性をNEが阻害すること(7)も，膜電位変化等による間接的効果ではなく，α_2受容体とA-サイクレース又はGTP結合蛋白質が直接カップルしていることを示唆する。

表3 NG108-15細胞における伝達物質受容体のイオンチャネルとA-サイクレースとのカップリングのタイプ
0は効果のないこと，−はA-サイクレース酵素活性を抑制することと，＋は脱分極を意味する。
NE, 5HT, AChのA-サイクレースのデーターはそれぞれ文献7.5.3による。

Type	Effector	Receptor	Effect	
			Adenylate cyclase	Membrane potential
I	NE	α-adrenaline	−	0
II	5HT	Serotonin	0	+
III	ACh	Muscarinic ACh	−	+

最近NG108-15細胞と同様，α受容体を介するA-サイクレースの阻害を示す血小板について，その受容体がα_2型であると報告された(10)。このようなα_2→A-サイクレースというカップリングが一般的なものか，データーの蓄積が望まれる。

受容体と膜電位に関する本実験とA-サイクレースについて集積された結果を参考に，NG108-15の神経伝達物質の受容体とそれに引きつづき起こる反応との関係をまとめると表3のようになる。A-サイクレースとカップリングはあるが膜電位を変えるようなイオンチャネルとカップルしていないものは，αアドレナリン性受容体の他，オピエト，アデノシンとPGE$_1$の受容体がある(タイプI)。逆に，A-サイクレースには影響しないが，膜電位を著しく変えるものに5HT受容体がある(タイプII)。タイプIIIはA-サイクレースの抑制も脱分極も伸介するムスカリン様ACh受容体である。これにはPGF$_{2\alpha}$が含まれる。

結局NEと5HTの両方のケースを考えると，Greengardらによって提唱された(11)(a)R→AC→I (R:受容体；AC:A-サイクレース；I:イオンチャネル)という連続反応モデルでは説明できず，それぞれ(b)R→AC，(c)R→Iの形式をとっていると考えられる。ドーパミンのD$_1$, D$_2$受容体にも考えられているように(12)，脳のシナプスにおいても(b) or (c)の様式がかなり基本であると考えられる。

【文献】

1) Nelson, P.G. et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 123-127.
2) Sharma, S. et al. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 590-594.
3) Traber, J. et al. (1975) Nature 255, 558-560.
4) McGee, R. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1314-1318.
5) MacDermot, J. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1135-1139.
6) Higashida, H., et al. (1978) Abs. Soc. Neurosci. 4, 591.
7) Sabol, S.L. & Nirenberg, M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1913-1920.
8) U'Prichard, D.C. & Snyder, S.H. (1979) Life Sci. 24, 79-88.
9) Jones, L.M. & Michell, R.H. (1978) Bioch. Soc. Trans. 6, 673-688.
10) Hoffman, et al. (1979) Life Sci. 24, 1739-1746.
11) Nathanson, J.A. (1977) Physiol. Rev. 57, 157-256.
12) Kebabian, J.W. & Calne, D.B. (1979) Nature 277, 93-96.

73 ラットグリオーマ由来の細胞(C-6)における N^G, N^G-ジメチルアルギニンを含む蛋白質の合成と分解

平井基陽・中嶋照夫
(阪大・医・高次研)

〔要約〕
蛋白質のメチル化の生理的意義を追求する目的でラットグリオーマ由来の細胞(C-6)を用いて培養実験を行ない, N^G,N^G- ジメチルアルギニンを含む蛋白質について検討し以下の知見をえた。

1) 蛋白質中の N^G,N^G- ジメチルアルギニンはミクロゾーム分画蛋白に最も高濃度に, ついで核分画蛋白に高く, ミトコンドリア分画および上清分画蛋白には低濃度に存在した。
2) 蛋白質中の N^G,N^G- ジメチルアルギニン残基の形成は蛋白合成に遅れておこることから, 蛋白質のメチル化は蛋白質の合成後におこることを確認した。
3) 各細胞内分画の N^G,N^G- ジメチルアルギニンを含む蛋白の分解パターンからミクロゾーム分画に関して代謝回転の速いものと遅いものの2つの代謝プールが存在することが示唆された。
4) 各細胞内分画の蛋白に含まれる N^G,N^G- ジメチルアルギニン残基の合成, 分解のパターンから N^G,N^G- ジメチルアルギニンを含む蛋白がミクロゾーム分画から他の分画へ移動する可能性が考えられた。

われわれの教室ではメチル化修飾蛋白質に関する一連の研究を行ない蛋白質に含まれるメチルアルギニン残基は真生細菌を除く全生物の蛋白中に存在すること, N^G,N^G-ジメチルアルギニン(N^G,N^G-DMArg)残基が核蛋白質中に高濃度に含まれていること, および蛋白質のメチル化は蛋白質の合成ののちにおこることを明らかにしてきた[3][4]。

今回われわれは蛋白質のメチル化の生理的意義を明らかにする目的でラットグリオーマ由来の細胞(C-6)を用い培養実験を行ない N^G,N^G-DMArg を含む蛋白質の合成と分解について細胞内分画のレベルで検討したので報告する。

〔実験材料および方法〕

1) L-メチオニン〔メチル-^{14}C〕(60.2 mc/mmole) は Radiochemical Center より入手した。
2) C-6細胞の培養は直径100 mmのペトリー皿を用い, 10%仔牛血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium中, 37°C, 95% Air, 5% CO_2, 湿度100%の条件下で静置培養を行なった。実験には播種後4~5日目の対数増殖期の細胞を用い, 一定時間放射性メチオニンを培養液に加えて培養したのち, 培養液を除き, 細胞を燐酸緩衝液(PBS)で3回洗い, rubber policemen で機械的に剥離し遠心して集めて検討した。
3)細胞内分画は集めた細胞に3倍量の 0.32 M 庶糖溶液を加えてホモジネートとし, 植村ら[6]の方法で行なった。蛋白質分画の調製はえられた各細胞分画に終末濃度が10%になるようにトリクロロ酢酸(TCA)を加えて遠沈後, 沈渣を10% TCA で2回洗い, さらにアセトンで脱脂, 乾燥させて行なった。
4)蛋白質中のメチオニンとメチルアミノ酸の定量はえられた蛋白質分画を6N HCl中で110°C, 20時間加水分解後, レジンカラムを用い中酸性アミノ酸分画と塩基性アミノ酸分画

に分け[5]アミノ酸自動分析機を用いて[1]行なった。
5)細胞内のS-アデノシルメチオニンと遊離のメチオニンの放射能は上述のTCA可溶性分画を用い，蛋白中のメチオニンとメチルアルギニン残基の放射能は蛋白質分画を6NHCl中，110°C，20時間加水分解したのち永解物を用い既報[4]にしたがって行なった。
6)蛋白質の定量はLowry法[2]によった。

〔実験結果〕

1)細胞内分画の蛋白中のメチオニンと$N^G,N^{G'}$-ジメチルアルギニンの含量：播種後4日目の細胞を用いて定量した結果が表1である。$N^G,N^{G'}$-DMArgはミクロゾーム分画に最も高濃度に，ついで核分画に多く含まれていた。なおN^G,N^G-ジメチルアルギニンは核分画のみで検出できたがその量は$N^G,N^{G'}$-DMArgの1/20以下であった。メチオニンは各分画ともほぼ同じ濃度に分布していた。

表1. 細胞内分画の蛋白中のメチオニンと$N^G,N^{G'}$-ジメチルアルギニンの含量

SUBCELLULAR FRACTION	$N^G,N^{G'}$-DMA NMOLES/MG PROT.	MET. μMOLES/MG PROT.
NUCLEAR	10,90 ± 1,72	24,20 ± 3,38
MITOCHONDRIAL	4,22 ± 0,43	16,13 ± 4,83
MICROSOMAL	15,04 ± 1,23	21,26 ± 4,00
SUPERNATANT	3,05 ± 0,74	32,53 ± 3,21

MEAN VALUES AND SD IN 3 EXPERIMENTS ARE PRESENTED.

2)$N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白質の合成：放射性メチオニン(1.5 μCi/ml)を培養液に加えて培養し，蛋白中のメチオニンと$N^G,N^{G'}$-DMArgおよび遊離のメチオニンとS-アデノシルメチオニンへの放射能のとり込みを経時的に検討した(図1)．蛋白中のメチオニンへの放射能のとり込みより遅れて，DMArgへの放射能のとり込みがおこり，蛋白中のメチオニンへのとり込みが増加するにしたがってDMArgへのとり込みも増加した。遊離のメチオニンとS-アデノシルメチオニンへのとり込みは2時間でほぼプラトーになった。

図1. C-6における$N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白質の合成

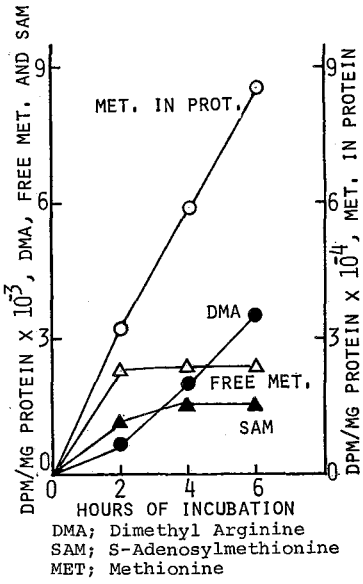
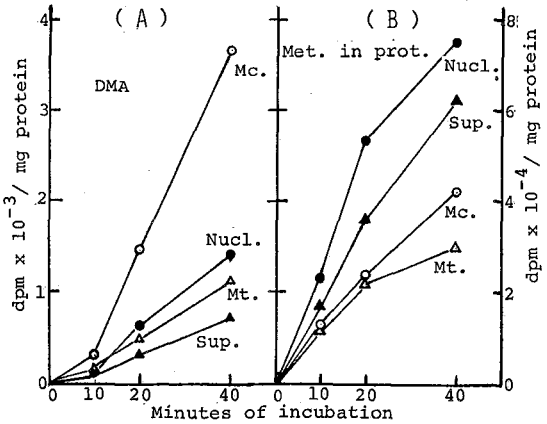


図2. 各細胞内分画の蛋白質中のDMArgとメチオニンへの放射能のとり込み



つぎに蛋白中のメチオニンと$N^G,N^{G'}$-DMArgへの放射能のとり込み状態を細胞内分画を行ない検討した(図2)。その結果,すべての分画で$N^G,N^{G'}$-DMArgへの放射能のとり込みは蛋白中のメチオニンへのとり込みより遅れておこることが確認された。さらにこの放射能のとり込みを蛋白当たりでみるとミクロゾーム,核,ミトコンドリア,上清分画の順に多くとり込まれており(図2.A)表1に示した各細胞内分画の蛋白に含まれる$N^G,N^{G'}$-DMArgの濃度の順序とよく一致していた。

3) $N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白質の分解: 放射性メチオニン(3μci/ml)を培養液に加えて18時間培養したのち冷却した培養液で充分に洗い,アイソトープを含まない培養液中で培養を続け,とり込まれた放射能の動態を各細胞内分画について経時的に調べた(図3)。蛋白中の$N^G,N^{G'}$-DMArgの放射能はミクロゾーム分画で最初の1.5時間で急速に減少しついで一定の減少傾向になる。核分画では最初の3時間はほぼ一定で,ついで一定の減少傾向を示す(図3A)。一方蛋白中のメチオニンの減少傾向は上清分画蛋白質を除けば各分画でほぼ一定の減少傾向を示し(図3.C)$N^G,N^{G'}$-DMArg残基の減少パターンとは一致しない。蛋白中のメチオニンおよび$N^G,N^{G'}$-DMArgの濃度が各培養時間で一定と仮定して表1の濃度で割り放射能の比活性で表わしてみた(図4)。ミクロゾーム分画の$N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白には少なくとも代謝回転の速いものと遅いものの2つがあり,ミトコンドリアおよび上清分画に関しても,その可能性が推察された。核分画のものに関しては3時間減少がみられないことから他の分画,とくにミクロゾーム分画からの移行が考えられた。細胞内の遊離のメチオニンとS-アデノシルメチオニンの放射能の減少を図3.Bに示したが,S-アデノシルメチオニンの放射能の減少は急激におこっており,このパターンはミクロゾーム分画蛋白中の$N^G,N^{G'}$-DMArgの放射能の減少パターンとよく似ていた。

図3. $N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白質の分解

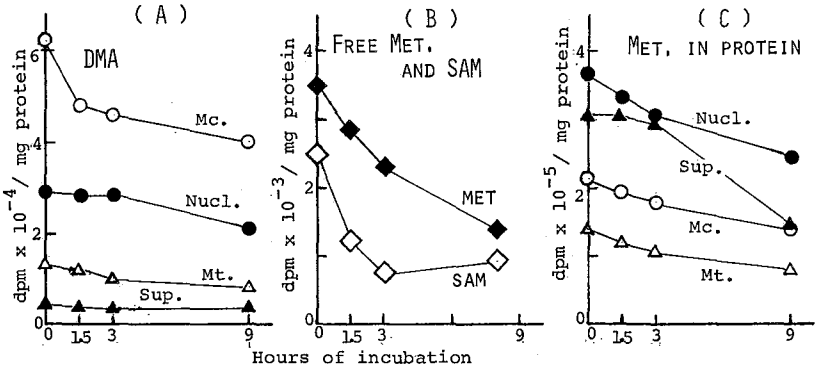
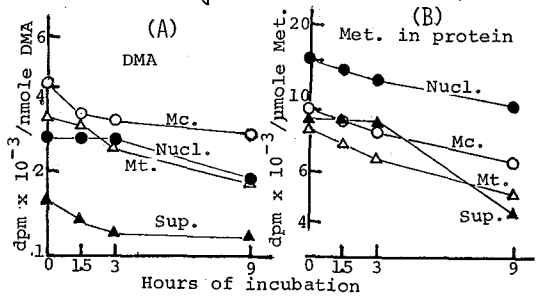


図4. $N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白質の分解



4)蛋白合成阻害剤のメチル化におよぼす影響: 以上の結果をさらに確認する目的でミトコンドリアと細胞質の蛋白合成を阻害するといわれているピューロマイシン(25μg/ml)

あるいは細胞質での蛋白合成を阻害するといわれているシクロヘキシミド(30μg/ml)を放射性メチオニン(6μci/皿)と同時に培養液に添加して培養を行ない，経時的に各細胞内分画について放射能のとり込み状態を調べた(図5,図6)。両者の場合とも細胞全体についてみると，蛋白中のメチオニンと$N^G,N^{G'}$-DMArgへの放射能のとり込みが抑えられ，逆に細胞内S-アデノシルメチオニンは増加の傾向があった。さらに蛋白質のメチオニンへのとり込みの抑制は$N^G,N^{G'}$-DMArgへのそれに比して速く，しかもその割合が大きいことが判かり(図5.C,図6C)生合成実験からえられた結果を確認した。つぎに細胞内分画のレベルで検討すると両者の場合ともミクロゾーム分画の蛋白の$N^G,N^{G'}$-DMArgへの放射能のとり込みが最も強く抑制されていたが(図5A,図6.A.)必ずしも蛋白中のメチオニンへのとり込みの抑制程度と一致していなかった。

図5. ピューロマイシンの影響

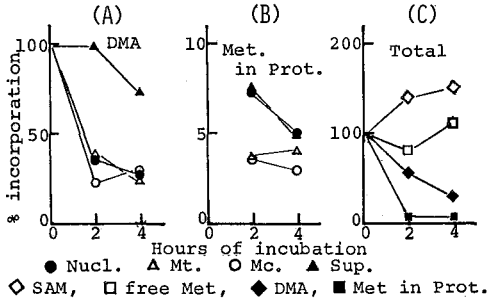
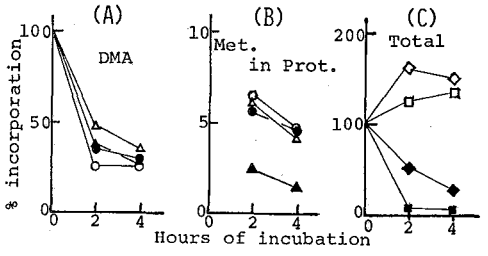


図6. シクロヘキシミドの影響



〔考察〕

今回の実験結果で今まで報告されていた蛋白質のメチル化は蛋白質の合成ののちにおこることを確認した。さらにミクロゾーム蛋白に$N^G,N^{G'}$-DMArgが高濃度に存在すること，その代謝回転が速いものと遅いものがあること，さらにchasingの実験で核蛋白の$N^G,N^{G'}$-DMArg残基の放射能は初めは減少しなく，のちに一定の減少傾向になることからある種の$N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白のミクロゾームから他の分画への細胞内移動の可能性が考えられる。現在，各細胞内分画蛋白について共通の$N^G,N^{G'}$-DMArgを含む蛋白の存在について検討中である。

〔文献〕

1) Kakimoto,Y. & Akazawa,S. (1970) J.Biol.Chem., 245, 5751-5758
2) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., & Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275
3) 松岡征夫 (1972) 生化学 44, 364-370
4) 三宅正治，井上良一 (1973) 神経化学 12, 116-119
5) Miyake,M. and Kakimoto,Y. (1973) J.Neurochem, 20, 859-871
6) 植村慶一，塚田裕三，飯田慈子 (1963) 神経進歩 7, 763-771

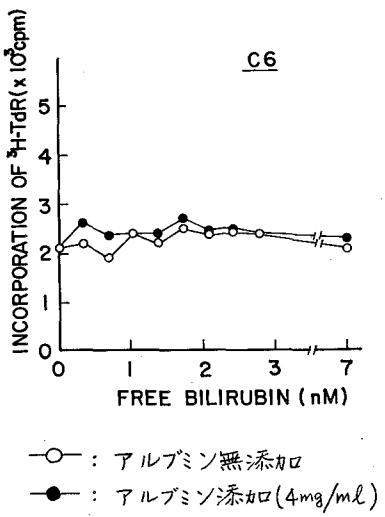
74 アルブミン結合型ビリルビンの培養神経系細胞に対する毒性

加藤泰治・*鬼頭秀行・福井陽子・田中　亮
*(名市大・医・小児)

〔要　約〕

アルブミン結合型ビリルビンは、神経系由来の培養細胞(Astrocytoma(C6), Neuroblastoma (NB-2A))に強い細胞毒性を示し、50～100μMの結合型ビリルビンは各細胞のDNA合成を著しく阻害した。ビリルビンのこの細胞毒性は単にビリルビンによる細胞剥離に起因するものではなく、細胞膜を介する物質移動の阻害によるものであることが示唆された。一方、非結合型ビリルビン(7nM, pH 7.4)はいずれの細胞にも毒性は持たず、細胞毒性を表わすには少なくともμMの結合型ビリルビン濃度が必要である。結合型ビリルビンでも、アルブミン/ビリルビン結合比により細胞毒性の程度が異なり、結合比が1以下の場合は強い細胞毒性を示すが、結合比が1以上になると毒性は急速に減少した。Neuroblastomaでは結合比＝2で、Astrocytomaは結合比＝3で毒性は完全に消失した。核黄疸の予防・治療上指標となる血中ビリルビン値20mg/dlでは、アルブミン/ビリルビン結合比は2となり、これよりビリルビン値が上昇する(結合比<2)につれて、急速に細胞毒性が強くなり臨床的にも治療処理が必要となってくる。これらの事実は、培養細胞を用いた結合型ビリルビンの実験がin vivoにおける現象をよく反映していることを示している。さらに、この方法は各種薬剤のビリルビンdisplacerとしての性質をスクリーニングするのに有用な実験系となりうる。

図1.



<序　文>

1956年、Silverman[7]らは、ある種の薬剤(Sulfisoxazole)投与が核黄疸の発症を著しく増加させることを見出し、その原因が、アルブミン・ビリルビン結合の薬剤によるdisplacementであることを明らかにした。以来、ビリルビンとアルブミンの結合様式に関する研究は進み、現在では、1分子のアルブミンには2モルのビリルビンが結合し[1,8]、2種類の結合部位(解離定数 7×10^{-9} M (1個), 2×10^{-6} M (2個))[3]を持つことまで判っている。しかし、ビリルビンの毒性に関しては、非結合型ビリルビンが各種酵素(ミトコンドリア系酵素, Na, K-ATPase[4])を阻害するという報告があるのみで、アルブミン結合型ビリルビンの生物学的毒性に関する検討は未だ十分になされていない。そこで、今回の実験では、神経系由来の培養細胞を用いて、結合型ビリルビンがいかに細胞毒性を示し、さらに、アルブミン過剰添加による毒性中和作用について

も検討した。

〈実験材料と方法〉

ビリルビン溶液の調整：　非結合ビリルビン溶液はTyrode溶液(pH 7.4)に溶解し、遮光なビリルビンはメンブレンフィルター(pore size: 0.25μm)上で滅菌ろ過した。アルブミン結合型ビリルビン溶液はpH 12の状態でアルブミン(40mg/ml)に遮光のビリルビンを加えTyrode溶液で一晩透析後、同様にろ過滅菌した。全ての操作は遮光下に行い調製後直ちに使用した。各溶液のビリルビン濃度は$\varepsilon_{440nm} = 4.6 \times 10^4$(非結合型)[5]、$\varepsilon_{460nm} = 4.9 \times 10^4$(アルブミン結合型)[6]より計算した。

細胞毒性の測定：　Astrocytoma cell (C6), Fibroblasts (3T3) は5% FCS含有F-10培地で、Neuroblastoma cell (NB-2A)は10% FCS含有Hanks MEM培地で培養したものをassayに用いた。培地除去後、各種濃度のビリルビン溶液を細胞に37℃, 30分間曝露し、ひきつづき新しい培地に交換すると同時に[^{3}H]チミジン(TdR)を加え一定時内のDNAへのとり込み量を測定した。同時に細胞に結合したビリルビン量も測定した。

〈結　果〉

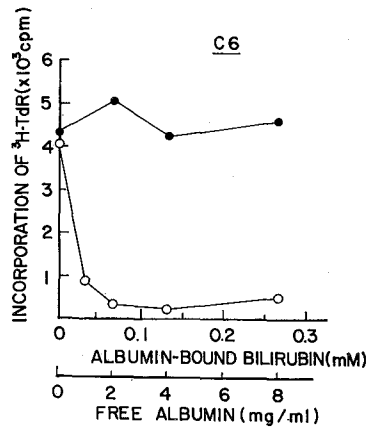
1. 非結合型ビリルビンの細胞毒性(図1)

中性溶液への非結合型ビリルビンの溶解性は極めて低く[2](7nM, pH 7.4)、臨界濃度でも細胞毒性は認められなかった。

2. グリオーマ細胞に対する結合型ビリルビンの細胞毒性(図2, 3,)

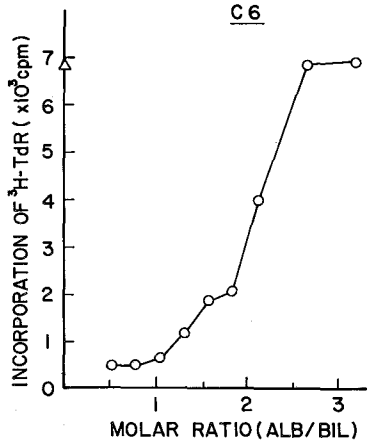
前記の方法で調整した結合型ビリルビン溶液(Alb/Bil結合比 = 1/2.3)はC6に対して強い毒性を示した。50μMの結合型ビリルビン溶液で70～80%の[^{3}H]TdRのとり込みが抑えられた。しかし、100μMの結合型ビリルビンでは90%以上の強い抑制がみられるにもかかわらず、培養フラスコ上の細胞形態には著明な変化が見られなかった。250μM以上ではじめて細胞の収縮、剥離が認められた。一方、130μMの結合型ビリルビン存在下に

図2.



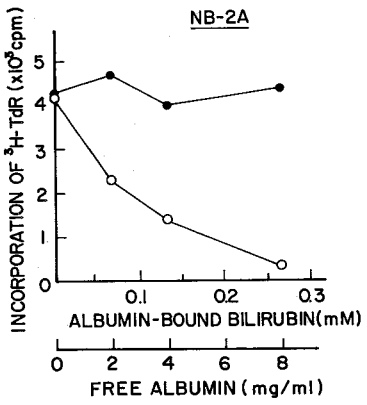
—○—：アルブミン結合型ビリルビン
—●—：アルブミンのみ

図3.



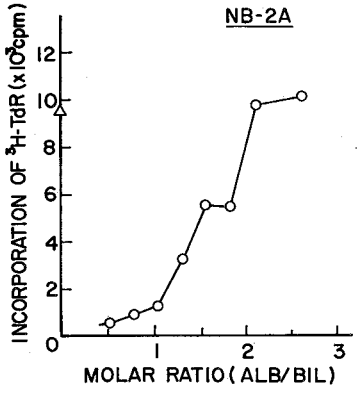
—○—：結合型ビリルビン(130μM)存在下
△　：結合型ビリルビン非存在下

図4.



—○—：アルブミン結合型ビリルビン
—●—：アルブミンのみ

図5.



—○—：結合型ビリルビン(130μM)存在下
△　：結合型ビリルビン非存在下

アルブミンを添加してゆくと細胞毒性は徐々に中和され、Alb/Bil結合比が1から中和が始まり、結合比3で完全に中和された。

3. 神経芽細胞に対する結合型アルブミンの細胞毒性（図4，5）

C_6 細胞に対する細胞毒性と比較して、NB-2Aは結合型ビリルビンの毒性を幾分うけにくい。50μMの結合型ビリルビンでは20~25%の[³H]TdRの取込みが抑えられるだけで、100μMでも約50%の低下しかみられない。しかし、結合型ビリルビンで曝露後のNB-2A細胞の細胞形態は C_6 とは異なり、50μMのビリルビンで既に大多数の細胞は剥離し培養液に浮遊した状態となっている。アルブミン添加による細胞毒性の中和では、Alb/Bil結合比＝2で既に完全に中和され、C_6（結合比＝3）より中和されやすい性質を示した。

〈考察〉

一般に、ビリルビンによる細胞毒性の実験には，1)ビリルビンが疎水性で中性領域では水に難溶である，2)不安定で光線等で分解されやすい，3)血清タンパク質・脂質と非特異的に結合しやすい等の難点があり、これまで培養細胞がビリルビン毒性の実験に用いられることは少なかった。今回の実験では、培養細胞を短時間ビリルビン溶液に曝露する方法を用いることにより、前述の難点を克服し、ビリルビンの培養細胞に対する直接的な影響をみることが可能になった。その結果、非結合型ビリルビン（pH 7.4，7nM）は細胞毒性を全く示さなかったが、アルブミン結合型ビリルビン（Alb/Bil＝1/2.3）はビリルビン濃度が数μMで、神経系由来の培養細胞（C_6，NB-2A）や線維芽細胞（3T3）のDNA合成を著しく阻害することがわかった（表1）。

他方、ビリルビンの細胞毒性には、ビリルビン濃度以外にAlb/Bil結合比が重要になることが明らかになった。通常、間接型ビリルビンのほとんどは血清アルブミンと結合した形で存在し、新生児期においてビリルビン

が著明に増加する場合でもその大部分はアルブミンと結合している。例えば、高ビリルビン血症の指標となる血中ビリルビン値＝20 mg/dl でのAlb/Bil 結合比は約2である。今回の実験結果でも、結合比＝2ではNB-2A や3T3には毒性を示さなかったが、C6には毒性がみられた（表1）。また、Alb/Bil結合比が2から低下するにつれて細胞毒性は急速に強くなり、結合比＝1（血中ビリルビン値30mg/dlに相当）以上になると全ての細胞のDNA合成は抑えられた。即ち、結合比＝2（血中ビリルビン値20mg/dl に相当）が、in vitro, in vivo を問わずcriticalな状態であることを示している。

ビリルビンの細胞毒性の本態，特に細胞の増殖過程のどの細胞相に影響を与えるのかという点については非常に興味ある問題であるが、現段階では不明である。最近、ビリルビンがNa, K-ATPase を阻害するという報告(4)もあり、細胞膜において結合型ビリルビンがどのような形で膜に結合し、細胞毒性を示していくかは今後検討すべき課題である。

表1.

Neutralization of bilirubin-toxicity by unbound albumin

Cell line	Alb/Bil molar ratio	
	Detectable neutraliz.	100 % neutraliz.
C6 (Astrocytoma)	1.05	2.70
NB-2A (Neuroblastoma)	0.90	2.00
3T3-Swiss (Fibroblast)	1.75	2.10

〈文　献〉

(1) Brodersen, R., Funding, L., Pedersen, A. O., and Roigaard-Pedersen, H. (1972) Scand. J. Clin. Lab. Invest., 29, 443-452
(2) Brodersen, R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2364-2369
(3) Jacobsen, J. (1969) FEBS Lett., 5, 112-114
(4) Kashiwamata, S., Goto, S., Semba, R. K., and Suzuki, F. N. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4577-4584
(5) Lee, K. S., and Gartner, L. M. (1976) Pediatr. Res., 10, 782-788
(6) Odell, G. B., Cohen, S. N., and Kelly, P. C. (1969) J. Pediatr., 74, 214-230
(7) Silverman, W. A., Anderson, D. H., Blanc, W. A., and Crozier, D. N. (1956) Pediatrics 18, 614-625
(8) Watson, D. (1962) Clin. Chim. Acta, 6, 737-739

75 Gunnラット小脳の神経化学的研究

御子柴克彦 ・ 高坂新一 ・ 高松 研
塚田裕三 (慶大・医・生理)

〔要 約〕

遺伝性高ビリルビン血症を呈するGunnラット(jj)の小脳の低形成につき神経化学的検索を加えた以下の結果を得た。1)形態学的にプルキンエ細胞数は著しく減少し、顆粒層の厚さは薄く、細胞密度は減少していた。Glial Fibrillary Acidic Proteinやs-100蛋白の抗体による免疫組織化学的反応の結果、Bergmann線維は、細胞体より直線的に表層へのびて特に異常を認めなかったが、他部位のアストロサイトにはhypertrophyを認めた。しかしhyperplasiaはみられなかった。2)遊離アミノ酸のうちグルタミン酸が減少し、顆粒細胞の減少を反映していることが推測された。3)電気泳動(SDS-polyacrylamideゲル、O'Farrell二次元電気泳動)により、jjの小脳の顆粒性分画を調べた結果プルキンエ細胞に特異なP400蛋白は著明に減少し、等電点が中性領域にある蛋白スポットが著明に増加した。水溶性分画ではJjに存在していた蛋白スポットがjjで欠損をしていた。4)2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolaseは比活性で対照と差がみられなかった。5)、Cholineacetyl transferase活性は対照の約2倍高い値を示したが、これは小脳の低形成の為、小脳外からの線維が相対的に増加した結果と考えられる。6)2-deoxyglucoseによる取り込みは、対照と同じく顆粒層へ最も強く取りこまれ、苔状線維から顆粒細胞への連絡は機能的に行なわれていることが示唆された。

はじめに: Gunnラットは肝臓のUDP-glucuronyltransferaseの遺伝的欠陥があるため高ビリルビン血症を呈し[2,16]、常染色体性劣性遺伝様式をとっている[4]。Gunnラットの種々の行動異常や学習能力の低下を示唆する報告も得られている[1,13]。特に小脳に於ては、低形成を伴いかつ組織学的にプルキンエ細胞の脱落がみられている[15]。既に著者らは、各種遺伝性小脳変性マウスを用いて、顆粒細胞欠損、プルキンエ細胞欠損、シナプス欠損などが、小脳の発育にどの様な影響をおよぼしているか、また、その変異に対して他の細胞はどの様に適応しているかを調べてきた[6,7,9]。我々はGunnラットの小脳につき免疫組織化学的並びに生化学的検索を試み、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法: 実験動物 Gunnラットのホモ接合体(jj)およびヘテロ接合体(Jj)は全て同腹のラットを用いた。2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase)活性の測定 塚田らにより開発された微量高速液体クロマトグラフィーにより測定をおこなった[10]。電気泳動 一次元電気泳動はSDS存在下で7.5-20%のlinear polyacrylamideゲルで既報の方法に従い泳動し[8,9]、二次元電気泳動はO'Farrellの方法に従った[13]。免疫組織化学 GFA(glial fibrillary acidic)蛋白に対する抗血清(Dr. Engより恵与をうけた)、S-100蛋白に対する抗血清(Dr. Levineより恵与をうけた)を用いて、パラフィン包埋した6μm切片を用いて、peroxidase antiperoxidase法により両蛋白の局在部位を観察した。Acetylcholinesterase活性、Ellmanの方法に従い[3]、non specific activityを抑えるためiso OMPA 10^{-4} Mを用いた。Choline acetyltransferase活性 Rossierの方法に従った[14]。2-deoxyglucoseの取り込み、尾静脈より10μCiの2-deoxyglucose[300-350 mCi/m mol, 2-^{14}C(U)]を静注し、安静状態で45分間、放置し、断頭瀉血後脳を剖出し、液体窒素

で凍結後、クリオスタットで20μm切片を作製し、オートラジオグラフィーを行なった。

結果および考察：大脳外套部、脳幹部の湿重量はjjとJjで差がみられなかったが、jjの湿重量は約1/3に減少しており、組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色によって調べた結果、プルキンエ細胞の欠損を認め、既に報告されている結果と一致した。

GFA抗体による免疫組織化学的反応の結果、Bergmann線維は分子層が薄いにも拘わらず細胞体から皮質表層迄、ほぼ直線的に伸びており、特に形態学的に異常は認められなかった。白質および顆粒層にみられるアストロサイトには著明なhypertrophyが観察された。S-100蛋白の抗体による染め出しの結果からhyperplasiaは認められなかった。既に報告されている様に発育が早期に終るnodulus[1,2]ではプルキンエ細胞、顆粒細胞も比較的、正常に近い像を呈しており、アストロサイトのhypertrophyもみられなかった。アストロサイトの変化は二次的な反応性の変化によるものと考えられる。

さてjjの小脳の遊離アミノ酸のうち、グルタミン酸がJjに比して有意な減少を示した(表1)。顆粒細胞の欠損ないしは減少を伴うweaver, reeler, staggererでは、グルタミン酸濃度は減少しており[2,3]、顆粒細胞がグルタミン酸を化学伝達物質としている可能性が示唆されている。jjの小脳でのグルタミン酸濃度の減少は、今回形態学的観察でみとめられた顆粒層の厚さおよび細胞密度の減少を反映している可能性が考えられる。アセチルコリンの合成酵素であるcholineacetyltransferaseおよび分解酵素であるacetylcholinesteraseの比活性は、jjの小脳の方が約2倍活性が高かったが、酵素活性の増加は小脳の湿重量が小さいため、小脳外からのcholinergic fiberなどの線維の占める割合が相対的に高くなったためと考えられる。

(表)1 Free amino acid content in the cerebellum from Gunn rat (8 months old)

	μmoles/g tissue wet weight					
	Aspartate	Glutamate	Glutamine	Glycine	Alanine	GABA
Jj	2.58 ± 0.22	8.17 ± 0.65	6.98 ± 0.20	0.88 ± 0.06	0.63 ± 0.12	1.77 ± 0.19
jj	2.24 ± 0.19	6.27 ± 0.85*	6.43 ± 0.57	1.12 ± 0.13*	0.66 ± 0.16	1.49

*; $P < 0.01$

中枢神経のミエリンのマーカー酵素として知られているCNPase活性を測定したところ、比活性でJjとjjは有意な差を認めず、jjに於てもミエリン形成は進行していることが知られた(表2)。しかし無髄の軸索を有する顆粒細胞の欠損を伴うweaver[3]や層構造の逆転を伴い、二次的に顆粒細胞の変性

(表)2 Choline acetyltransferase (CAT) and Acetylcholinesterase (AChE) activities in the brain from Gunn rat(55 days old)

		wet weight(a)	specific activity CAT(b)	Ach-E(c)
Cerebellum	Jj(3)	266±20	7.4±0.4	1.81±0.39
	jj(4)	71±20***	14.9±1.9**	3.06±0.50*
Brain stem	Jj(3)	582±32	60.8±1.3	8.37±1.59
	jj(4)	576±58	59.7±1.7	7.65±0.96
Pallium cerebri	Jj(3)	820±88	35.6±6.4	2.27±0.17
	jj(4)	824±136	33.1±2.7	2.40±0.17

Mean±S.D. with the number of animals in parentheses.
(a);mg, (b);nmol/mg prot/hr, (c);μmol/mg prot/hr
*;P<0.02, **;P<0.01, ***;P<0.001.

表3. CNPase activity in the brain from Gunn rat (55 days old)

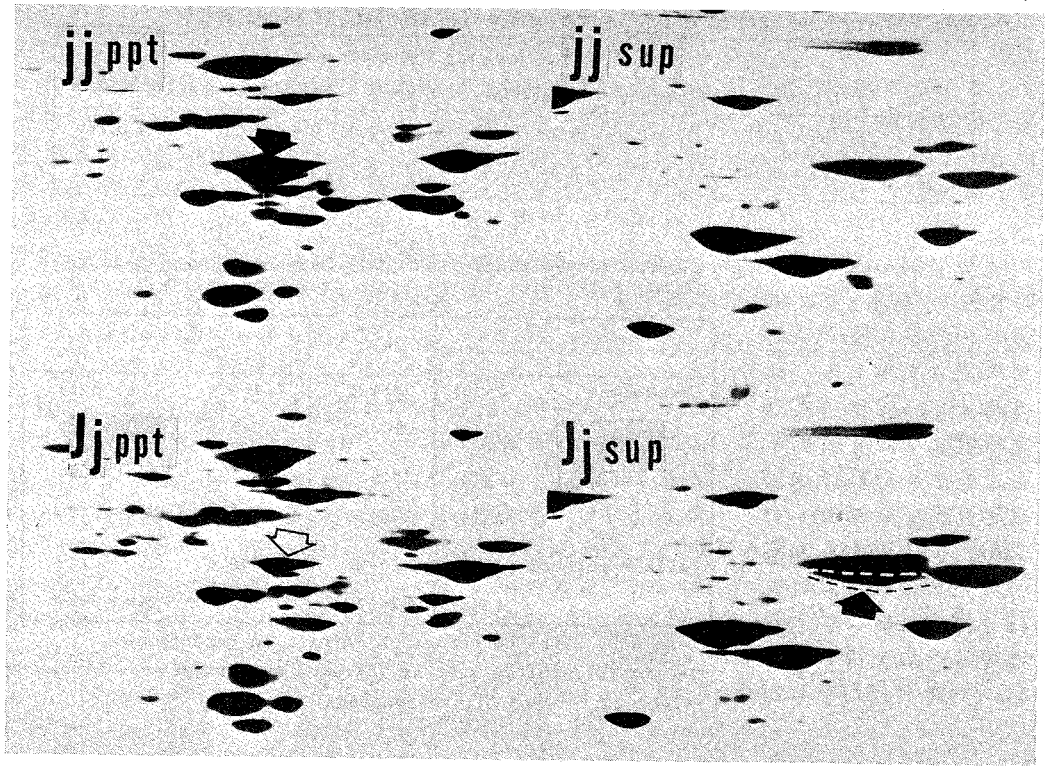
		wet[a] weight	specific[b] activity
Cerebellum	Jj	236±36	2.32±0.15
	jj	62±22***	2.47±0.34
Brain stem	Jj	530±64	4.23±0.44
	jj	528±86	3.83±0.36
Pallium cerebri	Jj	790±76	2.02±0.27
	jj	802±112	1.84±0.33

Mean±S.D. of 6 animals. ***;P<0.001.
(a);mg, (b);μmol/mg protein/min

を伴うreelerではCNPase活性の相対的な増加が認められ、高ビリルビン血症に伴う小脳皮形成との間に差を認めた。

小脳を水溶性分画と顆粒性分画に分けSDS-polyacrylamide gel電気泳動により調べたところ、顆粒性分画に於て、プルキンエ細胞膜・特異蛋白であるP400蛋白[2]は著明な減少を示した。その他の蛋白にも変化がみられた。その部分につき二次元電気泳動法により、調べたところ、等電点が中性領域の蛋白スポットが著明な増加を示した(図中jj pptに黒矢印)。水溶性分画ではJjで確認された蛋白のスポットが(図中Jj supに黒矢印)jjで欠損していた。この蛋白の等電点も中性領域にあった。P400蛋白の減少は、形態学的に観察されたプルキンエ細胞の減少を反映しているものと考えられる。顆粒細胞の相対的減少や、アストロサイトの

水溶性分画(sup)と顆粒性分画(ppt)の二次元電気泳動パターン(分子量3万~9万、中性領域の拡大図)



hypertrophy などが、P400蛋白以外にみい出された蛋白の変化と関連しているものと考えられる。

脳組織の代謝時に働いている部位を調べる方法として最近 2-deoxyglucose 法が用いられているが、正常の小脳では、顆粒層、分子層、白質のうちで苔状線維の終末がシナプスを形成している顆粒層に最も強い 2-deoxyglucose の取り込みがみられた。ここでもやはり顆粒層への取り込みが最も強く、残存している顆粒細胞は、機能時に働いていることが示唆された。

以上の結果より Gunn ラットの小脳は、形態学的にはプルキンエ細胞のみならず、顆粒細胞の減少がみられ、アストロサイトの hypertrophy が観察された。更に構成蛋白成分、遊離アミノ酸含量も変化しているため、脳内の代謝が著しく変化していることも予想される。これらの所見は、高ビリルビン血症時の脳の変化をとらえる上で大きな手がかりとなるばかりでなく、核黄疸の発症機序ならびに病因の解明にも有用なものであろうと考えられる。（尚 S-100, GFA 蛋白に関する免疫組織化学的検査結果、P400蛋白等に関連した蛋白パターン、2-deoxyglucose 法によるオートラジオグラフィーの結果は当日供覧する）。

文献

1) Butcher, R. E., Stutz, R. M. & Berrs, H. K. Amer. J. Ment. Def. 75 755

1) Butcher, R. E., Stutz, R. M. & Berrs, H. K. (1977) Amer. J. Ment. Def. 75 755-759
2) Changeux, J.-P. & Mikoshiba, K. (1978) in "Maturation of the nervous system" (Eds. Corner, M.A. et al) Prog. Brain Res. 48 Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 43-66
3) Ellman, G. L., Courtney, K.D., Anders, V., Robert, Jr. & Featherstone, R. M. (1961) Biochem. Pharmacol., 7 88-95
4) Gunn, C. K. (1938) J. Hered. 29 137-139
5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) J. biol. Chem. 193 265-275
6) Mariani, J., Crepel, F., Mikoshiba, K., Changeux, J.-P. & Sotelo, C. (1977) Phil. Transact. Royal Soc. London, B. Biological Sciences 281 1-28
7) 御子柴, Changeux, J.P. (1978) 神経化学 16 293-296
8) Mikoshiba, K. & Changeux, J.-P. (1978) Brain Res. 142 487-504
9) Mikoshiba, K., Huchet, M. & Changeux, J.-P. (1979) Developmental Neuroscience, in press
10) Mikoshiba, K., Nagaike, K., Aoki, E. & Tsukada, Y. (1979) Brain Res. in press
11) Mikoshiba, K., Nagaike, K., Kohsaka, S., Takamatsu, K. Aoki, E. & Tsukada, Y. (1979) Developmental Biology (accepted)
12) Nakata, D., Zakim, D. & Vessey, D. A. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 289-292
13) O'Farrell, P. H. (1975) J. biol. Chem. 250 4007-4021
14) Rossier, J., Bauman, A. & Benda, P. (1973) FEBS Letters 32 231-234
15) Sawazaki, Y., Yamada, N., Nakajima, H., (1976) J. Neurochem. 27 577-583
16) Schmid, R., Axelrod, J., Hammaker, L. & Swarm, R. L. (1958) J. Clin. Invest. 37 1123-1130
17) Tamaki, Y. & Yamazaki, Y. (1975) Teratology 12 214
18) 塚田, 永井, 須田 (1977) 神経化学 16 85-88
19) Yamada, N., Sawazaki, Y., Nakajima, H. (1977) Brain Res. 126 295-307

76 高ビリルビン血症Gunnラット：小脳の2′,3′-cyclic nucleotide-3′-phosphohydrolaseと小脳低形成によるタンパクパターンの変化について

仙波りつ子・青野幸子・青木英子
柏俣重夫
（愛知県コロニー）

〔要約〕

小脳低形成を示す遺伝的高ビリルビン血症Gunnラットホモ接合体(nn)の小脳で2′-Cyclic nucleotide-3′-phosphohydrolase(CNPase)活性の加齢変化と30日齢のnnで小脳のタンパク組成について検討した。1)nnの小脳重はヘテロ接合体(Nn)に比べ全日齢で低く、特に15日齢頃から著しくばらついた。2)全CNPase活性は小脳重と類似のパターンを示した。3)nnの小脳重当りの比活性Ⅰは10日齢でのみ有意に低かったが、タンパク量当りの比活性Ⅱは5,10日齢で低く、20,25,30日齢では逆に高かった。20日齢頃から小脳重と比活性Ⅱは負の相関を示した。4)nnの小脳のタンパク濃度は15日齢頃よりNnの85%に低下し、10日齢以降の小脳重とタンパク濃度には正の相関がみられた。nnの20日齢までのタンパク濃度の増加速度はNnより有意に低かった。5)CNPaseの発現はnnでやや遅れるがビリルビンによる直接的影響ではないこと、タンパク合成は小脳の生後発達の早期に著しく低下することが示唆された。6)30日齢のnnの小脳タンパクのSDS-PAGEでは分子量の異なる三つのバンドに特徴的な変化がみられた。ミクロゾーム分画におもに分布する分子量250,000(GR-250)と33,000(GR-33)のタンパクはそれぞれ減少および増加を、核分画におもにみられる分子量50,000(GR-50)のバンドは増加を示した。新生仔期の光照射はnnの小脳低形成および小脳タンパクの組成変化を防止もしくは改善した。以上の結果はこれら3種のタンパクがビリルビンによる小脳低形成と密接な関連をもつことを示している。

ラット小脳の生後発達に関する形態学的、細胞学的変化についてはこれまでに多くの報告がある[1]。また遺伝的に高ビリルビン血症を示すGunnラットnnでは小脳低形成が必発し、それがビリルビンによることが明らかにされており[10,11,13,17]生化学的にはDNA合成障害[10]、Thymidine kinase活性の低下[16]が知られている。さらに成獣nnの脳切片実験から神経細胞、ミエリンへのアミノ酸とりこみ低下も報告されている[5]。われわれはビリルビンによる小脳発達障害の背景を生化学的に解明するために、ミエリンの指標酵素であるCNPase活性発現の様相、小脳タンパク組成の変化を検索した。

〔実験材料および方法〕

1)Gunnラットnnおよびnnは各日齢においてすべて同腹仔を用いた。2)小脳homogenateのCNPase活性測定はDrummond[3]の方法に準拠し、PiはMartin-Doty法[14]に依った。3)30日齢Gunnラット小脳の細胞下分画(4℃)は10% homogenate(0.32Mしょ糖-10mMリン酸緩衝液,pH7.0)を1000×g,10分(2回洗滌);12,000×g,20分(同);105,000×g,60分;遠心し、沈査(おのおのP1,P2,P3)と上清を得た。4)SDS-PAGEは基本的にAmes[2]の方法に従ったが、5-15%直線濃度勾配ゲルの作製は30℃,試料(50μg)の泳動は4℃,1mA/tubeで行なった。5)光照射は親から分離した仔に対して生後4日から8日までの5日間、1日5時間、24×10⁴ erg/cm²/secの青色光線を用いて行なった[12]。6)タンパクはLowryら[6]の方法で定量した。7)統計処理としては、2つの平均値の差の検定には対応のある t 検定を、2変量間の直線性の検定には相関分析法を、2つの回帰直線の差異の検定には回帰係数の差の検定を用いた。

〔実験結果〕

本研究の一部は昭和54年度日本母性保護医協会からの研究助成金の援助を受けた。

5日齢でのoの小脳重(27.0±2.5mg; n=10)はf(28.2±2.9mg; n=10)と比較してすでに有意に低いが(P<0.02)、15日および30日齢のoがおのおの140.0±19.4mg, n=11; 207.5±12.6mg; n=11と比較的安定値を示すのに比べてoでは15日齢以降でばらつきが大きくなり、特に30日齢では小脳重の高い群(156.4±14.8mg; n=5)と低い群(43.5±10.3mg; n=6)にわかれる傾向を示した。全CNPase活性は小脳重ときわめてよく似たパターンを示し、例えば30日齢のoで65.0±35μmol Pi(n=11)oで高い群は48.9±6.0μmol Pi(n=5)、低い群は15.0±3.3μmol Pi(n=6)であった。図1,2に対照群である同腹のoのCNPase比活性に対するoの相対比活性を示す。比活性I(図1)は10日

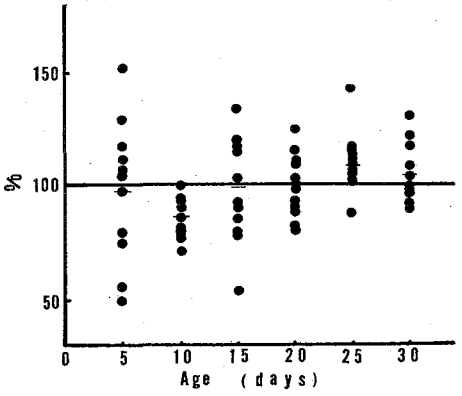


図1 小脳のCNPase比活性(I)(μmoles/min/g wet weight)の対照群に対する相対活性の加齢変化

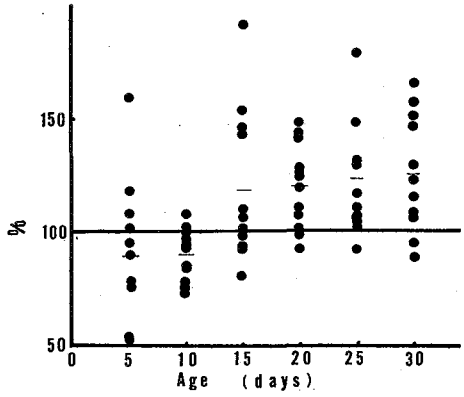


図2 小脳のCNPase比活性(II)(μmoles/min/mg protein)の対照群に対する相対活性の加齢変化

齢においてのみ有意に低い(86.5%; P<0.01)が、比活性II(図2)では5,10日齢で低値(89.0; 90.0%; P<0.05)、20,25,30日齢で逆に高値を示した(120.0; 123.0; 125.3%, P<0.05)。次に小脳重と比活性I,IIおよびタンパク濃度との関係を調べると、oの比活性Iは全日齢で小脳重との相関はなかったが、図3のように(20日齢を代表的に示す)、比活性IIは20,25,30日齢で負の相関(相関係数: -0.895, -0.728, -0.854; P<0.05)を、タンパク濃度は10日齢から正の相関(10日, 0.806; 15日, 0.710; 20日, 0.869; 25日, 0.778; 30日, 0.697; P<0.05)を示した。図4はfとoのタンパク濃度の日齢変化をプロットしたもので、その平均値は15日齢以降で有意差がみられ、20日齢までの2つの濃度増加直線の傾きは統計的に有意であり(勾配: o, 2.692, f, 4.183; P<0.01)、oでは傾きが小さいことが示された。この結果はoの小脳におけるタンパク合成障害を示唆しているので次に低形成のあるoの小脳のタンパク組成をSDS-PAGEによって分析した。図5に非光照射o(左上)とf(右上)、および光照射o(左下)とf(右下)のP3分画の典型的な例の泳動パターンを示す。非照射oではfに比してバンドAの顕著な減少、およびB, Cの増加が認められた。内部標準タンパク(Ferritin, 220,000; RNA polymerase β 165,000; 同β 155,000; 同α, 88,000; phosphorylase a, 93,000)を用いてのみかけの分子量はA, B, Cおのおの25,000(GR-250)、50,000(GR-50)、33,000(GR-33)であった。GR-250とGR-50はP1およびP3に存在するが、相対量としては後者はP1に優勢であり、前者はP3に多くoとfの差も顕著であった。GR-33はおもにP3に分布した。また小脳低形成の強いほどこれらのタンパクの変化は明らかであった。光照射されたoの小脳重は同腹のfのそれに接近しこれまでの報告[8,13]と一致するが、光照射oの泳動パターンも非照射に比べGR-250の増加、GR50, GR-33の減少を示し、fと同様のパターンになった。fに光照射を行なっても大きな影響はみられなか

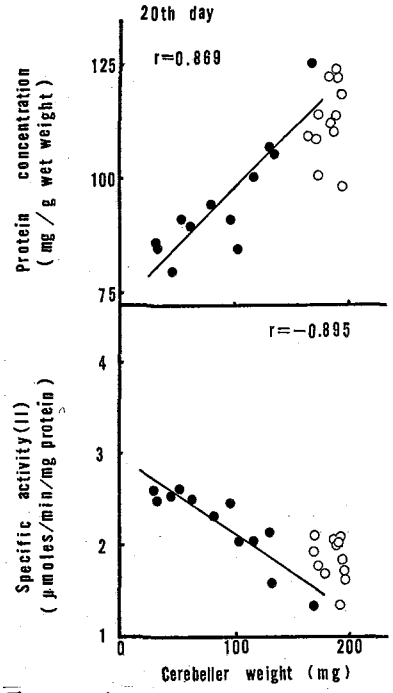


図3 小脳重と小脳のタンパク濃度およびCNPase比活性(II)の相関 ●ff, ○f+

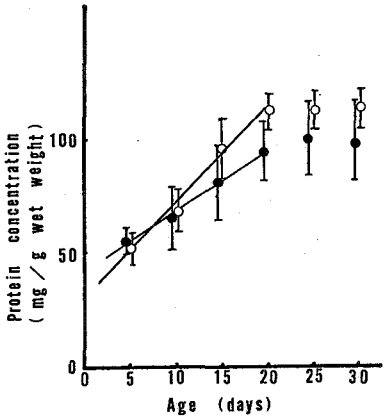


図4 小脳のタンパク濃度の加齢変化 ● ff, ○ f+

った。小脳上清および大脳のいずれの分画にもGR-250に相当するバンドはみられず、GR-50, GR-33相当のバンドは大脳にも存在したが f+ で差はみられなかった。

〔考察〕

小脳低形成を示す f+ のCNPaseの比活性I, IIは前者で10日齢、後者で5, 10日齢と小脳の生後発達のかなり早期(タンパク濃度の平均値に f+, f+ 間で差のない時期)に明らかな低値を示すことから、 f+ で小脳のCNPase活性の発現がビリルビンによって遅れていることを示唆する。ところが20日齢頃から f+ の比活性IIの平均値は対照群より有意に高く(比活性Iには差がない)、また小脳重と比活性IIの間には負の相関があり小脳重が小さいほど比活性IIは高くなる傾向を示したが、これは小脳内のタンパク濃度が逆に小脳重と正

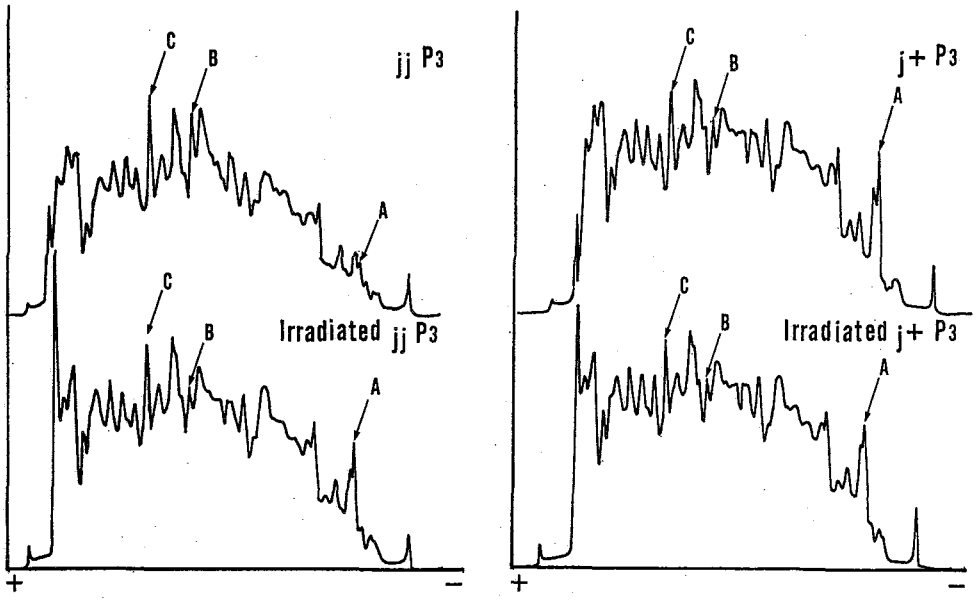


図5 光照射 非照射 f+ および f+ 小脳P3分画のデンシトグラム: A, GR-250; B, GR-50; C, GR-33

の相関をもつことに依存している。すなわちCNPase活性発現に遅延はあっても20日齢頃には対照群のレベルに達するのに対し、この時期の小脳のタンパク合成はおで著しく減少しているため比活性Vが高くなると考えられる。従ってCNPase活性の発現の遅延は酵素合成障害によるというよりはむしろ二次的影響と思われる。ミエリンのタンパク合成障害が成獣おの脳切片実験で報告されているが[5]、形態学的にはおの小脳髄質の変化はほとんどみられないことが明らかにされている[4,11]。小脳のタンパク濃度はおで15日齢頃から平均値に有意差がみられ、また小脳重との間には10日齢頃より正の相関が観察される。さらにおの小脳のタンパク濃度の増加速度はおより遅く、定常状態の20日齢以降のレベルも有意に低い。これらの事実は小脳の生後発達におけるかなり早期に小脳のタンパク合成がビリルビンにより障害をうけていることを示唆している。おで小脳のThymidine kinase活性低下が6日齢よりみられ[16]、DNA合成障害は10日齢頃に停止する[10]といわれる。また小脳低形成は光照射により予防もしくは改善されるがその臨界期は4-8日齢と考えられている[12]。従ってこの頃のタンパク合成障害は以後の小脳の発達に大きな影響をほぼすものと推察される。おの小脳では顆粒細胞など他の細胞と比べPurkinje細胞の変化が著しく、とくに前葉での変化は強い[11]。GR-250は大脳には存在せず、小脳のミクロゾーム分画に比較的多く存在するタンパクで低形成の強いおや小脳ほど著しく減少する。また新生仔期の光照射による低形成の発現抑制と一致してその減少も抑制される。Purkinje細胞に特異的なタンパクか否かは現時点では明確でないが、泳動パターン、大脳に存在しないこと、PAS陽性であることからPurkinje細胞に局在するといわれるP400[28]と非常によく似ていると思われる。しかし分子量的には大きな違いがあり、その異同は今後の問題となろう。GR-50とGR-33は低形成小脳では明らかな増加を示し、光照射によりその増加の抑制されるタンパクである。前者は核およびミクロゾーム(おもに核)分画に、後者はミクロゾームに見い出されるが大脳にもそれに相当するバンドがみられるので小脳に特異的ではないかもしれない。いずれにせよ、生後発達の著しいラット小脳[17]の神経細胞がビリルビン感受期[9]に障害され、正常な発達(増殖、細胞移動[3])にとって基本的なタンパク代謝の異常(特定タンパクの生成または消滅過程の障害)が起り見かけ上減少または増加したものと考えられる。特徴的な変化を示すこれらのタンパクがビリルビン誘導性の小脳低形成と密接な関係にあることは疑いない。全般的なタンパク合成能力の低下機構との関連は今後の興味ある問題である。

〔文献〕

1. Altman, J. (1972) J. Comp. Neur. 145, 353-398; 145, 399-464; 145, 465-514
2. Ames, G. F. L. (1974) J. Biol. Chem. 249, 634-644
3. Drummond, G. I., Iyer, N. T., and Keith, J. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3535-3539
4. 出浦滋之, 長崎幸雄, 藤田雅文, 藤田田美 (1978) 解剖学雑誌 53, 34-35
5. Greenfield, S., and Majumdar, A. P. N. (1974) J. Neurol. Sci. 22, 83-89
6. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
7. Mallet, J., Huchet, M., Pougeois, R., and Changeux, J. P. (1976) Brain Res. 103, 291-312
8. Mikoshiba, K., and Changeux, J. P. (1978) Brain Res. 142, 487-504
9. Sato, H., Semba, R. K., and Kashiwamata, S. (1977) Biol. Neonate 32, 158-165
10. Sawasaki, Y., Yamada, N., and Nakajima, H. (1976) J. Neurochem. 27, 577-583
11. Schutta, H. S., and Johnson, L. (1967) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 26, 377-396
12. 仙波禮治, 佐藤浩, 遠山幸子, 村上氏顕 (1977) 先天異常 17, 402-403
13. Sisson, T. R. C., Goldberg, S., and Slaven, B. (1974) Pediat. Res. 8, 647-651
14. Swanson, P. D., Bradford, H. F., and McIlwain, H. (1964) Biochem. J. 92, 235-247
15. Tamaki, Y., Semba, R., and Tooyama, S. (1977) Physiol. Behav. 18, 255-259
16. Yamada, N., Sawasaki, Y., and Nakajima, H. (1977) Brain Res. 126, 295-307
17. Yamamura, H., and Sawano, J. (1975) Teratology 12, 217

77 Cytosine Arabinoside投与による小脳形成不全マウスの脳内物質の変化と組織化学

辻　元宏・岩瀬則文・佐藤啓二
高橋三郎　（滋賀医大・精神）
島田司己　（滋賀医大・小児）

〔要　約〕

新生マウスで生後2,3,4日目Cytosine Arabinoside(Ara-C) 50 mg/Kg/dayを投与し小脳小頭マウスを得た。生理的食塩水投与対照群とにおいて小脳，脳幹および大脳のモノアミン，ポリアミン，核酸それにタンパク質を10日目，20日目，70日目で定量した。これらの生化学的所見を組織化学的所見と比較検討し次の結果を得た。

(1)小脳小頭マウス小脳内モノアミン量（ノルアドレナリン-NA，セロトニン-5HT，ドーパミン-DA）NA，5HTは10日目，20日目においても増加を認めるが特に70日目でDNA（即ち細胞数）あたりの5HT，NAは対照群の6倍，γ-アミノ酪酸（GABA）は2倍の増加をみた。大脳，脳幹部ではNA，5HT，DA，GABAともに小脳程著明な差は認められなかった。NAにつき28週目小脳小頭マウスを用いて組織螢光法による検索を行なった結果，菲薄化した皮質においてNA線維およびVaricosityの著明な増加が認められ特にプルキンエ細胞の周囲および分子層下部において多数のNA varicosityが観察された。このような変化はすでに20日目のマウス小脳でも認められた。

(2)小脳小頭マウスの小脳湿重量は10日目，20日目，70日目ともに20mg前後で増加が認められずその結果70日目で対照群の約½であった。DNA，RNAおよび蛋白量のうちDNAは20日目までに減少しその影響は70日目まで続いていた。また蛋白質/DNA，RNA/DNAの値が20日目，70日目で対照群より有意に高いことは対照群にくらべて大型細胞が多いことを示している。このことは組織学的にも証明された。

(3)ポリアミン（プトレスチン-Put，スペルミジン-Spd，スペルミン-Sp）Putは10日目，20日目で有意に高い値を取った。一方Spd，Spは対照群にくらべ有意に減少しているが，Sp/DNAでは対照群との有意差はなくなる。即ちSpの減少はDNAの減少に伴うものと考えられる。

Ara-CはDNA-polymeraseの阻害剤でありKraybillやMcCreatonらの報告にもあるように乳児期ではCytomegarovirus(DNA-virus)感染症に，大人では白血病の治療薬として使用されている。Ara-Cは新生マウスに投与すると小脳の発達障害を引きおこしその発生学的検索が1975年に，組織電顕的検索が1978年にShimada[1),2)]らによってなされ，治療面との関係で興味が持たれている。松谷ら[3)]は妊娠ラットにAra-Cを投与しその仔大脳小頭ラットの脳内モノアミンの変化と学習行動との関連を報告している。この様なAra-Cの新生マウス小脳に対する効果についての神経化学的，組織化学的検索は未だなされていない。今回われわれはAra-C投与小脳小頭マウスの脳内物質変化につき特に小脳における神経伝達物質の1つとされるNAの組織螢光法による検索を行ない生化学的所見との関連性を追求したので報告する。

〔実験方法〕

(1)実験動物ICR-JCLマウスを用い生後2,3,4日の3日間にAra-C 50 mg/Kg/dayを皮下投与しAra-C群とし，対照群には生理的食塩水を投与した。10日目，20日目および70日目に午前10時～12時の間に断頭し小脳，脳幹，大脳に分けただちに各物質の測定に供した。

(2)脳内物質の測定

①モノアミン，GABAおよびポリアミンの定量

C. Atack[9]らのカラムを一部変更して使用した。即ち0.4M過塩素酸で組織をホモジネートし，15000gで10分間遠沈後その上清を0.1Mリン酸緩衝液pH6.5でNa^+型にした1mlDowex 50 X-4，200～400メッシュに通し水洗後3mlの0.1Mリン酸緩衝液でGABAを8mlの1MHClでNAを3mlの1MHCl-50%エタノールでDAをついで8ml-1MHCl-50%エタノールで5HTを分離し　最後に6MHCl-50%エタノール3mlでポリアミンを溶出した。NAはKehr[5]のう法，DAおよび5HTはAtack[6),7)]らのう法で螢光測定した。GABAおよびポリアミン分画は減圧乾固後Seiler[8)9)]のう法でダンシル化し薄層クロマトグラフィーで分離後スポットをかきとり螢光測定を行なった。

②DNA，RNAおよびタンパク質の測定

上記ホモジネート遠沈後の沈渣をSchmidt-Thannhauser変法で抽出し，DNAはBurton法，RNAはMejbaum法およびタンパク質はLowry法で測定した。

(3)組織螢光法

Ara-C群，対照群それぞれ12匹のマウスを用い木村[10]らの方法に従って生後5日，20日，28週目に2%グリオキシール酸でかん流し採取した脳を凍結乾燥した。作製した標本を落射型螢光顕微鏡で観察し更に観察部位の同定のため透過光の併用あるいは次の切片の普通染色（Cresylecht-Violet）を行なった。

［実験結果］

(1)小脳重量，RNA，DNAおよび蛋白質の変化

表1でしめすように小脳重量はAra-C群では10日目，20日目及び70日いずれも20mg前後で有意な増加を認めなかった。DNA量は主に20日，70日とその減少が著明になり10日ではその減少は著明でなく対照群との差も認められなかった。このことはマウス小脳のマイクロニューロンが外顆粒層から形成される時期とされる20日までにDNAが減少していることとなり顆粒細胞の脱落していることを推察させた。また蛋白質/DNA，RNA/DNAが20日，70日でも2倍近くAra-C群のうが高いことから細胞容積が少なく大きな核を有する細胞即ち顆粒細胞が脱落しているのを意味していると同時に大型の細胞が相対的に残っていることが考えられた。大脳，脳幹部ではDNA，RNAそれに蛋白質とも有意差は認められなかった。

Table 1. DNA, RNA AND PROTEIN CONTENTS IN CEREBELLUM OF ARA C. AND CONTROL MICE AT 10TH, 20TH AND 70TH DAYS

		Weight (mg)	DNA (mg/g wet wt.)	RNA (mg/g wet wt.)	Protein (mg/g wet wt.)	Protein / DNA	RNA / DNA
10th days	Ara C.	21.00 ± 4.37	6.67 ± 1.03	5.08 ± 1.12	55.00 ± 5.98	8.19 ± 0.78	0.75 ± 0.08
	Control	32.12 ± 4.08	6.02 ± 0.65	5.19 ± 0.47	48.81 ± 5.64	8.26 ± 1.11	0.88 ± 0.10
20th days	Ara C.	22.50 ± 5.34	3.99 ± 0.19	3.60 ± 0.64	62.19 ± 9.42	15.89 ± 2.64	0.92 ± 0.15
	Control	47.12 ± 3.56	6.93 ± 0.67	3.36 ± 0.30	67.71 ± 6.20	9.78 ± 0.42	0.55 ± 0.03
70th days	Ara C.	21.00 ± 3.38	3.31 ± 0.25	3.28 ± 0.28	90.84 ± 7.50	29.36 ± 8.14	1.13 ± 0.25
	Control	62.37 ± 6.65	5.37 ± 0.36	2.56 ± 0.23	76.68 ± 3.57	13.08 ± 4.22	0.48 ± 0.03

(n=8, Mean±S.D.)

(2)小脳におけるモノアミン量の変化と脳幹，大脳でのモノアミン量

図1はDNA即ち細胞数あたりの各物質の濃度をしめした。5HT，NA，GABAとも対照群にくらべ10日目，20日目と有意な増加が観察され特に70日の成熟マウスでは5HT，NAで約6倍の著明な増加と約2倍のGABAの増加を認めた。このような増加は70日Ara-C群小脳湿重量g当りでNA：494.98±96.64ng/g（対照　173.03±35.18ng/g），5HT：1083.00±99.93ng/g（対照　344.03±64.75ng/g），GABA：（2505.24±252.78 nmole/g（対照，1978.23±252.78 nmole/g）であり，各物質の湿重量あたりの濃度も高くなっ

FIG.1 MONOAMINES AND GABA CONTENTES IN CEREBELLUM OF EXPERIMENTAL AND NORMAL MICE AT 10TH, 20TH AND 70TH DAY

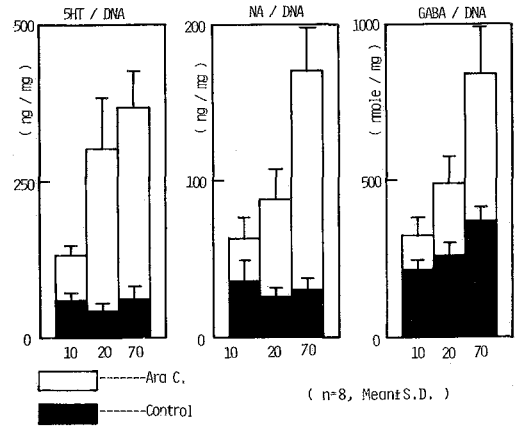


Table 2. MONOAMINES AND GABA CONTENTES PER DNA IN CEREBRAL HEMI. AND BRAIN STEM OF EXPERIMENTAL AND NORMAL MICE AT 20TH DAY

		5HT / DNA (ng/mg)	NA / DNA (ng/mg)	DA / DNA (ng/mg)	GABA / DNA (nmol/mg)
Cerebral hemi.	Ara C.	356.23 ± 17.42	68.70 ± 10.49	311.59 ± 31.45	1031.36 ± 63.24
	Control	436.05 ± 40.96	56.28 ± 9.57	307.59 ±39.16	1032.90 ± 59.46
Brain Stem	Ara C.	707.95 ± 87.49	214.40 ± 23.23	595.86 ± 88.88	648.19 ± 72.34
	Control	683.46 ± 69.02	151.50 ± 16.94	473.96 ± 109.65	645.22 ± 63.59

(n=8, Mean±S.D.)

Table 3. POLYAMINES CONTENTES OF CEREBELLUM OF EXPERIMENTAL AND NORMAL MICE AT VARIOUS AGES

Days after birth		Put (nmol/g wet wt.)	Spd (nmole/g wet wt.)	Sp (nmole/g wet wt.)
10	Ara C.	519.96 * ± 153.81	754.18 ± 114.78	249.04 ± 61.81
	Control	392.48 * ± 61.09	981.38 ± 68.98	550.47 ± 73.61
20	Ara C.	99.10 * ± 19.12	590.91 ± 44.39	216.42 ± 83.71
	Control	78.48 * ± 9.75	767.82 ± 80.02	557.89 ± 49.12
30	Ara C.	n.d.	437.74 ± 55.07	331.17 ± 51.30
	Control	n.d.	549.99 ± 39.79	563.05 ± 63.72
70	Ara C.	n.d.	501.65 ± 79.70	397.04 ± 66.64
	Control	n.d.	599.27 ± 49.59	476.79 ± 34.53

(* P<0.001) (n=8, Mean±S.D.)

ている。このことは組織螢光法でも明らかとなった。これら物質の増加の理由としては(イ)顆粒細胞が脱落して相対的に大型細胞(主にプルキンエ細胞)が残ることにより伝達物質の合成系が促進される。(ロ)分解系が抑制される。(ハ)Ara-C投与で分解系酵素の合成阻害が存在する。… 等の種々の可能性が考えられるが不明である。表2に小脳小頭マウスの生後20日目の大脳および脳幹でのDNAあたりの5HT, NA, DAそれにGABAの量を示した。各伝達物質とも小脳程著明な差は認められなかった。Adlard[11]らの報告にもあるように小脳は生後Neurogenesisがおこるため生後のAra-C投与では他の脳部位にくらべその影響が大きいことがわかる。

(3)小脳におけるポリアミン量の変化

表3でしめすようにPutの減少の遅れが認められ発達の遅滞を示唆する所見を得た。Spに関してはDNAと相関して減少するのが認められたがSpdとRNAとの間にはそのような所見は得られなかった。

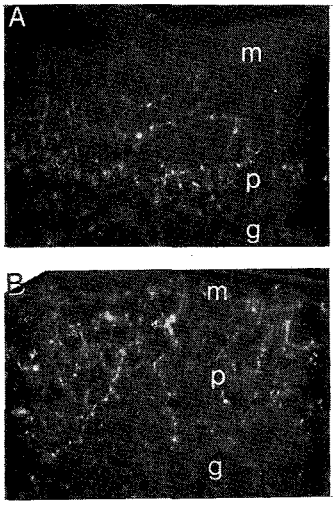
(4)組織学的所見

Ara-C群における小脳皮質は組織学的に対照群のそれと著しく異なっている。生後5日目のAra-C群では通常同日令のマウスで観察されるべき外顆粒層がほとんど消失しており皮質表層では散在性に分布するプルキンエ細胞が主体となっていた。また一部プルキンエ細胞は内顆粒層にも分布するため皮質の層形成は不完全に見え20日目および28週目では小脳皮質は著しく菲薄化し外顆粒層は対照群と同様観察されないがプルキンエ細胞は5日目Ara-C群と同様に皮質表層で散在性に分布し分子層および顆粒層にも多くのプルキンエ細胞が認められ, 3層の顆粒細胞の減少とあいまって小脳の三層構造は不明瞭であった。

(5)組織螢光法

生後5日目のAra-C群マウス小脳におけるNA線維の走行あるいはNA varicosityの分布は対照群のそれと比べ著明な差が認められなかった。緑白色を呈するNA線維は髄質中を直線的に走行し所々で皮質に向う分岐を出し皮質においては多くのNA varicosityは細胞間隙に存在して特定の細胞と密接な関係を示さなかった。20日および28週目の対照群マウス小脳ではNA線維あるいはvaricosityは髄質にはほとんど観察されないが皮質では全層にわたり認められた。顆粒層では細胞間隙を斜走して神経細胞層に向う

Fig 2. 生後28週の対照群(A), Ara-C群(B)の小脳において観察されたNA線維およびNA varicosity。



m…分子層, p…神経細胞層, g…顆粒層

NA線維がまたプルキンエ細胞の近くに少数のNA varicosityが観察された。分子層のNA線維は表面に垂直あるいは平行に走行していた。しかし28週目のArac群小脳でのNA線維あるいはvaricosityの分布状態は対照群と著しく異なり菲薄化した皮質にこれらが高密度に分布していた。特に散在性に分布するプルキンエ細胞の周囲にこれら細胞を取巻くように多数のNA線維が観察された。また分子層ではNA線維は表面に平行な神経叢を形成し，このような傾向はすでに20日目でも認められた。

〔考察〕

小脳の低形成を引きおこすものとして低栄養，X線照射，ウィルス感染それに化学物質(MAMやAra-C)が考えられるが，そのうちDNA polymeraseの阻害剤Ara-Cを投与して小脳小頭ラットの生化学的，組織学的検索を行なった結果小脳外顆粒層は生後5日目ですでに消失しその層より分化遊走する顆粒細胞の減少をまぬき相対的にプルキンエ細胞等の大型細胞の増加が観察された。外顆粒層から顆粒細胞が分化遊走する時期はマウスでは生後20日目までの間にあるので生化学的にAra-C群と対照群との間でDNAおよびタンパク質/DNAの差が10日目では存在せず20日目では有意の差を生じてDNAはAra-C群では減少し(Ara-C群/対照群=0.6)，蛋白質/DNAが増大する(Ara-C群/対照群=1.6)ことは生後10～20日の間で小容積の細胞質で大型の核が特徴的な顆粒細胞が脱落することでもたらされた結果と考えられる。そしてその影響が70日目の成熟マウスまで続くことはChanda[12]らが報告しているMAM投与ラットとは異なる所見である。組織螢光法でも明らかなようにNA線維の高密度の分布は20日目でもすでに認められるが，一方生化学的にはNAの合成が高まっているのか分解が抑制されているのか今後の研究をまたなければならない。これら顆粒細胞の減少および毛ノアミン量の増加とAra-C投与マウスに観察された失調性歩行との関係も今後検討を要する問題である。

本研究に御指導たまわった前田敏博教授，越智淳三教授に深謝します。

〔文献〕

1) Shimada, M., Wakaizumi, S., Kasubuchi, Y. and Kusonoki, T. (1975) Arch. Neurol., 32, 555
2) Yamano, T., Shimada, M., Nakamura, T., Wakaizumi, S. and Kusunoki, T. (1978) Acta. Neuropathol., 44, 41
3) 松谷天星丸，田丸政男，永吉道子，塚田裕三 (1978) 神経化学，17，209
4) Atack, C. and Magnusson, T. (1978) Acta. pharmacol. et toxicol., 42, 35
5) Kehr, W., Lindquist, M. and Carlsson, A. (1976) J. Neu. Transmi., 38, 173
6) Atack, C. (1973) Br. J. Pharmac., 48, 699
7) Atack, C. and Lindquist, M. (1973) Arch. Pharmacol., 279, 267
8) Seiler, N. and Wiechmann, M. (1967) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 348, 1285
9) Seiler, N. and Wiechmann, M. (1968) Hoppe-Seyler's Z physiol. Chem., 349 588
10) Kimura, H., Tohyama, M., Maeda, T. & Shimizu, N. (1976) Acta. Cytochem. Histochem., 9, 98
11) Adlard, B. P. F., Dobbing, J. and Sands, J. (1975) Br. J. Pharmac., 54, 33
12) Chanda, R., Woodmard, D. J. and Griffin, S. (1973) J. Neurochem., 21, 547.

78 フェノバルビタール依存ラット部位別脳におけるアミノ酸量の変化

青木公子・黒岩幸雄
（昭和大・薬・毒物）

〔要約〕

フェノバルビタール（PB）を含む粉末飼料をラットに35日間与えることにより、PB依存ラットをつくり、PB投与時および禁断時における症状を観察し、肝薬物代謝酵素活性、脳肝血清中のPB量と脳内アミノ酸の変動を調べた。

35日間の飼育によりラットは激しい禁断症状を示す強い依存状態となる。依存形成過程において、肝重量，チトクローム P-450. b5 量，ミクロゾーム蛋白量，Aminopyrine N-demethylase NADPH-cyt c-reductase 活性は投与開始後14日まで著しい増加を示し Aminopyrine-N-demethylase 活性以外はその後プラトー状態であった。これらの変化は禁断と共に回復し14日後には対照値にまで回復した。脳肝血清中のPB量は投与時増加の傾向にあり、禁断2日目には消失し、PB血清濃度が約15 μg/ml になると激しい禁断症状があらわれた。

依存禁断時におけるラット脳7部位のアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、タウリン、GABA量を測定した。依存時 GABA 量は大脳皮質、中脳、視床下部、線条体、海馬で減少しているが、禁断と共に対照値に回復する傾向にあった。禁断2日目にはアスパラギン酸量は大脳皮質、視床下部、線条体、海馬で減少し、グルタミン酸量は大脳皮質、視床下部、海馬で減少し、タウリン量は大脳皮質、中脳、線条体、海馬で増加を示した。グリシン量は大脳皮質、線条体で増加し、視床下部では減少した。

フェノバルビタール（PB）は代表的な肝薬物代謝酵素の誘導剤であり、PBの耐性発現には酵素誘導が大きな役割をしめていると思われる。しかし Caldwell ら[2]は5日間の PB 投与により生じる耐性すら、みかけの耐性ではないと報告しており、PB投与時、特に慢性投与時の薬物代謝酵素系と中枢の伝達物質量の変化を調べることは興味深いことである。バルビツレート連続投与時の中枢変化の中でアミノ酸に関しては一定の結果がえられていない。Essig[4]はバルビタール禁断後のけいれんを AOAA（aminooxyacetic acid）がおさえることから、依存禁断時の GABA量の減少がけいれんに関与していると仮定し、岩田ら[6]もバルビタール依存時の大脳皮質と脳幹 GABA量の低下より、Essig の仮説を支持した。また彼らは特に依存時の小脳タウリン量の増加に注目している。Tzeng[11]らは3日間のマウス背部皮下ペントバルビタールペレットのうめこみにより、GABA、グルタミン酸量の減少と禁断による GABA量の減少を報告している。一方 Crossland ら[3]はバルビタール依存禁断時において GABA量の有意な変化を認めず、Sutton ら[9]もペントバルビタール投与時に GABA量の変化は認めず GABA の代謝プールにおける turnover の減少を報告している。

本研究では柳浦ら[12]の粉末飼料混合法により PB依存ラットをつくり、PB投与時の肝薬物代謝酵素の変化と、脳肝血清中の PB量の変化、禁断時の血清 PB量の変化を調べて、PB依存状態に対する知見を得、依存禁断時の大脳皮質、中脳、小脳、橋延髄、視床下部線条体、海馬の脳7部位におけるアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、タウリン、GABA量の変化を調べた。

〔実験方法〕

1. PB依存ラット　柳沸らの粉末飼料混合法を用いた。ウィスター系雄性ラット 98.9g (±9.3)を1ケージ1匹で飼育し、対照群には粉末飼料(三共ラボサービス社製 F-2)を、PB投与群にはPB(三共株式会社)を粉末飼料にまぜ　1週目には 0.5 mg/g と 1 mg/g, 2週目は 1mg/g と 2 mg/g, 3,4週には 2 mg/g と 4mg/g, 5週目は 4 mg/g を与えた。5週目の最終日17時に普通粉末飼料にかえ禁断状態にした。

2. 依存形成過程の肝変化　対照群、PB投与群共それぞれ3匹のラットを9時30分より11時の間に断頭し、生理食塩水で灌流後肝臓を摘出した。肝は 0.25 M sucrose (pH 7.4)で20%ホモジネート液を調整し、10,000g 10分遠心後の上清を用い Aminopyrine-N-demethylase 活性を、上清に5倍量の 9.6mM $CaCl_2$ を含む 0.125 M sucrose を加える Ca塩法[8]により調整したミクロソーム分画を用い、シトクローム P-450, b_5 量、NADPH-cyt c-reductase, glucose-6-phosphatase 活性と蛋白量を測定した。

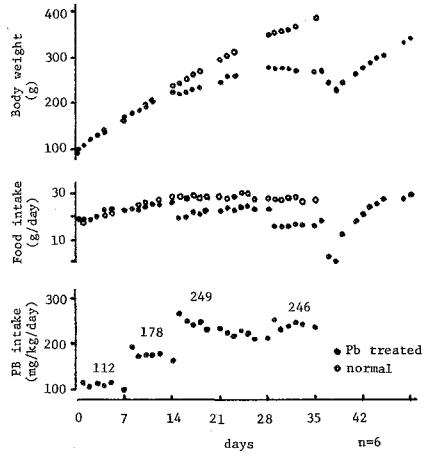
3. 脳，肝，血清中のPBの定量　肝脳は20倍量の 0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.6)中ポリトロンでホモジナイス後、同液で4-8倍に希釈した。禁断時の採血はラット眼窩静脈叢より 100μl ガラスキャピラリーを用いて行い、室温放置後遠心して血清をえた。希釈液 0.1 mlは グルタルアルデヒド法により結合された p-アミノ-PB-BSA を抗原としてえられた抗PB抗体と ^{14}C-PB (3.2mCi/mmol) を用いた硫安法によるラジオイムノアッセイで定量した。[7]

4. 脳内アミノ酸の定量　普通粉末飼料摂取35日から39日のものを対照群とし、PB投与5週間，禁断後2日，14日のラットの脳内アミノ酸を定量した。10時より10時30分の間にマイクロウェーブ(Metabostat NJE 2601, New Japan Co. Ltd.) 2~2.5 kW を 2.5秒間頭部照射後、とりだした脳を氷冷下、Glowinski の方法[5]により大脳皮質、中脳、小脳，橋延髄，視床下部、線条体、海馬の7部位にわけ秤量後、蒸留水中ポリトロンでホモジナイズ後 $HClO_4$ を最終濃度 0.4 N (含 1mM EDTA)になるように加え、13,000 rpm 15分遠心した上清を凍結保存した。上清 5~10μl を陽イオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離後 o-フタルアルデヒドを加える蛍光法[1]でアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、タウリン GABA を定量した。

〔結果と考察〕

図1は粉末飼料混合法で飼育した時の体重変化、1日あたりの飼料とPB摂取量を示したものである。PB投与ラットは飼料中のPB濃度があがるに従い飼料摂取量は減少し体重の増加率が悪く、投与終了時の35日目にはかなりの体重差が認められる。田頭ら[10]が同様なスケジュールで SDラットを用いている場合は、本実験よりもPB摂取量が低く、2mg/g と 4mg/g 投与時にも飼料摂取量の減少がみられず、体重も対照群に比し増加していた。PB投与により、体重あたりの肝重量は21日まで増加し(図2)、シトクローム P-450 含量、NADPH-cyt c-reductase

図1　体重，飼料摂取量，PB摂取量変化



活性は14日まで増加しその後一定の値をとっている。(図3) しかし14日以降シトクローム P-450, NADPH-cyt c- reductase 活性は一定にもかかわらず、Aminopyrine-N-demethylase の活性のみ低下の傾向にあることは、図4に示す様に肝臓内PB量の増加を考えれば、酵素部位におけるPBとの競合の結果低下したものと思われる。PBの肝薬物代謝酵素誘導を含む肝臓への影響は一般に14日まで増加しその後一定値を示し、禁断後14日には対照値に回復していた。禁断後2日には肝脳血清よりPBは消失し、この間に禁断症状があらわれる。禁断時の血清濃度を経時的にとり、禁断症状発現との関係をみるとPBの濃度低下がはやいラットほど症状がはやくあらわれ、一定濃度(約15μg/ml)以下になるとひきがねがひかれるように症状が出現した。禁断時には振顫、強直性けいれんがおき、ケージに身体をぶつけながら激しくかけまわるなど強度の症状がみられた。PB投与群46匹中1匹が投与中(4mg/g)死亡し、禁断37匹中9匹が禁断後1~2日で死亡、2匹がその後体重が回復せず死亡した。以上のことから、この方法によりPBの依存の強いラットが形成されたといえる。

表1はPB依存、禁断時の脳7部位におけるアミノ酸量の変化を示している。アスパラギン酸量は依存時に視床下部で減少し、禁断2日では視床下部でさらに減少し大脳皮質線条体海馬でも減少した。グルタミン酸量は依存時に小脳と視床下部で減少、禁断2日目で小脳では回復し、視床下部ではさらに減少し大脳皮質海馬でも減少した。グリシン量は依存時いずれの部位にも変化は認められないが、禁断2日目には大脳皮質線条体で増加、視床下部で減少した。タウリン量は依存時中脳と橋で増加、禁断2日目では中脳でさらに増加し、大脳皮質線条体海馬で増加を示し、橋では回復した。GABA量は依存時に大脳皮質中脳視床下部線条体海馬で減少し禁断2日目では大脳皮質視床下部でまだ減少がみられるものの他は回復した。依存時には低下しているGABA量が禁断により回復し、これに伴い興奮性伝達物質といわれるアスパラギン酸グルタミン酸量が減少し、抑制性のタウリンの増加が認められた。この結果から依存時にはPBの抑制効果によりGABA量は低下し、禁断時にはこのPBの抑制効果を補う方向にむかってGABA量が増加し他のアミノ酸も変化しているように考えられる。また

図2 肝重量変化

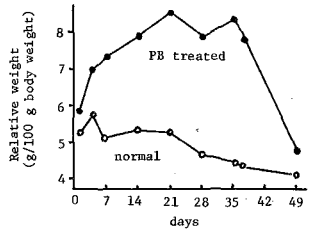


図3 肝薬物代謝酵素系の変化

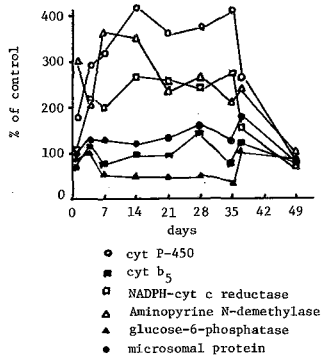


図4 脳,肝,血清PB量変化

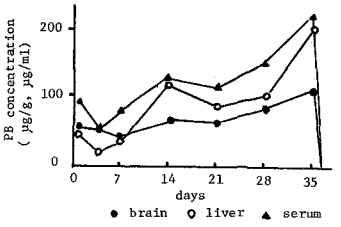
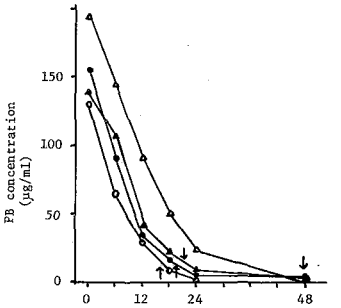


図5 禁断後の血清PB量



(矢印は禁断症状発現を示す)

タウリンの禁断時における増加は抗けいれん的な自己防禦の結果とも考えられる。しかし、これらの変化が禁断症状の原因であるのか結果であるのかは本実験結果から明らかにすることは出来なかった。

表1　PB依存ラット脳7部位のアミノ酸量　(μmol/mg wet weight ± S.E.)

		n	Cortex	Midbrain	Cerebellum	Pons-medulla	Hypothalamus	Striatum	Hyppocampus
Aspartate	c	9	2.43±0.07	2.52±0.09	2.02±0.06	2.28±0.05	2.26±0.05	2.09±0.07	2.14±0.05
	0	9	2.31±0.04	2.48±0.07	2.05±0.04	2.33±0.10	2.03±0.07*	2.10±0.04	2.11±0.04
	2	9	1.89±0.05**	2.27±0.11	2.06±0.06	2.48±0.09	1.84±0.10**	1.82±0.05**	1.59±0.05**
	14	12	2.72±0.07*	2.71±0.04	2.19±0.06	2.37±0.06	2.37±0.05	2.39±0.04**	2.47±0.05**
Glutamate	c	9	10.62±0.18	8.98±0.23	9.33±0.24	5.81±0.10	7.59±0.12	9.91±0.22	10.65±0.13
	0	9	10.36±0.13	8.78±0.63	8.68±0.12*	5.88±0.27	6.87±0.21**	9.37±0.14	10.40±0.19
	2	9	9.51±0.22**	8.94±0.41	8.97±0.21	6.26±0.21	6.72±0.30*	9.60±0.26	9.67±0.24**
	14	12	11.17±0.26	9.43±0.12	9.91±0.29	5.91±0.14	7.71±0.14	10.06±0.12	11.01±0.18
Glycine	c	9	0.62±0.02	1.14±0.04	0.77±0.10	2.60±0.07	0.86±0.02	0.65±0.02	0.83±0.05
	0	9	0.69±0.03	1.09±0.03	0.72±0.02	2.58±0.07	0.83±0.02	0.68±0.01	0.81±0.02
	2	9	0.83±0.04**	1.10±0.04	0.77±0.05	2.42±0.09	0.75±0.04*	0.76±0.03*	0.82±0.04
	14	12	0.67±0.04	1.10±0.02	0.78±0.03	2.55±0.11	0.85±0.02	0.65±0.03	0.78±0.04
Taurine	c	9	6.24±0.12	3.46±0.10	4.56±0.12	1.91±0.08	3.40±0.16	7.69±0.09	6.08±0.10
	0	9	6.57±0.18	3.82±0.13*	4.87±0.16	2.27±0.12*	3.69±0.15	7.55±0.21	6.24±0.14
	2	9	6.94±0.14**	4.29±0.24**	4.34±0.13	2.04±0.06	3.56±0.15	8.34±0.17**	6.67±0.18**
	14	12	5.66±0.10**	3.27±0.05	4.13±0.09*	1.79±0.05	3.05±0.08*	6.87±0.17**	5.44±0.10**
GABA	c	9	1.42±0.07	2.40±0.08	0.97±0.05	1.13±0.07	3.40±0.15	2.21±0.13	1.66±0.08
	0	9	1.07±0.05**	2.09±0.10*	0.86±0.04	1.10±0.09	2.81±0.21*	1.86±0.09*	1.29±0.06**
	2	9	1.24±0.04*	2.45±0.11	0.97±0.03	1.20±0.05	2.86±0.12*	2.10±0.07	1.60±0.04
	14	12	1.58±0.04	2.78±0.09**	0.99±0.03	1.20±0.05	3.96±0.17*	2.56±0.10*	1.85±0.07

* 0.01<P<0.05 vs. controls
** P<0.01 vs. controls

c: control　0: dependence(PB treatment 35days)
2: 2days after withdrawal　14: 14days after withdrwal

[文献]

1) Aoki, K., and Kuroiwa, Y. (1978) Chem. Pharm. Bull. 26, 2684-2688
2) Caldwell, J., Craft, J.E., and Smith, R.L. (1978) Br. J. Pharmacol. 61, 438
3) Crossland, J., and Turnbull, M.J. (1972) Neuropharmac. 11, 733-738
4) Essig, C.F. (1963) Int. J. Neuropharmac. 2,199-204
5) Glowinski, J., and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 665-669
6) Iwata, H., Matsuda, T., Yamagami, S., Hirata, Y., and Baba, A. (1978) Biochem. Pharmac. 27, 1955-1959
7) Satoh, H., Kuroiwa, Y., Hamada, A., and Uematsu, T. (1974) J. Biochem. 75, 1301-1306
8) Schenkman, J.B., and Cinti, D.L. (1972) Life Sci. 11, 247-257
9) Sutton, I., and Simmonds, M.A. (1974) Biochem. Pharmac. 23, 1801-1808
10) Tagashira, E., Izumi, T., and Yanaura, S. (1978) Psychopharmac. 57, 137-144
11) Tzeng, S., and Ho, I.K. (1977) Biochem. Pharmac. 26, 669-704
12) Yanaura, S., Tagashira, E., and Suzuki, T. (1975) Japan. J. Pharmacol. 25, 453-463

79 β-シトリルグルタミン酸のエネルギー代謝における役割

三宅正治・柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神）
反町　勝
（愛媛大・医・生理）

〔要　約〕

β-シトリルグルタミン酸(β-CG)のガスクロマトグラフィーによる定量法を確立し，臓器分布，成長に伴なう変化および系統発生的分布を調べた。

1)臓器分布―幼若ラットでは脳にほぼ特異的に存在するが，成熟ラットでは睾丸にのみ高濃度存在し，他のすべての臓器で低かった。

2)成長に伴なう変化―ラットで脳は生下時に高濃度で，その後著しく減少し，生後3週間で生下時の1/10以下になる。睾丸は生後3から4週間目にかけて著しく増加し，この時期は性ホルモン分泌よりも精子形成が活発になる時期に一致している。他臓器は生下時にも低濃度で，その後も不変かやや減少した。

3)系統発生的分布―両棲類(カエル)の脳に最も高濃度存在し，魚類(コイ)，爬虫類(カメ)が次に高く，鳥類(ハト，ニワトリ)は哺乳類と同様著しく低濃度であった。

幼若ラット脳と成熟睾丸に高濃度存在することから，β-CGが細胞増殖あるいは細胞分化に関係する可能性は，他臓器で細胞増殖に一致して増加しないこと，増殖・分化の完成した両棲，魚および爬虫類に多いこと等から否定的である。ラット脳が嫌気的から好気的エネルギー代謝に移る時期に減少し，系統発生的に下位の脳ほど嫌気的代謝が強いこと，睾丸の基礎酸素消費量の減少およびTCAサイクル酵素活性の低下とβ-CGの増加とが一致することから，β-CGのエネルギー代謝調節に関与している可能性が示唆された。

われわれは，幼若ラット脳に従来未知の物質を発見し，これをβ-シトリルグルタミン酸(β-CG)と同定した。[1] β-CGは幼若ラット脳に特に高濃度で成長とともに著しく減少することから，脳の成長に関連が深い物質と考えられたが，その生理的意義は不明であった。そこでβ-CGのガスクロマトグラフィーによる定量法を開発し，臓器分布，成長に伴なう変化，系統発生的分布等を調べ，これがエネルギー代謝と深い関連をもつかもしれないことを示す知見を得たので報告する。

〈実験方法〉

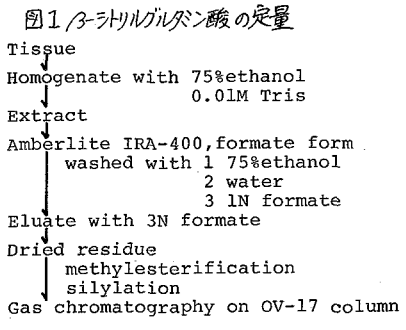
1)実験動物

ラットはWistar系を用い，コイ(150～300g)，トノサマガエル(20～32g)，ウシガエル(305～360g)および石ガメ(480g～590g)は夏期に捕獲した。

2)β-シトリルグルタミン酸の定量

β-CGの定量法の概略を図1に示す。本法によるβ-CGの回収率は82%であった。β-CGの4つのカルボキシル基をメチルエステルとした後水酸基をトリメチルシリル化し，ガスクロマトグラフィーで測定した。メチルエステル化のみではピーク幅が増大するし，トリメチルシリル化のみでは定量的誘導化が困難であった。ガスクロマトグラフィーの測定条件は2mの1% OV-17 (Gaschrome Q, 80-100 mesh) カラム，injector temp. 300°, column temp. 270°, N_2 gas 20 ml/min, FID detectorである。

図1 β-シトリルグルタミン酸の定量



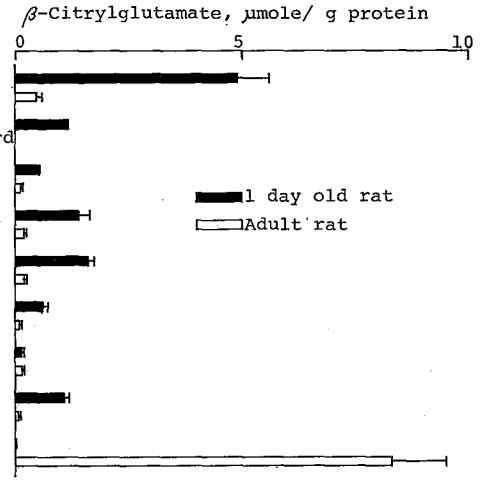
この条件下では．既知物質であるN-アセチルアスパラギン酸，N-アセチルアスパラチルグルタミン酸，その他N-修飾酸性アミノ酸のいずれとも保持時間が異なる。

〈実験結果〉

1)臓器分布

図2に生後1日目と成熟ラットの臓器分布を示した。生後1日目では．脳が最も多く，他の臓器は脳の約$\frac{1}{10}$～$\frac{1}{3}$であり，脳にほぼ特異的に存在するといえる。しかし成熟ラットになると，睾丸に幼若脳の16倍もの高濃度存在し，脳を含めたすべての臓器で低かった。

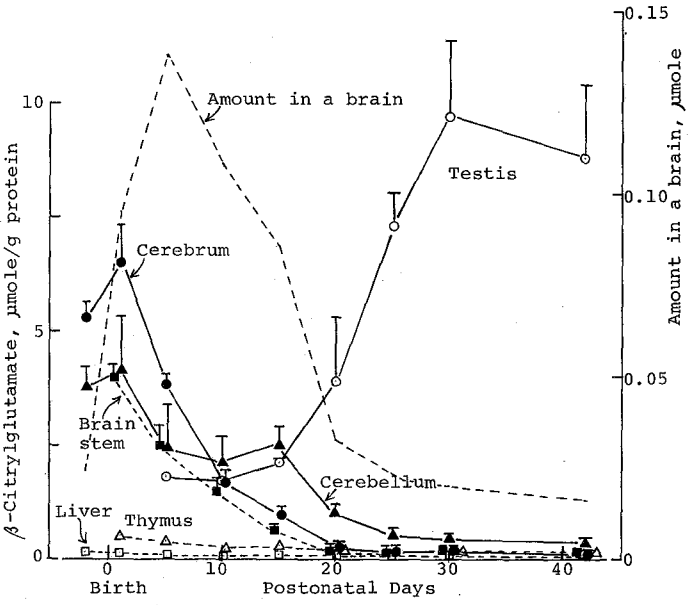
図2 β-シトリルグルタミン酸のラット臓器分布



2)成長に伴なう変化

臓器はその増殖速度から4つのタイプに分けられる。それらの代表として，脳，胸腺，肝臓および睾丸を選んだ。ただし脳のみ大脳，小脳および脳幹に分けて測定した。ラットの結果を図3に示した。大脳，脳幹は生下時に高濃度でその後著しく減少し，生後3週間で生下時の$\frac{1}{10}$以下になる。小脳は生下時と生後2週間目にピークをもつ2峰性変化を示した。

図3 β-シトリルグルタミン酸のラットの成長に伴なう変化

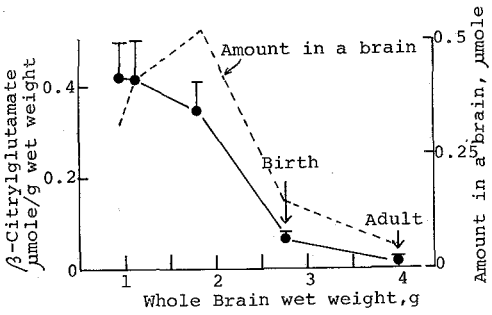


睾丸では生後3から4週間目にかけて著しく増加し，この時期に精子形成が活発になり始める[2]。睾丸のもう1つの機能である性ホルモンの分泌が始まるのは40日以降である[2]。他の臓器は生下時にも低濃度でその後も不変かやや減少した。

未熟な脳で出生し，生後顕著な発育を示すラットで，脳1個当りつまり脳細胞1個当りのβ-CG含量が生後5～10日目に最も高く，この時期はいわゆる"critical period"に相当する[3]。β-CGの役割がこのcritical periodに関係しているのかそれとも出生あるいは出生後に特異な現象に関与しているのかを明らかにする

ことは興味がある。そこで胎生期間中にかなり発育の進むモルモット脳の発育に伴なう変化を調べ図4に示した。胎生日数の割出がやや不正確であったため，脳重量の増加に対してプロットしてある。β-CGの濃度および脳1個当りの含量とも脳重量が1～2gの間が高く，出生後は低い。この脳重量はほぼ胎生40～50日に当り，この期間はモルモットのcritical periodに相当する。[3]

図4 β-シトリルグルタミン酸のモルモットの成長に伴なう変化

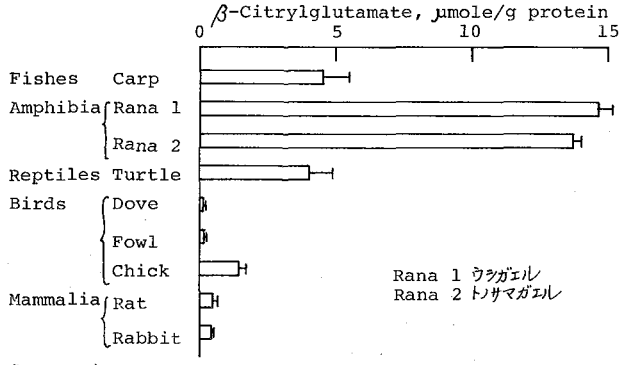


これらのことからβ-CGは出生あるいは出生後に特異な現象というより，脳の発育段階のある特殊な現象に関連している可能性が高い。

3)系統発生的分布

β-CGの系統発生的分布を図5に示した。カエル脳に幼若ラット脳の約3倍の濃度，コイおよびカメ脳にはそれとほぼ同濃度存在する。鳥類は哺乳動物と同様低濃度であった。このように爬虫類以下の下等脊椎動物には，哺乳類と異なり成熟した段階でも高濃度のβ-CGが存在することがわかった。このような下等動物には脳以外の臓器にもβ-CGが多量含まれているのかもしれない。そこでウシガエルについて臓器分布を調べた(表1)。β-CGは脊髄に脳と同程度存在し，肺に脳の約半含まれるが，他の臓器にはほとんどなかった。性殖器官の量を測定していないが，β-CGは下等脊椎動物においても脳神経系に限局して存在するように思われる。

図5 β-シトリルグルタミン酸の系統発生的分布



〈考　察〉

脳より機能が比較的単純である成熟睾丸に大量のβ-CGが含まれていることに注目したい。すなわち睾丸の機能は精子形成と性ホルモンの分泌とに大別でき，精子細胞およびSertoli細胞と間質細胞とがそれぞれの役割を担っている。次にのべる3つの理由からβ-CGは精子形成に関与する細胞に存在すると考えられる。つまり①β-CGの増加は性ホルモンの分泌よりも精子形成が盛んになる時期に一致する。②β-CGは間質細胞より精子細胞の存在する精細管で高い。[4] ③Ductuli efferentesの結紮により，間質細胞は変性しないが，精子細胞，Sertoli細胞は著しく変性し，[5] これと平行してβ-CGは減少する。[4]

精子はSertoli細胞表面で，精子細胞が分裂増殖し，その後著しい形態変化を経て成熟する。従ってβ-CGは細胞増殖あるいは細胞分化(形態変化)に関連している可能性

表1 β-シトリルグルタミン酸のカエル臓器分布

Organs	β-Citrylglutamate μmole/g protein
Brain	14.66 ±0.55 (4)
Spinal cord	12.85 ±1.74 (4)
Lung	3.20 ±0.83 (4)
Heart	0.67 ±0.30 (4)
Liver	0.49 ±0.16 (4)
Muscle	not detectable

がある。ラットとモルモット脳で，β-CGが最も高濃度存在する時期はミエリン形成，グリア細胞の増殖の時期からすると早く，神経細胞の分裂増殖とくらべるとおそい。大体神経細胞の軸索，樹状突起の生長(形態変化)が盛んになる時期に一致している。又肝臓あるいは胸腺は生後著しく細胞増殖が増大し，その重量が増加するがβ-CG濃度は不変である。さらに結果は示していないが，ラット再生肝でもβ-CGの含量は不変であった。これらのことから，β-CGは細胞増殖とは直接関係がなく，むしろ細胞分化と関連があるように思われる。しかしながら爬虫類以下の下等脊椎動物特にカエルで，細胞分化が完成していると考えられる成熟した脳に，β-CGが大量含まれることからこの可能性も否定的である。

β-CGが神経伝達に関与している可能性もあるので，^{14}C-β-CGと粗シナプトソーム分画との結合の親和性を調べたが，Km値が非常に大きく否定的であった[4]。

最後にβ-CGがその構造上の特徴から，エネルギー代謝と関係している可能性を考えた。脳のエネルギー代謝は，その発育に伴なって嫌気的から好気的代謝へと変換し，critical period に一致して急速に増強しはじめる[3]。ラットとモルモットの両方で，脳細胞1個当りのβ-CG含有量がこの時期に最も高く，その後急速に減少する事実はβ-CGがエネルギー代謝の調節に関与している可能性を暗示させる。又脊椎動物の脳の嫌気的解糖は呼吸と反対の進化過程を受ける。つまり下等脊椎動物では嫌気的エネルギー代謝の占める割合が非常に大きいことが知られており[6]，β-CG含有量も多いのである。

睾丸は，精子形成と性ホルモン分泌に関与する細胞とでエネルギー代謝が異なるし，同じ精子細胞でも成熟過程によっても異なる。又低温度，低酸素，血液—睾丸関門による基質の選択的透過性といった代謝上の制限がある[7]ため，睾丸切片を用いた結果から直接生体の代謝を判断するのは危険である。しかしin vitroの結果から敢て推察してみると，精子細胞は血中グルコースを，非精子細胞はリピドを主にエネルギー源にしている[7]が，後者の細胞数は前者の約10倍であるので，切片で得られた結果はほぼ精子細胞のそれを反映していると考えてさしつかえない。切片での基礎酸素消費量は生後3週目頃から減少しはじめ，リンゴ酸脱水素酵素活性は生後2から4週頃目にかけて著しく減少し[7]，β-CGが急速に増加する時期と一致する。又睾丸切片は嫌気的，好気的条件の両方で乳酸がたやすく蓄積する。

以上のことより考えると，β-CGはエネルギー代謝の調節，特に嫌気的エネルギー代謝を推持するために，ある役割を演じているのかもしれない。

〈文　献〉

1) Miyake M., Kakimoto Y. and Sorimachi M; Biochim. Biophys. Acta, 544, 656–666 (1978)

2) 山田盛男，宮地秀樹；幼若期の性腺ホルモン，代謝，14, 1643–1652 (1977)

3) 高垣玄吉郎；個体発生と脳の生化学，脳の生化学(塚田裕三編) 医学書院，30–52 (1964)

4) 三宅正治(未発表)

5) Anton E.; Fertil. and Steri., 31, 189–194 (1979)

6) Verjbinskaya N.A.; 脊椎動物の進化系列における脳エネルギー代謝の酵素系の進化，神経系の生化学(Palladin著，松本清右訳) 協立書店，201–216 (1957)

7) Michael J.F; Carbohydrate metabolism in the testis, The Testis (eds by Johnson A. et al) Academic Press, 125–192 (1970)

80 ラット錐体外路系へのカイニン酸の局所微量投与に伴う神経化学的変化について

栗原悦雄・米田幸雄・栗山欣弥
(京府医大・薬理)

〔要約〕

カイニン酸の脳内局所投与により、次の成績を得た。線条体へのカイニン酸投与で線条体、淡蒼球および黒質での GABA 含量並びに GAD 活性が低下した。また線条体の choline acetyltransferase および GABA-transaminase·succinic semialdehyde dehydrogenase 活性も低下した。淡蒼球への投与により淡蒼球と黒質の GABA 含量が、また黒質への投与で黒質および線条体の tyrosine hydroxylase 活性が低下した。以上の結果は、線条体から淡蒼球および黒質、さらに淡蒼球から黒質に至る GABA 作働性ニューロン、黒質から線条体に至る catecholamine (dopamine) 作働性ニューロン、さらに線条体に choline 作働性介在ニューロンが存在することを示唆している。

線条体切片には高低2つの親和性の違う ^{3}H-GABA の取り込み機構が存在したが、カイニン酸の影響で高親和性取り込みのみが消失した。また高 K^{+} 刺激に対応した ^{3}H-GABA の放出は、カイニン酸投与7日後では線条体切片で、14日後では淡蒼球および黒質の切片でもそれぞれ低下した。さらにカイニン酸の線条体への投与で、線条体における ^{3}H-muscimol の GABA リセプターへの結合は増大した。これらの結果より、カイニン酸障害性 GABA 作働性ニューロンでは、ニューロンの損傷に伴う高親和性の GABA 取り込みおよび刺激に対応した放出の抑制が起り、これらの変化に伴って GABA リセプターの結合能が増すと考えられる。

錐体外路系における神経路の局在や連絡は、軸索の hemitransection, horseradish peroxidase 法、あるいはオートラジオグラフを用いるなど、種々な手段で検討されている。一方、グルタミン酸の構造類似物質のカイニン酸 (KA) が、中枢神経の細胞体を選択的しかも非可逆的に障害することが最近報告されている[1]。従ってカイニン酸のこの性質を利用すれば、神経路の走行や連絡を生化学的、あるいは形態学的に探索することができる。今回は、このカイニン酸を線条体、淡蒼球、黒質に微量投与し、GABA 含量とその合成酵素である L-glutamate decarboxylase (GAD)活性、また acetylcholine と catecholamine の合成酵素である choline acetyltransferase (ChAc) と tyrosine hydroxylase (T-OH) 活性を測定することにより、錐体外路系における神経路の走行について検討した。さらに KA 投与によりニューロン群の障害を起した線条体における ^{3}H-GABA の取り込み、遊離、ならびに ^{3}H-muscimol の GABA リセプター (GABA-R) への結合の変化の様相についても検討を試みた。

〈実験方法〉

雄性ラット（体重180-220g）を pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 麻酔し、脳定位固定下に Pellegrino and Cushman[8] の atlas に従い、線条体 (A:7.8, L:3.0, V:4.5)、淡蒼球 (A:6.4, L:3.3, V:5.5)、黒質 (A:2.6, L:2.3, V:8.5) に人工脳脊髄液 (pH 7.4) に溶解したカイニン酸 (2 μg) を投与した。GABA の測定は Graham and Aprison の方法[3]、GAD 活性の測定は Kimura and Kuriyama[5] の方法に従った。また GABA の分解酵素である GABA-transaminase·succinic semialdehyde dehydrogenase (GABA-T·SSADH) 活性は米田の方法[7]、T-OH 活性は村松の方法[7]、また ChAc 活性は Fonnum の方法[2] によりそれぞれ測定した。 ^{3}H-GABA の取り込み：脳の各組織切片を 25°C で 15分間 60mM KCl を含む人工脳脊髄液（CSF、同じ濃度の NaCl を置換）中で incubate したのち、通

常の CSF に戻し，さらに15分間 incubate した。続いて 10^{-5}M の ^{3}H-GABA を含む CSF 中で10分間 incubate したのち、氷冷した CSF で洗浄し、組織を 80% Triton X-100 で可溶化して、トルエンシンチレーター (0.5% PPO, 0.03% POPOP, 33% Triton X-100 を含有) を加えて組織中の放射活性を測定した。また 10^{-2}M の GABA 存在下での放射活性を組織への非特異的な結合とみなし、これを差引いて取り込み量とした。 ^{3}H-GABA の遊離：各々の組織切片を25℃の CSF 中で20分間 incubate した後，^{3}H-GABA (最終濃度 6.5×10^{-9} M と aminooxyacetic acid (AOAA: 最終濃度 5×10^{-5} M) の存在する CSF 中で30分間 incubate した。氷冷した CSF で洗浄後、AOAA を含んだ 2 ml の CSF 中に移し、^{3}H-GABA の遊離を測定した。CSF は10分毎に交換し、Triton-toluene シンチレーター (toluene 中に 0.5% PPO, 0.03% POPOP, 33% Triton X-100 を含有) を加えて CSF 中の放射活性を測定した。高 KCl (30mM) 刺激を行なう時は，同濃度の NaCl と置換した CSF を用いた。最後に組織中の放射活性を取り込みの場合と同じ方法で測定し、遊離総量と組織の放射活性の和に対する ^{3}H-GABA の遊離率を算定した。 ^{3}H-muscimol の結合：各組織を 25 ml の水を加えて polytron で homogenate し、48000 × g で20分間遠心の後，得られた pellet を同じ方法でさらに3回処理した。最後の遠心で得られた pellet を 50mM Tris-citrate buffer (pH 7.1) で懸濁し、1 nM の ^{3}H-muscimol と共に2℃で30分間 incubate したのち、membrane filter (0.45 μ) を用いて吸引沪過し、filter の放射活性を Triton-toluene を加えて測定した。1 mM の GABA の存在下で同じ実験を行ないこの時の放射活性を組織への非特異的な結合とみなし、これを差引くことにより結合量を求めた。

〈結果および考察〉

I. KA 投与による GABA および各種酵素活性の変化：線条体への KA 投与7日後において、線条体、淡蒼球、黒質のいずれの部位においても、投与側の GABA 含量ならびに GAD 活性が低下したが (Fig.1, 2)、GABA-T・SSADH 活性は投与側の線条体においてのみ低下を示した (Fig.3)。また T-OH 活性は線条体、淡蒼球、黒質のいずれの部位においても、投与側と非投与側の間に有意な変化を示さなかった (Fig.4)。一方、KA の黒質への投与7日後においては、投与側の黒質ならびに線条体で T-OH 活性が低下したが、淡蒼球では変化がみられなかった。また淡蒼球への KA 投与7日後では、投与側の淡蒼球、黒質で GABA 含量が低下した (Fig.5)。

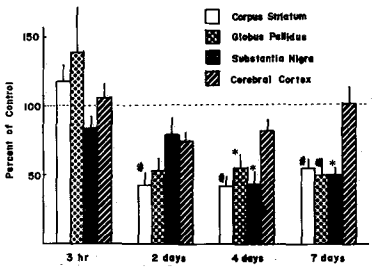


Fig.1. Effect of striatal injection of kainic acid on GABA contents in corpus striatum, globus pallidus substantia nigra and cerebral cortex. * P < 0.05, # P < 0.01.

ところで錐体外路系においては McGeer ら[6]によって、線条体から淡蒼球および黒質に至る GABA 作働性ニューロン、また淡蒼球から黒質に至る GABA 作働性ニューロン、黒質から線条体に至る dopamine 作働性ニューロン、さらには線条体の choline ならびに GABA 作働性介在ニューロンなどの存在が提唱されている。上記の実験結果は、これら各種のニューロンの錐体外路系における存在を裏付けるものと考えられる。

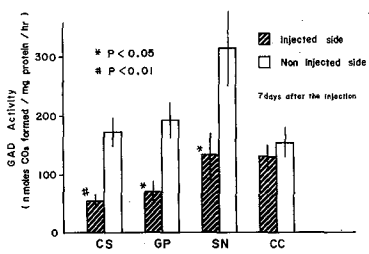


Fig.2 Effect of striatal injection of kainic acid on GAD activity in corpus striatum(CS), globus pallidus(GP), substantia nigra(SN) and cerebral cortex(CC).

また KA の脳への局所微量投与法は、神経走行路の局在や連絡を生化学的に探索する上で有力な手段であることが示唆される。

II. KA 障害性ニューロンにおける GABA の取り込み、放出およびリセプター感受性の変化：

線条体への KA 投与7日および14日後において、投与側の線条体切片への ^{3}H-GABA の取り込みは有意に低下したが、淡蒼球、黒質においては投与および非投与側の間には変化がなかった (Fig.6)。また線条体切片への ^{3}H-GABA の取り込みには高親和性 (Km: 1.8×10^{-5}M, Vmax: 9.3 pmoles/mg tissue/min) と低親和性 (Km: 1.5×10^{-4}M, Vmax: 64.2 pmoles/mg tissue/min) の2つの取り込み機構が存在した (Fig.7)。線条体への KA 投与7日後においては高親和性取り込み機構が消失し、低親和性取り込み機構 (Km: 1.6×10^{-4}M, Vmax: 19.2 pmoles/mg tissue/min) には著変を認めなかった。GABA は神経終末のみならず、細胞体、樹状突起、あるいは軸索などにも取り込まれる[4]とされ、さらに線条体には GABA 作働性の介在ニューロンの存在が示唆されている。KA は線条体の各種のニューロンや介在ニューロンに障害を与えることにより、高親和性取り込み機構のみを消失させたものと考えられる。

次に KA 投与7日後において、^{3}H-GABA の非刺激性放出は線条体、淡蒼球、黒質のいずれの部位においても著変を示さなかったが、高 K^+ 刺激に対する投与側線条体切片からの ^{3}H-GABA の放出は有意な減少を示した (Fig.8)。さらに投与14日後においては、投与側の線条体切片のみならず淡蒼球および黒質切片からの高 K^+ 刺激による ^{3}H-GABA 放出も低下した。これは線条体－淡蒼球、線条体－黒質の GABA 作働性ニューロンの細胞体の障害が、時間の経過と共にそれぞれの神経終末に波及したことを意味するのではないかと考えられる。

一方、KA の線条体への投与7日後においては、^{3}H-muscimol の GABA-R への結合が投与側の線条体で

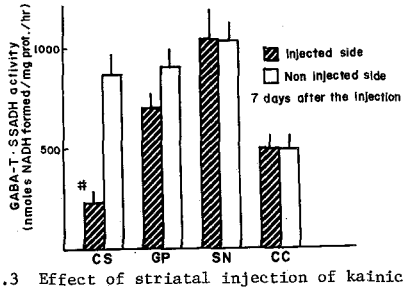


Fig.3 Effect of striatal injection of kainic acid on GABA-T·SSADH activity in corpus striatum, globus pallidus, substantia nigra and cerebral cortex. # P < 0.01.

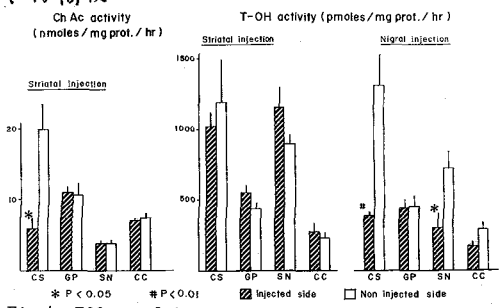


Fig.4 Effect of injection of kainic acid on choline acetyltransferase(ChAc) and tyrosine hydroxylase(T-OH) activities in the extrapyramidal tract.

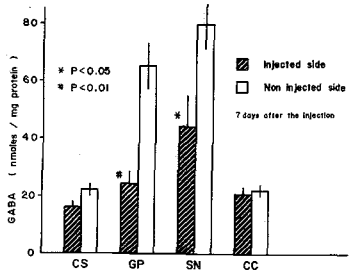


Fig.5 Effect of pallidal injection of kainic acid on GABA contents in corpus striatum, globus pallidus, substantia nigra and cerebral cortex.

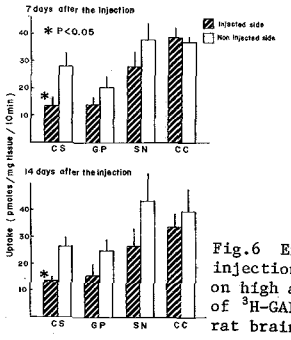


Fig.6 Effect of striatal injection of kainic acid on high affinity uptake of ^{3}H-GABA by slices in rat brain.

有意な増加を示したが、淡蒼球、黒質ではこのような変化がみられなかった。この ^{3}H-muscimolの結合量の増加は、リセプター側の感受性の増大を反映しているものと考えられる(Fig.9)。

以上の結果より、①ラットの錐体外路系には線条体-淡蒼球、線条体-黒質および淡蒼球-黒質の間にGABA作働性ニューロンが存在すること、②KAにより線条体に障害を与えた場合、GABAの高親和性取り込みおよび刺激性放出が抑制されることから考えて、これらの機構はニューロンに存在すること、③GABAリセプターにおいてもdenervation supersensitivityが出現すること、が示唆される。

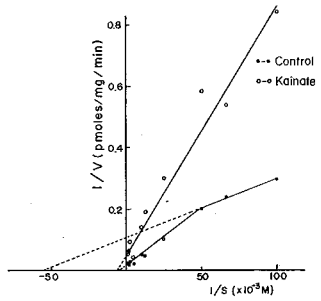


Fig.7 Kinetic analysis on striatal uptake of ^{3}H-GABA following striatal injection of kainic acid.

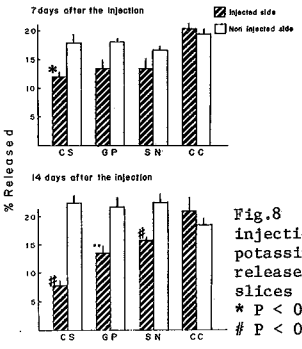


Fig.8 Effect of striatal injection of kainic acid on potassium(30 mM) evoked release of ^{3}H-GABA from slices of rat brain.
* P < 0.05, * * P < 0.02,
# P < 0.01.

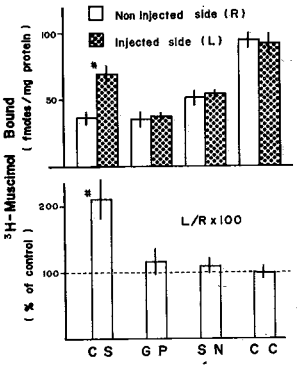


Fig.9 Effect of striatal injection of kainic acid on ^{3}H-muscimol binding in corpus striatum, globus pallidus, substantia nigra and cerebral cortex.
# P < 0.01.

References

1) Coyle, J.T., and Schwarcz, R. (1976) Nature (Lond.) 263, 244-246

2) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24, 407-409

3) Graham, L.T.Jr., and Aprison, M.H. (1966) Anal. Biochem. 15, 487-497

4) Hattori, T., McGeer, P.L., Fibiger, H.C., and McGeer, E.G. (1973) Brain Res. 54, 103-114

5) Kimura, H., and Kuriyama, K. (1975) Jap. J. Pharmacol. 25, 189-195

6) McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (1976) in GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., and Tower, D.B., eds) pp.487-495, Raven Press, New York

7) 村松 信 (1977) 京府医大誌, 86, 749-777

8) Pellegrino, L.J., and Cushman, A.J. (1967) A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. Appleton-Century-Crofts, New York

9) 米田年生 (1978) 京府医大誌, 87, 675-694

81 ラット網膜からのGABAの放出：特にglutamateの影響について

鎌田芳夫・水野有武（慈恵医大・眼科）
朝倉　正（慈恵医大・RI研）
松田　誠（慈恵医大・医化）

〔要　約〕

γ-aminobutyric acid (GABA)は他の中枢神経と同様に網膜においてもまた抑制性神経伝達物質と考えられている。今回，我々はラット摘出網膜を灌流することにより，網膜からのGABA放出について，ガスクロマトグラフィーを用いて微量定量し，直接に内在性GABAの放出量を調べた。また，^{14}C-GABAをpreloadすることにより間接的にGABA放出を検索した。両者とも，自発的GABA放出は0.03～0.05%/minでほぼ一致した。40mMカリウム液で灌流するとGABA放出は2.5～3倍に増加した。灌流液に1mM GABAを加えるとhomoexchangeが起り放出量は12倍に増加した。diaminobutyric acidとβ-alanineでは2倍以上に増加した。これはheteroexchangeによるものであろう。他の神経伝達物質のGABA放出に与える影響を調べるとaspartate, dopamine, acetylcholineなどは^{14}C-GABA放出に影響を与えなかったが，L-glutamateは^{14}C-GABA放出を増加させた。以上のことより，GABAは神経伝達物質として放出される可能性が強く，その放出はL-glutamateの様な他の伝達物質とinteractionしている可能性を示唆している。

γ-aminobutyric acid (GABA)は他の中枢神経系と同様に網膜においても抑制性神経伝達物質の可能性があると考えられている。GABAが神経伝達物質であるためには，次の条件を満足しなければならない。①, GABAとその合成酵素(glutamic acid decarboxylase)の存在。②, 化学的，電気的刺激によるGABAの放出。③, GABAの機能と考えられる作用が外因性GABAで引き起こされる。④, GABA antagonistが存在する。今回，我々は摘出ラット網膜よりのGABA放出に関し，ガスクロマトグラフィーを用いたGABA微量定量法により内在性GABA放出と^{14}C-GABAを用いた間接的なGABA放出を検索した。

〔実験方法・材料〕

動物はSD系(CRJ)ラット(雄性，5～6週齢)を用いた。

1)内在性GABA放出

網膜摘出法は前回述べた方法[5]に準じた。網膜秤量(約20mg)後，8片に細断し特別に作製したperfusion chamber(100μl)に移した。灌流液は5% CO_2, 95% O_2を10分通気したKrebs-Ringer bicarbonate液を用いた。灌流速度は一分間に0.5mlで灌流液を25°Cに保ちながら，灌流液容器・perfusion chamber・ペリスタポンプ・フラクションコレクターと導びきSamplingを行った。ガスクロマトグラフィーを用いたGABA微量定量法はSchmidらの方法に準じて行った。すなわち，フラクションコレクターで集めた試料をDowex 50w×8(H$^+$型 200～400 mesh, 8×20 mm)カラムにかけ，純水30mlで洗浄した後，3mlの2N-NH_4OH液で溶出し，標準として1nmoleのamino-

valeric acid (AVA) を加えた後に濃縮乾固させた。100μlの無水trifluoroacetic acidと50μlのhexafluoro-2-propanolを加え，密栓し室温で1時間放置した。N_2で過剰の無水trifluoroacetic acidとhexafluoro-2-propanolを蒸発させた後，200μlのethyl-acetic acidを加え，5μlをガスクロマトグラムに注入した。検知器温度300℃，カラム温度135℃，通気26ml/min N_2で行った。その結果をFig.1に示す。

2) ^{14}C-GABA放出

摘出網膜を8片に細分し，10^{-4} M aminooxyacetic acid (AOAA)を含む2.5mlのKrebs-Ringer bicarbonate液でpreincubationを25℃で15分間行った。その後，9.86×10^{-6}Mの^{14}C-GABAを加え，同じく25℃で45分間incubateした。灌流方法は内在性GABA放出実験と同様に行った。フラクションコレクターで集めた試料に10mlのScintisol 500を加え，液体シンチレーションカウンターでその放射能をカウントした。また灌流後の網膜は500μlの10% Triton X-100液に入れ室温にて1時間放置した後，10mlのScintisol 500を加えてその放射能をカウントした。

3) 灌流液及び試薬

Krebs-Ringer bicarbonate液：NaCl 118.3，KCl 4.8，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 2.54，KH_2PO_4 1.2，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 1.22，$NaHCO_3$ 24.8，glucose 11.1 (各mM)，pH 7.4

AVA及びacetylcholine chloride (半井化学)，^{14}C-GABA (Uniformal 205mCi/mmol, New England Nuclear)，Scintisol 500 (同仁化学)，AOAA及びDABA (Sigma)

[実験結果]

1) 内在性GABA放出

内在性GABAの放出はFig.2に示した。灌流開始後15分以内には一定のGABA放出量を認めた。これは網膜からの自発的GABA放出量を示し，2～3 pmoles/min/mg wet weightであり，網膜全GABA量の約0.05%であった。40mMの高カリウム液で灌流するとGABA放出量は約2.5倍に増加した。

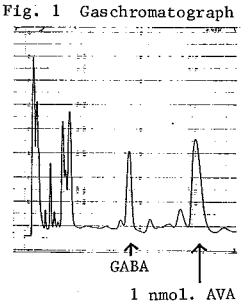


Fig. 1 Gaschromatograph

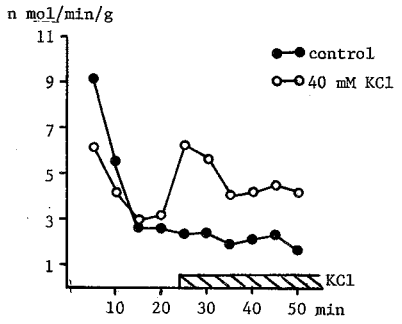


Fig. 2 Effect of high conc. of KCl on endogeneous GABA release

2) ^{14}C-GABAの放出

灌流前後の^{14}C-GABAを取り込ませた網膜を75%エタノール水でホモジナイズし，上清を薄層セルロースクロマトグラフィーを用いフェノール：水(4：1)で展開すると全放射能の95%以上はGABAのRf値と一致した所に認められた。このことにより液体シンチレーションカウンターで測定した放射能はほとんど^{14}C-GABAの放射能とすることができる。^{14}C-GABAの自発的放出は0.03～0.05%/min (^{14}C-GABA release/total

^{14}C-GABA uptake)であった。高カリウム液(40mM)で灌流すると^{14}C-GABA放出は自発放出時の約3倍に増加した。そして高カリウム刺戟を持続して行うとその放出は急戟な増加後も自発放出レベルまで戻らなかった。(Fig. 3)

coldのGABA 1mMを灌流液に加え，取り込まれた^{14}C-GABAとhomoexchangeを検索したのがFig.4である。自発放出レベルの12倍に達する^{14}C-GABAの放出が認められた。

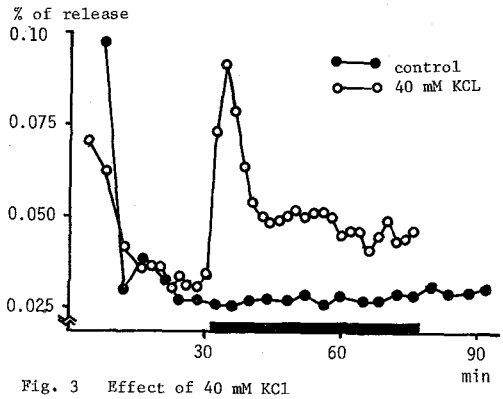


Fig. 3 Effect of 40 mM KCl

GABAの類似構造式を有するL-2,4-diaminobutyric acid (DABA)とβ-Alanineを灌流液に加えると^{14}C-GABAの放出は自発放出レベルのそれぞれ2倍以上に増加した。(Fig.4)

次に網膜において興奮性神経伝達物質の可能性があると考えられているL-glutamateによる^{14}C-GABA放出に対する影響をみたものがFig.5である。L-glutamate 0.01mMではわずかの^{14}C-GABA放出が増加し，0.1mMでは1.2倍，0.2mMでも0.1mMよりも大きな放出増加が認められた。他に神経伝達物質と考えられているacetylcholine chloride や aspartate, dopamine 0.1mMでは^{14}C-GABA放出に対して影響を与えなかった。

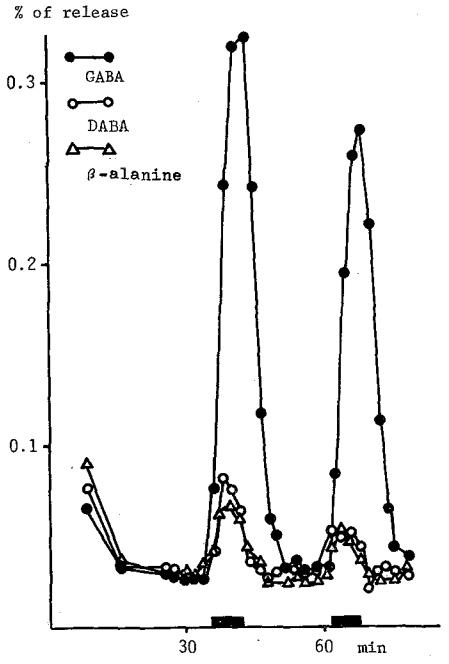


Fig. 4 Effect of cold GABA, β-alanine and DABA

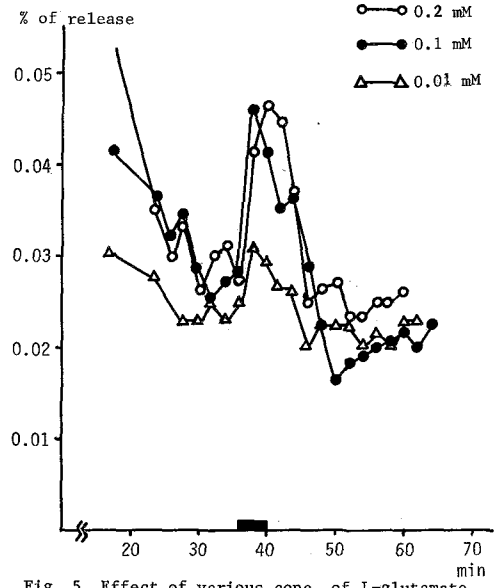


Fig. 5 Effect of various conc. of L-glutamate on ^{14}C-GABA release from rat retina

〔考察〕

網膜においてGABAは抑制性神経伝達物質の可能性があると考えられている。そしてその局在も水平細胞，アマクリン細胞に多いことが知られている[4]。今回，我々は神経伝達物質のひとつの条件である放出に関し，種々の物質による影響を検索した。GABA放出過程において、灌流開始時よりGABA放出増加が認められるが、これは網膜をperfusion chamberに移すときの刺戟，また灌流開始による刺戟による放出，さらに^{14}C-GABAを用いる実験においては十分に網膜を洗った後でもわずかに残った^{14}C-GABAにより灌流液にGABAが増加したものと解される。この一過性の放出増加の後GABAの放出は一定値を示した。ガスクロマト法で測定した値と^{14}C-GABAを用いた実験より得られた値はほぼ一致し，網膜GABAは一定の量が自発放出されていると思われる。

高カリウム刺戟によりGABA放出は自発放出レベルの2.5～3倍増加した。これは細胞が高カリウムにより化学的に脱分極し，GABA放出したと考えられる。高カリウム持続刺戟では急戟な放出増加後も増加は続き，これは持続刺戟では連続的に細胞が脱分極したと考えられる。

次にCold GABA 1mMを含む灌流液を流すと^{14}C-GABAは12倍の放出増加がみられた。これはGABAと取り込まれた^{14}C-GABAが置き換ったためで放出というよりexchangeと考えられる。GABAはautoradiographyを用いた実験によるとglial elementとneural elementの両方に取り込まれるといわれている[2]。cold GABAによるhomoexchangeではその両方から^{14}C-GABAは放出されたのであろう。

次にGABAと類似構造式を有するDABAとβ-alanineはGABA放出を自発放出レベルのそれぞれ2倍以上に高めた。DABAは主にneural elementに取り込まれたGABAをexchangeさせ，一方β-alanineはglial elementのGABAをexchangeするといわれている[1][3]。このことにより^{14}C-GABAは網膜のneural elementとglial elementの両者に取り込まれexchangeされると思われる。

^{14}C-GABA放出に関し他の神経伝達物質の可能性のある物質との関係を検索した。L-glutamateでは^{14}C-GABA放出増加がみられたが，aspartateやdopamine, acetylcholineでは著変が認められなかった。glutamateでは0.01mMの濃度においても灌流液に加えることにより，わずかではあるが^{14}C-GABAの放出を増加させた。またglutamateが興奮性神経伝達物質であることが電気生理学的に示唆されていることから，glutamateが神経伝達物質としてGABA含量の多いアマクリン細胞や水平細胞に作用してGABAの放出を増加させた可能性があり，神経伝達物質どうしのinteractionという機構を考える上で興味ある知見と思われる。

〈文献〉

1) Brennan, M.J.W. and Cantrill, R.C. (1978) J. Neurochem. 31 1339-1341
2) Bruun, A. and Ehinger, B. (1974) Exp. Eye Res. 19 435-447
3) Hammersted, J.P., Cawthon, M.L. and Lytle, C.R. (1978) J. Neurochem. 32 195-202
4) Kennedy, A.J., Neal, M.J. and Lolley, R.N. (1977) J. Neurochem. 29 157-159
5) 水野有武，鎌田芳夫，国田正矩，松田誠 (1978) 神経化学 17 285-288
6) Schmid, R. and Karobath, M. (1977) J. Chromatography 139 101-109

82 ラットCrude synaptic membraneのNa^+依存性γ-アミノ酪酸結合サイトの性質

栗岡　晋・松田　誠
（慈恵医大・医化）

〔要　約〕

ラット脳のCrude mitochondriaよりcrude synaptic membraneを得て、Na^+依存性GABA結合サイトについて調べた。その結果、解離定数3.1 μM, 12.5 μMおよび62.5 μMの異った結合サイトの存在があきらかになった。これらの結合サイトはいづれもNipecotic acid, N-ethylmaleimideで不活化された。IC_{50}はNipecotic acidで25 μM, cold GABAで5 μMであった。Crude synaptic membrane はK^+ loadingでvesicle化し、そのとき、解離定数はかわらないが結合量は約2倍になった。Crude synaptic membraneを10 mM tris緩衝液で洗浄処理することにより、二つの解離常数（3.1および12.5 μM）をもつmembraneに、又120 mM NaClを含む10 mM tris緩衝液処理では単一の解離常数（12.5 μM）をもつmembraneにかわった。又、0.1% triton X-100を含む緩衝液処理によりすべてのNa^+依存性GABA結合が失われた。一方、Na^+非依存性GABA結合はどちのいづれの処理にも抵抗性を示し、membrane上にとどまっていた。

を4～5回繰り返し、抽出される蛋白質、りん脂質を除いたmembraneとしてから、実験に用いた。用いた緩衝液は(1): 10 mM トリス緩衝液, (2): 120 mM NaCl-10 mM トリス緩衝液, および(3): 0.1% tritonX-100-120 mM NaCl-10 mM トリス緩衝液である。蛋白質はLowry法で、りんは試料を$HClO_4$で分解後Fiske Subbarow法で測定した。

〔^{3}H〕GABAの結合：〔^{3}H〕GABA, 40 Ci/mmole (New England Nuclear)を240 μM (20mCi/mmole), 50 μM (80 mCi/mmole), 2.4 μM (2 Ci/mmole)とし、目的に応じて使用した。〔^{3}H〕GABAによるGABA結合実験は、遠心チューブ(1.6 cm×7.5 cm)にmembrane懸濁液50 μl (0.025g脳相当量)；〔^{3}H〕GABA, 200 μlをとり、これに必要に応じて試薬を加え、最終的に、120 mM NaCl-10 mM トリス緩衝液(pH 7.4)になるように、全体を400 μlとした後，20°C，20分間反応させた。反応終了後ただちに35,000 g，20分間遠心し、ペレットを氷冷した純水10 mlでゆすぎ、ペレット中に含まれる結合型〔^{3}H〕GABAを測定した。反応のブランクは、上記反応液中の〔^{3}H〕GABAの1,000倍濃度のcold GABAを加えて反応させ、同じ操作で得られた結合型〔^{3}H〕GABA量とし、この数値を差し引いて得られるものを特異的結合量とした。又Na^+非依存性GABA結合量は、上記反応組成から120 mM NaClを除いた系で反応させ、同じ操作で測定した。

〈結果と考察〉

Na^+存在下で、Crude mitochondria，および Crude synaptic membraneへのGABA結合量をFig 1の(a),(b)にそれぞれ示した。GABA結合量に大きな違いがあるが、

中枢神経でのγ-アミノ酪酸(GABA)の取り込み，輸送はグリア細胞，シナプス前および後細胞でみられ，その結合は Na^+ 依存性であり，receptor site との結合と区別されている。ラットの synaptic membrane では，GABA に対して親和性を異にする Na^+ 依存性の結合サイトの存在が報告されている。[1] 親和性を異にするこれら membrane 上の GABA 結合サイトがそれぞれ如何なる細胞由来なのか，又その機能についても，現時点では不明であるが，GABA の中枢神経での役割を理解する為に，その解明が望まれている。membrane 上の Na^+ 依存性 GABA 結合サイトの性質は，membrane 調製時のわずかな条件の差で影響を受けることを今迄に経験してきた。そこで今回，ラット crude mitochondria から得られる crude synaptic membrane を材料にして，Na^+ 依存性 GABA 結合サイトの性質が，溶媒によってどのように変化するかを検討したので報告する。

〈実験方法〉

Crude synaptic membrane：0.32 M 蔗糖溶液中で得た Donryu 系ラットの crude mitochondria ペレットを，もとの脳重量の20倍量の 10 mM tris-SO4 (pH 7.4)- 1 mM MgSO4 - 0.5 mM EDTA（以下 トリス緩衝液と略す）に懸濁させ，氷冷下で超音波処理（富永製，UR-150P，最大出力で30秒）し，30分放置後，Zukin[3] らの方法により crude synaptic membrane ペレットを得た。このペレットを 0.32 M 蔗糖を含む 10 mM トリス緩衝液に 0.5 g. 脳重量/ml になるように懸濁し，−20°C に凍結保存して使用した。この方法で得た membrane は，融解してそのまま，又は次に記す緩衝液を加え，遠心（35,000 g, 20分），超音波分散（UR-150P，最大出力5秒）解離定数は共に 62.5 μM であった。又 Fig 1 にみられる GABA 結合は，5mM Nipecotic acid により 95%，10 mM N-ethylmaleimide により 97% 阻害されるので，Na^+ 依存性 GABA 結合であることが確認できた。Fig. 2 は Crude synaptic membrane の Na^+ 依存性 GABA 結合が Nipecotic acid，および cold GABA で dioplace されることを示し，IC_{50} は 25 μM (nipecotic acid)，5 μM (GABA) であった。Fig. 3 は N-ethylmaleimide による GABA 結合の阻害を示し，これと membrane と一緒にした pre-incubation なしの場合は 10 mM でも阻害は 50% にすぎず，GABA 結合が，結合サイトをこの試薬から保護できることを示唆している。Crude mitochondria 分画を membrane 化することによる GABA 結合量の大巾な減少は，Synaptosome，vesicles，あるいは膜断片から生じていた membrane vesicles などが，低張溶液，超音波処理によって破壊された為と思われる。Crude synaptic membrane を Kanner[2] の方法で K^+ loading した membrane vesicle では，Fig. 4 にみられるように，解離定数はかわらずに結合量だ

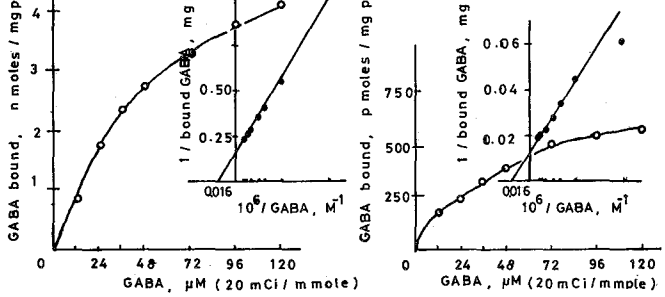


Fig. 1 Binding of ^{3}H GABA to crude mitochondria (a) and crude synaptic membrane (b).

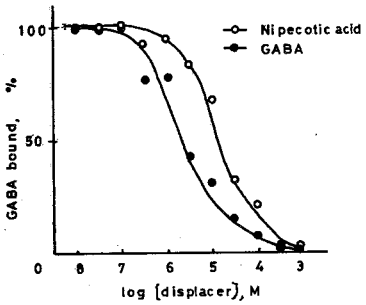


Fig. 2 Inhibition of ^{3}H GABA binding by nipecotic acid and cold GABA.

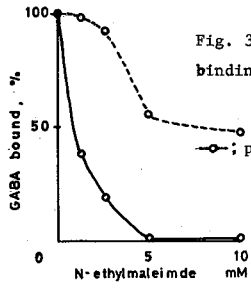


Fig. 3 Inhibition of ^{3}H GABA binding by N-ethylmaleimide.
—o—; pre-incubating the membrane with N-ethylmaleimide before binding assay.
--o--; without pre-incubating before binding assay.

けが約2倍に増加した。そのことは、先に述べた Crude mitochondria と Crude synaptic membrane の間にみられる大中な結合量の違いについての考え方を支持するそのかもしれない。Fig. 1 にみられた membrane 化にともなう結合量の減少と同時に、12～48 μM に、もう一つの saturable な過程があるように思えた。そこでより詳わしく分析した結果、Fig. 4 に示すように、3.1 μM および 12.5 μM に解離常数を持つような GABA 結合サイトがあることを明らかにすることができた。

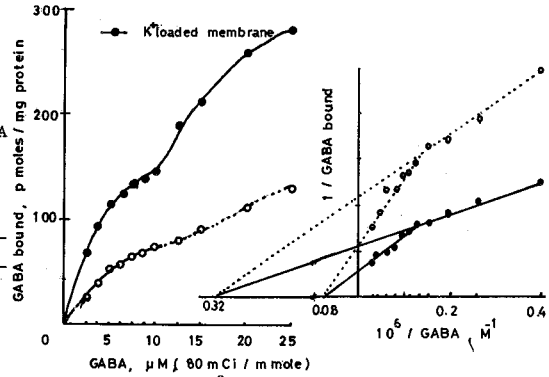


Fig. 4 Binding of ^{3}H GABA to crude synaptic membrane.

つぎに、実験法で述べた (1), (2) および (3) の緩衝液処理により、Crude synaptic membrane の GABA 結合サイトの性質がどのように変化するかを検討してみた。Fig. 5 は、それぞれの緩衝液で処理した membrane の蛋白質、りん脂質含量の変化を示している。緩衝液処理で Crude synaptic membrane の 29～34 % の蛋白質、34～45% のりん脂質が抽出されたことになる。一方、緩衝液処理した membrane の GABA 結合の性質は大きな変化を示した。Fig. 6 の結合曲線から明らかなように、緩衝液 (1) によって、62.5 μM の解離定数をもつ結合サイトは完全に消失し、3.1 μM および 12.5 μM

Fig. 5 Changes in the content of protein and phospholipid before (0) and after washing with buffer ; (1), 10 mM tris-sulfate, (2) 10 mM tris-sulfate containing 120 mM NaCl, and (3) 10 mM tris sulfate containing 0.1 % Triton X 100 and 120 mM NaCl.

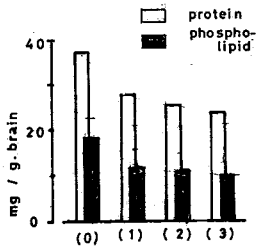


Fig. 6 Binding of ^{3}H GABA to crude synaptic membrane after washing with buffer (1), (2) and (3).

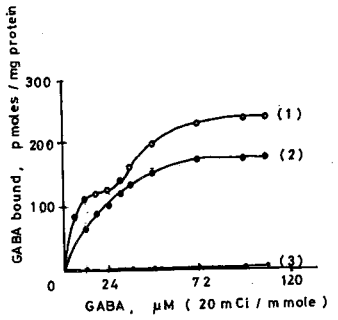
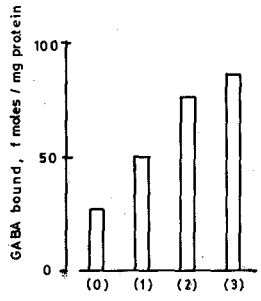


Fig. 7 Na^+-independent GABA binding to crude synaptic membrane before (0) and after washing with buffer; (1), (2) and (3).



を解離定数として持つ membrane に変化した。又緩衝液(2)での処理により、membrane は 12.5μM の解離定数しか示さないものに変化した。この事実は、解離常数3.1μM の GABA結合サイトが塩類溶液に影響されやすい性質であることを示している。又緩衝液(3)は0.1% triton X-100 を含むが、Fig.5 にみられたように、抽出される蛋白質、りん脂質の量は、わづかふえるだけである。しかし、membrane はすべての GABA 結合サイトを失っていた。

以上述べたように、Crude synaptic membrane は緩衝液処理によって membrane 上の結合サイトの一部又は全部を失ってしまうことがわかった。現在までのところ、この処理が、結合サイトを構成している物質を抽出してしまうから membrane の GABA結合性に変化がおきるのかどうか、はっきりわからない。しかし、Kanner[3] が membrane を triton X-100 で処理して GABA transport protein を抽出していることから判断して、緩衝液処理でも、結合サイトを構成する物質が抽出されるとみてよいだろう。

一方、緩衝溶液処理した membrane は Fig.7 に示すように、いづれも Na^+非依存性 GABA 結合、即ち receptor site の結合、を保持していた。Fig.7 の結果は、membrane の緩衝液処理により、蛋白質 mg あたりの結合が増加していることを示しているが、その脳重量あたりの結合としてみた場合、その結合量はほとんど変化していない。

中枢神経系において、GABA receptor site と GABA uptake site (GABA inactivation) の相互の関係をしらべるために、今回あきらかにされたような、単一の Na^+依存性 GABA結合サイトをもつ membrane がよい材料になるかもしれない。

〈文献〉

1) Estrada, C. (1977) Brain Research 128, 182-186
2) Kanner, B.I (1978) Biochemistry 17, 1207-1211
3) Kanner, B.I (1978) FEBS Letter 89, 47 - 50
4) Zukin, S.R., Young, A.B. and Snyder, S.H. (1974) Proc. nat. Acad. Sci. 71, 4802-4807

83 ラット脳粗シナプス膜分画への^{3}H-muscimolの結合とその内在性阻害物質について

米田幸雄・栗山欣弥
（京府医大・薬理）

〔要約〕

ラット脳におけるγ-アミノ酪酸（GABA）のシナプス受容体の性質を検討する目的で、リガンドとしての^{3}H-muscimolのラット脳粗シナプス膜分画（SM）への結合様式について検索を行なった。

1）ラット脳SM分画への^{3}H-muscimolの結合はsaturableな様式を示し、高親和性（Kd=4.7 nM）と低親和性（Kd=90 nM）の結合部位の存在が認められた。^{3}H-GABAをリガンドとして用いた場合とは異なり、^{3}H-muscimolの結合はNa^+の添加によっても増加せず、逆に抑制された。また薬理学的な検索の結果、この^{3}H-muscimolの結合は、シナプスのGABA受容体への結合を反映していることが確認された。

2）SM分画を凍結・融解処置しても^{3}H-muscimolの結合量には著変は見出せなかったが、SM分画をTriton X-100（0.01-0.5%）、パラメリクル安息香酸（10^{-5}-10^{-3}M）およびアセトン（5-20%）などで処置すると、著しい結合量の増加が見られた。一方、クロラミンT（10^{-4}-10^{-2}M）やN-ブロモサクシンイミド（10^{-4}-10^{-3}M）などのメチオニン残基化学修飾剤の処置によって、その結合は著明に抑制された。

3）Triton X-100で処置した上清中には、^{3}H-muscimolの結合を阻害する物質の存在が認められた。この物質は熱に安定で分子量500以下であり、また1級アミン構造を持たず、肝臓中にも見出されることから、GABAそのものではないことが示唆された。

哺乳動物の中枢神経系においても、γ-アミノ酪酸（GABA）は抑制性の神経伝達物質であることがほぼ確立されたといっても過言でない[2),4)~6),8),9)]。しかしながらそのシナプス受容体については、電気生理学的には存在が確認されているものの、生化学的に1個の分子として単離・精製されるまでには到っていない。その大きな要因の1つとして、GABA受容体と特異的に結合するリガンドが未だ発見されていないことが挙げられる。一方、Amanita muscariaから抽出したアルカロイドの一種であるmuscimolが強力な中枢抑制作用を有し、その作用がGABA受容体の活性化に起因していることが、近年明らかにされている[3)]。したがって本研究では、この^{3}H-muscimolをリガンドとして用いて、ラット脳におけるGABA受容体の性質について検索を進めることとした。

〈実験方法〉

ラット脳からの粗シナプス膜分画の精製は、既報の方法[10)]に準じて行なった。内在性GABAの混在を防ぐために、得られた分画は更に100倍量の50 mM Tris-citrate buffer (pH 7.1)で3回洗浄後、実験に用いた。^{3}H-muscimol結合量は、シナプス膜分画を1 nM ^{3}H-muscimolと2℃で30分間インキュベートしたのちメンブランフィルター（孔径：0.45 μ）を用いて吸引沪過し、フィルター上にトラップされた放射活性を測定することにより決定した。なお1 mM GABA存在下でも同様の実験を行ない、得られた放射活性を非特異的結合量として上記の値より差し引くことにより、特異的結合量を算出した。

〈実験結果〉

リガンドとして^{3}H-muscimolと^{3}H-GABAを比較すると、^{3}H-muscimolを用いた場合の方が特異的結合量も多く、また^{3}H-GABAの結合量はNa^+の添加によって著明に増加するのに対して、

^{3}H-muscimol では Na^+ により逆に抑制される傾向にあった（図1）。この^{3}H-muscimolの特異的結合は saturable な様式を示し、高親和性と低親和性の二つの結合部位の存在が認められた（図2）。また、GABAやGABA拮抗薬であるビククリンは濃度依存的に^{3}H-muscimol結合を抑制し（図3）、GABA作働薬のイミダゾール酢酸(10^{-4}M)は^{3}H-muscimolの特異的結合を完全に阻害した（図4）。一方、GABA拮抗薬ピクロトキシン、ニューロンへのGABAの取り込み機構の阻害薬ニペコチン酸およびGABA代謝酵素阻害薬アミノオキシ酢酸などの添加(10^{-4}M)では、その結合量に著変は見出せなかった。以上の結果から、ラット脳粗シナプス膜分画への特異的な^{3}H-muscimolの結合は、GABAのシナプス後受容体への結合を反映していることは明らかである。Zukinら[10]はシナプス膜分画を凍結・融解処置することにより^{3}H-GABAの特異的結合量が著明に増加することを報告しているが、^{3}H-muscimolをリガンドとして用いた本研究では、同様の結果は得られなかった（図4）。しかしながら、膜分画を凍結・融解後Triton X-100 (0.01-0.5%)で処置することにより、^{3}H-muscimolの結合量の著しい増加が認められた（図5）。更に、デオキシコール酸(DOC)、パラメリクル安息香酸(PCMB)およびアセトンなどの処置によっても、同様の結果が観察された。一方、クロラミンTやN-ブロモサクシンイミドなどのメチオニン残基の化学修飾剤でシナプス膜分画を処置すると、^{3}H-muscimolの特異的結合量は著しく減少したが、脂質過酸化剤の場合には著変は見出せなかった（図6）。このTriton X-100による活性化は、インキュベーション時

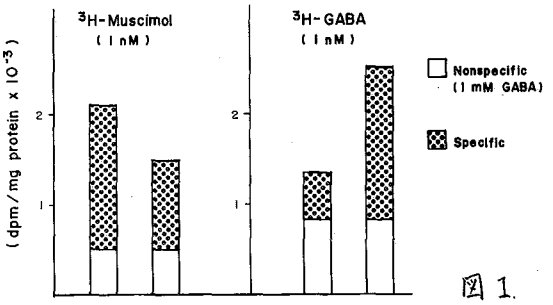


図1.

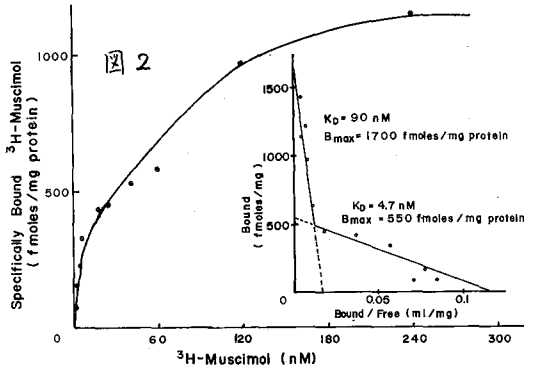


図2

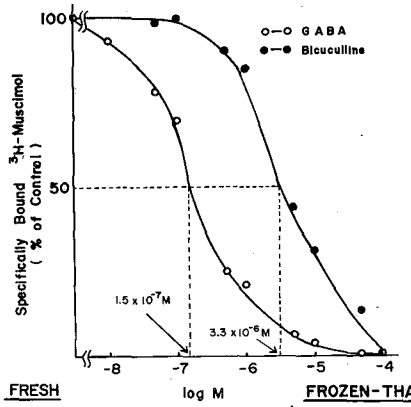


図3.

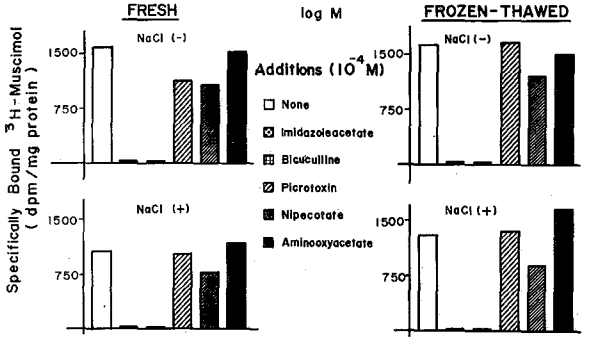


図4.

の buffer の pH に依存しており、pH 7.6 から 9.6 の間では Triton X-100 処置による著明な活性化は認められなかった（図7）。シナプス膜分画を Triton X-100 で処置した時の上清 (Sup T) を添加すると、Triton 処置膜標品ばかりでなく無処置膜標品においても、特異的な ^{3}H-muscimol の結合が著しく抑制されることが判明し、この上清中に ^{3}H-muscimol の結合を抑制する内在性の物質が存在することが示唆された（図8）。この阻害作用は上清を95℃で15分間加熱した場合にも見られ、トリプシン(500 μg/ml) と37℃で2時間インキュベートしても失活しなかった。この上清を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W × 8) を充填したカラムに適用すると、2N アンモニアで溶出される分画（分画14）に ^{3}H-muscimol 結合に対する阻害活性が認められたことから、この阻害物質はカチオンとしての性質を有していることが確察された（図9）。しかしながら、^{3}H-GABA を同じカラムに適用するとやはり同じ分画に溶出されてくることから、この阻害物質が GABA そのものである可能性が考えられた。したがって次に、1級ア

図5.

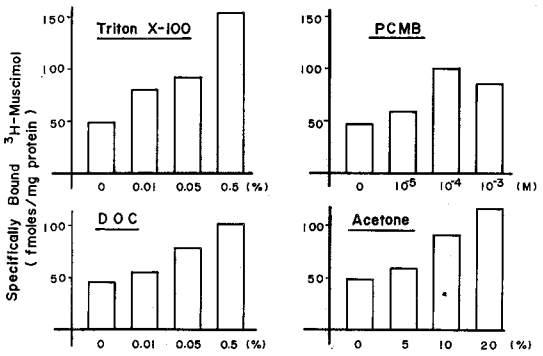
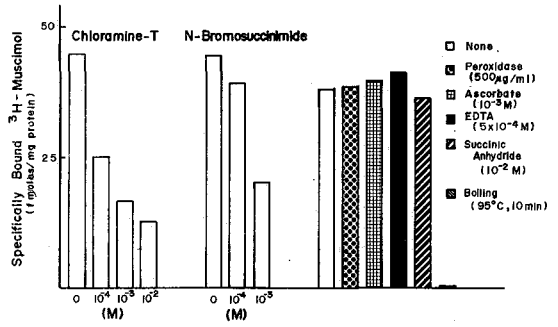


図6



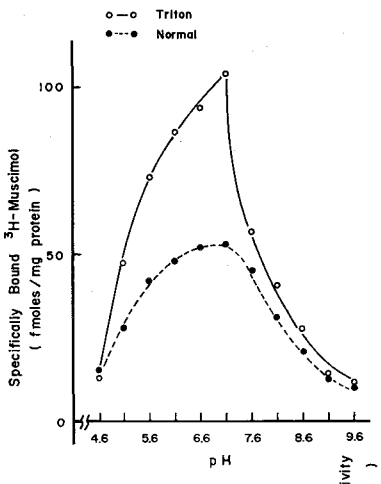


図7.

図8.

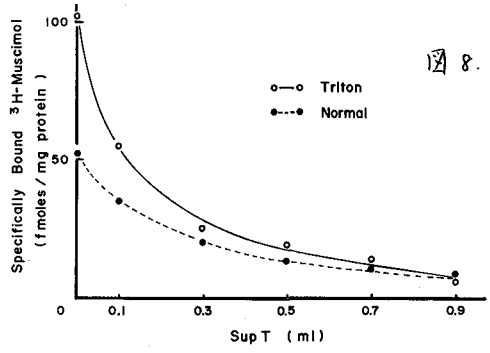
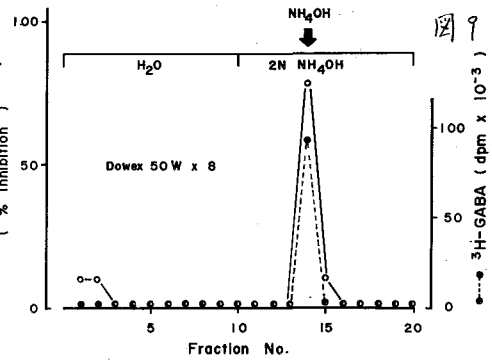


図9



ミンとの反応試薬であるフルオレスカミンを用いてこの可能性について検討を加えた。上清(Sup T)および分画14をフルオレスカミンと反応させたのち、^{3}H-muscimol結合への影響を見ると、GABAによる抑制作用はフルオレスカミンとの反応により弱められたのに対して、この上清および分画14ではともにその抑制活性は影響を受けないことが判明した(表1)。更に、GABAの存在しない肝臓にも同様の阻害活性が見出されたことから、この内在性阻害物質はGABA自身ではないと思われる。また、Amicon diaflo membrane UM05を用いて上清を限外沪過すると阻害活性が沪液中に出現したことから、この阻害物質の分子量は500以下であることが推定される(表2)。

表1

ADDITION	SPECIFICALLY BOUND ^{3}H-MUSCIMOL (fmoles/mg protein)
None	123.3
Sup T (0.1 ml)	30.1
" × Fluram	19.6
Fraction 14 (0.1 ml)	21.4
" × Fluram	21.8
Sup T of LIVER	
0.1 ml	74.0
0.5 ml	34.8
0.8 ml	18.3
GABA 10^{-7}M	35.7
" × Fluram	75.4
GABA 10^{-6}M	3.5
" × Fluram	15.2
GABA 10^{-5}M	0.7
" × Fluram	5.6

表2.

ADDITION		SPECIFICALLY BOUND ^{3}H-MUSCIMOL (fmoles/mg protein)
None		147.9
Diaflo membrane UM05		
filtrate	0.1 ml	50.8
	0.5 ml	15.9
residue	0.1 ml	142.7
	0.5 ml	143.3

〈考察〉

粗シナプス膜分画をTriton X-100で処置することにより、^{3}H-muscimolの特異的結合量は著明に増加することが認められたが、この活性化の機序として内在性阻害物質がTriton X-100により除去されたことが考えられる。事実、Toffanoら[7]はラット脳ホモジネートを20,000×gで遠心分離した上清中に、^{3}H-GABAの特異的結合を阻害する分子量約15,000の酸性蛋白が存在することを報告している。更に、この蛋白はベンゾジアゼピン系のトランキライザーの薬理作用発現に関与していることが示唆されている[7]。しかしながら、本研究で見出された内在性阻害物質は上述の報告とは異なり、分子量500以下の低分子物質であることが推察される。これら両者の相違の原因は現時点では明らかではないが、両者がまったく別個の物質として存在しているのか、あるいは一方がもう一方のフラグメントの1つとして存在しているのかなどは、早急に解決しなければならない問題である。いずれにしても、ラット脳中にはGABAとそのシナプス受容体との結合を調節する因子が存在しており、この因子によってGABAニューロンのシナプス伝達が大きく影響を受けるものと思われる。

References

1) Guidotti, A., Toffano, G. and Costa, E. (1978) Nature 275, 553-555. 2) Kimura, H. and Kuriyama, K. (1975) J. Neurochem. 24, 903-907. 3) Krogsgaard-Larsen, P., Johnston, G.A.R., Curtis, D.R., Game, C.J.A. and McCulloch, R.M. (1975) J. Neurochem. 25, 803-809. 4) Kuriyama, K., Haber, B., Sisken, B. and Roberts, E. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 846-852. 5) Kuriyama, K. and Yoneda, Y. (1978) Brain Res. 148, 163-179. 6) Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (1976) GABA in Nervous System Function, Raven Press, New York. 7) Toffano, G., Guidotti, A. and Costa, E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4024-4028. 8) Yoneda, Y., Kuriyama, K. and Kurihara, E. (1977) Brain Res. 124, 373-378. 9) Yoneda, Y. and Kuriyama, K. (1978) J. Neurochem. 30, 821-825. 10) Zukin, S.R., Young, A.B. and Snyder, S.H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4802-4807.

84　D-フェニルアラニンによる針鎮痛有効性個体差の消失

蜂須　貢・村居真琴・田中正明
久光　正・羅　昌平・武重千冬
（昭和大・医・Ⅰ生理）

〔要　約〕

既に前本学会で報告した様にラットの針鎮痛の有効性の個体差は脳内のモルヒネ様物質（ＭＬＦ）の含有量の個体差と高い相関性を示す。本研究で，更に針鎮痛の有効性の個体差は0.5mg/kgのモルヒネ鎮痛や中脳中心灰白質（ＰＡＧ）刺激による鎮痛の有効性の個体差とも並行するが，脳内のモルヒネ受容体の含有量とは何らの相関も示さないことが明らかになった。

針鎮痛もモルヒネ鎮痛もともにＰＡＧの部分的破壊や帯状束の破壊で消失し，ＰＡＧ刺激による鎮痛は帯状束の破壊で消失する。上記鎮痛を消失させるＰＡＧの部位や帯状束からは針麻酔式刺激（針刺激）によって誘発電位が記録される。

脳室に投与したエンケファリンによる鎮痛はＤ－フェニルアラニンによって増強される。一方針鎮痛，モルヒネ鎮痛，ＰＡＧ刺激による鎮痛の何れもＤ－フェニルアラニンによって増強され，殊に後効果が著しく増強される。かつそれぞれの鎮痛の有効性の個体差は消失し，何れも同じ程度の鎮痛が出現する様になる。

針鎮痛の求心路の破壊でモルヒネ鎮痛が減弱し，Ｄ－フェニルアラニンがモルヒネ鎮痛を増強することからモルヒネがＭＬＦを遊離する可能性と，Ｄ－フェニルアラニンによる鎮痛の有効性の個体差の消失から，ペプチダーゼの活性差が針鎮痛有効性の個体差の原因である可能性とが示された。

前回の本学会で，ラットで検した針麻酔の鎮痛（針鎮痛）には個体差があり，針鎮痛の有効性と脳内のモルヒネ様物質（ＭＬＦ）の含有量とは高い相関性があることを報告した[1]。その後の研究によって，針鎮痛の有効性の個体差は針鎮痛に相当する0.5mg/kgのモルヒネ鎮痛や中脳中心灰白質刺激による鎮痛（ＰＡＧ－ＳＰＡ）の有効性の個体差とも並行することが見出され，針鎮痛の有効性の個体差を単にＭＬＦの含有量の個体差に帰することの妥当性の検索が必要となった。本研究は針鎮痛有効性とオピエート受容体（ＯＲ）の脳の種々な部位の含有量との関係をまず検し，次に，鎮痛性ペプタイドの分解酵素を阻止するＤ－フェニルアラニン[2]が針鎮痛，モルヒネ鎮痛，ＰＡＧ－ＳＰＡの個体差にどの様に作用するかを検し，針鎮痛有効性の個体差が如何なる因子に帰因するかを検索した。

実験方法

実験にはウイスター系のラットを用いた。針，モルヒネ，中脳中心灰白質刺激による鎮痛の測定は尾逃避反応の潜伏期を指標とした。ＰＡＧの刺激はあらかじめＰＡＧに同心円の電極を挿入して固定した後行った。誘発電位の記録は双極電極をあらかじめ所定の部位にsterotoxicに挿入して固定した後行った。針麻酔式刺激（針刺激）は既に前報に記載した方法によった。ＭＬＦの定量，ＯＲの定量はすべてRadio-receptor assayによった。脳室内へのエンケファリンの投与はsterotoxicに脳室にカニューレ（直径400μm）を挿入しておき，これを介して行った。用いた薬物はモルヒネ，メチオニンエンケファリン（蛋白研究奨励会），Ｄ－フェニルアラニン（蛋白研究奨励会）などである。

実験結果

1、針鎮痛の有効性の個体差と脳内ＭＬＦ含有量との関係

既に報じた様に針鎮痛の有効性の個体差は脳内ＭＬＦの含有量と相関関係を示し，それぞれの個体の針刺激開始45分後のラットの尾逃避反応の潜伏期の増加率と，それぞれの個体のＭＬＦの含有量との間には相関係数0.74の相関関係が認められた。

2、針鎮痛とモルヒネ鎮痛の相関性

それぞれの個体の針鎮痛の有効性はまた0.5mg/kgモルヒネ鎮痛の有効性とも高い相関性を示す。相関係数は0.75であった。

3、針鎮痛とＰＡＧ－ＳＰＡの相関性

針鎮痛有効群のラットではＰＡＧ－ＳＰＡもよく出現し，これに反し無効群ではＰＡＧ－ＳＰＡはよく現われない。

4、針鎮痛有効群ラットと無効群ラットの脳内各部におけるＯＲの含有量の比較

前述の様に，針鎮痛の有効性とモルヒネ鎮痛やＰＡＧ－ＳＰＡの有効性とは並行するので，針鎮痛の有効性を単に脳内ＭＬＦ含有量の多少に帰することはできない。そこで，針鎮痛有効群のラット（n＝8）と無効群のラット（n＝7）の脳の各部のＯＲを定量してみた。その結果を表一に示す。表に示す様に両者の間には有意の差は見出されなかった。

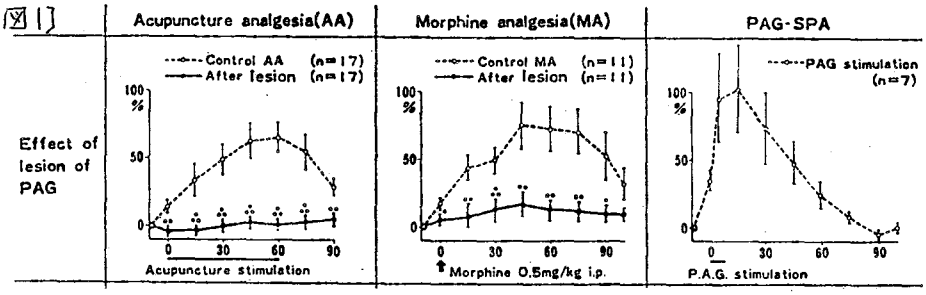
Comparison of opiate receptors in various parts of the brain between acupuncture effective and non-effective animals

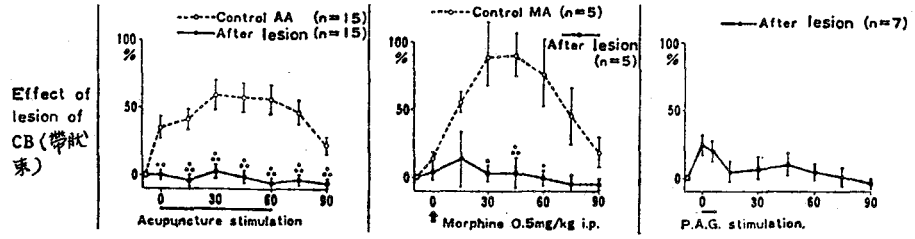
	Acupuncture Effective Group (n=8)	Acupuncture Non Effective Group (n=7)
	Stereospecific ^{3}H-Naloxone Binding (cpm/mg protein ± S.E.)	
Whole Brain	1026 ± 122	999 ± 130
Hypothalamus	1035 ± 142	1027 ± 143
Striatum	1523 ± 116	942 ± 218
Midbrain	1445 ± 172	1228 ± 146
Amygdala	1488 ± 202	1471 ± 160
Hippocampus	684 ± 157	661 ± 199
Cortex	947 ± 222	1031 ± 59
Medulla oblongata	681 ± 123	820 ± 71

5、ＰＡＧ，帯状束破壊による針鎮痛，モルヒネ鎮痛の消失及び帯状束破壊によるＰＡＧ－ＳＰＡの消失

ＰＡＧ及び帯状束に直径0.5mmの電極を挿入すると，針鎮痛ならびにモルヒネ鎮痛（0.5mg/kg）は消失する（図１）。また帯状束の破壊によってＰＡＧ－ＳＰＡは消失する。ＰＡＧや帯状束や海馬からは針刺激によって誘発電位が記録されるので，上記の部位は針鎮痛の求心路とすることができ，これらの部位の破壊による針鎮痛及びモルヒネ鎮痛の消失は求心路の破壊のためと考えられる。

〔図1〕





6. D-フェニルアラニンのエンケファリン分解阻害作用

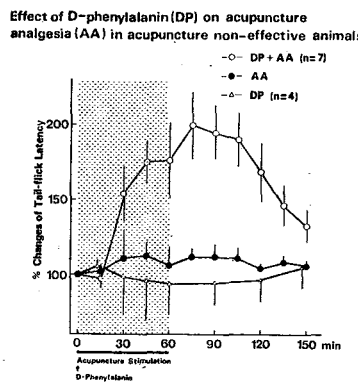
モルモット腸管の収縮を指標としてD-フェニルアラニンのエンケファリン分解阻害作用を検した。すなわち200倍稀釈した脳のホモジネートにエンケファリン30μg/mlを含む液は腸管収縮の抑制作用を示さないが，上記の液にD-フェニルアラニンを1μg/ml加えると中等度の，10μg/mlを加えると完全に腸管の収縮が抑制された。また，脳のホモジネートを熱処理しておくと，エンケファリン30μg/mlで腸管の収縮は抑制された。以上から，D-フェニルアラニンのエンケファリンの分解阻止作用が確認された。

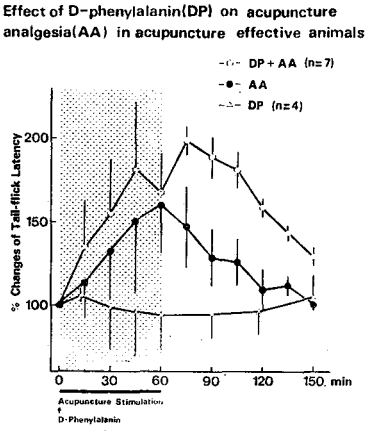
7. D-フェニルアラニンのエンケファリン鎮痛効果促進作用

200μg/20μlエンケファリンを20μl脳室内に投与し尾逃避反応を検すると鎮痛が現われるが，250mg/kg D-フェニルアラニンを腹腔内に投与しておくとこの鎮痛効果は約1.7倍ほど増強された。

8. 針鎮痛に対するD-フェニルアラニンの作用

針刺激によって5%の危険率で有意の差のある尾逃避反応の潜伏期の増加（鎮痛）が現われるか，現われないかを指標としてラットを針鎮痛有効群と無効群に分けて，それぞれにD-フェニルアラニン250mg/kgを腹腔に投与すると，前者では僅かに，後者では著明な針鎮痛の増強がみられ，殊に針刺激終了後も鎮痛効果の増大が著しくなり，両者ともにほぼ同じ程度の鎮痛となる（図2）。すなわち針鎮痛の有効性の個体差はD-フェニルアラニン投与後は消失する。〔図2〕





9. モルヒネ鎮痛に対するD-フェニルアラニンの作用

0.5mg/kgモルヒネの投与による鎮痛の有効性も針鎮痛の有効性とよく並行し，モルヒネの投与によっても鎮痛有効群と無効群に区分できる。D-フェニルアラニン投与後は両者の鎮痛は増大し，この場合にもモルヒネ鎮痛の有効性の個体差は消失した。

10. PAG-SPAに対するD-フェニルアラニンの作用

ＰＡＧ－δＰＡの有効性の個体差も針鎮痛と並行し，針鎮痛有効群，無効群，あるいはモルヒネ鎮痛有効群，無効群で区分したラットのＰＡＧ－δＰＡは前着では可成りの鎮痛が，後着では殆んど鎮痛が現われない。Ｄ－フェニルアラニンを投与すると両群ともほぼ同じ程度の増大した鎮痛が出現した。

考察

針鎮痛の有効性の個体差は脳内のＭＬＦの含有量に帰因し，脳内のＯＲの含有量とは無関係であることが判明した。ＰＡＧ－δＰＡの有効性の個体差はＰＡＧ－δＰＡがナロキソンで拮抗されることから，この鎮痛の有効性の個体差は脳内のＭＬＦの多い方がＰＡＧの刺激により多くのＭＬＦが遊離されるとすれば，解釈がつくが，モルヒネ鎮痛の有効性の個体差が針鎮痛のそれと並行することの解釈は困難である。しかしＰＡＧや帯状束の破壊で針鎮痛もモルヒネ鎮痛もともに消失した事実から，針鎮痛もモルヒネ鎮痛にもともに同じ作用機序が働いて鎮痛が現われるとすれば解釈は可能となる。ＰＡＧ－δＰＡが帯状束の破壊で消失することや，針刺激による誘発電位がＰＡＧや帯状束から記録されることから，ＰＡＧや帯状束は針刺激の求心路にあたると考えられ，かつこの系路の終末の何処からか，ＭＬＦが遊離されると考えられる。この様な想定から，針鎮痛とモルヒネ鎮痛の共通の作用機序は，「針鎮痛もモルヒネ鎮痛も共通の求心路をもち，これが刺激されて鎮痛が現われる」とすることができ，「モルヒネによってＭＬＦが遊離する」としなくてはならなくなる。ＰＡＧにはＯＲが多く存在するのでモルヒネはＰＡＧの求心路を活動させＭＬＦを遊離させる可能性は存在する。この可能性はモルヒネ鎮痛が，Ｄ－フェニルアラニンで増強されることからも支持される。すなわちＤ－フェニルアラニンはモルヒネとは直接関係のない物質であるので，同物質によるモルヒネ鎮痛の増強はモルヒネがＭＬＦを遊離させ，このＭＬＦの分解が阻止されたためモルヒネ鎮痛が増強されたと解することができる。この様な解釈から針鎮痛，モルヒネ鎮痛，ＰＡＧ－δＰＡの鎮痛の有効性の個体差が並行することはすべて首肯できることとなる。

Ｄ－フェニルアラニン投与後，これらの凡ての鎮痛の有効性の個体差が消失した事実は，これらの有効性の個体差はＤ－フェニルアラニンによって影響をうける因子，すなわちペプチダーゼの活性の差が個体差の形成にあずかっていることを暗示する。

文献

1) 村居真琴他，神経化学，17，157（1978）

2) Ehrenpreis. R.C. et al : Pain Abstracts, (Second World Congress on Pain), P260 (1978)

85 培養神経細胞の生産する Substance P-like Immunoreactivity

畠中　寛・天野武彦
（三菱生命研）

〔要　約〕

マウスニューロブラストーマ X ラットグリオーマ ハイブリッド細胞 NG115-401 が Substance P-like Immunoreactivity（SPLI）を生産していることを見出した。その生産量は対数増殖期後期の細胞で 96.3 pg/mg protein であった。同じマウスニューロブラストーマ細胞 N115 由来のハイブリッド細胞である NG115-301 および-303 は検出でき得る量の SPLI を生産しなかった。これらの細胞は Choline Acetyltransferase（CAT）活性をもたず，NG115-401 細胞のみが高い CAT 活性をもっていた。しかし，十数種の種々の培養神経細胞の SPLI 生産量を調べてみると，かならずしもそれらの CAT 活性の強さと相関していない場合もあった。

NG115-401 細胞の生産する SPLI は，アミノ酸残基 11 個よりなる Substance P（SP）にくらべ，はるかに高分子であることがゲルロ過の実験で観察された。この高分子性の SPLI が，この細胞において SP の前駆体であるか否かについては現在研究が進行中である。

ラットフェオクロモサイトーマ 由来の PC 12 細胞は神経成長因子（NGF）に依存した SPLI を，また生産することも合わせ報告したい。

1931年 von Euler ら（5）により牛腸管より抽出された強力な降圧作用と腸管収縮作用をもつ SP は，のちに中枢神経組織にきわめて高濃度に存在することが明らかにされ（11），1971年 Leeman ら（3,4）によって単離精製され，下記に示すようにその一次構造が明らかにされた undecapeptide である。

Substance P　：　H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2

SP の脳内分布はきわめて不均一であり，神経組織での SP の特別な機能が予想され（11），特に早くから Lembeck（8）によって，知覚神経伝達物質であろうとの予想がなされていた。その後，大塚ら（10）により中枢神経系に対する強力な興奮作用が見出されるにおよび神経伝達物質としての可能性が飛躍的に高まった。しかしながら，現在までのところ SP の神経細胞からの放出あるいはその生合成についての詳しい機構（特に後者は全然）についての研究はない。この意味において神経組織由来の培養細胞を系として用いることが出来れば有効な手段となり得るであろう。

天野ら（1）によって確立されたマウスニューロブラストーマ のアセチルコリン性，アドレナリン性，不活性型の3種に分れた種々のクローン，およびそれらとラットグリオーマ細胞 C6 とのハイブリッド細胞を用い，私達は，これら培養神経細胞クローン中に，十分に研究に供し得る量の SPLI を生産する細胞を探すことから，この仕事を始めた。本研究において，そのうち ある種のハイブリッド細胞 NG115-401 が SPLI を生産している可能性を見出したので報告する。

［実験方法］

SPのヨード化はクロラミンT法でおこなった(7,15)。(tyr^8-)SP: H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Tyr*-Gly-Leu-Met-NH$_2$(蛋白質研究奨励会) 1.7μgを^{125}I Na 1mCiを用いてヨード化した。^{125}I-SPの精製はセファデックスG-10をつめた使い捨てプラスチックカラムでおこない，分画をスチレンチューブで集めた(図1)。ピークの分画を，1mg/mlのジチオスレイトールを含むラジオイムノアッセイ稀釈用緩衝液，RIA-Buffer (0.14M NaCl, 1mM EDTAおよび1mg/ml牛血清アルブミンを含む10mM Na-燐酸緩衝液，pH 7.4)にて50倍にうすめ，分注し，−80°Cに凍結保存した。この保存で^{125}I-SPは少なくとも2ヶ月はイムノアッセイに使用可能であった。

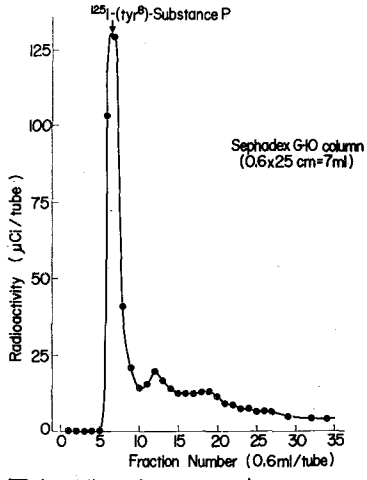


図1. ゲル口過による^{125}I-SPと，遊離^{125}Iとの分離。溶出は1mg/mlの牛血清アルブミンを含む0.1M酢酸溶液でおこなった。

SPに対するモルモットの抗血清は反町博士(愛媛大・医)よりいただいた(GP#4)。別に私達はウサギより作成した抗血清も用いた(R#1〜4)。

ラジオイムノアッセイはポリスチレンチューブ(12x75mm)中に100μlのサンプルあるいは標準SP(蛋白質研究奨励会)，100μlの抗血清(30,000-40,000倍稀釈)および50μlの^{125}I-SP(10,000-20,000 dpm)を入れ，全量250μlで，0°C，45時間の反応でおこなった。全て稀釈はRIA-Bufferを用いた。抗体に結合した^{125}I-SPと未反応との分離は，2.5mg/mlデキストランT-70と1mg/ml牛血清アルブミンを含む，10mM Na-燐酸緩衝液1mlを加え遠心分離することによりおこなった。図2は典型的な標準曲線の例である。

細胞は主としてハイブリッド細胞NG115-401を用いた。この細胞はN115細胞(アドレナリン性クローン)とC6細胞をポリエチレングライコール法によって融合させて得られたクローンで，高いアセチルコリン合成能を有し，カテコールアミン合成能を消失している(2)。細胞は5%新生牛血清(三基化成)を含むDME培地にHATを加えて培養した。実験には対数増殖期後期の細胞を0.1M酢酸溶液に集め，超音波破砕の後10,000×g，10分

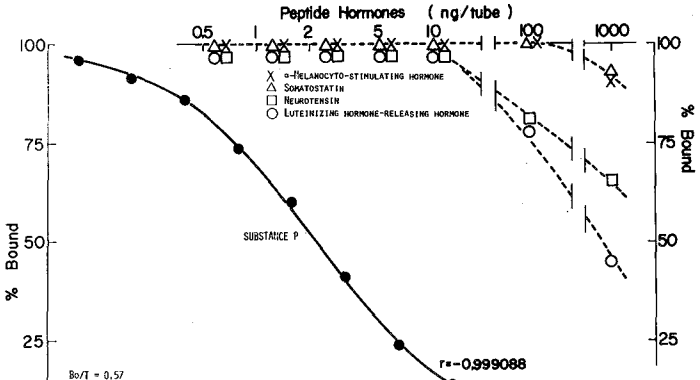


図2 SPのラジオイムノアッセイ標準曲線と他のペプチド類によるクロス反応。実線は，% Bound値をlogit-plotとした時に最小自乗法によって得られた直線から求めた。

の遠心上清を凍結乾燥した後，イムノアッセイに供した。

［実験結果と考察］

マウスニューロブラストーマ X ラットグリオーマハイブリッド細胞 NG115-401 の抽出液は ^{125}I-SP とその抗体との結合を阻害することを図3は示している。抽出液のいろいろな稀釈度に応じたその阻害程度は，標準SPの場合と完全に平行していた。この図からその存在量はSPLIとして 96.3 pg/mg protein と求められた。天野ら(1)によって分離されたマウスニューロブラストーマ細胞の3種のカテゴリーより，不活性型として N18，アセチルコリン性として N20，アドレナリン性として N115 をえらび，さらにこれらとラットグリオーマ細胞 C6 とのハイブリッド各種クローンについて，アセチルコリン生産性と SPLI の生成量を合わせ求めたのが表1である。この両者の活性間にはある程度の相関性が観察されたが，しかし絶対的ではなかった。興味深いことには，N115 細胞由来のハイブリッド細胞の中で，CAT の活性および SPLI が，或るハイブリッド細胞 NG115-401 にのみ検出され，また別におこなった顕微鏡による観察においても形態的に NG115-401 細胞は神経細胞に近い性質が

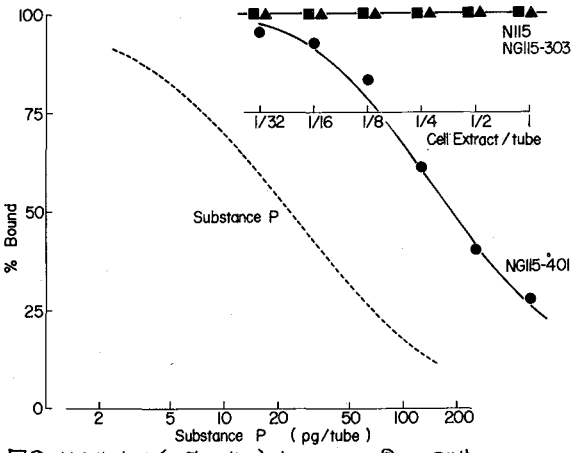


図3 NG115-401 細胞抽出液中のSPLI量の測定。

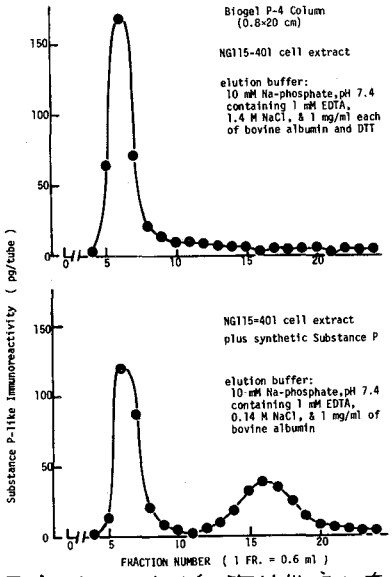


図4 NG115-401 細胞抽出液に存在する SPLI のゲル濾パターン。抽出液のみ(上)と標準SPを加えたもの(下)。標準SPは分画No.16にピークがある。

Cell Lines	Substance P-like Immunoreactivity	Choline Acetyltransferase activity
	(pg/mg prot)	(pmol/min/mg prot)
N18TG2	<0.5	3.5
NG108-A7	4.9	29
NG108-A8	11.0	29
NG108-15	8.9	225
N20	10.1	490
NG20-103	2.9	30
NG20-106	11.5	11
N115	<0.5	<1
NG115-301	<0.5	<1
NG115-303	<0.5	<1
NG115-401	96.3	176

表1 マウスニューロブラストーマおよびそれらのハイブリッド細胞各種クローンにおける SPLI と CAT の活性。CAT の活性は Wilson ら(14)の方法に従って測定した。N20 と N115 細胞の CAT 活性は天野ら(1)より引用した。

	Substance P-like Immunoreactivity in PC 12 Cells cultured for	
	11 days	14 days
	(pg/mg protein)	
without NGF	13.4	17.1
with NGF (100ng/ml)	54.7	63.5

表2 ラットフェオクロモサイトーマ クローン細胞 PC12 における SPLI 存在量と NGF による その変動。PC12 細胞は Dr. Greene (Harvard大医) よりいただいた。細胞は 5% 新生牛血清 5% 馬血清 (Gibco) を含む DME 培地で培養した。7S NGF は Stach ら (13) に従いマウス顎下腺より得た。

認められた。一方，NG115-301 および -303 両クローン は形態的にはグリアに近い性質に観察された (2)。NG115-401 細胞は，サイクリック AMP の影響をうけて形態的に分化し神経突起を伸ばすことを見出している。これらのことが，SPLI の生成と何らかの関係をもっているかどうかについては現在研究が進行中である。

NG115-401 細胞の生産する SPLI は，アミノ酸残基 11 個よりなる標準 SP にくらべはるかに高分子であることがゲルロ過の実験で示された (図4)。一般にこのような小さなペプチドホルモンは生体内でまず はるかに高分子の前駆体ができ，それが水解されてできると考えられており (9)，私達の系においても，図4でみられる高分子性の SPLI がその前駆体である可能性が考えられる。しかし その確証については まだ得られていない。

アドレナリン性の培養神経細胞として最近注目を集めているラットフェオクロモサイトーマ由来の PC 12 細胞 (6) も，また SPLI を生産していることを見出した (表2)。PC12 細胞の SPLI 存在量は NGF 存在下に培養すると約4倍に増加した。NGF は PC12 細胞をアセチルコリン性に変え (12)，また特長的な神経突起を出すこと (6) と合わせ考えると，このことは興味深い。

最後に，SP抗血清をくださった友町勝博士 (愛媛大医) に，PC12 細胞をいただいた Dr. L.A. Greene (Harvard大医) に感謝します。また，SP のラジオイムノアッセイについて種々お教えいただいた矢内原昇博士 (静岡薬大) に感謝します。細胞の培養について藤田純子氏に技術的協力を受けたことを感謝します。

［参考文献］

1. Amano,T.,Richelson,E. and Nirenberg,M.(1972)*Proc.Natl.Acad.Sci.* 69,258-263
2. 天野武彦,畠中竜,根岸美智子 (1979) 日本組織培養学会第47回研究会 抄録集，pp.30
3. Chang,M.M. and Leeman,S.E.(1970)*J.Biol.Chem.* 245,4784-4790
4. Chang,M.M.,Leeman,S.E. and Niall,H.D.(1971)*Nature,New Biol.* 232,86-87
5. von Euler,U.S. and Gaddum,J.(1931)*J.Physiol.* 72,74-87
6. Greene,L.A. and Tischler,A.S.(1976)*Proc.Natl.Acad.Sci.* 73,2424-2428
7. Hunter,W.M. and Greenwood,F.C.(1962)*Nature* 194,495-496
8. Lembeck,F.(1953)*Arch.exp.Pathol.Pharmakol.* 219,197-213
9. Nakanishi,S.,Inoue,A.,Kita,T.,Nakamura,M.,Chang,A.C.,Cohen,S.N. and Numa,S.(1979)*Nature* 279,423-427
10. Otsuka,M.,Konishi,S. and Takahashi,T.(1972)*Proc.Japan Acad.* 48,342-346
11. Pernow,B.(1953)*Acta Physiol.Scand.* 29 suppl. 105,1-90
12. Schubert,D.,Heinemann,S. and Kidokoro,Y.(1977)*Proc.Natl.Acad.Sci.* 74,2579-2583
13. Stach,R.W.,Wagner,B.J. and Stach,B.M.(1977)*Anal.Biol.* 83,26-32
14. Wilson,S.H.,Schrier,B.K.,Farber,J.L.,Thompson,E.J.,Rosenberg,R.N.,Blume,A.J. and Nirenberg,M.W.(1972) *J.Biol.Chem.* 247,3159-3169
15. Yanaihara,C.,Sato,H.,Hirohashi,M.,Sakagami,M.,Yamamoto;K.,Hashimoto,T.,Yanaihara,N.,Abe,K. and Kaneko,T. (1976)*Endocrinol.Japon.* 23,457-463

86 Substance P C-末heptapeptideの生成酵素とその生理的意義

加藤　武・浜　登希子・中野　完
小島幸一・永津俊治
(東工大・総合理工)

〔要　約〕

私達はdipeptidyl-aminopeptidaseの生理的意義について研究を続けているが，その一つとしてsubstancePから生理活性がより高いと考えられるSP C-末heptapeptide (Gln^5-Gln^6-Phe^7-Phe^8-Gly^9-Leu^{10}-Met^{11}-NH$_2$)を生理的条件下で生成する可能性があると考えている。今回ヒト大脳皮質から2種のdipeptidyl-aminopeptidase (DAP-AとDAP-B) を分離精製した。DAP-Aは分子量130000，合成基質7-(Gly-Pro)-4-methylcoumarinamide (Gly-Pro-MCA)に対する至適pHは4.7と5.8，Kmは1.43mM。そしてLys-Ala-β-naphthylamide (Lys-Ala-βNA)を水解することから，ウシの下垂体に発見されているdipeptidyl-aminopeptidase Ⅱと類似している。そしてDAP-Bは分子量160000，至適pHは5.8，Kmは0.89mM。合成基質Lys-Pro-pNAをよく水解し，今まで発見されていないdipeptidyl-aminopeptidaseの可能性があり，substance Pと酵素反応を行った所，substancePのN-末端からArg-ProとLys-Proを水解遊離した。

一方post-proline cleaving enzyme (PPCE) の新しい合成基質を用いてラット脳からPPCEを100倍に精製した。ジイソプロピルフルオルリン酸により阻害されることからヒツジ腎より発見されているPPCEと同様セリン酵素であった。そしてこのラット脳のPPCEがsubstance PをArg-Pro-Lys-ProとSP C-末heptapeptideに水解することを発見した。以上のことを考え合わせてsubstance Pの生理的条件下での代謝経路について考察した。

プロリンを含む生理活性ペプチドは多く知られているが，その中でも神経伝達物質に関与するペプチドとしてTRH，substance P，enkephalin，そしてangiotensin Ⅱ等が知られている。これらの内TRH，enkephalin，angiotensin Ⅱの生合成および代謝については多くの研究があり，明確になって来ている。しかしsubstancePに関する代謝についてはあまり分っておらず，生合成に至っては皆無に近い。昨年の第21回神経化学会で仲田らはsubstancePの色々な誘導体を用いて中枢神経のシナップス膜への特異的結合を調べ，SP C-末heptapeptide (SP$_{5-11}$) の結合が一番強いと述べた[1]。また私達はヒト顎下腺から精製したdipeptidyl-aminopeptidase Ⅳ (X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase) (DAP-Ⅳ) がSP$_{5-11}$を生成する可能性があること，そしてヒト脳には末梢とは異なるdipeptidyl-aminopeptidaseが存在することを述べた[2]。

今回はヒト脳内に2種のdipeptidyl-aminopeptidaseが存在することを見出し，その中の1種が新しい型のdipeptidyl-aminopeptidaseと考えられること，その性質とsubstance Pに対する反応性を検討した。一方SP$_{5-11}$の生成経路として，substancePから一段階でSP$_{5-11}$を生成させる酵素が存在するかも知れないと考え，ラット脳を用いて検討した。

〔実験材料〕

substance P，Boc-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH$_2$ (Boc SP$_{5-11}$)，Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro，succinyl-Gly-Pro-MCA，Gly-Pro-MCA，Arg-Pro-pNA，Lys-Pro-pNA はペプチド研で榊原等により合成された。SP$_{5-11}$の標品は使用直前にBoc SP$_{5-11}$を酸処理して生成した。Arg-Pro-Lys-Proは成実博士(武田薬研)から戴いた。bacitracinはSigmaから，Lys-Ala-βNAはBA-

CHEMからそれぞれ購入した。Silica gel (SiO_2) および cellulose の薄層プレートはMerckの製品を使用した。ヒト脳は神経疾患を伴わない患者の剖検材料，ラット脳は2~3週令のSprague-Dawley系を用いた。

〔実験方法〕

ヒト脳のdipeptidyl-aminopeptidase (DAP-AとDAP-B) とラット脳のpost-proline cleaving enzyme (PPCE) の酵素精製は合成基質 Gly-Pro-MCA と Suc-Gly-Pro-MCA をそれぞれ用いて行った。DAP-B による substance P の水解は反応液(50μl) 中に2mMのsubstance Pと3ngのDAP-BをpH5.2で incubationし，反応停止後展開溶媒n-butanol/acetic acid/H_2O (2:1:1) とphenol/H_2O (3:1) を用いてcelluloseの薄層クロマトグラフィー(TLC)により，分離し，

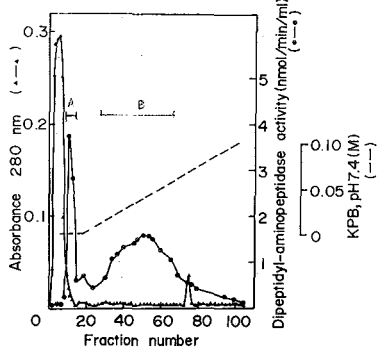


Fig. 1. ヒト脳のHydroxyapatiteカラムクロマトグラフィー

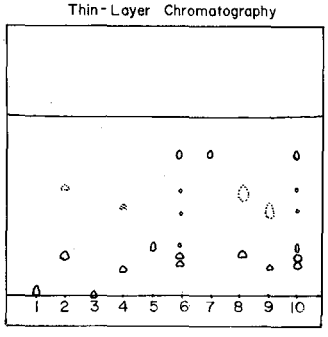


Fig. 2
1: Arg, 2: Arg-Pro-pNA + DAP-IV (○: Arg-Pro)
3: Lys, 4: Lys-Pro-pNA + DAP-IV (○: Lys-Pro)
5: substance P 6: substance P + DAP-IV,
7: SPs-11, 8: Arg-Pro-pNA + DAP-B,
9: Lys-Pro-pNA + DAP-B, 10: substance P + DAP-B
〔展開溶媒: phenol/H_2O (3:1)〕

Table 1 Some enzymatical and physicochemical properties of dipeptidyl-aminopeptidase-A and -B

	Dipeptidyl-aminopeptidase A	Dipeptidyl-aminopeptidase B
Molecular weight by gel filtration	130 000	160 000
Optimum pH[a]	4.7 and 5.8	5.8
Km (mM)[a]	1.43 ± 0.068	0.89 ± 0.005
Substrate Specificity	Lys-Ala-βNA ≫ Lys-Pro-pNA, Gly-Pro-pNA	Lys-Pro-pNA > Lys-Ala-βNA > Gly-Pro-pNA

a: Gly-Pro-MCA was used as substrate
βNA: β-naphthylamide, pNA: p-nitroanilide

Table 2
Purification of post-proline cleaving enzyme from rat brain.

Rat whole brains (23.4 g) at 2 or 3 weeks of age were used as enzyme source. Z-GPLGP-AH-Sepharose: Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-NH-$(CH_2)_6$-Sepharose

Step	Total protein (mg)	Specific activity (nmol/min/mg)	Purification
Homogenate	3000	8.6	1
100 000 × g supernatant	520	43.5	5.1
$(NH_4)_2SO_4$ (50 ~ 70 %)	155	143.5	16.7
Sephadex G-100	19.8	750	87.2
DEAE-cellulose	7.5	760	88.4
Z-GPLGP-AH-Sepharose	1.1	860	100

ニンヒドリンにて発色させて同定した。PPCEによるsubstance Pの水解は反応液(100μl)中にsubstance P 0~4mMと酵素をpH6.8で20min反応後，展開溶媒n-butanol/pyridine/acetic acid/H_2O (30:20:6:24) を用いてSiO_2 TLCにより分離し，ニンヒドリン発色させ，Shimadzu CS-910 二波長TLC scannerにて定量した。

（実験結果）

1. ヒト脳内 dipeptidyl-aminopeptidases (DAP-A と DAP-B) の性質と Substance P の水解

DAP-A と DAP-B は可溶性画分を CM-cellulose と Sephadex G-200 のカラムクロマトを行った後，hydroxyapatite のカラムによって分離される酵素 A (DAP-A) と B (DAP-B) であり (Fig. 1)，二つの酵素の物理的化学的性質の違いを Table 1 に示した。昨年の第21回神経化学会で得た酵素は DAP-A と DAP-B の混合物であったが，hydroxyapatite により2種の酵素に分離することが出来，後述するように DAP-A は McDonald 等がウシ下垂体から精製した dipeptidyl-aminopeptidase II (DAP-II)[3] と類似したが，DAP-B は新しい型の dipeptidyl-aminopeptidase ではないかと考えている。そこで DAP-B と substance P を酵素反応させた後，cellulose の TLC を行った所，substance P の N-末端から Arg-Pro と Lys-Pro が遊離されていることが分った (Fig. 2)。また同時に展開した SP_{5-11} と同じ所にスポットが見られることから，SP_{5-11} も生成していると判断しているが，未だ証明はしてない。

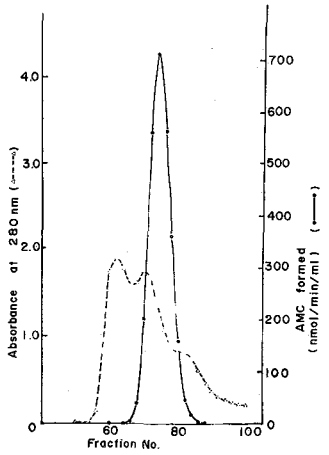


Fig. 3. PPCE Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー
AMC: 7-amino-4-methylcoumarine

2. ラット脳から post-proline cleaving enzyme (PPCE) の精製

ラット脳をリン酸緩衝液 (pH 6.8) に DTT と EDTA を含む液でホモジネートとし，100 000×g 可溶性画分を硫安 50-70% の画分を集め，Sephadex G-100 のゲル沪過を行って80倍以上に精製することが出来た (Fig. 3, Table 2)。その後のイオン交換カラムおよび Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AH-Sepharose カラムでは一部失活し，比活性はあまり上昇しなかった。

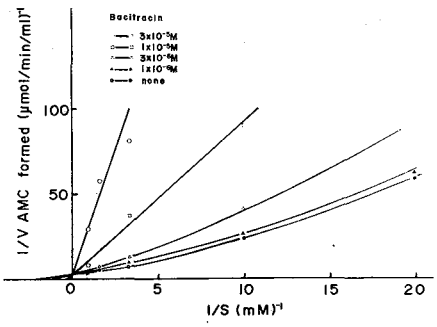


Fig. 4. bacitracin による PPCE の Suc-Gly-Pro-MCA(S) に対する阻害 (Lineweaver-Burk plot)

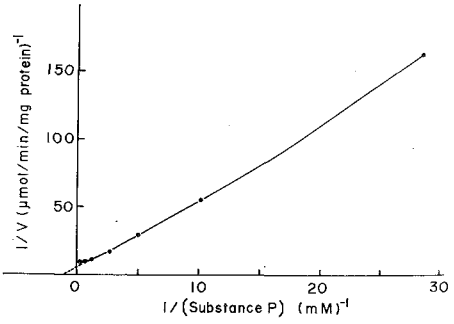


Fig. 5. PPCE による substance P 水解物 Arg-Pro-Lys-Pro の Lineweaver-Burk 曲線

3. ラット脳 PPCE の性質

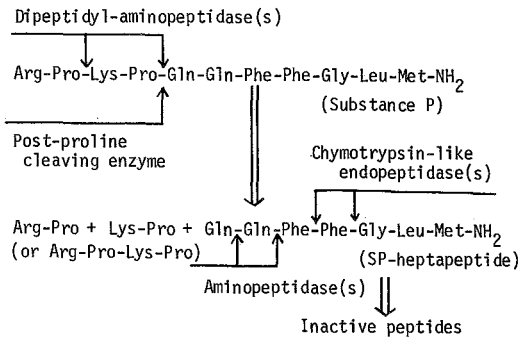
本酵素は DTT の除去や凍結融解に対し不安定であり，酵素活性は低下したが，DTT の存在下 0~4°C においてはかなり安定であった。Sephadex G-100 のゲル沪過によって求めた分子量は約100000であり，至適 pH は 5.8~6.5 にあり，ジイソプロピルフルオ

ル燐酸に対し低濃度で阻害(IC_{50}=1×10^{-6}M)されることからセリン酵素と考えられ，Walter等が腎臓から精製しているPPCE[4]と類似していると思われる。また抗生物質であるbacitracinに対しても competitiveに強く阻害され(Fig.4)，IC_{50}は2.5×10^{-6}Mであった。

4. ラット脳PPCEによるsubstance Pの水解

精製したラット脳のPPCEとsubstancePの種々の濃度と酵素反応させてTLCを行った。その際標品としてArg-Pro-Lys-ProとSP5-11の他にsubstance P，Arg-Pro，Lys-Pro，Arg，Lys等も同時にTLCを行ったが，反応生成物はArg-Pro-Lys-ProとSP5-11のみが現われ，反応生成物の内Arg-Pro-Lys-Proの定量は標品の標準曲線から換算して行った(Fig.5)。そしてLineweaver-Burk plotから，substancePの水解速度Kmは1.0mMであった。一方反応生成物のSP5-11についてはN-末端のグルタミンが一部非酵素的に脱アミノ化され，続いて環化(ピログルタミン形化)されるため，定量は出来なかったが，Arg-Pro-Lys-Proとほぼ同様の反応生成物を与えた。

Fig. 6 Speculation on Substance P Metabolism



〔考察〕

今回の実験によってヒト脳からDAP-AとDAP-Bを分離し，部分精製出来たが，McDonald等がウシ下垂体から精製した酵素(DAP-II)が分子量：130000，Lys-Ala-βNA ≫ Gly-Pro-βNAであり[3]，Table Iに示したDAP-Aの性質と似ていることからヒト脳から精製したDAP-AはDAP-IIと同じ酵素の可能性があると考えた。一方DAP-Bについては今まで知られているdipeptidyl-aminopeptidase-I～IVのどの酵素とも類似していないと考えられ，その生理的意義を追求する目的でsubstancePを水解させた所，Arg-ProとLys-Proを水解遊離することが分った。脳においてはDAP-BがsubstancePからSP5-11を生成し，生成したSP5-11がFig.6の様に他のアミノペプチダーゼかキモトリプシン様エンドペプチダーゼによって不活性化される系を担っている可能性も考えられ，今後更に検討したい。一方substancePから直接SP5-11を生成させる酵素，PPCE，が生理的に働いているとも考えられ，今回の実験でその可能性があることを認めた。興味あることにsubstancePの不活性化をbacitracinが一部防止するとの報告[5]があるが，今回精製したラット脳のPPCEがbacitracinによって強く阻害されることを発見したので，その点を手掛りにしてsubstance Pの生理的な代謝反応を解明したいと考え，実験を進めている。

〔文献〕

1) 仲田，日下，瀬川 (1978) 神経化学 17, 245.
2) 加藤，浜，永津，永津 (1978) 神経化学 17, 249.
3) McDonald J.K., Reilly, T.J., Zeitman, B.B., and Ellis, S. (1968) J.biol.chem. 243, 2028.
4) Yoshimoto, T., Orlowski, R.C., and Walter, R. (1977) Biochemistry 16, 2942.
5) Lembeck, F., Holzer, P., Schweditsch, M., and Gamse, R. (1978) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 305, 9.

87 中枢神経組織へのSubstance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11) SPのとりこみ機構の存在について

仲田義啓・日下歓子・瀬川富朗
(広大・医・総合薬)

〔要約〕

我々は、既に、substanceP(sP) が神経終末部やグリア細胞に再とりこみされないことを報告した[3,4]が、今回、sPのC末端同族ペプタイドであるGln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2(以下(5-11)sP)が、脳切片および脊髄切片にとりこまれることを見出した。

ラット脳切片では、Km値; 5.26×10^{-5}M Vmax値; 7.9 fmole/10mg wet weight/min の高親和性のとりこみと、同様に 1.00×10^{-4}M, 100 fmole/10mg wet weight/min の低親和性のとりこみが存在した。ウサギ脊髄切片では、Km値; 1.82×10^{-5}M, Vmax値; 25 fmole/10mg wet weight/min の高親和性のとりこみのみが存在した。いずれの切片へのとりこみ機構も、温度・エネルギー依存性(Ouabain 10^{-4}M, Dinitrophenol 10^{-3}M で有意に抑制)の能動的なものであることが認められた。

(5-11)sPは、すでに我々によって、sPよりも強い生物活性を有し[5]、sP受容体に対して、sPよりも強い親和性を有する[1]、ことが示されている。このことは、シナプス部においてsPが先ず酵素的に(5-11)sPにまで変換され、その後、ニューロンまたはグリア細胞にとりこまれる可能性を示唆するもので、従来の伝達物質にはみられない、全く新しい不活性化過程の存在することを想像させる、興味ある発見といえよう。

アミノ酸11個よりなるポリペプタイドsubstanceP(sP)は、Lembeckによって中枢神経伝達物質であることが示唆されて以来、機能的役割について多くの研究が行なわれてきた。最近、我々[1,2]は、ウサギ中枢神経系内にsP受容体が存在し、除神経によって感受性が増大することを見出した。この発見は、sPが伝達物質であることを強く支持するものといえよう。一方、伝達物質としてのsPの不活性化機構については、なお不明の点が多い。我々[3,4]は、sPが神経終末部やグリア細胞に再とりこみされないことを認め、従来の伝達物質にみられる様な不活性化過程としての再とりこみ機構は、sPには存在しないことを発表したが、今回、sPのC末端同族体である(5-11)sPが、脳切片および脊髄切片に、温度・エネルギー依存性にとりこまれるという興味ある事実を見出したので報告する。

〔実験方法〕 <u>[^{3}H]-(5-11) substanceP の精製</u>: 京都大学、矢島教授に合成していただいたGln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2(以下(5-11)sP)は、促進被曝法で^{3}H-標識化し、凍結乾燥を繰り返し、不安定なトリチウムが除去されたのち、N_2 gasで封管し4℃で貯蔵した。使用時 0.01N酢酸溶液に溶かし、シリカゲルの薄層に吸着させ、n-butanol; pyridine; acetic acid; water, 30:20:6:24 v/v で展開したのち、authentic(5-11)sPと同じRf値部分のシリカゲルをかきとって、acetone; water; acetic acid; pyridine, 50:50:3:1, v/v 溶液で溶出させた。溶出液を凍結乾燥後、予め0.1N酢酸緩衝液で平衡化させたSephadex G-15カラム(0.8×70cm)に添加し、同緩衝液で溶出させた。その結果、authentic(5-11)sPと同一位置にトリチウムが溶出された(Fig.1)。このようにして精製した[^{3}H](5-11)sPは、TLCでも単一物質であり(Fig.2)、その比活性は、モルモット回腸収縮活性により測定した結果、2.55 Ci/mmole であった。

とりこみ実験：切片へのとりこみ実験は，Segawa[4]の方法で行なった。Wistar系雄ラット(200g前後)，又は，雌雄のウサギ(1.6~3.8kg)より，脳あるいは脊髄をとりだし，約700μm^3の大きさに細切した。これを20~30倍の氷冷modified Krebs-Ringer solutionに懸濁させ，上清を捨てる操作をくり返した後，680μのナイロンメッシュを通して均一組織切片浮遊液を得た。尚，modified Krebs Ringer solutionの組成は次の通りである。(mM) NaCl; 126.5 KCl; 2.4 $MgCl_2$; 0.83 $CaCl_2$; 1.1 Na_2SO_4; 0.5 $NaHCO_3$; 27.5 KH_2PO_4; 0.5 glucose; 5.9 Trasylol® 0.5unit/ml(使用前 O_2 95% CO_2 5%で pH 7.4にした)

切片浮遊液を，0.8ml ポリチューブに入れ，0.1/mlの蒸留水又は薬物溶液を加えて37℃で10分間pre-incubationを行なった。これに0.1/mlの[3H](5-11)sP，あるいは，他の放射性化合物を加えて，さらに37℃でincubationを行なった。一定時間後，3mlの氷冷生理食塩水を加え，ただちにice bathに入れることで反応を停止し，350gで10分間遠心後，上清を捨て，ポリチューブの重量を測定し，ポリチューブ自体の重さを差し引いて，切片の湿重量を求めた。切片を，可溶化後，取りこま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。このときの計数効率は，外部線源法で約45%であった。

Inulin space：ラット脳およびウサギ脊髄切片の沈澱部の細胞間隙は，0.5μCi/tubeの[3H] inulinを用いて測定した。その結果，ラット脳切片では，37℃10分間のincubationで14.0%，0℃で12.4%ウサギ脊髄切片では，同条件で，21.8%と18.1%であった。

とりこまれた[3H](5-11)sPの同定：組織にとりこまれたトリチウムを，0.1N HCl(湿重量の2~3倍)で，100℃10分間煮沸して抽出後，160,000gで10分間遠心し上清部を凍結乾燥し，TLCで放射能活性を測定した。

[結果] ラット脳切片(小脳を除く)を，最終濃度が9.9×10^{-9}Mの[3H](5-11)sPと3~40分間，37℃でincubationしたときのとりこみを，Fig.3に示した。[3H](5-11)sPのとりこみ量は，最初の10分間まで急速に増加し，その後40分まで，徐々に増加するとりこみがみとめられた(Fig.3)。このラット脳切片へのとりこみ機構の諸性質について示したのがFig.4である。9.3×10^{-9}Mの[3H](5-11)sPを用いたとき，10分間のとりこみは，温度依存性を示し，1×10^{-4}M ouabainあるいは1×10^{-3}M dinitrophenolで有意に抑制された。従ってとりこみ機構はエネルギー依存性のものであることがわかった。又，sPをとりこませたのち，切片を氷冷蒸留水で洗浄すると，とりこみ量は有意に減少した。これは，低張処理により，細胞が破壊され，とりこまれたsPが細胞外に流出した結果であり，sPが単に細胞膜に吸着したものではないことを想像させる。

次に，ラット脳切片への[3H](5-11)sPのとりこみを速度論的

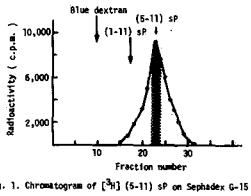


Fig. 1. Chromatogram of [3H] (5-11) sP on Sephadex G-15

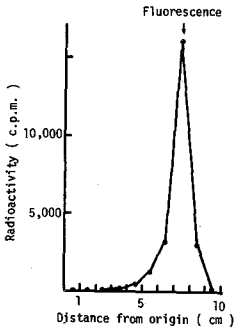


Fig. 2. Thin-layer chromatography of [3H] (5-11) sP

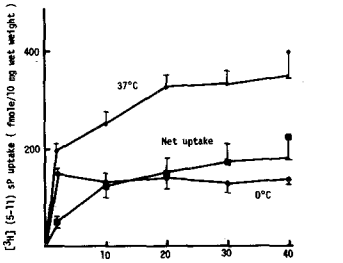


Fig. 3. Time course of [3H] (5-11) sP uptake into rat brain slices

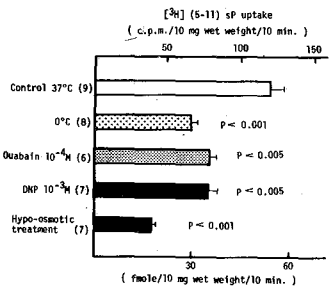


Fig. 4. Effect of temperature, metabolic inhibitors and hypo-osmotic treatment on [3H] (5-11) sP uptake into rat brain slices

に解析するため，最終濃度 1.54×10^{-8}～2.08×10^{-7}M の範囲の [^{3}H] (5-11)sP と 10 分間 incubation を行ない，その結果を double resiplocal plot で解析した(Fig.5)。その結果，とりこみには高親和性と低親和性の 2 つがあり，それぞれの Km 値は，5.26×10^{-8} と 1.00×10^{-6}M，Vmax 値は，7.94，100 fmole/10 mg wet weight/min であった。次に，伝達物質としての sP が神経終末部に局在する可能性の高い摘髄組織について同様な実験を行なった。まず，ウサギ摘髄切片へのとりこみを速度論的に検討した。最終濃度 1.54×10^{-8}～1.67×10^{-7}M の範囲の [^{3}H](5-11)sP と 10 分間 incubation を行なったが，ラット脳切片では高低両親和性のとりこみが存在したのに対し，摘髄切片では高親和性とりこみ機構のみが存在し，その Km 値は 1.82×10^{-7}M，Vmax 値は 25 fmole/10 mg wet weight/min であった(Fig.6)。同切片のとりこみの諸性質を示したのが Fig.7 である。[^{3}H](5-11)sP の濃度は 1.73～3.67×10^{-8}M で行なった。このとりこみ機構も，ラット脳切片へのとりこみ機構同様，温度・エネルギー依存性のある能動的なものであった。

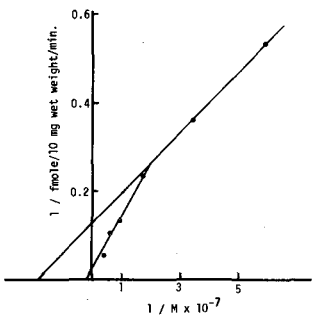


Fig. 5. Kinetic analysis of [^{3}H] (5-11) sP uptake into rat brain slices

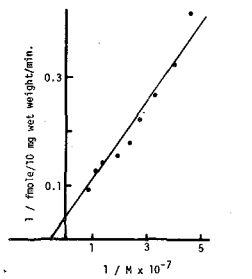


Fig. 6. Kinetic analysis of [^{3}H] (5-11) sP uptake into rabbit spinal cord slices

以上のようにして，中枢神経組織にとりこまれたトリチウムのうち (5-11)sP がどのくらい存在するかを知るために，とりこまれたトリチウムを抽出し，これを TLC で展開したのち，放射能活性を調べた(Fig.8)。

0°C 10 分間の incubation では，authentic (5-11)sP の Rf の位置に放射能活性が有意に検出できないのに対し，37°C 10 分間の incubation では，全放射能の 50～60% に相当する最も高い放射能活性が authentic (5-11)sP と同じ Rf 値を示した。しかしながら，低い Rf のところにも放射能の peak が認められた。この peak は，ここには示さなかったが，脳切片を用いた最初の実験においても同様にみとめられた。今後，この物質が何であるのか検討する必要がある。

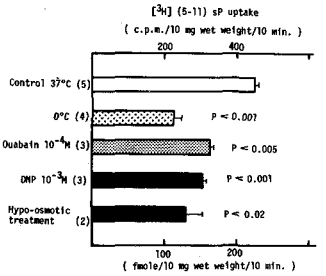


Fig. 7. Effect of temperature, metabolic inhibitors and hypo-osmotic treatment on [^{3}H] (5-11) sP uptake into rabbit spinal cord slices

[考察]

sP の伝達物質としての作用については，漸次明らかにされつつあるが，シナプス部での不活性化過程については，なお不明のままである。一般に，伝達物質のシナプス部での不活性化機構としては，1) 酵素的分解 2) 神経終末部およびグリア細胞への再とりこみ 3) シナプス間隙からの拡散 などが考えられる。このうち，1) については，2，3 の報告がみとめられるが，酵素の特異性や局在性，分解酵素か活性化型への変換酵素かなどが問題点として残されている。3) については，今のところ具体的な報告はない。

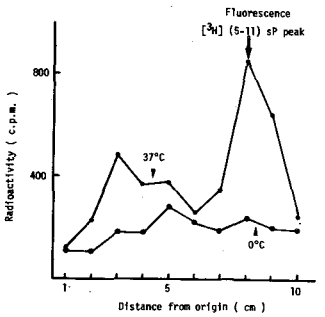


Fig. 8. Thin-layer chromatography of [^{3}H] (5-11) sP taken up into rabbit spinal cord slices

我々[3,4]は，すでに，sP 自体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報告した。しかしながら，今回の研究の結果 Glu-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2の(5-11)sPが，ラット脳切片，およびウサギ脊髄切片に温度・エネルギー依存性に能動的にとりこまれることを知った。ウサギ脊髄切片においては高親和性とりこみ機構のみがみとめられたが，ラット全脳切片では，高低両親和性のとりこみ機構が存在した。この差が，脳の部位別のとりこみ量の差によるものか，あるいは機能的な差によるものかは今後の検討にまたねばならない。0°Cでとりこまれたトリチウム活性の中には，(5-11)sPをほとんど認めず，一方，37°Cでとりこまれた活性の大部分は(5-11)sPであった。このことを考慮に入れれば，とりこみ機構の温度依存性はさらに大となる。なお，37°Cのincubationでは，他の代謝物の存在も観察された。

(5-11)sPは，モルモット回腸収縮作用においてsPよりも強い活性を示し[5]，受容体への[^{3}H]sPの結合をsPよりも強く抑制する[1]ことが知られている。一方，sPは神経組織内において酵素的に(5-11)sPに変換されることが報告されている[6,7]。これらのことを総合して考えると，神経終末部から遊離されたsPは，そのまま受容体に作用したのち酵素的に(5-11)sPに変換され，その後ニューロンまたはグリア細胞にとりこまれるかあるいは又，より活性の高い(5-11)sPとして作用したのちとりこまれるか，の2つの過程が考えられる。何れにしても，従来の伝達物質にはみられない，全く新しい不活性化過程の存在することを示唆する興味ある発見といえよう。

〔謝辞〕

本研究に用いた(5-11)sPを合成いただいた，京都大学　薬学部　矢島治明教授に感謝する。

本研究の一部は，文部省科学研究費 No. 304356 の補助を得て行なった。

〔文献〕

(1) Nakata, Y., Kusaka, Y., Segawa, T., Yajima, H. and Kitagawa, K. (1978) Life Sci. 22, 259-268

(2) Nakata, Y., Kusaka, Y. and Segawa, T. (1979) Life Sci. 24, 1651-1654

(3) Segawa, T., Nakata, Y., Nakamura, K., Yajima, H. and Kitagawa, K. (1977) Jap. J. Pharmacol. 26, 757-760

(4) Segawa, T., Nakata, Y., Yajima, H. and Kitagawa, K. (1977) Jap. J. Pharmacol. 27, 573-580

(5) Yajima, H., Kitagawa, K. and Segawa, T. (1973) Chem. Pharm. Bull. 21, 2500-2506

(6) Kato, T., Nagatsu, T., Fukasawa, K., Harada, M., Nagatsu, I. and Sakakibara, S. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 417-422

(7) Nakata, Y. and Segawa, T. unpublished

88 ラット中枢神経ＴＲＨ受容体の性状

小川紀雄・山脇泰秀・大藤　真
（岡大・医・Ⅲ内）

〔要　約〕

ラット中枢神経を受容体としてTRH radioreceptor assay（RRA）を確立したが，Kd値は5×10^{-9}Mと23×10^{-8}Mの２種が得られた。このＴRH－RRA系を用いてTRH受容体結合の性状について検討した結果，Li^{+}あるいはNi^{++}の存在により〔^{3}H〕－TRHの結合が著るしく小さくなることを明らかにした。アミン系，アミノ酸系およびペプチド系神経伝達物質（候補物質），神経ペプチドのうちACTH(1－18)とACTH(1－24)がそれぞれIC_{50}が6.5μMおよび3μMで〔^{3}H〕－TRH受容体結合を抑制した。しかも，ACTHの用量反応曲線はTRH標準曲線と完全に平行した。また三環系抗うつ剤およびbromocriptineもＴRH受容体結合を抑制したが，その用量反応曲線の傾斜はＴRH標準曲線のそれとやや異なった。

TRH受容体のラット中枢神経系における分布の検索では，脳のうち小脳には見出せないこと，更に従来全く報告のない脊髄に関する検討で，脳よりは低いが明らかなＴRH受容体の存在を認め，ことに脊髄腹側半分により多いことを明らかにした。またＴRH－受容体結合物をTriton X－100で可溶化し，Sepharose 6Bカラムを用いて分子量を決定することに成功したがＴRHと結合した状態でのＴRH受容体の分子量は約300,000であった。

下垂体からのTSH分泌を促進するホルモンとして視床下部から見出されたthyrotropin releasing hormone（ＴRH）は，脳のほとんどの部位に検出され，しかも脳のＴRH含量の2/3は視床下部外にあり(8)，また，脊髄のことに前角のmotoneuroneの周辺にも存在することが知られている（8，9）。ＴRHは当初知られた向下垂体作用に加えて，多彩な中枢神経作用を有することが報告されており（6，17），最近では小脳性運動失調症の症状改善をもたらすことが報告されている(16)。しかし，ＴRHの中枢神経作用の作用機序の詳細は不明な部分が多く，ことに中枢神経系の作用点である受容体（receptor：R）に関する文献的報告は我々の知る限りではわずかにBurt & Snyderの報告(1)をみるにすぎない。我々はＴRHの中枢神経作用機構の解明の一助としてＴRH radireceprorassayを確立し，ラット中枢神経系内のＴRH－Rの分布を未だ検索されたことのない脊髄を含めて検討した。また，神経伝達物質ならびにその関連物質，中枢神経作用薬および神経ペプチドの中枢神経ＴRH－R結合に及ぼす影響を検討した。更に，ＴRH－Rの可溶化を試み，分子サイズを決定し得たので併せて報告する。

方　法

(A) ＴRH radioreceptor assay（ＴRH－RRA）：すでに報告したopioid－RRAの方法(13)に準じて行った。すなわちＳＤ系雄ラット（体重200～250ｇ）を断頭屠殺し，すみやかに脳（小脳を除く）をとり出し，30容量の氷冷Tris buffer（50mM－Tris/HCl，pH 7.6）中でPolytron PT－10を用いてホモゲナイズし，50,000×Gで20分間遠沈，そのpelletをTris bufferで懸濁，次いで37℃の温浴中で30分間インキュベートし，再び50,000×Gで，20分間遠沈，そのpelletをおよそ30mg rat brain equivalent/mlとなるようにTris bufferで懸濁した。これをLowryらの方法(11)により蛋白量を定量し，3mg protein/mlとなるように調整してreceptor preparationとして使用した。その0.5mlと0.3mlのbacitracin（50μg/ml）－Tris buffer，0.1mlの試料，0.1mlの〔^{3}H〕－ＴRH（specific activity

115.0 Ci/m mol; 最終濃度 6.5×10^{-10} M) とを混じて氷中で3時間 incubate した。受容体結合型 tracer と遊離 tracer の分離には glass-fiber paper (Whatman GF/C) を用いる吸引濾過法を用いた(13)。10^{-4} M の TRH の存在下と非存在下での〔^{3}H〕−TRH の receptor preparation への結合を特異的結合 (specific binding：SB) とし，受容体結合能の指標とした。測定は triplicate で行ったが，そのバラツキは12%以下であり，結果はすべて平均値で示した。

(B) TRH 受容体結合に及ぼす陽イオンの効果：1価の陽イオンについては最終濃度が100 mM となるように，Na^+, K^+, Li^+ あるいは Rb^+ を，2価の陽イオンについては最終濃度が10 mM となるように Ni^{++}, Mn^{++}, Ca^{++} あるいは Mg^{++} を，いずれも Cl 塩として加え，陽イオンを添加しなかった場合を対照として SB の変化を比較検討した。

(C) TRH 受容体結合の薬理：表2に示すような神経伝達物質（候補物質）·その関連物質，中枢神経作用薬および神経ペプチドを最高1 mM となるように種々の濃度で4～6点で標準 TRH−RRA 系に入れ，〔^{3}H〕−TRH の受容体結合への阻害をみた。結果は log-probit analysis により tracer の結合を50%抑制する濃度(IC_{50})で表示した。

(D) TRH 受容体の中枢神経系における分布：Glowinski & Iverson の方法(4)に準じて表3に示すようにラット脳を8個の部位に分割した。また，脊髄（胸髄−腰髄）を取り出し前半部と後半部に2分した。分割した中枢神経各部位をそれぞれ(A)と同様の方法でホモゲナイズし，RRA の場合と同様の条件で遠沈しその pellet を用いて上記の TRH−RRA の手技を用いて〔^{3}H〕−TRH の特異的結合をみた。なお，この実験の際には，加える〔^{3}H〕−TRH の量を 1.6×10^{-9} M とした。

(E) TRH 受容体の可溶化と分子量の決定：ラット脳から P_2 分画をとり出し(3)，標準 TRH−RRA と同様の条件で incubate し，次いで1%の濃度となるように Triton X−100を加え，4°C で30分間スターラーで

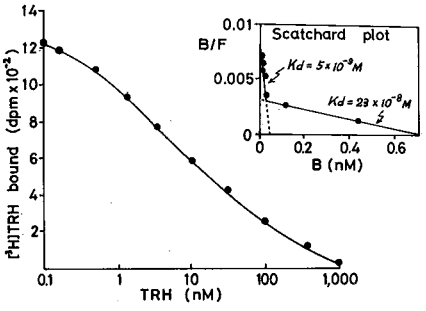


図1 Standard curve and Scatchard analysis of TRH radioreceptor assay.

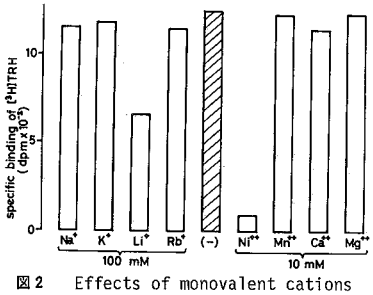


図2 Effects of monovalent cations and divalent cations on specific binding of [^{3}H]-TRH.

表2 Effects of Neurotransmitters and CNS-acting Drugs on the Specific Binding of [^{3}H]-TRH.

	IC_{50} (μM)
acetylcholine	*
p-chlorophenylalanine	*
5-HTP	*
imipramine	100
amitriptyline	100
dopamine	*
α-methyl-p-tyrosine	*
l-dopa	*
apomorphine	*
pimozide	*
haloperidol	*
chlorpromazine	*
bromocriptine	50
noradrenaline	*
adrenaline	*
GABA	*
glycine	*
taurine	*
l-glutamic acid	*
l-aspartic acid	*
diazepam	*
phenobarbital	*
LH-RH	*
somatostatine	*
MIF	*
ACTH (1-18)	6.5
ACTH (1-24)	3
substance P	*
β-endorphin	*
VIP	*
neurotensin	*

* no effect at 1 mM.

表1 Relative Potency of TRH-analogues.

	%
pGlu-His-Pro-NH_2 (TRH)	100
pGlu-His-Pro-NH_2·tartrate	100
	46
pGlu-His-Val-NH_2	0.2
pGlu-His-homoserine-lactone	< 0.0005
pGlu-His-NH-CH_3	< 0.0005
β-Ala-His-Pro-NH_2	0.005
GABA-His-Pro-NH_2	0.04
α-amino-isobutyric acid-His-Pro-NH_2	0.03
	0.05
Carbobenzyloxy-His-Pro-NH_2	0.013
	0.003
pGlu-His-Leu-NH_2	0.13

表3 Regional Distribution of TRH-receptor in Rat Central Nervous System.

	[^{3}H]TRH specifically bound (dpm/mg protein)
hypothalamus	2113 *
cerebral cortex	2022
hippocampus	1967
thalamus + midbrain	1579
olfactory bulb	1204
brain stem	1046
striatum	900
cerebellum	n. d.
spinal cord	
ventral half	685
dorsal half	256

* Values presented are the mean from 3 experiments, each conducted in triplicate.

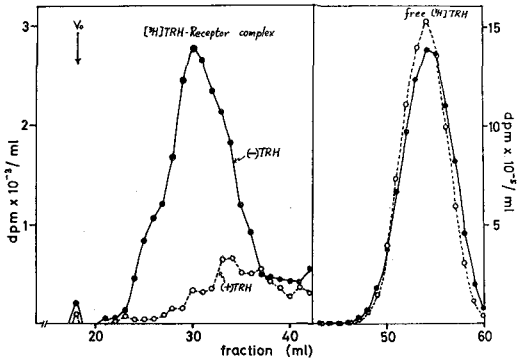


図3 Distribution of solubilized TRH-receptor complex after gel filtration on Sepharose 6B column.

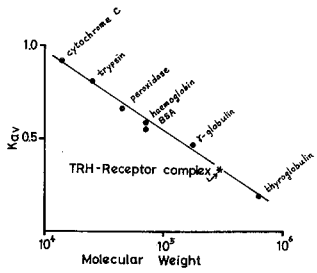


図4 Molecular weight determination of the TRH-receptor complex.

攪拌してTRH－受容体結合物を可溶化させた。次いでこの溶液を200,000×Gで60分間超遠沈し，上清の一部をScpharese 6B（1×70㎝）カラムに適用し，0.1％のTriton X－100を含む50mM －Tris／HCl buffer（pH 7.6）で溶出し，溶出液のうち 0.1 ml づつをカウンティングバイアルにとり，シンチレーターを入れβ－カウンターで放射能量を測定して溶出パターンを調べた。また，同様の条件で過量（100μM）の非標識TRHの存在下での実験を行い，得られたTRH－R分画がTRHによりdisplaceされることを確かめた。更に同一のカラムに7種のマーカー蛋白を適用してTRH－Rの分子量を決定した。

結　　果

1. TRH－RRAの基礎的検討

小脳を除く脳全体をホモジネートし，RRAを行った場合の標準曲線とScatchard plot (15) を図1に示す。〔^{3}H〕－TRHの結合を50％抑制するTRH濃度（IC_{50}）は8nMで，Kdは5×10^{-9}Mと23×10^{-8}Mの2つのaffinity constantが得られた。次にTRH analogueを用いて，構造－結合関係を検討し，比活性を算出した（表1）。この表から明らかなように本assay系はTRHに極めて特異的で，TRHの構造のうちC端側のproline－amideを失うと受容体結合能がほとんど失われた。

2. TRH－受容体結合に及ぼす陽イオンの影響

TRH－RRA系における陽イオンの効果を検討した結果（図2），1価の陽イオンのうちLi^+がTRH－受容体結合を減少せしめ，2価の陽イオンのうちではNi^{++}が著明にSBを減少させた。これらのSBの減少はScatchard analysis (15) によるとaffinity constantは不変で，受容体の数が減少していた。

3. TRH－受容体結合の薬理

表2に示す種々の物質のTRH受容体結合に及ぼす影響をみたところ，内因性物質としてはACTHのみが作用を示し，しかもその影響は用量反応性がありTRH標準曲線と完全に平行した。その他の内因性物質は検討

した限りでは影響がなかった。中枢神経作用薬のうち三環系抗うつ剤と bromocriptine が〔^{3}H〕－TRH 結合を用量反応的に抑制したが，TRH標準曲線とはやや slope を異にした。

4. ラット中枢神経系におけるTRH受容体の分布

上述のTRH－RRAの手技を用いて，ラット中枢神経系におけるTRH受容体の分布を検索した。表3に示すように，TRH受容体は視床下部，大脳皮質，海馬に比較的多量に検出されたが，その他の部位にも広く分布し，脊髄では背側半分より腹側半分に多く，小脳には検出されなかった。

5. TRH受容体の可溶化と分子量の決定

可溶化TRH・受容体結合物のSepharose 6Bカラムでの溶出パターンは図3のごとくで，single peakとして溶出され，過量の非標識TRHの存在下では〔^{3}H〕－TRHが結合し得ないことから，TRH－R分子であることがわかる。このTRH－R結合物は図4に示すように，各種の標準タンパクの溶出部位との比較から，分子量は約300,000であった。

考　按

以上のように，ラット脳神経細胞には高いaffinity constantを有するTRH－Rの存在することは明らかである。TRH analogue を用いた実験から受容体結合にはTRHのC端側のproline－aminde が重要であることが判明したが，下垂体のTRH受容体結合についても同じくC端側が重要であると報告されている（5，7）。

Li^+とNi^{++}の存在はTRH受容体結合を著しく低下させたが，これらのイオンの効果が生体内でTRH受容体の機能とどのように関係するかは今後の検討を待たねばならない。Li^+がうつ病の治療に使用されることと，TRHがうつ病の症状を改善するという報告（10，14）（無効であったという報告（2，12）もあるが）とを考えあわせると興味ある知見と考えられる。また三環系抗うつ剤もTRH－R結合に影響を示すことから，うつ病の病態生理にTRH－Rがあるいは一部関与しているかもしれない。

TRHは小脳性失調症状を改善する(16)と報告されているにもかかわらず，TRH－Rは小脳に検出されなかった。小脳失調症状が発現するためには，小脳自身のみならず小脳から視床，大脳皮質に到る神経路を考えねばならないので，TRHの効果は，小脳以外の中継核または更には上位の中枢にも作用する可能性が示唆される。また，脊髄前角細胞にTRHが作用する可能性も考慮する必要がある。

TRHの中枢神経受容体の分子サイズの報告は未だみられていないが，図3および図4からTRH受容体結合物の分子量は約300,000で，TRHの分子量は362で無視しうるほど小さいことから，これはTRH受容体の分子量と考えてもよいと思われる。

（本研究の一部は文部省科学研究費に依った。）

文　献

1) Burt, D.R. & Snyder, S.H. (1975) Brain Res., 93, 309.
2) Coppn, A., Montgomery, S & Peet, M. (1974) Lancet, 2, 433.
3) De Robertis, E., Pellegrino De Iraldi, A., Rodriguez De Lores Arnaiz, G. & Salganicoff, L., J. (1962) J. Neurochem., 9, 23.
4) Glowinski, J. & Iverson, L.L. (1966) J. Neurochem., 13, 655.
5) Grant, G., Vale, W. & Guillemin, R. (1973) Endocrinol., 92, 1629.
6) Guillemin, R. (1977) Recent Prog. Horm. Res., 33, 1.
7) Hinkle, D.M., Woroch, E.L. & Tashjian, A.H., Jr. (1974) J. Biol. Chem., 249, 3085.
8) Hökfelt, T., Fuxe, K. & Johansson, O. (1975) Europ. J. Pharmacol., 34, 389.
9) Hökfelt, T., Fuxe, K. & Johansson, O. (1975) Neurosience Leffers, 1, 133.
10) Kastin, A.J., Ehrensing, R.H. & Schalch, D.S. (1972) Lancet, 2, 740.
11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Blol. Chem., 193, 265.
12) Montjoy, C.Q., Price, J.S. & Weller, M. (1974) Lancet, 1, 958.
13) 小川紀雄，Friesen, H.G. (1978) 神経化学，17，153.
14) Prange, A.J., Jr., Wilson, I.C. & Lara, P.P. (1972) Lancet, 2, 999.
15) Scatchard, D. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660.
16) 祖父江逸郎 (1977) 臨床神経，17，791.
17) Wilber, J.F., Montoya, E., Plotnikoff, N.P., White, W.F., Gendrich, R., Renaud, L. & Martin, J.B. (1976) Recent Prog. Horm. Res., 32, 117.
18) Winokur, A. & Utiger, R.D. (1974) Science, 185, 265.

89 発達過程における脳のポリペプチド延長因子

村上一行・宮本侃治
(国立神経センター)

〔要約〕

発達過程におけるニワトリ脳のペプチド鎖延長因子を追跡し、ペプチド合成の調節機構への関与についても検討し、次の結果を得た。

1)脳のポリペプチド合成能は孵卵オ3週から急激に上昇し、孵化後オ2～5週でプラトーを示し、成鶏では減少傾向を示した。一方肝では孵化直後から急激な増加を続け、その合成能は脳に比して著名に高かった。また脳、肝のEF-1およびEF-2活性は発達に伴い増加するが、特にEF-2のそれが著しかった。

2)EF-1をSepharose 6Bカラムにより高分子量のEF-1Hと、低分子量のEF-1Lに分離し、発達過程に伴い追跡した。脳、肝ともに孵卵9日目ではEF-1Lが主成分をなすが、脳では孵卵オ3週目ごろから、肝では孵卵オ2週目からEF-1Hが出現した。ショ糖密度勾配遠心法により分子量を計測すると、EF-1Lは脳、肝ともに$5\text{-}6\times10^4$、EF-1Hは脳で$>10^6$、肝で約7×10^5であることを認めた。また上記のように発達の或時期からEF-1Hが増加してくるが、その分布は脳で10%以下、肝では30%以上であることを認めた。

3)脳のEF-1Hを、さらにGTP存在下でのDEAE Sephadexカラム、尿素存在下でのDEAEカラムなどにより精製し、EF-1bをSDSの単一バンドとした。EF-1bはそれ自身活性を示さないが、EF-1aに添加することにより、^{14}C-Pheのリボソーム結合、ポリ^{14}C-Phe合成、ヌクレオチド交換反応を数倍～十数倍に促進する作用を示すことを認めた。

脳のタンパク合成とその調節機構について、発達過程における変動を研究中である。これは脳発達障害の発現機序に関連する重要な因子の一つであると考えられるからである。今回はタンパク合成系の可溶性タンパク因子、特にポリペプチド延長因子(polypeptide elongation factor, EF)と脳発達の関係について報告する。EFの研究は principal 細胞(大腸菌)、数種の真核細胞(網状赤血球、肝、カイコ絹糸腺)について行われてきたが、脳についての研究は数少ない。[1][6]特に本研究で目指している発達過程脳における研究についての報告はない。ただアルテミア卵[7]、花粉[3]などで発生、生長過程におけるEFについての報告があるにすぎない。

EFにはaa-tRNA、GTPと共に作用し、リボソームのA部位にaa-tRNAを結合させるEF-1と、A部位に新しく生成されたpeptidyl-tRNAをP部位に転位(translocation)させるEF-2が存在する。またEF-1には分子量の大きいEF-1Hと、それの小さいEF-1Lが存在し、両者の存在様式がまちまちで、multiformを呈することも知られている。[6]このmultiformの様式が器官、組織差により異ることもあり、器官によるポリペプチド合成機能の差と、このEF-1Hが関連することも考えうることである。また他の真核細胞でEF-1Hのサブユニットが知られているが、脳の3種のサブユニットを今回初めて証明したことを併せ報告する。

材料および方法

白色レグホンの有精卵を38.5°C、湿度約90%で孵卵して、孵卵9、12、20日目の胚脳と、孵卵後1、2、3、5、36週の成鶏脳(いずれの脳も小脳、脳幹部を除く)を

主な実験材料として用いた。

1) 分画操作：ニワトリ胚の脳を2.5容の緩衝液A〔20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM Mg-acetate, 100mM NH_4Cl, 5mM 2-mercaptoethanol, 320mM ショ糖〕を用いてホモジナイズし、18,000×g、15分、更にその上清を120,000×g、90分の遠心を行った上清画分を得た。この上清画分より硫安30～80%飽和で沈殿したタンパク画分(S_{3-8})は、EF-1、EF-2、アミノアシルtRNA合成酵素を含む。別に120,000×g、90分の遠心による沈査、すなわちミクロソーム画分を100mM ショ糖を含む緩衝液Aでホモジナイズし、1.2% DOC処理後、2.0M、0.5M ショ糖勾配に重層し、120,000×g、16時間の遠心によりポリソームを沈殿として得た。このポリソームはEFなどの可溶性因子を完全に除去できず、さらに0.1mM puromycin処理によってモノソームを得た。このモノソームは80Sであることを確認し、EF測定のためにはすべてこのモノソームを用いた。

2) EF-1とEF-2の分離：上述のS_{3-8}画分を80mM K-phosphate buffer (KPB) (pH7.5)、2mM 2-mercaptoethanol、15%グリセロール溶液に溶解し、同緩衝液に対して透析して硫安を除去した後、hydroxyapatite (HA) カラムに吸着させ、KPB緩衝液を350mMまで直線的に増加することにより、EF-2、EF-1を順に溶出した。

3) $EF\text{-}1_H$と$EF\text{-}1_L$の分離：HAのEF-1画分を硫安65%飽和で沈殿させ、20mM Tris-HCl (pH7.5)、2mM 2-mercaptoethanol、50mM KCl、20%グリセロール溶液に溶解し、同緩衝液で平衡化したSepharose 6Bカラム(1.6×100cm)を用いてゲル口過を行い、$EF\text{-}1_H$と$EF\text{-}1_L$を分離した。同様操作は120,000×g、90分遠心の上清を、そのまま硫安80%飽和により沈殿させた画分を、同様にゲル口過する場合にも使用した。

4) ショ糖密度勾配遠心法：脳を100mM ショ糖を含む緩衝液Aでホモジナイズし、120,000×g、90分遠心の上清を試料とした。0.15M～0.6M ショ糖連続密度勾配液4.8mlに、試料200μlを重層後、250,000×g、3時間遠心した。遠心後、分画装置(日立)で表面から5滴づつ分画してEF-1活性を測定した。またこの方法により分離された各延長因子の分子量を標準試料と比較して推定した。

5) 各延長因子の活性測定

i) EF-1の測定：EF-1活性はpoly(U)依存性であるPhe-tRNAのリボソームへの結合活性により測定した。全容250μlの反応液B〔50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM $MgCl_2$、80mM KCl、2mM dithiothreitol (DTT)〕に、0.1μmole GMP-PCP (guanylyl methylene phosphate)、10～20pmole ^{14}C-Phe-tRNA (5.4×10^4μCi/pmole)、1～2 A_{260}モノソーム、10μg poly(U)、EF-1活性測定用試料を加え、37°C、15分反応させた。反応後メンブランフィルターで口過し、フィルターに残ったリボソーム結合の^{14}C-Phe-tRNAの放射能を測定した。この方法でGMP-PCPの代りにGTPを用いた場合、EF-2が混在するとポリフェニルアラニン合成が起こり、EF-1のみの活性が測定しがたい。ii) EF-2の測定：全容100μlの反応液Bに、85pmole ^{14}C-NAD (nicotinamide-U-^{14}C-ADP-dinucleotide, 3.0×10^4μCi/pmole)、5Lfジフテリア毒素、EF-2の測定試料を加えて37°C、15分反応させた。ジフテリア毒素とNADによって、EF-2が^{14}C-ADP-リボシル化されたものをメンブランフィルターにとり、その放射能からEF-2量を測定した。iii) ポリペプチド合成能：全容250μlの反応液Bに、i)と同様の^{14}C-Phe-tRNA、0.1μmole GTP、モノソーム、Poly(U)を加え、120,000×g、90分上清をそのまま測定試料とし、37°C、15分反応させた。反応後1mg卵白アルブミンと5% TCA 3mlを加え、90°C、10分加熱し、酸不溶性の^{14}C-poly-

Pheをガラスフィルターにとり、その放射能を測定した。

6)各延長因子の精製：i) HAで分離したEF-2は、DEAE Sephadex、CM Sephadexおよび Sephadex G-150により精製した。ii) Sepharose 6Bで分離したEF-1Lは、CM Sephadexにより精製した。iii) EF-1Hは、再びHAによって精製し、iv) EF-1bは、EF-1Hを0.4M NH_4Cl、0.1mM GTPで37℃、30分処理した後、25μM GTPで平衡化したDEAE Sephadexを用いて分離した[5]。さらにHAカラム、6M尿素存在下でのDE52カラムにより精製した[2]。v)これらの純度確認と、分子量測定にはSDSスラブ電気泳動[4]（12.5%アクリルアミド、400mA、2時間）を用いた。

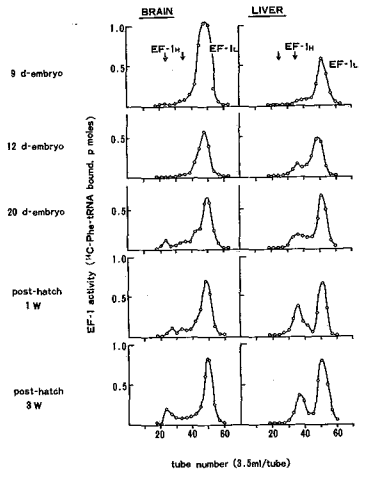


Fig 1. Developmental Changes in EF-1 (Sepharose 6B Chromatography)

結果および考察

1)ポリペプチド合成および各延長因子の発達過程における変化：脳あたりのポリペプチド合成能は、孵卵約3週から活発になり、孵化後2~5週でプラトーを示し、成鶏では低下する傾向を示した。一方肝ではポリペプチド合成能は孵化直後から急激に増加し続け、それは脳に比し著明に高かった。また脳、肝ともにEF-1とEF-2活性は発達過程とともに増大するが、EF-2のそれが著明であった。

2)EF-1の発達過程における変化：脳と肝のEF-1をSepharose 6Bを用いて分離した(Fig1)。脳ではすべての時期で、活性の約90%以上がMW5~6万の画分(EF-1L)として存在した。しかし孵卵20日胚以降の脳ではカラムを素通りする高分子画分EF-1H (MW100万以上)が認められるようになった。一方肝でも主ピークはMW5~6万の画分（EF-1L）であるが孵卵12日胚以後になるとMW約70万の画分（EF-1H）が急激に増加し、その分布は孵化後1週間で全活性の30%以上にもおよぶことが認められた。なお分子量の確認および量的分布の測定は、さらにショ糖密度勾配遠心法によって行われた。従来、幼若（生後2ヶ月）ラット脳で、他の器官と異なりEF-1活性のほとんどがEF-1Lとして存在し[1]、別に子牛脳には分子量100万以上のEF-1Hが存在するという報告[6]がある。またArtemia salinaの卵[7]では発生が始まると、また松花粉[3]では発芽が起こると、EF-1Hが減少しEF-1Lが増加することが報告されている。我々の結果では、発達の途中でEF-1Hが出現することを認め、また脳と肝のEF-1Hは分子量が異なることを認めた。

3)EFの精製：EF-1LをCM Sephadex C-50で精製を行い、SDS電気泳動で単一バンドを示し、分子量が54,000と算定されるものを得て、EF-1aとした。EF-1H活性中の核細胞のEF-Ts様タンパク質の精製を行った（Fig2，Fig3）。まずSepharose 6Bから得たEF-1Hを、0.4M NH_4Cl、0.1mM GTPで37℃、30分処理した後、GTP存在下でDEAE Sephadexカラム精製を行ったタンパク質（Fig2）は、SDS電気泳動で分子量50,000と27,000の2種類のバンドを含むことを認めた（Fig3）。次に6M尿素中でDE-52カラムクロマトグラフィを行い（Fig2）、分子量27,000でSDS電気泳動で単一バンドを示すタンパク質（Fig3）を得て、EF-1bと名づけた。またこの操作で分画される分子量50,000のタンパク質（Fig3）

をEF-1cと名づけた。

4) EF-1のサブユニットの機能：EF-1bは自らはEF-1a活性はまったく示さず、制限量のEF-1aに追加することにより、EF-1aのリボソーム結合活性を数倍に増加させることを認めた。さらにこのEF-1bは、EF-1aおよびEF-2で示すポリフェニルアラニン合成能を、十数倍に促進させ（Tab1）、またEF-1b·GDP$\xrightarrow{GTP}$EF1a·GTP+GDPというヌクレオチド交換反応をも促進させることを認めた。

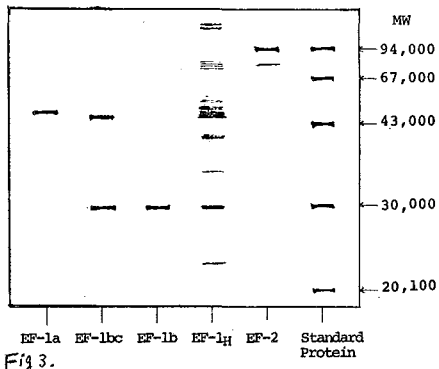
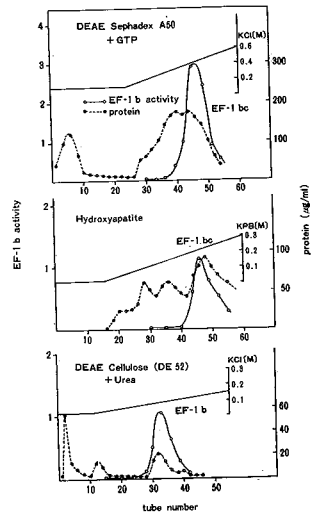


Fig 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified EFs

Fig 2. Purification of EF-1 b



脳のEF-1Hから精製されたEF-1bは機能上、寒核細胞のEF-Ts因子に相当するものと想定され、脳のEF-1のサブユニットについては、我々のニワトリ胚脳のEF-1a,b,cが最初の報告であると信ずる。また我々は脳や肝の発達に伴ってEF-1Hが増加することを認めたが、これはタンパク合成量が盛んで複雑になる時期に伴ってEF-1Hが増加することから、EF-1bを含むEF-1Hがポリペプチド合成系における調節機能を果し、変動していることを想定させる事実である。

Tab1. The accelerating activity of subunit EF-1 b

EF-1 a	EF-1 b	EF-2	polypeptide synthesized (pmole x 10^{-1})
a	b	+	67.2
a	-	+	3.5
-	b	+	0.3
a	b	-	0.5
a	-	-	0.1
-	b	-	0.2
-	-	+	0.3

Each 60 ng, 250 ng and 10 μg protein of EF-1 a, EF-1 b and EF-2 were added into 250 μl of reaction mixture, which contains 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 5 mM $MgCl_2$, 80 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 10-20 pmoles ^{14}C-Phe-tRNA (5.4 x 10^{-4} μCi/pmole), 0.4 mM GTP, 10 μg poly(U) and 1-2 unit (A_{260}); and incubated at 37°C for 30 minutes. The assay of polypeptides synthesized was in the text.

文献

(1) Bolla, R., Weissbach, H. and Brot, N. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 166, 683

(2) Ejiri, S., Murakami, K. and Katsumata, T. (1977) FEBS Lett. 82, 111

(3) Ejiri, S., Nunomiya, M. and Katsumata, T. (1976) Agr. Biol. Chem. 40 (2), 1227

(4) O'Farrell, H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007

(5) Iwasaki, K. Mizumoto, K. , Tanaka, M. and Kajiro, Y. (1973) J. Biochem. 74, 849

(6) Moon, H.M., Redfield, B., Millard, S., Vane, F. and Weissbach, H. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3282

(7) Slobin, L.I. and Möller, W. (1975) Nature 258, 452

90 神経細胞における10nmフィラメント(ニューロフィラメント)の単離，精製とその蛋白構成

森　　啓・黒川正則
(東大・医・脳研)

〔要約〕

ラット末梢神経の粗抽出液から、蔗糖密度勾配遠心法によって、1.0M/2.2Mの蔗糖液界面にニューロフィラメントを回収することに成功した。この精製ニューロフィラメントについて以下の知見を得た。

1) 精製ニューロフィラメントは分子量200K、160K、68Kの3種類のポリペプチド(トリプレット)から構成されている。これらのポリペプチドの量比は200K：160K：68K＝2：3：6であり、68Kのポリペプチドが主成分である。

2) ニューロフィラメントの形態は直径10nmの枝分れのない円筒構造であり、直線状あるいは曲線状をなす。外壁に側枝は見当らない。ニューロフィラメントは、少なくとも2～3本のプロトフィラメントから構成されているように見える。

3) トリプレットは重合型(ニューロフィラメント)と非重合型の2型で存在し、両者間の相互変換が推定される。

4) ヴィンブラスチンはニューロフィラメントに作用する。しかしその作用様式は、ウェーブリンの場合に示されたような特異的なものでなく、アクチンやアルブミンの場合のように非特異的なものであると考えられる。

ニューロフィラメントは神経細胞における顕著な細胞骨格構造であり、その蛋白構成と機能について、近年多くの関心と議論がよせられている。[2] 軸索流の内容物の検討から、Hoffman & Lasekは分子量212K、160K、68Kの3種類のポリペプチド(トリプレット)がニューロフィラメントであると推定した。[4] この推定は、分岐軸索における軸索流の研究、[7,8,9] 抗体を用いた実験、[12] 変性神経の解析、[14] β,β'-イミノジプロピオニトリル(IDPN)[3] や$AlCl_3$[15] の薬剤を用いた実験により支持されている。一方ニューロフィラメントの精製が試みられた[6,13]が、得られたニューロフィラメント分画にはトリプレット以外に分子量50－60Kのポリペプチドが含まれており、*in vivo*の知見とは一致していない。

本研究では、ニューロフィラメントを精製し、その構成蛋白質がトリプレットであることを確定した。[10] またトリプレットが非重合型で存在する可能性について報告する。

材料と方法

1) ニューロフィラメントの抽出

Schlaepferの方法[12]に準じた。ウィスター系ラット(体重400－450g)の末梢神経を、10mM Tris・HCl、1mM EDTA，pH 7.2の中で伸張処理した後に、カミソリで細かく切り刻む。20,000g，30分の遠心上清に1/10容の1.1M NaClを加えた後に再度遠心をし、得られる上清を神経抽出液とする。

2) ニューロフィラメントの精製

神経抽出液を蔗糖密度勾配(0.5M、1.0M、2.2M；蔗糖液は10mM PIPES、100mM

NaCl、1mM EDTA，pH 6.85の緩衝液で調製する）にかけ、200,000g，75分の超遠心を行う。ニューロフィラメントは1.0M/2.2Mの界面に回収される。精製ニューロフィラメントは少なくとも10日間は4℃で保存できる。

3) 電子顕微鏡観察

試料は5%ホルマリンで約1時間固定した後に、1.5%酢酸ウランによりネガティヴ染色をほどこした。

4) SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmliの方法[5]に準じた。[9]

5) 蛋白質の定量

BSAを標準蛋白質として用い、アミドシュワルツ・フィルター法[11]によった。

結果および考察

1) ニューロフィラメントの精製

神経抽出液には無数のニューロフィラメントと少量の膜断片・無定形凝集物が含まれている。蔗糖の不連続密度勾配遠心の結果、ニューロフィラメントは1.0M/2.2Mの蔗糖液界面に集まる。膜断片および可溶性蛋白質は0.5Mの上清分画として回収され、蔗糖溶液中には沈降しない。

2) ニューロフィラメントの電子顕微鏡像

ニューロフィラメントは直径が10nmの枝分れのない円筒状の繊維構造をしている（図1）。高倍率における観察で1本のニューロフィラメントの中に少なくとも、2－3本のプロトフィラメントが存在することが認められる。ニューロフィラメントと微小管は外径の大きさが異なるばかりでなく、その形状もまた異なる。すなわち、微小管が比較的直線状であるのに対し、ニューロフィラメントは曲線状になる場合もある。さらに微小管は酢酸ウランを用いたネガティヴ染色で直接に観察されるが、ニューロフィラメントの観察には5%ホルマリンによる固定が必要である。このことからニューロフィラメントと微小管では、その安定性に相違があることが推定される。

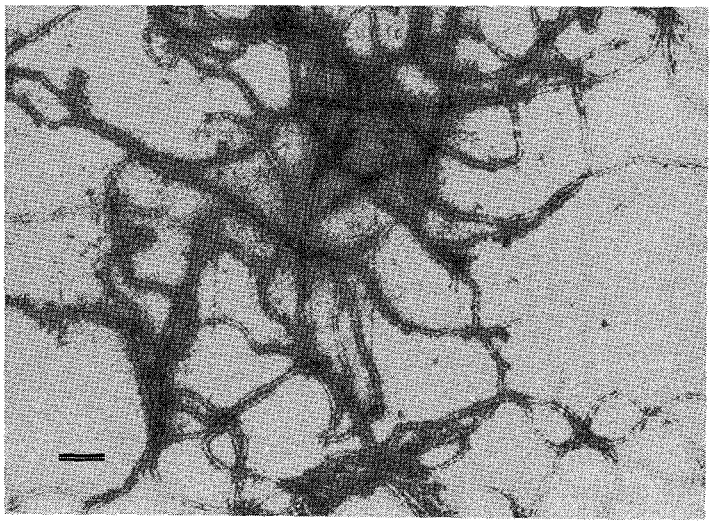
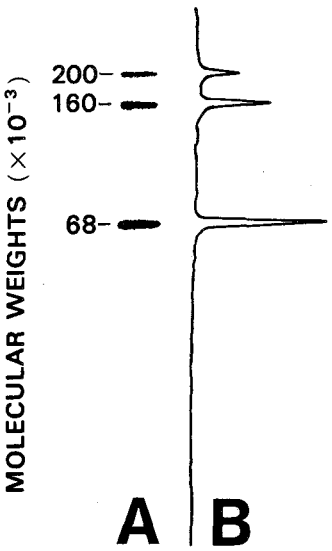


図1. ニューロフィラメントの電子顕微鏡像
精製ニューロフィラメントの酢酸ウランを用いたネガティヴ染色像（左下のスケールは0.1μを示す）。

3) SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるニューロフィラメント蛋白の解析



精製ニューロフィラメントは分子量200K、160K、68Kの3種類のポリペプチド（トリプレット）のみから構成されている（図2A）。 3種類のポリペプチドは、200K：160K：68K＝2：3：6の割合で存在している（図2B）。 この値はin vivoの実験である軸索流の内容物を個別に定量化[8,9]した結果（200K：160K：68K＝2：3：8）とよく一致しており、68Kのポリペプチドが主成分であることが重ねて証明された。 200Kと160Kのポリペプチドがニューロフィラメントの構成蛋白質か付随蛋白質であるのかはなお残された問題であり、さらに検討中である。

図2. 精製ニューロフィラメントの電気泳動像
A. クーマッシー・ブリリアント・ブルーR250による蛋白質染色像。
B. Aをスキャンしたもの。

4) トリプレットの重合型と非重合型

蔗糖密度勾配遠心後の、0.5M上清分画にはニューロフィラメントが検出されないにもかかわらず、その電気泳動像はトリプレットを含む。 これらの結果から、0.5M上清分画に含まれるトリプレットは非重合型として存在していると考えられる。 非重合型トリプレットの存在は、非重合型と重合型間の相互変換に直結する重要な問題である。

5) ニューロフィラメントとヴィンブラスチンの相互作用

ニューロフィラメントとヴィンブラスチンの共存下で37℃に加温すると白濁し、4℃に冷却するとこの白濁は消失し、再び透明になった。この反応は少なくとも10回はくり返えすことができる（図3）。電子顕微鏡観察では、加温中は電子密度の高い凝集体が認められた。また冷却した場合、再びもとと同じ繊維構造が観察された。 また低速遠心では上清に分画されるニューロフィラメントがヴィンブラスチンによって沈殿として分画された。ヴィンブラスチンが低い濃度（1mM以下）では作用しないことから、ニューロフィラメントとの相互作用は微小管の場合に報告されているような特異的な

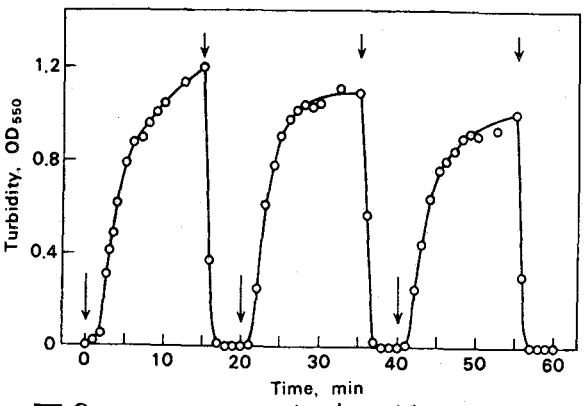


図3. ニューロフィラメントとヴィンブラスチンの相互作用 （長い矢印と短かい矢印は各々加温、冷却の始まりを示す）。

ものでなく、アクチンやアルブミンの場合のように非特異的なものと考えられる[1,16]。

1) Bhattacharyya, B. & Wolff, J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2375-2378.
2) Gilbert, D. (1978) Nature 272, 577-578.
3) Griffin, J.W., Hoffman, P.N., Clark, A.W., Carroll, P.T. & Price, D.L. (1978) Science 202, 633-635.
4) Hoffman, P.N. & Lasek, R.J. (1975) J. Cell Biol. 66, 351-366.
5) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
6) Liem, R.K.H., Yen, S.-H., Salomon, G.D. & Shelanski, M.L. (1978) J. Cell Biol. 79, 637-645.
7) Mori, H., Komiya, Y. & Kurokawa, M. (1977) Proc. Japan Acad. 53, Ser. B. 252-256.
8) 森 啓, 小宮 義璋, 黒川 正剛 (1978) 神経化学 17, 269-272.
9) Mori, H., Komiya, Y. & Kurokawa, M. (1979) J. Cell Biol. 82, 174-184.
10) Mori, H & Kurokawa, M. (1979) Cell Structure & Function 4, 163-167.
11) Schaffner, W. & Weissman, C. (1973) Anal. Biochem. 56, 502-514.
12) Schlaepfer, W.W. (1977) J. Cell Biol. 74, 226-240.
13) Schlaepfer, W.W. & Freeman, L.A. (1978) J. Cell Biol. 78, 653-661.
14) Schlaepfer, W.W. & Micko, S. (1978) J. Cell Biol. 78, 369-378.
15) Selkoe, D.J., Liem, R.K.H., Yen, S.-H. & Shelanski, M.L. (1979) Brain Res. 163, 235-252.
16) Wilson, L., Bryan, J., Ruby, A. & Mazia, D. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 807-814.

91 分離ニューロンにおける細胞骨格タンパク質の合成

中山　孝・黒川正則
（東大・医・脳研）

〔要　約〕

生後10－12日のラット脳よりニューロンの細胞体を分離しin vitroで、タンパク質の合成をおこなわせた。〔^{35}S〕－メチオニンでラベルしたタンパク質を、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動と二次元電気泳動により分析し、次の結果を得た。

1) 可溶性タンパク質として、細胞骨格タンパク質である分子量43Kのアクチン、55Kと53Kのα－およびβ－チューブリン、68Kのニューロフィラメントの成分が主要な合成タンパク質であった。

2) 合成されたニューロンのアクチン、チューブリンにheterogeneityのあることが二次元電気泳動によって示される、したがって脳のアクチン、チューブリンに見られるheterogeneityは、脳を構成している細胞の多様性のためではない。

3) チューブリンの二次元電気泳動で、膜結合性のチューブリンは等電点ゲル内に入ることができず、なんらかの修飾をうけていることを推定させる。

4) 軸索のニューロフィラメントを構成する200K、160K、68Kの3成分のうち、細胞体では68K成分のみが多く合成されており、他の2成分の合成は少ない。

---

in vivoにおける速い軸索流の内容物の解析によって、分子量43Kのアクチン、55Kと53Kのチューブリン、200K、160K、68Kのニューロフィラメントの3成分が、主要なポリペプチドであることが明らかにされた。[7]

これらの細胞骨格タンパク質の代謝動態を調べるために、ラット脳よりニューロンの細胞体を分離し、タンパク質合成をおこなわせた。〔^{35}S〕－メチオニンによって、ラベルしたタンパク質をSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動と二次元電気泳動によって分析して得られた知見を報告する。

材料と方法

1. 細胞の分離

生後10－12日のラット脳をカミソリで細切したのち、0.025％のトリプシンを含む0.32Mショ糖、0.5％BSA、20mMグルコース、20mM HEPES（pH 7.4）中で15分間37℃で処理して組織をほぐす。遠心したのちトリプシンインヒビターを加えトリプシンを不活性化する。そしてナイロンメッシュ、ステンレスメッシュで沪過して組織を完全にほぐし細胞懸濁液を得る。それをショ糖不連続勾配上に重層し、遠心によって神経細胞を回収した。細胞はEarle's BSS－20mM HEPES（pH 7.4）で洗ったのち懸濁した。

2. タンパク質合成

Earle's BSS－20mM HEPESに懸濁した細胞を50－60μCiの〔^{35}S〕－メチオニンとともに60分間37℃で振盪してタンパク質合成をおこなわせた。細胞を洗ったの

ち，テフロンホモジェナイザーによりホモジェナイズし，12,000 g 15分間の遠心をおこなった。回収した上清と沈渣を超音波により30秒間処理したのち，蒸留水に対して透析した。タンパク質合成の時間経過をしらべるために，細胞を1 μCiの，[^{35}S]-メチオニンとともに振盪し，各時間ごとにTCAを加えて反応を停止させて，メンブレンフィルターの上にタンパク質を集め放射活性を測定した。

3. 電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmli[4]の系に従って10%のポリアクリルアミドスラブゲルをもちいて泳動した。

二次元電気泳動はO'Farrell[8]の原法を改良した方法を用いた。凍結乾燥したサンプルをNP-40のかわりに1%のSDSを含む等電点電気泳動用のサンプルバッファーに溶かして一次元目の電気泳動をおこない，続いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなった。放射活性はフルオログラフィーによりX線フィルム上で検出した[11]。

実験結果

1. 分離細胞の形態

トリプシンの濃度を下げ(0.025%)，作用させる時間を短くしても，形態的には，従来から報告されている神経細胞とよく似た細胞を分離することができた[10]。時折毛細血管や裸核の混入がみられるが，大部分が神経細胞である。

2. タンパク質合成の時間経過

図1に示すように，最初の30分まで直線的にタンパク質の合成がおこっており，その後90分まで合成の上昇がみられた。タンパク質合成阻害剤の影響をしらべたところ，シクロヘキシイミドでは合成の活性が45~50%に低下し，またクロラムフェニコールではほとんど影響が認められなかった。

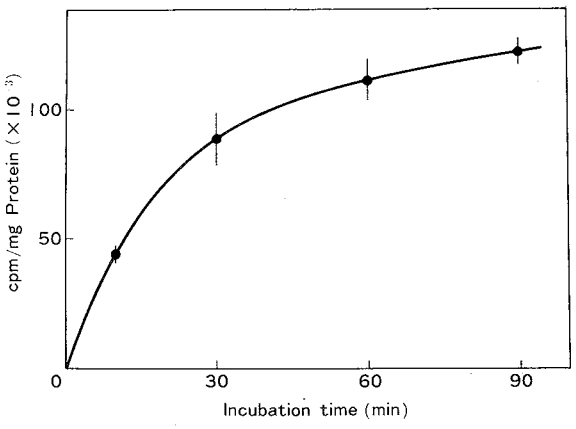


図1. タンパク質合成の時間経過

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

神経細胞が合成するタンパク質のうち，全体の放射活性の約30%が可溶性タンパク質として回収された。図2が合成された可溶性タンパク質と膜タンパク質のフルオログラムである。

合成されたタンパク質のうち分子量43K，53K，55K，68K，85Kのタンパク質が可溶性タンパク質の主要なバンドで，43Kはアクチンに，55Kと53Kはチューブリンのα，βサブユニットに，そして68Kはニューロフィラメント・トリプレットの主要成分にそれぞれ対応している。

また膜タンパク質においては，アクチンとチューブリンは主要なバンドとして認められるが，68Kのニューロフィラメントの成分は可溶性にくらべて，減少している。

4. 二次元電気泳動

アクチンとチューブリンが，二次元電気泳動でも主要なスポットである。（図3）
またアクチン，チューブリンには heterogeneity が認められる。可溶性チューブリンとは異なり，膜に結合しているチューブリンは（図2－B），等電点ゲル内には入らなかった。

SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動では，可溶性タンパク質と膜タンパク質の間で大きく違うバンドはわずかであったが，二次元電気泳動の泳動パターンでは，明瞭な差が認められた。

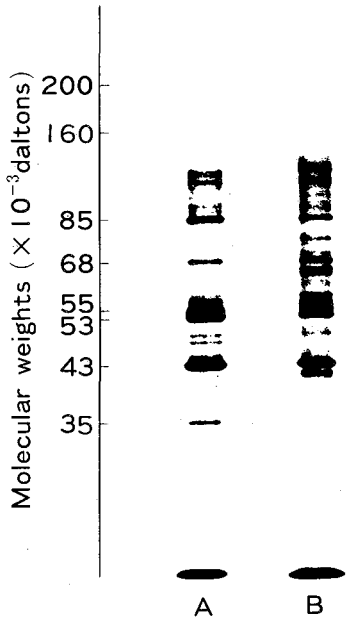


図2. SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動図
A：可溶性タンパク質
B：膜タンパク質

考察

脳から分離した細胞をもちいてタンパク質の研究をおこなう時に，混入物の影響が問題となるが，分離細胞にタンパク質の合成をおこなわせ，その合成産物を分析することにより混入物を影響を除くことができる。ニューロン細胞体の内在タンパク質の電気泳動による染色パターンと，新しく細胞体によって合成されたタンパク質のオートラジオグラフィのパターンはよく一致しており，分離細胞でのタンパク質合成は，in vivo の状態をよく反映していると考えられる。

合成されるタンパク質は，アクチン，チューブリン，ニューロフィラメントの68K成分など細胞骨格タンパク質が主体であり，in vivo の軸索流の解析で得られた結果と一致する。[7]

軸索のニューロフィラメントは200K，160K，68Kの3つのポリペプチドから構成されることが強く推定されているが，[3] 細胞体では68K成分のみが，多く合成されており，ニューロフィラメントの重合を考える上で重要な点である。

脳のアクチン，チューブリンには heterogeneity があることが知られているが，[2,5,6,9] これは分離したニューロンでも認められ，したがって脳を構成する細胞の多様性が，heterogeneity の原因ではないことが示される。
また膜結合のチューブリンはSDSで可溶化されているにもかかわらず，二次元電気泳動の等電点ゲル内に入ってこない。これは膜結合のチューブリンが，なんらかの修飾をうけていることを強く示唆する。

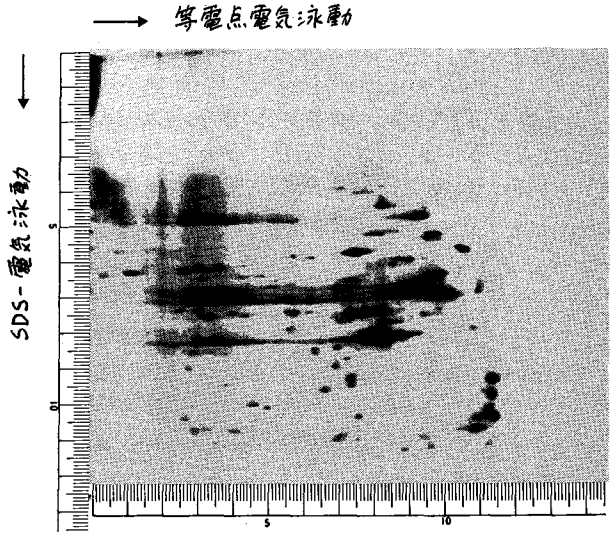


図3. 可溶性タンパク質の二次元電気泳動パターン

参考文献

1) Bonner,W.M. and Laskey,R.A. (1974) Eur.J.Biochem. 46 83-88

2) Gozes,I. and Littauer,U.Z. (1979) FEBS Lett. 99 86-90

3) Hoffman,P.N. and Lasek,R.J. (1975) J.Cell Biol. 66 351-366

4) Laemmli,U.K. (1970) Nature 227 354-358

5) Marotta,C.A.,Harris,J.L. and Gilbert,J.M. (1978) J.Neurochem. 30 1431-1440

6) Marotta,C.A.,Strocchi,P. and Gilbert,J.M. (1978) J.Neurochem. 30 1441-1451

7) Mori,H.,Komiya,Y. and Kurokawa,M. (1979) J.Cell Biol. 82 174-184

8) O'Farrell,P.H. (1975) J.Biol.Chem. 250 4007-4021

9) Palmer,E. and Saborio,J.L. (1978) J.Biol.Chem. 253 7482-7489

10) Raine,C.S.,Poduslo,S.E. and Norton,W.T. (1971) Brain Res. 27 11-24

92 コルヒチンによるチューブリン輸送の選択的阻害

小宮義璋・黒川正則
（東大・医・脳研）

〔要約〕
1). ラット第5腰髄神経節をL-[^{35}S]-メチオニンでラベルし，遅い流れの主要構成成分であるニューロフィラメント・トリプレット，チューブリン，アクチンの輸送に対するコルヒチン，ヴィンブラスチン，サイトカラシンDの影響を調べた。
2). コルヒチン（4μg）は，チューブリンの輸送を選択的に阻止するが，ニューロフィラメント・トリプレット，アクチンの輸送には影響を与えない。またこの投与量では，神経節における蛋白およびチューブリンの生合成を阻害しない。
3). ヴィンブラスチン（4μg）は，ニューロフィラメント・トリプレット，チューブリン，およびアクチンの輸送を無差別的に阻害する。
4). サイトカラシンD（1μg）は遅い流れに影響を与えない。
5). 以上の観察結果から，軸索内繊維系の間の相互作用と，遅い軸索流の輸送機構について考察を加える。

軸索内輸送は，下行性輸送も上行性輸送も，また速い流れも遅い流れもコルヒチンによって阻害される[2]。しかし阻害の受け方は一様ではなく，遅い流れの場合には，程度の差はあっても必ず阻止されないで残る部分の存在が知られている。一方速い流れに関しては，ほぼ完全に阻止されるという報告と，遅い流れより阻害を受けにくいという報告とが対立している。[3),4)]

遅い軸索流ではこばれる蛋白の約80%が，ニューロフィラメント蛋白（トリプレット：分子量200,000，160,000，68,000の3種のポリペプチド），微小管蛋白（α-，およびβ-チューブリン：分子量56,000および53,000）およびアクチン（分子量43,000）によって構成されていることはすでに報告した。[7),8),9)] コルヒチンは，これら遅い軸索流を構成する6種のポリペプチドのうち，α-，およびβ-チューブリンの輸送を選択的に阻害するが，ヴィンブラスチンは全ての輸送を阻害することを以下に報告する。

材料と方法

1). 動物および神経組織の処理：ウィスター系ラット（雄，9週令，体重約250g）の第5腰髄神経節（L_5）をエーテル麻酔下に露出し，L-[^{35}S]-メチオニン200μCi（0.4μl）を注入した。コルヒチン4μg（0.2μl），ヴィンブラスチン硫酸塩4μg（0.25μl），およびサイトカラシンD 1μg（0.2μl）をアイソトープ注入の約10分前に一側の神経節に投与し，対側には同量の溶媒を注入して対照とした。注入後4～28日で断頭し，坐骨神経，L_5神経節，後根をとり出し，3mmの連続小片に切断した。

各小片は，200μl の試料緩衝液（2.3% SDS, 10% グリセロール，5mM β-メルカプトエタノール，62.5mM トリス-HCl, pH 6.8）でホモジェナイズし，遠心後上清を分析した。[6]

2). 電気泳動，フルオログラフィー，および定量：試料の一部（50μl）は放射活性を測定し，他の一部（20μl）は2小片分を合わせた上で電気泳動とした後，更にフルオログラフィーにより泳動像を得た。またのこりの一部を中脳核，および末梢核ごとに合わせて電気泳動し，染色後ポリペプチドバンドを切り出し，対応する放射能を測定した。[6]

3). 神経節におけるアミノ酸のとり込み：上記と同様にコルヒチンおよび L-[^{14}C]-ロイシン 0.8μ Ci（0.2μl）を投与後 15分～24時間で神経節をとり出し，400μl の試料緩衝液でホモジェナイズ，遠心後上清の一部（20μl）で全放射能を測定，他の一部（30μl）で酸可溶性および酸不溶性分画の放射能を測定した。のこりの一部（200μl）は電気泳動後染色し，各バンドの放射能を測定した。[6]

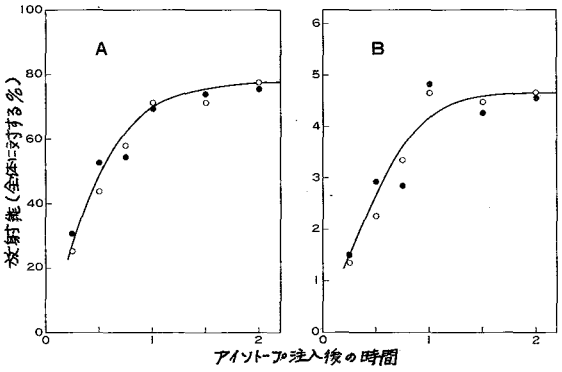


図1　L_5 神経節におけるアミノ酸の酸不溶性分画，およびチューブリン分画へのとり込みに対するコルヒチンの影響.
A：酸不溶性分画，B：チューブリン分画
○：対照群，●：コルヒチン処理群.

表1　チューブリン合成に対するコルヒチンの影響

	チューブリン/トリプレット	チューブリン/アクチン
対照群	0.88 ± 0.02 (9)	1.43 ± 0.05 (9)
コルヒチン処理群	0.86 ± 0.06 (9)	1.41 ± 0.03 (9)

平均値 ± 標準誤差（実験数）

結果と考察

1). コルヒチンは神経節におけるチューブリンの生合成を阻害しない。図1および表1に示すようにコルヒチンは神経節におけるアミノ酸の酸不溶性分画およびチューブリン分画へのとり込みに影響を与えない。神経節にはニューロン以外にグリア細胞も存在しているが，ニューロンの蛋白合成は，グリア細胞のそれより速いので[5]，図1に見るとり込みの時間経過のうち，早い時期の部分は主としてニューロン性の蛋白合成を反映していると考えられる。

コルヒチンにより神経節でのチューブリン合成は影響を受けず，しかも図2，3Bに示すように軸索内輸送によってニューロン細胞体より軸索内へ輸送される量がコルヒチンにより減少するならば，神経節にチューブリンの蓄積がおこる筈である。しかし神経節のチューブリンを時間を追って定量した結果，蓄積は認められなかった。こ

れはコルヒチンと結合して重合し得なかったチューブリンは，ニューロン細胞体ですみやかに処理されることを示していると考えられる。

2). コルヒチンはチューブリンの輸送を選択的に阻害する。コルヒチンは遅い輸送を約30～50%阻止する（図2）。これは主としてチューブリン輸送の選択的阻害による（図3および表2）。これに対してヴィンブラスチンによる阻害は約70%に達し，ほぼ全ての構成成分の輸送が阻止される（図2）。サイトカラシンBは，遅い流れに影響を与えない。

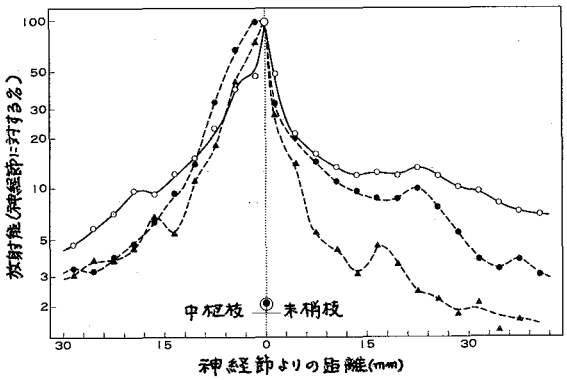


図2　遅い流れに対するコルヒチンおよびヴィンブラスチンの影響
○—○：対照群，●- -●：コルヒチン処理群，▲- -▲：ヴィンブラスチン処理群
縦軸：放射能＝$\frac{\text{神経小片(3mm)の放射能}}{\text{神経節の放射能}} \times 100(\%)$

表2　チューブリン輸送に対するコルヒチンの影響

	中枢核	末梢核
	チューブリン／トリプレット	
対照群	1.20 ± 0.02*	1.43 ± 0.03*
コルヒチン処理群	0.72 ± 0.05	0.71 ± 0.07
	アクチン／トリプレット	
対照群	0.57 ± 0.05	0.45 ± 0.01
コルヒチン処理群	0.67 ± 0.07	0.43 ± 0.05

平均値±標準誤差（n=4）：*は統計的に有意（P<0.01）を表す。

しかし，コルヒチンで処理した神経でも，チューブリンの一部は対照群とほぼ同じ程度の速度で輸送されている（図3B）。これに対しては次のような解釈が可能である。第一に，コルヒチンの作用発現には時間のかかることが知られている[10]ので，アイソトープ注入10分前にコルヒチンを投与したのではその抑制作用は充分に発現されない可能性がある。第二に，in vitroではコルヒチンに対して抵抗性を異にする微小管の重合状態が知られている[11]ので，in vivoでもコルヒチンの作用を受けにくい微小管が存在しているかもしれない。第三に，坐骨神経知覚繊維には有髄神経と無髄神経が混在しているので，これらの間にコルヒチンに対する抵抗性に差があるのかもしれない。実際に電子顕微鏡による観察では，無髄繊維のほとんどには変性をおこしているから，有髄繊維の変性は一部のものに限られている。

コルヒチンはニューロフィラメント構成蛋白であるトリプレットの輸送には影響を与えない（図3B）。またアクチンの輸送も影響を受けない（図3B）。このことは，軸索内でニューロフィラメント，微小管，アクチンが各々独立して移動することを示すもので，従来の推測とは違って遅い軸索流の機構が単一ではない可能性を示唆す

る。

参考文献

1) Haga, T. & Kurokawa, M., Biochim. Biophys. Acta, 392, 335-345(1975).

2) Hanson, M. & Edström, A., Int. Rev. Cytol., Suppl. 7, 373-402(1978).

3) James, K.A.C., Bray, J.J., Morgan, I.G. & Austin, A., Biochem. J., 117, 767-771(1970).

4) Karlsson, J.-O., Hansson, H.-A. & Sjöstrand, J., Z. Zellforsch., 115, 265-283(1971).

5) Koenig, H., J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 785-792(1958).

6) Komiya, Y. & Kurokawa, M., Brain Res., in press.

7) 森 啓, 小宮義璋, 黒川正則, 神経化学, 17, 269-272(1978).

8) Mori, H., Komiya, Y. & Kurokawa, M., Proc. Japan Acad., 53B, 252-256(1977).

9) Mori, H., Komiya, Y. & Kurokawa, M., J. Cell Biol. 82, 174-184 (1979).

10) Paulson, J.C. & McClure, W.O., J. Cell Biol., 67, 461-467(1975).

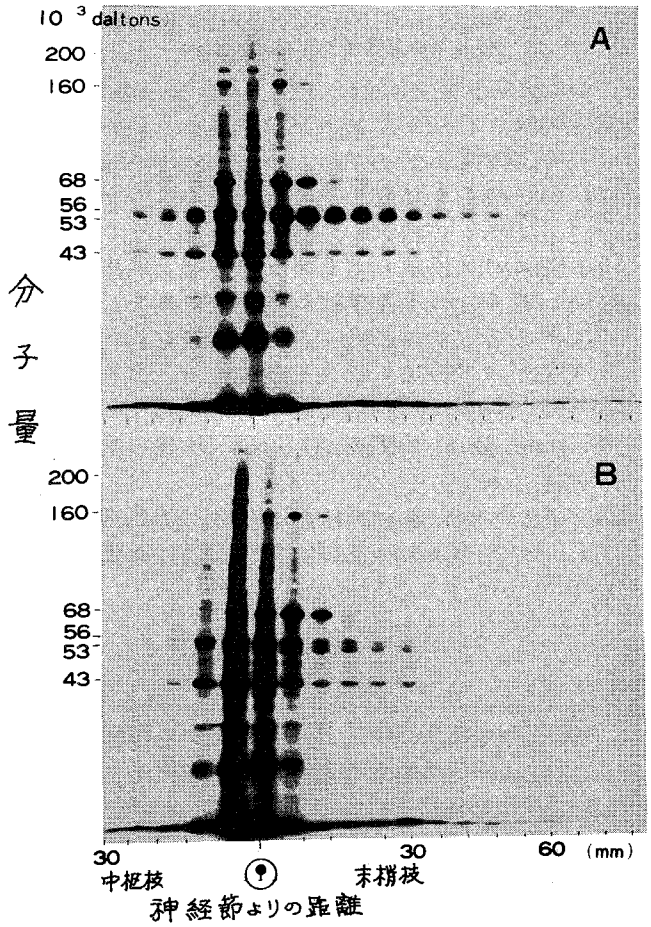


図3 遅い流れを構成するポリペプチド成分に対するコルヒチンの影響.

93 Neurofilament構成成分の蛍光抗体法による脳内分布状態の検討とAlzheimer原線維変化との関連について

羽賀誠一・石井　毅・徳武　哲
(都精神研)

〔要　約〕

1) 牛脳白質より，Yen，Liemらの myelinated axon を遊離する方法に基づき粗neurofilament 標品を調製，この中に含まれる分子量200,000，160,000，68,000 の三成分と，分子量50,000 の成分を Sepharose-6Bカラムを用いたゲル口過法により分画した。

2) 両画分の抗体を兎を用いて作製．抗体の特異性をOuchterlony法により検討したところ，両画分は免疫学的に特異性があり，免疫学的交叉反応はあまり見られなかった。

3) 両画分の抗体を用いて，ラットおよびマウスの脳，脊髄，末梢神経等の組織切片を蛍光抗体間接法で染色したところ，分子量の大きい三成分を含んだ画分の抗体では軸索や一部の神経細胞に強い蛍光が見られ、分子量50,000 の成分の抗体では，小脳の Bergmann glia，白質の astroglia に強い蛍光が見られたが，末梢神経の軸索にも蛍光が観察された。

4) Alzheimer 病の脳組織切片を同様に蛍光抗体法で染色したところ，両画分の抗体は，一部のAlzheimer原線維変化に陽性の蛍光が見られた。

脳神経組織中に存在するいくつかの線維性タンパク質のうち，microtubuleおよびmicrofilamentについては、それらを構成するタンパク質成分が明確になっているが，intermediate filamentとも呼ばれているneurofilamentについては，Shelanski(13)，Igbal(7)，Schlaepfer(12) らにより、単離精製法および構成成分について多くの報告があるが，まだ構成成分の本質が明確になったとはいい難い。各種の調製法により調製された試料は，主要成分として分子量約200,000，160,000，68,000，50,000，の四つの成分が見出されるが(9)，これらのうち分子量50,000の成分は，Dahl & Bignami(2,3,11)により単離されたglial fibrillary acidic protein(GFA) と分子量がほぼ同じであり、またこの成分に対する抗体はグリア細胞をよく染めることから，同一成分である可能性も考えられ(5)，分子量の大きい三つの成分のみがneurofilamentに特異な成分でないかと考えられるに到っている(9)。一方，Alzheimer病を始め老年痴呆等の脳に見られるAlzheimer原線維変化は，電顕を用いた形態学的な観察から，このneurofilamentが変化を受けたものではないかと考えられており(6,8,10)，変異原成分の生化学的方法による解明が待たれている。

本実験では，neurofilamentを牛脳から調製し，分子量の大きな三つの成分と分子量50,000 の成分を，Sepharose-6Bカラムを用いて分画し，各々の分画に対する兎抗血清を作り，蛍光抗体間接法により，ラットおよびマウスの大脳，小脳，脊髄，末梢神経を染色した結果，およびAlzheimer病の脳を染色した結果から，neurofilament およびglial filament の構成成分について考察する。

〔実 験 法〕

1) Neurofilamentの調製： neurofilamentは，牛脳白質より Yen (13) および Liem ら (9) の方法により調製した。その概要は，牛脳白質 40g を 0.85M sucrose を含む緩衝液 600ml で Potter型 homogenizer を用いてホモジナイズし，12,000g，15min 遠心し，myelinated axon を浮遊させた。これを 0.01M phosphate-0.01M mercaptoethanol (pH6.5) の低張溶液で一晩処理するか，1% Triton を含んだ緩衝液でホモジナイズすることにより myelin を分離後，0.85M sucrose よで遠心 (48,000g, 15min) することにより myelin を除き，得られた沈殿を 1.0M-1.5M-2.0M Sucrose よで遠心 (48,000g, 60min) し，1.5M-2.0M interface に得られたものを粗 neurofilament 標品として用いた。この標品を 8M 尿素溶液で溶解し，可溶性部分を Sepharose-6B カラム (1.5×90cm) でゲル口過した。カラムの溶出は 0.05M K-phosphate-6M尿素 (pH6.5) で行い，1 fraction は 2.5ml とした。

2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動： ポリアクリルアミド電気泳動は，0.1M NaH_2PO_4-6M urea-1% SDS (pH7.0) を含む 5% アクリルアミドゲルを用いて行った。ゲルは Coomassie Brilliant Blue で染色した。

3) 抗体の作製： Sepharose-6B カラムで分画した成分は，蒸留水に透析後，約 1 mg を生理食塩水 1 ml に溶かし，同量の Freund の complete adjuvant で乳化し，兎の足蹠，大腿部，腹部等に分散して皮下注射した。この注射を 2 週間間隔で 3 回行い，最終注射より 2 週間後に，頸動脈より全採血した。血清の特異性の検討は Ouchterlony 法により行った。

4) 蛍光抗体法： ラットおよびマウスの脳，脊髄，末梢神経，それと Alzheimer 病の脳はドライアイス-アセトンで急速に凍結後，クリオスタットで 4μ の切片とした。切片は風乾後，兎抗血清で処理後，FITC でラベル化した anti-rabbit goat serum を用いた通常の蛍光抗体間接法による染色を行った。control としては正常兎血清および抗原で中和した抗血清を用いた。

〔実 験 結 果〕

1) 粗 neurofilament 標品の電顕像： ショ糖密度勾配遠心法で，1.5M-2.0M interface から得られた粗 neurofilament 標品を電顕で観察したところ，直径のほぼ等しい 2 種類の線維の束からなっていた。電子密度の低い主要線維は neurofilament と思われ，もう一方の電子密度の高い線維は glial filament と思われた (Fig.1)

2) 粗 neurofilament 標品の Sepharose-6B カラムによる分画： 粗 neurofilament 標品を 8M 尿素溶液で溶解し，可溶性部分を Sepharose-6B カラムを用いゲル口過した結果を Fig. 2 に示した。各ピークに含まれる成分は，ポリアクリルアミド電気泳動により調べた (Fig.3)。その結果 peak II + III に分子量約 200,000，160,000，68,000 の三成分が含まれており，これを N-画分とした。peak-IV には分子量約 50,000 の成分が含まれており，これを G-画分とした。peak-VII には分子量約 27,000 の成分が含まれていたが，

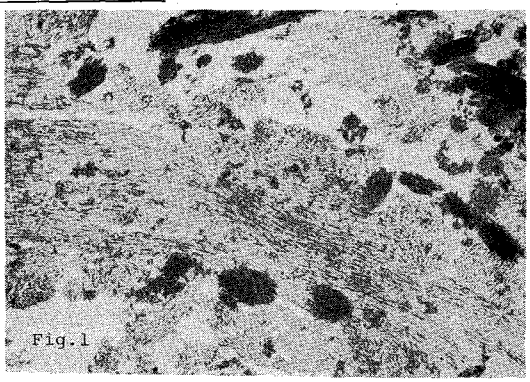


Fig.1

この成分の由来と機能については，まだ未検討で不明である。peak-Ⅳは量的には最も多く含まれている成分であった。Liemらは，myelinated axonを1% Tritonで抽出する方法では分子量の高い三成分が主として得られると報告しているが(9)，本実験ではYenらの方法(13)とほぼ同様の結果が得られた。

3) 免疫学的性質の検討：　Sepharose-6Bカラムのゲル口過で得られたN-画分，G-画分は蒸留水に透析後凍結乾燥してから，兎抗血清を作製し，Ouchterlony法により，免疫学的特異性を調べた。Fig.4に示すように，N-画分抗体(Anti N)もG-画分抗体(Anti G)も特異性があり，免疫学的交叉反応は見られなかった。しかしNとAnti Gとの間に弱い沈降線かと思われるものが観察された。

4) 脳，脊髄，末梢神経の蛍光抗体法による染色：　小脳組織にはAnti Nでは Purkinje 層に籠線維と思われる線維が，Purkinje細胞を取り囲み，また分子層にはパラレルファイバーが細かに見られた(Fig.5A)。Anti Gでは分子層に脳表面に達するBergmann gliaが見られ，脳軟膜の内側や血管周囲にも強い蛍光を呈した(Fig.5B)。脊髄組織にはAnti Nでは白質部分に大小様々の軸索が見られ，また灰白質の神経細胞は強く蛍光を呈するものから，全くないものまであった。一方Anti Gでは白質部に軸索間を走るgliaが顕著であったが軸索にも蛍光が見られた。灰白質には特徴的なastroglioが多数見られた。末梢神経ではAnti N，Anti G共に軸索に陽性の蛍光が見られた。

5) Alzheimer病脳の染色：　Alzheimer病の脳で原線維変化が多数観察された組織部分を同様に蛍光抗体間接法で染色したところ，いずれの抗体でも，原線維変化は陽性の緑色を呈するもの(Fig.6)から

Fig.2

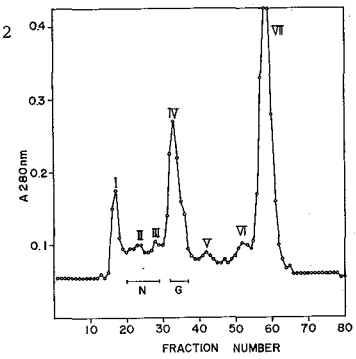


Fig.3

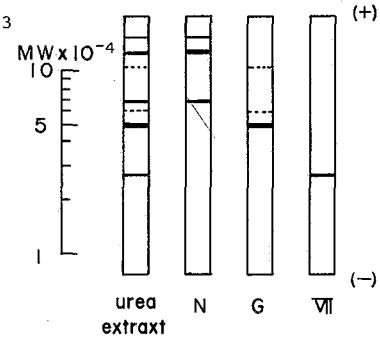


Fig.4

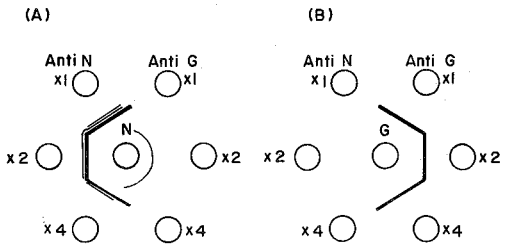


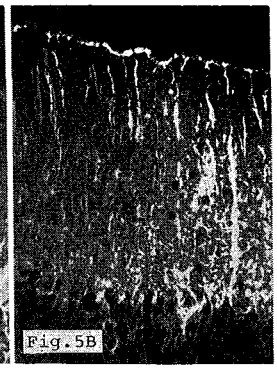
Table 1

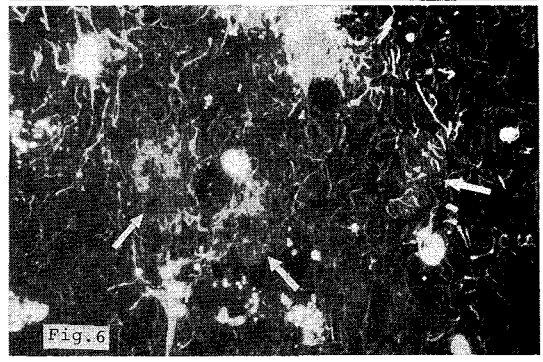
	Bovine G	Bovine 50 K (Davison)	Bovine GFA (Dahl)
Lys	5.8	5.7	4.4
His	2.7	2.0	2.3
Arg	8.4	9.7	5.7
Cys			1.5
Asp	9.6	9.5	10.3
Thr	5.1	4.8	5.8
Ser	6.0	3.4	6.2
Glu	17.3	16.6	15.0
Pro	2.7	0	4.9
Gly	5.6	6.0	7.5
Ala	9.6	9.8	8.5
Val	5.6	6.0	5.7
Met	2.7	2.1	2.6
Ilu	9.3	11.6	8.6
Tyr	2.9	4.1	3.2
Phe	3.1	3.8	3.9
Tryp			

，原線維変化の自己蛍光である青色のものまで様々の反応が見られた。原線維変化の確認は，同じ切片をBielschowsky染色することにより行った。

6）G画分の化学的性質：　G画分は再クロマトグラフィーにより，ゲル電気泳動で単一なバンドを示すまで精製されたので，そのアミノ酸組成とN-末端アミノ酸の分析を行った。アミノ酸分析の結果はTable Ⅰに示したが，すでに報告されているDavisonらが得たneurofilamentの主要成分である分子量50,000の成分(4)およびDahlらが得たGFAの分子量50,000の成分の組成(1)に非常に類似していた。N-末端アミノ酸の分析は，PTH法およびDansyl法による検出を試みたが，いずれの方法でも検出できずN-末端アミノ酸はブロックされているものと思われた。


Fig.5A


Fig.5B


Fig.6

〔考　　察〕

N画分とG画分はFig.4より，免疫的にはかなり特異性のある成分と考えられ，蛍光抗体による脳の染色でもAnti Nはneuronに対してかなり特異的であり，Anti Gはgliaに対する染色の方が比較的強かった。しかし，Anti Gはneuronを全く染めないわけではなく，特に末梢神経では軸索もよく染めること，Alzheimer原線維変化ではAnti Nとほぼ同様に染めることから，G画分は必ずしもgliaにのみ特異的な成分とは断定できず，neuronにも共通な成分のように思われる。この分子量50,000の成分はneurofilamentの調製標品にも多量に含まれている成分であり(13)，またGFA標品の主要成分であり(3,11)，アミノ酸組成，ペプチドマップも極めて類似し，両抗体は特異が少なく交叉的に反応することから(13)，両成分は同一物質である可能性も考えられる(5)。

〔参　考　文　献〕

1)Dahl,D.(1976)Biochim.Biophys.Acta 446,41
2)Dahl,D.and Bignami,A.(1976)Brain Res.116,150
3)Dahl,D.and Bignami,A.(1979)Biochim.Biophys.Acta 578,305
4)Davison,P.F.and Winslow,B(1974)J.Neurobiol.5,119
5)Goldman,J.E.,Schaumburg,H.H.and Norton,W.T.(1978)J.Cell Biol.78,426
6)Iqbal,K.,Wisniewski,H.M.,Iqbal,I.G.,Korthals,J.K.and Terry,R.D.(1975) J.Histochem.Cytochem.23,563
7)Iqbal,K.,Iqbal,I.G.,Wisniewski,H.M.and Terry,R.D.(1978)Brain Res.142,321
8)Kidd,M.(1963)Nature 197,192
9)Liem,R.K.H.,Yen,S.H.,SalomonG.D.and Shelanski,M.L.(1978)J.Cell Biol.79,637
10)Oyanagi,S.(1974)Adv.Neurol.Sci.(Japanese)18,77
11)Rueger,D.C.,Dahl,D.and Bignami,A(1978)Anal.Biochem.89,305
12)Schlaepfer,W.W.and Freeman,L.A.(1978)J.Cell Biol.78,653
13)Yen,S.H.,Dahl.D.,Schachner.M.and Shelanski,M.L.(1976)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73,529

94 筋萎縮における筋蛋白の構造変化

井上良一・佐久間長信・三宅正治
柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神）

〔要約〕
ある種の体蛋白はメチル化を受け、蛋白の分解に伴い放出されたメチルアミノ酸は、蛋白合成に再利用されることなく尿中へ排泄される。筋蛋白の中、アクチンは3－メチルヒスチジン（3-MeH）、ミオシンは3－MeH、ジおよびトリメチルリジン（DMLおよびTML）、N^GN^G－ジメチルアルギニン（DMA）を含んでいる。
1) 我々は一昨年、筋萎縮を呈する運動神経疾患と筋ジストロフィー症の患者の尿中メチルアミノ酸を測定した結果を報告したが、その後例数を増し、筋ジストロフィー症では尿中3－MeHの排泄が減少し、N^GN^G－DMAの排泄が増加すること、運動神経疾患では有意な変化がないことを明らかとした。 2) ついで筋蛋白を直接材料として、その機序を研究した。ジストロフィーマウスと坐骨神経および腱切断ラットの筋組織を用い、筋漿蛋白と筋繊維蛋白を調整し、メチルアミノ酸残基を測定した。ジストロフィーマウス筋および除神経筋の両者で、筋繊維蛋白の3－MeHの減少、N^GN^G－DMAの増加を見出した。筋漿蛋白では有意な変化がなかった。腱切断筋でも上と同様の傾向がみられた。 3) これらの結果から、骨格筋のミオシンのH鎖はL鎖と同様に発育分化の過程で構造が変化し、ジストロフィーマウスや除神経筋のミオシンは幼若型であること。また筋ジストロフィー症患者の骨格筋のミオシンも幼若型にとどまっている可能性を考察した。

我々は、筋蛋白のアクチンは3-MeH、ミオシンは3-MeH、DML、TML、およびN^GN^G-DMAを含み、これらのメチルアミノ酸を尿中で測定することにより、アクチンとミオシンの代謝動態を知ろうと試みた。一昨年本学会で、筋萎縮を呈する運動神経疾患と筋ジストロフィー症の尿中メチルアミノ酸を測定し、両者共に尿中3-MeHの排泄が減少することを報告した[1]が、その後症例を増して検討したところ、その結論を修正する必要が生じた。今回は、その結果と共に、直接筋組織を用いての研究を病態モデル動物で行ったのでその結果とあわせて報告する。

＜対象および実験方法＞

尿材料は表1の筋ジストロフィー症患者38名、運動神経疾患患者23名、対応する年令の正常人43名から得、メチルアミノ酸を柿本、赤沢の方法[2]で定量した。

筋ジストロフィーマウスはC57BL/6J-Dy系マウスを用い、対照として同腹の非発症マウスを用いた。ラットは体重600gの成熟雄ラットを用い、ラットの坐骨神経およびアキレス腱は一側を切断し、他側を対照とした。この際、筋材料採取の生後日数を6ヶ月に合わすように実験を計画した。これらの動物の筋組織より、筋漿蛋白と筋繊維蛋白を調整し[3]、それぞれのメチルアミノ酸残基を柿本と赤沢の方法[2]で定量した。

＜結果＞

1．筋萎縮症患者の尿中メチルアミノ酸量：個々の尿中メチルアミノ酸は、メチル化を受けた体蛋白に由来している[4]。従って、ある種のメチル化蛋白の量ないし代謝に変化があれば、その蛋白に由来する尿中メチルアミノ酸が他のメチルアミノ酸に比べて変化する筈である。そこで、個々の尿中メチルアミノ酸量は、5種のメチルアミノ

表1　筋萎縮症患者の尿中メチルアミノ酸相対量

Diagnosis		Ratio of the methylamino asid (%) Mean value ± SD				
		DML	TML	N^GN^G-DMA	$N^GN'^G$-DMA	3-MeH
Muscular Dystrophy						
Duchenne type	(N=20)	15±4.7	17±5.6	21±3.8*	13±3.4	35±8.7*
Congenital type	(N= 4)	15±4.2	15±5.7	18±1.0	16±3.5	36±3.8
Limb-Girdle type	(N=14)	15±3.9	15±4.2	20±6.1*	17±6.0	37±8.2*
Neurogenic						
Amyotrophic lateral sclerosis	(N= 5)	15±5.3	13±5.5	13±3.4	13±4.5	45±10.0
Spinal progressive muscular atrophy	(N= 7)	15±7.4	13±3.1	11±3.8	12±4.5	49±12.4
Charcot-Marie-Tooth disease	(N= 6)	12±6.0	15±2.7	14±4.8	13±3.3	41±5.2
Kugelberg-Welander disease	(N= 5)	14±3.4	14±4.0	17±5.8	13±3.8	41±5.2
Normal						
Young	(N=24)	13±6.0	13±2.9	14±4.2	13±3.5	47±11.4
Adult	(N=19)	16±5.8	17±3.4	11±3.8	11±3.0	49±9.6

* $p < 0.01$ against normal groups

酸量の総和に対する比で表わした(表1)。*Duchenne*型と肢帯型筋ジストロフィー症では、尿中3-MeHの排泄が有意に減少し、N^GN^G-DMAの排泄が有意に増加していた。先天型でも同様の傾向がみられた。運動神経疾患では、いずれのメチルアミノ酸にも有意な変化を認めなかった。

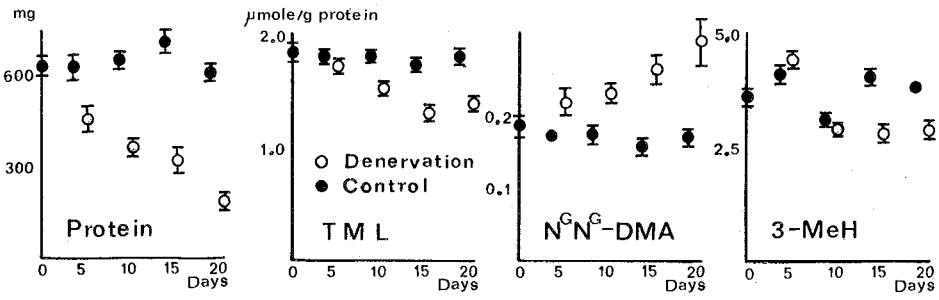
2．筋ジストロフィーマウス骨格筋のメチルアミノ酸量：筋ジストロフィーマウスの骨格筋より筋繊維蛋白を調整し、メチルアミノ酸を生後35日目と63日目で測定した。メチルアミノ酸量は、筋繊維蛋白当りで表した。表2に示すように筋ジストロフィーマウス骨格筋の筋繊維蛋白では同腹の正常マウスに比べて、TML、3-MeH量が有意に減少し、N^GN^G-DMA量が有意に増加していた。この変化は、生後のいずれの時期にもみられ、その量的変化の割合も一定していた。

表2　筋ジストロフィーマウスの骨格筋筋繊維蛋白中のメチルアミノ酸残基

35 days	Body Weight g	Tissue Weight g	Protein mg	TML	N^GN^G-DMA	3-MeH
				Mean ± SE μ moles/g protein		
Dystrophy Mouse (N=6)	6-19	0.6-3.1	103-332	1.1±0.1	0.19±0.02	3.6±0.4
Control (N=5)	15-29	1.7-4.9	275-578	1.5±0.1	0.13±0.02	7.1±0.4
63 days						
Dystrophy Mouse (N=5)	14-15	1.5-1.7	223-244	1.4±0.0	0.23±0.01	1.8±0.1
Control (N=5)	19-26	3.2-4.9	526-822	1.7±0.1	0.14±0.02	4.5±0.4

3．坐骨神経切断ラットの腓骨筋のメチルアミノ酸量：筋萎縮の1つのモデルとして、坐骨神経切断ラットを用い、腓骨筋のメチルアミノ酸量を経時的に測定した。図1に示すように、非切断側では蛋白量およびメチルアミノ酸量は一定していたが、切断側では、蛋白量は非切断側に比べて漸減し、TML量は、切断後10日目頃より、

図1　坐骨神経切断ラット腓骨筋のメチルアミノ酸量（各点は4例の平均とSE）



3-MeH量は15日目頃より有意に減少しはじめ、N^GN^G-DMA量は5日目ですでに増加しており、その後も漸増した。

4、アキレス腱切断ラットの腓骨筋のメチルアミノ酸量：筋萎縮のもう1つのモデルとして、アキレス腱切断ラットを用い、切断日から15日目に達した腓骨筋のメチルアミノ酸量を測定した。表3に示すように、切断側の蛋白量は非切断側に比べて減少し、3-MeH量も減少傾向を示した。N^GN^G-DMA量は増加を示したが、TML量は変化を示さなかった。

表3　ラット腓骨筋の筋繊維蛋白中メチルアミノ酸残基の腱切断による変化

	Body Weight g	Tissue Weight g	Protein mg	TML	N^GN^G-DMA	3-MeH
				Mean ± SE μmoles/g protein		
Tenotomy (N=4)	182-185	0.64-0.73	92-104	2.2±0.2	0.33±0.01	3.2±0.1
Contralateral (N=4)		0.73-0.91	107-112	2.3±0.2	0.27±0.00	3.7±0.2

5、白筋と赤筋のメチルアミノ酸量：白筋として長趾伸筋(E.D.L.)を、赤筋としてヒラメ筋を用いた。表4に示すように、白筋は赤筋に比べて、3-MeH量が多く、N^GN^G-DMA量が少く、TML量も少い傾向を示した。

表4　ラットヒラメ筋および長趾伸筋の筋繊維蛋白中メチルアミノ酸残基

	Body Weight g	Tissue Weight g	Protein mg	TML	N^GN^G-DMA	3-MeH
				Mean ± SE μmoles/g protein		
Soleus (N=4)	490-630	0.9-1.1	167-204	1.9±0.1	0.23±0.01	2.3±0.1
E.D.L. (N=4)		1.1-1.4	217-258	1.7±0.1	0.12±0.01	3.2±0.2

＜考察＞

筋ジストロフィー症のDuchenne型と肢帯型では共に尿中3-MeHの排泄が減少し、N^GN^G-DMAの排泄が増加し、先天型でも同様の傾向がみられた。この変化は、運動神経疾患ではみられなかった。筋ジストロフィー症におけるこの変化の原因としては、1)筋蛋白量の減少、2)代謝回転の変化、3)筋蛋白のメチル化の変化の可能性がある。筋蛋白量の減少をこの原因と考える場合、N^GN^G-DMAの増加は矛盾し、代謝回転の亢進ある

いは低下を原因と考える場合も、3-MeHとNᵍNᵍ-DMAの相反した方向への変化は説明しがたい。従って、第3の可能性が最も考えやすい。

ついで病態モデル動物の筋組織を用い、筋繊維蛋白のメチルアミノ酸量を測定した。筋ジストロフィー症マウスの筋繊維蛋白では、TMLと3-MeH量が減少し、NᵍNᵍ-DMA量が増加し、この現象は尿で得た結果と類似した。坐骨神経切断ラットでは、切断後15日目の腓骨筋のTML、3-MeHは減少し、NᵍNᵍ-DMAは増加し、筋ジストロフィーマウスと同様の所見を示した。更に、廃用性筋萎縮の場合にも量的変化は少いが、類似の変化が見られた。以上のことから、病因は異っても筋萎縮という現象では、共通して筋繊維蛋白のメチル化が変化していることが明らかになった。この変化の原因としては、メチル化を受ける蛋白構造の変化が考えられる。メチル化を受ける蛋白、アミノ酸残基とその部位は一定しており、蛋白質のメチル化は、その分子構造に規定されると考えられる。もし、蛋白の分子構造に変化があれば、蛋白質のメチル化も変化するであろう。ラットのミオシンでは成長に伴い3-MeH量が増加し、NᵍNᵍ-DMA量が減少すると報告され[5]、ラットの胎生期のミオシンは、萎縮筋のミオシンとメチルアミノ酸に関して似たパターンを示す。

ジストロフィーや成長に伴うミオシンの構造変化は幾つか知られている。ミオシンのL鎖については成長に伴い、白筋では胎生期の2本のL鎖に新しく1本を加える3本のL鎖をもつようになり、赤筋では胎生期とは異った2本のL鎖をもつと報告されている[6]。筋ジストロフィーマウスでは、成熟してもミオシンの3本のL鎖のうち1本の量が少く、胎生期の型に近いと報告されている[7]。除神経を受けた白筋のL鎖は変化しないが、赤筋では白筋型の3本を加え5種のL鎖をもつと報告されている[8]。従って、本来白筋と赤筋を有する腓骨筋が萎縮した場合、白筋型のL鎖が加わるために白筋型に近くなると考えられる。白筋と赤筋のメチルアミノ酸量を測定した結果は、予想に反し、萎縮した筋のメチルアミノ酸量は赤筋型に近かった。3-MeHはミオシンのH鎖に含まれ、L鎖には含まれないとされており[9]、萎縮筋のメチルアミノ酸量の変化は、H鎖の分子構造によると考えられる。今のところ、筋ジストロフィーマウスや除神経筋でのミオシンのH鎖の分子構造の変化は知られていないが、我々の研究からは、ミオシンのH鎖も白筋と赤筋とで異り、萎縮筋のミオシンのH鎖は、赤筋型あるいは胎生期のH鎖に近いことが示唆された。今後、ミオシンを精製し、これらの事実を確かめる一方、メチル化酵素の性質についても研究する予定である。

〈文献〉

1) 井上良一、三宅正治、柿本泰男. (1977) 神経化学 16 145

2) Kakimoto Y.,Akazawa S. (1970) J.Biol.Chem. 245, 5751

3) 杉田秀夫 生化学実験講座 15 筋肉 134P

4) 柿本泰男 三宅正治 (1974) 代謝 11 1303

5) Reporter M.,Corbin J.L. (1974) Biochem.Biophys.Res.Commun. 43, 644

6) Margreth A.,Salviati G. (1975)Riv.Istochim.Norm.Pat. 7, 139

7) John H.A. (1974)FEBS Letters 39, 278

8) Stelzner D.J.,Ershler W.B.,Weber E.D. (1975) Exp.Neurol. 46, 156

9) Kuehl M.W.,Adelstein S.R. (1969) Biochem.Biophys.Res.Commun. 37, 59

人名索引（ABC順）

〔番号は演題番号を示す〕

(A)

阿部輝雄……38
秋山一文……25、26
秋山万里子……34
天野武彦……53、69、85
安藤正人……21
青木英子……76
青木公子……78
青野幸子……76
有賀敏夫……58
有馬正高……60
有松靖温……69
朝倉正……81
浅野裕……24
阿相皓晃……27

(D)

出口武夫……23
土井亨……10、67

(E)

衛藤義勝……57、59

(F)

藤本明……25、26
藤沢仁……4
藤田省三……38
福井陽子……74
古川清……13
古田知久……50、51

(G)

蒲生昌仁……55
後藤治子……28
後藤香糸子……39

(H)

蜂須貢……84
芳賀和子……7、72
芳賀達也……7、72
羽賀誠一……93
浜登希子……86
原田泰弘……51
畠中寛……85
服部秀樹……2
早原敏之……26
早石修……53
林誠夫……1
林要喜知……34
挾間秀文……3
逸見順子……29
東田陽博……71、72
樋口宗史……40
久光正……84
平井基陽……73
平野誠……12
平野修助……27
本田雅子……15
堀真一郎……5
堀江賀与子……44
堀地肇……54
堀田直樹……14

(I)

今澤正興……41
井上良一……94
石井毅……93
石川裕二……68
石岡憲昭……49、52
磯辺俊明……49、52
岩佐寧……31
岩瀬則文……77

(K)

柿本泰男……79、94
垣内史朗……33
郭哲輝……34
金瀬春隆……3
鎌田芳夫……81
亀山茂樹……61
上條一也……1
唐沢忠彦……13
加沢鉄士……24
柏俣重夫……76
加藤聖……63
加藤尚彦……56
加藤進昌……41
加藤泰治……71、74
加藤武……86
川原隆造……3
川原康洋……31
川北幸男……19
金長寿……12
杵鞭宏育……1
木野稔……55
岸川秀実……51
岸本明……31
北村邦男……43、44
北島哲子……21
鬼頭秀行……74
小林和夫……30
河野康子……11
高坂新一……47、64、7
小宮義璋……92
近藤哲夫……55
小山司……24

小島幸一……86
公文明……35
国元憲文……3
国下龍英……42
栗原悦雄……80
栗原正……45
栗岡晋……82
栗山欣弥……22、80、83
黒田洋一郎……30
黒岩幸雄……78
黒川正則……90、91、92
日下歓子……87

(L)

羅昌平……84

(M)

松原繁広……24
松田誠……81、82
松田友宏……40
松元幹郎……27
松本孝……12
松谷天星丸……66
三船和史……10、67
三木直正……34
御子柴克彦……47、64、75
三国雅彦……24
三宅正治……79、94
三宅彰英……71
宮本侃治……41、89
宮武正……58
水川六郎……3
水口龍次……31
水野有武……81
水野昇……53
水田正……9
森啓……90
森浩一……19
森光寿……31
盛政忠臣……10、67
守屋芳夫……50、51
村居真琴……84
村上一行……89
村上直人……61
村本芳彦……33

(N)

長池一博……46、47
長尾卓夫……25、26
長崎信行……11
長沢貞継……27
永田豊……21
永津俊治……86
永吉道子……66
中川良一……11
中島熙……17、18
中嶋照夫……73
中浜隆之……32
中原辰雄……12
中原務……66
中村泰治……32
中野完……86
中根正樹……23
仲田義啓……87
中谷一泰……32
中山孝……91
中沢欽哉……21
成沢邦明……20
難波玲子……26
難波経篤……21
根岸晃六……63
西川徹……6
西本詮……50、51
西須英雄……38
西沢芳子……45
野口鉄也……48
野又康博……52
野村正彦……65
野村靖幸……9、16
則兼博……50

(O)

小幡邦彦……70
小田切脩……15、29
小笠原信明……28
小川紀雄……8、88
荻野広太郎……55
岡五百理……24
奥山典生……49、52
大藤眞……8、88
大木恵子……16
大野京介……19
大月三郎……25、26
大谷幸子……5
小沢雅子……35

(S)

斉藤順子……17
斎藤国彦……55
斉藤信太郎……54
斉藤嘉郎……24
佐久間長信……94
桜川宣男……60
佐武明……61
佐藤啓二……77
里内清……55
沢井保子……17
沢崎嘉男……17、18
瀬川富朗……9、16、8
関啓子……18

関口　茂……57
瀬戸章子……69
仙波りつ子……76
庄盛敏廉……10、67
柴田家門……27
島田司己……77
嶋田　裕……68
嶋津　孝……14
清水宏俊……15、29
清水孝雄……53
清水当尚……13
清水義勝……27
祖父江憲治……33
反町　勝……36、79
外山　孚……61
杉山博之……72
杉崎哲朗……48
鈴木　勝……43
鈴木　修……2
鈴木義之……56
(T)
田端葉子……58
田渕和雄……50、51
多田啓也……20
高橋三郎……77
高橋康夫……45、62
高井義美……31
高松　研……47、64、75
高嶋瑞夫……6
高須信美……27
竹田　稔……32
武重千冬……84
武富　保……42
玉井洋一……54
田丸政男……66
田中英明……70
田中恭子……71
田中正明……84
田中正敏……11
田中　亮……39、71、74
田中達也……71
坪井雅弘……50
塚田裕三……46、47、48
塚田欣司……64、66、75
都築紀宏……17
辻　正記……37
辻　元宏……19
徳武　哲……77
融　道男……93
豊島良枝……6
戸島信夫……1
(U)
内村英幸……11
植木幸明……12
植村慶一……61
植村富彦……43、44
(W)
和田　博……14
和久井淑子……52
渡辺和行……1
渡部紀久子……60
渡部修三……53
(Y)
山田則子……6
山田剛通……18
山田裕一……58
山上　栄……28
山本光利……19
山下　格……25、26
山内　卓……24
山脇泰秀……4
四元郁子……8、88
四宮由美子……16
米田幸雄……41
吉田　博……80、83
吉田耕一……40
吉田　豊……13
吉川　潮……62
吉川和明……31
22

神経化学　Vol.　18

第 22 回　日本神経化学会抄録集

昭和54年11月16日(金)

17日(土)

日本都市センター(東京)