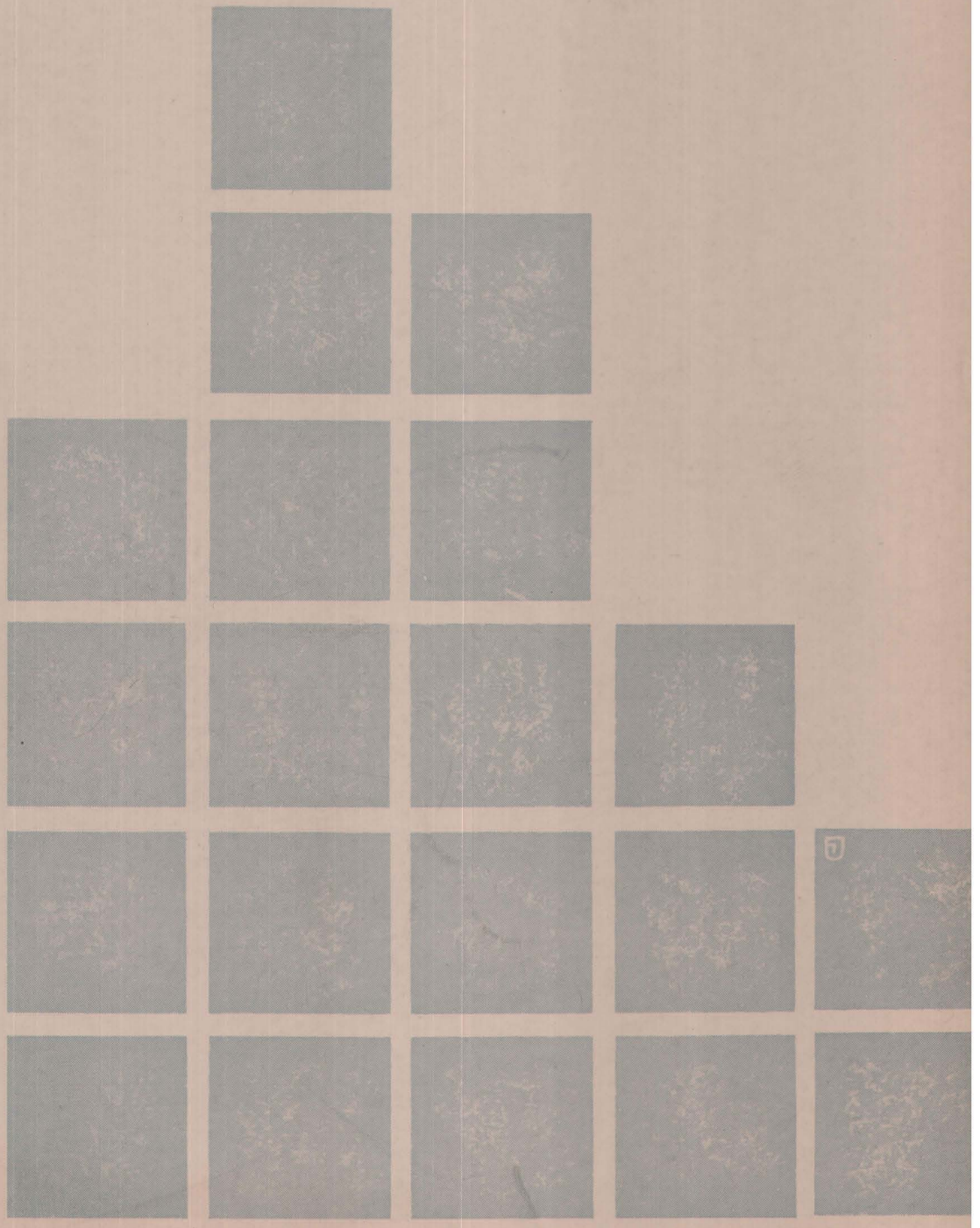
神経化学

VOL. 4 SUPPLEMENT SEPTEMBER 1965



神経化学懇話会

神経化学

VOL4 SUPPLEMENT SEPTEMBER 1965

第8回神経化学懇話会

東京 全共連・ビル会議室

9月16日(木), 17日(金), 18日(土)

目　次

一般講演　　⁂印は5分間演題

1 牛脳内アミノ化合物の同定(Ⅲ) ―――――――――――――――――――― 1

金沢　彰・柿本泰男・公文　明

武貞昌志・佐野　勇(阪大・医・神経)

2 牛脳内アミノ化合物の同定(Ⅳ) ―――――――――――――――――――― 5

柿本泰男・金沢　彰・清水宏俊

中嶋照夫・宮本英七・佐野　勇

(阪大・医・神経)

3 ⁂人脳内のシスタチオニン ―――――――――――――――――――― 9

清水宏俊・柿本泰男・佐野　勇

(阪大・医・神経)

4 トリプトファン水酸化酵素 ―――――――――――――――――――― 11

－脳におけるセロトニン生合成酵素－

中村重信・市山　新・西塚泰美

早石　修(京大・医・医化)

5 ⁂脳内アミノ酸代謝に及ぼすフェニルアラニンの影響 ―――――――――― 15

野口鉄也・塚田裕三(慶大・医・生理)

6 ⁂先天性代謝異常についての2・3の知見 ―――――――――――――― 17

谷口和覧・西村　健・中井健二

井田英乃夫(阪大・医・神経)

7 Infusion Methodによる脳アミノ酸・蛋白代謝の研究 ―――――――――― 19

渡辺昌祐(岡大・神経精神医学)

8 神経系の細胞核に関する研究 －分離と同定－ ---------- 23
加藤尚彦・平山 皓（東大・医・精神）
黒川正則（東大・医・脳研）

9 ※幼若ラツテ脳分離核におけるタンパク合成 ---------- 27
間瀬桂吉（新潟大・医・脳研）

10 モルモツト脳からの核分画の調整とPolymerized DNAの抽出 ---------- 29
森 浩一（阪市大・医・神経）

11 家兎摘出網膜でのアミノ酸及び核酸の代謝 ---------- 33
塚田裕三（慶 大・医・生理）
松谷天星丸（東邦大・医・第2生理）
植村慶一（慶 大・医・生理）

12 ※白鼠剔出交感神経節のアミノ酸輸送と活動電位 ---------- 37
永田 豊・横井幸雄
（東邦大・医・第2生理）
塚田裕三（慶 大・医・生理）

13 (Na, K)－Adenosine Triphosphatase活性の細胞内局在 ---------- 39
－脳組織における特徴
黒川正則（東 大・医・脳研）
坂本哲彦・加藤 誠
（東大・医・精神）

14 ※慢性覚せい剤中毒マウスの脳ATPaseについて ---------- 43
大須賀恒夫・清水俊郎
台 弘（群大・医・精神神経）

15 ⁂マウス自発運動量と脳内カテコールアミン ---------- 45
亀山　勉・木皿憲佐
（東北薬大・薬・薬品作用）

16 ⁂脳アセチルコリンエステラーゼの量的分布差及び
細胞学的局在部位に及ぼす電気ショックとストレスの効果 ---------- 47
福田哲雄・松田良一
（阪医大・神経精神）
宇川進逸・藤家康敬・木原　隆
（阪医大・第二解剖）

17 脳ミトコンドリアのＡＤＰ呼吸調節及び
ミトコンドリア内ＰＮの酸化還元に及ぼすMgイオン等の影響 ---------- 49
岩本省司・木村　潔
（和歌山県医大・神経）
長井音次（和歌山県医大・第一生理）

18 ⁂脳ミトコンドリアの分離調整法について ---------- 53
瀬田喜一郎・小沢和憲・半田　肇
（京大・脳神経外科）

19 脳におけるＮＡＤの生合成とその代謝回転について ---------- 55
出口武夫・市山　新・早石　修
（京大・医・医化）

20 脳におけるＮＡＤ代謝の特異性 ---------- 59
（特に肝臓との比較に於て）
川合　仁・鳩山　龍（京大・医・精神）

21 神経系のCO_2固定機構とその生化学的意義 ---------- 63
成瀬　浩（東大・神経）
H. Waelsch（Columbia大・精神）

22 ❊自律神経系と肝の糖質代謝 ---------- 67
嶋津　孝・福田　葵（阪大・医・三解剖）

23 ❊脳 Polyphosphoinositides への 32P 組入れについて ---------- 69
林　浩平・八木原嘉平・中村　勇
山添三郎（群大・医・生化）

24 脳脂質に関する研究 ---------- 71
－第一報：ニワトリの脳の成熟過程における脂質および脂酸の推移－
相沢豊三・長谷川恒雄・加藤正弘
立沢　寧（慶大・相沢内科）
中沢恒幸・原　洋二・猪股丈二
（慶大・神経）

25 中枢神経組織内のブローム化合物について ---------- 75
柳沢　勇（東邦大・医・生化）
吉川春寿（東　大・医・栄養）

26 神経成長促進因子 Nerve Growth Promoting Factor（NGF）の研究 ---------- 81
（その2）　中沢恒幸・鈴木恵晴
壁島彬郎・小宮英靖・猪股丈二
（慶大・神経）

27 ❊脳リンタン白の研究（Ⅲ） ---------- 85
native なリンタンパク抽出のこころみ
小宮義璋・石川晋次
（東大・医・脳研・生化）

28 ⁂脳 LDH アイソザイムの研究 ---------- 87
伊藤 斉・三浦勇夫・森 文彦
舛沢郁二・三浦貞則（慶大・神経）

29 ⁂髄液の酸塩基平衡に関する研究 ---------- 89
田崎義昭・佐野 昇・大阪 彰
鈴木玲子（東邦大・医・阿部内科）

招待講演

外・1 Protein specificity and nervous functions ---------- 91
F. O. Schmitt Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass. U.S.A.

外—2 Neurochemical studies in subcellular fractions of the brain ---------- 97
E. De Robertis Instituto de Anatomia Genral y Embriologia, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

外—3 Neurochemical correlates of behavior ---------- 100
M. H. Aprison Department of Biochemistry, Indiana University Medical Center, Indianapolis, Ind. U.S.A.

外— 4 The effect of psychotropic drugs on the metabolism of cerebral monoamines ——————— 103
A. Pletscher — Medical Research Department, F. Hoffmann La Roche Co. Ltd. Basle, Switzerland.

外— 5 The interaction of injected reserpine and dihydrophenylalanine or D-amphetamine on electrophysiological and behavioral responses in a conditioned situation in the cat ——————— 106
K. F. Killam — Department of Pharmacology, Stanford University, School of Medicine, Palo Alto, Calif. U.S.A.

外— 6 Trends in developmental neurochemistry
Movie: Basic mechanism in neurophysiology
J. P. Schade — Netherlands Central Institute for Brain Research, Amsterdam, The Netherlands.

1 牛脳内アミノ化合物の同定（Ⅲ）

金沢　彰・柿本泰男・公　文明
武貞昌志・佐野　勇（阪大・医・神経）

昨年度本会で牛脳内γ-グルタミルペプチド8種の分離同定を報告した。その後塩基性分画を精製し2種のアミノ化合物を分離同定し，その他に4種の化合物を精製同定した。

実　験

1）牛脳塩基性アミノ化合物分画の調製

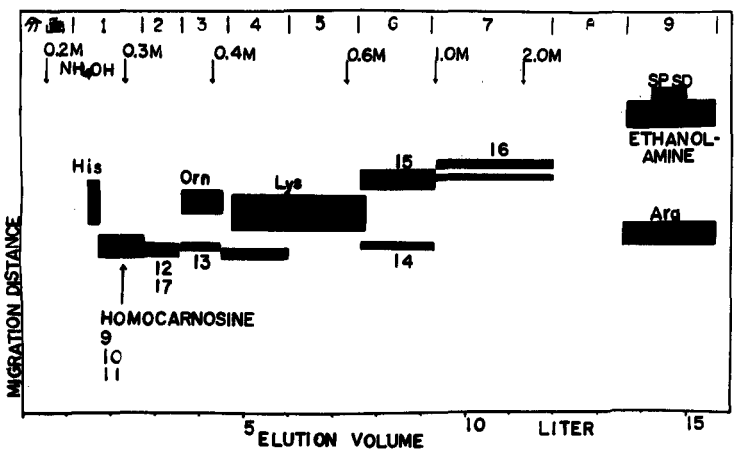
牛脳（死後1～3時間）58.05kg，150コを3回にわけて以下のように処理した。小片とし20ℓの水中で20分間60°Cに加熱，酢酸100mℓを加えpH4としホモジネートにし，エタノール24ℓを加え遠沈，上清35ℓを得た。これを2分しそれぞれ6.5×35 cmのAmberlite IR-120×8（100-200メッシュ）H^+型にとおし，レジンを3ℓの水で洗った後，2.25ℓの1Nピリジンで中性および酸性アミノ化合物を溶出し，ついで塩基性アミノ化合物の分画を3ℓの4Nアンモニア水-エタノール（1:1）混合液で溶出，減圧濃縮した。

この分画を全部合わせ800mℓの水にとかし6.3×80 cmのAmberlite IR-120×8（100-200メッシュ）NH_4^+型に吸着せしめ，0.2，0.3，0.4，0.6，1.0，および2.0 Mアンモニア水それぞれ2，2，3，2，2，4ℓで溶出し，溶出液を100-150 mℓずつ採取し図1のように9分画にわけた。各分画を減圧乾固した。

2）化合物9の精製と同定

第1分画をピリジン-ギ酸-水混合液（4:1:45）で緩衝化した3×50cmのAmberlite IR-120×8（100-200メッシュ）のカラムで同じ緩衝液で展開し，448-468 mℓの分画（分画1-1）を集めた。この減圧乾固物をピリジン-ギ酸-水混合液（2:1:47）を緩衝液とし3×55 cmの同じレジンのカラムで同様の方法で展開し，320-906 mℓの溶出液の分画を集めた。これを減圧濃縮し3×55 cmのAmberlite CG-50（200-300メッシュ）H^+型に吸着させ，0.1 M酢酸で溶出，溶出液の1859-2080 mℓを集めた。減圧濃縮後，塩酸塩，硫酸塩として結晶化を試みたが成功しなかった。

図1　牛脳塩基性アミノ化合物の溶出パターン



酸加水分解によりγ-アミノ酪酸お

よび1-メチルヒスチジンを生じ，N末端はγ-アミノ酪酸であった。そこで本物質の構造をγ-アミノブチリル-1-メチルヒスチジン（ホモアンセリン）と推定，合成し，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動でその性質が脳からの精製物と一致することをたしかめた（表1）。

カルボベンゾキシ-γ-アミノブチリル-1-メチル-L-ヒスチジン　カルボベンゾキシ-γ-アミノ酪酸1.77gと1-メチル-L-ヒスチジン塩酸塩（にわとり筋より分離したアンセリンを加水分解後精製）513mgから混合酸無水物法により合成し，熱水から結晶化し，630mg,（67%）m.p.137-138.5°Cを得た。

γ-アミノブチリル-1-メチル-L-ヒスチジン（ホモアンセリン）　上記化合物を50%メタノール中で酸化パラジウムを用い接触還元し沪液を濃縮後Amberlite CG50（200-300メッシュ）NH_4^+型で精製し，硝酸塩，ピクリン酸塩，塩酸塩，硫酸塩として結晶化を試みたが成功しなかった。したがってこの水溶液を以上の同定に用いた。

3）化合物10の精製と同定

分画1-1（化合物9の項参照）の精製における溶出液1432-2342ml（分画1-1-3）を集め，乾固後3×40cmのAmberlite CG 50（200-300メッシュ）NH_4^+型に吸着させ，水で溶出，溶出液の313-469mlを集めた。減圧濃縮後，塩酸塩，硫酸塩，酢酸塩として結晶化を試みたが成功しなかった。

酸加水分解によりセリンとリジンを生じ，N末端はセリンで，セリンのカルボキシル基とリジンのα-アミノ基がペプチド結合していることがわかった。この物質をセリルリジンと推定，Fölschらの方法で合成し，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動での性質が脳からの精製物と一致することをたしかめた（表1）。

4）化合物11の精製と同定

分画1-1-3（化合物10の項参照）の精製で469-1394mlの溶出液を集め，乾固後2×34cmのDowex 50×2（200-300メッシュ）NH_4^+型のカラムに吸着させ0.1 Mアンモニア水で溶出し，88-165mlを減圧濃縮し塩酸塩として結晶化を試みたが成功しなかった。

酸加水分解によりγ-アミノ酪酸とリジンを生じ，N末端はγ-アミノ酪酸であった。この物質をγ-アミノブチリルリジンと推定し，合成，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動でその性質が脳からの精製物と一致することをたしかめた（表1）。

カルボベンゾキシ-γ-アミノブチリル-ε-カルボベンゾキシ-L-リジン　カルボベンゾキシ-γ-アミノ酪酸1.12gとε-カルボベンゾキシ-L-リジン1.4gから混合酸無水物法で合成，酢酸エチルと石油エーテルから結晶させ，1.8g（73%），m.p.117-119°Cを得た。

γ-アミノブチリル-L-リジン　上記化合物500mgを接触還元し沪液にHClを加え，pH 5とし水-エタノールより結晶させ，塩酸塩174mg（65%），m.p.201-205°Cを得た。

5）化合物12の精製と同定

#2分画を3×55cmのDowex 50×2（200-400メッシュ）NH_4^+型のカラムに吸着させ，0.2 Mアンモニア水で溶出し，その630-990mlを減圧濃縮し，さらに3×40cmのAmberlite CG 50（200-300メッシュ）NH_4^+型のカラムに吸着させ，水で溶出，704-880mlの分画を集めた。乾固後，硫酸塩として結晶化を試みたが成功しなかった。

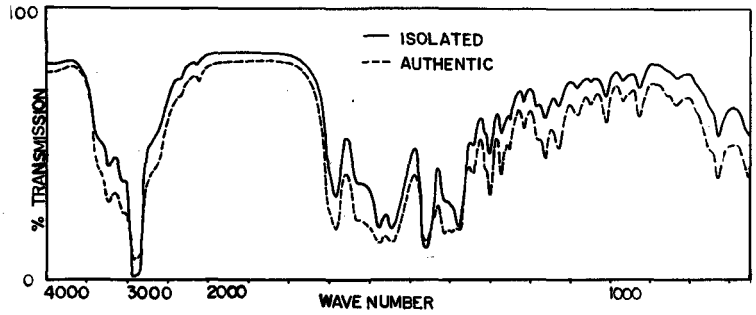
酸加水分解後アルギニンとアラニンを生じ，N末端はアルギニンであったので，この化合物の構造をアルギニルアラニンと推定，合成（化合物14の項参照）し，沪紙ク

ロマトグラフィー，沪紙電気泳動でその性質が脳から精製した化合物と一致することをたしかめた（表1）。

6）化合物13の分離と同定

沖3分画を3×55cmのDowex 50×2（200-400メッシュ）NH_4^+型のカラムに吸着させ，0.3Mアンモニア水で溶出し，その667-1170mlを集め，乾固後3×40cmのAmberlite CG 50（200-300メッシュ）NH_4^+型カラムに吸着させ，0.2Mアンモニア水で溶出し，376-450mlを乾固後，さらに3×40cm Amberlite CG 50（200-300メッシュ）NH_4^+型カラムに吸着させ水で溶出し，572-770mlの分画を減圧乾固した。硫酸塩として結晶化を試みたが成功しなかったので，Dowex 1酢酸型カラムで処理し酢酸塩とし，減圧乾固後1mlのエタノールにとかしエーテル2mlを加え，36mgの結晶，m.p. 168-178°Cを得た。

図2　化合物13とL-アルギニル-L-ロイシンの赤外吸収スペクトル

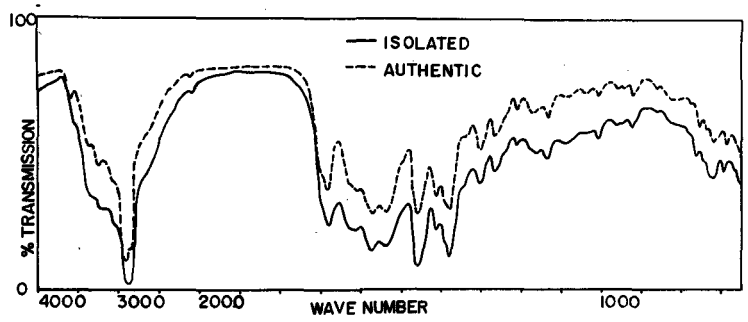


酸加水分解の結果，アルギニンとロイシンを生じ，N末端はアルギニンであったのでこの物質はアルギニルロイシンと推定，合成（化合物14の項参照）した。合成品の融点は172-178°Cで分離化合物のそれと一致し，合成品，分離化合物の赤外吸収スペクトル（図2）も一致した。また沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動の性質も一致した(表1)。

7）化合物14の分離と同定

沖6分画を3×47cmのDowex 50×8（200-400メッシュ）NH_4^+型に吸着させ，0.4Mアンモニア水で溶出し，855mlから溶出液を0.6Mアンモニア水にかえ，その1297-1983mlを集め乾固物を3×40cmのAmberlite CG 50（200-300メッシュ）NH_4^+型に吸着させ，水で溶出し350-450mlを集め減圧乾固した。残渣を水にとかしフラビアン酸として結晶化を試みたが成功しなかったので，Dowex 1酢酸型，Amberlite IR-120 H^+型で処理し，溶出液に酢酸を加え減圧乾固後，水0.2mlにとかしエタノール2ml，エーテル2mlを加え，酢酸塩として結晶16.5mg，m.p. 141-145°Cを得た。

図3　化合物14とL-アルギニル-L-フェニルアラニンの赤外吸収スペクトル



酸加水分解後，アルギニンとフェニルアラニンを生じ，N末端はアルギニンであったのでこの物質をアルギニルフェニルアラニンと推定，合成した。分離化合物と合成品の赤外吸収スペクトル（図3），

表1　分離，合成化合物の沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動の性質および呈色反応

	沪紙クロマトグラフィーのRF値			沪紙電気泳動の距離※※	呈色反応		
	PAA※	IpF※	BuA※		ニンヒドリン反応	坂口反応	パウリ反応
化合物 9	53	12	10	17.8	紫	−	−
ホモアンセリン	52	12	10	17.7	紫	−	−
化合物 10	52	14	11	19.4	茶→紫	−	−
L-セリル-L-リジン	52	13	12	19.6	茶→紫	−	−
化合物 11	53	19	11	21.7	紫	−	−
γ-アミノブチリル-L-リジン	52	18	10	21.8	紫	−	−
化合物 12	40	37	28	19.9	赤紫→紫	橙赤	−
L-アルギニル-L-アラニン	40	38	28	19.9	赤紫→紫	橙赤	−
化合物 13	51	60	47	17.7	紫	橙赤	−
L-アルギニル-L-ロイシン	51	60	47	17.3	紫	橙赤	−
化合物 14	52	52	41	16.5	赤紫→紫	橙赤	−
L-アルギニル-L-フェニルアラニン	53	52	42	16.5	赤紫→紫	橙赤	−

※ 沪紙クロマトグラフィーの展開溶媒は，PAA＝ピリジン-アセトン-3Nアンモニア水(10:6:5)，IpF＝イソプロパノール-ギ酸-水(8:1:1)，BuA＝n-ブタノール-酢酸-水(4:1:1)

※※沪紙電気泳動はピリジン-酢酸-水(189:10:1) pH 3.4を緩衝液とし，100V/cm，30分泳動した。陰極への泳動距離をcmで示した。　沪紙はいずれも東洋沪紙 No. 51 を用いた。

融点，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動の性質(表1)はよく一致したので，この物質をアルギニルフェニルアラニンと同定した。

カルボベンゾキシ-ニトロ-L-アルギニル-L-フェニルアラニンメチルエステル　カルボベンゾキシ-ニトロ-L-アルギニン 1.77 g とフェニルアラニンメチルエステル塩酸塩 0.97 g から混合酸無水物法で合成，メタノール-エーテルより結晶 820 mg (31%) m.p. 125-127℃ を得た。

カルボベンゾキシ-ニトロ-L-アルギニル-L-フェニルアラニン　上記メチルエステル 800 mg をけん化後，水-メタノールより結晶 530 mg (68%) m.p. 211-212℃ を得た。

L-アルギニル-L-フェニルアラニン　上記化合物 500 mg を接触還元後，酢酸塩とし，水-エタノールより結晶させ，300 mg, (73%) m.p. 134-138 ℃ を得た。

L-アルギニル-L-アラニン，L-アルギニル-L-ロイシンも同様の方法で合成した。

総　括

牛脳150コ，58.05 kg をイオン交換クロマトグラフィーの組合せにより精製，2種の塩基性アミノ化合物を分離，4種を精製した。酸加水分解，N末端決定により構造を推定，合成し，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動の性質，分離化合物では赤外吸収スペクトル，融点測定によりそれぞれ，γ-アミノブチリル-1-メチルヒスチジン(ホモアンセリン)，セリルリジン，γ-アミノブチリルリジン，アルギニルアラニン，アルギニルロイシン，アルギニルフェニルアラニンと同定した。

2 牛脳内アミノ化合物の同定（Ⅳ）

柿本泰男・金沢　彰・清水宏俊
中嶋照夫・宮本英七・佐野　勇
（阪大・医・神経）

Ⅰ,Ⅱおよび Ⅲ報以外に以下の5種のアミノ化合物を牛脳から分離した。

実験結果

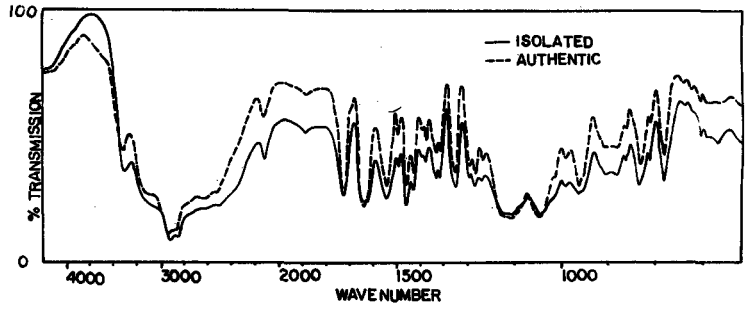
1)ホモカルノシン：本物質はPisanoらによって哺乳動物の成分として報告されたが，結晶として分離されておらず、同定法は満足すべきものではない。Ⅲ報の第1分画をピリジン-ギ酸-水混合液(4：1：45)で緩衝化した3×50cmのAmberlite IR-120×8(100～200メッシュ)のカラムで同じ緩衝液で展開し、142-468 mlの分画を集めた。この減圧乾固物をピリジン-ギ酸-水混合液(2：1：47)を緩衝液とし、3×55cmの同じレジンのカラムで同様の方法で展開し、406-1432 mlの分画を減圧濃縮した。これをさらに3×40cmのAmberlite IR-120×8 (200-400メッシュ), NH_4^+ 型に吸着，0.1Mアンモニア水で溶出，290×530 mlの分画を減圧乾固した。乾固物を10mlの水にとかし，1N硫酸でpH2とし減圧濃縮し，油状残渣を水10ml，エタノール15mlから結晶化し、それを水エタノールから再結晶し1.15gの針状結晶を得た。m.p. 236-238°. 再結晶により1.09g，m.p. 240-242°(dec)(報告値240°)，$C_{10}H_{18}N_4O_7S$ (338.34)，分析値；C 35.14，H 5.30，N 16.32，計算値；C 35.50，H 5.36，N 16.56。分析値は理論値に一致する。

赤外吸収スペクトルは図1のように分離品と合成品とで一致した。旋光度は分離品で $[\alpha]_D^{26}$ −9.1 (c, 1.14 0.2N HCl)，合成品で $[\alpha]_D^{26}$ −7.6 (c, 1.14 0.2N HCl)であり，上記の結果は分離物質は γ-アミノブチリル-L-ヒスチジンであることを示す。

2)化合物15：第6分画(Ⅲ報)を3×47cmのDowex-50(200-400メッシュ)，NH_4^+ 型に吸着，0.4Mアンモニア水855ml ついで0.6Mアンモニア水で展開、溶出液673-1193 mlを減圧乾固した。乾固物を3%ピクリン酸エタノール溶液にとかし，一夜冷蔵庫に保存沈殿を沪別した。上清にエーテル20 mlを加え一夜冷蔵庫に保存し結晶を分離，母液にさらにエーテル20 mlを加え得られた結晶を前者の結晶とあわせた。エタノール-エーテルから再結晶後、1NHClにとかし、エーテルでピクリン酸を充分のぞき水戸を減圧乾固した。乾固物をエタノール10mlより結晶化し、さらにエタノール20ml-エーテル10 mlより再結晶し，20.4mgの結晶 m.p. 154-157°を得た。再結晶により融点は上昇しなかった。元素分析値;C 37.07，H 7.91，N 12.34 O 14.87，Cl 28.42，$C_7H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$ の計算値；C 36.05，H 7.78，N 12.02，O 13.72，Cl 30.41。測定値でClが低くく，他の元素で高いが，他の塩基性アミノ酸と同じく一部が1塩酸塩を形成していると考えればよい。母液をあわせ除塩後、p-ヒドロキシアゾベンゼン-p-スルフォン酸塩として222mg，m.p. 200-205°，水-エタノールから再結晶し198mg，205-208°を得た。

本物質は酸加水分解に安定であり、沪紙クロマトグラフィー、沪紙電気泳動上の性質赤外吸収スペクトルはリジンのそれらに類似する。元素分析の結果は化合物15はリジン

図1　分離および合成ホモカルノシンの赤外吸収スペクトル



より-CH_2-だけ大きい分子であることを示している。

本物質の質量分析を大阪大学理学部化学教室芝博士に依頼した。このアミノ酸のエチルエステルの質量分析パターンは図2のようである。この物質の分子量は160(エチルエステル188)で元素分析値と一致する。質量分析パターンの解析から本物質の構造は図3のように推定される。自然界における存在は未報告である。

図2 化合物15の質量分析パターン

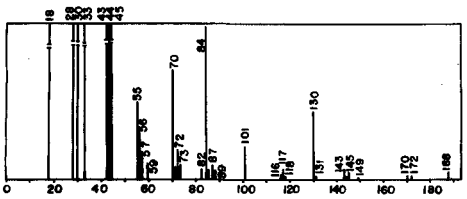
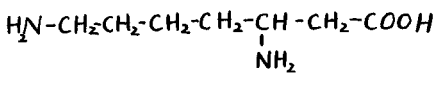


図13

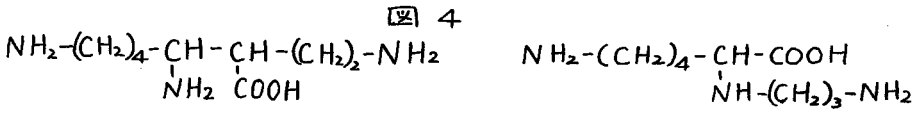


3,7-diaminoheptanoic acid

3)化合物16：第7分画(Ⅲ報)を3×47cmのDowex 50×2(200-400メッシュ)，NH_4型のカラムに吸着させ，0.6Mのアンモニア水で溶出し溶出液の507-780mlを集めて減圧乾固した。これを1%ピクリン酸エタノール溶液3mlにとかし，冷却後沈殿を沪別，沈殿を2mlのエタノールで洗い洗浄液を母液に加えた。この溶液に10mlのエーテルを加え一夜冷蔵庫におき沈殿物を集めた。これを0.5ml 1NHClにとかしエーテル(10ml 5回)でピクリン酸をのぞいた。水戸を減圧乾固し過剰のHClをのぞいた後，乾固物を5mlのエタノールにとかした。不溶物をのぞきピリジン0.3mlを加え一夜冷蔵庫に保存し沈殿物を集め，これを1mlの水，2mlのエタノールから結晶化し23mg，m.p. 238-242°を得，さらに水-エタノールから再結晶し14.4mg m.p. 240-244°を得た。C,37.79，H 7.97，N 13.79，O 17.54，$C_9H_{21}N_3O_2\cdot 2HCl\cdot H_2O$に対する計算値はC,36.74，H 8.60，N 14.29，O 16.32。

本物質は酸加水分解に対して安定である。アメリカNational Institute of HealthのDr. WitkopおよびDr. Dalyに質量分析を依頼した。その結果を表1に示す。この物質の分子量は203で上記の分子式と一致する。質量分析スペクトルの結果から推定される構造は図4a(Witkop氏による)かb(芝氏による)である。

図4



a　　b

表1:化合物16の質量分析スペクトル

質量数	強度 (%total)	フラグメントの分子式
203	非常に少	($C_9H_{21}N_3O_2$)
186.138	1.0	$C_9H_{18}N_2O_2$
185.131	5.5	$C_9H_{17}N_2O_2$
160	2.4	($C_7H_{16}N_2O_2$)
159	3.1	$C_7H_{15}N_2O_2$
142.084	0.6	$C_7H_{12}NO_2$
141.137	1.1	$C_8H_{17}N_2$
140.105	3.8	$C_8H_{14}NO$
100.080	2.5	$C_5H_{10}NO$
98.099	4.4	$C_6H_{12}N$
96.082	3.6	$C_6H_{10}N$
84.082	7.9	$C_5H_{10}N$
70	3.0	(C_4H_8N)
56	3.0	(C_3H_6N)
44	7.0	(C_2H_6N)
30	13.2	(CH_4N)

4)化合物17：第2分画(Ⅲ報)を3×55cmのDowex-50 ×2(200-400メッシュ)NH_4型のカラムに吸着させ0.2Mアンモニア水で溶出，溶出液の432－630mlの分画を減圧濃縮した。これをピリジン-ギ酸-水緩衝液(4：1：45)で緩衝化した2×55cmのAmberlite IR-120(200-400メッシュ)に吸着，同緩衝液で展開し溶出液の1213－1390mlの分画を減圧濃縮した。塩酸でpHを3-4とし減圧乾固し，水0.2mlにとかしエタノール3.0mlを加え析出する沈殿をのぞいた。上清にエタノール4mlを加え冷蔵庫に数日保存沈殿をのぞき、上清に2mlのエーテルを加え再び冷蔵庫に数日保存した。析出した結晶を水0.2mlエタノール7mlから再結晶し25.0mg，m.p. 215-218°(dec)を得た。元素分析値はC 54.31，H 7.96，N 10.26，O 24.53，Cl 3.55であるがClの含量がひくく，またバイルスタインテストでClを検出しなかった。そこで化合物が不純であり、Clの値を一応混入物によるものと考え補正すると，その値から推定される分子式は$C_6H_{11}NO_2$か$C_{12}H_{21}N_2O_4$が推定されるがその構造はまだ推定出来ない。本物質は酸加水分解によって分解するが分解産物は同定していない。

5) 化合物18の分離と同定：28.5kgの牛脳を第1報にのべたように処理し両性電解質とアミン分画を得，これを3分し6×42cmのDowex-1×8(100-200メッシュ)酢酸型のカラムに酸性物質を吸着させた。漏出液を減圧濃縮し合わせて800mlとした。3日間冷蔵庫に保存し析出した結晶を除いた。沪液のpHをピリジンで5.2とし2分しそれぞれを6.5×36cmのAmberlite IR-120×8(100-200メッシュ)アンモニウム型にとおし塩基性分画を吸着させ，漏出液の510－800mlを採取し約800mlに減圧濃縮した。沪過後沪液を6×70cmのAmberlite IR-120×8(100-200メッシュ)ピリジン型に吸着させ、レジンを水洗し漏出液800－2300mlを集め，450mlに減圧濃縮した。これを数日冷蔵庫に保存し沪過し沪液を150mlに濃縮した。この分画は中性α-アミノ酸をふくむ分画である。

この分画のpHをギ酸で2とし5.3×137cmのAmberlite IR-120，×8(200-400メッシュ)に吸着させた。レジンは前もってピリジン-ギ酸-水(1：9：190)で緩衝化し同緩衝液で溶出した。1760-2880mlを溶出液を減圧濃縮し，2×30cmのDowex-1，×10(200-400メッシュ)に吸着させた。レジンは前もって2,4-ルチジン-

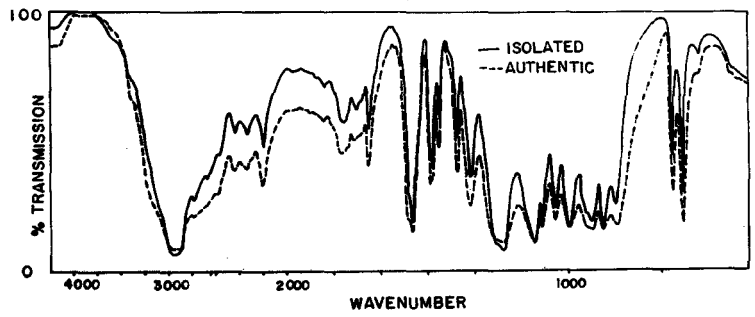
酢酸-水(10.7; 1.5: 488)で緩衝化し、溶出にも同じ緩衝液を用いた。140 ml後溶出液を2,4-ルチジン-酢酸-水(10.7 : 0.3 : 489)に変えた。51-172 mlの溶出液を減圧乾固し、これを5 mlの水にとかし炭末で処理し再び減圧乾固した。乾固物を水1 ml, エタノール1 ml, アセトン0.5 mlから結晶させ18 mg, m.p. 255°(dec)を得た。結晶の約半量を0.05 mlの熱水にとかし, 0.1 mlのエタノールを加え無色針状結晶, m.p. 270°(dec)を得た。分析値 C 19.41, H 6.57, N 11.12, $C_2H_8NO_3P$ に対する計算値はC, 19.21, H 6.44, N 11.20 でよく一致する。

本物質は酸加水分解には安定でリン酸を遊離しないが、灰化するとリンを検出した。本物質の沪紙クロマトグラフィー, 沪紙電気泳動の性質は2-アミノエチルリン酸のそれと類似するので元素分析の結果とあわせて分離した物質は1-あるいは2-アミノエチルフォスフォン酸であると推定した。合成品(東京大学農芸化学堀口氏の提供)と比較したところ分離物質はクロマトグラフィーで2-アミノエチルフォスフォン酸と一致した。本物質は2種の結晶系をもち異った赤外吸収スペクトルを示すが, 分離物質はβ-型の結晶と赤外吸収スペクトルで一致した。沪紙クロマトグラフィーおよび高圧沪紙電気泳動における化合物の性質を表2に示す。赤外吸収スペクトルは図5に示す。

表2 分離物質のクロマトグラフィー、電気泳動

	ピリジン-アセトン-アンモニア水-水 (50:30:5:20)	イソプロピール アルコール-ギ酸-水 (8:1:1)	n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:1)	沪紙電気泳動 pH3.4, 100 V/cm 30 min. (cm to cathode)
結晶1	0.51	0.27	0.21	24.6
結晶2	0.51	0.02	0.04	27.7
リジン	0.45	0.12	0.12	22.5
2-アミノエチルフォスフォン酸	0.02	0.23	0.24	0.8

図5 分離および合成2-アミノエチルフォスフォン酸の赤外吸収スペクトル



考察と結論

1)ホモカルノシンはこれまで結晶として分離されていなかったが, 結晶として分離し元素分析、赤外吸収スペクトルで同定した。

2)2種の従来未同定の物質を分離し、元素分析、赤外吸収スペクトルおよび質量分析の結果からその構造を[1]3,7-ジアミノヘプタン酸[2] 2-(2'-アミノエチール)-3,7-ジアミノヘプタン酸あるいはNα-(3-アミノプロピール)-リジンと推定した。3)1つの塩基性アミノ化合物を分離したが構造は未決定である。4)中性分画から2-アミノエチルフォスフォン酸を分離同定した。本物質は牛胃内プロトゾアにふくまれることが知られ、脳内の本物質もプロトゾアによって産生されたものであるかも知れない。脳リピッド中には本物質は検出されなかった。

3* 人脳内のシスタチオニン

清水宏俊・柿本泰男・佐野　勇
（阪大・医・神経）

シスタチオニンは他の組織に比べ脳，特に人脳，サル脳に高濃度に存在し，胎児脳に比し成人脳でより高濃度に存在することなどから興味深いアミノ酸である(1,2)。奥村ら(2)はシスタチオニン濃度が人脳で特に高い理由を検討し，脳あるいは全身の代謝状態や死後変化などがシスタチオニン濃度を高くする可能性を示唆した。彼らの実験では脳内の部位による濃度差，ことに白質，灰白質の差には注意が払われず，死後変化についても調べられていない。シスタチオニンの脳内分布はその機能的意義を知るために重要と思われるにもかかわらず，わかっていない。従来シスタチオニンはイオン交換クロマトグラフィーにより他のアミノ化合物を分離した後，ニンヒドリン反応により比色定量されているが，この方法は多数の試料を同時に測定するのには適さない。われわれはチオエーテル化合物がヨウ化白金酸から特異的にヨウ素を遊出させる反応(3)を利用して，この目的に合した新しいシスタチオニンの定量法を考案した。すなわち簡単なイオン交換クロマトグラフィーによりシスタチオニンを他のチオエーテル化合物から分離した後，ヨウ化白金酸試薬と反応させ，生じたヨウ素をでんぷんの存在下でチオ硫酸ソーダ溶液で滴定する．この方法を用いて人脳内でのシスタチオニンの分布や，死後変化などについて測定し，つぎの結果を得た。

1　脳内シスタチオニン濃度の死後変化：　手術に際し後頭葉正常組織より約1.5gの組織を得．脳の表面に直角になるように組織を速やかに切截して多数の切片とし，切片を交互に分けて2群とした。この両群は白質と灰白質の割合がほぼ等しいと考えられた。1群は直ちに三塩化酢酸溶液でホモジェネートとし，他の1群は10時間室温に放置後ホモジェネートとし両群のシスタチオニン濃度を測定したが，両者間に有意差は認められなかった。ラッテ脳を左右両半球に分け，1側は致死直後，他側は1,8,16時間後にそれぞれ三塩化酢酸溶液を加えてホモジェネートとし，各対のシスタチオニン濃度を比べた実験でも各対間に有意差は認められなかった。これらの実験から，少なくとも死後10時間以内では脳内シスタチオニン濃度に著変はないと考えられる。

2　生検人脳のシスタチオニン濃度：　脳の器質性疾患の手術に際し術技上の必要から得られた正常部組織を用いた。白質と灰白質とがほぼ一定の割合で含まれるような約1gの組織を試料とし，そのシスタチオニン濃度を測定した(表1)。疾患の種類や，経過，重篤度などにはあまり関係せず，新鮮人脳のシスタチオニン濃度は常に高い。

(表1)
Concentration of cystathionine in biopsy materials of human brain
(corrected by recovery of 90.8%)

Case	Age (yr)	Sex	Disease	Part	Cystathionine (μg/g wet tissue)
1	43	M.	astro-cytoma	frontal lobe	318
2	26	M.	aneurysma	occipital lobe	349
3	22	M.	head injury	temporal lobe	511
4	34	F.	acusticus neurinoma	cerebellum	220
5	43	F.	meningioma	occipital lobe	281

3　人脳内シスタチオニンの分布：　3例の剖検の脳(いずれも男)で各部位におけるシスタチオニン濃度を測定した(表2)。大脳では灰白質に比し白質の方

(表 2)

Distribution of cystathionine in various parts of human brain. (μg/g wet tissue) (corrected by recovery of 90.8%)

Case No.	I	II	III
Cause of death	head injury	frozen to death	myocardial infarction
Hours after death	12-13	12-14	7-9
Age(years)	63	55	50
Frontal lobe (gray matter)	20	14	69
(white matter)	233	213	272
Temporal lobe (gray matter)	33	43	66
(white matter)	386	282	264
Parietal lobe (gray matter)	84	34	70
(white matter)	330	314	323
Occipital lobe (gray matter)	197	79	201
(white matter)	502	373	426
Corpus callosum	295	226	280
Capsula interna			154
Nucl. caudatus	86	146	127
Nucl. lentiform.	223	155	174
Gyrus dentatus			43
Gyrus hippocamp.	95	152	174
Amygdara			54
Thalamus	224	212	206
Hypothalamus	98	34	66
Crus cerebri	86	80	
Corpus quadrig.	74		66
Pons (ventral)	149	51	40
(dorsal)	79	99	27
Cerebellum (gray matter)*	143	32	44
(white matter)	424	131	201
Medulla obl. (ventral)	91	89	101
(dorsal)	69	51	
Hypophysis	11	11	17

*contaminated by a small portion of the white matter.

(表 3)

Subcellulal distribution of cystathionine in the gray and white matters of human cerebrum.

Exp.		Total (mg)	Nucl. (%)	Mitoch. (%)	Micros. (%)	Supern. (%)
1	Gray matter	0.34	3.0	23.8		43.4
	White matter	1.01	4.5	14.6		74.5
2	Gray matter	0.39	11.4	17.1	0.6	69.2
	White matter	1.55	5.8	13.7	8.1	71.9

*Six g of each specimen was homogenized with 60 ml of 0.32 M sucrose.

(表 4)

Activities of cystathionine synthetase and cystathionase in human brain. (μmole/g of wet tissue/hour)

	Activity of cystathionine synthetase (cystathionine formed)	Activity of cystathionase (cysteine formed)
Human gray matter	0.09	0.03
white matter	0.11	0.03
Rat liver	1.94	1.69

がはるかに濃度が高く，他の部位の濃度も視床とレンズ核が例外的にやゝ高いのを除けばほゞ灰白質と白質の割合で規定される。

4 シスタチオニンの細胞内分布： 剖検の脳(死後7および9時間，事故死)の前頭葉を白質と灰白質とに分け，両者をそれぞれMandelら(4)の方法で4つの細胞内分画に分けて各分画のシスタチオニン含量を測定した(表3)。白質灰白質ともにシスタチオニンの大部分は非顆粒分画から回収される。

5 シスタチオニンの合成，分解に関与する酵素の活性： シスタチオニン合成酵素はBinkley(5)の方法で，シスタチオニン分解酵素はBinkley(6)の方法で精製し，ヒトの大脳白質，灰白質とラット肝とについてその酵素活性を比較した(表4)。人脳での両酵素の活性は著しく低い。

(文献)

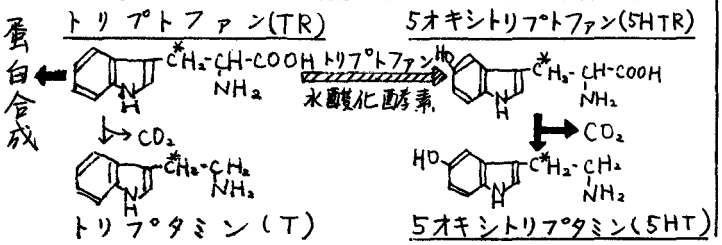
(1) Tallan,H.H. et al., J.Biol.Chem. 230, 707(1958)
(2) Okumura,H. et al., J.Biochem.(Tokyo) 47, 315(1960)
(3) Njaa,L.R. Acta Chem. Scand. 17, 1169(1963)
(4) Mandel,P. et al., J.Neurochem. 8, 126(1960)
(5) Binkley,F. J.Biol.Chem. 191, 531(1951)
(6) Binkley,F. "Methods in Enzymology" vol.3 p.311(1955)

4 トリプトファン水酸化酵素
—— 脳におけるセロトニン生合成酵素 ——

中村重信・市山　新・西塚泰美
早石　修　（京大・医・医化）

セロトニンがトリプトファンより5オキシトリプトファンを経て合成されることは，古くから知られていた。(14)(図1) この内第二の反応即ち5オキシトリプトファンが炭酸ガスと5オキシトリプタミン（セロトニン）になる反応はL-アミノ酸脱炭酸酵素によって触媒されることは，Lovenberg らにより報告された。(8) 一方，最初の反応即ちトリプトファンが5オキシトリプトファンになる水酸化反応は従来多くの試みにもかかわらず，*in vitro* での証明は困難であった。ところが，昨年 D. g. Grahame-Smith は動物体内におけるトリプトファンの水酸化反応をはじめて脳について記載し，脳幹部に特に活性が強いことを記載した。(3)われわれは，この反応を触媒するトリプトファン5水酸化酵素をウサギ脳幹部より精製し，その性質を明らかにしたので報告する。

[図1] 脳におけるトリプトファンの運命



[実験材料] (10,11)

1)テトラヒドロビオプテリン（H_4BP）はビオプテリン（2アミノ-4ヒドロキシ-6[1,2ジヒドロキシプロピル(Lエリスロ)]プテリジン）を亜鉛-塩酸中で還元して作った。(6) テトラヒドロ葉酸は葉酸を水素気流中で接触還元して作った。(12)

2)L-アミノ酸脱炭酸酵素は海猿腎臓あるいは白鼠肝臓よりそれぞれ Udenfriend (8) Awapara (1) の方法により精製し使用した。なおこの標品にはトリプトファン水酸化酵素の活性は認められなかった。

3)ブドウ糖脱水素酵素は牛肝臓のアセトン粉末より Strecker の方法により精製した。(13)

4)テトラヒドロビオプテリン（H_4BP）産生系は Kaufman の方法により精製し，これを用いてジヒドロビオプテリン（H_2BP）キノイド型から H_4BP への転換を行った。(7)

5)ビオプテリン，ハブ毒，ブドウ糖6燐酸脱水素酵素はそれぞれ Dr. A. K. Maas，東大水野教授，岡本宏氏よりの御好意による。

6)D,L-トリプトファン C^{14}[indoryl-(alanine 3-C^{14})]，D,L-5オキシトリプトファン^{14}C，セロトニン-C^{14}，フェニルアラニン C^{14}，チロジン C^{14} は Radiochemical Centre，Tracer-Lab より求め，その他の試薬は市販のものを用いた。

[水酸化酵素活性の測定方法]

トリプトファン水酸化酵素の活性測定の大要はトリプトファン C^{14}（TR）より生じた5オキシトリプトファン（5HTR）-C^{14} を更にL-アミノ酸脱炭酸酵素の存在の下に5オキシトリプタミン C^{14}（5HT）とし，これを高圧沪紙電気泳動により分離し，Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counter によって沪紙上の放射能を測定した。

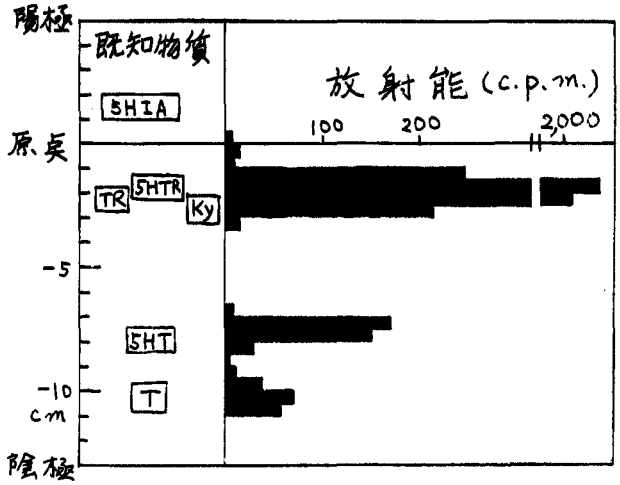
[実験結果] a) 5HT あるいは 5HTR の同定

前述の方法を用いて行った反応の一例を示すと次頁の(図2)のようになる。反応液組成は次の(表1)に示すとおりで，25°C 60分間振盪静置後，100°C 1分の加熱によ

〔表1〕反応液組成

燐酸緩衝液 pH7.0	100μモル
D,LトリプトファンC^{14} (5万c.p.m.)	5mμモル
NADP (TPN)	200mμモル
ブドウ糖	50μモル
ブドウ糖脱水素酵素	
5オキシトリプタミン	200mμモル
ニコチン酸アミド	20μモル
PALP (ビタミンB_6)	200mμモル
アミノ酸脱炭酸酵素	
メルカプトエタノール	40mμモル
H_4BP (還元ピオプテリン)	40mμモル
H_4BP産生系	
ウサギ脳ホモジネート	
(全量)	1.0ml.

〔図2〕トリプトファン(TR)より5オキシトリプタミン(5HT)の生成—高圧沪紙電気泳動



り反応を停止させた。これを遠沈して上清0.1mlをWhatman No1沪紙に置き，ピリジン酢酸緩衝液pH5.0の系で40分間 3.0KV，8mAで電気泳動を行った。既知のTR 5HT，キヌレニン(Ky) 5オキシインドール酢酸(5HIA)，5HT，トリプタミン(T)を同時に電気泳動し，それらをエールリッヒ試薬にて発色させた。放射能は0.5cm巾の紙片を液体シンチレーション測定器で測定した。(図2) なおこの反応液中のブドウ糖—ブドウ糖脱水素酵素はNADPH(=TPNH)の産生のため加え，ブドウ糖6燐酸—ブドウ糖6燐酸脱水素酵素を併用した。ニコチン酸アミドはNADPの分解を防ぐため，PALPは脱炭酸酵素の助酵素として，非放射性5HTは反応で生じた5HT C^{14}が粗酵素標品でさらに分解されて生ずる誤差を最小限にするため加えた。反応産物の同定はこの他に，5HTR-C^{14}は Gahane-Smith の電気泳動法により(4)，5HTC^{14}は Mason-Berg の溶媒系および n-Butanol-酢酸-水(5:1:1)の溶媒系によるペーパークロマトグラフィーおよびVaneの方法による生物検定によって同定した。(15)

b) トリプトファン水酸化酵素の分布

本水酸化酵素を(表1)のようにして測定し，種々の臓器部分における活性を比較した結果，(表2)のようになった。但し，酵素量は三倍量用いた。

(表2)トリプトファン水酸化酵素の分布　(単位：c.p.m.)

動物	部位	5HT	動物	部位	5HT	動物	部位	5HT
ウシ	脳全体	53	ウサギ	脳全体	620	白ネズミ	胃・十二指腸	81
〃	大脳皮質	2	白ネズミ	脳全体	172	〃	小腸	48
〃	大脳核	48	〃	大動脈	13	〃	盲腸	183
〃	視床・視床下部	224	〃	肝臓	23	〃	大腸	61
〃	3丘體・小脳	198	〃	腎臓・副腎	15			

c) 酵素の可溶化と精製

ウサギ脳幹部に最も強いトリプトファン水酸化酵素が認められたので，これを酵素源として用い，可溶化を試みた。ウサギ脳幹部を0.14MKCl中でホモゲナイズしたも

のを懸濁液，これを10,000×g，10分で遠沈して落ちたものをKClで洗浄後，pH7.0の燐酸緩衝液に懸濁したものを顆粒部分とし，これをハブ毒，リパーゼ，Na-デオキシコール酸(DOC)，Tween 20と80の混合液をそれぞれ加え，37°Cで1時間処置した後，遠沈で上清に来たものを可溶化液とした。その結果は下の(表3)の如く，活性は顆粒部分に存在し，それをハブ毒で処理することにより可溶化されたのがわかる。われわれはこの可溶化の際約5倍の活性上昇を認めた。この可溶化液を(表4)のごとく精製し，比活性にして約100倍，収量550%の標品を得た。

(表3) トリプトファン水酸化酵素の可溶化

標品	5HT	収量
懸濁液	56 cpm	100 %
上清 (10,000×g 10分)	11	19
顆粒部分	32	58
ハブ毒処理	260	464
リパーゼ処理	83	148
DOC処理	168	300
Tween 20 +80 処理	208	371

(表4) 水酸化酵素の精製

分画	比活性	収量
ハブ毒可溶化液	0.41	100
0.25% プロタミン沈澱	2.3	143
硫安 (35～50%飽和)	19.8	385
熱処理 (60° 3分)	42.3	550

比活性：mμモル/時間/mg蛋白

d) 酵素の性質

1) Cofactor 要求性

上記精製酵素(熱処理分画)を用いて，諸種の物質を添加してみた。反応液組成は(表1)のとおりである。(表5)で示されるとおり，1)NADPH，2)テトラヒドロビオプテリン(H_4BP) 3)メルカプトエタノールが反応に必須であることを示す。

(表5) トリプトファン水酸化酸化酵素のCofactor要求性

反応液組成	H.T.	活性(%)
完全系	272	100
−NADP +H_4BP (1.5μモル)	121	45
−NADP −H_4BP	42	15
−H_4BP	47	17
−H_4BP + テトラヒドロ葉酸 (1.5μモル)	48	17
−H_4BP還元酵素 + H_4BP (1.5μモル)	296	109
−NADP，ブドウ糖，脱水素酵素+NADPH	234	86
−メルカプトエタノール	107	39
−メルカプトエタノール+pCMB	10	4

(図3) トリプトファン水酸化の模式図

トリプトファン + O_2 ⇄ H_4BP ⇄ TPN(NADP)

5オキシトリプトファン+H_2O ⇄ H_2BP ⇄ TPNH(NADPH)

トリプトファン水酸化酵素　テトラヒドロビオプテリン還元酵素

この表よりKaufman(7)が肝臓のPhenylalanine水酸化酵素についてたてた下記のような系がトリプトファンの水酸化にも関与していることが考えられる。(図3)

2) 基質特異性について

Freedlandら(2)は肝臓のフェニルアラニン水酸化酵素がトリプトファンの水酸化を行うと報告した。一方永津ら(9)により脳のチロジン水酸化酵素が記載されたが，この酵素はフェニルアラニン，チロジンいずれをも基質にする(5)がトリプトファンは水酸化しないことが明らかにされた。そこでわれわれは，フェニルアラニン，チロジンとトリプトファンの水酸化が脳で起っているかを調べた。その結果(表6)より精製酵素標品ではフェニルアラニン，チロジンの水酸化反応が弱いこと，(表7)よりフェニルアラニン，チロジンによる阻害が認められないところから本酵素がトリプトファンに特異的なトリプトファン5水酸化酵素であろうと考えられる。

3)セロトニンの溶出について

ホモジェネートを用いて合成したセロトニン-C^{14}を反応後色々の操作を行い上清部分に現れたセロトニン量を調べたのが(表8)である。この表より0.2N KOH処理を行うとセロトニンC^{14}が沈澱部分より溶出して上清に来ることがわかる。即ち合成されたセロトニンが顆粒部分に吸着していて，アルカリ処理により遊離すると考えられる。次に5HT-C^{14}，5HTR-C^{14}をホモジェネートに加え25°1時間振盪静置した。その結果，5HT，5HTRは少量しか顆粒部分に吸着されず，(表8)のように上清・沈澱部分に大きな差はなく，de novoに合成されたものとは異るのではないかとも考えられる。

[考察]

顆粒部分がセロトニンの合成(トリプトファン水酸化酵素)を阻害している事実(表4,5)から，この顆粒にセロトニンが結合して，反応を調節しているのではないかという大胆な仮説をたて，それを現在証明すべく研究を進めている。

[結論]

1)トリプトファンの水酸化酵素を脳より精製した。

2)本反応はテトラヒドロビオプテリンを直接の水素供与体とする水酸化反応である。

3)フェニルアラニン，チロジンを基質にしないトリプトファン水酸化酵素である。

4)酵素的に合成されたセロトニンは顆粒に吸着して，反応を調節している可能性を指摘した。

(表6)脳における水酸化反応

標品	基質	産物
粗酵素	フェニールアラニン	0.4
	チロジン	0.6
	トリプトファン	0.7
精製トリプトファン水酸化酵素	フェニルアラニン	0.07
	チロジン	0.05
	トリプトファン	1.8

(表7)チロジン・フェニルアラニンの影響

添加物	5HT	阻害度
なし	168	%
10^{-3}Mフェニルアラニン	97	42
10^{-4}M	182	0
10^{-4}M チロジン	159	5

(表8)反応後の処理による5HTの溶出

処理	トリプトファン	セロトニン
なし	24576 c.p.m.	144 c.p.m.
遠沈上清	33712	121
アルカリ処理	19874	439
酸処理	20432	379

(表9) 5HTR-C^{14}，5HT-C^{14}，TR-C^{14}の外部から顆粒へのとり込み

基質	上清部分	顆粒部分
トリプトファン(TR)	4458 cpm	284 cpm
5オキシトリプトファン	2516	88
5オキシトリプタミン	8607	50

[文献]

(1) AWAPARA, J., SANDMAN, R. P., and HENLY, C., Arch. Biochem. Biophys. 98, 520 (1962)
(2) FREEDLAND, R. A., WADZINSKI, I. M., and WAISMAN, H. A., Biochem. and Biophys. Research Communs. 5, 94 (1961)
(3) GRAHAME-SMITH, D. G., Biochem. and Biophys. Research Communs. 16, 586 (1964)
(4) GRAHAME-SMITH, D. G., Biochim. et Biophys. Acta, 86, 176 (1964)
(5) IKEDA, M., and UDENFRIEND, Personal communication
(6) KAUFMAN, S., Proc. Natl. Acad. Sci. 50, 1085 (1963)
(7) KAUFMAN, S., J. Biol. Chem. 239, 332 (1964)
(8) LOVENBERG, W., WEISSBACH, H., and UDENFRIEND, S., J. Biol. Chem. 237, 89 (1962)
(9) NAGATSU, T., LEVITT, M., and UDENFRIEND, S., J. Biol. Chem. 239, 2910 (1964)
(10) NAKAMURA, S., ICHIYAMA, A., and HAYAISHI, O., Federation Proc. 24, 604 (1965)
(11) 中村重信，市山新介，木野検也，西塚泰美，早石修 第17回酵素化学シンポジウム予稿集 41 (1965)
(12) O'DELL, B. L., VANDENBELT, J. M., BLOOM, E. S., and PFIFFNER, J. J., J. Am. Chem. Soc. 69, 250 (1947)
(13) STRECKER, H. J., in S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN (Editors), Methods in enzymology, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 335
(14) UDENFRIEND, S., TITUS, E., WEISSBACH, H., and PETERSON, R. E., J. Biol. Chem. 219, 335 (1956)
(15) VANE, J. R., Brit. J. Pharmacol., 12, 344 (1957)

7 Infusion Method による脳アミノ酸・蛋白代謝の研究

渡 辺 昌 祐（岡大・神経精神医学）

脳のアミノ酸，蛋白質の代謝活性はかなり高いと云うことがアイソトープ技術導入と共に認められるに至っている。(Friedberg et al (1948), Gaitonde and Richter (1953), Lajtha et al (1957) Furst et al (1958), Mase et al (1962) 一方血液と脳の間でアミノ酸交換はかなり速く(Lajtha et al (1957) (1959), Appel et al (1960), Chirigos et al (1960) 脳中遊離リジンは1時間以内に血中リジンによっておき代えられる。(Lajtha et al (1957))。 これらの動的状態を知るためには血中，脳中，蛋白質中のアミノ酸の放射能比を直接測定することによってのみ正確な値を得ることはいうまでもなり。幸運にも最近のアミノ酸自動分析機と continuous Liquid Flow Detector の発達によりアミノ酸の放射能比を今迄の方法よりも正確かつ迅速に決定することが可能になった。この方法は Infusion Method により L-Leucine-^{14}C の脳遊離アミノ酸プール，脳蛋白への incorporation を測定し，併せて脳遊離アミノ酸の動的状態について考察した。Infusion Method とは，放射性アミノ酸を腹静脈より連続的に一定濃度で infuse し，実験中，血液中のアミノ酸の放射能比を一定に保たせるもので，この点では脳灌流法 (A. Geiger (1958) のそれと一致している。

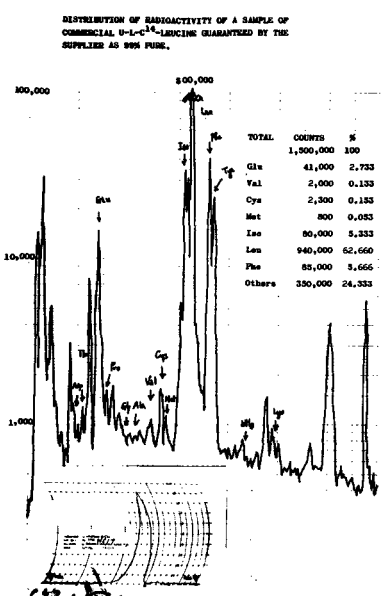
実験方法

Purification of Radioactive Leucine 市販の U-L-Leucine-^{14}C をテクニコン自動アミノ酸分析機で分析し，ロイシン分画をDowex 50 カラムで脱塩後使用した。市販 U-L-Leucine-^{14}C には，種々の contaminant が包有されていることがあり，使用前再度精製することが望ましい。その一例を第一図に示した。

実験動物は成猫を用い，精製された U-L-Leucine-^{14}C 50μC を実験開始と共に静注し以後 10分間に10μC の割合で追加連続静注した。生理的なロイシンの血中レベルに変動を与えないように cold ロイシンは加えなかった。血液サンプルを反対側腹静脈より採血し，血清アミノ酸定量に用いた。

脳は，実験終了時切り出しドライアイス，アセトンで固定後 10倍容の 7% PCA で homogenate し上清を酸可溶性分画とした。沈査を Vaba et al (1957) の方法で脂質を，Schneider法 (1945) で核酸分画を除去し，残りを蛋白分画とした。蛋白分画は一定量を 6N HCl で 110°C 24時間加水分解し，減圧下で塩酸除去後アミノ酸分析した。全蛋白分画の放射能の測定は Jaffay et al (1961) の方法によった。

アミノ酸の分析は Technicon 製自動分析機による Standard Procedure で，放射能の測定は Packard Series 314-F Continuous Liquid Flow Detector を用い，カラムからの effluent は直ちに counting cell を通り自動的に count が記録された。(Flowyn, 1964) 既知量の放射性



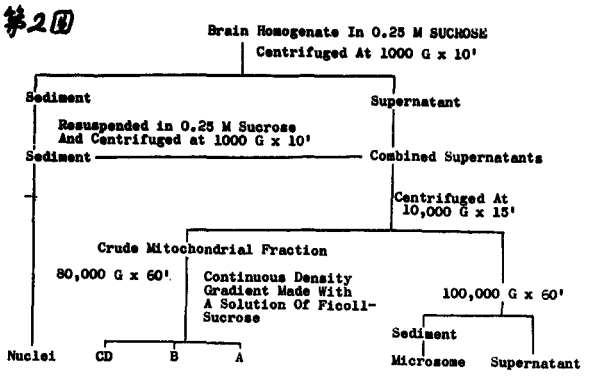
（第1図）

アミノ酸からcounting efficiencyを計算し得られた結果を補正した。

脂質，核酸分画，酸可溶性分画の放射能はTricarb Liquid Scincillation Spectrometerによりpassman等(1956)の方法によった。

脳組織のsubcellular fractionationは第2図に示した。ミトコンドリヤ分画はTanaka et al(1963)法でさらにA, B, CD分画に分けた。A分画にはfragmented axons, myelin sheath, synaptic vesicles, tom membrane, small vesicles of various size, a few nerve-ending: Bにはtypical nerve endings, broken membranes, C.Dにはおもにmitochondria，少量のnerve-endings, some membranous subcellular componentsよりなることを電子顕微鏡で再確認した。細胞分画後は10% TCAで酸可溶性分画をとり4回続けて洗った後上記方法で蛋白分画を得た。

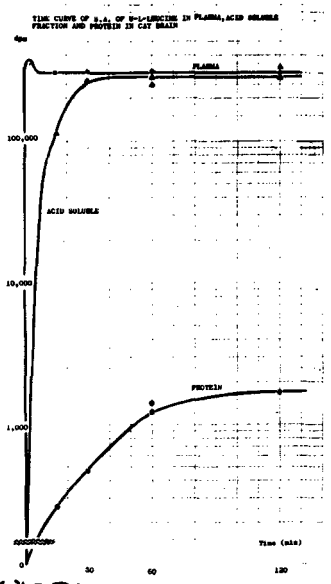
第2図



実験結果並びに考察

Radioactivity Level in the Blood, Acid soluble and protein

血中のRadioactivity Levelを一定に保つために上記方法でU-L-Leucine-^{14}Cを追加投注した。Radioactivity Levelは各実験により かなり異ってはいるが，同一実験内ではほぼ一定のレベルを実験中保つことが出来た。かい3例で異った時間の脳遊離ロイシン，蛋白ロイシンの放射能比(S.A)を測定し，血中のそれと比較すると脳中の遊離ロイシンと血中ロイシンがisotopic equilibriumに至る時間がわかる。血中，脳遊離，蛋白ロイシンのS.AのTime curveを第3図に示した。実験結果をわかり易くするため各実験の血中ロイシンのS.A.を300,000dpmとして示した。30分から60分の間にisotopic equilibriumが血中と脳遊離ロイシンの間でおきていることがわかる。そして実験2時間までほとんど直線的に蛋白へのincorporationが続いている。



(第3図)

Distribution of ^{14}C from U-L-Leucine-^{14}C in The Acid Soluble, Lipid, Protein and Nucleic Acid Fraction (Table 1)

最初の15分でかなり速いincorporationがAcid Solubleにあり，脳中の全放射能の71%がこの分画にみられた。又Acid Solubleの11～15%はDowex 50カラムのwater effluent中にみられた。このFraction中にはTCA cycle, glycolysisのintermediatesをふくんでいる。Acid Soluble Fractionからの放射能のlossは主としてProtein中へのincorporationによるもので あって蛋白中の放射能の割合は時間と共に増加し，実験開始1時間で脳全体の放射能の50%以上となりこの時間ではAcid Soluble中より多くなっている。Lipid fraction中の放射能は脳全体の6%を越えないが，主としてfatty acidへのincorporationであろう。

核酸分画へのincorporationは極めて少なかった。

Distribution of Radioactivity in the Free Amino Acids of the Cat Brain (Table 2)

実験15分で全アミノ酸中の放射能の63%がロイシンにみられた。その後は放射ロイシン中のnet countの連続的な増加はみられなかったがこれに反してロイシン以外のアミノ酸主としてグルタミン酸，アスパラギン酸，GABA，アラニン，グルタミンにみられた。かなり大きいradioactive peakがクロマトグラム上でタウリンの直後に認められたがこの点は目下検討中である。

ロイシンのS.Aは30分から2時間までほぼ一定で(第3図)そのレベルは血液中のそれとほぼ同じ値を保っているが全アミノ酸に対するrelative amountは時間と共に減り2時間後では約20%となる。

第1表

DISTRIBUTION INTO VARIOUS BRAIN FRACTIONS OF C^{14} DERIVED FROM U-L-C^{14}-LEUCINE. THE SPECIFIC ACTIVITY OF THE BLOOD LEUCINE WAS KEPT CONSTANT BY INFUSING INTRAVENOUSLY, AT A CONSTANT RATE, SALINE CONTAINING U-L-C^{14}-LEUCINE. EXPRESSED dpm/g. brain or dpm/ml blood.

	15 Min. Exp. 18	30 Min. Exp. 2	60 Min. Exp. 17	120 Min. Exp. 3
Acid Soluble	74,400 (71.13%)	71,800 (64.62%)	82,600 (74.69%)	86,000 (69.89%)
Neutral + Acidic Substances		7,800 (7.11%)		12,000 (9.88%)
Amino Acids		63,800 (57.51%)		74,000 (34.31%)
Proteins	26,400 (25.24%)	35,000 (31.89%)	39,600 (35.02%)	121,000 (56.12%)
Lipids	3,600 (3.44%)	3,800 (3.29%)	9,000 (7.93%)	7,000 (3.29%)
Base	200 (0.19%)	600 (0.54%)	600 (0.40%)	1,600 (0.74%)
TOTAL	104,600 (100 %)	110,000 (100%)	131,800 (100 %)	213,600 (100 %)
Blood	36,200	17,600	21,200	20,200

Table 2

INCORPORATION OF C^{14} DERIVED FROM U-L-C^{14}-LEUCINE INTO THE FREE AMINO ACIDS OF THE CAT BRAIN. THE SPECIFIC ACTIVITY OF THE BLOOD LEUCINE WAS KEPT CONSTANT BY INFUSING INTRAVENOUSLY, AT A CONSTANT RATE SALINE CONTAINING U-L-C^{14}-LEUCINE.

Counts

Amino Acids	15Min (Exp. 18) cpm/g brain(%)	30Min (Exp. 2) cpm/g brain(%)	60Min (Exp. 17) cpm/g brain(%)	120Min (Exp. 3) cpm/g brain(%)
Cystein) Taurine)	371 (3.72) 2,622 (9.82)	3,696 (16.88)	11,048 (51.11)	12,010 (17.47)
Met Sul				
Asp	882 (2.54)	1,008 (4.61)	1,048 (2.98)	8,840 (12.86)
Glutamine Aspargine Ser Ser	937 (3.68)	104 (0.48)	676 (1.90)	817 (0.78)
Gln	3,445 (13.41)	3,539 (16.17)	7,726 (21.76)	31,600 (46.97)
Proline				
Glycine			304 (0.86)	648 (0.94)
Ala	314 (2.00)	142 (0.65)	120 (0.34)	304 (0.44)
Val				
Met				
Cys				
Ile				
Leu	16,174 (62.96)	11,364 (52.02)	13,077 (36.81)	13,848 (20.14)
Tyr				
Phe				
GABA	476 (1.82)	2,009 (9.18)	1,518 (4.27)	1,266 (1.81)
Ethanolamine				
Tryptophane				
Orn				
Lys				
His				
Arg				
TOTAL	25,681	21,882	35,521	68,742

Table 3

INCORPORATION OF C^{14} DERIVED FROM U-L-C^{14}-LEUCINE INTO THE AMINO ACIDS OF THE PROTEINS OF THE CAT BRAIN. THE SPECIFIC ACTIVITY OF THE BLOOD LEUCINE WAS KEPT CONSTANT BY INFUSING INTRAVENOUSLY, AT A CONSTANT RATE SALINE CONTAINING U-L-C^{14}-LEUCINE.

Counts

Amino Acids	15Min (Exp. 18) cpm/g brain(%)	30Min (Exp. 2) cpm/g brain(%)	60Min (Exp. 17) cpm/g brain(%)	120Min (Exp. 3) cpm/g brain(%)
Cystein Taurine Urea		2,849 (10.14)	2,854 (8.03)	3,696 (4.72)
Aspartic		2,035 (7.14)	1,541 (2.72)	2,200 (2.81)
Glutamine				
Aspargine				
Serine				
Threonine				
Glutamic Acid	2,554 (11.60)	1,231 (4.32)	2,954 (5.26)	1,909 (2.44)
Pro				
Gly				
Ala				
Val				
Cys				
Met				
Ile				
Leu	19,458 (88.40)	22,337 (79.40)	49,311 (86.98)	70,976 (90.04)
Tyr				
Phe				
NH_4 + Ethanol				
Tryptophane				
Orn				
Lys				
His				
Arg				
TOTAL	22,012	28,492	56,690	78,381

また特にグルタミン酸，アスパラギン酸の放射能のrelative amountは時間と共に減少している。

Distribution of Radioactivety in the Amino Acids of the Brain Proteins (Table 3)

ロイシンの他に，グルタミン酸，アスパラギン酸に放射能が認められた。蛋白分画の全放射能の80～90%はロイシン中にみられ，約10%が他のアミノ酸とくにグルタミンとアスパラギン酸にみられクロマトグラム上でタウリンの直後にradio active peakがみられそれについては検討中である。

Incorporation into Subcellular Protein Fractions (Table 4) 各subcellular protein fractionへのincorporationはTable 4にみられる如くMicrosomeが最高で，ついでSupernatant, Nuclei, CD, A, Bの順序となっている。MitochondriaのCD fractionは，より pureなMtであり従来のcrude Mitochondriaにくらべると云う分incorporation rateが高くなった。

Calculation of the Flux of Leucine

血液中より脳のfreeアミノ酸プールに入るロイシン量を，実験15分，30分の2点を用いて計算し 0.108μM/g brain/60min を得た。血液中のロイシンのS.A.は．Infusion Methodでは実験中一定値(300,000 dpm)を保ってあり，Fluxを簡単に計

算出未3利点を持っている。得られたFluxと遊離ロイシンのプールサイズから脳の遊離ロイシンのTurnover timeを計算した。ロイシンのプールサイズが幾分少さく出ているからでもあるがLajthaらの結果とほぼ同単位の結果を得た。

Table 4

INFLUX TIME OF LEUCINE(FREE AND PROTEIN-BOUND) IN THE RAT BRAIN, THE SPECIFIC ACTIVITY OF THE BLOOD LEUCINE WAS KEPT CONSTANT BY INFUSING INTRAVENOUSLY AT 4.08 MG/HR RATE

	TIME	CONCENTRATION	DPM/μl	DPM/g BRAIN	DPM INCORPORATED INTO FREE BRAIN LEUCINE AND PROTEIN BOUND LEUCINE	FLUX OF BLOOD LEUCINE INCORPORATED INTO FREE LEUCINE POOL AND OF FREE LEUCINE INCORPORATED INTO PROTEIN BOUND LEUCINE FOR 60 MIN.	TURNOVER TIME
BLOOD FREE LEUCINE	15 min. 30 min.	0.070	300,000				
BRAIN FREE LEUCINE	15 min. 30 min.	0.050	139,500 / 279,000	5,720 / 13,620	8,091	8,091 / 300,000 × 60 = 0.108	0.463 mM/g (97.8 min.)
BRAIN PROTEIN BOUND LEUCINE	15 min. 60 min.	36.5k	679.6 / 1835.2	24,813 / 66,993	42,152	42,152 / 300,000 × 60 = 0.187	195.1 hr
BOUELE	15 min. 60 min.	9.09	1028.8 / 2060.0	9,270 / 18,725	9,255	9,455 / 300,000 × 60 = 0.0307	325.3 hr
NUCLEO-DNIA	15 min. 60 min.	28.32	867.6 / 1750.0	10,796 / 22,793	11,997	11,997 / 300,000 × 60 = 0.0533	438.8hr
A	15 min. 60 min.	7.08	338.8 / 698.8	2,956 / 7,078	4,806	4,806 / 300,000 × 60 = 0.0213	332.4hr
B	15 min. 60 min.	7.81	377.5 / 744.5	2,993 / 6,993	4,000	4,000 / 300,000 × 60 = 0.0133	587.2hr
C	15 min. 60 min.	7.82	433.5 / 1130.5	3,778 / 9,778	5,192	5,192 / 300,000 × 60 = 0.02308	328.8hr
MICRO-SOMES	15 min. 60 min.	6.95	1213.6 / 2625.0	10,535 / 22,859	10,474	10,474 / 300,000 × 60 = 0.0466	136.8hr
SUPERNAT-ANT	15 min. 60 min.	5.37	897.1 / 2141.0	7,750 / 18,500	7,224	7,224 / 300,000 × 60 = 0.0385	146.8hr

*FROM DISTILLED WATER PREPARATIONS AS CONVERTING THE S.A OF FREE LEUCINE IN BRAIN TO 300,000 DPM.

Rate of Synthesis of the Brain Proteins (Table 4)

脳の遊離アミノ酸プールよりProteinにincorporateされるFluxを15分と60分の二点を用いて計算した。脳蛋白へのincorporation rateは，最初の2時間までは，ほぼ直線的に増加している。実験15分と60分の二時点では，脳の遊離アミノ酸プールのロイシンのS.Aは直線的に増加中であるので（オ3図）各時点のS.A.を300,000dpmにconvertしてさらに脳蛋白中のロイシンのS.Aを計算した。0.183μM/g brain/60minのロイシンが脳蛋白合成に用いられ，血中より脳に入るロイシンのFluxの約2倍である。得られたFluxと蛋白中のロイシンのプールサイズより脳蛋白のTurnover timeを計算した所，今迄の結果よりかなり速く，脳蛋白の平均Turnover timeは約8日となった。同様の計算をSubcellular fractionの蛋白につりて行った計算も併記した。

以上の結果は 血流から脳に入るロイシン量の約2倍が脳内で蛋白合成に利用されることを示した。脳内のロイシン源としては蛋白分解でliberateされたものが考えられる。もち蛋白分解でliberateされたロイシンの約半分は蛋白合成に再度利用されると解される。もちろんこれらの結果は脳のアミノ酸プール，脳蛋白を一つのプールとして計算したものであり，アミノ酸プールのheterogenityとくにグルタミン酸代謝のcompartmentalizationという概念や，蛋白質の多様性を考慮すると上記のTurnover Timeそのものの意味づけには慎重でなければならないことは当然であるといえよう。

要旨

Infusion Methodにより U-L-Leucine-^{14}C をネコに静注し血中の放射能レベルを一定に保ちながら，血中，脳遊離並びに蛋白結合ロイシンのS.Aを継時的に測定した。U-L-leucineからのC^{14}のDistributionを検索し併せて脳遊離及び蛋白ロイシンのFluxとTurnover timeを計算した。脳遊離ロイシンのTurnover timeは約30分，脳蛋白ロイシンのそれは約8日であった。脳アミノ酸プールから脳蛋白へのロイシンのFluxは，血中から脳遊離アミノ酸プールへのFluxの約2倍であり脳では蛋白分解によるロイシンの半分が再び蛋白合成に利用されると理解される。

（本研究は米国イリノイ大学精神神経研究所で行われたものであり，故A. Geiger教授の御指導に深謝の意を表します）

文献

1) Friedberg, F., Tarver, H. and Greenberg, D. (1948) J. Biol. chem., 2.216 2) Furst, S. Lajtha, A and Waelsch, H. (1958) J. Neurochem. 2, 216 3) Mase, K., Takahasi Y. and Ogita, K. (1962) J. Neurochem 2, 231 4) Lajtha, A. (1959) J. Neurochem., 3. 358, 5) Lajtha, A. Berl, S. and Waelsch, H. (1959) J. Neurochem. 3, 322. 6) Chirigos, M.A., Greengard, P. and Udenfriend, S. (1960) J. Biol. Chem., 235, 2075. 7) Geiger, A. (1958) Physiological Review 38, 1. 8) Vrba, R. Fellengrava, T. and Kautůrek, V. (1957) J. Neurochem., 2. 187. 9) Schneider, W.C. (1945) J. Biol. Chem, 161, 293. 10) Jaffay, H. and Alvorez, J. (1961) Analyt. Chem., 33, 612 11) Flwyn, D.H. (1964) Absonlight No. 37. S 12) Tanaka, R. and Abood L.G. (1963) J. Neurochem

8 神経系の細胞核に関する研究 ―分離と同定―

加藤尚彦・平山 皓（東大・医・精神）
黒川正則（東大・医・脳研）

分離核の代謝的研究には目的に応じて種々の條件が必要とされるが，要約すれば次のごとくである。1)なるべく短時間内に核の分離，精製を行なうこと 2)代謝的活性が保たれていること 3)溶性成分の漏出がなるべく少ないこと 4)核以外の成分(赤血球，核以外の細胞内成分)が混在しないこと。従来胸腺細胞核，肝細胞核，腫瘍細胞核などに関する種々の分離法は以上の基準に従って検討されてきたが，唯一の方法で完全なものはなく，研究の目的に応じて水性溶液を用いる方法，有機溶媒を用いる方法(non-aqueous method[1])が使い分けられている。aqueous method の場合には溶液のpH，イオン構成，イオン強度が重視され，また CHAUVEAU 等の方法[2]にひとつの例をみいだしうるように，密度差の利用が一般的になっている。

神経組織についても核の分離はしばしば試みられてきたが[15][16]，核の研究に好んで用いられる胸腺細胞や肝細胞にくらべて，その分離と精製はいちじるしく困難である。この理由としては細胞(したがって細胞核)の大きさ，形態が多様なことと，多量のミエリンの存在があげられる。我々は神経系細胞核の研究を進めるにあたって，これらの難点をなるべく除去した分離法を検討中であるが，以下現在までの結果をまとめて報告したい。

―― 実験方法 ――

実験材料：成熟モルモット(あらかじめヘパリンを注射)を45秒間エーテルで麻酔，ついで60秒間氷水中で体部を冷却後開胸，左心にカニューレを挿入，指状で下行動脈を圧迫閉鎖しつつ右心房を切り，0.32M 蔗糖液(ヘパリン加，38℃)で150~210秒間頭部を灌流。脳を摘出後皮質下白質を切片状に除去し，のこりの大脳皮質部分を実験に用いた。エーテル麻酔をはじめてから皮質を採取するまでの所要時間は6~7分である。1実験に6匹のモルモット(灰白質9~10g)を使用し，全動物の灰白質採取に30~40分を要する。この間採取ずみの組織は氷冷下の humid chamber に保存した。組織を0.32M 蔗糖液-1.5mM $CaCl_2$，DOUNCE 型ホモジェナイザーで磨砕(テフロン軸，クリアランス 80~120μ，軸回転約2500回転/分，軸上下8回，120秒)，8重の滅菌ガーゼを通したのち5%のホモジェネート(H)とし，出発材料とした。

DNA，RNA の分離と定量：HUTCHISON-MUNRO[7]に従って抽出，分離，DNA はインドール反応，RNA はオルシノール反応で定量，精製DNA，RNA の基準直線から μg/g 組織を計算した[8]。またDNA は DABA を用いる微量定量法(蛍光比色)[9]を併用した。タンパクの定量：脱脂後の試料について Lowry 等(1951)の微量定量法を用いた。コハク酸脱水素酵素(SDH)，グルタミン酸脱水素酵素(GDH)活性：SDH は試料を Triton X-100 で処理後，チトクローム C の還元を測定した(550 mμ)[11]。GDH を試料をおなじく Triton X-100 (終濃度 0.1% v/v) で処理後，NAD^+ の還元を測定した(340 mμ)[5]。AChE・ChE 活性：AthCh，ButhCh と DTNB を用いる比色定量法(412 mμ)[3]を一部改変して使用[2][12]。DFP 阻害を規準として〔AChE + ChE〕および〔ChE〕活性を表現した[2][12]。ATPases の活性：表5 a)→k)のごとき反応組成液(各2.0 ml)に試料を加え，37.5°，6分の予備振盪後，Tris-ATP(pH 7.4，

終濃度 3mM) を加えて 37.5°C, 15分振盪後 TCA(終濃度 8% w/v)によって反応を止め, 遠心上清についてPiを測定. (g)−(e)は(NaK)ATPase 活性を示す。 NMN−アデニリル・トランスフェラーゼ活性： 測定の原理は KORNBERG[10] により, 最終的にアルコール脱水素酵素による NADH の生成量を定量(340mμ)。

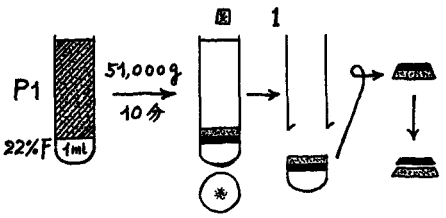
形態的観察： 光顕では染色と位相差顕微鏡を併用。染色は主にアセトオルセイン・ファスト・グリーンによったが, 補助的にヘマトキシリン・エオジン, メチルグリーン・ピロニンをも使用した。電顕所見は positive stain により検討中である。

核数の測定： もっとも純粋な核標品(後述のP4C)を 0.32M 蔗糖液に均一に浮遊し, アセトオルセイン・ファスト・グリーンで染色後, BÜRKER-TÜRK 計算盤で測定。

実験結果と考察

核の分離： 脳皮質から核を分離する際, 除去しなければならないのは破壊不十分な細胞, 赤血球, 毛細血管, ミエリン断片が主なものであり, またミトコンドリアおよびそれより密度の軽い細胞内粒子(またはその断片)の混入も慎重に避けねばならない。我々が予備実験で検討した原理は密度勾配遠心, 浮遊(ミリポール・フィルター, 平均径 70~80μ のガラス玉をつめて作ったカラム), 分画遠心(WHITBY 管をふくむ)など, 検討条件はイオン強度(Ca^{2+}, Mg^{2+}), pH(クエン酸法, 蔗糖・クエン酸法)などである。しかしもっとも安定した方法として現在我々が使用しているのは, 密度勾配を組合せる方法である。標品(P)を純度に従って並べると次のごとくである。

P1： 5% ホモジェネート(0.32M蔗糖液・1.5mM $CaCl_2$)を 1,000g(g値は以下すべて gav 値を示す), 15分間遠心, 上清を傾斜によって fluff とともに捨てる。沈渣を 0.32M 蔗糖液・1.5mM $CaCl_2$ に浮遊(1.3~1.5 ml/g 原組織), グラス・ホモジェナイザーで軽く磨砕したものをP1とする。赤血球はあらかじめ灌流によって除かれているが, 他に多くの夾雑物をふくむ。



P2： 図1のごとく 22% (w/v) Ficoll 溶液 1ml 上にP1 4.0ml を重層, 51,000 g で 10分間遠心すると組織は界面に圧縮される(Ficoll は蒸溜水にたいして透析, 0.32M 蔗糖液に溶解)。チューブを鏡利なハサミで切り, 上下を逆にして組織をとり出す。Ficoll に接した面(とり出した後は上面)を 0.32M 蔗糖・1.5mM $CaCl_2$ でよく洗い, Ficoll を除く。この組織塊は pudding に類似した外観を呈し, 頭部の約1/3は桃色を帯びた淡黄色, 他の部分は白い(非灌流脳を用いると上部約1/3は茶褐色を呈する)。頭部だけを両刃の安全カミソリで切りとり, 0.32M 蔗糖・1.5mM $CaCl_2$ 液に浮遊(0.7~0.9 ml/g 原組織), テフロン・ホモジェナイザーで磨砕(POTTER-ELVEHJEM 型。軸上下6回. 90秒), えられた均質液をP2とする。この操作によってミエリン(pudding の白い部分)の大部分が除去される。pudding の切り方によってP2の組織量, タンパク量に多少のズレが起るが, これは次に述べるP3Iによって調整されるので, それ以後の分画には影響しない。22% Ficoll の底に極く微量の沈渣ができるが, これは主に cell debris より成り, 微量の大型裸核をふくむ。

P3： 図2に示した Ficoll 密度勾配上に 2ml のP2を重層し水平遠心を行なう。界面Iには密な白色帯(主体はミエリン), 界面IIには粗な灰白色帯が分布する。22% Ficoll

底の沈渣(III)は pudding の頭部よりやや褐色味を増す。傾斜によってI, IIを捨て, 沈渣の表面を0.32M蔗糖で2回洗ったのち, 沈渣を0.32M蔗糖液に浮遊(0.7~0.9 ml/g 原組織), テフロン・ホモジェナイザーで均一化し, これをP3とする。P3ではミエリンはほぼ完全に除去されるが, 毛細血管の混入がのこる。

図 2

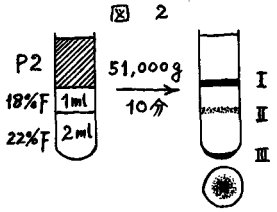
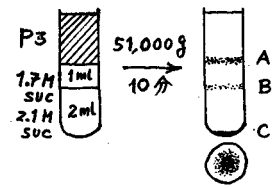


図 3



P4: 図3に示した蔗糖密度勾配上にP3 2.0 mlを重ねて水平遠心を行なう。Aは微量のミエリン, こわれた核内原形質, 小型の核などから成る。Bにはもっぱら毛細血管の断片が集中する。Cはほぼ純粋な核である。第1匹目の動物麻酔からP4Cにいたる全所要時間は190~200分である(P4A, P4Bを必要としない場合には20分程度短縮される)。

純化の程度: 表1に示したごとくP4CにおけるDNAの回収率はおおよそ30%である。精製肝細胞核の場合でも25~35%と報告されているから[13], 脳灰白質のごとき複雑な組織から出発する場合, 我々のえた値は満足すべきものと思われる。SPORN等[16]は粗な核分画(我々の場合のP1に相当)を6回洗浄後, 2.05~2.15M蔗糖液内で遠心(50,000 g, 120分), 夾雑物を高張蔗糖液内に浮遊させたままのこし, 精製された核を沈渣として回収する方法を用いている。この場合DNAの回収率は11%で我々の約1/3である。SPORN等の報告では赤血球の除去にたいする配慮は行われていない。我々の経験では密度差によって核と赤血球を分離することは, 神経系の場合にはきわめて困難と思われる(肝臓の場合は可能である[13])。

TABLE 1 Protein, DNA, RNA, DNA/RNA, RELATIVE SPECIFIC ACTIVITY (% BASIS)

	Protein	DNA	RNA	DNA/RNA	RELATIVE SPECIFIC ACTIVITY (% BASIS) DNA/RNA	DNA/Protein	RNA/Protein
H	100 %	100 %	100 %	0.30	1.00	1.00	1.00
P1	19.9	54.7	15.7	1.26	3.46	2.75	0.79
P2	6.9	39.9	6.2	2.36	6.49	5.79	0.89
P3	1.6	33.6	3.9	3.04	8.45	21.0	2.42
P4A	0.23	0.72	0.42	0.66	1.71	3.2	1.85
P4B	0.27	0.89	0.52	2.66	1.71	3.3	1.95
P4C	1.28	29.4	2.96	3.58	8.21	22.9	2.31

Values in H: Protein 98.5 ± 6.5 mg/g of original tissue (5)
DNA 841 ± 78 µg/g of original tissue (3)
RNA 2318 ± 95 µg/g of original tissue (3)

表2に示したようにミトコンドリアに局在するSDH, GDHの活性はP2にまで証明され, P3以下では証明されない。またJANUS緑染色もP3以下では陰性である。ミトコンドリア(あるいはその断片)の混入は, 以上の根拠によって除外されるものと考えられるが, 電顕的にさらに検討中である。細胞分画法によるAChE, ChEの細胞内分布については異論があり, 決定的ではないが, 「ミクロソーム」膜系およびシナプトソーム膜系のmarkerとみなすことは差支えないであろう。P4CにおけるAChE, ChEの活性はホモジェネートの0.1%以下であり(表3), したがってP4Cにはこれらの膜系要素はほとんど混入していないものと推定される(RICHTER等[15]が核分画に証明した高濃度のChEは, 上述の膜系およびおそらく赤血球の夾雑によって説明されるものと思われる)。P4Cの

TABLE 2

	SDH Unit/g (4)	GDH Unit/g (4)
H	13.8 ± 0.5	0.60 ± 0.07
P1	2.0	〃
P2	0.8	〃
P3	0	〃
P4A	0	〃
P4B	0	〃
P4C	0	0

Unit: SDH ΔE_{550}/min (250)
GDH ΔE_{340}/min (250)

TABLE 3

	AChE+ChE Unit/g (2)	ChE Unit/g (2)
H	33.03	3.60
P1	6.59	1.22
P2	1.37	0.16
P3	0.14	0.03
P4A	0.05	0.01
P4B	0.04	0.004
P4C	0.02	0.001

Unit: ΔE_{412}/min (37.5°)

AChE+ChE: AthCh − AthCh·10^{-4}M DFP
ChE: ButhCh − ButhCh·10^{-6}M DFP

ATPase は Mg^{2+} によって活性化されるが Na^+, K^+ によって影響されない(表4). 粗な核分画(P1, P2)に認められる (NaK)ATPase活性は cell debris, シナプトソーム, ミクロソームの夾雑によるものであり, これらの混入は単純な洗滌操作では除去されないことが示される。

核が示す酵素活性として NMN-アデニリルトランスフェラーゼ, RNAポリメラーゼ(DNA依存性がある[17]。P4C にはATP:NMNアデニリルトランスフェラーゼ活性が存在する。これはP4CにおけるDNAの回収率とほぼ平行しており, P4Cの核が代謝的に活性であることを示すひとつの証拠とみてよい。

核の起源: 細胞形質膜を伴わない分離裸核について, その起源がノイロン性であるか, グリア性であるかを判定することは危険な作業であり, むしろ今後の課題として解明さるべき問題である。ここでは予備的にこの問題に触れておきたい。核の分離操作中に核の大きさ, 核質の染まり方, 核小体にいちじるしい形態変化が起らないとすると(この仮定は切片染色標品とP4Cの染色標品の比較からおおむね支持される), これらの形態的基準[4]に従って明らかにノイロン性と判定できる大型の核をえらぶことは困難ではない。オリゴデンドログリア核の識別も比較的容易である。(かしアストログリア核と小型ノイロン核の識別はかなり困難であり, しばしば不可能である。明らかにノイロン性と判定できるものとそれ以外のものを neuronal, non-neuronal と大別し, P4Cについて実測したのが表5である。ラット大脳皮質標品を用いた計測によると, 全細胞核 9.6×10^7個/g 湿重量の中でノイロン性核は 2.3×10^7個/g (24%)と報告されている[14]。P4Cでは 48.8% であるから, 大型ノイロンに由来する核がおよそ2倍に濃縮された計算となる。小型ノイロン核で同定不確実のため non-neuronal に数えられているものを考慮に入れると, 実際の濃縮率はこれよりもさらに高いはずである。

TABLE 5 EVALUATION OF P4C

P4C: 1.64 ± 0.14 (5)*	
Neuronal	48.8±5.3 %
Non-neuronal	51.2±5.0 %
Cortex: 5.58*	
DNA/nuclei	15.75±2.25 µµg
RNA/nuclei	4.19±1.13 µµg
DNA/RNA	3.77
Protein/nuclei	7.7±1.0 mµg

*Number of nuclei/g of original tissue(x 10^7)

TABLE 4 Adenosine Triphosphatases (µmoles Pi/g/15 min, 37.5°)

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(g)-(e)
H	120.1	295.5	268.5	171.0	300.0	437.5	590.0	378.5	290.0
P1	27.4	63.4	51.1	34.9	70.5	97.5	132.0	81.5	61.5
P2	6.9	13.7	13.4	11.0	18.7	24.1	37.5	22.2	18.8
P3	1.60	3.23	2.62	1.42	3.20	3.45	4.45	3.02	1.25
P4A	0.64	1.02	--	--	0.98	1.28	1.92	1.18	0.94
P4B	0.64	0.88	--	--	0.95	1.02	1.24	1.08	0.29
P4C	1.17	1.53	1.26	1.00	1.50	1.48	1.56	1.37	0.06
Relative specific activity on a protein basis									
H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
P4C	0.76	0.41	0.37	0.46	0.39	0.27	0.21	0.28	0.016

(a) 30mM Tris (b) 6mM Mg-30mM Tris (c) 6mM Ca-30mM Tris
(d) 100mM Na-30mM Tris (e) 6mM Mg-20mM K-30mM Tris pH 7.4
(f) 6mM Mg-100mM Na-30mM Tris
(g) 6mM Mg-20mM K-100mM Na-30mM Tris (h) g) plus 100µM ouabain

1) ALLFREY V., STERN H., MIRSKY A.E. and SAETREN H. (1952) J. gen. Physiol. 35, 529 2) CHAUVEAU J., MOULÉ Y. et ROUILLER Ch. (1957) Bull. Soc. Chim. Biol. 39, 1521 3) ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V. and FEATHERSTONE R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88 4) GLEES P. (1955) Neuroglia. Morphology and Function, Blackwell, Oxford 5) HOGEBOOM G.H. and SCHNEIDER W.C. (1953) J. biol. Chem. 204, 233 6) HOLTER H. and MÖLLER K.M. (1958) Exp. Cell Res. 15, 631 7) HUTCHISON W.C. and MUNRO H.N. (1961) Analyst 86, 768 8) 加藤倫郎・平山・黒川(1964)神経化学 3, 増刊12; 神経生進学(印刷中) 9) KISSANE J.M. and ROBINS E. (1958) J. biol. Chem. 233, 184 10) KORNBERG A. (1950) J. biol. Chem. 182, 779 11) KUROKAWA M., SAKAMOTO T. and KATO M. (1965) Biochim. Biophys. Acta 94, 307 12) 黒川・高橋(1965) 脳と神経 17, 490 13) MAGGIO R., SIEKEVITZ P. and PALADE G. (1963) J. Cell Biol. 18, 267 14) NURNBERGER J.I. (1958) in Biology of Neuroglia (WINDLE W.F., Ed) pp. 193-202, Thomas, Springfield 15) RICHTER D. and HULLIN R.P. (1951) Biochem. J. 48, 406 16) SPORN M.B., WANKO T. and DINGMAN W. (1962) J. Cell Biol. 15, 109 17) WIDNELL C.C. and TATA J.R. (1964) Biochem. J. 92, 313

13 (Na, K) – Adenosine Triphosphatase 活性の細胞内局在 – 脳組織における特徴

黒川正則（東大・医・脳研）
坂本哲彦・加藤 誠（東大・医・精神）

末梢神経においてはじめて証明された(NaK)ATPase活性は[1]，その後各種の組織に比較的普遍的な分布を示すことが判明した。しかし脳組織ことに脳皮質は，網膜の4倍，腎皮質の7倍，筋組織の50倍，赤血球の1000～5000倍におよぶ異常な高活性[3]を示す点に特徴がある(組織重量当り)。赤血球膜のように同定の容易な膜系における(NaK)ATPaseの証明から，脳組織においてもこのATPaseが形質膜に分布することが類推され，たとえば分離ノイロンおよびグリア細胞について調べられた結果[2]は，細胞膜そのものがこのATPase活性の存在部位のひとつであることを示すものと考えられた。

しかし脳皮質の場合には著しい構造的な不均一性のために，細胞分画法による知見にもとずいて細胞レベルでの局在を再構成するにあたって，他の組織では遭遇しない特殊な困難さがある。脳組織(NaK)ATPaseの研究には多くの場合いわゆる「ミクロソーム分画」が用いられているが，遠心條件その他は便宜的なもので，構造的対応が十分に考慮された上で行われているとはいえない。我々は神経組織に特有な分画粒子であるシナプトソーム(神経終末粒子)に(NaK)ATPase活性が証明されることを指摘したが[7]，以下これをさらに補足して，シナプトソーム限界膜における活性の存在を報告し，その意味を考えてみたい。

実験方法

成熟モルモット大脳皮質から10％ホモジェネート(H, 0.32M蔗糖液)を作り，以下の方式で細胞分画をえた(gはすべてgav)。

P_1分画 1000g·10分(洗滌1回)；P_2分画 10,000g·15分(洗滌2回)；P_3分画 31,100g·40分(洗滌せず)：S分画 上清

比較のためにモルモット腎皮質を同様に処理して相当する分画をえた。大型シナプトソーム(径約1μ)はP_2分画(洗滌せず)からFicoll重層法[5]または蔗糖重層法[10]を用いて分離，ACh, ChA, LDH, SDHの％分布，総窒素を規準とした相対比活性，および電顕所見によって，ミエリン分画(A)，シナプトソーム(B)，ミトコンドリア(C)を同定した。シナプス小胞は1)水処理後のP_2分画から密度勾配遠心法[5]によって，また2)水処理後のB分画から分画遠心操作によって分離した(下記)。すなわち方法1)の場合はP_2沈渣を水に浮遊し(2.5ml/g原組織)，0～4°C，20分間放置後，10,000g·15分の遠心上清(Ws，白濁)を図1のごとき蔗糖液密度勾配上に重層，100,000g·60分の水平遠心後，水層と連続密度勾配の界面に分布するシナプス小胞分画(I)を採取した。分画IIは主にsynaptosome ghostsより成るものである。また方法2)の場合にはFicoll法によってP_2からBを分離，水に浮遊(2.5～3.5ml/g原組織)，0～4°Cで10分間振盪後(120サイクル/分)，計算量の高張蔗糖液を加えて0.32Mにもどしたのち，水平ローターを用いて以下の分画遠心を行なった。

B_1	2,030g·5分	B_4	18,360g·5分	B_7	130,580g·30分
B_2	4,000g·5分	B_5	41,320g·5分	S	上清
B_3	8,160g·5分	B_6	86,180g·5分		

しかし以上のいずれの方法を用いても，電顕的に判別されるかぎり，シナプス小胞とsynaptosome ghostsとの定量的な分離は困難である。

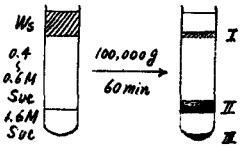
ATPase活性の測定：(α) 6mM $MgCl_2$, 5mM KCl, 100mM NaCl, 30mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4) (β) (α)から100mM NaClを除いたもの(いずれも2.0ml)に試料(0.1ml；100μg～300μg タンパク/ml 反応液に相当)をカロえて，37.5°C，6分の予備振盪後，Tris-ATP(pH 7.4，終濃度 3mM)をカロえてゼロ・タイムとし，37.5°，15分の振盪後 TCA(終濃度 8% w/v)によって反応を止め，遠心上清について P_i を測定した。単位は μmoles P_i/g 原組織(またはmgタンパク/15分(37.5°C)。(α)−(β)をもって(NaK)ATPase活性を表わした。表5の場合にはとくに指示したイオン組成を用いた。測定は原則として試料調製の当日に施行，例外はとくに指示してある。タンパクは試料を脱脂したのち Lowry 等の方法(1951)によって測定した。単位はmg/g 原組織。

TABLE 1

Fraction	Protein (mg/g)	ATPases (μmoles/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)
Brain				
H	97.6	336	183	153
P_1	9.9	40	15	25
P_2	36.0	111	68	43
P_3	17.1	119	51	68
S	32.7	19	21	-2
Kidney				
H	135.0	108	49	59
P_1	21.1	21	8	13
P_2	29.4	18	13	5
P_3	15.6	32	15	17
S	60.6	6	6	0

(α) Na present
(β) Na absent

図 1



実験結果と考察

脳皮質と腎皮質の比較：脳皮質の(NaK)ATPase活性が主として小顆粒分画(表1の場合は P_3)に分布することは，多くの研究者の一致した所見であるが，これ以外の分画については文献上混乱がみられる。粗な核分画(P_1)における分布のちがいはとくに極端で，回収率1%というのから[2]，33%というものがある。[8] 表1の結果では18%である。大顆粒分画(P_2)における分布は我々の場合32%で Schwartz 等[9]の26%と大体一致している。Bonting 等[3]は10%しか回収されないという。かかる相異は homogenization，分画操作，試料の保存条件など細かな技術的な相異にもとずくものであろう。homogenization について我々がふつう用いている条件は次のごとくである。Dounce 型テフロン軸・ガラスホモジェナイザー，clearance 80～120μ；軸回転2500回転/分，上下 8～10回，2分間；動物の死後 5～6 分以内に homogenization 終了。2，3の実験ではより烈しい磨砕条件(軸回転 4,000回転/分，上下25回，4分間)を用いて(NaK)ATPaseの分布を検討したが，表1と本質的に異なる結果はえられなかった。腎皮質の各分画における(NaK)ATPaseの分布は P_1, P_2, P_3, S でそれぞれ37%，14%，49%，0%であり，脳組織にくらべて P_2 における分布の低いことが目立つ。

TABLE 2

Fraction	Protein (mg/g)	ATPases (μmoles/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)
Ficoll				
P_2	39.1	115	62	53
A	7.5	42	22	20
B	14.5	68	36	32
C	12.5	28	22	6
Sucrose				
P_2	36.5	105	55	50
A	6.9	30	10	20
B	14.4	65	31	34
C	10.0	21	16	5

シナプトソームにおける(NaK)ATPase：Ficoll法，蔗糖法のいずれを用いても，Bには P_2(洗浄せず)の約55%の(NaK)ATPase活性が分布する(表2)。Cにおける微弱な活性はシナプトソームの混入によって説明できる。問題はAに存在する35%程度の(NaK)ATPase活性である。電顕像によればこの分画の主成分はミエリン断片であるが，精製ミエリンにおいて報告

TABLE 3

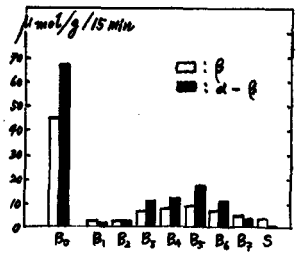
Fraction	Protein (mg/g)	ATPases (μmoles/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)
P_3'	3.7	25	10	15
A'	2.8	26	12	14
B'	0.4	0.7	0.7	0
C'	---	--	--	--

されている(NaK)ATPaseの低活性から考えると，Aの活性がミエリンによって説明されるとは思えない。Bを分離する場合，P_2を洗滌すると沈降特性が変化するので，洗滌を省略しており，このため本来ならばP_3に回収されるべき粒子が，P_2に混入するはずである。表3はP_2の洗滌液(2回)を31,100 g・40分遠心したのち(P_3')，Ficoll密度勾配上に重層して，A, B, Cの分離と同一の條件で，水平遠心したものである。肉眼的に組織のすべてが0.32M蔗糖－3%(w/v) Ficollの界面に止まる(A')。3% Ficoll層はほとんど透明であるが，分劃採取後105,400 g・20分間遠心すると微量の沈渣を生ずる(B')。13% Ficoll層は遠心後もまったく沈渣を生じない。表3から判ることは，Aにおける(NaK)ATPase活性のほとんどすべてが，元来P_3分画に回収されるはずであるが，洗滌を省略するためP_2に混入した粒子に由来することである。このことを考慮に入れるとP_2における(NaK)ATPaseの90%以上はBによって説明される。

TABLE 4

Fraction	Protein (mg/g)	ATPases (μmoles/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)
W_S	21.6	123	60	63
I	2.0	20	12	8
II	10.6	84	48	36
III	6.8	42	24	18

図2



シナプトソーム構造内の(NaK)ATPase分布：表4，図2に示した結果はいずれも，Bにおける(NaK)ATPaseがシナプス小胞ではなくて，シナプトソーム限界膜に分布していると解釈する上に好都合なものである。ただすでに述べたように，ここで用いた方法はいずれもシナプス小胞とsynaptosome ghostsを定量的に分離しえないので，表4，図2にもとずいて(NaK)ATPase活性がシナプトソーム限界膜にのみ局在すると結論することは躊躇される。

TABLE 5

Cation composition (Final concn.)	ATPases (μmoles/g/15 min) B	P_3
None	10	12
3 mM-Mg	34	52
6 mM-Mg	35	50
5 mM-K	10	10
100 mM-Na	15	15
3 mM-Mg, 5 mM-K	36	60
6 mM-Mg, 5 mM-K	40	55
6 mM-Mg, 5 mM-K*	44	56
3 mM-Mg, 100 mM-Na	46	90
6 mM-Mg, 100 mM-Na	42	87
6 mM-Mg, 5 mM-K, 100 mM-Na	71	130
6 mM-Mg, 5 mM-K, 100 mM-Na*	92	138
6 mM-Mg, 20 mM-K, 100 mM-Na	92	138
6 mM-Mg, 100 mM-Na, 40 mM-Li*	89	119
40 mM-K*	93	118
40 mM-Rb*	90	117
40 mM-Cs*	75	102
40 mM-NH_4*	100	120
6 mM-Mg, 5 mM-K, 100 mM-Li*	49	61
100 mM-Rb*	47	61
100 mM-Cs*	39	48
100 mM-NH_4*	51	62
6 mM-Mg, 5 mM-K, 100 mM-Na, 1 mM-Ca	60	105
3 mM-Ca	40	63
6 mM-Ca	35	55

In experiments indicated by asterisks, samples were kept frozen at -20° for 2 days before use. Chlorides only were used.

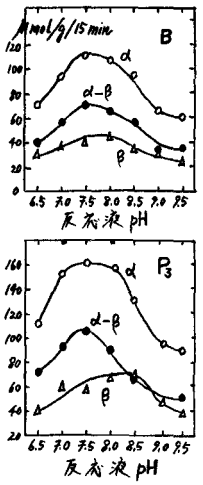


図3

シナプトソームとP_3分画における(NaK)ATPaseの比較：図3，表5，表6に示したように，至適pH，陽イオン要求，阻害剤にたいする態度などの点でBとP_3の(NaK)ATPaseを定性的に区別することはできない。至適pHは7.5付近にある。K^+はNH_4^+，Rb^+，Li^+，Cs^+によって代用されうるが，Na^+はこれらのイオンによっては代用されない。Ca^{2+}(3～6 mM)，ウアバイン(100～500 μM)は(NaK)ATPaseをほ

ぼ完全に阻害する。また グリコールエーテルジアミン四酢酸水溶液(GEDTA; 1mM, Trisで中和)によってB, P_3 を処理すると, 前者からは52%, 後者からは27%の溶性タンパクが遠心上清に移行するが, (NaK)ATPase 活性は溶性化されない。この結果両分画におけるタンパク当りの(NaK)ATPase 活性はほぼ匹敵する値を示すにいたる(表7)。Aにおけるタンパク当りの活性上昇はあまり目立たない。これはAにおける多量のミエリンの存在によって説明されるであろう。

TABLE 6

Addition (Final concn.)	B fraction Protein (mg/g)	B fraction ATPases (μmol/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)	P3 fraction Protein (mg/g)	P3 fraction ATPases (μmol/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)
None	14.8	102	44	58	15.5	128	56	72
Ouabain 1μM	14.2	92	48	44	15.0	110	60	50
10μM		84	45	39		95	55	40
100μM		60	42	18		70	58	12
500μM		50	43	7		60	56	4
PCMB 10μM	13.8	64	34	30	15.2	83	40	43
PCMB 10μM plus L-cysteine 10mM		86	40	46		120	50	70
DOC 0.5% (w/v)	12.1	21	3	18	14.9	30	6	24
Triton X-100 0.1% (v/v)	13.4	18	16	2	14.0	35	30	5

(Preparations kept for 2 days at -20°C)

推論： 現在我々がB分画に回収しうる(NaK)ATPase活性は, ホモジェネートの約20%にすぎない。もし脳組織におけるこの酵素系の異常な高活性をシナプトソーム膜系の存在によってのみ説明しようとすると, この程度の活性では不十分である。しかしかかる推論を行なうにあたって少なくとも次の2点に注意しなければならない。 1) 現在の方法ではシナプトソームが定量的に回収されていない。P_2 からえられるシナプトソームは比較的大型のもののみである。小型のシナプトソームは P_3 に多数に存在しており, 粗面小胞体とならんで脳組織の「ミクロソーム」の中で特徴的な構造となっている(電顕写真提示)。したがってシナプトソーム膜における(NaK)ATPase活性の存在が, シナプトソームの種類を問わず一般化されうるものであるとすれば, 脳の P_3 における(NaK)ATPaseのある部分は, シナプトソームの存在によって説明されねばならない。この場合(NaK)ATPaseのシナプトソーム/ホモジェネート比は現在の20%よりも高くなるはずであり, 現在検討中である。 2) (NaK)ATPase 活性は組織g当り, またはタンパクmg当りで表現されているが, これには特別な根拠があるわけではない。現在のところ技術的に可能ではないが, より適切な表現法は膜の単位面積当りの活性である。形態学的観察によると, 細胞表面のシナプス数は16.27個/100μ², 3200個/細胞といわれており(ネコ, 中脳ノイロン; DAVID, 1957), またノイロンおよび樹状突起表面の50~70%はシナプス接合をいとなんでいることも報告されている(ネコ, 脊髄; ELLIS, 1964)。ここから予想される神経終末限界膜, またはシナプス膜の広大な表面積は, 神経組織における膜系の輸送ATPase活性を考察する際, とくに考慮さるべき問題であろう。

TABLE 7

Fraction	Protein (mg/g)	ATPases (μmol/g/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)	ATPases (μmol/mg protein/15 min) (α)	(β)	(α)-(β)
No treatment							
A	8.1	45	20	25	5.6	2.5	3.1
B	14.4	81	30	51	5.6	2.1	3.6
P3	13.7	111	47	64	8.1	3.4	4.7
With 1mM GEDTA (pellet)							
A	5.6	43	20	23	7.7	3.6	4.1
B	6.9	77	30	47	11.2	4.4	6.8
P3	10.0	115	51	64	11.5	5.1	6.4
(supernatant)							
A	2.0	1	1	--			
B	7.7	3	2	1			
P3	3.5	2	3	-1			

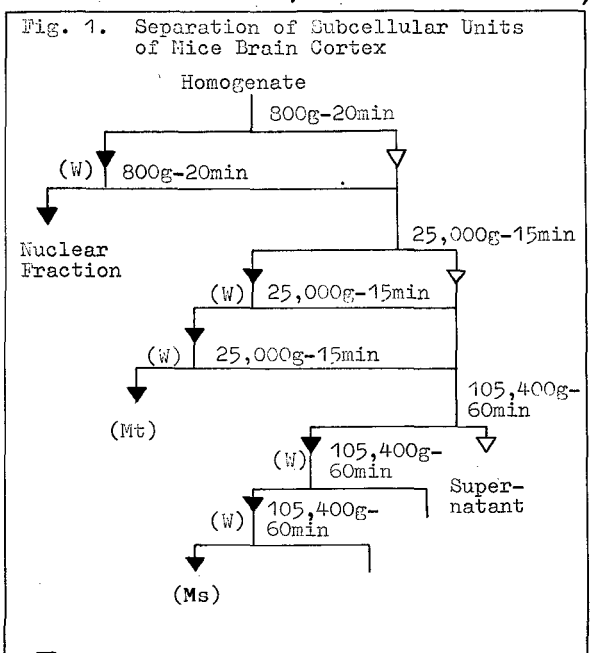
1) ADAMS C.W.M., DAVISON A.N. and GREGSON N.A. (1963) J. Neurochem. 10, 383 2) BONTING S.L., CARAVAGGIO L.L. and HAWKINS N.M. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 98, 413 3) BONTING S.L., SIMON K.A. and HAWKINS N.M. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 416 4) CUMMINS J. and HYDÉN H. (1962) Biochim. Biophys. Acta 60, 271 5) EICHBERG J., WHITTAKER V.P. and DAWSON R.M.C. (1964) Biochem. J. 92, 91 6) KUROKAWA M., SAKAMOTO T. and KATO M. (1965) Biochim. Biophys. Acta 94, 307 7) 黒川・坂本・加藤・秋元(1964) 神経化学 3, 増刊, 8 8) SCHWARTZ A., BACHELARD H.S. and McILWAIN H. (1962) Biochem. J. 84, 626 9) SKOU J.C. (1957) Biochim. Biophys. Acta 23, 394 10) WHITTAKER V.P. (1959) Biochem. J. 72, 694

14* 慢性覚せい剤中毒マウスの脳ATPaseについて

大須賀 恒 夫・清 水 俊 郎
台　　弘（群大・医・精神神経）

従来の研究で、私たちは慢性覚せい剤中毒動物の行動異常に関連する神経化学的所見として、脳内 ammonia (NH_3), adenineucleotide および phosphocreatine (PC) の、車かご内飼育が刺激（車かご刺激）となって生じた変動の様相について追求した。すなわち、慢性 methamphetamine (MA) 中毒マウス安静時の脳内 NH_3 は対照群安静値にくらべて推計学的に有意の減少を示すのに対し PC, ATP は軽度の減少を示す。しかしながら、これらの物質の車かご刺激による変動の様相は非常によく似ており、中毒群は対照群より遅れて最高値に達し、その回復には異常な遅延を示すのである。このような代謝の異常性を酵素活性の段階で検討し、ATP-creatinephosphotranspherase には異常のないことを確めたが、さらに脳内 ATPase 活性を測定し、数種の cation による活性化の状態を追求した。

〔実験方法〕　実験動物は 25～30 g の雄の dd-N 系マウスで、6～8匹を一群として飼育した。慢性MA中毒マウスは、methamphetamine HCl 4 mg/kg を3週間以上注射して作り、最終注射後5日時間以上経過したものを実験に供した。対照マウスは無処置。　マウスは断頭後素早く脳を取り出して、大脳皮質部分をとり、2匹分を pool して氷冷 0.32 M sucrose (pH 7.0) 中で Teflon 製 homogenizer を用いて、1700 rpm で5分氷冷 homogenize した。分画の均一性を保つため、全実験を同一の homogenizer で行った。　この様にして得た homogenate を第1図に示す遠沈操作[4]で mitochondrial fraction (Mt) および microsomal fraction (Ms) に分けた。



Mt, Ms をそれぞれ 20 ml の上記の sucrose に均等に懸濁させ、活性の測定と蛋白定量を行った。ATPase 活性の測定は cation の組合せにより、(Mg^{++}), ($Mg^{++}+Na^{+}$), ($Mg^{++}+K^{+}$), ($Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$) の場合について行った。各組成は第1表に示すごとくであるが、これらに分画懸濁液 0.5 ml 加えて 37°C で5分予備振盪し、Tris ATP を 3 mM（終末濃度）加えて総量 2 ml として 15分 incubate して、20% TCA 2.0 ml 加えて反応を止め、遠沈上清中の無機燐酸 (Pi) を Allem 法[1]で測定し、蛋白量と換算から活性値を算出した。Tris ATP は Na-ATP (Sigma) から Amberite 120 (H^{+} form) を用いて調製した。

蛋白量は Biuret 法[3]で比色定量した。すなわち、上記の分画懸濁液 8 ml に 20% TCA を等量加え、遠沈後沈渣を alcohol-ether で脱脂し、3% NaOH を 5 ml 加えて 60°C で 30分加温し、冷却後 20% $CuSO_4$ 0.1 ml 加えて室温に 30分放置し、充分発色させてから 550 mμ で比色定量した。

〔実験結果〕　私たちの行った分画法では、特に電子顕微鏡的に検討したわけではない

Table 1. Constituents of Reaction Mixture

	(1)	(2)	(3)	(4)
Tris HCl (pH 7.6)	150	30	135	30
Tris ATP	3	3	3	3
Mg^{++}	3	3	3	3
Na^{+}	-	120	-	100
K^{+}	-	-	20	20

All concentration is mM/l. final concentration.

なお、文献[4]を参考にすると、Mは純粋ではなく、神経終末や大きなmicrosome等を混入しているが、Msはほぼ純粋なものと考えてよいと思う。ヤや長に未すぬく、対照群のATPase活性値は両分画ともMcIlwain's(1961)[2]とほぼ等しい値を示す。cationの組合せによるATPase活性については、Mg^{++}にNa^{+}を加えるとMg^{++}のみの時の値にくらべて、Mでは僅か，Msでは33%増加するが、Na^{+}にかえてK^{+}を加えた場合には、両分画共その値はほとんど変らない。Na^{+}とK^{+}を一緒に加えると、Mでは約10%，Msでは180%も増加する。これらの増加率も文献値と大体一致している。中毒群と対照群を比較すると、Mの(2)と(3)では前者のそが10～15%高く、$0.02<p<0.05$で有意の差を示し、MsではMg^{++}-activated ATPase (Mg-ATPase)において22%の増加を示し、推計学的に$0.001<P<0.01$で有意の差を示す。

Table 2. ATPase Activity of Fractions from Mice Brain Cortex (μM Pi liberated/mg prot./15 min.)

		mitochondria		microsome	
		control	MA	control	MA
Mg	(1)	2.78 ± 0.33	3.23 ± 0.14	4.32 ± 0.40	5.25 ± 0.33**
Mg + Na	(2)	3.20 ± 0.18	3.58 ± 0.16*	5.73 ± 0.85	6.63 ± 0.59
Mg + K	(3)	2.92 ± 0.11	3.41 ± 0.27*	4.52 ± 0.62	5.46 ± 0.99
Mg + Na + K	(4)	5.03 ± 0.39	5.35 ± 0.39	12.10 ± 1.63	12.77 ± 1.35
		6 experiments		8 experiments	

* : $0.02<P<0.05$, ** : $0.001<P<0.01$

又Msの(4)/(1)の値は対照群は280%，中毒群は240%で，40%も低下している。

〔考察〕 Msのfull activityでは対照群と中毒群でほとんど差がなく、Mg-ATPaseが後者で増加しているのは、Na-k ATPase活性の低下を意味するものと思われる。モルモットを用いた抜沢病院の実験で、私たちのMsにあたるsupernatantのfull activityが中毒群で低く、Mg-ATPaseは変りがない。これは私たちの結果と異るが対照群のMg-ATPaseに対するfull activityの割合が20%で非常に低く、又supernatantがMsの他に多くの不純物を含んでいることを考え合せて抜沢病院のDataは再検討を要すると思う。私たちの結果は従来の研究で得たNH₃，adeninenucleotide，PCの所見と何らかの関係をもつもののように思われる。Mg-ATPase及びNa-K ATPaseの役割については多くの研究者が色々な仮説を提示しているが、そのどれも充分な根拠に基くものとはいい難い。もしもMg-ATPaseがいわゆる燐酸代謝に，そしてNa-K ATPaseがイオンの能動輸送に関係あるとするならば、中毒マウス安静時のATP levelはMg-ATPaseの増加に，又再び刺激で上昇したATP levelの回復遅延はNa-k ATPaseの低下に関係づけられるのもしれない。方谷はphosphate turnover rate及びglutamine synthetic activityについて検討したいと考えている。また行動と代謝との関連を論ずるにあたっては、慢性電気刺激を受けながらも行動異常を来たさない例についての検索が必要である。室敏彦奥谷によれば行動異常は群棲条件で電気刺激がなされる時に生じ、単独飼育条件では行動異常は得難いことが認められた。従って前述の実験は群棲条件で行われたものである。単独飼育条件の慢性中毒実験は次の機会に報告する予定である。

〔文献〕 1) Allen, R.J.L. Biochem. J. 34, 868 (1940). 2) Deul, D.H. & McIlwain, H. J. Neurochem. 8, 246 (1961). 3) Palladin, A.V. Regional Neurochemistry (1961) ed. Kety, S.S. & Elkes, J. Pergamon Press, Oxford. 4) 植村，塚田：神経進歩. 7. 763 (1963).

15* マウス自発運動量と脳内カテコールアミン

亀山　勉・木皿憲佐

（東北薬大・薬・薬品作用）

脳の catecholamine（CA）と中枢神経機能との相関性をしらべる手がかりとして，マウスの自発運動量におよぼす CA の作用について行動薬理学的検討を加えた。

＜実験方法＞

実験動物としては 18～25 g の ddN 系雄マウスで回転運動量が 400～500 回/30分 のものを選んで使用し，マウスを 30 分間装置に入れ環境に慣らしてから測定を行った。回転運動量は高木ら[4]のマウス回転運動量計を使用し，時間的経過による回転運動量を測定[2]した。このほか，photo-cell counters method[6]，振動籠による測定も行った。脳内の DOPA，Dopamine（DA），Noradrenalin（NA）の定量は武貞ら[5]の方法によった。

＜実験結果＞

A）Nialamide と dl-DOPA 併用時のマウス自発運動量

Nialamide 50 mg/kg と dl-DOPA 80 mg/kg を併用した場合，時間的経過に伴う回転運動量は 図 1 のようである。対照（0.3% CMC 投与）群にくらべ薬物投与群は，回転運動量が減少し特に投与後 30 分間の減少が目立った。この場合，マウスは挙尾，biting，fighting など異常な興奮状態にあり，リズミカルに円走行を行わない。

一方，振動籠法では薬物投与の 50 分後頃よりその運動性は著明に増大し（図2），photo-cell counters method でも運動量が増大している。

このときの脳内 CA 量の変動をみると，Nialamide の単独（50 mg/kg）よりも dl-DOPA と併用した時の方が，対照にくらべ DOPA，DA が著しく増加した。これにくらべ NA はあまり変化がなかった。

以上のことからうかがえることは，動物の行動量を測定して興奮あるいは鎮静の指標とするには，ただ一つの方法より判断するよりも，動物行動の質的相違を測定出来るいくつかの方法の組み合せにより総合的に判断することがよいと思われる。

なお，マウスおよびラットの条件回避反応[1)3)]では DA の一定レベルでは反応の形成

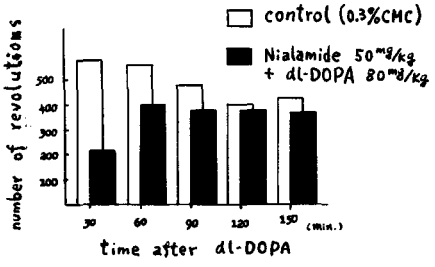


図１（上）　回転籠法

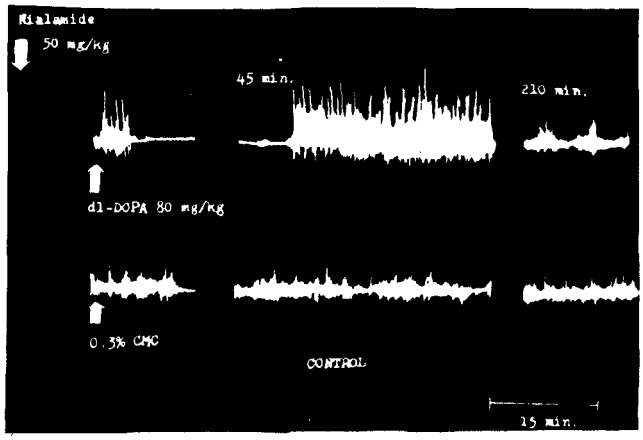


図２（右）　振動籠法

が速やかであるが，そのレベル以上（Nialamide と dl-DOPA の併用）では反応に混乱がみられる。

B）Reserpine，Chlorpromazine 投与時の回転運動量と脳内 DA 量の変動

Reserpine 5 mg/kg を投与するときわめて鎮静的になり回転運動量は減少する。この時に dl-DOPA 80 mg/kg を投与すると対照値まで回転運動量は回復する。しかし Reserpine と 5-HTP 併用時には Reserpine 単独投与のときよりもむしろ少なくなった。（図3） 一方，Chlorpromazine 2 mg/kg 投与時にはやはり鎮静的となり回転運動量は減少するが，dl-DOPA を投与しても回復は認められなかった。

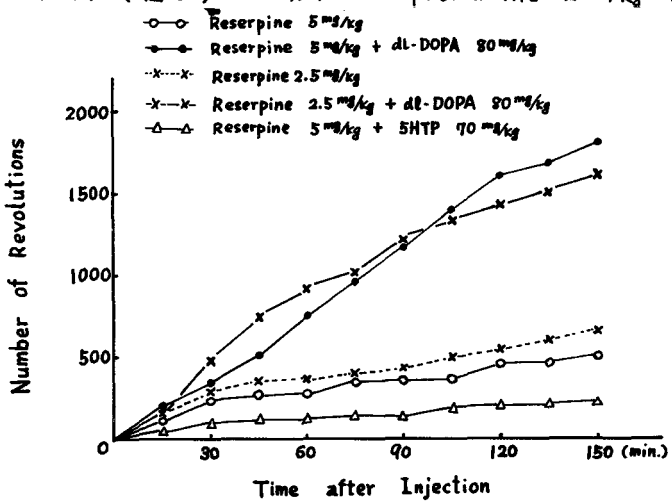


図3 回転籠法

Reserpine や Chlorpromazine によって回転運動量が抑制されはじめる投与 30 分後に脳内 DA 量を測定し，dl-DOPA 併用時と比較すると Reserpine では減少した DA 量が正常値にもどるが，Chlorpromazine では単独でやゝ減少し併用でさらに減少している。（図4）

以上の結果より，動物の興奮状態や鎮静状態には，従来いわれてきた NA の作用のほかに，DA の一定レベルが関与することは無視出来ない。条件回避反応の実験結果よりみても，動物の行動と DA 量との間に何らかの相関があるのではないかと考えられるが，なおさらに Serotonin などの関与も考慮せねばならない。

その他，糖質代謝についても検討を加えたので報告する。

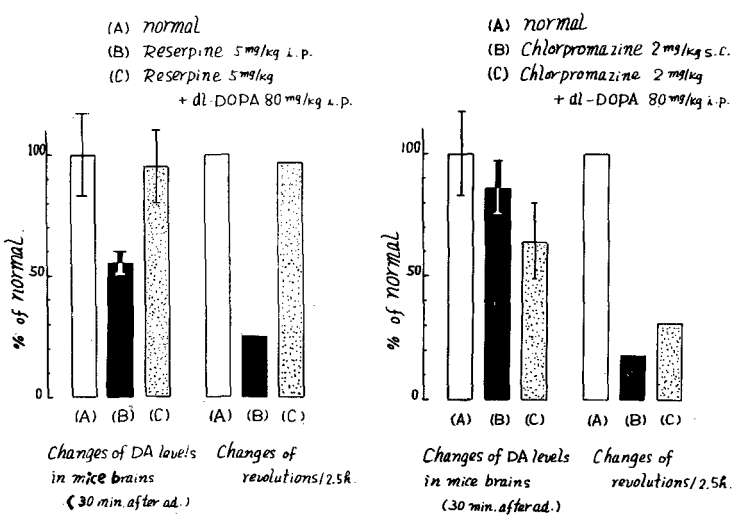


図4 回転運動量と脳内 DA 量との相関性

〈文献〉 1) Cook, L., and Weidley, E.,: Ann. N.Y. Acad. Sci., 66, 740 (1957) 2) 亀山ら：東北薬大研究年報 10, 49 (1963) 3) Mowrer, O.H., and Miller, N.E., : J. exp. Psychol. 31, 163 (1942) 4) 高木ら：日薬理誌 56, 1421 (1960) 5) 武貞：生化学 32, 478 (1960) 6) Winter, C.H., and Flataker, L.,: J. P.E.T., 103, 93 (1951)

16* 脳アセチルコリンエステラーゼの量的分布差及び細胞学的局在部位に及ぼす電気ショックとストレスの効果

福田哲雄・松田良一（阪医大・神経精神科）
宇川進逸・藤家康敬・木原　隆　（阪医大・第二解剖）

脳のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)は，定量と組織化学の2つの方法を用いて，今日なお種々の角度から検討を加えられている。その理由の主なものとしては，自律神経中枢，殊に副交感系作働物質としてのアセチルコリン(Ach)分解酵素としての意義のほかに，脳の化学的伝達物質としてのAchの機能的役割が，一部の反論(4)にも拘らず未だに有力視されている事実(9, 10, 11)があげられよう。もう一つは，AChEが細胞内でRNAを通じて合成される(6, 7)という，蛋白質乃至酵素の生合成における一般原則にあてはまり，所謂 one gene - one enzyme theory (1)による遺伝生化学と神経機能に橋をかけるのに恰好な対象と思われる点があげられる(5)。

以上の見解に基ずいて我々は種々の検討を加えてきたが，今回は表題の内容について若干の知見を報告する。

1) 実験条件：体重200 Gm.前後の成熟白鼠の脳を断頭により取り出し，半側ずつ夫々定量と組織化学操作に使用。定量は Lowry等(12)の原法を応用した Clouet及び Waelsch の変法(2)を用い，組織化学操作は福田及び Koelle による改良 thiocholine法(6, 7)に従った。定量には皮質・皮質下・脳幹・小脳・脊髄の5つの部分につき homogenate を作製，Ach-chloride を substrate として比色定量を行った。実験操作としての電気ショックは，Fukuda et al.(8)が用いた方法に依り，1日1回又は隔日に1回の頻度で grand-mal型の痙攣を起こさせ，ストレスは Dawson, Richter(3)の方法を応用した Fukuda et al. による回転ドラムによる強制回転を2～3時間施行した。電気ショックと強制回転とを組み合わせる場合は，まず回転を行い，その後30分から1時間の間に通電し，12～24時間後に屠った。

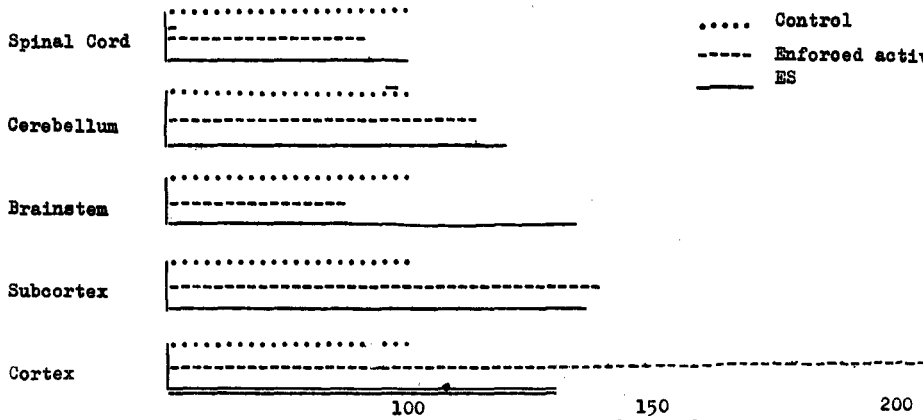
2) 実験成績：対象群ラットの AChE 活性を 100 %定量値とし，電気ショック(ES)群と強制回転(enforced activity)群，及び ES + enforced activity 群との3群を比較した。その内(ES)群と enforced activity 群とは夫々の実験操作後3日の時間後では，行動面でもAChE活性の面でも対象群と有意差を認めず，(ES)群のみが，経日による回数増加の影響を示したので，(ES)群と(ES)+enforced activity 群とを対象群と比較する結果となった。

第1表に見られるごとく，(ES)群では cortex, subcortex ともに対象群よりもAChE活性が平均して高く，brain stem では初期に低値で，ESの回数を重ねるに従って漸増する傾向が見られる（cerebellum と spinal cord は，第2表でも明らかなように，他の脳部位に対応するほどの有意差を示さなかった為，第1表から省いてある）。それに対して，(ES)+ enforced activity 群では，cortex, subcortex, brain stem のいずれも，(ES)群と同様の一般的傾向を示しているにも拘らず，回数を重ねるにつれて極めて特徴ある量的変動を示している。即ち，(ES)群では，Cortex の AChE 活性が(ES)6回を境として低下してゆくのに反し，(ES)+ enforced activity 群では，3回と9回とに(ES)群のそれを下回る活性値の低下がある以外には，対照群の約2倍近い高値の活性を示し，10回以後は更に上昇する傾向を示している。一方，brain stem では1回と4回とに僅少値の増加がある以外には，全体に低値を示しているが，興味のあるのは，9回頃から(ES)群が活性値増加の傾向を示すのに対し，(ES)+回転群では，対象群のほぼ½程度の活性値を持続的に示している。subcortex は，(ES)+回転群において

と6回から7回迄40%程の活性値低下が見られ，その後上昇する傾向を示し，(ES)群では比較的有意義と取られる程の変動が見られない。

そのような回数による活性値変動を別の角度から整理したのが次表である。その表では，AChE活性を，回数に関係なく，全回数をノクールと考慨して，その絶対値の部位別に平均値として出した数値が，control，ES，ES + enforced activity の3群の各々について算出され，比較されている。(次頁はスペースの制限の為，当日スライドにて示す)

(次 2 表)



既述の如く，cerebellum，spinal cord は，3群間の差が20%以下であるのに反し，brain stem では，(ES)と(ES)+回転との間に約50%，更に cortex では約100%にのぼる差異が見られる。内容的に見ると，cortex の場合，(ES)+回転で対照群の2倍以上，(ES)群の約2倍の高値を示すが brain stem では，(ES)よりも(ES)+回転の方が約1/2値減少している。即ち，cortex と brain stem では互いに反比例的な傾向を示しているようである。一方 subcortex では，(ES)と(ES)+回転との間に格差のない点に興味が持たれる。

組織化学的所見としては，(ES)と(ES)+回転とにおいて，細胞内 AChE が細胞膜乃至軸索に移行する傾向が見られ，殊に(ES)+回転の際にその傾向が強く，cholinergic neuron の "exhaustion" の像が認められる。更に，稀ではあるが細胞核内のみに AChE 活性が強く認められるものがあり，RNA を通じて合成される AChE が，緊急時に細胞核部でも合成される可能性を示すものとして解釈出来，興味ある所見と考えられる。

以上の成績をスライドで示し会がら，御教を加えたい。

文献：1) Beadle : Science, 129 : 1715, 1959　2) Clouet & Waelsch : J. Neurochem., 8 : 189, 1961.
3) Dawson & Richter : Proc. Roy. Soc. B., 137 : 252, 1950.　4) Eccles : "Physiology of synapses", Springer, 1964
5) Fukuda : Bull. Osaka Med. Sch., 5 : 46, 1959.　6) Fukuda & Koelle : J. Biophys. Biochem. Cytol., 5 : 433, 1959.
7) 福田：神経進歩，6 : 31, 1962.　8) Fukuda, Stern, Ulett : J. Nerv. Ment. Dis., 21 : 1, 1959.
9) Krnjevic & Phillis : J. Physiol., 166 : 296, 1963,　10) Krnjevic & Phillis : J. Physiol., 166 : 328, 1963.
11) Hebb et al. : Nature, 198 : 692, 1963.　12) Lowry et al. : J. biol. Chem., 207 : 19, 1954.

17 脳ミトコンドリアのＡＤＰ呼吸調節及びミトコンドリア内ＰＮの酸化還元に及ぼすMgイオン等の影響

岩本省司・木村　潔（和歌山県医大・神経）
長井音次（和歌山県医大・第1生理）

細胞水準でもミトコンドリア（Mtと略す）水準でも，呼吸速度はこれに共役する燐酸化反応の速度で調節される[1,2]が，生理的な代謝条件では燐酸化反応の律速因子は通常燐酸受容体ＡＤＰであるので，ＡＤＰの消長によって呼吸速度の緩急がおこる（ＡＤＰ呼吸調節又は受容体調節，R.C.と略す）。Chance[3]はChelater ＥＤＴＡを含む液に浸漬した肝－Mtの呼吸調節率（state 3速度：state 4速度　R.C.R.と略す）がMgイオンの補充により増大することを観察して，これを呼吸調節の恢復（Restitution of Respiratory Control）と説明したが，その外容については何等語っていない。

筆者等のグループは白鼠各組織Mtの呼吸調節とMgイオン等の関係を検討した結果，

1）肝MtではMgイオンはAdenylate Kinaseを賦活し，R.C.R.を増大すること[4]。

2）心筋Mtでは主としてAT P-aseを賦活してR.C.R.を低下せしめること[5]を見出した。

この報告は脳Mt（全脳）のコハク酸呼吸及びMt内ＰＮの酸化還元状態のstate－4－3－4遷移に及ぼすMgイオンの影響を検討することにより呼吸調節機構を考察するものである。

実験方法

1.）200g前後の白鼠を断頭，可逆的急速に氷冷，氷冷下にて全脳を剖出する。以後Voss[6]の方法を少しく変じた方法に脳－Mtを遠心分離する。（表Ⅰ）

表1　分離法

Homogenation.（1 Vol of Tissue to 5 Vol of Medium）

1000×g ..... 10min.
- ppt.
- Supern.

Supern.: 1000×g .... 10 min.
- ppt.
- Supern.

Supern.: 10000×g. ..... 10 min.
- Supern.
- ppt.

Supern.: 10000×g ..... 10 min.
- Supern.
- ppt.

Supern.: 10000×g ..... 10 min.
- Supern.
- ppt.

Medium：（Mannitol-sucrose-Medium）.

0.21	M	Mannitol
0.075	M	Sucrose
0.01	M.	Tris-Ac. Buffer.
0.2	mM.	EDTA.
	PH	7.4

2）標準反応液の組成

0.25	M	Sucrose
10	mM	Tris-Ac. Buffer.
10	mM	KCl
5	mM	Phosphate Buffer.
	PH.	7.4.

この標準反応液に所要濃度のＥＤＴＡ，$MgCl_2$等を追加して反応液を調製使用する。

3）呼吸速度の測定

酸素電極法（自家製ポーラログラフ）による。

反応液2.0 ml中に5 mg Protain のMtを入れ，反応条件をととえてO_2一定を記録する。

4）Intramitochondrial ＰＮの酸化還元状態の測定。

ＰＮの酸化還元状態は還元型ＰＮの放射する蛍光強度の消長の記録による。光源は500 Wat. Xenon，ホ／次分光器（励起波長340 mμ）ホ２次分光器（蛍光波長450 mμ）共に島津製格子型。受光部ＩＰ－28，転換及び増巾はGilfordの200型，記

代謝条件state 1～5については，
Chance, B and Williams, G.R.　J. Biol. Chem. 217, 409～427, (1955) 参照。

録は理化電料ERG-5, 10 mV であった。螢光用液槽は 10×10×45 に反応液3.0 ml. を入れ，これに 8 mg. Protein の Mt. を投入，次いで基質，受容体等を導入して代謝條件をととえ，螢光の消長を記録した。

実験成績及び考察

I 呼吸調節と Mg イオン

Fig. I に 50 μM $MgCl_2$ の存否を代謝條件の差異とする二例の呼吸曲線を示した。ADP の導入により，両例共呼吸が促進した（state 3）が，Mg イオンの存在はより大きな促進をよえた。ADP の消耗に伴い両例共呼吸は緩徐となる（state 4）が，Mg の存在例ではより緩やかであった。R. C. R. 即ち State 3 速度 : state 4 速度の比は 50 μM Mg. イオンの存在例では 1.52，Mg イオンの無添加例では 1.30 であり，この場合 Mg イオンは R. C. R. を増大している。然し乍ら，Mg イオンは常に R. C. R. を増大するものではない。Fig. 2 に Mg イオン及び EDTA 濃度の R. C. R. に及ぼす影響を図示した。(I) EDTA 添加を行った場合の Mg イオン濃度の影響は明らかに R. C. R. に対して2相性を示している。即ち (a) 約 50 μM 迄は Mg イオン濃度の増大は R. C. R. を増大し，(b) これ以上の Mg イオン濃度では R. C. R. を減少せしめている。EDTA は (a) 相での Mg イオンの R. C. R. 増大作用を，(b) 相では Mg イオンの R. C. R. 低下作用を抑制していると理解することが出来る。(2) EDTA の不存在では R. C. R. は Mg イオン濃度に拘らず 1.0 で ADP－呼吸調節を示さなかった。

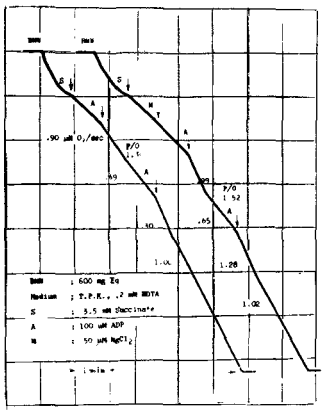


Fig I. 肝 Mt. のコハク酸呼吸の ADP 呼吸調節に及ぼす影響。反応液（0.25 M Sucrose, 10mM Tris-Ac. Buffer, 10mM KCl, 5mM phos. Buffer 0.2 mM EDTA pH. 7.4）全量 2.0 ml, 5 mg prot. Mt. 30°C.

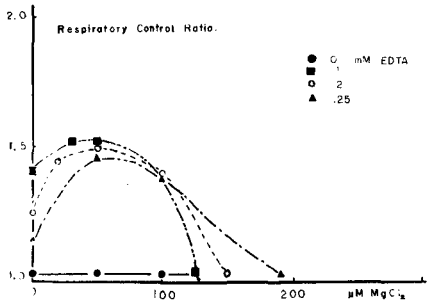


Fig. 2. コハク酸呼吸に於ける Mg イオン及び EDTA の呼吸調節率に及ぼす影響。
反応条件は Fig I と同じ（EDTA は除く）

II. Intramitochondrial Pyridine Nucleotide の酸化還元と Mg イオン。

以下の各実験は，呼吸を Mt 内 PN の酸化還元状態遷移に投影して考察したものである。これらの成績を通覧する時，PN 螢光水準に対して EDTA は還元的な影響を，Mg イオンはこれに拮抗して酸化的な影響をよえていることを感得出来る。

A. Mg イオンによる Adenine Nucleotide (AN) 転換活性の賦活。

Fig 3. は一定量の EDTA (0.2 mM) 及びこれに拮抗する種々量の Mg イオンを含む系で ATP をよえた場合の反応である。内因性呼吸状態（state 1）の Mt に基質をよえると state 4 となり PN の還元が見られる。ATP をよえると瞬間稀釈の影響が見られたが，その後の PN は Mg イオン濃度の差により様々な変化を示した。Mg 不存の時 ATP は PN の state 4 水準を一方還元に傾かしめた（Energy linked reduction）。[7] Mg イオンの増

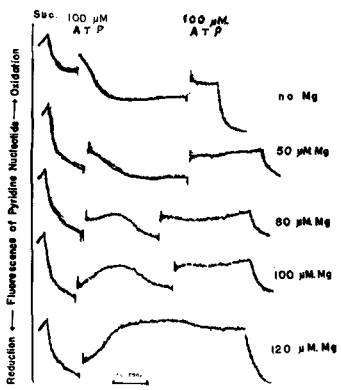


Fig 3

PN蛍光水準に反映したMgイオンによるATPase活性の賦活。反応液には定量のEDTA (0.2 mM) および示した量のMgイオンを含ましめた。その他は本文参照。

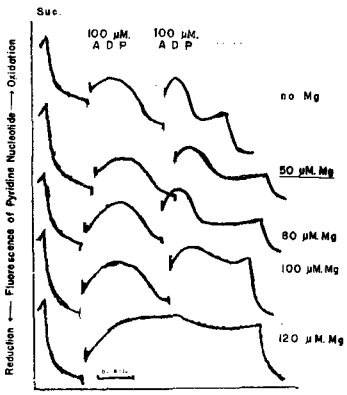


Fig 4.

PN蛍光水準に反映した呼吸調節におぼすMgイオンの影響。反応条件は大要前図と同じ。

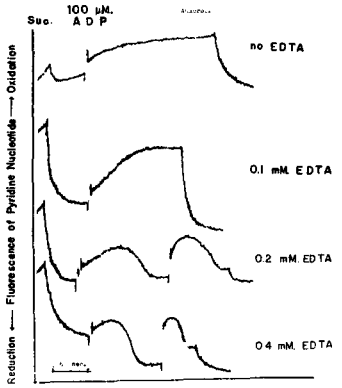


Fig. 5.

PN蛍光水準に反映した呼吸調節におぼすEDTA濃度の影響。100 μM Mgを指示量のEDTAも反応液に含ましめた。その他反応条件はFig 4. 参照

大(50 μM.)と共にこの還元傾向は減じ, state 4~3~4遷移を示すに到る(8.0 μM)。これは燐酸化の場の外(Extra)にあったATPが受容体ADPに変じつゝ燐酸化の場の中(Intra)にもたらされることを示す。従って呼吸は促進し(state 3), 且つR.C.R.は増大する(Mgイオン作濃度域)

$$ATP\ (Extra) \xrightarrow{Mg^{++}\ (低濃度)} ADP \cdots (1)$$

$$ADP + Pi \xrightarrow[state\ 3]{Respiration} ATP\ (intra) \cdots (2)$$

state 3 水準が定常的に維持されないことおよび無酸素状態での還元水準の相違はATP (Extra) とATP (intra) の場の相違の証左となる。

Mgイオン濃度を増大すると (100 μM), state 4~3遷移後の3~4遷移も矢張持続的にstate 3を維持するに到る。

$$ATP\ (intra) \xrightarrow{Mg^{++}\ (高濃度)} Pi + ADP \cdots (3)$$

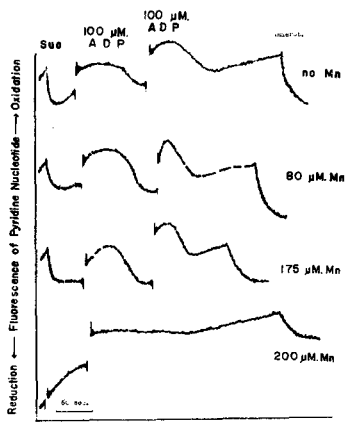


Fig. 6. PN蛍光水準に投影した呼吸調節におぼすMnイオンの影響。

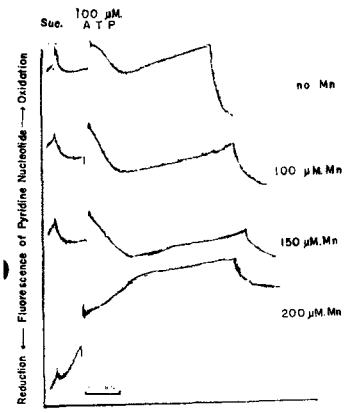


Fig. 7. ATPによるstate 4蛍光水準におぼすMnイオンの影響。

Mgイオンを Mnイオンに変更した他は大約 Fig 4. 5の条件に同じ。ATP-ase 活性の促進は認められない。200 μM Mn では非共役がおきている。

これはMgイオンの高濃度域での反応

と反応(2)によりサーカス現象を

起し，両反応の形成する定常状態で呼吸は律速されR.C.となるものと理解される。(1)及(2)は共にこの場合見掛上ATP-aseであるが(1)は必ずしもATP-aseである必要はない。Adenylate kinase或はHexokinaseであってもよい。その何であるかの決定は今后に少ずるが，Mgイオンに対する親和性は反応(3)とは異る。

B. Mg及PNのstate 4-3-4遷移とMgイオン。

Fig 4.に0.2 mM EDTA及び種々な濃度のMgイオンを含むMg無反応液にて基質コハク酸及びADPの添加によってstate 4-3-4遷移を行わしめた例をあげた。Mgイオンの低濃度域では後state 4-3-4遷移を起すが高濃度域では前実験と同様ATP-ase活性の賦活によってサーカス現象に移行するのをあげた。Fig. 5に100 μM Mgイオンと EDTAの種々の濃度を含むMg無反応液で行った同様な実験の成績をあげた。Mgイオンの一定濃度に対して比較的高濃度のEDTAはPNのstate 3水準の上昇を抑え，state 4水準を還元側に傾かしめる。EDTA濃度の比較的低下と共にstate 4-3-4遷移の経過は大きくなり，且つstate 4水準は酸化側に推移し，遂にはstate 3のサーカス現象に移行する。no EDTAでは0.1 mM EDTAと相似な経過を示しているが酸化還元の変化が小さい。

C. Mnイオンの作用.

Fig.6及7に0.2 mM EDTA及種々濃度のMnを含んだMg無反応液でのPN蛍光水準の変化を示標としてADP及びATPの変化を検した。175 μMまでは検討したMnイオン濃度の範囲ではstate 4-3-4遷移を示すが200 μM Mnになるとの変化はADPによっても，ATPによっても酸化側に傾くのみである。これはMnイオンがMgを非共役化した証拠である。

要約

共役性ある全脳ミトコンドリアのコハク酸呼吸における呼吸調節の機構を酸素電極による呼吸曲線及びミトコンドリア内在PNの酸化還元水準の遷移(蛍光による)から検討し考察した。1)呼吸速度は燐酸化反応へのADPの供給によって調節される。燐酸化反応の場へのADPの供給，ANの相互転換等はADP呼吸調節のオ二次調節機構となる。2)EDTA，Mgイオン等はオ二次調節系に重大な影響を与えている。呼吸調節律R.C.R.を目標として見る時，Mgイオンは2相性の影響を示した。低濃度域ではR.C.R.を増大し，高濃度域ではR.C.R.を減少させた。Mgの賦活作用を受けるものは，後者ではATP-ase活性であり，前者ではAdenylate kinaseの如き活性である。3)EDTAとMgイオンは互に拮抗し，酸化還元に対してEDTAはPNの還元的なATP様作用を有し，Mgは酸化的なADP様作用を示した。

文献.

1) Lardy, H.A., Wellman, H. J. Biol. Chem, 195 215. (1952)
2) Chance, B., Williams. G.R. Advance in Enzymology. 17 65 (1956)
3) Chance, B. Ciba Foundation Symposium. on the Regulation of Cell Metabolism Churchill, P91. (1959)
4) 川口成，日本生理誌，27 No.8. 掲載予定。 長井，川口他，日本生理誌 25 94(1963)
5) 高橋，日本生理誌 27 291 (1965)。
6) Voss. P.O. et Campello. A.P. & Bacila, M. Biech. Biophys. Res. Com. 4 48, (1961)
7) Chance, B. J. Biol. Chem. 236 1569 (1961)

18* 脳ミトコンドリアの分離調整法について

瀬田喜一郎
小沢和恵
半田肇
（京大・脳神経外科）

1952年 Brody and Bain によって 脳ミトコンドリアの分離調整法が発表されて以来 この分離法について 非常に多くの人達によって研究されて来ているが、呼吸調節能は 他の臓器に比して著しく低く、即ち tightly coupled のミトコンドリアと分離する迄には至っていない。我々は 脳腫脹の際 脳ミトコンドリアの活性が低下する事実を見出し、この事より 活性の高い脳ミトコンドリアの分離調整には 迅に脳腫脹を起す原因を除去出来る手段を用いなければならないのではないかと考え、種々検討した結果 可成りの成果をあげえたので この点について述べた。

脳ミトコンドリアの分離調整法—— 実験動物として白兎を用い、調整液として、0.3M mannitol 0.1mM EDTA (pH 7.4) を用いた。断頭後直ちに脳を剖出し、0～4°C の調整液に移ち 30秒間 homogenization を行った後 600×g 8分 0°C で遠心沈殿を行い、上清液を 10,000×g 10分で遠心沈殿した。かくて得られた沈渣に 上記調整液 40ml を加えて 5,000×g 10分の遠心沈殿を行った。この沈渣は 褐色層、白層、及び両者の中間層の3層に分れ、この内 遠心沈殿管の最下層に管壁に密着して沈殿している褐色層のみを取る為に、調整液にて3～4回洗浄を行い、この洗浄液は上清液に加え 褐色層のみを残す。この様にして得られたミトコンドリア分劃を Fraction-1 (F1) とした。次に 上述の上清液及洗浄液を 5,000×g 10分の遠心沈殿を行い、同様に褐色層のみを得て Fraction-2 (F2) とした。以下同様の操作を反復して Fraction-3, 4, ……を得た。(stepwise preparation)

尚 従来の一般に用いられている方法である 10,000×g 10分の遠心沈殿で得られたミトコンドリア分劃を 仮に Fraction C (Fc) とした。

呼吸調節能 (RC) 及び ADP/O ratio の測定—— closed system の振動白金電極による酸素電極法に従った。反応液として 0.3M mannitol, 0.01M KCl, 0.01M Tris-HCl buffer, 0.005M K-phosphate buffer, 0.2mM EDTA (pH 7.4) を用いた。すべて 22°C に於て測定した。

ATPase 活性の測定—— Fiske and SubbaRow の方法に従った。反応液は 0.25M mannitol, 0.01M KCl, 0.2mM EDTA, 3mM ATP, 0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4) を用い、ATPase の活性化には、0.05mM 2,4 dinitrophenol (DNP) 及び 2mM $MgCl_2$ を用いた。

実験結果は 図表に示す通りである。

紙面の都合上 代表的な 2,3 のデータのみを表示するにとどめるが、最後に ミトコンドリアの分離調整には contamination と共に 断頭時の ischemia の問題を 重要視しなければならない事を強調した。

Fig. 1. Change in the oxygen uptake (x- -x), respiratory control ratio (o—o) and ADP/O ratio (•- -•) during the oxidation of glutamate by mitochondrial fractions. Glutamate concentration, 4 mM.

Fig. 2. Polarographic assay of respiration and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria.

Fig. 1.

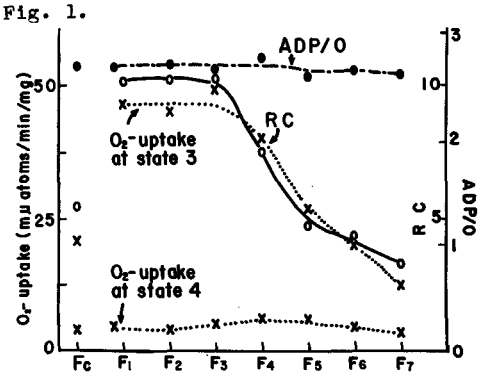


Fig. 2.

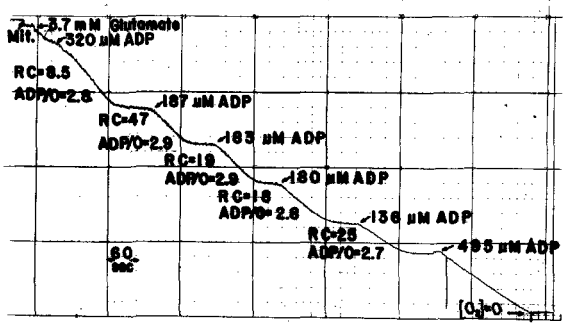


Table 1. Oxidation of various substrates. The oxygen uptake is expressed in millimicro-atoms per minute per mg of mitochondrial protein. Conditions are described under "Method". When malate was added, the concentration was 1 mM; the concentration of all other substrates was 4 mM.

Table 2. Comparison of Fc-and F1-preparation on glutamate oxidation and ATPase activity. O_2 uptake measured polarographically at 22° with 4 mM glutamate as substrate and expressed in millimicro-atoms per minute per mg of mitochondrial protein. When added, Mg^{2+} was present at a concentration of 4 mM, and dinitrophenol, at 0.05 mM.

Table 1.

		Fc	F1
O_2-uptake mμ atoms/mg/min	State 3	17.00	45.80
	State 4	3.97	3.88
Respiratory control		4.3	11.8
ADP / O		2.8	2.9
ATPase activity (μ moles ΔP/mg protein)	No addition	0.20	0.09
	DNP (0.05mM)	0.91	1.46
	Mg^{++} (4 mM)	1.82	0.98
	DNP + Mg^{++}	2.50	2.04

Table 2.

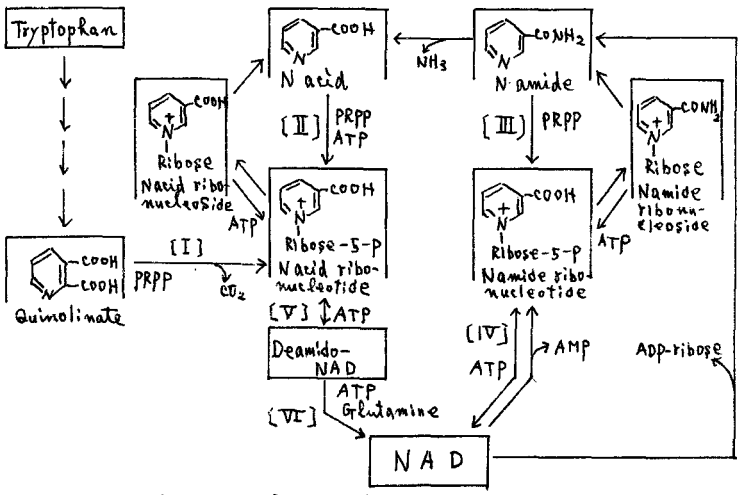
Substrate	Oxygen uptake		RC	ADP/O
	state 3	state 4		
glutamate	55.8	5.0	11.2	2.62
glutamate + malate	50.7	5.0	10.2	2.99
pyruvate + malate	60.0	8.2	7.3	3.00
α-ketoglutarate	62.7	8.4	7.4	2.70
α-ketoglutarate + malate	59.2	10.2	5.8	2.48
succinate	82.3	21.5	3.8	1.97
succinate + malate	61.5	17.9	3.4	2.15
isocitrate + malate	30.5	14.8	2.1	2.78
glutamine	16.6	6.2	2.7	1.94
glutamine + malate	21.0	6.8	3.1	2.48

19　脳におけるＮＡＤの生合成とその代謝回転について

出口武夫・市山　新
早石　修（京大・医・医化）

哺乳動物におけるＮＡＤ（ＤＰＮ）の生合成に関する研究は従来主として赤血球及び肝臓を用いて行われ，現在，図１に示したように大別して３つの経路が知られている。

図　１　ＮＡＤの生合成及び分解経路



オーの経路はNicotinamideとPRPPからNicotinamide Mononucleotideとなり[1,6]〔反応Ⅲ〕，次いでＡＴＰと反応してＮＡＤとなる[4]〔反応Ⅳ〕経路である。

オニの経路はPreissとHandlerにより発見されたもので Nicotinic AcidからNiacin Mononucleotideを生じ〔反応Ⅱ〕次いでd-ＮＡＤとなり〔反応Ⅴ〕最後にＡＴＰとglutamineによりアミド化されてＮＡＤとなる〔反応Ⅵ〕経路である。

オミの経路はTryptophanからＮＡＤに至る経路であるが，これについては本教室の西塚らがラットの肝臓を用い，Tryptophanが多くの中間体を経てQuinolinateとなった後 PRPPと反応してNiacin Mononucleotideとなり〔反応１〕Nacidからの合成経路に合流することを明らかにした[5]。又同時に〔反応１〕に関与する酵素 即ちQuinolinate Transphosphoribosylaseが肝 腎に認められるのみで 脳その他の臓器には全く認められないことも明らかにした[3]。

しかしこれらの発見はすべてin vitroの実験であり in vivoにおいてこれらのどの径路がどの様な速さで働き 又どのステップが律速段階になっているのか，或は一旦合成されたＮＡＤはどのような速さで代謝回転しているか については何う確証がなかったのである。本教室の伊地知らは マウスの門脈内に^{14}Cでラベルした Nacid Namide，Quinolinate等各種のＮＡＤ前駆体を注射することによって in vivoの肝臓では Nacidが有効なＮＡＤの前駆体である事 及びNacidはNaMN，d-ＮＡＤを経てＮＡＤとなっている事を見出したのである[3]。

今回我々は脳に於いてはＮＡＤがどの径路により合成され 又合成後の代謝回転がどうなっているかという事を in vivoのレベルで追求し 幾つかの知見を得たので報告する。

〔実験方法〕

(1) 実験動物　Wistar系ラット（体重170～200gm）を用いた。
(2) Nacid-ｎ-^{14}C；Namide-ｎ-^{14}CはRadiochemical Centerより購入した。

NaMN-^{14}C ; d-NAD-^{14}C, NAD-^{14}C は Nacid-^{14}C より赤血球のアセトン粉末抽出液を用いて酵素的に合成した。

NMN-^{14}C ; NAD-^{14}C は Namide-^{14}C から Lactobacillus fructoans より精製した酵素系を用いて合成した。

NR-^{14}C ; NaR-^{14}C は夫々 NMN-^{14}C, NaMN-^{14}C から前立腺の Acid phosphatase を用いて合成した。

(3) 注射及び抽出方法

(a) 内頸動脈注射： ^{14}C 標識化合物を 0.08 ml へ 0.12 ml の蒸溜水に溶解せしめ これを軽度にエーテル麻酔したラットの外頸動脈を結紮した後 内頸動脈より注射した。注射は 20 ～ 30 秒かけて徐々に行い 1 分後に両頸静脈を切断 直ちに両頸動脈より 0.85 % NaCl 各 0.5 ml をもって洗滌し 脳を摘出後更にその表面の血液を洗い落とした。その後 3 % PCA 7 ml 中でホモゲナイズし その沈渣を更に 3 % PCA 5 ml で洗滌し その双方の上清を 10 N KOH で中和し その上清のうち 0.2 ml を Nuclear-Chicago gas flow counter で測定した。猫自己吸収を補正するため測定値を 1.8 倍して実験結果とした。

(b) 脳槽への注射； ラット項部の皮膚及び筋肉を切開後 cisterna magna へ 0.04 ml の基質溶液を徐々に注射した。断頭後は直ちに液体空気をもって凍結し 脳摘出後は上と同じ方法で抽出し 放射能の取り込みを測定した。

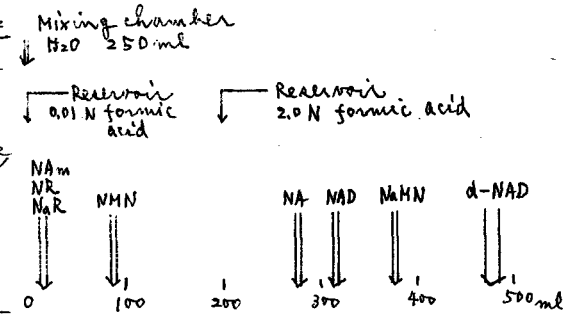
(4) NAD 及びその中間体の分画及び同定。

上記 PCA 抽出液を Dowex-1 x 2 Formate type (0.8 x 30 cm) のカラムに charge し, formic acid で溶出した。[図 2] 図 2 fraction pattern

カラムより溶出した各フラクションは 次いで authentic のサンプルと共に下記の溶媒系によるペーパークロマトグラフィーを行い同定した。

(1) Ethyl alcohal-1M-Ammonium Acetate, pH 5.0 (7 : 3)

(2) n-Butyl alcohal saturated with 15 % NH_4OH.



NaMN-^{14}C は更に前立腺の Acid phosphatase を作用させて NaR-^{14}C とし, d-NAD-^{14}C, NAD-^{14}C は脾臓の NAD-ase を作用させた後, それぞれ Nacid-^{14}C, Namide-^{14}C として上記溶媒系によるペーパークロマトグラフィーを行い同定した。

〔実験結果〕

上記の如く脳では Tryptophan ⟶ NAD の転換は起らないと思われるので 先ず Nacid-^{14}C, N-Amide-^{14}C, NAD-^{14}C を始めとして Nacid 及び Namide からの NAD の生合成及び分解経路の各種中間体を ^{14}C で標識し 内頸動脈に投与し 1 分後の脳への ^{14}C の取り込みを調べたのが〔表 1〕である。基質は一匹当り 20×10^4 cpm, 35.7 mμmole 投与した。結果は一匹のラットの全脳中のカウントで示してある。血液の混入が完全には除外出来ないこと 及び gas flow counter の測定誤差を考慮するならば これ

らの値はすべて実験誤差の範囲に入り 結局短時間ではいづれの前駆体も大量に血中より脳え取り込まれることはないものと思われる。猶これらの化合物をATP又はglucoseと共に注射したが 同様に顕著な取り込みは見られなかった。

〔表 2〕はNacid-^{14}C; Namide-^{14}C (20×10^{4}cpm; 35.7 mμ moles)をラットの腹腔内へ注射した際の脳への放射能の取り込みのTime courseであるが ^{14}Cの取り込み量は非常に少い。

これらの結果から 血中より脳へのNacid Namide及びその他のNAD代謝の中間体の取り込みは 強く制限されていることが明らかである。

次に我々はこれら^{14}C標識化合物を脳槽内へ投与し 脳えの^{14}Cの取り込みを検討した所、Nacidを注射した場合に可成り大量の^{14}Cが脳中に見出されることが判明した。〔図 3〕がNacid-^{14}C, 20×10^{4}cpm, 35.7 mμ molesを0.04mlの蒸溜水に溶かし 脳槽内に投与した場合の脳への^{14}Cの取り込みのtime courseである。一匹のラットの全脳中のカウントであるが 各時点3匹のラットを用いて実験し その平均値が示してある。図から明らかなように 投与後1分では投与量の約30%の^{14}Cが認められるが 以後急速に減少し 15分後には3.0×10^{4}cpmになり 以後長時間にわたりほゞ同一量のカウントが認められ 約4日後にカウントが半減する。肝臓における伊地知の研究によればNacidを門脈内に投与した場合 4時間後には肝臓に殆んど^{14}Cが認められないのであるが、これと比較して脳では血中からのNacidの取り込みが非常に遅い代りに 脳からの消失も非常に遅いことは興味深い。この^{14}Cの分画を行った結果が〔図 4〕である。Nacid投与後1分では^{14}Cの90%以上がNacidであるが その後急速に減少し 15分後には僅かに見出されるのみである。NaMNは既に1分後に認められ 5分後には最大値に達する。それに少し遅れてd-NADが増加し、更に遅れてNADが増加する。30分経過すると殆んどがNADとなり それ以後はNamideが小量認められる以外

表 1, 内頸動脈注射後の脳の放射能

	cpm/total Brain ※	mμmoles incorporated ※※	% incorporated into Brain
Nacid	1,050	180	0.48
Namide	580	110	0.23
NaR	0	0	0
NaMN	130	25	0.07
d-NAD	90	16	0.05
NAD	850	150	0.34
NR	190	35	0.09
NMN	0	0	0

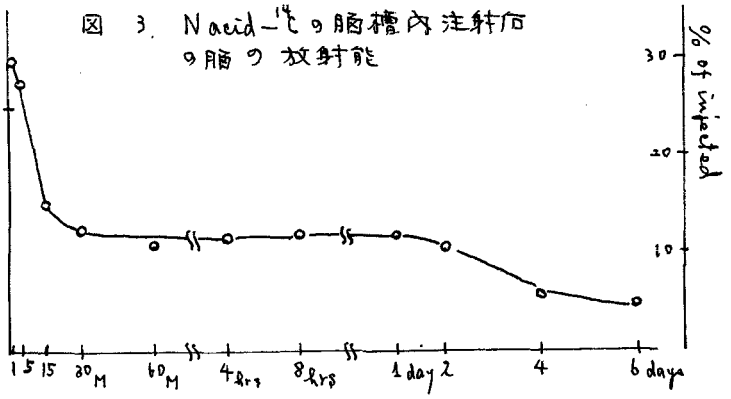
※ 2~5匹の平均値
※※ 比放射能より換算

表 2, 腹腔内投与後の脳の放射能

hrs	Nicotinic Acid cpm/total Brain ※	Nicotinic Acid mμmoles ※※	Nicotinamide cpm/total Brain ※	Nicotinamide mμmoles ※※
6	0	0	0	0
12	590	110	500	90
24	1000	180	409	73
48	610	113	860	153

※ 2匹の平均値
※※ 比放射能より換算

図 3. Nacid-^{14}Cの脳槽内注射後の脳の放射能



は すべてのカウントは NADとして存在する。猶 本実験ではNADHは考慮に入れていない。

この結果 in vivo の脳においても preiss と Handler が発見した経路、即ち Nacid → NaMN → d-NAD → NADという合成経路が存在することが明らかとなった。又 Nacid から NAD 生合成に要する時間が肝臓では約10分であるのに対し、[23] 脳では約30分であることを考えると脳でのNAD生合成の速度はそれ程遅いものではないと思われる。1が1生理的条件下で Nacid が NAD の前駆体として血中より脳に取り込まれているかどうか、又この経路が生理的状態で NAD の主要な合成経路であるかどうか という点については何ら確証を得るに至っていない。

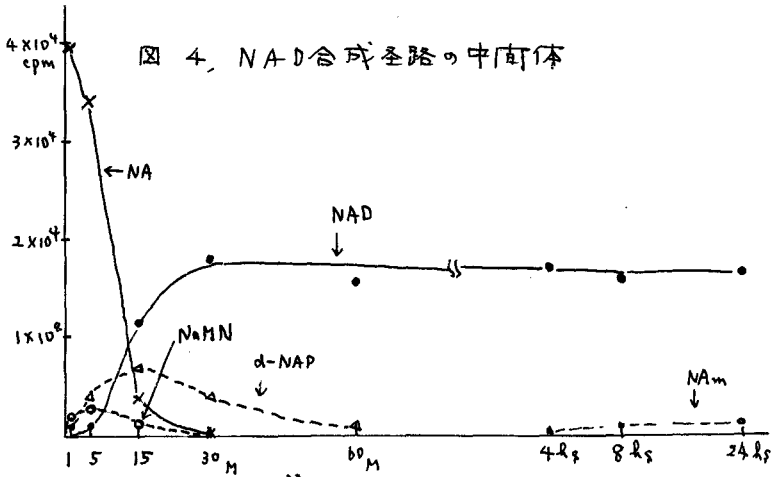


図 4. NAD合成経路の中間体

次に Nacid-^{14}C より生成した脳の NAD-^{14}C が非常に長時間にわたってNADとして存在することに関して

(a) 一旦合成された脳のNADは全く分解されずに長時間存在し続けるのか、或は

(b) 脳のNADは分解されるが、1かピリジン核又はそれを含む一部分が速やかにNADに再合成されるために、^{14}Cで追跡した場合一見して脳のNAD代謝回転は遅いような結果が得られたのではないか という2つの可能性が考えられる。

これを確認するため現在 $^{32}P_i$ を脳槽に注射し NAD及び Adenine Nucleotides への $^{32}P_i$ の取り込みを検討中である。既述の如く、脳へのNAD前駆体の取り込みが非常に遅い事から、もし脳槽内に投与した $^{32}P_i$ が脳のNADの2つのPに活発に取り込まれた場合には 脳内でNADの代謝回転が行われていることを示唆すると考えられる。現在迄得られた知見では NADへの ^{32}P の取り込みは可成り速やかであり 又NADへの ^{32}P の取り込みが最大値に達した時点に於いては NADの2つのPは同程度にラベルされているという結果が得られた。現在 脳に於いてはNADの分解と再合成の可能性があると推定されるので、目下その確証を得るべく実験中である。

〔本稿中の略語〕 NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, d-NAD: deamido-NAD, NaMN: niacin ribonucleotide, NMN: nicotinamide ribonucleotide, NaR: niacin ribonucleoside, NR: nicotinamide ribonucleotide, Nacid: nicotinic acid (niacin), Namide: nicotinamide, PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate

〔文 献〕

(1) DIETRICH, L. S., FULLER, L., MARTINEZ, L., and YERO, L. L. Fed. Proc., 24, 480 (1965)
(2) IKEDA, M., TSUJI, H., NAKAMURA, S., ICHIYAMA, A., NISHIZUKA, Y., and HAYAISHI, O., J. Biol. Chem., 240, 1395 (1965)
(3) 伊地知浜夫、市丸新、早石修、 生化学 36 702 (1964)
(4) KORNBERG, A., J. Biol. Chem., 182, 779 (1950)
(5) NISHIZUKA, Y., and HAYAISHI, O., J. Biol. Chem., 238, PC483, 3369 (1963)
(6) PREISS, J., and HANDLER, P., J. Biol. Chem., 225, 759 (1957)
(7) PREISS, J., and HANDLER, P., J. Biol. Chem., 233, 488, 493 (1958)

20 脳に於けるＮＡＤ代謝の特異性
（特に肝臓との比較に於て）

川合　仁・鳩谷　龍
（京大・医・精神）

ＮＡＤ(Nicotinamide adenine dinucleotide)が生体内に於ける酸化還元反応を触媒する諸酵素の主たる補酵素で、生体に取って極めて重要な物質であることは今更云うまでもないが、脳のＮＡＤに関する生化学的研究は余り多くない。生体中でも特に脳の呼吸活動は極めて活潑であること、ＮＡＤ合成のPrecursorとなるナイアシンの欠乏によってペラグラ精神病を来すこと、ニコチン酸欠乏症状と種々の精神神経障害とを伴うトリプトファン代謝異常のハルトナップ病の存在すること(2)、ニコチン酸アミドの拮抗物質であるアセチルピリジン(1)や6-アミノニコチン酸アミド(3)の投与によって種々の神経障害を来すこと等の事実から考えても脳に於けるＮＡＤ代謝研究の重要性は否定出来ない。著者らは今迄、成長に伴うトリプトファン代謝の変動を主としてＮＡＤ生合成との関連に於て検索して来たが、引き続き脳のＮＡＤ代謝について種々の角度から検討を加えて来た。その結果脳内のＮＡＤ濃度が他臓器(特に肝臓)に比して極めて特異的に調節されていることを示す種々の事実を明らかにした。

実験方法

実験動物――ラッテはすべてウィスター系を用い、その胎仔の年令は母体膣腔内にスペルマを発見した日を妊娠０日としそれより満２１日目を出産予定日として計算した。成熟ラッテを用いる場合はすべて体重１５０ｇから２５０ｇの雄を用いた。マウスはＤＤ系で体重１５ｇから２０ｇの雄を使用した。

酵素活性の測定――Niacin mononucleotide pyrophosphorylase(以後略してＮＭＮ pyrophosphorylase)の活性測定はPreiss and Handler(4)の方法に従った。動物断頭後速かに脳及び肝臓を取り出し、脳肝をそれぞれ３倍量及び６倍量の氷冷０.１４ＭＫCl溶液と共にホモジネイトし、その２００００ｇ２０分間の遠心上澄を酵素標品とした。反応液はphosphate buffer 50 μmoles, nicotinic acid-7-C^{14} 12 mμmoles (8×10^6 cpm per μmoles), 5 phosphoribosyl-1-pyrophosphate 100 mμmoles, ATP 2 μmoles, $MgCl_2$ 5 μmoles及び酵素を含み３７°Cで１０分間反応させた後加熱によって反応を止める。反応終了後、反応液の遠心上澄からペーパークロマトグラフィー（溶媒；１Ｍ Ammonium acetate, pH 5.0 – ethanol, 3:7）によって反応生成物のＮＭＮを分離しその放射能を測定した。放射能の測定にはPackard Tricarb liquid scintillation spectrometerを用いdirect strip countingを行った(5)。活性はすべてmμmoles NMN produced/g. wet weight tissue/hourで表した。

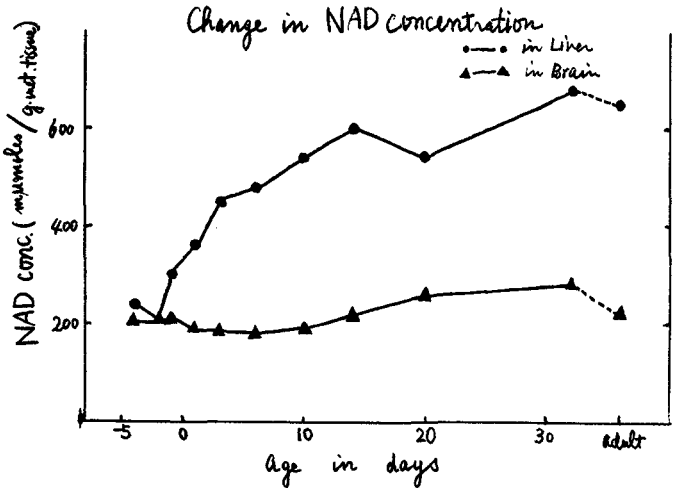
ＮＡＤ濃度の測定――動物断頭後速かに脳及び肝を取り出しすぐdry ice-ethanolの中で凍結させた後脳肝をそれぞれ５倍量，１０倍量の２% perchloric acid溶液と共にホモジネイトする。その遠心上澄を１０ＮＫＯＨで中和した後再び氷冷遠心により potassium perchlorateを除く。その一部を取りKornbergの方法(6)によりalcohol dehydrogenaseを用いて酵素的にＮＡＤ量を測定した。

注射――特別な指示のない限り、腹腔内注射である。dl 5-Hydroxytryptophan (5-HTP)及びニコチン酸アミドは生理的食塩水に溶かして注射した。注射薬はすべて0.1 ml/10 gの割合で注射出来る様に調整した。

実験結果

1. ラッテ脳肝に於けるNAD濃度の成長に伴う変化

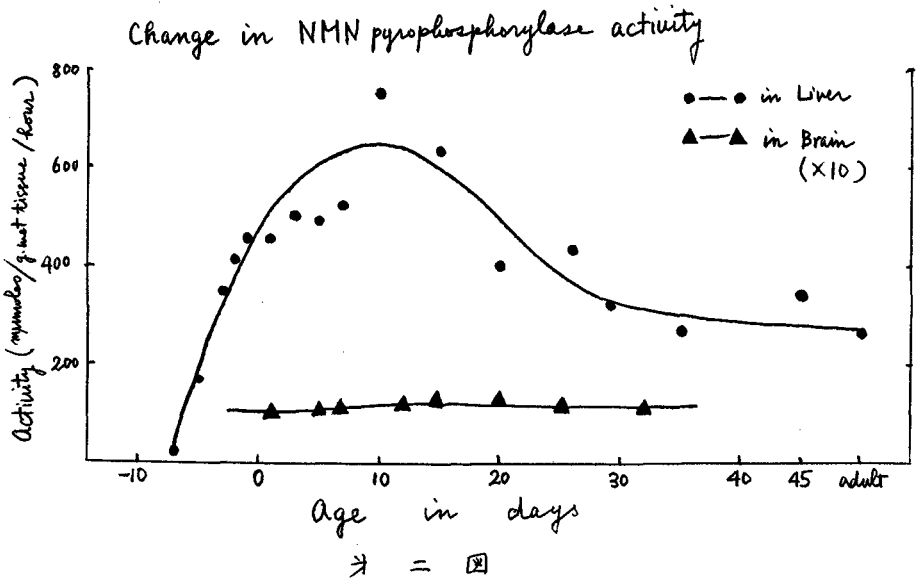
第1図はその結果を示したものであるが、この実験では胎仔から生後15日までの組織標品については同腹の標品をプールしてまとめて測定し、それ以後のものについては5匹から10匹の標品についてそれぞれ別々に測定した。図にはその平均値を示してある。(この事については次項のNMN pyrophosphorylase活性測定の場合も同様である。)図から明らかな様に脳に於ては出生から成熟に至る間にNAD濃度には著しい変化は見られず、ほゞ200~300 mμmoles/g の値を示す。それに対し肝NAD濃度は出生2日前より急激な増加を示し生後15日でadult levelに達する。



第一図

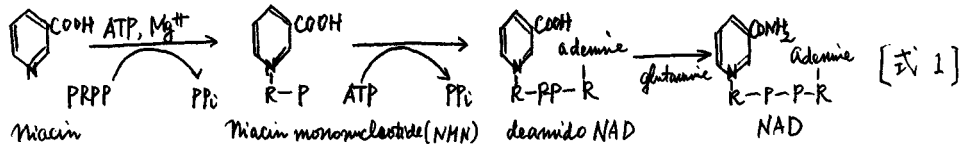
2. ラッテ脳肝に於ける NMN pyrophosphorylase活性の成長に伴う変化

NAD分解系の Nicotinamide Adennie Dinucleotidase の活性がモルモット,ラッテの脳肝脾に於て出生後著増を示す事については Nemeth ら の報告があるが、その事からは前項のNADレベルの変動は説明出来ない。NAD合成系の関与を考えなくてはならない。哺乳類に於てはNADは主として式1の様な経路で合成されると考えられているが、この経路の律速段階である Niacin ⟶ Niacin Mononucleotide の反応を触媒する酵素、NMN pyrophosphorylase の活性変化を追跡して見ると第二図の様になる。図から明らかな如く脳の該酵素活性は極めて低く、肝のそれの1/20~1/30程度である。(adult level との比)この事は脳内NAD濃度が肝の1/3程度であることと一致しない。又これらの事実は脳のNAD代謝が他臓器と本質的に異



第二図

るのか、或は脳内NADの一部が他臓器の合成に貢っている可能性を示している。



[式1]

一方肝の誘酵素活性は出生前から生后10日すぎまで急増を示すが、これはNAD濃度の変化とよく符合する。又15日過ぎより漸減を示す事については、この頃よりトリプトファンからのNAD合成が活発になり始めるという事実によって説明されるがこの問題については別の機会に論ずる。

3. 四塩化炭素による肝障害時のNAD濃度の変化

既にCCl4肝障害時の肝内NAD濃度が減少することは報告されているが(7)、我々は肝と脳との相関という見地からこの実験を施行した。

急性肝障害……20% CCl4オリーブ油溶液を10ml/kgの割で筋注
慢性肝障害……同液を2ml/kg宛1週間に2回の割で37日間筋注を続けたもの

NAD / Time		acute 6h.	12h.	18h.	24h.	chronic
脳	処置	226	235	221	236	206
	対照	216	229	213	229	—
肝	処置	651	666	316	313	529
	対照	727	693	—	702	—

オ一表 (mμmol/g 5例の平均値)
四塩化炭素肝障害時のNAD変化

オ1表に見られる如く、肝内NADの濃度は激減しても脳内NAD濃度には変化ない。

オ2表はマウスに急性肝障害を起させて18時間后にニコチン酸アミドを500mg/kgの割で負荷した際のNAD濃度の変化を示したものである。四塩化炭素処理群の脳では正常対照群に比べて増加量が多く、かつ負荷前値に復するまでの時間が遅延する肝に於ては四塩化炭素処理群でNAD増加量が少く又旧値に復するまでの時間ものびる。

Treatment / Time			0	6h.	12h.	18h.	24h.
四塩化炭素処理群	肝	Nm負荷	169	350	983	520	661
		Saline		—	217	—	210
	脳	Nm負荷	322	434	425	401	382
		Saline		—	314	—	315
正常群	肝	Nm負荷	373	2098	2233	836	386
		Saline		—	473	—	338
	脳	Nm負荷	320	398	320	324	304
		Saline		—	309	—	316

※オ二表 CCl4急性中毒マウスにニコチナミド(Nm)を負荷した場の NAD濃度の変化
(mμmol/g)

4. ニコチン酸アミド負荷量とNAD濃度との関係

オ三表はニコチン酸アミドを指示された量皮腹腔内注射し、8時間后のNAD濃度を示している。脳に於ては僅かづつではあるが投与量の増加に伴いNADも増加するが、肝に於てはすでに250mg/kgで飽和に達している。しかしいづれにしても脳内NADの変化は肝に比べれば極めて少い。

以上すべての実験を通じて云えることは、脳内NAD濃度は様々の條件変化に際して極めて変化し難く、又その点に於て特異的な代謝調節機転の存在が考えられると云う事である。

tissue / injection	saline injected	250mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	1500mg/kg
肝	331	2444	2362	2218	2470
脳	325	351	419	424	483

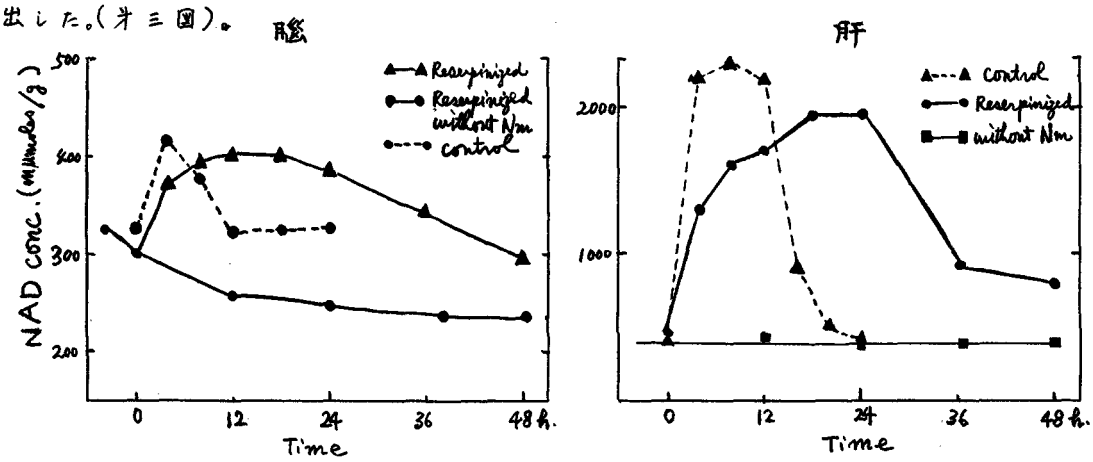
※オ三表 ニコチナミド投与量とNAD濃度(mμmol/g)

5. Psychotropic drugs, Hormonesのの NAD代謝への影響.

すでにKaplan(8)らはレセルピン,クロールプロマジンを注射したマウスにニコチン酸アミドを負荷した場合に、マウス肝で増量したNADが負荷前値まで減少するまでの時間が対照に比べて非常に長くという事実を報告しているが我々もその事実を確認し、同時に脳に於ても同様な現象の見られることを見

※以下マウスを使っての実験はすべて3匹分の組織をまとめて測定したものである。

出した。(第三図)。



第3図　レセルピンのNAD代謝に対する影響

この実験ではレセルピン(10mg/kg)注射后4時間目にニコチナミド(500mg/kg)を注射して、その時を0時とした。これと同様な現象はクロールプロマジンで見られたが、LSD, Psylocibin, Tofanil, Estrogen, Thyroxin等では見られない。又レセルピン注射前或はその后に5HTPを200mg/kgの割合で与えても上記のレセルピン効果は打ち消されない。従ってこの現象はセロトニンの減少によるものではないと考えられる。

更に注意すべきは、レセルピン注射により脳内のendogenous NADが約30%減少することである。

總括及び考察

1)脳内のNAD濃度は諸條件下(成長, 急性慢性肝障害時、ニコチナミド投与時等)に於ても極めて強固に恒常性を維持している。それに対して肝に於ては極めて多彩な変化が見られた。

2)ニコチナミド負荷時、脳内NADは30～40%程度の増加を示すのみであるという事実は一部はNMN pyrophosphorylase活性が低いという事によって説明されるが、膜透過性等の脳に特異的な調節機転の存在を推定せしめる。又脳内NMN pyrophosphorylase活性が低いのに分解系のNADase活性が高いという事実は極めて興味して居り、その解決は今後に残された問題である。

3)レセルピン投与によって脳内endogenous NADは約30%の減少を示す。又その他にも極めて興味あるレセルピン効果(NAD代謝に対する)が見られた。

文　献

1) Kaplan, N.O., Goldin, A., Humphreys, S.R. Ciotti, M.M. Science 120, 437 (1954)
2) Baron, D.N, Dent, C.E., Harris, H., Hunt, E.W., Jepson, T.B. Lancet, 2, 421, (1956)
3) Sternberg, S.S., philips, F.S., Science 127, 644, (1958)
4) Preiss, J., Handler, P., J. Biol. Chem. 233, 493, (1958)
5) Wang, C.H., Jones, D.E., Biochem. and Biophys. Research Communs., 1, 203 (1959)
6) Komberg, A., J. Biol. Chem., 182, 779 (1950)
7) Diangini, M.U., Biochim. Biophys. Acta. 17, 391 (1955)
8) Kaplan, N.O., in "Neurochemistry of Nucleotides and Amino acids" (R.O Brady & DB Tower eds) p.70. (1960)

21 神経系の CO_2 固定機構とその生化学的意義

成瀬　浩（東大・神経）
H. Waelsch（Columbia 大・精神）

脳において酸性アミノ酸への活発な CO_2 固定が Berl・高垣・Waelsch[1] らにより発見されて以来，Waelsch 研究室において神経系 CO_2 固定の問題は系統的に研究されて来たが[2)3)]，脳の場合他組織と異なり，*in vitro* では CO_2 固定を証明しにくいことやその他の方法的制約から，生化学的枠構の解明，解糖呼吸系への影響の研究などは未解決であった。演者は，Waelsch 研究室において，神経系 Citrate（Cit）の代謝を研究中，それらの問題につき興味ある知見を得ることが出来たので，概略を報告する。

実験方法　Cheng らにより[3)]，Lobster の歩行脚の神経を，電気的活性を保つ状態で，適当なリンゲル中に培養すると，活発な CO_2 固定が行はれることが発見されており，本実験においても，生化学的枠構解明のための材料として，Lobster の末梢神経および鬼生骨神経が使用され，脳 *in vivo* の実験のためには，マウス脳が使用された。マウスの場合，腹腔内に $NaHCO_3$-^{14}C を注射し，一定時間毎に，液体窒素固定により脳をとり出した。末梢神経の場合は，特殊な場合以外は action potential を測定し，一定の反応のあるもののみを使用した。それぞれの動物に適当なリンゲル液を選び，$NaHCO_3^{14}C$ を加え，Lobster の場合 15°C 30分，鬼の場合 30°C 2時間培養。リンゲル中の $NaHCO_3$-^{14}C の Specific activity（Sp. Ac.）（cpm/μ moles。本文中全て同じ）は，300,000 ～ 500,000 cpm/μ moles。脳粉末，あるいは末梢神経は，$\frac{M}{4}$ TCA により ホモジネートし，上清を酸溶性部分として使用。各々の組織の 50 mg wet weight あたり 0.3 ml $\frac{M}{4}$ TCA を使用した。

酸溶性部分の分析。Dowex-1-acetate カラム使用。Cheng らにより改良され[3)]，14×0.6 cm サイズで，glutamate（Glu），asparate（Asp），Succinate（Suc），malate（Mal）の分離が可能であったが，更にこれを改良し，Cit，Lactate（Lac），Fumarate（Fum），Oxaloacetate（O.A.A.）の分離を可能にした。1カラムに，$\frac{M}{4}$ TCA 0.3 ml に相当する試料付加。定量方法としては，Glu：Glu 脱水素酵素，Asp：ニンヒドリン呈色反応，Mal：Mal 脱水素酵素[3)]，glutamine（Gl-NH_2）：酸水解後 Glu として定量[2)]。

Cit 微量定量。既存の方法は，約 0.1 μ mole を必要とするので，神経系には応用困難であるので，次の方法による定量を考案した。Aconitase（Aco-ase），Isocitrate 脱水素酵素（I.C.D.H.）により，Cit + TPN ⟶ α-Ketoglutarate（α.K.G.）+ TPNH とし，TPNH を Fluorophotometer により測定。現在の精製法による Aco-ase は他酵素，Cit，その他を含有し，微量定量には不適当なので，Anfinsen 法による Aco-ase を更に，Sephadex B-25，0.6×27 cm カラムにより精製し，かなり純粋な Aco-ase を得，1 mμ moles（反応液 1 cc あたり）の微量定量を可能とした。

Cit，Glu，Asp，の Carboxyl group の ^{14}C 分布測定。Glu，Asp，はそれぞれの脱炭酸酵素を使用し，Glu の C-1，Asp の C-4 の Carboxyl を CO_2 として，Hyamin 液中にとらえ，残りの GABA，あるいは α-Alanin 中の Carboxyl を比較した。

Cit の場合は，上記精製 Aco-ase，I.C.D.H. TPN で Cit ⟶ αKG として，更に Glu 脱水素酵素，DPNH，NH_3 を加えて Glu に転ずる。この際 Cit の C-6 の Carboxyl

一^{14}Cが分離する。かくして得られたGluは上記の方法でC-1の測定が可能。しかし現実的には、CO_2よりの^{14}Cは、Citではc-6及びC-1にのみ在するのであり初めのCitのSp. Ac.と、分解後得られたGluのSp. Ac.の比較は、Citの「C-6 + C-1」とC-1の比となる。この方法により、微量のCitでの^{14}C分布測定が可能となった。(第1図参照)

結果。

兎坐骨神経を材料とした場合のCO_2-^{14}Cの各種有機酸之の分布を第1表に示した。(数字は6回の実験の平均)表中Fr. Iは、Gl-NH_2, GABA, その他中性アミノ酸, ブドー糖, 他のcationを含むが、^{14}Cは主にGl-NH_2とalanineに分布。Fr. XIIIは、α K.G.とpyruvateおよび他のAnionを含む。Citの Sp. Ac.は、溶媒中の$NaHCO_3$-^{14}CのSp. Ac.の1/3に近い。Lobsterの場合は、アミノ酸の濃なが全く異る為、^{14}C分布は全く異るが、Sp. Ac.で見ると、Glu = 165, Asp = 512, Mal = 2950, Cit = 8660 (実験回数12回の平均)。であり、兎の場合と同様の傾向の比を示す。この事実から、Malが主なCO_2固定位置であるという可能性は否定される。これらは、上述の如く、良いaction potentialを示す、所謂intactな神経と考えられる群での結果であるが、兎坐骨神経の場合、適出後に結合組織などをとりさる操作中に、しばしば神経に損傷を与えやすい。全くaction potentialを失ったものでは殆んどCO_2固定がないが、かなり減弱したaction potentialを示すものでは、CO_2固定が行はれる。正常の場合、一定の條件下で、5 volt 刺激で1.0~1.5 m voltの反応を示すが、同一條件下で10~50 voltの刺激で0.1~0.4 m volt程度の反応を示すものを選び損傷群とした。この様な群では、同一條件で培養後、CO_2取り入れは、Total 856 cpm/mg prot (実験回数=5)で正常群の2/3程度であり、主な酸のSp. Ac.は、Glu, Aspは正常と同じ、Mal平均16000で正常に比し、3/4程度に減少しているにすぎないが、Citの場合平均約25000と約1/3以下に減少している。

Table I. Distribution of ^{14}C in Acids(Rabbit).

	cpm/mg Prot. (%)	mμmoles/mg Prot.	Sp.Ac.
Fr.I	71 ± 28 (5.4)		
Glut.	340 ± 94 (25.9)	23.2 ± 4.4	15620
Asp.	229 ± 34 (17.4)	20.3 ± 3.3	11450
Lact.	68 ± 14 (5.2)		
Suc.	13 ± 6 (1.0)		
Mal.	70 ± 17 (5.3)	3.2 ± 0.8	21640
O.A.A.	1 ± 0.8		
Cit.	337 ±109 (25.6)	4.2 ± 0.7	80200
Fum.	8 ± 4.4 (0.6)		
Fr.XIII	15.± 7.5 (1.2)		

次に、CO_2固定部位を知る為、Citのcarboxyl groupの^{14}Cの比を測定した(第2表)。Citのc-6は、α-K.Gのcarboxylation(以下便宜的にTCAサイクルの逆反応と称す)により固定された^{14}Cであり、C-1はO. AAの位置に固定された^{14}Cである(第1図)が、O. AAよりSucにいたるDicarboxylic acid shuttle (D. C. A. S.)により、O. AAのcarboxyl groupの^{14}Cは、他のcarboxyl groupに転位する可能性があるので、D. C. A. S.の活性なを見る

Table II. Degradation of Citric acid.

		Specific Activity Cit.	Glut.	Ratio of Sp. Ac.
Lobster	1)	535	270	1 : 0.5
	2)	2260	1000	1 : 0.45
	3)	800	490	1 : 0.6
Rabbit(Intact)	1)	4000	1360	1 : 0.34
	2)	3800	1333	1 : 0.35
	3)	4400	1400	1 : 0.32
Rabbit(Damaged)	1)	1850	1100	1 : 0.60
	2)	1300	770	1 : 0.59
	3)	950	440	1 : 0.46

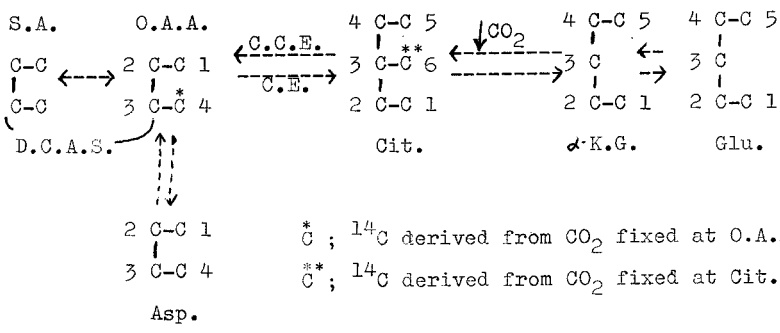
たりに，Asp の両 carboxyl group の ^{14}C を比較した(第3表)。(Asp と O.A.A との関係はごく短時間の間に平衡に達する)。Lobster ではほとんど O.C.A.S. の活性はみられず従って，Cit の C-6 対 C-1 の比は，ほぼ TCA サイクル逆及右による CO_2 固定と，O.A.A. 位置における CO_2 固定の比と考えられ，Lobster の場合この両位置における CO_2 固定程度が同じ程度と推定しうる。

Table III. Degradation of Aspartic acid.

		Radioactivity(c.p.m.) in CO_2	Radioactivity(c.p.m.) in α-alanine
Lobster	1)	340	45
	2)	2200	191
	3)	3000	252
Rabbit(Intact)	1)	380	352
	2)	450	396
	3)	365	370
Rabbit(Damaged)	1)	355	327
	2)	300	277
	3)	345	400

兎の場合は，O.C.A.S. がきわめて活潑であり，dicarboxylic acid の両 carboxyl group はほぼ完全に shuttle されている。従って，C-6 対 C-1 = 2 対 1 という比を，そのまま両位置における CO_2 固定の比と考えることは出来ない。もし Cit を acetyl CO-A と O.A.A. とに分解する Citrate cleavage Enzyme (C.C.E.) が極めて活潑であるとすると，C-6 に入った ^{14}C が，O.A.A. の C-1 に入り，すぐ O.A.A. の C-4 に移転し Condensing Enzyme (C.E.) により Cit の C-1 に入ってくるわけである。従って，極端な仮定としては，O.A.A. 位置の CO_2 固定が非常に少いか，あるいは皆無であるとしても，第II，III表のような結果となりうるのである。逆に反対の極端な場合として，C.C.E. が全く不活性であるとすると，O.A.A. の両 carboxyl group の ^{14}C は，全て O.A.A. 位置固定された CO_2 に由来するものということになり，従って Cit の C-1 及び C-6 の半分は O.A.A 位置での CO_2 固定によるもの，C-6 の半分だけが，TCA サイクル逆及右によるものということになる。つまり TCA サイクル逆及右の CO_2 固定は，O.A.A. 位置のそれの 1/2 あるいはそれ以上ということになる。in situ での，C.C.E., C.E. の活性比等がわからないため，両位置での CO_2 固定率の正確な比較は不可能であるが，現実は，上述の両極端の中間に位するものと思われ，いずれにせよ TCA サイクル逆及右による CO_2 固定率がかなり高いことが予想される。

Fig. I. Carbonskeletons of Cit. and related acids.



所が腹傷辞では，Cit の C-6 対 C-1 も，Asp の C-4 対 C-1 も共に約 1 であり，これと上述の，Cit への ^{14}C の取り入れの著しい低下という結果から，この辞において，TCA サイクル逆及右による CO_2 固定が殆んど欠除してあるものと考えられる。

マウス脳においても活潑な CO_2 固定が見られることは猫脳と同様である。^{14}C-$NaHCO_3$ 腹腔内注射後経時的に動物を固定し，同様の検索を行ったが，Cit が最とも高い Sp. Ac. を示し，Cit と mal の Sp. Ac. 比は約 4:1 であり，Cit. および Asp の ^{14}C 分布は，兎

の正常群と同様であり，TCAサイクル逆反応の存在もかなり活潑である．

尚この実験中，同時に Glu－NH_2，Glu の Sp. Ac. の比較をしたが，安静時において，注射後5分後～20分後の間，Gl－NH_2 対 Glu は略3対1であり，Pentothal 注射により，この比がより一層高まることが明らかとなり，Waelsch の言う Glu の Compartmentation とよばれる現象を再確認し，これが血中の高アンモニア濃度とは無関係であることをたしかめ得た．

討論　CO_2 固定は神経系にも一般的に存在する現象である．これは一方において O. A. A. 生成に関し，他方 Cit 生成に関与している．O. A. A. 及び Cit の濃度は，各種の病的條件においてTCAサイクルの limiting factor となりうるものであり，CO_2 固定が或る場合には，これらの物質の濃度維持においてはTCAサイクル活性の維持に役立つ可能性をおしてあり，Berl ら[1,2]により示された，NH_3 中毒時の CO_2 固定率上昇はこの可能性を支持する一資料である．また CO_2 固定が Cit の生成に関係しているが，Cit は phosphofructokinase の inhibitor であることから[4] 解糖系の Regulator としての役割も考えられる．また α-K-G の Carboxylation は TPNH → TPN の反応を伴う故，この点を介しての，代謝調節の可能性も無視しえない．

CO_2 固定の研究を通じて明らかにされた脳でのTCAサイクル逆反応の存在は，その率が決して低くないことから，この反応が Cit 生成あるいは他代謝におよぼす影響は少くないことを物語っている．このTCAサイクルの逆反応は，最近乳腺組織[5]，肝[6]においても証明されており，脳での存在は他の方法によってもたしかめられている様である．[7]

脳でも C. C. E. が活性であること，脳での Acetyl CO-A の濃度は，Cit の1/10以下であること[4]などから，このTCAサイクルの逆反応が，Acetyl CO-A 生成に重要な役割を果しうる可能性が充分考えられる．この反応の率は，CO_2 濃度 TPNH/TPN 比と共に α-K-G. の濃度により左右されるのである．従って脳内の高濃度に存在する Glu の量がこの反応に，大きな影響を及ぼすことが当然考えられる．D'Adamo は，脳で Glu－5－^{14}C を用いて ^{14}C が Lipid に入ることを証明しており，[7] これは Glu 自身が，この逆反応を介し Acetyl CO-A に変化していることの一つの証明である．

更に上記の一連の事実と江橋らにより示された脳での Acetylcholine (Ach) 生成に対して，Cit が Acetate よりはるかに有効であるという事実，[10] Glu が Ach の生成を促進するという古い報告[11]等を考えあわせると，CO_2 固定反応を介して，Glu が Ach 生成に直接の関係を持つことが想像される．目下 Glu—TCAサイクル逆反応——Ach 生成の関係につき，研究続行中である．

文　献

1) Berl S., Takagaki G., Clarke D.D. and Waelsch H., J. biol. Chem. 237 2570 (1962)
2) Waelsch H., Berl S., Rossi C.A. Clarke D.D. and Puepura D.P., J.Neurochem., 11 714 (1964)
3) Cheng S-C., and Waelsch H., Biochem. Z., 338 643 (1963)
4) Passonneau J.V. and Lowry O.H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 13 372 (1963)
5) Madson J., Abraham S. and Chaikoff I.L., J. biol. Chem., 239 1305 (1964)
6) D'Adamo A.F.Jr. and Haft D.E., J. biol. Chem., 240 613 (1965)
7) D'Adamo A.F.Jr., 私信
8) Srere P.A., Nature, 205 766 (1965)
9) Schuberth J., Sollenberg J., Sundwall A. and Sörbo B., J. Neurochem., 12 451(1965)
10) 江橋，武田，熊谷，生化学 25 443 (1954)
11) Nachmannsohn D., John H. and Waelsch H., J. biol. Chem., 150 485 (1943)

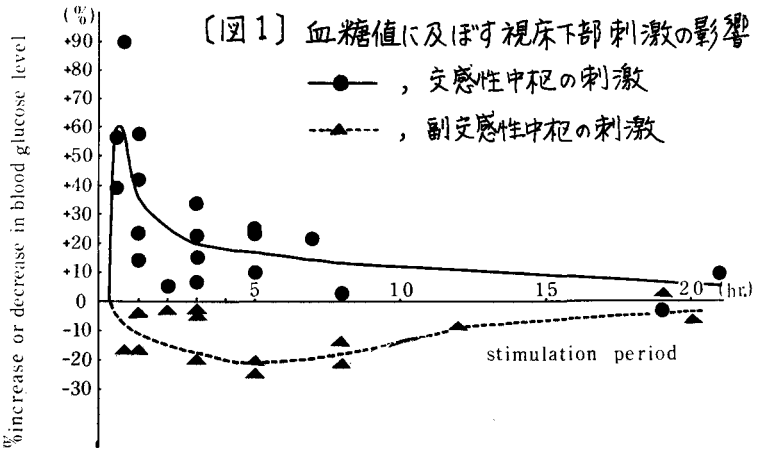
22* 自律神経系と肝の糖質代

嶋津　孝・福田　葵

（阪大・医・三解剖）

Claude Bernard の糖穿刺実験（１）以来、多くの先人によって間脳をはじめとする脳幹の穿刺による過血糖並びに糖尿の発生が追試報告された。清水信夫教授らは間脳の中でも視床下部交感性中枢（b-交感帯）に属する細胞群の穿刺又は電気刺激は血糖上昇を、副交感性中枢（a-及びC-副交感帯）の刺激は血糖下降をもたらすことを明らかにしている（３）。これらの諸研究での血糖上昇は穿刺又は刺激によって、①肝グリコーゲンの分解が促進される結果であるか、②肝臓での糖新生が高進するためであるか、③組織での血糖利用の低下が起ることによるか、のいずれかに起因するものと想像されるが、現在までその詳細な解析はなされていない。私共は自律神経系による代謝調節機構を明らかにしようとする従来の研究方向（２）の一環として、この問題をとりあげ、以下の実験成績を得た。

家兎の視床下部に電極を挿入し、４分間隔で２０秒宛の通電刺激を繰返し行った場合、血糖値の時間的推移を調べると図１のような結果が得られた。交感性中枢の刺激では刺激開始直後に約６０％の血糖上昇が認められ、５時間迄はかなりの高血糖を維持しているが、次第に正常レベルに回復してゆく。これに反し、副交感性中枢の刺激では、約２０％の緩除な血糖下降が起り、長時間に亘る反復刺激では再びえのレベルに復帰する。このような血糖値の変化をもたらす代謝機構を明らかにするために、視床下部刺激後の肝グリコーゲン量を測定してみた。表１に示すように、交感性中枢を１２～２０時間反復刺激した家兎肝のグリコーゲン含量は対照群に比して著しい減少を来している。副交感性中枢の刺激によっては、肝グリコーゲン量に有意な変化は認められなかった。肝グリコーゲンは食餌性並びに季節性にかなりの変動を示すので、この実験に用いた家兎は全て一晝夜絶食させ、且つ、夏、冬の両季節について測定を行った。これらの実験結果から、少くとも交感性中枢刺激による血糖上昇は肝グリコーゲンの分解促進に基くものであることが明らかである。



〔図１〕血糖値に及ぼす視床下部刺激の影響
●―●，交感性中枢の刺激
▲---▲，副交感性中枢の刺激

そこで肝グリコーゲンを分解して血糖にする過程を触媒する酵素系の中で、律速反応と考えられる glycogen phosphorylase 及び glucose-6-phosphatase が交感、副交感両神経系の刺激によって、どのような活性変動を示すかを調べた。この実験では末梢の自律神経系の刺激による影響を観察したが、種々の曲折の後、瞬間的な電気刺激、

周到且つ敏速な低温操作、並びに酵素の抽出に際して適当な溶媒(グリセロール)と阻害剤(NaF, EDTA)を使用することにより、*in situ* の酵素活性を測定することが可能となった。実験は開腹状態の下で行い、通常、刺激直前、刺激開始30秒、1分、5分後に夫々速かに結紮切除し、直ちに液体窒素中で凍結させた肝葉について酵素活性を測定した。動物の個体差による活性変動を除去する目的で、刺激直前の肝葉の比酵素活性値を100とし、刺激中に切除した同一個体の肝葉の比活性値を変化率(%)で以って表した。表2に示すように、内臓神経刺激(横隔膜直下)により、*phosphorylase* 活性は刺激開始30秒後に、既に刺激前活性値の約3倍に上昇し、この上昇値は少くとも5分間の刺激期間中は維持される。この実験で測定したのは *active phosphorylase* のみであるが、このような瞬間的な *phosphorylase* 活性の増加は、恐らく刺激によって既存の *inactive phosphorylase* が *active* 型に *molecular conversion* を起した結果であろうと思われる。*glucose-6-phosphatase* は *phosphorylase* に比して変化率は軽度であるが、内臓神経刺激により急速な活性上昇を起してくる。このことは本酵素にも不活性型の存在、ないしは酵素蛋白の構造変化に基づく活性変化が起りうる可能性を示唆している。いずれにしても、これらの実験結果は交感神経系の刺激によって、極めて短時間内に肝臓での *glycogenolysis* が促進される事をはっきりと示している。

〔表1〕視床下部刺激後の家兎肝グリコーゲン含量 (*mg glycogen/g liver*)

	対照家兎	交感性中枢刺激家兎	副交感性中枢刺激家兎
夏期	24.0 ± 2.9	1.0	20.1
冬期	63.6 ± 8.5	27.6 ± 6.6	62.4 ± 11.0

両酵素の活性は迷走神経刺激(頸部)によって軽度の低下傾向を示すようであるが、あまり大きな影響とはいえない。ところが内臓神経と同時に迷走神経を電気的に刺激すると、両酵素に対する内臓神経刺激の効果はほぼ完全に抑えられる。つまり、これら両酵素の活性調節に関する限り、副交感神経系の果す役割は交感神経系の興奮に基く影響を打ち消すという意味で、交感神経系と拮抗的であると言いうる。

〔表2〕家兎の内臓神経並びに迷走神経刺激後の肝 *glycogen phosphorylase* 及び *glucose-6-phosphatase* 活性の変化(%)

	刺激時間	内臓神経刺激	迷走神経刺激	内臓神経と迷走神経の同時刺激
Phosphorylase 活性	30秒	+225 (3)	−17 (3)	+2 (4)
	1分	+151 (5)	−10 (5)	+10 (4)
	5分	+311 (4)	0 (5)	+29 (4)
Glucose-6-phosphatase 活性	30秒	+37 (3)	−18 (3)	+6 (4)
	1分	+34 (6)	−5 (5)	+19 (4)
	5分	+41 (5)	−2 (5)	−2 (4)
Glycogen含量	5分	−16 (3)		

( ) は例数。

(文献)

1) Bernard, C., Leçons de physiologie expériment. hiver 1854-1855. 2) Shimazu, T. Biochim. Biophys. Acta, 65, 373 (1962).; J. Biochem., 55, 163 (1964); Gann, 56, 143, (1965); 現代の生化学(下) P239 (1965)., 3) 清水信夫、大阪医学会雑誌 40, 1029; 1472 (1941).

23 脳 Polyphosphoinositides への ^{32}P 組入れについて

林　浩平・八木原嘉平
中村　勇・山添三郎
（群大・医・生化）

脳には中性クロロホルム－メタノール（C-M）で抽出される monophosphoinositide（MPI）と，HCl·C-M でだけ抽出され蛋白質と強く結合している diphosphoinositide（DPI）および triphosphoinositide（TPI）の3種類の inositides が存在している。Inositides への ^{32}P の組入れは他のリン脂質よりも遥かに多く，Ballou[1]らはとくに polyphosphoinositides に多いことを報告している。我々は昨年度の総会で，Ballou らの方法とは異る Dawson の抽出法(2)によって実験を行った結果 TPI への ^{32}P 組入れは MPI にくらべて多くないことを報告した。しかしその後 polyphosphoinositides の死後分解は非常に早いことがわかったので，生体を液体酸素で凍結後抽出した場合と，氷冷下の操作で抽出した場合とを比較検討して，死後の分解を防げば TPI の ^{32}P 活性が最も強いことを確認した。また我々(4)はすでに脳切片で Na^+ 添加による MPI への ^{32}P 組入れの増加は phosphatidic acid（PA）のそれよりもはるかに大きくかつ ouabain によって抑制されることを報告したが，今回は脳切片 polyphosphoinositides への ^{32}P 組入れにおよぼす Na^+ 添加および ouabain の影響についても報告する。

実験方法

抽出および分画；モルモットを液体酸素で凍結させた場合は凍結した脳を粉末にした後，また凍結させない場合は大脳を氷冷した Ringer 液で附着した血液を除き沪紙で水分を除いた後，直ちに氷冷した10% TCA でホモジエナイズして遠心させ，もう一度5% TCA で洗ってから沈渣を Hokin らの方法(7)に従って HCl·C-M で抽出し水洗，乾燥後 Hawthorne の方法(3)によってアルカリ水解を行い，脱アシル産物を Dowex-1 formate 形カラムで分画した。脂質をそのまゝ分画する場合は従来の方法に従って珪酸カラムクロマトグラフィーを行った。切片の場合は孵置後氷冷した10% TCA を加えてよく反応をとめ氷冷させてから，粗い沪紙で沪過して切片だけを集めてから TCA 処理および HCl·C-M 抽出を行った。カラムクロマトグラフィーによって得られた各分画の同定は従来のれく各種ペーパークロマトグラフィーを用いた。

リン酸は過塩素酸水解後 Horecker 法によって，イノシトールは Shizosaccharomyces pombe によって定量した。

実験結果

Polyphosphoinositides の抽出条件とカラムによる分画

モルモット硬膜下に ^{32}P を注射し，40分後脳を取り出し大脳を TCA で処理後 HCl·C-M で抽出した脂質（図1），および大脳を直接 C-M で抽出した脂質（図2）をそれぞれアルカリ水解後脱アシル産物に Folch の DPI（MPI, DPI および TPI を含む）の脱アシル産物を Carrier として加えて Dowex-1 レジンカラムで分画した結果は図1および2に示されている。直接 C-M 抽出した脂質では DPI および TPI の ^{32}P 活性が非常に少ないが，確かに存在している。恐らく DPI, TPI の一部が C-M だけによっても蛋白と結合したまゝ抽出されるためと考えられる。TCA 処理後 HCl·C-M 抽出によって得られた脂質中（図1）の DPI, TPI の ^{32}P 活性は相当にみられるが，MPI の ^{32}P 活性が最も高い。また TCA

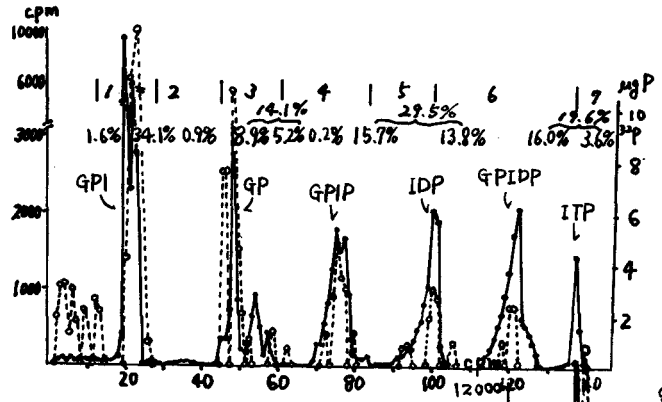


図 1　生体内で^{32}Pをラベルさせたモルモット大脳の inositides (TCA処理後, HCl-C-Mで抽出)

GP, glycerophosphate; GPI, glycerylphosphorylinositol; GPIP, glycerylphosphorylinositolphosphate; IDP, inositol-diphosphate; GPIDP, glycerylphosphorylinositol-diphosphate; ITP, inositoltriphosphate
実線は^{32}P活性, 点線は Lipid-P

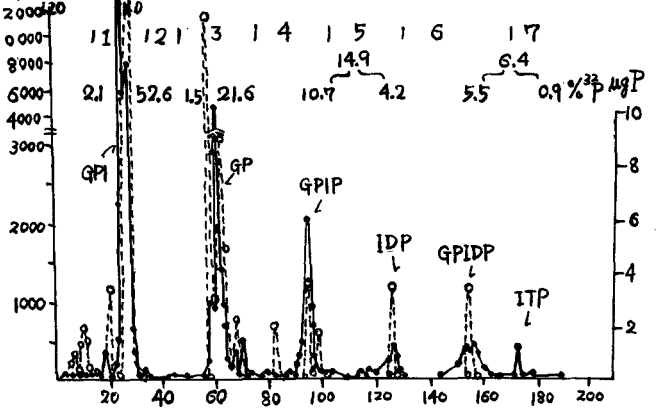


図 2　生体内で^{32}Pをラベルさせたモルモット大脳の inositides (直接 C-M で抽出)

図 1, 2 に使用した脱アシル産物には carrier として Folch の DPI の脱アシル産物を加えてある.

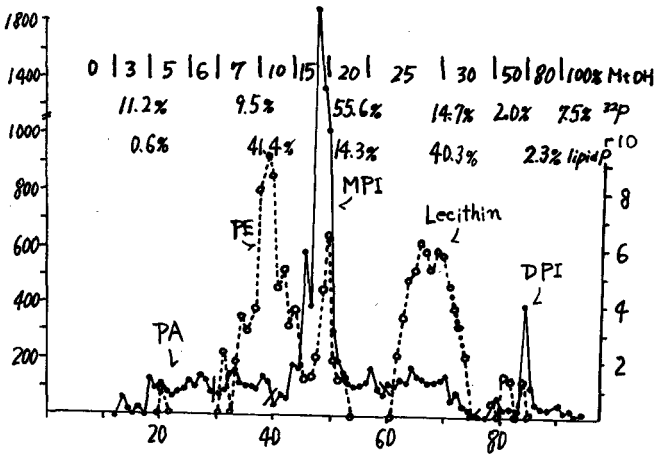


図 3
クロロホルム-メタノールで抽出された^{32}P標識大脳リン脂質の珪酸カラムクロマトグラフィー
使用した脂質は図2に用いたものと同じである.

処理後 HCl-C-M 2回抽出の残渣からは DPI, TPI が全く抽出されないので, この抽出法で DPI, TPI はすべて抽出されるものと考えられる。

図3は図2に使用したのと同じ脂質をそのまゝ（脱アシルを行わずに）珪酸カラムで分画したもので, すでに報告したようにレシチンの前に MPI, レシチンの後に DPI が溶出されている. 各分画のペーパークロマトから得られた autoradiogram の結果は lecithin, phosphatidyl ethanolamine (PE) の^{32}P活性は注射後40分という条件では非常に低いことを示した。したがって, 図1, 2のカラムでは MPI と GPC および GPE が同じ場所に溶出されるが, この^{32}P活性は殆んどすべて MPI に由来するものと考えてよい。

液体酸素で固定したモルモット脳から抽出した polyphosphoinositides の^{32}P活性

硬膜下に^{32}Pを注射して20分後モルモットを液体酸素中に落し凍結状態で脳を粉末と

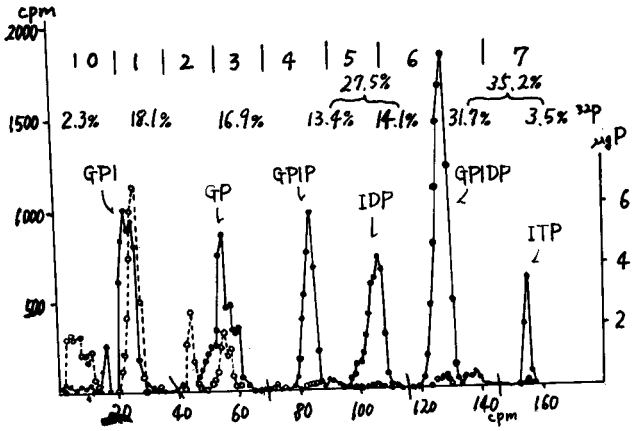
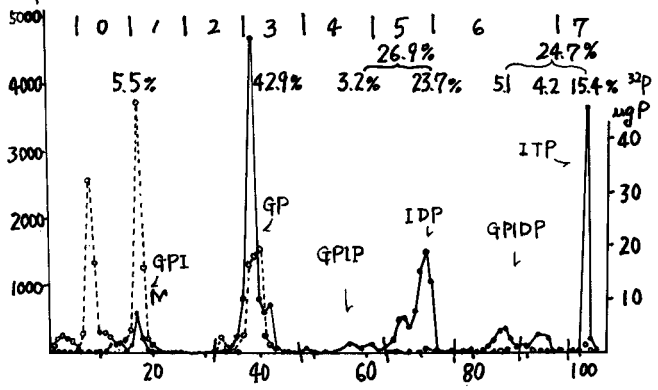


図 4
液体酸素固定をしたモルモット
大脳の ^{32}P-labeled inositides

図 5
モルモット脳切片の inositides
(A) 無Na溶液でincubateした場合



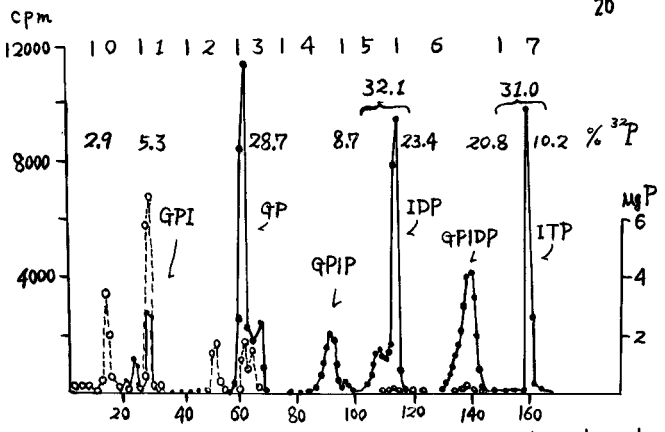
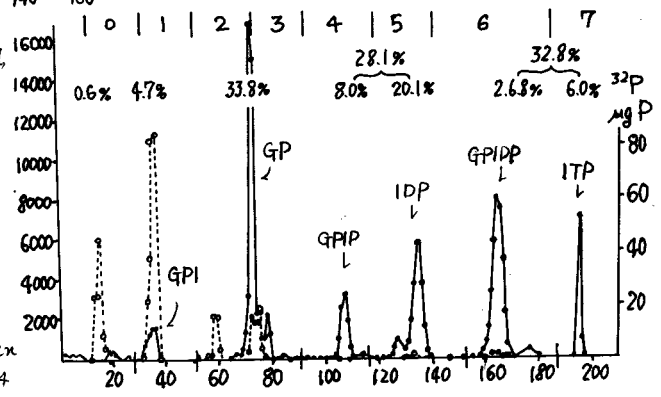


図 5
(B) 無Na溶液でincubateした後,
Naイオンを添加した場合

図 5
(C) 無Na溶液でincubateした後,
Naイオン及びOuabainを添加した場合



文献
1) Brockerhoff, H. and C.E. Ballou, J. Biol. Chem. 237, 1764, 1962.
2) Dittmer, J.C. and R.M.C. Dawson, Biochem. J. 56, 381, 1964.
3) Hawthorne, J.N. and G. Hübscher, Biochem. J. 71, 195, 1959.
4) Hayashi, K., I. Nakamura and S. Yamazoe, J. Biochem. 56, 381, 1964.
5) Hokin, M.R. and L.E. Hokin, Metabolism and physicological Significance Lipids, John wiley & Sons LTD. 423, 1964.
6) Larrabee, M.G., J.D. Klingman and W.S. Leicht, J. Neurochem., 10, 549, 1963.
7) E. Santiago-Calvo, S. mule, C.M. Redman, M.R. Hokin and L.E. Hokin, Biochim. Biophys. Acta 84, 550, 1964

して直ちに氷冷したTCAで処理後抽出した脂質の脱アシル産物をDowex-1レジンカラムで分画した結果は図4に示されている。図の上部にリン脂質に組入れられた^{32}P活性%分布が示されているが，TPIの^{32}P活性が最も高く，DPI, MPIの順に低くなっている。液体酸素による固定の条件が一定にならないためか，%分布の数値は各例ごとに動揺するが，常にTPI＞DPI＞MPIの順に^{32}P活性がみられる。図4の実験は氷冷下で速かに行ったものであるが，液体酸素固定の場合との比較から，polyphosphoinositidesの死後分解は非常に早いものと考えられる。Inositides以外のリン脂質は死後の分解が短時間内では無視し得るほど少ないのにくらべて極めて特徴的である。

脳切片のpolyphosphoinositidesへの^{32}P組入れに及ぼすNaイオンの影響

さきにC-M抽出脂質（polyphosphoinositidesは含まれていない）について行った実験と同じ条件でNaイオン添加の影響を観察した。すなわちNaClおよびリン酸緩衝液をそれぞれ等張塩化コリンおよびTris.におきかえ，かつブドー糖を含んだKrebs-Ringer 5 mlで脳切片を37°, 15分解置後，(A)そのまゝ水0.05 mlを加え；(B) medium 2 mlをNaClを含む通常のKrebs-Ringer（ブドー糖も含む）でおきかえ，かつ水0.05 mlを加え；(C) (B)と同じくmedium 2 mlをおきかえた上でOuabain ($5\times10^{-3}M$) 0.05 mlを加え，さらに(A)(B)(C)に^{32}Pを加えて37°C 30分解置後，氷冷した10% TCAを加えて反応をとめ，脂質を抽出した。それぞれの脱アシル産物のカラムの結果は図5 A, B, C, に示されている。全リン脂質のspecific radioactivityは(A) 928.8, (B) 2,739.8, (C) 2,344.1で，Naイオン添加による増加は著しいが，Ouabain共存による阻害は約15%で著明ではない。図5の結果からNaイオン添加による^{32}P活性の増加はPAよりもinositidesに著しいことがわかる。すでに報告した結果ではOuabainによってNaイオン添加によるMPIの^{32}P活性増加が著明に抑制されたが，図5の結果はpolyphosphoinositidesのNaイオン添加による^{32}P活性の増加はouabainによってあまり影響されないことを示している。

考察及び結論

生体で^{32}Pをラベルさせた場合polyphosphoinositidesとくにTPIの高い^{32}P活性は液体酸素固定の場合に観察され，通常の氷冷操作では観察されない。このことは脳のTPIは，死後筋のATPが急速に分解するのにくらべられる程速かに分解されることを示している。当然脳内恐らくは興奮性膜においてDPI⇌TPIの回転が非常に高いことが考えられる。polyphosphoinositidesは2価カチオン（Ca^{++}, Mg^{++}）と結合することからこの回転は2価カチオンの調節因子として働いていることが想像される。一方すでに我々が報告したC-M抽出脂質についての実験(4)，Hokinの塩腺(5)，Larrabee (6)のganglion cellの実験はMPIのリン酸部分の回転も高くかつその^{32}P活性が高まるようなある条件ではPAの^{32}P活性が低くなることを示しており，PA⇄DG⇄MPIの回路の回転も脳，塩腺等の機能と密接な関係をもつことが考えられている（Hokin (5)）。Inositidesおよび PAが関係したこれらの回路がいかなる機序で興奮性膜の機能に関与するかは興味ある問題となっている。

(1)生体内で^{32}Pをラベルした場合脳のTPIの非常に高い^{32}P活性は液体酸素固定の場合にだけ観察され，氷冷処理では観察されない。(2)脳切片でのpolyphosphoinositidesへの^{32}P組入れはNa^{+}によって高まるが，この増加はOuabainによって著明な抑制を受けずMPIの場合とは異っていた。

24 脳脂質に関する研究

—— 第一報：ニワトリの脳の成熟過程における脂質および脂酸の推移 ——

相沢　豊・長谷川恒雄・加藤正弘
立沢　寧　（慶大・相沢内科）

O'Brien[4]はMetachromatic Leucodystrophyの患者の脳のSphingomyelin, Cerebroside および Cerebroside sulfate の各脂質の脂酸構成を検索し、この疾患において各脂質ごとに前二者の長鎖脂酸（C21-26）の著明な減少を指摘し、しかも炭素数の長いものほど減少が著明なことより、この疾患においてはFulco[3]らのいうchain elongation systemに障害があるのではないかと考えた。したがって脳に存在する脂質およびその脂酸構成が脳の成長する過程においてどのように変化していくかということは興味がある。

一方我々は第6回日本神経学会総会において多発性硬化症脳軟化症の各病巣部および脳性小児麻痺患者の脳白質に病的に出現したCholesterol esterの脂酸構成がいずれの疾患においても略々同じである事を報告した。Cholesterol esterは正常の成熟脳には存在しないが胎児脳には存在するとされ、脳が成熟するにしたがって消失する。このCholesterol esterの脂酸構成を他の各脂質の脂酸構成と同時に観察することは、脂質代謝の一面を知るための何等かの手掛りを得るかもしれない。

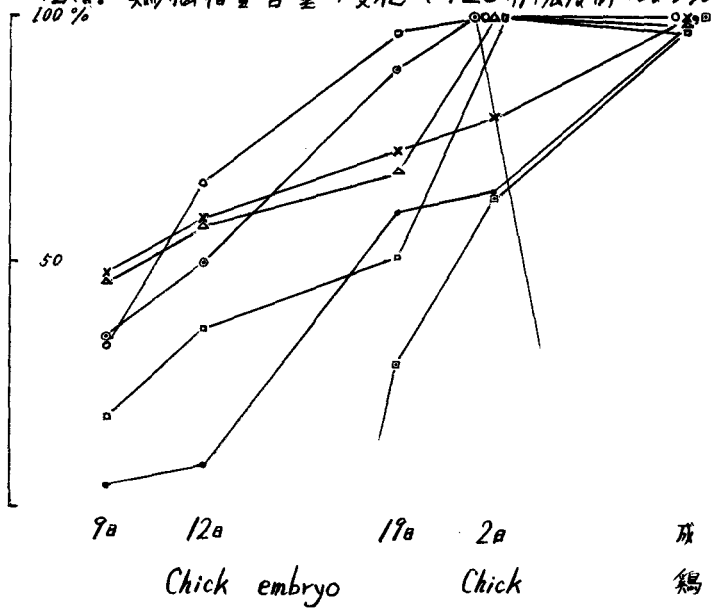
我々はChick embryoおよびChickの脳に含まれる脂質のうち、総燐脂質、Phosphatidyl serine、Phosphatidyl choline、Phosphatidyl ethanolamine、Sphingomyelin、Cerebroside、Cholesterol およびCholesterol esterの各脂質構成の成熟に際してその変化を薄層クロマトグラムを用いて調べ、更にガス・クロマトグラムにより各脂質の脂酸構成の推移を調べた。

実験材料　9日、12日、19日のChick embryo、2日ヒナおよび成鶏の全脳を使用した。

実験方法　1. 脂質の抽出　生まれ落るChick embryoおよびChickを断頭し全脳をとり出し、Folchの Wherrett ら[5]の変法により、新鮮脳の湿重量の19倍容のChloroform-Methanol 2:1(V/V)にてglass-homogenizerを用いhomogenizeしsintered glass filterにて炉過した後脳の湿重量の20/19容を補正した。

2. 薄層クロマトグラフィー.　Silica gel G (Merck)を矢澤科学のApplicatorを用い、200×200mm

図1. 鶏脳脂質含量の変化（TLC用濃度計による%）



のガラス板上に0.5mmの厚さに塗布して使用した。

Solvent systemは各脂質の分離にはChloroform-Methanol-水, 14:6:1 (v/v/v). また燐脂質の総脂酸構成を調べる為にはHexane-Ethyl ether-氷醋酸, 39:10:1を使用した。

各脂質の発色は50%硫酸を噴霧後120°C 15分間加熱した。またガスクロマトグラフィーにて各脂質の脂酸を分析するためにはSilica gel Gに2',7'-Dichlorofluorescein Sodium Saltの0.02%水溶液にて薄層を作り、展開後UV-lightにて各脂質分画をdetectした。

表1 鶏脳の燐脂質・総コレステロール含量

		9日 Chick embryo	12日 embryo	19日	2日 Chick	成鶏
total phospholipids	(mg/g wet wt. br.)	14.4	21.2	31.0	44.0	43.8
total cholesterol	(mg/g wet wt. br.)	2.0	4.4	8.2	14.6	14.6

表2. 鶏脳脂質構成 (TLC用濃度計による %)

	9日 Chick embryo	12日	19日	2日 Chick	成鶏
Phosphatidyl serine	20.2	16.0	12.8	10.4	12.5
Sphingomyelin	1.9	2.5	11.6	9.1	13.7
Phosphatidyl choline	31.7	25.9	19.6	21.3	20.2
Phosphatidyl ethanolamine	16.3	21.0	19.2	29.8	25.9
Cerebroside			3.2	5.0	7.7
Cholesterol	22.1	29.0	29.2	21.0	20.2
Cholesterol ester	7.7	5.6	6.4	5.3	

薄層クロマト板上Cerebrosideは東大野島教授より頂いた純品のRf値より、またCholesterol esterは純品のCholesterol palmitate (Applied Science Lab. Inc.) より、Free Cholesterolは東京化成のものを使用しRf値より同定し、燐脂質の各分画はDittmer & Lester[1]のspecific spot testにより同定した。

薄層板上の各spotは薄層クロマト用濃度計(Ozumor-6, 7タコ光学)により測定し、各分画は重量比のヒストグラムを算出した。

3. 脂酸のメチルエステル 薄層板より各脂質分画をかき採とし、5 ml, Methanolにて抽出し、これに0.2 mlの2,2'-Dimethoxypropane, 0.25 ml conc H_2SO_4を加え40°Cにて一晩incubateしメチル化した。このMethanol溶液より脂酸のメチルエステルをHexaneを用いて、水洗しながら再抽出し、無水硫酸ナトリウムにて脱水した後、60°Cの湯浴中にてH_2 gasをふきつけながら濃縮し、ガスクロマトグラムにて分析した。

4. ガスクロマトグラフィー 島津Gas chromatograph GC-1C, ionization detectorを装備したものを使用した。Columnは3×2750 mmでsuccinate polyester (島津) 5% Diabasa 100-120 mesh. Carrier Gasとして Argon (60 ml/min), Column温度190°Cにて分析した。

各脂酸はAuthentic sample (Applied Science Lab. Inc.) のRetention timeより同定したが、$C_{24:2}$以上の長いRetention Timeを持つものは未同定で一括した。

各脂酸の百分率はTrianglationにより算出した面積比によった。

5. 総燐脂質総コレステロール 総燐脂質はFiske-Subbarow法[2]、総コレステロールはZak-Henley法[3]を用いて測定した。

結果.

鶏の脳の燐脂質.総コレステロールの含量の成熟の過程に於ける変化を表1に示した。9日Chicke embry脳は成鶏の約30%の燐脂質.約10%のCholesterolを有する。表2は.各時期の脂質構成を薄層クロマト用濃度計を用い百分比を調べた。各脂質の最も高い濃度を示したSpotを100としその脂質の成熟の過程に於ける変化を図示したのが図1である。

図1.表2より比較的早い時期に成熟脳の含量に近づく脂質と、Chick embryoの若い時期には存在しないが非常に僅かずつ増加し、ふ化後も成熟脳よりはるかに含量が少ない脂質の二つに分けられる。後者は髄鞘に主に含まれるCerebroside. Sphingomyelinであり. Phosphatidyl serineは両者の中間の性質を有するようである。

各脂質の脂酸構成及び成熟に伴う変化を表3-9に示した。

燐脂質の総脂酸構成(表3)ではステアリン酸(18:0)の成熟につれての増加傾向が認められよ。不飽和脂酸は成熟するにつれて減少するようである。9日のChick embryoに於いてC24以上の長鎖脂酸を認めた。

Phosphatidyl serine(表4)では成熟するに従いステアリン酸(18:0).オレイン酸(18:1)の増加が他の脂質に比べ最も著明である。Lecithin(表5)ではパルミチン酸(16:0)が多く増加する傾向を示した。この脂質は.他の燐脂質と異なりオレイン酸(18:1)を比較的

表3. 燐脂質の総脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦	6.0	4.6	4.5	4.0	3.6
16:0	26.3	35.2	36.0	31.4	24.9
1	4.3	4.2	2.6	1.6	1.6
2	2.2	1.8	2.0	2.5	3.6
18:0	15.3	13.7	19.2	18.4	24.9
1	17.6	19.4	17.2	19.3	19.2
2	2.5	1.6	1.1	1.8	tr.
3	tr.	0.7			
20:0-3	2.4		1.1	2.8	tr.
4	1.3	1.3	tr.	0.8	0.8
22:0-1	8.5	6.2	4.5	6.7	8.2
24:0					2.6
1	2.0		tr.	2.2	3.3
25:≦	11.5	13.2	11.8	10.6	9.3

表4. Phosph. serineの脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦	10.1	10.8	9.9	9.9	9.3
16:0	11.4	10.1	7.5	8.0	8.7
1	0.9	0.6	0.8	0.9	tr.
2	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
18:0	22.7	27.6	32.0	49.4	50.6
1	5.2	7.2	8.9	10.4	12.7
2	tr.	2.5			
3					
20:0-3	3.3	3.1			
4	6.2	6.1	10.0	10.1	tr.
22:0-1					
24:0					
1	21.6	15.6	12.9	13.3	tr.
25:≦	18.5	16.4	17.9	tr.	20.4

表5. Lecithinの脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦	4.1	3.2	2.5	1.9	1.9
16:0	46.0	52.1	50.5	55.2	53.2
1	7.9	6.8	5.0	3.0	2.6
2	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
18:0	4.8	4.7	5.7	6.4	9.3
1	24.3	24.9	28.7	25.5	23.8
2	3.7	2.7	1.8	2.6	1.1
3					
20:0-3	0.9	tr.	2.5	2.4	1.1
4	4.6	3.4	1.0	2.9	4.5
22:0-1					
24:0					
1					
25:≦	3.6	2.2	2.3	tr.	5.6

表6. Phosph. ethanolamineの脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦	14.7	15.8	14.2	11.0	9.0
16:0	12.0	10.3	9.4	6.5	5.4
1	0.7	0.8	0.6	0.4	0.3
2	5.6	5.8	8.1	10.6	12.1
18:0	12.2	13.7	19.5	19.8	20.6
1	7.7	8.1	7.5	8.9	6.9
2	1.4	1.4	1.0	2.2	tr.
3					
20:0-3	2.0	1.9	1.6	3.2	2.0
4	2.1	2.1	1.3	0.9	1.1
22:0-1	9.5	8.8	7.5	10.8	12.8
24:0					
1	11.8	11.6	8.8	9.0	9.8
25:≦	20.2	19.4	22.7	18.4	20.1

表7. Sphingomyelinの脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦	13.7	15.7	23.2	8.5	5.8
16:0	12.7	8.8	14.8	7.9	5.2
1	tr.	tr.			tr.
2	0.8	tr.	tr.	tr.	tr.
18:0	33.0	36.5	45.7	48.4	59.0
1	8.3	9.5	8.1	9.5	8.0
2	1.7	tr.			
3					
20:0-3	2.4				
4	tr.	tr.	8.2		
22:0-2	29.3	29.4		25.6	22.0
24:0					
1					
25:≦					tr.

表8. Cholesterol esterの脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦	10.3	11.8	12.5	6.8	
16:0	29.1	25.6	16.6	19.9	
1	3.4	3.1	2.0	8.4	
2	tr.	tr.	tr.	tr.	
18:0	7.6	8.0	8.2	6.9	
1	29.1	25.5	21.3	31.9	
2	9.1	8.8	5.3	5.7	
3				tr.	
20:0-3	tr.	2.4	6.1	4.0	
4	5.2	4.4	7.3	6.0	
22:0-2	6.4	10.4	6.6		
24:0				7.3	
1					
25:≦	7.0		14.2		

表9. Cerebrosideの脂酸構成

	9日 Chick embryo	12日 Chick embryo	19日 Chick embryo	2日 Chick	成鶏
14:≦			26.3	11.4	11.3
16:0			4.3	8.9	6.5
1			2.5	1.7	1.9
2			tr.	tr.	tr.
18:0			8.0	19.3	18.5
1			13.4	15.5	21.3
2			7.6	8.4	2.2
3					
20:0-3			3.4	1.1	1.8
4			8.5	tr.	4.1
22:0-2			8.9	13.3	13.4
24:0			9.3	9.2	4.0
1			tr.	11.2	11.6
25:≦			7.7	tr.	3.5

多量に含み、この表では、Cholesterol ester, Cerebroside は近い。Phosphatidyl ethanolamine は複雑な脂酸構成をおし、パルミチン酸(16:0)の減少、ステアリン酸の増加を認めた。Sphingomyelin(表7)は Phosphatidyl ethanolamine に類似した傾向を示した。Cholesterol ester(表8) Cerebroside(表9)は一定の傾向を認め難いがこの両者は脳に於ける含有量が少なく結果は更に検討すべきである。

考按

髄鞘形成の時期に Cerebroside が出現し Sphingomyelin が増加し、Cholesterol ester が減少する事よりこれ等の関係及び他の脂質との関連をも脂酸構成の表より追求したが、相互の関係は見出せなかった。

各脂質の脂酸構成は成熟の過程に於て様々な変化を示し、その中ではステアリン酸の増加傾向は一般的であった。他の脂酸は脂質により まちまちであった。

結語

9日の Chick embryo より成鶏にまで成熟の過程を脳脂質構成及び各脂質の脂酸構成にわけて検索し、その変化が非常に多様であるがステアリン酸は燐脂質では増加する傾向を認めた。

終りにのぞみ貴重な資料を頂いた東京大学野島教授に感謝の意を表します。

文献

(1) Dittmer, J.C., AND Lester, R.L., J. Lipid Res., 5, 126 (1964). (2) Fiske, C.H. AND Subbarow, Y., J. Biol. Chem., LXVI, 375 (1925). (3) Fulco, A.J. AND Mead, J.F., J. Biol. Chem., 236, 2416 (1961). (4) O'Brien, J.S., Biochem. Biophys. Research Communs., 15, 484 (1964). (5) Wherrett, J.R., AND Cumings, J.N., Biochem. J. 86, 378 (1963). (6) 栄田・北村・臨床生化学定量法 p 137 (1963).

25 中枢神経組織内のブローム化合物

柳沢　勇（東邦大・医・生化学）
吉川春寿（東大・医・栄養学）

我々は先に神経化学懇話会において（1）髄液中に血中よりもはるかに大量のBrが含有されること，これが痙れんによって著明な減少を来すことを報告した。

このBrは表1の如く大部分が有機Brとして存在することを知り，この物質の分離同定を試みて或程度の成果を得た。

（表1）

性	年令	無機Br	全Br
♀	33才	0.7 mg/dl	7.4 mg/dl
♂	50 〃	0.3 〃	6.0 〃
♀	48 〃	0.3 〃	3.6 〃
♂	15 〃	0.3 以下	9.8 〃

また人間の脳下体のBr含有量は髄液中のBr含有量と略々匹敵する高値を示す理由から出発して，牛の下垂体を材料として人の髄液中のBr化合物と極めてよく似た物質を得た。さらに牛の大脳中からも類似のBr化合物の存在が証明された。

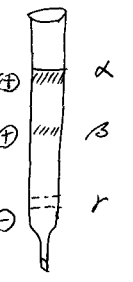
〔A〕人髄液からの抽出

人の髄液はあらかじめエチルアルコールを容器の半ばまで満たした中に外科手術室等にて各種の手術および検査等の場合に採取したものを集積してもらった。東邦大学中央検査室，同神経科，東京医大外科，東大中検，虎の門病院神経外科等の協力を得た。

（表2）

髄液 23リットル ＋ エタノール 23リットル
↓
不溶性蛋白 ← 沪液
↓ 20℃で減圧濃縮
0.5リットル
＋
1.0リットルのエタノール
↓
不溶物 ← 沪液
↓
濃縮 20℃減圧
↓
凍結乾
↓
不溶物 ← クロロホルム抽出液 Br(+)
↓
濃縮
↓
カラムクロマトⅠ
↓
カラムクロマトⅡ

カラムⅡ



抽出操作の概略は表2の如くである。髄液中のBr化合物はエタノール不溶の蛋白部分にはなく，すべてエタノール部分に入る。

カラムⅠはSilicic Acid 20×200mmで，メタノール－アセトン－エチルアセテート－クロロホルムの混合溶媒で展開し，最初に動く微黄色の部分をとり，これを濃縮してカラムⅡ silicic Acid 7×80mmにかけて四塩化炭素で展開すると左図の如く三部に分離する。γにはBrはなく無色，βは黄赤色，αは黄色でともにBrを含んでいるので，チューブを割って各々エーテルまたはメタノールで溶出させてαは47.5mg（溶媒除去後），βは9.8mgを得た。Brから計算して収量は数%であるが，各分画中から検出されるBr化合物は何れもα，βの分解物とみら

れるものだけであつた。

[B] 牛下垂体からの抽出

下垂体材料として N.B.C. の乾そう粉末を用いた。

(表3)

下垂体粉末 70g に水 200ml を加えて撹拌
エタノール 600ml 加

↓

沪液

↓

減圧濃縮

↓

凍結乾

↓

クロロホルム抽出液

↓

カラム クロマト
(Silicic Acid)

カラムはメタノール・アセトン・エチルアセテート・クロロホルムの混合溶媒で流出させ、最も早く流出する微黄色部分をとり、これを Silicic Acid の薄層クロマトにかけメタノール、アセトン、エチルアセテート、クロロホルムの 5:5:10:95 で展開して有機物および Br のスポットを検出し両者が Rf 0.9 のところで完全に一致することを確かめた。Br の含む分画は他にもあり薄層クロマトの Rf 0.7 と 0.3 のものがあるがしかしこれらは 0.9 Rf のものよりはるかに少く、また他の有機物の混入がひどいので 0.9 物質について実験を行った。

[C] 牛脳からの抽出

下垂体を除去した新鮮な牛大脳を使用した。
肉ひきで砕いた牛の大脳 1620g
同量の水を加える。Waring Blender 撹拌
エタノール 6400ml 加

(表4)

沪液

↓

減圧濃縮

↓

メタノール抽出液

↓

濃縮 2ml

↓

メタノール抽出

↓

濃縮 0.2ml

↓

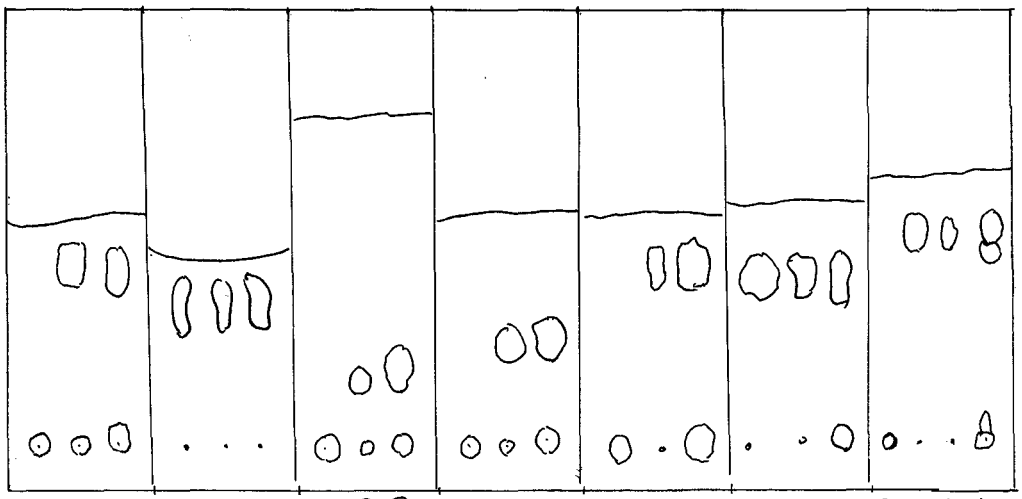
薄層クロマト

減圧濃縮はすべて 20℃ で施行した。薄層クロマトは下垂体の場合と同じものおよび後述の各種溶媒を使用した。大脳からの場合は含量が少いために、カラムクロマトは行なわず、薄層クロマトによる物質の検出だけに止めた。

図1は髄液、牛下垂体、牛大脳よりの Br 化合物を各種溶媒を用いて硅酸の薄層クロマトがラフである。これから判る如く各々異る材料から得た Br 化合物がお互に極めて類似した物質であることが推定される。

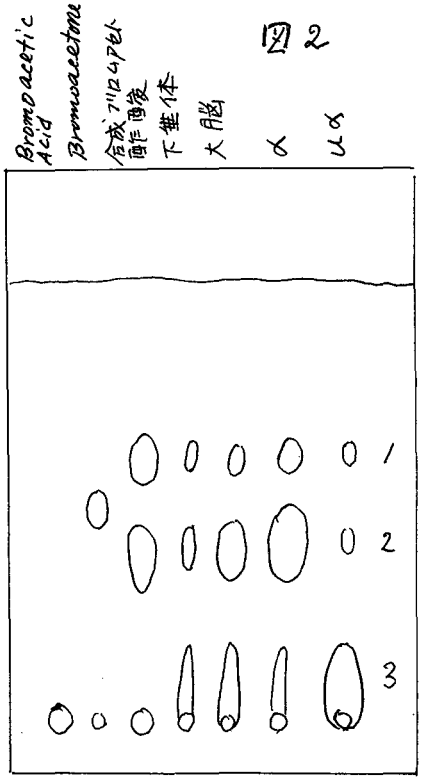
図2はこれらの物質を硅酸の薄層クロマトを四塩化炭素で展開してやると更に各々3つのスポットに分離する。これを上から No.1 No.2 No.3 と番号をつける。α と αα は髄液よりのもの

図	ベンゼン 2	イソプロパノール 10			アセトン 5	メタノール 5	アセトン 5
I	トルオール 1	ピリジン 5	CS_2	$CHCl_3$	メタノール 5	酢エチ 5	メタノール 5
	ジオキサン 1	ベンゼン 5			酢エチ 10		酢エチ 10
					$CHCl_3$ 95		$CHCl_3$ 95



I — 無機Br　P — 下垂体抽出物　C — 髄液抽出物　B — 大脳抽出物

図 2



であつて，他の実験から推定して髄液サンプルのNo.1はβ，No.2はαである。Uαは抽出法が異るときのサンプルでスポットNo.3がそれである。

各サンプルのNo.1，No.2，No.3とも塩化鉄，ニトロプルシドソーダの試薬に陽性であり，TTC試薬に還元性をもち，2,4ジニトロフェニールヒドラジンに反応するがミロンの試薬に対する反応は陰性であり，またこの物は紫外部吸収を示し，紫色がかった蛍光をもっている。これはアセト酢酸の性質と極めて類似しているので，Ethyl-α-bromoacetoacetateを合成して比べてみたところ薄層クロマトにおけるRfの位置，呈色反応等は何れもよく一致した。次に髄液サンプルおよび合成のα-bromoacetoacetateを各々封管中で5NのNaOHで水解し，分解物をペーパークロマトグラフィで検したところ，何れも酢酸，グリコール酸，蟻酸，無機Brの存在が認められたことから恐らく両者は同一構造部分をもつものと

思われる。

しかし牛分合成 Ethyl-α-bromoacetoacetate と髄液サンプルとでは水に対する比重が全く異ることから，髄液サンプルをアルカリ水解して生ずるアルコールをペーパークロマトグラフイ，ガスクロマトグラフイ等によつて検した結果炭素数9以外のアルコールが検出された。

下垂体サンプルは髄液サンプルと殆んど類似のものと思われるが、アルコール部分に差がある様である。

かくの如き物質が人間の髄液中，牛下垂体，中脳中に共通して存在することは極めて興味深いことと思われる。

(1) 柳澤勇，吉川春寿 他，神経研究の進歩 4巻 578 昭35

26 神経成長促進因子Nerve Growth Promoting Factor (NGF) の研究 (その2)

中沢恒幸・鈴木恵晴
壁島彬郎・小宮英靖・猪股丈二(慶大・神経)

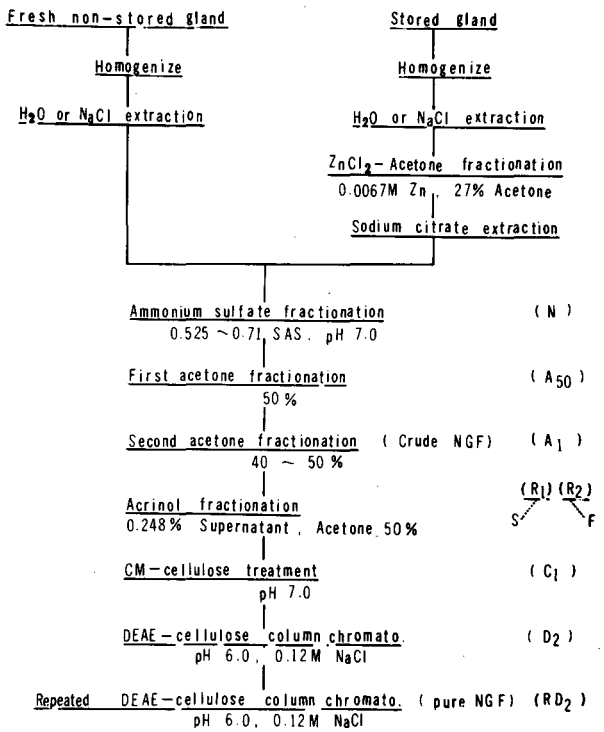
一昨年の本会でウシ類下腺より抽出したタンパクが in vitro に培養した神経線維の成長を対照の2.7倍促進すること。その成長は単に神経細胞の代謝過程を経ない原形質の redistribution による見かけ上のものではなく細胞内のタンパク生合成促進によって起るものであること。satellite glia (Schwann cell) は別途に異ったタンパク要求をなすこと を報告した。

このタンパクを神経成長促進因子 Nerve Growth Promoting Factor (NGF と略す) とした。NGF の研究は従来マウス肉腫、蛇毒、マウス類下腺など主として齧歯類より抽出されていたが哺乳類で、かつ高活性のものはまだ報告がなかった。

今回はウシ類下腺よりの NGF の物理化学的性質と in vivo での効果、ならびに NGF抗血清の作りについて述べる。

NGF抽出法 (図1)

新鮮材料と貯臓材料との前処置は夫々ことなるが図1に示すごとく硫安分画以下は同じである。第2次アセトン分画(粗 NGF)をアクリノールで分けた R_1 分画が NGF の本体でこれを NGF-S と仮称した。R_2 分画は前述の glia 系の増殖をみせるタンパクである。これを NGF-F と仮称した。R_1 分画をさらに精製したのが RD_2 分画でその性質は図2のごとくである。



(図1) PREPARATION OF NERVE GROWTH PROMOTING FACTOR (NGF) FROM BOVINE SUBMAXILLARY GLAND

NGFの物理化学的性質 (図2)

純度は free 沪紙泳動、超遠心分析では homogenous であるが acrylamidgel 泳動では multiple, 拡散分析で heterogenous であった。分子量 ≒4.000, 糖や lipo-タンパクなく protease で分解失活する。ちなみに抽出過程の各分画の収量と糖含量は図3のごとくである。抗血清は RD_2 分画 2mg を3羽の家兎に投与(7~10日間隔で5回)し、2羽は1回投与のみで試みたが 投

(図2) PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF BOVINE PURIFIED NGF (FRAC. RD_2)

	Properties	Conditions
Homogeneousty		
boundary phoresis	Homogeneous	(pH4.0 and pH8.6)
paper phoresis	Homogeneous	(pH8.6)
ultracentrifugation	Homogeneous	(pH7.1 59.780 rpm)
acrylamide gel phoresis	Multipleform	(pH8.9)
diffusion analysis	Heterogeneous	(pH7.1 , 12.590 rpm)
Sedimentation coefficient	$S_{20.W}=5.2X10$	
Diffusion coefficient	$D_{20.W}=6.0X10$	(Mean value)
Molecular weight	$M.W_{SD}=84.000$	(Multiple form)
Ultraviolet absorption	279 mμ	280/260 absorption ratio: 1.53
Isoelectric point	pH 6.4	(Cellulse acetate membrane Phoresis)
Sugar content	Negilible	(Hexose, Hexosamine, Sialic acid and Pentose)
Phosphorus content	0.2 %	
Protein color reaction	(+++)	
Lipoprotein color reaction	Negilible	
Susceptibilityforprotease	Hydrolyzed, loss activity	(Trypsin and Pepsin)
Antigenic action	(++)	(Rabbit antiserum)

(図3) YIELD, SUGAR CONTENT AND PAPER ELECTROPHORETIC PATTERN ON EACH FRACTION

Steps	Fraction	Yield/Kg. gland	Reducing sugar
Second acetone fractionation	A_1	1000-1500mg	2 - 4 %
Acrinol fractionation (P)	R_2	500-750	1 - 3
Acrinol fractionation (S)	R_1	120-150	5 - 7
CM-cellulose column chromato.	C_1	100-120	4 - 6
DEAE-cellulose column chromato.	D_2	80-100	< 1.0
Repeated DEAE-cellulose column chromato.	RD_2	50-80	≒ 0

等開始后2回に渡り接血i抗原（RD_2-分画）との重沈降反応を検べた。その結果5羽とも反応したためtiterは判定できぬがRD_2の抗原性は高いものと考えられる。

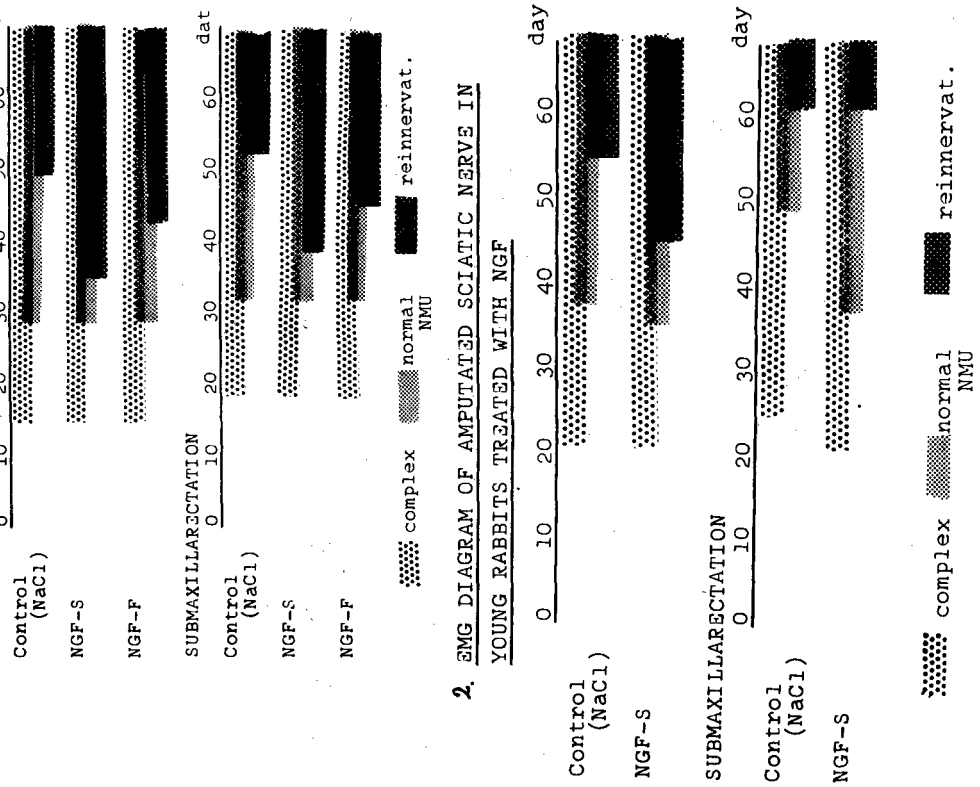
NGFのin vivoにおける効果

in vitroでの効果は胎生神経細胞よりのaxonの成長を短期間にみたものであった。

NGFがin vivoの新生マウスに接与されたときhyperneurotigation（神経節肥大）のおこることは知られているが成熟動物への影響はみられていない。そこで障害成熟神経の再生に対する効果を以下の方法で施行した。

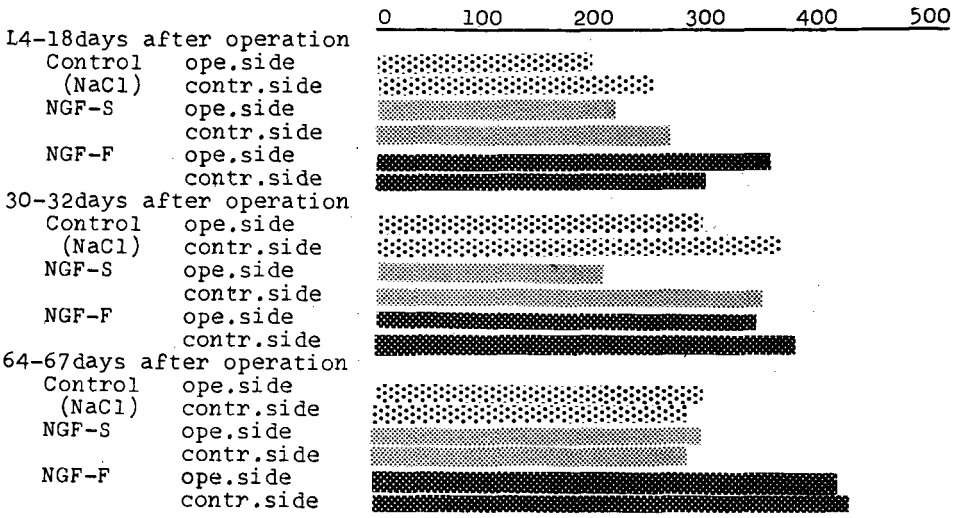
幼鼠（a.f.～0.5g）および成熟（1.5kg体重）家兎の一側坐骨神経を切断直ちに縫合し、その再生過程を体重、浮腫、筋重量、筋萎縮、坐骨神経組織標本、坐骨神経支配脊髄前角細胞核酸量で検べた。なおNGF-SとgiaまたはNGF-Fの対比、およびNGFは類下腺より抽出したが類下腺はNGFの産生臓器ではなく単に貯蔵しているに過ぎないとの推定（in vitroの実験から）の下に類下腺摘出家兎で同様の比較を行った。前角細胞核酸は坐骨神経のでる第4～6腰髄（主として第4）を厚さ6μのパラフィン切片としpH1.64に補正したgallocyanin chrom alum（Einarson法）で染めOlympus紫外線分光顕微鏡で分光測定。條件はspot直径25.2μ、2波長（$T_A=560$ mμ. $T_B=478$ mμ）法を使用（M.L. Mendelsohn）、評価は $mt=\frac{BLaC}{Ka\ln 10}$ の式中のLaCで表示される値を以て相対的に比較した。また髄鞘形成はprotoporphyrin亜型が脳内脂質（cerebrosid, Lecithin, sphingomyelinの3種）と特異的に結合し蛍光を

(図4) 1. EMG DIAGRAM OF AMPUTATED SCIATIC NERVE IN ADULT RABBITS TREATED WITH NGF



2. EMG DIAGRAM OF AMPUTATED SCIATIC NERVE IN YOUNG RABBITS TREATED WITH NGF

RELATIVE QUANTITY OF NUCLEIC ACID IN SPINAL MOTOR NEURONS OF EXPERIMENTAL RABBITS



Values are showed as $LaCx10^3$ in Potau's formula of the two-wave length method of microspectrophotometry.

生ずることを確認し(髄)鞘形成の初期の判定に用いた。

その結果次のことが解った。1)体重、栄養は対照と差を生じない 2)坐骨神経の形態的所見にも有意の差を認めない。3)髄鞘形成はNGF-Fが最も早く術後14～18日にそ

れを認め、これに対し対照は術後30日であった。4)筋電図はcomplex NMU, normal NMU voltageに差なくreinnervation voltageの出現がNGF-S, -Fとも対照より早い。類下腺摘出群も同様の傾向が認められる。(図4の1)。しかし幼若家兎の類下腺摘出群に投与されたNGF-Sの効果は認められない(図4の2)。このことは幼若期には類下腺がNGF以外の働きを神経再生に及ぼしていることを示唆している。以上各群6～8羽の平均値。5)前角細胞核酸の比較ではspotを25.2μ直径に限ってしかみていないので更に検討を要するがNGF-FがNGF-Sより少し核酸量が多く、またreinnervation voltageが出現する時期には術側も健康側とほぼ同じ核酸量を維持することが解った。

NGF抗血清の働き

幼若マウス21匹を3群に分け抗血清一定量を6～21日間投与し頸部交感神経節、胸髄側角、自律脳の神経細胞変性像をvolume ratio, cell number ratioで観察した。それはNGFは神経系中、交感神経節に多い故、抗血清の影響もそこへどの程度集中するかを検べた。その結果volume ratioは対照に比し減少しているが中枢では明かでない。

考按と(本稿の)結び

以上よりNGFはin vitroのみでなくin vivoにも或程度の働きのあることを知った。しかしそれは単に動物にapplyしたのみであってその作用部序、NGF生産部位など未解決の問題が残っている。最近Crainらはin vitroにNGFを与えhyperneurotizeした神経細胞の電顕像で原形質内の特異なfilament-structureをみ、それが胎生期の無処置神経細胞にもみられることから、NGFは神経細胞を代謝的に若返らせるのであらうと報じているが、このような報告が何等作用部序の糸口にならないこと勿論である。むしろ彼らColumbiaグループによるカテコールアミンその他のin vivoにおける体液化学的研究がすすみつつあり、一方抗血清を小児腫瘍治療に応用し効果をみているとの報告もある。私共の抽出したNGFはLevi一派のNGFとは図2に示すごとく異ったものであるが、それはLeviらが蛇出類を、私共が哺乳類を用いたための個体差であって、いづれもこれ以上精製すると失活するとは云え共にcarrierであるタンパクを一緒にはかり込むための差かとも考えている。

引用文献

1. 中沢ら：三浦教授還暦記念論文集、182-191. 1963 慶大神経科教室編
2. 鈴木ら：唾液腺レンポジウム 3：16～18. 1961
3. 鈴木ら：唾液腺レンポジウム 4：24～26. 1962
4. 中沢 ：医学のあゆみ 50：3, 100～102, 1964.
5. 鈴木ら：唾液腺シンポジウム 5：12～13. 1963.
6. 中沢 ：精神経誌 67：3. 213～214. 1965.
7. 中沢ら：神経研究の進歩 8：3, 565～571. 1964.

27* 脳リンタン白の研究 (Ⅲ)
Nativeなリンタンパク抽出のこころみ

小宮義璋・石川晋次
(東大・医・脳研・生化)

組織リンタン白はいくつかの点で細胞の機能と関連をもつことが予想されている。それらとして例えば，核内でのDNAとの関係においてタン白合成の調節，核外においては膜構造と結合した形でイオン輸送などの膜機能に関連していることが想像されてきた。しかしリンタン白が細胞内に少量しか存在しないこと，それを単離する適当な方法が存在しなかったことから上記の研究はいずれも想像の域から遠くはでなかった。我々は数年来，中枢神経がリンタン白を比較的多量にふくむこと，それが中枢神経の機能と関連をもっていることを想像させるに，三の実験事実が存在する事から出発して，その単離と酵素反応における挙動について系統的に研究して来た。そして酵素基質となるリンペプチドをリピドを含まない状態でとり出すことに一応成功しその二，三の性質について報告した。しかし分離精製に使用した方法は，得られたリンペプチドがin situの状態とはかなり異った性質の物に変化していると予想させるようなものである。そこで我々はより温和な条件下で"変性"していないリンタン白を精製することを目的としてその方法を検討し，ここに報告するようなリン酸緩衝液によるアセトン乾燥粉末の反復抽出という特殊な方法によって，アルカリ易水解性リンを多量に含む分画を抽出することができるのを知った。このようにして得られた分画の予備的な分析の結果は，それが従来HEALDによって報告されたlipophosphoprotein，我々によって報告されたリンペプチドのいずれとも異り，又より精製されている事を示している。この分画に存在するリピド及びアミノ酸の分析，リンタン白キナーゼの基質としての性質をもあわせて検討し報告したい。

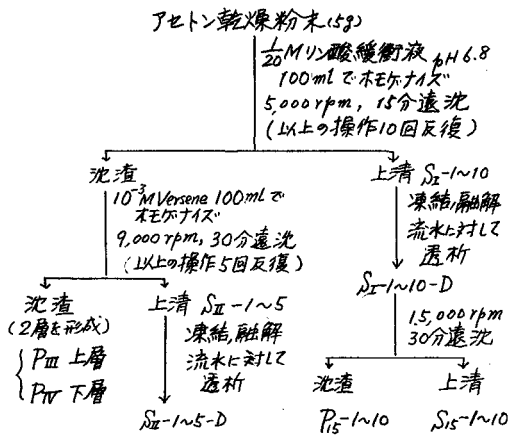


図1 抽出操作

酸可溶性リン	2.21 μg/mg乾燥粉末
アルカリ易水解性リン	2.13 〃
全リン	11.95 〃
アルカリ易水解性リン	3.48 μg/mgタン白
全リン	19.55 〃
N/アルカリ易水解性リン	10.1
N/全リン	18.1

表1 アセトン乾燥粉末の分析値

	P_{III}	P_{IV}
酸可溶性リン	0	0
アルカリ易水解性リン	0	0
全リン(μmoles)	1.26	2.31
N/全リン	12.7	7.8

表2 P_{III}及びP_{IV}の分析値

S_I-D	1	2	3	5	7	9	HEALD[1] (Fr.VII)	ORIKABE et al.[2] (Fr. VIII)
N (μmoles)	61.4	17.5	6.5	2.8	2.0	1.5		
アルカリ易水解性リン (μmoles)	0	0.11	0.12	0.10	0.11	0.13		
全リン (μmoles)	2.55	3.19	2.47	2.45	2.22	2.27		
N/アルカリ易水解性リン	—	159	54.2	28.0	18.2	11.5		
N/全リン	24.1	5.49	2.63	1.14	0.90	0.66	2.65	70

表3 S_I-D の分析値

P_{15}	2	3	4	5	6	7	8	9
N (μmoles)	26.5	16.0	7.2	10.7	6.7	10.2	6.4	6.2
アルカリ易水解性リン (μmoles)	0.32	0.49	0.40	0.76	0.44	0.79	0.50	1.20
全リン (μmoles)	4.52	3.22	1.78	3.48	2.80	3.79	3.55	3.61
N/アルカリ易水解性リン	84.1	32.5	18.2	14.1	15.1	12.9	12.8	5.2
N/全リン	5.9	5.0	4.0	3.1	2.4	2.7	1.8	1.7

表4 P_{15} の分析値

(1) HEALD, P. J. (1961). Biochem. J. 78, 340.
(2) ORIKABE, E., MATSUI, H., ISHIKAWA, S., & SHIMAZONO, N. (1965). J. of Biochem. 57, 346.

28* 脳ＬＤＨアイソザイムの研究

伊藤　斉・三浦勇夫・森　文彦
舛沢郁二・三浦貞則（慶大・神経）

ＬＤＨ isozymes の脳内部位別の差異，上清分画と mitochondria分画（以下Ｓ分画及びMt分画）における pattern，及びこれらに関する発育過程での変動について報告する。

実験方法：　実験動物は猫（生后１０日から成猫にいたるまでの各段階）を使用し，sodium pentobarbitone で麻酔の後，脳を摘出した。直ちに teflon homogeneizer を用いて 0.25 M sucrose（0.025 M nicotinamide加）による 10 % homogenate を作成，次に 1,500 G 10 min. 遠心，その上清を 18,000 G 20 min. 超遠心してＳとMt分画を得た。Mt分画は更に冷じ sucrose溶液で２回洗滌し，salt solution（0.154M-Nacl，0.154M-MgSo4，0.5M NAA，0.1M-K-phosphate buffer［pH 7.4］）に suspension としたものを標本にしている。

Isozymes の分離であるが，澱粉ゲル泳動法では活性値の recovery や再現性に難点があり，寒天ゲル泳動法は目下検討中であるので，今回の報告は cellulose acetate electrophoresis（SEPARAX 膜使用）による実験成績である。この方法は試料が極少量なため直接酵素活性を測定できない難点があるが，短時間で分離可能であり，再現性も良好である。泳動条件は小川[1]に準じ，zymograme は INT を用いる Raabo[2]の方法に従った。各 fraction は acetone で抽出後 500 mμ で比色定量している。通常，fractionは５ヶに分別されるが，陽極側からⅠ～Ⅴに命名した。

実験成績：　成績の概要は表Ⅰ，Ⅱ及び図に示してある。即ち，（１）SEPARAX膜に

TABLE I

PERCENTAGE DISTRIBUTION OF LDH ISOZYMES FROM CAT BRAIN AS SEPARATED BY SEPARAX ELECTROPHORESIS

Brain areas	Cases	Fractions Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
Frontal lobe	4	25.8 (21.5-30.2)	29.4 (26.7-30.8)	32.0 (30.0-34.8)	11.4 (3.8-17.3)	1.4 (0-3.2)
Temporal lobe	4	32.4 (28.8-40.1)	29.4 (27.2-32.2)	28.0 (24.0-32.2)	9.3 (5.5-12.5)	0.9 (0-2.5)
Occipital lobe	4	33.2 (29.6-39.6)	27.2 (20.0-30.1)	28.2 (25.5-30.2)	10.4 (5.5-12.9)	1.0 (0-2.0)
Thalamus	3	35.7 (27.3-45.5)	28.0 (22.3-36.4)	23.1 (17.0-30.0)	11.9 (9.9-15.8)	1.3 (0-3.5)
Striate body	3	25.2 (22.1-30.4)	23.5 (19.7-26.0)	27.9 (23.6-34.5)	13.7 (12.6-15.2)	9.7 (6.2-13.0)
Cerebellum	3	27.6 (20.1-33.6)	31.9 (28.5-33.0)	24.4 (23.2-26.0)	16.5 (6.2-23.2)	0.6 (0-1.3)
Pons	3	52.0 (49.1-54.6)	27.1 (22.1-30.0)	16.4 (15.4-17.0)	3.4 (0-5.5)	1.1 (0-3.2)
Corpora quadrigemina	3	48.3 (46.2-50.1)	23.0 (18.5-28.2)	19.8 (12.6-25.7)	6.3 (4.6-9.4)	2.6 (1.2-4.4)
Medulla oblongata	3	50.3 (48.2-52.1)	27.4 (23.9-31.2)	18.2 (16.2-20.7)	3.3 (2.1-4.0)	0.8 (0-2.4)
Cervical cord	3	56.7 (54.0-60.1)	25.1 (21.8-31.0)	16.0 (15.0-17.9)	2.2 (0-4.4)	0

よる分離では脳内部位により異なるpatternをホし，大脳皮質と脳幹部では明らかな差異を認めた。（LDH$_1$，LDH$_V$の百分率が特に著しい。）（2）発育の段階において特徴的な変動をホし，LDH$_1$の増加，LDH$_{IV,V}$の減少（いずれも百分率）が脳のpost-natal maturationに対応する。従って，LDH isozyme patternの上でも大脳皮質に比して間脳の方が成熟度が速い。以上の成績はBonavita[3]の報告（寒天ゲルによる）にかなり一致した点が多い。（3）脳mitochondriaの特異性として約10％程度（上清に比し）の解糖能を有することが知られているが[4]，成猫脳のLDH patternには殆んど差異が認められない。但し，幼若猫ではLDH$_{IV,V}$の百分率が上清に比しやゝ高い傾向にあり，この点甚だ興味深い。

TABLE 2 DISTRIBUTION OF LDH ISOZYMES IN CAT BRAIN HOMOGENATE FRACTIONS

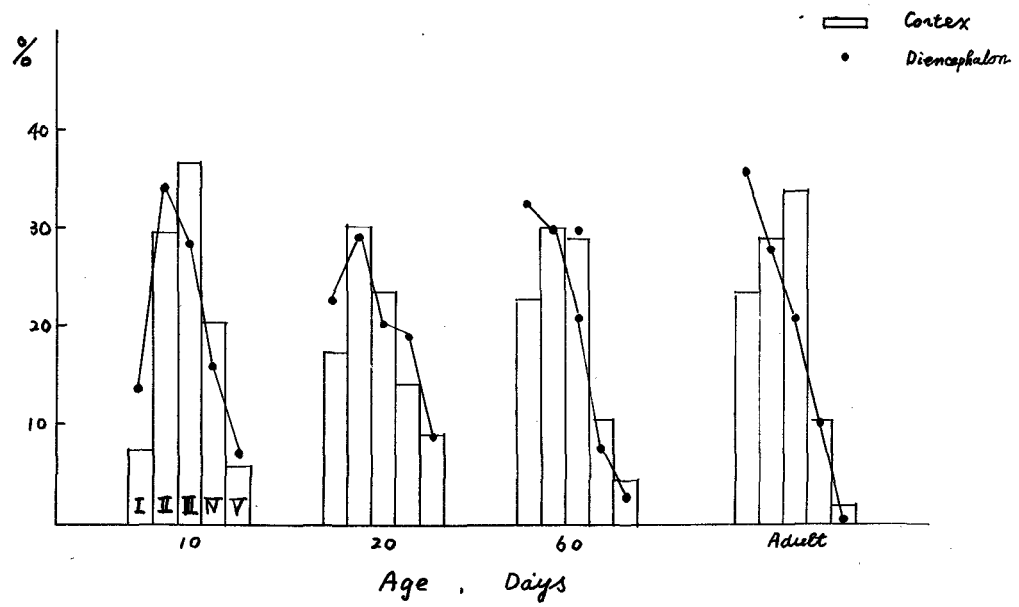
Homogenate fractions		LDH isozymes I	II	III	IV	V
Adult	Supernatant(4)	25.8	29.4	32.0	11.4	1.4
	(Range)	(21.5-30.2)	(26.7-30.8)	(30.0-34.8)	(3.8-17.3)	(0-3.2)
	Mitochondria(4)	27.0	26.7	31.5	13.6	1.2
		(24.0-30.8)	(24.3-29.0)	(29.2-34.2)	(9.6-16.2)	(0-4.0)
New-born 10 days after birth	Supernatant(3)	7.6	30.5	37.1	20.2	4.8
		(1.1-11.3)	(24.5-34.9)	(30.0-46.5)	(17.5-24.2)	(2.0-9.0)
	Mitochondria(3)	6.1	22.0	30.8	30.1	11.0
		(5.0-7.2)	(20.6-23.4)	(26.8-34.8)	(29.0-31.2)	(9.1-12.8)

主要文献

1) 小川：代謝，2，514，1965.
2) Raabo, E: Scandinav. J. Clin & Lab. Invest. 15, 405, 1963.
3) Bonavita, V: J. Neurochem., 10, 743, 1963. 10, 755, 1963. 11, 39, 1964.
4) Balázs, R. et al: J. Neurochem., 5, 1, 1959.

Fig.

CHANGES IN THE PERCENTAGE DISTRIBUTION OF LDH ISOZYMES FROM CAT BRAIN DURING THE POST-NATAL DEVELOPMENT



29* 髄液の酸塩基平衡に関する研究

田崎義昭・佐野　昇・大阪　彰
鈴木玲子　（東邦大・医・阿部内科）

髄液の酸塩基平衡，ガス分圧測定が臨床的にどのような意義があるかはいまだ明らかではない。髄液のpHについては，すでにFoaらにより1906年より研究されているが，最近Posnerら(3)は種々な酸塩基平衡障害を示す病態で，髄液の酸塩基平衡を検討し，髄液pHの異常を認める時には，脳症を伴い，臨床的に意義あるものとしている。

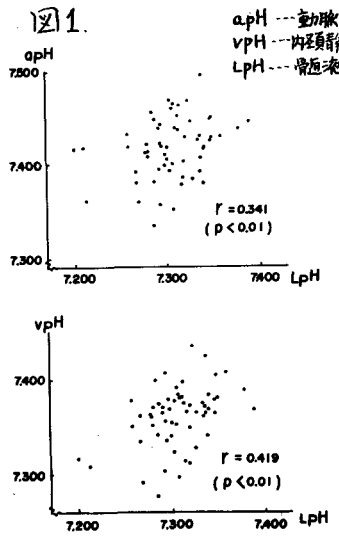
我々は髄液のガス分圧，酸塩基平衡は脳組織の変化を反映するものと考え，脳代謝との関係について検索を続けている。今回は髄液と，動脈血，内頸静脈血のガス分圧，酸塩基平衡がどのような関係にあるかについて報告する。

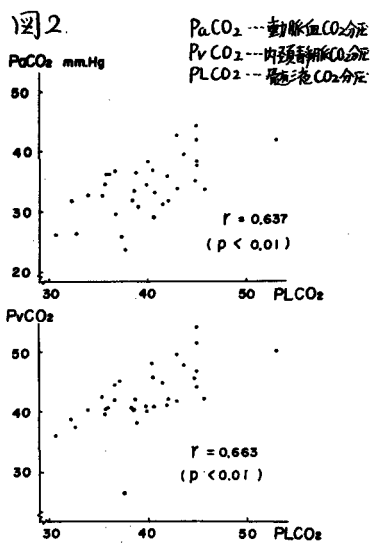
（方法）　横臥位にて腰椎穿刺により空気にふれぬよう髄液を採取する。さらに仰臥位として内頸静脈，股動脈を穿刺し，同時に採血した。　pHは毛細管ガラス電極により，37℃の恒温槽で測定した。CO_2分圧はPCO_2電極を，O_2分圧はPO_2電極を用いて，やはり37℃の恒温槽で測定した。pHの測定誤差は0.002以内，PO_2，PCO_2の誤差はそれぞれ2 mmHg以内であった。(HCO_3^-)をmM/Lで求めるにはHenderson-Hasselbalchの式より，pHとPCO_2の測定値より次の如く算出した。

$$[HCO_3^-] = antilog\ (pH - pK')\ (S \times PCO_2)$$

SはCO_2のsolubility factorで，37℃では血漿0.0308，髄液0.0324である。pK'は温度とpHにより変化するので血漿についてはSeveringhausら(4)，髄液についてはAlexanderら(1)のNomogramを用いた。

（結果）(i) pH。症例は58例で，動脈血pHは正常ないし軽度アルカローシスを示し，その平均値は7.417±0.0308であった。髄液pHは7.308±0.0298，内頸静脈血pHは7.361±0.0298であった。すなわち髄液の値は動脈血，脳静脈血よりも低く，そのいずれとも推計学的に有意差を示した。髄液pHと，動脈血pHまたは内頸静脈血pHとの相関は図1に示す如くで，いずれも推計学的に有意であるが，内頸静脈血との相関がより密接であった。





(ii) CO_2分圧。34例につき平均値を示すと，動脈血34.40±4.896 mmHg，髄液39.86±4.691 mmHg，内頸静脈血42.60±5.053 mmHgであった。髄液CO_2分圧は動脈血の値より上昇し，推計学的に有意差を示すが，内頸静脈血との間には有意差

は認められなかった。髄液CO_2分圧と動脈血CO_2分圧，あるいは内頸静脈血CO_2分圧との相関を示すと図2の如くで，そのいずれにも有意な相関を認める。

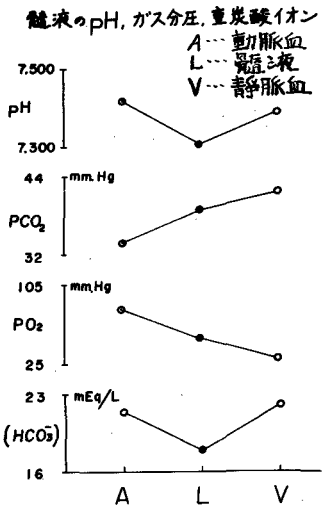
(iii)重炭酸イオン。34例の平均値は動脈血21.3 ± 2.68 mEq/L，髄液18.0 ± 1.66 mEq/L，内頸静脈血22.4 ± 2.56 mEq/L であった。髄液の値は，動脈，内頸静脈血より低下しており，そのいずれとも有意差を示している。髄液の重炭酸イオンも，動脈血，内頸静脈血の重炭酸イオンと正相関を示している。

(IV)O_2分圧。21例の平均値は動脈血81.30 ± 12.036 mmHg，髄液51.53 ± 9.421 mmHg，内頸静脈血32.35 ± 7.809 mmHg であった。髄液の値は，動脈血，内頸静脈血の中間にあり，そのいずれとも有意差を示している。髄液のO_2分圧と，動脈血または内頸静脈血中O_2分圧との間には有意な相関は認められなかった。

(V)急性呼吸性アルカローシス，アシドーシス。17例に過換気を3～5分間行なわせ，血中，髄液中の変化を測定した。動脈，内頸静脈のpH，O_2，CO_2分圧にはそれぞれ明らかな変化を認めるが，髄液には変化は認められなかった。5％CO_2ガスを7例に5分間吸入させると，動脈血pHは低下し，CO_2，O_2分圧は上昇し，内頸静脈血O_2分圧は上昇するが，髄液には著変を認めなかった。

（考案）「ヒト」の髄液酸塩基平衡の正常値には諸家の報告があるが，Posnerら(3)の報告が妥当なものと思われる。髄液pHは7.311 ± 0.026で，動脈血より0.1低下し，CO_2分圧は47.9 ± 5.7 mmHg で動脈血より9.6 mmHg 上昇し，(HCO_3^-)は22.9 ± 2.3 mEq/L で動脈血より0.5 mEq/L 低下しているとしている。私どもの測定値はpHについてはほぼ一致し，CO_2分圧，HCO_3^-はやや低値を示している。髄液と動脈，内頸静脈血中のガス分圧，酸塩基平衡との関連についての研究はほとんどなされていないが，図3に示すように髄液のpH，(HCO_3^-)は最も低く，CO_2分圧は内頸静脈血と近似していることが判った。腰椎穿刺による髄液とcisternal fluidでの測定値の差異については，すでにBradleyら(2)が検討し，steady stateではpH，CO_2分圧，(HCO_3^-)に差異がないことを報告している。髄液のガス分圧，酸塩基平衡は脳組織での代謝変化，脳血流と密接な関係にあると思われるので，今後両者の関係を検討し，さらには酸塩基平衡障害時の髄液をも検索し，その臨床的意義を明らかにしたいと思っている。

図3



（結語）髄液のpH，CO_2分圧，O_2分圧，重炭酸イオンを測定し，動脈血，内頸静脈血中の値と比較検討した。髄液のこれら諸量はsteady stateでは脳表の髄液の値とほぼ一致するものと考えられるので，臨床的に脳代謝および脳循環を知る一つの指標になるのではないかと考える。

（文献）

(1) Alexander, S.C., Gelfand, R., Lambertsein: J. biol. Chem. 236, 592, (1961)
(2) Bradley, R.D., and Semple, S.J.G.: J. Physiol. 160, 381 (1962)
(3) Posner, J.B., Swanson, A.G, and Plum, F.: Arch. Neurol., 12, 479, (1965)
(4) Severinghaus, J.W., Stupfel, M. and Bradley. A.F.: J. appl. Physiol. 9. 189. (1959)

外— 1 PROTEIN SPECIFICITY AND NEURONAL FUNCTION

by

Francis O. Schmitt

Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, and Neurosciences Research Program, Brookline, Massachusetts, U. S. A.

In this paper will be developed a point of view about the determinative role of proteins in brain functioning.
Documentation will be offered from published and unpublished work from these laboratories, from the literature, and from the Neurosciences Research Program.

Neurons from nets and eventually the brain, through chemical interaction at junctional sites (synapses). Developmental processes require specificities built into differentiating cells by genetic mechanisms; cues needed to form the complex weave of the brain are considered to be molecular or fabrics of specific molecules, probably protein. Protein growth factors (e.g., Levi-Montalcini et al.) powerfully stimulate specific neuronal types. It may be postulated that proteinaceous or peptidic determiners produced by target cells specifically stimulate neuronal multiplication and/or growth by evoking necessary homeostatic responses of derepression and repression, perhaps at the level of the genome. Such cuing proteins may well occur in salivary gland or connective tissue cells as targets for innervation by sympathetic neurons. At varying times and for limited periods, neurons in the developing brain, as target cells, may similarly liberate proteins which powerfully stimulate growth, primarily or exclusively, of those neurons destined to synapse with or converge upon the target neurons. In such a view the developing brain manifests temporally and spatially specific patterns of diffusion of large-and small molecule solutes capable of evoking growth and structural differentiation of brain cells acting alternately as target cells and as cells responding to

specific stimulating molecules.

Included in the mechanisms controlling the specific patterning in cellular reproduction and assembly in growth and differentiation are the processes that hook up neurons and activate the nets which subserve innate, instinctual behavior. These nets, presumably wired-in genetically, interact with nets capable, by plastic alteration, of storing and retrieving experiential information. Rubin and Stenzel (1965) have obtained active biogenesis, from subcellular ribosomal and microsomal preparations of brain cells, of proteins which combine with antisera directed against purified brain protein. Such experimental methods provide a means of studying specific growth processes in brain cells. Further development may permit study of biosynthesis and products of biosynthesis of small populations of cells.

Linkage, which may be relatively direct and rapid and which may be reflected in bioelectric changes, may exist between the surface membrane of the neuronal soma and the biogenetic centers of the cell. The products of such syntheses, as well as highly active solutes produced by neighboring cells, after diffusing to the neuronal membrane, may condition the electrical, biochemical, and physiological responsiveness of neurons, including the making or breaking of synaptic contacts in dynamic physiological processes. Partial systems of brain fragments cultivated in vitro, such as those studied by Bornstein and Crain (1965), may, when sufficiently refined, give valuable clues.

The engram, or memory trace, cannot readily be explained at the level of reverberating circuits but requires subcellular, i.e., molecular, changes which permit selective switching at synaptic junctions. Electron microscopic findings suggest transsynaptic proteinaceous structures (Hama, De Robertis, Gray, Taxi, Van der Loos) which may not only link neurons at synapses but also provide a molecular recognition system dynamically responsive to physiological alterations. Mihailović and Janković (1962, 1965) observed selective neurophysiological response of particular brain regions (e.g., caudate, hippocampus) to intraventricular infusion of antisera directed

against these regions serving as antigens. In cortical explants, which had developed synaptic connections in vitro, Bornstein and Crain (1965) observed blocking of evoked potentials and net firing following treatment with certain brain antisera. Antisera against a purified protein, thought by B. W. Moore (1964) to be characteristic of all vertebrate brains, cross-react with immunogens of all vertebrate brains studied, suggesting great evolutionary stability of this protein (L. Levine and B.W. Moore, 1965). It could be hypothesized that this member of a family of acidic neuronal proteins may function as a molecular recognition protein, which is analogous to the gamma-globulin molecular recognition system produced by vertebrate immunocytes but which has appeared early in evolution to meet the needs of multicellular organisms for neural coordination, for analyzer-integrator systems, and for information processing necessary to subserve memory and learning (Schmitt, 1964).

Huneeus-Cox (1964, 1965), in the Chilean laboratories of this Unit, obtained electrophoretic evidence for at least 14 proteins in squid axoplasm. Antisera directed against these proteins reacted, in Ouchterlony plates, to 6 axoplasmic antigens. Attempts at fractionation of these proteins are in progress. One or more of them appear to participate in membrane processes producing the polarization potential and the propagated action potential, as is indicated by the fact that antisera directed against axoplasm, when introduced into artificially perfused axons under certain conditions, block the action potential propagating mechanism without substantial influence on the polarization potential. Proteases injected into the axon perfusion fluid also block action potentials but also reduce polarization potentials (Rojas and Luxoro, 1963; Huneeus-Cox, 1964, 1965; Rojas, 1965).

Ubiquitous to all neurons are the neurofilaments seen in the electron microscope as 80 - 100 A wide filaments disposed in tangential, perinuclear arrays in the cell body and coursing continuously and unbranched past the axon hillock, throughout the axon to its terminals. Davison and Taylor (1960) proposed that the neurofilament subunits are composed of a globular protein (MW = 10^4) and that these globular molecules aggregate in strands which

wrapped about each other in highly specific array, produce the 100 A wide neurofilament. Davison (1961) found it to be an acidic protein (ca. 25% dicarboxylic amino acids) containing cysteine or cystine residues. Attempts are being made to prepare antisera against the purified neurofilament protein in the hope of gaining information, through immuno-neurological means, of the function of this universal neuronal organelle which has for so long remained refractory to biophysical and physiological analysis. The soluble purified protein (designated "S - 100"), obtained by B. W. Moore and found by him to be present in all the vertebrate brains examined, is also an acidic protein. Both may be members of a family of acidic proteins which, by small chemical alterations, may change from the soluble (monomeric) form to fibrous (neurofilament) or membranous (possibly including the axon surface membrane) form through alteration of tertiary and/or quaternary conformational parameters. In the program of this laboratory special attention is being paid to possible dynamic interrelationships between structural proteins of the axon membrane and synaptic membranes, to contractile proteins, and to the neurofilament protein. Results bearing on these relationships will be described.

References and Notes

Levi-Montalcini. R.: The nerve growth factor, Ann. N. Y. Acad. Sci. 118:149-170, 1964. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells, Harvey Society, 8th Lecture, 1964-1965 Series, N. Y., April 15, 1965.

Rubin, A. L., and Stenzel, K. H.: In vitro synthesis of brain protein, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53 (5): 963-968, 1965.

Bornstein, M. B., and Crain, S. M.: Functional studies of cultured brain tissues as related to "demyelinative disorders," Science 148(3674): 1242-1244, 1965.

Mihailović, L., and Janković, B. D.: Effects of intraventricularly injected anti-nucleus caudatus antibody on the electrical activity of the cat brain, Nature 192(4803): 655-656, 1961.

Mihailović, L., Janković, B. D., Beleskin, B., Mitrović, K., and Krazalic, L.: Effect of intraventricularly injected anticerebral antibodies on the histamine-like substance and postassium content of various regions of the brain of the cat, Nature 203(4946): 763-765, 1964.

Mihailović, L., and Janković, B. D.: Effects of anti-cerebral antibodies on electrical activity and behavior, Neurosciences Res. Prog. Bull. 3 (1): 8-17, 1965.

Moore, B. W.: Preparation of a brain protein which is soluble in saturated ammonium sulfate, Fed. Proc. 23:524, 1964.

Moore, B. W., and MacGregor, D.: J. Biol. Chem. (in press), 1965.

Levine, L., and Moore, B. W.: Structural relatedness of a vertebrate brain acidic protein as measured immunochemically, Neurosciences Res. Prog. Bull. 3 (1): 18-22, 1965.

Schmitt, F. O.: Molecular and ultrastructural correlates of function in neurons, neuronal nets, and the brain, Neurosciences Res. Prog. Bull 2 (3): 44-75, 1964.

Huneeus-Cox, F.: Electrophoretic and immunological studies of squid axoplasm proteins, Science 143(3610): 1036, 1964.

Huneeus-Cox, F.: In preparation.

Rojas, E., and Luxoro, M.: Micro-injection of trypsin into axons of squid, Nature 199(4888):78, 1963.

Rojas, E.; Membrane potentials, resistance, and ion permeability in squid giant axon injected or perfused with proteases, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53: 306, 1965.

Davison, P. F., and Taylor, E. W.: Physical-chemical studies of proteins of squid nerve axoplasm, with special reference to the axon fibrous protein, J. Genl. Physiol. 43: 801-823, 1960.

Schmitt, F. O., and Davison, P. F., Biologie moleculaire des neurofilaments, pp. 355-369 in Actualites Neurophysiologigues, 3ième serie. A.-M. Monnier, ed. Paris: Masson et Cie, 1961.

Acknowledgment is gratefully given for grants from: National Institutes of Health, U. S. Public Health Service (NB-00024-15 and GM 10211-04); National Aeronautics and Space Administration (NsG-462); Office of Naval Research, Department of the Navy (Nonr-1841 (27) and Nonr (G) -00089-64); Rogosin Foundation, Trustees under the Wills of Charles A. and Marjorie King, and the Louis and Eugenie Marron Foundation.

外－2 NEUROCHEMICAL STUDIES IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF THE BRAIN

Professor Eduardo De Robertis,
Director Instituto de Anatomía
General y Embriología,
Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires.

Modern neurobiology has recognized the importance of an integrated study of the chemical and structural organization of the nervous tissue. This concept has emerged, among other facts, from its high degree of functional complexity brain and the extraordinary cellular and subcellular compartmentalization demonstrated by electron microscopy. The need for such a correlation becomes more stringent for some of the more specific neuronal functions such as that of the biosynthesis and release of transmitter substances at the synaptic endings.

To consider a substance as a transmitter or involved in some other synaptic functions, it is prerequisite that it should be localized in nerve endings. Furthermore the enzymes directly involved in its synthesis or inactivation should be present within the synaptic region or in its proximity.

Methods have been developed in our laboratory for the isolation of two populations of nerve endings in addition to myelin and free mitochondria from the crude mitochondrial fraction (De Robertis, et al., 1962a). In addition a technique based on the hyposmotic shock of the crude mitochondrial fraction permits the disruption of nerve endings and the isolation of synaptic vesicles (De Robertis et al., 1962b, 1963).

The acetylcholine (Ach) system represented by Ach, cholineacetylase (ChAc), and acetylcholinesterase (AchE) was studied in all the above fractions. The entire system was found concentrated in one of the two fractions of nerve endings (cholinergic nerve endings).

Ach and ChAc were highly concentrated in the synaptic vesicles. This result is interpreted as definite evidence that synaptic vesicles are the carriers of Ach as earlier postulated by De Robertis and Bennett

(1954-55). AchE appears mainly concentrated in the membranes of the synaptic complex.

Granulated synaptic vesicles have been found in peripheral sympathetic nerve endings and the anterior hypothalamus (De Robertis and Pellegrino de Iraldi 1961, Pellegrino de Iraldi et al., 1963) and have been shown to change with drugs modifying the catecholamine content. The synaptic vesicle fraction isolated from the anterior hypothalamus has a 10-20 per cent concentration of granulated vesicles and the highest content of noradrenaline (De Robertis et al., 1965). Dopamine has also been found concentrated in synaptic vesicles.

Results from our laboratory on the localization of 5HT, MAO, 5HTPD and COMT will also be mentioned.

The problem of pools of free amino acids (AA) particularly glutamate, glutamine and GABA will be discussed and the key enzymes involved in the metabolism of these AA will be localized within the subcellular structure of the brain (Salganicoff and De Robertis, 1963 and 1965).

The localization of glutamic acid decarboxylase (GAD) in nerve endings and its association to synaptic vesicles will be discussed. The presence of a concentration of glutamine synthetase in the synaptic vesicles will be related to the possible role of this enzyme in convulsions produced by methionine sulfoximine. Several enzymatic and metabolic differences between free mitochondria and those contained within the synaptic complex will be mentioned.

The fine compartmentalization of enzymes and active substances revealed by cell fractionation methods in conjunction with the EM analysis of the fractions seems to be a basic contribution to the study of synaptic transmission in brain.

REFERENCES

De Robertis E. and Bennett H.S. (1954) Fed. Proc. 13, 35 (1955) J.

Biophys. Biochem. Cytol., 1, 47.

De Robertis E. and Pellegrino de Iraldi A. (1961a) Anat. Rec., 139, 298.

De Robertis E., Pellegrino de Iraldi A., Rodríguez de Lores Arnaiz G. and Salganicoff L. (1962a) J. Neurochem., 9, 23.

De Robertis E., Rodriguez de Lores Arnaiz G. and Pellegrino de Iraldi A. (1962b) Nature, 194, 794.

De Robertis E., Rodríguez de Lores Arnaiz G., Salganicoff L., Pellegrino de Iraldi and Zieher L. M. (1963) J. Neurochem., 10, 225.

Pellegrino de Iraldi A., Farini Duggan H. and De Robertis E. (1963) Anat. Rec., 145, 521.

Salganicoff L. and De Robertis E. (1963) Life Sciences, 2, 85.

Salganicoff L. and De Robertis E. (1965) J. Neurochem., 12, 287.

De Robertis E., Pellegrino de Iraldi A., Rodríguez de Lores Arnaiz G. and Zieher L. M. (1965) Life Sciences, 4, 193.

外－3 NEUROCHEMICAL CORRELATES OF BEHAVIOR

M.H. Aprison, Ph.D., Professor of Biochemistry
The Institute of Psychiatric Research and Department of Psychiatry and Biochemistry, Indiana University Medical Center, Indianapolis, Indiana, U.S.A.

In previous studies from our laboratories, it was demonstrated that a quantitative relationship existed between the dose of intramuscularly administered 5-hydroxy-tryptophan (5-HTP), the precursor of serotonin (5-HT), and the behavioral effect it produced, implying that the behavioral impairment correlated with the increase in brain serotonin. The behavioral changes were quantitatively measured employing operant (learned behavior) techniques. Further attempts to correlate disrupted behavior ('T') with the brain level of 5-HT were assessed by employing another means of increasing this transmitter. This was done by pre-treatment of the animals with the monoamine oxidase inhibitor iproniazid, prior to injecting 5-HTP, thereby increasing brain 5-HT buildup by preventing its rapid destruction. It was possible to correlate the recovery of the enhanced behavioral effects of a specific dose of 5-HTP (10, 25, 50mg/kg) with the recovery of brain MAO activity, hence, presumably with return to normal levels of the elevated brain 5-HT. This correlation was followed over a period of 50 days during which the MAO activity varied from 9 to 100 per cent of its maximal activity. A similar correlation with behavior was not possible with liver MAO activity. The enhanced behaviorral effects following the pretreatment with iproniazid were explained in terms of the increased free 5-HT pool in brain. This conclusion was tested by measuring serotonin levels in four specific brain areas as well as in several peripheral organs (liver, heart, and lung) in birds at different stages during the period in which behavior was disturbed with 50 mg/kg 5-HTP but without iproniazid. Only in the case of the telencephalon and diencephalon (plus optic lobes) did the 5-HT concentration pass through a maximum (at 30 per cent 'T') and then return to normal at the same time as the behavior returned to normal. Serotonin in the pons-medulla oblongata, cerebellum, heart, and lung also passed through

maxima (at 25-30 per cent 'T'), but then returned to normal by 60 per cent 'T'. The 5-HT concentration of liver reached peak values at the same time as did that of the other parts, but did not return to normal during the complete period studied. The rate of change of the 5-HT concentration in the telencephalon and diencephalon during the period of the behavioral change confirms the original explanation of the brain MAO-behavior correlation.

Recently several studies have provided evidence that the enzyme which synthesizes serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase, is the same as dopa decarboxylase, the enzyme which synthesizes dopamine (DA). Consequently, it has been suggested that when large amounts of 5-HTP are injected, DA and norepinephrine (NE) levels may be lowered or that 5-HT will be formed in neurons where DA and NE are normally stored in bound and labile pools. Experiments were repeated in which 50 mg/kg 5-HTP was injected into pigeons and after sacrificing the birds at various times during the behavioral disruption the catcholamines were measured in the same brain areas that 5-HT was measured. No significant changes in DA and NE concentrations were found in the telencephalon. Changes did occur in the norepinephrine levels of the diencephalon (plus optic lobes), pons-medulla oblongata, and cerebellum, but these changes were not related to the observed behavioral changes. Changes in dopamine occurred in diencephalon (plus optic lobes), pons-medulla oblongata and cerebellum but only in the first two brain parts is a temporal correlation with behavioral changes suggested. This relationship is discussed on the basis of DA being either the NE precursor or a transmitter in these pigeon brain parts. Although the data suggest that the depressed approach behavior noted after 5-HTP administration can best be explained by the action of free 5-HT on appropriate sites in brain, the lowered DA levels in the midbrain and pons-medulla oblongata must now also be considered.

In addition, our group injected α-methyl-m-tyrosine (α-MMT) into birds and measured their behaviorial changes as well as brain 5-HT, DA, NE and α-methyl-m-tyramine plus aramine levels at various times after the in-

jection. Since α-MMT is known to deplete 5-HT, NE, and DA differentially, a study was made to see which, if any, of the transmitters changed in concentration and then returned to normal over the same time course as the behavioral change. It was found that only the brain 5-HT changes correlated with changes in behavior. It is suggested that in these experiments the change in concentration of the free pool probably follows the change in the total level of this transmitter and consequently resulted in this correlation.

In the 5-HTP experiments it was shown that increased total (free plus bound) brain 5-HT is followed by a period of depressed responding in the pigeon working on a multiple fixed ratio-fixed interval schedule of reinforcement whereas in the α-MMT experiments the data indicate that a decrease in total brain 5-HT is also followed by a period of depressed responding on the same behavioral schedule. One explanation for the two opposite biochemical situations which result in virtually the same behavioral changes is found in the concept that CNS transmitter must be in the free form rather than bound in order to produce its physiological effect. Although the time course of the behavioral effects due to an injection of 5-HTP and α-MMT are distinctly different, it appears that in both these cases more free 5-HT can be formed or released than in the normal state. Therefore, a physiological situation can exist where greater amounts of the free form are available at synapses to produce its effect. The importance of the presence of this neurohumor in the free form in the brain rather than in the bound form will be discussed from the standpoint of serotonin acting as a neurotransmitter or modulator and hence having profound effects on the organisms behavior.

外－4 THE EFFECT OF PSYCHOTROPIC DRUGS ON THE METABOLISM OF CEREBRAL MONOAMINES

by A. Pletscher

Medical Research Department, F. Hoffmann-La Roche Co., Ltd.
Basle, Switzerland

Most of the major psychotropic drugs cause profound alterations of the metabolism of cerebral monoamines. The nature of these changes as well as their possible implications for the psychotropic effect in humans will be discussed in the present paper.

1. Monoamines oxidase (MAO) Inhibitors

The mechanism of action of these drugs (e.g. iproniazid, pargyline, tranylcypromine) consists in inhibition of MAO in various tissues which in general induces an increase of the content of cerebral monoamines such as 5-hydroxytryptamine (5HT), catecholamines, and their 3-0-methylethers. MAO inhibitors probably act primarily on the intraneuronal amines which secondarily leads to a rise of the extraneuronal amines. The latter stimulate the adrenergic receptors and are probably responsible for some central adrenergic and psychostimulant effects of the drugs.

2. Thymoleptics

Thymoleptics, e.g. imipramine, amitriptyline, desmethylimipramine, protriptyline, do not markedly interfere with enzymes involved in the metabolism or synthesis of aromatic monoamines (e.g. MAO, catechol-O-methyltransferase, decarboxylase of aromatic amino acids, β-hydroxylase). They increase, however, the adrenergic stimulating effect of exogenous or endogenous monoamines, especially norepinephrine (NE). Furthermore, they delay the disappearance of exogenous NE in the blood as well as of endogenous NE released by sympathetic stimulation or by drugs such as reserpine and benzoquinolizine derivatives. These and other properties suggest that thymo-

leptics interfere with the uptake or transport mechanism of the monoamines located in the nerve vesicles close to the synaptic membrane. Thereby, the inactivation of liberated NE by re-storing is inhibited. Consequently, the extraneuronal concentration of the neurotransmitter increase, leading to stimulation of the adrenergic receptor.

3. Rauwolfia Alkaloids and Related Compounds

Rauwolfia alkaloids (e.g. reserpine) and related compounds (e.g. benzoquinolizine derivatives) decrease the level of cerebral monoamines such as 5HT and catecholamines. The primary point of attack of these drugs is probably the storing mechanism of the amines within the storage organelles. As a consequence of the amine depletion in the storage vesicles of the sympathetic nerve terminals, the amount of the available catecholamines is not sufficient in order to maintain normal neuro-humoral transmission between nerve endings and adrenergic (or dopaminergic) receptors. Hypofunction of the adrenergic sys tem, sedation and extrapyramidal symptoms may result.

4. Phenothiazines and Related Neuroleptics

These drugs (e.g. chlorpromazine, chlorprothixene, haloperidole) enhance a) the increase of cerebral catecholamine metabolites (e.g. phenolcarboxylic acids) after injection of ^{14}C-dopa, and b) the rise of 3-methoxy-tyramine and normetanephrine following treatment with MAO inhibitors. In addition, chlorpromazine counteracts the accumulation of cerebral ^{14}C-NE due to injection of ^{14}C-dopa without affecting the level of endogenous NE. These effects are independent of the hypothermia produced by the drug.

The neuroleptics probably interfere with the trnasport of the catecholamines to the storage sites and to the adrenergic receptors. Lack of protection of newly formed amines by storage or a possible compensatory enhancement of the NE synthesis might lead to an increase of deaminated or O-methylated metabolites such as mentioned above. Furthermore, interference with the transport of NE to the adrenergic receptor (adrenergic blockade) would explain the antiadrenergic and in part the sedative effect of phenothiazines and

related compounds, whereas impairment of the transport of dopamine is possibly responsible for the extrapyramidal symptoms.
The causal connection of the psychotropic effects with the alterations of the metabolism of cerebral monoamines remains to be further elucidated. The following difficulties complicate the problem:

a) species differences in the effect of the drugs on monoamine metabolism
b) different action of the drugs on the monoamines in the central nervous system and in the periphery (e.g. in liver)
c) biochemical drug effects other than on monoamine metabolism (e.g. inhibition of other enzymes, interference with glucose metabolism)

外－5

THE INTERACTION OF INJECTED RESERPINE AND DIHYDROXYPHENYLALANINE OR D-AMPHETAMINE ON ELECTROPHYSIOLOGICAL AND BEHAVIORAL RESPONSES IN A CONDITIONED APPROACH SITUATION IN THE CAT.

K. F. Killam, E. K. Killam & L. S. Seiden. Dept. of Pharmacology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, Calif., U.S.A.

Numerous studies have implicated alterations in cathechol and indole amine levels in brain as a basis for the action of reserpine on the central nervous system. Injection of dihydroxy-phenylalanine (DOPA), the metabolic precursor of dopamine and noradrenaline, induces temporary reversal of reserpine-induced suppression of spontaneous motor activity (Blaschko & Chrusciel, J. Physiol., 1960; Carlsson & Lindqvist, Acta physiol. scand., 1962; Smith & Dews, Psychopharmacologia, (1962). This reversal of the effect coincides with increased levels of dopamine in brain. It has also been shown that L-DOPA can temporarily antagonize the reserpine-induced suppression of the conditioned avoidance response, and that the antagonism coincides with the accumulation in brain of dopamine but not noradrenaline (Seiden and Carlsson, Psychopharmacologia (Ber l.), 1964; Seiden & Hanson, Psychopharmacologia, 1964).

The present studies were undertaken to investigate 1) the influence of reserpine on electrophysiological responses to a visual conditioned stimulus, and the correlated positively reinforced behavioral responses to the same conditioned stimulus; and 2) to study the antagonism of the reserpine effects on the EGG and behavior by L-DOPA and d-amphetamine.

Cats were conditioned to press one of three panels in response to an illuminated pattern presented on the panel at a frequency of ten times per second. Each correct response was positively reinforced. Before training, recording electrodes were implanted in all cats in the visual system: lateral geniculate nucleus, lateral gyrus; in rhinencephalic structures: amygdala, hippocampus and/or entorhinal cortex; in thalamic nuclei: centralis lateralis,

centre median, ventralis lateralis or pulvinar; in reticular formation, in association cortex; and in one or another of the following: medial forebrain bundle, ventro medial hypothalamus, superior colliculus, nucleus reuniens. No more than 8 pairs of 32-gauge wire electrodes were used per animal and all were confirmed histologically at the end of the experiments.

One hundred micrograms per kg. reserpine reduced or eliminated correct performance at all discrimination levels and induced general depression, miosis, relaxation of the nictitating membrane and some diarrhea within 12 hours which lasted for periods of two or three days. DOPA at a dose of 100 mg/kg reversed the pharmacologically-induced side effects mentioned above and normalized spontaneous behavior in all cats; in contrast, in only 1 animal could the inhibition of conditional behavior be reversed.

D-amphetamine at 0.5 mg/kg in all the cats also strikingly reversed the peripheral signs of reserpine action including the general depression of spontaneous behavior. In more than half the animals amphetamine also reversed the depression of conditional responses.

These behavioral results were not dependent on the nature of the conditional stimulus or the discrimination involved. In different animals the discrimination required was either 1) one pattern (light-dark discrimination); 2) the most intense of two similar patterns (light-flux discrimination); or 3) one of two or three different illuminated patterns (form-pattern discrimination).

The electroencephalogram under reserpine showed low voltage, fast activity similar to that usually described and also bursts of high voltage potentials particularly in the anterior suprasylvian gyrus. The latter were dramatically suppressed by the action of DOPA, so that the electrical activity appeared normal. The high voltage waves reappeared in 2 to 6 hours along with the peripheral signs of reserpine action. The temporary nature of the DOPA effect is most readily explained by the fact that following DOPA injection eleva-

tion of dopamine in brain is temporary, particularly in reserpinized animals. Amphetamine similarly reversed the reserpine effect on spontaneous activity in the cortex.

Electrophysiological potentials evoked by the conditioned stimulus were analyzed by visual inspection and, using a LINC computer, by running average, auto correlation and pattern recognition computations. Alterations in form and regularity of potentials evoked in lateral geniculate and optic cortex, enhancement of 40 cps activity in the amygdala and marked enhancement of reticular responses were induced by reserpine administration. These, as well as changes in various other brain areas, were reversed by DOPA for periods up to 6 hours. The changes in electrical responses induced by reserpine were also reversed during the period of the amphetamine-reversal of spontaneous and conditional behavior. Reserpine patterns reappeared as the amphetamine effect abated.

This investigation was supported in part by Public Health Service Research Grant No. MHO 3241 from the National Institute of Mental Health and Grant No. DA18-108-AMC-63-208(A) from the Army Chemical Corps.

MEMO

MEMO

MEMO

編集委員（ＡＢＣ順）

鳩谷　龍　　川北　幸男　　高坂　睦年　　黒川　正則
成瀬　浩　　佐野　勇　　佐藤　倚男　　高垣玄吉郎
高橋　良　　高橋　康夫　　塚田　裕三　　宇尾野公義

昭和40年8月23日 印刷
昭和40年8月25日 発行

神経化学　別巻

編集者　（代表）塚田　裕三
編集所　東京都大田区大森西5丁目21番地
東邦大学医学部第二生理学教室内　神経化学懇話会
表紙印刷　東京都北区西ヶ原3丁目46番地　杏林舎
印刷及製本　東京都文京区後楽1丁目5番地　(株)中央商会
発行者　緒方秀雄
発行所　東京都文京区曙町11番地　緒方書店

本会員以外の方で本誌の希望者は，実費でお頒けしますから，上記の編集所宛にお申出下さい．

神 経 化 学　VOL. 4 SUPPLEMENT

第8回神経化学懇話会抄録集

昭和40年9月16日（木）
17日（金）
18日（土）

於　全共連ビル

外人招待講演

一般演題

緒 方 書 店 刊