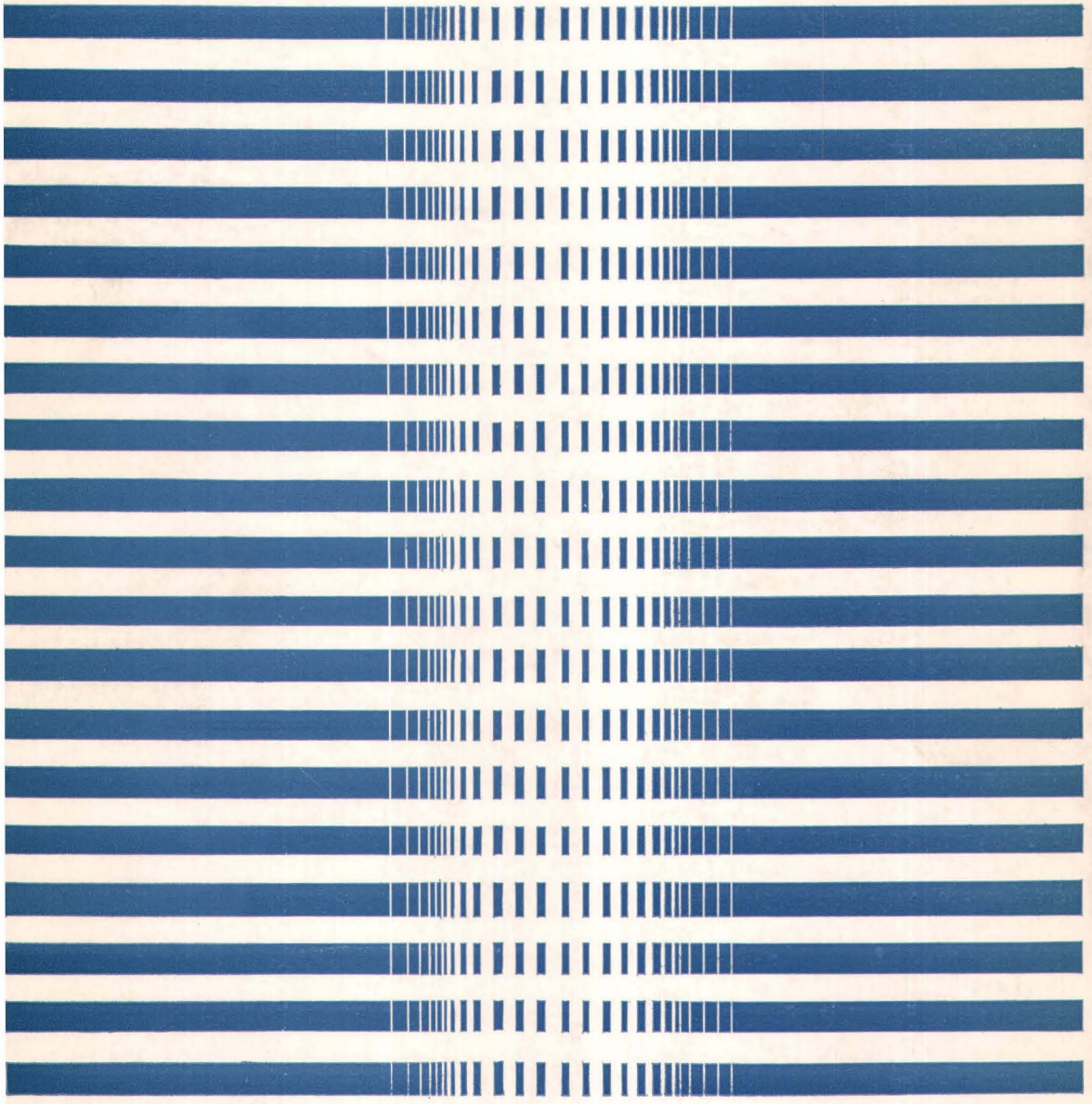
神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第13回 日本神経化学会抄録集



Vol. 9 Supplement 1970

日本神経化学会

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第13回日本神経化学会

於　岡　山

10月16日(金), 17日(土)

Vol. 9 Supplement 1970

日 本 神 経 化 学 会



目　　次

1. 脳細胞膜の脱分極とcyclic AMPの形成 …… 1

清水宏俊

（熊大・医・一薬理）

2. 自律神経と肝グリコーゲン合成 …… 5

嶋津　孝・天川　葵

（阪大・医・解剖）

3. 細胞核蛋白質燐酸化反応と3′, 5′-cyclic AMP …… 9

山村博平・武田誠郎

公文　明・中江活子

西塚泰美

（神大・医・二生化）

4. ラット脳より得たphosphodiesterase活性に対するカルシウムイオンの調節作用：脳のcyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesteraseに関する研究(Ⅱ)…… 13

垣内史朗・山崎礼子

（大阪府立中宮病院）

5. 中枢神経機能調節因子の研究－cyclic AMP, histamine, prostaglandinの動物行動に対する影響について－ …… 17

麻川武雄・川崎晃義

吉田　博

（阪大・医・一薬理）

6. 脳切片からのアセチルコリン遊出にたいするdibutyryl cyclic 3′, 5′-AMPの影響について …… 21

勝木昭次・三木直正

松田友宏・畑　文明

吉田　博

（阪大・医・一薬理）

7. アレコリンの脳アセチルコリン増量効果について …… 25
堀　真一郎・片岡喜由
（京大・医・生理）

8. シナプトゾームにおける（^{14}C）-アセチルコリンの合成と放出 …… 28
芳賀達也
（東大・理・生物化学）

9. ^{3}H -Dimetacrineの神経終末顆粒における存在様式について …… 32
石谷良一・斉藤堅太郎
（日立化学・研究部）
須賀哲弥　（東薬大）
北川晴雄　（千大，薬）
佐藤哲男（千大・腐敗研）

10. カテコールアミン生合成に関する研究－脳尾状核のチロシン水酸化酵素 …… 36
永津俊治・須藤幸子
（愛知学院大・歯・生化）
永津郁子
（愛知看護短大・解剖生理）

11. ラット脳幹網様体におけるnorepinephrine，5-hydroxytryptamineおよび
5-hydroxyindole-3-acetic acid量とその断眠時の変動 …… 40
融　道男・渋谷治男
小屋明子・島薗安雄
（東医歯大・医・神経）

12. p-Chlorophenylalanineによる中枢serotonin depletionと動物行動 …… 44
田中千賀子・余　寧子
伊藤博子・高折修二
（京大・医・薬理）

13. 脳内モノアミン代謝におよぼすパラクロロメチルアンフエタミンの影響 …… 48
小林暉佳・吉原　林
長尾佳子・加藤伸勝
（都立松沢病院）

14. 脳の脂質代謝・I－in vivoで与えたsodium acetate－1－^{14}Cの
14日マウス脳脂質への取り込み－ ····· 52
金沢一郎・植田伸夫
山川民夫
（東大・医・生化）

15. 発育期における脳の燐脂質の代謝 － phosphatidyl cholineについて－ ····· 56
千田信和・荒川雅男
（東北大・医・小児）

16. ブタ脊髄におけるsphingoplasmalogenとgalactosyldiglyceride····· 60
久保田　勝
（信大・医・二生理）
武富　保
（信大・医・順応研・生化）

17. Gangliosidesの神経細胞内分布について ····· 64
松川恵子・玉井洋一
佐武　明
（新大・脳研・神経化学）

18. Gaucher病患者の肝・脾・脳の糖脂質について ····· 68
武富　保・河村成子
（信大・医・順応研・生化）

19. Schilder病および一酸化炭素中毒患者の凍結保存脳ミエリンの生化学的特性····· 72
小宮義璋・笠原道弘
（東大・医・脳研・生化）

20. Astrocyte特異抗原（astroprotein）について ····· 75
森　武貞
（阪大・医・二外科）

21. 牛脊髄および末梢神経myelinの構成蛋白について …… 79

植村慶一・戸張千年

平野修助

（東邦大・医・二生理）

22. 実験的甲状腺機能低下症におけるラッテ脳蛋白合成の阻害 …… 83

山上　栄・森　浩一

川北幸男

（阪市大・医・精神）

23. 脳細胞核におけるRNAとその合成 …… 87

高橋康夫・荒木一明

鈴木雄二

（新大・脳研・神経化学）

24. ウシ脳からのN, N′-ビス（2-カルボキシエチル）-1, 4-ジアミノブタンの分離同定 …… 91

今岡信夫・松岡征夫

（阪大・医・高次研・神経）

25. 牛脳蛋白質分画よりN^G-モノメチル, N^G, N^G-ジメチルおよびN^G, N'^G-ジメチルアルギニンの分離同定 …… 94

中嶋照夫・柿本泰男

松林武之・松岡征夫

今岡信夫

（阪大・医・高次研・神経）

26. ラットにおける蛋白分画中のメチルアルギニンの体内，細胞内および核内分布について …… 98

松岡弘夫・中嶋照夫

（阪大・医・高次研・神経）

27. 脳のタウロシアミンに関する研究 …… 102
水野　晃・戴　礼忠
陣内伝之助
（阪大・医・二外科）
森　昭胤
（岡大・医・脳代謝研）

28. 実験的高アミノ酸血症：脳蛋白合成ならびに脳内遊離アミノ酸の変動 …… 106
高田五郎・多田啓也
（東北大・医・小児）

29. Miniature pigでの乳幼期における実験的高フエニールアラニン血症について …… 110
平野修助・相馬紀夫
中島昌子・植村慶一
長村洋三
（東邦大・医・二生理）

30. 脳組織の好気的解糖の調節機構 …… 114
高垣玄吉郎
（慶大・医・生理）

31. 各種機能状態における脳のTCAサイクルおよび関連物質の代謝の研究 …… 118
永山素男・成瀬　浩
（国立精神衛生研）
宮本侃治
（国立武蔵療養所）

32. 密度勾配遠沈法による白鼠大脳皮質からの分離細胞群の生化学的研究 …… 122
永田　豊・御子柴克彦
塚田裕三
（慶大・医・生理）

33. 標準灌流および血流障害時の〔U-^{14}C〕-アラニンの脳代謝 …… 126
渡辺昌祐・鈴木常夫
光信克甫・河野沢与
井口欽也・三宮崇典
大月三郎
（岡大・医・精神）

34. 強制不眠性疲労マウスの脳ホモジエネートの呼吸について …… 130
三尾隆弥・倉地守
（神戸商大・生物）

35. 脳腫瘍の組織呼吸ならびに蛋白代謝 …… 134
中沢省三・平岩奈美子
宮沢登・駒井裕一
小林啓志・植木幸明
（新大・脳研・脳外科）

36. ラット脳 Na^+-K^+ ATPase に対するGABAの影響 …… 137
波間美佐子・斉藤章二
（日大・医・薬理）

37. 脳由来株細胞のビタミンB_{12}関与メチオニン生合成－とくにメチル基転換酵素について …… 141
中沢恒幸・吉羽喜久江
高杉正
（慶大・医・精神）

1. 脳細胞膜の脱分極とcyclic AMPの形成

清水宏俊（熊大・医・一薬理）

垣内，Rall らの業績により，カテコールアミン，ヒスタミン，高カリウム，通電刺激等が脳スライス内 cyclic AMP (adenosine 3',5'-cyclic monophosphate) 値を著しく上昇させることがわかった。アミン効果は Theophylline 添加により増強されるが[1]，高カリウムや通電刺激による効果は Theophylline によって抑制されること等から[2,3]アミン効果と後者との間に作用機作の差が指摘された。前者は「アデニルシクラーゼの allosteric site に働く effector」との仮説に矛盾しないが，後者の作用機作は不明であった。著者らは脳スライス内 cyclic AMP 値の変動を知る簡便法を考案し[4]，この方法を用いて一連の脱分極剤（神経細胞膜の resting potential の減少を招く薬剤群）が高カリウムや通電刺激と同様な機作で cyclic AMP 値を上昇させることを見出した。さらに，膜安定剤，Ca^{++} イオン，代謝阻害剤等を用いた実験から，「脳スライス内 cyclic AMP 値の上昇にあずかる基本的因子は神経細胞膜の脱分極である」との結論を得た。

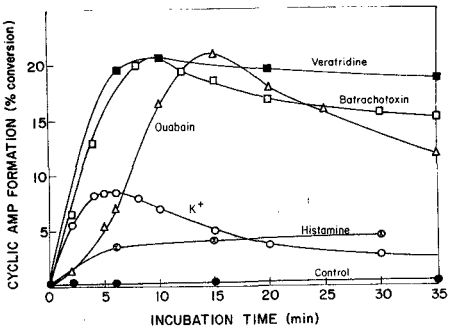
〔実験方法〕

本実験を通じて用いられた脳標品は，各種動物の大脳皮質灰白質部より得た厚さ 0.25 mm のスライスである。脱血致死よりスライス作成までを 5～6 分以内に 0～5 °C で行ない，スライスは直ちに O_2－CO_2 (95:5) 通気下の Krebs-Ringer-Bicarbonate-Glucose (NaCl, 122mM; KCl, 3mM; $MgSO_4$, 1.2mM; $CaCl_2$, 1.3mM; KH_2PO_4, 0.4mM; D-glucose, 10mM; $NaHCO_3$, 25mM; KRBG と略す) に移された。15分間のプレインキュベーションの後，スライスは 1.5μCi のアデニン－8－^{14}C (13.3μM) を含む KRBG 中で 40 分間インキュベートされ (pulse-labeling)，次に ^{14}C を含まない KRBG で洗った後，アミンや脱分極剤等を含む KRBG に移して，スライス内 cyclic AMP-^{14}C の形成を測定した。このように形成された cyclic AMP-^{14}C の精製，同定，測定法に関しては既に発表した[4]。上述のように pulse-label されたスライス内 ^{14}C の 95% 以上はアデニンヌクレオチド（ほとんど ATP）として存在する。この ATP-^{14}C のプールは細胞内全 ATP の 5% 以下を占める小さなものであるが，このプールはアデニルシクラーゼに特異的に密接しており，また pulse-label されたスライスを更に 50分，KRBG 中でインキュベートしても ATP-^{14}C と他の細胞内 ATP との混合は見られないことから，非常に安定したプールであることがわかる[5]。cyclic AMP の形成は，スライス内に取り込まれた全 ^{14}C のうち一定時間内に cyclic AMP に転換した量をパーセントで示した。

〔結果と考察〕

(1) <u>脱分極剤の効果</u>： 細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na]_i$) の上昇と，それにともなう細胞内 K^+ 濃度 ($[K]_i$) の減少を来たす種々の薬剤は膜脱分極剤 (depolarizing agents or membrane labilizer) として働くことが神経筋標品を用いた電気生理学的および薬理生化学的手技により知られている。ouabain は膜 ATPase および Na ポンプを阻害することにより，veratridine は膜の Na^+ 透過性 (P_{Na}) を増すことにより，共に上記のイオン濃度変化を招来する脱分極

剤である。Batrachotoxin は veratridine と同様な膜作用を有するが，神経終末部により特異的に作用する[6]。この三種の脱分極剤は脳スライスからのアセチルコリン遊出をも促進するので[4]脳でも神経細胞膜の脱分極を生ずると考えられる。これら脱分極剤はマウス，ラット，モルモット，家兎，赤毛ザル，ヒト等の大脳皮質での cyclic AMP 形成を 10～100倍促進した[10]。モルモット脳では batrachotoxin が最も活性が強く ($ED_{50} = 1 \times 10^{-7}$M)，veratridine，ouabain がこれに次ぎ，三者共 cyclic AMP への最高転換率は 20% 前後であった。これに反しアミン類による最高転換率は 5% 以下であった。モルモット大脳での veratridine (0.05mM)，batrachotoxin (0.002mM)，ouabain (0.05mM)，histamine (1.0mM)，K^+ (30mM) による効果の時間経過が上図に示されている[10]。



tetrodotoxin，saxitoxin 等の神経伝達遮断作用の機作は P_{Na^+} の低下にあることが知られている。tetrodotoxin (0.05mM) の存在下にスライスを脱分極剤と共にインキュベートすると，veratridine や batrachotoxin の cyclic AMP 形成促進作用はほぼ完全に抑えられ，ouabain の作用は約 50% 抑えられたが，高 K^+ やアミンによる cyclic AMP 形成作用は抑えられなかった（モルモットおよび家兎）。この知見は veratridine や batrachotoxin が，その P_{Na^+} 上昇作用により cyclic AMP 形成を促進することと一致する。メジウム中の Na^+ を著しく低下させることによっても，veratridine と batrachotoxin の cyclic AMP 形成促進作用は特異的に減弱させられた。なお，ouabain (10^{-4}M) と batrachotoxin (10^{-6}M) は脳ホスホジエステラーゼ活性（30,000 g，30 min 上清，基質 cyclic AMP，$10^{-6} \sim 10^{-4}$M）に対しては阻害作用がなかった。

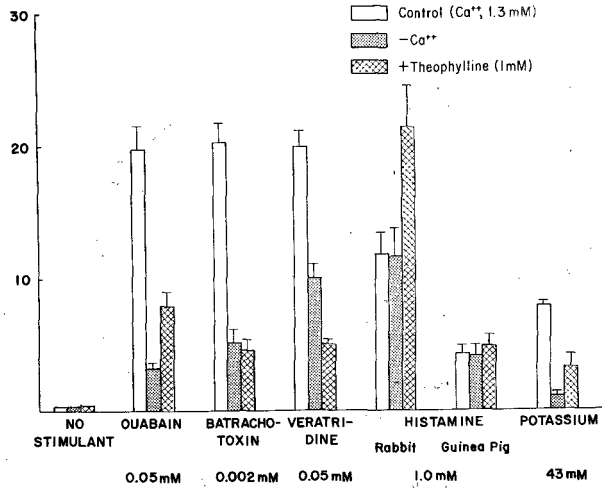
(2) <u>一価陽イオンの効果</u>：細胞膜の内と外との電位差は $\log [K]_i/[K]_o$ によりほぼ決定されるので，細胞外液（＝メジウム）中の高 K^+ もまた脱分極的に働く。Sattin と Rall[2] は 40mM K^+ が脳スライス内 cyclic AMP 値を上昇させることを報告したが，著者らの方法でも同様の高 K^+ 効果が観察された。KRBG 中の Na^+ を K^+ で置換することにより $[K]_o$ を 0 → 150mM と漸増すると，cyclic AMP 形成に対する作用は $[K]_o$ = 25mM より観察され，その後 $[K]_o$ の増加に平行してほぼ直線的に増強される（モルモット）。この $[K]_o$ による変化は Hodgkin[7] がヤリイカ軸索を用いて測定した膜電圧の変化とほぼ一致し，cyclic AMP 形成が脱分極の程度と平行することを示している。$[K]_o$ = 125mM による cyclic AMP 形成の最大値の半分に要する時間は 1～2分であった。これに反し，最大値に達したスライスを $[K]_o$ = 3mM のメジウムに移して観察した cyclic AMP ^{14}C の半減期は約 10分であった。このことは高 K^+ による cyclic AMP 値の上昇はホスホジエステラーゼの阻害によるのではなくてアデニルシクラーゼの活性化によることを示唆する。その他の一価

添加物*		Na^+ 濃度**	Cyclic AMP 形成
カリウム	43 (mM)	85 (mM)	7.4, 8.0 (%)
	125	0	14, 16
	125	10	21, 24
アンモニウム	122	25	8.3, 6.8
	147	0	4.7, 3.5
テトラメチル-アンモニウム	100	140	0.2, 0.3
	147	0	6.8, 5.7
コリン	122	25	0.2, 0.3
	147	0	8.4, 6.2
リチウム	122	25	1.1, 1.5
	147	0	0.3
しょ糖	147	0	3.2, 4.1
	147	5	1.0

* しょ糖以外は塩化物
** KRBG 中 NaCl（必要あれば $NaHCO_3$ も）を減らした

陽イオンも高濃度では効果があるが，Na^+の有無に著しく左右された(モルモット)。

(3) Theophylline添加効果およびCa^{++}除去効果： 下図に示す如く[10]，ouabain, veratridine, batrachotoxin, 高K^+等によるcyclic AMP形成の促進はTheophylline添加によりいずれも抑えられる(モルモット)。これに反しヒスタミンによる影響はTheophyllineにより増強される(家兎)か不変(モルモット)である。KRBG中から$CaCl_2$を除くと，これら脱分極剤のcyclic AMP形成作用は著しく抑えられるが，ヒスタミン効果にはかかるCa^{++}依存性は認められない。これらの知見は脱分極によるcyclic AMP形成促進がアミン類によるものとは別の範疇に属することを支持する。Ca^{++}を含まないKRBGにEGTA (2.0mM)を加えると脱分極剤効果はほぼ完全に消失し，ヒスタミン効果も半減する。これに$MgSO_4$ (3.0mM)を過剰に添加するとヒスタミン効果は140%回復し，高K^+効果やbatrachotoxin効果も70-80%回復するが，ouabain効果は全く回復しなかった。

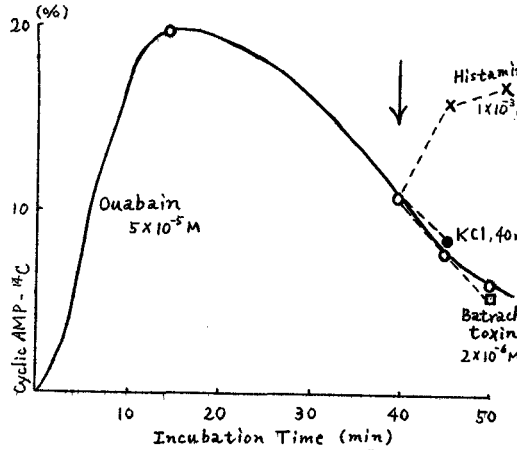


(4) 代謝阻害剤および膜安定剤の影響： 高カリウムやveratridineは大脳スライス中の呼吸および解糖を促進することが知られている[8]。観察されたcyclic AMP形成の促進も，こうした条件下で代謝亢進→酸化的リン酸化の促進→ATPの増加→アデニルシクラーゼ基質の増加とホスホジエステラーゼ阻害，という一連の反応の結果とも考えられる。しかしveratridineの解糖作用を50%以上抑えるマロン酸10mM[9]を添加してもveratridineのcyclic AMP形成に対する作用は変らなかった(右図)。ジニトロフェノールやヨード酢酸はアミンによるcyclic AMP形成をも抑制した。コカイン，ドラマラン等の局所麻酔剤は膜安定作用を有し，ouabain, veratridine等と拮抗することが神経筋標品を用いた電気生理学的実験により知られている。これら膜安定剤はveratridineや高K^+によるcyclic AMP形成促進作用を70~80%抑制したが，ヒスタミンによる作用には影響しなかった。これらの知見，およびouabain (10^{-5}M)は脳スライス内ATP値を低下させること，K^+によるcyclic AMP形成促進は1~2分で10倍以上に達することもあること，Ca^{++}やTheophyllineとの相互関係等から考えて，脱分極剤によるcyclic AMP形成の促進が，上述の代謝亢進による二次的結果とは考え難い。

添加物*	刺激剤			
	なし	ベラトリジン (0.08mM)	K^+ (43mM)	ヒスタミン (1.0mM)
	cyclic AMP-^{14}C の形成 (%)			
なし	0.2	19	8.1	2.9
マロン酸(10mM)	0.2	20	—	3.0
DNP (0.1mM)	0.6	0.7	—	0.5
ヨード酢酸(1mM)	0.2	0.2	—	0.3
コカイン(1mM)	0.2	3.1	1.7	2.7
ドラマラン(1mM)	0.2	1.9	1.8	3.1

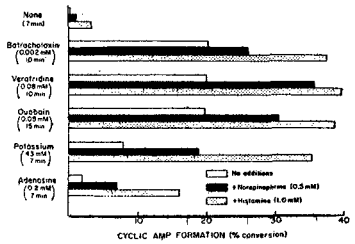
材料はモルモット大脳皮質
* 代謝阻害剤は刺激剤添加の2分前に加えた

(5) アミンと脱分極剤との相乗的協力作用： ouabain (5×10^{-5}M)存在下に40分間インキ



ユベートしたスライスに，batrachotoxin や KCl を添加してもこれらの効果はみられないが，ヒスタミンを加えると著しい効果がある(左図，モルモット)。この結果は，(1)で述べた時間経過に伴なう cyclic AMP-^{14}C 値の低下が，ATP-^{14}C の枯渇に由来するものでないことを示すと同時に，脳内 cyclic AMP 形成促進にあずかる因子がアミン類と脱分極とに大別されることを支持する。

垣内と Rall はノルエピネフリンとヒスタミンの相加的協力作用を報告し[1]，両者の作用する effector site が異なることを示唆したが，アミンと脱分極剤とを最高刺激濃度で併用すると相乗的協力作用が観察された(左図，モルモット，同様の相乗効果はヒトを含む6種の哺乳動物で確かめられた)。協力作用を示すアミンには，この他セロトニン等があるが，ドーパミンやアセチルコリは作用がない。



〔要約〕

① adenine-8-^{14}C で pulse-label された大脳皮質切片を用いて，種々の条件下での cyclic AMP-^{14}C の切片内での形成を測定した。

② ouabain, veratridine, batrachotoxin, 高濃度 KCl など作用機作の異なる種々の脱分極剤が一様に大脳皮質スライス内での cyclic AMP 形成を促進することが，ヒトを含む数種の哺乳動物で確かめられた。veratridine と batrachotoxin の効果は tetrodotoxin 等で特異的に阻害される。高 K^+ 効果はその脱分極効果に比例する。

③ 脱分極剤による cyclic AMP 形成の促進は，膜安定剤(コカイン等)や Theophylline の添加によって抑制され，メジウム中に Ca^{++} を必要とする。ノルエピネフリンやヒスタミンによる cyclic AMP 形成促進は，膜安定剤や Ca^{++} の有無には左右されず，Theophylline 添加で僅かに増強される。

④ 脱分極剤とアミン類とは cyclic AMP 形成に対して相乗的協力作用を示す。

(本実験の大部分はアメリカ合衆国，NIH において Dr. J. Daly との協同研究でなされた。)

〔文献〕

1. Kakiuchi, S. and Rall, T. W., Mol. Pharmacol. 4, 367, 379 (1968).
2. Sattin, A. and Rall, T. W., Fed. Proc. 26, 707 (1967).
3. Kakiuchi, K., Rall, T. W. and McIlwain, H., J. Neurochem. 16, 485 (1969).
4. Shimizu, H., Daly, J. W. and Creveling, C. R., J. Neurochem. 16, 1609 (1969).
5. Shimizu, H., Creveling, C. R. and Daly, J. W., Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.) 65, 1033 (1970).
6. Albuquerque, E. X., Warnick, J. E., Daly, J. W., Tokuyama, T., Shimizu, H. and Witkop, B., Science. In press.
7. Hodgkin, A. L., Biolog. Rev. 26, 239 (1951).
8. Elliott, K. A. C. and Wolfe, L. S., In: Neurochemistry, 2nd edition, edited by K. A. C. Elliott, I. H. Page and J. H. Quastel, p. 177. C. Thomas, Springfield, Illinois (1962).
9. Quastel, F. H., Enzymatic mechanisms of the brain and the effects of some neurotropic agents. Proceedings of the 4th International Congress of Biochemistry, 3, 90 (1958).
10. Shimizu,H., Creveling,C.R., and Daly,J.W., Mol. Pharmacol., 6 184 (1970)

2. 自律神経と肝グリコーゲン合成

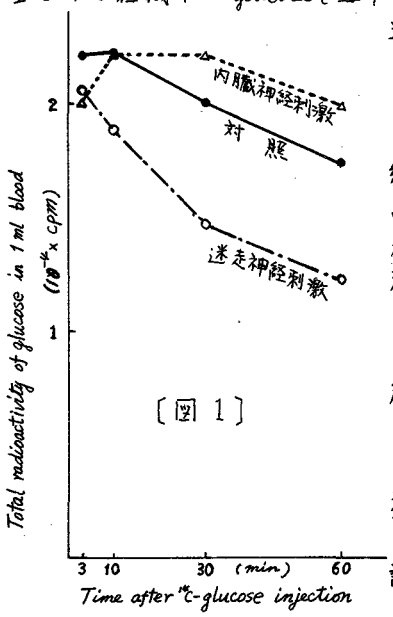
嶋津　孝・天川　葵
（阪大・医・解剖）

数年来、私共は家兎の肝グリコーゲン代謝が自律神経の直接的な支配を受けている事実について報告してきた。[3~7] 即ち、交感神経系（中枢ならびに末梢）を電気的に刺激すると、肝グリコーゲンの分解を司るphosphorylase, G6Paseが瞬間的に活性化され、肝グリコーゲンを分解して血糖を上昇させる。交感神経のもつこの作用はカテコールアミンの作用と種々の点で異っているので、酵素に対する神経性の調節であると考えた。

一方、副交感神経系を電気的に刺激すると、肝グリコーゲン合成の律速段階であるglycogen synthetase（G.S.と略す）が活性上昇を来たし、グリコーゲン合成を促して血糖を低下させる。この成績の一部は既に報告したが[3]、今回は肝グリコーゲン合成と自律神経の作用との関係を一層明確にするため、血糖の利用率、肝グリコーゲンの合成速度およびUDPG, G6Pの肝細胞内濃度、ならびにG.S.に対する自律神経系ことに副交感神経の影響についてさらに検討を加えた。

(1) 血糖の利用率ならびに肝グリコーゲン合成速度に及ぼす自律神経の影響

図1は麻酔開腹下に家兎の門脈から^{14}C-glucose（100μc, 3m moles）を注射後、時間を追って大腿静脈から採血し、1mlの血液中に残存するglucoseの放射能を測定した結果である。対照動物に比し、迷走神経刺激家兎では全放射能の低下が著しい。血糖値は1時間の実験期間中280~260mg/dlに維持されており、減少は軽度であるので、肝臓を主とする組織中のglucoseと血中glucoseとのexchangeが迷走神経の刺激によって促進すると考えられる。内臓神経刺激では逆にexchange rateは減少する。



〔図1〕

表1は^{14}C-glucoseを注射してから30分、60分間に肝グリコーゲン中へ取り込まれた放射能を測定した実験結果である。1mgグリコーゲン当りのglucoseの取り込みは対照動物に比して内臓神経刺激群で抑えられ、迷走神経刺激群で著しく促進する。グリコーゲン量は迷走神経刺激によってかなり増加するので、1gの肝臓当りグリコーゲンに転換されたglucoseの量はさらに大きくなる。迷走神経刺激によってインシュリンの分泌が起る可能性を除外するため、予め膵摘除を行った動物でもグリコーゲン合成速度は著しく亢進した。

(2) 肝細胞内UDPGならびにG6Pの含量に及ぼす自律神経の影響

上と同一条件の下でグリコーゲン合成過程の中間代謝産物であるUDPGならびにG6Pの肝内濃度を測定してみた（表2）。対照動物では門脈よりglucose注射後60分でUDPG, G6P共に軽度の減少を示すに過ぎないが、迷走神経刺激群では30分後で、

〔表1〕^{14}C-glucose の肝グリコーゲン中への取り込みに及ぼす自律神経の影響

	^{14}C-glucose 注射 30分後			^{14}C-glucose 注射 60分後		
	cpm/mg glycogen	mg glycogen per g. liver	10^3 x μmoles glucose incorporated per g. liver	cpm/mg glycogen	mg glycogen per g. liver	10^3 x μmoles glucose incorporated per g. liver
対照家兎	1128	5.4	224	2313	8.3	707
内臓神経刺激	884	4.5	147	1587	4.8	281
迷走神経刺激	5645	9.9	2059	12000	12.8	5660
腎摘除+迷走神経	4023		1468	8864		4182

（神経刺激は実験期間中継続）

〔表2〕自律神経刺激による肝細胞内 UDPG ならびに G6P 含量の変動

	UDPG 濃度 (μmoles/g. liver)			G6P 濃度 (μmoles/g. liver)		
	glucose 注射前	30分後	60分後	glucose 注射前	30分後	60分後
対照家兎	0.445	0.438	0.393	0.241	0.250	0.222
内臓神経刺激	0.457	0.420	0.457	0.251	0.247	0.293
迷走神経刺激	0.434	0.202	0.160	0.240	0.104	0.106

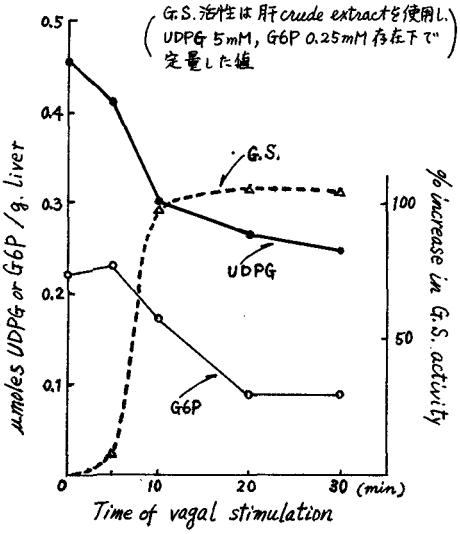
（UDPG量は UDPG dehydrogenase, NAD 存在下に、G6Pは G6P dehydrogenase, NADP 存在下で enzymatic に定量した）

すでに著しい減少が認められた。内臓神経刺激群では両基質共ほとんど変化しない。

この実験結果から、迷走神経刺激による肝グリコーゲン合成の促進はグリコーゲン合成に必要な肝内基質量を増加させ代謝系を合成の方向におしやる push mechanism によると考えるよりは、グリコーゲン合成経路の最終段階（G.S.）を活溌化させ代謝系を合成の方向にひっぱる pull mechanism であると考えられる。このことは次に示す実験結果からも明らかになった。

即ち、図2は glucose 投与を行わない時の UDPG および G6P 濃度、ならびに G.S. 活性の変化と迷走神経刺激時間との関係を示したもので、G.S. 活性は刺激10分で maximum となるが、これと時間的にほぼ平行して UDPG は急速に減少する。G6P の減少は UDPG よりも時間的にやゝ遅れる。

〔図2〕迷走神経刺激による肝内 UDPG, G6P 濃度および G.S. 活性変動の時間的経過



(3) 肝 glycogen synthetase (G.S.) に対する自律神経の影響

すでに報告したように(3.7)、肝 G.S. は迷走神経の刺激によって著明な活性上昇を来し、内臓神経の刺激では逆に軽度の活性低下を来す。

肝 G.S. に関する最近の知見によると[1,2]、この酵素には活性型と非活性型とが存在する。この酵素の活性はまた、G6P の濃度によって著明な影響を受け、両型とも G6P の存在によって基質である UDPG に対する Km が著しく小さくなることが知られている。活性型は非活性型に比して UDPG および G6P との親和性が強く、低濃度の UDPG および G6P の下でも酵素活性を発揮できるのに対し、非活性型は高濃度の UDPG あるいは G6P が存在しないと酵素活性を発現しない。

〔図3〕種々な濃度下における肝 G.S. 活性の UDPG に対する double reciprocal plots

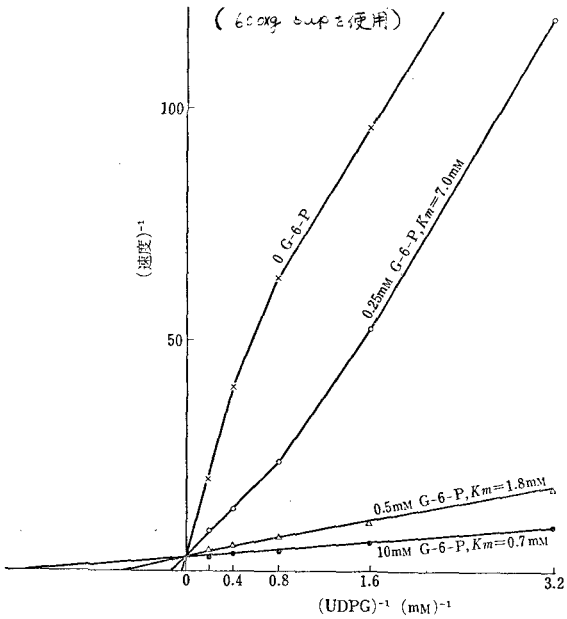
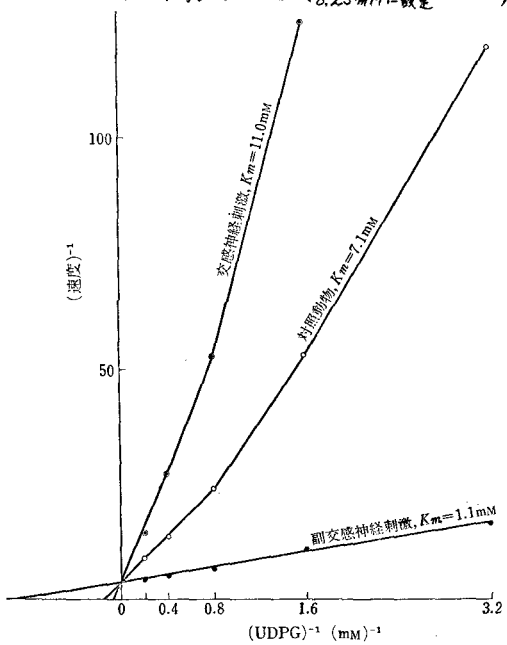


図3は正常家兎の肝 crude extract (600xg 遠心上清) を用いて G.S. の UDPG に対する Km 値に及ぼす G6P の効果を検討した実験結果である。G6P 濃度を増加させるにつれて UDPG に対するこの酵素の Km は小さくなるが Vmax は変らないことを示している。G6P の肝細胞内濃度と考えられる 0.25mM 付近では UDPG に対する酵素の Km 値は図から計算すると 7mM となり、これは UDPG の肝細胞内濃度 (0.5mM 前後) をはるかに越えている。したがって生理的条件下ではこの状態の酵素はほとんど働いていないと考えてさしつかえない。おそらく正常肝では大部分が非活性型酵素として存在するものと思われる。

〔図4〕肝 G.S. の UDPG に対する Km 値に及ぼす自律神経刺激の影響 (600xg sup 使用, G6P 濃度 0.25mM に設定)



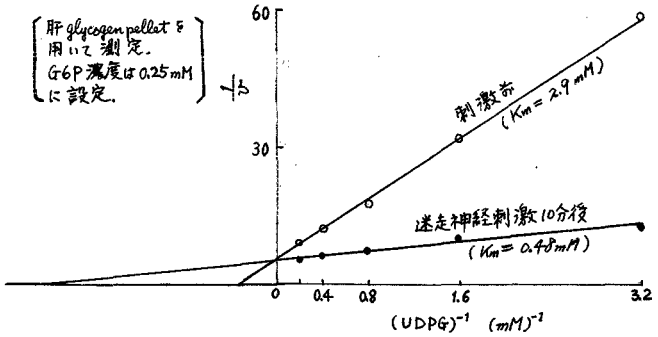
この酵素に対する自律神経の刺激効果を調べると、図4に示すように 0.25mM G6P 存在下で求めた基質 (UDPG) に対する Km 値は迷走神経刺激によって対照値の約 1/3 となり、反対に内臓神経刺激の場合には Km は若干大きくなる。しかしながら Vmax, 即ち全酵素量は、いずれの神経刺激によっても変化ない。

迷走神経刺激を行う前後の肝臓について部分的に精製した酵素 (glycogen pellet) を用い、UDPG に対する正確な Km 値を求めると (図5, G6P 濃度は 0.25mM), 刺激前値 2.9mM に対して

刺激10分後には0.48mMに低下した。一方、生理的な基質濃度(0.5mM)の下で、この酵素のG6Pに対するKm値を求めると、(図6)刺激前値0.7mMに対して迷走神経刺激10分後には0.22mMに低下した。

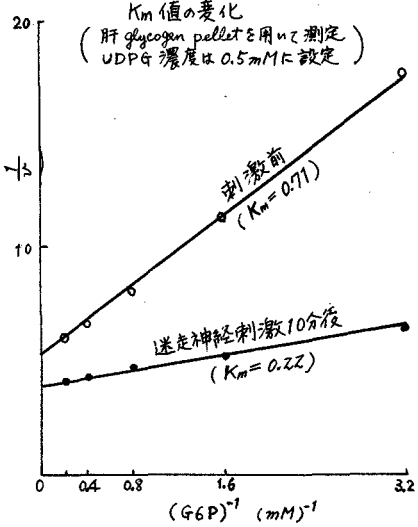
つまり、迷走神経の刺激によって、肝G.S.の総量は変らないが基質ならびにG6Pとの親和性が強くなり、生理的範囲の基質ならびにG6P濃度において十分働きうるようになる。おそらく迷走神経の刺激によって非活性型酵素が活性型に転換するためであろう。

〔図5〕迷走神経刺激と肝G.S.のUDPGに対するKm値の変化



以上の実験結果を総括すると、副交感神経の刺激は肝G.S.の基質ならびにG6Pに対するKmを下げることによって見かけ上の活性上昇を来し、グリコーゲン代謝系を合成の方向にひっぱり、その結果グリコーゲン合成が促進すると考えられる。これに対して交感神経の刺激はG.S.の基質に対するKmを増大させることによって見かけ上の活性低下を招来してグリコーゲン合成を抑える方向に作用し、グリコーゲン分解を促進する本来の作用と相まって肝グリコーゲンの減少をもたらしている。

〔図6〕迷走神経刺激と肝G.S.のG6Pに対するKm値の変化



1. A.L.GOLD AND H.L.SEGAL, ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 120, 359, 1967.
2. H.J.MERSMANN AND H.L.SEGAL, PROC. NATL. ACAD. SCI., 58, 1688, 1967.
3. 嶋津孝, 天川菱. 神経化学, 6(Suppl), 25, 1967.
4. T.SHIMAZU AND A.AMAKAWA, BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 165, 335, 1968.
5. T.SHIMAZU AND A.AMAKAWA, BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 165, 349, 1968.
6. T.SHIMAZU, A.FUKUDA AND T.BAN, NATURE, 210 1178, 1966.
7. T.SHIMAZU, SCIENCE, 156, 1256, 1967.

3. 細胞核蛋白質燐酸化反応と3′, 5′- cyclic AMP

山村博平・武田誠郎・公文　明
中江活子・西塚泰美
（神大・医・二生化）

3',5'-Cyclic AMPはホルモン作用のmediatorとして脚光をあびているが、脳神経系組織にはadenyl cyclase, phosphodiesterase の活性が強く、各種神系ホルモンの作用機構をめぐつて　cyclic AMP の細胞内作用部位と機構は興味ある課題である。今日cyclic AMP 関与反応として glycogen phosphorylase kinase kinase(1), glycogen synthetase kinase (2) 及び histone kinase (3) が知られているが、最近脳の histone kinase も cyclic AMP により賦活される事が Greengard 一門(4)により報告された。これ等はいづれも燐酸化反応であり、cyclic AMP は一般に蛋白質燐酸化反応を介して作用するよう思われる。動物実験では cyclic AMP 投与により各種の誘導酵素の合成が促進される(5)。したがつて　cyclic AMP が、一方において細胞質の糖、脂質代謝等の生体エネルギー産生反応を促進すると共に、他方、これに呼応して細胞核機能を亢進するとすれば、極めて魅力ある処である。細胞核蛋白質は組織の分化、再生、増殖等に際し、高度に燐酸化されるがその役割は不明である(6–10)。そこで、この未開拓の細胞核蛋白質の燐酸化反応について酵素化学的解析を行い、cyclic AMP との関連、その作用機作等を検索し、ホルモン作用の機構と共にこれ等細胞核蛋白質燐酸化反応の生理的役割を知ろうと試みた。現在なお不明の点が多いが、上記燐酸化反応の多彩な性格と共に cyclic AMP の複雑な関与形式が明らかになりつつあり、その概略を報告する。

[EXPERIMENTAL PROCEDURES]

実験には主として牛脳を、一部必要により白鼠肝を用いた。細胞核はChauveau ら(11)の方法により単離し、クロマチンはMarushige and Bonner(12) の方法、ヒストンは仔牛胸腺より Johns(13) の方法により調整した。蛋白質燐酸化反応の活性測定は第1表の条件で行つた。その他の詳細は省略する。なお、本実験では神経細胞核とグリア細胞核とは特に区別して用いていない。

[RESULTS]

(1)　細胞核蛋白質燐酸化反応

動物に^{32}Piを投与すると多量の放射能が細胞核蛋白質に取込まれ、速かな代謝回転をうける。この現象は単離した細胞核においても再現され（第1図）、細胞核をATPと反応させると急速に蛋白質は燐酸化される。これ等の燐酸はアルカリ不安定であり、酸分解により phospho-ser, phospho-thr として回収される。そこで核蛋白質を酸抽出でヒストンと非ヒストン性蛋白質（主として酸性蛋白質）に分画すると、両蛋白質とも燐酸化をうけている（第2表）。両蛋白質にはそれぞれに対応する燐酸化酵素系があり（後述）、その細胞内分布は第3表に示した。即ち、ヒストン燐酸化酵素は大部分可溶性に、非ヒストン性蛋白質燐酸化酵素は可溶性及びクロマチンの両方に分布する。しかし後者の比較性はクロマチンに圧倒的に高い。

(2)　ヒストン燐酸化反応の多様性とCyclic AMP

ヒストン燐酸化酵素はGreengard 等の報告(4) の如くcyclic AMP により促進される。しかしこの酵素はそれほど単純ではなく、脳可溶性画分をDEAE-Sephadex で分画すると、

Table I. Assay System for Phosphorylation of Protein

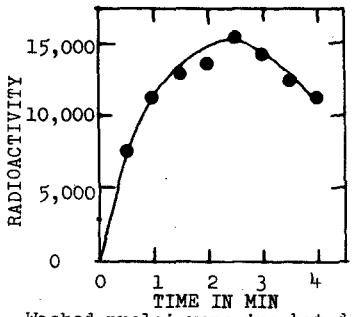
Reaction mixture:

Phosphate buffer pH, 7.5	5 μmoles
Mg acetate	5 μmoles
ATP-γ-^{32}P (20-45 x 10^3cpm/mμmole)	2.5 mμmoles
Substrate protein	100 μg
Enzyme	

0.25 ml; 37°, 5 min.

The reaction was stopped by the addition of 10% TCA, and acid-insoluble radioactivity was measured by a Millipore filter.

Fig. 1. Enzymic Phosphorylation of Bovine Brain Nuclei



Washed nuclei were incubated with ATP-γ-^{32}P under the standard conditons.

Table II. Association of Phosphate with Histone and Non-histone Nuclear Protein

Protein fr.	Radioactivity cpm	%
Whole nuclei	49,080	100
Histone fraction	20,410	42
Non-histone proteins	27,890	57

The nuclei were labeled for 3 min under the conditions described in Fig. 1, except the total volume of 1 ml. Histone was extracted with 0.25N HCl.

Table III. Intracellular Distribution of Enzymes Which Phosphorylate Histone and Non-histone Nuclear Proteins

Enzyme source	Histone	Non-histone protein
Chromatin	21 units (0.25)	1,500 units (8.80)
Soluble fr.	2,293 units (0.43)	1,180 units (0.33)

One unit: 1 mμmole of Pi incorporated
Numbers in ( ): units/mg of protein

Fig. 2. DEAE-Sephadex Column Chromatography of Histone Kinases (Brain Soluble Fraction)

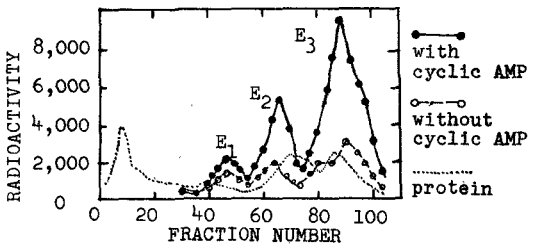
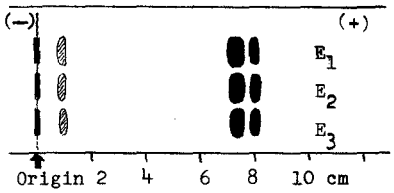


Table IV. Substrate Proteins of Histone Kinases from Bovine Brain (Reaction Rate)

Protein	E_1		E_2		E_3	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
Protamine	6.4	5.9	13.2	19.5	29.6	70.8
Histone	7.0	8.1	17.3	20.5	18.2	41.4
Phosvitin	0	0	1.7	0.9	18.7	14.8
Casein	0.7	0.4	6.7	5.3	13.4	14.5
Albumin	0.7	0	0	0	0.6	0.2

Numbers are expressed as μμmoles ^{32}Pi incorporated/ 10 min under the standard conditions.

Fig.3. Electrophoresis of Tryptic Digests of F_{2b}-histone Phosphorylated by either E_1, E_2 or E_3. (Autoradiography, Schematic)



3,000 volts for 120 min.

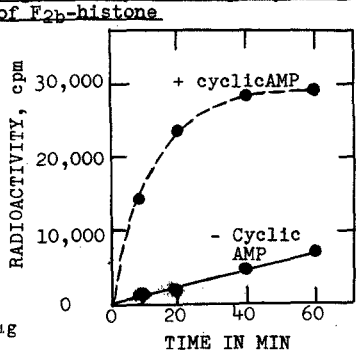
Table V. Substrate Specificities of Various Histones Obtained from Calf Thymus (Reaction Rate)

Histone	E_1		E_2		E_3	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
Whole	9.7	7.4	15.6	22.3	18.7	40.5
F_1 -histone	17.3	16.9	24.5	33.4	23.9	52.4
F_{2a}-histone	1.1	1.2	6.9	10.7	8.7	12.7
F_{2b}-histone	33.2	30.6	89.0	118.7	73.7	213.7
F_3 -histone	1.6	1.2	7.6	9.6	7.7	15.6

Numbers are expressed as μμmoles ^{32}Pi incorporated per 10 min under the standard conditions.

➡ The reaction was carried out with or without cyclic AMP under the standard conditions with 20 μg of F_{2b}-histone as substrate.

Fig. 4. Enzymic Phosphorylation of F_{2b}-histone



2個、或いは3個、時にそれ以上のcyclic AMPに対する挙動の異なる活性のピークが認められる（第2図）。これ等を仮にE_1, E_2, E_3と呼ぶが、全てヒストン、プロタミンに作用する（第4表）。E_2, E_3はカゼイン、フォスヴアイチンをも燐酸化するが、この活性は別種酵素（後述）の混在と思われる。第5表の如く、F_1, F_{2b}ヒストンが特に燐酸化され易い。これ等の酵素はヒストンの全てのser, thrを無差別に燐酸化するのではなく、その部位は特定である。しかし、これ等の酵素それぞれに対応するser, thrがあるのではなく、トリプシン消化で得るペプチドの解析の結果、第3図の如く、同一パターンが得られるので、全ての酵素が同一の特定ser, thrを燐酸化すると思われる。これ等の酵素はcyclic AMPに対する挙動が異る以外は、至適pH, ATPのKm, Mgの要求性等、一般酵素学的性質は極めて類似する。

Cyclic AMPの賦活作用は反応速度の促進であり（第4図）、反応の終止点、即ち燐酸化の部位は感知しない。cyclic AMPに比較的特異的であり、Kaは4×10^{-7} Mであるが、濃度が濃いと逆に阻害する（第5図）。cyclic IMPは高濃度で活性を示す（第6表）。最近cyclic GMPに特異的なヒストン燐酸化酵素がLobsterで報告されたが本酵素は脳に確認出来ない。

以上の如くヒストン燐酸化酵素は単純ではなく、cyclic AMPの要求度の異なる多数の酵素型がある。その詳細は明らかではないが、種々の実験を通じて、cyclic AMPの感受性を高める第2の因子の関与が想定され、cyclic AMPの作用機構の解明に連るものと考え、その詳細を検索中である。

(3) 細胞核非ヒストン性蛋白質（酸性燐蛋白質）燐酸化反応

この種蛋白質の燐酸化反応にはこれまでの検索の結果、cyclic AMPは関与しない。従来、細胞核中の多量に燐酸を含有する一群の酸性蛋白質はphosphoproteinと呼ばれ、その燐酸化反応はautocatalyticと考えられている(6, 7)。処が、本反応の解析の結果、これら蛋白質とこれを燐酸化する酵素系とは明瞭に分離され、少くともその大部分はautocatalysisによるものではない。この非ヒストン性蛋白質の燐酸化酵素はSephadex G-200により第6図の如く2種（A_1, A_2）に分離される。これ等はいづれもヒストンを燐酸化せず、核内蛋白質の他、カゼイン、フォスヴアイチン等のいわゆる燐蛋白質を燐酸化する（第7表）。両者ともこれ等蛋白質のser, thrを無差別に燐酸化せず、この場合はA_1, A_2にそれぞれ特有の別の部位を燐酸化する。例えば、第7図の如く、カゼインを基質とするとA_1は主に特定thrを、A_2は主に特定serを燐酸化し、P-thr, P-ser相対比は基質により異なる別種の酵素である（第8表）。

[SUMMARY AND DISCUSSION]

一見単純に見えた細胞核蛋白質燐酸化反応も酵素化学的解析の結果、塩基性及び酸性蛋白質に対応した多数の酵素反応群の集合であり、それぞれが無差別でなく、特定蛋白質の特定ser, thrを燐酸化し、特にヒストン燐酸化反応にはcyclic AMPが極めて複雑な形で関与する事が明らかである。これ等一群の反応で蛋白質の特異性が、如何に生物学的特異性と対応するか、またこれ等蛋白質や燐酸化反応自身の生理的役割も現在不明である。上記の燐酸化反応は明らかにホルモンの関与反応も加わり、細胞核の機能と生理に重要な意味をもつものと思われる。

Fig. 5. Effect of Concentration of Cyclic AMP

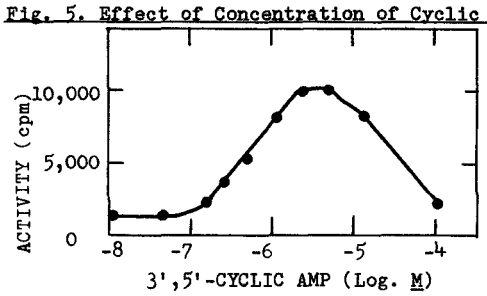


Table VI. Specificity of Cyclic Nucleotide

Nucleotide	Activity *			
	2×10^{-6} M	%	2×10^{-5} M	%
None	9.4	---	9.4	---
3',5'-Cyclic AMP	36.6	100	28.3	100
3',5'-Cyclic IMP	12.1	10	36.7	144
3',5'-Cyclic GMP	8.9	0	12.3	15
3',5'-Cyclic CMP	10.1	0	12.6	15
3',5'-Cyclic UMP	10.1	0	13.2	17
2'-AMP	---	---	9.3	0
3'-AMP	---	---	9.3	0
5'-AMP	---	---	1.9	---

*Activity: μμmoles Pi/min/100 μg F_{2b}
Assays were carried out under the standard conditions.

Fig. 7. Paper Electrophoresis of Acid-hydrolysates of Various Proteins Phosphorylated with Non-histone Nuclear Protein Kinases

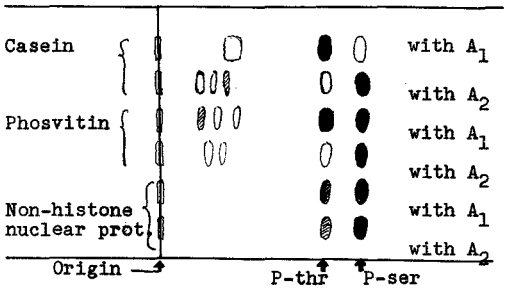


Table VIII. Ratios of Phosphothreonine to Phosphoserine Phosphorylated with Non-histone Nuclear Protein Kinases

Substrate protein	P-thr/P-ser	
	Kinase A1	Kinase A_2
Casein	9.6	0.3
Phosvitin	1.5	0.1
Non-histone nuclear prot.	0.4	0.3

The substrate protein indicated was fully phosphorylated with either A_1 or A_2, and subjected to acid hydrolysis. The hydrolysates were electrophoresed on paper (Fig.7), and radioactive phosphothreonine and phosphoserine were separately determined.

Fig. 6. Sephadex G-200 Filtration of Non-histone Nuclear Protein Kinases

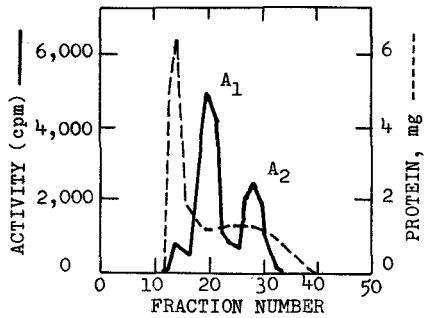


TABLE VII. Substrate Proteins of Non-histone Nuclear Protein Kinases

Protein	Activity*	
	A_1	A_2
Casein	9.5	4.2
Phosvitin	2.2	0.6
Non-histone nuclear protein (acidic)	3.2	0.6
Histone (basic)	0.3	0.3
Protamine	0.4	0.4
Albumin	0	0

*Activity: mμmoles Pi/mg protein

[REFERENCES]

10) Benjamin,W.B. & Goodman,R.M., Science, 166, 629 (1969).
11) Chauveau,J., Moule,Y.,& Rouiller,C., Exp. Cell Res., 11, 317 (1956).
8) Gershey,E.L., & Kleinsmith,L.J, Biochim. Biophys. Acta, 194, 519 (1969).
2) Glinsmann,W.H. & Hern,E.P., Biochem. Biophys. Res. Communs., 36, 931 (1969).
13) Johns,E.W., Biochem.J., 92, 55 (1964).
7) Kleinsmith,L.J., Allfrey,V.G., & Mirsky,A.E., Proc.Natl.Acad.Sci.,55, 1182 (1966).
6) Langan,T.A., Biochim.Biophys.Acta Library, 10, 233 (1967).
3) Langan,T.A., Science, 162, 579 (1968).
12) Marushige,K. & Bonner,J., J.Mol.Biol., 15, 160 (1966).
4) Miyamoto,E., Kuo,J.F., & Greengard,P., Science, 165, 63 (1969).
9) Turkington,R.W., & Riddle,M., J.Biol. Chem., 244, 6040 (1969).
1) Walsh,D.A., Perkins,J.P., & Krebs,E.G., J.Biol.Chem., 243, 3763 (1968).
5) Wicks,W.D., Kenney,F.T., & Lee,K., J.Biol.Chem., 244, 6008 (1969).

4. ラット脳より得たphosphodiesterase活性に対するカルシウムイオンの調節作用：脳のcyclic 3′,5′- nucleotide phosphodiesterase に関する研究(Ⅰ)

垣内史朗・山崎礼子
（大阪府立中宮病院）

哺乳動物脳組織中の，3′,5′-AMP濃度が種々の刺戟（断頭，通電，カテコラミンやヒスタミンの添加）によって著しく変動することが見いだされて以来[1]，その酵素的機作として，Adenyl Cyclase（合成系）による調節機転が注目されて来た。[1,2] しかし，それとは別に，分解系（3′,5′-Nucleotide phosphodiesterase；以下phosphodiesteraseと略する）にもまた何等かの調節機構が存在するのではなかろうかという可能性が，一部の研究者の興味をひいた。すなわち，Cheung[3]はphosphodiesteraseに対するATP，PP_i，citrateによる調節を提唱したのであるが，われわれは，彼の用いた定量法に対する批判も含めて，彼の報告の生理的意義に疑問点のあることを，昨年度の当学会において指摘した。[6]

その後，われわれは，① phosphodiesterase 活性が，生理的濃度の範囲と考えられるカルシウムイオンによって調節されていることを見いだし，さらに，②このカルシウムイオンによる酵素活性のstimulationに，われわれが昨年の当学会で報告した耐熱性のactivator因子*)が関係していることを認めて，これを仮に PAF（phosphodiesterase activating factor）と名づけるにいたった。これらを以下に報告する。この研究の一部は既報した。[4,5] 尚この報告は，脳組織中3′,5′-AMP濃度に対するadenyl cyclaseの調節的役割を否定するものではないことを付記する。

〔 実験方法 〕

Phosphodiesterase 活性 は昨年度の報告[6]のごとくにして定量した。すなわち，オ1法は基質（3H－3′,5′-AMP）の減少を測定し，オ2法は生成物（5′-Nucleotide→P_i）を定量した。標準 assay system は，反応液1ml中にImidazole Buffer（またはTris-Maleate），PH 6.9，80μmoles；$MgCl_2$，3μmoles；3′,5′-AMP，1.2μmoles，および種々の添加物を含み，30°C においてインクベートした。

酵素：Sprague Dowley 種ラットの断頭新鮮脳（除小脳）を約2倍容のmedium（10mM Tris-HCl，PH 7.5，plus 2mM $MgCl_2$）と共にglass homogenizerで処理したのち，40000 rpm，70分間（日立40Aローター）遠心沈澱を行った。その上清，及び沈澱を小量のmediumで洗って（遠心沈澱）得た上清を合して"40S 酵素"とした。"40SD酵素"は，"40S 酵素"をGEDTA 0.1 mMを含む上記のmediumで数回，ついでGEDTAを含まないmediumで数回透析して作成した。透析は，セロファン膜袋中に酵素を入れ，約100倍容のmedium に浸けて行う従来の方法の他に，コロジオンチューブ（ザルトリウス社製）中に大量のメジウムと共に酵素を入れ，減圧沪過を行う方法をも試み，略同様な結果を得た。

PAFとしては，脳boiled extractを用いた。すなわち，上述の"40SD酵素"を材料とし，そのPHを略6.9にしたのち（HCl），85°Cのbathに5分間浸け，直ちに遠心沈澱を行って得た上清（boiled extract）をPAFとして用いた。以上，酵素，PAFの調整は，一般に4°c～7°C にて行い，標品は原則として－80°Cに保存した

*) fr. Cとしてラット脳より分離された。耐熱性且つ高分子（MW≒6万）である。[6]

。蛋白の定量は Lowry らの方法(11)に準じて行い，本文中の酵素活性は，特に断わらぬ限り，μ moles 分解量 in 30分 per mg酵素蛋白量でもって示した。

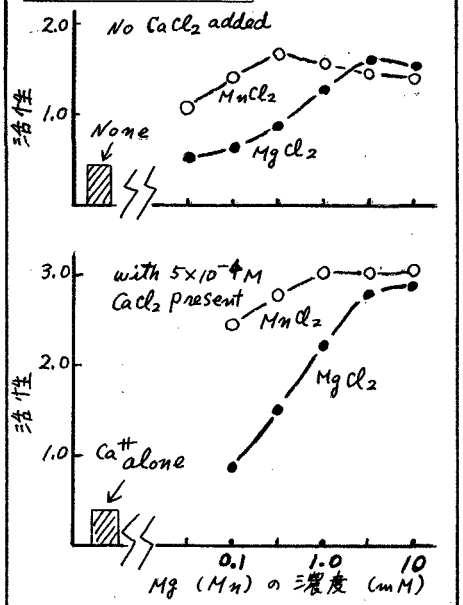
〔 実験結果 〕

この酵素がマグネシウムイオンを必要とすることは，この酵素の発見当初（1958年）から知られていた。(7)その後に，マンガンやコバルト（部分的）によっても，透析酵素の活性が回復することが示されたが，カルシウムイオンの添加は，その意味では無効であると報告されていた。(8-10)

この酵素の活性が，3mM の Mg^{++}，或は，0.3mM の Mn^{++} の添加にて極大になることは図1に示すごとくである。しかし，この系に，カルシウムイオンをオ2の metal として添加した場合に，その酵素活性が更に（2倍以上に）増大することを，われわれは見い出した（図2）。表3は，至適濃度の Mg^{++}（3mM）に共存させて，カルシウムを添加したときの効果を種々の條件下で見たものである。カルシウムイオンの効果は，Mg^{++}（Mn^{++}）の共存のもとでなければ発揮されないことを特記しておくが，このことは図2においても示されている。

図3に，カルシウムの効果をその濃度の函数として示した。オ1に指適すべきは，カルシウムの有効濃度が 3×10^{-6}M（pCa 5.5）～ 4×10^{-5}M（pCa 4.5）の，いわゆる生理的濃度範囲にあることである。オ2の点は，脳 boiled extract（PAオ）の共存によって，このカルシウムの効果が，その感度（横軸上）及び，強度（縦軸上）ともに増強

図1（上），図2（下）



〔定量法はオ2法による〕

表1. カルシウムイオンの添加効果

	addition	activity
Exp. 1 Complete System★1)	GEDTA 1μmole + $CaCl_2$ 0.33μmoles ★2)	1.0
	none ★3)	1.2
	$CaCl_2$, 0.03μmoles	1.9
	$CaCl_2$, 1.0 μmole	2.0
Exp. 2 Complete S. − DTT	GEDTA 1μmole + $CaCl_2$ 0.33μmoles	1.0
	none	1.0
	$CaCl_2$, 0.03μmoles	1.3
	$CaCl_2$, 1.0 μmole	1.4
Exp. 3 Complete S. − $MgCl_2$	GEDTA 1μmole + $CaCl_2$ 0.33 μmoles	< 0.1
	$CaCl_2$, 0.03μmoles	0.4
Exp. 4 Complete S. − 3',5'-AMP	GEDTA 1μmole + $CaCl_2$ a33 μmoles	0.0
	$CaCl_2$, 0.03μmoles	0.0
Exp. 5 Complete S. − enzyme	GEDTA 1μmole + $CaCl_2$ 0.33μmoles	0.0
	$CaCl_2$, 0.03 μmoles	0.0

★1) Complete System は標準 assay system〔実験方法の項〕にかえて dithiothreitol (DTT) 1μmole を含む。
★2) free Ca^{++} 濃度は 1×10^{-6}M と計算される。
★3) free Ca^{++} 濃度（contamination level）は 1×10^{-6}M ～ 1×10^{-5}M と推定された。

されることである。PAH 標品の free metal 汚染の可能性をテストするために，実験に用いた PAH 標品をコロジオン膜（ザルトリウス社）を通して沪過した外液（沪液），内液（medium を加えて元の容積に戻した），及び処理前の PAH 原液の三者についてその添加効果を調べた結果は表4に示した如くであって，free metal ion 汚染の可能性は否定されるものと考えられる。

図4にカルシウム，或は PAH 添加時における反応の時間経過を示すが，そのいづれもが直線になるところから，カルシウムや PAH の効果が，インクベーション時の酵素の安定化によると考えることは難かしい。

脳組織中の 3',5'-AMP 濃度は 10^{-6}M～10^{-5}M のオーダーにあるものと考えられる。[11] 従って，低濃度基質（6.6×10^{-6}M）のもとにおいて，別に実験を行った（表2，表3）。やはり，Ca^{++} の効果が認められるが，その効果が PAH に depend しているのは興味深い（表2）。反応速度は夫々の場合の Vmax の約 1/20 に減少した。

基質特異性を調べた結果を表5において示した。

〔 考察 〕

1）現在，筋収縮弛緩における カルシウムイオンの調節的作用は，生理的なものとして承認されており，skinned fibres についての最近の報告[13]によれば，その調節域は pCa 4.9～pCa 5.9 と測定されている。*) 脳 phosphodiesterase に対するカルシウムイオンの作用は pCa 4.5～pCa 5.5 において認められ（図3），上述筋肉系との比較からみて生理的なものと推定されるわけである。

2）カルシウムの作用は GEDTA－Ca^{++} buffer を用いた場合（例えば図3～5）でも，用いない場合（表1の一部，表3）においても認められ，更に非透析酵素（40S）に対しても認められ（図略），異った原理による2つの定量法（第1法，第2法）で共に認められた。

3）図3，或は表1の結果からみれば，1×10^{-6}M 以下のカルシウム濃度においても常に一定度の酵素活性が残り，現象的には calcium independent な活性及び calcium dependent 活性（＝total 活性－independent 活性）として区別しうる。

表2．低濃度基質での実験（I）

添加物（in 1ml）	△35AMP in 60min
Ca^{++}, 3×10^{-7}M	330
Ca^{++}, 3×10^{-7}M + PAH (50μg)	310
Ca^{++}, 2×10^{-5}M	310
Ca^{++}, 2×10^{-5}M + PAH (50μg)	780
Ca^{++}, 2×10^{-5}M + PAH (100μg)	880
boiled 酵素系	neglegible

〔 ^{3}H-3',5'-AMP, 0.0066μmole/ml（約1400 cpm 相当）。GEDTA－Ca^{++} buffer を使用。定量法は第1法による（cpm 表示のまま）。〕

表3．低濃度基質での実験（II）

添加物	△35AMP (cpm)
Exp. 1.	
$MgSO_4$ (3mM) のみ	350
$MgSO_4$ (3mM) + $CaCl_2$ (0.3mM)	630
$MgSO_4$ (3mM) + $FeSO_4$ (0.3mM)	190
$MgSO_4$ (3mM) + $MnCl_2$ (0.3mM)	400
$MnCl_2$ (0.3mM) のみ	390
$MnCl_2$ (3.0mM) のみ	360
Exp. 2.	
$MgSO_4$ (3mM) のみ	470
$MgSO_4$ (3mM) + $CaCl_2$ (0.2mM)	650
$MgSO_4$ (3mM) + $CoCl_2$ (0.3mM)	210
$MgSO_4$ (3mM) + $NiCl_2$ (0.3mM)	160
$MgSO_4$ (3mM) + $ZnCl_2$ (0.3mM)	380
$CaCl_2$ (0.1mM) のみ	neglegible
$CaCl_2$ (0.3mM) のみ	neglegible
$CaCl_2$ (1.0mM) のみ	100

〔 実験條件は表2に準ずる。結果は cpm 表示のままである。〕

*) いづれも GEDTA－Ca^{++} buffer を用いている。GEDTA の見かけの結合常数として最近の実測値[12]，$5\times10^5M^{-1}$ を採用したため，従来からの慣用値（$2\times10^6M^{-1}$）を用いての計算に比べて free Ca^{++} 値が高い目に出ていることに注意。われわれのデータも $5\times10^5M^{-1}$ によって計算した。

図3. Ca^{++}, dose-activity

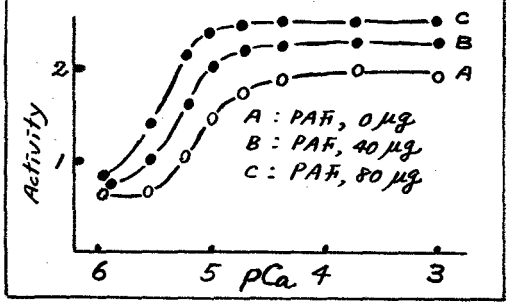


表4. PAF 添加効果について

addition	activity in the presence of Ca^{++} (M)				
	1×10^{-6}	3×10^{-6}	1×10^{-5}	4×10^{-5}	2×10^{-4}
PAF 原液	1.0	1.5	3.2	3.8	3.7
PAF 沪過内液	1.0	1.7	3.1	3.6	3.6
PAF 沪過外液	1.0	1.0	2.2	3.1	3.0
無添加	1.0	1.0	2.1	3.2	3.2

(PAF, 53μg 又はその相当分を添加した。
定量法は方2法によった。表4, 図3共に GEDTA-Ca^{++} buffer を使用した。)

図4. Time Course

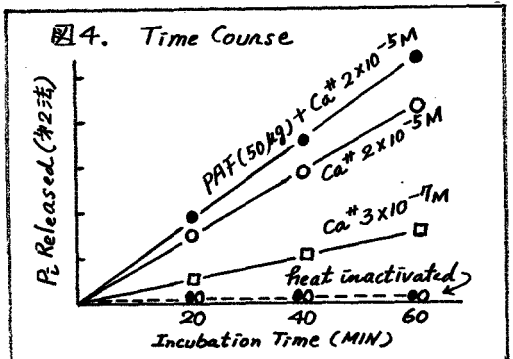


表5. 基質特異性

Substrate	activity in the presence of Ca^{++} (M)			
	3×10^{-7}	2×10^{-5}	3×10^{-7}	2×10^{-5}
	with PAF, 0μg		with PAF 50μg	
3',5'-AMP	1.1	2.9	1.1	3.9
3',5'-GMP	1.0	1.8	1.1	2.4
3',5'-IMP	1.0	2.2	1.1	2.9
3',5'-UMP	<0.1	0.4	~0.1	0.5

(GEDTA-Ca^{++} buffer を使用した。
定量法は方2法による。)

Calcium independent な活性が比較的安定であって略 0.9 units/mg と一定の値を示すのに対して, calcium dependent な活性は酵素 preparation やその aging, 実験條件等によって 0.5～2.5 units/mg と変化する。従って実験値の比較は同時に行った実験の間でのみ可能である。dithiothreitol の添加効果は calcium dependent 活性に対して認められたが, 酵素活性及び, そのカルシウム activation にとって本質的なものとは認められなかったので(表1), 以後の実験においては添加していない。

4) PAF の作用は calcium dependent な活性に対してのみ認められた(図3, 表2)。その本態は不明であって, Calcium dependent 活性及び independent 活性の実体的な意義と共に, 今後明らかにしてゆきたいものと考えている。

引文献

(1) Kakiuchi, S., & Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4, 367 (1968) : ibid, 4, 379 (1968) Kakiuchi, S., Rall, T.W., & McIlwain, H., J. Neurochem., 16, 485 (1969)
(2) Kleinen, L.M., Chi, Y.M., Freiberg, S.L., Rall, T.W., & Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1239 (1962)
(3) Cheung, W.Y., B.B.R.C, 23, 214 (1966)
(4) Kakiuchi, S., & Yamazaki, R., Proc. Japan Acad., 46, 387 (1970)
(5) Kakiuchi, S., & Yamazaki, R., & Nakajima H., Proc. Japan Acad., 46, 589 (1970)
(6) 垣内史朗, 山崎礼子, 中島久, 神経化学 8, 17 (1969)
(7) Sutherland, E.W., & Rall, T.W., J. Biol. Chem., 232, 1077 (1958)
(8) Butcher, R.W., & Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
(9) Nain, K.G., Biochemistry, 5, 150 (1966)
(10) Cheung, W.Y., Biochemistry, 6, 1079 (1967)
(11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
(12) Ogawa, Y., J. Biochem., 64, 255. (1968)
(13) Ebashi, S., & Endo, M., in "Progress in Biophysics and Molecular Biology (Butler, J.A. V., & Noble, D. ed.) P123, Pergamon Press (1968)

5. 中枢神経機能調節因子の研究 − cyclic AMP, histamine, prostaglandin の動物行動に対する影響について

麻川武雄・川崎晃義・吉田　博
（阪大・医・一薬理）

cyclic AMP (CAMP) は脳をはじめ各臓器に広く分布し、各種ホルモン作用の細胞内 mediator としてその重要性が注目されている。脳においては CAMP 生合成・分解に関与する adenyl cyclase, phosphodiesterase 活性が他の臓器に比べて最も強く[1,2]これら活性の脳内分布についても脳内の全ての region に分布している[3]。また垣内らの報告[4]によると脳切片を Histamine (Hist) Noradrenaline と incubate すると切片内 CAMP 含量が著明に増加する。Hist は古くより脳内に定量されていたが上記垣内らの報告により脳内 Hist と CAMP との関係が最近注目されている。Prostaglandin (PG) は CAMP と同様各臓器に広く分布しており、脳においても全ての region に分布している。脂肪組織, toad bladder をはじめ多くの臓器において PG と CAMP との関係が注目されている[5]。また交感神経の刺激などにより各種臓器より PG が遊出することが報告されており[6] PG が臓器機能の神経調節或はホルモン調節に関与している可能性が推測される。我々は中枢神経機能の調節機序を生化学的に研究する目的で先ず CAMP, Hist, PG などの中枢神経機能に対する影響を in vivo で検討した。

材料、方法　動物は♂ Chick (White Leghorn) の生後 5〜7 日で体重 51〜53g のものを用いる。動物の体を固定し、naso-ear line を水平に固定し 1/5 静脈針を用いて無麻酔下に脳実質内注入を行う、注入した試薬は ~~PH~~ を PH 7.33〜7.35 に調整し滲透圧を saline のそれにほぼ等しく調整する。注入する液量は常に 25μl とする。動物の自発運動の測定は Photo-transistor を用いて試作した動物行動測定装置を用いる。動物を 3 匹ずつ一組として測定装置に入れ、20分間自発運動を測定し、その後脳実質内注入を行いさらに 20〜25分間自発運動を測定する。測定後全脳をホルマリン固定し組織学的に注入部位を検討した。その結果 Neostriatum の dorsal 部の lamina Hyperstriatica の近傍に針の先端が達しているのが認められた。マウスを用いた実験は DD系マウス (18〜23g) を用い脳実質内投与を行い3時間観察し痙攣の出現したものを陽性とする。

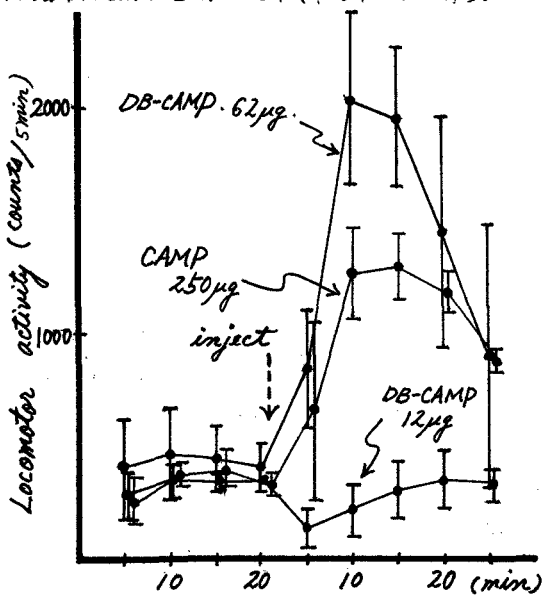


Fig. 1 Effect of cyclic AMP and dibutyryl cyclic AMP on the behavior of chicks.

結果および考察　1) CAMP および CAMP 誘導体の影響：DB-CAMP 62μg を注入すると 1〜2 分以内に首を伸展し激しく chirp しながら歩きまわる。注入後 2〜4分で動物は激しく chirp しながら走りはじめやがてほとんど休むことなく連続的に走りまわる状態が持続する。注入後約 15〜20分で走りまわる間にたびたびすわ

りこみ激しい呼吸を行う状態がみられる。(眼裂拡大着明) 走る方向は一定ではなく無目的に走りまわっていると考えられ餌に対しても無関心である。また ataxia の徴候は全くみられず、測定装置の壁に衝突することも、動物同志が衝突することもみられない。従って高度に regulate された行動であると考えられる。この他翼の伸展や feather の erection も全くみられない。注入後約1時間で注入前の状態にもどる。DB-CAMP 100 μg を注入したときは 62 μg 注入時と同様に激しく chirp しながら走りまわる。しかし注入後 8~10 分より床に腹部を接したまま滑るように移動し、度々腹部を床に接し静止した状態がみられる。このとき動物の反応性は著明に増加している。(fig 1, fig 2) CAMP 注入の場合にも DB-CAMP の場合と同様な動物行動の変化がみられる。しかし locomotor activity および vocal activity の亢進は DB-CAMP の場合程強くはない。(fig 1, fig 3) AMP 注入の場合は DB-CAMP の場合のような行動変化はみられない。しかし AMP 250 μg 注入直後 30秒~1分に数秒間持続する足踏み様の運動あるいは軽度の駈足様の運動が数回みられる場合あるいは反応性の亢進がみられる場合などがある。しかし chirp は全く認められない。(fig 3)

Fig. 2 Effect of the amount of dibutyryl cyclic AMP on the behavior of chicks.

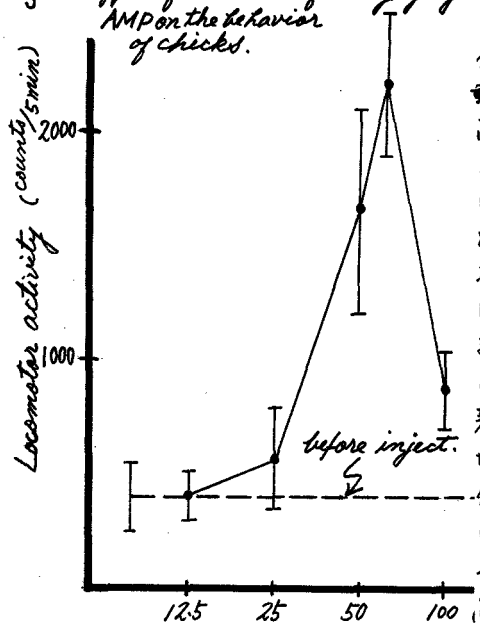


Fig. 3 Effect of the amount of CAMP on the behavior

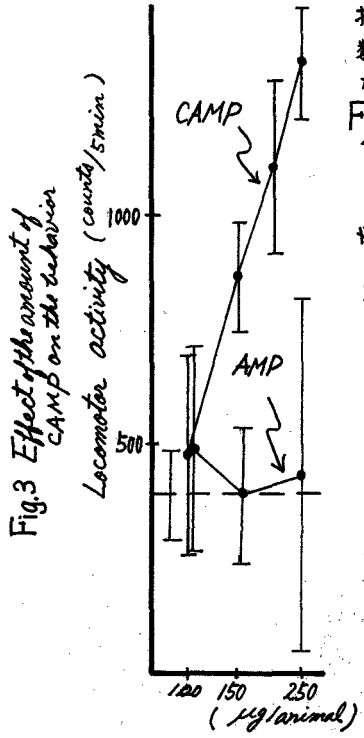
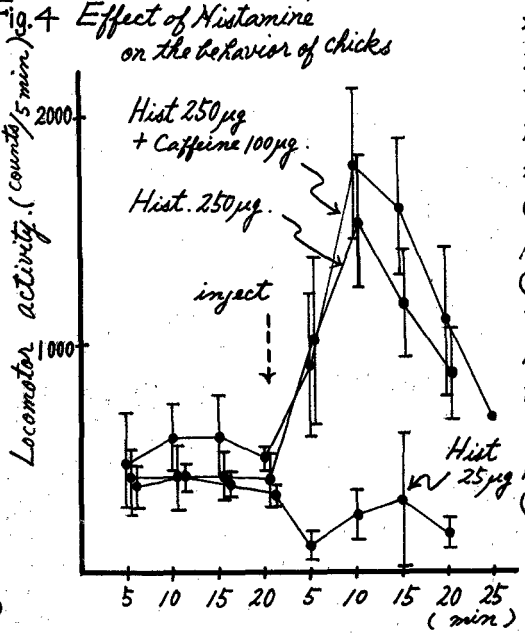


Fig. 4 Effect of Histamine on the behavior of chicks

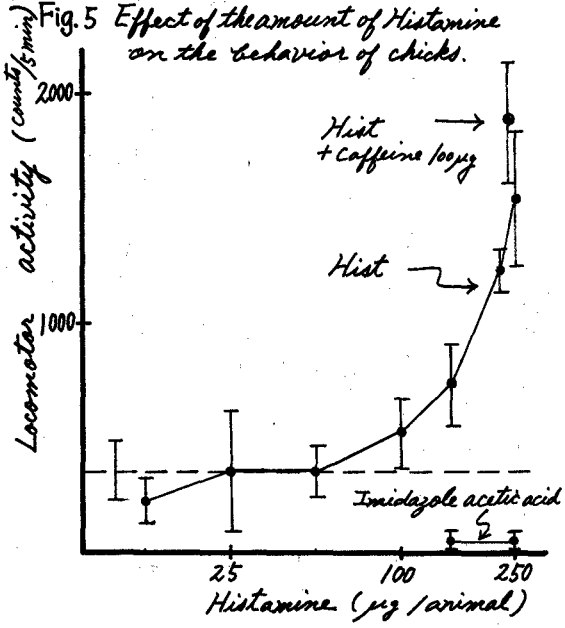


次にマウスにおいて DB-CAMP を脳室質内注入すると痙攣がみられその CD_{50} は 94.5 μg/animal (70.1-126.5 μg) である。Caffeine i.p. 投与前処置動物においては CD_{50} は 6.0 μg/animal (2.7-13.5 μg) であった。

2) Histamine の影響:

Hist注入時もDB-CAMPとほぼ同様の動物行動が観察される。locomotor activityおよびvocal activityの増加が観察される。Hist 250 μg注入後 1~2分後に首を伸展し激しくchirpしながら歩きまわるが 2~4分後より激しくchirpしながら著明に走りまわり 10~15分までこの状態が持続する。その後激しくchirpしながら歩きまわったり走りまわったりする状態が持続する。(fig 4, fig 5) しかしDB-CAMPの場合とは異りlocomotor activity, vocal activityの亢進が消失した後、著明な鎮静状態に移行し 1~2 hr 持続した後注入前の状態に回復する。Hist構造類似物としてimidazole acetic acidを注入するとHistの場合のような行動変化はみられない。注入直後に30秒~1分間程緊張の増加, ataxiaがみられる場合があるが注入後約1~3分後より鎮静状態がみられる。時間の経過と共に鎮静状態は極度に増加しrighting reflexの減弱がみられる。数時間後にこのような鎮静状態から注入前の状態に完全に回復する。(fig 5)

Fig. 5 Effect of the amount of Histamine on the behavior of chicks.



Histの効果に対するCaffeineの影響を検討するためHistとCaffeineを同時注入するもCaffeineの増強効果は軽度である。(fig 4, fig 5) しかしながらCaffeineの増強効果が著明にみられる場合がある。我々の実験においては生後 24 hr 以内のchickを孵卵所より100匹単位で入手飼育し実験に供しているがHistの効果が著明にみられる100匹群と

Fig 6 Effect of PGE, on the behavior of chicks

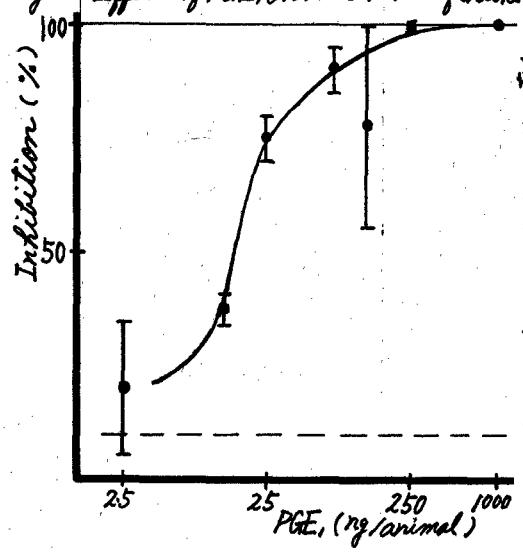
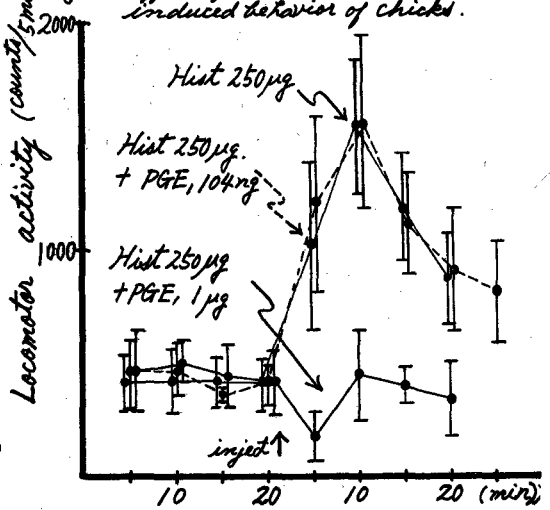
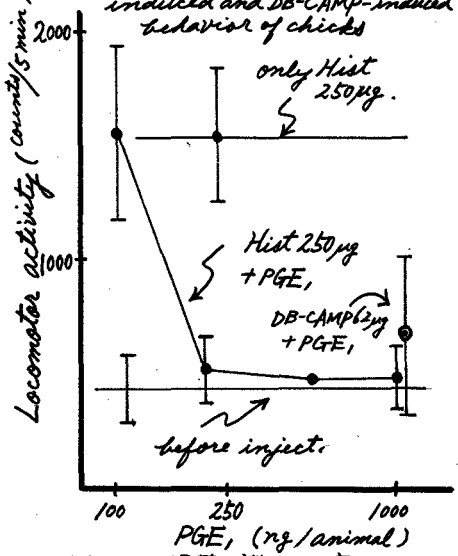


Fig. 7 Effect of PGE, on the Histamine-induced behavior of chicks.



Histの効果が軽度にしか認められない100匹群とがある。このことは恐らくchickの出生時及び出生後の環境条件によりHistのresponseに差が生じると考えられる。このようなHistの効果が軽度である100匹群についてはCaffeineの増強効果が著明にみられることを経験している。

Fig. 8 Effect of PGE, on the Histamine-induced and DB-CAMP-induced behavior of chicks



3) PGの影響： PGE_1注入後1~3分で鎮静状態が始る。立位の姿勢で首を下方へ低下させ閉眼した状態あるいはしゃがんだ姿勢で閉眼した状態などが観察された。chirpは全くみられない。righting reflexは陽性であった。(fig6)

以上のHist, DB-CAMP, Hist + Caffeineの動物行動に対する影響および垣内らの報告[4]からHistがadenyl cyclaseを活性化し細胞内CAMP含量を増加させその結果locomotor activity, vocal activityの亢進をひきおこしている可能性が推測される。PGの作用機序について脂肪組織などを用いた実験から、PGはホルモンによるadenyl cyclaseの活性化をblockすることによりPGの作用を発現しているという仮説[5]が提出されている。そこでHist, DB-CAMPによる動物行動の変化に対するPGの影響を検討した。その結果はfig7, fig8, fig9に示す如くであるがPG単独注入では動物行動が完全に抑制され鎮静状態が観察されるがHistによる動物行動の亢進は過剰量のPGを同時注入しても完全に抑制されない。またDB-CAMPによる動物行動の亢進も過剰量のPGを同時注入することにより抑制される。従って我々の実験結果は上述した仮説に矛盾しPGの作用点はadenyl cyclaseよりもさらに後のstepにあるとも考えられる。この点を現在さらに検討中である。脳においては細胞の種類が均一ではなくこれらが複雑にorganizeされているため以上の実験結果の解釈を充分慎重に検討したい。

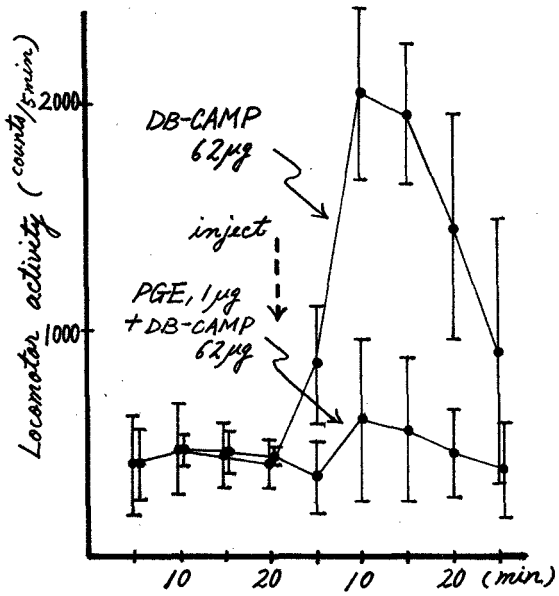


Fig. 9 Effect of PGE, on the DB-CAMP-induced behavior of chicks

参考文献

1). E.W. Sutherland, T.W. Rall and T. Menson, J. Biol. Chem 237, 1220, 1962
2). R.W. Butcher and E.W. Sutherland, J. Biol. Chem. 237, 1244, 1962.
3). B. Weiss, E. Costa, Biochem. Pharmacol 17. 2107, 1968.
4). S. Kakiuchi and T.W. Rall, Mol. Pharmacol 4. 367, 1968, Mol. Pharmacol 4. 379. 1968.
5). S. Bergström, L.A. Carlson and J.R. Weeks, pharmacol Rev 20. 1. 1968.
6) 麻川武雄 、吉田 博 診療 23. 1337

6. 脳切片からのアセチルコリン遊出にたいするdibutyryl cyclic 3′,5′-AMPの影響について

勝木昭次・三木直正・松田友宏
畑　文明・吉田　博
（阪大・医・一薬理）

脳組織はCyclic 3′,5′-AMP (c-AMP) の合成，分解に関与しているAdenyl cyclase[20], Cyclic nucleotide phosphodiesterase活性[4]が他臓器に比べてきわだって高い。これらによって量が調節されているc-AMPが脳でいかなる役割をなしているかは興味深い。脳の種々の部位にc-AMPの誘導体であるdibutyryl c-AMP(db c-AMP)の投与により，Hyperactivity[1][14] Hyperthermia，mydriasisなどがみうれるが，これは脳機能に対してc-AMPが影響を与えうることを直接的に示している。

内分泌腺や外分泌腺より分泌されるホルモン，酵素類は一般にその臓器において顆粒につつまれた状態で存在しているが，このような貯蔵顆粒からの遊出にはc-AMPの関与が認められている。[2][3][15] 脳における代表的なtransmitterと考えられているアセチルコリンは神経終末部にかなりの量が存在しており，[21]さらに神経終末部の細胞膜にAdenyl cyclase活性が強いことは[6] c-AMPがシナプスでの刺激伝達の調節に関与していることを示唆するものである。Goldbergら[7]はラットのphrenic nerve diaphragm preparationでdb c-AMP及びテオフィリンがminiature endplate potentialの頻度を増加させることを報告したが，これは刺激伝達への関与を末梢神経系で示したものである。

我々は中枢神経シナプスでのこのヌクレオチドの役割を追求する目的で，脳切片よりのアセチルコリン遊出を指標に，c-AMPや他の刺激の効果をしらべてみたので報告する。

〈実験方法〉

Sprague Dawley系雄ラットを断頭し，直ちに大脳をとり出し冷却したRinger液に浸した。Ringer液の組成はNaCl 128.2mM, KCl 5.13mM, $CaCl_2$ 2.75mM, $MgSO_4$ 1.28mM, Na_2HPO_4-HCl buffer (pH7.4) 2.5mM, Tris-HCl buffer (pH7.4) 18.25mM, Glucose 10mM, Eserine sulfate 0.05mMである。低温室にて皮質(新，旧皮質)切片をStadie-Rigg slicerを用いて作り，2mlのRingerに約80mgの切片を浮遊させ，37°Cで100%酸素通気下にincubateした。Preincubation 15分間行なったのち，切片をナイロンガーゼ上にとり出し，新しいRinger液にて洗い，続いて10分又は15分間のincubationを行なった。Ca^{++}なしの条件下の場合は普通のRingerで10分，Ca^{++}無添加のRingerで5分の計15分間のpreincubationを行なった。incubation後切片を除去し，mediumのtonicityを調整し，エゼリン感作カエル腹直筋にてChangらの方法[5]でアセチルコリン量を定量した。結果は対照切片から遊出されたアセチルコリン量を1とした比で表示した。切片のATP量は切片を2.5%過塩素酸でホモゲナイズし，遠心後の上清を中和，沈殿を遠沈で除いた上清をHexokinase-Glucose 6-phosphate dehydrogenase系でNADPHによる蛍光の測定で定量した。[8]

c-AMP量は切片を急速に凍結させ，0.6N過塩素酸でホモゲナイズして抽出，遠心上清をKOHで中和し，沈殿を再度遠心除去した上清を$BaSO_4$処理し，つぎでAmberlite IRA 400カラムに吸着させ，c-AMP分画をpH2.4 HClで溶出採取した。凍結乾燥により濃縮後，Brookerら[3]のradio-isotopic displacement methodにより定量した。

〈実験結果〉

1. 脳切片からのアセチルコリン遊出に対するdb c-AMPの影響：我々の用いた脳切片のATP含量はincubation終了時(30分)において約1 μmoles/g湿重量であった。表1に示すようにdb c-AMP 5mM, テオフィリン1mMをincubation mediumに加えると遊出されてくるアセチルコリン量は約1.5倍に増加がみられた。テオフィリン1mMの単独では増加はみられなかった。db c-AMP, テオフィリン及びその共存はいずれもカエル腹直筋のアセチルコリンによる収縮に影響を示さず，このことは，db-c-AMPによって切片からのアセチルコリン遊出量が増加したものと考えられる。高濃度のK^+(35mM)により脱分極を起させた状態ではdb c-AMPの効果が一月著明になるのではないかと考え，この点を検討したが1.37±0.21倍と著明な増加はみられなかった。

表1. db c-AMP及びテオフィリンのアセチルコリン遊出に対する影響 (incubation 15分)

	medium	遊出量比 Exp./Cont.	平均値±S.D.
db c-AMP 5mM + Theophylline 1mM	normal	1.74, 1.54, 1.53, 1.4 1.42, 1.47, 1.49, 1.2 1.48, 1.48	1.47±0.14
	high K^+ 35mM	1.40, 1.56, 1.15	1.37±0.21
Theophylline 1mM	normal	1.0, 1.07, 0.86 1.0	0.98±0.09

2. 生体アミンなどの影響：db c-AMPの添加でアセチルコリン遊出増加がみられたので他の刺激により切片c-AMP量を増加させる場合を検討した。脳切片のc-AMP量は電気刺激[9]，ヒスタミン[10]やノルエピネフリン[11]，アデノシン[18]により上昇すると報じられている。これらの影響を調べたのが表2である。カエル腹直筋にこれらの物質は何ら影響は示さない。アデノシン[18]は著明なc-AMP上昇を起すというにも拘らずアセチルコリン遊出の増大はみられなかったが，ノルエピネフリンやヒスタミンは遊出量を増加させ，テオフィリンの共存はさらに幾らか増加させた。

3. 高濃度K^+によるアセチルコリン遊出とCa^{++}，切片のc-AMP量について：

高濃度のK^+や電気刺激に対しての切片からのアセチルコリン遊出に，mediumにCa^{++}の存在が必要であることはよく知られている。図1は切片からのアセチルコリン遊出と切片内c-AMP量を対比したものである。

c-AMP量は高濃度のK^+により2~3倍の増加がみられたが，この時mediumへの

表2. ノルエピネフリン，ヒスタミン，アデノシンのアセチルコリン遊出に対する影響 (incubation 15分)

*平均値±S.D.

Norepinephrine 0.1mM		Histamine 0.1mM		Adenosine 0.1mM
—	+Theophylline 1mM	—	+Theophylline 1mM	
2.08	2.42	1.35	1.47	0.95
1.32	1.71	1.58	1.66	1.0
1.14	1.24	1.99	1.81	1.08
1.32	1.40	1.50	—	
1.21	—	1.41	—	
1.61	1.95	1.31	1.53	
*1.45±0.35	1.74±0.47	1.52±0.25	1.62±0.15	1.01±0.07

Ca^{++}の添加，無添加の影響は何らみうれなかった。一方アセチルコリンの高濃度K^+による遊出増加に対してはCa^{++}の無添加は明うかな遊出抑制がみうれる。アセチルコリン遊出とc-AMP量に対する外液Ca^{++}の影響が並行していないというこの結果では，c-AMPとアセチルコリン遊出とは無関係であるとも考えうれるが，勿の一つの可能性はc-AMPがアセチルコリン遊出を起すにはCa^{++}の存在が必要であることを示唆しているといえる。

4. db c-AMPによるアセチルコリン遊出促進効果とCa^{++}：

c-AMPがアセチルコリン遊出を起すにはCa^{++}の存在が必要であるかどうかを検討した。表3によって明らかなように，db c-AMPの遊出促進効果はmediumからCa^{++}を除去することによりみうれなくなった。

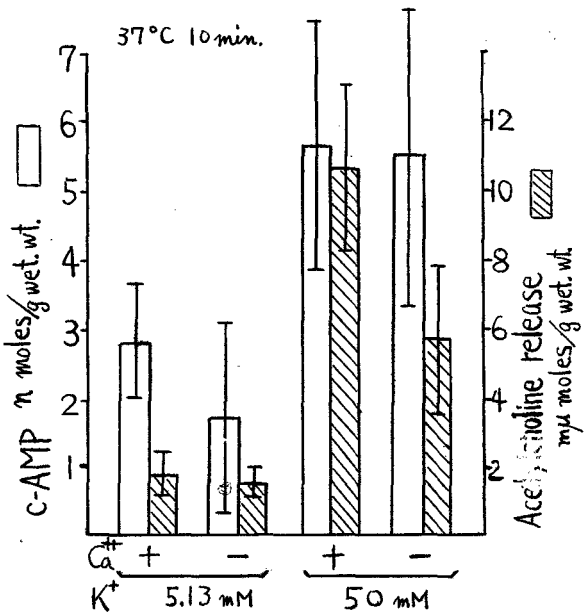


図1. high K^+によるAcetylcholine遊出と切片内c-AMP量

表3. db c-AMPによる促進効果に対するCa^{++} omissionの影響 (incubation 15分)

	db c-AMP 5mM + Theophylline 1mM	control Ca^{++} omission	db c-AMP 5mM + Theophylline 1mM Ca^{++} omission
(1)	1.48	—	1.0
(2)	1.2	—	0.5
(3)	1.48	1.06	1.1
(4)	1.4	1.04	0.8

〈考察〉

c-AMPはその作用機器において一般にその機器の基本的なspecificな機能に対する調節因子として働らいている。脳切片からのアセチルコリン遊出が，db c-AMPによって促進をうけるという我々の実験結果は中枢神経シナプスにおいてもc-AMPはその基本的な機能，即ち刺激伝達に関与する一因子として又はそこに調節を行ないうる因子として考えうることを示したものである。ノルエピネフリンやヒスタミンなどにも，transmitterとしての役割は考えうれているが，これらによってアセチルコリンの脳切片よりの遊出が増したことは，c-AMPを介して刺激伝達を調節するという，modulator的役割をもこれらのアミンがなしている可能性を示すものであると考える。

種々のcellular processにおいてCa^{++}は非常に重要な働らきをもっており，c-AMPとCa^{++}の共存が多くの過程の調節を行なう可能性が考えうれている。我々のデータを単純に理解すると，種々の刺激によって細胞内c-AMPが増量するが，この反応にはCa^{++}

は大きな意味はもたず，増量したC-AMPがアセチルコリンの遊出促進をおこす過程にCa^{++}は不可欠のものと思われるのである。刺激に反応したC-AMPの増加が，Ca^{++}を除去しても影響をうけないとの知見は既にSalivary gland[17], heart[16]などで知られている。

一方Shimizuら[19]は脳切片で^{14}C-アデニンとのincubationで形成される^{14}C-ATPの^{14}C-c-AMPへの変化をしらべる実験で，高濃度のK^{+}によるC-AMP形成の増加にはCa^{++}が必要であることを示している。我々の結果と一見矛盾するのであるが，我々はC-AMPの絶対量を測っており，ShimizuらはC-AMPの形成速度を測っていると思われる。この見かけ上の矛盾はKakiuchiら[12]のphosphodiesteraseがCa^{++}によって活性の促進をうけるという実験結果で説明できるかもしれないし，又C-AMPにいくつかのプールを考える必要があるのかも知れない。何れにしろ今後の興味ある研究課題と考えている。

文献

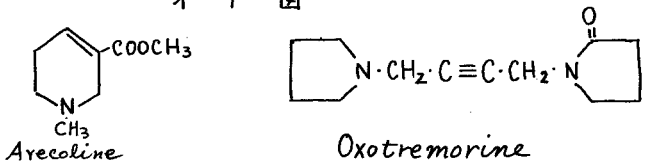
1) 麻川武雄，川崎晃敏，三木直正，吉田博，未発表
2) Babad, H., Ben-Zvi, R., Bdolah, A., & Schramm, M., Eur. J. Biochem., 1, 96 (1968)
3) Brooker, G., Thomas, L.J., Jr., Appelman, M.M., Biochemistry, 7, 4177 (1968)
4) Butcher, R.W., & Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
5) Chang, C.H. & Gaddum, J.H., J. Physiol., 76, 255 (1933)
6) De Robertis, E., Rodriguez De Lores Arnaiz, G., Alberici, M., Butcher, R.W., & Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 242, 3487 (1967)
7) Goldberg, A.L., & Singer, J.J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 64, 134 (1969)
8) Greengard, P., Methods of Enzymatic Analysis p. 551, Verlag Chemie (1963)
9) Kakiuchi, S., Rall, T.W., Mallwain, H., J. Neurochem., 16, 485, (1969)
10) Kakiuchi, S., & Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4, 367, (1968)
11) Kakiuchi, S., & Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4, 379, (1968)
12) Kakiuchi, S., & Yamazaki, R., Proc. Japan Acad., 46 387 (1970)
13) Kulka, R.G., & Sternlichet, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 61, 1123 (1968)
14) Mc Kean, C.M., Peterson, N.A., & Raghupathy, E., Fed. Proc., 28, 776 (1969)
15) Malaise, W.J., Malaise-Lagae, F., & Mayhew, D., J. Clin. Invest. 46, 1724 (1967)
16) Namm, D.H., Mayer, S.E., & Maltbie, M., Mol. Pharmacol., 4, 522 (1968)
17) Rasmussen, H., & Tenenhouse, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 59, 1364 (1968)
18) Sattin, A., & Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 6, 13 (1970)
19) Shimizu, H., Creveling, C.R., & Daly, J.W., Mol. Pharmacol., 6, 184 (1970)
20) Sutherland, E.W., Rall, T.W., & Meron, T., J. Biol. Chem., 237, 1220 (1962)
21) Whittaker, V.P., Michaelson, I.A., & Kirkland, R.T.A., Biochem. J. 90, 293 (1964)

7. アレコリンの脳アセチルコリン増量効果について

堀　　真一郎・片岡喜由
（京大・医・生理）

Tremorine 及びその活性型といわれる Oxotremorine は in vivo 投与によりマウス，ラット，ネコに振顫を誘発し，その際脳内アセチルコリン（ACh）含量を増加させる。(1)(2)(3)(4)(5) これらの物質と構造を異にする Arecoline（第1図）も振顫誘発物質としてよく知られているが，脳アセチルコリン系に及ぼす影響については余りしらべられてはいない。我々は Arecoline 投与で誘発される振顫も脳内アセチルコリンの増量を伴うことを確かめたので，これが脳のアセチルコリン合成系あるいは分解系への関与によるものかどうかを検討してみた。

第 1 図



実験方法

生後約30日のDDD系マウスを用いた。一定量の Arecoline（A）生食溶液をマウス腹腔内に注射し（対照群には生理的食塩水注射）一定時間後断頭，脳組織を摘出，蟻酸－アセトン溶液で ACh. を抽出した(6)。ACh. の定量は蛙腹直筋を用いた bioassay による回収法で行った(7)。摘出脳の一部は Esserine sulphate を 10^{-5} M 含んだ 0.25M Sucrose 液でホモジネートにし，75,000g 30分遠心により上清（遊離ACh.分画）と沈渣に分けた。さらに沈渣は蒸溜水でホモジネートとし，2～3分後 75,000g 30分遠心により上清（Labile bound ACh. 分画）と沈渣（Stable bound ACh. 分画）に分離した。それぞれの分画について，ACh. 含量を測定した。

ACh.-esterase 活性は基質の Acetylthiocholine の水解速度を 412mμ での吸光度から見積ることにより行った(8)。比活性は μmoles ATC hydrolysed/min/mg protein として表現した。

Aceto-CoA kinase 活性は Lipman & Tuttle の Acetohydroxyamate の生成量測定（515mμ 波長）によった(9)。比活性は mμ moles Acetohydroxyamate/min/mg protein として表現す。

Choline acetylase 活性は Fonnum の方法に従い ^{14}C-acetate と Choline を基質とし，生成される ^{14}C-ACh. の放射活性の測定から見積った(10)。

実験結果

Arecoline の腹腔内投与後，脳ACh.量変動の時間的経過は第1表に示す様に，投与後10分で最も著明であり，その後漸減して 20分では対照値に戻る。この時間経過は Oxotremorine あるいは Tremorine による場合と大体類似している。Arecoline の投与量は体重 Kg あたり 5mg から確実に効果を発揮しはじめ 20mg では最大効果を示す（表2）。5mg/Kg の投与後，1～2分で全実験例に振顫がおこり，増量に従って死亡例が増加する。振顫と ACh 含量の増加は必ずしも平行関係になく，振顫はより持続的である。この Arecoline の ACh. 増量効果は

表1. Arecoline投与後脳ACh量変動の時間経過

投与後(分)	ACh (μg/g.組織) 3-5例の平均値
0	3.0
5	3.3
10	4.2
15	3.4
20	2.9

(投与量; 20mg/kg)

表2. Arecoline投与量と脳ACh量との関係

投与量(mg/kg.)	ACh (μg/g.組織) 3-5例の平均値
0	3.0
10	3.7
20	4.2
40	4.4
50	4.4

(投与後 10分値)

脳ホモジネートを使った in vitro 実験でも同様に出現する。このACh.含量の変化を各細胞内顆粒分画について比較してみると遊離型よりも結合型ACh.の増量が著明で，中でも，Whittaker (11) のいう低浸透圧処理で遊離しない安定結合型の増量が著しい。我々はその脳内ACh.の増加がACh.合成系の賦活か，又は分解系の抑制によるのではないかと考え，それぞれの系についてのArecolineの影響をしらべてみた。表4に示す様にACh.-esteraseに対して，Arecolineは何らの影響も示さなかった。一方，合成系について検べてみると，Choline acetylaseに対して，Arecolineはほとんどみるべき効果を示さないが，Aceto-Co A kinaseに対して，異常に高い濃度でArecolineは刺激的に働くことが確められた(表5)。この効果は肝臓のAceto-CoA kinaseにおいてもみられた。

表3. 各細胞分画のACh.増加率 (3例平均)

	投与前 (μg/g組織)	投与後 (μg/g組織)	増加率(%)
Stable bound ACh.	1.2	2.05	70
Labile bound ACh.	1.3	1.6	23
Free ACh.	0.5	0.55	10
Total	3.0	4.2	

表4. ACh.-esterase活性に及ぼすArecolineの影響

	蛋白量 (μg)	対照例	with Arecoline (25mg/Kg体重)	
in vivo	100	0.18	0.19	
	200	0.37	0.41	
	400	0.89	0.84	
			40μM	10mM
in vitro	300	0.54	0.55	0.55

振顫誘発物質の脳ACh.増量作用については Oxotremorine を材料にしてかなり精力的にその機構が検索されているにもかかわらず，現在まで ACh.増量を説明できる何らの実験的根拠も得られていない。即ち，ACh. esterase に対してほとんど効果を示さない。Ratkovic 等は Oxotremoline が Choline acetylase を賦活すると報告したが（12），Lundgren によって否定されている（13）。　脳内 Acetyl-CoA 含量も Oxotremoline 投与で変化しない（14）。Slice の Choline のとり込みにも影響はほとんどない（15）。　我々のしらべた限りでは Arecoline も ACh.増量を説明するに足る根拠は何も得られなかった。　in vitro での Aceto-CoA leinase を刺激する濃度は著明に高く in vivo 実験で投与した量をはるかに逸脱する。したがって，脳ACh. の extractable あるいは mobilizable part と，そうでない part を考えなければならないかもしれない。

表5.　脳 Aceto-CoA kinase 活性に及ぼす Arecoline の影響（in vitro）

Arecoline (mM)	mμ moles Acetohydroxyamate/min/mg 蛋白
0	1.34
0.01	1.35
0.2	1.35
1	1.50
2	1.69
10	2.15

参考文献

1) B. Holmstedt and G. Lundgren　Mechanism of Release of Biogenic Amines. ed. by U.S. von Euler, Pergamon Press. pp. 43 (1965)
2) B. Holmstedt et al　Biochem. Pharmacol. 14 189 (1965)
3) B. Cox and D. Potkonjak　Int. J. Neuropharmacol. 8 291 (1969)
4) G. Lundgren　Life Sci. 5 977 (1966)
5) A. Bartolini et al　J. Pharm. Pharmacol. 22 59 (1970)
6) M. Toru and M. H. Aprison　J. Neurochem. 13 15-33 (1966)
7) H. C. Chang and J. H. Gaddum.　J. Physiol. 79 255 (1933)
8) G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres and R. Featherstone　Biochem. Pharmacol. 7 88 (1961)
9) F. Lipmann and L. C. Tuttle　J. Biol. Chem. 159 21 (1945)
10) F. Fonnum.　Biochem. J. 100 479 (1966)
11) V. P. Whittaker　Biochem. J. 72 694 (1959)
12) D. Ratkovic et al　Bull. Scient. Cons. Acads. RPF. Yougosl. 2 40 (1965)
13) G. Lundgren and M. Malmberg.　Biochem. Pharmacol 17 2051 (1968)
14) J. Schubert et al　J. Neurochem. 13 819 (1966)
15) J. Schubert et al　Scand. Meeting Pharmacol. (1965)

8. シナプトゾームにおける（^{14}C）-アセチルコリンの合成と放出

芳賀達也（東大・理・生物化学）

高濃度K^+によりアセチルコリンの放出が促進される事は、脳切片、脳ホモジェネート、シナプトゾーム等を用いた研究で知られている[4),5),10)]。詳細な生化学的研究を進める為に定量法の改善、簡便化が必要と考えられる。(^{14}C)コリン（以下 *Ch** と略記）をシナプトゾームに取り込ませ、(^{14}C)アセチルコリン（以下 *Ach** と略記）を合成させる事、又その放出を調べる事を試みた。

〔実験方法〕

1 試料。大部分の実験は、大脳ホモジェネートから核とミクロゾームを除いた粗ミトコンドリア画分を用いて行なった。Ficoll密度勾配遠心法[1),3)]で分画した試料で検討する事により、粗ミトコンドリア画分で見られる *Ach** 合成の大部分がシナプトゾームに依るものである事を確かめた。

2 保温条件。保温温度は37°C又は25°C。保温液は修正したKrebo-Ringer液（140mM NaCl, 5mM KCl, 0.8mM $CaCl_2$, 1.2mM $MgCl_2$, 10mM グルコース, pH 7.4）又は50mMトリス緩衝液、1mMリン酸緩衝液（pH 7.4）、いくつかの実験には0.1mMネオスチグミン添加、以下 KR と略記）。用いた粗ミトコンドリア画分は、最初の脳重量にして 0.08 g wet weight / ml。液量は1又は2 ml。取り込み実験では、^{14}C-choline（54 mc/m mole）と一定時間保温後、7 ccの冷却したKR液を加えて遠心し、沈澱を分析した。放出実験では、上記条件で取り込ませた後遠心し、2回冷却したKR液で洗う。沈澱を軽くホモジェナイズし、もう一度一定時間保温後遠心し、沈澱を分析した。

3 分析。沈澱に0.3 ml酸性エタノール溶液（95%エタノール、0.2%酢酸、0.1mMネオスチグミン、2mM Ach, 3mM Chol）を加えてガラス棒でかきまぜ、室温に約20分間静置後遠心する。上清の内50 μl をペーパークロマトグラフィーにかけ、沃素で発色後 *Chol* と *Ach* 画分を切って、直接又は水で溶出後ガスフローカウンターで測定した。クロマトの溶媒はn-ブタノール：ギ酸：水（6:1:1）又はアセトン：0.2M酢酸アンモニウム（pH 4.8）（4:1）[2)]を用いた。前者を用いた場合は、抽出液中に *Chol* を加えない。分離は後者が良く、*Chol** を用いた時 *Ach* 画分へのカウントの混入は0.5%であった。後者の溶媒を用い、水で溶出して測定した際の回収率は97%、同一抽出液を14個同時に分画した時の、*Chol*, *Ach** 各々の%標準偏差は5%であった。放出実験に於いて、シナプトゾームから放出され上清に回収される *Chol** と *Ach** は以下の操作で分析した。フィネッケ塩（1.3%）による *Chol** と *Ach** の沈澱生成（*Chol* と *Ach* 各々0.5 μ moles存在下、最終液量2 ml, 0°C 2時間放置）→遠心→アセトン抽出→50%アセトン水溶液（2.5 ml）をDowex 2（dry wt. 2g + 水 1ml）に加える→溶出液濃縮→電気泳動で *Chol** と *Ach** の分画。ペーパークロマトグラフィーと電気泳動による分画は良く一致した。*Ach** は、アセチルコリンエステラーゼによって十確認した。

〔結果・考察〕

1 Chol* の取り込みと Ach* の合成。[2),7),8),9)]

図1に、KR液とNaの少ないKR液(sKR)で保温した時の、シナプトゾーム内への Chol* の取り込みと Ach* の合成の時間経過を示す。細胞膜外の Ach はアセチルコリンエステラーゼにより速やかに分解される事が知られているので、沈澱に回収されたものはシナプトゾーム内にあると考えられる。Chol* も、その相当分が浸透圧感受性である事、KR液で洗っても上清に移行しない事から、0分での測定値との差がシナプトゾーム内に取り込まれたものと解釈される。[6)] 又、非標識 Chol 50mM 及至ヘミコリニウム No 3 1mM 共存下では、保温により取り込みは増加せず、0分での測定値とほぼ等しい値を与える。Chol* の Ach* 以外の成分への変換は、全体の2%程度であった。又、Ach* を 0.1mM ネオスチグミン共存下でシナプトゾームと保温しても殆んど取り込まれなかった。

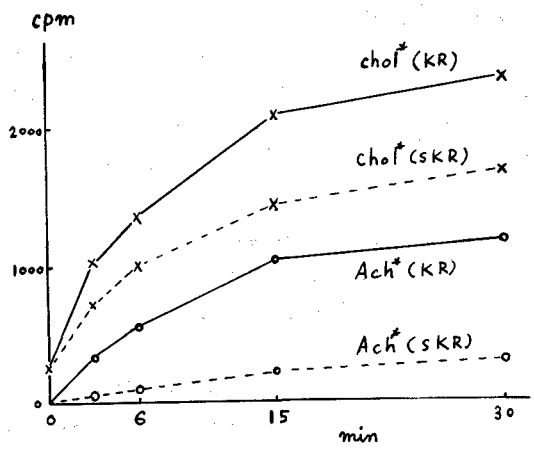


図1 Chol* の取り込みと Ach* の合成。
7.2 μM ^{14}C-chol (4 μCi/ml)
sKR: NaCl 20mM, 庶糖 240 mM,
他の成分はKRと同一。

KRを媒質とした場合、Ach* の取り込み全量に対する割合は約35%で、保温時間に依らず殆んど一定であった。この事は、Chol* → Ach* の変換が Chol* の取り込みに比べ十分早く、後者が律速段階である事を示す。sKRを媒質とした場合は、シナプトゾーム内の Chol*, Ach* 共に減少するが、Ach* への影響が大きく、取り込み全量に対する Ach* の割合は10～20%に減少する。この場合は、保温時間と共に Ach* の割合が徐々に増加する。

媒質中の Na の濃度変化は、Chol* より Ach* に対して大きな効果を持つので、シナプトゾーム内での Chol* → Ach* の変換に Na が作用する可能性が考えられる。この点を検討する為、表1に示すような実験を行なった。この結果、Na の無い

	Incubation I	Incubation II	Ach (cpm)	Chol (cpm)
	(^{14}C) chol	cold chol, 0′	116	961
	〃	〃 sKR, 15′	92	657
	〃	〃 KR, 15′	96	539
対照	cold chol	(^{14}C) chol 0′	88	345
	〃	〃 sKR 15′	162	1590
	〃	〃 KR 15′	1074	1871

表1 Ach 合成に対する Na の効果。

実験条件。Incubation I (sKR, 25°C 15′)
⇓ 遠心, washing 2回
⇓ Incubation II (KR or sKR, 25°C 15′)
⇓ 遠心, 沈澱の分析。

sKR: Na 0mM, 庶糖 280mM,
他の成分はKRと同一。

媒質中で取り込まれたシナプトゾーム内の $Chol^*$ に対しては、Naの Ach^* 生成促進効果は見られず、$Chol^*$ の取り込みがある時にNaが存在して初めて Ach^* 生成促進効果が見られる事が解った。

一方、Naの効果は、Ach^* に対しては媒質中の $Chol^*$ 濃度に依存しないが、$Chol^*$ に対する効果は、媒質中の $Chol^*$ 濃度が高くなると減少する。又取り込み全量に対する Ach^* の割合は、媒質中の $Chol^*$ 濃度の増大と共に減少する。以上のような結果は、2種類のシナプトゾームを仮定する事によって説明できる。一種はNa依存性で、低い K_m で $Chol^*$ を取り込み、Ach^* 合成能高いもの、他は高い K_m で $Chol^*$ を取り込み、Na依存性でなく、Ach合成能低いものである。ここで K_m は、取り込みに carrier を仮定した時の酵素の Michaelis 定数に対応するものである。このような仮定は、シナプトゾーム画分には cholinergic 由来と non-cholinergic 由来のシナプトゾームが混在しているであろう事を考えれば唐突なものではない。$Chol^*$ 濃度を変えて取り込ませた結果を、上記の仮定で予備的に解析して見ると、前者の K_m が 3.7 μM, Ach^* の比率が 43%、後者の K_m が 47 μM、Achの比率が 4% であった。

2. シナプトゾームからの Ach^* の放出。

図2に、シナプトゾームに取り込まれた Ach^* の放出の時間経過を示す。媒質のK濃度を 5 mM から 35 mM に代えると Ach^* の放出が促進される。この促進効果は、最初の5分間の保温中に起り、全 Ach^* の約 25% がKの増加により速やかに放出される。$Chol^*$ の放出もKの濃度増加により、若干促進されるが、その程度は Ach^* の場合に比べ小さい。

このKの効果は、ヘミコリニウム No.3 の存在下で $Chol^*$ の取り込みと Ach^* の合成を阻害した条件でも見られるので、放出されたものの再取り込みに対する効果を見ているという可能性は除かれる。又保温中の Ach^* と $Chol^*$ 各々の残量(沈澱画分+上清画分)は変らないので、Kの効果が $Chol^*$ に対してより、Ach^* に対して大きいのはその放出に影響を与えている為で、$Chol^* \rightleftarrows Ach^*$ の変換に影響を与えている為ではない。

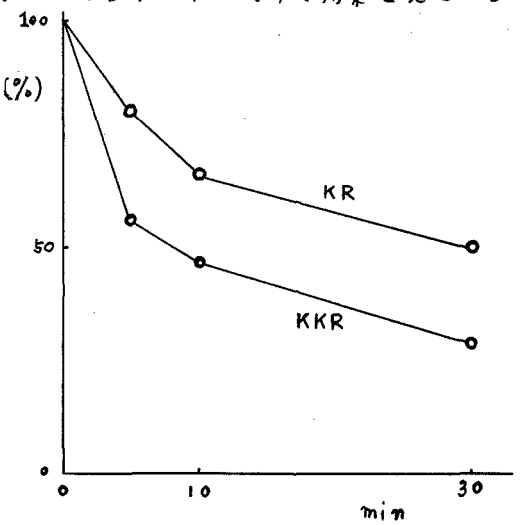


図2 Achの放出。
KKR: NaCl 11 mM, KCl 35 mM、他の成分はKRと同一

図2に示すような条件で10分間保温した後遠心し、沈澱についてもう一度Kの効果を見ると、最初に 5 mM KCl を含む媒質で保温した試料では最初の保温と同程度のKの効果が見られるが、最初に 35 mM KCl を含む媒質で保温した試料ではKの効果が非常に小さくなっている。この結果に対する一つの解釈は、合成された Ach^* の内 25% がKに感受性のコンパートメントにあると仮定する事である。この仮定は、具体的な形では検証できていない。即ち、取り込まれた Ach^* の内、75% が浸透圧感受性で、25%

が低放性であるか、その何れかに対応している訳ではない。又シナップス小胞画分には殆んど Ach^+ を検出出来なかった。

図3に、Ach^+ の放出に対するKとNaの効果を示す。取り込みの場合と違い、放出に対してはNaの効果は殆んど見られない。又CaとMgの効果も殆んど見られなかった。ウアバインと$NaCN$を添加した時、放出を促進する効果が見られた。

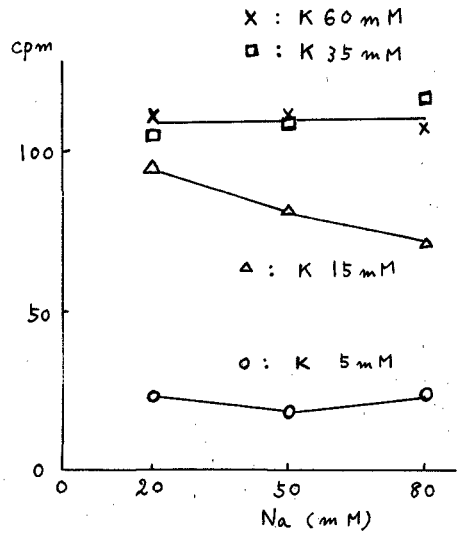


図3 Achの放出に対するNaとKの影響。
縦軸：37°C, 8分間保温中に放出されたAch。
蔗糖 [145 − (Nacl) − (kcl)] × 2 mM が加えられている。

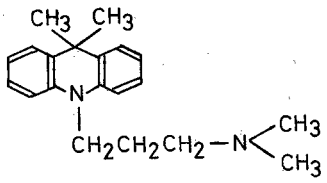
〔文 献〕

1) Abdel-Latif A. A. : Biochim. Biophys. Acta 121, 403 (1966)
2) Diamond I. and Kennedy E. P. : J. Biol. Chem. 244, 3258 (1969)
3) Kurokawa M., Sakamoto T. and Kato M. : Biochem. J. 97, 833 (1965)
4) 黒川正則, 加藤誠, 町山幸輝, 坂本哲彦, 秋元波留夫：神経患研究の進歩 8, 587 (1964)
5) Mann P. J. G., Tennenbaum M. and Quastel J. H. : Biochem. J. 33 822 (1939)
6) Marchbanks R. M. : Biochem. J. 104, 148 (1967)
7) Marchbanks R. M. : Biochem. J. 110, 533 (1968)
8) Marchbanks R. M. : Biochem. Pharmcol. 18, 1763 (1969)
9) Potter L. T. In The Interaction of Drug and Subcellular Components on Animal Cells (Edited by Champbell P. N.) p. 293 J. and A. Churchhill Ltd., London.
10) 武山邦彦, 小林晴男, 畑文明, 竹野一, 柳谷岩雄：神経化学 II, 201 (1968)

9. ^{3}H - Dimetacrine の神経終末顆粒における存在様式について

石谷良一・斉藤堅太郎（日立化学・研究部）
須賀哲弥　（東薬大）
北川晴雄　（千大，薬）
佐藤哲男　（千大・腐敗研）

緒言　10-(3(dimethylamino) propyl)-9,9-dimethyl-acridan（以下Dimetacrineと略す）は，Molnar[1]らにより合成された化合物でありイミプラミン同様抗レセルピン作用を有し，顕著な抗うつ作用を有する事が臨床的にも報告されている。我々は第39回日本薬学会において本化合物の生体内挙動[2]，および代謝運命[3]について報告したが，今回は本化合物を中心として中枢神経系薬物の作用機序を解明するための第一歩として，標的組織である大脳における本化合物の存在様式を細胞下レベルで検討した。



Structure of Dimetacrine

実験方法

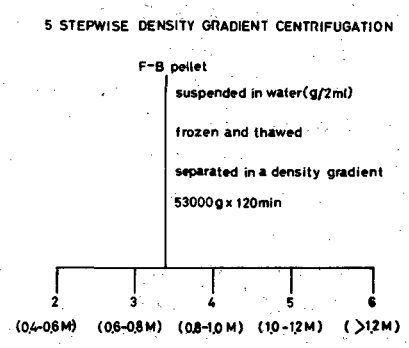
・H^3-Dimetacrineの合成　Dimetacrineのトリチウム標識化に関しては Eidinoff[4]らの方法に従った。即ちトリチウム水を labeled-precursor とし，比放射能 22 μCi/mg の H^3-Dimetacrine を合成した。放射化学的純度は，混融試験，Thin layer および paper chromatography により確認した。

・myelin fragments，synaptosomes および mitochondria の分画

分画方法については，V.P. Whittaker[5,6]らの方法に従った。ラット大脳皮質より 0.32M sucrose にて 10% homogenate を作製し，1000g×10min. の条件下で nuclei と上清部に分画した。上清部をさらに 17000g×55min.，Hitachi 65P ultra centrifugator にて遠沈し，crude mitochondria 分画を得た。このものを 0.32M sucrose に懸濁し，0.8M と 1.2M sucrose の stepwise density gradient に層積し，Hitachi 65T swing rotor にて 53000g×120min. の条件下で F-A（particle density：0.32－0.8M sucrose），F-B（particle density：0.8－1.2M sucrose）および F-C（particle density：>1.2M sucrose）の3分画を得た。17000g×55min. の上清部はさらに 10^5g×120min. の条件下で microsomes と soluble fraction に分画した。

・synaptic vesicles および synaptosomes ghost の分画

神経終末顆粒から synaptic vesicles および synaptosomes-ghost の分画方法について，その概略を図に示した。particle density 0.8－1.2M sucrose 分画を 10^5g×60min. 遠沈を行い pellet を得た。この pellet を original tissue g当り 2ml の水に懸濁し，凍結融解を12回行った後，0.4, 0.6, 0.8, 1.0 および 1.2M sucrose にて作製した stepwise density gradient に層積し，Hitachi RPS 25-3A swing rotor にて 53000g×120min. の条件下で密度勾配遠沈を行った。



・形態学的考察

シヨ糖密度勾配遠沈にて得られた各分画は電子顕微鏡的手法により形態学的検討を行った。電子顕微鏡用ブロックの作製方法は，各分画を4% Glutaraldehyde 溶液にて前固定後，1.5% Osmium tetroxide にても固定を行い，EtOH 脱水後 Epon-resin mixture にて包埋し，Potor Blum 工型 ultra microtom で 500Å の超薄切片を作製し，Uranyl-acetate および Hillonig[7] の Lead acetate で二重電子染色後 日本電子製 JEM-T7S（60kV）電子顕微鏡にて観察した。

・測定方法

タンパク量については、Bovine serum albumin を standard とし Folin-Lowry[8] 法にて 750mμ で比色定量した。Cyt.C-oxidase (E.C.1.9.3.1.) 活性の測定に関しては、L.Smith[9] の方法に従った。還元型 Cyt.C の酸化速度を 550mμ で測定した。反応条件は、pH7.0 で温度 30℃、反応時間は 1min. であった。H^3-radioactivity の測定方法は、酸素フラスコ (500ml) を用いて dry combustion method[10] に依りトリチウム水として、あるいは一定希釈法直接親水性 scintillator にて Aloka LSC 501型 Liquid Scintillation Spectrometer で計測した。absolute dissociation constant は、Cs^{137} による外部線源法にて算出した。計数効率は 42% であった。

・Paper chromatography

大脳組織を 5 倍量の MeOH にて 2 回 homogenize した後、MeOH 相を 30℃、減圧下 evaporate した。残渣に 0.6N-HCl 10ml を加えて懸濁後 Ether 10ml を添加して 5 min. 振盪し、1000g×10min. 遠沈後、Ether 相は除去した。HCl 相をアンモニア水 (28-29%) にて pH 11 とした後 NaCl にて飽和し、1,2-dichloroethane 10ml にて 3 回抽出した。かくして得られた有機相を 30℃、減圧下 evaporate した。残渣に少量の 1,2-dichloroethane (0.2ml) を加え、Toyo Roshi No.51A にスポットした。展開は上昇法で行い、展開溶媒は Toluene-Ether-Formic acid (10:10:5) であった。展開終了後汎紙を 1cm 間隔で切り取り、3ml の MeOH で抽出後、親水性 scintillator にてその radioactivity を計測した。

・脳室内注射

脳室内注射については、Noble[11] らの方法に従った。投与量はラット当り 30μl (3μCi) であった。

実験結果および考察

(1) myelin fragments, synaptosomes および mitochondria の分画

V.P.Whittaker らの方法に従って crude mitochondria 分画を stepwise density gradient centrifugation により particle-density 0.32-0.8M の F-A, 0.8-1.2M の F-B および 1.2M 以下の F-C の 3 分画を得た。各分画のタンパク量および Cyt.C-oxidase 活性についての結果を Table 1 に示した。Cyt.C-oxidase 活性は、F-B では 28.0%, F-C では 65.3% であった。各分画に含まれる顆粒成分は、電子顕微鏡による考察から F-A は myelin fragments F-B は synaptosomes, F-C は mitochondria であった。

(2) Synaptic vesicles および synaptosomes ghost の分画

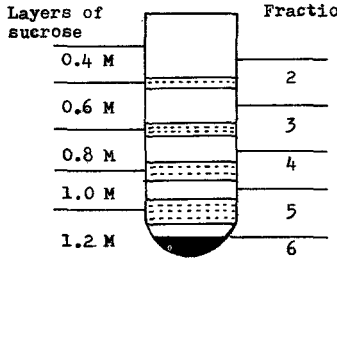
stepwise density gradient centrifugation の結果を Fig. 1 に示した。我々が行った条件下で F-B は 5 分画に分画された。各分画の形態学的考察を Table 2 に示した。synaptic vesicles は、particle density 0.4-0.6M sucrose の F-2 分画に認められた。粒子径は 500Å であった。synaptosomes ghost は particle density 1.0-1.2M sucrose の F-5 分画に認められた。これらの結果は Whittaker らの報告と若干の違いを呈示し

TABLE 1

PROTEIN CONTENT AND CYT.C OXIDASE IN THE SUBFRACTIONS OF RAT BRAIN CORTEX

Fraction	Recovered protein (%)	Recovered cyt.c-oxidase (%)
nuclei	7.1	11.3
crude mitochondria	68.0	88.0
microsomes	6.2	0.7
soluble fraction	18.7	0
recovery (%)	92	86
3 stepwise		
F—A	28.9	6.7
F—B	40.2	28.0
F—C	24.9	65.3
recovery (%)	76	49

FIG.1 DIAGRAM SHOWING THE APPEARANCE OF THE DENSITY GRADIENT



ている。synaptic vesicle の密度については、linear-density gradient を用いていないので正確には判らないが、Jones[12]は、octopus brain を用いて particle-density 0.4–0.6 M sucrose 分画に synaptic vesicles を認めたと報告している。

(3) MeOH 不溶性の radioactive component の paper chromatography

ラット大脳から MeOH により抽出される radioactive-component について paper chromatography を行い、Fig.2 に示す結果を得た。radioactive component は Rf 値 0.42 を示し、internal standard とした Dimetacrine の U.V. 254 mμ での吸収帯と一致した。

(4) H^3-Dimetacrine の細胞内分布について

Wistar 系雄ラット (B.W. 200–250g) に H^3-Dimetacrine を 25mg/kg 経口投与し、2.5 時間後の各分画での H^3-radioactivity を計測した。その結果を Table 3 に示した。crude mitochondria 分画に 71.7% の H^3-radioactivity が認められた。この分画をさらに密度勾配遠沈により細分画した結果は、F-A (myelin fragments) に 27.8%, F-B (synaptosomes) に 48.9%, F-C (mitochondria) に 23.3% であった。Table 4 には、H^3-Dimetacrine を脳室内注射し、1 時間後の各分画での分布状態の結果を示した。経口投与同様、crude mitochondria 分画に 75.6%, F-A (myelin fragments) に 36.3%, F-B (synaptosomes) に 47.1%, F-C (mitochondria) に 16.6% の H^3-radioactivity が認められた。これらの知見から、H^3-Dimetacrine は crude mitochondria 分画に大部分存在し、その内でも特に particle density 0.8–1.0 M Sucrose の F-B 即ち synaptosomes 顆粒を多く含む分画に存在する事が判明した。

Table 4 に示した F-B (synaptosomes) 分画を、低張処理および凍結融解処理した後、stepwise density-gradient centrifugation により 5 つの分画に分画し、Table 5 に示す結果を得た。H^3-radioactivity は、F-2, F-3, および F-4 には殆んど認められず、F-5 即ち particle density 1.0–1.2M sucrose 分画に 53.7%, F-6 即ち particle density 1.2M sucrose 以下分画に 40.5% であった。電子顕微鏡による知見からは、synaptic vesicles は F-2 の分画に、synaptosomes – ghost は F-5 の分画に位置していた。この事から H^3-Dimetacrine は synaptosomes 顆粒では、

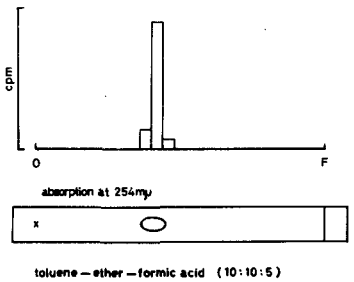
TABLE 2

MORPHOLOGY OF FRACTIONS PREPARED BY DENSITY GRADIENT SEPARATION

Fraction	Particle density	Morphology
2	0.4 — 0.6M	synaptic vesicles
3	0.6 — 0.8M	synaptic vesicles myelin fragments
4	0.8 — 1.0M	some synaptic vesicles myelin fragments synaptosomes ghost
5	1.0 — 1.2M	synaptosomes ghost
6	>1.2M	damaged synaptosomes membrane fragments

FIG. 2

PAPER CHROMATOGRAPHY OF MeOH EXTRACTABLE COMPONENT IN RAT BRAIN



toluene — ether — formic acid (10:10:5)

TABLE 3

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF H^3RADIOACTIVITY IN THE SUB-FRACTIONS OF RAT BRAIN CORTEX

Fraction	H^3radioactivity (dpm)	Recovered — H^3radioactivity (%)
nuclei	6.3×10^4	6.9
crude mitochondria	6.62×10^5	71.7
microsomes	8.33×10^4	9.0
soluble fraction	1.15×10^5	12.4
recovery (%)	89	
3 stepwise		
F — A	1.57×10^5	27.8
F — B	2.76×10^5	48.9
F — C	1.32×10^5	23.3
recovery (%)	86	

P.O.

TABLE 4

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF H^3RADIOACTIVITY IN THE SUBFRACTIONS OF RAT BRIN CORTEX

Fraction	H^3radioactivity (dpm)	Recovered H^3radioactivity (%)
nuclei	1.36×10^5	6.3
crude mitochondria	1.63×10^5	75.6
microsomes	3.14×10^5	14.6
soluble fraction	7.55×10^4	3.5
recovery (%)	89.6	
3 stepwise		
F — A	4.1×10^5	36.3
F — B	5.33×10^5	47.1
F — C	1.86×10^5	16.6
recovery (%)	76.6	

Intraventricular

Synaptic vesicles よりも synaptic membrane に存在して いると考えられる。本薬物とは逆の薬効を示す, Phenothiazine 系の tranquilizer である chlorpromazine, および Neutral red について Koenig[13] らは, synaptic-vesicles を多く含む分画に最も高い数値を示したと報告している。本実験より得られた結果を比較検討する事は早急と思われるが, tranquilizer と antidepressants について, 神経終末顆粒内でその存在様式を異にしているのかもしれない。

TABLE 5
DISTRIBUTION OF H^3-RADIOACTIVITY IN THE SUBFRACTIONS OF SYNAPTOSOMES

Fraction	H^3-radioactivity (dpm)	Recovered H^3-radioactivity(%)	Recovered protein(%)
2	5.81×10^3	1.7	0.8
3	5.22×10^3	1.6	0.8
4	8.22×10^3	2.5	1.8
5	1.75×10^5	53.7	59.0
6	1.32×10^5	40.5	37.6
recovery(%)	91		78

Synaptic membrane については, De Robertis[14] らの報告に依れば, acetylcholinesterase が局在して居り, Na^+-K^+ dependent ATPase 活性も高い。また biogenic amines に対する receptor-property を持つと思われる gangliosides については, synaptic vesicles には強く認められず, synaptic-membrane に多いと報告されている。[15] Synaptosomes と中枢神経系薬物との相関関係については, 我々の知見からは, 現段階では何にも言えないが, 一例として C^{14}-Serotonin と synaptosomes を in vitro で incubation すると, C^{14}-serotonin が特異的に synaptic membrane に結合し, Desmethylimipramine および Reserpine の存在下では, 結合の割合が減少すると報告されている。[16] 今後は, 中枢神経系薬物と神経終末顆粒との相関関係を生理的な面から検討したく考えている。

文献

(1) I. Molnar and Wagner-Jauregg : Helv. Chim. Acta, 48, 1782 (1964)
(2) R. Ishitani, K. Saito and H. Kitagawa : Jap. J. Pharmacol., 投稿中
(3) R. Ishitani, K. Saito and H. Kitagawa : Jap. J. Pharmacol., 投稿中
(4) L. M. Eidinoff : J. Am. Chem. Soc., 75, 1992 (1953)
(5) E. G. Gray and V. P. Whittaker : J. Anat., 96, 79 (1962)
(6) V. P. Whittaker and I. A. Michaelson : Biochem. J., 90, 293 (1964)
(7) G. Millonig : J. cell. Biol., 11, 736 (1961)
(8) O. H. Lowry : J. biol. chem., 193, 265 (1951)
(9) L. Smith : Methods of Biochemical Analysis Vol. II P-427
(10) S. Baba and S. Iwahara : Yakugakuzasshi, 87, 830 (1967)
(11) E. P. Noble and J. Axelrod : Life Sciences, 6, 281 (1967)
(12) D. G. Jones : Brain Research, 17, 181 (1970)
(13) H. Koenig et al., : Trans. Amer. Neurol. Asso., 90, 189 (1965)
(14) G. R. De Lores Arnaiz, M. Alberici and E. De Robertis : J. Neurochem., 14, 215 (1967)
(15) E. G. Lapetina, E. F. Soto and E. De Robertis : Biochim. Biophys. Acta, 135, 33 (1967)
(16) S. Fiszer and E. De Robertis : J. Neurochem., 16, 1201 (1969)

10. カテコールアミン生合成に関する研究－脳尾状核のチロシン水酸化酵素

永津俊治・須藤幸子（愛知学院大・歯・生化）
永津郁子　（愛知看護短大・解剖生理）

チロシン水酸化酵素（1）は，チロシンを水酸化してドーパを生成する一原子酸素添加酵素で，カテコールアミン生合成の律速段階と考えられる（2）。脳，副腎の他，心臓，精索などの交感神経分布臓器でのカテコールアミン生合成は，終末産物のカテコールアミンによる，第一段階のチロシン水酸化酵素のフィードバック阻害によって調節されている（3，4，5）。カテコールアミンは，副腎（6），交感神経終末（7）で顆粒画分に存在することが立証されている。新しく生合成されたカテコールアミンはチロシン水酸化酵素を阻害すると考えられるので，細胞内での，チロシン水酸化酵素と，カテコールアミンの局在は密接であると推定される。しかしチロシン水酸化酵素の細胞内局在については意見が一致していない。脳，副腎では本酵素の大部分は particle-bound であった（1，8）。その後，本酵素は脾神経，副腎で，可溶性画分のみに局在するという報告が現われた（9，10，11）。これらの本酵素の細胞内局在の研究は，主に副腎について研究され，脳については詳細な研究はなされていない。

最近 L-ドーパがパーキンソニスムに有効であることにより，線条体でのカテコールアミン（ドーパミン）の生合成が注目されている。脳内チロシン水酸化酵素の局在はカテコールアミンの分布と一致し，尾状核，視床下部，視床，中脳，延髄，大脳皮質，小脳の順であり尾状核に最も活性が高い（12，13）。パーキンソニスムの病因に線条体の本酵素が何らかの関連をもつことが推定される。脳チロシン水酸化酵素については，細胞内分布の詳細，精製とその性質などの基礎的知見も不明のままであるので，脳内カテコールアミン生合成研究の一部として，まず尾状核におけるチロシン水酸化酵素の基礎的知見の解明を行なった。

1．実験材料・実験方法

新鮮なウシ脳を採取後直ちに氷冷し，尾状核を分離した。尾状核の細胞分画は Whittaker（14）の方法によった。0.32 M ショ糖液で，Ultra-Turrax ホモゲナイザーでホモジネートとし，1,000 × g，10 分間遠沈して核，cell debris を除去した後，上清を 18,500 × g，60 分間遠沈した。沈渣（粗ミトコンドリア画分）を 0.8 M，1.2 M のショ糖液よりなる密度勾配法で，55,500 × g，120 分間遠沈し，ミエリン，神経終末（synaptosomes），ミト

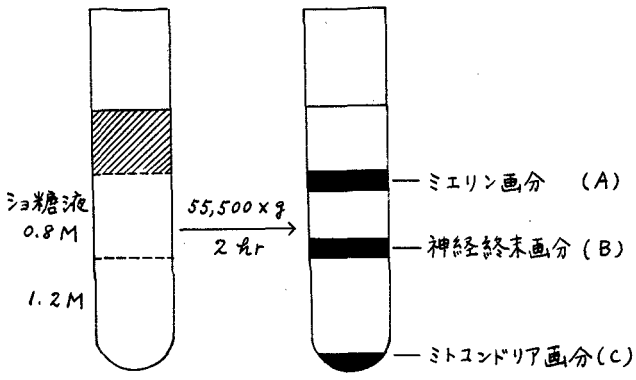


図1.
ウシ脳尾状核の細胞内画分のショ糖密度勾配法による分離
（Whittaker 法（14）による）

コンドリアを分離した（図1）。シナプス小胞画分（synaptic vesicles）の分離はMaynertらの方法（15）により粗ミトコンドリア画分を低張処理した後遠沈分離した。各画分の純度は電子顕微鏡で検定した。チロシン水酸化酵素活性はL-チロシン-^{14}Cを基質として，生成したL-ドーパ-^{14}Cをアルミナカラムで分離測定した（1）。5,6-ジメチルテトラヒドロプテリジン（DMPH$_4$）はCalbiochem.より購入した。反応液は酢酸バッファー（pH 6.0），200 μmoles; L-チロシン-^{14}C，0.1 μmole（50 μC）; $FeSO_4$，1 μmole; メルカプトエタノール，100 μmoles; DMPH$_4$，1 μmole; 酵素; 水で総量1.0 mlとした。モノアミン酸化酵素活性はkynuramineを基質として基質の減少より測定した（16）。反応液は，リン酸バッファー（pH 7.4），75 μmoles; kynuramine，0.25 μmole; 酵素; 総量1.5 mlとした。タンパク量はLowry法（17）で測定した。

2．実験結果

1）尾状核のチロシン水酸化酵素とモノアミン酸化酵素の細胞内分布

チロシン水酸化酵素と同時に，カテコールアミンの分解酵素であり，またミトコンドリア酵素であるモノアミン酸化酵素の尾状核における細胞内分布もしらべた。表1に示すように，チロシン水酸化酵素は，神経終末画分（synaptosomes），ミクロソーム画分，可溶性画分に存在した。これに対してモノアミン酸化酵素は，ミトコンドリア画分に集中して存在し，神経終末，ミクロソームにも弱い活性が認められた。神経終末内の局在をさらにしらべるために，粗ミトコンドリア画分をMaynertら（15）の方法で，低張処理後，遠沈分離したシナプス小胞画分にも高いチロシン水酸化酵素活性が認められた。

表1．ウシ脳尾状核のチロシン水酸化酵素とモノアミン酸化酵素の細胞内分布

細胞内画分	チロシン水酸化酵素	モノアミン酸化酵素
	μmoles / min / mg protein	
ホモジネート	12	755
ミトコンドリア（C）	9	3030
神経終末（B）	17	1300
ミエリン（A）	3	320
ミクロソーム	20	800
可溶性画分	17	0
シナプス小胞画分（synaptic vesicles）	18	390

2．脳尾状核のparticle-bound チロシン水酸化酵素と可溶性画分チロシン水酸化酵素の性質の比較

上記の成績より，尾状核チロシン水酸化酵素には，particle-bound（神経終末画分，おそらくsynaptic vesicles）の酵素と可溶性画分の酵素との2種類が存在することが明らかとなった。particle-boundの酵素は，粗ミトコンドリア画分を材料として，種々の可溶化の処理を行なったが，極めて強固に結合しており，容易に可溶化されな

いので，尾状核の神経細胞内でも，細胞質と顆粒内とに異なった局在をしていると推定される。

粗ミトコンドリア画分をKClで3回，リン酸緩衝液で2回洗滌したwashed particlesについて，各種の可溶化を試み，デオキシコール酸存在下にトリプシン処理を行なうと，可溶化されることを発見した。可溶化の条件は0.05%デオキシコール酸存在下に，トリプシン（Boehringer）（0.5μg/mg protein）を添加，4°で15時間反応させ，soybean trypsin inhibitor（Calbiochem）をトリプシンと同量添加して反応を停止した。最適トリプシン量は購入したトリプシンの種類により極めて異なるので予備実験で確

表2. ウシ脳尾状核（41g）のparticle-boundチロシン水酸化酵素の可溶化と硫安分別による精製

酵素標品	タンパク量（mg）	比活性（mμmoles/min/mg）	総活性（mμmoles/min）
洗滌した粗ミトコンドリア画分	1443	0.164	236
トリプシン消化後の上清	499	0.285	142
硫安分別			
0 ～ 25 %	16	0.089	5.27
25 ～ 35 %	25	0.187	8.40
35 ～ 45 %	31	0.863	53.63
45 ～ 55 %	38	0.472	30.81
55 ～ 65 %	25	0.045	1.93
65 ～ 80 %	26	0.005	0.28

める必要がある。可溶化された酵素を含む上清を硫安分別すると表2に示すように35～55%，ことに35～45%硫安飽和度の沈澱にほとんどの活性が回収された。当初の実験では可溶化した上清の総活性は硫安分別により著明に増大するという結果が得られたが，これは可溶化された酵素は稀釈すると活性が上がるために，抑制された活性を測定していたためと判明した。表2は可溶化後の上清を酵素量と活性が比例するまで稀釈して測定した値で，硫安分別による活性回収は約70%であった。稀釈効果のあることは内在阻害因子の存在を推定させるが，硫安分別後の各画分を添加テストした結果では，35～45%の酵素画分以外のいずれの画分も阻害効果はなく，現在までのところ内因性阻害因子の画分を得ることに成功していない。従って阻害因子の存在は未だ明らかでない。粒子画分より可溶化硫安分別で精製した酵素はDMPH4なしでは活性はなかった。またFe^{2+}なしでもほとんど活性は認められなかった。各種金属のうちでFe^{2+}のみが活性化した（表3）。最適pHは酢酸バッファー中で約5.9，リン酸バッファー中では活性は酢酸バッファー

表3. 粒子画分からの精製酵素に対する金属の影響

金属	酵素活性 DOPA formed (mμmoles)	比率
—（対照）	0.249	1.0
Fe^{2+}	6.508	26.2
Fe^{3+}	0.709	2.9
Ba^{2+}	0.241	1.0
Cd^{2+}	0.179	0.7
Ca^{2+}	0.268	1.1
Co^{2+}	0.064	0.3
Mg^{2+}	0.295	1.2
Mn^{2+}	0.257	1.0
Zn^{2+}	0.092	0.4

中の約15%あった。精製酵素は不安定で，30°で30分で50%に失活し，50°では10分でほとんど活性が消失した。チロシンに対するKmは4.6×10^{-5}M，$DMPH_4$に対するKmは1.3×10^{-4}Mであった。

3．考察と結論

従来，チロシン水酸化酵素の細胞内分布，精製とその性質などの研究は，副腎の本酵素について報告されてきた（1,8）。これに対して，脳内のチロシン水酸化酵素については，詳細は不明のままであった。本研究の成績より，脳尾状核の本酵素について，次のことが一応結論されよう。1）脳(尾状核）では可溶性画分の酵素と粒子画分の酵素の2種類がある。粒子画分の酵素は神経終末画分（おそらくsynaptic vesicles）に局在すると推定される。最近Fahn 5[18]も，本研究の成績と一致して，牛脳尾状核のチロシン水酸化酵素はsynaptic vesiclesに局在することを示す成績を得た。2）粒子画分の本酵素は，極めて強く粒子と結合しているが，デオキシコール酸存在下にトリプシン消化で可溶化される。尾状核では大部分の酵素活性は粒子画分に存在し，可溶性画分の酵素活性は一部にすぎない。3）可溶性画分の本酵素と粒子画分の本酵素は分子として異なっており，isozymeである可能性があるので，両画分の酵素をさらに精製し，性質を比較検討している。現在までの成績では，脳の両画分の酵素共に副腎の本酵素と著明な性質の差は認められず，いずれも助酵素に還元型プテリジンを要求した。脳の可溶性画分，粒子画分の両酵素の精製とその性質，カテコールアミン生合成の調節との関係，内在阻害因子の存在についてさらに追求中である。

謝辞：本研究に対する，西川裕子氏，芝原由美子氏の技術的援助に感謝します。

4．文献

1) Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S., J. Biol. Chem., 239, 2910 (1964).

2) Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S., J. Pharmacol. Exp. Therap., 148, 1 (1965).

3) Gordon, S., Spector, S., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S., J. Pharmacol. Exp. Therap., 153, 440 (1966).

4) Alousi, A. and Weiner, N., Proc. Natl. Acad. Sci., 56, 1491 (1966).

5) Roth, R. H., Stjärne, L. and von Euler, U. S., Life Sci., 5, 1971 (1966).

6) Blaschko, H. and Welch, A. D., Arch. Exp. Path. Pharmak., 219, 17 (1953).

7) von Euler, U. S. and Hillarp, N.-Å., Nature, 177, 44 (1956).

8) Petrack, B., Sheppy, F. and Fetzer, V., J. Biol. Chem., 243, 743 (1968).

9) Stjärne, L. and Lishajko, F., Biochem. Pharmacol., 16, 1719 (1967).

10) Laduron, P. and Belpaire, F., Biochem. Pharmacol., 17, 1127 (1968).

11) Musacchio, J. M., Biochem. Pharmacol., 17, 1127 (1968).

12) 永津俊治，神経研究の進歩，9, 460 (1965).

13) Nagatsu, T. and Yamamoto, T., Experientia, 24, 1183 (1968).

14) Whittaker, V. P., in " Methods of Separation of Subcellular Structural Components ", Biochem. Soc. Symposium, No. 23, Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 109 (1963).

15) Maynert, E. W., Levi, R. and De Lorenzo, A. J. D., J. Pharmacol. Exp. Therap., 144, 385 (1964).

16) Weissbach, H., Smith, T. E., Daly, J. W., Witkop, B. and Udenfriend, S., J. Biol. Chem.,235,1160 (1960).

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

18) Fahn, S., Rodman, J. S. and Côté, L. J., J. Neurochem., 16, 1293 (1969).

11. ラット脳幹網様体における norepinephrine, 5-hydroxytryptamine および 5-hydroxyindole-3-acetic acid 量とその断眠時の変動

融　道男・渋谷治男・小屋明子
島薗安雄　（東医歯大・医・神経）

睡眠機構の生化学的解明のために動物に断眠（sleep deprivation）という条件を与えて、その際の代謝の変動をみる方法がある。われわれもさきにこの方法を用いてラット脳内 acetylcholine, norepinephrine (NE) および 5-hydroxytryptamine (5HT) を測定し、今まで全脳を用いる方法では変化がみられないと報告されていたこれらの物質について、分割脳を用いて測定することにより変化を認めた。[14][15] 今回の実験では脳を更に分割することにより、これらの物質の変動の局在を確かめることを目的とし、脳幹網様体をとりだしてmonoamineおよびその代謝物質を測定することを試みた。

実験動物および実験方法

1. 実験動物

使用した動物は体重174g～310gのWistar系ラットである。

2. 断眠動物および対照動物のつくり方

全睡眠遮断法は既報[14]と同様であるが、今回は電源を4時間に1回タイマー（東芝2段動作タイムスイッチ）を用いて15分間ずつ停止し、この間に動物がスキンナー箱内の餌と水を摂取できるようにした。実験はすべて午前9時～10時の間に開始し、同時に餌量を断眠動物とほぼ同量に制限した対照動物を準備し、断眠動物と同時刻に実験に供した。

3. 脳幹網様体をとりだす方法

ラットの脳をとりだし、中脳、橋、延髄の3部分に分け、それぞれの部位について凍結法で50μの厚さの切片をきりだし、hematoxylin-eosin法で染色した。それぞれの標本について10倍に拡大した写真を撮影し、それぞれの写真における網様体部分の輪郭を描き、これを中脳、橋、延髄に分け、重ね合せて1枚の紙に描いたのち、それぞれの部位において脳幹網様体の共通部分としてよいと思われる部位を決定した（図1）。拡大を元に戻して、厚さ0.08mmの特殊合金（アメリカR社製）を用いて脳幹網様体をくりぬく（punching）器具を作成した。

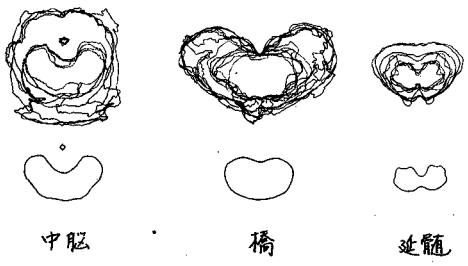


図1. ラット脳幹網様体の部位別重複写生図

それぞれの下に示した図は、破線内部の網様体部分をpunchingする器具を作るための設計図で、写生図の共通部分から輪郭を決めたものである。

4. 脳をとり出す方法

ラットを室温にて断頭し，ただちに冷凍室内の砕氷上で脳をとりだし，上述の3部分に分け，各部分を脳幹網様体とそれをくりぬいた残部組織とに分けた。橋は三叉神経根の出入りする高さで三叉神経前部（pretrigeminal part）と三叉神経後部（retrotrigeminal part）に分け，前者は中脳と合わせ，後者は延髄と合わせて測定に供した。残部組織についても同様に合わせて用いた。

5. 脳内物質の測定法

NEは0.01N HClで抽出し，butanolおよびheptaneを用いて0.1N HClに移行させ[9] Chang[3]の方法により蛍光的に測定した。

5HTと5-hydroxyindole-3-acetic acid (5HIAA)は0.4N perchloric acidにより同時に抽出した[11]のち，5HTはSnyderら[12]，5HIAAはGiacaloneらの方法[6]により測定した。なおNEの測定は1匹の動物を用いたが，同一標本から5HTと5HIAAを測定するためには3～4匹の動物脳部分をプールして用いた。

結果

24時間の断眠ラットにおいては26.0±12.05gの体重が減少し，対照ラットにおいては24時間後8.5±10.89gの体重減少を認めた。つぎに表1に測定した各部位の脳重量を示す。また表2に示すように脳幹網様体におけるNE，5HT，5HIAA量は中脳＋橋三叉神経前部においては1%以下の危険率をもって網様体（Rf）の方が残部（Rm）より高い。しかし橋三叉神経後部＋延髄においては3物質ともRfに高い傾向がみられたが，その差は中脳＋前部より少なく，5HT量については有意差が認められなかった。また5HT，5HIAAに関して，橋三叉神経後部＋延髄網様体よりも，中脳＋橋三叉神経前部の網様体の方が高濃度であった。

表1：脳重量（平均値±S.D. mg）

DI	ME-P		P-MO	
	Rf	Rm	Rf	Rm
93.9 ± 5.3 (14)	31.1 ± 4.2 (14)	82.3 ± 6.6 (14)	33.8 ± 2.4 (14)	105.3 ± 8.0 (14)

DI：間脳
ME-P：中脳＋橋三叉神経前部
P-MO：橋三叉神経後部＋延髄
Rf：脳幹網様体
Rm：脳幹網様体を除いた残部組織
（）：動物数

表2：脳幹網様体におけるNE，5HT，5HIAA量（平均値±S.D. μg/g）

	ME-P		P-MO	
	Rf	Rm	Rf	Rm
NE	1.03 ± 0.35 (7)*	0.36 ± 0.08 (7)	0.85 ± 0.18 (6)*	0.57 ± 0.04 (7)
5HT	1.65 ± 0.32 (5)*	0.49 ± 0.13 (7)	0.79 ± 0.15 (4)	0.55 ± 0.19 (6)
5HIAA	2.15 ± 0.30 (6)*	1.01 ± 0.25 (5)	1.20 ± 0.24 (6)*	0.79 ± 0.18 (6)

* $P < 0.01$

表3には24時間断眠ラットの脳幹網様体における5HT量を示した。断眠ラットにおいても5HTは分割した脳各部位で対照ラットに比し有意差は認められなかった。

表3：24時間断眠後の脳幹網様体における5HT量（平均値±S.D. μg/g）

	ME-P		P-MO	
	Rf	Rm	Rf	Rm
5HT	1.24 ± 0.31 (7)	0.56 ± 0.20 (10)	0.72 ± 0.28 (7)	0.48 ± 0.27 (10)

表4に示すように終脳および間脳の5HIAA量は断眠後も変化はみられなかった。

表4：対照および断眠ラットの終脳，間脳における5HIAAの比較（平均値±S.D. μg/g）

	TE	DI
Control	0.47 ± 0.05 (7)	0.94 ± 0.08 (7)
Sleep deprivation	0.56 ± 0.10 (4)	1.07 ± 0.09 (4)

TE：終脳

考察

ラットのような実験用小動物で脳内物質の局所的な変化を調べていくことには，微量定量法の発展が伴なわない限り限界がある。しかし特に断眠の実験の場合この動物を用いることが好都合なので，脳幹網様体のような脳組織を測定の対象に選んだ場合，これを一定の基準でとりだす必要があり，このために器具を考案した。

今回の実験において，橋を三叉神経前部および後部に分けたのは，Batini ら[1,2] Pisa group の切断実験（pretrigeminal midpontine preparation）によって示された橋の前後部での機能の分化を重視したからであり，また形態学的にみても網様体を構成する細胞は橋の後部に大きい細胞が多いといわれているからである。[10]

従来脳幹網様体内部の monoamine については，Kuntzman ら[9]によるとネコの Formatio reticularis mesencephali で 5HT 2.6μg/g，NE 1.4 μg/g，pontis で 5HT 0.89 μg/g，NE 0.97 μg/g であるが，これらは同時に測定された他の脳部位の値に比べて高い。われわれのラットで得た値でもNE，5HTともに脳幹網様体において含有量が高いことがみ出され，特に橋三叉神経前部と中脳を合わせた部分では残部組織の2～3倍に達することが特徴的であった。組織螢光法によればNEは中脳網様体内部に多く存在し[4]，5HTは raphe 核，脳幹網様体中に高濃度に存在していることが確かめられている。[7] われわれの結果はこれらを生化学的定量によって支持しているといえよう。Taber ら[13]は raphe 核が脳幹の上行賦活系の形態的基礎であることを示唆しており，これは raphe 核中に高濃度に存在する5HTが睡眠の機序に関与しているという説[8]とともに重要である。われわれの測定した脳幹網様体部分に大部分の raphe 核は含まれるが，脳幹網様体（特に前部）におけるNEや5HTの高濃度はこれらの monoamine がこの部位の機能に何らかの形で関与していることを推測させる。

また5HIAAの値も monoamine と同じ傾向を示し，とくに脳幹網様体前部において2.15μg/g という高値を示した。最近報告されたラットの脳部位別の値をみると[5]終脳 0.38μg/g，間脳＋中脳 0.89μg/g，橋＋延髄 0.69μg/g であり，われわれの得た終脳

や間脳の値はこれらとほぼ等しいと考えられるので，この高値はこの部位に特有なものであり，5HTの高値と対応しているのであろう．試みに中脳＋橋前部で，脳幹網様体を分割せずにこの物質の測定をしたところ，1.64，1.68，1.40 μg/g という値を得，このことからもこの値が妥当なことが推測された．

われわれはすでに，24時間の全睡眠遮断後に5HTが間脳で減少することを報告したが[14][15]，この機構を確かめるために，この部位の5HIAAの変化を調べたところ，変化は認められなかった．

同じく24時間の全睡眠遮断時に，脳幹網様体内部および外部の5HTの値は，現在の例数では有意な変化は得られていない．

（なお脳幹網様体について御教示いただいた萬年甫教授に感謝します．またこの研究には当研究室でおこなわれた山口博通氏（現エーザイ株式会社）の卒業研究の一部を使用した．）

文　献

1) Batini, C., Magni, F., Palestini, M., Rossi, G. F. and Zanchetti, A., Arch. ital. Biol., 97 : 13, 1959.
2) Batini, C., Palestini, M., Rossi, G. F. and Zanchetti, A., Arch. ital. Biol., 97 : 26, 1959.
3) Chang, C. C., Int. J. Neuropharmacol., 3 : 643, 1964.
4) Dahlström, A. and Fuxe, K., Acta Physiol. scand., 62 : 5, 1964.
5) Fischer, C. A., Kariya, T. and Aprison, M. H., Comp. gen. Pharmac., 1 : 61, 1970.
6) Giacalone, E. and Valzelli, L., J. Neurochem., 13 : 1265, 1966.
7) Hillarp, N. -Å. Fuxe, K. and Dahlström, A., Mechanisms of release of biogenic amines (ed. von Euler, U.S., Rosell, S. and Uvnäs, B.), Pergamon Press, Oxford, 1966.
8) Jouvet, M., 精神医学 12 : 4, 1970.
9) Kuntzman, R., Shore, P. A., Bogdanski, D. and Brodie, B. B., J. Neurochem. 6 : 226, 1961.
10) 萬年甫, 脳と神経, 19 : 447, 1967.
11) Scapagnini, U., Vandenbroeck, R. and de Schaepdryver, A., Biochem. Pharmacol., 18 : 938, 1969.
12) Snyder, S. H., Axelrod, J. and Zweig, M., Biochem. Pharmacol., 14 : 831, 1965.
13) Taber, E., Brodal, A. and Walberg, F., J. comp. Neurol., 114 : 161, 1960.
14) 土屋健二，小屋明子，青治浩，舘道男，小林暉佳，神経化学 7 : Suppl., 122, 1968.
15) Tsuchiya, K., Toru, M. and Kobayashi, T., Life Sci. 8 : 867, 1969.

12. p-Chlorophenylalanineによる中枢 serotonin depletionと動物行動

田中千賀子・余　寧子・伊藤博子
高折修二　（京大・医・薬理）

先天性フェニールケトン尿症の研究は、1958年 Waismanたちによって Phenylalanine (PA) 負荷ラットの実験的フェニールケトン尿症動物が作製されたことを機会に、脳機能障害の物質的背景の探究へと発展し、動物行動変化と脳内物質代謝異常の関連が論じられてきた。その一つとして血中 Serotonin 及びその代謝物質の尿中排泄の減少という形で見出されたフェニールケトン尿症患者の Tryptophan 代謝異常は実験的高フェニールアラニン血症動物でも脳 Serotonin の低下として確められている。1966年、Koe and Weissman[4] は PA 誘導体の中から中枢 Serotonin の specific depletor として para-Chlorophenylalanine (p-CPA) を見出し、中枢 Serotonin に関する研究に一つの有力な手段を与えた。p-CPA は monoamine oxidase, 5HTP decarboxylase を抑制せずに trypotophan hydroxylase, phenylalanine hydroxylase を阻害することが知られている。また、Lipton et al.[5] は p-CPA によりラットにフェニールケトン尿症があらわれることを報告している。動物行動への p-CPA の影響についても若干の報告があり、p-CPA はラットの自発運動を減少させ[1,9,10]、マウスの闘事性を抑制するが[11]条件回避反応 (jump onto platform) の習得を促進するといわれている。[1,9]

今回は、p-CPA などを用いて Sidman型条件回避反応と multiple T, water-escape maze performance を指標としたラットの行動変化と中枢 Serotonin の変動との関連を検討した。更に、PA負荷ラットおよび tyrosine hydroxylase の specific inhibitor である α-Methyl-para-tyrosine (α-MT) を用いて低 Norepinephrine (NE) レベルラットの行動変化を中枢モノアミンの変動と併せて検討した。

実験材料と方法

p-CPA は Pfizer Medical Research Laboratories より提供されたものである。α-MT, 5HTP は、市販のものを用いた。それぞれ生理的食塩水に懸濁又は溶解し、急性実験では p-CPA は経口投与、5HTP, α-MT は腹腔内に投与した。長期連続経口投与にあたっては粉末飼料 (CLEA, CA-1) に p-CPA, PA を混合して投与した。

1) Sidman型条件回避反応　実験開始時体重約 250g (月令 4ヶ月) の Wistar系雄ラットを用いた。個々の動物の1日摂食量は 15g に制限した。Sidman により考案された非弁別条件回避反応装置 (京都計測器製) を用い、回避反応および Shock 回数を毎日 30分間測定した。反応-Shock 間隔は 40秒、Shock-Shock 間隔は 10秒であり、回避反応回数は Lever 押し回数より逃避反応回数を減じた値である。10匹の平均回避反応は 53.2～77.6 回であり、Shock 平均回数は 24.6～32.2 回であった。

2) Multiple-T, water-escape maze performance　一生仔4週の litter mate ラット10匹を1群とし、そのうち5匹を対照群、5匹を薬物投与群とした。7% PA, 3.5% PA, 0.25% p-CPA, 0.1% p-CPA となるように飼料に混合し、pair-feeding により飼育した。急性実験では、生仔6～7週の litter mate 10匹を1群として用いた。Biel の multiple unit water T-maze を使用し start から goal までの遊泳時間(秒) 及び決められた maze の6点での誤状の error 回数を記録した。1日1個体6試行を15分以上の間隔で反復し、6試行の total swimming time と total error 回数を比較した。

3) SerotoninとNEの化学定量 ラットは断頭致死せしめ，直ちに脳を摘出し砕氷上で小脳を除去して残りを Telencephalon とその他の部分に分けて NE および Serotonin を測定した。Serotonin の定量は Bogdanski らの方法，NEの定量は Anton らの方法によった。

表1. 0.1 % p-CPA feeding during 12 days

	Avoidance response (% change)	Shock (% change)
Before	100 %	100 %
1st day	111.4 ±10.5	94.8 ±13.2
2nd "	150.7 ±27.0	77.9 ±11.7
3rd "	136.9 ±11.0**	88.0 ± 6.6
4th "	166.4 ±20.3**	70.9 ±10.9+
5th "	143.8 ±17.9*	98.1 ±10.0
7th "	143.7 ±18.2*	90.8 ±15.8
10th "	147.6 ±11.6**	81.6 ± 6.8+
11th " (5-HTP, 50 mg/kg)	78.5 ±10.7	119.6 ±14.6
12th "	156.9 ±42.9	86.4 ±12.2
Withdraw from the p-CPA feeding		
5th day	124.1 ±21.1	108.6 ±14.6
10th "	92.2 ± 7.3	105.2 ± 9.1

Mean ± S.E. (n = 8), Student's t-test,
significantly increase: * P<0.05, ** P<0.01
significantly decrease: + P<0.05

図1. Multiple-T-water-escape maze

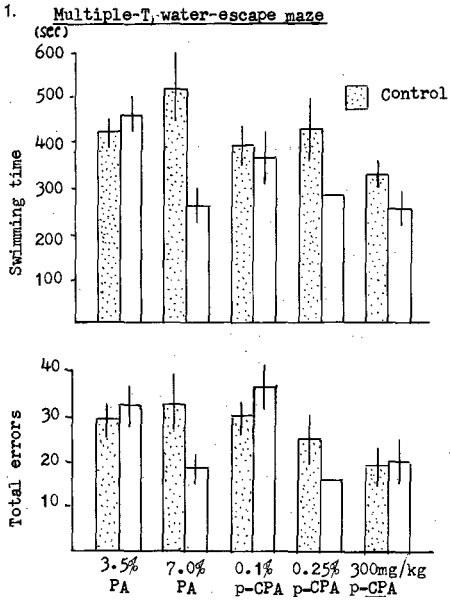


表2. p-CPA (p.o.), 24 hr before the 1st day-trial

p-CPA (mg/kg)		100	300	300
5-HTP, 50 mg/kg		−	−	+
Avoidance response (% change)	Before	100 %	100 %	100 %
	1st day	142.5 ±24.5	172.9 ±14.1**	118.4 ±10.5
	2nd "	—	195.7 ±27.6**	178.3 ±28.8**
	3rd "	173.2 ±32.6*	189.9 ±21.1**	176.7 ±24.0**
	4th "	114.8 ±14.2	223.2 ±36.5**	175.2 ±24.1**
	5th "	136.0 ±19.1	231.1 ±35.2**	179.5 ±29.9*
	7th "	123.3 ±12.2	149.7 ±29.5	148.9 ±22.0*
	10th "	121.9 ±22.1	122.9 ±15.1	112.7 ±12.6
Shock (% change)	Before	100 %	100 %	100 %
	1st day	87.0 ± 7.2	76.9 ± 7.5++	106.4 ± 4.7
	2nd "	—	76.1 ± 8.9+	73.2 ±12.2+
	3rd "	77.3 ± 7.0++	65.1 ± 9.2++	68.5 ± 8.1++
	4th "	95.4 ± 9.6	87.8 ±10.2	53.7 ± 7.3++
	5th "	96.9 ± 7.2	71.9 ± 7.1++	67.4 ±12.0+
	7th "	87.3 ± 9.6	92.7 ±13.3	100.9 ±14.2
	10th "	98.9 ± 7.5	96.0 ±17.9	96.6 ±12.9

Mean ± S.E.
t-test;
significantly increase:
* P<0.05
** P<0.01
significantly decrease:
+ P<0.05
++ P<0.01
(n = 10)

実験結果

0.1% p-CPA食投与開始より2日より動物の体重は次第に減少し，第10日には投与前の体重より約30g減少した。自発運動も軽度に減少したが，その他の異常行動はみられなかった。表1に示す如く，回避反応回数は投与後次第に増加し，第3日以後のそれは有意に増加した。一方，Shock 回数は10～30%の減少を示した。p-CPA による回避反応回数の増加および Shock 回数の減少は，投与第11日に 5HTP 50mg/kg を試行1時間前に投与することによって完全に抑制された。p-CPA 食投与を停止すると上記 Parameters は次第に正常値

に回復した。表2に示す如く、p-CPAの1回投与によっても回避反応回数は明らかに増加した。特に300mg/kg投与では第1日より第5日までのそれは有意に増加し、10日後にはじめて正常値に回復した。一方Shock回数は明らかに減少した。p-CPA300mg/kg投与24時間後の試行1時間前に5HTP 50mg/kgを腹腔内投与した。回避反応およびShock回数は正常値に比して殆んど変化せず、p-CPAの効果を遮断した。第2日以後のそれらはp-CPA単独投与群のparametersとほぼ同じ推移を示した。α-MT 50および100mg/kg腹腔内投与は回避反応回数にはほとんど影響しないが、Shock回数は100mg/kg投与8時間後の試行で有意に増加した(表3)。

Water maze performanceの結果は図1に示す如く3.5% L-PA食3週投与動物群ではSwimming time, errors共に対照群と殆ど差が認められないが、7% L-PA長期動物群では2週ですでにSwimming timeは約2/3に短縮し、error回数も約60%に減少した。0.1% p-CPA食2週投与動物のこれらParametersは対照群のそれと異ならなかったが、0.25% p-CPA食を1週間与えると、Swimming timeは対照群の69%, errorsは64%に減少した。p-CPA 300mg/kg投与24時間後の動物ではSwimming timeはやや短縮されたがerrorの回数は殆ど変化しなかった。α-MT 50mg/kg, 150mg/kg, 200mg/kg腹腔内投与(4時間後)はerror回数には影響を与えなかったが、Swimming timeは50mg/kgで短縮し、150mg, 200mg/kgでは延長の傾向がみられた。

表3. α-MT (i.p.), 8 hr before the 1st day-trial

Doses (mg/kg)		50	100
Avoidance response (% change)	Before	100 %	100 %
	1st day	93.6 ± 8.8	111.2 ±12.5
	2nd "	85.3 ± 9.9	102.4 ±10.1
	3rd "	106.3 ±13.6	90.8 ±10.5
Shock (% change)	Before	100 %	100 %
	1st day	93.5 ± 8.8	145.3 ±16.8*
	2nd "	103.1 ± 5.8	113.3 ±23.1
	3rd "	102.7 ±10.0	111.5 ±11.6

Mean ± S.E. (n = 10), Student's t-test,
significantly increase: * $P<0.05$

p-CPA投与動物およびα-MT投与動物について脳SerotoninおよびNEを化学定量した結果は表4に示す。p-CPA 300mg/kg投与24時間後では脳Serotoninは Controlの30%以下に減少し、10日後には60〜70%まで回復した。但しそのほかのNEは殆ど変化しなかった。0.1% p-CPA食投与2週のラット脳Serotonin量は極度に減く、2匹つつpoolして測定したがなお、測定出来なかった。7% PA投与動物でも脳Serotoninは極度に減少し、Telencephalon 0.02μg/g以下, Others 0.04μg/g以下であった。α-MT 100mg/kg投与8時間後の脳NE量は70〜80%まで減少した。

表4. Brain 5-HT level (Rat)

Brain area / Treatment	Amine contents μg/g (wet weight) Telencephalon	Others
Control※1	0.51 ± 0.03 (9)	0.77 ± 0.03 (10)
p-CPA 300mg/kg p.o. 24hrs	0.16 ± 0.04 (10)*	0.16 ± 0.04 (10)*
p-CPA 300mg/kg p.o. 10days	0.30 ± 0.03 (5)*	0.53 ± 0.05 (5)*
p-CPA 300mg/kg p.o. 24hrs + 5-HTP 50mg/kg i.p. 1hr	0.25 ± 0.04 (5)*	0.22 ± 0.05 (5)*
Control※2	0.31 ± 0.01 (5)	0.41 ± 0.01 (5)
0.1% p-CPA feeding(2 weeks)	< 0.02 (10)	< 0.04 (10)

Brain NE level (Rat)

Brain area / Treatment	Amine contents μg/g (wet weight) Telencephalon	Others
Control※1	0.29 ± 0.03 (6)	0.56 ± 0.04 (6)
p-CPA 300mg/kg p.o. 24hrs	0.23 ± 0.02 (4)	0.56 ± 0.05 (3)
α-MT 100mg/kg i.p. 8hrs	0.20 ± 0.02 (5)**	0.35 ± 0.02 (5)*

※1 Body weight 250g (16 weeks old)
※2 Body weight 180g (11 weeks old)
Mean ± S.E. (No. of animals)
* Significantly different from control, $P<0.01$ (Student's t-test)
** " $P<0.05$ (")

考　察

Sidman 型條件回避反応実験において p-CPA 300mg/kg 単独投与または 0.1% p-CPA 食連続投与は回避反応回数を著明に増加し，Shock 回数を減少した。また，p-CPA 食投与は water maze performance を改善した。これらの学習遂行における改善の原因として 1) p-CPA の直接作用，2) PA量増加による効果 および 3) 脳 Serotonin 減少による効果の3つの可能性が考えられる。脳p-CPA量は投与6～8分後に最高に達し，30分後には 1/50 以下に減少すること (Koe and Weissman[4])，脳PA量は投与4～2日に最高になり，4～3日には正常値まで回復すること (Jéquier et al.[3])，および今回の実験においても脳 Serotonin 量は投与24時間後に著減し，その回復には10日以上を要したこと等により，上記の学習行動における変動は脳内 Serotonin 減少の推移と極めてよく合致した。更に，p-CPA 投与後の脳 Serotonin 量の減少が 5HTP 投与により回復したのに一致して，回避反応回数の増加は完全に抑制されたことも，脳 Serotonin 量と，動物行動との密接な関係を裏付ける。以上の成績は p-CPA による Active avoidance performance における促進を述べた Tenen[9] および Brody[1] の結果ともよく一致する。今回 Wate maze performance において 7% PA 食投与が swimming time を短縮し，error 回数を減少した成績は Yuwiler and Louttit[12] および Hess たち[2] の結果とは矛盾した。しかし彼等の実験は去勢直後より PA を負荷したものであり，我々は生後4週より PA を投与した。今回の performance の改善は主として PA による脳 Serotonin 欠乏に由来するものと考えられる。

Tyrosine hydroxylase 阻害により NE 量減少を来すといわれている α-MT は 100mg/kg 以上投与により，脳 NE 量を低下させ，同時に Sidman 型条件回避反応における Shock 回数を減少させ，Water maze performance を悪化させた。α-MT の大量が shuttle box における條件回避反応を弱めることは Moore[6] および Rech[7,8] たちによって報告されており，今回の成績ともよく符合するが，その効果が脳内 NE または Dopamine 欠乏と直接関係するのか，またはα-MT の中毒作用に由来するのかについてはさらに検討を要する。

以上の様に p-CPA による脳 Serotonin の減少が学習の改善を示す原因は，脳 Serotonin の減少が serotonineregic pathway の機能低下を来たし，相対的に central adrenergic activating system の優位を来たすか，または，central inhibitory system を解放するためであろう。α-MT による脳 Catecholamine の減少による効果はこれと逆の関係が成立すると考えられ，中枢における Monoaminergic system の電気組織学的 approach を加えて，中枢アミンと動物行動の形態学的背景をも明らかにしたい。

文　献

1) Brody, J.F.Jr.: Psychopharmac. 17, 14 (1970)

2) Hess, S.M., Paulsen, E.C., Muller, S.A. and Carlton, P.L.: Life Sci. 5, 927 (1966)

3) Jéquier, E., Lovenberg, W. and Sjoerdsma, A.: Mol. Pharmac. 3, 274 (1967)

4) Koe, B.K. and Weissman, A.: J. Pharmac. exp. Ther. 154, 499 (1966)

5) Lipton, M., Gordon, R., Guroff, G. and Udenfriend, S.: Science 156, 248 (1967)

6) Moore, K.E.: Life Sci. 5, 55 (1966)

7) Rech, R.H., Borys, H.K. and Moore, K.E.: J. Pharmac. exp. Ther. 153, 412 (1966)

8) Rech, R.H., Carr, L.A. and Moore, K.E.: J. Pharmac. exp. Ther. 160, 326 (1968)

9) Tenen, S.S.: Psychopharmac. 10, 204 (1967)

10) Volicer, L.: Int. J. Neuropharmac. 8, 361 (1969)

11) Welch, A.S. and Welch, B.L.: Biochem. Pharmac. 17, 699 (1968)

12) Yuwiler, A. and Louttit, R.T.: Science 134, 831 (1961)

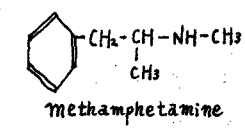
13. 脳内モノアミン代謝におよぼすパラクロロメチルアンフエタミンの影響

小林暉佳・吉原　林・長尾佳子
加藤伸勝　（都立松沢病院）

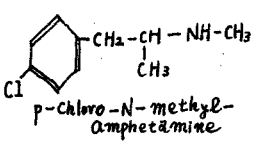
行動異常を示すメトアンフェタミン中毒動物脳で生じたモノアミン代謝異常に対し，その特異性を明らかにするために，われわれはこれまでトリプトファン水酸化酵素の阻害剤であるパラクロロフェニールアラニン（PCPA）の影響について調べてきた。[5] PCPAは脳内セロトニンのみならずノルエピネフリンをも長時間にわたつて低下させる作用のあることが知られている。これに対して，メトアンフェタミン（MA）と類似の構造で，ベンゼン核に塩素原子の附加したパラクロロ-N-メチルアンフェタミン（PCMA, Fig 1）も脳内セロトニンを減少させるが，その作用時間は短かく，またカテコールアミンに対する影響もほとんどないことがPletscherら[8]によつて報告されている。PCMAを臨床的に用いるとメトアンフェタミン様の中枢刺激効果は少ないが抗抑うつ効果を発揮するとPraagら[10]は報告している。われわれはこのMA，PCPAなどと類似の構造をもち，脳内セロトニンを低下させるPCMAについて，脳の部位別の5-hydroxytryptamine（5HT），5-hydroxyindole-3-acetic acid（5HIAA），norepinephrine（NE），dopamine（DA）などの動態を調べ，これらの物質の動きと行動変化との関連を追求し，同時に前回報告したPCPAの場合と同様に慢性MA中毒動物脳で生じたアミン代謝異常に対する本剤の影響についても検討した。

実験材料および方法

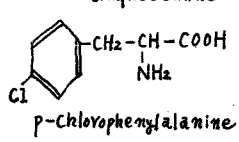
Fig 1.



methamphetamine



p-chloro-N-methyl-amphetamine



p-chlorophenylalanine

体重200～300 gのwistar系albino rat，雄を用いた。動物はすべて集団飼育とし，1ケージあたり5～6匹とした。PCMAは塩酸塩を用い，蒸溜水でとかし，それぞれ対照群およびMA中毒群の皮下に注射した。MA中毒群はMA 5 mg/kgを40日間以上連続注射したものである。

脳内物質の測定法：動物を腹部で切断し，直ちに砕氷上にてtelencephalon（TE），diencephalon + mesencephalon（DIM），pons + medulla oblongata（PM），spinal cord（SC）の4部位を摘出し，5HT，5HIAA，NE，DAをそれぞれにつき測定した。5HTおよび5HIAAの定量はともに0.4 N過塩素酸で抽出し，前者はSnyder[11]の方法で，後者はGiacaloneら[12]の方法で定量した。NEとDAはともに0.01 N HClで抽出し，Welchら[12]の方法で定量した。4物質の螢光測定には日立分光螢光光度計（MODEL 203）を用いた。全脳の実験の場合には，小脳を除いて延髄下部切断のものを用いた。

実験結果および考察

Table 1に示す如く，MA中毒群では対照群に比較して，DIMで5HT，5HIAAの増加があり，とくに5HTよりもその代謝産物である5HIAAの著しい増加を認めた。NEについてはTE，DIM，PM，SCの全領域において著しい低下があり，これに対応してNEの前駆物質であるDAの増加を認めた。このような中枢神経系におけるNEの低下，DAの増加の所見は，disulfiramなどのdopamine-β-hydroxylaseの阻害

Table 1. 5HT, 5HIAA and catecholamine concentrations in CNS in normal and MA intoxicated rats

Exptl Condition	Compound	TE (μg/g)	DIM (μg/g)	PM (μg/g)	SC (μg/g)
Native Control	5HT	0.40±0.08 (6)	0.56±0.08 (4)	0.44±0.08 (5)	0.44±0.08 (5)
	5HIAA	0.54±0.11 (4)	0.57±0.06 (4)	0.47±0.06 (5)	0.33±0.03 (4)
	NE	0.47±0.15 (3)	0.81±0.17 (3)	0.68±0.16 (3)	0.48±0.08 (3)
	DA	1.43±0.28 (4)	0.29±0.11 (3)	0.21±0.10 (3)	0.16±0.02 (2)
MA intoxicated	5HT	0.34±0.11 (4)	0.84±0.20 (3) *	0.43±0.09 (4)	0.35±0.02 (4)
	5HIAA	0.61 (3)	1.14±0.01 (3) ***	0.56 (2)	0.38 (2)
	NE	0.19±0.06 (7) **	0.31±0.04 (6)	0.23±0.08 (6) ***	0.13±0.02 (3)
	DA	3.74±0.50 (4) ***	1.23±0.28 (3) **	2.20±0.08 (3) *	0.60±0.03 (2)

( ): number of animals. Each value is the mean ± SD
* $P<0.05$ ** $P<0.02$ *** $P<0.01$

Table 2. The effects of PCMA on 5HT, 5HIAA and NE in CNS in normal rats

Exptl Conditions (Time)	Compound	TE (μg/g)	DIM (μg/g)	PM (μg/g)	SC (μg/g)
Control-PCMA(4hr)	5HT	0.47 (2)	0.69 (2)	0.42 (2)	0.33 (2)
	5HIAA	0.56 (2)	0.46 (2)	0.43 (2)	0.36 (2)
Control-PCMA(24hr)	5HT	0.43 (2)	0.60 (3)	0.52 (2)	0.50 (2)
	5HIAA	0.38 (2)	0.20 (2)	0.20 (2)	0.22 (2)
	NE	0.42 (2)	0.56 (2)	0.34 (2)	0.27 (2)

Animals were sacrificed 4hr and 24hr after PCMA(25mg/kg) injection

剤で認められているので，3) 中毒群における NE の低下，DA の増加は NE の合成酵素である dopamine-β-hydroxylase の抑制によるものと考えられる。

Gunne ら[4] は dl-amphetamine の慢性投与（20 mg 6 days）により，ラット脳で NE，DA の減少と normetanephrine の増加のあることを報告している。また，Baird ら[1] は d-amphetamine，d-methamphetamine を動物に1回投与後，ラット全脳の NE，DA を測定しており，10 mg/kg で3時間後に NE/DA ratio が低下してくることから d-amphetamine，d-methamphetamine に dopamine-β-hydroxylase の阻害効果のあることを報告している。今回の実験では，MA の一回投与でも NE 低下，DA 増加が軽度ながら認められ（Table 3 参照），慢性投与ではこの変化が一層明白になっている。

つぎに上記の MA 中毒群で生じたアミン代謝障害に対して，PCPA よりもさらに特異的な脳内 5HT の depletor である PCMA を投与した場合，どのような影響があるかについて調べてみた。

Pletscher ら[9] は，PCMA は脳内 5HT，5HIAA は低下させるが，カテコールアミンには影響を与えず，わずかにモノアミン酸化酵素（MAO）を抑制するといっている。彼らは 25mg/kg の PCMA の投与後 24 hr～96 hr に至る間 5HT，5HIAA の著明な減少を報告している。また，Miller ら[7] はわずか 3.7 mg/kg の PCMA をラットに投与するだけで，

Table 3. The effects of MA and PCMA on the level of NE and DA in the whole brain of normal rats

Treatment	Dose (mg/kg)	NE	DA	Ratio NE/DA
Control		0.62	1.4	0.44
MA	10	0.45	1.4	0.32
PCMA	50	0.84	2.2	0.39

Animals were sacrificed 4hr after injection

ラットの脳各部位における 5HT, 5HIAA, は 4hr ～ 96hr に至るまで減少をつづけると報告している。しかし、NE については、PCMA 投与後、1～4hr で視床下部において一過性の著しい増加を認めており、また、この時間内では 5HT も軽度の上昇が認められ、5HIAA は減少している。このことから Miller は PCMA に MAO 阻害効果のあることを指摘している。

Table 2 に示すごとく、PCMA 25 mg/kg で対照動物に投与した場合、4hr 後では 5HT, 5HIAA に影響はなく、24hr 後で 5HIAA のみが低下する。NE, DA はあまり影響を受けない。この点 Pletscher らの成績とは異なるが、使用動物の種属差によるものと思われる。そこで、われわれの場合は 50 mg/kg を用いた。Table 3 に示す如く、PCMA 投与により、NE, DA は対照ラットに比し、増加傾向にある。とくに NE よりも DA がより一層増加している。従来の報告では、PCMA はカテコールアミンに対してあまり影響がないとされているが、Table 2 のごとく、投与後数時間はかなりの増加傾向が認められ、この変化は MAO 阻害効果のみでは説明しつくせない。

さて、このような作用をもつ PCMA 50 mg/kg を対照および MA 中毒群に投与した結果が Table 4 である。対照群では投与後 4 hr 後で 5HT は僅かに低下傾向にあり、5HIAA はかなり低下している。さらに 24 hr では 5HT, 5HIAA ともに低下している。これに対し中毒群では投与 4 hr で 5HT, 5HIAA は減少傾向が認められ、24hr で 5HT の著しい低下が認められる。この 24hr 後の 5HT の中毒群における減少は前回報告した PCPA (316 mg/kg) 投与時の変化と類似している。すなわち、中毒群では 5HT は 4 hr 後でほぼ MA の慢性投与で増加した分だけ低下し、24 hr 後では一層著しい低下を示す。5HIAA の変化は 5HT ほどに著しくないが、MA の慢性投与は 5HIAA を対照に比較して 3 倍近く増加するので、これに対し PCMA 投与した場合の 5HIAA の低下はかなり著しいものといえる。PCMA 投与後の NE については、中毒群において 4 hr で対照群より低下傾向にある。DA については中毒群ではもともと対照群よりも著しい増加を示しているので、中毒群での見掛け上の変化は少ないようであるが、さらに例数を増して検討したい。

なお、PCMA 投与後の脳内カテコールアミン代謝についてはさらに NM, VMA, HVA などの測定も行ない、その影響について調べていきたいと思う。たゞ、今回の実験からも前回と同様、MA 中毒群におけるアミン代謝の障害が明らかにされ、とくに 5HT depletor に対する反応の特長が示されたものと考えることができる。

PCMA 投与後の動物の行動変化については、その投与量とも関連があり、大量投与 (50 mg/kg) では投与後 4 hr でかなり激しい興奮が見られる。Miller ら[6] は PCMA

Table 4. The effects of PCMA on 5HT, 5HIAA and catecholamines in CNS in normal and intoxicated rats

Exptl conditions (time after PCMA inject)	Compound	TE (μg/g)	DIM (μg/g)	PM (μg/g)	SC (μg/g)
Control+PCMA (4hr)	5HT	0.29 (2)	0.47 (2)	0.42 (2)	0.40 (2)
	5HIAA	0.34 (2)	0.22 (2)	0.53 (2)	0.30
	NE	0.36 (2)	0.52 (2)	0.51 (2)	0.31 (3)
	DA	2.28 (3)	0.92 (2)	1.01 (3)	0.38 (2)
Control+PCMA (24hr)	5HT	0.27 (3)	0.38 (3)	0.44 (2)	0.29 (2)
	5HIAA	0.32 (2)	0.18 (2)	0.26 (2)	0.25 (2)
MA+PCMA (4hr)	5HT	0.29 (3)	0.51 (2)	0.35 (2)	0.34 (2)
	5HIAA	0.35 (2)	0.43 (2)	0.35 (2)	0.12 (2)
	NE	0.21	0.35	0.21	0.18
	DA	3.52 (2)	1.17	1.66 (2)	0.54
MA+PCMA (24hr)	5HT	0.12 (3)	0.18 (3)	0.23 (2)	0.12 (3)
	5HIAA	0.28 (2)	0.41 (3)	0.29 (3)	0.22 (2)

Animals were sacrificed 4hr and 24 hr after PCMA (50mg/kg) injection

投与後にみられる動物の興奮と5HTの低下との関連を結びつけて考えており，free 5HT > NE の相対的な比率が重要であり，アミンのreleaserといわれる薬物がこの比率をかえ，free 5HT がfree NE よりも優位になると動物は鎮静状態を示すと述べている。しかし，動物の鎮静・興奮の機構は単に脳内の5HT，NE の比のみでは説明しつくされない。われわれの実験では，動物の行動変化は対照動物ではPCMA 投与よりMA投与の際により顕著な興奮がみられ，その際の NE/DA の比はTable 3 にみられるように，PCMA投与時，MA 投与時の順に低くなるので，動物の興奮の生起には，5HT，NE の比のみならずNE/DA もまた密接な関連を有するものと考えられる。

まとめ

慢性MA中毒動物脳の5HT，5HIAA，NE，DA について，脳部位別分布を調べた。そして中毒群において，5HT，5HIAA の増加，NE の低下，DA の増加というアミンレベルの顕著な変化のあることがわかった。ついで，PCMAを対照動物に投与し，5HT，5HIAA に対しては低下傾向が認められたが，その低下の程度は従来の報告ほどには著しくなかった。それに対し，NE，DA については増加傾向にあることを認めた。また，PCMA を中毒動物に投与した場合，5HT の24hr後における著しい低下傾向を認めた。

本実験に用いたPCMA (parachloro-N-methylamphetamine) は吉富製薬より提供されたもので，数種の物性検査の結果，純品であることが確認されているものである。

文　献

1) Baird,J.R.C.& Lewis,J.J., Biochem.Pharmacol.13,1475(1964)
2) Giacalone,E.& valzelli,L., J.Neurochem.13,1265(1966)
3) Goldstein,M.& Nakajima,K., Life Science.5,1133(1966)
4) Gunne,L.& Lewander,T.,in" The Addictive States " ed by Wikler, A. The Williams and Wilkins, Baltimore 1968,pp 106.
5) 小林暲佳，吉原林，長尾佳子，加藤伸勝，神経化学，8，60（1969）
6) Miller,F.P.& Maickel.,Life Science.8,487(1969)
7) Miller,F.P.et al., Biochem.pharmacol.19,435(1970)
8) Pletscher,A.et al., Life Science. 828(1963)
9) Pletscher,A.et al., J.Pharmacol.exp.therap.154,64(1966)
10) Praag,H.M.van et al., Psychopharmacologia 13,145(1968)
11) Snyder,S.H. et al., Biochem.Pharmacol.14,831(1965)
12) Welch,A.S.& Welch,B.L., Analytical Biochemistry.30,161(1969)

14. 脳の脂質代謝・I — in vivoで与えたsodium acetate-1-^{14}Cの14日マウス脳脂質への取り込み

金沢一郎・植田伸夫・山川民夫
（東大・医・生化）

脳の機能を解明する上で、脳に極めて多量に存在する脂質およびその代謝について、十分な知識を得ることが必要であることは言を待たない。

脳の脂質が、脳で合成されるのか、或いは脳以外の臓器で合成されたのち脳に運び込まれるのか、更に一旦脳に定着した脂質が、いかなる過程で異化されてゆくのか、などについて、従来より多くの研究者により知見が積み上げられて来ている。(2)(6) しかしまだ全体としての整理された結論には至っていないように思われる。

一般に、幼若期動物の脳では、myelinationと一致して脂質の動きが活発化し、成熟動物になると脂質の動きは不活発になることが認められている。(1)(3)(5)

本実験は、脂質の動きが活発であると考えられる、生後14日目の幼若マウスに、Sodium acetate-1-^{14}Cを腹腔内投与し、極く短時間後に脳を剔出し、その脳の全構成脂質への取り込みをみたものである。

本実験の如く、Sodium acetate-1-^{14}Cをin vivoで投与したのち、1分、5分等の短時間での、脳脂質放射活性の分布の分析は、従来の報告にもほとんどなく、異化分解による影響の比較的少ない、純粋な合成の様子を示し得たものとして、ここに報告する。

［実験方法］

A．使用動物　：生後14日目 C3H/Heマウス。1群5匹とし、計5群を使用した。

B．投与標式化合物　：Sodium acetate-1-^{14}C（45.4mCi/mMol）オール化学。

C．標式化合物の投与方法　：Sodium acetate-1-^{14}Cを水溶液とし、0.1mc（10μl水溶液）／マウスの割で腹腔内に注射した。

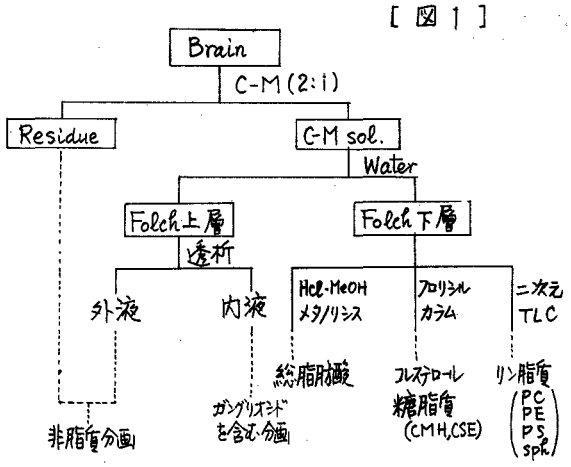
D．脳の剔出　：標式化合物投与後、1分、5分、30分、60分、120分に各群マウスを断頭、たゞちに脳を剔出した。1匹分はオートラジオグラフを行う目的でホルマリンその他に入れ固定。残る4匹分を脂質分析のために、C-M(2:1%)混液に入れ磨砕した。

E．脂質の抽出および分画　：　図1の如くに行った。

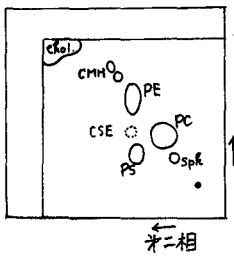
a) コレステロールの分離および定量：Folch下層の一部（脂質量にして約1.5～2.0mg）をとり、クロロフォルムにて充填したフロリジル2.5gのカラムにのせ、クロロフォルム50mlにて溶出してくる分画をコレステロール分画とした。コレステロールの定量はZak法によった。

b) リン脂質の分離および定量：Folch下層の一部（脂質量にして約220～260μg）をHamiltonの50μl用microsyringeにて薄層プレートに、点状にapplyし、これをRouser(7)等の方法により二次元に展開した。

［図1］



すなわち、第一相にはC-M-W(65:25:4)、第二相にはBtOH-HAc-W(60:20:20)の各溶媒系を用いた。展開終了後、ヨード蒸気にてスポットを検出し、各スポットをカミソリにてかきとり、放射活性を測定した。又リン脂質各分画の定量は、同様操作ののち、各分画について、Bartlett法にて行った。二次元TLC上における各脂質分画の分離状況は[図2]の如くである。



CMH: Cerebroside
CSE: Sulfatide
PC: Phosphatidyl choline
PE: Phosphatidyl ethanolamine
PS: Phosphatidyl serine
Sph: Sphingomyelin
Chol: Cholesterol

c)糖脂質の分離および定量：上記のフロリジルカラムでコレステロール分画を得たのち、C-M(2:1)50mlにて溶出してくる分画を糖脂質分画として得た。これを更に薄層クロマトグラフにより(溶媒はC-M-W 65:25:4) CMHとCSEを分離し、それぞれをかきとり、3% HCl-MeOHにて100°C 3時間、メタノリシスを行い、メチルグリコシドとしての糖を、アンスロン硫酸法にて定量した。

F.放射活性の測定：2π gas flow counter (Aloca FC-1E TDC2)および liquid scintillation counter (Beckman LS-133)を用いた。TLCについては Radio-scanner (Aloca TLC-1型)により放射活性の分布をみた。脂肪酸の放射活性の分布は、Radio-gaschromatograph (HITACHI-KR-2)を用いて調べた。なお Sodium acetate-1-^{14}C の残留が計測値を誤らせないために、測定試料には coldの酢酸を加え、酢酸臭がなくなるまで強熱したのち、放射活性を測定した。

[実験結果および考察]

14日目マウス脳の脂質を分析した結果は、コレステロール 4.5mg/脳 (24.1%) リン脂質 12.4mg/脳 (66.3%)、糖脂質 1.8mg/脳 (9.6%)で、文献的[5]にもほぼ一致した値を示した。

①Acetateの脂質分画への取り込み：[表1]に示したように、Acetate は投与后5分で急速に脂質分画に取り込まれ、その后の増加は比較的少ないことが確認された。この結果は、髄鞘形成期ニワトリで、Acetate投与后15分以后の取り込み[9]、又幼若ラットでAcetate投与后4時間の取り込み[3]をみたデータとほぼ匹敵する。たゞ1分、5分については比較するデータがないので十分評価ができないが、オートラジオグラフにてGrainをかぞえて定量化したTorvik等[11]の結果と比較すると、彼等も1分后にすでに脂質に放射活性を認めており、5分～10分にかけて急速に活性上昇をみると述べている。我々の結果はTorvik等の結果を化学分析により裏付けていると考えてよいものと思われる。

[表1]

単位: cpm/4ヶ脳	Folch下層 (総脂質分画)	Folch上層透析内液 (ガングリオシド含有分画)
1分	5.8×10^5 (0.07)	0.46×10^5
5分	26.7×10^5 (0.30)	[3.40×10^5]
30分	49.7×10^5 (0.56)	1.56×10^5
60分	59.6×10^5 (0.68)	1.25×10^5
120分	53.7×10^5 (0.61)	0.76×10^5

カッコ内は、投与Acetateに対する%

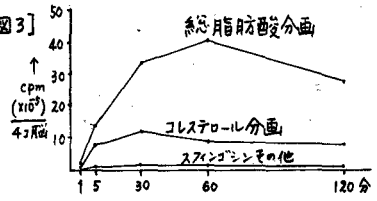
[表2] 単位: cpm/4ヶ脳

	総脂肪酸分画	コレステロール分画	スフィンゴシンその他
1分	2.96×10^5 (60.4)	1.53×10^5 (31.2)	0.41×10^5 (8.4)
5分	13.53×10^5 (56.3)	8.58×10^5 (35.7)	1.92×10^5 (8.0)
30分	34.64×10^5 (71.0)	10.57×10^5 (21.7)	3.59×10^5 (7.4)
60分	41.34×10^5 (74.8)	9.60×10^5 (17.4)	4.32×10^5 (7.8)
120分	28.93×10^5 (69.3)	9.39×10^5 (22.5)	3.45×10^5 (8.3)

カッコ内は全体のうちで占める%

②総脂肪酸分画，コレステロール分画へのAcetateの取り込み：[表2]および[図3]の如く、与えたAcetateは各時間とも、その60～70%は脂肪酸に入る。コレステロールへは20～30%が入る。総脂肪酸とコレステロールとの量的関係は、大よそ5:4.5であるから、Specific activityとしても脂肪酸の方が高い。Acetateからは、動物組織内で脂質としてはまず一次産物

[図3]



として コレステロール, 脂肪酸ができ. 更に脂肪酸からスフィンゴシン塩基が合成されると考えられるが, 周知の如く成熟動物脳ではコレステロールはほとんど合成されず, 幼若動物脳でほその合成がみられる。文献上幼若ラットにおいて[3] Acetate を与えてから4時間后に放射活性の77%が総脂肪酸分画に見出されることから考えて, 幼若動物であっても, コレステロールの合成は, 総脂肪酸の合成の 1/2 ~ 1/3 程度であると考えられる。我々の結果をみると, 1分, 5分では, コレステロールの放射活性が総脂肪酸の放射活性に対してやゝ高くなっている。この点については今后検討するつもりである。

③一次産物としての脂肪酸への Acetate のとり込み: [表3] 単位: %

	14:0	16:0 / 16:1	18:0	18:1	その他
1分	7.4	72.1	12.2	3.2	5.1
5分	3.4	69.1	18.2	5.6	3.7
30分	2.0	69.6	16.8	7.6	4.1
60分	1.5	70.0	17.5	8.1	2.9
120分	0.1	65.6	15.6	11.1	7.6

総脂肪酸でみる限り全時間を通して放射活性は $C_{16:0}+C_{16:1}$ 分画で高いが, [表3]の如く, Acetate 投与后の $C_{14:0}$ の放射活性は時間経過と共に急速に減少し, 漸時長鎖のものに移行すると思われる。$C_{16:0}+C_{16:1}/C_{18:0}+C_{18:1}$ も時間経過と共に低下し, $C_{18:0}/C_{18:1}$ の比も時間経過と共に低下する。しかし $C_{24:0}$, $C_{24:1}$ などへの放射活性の分布は遂に確認できなかった。

④各脂質分画への Acetate のとり込み: 以上の様にして合成された脂肪酸が各脂質分画へいかなる割合で入ったかをみたのが[表4]である。各脂質群への分布をみると, 1分, 5分, では, リン脂質, コレステロールはほゞ匹敵する放射活性を示すが, それ以后はあきらかにリン脂質へのとり込みが増加する。これに対して糖脂質分画へのとり込みは全経過を通じて6%前後であり, 糖脂質の存在率 9.6% と比してあきらかにとり込みは少ない。

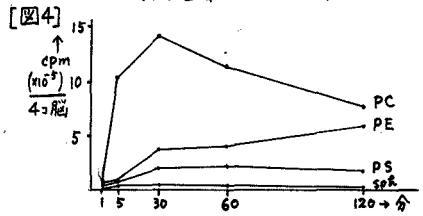
⑤リン脂質分画での放射活性の分布:
PC は終始最も放射活性が高いが, [図4]にある如く, 1分と5分の間で放射活性が急速に高まる。又30分で最も高い値を示したあと, 徐々に低下する。PE は, PC とほゞ匹敵する量が脳には存在するが, 放射活性は低く, 120分后にやっと PC の放射活性に近づく。PS も放射活性としては低い。Spl も終始低い放射活性である。

[表4] 単位 cpm/4ヶ脳

	リン脂質分画	糖脂質分画	コレステロール分画
1分	1.67×10^5 (48.7)	0.23 (6.7)	1.53×10^5
5分	11.77×10^5 (56.0)	0.65 (3.1)	8.58×10^5
30分	21.21×10^5 (63.2)	1.75 (5.2)	10.57×10^5
60分	20.26×10^5 (64.1)	1.73 (5.5)	9.60×10^5
120分	15.21×10^5 (57.9)	1.67 (6.3)	9.39×10^5

カッコ内は全体のうちで占める%

[図4]



⑥ Acetate の CMH と CSE へのとり込み: [表5]の如く, Acetate 投与后 1分ですでに CMH, CSE に放射活性は認められるが, その全脂質における割合は低い。CMH と CSE を比較すると, 脳での存在比はこの年令で約4:1であるから, Specific activity としてみると少なくとも30分以后では CMH の方があきらかに高い。又放射活性そのものの動きをみると, 1分から2時間に至るに従い, CMH では約12倍に活性が増加しているのに対し, CSE では2倍にまで達しない。

[表5] 単位: cpm / 4ヶ脳

	CMH	CSE
1分	1.28×10^4	1.05×10^4
5分	4.88×10^4	1.60×10^4
30分	15.15×10^4	2.48×10^4
60分	15.58×10^4	1.75×10^4
120分	14.89×10^4	1.82×10^4

周知の如く, 脳は神経細胞, 各種グリア細胞, 有髄無髄線維, 毛細血管などの組織学的単位より成り, それらがある規則性をもちながらも複雑にからみあっている。一方それら組織学的単位には

それぞれ異なった脂質パターンがあり、(4X8X10)異なった脂質代謝様式があることは、むしろ当然といえよう。従って全脳を処理しただけでは、少なくとも組織学的単位、それぞれに対する知見がえられることはほとんど期待できない。その意味で分離された組織学的単位についての脂質生化学的研究は高く評価されねばならないが、代謝様式の研究に、この方法をただちに応用するにはまだ解決されねばならない問題が多々あるように思える。従って現段階においては、脂質代謝を組織学的単位レベルで考える場合、組織化学、オートラジオグラフなどの方法も利用されており、それによる知見も集積しつつある。[11] 我々もオートラジオグラフにより組織学的単位の in situ における脂質代謝をみることを、今回の目的の1つとしているが、それについては別の機会に発表するつもりである。それと同時に、今后は組織的に単一化された細胞群についての脂質代謝についても追求して行きたいと考えている。その第一歩として今回の実験を行ったのであるが、その結果、大よそ次ぎの如く要約できる結果をえた。

1) 14日目マウス脳では、Sodium acetate-1-^{14}C を腹腔内に注射した場合、1分后にすでに一次産物としての脂肪酸、コレステロールにかなりな放射活性が認められ、脂肪酸の各脂肪分画への分配パターンも、その時期にはほぼ完成しているということ。

2) Myelinが急速に合成されているはずの14日目マウス脳においても、注射后1分～2時間の比較的早い時期に脳を剔出し、脂質分析を行ったのでは、CMH、CSEに高い放射活性をみることが出来なかったこと。

3) 総脂肪酸では、主として C_{14}, C_{16}, C_{18} に放射活性があり、特に、時間経過とともに C_{14}, C_{16} 脂肪酸から、C_{18} 脂肪酸へ放射活性が移行すると考えられる結果をえたこと。ただし、C_{24} 脂肪酸へは、少なくとも2時間までの観察では、放射活性が入ってこなかったこと。

4) リン脂質では、PCに圧倒的に多くの放射活性が認められ、PEではおくれて活性上昇をみたこと。

[文献]

1. Aeberhard, E., Grippo, J., and Menkes, J. H., Pediat. Res., 3 : 590 (1969)
2. Davison, A. N., Comprehensive biochemistry, vol. 18 chap. VII (1970)
3. Dhopeshwarker, G. A., Maier, R., and Mead, J. F., BBA, 187 : 6 (1969)
4. Fewster, M. E., and Mead, J. F., J. Neurochem., 15 : 1041 (1968)
5. Folch-Pi, J, Biochemistry of the developing nervous system p. 121 (1955)
6. 宮本侃治, 西村顕治, 脳の生化学 p 174 (1969)
7. Siakotos, A. N., and Rouser, G., J. Am. Oil Chemists' Soc., 42 : 913 (1965)
8 Siakotos, A. N., Rouser, G., and Fleischer, S., Lipids 4 : 234 (1969)
9. 立沢寧, 塚田裕三, 中沢恒幸 神経化学 6 : suppl. 113 (1967)
10. 玉井洋一, 松川恵子, 佐武明 神経化学 8 : suppl. 99 (1969)
11. Torvik, A., and Sidman, R. L., J. Neurochem. 12 : 555 (1965)

15. 発育期における脳の燐脂質の代謝－phosphatidyl choline について

千田信和・荒川雅男
（東北大・医・小児）

phosphatidylcholine（以下PCと略）は脳の灰白質及び白質に広く存在し，且髄鞘の重要な構成々分でもある。PCは肝や他肺その他肝外組織でも活潑に合成される事が知られているが主に a) phosphatidylethanolamine の methylation による径路[1]，b) choline が phosphorylcholine，CDP-choline を経てPCにとりこまれる径路[2]のふたつが考えられている。動物において，脳は生下時肝よりも大きく，生後更に急速に発育し活潑な髄鞘形成が行われるが，その反面，此時期は内的，外的因子により脳発育が阻害され易い危険な時期，" vulnerable period "[3]といわれ注目されつつある。此時期には種々の酵素活性が活潑となる事が報告されている。私共は発育期のネズミを用いて a) 及び b) の径路によるPCの代謝を検討し興味ある所見を得たので報告する。

実験方法

本実験ではすべて Wistar系白ネズミを使用した。

1. in vivo のトレーサー実験

(i) methionine-methyl-^{14}C (specific activity 10.3 mc/mM) を生理的食塩水にとかし体温に温めて 5μc/体重20g を腹腔内注射し，一定時間後脱血屠殺し，脳及び肝をとりだし，生理的食塩水にて洗い脂質分析を行った。脳及び肝のホモジネートに10%トリクロル酢酸を加え，可溶部と沈でんに分け，後者を脂質分析に用いた。脂質の抽出は chloroform : methanol (2:1, v/v) により，分劃は DEAE-セルロースカラムクロマト及び薄層クロマト (Silica Gel H. を使用，展開溶媒は chloroform : methanol : water (70 : 25 : 2, v/v)) の併用によった[4]。薄層上のスポットは同定後直接測定用 vial にかき入れ Snyder 等[5]に従い 4% Cab-O-sil toluene scintillation Solution 中に均一なゲル状にして液体シンチレーションカウンター (Aloka 製) で測定した。

(ii) Doble Labelling 法によるトレーサー実験

methionine-methyl-^{14}C (specific activity 56.8 mc/mM)，choline-methyl-^{3}H (specific activity 6700 mc/mM) を cpm で 1 : 10 に混合し，妊娠中の母ネズミ，suckling rats に腹腔内注射し，一定時間後脱血屠殺し，上記の方法で脂質の抽出及び分劃を行った。PCの ^{3}H 及び ^{14}C による放射能は Aloka 製液体シンチレーションカウンターで，Screen out 法で同時に測定した。

2. in vitro のとりこみ実験。

脱血屠殺したネズミの脳を 0°C の生理的食塩水及び 0.25 M Sucrose にて洗い，Brady等[6]に従い 0.25M sucrose でホモジネートを作り 600×g で10分遠心して得た上清を 8,600×g で遠心して mitochondria fraction を得，上清を更に 100,000×g で30分遠心して得た沈でんを microsome fraction とした。

反応条件：反応液[2)7)]，50mM Tris buffer, pH 8.0, 10 μM $MgCl_2$, 5μM reduced glutathione, 1 μM S-Adenosyl methionine-methyl-^{14}C (49.0 mc/mM) 或 CDP-choline-1,2-^{14}C (22.6 μc/5mg) に microsome fraction (蛋白として約 15mg) を加え Tris buffer にて最終量を 2 mL とした。

incubationは37°C，2時間。chloroform：methanol（2：1，V/v）で反応を止め，脂質の抽出及び分割は上記の如くに行い、放射能は液体シンチレーションカウンターで測定した。S-Adenosyl-methionine-methyl-^{14}C を用いた場合は Bremer 等[7]に従いPCを更に加水分解し，choline を Reineckate 塩として沈でんさせ，aceton-propanol で再結晶させた。choline Reineckate を1NHClとmethylethyl-ketone 混液で分解し，Reineckate を methyl-ethyl-ketone で除去し，choline 分割の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

実験結果及び考察

1．methionine methyl-^{14}C の脳PCへのとりこみ（in vivo）

methionine-^{14}C を腹腔内に注射すると，遊離のmethionineは脳内へ肝の約$\frac{1}{5}$以下ととりこまれ，24時間は殆んど一定である事，即ち Blood Brain Barrier（BBBと略）によりcontrolされているであろう事，且脳PCへのとりこみは略直線的に増加し，逆に肝PCの放射能は注射後1時間以内にピークに達し，其後減少し24時間後には脳PCの放射能に近づく事等を報告した。[8]類似の結果はcholine-methyl-^{14}C の腹腔内注射後認められる。[9] methionine-methyl-^{14}C の脳PCへのとりこみ，specific activity を肝PCへのそれとの3つの時期において検討すると表1の如くである。即ち脳PCのspecific activity は肝に比し非常に低く注射後4時間は肝の1%以下であるが24時間後では生後1週及び2週の群では20%以上となる。之に反し生後7週のものは3.8%と非常に低い。

又，methionine-methyl-^{14}C の脳全体のPCへのとりこみを注射後2時の値で色々の発育期で比較検討すると図1の如くである。

表 1

$$R=\frac{\text{脳PCのspecific activity}}{\text{肝PCのspecific activity}}\times 100$$

	注射後	15分	30分	60分	2時間	4時間	8時間	24時間	48時間
R	生後1週	0.16	0.40	0.82	0.78	0.84	1.81	22.39	20.80
	2週	—	828	0.56	—	0.59	1.46	23.92	—
	7週	—	0.23	0.54	0.53	0.86	1.43	3.80	15.90

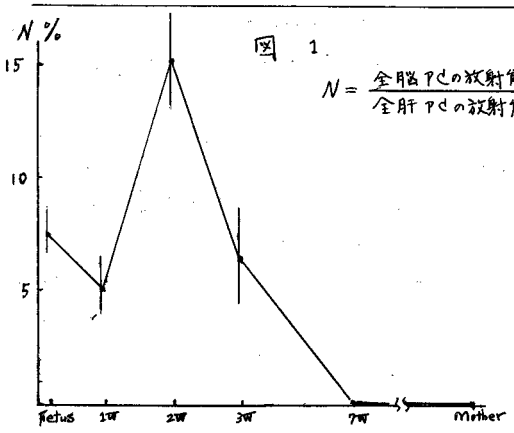


図 1

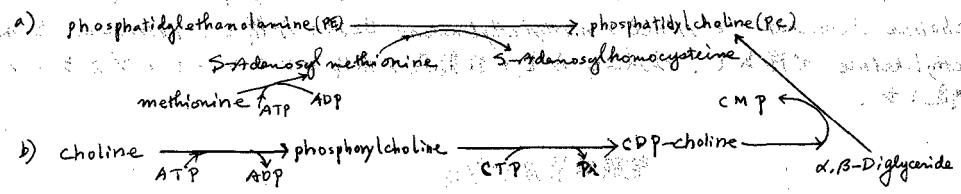
$$N=\frac{\text{全脳PCの放射能}}{\text{全肝PCの放射能}}\times 100$$

即ち脳へのとりこみは生後2週間をピークとして生後3週間頃まで高値を示すが，7週間のネズミ，母ネズミでは著明に低下する。此期間ではtransmethylationによるPCの合成が脳で行われているか，或は肝で作られたPCがそのまま或は何等かのかたちで脳にとりこまれたのか，就れにせよ

之等発育期の脳は成熟ネズミに比し大量に methionine を利用している事をうすと思われる。

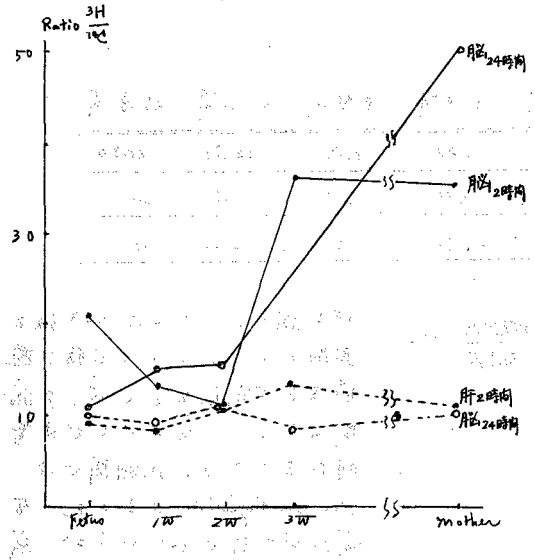
2. Double Labelling 法による脳PCの合成径路の検討

PC の de novo の合成径路は見え次の如くである。



両径路共肝においては活発であるが a) の系路は一般に肝外組織では非常に低く、成熟ネズミの脳は肝の脳1/150と報告されている[7]。又脳では此径路は欠除していると考えるものもある[9]。PCの合成に際し a) 及び b) の活性を比較する目的で methionine methyl-^{14}C と choline-methyl-^{3}H の mixture を腹腔内注射し、種々の発育段階で経時的にPCの $^{3}H/^{14}C$ を検討した。2時間値，24時間値を各 age group の脳，肝についてみると図2のごとくである。肝では PC の $^{3}H/^{14}C$ は2時間値，24時間値共年令による差は殆んどなく10前後である。これに対し脳PCの $^{3}H/^{14}C$ を2時間についてみると生後1～2週間は低く，年令の高いものでは上昇し，24時間においても類似の傾向が認められる。以上を綜合してみると，生後1～2週のネズミは脳PCの $^{3}H/^{14}C$ が肝に類似して低く，従って a) の径路が比較的高く関与していると考えられる。又成熟ネズミでは a) は非常に低く b) が主体であり，即 Kennedy の径路が major であると解される。

図2.



3. CDP-choline-1,2-^{14}C の脳PCへのとりこみ：(in vitro)

生後2週間のネズミ脳の microsome fraction は肝のそれと略同様の活性を示す事を報告した[7]が表2に示す如く fetus (18 days gest) → 2週間と高くなり3週間では幾分低下する傾向を認める。Mc Murray[10] は脳ホモジネートを用い CDP-choline-1,2-^{14}C より alkali-labile phospholipids へのとりこみを検討して得た結果と略同様である。

表2

		脳	cpm/mg prot/hr	肝
fetus	1	85,908		74,668
	2	79,162		67,359
2W	1	112,372		91,780
	2	100,315		89,319
3W	1	61,666		
	2	87,907		

5. S-Adenosyl-methionine-methyl-^{14}C より脳 PC へのとりこみ (in vitro)

Bremer 等は成熟ネズミの脳 microsome では肝のそれの約 1/50 と低い事を報告し[8]，我々は 2 週間の幼若ネズミでは肝の約 $\frac{1}{20}$ と比較的に高値をとす事を報告した[8]。又 PC を加水分解して choline へのとりこみをみると PC の略 80% は choline moiety にある事が分った[9]。この transmethylation の活性を脳 microsome fraction を用いて異った発育相で比較すると表3の如く，Fetus で低く，生後 1，2 週間で高く，母ネズミでは低くなる。即ち脳において transmethylation は肝程著明ではないが，生後 1～2 週間は相対的に活発となると考えられる。

表 3

S-Adenosyl-methionine-methyl-^{14}C より PC へのとりこみ

	脳 cpm/10mg prot/hr	(肝)
Fetus 1	147	
2	163	
1W 1	924	……(17276)
2	882	
2W 1	594	
2	733	
mother 1	155	
2	170	

人の新生児では体重 4000 g の際肝は約 220 g 脳は 450 g で肝は脳の半分である。ネズミでも生下時肝は約 200 mg，脳は約 400 mg で，其後約 2 週間で脳は約 3 倍，肝は約 4 倍となる。生後約 3 週で脳，肝は略同重量となる。新生児に脳が急速に発育する際には PC についてみると栄養源からの PC，肝で作られた PC が何等かの形で脳に入る可能性の他脳自体での PC の合成 — transmethylation を含めて — を考慮する必要があると思われる。

文献

1. Bremer, J., Figard, P.H., and Greenberg, D.M., Biochim. Biophys. Acta, 43, 477, 1960
2. Kennedy, E.P. and Weiss, S.B., J. Biol. Chem., 222, 193, 1956
3. Davison, A.N. and Dobbing, J., Brit. Med. Bull., 22, 40, 1966
4. Rouser, G., Galli, C., and Kritchevsky, G., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 404, 1965
5. Snyder, F. and Stephens, N., Anal. Biochem., 4, 128, 1962
6. Brady, R.O., Bradley, R.M., Young, O.M., and Kaller, H., J. Biol. Chem., 240, PC3692, 1965
7. Bremer, J. and Greenberg, D.M., Biochim. Biophys. Acta, 46, 205, 1961
8. Chida, N. and Arakawa, Ts., To be published; 第12回日本脂質生化学研究会 (1970年) 発表
9. Chojnacki, T., Korzybski, T., and Ansell, G.B., Biochem. J. 90, 18P, 1964
10. Mc Murray, W.C., J. Neurochem., 11, 287, 1964

16. ブタ脊髄における sphingoplasmalogen と galactosyldiglyceride

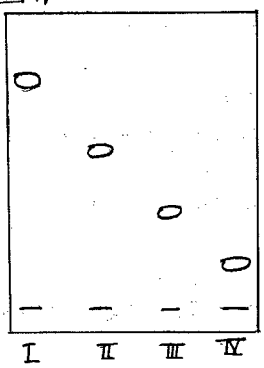
久保田　勝　（信大・医・二生理）
武富　保（信大・医・順応研・生化）

脳神経組織を構成する糖脂質において、cerebroside より極性の少ない糖脂質の研究について今まで数多くの報告がある。中でも1964年に Kochetkov[6][7] らは牛の脳組織において新しい型の sphingoplasmalogen を報告しているがその後多くの研究者が検討しているにもかかわらず必ずしも追試確認されてはいない。今回、私達はブタ脊髄の糖脂質微量分画から alkali stable で acid labile な sphingoplasmalogen 様物質が抽出されたので、改めて再検討してみた。Kochetkov[6][7] らは TLC と定量分析を使って sphingosine base や糖、fatty acid, fatty aldehyde を決めているが演者らの結果では糖成分で galactose が一致しただけで、他の構成は若干の相異を認めた。その他 Horton and Brotz[5], Benson[1], Dittner[2], Stein[11], Rumsby[10] は galactosyl diglyceride の存在を報告しているが、演者らはこの物質の単離精製を試みて純化したものを得ることに成功した。極性の少ない糖脂質の中には、勿論 estercerebroside も確認されるが多くの報告があるのでここでは触れない。演者らは新しい型の sphingoplasmalogen と galactosyl diglyceride について実験を行った結果を報告する。

実験と結果

〔抽出と精製〕新鮮なブタ脊髄から軟膜、クモ膜、硬膜とその周囲に分布している血管結合織を剥離した。Folch らの方法に従ってクロロホルム－メタノール（2：1 V/V）で総脂質を抽出した。この総脂質を Rumsby[10] の方法でクロロホルム－アセトンの非極性溶媒を使い Mallinckrodt のケイ酸カラムを行った。溶媒系はクロロホルム－アセトン（C-A）（20：0 %）（19：1）（9：1）（4：1）（3：1）（2：1）の順に溶出し、これを 20ml の試験管に集め、各試験管より 1ml ずつとり蒸発乾固し、TLC（C-M-W）90：12：1 V/V）に展開し、cerebroside より Rf 値の高い物質でアンスロン硫酸で糖の発色を示す物質と確認した。sphingoplasmalogen は C-A（3：1 V/V）に galactosyl diglyceride は C-A（4：1 V/V）に溶出された。これらの物質の均一性は TLC 及び IR で確認した。（図1）（図2）

図1)



〈新しい型の sphingoplasmalogen〉

〔赤外線吸収スペクトル〕KBr pellet で糖（3400 CM^{-1}, 1070 CM^{-1}）、酸アミド（1640 CM^{-1}, 1530 CM^{-1}）に吸収があり、alk-1-enyl ether group の吸収は（1668－1666 CM^{-1}）に特長ある吸収があるが酸アミドの吸収と一致しているので明らかでない。エステルとリンの吸収は見られない。（図2 A）

[mild acid hydrolysis] 1 N HCl in ethyl-ether 40°C 30分処理後 ethyl-ether で fatty aldehyde を分離した。その残渣については、クロロホルムで抽出し、TLC で cerebroside であることが確認された。(図5)

[mild alkaline hydrolysis] Dawson法[2]で 0.5 N NaOH in MeOH で 40°C 30分処理したが水解されなかった。(図5)

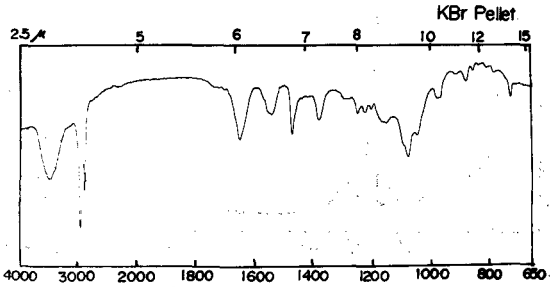
[糖成分] 5% HCl-CH_3OH で 100°C 3時間 methanolysis した後石油エーテルで fatty acid methyl ester を除きメタノール層を silver acetate で脱塩、沪過後その沪液中の酢酸の臭いがぬけるまで N_2 ガスで蒸発乾固し、その残渣を TMS 化後 GLC を行った。糖成分としてはガラクトースが見つかった。(図3)

[Sphingosine base の分析] Graver-Sweely[3]の方法より水性 2N HCl-CH_3OH で 70°C 3時間水解し石油エーテルで fatty acid methyl ester を除き、メタノール層を conc alkali で pH 9-10 にし、エーテルと水を加えて振り、エーテル層に Sphingosine を抽出後蒸発乾固して TMS 化し、GLC (SE-30, 210°C) で分析した結果 C_{18}-Sphingosine が 79% で dihydrosphingosine は 21% で Kochetkov の報告結果とはかなり異っている。C_{20}-Sphingosine は検出されなかった。(図4)

[Fatty acid] 5% HCl in CH_3OH 100°C 3時間処理後、石油エーテルで脂肪酸メチルエステルを抽出し、GLC で脂酸構成を見た。long chain ($C_{24:0}$ + $C_{24:1}$) が 55% で大部分を示した。(表1)

[Fatty aldehyde] mild hydrolysis 後 ethyl ether で fatty aldehyde を抽出し、GLC にて検討中である。

図2 A) Infrared Spectra of Sphingoplasmalogen



B) Infrared Spectra of Galactosyl Diglyceride

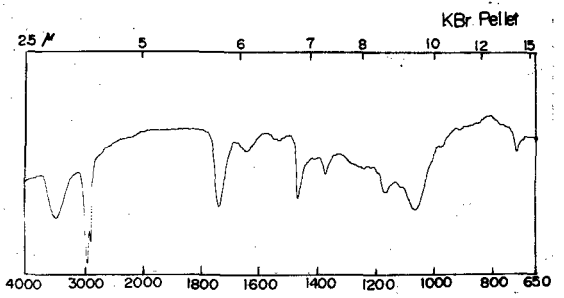
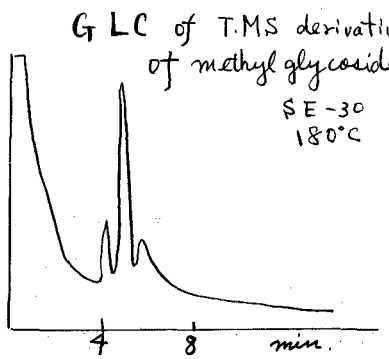


図3)



〈Galactosyl diglyceride〉

[赤外線吸収スペクトル] KBr pellet で糖 (3400 CM^{-1}, 1070 CM^{-1}), エステル (1730 CM^{-1}) があり、酸アミド (1640 CM^{-1}, 1530 CM^{-1}), P の吸収はなかった。(図2B)

[mild acid hydrolysis] 1N HCl in CH_3OH 40°C 30分で処理したが水解されなかった。(図5)

[mild alkali hydrolysis] Dawson法[2]で 0.5N NaOH in CH_3OH で 40°C 30分処理後クロロホルムと水を加えて二層に分け、クロロホルム層を TLC で見ると脱アシル化されていることがわかった

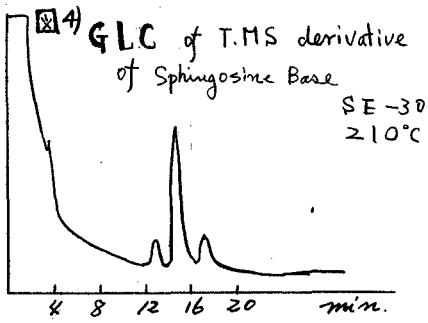


図4)

。なお、galactosyl glycerol は未確認である。(図5)
〔糖成分及び glyceral〕 sphingoplasmalogen と同様に 5% HCl-CH_3OH で methanolysis した後、TMS化し、GLC (SE-30, 180°C) で galactose の存在を認めた。
又 glycerol も GLC (SE-30, 120°C) で glyceral が確認された。
〔Fatty acid〕 sphingoplasmalogen と同じ方法で fatty acid methyl ester を GLC で同定した。

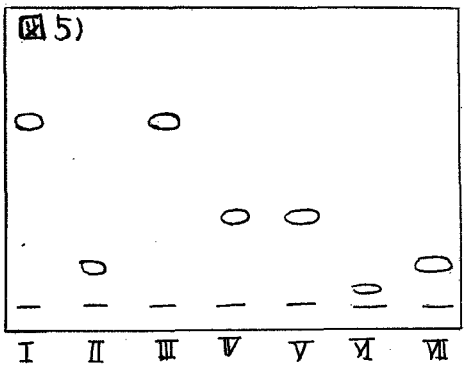


図5)

C-M-W 90-12-1
I Sphingoplasmalogen (S.P.)
II S.P. treated with mild acid
III S.P. treated with mild alkali
IV Galactosyl Diglyceride (G.D)
V. G.D. treated with mild acid
VI G.D. treated with mild alkali
VII cerebroside

Spray reagent
Anthron 硫酸

C_{16-0} が 34.1% で大部分を占めるが、残りの C_{18}, C_{20}, C_{22}, C_{24} は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が pair で存在していた。(表2)

表1) Fatty Acid Composition of Sphingoplasmalogen

Fatty acid	% of total
$C_{16:0}$	2.5 %
$C_{18:0}$	22.5
$C_{20:0}$	7.8
$C_{22:0}$	4.6
$C_{23:0}$	4.3
$C_{24:0}$	20.1
$C_{24:1}$	33.2
$C_{25:0}$	2.6
$C_{26:0}$	2.4

表2) Fatty Acid Composition of Galactosyl Diglyceride

Fatty acid	% of total
$C_{14:0}$	2.2 %
$C_{16:0}$	34.1
$C_{16:1}$	2.8
$C_{18:0}$	10.5
$C_{18:1}$	15.7
$C_{20:0}$	6.5
$C_{20:1}$	7.1
$C_{22:0}$	4.7
$C_{22:1}$	5.6
$C_{24:0}$	5.6
$C_{24:1}$	5.3

考察

燐脂質の plasmalogen は言うまでもなく、最近 cholesteryl alk-1-enyl ether の報告など vinyl ether を持つ脂質が注目されつつある。Sphingoplasmalogen も Kochetkov[1,7] らによって報告されていたが詳細な点まで検索されていないし、また、今回まで多くの研究者によって追試されて来なかった。Kochetkov[1,7] は、sphingosine base を C_{18} の dihydro-

sphingosine と考えていたが今回の実験において C_8 の sphingosine が大部分を占めることがわかった。この相異は動物種えは年令的な差が関係しているかは今後研究して行こうと思う。脂肪酸は C_{24-0} と C_{24-1} で約55%を占めて cerebroside の構成脂酸と似ている。最後に vinyl ether の位置は Kochetkov[10] の指摘しているように sphingosine の C_3 の位置に結合していると考えられる。しかし、完全メチル化法による ester cerebroside の ester の結合位置の問題には、Klenk[5], 玉井[12], Radin[9] らの報告に見られるように、いずれも一致した結論がなく、vinyl ether の位置決定は慎重を期したく、今回は結論を出すまでに至っていない。

galactosyl diglyceride は Stein によって構造式はすでに報告されているが脂酸構成において C_{18-3} の存在について私達の実験で non-polar の column (SE 30) と Br 処理の結果では C_{18-3} は殆ど認められなかった。又、C_{14-0} と C_{16-0} を除き、飽和と不飽和が pair で存在していることを注目したい。今まで glyceral の2の位置は不飽和が多いと報告されていることから、glyceral の1と2では飽和と不飽和が相対して結合しているのではないかと考える。

これらの物質が脳組織においてどの様な代謝をし、脳神経の生理に如何に働くか更に研究を進めたいと思う。

文献

1) Benson A. A. and Stein J. M., Fed. Proc. 22 299 (1963)
2) Dawson R. M. C., Biochem. J. 75 45 (1960)
3) Dittmer J. C. and Wells M. A., Biochem. 5 3405 (1966)
4) Gruner R. C. and Sweeley C. C, J. Am. Oil chemists Soc. 42 294 (1965)
5) Klenk V. E. and Löhr J. P., Hoppe-Seyler's Z. physiol. 348 1710 (1967)
6) Kochetkov N. K., Zhukova, I. G. and Glukhoded I. S. Biochim. Biophys. Acta 60 431 (1962)
7) Kochetkov N. K., Zhukova, I. G and Glukhoded I. S. Biokhimiya 29 570 (1964)
8) Horton W. T. and Brotz M., Biochem. Biophys. Res. Comm. 12 193 (1963)
9) Radi N. S. and Y. Kishimoto, M. Wajda J. Lipid Res. 7 27 (1965)
10) Rumeby M. G., J. Chromatog. 34 461 (1968)
11) Stein J. M., Biochim. Biophys. Acta 144 118 (1967)
12) Tamai Y., Taketomi T. and Yamakawa T., Jap. J. Exp. Med. 37 79 (1967)

17. Gangliosidesの神経細胞内分布について

松川恵子・玉井洋一・佐武　明
（新大・脳研・神経化学）

ガングリオシドの存在は神経組織に特徴的であり，神経組織内分布について数々の研究が行なわれて来ており，神経膜と結びついて存在し，神経系の機能になんらかの役割を果たしているのではないかと思われている。[1] 我々は先に豚の脳幹から，内部構造をかなり良好に保存した神経細胞体を多量に分離する方法に成功し[2]，極めて高いガングリオシド量が神経細胞に含まれているのではないかと予想し，それに重点を置き脂質分析を行ったが，ガングリオシド量は，NANA含量を mg/dry weight g. として表わすと，神経細胞体では1.5となり，灰白質の5.8と比して低く，まったく予想に反した。[3] これは我々が得た神経細胞が，電顕上，必ずしも細胞膜の保存がよくないことから，神経細胞体分離の途中で，ガングリオシドが神経膜成分と共に離れてしまったのか，或は神経細胞体にはもともとガングリオシドはすこししか存在せず，この少量存在するガングリオシドが完全神経細胞体の機能に関与しうるのかなどが考えられる。更に又，いずれの可能性にせよ，我々が得た神経細胞体は内部構造をかなり良く保っている点から考えて，細胞内に存在し，従来ガングリオシド含量が高いと言われているマイクロゾームには，ガングリオシドが少ないのではないかと推定される。本研究では，白鼠脳のマイクロゾームの細分画を行い，ガングリオシドその他の分析を試み，上記推定を支持する結果を得た。

——— 実験方法 ———

I〈マイクロゾームの分画方法〉

Peters[4] の肝臓での実験に従って次の様に行った。ラットはエーテルで軽く麻酔し心臓から生理食塩水を注入灌流したのち断頭し，脳を取り出し，その重さの4倍量の0.88M sucroseで，clearance 0.25mmのテフロン－硝子ホモジナイザーを用いて，一回ゆるやかにホモジナイズした。一部はホモジネート(H)として残し，後に述べるように脂質，蛋白質の分析を行った。0.88M sucroseホモジネートは25,000×g，20分遠心し，上清に等量の1.76M sucroseを加え，よく混和した。次にその溶液の2mlに，1.23M sucrose 6.5ml，0.15M sucrose 1.5mlを順次重ね，105,000×g，16時間遠心した。0.15M sucrose部分に浮遊する白い膜様物質と，0.15M sucroseと1.23M sucroseの境界面より少し下の管壁についた物を集めsmooth surface fraction (S)とし，底の沈でんをrough surface fraction (R)とし，中間の部分をinterphase fraction (I)とした。smoothおよびinterphase fractionは各々3倍量の水を加えて懸濁し，105,000×g，2時間遠心し，smoothおよびinterphaseのpelletを得た。smooth，interphase，rough，ホモジネートとも，水でホモジナイズし，1部は蛋白定量及びRNA定量を行い，残りは再び超遠心し得られた沈でんは脂質分析に用いた。

II〈脂質分析〉

smooth，interphase，rough fraction，ホモジネートのそれぞれは1mlの水にsuspendし，20倍量のクロロホルム：メタノール(2：1)でホモジナイズし，脂質を抽出

抽出残渣は0.5 M KCl を含んだ クロロホルム：メタノール（1：1）で，更にクロロホルム：メタノール（2：1）で抽出を繰返し，抽出液は合わせ濃縮乾固したのち クロロホルム：メタノール(2:1)混液にとかし，その可溶部分に1/4倍量の水を加え，振盪，2層に分け，下層は理論的上層で抽出した。洗液と合わせた上層画分は理論的下層で洗って精製し，ガングリオシドの定量に，下層画分はコレステロール，燐脂質の定量と，薄層クロマトグラフィーに供した。コレステロールは Searcy & Bergquist の方法[5]，燐脂質は Bartlett 法[6]でそれぞれ定量した。ガングリオシドの定量は Warren の方法[7]により N-acetylneuraminic acid を定量して行った。

Ⅲ〈マイクロゾーム各分画の下層画分の薄層クロマトグラフィー〉

各分画の下層の適当量を N_2 gas でとばし，クロロホルム：メタノール(2:1)にとかし，Kiesel gel G の plate 又は basic plate にスポットし，展開，発色には 50% - H_2SO_4 を噴霧し 120－150℃で15分加熱した。溶媒として C：M：H_2O (65/25/4)，C：M：AcOH：H_2O (25/15/4/2) を一次元クロマト用に，C：M：NH_4OH (13/7/1) － C：Acetone：M：AcOH：H_2O (10/4/2/2/1) を二次元クロマトに用いた。

Ⅳ〈蛋白，RNAの定量〉

蛋白の定量は Lowry らの方法[8]に従った。RNAの定量は Steele らの方法[9]と Fleck & Munro の方法[10]を組み合せ，紫外吸収とオルシノール反応で測定した。

——— 結果と考察 ———

細胞分画法で得られるいわゆる脳のマイクロゾーム分画と言われているものは均一な分画とは見なされていない。[11][12][13] この分画には rough-surfaced endoplasmic reticulum と smooth-surfaced endoplasmic reticulum の他にかなりの external cell membrane 等を含んでいると思われる。今回マイクロゾーム分画を肝について Peters の行った方法を用いて，更に rough surface fraction, interphase fraction, smooth surface fraction の3つの分画に分けて，蛋白質，RNA，ガングリオシド，コレステロール，燐脂質の分析を行った。rough, interphase, smooth fraction とも電顕像は未だ調べてないが，RNA / Protein を見ると（表2）rough surface fraction は高い値を示し，smooth, interphase fraction とも低い値を示すことにより，一応 rough-surfaced endoplasmic reticulum を rough surface fraction に濃縮し得たと考えてよいように思われる。この様にして得られた rough surface fraction の蛋白の一部は ribosome の蛋白故，rough surface fraction は脂質含量に比し蛋白含量が多く，phospholipid / protein, cholesterol / protein が，smooth surface fraction, interphase fraction に比し低い値を示すと考えられる。（表2）cholesterol / phospholipid は rough surface fraction では 0.28 となり，smooth surface fraction の半分，又 interphase fraction よりわずか低い値を示した。（表3）

薄層クロマトグラフィーの結果では，rough surface fraction には phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl choline, cholesteral が主で，その他 cerebroside, phosphatidyl serine に相当する spot が認められるが，sphingomyeline, sulfatide は認められなかった。又 smooth surface fraction や interphase fraction に較べて phosphatidyl ethanolamine よりも phosphatidyl choline の方が多い様に見え

3. rough surface fraction には NANA の存在はまったく証明されなかった。smooth surface fraction, interphase fraction は両方ともほぼ同じ含有量を示し、又 NANA / protein も同じ様な値を示した。(表1)(表2)
現在迄, 同一種細胞に含まれる rough-surfaced endoplasmic reticulum と smooth-surfaced endoplasmic reticulum の異同についての明確な記載はない。これは

表1 Protein, RNA and Lipids Contents of Microsomal Fractions isolated from Rat Brain

	Protein		RNA	Cholesterol		Phospholipid		NANA	
	mg/g wet wt.	recovery %	μg/g wet wt.	μg/g wet wt.	recovery %	μg/g wet wt.	recovery %	μg/g wet wt.	recovery %
Rough	1.4	(1.3)	233	27	(0.2)	95	(0.3)	0	(0)
Inter-phase	3.5	(3.2)	62	565	(3.4)	1749	(4.6)	26	(6.5)
Smooth	3.4	(3.1)	14	1679	(10.1)	2922	(7.7)	31	(7.7)
Sum	8.3	(7.5)	309	2271	(13.7)	4766	(12.6)	57	(14.1)

表2 RNA, and Lipids Contents in Specific Concentration of Rat Brain Microsomal Fractions

	RNA μg/mg.protein	Cholesterol μg/mg.protein	Phospholipid μg/mg.protein	NANA μg/mg.protein
Rough	166	19	68	0
Inter-phase	18	161	500	7.4
Smooth	4	494	859	9.1

表3 Cholesterol/Phospholipid Ratio in Microsomal Fractions of Rat Brain

Rough	0.28
Inter-phase	0.32
Smooth	0.57

各の構造物. 特に後者を純粋な画分として分け得られていないことに基づくものであろう。もし両者を ribosome の附着の有無のみによる一種の状態像の差とすると。endoplasmic reticulum には ganglioside は無いことになり, 我々が先に分離した神経細胞体に蛋白当りの ganglioside (NANA) 含量の少ないことと矛盾しない。なお Rouser 等も glycolipids は細胞膜表面に存在していて endoplasmic reticulum には存在しないとしているが, data は記載されていない。[14] 即ち以上の結果からガングリオシドは主に脳を構成する細胞恐らくは, 神経細胞膜に局在していると推測されるが, 我々の用いた Peters の方法では RNA の約 50% が 25,000×g, 20分の沈渣部分にありここに回収される rough-surfaced membrane の分離分析等の結果を得て, 結論を

得た、と思う。

文献

1) A.L. Lehninger : Proc. Natl. Acad. Sci. 60 1069 (1968)
2) M. Satake, S. Hasegawa, S. Abe, and R. Tanaka : Brain Res. 11 246 (1968)
3) Y. Tamai, S. Matsukawa, and M. Satake : Brain Res. in press
4) T. Peters : J. Bial. Chem. 237, 1181 (1962)
5) R.L. Searcy and L.M. Berggquist : Clinica Clim. Acta 5 192 (1960)
6) G.R. Bartlett : J. Biol. Chem 234, 466 (1959)
7) L. Warren, 234, 1971 (1959)
8) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall : J. Biol. Chem 193, 265 (1951)
9) W.J. Steele, N. Okamura and H. Busch : Biochim. Biophys. Acta, 87, 490 (1964)
10) A. Fleck and H.N. Munro : Biochim. Biophys. Acta, 55, 571 (1962)
11) H. Wiegandt : J. Neurochem 14 671 (1967)
12) J.R. Wherrett and H. McIlwain : Biochem. J. 84, 232 (1962)
13) V.P. Whittaker : Ann New York Acad. Sci 137 982 (1966)
14) G. Rouser, G.J. Nelson, S. Fleischer and G. Simon : Biological Membranes page 55 (1968) Academic Press

18. Gaucher 病患者の肝・脾・脳の糖脂質について

武富　保・河村成子
（信大・医・順応研・生化）

今回、Gaucher病患者の新鮮な剖検材料である肝脾脳の糖脂質について検討した。Gaucher病は病態生化学的にはglucocerebrosidase酵素欠損による網内系のglucocerebrosideの代謝異常であり、特に、脾の糖脂質については、これまでにも演者ら(5)を含めて、かなりの研究者(2,3)によって明らかにされている。肝の糖脂質については、glucocerebrosideの増量が言われているが詳細な報告については見当らない。また、脳の糖脂質については特にinfantile型の例でSvennerholm(4)によってglucocerebrosideの異常蓄積が報告されているが、これは必ずしも一致した見解とは言えない。本実験の結果によると、肝脾に著明なglucocerebrosideの増量が認められた。肝脾の糖脂質は質的には極めて類似しているが、量的には脾が肝に比して約4～5倍も多いことが判った。脳にはそのようなglucocerebrosideの増量は見られず、むしろ、1才未満児のgalactocerebrosideとsulfatideの構成であり、ganglioside は正常な新生児脳gangliosideの組成と幾分違って、GIがGIIに比してやゝ多くなっている程度であった。

実験材料及び方法

本実験試料は武蔵野赤十字病院病理部　陳雄嘉博士によるもので、患者は男児で、生後8ヶ月で死亡した。主要剖検所見としては、高度の大形細網細胞増生を伴なう肝脾腫で肝(505g)，脾(240g)。肝には集団的gaucher細胞増生による肝実質の区分及び肝細胞腫大を伴う実質の高度の混濁腫張、脾は殆んど全実質を置換する様な高度のgaucher細胞増生及び髄外造血を伴う脾腫。全身性リンパ腺腫大。脳は205gで異様細胞は見出されていない。四肢軽度の点状出血を伴う中等度の全身貧血発育不良で、カタル性肺炎が死因であった。

本患者の肝脾脳の糖脂質については以下のような実験方法によった。実験には、肝(26g)，脾(38g)，脳(17g)が用いられ、いづれも湿組織1g当り20mlのC-M(2:1, v/v)の溶媒で総脂質が抽出された。肝脾の総脂質はアセトン可溶の中性脂質、エーテル可溶の燐脂質分画，エーテル不溶の粗スフィンゴリピド分画に分けられたが、脳では総脂質のC-M抽出液にその1/5容の水を加えることによって、上層と下層に分け、上層はセロファンチューブに入れて透析後凍結乾燥して粗ganglioside(約80mg)が得られ、下層についてはアセトン，エーテル処理後、エーテル不溶の粗スフィンゴリピド(約191.1mg)が得られた。各分画の收量は大体以下の通りであった。

組織	湿組織重量	中性脂質分画	燐脂質分画	粗スフィンゴリピド分画
肝	26g	659.9mg	199.1mg	330.0mg
脾	38	516.0	225.0	768.8
脳	17	311.1	254.0	271.1

粗スフィンゴリピド及び粗gangliosideについては更に珪酸-Hyflo Super Cel (2:1, w/w)

カラムクロマトによって種々の糖脂質に分画精製された。各種糖脂質の同定には、常法によって、TLC, IR-スペクトル, 中性糖、アミノ糖、シアル酸の定量、脂酸、スフィンゴシン塩基、ガラクトース対グルコースの比のGLCによる分析、メチル化糖のGLCによる糖結合様式の推定などによって行われた。

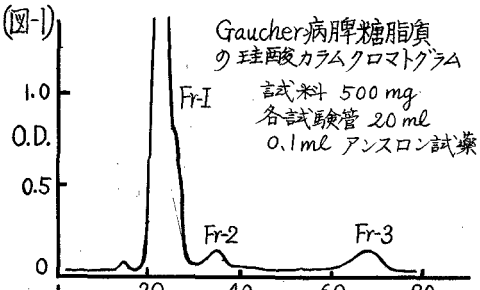
実験結果

肝脾の糖脂質： 肝脾より抽出された粗スフィンゴリピド分画は珪酸カラムクロマトによって各種糖脂質分画に分けられた。図-1,2には肝脾の糖脂質の溶出パターンが示されている。肝脾いづれもFr-Iが圧倒的多量を示し、Fr-IのTLCではglucocerebrosideに相当するspot(upperとlower spotに分離)が検出され、構成糖はグルコースのみが認められることから、明らかにgaucher病に異常増量するglucocerebrosideに一致することが判った。Fr-2はTLCでceramide lactosideに相当するRf値のspotを示し、構成糖としてガラクトース対グルコースの比は1:1であり、完全メチル化後、メタノリーシスして得たメチル化糖のGLCの結果はmethyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl α,β-galactosideとmethyl 2,3,6-tri-O-methyl-β-glucosideとそのα-anomerのピークが得られることからceramide lactosideと同定された。Fr-3はTLCでかなり均一なspotを示し、シアル酸を含有し、ガラクトース対グルコースの比が1:1であり、完全メチル化後メタノリーシスして得たメチル化糖のGLCはmethyl 2,4,6-tri-O-methyl β-galactoside, methyl 2,3,6-tri-O-methyl β-glucosideとそれらのα-anomerのピークを示すことからhematosideの構造と一致するものであることが判った。

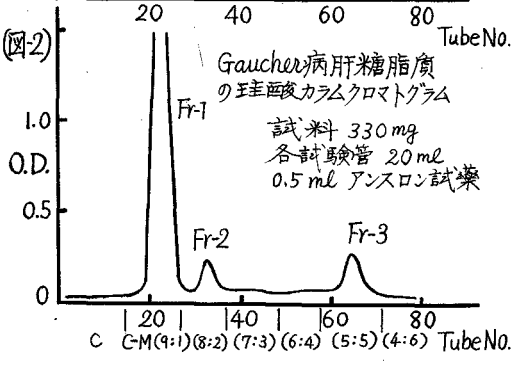
Fr-I, 2, 3の各種糖脂質は図-3に示されるようにIR-スペクトルによっても確認されることが出来た。以上の結果からglucocerebrosideの異常蓄積が見られるGaucher病の肝脾であることが明らかであった。

肝脾の糖脂質は質的には類似しているが量的には図-1,2から判かるように、脾が肝に比して大体4～5倍量も多いことが明らかとなった。

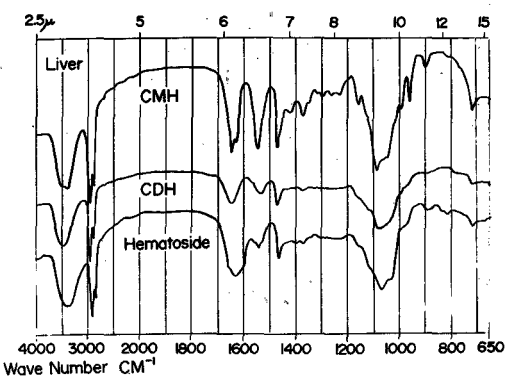
(図-1)



(図-2)

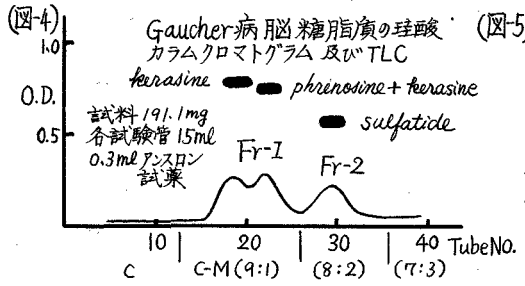


(図-3) Gaucher病肝糖脂質のIR-スペクトル

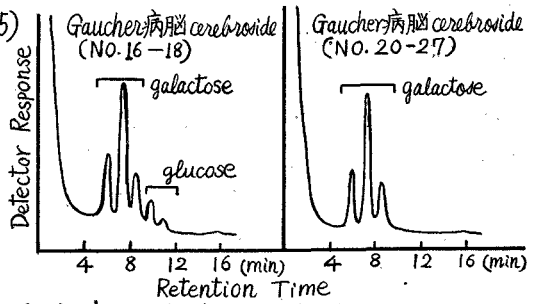


脳の糖脂質：　先ず、エーテル不溶の粗スフィンゴリピド分画については、Svennerholmの報告と関連して、果して、脳組織にglucocerebrosideの多量が見られるかという関心の下に詳細に実験が行われた。珪酸カラムクロマトを行って得た糖脂質の溶出パターン(図-4)に見られるFr-1はTLCでkerasineとphrenosineに相当する2 spotsを示した。特に、構成糖についてはFr-Iの各試験管について、丹念に検出されたが NO.16, 17, 18 に相当する3部分にほんの僅かglucoseが見出される程度で、殆んどがgalactoseであった。これらの結果は図-5に示されている。正常脳でも幾分速く溶出されるkerasine分画にもこの程度のglucoseは認められるので、特別に、glucocerebrosideの増量ということはなかった。　Fr-2はTLCでauthenticなsulfatideと一致し、構成糖がgalactoseであり、IR-スペクトルの硫酸基などによるピークからもsulfatideと同定された。成人脳のcerebrosideとsulfatideの溶出パターンと著しく異なることは年令が1才未満によるものと考えられる。

(図-4)

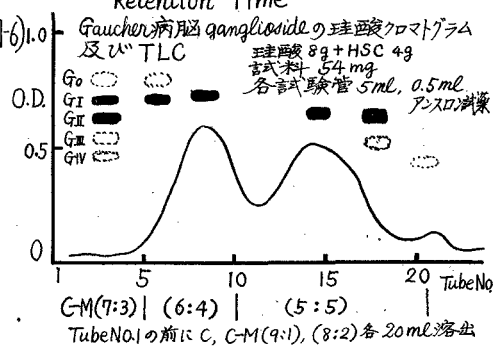


(図-5)



次に、脳の粗ganglioside分画について珪酸カラムクロマトによって分画精製すると図-6に示されるような溶出パターンが得られたが　TLCと分析の結果から、Go(2.5%), GI(40.0%), GII(50.3%), GIII+IV(7.2%)からなることが示された。演者ら(6)がすでに報告している正常な新生児脳のgangliosideと比較して、GIがGIIに比して幾分多いように思われた。

(図-6)



肝脾脳の糖脂質の脂酸及びスフィンゴシン塩基組成：　糖脂質の構成脂酸やスフィンゴシン塩基は糖脂質の代謝を考える上に極めて重要である。そして、これらの分析は試料に他の夾雑物があったのでは意味がない。この観点から行われた分析結果は表-1に纏められている。肝脾に異常に増量するglucocerebrosideがTLCで2 spotsになるのは脂酸の炭素鎖の長いのが多いか少ないかによるもので、脳のcerebrosideに見られるようなオキシ酸は全く見出されなかった。Gaucher病脳のcerebrosideには明らかにオキシ酸が見られるが表-1には省かれている。スフィンゴシン塩基については肝の糖脂質は脾に較べてdihydrosphingosine (C18-SH2)の割合が常に多いが、我々(7)が既に報告したNiemann-Pick病の肝脾の糖脂質についても見られ、臓器の違いによるものと思われる。Gaucher病脳のgangliosideにもC20-Sphingosineが見られている。

Fatty acids	Liver CMH-1	CMH-2	CDH	Hematoside	Spleen CMH-1	CMH-2	CDH	Hematoside
C_{16}	3.6	24.2	11.5	12.2	2.6	34.6	20.5	24.6
C_{18}	2.0	10.0	20.9	21.1	1.7	7.0	14.8	17.9
$C_{18:1}$	1.4	-	4.2	4.5	-	-	4.5	4.6
C_{20}	0.5	6.2	3.6	5.4	2.9	5.1	3.3	3.7
C_{22}	9.8	22.3	19.1	21.4	23.6	19.5	19.8	14.9
C_{23}	2.5	2.1	3.3	2.9	6.4	4.5	3.4	3.0
C_{24}	25.7	10.7	18.8	12.5	28.8	18.1	12.8	13.1
$C_{24:1}$	54.5	24.5	16.4	20.1	34.0	10.4	18.5	18.2
C_{18}-sphingosine (S)	88.6	85.7	77.0	80.3	91.4	92.5	82.5	83.7
C_{18}-SH_2	11.4	14.3	23.0	19.7	8.6	7.5	17.5	16.3

Fatty acids	Brain cerebroside (No.16)	(No.18)	(No.20-27)	CSE	GII	GIII
C_{16}	2.8	0.8	19.3	6.1	2.8	2.6
C_{18}	9.6	11.9	26.9	19.5	89.7	88.9
C_{20}	1.1	2.6	5.9	4.4	5.9	6.1
C_{22}	9.5	11.3	11.3	12.7	1.6	2.4
C_{23}	3.6	4.6	-	3.9		
C_{24}	50.9	47.0	19.7	30.3		
$C_{24:1}$	22.5	21.8	16.9	23.1		
C_{18}-sphingosine (S)	75.6	89.9	88.2	86.9	72.3	70.3
C_{18}-SH_2	24.4	10.1	11.8	13.1	13.2	16.2
C_{20}-sphingosine (S)					14.5	13.5

(表-1)

考察

本疾患の肝脾脳の糖脂質の分析結果は、特に、肝脾にglucocerebrosideの異常蓄積を明らかにすることが出来たが、脳には糖脂質の著明な異常を見出すことは出来なかった。本疾患のinfantile型は普通、脳障害を伴うとされているが、本疾患患者の脳には病理組織学的にも異様細胞は見られていない。Svennerholmのinfantile型の例とは明らかに異なるものと思われる。adult型では殆んど脳障害や脳の糖脂質の異状が報告されていないので果してadult型と類似のものと考えてよいか今後の問題である。肝脾のglucocerebrosideの増量はglucocerebrosidase酵素欠損によるものと考えられているが、このglucocerebrosideが血球由来の糖脂質の分解過程のものかどうかについてはまだ決着がついていない。最近、Dawson & Sweeley(1)は7~8血漿糖脂質の80%は血球糖脂質に由来するとして、Gaucher病やFabry病のような糖脂質の異常蓄積を血球由来の糖脂質に求めているが、果して、Gaucher病が患者の血液によって診断が容易につくようになるものかどうか今後の関心事である。

文献

(1) Dawson, G. and Sweeley, C.C., J. Biol. Chem., 245, 410 (1970)
(2) Makita, A., Suzuki, C., Yosizawa, Z. & Konno, T., Tohoku J. exp. Med., 88, 277 (1966)
(3) Suomi, W.D. and Agranoff, B.W., J. Lipid Res., 6, 211 (1965)
(4) Svennerholm, L., "Inborn Disorders of Sphingolipid Metabolism", p. 169 (1967)
(5) Taketomi, T. and Yamakawa, T., Japan J. Exp. Med., 37, 505 (1967)
(6) Taketomi, T. and Kawamura, N., J. Biochem., 66, 165 (1969)
(7) 武富保, 河村成子, 内貴正治, 岡野照, 脂質生化学研究 p. 61 (1970)

19. Schilder病および一酸化炭素中毒患者の凍結保存脳ミエリンの生化学的特性

小宮義璋・笠原道弘
（東大・医・脳研・生化）

ミエリンは古くから膜の典型として種々の研究がなされてきた。またミエリンは，中枢神経系から分離される他の膜標品と比べてより均一と考えられ，量もかなり多く得ることができるので，生化学的な研究材料として都合がよい。我々は神経系の膜に生化学的な方法でアプローチしようと試み，動物脳及び正常ヒト脳のミエリンを研究する一方，ミエリンが破壊される脱髄疾患の脳からミエリンを精製し，これを正常のものと比較することにより，ミエリン膜構造の生化学的特性をあきらかにしようとした。

昨年度本学会において，Schilder病（症例1，6才♂）の脳よりミエリンを分離精製してその生化学的特性を報告した(6)。今回はSchilder病（症例2，17才♂）及び一酸化炭素中毒（44才♂）の凍結保存脳よりミエリンを分離精製し，いくつかの生化学的特性をあきらかにすることができたので報告する。

実験材料及び方法

1). 実験材料

Schilder病

症例1．6才♂，昨年度本学会で報告した症例

症例2．17才♂，

一酸化炭素中毒，44才♂，

2). 実験方法

ミエリンの精製：　ミエリンの精製は主としてAUTILIOら(1)の方法に従って行なった。組織を0.32Mショ糖溶液で10%ホモジェネートとし，ほぼ等量の0.656Mショ糖溶液の上に重層して，40,000×g，30分遠心した。0.32Mと0.656Mショ糖溶液の境界面にある白い層をPasteurピペットで吸いとり，水で約2倍にうすめた後同じ操作をくり返した。Schilder病の症例2では，はじめの遠心の際生じた，0.656Mショ糖溶液より重い沈渣をもう一度0.32Mショ糖溶液に懸濁し，0.8Mショ糖溶液の上に重層して遠心し，境界面にある白色の層を集め，それ以後は他の分画と同様に処理した。重層遠心により得られたミエリン分画を，低張処理した後0.8～0.32Mショ糖連続密度勾配の上に重層し，53,000×g，12時間遠心して精製した。精製した各分画は，Pasteurピペットで分取し，凍結保存しておいて実験に使用した。

乾燥重量の測定：　2mlの0.8Mショ糖溶液の上に26mlの0.8～0.32Mショ糖連続密度勾配を作り，0.32Mショ糖濃度以下になるよう適当にうすめた試料2mlをその上に重層した。日立RPS 25ローターを用い，53,000×g，8～12時間遠心後，遠心管の底に孔をあけ25滴ずつ分取した。その一部でABBEの屈折計（島津ポシェロム）によりショ糖濃度を求め比重に換算した。他の一部で280nmの吸光度を測定しミエリンの位置と

決定した。

2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) 活性： CNP 活性の測定は KURIHARA ら（3, 4）に従った。なお今回の測定は超音波処理と全てデオキシコール酸処理に切りかえて行なった。

タンパク量の測定： タンパク量の測定は，試料を 1 N NaOH で処理した後，ウシ血清アルブミンを基準として，LOWRY ら（5）の方法により定量した。

結果及び考察

1). ミエリン分画の収量

ミエリン分画として回収された量を表1に示す。CUZNER ら（2）によると正常ヒト脳ではミエリン分画として得られる量は，125～155 mg 乾燥重量／g 湿重量であり，彼らの分離方法は我々のものと多少異なるのでそれを考慮に入れて比較すると，一酸化炭素中毒の症例ではあまり減少していないが，Schilder 病の症例1，2では明らかな減少がみとめられる。また Schilder 病の症例2においては，0.656 M ショ糖溶液よりも重く，0.8M ショ糖溶液よりも軽い分画にかなりの量が回収された。Schilder 病の症例1でミエリン分画が非常に少ないのは，0.656M ショ糖溶液より重い分画があって，それを最初の遠心の時に沈渣としてのがしてしまった可能性も考慮されねばならない。

		Yield
SCHILDER I	Occipital lobe	0.7
	Frontal lobe	13
SCHILDER II	0.656M ≧	48
	0.8 M ≧	20
CO Intoxication		96

mg of dry weight/g of wet weight

表 1 ミエリン分画の収量

Schilder 病の症例1では病変の顕著な後頭葉白質では軽いミエリンのみ得られて，重いミエリンは得られず，それよりやや病変の軽い前頭葉白質では軽いミエリンと重いミエリンの明らかに区別できる二つの分画が得られた。しかし Schilder 病の症例2では軽いミエリンと重いミエリンの分画は明らかな境界を示さず連続していた。

2). 精製ミエリンの比重

精製ミエリンの比重を表2に示す。病変脳，正常ヒト脳，ウシ脳ミエリン共に，軽

		Upper Light	Light	Heavy
SCHILDER I	Occipital lobe	—	1.050	—
	Frontal lobe	—	1.052	1.084
SCHILDER II		—	(1.058)	(1.073)
CO Intoxication		—	1.051	1.078
Normal	Occipital lobe	1.043	1.050	1.079
	Frontal lobe	1.042	1.050	1.081
Bovine White Matter		1.044	1.052	1.081

表 2 精製ミエリン各分画の比重

ミエリンは1.050前後，重いミエリンは1.080前後で殆んど差はみとめられなかった．Schilder病の症例2では軽いミエリンと重いミエリンが連続していて境界がはっきりしなかったために，大体それらに相当すると思われる部分をピペットですいとってから測定したために他と多少異なった値を示している。なお，Schilder病の症例2で得られた0.656M ショ糖溶液より重い分画は予備的な測定で，1.090 前後の値を示した。

3). タンパク含有量

Schilder病の症例1前頭葉の軽いミエリンでは7.3%という低い値が得られたが，正常ヒト脳及び一酸化炭素中毒の症例の軽いミエリンでは15～17%，重いミエリンでは23%で，この値はSchilder病の症例1前頭葉の重いミエリンでも同じであった。

4). 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) 活性

CNP活性を表3に示す。Schilder病の症例1ではこの活性値に低下がみとめられたが(6)，Schilder病の症例2と一酸化炭素中毒の症例では正常ヒト脳と比較して特に顕着な差はみとめられなかった。

	Gray Matter Homogenates	White Matter Homogenates
SHILDER II	2.5	19.3
CO Intoxication	5.7	14.3
Normal	3.8	20.5

μmoles of cAMP hydrolysed/min/mg protein (37°)

表3 CNP 活性値

貴重な症例について検討の機会を与えて頂いた群馬大学医学部横井晋教授，CNP活性測定にあたっていろいろ御教示下さった慶応大学医学部栗原正博士，上智大学理工学部須藤恵四氏に感謝の意を表します．

文 献

1) AUTILIO L.A., NORTON W.T. and TERRY R.D. (1964) J. Neurochem. 11, 17
2) CUZNER M.L., DAVISON A.N. and GREGSON N.A. (1965) J. Neurochem. 12, 469
3) KURIHARA T. and TSUKADA Y. (1967) J. Neurochem. 14, 1167
4) KURIHARA T., NUSSBAUM J.L. and MANDEL P. (1969) Brain Res. 13, 401
5) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265
6) 宮武正，小林隆子，小宮義璋，石川晋次，神経化学，8 suppl. 88,(1969)

20. Astrocyte特異抗原（astroprotein）について

森　武貞（阪大・医・二外科）

I, はじめに

Bogoch（1966）[1]は、Tay-Sachs症候群の脳の水溶性蛋白をcolumn chromatography分画し、正常脳のそれと比較検討した結果、Tay-Sachs症候群の脳に著しく増量している酸性蛋白分画（10B分画）の存在を認めて報告した。彼は、はじめ10B分画蛋白のTay-Sachs症候群における特長的な増加をsphingolipidosisにおける蛋白代謝の異常をしめすものと考え、この異常蛋白をTay-Sachs' disease proteinとよんだ。

しかし、その後（1968）[2]、10B分画蛋白はヒト、およびマウスのgliomaからも多量に抽出されたので、10B蛋白の増量はTay-Sachs症候群に特長的な現象とはいえなくなった。

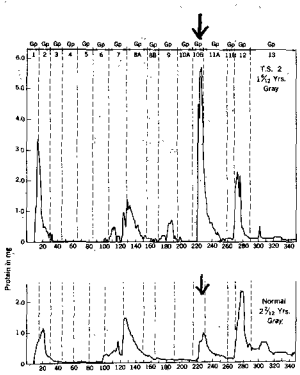
Tay-Sachs症候群とgliomaに共通する組織学的変化としてはまず著明なgliosisがあげられる。したがってgliomaやTay-Sachs症候群の脳における10B分画蛋白の増量がgliaの増生と直接的な因果関係を持つのではないかと推論しても不自然ではなかろう。幸いヒト10B分画蛋白にたいする家兎抗血清は容易に、しかもtiterの高いものが得られ、また10B分画蛋白が熱にたいして比較的安定なことは免疫組織学的研究にきわめて有利な條件であって（たとえばS-100蛋白ではこうはよくはゆかない）10B分画蛋白（の主成分）がastrocyte特異抗原であることを蛍光抗体法によって立証することができたのである。

II, 実験材料と方法

1) 10B分画蛋白

Tay-Sachs症候群に罹患した1歳半の小児の脳（図1参照）よりBogochらによって抽出された10B分画蛋白を抗原として用いた。その抽出方法や性状についてはすでに報告されている[1]。

図1, 10B分画蛋白



（↓は10B分画をしめす。）
Bogoch[1]より引用

2) 家兎抗血清

ヒト10B分画蛋白2mgを、adjuvantを併用することなく家兎に筋注し（1回/週）、4回注射後1ヶ月おいて1回のboosterをし、その1週後に採血した。

抗血清よりγ-globulin（48.5 mg protein/ml）を硫安分画した。その抗体液はdouble gel diffusionにて10B分画蛋白と3～4本の沈降線を生じたが、10倍以上の稀釈では沈降線は主なる1本のみとなり（図2）、蛍光抗体法にはその100～200倍稀釈液を使用した。

3) 脳腫瘍と正常脳

手術によって得られた新鮮なるヒト脳腫瘍組織を、

ただちに冷95%エタノールにて固定し、以下Sainte-Marieの方法[3]に準じてパラフィン切片を作製、蛍光抗体法、およびHE染色、Cajal（またはBodian）鍍銀染色による組織学的検索に供した。その内わけは表1のごとくで、大部分はgliomaである。

表1.

HUMAN BRAIN TUMORS EXAMINED

Case No.	name	age	histological diagnosis
1.	D.E.	69	glioblastoma multiforme
2.	F.A.	58	glioblastoma multiforme;recurrent
3.	K.R.	50	glioblastoma multiforme
4.	L.A.	48	glioblastoma multiforme
5.	M.B.	37	glioblastoma multiforme
6.	C.R.	26	astrocytoma, grade I-II, II-III
			astrocytoma, grade II-III; recurrent
			infiltrating astrocytoma; recurrent
			glioblastoma multiforme; recurrent
7.	P.W.	48	astrocytoma, grade II-III
			glioblastoma multiforme; recurrent
8.	F.J.	29	glioblastoma multiforme
9.	G.B.	52	astrocytoma, grade II-III
10.	N.S.	50	astrocytoma, grade II
11.	M.E.	18	astrocytoma, grade I; infiltrating
12.	J.P.	16	acoustic schwannoma
13.	F.M.	48	meningioma
14.	B.E.	57	astrocytoma, grade III-IV
			(giant gemistocytic astroblastoma)
15.	O.M.	66	acoustic schwannoma
16.	P.R.	34	meningioma

Glioma の2例からは腫瘍に近い大脳皮質の正常部分を、また剖検例からはcaudateの部分を入手した。さらに正常脳の全体について検討を進める必要上、C_3Hマウス、Wisterラットより正常脳（同時に、肝、腎、脾も）を摘出し、同様に処置した。

4）蛍光抗体法

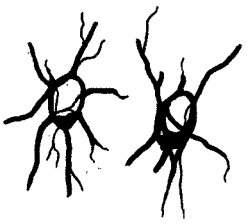
蛍光抗体法は間接法を主として行った。その際、FITC標識の山羊抗家兎γG抗体を使用前に0.03Mリン酸緩衝液，pH 7.2 の DEAE-sephadex A 25にて吸着濾過することが肝要で[4]、この処置によって脳における非特異的染色は完全にのぞくことができた。

FITC標識の抗家兎γG抗体は30倍稀釈、抗10B蛋白抗体は100～200倍稀釈（対照群には等濃度の正常家兎血清γ-globulin）を使用した。

Ⅲ、成績ならびに考察

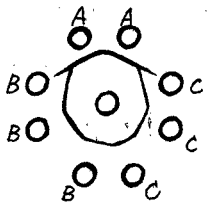
図3に示すごとく抗10B蛋白抗体によって蛍光抗体染色された細胞は、その特長ある形態からastrocyteであることは疑う余地がない。10B蛋白はastrocyteのperikaryonから突起の末梢にいたるまでその原形質に充満して存在し核には存在しない。

図3、蛍光染色



ヒトgliomaにみられたastrocyteの蛍光抗体染色像をしめす。

図2、gel diffusion



(A)ヒト、(B)マウス、(C)ラットのそれぞれ10B蛋白抗原と、抗ヒト10B蛋白抗体(中央)との反応をしめす。

この蛍光抗体染色の特異性はきわめて高く、実験に用いたヒトglioma，ヒト，マウスおよびラット正常脳（計42組織片）においてastrocyteの原形質以外に染色されたものは皆無であった。

ことにマウス、およびラットの全脳切片（前額面）では10B蛋白を小さい細胞（astrocyte）は図4のごとき分布をしめし、形態学的にもfibrous astrocyteであることは明白であった。Neuronや他のglia系細胞はまったく蛍光染色されず、またマウス、ラットの肝、腎、脾には10B蛋白は検出されなかった。

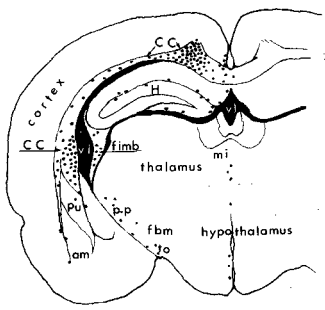
マウス、ラットの正常脳において，灰白質では特定の部位をのぞくとastrocyteを

ふくめてまったく染色された細胞が存在しなかったことは10B蛋白がfibrous astrocyteの原形質に特有の成分であると結論せざるをえない。

特定の部位とはcortical sulcusのsubpial region, subependymal regionであって、ともにfibrous astrocyteの存在域である。

同様の所見はヒト正常脳においても、infiltrating astrocytomaでも認められた。

図4、マウス正常脳における10B蛋白の分布



蛍光染色されたastrocyteの所在を(・)にてしめす。

Gliomaにみられるastrocyteは原形質が肥大、膨化し、種々な変態をしめすのであるが、その肥大した原形質にはとくに10B蛋白が豊富に認められる。原形質の肥大したいわゆるgemistocytic astrocyteは白質にみられることが多いが灰白質にも認められるものであり、そのいずれにおいても10B蛋白は豊富に存在する。

しかしながら、核の異型性の著しい明らかな腫瘍細胞(giant astroblastoma cell, astroblastoma cell with bizarre-form nucleus)には10B蛋白を認めることができなかった。

以上のことがらを整理すると

① 10B蛋白はastrocyteの原形質に特異的に存在する。
② 10B蛋白はfibrous astrocyteに豊富に存在するが、protoplasmic astrocyteには検出されない。
③ gemistocytic astrocyteは、それが元来fibrousであれ、protoplasmicであれ、10B蛋白に富む。
④ 核の異型性の著しい腫瘍細胞(astroblastoma cell)には認められない。
⑤ 蛍光抗体法の所見、および gel diffusion(図2)の結果から、ヒトとラット、マウスの10B蛋白には共通抗原性がある。

とする。

①—④の所見はastrocyte tonofilamentの電顕所見[5]とまったく類似であり、10B蛋白がtonofilamentの構造蛋白であることを推定させる。

IV、結論

10B分画蛋白(Bogoch)の主成分がastrocyte特異抗原であることを免疫組織学的にしめした。

10B蛋白というのは元来、複数の蛋白のふくむ分画名であってastrocyte特異抗原のよび名としては適当ではないので、今後は<u>astroprotein</u>とよびたい。

参考文献

1. Bogoch, S. and Belval, P.: Brain proteins in the sphingolipidoses: Tay-Sachs' disease protein. In: Inborn disorders of sphingolipid metabolism, Proc. of the Third International Symposium on the Cerebral Sphingolipidoses. Aronson, S. and Volk, B.W., Eds., Pergamon Press (New York), pp. 273-287, 1966

2. Bogoch, S.: The biochemistry of memory, with an inquiry into the function of brain mucoid. Oxford Univ. Press (London), 1968

3. Sainte-Marie, G.: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem., 10: 250-256, 1962

4. Coons, A.H.: Personal communication (to be published in Methods in Immunology and Immunochemistry, vol IV, Academic Press (New York))

5. Vaughn, J.E. and Pease, D.C.: Electron microscopy of classically stained astrocyte. J. comp. Neurol., 131: 143-154, 1967

追記

1. 本論文は、Massachusetts General Hospital, Dr. William H.Sweet研究室、および阪大第二外科における著者の研究を総括したものである。
ヒトglioma についての成績には一部Dr. Philippe Benda との協同研究がふくまれる。

2、Dr. Samuel Bogoch より抗10B蛋白抗体の提供をうけた。厚くおれを申しあげる。

3、本研究は文部省科学研究費、大阪対がん協会研究助成金をうけている。

21. 牛脊髄および末梢神経myelinの構成蛋白について

植村慶一・戸張千年・平野修助
（東邦大・医・二生理）

中枢神経組織のMyelinは塩基性蛋白[7]，Fold-Less type Proteolipid[4]とWolfgram type[15]のProteolipidによって構成され，その塩基性蛋白に実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)を惹起させる抗原性の存在することが明らかにされている[2,3]。一方末梢神経組織のMyelinについてはその構成蛋白についても，アレルギー性神経炎(EAN)の抗原蛋白についてもまだ不明の点が多い[3,14]。われわれは既に豚と牛の脊髄および末梢神経より異なった塩基性蛋白を分離精製し，その性質について報告した[12,13]。今回は細胞分画法によって牛脊髄および末梢神経よりMyelinを分画し，それを細分画し構成蛋白の分離を試みその性質を比較検討した。

[実験方法] 1) 牛脊髄および末梢神経のMyelinの分画；屠殺場より新鮮な牛脊髄と馬尾神経部を得て低温下で脊髄と末梢神経を分離し，−20°Cに凍結保存し必要に応じて使用した。Myelinの分画には序理的にはLaatschの方法[7]を用いた。脊髄は組織重量の20倍容量，末梢神経は10倍容量の0.8M蔗糖液中でTeflon homogenizerでhomogenize 1回。末梢神経についてはHomogenateをガーゼでロカした均一な液を分画に用いた。分画には日立40Pローターを用い試料を含む0.8M蔗糖液7.0mlの上に2.0mlの0.32M蔗糖液を重ね55,000g 60分遠心して中間層と沈渣に分離。中間層を脱イオン水で希釈して2 Hypotonic shockを0°C 5分かけた後10,5,000g 30分遠心し沈渣をMyelin分画とした。この分画について形態学的には1% Osmium−リン酸緩衝液で固定脱水後Epoxy樹脂で包埋して電子顕微鏡でcheckした。 2) Myelinの細分画；得られたMyelin分画をEngらの方法[3]によって細分画した。方法(1)では a) Myelin分画を冷0.1M CH_3COONH_4(pH6.9)中で30分撹拌した後，105,000g 60分遠心し上清抽出液と沈渣を得た。b) 次にその沈渣を0.5M CH_3COONH_4 + 0.5% Triton X−100液(以下Triton塩液と略す)で30分処理した後同様に105,000g 60分遠心し，上清抽出液と沈渣(Residue)を得た。方法(2)は方法(1)の操作b)の前に0.5M CH_3COONH_4(pH6.9)抽出を加えたものであり，方法(3)は更に0.1M CH_3COONH_4抽出を2回くり返し，以下0.5M CH_3COONH_4抽出，Triton−塩液抽出をつけて行ったものである。 3) 蛋白，Cholesterol，2′3′Cyclic Nucleotide 3′Phosphohydrolase (CN phosphohydrolase)活性の測定；蛋白定量はLowryによる方法[8]，Cholesterolの定量はSakaの方法[13]，CN phosphohydrolase活性の測定はKurihara-Tsukadaによる方法[6]を用いた。但し酵素の活性化にはBanikらの1% Triton処理による方法[1]によった。 4) Disc電気泳動法；7% Acrylamide gel (pH8.9)を用いるDavisの方法[2]，14% Acrylamide gel (pH4.3)を用いるReisfeldの方法[10]を併用した。gelの重合，染色は既報の方法によった。[12]

5) 蛋白のアミノ酸組成の分析；約1mgの蛋白を1mlの定沸点HClと共に真空封管後，110°C 24時間分解し，日立液体クロマトアミノ酸分析計0348型を用いアミノ酸の分析を行った。[11]

[実験結果および考察] 1) 牛脊髄および末梢神経のMyelin分画の分離；凍結した牛脊髄および末梢神経(馬尾神経部)のHomogenate，Myelin分画と，0.8M蔗糖液層への沈渣の蛋白量と蛋白当りのcholesterol量，CN phosphohydrolase活性を表1に示した。Myelin蛋白に対する沈渣蛋白の比が脊髄ではほぼ1/2であるのに対し末梢神経では1/7と極めて低

いのが特徴である。蛋白当りのCholesterol量は脊髄末梢神経共にMyelinに特徴的に高値を示す。蛋白当りのCN phosphohydrolaseについてはHomogenateで末梢神経は脊髄の1/8程度の活性であり、脊髄Myelinは既にKuriharaらによって報告された[6]如く、Homogenateにおしほぼ2倍の値を示すのに比べ末梢神経Myelinでは1.2倍程度である。また末梢神経では0.8M蔗糖液沈渣にかなり高い活性がみられることなどから、末梢神経Myelinについてはは CN phosphohydrolaseは脊髄Myelinの場合の様なよいMarker Enzymeとはなり得ない様である。また電顕による検索では脊髄末梢神経共にMyelin分画はいわゆる層状のMyelin断片よりなることが確かめられた。以上の結果よりここで得られた分画は形態学的にも化学的にもMyelinを主とするものである。

第1表

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF PROTEIN, CHOLESTEROL AND CN PHOSPHOHYDROLASE IN BOVINE SPINAL CORD AND PERIPHERAL NERVE.

	Protein mg/g wet wt.	Cholesterol mg/mg protein	CN Phosphohydrolase U/mg protein
Spinal Cord			
Homogenate	104.0 ±12.0 (4)	0.78±0.12	7.04(2)
Myelin	18.6 ± 3.06	1.49±0.24	13.15
Precipitate	11.6 ± 1.58	0.39±0.13	4.90
Peripheral Nerve			
Homogenate	32.26± 5.23(5)	0.94±0.03(4)	0.91±0.06(3)
Myelin	9.80± 1.05	1.94±0.13	1.13±0.25
Precipitate	1.40± 0.08	0.58±0.10	1.61±0.34

* g wet weight of tissue

2)脊髄と末梢神経Myelinの細分画：従来中枢神経系のMyelinを構成するproteolipid類は有机溶媒を用いる方法，塩基性蛋白は酸による抽出というがなり drasticな方法で分離されていた。[4)5)7)] 最近Engらは CH_3COONH_4 とTriton x-100混合液によって脳Myelinの塩基性蛋白とFold-Less typeのproteolipidを可溶化分離しうることを示した。[3)] われわれは彼らの方法に従って牛脊髄および末梢神経のMyelinの細分画を試み各分画の蛋白量CN phospho-hydrolase活性の測定結果を第2表に，Davisおよび Raisfeld系Disc電気泳動の結果を第1図に示した。まず0.1M CH_3COONH_4 で処理すると脊髄末梢神経Myelin共に5～10%の蛋白が抽出される。抽出蛋白をDisc電気泳動法でcheckすると脊髄Myelinのものは Davis系でもRaisfeld系でも多くのBandがみられる。(1図 I. S.C.a, II. S.C. a) これに対し末梢神経Myelinのものは Davis系ではBPBに対するRfが0.70を示す主Bandの他いくつかのBandが認められ(1図 I. P.N.a) Raisfeld系では Lysozymeに対するRfが1.07を示す強いBandの他 0.20, 0.05のBandがみられた。(II. P.N. a) そして Rf. 1.07を示すBandは既にわれわれが末梢神経の塩酸抽出液より精製した蛋白[12]に相当し，Davis系でRf 0.70, Raisfeld系でRf 0.20を示すものは既に報告したNeurotubules蛋白に類似のアミノ酸組成をもつ蛋白[13]に相当すると考えられる。Engらは0.1M CH_3COONH_4 で抽出される蛋白は Myelinの構成蛋白ではなくMyelinに混在している蛋白で

第2表

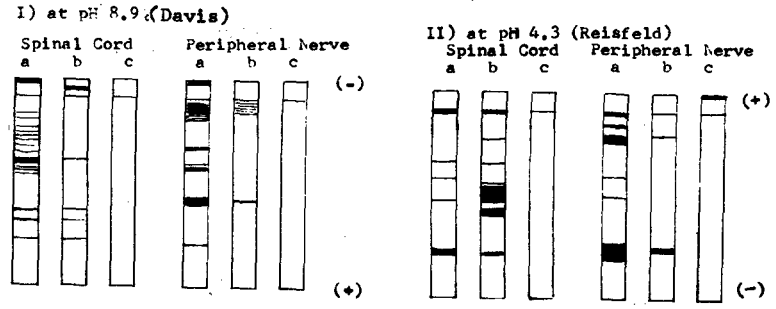
DISTRIBUTION OF PROTEIN AND CN PHOSPHOHYDROLASE IN SUBFRACTION OF MYELIN OF BOVINE SPINAL CORD AND PERIPHERAL NERVE

Tissue	Spinal Cord (1)		(2)	Peripheral Nerve (1)		(2)	(3)
Procedure	Protein*	CN act.**	Protein*	Protein*	CN act.**	Protein*	Protein*
Myelin	22.7(100)	9.91	39.0(100)	8.80(100)	0.938	9.70(100)	9.20(100)
Myelin subfraction							
1) 0.1M CH_3COONH_4 Extract-1	1.84(8.5)	0	2.1(5.1)	0.70(7.3)	0.168	0.72(5.0)	0.96(9.1)
2) 0.1M CH_3COONH_4 Extract-2	----	----	----	----	----	----	0.18(1.8)
3) 0.5M CH_3COONH_4 Extract	----	----	4.6(11.2)	----	----	0.24(1.7)	0.05(0.5)
4) 0.5M CH_3COONH_4 +0.5% Triton Extract	14.2(62.9)	5.82	18.6(45.6)	2.21(30.5)	1.432	3.11(32.1)	2.66(30.1)
5) Residue	6.7(29.1)	16.4	14.8(36.3)	5.86(62.1)	1.500	5.61(57.9)	5.33(58.5)

* Protein; mg/g original wet weight of tissue. % of protein distribution are gives in brankets.(%)
** CN act.; CN phosphohydrolase activity, U/mg Protein.

ある と考えている。[3]
これらのことから
われわれが既に末梢神経の塩酸抽出液より精製した蛋白は
Myelinの構成蛋白というより looseに統合した蛋白である可能性が強い。
次に、0.1M CH_3COONH_4 抽出残渣を

DISC ELECTROPHORESIS OF MYELIN SUBFRACTION (第1図)



a) 0.1M CH_3COONH_4 Extract
b) 0.5M CH_3COONH_4 +0.5% Triton Extract
c) Residue

0.5M CH_3COONH_4 と0.5% Triton 混合液で抽出して、その抽出液と残渣に分離し、その蛋白の比率を比較すると脊髄Myelinでは63%が抽出され30%が残渣として残るのに対し末梢神経Myelinでは逆に約30%が抽出され約60%が残渣となる。(第1表 Procedure 1)更に蛋白当りのCN phosphohydrolase 活性を比較すると脊髄のMyelinでは残渣もTriton-塩抽出液に比べて約3倍の比活性が認められた。これに対し末梢神経のMyelinでもTriton-塩抽出液と残渣の活性はほぼ等しくこの点でも脊髄のMyelinとは異った分布を示した。Disc 電気泳動法でcheckすると脊髄MyelinのTriton-塩抽出液にはReisfeld系でRf 0.60 を示す強いBand (1図 II. S.C. b), Davis系ではConcentrating gelに残るBandが認められ(1図 I. S.C. b)これは既に報告した様にEAE蛋白のRfと一致する。(このBandは0.1M CH_3COONH_4 抽出液中には認められない。) この事実はEngsがTriton-塩溶液でEAE蛋白が新たに抽出されると報告している事実[3]と一致する。尚同時に抽出されるFolch-Less typeのProteolipidはこの電気泳動条件ではgelに入らない。駒井らはFolch-free typeのProteolipidをTakayamaらの酢酸と尿素を含む7.5% gelを用いた電気泳動で分離出来ると報告している[5]ので現在検討中である。一方末梢神経Myelinの Triton-塩抽出液ではDavis系でもReisfeld系でも0.1M CH_3COONH_4 抽出でみられたBandの混入以外の新しいBandは全く認められなかった。即ち末梢神経Myelinには脊髄のMyelinの塩基性蛋白と類似の構成蛋白は存在しない可能性が考えられた。更にこれを確かめるため、方法(2)により、Triton-塩抽出の前に0.5M CH_3COONH_4 で抽出を行うと脊髄Myelinより全体の11%に当る蛋白が新たに抽出され、それはDisc電気泳動でもEAE蛋白に相当するが、末梢神経Myelinからはこの条件ではわずか1.7%の蛋白しか抽出されず電気泳動でも新しいBandは現れなかった。(第2表 Procedure 2) さらに方法(3)で0.1M CH_3COONH_4 抽出を2回くり返し抽出をより完全にすると2回目の抽出で1.8%, 次の0.5M CH_3COONH_4 抽出で0.5%の蛋白が抽出されるにすぎない。(第2表 Procedure 3) これらの事実は脊髄のMyelinに存在する0.5M CH_3COONH_4 又はTriton-塩液ではじめて抽出される様な塩基性蛋白は末梢神経には存在しないという仮説を支持する。また Triton-塩溶液に抽出されないResidue蛋白は脊髄Myelin, 末梢神経Myelinいづれのものも2つの電気泳動法でgelに入らない。(第1図 c)

3) 脊髄および末梢神経Myelinの構成蛋白の分離とそのアミノ酸組成; Engらの方法[3]に従って脊髄および末梢神経Myelinの Triton-塩抽出液を3回Ether処理し、Etherア, 中間層, 水層に分離し、その中間層蛋白をA分画, Triton-塩抽出残渣より19倍量のChloroform:

・Methanol (2:1) 処理して不溶性の蛋白を B 分画として、それぞれの蛋白のアミノ酸組成の分析を行った。表3表にまとめたごとく脊髄の A 分画は Gly・Ala・Ileu・Leu が高値を示し、Folch-Lees type の Proteolipid[4] をまとするものと考えられる。Folch-Lees type Proteolipid に対して酸性・塩基性アミノ酸が多いのは他の1種に EAE 蛋白の混在が考えられる。B 分画のアミノ酸組成は Wolfgram によって報告された Proteolipid のそれ[15]と極めてよく一致する。これらの成績は Folch-Lees type の Proteolipid は Triton-塩溶液に可溶性であり、Wolfgram type のものは不溶性であるとする Eng らの成績[3]を支持する。一方末梢神経 Myelin についても A 分画と B 分画共に中枢神経系の Folch-Lees type とも Wolfgram type Proteolipid とも異ったアミノ酸組成をもち、互によく類似している。Wolfgram らは末梢神経 Myelin 蛋白と Trypsin と Pepsin で処理して分解されない蛋白のアミノ酸組成が中枢神経の Folch-Lees type の Proteolipid と一致はしないが類似した点のあることを報告している。[16] 併しわれわれの成績の結果からは末梢神経に Folch-Lee type の Proteolipid が存在するとしても、脊髄のものと異って Triton-塩溶液では抽出され難いこと、更に Triton-塩溶液で抽出される蛋白と不溶性の蛋白は類似または同一のものである可能性が考えられた。しかしこの仮定の証明には尚詳細な検討が必要である。

AMINO ACID COMPOSITION OF VARIOUS PROTEIN FRACTION FROM SPINAL CORD AND PERIPHERAL NERVE MYELIN (表3表)

	Spinal Cord		Peripheral Nerve	
	(A)	(B)	(A)	(B)
Asp	6.78	9.18	8.54	7.44
Glu	7.74	11.10	9.59	9.31
(Acidic)	(14.52)	(20.28)	(18.13)	(16.75)
Lys	7.41	4.74	7.95	5.77
His	4.00	2.87	4.69	3.66
Arg	5.78	7.23	6.19	7.34
(Basic)	(19.19)	(14.84)	(18.83)	(16.77)
Gly	11.60	8.59	8.42	7.90
Ala	9.75	7.75	6.49	6.70
Ileu	3.87	6.86	4.42	4.74
Leu	9.49	5.80	7.01	8.08
(GMLI)	(34.71)	(29.00)	(26.34)	(27.12)
Thr	6.69	5.90	6.61	5.37
Ser	9.01	7.03	7.62	7.84
Pro	2.87	6.60	5.36	4.97
Cys	0	1.18	1.52	1.86
Val	6.00	4.51	6.09	7.15
Met	2.05	1.93	0.71	1.15
Tyr	2.27	3.80	4.62	4.75
Phe	4.08	5.21	4.41	5.14

(A) Protein from 0.5M CH_3COONH_4 +0.5% Triton Extract.
(B) Protein from Residue.

4) EAN 抗原性の検定：1定量の試料蛋白(300~1000 μg/0.1ml)に等量の Freund Complete Adjuvant を混和しモルモットに注射後、経時的に体重減少、後肢麻痺などの神経症状を観察し1定期間後に中枢・末梢神経系の病理学的検索を行った。末梢、注 Myelin を 1mg 注射するとその為に注射後20日頃に症状が現われ病理学的には脊髄神経節の末梢神経に限局した脱髄のみられる EAN の発症していることが確かめられた。同量の 0.8M 蔗糖液遠心後の注射では症状は全く出現しなかった。次に Myelin の細分画について検索すると 0.1M CH_3COONH_4 抽出蛋白 1mg 注射では 0/3, Triton-塩抽出蛋白 400μg で 2/3, Triton-塩不溶性蛋白 700μg でも 2/3 に EAN 症状が現われ脊髄神経節に限局した病変が認められた。いづれの場合も中枢神経系には全く異常がなかった。EAN 抗原性蛋白については尚追求中であるが、現段階ではこの蛋白は末梢神経 Myelin の 0.1M CH_3COONH_4 で抽出される分画に存在するのでなく、Myelin の構成蛋白と考えられる Triton 塩溶液抽出蛋白および不溶性蛋白分画のなかに存在するものと推論される。

[文 献]　(本研究に対し、慶大 塚田喜文博士、日脳生研 林山教授の御協力を頂きました。)

1) N.L.Banik, A.N.Davison; Biochem.J. 115,1051(1969) 2) B.J.Davis; Ann.New.York.Acad.Sci. 121,404(1964) 3) L.F.Eng, F.C.Chao, B.Gerstl, D.Pratt, M.G.Tavaststjerna; Biochemistry. 7, 4455(1968) 4) J.Folch, M.Lees; J.Biol.Chem. 191,807(1951) 5) 船井、平尾、高橋；神経化学 8, Suppl.1(1969) 6) T.Kurihara, Y.Tsukada; J.Neurochem. 14,1167(1967) 7) M.Laatsch, M.W.Kies, S.Gordon, E.C.Alvord; J.Exp.Med. 115,777(1962) 8) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R. J.Randall; J.Biol.Chem. 193,265(1951) 9) J.H.Luft; J.Biophys.Biochem.Cytol. 9,409(1961) 10) R.A.Reisfeld, U.J.Lewis, D.E.Williams; Nature. 195,281(1962) 11) D.H.Spackman, W.H. Stein, S.Moore; Anal.Chem. 30,1190(1958) 12) K.Uyemura, C.Tobari, S.Hirano; Biochem.Biophys Acta. 214,190(1970) 13) 植村、戸張、平野；神経回生理学会(1970) 14) B.H.Waksman, R.D.Adams; J.Exp. Med. 102,213(1955) 15) F.Wolfgram; J.Neurochem. 13,461(1966) 16) F.Wolfgram, K.Kotorii; J. Neurochem, 15,1291(1968) 17) B.Zak ; Am.J.Clin.Path. 27,583(1957)

22. 実験的甲状腺機能低下症におけるラット脳蛋白合成の阻害

山上　栄・森　浩一・川北幸男
（阪市大・医・精神）

甲状腺ホルモンが脳の発達に重要な役割を担っていることは、先天性甲状腺機能低下症で、知能低下を起すことでも明らかである。実験的甲状腺機能低下症では、大脳皮質の蛋白への^{14}C-アミノ酸のとりこみが著しく低下するといわれている。[2)6)] このことは甲状腺機能低下時に認められる脳の機能的、形態的変化が、蛋白合成の抑制によるものであることを示唆している。しかし、こうした蛋白合成の阻害が、どの機構の障碍によって起るのかは、いまだに一定の結論が出されていない。今回、われわれは、甲状腺剔除ラット脳から調製したポリゾームを用いて、in vitroで^{14}C-アミノ酸のポリゾーム蛋白へのとりこみを対照群と比較し、甲状腺機能低下症における脳の蛋白合成の変化を追究した。併せて、発育期ラット脳の核酸、酵素活性の変動を検討したので報告する。

方法　(1)甲状腺剔除ラットの作製、^{131}Iを生理的食塩水で稀釈し、80μcを出生直後のラット（体重約6g）の腹腔内に注射した。注射5日後に再度50μcを追加して注射し、甲状腺剔除群とした。対照群には、生理的食塩水の同量を注射した。

(2)脳DNAとRNAの抽出と定量、Santin－Agranoffの方法[12]に従って抽出および定量を行った。尚、ホモジネイトの蛋白の定量は、Lowryらの方法[7]に従った。[15)16)]

(3)ポリゾームおよびpH5酵素の調製、ポリゾームの調製は、前報で述べた方法に従い、pH5酵素は、Muthy と Rappoportの原法[5]に従い、前報[14]で述べた改変法を用いて調製した。

(4)ポリゾーム蛋白へのin vitroでのアミノ酸のとりこみ、反応系は、1本の小試験管当り、ポリゾーム（200μg）、pH5酵素（1mg）、ATP（0.5μmol）、GTP（0.125μmol）、ピルビン酸キナーゼ（0.015mg）、ホスフォエノールピルビン酸（5μmol）、^{14}C-L-フェニールアラニン（0.001μmol、比放射能、375.3mc/mM）、KCl（20μmol）、$MgCl_2$（2.5μmol）、アミノ酸混液（9μmol）、トリス緩衝液、pH 7.8（20μmol）を含む。この混液を37°C、45分間インキュベートする。その後、10%TCAで反応を停止し、常法[13]に従って蛋白を精製した。放射能はBray[4]の溶液中で、液体シンチレーション、カウンターを用いて計測した。

(5)アルカリホスファターゼと5'－ヌクレオチダーゼ活性の測定、両酵素の活性は、基質としてP－ニトロフェノール、ホスフェートとAMPを用い、前報[15)16)]に従って測定した。ただし、インキュベーションは37°C、20分で行い、インキュベーション後10%PCAで反応を停止し、基質より解離した無機燐をそれぞれAllen[1]の方法で定量した。

結果と考察　(1)体重および脳重量の変化、^{131}I処置群と対照群における発育期ラットの体重および脳の重量の変化を図1に示す。両者の体重の著しい相違は、生後45日において出現する。その後、この差はさらに拡大する傾向が認められた。同様な変化は脳重量の変化においても認められる。ただし、この場合には、両者の差異は、生後25日以後において顕著になってくる。

(2)脳DNA量の変化、図2に、脳1ケ当りのDNA量(a)と脳湿重量当りのDNA量(b)の変化を示す。^{131}I処置群のDNA量は、生後10日に急速な増加を示し、生後15日で成熟量に達する。これに対し、対照群では、生後15日迄直線的な増加が認められるが、

それ以後なお45日まで軽度な上昇を認める。一方、脳湿重量当りのDNA量は、成熟にともなって急速な減少が認められるが、^{131}I処置群では、いずれの時期においても減少が対照群より抑制される。これらの結果は、野村ら[10]の大脳皮質DNAの結果とも一致している。しかし、注目すべきことは、^{131}I処置群において認められる生後10日目のDNAの一時的な上昇である。一般に、甲状腺剔除でみられるDNA量の減少は、細胞増殖の阻害(DNA合成の抑制)によるのではなく、むしろ細胞の成長の阻害によるものであるとされている[2)3)11)]。しかし図2(b)の生後10日付近に認められるDNAの一時的上昇は、DNA合成の一時的な促進を反映しているのかも知れない。つまり^{131}I処置群では、対照群より早期にDNA合成が終了するのかも知れない。

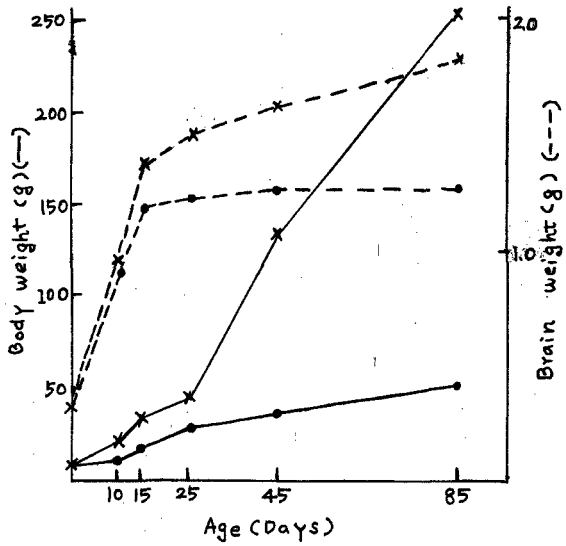


Fig 1. Effect of hypothyroidism on body weight and brain weight increases.
× control, • Hypothyroid

(3) RNAおよび蛋白量の変化

RNA/DNA比の変化を図3に示す。対照群では、この比は、生後15日まで急速に増大し、その後軽度の上昇を示すにすぎない。これに対し、^{131}I処置群は、対照群に比べて恒久的な低値を示した。図4に、蛋白/DNA比の変化を示す。発育にともなって、この値は著しい増加を示すが、^{131}I処置群では、対照群にくらべて、この値の上昇が、いずれの時期においても極めて僅かであった。図3と4の結果は、他の報告[3)11)]ともよく一致する。

(4) 蛋白合成の変化

今迄述べてきた甲状腺機能低下症にともなう脳内物質の恒久的な減少は、おそらく蛋白合成の変化によるものであろうと考えられる。そこで、^{131}I処置群と対照群からポリゾーム、pH5酵素をそれぞれ調製し、組合わせ実験を行った。調製したポリゾームの性質には、^{131}I処置群で、紫外吸収の最大/最小比が

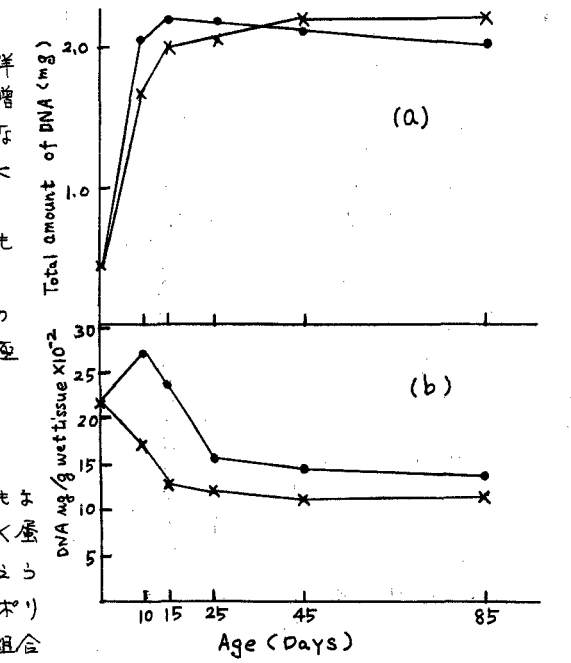


Fig. 2. Effect of hypothyroidism on DNA content. × control, • Hypothyroid.

低値であった他に、著しい相違は認められなかった。(表1)

Table 1. Some chemical properties of brain polysome from 25-day-old rats thyroidectomized at birth

	normal	hypothyroid
u.v. absorption		
max./min ratio	1.55	1.49
E_{260}/E_{280} mμ ratio	1.74	1.70
Ratio of RNA to protein	1.02	0.98

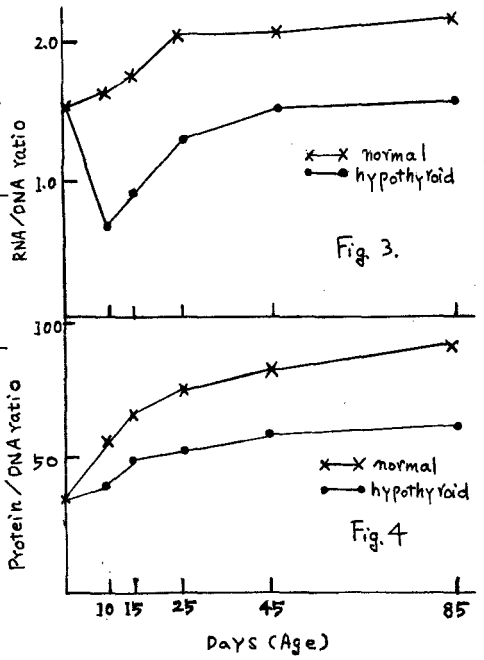


Fig. 3 and 4. Effect of hypothyroidism on ratios of RNA/DNA and protein/DNA.

^{131}I処置群から調製したポリゾームとpH5酵素の組合わせでは、同一方法で調製した対照群の系の約$\frac{1}{6}$～$\frac{1}{7}$のアミノ酸とりこみ能を示したに過ぎなかった。(表2). しかし、^{131}I処置群のpH5酵素を対照群のそれで置換すると、対照群のみの系の約$\frac{1}{1.5}$～$\frac{1}{2}$までアミノ酸とりこみ能を回復する。一方、^{131}I処置群のポリゾームを対照群のポリゾームで置換すると、アミノ酸のとりこみ能は約$\frac{1}{4}$～$\frac{1}{5}$を示す。したがって、甲状腺剔除は、ポリゾームおよびpH5酵素に大きな影響を及ぼし、脳の蛋白合成を顕著に抑制するといえる。

Table 2. Incorporation of [^{14}C]-L-phenylalanine into brain of polysomes from normal and hypothyroidectomized rats at birth.

Source of fractions incubated		Age in days	
Polysomes	pH 5 enzyme	10 day	25 day
		Specific activity (c.p.m./mg of protein/mg of polysomal RNA)	
normal	normal	4935	3517
normal	hypothyroid	1278	1660
hypothyroid	normal	2903	1909
hypothyroid	hypothyroid	836	523

(5)酵素活性の変化

甲状腺剔除が、脳のアルカリ、ホスファターゼ活性に及ぼす影響を図5に示す。DNAを基数としてアルカリ、ホスファターゼ活性を示すと、対照群では、生後15日迄に急速な上昇を示し、その後急激に減退して、成熟脳の活性に達する。一方、^{131}I処置群では、生後25日迄にきわめて僅かな活性の上昇を示したにすぎず、対照群に認められた生後15日の活性の急上昇も消失している。対照群にみられる生後15日付近の酵素活性の急上昇は、Cohn と Richter[5]の組織化学的な結果とも一致している。この時期に、RNA、蛋白、リン脂質などの合成が活発に行われることを考えると、甲状腺剔除

群にみられる活性の急上昇の消失は、それら細胞成長の欠如を反映しているのかも知れない。図6に5'-ヌクレオチダーゼ活性に及ぼす甲状腺剔除の影響を示す。

5'-ヌクレオチダーゼ活性は、生後85日まで徐々に増加するが ^{131}I処置群では、その程度がはるかに少い。Naidoo[9]によれば、発育期脳における5'-ヌクレオチダーゼ活性の上昇はミエリン形成のパターンと平行するという。この見解に従えば ^{131}I処置

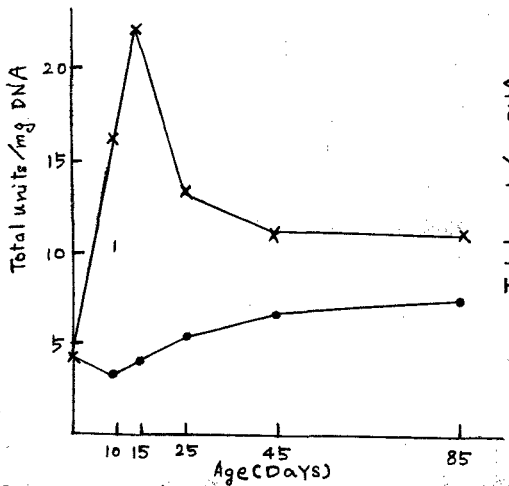


Fig 5. Effect of hypothyroidism on alkali phosphatase activities. × control, • normal

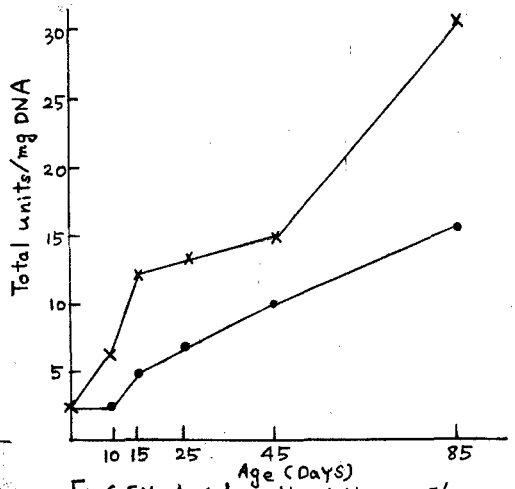


Fig 6. Effect of hypothyroidism on 5'-nucleotidase activities, ×control •normal

群にみられるこの酵素活性の増加の抑制は、ミエリン形成の減退を反映しているのかも知れない。

文献 (1) Allen R.J.L. (1940) Biochem. J., 34, 858.

(2) Balázs R. and Gaitonde M.K. (1968) Biochem. J., 106, 1.

(3) Balázs R., Kovács S., Teichgräber P., Cocks W.A. and Eayrs J.T. (1968) J. Neurochem. 15, 1335.

(4) Bray G.A. (1960) Anal. Biochem., 1, 279.

(5) Cohn P. and Richter D. (1956) J. Neurochem., 1, 166.

(6) Geel S.E., Valcana T. and Timiras P.S. (1967) Brain Res. 4, 143.

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

(8) Murthy M.R.V. and Rappoport D.A. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 95, 132

(9) Naidoo D. (1962) J. Histochem. Cytochem. 10, 421.

(10) 野村正彦, 氷井克子, 森喜久江, 塚田裕三, (1969), 神経化学, Supl 8, 56.

(11) Pasquini J., Kaplun B., Garcia Argiz C.A. and Gomez C.J. (1961) Brain Res. 6, 621.

(12) Santen R.J. and Agranoff B.W., (1963) Biochim. Biophys. Acta, 72, 251.

(13) Siekevitz P (1952) J. Biol. Chem. 195, 549.

(14) Yamagami S., Fritz R.R., and Rappoport D.A., (1966) Biochim. Biophys. Acta, 129, 532.

(15) 山上栄, 森治一, 川北幸男 (1968) 神経化学 Supl. 7, 17.

(16) Yamagami S. and Mori K. (1970) J. Neurochem, 17, 721.

23. 脳細胞核におけるRNAとその合成

高橋康夫・荒木一明・鈴木雄二
（新大・脳研・神経化学）

脳細胞核に於けるRNA合成に就てはいくつかの報告がある[1,2,5,9,10,12]。しかし、それらの報告は相反する成績を述べており、一方では高分子RNAへの短時間での合成を観察しているものもあるがそれを否定している観察もある。筆者らは脳に特異なRNAを追求する目的の一連の研究の一つとしてこの脳の核RNA（N-RNA）をも検索することとした。その為にはRNAの分解を防ぎながら出来るだけ速くきれいな核を分離することが必要と考えられるので下記の方法を確立し、又RNAの分画法としては既に筆者ら[7]によっても有効であることが立証されたポリアクリルアミド電気泳動法を適用した。これまで脳の核RNAの分析に電気泳動法を適用しているのはTencheva ら[9]が寒天を使用しているのが唯一の報告であるが寒天はアクリルアミドより分離度はよくない。以下現在までに得られた成績をまとめて報告する。

実験方法

1. 核分離法　RNAの分解をさけしかも又出来る限り速かに核を分離する為にMandelの方法[4]を改良して使用した。即ち生後15日の白鼠の大脳皮質組織を2.2 M 蔗糖液（Ca 0.0015 M）pH 6.8の約15 mlで0.2 mmクリアランスのホモジェナイザーを使用して500 RPM、5回上下ホモジェナイズした。この蔗糖液中には25～30 mg 蛋白のRNase inhibitorが100 mlあたり含有されている。ホモジェネートを原組織の10倍量に稀釈しガーゼ4枚で濾過後 RP30ローターを使用して30000 RPM 60分遠心し沈澱として核を得た。核はRNase inhibitor 入りの0.25 M蔗糖液（Ca 0.0015 M）pH 6.8に軽くホモジェナイズした後2800 RPM 10分遠心洗滌した。

2. 核分画法　上述の方法で得られた核を2.0 M 蔗糖液（Ca 0.0015 M）pH 6.8でホモジェナイズし各0.0015 M Ca 含有 pH 6.8の2.5 M, 2.4 M, 2.2 M.（各1 ml 或いは各7.5 ml）の蔗糖密度勾配上にのせ RPS 40、或いはRPS 25 ローターを使用して40000 RPM、60分（或は25000 RPM）遠心して、2.2 M－2.4 Mの界面、2.4 M－2.5 Mの界面、2.5 Mの底に夫々A, B, Cの3分画を得ることができた。

3. RNase inhibitorの精製　RNase inhibitorは既報[8]の如く行ったがDEAEセルロースの段階にとどめた。

4. Incorporation　10～12匹の15日白鼠の背皮膚下に10 μl 或は15 μl の6-C^{14} オロチン酸（Sp. A. 60.8 mC/mM）（2 μC, 4 μC, 6.5 μC, 10 μC）或は10 μlのC^{14}-methyl メチオニン（Sp. A. 60 mC/mM）（5 μC, 10 μC）をHamiltonのマイクロシリンダで注射後、15分、30分、60分、2時間、4時間、20時間で断頭、直ちに大脳皮質を採取し上述の様にして核を分離、0.02 M Sod. acetate、pH 5.1, 0.5 mM EDTA, 0.3% SDS, 10 μg/ml PVS の15 ml 中にて1分間、手でホモジェナイズ、80%フェノールの等量を添加して更に1分ホモジェナイズする。10分間この溶液を室温で振盪後10000 RPM 10分遠心して水層をとる。以後室温1回、60－65°1回フェノール抽出して得られる水層を合わせてからフェノールで2回処理し、$\frac{1}{20}$量の40%酢酸カリ、2倍量のエタノールを添加して－20°に放置してRNAを沈澱させる。RNAは75%エタノールで3回、エタ

ノールで2回洗ってから乾燥させ使用した。

5. 電気泳動法 DNaseで処理したRNA 50 μg～100 μgを使用して既報の如く[7]、ポリアクリルアミド、アガロース-ポリアクリルアミドによる電気泳動を行ったが、ゲル濃度は主として2%であった。0.02% Azur Bで染色、水で脱色後 Joyce-Loebl マイクロデンシトメーターで測定した。

6. 放射能測定法 ゲルの放射能測定の方法としてアガロース-アクリルアミドの場合は既報の方法[7]によったが、アクリルアミドの場合には濾紙上に乾燥し、バンドを切り出し、ステンレス皿上にのせ Nuclear Chicago low back gas flow counter Model 4334で測定した。

7. 他の化学分析法 Fleck Munro 法で分離後、RNAは紫外部吸収、P定量、オルシノール法、DNAは紫外部吸収、P定量、ダフェニールアミン法を随時行った。蛋白は Lowry 法によった。

実験成績及び考察

1. 核分離法 筆者らは以前ポリゾームのRNA分析に際して副産物という考えで不充分な条件下で核を分離、そのRNAを分析したが[6]その際の核は純粋なものではなかった。又RNase阻害剤としてベントナイトを使用したが、余り有効ではなかった。今回の実験では最初から核のRNAのみに目標を置いたので、先ず核の分離法を検討した。その結果選ばれたものが方法の項で述べたものであり、15日白鼠を使用したのはミエリン、血球等の混在除去に好都合であったからである。得られた核は形態学的には大体正常と見なされ、細胞質成分の混在もきわめて少なかった。(写真略) その核の分析結果は表1の如くであり、文献と比較してもほぼ妥当な値と考えられる。2.0 M, 2.2 M, 2.4 M, 2.5 M蔗糖密度勾配によって分画されたA, B, Cの3分画に就ては尚形態学的、純度的に問題があるがその分析結果は表2の如くであった。これらの分画に就ては現在尚検討中であり、その結論にもとづいてRNA分析、代謝などの実験を行う予定である。

表1

	RNA(μg/g)	DNA(μg/g)	RNA/DNA
H	2200 (100%)	1130(100%)	
N	150 (6.8%)	363 (32.1%)	0.41

表2

	RNA(μg/g)		DNA(μg/g)		RNA/DNA
I					
H	2800		1060		
N-A	34	150	68	373	0.50
N-B	44		102		0.43
N-C	72		203		0.35

2. 核RNAの電気泳動パターン 脳の全細胞RNA及びN-RNAポリアクリルアミドの電気泳動パターンは図1及び図3の実線に示されている。N-RNAでは28S, 18S, 4Sのバンドの他に28Sよりゆっくり泳動する少なくとも4本の小バンドが認められる。28Sと18Sの間にも数本の小バンドが存在する。又18S以下のバンドもいくつか存在する。精製した核の場合には18Sのバンドが28Sに比して非常に小さい。低分子の部分では4Sに加うるに5S, 6Sに相応すると思われる二つのバンドが認められ、6Sは大きく全細胞RNAのパターンと非常に異なる。脳の高分子RNAに就てはまだ、きりした証明は殆んどなされていないので正確な分子量の知られている肝RNAの28S, 18S RNAをスタンダードとして大体の分子量の計算を行ってみた。肝RNAと混合した脳RNAの泳動パターンから脳RNAの28S, 18Sも肝のそれとほぼ一致することが見出されたのでLoeningの方法[3]に従って図2の如くバンドA, B, C, Dは(6.8×10^6), (4.6×10^6), (3.0×10^6), (2.0×10^6) の値が得られた。文献[11]を参照するとBは45S, D

は32Sではないかと考えられる。これらのバンドは以前ベントナイトをRNase阻害剤として使用した時は余り明確でなかったが豚肝からのRNase inhibitorを使用し短時間に核を分離することにより、より明確になれた。(13)

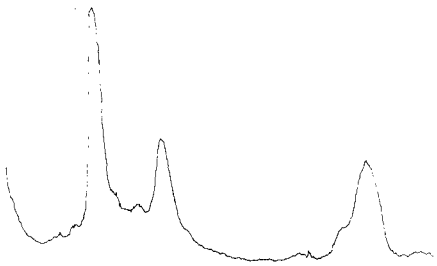


図 1

60－65°で抽出したRNA分画を別個に泳動すると高分子から低分子の部分に広がるdiffuseなバンドとなる。以上の所見はすべてDNase処理して得られたがDNase処理しない場合には28S RNAより高分子の部分にDNAのバンドが出現する。

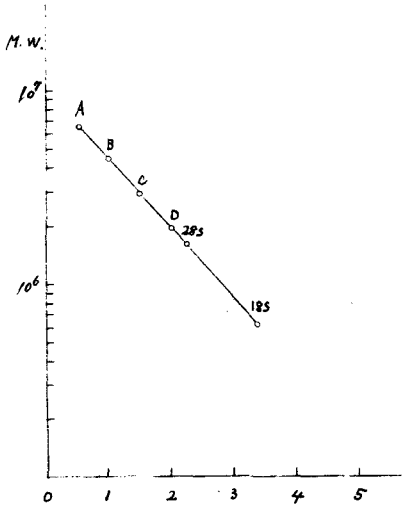


図 2

3. C^{14}オロチン酸のincorp. C^{14}オロチン酸を大量にクモ膜下に注射すると15分後に既にN-RNAにとりこまれる。それを電気泳動パターンでみると図3(A)の如くほぼゲル全体に放射能は分布するが低分子部分では非常に少ない。高いincorp.は28Sより高分子のバンドに認められ、45Sに相当するバンドで著明である。この放射能は30分(図3B) 60分後(図3C)になると次第により低分子の方向へ移動しそのピークは41S－35S, 32Sのバンドへと移動する。120分後(図3D)には28S RNAは著明にlabelされたが尚より高分子の部分にすこし高いincorp.が認められる。4時間後(図3E)には28S RNAにほぼ放射能のピークが一致して来る。以上の様に筆者らの実験で肝に於いてもリボゾームRNAが45S RNAから合成されることが明らかにされた。

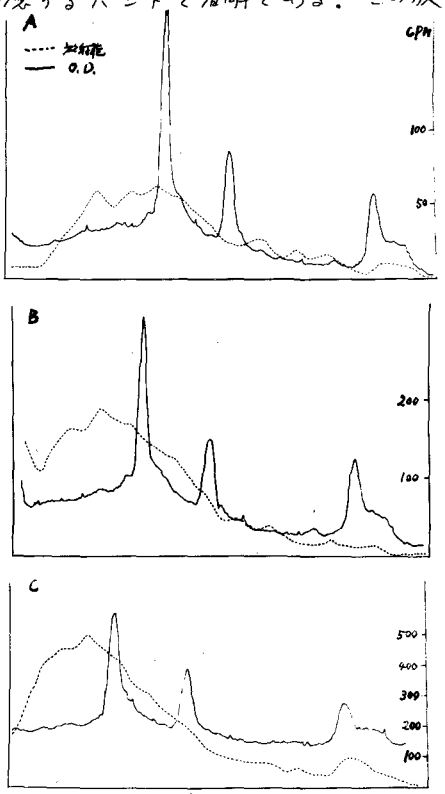


図 3

4. C^{14}methyl メチオニンのincorp. 45S RNAはリボゾームRNAの前駆体でありC^{14}methyl メチオニン投与後短時間にメチル化されるからC^{14}methyl メチオニンをクモ膜下に注射後30分のN-RNAの電気泳動をしその放射能分布を検討した。(図4)図の如く明らかに28Sより高分子のバンドに著明なとりこみが認められている。

HeLa細胞や肝での実験(11)から大体次の様なことがわかっている。即ちリボゾームRNA前駆体(45S)は核小体で合成され急速にメチル化されそして41S RNAに分解し更に18S RNAと32S RNA

に分解する。18S RNAは急速に細胞質に移行し、一方、32S RNA
一方、32S RNAは更に核中で28S RNAに分解する。
それから細胞質に移行する。又 rapidly labeled
N-RNAの他のタイプは非常にpolydisperseで
クロマチンで合成され、messenger型であると考
えられている。筆者らの上記の実験は脳核で始
めて明確な28S以上のRNAのバンド(特に45S)
を観察することに成功すると共に、45S→28Sへ
の分解過程をほぼ立証することが出来た。それ
故 Dutton[1]らが45S RNAなどを証明出来なか
った理由として45S→28Sの非常に急速な反応速
度をあげているがこれは多分操作中のRNAの崩
解による誤りの為であろう。又筆者らの実験で
15分、30分のincorp.の中相当量の放射能が
polydisperseであったのはmessenger RNAを
示すものと思われる。前述の様な方法で分離し
ている脳細胞核各分画、及び核小体の夫々のRNA
の電気泳動パターンとincorp.の研究は以上の成
績をより明確にすると思われる。

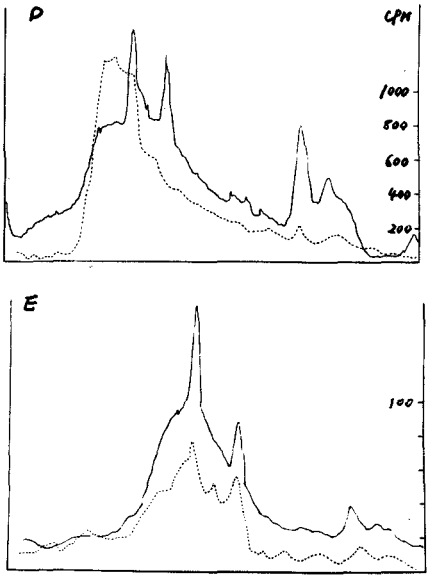


図 3

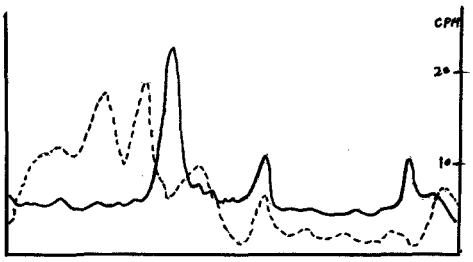


図 4

文 献

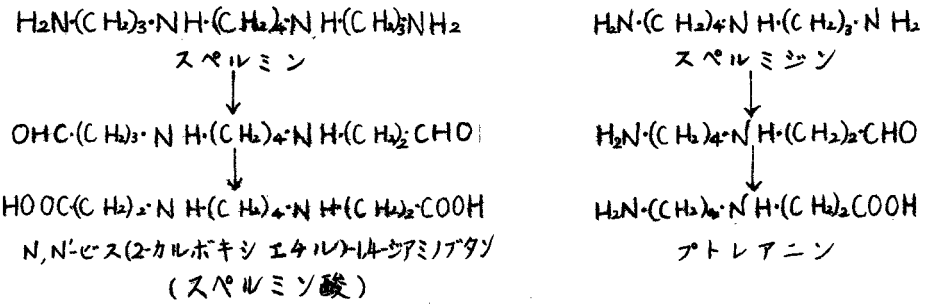
(1) Dutton, G.R., Campagnoni, A.T., Mabler, H.R. and Moore W.J. J. Neurochem. 16, 989 (1969)
(2) Egyhazi, E. and Hyden, H., Life Sci. 5, 1218 (1966)
(3) Loening, U.E., Biochem. J. 113, 131 (1969)
(4) Mandel, P., Dravid, A.R. and Pete N., J. Neurochem. 14, 301 (1967)
(5) Soborio, J.L. and Aleman, V., J. Neurochem. 17, 91 (1970)
(6) 高橋、徐、鈴木 神経化学 7, 13 (1968)
(7) Takahashi, Y., Hsü, C.S. and Suzuki, Y., Brain Res, 13, 397 (1969)
(8) Takahashi, Y., Mase, K. and Suzuki, Y., J. Neurochem. 17, in press (1970)
(9) Tencheva, Z.S. and Hadjiolov, A.A., J. Neurochem. 16, 769 (1969)
(10) Vesco, C. and Giuditta, A., Biochim. Biophys. Acta. 142, 385 (1967)
(11) Weinberg, R.A. and Penman, S., J. Mol. Biol. 47, 169 (1970)
(12) Yanagami, S. and Rapport, D.A., Abst. V of 7th Internat. Congress of Biochem. P.996 (1967)
(13) Younger, L.R. and Gelboin, H.V. Biochim. Biophys. Acta 204, 168 (1970)

24. ウシ脳からのN, N′－ビス（2－カルボキシエチル）－1, 4－ジアミノブタンの分離同定

今岡信夫・松岡征夫
（阪大・医・高次研・神経）

昨年本学会において柿本ら[1]は脳に特異的に存在するノルアミノ酸プトレアニンについて報告した。その後中島ら[2]はプトレアニンは、スペルミジンが酸化的に脱アミノされ、形成されたアルデヒドがさらに酸化されて生成することを in vitro の実験で証明した。

われわれはスペルミジンと同じポリアミンであるスペルミンについても同様の反応が働くのではないかと考えた。もしこの考えが正しいとするとスペルミンからは N,N′-ビス(2-カルボキシエチル)-1,4-ジアミノブタン が形成され脳内に検出されると期待される。そこでこの物質の存否を知るため牛脳を用いて精製しこの物質の存在を確認した。われわれはこの物質を spermic acid (スペルミン酸)と名づけた。



実験材料

N,N′-ビス(2-カルボキシエチル)-1,4-ジアミノブタン の合成[3]

Tabor の方法に従い、プトレシンより N,N′-ビス(2-シアノエチル)-1,4-ジアミノブタン を合成しこれを酸水解して得た。

実験結果

1. 牛脳からのスペルミン酸の精製

新鮮なウシ脳 2.5 kg に10%トリクロル酢酸等量を加えてホモジネートにし、さらに5%トリクロル酢酸3倍量を加えてし、遠沈し、46 l の上清を得た。上清を3等分し、それぞれを 6.4×40 cm Amberlite IR-120（100～200メッシュ）H型に通し、水洗後各カラムを2Nピリジン4 l で溶出し、これを中酸性アミノ酸分画とした。各カラムからの中酸性アミノ酸分画をあつめ、減圧乾固したのち水200 ml に溶かし10% NaOH 25 ml を加え pH 8 とし、あらかじめ0.1Mピリジンで平衡化しておいた 6×20 cm Dowex 1 X10（100～200メッシュ）H型にとおした。ついで水200 ml を通し中性アミノ酸分画を得これを減圧乾固した。全乾固物を120 ml の水溶液として、3×88 cm Amberlite IR-120（100～200メッシュ）H型に通し、水洗後 0.5N, 1.0N, 2.0N, 2.5N, 3.0N,

3.5N, および4.0N塩酸各600 mlずつで段階的に溶出した。溶出液を10 mlずつあつめ、その一部を濃縮し各分画の250 μl相当量中に含まれる2級アミン検出に用いるシモン反応陽性物質を高圧沪紙電気泳動で分析したところ合成品と一致する化合物が4.13～4.44 lの間に溶出されたのでこの分画を減圧乾固した。この分画には数種のニンヒドリン反応陽性アミノ化合物を混入していたのでさらに2つの精製を行った。

乾固物を水20 mlにとかし(pH:1.5) 2.8×47 cm, Dowex 50×2, (100～200メッシュ)ピリジン型を用いてピリジン:ギ酸:水、(1:9:190)で平衡化したのち、ピリジン:ギ酸:水混合液(1:9:190), (2:8:190), (3:7:190), (4:6:190), (5:5:190), (6:4:190), (7:3:190), (8:2:190), (9:1:190), 各々200 mlずつで段階的に溶出した。溶出液を4.5 mlずつあつめその一部づつを濃縮し、各分画の50 μl相当量中に含まれるシモン反応陽性物質を高圧沪紙電気泳動を行い分析したところ目的物質は1.530 mlから1.622 mlの間に溶出された。これを減圧乾固し少量の水にとかして活性炭で処理したのち再び減圧乾固し、乾固物を水-アルコール-エーテルより結晶せしめ約1.5 mgの結晶を得た。

2.スペルミン酸の同定

高圧沪紙電気泳動、および沪紙クロマトグラフィーを3つの溶媒系で行い、電気泳動距離およびRf値が精製化合物と合成化合物と一致した(表1)。赤外吸収スペクトルも合成化合物と一致した。

赤外吸収スペクトルに用いたサンプルを回収しその約1/10をSangerの方法でジニトロフェニール誘導体とし、2つの溶媒系(1) 0.1%アンモニアで飽和したn-ブタノール(2) 7.8g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 4.45g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$/100 mlで沪紙クロマトグラフィーをおこない合成品のジニトロフェニール誘導体とRf値が一致した(表2)。残りの精製物質約0.5 mgを1 mlのエタノールに浮遊させ塩素ガスを飽和せしめ、その後一夜放置、減圧乾固せしめた。合成品も同様に処理した。その結果両者よりモノエチルおよびジエチールエステルを生じ、高圧沪紙電気泳動で精製物および合成品から生じたエステルの泳動距離は一致した(表2)。

表1 沪紙クロマトグラフィーおよび高圧沪紙電気泳動

		Rf値 合成化合物	Rf値 精製化合物
ピリジン	50		
アセトン	30	0.31	0.31
3Nアンモニア	25		
n-ブタノール	120		
ギ酸	30	0.25	0.25
水	50		
イソプロピールアルコール	80	0.28	0.28
ギ酸	10		
水	10		
高圧沪紙電気泳動距離		9.3(cm)	9.3(cm)

高圧沪紙電気泳動:電位勾配; 45V/cm
泳動時間:30分, ピリジン:酢酸:水(1:1:189)

考察

われわれは序論にのべた理由からスペルミン酸の存在を予想し、微量ながら本物質の脳内存在を確かめることができた。本物質の同定に関しては得られた物質の量が少なかったので元素分析その他の分析は行い得なかったが沪紙クロマトグラフィーでのRf値の一致、電気泳動での泳動距離、赤外スペクトル、DNP化合物、エチルエステル化合物の一致したことから同定に関してはまちがいないと考えられる。しかしなから得た量から推定するとその濃度はプトレアニンの約 1/50 くらいとなる。脳の中酸性アミノ酸の量は非常に多く、そのため分離精製が困難であったため回収率が低かった可能性もある。しかしそれを考慮してもなお量は少なく、スペルミン酸量はプトレアニンにくらべてはるかに低濃度であると考えられる。これにはいくつかの原因が予測しうる。1) プトレアニンの前駆物質はスペルミジンであり、その脳内濃度はスペルミン酸の前駆物質であるスペルミンの脳内濃度の約2倍であること、2) スペルミンは以前の我々の研究から細胞核に存在することが考えられ、それからスペルミン酸を合成する酵素とは異なったコンパートメントに属する可能性があること、3) 合成にアミン酸化酵素、アルデヒド酸化酵素があるが、スペルミンおよびスペルジンとそれから生じたアルデヒドはこれらの酵素に対して異ったKmおよびVmaxを示す可能性があること、4) 分解酵素に対する性質の差などが挙げられる。これらの可能性については現在進めつつある酵素実験の中で明かにされるであろう。なお体内分布および組織内分布については現在研究中であり学会において発表するつもりである。

表2　分離および合成スペルミン酸の誘導体の性質

1. 沪紙クロマトグラフィーでのRf値

	DNP化合物	
	合成物質	分離物質
0.1%アンモニアで飽和したn-ブタノール	0.54	0.54
7.8 g $NaH_2PO_4 2H_2O$ 44.5 g $Na_2HPO_4 2H_2O$ / 100 ml	0.39	0.39

2. 高圧沪紙電気泳動距離

	エチルエステル	
	合成物質	分離物質
電位勾配: 75 V/cm, 電気泳動30', ピリジン: 酢酸水(1:10:189)	a) 14.0 (cm) b) 18.9	a) 14.0 (cm) b) 18.9

a) モノエチルエステル
b) ジエチールエステル

文献

(1) Kakimoto, Y., Nakajima, T., Kumon, A., Matsuoka, Y., Imaoka, N., and Sano, I., J. Biol. Chem., 244, 6003 (1969)

(2) 中嶋照夫　　未発表

(3) Tabor, C. W., Tabor, H., Bachrach, U., J. Biol. Chem., 239, 2194 (1964)

25. 牛脳蛋白質分画よりN^G-モノメチル，N^G，N^G-ジメチルおよびN^G，N'^G-ジメチルアルギニンの分離同定

中嶋照夫・柿本泰男・松林武之・松岡征夫
今岡信夫　　（阪大・医・高次研・神経）

最近われわれの教室でヒト尿の成分としてN^G,N^G-ジメチルアルギニンとその異性体であるN^G,N'^G-ジメチルアルギニンを発見した[1]。その濃度はアルギニンの2-3倍におよぶ。さらにリシンのN^ε-メチル誘導体すなわちN^ε-モノメチル、N^ε,N^ε-ジメチル、N^ε,N^ε,N^ε-トリメチルリシンもヒト尿中に多量に排泄されていることを証明した。すでにリシンのメチル誘導体は種々の蛋白の構成アミノ酸であることが知られている。このことからアルギニンのメチル誘導体も蛋白構成成分であろうと考え、牛脳より蛋白質分画を精製し、N^G-モノメチル、N^G,N^G-ジメチル、N^G,N'^G-ジメチルアルギニンを分離同定した。

〔実験方法ならびに結果〕

N^G-モノメチルアルギニンの合成：740 mg のメチル尿素と1.26 g のジメチル硫酸を3分間110°に加熱し、1.2-ジメチルプソイド尿素を作った。これに10 m mole のオルニチン-銅溶液を加え、さらに2.1 ml の5N苛性ソーダを加えてアルカリ性としたのち、37°3日間反応を行つた。反応後チオアセタミドで銅を除き、Amberlite IR-120で除塩した。これを2×35 cm Amberlite IR-120アンモニウム型上で、0.5N アンモニア水を用い展開し、N^G-モノメチルアルギニンを精製した。これをp-ヒドロキシアゾベンゼン-p'-スルフォン酸（HABS）塩として結晶させ、1.6 g の結晶をえた。融点は204-7°で、収量は16％である。元素分析値：C, 48.83；H, 4.70；N, 14.52；S, 8.35％（計算値 $C_7H_{16}N_4O_2 \cdot 2 \cdot C_{12}H_{10}N_2O_4S \cdot H_2O$ ：C, 48.81；H, 5.02；N, 14.69；S, 8.41％）。

N^G,N^G-ジメチル、N^G,N'^G-ジメチルアルギニンの合成：柿本および赤沢の方法を用い合成した[1]。

蛋白質分画の精製：牛脳31個（12.5 Kg）を等量の10％トリクロロ酢酸（TCA）中でホモジネートとし、倍量5％TCA で稀釈した。遠沈後沈渣を45 l アセトン中でホモジネートとし、遠沈沈渣をさらに30 l のアセトンで洗滌した。同様のTCA-アセトン洗滌を再度繰返し、沈渣をアセトン中で撹拌して濾過した。残渣をエーテルで洗滌したのち、これをデシケータ中で2日間吸引乾燥し、1440 g の粉末をえた。これを蛋白分画として使用した。

蛋白質分画の酸水解と塩基性脂肪族アミノ酸分画の精製：1.2 kg の牛脳蛋白分画を28 l 6N塩酸中で18時間加水分解し、冷却濾過後濾液を減圧濃縮し、水を加えて濃縮を繰返し十分塩酸を除去した。濃縮液を水で稀釈し4等分した。各分画を6×53 cm Amberlite IR-120 H型に通し、各8 l の水、1Nピリジンで洗滌後、塩基性物質を7.5 l 3Nアンモニア水で溶出した。これを減圧乾固後水に溶かし、さらに6×27 cm Amberlite CG 50アンモニウム型に通し、5 l の水で洗滌後、5 l 3Nアンモニア水で塩基性物質を溶出し、塩基性脂肪族アミノ酸分画をえた。各分画を処理してえた塩基性脂肪族アミノ酸分画を合わせ、300 ml の水に溶かし、つぎの精製に用いた。

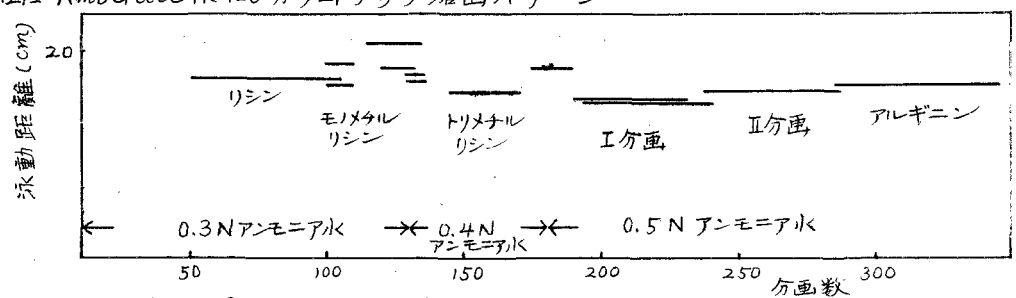
アルギニンのメチル誘導体の分離精製：上述のようにしてえた分画を6×77 cm の Amberlite IR-120（NH_4^+型）カラム上で、0.3N（3 l）、0.4N（3 l）、0.5N（5.7

l)、さらに3Nアンモニア水で段階的に溶出展開した。溶出液を約100 mlづつ集め、その10 μl を用い高圧濾紙電気泳動を行い、ニンヒドリンで発色させ溶出物の分画を行った。リシンは1,160－8,100 ml、アルギニンは10,690－14,770 ml の分画に溶出された。リシン分画の終りの2,020 ml を減圧乾固し、塩酸塩として水-エタノール中で2回結晶化を繰返し、大部分のリシンを除去した。母液を集め、これにリシン脱炭酸酵素を働かせることにより残余リシンの大部分を除去した。反応液をAmberlite IR-120に通し、アンモニア溶出することにより、脱塩と生成したカダベリンを除去した。一方アルギニン分画の最初の210 ml にアルギナーゼを働かせ、大部分のアルギニンを分解したのち、除塩した。この両分画とリシン溶出後からアルギニン溶出前までの分画（8,100－10,690 ml）を合わせ、Amberlite IR-120（4×55 cm、NH_4^+型）上で、0.3 N（2,260 ml）、0.4 N（940 ml）、ついで0.5 Nアンモニア水で展開した。溶出液17.5 mlづつ集め、その10 μl を高圧濾紙電気泳動し、ニンヒドリンで発色したものが図1である。目的とする物質の含まれるI分画とII分画を表1に示すような操作で精製し、A、B、Cの3物質を単離した。

単離物質の同定：精製されたA物質をHABS塩として結晶させ、水より3回再結晶を繰返し、22 mg の結晶をえた。融点は173-6°。元素分析値：C, 49.88; H, 4.65; N, 14.19; S, 8.21 %（計算値 $C_8H_{18}N_4O_2 \cdot 2 \cdot C_{12}H_{10}N_2C_4S \cdot H_2O$：C, 49.47; H, 5.19; N, 14.32; S, 8.70 %）。

精製されたB物質をHABS塩として結晶させ、さらに水から3回再結晶を繰返し、120 mg の結晶をえた。融点は200-2°。元素分析値：C, 50.03; H, 4.59; N, 14.

図1 Amberlite IR-120 カラムからの溶出パターン



高圧濾紙電気泳動はピリジン-酢酸-水（5：50：945, PH 3.4）中で70ボルト/cm 30分行った。発色はニンヒドリン試薬を用いた。

表1 A,B,C物質のイオン交換樹脂カラムによる分離精製

	一次精製	二次精製			三次精製		
物質	分画	レジンカラム	溶出液	分画	レジンカラム	溶出液	分画
A	I (3,342.5～4,165 ml)	Amberlite CG 50, NH_4^+型 2×36.5 cm	0.3N アンモニア水	110～170 ml	*Dowex 1×10 OH型 3×130 cm	0.5N アンモニア水	310～370 ml
B							330～450 ml
C	II (4,182.5～5,005 ml)	Amberlite CG 50, NH_4^+型 3×35 cm	0.3N アンモニア水	204～456 ml			

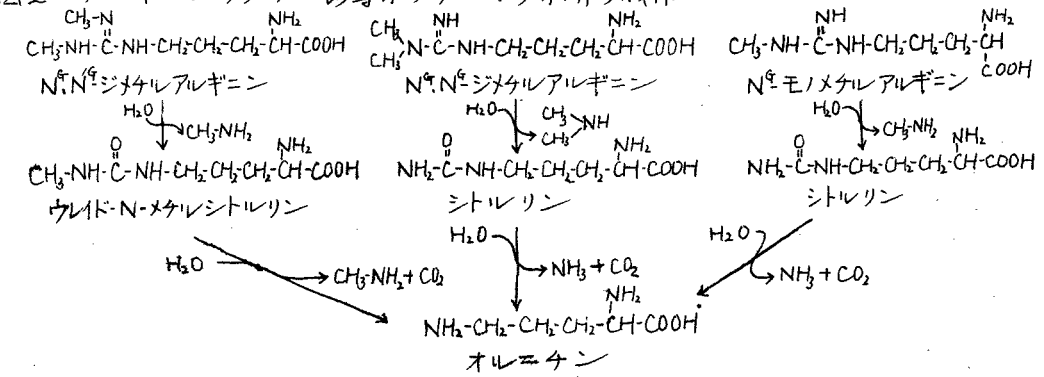
*単離された部分をとり、重複している部分を再クロマトした。この操作を3回繰返した。

34；S，8.32％（計算値：A物質のそれと同じ）。

精製されたC物質をHABS塩として水から3回再結晶を繰返し、230 mgの結晶をえた。融点は204-7°。元素分析値：C，48.76；H，5.06；N，14.59；S，8.48％（計算値：N^G-モノメチルアルギニンの計算値と同じ）。

A，B，C物質を6％$Ba(OH)_2 \cdot 12H_2O$中で120°20時間加水分解すると計算量のオルニチンと揮発性物質としてA物質からメチルアミン、B物質からジメチルアミンとアンモニア、C物質からメチルアミンとアンモニアが発生した（図2）。

図2　アルギニンのメチル誘導体のアルカリ水解の残作



以上の結果よりこれらの物質はアルギニンのメチル誘導体であると想定し、合成実験を行った。赤外スペクトル分析からA物質はN^G,N^G-ジメチルアルギニンのスペクトルに、B物質はN^G,N^G-ジメチルアルギニンのそれに、C物質はN^G-モノメチルアルギニンのスペクトルに一致した。濾紙クロマトグラフィー、高圧濾紙電気泳動上の性質は単離物質と合成品で完全に一致した。

表2　アルギニンとそのメチル誘導体のRf値と泳動距離

	溶媒系				泳動距離(cm)
	#1	#2	#3	#4	PH3.4，67V/cm 30分
アルギニン	0.18	0.49	0.19	0.26	17.9
N^G-モノメチルアルギニン	0.30	0.59	0.24	0.29	17.0
N^G,N^G-ジメチルアルギニン	0.44	0.66	0.28	0.32	16.2
N^G,N^G-ジメチルアルギニン	0.36	0.61	0.26	0.29	16.6
N^δ-モノメチルアルギニン	0.22	0.53			17.7
N^G,N^δ-ジメチルアルギニン	0.36	0.64			16.6
$N^G,N^G,N^{G'}$-トリメチルアルギニン	0.36	0.67			16.2

溶媒系：#1，ピリジン-アセトン-3Nアンモニア水(50：30：25)；#2，イソプロパノール-ギ酸-水(4：1：1)；#3，n-ブタノール-酢酸-水(4：1：1)；#4，n-ブタノール-ピリジン-酢酸-水(4：1：1：2)。

〔考察〕

KimおよびPaik[2]は放射性S-アデノシルメチオニンを用い蛋白メチル化酵素の活性を測定し、脳に活性の高いことを示した。ついで彼らはin vitroの実験で蛋白のアルギニン残基がメチル化されることを示し、その一つがN^{G}-モノメチルアルギニンであると考えた[3]。今回われわれは初めてN^{G}-モノメチルアルギニン、N^{G},N^{G}-ジメチルアルギニンおよび$N^{G},N^{G'}$-ジメチルアルギニンがnaturalな蛋白構成アミノ酸であることを証明した。高分子物質の微量構成成分として種々のメチル誘導体が存在することはヒストン、チトクロムCにおけるリシンのメチル誘導体、tRNAにおける塩基のメチル誘導体の存在などから知られているが、その生理学的作用については未知である。tRNAにおいてこれらの微量構成成分は高分子物質のconformationに関係いるとの想定がある。リシン、アルギニンのメチル誘導体もしたがって蛋白質の立体構造に関して重要な役割を演じている可能性がある。

またこれらの物質の合成が蛋白合成後に行なわれるか、アルギニン自身がまずメチル化をうけて、ついで蛋白質に組み込まれるかについては今後の研究に待たねばならない。柿本および赤沢はアルギニンの負荷実験と創餓時の尿の分析から、尿中のN^{G},N^{G}-ジメチルアルギニンおよび$N^{G},N^{G'}$-ジメチルアルギニン量が上の條件で変化しないことを認めた[1]。このことからアルギニンが蛋白に取込まれたのちにメチル化されると考えている。リシンに関しては蛋白合成後にそのリシン残基がメチル化されることが知られている。メチル化酵素の基質特異性、系統発生および個体発生との関連、メチル誘導体の体内分布、組織、細胞内分布については興味のある問題であり、今後報告する予定である。

牛脳蛋白分画の水解とその濃縮は田辺製薬化成研究所に依頼した。そのさい御協力下された応用化学部の千畑一郎部長および柿本年雄博士に感謝します。

〔参考文献〕

1) Kakimoto, Y. and Akazawa, S., J. Biol. Chem., accepted.
2) Paik, W. K. and Kim, S., J. Neurochem., 16, 1257 (1969).
3) Paik, W. K. and Kim, S., J. Biol. Chem., 245, 88 (1970).

26. ラットにおける蛋白分画中のメチルアルギニンの体内，細胞内および核内分布について

松岡征夫・中嶋照夫
（阪大・医・高次研・神経）

我々の実験室では、従来から生体内の塩基性アミノ化合物の分離同定に関する一連の研究をおこなってきた。柿本，市沢ら[3]はヒト尿中から従来未知のN^G,N^Gおよび$N^G,N^{G'}$ジメチルアルギニンを分離同定し，さらに最近中嶋らは，ウシ脳蛋白分画からN^Gメチルアルギニンのグアニジン基のNがメチル化された化合物を初めて分離同定した。すなわちN^G,N^Gジメチルアルギニン(N^G,N^GDMA)，$N^G,N^{G'}$ジメチルアルギニン($N^G,N^{G'}DMA$)にかえてN^Gメチルアルギニン(N^GMA)を分離同定した。本実験は，これら蛋白中のメチルアルギニン誘導体の体内，細胞内ならびに核内分布をラットについて調べたものである。

実験方法

蛋白質分画の調製

各組織の5%トリクロル酢酸(TCA)のホモジネートをつくり，その沈渣を5%TCAで2回洗ったのち充分量のアセトンで脱脂，乾燥させた。また細胞内分画，核蛋白分画についてはそれぞれの分画を水に対して48時間透析してその後凍結乾燥させたものを蛋白標本とした。

細胞分画ならびに核分画の調製

細胞分画法は，肝臓については Schneider's Hogeboom[7]，脳については植村の方法[10]によった。核分画は，脳，肝臓ともに Chauveau の方法に準じて調製した。[1]

酸水解ならびに分析試料の調製

蛋白分画を20倍量の6N塩酸で105°，24時間酸水解したのち，以前報告した方法で[4]脂肪族塩基性アミノ分画を分離した。測定に支障となる過剰のリシン，アルギニンを除くためつぎの操作を加えた。(1)体内，細胞内分布については，それぞれの脂肪族塩基性分画を1×15cm Amberlite IR 120，NH_4^+型のカラムに吸着させ，0.5Nアンモニア溶出をおこないリシンおよびアルギニンが溶出される中間部分をメチルアルギニン分画として採集した。(2)核内分布では，市販のリシンデカルボキシラーゼを加かせたのち，ついでアルギニン中で増殖させた Streptococcus faecalis から分離したアルギニンデスイミダーゼを加かせて[8]，リシン，アルギニンをそれぞれキャダベリン，シトルリンにしたのちTCAで反応を止め，上清を1×3cm Amberlite IR 120 H^+に吸着させ1Mピリジンで洗ったのち2Nアンモニアで溶出して塩性分画を採集した。

アミノ酸自動分析

蛋白分画200mg以下に相当する試料を30cmカラムにかけて，柿本らの方法[3]で溶出分析した。

結果

蛋白および非蛋白分画におけるメチルアルギニンの分布

肝臓を除いたラット全身の5%TCAホモジネートを遠沈し，TCA上清には70%になるようアセトンを加えて沈渣分画と上清に分けて，各々の分画について調べ

た。メチルアルギニンは，その殆んどがTCA不溶蛋白分画に認められ，その量は $N^G,N^{'G}$DMA 0.39μmole/g乾燥重量，N^G,N^{G}DMA 0.04μmole/gで前者は後者にくらべて約10倍高い。TCA溶性蛋白分画には$N^G,N^{'G}$DMAが0.02μmole/g存在したのみで上清には検出されなかった。

体内分布

各組織のち%TCA不溶蛋白分画について調べた結果が表1である。濃度差によって3つのグループに分けられるようであるが，どの組織においても存在しかも$N^G,N^{'G}$DMAがN^G,N^{G}DMAより約7~8倍高く。脳の$N^G,N^{'G}$DMAは一番高い。なおTCA上清には認められなかった。

表1 体内分布

	$N^G,N^{'G}$DMA	N^G,N^{G}DMA
	μmole/g dry weight	
脳	1.10	0.31
肝	1.11	0.15
肺	1.14	0.10
脾	1.68	0.13
腎	0.87	0.10
腸	1.78	0.16
心	0.32	<0.01
筋	0.14	<0.01
皮	0.17	<0.01
血	<0.01	<0.01

細胞内分布

つぎに細胞内分布について調べた。表2のように肝臓においては顆粒分画が，脳においては核分画が一番高い濃度を示しているが他の分画においても認められた。脳の$N^G,N^{'G}$DMAは，肝臓のそれよりも約7~10倍高い値を示している。

核内分布

核蛋白を水可溶性，酸可溶性(主にヒストン)，それに不溶性蛋白に分けて調べた結果が表3である。採集した肝，脳の核分画を最初0.14MNacl, 0.001MMgcl₂を含む0.01MTris buffer pH 8.0で抽出し，100,000×gで遠心した上清を水可溶性蛋白とし，さらに沈渣を0.25NH_2SO_4で抽出したのち同様に遠心して酸可溶性と不溶性蛋白に分けた。肝臓，脳ともにメチルリシン，

表2 細胞内分布

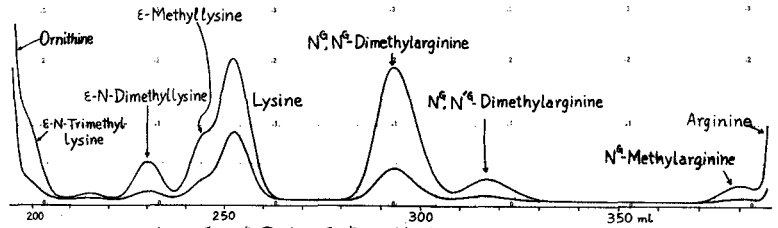
	N^G,N^GDMA	$N^G,N^{'G}$DMA
	μmole/g dry weight	
肝臓		
核分画	0.33	0.04
ミトコン分画	0.12	0.02
顆粒分画	0.63	0.11
上清分画	0.13	0.01
脳		
核分画	2.12	0.27
ミエリン分画	0.44	0.27
ミトコン+シナプソーム分画	0.07	0.05
顆粒上清分画	0.28	0.03

表3 核内分布

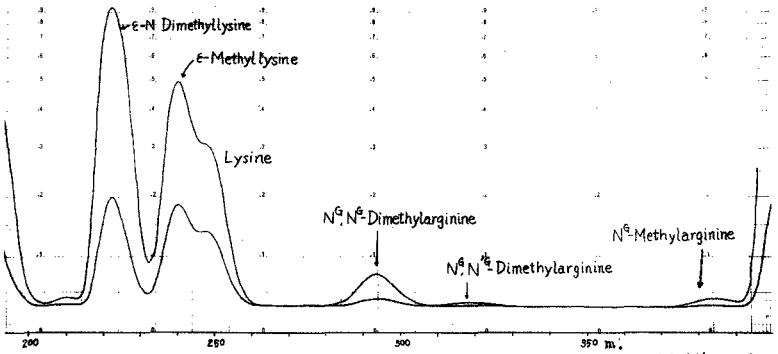
	N^{ε}ML[x]	N^{ε}DML[xx]	N^GMA	N^G,N^GDMA	$N^G,N^{'G}$DMA
				μmole/g dry weight	
肝臓					
水可溶性	0.73	0.59	0.18	2.31	0.41
酸可溶性	5.83	22.08	0.23	1.01	0.11
不溶性	0.71	1.70	0.06	0.48	<0.01
脳					
水可溶性	0.89	0.55	0.79	9.22	0.39
酸可溶性	8.59	26.10	0.63	2.84	0.48
不溶性	0.82	1.22	0.45	2.18	0.10

x. N^{ε}methyllysine, xx N^{ε}dimethyllysine.

メチルアルギニンについても，各分画の比率は似かよっているが，メチルアルギニンは細胞内分布の結果と同じく脳の方が高い値を示している。またメチルリシンは酸可溶性分画に非常に高く，一方メチルアルギニンは水可溶性分画に高いと云える。図1は，肝臓，脳の水可溶性および酸可溶性蛋白分画を酸水解後，実験方法の項で記載したごとく処理して得られた分画のイオン交換クロマトグラムである。

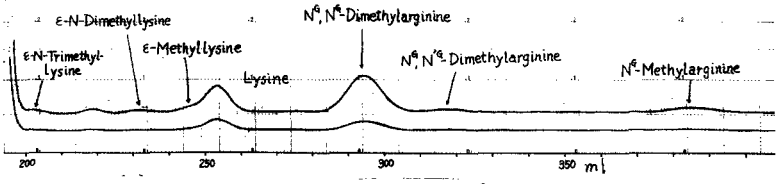


A. ラットの肝臓の水可溶性核蛋白分画 92mg



B. ラット肝臓の酸可溶性核蛋白分画 49mg

C. ラット脳の水可溶性核蛋白分画 6.6mg



D. ラット脳の酸可溶性核蛋白分画 9mg

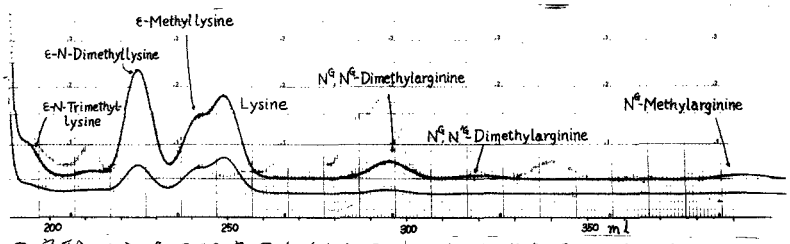


図1.
肝臓，脳の核蛋白分画のイオン交換クロマトグラム

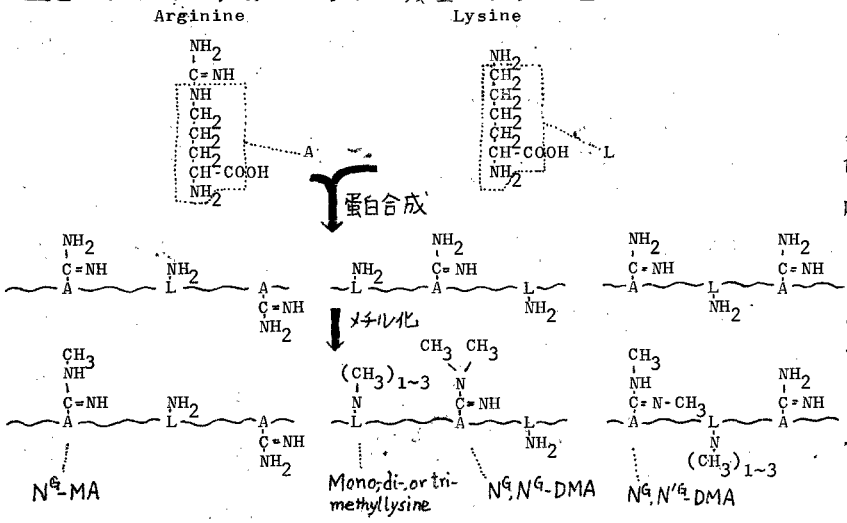
考察

近年蛋白中のアミノ残基のリン酸化，アセチル化，メチル化などの修飾とその蛋白の機能との関係が広く研究されている。

特にヒストン中のリシンのε-Nのメチル化に関しては，その蛋白の遺伝抑制因子との関係において論議されているがいまだ不明である。[9] 近年 Arginine rich-histone の一次構造が決定され，1個のε-Nメチルリシンが含まれていることが分かった。[2)(5)] 一方S-アデノシルメチオニンのメチル基の蛋白へのとりこみ実験から，[6] メチルリシンのほかにメチルアルギニンの存在も推測されていたが中嶋らによって決定的に確かめられた。このアミノ酸は，今回の実験からある特定の組織あるいは細胞内分画に限局するものではなく，すべての蛋白分画に若干の差はあれ存在することが分かった。細胞内分布の実験から脳では核分画に，肝臓では顆粒分画に高いことが示されたが，核内分布の結果からメチルリシンが酸可溶性分画に可成り限局しているのに較べてメチルアルギニンは逆に水可溶性分画に多い，しかし前者ほど著明な分画間の差は認められなかった。

現在蛋白中リシン残基のε-Nのメチル化は蛋白中でなされることが確かめられている。アルギニンのメチル化に対しても同様の機作が考えられ(図2)，柿本らのアルギ

図2　アルギニンおよびリシン残基のメチル化



ニン負荷実験においても尿中のメチルアルギニン量は殆んど変化しない。また腎尿細管での再吸収が殆んどなくメチルアルギニンそのものは生体内でinactiveで速かに排泄される。[3] またヒト尿中のN^G,N^GDMAとN^G,N'^GDMAの比はほぼ1:1に，牛脳のそれは2:1に保もたれてる。ラットにおいては今回の実験，また尿中の検査から大体10:1に保もたれていた。このことは蛋白中でのアルギニン残基のメチル化を触媒するメチラーゼの種族による性質の差によって説明され得る可能性があるが，今後の研究を待たねばならない。

生体内のあらゆる蛋白分画にメチルアルギニン残基が存在するが，その量がたとえば脳では0.4 μmoles/g蛋白分画，存在し蛋白分画1g中の蛋白量をたとえば0.5gと考え，その分子量を5～10万と考えると1分子に1～2のジメチルアルギニン残基が存在することになる。この点から蛋白中のアルギニン残基のメチル化はある特定の蛋白というより，かなり多種類の蛋白がメチル化をうけることを示しており，蛋白質の合成，分解あるいは機能にとって一般的に存在する重要な修飾機構と考えられる。今後メチル化の起こる時期，メチル化された蛋白の代謝，メチル化の意義に関する研究を進める予定である。

最後にリシンデカルボキシラーゼを提供していただいた協和醗酵，および*Streptococcus faecalis* STを分譲していただいた田辺製薬化成研の千畑一郎氏に感謝します。

参考文献

(1) Chauveau J., Moulé Y. and Rouiller C., Exptl. Cell. Res. 11. 317. (1956)
(2) Delange R.T., Fairbrough D.M., Smith E.L. and Bonner J., J. Biol. chem., 244. 319 (1969)
(3) Kakimoto Y. and Akazawa S., J. Biol. chem., accepted
(4) Kumon A., Nakajima T., Matsuoka Y. and Sano I. 神経化学抄録集 7. 51. (1968)
(5) Ogawa Y. Quaglia tti G., Jordan J., Taylor C.W., Starbuck W.C. and Bush H. J. Biol. chem., 244. 4387 (1969)
(6) Paik W.K. and Kim S., J. Biol. Chem., 245. 88 (1970)
(7) Schneider W.C. and Hogeboom G.H., J. Biol. chem., 183, 123 (1950)
(8) Sekine T., J. japan Biochem. Soc., 19. 79 (1947)
(9) Stellwagen R.H. and David Cole R., Ann. Rew. Biochem., 38, 951 (1969)
(10) Uemura K., 神経研究の進歩 7. 763 (1963)

27. 脳のタウロシアミンに関する研究

水野　晃・戴　礼忠・陣内伝之助
（阪大・医・二外科）
森　昭胤　（岡大・医・脳代謝研）

脳内にはarginineのほか，γ-guamidinobutyric acid，glycocyamine，taurocyamineおよびα-N-acetylargimineまでのグアニジノ化合物が存在する。これらのうちargimine以外は，これらの一定量を動物の大槽内に注入すると，それぞれ痙攣が発現することを知ったが，このうちtaurocyamineによって誘発されるものはまったく特異のものである。すなわち，7~9 mg/Kg のtaurocyamineをウサギの大槽内に注入すると，数分間の潜時ののち，強直性痙攣を主体とする発作が数分間の間歇期をおいて繰返し，数時間持続するが，各発作は，まず頭を起こし，両前肢を前方に伸ばし，続いて頭を後方に倒し，ついで平衡を失って後方に倒れるにいたるものである。他方，ネコを用いた実験で深部脳波を観察すると発作活動は主としてhippocampusにoriginateするものであることがわかった（3,4）.

その後も，われわれはtaurocyamineによる発作発現の機序を追求しているが，脳内におけるtaurocyamineについての生化学的知見としては，Blass（2）がpaperchromatographyにより，guinea-pig，ウシおよびラット脳中にtaurocyamineが存在することを示しているほか外にはほとんど見あたらない．そこでわれわれは，ウシ脳からtaurocyamineを分離する方法を見出すとともに，これの脳内分布について検索をすすめ，また，あわせて脳の機能の変動にともなう変化をしらべ若干の知見をえたので，ここに報告する．

実験方法

（1）実験動物：体重2 Kg前後のウサギを使用した．taurocyamineの分離の実験には死後約5時間以内のウシ脳を使用した．

（2）実験材料

a．taurocyamine：S-methylisothiourea法によりtaurineから合成した．mp. 267°C.

b．^{3}H-taurocyamine：米一化学工業K.K.に依頼し，Wilzbach法により調製した．

C．^{14}C-taurine：taurine-1,2-^{14}C，New England Nuclear社製．

（3）脳組織よりのtaurocyamine分離方法：1.1 Kgのウシ脳に同量の蒸留水を加えてホモゲナイズしたのち，10分間100°Cに加熱し，放冷後，2.2 lのエチルアルコールを加え一夜放置する．ついで沪過して沈渣を除き，沪液を減圧乾固したのち，100 mlの脱イオン水を加え，この可溶部分をAmberlite CG-120〔H^{+}型〕の2×100 cm Columnに負荷させたのち，脱イオン水にて溶出すると，約200 mlあたりに坂口反応陽性分画があるので，この部分を集める（このさい，他のグアニジノ化合物は脱イオン水のみにて溶出することなく，塩酸により溶出される）．この坂口反応陽性分画は減圧乾固したのち，再び少量の脱イオン水に溶解せしめ，これに1%メタノール性ピクロロン酸を加えて10分間加熱したのち室温に数日放置すると黄色の沈殿が生ずるのでこれを沪取し，熱メタノールにより再結晶を繰返すとmp. 127~8°（発泡分解）の黄色結晶が約5 mgえられる．

(4) 液体クロマトグラフィーによるtaurocyamineの定量方法：1~3gの脳組織を1%ピクリン酸水溶液とホモゲナイズし，遠沈後の上清を強陰イオン交換カラムDowex 1×8（Cl型）のカラムを通してピクリン酸を除く。ついで，これを減圧乾固させたのち2~3 mlの N/100 塩酸にとかし，Aminex A-5を用いたグアニジノ化合物自動分析装置（5）により分析を行なった。この際脳試料ではtaurocyamineのピークが約25分後に出現し，続いてglycocyamine, N-acetylarginine, γ-guanidinobutyric acid, arginineが順次出現してくる。

(5) 薄層クロマトグラフィーおよびペーパークロマトグラフィー：taurocyamineの分離および確認のため随時薄層クロマトグラフィー（TLC）およびペーパークロマトグラフィー（PPC）を行なったが，その際使用した展開溶媒およびRfはつぎのごとくである。なお，スポットの検出は坂口反応によった。

TLC (Eastman Chromagram (6060))

ブタノール：酢酸：水（4：1：2）　Rf = 0.25

ピリジン：アミルアルコール：水（7：7：6）　Rf = 0.45

ルチジン：水（35：65）　Rf = 0.70

ブタノール：6N-塩酸（7：3）　Rf = 0.46

PPC（東洋沪紙No. 52）

ブタノール：酢酸：ピリジン：水（4：1：1：2）　Rf = 0.26

ブタノール：酢酸：水（4：1：2）　Rf = 0.22

実験成績

(1) ウシ脳よりtaurocyamineの分離と同定

前述の方法に従って，ウシ脳1.1gよりtaurocyamineをpicrolonateとして5mg分離した。mp. 127~8°C。分析値：実験値　C 34.24%, H 4.16%, N 22.98%, S 8.21%，理論値　$C_3H_9O_3N_3S \cdot C_{10}H_8O_5N_4 \cdot H_2O$として，C 34.72%, H 4.23%, N 21.82%, S 7.13%.

赤外吸収は合成taurocyamineの吸収曲線と完全に一致した（図：省略）。他方，前述の方法にしたがい，TLCおよびPPCを行なったが，Rf値はいずれも合成標品のそれに一致した。

(2) Taurocyamineのウシ脳内分布について

ウシ脳内におけるtaurocyamineの分布を，グアニジノ化合物自動分析装置を用いて定量した結果，hippocampusおよびthalamusに比較的高濃度に存在していることがわかった。その他，脳幹や大脳白質に中等度存在し，大脳灰白質や小脳にはきわめて低濃度にしか存在していない

表1　ウシ脳中タウロシアミン含有量（μmoles/g 組織）

大脳	灰白質	0.010
	白質	0.047
小脳		< 0.001
視床		0.065
海馬		0.062
脳幹		0.043

ことがわかった。

(3) 大槽内に注入した ^{3}H-taurocyamineの脳内分布について

12.7μC (16.7mg) の ^{3}H-taurocyamineをウサギ大槽内に注入したのち，frontal lobe，amygdala，hippocampus，thalamus，brain stem，および cerebellum における組織内 ^{3}H-放射能を測定した。その結果は表2に示すごとく，15分後の例，すなわち，まだ痙攣の起こらない例では諸部位の間にはほとんど相異が認められるいが，痙攣期中にある30，100分後，120分後の例について調べた例では，いずれもすべての例で hippocampus に著明に incorporate していることが観察された。

表2 ^{3}H-タウロシアミンの脳内分布 (cpm/mg)

実験番号	1	2	3
注入後時間	15分	100分	120分
皮質前頭葉	157.5	40.0	8.3
扁桃核	154.0	287.4	104.8
海馬	152.9	1034.0	1653.0
視床	139.7	339.0	174.2
脳幹	198.7	308.1	619.7
小脳	128.4	331.4	171.6

タウロシアミン投与量： 12.7μC (16.7mg)

(4) ^{14}C-taurineの脳内代謝について

10μCのtaurine-1,2-^{14}Cをウサギの大槽内に注入し，30分後に脳組織を摘出し，1%ピクリン酸液でホモゲナイズし，遠沈した上清をDowex 1-8 (Cl型) でピクリン酸を除き，これを減圧乾固した試料について，taurocyamineが生成されているかどうかをTLCを用いてしらべた。その結果は表3に示すごとく，taurocyamineに相当する部位にほとんど放射能が検出されず正常脳ではtaurineからtaurocyamineへ移行しがたいことがわかった。

表3 ^{14}C-タウリンよりタウロシアミンの生成 (予備実験)

	放射能
タウリン (Rf 0.35)	1439.6 cpm
タウロシアミン (Rf 0.45)	15.6
タウロシアミンの上部	175.6
タウリンの下部	5.4

ピリジン：アミルアルコール：水 (7：7：6) を使用した。

(5) 興奮時および麻酔時における脳のtaurocyamineの変動

d-Desoxyephedrine·HCl (Hiropon) 6mg/Kgを筋注して20分後，およびエーテルによる深麻酔時におけるウサギ脳taurocyamine値を測定したところ，Hiropon投与例では著名な増加が認められ，他方，エーテル麻酔時には著明な減少が認められた

表4 Hiroponおよびエーテルによる脳taurocyamine値の変動 (μ moles/g)

正常値	ヒロポン興奮時 (3例)	エーテル麻酔時 (3例)
	0.024	0.006
0.010	0.026	0.008
～0.015	0.025	0.010

考按ならびに結言

ウサギの大槽内にtaurocyamineを注入すると脳波学上hippocampusにoriginateすると考えられる特異な強直性痙攣を主体とする発作がおこるが，この問題に端を発して脳内taurocyamineの生化学的検索を行なった．現在まで脳のtaurocyamineに関する知見としてはBlass（2）によるPPCを用いた脳からの証明以外ほとんど見あたらなかったが，われわれはまずウシ脳より結晶状に抽出することを試み，ピクロロン酸塩として分離同定できた．ついで，ウシ脳について脳内分布をしらべたところ，hippocampusやthalamusに多量に存在していることを見出した．また^{3}H-taurocyamineを大槽内に注入した場合もhippocampusに特異的に集まることを見出したが，これらの知見は，taurocyamineはhippocamusに親和性のある物質であり，脳波学的知見にもみられるごとく，taurocyamineはhippocampusにおいて何らかの重要な役割を演じていることを示唆している．

Taurocyamineの生成過程に関して，Van Thoai（6）はラットにtaurineを投与すると尿中にtaurocyamineが増量すると報告しているが，AbottとAwapara（1）はin vivoの実験では，非常に大量の放射性taurineを生体に投与しないと，その生成は認められないと報告しているが，われわれの^{14}Cを用いた実験でもtaurocyamineの生成はほとんど認められなかった．これは正常脳においてはtaurineからtaurocyamineの生成過程の活性はきわめて弱いものであることを示すとともに，逆に，何らかの生成異常がおこるような場合には痙攣発作を誘発する可能性が保留される．また，d-desoxyephedrine（Hiropon）投与による増加及びエーテル麻酔時における減少は，taurocyamineはただ痙攣発作のみるうず，一般的に，脳の機能状態と関係して変動することを示すものとして興味深く，今後，とくに解剖学的ならびに生理学的なapproachをともなったより詳細な生化学的検索が必要であろうと考えられる．

文献

（1）Abott, W. and Awapara, J. : Biol. Bull. 119, 357, 1960

（2）Blass, J.P. : Biochem. J. 77, 484, 1960

（3）陣内伝之助，木野見，岩田吾一，小林清史，大川二郎，森昭胤：条件反射 85, 3281, 1967

（4）Jinnai, D., Mori, A., Mukawa, J., Ohkusu, H., Hosotani, M., Mizuno, A, Tye, L. C. : Jap. J. Brain. Physiol. 106, 3698（1969）

（5）大楠晴美，沢井愛次郎，森昭胤，陣内伝之助，猪川寿夫，山本勝美：条件反射 107, 3736, 1969

（6）Van Thoai, N., Roche, J. et Olumuki, A. : Biochim. Biophys. Acta 14, 448, 1954

28. 実験的高アミノ酸血症：脳蛋白合成ならびに脳内遊離アミノ酸の変動

高田五郎・多田啓也
（東北大・医・小児）

先天性アミノ酸代謝異常症の知能障害の成因，特にPKUのそれとして，近時，血中に過量に存在するフェニールアラニンそのものによる脳内遊離アミノ酸濃度のアンバランス，それに基づく脳蛋白合成障害を重視する論文が相ついで見られる[1)5)9) 13) 14)15-17)]。筆者らもその点に基づき，幼若白鼠に高フェニールアラニン血症の状態を作り出しておき，脳内へのアミノ酸輸送，脳蛋白合成能さらにはこれにつづくオリゴペプチドプールを同時に定量的に測定し，同時に脳内遊離アミノ酸分布のアンバランスの有無をも調べ，又，他のアミノ酸についても同様の実験を行い比較検討したので報告する。

実験方法

生後17日目の離乳期幼若白鼠（Albino-Wister系，両性）の同腹3～4匹に，2.5%，1.0 ml の l-phenylalanine を12時間毎に2回，計4回腹腔内に注射し，高フェニールアラニン血症類似状態を作っておき，5回目にフェニールアラニンと同時に ^{14}C-l-leucine（specific activity 9.5 mC/mM）20μCi を腹腔内に注射し，その後1時間目に血液を採取し，大脳を取出し，直ちに生食水にて充分血液を洗い落し，5倍量の0.5% Triton-X-100 をふくむ 0.4M sucrose 中でホモジナイズし，遠心分離（15000 r.p.m. 30分）し，上清を集めた。この上清を更に同量のHClO$_4$にてTCA除蛋白し，その上清，即ち遊離アミノ酸分画を減圧濃縮し次章各部分の放射能活性を測定した。沈渣した蛋白については，5% TCAにて3回洗い遊離アミノ酸を十分に洗い去った。脳蛋白質量はBiuret法[8)]により測定した。脳内遊離アミノ酸はアミノ酸自動分析計（HITACHI KLA-3B）にて測定した。対照群には生食水を注射した。他のアミノ酸負荷実験も同様に行った。例にフェニールアラニン腹腔内1回注射後の血中濃度を経時的にみると，その代謝は比較的速やかで，血中濃度のピークは注射後1時間前後にあり，6～8時間目までには正常のレベルに戻ることが分った。

結果

第1表は，Phe., Val., His., Met., Gly., Pro. を負荷した場合の血清を各々アミノ酸アナライザーにて分析したものである。血清では負荷されたアミノ酸以外のアミノ酸濃度には明らかな変化はみられない。Phe. 負荷の場合には当然のことながら，Tyr. も高値を示した。また，負荷されたアミノ酸の血中濃度は，実際のPKUのそれに比し，患者の食事摂取などによる日内変動を考慮すれば高すぎるものとは思われない。因にPhe. 負荷群の尿について塩化第二鉄反応をみたが全く陰性であった。従って本実験で見出された所見は，Phe. それ自体の高値に基づくものであり，Phe. 代謝物の蓄積によるものとは思われない。

第2表に見る如く，Phe., Val., His., Met., Gly. 負荷群に於て，^{14}C-leucine の脳への取込み，脳蛋白への組込みはきわめて著明な低値を示した。しかし，Pro. 負荷時には障害はさ程明らかでなかったが，これはその血中濃度が比較的低かったためと思われる。

第3表の脳内遊離アミノ酸分布をみると，いずれのアミノ酸負荷の場合でもその分布にかなりなアンバランスを来しており，就中 GABA は各アミノ酸負荷に共通して著

TABLE 1. Serum amino acid levels one hour after the intraperitoneal injection of a single amino acid (mg/100ml). Loaded dosis of each amino acid is showed in Table 2.

	Phenylalanine		Valine		Histidine		Methionine		Glycine		Proline	
	Load.	Cont.	Load.	Cont.	Load.	Cont.	Load.	Cont.	Load.	Cont.	Load.	Cont.
Asp			1.38	0.48	4.03	3.79	4.39	4.25			0.74	0.80
Thr	2.07	2.03	1.71	1.65	5.65	2.86	4.09	3.78	1.67	1.82	1.33	2.30
Ser + Glun	12.00	11.30	2.73	6.30	11.90	10.62	7.07	9.30	6.26	7.33	5.38	6.20
Pro	3.51	2.73	1.47	1.40	3.84	2.25	2.73	1.89	4.52	3.60	29.60	1.70
Glu	10.06	8.68	2.70	2.29	6.35	3.14	2.44	2.51	4.82	4.60	5.83	2.62
Gly	3.26	4.00	0.84	1.50	5.04	3.44	2.78	2.90	29.46	3.24	1.86	2.24
Ala	9.24	8.56	2.59	3.56	8.38	7.64	9.50	8.51	4.81	5.20	3.77	3.50
Val	4.59	3.19	64.70	2.62	4.14	3.60	2.48	2.02	1.78	2.21	1.40	1.70
Met	1.69	1.31	0.42	1.19	2.50	1.44	124.40	1.15	1.07	1.40	0.83	1.05
Ileu	1.55	1.22	1.05	1.26	1.49	1.32	1.31	1.20	1.21	1.47	1.05	1.15
Leu	2.57	2.11	2.09	2.09	3.07	2.60	1.97	1.15	1.78	2.22	1.73	1.20
Tyr	55.00	2.67	0.51	2.03	1.51	1.28	0.91	1.10	0.87	1.16	1.01	1.27
Phe	57.00	1.41	0.39	1.12	1.12	0.97	0.69	1.05	0.86	1.10	0.99	1.08
Lys					3.39	3.67	7.21	3.48				
His					166.90	3.65	2.67	2.60				
Arg					2.16	1.88	3.34	2.54				

* Values represent the averages from 3 to 4 rats.

TABLE 2. Radioactivity found in the brain of rats with or without a single amino acid load one hour after an intra-peritoneal injection of ^{14}C-l-leucine.

Amino acid loaded	Radioactivity in free amino acid fraction (% for control)	Radioactivity in protein fraction (% for control)	Single loading dosis (m-moles)	Body weight (g)
Phenylalanine	50.2	51.8	0.15	27
Valine	55.3	77.8	0.15	30
Proline	96.6	113.5	0.15	34
Histidine	31.0	41.7	0.30	36
Methionine	73.8	60.8	0.30	30
Glycine	98.5	76.5	0.30	29

* Values represent the averages from 3 to 4 rats.

明な低下を認めた。負荷されたアミノ酸以外の脳内アミノ酸の総量は，Phe., Val., His., Met., Gly. 負荷群に減少が認められた。脳内各アミノ酸の低下の示す意味は，それが必須，非必須アミノ酸のいずれであるかにより異なってくるであろう。

考察

血中アミノ酸の脳への取込みは，active transport により行なわれており，単一アミノ酸が血中に過剰に存在すれば，それと類似構造をもつ他のアミノ酸の transport

TABLE 3. Free amino acid levels in the brain following the intraperitoneal loading of a single amino acid.

Amino acid (μ-moles/g of the brain)	Phenylalanine			Valine			Histidine			Methionine			Glycine			Proline		
	Load.	Cont.	% for cont.	Load.	Cont.	% for cont.	Load.	Cont.	% for cont.	Load.	Cont.	% for cont.	Load.	Cont.	% for cont.	Load.	Cont.	% for cont.
Asp	5.82	7.14	81.5	9.13	8.72	104.7	8.58	7.04	121.9	6.58	7.12	92.4	4.51	5.23	86.2	8.66	8.02	108.0
Thr	1.13	1.48	76.4	2.08	2.12	98.1	3.35	3.19	105.0									
Ser	2.07	2.51	82.5	} 4.03	4.14	97.4	} 5.37	5.01	107.2	1.70	1.74	97.7	2.80	2.48	112.9	2.56	2.57	99.6
Glun	2.34	2.30	101.7							1.76	2.09	84.2	3.44	3.39	101.5	3.80	3.84	99.0
Glu	6.45	8.11	79.5	9.89	10.03	97.5	11.49	9.59	119.8	9.19	10.90	84.2	9.81	10.92	89.8	10.12	9.96	101.6
Gly	1.84	2.13	86.4	2.42	2.29	105.8	2.98	3.04	98.0	1.94	2.19	88.6	5.03	2.83	177.4	3.31	3.39	97.6
Ala	1.58	1.68	94.0	1.92	1.73	110.4	2.38	2.63	90.5	2.06	2.23	92.4	1.35	1.49	90.6	2.73	2.96	92.9
Val	0.39	0.36	108.3	3.29	0.56	588.0	0.54	0.68	79.4	0.58	0.78	74.4	0.35	0.32	109.4	0.84	0.85	98.8
Met	0.17	0.25	68.0	0.26	0.29	89.6	0.28	0.38	73.7	4.26	0.29	1470.0	0.19	0.18	105.6	0.35	0.36	97.2
Ileu	0.22	0.29	75.9	0.30	0.44	68.2	0.34	0.49	69.4	0.33	0.44	75.0	0.20	0.21	95.2	0.50	0.46	108.7
Leu	0.42	0.48	87.5	0.50	0.71	70.4	0.69	0.99	69.7	0.88	0.95	92.6	0.32	0.38	84.2	0.82	1.02	80.4
Tyr	0.33	0.26	126.9	0.22	0.27	81.5	0.26	0.41	63.4	0.30	0.37	81.0	0.17	0.25	68.0	0.45	0.45	100.0
Phe	1.56	0.16	975.0	0.20	0.29	69.0	0.21	0.33	63.6	0.26	0.33	78.8	0.15	0.19	78.9	0.41	0.37	110.8
GABA	4.64	7.19	64.5	7.44	8.54	87.1	3.04	7.39	41.1	6.70	8.85	75.7	5.83	7.68	75.9	6.09	6.21	98.1
Lys	0.43	0.75	57.3	0.73	0.78	93.6	0.60	1.26	47.6	0.84	1.16	72.4	0.33	0.34	97.1	0.71	0.73	97.3
His	0.27	0.38	71.1	0.25	0.26	96.2	4.49	0.27	1663.0	0.36	0.37	97.3	0.25	0.29	86.2	0.35	0.35	100.0
Arg	0.32	0.49	65.3	0.35	0.34	102.9	0.27	0.42	64.3	0.53	0.58	91.4						
The total	28.42	35.89	79.2	39.71	40.95	97.0	40.38	42.85	94.2	34.01	40.10	84.8	29.71	33.35	89.1	41.70	41.54	100.4

* Values represent the averages from 3 to 4 rats.

ではなく，それとは無関係に，aminoacyl adenylate 形成～polypeptide 形成の過程に於て起り得ることが，cell-free 蛋白合成系を用いた実験においてPhe.，Tyr.[10]，Leu.，Ileu.，Val.，His.の[22]，Homogentisic acid が Tyr.，Leu.，Ileu.，Val.，Lys.[13]の脳蛋白への組込み障害を示すことにより知られている。更に進んで，脳蛋白合成障害と知能障害との直接結びつきを証明せんとする実験がみられる。即ち，鼠脳の側頭葉にPuromycinを注射したものは，対照群及び前頭葉に注射したものに比し，その部位の80%の蛋白合成障害と共に，記憶力の低下を認めたとの報告がある。[3)6)]

乳幼児期の脳では，成熟期の脳に比し，アミノ酸の脳内への取込み，脳蛋白のturn overは極めて旺盛であり，この時期に"知能"の基本的な構築が営まれる。[21)]換言すれば，この時期の脳は障害を受け易いと考えられる。かかる脳発育の盛んな時期に，体液中のアミノ酸のアンバランスに基づく脳蛋白合成障害が持続すれば，永久的な知能障害として反映されるであろうことは，PKUの患者を早期に治療開始し，I.Q.が正常に達した患児を，4～6才以後治療を中止しても，生化学的所見は当然のことながら復えするが(血中Phe.の上昇，尿中ノルピルビン酸の排泄等)，I.Q.の低下はまぬがれないという事実によって裏付けされている様に思える。

かくの如く幼若期における極端な血中単一アミノ酸の上昇は，脳内アミノ酸全般にアンバランスを引起し，その結果としての脳蛋白合成能の低下をもたらし，その影響はこの時期に活発に合成されるべき大脳の諸種の酵素の合成能を低下せしめることとなり，脳代謝の乱れを来し，その結果，知能障害となって表現されるのであろうと思われる。なお，脳にのみ特異的に存在するGABAの著明な低下が，実験的に[12)19)]，PKU患児の剖検例[20)]にても認められているが，その理由については現在検討中である。

文献

1) Appel,S.H.& Durham,N.C.; J.Clin.Invest., 44,1026(1965)
2) Appel,S.H. ; Trans,N.Y.Acad.Sci., 29, 63 (1967)
3) Barondes,S.H. & Cohen,H.D. ; Science, 151,594 (1966)
4) Bondy,S.C. & Perry,S.U.; J.Neurochem.,10,603 (1963)
5) Daniel,R.G. & Waisman,H.A.; J.Neurochem., 16, 787 (1969)
6) Flexner,J.B., Flexner,L.B. & Steller,E.; Science, 141, 57 (1963)
7) Guroff,G., King,W. & Udenfriend,S.; J.Biol.Chem., 236, 1773 (1961)
8) Layne,E.; Methods in Enzymology, Academic Press Publishers, New York, Vol.III, 1957, pp450
9) Linneweh,F. et al.; Klin.Wschr., 41, 253 (1963)
10) Neam,K.D.; Nature, 192,173 (1961)
11) Neam,K.D.; J.Neurochem., 11, 67 (1964)
12) 野口鉄也；神経化学，6，131 (1967)
13) Raghupathy,E., Peterson,N.A. & Mc-Kean,C.M.; Biochim.Biophys.Acta, 161,575(1968)
14) 三宅薬映；神経化学，8，111 (1969)
15) 多田啓也；神経研究の進歩，9，235，昭和40年
16) 多田啓也；小児科診療，30，538，昭和42年
17) 多田啓也，吉田稔男；神経研究の進歩，12，137，昭和43年
18) Tsukada,Y., Nagata,Y., Hirano,S. & Matsutani,T.; J.Neurochem., 10, 241 (1963)
19) 塚田裕三；脳神経系 16, 747 (1964)
20) 塚田裕三；野口鉄也；神経誌，9,217(1965)
21) Winick,M.; J.Pediat., 74, 667 (1969)
22) Peterson,N,A.,Raghupathy,E.,McKean,C.M.,Shah,S.N.&Terres,G.;Fed.Proc.Abs.,27,333(1968)

29. Miniature pigでの乳幼期における実験的高フエニールアラニン血症について

平野修助・相馬紀夫・中島昌子・植村慶一
長村洋三　（東邦大・医・二生理）

緒言：　発育過程にある脳は，侵襲に対して感受性が強く幼弱期に受けた侵襲が屢々不可逆的な脳の機能障害を引き起こす例がある。高フエニールアラニン血症も，胎生期或いは乳幼期に続くと，不可逆的脳の機能障害として精神薄弱を残すことが知られている。[1)2)] 一方，実験的に作られた高フエニールアラニン血症動物については，脳組織のアミノ酸代謝の異常がみられ学習能力の遅滞が認められることが報告されている。[3)4)] しかし豚では乳幼期のものが入手が難しいことや，白鼠では母乳を介して高アミノ酸血症を引き起こさせることなどから，これらの動物を直接に乳幼期から高フエニールアラニン血症にすることが困難であった。豚では出産直後から人工的に哺乳することが可能であることから，乳幼期に於ける高フエニールアラニン血症動物を作る場合に好適の材料と考えられた。

そこで，豚を用い出産直後から高フエニールアラニン血症を作り，その経過について神経化学的検索を行い脳機能障害の物質的基礎を明らかにしようと考えた。

実験方法：

a)実験動物の製作：　実験動物は Pitman-Moore 系の Miniature Pig[5)] の雌を用いた。Miniature Pig は成豚時でも体重は通常の豚の約30%程度であり実験取扱上は比較的容易である。実験群については，出産直後から，豚飼育用ミルク・Sun A ミルク（味の素社製）に重量当り5%に L-Phenylalanine (phe) を混合し2週間飼育し，以後コロミルク（日清飼料社）に切換え L-phe は同様5%を含むようにして飼育を続けた。生後50日目頃で L-phe を含まぬ正常食に切換え更に約1ヶ月間飼育を続けた。対照群については出産直後から L-phe を無添加のまゝで飼育を続け経過を観察した。

b)試料の調製：

1.採血及び採尿：　採血は耳静脈より随時採取し，採尿は流動パラフィンを重層した 1/8N 硫酸を含む容器中に取り酸化を可及的に防いだ。

2.組織の採取：　ペントバールを体重 1kg 当り 200 mg 皮下注射して軽く麻酔し脳脊髄液を腰椎穿刺によって採取した後，瀉血により屠殺し，脳・肝など各組織を摘除し凍結保存した。

c)化学的定量法：

1.血液並びに組織内遊離アミノ酸の定量：　血清及び組織をエタノールで除蛋白し，アミノ酸自動分析器（日立KL型）により遊離アミノ酸を分画定量した。特に血液中の phe 及び tyrosine は各々 McCaman-Robin,[6)] Udenfreind-Cooper の方法[7)]で定量した。尿中の phenylpyruvic acid は Saifer-Harris の方法[8)]により，また蛋白は Lowry の方法[9)]を用いて定量した。

2.燐脂質，Cerebroside, Cholesterol, Ganglioside 及び Proteolipid の定量：　これらの化学定量値は，脳の部位によりその含有量が異っていることが知られているので，[11)] 分析に当っては同一部位を選んで採取し比較検討した。先ず摘出脳を Folch の方法[12)]に従い CM (2:1) で脂質を抽出し，脂質燐は Lowry の方法，Cerebroside は Svennerhorm の方法[13)]により

Cholesterol は Zak[14]の方法に準じ，Ganglioside は N-acetylneuramic acid として測定[15]した。Proteolipid は，Folch-Lees[16]及び Wolfgram[17]の方法に従って抽出し，蛋白は Lowry[9]の方法によって測定した。

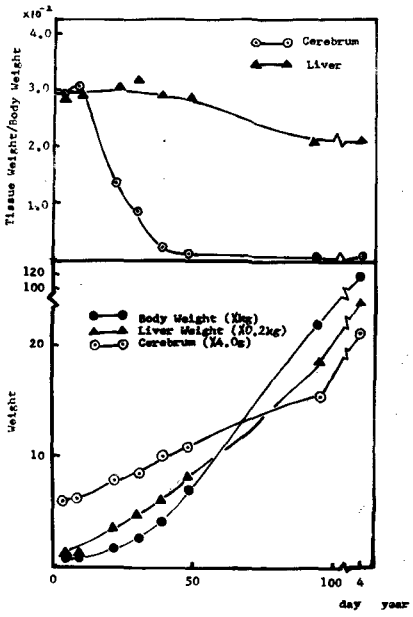
d)酵素活性の測定：

フェニールアラニン水酸化酵素は，Udenfreind and Cooper[18]の方法に準じて行い，単位蛋白当りの Tyrosine 生成量を以て表した。2'3' Cyclic Nucleotide 3' Phosphohydrolase の活性は Kurihara and Tsukada[19]の方法を用い，単位蛋白当りの Unit 量として表し，活性化には Banik らの 1% Triton 処理を使用した。

結果及び考察：Pitman-Moore 系の Miniature Pig の生下時体重は，約 800 g であり発育に伴う体重変化は図1に示すように，生後40日目頃で急激に増加する。しかし脳の重量はむしろ40日目頃までに増加が進み，それ以後の増加率は極めて少い。臓器の一つとして肝の重量変化も同時にみると，その増加はほぼ体重と平行しており（図-1），脳組織とは発育の態度が異っていることを示した。脳組織は生後40日目頃までで急激な重量増加が終ることから，生後47日目まで高 phe 血症として飼育し，それ以後正常食に切換えて飼育を続けた。その場合の重量変化を，対照例に対する実験例の比として表わすと，表1に示すように体重及び肝組織重量はともに，高 phe 血症例で対照例に比較し強く減少しているのが示された。

（図 1）

Body, Liver and Cerebrum Weight during Development



（表 1）

Body, Brain and Liver Weight of Miniature Pig during Maturation

Condition	Whole Body		Cerebrum		Liver	
	Weight*(Kg)	Ratio	Weight*(g)	Ratio	Weight*(g)	Ratio
Phe (47 days)	4.5/8.5	0.53	35.0/40.5	0.86	131/220	0.59
Phe to Normal (94 days)	14.5/22.0	0.66	52.0/62.0	0.83	330/370	0.89

* Experiment/Control - Weight

此の場合，血清蛋白はほぼ 7.0 mg/dl で実験例で特に低値を示すことはなかった。正常食にもどすと，体重，肝ではその重量が増加し対照例に近づくのがみられた。脳では体重や肝ほど高 phe 血症での阻害効果はないが，高 phe 血症を解除した後も，対照例に比べ依然低値を示しており，乳幼期での高 phe 血症の影響が脳組織では強く残っていることが臓器重量の面からみて示された。

肝組織中のフェニールアラニン水酸化酵素の活性は(表2)対照例でも白鼠などに比べ遥に低く約 1.0 μmoles/mg-Protein と 1/2 以下であるが，高 phe 血症の場合は，この活性が 1/10 に減少し，尿中に phenylpyruvic acid の著しい排泄が認められた。血漿中アミノ酸では，phe が 20 倍に増加し tryptophane の減少も認められた。高 phe 食での飼育を止めれば，血漿中 phe 値は減少し tryptophane もまた増加して正常値に近づく。肝組織のフェニールア

ラニン水酸化酵素の活性もまた対照例に近づき血液中tyrosine値が低下して高phe血症は解除される。

脳組織中の遊離アミノ酸では(表3)pheが血液中pheの増加に伴って著しく増加するのが認められた。屠殺時に脳脊髄液を採取しそのアミノ酸組成についても検討を加えたが，高phe血症例では対照例の100倍近くもその増加を認めた。他のアミノ酸としては，GABA，Cystathionineが高phe血症で減少した。Cystathionineは発育過程に伴って増加するのがみられており94日目では47日目の約2倍に増加した。高phe血症を解除するとCystathionineもGABAもともに対照例の値となった。

った。高phe血症の際にGABA，Cystathionineが減少することは既に堺田[4]，平野[5]らによって報告されているが，豚の脳組織についても同様に認められた。

脂質成分では(表4)燐脂質が発育に伴って増加しており，高phe血症の際も対照とは変化が認められなかった。しかしcholesterol，Cerebroside，Ganglioside は高phe血症で低値を示した。Geison[20]らは低栄養で飼育した白鼠で脳組織中のgalactolipidやCholesterolの低下を報告しているが，高phe血症の場合は，血清蛋白は特に対照例に比べ著しい低下はみられなかった。更に高phe血症から正常食に切換えて飼育を続けた場合も，これらの脂質成分の低下はやはり認められており、乳幼期での高phe血症は脂質代謝の異常を広く起こしその影響が広々まで残ることが考えられた。

（表　2）

Phe-Hydroxylase Activities and Amino Acids Contents in Sera of Miniature Pigs

Condition (Days after Birth)	Phe-Hydroxylase* in Liver	Serum **			Urine**
		Phe	Tyr	Trp	PPA
Control (47 days)	0.90	0.10	0.14	0.06	0.05
Control (94 days)	1.02		0.15	0.06	
High Phe (47 days)	0.12	2.11	0.52	0.02	5.71
High Phe to Normal (94 days)	0.48	0.07	0.08	0.04	0.05

* Phenylalanine hydroxylase activities are expressed as μmoles of tyrosine formed/mg-protein.

** All vallues are expressed as μmoles/ml.

（表　3）

Amino Acids Contents in Cerebrum of Miniature Pig

Condition (Days after Birth)	Asp	Glu	Gly	Ala	Cysta	GABA	Tyr	Phe
Control (47 days)	2.68	4.38	1.15	1.39	0.29	2.42	0.12	<0.01
High Phe (47 days)	2.43	5.48	1.56	1.30	0.18	0.09	0.41	4.40
Control (94 days)	2.91	4.54	1.48	1.67	0.70	2.31	0.08	0.07
High Phe to Normal (94 days)	2.99	5.68	1.59	1.88	0.79	2.60	0.15	0.11

All values are expressed as μmoles/g-wet weight.

（表 4）

Lipid Contents in Miniature Pig Cerebrum

Condition	Phospholipid (mg-P/g)		Cholesterol (mg/g)		Cerebroside (mg/g)		Ganglioside (mgNANA/g)	
Days after Birth	47	94	47	94	47	94	47	94
Control	1.30	1.90	23.2	24.2	28.5	29.8	0.14	0.19
High Phe	1.30	....	15.5	....	21.3	....	0.12	....
High Phe to Normal	....	2.01	....	20.8	....	26.9	....	0.11

更に，Proteolipidについてみると，Folch-Lees分画は高phe血症で低下の傾向を示した。しかしWolfgramのProteolipid分画はむしろ増加を示している。(表5) Gaison[20]らは白鼠で発育過程に伴って脳組織中のFolch-Lees分画の蛋白量の増加を報告しており，低栄養下の飼育では

Folch-Leesの Proteolipid 分画の低下することを報告している。[21] 一方 Agrawalらは，Chloroform-Methanol 可溶並びに不溶分画の蛋白への ^{35}S-Methionine Incorporation が高phe 血症で抑制され，幼弱期ではその抑制が成獣の場合より強く，ミエリン分画ではミエリン以外の分画に比べ抑制が強いことを[22]示している。更にまた，Rudolphらも高phe 血症の場合，血液中 Tryptophane の減少と脳の蛋白合成の低下を認めており表6に示す高phe 血症での Folch-Lee Proteolipid の低下は，これらのことと関連すると考えられ，乳幼期での高phe 血症では髄鞘形成不全並びに Myelin の形成不全を引き起こすことが充分考えられる。しかし Wolfgram の Proteolipid分画は，高phe 血症で組織重量当り及び蛋白当り増加しており，正常にもどした後でもその値は対照例に比し高値を示した。一方中枢神経系の Myelin に高濃度に存在することが報告されている 2'3' Cyclic Nucleotide 3' phosphohydrolase 活性（CN phosphohydrolase）もまた高phe 血症で増加しており，正常食に切換えた場合も高値を示した。このように，CN phosphohydrolase 活性の変化は Wolfgram の Proteolipid 分画の変化と平行しており，高phe 血症で Folch-Lees 分画の減少と如何に関連するか更に検討を進めている。いづれにしても，これらの変化はともに高phe 血症を正常食にもどした際も，依然認められており，乳幼期での高phe 血症は強く物質代謝の異常を引き起こし，その影響が長く残ることを示唆している。これらの物質代謝の変化が不可逆的な脳の機能障害と直ちに関連するか否かは更に検討されなければならないが，形態学的にも更に検索を進めている。

（表　5）

Proteolipid Contents and 2'3'Cyclic Nucleotide 3'-phosphohydrolase Activities in Miniature Pig Cerebrum

Condition	Proteolipid-Protein(%) Folch-Lee		Proteolipid-Protein(%) Wolfgram		CN Phosphohydrolase (U/mg-protein)	
Days after Birth	47	94	47	94	47	94
Control	2.55	2.97	0.22	0.19	2.42	3.09
High Phe	2.34	....	0.67	....	2.90	....
High Phe to Normal	....	2.64	....	0.42	....	5.34

Protein contents of proteolipid are expressed as per cent of original tissue protein.

文献：

1) Lyman,L.Frank; in phenylketonuria c.c.Thomas (1963)
2) Mabry,C.C.etal; New England J.Med.(1963) 269,1404
3) Platt,B.S; Develop.Med.Child.Neurol.(1965) 7,9
4) 塚田裕ら；神保進歩 (1963) 7,721
5) 平野俊助ら；神保進歩 (Suppl) (1967) 6,117
6) McCaman,M.W and Robbins,E; J.Lab.Clin.Med.(1962) 59,885
7) Udenfriend,S.and Cooper,J.R; J.Biol.Chem.(1952) 196,227
8) Saifer,A and Harris,A.E; Clin.Chem.(1959) 5,203
9) Lowry,C.H; J.Biol.Chem.(1959) 5,203
10) Landolt,R.and Hess,H.H; J.Neurochem.(1966) 13,1453
11) Folch,J. et al; J.Biol.Chem.(1951b) 191,833
12) Lowry,H. et al; J.Biol.Chem.(1953) 207,1
13) Svennerholm,L; J.Neurochem.(1956) 1,42
14) Zak-B; Am.J.Clin.Path.(1967) 27,583
15) Svennerholm,L; Biochem.Biophys.Acta.(1957) 24,604
16) Folch,J and Less,M; J.Biol.Chem1.(1951)191,807
17) Wolfgram,F; J.Neurochem. (1966) 13,461
18) Udenfriend,C and Cooper,J.R; J.Biol.Chem. (1952) 194,503
19) Kurihara,T and Tsukada,Y; J.Neurochem. (1967) 14,1167
20) Geison,R.L and Waisman,H.A; J.Nutrition. (1969) 100,315
21) Agrawal,H.C. et al; Biochem.J. (1970) 117,325
22) Rudolph,N and Betheil,J.J; J.Nutrition. (1969) 100,21

30. 脳組織の好気的解糖の調節機構

高垣 玄吉郎（慶大・医・生理）

脳組織の好気的解糖の調節に関し，筆者はさきに，ピルビン酸キナーゼ(PK)が調節段階であろうと述べた[1,2]。今回の発表では，モルモット脳切片を用いて行なったその後の実験の成績，とくにmediumのK⁺濃度と解糖中間代謝物の濃度の関係，グルタミン酸の作用，ATP濃度の変化などの成績を示し，解糖調節の機構を論じたい。

実験材料および方法は，さきの発表[1]とほとんど同じであるから，その要点のみを本文中に記すことにする。

実験成績と考察

1）解糖中間代謝物の濃度の変化　モルモット脳切片をK⁺濃度0～60mMのKrebs-Ringerリン酸緩衝液(pH 7.4，グルコース5mM)中に30分間incubate(空気中)したのち，過塩素酸を加えてmediumとともにhomogenizeして得た切片の抽出液について，解糖系の中間代謝物の濃度を測定した成績を一括して表1および図1に示す。中間代謝物の測定は，普通に行われている酵素的方法[3]により，分光光度計(340mμ)あるいは分光螢光光度計を用いてNADHあるいはNADPHの増減から計算した。K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺については，incubationののちmediumから急速にわけた(200メッシュのナイロン布を用いて吸引下に分離)切片を，一旦乾燥したのち，0.75N硝酸を加えて試験管のまま超音波洗滌器中で60分間sonicateして均一な浮遊液としたものを適当に希釈し，あるいは入

Intermediates (mμM/g)	K^+, 5.1 mM	plus D-Glutamate, 5.0 mM	K^+ 50.0 mM	plus D-Glutamate, 5.0 mM
Glucose consump.*	13,800. ±1,83(8)	21,800. ±3,13(5)	29,690. ±1,97(4)	28,730. ±1,29(4)
G6P	95.0 ± 5.1(7)	93.9 ± 3.0(4)	80.8 ± 8.6(4)	84.1 ± 10.6(4)
F6P	27.3 ± 3.1(7)	25.3 ± 1.9(4)	22.7 ± 1.9(4)	22.3 ± 1.2(4)
FDP	17.7 ± 3.2(5)	22.9 ± 3.7(3)	267.1 ± 26.8(4)	40.8 ± 11.0(4)
Triose P	66.0 ± 5.8(5)	71.8 ± 7.4(3)	206.8 ± 11.1(4)	114.5 ± 25.7(4)
α-GlycerP	32.9 ± 1.3(3)	73.2 ± 9.3(3)	72.7 ± 8.4(3)	68.8 ± 9.7(3)
3-PGA	81.6 ± 8.2(6)	89.7 ± 3.5(3)	71.9 ± 6.3(3)	72.2 ± 11.5(3)
2-PGA	23.7 ± 4.3(6)	26.3 ± 5.2(3)	27.3 ± 2.5(3)	25.6 ± 5.3(3)
PEP	53.9 ± 10.7(7)	40.7 ± 2.6(3)	34.1 ± 8.9(3)	33.6 ± 6.0(3)
Pyruvate	595.9 ± 98.3(7)	376.6 ± 27.5(3)	294.2 ± 91.1(3)	437.6 ± 38.5(3)
Lactate	16,080. ±1,16(6)	22,800. ±0,43(3)	34,120. ±1,89(4)	33,560. ±1,86(4)
ATP	1,085. ± 160(6)	740. ± 82(4)	902. ± 126(6)	764. ± 111(4)
ADP	166. ± 7(4)	270. ± 6(4)	215. ± 11(4)	234. ± 13(4)
AMP	90. ± 4(4)	197. ± 19(4)	125. ± 22(4)	175. ± 19(4)
(mM/g)				
K^+	46.20 ± 3.09(5)	59.47 ± 2.08(5)	92.25 ± 2.85(7)	98.33 ± 3.56(7)
Ca^{++}	6.07 ± 0.22(5)	7.02 ± 0.56(5)	6.70 ± 0.22(7)	7.88 ± 1.00(7)
Mg^{++}	4.18 ± 0.14(5)	4.22 ± 0.20(5)	4.35 ± 0.10(7)	4.08 ± 0.19(7)

表1．カリウム効果の解糖中間代謝物の濃度変化とD-グルタミン酸(5mM)の作用
——モルモット脳切片を好気的(空気下)に30分間incubateしたのち，解糖中間代謝物の濃度を測定した。平均値±S.D.(実験例数)——

トロンケウムを加えたものを試料として，原子吸光光度計を用いて測定した。表1はmediumのK⁺濃度5mMと50mMの場合について，D-グルタミン酸5mMを加えた場合

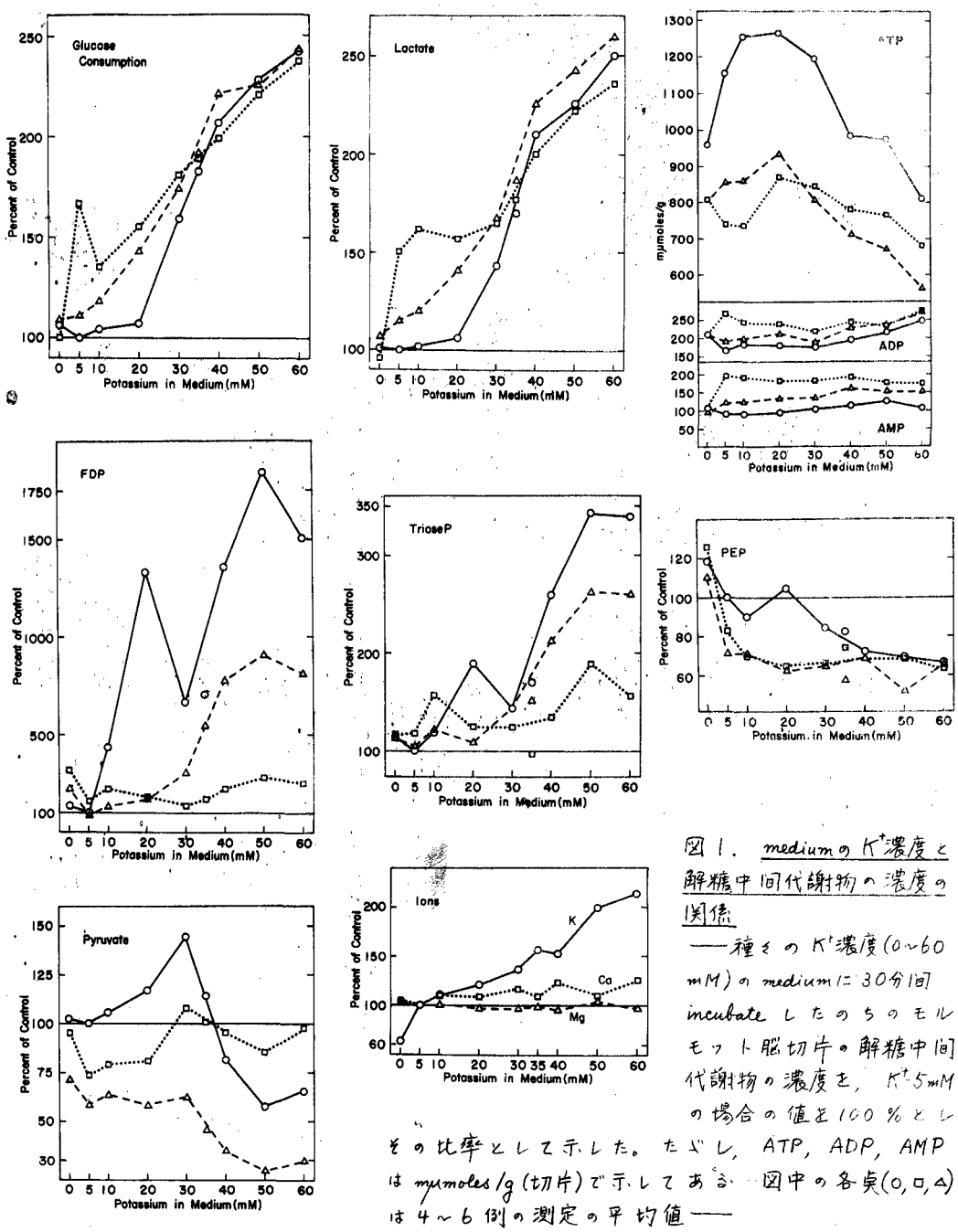


図1. mediumのK⁺濃度と解糖中間代謝物の濃度の関係

——種々のK⁺濃度(0～60 mM)のmediumに30分間incubateしたのちのモルモット脳切片の解糖中間代謝物の濃度を，K⁺5mMの場合の値を100％としてその比率として示した。ただし，ATP, ADP, AMPはmμmoles/g(切片)で示してある。図中の各点(○,□,△)は4～6例の測定の平均値——

○——○ 対照

□·····□ D-グルタミン酸 5mM

△-----△ D-アスパラギン酸 5mM

} 添加

K^+ in medium: 5.1 mM

ATP added to medium		Concentrations of intermediates after 30 min. incubation (μmoles/g of slices or /ml of medium) ATP	ADP	AMP	Glucose consump.	FDP	Triose P	PEP	Pyruvate	Lactate
0 mM		1,090.± 160.(6)	166.± 7.(4)	90.± 4.(4)	13,800.± 1,83(3)	17.7 ± 3.2(5)	66.0 ± 5.8(5)	53.9 ± 10.7(7)	595.9 ± 98.3(7)	16,080.± 1,16(6)
1 mM	slices	1,020.± 71.(3)	242.± 24.(3)	305.± 6.(3)	10,290.± 2,17(4)	45.4 ± 2.3(4)	618.0 ± 31.9(4)	39.2 ± 10.9(4)	388.6 ± 37.9(4)	12,830.± 2,13(4)
	medium	28.± 21.(3)	181.± 21.(3)	622.± 10.(3)						
2 mM	slices				10,520.± 2,20(4)	39.8 ± 13.5(4)	490.1 ± 95.2(4)	22.6 ± 8.9(4)	222.5 ± 32.7(4)	10,770.± 3,34(4)
	medium	180.± 82.(3)	494.± 59.(3)	1,160.± 176.(3)						
3 mM	slices	974.± 74.(3)	636.± 91.(3)	1,460.± 95.(3)	10,380.± 2,71(4)	23.5 ± 1.8(4)	237.4 ± 55.6(4)	22.3 ± 9.0(4)	125.4 ± 26.3(4)	7,870.± 1,68(4)
	medium	441.± 294.(3)	859.± 111.(3)	1,570.± 416.(3)						
5 mM	slices				11,470.± 3,09(3)	12.5 ± 2.8(3)	111.3 ± 28.6(3)	21.4 ± 8.1(3)	64.6 ± 8.0(3)	6,060.± 1,61(3)
	medium	1,270.± 400.(3)	1,840.± 62.(3)	1,810.± 470.(3)						

K^+ in medium: 50 mM

ATP added to medium		Concentrations of intermediates after 30 min. incubation (μmoles/g of slices or /ml of medium) ATP	ADP	AMP	Glucose consump.	FDP	Triose P	PEP	Pyruvate	Lactate
0 mM		902.± 126.(6)	215.± 11.(4)	125.± 22.(4)	29,690.± 1,97(4)	267.1 ± 26.8(4)	206.8 ± 11.1(4)	34.1 ± 8.9(3)	294.2 ± 91.1(3)	34,120.± 1,89(4)
1 mM	slices	640.± 139.(3)	352.± 12.(3)	385.± 46.(3)	24,450.± 1,87(4)	208.3 ± 49.9(4)	1,290.± 166.(4)	38.8 ± 3.9(4)	285.1 ± 32.5(4)	30,230.± 7,87(4)
	medium	21.± 15.(3)	140.± 11.(3)	698.± 29.(3)						
2 mM	slices				20,780.± 1,38(4)	154.6 ± 47.9(4)	1,130.± 286.(4)	28.3 ± 11.5(4)	244.8 ± 26.3(4)	24,590.± 7,27(4)
	medium	123.± 65.(3)	438.± 62.(3)	1,280.± 136.(3)						
3 mM	slices	838.± 106.(3)	556.± 100.(3)	1,390.± 150.(3)	17,990.± 825.(4)	71.9 ± 2.7(4)	652.1 ± 64.9(4)	28.4 ± 8.4(4)	178.8 ± 21.6(4)	17,270.± 6.38(4)
	medium	487.± 154.(3)	902.± 82.(3)	1,460.± 154.(3)						
5 mM	slices				15,470.± 2,89(4)	38.3 ± 5.3(4)	356.6 ± 54.5(4)	17.8 ± 6.9(4)	75.8 ± 11.7(4)	11,090.± 2,92(4)
	medium	1,180.± 265.(3)	1,780.± 108.(3)	1,810.± 265.(3)						

表2. medium の K^+ 濃度 5.1mM および 50mM の場合の ATP 添加の影響

—— モルモット脳切片(約100mg)を ATP(0~5mM) を加えた medium (2.5ml) に 30分間 incubate (好気的, グルコース 5mM) したのち, 解糖中間代謝物の濃度を測定した。ATP, ADP, AMP 濃度を切片と medium をわけて測定する場合は, 200メッシュのナイロン布を用いて切片を急速に分離した。切片のヌクレオチド濃度は酵素法により, medium の濃度はカラムクロマト[4]により測定した。平均値±S.D.(実験例数).——

と加えない場合の中間代謝物の濃度を数値で示したものであり，図1は解糖中間代謝物の濃度を K^+ 濃度 5.1mM の場合を100％としての比率で示し，K^+ 濃度との関係を図示したものである。表1および図1から，次のことがわかるだろう。

a) グルコース消費および乳酸形成は，K^+ 20mMまではほとんど増加せず，それ以上で著しく増加し，また K^+ 40mM 以上でもさらにあまり変化しない。一方，フルクトースニリン酸(FDP)，トリオースリン酸(Triose P)は，K^+ 20mMで著しく増加し，K^+ 30mMでは減少し，K^+ 40mMでふたたび増加する。これらの成績は，K^+ 濃度の変化による好気的解糖の調節には少なくともふつの段階があり，1つはホスホフルクトキナーゼ(PFK)で，もう1つは PK(?) であり，その K^+ 濃度に対する反応がことなっているために，表1および図1のような中間代謝物の濃度変化を示すのであると理解されるだろう。

b) D-グルタミン酸およびD-アスパラギン酸は K^+ 濃度の低いときのみ解糖を増加するが，このときは FDP, Triose P の増加はほとんど認められない。K^+ 50mMで D-グルタミン酸を加えると(表1)，FDP, Triose P は減少し，ピルビン酸は増加する。グルタミン酸の作用は現象的には PK(?) 段階の増強によると考えられるだろう。

c) K^+ 濃度の変化にともなう Ca^{++}, Mg^{++} の変化が図1のなかに示してある。medium の K^+ 濃度の変化につれて，切片の K^+ 濃度は変化するが，Mg^{++}, Ca^{++} 濃度はほとんど変化しない。K^+ による解糖の増加は，Mg^{++} や Ca^{++} 濃度の変化を介してあらわれるのではないだろう。

d) 切片の ATP 濃度は medium の K^+ 濃度が 0mM から 20mM までは増加し，それよりさらに K^+ 濃度を高めると低下する(図1)。解糖系全体の流れが増加する K^+ 濃度で ATP 濃度が低下する。また，D-グルタミン酸を加えた場合は，ATP 濃度が著しく低下する。ATP は PK およびホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)の阻害因子であるから，ATP 濃度の低下によりこれらの酵素の脱阻害を介して好気的解糖を増加すると考えうるだろう。

2) medium に加えた ATP の作用　脳切片を incubate する medium に ATP(1～5mM) を加えた場合の解糖中間代謝物の濃度変化を表2に示す。medium に加えた ATP は脳切片によって分解されて，30分間の incubation ののちではほとんど ADP および AMP になっている。medium と脳切片を分離して，ATP, ADP, AMP 濃度を測定した結果も表2に示してある。加えた ATP 濃度に応じて 30分間の incubation 後の ATP, ADP, AMP 濃度はことなるが，いづれの場合でも FDP と Triose P, ことに後者が著しく増加し，好気的解糖の全体の流れは阻害される。解糖中間代謝物の濃度の変化は，ATP が PGK の段階を強く阻害したためであるとして理解しうる。

Newsholme ら[5]は，PK とトリオースリン酸デヒドロゲナーゼが共役して調節酵素となっているとし，また Weber[6]は PK がフェニルアラニンにより阻害されることを指摘している。これらの知見と上に示した成績との関連をも考察する。

文献
1) TAKAGAKI, G.(1968): J.Neurochem., 15, 903. 2)高垣玄吉郎(1969): 蛋白質核酸酵素, 14, 320.
3) BERGMEYER, H.-U.(1965): Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press. 4)COHN, W.E.(1957): in Methods in Enzymology, Vol. III, p.867. 5) ROLLESTON, F.S. & NEWSHOLME, E.A.(1967): Biochem.J., 104, 524.
6) WEBER, G.(1969): Proc.N.A.S., 63, 1365.

31. 各種機能状態における脳のTCAサイクルおよび関連物質の代謝の研究

永山素男・成瀬　浩（国立精神衛生研）
宮本侃治　　（国立武蔵療養所）

われわれは脳の解糖呼吸系の代謝調節の研究をおこなってきたが、この目的のためには呼吸系中間物質の正確な定量と放射能測定が必要であると考え、ガスクロマトグラフによる分離定量方法を開発し、脳組織に適用することに成功し、さきに本学会に報告した。

今回はこの方法を用い、各種状態における呼吸系中間物質および関連物質の濃度および比放射能の変動についていくつかの新しい知見を得たのでここに報告する。以下のべるような分析方法は呼吸系調節の研究に役立つと共に、脳機能変化と脳代謝変化の関連を追求するためにも寄与しうるものと考える。

[実験方法]

実験動物　dd系マウスの雄を用いた。動物はすべて前夜より絶食させ実験に供した。

アモバルビタール　注射用アモバルビタールソーダ2.45mgを0.1mlの水に溶解して腹腔内に注射。30℃に保温し、昏睡状態のまま45分間放置した後 ^{14}C-グルコースを注射した。

インシュリン　インシュリン・ノボ・レギュラー注射液 0.06ml (2.4 i.u.) を腹腔内に注射。50～60分後、傾眠ないし亜昏睡状態になった時 ^{14}C-グルコースを注射。

ピリテオキシン　ピリテオキシンを1日体重Kg当り300mg経口的に2週間投与。

^{14}C-グルコース　U-^{14}C-グルコース(195mCi/mmole) 10μCi (0.1ml)を腹腔内に注射。10分または15分後に液体窒素により固定。

分析方法　固定脳の分析は1968年本学会に報告したさいの分析方法[1]を用いた。すなわち、過塩素酸抽出の後、Dowex-AG-1 (酢酸型)、およびDowex-AG-50 (H型)を用いてグルコース、グルタミン酸、アスパラギン酸、乳酸、グルタミンを分離、それぞれ定量および放射能の測定をおこなった。定量には、グルコースは、グルコース酸化酵素法、グルタミン酸、グルタミンはグルタミン脱水素酵素法、乳酸は乳酸脱水素酵素法をそれぞれ用いた。蛋白質の定量はLowry法によった。なおグルコースについては、上記諸カラムを通過した分画をグルコース分画としているが、他の物質の混入があるので、さきにビタミン学会に報告したように、グルコース酸化酵素によりグルコースをグルコン酸に変化させ、Dowex-AG-1カラムによりこれを分離し、放射能を測定する方法を開発した。この方法によると、U-^{14}C-グルコース注射時の上記グルコース分画中の他の物質の放射能の混入は約10%であるので、今回の報告では、この比率を用いて、グルコースの放射能を計算した。また本抄録には測定値をしめしていないが、アラニン、GABAはアミノ酸自動分析器に自動放射能連続測定器を併用して分析中であり、アスパラギン酸についてもニンヒドリン法により測定中である。

コハク酸、クエン酸、リンゴ酸はDowex-AG-1カラムより0.3N ギ酸により流出させた分画および2N塩酸により流出させた分画をそれぞれ珪酸カラムによる分配クロマトをおこなった後、メチルエステルとし、ガスクロマトグラフにガスフラクショ

ンコレクターを併用して、分離定量および放射能測定をおこなった。なおα-ケトグルタル酸については、同様の方法を用いて定量するべく検討を重ねたが、U-^{14}C-α-ケトグルタル酸、5-^{14}C-α-ケトグルタル酸のいずれも、Dowex-AG-1カラムにより分離する際、^{14}C-ピルビン酸と同様分解し、定量的回収が困難であったので、今回は測定しえなかった。

放射能の測定はすべて液体シンチレーション・カウンターを用いた。

[実験結果および考察]

各種機能状態におけるグルコース、乳酸、グルタミン酸、グルタミン、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の脳内濃度の平均値を mμmoles/mg蛋白であらわして第Ⅰ表にしめした。第Ⅱ表にはU-^{14}C-グルコース注射時の上記各物質の比放射能の範囲をd.p.m/μmoleでしめした。この表で正常10分以外はすべて注射後15分の値である。さらに、グルコースの比放射能を1とした際の比放射能比（以下R.S.Aと略す）を計算し、その平均値を第3表にしめした。これらいずれの値も2-6サンプルの測定によるものである。

安静時の動物の各種物質濃度は、第1表にしめすように、グルコース、乳酸、グルタミン酸、グルタミンについては、これまでの報告とほぼ一致している。TCAサイクル中間物質のうち、クエン酸、リンゴ酸の濃度はわれわれがこれまで酵素法を用いて測定した値およびGold berg ら[2]の報告とほぼ一致する。コハク酸については、これまでGold berg ら[2]の報告があり、湿重量1g当り686 mμmolesであり、われわれの測定値と異なっている。しかし本実験におけるDowex-AG-1 の0.3N ギ酸分画のU-^{14}C-グルコース注射後15分の放射能は、コハク酸以外の物質の混入があると考えられるにもかかわらず132d.p.m/mg蛋白であり、Gold berg らの測定値を用いるとコハク酸の比放射能は17500d.p.m/μmole 以下となり、リンゴ酸の比放射能に比し著しく低いという矛盾を生じる。

安静時の動物に、U-^{14}C-グルコース注射後10分と15分の脳内各種物質への^{14}Cのとりこみを第2表によって比較すると、グルコースおよび乳酸の比放射能はほぼ同じであるが、それ以外の物質の比放射能は15分値の方が高い。また、ここにはしめさなかったが、注射後30分には、グルコース、乳酸の比放射能が15分値の約1/2 に低下する

［第1表］ 各種機能状態における脳内物質濃度

	Glucose	Lactate	Glutamate	Glutamine	Citrate	Succinate	Malate
Normal	8.63	26.5	102.8	43.9	3.68	3.11	4.37
Amobarbital	16.7	14.2	82.7	61.4	2.78	2.12	2.18
Insulin	3.01	11.2	92.1	52.2	2.66	2.39	2.39
Pyrithioxine	9.39	27.0	104.3	45.0	3.81	3.60	4.56

(mμmoles/mg of protein)

［第2表］ U-^{14}C-グルコース注射時の各種物質の比放射能

	Glucose	Lactate	Glutamate	Glutamine	Citrate	Succinate	Malate
Normal 10'	182.5 - 209.5	67.0 - 80.6	30.2 - 31.8	14.3 - 15.3	37.5 - 47.5	24.4 - 27.9	27.6 - 33.2
Normal 15'	140.0 - 220.0	66.0 - 91.4	42.6 - 71.2	20.9 - 47.0	50.7 - 55.1	33.6 - 58.2	42.0 - 63.2
Amobarbital	233.0 - 250.0	31.0 - 46.6	3.2 - 4.4	2.3 - 2.6	7.8 - 11.5	3.2 - 4.3	3.7 - 4.1
Insulin	422.0 - 450.0	50.8 - 53.6	36.6 - 41.0	18.9 - 21.5	43.6 - 47.7	33.5 - 35.8	35.3 - 37.9
Pyrithioxine	180.0 - 200.0	114.0 - 117.0	90.0 - 99.1	29.8 - 39.4	80.0 - 85.4	79.2 - 81.0	78.4 - 84.8

(d.p.m. × 10^{-3} / μmole)

ことをたしかめている。このため、以後の実験はすべて^{14}Cのとりこみが最も高い15分で固定した。

10分、15分値ともに、グルタミン酸の比放射能が、コハク酸、リンゴ酸の比放射能と同じか、高い値をしめしている。また各物質が一様にラベルされているとして炭素原子1原子当りの比放射能を計算すると、グルタミン酸とコハク酸、リンゴ酸の値は一致する。このことはTCAサイクルとグルタミン酸の間に常にアイソトープ平衡が成立していることをしめす。さらに、α-ケトグルタル酸の脳内濃度は湿重量1g当り約100mμmolesであり、グルタミン酸濃度はその約100倍であることを考えるならば、α-ケトグルタル酸の一部がグルタミン酸と部分的にexchangeするとし、グルタミン酸を通る経路をTCAサイクルにとって補助的な経路と考える説は成立しえないのではなかろうか。むしろグルタミン酸とα-ケトグルタル酸の間の反応は、脳のTCAサイクルの主要な経路の一部を構成していると考えることが妥当ではなかろうか。また、このことは、後にのべるように各種機能状態においても、コハク酸、リンゴ酸の比放射能がグルタミン酸と平行して増減することからもうかがわれる。

アモバルビタール投与動物における各種物質の濃度は第1表にしめしたように、安静動物に比しグルコースは194％と著明に増加し、乳酸54％、リンゴ酸50％と著

［第3表］ 各種物質の比放射能比（グルコース基準）

	Lactate	Glutamate	Glutamine	Citrate	Succinate	Malate
Normal 10'	37.8	15.9	7.8	21.9	13.3	15.5
Normal 15'	41.5	28.1	16.3	26.9	23.5	25.9
Amobarbital	18.5	1.58	1.00	3.93	1.57	1.63
Insulin	11.9	8.91	4.63	10.5	7.92	8.91
Pyrithioxine	60.0	48.0	33.1	43.2	39.5	42.9

(Specific activity of each compound / Specific activity of Glucose × 100)

明に減少している。またグルタミン酸、クエン酸、コハク酸も減少している。この所見はコハク酸の減少を除き、Goldberg ら[2]の報告およびこれまでの報告と一致する。たゞコハク酸については、Goldberg らは変化がないとし、呼吸系調節部位の討議の論拠としている。しかしわれわれの定量では明らかに低下がある。この場合の比放射能は、第2表にしめしたように、グルコースでは増加し、乳酸では約½に減少している。さらに特徴的なのは、TCAサイクル中間物質およびグルタミン酸、グルタミンの比放射能の著明な低下である。第3表によって、グルコースに対するR.S.Aとして比較するとコハク酸、リンゴ酸、グルタミンでは安静時の6～7％、グルタミン酸は約10％、クエン酸は約15％となる。これら物質の比放射能のこのような著明な低下は、濃度を測定するのみでは予想しえないものである。またTCAサイクル中間物質中コハク酸、リンゴ酸に比しクエン酸の比放射能の低下が少ないが、これはTCAサイクルの代謝回転が著しく低下しているため、注射15分後にも"cold"グルタミン酸による^{14}Cの希釈が多いことによると推定される。呼吸系中間物質に比し乳酸の比放射能の低下は少ない。これは呼吸系の代謝回転の低下に比し、解糖系の代謝回転の低下が少ないことを意味する。またグルコースについてみると、脳内濃度が増加し、利用が低下しているにも拘らず、比放射能が増加しており、グルコースの脳内へのtransportの増加を示唆しているといえよう。

インシュリン投与動物では、第1表にみる如くグルコース、乳酸、リンゴ酸の濃度が、それぞれ安静動物の35％　42％、55％であり著明に低下している。クエン酸、コハク酸、グルタミン酸も低下する傾向をしめしている。この場合の比放射能は第2表にしめすようにグルコースで著明に増加している。これは血中グルコース濃度の低下によるものと考えられる。他の物質の比放射能は、第3表にしめすように、グルコースを基準にしたR.S.Aでみるといずれも著明に低下している。特に乳酸の低下は著しい。このような低下は、解糖呼吸系全般の代謝回転の低下をしめすものであり、血中からのグルコース供給の低下にもとづくものと考えられる。

ピリチオキシン投与動物。この実験は、TCAサイクルの代謝回転が増加する状態を検討するためにおこなった。TCAサイクルの代謝回転を増加させるものとしては、高体温状態が知られているが、われわれは現在のところこの実験に成功していないため、^{14}C-グルコースから脳への^{14}Cのとりこみを増加させるといわれているピリチオキシンを用いた。第1表にしめしたように、われわれの測定した限りの物質濃度には変化がみられなかった。この場合の比放射能は、第2表にしめしたようにグルコースでは安静時と変化なく、他の物質では有意に増加した。したがって、グルコースを基準としたR.S.A（第3表）では、1.5～2倍と著明に増加している。これらの結果を総合的に考えるならば、物質濃度の大きな変化なしに代謝回転が変化している。こうした現象は各種の脳機能変化のさいにも起りうると考えられ、これら機能変化と脳代謝の関連を追求する際に物質濃度のみを測定するのでは不充分であることを示唆していると考えられる。

[文　献]

(1) 成瀬、永山、小松、佐々木、宮本：神経化学 7 Suppl. 166. 1968
(2) N.D.Goldberg, J.V.Passonneau, O.H.Lowry: J.Biol Chem. 241 3997, 1966

32. 密度勾配遠沈法による白鼠大脳皮質からの分離細胞群の生化学的研究

永田　豊・御子柴克彦・塚田裕三
（慶大・医・生理）

従来脳の生化学的研究の多くは、脳全体を材料としておこなわれてきた。しかし脳組織にはその活動の主役を演ずる神経細胞のみならず、その周囲をぎっしりとグリア細胞が、とり囲んで居り、決して、均一な細胞群の集まりではない。したがってこの様な異なった種類の細胞がいろいろな割合で混りあった組織全体について行われた生化学的分析は、当然、脳全体の平均的な値を示すものにすぎない。そこで脳からその構成成分である神経細胞とグリア細胞とを別々になるべく傷つけない形で取り出して、その生化学的特徴を調べることによって、脳の機能の物質的背景を明らかにすることは、神経化学の重要な課題の一つである。

既知の生化学的方法を使用するためには、比較的大量の神経細胞あるいはグリア細胞群を集めることが必要である。既にRose[1], Satake[2][3] Hamburger[4], Norton[5]らによってmeshによる細胞沪過とsucroseやFicollによる密度勾配遠沈法を組合わせて、脳細胞の分離がおこなわれている。我々は、これらの方法を更に改良して新鮮白鼠脳よりニューロンおよびグリア細胞を多く含む分画を得ることができた。ここではニューロンおよびグリア細胞分画の分離の方法を形態学的のみならず、生化学的にも検討し、更に各分画のアミノ酸、蛋白質について分析をおこなった。

実験方法

成熟白鼠をエーテル麻酔下に心臓より生食水にて脳を灌流血液を除いたのち断頭し脳を剔出して、軟脳膜を細いピンセットできれいに除去する。カミソリの刃で脳皮質部分をとり細切し、冷した10% Ficoll (100mM-KCl, 10mM-燐酸緩衝液を含む)に浮遊させる。これを我々の考案した細胞沪過装置で、ガラス円筒(シリンジ)の基底部に装着したナイロン網……開口740μ, 430μ, 193μ, 106μおよび55μの順番で……を順次ゆっくり一定速度で加圧しながら低温下で沪過する。この細胞懸濁液を等量の30% Ficoll溶液を加えて20%懸濁液とし、これを30% Ficoll-1M sucrose溶液と30% Ficoll液との連続密度勾配をつくった液層上に重ね、更に15% Ficollおよび10% Ficoll（以上いずれもそれぞれ100mM-KCl, 10mM燐酸緩衝液 pH 7.4 を含む）を重層して、SW-25ローターで20,000 rpm/90分遠沈をおこなう。遠心分離された各層の細胞は、通常酢酸オルセインで染色後顕微鏡下で形態学的検索をおこなった。主として各濃度のFicoll溶液境界部に層状に集まった細胞群は、それぞれ0.32M-sucrose-2% Ficoll, 10mM-燐酸緩衝溶液中で釈して、7,000 rpm/15分遠沈して管底にpelletとして集め、これを生化学的分析ならびに電顕試料に供した。蛋白定量はLowryらの方法[6] RNA定量はOrcinol法[7] DNA定量はBurton法[8]で、また2', 3' cyclic nucleotide phosphohydrolase活性の測定は栗原らの方法[9]でおこなった。細胞内カリウムの測定は細胞群を2%イヌリンでincubation後、組織内イヌリンを定量して[10]細胞外および細胞内水分を計算し、乾燥組織より0.1N-HNO_3で抽出したK溶液をエルマ超微量炎光光度計で定量して算出した。酸素消費は、微小chamberに装着した酸素電極を用いて

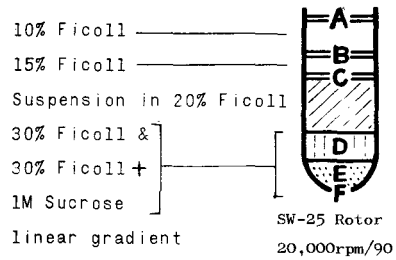
測定した。各成分の遊離アミノ酸は、エタノール除蛋白、脱塩[11]後微小型アミノ酸自動分析[12]で定量した。S-100抗体はDr. Levinから供与されたものを、脳ミクロソーム抗体は野口ら[13]のものを使用し、寒天ゲル内沈降反応はOuchterlonyの原法[14]に従った。

実験結果および考察

1. 細胞分離法の検討

細切した白鼠大脳皮質を10% Ficoll液に懸濁し、種々の大きさのナイロン網を粗いものから細いものへと順次通過させて、細胞を分離を行う過程で充分分離されない細胞塊はナイロンの網目を通過せず網の上に残るが、通過した細胞群は大部分のdendriteやaxon等の突起はちぎられてしまう。この種々の細胞の混りあった懸濁浮液(G)を前述のFicoll-sucrose密度勾配遠沈法によって比重差による細胞群の分離をおこなうと、最上層(A)には比重の軽い充分剥離されない細胞群やミエリンが浮遊し、10%と15% Ficoll液の境界面(B)には主としてミエリンやグリア細胞群、毛細血管内皮細胞などがみられる。その下の15%と20% Ficoll液との境界面(C)には、殆んど小型の核をもち細胞質の少いグリア細胞群がみられ、30% Ficoll 1M sucrose液と30% Ficoll液の連続密度勾配液層の上層部(D)は主として核小体のある大きな核をもちニッスル小体のみえる、細胞突起も不完全ながら保たれている神経細胞体が多数認められる。更にその下層(E)は細胞膜が壊われて核が露出したニューロンやグリアなどが主として認められ、最下層堆底(F)には核がpelletとして集められる(図1.および表1)然しながら、(C)および(D)分画の電顕像では細胞膜の存在は、殆んど認められず、核の周囲に細胞質が附着している像が多数認められる。各層の蛋白および核酸分布は表2の如くで、蛋白の90%以上は上部の(A)(B)層に存在するが、DNAおよびRNAは、その下の(C)(D)(E)(F)の各層にみられる。RNA/DNA比は(C)(D)層では一応1.5~2.0の間にあり、細胞質成分が核と共に比較的intactな細胞の比率で存在することが示された。またミエリンのmarker enzymeといわれる2'3'環状ヌクレオチド水解酵素活性は大部分上部の(A)(B)(C)層に強く、下層の(D)(E)(F)層には殆んど見出されなかった。(C)および(D)分画の細胞浮遊液を0.1%ブドウ糖を含むKrebs-Ringer中で37°Cでincubateした場合、細胞内[K^+]は時間とともに急速に取り込まれ蓄積するが(図2),

Fig.1



Tab.1 DISTRIBUTION OF CELLS IN ISOLATED CELL SUSPENSIONS OF RAT CEREBRAL CORTEX

	Neuronal	Glial	Nuclear	Capillary Endothel
A (Undisrupted Cells Myelin, etc.)	++	++		+++
B (Myelin, Glial Cells, etc.)	+	+++		++
C (Glial Cells)	−	+++		±
D (Neuronal Cells)	+++	+	+	±
E (Disrupted Neuronal, Nuclear)	+	±	++	+
F (Nuclear, Disrupted Cells)	−	−	+++	±
Original Cell Suspension	++	++	+	++

15分をすぎると次第に低下の方向に向う。低温(0°C)でincubationをおこなうとK⁺の取り込みは全くみられなかったことから、大部分の細胞突起は切断され、細胞膜の存在は殆んど認められない標本ではあるが、K⁺を或程度能動的に蓄積する能力をもつ細胞が存在することが示された。また(C)および(D)分画は少ないながらも脳切片の1/5程度の酸素消費能(ブドウ糖基質)を示すことからも、細胞内呼吸系の各酵素の働きが保持されていることが推定される(表3)。

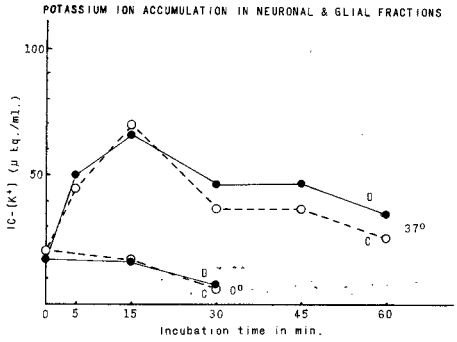
Tab.2 PROTEIN, DNA, RNA & CN-PHOSPHOHYDROLASE IN CELL FRACTIONS FROM RAT BRAIN CORTEX

Layers	Protein(%)	DNA (μg/mg-prot.)	RNA (μg/mg-prot.)	RNA/DNA Ratio	CN-P-Hydrolase (U./mg-prot.)
A	87.0	0.31	1.14	3.67	1.92, 2.07
B	10.9	0.36	1.64	4.55	3.97, 4.27
C	0.2	15.82	25.00	1.58	2.11, 3.04
D	0.6	25.95	43.27	1.67	0.21, 0.18
E	0.9	53.15	45.89	0.86	0.19, 0.19
F	0.3	85.51	41.03	0.48	0.09, 0.16
Original Cell Suspension		2.23	5.86	2.65	1.97, 1.89

2. 遊離アミノ酸分布

沪過と密度勾配遠沈法によって得られたglia richおよびneuron richな分画は、遊離アミノ酸の量は全脳の場合に比べて、その分離精製過程で1/3~1/5に減少する。しかし含まれる主な遊離アミノ酸はやはりグルタミン酸、アスパラギン酸、GABAおよびグリシン、アラニンで、その分布比率は余り変らない。一般にneuron分画の方がglia分画より各アミノ酸含量が多い様にみえるが有意の差とは考えられない(表4)。

Fig.2



Tab.3

OXYGEN CONSUMPTION IN ISOLATED CELL FRACTIONS FROM RAT CEREBRAL CORTEX

Layers	O_2 Uptake (mumoles/mg-protein/hr.)
A	96.2
B	92.9
C	160.6
D	134.4
E	119.7
F	88.8
Original Cell Suspension	178.7
Cortex Slice	703.8

3. 蛋白質の免疫化学的分析

図3に示される様に、寒天ゲル沈降法で、S-100抗体は(A)(B)(C)分画の蛋白と一本の明瞭な沈降線を示すが(D)とは極めて弱い線の痕跡がみられる程度で、(F)とは全く反応を示さなかった。このことは、神経系特異蛋白であるS-100蛋白がグリア細胞成分に由来していると主張するHydénら[15]あるいはPerezら[16]の意見とも一致するものである。また脳ミクロソーム特異性蛋白の抗体は、(A)(B)分画とのみ強い沈降線を示すことから細胞膜成分は主として(A)(B)分画に集められていることが考えられる。

まとめ

Tab.4 FREE AMINO ACID DISTRIBUTION IN ISOLATED BRAIN CELL FRACTIONS

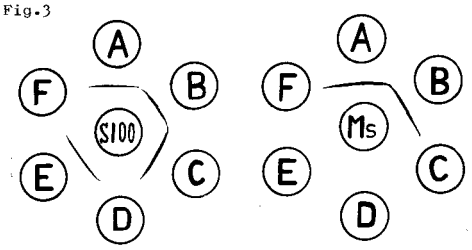
(mμ moles/mg-protein)

	Aspartate	Glutamate	Glycine	Alanine	GABA
C (glial fraction)	5.76 ± 2.61 (5)	20.6 ± 12.1 (5)	3.27 ± 1.66 (5)	2.15 ± 1.15 (5)	4.15 ± 2.36 (5)
D (neuronal fraction)	4.08 ± 1.77 (5)	29.8 ± 11.5 (5)	6.52 ± 2.55 (5)	3.57 ± 1.55 (5)	7.06 ± 2.19 (5)
G (mixed cell suspension)	24.3 ± 5.18 (3)	53.2 ± 3.17 (3)	6.23 ± 1.64 (3)	3.37 ± 1.21 (3)	21.9 ± 1.59 (3)
Whole brain	30.21	79.98	12.06	8.22	29.22

Amino acids were determined by automatic amino acid analyser. Mean ± S.D., Number of experments in brackets.

白鼠大脳皮質より沪過と密度勾配遠沈法によってneuron richおよびglia rich分画を得た。これら細胞群は、細胞内にK⁺を取り込み酸素消費を示し、遊離アミノ酸を保持するが両者の間に質的差異は示されなかった。ただS-100蛋白は主としてグリア成分に存在することが確かめられた。この様にして得られたニューロンとグリアの化学組成あるいは代謝系などに有意の差が見出しにくい事は、両者が本質的には同一起源を有するものである為なのか、あるいは脳細胞分離方法の限界によるものなのか、今後方法の改善とともに明らかにされるべき課題であろう。

Fig.3



S-100 : anti-S-100 Protein Serum

Ms : anti-Brain-Microsome-Serum

(光顕像ならびに電顕像は当日供覧する)。

文献

1) Rose, S.P.R. (1967) Biochem. J. 102, 33
2) Satake, M. and Abe, S. (1966) J. Biochem. (Tokyo) 59, 72
3) Satake, M., Hasegawa, S.-I., Abe, S. and Tanaka, R. (1968) Brain Res. 11, 246
4) Blomstrand, C. and Hamburger, A. (1969) J. Neurochem. 16, 1401
5) Norton, T.W. and Poduslo, S.E. (1970) Science, 167, 1144
6) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 256
7) Majbaum, W. (1939) Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem. 258, 117
8) Burton, J. (1956) Biochem. J. 62, 315
9) Kurihara, T. and Tsukada, Y. (1967) J. Neurochem. 14, 1167
10) Higashi, A. and Peters, A. (1950) J. Lab. Clin. Med. 35, 476
11) Winzler, R.J., Moldave, K., Rafelson Jr., M.E. and Pearson, H.E. (1952) J. biol. Chem. 199, 485
12) Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S. (1958) Anal. Chem. 30, 1190
13) 野口, 野村, 塚田, (1967)神経化学 6, Suppl. 90
14) Ouchterlony, O. (1958) Prog. Allerg. 5, 1
15) Hydén, H. and McEwen, B.W. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 55, 354
16) Perez, V.J., Olney, J.W., Cicero, T.J., Moore, B.W. and Bahn, B.A. (1970) J. Neurochem. 17, 511

33. 標準灌流および血流障害時の〔U-^{14}C〕-アラニンの脳代謝

渡辺昌祐・鈴木常夫・光信克甫
河野沢与・井口欽也・三宮崇典
大月三郎　（岡大・医・精神）

脳灌流法を用いて、血液中に〔U-^{14}C〕グルコースを加え、その脳内のグルコース代謝中間産物への移行度を測定すると、脳の機能が高い程クエン酸サイクル関連アミノ酸への移行度が高く、脳の機能低下に伴って減少することが明らかになったが、アラニンは乳酸、GABAと共に低機能状態で、脳内濃度が増加し、比較的比放射能も上昇することが明らかになった[9]。低機能のある段階では酸化過程の障害が著しくなり、乳酸による処理機構が飽和された段階で、グルコースからアラニンへのnet flowが増加するものと考えられる。

この様に脳の機能に著しく影響されやすいアラニンの代謝をさらに検討するために、人工血液中に〔U-^{14}C〕アラニンを加え、可逆的な低機能状態を得るために、血流を約半分に低下させた状態で脳を灌流し、標準灌流における脳のアラニン代謝と比較した。

実験方法

1)体重2.5Kg前後の成猫を用い、脳灌流法はGeigerの原法[3]を改良した方法[5]を用いた。

2)灌流人工血液3000mlにL-〔U-^{14}C〕アラニン50μCを、20mg/lのL-アラニンと共に加えて灌流し、実験開始30分頃、灌流脳機能が高機能あるいは中等機能を経過することを確かめた上で、脳血流量を約40～55%減少させさらに40分間灌流を続けた。この間、脳血流量の低下と共に、脳波は速やかに平坦化し、低機能状態になった。

実験開始約70分で脳を摘出し、脳のアミノ酸、グルコース、乳酸、呼吸炭酸ガスへの放射能の移行を測定した。本編には、血流低下灌流3例と標準灌流3例をまとめた。

脳標本の分析、測定方法

1)グルコースはSomogyi法[8]による除蛋白液をDowex 50×4 H^+カラムを通しその水溶出液をDowex 2×8 OH^-カラムに添加し、その水溶出分画をグルコース分画としてSaifer & Gerstenfeldの Glucose Oxidase法[6]により測定し、又放射能の測定にも用いた。

2)乳酸量の測定には、脳の5%トリクロール酢酸(TCA)除蛋白液を用い、Barker & Summerson法[1]によった。乳酸の放射能測定には上記TCA上清のDowex 50×4 H^+カラムによる水溶出液をDowex 1×8酢酸カラムを通し、水溶出分画を除去した後、2N酢酸による溶出分画を乳酸分画として測定した。

3)遊離アミノ酸の分離、定量及び放射能測定方法：脳及び血清の5%TCA上清のDowex 50×4 H^+カラムによる水溶出分画を除去した後、4Nアンモニア水により溶出するアミノ酸分画をアンモニア除去後、柳本LC4型アミノ酸自動分析装置を用いてAmberlite CG-120 0.9×100cmカラムにより、pH 2.86, 0.3Nクエン酸リチウム緩衝液で分離定量した((2)の変法)。GABAはAmberlite CG 120 0.9×30cmカラムによりpH 4.15、0.5Nクエン酸リチウム緩衝液で分離定量した。放射能測定には、アミノ酸自動分析装置に連結した島津製フロー・ディテクターを用いた。呼吸炭酸ガスの測定は既述の方法によった[5]。各試料の放射能は、disintegration per minute(dpm)として現わした。脳内のアラニン中間代謝物質の比放射能(SA)はdpm/μmoleとして現わした。

実験結果及び考察

①血液アラニンと脳アラニンの交換(表1)

脳動静脈血中のアラニン濃度に有意の差は認められなかった。しかしアラニンのdpm/mlを比較すると標準灌流、血流障害共に、静脈血アラニンのdpm/mlが動脈血のそれより下廻っており、標準灌流で約87%、血流障害では約71%であった。この両者から、アラニンは血液、脳の間でexchangeをしていることが明らかである。灌流70分の時点で、動静脈アラニン濃度差(d)、動脈血中アラニン放射能量(A)、静脈血アラニン放射能量(V)、動脈血アラニンの比放射能(a)と、脳アラニンの比放射能(b)から、次の式により、脳から静脈血へのアラニン排出量(Efflux:E)と、動脈血アラニンの脳への移行量(Influx:I)をチロシンの場合[7]と同様の方法で計算した。

表1 血液アラニンと脳アラニンの交換

	標準灌流	血流障害
動脈血アラニン量(μmole/ml)	0.329±0.054	0.341±0.029
静脈血アラニン量(μmole/ml)	0.343±0.084	0.334±0.043
動脈血アラニンの放射能(dpm/ml):A	60387± 893	61320±2988
静脈血アラニンの放射能(dpm/ml):V	52680±5461	43610±7543
(V/A)×100(%)	87.2	71.1
動脈血アラニンの脳へのinflux*	0.116±0.017	
脳内アラニンの静脈血へのefflux* (μmole/g brain/min)	0.134±0.054	

* 計算値(本文参照)

$$\begin{cases} A - aI + bE = V \\ I = E + d \end{cases}$$

標準灌流の場合、血液アラニンの脳移行量は、0.116±0.017 μmole/g brain/min.で、脳から血液へのアラニン排出量は0.134±0.054で、両者には有意の差は認められなかった。この結果を、血液チロシンのそれ[7]と比較すると、Influx、Efflux共に約3倍であり、又グルタミン酸の場合の0.01 μmole/g brain/min.[4]よりも約10倍高い値であり、アラニンは脳ではexchange rateの高いアミノ酸であると云うことが出来る。

②脳内アラニンの血液アラニンに対する比較的比放射能(RSA)(表2)

血液アラニンの比放射能に対する脳遊離アラニンの比放射能の割合を%で示した。標準灌流では4.77±1.16%に対し、血流障害では3.21±1.27%であり、後者が幾分低下する傾向にあったが、有意の差はなかった。我々は灌流血液中に[U-^{14}C]グルタミン酸を加えて脳内へのとり込みをみたが、その場合RSAは灌流時間60へ90分で、0.58±0.089%であった[4]。[U-^{14}C]アラニンのRSAはこれのほぼ5へ8倍に達している。チロシンの場合は、52%程度であり[7]、アラニンやグルタミン酸よりはるかに高い値である。脳にとってチロシンは必須アミノ酸であることは既に示した[7]が、脳内アラニンの血液アラニン依存度はチロシンの場合のそれよりはるかに低い。しかしグルタミン酸の場合よりも高い。

表2 脳内アラニンの血液アラニンに対する比較的比放射能

標準灌流	血流障害
4.77±1.16	3.21±1.27

$$RSA = \frac{dpm/\mu mole\ of\ Brain\ Alanine}{dpm/\mu mole\ of\ Plasma\ Alanine} \times 100\ (\%)$$

③脳内物質の含有量の変化について(表3)

標準灌流と血流障害について比較すると、血流障害で乳酸量の著しい増加のみら

れることは、〔U-^{14}C〕グルコースの実験で既に発表した[9]が、同一の結果が得られた。アスパラギン酸、GABA も血流障害で増加傾向がみられた。又アラニンの脳内含有量は血流障害で増加しており、標準灌流の機能状態の低下する際にも増加する[9]事実とともに、興味のある所見である。

④脳内物質中の^{14}C 分布 (表4)

血液〔U-^{14}C〕アラニンから脳に侵入した^{14}C の分布を脳酸可溶性分画の放射能に対する%として示した。

グルタミン酸の占める割合は、標準灌流で28.7%であるが、血流障害では17.0%と減少していた。血流障害では乳酸の放射能が著明に増加していた (9.6→23.7%)。その他のアミノ酸では有意の差がなかった。〔U-^{14}C〕グルコースを用いた実験で血流障害時、グルコースから乳酸への^{14}C の net flow が増加すると共に、non glucose からの cold carbon の net flow も増加することを示した[9]が、本実験により non glucose carbon の一部がアラニンであることが示された。

表3 各物質の脳内含有量

	標準灌流	血流障害
Glutamate	9.25 ± 0.47	10.07 ± 2.04
Aspartate	1.41 ± 0.15	1.94 ± 0.19 *
Glutamine	3.70 ± 0.47	2.83 ± 0.77
GABA	1.16 ± 0.05	1.55 ± 0.14 *
Alanine	0.42 ± 0.04	1.18 ± 0.03 ***
Lactate	5.70 ± 1.63	14.35 ± 2.48 **

(μmole／g brain)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

アラニンへの^{14}C の分布は、標準灌流、血流障害共にほぼ40%であった。〔U-^{14}C〕チロシンを用いた標準灌流の場合の、脳酸可溶性分画の^{14}C に対する脳チロシンの^{14}C の割合は88%であり[17]、アラニンはチロシンよりも conversion され易いということを示す。又血流障害でアラニン量の増加がみられ、比放射能はむしろ減少している。しかも血液よりのとり込みは増加していない。このことは血液アラニン以外の物質からの脳アラニンの生成が増加することを示している。

表4 脳内物質中の^{14}C 分布

	標準灌流	血流障害
Glutamate	28.7± 6.0	17.0± 2.9 *
Aspartate	5.4± 0.7	4.8± 2.6
Glutamine	5.5± 2.2	4.8± 2.9
GABA	2.6± 1.2	2.6± 1.3
Alanine	38.8± 9.9	38.3± 4.0
Lactate	9.6± 3.3	23.7± 3.5 **
計	90.6	91.2
脳酸可溶性分画	100	100

$$\frac{\text{dpm／g brain of Each Metabolite}}{\text{dpm／g brain of TCA Supernatant of Brain}} \times 100\ (\%)$$

* $p<0.1$, ** $p<0.01$

⑤脳内物質の比放射能(表5)

脳内アミノ酸、乳酸及び炭酸ガスの比放射能を dpm/μmole で示し、標準灌流と血流障害を比較した。血流障害では、グルタミン酸の比放射能の減少がみられ、GABA に増加傾向がみられた。これらの傾向は、〔U-^{14}C〕グルコースを血液中に加えて行った血流障害の脳内物質の比放射能の変化傾向[4]と一致している。

〔U-^{14}C〕グルタミン酸灌流時[4]にみられた、グルタミン酸の比放射能よりグルタミンの比放射能

表5 脳内各物質の比放射能

	標準灌流	血流障害
Glutamate	318.3 ± 11.1	208.8 ± 55.4 *
Aspartate	359.3 ± 45.4	379.8 ± 90.7
Glutamine	189.3 ± 67.8	171.9 ± 143.1
GABA	191.4 ± 57.4	272.1 ± 41.8
Alanine	9538.8 ± 308.7	6443.3 ± 2636.9
Lactate	153.8 ± 4.1	172.4 ± 20.4
Respiratory CO_2	302.5 ± 48.6	253.4 ± 42.5

* $p<0.05$ (dpm／μ mole)

が上廻ると云う、グルタミン酸－グルタミンのコンパートメンテーションの現象は、アラニンラベルの時にはみられなかった。又血流障害でGABAの比放射能がグルタミン酸の比放射能を上廻っており、これは{u-^{14}C}グルコースラベルの血流障害の実験[9]と同様の結果であった。

総括

灌流法を用いて、血液中にL-{u-^{14}C}アラニンを加え、脳への移行、脳内代謝、脳からの排出の状態を検討し、標準灌流と血流障害時を比較した。

①脳動静脈血中のアラニン量には有意の差はないが、脳静脈血中のアラニンの放射能量は動脈血中のそれの70～80%であり、血液－脳間のexchangeのあることが示された。血液アラニンの脳への移行量及び排出量は殆ど等しく、各々0.116±0.017, 0.134±0.054 μmole/g brain/min.であった。

②脳内アラニンの血液アラニンに対する比較的比放射能は、標準灌流では4.77±1.16%であり、血流障害では3.21±1.27%であった。

③血流障害では乳酸量とアラニン量の著明な増加と、GABA及びアスパラギン酸量の増加傾向がみられた。

④血液アラニンからの^{14}Cの脳内分布では、血流障害で乳酸の^{14}Cの著明な増加とグルタミン酸の^{14}Cの減少が認められた。アラニンの^{14}Cは、脳酸可溶性分画の放射能の約40%を占め、標準灌流、血流障害で有意の差はなかった。

⑤血流障害時の各物質の比放射能は、グルタミン酸が減少傾向があり、GABAは増加傾向が認められた。

文献

1) Barker, S.B. and Summerson, W.H., J. biol. Chem., 138,535 (1941).

2) Benson, J.V.Jr., Gordon, M.J. and Patterson, J.A., Analyt. Chem., 18,228 (1967).

3) Geiger, A. and Magnes, J., Amer. J. Physiol., 149,517 (1947).

4) 中島良彦, 神経化学, 6,11 (1967).

5) Otsuki, S., Watanabe, S., Ninomiya, K., Hoaki, T. and Okumura, N., J. Neurochem., 15, 859 (1968).

6) Saifer, A. and Gerstenfeld, S., J. Lab. clin. Med., 51,448 (1958).

7) 三宮崇典, 神経化学, 8, 111 (1969).

8) Somogyi, M., J. biol. Chem., 160, 69 (1945).

9) Watanabe, S., **Otsuki**, S., Mitsunobu, K., Sannomiya, T. and Okumura, N., J. Neurochem., in press.

34. 強制不眠性疲労マウスの脳ホモジエネートの呼吸について

三尾隆弥・倉地　守
（神戸商大・生物）

われわれは，先に，強制不眠性疲労マウスの諸臓器遊離ニンヒドリン陽性物質の変化について[1]報告したが，その際，肝臓に於て還元型グルタチオン(GSH)が激減すること，脳に於てGSH，γ-アミノ酪酸とグルタミン酸が減少することなどについて言及した。以後，強制不眠性疲労マウスの諸臓器の呼吸について，in vitroで研究を進めて来た。周知の如く，呼吸活性の高いホモジエネートを得ることは極めて困難なわざであるが，われわれは，肝臓でその調製法を見出し，強制不眠性疲労で肝臓ホモジエネートの呼吸が激減し，GSHの添加でほぼ対照値に復する[2]ことなどについても報告した。

このホモジエネート調製法を脳に試み，種々検討を重ねた結果，5~6分間の簡単な処理で，再現性高く呼吸活性も高く，しかも卵アルブミン(EA)を加えることによりその活性が持続されるホモジエネートを得ることが出来るようになった。この標品を用いて，強制不眠性疲労並び先の脳内減少物質と呼吸との関係をも調べてみた。

実験方法

実験動物　ICRマウスの5週以上の同性同日出生のものを6~8匹1群として用いた。

強制不眠性疲労法　マウスを回転飼育網カゴ(直径24cm．5mmメッシュ 回転速度10r·p·m)に入れ昼夜連続回転し，強制不眠性疲労に陥ち入らしめた。

ホモジエネート調製法　マウスを-70℃ドライアイスーアセトン中に1秒間投入急冷し，断頭，その脳を摘出する。これが10%になるよう冷懸濁用液(1.5%EA．0.5%牛血清アルブミン(BSA)．3.5%デキストランT-40．55mM KCl．40mMニコチン酸アミド．1mM NAD．1/30 M Na_2HPO_4)を加え，氷上針でほぐし細片化する。これをテフロンホモジエナイザー(クリアランス0.20mm)に移し，22g/cm²加圧し，回転速度150r·p·mで45秒間ホモジエナイズする。

呼吸測定条件　標準ワールブルグ検圧計．37℃，空気中，振盪回数150回/分 ホモジエネート1ml 0.15M基質0.1ml．添加物は，0.05mlで終末濃度が5または10mMになるようにし，2時間以上測定した。

実験結果

1．マウスの週令による脳ホモジエネートの呼吸量

ブドウ糖基質でQ_{O_2}の測定値は，4週で24μl，5週で30μl　6週で30μlであったため強制不眠性疲労実験には5週以上のものを使用した。

2　回転飼育網カゴの回転速度と強制不眠性疲労

回転速度8r·p·m以下の場合，マウスは2週間も生存するものがあり，12r·p·mでは2日間で死亡するため　10r·p·mで固定し，疲労の経日変化を測定した。

3　ホモジエネート調製法の検討

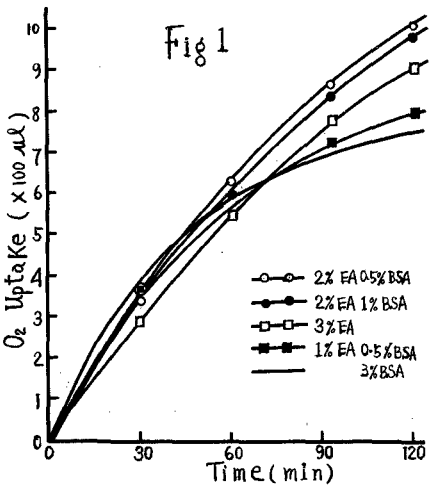
(a)　急冷時間について．-70℃ドライアイスーアセトン中でマウスを8秒間以上急冷した場合，その脳組織が硬化凍結し，頭蓋骨剥離が困難となる上，呼吸活性も顕著に低下する。5·3·1と0秒間の場合の呼吸量を調査したが，1秒間以外は，その偏差が大き

く再現性という点から不適当であることが分った。

(b) 細片化の意義　急冷時間短縮のため，脳内深層冷却不足を補充し，ホモジェナイズの時間短縮，細胞膜損傷防止などを目的として，10秒間柄付針でほぐすだけでよいことが分った。

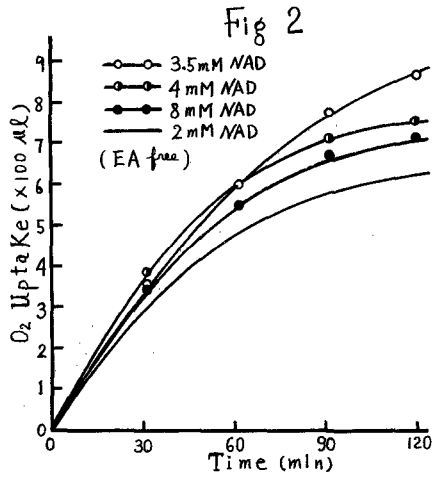
(c) 懸濁用液の改良　切片用燐酸緩衝液を用いて比較検討した結果，いずれもIncubate後30分で呼吸活性の急激な低下がみられ，血清近似のイオン組成のものより脳細胞近似イオン組成のものの方がQO_2は大きかった。

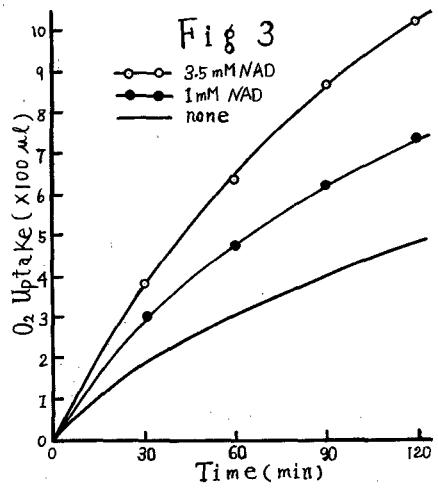
牛血清アルブミンは，初発10分間値を増加させるが，図1に示す通り，急激な活性低下を防止し得なかった。またpH低下は可成り防止し得ることも分った。



卵アルブミンは，初発を高めないが，活性持続効果がある。しかし長時間の振盪では，pH低下と重なり凝集を誘発し，活性低下をもたらす。

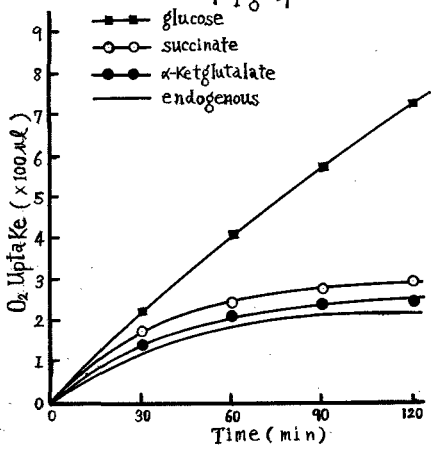
NADの量は，図2と3に示すように4mMまで濃度に比例し呼吸量が増加した。1mMは，その中間値である。この濃度は液状脳と対照との差を鋭敏に呼吸に反映した。その差は，NADの過剰も皆無も共に僅少であった。なお，NADの主・側室よりの添加は，その効果を減少させた。





(d) ホモジェナイザーのクリアランス　クリアランス 0.15mm以下，0.25mm以上では，呼吸量が激減する。また，テフロン攪拌子は，その形が丸型では測定値の偏差が大きく使用に耐えなく，筒型が適する。また加圧条件は，出来るだけ人力を排除して，再現性を高めることを目的として考えたもので，最初の30秒間は外管の回転を止めるためにのみ人力を用いた。攪拌子の回転数は，200 r.p.m以上では，呼吸活性を低下させた。

4　各基質による呼吸



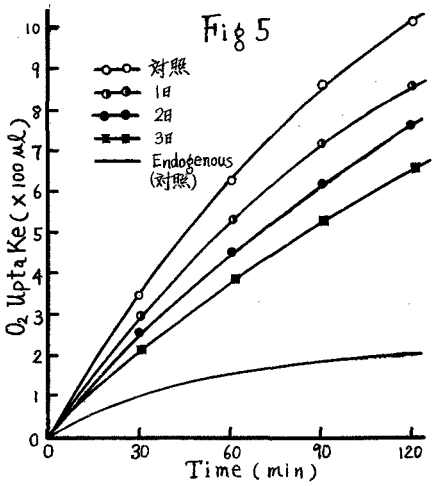


図4に示すように，正常マウス脳ホモジェネートの呼吸には，ブドウ糖が最も有効な基質である。肝臓ホモジェネートの呼吸に比較して，なんらかの代謝的特性の存在を示唆するものと考えられる。

5　正常脳の呼吸

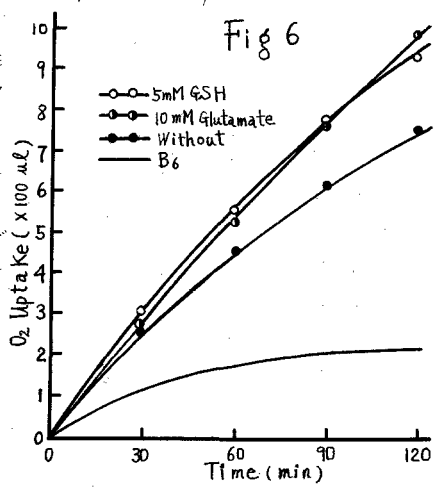
飼育室中の正常マウスと停止した回転飼育網カゴ中のもの(これを対照とする)との脳ホモジェネートの呼吸を比較すると前者は低値で，また午前は午後より低値であった。

6　強制不眠性疲労脳ホモジェネートの呼吸

1mM NADレベルで，対照に比較して強制不眠性疲労脳の呼吸は減少した。図5にその低下と疲労日数との関係を示す。

7　強制不眠性疲労脳ホモジェネートに対する脳内減少物質の添加効果

図6に示すように，GSHは呼吸活性持続効果が認められた。L-グルタミン酸もGSHより低度の持続効果が遅れて現われた。また比較のためビタミンB群を添加してその影響を調べると，B_1はGSH様活性持続効果がNAD量に依存して現われ，B_6は顕著な抑制効果が見られた。



結論

脳切片は，その生理的機能が保持されているがゆえに，古くから種々の研究に用いられてきた。しかし，小動物脳の研究には不適当である。そこで切片に代るものとして，ホモジェネートを取り上げ，その調製法を改良し，代謝調節能を有するものを期した。

対照脳ホモジェネートの呼吸が，ブドウ糖基質でQ_{O_2}=30ul/mg/hrとほぼin vivoに近い値を示し，その活性も安定性があるものが得られたことは，今後この領域の研究に何らかの手掛りを与えるものと考えられる。

また、強制不眠性疲労脳ホモジェネートの呼吸低下という事実は、他の刺激伝達物質の増減と関連させた上でその機構解明の動機を提起すると共に、中枢性疲労の一面を示すものと考えられる。

1) 倉地・三尾：日農化講演要旨集．107,(1968)
2) 倉地・三尾：日農化講演要旨集．176,(1970)

35. 脳腫瘍の組織呼吸ならびに蛋白代謝

中沢省三・平岩奈美子・宮沢　登
駒井裕一・小林啓志・植木幸明
（新大・脳研・脳外科）

人脳腫瘍は，組織学的に極めて多彩であり，且つ新鮮な腫瘍組織自体の採集が甚だ困難である為に，酵素学的レベルに於ける生化学的研究は極めてすくなく，極く限られた数の論文を散見するに過ぎない。[1)2)3)] 吾々は手術により剔出した人脳腫瘍組織を，組織呼吸及び蛋白代謝の面より検索し，興味ある知見を得たので発表する。

実験方法

手術により剔出した脳腫瘍組織を，可及的速かに氷冷下に移し，氷室内にて切片を作成し，standard manometric techinique による腫瘍組織の酸素消費量を測定し，同時に C^{14} アミノ酸添加による腫瘍組織蛋白への incorporation を測定した。反応溶液は Krebs-Ringer 燐酸緩衝液（PH 7.4）を用い，基質として終濃度 10 mM の glucose を使用した。カリウム効果は，反応溶液の組成を変えず，終濃度 100 mM KCl をこれに加えて実験を行った。[5)]

実験結果及び考按

表1はカリウム効果について，手術時同時に採取した人脳組織と脳腫瘍組織とを比較検討したものである。本実験に用いた腫瘍組織は，astrocytoma 2例 meningoma 2例の計4例である。即ち表1に示す如く，脳腫瘍の組織呼吸は，皮質のそれに比べて極めて低く白質の呼吸にむしろ近い値を示したが，興味ある事には，皮質切片のカリウム効果が 50% にも及ぶ刺激効果を示すのにひきかえ，脳腫瘍組織ではむしろ 50% 近い抑制を示すことである。既に McIlwain[2)] は glioma が電気刺激に対する組織呼吸の response を欠いている事を報告し，これが恐らく in vivo における電位変動の欠損と対応する現象であろうと推論しているが，吾々の例では，高カリウム添加による脳腫瘍組織呼吸の response の欠損ではなく，むしろ著明な抑制をみた事実は強調されなければならない。これに対する明確な解答は未だ得られていないが，恐らく，高カリウム添加による組織の ATP level の減少が関与しているのではなかろうか。

次に [U-^{14}C] leucine の脳腫瘍組織への uptake を測定したところ，人脳皮質の約2/3の値が得られ，皮質に比べてかなり低い事が分った。又 [U-^{14}C] leucine の蛋白質分画への incorporation は，脳腫瘍組織で非常に高い値が得られており，皮質に比べ，その uptake の低値にかかわらず，腫瘍組織には活発な蛋白の更新のある事が分った。

次いで [U-^{14}C] leucine の蛋白への incorporation に及ぼす高カリウム添加の影響を，人脳皮質及び脳腫瘍組織で比較検討すると，表2に示すように，100 mM KCl の添加により，大脳皮質の蛋白比放射能は 70% 以上にも及ぶ抑制を示すのにひきかえ，脳腫瘍組織では僅か 20% の抑制をみるに過ぎない。先にも述べた如く，高カリウム添加により，組織の ATP level は著明に減少する事が知られており，この為に [U-^{14}C] leucine の蛋白への incorporation は著明に抑制されると解釈されるが，[4)] 脳腫瘍組織では，たとえ ATP level の低下があっても，蛋白の更新はなほ活発に行われているものと思われ，皮質が代謝とはかかる面からも極めて異なった動態を示すことがわかる。

表 1
Effects of KCl on the rate of O_2 uptake

material	5 mM KCl	105 mM KCl	change(%)
cortex	47.9* (4)	72.2 (4)	+50
white matter	11.4 (3)	11.1 (3)	−3
Brain tumor	9.4 (4)	5.2 (4)	−45

*: O_2 uptake; μ Moles/g. wet wet tissue/hr.

表 2
Effects of KCl on the rate of [U-^{14}C] leucine incorporation into protein

material	5 mM KCl	105 mM KCl	change(%)
cortex	46.8** (3)	11.2 (3)	−73
Brain tumor	265 (4)	208 (4)	−22

** specific activity in protein; cpm/mg protein

表 3
O_2 uptake and [U-^{14}C] leucine incorporation into protein of human meningioma and Neurinoma

NO	patient	tissue	O_2 uptake	Specific activity in protein
1	O.I.	meningothelial	4.3*	114**
2	Y.M.	〃	4.0	131
3	Y.K.	〃	4.3	383
4	K.K.	〃	10.1	339
5	K.K.	〃	14.0	1150
6	O.R.	fibroblastic	13.7	358
7	N.T.	〃	4.2	391
8	T.I.	acoustic Neurinoma	7.2	306
9	H.N.	〃	6.4	558
10	O.K.	〃	7.4	716

*, ** } 同上

次に脳腫瘍組織の酸素消費量及び [U-^{14}C] leucine の蛋白質への incorporation を各腫瘍別に比較検討してみると，表3に示した如く，先ず meningioma では，組織学的にはとも meningothelial meningioma と診断されていても，生化学的活性は極めて variable な事が分った。既に Victor & Wolf[1] も meningioma の代謝が極めて variable な事を指摘し，これがこの腫瘍の構成々分が極めて区々なものより成る為ではないかと述べているが，吾々の data もそれを支持するものである。

Victor & Wolf[1] 及び Weller & Elliott[3] らは，全脳腫瘍中の組織呼吸で，oligodendroglioma が最も高値を示したと報告しているが，吾々の例でも，この腫瘍の O_2 uptake が最も高い値を示した。又興味あることには，臨床的にはかなり良性と目されている acoustic neurinoma の蛋白の比放射能が，他の脳腫瘍に比べてかなり高い値を示す事である。これらは，すべて腫瘍発生の時期及び剔去時間，予後等又同一腫瘍の部位による活性の差等を実体自ら検索の事がなければならないと考えて，臨床的に極めて悪性度の強い metastatic brain tumor や glioblastoma multiforme 及び two cell pattern pinealoma 等が，O_2 uptake の低いのにひきかえ，蛋白の比放射能の割合が非常に高い事が注目される。更に脳腫瘍の診断の下で，開頭術を行ったが，組織像が gliosis であった一例は，先ず酸素消費量も比較的高い値を示し且つ蛋白の比放射能も低い値が得られており，明らかに他の腫瘍組織

とはその動態を異にしていたのは注目に値する。

表 4

O_2 uptake and [U-^{14}C] leucine incorporation into protein of human tumor

NO	patient	tissue	O_2 uptake	Specific activity of protein
1	S. K.	glioblastoma multiforme	6.2 *	424 **
2	Y. I.	"	2.8	272
3	M. K.	medulloblastoma	10.0	365
4	T. Y.	spongioblastoma	8.9	269
5	S. M.	oligodendroglioma	25.5	2610
6	S. T.	gliosis	18.3	155
7	I. H.	metastatic carcinoma	7.5	807
8	I. T.	"	12.2	2599
9	S. T.	two cell pattern pinealoma	21.9	971
10	Y. S.	astrocytoma	7.7	467
11	S. M.	"	7.7	239
12	O. T.	"	6.1	124

* ** } 同上

文 献

1) Victor, J. & Wolf, A. ; Tumors of the nervous system. P. 44. The williams & wilkins Co Baltimor, (1937)

2) Mc Illwain, H. ; Biochemistory and the central nervous system P. 51 Churchill Ltd. London, (1955).

3) Keller, I. H. & Elliott, K. A. C. ; Can. J. Biochem. physiol. 33: 395 (1955)

4) Nakazawa, S. ; Neurology 19: 269 (1969)

5) Nakazawa, S. & Quastel, J. H. ; Can. J. Biochem. 46: [illegible] (19).

36. ラット脳Na^+-K^+ ATPaseに対するGABAの影響

波間美佐子・斉藤章二
（日大・医・薬理）

Na^+-K^+ ATPaseは生体膜に存在し，Na^+・K^+の能動輸送を行っている本体といわれ，数多くの報告がある。また，Na^+-K^+ ATPaseはMg^{++}の存在下で活性化され，とくに脳組織では，g組織あたり最高の活性値が報告されている。ちなみに赤血球の1600倍，心筋の約20倍，腎皮質の約5倍も含まれているといわれている。そしてこの酵素の分布が，Na^+，K^+の交換的能動輸送に多くの動物種においても，器官においても平行していることが報告されている[1]。今回，われわれは動物脳に存在するNa^+-K^+ ATPaseと甲殻類で抑制性の伝達物質であり，おそらく哺乳類の中枢神経系で抑制性の伝達物質の役割を果たしていると思われているγ-アミノ酪酸（GABA）との関係を追求すべく以下に述べるような実験を行った。主として体重200g前後のWistar系雄性ラットを用い，この酵素に対する定量条件などについて吟味し，つぎにラット，モルモット，マウス，ウサギ脳のNa^+-K^+ ATPaseに対するOuabainのKiを求め，さらにラット，モルモットの大脳皮質を用いin vitroにて各濃度のGABAを添加し，Na^+-K^+ ATPase活性への影響をみた。

予備実験

1．ラット脳におけるNa^+-K^+ ATPase活性と反応液のイオン組成

NaCl 140 mM，KCl 14mM，$MgCl_2$ 5mMを用い活性を測定した結果Fig 1に示すとおりNa^+，K^+，Mg^{++}混液mediumのものの酵素活性が高く，Na-K，K-Mg，Na-Mg，Mg，K，Na反応液では低く，またこれらイオンを含まぬものの比活性は低かった（Fig 1）。

2．酵素添加量と酵素活性．

4.25，8.5，17，34，64γ protein/ml mediumについてNa^+-K^+ ATPase活性をみると，34γ protein以下では，ほんど直線関係があるが，それ以上のprotein濃度では曲線となった（Fig 2）。以上の結果からNa^+-K^+ ATPase活性定量には，Fig 3のような条件をもちいた。その反応液を30分間，37°Cで加温し[2]，遊離する無機リンをFiske Subbarow法に準じ，タンパク量はLowry法[3]に準じ測定した。ATPase活性はμmole Pi/mg protein/30 minであらわした。

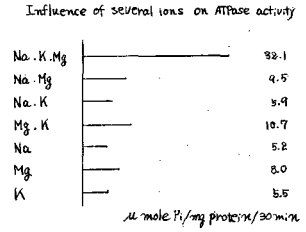


Fig 1

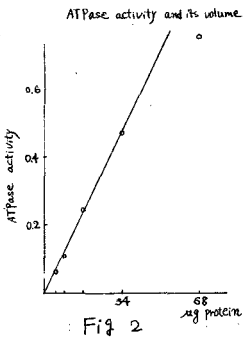


Fig 2

For assay of ATPase activity

reaction mixture	
NaCl	140 mM
KCl	14
$MgCl_2$	5
ATP.2Na	3
Tris-HCl	40

pH 7.7

Fig 3

実験成績

1．ラット全脳および部分脳の日令における酵素活性．

Fig 4にみるように生後18，25日目に高い比活性をみとめ，また，39日目に小さなピークをみとめた（Fig 4）。Samson[4]らは，

発育段階を追って酵素活性をみたところ，20日齢後から酵素活性は一定になったとの報告をしている。しかしわれわれの所見では脳を各部分に分けた場合，全脳の場合と異なり，必ずしも一定ではなかった。

days	8	18	25	32	39	46
Whole brain	9.4	10.5	11.7	9.8	9.4	10.2
cerebrum	8.2	12.8	11.2	10.2	11.5	9.2
messencephalon	10.2	12.2	12.2	9.4	9.1	7.9
diencephalon	5.4	7.7	9.6	7.9	11.3	9.7
Cerebellum	10.2	11.8	12.4	10.4	10.6	12.6

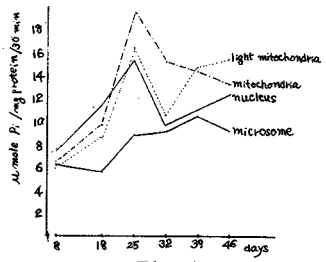
μ mole Pi/mg protein /30 min

2．細胞分画での日令による酵素活性の影響．

ラット皮質を約9倍量の0.32M庶糖[5]でホモジネートし，高速遠心機を用いて分画し日令による酵素活性の変動をみた。その結果，25日目では，100,000×g，60 min で沈殿するミクロゾーム分画を除く3分画では高い酵素活性を示した（Fig 5）。その後，32日目に多少下降し，39，46日目と酵素活性が上昇した。39，46日目では大きな変動はみとめられず，46日目酵素活性を各分画で比較してみると，ライトミトコンドリア分画が，他の分画に比べ，多少酵素活性が高いことがわかった。

days	8	18	25	32	39	46
nucleus	7.6	11.5	15.4	9.7	11.2	12.4
mitochondria	6.5	9.9	19.5	15.4	14.4	13.6
light mitochondria	6.0	8.8	16.7	10.7	14.9	15.6
microsome	6.3	5.8	9.0	9.4	10.6	9.4

μ mole Pi/mg protein /30 min



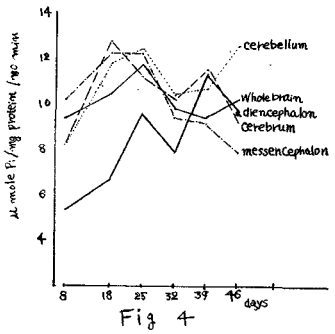


Fig 4

3　heavey microsome について

中尾らのいわゆる heavey microsome[6],[7],[8],[9] 分画を得るため Fig 6 のように，2N NaI，50mM Cystein，0.5mM EDTA，3mM ATP を加えよく混和し，30 min 0°C に保存し，1.5倍の水を加えた。次に 20,000×g，30 min での沈渣を集め，その後 0.5mM EDTA で3回洗い実験に使用した。ちなみにタンパク量で 100 μg/ml 前後とし，この 0.1 ml を Na^+-K^+ ATPase 活性測定に用いた（Fig 6）。

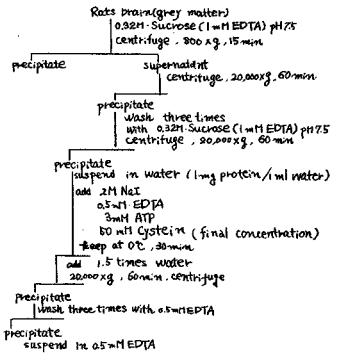


Fig 6

4．20,000×g 分画の電顕像．

20,000×g，30 min で沈渣した heavey microsome をオスミウム固定し，Epon包埋し切片を作製した。また切片は二重染色をした。電顕像には膜成分らしきものと，Synaptic vesicle の混入を認めた。

5．NaI 精製した Na^+-K^+ ATPase の Ouabain に対する Ki

各種動物脳を NaI 精製し，Ouabain（10^{-9}，10^{-7}，10^{-6}，10^{-5}，10^{-3} M）での Na^+-K^+ ATPase における Ki は，ラット皮質 7×10^{-5}～5×10^{-4}M，モルモット 5×10^{-7}～5×10^{-5}M マウス 5×10^{-5}～8×10^{-4}M，ウサギ 1×10^{-6}M であった。そのうち，とくにラット皮質モルモット皮質の Ouabain 曲線をみると，モルモット皮質の方がより Ouabain に対して sensitive である結果を得た。

6．ラット，モルモット大脳皮質，肝臓の Na^+-K^+ ATPase 活性．

Na^+-K^+ ATPase 活性を大脳皮質，肝臓を比較すると，肝臓の酵素は皮質のそれに比べて

約10数分の1であり，ラット，モルモットともに変らなかった。以後の実験には皮質，肝臓の蛋白濃度を一定にして使用した。また皮質では Ouabain 1×10⁻³M にて動物差にそろいきれいな阻害曲線を求めることが出来たが，肝臓の heavey microsome の Ouabain 阻害はみられなかった。

7. GABA 添加時の皮質，肝臓の Na^+-K^+ ATPase への影響

ラット，モルモットの皮質，肝臓の heavey microsome に各濃度の GABA（10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5} M 終濃度）を加えたものと，GABA 無添加時の Na^+-K^+ ATPase 活性への影響をみると，ラット，モルモット皮質では，GABA 無添加の Na^+-K^+ ATPase 活性に比べ数μmole Pi/mg protein/30 min の増加をみとめた（Fig 7. 8）。前述した如く，肝臓での活性は皮質の約10数分の1であるが，Fig 9, 10 に示すように，わずか数値の上昇がみられた。が Na^+-K^+ ATPase 活性が低いためはっきりしない。以上の実験からいえることは μmole Pi/mg protein/30 min の比活性が低いため，果して GABA 添加時 activate されているのか明確ではない。

Influence of several volume of GABA on Na^+-K^+ ATPase activity in rat brain (in vitro)

GABA		
	10^{-10} M	13.12 ± 2.11
	10^{-9}	14.99 ± 1.42
	10^{-7}	14.65 ± 1.36
	10^{-5}	14.72 ± 1.02
no add		11.36 ± 1.51

μmole Pi/mg protein/30 min

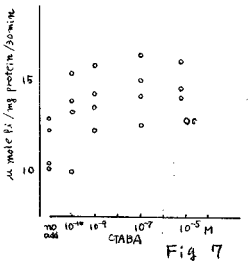


Fig 7

Influence of several volume of GABA on Na^+-K^+ ATPase activity in guinea pig brain (in vitro)

GABA		
	10^{-10} M	15.14 ± 4.78
	10^{-9}	16.20 ± 5.98
	10^{-7}	16.34 ± 5.39
	10^{-5}	15.67 ± 6.69
no add		14.37 ± 4.17

μmole Pi/mg protein/30 min

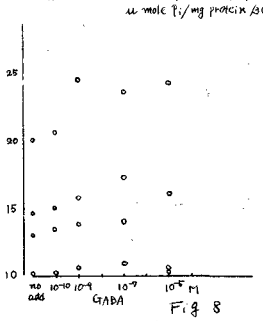


Fig 8

Influence of several volume of GABA on Na^+-K^+ ATPase activity in guinea pig liver (in vitro)

GABA		
	10^{-10} M	0.60 ± 0.21
	10^{-9}	0.63 ± 0.19
	10^{-7}	0.63 ± 0.18
	10^{-5}	0.67 ± 0.24
no add		0.53 ± 0.11

μmole Pi/mg protein/30 min

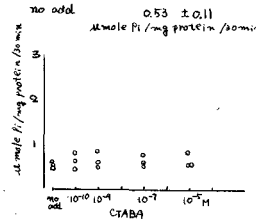


Fig 9

Influence of several volume of GABA on Na^+-K^+ ATPase activity in rat liver (in vitro)

GABA		
	10^{-10} M	1.22 ± 0.19
	10^{-9}	1.31 ± 0.13
	10^{-7}	1.41 ± 0.31
	10^{-5}	1.56 ± 0.12
no add		1.11 ± 0.21

μmole Pi/mg protein/30 min

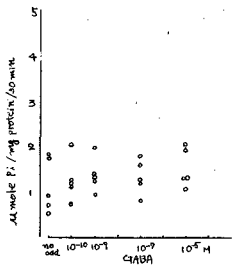


Fig 10

8. DOC, NaI を用いた分画。

分画法は Fig 11 に示したように DOC, NaI を用いて Na^+-K^+ ATPase 活性を4～5倍上昇させ，いくつかの条件を検討し，再度，GABA 各濃度の添加を試みた。GABA 各濃度（10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5} M 終濃度）したものと無添加のものを比較すると，軽度に Na^+-K^+ ATPase 活性を抑えているようであるが著明な変化とは云えず，in vitro の実験から判断出来なかった（Fig 12）。

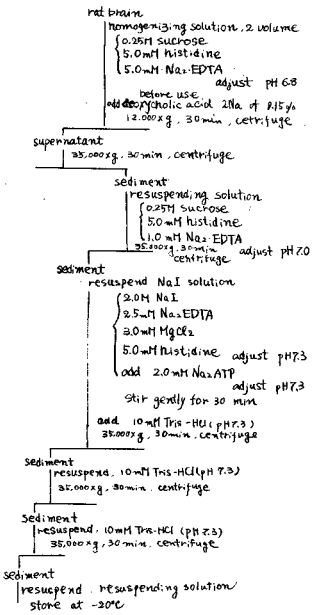


Fig 11

Influence of several volume of GABA on Na^+-K^+ ATPase activity in rat brain (in vitro)

GABA	10^{-10} M	15.3 ± 3.0
	10^{-9}	14.9 ± 3.2
	10^{-7}	15.1 ± 1.9
	10^{-5}	15.6 ± 1.9
no add		16.0 ± 2.4

(mean ± S.D)

μmole Pi/mg protein/10 min

Fig 12

まとめ

われわれは，Na^+-K^+ ATPase 活性と GABA との関係を追求するため，脳各部分を生後日数から活性をみた。その結果 25日目前後脳全活性の上昇をみた。つぎに細胞分画レベルで，生後日数からの変動をみた。46日目ではライトミトコンドリアが他の分画に比べ比活性が高かった。25日目活性の上昇が著明であった。各動物脳を用い K_i を求めると，モルモット皮質が Ouabain により sensitive であることが解った。ラット，モルモット皮質および肝臓に GABA を添加し，添加しない酵素と活性を比較すると，多少活性を上昇させるように思えた。しかしこのような NaI 処理で GABA 添加時，活性が上昇したかにみえるのは，精製度が低いために ATPase そのものの作用ではなく，他の要因によるのではないかと考えられる。そこで単位時間あたりの比活性を上昇させるため，DOC，NaI 両方を使用し比活性を数倍上昇させ，再度 GABA 各濃度を添加した。各濃度で抑制しているかのようにみえるが，著明ではない。むしろあまり影響を受けないようである。

文献

1) S.L. Bonting, L.L. Caravaggio and N.M. Hawkins, Arch. Biochem. Biophys., 98, 413 (1962)
2) Fiske, C.H and Subbarow, Y., J. Biol. Chem, 66, 375 (1925)
3) Lowry, O.H., et al. J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
4) Samson, F.E. Jr. and Quinn, D.J. J. Neurochem., 14, 421~427 (1967)
5) 藤村，塚田 et all., 神経研究の進歩，7，71~79 (1963)
6) Schwartz, A., Bachelard, H.S., et al. Biochem. J., 84, 626 (1962)
7) Nakao, T., et al., Biochem. Biophy. Research. Communs., 13, 444~448 (1963)
8) Nakao. T., et al., Biochem. Biophy. Research. Communs, 19, 755~758 (1965)
9) 大西 顕，生体膜実験技術，227，南江堂 (1967)

37. 脳由来株細胞のビタミンB_{12}関与メチオニン生合成 ーとくにメチル基転換酵素について

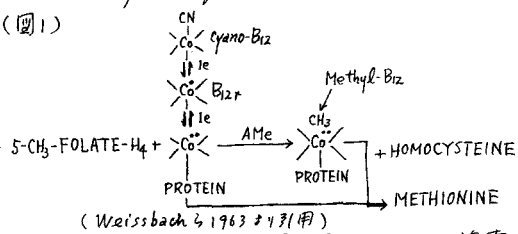
中沢恒幸・吉羽喜久江・高杉　正
（慶大・医・精神）

Mangum ら[1] 1968 はヒト咽頭上皮ガン細胞（HEp-2）を用い培地内 Methionine（Met）を HCySH（Homocysteine）と置換してビタミンB_{12}（B_{12}）を加えると 5-Methyltetrahydropteroyl-glutamate: homocysteine S-methyltransferase（E.C. 2.1.1.13 — 以下 methyltransferase）活性が10～20倍増加し、それは HeLa（ヒト子宮頸癌細胞）、PS（ブタ腎細胞）、HaK（ハムスター腎細胞）、BHK-21（幼若ハムスター腎細胞）などの株細胞にみられないほとんど特異的な現象であることを報じた。しかし中沢ら[2] 1970 は新生ラットネズミ小脳由来株細胞（NTS）を用いた同様の実験で NTS細胞にもB_{12}添加で methyltransferase 活性が約25倍増加し、かつ神経細胞を含む初代培養でも同様の傾向を観察した。

この両者はB_{12}関与 Met 生合成反応の一方は細胞特異性を唱い他はその普遍性を示唆した相反するものであるが、いづれも関与する methyltransferase が誘導か、調節かに触れていない。

従来細胞レベルにおける本反応（図1）は Larrabee[3] 1961, Stravrianopoules ら[4] 1967, Weissbach ら[5] 1963 などにより報告され、また Buchanan ら[6] 1966 により動物肝でも認められている。今回は NTS細胞を用い CH_3-B_{12} を中心に tetrahydropteroylglutamate（N^5-CH_3-THFA）より HCySH へのメチル基転換反応をさらに検索した。

（図1）



（Weissbach ら1963 より引用）

［実験方法］

1. 材料：DD 系新生ラットネズミ小脳より樹立した単層培養株でクローン分離した細胞（NTS株）で使用世代は 161 ～ 164 tissue culture generation のものである。本株の性状は第9回本会で報告した[7]がその後 spontaneous malignant transformation をなしている。[3] また対照の意味で同ラットネズミ小脳の初代培養を使用した。

2. 培地：基礎培地として Eagle MEM 1959 と 10 % 牛血清の混合培地を用いた。この Eagle 培地より Met および Choline を除いた液（MC-def）と、MC-def. に HCySH 0.015 g/l と CH_3-B_{12} を添加した液（HCySH-B_{12}）および MC def に HCySH と Dimethylbenzimidazolyl cobamide coenzyme（DBCC）を添加した液（HCySH-DBCC）を作成した。また一部 CN-B_{12} も用いた。

3. 5-Methyltetrahydropteroyl-glutamate: homocysteine S-methyltransferase の測定：単層培養24～96時間細胞シートを冷機時に剥離し 30 mM リン酸緩衝液（pH 6.5）に浮遊させテフロンガラスホモゲナイザーにて磨砕し 50,000 rpm, 2時間遠心沈澱を行った上清を酵素系とした。反応系には Krebs リン酸緩衝液 10 μl（10 μモル）、HCySH 20 μl（0.1 μモル）、S-Adenocyl-Met 10 μl（0.02 μモル）、NADH 10 μl（0.1 μモル）、N^5-CH_3-THFA 10 μl（0.05 μモル）および酵素系 100 μl を用いた。

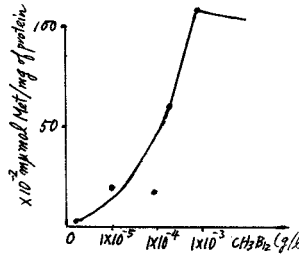
測定は Weissbach ら[5] 1963 の方法を一部変更した。すなわち酵素系を除いた上記試薬を 4°C で混ぜ N_2 ガスで2分間置換し酵素系を添加して封じ 37°C 30分間温置したのち冷水 a5 ml を加え、Dowex 1（Cl^-）カラム（20×5 mm）を通じ Dioxan naphthalene 10 ml をカ

cpmを測定した。すなわち(表示)Met量は N^5-$^{14}CH_3$-THFAより$^{14}CH_3$基がHCySHへとり込まれ$^{14}CH_3$-Metを生成する度合で表わし、Lowry法で測定したたんぱく量mg当りで示した。(アイソトープ比活性より61,000 cpm = 1mμモルMetとした)

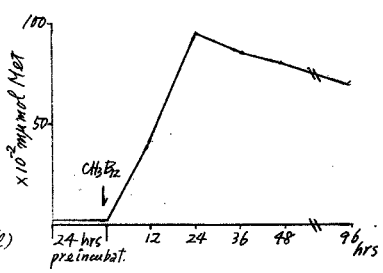
〔実験結果〕

1. B_{12}濃度によるmethyltransferase活性の差とその経時的変動(図2,3)

NTS細胞をEagle MEMにCH_3B_{12} 10^{-3}～10^{-5}g/l添加した培地で72時間温置しそれぞれのmethyltransferase活性を比較すると10^{-3}g/lで高い活性値が示される(図2)。また細胞を24時間Eagle MEMで培養したのちCH_3B_{12} 2×10^{-4}g/lを添加し経時的に追うと図3のごとく24時間温置で活性値が高かった。



(図2) NTS細胞のCH_3B_{12}各濃度によるmethyltransferase活性の比較



(図3) NTS細胞のCH_3B_{12}添加後にみるmethyltransferase活性

2. 各培地における細胞増殖とmethyltransferase活性の比較(表1,2)

各培地における細胞増殖を核数算定法で比較すると表1のごとくMCdef培地では細胞増殖は維持されないこと、これにB_{12}を添加すると細胞増殖は恢復すること、HCySHは細胞増殖にむしろ抑制的に働くことが観察される。

また各培地のmethyltransferase活性は表2のごとくMEM, MC-def両培地で本酵素活性は低く、これらに対しB_{12}添加により、それらは上昇する。かつB_{12}とくにCH_3B_{12}添加による上昇はHCySHの有無に関係せず、また培地中のMetおよびCholineの存在に依存しないことを物語る結果であった。(表3)

HCySH·CH_3B_{12}培地ものぞき他培地で再度比較したが活性値としては偏差が大きく問題があるとしても、各培地間の傾向はほぼ類似していた(表3)。

以上の結果は本酵素活性がHCySHの有無に関係なくB_{12}添加により上昇すること、換言すればじゅうぶんなMetを含む培地でメチルグループ形成に依存しない細

培地(添加)		細胞数/ml 温置時間(37°C) 0	24	48	72
MEM	control	5×10^4	72×10^4	87×10^4	145×10^4
	CH_3B_{12}	5	64	96	165
MC-def	control	5	55	68	—
	CH_3B_{12}	5	75	93	186
	DBCC	5	84	89	211
	HCySH·CH_3B_{12}	5	107	112	106
	HCySH·DBCC	5	105	101	117

(表1) 各培地と細胞増殖

培地(添加)		たんぱく mg/tube	cpm	cpm/mg たんぱく	Met $\times10^{-2}$mμmol
MEM	control	193	156	870	1.33
	DBCC	131	809	6180	10.1
	CH_3B_{12}	148	2542	17100	28.1
	HCySH·CH_3B_{12}	156	2684	17200	28.2
MCdef	control	216	111	513	0.84
	DBCC	148	1011	6830	11.2
	CH_3B_{12}	122	2234	18360	30.0
	HCySH·CH_3B_{12}	95	1470	15500	25.4

(表2) 各培地とmethyltransferase活性の比較
(61,000 cpm/mμmol Met)

培地(添加)		cpm/mg たんぱく	Met $\times10^{-2}$mμmol
MEM	control	1211 ± 318	2.0 ± 0.5
	DBCC	21100 ± 5400	30.2 ± 4.7
	CH_3B_{12}	34450 ± 3450	56.4 ± 5.6
MCdef	control	1640 ± 175	2.7 ± 0.3
	DBCC	14950 ± 1950	24.6 ± 3.3
	CH_3B_{12}	18450 ± 2450	30.2 ± 4.0

(61,000 cpm/mμmol Met)

胞が、なおMet合成力をもっており、それはB_{12}により供給されることを示唆している。

3. 無細胞系およびPuromycin処理によるmethyltransferase活性（表4 図4,5）

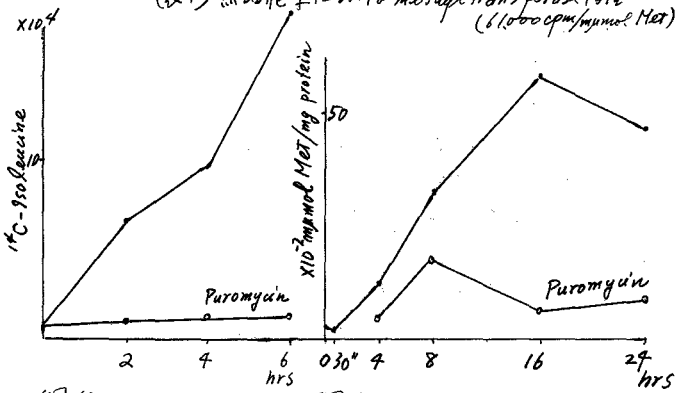
無細胞系における本酵素活性はMEMおよびMCdef両培地ともB_{12}添加によりその上昇をみない（表4）。

培地（添加）		たんぱく μg/tube	cpm	cpm/mg たんぱく	Met $\times10^{-3}$ μmol
MEM	control	180	606	3370	5.52
	DBCC	180	343	1900	3.13
	CH_3B_{12}	180	264	1420	2.34
	HCySH·CH_3B_{12}	193	96	497	0.81
MCdef	control	200	321	1600	2.67
	DBCC	200	263	1260	2.08
	CH_3B_{12}	200	315	1670	2.58
	HCySH·CH_3B_{12}	216	130	600	0.99

（表4）無細胞系におけるmethyltransferase活性（61,000 cpm/μmol Met）

図4はNTS細胞のPuromycinによるたんぱく合成阻害である。67時間NTS細胞シートに^{14}C-Isoleucine 2.5μc/mlを加え経時的に5% TCA, アセトン処理し液体シンチレーションカウンターにてたんぱく分画へのとり込みをPuromycin 10μg/ml添加でしらべるとその阻害は明らかであった。

そこで67時間細胞シートに対照としてCH_3B_{12}を、他方にCH_3B_{12}およびPuromycin 10μg/mlをそれぞれ添加し、その時点を0点として経時的に本酵素活性を追ったのが図5である。Puromycin添加4時間後に差が現われ8時間まで活性上昇をみたが以後低下した。このことは新たに生成される本酵素たんぱくがPuromycinにより阻害されることを物語っている。



（図4）Puromycinによる NTS細胞のたんぱく合成阻害

（図5）NTS細胞のCH_3B_{12}添加培地におけるPuromycinのmethyltransferaseに及ぼす影響

4. 初代培養にみるmethyltransferase活性の比較（表5）

小脳初代培養をNTS細胞と対比する意味で培養72時間、96時間とmethyltransferase活性を比較した。一般に神経細胞の培養には高分子が要求されるため牛血清添加濃度を高め（25%）、また培地交換をおこなわぬなど株細胞の培養条件と同一ではないが表5にみる結果は、B_{12}添加により本酵素活性の上昇を認めていた。このことは本酵素活性は形質転換した腫由来細胞であるNTS株のみでなく神経細胞、グリア細胞を含む細胞集団においてもB_{12}添加により上昇しうることを物語っている。

培地（添加）		Met ($\times10^{-3}$ μmol/mg たんぱく) 72 hrs	96 hrs
MEM		2.9	2.1
MCdef	control	—	7.7
	HCySH	27.0	15.1
	CH_3B_{12}	67.0	44.8
	HCySH·CH_3B_{12}	105.0	54.5
	HCySH·DBCC	54.4	51.8

（61,000 cpm/μmol Met）

（表5）小脳初代培養にみるmethyltransferaseの比較

〔考按とまとめ〕

本報告はあらためてB_{12}における既知の型（CN·B_{12}およびOH·B_{12}）により検討された。CNB_{12}添加による本酵素活性はその立ちあがりが極めて低く（温置16時間で6.0±1.2 $\times10^{-2}$ μmol Met/mg of protein, CH_3B_{12}添加では30.0$\times10^{-2}$を示す）。またOH·B_{12}添加では11

TS細胞に関するかぎり細胞増殖がえられない。この理由は現在のところ追求しえなかったがmethyltransferaseの追求には使用することが望ましいB12であった。

周知のごとくMet合成の最終反応は5-CH3-THFAからHCySHへのメチル基転移であり、この反応に関するmethyltransferaseは細胞にB12を添加することにより活性を上昇させる。本報告に用いたB12濃度はきわめて高いがMonguma[1]1968の報告も4×10⁻⁴g/lを用いておりこのような濃度は細胞培養で実験をする場合にしばしば問題となるところである。

NTS細胞で本酵素活性はCH3·B12添加により上昇され、それはDBCCもしのいでいた。この際無細胞系ではその酵素活性の上昇はなく、またPuromycinで細胞の新たなたんぱく生合成を阻害すると本酵素活性の上昇もおさえられる。このことは細胞のたんぱく生合成による本酵素の誘導がB12によりもたらされることを示唆している。かつ本酵素活性の上昇はNTS細胞よりはるかに脳の諸性状を維持する初代培養の場合にもB12添加により認められた。

［文献］

1. Monguma, J.H. et al: Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 105, 1968.
2. 中沢, 吉羽, 喜秋, 上代: ビタミン 41, 333, 1970.
3. Larrabee, A.R. et al: J. Biol. Chem., 238, 1025, 1963.
4. Stravrianpoules, J. et al: Europ. J. Biochem., 3, 95, 1967.
5. Weissbach, H. et al: J. Biol. Chem., 238, 3318, 1963.
6. Buchanan, J.M. et al: Ann. N.Y. Acad. Sci., 112, 756, 1964.
7. 中沢, 鷲水, 望月, 塚田, 野口, 吉沢: 神経化学 5. Suppl. 64. 1966.
8. 上島, 小宮, 富永: 神経研究進歩 14, 244, 1970.

M E M O

M E M O

M E M O

M E M O

第 13 回　日本神経化学会抄録集

昭和 45 年 10 月 16 日（金）

17 日（土）

於　葦川（いせん）会館　（岡山市）