

γ-アミノ酪酸の代謝に関する研究

第 2 編

てんかん脳切片による ^{14}C -γ-Amino-butyrlic acid の代謝について

岡山大学医学部第 1 (陣内) 外科教室 (指導: 陣内傳之助教授)

医学士 宇野和昌

〔昭和 36 年 12 月 20 日受稿〕

第 1 章 緒言並びに文献

ヒトの正常脳は、部位により多少異なるが、約 40 mg % の γ-アミノ酪酸 (GABA) を含有している。これは脳遊離アミノ酸全体の約 7% に相当し、脳遊離アミノ酸のうちではグルタミン酸、N-アセチルアスパラギン酸に次ぐ値であり¹⁾、このような大量の GABA が脳内に遊離の形で存在しているということは極めて興味深いことである。

さて、我々の教室においては 1952 年以来真正てんかん脳の生化学的研究が続けられており、真正てんかん脳には種々の生化学的変化があることが明らかにされてきた。そのうち今日までの検索の結果、重要と考えられるものは次の 3 つに大別することができる。

- 1) Acetylcholine 代謝系の変化
- 2) Glucose 代謝系の変化
- 3) アミノ酸代謝系の変化

1) に含まれる変化としては、Pope (1947)²⁾ がてんかん脳の focus では cholinesterase (ChE) 活性が亢進していることを見出したのに端を発し、教室の神³⁾ は真正てんかん患者の大脳皮質においても ChE 活性の増加していることを見出し、acetylcholine 代謝の亢進が認められることを指摘した。

2) に含まれる変化としては、教室の山本⁴⁾ は真正てんかん脳では glucose 利用がやや阻害されていることを見出し、教室の山田⁵⁾ は hexokinase 活性が低下していることを、また教室の樋口⁶⁾ は TCA cycle のコハク酸以外の諸 members の酸化能が抑制されていることを明らかにしている。

3) に属する変化としては、教室の井上 (圭) (1952)⁷⁾ が真正てんかん脳では遊離アミノ酸が著

しく減少していると報告しており、最近では教室の国土⁸⁾ は Paperchromatography による定量法で GABA の減少を、また Yamamoto, Mori and Jinnai¹⁾ はイオン交換樹脂法によるアミノ酸分析法で GABA その他のアミノ酸の減少を明らかにしている。

以上が真正てんかん脳にみられる変化の主要であるが、一方、最近になつて Acetylcholine 代謝系、glucose 代謝系に認められる変化の大部分は、実験系に GABA あるいは GABA と代謝的に関連を有するグルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸あるいはアスパラギン等のアミノ酸を添加してやると正常値に回復するという事実を見出した (山口⁹⁾、山本⁴⁾、山田⁵⁾)。そのため現在では、真正てんかん脳の生化学的特徴のうち最も重要なものは、GABA などの遊離アミノ酸が生成され難いため脳遊離アミノ酸が減少していることであつて、そのために ChE 活性の亢進とか、Glucose 代謝系の活性低下などの異常が生じてくるのであろうと考えている (陣内、森¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾)。このさい GABA は、第 1 報¹³⁾ において明らかなごとく、血液からはほとんど脳内に移行して行かないので、脳の GABA は脳内で glucose から生成されると考えられているが、教室の黒田¹⁴⁾ の ^{14}C -glucose から GABA 生成に関する実験でも、てんかん脳では正常に比べ明らかに GABA 生成が抑制されていることが明らかになつている。

私はこれらの諸報告にかんがみ、直接 GABA と関係ある代謝系について検索を試みようとして、 ^{14}C -GABA を使用して、これの真正てんかん脳切片による代謝を非てんかん脳のそれと比較検討するとともに、動物実験として ep-マウス脳および脳局所

アナフィラキシーウサギ脳（以下脳局「ア」と略す）の場合についても同様な実験を行なった。

第2章 実験方法

第1節 実験材料

第1項 てんかん脳および非てんかん脳

陣内外科へ入院し、治療の目的で皮質剔除を受けた真正てんかん患者の大脳皮質を用い、一方対照としててんかん以外の疾患（脳腫瘍）で痙攣発作の認められない患者の大脳皮質を使用した。

第2項 マウス

ep系マウス¹⁵⁾で生後6週間以上を経過し、痙攣発作の起ることが確かめられた体重20g前後のものを使用した。対照としてはCF-I系マウスを使用した。

第3項 脳局「ア」ウサギ

教室笠井¹⁶⁾の方法にならひ牛脳灰白質から phosphatide を精製し、非働化牛血清 2 ml に phosphatide を 10 mg の割合に混じて emulsion を作り、これを体重 2.5 kg 以上のウサギに pro kg 2 ml 2 日間連続静注し、2週間後さらに pro kg 1ml 宛2週間間隔で5回注入して脳局「ア」ウサギを作成した。

第2節 Isotope

第一製薬株式会社より恵与された第一化学株式会社製品で、 γ -phthalimido-butyrionitrile-(nitrile-¹⁴C) の加水分解によつて調製されたものである。これはイオン交換樹脂 IR-120 によつて精製され、methanol と ether から再結晶したもので、specific activity は 1.3 mc/mM (12.6 μ c/mg) であり、radiochemical purity は ca. 100% である。これを使用し carrier を加えて 100 μ c が 33 mg になるようにした。

第3節 標準実験系および実験手技

反応系として、試験管に下記のものをつた。

¹⁴ C-GABA	(2 μ C)	0.5 ml
脳 slices		100 mg
Ringer 液		2.0 ml

これらを 37°C に60分間 aerobic の状態で incubate し、ethylalcohol 4.0 ml を加えて反応を停止せしめるとともに除蛋白し、2000 r. p. m. の10分間遠心により上清を分離し、これの 0.4 ml について paperchromatography によるアミノ酸の分離を行ない、Ninhydrin 反応により諸アミノ酸の検出を行なつて、これらの Spots を単離し、これらを gas flow counter (神戸工業製 2 π Gas Flow Counter

Model PR-123 を scintillation counter model SA-1000 A に接続) にて5分間測定し、それぞれの counts per minute (cpm) を求めた。

第4節 ¹⁴CO₂ 消失量の算定

incubate を行なわない対照実験系の alcohol extract と incubate を行なつた alcohol extract とそれぞれその 0.4 ml を paperchromatogram 用濾紙にとり、十分乾燥したものを第3節と同様に放射能測定を行ない、この差をもつて ¹⁴CO₂ 消失量とした。

第3章 実験成績

第1節 ¹⁴C-GABA の代謝

本実験系において ¹⁴C-GABA を正常ウサギ脳 slice と incubate した場合、大部分は ¹⁴CO₂ となつて放出すると考えられるが、一部の ¹⁴C-GABA は他のアミノ酸に転化して行くことが考えられるので、いかなる物質の中に転化して行くかを明らかにするため、反応後の alcohol extract について paperchromatography を行なつた。paperchromatography の Ninhydrin 反応陽性 spots を切りとつて gas flow counter にて放射能をしらべた結果、radioactive な spot は第1表のごとくであつた。

第1表 アルコール抽出液の Paperchromatography に見られる Radioactive Spots (単位: cpm)

実験番号	アミノ酸名			
	GABA	glutamic acid	glutamine	aspartic acid
1	8,660	71	91	35
2	8,350	5	47	51
3	7,960	25	71	54
4	8,670	50	61	23
5	8,560	32	81	37
平均	8,340	37	70	40

すなわち ¹⁴C-GABA を脳 slice と incubate すると、¹⁴C は glutamic acid, glutamine 及び aspartic acid の中に見出されることが明らかになつた。このさい GABA の放射能に比し、他のアミノ酸の放射能はきわめて少なく、また各アミノ酸の数値にも推計学的に有意の傾向を認めることができないので、以後の実験においては glutamic acid, aspartic acid および glutamine の3つの spots の合計の cpm の統計のみを表示することにした。

第2節 真正てんかん大脳皮質切片によ

る ¹⁴C-GABAの代謝

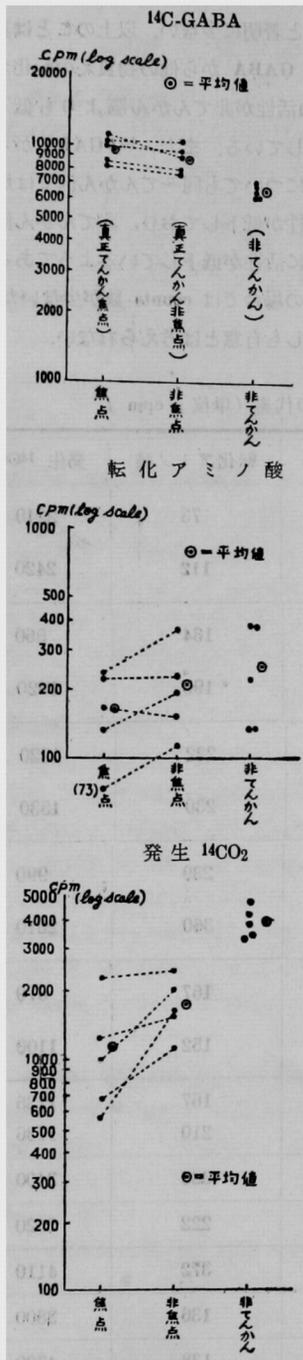
真正てんかん5例、および非てんかん例5例について ¹⁴C-GABA の他のアミノ酸および CO₂ への変化を検索した。成績は第2表、第1図に示すごとく、paperchromatography 上の GABA の spot はてんかんの同一例では焦点部は非焦点部に比し radioactivity がやや多い。また真性てんかん例と非てんかん例とを比較しても真正てんかん例の GABA の spot は非てんかん例に比し radioactivity が明らかに多い。そのさい ¹⁴C-GABA から生成される ¹⁴CO₂

を見ると、¹⁴CO₂ としての消失は同一てんかん例では焦点部では非焦点部に比して少なく、非てんかん例と比較すると著明に少ない。以上のことは真性てんかん脳では GABA から他の物質への転化および GABA 分解の活性が非てんかん脳よりも低下していることを示している。また、¹⁴C-GABA からアミノ酸への転化についても同一てんかん例では焦点部においては活性が低下しており、非てんかん例と比較すると著明に活性が低下しているようであるが、転化アミノ酸の場合では counts 数が少ないため推計学的に必ずしも有意とは考えられない。

表 2 ヒト真正てんかん脳 Slice による ¹⁴C-GABA の代謝 (単位; cpm)

	患者名	性	年齢	別出部位	¹⁴ C-GABA	転化アミノ酸	発生 ¹⁴ CO ₂
真正てんかん	H. Y.	♀	22	focus (temporal)	8000	73	2240
				non focus (temporal)	7460	112	2420
	S. K.	♂	12	focus (temporal)	10970	134	560
				non focus (temporal)	8830	199	1620
	M. N.	♀	52	focus (Parieto-temporal)	9700	222	1220
				non. focus (Parieto-temporal)	9200	230	1530
	M. K.	♂	28	focus (temporal)	8470	239	990
				non focus (temporal)	7970	360	2010
	K. K.	♂	28	focus (temporo-parietal)	10560	167	670
				non focus (temporo-parietal)	10300	152	1100
平均				focus	9540	167	1136
				non focus	8752	210	1736
非てんかん	T. Y.	♂	34	(frontal)	6420	380	3400
	M. T.	♀	46	(parietal)	7030	222	3320
	Y. T.	♂	38	(frontal)	6120	372	4110
	K. O.	♀	20	(temporal)	6870	136	3800
	T. N.	♂	40	(temporo-occipital)	6140	138	4720
	平均					6516	250

第1図 ヒト真正てんかん脳 Slice による
14C-GABA の代謝



第3節 脳局「ア」ウサギ
についての実験

実験的てんかん症とわれわれが考
えている脳局「ア」ウサギについ

て、ヒトの真正てんかん例について行つたと同一の
実験を試みた。成績は第3表、第2図に示すごと
く、脳局「ア」ウサギの場合は正常ウサギとの間に
何らの有意の相異を認めることができなかった。

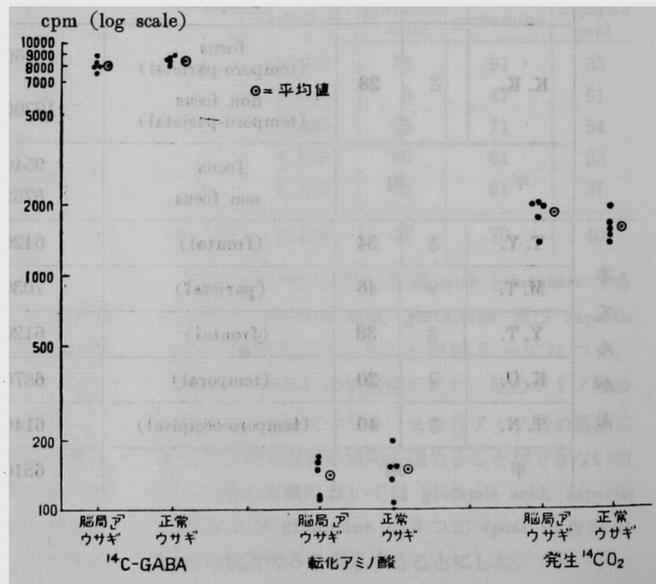
第4節 ep-系マウスについての実験

ep-系マウスについて真正てんかん脳について行
なつたと同一の実験を試みた。成績は第4表、第3
図に示す。すなわち ep-系マウスの 14C-GABA 代

第3表 脳局「ア」ウサギ脳 Slice による
14C-GABA 代謝 (単位: cpm)

	実験 番号	14C-GABA	14C-GABA から転化し たアミノ酸	発生 14CO ₂
脳局「ア」 ウサギ	1	8210	143	2040
	2	8840	116	1380
	3	7990	109	2080
	4	7640	158	1940
	5	8080	114	1760
	平均	8152	138	1820
正常 ウサギ	1	8660	197	1570
	2	8350	103	1620
	3	7960	150	1940
	4	8670	131	1440
	5	8560	150	1330
	平均	8340	146	1580

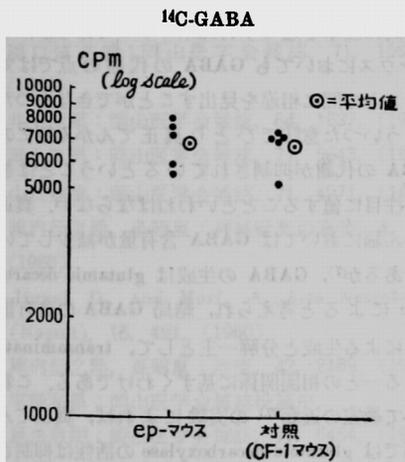
第2図 脳局「ア」ウサギ脳 Slice による 14C-GABA
代謝



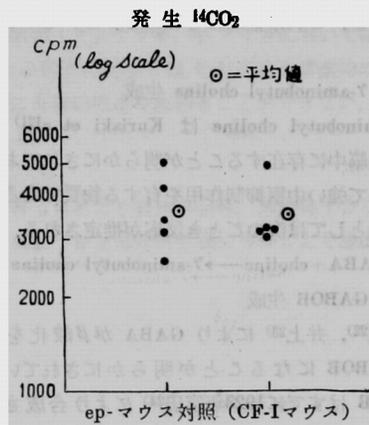
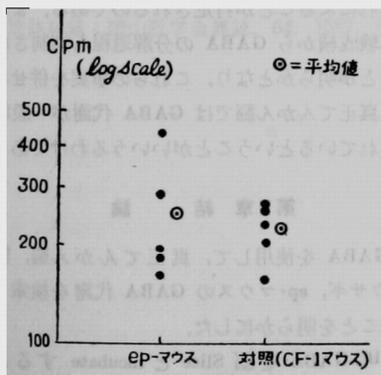
第4表 ep-マウス脳 Slice による ¹⁴C-GABA 代謝 (単位: cpm)

	実験番号	¹⁴ C-GABA	転化アミノ酸	発生 ¹⁴ CO ₂
ep-マウス	1	7730	430	2510
	2	5530	282	4970
	3	5860	160	4170
	4	7260	189	3070
	5	8000	183	3310
	平均	6876	249	3606
対照 (CF-1系マウス)	1	6940	231	3070
	2	7160	267	3110
	3	7340	258	3160
	4	5110	157	4800
	5	7120	203	2970
	平均	6734	223	3422

第3図 ep マウス脳 Slice による ¹⁴C-GABA 代謝



転化アミノ酸

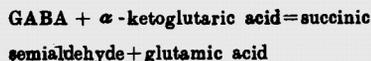


謝は対照として用いた CF-I 系マウスのそれと何らの有意の相異を示さなかつた。

第4章 総括並びに考按

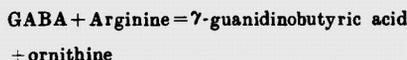
脳組織における GABA の代謝はきわめて複雑多岐にわたつて行なわれており、各々の代謝経路も種々の co-factor 或いは反応条件により影響されやすいと考えられる。すでに述べたごとく、GABA は glutamic decarboxylase により glutamic acid から生成されるが、その後の代謝過程として今日考えられるもの下記のごとき過程がある。そのうち量的にもつとも大であり、強力に行なわれているものは (1) である。

1) transamination



この反応は Bessman¹⁷⁾ 及び Roberts¹⁸⁾ によつて明らかにされたもので、pyridoxal phosphate を coenzyme として要求し、optimal PH は 7.2~8.0 といわれる。この反応系により生成された succinic Semialdehyde は酸化されて succinic acid となり、TCA cycle に入り、CO₂+H₂O に分解される。GABA を脳 slice と incubate して発生する炭酸ガスは大部分がこの過程によつて生成されるものであり、本実験において反応系の alcohol extract 中の放射能の減少はこのようにして消失した ¹⁴CO₂ によるものである。

2) γ-guanidinobutyric acid 生成

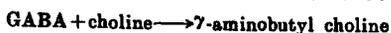


Pisano et al¹⁹⁾, Irreverere et al²⁰⁾ によつて γ-guanidinobutyric acid の脳における存在が明らかにされ

ているが、これは量的にきわめて少ないものと思われる。

3) 7-aminobutyl choline 生成

7-aminobutyl choline は Kuriaki et al²¹⁾ により、大脳中に存在することが明らかにされており、きわめて強い中枢抑制作用を有する物質である。生成方法としては次のごとき反応が推定される。

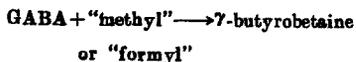
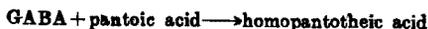


4) GABOB 生成

大原²²⁾、井上²³⁾ により GABA が β 酸化を受けて GABOB になることが明らかにされている。GABOB はすでに1923年富田²⁴⁾ により合成されていたのであるが、近年林²⁵⁾ の中枢興奮抑制物質としての研究以来きわめて注目されているが、脳含有量は約 3 mg %程度であり、本反応は transamination とくらべると極めて少ない。

5) その他の推定される反応

Pantoic acid と反応して homopantoic acid を生成すること、あるいわ methyl 基、formyl 基をうけとつて 7-butylobetaine を生成することなどが推定される。すなわち、



さて本実験において、¹⁴C-GABA の radioactivity が ¹⁴CO₂ となつて失なわれるのは、transamination により succinic semialdehyde が生成されてこれが続いて succinic acid となり、TCA cycle において ¹⁴CO₂ となるからである。したがつて ¹⁴CO₂ の発生を調べることににより transamination およびこれに連なる反応系の活性を一括して検することになる。すなわち、¹⁴C-GABA の代謝において真正てんかん脳 slice では ¹⁴CO₂ 発生が対照脳に比して少ないということは、この一連の反応のいずれかの部分に活性の低下が認められることを意味している。

一方、他のアミノ酸にも一部放射能が認められるが、本実験においては主として glutamic acid, aspartic acid 及び glutamine の area において認められ、このことは塚田²⁶⁾ の報告ときわめてよく一致している。しかし、この場合、これらのアミノ酸への移行はきわめて少なく、¹⁴CO₂ として消失されたものの数十分の一にすぎない。それ故測定された放射能の count も小さく、推計学的に一定の傾向をとらえることができなかった。

GABA 代謝の (2) 以下の反応過程については、

酵素的に今日までいずれも詳細な研究が進められていないので十分検討することはできないが、私の実験方法においてはいずれも検出することはできず、脳内で反応が行なわれる場合にもきわめて少ないと考えられる。

さらに次の段階として、transaminase についての検索が要求されるので、これについては第3編において行なうこととした。

次に脳局「ア」ウサギの問題であるが、本実験動物は稀薄抗原を繰返しウサギに静注し、脳に局所的アナフィラキシーを惹起せしめたウサギであり、今日までの研究によれば、その脳内の生化学的検索の結果はきわめてヒトの真正てんかん脳のそれと似ていたため、これを真正てんかんの実験動物として、真正てんかんについての実験と比較しつつ、いろいろの実験が行なわれてきた。

しかし、GABA の代謝の点では私の実験による正常ウサギとの間に何らの相違も認めることができなかった。

また、ep-マウスはわずかの体位変換刺激により自発的に痙攣を起こす特殊系マウスであるが、この ep-マウスにおいても GABA の代謝の点では対照マウスとの間に相違を見出すことができなかった。

そういった意味でひとり真正てんかん脳にのみ GABA の代謝が抑制されているということはきわめて注目に値することといわねばならない。真正てんかん脳においては GABA 含有量が減少しているのであるが²⁷⁾、GABA の生成は glutamic decarboxylase によると考えられ、結局 GABA の含有量はこれによる生成と分解—主として、transamination による—との相関関係に基ずくわけである。これに関して教室の近藤²⁷⁾ の実験によれば、真正てんかん脳では glutamic decarboxylase の活性は抑制されているので、真正てんかん脳における GABA の減少はこれによることが肯定されるのである。また、私の実験成績から GABA の分解過程も抑制されていることが明らかとなり、これらの事実を併せ考えると、真正てんかん脳では GABA 代謝が一般的に抑制されているということがいえるわけである。

第5章 結 論

¹⁴C-GABA を使用して、真正てんかん脳、脳局「ア」ウサギ、ep-マウスの GABA 代謝を検索し、つぎのことを明らかにした。

1) ¹⁴C-GABA を脳 slice と incubate すると、

^{14}C -GABA の放射能はわずかながら glutamic acid, spartic acid および glutamine の中に見出されるようになる。

2) この場合、消費される GABA の大部分は $^{14}\text{CO}_2$ となつて消失する。

3) $^{14}\text{CO}_2$ となつて消失される量を真正てんかんと非てんかんととの脳 slice について比較すると、真正てんかん脳の場合は非てんかん脳より $^{14}\text{CO}_2$ 発生の活性が低下しており、また同一てんかん脳では焦点部が非焦点部よりその活性が低下している。

4) 脳局「ア」ウサギ, ep-マウスにおいては ^{14}C -GABA の代謝に関してはそれぞれ正常動物の対照との間に有意の相違を認めることができない。

稿を終るにあたり終始御指導、御鞭撻下さり、御校閲を賜つた恩師陣内教授につつしんで深謝す。

文 献

- 1) Yamamoto, Y., Mori, A. and Jinnai, D.: J. Biochem. 49, 368. (1961).
- 2) Pope, A., Morris, A. A., Jasper, H., Elliott, K. A. C., and Penfield, W.: Proc. A. Rea. Nerv. and Ment. Dis., 26, 218, (1946).
- 3) 沖 修之: 岡山医学会雑誌, 64, 1625, (1952).
- 4) 山本泰久: 岡山医学会雑誌, 71, 314, (1958).
- 5) 山田孝彦: 岡山医学会雑誌, 71, 791, (1958).
- 6) 樋口慎之助: 岡山医学会雑誌, 71, 1563, (1959).
- 7) 井上圭爾: 岡山医学会雑誌, 64, 1637, (1959).
- 8) 国土忠男: 岡山医学会雑誌, 71, 5643, (1959).
- 9) 山口穂哉: 岡山医学会雑誌, 71, 4971, (1959).
- 10) 陣内伝之助, 森昭胤: 神経研究の進歩, 4, 531, (1960).
- 11) Jinnai, D., and Mori, A.: Acta Neurologica (Napoli), 15, 491, (1960).
- 12) 陣内伝之助, 森昭胤: 治療, 42, 2189, (1960).
- 13) 宇野和昌: 岡山医学会雑誌投稿中.
- 14) 黒田尊明: 岡山医学会雑誌, 71, 6454, (1959).
- 15) 今泉清, 伊藤昭吾, 沓掛源次郎, 滝沢隆安, 藤原公策, 土川清: 実験動物, 8, 6, (1959).
- 16) 笠井祐蔵: 岡山医学会雑誌, 64, 1587, (1953).
- 17) Bessman, S. P., Rossep, J. and Layne E. C.: J. Biol. Chem., 201, 385, (1953).
- 18) Roberts, E., Frankel, S. and Harman P. J.: Proc. Soc. Exp. Biol., 74, 383 (1950), Roberts, E., and Frankel S.: J. Biol. Chem. 187, 55, (1950).
- 19) Pisano, J. J., Mitoma, C., and Udenfried, S.: Nature (Lond.) 180, 1125, (1957).
- 20) Irreverere, F., Evans, R. L., Hayden, A. R. and Silber, R.: Nature 180, 704, (1957).
- 21) Kuriaki, T., Yakushiji, T., Noro, Shimizu, T., and Saji, S.: Nature (Lond.) 181, 1336, (1958).
- 22) 大原和雄: 生化学, 30, 981, (1959).
- 23) 井上和久: 生化学, 31, 127, (1959).
- 24) Tomita, M.: Ztschr. f. Physiol. Chem. 124, 253, (1923).
- 25) Hayashi, T.: Chemical Physiology of Excitation in Muscle and Nerve, second edition, (1958). Nakayama shoten Ltd.
- 26) Tsukada, Y., Nagata, Y., Takagaki, G.: Proc. Japan Acad. 33, 510, (1957).
- 27) 近藤整: 未発表

Metabolism of γ -Aminobutyric Acid

Part 2. Metabolism of ^{14}C - γ -Aminobutyric Acid in an Epileptic Brain Slice

By

Kazuaki Uno

Department of Surgery and Neurosurgery Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dennonuke Jinnai)

Author's Abstract

Studies were carried out to clarify GABA metabolism in the brains of an epileptic, the latent cerebral local anaphylactic (L. C. L. A.) rabbit and ep-mouse administered with ^{14}C -GABA.

- 1) Incubated with a brain slice, radioactivity of ^{14}C -GABA was slightly detected in glutamic acid, aspartic acid and glutamine in the incubation medium.
 - 2) In this case, most of the radioactive carbon of GABA was converted into $^{14}\text{CO}_2$.
 - 3) The epileptic brain appeared to decreased in the $^{14}\text{CO}_2$ -activity, compared with the non-epileptic. In case of the epileptic brain, the activity in the focus was lower than the one in the non-focus.
 - 4) The study with L. C. L. A. rabbit and ep-mouse could not manifest any difference in GABA metabolism in contrast to the normal control groups.
-