

脳 の 窒 素 代 謝

第 15 篇

各種動物脳髓 extract の グルタミン合成能

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

太 田 典 子

[昭和 34 年 2 月 14 日受稿]

緒 言

脳神経組織とアンモニアは、相互に密接な関係を有し、脳の異常興奮状態でアンモニアが増加し、機能減弱で減少する等の事実は、古来、多数の学者によつて記載されているところである¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。また、我々が、日常臨床にたづさわりの、精神々経病、或は肝脳疾患において、かかる過程の行われているであろう事を、容易に推測しうる症例に遭遇する事も、また屢々である。しかし乍ら、このアンモニアの源泉については、諸説いまだ定まるに至つていない現状であり、著者らは、むしろ多元的であろうとの見解すらとつていのである。

著者の教室では、近年、このアンモニアをめぐる脳の窒素代謝に関する研究を、動物に種々の処置を加えた際の、脳髓アンモニア並びにアミノ酸の動向について観察し、興味ある知見を得て来ている。著者も、これらの研究の後を受け、鼠毒並びに痙攣剤たるモノ弗化醋酸ナトリウムを大黒鼠に投与し、前篇³⁵⁾に記した結果を得たのであるが、この成績は、さきと同じく痙攣剤たる塩化アンモンを投与した河田¹⁶⁾の知見に比し、そのアミノ酸の態度が著しく異つてい事が注目された。

脳内の生化学的過程は、誠に複雑多岐で、単に、アンモニアとアミノ酸の消長のみとりあげるにしても、無数の化学反応が、絶えず繰返されているであろう事は、想像に難くない。これまで、私達の教室では、このうち主としてアンモニア発生面の側に立つて考究をすすめて来たのであつたが、先述の河田は、塩化アンモン投与時に見たグルタミンの増量を、*in vivo* におけるグルタミン合成の為であろうと考え、著者は、モノ弗化醋酸ナトリウム中毒時のグルタミン減少は、グルタミン合成過程の阻碍によるの

であろうとの推定を下すに至り、ここに従来のアンモニア発生面を主とした一連の研究に加えて、更に、その処理面をも併せ観察する必要を感じたのである。

1935年、Krebs⁷⁾ は、脊椎動物の脳皮質切片、網膜切片、兎、海猿の腎切片等が、グルタミン酸とアンモニアから、グルタミンを作る事を発見したが、其後、Örström et al.¹⁷⁾, Cohen & Hayano¹⁸⁾¹⁹⁾, Leuthardt & Bujard²⁰⁾, Speck²¹⁾²²⁾, Frei & Leuthardt²³⁾, Elliott²⁴⁾²⁵⁾ 等も、相継いでこの方面の研究を行つてをり、これらによると、アンモニアとグルタミン酸から、グルタミンを作る酵素、即ち、Glutamine Synthetase は、大黒鼠、兎、海猿、猫等の肝、腎、脳、鳩の肝、脳、豚、牛の肝臓等に存して、この反応には、Phosphate, Mg^{++} , O_2 を要し、促進物質として、 K^+ , DPN, Cytochrom C, Citrate, A. T. P., 阻 碍 物 質 として、アデニン、アデノシン3磷酸、弗化物、Pyruvate, Crystalviolett, Methionin sulfoxid 等があるとされている。著者は、之等を参考とし、脳の窒素代謝を、アンモニア処理機構の側から追求せんと考え、まづ、グルタミン合成能の問題をとりあげ、以下の知見を得た。

実 験 方 法

① Enzyme Solution の作製²⁶⁾

体重約 100 g の大黒鼠を断頭、脳髓を摘出、直ちにドライアイスアセトン冷剤で凍結、秤量、15~20倍容の冷却アセトンを用いて homogenize し、吸引濾過を行う。之を、更に、冷却アセトン及びエーテルを用いて十分に洗滌し、真空乾燥により粉末とする。

上記粉末を秤量し、50倍の再蒸溜水を加え、混和遠沈し、上清を 4°C に冷却、更に 1/5 容の pH. 4.2 醋酸緩衝液を加え、遠沈、沈渣を pH. 7.2 磷

酸緩衝液 2.5 cc に溶解させる。

② グルタミンの定量²⁶⁾

作用後の試料をとりこれに等量の10%三塩化醋酸液を加え、反応を止め、遠沈、上清を75分間、70°C²⁶⁾ に保つて、グルタミンを水解せしめ、生じたアンモニアを Conway 微量拡散分析法により測定する。この際、既知濃度のグルタミン標準液を一次標準とする。

③ アンモニアの測定²⁴⁾

Conway Unit の外室に飽和炭酸カリ液、1.0 cc 内室には田代氏指示薬含有 0.0004 N 塩酸 1.0 cc を入れておき、外室へ検液を正確に、0.5 cc 注加する。外室の内容を混合し、Unit を1時間静置、吸収せしめた後、内室の塩酸を、0.0015 N 水酸化バリウムを用いて滴定する。

実験結果

第1表は、健常大黒鼠脳髓 extract のグルタミン合成値である。前述の Enzyme Solution に、基質を加え、Warburg 恒温槽中、37°C、25分空気相中で incubate の後、グルタミン量を測定した。単位は $\mu\text{M}/\text{tube}$ 、Reaction System は下記の如くである。

表に示す如く、グルタミン合成量は最高、1.78 $\mu\text{M}/\text{tube}$ 、最低、1.20 $\mu\text{M}/\text{tube}$ で、12例の平

第1表 健常大黒鼠脳髓 extract の glutamine 合成能

例数	合成量 $\mu\text{M}/\text{tube}$	例数	合成量 $\mu\text{M}/\text{tube}$
No 1	1.60	No 7	1.48
2	1.20	8	1.58
3	1.53	9	1.46
4	1.43	10	1.44
5	1.78	11	1.47
6	1.76	12	1.67
平均		1.53 $\mu\text{M}/\text{tube}$	

Reaction System

Na. glutamate	0.05 M
Neutralized $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	0.02 M
Neutralized Cystein $\cdot\text{HCl}$	0.02 M
A. T. P.	0.004M
Mg Cl_2	0.02 M
Enzyme Solutione	0.5 cc
final volume	2.0 cc
pH.	7.2

均は、1.53 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であつた。以上の分布を度数分布表で示せば第1図の如くなる。

第2表は、各基質を除去して行つた実験結果である。

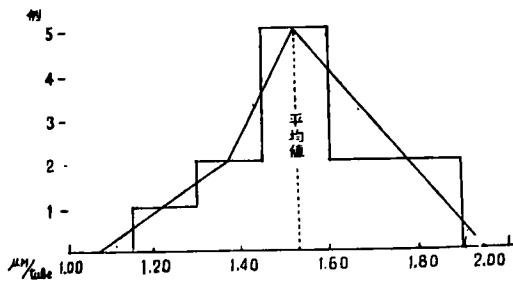
第2表 Reaction System の検討

	glutamate	hydroxylamine	A. T. P.	Cysteine	Mg Cl_2	Enzyme Solution	glutamine 生成量	合成率
Complete System.	+	+	+	+	+	+	1.7 $\mu\text{M}/\text{tube}$	100%
Without glutamate	-	+	+	+	+	+	0.07	4
Without hydroxylamine	+	-	+	+	+	+	0	0
Without A. T. P	+	+	-	+	+	+	0.14	8
Without Cysteine	+	+	+	-	+	+	0.34	20
Without Mg Cl_2	+	+	+	+	-	+	0.40	23
Without Enzyme Solution	+	+	+	+	+	-	0	0

先づ、Reaction System の各作用物質を含有せる“Complete System”による値は、1.7 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であり、これを対照、100とする。次の欄は、他の物質はそのままとし、基質のグルタミン酸を除いたもので、値は、0.07 $\mu\text{M}/\text{tube}$ でグルタミン合成量は0に近い。また次に、アンモニア源であるヒドロキシルアルミンを除外したものでは、完全に反応は起つていなかった。エネルギー供給源である A. T. P. を除外して行つたものでは、計算量 0.14 $\mu\text{M}/\text{tube}$ 、

対照と比べると僅かに8%に過ぎず、この場合もグルタミン合成反応は殆ど行われぬ様である。更にこの反応に於て賦活物質として働くと思われるシステインを除いてみると 0.34 $\mu\text{M}/\text{tube}$ 合成率20%となつた。また、グルタミン合成反応を促進するとされる塩化マグネシウムを除いたところ、この場合は、0.40 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であつて、約23%の合成率であつた。最後の欄に示す如く、Enzyme Solution を欠くものでは反応は全然起らず、上記の反応が酵素反応で

第1図 健常大黒鼠脳髓 extract の glutamine 合成能分布図



組別 μM/tube	度 数
1.15~1.29	1
1.30~1.44	2
1.45~1.59	5
1.60~1.74	2
1.75~1.89	2

第3表 pH の 検 討

例数 \ pH	6.0	7.2	7.4	8.0
No 1	0.8 (47%)	1.7 μM/tube	1.3 (76%)	—
2	—	1.8	1.0 (55%)	—
3	1.2 (63%)	1.9	—	1.1 (78%)
4	—	1.4	0.6 (43%)	—
5	—	1.4	—	1.0 (71%)
平 均	(54.5%)	1.6	(58%)	(74.5%)

第4表 各種動物脳髓 extract の glutamine 合成能

種 類	例数	グルタミン合成量 μM/tube	例数	グルタミン合成量 μM/tube
ハツカネズミ	1	1.30	6	0.41
	2	0.55	7	1.07
	3	0.80	8	0.88
	4	0.47	9	0.76
	5	0.55	10	1.33
		平均		0.81
b ナマズ	1	1.64	5	1.14
	2	1.35	6	1.00
	3	1.22	7	0.98
	4	1.06	8	1.07
		平均		1.18
c ヒト	1	2.45	2	1.15
d ダイコクネズミ			対照	1.53

ある事を確信させる。

第3表は、作用時の水素イオン濃度を種々変えて行つた実験結果である。表に示す如く、pH. 7.2で行つたものが、合成値最も高く、最高1.9 μM/tube、最低1.4 μM/tube、5例平均は1.6 μM/tubeであつた。pH. 7.4では、平均0.97 μM/tubeで、pH. 7.2のものに比べると58%に過ぎない。同様に pH. 8.0のものは、平均1.05 μM/tubeで74.5%であつた。又、酸性側、pH. 6.0の所では、平均1.0 μM/tubeで54.5%であり、結局、pH. 7.2の所が、この反応の至適水素イオン濃度と云う事になる。

以上の検討で、in vitroのグルタミン合成には、第1表に示した条件がやはり適當の様であるから、この条件で、各種動物腦のそれを検索したのが第4表である。

第4表 (a) は、二十日鼠のそれである。体重30

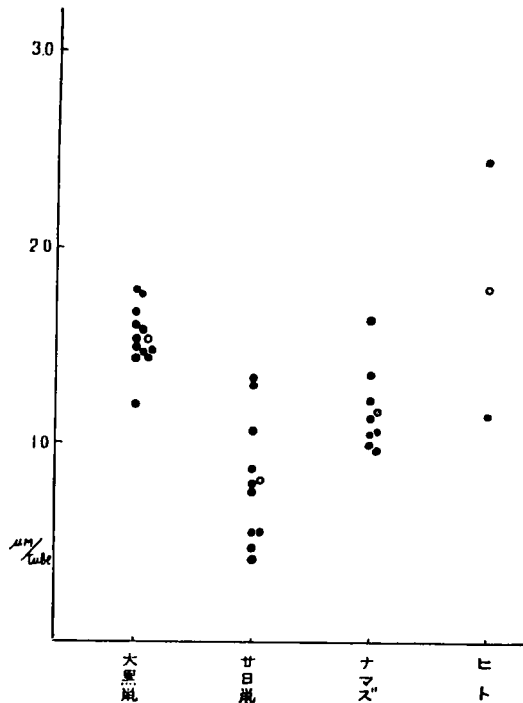
~50 gの二十日鼠を用い、断頭により脳髓を摘出、Enzyme Solutionを作る事、大黒鼠と同様である。グルタミン合成値は、最高、1.33 μM/tube、最低、0.41 μM/tubeで、10例の平均は、0.81 μM/tubeであり、大黒鼠に比べると、可成り活性度が劣つている様である。

(b) は、なまず脳髓 extract による合成値である。条件は前二者と同様である。値は、最高、1.64 μM/tube、最低0.98 μM/tubeであり、8例の平均は、1.18 μM/tubeで、丁度大黒鼠と二十日鼠の間であつた。

(c) はひとの脳髓 extract を用いて得た値である。材料は、陣内外科において、脳手術の際得たものを提供されたのであつて、第1例で、2.45 μM/tube、第2例で、1.15 μM/tubeであつた。

以上の分布を図に示せば、第2図のごとくなる。

第2図 各種動物脳髓 extract の Glutamine 合成能分布図 (○は平均値を示す)



考 察

先づ大黒鼠の値, 1.53 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であるが, これは, Elliott²⁵⁾ の brain-extract を用いた実験結果によく一致してをり, 私の行つた実験でも, 数値は極

めて狭い範囲に密集している事から, 大黒鼠脳髓 extract のグルタミン合成値は, 先づこの値の前後にあるとみて, 大した誤りはないものと考えられる。

次は, Reaction System の検討であるが, 基質であるグルタミン酸がない時, またアンモニア源であるヒドロキシルアミンを欠く時, 共にグルタミンが合成せられぬのは当然である。

A. T. P. は, この反応が進行する際の直接の energy donor と考えられているのであるが, この物質を欠く時, やはり反応は強く阻害されてをり, Elliott et al.²⁴⁾²⁵⁾ が述べているのとよく一致する。システインを欠いた場合の合成率の低下は, この反応に, 同物質の占める役割がまた少なからぬ事を示している。Mg⁺⁺ も不可欠とされているが, 私の検した所では, これを欠いても, 尚合成が可成りの量に行われる場合もあつた。これは, Elliott の結果と矛盾している点であるが, しかし, Mg⁺⁺ を欠いては, グルタミン合成が停止するというのは, purified extract の場合であり, 私の用いた, crude extract で, 一部の例にこの現象が見られぬのは, 敢えて怪しむに足らぬ事かとも考えている, Enzyme Solution の加わらぬ際は, 無論, 反応は起らない。

次の pH. の検討であるが, 私の経験した所では, 7.2が, 至適 pH. であつた。

次に, 各種動物の, グルタミン合成についてであるが, 第5表は, 今迄に得られた, アンモニア, グ

第5表 健常大黒鼠並びに各種動物の脳髓所見(平均値)

種別	mg %		グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸	グルタミン合成 ($\mu\text{M}/\text{tube}$)
	アンモニア	グルタミン				
大黒鼠	0.62	80.3	158.4	35.2	30.3	1.53
廿日鼠	0.57		160.7	21.6	30.2	0.81
ナマズ	0.50	47.5	52.6	19.0	15.1	1.18
ヒト 1	0.83	95.5	108.8	7.0	23.9	2.45
ヒト 2	0.59	86.5	145.7	11.7	33.8	1.15

ルタミン酸, グルタミン, γアミノ酪酸, およびアスパラギン酸の値を, グルタミン合成値に併記したものであるが, これを見ると, グルタミン合成量は, in vivo のグルタミン含量と, 密接な関係を有するものの如くである。すなわち, グルタミン量の多寡と, グルタミン合成値との間には, 一致した関係があり, 下等動物程低く, 高等動物に高いという事になるようであつて, グルタミン合成が, 脳の機能と, 密接な関係を有している事を暗示する。興味ある値である。

緒言にも述べたごとく, 脳髓アンモニアは, 脳の機能と密接な関係を有し, 種々の脳髓状態の変化に伴つて増減し, また同時に, これが, 脳の機能変化を導き出すとも考えられるのである。河田¹⁶⁾ は, 塩化アンモンを大黒鼠に与え, 脳髓アンモニア量を極度に増加せしめておいたとき, 同時にグルタミンが増量することをのべ, 生体において, グルタミン合成過程が, アンモニア処理的に働いていると考えた。もとより, アンモニアは, 脳にとつては有毒な物質であるに相違なく, 脳は, これを速やかに処理

する必要上、かかる意味でのグルタミン合成過程は、この際、特に重視さるべき問題であろう。

ところで、或種の精神病、神経病、或は肝脳疾患等で、重篤な精神症状が、アンモニア増量に起因するらしい事は、日常の臨床においても、屢々経験するところであり、この事に関しては先にもふれたが、これは、正常な状態では、一過性にアンモニアが増量しても、直ちに処理され症状を来さぬに反し、病的状態では、増加するのみで処理されぬ為、多量に蓄積されることとなり、Ammonia removing mechanism、ひいては、グルタミン合成過程の破綻が起つてくる事が、容易に想像されるのであつて、従つて、種々の疾病、或は薬剤投与時の、グルタミン合成能の研究は、今後の重要な課題の一つといえよう。

著者の実験は、動物脳髓および少数の人脳髓における、グルタミン合成能の正常値を明らかにし、向後の、かかる研究に、基礎的役割を果すものと信じる。

総 括

各種動物脳髓 extract のグルタミン合成能 (37°C, 25分, pH. 7.2, 空気相) を、Conway 微量拡散

分析法を用いて測定した。

(1) 健常大黒鼠脳髓 extract のグルタミン合成値は、上記条件で、平均、1.53 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であつた。

(2) 二十日鼠脳髓 extract では、平均、0.81 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であり、大黒鼠に劣る。

(3) なまぜ脳髓 extract を用いたものでは、平均、1.18 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であつた。

(4) ひと脳髓例は、わづか2例に過ぎなかつたが、平均、1.80 $\mu\text{M}/\text{tube}$ であつた。

文 献

便宜上、第16篇にまとめて記す。

Nitrogen Metabolism of the Brain

Part 15 Studies on Activities of Glutamine Synthesis in the Brain Extracts of Various Animals.

By

Tsuneko Ōta

Department of Neuropsychiatry, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Nikichi Okumura)

The activity of glutamine synthesis in the brain extracts of various animals were observed by means of the Conway's microdiffusion analysis. The brain extracts were incubated at 37°C, pH 7.2 for 25 minutes under aerobic condition.

1) The activity of glutamine synthesis in the normal rat brain extract was 1.53 μM per tube on an average.

2) In the mouse brain it averaged 0.81 μM per tube and was lower than the rat's.

3) It was 1.18 μM per tube on an average in the cat-fish brain.

4) In the human brain, even though only two cases, it was 1.80 μM per tube in average.
