

脳 の 遊 離 ア ミ ノ 酸 に つ い て

(VII)

イオン交換クロマトグラフィーによる ヒト脳遊離アミノ酸の定量

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

湯 之 上 茂

〔昭和 34 年 1 月 19 日受稿〕

緒 言

脳の窒素代謝の生化学的研究は、最近のアミノ酸分析の進歩と相俟つて活潑なものがみられ、脳遊離アミノ酸の代謝特異性の種々相が次第に明らかになってきた。われわれの教室では、種々の動物脳について遊離アミノ酸およびその関連物質の定量を行っている。もちろんこの研究は、その結果をもつて直ちに精神現象との関連をもとめようとするものではないが、精神機能に影響をおよぼす種々の薬物が提供され関心をひいている今日、脳代謝のあらゆる観点からの基礎的な研究、その組織特異性の検索は更に重要な課題となりつつある。本編では新鮮ヒト脳についてイオン交換クロマトグラフィーによりこれを定量した結果、既報の諸動物の場合とかなりことなつたパターンを得たので報告し、比較生化学上の考察を加えた。

実験材料及び方法

1) 試料の調製

被検脳は下記の 3 例で、当大学陣内外科より脳手術にさいして切除した大脳皮質の一部を分けていただいたものである。

- (1) 3才♀, 脳腫瘍, 左側頭葉
- (2) 17才♂, 脳腫瘍, 前頭葉
- (3) 35才♀, 真性てんかん, 右側頭葉

切除された脳 (1 g 前後) はただちにドライアイス・アセトン中に浸し凍結、秤量し、90%エタノールによるホモジネートとし、全量 35~40 ml とする。20分間遠心、上清を約 50°C の湯浴上で蒸発乾固し、0.2 N. pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液 5 ml に溶解し、さらに遠心した上清 2~3 ml を

カラムに加えた。

2) イオン交換クロマトグラフィー

Moore & Stein¹⁾ の方法にしたがい、強酸性ポリスチレン樹脂 Dowex 50-X4(200~400 mesh), 150×0.9 cm のカラムをもちい、展開用緩衝液には (1) pH 2.2, 0.2 N, (2) pH 3.1, 0.2 N, (3) pH 5.1, 2 N のクエン酸ナトリウム液を使用した。流出速度は 1 時間 4~8 ml, 流出液は Photoelectric Fraction Collector (柳本製作所) で 2 ml 分画で採取、各 1 ml を Moore & Stein のニンヒドリン改良反応²⁾ によつて比色し、ロイシン溶液について作製した標準曲線を基準とし、それぞれ呈色比を乗じて各アミノ酸量を算出した³⁾。なお、比色は Coleman-Junior 型分光光度計をもちいた。N・アセチルアスパラギン酸はその流出部位の残液を塩酸加水分解中和したものにつき、同様に比色定量したものである⁴⁾。タウリンとホスホエタノラミンはこのカラム条件では分離しないので、メチルセロソルブを溶媒としてペーパークロマトグラフィーを行い、その量比により概略値を算出した⁵⁾。またグルタミンの回収率は展開溶媒の流出速度によつて左右されるので、定量的な値が得られていない。

3) アミノ窒素の定量

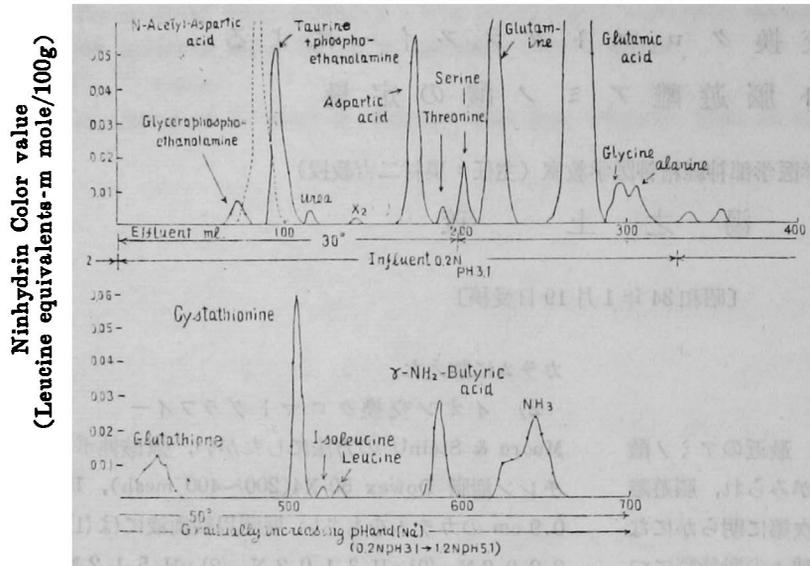
試料 1 ml を 50~100 倍にうすめ、その 1 ml に前記改良ニンヒドリン試薬を加えて加温発色、ロイシンの標準曲線により定量した。

4) アミノ酸の定性

第 1 報³⁾ に記載した通り Stein⁶⁾ の方法に従つて行つた。シスタチオニンの定性は、authentic Sample が得られなかつたが、Tallan⁷⁾ らの報告における溶出位置と符合すること、および相当分画の脱塩濃縮液について、n-ブタノール:酢酸:水=4・

1:1および75%含水フェノールを溶媒としてパークロマトグラフィーを行い、Berg⁹⁾が同物質について報告した Rf 値とほぼ一致することを確かめた。

第1図 Dowex 50-X4 150×0.9 cm カラムによるヒト脳のニヒドリン陽性物質溶出曲線



実験成績

1) 第1図はヒト脳遊離アミノ酸の溶出曲線の1例である。X₂⁹⁾は他の哺乳動物にもみだされた未同定物質、またリジン、ヒスチジン、アルギニン等は微量で明瞭なピークが得られなかつたため、アンモニア以下は省略した。

2) 3例のヒト大脳皮質遊離アミノ酸およびその関連物質を定量した結果を第1表に示す。なお比較に便ならしめるため、ナマズ、ダイコクネズミ、イヌの実測値¹⁰⁾¹¹⁾をあわせ記載した。

第1表 脳遊離アミノ酸およびその関連物質

	ヒト (1)	ヒト (2)	ヒト (3)	ダイコク ネズミ (♂, 全脳)	イ ヌ (大脳皮質)	ナ マ ズ (全 脳)
総アミノ窒素	46.5	41.1	36.2	43.5	35.7	50.5
グリセロホスホエタノラミン	11.1	10.2	39.3	17.8	17.2	16.9
X ₁	0	0	0	0	0	0.041
ホスホエタノラミン	29.6	10.3	5.3	19.8	24.2	17.6
タウリン	16.7	9.0	14.3	49.0	15.1	42.5
尿素	25	20	13	50	18	0
X ₂		0.019	0.020	0.011	0.011	0.719
アスパラギン酸	24.6	18.0	9.8	30.0	29.2	3.9
スレオニン	3.6	2.4	9.8	3.6	2.9	7.9
セリン	10.6	5.4	2.3	10.1	4.4	2.9
グルタミン	100	130	98	70	80	90
グルタミン酸	139.3	92.6	118.0	147.0	127.0	74.2
グリシン	4.6	2.6	7.0	6.8	4.2	6.0
アラニン	5.6	2.9	1.7	5.0	5.9	2.2
グルタチオン	27.5	11.5	10.9	25.9	16.4	14.3
シスタチオン	43.2	19.4	24.8	<1	9.1	<1
イソロイシン	2.2	<1	<1	1.6	2.6	2.8
ロイシン		<1	<1	1.7		3.9
γアミノ酪酸	7.4	7.5	19.1	22.1	18.7	18.8
リジン	<1	<1	<1	1.8	0.9	3.0
ヒスチジン	<1	<1	<1	1.8	1.2	4.6
アルギニン	<1	<1	<1	1.9	<1	1.3
N-アセチル・アスパラギン酸	106.0	—	67.2	75.1	106.5	14

(1) 単位 mg/100g 湿重量, たゞし未同定物質 X₁, X₂ は m mole/100g 湿重量にて記載。
 (2) ダイコクネズミ, イヌ, ナマズの値は文献⁵⁾ および⁸⁾ 所載のもの。

3) 一見していちぢるしい所見は、かなり大量のシスタチオニンの存在である。これはイヌにも見出されているがはるかに少い。また γ -アミノ酪酸およびタウリンが他動物に比して少量である。

考 按

イオン交換樹脂クロマトグラフィーを用いて種々の動物組織や体液のアミノ酸含量が Tallan¹²⁾ らによつて呈示され、多種類のアミノ酸が定量的に分離可能なる点で、この方法は所要時間と操作の煩雑さにもかかわらず極めて有用なアミノ酸分析法とみとめられるに至つた。ヒト脳のアミノ酸パターンについては、最近 Tallan⁶⁾ らの死体脳によるものがあるほか、多種のアミノ酸について定量的な結果を示した文献はない。脳組織の遊離アミノ酸構成は、死後かなり速やかな変化をこうむると考えられているが¹³⁾¹⁴⁾、切除後直ちに凍結した私の実験結果では、ほぼ *in vivo* の化学的構成に近いものと考えてよからう。ただし一応考慮しなければならぬ点は、3例とも何らかの疾患脳であること、すなわち2例は脳腫瘍、1例は真性てんかんで、いずれも肉眼的には健常と思われる部位を用いてはいるが、全く病態生理学的に健常であるとはいひ切れないが、ヒト脳という材料取得の制限上やむを得なかつた。また年齢差についても一応考慮を要することであり、ダイコクネズミの場合、Roberts¹⁵⁾ らは幼若なものではタウリンが多く、ジカルボン酸群の量が少い傾向があると報告している。

ここで得られた成績を、ダイコクネズミ、イヌ等の哺乳動物および二、三の脊椎動物と比較するとき二、三の特異な相異がみられる。すなわち比較的大量のシスタチオニンの存在と、 γ -アミノ酪酸およびタウリンの少いことである。 γ -アミノ酪酸については、Awapara¹⁶⁾ らがヒトおよび種々の哺乳動物脳について定量したもので、私の成績よりも一般にかなり高値を示しており、またヒトと他の動物との差も少いが、私の成績ではヒトで 10.1 mg % と著しく低くなつている。タウリンはダイコクネズミ 49 mg % に対し、ヒト 13.3 mg % と低いが、イヌではヒトの値にかなり近い。その他、グルタミン酸量はイヌの値に近く、大量の N-アセチル・アスパラギン酸の存在についても、イヌ、ダイコクネズミと同様である。総アミノ酸窒素量はダイコクネズミの場合と大差はない。シスタチオニンの存在およびその含硫アミノ酸代謝における態度については

Horowitz¹⁷⁾, du Vigneaud¹⁸⁾, Hess¹⁹⁾, Berg⁹⁾ による研究がある。すなわち、メチオニン \rightleftharpoons シスチンの代謝系列における中間物質であり、その酵素的分解と合成には、ピリドキシン磷酸が関与するといわれている²⁰⁾²¹⁾。この代謝関係は、同位元素 S³⁵ でラベルされたメチオニンをネズミにあたえ、肝においてシスタチオン、システイン酸、タウリンへの S³⁵ の移行が証明されている²²⁾。また Gaitonde & Richter²³⁾ は、S³⁵ メチオニンを槽穿刺により注入し、脳蛋白においてその一部がシスチンに移行することを見出した。しかし最近にいたるまで、シスタチオンは正常哺乳動物組織中には発見されなかつた。Tallan⁶⁾ らはヒトの死体脳より 22.5~56.6 mg % のシスタチオンを分離しているが、この実験では死後の時間経過中における酵素活性の変化により、シスタチオンが蓄積される可能性が否定出来ないとのべている。この点については、切除後直ちに処理した私の実験でもほぼ同程度の量に証明されたので、死後の蓄積ということは一応否定出来る。またダイコクネズミでは、シスタチオンを測定可能な量においてみとめ得なかつたに反し、タウリンは 49 mg % と多く、ヒトの場合と比較して逆の関係にある点は興味深い。脳における含硫アミノ酸の代謝機序はいまだ詳かでないが、この点ヒトと他の哺乳類とはことなつたものがあると考えられる。

結 論

脳手術により切除した3例(脳腫瘍2, 真性てんかん1)の新鮮ヒト大脳皮質について、その遊離アミノ酸および関聯物質をイオン交換クロマトグラフィーを用いて定量した。

1) かなり大量のシスタチオンが存在し、 γ -アミノ酪酸およびタウリンはイヌ、ダイコクネズミ等の哺乳動物および他の二、三の脊椎動物と比較していちぢるしく少い。

2) これらの脊椎動物を比較すれば、ヒト脳の遊離アミノ酸パターンはイヌのそれに最も近い。

稿を終るにのぞみ御指導、御教誨をたまわつた奥村二吉教授に感謝の意を捧げると共に実験に当り終始御援助をたまわつた大月三郎講師、亀山彰氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Moore, S., Stein, W. H. : J. Biol. Chem., **211**, 893 (1954)
- 2) Moore, S., Stein, W. H. : J. Biol. Chem., **211**, 907 (1954)
- 3) 那須弘之 .. 生化学, **30**, 205 (1958)
- 4) Tallan, H. H., Moore, S., Stein, W. H. : J. Biol. Chem., **219**, 257 (1956)
- 5) 那須弘之 生化学, **30**, 264 (1958)
- 6) Stein, W. H. : J. Biol. Chem., **201**, 45 (1953)
- 7) Tallan, H. H., Moore S., Stein, W. H. J. Biol. Chem., **230**, 707 (1958)
- 8) Berg, P. : J. Biol. Chem., **205**, 145 (1953)
- 9) 奥村二吉, 大月三郎, 青山達也, 本郷亮 : 医学と生物学, **47**, 8 (1958)
- 10) 奥村二吉, 大月三郎, 青山達也 : 医学と生物学, **47**, 160 (1958)
- 11) 奥村二吉, 大月三郎, 深井延浩, 西岡博輔 . 医学と生物学, **48**, 109 (1958)
- 12) Tallan, H. H., Moore, S., Stein, W. H. . J. Biol. Chem., **211**, 927 (1954)
- 13) Ansell, G. B., Richter, D. Biochim. Biophys. Acta, **13**, 92 (1954)
- 14) 湯之上茂 : 岡山医学会雑誌投稿中.
- 15) Roberts, E., Frankel, S. : J. Biol. Chem., **187**, 55 (1950)
- 16) Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R., Seale, B. : J. Biol. Chem., **187**, 35 (1950)
- 17) Horowitz, N. H. : J. Biol. Chem., **171**, 255 (1947)
- 18) Stekol, J. A. : A Symposium on Amino Acid Metabolism, 509 (1955)
- 19) Hess, W. C. . Arch. Biochem. Biophys., **40**, 127 (1952)
- 20) Blaschko, H., Hope, D. B. : Biochem. J., **63**, 7P (1956)
- 21) Binkley, F., Christensen, G. M., Jensen, W. N. . J. Biol. Chem., **194**, 109 (1952)
- 22) Tabachnick, M., Tarver, H. : Arch. Biochem. Biophys., **56**, 115 (1955)
- 23) Gaitonde, M. K., Richter, D. : Proc. Roy. Soc. London, Series B, **145**, 83 (1956)

Studies on Free Amino Acids in the Brain

Part VII

Estimation of Free Amino Acids in the Human Brain by the Ion-Exchange Chromatography.

By

Shigeru Yunoue

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

By means of the ion-exchange chromatography free amino acids and their related compounds in the fresh brain tissue have been estimated. As for the test material, pieces of the cerebral cortex sectioned at the time of the surgical operation in the patients with cerebral tumor or with epilepsy are used.

As the result we have obtained the following noteworthy differences when compared with the results previously reported by us concerning several species of mammals. They are: (1) In the human brain there is a considerable amount of cystathionine. Namely, 19.4 to 43.2 mg/100g wet weight, and this substance is far smaller or not recognizable in other animals; and (2) the amounts of γ -aminobutyric acid and taurine are a good deal smaller than animals.

Moreover, in general the pattern of the free amino acids in the human cerebral cortex may be said to resemble closely that in dog.
