

脳のアミノ酸代謝 (IV)

ナマズ脳におけるトランスアミノネーションについて

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

今井 昭 正

〔昭和34年1月20日受稿〕

序 論

脳の生化学的研究の発展により脳アミノ酸代謝の特異性がしだいに問題となつてきているが、トランスアミノネーションについては Braunstein ら¹⁾²⁾ によりグルタミン酸酸化の意義及びトランスアミノネーションの役割に関連して多少とも理解されるようになり漸次広範囲に亘つて行われる事³⁾ が判つて来たが、未だ哺乳動物脳についての報告⁴⁾⁷⁾ をみる以外、広く下等動物脳にいたるまで系統的に検索した報告はない。

各種動物脳は発達の状態及び機能、細胞構築像に対応した複雑なアミノ酸代謝機構の存在する事が考えられる。私はこれらの見地から脳におけるアミノ酸代謝の動態解明の一方法として広く脊椎動物門の各綱から代表的な動物を選び、脳におけるトランスアミノネーションの比較生化学的研究を試みた。

今回は先づ脊椎動物の中、最も下等な中枢神経系をもつ魚綱の中から日本産ナマズ (*Parasilurus asotus*) の脳についてペーパークロマトグラフィー法によりトランスアミノナーゼ活性を測定し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1) 実験材料

実験に用いたアミノ酸は国産品、輸入品を問わず可及的一流メーカーの特級品を使用した。 β -オキシ- γ -アミノ酪酸は神戸薬大富田教授の御好意によるものであり、 ϵ -アミノカプロン酸は鳥取大学医学部精神科教室において合成⁸⁾ したものである。 α -ケトグルタル酸は和光純薬特級品を使用した。

酵素材料としては断頭直後速に取り出したナマズ、マウスの新鮮全脳を pH 7.6 $1/16$ M リン酸緩衝液で10倍のホモジネートとしたものを使用した。なおナマズは12月、1月 (冬期) のものである。

2) 実験手技

a) Incubation : 1.0mlの脳ホモジネート, 1.0mlのリン酸緩衝液, 0.5mlのアミノ酸溶液 (75 μ M) をツンベルグ管主室に入れ、予め中性化した 0.5mlの α -ケトグルタル酸溶液 (75 μ M) を側室に入れ、ガス相は窒素ガスで完全に交換し、ワールブルグ装置を利用し、38°C水浴中で10分間予備振盪後、側室の α -ケトグルタル酸を主室に傾注し、更に38°C、60分間振盪した。

Incubation 終了後直ちに7.0mlの無水アルコールを加え、蛋白凝固を来すまで充分混合した後、15分間遠沈し、完全に除蛋白した上澄液を定量的に採取し蒸発乾固せしめ、その残渣を水で1.0mlの容量とした。

b) ペーパークロマトグラフィーによる分離、定量: 生成されたグルタミン酸をペーパークロマトグラフィーを用いて分離、定量し、トランスアミノナーゼ活性を測定した。東洋濾紙 No. 50 に 0.03ml の Sample を塗布し、一次元上昇法により展開した。溶媒は各アミノ酸の Rf を考慮し、ブタノール・醋酸・水 (4・1・1) 或は75%含水フェノールの中、分離のよい方を用いた。然しセリンの場合のみグルタミン酸との分離には何れも不完全であつた。フェノール溶媒を用いた時は展開終了し、濾紙乾燥後エーテルで洗滌した。アミノ酸の位置は0.15%ニンヒドリンの水飽和ブタノール溶液を噴霧決定し、グルタミン酸に相当する部位を切り取り、又ペーパーだけによる色価を決定するため等面積のブランクも切り取つた。それぞれの濾紙片を各試験管にとり、Fowden⁹⁾ の方法で濾紙表面に吸着されたアムモニアを除去した後、Troll & Cannan¹⁰⁾ の方法で発色、島津製分光光度計570m μ で比色定量した。

以上の実験手技については Awapara & Seal¹¹⁾ 及び住田⁷⁾ の報告を参照した。

実験成績

アミノ酸を加えずに α -ケトグルタル酸だけで組織を incubate しても若干のグルタミン酸が合成されるので、各実験毎にアミノ酸を除外したケト酸単独添加の対照を作り、各アミノ酸のトランスアミナーゼはこの価を差引き補正した。以下各表に示す価は生成されたグルタミン酸からケト酸単独添加の対照で生成された量を差引いたもので、数値はグルタミン酸の窒素量を per tube μg 単位で表したものである。又これらペーパークロマトグラフィーによるグルタミン酸定量の精度を知るため、予備実験として per tube 180 μg 窒素量のグルタミン酸を加え、前述の実験法に従い添加グルタミン酸を定量した。その結果は第1表に示す通りである。更にグルタミン酸は1時間の Incubation の間に量的変化を来す事が考えられるので、同一条件で1時間後に

第1表 脳組織ホモジネートに附加したグルタミン酸の検出 (4例平均)

附加グルタミン酸 アミノ窒素量	検出量*	%
180 μg	191.1 μg	106.2

* 組織だけによるグルタミン酸量を差引き補正した値

第2表 脳組織ホモジネートに附加したグルタミン酸の38°C, 1時間 Incubation 後の検出 (4例平均)

附加グルタミン酸 アミノ窒素量	検出量*	%
180 μg	176.2 μg	97.9

* 1時間 Incubation 後の組織だけによるグルタミン酸量を差引き補正した値

定量し第2表の結果を得た。

なお以上の予備実験で示される如く10 μg per tube 或はそれ以下に相当する数値は誤差の範囲で確実ではない。

1) α -アミノ酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミナーゼ

第3表は16種の α -アミノ酸と α -ケトグルタル酸からのトランスアミナーゼを調べたものであるが、可成りのアミノ酸において本反応の行われる事が判る。

マウス脳と比較すればむしろ一般に比較的高い活性を示している。特にアスパラギン酸、アラニン、ロイシン、スレオニンに著明な差がみられた。本実験の結果あらたにナマズ脳においてグリシン、メチオニンに僅かではあるが本反応が認められ、又逆に

第3表 α -アミノ酸と α -ケトグルタル酸からのグルタミン酸生成

アミノ酸	動物別					
	生成グルタミン酸アミノ窒素量				* マウス脳	6) マウス脳
	ナマズ脳					
1	2	3	平均			
l- アスパラギン酸	334.6	354.0	348.0	345.5	259.2	285.0
dl- アラニン	168.7	182.0	171.3	174.0	81.5	93.0
dl- イソロイシン	82.5	83.1	83.8	83.1	79.7	92.6
l- ロイシン	124.6	112.3	129.5	121.1	82.0	76.9
dl- バリン	95.4	89.2	100.4	95.0	65.8	61.1
dl- スレオニン	43.6	49.8	50.8	48.0	19.7	27.0
dl- ノルバリン	57.8	52.6	48.2	52.8	42.7	41.1
dl- セリン	分離不良	"	"	"	"	"
l- メチオニン	15.7	17.5	10.5	14.5	8.4	- 2.3
l- チロシン	79.2	83.8	84.9	82.6	54.5	-
グリシン	9.9	12.3	17.8	13.3	3.8	1.2
l- ヒスチジン	- 5.3	- 3.6	- 3.9	- 4.2	4.3	5.1
dl- ノルロイシン	6.0	3.9	4.3	4.7	0.6	0.4
l- プロリン	2.2	5.3	5.8	4.4	- 2.2	- 1.4
l- ヒドロキシプロリン	3.1	3.5	2.9	3.1	- 2.0	- 2.6
l- フェニールアラニン	6.7	12.3	7.1	8.0	28.1	20.6

単位: μg per tube

* 3例平均値

第4表 ω-アミノ酸とα-ケトグルタル酸からのグルタミン酸生成

動物別 アミノ酸	生成グルタミン酸アミノ窒素量						
	ナマズ脳					* マウス脳	7) マウス脳
	1	2	3	4	平均		
γ-アミノ酪酸	75.4	71.2	78.4	69.5	73.6	89.5	98.8
β-アラニン	19.4	27.7	22.4	21.1	22.6	49.8	57.6
β-オキシ-γ-アミノ酪酸	25.1	23.5	29.8	26.4	26.2	73.9	91.0
ε-アミノカプロン酸	10.5	6.9	5.3	7.8	7.6	7.3	7.1

単位: μg per tube * 3例平均値

第5表 ジ-アミノ酸及びシステイン酸とα-ケトグルタル酸からのグルタミン酸生成

動物別 アミノ酸	生成グルタミン酸アミノ窒素量						
	ナマズ脳				* マウス脳	6) マウス脳	
	1	2	3	平均			
dl-オルニチン	33.3	39.2	32.5	35.0	33.5	31.7	
l-リジン	- 2.9	1.8	- 0.4	0.5	0.8	0.9	
dl-シトルリン	7.7	4.2	8.1	6.6	3.8	1.8	
l-アルギニン	- 1.8	- 3.5	- 3.3	- 2.8	2.5	1.8	
l-システイン酸	162.0	155.7	163.8	160.5	169.8	177.0	

単位: μg per tube * 3例平均値

マウス脳において活性のみられたフェニールアラニンに本反応の行われない事が判明した。

本研究で調べたα-アミノ酸の中、ヒスチジン、ノルロイシン、プロリン、ヒドロキシプロリン及びフェニールアラニンにはトランスアミナーゼ活性はみられなかつた。

2) ω-アミノ酸とα-ケトグルタル酸とのトランスアミネーション

使用したアミノ酸はγ-アミノ酪酸, β-アラニン, β-オキシ-γ-アミノ酪酸, ε-アミノカプロン酸の4種であるが、この成績は第4表に示した。

γ-アミノ酪酸はナマズ脳とマウス脳とではほぼ同様の活性値を示している事は極めて興味深く、サカナの脳で本反応を調べた近藤¹²⁾の報告にもほぼ一致している。β-アラニン, β-オキシ-γ-アミノ酪酸は何れもマウス脳に比較すると低い値を示している。ε-アミノカプロン酸についてはすでに Roberts¹³⁾及び住田⁷⁾がマウス脳では活性をみとめないと報告しているが、ナマズ脳においても全く活性がみられなかつた。

3) ジ-アミノ酸及びシステイン酸とα-ケトグルタル酸とのトランスアミネーション

第5表は4種のジ-アミノ酸とシステイン酸から

のトランスアミネーションの成績であるが、ジ-アミノ酸の中、オルニチンにマウスと同様の活性値を認めた以外、リジン, シトルリン, アルギニンには本反応は全くみられなかつた。

又システイン酸にマウス同様著明なトランスアミナーゼ活性が認められた。

以上、主としてナマズ脳におけるトランスアミネーションの成績についてマウス脳と比較して述べたが、今回行つたマウス脳のトランスアミネーションでは何れのアミノ酸においても第3, 4, 5表にみられるとおり住田⁶⁾⁷⁾の報告と同様の結果を得た。

考 察

脊椎動物門中高等な哺乳綱に属するマウス脳のトランスアミネーションについては、すでに住田の詳細な報告⁶⁾⁷⁾があり、又最近、近藤¹⁴⁾は犬の脳各部位についてトランスアミナーゼ活性を測定し、α-アミノ酸とω-アミノ酸に関与するトランスアミナーゼの種類が相違するであろう事を推定した。Schwering¹⁵⁾はグルタミン酸と焦性ブドウ酸とのトランスアミネーションは、ウサギの胎盤ではみられるがネズミの胎盤ではみられない事を記載している。而して本実験の結果、マウス脳とナマズ脳ではトラン

スアミナーゼ活性に可成りの相違がみられた事実から、明らかに動物の脳は種類及び発達の状態、機能、細胞構築像の異なるに従つてその酵素活性度に可成りの相違のみられる事が示唆されたものと思われる。

更に又下等動物の脳が如何なる代謝機構を示しているかを知る事は、哺乳動物脳のアミノ酸代謝系について考えるためにも大きな基盤を与えるものであろうとの見地から、最近これら動物脳についての生化学的研究が知られてきている。即ちナマズ脳についての高橋¹⁶⁾及び教室¹⁷⁾の研究によるとナマズ脳のアムモニア量は少いといわれ、この事は哺乳動物と比較してナマズ脳の前駆物質のグルタミン酸脱水素酵素活性が非常に弱いという事と密接な関連をもつものであろうし、更に今回ナマズ脳に比較的高いトランスアミナーゼ活性をみとめた事はアムモニアによりトランスアミネーションが容易に抑制されるという見解¹⁸⁾をも裏付けるものであろうと考えられる。青山¹⁹⁾は最近ナマズ脳の前駆アミノ酸量を測定し、哺乳動物に比べアスパラギン酸、グルタミン酸量が少い事を報告した。この事は魚類では哺乳動物脳に比べ呼吸が低く嫌気的解糖が高いという Verjbinskaya²⁰⁾の記載と矛盾するものではないが、更に γ -アミノ酪酸、グリシン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン等のアミノ酸量は哺乳動物と著変のない事を報告している。一方奥村²¹⁾の研究によればナマズ脳の前駆グルタミン酸脱水素酵素活性は殆んどみとめられない

といわれている。然るに本研究の結果、ナマズ脳においてこれらアミノ酸に何れもトランスアミナーゼ活性がみとめられ、特にグルタミン酸の脱炭酸反応生成物である γ -アミノ酪酸においても著明な活性をみとめた事は以上の知見と考え合わせ極めて興味深く、ナマズ脳におけるアミノ酸代謝の主要なる経路はトランスアミネーションによるものではあるまいかという推定に解明の一端を与えたものと考えられる。

結 論

ナマズ脳、マウス脳を用い定量的ペーパークロマトグラフィーを応用し、16種の α -アミノ酸、4種の ω -アミノ酸、4種の β -アミノ酸及びシステイン酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミネーションについて比較研究し、ナマズ脳におけるアミノ酸代謝機構の可能性を検討した。

1) ナマズ脳ではマウス脳に比べ一般に高いトランスアミナーゼ活性を示し、特にアスパラギン酸、アラニン、ロイシン、スレオニンに著明であつた。

2) マウス脳で本反応のみられなかつたグリシン、メチオニンに活性が認められた。

3) ナマズ脳においてフェニールアラニンにはトランスアミネーションが行われない事が判明した。

文 献

- 1) Braunstein, A. E : *Advances in Protein Chem.*, **3**, 1 (1947)
- 2) Cohen, P. P. : *The Enzymes*, **1**, 1040 (1951)
- 3) Meister, A. : *Federation Proc.*, **14**, 683 (1955)
- 4) Bessman, S. P., et al. : *J. Biol. Chem.*, **201**, 385 (1953)
- 5) Roberts, E. & Bregoff, H. M. : *J. Biol. Chem.*, **201**, 393 (1953)
- 6) 住田新平 : *生化学*, **28**, 339 (1956)
- 7) 住田新平 : *米子医誌*, **7**, 306 (1956)
- 8) *Organic Synthesis*, 合冊 II, 36, 東京丸善 (1951)
- 9) Fowden, L. : *Biochem. J.*, **48**, 327 (1951)
- 10) Troll, W. & Cannan, R. K. : *J. Biol. Chem.*, **200**, 803 (1953)
- 11) Awapara, J. & Seale, B. : *J. Biol. Chem.*, **194**, 497 (1952)
- 12) 近藤務 : *生化学*, **30**, 447 (1958)
- 13) Roberts, E. : *Archiv. Biochem. & Biophys.*, **48**, 395 (1954)
- 14) 近藤務 : *生化学*, **30**, 449 (1958)
- 15) Schwerling : *Biochimija*, **15**, 25 (1950)
- 16) 高橋泰常 : *神経進歩*, **2**, 133 (1957)
- 17) 河井清 : 未発表
- 18) Kergl, E., 茂在敏司, 他訳 : *グルタミン酸*, **30**, 医学書院, 東京 (1957)
- 19) 青山達也 : *生化学*, **30**, 452 (1958)
- 20) Verjbinskaya, N. A., Palladin, A. V., 松本淳治訳 *神経系の生化学*, **201**, 協立書店, 京都 (1957)
- 21) 奥村二吉 : *生化学*, **28**, 740 (1957)

Metabolism of Amino Acids in the Brain (IV)
Studies on the Transamination in the Brain of Catfish
(Parasilurus asotus)

By

Akimasa Imai

Department of Neuro-Psychiatry Okayama University Medical School
(Director: Prof. Nikichi Okumura)

Using the brains of catfish (*Parasilurus asotus*) and mouse as the test materials and with the aid of paper chromatography the author compared the transamination of 16 kinds of α -amino acids, 4 different ω -amino acids, 4 di-amino acids, cysteic acid and α -ketoglutaric acid and studied the possibility of the amino acid metabolism in the brain of catfish. The results are as follows:

1. The brains of catfish demonstrate generally a high transaminase activity as compared with the brains of mice, especially the activity of aspartic acid, alanine, leucine and threonine is marked.
 2. Glycine and methionine that are not transaminated in the mouse brain demonstrate their activity in the brain of catfish.
 3. Phenylalanine is not transaminated in the brain of catfish.
-