

# 脳髄組織における $^{14}\text{C}$ -glucose のアミノ酸への 転化に関する研究

## 第 1 編

### 人脳および家兎脳 homogenate による $^{14}\text{C}$ -glucose より アミノ酸への転化について

岡山大学医学部第1 (陣内) 外科教室 (指導: 陣内教授)

黒 田 尊 明

[昭和34年8月7日受稿]

#### 第1章 緒言ならびに文献

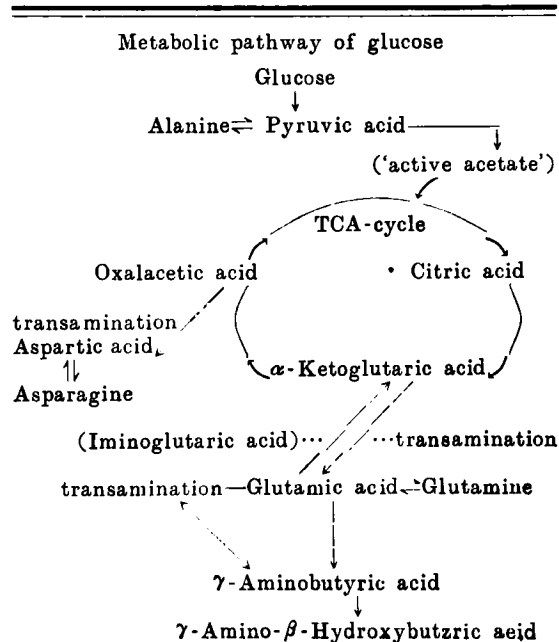
脳は energy 源をもつばら glucose に仰いでいるという点において脳の glucose 代謝の研究はきわめて重要視されており、今日まで数多くの研究がなされている。すなわち glucose は脳髄においても筋あるいは肝組織におけるとほぼ同様に、まず hexokinase により ATP から terminal phosphate をうけとり、大部分は Embden-Myerhof の経路に入り、数段階の中間代謝過程を経て pyruvate を生じ、酸素の存在する場合はさらに TCA cycle にはいつて炭酸ガスと水にまで分解される。その他一部は Warburg-Dickens の酸化過程などの shunt pathway を経て代謝されうると考えられるが、いずれも直接的あるいは間接的には pyruvate を経て TCA cycle に連絡されている<sup>1)2)</sup>。

一方、TCA cycle は glucose などの炭水化物代謝の最終段階としての役割をはたしているのみならず、脂肪も acetylcoenzyme A を経て、これに流入するし、蛋白質も一部のアミノ酸を通してこれに連絡している。すなわち第1図に示すごとく、transamination により alanine は pyruvate と、aspartic acid は oxal-acetate と、glutamic acid は  $\alpha$ -ketoglutarate とそれぞれ移行しうることが明らかにされており、これらのアミノ酸はその他のアミノ酸とも互いに代謝的連絡があることが知られている。すなわち cysteine, cytine, methionine は alanine と、また histidine, proline, hydroxyproline, arginine, ornithime などは glutamic acid とそれぞれ連絡がある。それゆえ radio active な glucose を脳組織

に与えると、これの一部は TCA cycle にはいつたのち種々のアミノ酸に転化してゆくであろうことは当然考えられることである。

このことはすでに Rafelson, Winzler and Pearson が Mouse 脳と  $^{14}\text{C}$ -glucose を incubate することにより、その蛋白分割から放射能が検出されることによつて明らかにし、つづいて1951年には正常および Theilers GD VII Virus を接種した生後1日の Mouse の脳 homogenate と  $^{14}\text{C}$ -glucose を incubate してその蛋白分割をとり、それを加水分解して Moore and Stein の方法でこれを column chromatography により分割し、系統的にアミノ酸

第 1 図



を分離し、これらの種々のアミノ酸への  $^{14}\text{C}$  の incorporation を検索しているが、このさい proline 以外の non-essential amino acid および, threonine 以外の essential amino acid の全部に放射能が検出されることを見出している<sup>4)</sup>。

さて、私どもの教室においては数年前より真正癲癇腦の生化学的研究が続けられており、その業績の一部はすでに陣内教授により綜説されているが<sup>9)10)</sup> 最近になつて真正癲癇腦のもつとも重要な生化学的特長は脳遊離アミノ酸とくに glutamic acid およびこれと代謝的関連のある glutamine, aspartic acid, asparagine,  $\gamma$ -aminobutyric acid などのアミノ酸のうちのいずれかの代謝過程に欠陥があるのではなからうかと考えられるに至つており<sup>11)12)13)</sup>、真正癲癇腦の生化学的特長を究明するうえにおいて脳遊離アミノ酸の生成状態を知るといふことはきわめて重要なことであると考えられる。

私はかかる目的の研究のため、まず、家兎正常脳および非癲癇人脳において glucose から遊離アミノ酸の生成される状態を明らかにするため、 $^{14}\text{C}$ -glucose もちいて次のごとき実験をおこなつた。

## 第2章 実験方法

### 第1節 実験に用いた組織

人脳は、私どもの教室において外科的手術をおこなつた患者の大脳皮質を使用した。

すなわち、癲癇患者の場合には Area 6、非癲癇患者（脳腫瘍）の場合には、前頭葉を剔除した脳組織片を使用した。

動物実験例には正常家兎をもちい、その大脳皮質のみを取り出して使用した。

### 第2節 脳 homogenate の作成

剔除した脳組織を直ちに氷冷し、附着せる柔膜および血管をとりのぞき皮質のみとなし、10倍容の生理的食塩水を加え、Potter-Elvehjem の homogenizer で3分間 homogenize した。

### 第3節 Isotope

使用した  $^{14}\text{C}$ -labelled glucose は Radiochemical Center, Amersham (England) 製のものであり、generally  $^{14}\text{C}$ -labelled D-glucose である。

放射能の強さは、その 1.37mg が 0.1mC である。実験にさいしては、この 0.1 mC を蒸留水 30 ml に溶解して使用した。

### 第4節 実験系

Rafelson<sup>3)4)</sup> らに準じ脳 homogenate を Simons 液中に incubate した。すなわち脳 homogenate

0.5 ml に Simons 液 3ml および  $^{14}\text{C}$ -glucose 液 0.3ml (1  $\mu\text{C}$ ) を加えた。

これに用いた Simons 液 (Simons' solution X7) は次の組成を有し pH9.0 である。

NaCl	8.0g/l
KCl	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.147
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.203
$\text{NaHCO}_3$	1.01
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.213
glucose	1.0

### 第5節 実験手技

上述のごとき実験系に 38°C の孵卵器に 24 時間 incubate したのち、100°C の water bath 中に 3 分間入れ、冷却後無水 alcohol 3ml を加えて反応停止および蛋白凝固せしめた後、2,000 回転にて 5 分間遠沈し、この上清 0.1 ml について paper chromatography を行なつた。

paper chromatography の展開は 2 次元展開を行い、展開溶媒は飽和 phenol 水、およびブタノール-醋酸-水 (4:2:1) をもちいた。spot の検出は X 線フィルムによる autoradiography 法によるほか ninhydrine 試験薬による呈色反応を行なつた。

また一方 autoradiography により検出された spot については低 energy 用 Geiger-Müller 計測器により counts per minute (cpm) を測定した。

この際 radio-activity が検出される spot の同定には、精製した既知の種々のアミノ酸試薬を同時に展開して、この ninhydrine による spot を対照として比較した。

## 第3章 実験成績

上記の方法により  $^{14}\text{C}$ -glucose の人脳および家兎脳 homogenate によるアミノ酸への転化を検索し、次のごとき成績をえた。

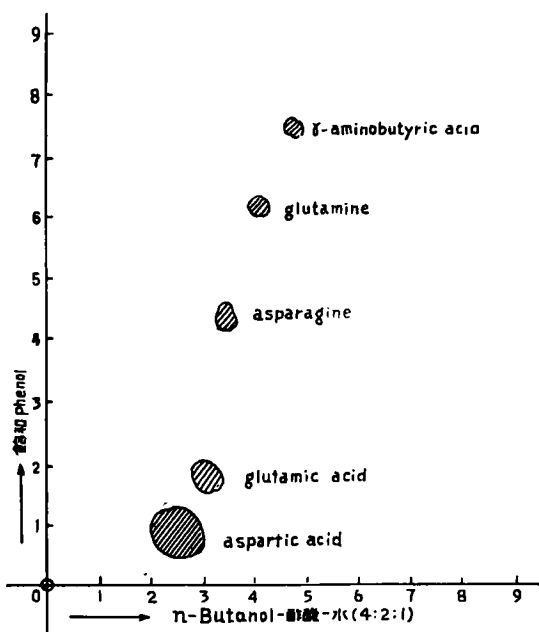
### 第1節 人脳例についての実験

第2図は人脳を用いた反応系を除蛋白した上清を 2 次元 paper chromatography により展開した後、レントゲンフィルム (Fuji X-ray film) と 2 週間密着させてえられた radiogram である (第2図)。

これにより人脳 homogenate によつて  $^{14}\text{C}$ -glucose から aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine および  $\gamma$ -aminobutyric acid が生成されたことがわかる。

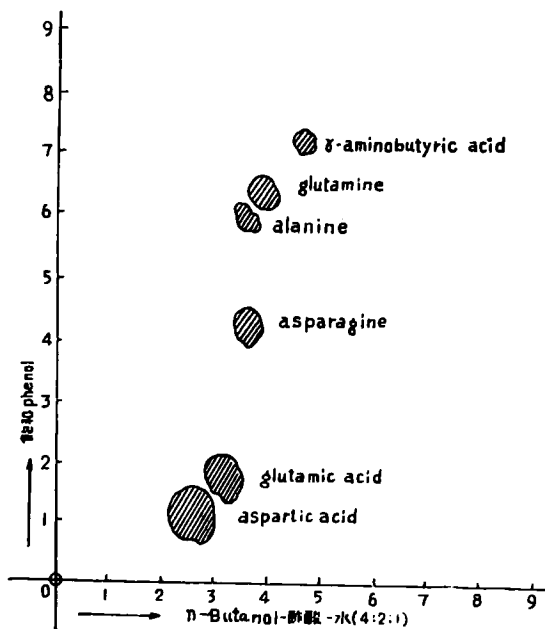
### 第2節 家兎脳についての実験

第2図 人脳 homogenate により  $^{14}\text{C}$ -glucose から転化した遊離アミノ酸



上述の人脳例における実験と同様な方法を正常家兎脳について用いてえられた radiogram は第3図に示すごとくである。これによると生成されたアミノ酸はほとんど人脳例と同様であるが、人脳と異なる点は alanine が生成されていることと aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine の spot が人脳例よりも強くあらわれていることである。

第3図 正常家兎脳 homogenate により  $^{14}\text{C}$ -glucose から転化した遊離アミノ酸



### 第3節 生成アミノ酸量の incubate 時間による推移に関する実験

第1節、第2節の実験により、上述のごとき数種のアミノ酸が生成されることが明らかになったが、これらのアミノ酸の生成の状態を正常家兎脳について時間的に追求してみたところ第1表のごとき成績をえた。すなわち10分~2時間までの短時間までは radioactive なアミノ酸の spot の数も少なく、濃度も淡いが、時間の経過とともに強くあらわれ、3時間では全部出揃い、24時間を経過するともつとも鮮明な spot がえられるようになる。短時間すなわち10分~2時間で生成されるアミノ酸は aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine に限定されているが、3時間で alanine および  $\gamma$ -aminobutyric acid も検出されうるようになる。いま、aspartic acid と asparagine とを比較すると明らかに aspartic acid が早期に強くあらわれ、同時に glutamic acid と glutamine とを比べると、glutamic acid が早くかつ強くあらわれることがわかる。

第1表 Incubate 時間による生成アミノ酸の推移

生成アミノ酸	時間						
	10分	30分	1時間	2時間	3時間	18時間	24時間
Aspartic acid	+	+	++	++	+++	+++	+++
Glutamic acid	+	+	+	++	++	+++	+++
Asparagine	+	+	+	+	++	++	++
Glutamine	+	+	+	+	+	+	++
$\gamma$ -Aminobutyric acid	-	-	-	-	±	±	±
Alanine	-	-	-	-	±	±	±

### 第4節 反応液 pH の遊離アミノ酸生成におよぼす影響

本節においては反応液がいかなる pH の場合にもつともよくあらわれるかということを知るために、もつとも早くかつ強くあらわれる aspartic acid について検討してみることにした(他のアミノ酸では spot がうすくて差があまりでないため)。いま反応液の pH を 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 と種々変化させて radiogram 上の spot の強さから aspartic acid のもつとも旺盛な pH の範囲を求めてみたところ、第2表のごとく人脳においても家兎脳においても 8.5~9.0 附近がもつとも spot が強くあらわれることを知った。

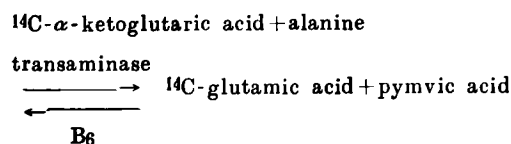
第2表 反応液 pH の Aspartic acid  
生成に及ぼす影響

実験 脳	pH 値	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
		家 兎 脳	++	+	##	###
人 脳	ス強の ポさを ットで (+)示 す	+	+	+	++	++

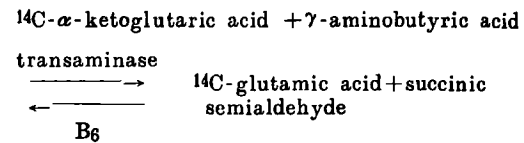
#### 第4章 総括ならびに考按

人脳ならびに家兎脳の homogenate による  $^{14}\text{C}$ -glucose から脳遊離アミノ酸への転化の状態を検索せんとして, paper chromatography を行ない, そののちの X線フィルムによる autoradiography により, 人脳, 家兎脳ともに  $^{14}\text{C}$ -glucose から aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine,  $\gamma$ -aminobutyric acid が, また家兎脳ではこの他に alanine が生成されることがわかった. また incubate 時間の変化によるアミノ酸の種類は2時間以内の短時間では aspartic acid, glutamic acid, asparagine および glutamine に限定されるが3時間を経過すると alanine および  $\gamma$ -amino-butyric acid も検出されるようになり, 24時間を経過するとすべての spot がもつとも鮮明となることを知った. そして aspartic acid や glutamic acid のごとき前駆物質となるものはその各々より生ずる誘導体よりもより早く且強くあらわれることがわかった. 反応液の pH の変化によるアミノ酸生成状態を aspartic acid について検するに, pH が 8.5~9.0 付近においてももつとも強い spot があらわれることを知った. したがって反応液の pH を 8.5~9.0 にすればもつとも良好な結果がえられるものと思われる.

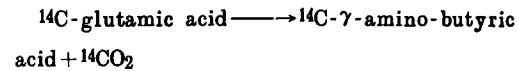
さて  $^{14}\text{C}$ -glucose から遊離アミノ酸の生成されることの説明としては, 第1図に示したごとく, 脳組織においては  $^{14}\text{C}$ -glucose は  $^{14}\text{C}$ -pyruvate をへて TCA cycle に入り,  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -ketoglutaric acid となり. これの一部は組織中の alanine あるいは  $\gamma$ -aminobutyric acid と transaminate し,



あるいは

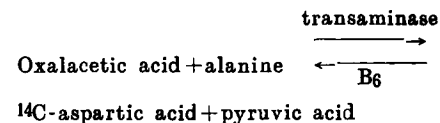


なる反応を介して  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid に転化し, この  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid は glutaminase により一部は  $^{14}\text{C}$ -glutamine に変化し, また一部は glutamic decarboxylase により,



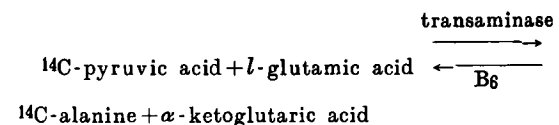
なる反応により  $\gamma$ -aminobutyric acid が生成されると考えられる.

一方, aspartic acid の生成されることは, TCA cycle member 中の  $^{14}\text{C}$ -Oxalacetic acid がつぎのごとく transaminate するからであろうと考えられる. すなわち,



また,  $^{14}\text{C}$ -asparagine は aspartic acid 対する asparaginase の作用と考えられる.

$^{14}\text{C}$ -alanine の生成されることは,



のごとき transamination によると考えられる. incubate 時間による生成アミノ酸の推移に関しては, 2時間までの短時間では aspartic acid および glutamic acid ごとき前駆物質となるものが比較的早く強くあらわれ, ついで asparagine, glutamine があらわれ, 3時間以上となれば alanine や  $\gamma$ -aminobutyric acid が検出されてくることがわかったがこのことは第1図のごとき代謝過程を経て生成されると考えれば当然のことであろう.

また本実験の成績から考えて, 十分アミノ酸を生成せしめるためには反応時間を常に24時間とする必要があることがわかる.

また反応液 pH の脳遊離アミノ酸生成におよぼす影響を aspartic acid についてみるに, 家兎脳, 人脳ともに pH 8.5~9.0でもつとも spot が強くあらわれるのを知った. 先に蛋白結合アミノ酸への  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation の研究を行なった Rafelson<sup>3)</sup> も pH 9.0 としているので私も第2編の実験

においては常に pH 9.0 の Simons 液を使用することにした。

### 第5章 結 論

人脳ならびに家兎脳の homogenate により  $^{14}\text{C}$ -glucose から脳遊離アミノ酸への転化の状態を検索せんがため、paper chromatography を行なつたのち、X線フィルムによる radioautography を行ない、つぎのことを明らかにした。

1) 人脳および家兎脳ともに  $^{14}\text{C}$ -glucose から放射性をもつた glutamine, asparagine, glutamic acid, aspartic acid および  $\gamma$ -aminobutyric acid が、家兎脳ではこの他に alanine が生成される。

2) 正常家兎脳について incubate 時間による生成アミノ酸の推移をみるに、短時間では aspartic acid および glutamic acid のごとき前駆物質となるものが早くかつ強くあらわれ、ついで asparagine, glutamine があらわれやがて alanine, および  $\gamma$ -aminobutyric acid も検出されるようになる。

3) 全部遊離アミノ酸が鮮明にあらわれるには24時間を要する。

4) 反応液の pH は 8.5~9.0 の間で反応がもつとも強くあらわれる。

(稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導御校閲を賜つた陣内教授に深甚の謝意を捧げる)。

### 文 献

- 1) Krebs, H. A., chemical pathway of Metabolism 1, 109~171 (1954).
- 2) 陣内伝之助, 森昭胤・日新医学, 44, 243~249 (1957).
- 3) Rafelson, M. E., Jr, Winzler, R. T. and Pearson, H. E. J. Biol. chem. 181, 595 (1949).
- 4) Rafelson, M. E., Jr. Winzler, R. T. and Pearson, H. E., J. Biol. Chem. 193, 205 (1951).
- 5) Moore, S. and Stein, W. H.: J. Biol. Chem., 221, 893~906 (1954).
- 6) Moore, S. and Stein, W. H.: J. Biol. Chem. 221, 907~913 (1954).
- 7) Stein, W. H. and Moore, S.: J. Biol. Chem. 221, 915~926 (1954).
- 8) Tallan, H. H., Moore, S. and Stein, W. H.: J. Biol. Chem. 201, 927~939 (1954).
- 9) 陣内伝之助・アレルギー, 3, 209~225 (1954).
- 10) Jinnai, D.: Acta Medicine Okayama, 18, 423~450 (1954).
- 11) 山田孝彦 岡山医学会雑誌, 71, 780~798 (1959).
- 12) 山本泰久: 岡山医学会雑誌, 71, 305~318 (1959).
- 13) 山口穂也・岡山医学会雑誌, 71, 投稿中.

## Conversion of $^{14}\text{C}$ -Labelled Glucose to Amino Acid in Brain Tissue

### Part 1. Conversion of $^{14}\text{C}$ -labelled Glucose to Amino Acid by Homogenate of human and Rabbits Brain

By

Takaaki KURODA

1st Dept. of Surgery Okayama University Medical School  
(Director: Prof. D. Jinnai M. D.)

The conversion of  $^{14}\text{C}$ -labelled glucose to free amino acids by homogenate of human and rabbit brain was studied by paper chromatography and radioautography with X-ray film.

**Results were:**

1) In both human and rabbit brain glutamine, asparagine, glutamic acid, aspartic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid with radioactivity were derived from  $^{14}\text{C}$ -labelled glucose. Moreover in rabbit brain alanine was also derived.

2) In normal rabbit brain the derived amino acids were investigated. During short incubate time the precursors such as aspartic acid and glutamic acid appeared quickly and intensively. Next asparagine and glutamine showed up and then alanine and  $\gamma$ -aminobutyric acid were proved.

3) It needed 24 hours for all free amino acids to appear sharply.

4) The optimal pH of this reaction was 8.5—9.0

---