



Title	中枢神経系におけるthiamine代謝の生理的意義に関する基礎的研究
Author(s)	馬場, 明道
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/299
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文目錄

馬場明道

論文目録

氏名	馬場明道
----	------

主論文

中枢神経系における thiamine 代謝の 生理的意義に関する基礎的研究

1. Glucose intolerance in thiamine-deficient rats.

H. Iwata, A. Baba, T. Baba and T. Nishikawa

J. Pharm. Pharmacol., 26, 707 (1974)

(Thiamine 不足時の耐糖能低下)

1. Role of thiamine metabolism in the central nervous system. I. Basic properties of thiamine triphospha- tase in rat brain,

H. Iwata, A. Baba and T. Matsuda

Japan. J. Pharmacol., 24, (1974) in press

(中枢神経系における thiamine 代謝の役割
I. ラット脳 thiamine triphosphatase の基礎的性質)

1. Role of thiamine metabolism in the central nervous system. II. Effects of various agents on thiamine triphosphatase activity in rat brain.

H. Iwata, A. Baba, T. Matsuda and Z. Terashita

Japan. J. Pharmacol., 24, (1974) in press

(中枢神経系における thiamine 代謝の役割
II. ネット脳 thiamine triphosphatase に対する種々薬物
の作用)

1. Some properties of degradating enzyme system of phosphorylated thiamines in the brain and the effect of chlorpromazine on it.

H. Iwata, A. Baba, T. Matsuda and Z. Terashita
in "Thiamine-Physiological functions, metabolism,
and relation to disease with particular emphasis
on neurological relationships-", edited by
Gubler, C.J. and Fujiwara, M., John Wiley and
Sons, Inc. (1975) in press

(ネット脳における リン酸化 thiamine の分解酵素系の
性質 及び それに対する クロルプロマジンの作用)

1. Properties of thiamine diphosphatase and thiamine triphosphatase in rat brain microsomes
The action of chlorpromazine.

H. Iwata, A. Baba, T. Matsuda and Z. Terashita
J. Neurochem., submitted for publication

(ネット脳ミクロソームの thiamine diphosphatase と
thiamine triphosphatase の性質. クロルプロ
マジンの作用)

参考論文

1. Catecholamine accumulation in tissues of thiamine-deficient rats after inhibition of monoamine oxidase.

H. Iwata, T. Nishikawa and A. Baba

Europ. J. Pharmacol., 12, 253 (1970)

(Thiamine 欠乏鼠の組織内カテコールアミン
のモノアミンオキシダーゼ阻害後の蓄積)

論文内容の要旨

中枢神経系における thiamine 代謝
の生理的意義に関する基礎的研究

学位申請者

馬場 明道

緒 言

近年になり、von Muraletにより thiamine リン酸エステルが補酵素としての役割以外に、神経組織において神経伝達に関与する可能性が示された。以後、この仮説を支持する多くの研究がなされているが、いまだ完全に解明されてはいない。

最近になり、中枢神経系での thiamine triphosphate (TTP) の欠損症としての亜急性壊死性脳脊髄炎の発見、更には、神経活性物質による神経膜分画からの脱リン酸化された thiamine の遊離、等の事実により、神経組織でのリン酸化された thiamine の生理的意義が注目されてきた。以来、多くの研究がなされているが、この現象の生化学的解明、その機作についてはいまだ不明の点が多い。

生体内においては、thiamine は大部分が thiamine diphosphate (TDP) として存在し、この分解酵素 thiamine diphosphatase (TDPase) の性質については、以前から多くの研究がなされてきた。一方、TTP を分解する酵素 thiamine triphosphatase (TTPase) については、ごく最近にその存在がみいだされたのみで、その諸性質、活性に要する物質、更には、その生理的意義については何ら判明していない。

以上のことから、著者は神経系での thiamine の生理的意義を追求する研究の一段階として、TTPase を中心に thiamine 代謝酵素の諸性質、並びに神経機能との関連を明らかにしていくことが必要と思われる、本研究に着手した。

第 I 章 ツット脳 TTPase, TDPase の諸種性質

まず、TTPase, TDPase の細胞内分布、反応の特異性並びに基礎的性質の検討を行った。

ツット脳の細胞分画において、TTPase は後述する様に、soluble なものと、membrane-associated なものの二種類が存在し、membrane-associated TTPase は、核、ミトコンドリア分画に活性が高く、soluble TTPase は上清分画にその活性が高かった。一方、TDPase 活性はミト

ミトコンドリア分画に高い活性がみとめられた。又、肝については、TTPase、TDPase共に脳における分布とはほぼ同じであった。従って、以下の実験にはTDPaseとしてはミトコンドリア、TTPaseとしてはミトコンドリア、エリソ分画を用いた。

種々のpH値でのTTPase活性の分布をみると、microsomal TTPaseにおいてはpH 6.5とpH 7.8に二つのピークがみとめられ、一方、soluble TTPaseではpH 8.5~9.0にひとつのピークがみとめられた。次に、microsomal nucleoside triphosphataseのpH分布をinosine triphosphateを基質として検討すると、pH 8.0~8.5にひとつのピークがみとめられるのみで明らかにTTPaseの場合と異なっていた。又、部分精製したsoluble TTPaseについて基質特異性を検討したところTTPに特異的であった。

次に、TTPase反応の生成物の直接定量から P_i のモル遊離量と、TDPのモル生成量とが一致しており、TMPの生成はみとめられず一段階の脱リン酸反応であることが判明した。

TTPaseの二価カチオン要求性については、soluble TTPaseは Mg^{++} （最大活性：6mM）において活性化を受けるが、microsomal TTPaseは Mg^{++} 、あるいは Ca^{++} （最大活性：3mM）でも活性化がみとめられた。又、soluble TTPaseとmicrosomal TTPaseの違いのひとつとして、soluble TTPaseのみが生理的濃度の Ca^{++} で著明な活性阻害を受けることが明らかとなった。一方、microsomal TDPaseの二価カチオン要求性については、 Ca^{++} 、 Mn^{++} 、 Mg^{++} の順に活性化を受けることが判明した。

以上のことから、ラット脳TTPaseには性質の異なるsoluble TTPaseとmembrane-associated (microsomal) TTPaseの二種類が存在することがみとめられた。又、TTPase代謝が Ca^{++} によって調節される可能性が示された。

第二章 TTPase, TDPaseに対する薬物の作用

最近、神経活性物質による神経膜分画でのTTP、TDPの脱リン酸化の促進を示唆する知見、あるいは急性壊死性脳脊髄炎におけるTTPの欠損を示す知見、等から神経系における活性な型のthiamineとして

TTPase注目されているが、TTPase, TDPase に対し共に作用する条件、あるいは神経活性物質はみいだされていない。そこで本章では、種々の条件あるいは薬物の投与の TTPase, TDPase 活性に対する作用を *in vivo* と *in vitro* で検討した。

まず *in vivo* において、thiamine 欠乏、DL-methamphetamine, chlorpromazine の投与により、ラット脳 TTPase 活性の有意な変化が惹起されたが、reserpine では影響されず、現時点でこれら薬物による機能変化と酵素活性の変動の関連は不明である。又、insulin 投与、絶食等の実験から、脳及び肝 TTPase は calorigenic な因子によっても変動しないことが確認された。

次に、*in vitro* で種々の神経活性物質の作用を検討した。Microsomal TTPase, TDPase 共に acetylcholine, noradrenaline, tyramine, diphenylhydantoin 等によつて活性変動をうけなかった。そこで次に、一般に膜の ATPase を阻害することの知られている chlorpromazine (CPZ) の作用を検討した。

CPZ は、0.25~1.0 mM において soluble 及び microsomal TTPase を 20~70% 阻害し、逆に TDPase に対しては 0.125~0.5 mM の濃度において 20~180% もの著明な活性化を惹起することから明らかとなった。一方、ミトコンドリアの " Ca^{++} -TTPase" 活性は CPZ により影響されなかった。TTPase に対する CPZ 類似の作用は imipramine, desipramine でもわずかにみとめられた。更に CPZ は TTPase に対して非拮抗阻害を示し、TDPase については V_{\max} の約 3 倍の増大と共にそれに伴つて K_m の減少も惹起した。

以上のことから、TTPase, TDPase は非常に活性変動の捉え難い酵素であるが、多くの神経活性物質の中で、膜に作用しその機能を変えるとされている CPZ により TTPase 活性は抑制され、TDPase は活性化されるという興味ある事実が判明した。CPZ は多くの酵素系に対し、阻害作用を有するが、代謝上隣接する二つの酵素に全く逆の作用を及ぼす例は thiamine phosphatases において初めてみとめられたものである。

第三章 ラット脳ミクロゾームにおける TDPase, TTPase の 存在形式 (TTPase, TDPase に対する CPZ の作用機作)

一般に CPZ の作用場は細胞膜、顆粒膜にあるといわれており、膜蛋白の立体構造の变化、あるいは脂質部分への作用が考えられている。従って、前章で述べた CPZ の TTPase, TDPase に対する逆方向の作用という結果から、ミクロゾーム分画におけるこの二つの酵素の存在形式が異なっていることが推察される。そこで、CPZ のこれら酵素に対する作用機作の解明を通じて両酵素の存在形式の違いを明らかにすることを目的とし、アセトン処理並びに界面活性剤である deoxycholate の作用を検討した。

まず脳ミクロゾーム分画をアセトン抽出すると、TTPase 活性は約半に低下し TDPase 活性は逆に約4倍に活性化された。又、アセトン処置したミクロゾームでは、TDPase に対する CPZ の作用の逆転がみられ、抑制作用を示した。一方、TTPase に対する作用は変化しなかった。又、アセトン処置により、TDPase の V_{max} の著明な増大とそれに伴った K_m の減少がみられた。

次に、界面活性剤である deoxycholate (DOC) の作用を検討した。DOC, 0.02% の添加により TTPase の活性阻害、TDPase の活性化がみられた。又、アセトン処置したミクロゾームでは TDPase に対する DOC の作用の逆転がみられ抑制作用がみとめられた。

更に、アセトン処置によりみられた結果は、Triton X-100 で可溶化したもの、あるいは水に対して透析した後、凍結融解したものについてもみとめられた。

以上のことから、TTPase と TDPase は脳のミクロゾームにおいてその存在形式を異にし、TTPase 活性には脂質成分が必要であり、逆に TDPase は正常な状態では活性の抑えられた型として存在し、その抑制因子として、脂質成分の関与のことが推察される。又、CPZ の両酵素に対する作用の違いも、脂質を必要とする TTPase は CPZ が脂質と結合することにより活性が低下し、TDPase は活性化された型になる為と考えられる。このことは、CPZ の作用場が脂質成分にあること、更には、本章で示した如く、DOC

が CPZ と類似の作用を有していることから推定される。

第四章 Thiamine のそのリン酸エステルの膜機能 (ATPase) に対する作用

すでに明らかにして置いた如く、thiamine リン酸エステルの代謝は、膜顆粒分画においてその特有の性質を有している。従って、次に膜顆粒分画における thiamine リン酸エステルの作用の検討が必要である。

Thiamine リン酸エステルが直接、あるいは間接的にもひとつの生理作用をなすことを示す知見はほとんどない。そこで著者は、thiamine のひとつの生理作用の可能性として、膜の輸送系に対する作用を考へ、ATPase 活性を指標として in vitro で検討した。

その結果、ラット脳ミクロソームの Mg^{2+} -ATPase, $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, $Mg^{2+}-Ca^{2+}$ -ATPase のうち、 Ca^{2+} -ATPase 活性と $Mg^{2+}-Ca^{2+}$ -ATPase の Ca^{2+} 依存性活性の4が $10^{-5} \sim 10^{-3} M$ の TTP により約 20~50% の阻害を受けることが明らかにされた。又、この TTP による " Ca^{2+} -ATPase" 活性の阻害は単にナトリウム中での Ca^{2+} のキレートによるものではないことが示された。

以上の様に、TTP が多くの ATPase の中で " Ca^{2+} -ATPase" のみを阻害することが判明した。 in vivo において TTP が Ca^{2+} の輸送を変え得るかどうかについては、用いている TTP の濃度が高いことから明らかではないが、TTP が膜にも局在していること、又、" Ca^{2+} -ATPase" のみを特異的に阻害することを考へ併せると、TTP のこの作用は、thiamine リン酸エステルの代謝と Ca^{2+} の代謝が密接に関連する可能性を示すものとして興味ある知見であろう。

結 論

ラット脳 thiamine Triphosphatase (TTPase) には、可溶性のものとして膜に結合したもの2種類の存在がみとめられ、各々異なる性質を有していた。TTPase, thiamine diphosphatase (TDPase) 活性は、若干の例を除いて in vivo あるいは in vitro において、種々の

因子、神経活性物質によっても変動がみられず、活性変化の捉え難い酵素であることが判明した。しかしながら膜に作用しその機能を変えることの知られている chlorpromazine (CPZ) により、TTPase 活性が阻害され、TDPase 活性は逆に著明な活性化をうけるという興味ある知見がみとめられた。この CPZ の作用機作を解明するため、酵素標識である ミクロソーム合画をアセトン抽出すると、まず TTPase の比活性は低下し、TDPase のそれは著明に増加した。更に、TDPase に対する CPZ の作用も逆転し抑制作用がみとめられた。又、界面活性剤である deoxycholate はこれらの酵素に対して CPZ と類似の作用を有していた。これらのことは脳ミクロソーム合画における TTPase、TDPase の存在形式が脂質成分を介在として異なっていること、TDPase については正常では活性の抑えられる型で存在することを示している。次に、thiamine 及びそのリン酸エステルと膜機能の関連については、TTPase 種の ATPase の中で " Ca^{2+} -ATPase" 活性のみに著明な阻害作用を有することのみがみとめられた。

以上の知見から、脳ミクロソーム合画において、TTP、TDP の膜リン酸過程がそれぞれ特異な性質を有していること、そして、その代謝が Ca^{2+} の輸送系と密接な関連を有することのみが示された。

中枢神経系における thiamine 代謝
の生理的意義に関する基礎的研究

目次

緒言 ----- 1

本論

第I章 ラット脳 thiamine diphosphatase (TDPase),
thiamine triphosphatase (TTPase)の諸特性値----- 3

第1節 ラット脳及び肝 TTPase の細胞内分布----- 3

第2節 ラット脳 TTPase の特異性----- 10

第3節 ラット脳 soluble TTPase の Ca^{++} による抑制-- 15

第4節 考察 及び 小括 ----- 19

第II章 TTPase, TDPase に対する薬物の作用----- 24

第1節 Thiamine 欠乏動物の脳及び肝 TTPase 活性-- 25

第2節 ラット脳 TTPase 活性に対する DL-meth-
amphetamine, reserpine, chlorpromazine の
作用 (*in vivo*)----- 30

第3節 ラット脳 microsomal TTPase と TDPase 活性
に対する神経活性物質の作用----- 32

第4節 考察 及び 小括 ----- 40

第III章 ラット脳ミクロゾームにおける TDPase, TTPase
の存在形式 ----- 45

第1節 アセト処理ミクロゾームの TTPase,

TDase の活性変化, 並びに chlorpromazine の作用 --- 46

第2節 Deoxycholate の TTPase, TDase 活性に

及ぼす作用 --- 48

第3節 考察及び小括 --- 52

第IV章 Thiamine 及びそのリン酸エステルの膜機能

(ATPase) に対する作用 --- 56

第1節 ラット脳ミクロゾームの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, Mg^{2+}

ATPase, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性に対する thiamine 及び

そのリン酸エステルの作用 --- 57

第2節 ラット脳ミクロゾームの $\text{Mg}^{2+}\text{-Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性

に対する TTP の作用 --- 63

第3節 考察及び小括 --- 67

第V章 総括及び結論

1. 総括 --- 71

2. 結論 --- 75

謝辞 --- 77

参考文献 --- 78

緒言

Thiamine の生体内における存在意義としては, thiamine diphosphate (TDP) として pyruvate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, Ac^+ transketolase の補酵素として, 生体内代謝過程に重要な役割をにな, ていることが古くより知られている。しかしながら, thiamine 欠乏動物にみられる痙攣, 振せん, 反弓緊張等の症状の発現は, thiamine の補酵素としての役割からは説明できない¹⁾。同様にこれらの症状の発現が中枢原発性であることは, 中枢移行性の thiamine 類似拮抗物質である pyri thiamine により, 欠乏動物にみられると同一神経症状の発現がみとめられる²⁾に於し, 脳内に移行しえない oxythiamine においては観察されない³⁾ことより明らかである。

近年になり, von Muralt^{4,5)}により thiamine リン酸エステルが補酵素としての役割以外に, 神経組織において神経伝達に関与する可能性が示された。以後, この仮説を支持する多くの研究がなされているが⁶⁻¹⁰⁾, いまだ完全に解明されてはいない。

しかしながら, 最近になり中枢神経系での thiamine tri-

phosphate (TTP)の欠損症としての亜急性壊死性脳脊髓炎の
発見¹¹⁾, 更には, Itokawa, Cooper ら^{12,13)}により明らか
なされた神経活性物質による神経膜分画からの脱リン酸化を
経た thiamine の遊離, あるいは, 岩田ら¹⁴⁻¹⁸⁾によりみとめ
られた thiamine 欠乏動物における adrenergic system の抑
制, 等のことより神経組織でのリン酸化された thiamine の
補酵素として次の生理的意義が注目されてきた。しかし
ながら, 現在においてもこれらの現象の生化学的解明, そ
の作用機作については判明していない。

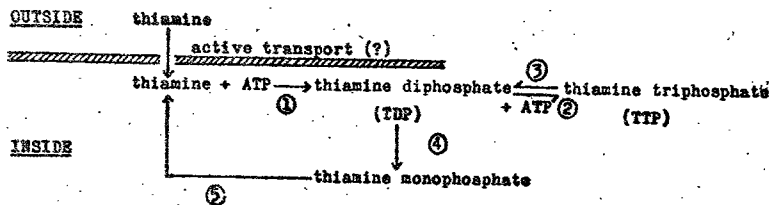
従って著者は, thiamine の神経組織での生理的役割を追
求していく上で, 脳における thiamine 代謝の基礎的性質の
解明が必要であるという観点から, いましばらく研究のな
されていない thiamine triphosphatase (TTPase)を中心に,
ラット脳における thiamine 脱リン酸化過程の酵素の種々の
性質, その意義について検討し, 更に thiamine の神経組
織におけるひとつの生理作用の可能性として, 膜機能に対
する作用を検討すべく, 本研究に着手した。

本 論

第 I 章

ラット脳 thiamine diphosphatase (TDPase), thiamine triphosphatase (TTPase) の諸種性質

Fig. 1 SCHEME OF THIAMINE METABOLIC PATHWAYS IN BRAIN



1. thiamine pyrophosphokinase
2. thiamine pyrophosphate-ATP phosphoryltransferase
3. thiamine triphosphatase (TTPase)
4. thiamine diphosphatase (TDPase)
5. thiamine monophosphatase

図1に哺乳動物の脳における thiamine 代謝の模式図を示す。図にみられるごとく、まず thiamine は、能動輸送により神経細胞内にとり込まれる¹⁹⁾。とり込まれた thiamine は、thiamine pyrophosphokinase により大部分がリン酸化を受け thiamine diphosphate (TDP) となる。TDP の代謝としては、古くからみとめられている脱リン酸化を受けて thiamine monophosphate (TMP) になる系 (TDPase) と、最近になり Cooper ら²⁰⁾ によりみとめられた ATP 依存性のリン酸化を受けて TTP になる系 (TDP-ATP-phosphoryl transferase)

の存在とがある。哺乳動物の脳では, thiamineはその約50%がこのTDPとして存在する。

Thiamine diphosphate 分解酵素 (TDPase) については、古くから多くの研究がみられ、ゴルジ体等の顆粒、膜分画に活性が高いこと²¹⁻²³⁾、cholinergic systemと関連を有すること^{24,25)}、又、肝臓においては、inosine diphosphatase と同一の酵素であること²⁶⁾等が知られている。

一方、TTPは脳において全 thiamine 量の約10%存在するが、前述のごとく、近年 TDP以上に神経組織における活性な型の thiamine として注目されている。しかし、その分解酵素 (TTPase) については、1972年に Hashitani, Cooper²⁷⁾ 及び Barchi, Braun²⁸⁾によりはじめて報告されたのみで、その諸性質、活性に変動を与える物質、等については何ら説明されていない。

従って、本章においてラット脳TTPaseについて、TDPaseとの比較のもとに、種々の性質の検討を行なった。

第1節 ラット脳及び肝TTPaseの細胞内分布

実験方法

1) ラット脳及び肝の細胞分画法

体重200~250 gのS.D.系雄性ラットを断頭後、脳及び肝を

氷冷した10倍量の0.25 M sucrose で テフロンホモゲナイザーを用い、ホモジナイズした。そのホモジネートについて遠心分離法を用い、各々、核分画(1000×g, 10分), 粗ミトコンドリア分画(14500×g, 20分), ミクロソーム分画(105000×g, 60分), 及びその上清分画(105000×g, 60分の上清)を得た。各顆粒分画は、0.25 M sucrose で各々3回洗滌した。得られた各分画は適量の0.25 M sucrose に懸濁し、蛋白濃度を2.0~3.5 mg/ml とした。各分画同志の混入は、ミトコンドリアの marker enzyme である succinate dehydrogenase²⁹⁾, RNA, DNA の測定³⁰⁾ によりチェックした。蛋白は Lowry の方法³¹⁾ により測定した。

2) TTP分解活性(TTPase)の測定

TTP分解活性の測定は、生成してくる無機リン酸を Baginski らの方法³²⁾ で定量しおこなった。標準反応液は、soluble TTPase の場合、全量 0.5 ml 中に 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 6 mM MgCl₂, 3 mM TTP と 300 µg/ml の蛋白を含み、membrane-associated TTPase の場合、同いく 100 mM Tris-maleate (pH 6.5), 3 mM MgCl₂, 3 mM TTP と 600 µg/ml の蛋白を含む。

5分間のプレインキュベーションの後、反応はTTPの添加により開始し、37℃で30分間インキュベーションした。反応停

止は氷冷した 10% TCA 0.5 ml を加えることにより行ない、遠沈後、その上清の無機リン酸を測定した。

ラット脳 TTPase には, soluble enzyme (至適 pH 9.0) 及び membrane-associated enzyme (至適 pH 6.5) の 2 種類^{27, 28)} の存在が報告されていることから, 脳の各分画について, soluble TTPase 活性としては, pH 9.0, membrane-associated TTPase としては, pH 6.5 の medium を用い各々測定した。

3) TDP 分解活性 (TDPase) の測定

標準反応液には, 全量 2.7 ml 中に 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 4 mM $MgCl_2$, 4 mM TDP と 200 $\mu g/ml$ の蛋白質を含む。5 分間のプレインキュベーションの後, TDP の添加により反応を開始し, 37°C で 30 分間反応を行なった。反応停止は, 0.3 ml の氷冷した過塩素酸の添加により行ない、遠沈後, 上清の無機リン酸を Baginski らの方法³²⁾ に従って定量した。TDP 分解活性は酪素としての特異性はなく, 肝においては inosine diphosphatase と同一であることが知られているが, 表現として TDPase とあらわした。

TTPase, TDPase 活性測定の際は, 共に対照として酪蛋白剤を先に添加したものとった。又, 反応中の非特異的な TTP, TDP の分解は, 無機リン酸の定量からはほとんど

みとめられなかった。TTPase, TDPaseの反応は、共に蛋白濃度、反応時間に従い直線的に増加していた。

4) TTP, TDPの純度

TTPは三共株式会社から供与された。TDPはSigma社のものを使用した。TTP及びTDPの純度の測定は、Itokawa, Cooper³³⁾の高圧泳紙電気泳動法を一部変更し行なった。すなわち、Whatman No.3MM泳紙を用い、50 mM acetate buffer (pH 5.8) に780 V/cm, 2 mA/cm で20分間泳動を行なった。

実験成績

Table 1

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF THIAMINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN RAT BRAIN

	Membrane-associated		Soluble	
	Specific activity ^{a)}	Percent of total activity	Specific activity ^{a)}	Percent of total activity
Nuclei	0.94	26	0.65	15
Mitochondria	0.44	41	0.50	37
Microsomes	0.75	27	0.86	25
Supernatant	0.17	4	1.06	23

a) μ moles Pi/mg protein/h

Membrane-associated TTPase 活性は、核分画及びミトコンドリア分画に比活性が高く、total 活性は、ミトコンドリア分画に多くみられた。又、上清分画には、比活性、total 活性共にわずかにしかみとめられなかった。一方、soluble TTPase 活性については、上清分画に高い比活性がみられ、

次いでミクロソーム分画にも高い活性がみとめられた。

Table 2 Subcellular distribution of protein, DNA, RNA and succinate dehydrogenase activity in rat brain

Fraction	Protein (%)	DNA (%)	RNA (%)	Succinate dehydrogenase (%)
Nuclei	15	97	31	5
Mitochondria	48	2	26	80
Microsomes	19	0	28	3
Supernatant	14	1	27	10

表 2 に各細胞分画における蛋白, DNA, RNA, 並びに, succinate dehydrogenase 活性の分布を示す。表にみられるごとく, ミトコンドリアの他の分画への混入はわずかであり, 又, 核の他の分画への混入もほとんどみられていない。

Table 3 Subcellular distribution of thiamine triphosphatase activity in rat liver

Fraction	Membrane-associated		Soluble	
	Specific activity*	% of total activity	Specific activity*	% of total activity
Nuclei	0.99	28	0.72	29
Mitochondria	0.98	47	0.38	27
Microsomes	0.62	15	0.43	14
Sup.	0.15	10	0.66	31

* μ moles Pi/mg protein/h

表3に TTPase の肝臓における細胞内分布を示してあるが、membrane-associated TTPase 活性は、核分画及びミトコンドリア分画に高く、soluble TTPase 活性は、核分画及び上清分画に高く、脳における分布とに大きな違いはみとめられなかった。

次に、TTPase との比較として TDPase についても同様に、脳及び肝での細胞内分布を検討した(表4, 5)。

Table 4 Subcellular distribution of thiamine diphosphatase activity in rat brain

Fraction	TDPase	
	Specific activity*	Total activity (%)
Nuclei	0.61	13
Mitochondria	0.35	34
Microsomes	1.11	42
Sup.	0.20	6

* μ moles Pi/mg protein/h

Table 5 Subcellular distribution of thiamine diphosphatase activity in rat liver

Fraction	TDPase	
	Specific activity*	Total activity (%)
Nuclei	0.47	10
Mitochondria	1.37	50
Microsomes	1.85	33
Sup.	0.29	7

* μ moles Pi/mg protein/h

また脳においては、ミクロゾーム分画に比活性、total 活性、共に高く分布している。又、肝においては、ミクロゾーム分画に活性が高く、脳と異なりミトコンドリア分画にも高い活性がみとめられた。

第2節 ウット脳 TTPase の特異性

第1節において、ウット脳 TTPase に soluble なものと、membrane-associated なものの2種類が存在することを述べた。従って、次に、TTPase がいわゆる非特異的な nucleoside triphosphatase と同一の酵素であるか否かについて、すなわち、その特異性について明らかにする目的で、pH 分布、基質特異性等を検討した。

実験方法

1) TTPase は *nucleoside triphosphatase* 活性の測定

TTPase の測定には第1節で述べたと同様の方法を用いた。Nucleoside triphosphatase 活性の測定は、inosine triphosphate (ITP) を基質とし、インキュベーション時間が15分である他は TTPase 活性測定と同様の条件にて行なわれた。TTPase の酵素標品としては、ミクロゾーム分画及び上清分

画を用いた。又、基質特異性の実験においては部分精製した soluble TTPase を用いた。

2) Soluble TTPase の部分精製

Soluble TTPase の部分精製は、Ishitani, Cooper²⁷⁾の方法を一部変更し行なった。すなわち、ウット脳を5倍量の 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) でホモジナイズし、105000 × g, 60 分の遠心後、その上清を 1 N 酢酸で pH 5.2 に補正し、50°C 3 分間の熱処理後、再度 105000 × g, 60 分の遠心を行なった。その上清を中性にした後、アセトン分画を行ない 55~80% アセトン分画を得、これを 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) に懸濁後、300 倍量の同じ buffer で 20 時間透析し酵素標品とした。以上の操作によりこの酵素は比活性にして約 10 倍精製された。これは、Ishitani, Cooper²⁷⁾の結果と一致している。

3) 高圧紙電気泳動法による thiamine リン酸エステル の分離、並びに定量

TTPase 反応の生成物を高圧紙電気泳動法により分離後、蛍光法にて定量した。TTPase の反応条件は第 1 節で述べた方法に従った。反応停止は、氷冷した 0.1 N HCl を 0.5 ml 加えることにより行なった。遠心後、その上清の一部は無機リン酸の定量に用い、他の一部は acetate buffer (pH 3.8)

で2倍希釈後、第1節で述べた方法に従い分離定量を行なう。

実験成績

1) 至適 pH

Fig. 2

ATPase activities at various pH

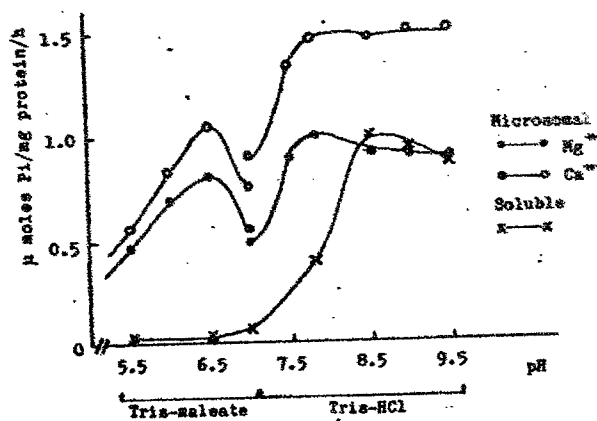
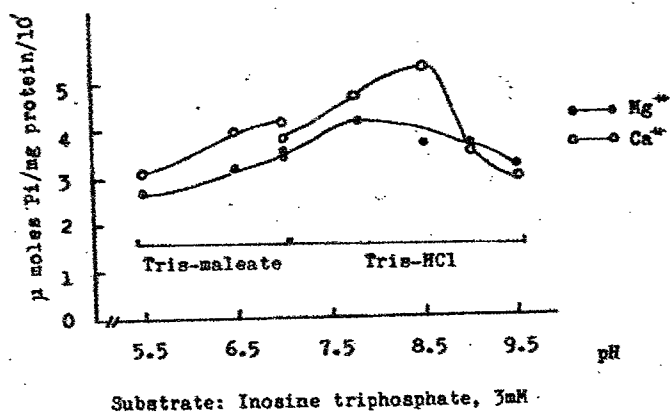


図2に microsome ATPase と soluble ATPase の各 pH 値での活性を示した。図にみられる様に microsome ATPase と soluble ATPase は至適 pH 値が異なり、2 あり、soluble ATPase では pH 8.5 ~ 9.0 にピークが 7 あり、microsome ATPase では pH 6.5 と pH 7.8 (Mg²⁺ 存在下) に 2 つのピークが 7 あり。又、microsome ATPase は、第3節でも述べる様に Ca²⁺ によっても活性が

みられるが、その最適 pH は Mg^{2+} の場合と大まかに違いはみとめられるが、た。

次に、nucleoside triphosphatase の pH 分布を調べる目的で、ミクロソーム分画を用い ITP を基質として検討した(図3)。図から明らかな様に、 Mg^{2+} 存在下では pH 7.8

Fig. 3 Microsomal nucleoside triphosphatase activity at various pH



に、 Ca^{2+} の存在下では pH 8.5 に各々 1 つのピークを有しており、TTPase のそれとは異なり、といふ。

2) Soluble TTPase の基質特異性

表6にみられる様に、部分精製した soluble TTPase は、GTP, ATP に対してわずかな活性を示すが ITP あるいは、UTP には全く活性を示さなかつた。

Microsomal TTPase の基質特異性については、microsomal TTPase は deoxycholate, Triton X-100, アルカリ処置等に

よ、でも可溶性が困難であり、精製できないことから詳細は不明である。粗ミクロゾーム分画をそのまま用いたものでは、予想される如く ATP, GTP 等の nucleotide の分解活性は、TTP のそれを大きく上回るものであ、た。

Table 6 SUBSTRATE SPECIFICITY OF PARTIALLY PURIFIED SOLUBLE TTPase

Substrate	Specific activity (μ moles Pi/mg protein/h)	(%)
TTP	9.79	100
ITP	0	0
GTP	1.27	13
UTP	0	0
ATP	0.39	4

TTP and various nucleotides (3 mM) were used as substrates.

3) Microsomal TTPase 反応の特異性

第1節で述べた様に、ラット脳ミクロゾーム分画には、TTPase, TDPase 共に高い比活性を示した。従、microsomal TTPase の反応において、生成してくる TDP が更に脱リン酸され TMP にまで分解されるという可能性が考えられる。この問題については反応により生成してくる無機リン酸の定量では判定が不可能なことから、TDP, TMP の直接定量から検討を行なった。反応はすでに述べた様に microsomal TTPase が pH 6.5 と 7.8 に2つの至適 pH を有することからこの2つの pH において行なった(表7)。

Table 7

Identification of the products of the microsomal TTPase reaction

Time (min)	Pi liberated (μ moles/mg protein)	TDP formed (μ moles/mg protein)	TMP formed (μ moles/mg protein)
pH 6.5			
30	0.34	0.41	N.D.*
60	0.63	0.70	N.D.*
pH 7.8			
30	0.43	0.48	0.04
60	0.88	0.90	0.08

* Not detected (<0.005)

表にみられる如く、両 pH において、無機リン酸のモル生成量と TDP のモル生成量は、ほぼ等しくみられた。pH 6.5 の反応については、TMP の生成は検出されなかったが、pH 7.8 の反応においてはごくわずかながら時間に従って TMP の生成がみられている。

第3節 うット脳 soluble TTPase の Ca^{++} による抑制

第2節において、うット脳 TTPase に2つの異なる特異的な酵素があることについて述べてきたので、次に各々の酵素のイオン要求性、生理的濃度の Ca^{++} の作用について検討した。

実験方法

酵素活性の測定は第1節に述べたと同様の方法により行
 った。酵素標品は、脳の血清分画及びミトコンドリア分画
 を300倍量の0.25 M sucroseで20時間、0°Cにて透析し
 たものを用いた。

実験成績

Fig. 4 Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations on brain TTPase activity in vitro

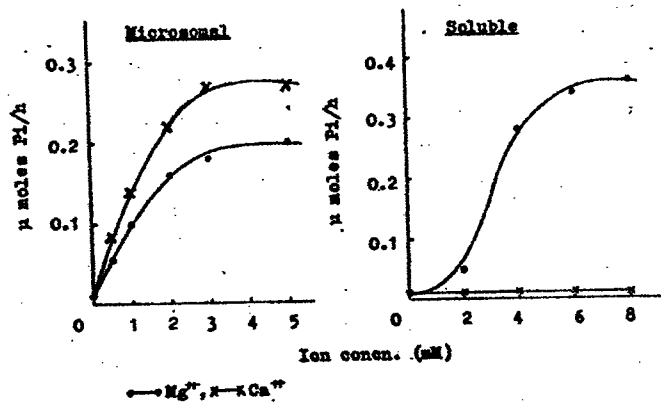


図4, 及び図5に, TTPase並びにTDPaseの2価カチオン要求性についての結果を示す。

Microsomal 及び soluble TTPaseは, 2価カチオン要求性の酵素であり, microsomal TTPaseは Mg^{2+} , Ca^{2+} により活性化をうけた。共に, 約3 mMの濃度で最大活性がみられるが Ca^{2+} による活性化の方が Mg^{2+} によるものより大さく, 尤。一方, soluble TTPaseは, Mg^{2+} により活性化され, Ca^{2+} によりは全く活性化をうけず, 尤 (図4)。

次に、同様に microsomal TDPase についても検討すると Mg^{++} , Ca^{++} あるいは Mn^{++} によっても活性化がみられ、活性化の程度は $Ca^{++} > Mn^{++} > Mg^{++}$ の順である。(図5)。

Fig. 5

Effect of Ca^{++} , Mg^{++} and Mn^{++} concentrations on brain microsomal TDPase activity in vitro

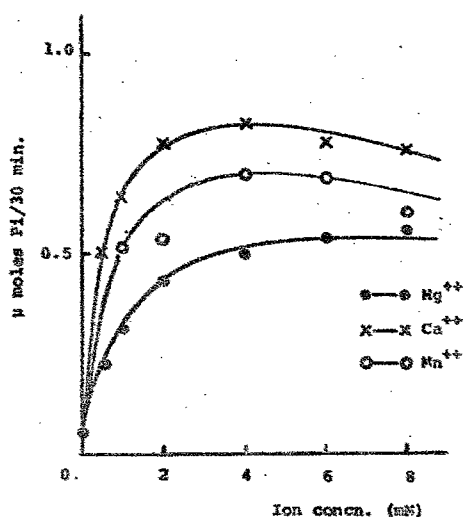


図6に microsomal TTPase の Ca^{++} あるいは Mg^{++} 存在下の基質濃度に対する Lineweaver-Burk plot を示したが、図にみられる様に、両イオン存在下でも K_m は同じであり、 V_{max} は Ca^{++} 存在下の方が大であった。

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots of microsomal TTPase activity against TTP concentration

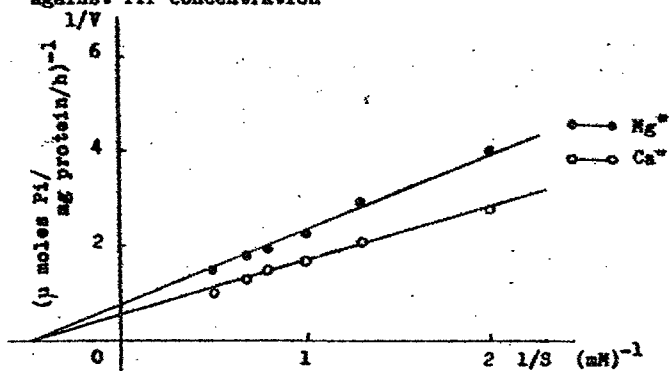
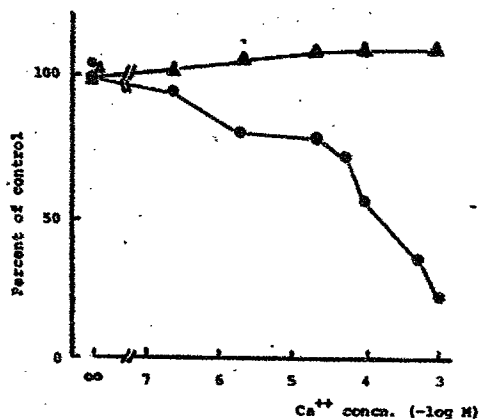


Fig. 7



Effects of Ca^{2+} on TTPase activities in the presence of Mg^{2+} .

-○-, soluble; -△-, microsomal; -○-, soluble (in the presence of EGTA, $1.25 \times 10^{-4} M$); -△-, microsomal (in the presence of EGTA, $1.25 \times 10^{-4} M$). Control (100%) activities: soluble, 9.79 μ moles Pi/mg protein/h; microsomal, 0.71 μ moles Pi/mg protein/h.

次に、生理的濃度の Ca^{2+} の soluble & microsomal TTPase 活性に対する作用を検討した (図7)。各々、至適濃度の Mg^{2+} の存在下に $10^{-7} \sim 10^{-3} M$ の Ca^{2+} を添加すると、

microsomal TTPase には何ら変化はみられなかつた。

soluble TTPase では著明な活性阻害がみとめられ、 10^{-4} M の Ca^{++} で阻害は約 50% に達した。又、酵素標品中に混入している可能性のある Ca^{++} の作用を知る目的で、 1.25×10^{-4} M の EGTA を添加した時、変化はみられなかつた。

第4節 考察 及び 小括

1) 考察

従来、choline リン酸エステルの脱リン酸化過程に関しては、組織の TDP 含量が多いこと、TDP が補酵素であるといふ観察から、TDPase についてしか報告がみられなかつた。

一方、TTP 分解酵素については、その存在さえ知られておらず、1972 年になり、Ishitani, Cooper²⁷⁾, Barchi, Braun²⁸⁾ により相次いでその存在及び若干の性質が報告されたのみであった。Ishitani, Cooper は、ラット脳上清分画に適当 pH 9.0 の特異的な TTPase をみつめ、次いで Barchi, Braun は、ラット脳の核分画に Ishitani らの上清分画の酵素とは異なり、性質を有する最適 pH 6.5 の membrane-associated TTPase をみいだした。

著者も本章において示した如く, soluble TTPase と membrane-associated TTPase をそれぞれ脳 105000 × g, 60 分の上清及びミクロゾーム分画に分画に分けた。一方, TDPase はミクロゾーム分画にのみ高い活性がみとめられ、明らかに TTPase と細胞内分布の異なることが示された。又、肝においては、TTPase, TDPase 共に、脳での分布と大きな差はみとめられなかった。

上清分画の TTPase は, Iwasaki らの報告と同じく、至適 pH を 約 9.0 に有する TTP に特異的な酵素であることが判明したが、microsomal TTPase は、Barchi らの報告した核酵素とは若干性質が異なっており、pH 6.5 と pH 7.8 に 2 つのピークを有していた。一方、ITP を基質としてミクロゾーム分画の nucleoside triphosphatase 活性の pH 分布を検討すると、pH 7.8 に 1 つのピークを有することが明らかとなり、TTP を基質にした時と全く異なることが判明した。Microsomal TTPase は deoxycholate, Triton X-100, アルカリ処置等によっても可溶化が困難であり、ミクロゾーム分画をそのまま用いると広い基質特異性を示した。従って、microsomal TTPase が TTP に特異的な酵素であるかは断定できぬが、上述した nucleoside triphosphatase との至適 pH の違い、あるいは

Barchi ら²⁸⁾ の TTP 分解活性に対する特異的な阻害剤の報告, 等を考へ併せると, *microsomal* TTPase も pH 6.5 の反応において *nucleoside triphosphatase* とは異なると考えられる。従つて, 以下の実験には, pH 6.5 の反応を用い, ミクロソーム分画の TTP 分解活性も *microsomal* TTPase と表現した。

TTP の分解反応においては, 特にミクロソーム分画を用いる時 TDPase 活性が高いことから生成した TDP が更に TDPase により脱リン酸化をうけ, TMP にまで分解されるか否かという点の解明が重要な問題であり, これについての詳細な検討はみられていなかった。しかしながら, 第2節で示した如く, *microsomal* TTPase の反応において, pH 6.5 では全く TMP の生成はみられず, 又, pH 7.8 の反応においても TDP の約 10% とはほとんど TMP の生成はみられず, この条件下において TTPase の反応が特異的な一段階反応であることが確認された。又, データには示していないが, TDPase についても一段階反応であり, *thiamine* の生成はみられないことを確認している。更に, TDPase はその最適 pH をアルカリ側に有すること^{22, 23, 33, 34)} から pH 7.8 での *microsomal* TTPase の高い活性が TDPase の混在によるのではないかという疑問も, 上述のことから否定され

る。

第3節で述べた如く, soluble TTPaseは生理的濃度の Ca^{++} により著明に阻害を受けるが, microsomal TTPaseは変化を受けないという興味ある知見を得た。このことは, Ca^{++} が神経組織における TTPの代謝を調節している可能性を示すもので, Ca^{++} の神経細胞における重要な役割^{36,37)}を考え併せると, thiamineの神経組織における役割を追求する上で興味あることと考えられる。

2) 小 括

(1). ラット脳 TTPase の細胞内分布について, membrane-associated TTPase は, 核分画及びミクロゾーム分画に活性が高く, soluble TTPase は上清分画に高い活性がみられる。又, 肝においてもほぼ同様の分布を示している。

(2). ラット脳 TTPase の細胞内分布は, ミクロゾーム分画に活性が高く, 上清分画にはほとんど活性はみられなかった。又, 肝においてはミクロゾーム分画及びミトコンドリア分画に活性が高かった。

(3). Soluble TTPase は pH 9.0 に至適 pH をもち, 酸性側では活性はみられなかった。一方, microsomal TTPase

は pH 6.5 から pH 7.8 に 2 つの至適 pH をもつてゐた。

ITP を基質とした microsomal nucleoside triphosphatase は pH 7.8 ~ 8.5 に 1 つのピークを示した。

(4). Soluble TTPase は, trinucleotide にはほとんど活性を示さず, TTP に特異的であつた。

(5). Microsomal TTPase は, pH 7.8 と pH 6.5 の両方の反応において, 無機リン酸のモル遊離量と TDP のモル生成量とが一致しており, TMP の生成がみられないことから TTPase の反応に TDP 分解反応の関与はないことが判明した。

(6). TTPase は 2 価のカチオン要求性の酵素であり, microsomal TTPase は Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} で活性化されるに対して, soluble TTPase は Mg^{2+} で活性化そうが, Ca^{2+} では活性化されなかつた。一方, microsomal TDPase は $\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ の順に活性化そうがた。

(7). Soluble TTPase 活性は生理的濃度 ($10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ M}$) の Ca^{2+} により著明に阻害されることがみとめられた。

第 II 章

TTPase, TDPase に対する薬物の作用

前章において著者は、ラット脳 TTPase の基礎的性質、特異性並びに Ca^{++} による活性調節の可能性を示して置く。

最近, Itokawa, Cooper らは一連の研究^(12, 13, 37, 39) において, acetylcholine (ACh), tetrodotoxin 等の神経活性物質により, ラット脳膜分画での TDP, TTP の減少を伴った TMP, thiamine の遊離がみられる事実を報告している。このことは, これら神経活性物質による TDP, TTP の脱リン酸化の促進が生じていることを示している。又, 岩田^(24, 25) は, cholinesterase 阻害剤である physostigmine, ambenonium の腹腔内投与により, 脳 TDPase が活性化を受け, 同時にラット脳内 thiamine 含量が減少していることを報告している。これらの現象は, 電気刺激により摘出神経線維から thiamine が遊出されてくるという知見^(4, 38, 39, 40) が, 中枢神経系においても起り得ることを示唆するものである。

一方, TTPase については, in vivo あるいは in vitro の系においてその活性に影響を与える薬物, あるいは条件

(因子)が現在まで全く判明していない。従って、その存在意義についても何ら推察さえ行なわれていなかった。只、最近になり TTP の欠損症としての遺伝的疾患である亜急性壊死性脳脊髄炎の発見¹¹⁾により、神経組織での TTP はその代謝が注目を浴びてきている。

従って、著者は本章において、TTPase に作用する薬物を追求すべく種々の薬物の作用を in vivo あるいは in vitro で検討した。

第1節 Thiamine 欠乏動物の脳及び肝 TTPase 活性

Thiamine 欠乏ラットの脳 TTPase の活性変化については、すでに岩田ら²⁵⁾により報告されている。そこでまず欠乏動物の脳及び肝 TTPase 活性の検討を行なった。

実験方法

Thiamine 欠乏ラットの作製は岩田ら¹⁴⁾の方法に従って行なった。すなわち、体重 100 g 前後のラットを合成 thiamine 欠乏飼料にて飼育し、約 5 週間前後した後、心拍数が対照群ラットの 70% 以下を示すものを欠乏動物として用いた。この時点で脳の total thiamine 含量は 30% 以下に減少

しており、振せん、運動失調、回転運動、体重減少等の特徴的な thiamine 欠乏症状を呈していた。

TTase 活性の測定は、第I章第1節で述べた方法に従って行った。酵素標品は、動物を断頭後、脳を10倍量の50 mM Tris-HCl (pH 7.8) でホモジナイズし、 $1000 \times g$, 10分の遠沈の沈渣 (membrane-associated 分画) 及び $105000 \times g$, 60分の遠沈上清 (soluble 分画) の2つを用いた。

血糖値の測定は、常法に従い anthrone を用いて行った。

マウスの耐糖能の検査は、 $2g/kg$ の glucose を腹腔内に投与した後、血糖値の変化より求めた。

実験成績

Table 8

THIAMINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY^{A)} IN BRAIN AND LIVER OF NORMAL, PAIR-FED AND THIAMINE-DEFICIENT RATS

	n	Brain		Liver	
		Soluble	Membrane-associated	Soluble	Membrane-associated
Normal	7	1.20 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.84 ± 0.06
Thiamine-deficient	4	$1.37 \pm 0.07^{**b)}$	$0.43 \pm 0.01^{**c)}$	0.43 ± 0.03	1.07 ± 0.15
Pair-fed	4	1.14 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.43 ± 0.01	0.83 ± 0.09
Thiamine-def. + thiamine ^{d)}	2	0.97	0.46	0.41	0.90

a) μ moles Pi/mg protein/h

b) $P < 0.01$, compared to pair-fed

c) $P < 0.01$, compared to normal

d) Thiamine-HCl (4 mg/kg, s.c.), 3 h before

表8に thiamine 欠乏群, pair-fed群, 及び欠乏動物に thiamineを投与した群の脳及び肝 TTPase 活性を示した。表にみられる如く, 欠乏動物の脳において soluble TTPase 活性は, pair-fed 群に比して有意に増加していた。又, membrane-associated TTPase 活性は, 対照群に比して有意に減少していることがみとめられた。一方, 肝においては変化はみとめられなかった。

脳は必要とするエネルギーの大部分を血液の中から送られてくる glucose に依存していることは周知のことである。従って, 表8にみられた欠乏動物の脳 TTPase 活性の変化の原因として, 神経系の変化以外に糖代謝の変化も考えられる。そこでまず欠乏動物の糖代謝の変動を血糖値のレベルから追求めてみた。

Fig. 8

Glucose tolerance of normal (○), pair-fed (x) and thiamine-deficient rats (●)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

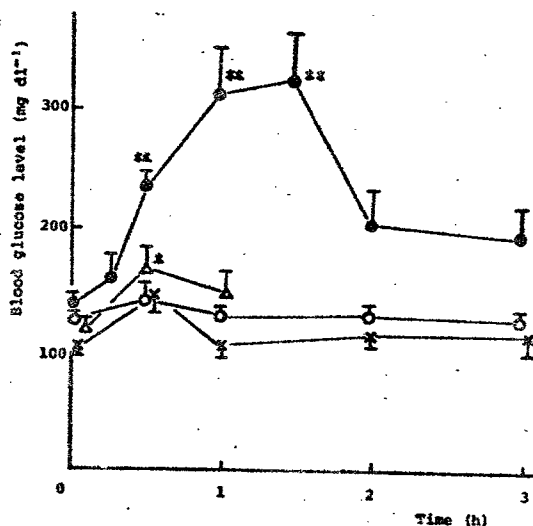


Fig. 9

Effect of insulin on the blood glucose level of normal (○), pair-fed (×) and thiamine-deficient rats (●)

Insulin, 1 i.u./kg, i.p.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

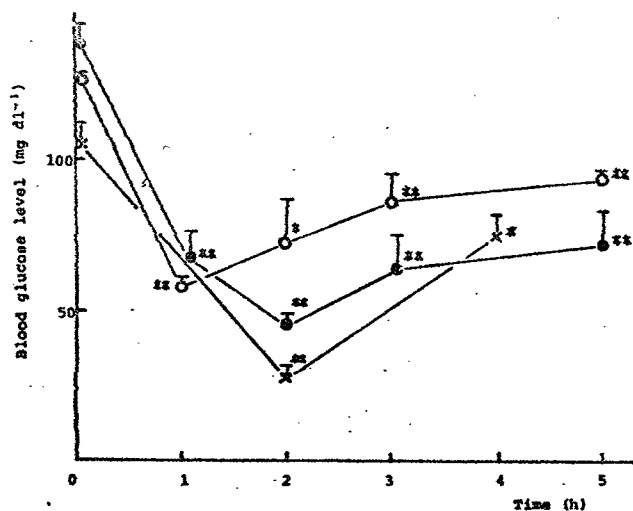


Fig. 10

Effect of tolbutamide on the blood glucose level of normal (○), pair-fed (×) and thiamine-deficient rats (●)

Tolbutamide, 40 mg/kg, i.p.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

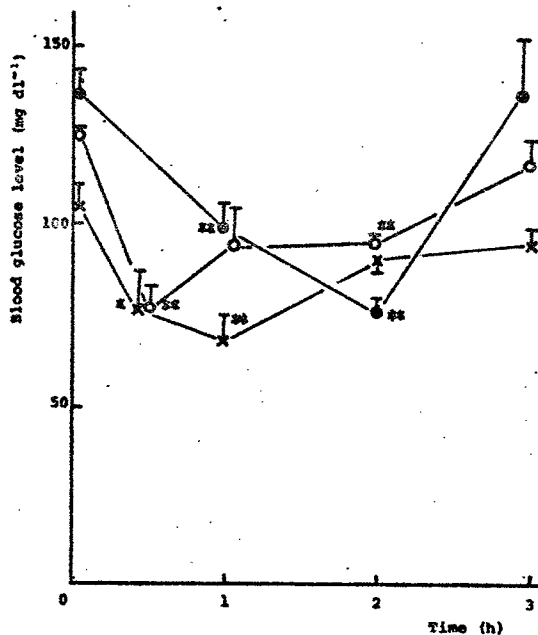


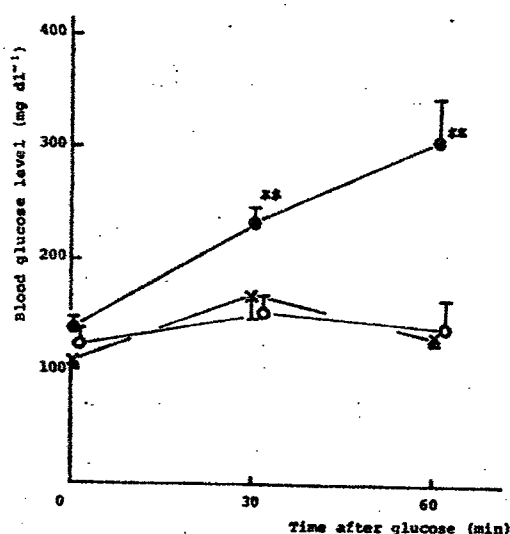
図8に thiamine 欠乏動物, pair-fed 群, 対照群の耐糖能のグラフを示したが, 欠乏動物においてのみ著明な耐糖能の低下がみとめられた。しかしながら, 図9にみられる様に 1 i.u./kg の insulin の腹腔内投与による血糖低下は, 3 群共にほぼ等しくみられた。又, すい臓ランゲルハンスから

の insulin の遊離剤である tolbutamide, 40 mg/kg を腹腔内に投与した時に血糖低下は, 3 群共にみとめられるが, 欠乏動物では最低血糖値に達, する時間の遅延がみとめられた (図 10)。しかしながら, 図 11 に示した如く, 欠乏動物の耐糖能の低下は, catecholamine の遊離剤である tyramine 10 mg/kg の投与により回復した。

Fig. 11

Effect of tyramine on glucose tolerance of thiamine-deficient rats

- Thiamine-deficient
 - " + tyramine
 - X- Normal + tyramine
- Tyramine, 10 mg/kg, i.p.
* $P < 0.01$



この様に, thiamine 欠乏動物において, 著明な糖代謝の障害がみられることから, 次に正常動物の糖代謝を変えた時の TTPase 活性の変動を知る目的で, insulin と絶食の影響を検討した (表 9)。

しかしながら, 5 i.u./kg の insulin あるいは 48 時間の絶食によ, とも脳及び肝 TTPase 活性に変化はみられなかった。

Table 9

EFFECTS OF INSULIN AND STARVATION ON THIAMINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY^{A)}

Treatment	n	Brain		Liver	
		Soluble	Membrane-associated	Soluble	Membrane-associated
Untreated	7	1.20 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02	0.47 \pm 0.03	0.84 \pm 0.06
Insulin ^{b)}	7	1.17 \pm 0.03	0.50 \pm 0.02	0.56 \pm 0.05	0.93 \pm 0.09
Insulin ^{c)}	7	1.40 \pm 0.11	0.49 \pm 0.03	0.55 \pm 0.02	0.79 \pm 0.03
Starvation, 48 h	4	1.04 \pm 0.08	0.54 \pm 0.02	0.44 \pm 0.01	1.08 \pm 0.06

a) μ moles Pi/mg protein/h

b) Insulin (5 i.u./kg, i.p.), 3 h

c) Insulin (5 i.u./kg, i.p.), 5 h

第2節 脳TTPase活性に対するDL-methamphetamine, reserpine, chlorpromazineの作用 (*in vivo*)

第1節において thiamine 欠乏動物の脳TTPaseが有意に変化すること、更にそれが欠乏動物にみられた耐糖能の低下、可なり、insulin不足等の糖代謝の障害に起因するものではないことを示して置く。

次に、脳TTPaseに対する神経系の関与を追求する目的で、中枢神経系の伝達物質の代謝を人為的に変化させることの知られてゐる DL-methamphetamine, reserpine, chlorpromazine の作用を検討した。

実験方法

上清のピクログラム分画の調製及び TTPase 活性の測定は第 I 章第 1 節で述べた方法に従った。

薬物は各々生理食塩水に溶解した。ただし, reserpine は注射液(セルパシル; 藤沢)をそのまま用いた。DL-Methamphetamine は 10 mg/kg を 1 時間前に腹腔内投与し, chlorpromazine 投与群は 25 mg/kg を 24 時間毎に 3 回投与したものと, 1 回投与したものにわけ, 共に最終投与後 90 分に実験に用いた。Reserpine は 2.5 mg/kg を 4 時間前に腹腔内に投与した。

実験成績

Table 10 EFFECTS OF DL-METHAMPHETAMINE, RESERPINE AND CHLORPROMAZINE ON TTPASE ACTIVITIES^{a)} IN BRAIN

		Soluble	Microsomal
Exp. (A)	Control	0.91 ± 0.02 (9)	0.75 ± 0.03 (5)
	DL-Methamphetamine ^{b)}	1.10 ± 0.04** (4)	0.77 ± 0.03 (5)
	Reserpine ^{c)}	0.96 ± 0.03 (5)	0.78 ± 0.02 (5)
Exp. (B)	Control	0.90 ± 0.03 (5)	0.72 ± 0.03 (9)
	Chlorpromazine ^{d)}	0.93 ± 0.03 (5)	0.73 ± 0.05 (8)
	Chlorpromazine ^{e)}	0.86 ± 0.10 (4)	0.61 ± 0.03* (6)

a) Activities are expressed as μ moles Pi/mg protein/h.

b) DL-Methamphetamine (10 mg/kg i.p.), 1 h before sacrifice

c) Reserpine (2.5 mg/kg i.p.), 4 h before decapitation

d) Chlorpromazine (25 mg/kg s.c.), 90 min before sacrifice

e) The same dose of the drug was administered 3 times at 24 h intervals. Animals were decapitated 90 min after the last injection.

*p<0.05, **p<0.01

表 10 にこれらの薬物投与後のラット脳 soluble 及び microsomal TTPase 活性を示した。DL-Methamphetamine により, soluble TTPase 活性が有意に増加していることが認められた。一方, reserpine では何ら変化はみられなかった (Exp. A)。Chlorpromazine の 3 回投与により, microsomal TTPase 活性の有意な低下が認められた。尚、データには示していないが、これらの薬物では脳の microsomal TDPase は全く変化しなかった。

第 3 節 ラット脳 microsomal TTPase と TDPase 活性に対する神経活性物質の作用 (*in vitro*)

実験方法

TTPase, TDPase 活性の測定は、第 I 章第 1 節で述べた方法を用い行なった。ただし、TDPase の medium には 2 価カチオンとして 4 mM の Ca^{2+} を用いた。添加する薬物は全て脱塩蒸留水に溶解した。又、名々の薬物の無機リン酸の比色定量に及ぼす作用のないことを確認している。

$\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ 活性の測定は Sulkow⁴¹⁾ の方法に従い行なった。

Chlorpromazine, imipramine, desipramine は、 $\text{pH } 9.0$ の

medium では析出がみられることから, soluble TTPase の反応は Tris-HCl (pH 7.5) を用い行なつた。pH 7.5 にするにより比活性は約 1/2 に低下したが, これらの薬物の作用パーセントは, 両 pH の反応において変化はなかつた。

実験成績

1) TTPase に対する作用

神経伝達物質である ACh, noradrenaline (NA), NA の遊離剤である tyramine, axonal transport の阻害剤である colchicine, 更には, 抗てんかん薬である diphenylhydantoin を 0.5 ~ 1.0 mM の濃度で添加した (表 11)。

Table 11 Effect of various compounds on microsomal TTPase activity

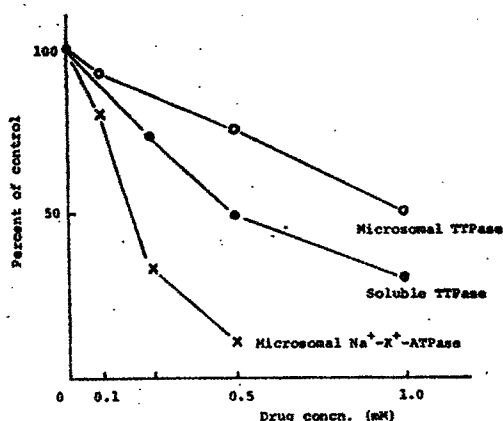
Addition	(mM)	TTPase	
		Specific activity ^{a)}	(%)
None	-	0.71	100
Acetylcholine	1.0	0.74	104
Noradrenaline	0.5	0.71	100
Tyramine	1.0	0.65	92
Colchicine	1.0	0.60	84
Diphenylhydantoin	1.0	0.71	100

a) μ moles Pi/ μ g protein/h

しかしながら, 表にみられる様に, 1.0 mM の colchicine で約 20%, tyramine で約 10% の microsomal TTPase 活性の阻害がみられるのみで大きな活性変化はみとめられなかつた。

次に、膜機能に影響を与える薬物として膜の ATPase を阻害することの知られている chlorpromazine (CPZ)^{42,43)} について検討を加えた(図 12)。

Fig. 12 Effect of chlorpromazine on brain TTPase and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activities in vitro



Control activity: Soluble TTPase, 4.46 μ moles Pi/mg protein/h;
Microsomal TTPase, 0.77 μ moles Pi/mg protein/h; $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase,
6.30 μ moles Pi/mg protein/10 min.

図にみられる様に, soluble は O^m microsomal TTPase 活性が, 0.25 ~ 1.0 mM の CPZ で 20 ~ 70 % の著明な阻害を受けることがみとめられた。更に, CPZ による TTPase 活性の阻害は, ミトコリアーム分画のものより上清分画のものの方が高かった。又, ミトコリアーム分画の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase 活性は他の報告^{42,43)} にみられる如く, 著明に阻害を受けていた。

同様のことは CPZ の類似化合物である imipramine, desipramine によってもみとめられた(図 13, 14)。しかしながら

ら、これら3種の薬物の中では、TTPase活性阻害力はCPZ
 がもっとも強かった。

Fig. 13 Effect of imipramine on brain TTPase and
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities in vitro

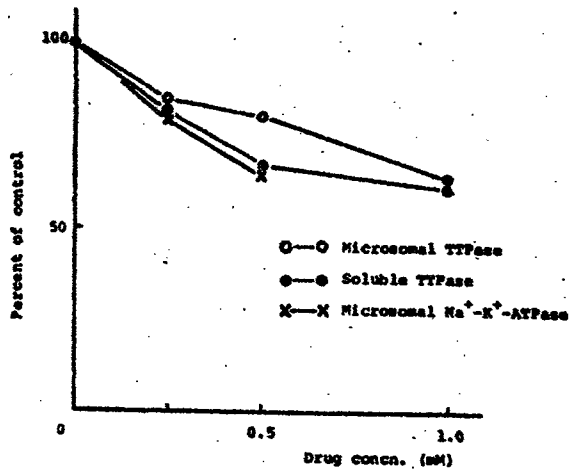
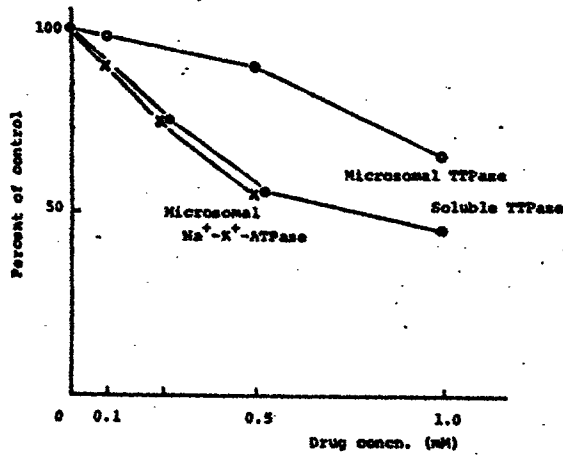


Fig. 14 Effect of desipramine on brain TTPase and
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in vitro



第I章第3節において, microsomal TTPase は Mg^{++} あるいは Ca^{++} によって活性化を受け, しかも Ca^{++} による活性化の方が大きいことも明らかにした。しかしながら, この Mg^{++} 依存性活性と Ca^{++} 依存性活性が同一の酵素であるかは不明であった。そこで次に CPZ の作用を Ca^{++} の存在下においても検討した(表12)。 Mg^{++} -TTPase とは 3 mM の $MgCl_2$ 存在下の TTPase 活性を示し, Ca^{++} -TTPase とは 3 mM の $CaCl_2$ 存在下の活性を示している。

Table 12 Chlorpromazine-induced inhibition of microsomal TTPase activity

CPZ concn. (mM)	Relative activity (%)	
	Mg^{++} -TTPase	Ca^{++} -TTPase
0	100 a)	100 a)
0.25	83	100
0.50	73	98
1.00	39	84

a) Control activity

Mg^{++} -TTPase, 0.80 μ moles Pi/mg protein/h

Ca^{++} -TTPase, 0.98 μ moles Pi/mg protein/h

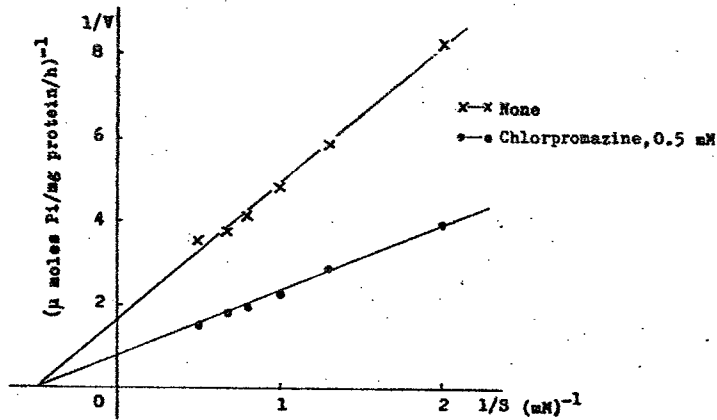
Mg^{++} -TTPase 活性は, 先に述べた様に 0.25 mM ~ 1.0 mM の CPZ で著明な活性阻害を受けるが, Ca^{++} -TTPase 活性は 1 mM の CPZ によっても約 20% とほとんど阻害はみとめられなかった。

図15に 0.5 mM の CPZ 存在下及び非存在下の microsomal

TPaseの基質濃度に対する Lineweaver-Burk plot を示した。図にみられる様に CPZ による阻害は、非拮抗型の阻害であった。

Fig. 15

Effect of chlorpromazine on microsomal TPase activity



2) TD Pase に対する作用

次に, microsomal TD Pase に対する種々の薬物の作用を in vitro で検討した。表 13 に結果を示した。CPZ は TPase に対しては強い阻害作用を有することと述べてたが, TD Pase に対しては逆に著明な活性化をひき起こすことがみとめられた。一方, imipramine, desipramine は大きな変化を与えず, 又, diphenylhydantoin, ACh, physostigmine, tyramine, colchicine 等にも作用はみとめられなかった。一方, SH 阻害剤である N-ethyl-maleimide (NEM) あるいは、アルコール類で阻害がみとめられた。

Table 13

EFFECT OF VARIOUS SUBSTANCES ON BRAIN MICROSOMAL
TDPase ACTIVITY

	concn.	% of control
Diphenylhydantoin	1.0 (mM)	104
Imipramine	0.5	83
Desipramine	0.5	93
CPZ	0.5	260
Acetylcholine	1.0	98
Physostigmine	1.0	99
ACh + Physostigmine	1.0	98
Tyramine	1.0	109
Colchicine	1.0	102
N-ethyl-maleimide	0.1	61
	1.0	53
Pentobarbital	1.0	91
Methyl alcohol	5.0 (V/V%)	95
	10.0	58
Ethyl alcohol	2.5	93
	5.0	70
	10.0	35

Fig. 16

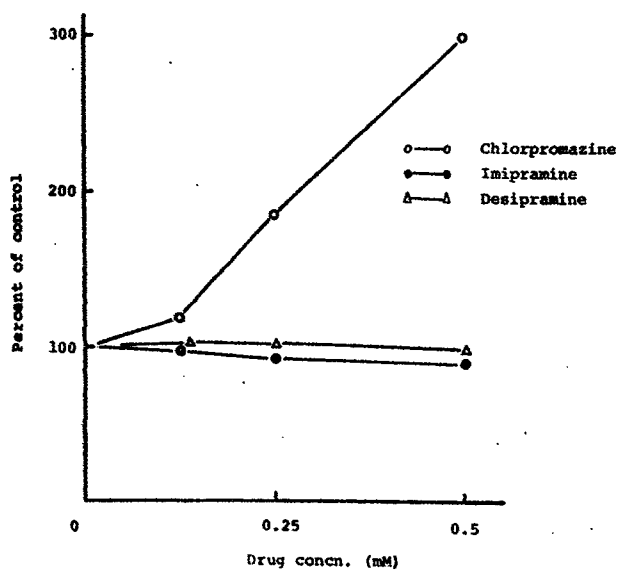
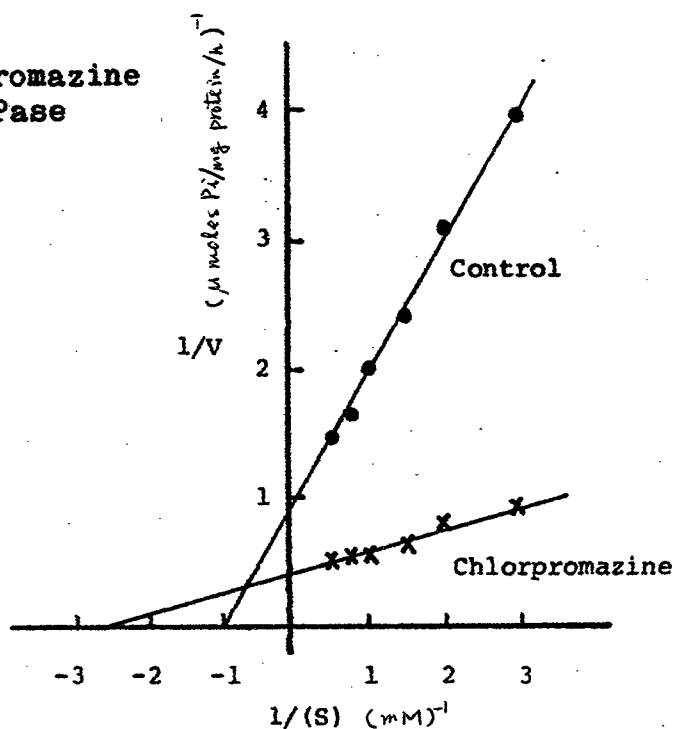
EFFECTS OF CHLORPROMAZINE, IMIPRAMINE AND DESIPRAMINE
ON MICROSOMAL TDPase ACTIVITYControl activity of TDPase: 1.30 μ moles Pi/mg protein/h

図16に TDPase に対する CPZ の作用の濃度曲線を示してあるが、microsomal TDPase は $0.125 \sim 0.5 \text{ mM}$ の CPZ で $20 \sim 180\%$ の活性増加がみとめられた。一方、imipramine, desipramine では変化はみられなかった。

CPZ による TDPase の活性化の機構を知る目的で CPZ 0.5 mM 存在下及び非存在下で基質濃度に対する Lineweaver-Burk plot をとった (図17)。図から明らかな如く、CPZ の添加は、 V_{\max} の約3倍の増加及びそれに伴、 K_m の減少をひきおこした。

Fig. 17

Effect of chlorpromazine on microsomal TDPase activity



第4節 考察 及び 小括

1) 考察

すでに述べた Itokawa らの ACh, tetrodotoxin 等による神経膜からの TMP, thiamine の遊離現象は、神経組織中、特にその膜分画において thiamine, TMP は全体の約 10% であり、しかもこれらの薬物により TDP, TTP の減少もわずかにみられることを考え併せると、神経膜中の thiamine, TMP がそのまゝ遊離してゐると考えるよりも、TDP, TTP からの TMP, thiamine への分解が促進されて遊離して行くと考えの方が妥当であろう。従つて、当然その条件下で ACh, tetrodotoxin 等による TDP, TTP の脱リン酸化の促進がみられねばならない。

しかしながら、Cooper ら^{24, 27)}, Barchi ら^{25, 28)}の報告にもみられる様に、ACh, tetrodotoxin で TTPase, TDPase 活性は変動せず、又、本章において示した如く、ACh, NA, あるいは他の神経活性物質によつても microsomal TTPase, TDPase の著明な活性変化はみいだしえなかつた。このことについては、現在その理由は不明であるが、TDP, TTP が膜、顆粒に結合した型で存在すること⁴⁴⁾並に TTPase 及び TDPase が膜分画にも局在することとを考え併せると、

ACh, tetrodotoxin 等が膜と TDP, TTP との結合に変化を与え、膜に局在する分解酵素によりこれらを分解され易くするという可能性も十分考えられるものである。

本章においては、in vivo あるいは in vitro の系において TTPase, TDPase に対する種々の薬物の作用を検討した。DL-Methamphetamine で soluble TTPase 活性が増加し、鎮静量の CPZ の連続投与により microsomal TTPase 活性が逆に減少したが、強力な鎮静作用を有する reserpine で活性に変化がみられなかったことから、現時点では、この TTPase 活性の変化とこれらの薬物による生体の中枢機能変化との関連は明らかではない。

Thiamine 欠乏動物の脳において、TDPase 活性が有意の増加を示すことは、すでに Inoue ら²⁴⁾ により報告されている。従って、TTPase についても検討したが、欠乏動物の脳において soluble TTPase 活性が増加し、逆に membrane-associated TTPase 活性が減少するという知見を得た。この原因については、データにも示したが、欠乏動物において insulin の遊離阻害にもとづく耐糖能の低下等の著明な糖代謝の障害がみえることから、欠乏動物におけるエネルギー代謝の変化との関連が考えられた。しかしながら、insulin、あるいは絶食で全く酵素活性は変化せず、従って、

この酵素はエネルギー代謝とは密接な関連を有さないことが示された。従って、欠乏動物でのこの酵素活性の変動は中枢神経系における何らかの因子の変動、たとえば adrenergic system の変動⁴⁴⁻⁴⁸⁾、 Ca^{++} 代謝の変動⁴⁵⁾に起因するものかも知れない。

一方、本章において著者は、ラット脳 TTPase に作用するほじめての薬物として cpz, imipramine, desipramine を見いだした。cpz は、膜の ATPase を抑制し膜の透過性に変化を与えることが知られている^{43, 46, 47)}。 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ -ATPase⁴²⁾、 Ca^{++} -ATPase⁴⁷⁾、 Mg^{++} -ATPase⁴³⁾、phosphodiesterase⁴⁸⁾ 等の多くの酵素がこの薬物により阻害をうける。しかしながら、この薬物によって活性化をうける酵素はほとんど知られておらず Robinson ら⁴⁹⁾の報告した adenylylate kinase があるのみである。従って、cpz がラット脳 TTPase を阻害するだけでなく、thiamine の代謝上隣接する TDPase には逆に著明な活性化をひき起こすという知見は、これらの酵素の生理的意義、並びにその存在形式を追求する上できわめて興味深い知見である。又、同時に、cpz の thiamine 代謝への作用の特異性を示しているものとも思われる。

本実験に使用した cpz の濃度が、*in vivo* においても可能か否かは検討していないが、これらの濃度範囲は、この

薬物の治療量の投与後の脳内濃度が約 2.5×10^{-4} M であるという報告⁵⁰⁾から考えると生体内においても可能な濃度であると思われる。更に、第II章、第2節で述べた如く、この薬物の皮下投与により脳TTPase活性の有意の低下がみられることから、少なくともこの薬物により thiamine 代謝の変動が生じることは明らかである。

CPZがTTPase, TDPaseに対して全く逆の著明な作用を有するという事実の生理的意義は明確でないが、CPZの作用は、膜構造の変化に関連している⁵¹⁾との観点から、その過程自身は非常に興味深く思われる。

2) 小括

(1) Thiamine 欠乏ラットの脳において soluble TTPase 活性は有意に増加し、一方、membrane-associated TTPase 活性は有意に減少していた。

(2) Insulin (5 i.u./kg) の投与あるいは48時間の絶食等の calorigenic な因子の変動により、ZIF、脳及び肝 TTPase 活性は変動しなかった。

(3) DL-Methamphetamine (10 mg/kg) の投与により soluble TTPase 活性が有意に増加していた。又、CPZ

(25 mg/kg)については、1回投与では本酵素活性に変動はみられなかつたが、24時間毎3回投与により、microsomal TTPase活性の減少がみとめられた。一方、reserpineに与っては何ら変化はみとめられなかつた。

(4) Microsomal TTPaseは、ACh, NA, Tyramine等の神経活性物質で変化をうけず、TDPaseについてもアルコール類、NEM等に作用がみられるのみで神経活性物質による変化はみとめられなかつた。

(5) Soluble & microsomal TTPaseは、cpz, imipramine, desipramineにより著明な活性阻害をうけた。cpzによる阻害が一番強く、0.25~1.0 mMで20~70%の阻害を示していた。又、この阻害は、非拮抗型の阻害であった。一方、Ca²⁺-TTPase活性はcpzによりほとんど阻害をうけなかつた。

(6) Microsomal TDPaseは、0.125~0.5 mMのcpzで20~180%の著明な活性増加を示した。Imipramine, desipramineでは大きな変化はみられなかつた。cpzの添加はTDPaseのVmaxを3倍に増加させ、それに伴、Kmの減少をひきおこした。

第Ⅲ章

ラット脳ミクロゾームにおける TDPase, TTPase の 存在形式 (TDPase, TTPase に対する cpz の作用機作)

第Ⅱ章においてラット脳 TDPase, TTPase は種々の薬物
あまいは条件により活性変化をうけ難い^{52,53)}が, cpz により著
明な逆方向の作用をうけることを述べた。

cpz の生体内における作用としては, 主に生体アミンの
代謝を変化させること^{52,53)}が知られているが, その作用場
は細胞膜, 顆粒膜にあまといわれており⁵⁴⁾, 膜蛋白の立体
構造の変化⁵⁴⁾, あまいは脂質部分への作用^{54,55)}が考えら
れている。一方, TDPase, TTPase もミクロゾーム分画に局
在⁵⁶⁾がみられ, 更に Itokawa ら^{12,13)}の神経活性物質による脱
リニ酸化を経た thiamine の遊離という現象も, 膜分画にで
の変化と考えられる。

従って, 前章で述べた cpz のこれらの酵素に対する逆方向
の作用は, ミクロゾーム分画におけるこの二つの酵素の存
在形式⁵⁶⁾が, 全く異なっている可能性を示していると考えら
れる。

本章においては, cpz のこれらの酵素に対する作用機作

の解明を通して、ミクロゾーム分画における両酵素の存在形式の違いを明らかにすることを目的とし、アセトン処理並びに界面活性剤である deoxycholate の作用を検討した。

第1節 アセトン処理ミクロゾームの TTPase, TDPase の活性変化, 並びに CPZ の作用

まずミクロゾーム分画からアセトン抽出により脂質成分をとり除くことによる酵素活性の変化, 並びに CPZ の作用の変化について検討した。

実験方法

TTPase, TDPase 活性の測定は、第I章、第1節で述べた方法により行なった。

アセトン処理したミクロゾームは、2匹のラット脳から第I章、第1節で述べた方法に従いミクロゾーム分画を採取し、15 ml のアセトン (-20°C) でホモジナイズし、アセトン抽出を行なった。この操作は2回繰返し、最終的に得られた粉末をデシケーター中に乾燥し、酵素標品とした。

実験成績

Fig. 18

Effect of acetone treatment on rat brain microsomal
TTPase and TDPase activities

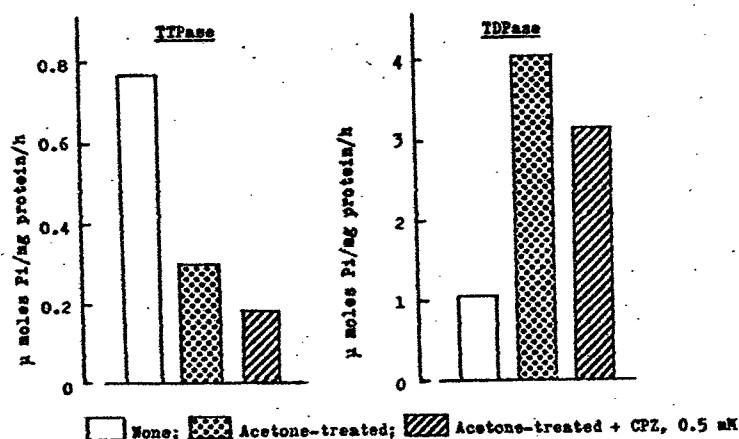
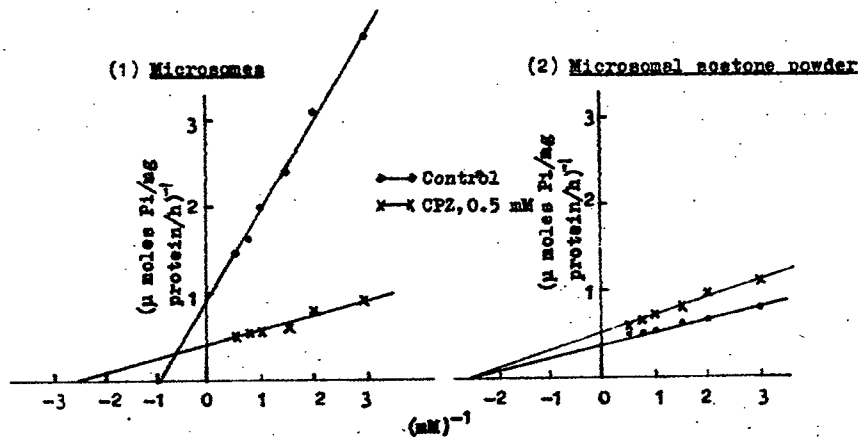


図18にアセトン処理したミクロゾームのTTPase並びにTDPaseの活性, 及び0.5 mMのCPZの作用を示した。図にみられる様に, アセトン処理によりTTPaseの比活性は著明に減少したが, CPZの作用は無処置ミクロゾームの場合と同様に, 抑制的であった。一方, TDPaseについては, アセトン処置により逆に比活性が約4倍に増加し, 更にCPZの活性化作用は消失し, むしろ抑制的になることが判明した。

図19にkineticなデータを示した。右図にみられる様にミクロゾーム分画のアセトン処理は, TDPaseの V_{max} を著明に増加させ, K_m の減少をみせている。又, CPZの作用も左図に示した無処置ミクロゾームでの結果とは逆に, 非拮抗的な阻害を示している。

Fig. 19

Lineweaver-Burk plots of TTPase activities of (1) microsomes and (2) microsomal acetone powder in the presence or absence of chlorpromazine in rat brain



第2節 DeoxycholateのTTPase, TDPase 活性に及ぼす作用

第1節において、ミクロゾーム分画のTTPase, TDPaseがアセトン処置により全く逆の活性変化を示すこと、並びに、CPZの作用もTDPaseについては逆転がみられる等のことから、これらの酵素における脂質成分の関与の違い、あるいは、構造変化に対する反応性の違いがあることが推察された。従って、次にこの点を明確にするべく界面活性剤であるdeoxycholateの作用を検討してみた。

実験方法

TTase, TDPase の活性測定は、第I章第1節で述べた方法により行なつた。

ミクロゾーム分画の TDPase の Triton X-100 による可溶化は以下の様に行なつた。約 4 mg/ml の蛋白濃度のミクロゾームを同量の 0.25 M sucrose (2 W/V% の Triton X-100 を含む) に懸濁し、0°C で 30 分間振盪し、105000 × g, 60 分の遠沈によりミクロゾーム蛋白を約 80% 上清に可溶化した。その上清について、Triton X-100 を除くために硫酸分画を行ない、40~70% 分画を得、酵素標品とした。尚、この分画において反応液中に混入してくる Triton X-100 は約 0.005% 以下で酵素に対するその直接作用は無視できるものであつた。

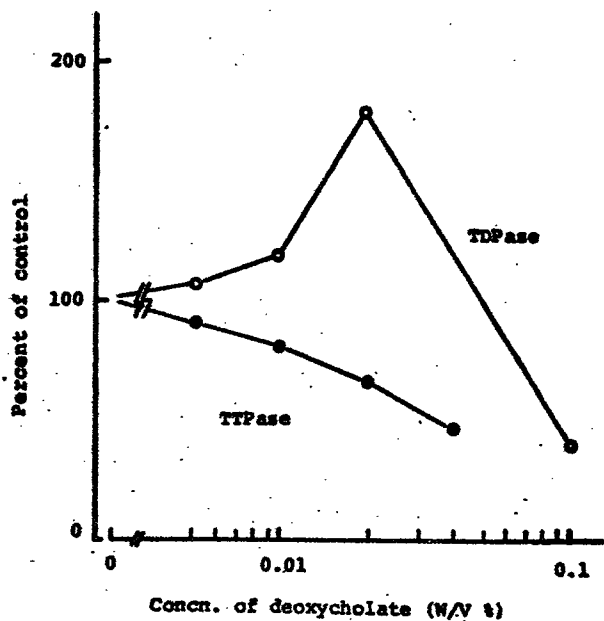
実験成績

まず sodium deoxycholate の microsomal TTase, TDPase 活性に及ぼす作用を検討した(図 20)。

図にみられる様に、deoxycholate は 0.02% (W/V) の濃度において、TDPase 活性の 80% の増加、並に TTase 活性の 50% の抑制という逆の作用を示した。更に TDPase については、0.1% の高濃度においては逆に抑制作用がみとめられた。

Fig. 20

EFFECT OF SODIUM DEOXYCHOLATE ON MICROSOMAL TDPase AND TTPase ACTIVITIES



Control activity:

TDPase, 1.05 μ moles Pi/mg protein/h

TTPase, 0.75 μ moles Pi/mg protein/h

Table 14 Effect of sodium deoxycholate on TDPase and TTPase activities in acetone-treated microsomes

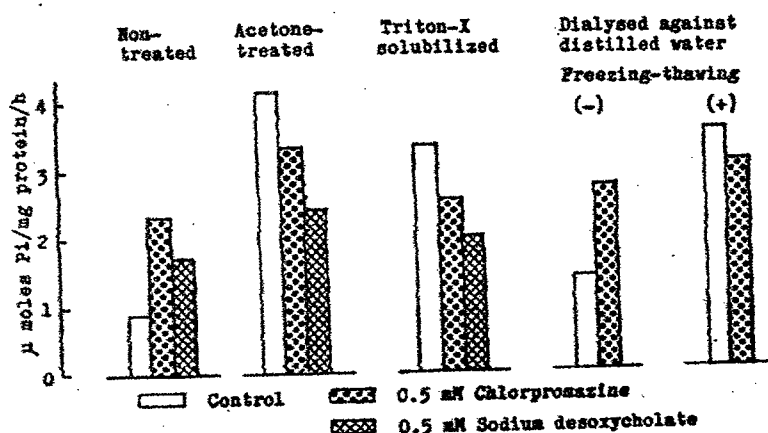
Addition	TDPase		TTPase	
	activity*	(%)	activity*	(%)
None	4.04	100	0.32	100
Deoxycholate (0.02 W/V%)	2.40	59	0.31	97

* μ moles Pi/mg protein/h

表14にアセトン処置をしたミクロゾームのTTPase, TDPase
に対する0.02%のdeoxycholateの作用を示した。

アセトン処置ミクロゾームではdeoxycholateにより、
TDPaseが約40%の阻害を受けることが明らかになり、
又、TTPaseには変化はみとめられなかつた。

Fig. 21 Effects of chlorpromazine and sodium desoxycholate on brain
microsomal TDPase activity after various treatments



アセトン処置, TritonX-100 による可溶化, 並びに水に
対して透析した後、凍結融解を行なう酵素標品について
比活性の変化並びにCPZ, deoxycholateの作用の変化を
一括して図21に示した。まずTDPaseの比活性はこれらの
処置全てにより上昇した。更に、CPZ, deoxycholateの
TDPaseに対する作用もこれらの処置により逆転することが
みとめられた。尚、データには示さなかつたがTTPase活性は

これらの処置により低下することをみとめている。

第3節 考察 及び 小括

1) 考察

従来、中枢神経系において TTPase, TDPase が膜、顆粒分画に局在すること、及び不溶性の膜と結合した酵素であることは知られていた。しかしながら、thiamine の代謝系路上に隣接するこの二つの脱リン酸化酵素が、膜分画においてどのような存在形式を有しているかについては全く不明であった。

本章において、著者はミクロゾーム分画をアセトン処置で脂質成分をとり除くと TTPase 活性が約 1/2 に低下し、逆に TDPase が 4 倍もの活性化を示すことをみとめた。又、それに伴って cpz の作用も TTPase については無処置ミクロゾームにおけると同様に抑制がみられるが TDPase については cpz の作用の逆転がみられることを明らかにした。同時に、アセトン処置により TDPase の K_m 値の著明な減少が生じることも判明した。更に、界面活性剤である deoxycholate が TTPase, TDPase に対して、cpz に類似した作用を有することもみとめた。

アセトン抽出が脂質成分をとり除く膜の構造を変化させることも考えると、上述の結果から次のことが指摘される。すなわち、TTPaseとTDPaseは膜のミクロゾームにおいてその存在形式が全く逆であること、TTPaseの活性には脂質成分が必要であり、逆にTDPaseは、正常な状態では活性の抑制された型、すなわち“latent”な型で存在し、その抑制因子として脂質成分の関与のあることが考えられる。しかしながら、現時点ではこの変化の因子が脂質成分そのものの除去にあるのか、あるいは結果として生じる構造の変化にあるのかは判定し難い。しかし、界面活性剤のdeoxycholateによりTTPaseが抑制され、TDPaseが活性化するという事実、更にはアセトン抽出したミクロゾームではdeoxycholateのTDPaseに対する作用が逆転するという事実は、これら両酵素における脂質成分の重要性を物語るものであろう。このことは、アセトン処置以外にもTritonX-100で可溶化したもの、あるいは水に対して透析した後、凍結融解したミクロゾームについても、更には、phospholipase C処置によってもアセトン処置でみられた変化がみとめられる⁵⁶⁾という点からも明らかであろう。

一般に、膜酵素と脂質の関係については、界面活性剤やphospholipaseを用いた実験から多くの酵素が脂質除去によ

り失活するか、あるいはその酵素に作用するホルモンの作用が消失することがみとめられている^{57, 58)}。従って、脂質除去により比活性の著明な増大のみられる TDPase は変わてまれない例である。

CPZ のこれらの酵素に対する作用の違いも今まで述べてきた TTPase, TDPase の脂質成分を介在とする存在形式の違いに求められる。すなわち、脂質を必要とする TTPase は CPZ が脂質成分と結合することにより活性が低下し、逆に TDPase は CPZ が脂質と結合することにより活性化された型になると考えられる。このことは、CPZ の作用場が脂質成分にあるということ^{51, 55)}、更には、本章で示した如く、deoxycholate が CPZ と類似の作用を有していることから推定される。

2). 小括

(1). ラット脳ミクロゾームをアセトン抽出すると、TTPase 活性は約 $\frac{1}{2}$ に低下し、TDPase 活性は約 4 倍に活性化された。又、アセトン処置したミクロゾームでは、TTPase に対して CPZ の作用は抑制的であったが、TDPase に対しては、作用の逆転がみられ抑制的になった。

(2). アセトン処置により, TDPaseの V_{max} が著明に増加し, それに伴い K_m の減少がみられた。又, CPZ の作用は非拮抗阻害である。

(3). 界面活性剤 deoxycholate, 0.02% の添加により, TDPase の活性阻害, TDPase の活性増加がみられた。又, アセトン処置したミウロゾームでは, TDPase に対する deoxycholate の作用は逆転し, 抑制作用を示した。

(4). アセトン処置でみられた結果は, Triton X-100 で可溶化した TDPase, あるいは水に対して透析した後, 凍結融解したものについても同様にみとめられた。

第 IV 章

Thiamine 及びそのリン酸エステルの膜機能 (ATPase) に対する作用

第 I 章から第 III 章までにおいて, thiamine リン酸エステル
の代謝がミトコンドリア分画(膜分画)に局在し, 各々,
特有の性質を有すること, 更に cpz 等の膜機能に影響を与
える物質で特異な作用をうけること, そして膜-脂質の除
去による膜構造の変化と密接な関連を有することと明らか
にした。この様に, thiamine リン酸エステルの代謝は,
膜, 顆粒分画においてその特有の性質を示しており, 従っ
て次に, 膜, 顆粒分画での thiamine リン酸エステルの生
理作用の検討が必要である。

Thiamine あるいはそのリン酸エステルが, 直接生理作
用を及ぼすこと, あるいは間接的にもあるひとつの生体機
能に関係し得ることを強く示す例は余りみられず,
 $\text{Petrooulos}^{71)}$, $\text{Kunz}^{81)}$ 等のミエリン鞘をもつ単一神経線
維の活動電位の発生を thiamine の拮抗物質である pyri-
thiamine が阻害すること, $\text{Armett, Cooper}^{59)}$ の髄鞘を
除去した迷走神経線維に pyri-thiamine を作用させると, 活動

電位の増大と過分極の逆転が生じること、あるいは Cooper ら⁶⁰⁾ の X 線照射した神経の活動電位の消失が、thiamine により回復すること、等の報告がみられるのみである。

従って、著者は本章において thiamine の生理作用のいくつかの可能性として、膜の輸送系に対する作用を ATPase 活性を指標として検討した。

ATPase については、生体のほとんどの組織において、その存在がみとめられており、その存在意義も、細胞膜を經たイオンの能動輸送に必要なエネルギーの供給という点からみとめられている。ATPase としては、各組織、各分画によりことなるものが存在しているが、一般的には Na^+ - K^+ -ATPase, Mg^{++} -ATPase, Ca^{++} -ATPase, Mg^{++} - Ca^{++} -ATPase 等が知られている。

第1節 ウット脳ミクロゾームの Na^+ - K^+ -ATPase,

Mg^{++} -ATPase, Ca^{++} -ATPase 活性に対する

thiamine 及びそのリン酸エステル作用

まず第1に、 Na^+ の輸送に関与している Na^+ - K^+ -ATPase, basal ATPase としての Mg^{++} -ATPase, 更に Ca^{++} -ATPase について、ウット脳ミクロゾーム分画を用い、thiamine 及びそのリン酸エステルの作用を検討した。

実験方法

1) ミクロゾーム分画の調製

Deoxycholate 処置ミクロゾームの調製は, Heckenbergs の方法⁶¹⁾に準い行なつた。すなわち, ラット脳を4倍量の 0.2% deoxycholate を含む 0.25 M sucrose (histidine, 5 mM; EDTA, 1 mM を含む) でホモジナイズした。ホモジネートを 12000 × g, 30 分の遠沈により, 核, ミトコンドリアを取り除く, その上清を 35000 × g, 30 分の遠沈にかけ, 沈渣としてミクロゾーム分画を得た。次に, このミクロゾームを 0.25 M sucrose (histidine, 5 mM; EDTA, 1 mM を含む) に懸濁後, 35000 × g, 30 分の遠沈を行ない, その沈渣を 0.25 M sucrose に蛋白濃度約 2 mg/ml になる様に懸濁し, 酵素標品とした。酵素は, 採取後日数の経過に従い失活がみられたので, 活性の測定は当日に行なつた。

2) ATPase 活性の測定

名々のインキュベート medium は次の組成である。

Mg²⁺-ATPase については, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-ATP, ミクロゾーム蛋白, Na⁺-K⁺-ATPase については, Mg²⁺-ATPase 用のインキュ

ベート medium 1 = 100 mM NaCl, 30 mM KCl を添加したものを
を用いた。Ca²⁺-ATPase については、50 mM Tris-HCl (pH
7.5), 0.5 mM EDTA, 5 mM CaCl₂, 5 mM Tris-ATP, ミ
ホリム蛋白を含む。各々、全量 0.5 ml にした。

酵素反応は、37°C において 5 分間の プレインキュベート
の後、基質を添加し 10 分間行なった。反応後、12% の冷 TCA
0.5 ml を添加し、遠沈後、その上清について無機リン酸を
Taussky, Shorr の方法⁽²⁾により比色定量した。

ATP の自然分解は、ほとんどみとめられなかった。又、
ATP 中の無機リン酸及び酵素標品中の無機リン酸はトラン
クとして測定した。Na⁺-K⁺-ATPase 活性は、Mg²⁺-ATPase
の反応系に Na⁺, K⁺ を添加した時の値から非添加の時の値
(Mg²⁺-ATPase 活性) を差し引いて求めた。

Thiamine リン酸エステルは、Tris-base により中性に
し用いた。又、thiamine 化合物の無機リン酸定量への影
響はみとめられなかった。添加した thiamine リン酸エス
テルの分解は、約 6% 位みとめられたが、ATP 由来の無機
リン酸に比しても約 6% でありさわめてわずかであった。
この thiamine リン酸エステル由来の無機リン酸は、各々
対照として測定した。

実験成績

Fig. 22

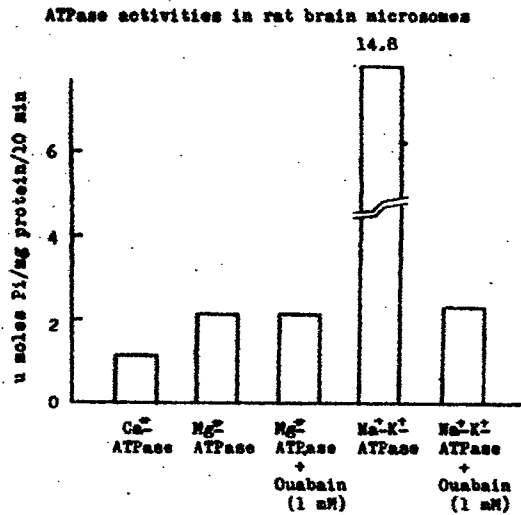


図22に deoxycholate処置ミトコンドリアの各ATPase活性を示した。Na⁺-K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPaseの比活性の比が約15:2:1であり, Na⁺-K⁺-ATPase用の分画として妥当であることが判る。又, ouabain 1 mMの添加でNa⁺-K⁺-ATPase活性は, はい完全に抑制された。一方, Mg²⁺-ATPase活性は ouabainにより全く影響をうけなかった。

次に, この各ATPase活性に対する1 mMの thiamine, pyriithiamine, TMP, TDP, TTP の作用を検討した(表15)。

表にみられる様に, TDP, TTPによりCa²⁺-ATPase活性が, 各々約40%, 50%の著明な活性阻害をうけることがみ

とめられた。又, thiamine, pyrithiamine, TMP でも多少
 から抑制がみられた。しかしながら, Mg^{2+} -ATPase, Na^{+} -
 K^{+} -ATPase については何ら変化はみとめられなかった。

Table 15

Effects of thiamine derivatives on ATPase activity
 in rat brain microsomes

Addition	Ca^{2+} -ATPase	Mg^{2+} -ATPase	Na^{+} - K^{+} -ATPase
None ^{a)}	100	100	100
Thiamine	83	97	104
Pyrithiamine	79	79	110
TMP	79	97	108
TDP	64	93	103
TTP	50	100	101

Thiamine compound; 1 mM

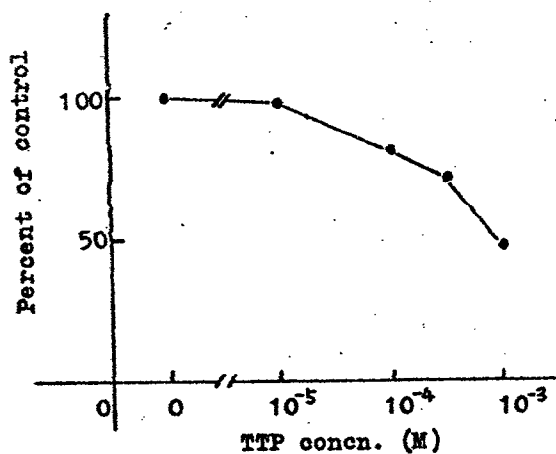
a) Control activity (μ moles Pi/mg protein/10 min):

Ca^{2+} -ATPase, 1.15 ± 0.13 ; Mg^{2+} -ATPase, 2.15 ± 0.22 ;

Na^{+} - K^{+} -ATPase, 14.9 ± 1.40

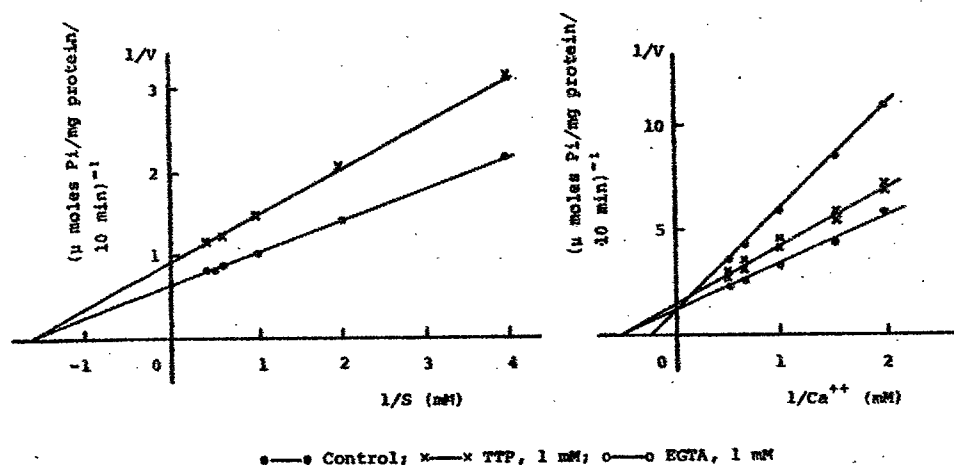
Fig. 23

Inhibition of Ca^{2+} -ATPase by TTP



又, TTPによる Ca^{++} -ATPase活性の阻害は, 0.1 mM でも約20%みとめられる(図23)。

Fig. 24 LINEWEAVER-BURK PLOT OF Ca^{++} -ATPASE



次に, このTTPによる Ca^{++} -ATPase活性の阻害機構を検討した(図24)。左図に 1 mM のTTP存在下及び非存在下の Ca^{++} -ATPaseの基質濃度に対するLineweaver-Burk plotを示したが, 図から明らかな様に, TTPによる非拮抗的な阻害がみとめられた。一方, 右図は, 1 mM のTTP, あるいはEGTA存在下での Ca^{++} 濃度に対するLineweaver-Burk plotを示してある。EGTAは Ca^{++} のキレート剤であり, テーブルには示していないがこの Ca^{++} -ATPase活性を阻害する。図にみられる様に, EGTAによる阻害(拮抗型)と, TTPによ

る阻害(非拮抗型)は、異なり、その形式を示すことが明らかとなり、 Ca^{2+} 。

第2節 ラット脳ミクロゾームの $Mg^{2+}-Ca^{2+}$ -ATPase 活性に対する TTP の作用

第1節において、各種 ATPase の中で Ca^{2+} -ATPase 活性のみが TTP により著明な阻害をうけることを述べてきた。しかしながら、この ATPase (Ca^{2+} -ATPase) については、哺乳動物脳においてその存在が報告されているが、その詳細な性質、生理的役割についてはほとんど知られていない^{63, 64}。

従って、次に赤血球膜⁶⁵⁻⁶⁷、脳^{63, 68-70}において Ca^{2+} の輸送に関与することから示唆されている $Mg^{2+}-Ca^{2+}$ -ATPase について同様に TTP の作用を検討した。

実験方法

1) ラット脳ミクロゾームの調製

ラット脳を10倍量の 0.08% deoxycholate を含む 0.32 M sucrose でホモジナイズし、 $17000 \times g$, 30分の遠沈後、その上清を $105000 \times g$, 30分で遠沈し沈渣としてミクロゾームを得た。このミクロゾームを 0.1 M sucrose に懸濁後、

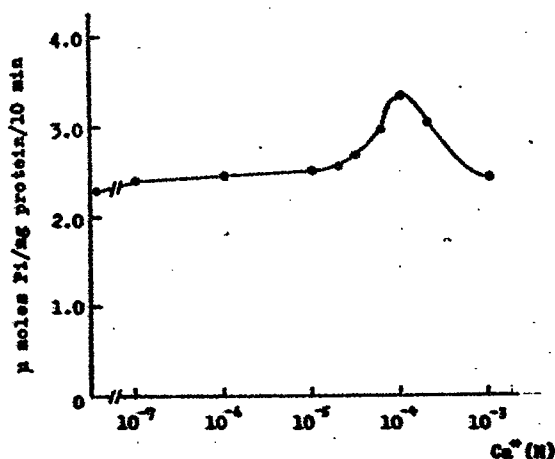
105000×g, 30分の遠沈を行ない, 沈渣を 0.1 M の sucrose に蛋白濃度約 2.5 mg/ml で懸濁し, 酵素標品とした。

2) Mg²⁺-Ca²⁺-ATPase 活性の測定

標準インキュベート medium には, 40 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.125 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-ATP, 酵素蛋白, 並びに必要なに応じて 10⁻⁷~10⁻³ M の CaCl₂ を添加した。全量は 0.5 ml で, インキュベート, 反応停止及び無機リン酸の定量は, 第 IV 章第 1 節で述べた方法に従う。活性の表示は, Ca²⁺ 無添加の時の活性を Mg²⁺-dependent 活性とし, Ca²⁺ 添加 (通常, 0.1 mM) の添加により増加した活性を Ca²⁺-dependent 活性として示した。

実験成績

Fig. 25 Effect of CaCl₂ on ATPase activity of DCC-treated microsomes



ラット脳の $Mg^{++}-Ca^{++}$ -ATPase については報告がみられないので、まずその存在について検討した。

図25にラット脳ミクロゾームの $Mg^{++}-Ca^{++}$ -ATPase の Ca^{++} による活性化の曲線を示した。 $1.25 \times 10^{-4} M$ の EGTA 存在下、 Ca^{++} $0.1 mM$ の添加により約50%の活性化がみとめられ、 $1 mM$ の Ca^{++} では活性化は消失した。又、データには示していないが、EGTA非存在下では、 $0.6 \times 10^{-4} M$ の Ca^{++} の添加により同様の活性化がみとめられている。この結果は、牛脳⁶⁵⁾、マウス脳⁷¹⁾ における知見と類似しており、従って、この酵素標品は、 $Mg^{++}-Ca^{++}$ -ATPase の標品として妥当であることが判る。次に、TTPのこの酵素活性に対する作用を検討した(表16)。

Table 16

EFFECT OF TTP ON $Mg^{++}-Ca^{++}$ -ATPASE ACTIVITY IN RAT BRAIN MICROSOMES

TTP concn. (M)	Mg^{++} dependent activity*		Ca^{++} dependent activity**	
	Specific activity***	%	Specific activity***	%
0	2.46	100	1.09	100
10^{-6}	2.39	97	1.00	92
10^{-5}	2.46	100	0.86	79
10^{-4}	2.44	99	0.69	63
5×10^{-4}	2.39	97	0.65	60
10^{-3}	2.31	94	0.55	50

* EGTA ($1.25 \times 10^{-4} M$) was present.

** Ca^{++} (6×10^{-5}) was added.

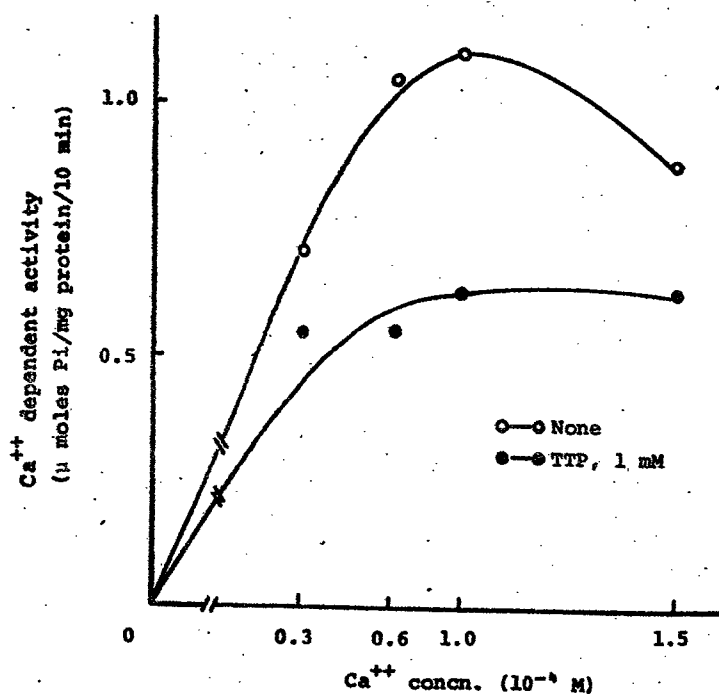
*** μ moles Pi/mg protein/10 min

表にみられる様に, Mg^{++} - Ca^{++} -ATPaseの Mg^{++} -dependent 活性は, TTPにより何ら変化をうけないが, Ca^{++} -dependent 活性は 10^{-5} ~ 10^{-3} Mの TTPにより約 20~50%の著明な阻害をうけることが明らかとなった。

図26に, TTP 1 mMの存在下及び非存在下の Mg^{++} - Ca^{++} -ATPaseの Ca^{++} による活性化曲線を示したが, TTPによる活性の阻害は, 添加する Ca^{++} 濃度にかかわらずおみとめられた。

Fig. 26

EFFECT OF TTP ON Mg^{++} - Ca^{++} -ATPASE ACTIVITY AT VARIOUS CONCENTRATION OF Ca^{++}



Mg^{++} dependent activity:
2.50 μ moles Pi/mg protein/10 min

第3節 考察 及び 小括

1) 考察

生体内、特に神経膜などの興奮性膜において、膜を經だてたイオンの輸送が、膜の興奮現象、ひいては膜における刺激伝導系の根本をなしていることは、広く知られている事実である。又、近年になりこの膜を經だてたイオンの輸送について、膜のATPaseが重要な役割を有しているという事実は、多くの生化学的あるいは電気生理学的な研究により確立されてきた。

Thiamine と膜機能との関連を示す直接的な研究はみられないが、すでに述べた Cooper 一派の神経活性物質による thiamine の遊離^(12,13)、あるいは、神経線維に anti-thiamine である pyri-thiamine を添加した時に活動電位の変化が生じる⁽⁶⁻⁸⁾といった知見は、膜機能における thiamine の役割を示唆しているものと考えられる。

本章において、著者は thiamine の膜機能に対するひとつの生理作用の可能性として、ATPase への thiamine の作用を検討した。その結果、thiamine リン酸エステル、特に TTP から $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$ 、並びに $\text{Mg}^{++}\text{-Ca}^{++}\text{-ATPase}$ 活性を抑制するが $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 、 $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$ には作用しないことをみと

めた。TTPのこの作用については、TTPの Ca^{2+} キレート作用による可能性も考えられるが、 Ca^{2+} -ATPaseについては飽和濃度の約2倍の5 mMという高濃度の Ca^{2+} を用いていること、又、 Ca^{2+} のキレート剤であるEGTAによる活性阻害は、 Ca^{2+} に対して拮抗的であるのに対して、TTPによる阻害は、非拮抗的であること、更に、 Mg^{2+} - Ca^{2+} -ATPaseの Ca^{2+} -dependent活性の阻害についても、 Ca^{2+} 濃度の如何にかかわらずみとめられることから、TTPによる“ Ca^{2+} -ATPase”活性の阻害を単にmedium中での Ca^{2+} のキレートによるものと考えるのは困難であろう。

Ca^{2+} が神経系においてその活動に重要な役割を有していることは広く知られており、電気生理学的には膜の“stabilizer”としての多くの作用をみとめられている⁷¹⁾。又、神経末端からの伝達物質の遊離、あるいはcyclic-AMPを媒介とする多くのホルモン作用にも Ca^{2+} は重要な位置を占めている⁷²⁾。

Ca^{2+} とthiamineの関連については、余り多くの事実は知られていないが、前述したAChによる神経膜分画からのthiamineの遊離が Ca^{2+} により促進されるという知見¹³⁾、thiamine欠乏ハトの脳膜分画の Ca^{2+} 含量の変動⁴⁵⁾、あるいは、第5章でも述べた様に、soluble TTPase活性が生理的濃度の Ca^{2+} により阻害を受ける等のことから興味ある問題

と考えられている。Cooper らは、その一連の研究から、thiamine リン酸エステルと膜における Na^+ の輸送とが密接な相互関係を有する可能性を提唱しているが、神経系においては、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ exchange reaction が存在し膜をへだてての Na^+ と Ca^{++} の輸送とが有機的につながっていることがわめられている⁷³⁾。従って、Cooper らの提唱している thiamine と Na^+ の輸送の関連についての仮説と、本章に示した Ca^{++} 輸送系への thiamine リン酸エステルの作用とは何う矛盾するものではなく、共に thiamine の生理作用を考える上で興味深い。

本章で得られた知見から、in vivo において TTP が Ca^{++} の輸送を変え得るかどうかについては、用いている TTP の濃度が生体濃度よりも高いことから明らかではないが、TTP 等の thiamine リン酸エステルが膜に局在していること⁴⁶⁾、更には、TTP は " Ca^{++} -ATPase" のみに作用することとを考へ併せると、TTP のこの作用は thiamine リン酸エステルの代謝と Ca^{++} の代謝とが密接に関連する可能性を示すものとして興味ある知見であろう。

2) 小 括

(1). 1 mM の TDP, TTP でラット脳ミトコンドリアの Ca^{2+} -ATPase 活性が、各々、40%、50% の著明な阻害をうけた。一方、 Mg^{2+} -ATPase, Na^{+} - K^{+} -ATPase には何ら変化はみとめられなかった。

(2). TTP による Ca^{2+} -ATPase 活性の阻害は、濃度的には、0.1 mM においても約 20% みとめられ、基質濃度に対して非拮抗的であった。又、 Ca^{2+} 濃度に対しても非拮抗的な阻害形式を示し、拮抗阻害を示す EGTA とその阻害形式が：となっていた。

(3). ラット脳ミトコンドリアの Mg^{2+} - Ca^{2+} -ATPase 活性を検討すると、 1.25×10^{-4} M の EGTA 存在下に 0.1 mM の Ca^{2+} 添加により、約 50% の活性化がみとめられた。

(4). TTP は $10^{-5} \sim 10^{-3}$ M の濃度において、 Mg^{2+} - Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} -dependent 活性を約 20% ~ 50% 阻害した。一方、 Mg^{2+} -dependent 活性に対しては何ら影響しなかった。

(5). TTP による Mg^{2+} - Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} -dependent 活性の阻害は、添加する Ca^{2+} 濃度の如何にかかわらずみとめられた。

第 V 章

総括及び結論

1. 総括

中枢神経系における thiamine の生理的役割を追求することとを目的とし、まず第 1 にいまだほとんど性質の判明していない thiamine 代謝 (TDPase, TTPase) について、その基礎的性質、並びに活性に影響を与える薬物の検討を行ない、次に thiamine の C と T の生理作用の可能性として、膜機能に対する作用を考え、ATPase を指標として検討した。

ラット脳中の TTPase, TDPase の細胞内分布は、TTPase については、soluble TTPase と membrane-associated TTPase の二つがあり、前者は上清分画、後者はミクロソーム分画、及び核分画に活性が高かった。又、この二つの TTPase は、二価カチオン要求性、至適 pH、至適反応条件についても全くことなっていた。更に、soluble TTPase は、生理的濃度の Ca^{2+} により著明な活性阻害を受けることが明らかとなった。一方、TDPase についてはミクロソーム分画に高い活性がみとめられた。TDPase は、脳においても特異的な酵素ではなく、nucleoside diphosphatase と同一の酵素であることが示唆されている²⁴⁾、TTPase については、soluble

TTase, 更には microsomal TTase も特異的な酵素であることが示された。又, TTase 反応は一般に脱リン酸化反応であり, TDP 分解反応の関与はみとめられなかった。これらのことは脳における TTase, TDPase の特異性を示しているものと思われる。

In vivo の条件下で, TTase 活性が DL-methamphetamine, chlorpromazine (CPZ), thiamine 欠乏, 等により変動することを見いだしたが, それらによる中枢機能変化と酵素活性の変動の関連については, 現時点では不明である。更に, insulin, 絶食によっても TTase 活性の変化はみられず, 非常に活性変化のうけ難い酵素であると推測される。このことは, in vitro においても同様で, ACh, NA, tyramine 等々の神経活性物質によっても酵素活性の変化は全くみとめられなかった。TDPase についても同様に活性変化はみられなかった。

しかしながら, 膜に作用し膜機能を変えることの知られている CPZ により TTase が著明に阻害を受けること, 又, imipramine, desipramine も同様の作用を有することを見いだした。一方, CPZ は TDPase に対しては逆に著明な活性化をひきおこすこともみとめた。

CPZ は, TTase, TDPase の両方に作用を有する物質として

は初めて見出された物質であり、一般的にCPZにより多くの酵素が阻害されるが、活性化をうける酵素はほとんど知られぬことを考える時、thiamineの代謝に隣接するこの二つの酵素が全く逆の作用をうけるという知見は、さうめて興味深く思われる。又、TTPaseについては“Ca⁺⁺-TTPase”はCPZにより阻害されなかった。このことはミクロソームのTTPaseの多様性を示すものとして今後のひとつの課題になり得るであろう。

CPZの作用点が一般に膜の脂質成分にある⁵⁷⁾との観点から、次にTTPase, TDPaseのミクロソーム分画におけるその存在形式を検討する目的でミクロソームをアセトン抽出し、CPZの作用を検討した。その結果、アセトン抽出はTTPaseの活性をひきおこすが逆にTDPaseについては約4倍もの活性化をひきおこすことをみとめた。又、このアセトン処置ミクロソームのTDPaseについては、 V_{max} の増大、並びに K_m の減少もみられた。更に、アセトン抽出はTTPaseに対するCPZの反応性には変化を与えないが、TDPaseに対する反応性には著明な変化を与え、その作用が逆転し、抑制的になることが判明した。従って、これらのことから、TTPaseとTDPaseは、ラット脳ミクロソーム分画において、脂質成分を介在としてその存在形式が全くことなり、

こと、すなわち、TTPaseにはその活性発現に脂質が必要であり、逆にTDPaseは、正常状態では脂質により活性のあるえうれん型として存在しているであろうことが示唆される。このことは、アセトン処置以外の他の処置によっても同様のことがみられること、又、界面活性剤である deoxycholate がCPZと類似の作用を有することからも推定される。更に、TTPase, TDPaseに対するCPZの反応性の違いもこの二つの酵素の存在形式の違いにもとづくものと考えられる。

CPZは生体に対して多くの作用を有するが、そのほとんどの共通の作用点として、生体膜に作用しその機能を変化させることにあることを考慮に入れると、先に述べた知見は、膜機能とthiamine リン酸エステルの代謝の関連性を示すものとして興味深い。そこで次に著者は、thiamine及びそのリン酸エステルのひとつの生理作用として膜機能に対する作用を想定し、その指標としてATPaseに対する作用を検討した。

ラット脳ミクロゾームの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$, $\text{Mg}^{++}\text{-Ca}^{++}\text{-ATPase}$ の中で、TDP, TTPは $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$ 活性を著明に阻害すること、又、TTPは、 $\text{Mg}^{++}\text{-Ca}^{++}\text{-ATPase}$ の $\text{Ca}^{++}\text{-dependent}$ 活性のみを阻害すること、しかしながら、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$ には何ら作用し

ないことをみとめた。このことについて、in vitroでの ATPaseの阻害が直接的に膜のイオン輸送に結びついているか否かという問題、あるいは用いている TDP, TTP の濃度が高濃度であるということから、現時点で in vivoにおいて TTP, TDP から Ca^{++} の輸送に変化を与えると断定することは危険であるが、多くの ATPaseの中で " Ca^{++} -ATPase" 活性のみが抑制をうけるという事実は、TTP, TDP から Ca^{++} の輸送と何らかの関連を有することを示唆しているものと思われる。

2. 結 論

ラット脳 thiamine triphosphatase (TTPase) には、可溶性のもの と 膜に結合したもの の 2 種類の存在がみとめられ、各々ことなる性質を有していた。TTPase, thiamine diphosphatase (TDPase) 活性は、若干の例外を除いて in vivo あるいは in vitro において、種々の神経活性物質によっても変動がみられず、活性変化のうけ難い酵素であることが判明した。しかしながら、膜に作用し膜機能をかえよことの知られている chlorpromazine (CPZ) により、これらの酵素活性は全く逆の著明な変化をうけた。すなわち、

TTPaseは活性が阻害され、TDPaseは著明な活性化をうけた。このCPZの作用機作を解明するため、酵素標品であるミクロゾーム分画をアセトン抽出すると、まずTTPaseの比活性は低下し、TDPaseの比活性は著明に増加した。更に、TDPaseに対するCPZの作用も逆転した。又、界面活性剤である deoxycholate はこれらの酵素に対してCPZと類似した作用を有していた。これらのことは脳のミクロゾーム分画におけるTTPase、TDPaseの存在形式が脂質成分を介在として全く逆であること、TDPaseについては正常では活性の抑えられる形で存在することを示している。次に thiamine などそのリン酸エステルと膜機能の関連については、TTPaseが種々のATPaseの中で" Ca^{2+} -ATPase"活性に対して著明な阻害作用を有することを見いだした。

以上の知見から、ラット脳ミクロゾーム分画(膜、顆粒分画)において、TTP、TDPの脱リン酸化過程が、さわめて特異的な性質を有していること、そして、その代謝が Ca^{2+} の輸送系と密接な関連を有する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終りに臨み、終始、御懇切なる御指導並びに御校閲を賜わりました恩師、岩田平太郎教授に心より感謝致します。

また、本研究に御協力下さいました松田敏夫、寺下善一、石井紀江子 諸氏 並びに 大阪大学薬学部薬理学教室の 諸氏 に対し感謝の意を表します。

また、貴重な thiamine triphosphate を御分与いただきました 三共株式会社 に感謝致します。

参考文献

- 1) in "Thiamine deficiency: Biochemical Lesions and their Clinical Significance" Edited by Wolstenholme G.E.W. and O'Connor, M. Churchill, London (1967).
- 2) Wooley, D.W. and White, A.G.C.: J. Biol. Chem., 149, 285 (1943).
- 3) Euseibi, A.J. and Cerecedo, L.R.: Science, 110, 162 (1949).
- 4) von Muralt, A.: Nature, 154, 767 (1944).
- 5) von Muralt, A.: Ann. N. Acad. Sci., 98, 499 (1962).
- 6) Hoffman, H., Eckert, T. and Möbus, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 335, 156 (1964).
- 7) Petropulos, S.: J. Cell Comp. Physiol., 56, 7 (1960).
- 8) Kunz, H.A.: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 14, 411 (1956).
- 9) Heller, I.H., Wolfe, L.S. and Hesse, S.: J. Neurochem., 9, 443 (1962).
- 10) Gurtner, H.P.: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, Suppl. XI (1961).
- 11) Cooper, J.R., Itokawa, Y. and Pincus, J.H.: Science, 164, 74 (1969).
- 12) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: Biochim. Biophys. Acta, 196, 274 (1970).

- 13) Itokawa, Y., Schulz, R.A. and Cooper, J.R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 293 (1972).
- 14) Iwata, H., Fujimoto, S., Nishikawa, T and Hano, K.: *Experientia*, 24, 378 (1968).
- 15) Iwata, H., Nishikawa, T. and Watanabe, K.: *Experientia*, 25, 283 (1969).
- 16) Iwata, H., Watanabe, K., Nishikawa, T. and Ohashi, M.: *Europ. J. Pharmacol.*, 6, 83 (1969).
- 17) Iwata, H., Nishikawa, T. and Fujimoto, S.: *J. Pharm. Pharmac.*, 21, 237 (1969).
- 18) Iwata, H., Nishikawa, T. and Baba, A.: *Europ. J. Pharmacol.*, 12, 253 (1970).
- 19) Sharma, S.K. and Quastel, J.H.: *Biochem. J.*, 94, 790 (1965).
- 20) Cooper, J.R., Pincus, J.H., Itokawa, Y. and Piros, K.: *New Engl. J. Med.*, 283, 793 (1970).
- 21) Seijo, L. and Rodriguez de Lores Arnaiz, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 211, 595 (1970).
- 22) Cooper, J.R. and Kini, M.M.: *J. Neurochem.*, 19, 1809 (1972).
- 23) Barchi, R.L. and Braun, P.E.: *J. Neurochem.*, 18, 1039 (1972).
- 24) Inoue, A., Shim, S. and Iwata, H.: *J. Neurochem.*,

- 17, 1373 (1970).
- 25) Iwata, H., Inoue, A. and Tomoi, M.: J. Neurochem.,
18, 1371 (1971).
- 26) Yamazaki, M. and Hayaishi, O.: J. Biol. Chem., 243,
2934 (1968).
- 27) Hashitani, Y. and Cooper, J.R.: J. Biol. Chem.,
247, 2117 (1972).
- 28) Barchi, R.L. and Braun, P.E.: J. Biol. Chem., 247,
7668 (1972).
- 29) King, T.E.: Methods in Enzymology, Edited by
Estabrook, R.W. and Pullman, M.E., Vol. 10, p. 322.
Academic Press, New York and London (1967).
- 30) Shcneider, W.C.: J. Biol. Chem., 164, 747 (1946).
- 31) Lowry, O.H., Rosebrough, N.T., Farr, A.L. and
Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 32) Baginski, E.S., Foa, P.P. and Zak, B.: Clin. Chim.
Acta, 15, 155 (1967).
- 33) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: Methods in Enzymology,
Edited by McCormick, D.B. and Wright, L.D., Vol. 18,
p. 91. Academic Press, New York and London (1970).
- 34) 岩田平太郎, 馬場明道, 松田敏夫: 未発表.
- 35) Inoue, A. and Iwata, H.: Biochim. Biophys. Acta,
242, 459 (1971).

- 36) Frankenhaeuser, B. and Hodgkin, A.L.: J. Physiol., 137, 218 (1957).
- 37) Shanes, A.M.: Pharmacol. Rev., 10, 59 (1958).
- 38) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: Biochem. Pharmacol., 18, 545 (1969).
- 39) Itokawa, Y. and Cooper, J.R.: Science, 166, 759 (1969).
- 40) Minz, B.: Compt. rend. soc. biol., Paris, 127, 1251 (1938).
- 41) Sulkae, S.: J. Biol. Chem., 248, 4158 (1973).
- 42) Squires, R.F.: Biochim. Biophys. Res. Comm., 19, 127 (1965).
- 43) Akera, T. and Brody, T.M.: Mol. Pharmacol., 5, 605 (1969).
- 44) Tanaka, C. and Cooper, J.R.: J. Histochem. Cytochem., 16, 362 (1968).
- 45) 糸川嘉則 : ビタミン, 47, 249 (1973).
- 46) Davis, P.W. and Brody, T.M.: Biochem. Pharmacol., 15, 703 (1966).
- 47) Godfraind, T. and Verbeke, N.: Arch. int. Pharmacodyn. Ther., 203, 400 (1973).
- 48) Honda, F. and Imamura, H.: Biochim. Biophys Acta, 161, 267 (1968).

- 49) Robinson, J.D., Lowinger, J. and Bettinger, B.:
Biochem. Pharmacol., 17, 1113 (1968).
- 50) Salzman, N.P. and Brodie, B.B.: J. Pharmacol. exp.
Ther., 118, 46 (1956).
- 51) Guth, P.S. and Spirtes, M.A.: Int. Rev. Neurobiol.,
7, 231 (1964).
- 52) Axelrod, J., Whitby, L.G. and Hertting, G.:
Science, 133, 383 (1961).
- 53) Johnson, D.G., Thoa, N.B. and Kopin, I.J.: J.
Pharmacol. exp. Ther., 177, 146 (1971).
- 54) Nagy, A. and Wollemann, M.: Biochem. Pharmacol.,
20, 3331 (1971).
- 55) Seeman, P. and Weinstein, J.: Biochem. Pharmacol.,
15, 1737 (1966).
- 56) 岩田平太郎, 馬場明道, 松田敏夫: 未発表.
- 57) Rodbell, M., Krans, H.M.J., Pohl., S.L. and
Brinbaumer, L.: J. Biol. Chem., 246, 1861 (1971).
- 58) Stahl. W.L.: Arch. Biochem. Biophys., 154, 56
(1973).
- 59) Armett, C.J. and Cooper, J.R.: J. Pharmacol. exp.
Ther., 148, 137 (1965).
- 60) Cooper, J.R., Roth, R.H. and Kini, M.M.: Nature,
199, 609 (1963).

- 61) Heckenbergs, H. and Kriegstein, J.: Naunyn-Schmiedbergs Arch. Pharmacol., 274, 63 (1972).
- 62) Taussky, H.H. and Shorr, E.: J. Biol. Chem., 202, 675 (1953).
- 63) Roufogalis, B.D.: Biochim. Biophys. Acta, 318, 360 (1973).
- 64) Berl, S. and Puskin, S.: Biochemistry, 9, 2058 (1970).
- 65) Schatzmann, H.J.: Experientia, 22, 364 (1966).
- 66) Wolf, H.U.: Biochim. Biophys. Acta, 219, 521 (1970).
- 67) Schatzmann, H.J. and Rossi, G.L.: Biochim. Biophys. Acta, 241, 379 (1971).
- 68) Nakamaru, Y. and Konishi, K.: Biochim. Biophys. Acta, 159, 206 (1968).
- 69) Nakamaru, Y.: J. Biochem., Tokyo, 63, 626 (1968).
- 70) Nakamaru, Y., and Schwartz, A.: Arch. Biochem. Biophys., 144, 16 (1971).
- 71) Shanes, A.M.: Pharmacol. Rev., 10, 165 (1958).
- 72) Rasumussen, H.: Science, 170, 404 (1970).
- 73) Baker, P.F., Blaustein, M.P., Hodgkin, A.L. and Steinhardt, R.A.: J. Physiol., 200, 431 (1969).

Reprint



Journal of Pharmacy and Pharmacology

**The Pharmaceutical Society
of Great Britain
17 Bloomsbury Square London WC1**

**Reprinted from
Volume 26 Number 9 September 1974**

Glucose intolerance in thiamine-deficient rats

H. IWATA, A. BABA, T. BABA† AND T. NISHIKAWA††

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka, Osaka, Japan

The mechanism of glucose intolerance in thiamine-deficient rats has been examined. Deficient rats showed marked glucose intolerance. However, the hypoglycaemic effect of insulin (1 i.u. kg^{-1} , i.p.) was similar in the deficient, pair-fed and normal groups, though somewhat weaker in the normal group than in the other two groups. After injection of tolbutamide (40 mg kg^{-1} , i.p.), the hypoglycaemic effects in the three groups were the same. Tyramine (10 mg kg^{-1} , s.c.) restored the impaired glucose tolerance of deficient rats to normal, but not that of alloxan diabetic rats. Furthermore, tyramine did not restore the intolerance of deficient rats pretreated with alloxan. These results suggest that the main factor causing glucose intolerance in the deficient rats may be suppressed insulin secretion.

Previously, we observed that thiamine-deficient rats showed alterations of adrenergic mechanisms (Iwata, Fujimoto & others, 1968; Iwata, Nishikawa & Fujimoto, 1969; Iwata, Watanabe & others, 1969; Iwata, Nishikawa & Watanabe, 1969; Iwata, Nishikawa & Baba, 1970; Iwata & Nishikawa, 1970; Iwata, 1972). In these reports, we suggested a relation between depressed adrenergic mechanisms and disturbance of nervous function in the deficient rats.

On the other hand, it has been reported that deficient rats show decreased tolerance to dextrose (Lepkovsky, Clarence & Evans, 1930; Pachman, 1941), and that the concentration of insulin-like substance in the serum of deficient mice is abnormally low (Machida, 1956). But the mechanism of these disturbances is not clear. Furthermore, it is well known that adrenergic mechanisms are involved in the regulation of insulin secretion from the pancreas. Accordingly, the mechanism of glucose intolerance in deficient rats was investigated.

MATERIALS AND METHODS

The animals and the methods used to obtain thiamine-deficient, pair-fed and control rats were reported previously (Iwata & others, 1968). Deficient rats were used when the heart rate was reduced to below 70% of the normal rate (about 350 beats min^{-1}). Alloxan diabetic rats were obtained by withholding food from rats, ~250 g, for 2 days, alloxan (160 mg kg^{-1} , i.p.) was given on the second day. The rats were used 3 days later when the blood glucose level was over 400 mg dl^{-1} . With deficient rats, food was removed when the heart rate was about 420 beats min^{-1} , these animals were treated with alloxan in the same way as normal rats. The heart rate of these animals before decapitation was about 300 beats min^{-1} . The acute mortality rates of alloxan diabetic and alloxan + thiamine-deficient rats were 11 and 21%, respectively. The concentration of blood glucose was measured by the anthrone method. Glucose tolerance was measured as the change in the blood glucose level after intraperitoneal

† Present address: Department of Physiology, Medical School, Osaka City University, Abeno, Osaka, Japan. †† Present address: Department of Pharmacology, School of Dentistry, Hiroshima University, Kasumi, Hiroshima, Japan.

administration of 2 g kg^{-1} of glucose. Statistical significance was calculated using Student's *t*-test. Tolbutamide was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose. Insulin, tyramine and alloxan were dissolved in 0.9% NaCl.

RESULTS

Glucose tolerance in thiamine-deficient rats

The glucose tolerance test was performed on normal, control, pair-fed and thiamine-deficient rats. A specific change of the blood glucose curve was seen in deficient rats, as shown in Fig. 1. In these animals the maximum level was about 300 mg dl^{-1} and the level remained high for about 30 min and did not return to the initial level within 3 h. Other groups did not exhibit any significant increase of the blood glucose level except for controls which showed a slight increase 30 min after glucose injection.

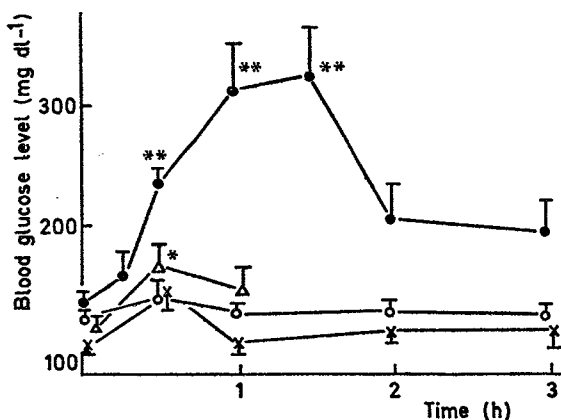


FIG. 1. Glucose tolerance of normal (○—○), pair-fed (×—×), control (△—△) and thiamine-deficient rats (●—●). Glucose (2 g kg^{-1} , i.p.) was loaded at 0 time. Each point represents the mean (\pm s.e.) of 6 to 10 observations. The statistical significance is calculated with respect to the corresponding value at 0 time. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

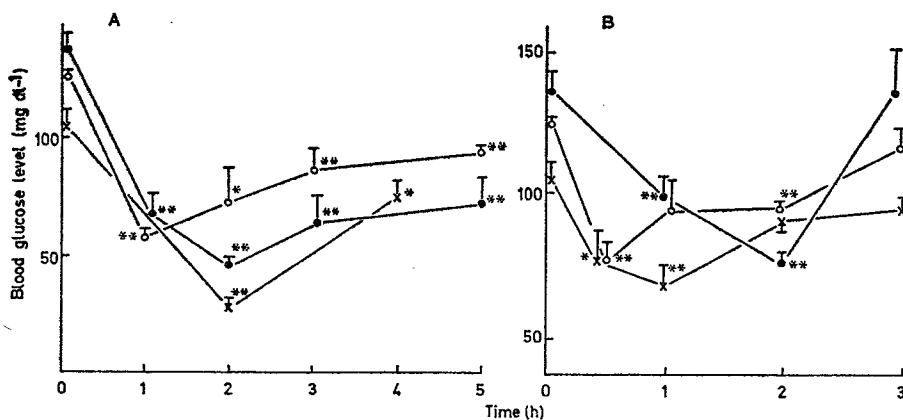


FIG. 2A. Effect of insulin (1 i.u. kg^{-1} , i.p.) and B. tolbutamide (40 mg kg^{-1} , i.p.) on the blood glucose level of normal (○—○), pair-fed (×—×) and thiamine-deficient rats (●—●). Each point represents the mean (\pm s.e.) of 4 to 6 observations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Hypoglycaemic effects of insulin and tolbutamide in thiamine-deficient rats

Next, to test the insulin response of deficient rats, the blood glucose level was examined after insulin injection (1 i.u. kg^{-1} , i.p.) (Fig. 2A). The action of insulin in deficient rats was similar to that in pair-fed rats, though it was somewhat less in normal rats than in the other two groups. To investigate the hypoglycaemic action of endogenous insulin in these animals, the effect of tolbutamide was examined (Fig. 2B). After tolbutamide injection (40 mg kg^{-1} , i.p.) the blood glucose level reached a minimum level in normal and pair-fed rats within 30 to 60 min, while in the deficient rats, the minimum level was only reached after 2 h, though it was the same as in the other two groups.

Effect of tyramine on glucose intolerance in thiamine-deficient and alloxan diabetic rats

Tyramine (10 mg kg^{-1} , s.c.) did not cause any change in the basal glucose level in deficient or normal rats after 3 h. Moreover, it did not cause any change in the glucose tolerance of normal rats but it restored the impaired glucose tolerance of deficient rats (Fig. 3).

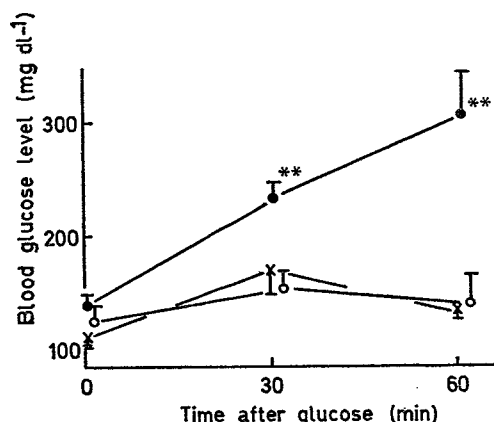


FIG. 3. Effect of tyramine on the glucose tolerance of thiamine-deficient rats. Thiamine-deficient (●—●), thiamine-deficient + tyramine (○—○), normal + tyramine (×—×). Tyramine (10 mg kg^{-1}) was administered 3 h before glucose. Each point represents the mean of 5 observations. * $P < 0.05$.

Table 1. *Effect of tyramine on glucose tolerance of alloxan diabetic rats.*

Time after glucose					Blood glucose level (mg dl^{-1})	
					0 min	30 min
Normal						
Untreated	125 ± 2	141 ± 16
Alloxan	455 ± 41	$750 \pm 58^{**}$
Alloxan + tyramine	432 ± 39	$605 \pm 37^{**}$
Thiamine-deficient						
Untreated	137 ± 7	$235 \pm 14^{**}$
Alloxan	479 ± 41	$622 \pm 52^{*}$
Alloxan + tyramine	410 ± 47	$667 \pm 87^{*}$

Tyramine (10 mg kg^{-1}) was administered 3 h before glucose. Alloxan diabetic rats were prepared as described in the methods. Each value represents the mean ($\pm \text{s.e.}$) of 4 observations. Statistically significant differences between values at 0 and 30 min at levels of $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by * and **, respectively.

Alloxan diabetic rats exhibited a high level of blood glucose and marked glucose intolerance, which was not restored by tyramine (Table 1). As shown in Fig. 3, tyramine restored the impaired glucose tolerance of deficient rats but this restoration was no longer observed when the deficient rats had been treated with alloxan.

DISCUSSION

Thiamine-deficient rats showed a characteristic blood glucose curve in the glucose tolerance test, with a high peak level, delay in the time of the peak and slow recovery to the initial level. This indicates that they have remarkably impaired glucose tolerance. This observation agrees with those of others (Lepkovsky & others, 1930; Pachman, 1941). These workers reported that the poor glucose tolerance of deficient rats was observed irrespective of whether the sugar was given orally, intravenously or intraperitoneally. This eliminates the possibility of impaired intestinal absorption of sugar in these animals.

Our result showing that hypoglycaemic actions of insulin in deficient rats were similar to those in other groups suggested that in deficient rats the sensitivity of target organs to insulin is the same as in the other two groups but that insulin release from the pancreas is disturbed. This postulation was supported by the experiment with tolbutamide, which is known to cause insulin secretion (Coore & Randle, 1964). Furthermore, the fact that thiamine deficiency had no further effect in impaired glucose tolerance in diabetic rats may also support this postulation. In deficient rats which had been treated with alloxan, tyramine did not restore the impaired glucose tolerance. However, as thiamine deficiency had no further action in impaired glucose tolerance in alloxan diabetic rats, the implication of this result is not clear.

Previously we have shown sympathetic tone is to be depressed in thiamine-deficient rats (Iwata & others, 1970). Tyramine was found to improve the bradycardia in such rats and this action may be mediated through release of catecholamines (Iwata, Watanabe & others, 1969). In the present work we have found tyramine to improve the glucose tolerance of deficient rats. It is possible that this effect of tyramine is due to some action in improving insulin secretion or increasing the effectiveness of endogenous insulin. These may be direct actions of tyramine or secondary to the effect of the drug in correcting the impairment of sympathetic nerve function. It is possible that improvement of the efficiency of an impaired blood circulation, for example, due to correction of bradycardia, may explain the beneficial effects of tyramine in thiamine-deficient rats.

REFERENCES

- COORE, H. G. & RANDLE, P. J. (1964). *Biochem. J.*, **93**, 66-78.
IWATA, H. (1972). First Congress of the Hungarian Pharmacological Society, in the press.
IWATA, H., FUJIMOTO, S., NISHIKAWA, T. & HANO, K. (1968). *Experientia*, **24**, 378-380.
IWATA, H. & NISHIKAWA, T. (1970). *J. Pharm. Pharmac.*, **22**, 645-646.
IWATA, H., NISHIKAWA, T. & BABA, A. (1970). *Eur. J. Pharmac.*, **12**, 253-256.
IWATA, H., NISHIKAWA, T. & FUJIMOTO, S. (1969). *J. Pharm. Pharmac.*, **21**, 237-240.
IWATA, H., NISHIKAWA, T. & WATANABE, K. (1969). *Experientia*, **25**, 283-284.
IWATA, H., WATANABE, K., NISHIKAWA, T. & OHASHI, M. (1969). *Eur. J. Pharmac.*, **6**, 83-89.
LEPKOVSKY, S., CLARENCE, W. & EVANS, H. M. (1930). *J. biol. Chem.*, **87**, 239-250.
MACHIDA, K. (1956). *J. Vitamin.*, **2**, 216-222.
PACHMAN, D. J. (1941). *Am. J. Physiol.*, **133**, 43-46.

ROLE OF THIAMINE METABOLISM IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

I. BASIC PROPERTIES OF THIAMINE TRIPHOSPHATASE IN RAT BRAIN

Heitaroh IWATA, Akemichi BABA and Toshio MATSUDA

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, Toyonaka, Osaka, Japan*

Accepted August 8, 1974

Abstract—The properties of soluble and microsomal thiamine triphosphatase (TTPase) in rat brain were examined. The subcellular distributions and the pH optima of these enzyme activities differ markedly. TTPase seems to be distinct from a general nucleoside triphosphatase. The TTPase activities have an absolute divalent cation requirement which is fulfilled by Mg^{++} or Ca^{++} in microsomes and by Mg^{++} , but not Ca^{++} , in the soluble fraction. Addition of a physiological concentration of Ca^{++} markedly inhibited the soluble TTPase activity.

von Muralt (1) first suggested the specific involvement of phosphorylated thiamine in nerve conduction. In support of this it has been demonstrated that neuroactive agents, at concentrations affecting conduction, caused release of thiamine from nerve membranes (2, 3) and that pyriethamine, an antimetabolite of thiamine, affected the action potential of peripheral nerves (4). However, the relationship between these phenomena and the process of dephosphorylation of phosphorylated thiamines have not been elucidated.

In previous papers we reported some properties of thiamine diphosphatase in rat brain (5-7). More recently the existence and some properties of thiamine triphosphatase (TTPase) in rat brain were reported (8, 9). The possible significance of thiamine triphosphate (TTP) in nerve tissue was suggested by the demonstration (10) that TTP was not present in the brain of patients with subacute necrotizing encephalomyelitis, a fatal disease associated with an abnormality in thiamine metabolism. However, the function of TTPase in nerve tissue has not been clarified. As a part of our studies on the role of thiamine in the function of the central nervous system, we examined the basic properties of TTPase in rat brain and its interaction with Ca^{++} . The results are described herein.

MATERIALS AND METHODS

TTP was a gift from Sankyo Co., Ltd., Tokyo. Purity was determined by paper electrophoresis (11) to be 97% TTP. GTP, ITP, UTP and ATP were obtained from Sigma Chem. Co., St. Louis. TTP and nucleotides were neutralized with tris base before use in enzyme assays.

Subcellular fractionation: Adult male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were sacrificed by decapitation and the brain was rapidly removed and homogenized in

10 vol. of ice-cold 0.25 M sucrose using a glass homogenizer fitted with a Teflon pestle. The homogenate was subjected to differential centrifugation to obtain a nuclear fraction ($1000\times g$, 10 min), a crude mitochondrial fraction ($14500\times g$, 20 min), a microsomal fraction ($105000\times g$, 60 min) and the resulting supernatant fraction. Particulate fractions were washed three times in ice-cold sucrose, and then diluted with 0.25 M sucrose to protein concentrations of 2.0 to 3.5 mg/ml. Succinate dehydrogenase activity was determined by the method of King (12). DNA and RNA was determined by the method of Schmidt-Thannhauser-Schneider (13). Protein was determined by the procedure of Lowry *et al.* (14).

Determination of TTPase activity: Hydrolysis of TTP was measured by determining the release of inorganic phosphate by the method of Baginski *et al.* (15). Unless otherwise indicated the standard reaction mixture contained: for soluble TTPase, 100 mM tris buffer (pH 9.0), 6 mM $MgCl_2$, 3 mM substrate and about 300 μg /ml of protein; for membrane-associated TTPase, 100 mM tris-maleate buffer (pH 6.5), 3 mM $MgCl_2$, 3 mM substrate and about 600 μg /ml of protein in a final volume of 0.5 ml. After 5 min of pre-incubation, incubation was started by addition of TTP and carried out for 30 min at 37°C. The reaction was terminated by addition of cold trichloroacetic acid to a final concentration of 5%. Nucleoside triphosphatase activity was determined in the same way as TTPase activity except that ITP, GTP, UTP or ATP served as substrate and the incubation time was 15 min.

Partial purification of soluble TTPase: Unless otherwise stated, partially purified soluble TTPase was used. Partially purified soluble TTPase was obtained by a slight modification of the method of Hashitani and Cooper (8); material precipitated with between 55 to 80% acetone was suspended in 50 mM tris buffer (pH 7.8) and dialysed for 16 hr against the same buffer at 0°C. The specific activity was increased about 10-fold by this procedure.

Electrophoretic and fluorometric determination of thiamine phosphate esters: Thiamine phosphate esters in the reaction mixture of microsomal TTPase were determined by a slight modification of the method of Itokawa and Cooper (11); paper electrophoresis was carried out for 20 min in 50 mM acetate buffer (pH 3.8) using Whatman No. 3MM paper (80 V/cm, 2 mA/cm).

RESULTS

Subcellular distribution and optimal pH of TTPase activity

Subcellular distribution of the membrane-associated and soluble TTPase were determined by assaying the hydrolysis of TTP by each fraction at pH 6.5 and at pH 9.0 (Table 1). At pH 6.5 the nuclear and microsomal fractions had high specific activities, whereas the activity of the soluble fraction was low. On the other hand, at pH 9.0 the soluble fraction had the highest specific activity. Table 2 shows the distributions of protein, DNA, RNA and succinate dehydrogenase activity in each subcellular fraction of rat brain.

The optimal pH of the soluble and membrane-associated (microsomal fraction) TTP-

TABLE 1. Subcellular distribution of thiamine triphosphatase activity in rat brain

	Membrane-associated		Soluble	
	Specific activity ^{a)}	Percent of total activity	Specific activity ^{a)}	Percent of total activity
Nuclei	0.94	26	0.65	15
Mitochondria	0.44	41	0.50	37
Microsomes	0.75	27	0.86	25
Supernatant	0.17	4	1.06	23

a) Activity is expressed as μ moles Pi/mg protein/h.

Procedures used for subcellular fractionation and assay are described in Methods. Reaction mixture contained : for soluble TTPase, 100 mM tris buffer (pH 9.0), 6 mM $MgCl_2$, 3 mM TTP and 300 μ g/ml of protein ; for membrane-associated TTPase, 100 mM tris-maleate buffer (pH 6.5), 3 mM $MgCl_2$, 3 mM TTP and 600 μ g/ml of protein in a final volume of 0.5 ml.

TABLE 2. Subcellular distribution of protein, DNA, RNA and succinate dehydrogenase activity in rat brain

Fraction	Protein (%)	DNA (%)	RNA (%)	Succinate dehydrogenase (%)
Nuclei	15	97	31	5
Mitochondria	48	2	26	80
Microsomes	19	0	28	3
Supernatant	14	1	27	10

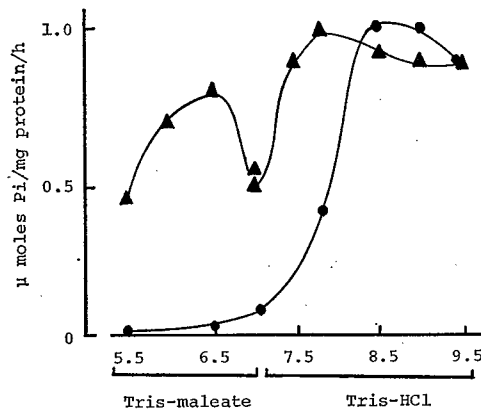


FIG. 1. Activities of soluble and microsomal TTPases at various pH values.

—●—, soluble ; —▲—, microsomal

ases was found to be very different (Fig. 1). The soluble TTPase had one peak at pH 8.5–9.0, while the microsomal TTPase had two peaks at pH 6.5 and 7.8. Furthermore, it was found that the optimal pH of the microsomal nucleoside triphosphatase activity, determined using ITP as substrate, differed markedly for that of TTPase (Fig. 2).

The electrophoretic and fluorometric determination of the reaction mixture of micro-

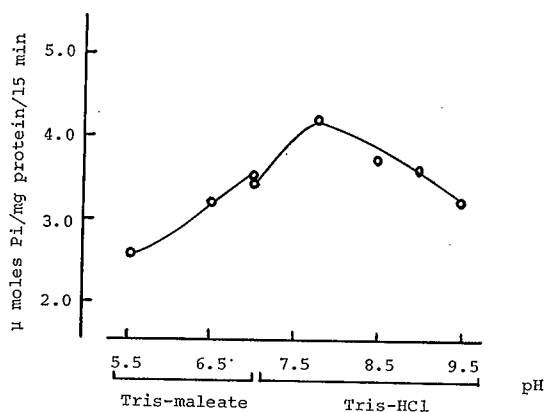


FIG. 2. Nucleoside triphosphatase activity at various pH values. ITP (3 mM) was used as a substrate. Assay conditions are described in Methods.

TABLE 3. Identification of the products of the microsomal TTPase reaction

	Time (min)	Pi liberated (μ moles/mg protein)	TDP formed (μ moles/mg protein)	TMP formed (μ moles/mg protein)
pH 6.5	30	0.34	0.41	N.D.*
	60	0.63	0.70	N.D.*
pH 7.8	30	0.43	0.48	0.04
	60	0.88	0.90	0.08

Incubation condition is described in Methods.

Reaction was terminated by the addition of cold 0.1 N HCl (final concentration, 0.05 N). After centrifugation one portion of the supernatant was used for the assay of Pi and another was diluted with acetate buffer (pH 3.8) and used for the electrophoretic and fluorometric determination of the reaction mixture. *Not detected (<0.005)

somal TTPase at pH 6.5 or 7.8 was examined (Table 3). The production of thiamine diphosphate was equimolar to inorganic phosphate liberated at both pH values. A slight amount of thiamine monophosphate, a product of a further dephosphorylation of thiamine diphosphate, was detected at pH 7.8 reaction.

Substrate specificity of partially purified soluble TTPase

Partially purified soluble TTPase showed slight activity with GTP or ATP, but no activity with ITP or UTP (Table 4).

TABLE 4. Substrate specificity of partially purified soluble TTPase

Substrate	Specific activity (μ moles Pi/mg protein/h)	(%)
TTP	9.79	100
ITP	0	0
GTP	1.27	13
UTP	0	0
ATP	0.39	4

TTP and various nucleotides (3 mM) were used as substrates. Assay conditions are described in Methods.

Effect of Ca^{++} on TTPase activity

As shown in Fig. 3, the microsomal TTPase activity exhibited an absolute divalent cation requirement which was satisfied by Mg^{++} or Ca^{++} and maximum activations were observed with concentrations of about 3 mM cation. On the other hand, the divalent cation requirement of partially purified soluble TTPase activity was fulfilled by Mg^{++} , but not by Ca^{++} .

Fig. 4 shows the effect of Ca^{++} on the microsomal and soluble TTPase activities in the presence of the optimal concentration of Mg^{++} . Addition of 1.25×10^{-4} M EGTA [ethylene glycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N-tetraacetic acid], had little effect on the

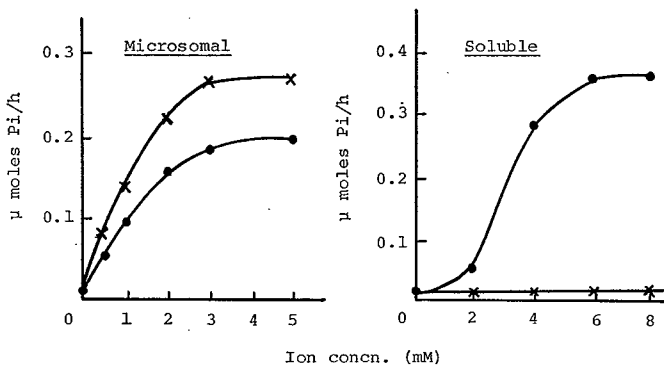


FIG. 3. Effects of Ca^{++} and Mg^{++} on microsomal and soluble TTPase activities.
—●—, Mg^{++} ; —×—, Ca^{++}

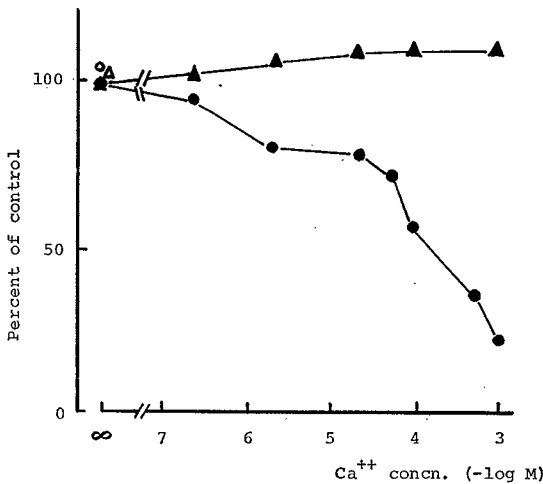


FIG. 4. Effects of Ca^{++} on TTPase activities in the presence of Mg^{++} .
—●—, soluble; —▲—, microsomal; —○—, soluble (in the presence of EGTA, 1.25×10^{-4} M); —△—, microsomal (in the presence of EGTA, 1.25×10^{-4} M). Control (100%) activities: soluble, 9.79μ moles Pi/mg protein/h; microsomal, 0.71μ moles Pi/mg protein/h.

activities of the soluble and microsomal TTPases. In the presence of 6 mM Mg^{++} , Ca^{++} strongly inhibited the soluble TTPase activity at physiological concentrations of this cation. However, Ca^{++} did not inhibit the microsomal enzyme.

DISCUSSION

Hashitani and Cooper (8) found a specific TTPase, having an optimal pH of 9.0 in rat brain supernatant. A recent report by Barchi and Braun (9) showed that there is also an enzyme specifically associated with subcellular membrane fractions, which catalyses the same reaction and has an optimal pH of 6.5.

In the present work, we also found the highest specific activities of the soluble and membrane-associated TTPases in the supernatant and nuclear fractions, respectively. However, unlike Barchi and Braun (9) we could not detect high specific activity of membrane-associated TTPase. This may be due to differences in the methods used for enzyme assay or to differences in the procedures used for obtaining subcellular fractions. We also found that soluble TTPase has a pH optimum of 8.5–9.0 and that TTP is the specific substrate of this enzyme. This result is in good agreement with that of Hashitani and Cooper (8). On the other hand, the microsomal enzyme showed two optimal pH values, one at pH 6.5 and the other at pH 7.8, whereas the optimal pH for the microsomal nucleoside triphosphatase activity, measured using ITP as substrate, was pH 7.8.

Barchi and Braun reported that the membrane-associated TTPase in nuclear fraction of rat brain has a pH optimum of 6.5 (9). As thiamine diphosphatase in brain has an optimal pH at alkali ranges (7, 16, 17), it may be considered that the high activity of microsomal TTPase at pH 7.8 is due to a further dephosphorylation of thiamine diphosphate through thiamine diphosphatase. However, as shown in Table 3, the production of thiamine monophosphate was only about 10% of thiamine diphosphate at pH 7.8 reaction. Thiamine monophosphate was not detected in the reaction mixture of pH 6.5. We found that the microsomal enzyme is difficult to solubilize with deoxycholate, Triton X-100 or alkali-treatment and has a wide substrate specificity for various nucleotides (data not shown), so it is still unknown whether or not the TTPase activity of the microsomal fraction is specific for TTP. However, from our results mentioned above and the finding of a specific inhibitor of the hydrolysis of TTP (9), the microsomal TTPase also seems to be distinct from a general nucleoside triphosphatase in the reaction at pH 6.5.

The hydrolysis of TTP by the soluble and microsomal enzymes have an absolute divalent cation requirement which is fulfilled by Mg^{++} or Ca^{++} .

Previously, Hashitani and Cooper (8) reported that soluble TTPase was inhibited by Ca^{++} . Furthermore, Barchi and Braun (18) reported the inhibition of membrane-associated TTPase by this cation, but in a later report (9) they stated it to be in error as a result of the contribution to the system of an inorganic pyrophosphatase which is inhibited by Ca^{++} . In the present study, it was observed that physiological concentrations of Ca^{++} inhibited the soluble, but not the microsomal enzyme activity. Changes of the enzyme activities caused by contamination of the fractions with Ca^{++} were found to be slight because

the effect of addition of EGTA was not observed. These results suggest that Ca^{++} may regulate TTP metabolism in nerve tissue. In elucidating the role of thiamine in the central nervous system, this effect of Ca^{++} on TTPase activity is worthy of attention, since Ca^{++} is known to have a specific role in nerve conduction (19, 20).

Acknowledgements: This investigation was supported in part by a grant in 1973 from the Scientific Research Fund of the Ministry of Education of Japan. We wish to thank Sankyo Co., Ltd., Tokyo for the gift of thiamine triphosphate.

REFERENCES

- 1) VON MURALT, A.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **98**, 499 (1962)
- 2) ITOKAWA, Y., SCHULZ, R.A. AND COOPER, J.R.: *Biochim. biophys. Acta* **266**, 293 (1972)
- 3) ITOKAWA, Y. AND COOPER, J.R.: *Biochim. biophys. Acta* **196**, 274 (1970)
- 4) ARMETT, C.J. AND COOPER, J.R.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **148**, 137 (1965)
- 5) INOUE, A., SHIM, S. AND IWATA, H.: *J. Neurochem.* **17**, 1373 (1970)
- 6) IWATA, H., INOUE, A. AND TOMOI, M.: *J. Neurochem.* **18**, 1371 (1971)
- 7) INOUE, A. AND IWATA, H.: *Biochim. biophys. Acta* **242**, 459 (1971)
- 8) HASHITANI, Y. AND COOPER, J.R.: *J. biol. Chem.* **247**, 2117 (1972)
- 9) BARCHI, R.L. AND BRAUN, P.E.: *J. biol. Chem.* **247**, 7668 (1972)
- 10) COOPER, J.R., ITOKAWA, Y. AND PINCUS, J.H.: *Science* **164**, 74 (1969)
- 11) ITOKAWA, Y. AND COOPER, J.R.: *Methods in Enzymology*, Edited by McCORMICK, D.B. AND WRIGHT, L.D., Vol. 18, p. 91, Academic Press, New York and London (1970)
- 12) KING, T.E.: *Methods in Enzymology*, Edited by ESTABROOK, R.W. AND PULLMAN, M.E., Vol. 10, p. 322, Academic Press, New York and London (1967)
- 13) SCHNEIDER, W.C.: *J. biol. Chem.* **164**, 747 (1946)
- 14) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.T., FARR, A.L. AND RANDALL, R.J.: *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- 15) BAGINSKI, E.S., FOA, P.P. AND ZAK, B.: *Clin. chim. Acta* **15**, 155 (1967)
- 16) COOPER, J.R. AND KINI, M.M.: *J. Neurochem.* **19**, 1809 (1972)
- 17) BARCHI, R.L. AND BRAUN, P.E.: *J. Neurochem.* **19**, 1039 (1972)
- 18) BARCHI, R.L. AND BRAUN, P.E.: *Biochim. biophys. Acta* **255**, 681 (1972)
- 19) FRANKENHAEUSER, B. AND HODGKIN, A.L.: *J. Physiol.* **137**, 218 (1957)
- 20) SHANES, A.M.: *Pharmacol. Rev.* **10**, 59 (1958)

ROLE OF THIAMINE METABOLISM IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

II. EFFECTS OF VARIOUS AGENTS ON THIAMINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN RAT BRAIN

Heitaroh IWATA, Akemichi BABA, Toshio MATSUDA,
Zen-ichi TERASHITA and Kieko ISHII

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, Toyonaka, Osaka, Japan

Accepted August 8, 1974

Abstract—The effects of various agents on the activity of brain thiamine triphosphatase (TTPase) *in vivo* and *in vitro* were studied. Thiamine deficiency caused a significant increase in soluble TTPase activity and a decrease in membrane-associated TTPase activity. Insulin and a fasting state did not affect these enzyme activities. DL-Methamphetamine (10 mg/kg i.p.) increased the activity of the soluble TTPase, whereas reserpine (2.5 mg/kg i.p.) caused no change in the enzyme activities. A single injection of chlorpromazine (25 mg/kg s.c.) had no effect on the microsomal or soluble TTPase activities, but repeated injections reduced the activity of the microsomal enzyme. The effects of various neuroactive agents on microsomal TTPase activity were examined *in vitro*. Among the drugs tested, only chlorpromazine caused marked inhibition of the enzyme activity.

The specific participation of phosphorylated thiamine in nerve conduction has been suggested by many workers (1-4), but the nature of this participation has not been elucidated at the molecular level. Several enzymic analyses of thiamine diphosphate in brain have been reported (5-7). Recently the possible significance of thiamine triphosphate (TTP) in nervous function was demonstrated (8), and very recently, the existence and some properties of TTPase in rat brain were reported (9, 10).

Previously we also studied the properties of the soluble and membrane-associated TTPases and our results indicated that Ca^{++} may regulate their activities (11). However, there are no drugs known to affect these enzyme activities and the role of the enzymes in nerve function has not been clarified. In this work, we examined the effects of thiamine deficiency, insulin, fasting states and various neuroactive agents on TTPase activity *in vivo* and *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

TTP was a gift from Sankyo Co., Ltd., Tokyo. Purity was determined by paper electrophoresis (11) to be 97% TTP. No further dephosphorylation of the product of the enzymic reaction was detectable as described previously (11).

Soluble and microsomal fractions were prepared from the brains of male adult rats as described previously (11). In some experiments (Tables 1 and 2), brain tissue was

homogenized in 50 mM tris buffer (pH 7.8) instead of 0.25 M sucrose. In this case material precipitated by centrifugation at $1000\times g$ for 10 min (membrane-associated fraction) and the supernatant obtained by centrifugation at $105000\times g$ for 60 min (soluble fraction) were used as enzyme sources. Hydrolysis of TTP was measured by determining the release of inorganic phosphate by the method of Baginski *et al.* (12). The standard reaction mixture contained: for soluble TTPase, 100 mM tris buffer (pH 9.0), 6 mM $MgCl_2$, 3 mM substrate and about 300 $\mu g/ml$ of protein; for membrane-associated TTPase, 100 mM tris-maleate buffer (pH 6.5), 3 mM $MgCl_2$, 3 mM substrate and about 600 $\mu g/ml$ of protein in a final volume of 0.5 ml. After 5 min of pre-incubation, incubation was started by addition of TTP and carried out for 30 min at $37^\circ C$ and the reaction was terminated by addition of cold trichloroacetic acid to a final concentration of 5%. Thiamine-deficient and pair-fed rats were obtained by the method of Iwata *et al.* (13). When the animals on the thiamine-deficient diet showed a heart rate of less than 70% of that of the control group they were regarded as acutely deficient, and used in the experiments. The total thiamine content in the brains of these animals, estimated by the method of Fujiwara and Matsui (14), was less than 30% that of normal rats. These animals exhibited various symptoms such as body weight-loss, tremor, ataxia, frequent seizure, opisthotonus and circular walk.

RESULTS

Effects of thiamine deficiency (in vivo)

As shown in Table 1, in thiamine-deficient rats the activity of soluble TTPase in the brain was significantly more than that of pair-fed animals, and the activity of membrane-associated TTPase significantly was less than that of normal animals. There was no significant difference in the enzyme activities in the livers of these three groups.

TABLE 1. Thiamine triphosphatase activity^{a)} in brain and liver of normal, pair-fed and thiamine-deficient rats

	n	Brain		Liver	
		Soluble	Membrane-associated	Soluble	Membrane-associated
Normal	7	1.20 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.84 ± 0.06
Thiamine-deficient	4	$1.37 \pm 0.07^{**b)}$	$0.43 \pm 0.01^{***c)}$	0.43 ± 0.03	1.07 ± 0.15
Pair-fed	4	1.14 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.43 ± 0.01	0.83 ± 0.09
Thiamine-def. + thiamine ^{d)}	2	0.97	0.46	0.41	0.90

a) Activity is expressed as μ moles Pi/mg protein/h.

b) Statistically significant ($P < 0.01$) compared to pair-fed

c) Statistically significant ($P < 0.01$) compared to normal

d) Thiamine-HCl (4 mg/kg) was administered s.c. 3 hr before decapitation. Values are given as means \pm S.E. Assay conditions are described in Methods.

Effects of insulin and fasting (in vivo)

Injection of insulin (5 i.u./kg i.p.) or fasting for 48 hr did not influence TTPase activity (Table 2).

TABLE 2. Effects of insulin and fasting on thiamine triphosphatase activity^{a)}

Treatment	n	Brain		Liver	
		Soluble	Membrane-associated	Soluble	Membrane-associated
Untreated	7	1.20±0.03	0.53±0.02	0.47±0.03	0.84±0.06
Insulin ^{b)}	7	1.17±0.03	0.50±0.02	0.56±0.05	0.93±0.09
Insulin ^{c)}	7	1.40±0.11	0.49±0.03	0.55±0.02	0.79±0.03
Fasting, 48 hr	4	1.04±0.08	0.54±0.02	0.44±0.01	1.08±0.06

a) Activity is expressed as μ moles Pi/mg protein/h.

b) Insulin (5 i.u./kg) was administered i.p. 3 hr before sacrifice.

c) Insulin (5 i.u./kg) was administered i.p. 5 hr before sacrifice. Values are given as means±S.E. Assay conditions are described in Methods.

TABLE 3. Effects of DL-Methamphetamine, reserpine and chlorpromazine on TTPase activities^{a)} in brain

		Soluble	Microsomal
Exp. (A)	Control	0.91±0.02 (9)	0.75±0.03 (5)
	DL-Methamphetamine ^{b)}	1.10±0.04** (4)	0.77±0.03 (5)
	Reserpine ^{c)}	0.96±0.03 (5)	0.78±0.02 (5)
Exp. (B)	Control	0.90±0.03 (5)	0.72±0.03 (9)
	Chlorpromazine ^{d)}	0.93±0.03 (5)	0.73±0.05 (8)
	Chlorpromazine ^{e)}	0.86±0.10 (4)	0.61±0.03* (6)

a) Activities are expressed as μ moles Pi/mg protein/h.

b) DL-Methamphetamine (10 mg/kg i.p.), 1 hr before sacrifice.

c) Reserpine (2.5 mg/kg i.p.), 4 hr before decapitation

d) Chlorpromazine (25 mg/kg s.c.), 90 min before sacrifice

e) The same dose of the drug was administered 3 times at 24 hr intervals. Animals were decapitated 90 min after the last injection. Values are given as means±S.E. Number of experiments is indicated in brackets.

*P<0.05, **P<0.01

Effects of neuroactive agents (in vivo)

Table 3 shows the effects of DL-methamphetamine, reserpine and chlorpromazine on the soluble and microsomal TTPase activities in the brain. One hr after the injection of DL-methamphetamine (10 mg/kg i.p.), the soluble TTPase activity was increased. Reserpine (2.5 mg/kg i.p.) did not cause any change in either TTPase activity (Exp. A). A single injection of chlorpromazine (25 mg/kg s.c.) had no effect on the microsomal TTPase activity, but repeated injections reduced the activity significantly. The soluble TTPase activity was not influenced by either single or repeated injections of the drug (Exp. B).

Effects of various neuroactive agents (in vitro)

As shown in Table 4, acetylcholine, noradrenaline, tyramine and diphenylhydantoin had no effects on the microsomal TTPase activity, but 1.0 mM colchicine caused a slight decrease in enzyme activity. Concentrations of 0.25 to 1.0 mM chlorpromazine strongly inhibited the enzyme activity causing 17 to 61% inhibition.

TABLE 4. Effects of various agents on microsomal TTPase activity^{a)}

Addition	Concn. (mM)	TTPase	
		Specific activity ^{a)}	(%)
None	—	0.71	100
Acetylcholine	1.0	0.74	104
Noradrenaline	0.5	0.71	100
Tyramine	1.0	0.65	92
Colchicine	1.0	0.60	84
Diphenylhydantoin	1.0	0.71	100
Chlorpromazine	0.25	0.59	83
Chlorpromazine	0.5	0.52	73
Chlorpromazine	1.0	0.28	39

a) Activity is expressed as μ moles Pi/mg protein/h.

DISCUSSION

The recent studies of Itokawa *et al.* (2, 3) on membrane fragments of rat brain, strongly indicated that ion movement across the nerve membrane is associated with the dephosphorylation of phosphorylated thiamines. The possible significance of TTP in nervous tissue was also suggested by the demonstration (8) that TTP is not present in the brains of patients with subacute necrotizing encephalomyelitis, a fatal disease associated with an abnormality in thiamine metabolism.

Hashitani and Cooper demonstrated a soluble TTPase in rat brain and its regulation by Ca^{++} (9), while Barchi and Braun reported the existence of membrane-associated enzyme in rat brain and its inhibition by ADP (10). We also studied the properties of these two enzymes and results indicated possible regulation of activity by physiological concentrations of Ca^{++} (11).

In the present work we found that some drugs affected TTPase activity *in vitro* or *in vivo*. DL-Methamphetamine increased the activity of the soluble enzyme, whereas repeated injections of a sedative dose of chlorpromazine inhibited the microsomal enzyme activity. However, reserpine did not affect the enzyme activity. Therefore, at present the relationship between the changes of the enzyme activities and functional changes of the animals induced by these drugs is not clear.

We reported previously that thiamine diphosphatase activity in rat brain was significantly elevated in thiamine deficiency (15). The present results show that thiamine deficiency causes an increase in soluble TTPase activity and a decrease in membrane-associated enzyme activity in the brain. Taking into account the possible significance of TTP in the central nervous system (8) and of the appearance of neural symptoms in thiamine deficiency, this finding is of interest.

Next, we examined the effect of calorigenic factor on TTPase activity using insulin or food-deprivation, but no change in the enzyme activity was observed.

Neuroactive agents, such as acetylcholine and tetrodotoxin, cause release of phosphorylated thiamine from membrane fragments of nervous tissue (3). Hashitani and

Cooper reported that these agents have no effect on the soluble TTPase activity *in vitro* (9). In this work, we examined the effects of some neuroactive agents on the activity of microsomal TTPase *in vitro*. Most of the drugs tested had no effect, but at concentrations of 0.25 to 1.0 mM chlorpromazine caused 17 to 61% inhibition.

It has been suggested that chlorpromazine inhibits ATPase in brain microsomes and may induce a change in membrane permeability (16-18). Since dephosphorylation of phosphorylated thiamines is associated with ion movement across the nerve membrane (3), our data showing that chlorpromazine inhibits TTPase also suggest the possible participation of this enzyme in nervous function. But it is still uncertain whether the concentrations of chlorpromazine tested correspond at all to those which might be expected *in vivo*. Detailed analysis of the action of chlorpromazine on thiamine metabolism is now in progress.

As there have been no previous reports on the effects of drugs on TTPase activity *in vivo* or *in vitro*, our findings that thiamine deficiency, DL-methamphetamine and chlorpromazine can alter the enzyme activity should be applicable in further investigation of the role of thiamine metabolism in the central nervous system.

Acknowledgements: This investigation was supported in part by a grant in 1973 from the Scientific Research Fund of the Ministry of Education of Japan. We wish to thank Sankyo Co., Ltd. Tokyo for the gift of thiamine triphosphate.

REFERENCES

- 1) VON MURALT, A.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **98**, 499 (1962)
- 2) ITOKAWA, Y. AND COOPER, J.R.: *Biochim. biophys. Acta* **196**, 274 (1970)
- 3) ITOKAWA, Y., SCHULZ, R.A. AND COOPER, J.R.: *Biochim. biophys. Acta* **266**, 293 (1972)
- 4) ARMETT, C.J. AND COOPER, J.R.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **148**, 137 (1965)
- 5) BARCHI, R.L. AND BRAUN, P.E.: *J. Neurochem.* **19**, 1039 (1972)
- 6) COOPER, J.R. AND KINI, M.M.: *J. Neurochem.* **19**, 1809 (1972)
- 7) INOUE, A. AND IWATA, H.: *Biochim. biophys. Acta* **242**, 459 (1972)
- 8) COOPER, J.R., ITOKAWA, Y. AND PINCUS, J.H.: *Science* **164**, 74 (1969)
- 9) HASHITANI, Y. AND COOPER, J.R.: *J. biol. Chem.* **247**, 2117 (1972)
- 10) BARCHI, R.L. AND BRAUN, P.E.: *J. biol. Chem.* **247**, 7668 (1972)
- 11) IWATA, H., BABA, A. AND MATSUDA, T.: *Japan. J. Pharmacol.* **24**, 817 (1974)
- 12) BAGINSKI, E.S., FOA, P.P. AND ZAK, B.: *Clin. chim. Acta* **15**, 155 (1967)
- 13) IWATA, H., FUJIMOTO, S., NISHIKAWA, T. AND HANO, K.: *Experientia* **24**, 378 (1968)
- 14) FUJIWARA, M. AND MATSUI, K.: *Vitamins* **6**, 143 (1953) (*in Japanese*)
- 15) INOUE, A. SHIM, S. AND IWATA, H.: *J. Neurochem.* **17**, 1373 (1970)
- 16) DAVIS, P.W. AND BRODY, T.M.: *Biochem. Pharmacol.* **15**, 703 (1966)
- 17) AKERA, T. AND BRODY, T.M.: *Mol. Pharmacol.* **5**, 605 (1969)
- 18) GODFRAIND, T. AND VERBEKE, N.: *Archs int. Pharmacodyn. Thé.* **203**, 400 (1973)

PROPERTIES OF THIAMINE DI- AND TRIPHOSPHATASES IN RAT BRAIN MICROSOMES: EFFECTS OF CHLORPROMAZINE

H. IWATA, A. BABA, T. MATSUDA and Z. TERASHITA

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
133-1, Yamada-kami, Suita-shi, Osaka, Japan

(Received 7 October 1974. Accepted 16 December 1974)

Abstract—The mechanism of the action of chlorpromazine on rat brain thiamine phosphatases were studied to clarify the properties of these enzymes in the CNS. Chlorpromazine at concentrations of 0.25–1.0 mM caused marked decrease of microsomal and soluble thiamine triphosphatase (TTPase) activities and marked increase of microsomal thiamine diphosphatase (TDPase) activity. Imipramine and desipramine also inhibited TTPase but did not cause any marked change in TDPase activities. Addition of chlorpromazine (0.5 mM) decreased the V_{\max} of microsomal TTPase by about one-half, increased that of TDPase about 3-fold, and lowered the K_m value for TDP but not for TTP.

Acetone treatment of the microsomal fraction lowered the TTPase activity and markedly enhanced the TDPase activity. In acetone-treated microsomes, chlorpromazine also inhibited TTPase activity but did not activate TDPase. Deoxycholate had similar effects to chlorpromazine on these enzyme activities.

THE SPECIFIC involvement of phosphorylated thiamine in nerve conduction has been suggested by VON MURALT (1962), but the nature of this involvement has not yet been elucidated at a molecular level. Recently, the possible significance of thiamine triphosphate (TTP) in nervous tissue was suggested by the demonstration (COOPER *et al.*, 1969) that TTP is not present in the brains of patients with subacute necrotizing encephalomyelitis, a fatal disease associated with an abnormality in thiamine metabolism. Furthermore, the studies with membrane fragments of rat brain (ITOKAWA & COOPER, 1970a; ITOKAWA *et al.*, 1972), strongly indicated that ion movement across the nerve membrane is associated with the dephosphorylation of phosphorylated thiamines.

Recently there have been several reports of the existence and some properties of thiamine diphosphatase (TDPase) (BARCHI & BRAUN, 1972a; COOPER & KINI, 1972), and thiamine triphosphatase (TTPase) (HASHITANI & COOPER, 1972; BARCHI & BRAUN, 1972b) in rat brain. Previously, some basic properties of TDPase (INOUE *et al.*, 1970; IWATA *et al.*, 1971; INOUE & IWATA, 1971) and TTPase (IWATA *et al.*, 1974a, b) have been reported from our laboratory. However, no drug has been found which affects both these enzyme activities, and the roles of these enzymes in nerve tissue have not been clarified. Based on the possible role of phosphorylated thiamines in membrane function and our previous results (IWATA *et al.*, 1974b) showing the inhibitory action of chlorpromazine on microsomal TTPase activity, we examined the effect of chlorpromazine, which affects the mem-

brane-bound ATPases (SQUIRES, 1965; AKERA & BRODY, 1969; GODFRAIND & VERBEKE, 1973), on TDPase and TTPase activities *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

TTP was a gift from Sankyo Co., Ltd., Tokyo. Thiamine diphosphate (TDP) was obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis. Purities of TTP and TDP were determined by paper electrophoresis to be greater than 97% TTP and 97% TDP, respectively. All other reagents were of the best analytical grade available.

Enzyme preparations

The microsomal and soluble fractions were obtained as follows. The brains of male Sprague-Dawley rats were homogenized in 10 vol of 0.25M sucrose and homogenate was centrifuged at 14,500 *g* for 20 min. The resulting supernatant was recentrifuged at 105,000 *g* for 60 min and pellet and supernatant obtained were used as the microsomal and soluble fractions, respectively. The microsomal fraction was washed with cold sucrose and possible contamination with mitochondria was checked by measuring total succinate dehydrogenase activity. This was usually only a few per cent of that of the homogenate. The microsomal fraction was suspended in 0.25M sucrose. Soluble TTPase was partially purified as described by HASHITANI & COOPER (1972) with modifications: gradient elution in Sephadex column and ultrafiltration were omitted, and material precipitated with between 55 and 80% acetone was suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) and dialysed for 16 h against the same buffer at 0°C. This purification of the enzyme was about 10-fold with a yield of 49% of original supernatant.

Enzyme assays

The standard reaction mixtures were as follows: for soluble TTPase, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM $MgCl_2$, 3 mM TTP and about 100 $\mu g/ml$ of protein in a volume

Abbreviations used: TDP, thiamine diphosphate; TTP, thiamine triphosphate.

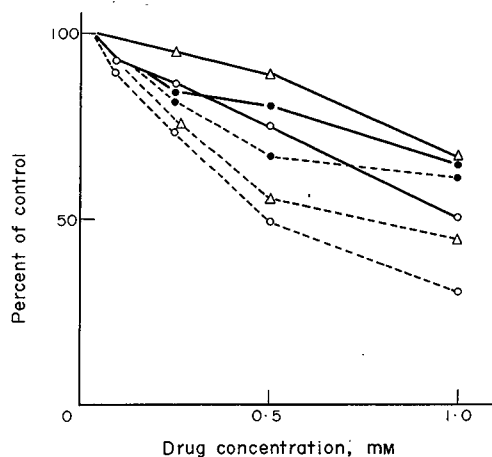


FIG. 1. Effects of chlorpromazine (—○—), imipramine (—●—) and desipramine (—△—) on microsomal and soluble TTPase activities. The incubation conditions were described in Methods. —, Microsomal TTPase (control activity; $0.75 \mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/h}$); ---, soluble TTPase (control activity; $4.48 \mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/h}$). The control activities are taken as 100.

of 0.5 ml; for microsomal TTPase, 100 mM Tris-maleate buffer (pH 6.5), 3 mM MgCl_2 , 3 mM TTP and about 600 $\mu\text{g/ml}$ of protein in a final volume of 0.5 ml; and for TDPase, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 4 mM CaCl_2 , 4 mM TDP and about 200 $\mu\text{g/ml}$ of protein, in a volume of 2.7 ml. After preincubation for 5 min at 37°C reactions were started by addition of substrates and terminated after 30 min by addition of cold trichloroacetic acid (with TTPases), or perchloric acid (with TDPase). Hydrolyses of TDP and TTP were measured by determining the release of inorganic phosphate by the method of BAGINSKI *et al.* (1967) using a Shimadzu UV-200, double beam spectrophotometer. Protein was determined by the method of LOWRY *et al.* (1951).

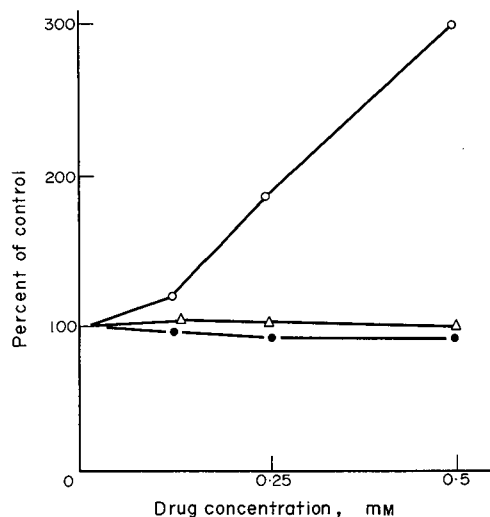


FIG. 2. Effects of chlorpromazine (—○—), imipramine (—●—) and desipramine (—△—) on microsomal TDPase activity. The assay condition was described in Methods. The control activity ($1.05 \mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/h}$) is taken as 100.

Enzyme activities were proportional to both the protein concentration and the incubation time for up to 45 min. The concentrations of substrates and divalent cations used were optimal, as described previously (IWATA *et al.*, 1974a). No further dephosphorylation of the products of the enzymic reactions were detectable by electrophoretic and fluorometric examination (ITOKAWA & COOPER, 1970b) of the reaction mixtures. The specific activities of TDPase and TTPase are expressed as $\mu\text{mol P}_i$ formed per mg protein per h. The data shown are means of 4–10 observations.

Acetone treatment

Microsomes were treated with acetone as described previously (INOUE & IWATA, 1971); the microsomes were extracted with acetone twice and the resulting powder was used as the enzyme source.

RESULTS

Effects of chlorpromazine

Figure 1 shows the effects of chlorpromazine, imipramine and desipramine on the microsomal and soluble TTPase activities. Chlorpromazine strongly inhibited both the soluble and microsomal TTPase activities, concentrations of 0.25–1.0 mM causing 20–70% inhibition. It inhibited the soluble TTPase more than the microsomal one. Imipramine and desipramine also caused inhibition, but less than chlorpromazine. These drugs are precipitated in medium of pH 9.0, the optimal pH of soluble TTPase reaction, so Tris-HCl (pH 7.5) was used in experiments on the soluble TTPase. The activity at pH 7.5 was about half that at pH 9.0, although the relative inhibitory actions of these agents were the same at the two pH values.

On the other hand, as shown in Fig. 2 chlorpromazine markedly activated the microsomal TDPase activity, concentrations of 0.125–0.5 mM causing 20–180% activation. Imipramine and desipramine did not affect the enzyme activity appreciably. The percentage activation of the enzyme by chlorpromazine varied with the protein concentration used, and was more at low protein concentration than at high protein concentration (data not shown). The data shown in Fig. 2 were obtained using a protein concentration of 180 $\mu\text{g/ml}$. Addition of chlorpromazine decreased the V_{max} of TTPase by about one-half (Fig. 3) and increased the V_{max} of TDPase about 3-fold with a corresponding decrease in the K_m value (Fig. 4).

As shown in Table 1, when 3 mM Ca^{2+} was used instead of Mg^{2+} , chlorpromazine did not cause any marked inhibition of TTPase activity. On the other hand, TDPase activity was markedly activated by the drug in the presence of Mg^{2+} (data not shown).

Effects of acetone treatment

Figure 5 shows the effects of acetone treatment of microsomes on the enzyme activities and on the action of chlorpromazine. Acetone treatment markedly lowered the activity of TTPase, and chlorpromazine inhibited this activity. In contrast acetone treatment increased TDPase activity about 4-fold, and chlorpromazine inhibited this activity. Kinetic data

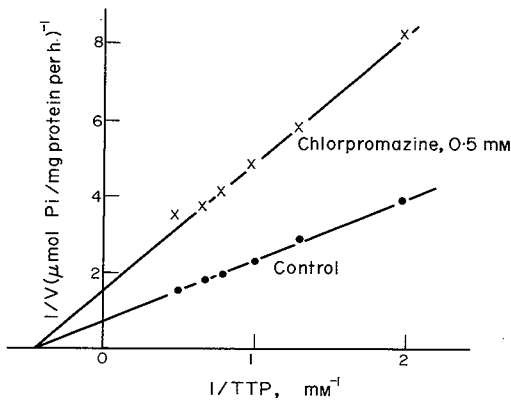


FIG. 3. Double-reciprocal plots of velocity of microsomal TTPase reaction in the presence and absence of chlorpromazine (0.5 mM).

on TDPase in acetone-treated microsomes are shown in Fig. 6. Acetone treatment of the microsomes increased the V_{\max} of the enzyme with a corresponding decrease in the K_m value, and chlorpromazine was found to cause competitive inhibition.

Effects of deoxycholate

Figure 7 shows the effects of sodium deoxycholate on TDPase and TTPase activities. Deoxycholate at a concentration of 0.02% (w/v) caused about 80% activation of TDPase and inhibited TTPase. However, in acetone-treated microsomes deoxycholate inhibited TDPase activity (Table 2).

DISCUSSION

It is well known that TDPase is localized in the particulate fraction of mammalian brains (SEJO & ARNAIZ, 1970; BARCHI & BRAUN, 1972a; COOPER & KINI, 1972). In our previous study, it was reported that TDPase activity in rat brain was enhanced by the injection of cholinergic drugs (IWATA *et al.*, 1971).

On the other hand, two specific TTPases have been found in the soluble and particulate fractions, respectively (HASHITANI & COOPER, 1972; BARCHI & BRAUN,

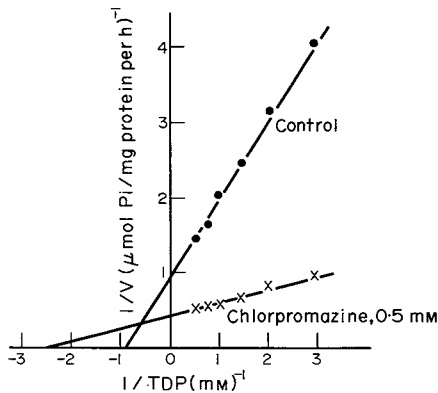


FIG. 4. Double-reciprocal plots of velocity of microsomal TDPase reaction in the presence and absence of chlorpromazine (0.5 mM).

TABLE 1. EFFECT OF CHLORPROMAZINE ON MICROSOMAL TTPase ACTIVITY IN THE PRESENCE OF Ca^{2+}

Chlorpromazine (mM)	Relative activity (%)	
	Mg^{2+} -dependent activity	Ca^{2+} -dependent activity
0	100	100
0.25	83	100
0.50	73	98
1.00	39	84

The incubation conditions were described in Methods, except that the medium for Ca^{2+} -dependent activity contained 3 mM CaCl_2 as divalent cation. The control activities of Mg^{2+} -dependent TTPase (0.80 $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) and Ca^{2+} -dependent TTPase (0.98 $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) are taken as 100.

1972b; IWATA *et al.*, 1974a). Previously, we reported that of the various neuroactive agents, such as ACh, NA, tyramine, diphenylhydantoin, colchicine and chlorpromazine, only chlorpromazine inhibited rat brain microsomal TTPase activity (IWATA *et al.*, 1974b). This work shows that chlorpromazine also inhibited partially purified soluble TTPase activity. Furthermore, imipramine and desipramine were also found to inhibit the TTPase activities of both fractions, while only chlorpromazine markedly activated microsomal TDPase (Fig. 2).

Chlorpromazine is known to inhibit the activities of ATPases (SQUIRES, 1965; AKERA & BRODY, 1969; GODFRAIND & VERBEKE, 1973), but few enzymes are known to be activated by this drug. ROBINSON *et al.* (1968) reported that adenylate kinase is markedly activated by this drug. This effect could not be observed in deoxycholate-treated microsomes, so they suggested that the effect of the drug on enzyme activity might be related to some specific local membrane structure.

In this work we examined the effects of this drug on acetone-treated microsomes (Fig. 5). Acetone treatment lowered the specific activity of TTPase and markedly enhanced that of TDPase. Furthermore, acetone treatment of the microsomes reversed the action of chlorpromazine on TDPase. Kinetic data

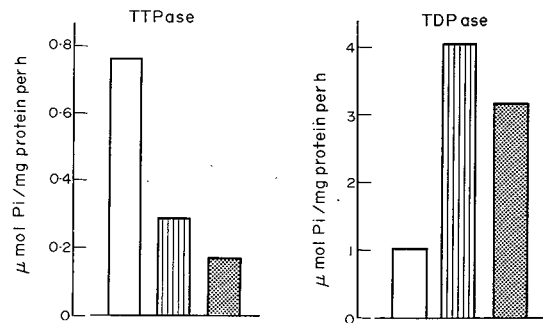


FIG. 5. Effect of acetone treatment on microsomal TTPase (left) and TDPase (right). Acetone treatment of the microsomes and the incubations were carried out as described in Methods. □, Fresh microsomes; ▨, acetone-treated microsomes; ▩, acetone-treated microsomes + chlorpromazine (0.5 mM).

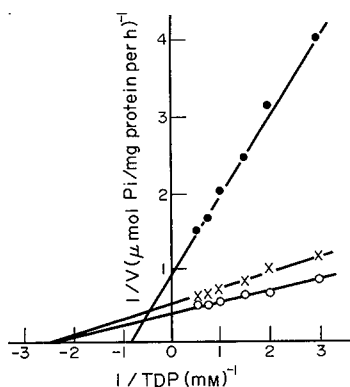


FIG. 6. Double-reciprocal plots of velocity of TDPase in fresh (—●—) and acetone-treated microsomes (—○—, —×—). —×—, Chlorpromazine (0.5 mM).

on TDPase in acetone-treated microsomes indicated that acetone treatment increased the V_{max} of the enzyme with a corresponding decrease in the K_m value and that chlorpromazine caused competitive inhibition. Furthermore, results on the action of sodium deoxycholate on TDPase and TTPase (Fig. 7 and Table 2) show that this detergent has similar effects to chlorpromazine on these enzymes.

As to the mechanism of the action of chlorpromazine on biological membranes, several authors reported that this compound interacts with the lipidic part of the membrane, though the possibility of protein modifications cannot be ruled out (GUTH & SPIRITES, 1964; KWANT & SEEMAN, 1969; SEEMAN *et al.*, 1971). Recently, LETTERRIER *et al.* (1974) reported a mild detergent-like action of this compound on synaptosomal membrane. Therefore, our data may indicate that chlorpromazine affects microsomal TDPase through its action on acetone-extractable materials or by modifications of the membrane struc-

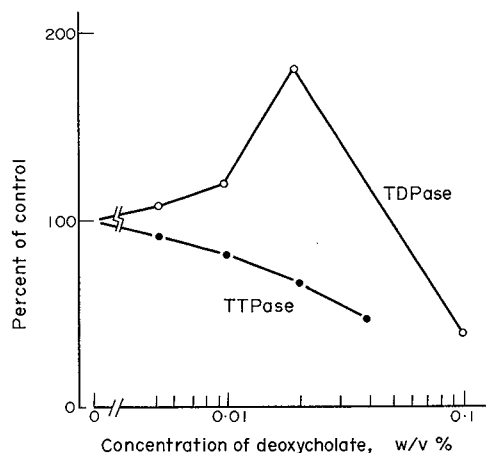


FIG. 7. Effect of sodium deoxycholate on microsomal TDPase (—○—) and TTPase (—●—). The incubation conditions were described in Methods. The control activities of TDPase (1.05 $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) and TTPase (0.75 $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) are taken as 100.

TABLE 2. EFFECT OF SODIUM DEOXYCHOLATE ON TDPase AND TTPase ACTIVITIES IN ACETONE-TREATED MICROSOMES

Addition	TTPase		TDPase	
	Specific activity*	(%)	Specific activity*	(%)
None	0.32	100	4.04	100
Deoxycholate (0.02 w/v%)	0.31	97	2.40	59

The procedure for obtaining acetone-treated microsomes and the standard assay conditions were described in Methods.

* Activity is expressed as $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$.

ture. It was also suggested that brain microsomal TDPase and TTPase could be influenced oppositely by the changes in membrane properties. Furthermore, results suggest that TDPase exists generally in a 'latent form', and is influenced by micro-environmental changes within the membrane.

The drug concentrations which we used in this study are relatively high, so it might be probable that the action of chlorpromazine on TDPase and TTPase are in nonspecific manner. However, as shown in Table 1, 'Ca²⁺-dependent TTPase' was hardly inhibited by this drug, so the fact that TDPase and TTPase, vicinal enzymes in thiamine metabolism were oppositely affected by this drug is a specific phenomenon.

It is still uncertain whether the concentrations of chlorpromazine which we found to affect TTPase and TDPase *in vitro* have any relevance to those expected *in vivo*, since it seems not applicable to compare the added drug concentrations strictly in two different conditions. Furthermore, it is difficult to correlate the effect of this compound on TDPase and TTPase with its pharmacological actions on the CNS, because the similar changes in TDPase and TTPase inducing by this compound were also obtained with promethazine, another phenothiazine derivative with no anti-psychotic effects (data not shown).

Anyhow, the fact that rat brain microsomal TDPase and TTPase are affected in diverse direction by the changes in membrane properties (caused by chlorpromazine, acetone or deoxycholate) is very useful in further studies on the physiological roles of thiamine and its phosphate esters in the CNS.

Acknowledgements—The authors are indebted to Miss KIEKO ISHII for excellent technical assistance. We wish to thank Sankyo Co., Ltd., Tokyo for a gift of TTP.

REFERENCES

- AKERA T. & BRODY T. M. (1969) *Molec. Pharmac.* **5**, 605–614.
- BAGINSKI E. S., FOA P. P. & ZAK B. (1967) *Clin. chim. Acta* **15**, 155–158.
- BARCHI R. L. & BRAUN P. E. (1972a) *J. Neurochem.* **19**, 1039–1048.
- BARCHI R. L. & BRAUN P. E. (1972b) *J. biol. Chem.* **247**, 7668–7673.

- COOPER J. R., ITOKAWA Y. & PINCUS J. H. (1969) *Science, N.Y.* **164**, 74-75.
- COOPER J. R. & KINI M. M. (1972) *J. Neurochem.* **19**, 1809-1811.
- GODFRAIND T. & VERBEKE N. (1973) *Archs. int. Pharmacodyn. Thér.* **203**, 400-402.
- GUTH P. S. & SPIRITES M. A. (1964) *Int. Rev. Neurobiol.* **7**, 231-278.
- HASHITANI Y. & COOPER J. R. (1972) *J. biol. Chem.* **247**, 2117-2119.
- INOUE A. & IWATA H. (1971) *Biochim. biophys. Acta* **242**, 459-469.
- INOUE A., SHIM S. & IWATA H. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 1373-1382.
- ITOKAWA Y. & COOPER J. R. (1970a) *Biochim. biophys. Acta* **196**, 274-284.
- ITOKAWA Y. & COOPER J. R. (1970b) in *Methods in Enzymology* (McCORMICK D. B. & WRIGHT L. D., eds.) Vol. 18, pp. 91-92. Academic Press. New York.
- ITOKAWA Y., SCHULZ R. A. & COOPER J. R. (1972) *Biochim. biophys. Acta* **266**, 293-299.
- IWATA H., INOUE A. & TOMOI M. (1971) *J. Neurochem.* **18**, 1371-1377.
- IWATA H., BABA A. & MATSUDA T. (1974a) *Japan. J. Pharmac.* **24**, 817-823.
- IWATA H., BABA A., MATSUDA T. & TERASHITA Z. (1974b) *Japan. J. Pharmac.* **24**, 825-829.
- KWANT W. O. & SEEMAN P. (1969) *Biochim. biophys. Acta* **183**, 530-543.
- LETERRIER F. R., RIEGER F. & MARIAUD J. F. (1974) *Biochem. Pharmac.* **23**, 103-113.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. & RANDALL R. J. (1951) *J. biol. Chem.* **193**, 265-275.
- ROBINSON J. D., LOWINGER J. & BETTINGER B. (1968) *Biochem. Pharmac.* **17**, 1113-1116.
- SEEMAN P., KWANT W. O., GOLDBERG M. & CHAU-WONG M. (1971) *Biochim. biophys. Acta* **241**, 349-355.
- SEJO L. & RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ G. (1970) *Biochim. biophys. Acta* **211**, 595-598.
- SQUIRES R. F. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 27-32.
- VON MURALT A. (1962) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **98**, 499-507.

Short communication

CATECHOLAMINE ACCUMULATION IN TISSUES OF THIAMINE-DEFICIENT RATS AFTER INHIBITION OF MONOAMINE OXIDASE

H. IWATA, T. NISHIKAWA and A. BABA

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka, Osaka-fu, Japan

Received 29 July 1970

Accepted 24 August 1970

H. IWATA, T. NISHIKAWA and A. BABA, *Catecholamine accumulation in tissues of thiamine-deficient rats after inhibition of monoamine-oxidase*, European J. Pharmacol. 12 (1970) 253-256.

The increase in the catecholamine levels in tissues after inhibition of monoamine oxidase by pheniprazine was slower in thiamine deficient rats than in control animals. When thiamine was administered to the deficient rats, the rate of catecholamine biosynthesis increased to the control level and the blood catecholamine and blood pressure increased to normal levels.

Catecholamine accumulation

Monoamine oxidase

Thiamine deficiency

Pheniprazine

1. INTRODUCTION

Starting from the finding that the concentration of catecholamine is significantly elevated in various organs in thiamine-deficient rats (Iwata et al., 1968), we have made a series of pharmacological studies on thiamine-deficiency (Iwata et al., 1969a; Iwata, Nishikawa and Watanabe, 1969b; Iwata, Nishikawa and Fujimoto, 1969c). In studies on the mechanism of catecholamine (CA) accumulation, we found that CA release into the blood stream was greatly suppressed in thiamine-deficient rats (Iwata et al., 1969a), and that in organs where the CA concentration was elevated, monoamine oxidase (MAO) activity was impaired (Iwata et al., 1969c). However, the catechol-O-methyl-transferase activity in the liver of these animals was unchanged (to be published).

In studies on the mechanism of CA accumulation in thiamine-deficiency, it is necessary to see whether the rate of CA turnover changes. Accordingly we examined the change in CA biosynthesis and the accompanying change in blood pressure in deficient rats and results are reported here.

2. METHODS

The animals used and the methods adopted to obtain thiamine-deficient rats were reported previously (Iwata et al., 1969c). Ten mg/kg pheniprazine (β -phenylisopropyl-hydrazine HCl; JB-516) were injected intraperitoneally and animals were killed 1, 2, 3, 4, 5, 12, or 24 hr after the injection. The CA contents of the tissues and blood were determined as described previously (Iwata et al., 1969c; Iwata et al., 1969b). Animals were anaesthetized with urethane (0.6 g/kg, i.p. and 0.6 g/kg, s.c.), a cannula was inserted into the right common carotid artery and blood pressure was recorded on smoked kymograph paper.

3. RESULTS

In a preliminary experiment it was clarified that the maximum inhibition of MAO in the brain, heart and spleen by pheniprazine (10 mg/kg, i.p.) using kynuramine as substrate occurred 25 min after the

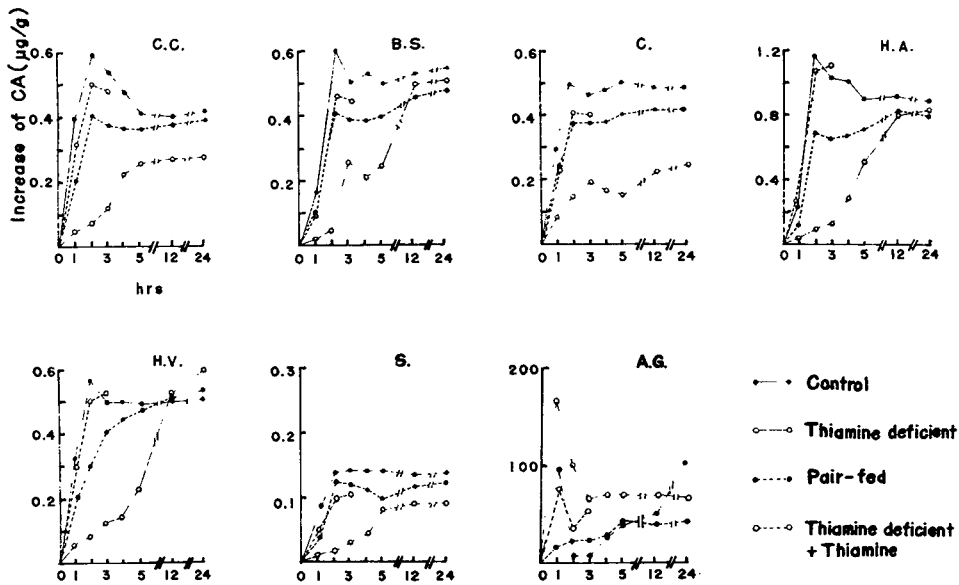


Fig. 1. Accumulation of tissue catecholamine in thiamine-deficient rats after pheniprazine injection. Each point represents the mean of values of 4 to 6 animals. Control values as catecholamines of control, pair-fed and thiamine-deficient animals were reported previously (Iwata et al., 1968). Thiamine hydrochloride (4.0 mg/kg) was injected subcutaneously into thiamine-deficient animals. C.C.: cerebral cortex; B.S.: brain stem; C: cerebellum; H.A.: heart atrium; H.V.: heart ventricle; S.: spleen; A.G.: adrenal glands.

Table 1
Relationship between the catecholamine content in the blood and the blood pressure.

Animals	Time after thiamine administration (hr)	CA content ($\mu\text{g/ml}$)	Blood pressure (mm Hg)
Control ^a		0.030 ± 0.002	113–126
Pair-fed ^a		0.025 ± 0.003^c	105–125
Thiamine deficient ^a		0.015 ± 0.001^c	86–100
Thiamine deficient + thiamine ^b	1	0.020 ± 0.002^d	90–105
+ thiamine ^b	3	0.027 ± 0.001^d	100–120
+ thiamine ^b	5	0.040 ± 0.002^d	100–130

Values are the means \pm S.E. of values for 4 or 5 animals.

^a Data reported previously (Iwata et al., 1969a).

^b 4.0 mg/kg thiamine injected subcutaneously.

^c Significance difference from control group ($p < 0.05$).

^d Significance difference from thiamine deficient group ($p < 0.05$).

injection both in thiamine-deficient rats and two types of control animals.

Fig. 1 shows that increase in the CA level after injection of pheniprazine was less in the cerebral

cortex, brain stem, cerebellum and heart atria and ventricles in thiamine-deficient rats than in control and pair-fed animals. This impaired CA accumulation in the deficient rats was restored to nearly the control

level by simultaneous injection of 4.0 mg/kg of thiamine hydrochloride with pheniprazine.

In parallel with this restoration of CA biosynthesis, the lowered CA concentration in the blood and marked hypotension of thiamine-deficient rats were also restored to the control level by administration of thiamine (table 1). The blood pressure returned nearly to the normal level within 30 min after thiamine injection.

4. DISCUSSION

Fig. 1 shows that after a large dose of pheniprazine CA accumulation in all tissues except the spleen and adrenal glands is far less in thiamine-deficient rats than in the two control groups.

It has been suggested that CA accumulation, under conditions similar to those described here, is due primarily to its biosynthesis (Udenfriend and Weissbach, 1958; Spector, Hirsch and Brodie, 1963). Kulkarni and Shideman (1968) reported that the increase in the level of CA in the central nervous system under such conditions was greater in adult rats than in infants. We found that the maximum inhibition of MAO by pheniprazine injection occurred at approximately the same time in thiamine-deficient rats and two types of control animals.

The present results show that CA synthesis is markedly inhibited in thiamine-deficient rats. CA is known to inhibit the activity of tyrosine hydroxylase and regulates its own synthesis through a feedback inhibition mechanism (Nagatsu et al., 1964; Neff and Costa, 1965; Levitt et al., 1965); moreover, it blocks the accelerated synthesis of the hormone normally seen during nerve stimulation (Alousi and Weiner, 1966). Inhibition of CA synthesis in thiamine-deficient rats might occur through accumulated CA caused by inhibition of MAO activity and of CA release into the blood stream. Other mechanisms may also participate, such as those involving decrease in precursors, tyrosine or in enzyme activities other than that of tyrosine hydroxylase. However, the present data, together with our previous findings, showing that CA release is suppressed and MAO activity is reduced, indicate that the turnover rate of CA is definitely reduced in thiamine-deficiency.

The present data show that, shortly after injection

of thiamine, the blood pressure began to rise in parallel with restoration of CA biosynthesis and CA release. Furthermore, results in the previous paper showed that bradycardia, observed in thiamine-deficient rats, ceased within 40 min after thiamine administration (Iwata et al., 1968). These results indicate that the CA turnover rate has a close relationship with physical symptoms of thiamine-deficiency. However, neurological symptoms, such as reduction in spontaneous movement, tremor, turning movements and convulsions were not fully overcome by thiamine administration, although they are greatly improved within 60 min after its injection. This could be due to irreversible morphological changes in the central nervous system caused by thiamine-deficiency.

REFERENCES

- Alousi, A. and N. Weiner, 1966, The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: Effect of nerve stimulation, cocaine and catecholamine-releasing agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1491.
- Iwata, H., S. Fujimoto, T. Nishikawa and K. Hano, 1968, *Pharmakologische Untersuchungen bei Thiaminmangel I. Änderungen des Katecholamingehalts im Gewebe*, *Experientia* 24, 378.
- Iwata, H., K. Watanabe, T. Nishikawa and M. Ohashi, 1969a, Effects of drugs on behavior, heart rate and catecholamine levels in thiamine-deficient rats, *European J. Pharmacol.* 6, 83.
- Iwata, H., T. Nishikawa and K. Watanabe, 1969b, *Pharmacological studies on thiamine deficiency IV. Blood catecholamine content and blood pressure of thiamine deficient rats*, *Experientia* 25, 283.
- Iwata, H., T. Nishikawa and S. Fujimoto, 1969c, Monoamine oxidase activities in tissues of thiamine-deficient rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 21, 237.
- Kulkarni, A.S. and F.E. Shideman, 1968, Catecholamine accumulation in the brains of infant and adult rats after monoamine oxidase inhibition, *European J. Pharmacol.* 3, 269.
- Levitt, M., S. Spector, A. Sjoerdsma and S. Udenfriend, 1965, Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 148, 1.
- Nagatsu, T., M. Levitt and S. Udenfriend, 1964, Tyrosine hydroxylase: The initial step in norepinephrine biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 239, 2910.
- Neff, N.H. and E. Costa, 1965, The influence of monoamine oxidase inhibition on catecholamine synthesis, *Life Sci.* 4, 2339.

Spector, S., C.W. Hirsch and B.B. Brodie, 1963, Association of behavioural effects of pargyline, a non-hydrazide MAO inhibitor with increase in brain norepinephrine, Intern. J. Neuropharmacol. 2, 81.

Udenfriend, S. and H. Weissbach, 1958, Turnover of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in tissues, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 97,748.