

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/299">https://hdl.handle.net/11094/299</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【 2 】

氏名・(本籍)	馬 場 明 道
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 3 2 2 1 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 11 月 27 日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>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</b>
論文審査委員	(主査) 教 授 岩田 平太郎  (副査) 教 授 上原喜八郎 教 授 近藤 雅臣 教 授 青沼 繁

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

近年になり、von Muralt 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、活性に変動を与える物質、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 ラット脳 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なった。

ラット脳の細胞画分において、TTPaseは後述する様に、solubleなもの、membrane-associatedなもの2種類が存在し、membrane-associated TTPaseは、核、ミクロゾーム分画に活性が高く、soluble TTPaseは上清分画にその活性が高かった。一方、TDPase活性はミクロゾーム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ほぼ同じであった。従って、以下の実験にはTDPaseとしてはミクロゾーム、TTPaseミクロゾーム、上清分画を用いた。

種々のpH値でのTTPase活性の分布をみると、microsomal TTPaseについてはpH6.5とpH7.8に二つのピークがみとめられ、一方、soluble TTPaseではpH8.5~9.0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、pH8.0~8.5にひとつのピークがみ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が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Pi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2価カチオン要求性については、soluble TTPaseは $Mg^{++}$  (最大活性：6mM)によって活性化をうけるが、microsomal TTPaseは $Mg^{++}$ 、あるいは $Ca^{++}$  (最大活性：3mM)でも活性化がみられた。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うけることが明らかとなった。一方、microsomal TDPaseの2価カチオン要求性については、 $Ca^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 、 $Mg^{++}$ の順に活性化をう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、TTPの代謝が $Ca^{++}$ によって調節される可能性が示された。

## 第II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、あるいは亜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型のthiamineとしてTTPが注目されているが、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活性の有意の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を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cholinergic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等によっ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、0.25~1.0mMにおいてsoluble及びmicrosomal TTPaseを20~70%阻害し、逆にTDPaseに対しては0.125~0.5mMの濃度において20~180%もの著明な活性化を惹起することが明らかと

なった。一方、ミクロゾームの分画の“Ca<sup>++</sup>-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Vmaxの約3倍の増加とそれに伴ったKmの減少を惹起した。

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の作用点は細胞膜、顆粒膜にあるといわれており、膜蛋白の立体構造の変化、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し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 $\frac{1}{2}$ 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Vmaxの著明な増加とそれに伴ったKmの減少がみられた。

次に、界面活性剤であるdeoxycholate(DOC)の作用を検討したが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に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、脂質成分の関与のあることが推察される。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の作用点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及び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きた如く、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及ぼ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え、ATPase 活性を指標として *in vitro* で検討した。

その結果、ラット脳ミクロゾームの  $Mg^{++}$ -ATPase,  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase,  $Ca^{++}$ -ATPase,  $Mg^{++}$ - $Ca^{++}$ -ATPase のうち、 $Ca^{++}$ -ATPase 活性と  $Mg^{++}$ - $Ca^{++}$ -ATPase の  $Ca^{++}$  依存性活性のみが  $10^{-5}$  ~  $10^{-3}$  M の TTP により約 20~50% の阻害をうけることが明らかになった。又、この TTP による “ $Ca^{++}$ -ATPase” 活性の阻害は単にメディウム中での  $Ca^{++}$  のキレートによるものでないことが示された。

以上の様に、TTP が多くの ATPase の中で “ $Ca^{++}$ -ATPase” のみを阻害することが判明したが、*in vivo* において TTP が  $Ca^{++}$  の輸送を変えるか否かについては、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、“ $Ca^{++}$ -ATPase” のみを特異的に抑えることを考え併せると、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、可溶性のものと膜に結合したものの 2 種類の存在がみとめられ、各々異なった性質を有していた。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、活性変化の換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た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、TTP が種々の ATPase の中で “ $Ca^{++}$ -ATPase” 活性のみに著明な阻害作用を有することをみいだした。

以上の知見から、ラット脳ミクロゾーム分画において、TTP, TDP の脱リン酸過程がきわめて特異な性質を有していること、そして、その代謝が  $Ca^{++}$  の輸送系と密接な関係を有することが示された。

#### 論文の審査結果の要旨

ラット脳における thiamine triphosphatase (TTPase) と thiamine diphosphatase (TDPase) の基礎的

性質を明らかにし、種々の神経活性物質の両酵素活性に及ぼす影響を検討した。とくに、chlorpromazine がTTPaseを抑制し、TDPase活性を著明に促進した。すなわち、ラット脳マイクロゾーム分画においてTTP、TDPの脱リン酸化過程が特異な性質を有し、その代謝がCa<sup>++</sup>輸送系と密接に関連していることを明らかにした。

従って本論文は、薬学博士の学位を授与するに値するものである。