



Title	中枢神経系における酵素的thiamine diphosphate分解能の生理的意義に関する研究
Author(s)	井上, 章
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30573
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏名・(本籍)	井 上 章
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 2373 号
学位授与の日付	昭和46年8月14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	中枢神経系における酵素的 thiamine diphosphate 分解能の生理的意義に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 岩田 平太郎 (副査) 教 授 青沼 繁 教 授 上原 喜八郎 教 授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

Thiamine が thiamine diphosphate (TDP) として、ピルビン酸脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素、ならびに、transketolase の補酵素となり、生体内代謝過程の重要な役割を担っている事実は広く知られている。しかし、thiamine 欠乏動物において、痙攣、振せん、旋回運動等の異常行動に加えて、多発性神経炎が起こるという古くからの知見は、thiamine の補酵素としての役割からは、説明が不可能である。脳内に移行することが知られている thiamine 拮抗類似体 pyriithiamine により同様な症状がみられるのに、脳内に移行し得ない oxythiamine においては観察されないことより、上記症状は中枢原発性であると考えられる。

1945年、von Muralt は thiamine のリン酸エステル類が、補酵素としての役割とは別に、末梢神経において、おそらく中枢神経においても Na^+ イオンの担体として、神経刺激伝達に関与するとの仮説を提出した。以後、この仮説を支持する研究がなされているが、いまだ完全には解明されていない。

1965年、岩田等は thiamine 欠乏動物の薬理学的研究から、この欠乏動物の特定臓器に神経伝達物質である catecholamine が著明に増加していることをみとめ、thiamine の交感神経系における役割を推定した。

最近までに、神経刺激、ACh、または、tetrodotoxin により細胞内の TDP が分解され、free thiamine と thiamine monophosphate (TMP) として、神経細胞外に遊出されることが報告されている。著者は中枢神経における上述の thiamine の特異な役割を解明するために、脳内においては全くその機能、ならびに、性状が判明していない thiamine diphosphate 分解酵素である thiamine diphosphatase (以下 TDPase と略す) の中枢神経系における生理的意義の解明を行なう目的で実験に着手した。

第I章 各種臓器内TDP分解活性と薬物の影響

各種臓器はTDP分解活性を有し、9.3に至適pHを持つアルカリ型ホスファターゼであるTDPaseがその反応を触媒することが知られている。牛肝臓精製TDPaseはアロステリック酵素であり、ATPにより活性化を受け、エネルギー生産の調節を行なっていることが判明している。

著者は種々の薬物をラットに投与し、その臓器ホモゲネート中のTDP分解活性を測定すると、血糖値を変動させるinsulin, alloxanの投与により、それぞれ抑制または増大がみとめられた。また、SH-阻害剤、TCAサイクル阻害剤、アンカプラー投与により、肝、腎における活性は変動し、さらに、phenobarbital, chlorpromazineによっても本活性は増加した。この事実より、生体内代謝系に影響を及ぼす薬物の投与は、TDP分解能にも影響を与えることが判明した。

第II章 Cholinesterase 阻害剤による脳TDP分解能の活性化機構

中枢神経細胞の興奮時における脳ならびに末梢臓器のTDP分解能を検討する目的で、コリン性作動薬、特にcholinesterase阻害剤をラットに投与し、ホモゲネート中の活性を測定した。

痙攣は発現するが死亡しない量のphysostigmine, ambenonium、あるいは、ACh遊離作用を示すpentetrazolの投与により、脳のTDP分解活性は著明に上昇した。この活性化は振せん持続期間と一致して、30分で最高となり、60分においては正常値まで回復していた。しかし、acetylcholinesterase活性はphysostigmine投与45分後に、最も阻害されていた。Physostigmineは脳TMP分解能も増加させ、同時に脳においてのみ、総ならびにエステル型thiamine含量を有意に減少させた。

痙攣量のstrychnineによっても、脳TDP分解活性は変化しないことより、本活性化が痙攣により誘発された2次的な代謝変化ではないことが示され、cholinesterase阻害剤により遊出されたfree AChにより、本分解能が活性化されたものと推定できる。

第III章 ATPによる脳TDP分解能の活性化とthiamine欠乏動物におけるその活性

牛精製肝TDPaseはinosine diphosphataseと同一の酵素であり、共にATPその他triphosphate類によりアロステリックに活性化を受ける。そこで、著者は正常ラット脳よりアセトン乾燥粉末を作成し、TDP、IDP分解活性に対するATPの効果を検討した。

脳TDP、IDP分解能は基質量の μ g量に相当する比較的低濃度のATP (0.1mM)により著明な活性化を受けた。

Thiamine欠乏ラット脳のTDP分解能は、Pair-fed群に比し、有意の活性増加を示したが、肝活性は両群共に、対照群に比し著しい活性低下がみられた。この欠乏動物脳にATPとPiが有意に増加していたが、この増加したATPとTDP分解能の亢進の詳細な関連は不明である。対照動物における、TDP分解能の分布は、小脳において最も高く、次いで脳幹または大脳皮質で、脊髄の活性は最も低かった。この分布はDreyfusが報告した脳内のthiamine分布と類似していた。

肝TDPaseは可溶性であるが、脳酵素は不溶性であり、freezing-thawingやtrypsin処理による可溶化は成功しなかった。しかし、非イオン性界面活性剤Triton X-100の高濃度により可溶化されることより、脳TDPaseは細胞膜あるいは顆粒膜に強固に結合しているものと考えられる。

第IV章 部分精製脳TDPase活性に対する1価カチオンならびにATPの影響

正常ラット脳より Triton X-100 にて可溶化し、部分精製を行なったTDPase に対する 1 価カチオンと ATP の効果を検討した。

本酵素は Mg^{2+} -依存性酵素であり、ATP の非存在、あるいは存在下において、1 価カチオン特に Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ により活性化された。 Na^+ は最も効果が強く 30—40mM において、ATP 存在、非存在時にそれぞれ 50、35% の活性化をひき起こした。 Na^+ と K^+ の共存下においては、 (Na^+-K^+) -依存性 ATPase にみられる様な相乗効果はみられず、逆に K^+ は Na^+ の活性促進効果を抑制した。それ故、脳 TDPase は $(Mg^{2+}-Na^+-ATP)$ -活性化 pyrophosphatase であることが推定される。

Ca^{2+} も Mg^{2+} と同様に ATP の存在にかかわらず、TDPase 活性を上昇させた。しかし、 Li^+ 、 NH_4^+ あるいは Na^+ を共存させると、この Ca^{2+} の活性促進効果は抑制された。 Ca^{2+} は Mg^{2+} の効果と拮抗することが観察された。

Matsuda 等は Na^+ 、 Mg^{2+} と ATP がラット脳シナプス顆粒より ACh を遊出させることをみとめている。

著者も cholinesterase 阻害剤投与による中枢興奮時に脳 TDP 分解能が活性化され、これが ACh により誘発された現象であることを推定している。これらの知見は、神経刺激時に Mg^{2+} -依存性 TDPase が ATP と Na^+ により活性化される可能性を示唆するものである。それ故、古くより多くの研究者により観察されている電気刺激、ACh、tetrodotoxin により神経線維よりの thiamine、TMP の遊出は、これらの刺激によりひき起こされた神経細胞興奮時に ATP と Na^+ により Mg^{2+} -依存性 TDPase が活性化されたために惹起される現象であると推定した。

第 V 章 脳 TDPase における ATP と Na^+ のアロステリック効果と各種薬物の影響

脳 TDPase も、肝酵素と同様に、アロステリックな性状を有しているかどうかについて検討し、さらに、ATP と Na^+ による酵素活性化の詳細な機作をうかがう目的で実験を行なった。

脳 TDPase の至適 pH は 9.3 であったが、ATP の添加により 8.6 に移行した。 Na^+ あるいは K^+ を ATP と共存させると、至適 pH はさらに 9.0 に移動した。Acetone, n-butanol, あるいは、chloroform-methanol (2 : 1, v/v) を段階的に処理すると、本活性は増加の傾向を示したが、ATP による活性化は chloroform-methanol 乾燥粉末において完全に消失した。この事実は ATP が基質反応部位以外の部位の酵素 lipid と結合して、活性化をひき起こしていることを示唆している。本酵素の TDP に対する K_m 値は 0.25mM であり、精製肝酵素より 83 倍 K_m 値が低かった。0.1 mM の ATP の添加は K_m 値を減少させ、同時に V_{max} 値をおよそ 2 倍増加させた。同様な効果は Na^+ の添加でもみられたが、ATP と Na^+ 共存時にその効果は最大であった。以上の事実より、本酵素がアロステリック酵素の性状を有しており、その活性が ATP と Na^+ により調節されていることが判明した。

結 論

正常ラット脳 thiamine diphosphatase は肝酵素と異なり、極めて不溶性で細胞膜あるいは顆粒膜と強固に結合している。本酵素は $(Mg^{2+}-Na^+-ATP)$ -活性化 pyrophosphatase であり、 Na^+ と ATP によりアロステリックに活性化されることが判明した。

TDP に対する K_m 値は 0.25mM であり、肝酵素の $\frac{1}{83}$ とかなり低い。この TDP 分解能の脳内分布

は thiamine の分布と類似し、さらに thiamine 欠乏動物においては、活性が増加していた。Cholinesterase 阻害剤である physostigmine, ambenonium の投与により活性化され、同時に脳内 thiamine 含量の減少が観察された。この活性化は脳内において遊離された ACh により引き起こされたことを推定した。

古くから、多くの研究者により、神経刺激時において TMP と free thiamine が遊出されることが認められている。著者はこの神経刺激に適応した thiamine の遊出は、このような神経細胞興奮状態における Mg^{2+} -依存性 TDPase が ATP と Na^+ により活性化されることにより発現することを示唆した。

論文の審査結果の要旨

脳 thiamine diphosphatase は (Mg^{2+} - Na^+ -ATP) により活性化されるアロステリックな性状をもつ酵素であり、cholinesterase 阻害剤投与により活性化をうけることを明らかにした。神経刺激に対応した thiamine の遊出は、この酵素が活性化されることにより発現することを示唆した。本論文は薬学博士の学位を授与するにふさわしい内容である。