



Title	アセチルコリン遊離促進物質の精製と同定
Author(s)	郭, 哲輝
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32114
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏名・(本籍)	郭 哲 輝
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4 2 2 4 号
学位授与の日付	昭和 53 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 第位規則結 5 条第 1 項該当
学位論文題目	アセチルコリン遊離促進物質の精製と同定
論文審査委員	(主査) 教授 吉田 博 (副査) 教授 和田 博 教授 垣内 史朗

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

“Ca⁺が引金となり化学伝達物質が放出される”という事は広く認められており、更に、Ca⁺を直接神経終末に注入するとアセチルコリン (ACh) の放出が高まる。すなわち生理的には、膜の構造変化に伴う細胞外からの Ca⁺の流入、その結果として神経終末内 Ca⁺濃度の上昇が、化学伝達物質の放出に重要な役割を果たしていると考えられる。では、どのようにして Ca⁺が化学伝達物質を放出させるのか? は、不明であるが、神経末端の Ca⁺の少なくとも一つの作用点は、シナプス小胞 (Synaptic Vesicle) と考えられる。Rat Brainより得た Synaptic Vesicleを用いて ACh の遊離を検討したところ ATP, Mg⁺存在下, Sap (神経終末可溶性分画) の添加で、低濃度の Ca⁺に依存した ACh の著明な遊離促進効果がみられる。化学伝達物質として ACh の遊離機序を詳細に知るために、Sap 中の ACh 遊離促進物質の精製を試みた。

〔方法ならびに成績〕

Rat Whole Brainより得た P₂ (Crude Mitochondrial Fraction) を低張処理後、Ws (12000×g, 40min. で得られる上清) を 10万×g, 40min. 遠心後、その沈渣を Crude Synaptic Vesicle として ACh の遊離に、その上清を Sap として用いた。ACh の定量は、カエルの腹直筋を用いた。ACh 遊離促進物質は不安定であるが、酸性下あるいは、-SH 試薬である DTT 存在下では安定化されるので、一定の精製段階までは、DTT 存在下で行った。精製は次の 5 step を経て、265nm の吸収で約 8 倍、糖の定量で約 1 ~ 2 万倍の部分精製を行った。全活性の回収率は、15 ~ 25% であった。

Step 1. Sap を HCl で pH 5.0 処理後、遠心で除たん白。

Step 2. 凍結乾燥後、G-15に apply し、50mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4), 10^{-4} M DTT で溶出。ACh遊離活性は、Cysteineの前で溶出。

Step 3. Sample を DEAE-Sephadex A-25 に apply し、上記Medium で充分洗った後、50mM Tris (pH 7.4) と 200mM KCl を含む 50mM Tris (pH 7.4) の Gradient。ACh遊離活性は、265nm での吸収と一致して、イオン強度約 120mM で溶出される。

Step 4. 凍結乾燥後、G-10に apply し、5%の酢酸で溶出。ACh遊離活性は、Tris, KClの溶出より遅れる。(脱塩)

Step 5. 凍結乾燥後、AG50W-X 2 に apply し、20mM ピリジン-酢酸 Buffer (pH 3.0) で溶出。ACh遊離活性、糖の定量、紫外部吸収が一致した。

このように部分精製した ACh遊離促進物質の性質は、次の諸点で、L-アスコルビン酸と一致した。

1) 酸で安定、アルカリで不安定 2) クロロホルム等の溶解性 3) 紫外部吸収 (中性で λ_{\max} : 265nm, 酸性で λ_{\max} : 241~243nm, に Shift し、可逆的。等吸収点は、250nm。pKa: 4.0。強アルカリ下では、吸収の消失。 λ_{\max} : 265nm の吸収の $T_{1/2}$ は、約 7 min で、この吸収の減少は Cysteine でおさえられ、DTT で可逆性を示す。) 4) UMO5 より分子量 300 以下 5) 糖の発色陽性 6) Cellulose 薄層クロマトグラフィーにより Rf 値が一致。更に、L-アスコルビン酸は、ATP、 Mg^{+} 存在下、ACh遊離促進効果を示し、EGTA で完全に抑制された。

[総括]

Sap の ACh遊離促進効果は、約 10^{-6} M という生理的濃度に近い Ca^{+} でみられるので Sap 中の ACh遊離促進物質の精製を試みた。5 step を経て、Sap 中の ACh遊離促進物質の部分精製を行ったが、上記の実験結果より、本物質を L-アスコルビン酸と考える。Sap 中の ACh遊離促進物質の効果は、単独ではみられず、ATP、 Mg^{+} 存在下、 Ca^{+} 濃度に依存してその作用を示す。換言すれば、化学伝達物質である ACh の遊離は、 Ca^{+} で Regulate されている。この遊離促進効果は、 S_3 (可溶性分画) に比べ、Sap (神経終末可溶性分画) の方が著明であった。中枢神経におけるアスコルビン酸の作用は、ほとんど知られておらず、本物質が 5×10^{-6} M という低濃度で Sap と同様に Ca^{+} に依存して ACh遊離促進効果を示すことは興味深く、その作用様式などは、今後の問題である。

論文の審査結果の要旨

シンプス小胞からのアセチルコリン (ACh) 遊離は、ATP、 Mg^{+} 存在下、神経終末可溶性分画の添加で、低濃度の Ca^{+} に依存した著明な遊離促進効果が見られる。

著者は、この神経終末可溶性分画中に存在する ACh遊離促進物質の精製を行い、これをアスコルビン酸と同定した。

本論文は、独創性に富み、学位取得に、価する。