



Title	中枢神経系における含硫アミノ酸の役割に関する基礎的研究
Author(s)	山上, 悟
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32782
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	山上	悟
学位の種類	薬学	博士
学位記番号	第	5259号
学位授与の日付	昭和	56年3月25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2項	
学位論文題目	中枢神経系における含硫アミノ酸の役割に関する基礎的研究	
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎	
	(副査) 教授 近藤 雅臣 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温	

論文内容の要旨

緒言

中枢神経系においては、いくつかのアミノ酸が代謝系での役割以外に、神経機能と密接に関係していることが知られている。特に、 γ -aminobutyrate, glutamate, aspartate, glycine は現在、神経伝達物質の候補として考えられている¹⁾。

近年、含硫アミノ酸である taurine(tau)について多くの研究が行なわれ、中枢神経系において抑制性神経伝達物質として働いている可能性が示唆されている^{2,3)}。又、このアミノ酸の抗けいれん効果が臨床的に応用され⁴⁾、実験モデルに対してもその有効性が報告されている⁵⁻⁷⁾。しかし、その機構は未だ不明で、これを否定する成績もみとめられている^{8,9)}。

一方、tauの前駆物質である cysteine sulfinic acid(CSA)は含硫アミノ酸の代謝系の key intermediate として働いているが、その中枢作用を示す知見としては、ネコ脊髄ニューロンで興奮作用を示すこと¹⁰⁾、モルモット大脳皮質切片において cyclic AMP 量を上昇させること¹¹⁾などが報告されているのみで、その中枢神経系における存在すら不明である。

この様に、CSA と tau が中枢神経系において全く逆の作用を示すという知見を考えると、神経系における含硫アミノ酸代謝はきわめて重要な意義を持つと思われる。

そこで、含硫アミノ酸、特に、CSA と tau の生理的役割を追求する目的で、けいれんと脳内 tau の関係について、そして、神経系における CSA の存在とそのけいれん誘発作用について検討した。さらに、神経化学的研究から、神経終末部における CSA の動態についても検討を加えた。

本論

第1章 薬物依存ラット及びEl系マウスにおける脳内tau含量

けいれんと脳内tauの関係を明らかにする目的で、薬物（バルビタール、エタノール）依存ラット及びEl系マウスを用い、脳内tau含量の変動について検討したところ、薬物禁断けいれん及びElマウスのけいれん発現の際に、大脳皮質tau含量の増加がみとめられた。遺伝的にけいれんを起こす系統のEl系マウスとddY系マウスとの間に脳内tau含量の種差はみとめられなかった。tauの抗けいれん作用については、El系マウスのけいれんの場合その有効性を示唆する成績を得たが、薬物禁断けいれんの場合その有効性はみとめられなかった。

一般に、脳内tau含量は変動しにくいといわれているが、今回の大脳皮質における増加の機作としては、脳へのtauあるいはその前駆体の取込み増加、脳内tau合成の増加が考えられる。

第2章 CSA誘発seizureとそのseizureに対するtauの抑制効果

ラット側脳室へCSAを投与すると、50 μ g/匹の投与量で全例において、脳波上seizureの発現がみとめられた。このseizure波は高振幅、高頻度のcomponentsとそれに続くspikesで構成されるものであり、hippocampusに発生し、cortexへ波及するものであった。tau(200 μ g/匹)の側脳室への同時投与によって、CSA(50 μ g/匹)誘発seizureの持続時間は短縮された。glutamate, aspartateもCSAと同様なseizureを誘発したが、これらのseizureに対しては、tauは無効であった。

以上のtauのCSA誘発seizureに対する選択性拮抗という現象は、中枢神経系におけるCSAからtauに至る系がけいれん発生に重要な役割を果たしている可能性を示すものである。

第3章 CSAの微量定量

CSAの定量法に関しては、他のアミノ酸の場合と同様、原則的にはニンヒドリン、フルオレスカミンを用いたクロマトグラフィー法により行なうことが可能である。しかしながら、これらの方法を用いてもラット脳内微小部位あるいは細胞下分画でのCSAは検出できなかった。そこで、新しい微量定量法として酵素変換法と酵素サイクリング法¹²⁾を用いた方法を確立した。この方法においては、pyruvate, aspartate, cysteateの妨害は除去できた。又、感度は非常に高く5pmoleの検出が可能である。この方法により、ラット脳内各部位のCSA含量を検討した結果、大脳皮質、小脳に高濃度存在し、中脳、嗅球に低いという局在性がみとめられた。全脳細胞下分画においては上清分画にほぼ90%のCSAの存在がみられ、又、神経機能とのかかわりを論ずる場合、特に、重要とされている粗ミトコンドリア(p₂)分画にもCSAの存在がみとめられた。

第4章 神経終末部におけるCSAの生合成取込み、遊離、結合

1. 生合成

p₂分画を用い、cysteineからtauの生合成を検討したところ、中間代謝産物としてCSA, cysteate, hypotaurine, が経時的に生成されることが明らかとなった。

2. 取込み

神経終末部への取込み機構は、アミノ酸系神経伝達物質の不活性化機構と考えられている。tauの場合、高親和性、温度、Na⁺エネルギー依存性の取込み機構の存在することが知られている¹³⁾。そこで、CSAについてもラット大脳皮質p₂分画を用い検討した。CSAの取込みには高親和性と低親和性

の2つがみとめられ、各々 K_m 値が 12 と $155 \mu M$ であった。高親和性取込みは完全に Na^+ 依存性を示し、又、部分的には Ca^{2+} にも依存していた。p₂ 分画の細分画としてはミトコンドリアには取込みはなく、シナプトゾームに大部分の取込み活性がみとめられた。CSA の構造類似物質の中で glutamate, aspartate, cysteate がこの Na^+ 依存性高親和性取込みを競合阻害した。

3. 遊離

脊髄ニューロンでの CSA の興奮作用¹⁰⁾、今回の seizure 誘発作用から CSA が神経伝達物質として働く可能性を考えるとき、神経終末部からの CSA の遊離現象についての知見は不可欠なものとなる。この点から、大脳皮質 p₂ 分画を用いて CSA の遊離を検討した結果、脱分極剤 (high K^+ , veratridine) により CSA の遊離の増加がみとめられた。この脱分極剤による遊離の増加は Ca^{2+} 非存在下で低下した。この結果は、神経伝達物質一般にみとめられる現象と一致する。

4. 結合

ある物質が神経伝達物質であれば、その作用部位である受容体が存在する。そこで、神経膜における CSA の特異的結合部位の存在について検討した。特異的結合部位を検索する場合、放射比活性の高い ligand を必要とするが、今回は、ligand としては合成のしやすさ、CSA との構造類似性を考慮し、CSA の酸化されたものである cysteate (CA) を用いた。 $[^{35}S]$ -L-CA は $[^{35}S]$ -L-cystine から酸化法により合成した。粗シナプス膜分画への $[^{35}S]$ -L-CA の特異的結合には Na^+ 依存性のものと非依存性のものの 2 つがみとめられ、 Na^+ 非依存性の特異的結合は、温度、pH 依存性を示した。Scatchard plot から求めた Na^+ 非依存性の特異的結合の K_d 値は 358 nM で結合部位の数は $2.88 \text{ pmole/mg protein}$ であった。

中枢神経系での CA の存在は明らかでなく、又、私の検討からもその予想濃度は CSA に比べて無視できるものであった。そこで、 $[^{35}S]$ -L-CA の特異的結合部位が CSA の特異的結合部位を示すか否かについて、 $[^{35}S]$ -L-CA の Na^+ 非依存性特異的結合に対する CSA, glutamate, aspartate, CA, homocysteate, kainate の効果を検討した。 $[^{35}S]$ -L-CA の結合を 50% 阻害する濃度 (IC_{50}) は各々、CSA; 9.6 nM glutamate; 107.4 nM homocysteate; 298.5 nM CA; 704.3 nM aspartate; 912 nM kainate; $> 20 \mu M$ であった。

この結合部位が CSA に対して特異性の高いことが明らかになり、神経膜における CSA の特異的結合部位の存在が示唆された。

結論

1. 薬物禁断けいれん及び El 系マウスのけいれん発現の際に大脳皮質 tau 含量の増加がみとめられた。El 系マウスのけいれんに対して tau は抗けいれん作用を示した。
2. CSA の側脳室への投与により脳波上 seizure の発現がみとめられた。この seizure の持続時間は tau の同時投与により短縮された。この現象は含硫アミノ酸代謝系、特に、CSA から tau に至る系が、けいれん発生に重要な役割を果たしている可能性を示すものである。
3. CSA の酵素サイクリング法による定量法を確立し、中枢神経系でのその存在をはじめて明らかにした。ラット脳各部位の内、CSA は大脳皮質、小脳に高濃度存在し、中脳、嗅球にはその 1/3

～1/4の程度しか存在しないこと、又、脳細胞下分画において CSA の90%が上清分画に10%が p_2 分画に存在することを明らかにした。

4. 中枢神経系における CSA の動態を神経化学的研究から追求したが、 Na^+ 依存性高親和性取込み、脱分極による Ca^{2+} 依存性の遊離、 Na^+ 非依存性の特異的結合部位の存在がみとめられた。これらの事実は、神経伝達物質同定の規準を一部満たすものであり、CSA が中枢神経系において興奮性の物質として働いている可能性を示すものである。

- 1) Snyder, S. H., Young, A. B., Bennett, J. P. and Mulder, A. H., Fed. Proc., **32**, 2039-2047 (1973).
- 2) Oja, S. S. and Lähdemäki, P., Medical Biology, **52**, 138-143 (1974).
- 3) Mandel, P. and Passantes-Morales, H., In Advances in Biochemical Psychopharmacology, ed. by Costa, E., Giacobini, E. and Paoletti, R., Raven Press, New York, pp. 141-151 (1976).
- 4) Bergamini, L., Mutani, R., Delsedime, M. and Durelli, L., Europ. Neurol., **11**, 261-269 (1974).
- 5) Van Gelder, N. M., Brain Res., **47**, 157-165 (1972).
- 6) Izumi, K., Donaldson, J., Minnichi, J. L. and Barbeau, A., Can. J. Pharmacol., **51**, 885-889 (1973).
- 7) Izumi, K., Igisu, H. and Fukuda, T., Brain Res., **76**, 171-173 (1974).
- 8) Perry, T. L. and Hansen, S., In Taurine, ed. by Huxtable, R. and Barbeau, A., Raven Press, New York, pp. 275-281 (1976).
- 9) Joseph, M. H. and Emson, P. C., J. Neurochem., **27**, 1495-1501 (1976).
- 10) Curtis, P. R. and Watkins, J. C., J. Neurochem., **6**, 117-141 (1960).
- 11) Shimizu, H. and Yamamura, Y., J. Neurochem., **28**, 383-388 (1977).
- 12) Kato, T., Berger, S. J., Carter, J. A. and Lowry, O. H., Anal. Biochem., **53**, 86-97 (1973).
- 13) Schmid, R., Sieghart, W. and Karobath, M., J. Neurochem., **25**, 5-9 (1975).

論文の審査結果の要旨

本論文は中枢神経系における含硫アミノ酸のうちタウリンとシステインスルフィン酸の機能的役割について神経化学的手法を用い検討したもので、とくにシステインスルフィン酸が神経伝達物質としてもつべき条件を一部満たすものであることを明らかにした。以上のことから著者に対し薬学博士の称号を授与するに値するものであると考える。