

| | |
|--------------|---|
| Title | 中枢神経系におけるブラジキニン分解系の生理的役割に関する基礎的研究 |
| Author(s) | 岩木, 秀夫 |
| Citation | 大阪大学, 1981, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33039 |
| 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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 岩 ^{いわ} 木 ^き 秀 ^{ひで} 夫 ^お |
| 学位の種類 | 薬学博士 |
| 学位記番号 | 第 5476 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 56年 12月 2 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |
| 学位論文題目 | 中枢神経系におけるブラジキニン分解系の生理的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 鎌田 皎 教授 青沼 繁 |

論文内容の要旨

緒言

末梢組織を循環するペプチドホルモンが中枢神経系にも存在することが最近証明され、これらの中
 枢神経系における生理活性が注目を集めている。ブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-
 Pro-Phe-Arg, BK) もその様なホルモンの1つであり、BK様物質がラット脳内に存在することが
 免疫組織化学的に証明され、¹⁾ 中枢神経系におけるBKの生理作用が様々な方面から研究されている。
 我々もすでにマウスのペントバルビタール誘発睡眠がBKの大槽内投与により延長され、BK構成ペプ
 チドの中でもC末端にSer-Proを含有するペプチドにBKよりも強い睡眠延長作用を認めた。²⁾ このこ
 とは脳内ペプチダーゼによりSer-Proを含むペプチドが生じた場合に、BKそのものよりも強い生理
 作用を発現することを示唆している。

私は脳内ペプチダーゼによりBKからこれらのペプチドが遊離する可能性を調べることを第一の目
 的とし、ラット脳からBK分解酵素の精製を試み、次いでBK分解酵素活性の化学的定量法を考案した。

従来よりBK分解酵素活性の測定には平滑筋を用いた生物学的方法が用いられてきたが、前述のご
 とし生理活性ペプチド、あるいは酵素の性質を調べるために用いた種々の薬物の平滑筋に与える影響
 が無視できないことは以前から指摘されていた。そこで新たにダンシル化とクロマトスキャナーを用
 いた化学的方法により、ラット脳より得たBK分解酵素の性質についての知見をも得た。

本論

第I章 ブラジキニンの中枢作用について

大槽内投与のためのカニューレと3本の双極電極を尾状核、海馬、脳梁に挿入した慢性電極挿入ラ

ットの自発脳波に対してBKの5 n moleを大槽内投与すると、尾状核と脳梁の波形は直ちに高振幅不規則化し、海馬にも同様の变化および棘波の出現がみられた。この時のラットは興奮症状がみられ、BK投与1分後には脳波はもとにもどり、ラットは強い鎮静状態に入った。海馬の棘波はBK投与10分後においてもみられた。

血漿キナーゼの阻害剤であるo-フェナンスロリン (o-Phe) の単独では無作用である25p moleをあらかじめ大槽内投与しておき、次いで5 n moleのBKを大槽内投与するとBKの脳波および行動上に与える影響が著明に持続した。

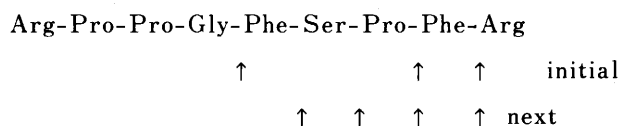
これらの成績は、脳におけるBKの生理作用が脳内ペプチダーゼの活性に依存して発現することを示している。一方、BKを脳内投与すると今回得られたような二相性の行動変化、即ち初期の興奮と続いて鎮静がみられることは良く知られており、³⁾ Iwataらは初期の変化は無傷のBK分子により、鎮静はBK代謝物により起こると考えている。⁴⁾ 我々もBK構成ペプチドフラグメントに睡眠延長作用のあることを認めているが、これらの成績はBKの中樞作用の発現にその分解産物である何らかのペプチドが大きく関与していることを推定させるものである。従って、BKの中樞作用を検討する上で、その分解系の詳細を明確にすることがまず必要と考えられ、以下中枢神経系におけるBKの分解系について種々の検討を行った。

第二章 ラット脳におけるブラジキニン分解活性について

ラット脳よりBK分解酵素の部分精製を行った。即ち、血漿中にはキナーゼIおよびIIが存在するので完全に除血した脳を0.25Mシュクロースでホモジネートし、常法により細胞分画した。各分画のBK分解活性を生物学的方法で検索すると、可溶性画分に強い活性がみ出された。従って全脳ホモジネートの25,000g上清画分のpHを0.5M酢酸にて5.0に合わせ、沈澱したタンパクを除去し、再度pHを7.5にもどし30mM NaClを含む50mMリン酸緩衝液で透析した標品を部分精製酵素とした。

ラット子宮を用いた生物学的方法により、o-Phe、ジエチルジオオカルバメート (DDC) および8-ヒドロキシキノリン (8-OHQ) の本酵素活性に対する影響を検討すると、o-Pheに用量依存性の強い阻害作用を認め、DDC、8-OHQの阻害作用は弱かった。BKと本酵素の反応溶液の一部を経時的にダンシル化し、加水分解後アミノ酸の同定を行うと、反応初期にPheが強くSer、Proが弱く現われ、反応60分後にはGlyを除く全ての構成アミノ酸が検出された。o-Pheはこの方法によって調べた活性に対しても強い阻害を与えた。

ラット全脳から得た部分精製酵素は、反応初期の段階でPhe又はPheをN末端にもつペプチドを遊離させ、続いてSer、Pro又はそれらをN末端にもつペプチドを遊離させることから、この部分精製酵素のBK分子切断位置は次のように推定された。



また、o-Pheはこの部分精製酵素に対して強い阻害作用を示した。なお、C末端のArgの遊離はBK自身がN末端にArgをもつことから、この方法では明らかにできなかった。

この様にこの部分精製酵素には数種のBK分解酵素の存在が予想されたので、次にDEAE-セルロースにより更に精製を進めた。

第三章 脳内ブラジキニン分解系酵素の分離とその代謝物の同定

第二章で得られた部分精製酵素をDEAE-セルロースに吸着させ、溶出緩衝液のNaCl濃度を最初の30mMから50, 70, 100, 150mMと段階的に上げると、まず70mMで強い活性が溶出され、このものを分画A、次いで100mMおよび150mMで若干の活性が溶出され各々分画B, Cとした。これらは各々ホモジテートからは122, 39, 11倍に精製された。これらの分画とBKの反応液の一部をダンシル化し、シリカゲル薄層板上でその反応生成物の同定を試みると、分画AはBKを分解してArg-Pro-Pro-Gly-PheおよびSer-Pro-Phe-Argの2種のペプチドを遊離させた。分画BについてはArg, PheおよびPhe-Argの確認はできたが、他の2つのスポットの確認は困難であった。また分画Cの反応液中には全てのBK構成アミノ酸が検出された。

次いで第二章で用いたキナーゼ阻害剤を添加し反応後、クロマトグラム上の蛍光強度を目測すると、いずれの分画においてもo-Phe添加反応液中にはBKがそのまま残り、強い阻害作用が確認された。DDCは中程度の阻害を、8-OHQは無影響であった。分画A, BおよびCのうちで比活性が最も強く、かつ単一の切断位置を示した分画Aについてその活性を化学的に定量すべく次のような実験を行った。

第四章 ブラジキニン分解酵素活性の化学的定量法

微量のペプチド又はアミノ酸を検出し得るダンシル化法にはDNS-OHとDNS-NH₂が副産物として生じる。とくに前者の発する蛍光は強く、従来の展開溶媒によればペプチド又はアミノ酸のダンシル体と重なることが多く定量は困難であった。そこでこれらの副産物を反応生成物と完全に分離し得る溶媒を探した結果、トルエン：モノクロロエタノール：25%アンモニア水＝6：10：0.5 (V/V)により良い分離能を得た。蛍光クロマトスキャナー (Shimadzu CS-910) を用いて励起波長360nm、蛍光波長500nmで各スポットの蛍光強度を同時に展開した既知濃度のペプチドのそれと比較することにより、BKおよび反応生成物の量を求めた。

本法を用いた場合、ペプチドの薄層板上での最少検出限界は0.25 n moleであり、1.0 n moleまでの直線関係が得られた。酵素反応時に分画Aのタンパク量を変化させると1.25 μgまで活性は直線的に増加したので、このタンパク量を用いて反応の経時的变化を追うとBKの分解およびペプチドの生成は約20分間は直線的に進み、その後は徐々に減少した。BKの濃度を変化させ、その結果をLineweaver-Burkの方法でプロットすると、分画AのBKに対するkm値は0.1mM、Vmaxは397 n mole/mg protein/minの値を得た。

BK分解酵素活性の化学的定量法について過去にはアミノ酸分析器などを用いた報告⁵⁾がみられるが、本法は操作が簡単であり、分析時間が短いという利点をもつ。次に本法を用いて得られた分画Aの性質について生物学的方法により得られた成績と比較した。

第五章 化学および生物学的方法によるブラジキニン分解酵素の性質の比較

いずれの方法を用いても分画Aの至適pHは中性域にあり、o-Pheにより強い阻害を受けた。しか

し、生物学的方法において、EDTAは用量に依存しない活性化を示し、SH化合物は低濃度において活性化を示した。一方、化学的方法では、EDTAは何ら活性に影響を与えず、SH化合物は活性化を示した。また化学的方法においてアンジオテンシン変換酵素の阻害剤であるSQ14225は高濃度においても分画Aを阻害しないという成績が得られたが、この成績はSQ14225のもつキニン増強作用のために生物学的方法では得られなかった。同様のことがSer-Pro-Phe-Argの分画Aに対する影響を検討した際にもみられ、このペプチドのBKによる回腸収縮増強作用のために、生物学的方法では高濃度域での影響が検討できなかった。このように平滑筋の収縮に影響を与える薬物の分画A活性に対する影響を検討するには生物学的方法には限界があった。

分画A様の活性は脳以外に心臓、腎臓にも見い出されており、⁶⁾ これらの酵素の性質を生化学的に比較検討したり、それらの組織における種々の薬物、とくに平滑筋に何らかの影響を与える薬物などの作用を検討する上にも今回示した化学的方法は有用な手段になり得ると考える。

結 論

BKの中枢作用に関してはRocha e Silvaらが家兔にBKを脳室内投与して不動状態すなわちカトニアの状態を報告⁷⁾して以来、数多くの報告がみられるが、ラット自発脳液に対する作用を検討し、キナーゼ阻害剤の前処置によりその作用が延長する成績を得たのは初めてである。一方、ラット脳には3種のBK分解酵素活性が存在し、これらが*in vitro*でo-Pheにより強い阻害を受けたことから、前述の中枢作用の延長はBKの分解阻止によって起っていることが示唆された。

BK構成ペプチドフラグメントに薬理活性のあることはすでに報告されている²⁾が、今回精製した酵素によりこれらのフラグメントが脳内で遊離し得ることは、分画A, B, CのBK分子切断位置から容易に推定し得る。これらのことは、BKの中枢作用におけるその分解活性の生理的役割というものが、単にBKの不活性化ということだけにとどまらず、生理活性を有する代謝産物を産生することにより、BKの作用を修飾したりあるいは全く異なった生理作用を惹起するという可能性をもつことから、非常に重要な意義をもつと考えられる。

BK構成ペプチドフラグメントにはこれらの中枢作用の他にBKによる平滑筋収縮を増強するという報告⁸⁾もあり、これらを併せて考えると、BK分解活性の測定を生物学的手段にのみ依存することは、以前より指摘があったように一考の余地がある。事実、キナーゼの性質を生物学的方法により検討した成績には種々の相異点のあることがこのことを裏づけている。我々も今回用いた化合物のうち、EDTAには用量に依存しない活性化がみられた。このような現象は化学的方法で酵素活性を測定した成績にはみられなかった。

生物学的方法は、BKの量の変化は鋭敏に追跡し得ても、その代謝物に関する知見が得られないという点で十分なものとは言えない。この意味でも今回考案した化学的方法は操作の簡便性あるいは感度のうえからも充分使用に耐え得る方法であり、今後の研究に寄与できるものと考えられる。

参考文献

- 1) Correa, F. M. A., Innis, R. B., Uhl, G. R. and Snyder, S. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76(3), 1489 (1979)

- 2) Okada, Y., Tsuchiya, Y., Yagyu, M., Kozawa, S. and Kariya, K., *Neuropharmacology* **16**, 381 (1977)
- 3) Graeff, F. G., Pela, R. and Rocha e Silva, M. Br. *J. Pharmac.* **37**, 723 (1969)
- 4) Iwata, H., Shikimi, T., Iida, M. and Miichi, H. *Japan. J. Pharmacol.* **20**, 80 (1970)
- 5) Camargo, A. C. M., Shapanka, R. and Greene, L. J., *Biochemistry* **12**, 1838 (1973)
- 6) Cicilini, M. A., Caldo, H., Berti, J. D. and Camargo, A. C. M., *Biochem. J.* **163**, 433 (1977)
- 7) De Silva, G. R. and Rocha e Silva, M., *Europ. J. Pharmacol.* **15**, 180 (1971)
- 8) 亀山 勉, 佐々木健一, 鍋嶋詢三, *薬学雑誌* **90**(8), 1006 (1970)

論文の審査結果の要旨

本論文は中枢神経系のブラジキニン分解酵素の性質を検討したものであり、とくに脳内ブラジキニンの定量法につきすぐれた化学的方法を開発したものである。従って薬学博士の学位を授与するに値するものであると考える。