

Title	神経膜adenylate cyclaseの活性調節機構に関する研究
Author(s)	李, 英培
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33195
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)	李 英 培
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 5636 号
学位授与の日付	昭和 57 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 1 項該当
学位論文題目	神経膜 <i>adenylate cyclase</i> の活性調節機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

生体内情報伝達機構に cyclic AMP が 2nd メッセンジャーとしての役割を有することが知られている¹⁾ すなわち、ある種のホルモンは cyclic AMP の合成酵素である *adenylate cyclase* (AC) を活性化させ、細胞内 cyclic AMP の増加を介してその作用の発現する機構が確立している。脳においても神経伝達機構に cyclic AMP の関与することが明らかにされつつある²⁾

近年、肝や赤血球などの AC の調節に関して多くの知見が集積され、*guanine nucleotide regulatory protein* がその活性調節に関与することが示された³⁾ また、AC は膜酵素であり、膜の状態変化によりその活性の影響されることも注目されている。たとえば、膜の流動性⁴⁾ および膜リン脂質のメチル化反応⁵⁾ がホルモンによる AC の活性化に関与すること、さらに、*phospholipase* や *protease*^{8,9)} の膜修飾により AC 活性の変動することなどが報告されている。このように生体膜は AC のための単なる場を提供するだけでなく、膜の構造あるいはその構成成分であるタンパク質や脂質が AC 活性に対して何らかの役割を有するものと思われる。

一方、脳の AC については *calmodulin* による調節の可能性が指摘されている¹⁰⁾ にすぎず、AC 活性と膜の状態との関連についての知見はほとんどない。そこで、神経膜 AC の活性調節における膜の動態あるいは膜構成の役割を知る目的で本研究に着手した。

AC 活性は SH 阻害剤で抑制されることから、AC 活性に SH 基が必要であることが示されている¹¹⁾ しかしながら、AC 活性調節における膜 SH 基の役割については不明である。そこで、AC 活性における膜 SH 基の役割について検討した。さらに、その過程で膜脂質の過酸化により AC が活性化され

ることを見出したので、AC活性における脂質、とくに不飽和脂肪酸の役割についても検討を加えた。

本 論

第1章 Adenylate cyclase活性における膜タンパクSH基の役割

近年、酸化型グルタチオン (GSSG) が膜タンパクSH基と disulfide を形成した mixed disulfide (GSS-protein) の存在が種々の組織で見い出されている。¹²⁾ また、GSS-proteinの形成により種々の酵素活性が調節される可能性が考えられている。¹³⁾ そこで、ラット線条体dopamine (DA) 感受性ACに対するGSSGの作用について検討した。DAは線条体ホモジネートのAC活性を増加させるが、2.5mM GSSGが存在するとbasal活性およびDAによる活性化は約50%阻害された。線条体顆粒分画を前処置した場合にもACの不活性化がみられ、標品中のGSS-protein量は著明に増加していた。SH化合物であるdithiothreitol (DTT) はGSSGによるGSS-protein量の増加とともにAC活性の阻害をcontrol値に回復させた。すなわち、GSSGはGSS-proteinを形成することによりACを不活性化させることが明らかとなった。GSSGによる阻害効果は脳皮質粗シナプス膜 (M_1 分画) のACについても同様にみとめられた。

次に膜SH基を酸化する Cu^{2+} ¹⁴⁾の作用を検討したところ、 Cu^{2+} は低濃度で M_1 分画のAC活性を阻害した ($IC_{50}=1\mu M$)。 Cu^{2+} で処置した M_1 分画ではACの不活性化とともに膜SH基の減少がみられ、DTTによりこの効果は消失した。以上の結果は膜SH基の酸化および還元によりAC活性が調節される可能性を示すものである。

第II章 神経膜の脂質過酸化によるadenylate cyclaseの活性化および可溶化

Cu^{2+} によるACの不活性化とそれに対するSH化合物の効果を検討する過程で、 Cu^{2+} とDTTが共存すると Cu^{2+} による阻害が消失するだけでなく逆に著明な活性化のおこることを見出した。さらに、 Cu^{2+} よりも Fe^{2+} が強力なAC活性化作用を有していたので、 Fe^{2+} +DTTの作用について検討を加えた。

Fe^{2+} +DTTによるACの活性化は酵素標品である M_1 分画とのpreincubation timeに依存しており、10分間のpreincubationで約4倍の活性化がみられた。 Fe^{2+} が脂質過酸化をひきおこす因子として知られていることを考慮し、膜脂質の過酸化に対する Fe^{2+} +DTTの効果を調べた。 Fe^{2+} +DTTは反応時間に依存して著明な脂質過酸化をひきおこした。AC活性化に対する Fe^{2+} およびDTTの濃度反応曲線は脂質過酸化のそれと一致していた。 Fe^{2+} +DTTによるACの活性化は過酸化の阻害剤であるN-N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD) の存在下もしくは N_2 条件下ではみられなかった。これらのことより、 Fe^{2+} +DTTは膜脂質の過酸化を介してACを活性化することが明らかとなった。AC以外の M_1 分画の Mg^{2+} -ATPase, Na^+ - K^+ -ATPase, 5'-nucleotidase, acetylcholinesterase およびphosphodiesterase (PDE) は脂質過酸化により活性化されなかった。

Liver plasma membranes, cardiac sarcolemma およびerythrocyte ghostsなどの末梢のACは脂質過酸化により活性化されなかった。すなわち、脂質過酸化によるACの活性化は神経膜に特異的であることが判明した。

脂質過酸化の膜構造に与える影響を知るためM₁分画の濁度を測定した。Fe²⁺+DTTは反応時間に依存して脳および肝の膜の濁度を減少させた。なお、DPPDはこの濁度の減少を消失させた。したがって、脂質過酸化により膜構造が変化すること、および膜が可溶化される可能性が考えられた。そこで、過酸化によるACの可溶化について検討を加えた。

Fe²⁺+DTTは牛脳の膜分画からAC活性および膜タンパクを約60%可溶化させた。この可溶化はDPPDにより阻害された。可溶化されたACはNaF, Gpp (NH) p およびcalmodulinにより活性化されず、本酵素標品にはguanine nucleotide regulatory proteinが失活あるいは消失している可能性が考えられた。種々の膜酵素のうち、AC以外にthiamine diphosphataseとPDEがFe²⁺+DTTにより可溶化された。

膜標品としてラット大脳皮質M₁分画を用いても同様の結果が得られたが、liver plasma membranesのAC活性はFe²⁺+DTTにより可溶化されなかった。脂質過酸化により脳M₁分画のphosphatidyl-ethanolamineが特異的に40%減少した。

第三章 Adenylate cyclase活性における高級不飽和脂肪酸の役割

脂質過酸化はリン脂質の不飽和脂肪酸が酸化され、脂肪酸hydroperoxideが形成されることである¹⁵⁾したがって、脂質過酸化によるACの活性化に不飽和脂肪酸あるいはそのhydroperoxideの関与する可能性が考えられる。そこで、M₁分画のAC活性に対する高級不飽和脂肪酸の作用を検討した。

不飽和脂肪酸であるアラキドン酸、リノール酸およびオレイン酸は低濃度(50μM)でACを活性化し、高濃度では逆に阻害する二相性の作用を示した。また、リノール酸で処置した場合にもみられた。なお、阻害のみられた標品では膜流動性の増加を伴っていた。

一方、低濃度のリノール酸によるACの活性化はリノール酸を大豆lipoxygenaseと反応させることにより著明に増大した。また、この活性化はhydroperoxideの生成量と平行していた。さらに、lipoxygenaseと反応したリノール酸のうち、未反応のリノール酸を除去して調製したlipoxygenase系の代謝物はAC活性を増加させた。しかしながら、酵素標品としてliver plasma membranesを用いた場合、ACの活性化はみとめられなかった。

脳におけるlipoxygenaseの存在は知られていなかったが、リノール酸を基質としてlipoxygenase活性を検索したところ、脳にその活性が存在することを発見した。このことは脳内で不飽和系脂肪酸のlipoxygenase系の代謝物が生成され、それがACの活性化をおこす可能性を示すものである。

結 論

1. GSS-proteinの形成によりACが不活性化されること、およびAC活性が膜SH基の酸化・還元により調節される可能性が示された。
2. 膜脂質の過酸化によりACが活性化および可溶化されることを見出した。また、この現象が神経膜に特異的であることを明らかにした。
3. 不飽和脂肪酸はACの活性化と不活性化の二相性の作用を有していた。なお、不活性化には膜流動性の増加が伴っていた。
4. 脳内で不飽和脂肪酸のlipoxygenase系の代謝物が生成され、神経膜ACの調節に関与すること

が示唆された。

引用文献

- 1) Robison, G. A., Butcher, R. W., and Sutherland, E. W. (1971) Cyclic AMP (Academic Press, New York)
- 2) Greengard, P. (1976) Nature **260**, 101—108.
- 3) Ross, E. M., and Gilman, A. G. (1980) Ann. Rev. Biochem. **49**, 533—546.
- 4) Hanski, E., Rimon, G., and Levitzki, A. (1979) Biochemistry **18**, 846—853.
- 5) Hirata, F., Strittmatter, W. J., and Axelrod, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 368—372.
- 6) Pohl, S. L., Krans, H. M. J., Kozyreff, V., Birnbaumer, L., and Rodbell, M. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 4447—4454.
- 7) Rubalcave, B., and Rodbell, M. (1973) J. Biol. Chem. **248**, 3831—3837.
- 8) Wallach, D., Anderson, W., and Pastan, I. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 24—26.
- 9) Anderson, W. B., Jaworski, C. J., and Vlahakis, G. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 2921—2926.
- 10) Cheung, W. Y., Lynch, T. J., and Wallace, R. W. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. **9**, 233—251.
- 11) Spiegel, A. M., Brown, E. M., and Auerbach, G. D. (1976) J. Cyclic Nuc. Res. **2**, 393—404.
- 12) Isaacs, J., and Binkley, F. (1977) Biochim. Biophys. Acta **497**, 192—204.
- 13) Ernest, M. J., and Kim, K. H. (1973) J. Biol. Chem. **248**, 1550—1555.
- 14) Hemmerich, P. (1966) Biochemistry of Copper (Eds. Peisach, J., and Blumberg, W. E.), p. 15 Academic Press, New York.
- 15) May, H. E., and McCay, P. B. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 2296—2305.

論文の審査結果の要旨

本論文は脳adenylate cyclase活性が膜脂質の過酸化により活性化されることを明らかにし本酵素活性に対する脂質の役割について検討を加えたもので薬学博士の称号を授与するに値するものである。