

Title	海馬興奮性アミノ酸神経における Zn の機能的役割に関する神経薬理学的研究
Author(s)	木原, 哲郎
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37510">https://hdl.handle.net/11094/37510</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 【 4 】

氏名・(本籍)	木 原 哲 郎
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 9 2 7 1 号
学位授与の日付	平成 2 年 6 月 27 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	海馬興奮性アミノ酸神経における Zn の機能的役割に 関する神経薬理学的研究
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 三村 務 教授 三浦 喜温

## 論 文 内 容 の 要 旨

L-グルタミン酸 (Glu) は、中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質として作動しているアミノ酸であり、記憶、学習等の高次神経機能の他、痙攣、脳虚血等の神経疾患とも関連の深い物質であると報告されている。海馬苔状線維 (MF, mossy fiber) は興奮性アミノ酸 (EXAA) 神経作動性であると考えられているが、その終末部位には高濃度の亜鉛 ( $Zn^{2+}$ ) が存在していることが知られている。最近 MF の終末部位で神経興奮に応じた  $Zn^{2+}$  の取り込み及び遊離の系が存在していることが発見され、 $Zn^{2+}$  の神経伝達物質あるいは神経伝達修飾物質としての役割が提唱されている。しかしながら、MF において  $Zn^{2+}$  が EXAA 神経系と如何なる機能的関連性を有しているかについては未だ不明である。そこで  $Zn^{2+}$  の海馬神経における動態から、EXAA 神経の機能的役割を明確にすることを目的として、ラット海馬標本を用い、 $Zn^{2+}$  および EXAA の相互の神経薬理学的検討を行った。 $Zn^{2+}$  は海馬切片からの 40 mM KC1 (high- $K^+$ ) 及び veratrine (7  $\mu$ g/ml) による脱分極性 [ $^3H$ ] Glu の遊離を濃度依存的に抑制し、100  $\mu$ M の  $Zn^{2+}$  でそれぞれ 45% 及び 48% の有意な抑制が認められた。しかしながら海馬切片からの [ $^3H$ ] GABA 及び [ $^3H$ ] ACH の脱分極性刺激による遊離は、100  $\mu$ M の  $Zn^{2+}$  で全く影響を受けなかった。 $Zn^{2+}$  は海馬  $P_2$  からの [ $^3H$ ] Glu をも抑制した。二価カチオンの中では  $Fe^{2+}$  が有意に [ $^3H$ ] Glu の遊離を抑制したが、その程度は  $Zn^{2+}$  よりも弱く、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  はいずれも 100  $\mu$ M で無作用であった。 $Zn^{2+}$  はまた海馬シナプス膜への [ $^3H$ ] Glu 結合を basal 及び  $Ca^{2+}/Cl^-$  存在下の何れの場合に対しても著明に阻害した。ラット脳内における  $Zn^{2+}$  の存在様式について基礎的検討を行った結果、 $Zn^{2+}$  は海馬において、且つその上清可溶性画分に最もその含量が高かった。海馬上清画分の Sephadex G-75 によるゲル濾過パターンから、 $Zn^{2+}$  は大部分が蛋白と結合した形で存在することが

示唆され、HPLC イオン交換クロマトグラフィーによる結果、脳内において  $Zn^{2+}$  結合蛋白が海馬に比較的多く存在し、大脳皮質、脳幹では低量であった。また、海馬上清蛋白の  $Cd^{2+}$  及び  $Cu^{2+}$  に対する結合能力はいずれも  $Zn^{2+}$  のそれよりも弱いものであった。海馬  $Zn^{2+}$  結合蛋白をさらに HPLC ゲル濾過で分離すると、3つのピークが観察され、概算分子量は 90, 32 及び 10K dalton であった。海馬上清画分を  $37^{\circ}C$  で 30分 incubation し、氷冷後、遠心限外濾過法により濾液中の  $Zn^{2+}$  含量をフレイムレス原子吸光分光光度計にて測定すると、incubation しない場合に比較して約 90%、有意に増加していた。この現象は 15-120分の incubation ではほぼ同程度認められ、上清中の蛋白濃度に依存していること、trypsin 及び熱処理で著明に増加することより、濾液中の  $Zn^{2+}$  の増加は蛋白から解離した  $Zn^{2+}$  を反映しているものと考えられた。海馬 MF は EXAA 神経作動性であるので、EXAA および関連のアミノ酸を海馬上清画分に添加して  $Zn^{2+}$  の解離に対する効果について検討した。30分の incubation で  $Glu$  ( $100\mu M$ ) は  $Zn^{2+}$  の解離を約 35% 有意に促進した。60-120分でも促進傾向がみられた。しかしながら  $D$ -glutamate は  $100\mu M$  で  $Zn^{2+}$  の解離に全く無影響であった。Aspartate (Asp), Cysteate は、ともに  $100\mu M$  で有意な促進作用を示し、EXAA 神経受容体サブタイプの agonist はいずれも低濃度で強い  $Zn^{2+}$  解離促進効果を惹起した。促進効果の強度は、quisqualic acid (QA) >  $N$ -methyl- $D$ -aspartic acid (NMDA) > kainic acid (KA) の順であった。抑制性アミノ酸とされる GABA 及び Taurine はいずれも  $100\mu M$  で  $Zn^{2+}$  の解離に作用を及ぼさなかった。NMDA 受容体 antagonist とされる  $Mg^{2+}$  の解離に作用を及ぼさなかった。NMDA 受容体 antagonist とされる  $Mg^{2+}$  は  $100\mu M$  で  $Glu$  による海馬上清画分からの  $Zn^{2+}$  解離をやや抑制したが有意な効果ではなかった。また APV ( $D$ -2-amino-5-phosphonovaleric acid) も  $100\mu M$  で  $Glu$  の効果に無作用であった。海馬膜画分からの  $Zn^{2+}$  の解離は  $37^{\circ}C$  でインキュベートしても明白にはみられず、また  $Glu$  ( $100\mu M$ ) を添加しても何ら変化は認められなかった。 $Zn^{2+}$  キレート薬である dithizone (DITH) は海馬切片からの脱分極性 [ $^3H$ ]  $Glu$  遊離を  $1\mu M$  から有意に促進し、 $10\mu M$  では約 2 倍著明に増加させた。この作用は外液中の  $Ca^{2+}$  の有無にかかわらずみられた。また、 $o$ -phenanthroline, tetraethylenepentamine, diethyldithiocarbamate はいずれも  $10\mu M$  で high- $K^{+}$  による [ $^3H$ ]  $Glu$  遊離に何ら影響しなかった。DITH ( $20\mu g$ ) をラット海馬 MF 付近に両側性に注入すると、海馬内  $Zn^{2+}$  及び  $Glu$  の含量が有意に減少することが認められた。しかしながら、他の metals, amino acids, monoamines 及び acetylcholine の含量は対照群に比して変化しなかった。また、DITH ( $100mg/kg, i. p.$ ) をマウスに投与すると、4時間後、脳内  $Glu$  及び Asp レベルが有意に減少することがみられた。以上要約すると、①  $Zn^{2+}$  は海馬興奮性アミノ酸神経系に対し、脱分極性  $Glu$  の遊離を特異的に抑制し、海馬シナプス膜への  $Glu$  結合を阻害したことから、海馬内因性  $Zn^{2+}$  は興奮性アミノ酸神経を調節する作用を有することが示唆された。②海馬に局在する  $Zn^{2+}$  は大部分蛋白結合性であり、その結合蛋白は HPLC 分析から海馬に高濃度存在し、 $Cu^{2+}$  及び  $Cd^{2+}$  に対する結合力は  $Zn^{2+}$  よりも弱かった。③海馬  $Zn^{2+}$  結合蛋白は、生理的条件下で  $Zn^{2+}$  を解離しうるものであり、特徴的なことは、その解離が興奮性アミノ酸により著明に促進されること、且つ解離に過程立体特異性が認識されることであった。④  $Zn^{2+}$  キレート薬, dithizone は海馬からの脱分極性  $Glu$  遊離を著明に促進し、また脳内投与により、 $Zn^{2+}$  及び  $Glu$  が特異

的に減少したことから, dithizoneは海馬興奮性アミノ酸神経に選択的に作用しているものと考えられる。したがって, 海馬に局在する  $Zn^{2+}$ は興奮性アミノ酸神経と密接な機能的関連性を有していることが示され,  $Zn^{2+}$ と興奮性アミノ酸が相互に神経機能を調節している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は海馬に局在する  $Zn^{2+}$ が興奮性アミノ酸神経と密接な機能的関連性を有し,  $Zn^{2+}$ と興奮性アミノ酸が相互に神経機能を調節している可能を示唆したものであり, 薬学博士の称号を授与するに値するものである。