

氏 名 (本籍)	いずみひろし 和 泉 博 之
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 5 1 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 門 課 程	東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科 (博 士 課 程) 薬 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on synaptosomal adenylate cyclase and its stimulation by the supernatant from rat cerebral cortex (ラ ッ ト 大 腦 皮 質 に お け る シ ナ プ ト ソ ー ム adenylate cyclase と, そ の 上 清 に よ る 活 性 化 に 関 す る 研 究)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 小 澤 光 教 授 橋 本 嘉 行
 教 授 曳 野 宏

論 文 内 容 要 旨

Adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP) は天然に広く分布し、数種のバクテリア、粘菌類、高等植物、殆どすべての動物組織に検出されている。それぞれの標的組織において多くの polypeptide や biogenic amine により cyclic AMP の産生が代謝あるいは生理的反応よりも先んじて増加することから Sutherland ら (1965) はホルモン作用の second messenger としての cyclic AMP の役割を提出した。

Robison ら (1971) は cyclic AMP 系がホルモン反応の mediator となっていることを確認するには、第 1 に target 組織から調整した adenylate cyclase 活性がそのホルモンの添加により制御されるべきこと、第 2 に生きた target 細胞中にみられる cyclic AMP 量はそのホルモンの刺激に応じて変動すべきこと、すなわち cyclic AMP の組織レベルの変動が時間的にみて、そのホルモン反応の発動に先んじておきてこなければならぬ。第 3 に、そのホルモンの効果が cyclic AMP 分解酵素の阻害物質により増強されること。第 4 に生きた target 組織、あるいはそのホモジネートに添加された外因性 cyclic AMP、またはその誘導體 (dibutyryl 型など) により同様にホルモンレスポンスが再現されるべきこと。以上 4 つの規準を満足しなければならないと報告している。

Fat, liver その他多くの組織ではこの 4 つの規準を満足する報告がなされている。一方脳標本においては、epinephrine norepinephrine histamine, serotonin などにより cyclic AMP 量が著しく増加することは脳切片を用いた実験で数多くの研究者により報告されているが、脳 broken cell preparation ではホルモン反応が低下ないしは消失し cyclic AMP の増加がみられないと報告されている。(William ら 1969)

これらの事実はホルモンによる adenylate cyclase の活性化に必要な何らかの essential substance (s) が組織の homogenization や fractionation 中に膜より遊離するためではないかと推定される。現在までに報告されている adenylate cyclase 活性測定は酵素標本を buffer 溶液に懸濁して測定している。今回ラット大脳皮質を酵素標本として用い、同組織より得た $105,000 \times g$ supernatant (supernatant) 共存下における adenylate cyclase 活性と supernatant の非共存下での adenylate cyclase 活性を比較検討してみた。

1. $105,000 \times g$ supernatant のラット大脳皮質 adenylate cyclase に対する影響

Supernatant 存在下、非存在下での大脳皮質の adenylate cyclase 活性を測定した結果、supernatant 中には adenylate cyclase 活性は全くみられないにもかかわらず crude mitochondrial fraction は supernatant 添加により cyclic AMP 値が著しい増加がみられた。この crude mitochondrial fraction をさらに myelin, synaptosomes, mitochondria に sucrose density gra-

dient 法にて分画後各分画の活性を supernatant 存在下, 非存在下にて測定した。supernatant 無添加では synaptosomes が他の 2つの分画よりもやや高い活性を有しているにすぎないが supernatant 添加により synaptosomes が他の 2つの分画より著しい adenylate cyclase 活性の増加を示した。

これらの事実は synaptosomal adenylate cyclase が supernatant 中の何らかの因子により調節を受けていることを暗示している。一方 synaptosomes は生きた動物中における synaptending の生化学的組成と類似した性質を有することから, 神経系の動的過程を in vitro で解明するために多くの研究者によって利用されるようになってきた。また cyclic AMP が神経組織で重要な役割をなしていると報告されていることから以下の章で synaptosomal adenylate cyclase の諸性質と supernatant 中の stimulatory substance(s) について検討を加えた。

2. Supernatant 中の stimulatory substance(s) について

Supernatant を透析後 (24 hr 4×500 volumes), その効果を検討した結果, その活性化現象は全くみられなかった。このことは stimulatory substance が透析性物質であることを示している。supernatant を sephadex G-25 superfine にてゲルろ過法にて分画すると Vitamin B₁₂ (M.W. 1350) よりもやや遅く溶出してくることから分子量 1,300 以下の物質と推定される。また限外ろ過 (Ulvac ultra filtration cell, G-01T membrane) するとろ液には活性化現象がみられないことからこの stimulatory substance は 1,000 以上の物質と推定される。Supernatant を熱処理 (100°C, 10min) を行っても, その活性化は消失しないことから熱安定性物質と思われる。stimulatory substance による synaptosomal adenylate cyclase 活性化は Mg イオンが必須であり約 4 mM が最適である。またこの活性化は synaptosomal adenylate cyclase の K_m 値は, 殆ど変化することなく V_{max} 値のみを著しく増加した。このことは基質 ATP との親和性を増加するのではなく反応速度を増大することによって起る活性化と思われる。

Supernatant 中の cyclic AMP phosphodiesterase 活性は synaptosomal adenylate cyclase 活性よりも遥かに高いにもかかわらず, adenylate cyclase 系に添加しても cyclic AMP 値を減少することなく, 逆に cyclic AMP 値を著しく増加することは synaptosome の adenylate cyclase により生成した cyclic AMP が receptor protein などと結合あるいは cyclic AMP phosphodiesterase により加水分解されにくい部分に存在していること, あるいは supernatant 中の cyclic AMP phosphodiesterase の K_m 値が高いためによるものと思われる。

3. Stimulatory substance の作用部位

Adenylate cyclase 活性測定は Krishna らの方法を少し改良して行った。即ち ³H-ATP を基質として生成した ³H-cyclic AMP を Ba-Zn 沈澱法と Dowex 50W カラムにより他の nucleotides から分離生成してその radioactivity を測定した。生成した ³H-cyclic AMP から adenylate

cyclase 活性を計測しているために、supernatant 中の stimulatory substance(s) が adenylate cyclase を直接活性化しているのか、あるいは基質 (ATP) 値や、生成した cyclic AMP を加水分解する酵素を (cyclic AMP Phosphodiesterase) に影響を与え 2 次的に cyclic AMP 量を増加しているのではないかということが考えられることから supernatant あるいは boiled supernatant の synaptosomal ATP ase synaptosomal cyclic AMP phosphodiesterase に対する効果を検討した。その結果、ATP ase は約 20% 阻害、cyclic AMP phosphodiesterase は約 1.5 倍活性化された。Synaptosomal cyclic AMP phosphodiesterase 活性が阻害ではなく逆に活性化されることから supernatant の adenylate cyclase assay 系への添加による cyclic AMP 形成の増大は分解酵素の阻害によるものではないと推定される。ATP ase 阻害と cyclic AMP 形成増大が相関関係があるかどうか調べる目的で典型的 ATP ase 阻害剤でありかつ adenylate cyclase の活性化剤である sodium fluoride を用いてそれぞれの assay 系に添加してその効果をみた。ATP ase 阻害は濃度に比例して増大するが、adenylate cyclase 活性化は 5 mM で maximum であった。ATP ase 阻害による ATP 直の増大が必ずしも cyclic AMP 形成を増大しないことから supernatant の著しい cyclic AMP 形成増大が ATP ase の 20% 程度の阻害に基因している可能性は少ないと思われる。現在他の可能性を完全に否定することはできないが、おそらく supernatant 中の stimulatory substance(s) による cyclic AMP 形成増大は synaptosomal adenylate cyclase への直接的活性化によるものと思われる。

4. 種々薬物による効果

Norepinephrine, histamine, dopamine, serotonin らの neurotransmitter は supernatant 共存下における synaptosomal adenylate cyclase に対しても促進効果は全くみられなかった。Sodium fluoride (NaF) と stimulatory substance(s) は相加的に adenylate cyclase を活性化した。SH 基反応試薬 P-chloromercuribenzoate (P-CMB) により、synaptosomal adenylate cyclase はその濃度と比例して次第に活性が消失してくることから、SH 基が adenylate cyclase 活性発現のために必須の反応基と考えられる。Methylmercury が rat 肝 plasma membrane の adenylate cyclase の強力な阻害作用を有すると報告されているが今回の P-CMB の阻害作用を考えると synaptosomal adenylate cyclase を methylmercury により阻害される可能性を示している。Boiled supernatant 存在時における P-CMB の synaptosomal adenylate cyclase 阻害の濃度の違いから stimulatory substance(s) もまた SH 基を有する可能性を示している。synaptosomes の SH 基は P-CMB により一度反応してしまうと、この反応は SH 基剤 (dithioerythritol) の添加により回復することはない。これらの結果は adenylate cyclase の catalytic subunit に sensitive な SH 基が存在していることを暗示している。Synaptosomal adenylate cyclase は SH 基を有する cysteine, coenzyme A, glutathione はすべて adenylate cyclase を

活性化し、その内 cystein が最もその作用が強かった。

Caイオンの adenylate cyclase に対する効果は臓器により異なる。Synaptosomal adenylate cyclase はCaイオン特異的キレート剤である EGTA (ethylene glycol bis (β -aminoethylether) -N,N,N-N-tetracetic acid) により boiled supernatant 存在時, 又非存在時共に著しく活性化された。この現象はmgイオンとCaイオンが adenylate cyclase 系において allosteric site で互い拮抗しているという報告と一致し EGTA によりCaイオンの低下により adenylate cyclase が活性化されたためと思われる。

Adenosine がラット肝 plasma membrane での adenylate cyclase に対し阻害作用があると報告されているが, synaptosomal adenylate cyclase に対しては adenosine, adenine, AMP, ADP の生理的と思われる低濃度では全く効果がなかった。さらに GTP, carbamylcholine など何ら効果はなかった。

5. Synaptosomal cyclic AMP phosphodiesterase の活性化について

すでに3.で述べたように synaptosomal cyclic AMP phosphodiesterase の boiled supernatant による活性の増大がみられた。これを adenylate cyclase stimulatory substance (s) と同様に sephadex G-25 superfine にてゲルろ過を行い, 各分画の synaptosomal cyclic AMP phosphodiesterase に対する効果をみると, adenylate cyclase の場合と同様の分画にて活性化がみられた。一方 sodium fluoride は adenylate cyclase のみを活性化し, cyclic AMP phosphodiesterase は活性化しないことからこの2つの酵素の活性化には何ら相関関々がないものと思われる。一方この stimulatory 分画は soluble supernatant 中の cyclic AMP phosphodiesterase は活性化しない。Imidazole は両方の cyclic AMP phosphodiesterase を活性化する。これらの結果はこの stimulatory substance (s) は Kakiuchi, Cheung, Teo らが報告している活性化因子とは異なるものと思われる。

ま と め

以上の結果より, ラット大脳中に synaptosomal adenylate cyclase を活性化する因子の存在が確認された。その活性化因子は透析性, 熱に対し安定性で, 分子量約 1,200 と推定される物質である。

近年, dopamine- β -hydroxylase の endogenous inhibitor, ATPase の endogenous inhibitor, smooth muscle の relaxing factor, collagen stimulatory factor などの低分子調節因子の存在が報告されており, その諸性質は, いずれも透析性, 熱に対し安定性の低分子で adenylate cyclase の活性化因子と類似した点が多い。

生体内, 特に脳内において, 代謝や神経伝達などに cyclic AMP は重要な役割をなしていることから adenylate cyclase の活性化因子は cyclic AMP 値の増減を調節し, 重要な役割を果している可能性が考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

ホルモン作用の second messenger をなす cyclic AMP を生成する細胞膜に存在する酵素 adenylate cyclase 活性に対するラット大脳皮質中に存在する活性物質の確定と、その性状に関する研究である。その内容は次の 5 部からなっている。

1. ラット大脳皮質 adenylate cyclase に対する supernatant の影響

大脳皮質の adenylate cyclase 活性が supernatant 非存在下では弱く、supernatant を添加すると著しく増大することを発見した。このことより synaptosomal adenylate cyclase が supernatant 中の何らかの因子により調節を受けているものと想定した。

2. Supernatant 活性因子の性状

活性因子が透析性物質であることが判ったので、種々の方法で分画を試みたところ分子量 1300 以下の物質と考えられ、また熱処理によっても活性が失われなことも証明された。さらに Mg^{+} が活性化に必須であり、synaptosomal adenylate cyclase の K_m 値は殆んど変化せず、 V_{max} 値のみ増加することから、基質 ATP と親和性を増すのではなく、反応速度を増加することによる活性化と推定された。

3. 活性因子の作用部位

Adenylate cyclase の直接の活性化か、あるいは c-AMP phosphodiesterase を阻害するか、または ATPase の活性化によって二次的に c-AMP が増加するのではないかと考えられるのでこの面の検討を行った。phosphodiesterase は逆に活性化され、ATPase は 20% 程度阻害されるが、この程度では c-AMP 生成には影響を与えないことが明らかとなり活性因子は直接作用によることを確認した。

4. 種々薬物による影響

活性因子に対する norepinephrine, histamine, dopamine, 5-HT などの影響を調べたが、殆んど作用はなかった。一方、有機水銀化合物の P-CMB は強い阻害作用を示し、さらに SH 基剤の添加でも回復しなかった。また adenosine, adenine, AMP, ADP, GTP など全く影響を与えなかった。

5. Phosphodiesterase の活性化

本活性因子は c-AMP phosphodiesterase も活性化するのでこの性質を調べたが、すでに知られている Kakiuchi らの得ている phosphodiesterase 活性化因子とは異なるものであることを知った。

以上よりラット大脳中の synaptosomal adenylate cyclase に対する活性化因子が supernatant 中に存在することを確認し、その諸性質を明らかにして、生理的にも重要な役割を果していることを示唆した。

きわめて有意義な知見であり、学位論文に値する。