

氏 名 (本籍)                    やま            もと            ひろ            たか  
山            本            裕            高

学 位 の 種 類                    医            学            博            士

学 位 記 番 号                    医   第   1 9 3 8   号

学 位 授 与 年 月 日                昭 和 6 3 年 2 月 2 4 日

学 位 授 与 の 要 件                学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和 5 8 年 3 月  
東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科  
博 士 課 程 前 期 2 年 の 課 程 修 了

学 位 論 文 題 目                    ヒト脳のグルタミン合成酵素：精製とその基礎的  
性状の検討

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教 授 岩 崎 祐 三            教 授 林            典 夫

教 授 小 暮 久 也

# 論文内容要旨

## 目 的

中枢神経では尿素サイクルが欠如するために、中枢神経組織のアンモニアは脳に最も豊富に存在するアミノ酸であるグルタミン酸と結合してグルタミンに変換されその毒性を失う。この反応を触媒するグルタミン合成酵素 (GS) はアンモニア代謝とグルタミン酸代謝の両方に深く関与する重要な酵素である。すなわちGSの一方の基質であるグルタミン酸は、TCA回路のアルファケトグルタル酸に変換可能なエネルギー中間体として存在する中枢神経組織の代表的アミノ酸であり、また興奮性アミノ酸としてシナプスより放出される神経伝達物質として知られる。しかも、時に excitotoxin として作用し、種々の神経疾患の発症の鍵となるとの考えが、最近一般化している。特に虚血性脳病変、てんかん、脊髄小脳変性症、アルツハイマー病の病因として興奮性アミノ酸の異常を指摘する報告もみられる。そこで本研究では、中枢神経組織のアンモニアの解毒と興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の不活性化を担うGSの組織病理学的研究への応用を目的としてヒトの脳から初めてGSを単一に精製し、生化学的性状と免疫組織化学的な局在の検討を行った。

## 方 法

GSの酵素活性の測定はアンモニアの代わりにヒドロキシルアミンを基質として使い、ガンマーグルタミルヒドロオキサメートの生成量を鉄イオンで発色させ吸光度を測定する方法で行った。また、酵素の精製には2例の剖検脳(45才男性と55才女性)の一部(前頭葉皮質と皮質下白質)と、ヒツジおよびラットの全脳を用いた。各々の脳からアセトンパウダーを作製し、各種のカラムクロマトグラフィを行ってそれぞれの脳よりGSを精製した。ヒトのGSはアセトンパウダーよりタンパク質の抽出、酸沈澱の後、ヒドロキシルアパタイト、アミノヘキシルセファロース、セファクリルS-300、および2',5'-ADPセファロースの各カラムクロマトグラフィの操作を行って精製した。また、ヒツジのGSも単一に精製した。精製したGSの酵素化学的性状を明らかにすると共に、ヒトおよびヒツジGSに対する抗体をそれぞれウサギを使って作製し、ヒト、ヒツジおよびラットGSの免疫学的交差性について検討した。また、ABC法を用いて、ヒトおよびラットの脳の免疫組織染色を行い、GSの局在について検討した。ラットは4%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドを含むMillonig'sリン酸緩衝液で15分間環流固定後、PBSで再還流して固定液を洗いだした。ヒトの剖検大脳皮質は、4%パラホルムアルデヒドないし60%エタノールで浸潤固定して免疫組織染色に用いた。

## 結果および考察

ヒト脳より精製した比活性 179.2 units/mg protein のGSはSDS-PAGEで分子量 44kの単一バンドを示し、ヒツジGSの43kとほぼ同じであった。免疫沈降法でヒトのGSはヒツジおよびラットのGSと免疫学的交差性が認められた。また酵素化学的特性として、ヒトGSはマグネシウムイオンによる著しい活性化が認められ、10 mMの濃度で最大の活性を示した。マグネシウムイオンは興奮性神経伝達物質の一つであるグルタミン酸のN-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体と非競合的に拮抗するとともに、グルタミンの合成を促進させてグルタミン酸を不活性化していることが推測された。マグネシウムイオン非存在下ではGSはほとんど酵素活性を示さないことからマグネシウムイオンを介したグルタミン酸の代謝調節系が存在するものと思われた。一方、GS活性はATP/ADPが1のときに50%阻害された。このことから高アンモニア血症のほか脳虚血などでも出現するAlzheimer II型グリアの成因の一つとしてエネルギー失調で増加するADPによるGS活性の阻害と組織のアンモニアレベルの上昇が推察された。抗ヒトGS抗体を用いた免疫組織化学ではヒトおよびラットの脳の星状膠細胞、特に大脳皮質と海馬では星状膠細胞の胞体のみならず、その突起にGSに対する強い反応性がみられた。このことは興奮性神経伝達物質としてシナプスより放出されるグルタミン酸がGSによって直ちにグルタミンに変換されていることを示唆するものであろう。また、間脳、脳幹や小脳では核周囲にのみGSの免疫反応がみとめられた。脳以外の組織では肝の中心静脈を囲む1-2層の肝細胞にも強い免疫反応が認められた。これはGSの特異的阻害剤メチオニンスルフォキシミン(MSO)が、2.5 mMの濃度で酵素活性を50%阻害することと併せて考察すると、MSOの投与でみられる高アンモニア血症が肝GS活性の阻害によることを裏付ける所見であり、全身的アンモニア代謝系においてもGSが重要な役割を果たしていることが推測された。

## 審査結果の要旨

中枢神経組織では尿素サイクルが欠如しており、中枢神経組織のアンモニアは脳に豊富に存在するグルタミン酸と結合しグルタミンに変換されてその毒性を失う。この反応の一方の基質であるグルタミン酸はTCA回路のアルファケトグルタル酸に変換可能なエネルギー中間体として存在する中枢神経組織の代表的なアミノ酸であるが、これはまた興奮性の神経伝達物質としての役割をはたしており、その異常は虚血性脳病変、てんかん、脊髄小脳変性症など種々の神経疾患の発現に関与していることが明らかにされつつある。つまり、この反応を触媒するグルタミン合成酵素（GS）は脳組織でのアンモニアの解毒と興奮性アミノ酸の不活性の鍵をにぎる重要な酵素である。この酵素については既に幾つかの研究が発表されているが、ヒトの脳から分離されたGSについての報告はない。本研究はヒトの脳からGSを単離精製し、その生化学的性状と免疫原性を他種動物のGSと比較するとともに、その中枢神経組織内分布を免疫組織学的に明らかにしたものである。

ヒト脳から分離された比活性 179.2 unit / mg proteinのGSはSDS-PAGEで分子量44 kの単一バンドを示し、免疫沈降法ではヒツジ、ラットのGSと免疫交差性がみられた。一方、ヒトGSはヒツジ、ラットのGSに較べてもその活性化にさいしてマグネシウムイオンへの依存度が高く、マグネシウム非存在下では酵素活性を殆ど示さず、10mMの濃度で最高の活性を示すことを明らかにした。またADPの増加により酵素活性が低下、ATP/ADPが1の場合に50%の阻害が見られたことからAlzheimer II型グリア出現の機序としてエネルギー失調にともなうADPの増加を推測している。抗ヒトGS抗体による免疫組織化学により、これが星状膠細胞に選択的に局在すること、更に大脳皮質、海馬では膠細胞の突起にも強い反応が見られるのに反し、間脳、脳幹、小脳などでは反応が核周囲に局限していることから、シナプスから放出されたグルタミン酸がその場で直ちにグルタミンに変換されている可能性を推測している。

本研究はヒト脳からのGSの単離、精製とその生化学的性状、抗原性に関する最初の論文であるのみならず、高アンモニア血症、excitotoxinによる脳障害の発現機序についても多くの重要な示唆を示すもので学位の授与に値する業績であると認める。