

脳下垂体とトランスアミナーゼ活性

I. 脳下垂体剔出のラット脳肝トランスアミナーゼ活性に及ぼす影響

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

東 漸

(昭和34年6月24日受稿)

1871年 Lovain¹⁾ が、ついで 1886年に Pierre Marie²⁾ が生体の成長と脳下垂体に関連があることを指摘し、1912年 Aschner³⁾ が脳下垂体剔出により幼若犬の発育の遅退することを認め、更に1921年 Evans & Long⁴⁾ が幼若ラットに牛の脳下垂体前葉エキスをあたえると、著名な成長促進をきたし成長促進物質が前葉に存在することを発見した。1944年にいたり Liら⁵⁾、Li & Evans⁶⁾、Wilhelmiら⁷⁾、Fischmanら⁸⁾ が成長ホルモンの結晶化に成功して以来脳下垂体と、蛋白代謝の関係は注目を集めてきた。内分泌の上位中枢として存在する脳下垂体からは、前葉から成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、性腺刺激ホルモン、黄体刺激ホルモン等が、又中間葉よりメラニン細胞刺激ホルモンが、後葉より Vasopressin, Oxytocin などが現在発見されており、それぞれ代謝あるいは酵素との関係について研究がなされている。

一方 Braunstein & Kritzman⁹⁾ が1937年 α -アミノ酸トランスアミナーゼを発見し、ついで Cohen¹⁰⁾ がアスパラギン酸-グルタミン酸トランスアミナーゼと、アラニン-グルタミン酸トランスアミナーゼの二つの系を実験的に証明して以来、トランスアミナーゼの種類とその基質特異性及び存在臓器の問題に関して種々の研究がなされてきた。即ち Rudman & Meister¹¹⁾ がトランスアミナーゼA、トランスアミナーゼBの所謂群特異性を明らかにし、Meister & Tice¹²⁾、Meister & Soberら¹³⁾ はグルタミン又はアスパラギンもトランスアミネーションすることを発見し、一塩基性アミノ酸と一塩基性ケト酸のトランスアミネーションを Rowsell¹⁴⁾、Rudman & Meister¹¹⁾、Sallach¹⁵⁾ が認め、更に α -アミノ酸のみでなく ω -アミノ酸も又トランスアミネーションすることを、脳肝

で Bessman⁶⁾ らおよび Roberts & Bregoff¹⁷⁾、腎で住田¹⁶⁾ がそれぞれ証明するなど、多くの研究があり、最近に至り近藤¹⁸⁾ は γ -アミノ酪酸は特別な系のトランスアミナーゼによりアミノ基の転移をおこすと推論しており、さらに Baxter & Roberts²⁰⁾ は牛の脳で γ -アミノ酪酸トランスアミナーゼを抽出したという。しかし脳下垂体ホルモンとトランスアミナーゼとの関係に就ては、まだほとんど知られていない。

私は蛋白質代謝のうち、特にトランスアミナーゼ活性と脳下垂体ホルモンとの関係に興味を抱き、脳及び肝に於けるアスパラギン酸、アラニン及び γ -アミノ酪酸と α -ケトグルタル酸よりのトランスアミネーションによるグルタミン酸生成と脳下垂体ホルモンの関係について、若干の検索をおこない新しい知見を得ることができたので報告する。

実 験

1. 実験動物及び飼育条件

Wister 系雄性未成熟ラット、体重 90~110g のものを使用し、田中式経外聴道法²¹⁾ により脳下垂体剔出を行い、剔出後 4~6 日目のものを使用した。なお脳下垂体剔出の確認は剔出手術時、及び断頭時に行つた。

これらすべてのラットは、生後より実験中も同一無制限食をあたえ、又温度も可及的に 20°C に保ち音響等ストレスはできるだけさけた。

2. 実験材料

γ -アミノ酪酸は、第一化学医薬品株式会社製のものを三度以上再結晶し、m.p.198°C 以上のものを使用した。その他のアミノ酸、 α -ケトグルタル酸その他の試薬は国産品、輸入品をとわず可及的一流メーカ

の特級品を用いた。

酵素材料としては、断頭直後すみやかにとりだしたラットの脳及び肝を、それぞれ氷冷下で $5/6$ M 磷酸緩衝液(pH 7.6)を用いて、Potter-Elvehjem ホモジナイザーで10倍のホモジネートとしたものを使用した。

添加アミノ酸は、1-アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸共に $50\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ 、dl-アラニン $100\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ 、 α -ケトグルタル酸は $50\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ のものを使用した。これらはいずれも使用時にpH 7.0に調整して用いた。

3. 実験手技

1.0ml のホモジネイト、0.5ml のアミノ酸溶液、1.0ml 磷酸緩衝液をThunberg 管主室に、 α -ケトグルタル酸 0.5ml を側室に入れ、ガス相は窒素ガスに置換し、Warburg 装置を用いて 38°C 15分間予備振盪の後、側室内の α -ケトグルタル酸を主室に傾注し、 38°C 60分間振盪した。振盪後、直ちに無水アルコール 7.0ml を加え蛋白凝固をきたす迄十分に振盪した後15分間遠沈し、上澄液を定量的に蒸発皿にとり $50\sim 60^\circ\text{C}$ にて蒸発乾固せしめ、その残渣を再び1.0mlの再留水に溶解した。これを一次元ペーパクロマトグラフ用東洋濾紙 No.50 に定量的に塗布し、80%フェノール水を溶媒として展開した。展開終了後濾紙を乾燥し、エーテルで3回洗滌、0.1%ニンヒドリンの水飽和ブタノール溶液を噴霧し、加熱してグルタミン酸部位を決定し、この部分を切り取り試験管に入れ、Fowden²²⁾の方法で濾紙表面に吸着したアンモニアを除去した後 Troll & Cannan²³⁾法で発色せしめ、波長 $570\text{m}\mu$ における吸光度をベックマン分光光度計により比色測定し、その吸光度からグルタミン酸を定量した。なお盲検として、同質濾紙等面積のものを用い、同一操作でアンモニア除去及び発色を行い、この測定値を差し引いた。なお以上の実験手技を用いるにあたっては Awapara & Seale²⁴⁾、奥村・近藤²⁵⁾及び住田¹⁸⁾の報告を参照した。

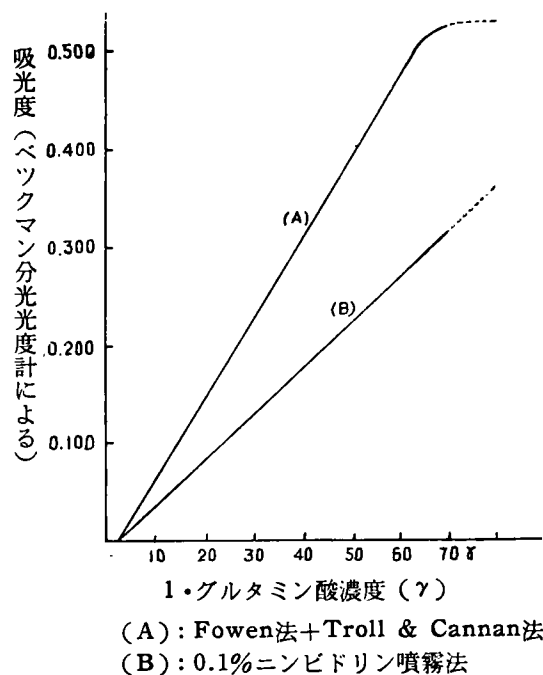
実験成績

以下、アスパラギン酸、グルタミン酸トランスアミナーゼを AsGT, アラニン、グルタミン酸トランスアミナーゼを AIGT, γ -アミノ酪酸、グルタミン酸トランスアミナーゼを γ AGT と略す。

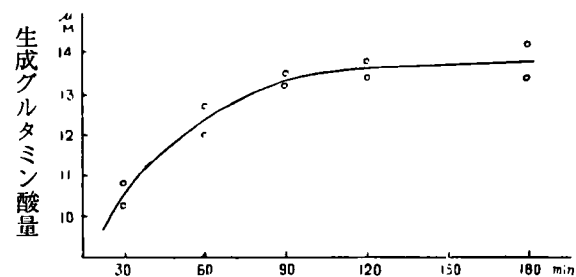
a) Troll & Cannan 法と0.1%Ninhydrin 噴霧法との比較(第1図)

本実験に先立ちアミノ酸の定量法を吟味する目的で、Fowden 法でアンモニアを除去し Troll & Can-

第1図 Troll & Cannan 法と0.1% Ninhydrin噴霧法との比較



第2図 グルタミン酸—アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性と時間の関係



第3図 グルタミン酸—アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性とpHの関係

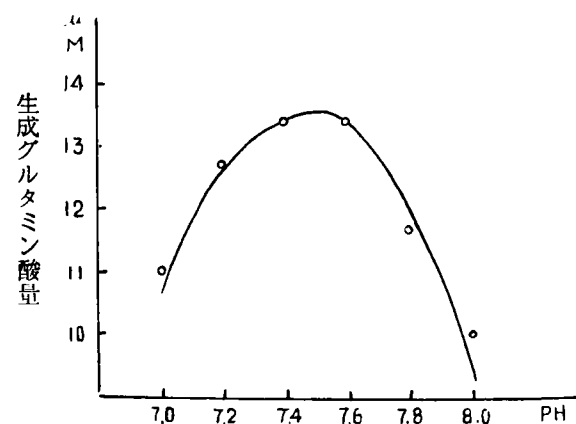


表1 正常および脳下垂体剔出ラット脳におけるトランスアミナーゼによる生成グルタミン酸量 (μM/tube/hr.)

基質アミノ酸	正常群(4)※		脳下垂体剔出群(4)※	
	範囲	平均	範囲	平均
L-アスパラギン酸	10.3~13.0	12.2	18.2~22.5	20.9
		標準偏差 1.3		標準偏差 1.9
DL-アラニン	5.1~7.6	6.5	4.8~8.2	6.4
		標準偏差 1.3		標準偏差 1.4
γ-アミノ酪酸	2.0~3.2	2.5	4.2~4.8	4.4
		標準偏差 0.5		標準偏差 0.3

※ () 内は例数

表2 正常および脳下垂体剔出ラット肝におけるトランスアミナーゼによる生成グルタミン酸量 (μM/tube/hr)

基質アミノ酸	正常群(4)※		脳下垂体剔出群(4)※	
	範囲	平均	範囲	平均
L-アスパラギン酸	9.1~11.9	10.7	15.7~21.4	19.0
		標準偏差 1.3		標準偏差 2.4
DL-アラニン	22.4~28.7	25.1	19.3~32.5	26.2
		標準偏差 2.8		標準偏差 6.2
γ-アミノ酪酸	0.8~2.8	1.8	3.1~3.7	3.5
		標準偏差 0.8		標準偏差 0.3

※ () 内は例数

nan法で発色させた場合の検量曲線を描いた(第1図A)。これと同時に0.1% Ninhydrin 法でも発色を行い検量曲線を描いた(第1図B)が、両者の間にははるかに相違のあることがわかった。すなわちFowden法と Troll & Cannan 法を併用した場合には、より鋭敏であり測定誤差も少なく、検量曲線はグルタミン酸として60γまでは直線的であることがわかった。

又本実験に際しては、アミノ酸を添加せず α-ケトグルタル酸だけを加えて振盪しても、若干のグルタミン酸が合成されるので、以下の実験数値は、ホモジネイトと α-ケトグルタル酸、及びホモジネイトとグルタミン酸のみのものをそれぞれ振盪して、これらを考慮してグルタミン酸の生成量の測定値を補正し、μM per tube per hour であらわしてある。

b) AsGH 活性と反応時間の関係(第2図)

本実験に用いた反応系に於て、反応時間によつて、生成されるグルタミン酸がどの様に増量するかを、AsGTについて検索した。成績は第2図にしめす如く60分までは直線的にかつ急激に上昇し、90分ではほぼ平衡状態に達することがわかった。

c) AsGT 系の最適 pH (第3図)

使用磷酸緩衝液の pH が、トランスアミナーゼの活性に及ぼす影響を検索するため、AsGT 系を用いて、種々の緩衝液の pH によるグルタミン酸生成量をしらべた。成績は第3図のごとく pH 7.4~7.6 に於て、最適 pH 値をしめすことがわかった。よつて以後の実験に於ては、緩衝液の pH を7.6とした。

d) 脳下垂体剔出による、脳肝トランスアミナーゼ活性の変動(表1, 表2)

脳下垂体剔出により、トランスアミナーゼ活性がど

の様に変化するかを、AsGT, AIGT, γAGT 系について生成するグルタミン酸量により検索をおこなつた。生成グルタミン酸量は脳の場合は表1, 肝の場合は表2に掲示した。

AsGT 活性は、脳下垂体剔出により、脳では 12.2 μM より 20.9 μM, 肝では 10.7 μM より 19.0 μM と共に著明に有意に亢進し、脳で71.3%肝で77.5%の亢進率を示す。

AIGT 活性は、脳では 6.5 μM より 6.4 μM, 肝では 25.1 μM より 26.2 μM となり、脳下垂体剔出による影響は認められない。

γAGT 活性は、脳下垂体剔出により脳で 2.5 μM より 4.4 μM, 肝では 1.8 μM より 3.5 μM と共に著明に有意に亢進し、脳で76%肝で94.4%の亢進率をしめし、AsGT活性と同一傾向を有する。

考 按

Bartlett & Glynn^{20) 27)} は、脳下垂体剔出をおこなない、雌性ラットの AsGT 活性が、肝では変化がないが前脛骨筋では増加することを認めた。又 Zuchlewski & Gaebler²⁸⁾ は、雌性未成熟ラットで脳下垂体を剔出した場合の肝の AIGT, 及び肝、筋の AsGT について、活性の時間的経過観察をおこなつているが、5日目のものでは、肝で AIGT 及び AsGT 活性は変化なく、筋に於ける AsGT 活性はやや亢進することを明らかにした。以上のごとく我々の検索成績とあるものは同一傾向をしめし、あるものは相反する成績を報告しているが、これらは Ershoff²⁹⁾, Margitary-Becht & Wallner³⁰⁾, Ershoff & Deuel³¹⁾, Simpson & Evans^{32) 33)}, Beare³⁴⁾, Gaebler

& Mathiesら⁸⁵⁾のいう如く、実験条件、例えば雌雄の別、成熟未成熟の別、与えられた食物の差異、温度その他実験中のストレス等が強く影響すると考えられるが、いずれにせよ今後の研究に待たねばならない。

本実験成績では脳下垂体 剔出により、AsGT 及び γ AGT 活性は脳肝共に亢進しているが、AIGT 活性は脳肝共に変化なく、まったく異なる態度を示す。AsGT と、AIGT については、酵素系が異なることは Cohen¹⁰⁾が発見し、我々の成績もこれと一致している。最近近藤¹⁰⁾は γ AGT がまったく別の酵素系であることを推定し、又 Baxter & Roberts²⁰⁾が牛の脳で γ AGT を抽出したと云うが、我々の実験で γ AGT が AsGT に比し反応速度ははるかに遅い³⁰⁾にもかかわらず、AsGT と同じ態度を示し AIGT と異なる態度をとることは、 γ AGT と AIGT がその酵素系が異なるためではないかと思われる。しかし γ AGT が AsGT と酵素系をことにするか否かは、この実験からは不明である。とにかく γ -アミノ酪酸は特異的に高濃度に脳に存在しており、グルタミン酸前駆物質と考える人もあるが^{87), 88)}。脳下垂体剔出により、 γ AGT 活性が脳で76%も亢進することは、反応速度の380倍も速い AsGT 活性が同じく71.3%亢進することとあわせ考える時興味深い事実である。

脳下垂体を剔出した場合には、Hoberman³⁰⁾が肝腎に於てアミノ酸分解が高まることを観察し、Ulrichら⁴⁰⁾がアルブミン合成速度の著減することを報告し、山本⁴¹⁾は一般にアミノ酸分解に關与する酵素群の活性の高まることを述べており、湯之上⁴²⁾は脳の遊離の α -アミノ窒素の減少することを明らかにし、奥村・大月ら⁴³⁾はラット脳の遊離アミノ酸パターンを検索してグルタミン酸群アミノ酸減少を示しておるなど、脳下垂体剔出時の蛋白質代謝を明らかにしている報告は多い。私のおこなったAsGTおよび γ AGT活性が亢進するという実験結果は、脳下垂体剔出により脳下垂体ホルモンの脱落が起り、脳肝のアミノ酸代謝の異常が惹起されることをあらわし、脳下垂体ホルモンがトランスアミナーゼ活性に影響を与えている一指標と考えられる。

結 論

田中式経外聴道法による脳下垂体剔出ラットについて AsGT, AIGT, γ AGT 活性をしらべた結果、AsGT, γ AGT活性は脳肝共、脳下垂体剔出により著るしく亢進するが、AIGT 活性は脳肝共変動がないことがわかった。

文 献

- 1) Lovain : 中尾健・中村悦郎・大森義仁 : 脳下垂体ホルモン, 1, 1957.
- 2) Marie, P. : Brain, 12, 59, 1890.
- 3) Aschner, B. : Pflügers Arch. f. ges. Physiol., 146, 1, 1912.
- 4) Evans, H. M. & Long, J. A. : Anat. Rec., 21, 62, 1921.
- 5) Li, C. H., Evans, H. M., & Simpson, M. E. : J. Biol. Chem. 159, 353, 1945.
- 6) Li, C. H. & Evans, H.M. : Science., 99, 183, 1944.
- 7) Wilhelmi, A. E., Fishman, J. B., & Russell, J. A. : J. Biol. Chem. 176, 735, 1948.
- 8) Fishman, J. B., Wilhelmi, A. E., & Russell, J. A. : J. Clin. Endocrinol., 8, 593, 1948.
- 9) Braunstein, A. E. & Kritzman, M. G. : Enzymologia, 2, 129, 1937.
- 10) Cohen, P. P. : Biochem. J., 33, 1478, 1939 ; J. Biol. Chem., 136, 565, 1940.
- 11) Rudman, D. & Meister, A. : J. Biol. Chem., 200, 591, 1953.
- 12) Meister, A. & Tice, S. V. : J. Biol. Chem., 187, 173, 1950.
- 13) Meister, A., Sober, H. A., Tice, S. V., Fraser, : J. Biol. Chem., 197, 319, 1952.
- 14) Rowsell, E. V. : Nature, 168, 104, 1951.
- 15) Sallach, H. J. : in Symposium on Amino Acid Metabolism, Baltimore, 1954.
- 16) Bessman, S. P., Rossen, J., & Layne, E. C., : J. Biol. Chem., 201, 385, 1953.
- 17) Roberts, E. & Bregoff, H. M. : J. Biol. Chem., 201, 393, 1953.
- 18) 佳田新平 : 米子医誌, 7, 306, 1956.
- 19) 近藤務 : 生化学, 30, 449, 1958.
- 20) Baxter, C. F. & Roberts, E. : J. Biol. Chem., 233, 1135, 1958.
- 21) 田中明 : 塩野義研究所年報, No. 5, 1955.
- 22) Fowden, L : Biochem. J., 48, 327, 1951.
- 23) Troll, W. & Cannan, R. K. : J. Biol. Chem., 200, 803, 1953.

- 24) Awapara, J. & Seale, B. : J. Biol. Chem., 194, 497, 1952.
- 25) 奥村二吉・近藤務 : 米子医誌, 7, 52, 1956.
- 26) Bartlett, P. D. & Glynn, M. : J. Biol. Chem., 187, 253, 1950.
- 27) Bartlett, P. D. & Glynn, M. : J. Biol. Chem., 187, 261, 1950.
- 28) Zuchlewski, A. C. & Gaebler, O. H. : Arch. Biochem. Biophys., 66, 463, 1957.
- 29) Ershoff, B. H. : Endocrinol., 48, 111, 1951.
- 30) Margitary-Becht, E. & Wallner, E. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 55, 250, 1944.
- 31) Ershoff, B. H. & Deuel H. G. : Endocrinol., 36, 280, 1945.
- 32) Simpson, M. E. & Evans, H. M. & Long, C. N. H. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 43, 383, 1943.
- 33) Evans, H. M. & Simpson, M. E. : Anat. Rec., 48, (supp) 18, Feb. 25, 1931.
- 34) Beare, J. L., Beaton, J. R., & McHenry, E. W. : Endocrinol., 55, 40, 1954.
- 35) Gaebler, O. H. & Mathies, J. C. : Endocrinol., 51, 469, 1952.
- 36) McIlwain, H. : 臺弘・黒川正則訳 : 中枢神経の生化学, 99, 1957.
- 37) Steward, F. C., Thompson, J. F., & Dent, C. E. : Science, 110, 439, 1949.
- 38) Steward, F. C. & Thompson, J. F. : Ann. Rev. Plantphysiol., 3, 251, 1952.
- 39) Hoberman, H. D. : Yale J. Biol. Med., 22, 341, 1950.
- 40) Ulrich, F., Tarver, H., & Li, C. H. : J. Biol. Chem., 211, 117, 1954.
- 41) 山本清 : ホルモン作用と酵素 (金原出版), 84, 1957.
- 42) 湯之上茂 : 岡医誌, 70, 2673, 1958.
- 43) 奥村二吉・大月三郎・西岡博輔・亀山彰 : 医学と生物学, 50(3), 117, 1959.

Hypophysis and Transaminase Activity

1. Effect of hypophysectomy on transaminase activity in rat brain and liver.

By

Susumu HIGASHI

Department of Neuropsychiatry, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Nikichi Okumura)

The author estimated the effect of hypophysectomy on the transaminase activity in the brain and liver of the Wister albino rat. The activities determined were aspartate-glutamate (AsGT), alanine-glutamate (AlGT), and γ -aminobutyrate-glutamate (γ AGT) transaminases.

The activities of AsGT and γ AGT increased remarkably in the brain and liver of the hypophysectomized rat. The AlGT activity of these organs did not change under the same condition.
