

実験的衝撃の生化学的研究

第 4 篇

正常猫脳髓の遊離アミノ酸に就いて

岡山大学医学部神経精神医学教室（主任：藤原高司教授）

西 紋 孝

〔昭和30年6月11日受稿〕

I. 緒 言

1944年 Consden が遊離アミノ酸の検出にペーパークロマトグラフィーを試みてより、動物各組織に対する該方法の応用は多くの新しい知見を生んでいる。本法はもともと定性的な意味に於てなされたものであるが、その後、多少の粗雑さはあるが、定量的にも応用され、今日に於ても多くの改良、吟味がなされている現状である。

私がこゝで取扱おうとする脳髓のアミノ酸に就いても、既に Roberts, Frankel, Awapara, Harman 等によつて多種の遊離アミノ酸が分離され、その一部に就いては種々の条件に於ける量的な考慮もなされている。これらのうちの中心になるものはグルタミン酸であることは勿論である。グルタミン酸は脳髓遊離アミノ酸の中でも特殊な存在であるからである。グルタミン酸は脳で酸化を受ける唯一の遊離アミノ酸であり、従つて、その生成物であるγ-アミノ酪酸が脳には甚だ多量に存在すること、又一方グルタミン酸とアンモニアの結合によつて生ずるグルタミンも多い。更に脱アミノ反応によつてα-Ketoglutar 酸が生ずるが、これはクエン酸サイクルに入つて重要な機能に与る。

つまり、グルタミン酸を中心としてグルタミン、γ-アミノ酪酸、α-Ketoglutar 酸、アンモニアと云つたものは脳の機能に重大な役割を演ずるものであると云える。

さて私が検索を試みたのは、上述したような物質が、繰返して行なわれた電気又は衝撃

の後に如何なる態度をとるか云うことである。既に同僚の森本は、そういうような条件下に於ける動物脳髓の焦性ブドウ酸、α-Ketoglutar 酸、アンモニア窒素を測定し、電気衝撃に於てもインシュリン衝撃を行つたものに於ても、何れもα-Ketoglutar 酸、アンモニア窒素の増量を認め、それは畢竟するに脳髓の機能亢進の兆だと述べている。

そこで私は実験的衝撃の研究の一環として脳髓遊離アミノ酸の態度を検討してみたが、そのうちでも特にグルタミン酸、グルタミン、γ-アミノ酪酸に重点を置き、且つ、グルタミン酸とグルタミン及びγ-アミノ酪酸との量的関係を追求したのである。そうすることがこの間の事情を明瞭にせしめるものだと思うからである。

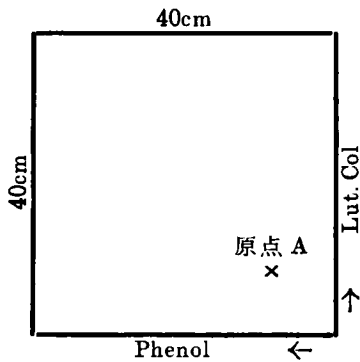
II. 実験方法

試 薬

1. 75%アルコール。
2. 20%含水フェノール。（市販フェノールを減圧蒸溜再結晶させたものを用いる）
3. 飽和含水率35%ルチヂン・コリヂン液。（市販ルチヂン及びコリヂンを夫々沸点 150°~165°C 及び 165~185°C で再蒸溜し、容量%で35%の水を加えると、コリヂンは水層を分離するが、ルチヂンは水を完全に混合する。使用直前に含水コリヂンをふつて乳濁液とし、その一定量に含水ルチヂンを滴下して、丁度液が透明になる所でとめると飽和含水率35%のルチヂン・コリヂン液がえられる）。
4. 0.1%ニンヒドリン・ブタノール溶液。

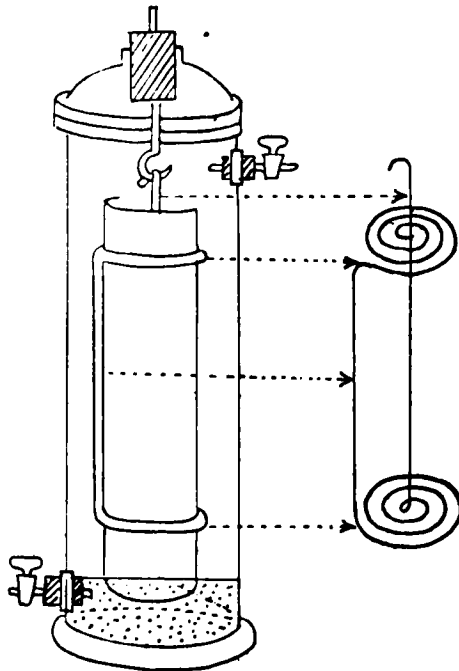
体重2~3kg 猫脳髓皮質を取出し、之を直に dry ice で凍らす。その 3gr を秤量して75% アルコール 39cc を加えて homogenate を作り、共栓付遠心沈澱管に入れて充分振盪後遠沈、その滲出液を重盪煎上にて乾燥し、1cc の再蒸溜水を加え乾燥物を溶かす。之を再び遠沈して不溶性物質を除き上清液 0.02cc (脳皮質量に換算すると 60mg) をペーパークロマトグラフィに供した。(Roberts, Frankel)

濾紙には、東洋濾紙 No. 50 (40×40) を用い (図 1), 原点 A) に試料を毛細管ピペ



(図 1)

ットを用いてつける。試料の乾燥後20%含水フェノール液を展開剤として、図 2 の如く上



(図 2)

昇法展開を行う (室温約20°C).

之を風乾後、飽和含水率35%ルチチン・コ

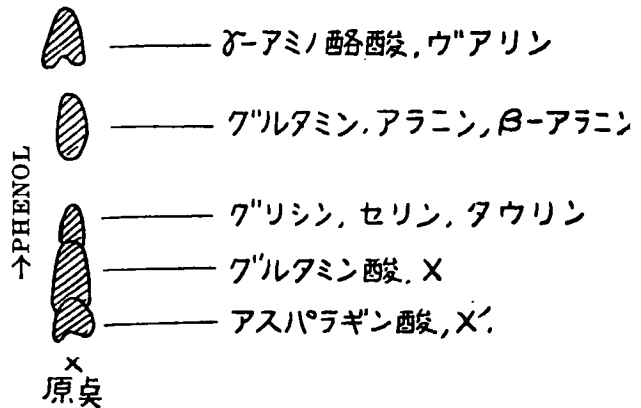
リチン液を用いて二次元展開を行う。

次に之の乾燥後、0.1% ニンヒドリン・ブタノール溶液を噴霧乾燥して、93°C に 30 分保ち発色させた。(Dent, Consden et al., Roberts, 佐竹, 桑田)

現われたアミノ酸の呈色班に就いて、之の量的見当をつける為、各呈色班を切りとり、3cc の蒸溜水を加えて2~3分間強く振盪して得た呈色溶を遠沈後上清液を波長 570mμ で光電比色計により吸光度を測定した。グルタミン酸、γ-アミノ酪酸、グルタミン・タウリン・グリシンに就ては、夫々標準グラフを作りその量を測定した。(Rebert, Erankel)

III, 実験成績

先ず、フェノールに依る一次元展開を行うと、図 3 の如き呈色班群を得た。



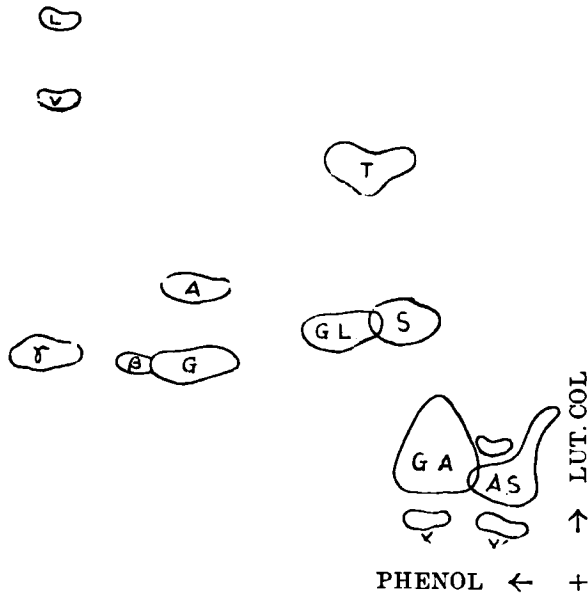
(図 3)

更に、ルチチン・コリチン液を用いた、二次元展開に依て、図 4 の如く、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン・グリシン・タウリン、アラニン、グルタミン、β-アラニン、γ-アミノ酪酸、ヴァリン、ロイシン等の遊離アミノ酸を証明し得た。

此の中、特に強い呈色班はアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、γ-アミノ酪酸、タウリン、中等度の呈色班はグリシン、アラニン、弱く痕跡的に現れるのはセリン、β-アラニン、ヴァリン、ロイシン等であつた。

次に、定量的測定の結果は第 1 表に見る如くグリシンは最低1.3最高15.6 平均7.0±1.4, タウリンは最低3.6最高25.4 平均12.9±2.3,

(図 4)



As : Aspartic Acid
 G. A : Glutamic Acid
 S : Serine
 G. L : Glycine
 T : Taurine
 G : Glutamine
 β : β-Alanine
 A : Alanine
 r : γ-Aminobutyric Acid
 V : Valine
 L : Leucine
 X and X' are unknown ninhydrin reactive substances.

第 1 表

	グリシン	タウリン	γ-アミノ酪酸	グルタミン酸	グルタミン
1	8.3	17.7	7.9	57.1	13.5
2	7.6	25.4	11.1	53.4	10.7
3	1.3	6.7	2.8	21.8	7.3
4	2.2	3.7	7.9	34.1	9.8
5	2.2	3.6	3.8	37.8	9.5
6	6.7	6.7	7.6	50.9	20
7	11.5	22.3	13	88.7	27.8
8	4.5	13.6	11.4	88.7	17.2
9	—	18.6	13	97.7	26
10	10.2	16.7	8.2	96.5	10.5
11	15.6	—	12.7	140.1	20.6
	(r/60mg)	(r/60mg)	(r/60mg)	(r/60mg)	(r/60mg)
	7.0	12.9	9.0	67.8	15.7
	±1.4	±2.3	±1.0	±10.2	±2.0

γ-アミノ酪酸は最低2.8最高13, 平均9.0±1.0, グルタミン酸は最低21.8最高140.1平均67.8±10.2, グルタミンは最低7.3最高27.8, 平均15.7±2.0であつた。

次にグルタミン酸を中心として, その近縁物質である γ-アミノ酪酸及びグルタミンの三者に就いて, その各例に於ける相互的關係を調べてみると第2表の如くなる。即ち

第 2 表

	γ-アミノ酪酸 グルタミン酸	グルタミン グルタミン酸
1	0.14	0.24
2	0.21	0.20
3	0.13	0.33
4	0.23	0.29
5	0.10	0.28
6	0.15	0.39
7	0.15	0.31
8	0.13	0.19
9	0.13	0.27
10	0.08	0.11
11	0.09	0.17
平均	0.14 ±0.01	0.26 ±0.02

γ-アミノ酪酸
グルタミン酸に於ては, 第2及び第4例を除き他は全て0.15若しくはそれ以下で, 平均0.14±0.01である。又グルタミンのグルタミン酸に対する比, 即ち $\frac{\text{グルタミン}}{\text{グルタミン酸}}$ は最低No. 10の0.11, 最高0.39平均0.26±0.02である。

IV. 考 案

動物脳髓の遊離アミノ酸に就いては Weil-Malherbe, Roberts, Frankel, Harman 等の報告があることは緒言に於て述べた通りである。

遊離アミノ酸の種類は, アスパラギン酸, グルタミン酸, セリン, グリシン, タウリン, アラニン, グルタミン, β-アラニン, γ-アミノ酪酸, ヴァリン, ロイシン等であり, 私の実験に於ても結果は同様で附加すべき何物も無い。

そこでこういう一連のアミノ酸を見て誰で

も気附くところは、これら脳髄に証明される遊離アミノ酸は所謂必須アミノ酸ではないものが大部分であることである。つまり、脳髄に於ける遊離アミノ酸は外来性のものではなく、体内で形成されたものであることが知れる。そして、それらは、E. Albert によると、糖と共に肝臓から供給されるのである。

次に量的関係を見よう。Weil-Malherbe は、除蛋白脳髄濾液中に含まれる約30種類の窒素化合物中、グルタミン酸が主位を占めること、第3、第4位にそれと近縁関係にあるグルタミンとγ-アミノ酪酸があることを述べている。次に、遊離アミノ酸だけに就いて云えば、グルタミン酸は全体の30%、グルタミン酸、グルタミン、γ-アミノ酪酸の和は約70%を占めると云う。このようなグルタミン酸及びその近縁物質の他を抜く高濃度さはこれら一群のアミノ酸が脳機能に重要なものであることを示すものである。

年齢による増減に就いては、Roberts, Frankel und Harman 報告がある。マウス脳に就いて行つた実験で、胎生脳は成熟脳に比して、グルタミン酸、アスパラギン酸が少く、タウリン、アラニンが多い、新生マウスではγ-アミノ酪酸、グルタミン酸、アスパラギン酸が少く、タウリンが多いという。この事実もまたグルタミン酸、γ-アミノ酪酸が脳機能の亢進に連れて多くなることを示すものであろう。

さて、Friedberg and Greenberg によると、脳髄アミノ酸の特徴として、腎と共に諸臓器中最も多い場所であるが、その中にたゞグルタミン酸だけが代謝に与る点であると云う。

以上の記述から、脳髄遊離アミノ酸のうちグルタミン酸を中心として、その近縁物質であるグルタミン、γ-アミノ酪酸が特に重要であることがわかる。私の実験に於ても、グルタミン酸及びグルタミン、γ-アミノ酪酸を比較的大量に認め得た。

そこでグルタミン酸に就て今迄の文献に載つている主なる事実を捨つておこう。

Weil-Malherbe, Nachmansohn, Awapara, Dingo, Roberts, Frankel, Price, Waelsch,

Krebs. 等により、グルタミン酸の働き及びその近縁物質との関係が報告されている。

即ち、グルタミン酸、グルタミン、γ-アミノ酪酸は脳内遊離窒素化合物の約70%を占めることは前述した通りだが、特にグルタミン酸に就いては、Weil-Malherbe は大脳切片に種々のアミノ酸を基質として与えた時、たゞ1 (+)グルタミン酸だけが使われることを、Nachmansohnはアセチルヒヨリンが出来るときには1 (+)グルタミン酸が触媒的に作用することを認めているし、臨床的にはPrice, Waelsch, 中による癲癇患者に応用しての鎮瘳的効果, Zimmermann の精神薄弱児の智能改善に役立つとの記述、又林等のグルタミン酸曹達の脳髄注入による癲癇惹起、その他報告に見る如く、脳に於てはグルタミン酸が重大な役割を演ずる事が考えられる。林はグルタミン酸の上述の作用は脳髄作用をプラスの方向に高めるものだとしている。一体脳に於てグルタミン酸の転化する化学反応には、Weil-Malherbe, Wingo, Awapara, Roberts, Frankel の記述に見る如く、次の5反応が行われる。

1. 脱アミノ基反応
2. アミノ基転移反応
3. グルタミン形成反応
4. 脱炭酸基反応
5. グルタモトランスフェラーゼの可能性

即ち、脳髄に於てはこれらの反応を介して、グルタミン酸はTCA サイクルの調節、 NH_4^+ の結合と解離及びケト酸とアミノ酸の相互移動等の機作に関与するわけである。此の中、脱炭酸基反応は以上5反応のうち比較的新しい知見である。Wingo & Awapara, Roberts & Frankel はグルタミン酸脱炭酸酵素が脳に於ては肝・腎の数倍の大量に含まれているという。それはグルタミン酸の脱炭酸によつて生ずるγ-アミノ酪酸が脳に大量に証明されることでも分る。Awapara, Landua 等は脳組織よりの分離を行つている。

一方脳に於けるグルタミンの態度は、グルタミン⇌グルタミン酸系としてアンモニアの

移動に、更にグルタミン酸を通じて脳の物質代謝に重要な役割を演じている。

このように見えてくると、グルタミン酸を中心として γ -アミノ酪酸、グルタミンは互に密接な関係にあることが益々明瞭となつてくる。

そこで私はそれら各々の量的関係を見るばかりでなく、グルタミン酸と γ -アミノ酪酸、グルタミン酸とグルタミンの比に就いて検討してみた。それはつまり、グルタミン酸を γ -アミノ酪酸にする脱炭酸酵素の作用、又はグルタミン酸とグルタミンの相互移動に与る酵素作用を示すものである。

このようにして、先ず $\frac{\gamma\text{-アミノ酪酸}}{\text{グルタミン酸}}$ を見ると、大部分が0.15以下で平均0.14 \pm 0.01となり、 $\frac{\text{グルタミン}}{\text{グルタミン酸}}$ は平均0.26 \pm 0.02と云うような値となる。

文献上このような相互比率に重点を置いた見方をしているものも2, 3 存する、例えば Munkvad は $\frac{\text{グルタミン}}{\text{グルタミン酸}}$ を精神病者血清に就いて検したが、グルタミンとグルタミン酸の和は変らない、にも拘らず、その比は変化していたと云う。即ち、急性分裂病や急性躁状

態では10倍位の上昇が見られ、慢性になるに従い正常比に近づき、10年以上の陳旧例では殆んど正常比と変らないと云う。

V. 総 括

正常猫脳髓の遊離アミノ酸に就いて検索の結果は次の如く総括し得る。

1) : 20%含水フェノール及び飽和含水率35%ルチチン・コリチンによる二次元展開を行うと、アスパラギン酸・グルタミン酸・グルタミン・ γ -アミノ酪酸・タウリンは強く、グリシン・アラニンは中等度に、痕跡的にセリン・ β -アラニン・ヴァリン・ロイシンを証明した。

2) : 脳に於て認めうる遊離アミノ酸は、殆ど必須アミノ酸にあらざるアミノ酸である。

3) : グルタミン酸と γ -アミノ酪酸及びグルタミンの間には或る一定の比率をみる事が出来る。

文 献

第6編に掲げる。

Department of Neuropsychiatry, Okayama University Medical School
(Director . Prof. T. Fujiwara)

Biochemical research on the experimental shock

Part 4. On the free amino acids contained in the brains of the normal cats.

By

Takashi Nishimon

The present work was carried on by means of 2 dimensional paper chromatography, where phenol and lutidine-collidine were used. The following results were obtained.

1) Aspartic acid, glutamic acid, glutamine, γ -aminobutyric acid and taurine were remarkably demonstrated, glycine and alanine moderately, while serine, β -alanine, valine as well as leucine, slightly.

2) The free amino acids found in the brain are almost non-essential amino acids.

3) Certain fixed relation in quantitative ratio has been recognizable among glutamic acid, γ -aminobutyric acid and glutamine.