

脳のアミノ酸代謝 (VI)

トノサマガエル脳におけるトランスアミノネーションについて

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任・奥村二吉教授)

今井 昭 正

〔昭和34年1月20日受稿〕

序 論

脳アミノ酸代謝動態解明の一方法として脊椎動物門の各綱から代表的な動物を選び、脳におけるトランスアミノネーションの比較生化学的研究を試みているが、すでに哺乳綱 (マウス¹⁾、魚綱 (ナマズ¹⁾、爬虫綱 (イシガメ²⁾) についての成績を比較検討する事により、脳アミノ酸代謝機構の可能性について考察を加え報告した。

今回は両棲綱の代表としてトノサマガエル (*Rana nigromaculata*) の脳を選び、ペーパークロマトグラフィーを応用、トランスアミノナーゼ活性を測定し、上記各動物脳と比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1) 実験材料

α -ケトグルタル酸及び各アミノ酸は前報¹⁾²⁾ 同様のものを使用した。

酵素材料としては断頭直後速に取り出したトノサマガエルの新鮮全脳を pH 7.6 $1/15$ M リン酸緩衝液で10倍のホモジネートとしたものを使用した。なお本実験は6月下旬より8月末までの期間 (夏季) に行つたものである。

2) 実験手技

実験手技は前報に準じて行つた。Medium の構成は組織ホモジネート及び $1/15$ M リン酸緩衝液各1.0ml とそれぞれ75 μ M のアミノ酸溶液及びケト酸溶液0.5 ml より成つており、終容量3.0ml、終 pH 7.6である。38°C、60分 Incubation 後除蛋白し、定量的に採取した上澄液は蒸発濃縮して1.0ml の容量とした。

ペーパークロマトグラフィーを応用、生成されたグルタミン酸を分離、定量し、トランスアミノナーゼ活性を測定した。溶媒はブタノール・醋酸・水 (4:1:1) 及び75% 含水フェノールの中、各アミノ酸の Rf を考慮して分離のよい方を用いた。

東洋濾紙 No. 50 に試料 0.03ml を塗布し、一次元上昇法で展開後、Troll & Cannan³⁾ の方法で呈色、島津製分光光度計 570m μ で比色定量した。

実験成績

アミノ酸を加えずに α -ケトグルタル酸だけで組織を incubate しても若干のグルタミン酸が生成されるので、各実験毎に之を行対照とし、転移グルタミン酸量はこの値で補正した。なお 10 μ g per tube 或はそれ以下の値は誤差の範囲で確実でない。

1) α -アミノ酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミノネーション

第1表は16種の α -アミノ酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミノネーションをトノサマガエル脳を用いて調べた成績をそれぞれナマズ脳、イシガメ脳、マウス脳と比較したものであるが、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、ノルバリン、メチオニン、グリシンに本反応の行われる事が判る。アスパラギン酸とイソロイシン、ロイシンはイシガメ脳同様の値を示しているがナマズ脳、マウス脳に比べると可成り低値を示している。

アラニン、バリン、ノルバリンはマウス脳と比較して著明な差はみとめられない。

なお本実験の結果あらたに判明した事はスレオニン、チロジンがナマズ、イシガメ、マウス脳に比べて transaminate されない事、逆にナマズ脳で僅かに活性のみられた以外、イシガメ、マウス脳で全く transaminate されないグリシン、メチオニンに相当な活性を示した事である。

又フェニールアラニンは冷血動物脳では何れも本反応がみられず、ヒスチジン、ノルロイシン、プロリン、ヒドロキシプロリンは各動物脳とも全く活性がみとめられなかつた。

2) ω -アミノ酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミノネーション

第1表 α -アミノ酸と α -ケトグルタル酸からのグルタミン酸生成

動物別 アミノ酸	生成グルタミン酸アミノ窒素量							
	トノサマガエル脳				1) ナマズ脳	2) イシガメ 脳	1) マウス脳	4) マウス脳
	1	2	3	平均				
l- アスパラギン酸	210.5	189.0	197.9	199.1	345.5	209.5	259.2	285.0
dl- アラニン	79.8	88.0	82.6	83.4	174.0	58.8	81.5	93.0
dl- イソロイシン	47.4	49.7	42.5	46.5	83.1	47.3	79.7	92.6
l- ロイシン	57.9	60.1	59.1	59.0	122.1	57.2	82.0	76.9
dl- バリン	50.0	57.9	52.7	53.5	95.0	12.0	65.8	61.1
dl- スレオニン	2.1	3.7	3.4	3.0	48.0	12.4	19.7	27.0
dl- ノルバリン	33.7	39.4	40.2	37.7	52.8	11.9	42.7	41.1
dl- セリン	分離不良	"	"	"	"	"	"	"
l- メチオニン	24.2	21.0	19.9	21.7	14.5	4.7	8.4	- 2.3
l- チロシン	8.5	6.5	4.3	6.4	82.6	16.6	54.5	-
グリシン	23.5	36.9	29.7	30.0	13.3	4.1	3.8	1.2
l- ヒスチジン	2.7	3.1	2.5	2.7	- 4.2	- 2.4	4.3	5.1
dl- ノルロイシン	5.4	4.1	3.3	4.2	4.7	2.6	0.6	0.4
l- プロリン	2.4	2.8	1.6	2.2	4.4	2.0	- 2.2	- 1.4
l- ヒドロキシプロリン	1.4	2.5	0.7	1.5	3.1	1.2	- 2.0	- 2.6
l- フェニールアラニン	2.1	3.5	3.3	2.9	8.0	- 2.3	28.1	20.6

単位: μg per tube第2表 ω -アミノ酸と α -ケトグルタル酸からのグルタミン酸生成

動物別 アミノ酸	生成グルタミン酸アミノ窒素量								
	トノサマガエル脳					1) ナマズ脳	2) イシガメ 脳	1) マウス脳	5) マウス脳
	1	2	3	4	平均				
γ -アミノ酪酸	33.8	30.1	39.3	43.1	36.5	73.6	16.4	89.5	98.8
β -アラニン	19.3	18.1	25.4	20.2	20.7	22.6	6.0	49.8	57.6
β -オキシ- γ -アミノ酪酸	29.9	27.5	36.2	38.1	32.9	26.2	23.1	73.9	91.0
ϵ -アミノカプロン酸	1.6	2.3	1.8	2.0	1.9	7.6	- 2.1	7.3	7.1

単位: μg per tube第3表 β -アミノ酸及びシステイン酸と α -ケトグルタル酸からのグルタミン酸生成

動物別 アミノ酸	生成グルタミン酸アミノ窒素量							
	トノサマガエル脳				1) ナマズ脳	2) イシガメ 脳	1) マウス脳	4) マウス脳
	1	2	3	平均				
dl- オルニチン	24.8	27.6	21.0	24.4	35.0	32.8	33.5	31.7
l- リジン	0.7	1.2	0.9	0.9	0.5	0.2	0.8	0.9
dl- シトルリン	4.4	4.6	6.1	5.0	6.6	6.1	3.8	1.8
l- アルギニン	3.8	4.9	4.1	4.2	- 2.8	20.8	2.5	1.8
l- システイン酸	55.0	60.3	53.6	56.3	160.5	41.7	169.8	177.0

単位 μg per tube

第2表は4種の ω -アミノ酸と α -ケトグルタル酸についての成績であるが、ナマズ脳で γ -アミノ酪酸がマウス脳とほぼ同様の値を示している以外は冷血動物脳では何れも低い活性を示している。

ϵ -アミノカプロン酸は各動物脳とも本反応は行われない。

3) ジ-アミノ酸及びシステイン酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミネーション

4種のジ-アミノ酸及びシステイン酸からのグルタミン酸生成を調べた成績は第3表に示すとおりであるが、ジ-アミノ酸ではオルニチンが各動物間にほぼ同様な活性を示し、イシガメ脳でアルギニンに活性をみとめた以外、リジン、シトルリンには何れも本反応がみられなかつた。

又、システイン酸はイシガメ脳と同様な値であるがナマズ、マウス脳に比べると相当低い活性を示している。

考 察

ナマズ⁶⁾、ネズミ⁷⁾、カエル⁸⁾、カメ⁹⁾ 脳の遊離アミノ酸量を測定した青山、那須の研究によれば、スレオニンがナマズ脳では他の動物脳に比べ多量に存在し、一方カエル脳ではグリシンが多量であつたと記載しているが、本実験の結果ナマズ脳でスレオニンに、又カエル脳でグリシンに著明な活性がみとめられた事は極めて興味深く、脳のアミノ酸量は関与する酵素系となんらかの関連をもつてであろうという先報²⁾の推察をも更に裏付け得るものと思われる。

又冷血動物脳では哺乳動物脳に比較してグルタミン酸、アスパラギン酸等のモノアミノジカルボン酸が少い事を報告⁶⁾⁸⁾⁹⁾しているが、この事はこれら冷血動物脳の呼吸が低い事¹⁰⁾並びに脳の機能の優劣とも密接な関係をもつものであろうし¹¹⁾、更にナマズ脳以外、冷血動物脳においてトランスアミナーゼ活性が弱いという成績から、グルタミン酸を中心とするトランスアミネーションは一般に呼吸量の生理的変動の大きい組織とくに発達しているというBraunstein¹²⁾の見解とも矛盾するものではないと考えられる。

松田¹³⁾及び教室の研究¹⁴⁾によれば、カエル脳のアムモニア量はマウス脳に比べ若干少いといわれるが、トランスアミナーゼ活性とグルタミン酸脱水素酵素活性とは互に平行して変化する事が一般にみとめられている事¹⁵⁾からして、ナマズ脳と異りカエル脳におけるグルタミン酸脱水素酵素活性の存在を想定せ

しめ得るものであるがこの点についてはなお今後の検索を俟たねばならないであろう。

又脳に特異的に存在する γ -アミノ酪酸はこれら動物間に著変がない⁸⁾⁹⁾にも拘わらず、 γ -アミノ酪酸-グルタミン酸トランスアミナーゼ活性はカエル脳では低く、ナマズ脳では哺乳動物脳同様に存在し、一方奥村の研究¹⁶⁾によればグルタミン酸炭酸酵素活性はカエル脳では他の動物に比べ異常に高く、ナマズ脳では殆んど存在しないといわれている。これらの事実は γ -アミノ酪酸はグルタミン酸の前駆物質としての可能性を指摘したSteward¹⁷⁾¹⁸⁾らの見解をも否定するものであると共に、冷血動物脳においてもまたそれぞれ異つた複雑な代謝機構の存在する可能性を示唆するものであるといえよう。

Verjbinskaya¹⁰⁾は形態、機能及び糖代謝の過程において、又青山⁸⁾は脳遊離アミノ酸検索の結果から、カエル脳は魚類と哺乳類の中間移行型を示すものであると記載しているが、トランスアミネーションの見地からもまた同様の傾向を示した事は注目すべき事と思われる。

結 論

比較生化学的見地から両棲綱に属するトノサマガエル (*Rana nigromaculata*) の脳を用い、16種の α -アミノ酸、4種の ω -アミノ酸、4種のジ-アミノ酸及びシステイン酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミネーションについて研究し、マウス、ナマズ、イシガメ脳と比較検討した。

1) α -アミノ酸はカエル脳ではナマズ、マウス脳に比べ一般に弱いトランスアミナーゼ活性を示したが、ナマズ脳で僅かに活性のみられた以外 transaminated されないグリシン、メチオニンに相当な活性をみとめた。

2) ナマズ、イシガメ、マウス脳と異りカエル脳ではスレオニン、チロジンに全く本反応がみられなかつた。

3) フェニールアラニンは冷血動物脳では全く transaminated されない。

4) ω -アミノ酸ではナマズ脳における γ -アミノ酪酸を除く以外、冷血動物脳では何れも低い活性を示した。

5) ジ-アミノ酸では各動物間の活性度に著変がみられなかつた。

本研究に対し御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた奥村二吉教授に衷心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) 今井昭正：岡山医誌掲載予定
- 2) 今井昭正：岡山医誌掲載予定
- 3) Troll, W. & Cannan, R. K. : J. Biol. Chem., **200**, 803 (1953)
- 4) 住田新平：生化学, **28**, 339 (1956)
- 5) 住田新平：米子医誌, **7**, 306 (1956)
- 6) 青山達也：生化学, **30**, 452 (1958)
- 7) 那須弘之：生化学, **30**, 205 (1958)
- 8) 青山達也：岡山医誌, **70**, 2131 (1958)
- 9) 青山達也：岡山医誌, **70**, 2135 (1958)
- 10) Verjiskaya, N. A., Palladin, A. N., 松本淳治 訳：神経系の生化学, **201**, 協立書店, 京都 (1957)
- 11) Roberts, E., Frankel, S., Harman, P. J. Proc. Soc. Exp Biol. & Med., **74**, 383 (1950)
- 12) Braunstein, A. E. : Adrance in Proteinchemistry, **3**, 1 (1947)
- 13) 松田誠：生化学, **30**, 79 (1958)
- 14) 未発表
- 15) 岡本彰裕, 中脩三：神経化学, **269**, 医学書院, 東京 (1954)
- 16) 奥村二吉：生化学, **28**, 740 (1957)
- 17) Steward, F.C., Thompson, J.F., Dent, C. E. : Science, **110**, 439 (1949)
- 18) Steward, F.C., Thompson, J.F. . Ann. Rev. Plantphysiol., **3**, 251 (1952)

Metabolism of Amino Acids in the Brain (VI)

Studies on the Transamination in the Brain of Frog
(*Rana Nigromacnlata*)

By

Akimasa Imai

Department of Neuro-Psychiatry Okayama University Medical School
(Director: Prof. Nikichi Okumura)

With a view to make biochemical comparison the author studied the transamination of various amino acids, and α -ketoglutaric acid in the brain of frog (*Rana Nigromaculata*), and compared these results with those obtained with the brains of mice, catfish and common turtle.

1. α -amino acids in the brains of frog show on the whole a lower transaminase activity as compared with those in the brains of catfish and mice, but glycine and methionine that show no transamination other than a slight transaminase activity in the brain of catfish reveal a fairly active transamination in the frog brain.
2. In the frog brain threonine and tyrodine are not at all transaminated.
3. Phenylalanine is not at all transaminated in the brains of cold-blooded animals.
4. Of ω -amino acids with an exception of γ -aminobutyric acid in the brain of catfish, all other show a low transaminase activity in the brains of cold-blooded animals.
5. The degree of the enzyme activity of di-amino acids does not differ to any marked extent in different animals.