

0086080714

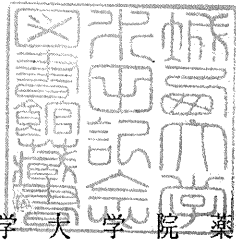
城西大学大学院薬学研究科
博士学位論文

IV

甲第4号

昭和60年度

城西大学水田記念図書館



城西大学薬学院

博士学位論文

昭和60年度

城西大学水田記念図書館

0086080714

城西大学水田記念図書館

神経刺激伝達機構における酸性脂質の
生理機能に関する研究: Tryptamine 受
容体機構における酸性脂質の役割につ
いて

城西大学薬学部薬理学教室

唐 澤 明

目 次

緒 論	1
文 献	3
第 一 章	
Myelin proteolipids に存在する [^{14}C] tryptamine 結合本体の性質について	4
緒 言	4
第一節	
Myelin proteolipids 由来の脂質分画に対する tryptamine の結合について	5
緒 言	5
実験材料及び方法	5
実験結果	9
考 察	13
第二節	
Quaking mice 由来の各種 myelin proteolipids に対する tryptamine の結合について	14
緒 言	14
実験材料及び方法	14
実験結果	17
考 察	22
文 献	23
第 二 章	
酸性脂質による脂質再構成系への tryptamine の結合について	24
緒 言	24
実験材料及び方法	24
実験結果	32
考 察	37
文 献	41

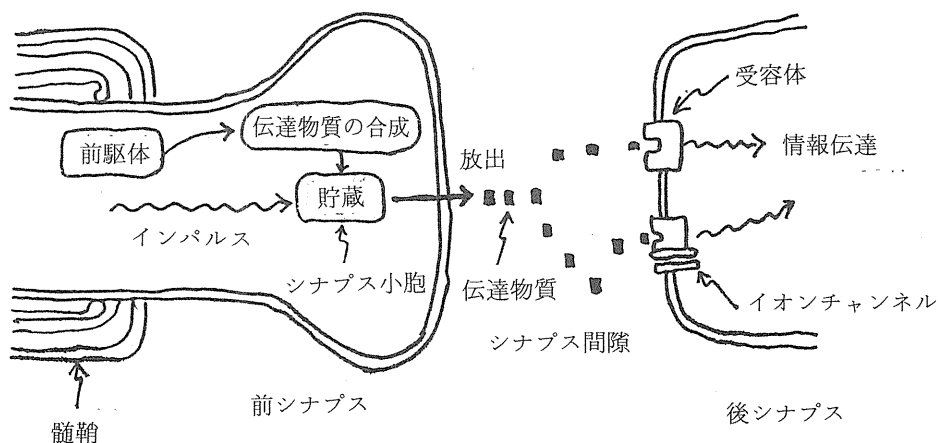
第 三 章

中枢神経系での tryptamine 受容体機構における酸性脂質の役割について	42
緒 言	42
実験材料及び方法	43
実験結果	44
考 察	57
文 献	59
総 括	61
謝 辞	63

緒 論

中枢神経組織は、血管と被膜の細胞を除けば、神経系の機能に直接に関与しているニューロン (neurone) と間質細胞であるグリア細胞 (neuroglia) とから構成されている。Neurone は突起のある細胞で、核 (細胞核) を含む細胞体 (soma) と、普通複数の短い樹状突起 (dendrite) と1本の長い軸索 (axon) から成っている。軸索の先端は別の neurone の樹状突起や細胞体とシナプス (synapse) を形成している。軸索は神経線維 (nerve fiber) と呼ばれ、たいてい髄鞘 (myelin sheath) で覆われている (有髄線維)。

高等動物の中枢神経組織でのシナプスを介しての神経刺激伝達機構は、主として神経伝達物質 (neurotransmitter) を媒体として行なわれる化学的伝達 (chemical transmitter) である。伝達物質としては、現在までに、acetylcholine (ACh), noradrenaline (NA), dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin), histamine, glutamic acid, aspartic acid, γ -amino butyric acid (GABA) 及び glycine などが報告されている。伝導された神経インパルスに対応して、シナプス小胞に貯蔵されていたこれらの神経伝達物質が前シナプス部からシナプス間隙へ放出され、後シナプス膜上に存在する受容体 (receptor) と結合し情報が伝達される。後シナプス膜上に存在する受容体分子は、伝達物質と特異的に結合する部位 (結合部位、binding site) と、細胞内での二次的情報伝達系 (例えば、イオンチャンネルあるいは cyclic AMP (or GMP) 産生系) と共役している部位とから構成されている。



化学的シナプス伝達の模式図

アセチルコリンのニコチン様受容体（1）については、分子レベルでの研究が進み受容体分子として単離、精製が成功しているが、他の受容体については未だに研究段階である。一般に、受容体分子は生体膜の脂質二重層内で蛋白質分子と脂質分子との相互作用により、ある種の適切な立体構造が形成されて初めてその生理機能が発現すると考えられる。従って酵素蛋白質研究の場で開発された蛋白質の精製技術のみでは受容体分子の精製が困難であるという点を指摘できよう。このことが、物性面からの研究の遅れを起こしていた。

受容体を物性面から研究する試みがさかんになったのは、proteolipidsの発見以降のことである。1951年に Folch-P₁ & Lees（2）によって神経組織から proteolipids という一種の蛋白質-脂質複合体が発見された。その後多くの研究者によって、この物質が刺激伝達物質に対する受容体分子としての機能を有する可能性が検討された。例えば、インドールアミン類の 5-HT について、Godwin & Sneddon（3）はラット脳幹部由来の proteolipids が 5-HT に対して受容体分子としての生理的機能を有していると報告した。しかしながら、彼らの報告した proteolipids は、myelin 由来の proteolipids であり、5-HT に対する結合本体は、酸性脂質群であることが当教室によって明らかにされた（4, 5）。第一次的な脂質の機能は、生体膜及び細胞内顆粒群の構築における“molecular cement”としての役割であるが、より動的な生理機能についても検討され出した。例えば、Loh & Law（6）は、脂質の動的な機能の1つとして、受容体機構において脂質それ自体が直接結合部位としての機能を示す可能性及びこの役割を担う候補として、多くの神経伝達物質や薬物分子が生理的条件下では、陽イオンに帯電していることより、酸性脂質が最適であることを指摘している。

Tryptamineは5-HT同様インドールアミン類であるが、5-HTに比べると同物質の中枢神経組織での含量の僅少性から神経伝達物質としての概念確立が遅れており、tryptamine受容体の神経化学的な研究はほとんど為されておらず、一度検索されるべき分野である。

本論文では、酸性脂質の中枢神経系における動的な生理機能を検討すべく、特に、tryptamine受容体機構への関与の可能性を想定し、第一段階として完全なin vitro系での各種酸性脂質による再構成系に対する [³H] tryptamine の結合実験を立案した。さらに上記モデル実験系にて導き出された推察、すなわち、特定の酸性脂質群が tryptamine 受容体機構において認識部位あるいは調節因子としての役割を演じているということをし

ナプス膜を用いた受容体レベルの実験系で実証した。

参 考 文 献

- 1) Raftery, M. A., Hunkapiller, M. W., Strader, C. D. and Hood, L. E. : Science 208, 1454 (1980)
- 2) Folch-Pi, J. and Lees, M. : J. Biol. Chem. 191, 807 (1951)
- 3) Godwin, S. F. R. and Sneddon, J. M. : J. Neurochem. 25, 283 (1975)
- 4) Ishitani, R., Miyakawa, A., Saito, R. and Iwamoto, T. : Experientia 33, 932 (1977)
- 5) Miyakawa, A. and Ishitani, R. : Life Sciences 31, 1427 (1982)
- 6) Loh, H. H. and Law, P. Y. : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 201 (1980)

第一章

Myelin proteolipids に存在する [¹⁴C] tryptamine 結合本体の性質について

緒言

Proteolipids は Folch-P₁ & Lees (1) により神経組織から発見された特異な hydrophobic protein であり、chloroform-methanol 及び butanol-water 混液には可溶性であるが、水には不溶性の性質を有する。

近年、多くの研究者により proteolipids に関して、この物質が刺激伝達物質に対する受容体分子としての機能を有する可能性が検討されて来た。例えば、Fiszer & De Robertis (2) 及び Godwin & Sneddon (3) らは、ラット脳幹部由来の butanol extracts への [¹⁴C] または [³H] 5-HT の結合実験から、5-HT 結合成分としての proteolipids の関与を報告した。他方、石谷ら (4, 5) は、上記ラット脳幹部より得られる butanol extracts 中には、多量の myelin 由来の proteolipids が含まれていること及び同物質が [¹⁴C] 5-HT に対して高親和性のある結合能を有すること、さらにはその結合を tryptamine が特異的に阻害することを報告した。他方、著者ら (6) は、ラット脳幹部 mitochondria 由来の proteolipids に対する [¹⁴C] 5-HT の結合実験の結果より、同物質も 5-HT に対して特異的結合能を有することを明らかにした。

以上の事実より、中枢神経組織由来の proteolipids は、それ自体が受容体分子の機能を有する可能性は否定的となったが、特にインドールアミン (5-HT, tryptamine) と特異的に親和性を有することが当教室の研究にて明らかとなった。

本章では、tryptamine 受容体の分子構築を検討するための第一歩として上記 myelin proteolipids を用いて、同物質と tryptamine との相互関係を特に結合本体の性質の面から検討した。

第一節

Myelin proteolipids 由来の脂質分画に対する tryptamine の結合について

緒言

Myelin proteolipids に対する tryptamine の結合について、当教室の他のグループ (7) により、特異性のある結合能を有すること、及びその結合本体は、脂質様の性質を示すことが報告された。他方 opiate 受容体としての可能性が示唆されている proteolipids の本体に関しては、酸性脂質の1つである sulphatides (CS) の関与が指摘されている (8)。さらに Johnson ら (9) 及び著者ら (10) は、脂質再構成系実験から 5-HT は特に酸性脂質群と高親和的に結合することを報告した。

本実験では、myelin proteolipids 中に存在する tryptamine 結合物質の性質について、同 proteolipids より得られる脂質分画を用い詳細に検討した。

実験材料及び方法

(1) Myelin 分画の調製

体重100-150 g の Wistar 系雄性ラットの脳幹部を用いた。細胞分画法としては、Norton & Poduslo (11) の方法に従った。その概略を図 1-1 に示した。摘出した脳幹部より 0.32 M sucrose にて 5% homogenate を作製し、このものを 0.85 M sucrose 上に層積し、日立 RPS-27 型 swing rotor を用い、 $75,000 \times g$ 30 分間の条件下で中間層 (myelin rich-fragments) 及び沈渣を得た。この中間層を集め等量の水を加え、 $156,000 \times g$ 50 分間遠心し、粗 myelin 分画を得た。この粗 myelin 分画を 5% homogenate と同量の水に懸濁させた (低張処理)。20 分間放置後、 $12,000 \times g$ 10 分間の条件下で遠心し沈渣 (myelin fragments) を得た。この操作は 2 回行なった。Myelin pellet を 5% homogenate と同量の 0.32 M sucrose に懸濁後、0.85 M sucrose 上に層積し、上記遠心条件下で中間層 (myelin rich-fragments) 及び沈渣を得た。この中間層を集め等量の水を加え $156,000 \times g$ 50 分間遠心して pure myelin 分画を得た。(なお本操作はすべて 4℃にて行なった。)

なお、myelin 分画の純度は、電子顕微鏡により形態学的手法にて確認した。

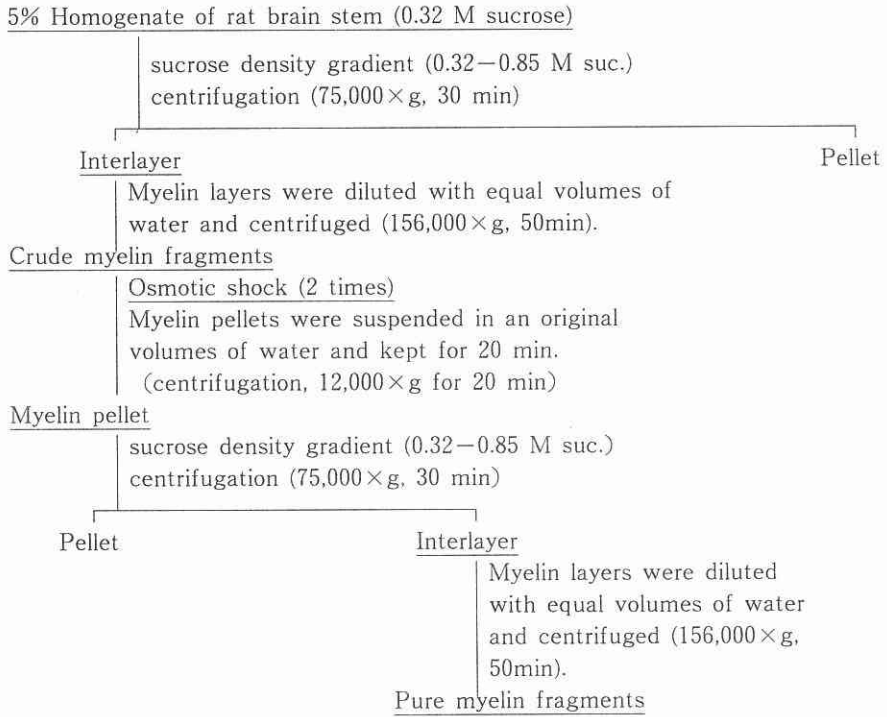


Fig. 1—1. Fractionation method of myelin fragments from rat brain stems.

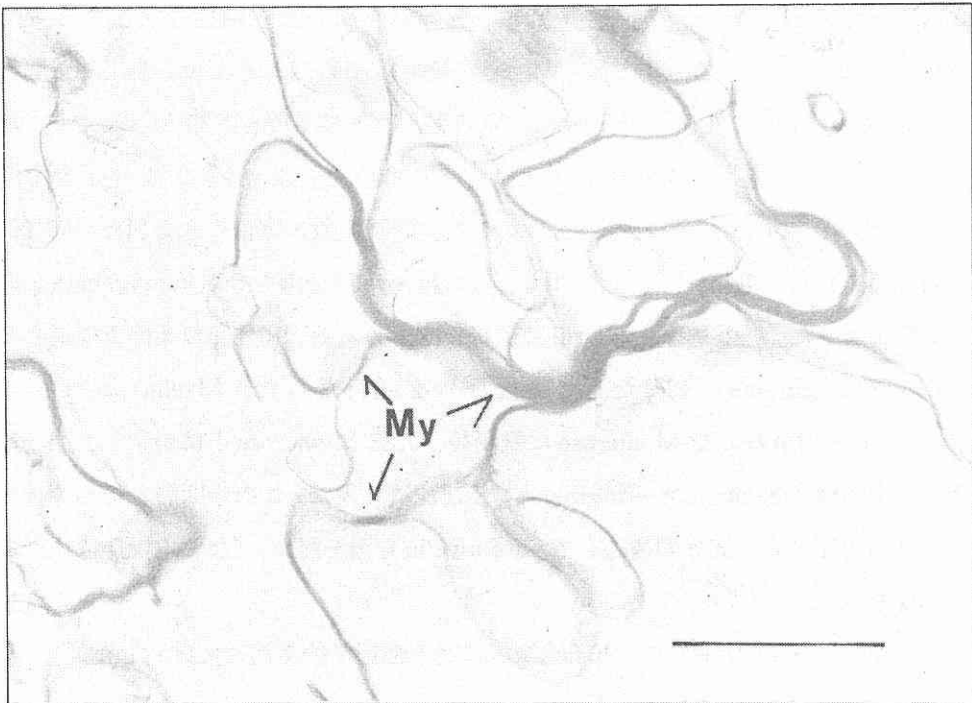


Fig. 1—2. Electronmicrograph of myelin fraction showing several myelin fragments (My). Bar equals 1 μ m.

(2) Myelin butanol extracts の作製

細胞分画によって得られた myelin fragments を 50% sucrose (2ml/g brain stem) に懸濁させ、10倍量の水飽和 butanol 液にて室温下 2 時間抽出した。抽出液を $1,000 \times g$ 20 分間遠心し、得られた butanol 層を窒素気流下 35°C にてもとの容量の約 1/3 に濃縮し、myelin butanol extracts とした。

(3) 脂質分画の作製

脂質混液を Mokrasch (12) の ice-cold ether 処理法に従って、14%の水を加えて残渣を可溶化した butanol extracts より調製した後、種々の脂質分画をケイ酸カラムクロマトグラフィーにて同混液より作製した。すなわち、一定量の試料 (lipid phosphorus として約 $15 \mu\text{mol}$) をケイ酸カラム (1.3×15cm) 上に層積し、表 1-1 に示した溶媒系にてそれぞれの分画を得た。各脂質分画は、窒素気流下蒸発乾固させ、butanol-water 混液 (14%, V/V) に溶かして結合実験に用いた。

Table 1-1. Silicic Acid Column Chromatography

Fraction	Solvent composition (chloroform-methanol, v/v)	Total volume (ml)
F-A	98 : 2	30
	96 : 4	20
F-B	90 : 10	60
F-C	80 : 20	40
	60 : 40	45
F-D	50 : 50	40
	0 : 100	40

(4) [^{14}C] Tryptamine との結合実験

各試料について一定量 (0.3ml, lipid phosphorus として約 $1 \mu\text{mol}$) を室温下 20 分間 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の [^{14}C] tryptamine と incubate した。Incubation 後、反応混液を Sephadex LH₂₀ カラム (0.6×19cm) 上に層積した。溶出系には Stepwise 法を用い、その溶媒と溶出量は、chloroform, chloroform-methanol (CM) 10 : 1 各 10ml 及び 9 : 1 16ml であっ

た。カラムクロマトグラフィー後、各分画より一定量 (0.2ml) をバイアルビンに分取し、toluene/Triton X-100 (2:1) シンチレーター (13) 10mlを添加後、液体シンチレーションカウンターにて計数効率70~90%でその放射能を測定した。

(5) 各脂質値の測定

Cholesterol は、Searcy & Bergquist (14) の方法で測定した。各種 phospholipids は、2次元展開を用いる Norton & Autilio (15) の TLC 法にて分離、同定後測定した。第一展開溶媒として chloroform-methanol-ammonium hydroxide (14:6:1) を、第二展開溶媒として chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (10:4:2:2:1) を用いた。なお、総脂質リン量の測定は、Chen ら (16) の方法で行なった。Minor galactolipids, cerebrosides 及び sulphatides も同様に TLC 法にて分離、同定後測定した。すなわち、一定量の試料 (lipid phosphorus として約 2 μ mol) を TLC プレート上にスポットし、chloroform-methanol-water (70:30:4) の展開溶媒にて展開後、各脂質を I₂ vapor にて確認した。それぞれの galactolipid に相当するスポットをプレート上からかき取り、CM (1:2) 溶媒にて抽出し、Svennerholm (17) の方法で総脂質 galactose 量を測定した。各脂質分子濃度を算出するために、以下の平均分子量 (18) を用いた。minor galactolipids = 846, cerebrosides = 828, sulphatides = 933, ethanolamine phosphatides = 732, choline phosphatides = 804, sphingomyelin = 800, phosphatidylserine = 820 及び phosphatidylinositol = 890.

実験結果

Myelin proteolipidsより得られた脂質混液が、 $[^{14}\text{C}]$ tryptamineに対して結合能を保持していたことより(7), proteolipids中に存在する tryptamine 結合物質の性質を検索する第一歩として、同混液をケイ酸カラムクロマトグラフィーにてさらに4分画に分け、各分画中の脂質群と $[^{14}\text{C}]$ tryptamine 結合能との関係を比較検討した。表1-2は脂質混液より得られた4種の分画中の脂質組成の定性結果をTLC像より求めたものである。

Table 1-2. Lipid Composition of the Several Fractions Isolated from the Lipid Mixtures of Myelin Butanol Extracts

Fraction	Major lipid component
F-A	Cholesterol, minor galactolipids
F-B	Cerebrosides
F-C	Ethanolamine phosphatides, sulphatides, phosphatidylserine, phosphatidylinositol
F-D	Choline phosphatides, sphingomyelin

他方、結合実験を Sephadex LH₂₀ カラムクロマトグラフィーにて実施したが、myelin butanol extracts の場合における Sephadex LH₂₀ カラムからの $[^{14}\text{C}]$ Tryptamine の溶出パターンを図1-3に示した。 $[^{14}\text{C}]$ Tryptamine の溶出ピークは、CM 9:1 に narrow 型として現われた。この溶出された放射能が結合型か否かを明らかにするために、butanol のみに $[^{14}\text{C}]$ tryptamine を加えて対照実験を行なった。結果は、narrow 型の溶出ピークが出現した位置に放射能は検出されなかった (methanol 溶媒にてのみ溶出した)。よってこの放射能の溶出ピークは結合型であることが判明した。以上の結果より、 $[^{14}\text{C}]$ tryptamine との結合実験は全て Sephadex LH₂₀ カラムクロマトグラフィーにて行なった。

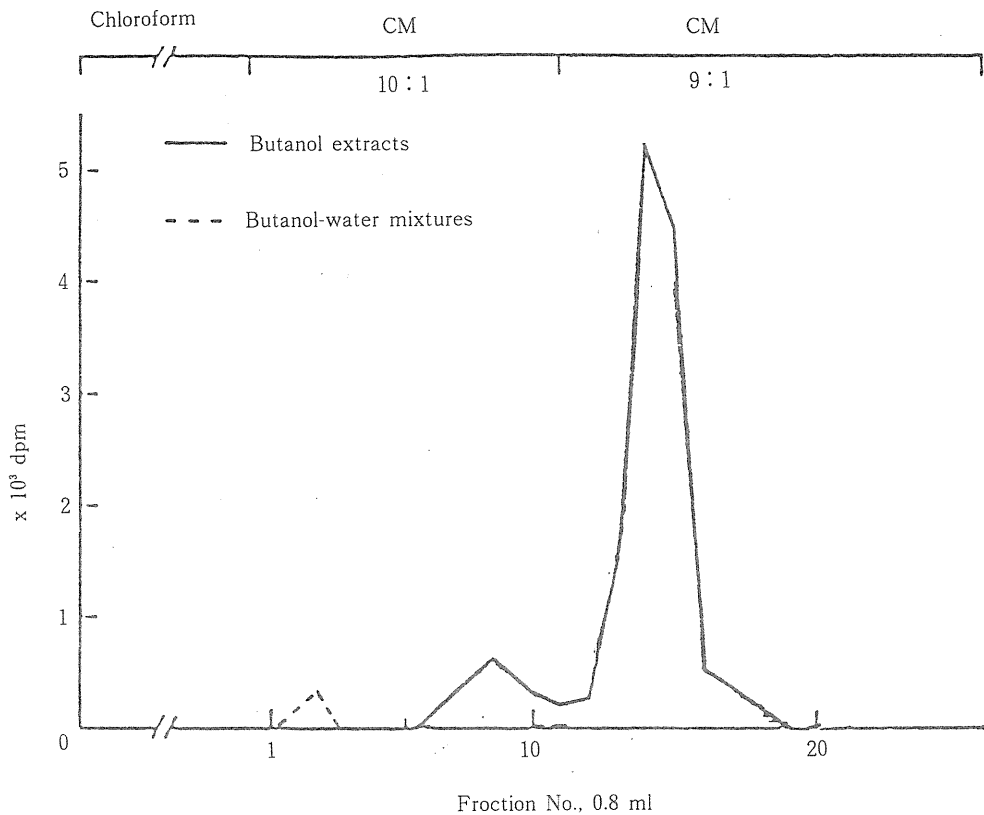


Fig. 1-3. Sephadex LH₂₀ chromatograms of myelin butanol extracts and butanol-water mixtures.

Samples were incubated with 5×10^{-7} M [¹⁴C] tryptamine. The discontinuous elution system described in the text was used.

Sephadex LH₂₀ カラムクロマトグラフィーを用いて脂質混液より得られた4種の分画における [¹⁴C] tryptamine 結合能を検討した (表 1-3)。その結果は、F-C分画のみが元の myelin butanol extracts が有するのと同等の tryptamine 結合能を維持していた。さらに、myelin butanol extracts, 脂質混液及び F-C分画と [¹⁴C] tryptamine との結合溶出パターンを上記同様 Sephadex LH₂₀ カラムクロマトグラフィーにて検討したところ、図 1-4 に示した様にこれら3種の試料は同様の溶出パターンを示した。以上の結果より、F-C分画は元の myelin butanol extracts に存在する [¹⁴C] tryptamine 結合本体の結合能及び分子構築度を完全に保持していることが判明した。

Table 1-3. [¹⁴C] Tryptamine Binding to Several Fractions

Fraction	Amount of tryptamine bound (%)
Butanol extracts	72.2±6.4*
Lipid mixtures	71.8±5.3*
F - A	None
F - B	None
F - C	72.3±5.0
F - D	None

Several fractions were incubated with 5×10^{-7} M [¹⁴C] tryptamine. After incubation, the mixtures were passed through a Sephadex LH₂₀ column, and the bound radioactivity was measured as described in the text. Results are expressed as the percent of total input radioactivity (mean ± S. E. M. of 3 experiments).

*Data from Ref. (7)

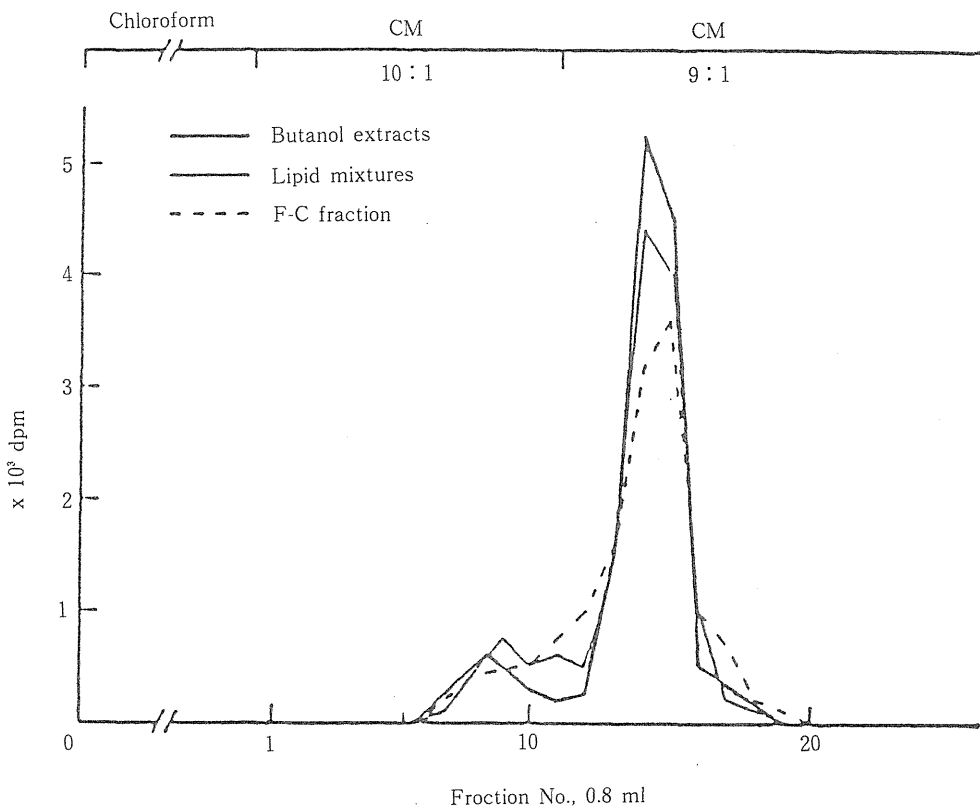


Fig. 1-4. Sephadex LH₂₀ chromatograms of myelin butanol extracts, lipid mixtures and F-C fraction. Samples were incubated with 5×10^{-7} M [¹⁴C] tryptamine. The discontinuous elution system described in the text was used.

当教室の他のグループ（7）は、myelin butanol extracts への tryptamine 結合の特異性を検討した結果、tryptamine 及び 5-methoxytryptamine のみが myelin butanol extracts への $[^{14}\text{C}]$ tryptamine 結合を阻害するが、インドールアミン類似体及び他の神経伝達物質は何らの作用も示さないことを明らかにしている。そこで脂質混液及び F-C 分画が上記に示す $[^{14}\text{C}]$ tryptamine 結合能の特異性を保持しているか否かを明確にするために、displacement 実験を行なった。結果を表 1-4 に示したが、元の myelin butanol extracts が示す特異性を両分画は完全に保持していることが判明した。

Table 1-4. Inhibition of $[^{14}\text{C}]$ Tryptamine Binding by Various Compounds

Compound	% Inhibition		
	Lipid mixtures	F-C fraction	Butanol extracts*
Tryptamine	84.5±3.8	85.9±4.0	59.4±12.3
5-Hydroxytryptophan	None	None	None
5-Hydroxy-3-indole acetic acid	None	None	None
5-Methoxytryptamine	100	100	78.9±4.0
5-Hydroxytryptamine	None	None	None
Acetylcholine	None	None	None
Dopamine	None	None	None
Noradrenaline	None	None	None

Samples were preincubated with various compounds (all : 5×10^{-4} M) for 30 min, and then 5×10^{-7} M $[^{14}\text{C}]$ tryptamine was added. After incubation, the bound radioactivity was measured by Sephadex LH₂₀ column chromatography as described in the text (mean±S. E. M. of 4 experiments). *Date from Ref. (7).

特定な脂質再構成系の tryptamine 結合能を検討する（第二章にて）予備段階として、 $[^{14}\text{C}]$ tryptamine に対して特異的な結合能を保持している 3 種分画中の脂質組成を定量分析した。その結果を表 1-5 に示した。Myelin butanol extracts 中に含まれている塩基性蛋白質と酸性脂質群とは強固に会合しているため、エーテル処理にて得られた脂質混液中の酸性脂質群〔sulphatides (CS), phosphatidylserine (PS) 及び phosphatidylinositol (PI)〕は概して元の butanol extracts のそれより低い値を示した。今、F-C 分画中の脂質群でその含量が元の myelin butanol extracts 中のその 10% 以下のものは tryptamine 結合に関与し得ないと仮定すれば、同分画中の脂質群の内、ethanolamine phosphatides, PS 及び PI にのみ tryptamine 結合物質の本体としての可能性が認められる。

Table 1-5. Lipid Compositions

Lipid	Lipid mixtures	F-C fraction	Butanol extracts
Cholesterol	469.9±14.0	Not detected	490.0±10.0
Minor galactolipids	23.3±2.0	1.4±0.5	21.0±0.8
Cerebrosides	226.4±4.0	6.5±0.4	306.7±7.6
Sulphatides	7.0±0.6	0.4±0.2	79.0±1.7
Ethanolamine phosphatides	310.3±7.0	301.8±6.2	303.1±3.3
Choline phosphatides	189.9±5.7	Not detected	192.3±4.7
Sphingomyeline	16.4±0.9	1.3±0.2	38.5±3.8
Phosphatidylserine	31.7±0.5	19.2±1.2	76.1±4.2
Phosphatidylinositol	4.2±0.6	2.8±0.1	8.6±0.3

Values are expressed as $\mu\text{g}/\text{incubation mixture}$ (mean±S. E. M. of 4 determinations).

考 察

Mokrasch (12) の cold-ether 処理法は、proteolipids の protein-lipid 間の結合を選択的に切りはなす。Myelin proteolipids を 4 倍量の ice-cold ether にて処理すると脂質分画部に 6.1% の protein 及び 82.1% の lipid phosphorus が回収されると石谷ら (5) は報告している。脂質混液をケイ酸カラムクロマトグラフィーにて 4 種類に分割した際、F-C 分画のみが、元の myelin butanol extracts が示すと同様の tryptamine 結合能を示し、この分画への [^{14}C] tryptamine 結合の溶出パターンも、myelin butanol extracts のそれとよく一致していた。さらにインドールアミン類似体及び他の神経伝達物質を用いての displacement 実験より、F-C 分画が、元の [^{14}C] tryptamine 結合能の特異性を反映することが明らかとなった。以上の結果より、myelin butanol extracts 中に存在する tryptamine 結合本体の性質を F-C 分画が保持していることが強く示唆された。

Myelin butanol extracts, 脂質混液及び F-C 分画における脂質定量分析の結果より、F-C 分画においては、脂質混液の脂質含量と比較して ethanolamine phosphatides, CS, PS 及び PI の含量にはそれ程の低下が認められなかったが、cholesterol, minor galactolipids, cerebrosides, choline phosphatides 及び sphingomyelin には著しい低下が認められた。これらのことより、myelin butanol extracts 中に見いだされた [^{14}C] - tryptamine 結合物質の本体として、上記 4 種の脂質の関与の可能性が指摘出来よう。

第二節

Quaking mice 由来の各種 myelin proteolipids に対する tryptamine の結合について

緒言

Quaking mice は、Sidman ら (19) によって発見された遺伝子異常を呈する mutants であり、中枢神経系において著しい myelin 形成欠損が認められ、さらに異常な歩行、戦慄、けいれんによって特徴づけられる。

前節において、myelin proteolipids 中に存在する特異的高親和性 [^{14}C] tryptamine 結合物質の本体として、特定の脂質分子 (ethanolamine phosphatides, CS, PS 及び PI) の可能性を示唆する結果が得られた。本節では上記可能性をより前進させる目的で、脂質含量 (特に酸性脂質群) の異なった種々の myelin proteolipids を病態及び未熟動物より調製し、[^{14}C] tryptamine との結合能並びに競合実験 (IC_{50} 値) を用い分子構築面において両者より比較検討した。

実験材料及び方法

(1) 実験動物

雌雄 Quaking mice ($\text{B}_6\text{C}_3\text{HF}_1\text{-qk}$ 種) をアメリカジャクソン研究所 (NIH) より入手し、当研究室にて自然交配 (4~7回) させ、Quaking mice を得た。動物はすべて温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の動物フード内で飼育し、固型飼料及び飲料水は自由に摂取させた。

(2) Myelin 分画の調製

本実験には次の条件の mice を使用した。

Quaking mouse 特有の症状を呈しない litter mate (同腹) controls の生後12-13日齢, 26-27日齢をそれぞれ control pups 及び control adults 群とし、Quaking mutants としては、26-27日齢のものを用いた。3種類の mice につき、断頭後全脳を摘出し、小脳及び嗅脳を除去し試料とした。細胞分画法については、Matthieu ら (20) の方法を一部改良したものを使用した。その概略を図1-5に示した。(なお、操作はすべて 4°C にて行なった。)

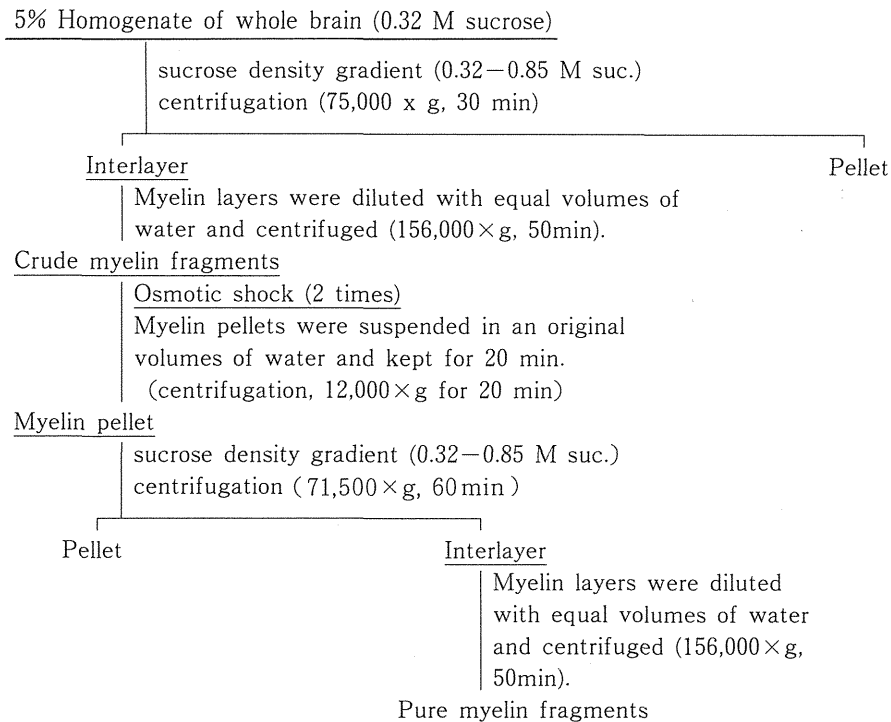


Fig. 1-5. Fractionation method of myelin fragments from whole mice brains.

小脳及び嗅脳を除いた全脳より0.32M sucroseにて5% homogenateを作製し、このものを0.85M sucrose上に層積し、日立RPS-27型 swing rotorを用い、75,000 x g 30分間の条件下で中間層 (myelin rich-fragments) 及び沈渣を得た。この中間層を集め等量の水を加え、156,000 x g 50分間遠心し、粗 myelin 分画を得た。この粗 myelin 分画を5% homogenateと同量の水に懸濁させた (低張処理)。20分間放置後、12,000 x g 10分間の条件下で遠心し沈渣 (myelin fragments) を得た。この操作は2回行なった。Myelin pelletを5% homogenate量に対し1/3容量の0.32M sucroseに懸濁後、0.85M sucrose上に層積し、日立RPS-25-3型 swing rotorを用い、71,500 x g 60分間の遠心条件下で中間層を集め等量の水を加え156,000 x g 50分間遠心して pure myelin 分画を得た。

(3) Myelin butanol extracts の作製

細胞分画によって得られた myelin fragments を5% sucrose (3ml/0.1g) に懸濁させ、10倍量の水飽和 butanol液にて室温下2時間抽出した。抽出液を1,000 x g 20分間

遠心し、得られた butanol 層を窒素気流下35℃にて実験使用至適濃度にまで濃縮し、myelin butanol extracts とした。

(4) [¹⁴C] Tryptamine との結合実験

試料 (0.4ml) に水 (14%) を加え沈渣を可溶化後、0.3ml を室温下20分間 5×10^{-7} M の [¹⁴C] tryptamine と incubate した。Incubation 後、混液を Sephadex LH₂₀ カラム (0.6×19cm) 上に層積した。溶出系には Stepwise 法を用い、溶媒及び溶出量はそれぞれ chloroform, chloroform-methanol (CM)10:1 各10ml 及び CM 9:1 16ml であった。カラムクロマトグラフィー後、各分画より一定量 (0.2ml) をバイアルビンに分集し、toluene/TritonX-100 (2:1) シンチレーター (13) 10ml を添加後、液体シンチレーションカウンターにて計数効率70~90%でその放射能を測定した。

(5) 蛋白質及び脂質値の測定

Myelin butanol extracts 及び溶出された分画中の蛋白質含量は、Lees & Paxman らの SDS-Lowry 法 (21) にて測定した。Cholesterol、各種 phospholipids 及び galactolipids の測定は、第一節に記載した方法に従った。

(6) 電子顕微鏡用試料作製

Quaking mice 特有の myelin 形成不全症を確認する形態学的手段として電子顕微鏡法を用いた。検鏡用試料を1)超薄切片法、2)凍結破断 (freeze fracture) 法の2種類にて調整した。

1) 超薄切片法

Myelin 試料を glutaraldehyde (4%) 及び osmium tetroxide (2%) を用いて二重固定し、ethanolにて段階的脱水後エポキシ樹脂を用いて包埋した。600~1,000 Å の超薄切片をウルトラ・ミクロトーム (Hitachi MUM-2型) にて作製し、酢酸ウラニル及び一酸化鉛にて二重染色後、Hitachi HU-12A (印加電圧100KV) 電子顕微鏡にて検鏡した。

2) 凍結破断法

Myelin 試料を glutaraldehyde (2%) で前固定後、30% glycerol にて後固定した。上記前処理試料を液体窒素下で急速凍結後、EIKO FD-2A 凍結破断装置を用い-120℃、 10^{-6} Torr 以下の条件下で破断を行ない、露出した破断面に対し platinum-carbon にて shadowing (2π) し、レプリカ膜を作製した。得られたレプリカ膜は印加電圧125KV の条件下で検鏡した。

実験結果

本実験で用いた $B_6 C_3 HF_1$ -qk 種の mutants、 littermate controls 及び pups 由来の myelin 膜を超薄切片法及び凍結破断法にて形態学的に観察した。図 1-7 に示す様に (C) から得られた myelin 膜は、 control adults (A) が multilamella 構造を有する compact myelin 層を形成しているのと比較すると、 intraperiod gap の形成が不完全であり、空間の多いいわゆる loosely packed myelin 層を示していた。他方 pups (B) は、 myelination 形成が開始される時期である為に、 multilamella 構造を形成するまでに至らない single 膜が多数認められた。以上超薄切片法により、 3 種の試料間において myelin 膜形成の違いが明らかとなった。さらに lamella 内の内在性蛋白質の面からも凍結破断法にて検討を加えた。図 1-8 に示す様に control adults (A) は、 intraperiod gap 中にうめこまれている内在性蛋白質が head piece として lamella 層を形成していた。 Pups (B) では、 head piece が一列に並んでいるものの方が多く見られた。 Mutants (C) は、 head piece の数が少なく、 intraperiod gap が途中で切断されていることと相まって、内在性蛋白質量の少ないことが確認された。すなわち、 2 種類の超微形態法にて、それぞれの試料の myelin 形成の相違が確認された。

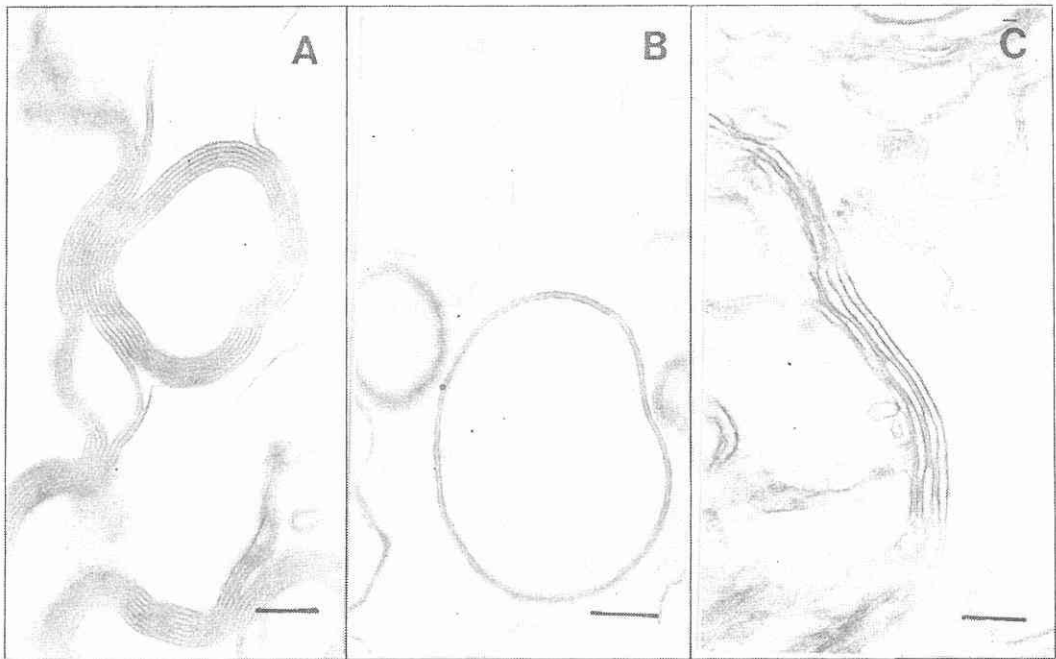


Fig. 1-6. Ultrathin section electronmicrographs of several myelin fractions. A, control adults; B, pups and C, Quaking mutants. Bar equal $0.25 \mu m$.

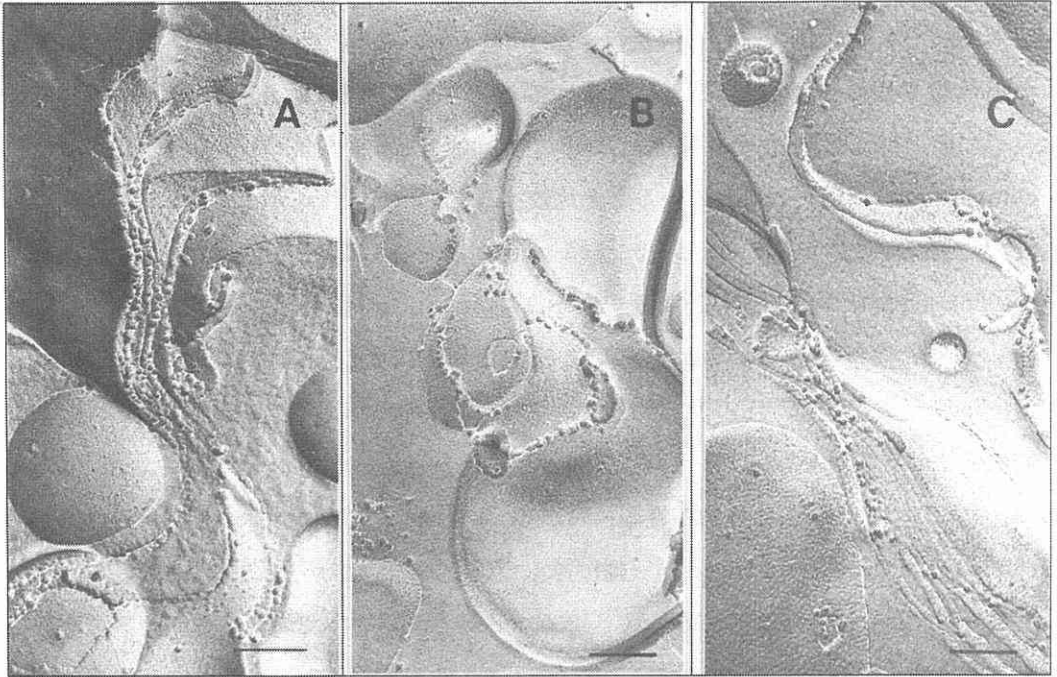


Fig. 1-7. Freeze-fracture electronmicrographs of several myelin fractions. A, control adults; B, pups and C, Quaking mutants. Bar equals $0.2\mu\text{m}$.

Quaking mice 由来の myelin 膜の構成成分に関して、生化学的には galactolipids 含量の低下 (22) 及び basic protein, proteolipid protein の減少 (20) が報告されている。表 1-6 は実験で用いた control adults, pups 及び Quaking mutants それぞれの脳重量、myelin 収量及び myelin butanol extracts 中の proteolipid protein, lipid phosphorus 量を示したものである。Pups 及び Quaking mutants の各項目における測定値は、control adults に対して有意差 ($p < 0.05$) を持って減少していた。

Control adults, pups 及び Quaking mutants 由来の butanol extracts 中に含まれる各脂質組成の結果を表 1-7 に示した。Control adults に比べ pups 及び Quaking mutants 由来の butanol extracts 中の殆んどの脂質値は減少していた。特に galactolipids は、Baumann ら (22) の報告通り、その減少傾向が phospholipids に比べ強いことが判明した。

Table 1-6. Myelin from Central Nervous System

	Control		Quaking
	Adult	Pups	
Age (days)	26-27	12-13	26-27
Brain weight (mg)	367±5.04	333±1.83	341±3.19
Myelin Wet weight*	54.82±2.43	9.45±0.63	9.42±0.73
Proteolipid protein** (mg)	23.41±2.55	5.76±1.01	2.15±0.36
Lipid phosphorus** (μ mol)	67.2±4.4	38.0±1.40	44.4±5.1

*mg/g brain **per g myelin butanol extracts

Mean \pm S. E. M. of 5 experiments

Table 1-7. Lipid Composition of Several Myelin Butanol Extracts

Lipid	Control		Quaking
	Adult	Pups	
Cholesterol	22.04±1.88	8.78±0.70**	8.93±0.63**
Minor galactolipids	1.30±0.15	0.70±0.23	0.22±0.05*
Cerebrosides	11.80±1.03	4.94±0.10**	4.19±0.27**
Sulphatides	2.50±0.45	1.39±0.02	1.59±0.11
Ethanolamine phosphatides	19.40±2.37	8.06±0.53*	11.80±0.83*
Choline phosphatides	14.76±1.69	8.19±1.13*	10.17±0.79
Sphingomyelin	1.42±0.12	0.55±0.02*	1.36±0.10
Phosphatidyl- serine	3.89±0.23	1.93±0.30*	3.42±0.23
Phosphatidyl- inositol	0.66±0.02	0.41±0.05	0.73±0.01

Results are expressed as mg/g myelin butanol extracts (mean \pm S.E.M. of 3 experiments). Significantly different from the value of control adults at *p<0.05 and **p<0.01.

Quaking mice 由来の種々 myelin butanol extracts との結合実験を 5×10^{-7} M の $[^{14}\text{C}]$ tryptamine を用いて行なった。Control adults (濃縮度 1/6) の場合における Sephadex LH₂₀ カラムからの $[^{14}\text{C}]$ tryptamine の溶出パターンは、CM 9:1 の領域に結合型の narrow なピークを示した。同様の実験を pups, mutants 由来の myelin butanol extracts についても行なった。2 種の butanol extracts の濃縮度を control adults と同程度にとどめると、tryptamine に対して結合能を示さなかったが、両試料共に濃縮度を増すと結合能が出現することが判明した。以上の予備検討後、両試料の PS 含量を control adults のそれとほぼ同程度に成る様にそれぞれ濃縮したところ、3 種共に同程度の tryptamine 結合能を示した (表 1-8)。

Table 1-8. Myelin Butanol Extracts

	Controls		Mutants
	26-day-old	12-day-old	
Lipid phosphorus (μ mol)*	67.2 \pm 4.4	38.0 \pm 1.4	44.4 \pm 5.1
Phosphatidylserine (μ g)**	24.0 \pm 0.8	23.4 \pm 0.7	23.8 \pm 0.5
Amount of tryptamine bound (%)***	75.9 \pm 1.5	77.8 \pm 2.7	75.9 \pm 1.1

Myelin butanol extracts from controls, pups and mutants were concentrated to 1/6, 1/12 and 1/8 of its original volume and then incubated with 5×10^{-7} M $[^{14}\text{C}]$ tryptamine. After incubation, the bound radioactivity was measured by Sephadex LH₂₀ column chromatography as described in the text. Mean \pm S. E. M. of 3 determinations. * μ mol/butanol extracts of g myelin. ** μ g/incubation mixture. ***% of total input radioactivity.

Myelin proteolipids 中の tryptamine 結合物質の分子構築度を検討するために、非放射性 tryptamine との競合実験を行なった。図 1-8 にその結果を示したが、 5×10^{-4} M の tryptamine (agonist として 1,000 倍過剰) で 3 種の myelin butanol extracts 共に、competition plateau (競合飽和) を示した。しかしながら、control adults、pups、及び mutants 由来の myelin butanol extracts における見かけ上の IC₅₀ 値は、それぞれ 3×10^{-5} 、 6×10^{-5} 及び 2×10^{-4} M であった。

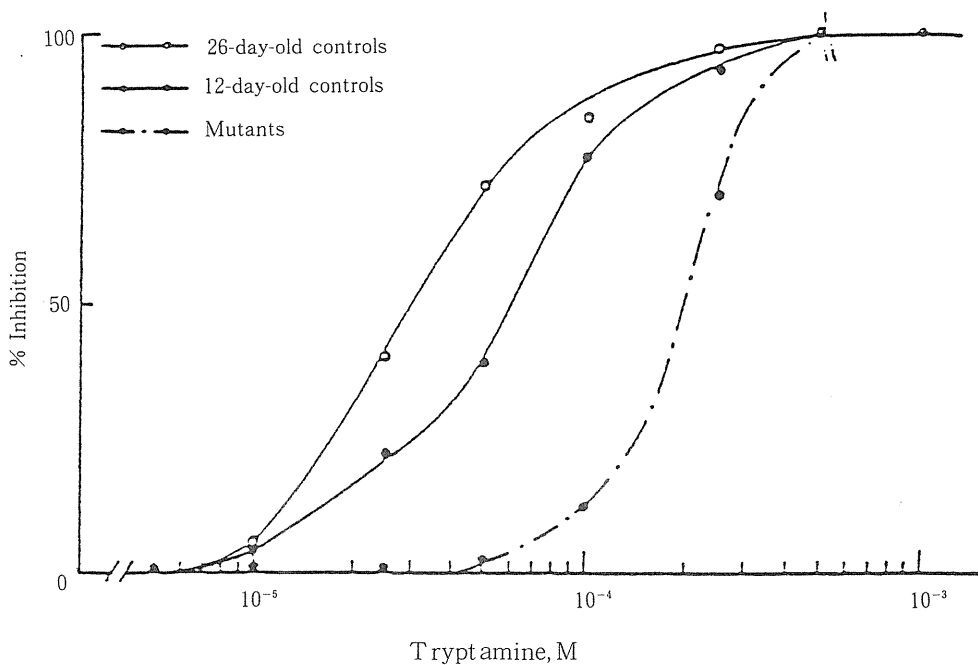


Fig. 1-8. Competition curves by tryptamine on the specific binding of [14 C] - tryptamine to several myelin butanol extracts. Samples were preincubated with various concentrations of unlabelled tryptamine for 30 min and then 5×10^{-7} M [14 C] tryptamine was added. After incubation, the mixtures were chromatographed through a Sephadex LH₂₀ column as described in the text. Specific binding of [14 C] tryptamine was defined by the competition plateau occurring at 0.5-1 mM tryptamine. Points are the mean of 2 to 4 experiments. The extent of concentration of each sample is described in Table 1-8.

考 察

本節では myelin butanol extracts (すなわち proteolipids) 中に見い出された tryptamine 結合物質の本体を解明するための予備段階として種々の myelin 膜を調製し、それぞれの tryptamine 結合能について脂質含量 (特に PS) の面から検討した。モデル動物としては、myelin 膜の遺伝的欠損症を呈する Quaking mice を選び、さらに発生未熟として同腹の pups を用いた。

本実験に用いた Quaking mice の mutation を確認する手段としては、染色体の遺伝疾患度を検索するのが最も確実と思われるが、その技術的困難性より本論文では、電子顕微鏡による形態学的手法にて、同動物の mutants としての確認同定を行なった。

Control adults, pups 及び mutants myelin 由来の butanol extracts の tryptamine に対する結合能を検討した結果、3 種共に同一の濃縮度 (1/6 濃縮) にて tryptamine との結合実験を行なうと、control adults の myelin butanol extracts が示した結合能を pups 及び mutants のそれらは共に示さなかった。結合ピークを示さなかった pups 及び mutants の各 butanol extracts においても、PS 含量を control adults 程度になる様にそれぞれの濃度を調整すると、結合能の再現が認められた。しかしながら、さらに結合物質の分子構築面からの検討を競合実験にて行なった結果、3 種間において見かけ上の IC_{50} 値が一致しない事実が判明した。

以上の事実より、myelin proteolipids 中に存在する tryptamine 結合物質の本体として、主として PS が結合能の発現に関与していること、及び同結合物質の分子構築には PS 以外にも他の特定の脂質分子 (多分、酸性脂質) の存在が不可欠であることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Folch-Pi, J. and Lees, M. : J. Biol. Chem. 191, 807 (1951)
- 2) Fiszer, S. and DeRobertis, E. : J. Neurochem. 16, 1201 (1969)
- 3) Godwin, S. F. R. and Sneddon, J. M. : J. Neurochem. 25, 283 (1975)
- 4) Ishitani, R., Miyakawa, A., Saito, R. and Iwamoto, T. : *Experientia* 33, 932(1977)
- 5) Ishitani, R., Miyakawa A. and Iwamoto, T. : Japan. J. Pharmacol. 28, 899 (1978)
- 6) Ishitani, R., Karasawa, A., Mizusaki, K. and Iwamoto, T. : Japan. J. Pharmacol. 29, 950 (1979)
- 7) Miyakawa, A., Kim, S.-J., Kameyama, T. and Ishitani, R. : Japan. J. Pharmacol. 32, 1051(1982)
- 8) Loh, H. H., Cho, T. M., Wu, Y. C. and Way, E. L. : Life Sciences 14, 2231 (1974)
- 9) Johnson, D. A., Cho, T. M., and Loh, H. H. : J. Neurochem. 29, 1105 (1977)
- 10) Ishitani, R., Karasawa, A. and Miyakawa, A. : Life Sciences 27, 291 (1980)
- 11) Norton, W. T. and Poduslo, S. E. : J. Neurochem. 21, 749 (1973)
- 12) Mokrasch, L. C. : Life Sciences 6, 1905 (1967)
- 13) Patterson, M. S. and Greene, R. C. : *Analyt. Chem.* 37, 854 (1965)
- 14) Searcy, R. L. and Bergquist, L. M. : *Clin. Chim. Acta* 5, 192 (1960)
- 15) Norton, W. T. and Autilio, L. A. : J. Neurochem. 13, 213 (1966)
- 16) Chen, P. S., Toribara, T. Y. and Warner, H. : *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956)
- 17) Svennerholm, L. : J. Neurochem. 1, 42 (1956)
- 18) Norton, W. T. and Poduslo, S. E. : J. Neurochem. 21, 759 (1973)
- 19) Sidman, R. L., Dickie, M. M. and Appel, S. H. : *Science* 144, 309 (1964)
- 20) Matthieu, J.-M., Koellreutter, B. and Joyet, M.-L. : J. Neurochem. 30, 783 (1978)
- 21) Lees, M. B. and Paxman, S. : *Analyt. Biochem.* 47, 184 (1972)
- 22) Baumann, N., Bourre, J. M., Jacque, C. and Harpin, M. L. : J. Neurochem. 20, 753 (1973)

第二章

酸性脂質による脂質再構成系への tryptamine の結合について

諸言

第一章において、myelin proteolipids に存在する tryptamine の結合物質の本体として特定の脂質群 (PE, CS, PS, PI) 特に酸性脂質の関与の可能性が強く示唆された。

第一次的な脂質の機能は、生体膜及び細胞内顆粒群の構築における “molecular cement” としての役割であるが、より動的な生理機能も期待出来よう。例えば、Loh & Law (1) は、脂質の動的な機能の 1 つとして受容体機構において脂質それ自体が結合部位として直接作用すること、及びこの役割を担う候補として、多くの神経伝達物質や薬物分子が生理的条件下では陽イオンに帯電していることより、酸性脂質が最適であると指摘している。事実、いく人かの研究者 (2, 3, 4) により神経伝達物質や薬物の受容体としての可能性を有する proteolipids 分子の本体に酸性脂質が関与していることが報告されている。

他方ごく近年 Cascio & Kellar (5) によりラット中枢神経組織において、高親和性の [³H] tryptamine 結合部位 ($K_D=3nM$) の存在が報告された。この発見は、従来生理学的研究にて明らかにされた tryptamine ニューロンの存在より示唆される神経伝達物質としての tryptamine の生理機能を支持するものであり、さらに tryptamine 受容体の存在の可能性をも指摘した。

以上の様相より、本章では酸性脂質の中枢神経系における動的な生理機能の 1 つとして tryptamine 受容体機構への関与の可能性を想定し、その検索の第一段階として完全な in vitro 系での各種酸性脂質の再構成系に対する [³H] tryptamine の結合実験を立案した。

実験材料及び方法

(1) 酸性脂質の作製

CS, PS 及び PI は、新規に開発した以下の精製法にて調製した。体重 100–150 g の Wistar 系雄性ラットの全脳 (小脳及び嗅脳を除く) を chloroform–methanol (CM) 2 : 1 を用いて抽出し、粗脂質分画としてのいわゆる “Folch–washed extracts” (6) を得

た。同分画（総脂質として250mg）をケイ酸カラム（1.3×30cm）上に層積し、表2-1に示した溶媒系にてクロマトグラフィーを行ない各分画を得た。各脂質分画より一定量（総脂質として40~60 μ g）を TLC プレート上にスポットし、中性1次元展開溶媒 chloroform-methanol-water（70:30:4）にて TLC を行ない各分画中の脂質組成を確認した（図2-1）。

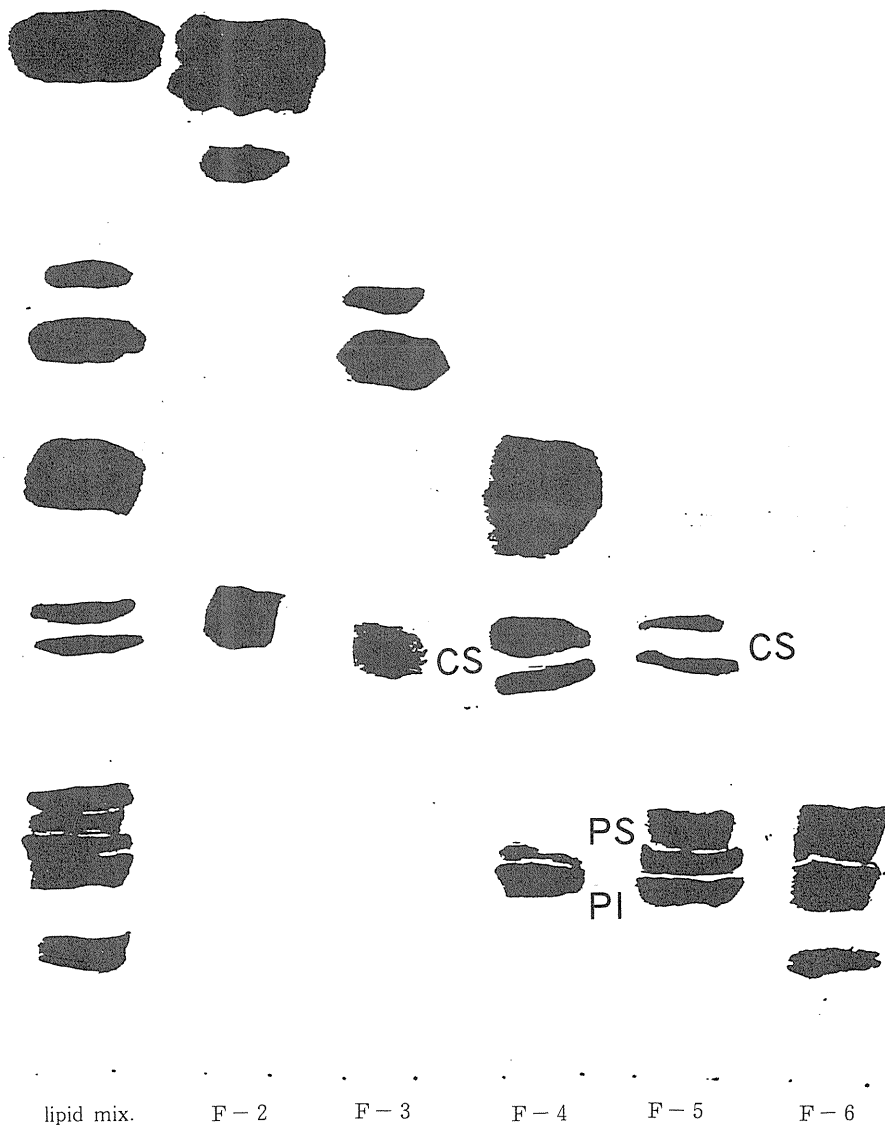


Fig. 2-1. Thin-layer chromatograms of the fractions separated by silicic acid column chromatography as described in Table 2-1.

Table 2-1. Silicic Acid Column Chromatography

Fraction	Solvent composition (chloroform-methanol, v/v)	Total volume (ml)
F-1	98:2	100
F-2	96:4	120
F-3	90:10	120
F-4	80:20	160
F-5	60:40	180
F-6	50:50	160

ケイ酸カラムクロマトグラフィーにて得られた分画より3種酸性脂質を含有するF-4及びF-5分画を集めその混液(総脂質として100mg)をDEAE-Celluloseカラム(2×25cm)上に層積し、表2-2に示した溶媒系にてクロマトグラフィーを行ないそれぞれの分画を得た。3種の酸性脂質の確認は、2次元TLC法[第1展開溶媒としてchloroform-methanol-ammonium hydroxide(14:6:1)、第2展開溶媒としてchloroform-acetone-methanol-acetic acid-water(10:4:2:2:1)]によった。

Table 2-2. DEAE-Cellulose (acetate type) Column Chromatography

Fraction	Solvent composition	Total volume (ml)
F-A	chloroform-methanol (7:3)	560
F-B	methanol	320
F-I fraction	acetic acid	400
F-C	methanol	360
F-II fraction	chloroform-methanol-ammonia, (2:1:0.06) containing 0.05 M ammonium acetate	400
F-D	methanol	80

図2-2にその結果を示したが、F-I分画にはPSが、F-II分画にはCS, PIが溶出されていることが明らかになった。

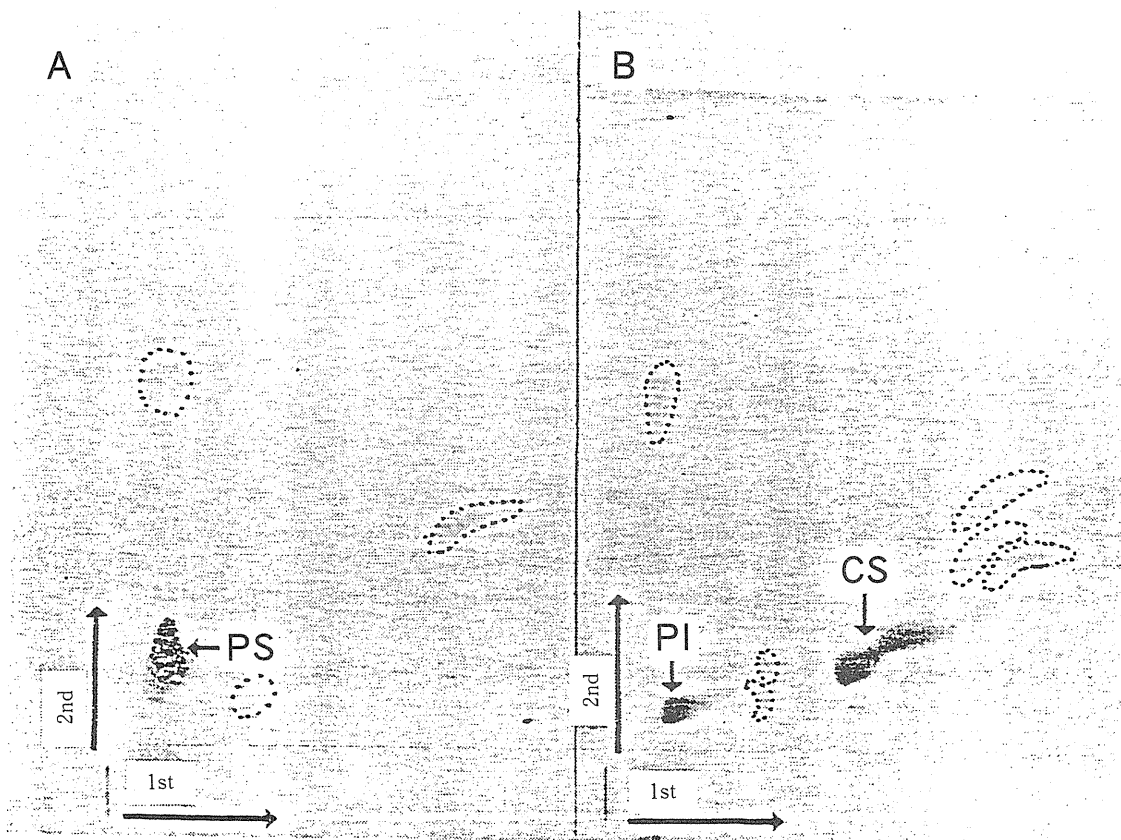


Fig. 2-2. Thin-layer chromatograms of the F-I and F-II fractions separated by DEAE-cellulose column chromatography. The plates were developed in a two-dimensional solvent system as described and compounds were detected with 50% sulphuric acid. (A) Acetic acid fraction (F-I) ; (B) chloroform-methanol ammonia-ammonium acetate fraction (F-II).

PSをさらに精製する為に、F-I分画(総脂質として8mg)をケイ酸カラム(1.3×30cm)上に層積し、chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water(10:4:2:2:1)より成る溶媒系を用いクロマトグラフィーを行ない図2-3に示す結果を得た。PSは、3番目のピークとして出現し、このカラムクロマトグラフィーにおけるそれぞれの脂質の溶出位置は、同一溶媒によるTLCの結果(図2-2)とよく一致していた。

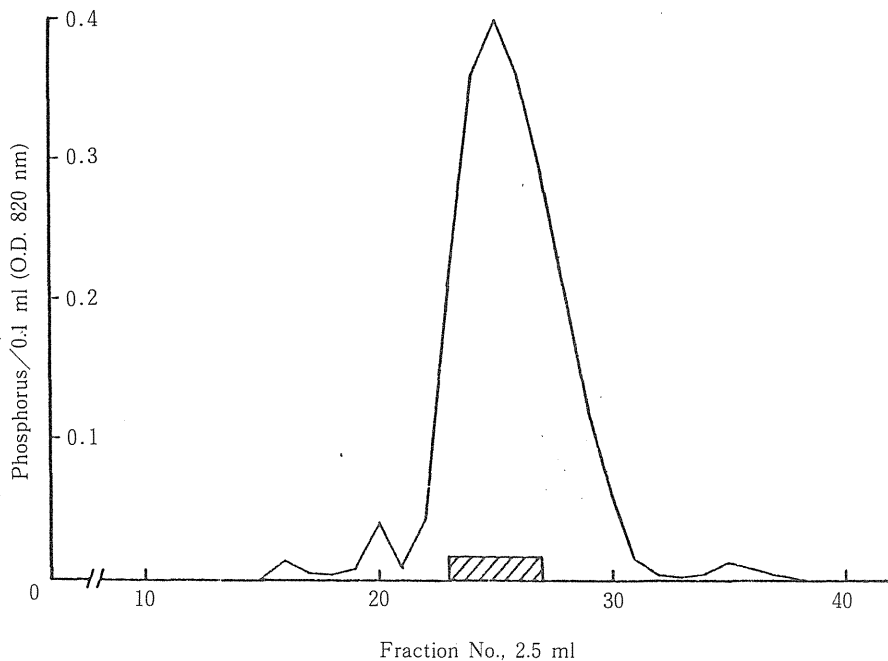


Fig. 2-3. Separation of phosphatidylserine from the F-I fraction by silicic acid column chromatography. The acetic acid fraction (F-I) separated by DEAE-cellulose column chromatography was loaded on to a silicic acid column and elution was carried out with chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (10:4:2:2:1). The elution pattern of lipid phosphorus is presented. The hatched area represents the separated fraction as PS.

主として CS 及び PI を含む F-II 分画 (総脂質として 18mg) をケイ酸カラム (1.3×30cm) 上に層積し、chloroform-methanol(CM) 9:1, 4:1 及び 3:2 の 3 種溶媒による Stepwise 法にてクロマトグラフィーを行なった。図 2-4 にその結果を示したが、CS は CM 4:1 にて PI は CM 3:2 にて溶出した。他方、大部分の不純物は、CM 9:1 及び 4:1 のフロント部分に溶出した。なお、3 種酸性脂質、CS、PS 及び PI の収量は、g tissue 当りそれぞれ 0.9, 2.5, 0.3mg であり、それらの純度は 96% 以上であった。

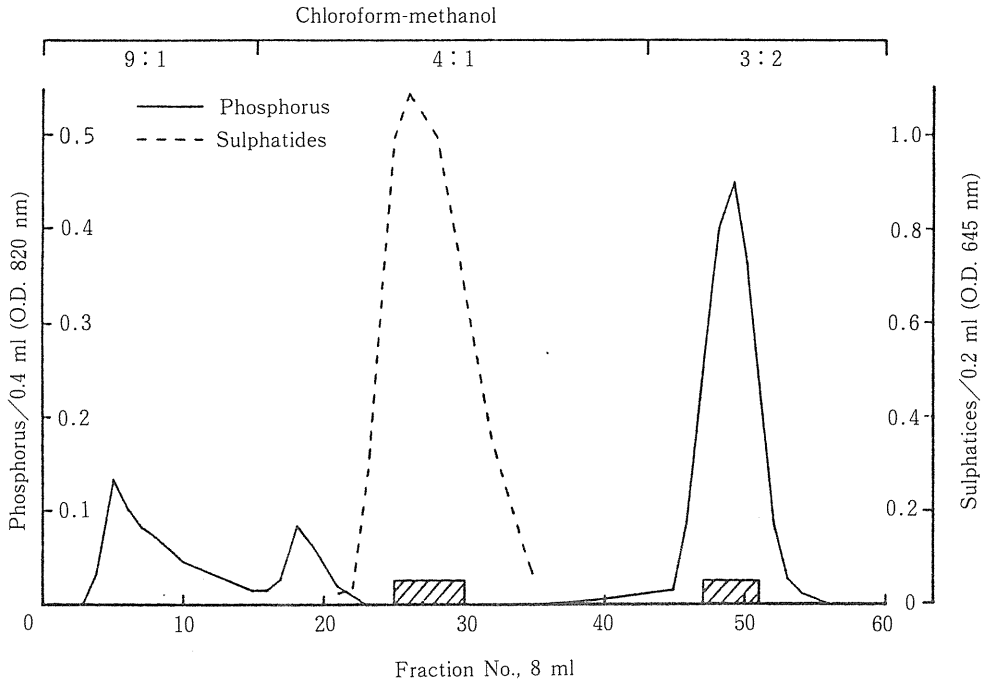


Fig. 2-4. Separation of sulphatides and phosphatidylinositol from the F-II fraction by silicic acid column chromatography. The chloroform-methanol-ammonia-ammonium acetate fraction (F-II) separated by DEAE-cellulose column chromatography was loaded on to a silicic acid column. Stepwise elution was carried out with the following solvents: 120 ml of chloroform-methanol (9 : 1), 240 ml of chloroform-methanol (4 : 1) and 120ml of chloroform-methanol (3 : 2). The elution profiles of lipid phosphorus and CS (as the coloured complex formed with CS and azure A) are indicated. The hatched areas represent the separated fraction as CS and PI.

(2) シナプス膜の調製

体重100-150 g の Wistar 系雄性ラットより全脳（小脳及び嗅脳を除く）を摘出した。細胞分画法については、石谷ら（7）の方法に従った。その概略を図 2-5 に示した。摘出した全脳より 0.32M sucrose にて 10% homogenate を作製し、このものを 1,000 × g 10 分間の遠心下、沈渣（核）と上清部に分画した。上清部をさらに 10,000 × g 20 分間の遠心にて Crude mitochondria 分画（沈渣）を得た。この分画を 10% homogenate 量に対し約 1/4 容量の 0.32M sucrose に懸濁後、0.8M 及び 1.2M sucrose の不連続ショ糖密度勾配層上に層積し日立 RPS-27 型 swing rotor を用い 53,500 × g 120 分間の遠心条件下

で F-A (particle density : 0.32-0.8M sucrose, myelin-rich), F-B (particle density : 0.8-1.2 M sucrose, synaptosomes - rich) 及び F-C (pellet, mitochondria-rich) の 3 分画に分画した。F-B 分画を集め、5 倍量の水にて希釈後、 $27,000 \times g$ 30 分間遠心し、沈渣を得た。このものを $3\text{ml}/\text{original g tissue}$ の水に懸濁させ低張処理とした。30 分間放置後再度 0.8M 及び 1.2M sucrose の不連続ショ糖密度勾配層上に層積し、上記条件下で遠心し得られた F-B 分画を synaptic plasma membranes 分画とした。なお、synaptic plasma membranes 分画の純度は、電子顕微鏡法にて確認した。(上記操作行程は、全て 4°C にて行なった。)

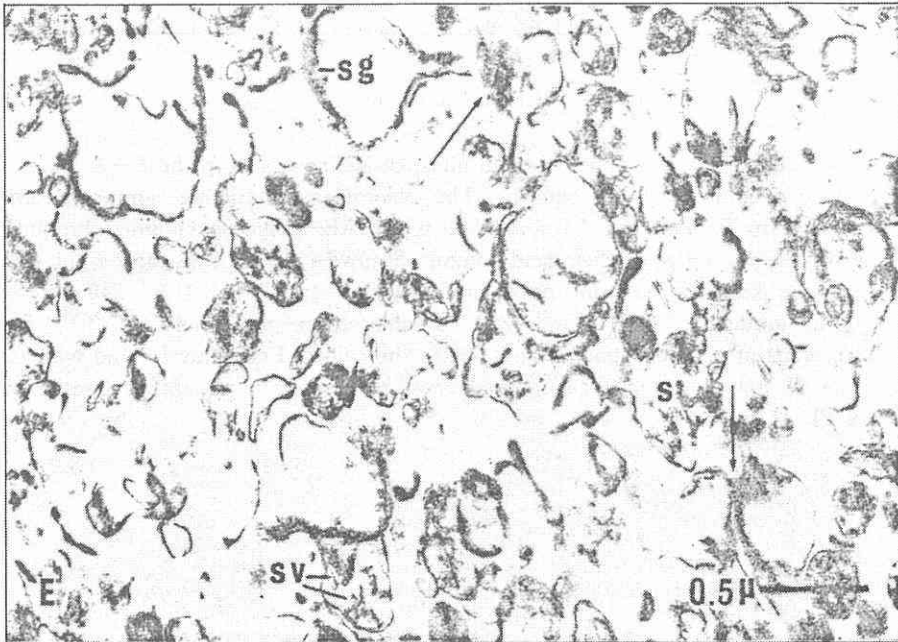


Fig. 2-6. Electronmicrograph of synaptic plasma membranes fraction showing a rather homogenous population of synaptosomes ghosts (sg). Arrows indicate attachment of subsynaptic structures. sv, synaptic vesicles; s, damaged synaptosomes.

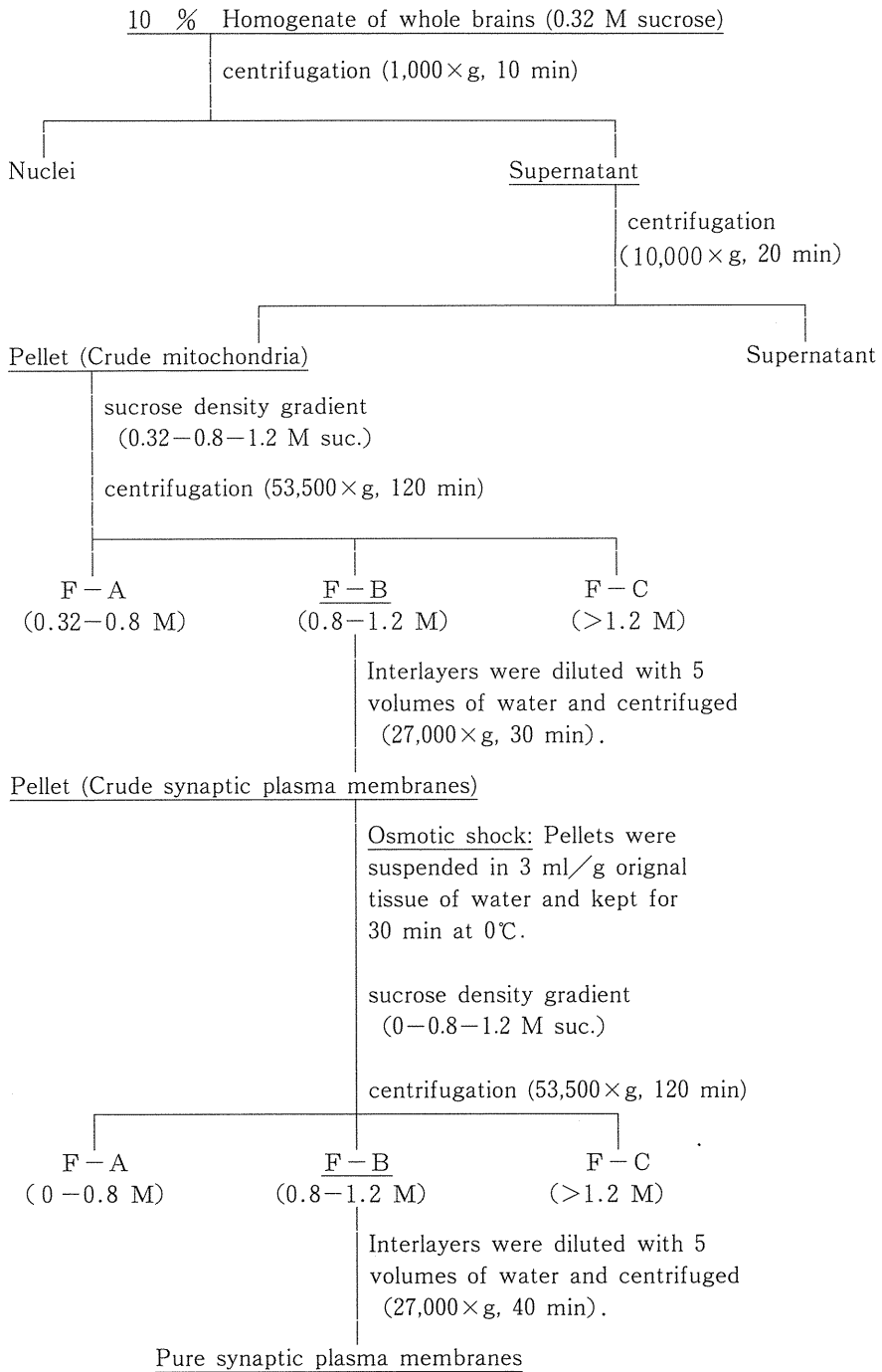


Fig. 2–5. Fractionation method of synaptic plasma membranes.

(3) 脂質値の測定

シナプス膜中の各脂質含量の測定は、第一章に記した方法に従った。ただし galactolipids の内 CS のみは orcinol 法より約30倍の高感度である AzureA 法 (8) にて計測した。

(4) [^3H] Tryptamine との結合実験

シナプス膜に存在する 3 種の酸性脂質含量 (CS, 17 μg ; PS, 108 μg ; PI, 26 μg) 値にて種々の脂質再構成系を作製し、butanol-water 混液 (含水率14% v/v) 1 ml に可溶化させた。同試料 (0.25ml) を室温下20分間 [^3H] tryptamine と incubate した。Incubation 後、反応混液を Sephadex LH₂₀ カラム (0.6 \times 15cm) 上に層積した。溶出系には Stepwise 法を用いた。溶媒と溶出量は、chloroform, chloroform - methanol (CM) 10:1 を各 8 ml、及び (CM) 9:1 12ml であった。クロマトグラフィー後、各分画より一定量 (0.4ml) をバイアルビンに入れ、空気気流下38 $^{\circ}\text{C}$ にて蒸発後、toluene-ethanol (9:1 v/v) シンチレーター-10ml を加え、液体シンチレーションカウンターにて計数効率30~40% でその放射能を測定した。

実験結果

[^3H] Tryptamine と各種再構成系との結合実験を行なうに際し、シナプス膜に含まれる各脂質の定量分析を行なった。その結果を表 2-3 に示した。各脂質値について、

Table 2-3. Lipid Composition of Synaptic Plasma Membranes

Lipid	Cortices	Stems
Cholesterol	70.0 \pm 5.5	76.3 \pm 7.2
Minor galactolipids	0.2 \pm 0.1	1.5 \pm 0.5
Cerebrosides	1.1 \pm 0.1	15.6 \pm 1.4
Sulphatides	0.8 \pm 0.1	7.8 \pm 0.9
Ethanolamine phosphatides	94.4 \pm 3.4	101.9 \pm 6.3
Choline phosphatides	120.3 \pm 3.3	128.3 \pm 10.1
Sphingomyelin	12.3 \pm 0.5	16.9 \pm 1.3
Phosphatidylserine	24.9 \pm 1.2	29.1 \pm 1.5
Phosphatidylinositol	5.9 \pm 1.1	7.0 \pm 1.0

Values are expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight (mean \pm S. E. M. of 4 determinations). Cortices: cortex+hippocampus. Stems: midbrain+striatum+hypothalamus+pons-medulla.

Cortices (cortex + hippocampus) と Stems (midbrain + striatum + hypothalamus + pons + medulla) に分けて測定した両者間で、minor galactolipids, cerebrosides, CS を除いて他のすべての脂質はほぼ同程度、両分画にふくまれていることが判明した。従って、以下の再構成系実験での脂質含量はそれぞれ両試料の平均値を用いた。なお、反応液0.25 ml は、1 mg 乾燥シナプス膜重量に対応するものとした。

CS, PS 及び PI より作製した各種酸性脂質再構成系と [³H] tryptamine との結合実験を Sephadex LH₂₀ カラムクロマトグラフィーにて行なった。表 2-4 にその結果を示したが、PS, PS+CS, PS+PI 及び CS+PS+PI 系は互いに同程度の [³H] tryptamine 結合能を再現したが、他の再構成系には何らの結合能も認められなかった。これらの結果より、tryptamine 結合能を再生するには、PS を主成分とする特異的に構築されたある種の脂質複合体の必要性が示唆された。

Table 2-4. [³H] Tryptamine Binding to Various Reconstituted Fractions

Fraction	Amount of tryptamine bound (%)
CS	None
PS	60.0 ± 1.5
PI	None
CS + PS	61.1 ± 1.0
CS + PI	None
PS + PI	62.4 ± 2.6
CS + PS + PI	61.0 ± 2.6

Various fractions were incubated with 5 nM of [³H] tryptamine. After incubation, the mixtures were passed through a Sephadex LH₂₀ column, and the bound radioactivity was measured as described in the text. Results are expressed as the percent of total input radioactivity (mean ± S. E. M. of 5 experiments).

さらに、ほぼ同程度の結合能を有した 4 種構成系に対し、tryptamine 及び 5-methoxytryptamine を用いて競合実験を行ない分子構築の程度を比較検討した。表 2-5 にその結果を示した。5-methoxytryptamine を用いた場合、PS+CS 系においては見かけ上の IC₅₀ 値が他の再構成系に比べ最も良い値を示した。他方、tryptamine を用いた場合は、4 種類の再構成系においては有意の差が認められなかった。以上の結果より PS+CS 系を用いて以下の実験を行なった。

Table 2-5. IC_{50} Values of Tryptamine and 5-Methoxytryptamine against [3H] - Tryptamine Binding to Several Reconstituted Fractions

Fraction	$IC_{50}, \times 10 \mu M$	
	Tryptamine	5-Methoxytryptamine
CS + PS + PI	7.8 \pm 0.69	3.7 \pm 0.17
PS + PI	8.2 \pm 0.38	4.3 \pm 0.52
PS + CS	7.0 \pm 0.68	1.5 \pm 0.21*
PS	7.3 \pm 0.75	4.4 \pm 0.44*

The reconstituted fractions were preincubated with various concentrations (5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, and 500 μM) of displacers for 30 min, and then 5nM of [3H] tryptamine was added. After incubation, the bound radioactivity was measured by Sephadex LH₂₀ column chromatography as described in the text. Both tryptamine - and 5-methoxy-tryptamine-specific bindings were defined by the competition plateau occurring at 250 μM displacers. The apparent IC_{50} value (mean \pm S. E. M. of 4 experiments) is defined as that drug concentration required to inhibit 50% of specific binding, and was calculated from the computer-generated competition curve. *Significantly different from PS fraction at $P < 0.001$.

PS 及び CS より成る再構成系に対し [3H] tryptamine と incubate し, Sephadex LH₂₀ カラムクロマトグラフィーにて [3H] tryptamine, PS 及び CS の溶出パターンを検討した (図 2-7)。カラムからの PS 及び CS の total recovery はそれぞれ 75.4%, 82.9% であり、両脂質の大部分 (72.9%, 70.4%) は CM 9:1 にて溶出した。結合型 [3H] tryptamine の溶出ピークと PS のそれとは CM 9:1 のほぼ同じ位置に確認された。他方 CS は、[3H] tryptamine の結合型ピークより 5~7 分画後方に溶出された。再構成系での脂質複合体の形状 (逆相ミセル、リポゾーム、等) に関しては不明であるが、結合型 [3H] tryptamine の溶出領域内の CS 及び PS は tryptamine との結合型であると仮定すると、おのおのの tryptamine に対するモル比は、5,000 及び 80,000 となった。

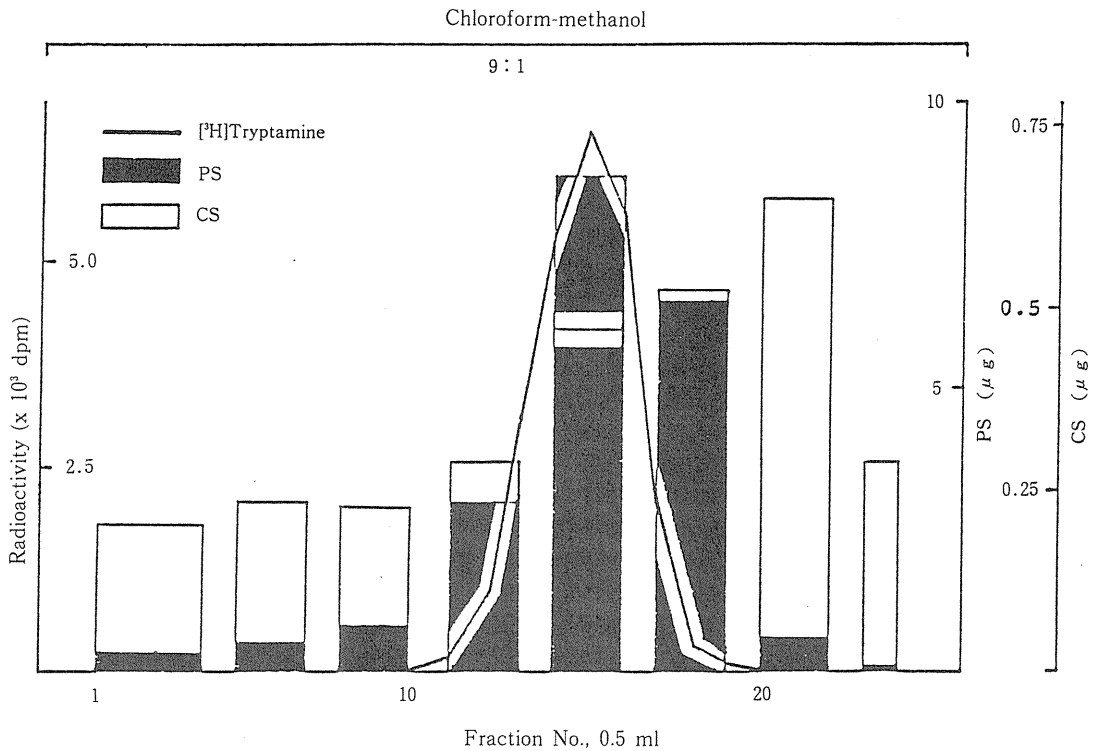


Fig. 2-7. Sephadex LH₂₀ chromatogram of the reconstituted fraction with PS and CS. Sample was incubated with 2×10^{-9} M of [³H] tryptamine. The discontinuous elution system described in the text was used. To determine the PS and CS concentration, each 3 (or 4) fractions were combined.

PS+CS系が示す tryptamine 結合能を動力的に検討した ([³H] tryptamine 0.8-15nM)。その結果を図 2-8 に示したが、飽和曲線 ([total] - [nonsaturable]) 及びその二重逆数プロットより明らかな様に、同再構成系には少なくとも 2 種類の tryptamine 結合物質 (部位) の存在が示唆され、それぞれの見かけ上の K_D 値は、3.0 及び 10nM であった。

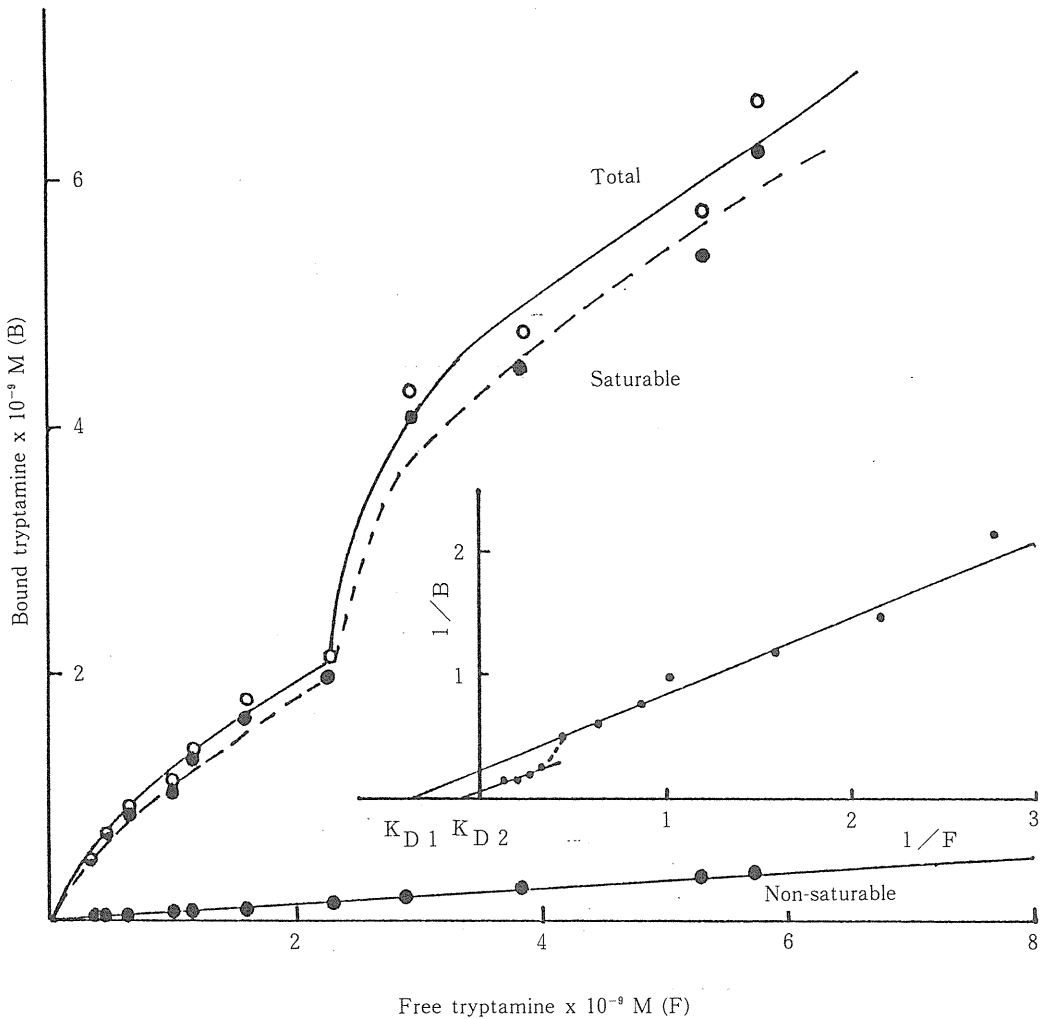


Fig. 2-8. Binding curves and double reciprocal plot of $[^3\text{H}]$ tryptamine to the reconstituted fraction with PS and CS. Saturable binding was defined as the total binding minus binding in the presence of 5×10^{-4} M unlabelled tryptamine (non-saturable), and those components are plotted as a double reciprocal. Each point represents the mean of 2-3 experiments. K_{D1} , 3 nM and K_{D2} , 10 nM

2種酸性脂質より成る再構成系が示す $[^3\text{H}]$ tryptamine 結合能の特異性を検討するために各種インドールアミン類似体及び神経伝達物質を用いて競合実験を行なった。なお、高親和性結合部位を選択的に識別すべく $[^3\text{H}]$ ligand 濃度を 3nM に定めた。表 2-6 にその結果を示したが、tryptamine 及び 5-methoxytryptamine のみが高親和性 $[^3\text{H}]$ - tryptamine 結合を抑制し、他の薬物群は何らの作用も示さなかった。

Table 2-6. Inhibition of [³H] Tryptamine Binding by Various Compounds

Compound	% Inhibition
Tryptamine	88.5 ± 0.7
5-Hydroxytryptamine	None
5-Methoxytryptamine	100
5, 6-Dihydroxytryptamine	None
Bufotenine	None
5-Methoxy-N, N-dimethyl-tryptamine	None
Dimethyltryptamine	None
5-Hydroxytryptophan	None
5-Hydroxy-3-indole acetic acid	None
Dopamine	None
Noradrenaline	None
Acetylcholine	None
Histamine	None
r-Aminobutyric acid	None
Glutamic acid	None
Aspartic acid	None
Glycine	None

The reconstituted fraction with PS and CS was preincubated with various compounds (all : 500 μ M) for 30 min and then 3 nM of [³H] tryptamine was added. After incubation, the bound radioactivity was measured by Sephadex LH₂₀ column chromatography as described in the text. (mean ± S. E. M. of 4 experiments).

考 察

第一章において、myelin proteolipidsに存在する tryptamine 結合物質の本体として特定の脂質群（特に酸性脂質）の関与の可能性が強く示唆された。著者は、5-HT 結合物質の本体において酸性脂質の関与の可能性を支持する実験結果を得た。すなわち図 2-9 及び 2-10に示す様に結合型 [¹⁴C] 5-HT の溶出領域内に CS の存在が認められ、さらに CS+PI系より成る再構成系が [¹⁴C] 5-HT に対して高親和性の結合能を有することを明らかにした。

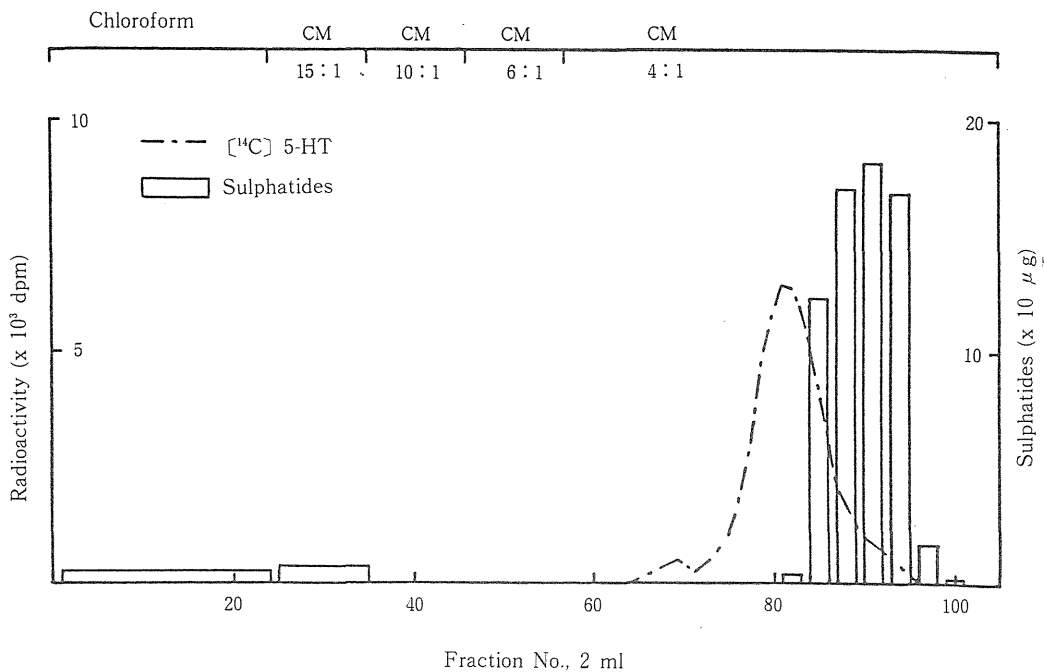


Fig. 2-9. Sephadex LH₂₀ chromatogram of the myelin butanol extracts (TE). The water-treated TE was incubated with 5×10^{-7} M of [¹⁴C] 5-HT.

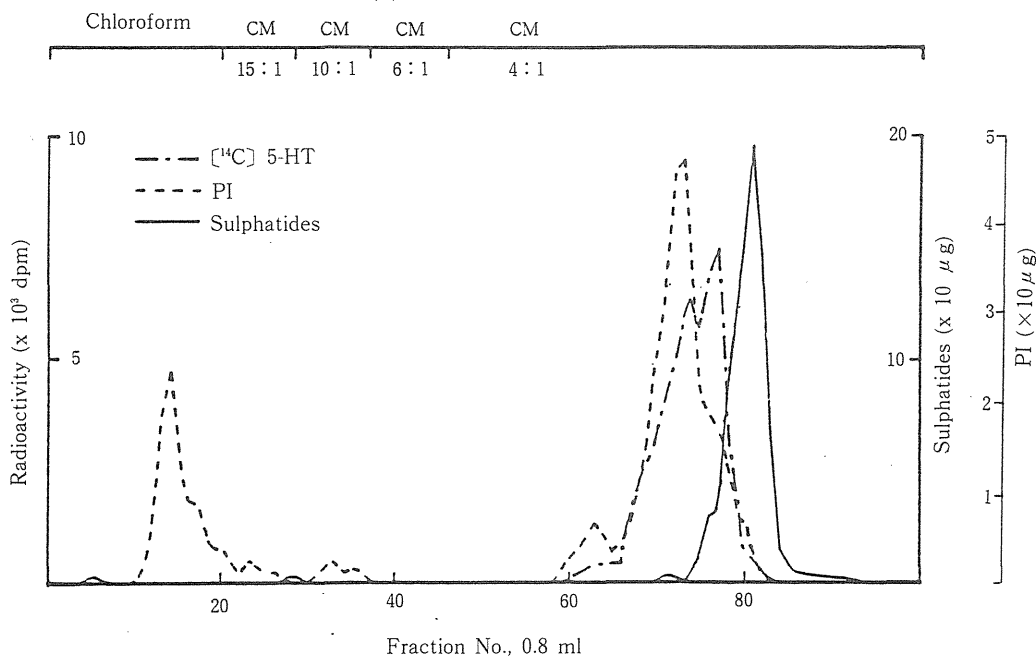


Fig. 2-10. Sephadex LH₂₀ chromatogram of the recombinant fraction with sulphatides and PI. Sample was incubated with 5×10^{-7} M of [¹⁴C] 5-HT.

他方、予備実験として [^{14}C] tryptamine と酸性脂質再構成系との結合実験を（F-C分画中のPS, PI含量による脂質再構成系）行なった（図2-11）。PS単独系は、元の myelin proteolipids が示す溶出パターンと類似した同程度の結合能を示した。しかしながら、競合実験の結果よりPS単独及びPS+PI系共にインドールアミン類似体及び他の神経伝達物質に対する特異性を再生していないことが判明した。以上の知見より、同酸性脂質群の情報伝達系での動的機能の一つとしてのtryptamine受容体機構への関与の可能性を完全な in vitro での脂質再構成実験手技を用いて詳細な検討を試みた。

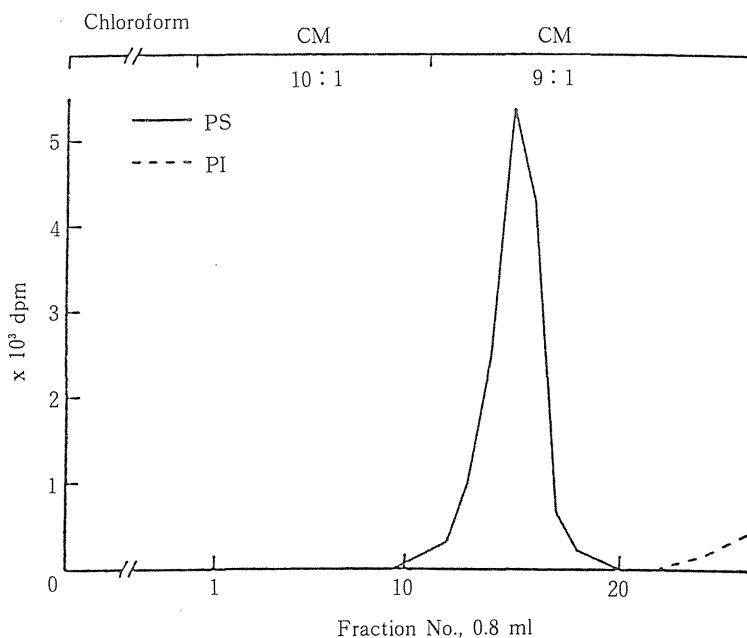


Fig. 2-11. Sephadex LH₂₀ chromatograms of phosphatidylserine and phosphatidylinositol. An aliquot of sample (20 μg PS and 3 μg PI) was dissolved in 0.3 ml of butanol-water mixture (14%, v/v) and then incubated with 5×10^{-7} [^{14}C] tryptamine. Stepwise elution was carried out as described in the text.

3種酸性脂質より調製した種々の脂質再構成系への [^3H] tryptamine 結合実験の結果、PS, PS+CS, PS+PI及びCS+PS+PI系共に tryptamine 結合能を保持していた。しかしながら、これら4種の脂質再構成系の分子構築度の違いを競合実験より明らかにすることが出来た。すなわち、上記4種の脂質再構成系において、tryptamine に対す

るIC₅₀値には差異が認められないが、5-methoxytryptamineの場合、PS+CS系が最も低い値（すなわち、高親和性）を示した。これらの結果より、³H tryptamineに対して高親和性結合能を再生する脂質再構成系として、本章ではPS+CS系を選択した。

PS+CS系への³H tryptamine結合能を動力学的に検討した結果、結合物質（または部位）が2つより成る多様性の結合様式を示した。この機構については、現在のところ適切な説明が出来ないが、酸性脂質再構成系の結合様式の多様性は、³H 5-HTとの結合実験でも観察されている（4、9）。今、かりにこれらの結合物質（部位）がお互いに相関関係を持たないとすれば、見かけ上のK_D値は二重逆数プロットで算出可能となる。本再構成系においては、上記解析法にて3及び10nMのK_D値が得られた。なお、脳組織由来のシナプス膜に存在する高親和性³H tryptamine結合部位のK_D値に対しては、いく人かの研究者（5、10、11）によって1.2~3.7nMという値が報告されている。さらに、同結合能の特異性を検討した結果、tryptamine及び5-methoxytryptamineとは相互作用を示すが他の物質とは何らの親和性も示さなかった。

本章で立案した完全なin vitro系での酸性脂質再構成系実験にて、ある特定の酸性脂質群（PS, CS）より構築される脂質複合体が³H tryptamineに対して特異的高親和性結合能（すなわち、~nMのK_D値、5-HTや他の神経伝達物質と何らの親和性をも示さない）を示すことを明らかにした。

近年いく人もの研究者により特定の酸性脂質が生体生理活性物質の同受容体への結合に関与している事実が判明しつつある。例えば、Lohら（12）は、opiate受容体の認識部位の立体構造的考察より、同部位の本体としてのCSの可能性を指摘している。Ebadi & Chweh（13）は、GABA認識部位にsulpholipidsが含まれていることを報告している。さらに、L-glutamate受容体の結合能をPSが制御していること（14）、及び5-HT₁受容体の分子構築においてCS, PS, PIの3種の酸性脂質が認識部位並びに同分子機構の調節因子としての役割を担っていること（15、16）が実証されている。以上の様相より、2種酸性脂質PS, CSはtryptamine受容体の分子構築において一部分認識部位としての関与の可能性が強く示唆された。

参 考 文 献

- 1) Loh, H. H. and Law, P. Y. : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 201 (1980)
- 2) Wu, Y. C., Cho, T. M. and Loh, H. H. : J. Neurochem. 29, 589 (1977)
- 3) Johnson, D. A., Cho, T. M. and Loh, H. H. : J. Neurochem. 29, 1105 (1977)
- 4) Miyakawa, A. and Ishitani, R. : Life Sciences 31, 1427 (1982)
- 5) Cascio, C. S. and Kellar, K. J. : European J. Pharmacol. 95, 31 (1983)
- 6) Folch-Pi, J., Lees, M. and Sloan—stanley, G.H. : J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
- 7) Ishitani, R., Satoh, T., Suga, T. and Kitagawa, H. : Japan. J. Pharmacol. 22, 313 (1972)
- 8) Kean, E. L. : J. Lipid Res. 9, 319 (1968)
- 9) Nishi, A., Karasawa, A., Yoshikawa, S. and Ishitani, R.: Japan. J. Pharmacol. 38, 411 (1985)
- 10) Bruning, G. and Rommelspacher, H. : Life Sciences 34, 1441 (1984)
- 11) Wood, P. L., Pilapil, C., LaFaille, F., Nair, N. P. V. and Glennon, R. A. : Arch. int. Pharmacodyn. 268, 194 (1984)
- 12) Loh, H. H., Law, P. Y., Ostwald, T., Cho, T. M. and Way, E. L. : Fed. Proc. 37, 147 (1978)
- 13) Ebadi, M. and Chweh, A. : Neuropharmacology 19, 1105 (1980)
- 14) Foster, A. C., Fagg, G. E., Harris, E. W. and Cotman, C. W. : Brain Res. 242, 374 (1982)
- 15) Bennett, J. P., Jr. and Snyder, S. H. : Mol. Pharmacol. 12, 373 (1976)
- 16) Yoshikawa, S. and Ishitani, R. : Life Sciences 36, 485 (1985)

第 三 章

中枢神経系での tryptamine 受容体機構における酸性脂質の役割について

緒 言

Tryptamine は構造的にインドール骨格を有し、中枢神経系に存在するトレースアミンの 1 つであり、Hess ら(1) によって1959年に始めて脳内に存在することが定量的に確認された。しかしながら、同じインドール骨格を有する5-HTについては、神経刺激伝達機構におけるその生理機能の研究が進んでいるのに対し、tryptamine に対してはほとんど注目されなかった。このことに対する最大の理由は、内在性 tryptamine 量がきわめて少ないことであった。5-HT の場合は、0.3~0.4 $\mu\text{g/g}$ 組織(2) で存在しているのに対し、tryptamine は0.5~1 ng/g 組織程度(3) であった。この量的に少ないということが、同物質の局在性、及び生理応答に対する定量分析に関する検索を遅らせた。

Tryptamine ニューロンが中枢神経系に存在することを始めて報告したのは Dewhurst & Marley (4) であった。彼らは、ヒヨコを用い脳室内へ5-HTを注入すると、皮質における脳波において抑制作用が見られるが、tryptamine の場合は興奮作用が引き起こされることを報告した。また Cox ら(5) は、ラット視床下部への5-HT及び tryptamine の注入実験より、5-HT では基礎体温が下降するが、tryptamine では逆に上昇するという体温に関して両インドールアミンでは正反対の作用を有することを報告した。さらに Jones (6, 7) は、ラット皮質ニューロン群へ微小電極法を用い5-HT及び tryptamine を注入させた後の変化を観察すると、ニューロン群膜電位のおおよそ40% は tryptamine を用いることによって抑制されるが、5-HT の場合は興奮することを報告し、中枢神経系には、5-HT ニューロンとは別に tryptamine ニューロンの存在をより明白にした。他方、radioreceptor-結合実験法の進歩により、近年 Cascio & Kellar (10) は、ラット中枢神経系組織において、高親和性の [^3H] tryptamine 結合部位 ($K_D = 3$ nM) すなわち tryptamine 受容体の存在の可能性を報告した。

以上の知見より、前章で得られた実験結果より導き出された仮説、すなわち特定の酸性脂質群より成る一種の脂質複合体が高親和性 tryptamine 結合部位 (tryptamine 受容体) の分子構築における認識部位または調節因子として関与の可能性を、受容体レベルの検索にて実証することに最終目標を定めた。本章では、ラット中枢神経系組織より

ナプス膜を単離し、同膜上に存在する tryptamine 受容体の特異的識別法（温度依存性高親和性結合）を新規に開発し、さらに同受容体機構への酸性脂質の確かな関与を明らかにした。

実験材料及び方法

(1) シナプス膜及び各種脂質の作製

体重100–150 g の Wistar 系雄性ラットの全脳（小脳及び嗅脳を除く）より0.32M sucroseにて10%homogenateを作製後、第二章（P. 29）ですでに記述した石谷らの細胞分画法（8）にてシナプス膜分画（顆粒密度：0.8–1.2M sucrose）を得た。同膜分画を遠心後、沈渣としての膜成分は最終的に0.05M Tris–HCl buffer, PH7.4にて懸濁（4 mg protein/ml）し、液体窒素下急速凍結させ–75℃に保存した（通常1～3週間）。本実験で使用した脂質群は、ラット全脳（小脳及び嗅脳を除く）より単離精製（純度96%以上）した。酸性脂質（CS, PS, PI）はすでに記述した（第二章P. 24）方法を、ethanolamine phosphatides（PE）並びに choline phosphatides（PC）には Rouserら（9）の方法を用いた。

(2) [³H] Tryptamine 受容体との結合実験

凍結膜試料を急速解凍後、一定濃度の膜懸濁液（通常2 mg protein/ml）を37℃55分間 incubate した（up-regulation 操作）。Preincubation 後27,000×g 25分間遠心し得られた膜分画を standard assay medium（5.7mM ascorbic acid, 10μM pargyline–0.05 M Tris buffer, PH7.4）に懸濁（mg protein/ml）し、radioreceptor–結合実験に用いた。結合実験の条件は、基本的には Cascio & Kellar（10）の方法に準じた。すなわち、上記膜懸濁液0.5ml を用いて一定濃度の [³H] tryptamine と 0℃60分間 incubate した。反応終了後、rapid-filtration 法（Whatman GF/B filter）にて結合型 [³H] – tryptamine 量を計測した。使用したシンチレーターは toluene/Triton X-100（3：1）系であり、液体シンチレーションカウンターにて計数効率30～40%でその放射能を測定した。特異的 [³H] ligand 結合量は、〔総結合量〕 – 〔非特異的結合量：1–10μM 非放射性 tryptamine 存在下での結合量〕で得られる値とした。結合実験は全て、各3列を1組とした。

(3) 膜蛋白質の定量

膜蛋白質の定量は、牛血清アルブミンを standard とする Lees & Paxman らの

SDS-Lowry 法 (11) にて測定した。

(4) Data 解析

Scatchard プロットの結果は、Boeynaems & Dumont による nonlinear regression (非直線回帰) 法 (12, 13) にて解析した。なお、one-site か two-site model のいずれに適しているかの検定は、F-test 分析 ($P < 0.01$) にて行なった。使用したコンピューターは NEC PC-9800 である。

(5) 脂質修飾試薬によるシナプス膜の前処理

脂質修飾試薬として本実験では、Azure A, phospholipase A_2 (EC 3.1.1.4 from, Naja Naja, 290U/mg solid) 及び D (EC 3.1.4.4 from Peanut, 250U/mg solid) を用いた。反応条件は、Azure A においては、0.05M Tris buffer (PH7.4) で 0 °C 30分間膜試料 (2 mg protein/ml) と incubation 後、直ちに up-regulation (37 °C 55分間) を行なった。Phospholipases 群では、0.05M Tris-2mM $CaCl_2$ buffer (PH7.4) 下 37 °C 55分間とした。(すなわち、up-regulation 操作と同時 incubation)。なお、5 mM EGTA の添加にて反応を停止させた。Phospholipase A_2 処理後の膜試料は、直ちに 1 % defatted BSA にて 0 °C 30分間 incubate し、同酵素にて膜脂質より生成した by-products (fatty acid, lysophosphatides) を洗浄除去した。

実験結果

[3H] Tryptamine との結合実験に際し、まず [3H] tryptamine 結合への 37 °C における preincubation 時間を検討した。図 3-1 にその結果を示したが 10分間の incubation ですでに特異的 [3H] tryptamine 結合能は 1.9 倍の増大が認められ、55分間の incubation にて最大 2.4 倍の増加が得られた。さらに興味ある現象として、20分間の incubation で非特異的結合量の著しい減少 (約 70%) が観察出来た。これらの事実より、preincubation 過程で発現した特異的結合部位の少なくとも一部分は、非特異的結合部位からの転換に起因するかもしれない。なお、膜試料の懸濁濃度について検討し (0.5, 1.0, 2.0 mg protein/ml), 2.0 mg protein/ml の条件下が最も再現性の高い結果を与えることが判明した (表 3-1)。

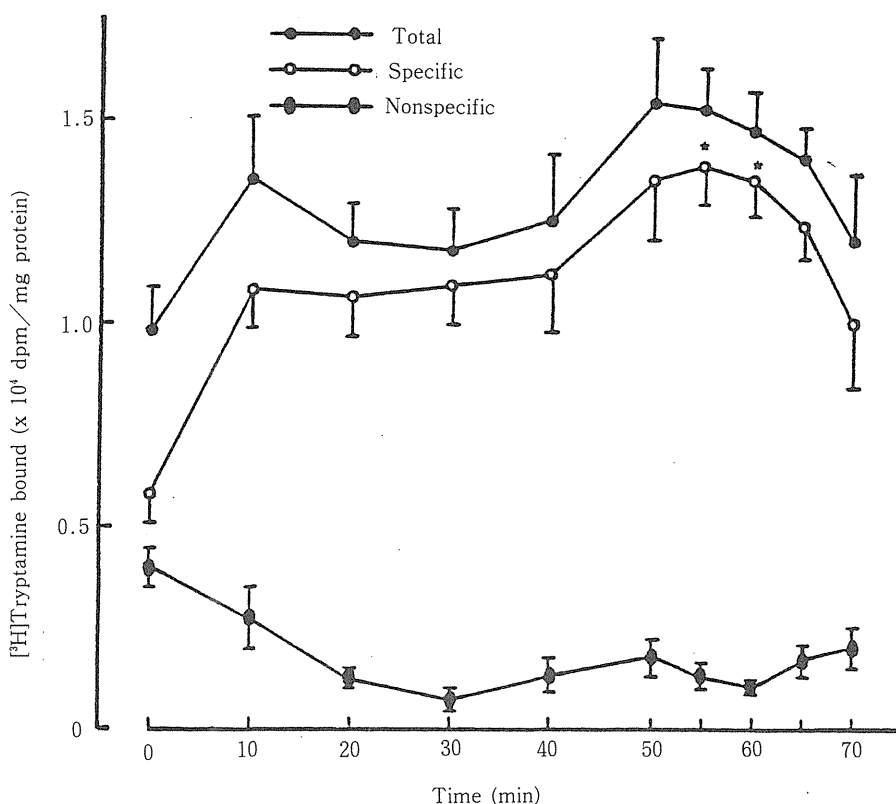


Fig.3-1. Effect of preincubation time on $[^3\text{H}]$ tryptamine binding. Rat brain synaptic plasma membranes were suspended in 0.05 M Tris-HCl buffer, PH 7.4 (2 mg protein/ml). Aliquots were preincubated for the appropriate period of time at 37°C. Following centrifugation and washing binding assay was done with 3 nM $[^3\text{H}]$ tryptamine as described in the text. Values are expressed as the mean \pm S. E. M. of 4 experiments.

*Significantly different from the value of 10 min period at $P < 0.05$.

Table 3-1. Effect of Concentration of SPM — suspension on Subsequent $[^3\text{H}]$ - Tryptamine Binding

Preincubation time (min)	Concentration of SPM-suspension (mg/ml)		
	0.5	1	2
30	11044 \pm 2877	7660 \pm 1999	10994 \pm 967
40	9077 \pm 3251	9614 \pm 1239	11248 \pm 2103
60	9776 \pm 1754	9401 \pm 2277	13630 \pm 872

Rat brain synaptic plasma membranes (SPM) were suspended in 0.05 M Tris-HCl buffer (PH 7.4) as indicated. After preincubation for the appropriate period of time at 37°C, specific binding (dpm/mg protein) was measured with 3 nM $[^3\text{H}]$ tryptamine as described in the text. The data are expressed as the mean \pm S. E. M. of 3 experiments.

温度依存性- $[^3\text{H}]$ tryptamine 結合能の増大（すなわち、up-regulation）の機構を検討する為に Scatchard 解析を行なった。その結果を図 3-2, 3-3 に示したが、膜試料の 0°C preincubation 下での $[^3\text{H}]$ tryptamine 結合の Scatchard プロットは直線性を示し、 $K_D=33.1\text{nM}$, $B_{\text{max}}=543\text{ f moles/mg protein}$ であった。しかるに、 37°C 55 分間の preincubation を行なうと、得られた同プロットは非直線性を示した。さらに、nonlinear regression 解析の結果、one-site よりも two-site モデルに統計的に有意に適合した。その時の K_D , B_{max} 値は、高親和性部位で 0.45nM , 102.7 f moles 、低親和性部位で 33.7nM , 603.4 f moles であった。

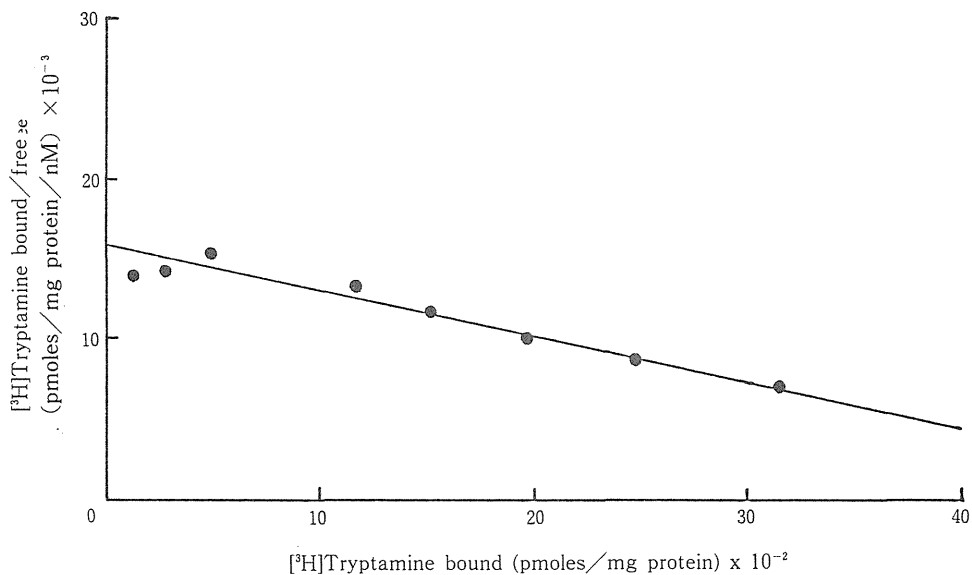


Fig. 3-2. Scatchard plot of $[^3\text{H}]$ tryptamine binding: effect of temperature. Membrane preparations were preincubated for 55 min at 0°C and the subsequent $[^3\text{H}]$ tryptamine (1–25nM) binding capacities of those were estimated as described in the text.

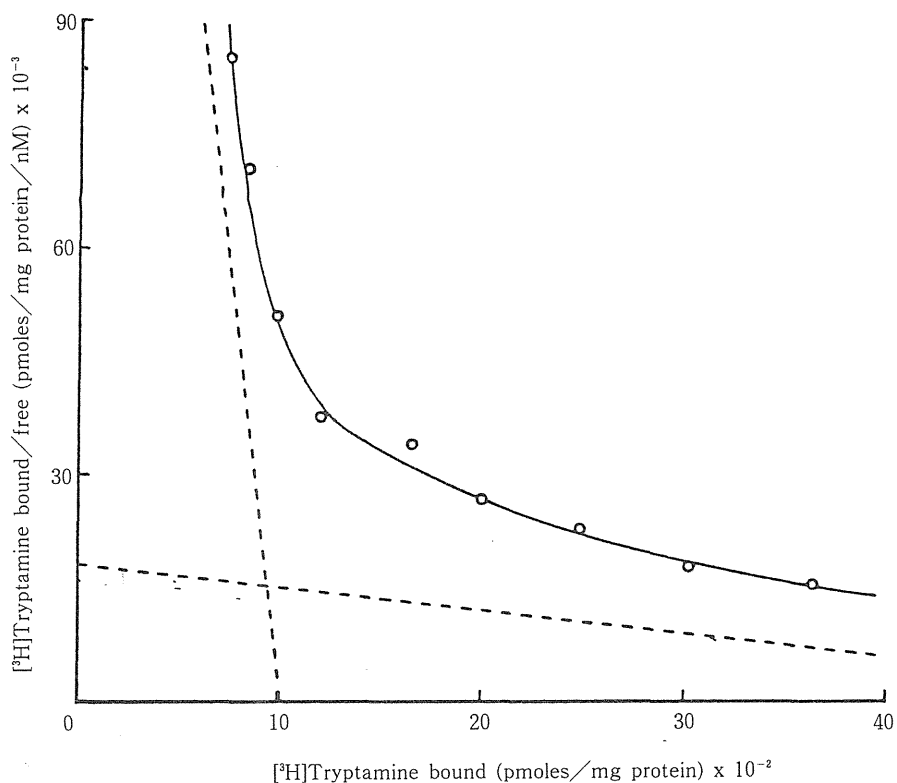


Fig. 3-3. Scatchard plot of $[^3\text{H}]$ tryptamine binding: effect of temperature. Membrane preparations were preincubated for 55 min at 37°C and the subsequent $[^3\text{H}]$ tryptamine ($1-25\text{nM}$) binding capacities of those were estimated as described in the text. Results shown are those of a typical experiment, performed 2-3 times.

The computer-generated curves were derived from nonlinear regression analysis and two dashed lines were drawn theoretically from the curvilinear plot using a two-site model.

37°C 55分間の preincubationにて認められた $[^3\text{H}]$ tryptamine結合部位の多様性について、さらに Monroe & Smith (14) の方法に準じて付加的実証を試みた。すなわち、高親和性と低親和性結合部位をそれぞれ優先的に標識すべく 3nM と 25nM の $[^3\text{H}]$ ligandを用いて、非放射性 tryptamine との競合実験を行ない、2種 $[^3\text{H}]$ ligand 濃度でのスロープ(見かけの Hill 係数と同等)を比較検討した。その結果を図 3-4 に示したが、 25nM ではスロープに典型的な 2 相性が認められた。これらの結果より、 $[^3\text{H}]$ tryptamine 結合部位の多様性の存在がより一層支持された。

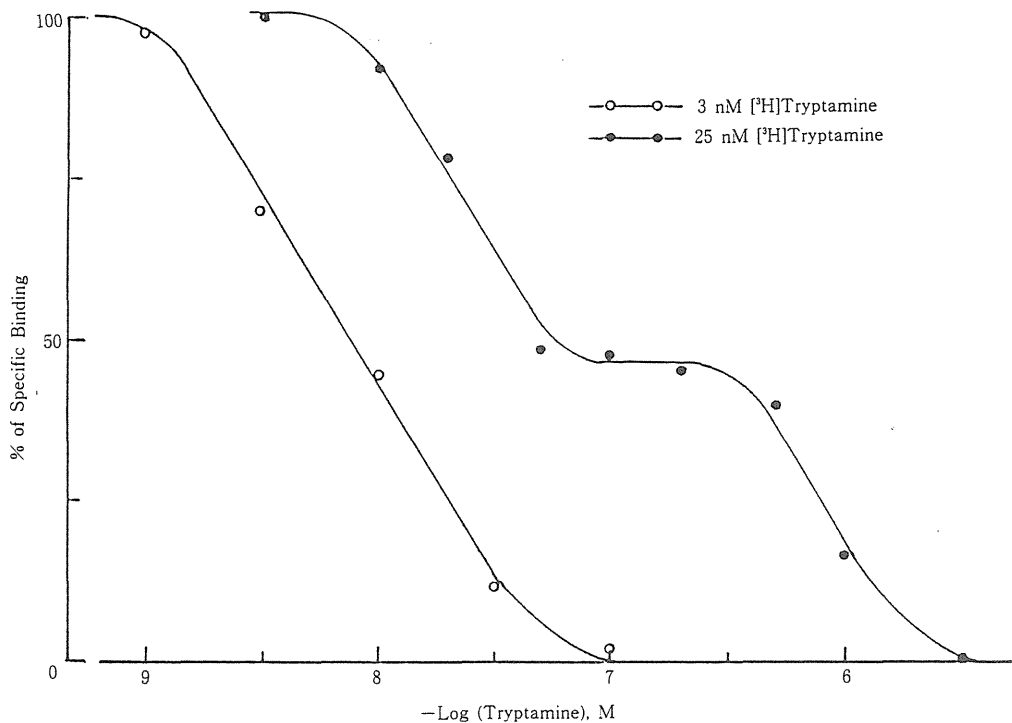
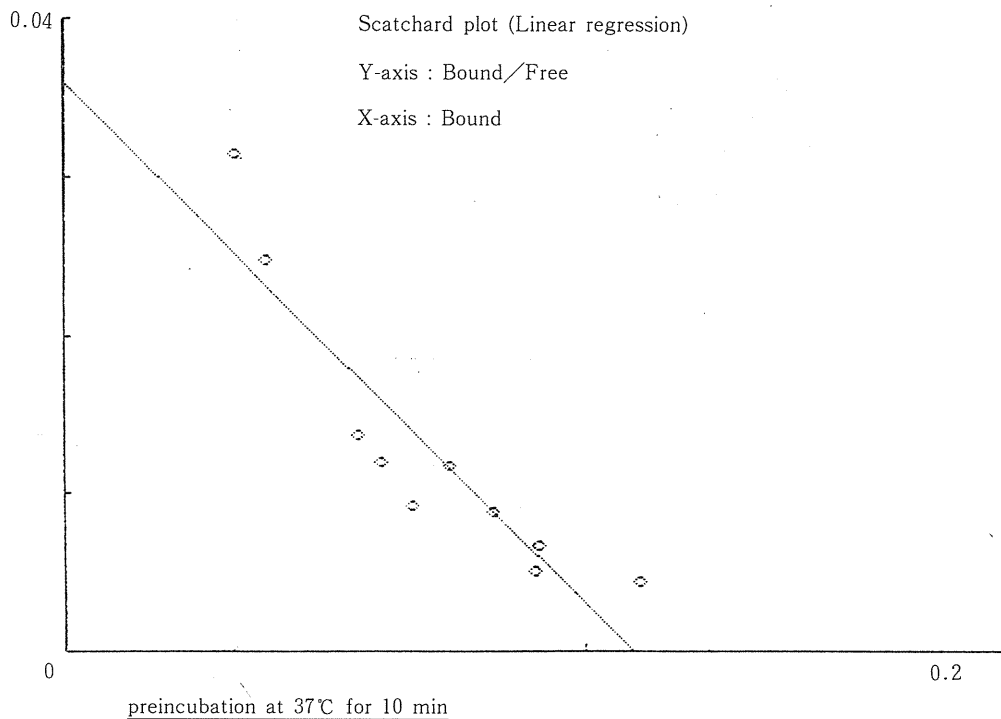


Fig. 3-4. Displacement curves of [³H] tryptamine binding (3 and 25 nM). Data presented are mean of 2-3 experiments.

温書依存性 — [³H] tryptamine 結合部位の多様性に関する文献的考察を試みた。

高親和性 [³H] tryptamine 結合部位 ($K_D=2.8\text{nM}$, 単一種) の存在を最初に報告した Cascio & Kellar の実験条件を詳細に検索したところ、彼らは粗膜分画を 37°C 5-10 分間膜試料を preincubate していた (内在性 tryptamine を系から除去したいという別の目的で)。ただし、彼らの Scatchard プロット解析は、linear regression 解析のみであった。以上の様相より、 37°C 10 分間 preincubation 下の膜試料を用いて得られた Scatchard data の解析を nonlinear (two-site モデル) 及び linear (one-site モデル) の 2 種類の regression 解析にて行なった。その結果を図 3-5, 3-6 に示したが、統計的に有意の差を持って two-site モデルの方がより適合していることが判明した。しかしながら、one-site モデルに適合していると仮定して linear regression 解析を行なうと $K_D=3.04\text{nM}$ 値が得られ、この値は上記 Cascio & Kellar の値 ($K_D=2.8\text{nM}$) に近似しているこ

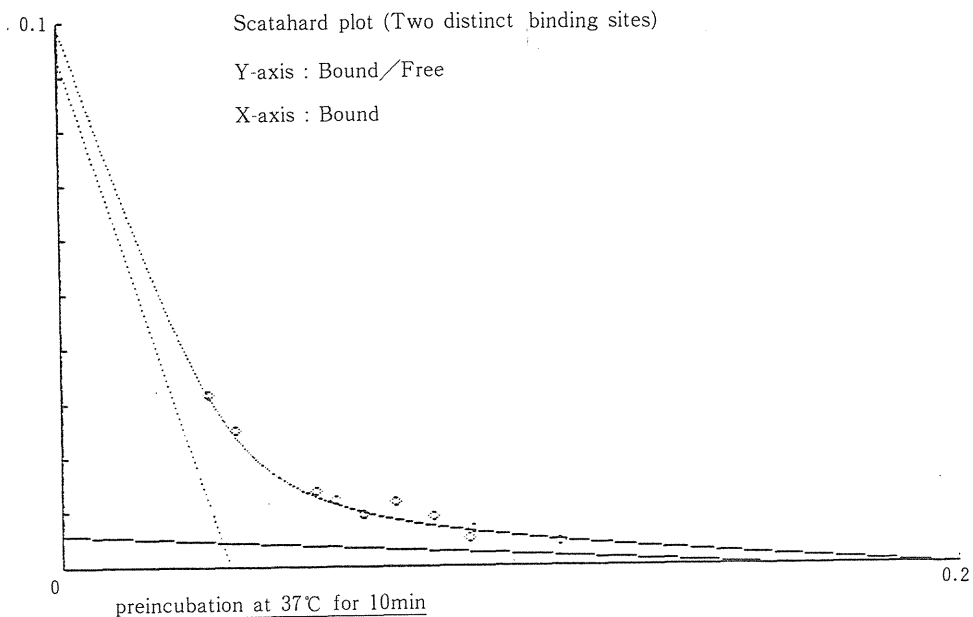
とが判明した。以上の結果より、Casco & Kellar も膜試料の前処理を行っていたがその incubation 条件が不完全であり、かつ Scatchard data の regression 解析が一方的 (linear regression 単独) であったと結論付けられた。



***** RESULTS OF SCATCHARD ANALYSIS *****

Dissociation constant	(nM)	3.03727
Maximal binding	(Xint)109244
	(fmol/mg tissue)	546.221
	(fmol/mg protein)	182.989
Correlation coefficient	909485
AIC		-86.2707

Fig. 3-5. Scatchard plot of [³H] tryptamine binding: Membrane preparations were preincubated for 10 min at 37°C and the subsequent [³H] tryptamine (1-25nM) binding capacities of those were estimated as described in the text. The computer-generated curve was derived from linear regression analysis.



***** RESULTS OF SCATCHARD ANALYSIS *****

High affinity component

Dissociation constant	(nM)400333
Maximal binding	(Xint)0373451
	(fmol/mg tissue)	186.725
	(fmol/mg protein)	62.5546

Low affinity component

Dissociation constant	(nM)	27.9365
Maximal binding	(Xint)160036
	(fmol/mg tissue)	800.179
	(fmol/mg protein)	268.067

Correlation coefficient986103

AIC-100.616

Used regression No. 0

Fig. 3-6. Scatchard plot of [³H] tryptamine binding. Membrane preparations were preincubated for 10 min at 37°C and the subsequent [³H] tryptamine (1-25nM) binding capacities of those were estimated as described in the text. The computer-generated curves were derived from nonlinear regression analysis. (two-site model).

脂質（特に酸性脂質群）修飾試薬として Azure A の可能性を検討すべく、種々の脂質群との親和性について表 3-2 に示す結果を得た。本色素は中性脂質よりもはるかに酸性脂質群に対して高親和性（24~790倍）を示した。さらに 3 種類酸性脂質に対する優先性は CS>PI≫PS であった。

Table 3-2. Color Yields of Several Lipids

Lipid	Color yield*
	(O.D. units/ μ mol)
Sulphatides	45.7 \pm 3.2
Phosphatidylinositol	14.0 \pm 0.5
Phosphatidylserine	1.37 \pm 0.18
Ethanolamine phosphatides	0.058 \pm 0.005
Choline phosphatides	0.018 \pm 0.002

*Absorbances (at 645 nm) of the colored complexes formed with Azure A. Values are expressed as the mean \pm S. E. M. of 4 determinations.

各種脂質修飾試薬の tryptamine 受容体分子に対する影響を、前述の温度依存性 [^3H] tryptamine 結合能を指標として検討し表 3-3 に示す結果を得た。シナプス膜試料を Blue dye である Azure A にて前処理を行なうと、濃度依存的に [^3H] tryptamine 結合の減少が認められた。同様に、phospholipase A₂ 前処理にて（ただし、by-products 除去操作としての defatted BSA による膜試料の洗浄は行なっていない）、濃度非依存性の [^3H] tryptamine 結合能の減少が確認されたが、他方 phospholipase D には何んらの作用も認められなかった。

Table 3-3. Effects of Several Lipid-Modifying Reagents on [³H] Tryptamine Binding to SPM

Reagent	%Inhibition
Control (dpm/mg protein)	13971 ± 900
Azure A (M)	
1 x 10 ⁻⁹	None
1 x 10 ⁻⁸	45.1 ± 8.4**
5 x 10 ⁻⁸	79.3 ± 2.0***
Phospholipase (U/mg protein)	
<u>A₂</u> 0.01	None
0.05	25.6 ± 5.6*
0.1	25.2 ± 5.1*
<u>D</u> 1	None
50	None
100	None

Rat brain synaptic plasma membranes (SPM) were pretreated with several lipid-modifying reagents, and the specific binding of 3 nM [³H] tryptamine to an untreated control SPM and the treated SPM was determined as described in the text (mean ± S. E. M. of 4 experiments). Significantly different from control at *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

BSAはfatty acids及びlysophosphatidesと高親和性を有することが知られているので(26, 27) phospholipase A₂処理後の膜試料において認められた [³H] tryptamine 結合能の減少に対するBSAの洗浄効果について検討した。図3-7にその結果を示したが、一般的に見られる phospholipase A₂にて生成した by-products の除去に起因するBSAの修復効果は全く認められなかった。むしろ、BSA洗浄操作にて phospholipase A₂の阻害作用に、Azure Aの場合と同様の濃度依存性が発現した。

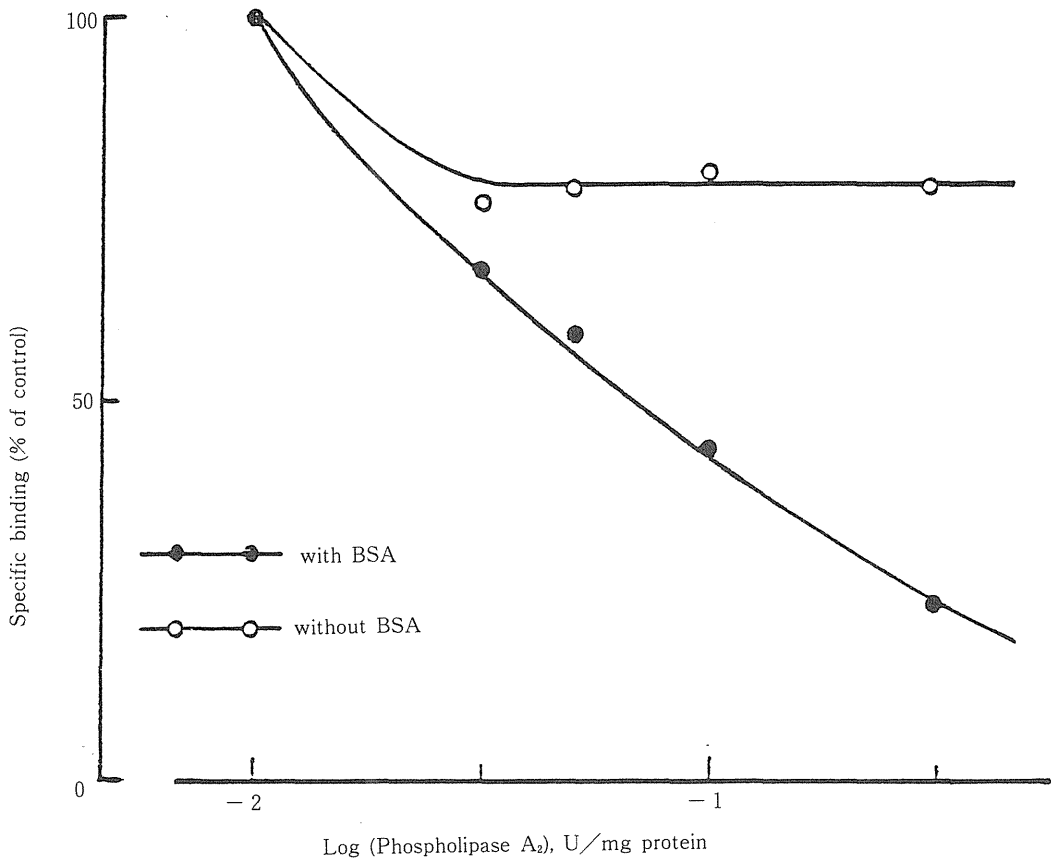


Fig. 3-7. Effect of BSA incubation on the [³H] tryptamine binding activity in phospholipase A₂-treated SPM.

Rat brain synaptic plasma membranes (SPM) were pretreated with phospholipase A₂. After pretreatment, membrane samples were further incubated with 1% BSA, and assayed for [³H] tryptamine (3 nM) binding activity as described in the text. Data are given as the percent of control binding (mean of 2-3 experiment).

Azure A 及び phospholipase A₂ の tryptamine 受容体への作用様式を Scatchard 解析にて検討し、図 3-8, 3-9 に示す結果を得た。Azure A 処理後の膜試料に対する温度依存性 [³H] tryptamine 結合の Scatchard プロットは、control 試料の場合と同様に curvilinear を呈し、見かけ上 noncompetitive type の阻害様式が認められた。同様に phospholipase A₂ 処理にてても curvilinear を示したが、noncompetitive よりむしろ uncompetitive type (完全に平行移動とは言えない) の阻害型が確認された。

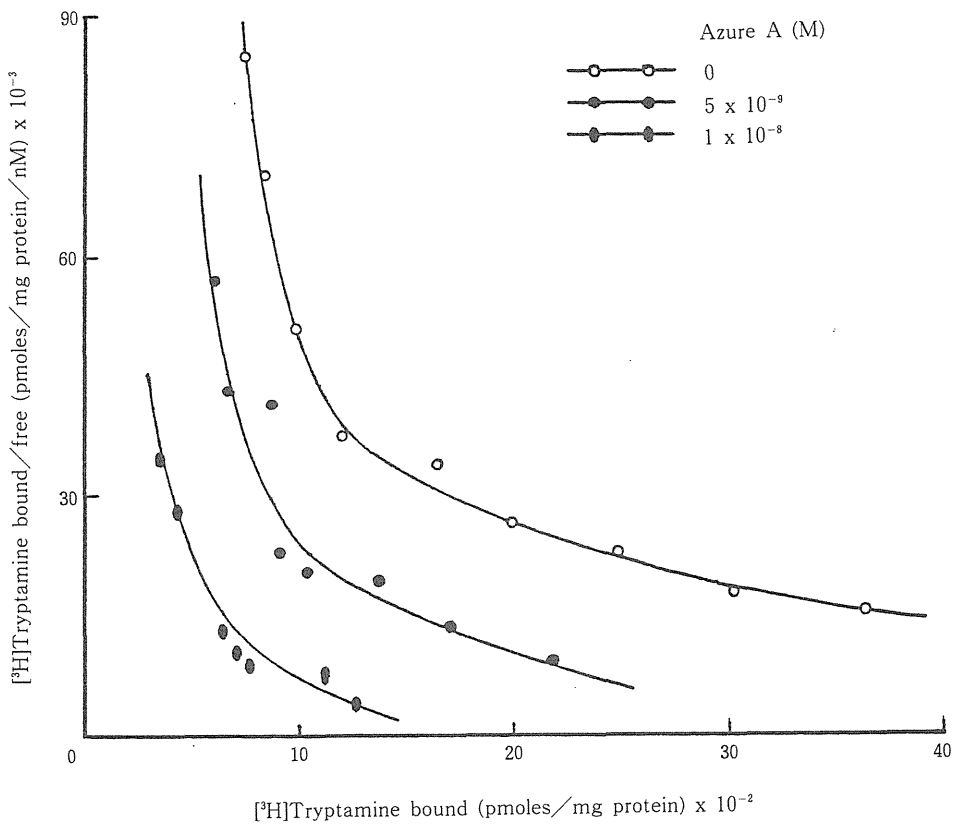


Fig. 3-8. Scatchard plot of [^3H] tryptamine binding: effect of Azure A. Membrane preparations were treated with Azure A for 30 min at 0°C and then preincubated for 55 min at 37°C . After preincubation, [^3H] tryptamine (1–25 nM) binding capacities of the samples were estimated as described in the text. The results shown are those of a typical experiment, performed 2–3 times. The computer-generated curves were derived from nonlinear regression analysis.

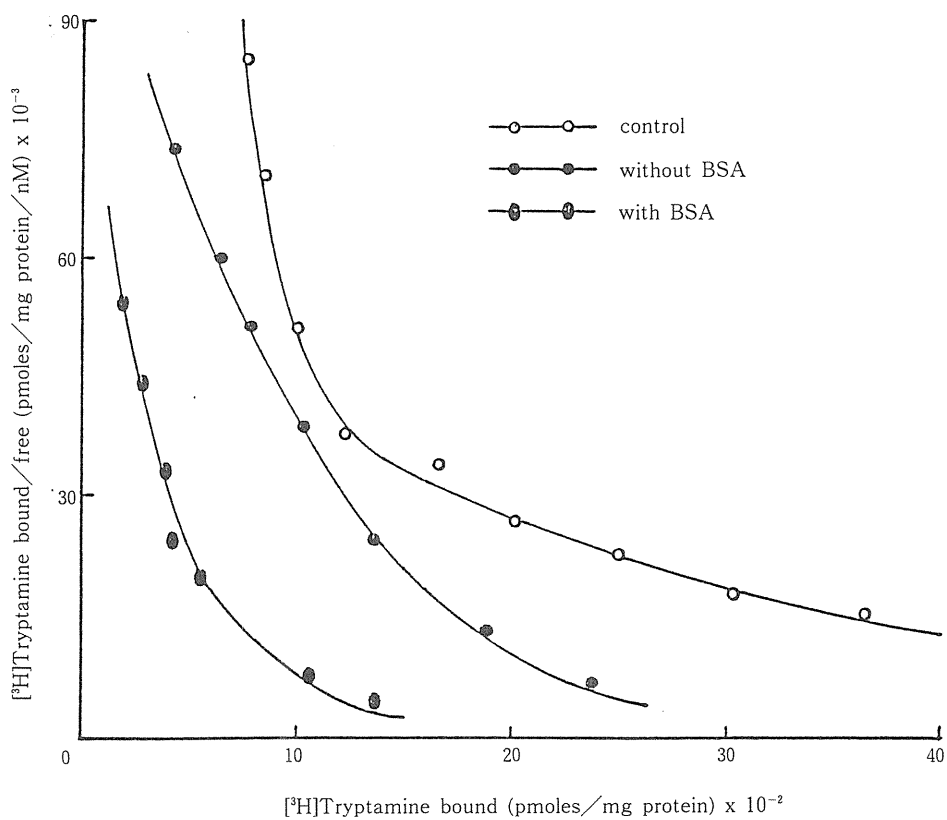


Fig. 3-9. Scatchard plot of [3H] tryptamine binding: effect of phospholipase A₂. Membrane preparations were pretreated with phospholipase A₂ (0.1U/mg protein) under several conditions (BSA, 1%) and the subsequent [3H] tryptamine (1-25 nM) binding capacities of the preparations were estimated as described in the text. The results shown are those of a typical experiment, performed 2-3 times. The computer-generated curves were derived from nonlinear regression analysis.

さらに、両修飾試薬の [^3H] tryptamine 結合能への抑制作用を2つの binding parameters (すなわち、 K_D と B_{\max} 値) からも検索すべく、それぞれの curvilinear についてコンピューターによる nonlinear regression 解析を行なった結果が表3-4である。Azure Aの場合、高親和及び低親和性の両部位に対して濃度依存的に B_{\max} 値の減少が認められたが、 K_D 値には有意の変化は認められなかった。他方、phospholipase A_2 処理後の tryptamine 受容体においては、両結合部位の B_{\max} 値の減少のみならず、 K_D 値(主として高親和性部位)の増大傾向も認められた。

Table 3-4. Scatchard Analysis of [^3H] Tryptamine Binding to SPM pretreated with Azure A and Phospholipase A_2

Pretreatment	High affinity sites		Low affinity sites	
	K_D	B_{\max}	K_D	B_{\max}
Control				
37°C	0.45	102.7	33.7	603.4
0°C	-	-	33.1	543.0
Azure A (M)				
5×10^{-9}	0.47	66.7	33.8	433.1
1×10^{-8}	0.44	46.0	34.9	187.8
Phospholipase A_2 (0.1U/mg protein)				
with BSA	0.75	72.3	42.9	433.3
without BSA	0.66	103.0	41.2	443.2

Rat brain synaptic plasma membranes (SPM) were pretreated with Azure A and Phospholipase A_2 as described in the text. After pretreatment, the untreated control SPM and the treated SPM were incubated with various concentration of [^3H] tryptamine (1-25 nM) and Scatchard analyses were performed. The Scatchard plot data were computer-assessed by nonlinear regression analysis. The phospholipase A_2 -treated samples were further incubated with 1% BSA, unless otherwise stated. The values are the means of 2 experiments. (K_D , nM; B_{\max} , fmoles/mg protein)

考 察

高親和性 [^3H] tryptamine 結合部位に関する既報 (10, 15, 16) では、特別な膜処理についての配慮は皆無である。現在までのところ、radioreceptor 結合実験での膜試料の前処理に関する生理的意義の是非については不確定な面も残されている様であるが、dopamine, 5-HT, opiate 及び imipramine 受容体群での膜前処理の効果 (結合能の増大) は実証されている (17~20)。温度依存性高親和性 [^3H] tryptamine ($K_D=0.45$ nM) の存在を始めて明らかに出来たが、その機構に関しては Scatchard プロット data のコンピューター解析より、低親和性結合部位からの高親和性部位へのアロステリック的立体構造の転換現象に起因するものと考えられる。5-HT 受容体に比較して、その神経薬理的及び化学的検索が遅れている tryptamine 受容体の現象を考えると、上記 radioreceptor-結合実験法 (すなわち、高親和性 [^3H] tryptamine 結合部位を特異的に識別する方法) は、今後の同受容体の研究に有力な実験手技と成り得るであろう。

本実験に用いた脂質修飾試薬の基質選択性については、Azure A は酸性脂質と特異的に親和性 (CS>PI \gg PS) を有することを明らかにした。他方、phospholipase A₂ Dの基質選択性は、それぞれPS>PC>PE及びPC \gg PE \gg PSと報告されている (21, 22)。本実験において、Azure A 及び phospholipase A₂ 前処理の場合温度依存性 [^3H] -tryptamine 結合能の減少が認められたが、phospholipase Dの同受容体への影響は認められなかった。以上の様相より、2種酸性脂質 (PS 及び CS) の [^3H] tryptamine 結合能への関与が示唆された。上記推察で一番の問題点はシナプス膜での2種酸性脂質の局在性にあると思われる。PS に関しては、Smith & Loh (23) は同脂質のシナプス膜の outer surface 上での局在性を報告している。他方 CS は、opiate 受容体に対する CS 抗体の競合作用及び Azure A の脳室内注入により、morphine の AD₅₀ 値が2倍に増加した事実 (24) から、同脂質もシナプス膜上では outer surface 側に優先的に存在していると考えられる。

生体膜における特定の phospholipids を選択的に除去或は転換させる調節試薬として、phospholipase は有益であるが、一般的に同酵素への蛋白質分解酵素の共存の危険性が指摘されている (21)。実際、本実験で用いた市販の phospholipase A₂ (sigma 社製) には、proteolytic activity の存在が当教室の別の研究グループ (25) にて確認された。従って、本実験では同酵素試料を100℃10分間熱処理し、共存する proteolytic activity を完全に失活させた。Phospholipase A₂ の tryptamine 受容体への作用が本酵素固有の活性に起

因していることを、すでに 5-HT 受容体で報告 (25) した EGTA (5mM) による Ca^{2+} 除去方法にて確認した。Phospholipase A_2 の受容体に対する阻害作用の一部分に、膜脂質から 2 次的に生成した物質が関与している事が opiate 受容体 (26) 並びに一種の神経毒である saxitoxin 結合部位 (26) の実験で報告されている。本実験で得られた phospholipase A_2 による $[^3\text{H}]$ tryptamine 結合能の減少が、上記 by-products に起因するの否かについて、さらに同物質群と高親和性を有する BSA (fatty acid 含有率 0.005% 以下) 洗浄実験を行なった。その結果、BSA 洗浄による phospholipase A_2 阻害作用の修復効果は認められず、 $[^3\text{H}]$ tryptamine 結合能の低下は同酵素による特定の脂質分子の消失に基づく受容体分子の構築度の不完全性に起因するものと考えられる。なお、phospholipase A_2 の阻害作用に対する BSA 洗浄の相乗作用の機構については、現段階では明確な説明は出来ない。

各々の脂質修飾試薬の tryptamine 受容体への作用様式について、Scatchard プロット並びにコンピューターによる nonlinear regression 解析を行なった。Azure A 前処理にて、tryptamine 受容体での K_D よりもむしろ B max 値の減少が認められた。この結果より、同受容体分子において特定の脂質 (多分 CS 分子) が ligand に対する認識 (または結合) 部位としての役割を演じていることが示唆される。他方、phospholipase A_2 の結果 (K_D 及び Bmax 値の parameters への影響) から、特定の脂質 (多分 PS 分子) が tryptamine 受容体機構において認識部位、並びに同受容体の分子構築の調節因子として関与していることが指摘出来る。

参 考 文 献

- 1) Hess, S. M. and Udenfriend, S. : J. Pharmacol. Exp. Ther. 127, 175 (1959)
- 2) Nelson, D. L., Herbet, A., Bourgoïn, S., Glowinski, J. and Hamon, M. : Mol. Pharmacol. 14, 983 (1978)
- 3) Philips, S. R., Durden, D. A. and Boulton, A. A. : Can. J. Biochem. 52, 447 (1974)
- 4) Dewhurst, W. G. and Marley, E. : Brit. J. Pharmacol. 25, 705 (1965)
- 5) Cox, B., Lee, T. F. and Martin, D. : Brit. J. Pharmacol. 72, 477 (1981)
- 6) Jones, R. S. G. : Neuropharmacology 21, 209 (1982)
- 7) Jones, R. S. G. : Prog. in Neurobiol. 19, 177 (1982)
- 8) Ishitani, R., Satoh, T., Suga, T., and Kitagawa, H. : Japan. J. Pharmacol. 22, 313 (1972)
- 9) Rouser, G., Kritchevsky, G. and Yamamoto, A. : Lipid Chromatographic Analysis, 1 P.99, Marcel Dekker, New York (1967)
- 10) Cascio, C. S. and Kellar, K. J. : European J. Pharmacol. 95, 31 (1983)
- 11) Lees, M. B. and Paxman, S. : Analyt. Biochem. 47, 184 (1972)
- 12) Boeynaems, J. M. and Dumont, J. E. : Outlines of Receptor Theory, P.23, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam·New York·Oxford. (1980)
- 13) Yoshikawa, S. and Ishitani, R. : Neuropharmacology 23, 1227 (1984)
- 14) Monroe, P. J. and Smith, D. J. : J. Neurochem. 41, 349 (1983)
- 15) Bruning, G. and Rommelspacher, H. : Life Sciences 34, 144 (1984)
- 16) Wood, P. L., Pilapil, C., LaFaille, F., Nair, N. P. V. and Glennon, R. A. : Arch. int. Pharmacodyn. 268, 194 (1984)
- 17) Bacopoulos, N. G. : Biochem. Pharmacol. 31, 3085 (1982)
- 18) Hamblin, M. W. and Creese, I. : Life Sciences 30, 1587 (1982)
- 19) Pasternak, G. W., Wilson, H. A. and Snyder, S. H. : Mol. Pharmacol. 11, 340 (1975)
- 20) Kinnier, W. J., Chuang, D.-M., Gwynn, G. and Costa, E. : Neuropharmacology 20, 1411 (1981)
- 21) Drenthe, E. H. S. and Daemen, F. J. M. : Methods in Enzymology, 81 P.320, Academic Press, New York, San Francisco, London (1982)
- 22) Toffano, G., Aldinio, C., Balzano, M., Leon, A. and Savoini, G. : Brain Res. 222, 95 (1981)
- 23) Smith, A. P. and Loh, H. H. : Proc. West. Pharmacol. Soc. 17, 147 (1976)

- 24) Law, P. Y., Harris, R. A., Loh, H. H. and Way, E. L. : J. Pharmacol. Exp. Ther. 207, 458 (1978)
- 25) Yoshikawa, S. and Ishitani, R. : Life Sciences 36, 485 (1985)
- 26) Lin, H.-K., Holland, M.-J. C. and Simon, E. J. : J. Pharmacol. Exp. Ther. 216, 149 (1981)
- 27) Baumgold, J. : J. Neurochem. 34, 327 (1980)

総括

近年、多くの研究者により proteolipids (蛋白質-脂質複合体) が刺激伝達物質に対する受容体分子としての機能を有する可能性が検討されて来た。例えば、5-hydroxytryptamine (5-HT) について、Godwin & Sneddon はラット脳幹部由来の proteolipids が 5-HT に対して受容体分子としての生理的機能を有していると報告した。しかしながら、彼らの報告した proteolipids は myelin 膜由来の proteolipids であり、さらに 5-HT に対する結合本体は、酸性脂質群であることが当教室によって明らかにされた。脂質の第一次的な機能は、生体膜及び細胞内顆粒群の構築における “molecular cement” としての役割であるが、より動的な生理機能についても検討され出した。例えば、Loh & Law は、脂質の動的な機能の 1 つとして、受容体機構において脂質それ自体が直接生理活性物質に対する認識部位としての機能を有する可能性及びこの役割を担う候補として、多くの神経伝達物質や薬物分子が生理的条件下では陽イオンに帯電していることより、酸性脂質が最適であることを示唆している。

Tryptamine は 5-HT 同様インドールアミンであるが、5-HT に比較して同物質の中樞神経組織での含量の僅少性 (約 1/1000) から神経刺激伝達物質としての概念確立が遅れており、同受容体の神経化学的な研究がほとんど為されていない。著者は、上記 myelin 膜由来の proteolipids が 5-HT と同様に tryptamine に対しても特異的結合能を有するという知見に着目し、同物質を礎材として、tryptamine 受容体機構を分子レベルで検討することを目的とした。

以下得られた結果をまとめると、

(1) 第一章においては、myelin 膜由来の proteolipids 中に存在する tryptamine 結合本体の物性について検討した。その結果、同結合物質の本体として、主として PS が結合能の発現に関与していること (I) 及び同結合物質の分子構築には PS 以外にも他の特定の脂質分子 (多分、酸性脂質) の存在が不可欠であること (II) が判明した。

[I] Japan. J. Pharmacol. 33, 181 (1983)

[II] Japan. J. Pharmacol. 33, 492 (1983)

(2) (1)にて得られた tryptamine 結合物質の本体としての酸性脂質の機能より、同脂質の tryptamine 受容体機構への関与の可能性を想定し、第二章においてその検索の第一段階として完全な in vitro 系での各種酸性脂質の再構成に対する [³H] tryptamine の結合実験を立案、検討した。その結果、特定の酸性脂質群 (PS, CS) から成る一種の脂質複

合対が、tryptamine 受容体の分子構築において認識部位として関与している可能性が示唆された (Ⅲ～Ⅵ)。

〔Ⅲ〕 Life Sciences 27, 291 (1980)

〔Ⅳ〕 J. Chromatogr. 260, 513 (1983)

〔Ⅴ〕 Japan. J. Pharmacol. 38, 411 (1985)

〔Ⅵ〕 Japan. J. Phamacol. (in press)

(3) 第三章では、上記実験結果より導き出された作業仮説、(すなわち特定の酸性脂質群が tryptamine 受容体の分子構築に関与している可能性) を受容体レベルにて実証することを目標とした。実験手段として、シナプス膜上に存在する tryptamine 受容体の特異的識別法 (温度依存性高親和性結合部位) を新規に開発し (Ⅶ)、同受容体機構への酸性脂質の役割について検討した。その結果、CS 並びに PS の 2 種酸性脂質が tryptamine 受容体機構において、認識部位並びに調節因子としての役割を演じていることが判明した (Ⅷ)。

〔Ⅶ〕 Life Sciences 38, 1331 (1986)

〔Ⅷ〕 (投稿準備中)

謝 辞

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬理学教室の石谷良一先生に衷心より感謝致します。この研究に御協力いただいた同教室の皆様に感謝致します。また本論文作製にあたり御助言をいただいた同教室荻原政彦先生に感謝いたします。

博 士 学 位 論 文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

薬学研究科

第 3 号

城 西 大 学

昭和 61 年 2 月

は し が き

本集は、学位規則（昭和49年文部省令第29号）第8条による公表を目的として、昭和60年度本学において、博士の学位を授与した者の、論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した「甲」は学位規則第5条第1項によるもの（博士課程）であることを示す。

目 次

(学位記番号)	(学位論文題目)	(氏名)	(頁)
課程修了による博士 博甲第4号	神経刺激伝達機構における酸性脂質の生理機能に関する研究： Tryptamine 受容体機構における酸性脂質の役割について	唐澤 明	1

氏名(生年月日) から さわ 唐 澤 あきら 明 (昭和29年6月9日生)

本 籍 東京都

学位の種類 薬学博士

学位記番号 博甲第4号

学位授与年月日 昭和60年12月20日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科名 城西大学大学院薬学研究科
(博士課程) 薬学専攻

学位論文題目 神経刺激伝達機構における酸性脂質の生理機能に関する研究：Tryptamine 受容体機構における酸性脂質の役割について

論文審査委員 (主 査) 助教授 石 谷 良 一
(副 査) 教 授 菅 谷 愛 子
(副 査) 助教授 谷 覚
(副 査) 講 師 荻 原 政 彦

論文内容の要旨

はじめに

近年、多くの研究者により proteolipids (蛋白質-脂質複合体) が刺激伝達物質に対する受容体分子としての機能を有する可能性について検討されて来た。例えば、Godwin & Sneddon はラット脳幹部由来の proteolipids が 5-hydroxytryptamine (5-HT) に対する受容体分子としての生理的機能を有していると報告した。しかしながら、彼らの報告した proteolipids は myelin 膜由来の proteolipids であり、さらに、5-HT に対する結合本体は酸性脂質群であることが当教室によって明らかにされた。脂質の第一次的な機能は生体膜及び細胞内顆粒群の構築における“molecular cement”としての役割であるが、脂質のより動的な生理機能についても検討され出した。例えば、Loh & Law は受容体機構において脂質それ自体が直接生理活性物質に対する認識部位としての機能を有する可能性、及びこの役割を担う候補として酸性脂質が最適であることを示唆している。

Tryptamine は 5-HT 同様インドールアミンであるが、5-HT に比較して同物質の中枢神経組織における含量の僅少性(約 $\frac{1}{1000}$)から神経刺激伝達物質としての概念確立が遅れており、同受容体の神経化学的な研究がほとんど為されていない。そこで著者は上記 myelin 膜由来の proteolipids が 5-HT と同様に tryptamine に対しても特異的結合能を有するという知見に着目し、同物質を礎材として、中枢神経組織における tryptamine 受容体機構への脂質(すなわち、酸性脂質)の関与を分子レベルで検討する目的で本研究を行なった。

〔I〕 Myelin proteolipids に存在する tryptamine 結合本体の性質について

Tryptamine 結合物質の本体が脂質様の物性を示すことが当研究室にて明らかにされたが、その性質をより詳細に検討した。まず、同物質より脂質混液を Mokrasch の cold ether 処理法にて作製し、さらに、同混液をケイ酸カラム法にて4種類に分割した。これらの分画に対する [^{14}C]tryptamine の結合実験の結果は F-C 分画のみが元の myelin butanol extracts が示すのと同様の tryptamine 結合能を示し(表1)、同分画に対する [^{14}C]tryptamine 結合の溶出パターンも myelin butanol extracts のそれとよく一致していた。さらに、インドールアミン類似体及び他の神経伝達物質を用いての競合実験より、F-C 分画が元の [^{14}C]tryptamine 結合能の特異性を反映することが明らかとなった。以上の結果より、myelin proteolipids 中に存在する tryptamine 結合本体の性質は F-C 分画に保持されていることが示唆された。

Table 1. [¹⁴C]Tryptamine Binding to Several Fractions

Fraction	Amount of tryptamine bound (%)
Butanol extracts	72.2±6.4
Lipid mixtures	71.8±5.3
F-A	None
F-B	None
F-C	72.3±5.0
F-D	None

Several fractions were incubated with $5 \times 10^{-7} \text{M}$ [¹⁴C]tryptamine. After incubation, the mixtures were passed through a Sephadex LH₂₀ column, and the bound radioactivity was measured as described in the text. Results are expressed as the percent of total input radioactivity (mean ± S.E.M. of 3 experiments).

さらに、F-C 分画中の各脂質を分析した結果 (表 2)、sulphatides (CS)、phosphatidylserine (PS) 及び phosphatidylinositol (PI) の 3 種酸性脂質群の存在が明らかとなった。

Table 2. Lipid Composition of the Several Fractions Isolated from the Lipid Mixtures of Myelin Butanol Extracts

Fraction	Major lipid component
F-A	Cholesterol, minor galactolipids
F-B	Cerebrosides
F-C	Ethanolamine phosphatides, sulphatides, phosphatidylserine, phosphatidylinositol
F-D	Choline phosphatides, sphingomyelin

〔Ⅱ〕 酸性脂質による脂質再構成系への tryptamine の結合について

〔Ⅰ〕にて、酸性脂質群が tryptamine 結合物質の本体としての役割を果たしていることが示唆されたので、同脂質の tryptamine 受容体機構への関与の可能性を想定した。この可能性を検索する第一歩として完全な in vitro 系での各種酸性脂質の再構成系に対する [³H] tryptamine の結合実験を立案、検討した。その結果、PS、CS+PS、PS+PI 及び CS+PS+PI 系の組み合わせが tryptamine 結合能を保持していた (表 3)。さらに、これら 4 組について分子構築度の違いを 5-methoxytryptamine を用いた競合実験より検討したところ、CS+PS 系が最も低い IC₅₀ 値 (すなわち高親和性) を示した。

Table 3. [³H]Tryptamine Binding to Various Reconstituted Fractions

Fraction	Amount of tryptamine bound (%)
CS	None
PS	60.0±1.5
PI	None
CS+PS	61.1±1.0
CS+PI	None
PS+PI	62.4±2.6
CS+PS+PI	61.0±2.6

Various fractions were incubated with 5 nM of [³H]tryptamine. After incubation, the mixtures were passed through a Sephadex LH₂₀ column, and the bound radioactivity was measured as described in the text. Results are expressed as the percent of total input radioactivity (mean ± S.E.M. of 5 experiments).

CS+PS 系への [³H]tryptamine 結合能を動力的に検討した結果、同再構成系には 2 種の tryptamine 結合部位より成る多様性の結合様式が見出され、それぞれの見かけ上の K_D 値は 3 及び 10nM であった(図 1)。さらに、同結合能の特異性を検討した結果、tryptamine 及び 5-methoxytryptamine とは相互作用を示すが、他のインドールアミン類似体及び刺激伝達物質とは何らの親和性も示さなかった。以上の結果より、特定の酸性脂質群 (CS、PS) から成る一種の脂質複合体が tryptamine 受容体の分子構築において認識部位として関与している可能性が示唆された。

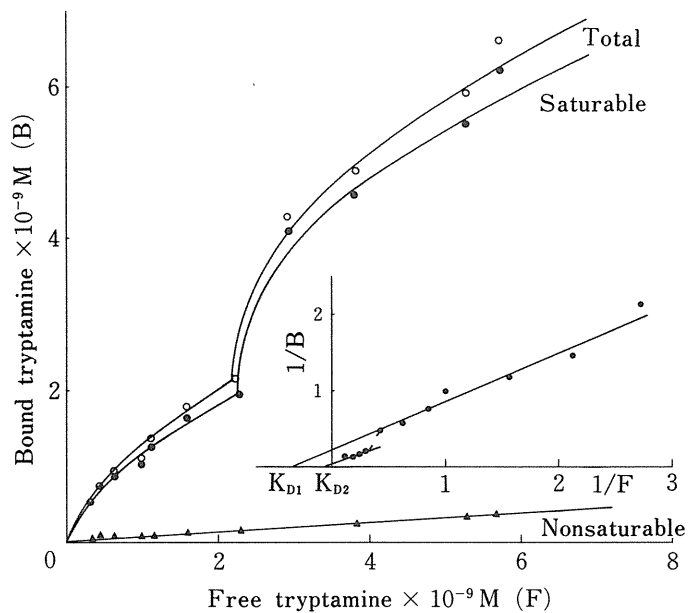


Fig. 1. Binding curves and double reciprocal plot of [³H] tryptamine to the reconstituted fraction with PS and CS. Saturable binding was defined as the total binding minus binding in the presence of 5×10⁻⁴ M unlabelled tryptamine (non-saturable), and those components are plotted as a double reciprocal. Each point represents the mean of 2-3 experiments. K_{D1}, 3 nM and K_{D2}, 10 nM

〔Ⅲ〕 中枢神経系での tryptamine 受容体機構における酸性脂質の役割について

再構成実験にて導き出された作業仮説（すなわち、特定の酸性脂質群が tryptamine 受容体の分子構築に関与している可能性）を受容体レベルにて実証することを目的とした。シナプス膜上に存在する tryptamine 受容体の特異的識別法（温度一依存性高親和結合部位）を新規に開発し、同受容体機構での酸性脂質の役割について各種脂質修飾試薬（Azure A、phospholipase A₂ 及び D）を用いて検討した。その結果、Azure A 及び phospholipase A₂ 前処理の場合、温度一依存性 [³H]tryptamine 結合能の減少が認められたが、phospholipase D の同受容体への影響は認められなかった（表 4）。

Azure A 及び phospholipase A₂ の tryptamine 受容体への作用様式について、Scatchard プロット並びにコンピューターによる nonlinear regression 解析を行なった結果、Azure A 処理（CS 分子を特異的に隠蔽する）の場合、B max 値の減少が認められた。他方、phospholipase A₂ 処理（優先的に PS 分子を加水分解する）では K_D 値の上昇及び B max 値の減少が認められた。このことより、CS 及び PS の 2 種酸性脂質が tryptamine 受容体機構において、認識部位並びに調節因子としての役割を演じていることが判明した。

Table 4. Effects of Several Lipid-Modifying Reagents on [³H] Tryptamine Binding to SPM

Reagent	% Inhibition
Control (dpm/mg protein)	13971±900
Azure A (M)	
1×10 ⁻⁹	None
1×10 ⁻⁸	45.1±8.4**
5×10 ⁻⁸	79.3±2.0***
Phospholipase (U/mg protein)	
A ₂ 0.01	None
0.05	25.6±5.6*
0.1	25.2±5.1*
D 1	None
50	None
100	None

Rat brain synaptic plasma membranes (SPM) were pretreated with several lipid-modifying reagents, and the specific binding of 3 nM [³H]tryptamine to an untreated control SPM and the treated SPM was determined as described in the text (mean ± different from control at *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001).

まとめ

Myelin proteolipids の tryptamine 結合本体が酸性脂質群 (CS、PS、PI) である可能性を Sephadex LH₂₀ カラム法にて示した (I)。さらに、これらの酸性脂質群の組み合わせにより作製した再構成系に対する [³H] tryptamine の結合実験から、CS+PS系にリガンドが最も高親和性で結合することを見出した (II)。そこで、中枢神経系における tryptamine の受容体機構にも酸性脂質が重要な役割を果たしているとの作業仮説を立て、シナプス膜を用いて仮説の検証を試みた。種々の脂質修飾試薬を用いた実験の結果から (III)、酸性脂質が tryptamine 受容体機構に不可欠であり、認識部位ないし調節因子として機能していると考えられ、仮説は実証し得たと思われる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経刺激伝達機構で主要素の1つである受容体分子は、生体膜の脂質二重層内で蛋白質分子と脂質分子との相互作用により、ある種の適切な立体構造が形成されて始めてその生理機能が発現すると考えられる。

1951年 Folch & Lees により神経組織から Proteolipids' という一種の蛋白質-脂質複合体が発見されたが、近年多くの研究者により同物質が神経伝達物質に対する受容体分子としての機能を有する可能性が検討されて来た。例えば 5-hydroxytryptamine (5-HT) について、Godwin & Sneddon はラット脳幹部由来の proteolipids が 5-HT に対して受容体分子としての生理機能を有していると報告した。しかしながら、彼らの報告した proteolipids はミエリン膜由来であり、同結合本体は酸性脂質群であることが当教室によって明らかにされた。脂質の第一次的な機能は、生体膜及び細胞内顆粒群の構築における“molecular cement”としての役割であるが、より動的な生理機能についても検討され出している。Loh & Law は、脂質の動的な機能の1つとして、受容体機構において脂質それ自体が直接生理活性物質に対する認識部位としての機能を有する可能性、及びこの役割を担う候補として酸性脂質が最適であることを示唆している。

本論文は、上記ミエリン膜由来の proteolipids が 5-HT と同様に tryptamine に対しても特異的結合能を有するという知見に着目し、同物質を礎材として tryptamine 受容体機構への脂質（すなわち、酸性脂質）の関与を分子レベルで検討することを目的としたものであり、得られた結果は3つの章にまとめられている。

(1)第一章においては、ミエリン膜由来の proteolipids 中に存在する tryptamine 結合本体の物性について検討し、その結果主として phosphatidylserine (PS) が結合能の発現に関与していること、及び同結合物質の分子構築には PS 以外にも他の特定の酸性脂質、sulphatides (CS)、の存在が不可欠であることが明らかにされた。

(2)第一章にて得られた tryptamine 結合物質の本体としての酸性脂質の機能より、同脂質の tryptamine 受容体機構への関与の可能性を想定し、第二章においてその検索の第一段階として完全な in vitro 系での各種酸性脂質の再構成系に対する [³H] tryptamine の結合実験を立案、検討した。その結果、特定の酸性脂質群 (PS、CS) から成る一種の脂質複合体が、tryptamine 受容体の分子構築において認識部位として関与している可能性が示唆された。

(3)第三章では、上記実験結果より導き出された作業仮説、すなわち特定の酸性脂質群が tryptamine 受容体の分子構築に関与している可能性を受容体レベルにて実証することを目標とした。実験手技として、シナプス膜上に存在する tryptamine 受容体の特異的識別法(温度一依

存性高親和性結合部位) を新規に開発し、同受容体機構への酸性脂質の役割について、特定の脂質修飾試薬 (Azure A、phospholipases A₂ & D) を用いて検討した。その結果、PS 並びに CS の 2 種酸性脂質が tryptamine 受容体機構において、認識部位並びに調節因子としての役割を演じていることが実証された。

以上、本論文は神経刺激伝達機構における酸性脂質のより動的な生理機能を探索すべく、ミエリン膜由来の proteolipids が tryptamine に対して特異的結合能を有する事実を出発点とし、同結合本体の解析から、完全な in vitro 系での酸性脂質群との再構成実験へと進み、最終的にシナプス膜を用いた受容体レベルで特定の酸性脂質 (PS、CS) が、tryptamine 受容体の分子構築に認識部位ないし調節因子として関与していることを実証し得て居り、内容的に一貫性と独創性を有していると言える。

よって、本論文は薬学博士の請求論文として価値あるものと認める。

