

動物グルタミン酸脱炭酸酵素の分布に関する研究

—殊に胚と中枢神経系について—

金沢大学大学院医学研究科第二病理学講座(主任 石川大刀雄教授)

北村正順

(昭和35年10月31日受付)

Glutamic acid decarboxylase (以下 GDC と略記する) は、植物においてはほとんど唯一のアミノ酸脱炭酸酵素として、極めて広い分布をしめすことが明らかにされている¹⁾²⁾。また細菌については、主に Gale³⁾ によつてその存在が明らかにされた。植物と細菌の酵素は至適 pH, Michaelis 定数, その他の点で違いが見つかつている。動物組織にも GDC の存在することが最近 Roberts⁴⁾, Awapara⁵⁾ 等によつて見いだされた。極めて注目されることは、動物組織の中でこの酵素の存在するのが全く中枢神経系に限られていることである。その存在は当然脳中の遊離グルタミン酸, グルタミンおよびγ-アミノ酪酸 (以下 γ-ABA と略記する) の含量の高いことと関連づけられるであろうし, cholinesterase, amine oxidase 等とともに神経系の酵素化学的研究の主要なテーマとなるであろう。

筆者は胚発生時における GDC 活性の消長を測定することにより、神経分化の過程を追求しようと試み、また正常脳におけるその分布をイモリ、ラッテについてしらべた。この場合、胚材料あるいは小動物脳の一部は、量的に到底ワールブルグ検圧法による測定の対称となりえない。そこで筆者は同装置のマイクロ化とも云うべきカーテシアン・ダイバー装置⁶⁾⁻¹³⁾により定量をおこない、再現性ある測定値を得ることができた。また豊富に得られる材料については、ワールブルグ検圧法を用いて、酵素の細胞内分布・部分精製標本による酵素の二三の性質などもしらべた。

ダイバー充填法および操作法

使用したダイバーは実験目的にしたがい、その感度を高めるために、すべて cylindrical diver (円筒型ダイバー) をもちいた。その neck の口径は 0.90~1.04 mm, 長さ約12mm, 全容積ほぼ 10μl, ダイバー恒数は

大体 5μl である。ダイバーは Simacone (島津製一 NS-200) を用いてシリコン加工を施した¹³⁾。反応液の充填にさきだつて、嫌気的条件をつくるため Waterlow & Barrow¹⁰⁾ の方法に準じて操作し、窒素ガスを約2分間通じて空気と置換した。なお窒素ガスは還元銅上で 400°C に焼いて酸素ガスを除去して用いた。

ダイバー内の反応液の組成はつぎのようである。

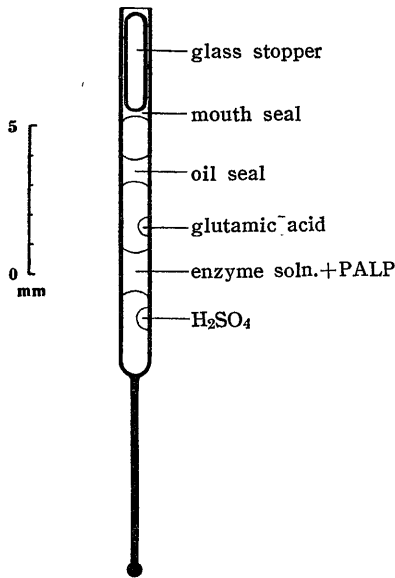
- 1) 0.25N 硫酸溶液 (side drop)……0.40μl
- 2) 酵素液 (neck seal)……0.87μl
(酵素液のつくり方は各項で記述する)
- 3) ピリドキサルリン酸 (PALP) 溶液……0.13μl
(PALP 0.1mg を 0.05M 磷酸緩衝液の pH 6.9 の 0.1ml にとかしたものを), neck seal に添加。
- 4) 0.5M l-グルタミン酸ソーダ (side drop)……0.25μl, 対照にはこの代りに等量の蒸留水を用いる。
- 5) オイルシール (oil seal)……0.75μl (パラフィンに Sudan III をとかしたものを)。
- 6) マウスシール (mouth seal)……所要量 (glass stopper を使用する)。

なお PALP の量は Roberts¹⁴⁾ の記載にしたがつた。

上記の反応液を第1図のように設置してから、ダイバーを恒温槽 (30±0.1°C) 内の浮游管に入れ、10分間インキュベートして温度平衡に達しさせたのち、平衡圧をマンメーターで 0.1mm まで読み、直ちに酵素液と基質液とを混合する。それ以後10分毎 (あるいは15分毎) に平衡圧を読み、1時間後に硫酸と混合して酵素液中に溶解している炭酸ガスを追い出し、20分後に平衡圧をよみ反応を終える。なお、酵素液の一部

Studies on the Distribution of Animal Glutamic Acid Decarboxylase Activity, Especially on the Embryo and Central Nervous System. Masayori Kitamura, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, University of Kanazawa.

第1図 GDC 活性測定用のダイバー充填模式図



(大体 10 μ l 程度) は Conway の微量拡散定量法¹⁵⁾を用いて蛋白窒素を測定した。

このダイバー内諸液の充填および操作法についての詳細は、橋¹³⁾が記述しているので省略した。

つぎに計算に用いたダイバー内のガス変化量 (ΔV) の求め方を略記する。即ち

$$\Delta V = \frac{V \cdot \Delta P}{P_o} \cdot \frac{T}{T+t} \cdot \left(1 + \frac{Voil \cdot \beta'_{CO_2}}{V} \right)$$

ここに、 ΔP : 平衡圧の変化 (cm), P_o : 正常圧 (ブローディー液柱 10³cm), T : 絶体温度 (273°C), t : 恒温槽の温度 (30°C), $Voil$: オイルシールの容積 (0.75 μ l), β'_{CO_2} : パラフィンオイルの CO₂ 吸収系数 (0.90) である。

なお、ダイバー恒数等に関しては、Lindenström-Lang⁷⁾ および Holter⁸⁾ が詳細に記載している。

[I] 動物 GDC の体内分布

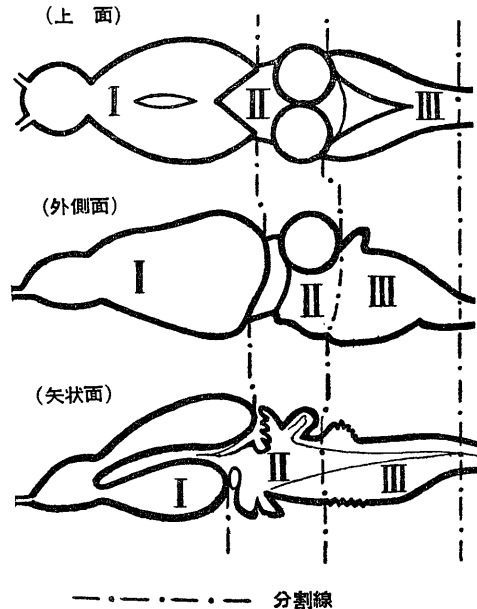
1. イモリについて

先づ成熟雄イモリ 3匹を断頭して脳を取り出し、次に脊部より小さいハサミで脊椎管をひらいて脊髄を糸状に取り出すとともに、脊髄神経節も剔出する。さらに開胸、開腹して心臓、肝、脾、腎、睪丸、坐骨神経および大腿部筋肉を取りだす。これらの剔出材料はあらかじめ氷冷しておいたペトリシャーレの中に入れ、酵素液の調製をはじめまで -10°C の冷凍室に保存する。この全剔出操作に約30分を要した。剔出標本は軟脳膜あるいは被膜、血管などを手早く取りのぞ

き、下記のように酵素液を調製した。なお、磷酸緩衝液はすべて 0.05M, pH 6.9 のものを使用した。

脳は第2図のように分割した。

第2図 イモリ脳の分割法



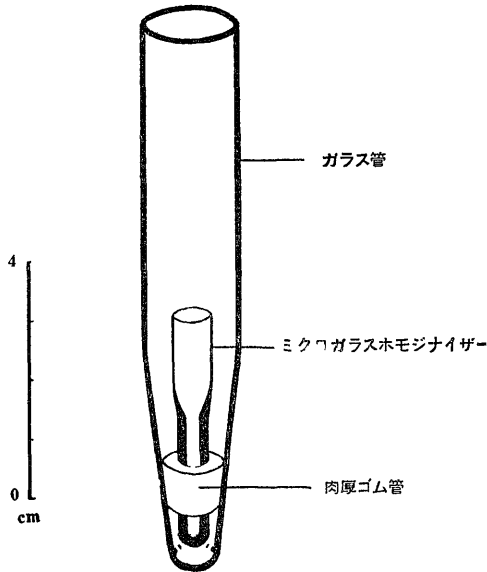
図において (I) の部分は終脳、(II) は間脳と中脳、(III) は小脳、橋および延髄である。これらの各部分はそれぞれ氷冷しておいた Potter-Elvehjem 型のマイクロガラスホモジナイザ¹³⁾ (内径: 3.5mm, スリ合せ部分の長さ: 20mm, 容量: 0.2ml, 内筒先端にガラス疣を有しない) に入れて、大体 0.1ml の磷酸緩衝液を加えてホモジナイズする。

また脊髄 その他の剔出標本はハサミで細挫してのち、同じように20~30%のホモジネートをつくる。

つぎに第3図のようにホモジナイザ容器の下端に肉厚ゴム管をはめ、これを更にガラス管内に固定し、上部をパラフィルムで被覆して冷凍室内 (5~2°C) で 3000 r.p.m., 5分間遠心し、その上清を酵素液とする。

実験成績は第1表および第4図に示したように、GDC の分布は主として中枢神経系に局在している。その他の組織では 10⁻³ μ l にも達しない値を示したが、なかでは腎と睪丸が比較的高い値をしめした。肝は腎と同程度の活性があるように見えたが、対照が一定せず測定出来なかつた。GDC は他の脱炭酸酵素と異り、脳のみ存在すると云われてきたが、この実験においても脳、脊髄以外では極く僅かの活性しか認められなかつた。また脳の中ではとくに間脳と中脳の領

第3図 酵素材料の遠心管



第1表 イモリの各臓器における GDC 活性
($\times 10^{-3}\mu\text{l}/\text{N}\mu\text{g}\cdot 60\text{min.}$)

臓器	1	2	3	平均値
終脳	17.02	17.03	18.50	17.52
間脳・中脳	30.04	29.52	33.58	31.05
小脳・橋・延髄	15.57	16.40	17.43	16.47
脊髄	11.10	12.98	15.25	13.11
腎	1.52	0.64	0.73	0.96
睪丸	1.00	0.50	0.61	0.70
膵	0.31	0.19	0.24	0.25
脾	0.20	0.24	0.30	0.25
肝	1.51			
心	0.42	0.12	0.30	0.28
筋肉	0.31	0.22	0.25	0.26
脊髄神経節	0.28	0.27	0.18	0.24
坐骨神経	0.30	0.25	0.17	0.24

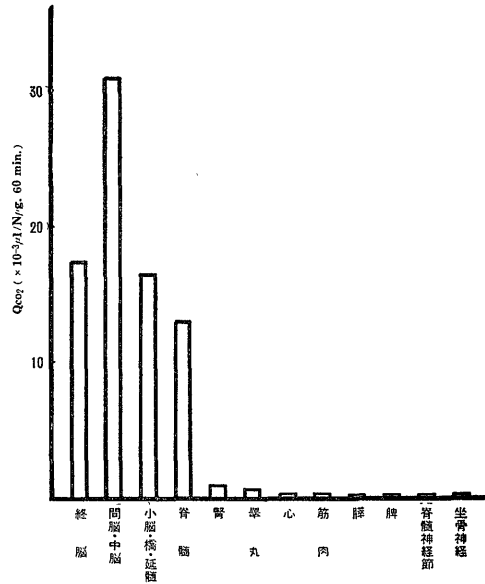
域において他の領域の約2倍近い活性をしめすことは非常に注目される事実である。Roberts et al¹⁶⁾ はマウスを使いワールブルグ検圧法で、脳: 420, 筋肉: 8, 肝: 25, 腎: 20 ml/500 mg・80 min. を記載しているが、イモリにおいても脳, 筋肉, 腎の活性は大体 21, 0.3, 1 のほぼ同じ比率が得られた。

2. ラットについて

1) 諸臓器分布

3匹の雄ラットを断頭して10分以内に脳, 脊髄, 肝, 膵, 脾, 腎および睪丸を剔出し, 予め氷冷しておいた 0.05M 磷酸緩衝液 pH 6.9 中で軟脳膜, 被膜,

第4図 イモリにおける GDC の体内分布



血管などをすみやかに取りのぞく。脳以外の各組織はガラスホモジナイザーを用いて、2~3倍容の冷磷酸緩衝液 (0.05M, pH 6.9) を加えてただちにホモジナイズする。脳はつぎのように3部に分割した¹⁷⁾。これにはスパーテルに鋭利に刃をつけたものを用いた。

(1) 両大脳半球を左右に開いて、脳梁を前後に切断する。さらに強く両半球をひらき、大脳が両側においてまだ間脳部とつらなっている部分を切線で切り離す。これが終脳である。

(2) 次に四丘体下丘の後縁より脳底に向けて切りおろし、橋脳前縁の彎曲に合致させる。この部分が間脳と中脳である。

(3) 延髄と脊髄との境界部で切断する。この部分は小脳, 橋, 延髄を含んでいる。

これらの3部分に分けた脳はそれぞれのホモジナイザーにとり、上記の冷磷酸緩衝液を加えて30%前後のホモジネートをつくる。

こうしてできた脳および諸臓器のホモジネートは、冷凍室中 (5~2°C) にて、3,000 r.p.m., 5分間遠心して上清を酵素液とし、ワールブルグ検圧法によつて実験した。

容器: コーニカル・フラスコ, 容器恒数 20ml 前後
主室: 酵素液 2.0ml および PALP 200 μg

側室: 0.5M グルタミン酸ソーダ (pH 7.0) 0.5ml, 対照には等量の蒸留水を用いる。

副室: 1.2N 硫酸 0.5ml (長さ 30mm, 巾 1.5mm の漏紙片を挿入する)。

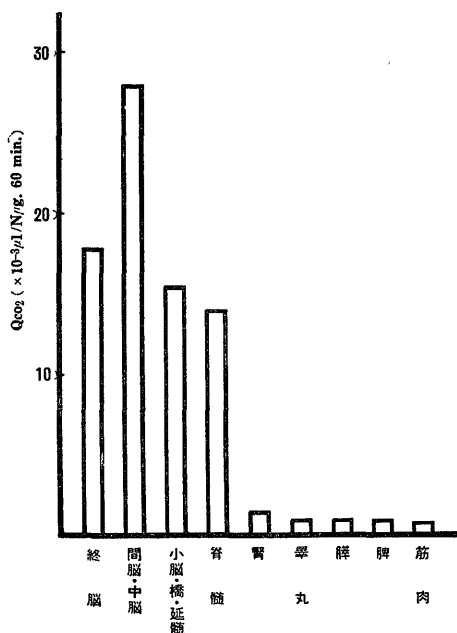
気相：純窒素ガス

実験温度：30°C

プレインキュベーション10分間の後、側室内液を流入させ、1時間反応させてのち硫酸を入れ、それから20分後に測定を終了する。

実験結果は第5図および第2表に示したように、ラッテにおいてもイモリと同様の結果となり、間脳-中脳領域が最も活性が強く、脳、脊髄以外の組織では僅少の活性しか認められなかつた。肝はイモリの場合と同じように測定可能な活性がみられなかつた。ラッテ脳におけるそれぞれの活性は、イモリのそれとほぼ一致した値が得られた。

第5図 ラッテにおける GDC 体内分布



第2表 ラッテの各臓器における GDC 活性

	Qco ₂ (×10 ⁻³ μl/N/g.60min.)			
	1	2	3	平均値
終脳	17.7	17.3	18.5	17.8
間脳・中脳	27.3	28.1	28.5	28.0
小脳・橋・延髄	15.2	15.9	15.2	15.4
脊髄	14.9	13.0	13.8	13.9
腎	1.6	1.3	1.2	1.4
膵	0.8	0.9	1.0	0.9
脾	0.9	0.8	1.0	0.9
睪丸	0.9	1.0	0.9	0.9
筋肉	0.8	0.7	0.6	0.7

第3表 ワールブルグ検圧法とダイバー法の測定値の比較

	Qco ₂ (×10 ⁻³ μl/N/g.60min)		百分率 (%)
	ワールブルグ検圧法	ダイバー法	
1	17.7	17.4	98.4
2	17.3	17.8	103.1
3	18.5	18.7	101.0

なおダイバー法とワールブルグ検圧法との2者を用いて、ラッテ終脳の活性を測定した結果、実測値はつぎのようであつた(第3表)。

両法ともよく一致した値をしめた。

2) 中枢神経系における分布

1匹の雄ラッテを断頭後、脳、眼球、脊髄、脊髄神経節および坐骨神経を剔出し、系統的につぎのように分割する¹⁷⁾(第6図)。

(1) 前述のように終脳を切離す。

(2) 終脳を取り去つた標本について、視神経索の後縁に沿つて視神経交叉をその直後で切断する。この領域が視床部である。

(3) 視神経索の後縁に沿つて切り、動眼神経根を目標にして切りおろす。視床下部の前部。

(4) 視床下部前部において、灰白結節および乳頭体を水平断する。乳頭体は発育が悪く、ほとんど見えない。灰白結節部。

(5) 四丘体下丘の後縁から脳底に向けて切り、橋前縁の彎曲を狙つて切断する。視床下部の後部。

(6) 視床下部後部から四丘体の上丘と下丘を切りはなす。上丘および下丘。

(7) 小脳を取り去る。小脳。

(8) 延髄と脊髄との境界部で切断し、橋および延髄を脊側と腹側に2分する。

(9) 最初に切り離した終脳より脳梁を切り出す。大脳髄質。

(10) 終脳を神経交叉で前後に2分し、各々の部分の脳表面より皮質を剥ぐ。前部および後部の大脳皮質。

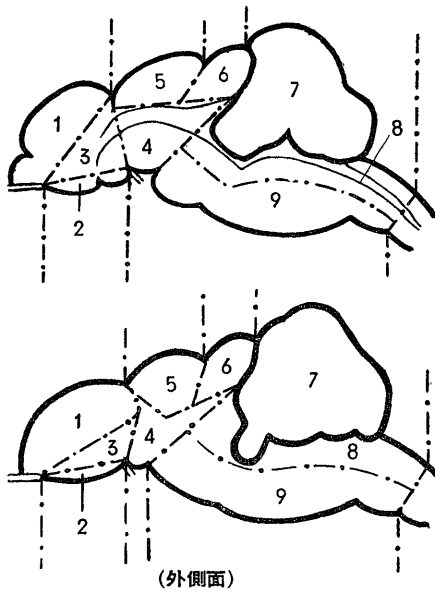
(11) 小脳も皮質と髄質とに分けて切り出す。

眼球は切り開いて網膜を剝離する。脊髄の灰白質、白質および脊髄神経節は頸部、胸部より取り出した。

これらの分割操作は5~2°Cで手早く処理し、各々の切り出し標本は適当な大きさのマイクロガラスホモジナイザーをもちいて、磷酸緩衝液(0.05M, pH 6.9)で20~30%ホモジネートを作り、冷凍室内で3,000 r.p.m., 5分間遠心して上清を酵素液とする。

測定結果は第4表、第7図および第8図に示すよ

第6図 ラッテ脳分割法
(矢状面)



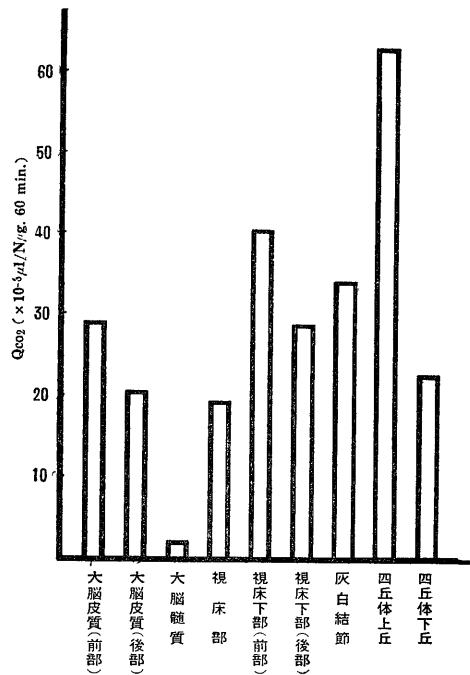
----- 分割線

- 1: 視床部
- 2: 灰白結節部
- 3: 視床下部前部
- 4: 視床下部後部
- 5: 四丘体上丘
- 6: 視丘体下丘
- 7: 小脳
- 8: 橋・延髄の背側部
- 9: 橋・延髄の腹側部

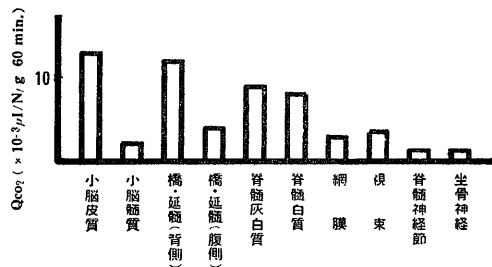
第4表 ラッテ神経系における GDC 活性

	Qco ₂ (× 10 ⁻³ μl/N/g.60min.)			
	1	2	3	平均值
前部大脳皮質	30.24	29.60	27.33	29.06
後部大脳皮質	24.38	19.80	17.15	20.44
大脳髓質(脳梁)	1.58	2.77	2.08	2.14
視床部	20.68	17.74	19.27	19.23
前部視床下部	44.30	36.58	40.13	40.32
後部視床下部	32.60	27.02	26.51	28.71
灰白結節	33.45	33.80	34.50	33.92
四丘体上丘	60.38	64.30	65.26	26.98
四丘体下丘	25.32	20.27	21.81	22.47
小脳皮質	12.50	14.13	12.88	13.17
小脳髓質	1.68	2.45	2.40	2.18
橋・延髄背側	13.35	11.23	11.91	12.16
" 腹側	4.50	3.94	3.54	3.99
脊髄灰白質	8.70	9.68	8.97	9.12
" 白質	7.46	8.35	8.61	8.14
眼球網膜	2.69	3.80	2.53	3.01
視束	3.74	2.30	1.82	3.62
脊髄神経節	1.55	1.18	1.10	1.28
坐骨神経	1.51	0.90	1.55	1.32

第7図 ラッテにおける GDC の大脳内分布



第8図 ラッテの後脳その他における GDC 分布



うに、四丘体上丘が最も活性が大きく、視床下部前部、灰白結節、視床下部後部の順である。大脳および小脳の皮質と髓質との間には顕著な差異があらわれた。即ち髓質にくらべ非常に活性が低かった。橋-延髄領域は脊側が腹側の約3倍の活性をしめした。しかし脊髄の灰白質と白質との間には有意の差が認められなかった。また網膜と視束とでは後者の方が僅かに活性が高く、両者と脊髄神経節および坐骨神経より活性が強かった。

最近 Lowe et al¹⁵⁾ は、GDC の反応産物である γ ABA を蛍光測定法を用いて実験し、猿、兎、ラッテおよびマウスについて GDC の神経系における分布を詳細にしらべている。彼によると、この酵素の活性は一般に脳皮質には強いが、各脳領域においてそれぞれ活性が異なり、猿では淡蒼部が最も強く小脳では顆粒

層は分子層よりも僅かに強く髄質には活性がないことを記載している。また兎では四丘体上丘が最も高く視床下部、アンモン角、尾状核頭部の順であると報告している。そして γ ABA が中枢系における伝導に抑制効果を及ぼすと云うことは、恐らく GDC 分布が神経系の各領域の inhibitory synapse の量に平行することを暗示しているとのべた。Albers et al¹⁹⁾ も同じく猿について liquid scintillation spectrometry をもちい、この酵素の神経系における分布をしらべているが、彼の成績によると視床下部および中脳において最も活性が強く、脊髓白質伝導路、脊髓神経根および神経節では活性が認められない。また大脳皮質では黒質が最強であった。筆者のラッテについての成績はむしろ Lowe et al の兎における分布によく似ている。ラッテに関する脳の解剖は今日まで研究にとほしく、大脳核の存在または局在についてはほとんど知られていない。猿などのように限局した神経細胞の集団はなくただ散在的に存在するらしく、これらについて測定することができなかった。

最後に筆者が実験した4種の動物について、終脳の GDC 活性を比較して見るとつぎの様であった(第5表)。

第5表 動物種による終脳 GDC 活性の相違

動物種	Qco ₂ μ l/N μ g.60min.
イモリ	17.5×10^{-3}
ラッテ	17.8×10^{-3}
ニワトリ(18カ月)	21.8×10^{-3}
牛	1.1×10^{-3}

即ち、イモリとラッテはほぼ等しい活性値を示したが、ニワトリ、牛の間にはそれぞれ差が認められた。Lowe et al¹⁸⁾ も猿、兎、ラッテおよびマウスの間に著しい差異があるとのべている。

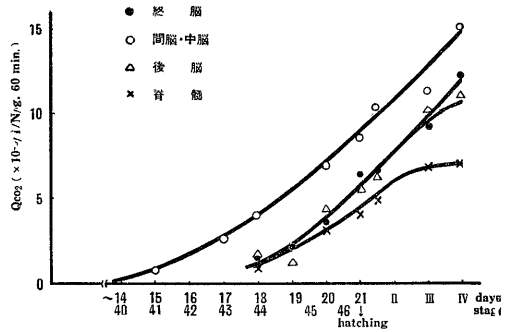
〔II〕 ニワトリの発生期における GDC 活性の変動

胚発生開始第1日より孵化してのち549日にわたつ

第6表 ニワトリの発生期における GDC 活性

	Qco ₂ ($\times 10^{-3}\mu$ l/N μ g.60min.)							
	卵 1~14日	15	16	17	18	19	20	21
	stage 40	41	42	43	44	45	46	
I	—	—	—	—	1.5	1.9	3.4	6.5
II	—	0.9	—	2.6	4.0	—	7.0	8.4
III	—	—	—	—	1.8	1.2	4.3	5.6
IV	—	—	—	—	1.0	—	3.1	3.9

第9図 ニワトリの発生期における GDC 活性の変動



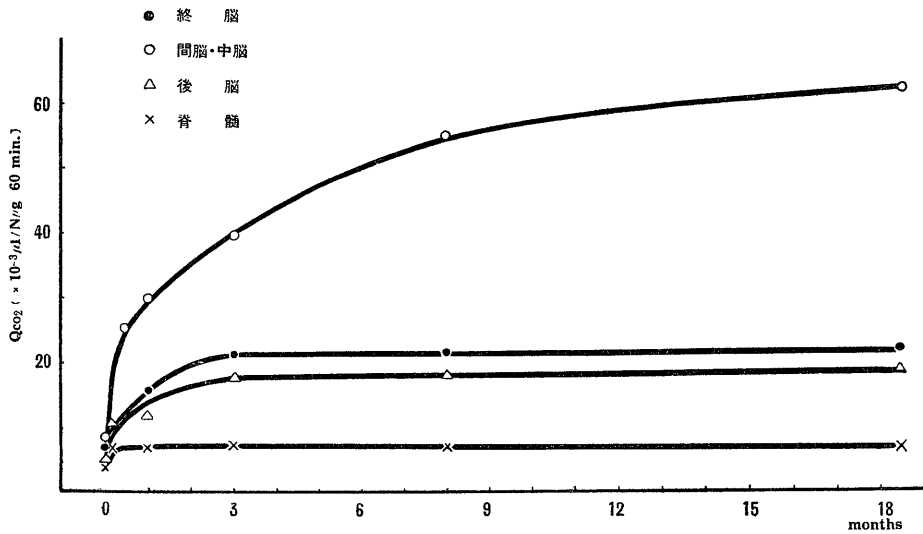
て GDC 活性の変動を測定した。脳は、断頭後既述の方法に従つて、I (終脳)、II (間脳・中脳)、III (後脳)、IV (脊髄) の4部に分けて、0.05M 磷酸緩衝液(pH 6.9)を加えて20~30%ホモジネートをつくり、3,000 r.p.m., 5分間遠心し上清をカーチアン・ダイバー法で測定した。

第6、7表および第9、10図に示したように、発生第1日目より第14日(stage 40²⁰⁾までの胚には活性が見られず、それ以後になつて次第に現われてきた。即ち、第15日目(st. 41)に至つて脳のII領域における酵素活性が測定できるようになり、I、IIIおよびIVの領域では第18日(st. 44)に活性が現われてきた。II領域は発生第15日より孵化後第4日頃までは急速にその強さを増し、それ以後は次第に緩やかな曲線をえがいて増加の傾向をたどり、8ヶ月以後でもなお

第7表 ニワトリの孵化後における GDC 活性

	Qco ₂ ($\times 10^{-3}\mu$ l/N μ g.60min.)									
	第15日	3	4	5	13	31	90	240	549	
I	6.6	9.2	11.9	12.8	14.9	15.6	21.1	21.6	21.8	
II	10.3	11.3	15.2	16.3	26.0	30.0	39.7	55.3	62.5	
III	6.1	10.1	11.1	10.6	10.9	11.8	17.7	18.5	19.5	
IV	4.7	6.8	6.9	6.7	7.5	6.5	7.5	7.0	7.2	

第10図 ニワトリの発生期における GDC 活性の変動 (孵化後)



増加をしめた。I および III の領域は孵化後第 3 日までは大体同じ曲線をえがいて増加したが、その頃より III 領域はその勾配を減じ、3 ヶ月頃にはほぼ一定のレベルに達した。また I 領域は第 4 日頃より次第にゆるやかな曲線となり、同じく 3 ヶ月頃に一定の値に達した。IV 領域は孵化後第 3 日まで増加をしめすがそれ以後は一定の活性値をしめた。

もし GDC が神経系の機能的発育の指標となるならば、中枢神経系の機能的なできあがりには、脊髄が最も早く、後脳および終脳がこれにつぎ、間脳・中脳は孵化後 1 年 6 ヶ月でもなお発育し続けるものであるということができる。

Williams et al.²¹⁾ はニワトリ胚について、その発生過程における遊離アミノ酸の質的量的な変化を研究している。それによると孵卵後 9 日目にかけてグルタミン酸を含む遊離のアミノ酸は、その種類においても量においても増加するが、12 日頃になるとまた減少する経過をたどる。また Roberts²²⁾ 等は種々の動物種族について、 γ ABA およびその他のアミノ酸をペーパークロマトグラフィーで証明し、ニワトリの発生過程においては孵卵後第 4 日目になつて脳にあらわれ、その後発生とともに次第に増加して第 17 日から孵化の時期にかけて成体のレベルに達することを報告した。

このように GDC の基質である L-グルタミン酸はすでに孵卵第 3 日において認められ、さらに反応終産物である γ ABA も第 4 日目に検出できるのに、どうして GDC 活性が第 15 日にいたるまで現れないのであろうか。その理由としては、第 1 に GDC は存在するが非常に微量のためダイバー法でも検出できない場

合、第 2 に GDC が存在しない場合が考えられる。もし後者だとすると当然 γ ABA の生成にグルタミン酸脱炭酸以外の未知の反応経路の存在が推定されることになる。しかし前者の公算がより大きい。Peters et al.²³⁾²⁴⁾ はニワトリの発生過程における神経系の機能的発育に関して、electroencephalography によつて追求し、孵卵後第 12 日目には大脳はまだ電氣的に不活性であり、第 14 日にいたつて Metazol によつて誘導できるようになり、第 15 日ないし第 16 日にはじめて spontaneous electrical activity をしめすことを報告している。これは筆者の検圧法による酸素活性出現の時期とよく一致しており、GDC が神経機能とくにその電気現象と関係を有するであろうことを暗示している。そしてこの神経機能の活動がはじまるとそれまで増加の傾向をたどつた γ ABA も次第に消費されるようになり、成体のレベルに達すると考えられないであらうか。

〔III〕 動物 GDC の細胞内分布

1 匹の雄ラットを断頭して手早く脳を取り出し、ガラスホモジナイザーを用い、0.25M 蔗糖液を媒質として約 10% ホモジネートをつくり、Schneider 法²⁵⁾²⁶⁾ に準じて核、ミトコンドリア、ミクロソームおよび上清の各細胞分劃を分離した。遠心機は Phywe 超遠心機を使用し、5°C 以下で処理した。分離したミトコンドリア分劃については、ヤース緑 B による超生体染色でたしかめた。各細胞分劃は約 2 倍容の 0.05 M 磷酸緩衝液に (pH 6.9) 懸濁させ、ダイバー法によつて GDC 活性を測定した。

第8表 GDC 活性の細胞内分布 (ラッテ脳)

	QCO ₂ (× 10 ⁻³ μl/Nμg.60min.)			
	1	2	3	平均値
核 分 割	4.86	4.95	5.13	4.98
ミトコンドリア分割	16.89	17.73	18.32	17.65
ミクロソーム分割	8.38	7.95	7.86	8.06
上 清 分 割	5.06	6.45	5.81	5.78

第8表に示したようにミトコンドリア分割が最も強い活性をしめし、ミトコンドリア分割: 48%, ミクロソーム分割: 22%, 上清分割: 16%, 核分割: 14%の割合に分布し、GDCはTCA-Cycleやその酸化酵素に対する電子伝達系、脂肪酸酸化酵素、酸化的磷酸化の酵素系またその他の諸種合成酵素、transaminase, glutamic dehydrogenase などと同じように、ミトコンドリア中に含まれることが明らかとなった。しかしこのミトコンドリア分割の示した活性は、第2表および第5図にしめしたラッテの終脳あるいは後脳の値に近似して、かなり低い値をしめした。

〔IV〕 動物 GDC の性質

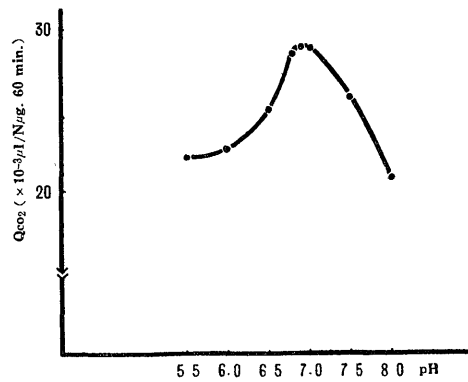
1. pH による GDC 活性の変動

3匹の成熟雄イモリを断頭して脳を取り出し、0.05 M 冷磷酸緩衝液を約 0.1 ml 加えてホモジナイズし、既述のように 5~2°C で 3,000 r.p.m., 5分間遠心して上清をとりダイバー法で測定した。使用した 0.05 M 磷酸緩衝液は水素ガス電極法をもちいて正確に pH 5.5, 6.0, 6.5, 6.8, 6.9, 7.0, 7.5, 8.0 のものを調製した。

これらの各 pH における GDC の活性は、第9表および第11図にしめすような結果となり、pH 6.9 において最も高い値をしめした。

Roberts¹⁶⁾等はマウスを使つてワールブルグ検圧法で至適 pH 6.4~6.5 を、また Awapara²⁰⁾等はラッテを使つてワールブルグ検圧法および γ ABA のペーパークロマトグラフィーを用いる定量法により至適

第11図 GDC の pH 曲線



pH 6.8 を得ている。筆者の至適 pH 6.9 は Awapara 等の値に近い。ただしこの pH 値は反応中徐々に変化するため、反応開始前即ち基質添加前の値である。

細菌、植物及び他の動物の GDC の至適 pH はそれぞれ 4.5~5.0²¹⁾, 5.3~5.9²²⁾ および 7~9²⁰⁾ と記載されているが脳の至適 pH は他のそれとは異つた値を示していることは注目されるべきことである。

2. 部分的精製

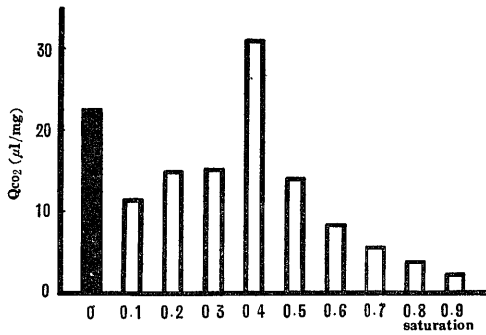
GDC の精製はこの酵素が不溶性であるために今まで成功していない。筆者は最初牛脳を材料としていわゆる Green-brei をつくつてその精製をこころみたが不成功に終つた。つぎに硫酸アンモニウムによる塩析法で部分的精製をこころみた。

牛の脳皮質 100g に 400ml の冷磷酸緩衝液 (0.05 M, pH 6.9) を加え Waring blender (シリコン加工を施す) で約 2分間ホモジナイズする。それを 3,000 r.p.m. 15分間遠心し、その上清について中性化した飽和硫酸溶液を用いた Hofmeister の方法にしたがつて分割し、沈澱 (3,000 r.p.m., 15分間遠心) を 2倍容ないし 3倍容の 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 6.9) にかして酵素液とした。以上の全操作は 5~2°C で行つた。こうして得られた酵素液はワールブルグ検圧法で測定し乾燥重量 1mg 当りの specific activity を算出した。

第9表 各 pH における GDC 活性 (イモリ脳)

	QCO ₂ (× 10 ⁻³ μl/Nμg.60min.)							
	5.5	6.0	6.5	6.8	6.9	7.0	7.5	8.0
1	22.70	23.30	26.11	28.50	29.00	28.64	27.09	21.51
2	22.06	22.80	25.44	28.61	29.22	28.89	25.04	20.51
3	21.57	21.90	23.44	28.43	28.90	28.83	25.07	20.76
平均値	22.11	22.67	25.00	28.51	29.04	28.79	25.73	20.93

第12図 各硫安分劃における GDC 活性



硫安 0.4 飽和分劃に活性のピークがあり、ホモジネートの上清における活性値 2.25µl/mg の 1.8 倍の活性をしめた。各分劃における活性値は第12図のとおりであつた。なおこの段階以上の精製はまだ成功していない。

3. 阻害実験

上の 0.3~0.5 硫安飽和分劃について、種々の阻害剤(終末濃度 10⁻³M)を加えてワールブルグ検圧法で測定した。対照には阻害剤の代りに等量の蒸留水をもちいた。

実験結果は第10表のように KCN, EDTA, α,α'-dipyridyl, PCMB, hydroxylamine, hydrazine および semicarbazide など酵活性は阻害されるが、その他のものでは阻害されない。Roberts 等¹⁴⁾ および Awapara 等²⁰⁾ もマウス脳およびラッテ脳の GDC 阻

第10表 牛脳 GDC に対する各種阻害剤の影響

阻 害 剤	Qco ₂ (µl/mg)	阻害率
—	1.57	%
KCN	0.56	64.2
Na azide	1.56	0
EDTA	1.16	26.4
oxin	1.60	0
cupferron	1.90	0
o-phenanthroline	1.66	0
α,α'-dipyridyl	1.17	25.5
PCMB	0.13	92.0
iodosobenzoate	1.69	0
monoiodacetate	1.57	0
hydroxylamine	0.79	49.5
hydrazine	0.91	35.8
semicarbazide	1.07	31.6

酵素液+阻害剤+PALPを10分間インキュベートしてのち基質を加えた。

害剤として KCN, hydroxylamine, semicarbazide を報告している。ところが PALP を加える前に酵素液と阻害剤をプレインキュベートしておく、それまで阻害作用をしめさなかつた oxin, cupferron, o-phenanthroline, iodosobenzoate によつても阻害のあることが見いだされた(第11表)。

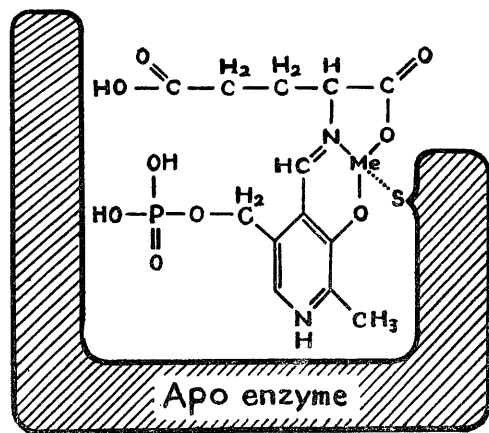
第11表 牛脳 GDC に対する種阻害剤の影響

1st preincubation	2nd preincubation	Qco ₂ (µl/mg)	阻害剤
—	PALP	2.75	%
Na azide	〃	2.58	6.2
EDTA	〃	1.93	29.8
oxin	〃	1.70	38.2
cupferron	〃	2.45	10.9
o-phenanthroline	〃	2.19	20.4
α,α'-dipyridyl	〃	1.80	34.5
iodosobenzoate	〃	1.24	54.9

酵素液+阻害剤を10分間インキュベートしてのち、PALP 基質を加えた。

以上の結果から GDC がその活性を維持するのに CO 基, SH 基および金属を必要とすることは明らかであり、第13図のようなアポ酵素, 助酵素, 基質の間の結合様式が予想されるであろう。このような模式図は PALP を助酵素とする他の酵素たとえば tryptophanase などについてもものべられている³¹⁾。

第13図 GDC に作用における酵素・基質・助酵素の結合様式に関する模型図



む す び

種々の動物における GDC 分布, 発生にともなう活性の消長についてカーチアンダイバー法およびワ

ールブルグ検圧法を用いて研究し、また動物 GDC の 2, 3 の性質をしらべた。

1. 成熟イモリでは GDC 活性は主として中枢神経系に存在し、腎、睪丸、膀胱、脾、心、筋肉、脊髄神経系節および坐骨神経系には極めて乏しかつた。

2. 成熟イモリにおける中枢神経系内分布は全脳活性の40%が間脳・中脳領域に、22%が終脳に、21%が後脳に、17%が脊髄にみられた。

3. 成熟ラッテの中枢神経系における分布もイモリのそれと非常によく一致し、間脳・中脳領域：37%、終脳：24%、後脳：21%、脊髄：19%であり、その他の組織の活性は微量であつた。

4. 成熟ラッテの脳内分布では、四丘体上丘が最も活性が強く、視床下部前部、灰白結節、前部大脳皮質、視床下部後部、四丘体下丘の順であり、後部大脳皮質および視床部がそれに続いた。

5. 大脳および小脳の髄質は皮質にくらべ非常に活性が低く、網膜、視束、脊髄神経節および坐骨神経も非常に低い値をしめた。

6. 橋・延髄領域においては脊側が腹側の約3倍の値をしめたが、脊髄の灰白質と白質とには有意の差が認められなかつた。

7. 脳 GDC 活性値はイモリとラッテはほぼ一致した値をしめし、その他の動物の間には差が認められた。

8. ニワトリの発生期における酵素活性は孵卵後第15日 (st. 41) にいたつて間脳・中脳領域に現われ、終脳、後脳、脊髄は第18日 (st. 44) になつて測定可能となり、各領域とも次第に活性を増した。

9. 脊髄は孵化後第3日で一定の活性値をしめし他のいずれの領域より低い値を示した。終脳および後脳は孵化後3ヶ月まで増加し間脳・中脳領域は8ヶ月にいたつてもなお増加の傾向をたどつた。

10. GDC の細胞内分布をラッテ脳について調べたところでは、ミトコンドリア分割に活性局在が認められた。

11. イモリ脳 GDC の至適 pH は 6.9 であつた。

12. 牛脳皮質の硫酸分割による GDC 部分精製標本をもちい種々の阻害剤の効果をみた。動物 GDC 活性は金属阻害剤およびカルボニル試薬によつて阻害されると同時に SH 試薬によつても著明に阻害された。即ち動物 GDC も細菌の GDC と同じように活性の SH 基、CO 基をもつ金属酵素と考えられる。

おわりに、御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた石川大刀雄教授に厚く感謝するとともに多大の御教示を戴いた倉田自章助教授、橋武彦博士ならびに御協力下さつた教室の諸兄に心から謝意を表します。

文 献

- 1) Schales, O., Mims, V. & Schales, S. S. : Arch. Biochem. **10**, 455 (1946).
- 2) Schales, O. & Schales, S. S. : *ibid.*, **11**, 155 (1946).
- 3) Gale, E. F. : Advances in Enzymol., **6**, 1 (1946).
- 4) Roberts, E. & Frankel, S. : J. Biol. Chem., **187**, 55 (1950).
- 5) Wingo, W. J. & Awapara, J. : *ibid.*, **187**, 35 (1950).
- 6) Lindenström-Lang, K. : Nature, **140**, 108 (1937).
- 7) Lindenström-Lang, K. & Glick, D. : Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., **24**, 333 (1943).
- 8) Holter, H. : *ibid.*, **24**, 399 (1943).
- 9) Schwartz, S. : *ibid.*, **27**, 79 (1949).
- 10) Waterlow, J. C. & Barrow, A. : *ibid.*, **27**, 93 (1949).
- 11) Boell, E. J., Needham, J. & Rogers, V. : Proc. Roy. Soc. London, B. **127**, 322 (1939).
- 12) Boell, E. J., Koch, H. & Needham, J. : *ibid.*, B. **127**, 363 (1939).
- 13) 橋 武彦 : 十全会誌, **61**, 157 (1959).
- 14) Roberts, E. & Frankel, S. : J. Biol. Chem., **188**, 789 (1951).
- 15) Conway, J. C. : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, I, Crosby Lockwood and Son LTD., London, 1950. 石坂香治訳 : 微量拡散分析及び誤差論, 1, 南江堂, 東京, 1952.
- 16) Roberts, E. & Frankel, S. : J. Biol. Chem., **190**, 505 (1951).
- 17) 伊藤文雄 : 十全会誌, **57**, 20 (1945).
- 18) Lowe, I. P., Robins, E. & Eyerman, G. S. : J. Neurochem., **3**, 8 (1958).
- 19) Albers, R. W. & Brady, R. O. : J. Biol. Chem., **234**, 4 (1959).
- 20) Hamburger, V. & Hamilton, H. L. : J. Morph., **88**, 49 (1951).
- 21) Williams, M. A., DaCosta, W. A., Newman, L. H. & Marshall, L. M. : Nature, **173**, 490 (1954).
- 22) Roberts, E., Lowe, I. P., Guth, L. & Jelinek, B. : J. Exptl. Zool., **138**, 313 (1958).
- 23) Peters, J. J., Vonderahe, A. R. & Powers, T. H. : *ibid.*, **133**, 505 (1956).
- 24) Peters, J. J., Vonderahe, A. R. & Powers, T. H. : *ibid.*, **139**, 459 (1958).
- 25) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. & Pallade, G. E. : J. Biol. Chem., **172**, 619 (1948).
- 26) Schneider, W. C. : *ibid.*, **176**, 259 (1948).
- 27)

- Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H. : *ibid.*,
183, 123 (1950). 28) Brody, T. M. &
Bain, J. A. : *ibid.*, 195, 685 (1952). Wada, H., Yoshimatsu, H., Koizumi, T.,
29) Wingo, W. J. & Awapara, J. : *ibid.*, Inoue, F., Ito, K., Morisue, T., Nasu, H.,
187, 267 (1950). 30) Blaschko, H. : Ito, H., Sakamoto, Y. & Ichihara, K. :
Advances in Enzymol., 5, 67 (1945). 31) Proc. Intern. Symp. Enzym. Chem., 2, 148 (1957).

Abstract

The author studied on (1) the distribution of GDC activity in the various animals, (2) its changes during the development of the nervous system of the chick, and (3) some properties of this enzyme. All of these studies were carried out by the cartesian diver and Warburg techniques in an N₂ atmosphere at 30°C.

(1) Levels of GDC activity were different among the animal species investigated. Its activity was essentially confined to the central nervous system, in which the diencephalon-mesencephalon area was the most active and the spinal cord the least active. The spinal nerve, the dorsal ganglia and the other tissues had negligible activities.

To study further the distribution of this enzyme, GDC was measured at many or various areas of the rat central nervous system. The grey matter showed a four- and five-fold range of activity, with the superior colliculus exhibiting the highest activity, while in the white matter little activity was found. In the pons-medulla area the dorsal showed about three times as much activity as the ventral.

This enzyme was found in the mitochondrial fraction of the rat brain.

(2) GDC activity during the development of the chick embryo appeared on the 15th day of incubation in the diencephalon-mesencephalon area, and in the other areas appeared on the 18th day. The activity in each area increased slowly and progressively with the advance of growth. The spinal cord reached to adult level of activity on the 3rd day after hatching, the telencephalon and metencephalon respectively in the 3rd month. At the diencephalon-mesencephalon area the increase continued until the 18th month.

(3) The pH optimum of brain GDC in *Triturus pyrrhogaster* was found to be 6.9.

The effects of the various inhibitors were investigated with partially purified preparation of the cattle brain, consequently it might be considered that animal GDC was a metal enzyme contained SH- and CO-radical(s) as an essential part of its structure like that of bacterial GDC.