

脳 の Histidine 代 謝 に つ い て

特に Histidine の Deamination による Urocanic acid の 生 成 に つ い て

戸 田 茂, 黒 田 正 清

Histidine 代謝は1926年 Edlbacher^{(1), (2), (3)} に初まり、つづいて Mislowitzer⁽⁴⁾, Abderhalden⁽⁵⁾, 瀬良^{(6), (7)}, 赤松⁽⁸⁾, 竹内⁽⁹⁾, 松田⁽¹⁰⁾等の研究があり、更に N¹⁵ で label した Isotope を用いた Taber⁽¹¹⁾ の実験等枚挙にいとまのない程で、其の結果 Histidine の Liver brei による代謝経路としては次の如く

L-Histidine → Urocanic acid → Formamido-L-glutamic acid → Formyl-L-glutamic acid → L-glutamic acid の過程が証明され且つ一般に認められている。

一方須田⁽¹²⁾, Borck⁽¹³⁾等の *Pseudomonas fluorescens* を用いた実験によつても略同様の過程を経る事が証明されている。

然るに脳組織には、可成りの量の Histidine⁽¹⁴⁾ が遊離して存在しているにも拘らず、脳の Histidine 代謝に関しては未だに何等の報告にも接していない現状である。其処で著者等は脳の Histidine 代謝は如何なる過程を経るかを解明せんとする目的をもつて Guineapig の Brain brei を用いて Histidine 代謝を行つた。

実 験 の 部

(1) Urocanic acid の調製

摘出直後の猫の Liver^{(6), (7)}を氷冷下10倍量の $1/15\text{M}$ ・Phosphate buffer (pH 8.6) で Potter's homogenizer にて Homogenate した酵素液 2 ml., 及びあらかじめ調製せる $1/10\text{M}$ ・Histidine monohydrochloride (pH 8.6) 2 ml. に、 $1/15\text{M}$ ・Phosphate buffer 2 ml. と蒸溜水 2 ml. とを加えたものを Thumberg 管中に取り、14mmHg に吸引し Anaerobic state で38°C の恒温槽中に36時間 incubate した後、同量の 10 per cent Trichloroacetic acid を加えて反応を停止せしめ Paperchromatography により Histidine の Spot が消失し、更に又純 Histamine の Sample より得た Rf. 0.69 と全く異なる Urocanic acid の Spot のみを認め得るものを使用す。

(2) 反応時間5分の資料

氷冷下 Guineapig の脳 5 g. を50ml. の Phosphate buffer (pH 8.6) で10倍稀釈 Homogenate としたものと及び $1/15\text{M}$ ・Phosphate buffer 50ml., 水 50ml. とを枝付 Kolben に取り、又一方 Histidine monohydrochloride 1 g. を $1/15\text{M}$ ・Phosphate buffer 50ml. に溶かしたものを別の

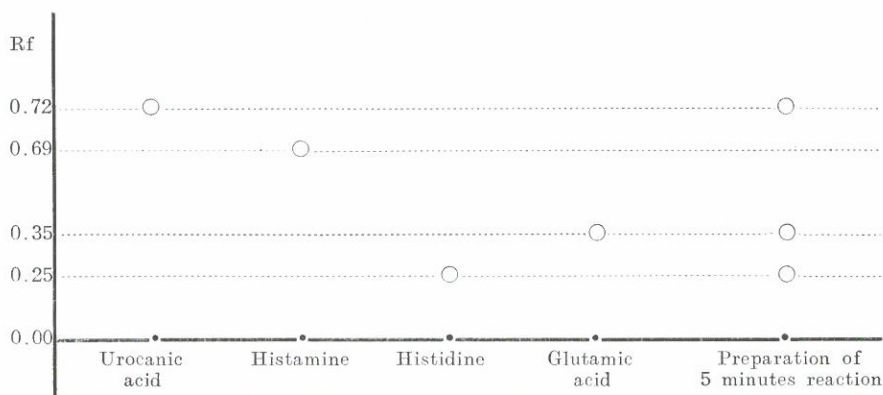
Kolben に取り、両者を硝子管で連結し、枝付 Kolben の枝の先端に活栓を付し、14mmHg に吸引した後 38°C の恒温槽中で振盪し、反応液が温まってから両者を混和し 5 分間 incubate して、直ちに同量の 10% Trichloroacetic acid を投入して反応の進行を停止せしめ、濾過除蛋白後更に温水浴上にて減圧乾涸し、完全に水分を除去し、Octylalcohol 25ml. づつにて 2 回熱時抽出したものを使用する。

(3) Paperchromatography による反応生成物の分離

猫の Liver brei を用いて調製した Urocanic acid 含有液 0.03ml. 及び Guineapig の Brain bréi を用いた資料 0.03ml. を、それぞれ東洋濾紙 No. 50 (40×40cm) 上の原点に付し、Butanol-水-酢酸 (4 : 2 : 1) の展開溶媒を用いて、一次元上昇法によつて展開後、Ninhydrin 及び Diazo 反応によつて発色せしむ。

実 験 結 果

以上の実験から次表に示す如き結果を得た。



考 按

実験結果より明らかなる如く Butanol-水-酢酸 (4 : 2 : 1) の展開溶媒を用いて、一次元上昇法による Paperchromatography によつて、5 分後の実験資料、即ち特に Histidine 及び Urocanic acid 間の生成機構を確認する目的をもつて incubate したものを除蛋白後、更に減圧にて完全に乾燥し、Imidazol 環を有するもののみ、即ち Histidine 及び Urocanic acid のみを抽出する目的をもつて、Octylalcohol にて熱時抽出を行つたものを使用した資料からは、Ninhydrin 反応による発色にては、Rf. 0.25 及び 0.35 の 2 つの Spot を、又 Diazo 反応による発色にては Rf. 0.25 及び 0.72 の 2 つの Spot を得た。

その内 Rf. 0.25 及び Rf. 0.35 の物質は、それぞれ純 Histidine 及び純 Glutamic acid の Spot に一致する。よつて問題は Rf. 0.72 の Spot に存する解であるが、Rf. 0.72 は猫の Liver brei^{(6) (7)} を用いて 38°C で 36 時間 incubate し、純 Histamine の Spot より得た

Rf. 0.69 との明らかなる Rf. の相異、並びにその色調の相異を確認して後得た Urocanic acid の Rf と同一の値を示し、更に松田⁽¹⁰⁾ の Liver brei による Paperchromatography の実験によつても、ほぼ同様な Rf 値を得ている事を参照すれば Guineapig の Brain brei を用いて得た Rf 0.72 なる物質は Urocanic acid なりと思ふ。

従つて此処において注目すべきは、Guineapig の Brain brei による Histidine 代謝においては、反応後僅か5分にして、すでに Rf 0.72 の Urocanic acid の Spot を初め、Rf 0.35 の Glutamic acid の Spot をも生ずる事にして、Liver に於ては36時間もの長時間の incubate に依つてのみ得られる事とを対比すれば その反応の速かなる事は特筆すべき事にして Guineapig の Brain brei によつても Urocanic acid 並びに Glutamic acid の従来 Liver enzyme 及び Pseudomonas fluorescens によつて認められている Histidine の代謝過程の存在する事を物語るものであり Guineapig の brain 中にも Histidase の存在する事をうかがい知るものである。

結 論

Guineapig の Brain brei による Histidine 代謝を行い、5分間 incubate した資料を Octylalcohol で抽出したものをを用い、Paperchromatography を行つた結果 Rf 0.25、0.35 及び 0.72 の3つの Spot を得た。その内 Rf 0.25 は Histidine、0.35 は Glutamic acid、0.72 は Urocanic acid である。従つて Brain brei に依る Histidine 代謝においても、Liver brei 及び Pseudomonas fluorescens における如く Histidine→Urocanic acid→Glutamic acid の Pathway が存在する。

本論文の要旨は昭和32年5月19日、第7回日本生化学会中国・四国地方部会総会にて発表した。尚研究費の一部は県委託研究費によるものである。記して深謝す。

文 献

- (1) Edlbacher, S. : Z. physiol. Chem. 157, 106 (1926)
- (2) Edlbacher, S. und Kraus, J. : ibid 191, 225 (1930)
- (3) Edlbacher, S. und Neber, M. : ibid 224, 261 (1954)
- (4) Mislowitzer, E. und Kauffmann, F. : Biochem. Z. 224, 101 (1931)
- (5) Abderhalden, E. und Buadje, S. : Z. physiol. Chem. 157, 106 (1926)
- (6) 瀬良好太 : 大阪医, 38, 1107 (1939)
- (7) 瀬良好太 : 生化学, 17, 107 (1942)
- (8) 赤松茂 : 同上, 17, 75 (1942)
- (9) Takeuchi, M. : J. Biochem. 34, 1 (1941)
- (10) 松田誠 : 生化学, 28, 158 (1956)
- (11) Tabor, H. Mehler, A. H. Hayashi, O. and White, J., : J. Biol. Chem. 196: 121 (1952)
- (12) 須田正己 : 酵素化学シンポジウム4, 11 (1950)
- (13) Borek, B. A. and Waelsch, H. : J. Biol. Chem. 205, 459 (1953)
- (14) Weil-Melherbe, H. : Metabolism and Function in Nervous Tissue. Biochemical Society Symposia No. 8. 24, (1952)