

Title	ラット脳内Tyrosine Hydroxylaseに関する研究(第1報) : Tyrosine Hydroxylaseの脳内分布と性周期に伴う変動
Sub Title	Tyrosine hydroxylase activity in rat brain [I] distribution of the enzyme and activity during different phases of the estrous cycle
Author	吉原, 民子(Yoshihara, Tamiko) 中村, 悦郎(Nakamura, Etsuro) 木村, 都(Kimura, Miyako) 小野, 純子(Ono, Junko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1977
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.22 (1977.) ,p.70- 77
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000022-0070

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ラット脳内 Tyrosine Hydroxylase に関する研究 (第1報) Tyrosine Hydroxylase の脳内分布と性周期に伴う変動*

吉原民子, 中村悦郎, 木村 都, 小野純子

Tyrosine Hydroxylase Activity in Rat Brain [I] Distribution of the Enzyme and Activity during Different Phases of the Estrous Cycle

ETSURO NAKAMURA TAMIKO YOSHIHARA, MIYAKO KIMURA and JUNKO ONO

(Received September 30, 1977)

Tyrosine hydroxylase (TH) in rat brain during different phases of the estrous cycle and the effects of 17β -estradiol (E) and progesterone (P) on TH were studied using a modification of Waymir's method. Seven brain regions were dissected from adult SD rats, maintained on a 11 hr light-13 hr dark lighting schedule, according to the method of Glowinski and Iversen. The activity was highest at proestrus and then decreased steadily to the lowest levels at estrus II in all of seven regions. In oophorectomized rats, E in olive oil ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$, twice a day for 2 days, s. c.) decreased the activity in all brain regions, except midbrain and P in olive oil (1 or 2 mg/kg, given in the same way as E) was more effective in decreasing the activity except in the striatum at the dose of 1 mg/kg. However, when P was injected concomitantly with E, the activity showed the tendency toward restoration, or rather to increase, though such was not necessarily dose dependent. The participation of these steroids in the gonadotropin releasing mechanisms through the action on TH is doubtful.

Tyrosine hydroxylase (以下THと略す) [E. C. 1. 14. 16. 2, tyrosine 3-monooxygenase, tyrosine 3-hydroxylase, L-tyrosine, tetrahydropteridine: oxygen oxidoreductase (3-hydroxylating)] は L-tyrosine より L-3, 4-dihydroxy phenylalanine (L-dopa) を生成する, tetrahydropteridine を補酵素として要求する 1 原子酸素添加酵素で, 動物の交感神経の伝達物質や副腎髄質ホルモンである catecholamines (dopamine, noradrenaline, adrenaline) の生合成の第一段階に関与する律速酵素である。

本酵素は副腎髄質 (adrenaline 生産), 末梢交感神経の adrenergic neuron 等 catecholamine 産生細胞に局在する。したがってこの神経分布臓器の脾臓, 心臓, 唾液腺, 脾神経, 精索, 腎臓, また, 脳の dopaminergic neuron (黒質, 尾状核など) に多く存在する。中枢では neuron の細胞体と神経終末の双方に存在するが, 脳内の大まかな分布は尾状核に最も多く含有され, 以下視床下部, 視床, 中脳, 延髄, 大脳皮質, 小脳の順である。また脳内では dopaminergic neuron における活性の方が noradrenergic neuron におけるよりも高い¹⁾。

*本論文の一部要旨は1977年3月29日第50回日本薬理学会総会において発表

Sawyer and Krieg²⁾ は第3脳室への noradrenaline 注入が視床下部からの LH releasing factor を高めると推論しており、脳内 catecholamine が視床下部—下垂体系機能に関与し、LH releasing factor の1つとして作用することは否定しえない。従って catecholamine 系代謝の律速段階に関与している TH は LH 分泌にも関係があり、また卵巣摘出によって TH 活性が高まっていると考えられる。今回私たちは TH のラット脳内分布、性周期による変動および性ホルモン—17 β -estradiol (E), progesterone (P)—投与の影響について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

温度23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度55%の恒温恒湿度室, 照明時間11時間(6時~17時)で, 固型飼料(日本クレア製, CE-2)と水を自由に与えて飼育した Sprague-Dawley 系の健康な雌性ラット(10~15週令) 1群3~5匹を用いた。

ラットを午前9~11時に断頭後直ちに5 $^{\circ}$ Cの低温室内に移し, 碎水上にて血液および附着組織を取り除いて Glowinski and Iversen³⁾ の方法で7部位—cerebellum, medulla oblongata, hypothalamus, striatum, midbrain, hippocampus, cortex—に分け, Coyle⁴⁾ の方法を参照にして 0.2% Triton X-100を含む0.05M Tris-HCl buffer (pH 6.0) の10容量(w/v)でテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし, 10,000 \times g 10分間0 $^{\circ}$ Cで遠心した上清を同緩衝液で2倍希釈して酵素材料とした。

TH は活性が低いので粗酵素材料での測定には高感度のアイソトープを用いる dilution method を必要とする。Petrack ら⁵⁾ および Waymire ら⁶⁾ の方法を参照にして Fig. 1 に示す手順によって TH 活性を測定した。すなわち基質に 1-¹⁴C tyrosine を用い, 酵素材料と incubation して 1-¹⁴C dopa を生成させ dopa の Km が tyrosine より約1/100小さいことを利用して一定量の dopadecarboxylase を添加して dopa のみ特異的に脱炭酸させて発生する¹⁴CO₂ 量から含有蛋白量1mg 当りの tyrosine 消費量 n moles/hr で酵素活性を表わした。

即ち Fig. 1 に示すように酵素材料 0.2ml に Tris-HCl buffer (pH8.6) 2.5 μ mol., mercaptoethanol 25 μ mol. および ferrous sulfate 0.5 μ mol. を加えて全量 0.4 mlとし, 30 $^{\circ}$ C, 5分間 preincubation を行って酵素を活性化し, その $\frac{1}{2}$ 容量 0.2mlを予め phosphate buffer (pH6.0) 40 μ mol., 6, 7-dimethyl-5, 6, 7, 8-tetrahydropterine 0.75 μ mol., mercaptoethanol 25 μ mol., L-1-¹⁴C-tyrosine 67.92 η mol. を入れた試験管中に加え全量 0.5mlとする。直ちに 25% β -phenethylamine(methanolで希釈)を浸み込ませた Whatman No. 1 濾紙(1.7 \times 8 cm)を捜入したバイアル瓶を上記試験管に肉厚アメゴムを用いて連結し⁷⁾, 37 $^{\circ}$ Cで20分間水酸化反応を行ない, dopa を生成させ, 3-monoiodo-L-tyrosine 0.5 μ mol. を注入して反応を停止させる。次いで sod. phosphate (pH 7.0) 120 μ mol., pyridoxal phosphate 0.105 μ mol., mercaptoethanol 15 μ mol. お

1) 永津俊治: 蛋白質核酸酵素, **21**, 161, (1976)

2) Sawyer, C. H. and Krieg, R. J. : *Endocrinol.*, **99**, 411, (1976)

3) Glowinski, J. and Iversen, L. L. : *J. Neurochem.* **13**, 655, (1966)

4) Coyle, J. T. : *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1935, (1972)

5) Petrack, B. et al. : *J. Biol. Chem.*, **247**, 4872, (1972)

6) Waymire, J. C. et al. : *Anal. Biochem.*, **43**, 588, (1971)

7) 市山新: 生化学, **44**, 825, (1972)

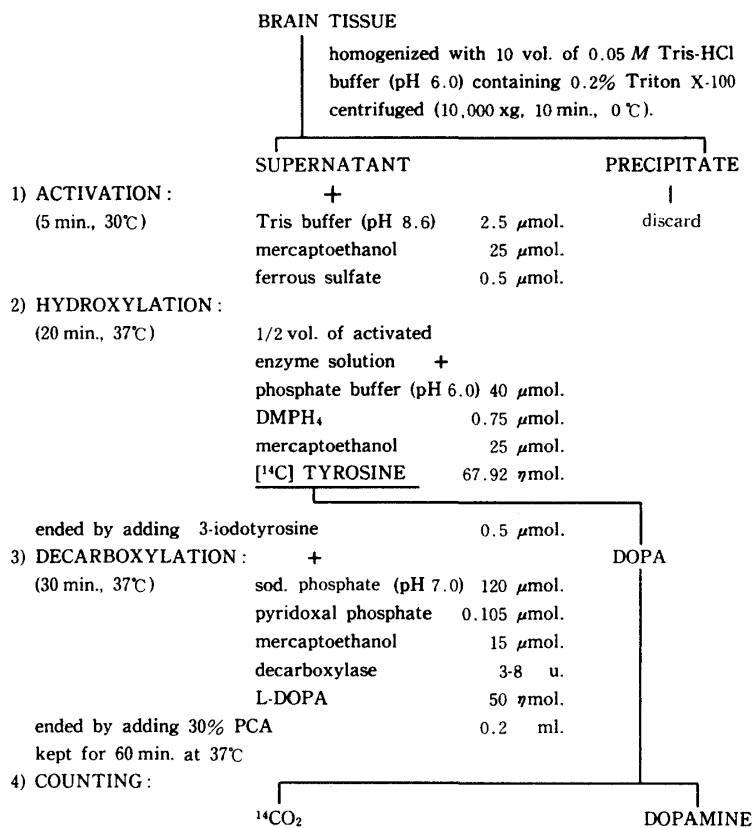


Fig. 1 Tyrosine hydroxylase assay.

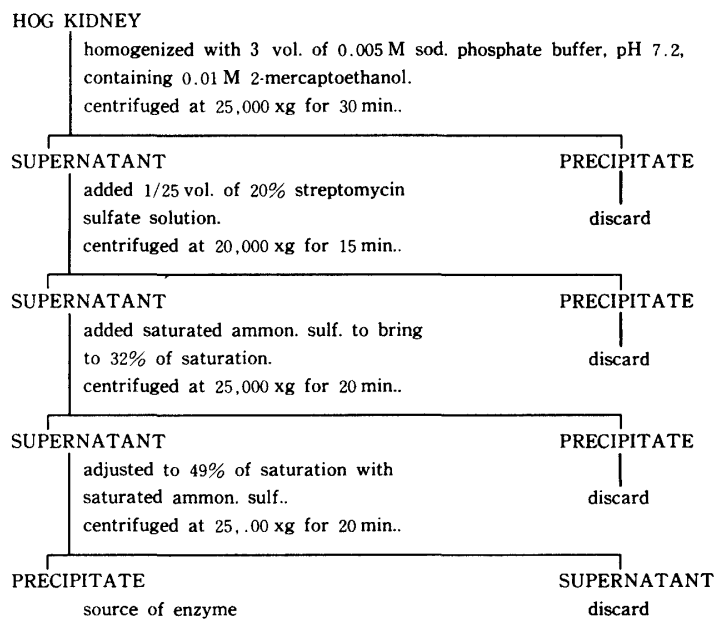


Fig. 2 Preparation of aromatic L-amino acid decarboxylase.

よびブタ腎臓より抽出⁸⁾し (Fig. 2 予め単位を決定した aromatic L-amino acid decarboxylase 3~8 単位⁷⁾, carrier として L-dopa 50 μ mol. を添加, 再び37°C で incubation を行って L-dopa-1-¹⁴C (L-1-¹⁴C tyrosine より生じた) を脱炭酸させ, 30分後に30% perchloric acid 0.2 ml を注入して反応を停止させる。更に 37°C で60分間振盪 (150 strokes/min) して発生した ¹⁴CO₂ を β -phenethylamine に完全に吸着される。バイアル瓶をはずして triton scintillation fluid (DPO 5.5g, dimethyl POPOP 0.1g, Triton X-100 333 ml に toluene を加えて1 l とし, さらに水を 50 ml 加える) 10ml を加えて¹⁴C の放射能を測定した。

なお, 蛋白量は bovine albumine (第1化学製) を標準として Folin phenol 試薬を用い, Oliver ら⁹⁾ の方法に準じて測定した。

性ホルモンの影響を観察するためにはラットを10~11週令で卵巣摘出し, 5日間以上間期が連続したものに1日2回2日間ホルモンを投与し, 最終投与の2時間後に断頭した。ホルモン投与量は 17 β -estradiol (E) は 0.05, 0.1, 0.2mg/kg, progesterone (P) は 1, 2mg/kg を1回量とした。またE, P同時投与実験は1回量を E 0.1mg, P 1mg/kg 投与群 (0.1—1群と略す) と E 0.2mg, P 2mg/kg 投与群 (0.2—2群) で行った。なお, ホルモンはすべて3% ethanol 含有 olive oil に溶解し, 対照群には3% ethanol 含有 olive oil を投与した。

実験成績

1. ラット TH 活性の脳内分布

TH 活性は蛋白 1 mg あたりで striatum で最も高く, 次いで hypothalamus に高い。Mid brain, cortex, medulla oblongata, cerebellum および hippocampus における活性は非常に低値を示した。(Fig. 3)。

2. TH 活性の性周期による変動

性周期は中尾, 小山による分類に従って proestrus, estrus I, estrus II, diestrus の4期に分けた。TH 活性は酵素活性の高い部位 striatum, hypothalamus において proestrus 期に最も高く, estrus II 期に最も低いという性周期に伴うはっきりした変動が観察された。この傾向は mid-brain においても同様であったが, cortex, hippocampus においては proestrus 期には最も高い活性値を示したが, estrus II 期より diestrus 期において TH 活性は低い。Cerebellum と medulla oblongata では proestrus 期で他の時期よりやや低い活性値を示したがどの時期でも TH 活性は非常に低く, 有意の差は認められなかった (Fig. 3)。

3. 卵巣摘出による TH 活性の変動並びに性ホルモンの影響

卵巣摘出後5日間以上間期の連続したラット脳内各部位の TH 活性は Fig. 4 にみられるように, 正常動物 (diestrus 期) の値に比べ, すべての部位で増加し, 特に cerebellum, hippocampus で著明であった。

17 β -estradiol を卵巣摘出ラットに投与した時, TH 活性は 0.05mg/kg では midbrain で僅かに上昇, striatum で僅かに低下, 他の部位では著明に低下した。しかし, 0.1, 0.2 mg/kg 投与では更に活性低下を示す部位 (hippocampus), あるいは 0.05mg/kg 群より活性上昇をきたした部位 (hypothalamus, striatum, cortex) があって, E の投与量と活性変動の間に特に一定

8) Christenson, J. G. et al.: *Arch. Biochem.*, **141**, 356 (1970)

9) Oliver, H. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, (1951)

の関連はみられなかった。Pは1あるいは2 mg/kgのいずれもTH活性を低下させる傾向がみられたが, hypothalamus, striatum ではその程度は極めて軽微であり, また1 mg/kgと2 mg/kgの量の差による活性値の変動幅には特に関連がみられなかった。E, P同時投与によってTH活性は0.1-1群では卵巣摘出対照群に比べ medulla oblongata, hypothalamus, midbrain, cortex では著明に増加し, striatum では差異なく, cerebellum では逆に著明に減少した。ホルモン量を増加した0.2-2群における酵素活性は cerebellum 以外の全部位で0.1-1群より著しく低下し, hypothalamus, striatum, hippocampus の各部位では卵巣摘出対照群よりも低値を示した (Fig. 5)。

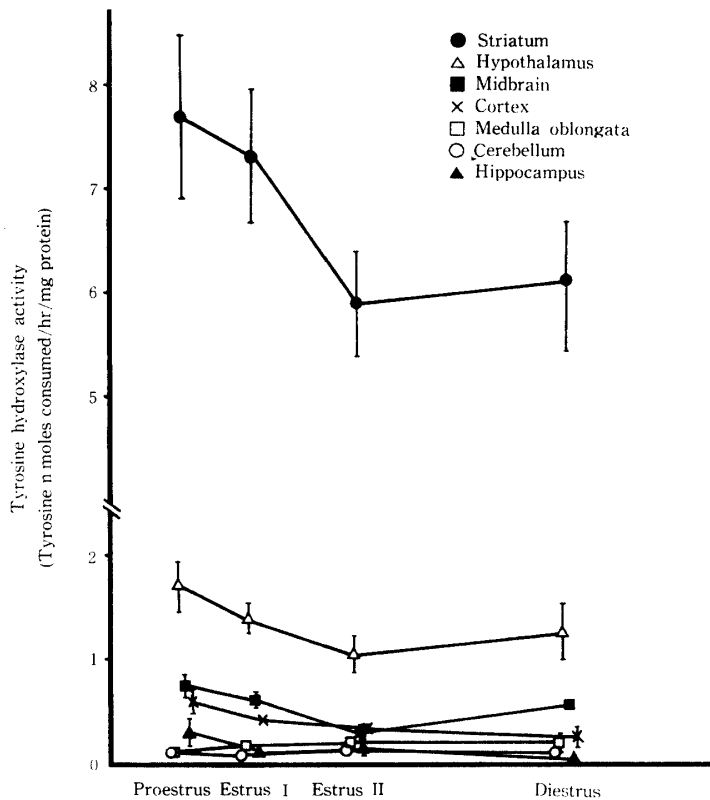


Fig. 3 Tyrosine hydroxylase activity in the rat brain during different phases of the estrous cycle.

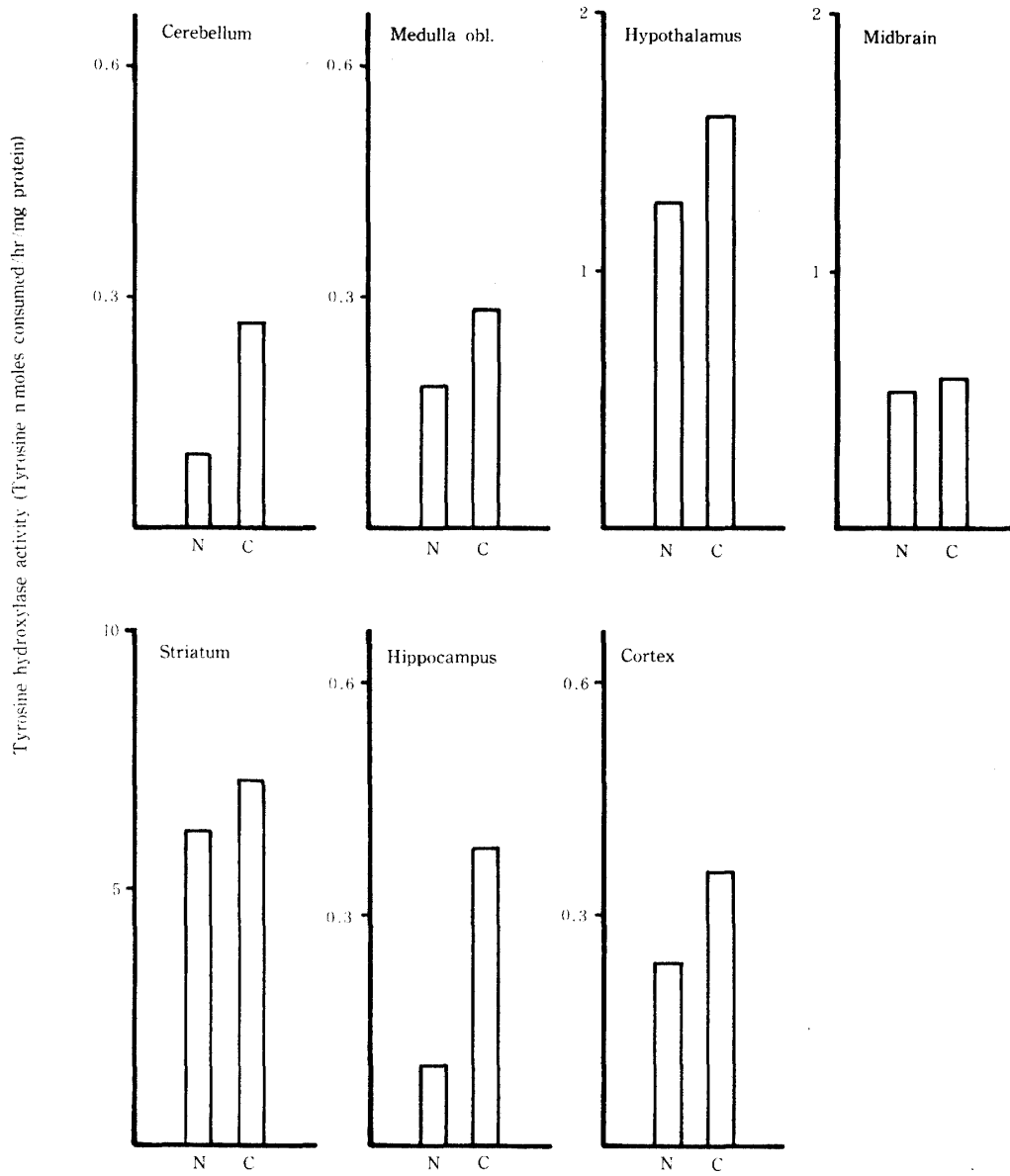


Fig. 4 Tyrosine hydroxylase activity in several regions of normal and oophorectomized rat brain. N : normal rat (diestrus) C : oophorectomized rat

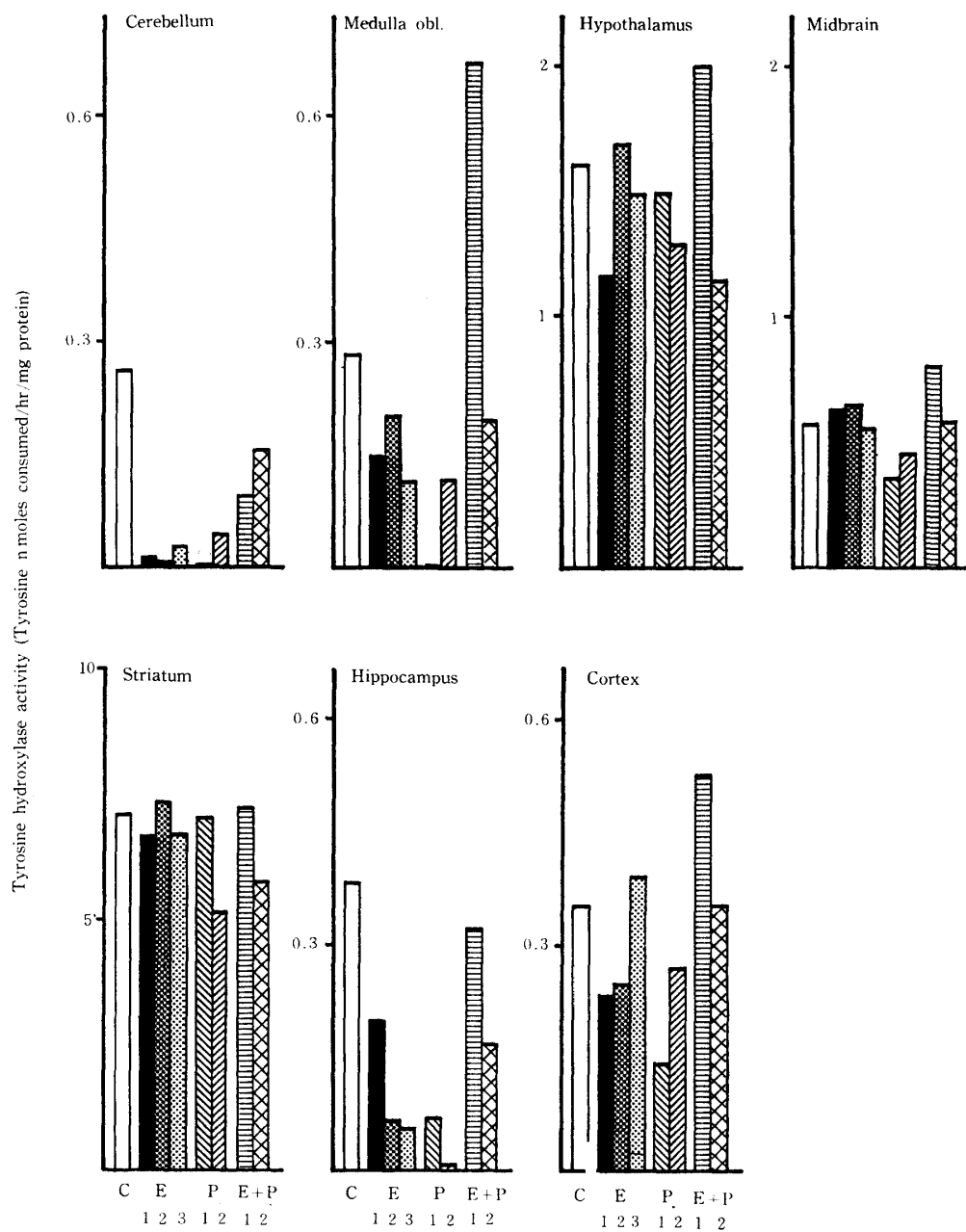


Fig. 5 Tyrosine hydroxylase activity in several regions of oophorectomized rat brain administered 17β -estradiol or progesterone, or both subcutaneously.

C : control (olive oil)

P1 : progesterone 1mg/kg

E1 : 17β -estradiol 0.05 mg/kg

P2 : " 2 "

E2 : " 0.1 "

E+P1 : 17β -estradiol 0.1+progesterone 1 mg/kg

E3 : " 0.2 "

E+P2 : " 0.2+ " 2 "

総 括

ラット TH 活性は striatum で最も高く、次に hypothalamus に高く、他の部位は非常に低値を示す。この結果は Coyle⁹⁾の報告にほぼ一致する。

性周期における TH 活性は striatum, hypothalamus, midbrain で proestrus 期に最も高く、estrus II に最も低く diestrus 期に回復している。Youdim ら¹⁰⁾はラット hypothalamus, caudate nucleus の monoamine oxidase 活性は proestrus 期と diestrus 期で最も高く、estrus 期で最も低いと報告しているが TH 活性もこれと類似した傾向を示している。また proestrus 期はラットでは critical period に続き LH の放出が 5 ~ 6 時間続く時期であり、TH が LH 放出に関係あることが考えられる。

卵巣摘出ラットに E 0.05mg/kg を投与すると midbrain 以外は減少し、P 1, 2 mg/kg は 1 mg/kg の striatum 以外は減少している。しかし E, P 同時投与では 0.2 - 2 群の大量で TH 活性を抑えるが 0.1 - 1 群というすでに LH を抑える量で予期に反してむしろ TH 活性が上昇している。TH は dopaminergic および adrenergic な神経機能に関連しているので TH 活性の増減の結果は単純なものではない。noradrenaline が LH releasing factor を高めるとするなら 0.1 - 1 群が TH 活性を抑制しなかったことは LH releasing factor における TH の役割が直接的な関係をもつとは思われない。これらについては更に 17 β -estradiol, progesterone の生体アミン類および関連のある酵素, cyclic AMP などについて検討を加えていく計画である。

10) Youdim, M.B.H. *et al.*: *Neuropsychopharmacology of Monoamines and Their Regulatory Enzymes*, p. 11, *Advances in Biochemical Psychopharmacology* **12**, North-Holland Pub. Com. (Amsterdam), 1974