

バナジウムの生体内動態と脳神経への影響

井戸達雄¹⁾・山本文美子¹⁾・岩田 錬¹⁾・石渡喜一¹⁾
木村修一²⁾・岩井邦久²⁾・川村美笑子²⁾
(東北大学, ¹⁾サイクロトロンRIセンター*, ²⁾農学部栄養化学**)

EFFECT ON NEURO RECEPTOR AND METABOLIC ANALYSIS OF VANADATE

Tatsuo IDO¹⁾, Fumiko YAMAMOTO¹⁾, Ren IWATA, ¹⁾Kiichi ISHIWATA¹⁾, Shuichi KIMURA²⁾,
Kunihisa IWA²⁾ and Mieko KAWAMURA²⁾

¹⁾Cyclotron and Radioisotope Center, and ²⁾Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku University

Vanadium has been shown to be as an essential trace element in experimental animals and proposed to be a possible etiological factor in manic depressive psychosis. To investigate the effects of vanadate on neuroreceptors, the binding properties of muscarinic acetylcholine receptor (mACh-R) and dopamine receptor (D-2) were assayed in the brain of the rat treated under chronic administration of vanadate. Both of receptors were not changed in concentration (B max) but the binding affinity of mACh-R was decreased. The behavior of vanadium *in vivo* was investigated by use of cyclotron produced V-48 as a radioactive tracer. The major of vanadate in blood was reduced to vanady (4+) and bond to transferrin. The small part of unchanged vanadate was transferrd into brain through the anion channel. In cell fractionation of the brain, the cytosol had transferrin-vanadyl, free vanadate and no free vanadyl. The other cell component had about 60% of vanadium in the brain. The inhibition of Na^+, K^+ -ATPase and the promotion of adenyl cyclase by vanadate may be concerned with the denature of mACh-R.

遷移元素であるバナジウムは、土壌や海水をはじめ自然界に広く分布しており、生体中にも微量ながら存在している。近年バナジウムの生体に対する重要性が知られるようになり、必須性が確認されている¹⁾。一方比較的高濃度のバナジウムは生理学的影響として、種々の組織の Na^+, K^+ -ATPase²⁾や Ca^{2+} -ATPase³⁾を強力に阻害し、イオンポンプに異常を起こすことが知られており、種々のホスファター

*所在地：仙台市青葉区荒巻字青葉 (〒980)

**所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (〒981)

ゼ⁴⁾やヌクレアーゼ⁵⁾の阻害が報告されている。さらにアデニレートシクラーゼ⁶⁾やホスホグルコムターゼ⁵⁾、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ⁷⁾はその働きがバナジウムによって促進されることがわかっている。またリノレン酸やドコサヘキサノン酸、コレステロールを増加し、アラキドン酸を減少させるなど脂質代謝を変化させるという報告もある⁸⁾。

本研究の主題である中枢神経系に対する影響についても各種神経疾患との関連が予想されており、鬱病患者の全血や血漿中にバナジウムが多く、しかも治療後はそのレベルが減少するという報告^{9,10)}や、運動ニューロンが浸される筋萎縮性側索硬化症が多発する地域の、土中バナジウム濃度が高いという報告¹¹⁾がある。またバナジウムの長期的な投与によって、ラット脳中の神経伝達物質が減少するという結果も得られている¹²⁾。しかし、バナジウムは容易に原子価数が変化し、それに伴い生体への影響も変わるので、メカニズムの解明は難しい。本研究ではバナジウムと神経系疾患との関連を解明するために、脳への影響と体内動態について検討した。

実験方法

1. 100ppmの Na_3VO_4 水溶液を、飲料水としてWister系雄性ラット(4週令)に与え、1, 2, 3ヶ月間飼育した。これらのラットの血漿と脳について原子吸光測定法によりバナジウム量を測定した。さらに脳について、ムスカリン性アセチルコリン(m-ACh)とドパミン(D_2)レセプターの変性を、ラジオレセプターアッセイ法(RRA)により調べた。
2. サイクロトロンを用い $^{48}\text{Ti}(p,n)^{48}\text{V}$ 反応で製造した放射性同位体バナジウム-48(^{48}V)は、イオン交換クロマトグラフィーで精製し、5価のものを使用した。これをddY系雄性マウス(7~8週令)に尾静注し、一定時間後に主な組織を摘出して、その放射能を測定し体内動態を調べた。さらに、Wister系雄性ラット(9~10週令)に ^{48}V を尾静注し、その血漿について、ゲル濾過と陰イオン交換クロマトグラフィーで ^{48}V と血漿タンパク質との結合を分析した。また、血漿に ^{48}V を加え、血漿タンパク質との結合に対する、還元剤グルタチオンの影響を調べた。 ^{48}V を投与したラットの脳については、酸処理をして酸不溶性分画を分離し、また別に細胞成分分画を行い、各分画の ^{48}V 量を測定するとともに可溶性分画のHPLC分析を行った。さらに、脂質、酸性ムコ多糖を抽出して ^{48}V との結合を調べた。

結果と考察

バナジウム(Na_3VO_4 100ppm 水溶液)を連続長期投与したラットの血漿と脳におけるバナジウムの量は、Fig. 1に示すように投与期間が長いほど増加する傾向にある。血漿中バナジウム量は投与2ヶ月までは1ヶ月あたり $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ の急激な増加がみられるが、2ヶ月から3ヶ月では $0.6\mu\text{g}/\text{ml}$ の値で飽和した。一方脳では投与2ヶ月まではバナジウムの集積はあまり増加しないが2ヶ月以後急激な増加があり、3ヶ月で $4.2\mu\text{g}/\text{g dry brain}$ であった。これは単に血漿と脳組織との間でバナジウム濃度が平衡状態になっているのではなく血漿中とは違った形で脳に取り込まれていることを示唆している。

バナジウムの慢性投与下における、神経レセプター変性を予想して、ムスカリン性アセチルコリンレセプター(m-AChレセプター)とドーパミン D_2 レセプター(D_2 レセプター)について、 ^3H -QNBおよび

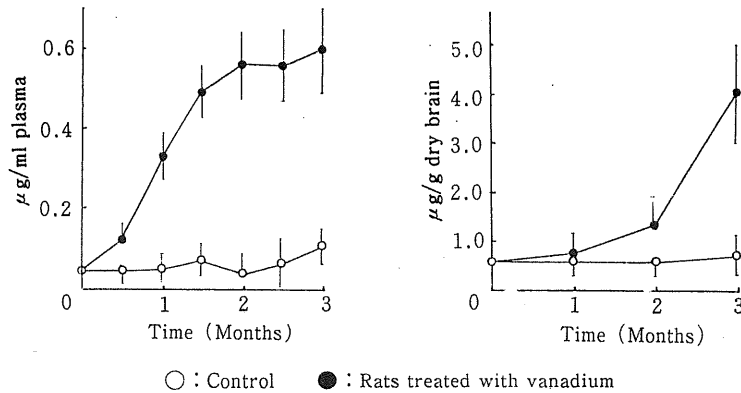


Fig. 1. Concentration of vanadium.

び³H-スピロペリドールを使用して、ラジオレセプターアッセイ法で、レセプター濃度(β max 値)および、結合能(Kd 値)を測定した。結果を Table 1 (m-ACh レセプター)および Table 2 (D₂レセプター)に示す。

Table. 1 Effect of vanadium on ³H-QNB binding in rat brain

Age(weeks)		Kd(nM)	β max(pmol/mg protein)
8	C(n=5)	0.55±0.06	0.92±0.06
	V(n=8)	0.54±0.14	0.94±0.08
12	C(n=5)	0.49±0.09	0.96±0.05
	V(n=8)	0.77±0.11*	1.04±0.13
16	C(n=5)	0.80±0.13	0.93±0.09
	V(n=7)	1.77±0.24*	1.04±0.13

V: Rats treated with vanadium, C: Control

*Significantly different from the control group at $p < 0.05$.

*Significantly different from the control group at $p < 0.01$.

Table. 2 Effect of vanadium on ³H-spiperone binding in rat brain

Age(weeks)		Kd(nM)	Bmax(pmol/mg protein)
8	C(n=5)	0.96±0.16	0.31±0.02
	V(n=8)	0.97±0.18	0.29±0.03
12	C(n=5)	0.98±0.15	0.34±0.05
	V(n=8)	1.07±0.23	0.33±0.02
16	C(n=5)	0.91±0.22	0.33±0.02
	V(n=7)	0.95±0.16	0.33±0.09

V: Rats treated with vanadium C: Control

m-ACh レセプターにおいては β max 値に変化はなかったが、バナジウム投与 2 ヶ月群および 3 ヶ月群に Kd 値の増加がみられた。D₂レセプターでも β max 値は不変であったが Kd 値の方は統計的有意差は確定できないものの、増加傾向がみられた。すなわちバナジウムは、m-ACh、D-2の両レセプターの結合部位数には変化を与えないが、特に m-ACh レセプターの Kd 値の増加から、その結合親和性を減少させることがわかった。m-ACh レセプターの親和性減少によって一般的中枢神経系抑制作用が予想される。本実験で飼育したラットは自発運動の低下がみられたが、これはレセプターの変性によるものか、食餌量減少による体力低下によるものか断定はできなかった。

m-ACh レセプター結合の低下が起こる脳神経疾患には、痴呆やてんかんが知られているが、どちらも結合部位数(β max 値)の減少であり、バナジウムによる変性とは異なっている。

レセプター変性の発生メカニズムを解明する一助として投与されたバナジウムがどのような過程を経て脳に達するか、またその化学形を同定する目的でサイクロトロンで製造した⁴⁸V 標識体を使用してトレーサー分析を行った。

静注 1 回投与では、⁴⁸V は肝臓、腎臓、骨に集まり易く、脳には取り込まれにくかった。血漿を HPLC 分析したところ、血漿中バナジウムの 49.4% がトランスフェリンに、3.0% がアルブミンに結合しており、残りは無機塩遊離型であった。(Fig. 2)

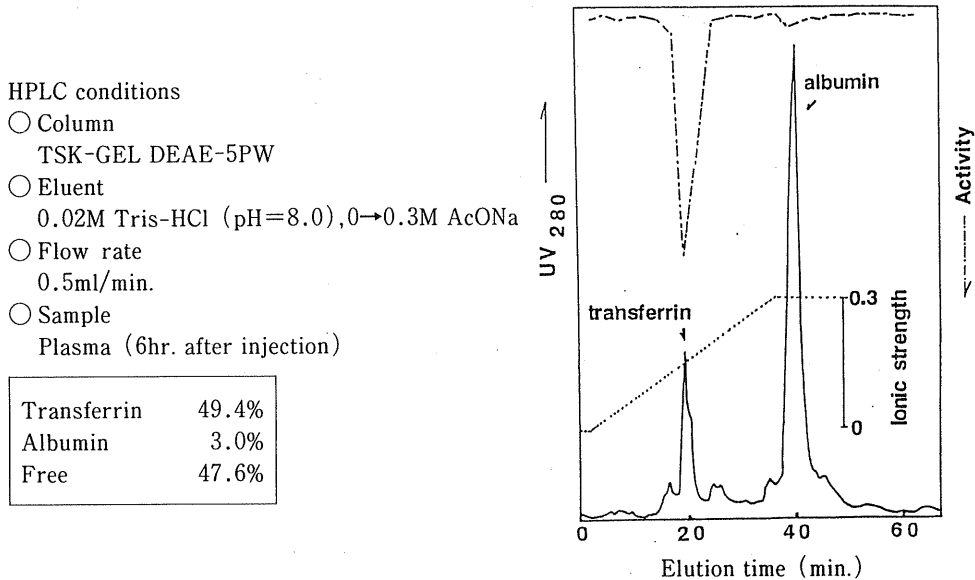


Fig. 2. HPLC analysis of rat plasma.

無機塩についてイオンクロマトグラフィー法で調べたところ 5 種のバナジウム塩であった。これらの血漿中のパターンは経口投与でもほぼ同じであった。さらにトランスフェリンとの結合は酸処理によって切れることがわかった。in vitro の実験ではグルタチオン添加によってトランスフェリンへの結合が

増えており、トランスフェリンと結合しているほとんどは、還元されて4価になったバナジウムであると考えられる。脳中では、ミトコンドリア、ライソゾーム、マイクロゾームの膜成分に脳全体の55.3%のバナジウムがみられ、また、可溶性画分は36.8%であった。この可溶性画分では、血漿と同様にトランスフェリン溶出位置に46.4%のバナジウムがあり、残りはほとんど5価の遊離型であった。(Fig.3)

HPLC conditions

- Column
TSK-GEL DEAE-5PW
- Eluent
0.02M Tris-HCl (pH=8.0), 0→0.3M AcONa
- Flow rate
0.5ml/min.
- Sample
Brain cytosol fraction
(24hr. after infection)

Transferrin	46.6%
Albumin	3.8%
Free	49.6%

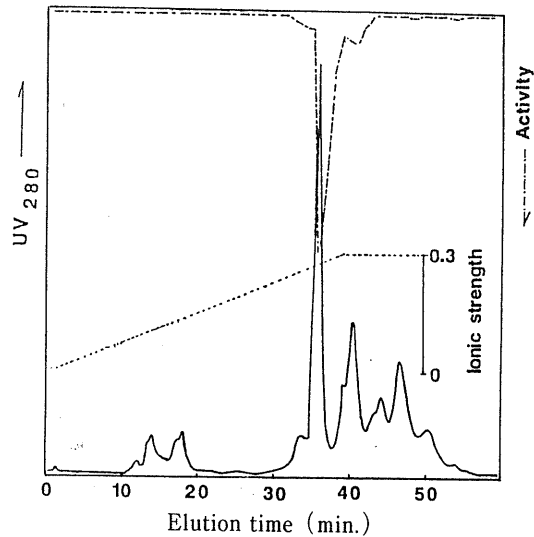


Fig. 3. HPLC analysis of rat Brain.

また、酸性ムコ多糖、脂質との結合はそれぞれ9.9%、0.8%、酸で切れないタンパク質との結合を形成しているものが54.3%あった。

以上の結果からバナジウムの体内動態を Fig. 4 に示す。血中に入った5価のバナジウムは、グルタチオンなどによって42.2%が還元され、4価となりトランスフェリンと結合しており、35.4%が5価の無機遊離型である。その他数%がアルブミンと結合しており、また約20%が血球に取り込まれている。脳には、5価の遊離型がアニオンチャンネルを通して入ると考えられ、脳内の17.3%が還元されてトランスフェリンと結合しており、19.5%が5価の遊離型であり4価の遊離型は認められなかった。また脳細胞内では7.9%が核に、35.1%がミトコンドリアに、20.2%がマイクロゾームやライソゾームに結合して存在していた。

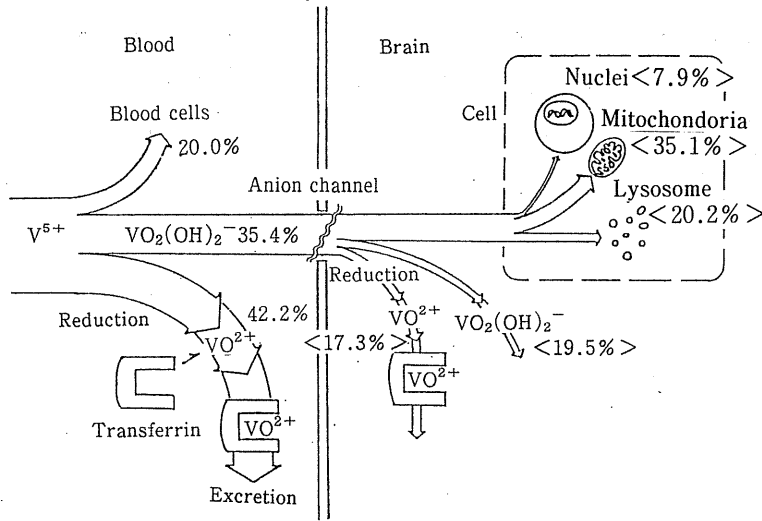


Fig. 4. Vanadium transport at brain.

結 論

m-ACh レセプターの刺激では Cyclic GMP の増加, Cyclic AMP の減少, それに伴う細胞内 Ca^{2+} の流入増加が起こる。これに対し, バナジウムはアデニレートシクラーゼを刺激し Cyclic AMP を増加するように作用する。Cyclic AMP は Ca^{2+} 流出を促進するので, 膜電位の発生を抑制し, 神経伝達を阻害する。さらに, Cyclic AMP は Cyclic AMP-dependent protein kinase を活性化し, 膜蛋白質をリン酸化する。かなり大胆な推論ではあるが, 無機遊離型のバナジウムのために増加した Cyclic AMP によって, このリン酸化が異常に促進されることにより, レセプター蛋白質に影響をおよぼしその親和性を減少させたと考えられる。

近年最もクローズアップされている脳疾患の一つにアルツハイマー病があるが, このレセプター変性も, m-ACh レセプターの β max 値の減少, 則ち結合部位数の減少であり, バナジウムによる影響とは異なっている。しかしアルツハイマー病とアルミニウムとの関連も指摘されており, 微量金属であるバナジウムの神経系に対する研究は脳神経疾患のメカニズムの解明に役立つと考えられる。

文 献

1. NIELSEN, F. H. and H. H. SANDSTEAD (1975) Am. J. Clin. Nutr. 27: 515
2. CANTLEY, L. C. Jr., L. JOSEPHSON, R. WARNER, M. YANAGISAWA, C. LECHENE and G. GUIDOTTI (1977) J. Biol. Chem. 252 : 7421
3. DUX, L. and A. MARTONOSI (1983) J. Biol. Chem. 258: 2599
4. SWARAP, G., S. COHEN and D. L. GARBERS (1982) Biophys. Res. Comm, 107: 1104
5. CHASTEEN, N. D. (1983) Struct. Bonding 53: 105

6. COMBEST, W. L. and R. A. JOHNSON (1983) Arch. Biochem. Biophys. 225 : 916
7. NECHAY, B. R., L. B. NANNIGA, P. S. E. NECHAY R. L. POST, J. J. GRANTHAM, I. G. HACARA, L. F. KUBENA, T. D. PHILIPS and F. H. NIELSEN (1986) Federation Proc. 45 : 123
8. CATALAN, R. E., A. M. MARTINEZ, M. D. ARAGONES A. ROBLES and B. G. MIGUEL (1987) Life Science 40 : 799
9. NAYLER, G. J., A. H. W. SMITH, D. BRYCE-SMITH and N. I. WARD (1984) Physiol. Med. 14 : 767
10. CONRI, C., M. SIMONOFF, B. FLEURY and F. MOREAU (1986) Biol. Psychiatry 21 : 546
11. YASE, Y. (1982) 脳神経 34 : 7
12. SHARMA,R.P.,R.A.Jr.COULOMBE and B.SRISCHART (1986) Biochem.Pharmacol. 35 : 461