

## 神経栄養因子ガングリオシドと神経伝達アミンとの相互作用

井戸 達雄 ・ 佐々木 進 ・ 安達 倫子  
(東北大学, サイクロトロン RI センター\*)

### AN INTERACTION BETWEEN GANGLIOSIDE AND NEUROTRANS-AMINES

Tatsuo IDO, Susumu SASAKI and Michiko ADACHI

Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University, Sendai 980-77 JAPAN

Ganglioside (GM1) binding octylsepharose (CL-4B) column was prepared for the measurement of an interaction between ganglioside and amines by the method of on affinity chromatography. Every amine had an affinity to this column with an increased elution volume (PBS-K or PBS-Ca) as compared to the control column (CL-4B only).

The most of these affinities were based on an acid-base interaction because of a linear correlation between the elution volume and the basicity of amine. Serotonin, curare and 3-methoxytyramine had more strong affinities including the specific interactions with glycoconjugates than the acid-base interactions. Acetylcholine and dopamine had the weak affinities resulted from the interfering effects of binding to ganglioside.

This interaction may cause to increase the opportunity of the receptor-binding of neurotrans-amine by the delaying the diffusion of amines from synapse gap.

ガングリオシドは、約50年前にKlenk<sup>1)</sup>により遺伝性代謝疾患である Tay-Sachs 病の患者の脳内からはじめて単離されたスフィンゴ糖脂質の一群である。このガングリオシドは糖鎖の先端に N-acetylneuraminic acid などのシアル酸を有しており、糖鎖及びセラミド部分を構成する長鎖塩基及び、脂肪酸組成により数多くの分子種が知られておりそれぞれ略号を用いて表されている (Fig. 1)。Klenk 以降、多種のガングリオシドが哺乳類の細胞膜において普遍的に存在することがわかってきた<sup>2), 3)</sup>が、脳、特にシナプスへの集積が顕著にみられ、神経細胞においてはガングリオシドは総脂質の10%を占めるほど<sup>4)</sup>である。また、ガングリオシドは *in vitro* の実験により  $Ca^{2+}$  との相互作用<sup>5)</sup>及び、セロトニン等の神経活性物質との相互作用<sup>6), 7)</sup>が確認されており、生体内においては神経活性物質との関与の可能性が示唆されている<sup>8)</sup>。そこで、今回神経シナプス膜モデルとしてオクチルセファロースにガングリ

\*所在地：仙台市荒巻字青葉 (〒980)

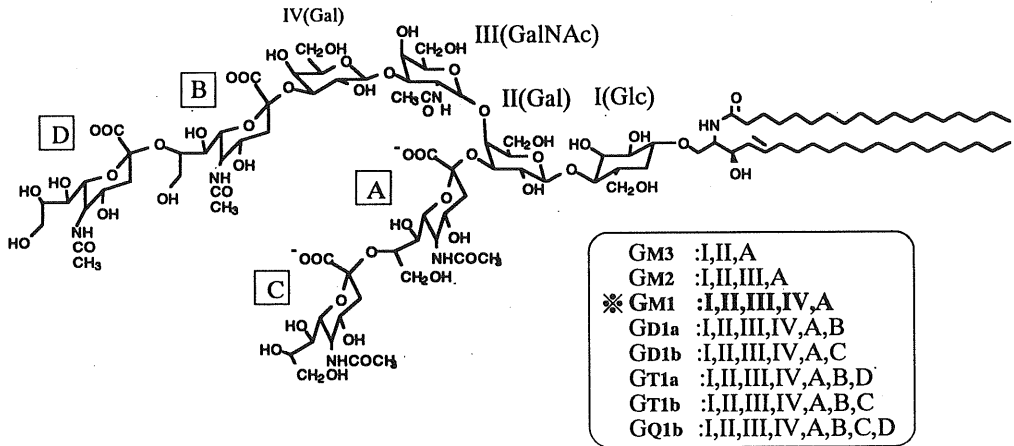


Fig. 1 Structure of gangliosides

オシド (GM 1) を吸着させた GM 1-オクチルセファロースカラムを作製<sup>9)</sup>し, “ガングリオシド特にそのシアル酸部分が神経活性物質の伝達に対して影響を及ぼしている”との仮説をたて, 様々な神経活性物質との相互作用を神経活性物質の pKa 及び陽イオン交換樹脂からの溶出速度を基にして検討したので報告する。

### 実験方法

オクチルセファロース CL-4B (エタノール溶液) (ファルマシア) に 0.1MKCl : メタノール (1 : 1) 溶液を加え上清を取り除いた。この操作を 3 回繰り返すことによりオクチルセファロースを 0.1MKCl : メタノール (1 : 1) 溶液中における沈澱として得た。ここで, 沈澱しているオクチルセファロースから 2 本の試験管にそれぞれ 4 ml ずつ分取した。片方にはガングリオシド (GM 1) を

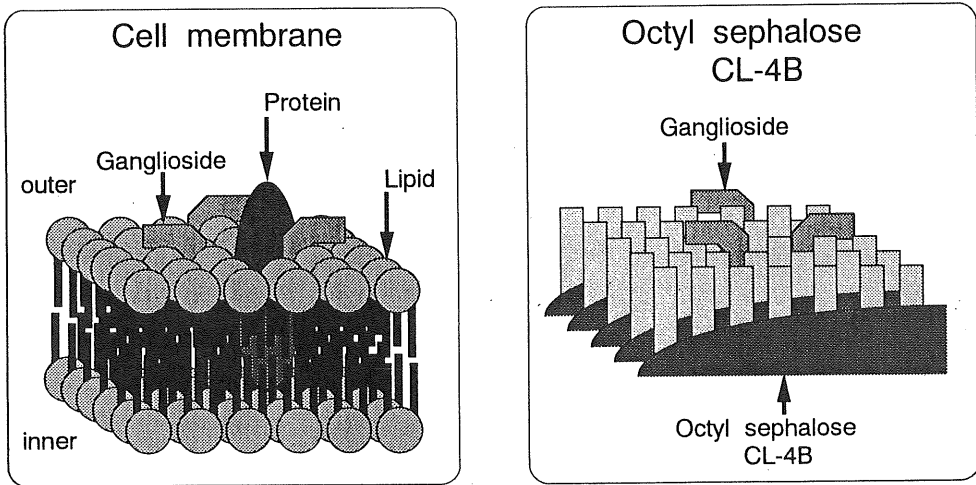


Fig. 2 Cell membrane simulation by octyl sephalose

0.1MKCl:メタノール(1:1)溶液に70℃加温下で溶解させた液を加え攪拌した。また他方には70℃に加温した0.1MKCl:メタノール(1:1)溶液4mlを加え同様に攪拌した。それぞれ数回の攪拌を繰り返しながら60分間放置した後、両者とも別々のカラムに入れPBS(Phosphate buffered-saline)をそれぞれ500ml流すことによりカラム中の溶媒をPBSに置換し、ガングリオシド(GM1)を吸着させたオクチルセファロースカラム(GM1カラム)と、オクチルセファロースのみのカラム(コントロールカラム)をそれぞれ作製し、両方のカラムに対してそれぞれ神経活性物質を付しUV吸収のあるものについてはUV検出器(日立, 220型)を用いて波長275nmにおける溶出様式を記録し、UV吸収を持たないアセチルコリンに対してはECD検出器(エイコム, ECD-100)を用いて溶出様式を記録しpKaとの相関関係および陽イオン交換カラムCM Sephalose CL-6B(ファルマシア)からの溶出時間との相関関係を検討した。今回作製したGM1-オクチルセファロース CL-4BカラムはFig. 2に示したように神経伝達物質に対しシナプス膜上でのガングリオシドの作用モデルとなり得ると考えた。

### 結果と考察

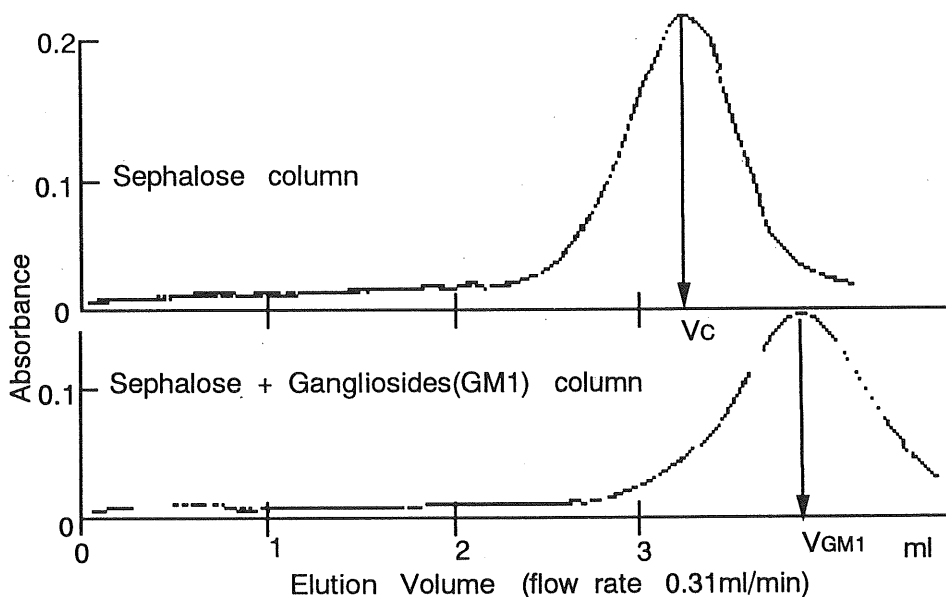


Fig. 3 Elution patterns of serotonin from sepahalose column and ganglioside (GM1) absorbed sepahalose column

これまでにガングリオシド(GM1)と相互作用があると報告されているセロトニン<sup>7)</sup>をGM1カラムに付すると、セロトニンに対するガングリオシドの影響によりコントロールカラムに付したときよりも若干遅れて溶出してくることが認められた(Fig. 3)。これは、ガングリオシドのシアル酸部分とセロトニンとの酸塩基相互作用によるもの、または立体的相互作用によるものと考えられる。また、神経活性物質とガングリオシドとの相互作用をセロトニンと同様の方法を用いて検討したところ、神経活性

**Table** Effects of ganglioside (GM1) for chemicals in PBS (-)

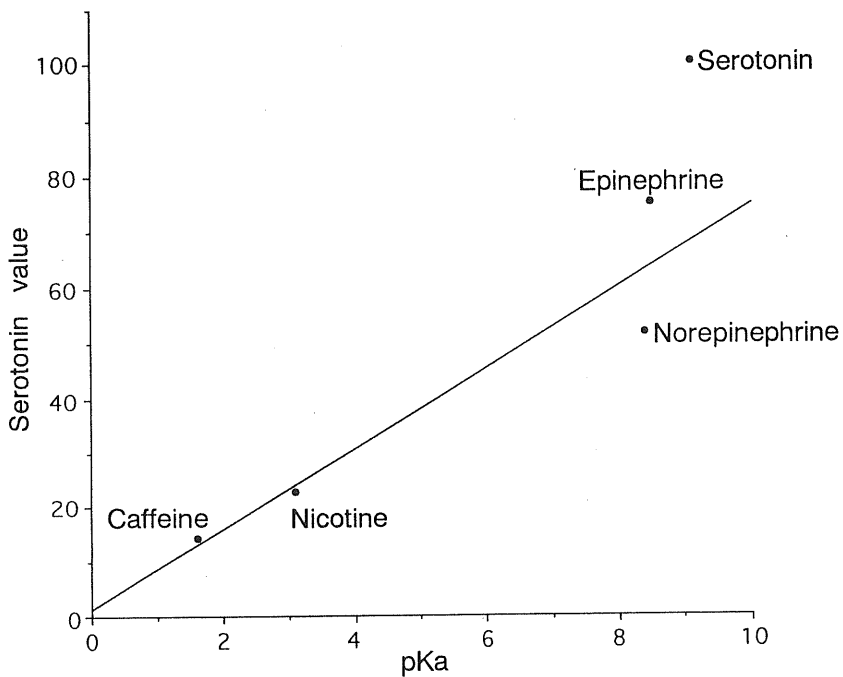
	VGMI (ml)	VC (ml)	VGMI-VC	Serotonin value
Serotonin	3.57	3.22	0.34	100
Tryptamine	3.04	2.88	0.16	46
Dopamine	3.05	2.98	0.08	22
DOPAC	3.07	2.85	0.22	65
3-MT	3.26	2.98	0.28	81
Norepinephrine	2.91	2.76	0.15	44
Epinephrine	3.04	2.81	0.22	66
Acetyl choline	3.02	2.98	0.04	11
Curare	4.65	3.34	1.31	382
Benztropine	3.05	2.98	0.07	20
Nicotine	2.90	2.83	0.04	20
Caffeine	3.02	2.98	0.05	13

DOPAC : 3,4-dihydroxy phenyl acetic acid

3-MT : 3-methoxy tyramine

物質はGM1カラムに付すると、いずれもガングリオシドの影響によりコントロールカラムに付したときよりも若干遅れて溶出してくることが認められた (Table)。

そこで、GM1カラムからの溶出容量とコントロールカラムからの溶出容量との差と、pKaが既知の神経活性物質のpKaとの相関についてセロトニンにおける溶出容量の増加量を基準にして検討した。(Fig. 4)。

**Fig. 4** Relation between pKa and serotonin value

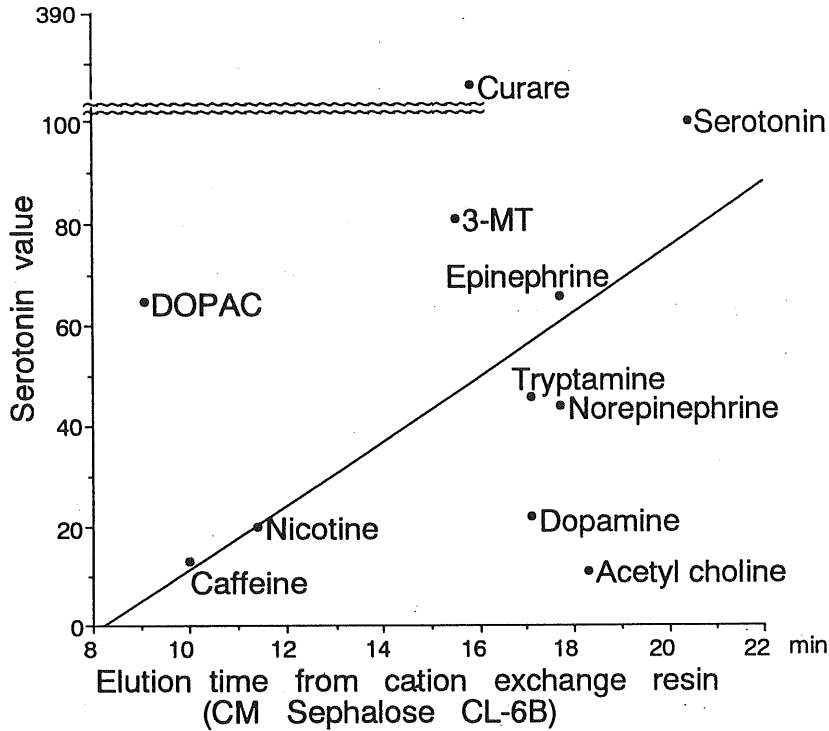


Fig. 5 Relations between elution time from cation exchange resin and serotonin value

GM1-カラムによる溶出容量の増大は神経活性物質のpKaと正の相関の傾向がみられ、セロトニンについてはこの直線よりはずれていることが解る。このことより、セロトニンにおいては酸塩基相互作用以外にも何らかの特異的な相互作用を持っていることが示唆される。また、pKaの未知のアミン類について陽イオン交換カラムCM Sephalose CL-6Bからの溶出時間との関連についてセロトニンを基準にして検討した (Fig. 5)。

DOPAC (3, 4-dihydroxy phenyl acetic acid), 3-MT (3-methoxy tyramine), セロトニンおよびツボクラリンにおいてはGM1カラムからの溶出容量とコントロールカラムからの溶出容量との差は、陽イオン交換カラムからの溶出時間と比較すると比較的大きな値を示しており、特にツボクラリンはセロトニンの4倍弱という非常に大きな値を示していた。このことよりDOPAC, 3-MT, セロトニンおよびツボクラリンはガングリオシドに対して酸塩基相互作用以外の特異的な相互作用があることが示唆され、特にツボクラリンでは非常に大きいことが示唆された。また、アセチルコリンおよびドーパミンについてはGM1カラムからの溶出容量とコントロールカラムからの溶出容量との差が、陽イオン交換カラムからの溶出時間と比較するとより小さな値を示していた。このことよりアセチルコリンおよびドーパミンはガングリオシドのシアル酸部分との酸塩基相互作用がPBSにより阻害されることが示唆された。以上より、本法はシナプス間隙に存在するガングリオシドの神経活性物質に対する作用モデルとなり得る可能性があり、神経伝達アミンとシナプス膜上のガングリオシドとの相互作用は、神経伝達アミンが受容体と結合する機会を増す効果があると考えられ、ガングリオシドは神経伝達を円滑に機能

させる役割を担っているのではないだろうか。今後、他の種類のガングリオシドに対しての検討を加えシナプス膜表面上に存在するガングリオシドの神経伝達系における役割を明らかにしていきたい。

## 文 献

1. Klenk E (1942) *Z. Physiol. Chem.* 273, 76-86
2. Ledeen R. W., and Yu R. K. (1982) *Methods Enzymol.* 83, 139-191
3. Stults C. L. M., Sweeley C. C., and Macher B. A. (1989) *Methods Enzymol.* 179, 167-214
4. Wiegandt H. (1971) *Adv. Lipid Res.* 9, 249-289
5. Cumar F. A., Maggio B., and Capputo R. (1978) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 84, 65-69
6. Heyningen W. E. (1963) *J. gen. Microbiol.* 31, 375-387
7. Heyningen W. E. (1974) *Nature* 249, 415-417
8. Thomas P. D., and Brewer G. J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 277-289
9. Hirabayashi H., Suzuki T, Suzuki Y, Taki T, Matsumoto M., Higashi H., and Kato S. (1983) *J. Biochem.* 94, 327-330