

食環境因子による脳神経シナプスでのガングリオシド変化

井戸達雄¹⁾, 鈴木香織¹⁾, 船木善仁¹⁾, 川村美笑子²⁾, 木村修一³⁾

¹⁾ 東北大・サイクロترون*, ²⁾ 東北大・農**, ³⁾ 昭和女子大・院***

Alteration of Ganglioside at the Synapse of Central Nervous System through Nutritional Behavior

Tatsuo Ido¹⁾, Kaori Suzuki¹⁾, Yoshihito Funaki¹⁾, Mieko Kawamura²⁾ and Shuuichi Kimura³⁾

¹⁾ Cyclotron and radioisotope center, Tohoku University, ²⁾ Faculty of Agriculture, Tohoku University

³⁾ Graduate school, Showa Women's University

Gangliosides comprise a family of acidic glycolipids that are characterized by the presence of sialic acid on the terminal carbohydrate portion. The localization of gangliosides is very high in a synapse membrane, amounting to 10% of total lipids in a nerve cell. In the neurotransmission system gangliosides may act together with neuroreceptor and interact with a neurotransmitter. It has been observed that a conformational change of gangliosides through acute or chronic administration of ethanol results in the degeneration of neurotransmission function. In this study, the effects of ascorbic acid deficiency, zinc deficiency and injection of ibotenic acid into olfactory bulb on the behavior of gangliosides at synapse in hippocampus were determined by HPLC and or *in vivo* micro dialysis technique with radioactive tracer.

In the rat fed the ascorbic acid deficient diet for 3 weeks, the sialic acid originated from ganglioside (GSA) was decreased in hippocampus but no significant difference was observed in other parts of brain. In the rat fed the zinc deficient diet for 6 weeks, the sialic acid originated from sialoglycoconjugates (TSA) was decreased in hippocampus and striatum but no changes were observed for GSA. The amount of GSA in rat hippocampus under the effect of ibotenic acid injected (20 nmol) into olfactory bulb was increased on 4-day and recovered on 7-day. The sialic acid released from sialoconjugate on the synapse membrane of hippocampus by neuraminidase (30 mU/ml) *in vivo* was 1.8 times more than that of control on 4-day.

It was clarified that the deficiency of trace nutrients affects the amounts of gangliosides in central

*所在地：仙台市青葉区荒巻 (980-77)

**所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (981)

***所在地：東京都世田谷区太子堂1-7 (154)

nerve system and on the function of neurotransmission.

脳神経シナプスにはガングリオシドと呼ばれる末端にシアル酸を有する糖脂質が多く存在する。ガングリオシドの神経伝達系に関する機能については、神経毒に対する保護効果、神経成長因子としての働き、シナプス形成時での関与などが提案されている。これまで我々はセロトニンを初めとする神経伝達アミンや神経活性アミン、神経障害アミンなどとガングリオシドが相互作用する事により、これらアミンのシナプス間隙での拡散が遅延する事を明らかにしてきた¹⁾。このことからガングリオシドが神経シナプスにおいて神経伝達アミンと受容体との結合機会を高める機能を有すること、すなわち神経伝達補助作用としての役割を担うものと考えている。一方エタノールやカフェインの大量投与によるシナプス膜面でのガングリオシド状態変化や、量的変化を観測しており、このようなガングリオシドの変化は加齢に伴う神経伝達機能の低下の一因と成りうると考えてきた²⁾。今回さらに食環境因子として、アスコルビン酸欠乏・亜鉛欠乏、薬物（神経毒）因子としてイボテン酸投与のラット脳神経シナプスでのガングリオシド変化を調べたので報告する。

実 験 方 法

1 実験動物の作成

1) アスコルビン酸欠乏：遺伝的アスコルビン酸合成不能ラット（ODS；雄5週齢，日本クレア KK）をアスコルビン酸欠乏食（AIN-93G 配合，オリエンタル酵母 KK）で3週間飼育した。対照群にはアスコルビン酸水溶液（2.5g/L）を飲料水として与えた。

2) 亜鉛欠乏：Wistar 系ラット（雄5週齢）を亜鉛欠乏食（AIN-76配合，ミネラル；ハーバー配合，オリエンタル酵母 KK）で6週間飼育した。対照食にはハーバー組成の亜鉛を添加した。

3) イボテン酸投与：Wistar 系ラット（雄10週齢）を用い，左側嗅球にイボテン酸（20nmol）をマイクロインジェクション法で投与し，4日，7日後に嗅球からの神経伝導路の投射部位である左側海馬におけるガングリオシドの量的変化を神経伝達物質及びその受容体機能の変化とともに，リン酸緩衝液投与群を対照にして測定した。

2 ガングリオシドの状態測定

1) 脳組織内シアル酸（総シアル酸，ガングリオシド由来シアル酸）：脳内各部位の総シアル酸測定には組織ホモジネートの0.1N 硫酸加水分解物（80℃ 2時間）を試料とし，ガングリオシド由来シアル酸測定には組織ホモジナイズをCHCl₃・CH₃OH（2：1）で抽出，珪酸クロマトグラフィーで得られた酸性脂質画分（回収率52－56％）の硫酸加水分解物を試料として， α -ケト酸の選択的な誘導体化試薬1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzen でシアル酸を蛍光誘導体としてから HPLC-蛍光検出法（Nova-pack C-18 cartridge，CH₃OH：CH₃CN：H₂O＝25：4：91， λ_{ex} ；370nm λ_{em} ；450nm，1.2mL/min）で定量した。（検出限界 0.03nmol/mL）

2) 細胞膜面シアロ複合糖鎖（ガングリオシド）の測定：あらかじめ海馬に手術固定したガイドカニューレにマイクロインジェクションニードル付き透析プローブ（エイコム MI-A 型）を挿入し，マイクロイ

ンジェクションポンプを用いてシアル酸の生合成前駆体 ^3H 標識 N-アセチルマンノサミン $50\ \mu\text{Ci}$ を $0.5\ \mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。4日後再び透析プローブを海馬に挿入しマイクロダイアリス装置を用い、定常に達してからシアル酸加水分解酵素・ノイラミニダーゼ (Streptococcus 6646K; 生化学工業) 30mU を $0.5\ \mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。酵素で細胞膜表面のガングリオシドから遊離された ^3H -シアル酸を透析し、HPLC-放射能計測法 (HPX-87H, $0.006\text{N}\ \text{H}_2\text{SO}_4$, 42°C , $0.65\text{mL}/\text{min}$, 液体シンチレーション計測器) で定量した。

実験結果と考察

アスコルビン酸欠乏食で3週間飼育したラットは、典型的な壊血病症状を呈しており、対照群に対し体重は70%, 脳重量は95-97%であった。この時期における神経伝達系の変化はすでに報告した様に³⁾, 大脳皮質においてセロトニン, ヒスタミンの放出量が増大し, 対応する受容体の親和性及びGABA受容体の親和性が低下しており, 中脳においてノルアドレナリン, セロトニンの放出量の減少が観測された。今回測定した細胞内シアル酸については, Fig. 1に示されたように海馬におけるガングリオシド由来シアル酸が有意に減少したが, 総シアル酸 (糖蛋白・ガングリオシド・遊離シアル酸) は減少傾向にはあるが, 有意差はなかった。ほかの脳部位については総シアル酸・ガングリオシド由来シアル酸とも有意な変化は認められなかった。

亜鉛欠乏食で6週間飼育したラットは, 対照群に対し体重は50%, 脳重量は95%であった。また骨・肝臓・血清中の亜鉛濃度はいずれも低下していたが, 脳では低下が見られなかった。この条件での細胞

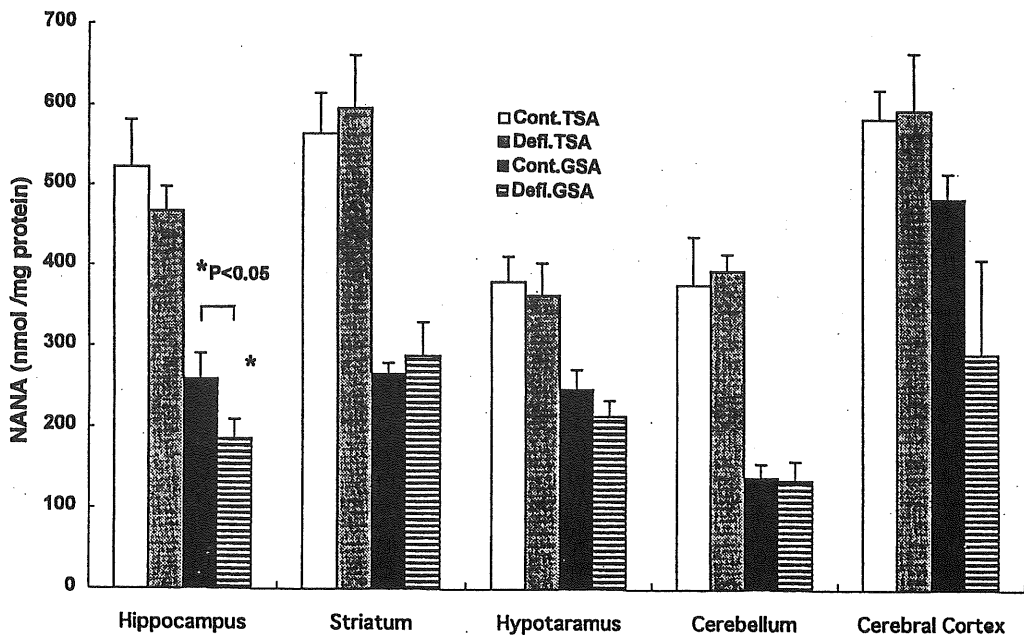


Fig. 1 Amount of sialic acid (NANA) in the rat brain under AsA deficiency
TSA : sialic acid from total sialoconjugate GSA : sialic acid from ganglioside

内シアル酸の状態は Fig. 2 に示したように海馬と線条体の総シアル酸が有意に減少したが、ガングリオシド由来シアル酸量は変わらなかった。

グルタミン酸作動性神経刺激薬（神経毒）であるイボテン酸を嗅球に投与し、嗅球からの神経伝導路の投射部位である海馬における神経伝達物質・神経受容体及びガングリオシドの状態変化を調べたところ、神経細胞間のドパミン及びセロトニン代謝物量はイボテン酸濃度（20, 30, 40nmol）に依存して一過性に上昇し、アセチルコリンは4日後にやや上昇し7日後には回復した。アセチルコリン受容体については4日後、7日後においてその密度（B max）が顕著に増大した。イボテン酸（20nmol）投与による投射側海馬において Fig. 3 に示したように総シアル酸量は4日後・7日後ともコントロール群、Sham 群と差はないが、ガングリオシド由来シアル酸量は4日後において Sham 群にたいし有意に増加した。しかし7日後にはこの差は見られなくなった。またノイラミニダーゼで切断された細胞膜表面のシアル酸は Fig. 4 の様に対照の1.8倍に増加した。

以上の結果は神経細胞膜面でのガングリオシドの存在状態が神経伝達機能の変化と相互に密接に関わっていることを示唆しており、神経伝達系におけるガングリオシドの役割を解明するのに有力な手がかりである。また極端な例ではあるが食環境因子によってガングリオシドの状態に変化を生ずることは、影響の慢性化が結果として加齢に伴う神経伝達機能の低下に繋がる可能性を示唆している。

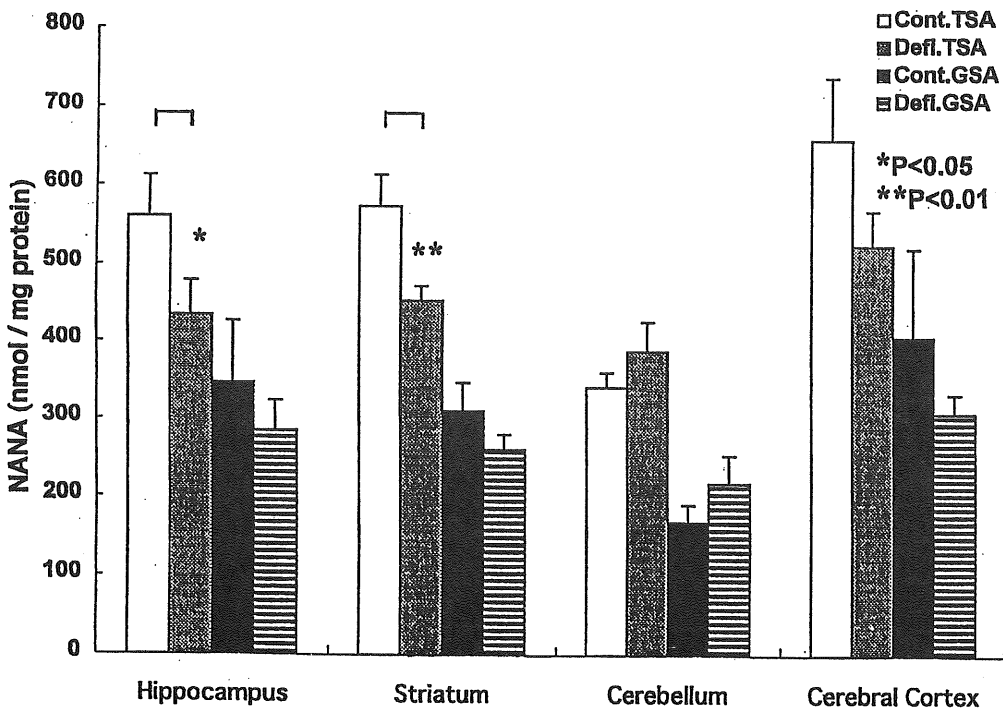


Fig. 2 Amount of sialic acid (NANA) in the rat brain under zinc deficiency
TSA : sialic acid from total sialoconjugate GSA : sialic acid from ganglioside

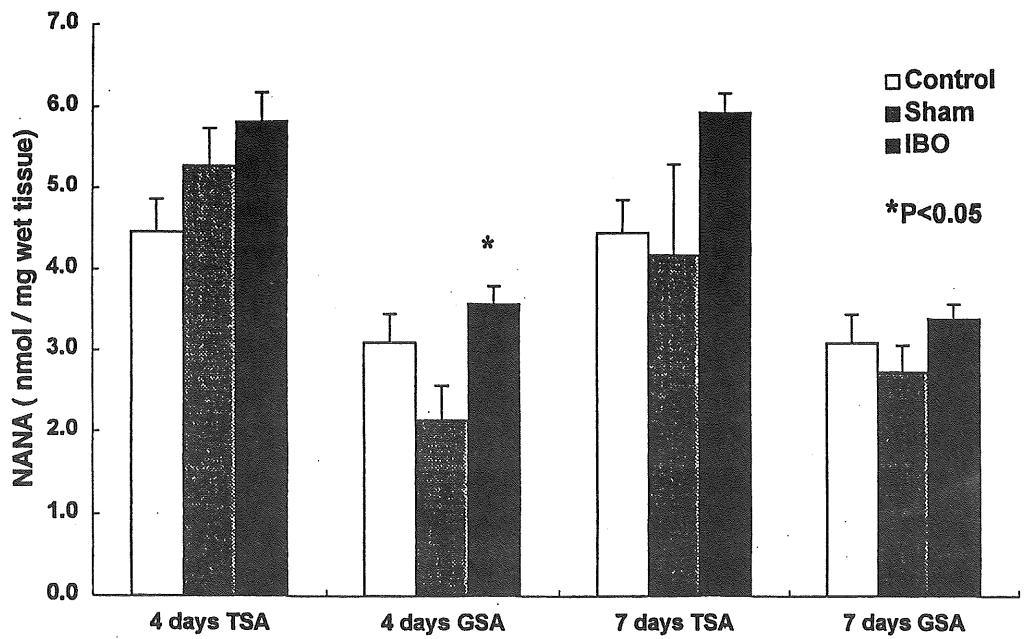


Fig. 3 Amount of sialic acid in rat hippocampus under the effect of ibotenic acid injected in olfactory bulb

Sham : sham operated IBO : ibotenic acid (20 nmol) injected

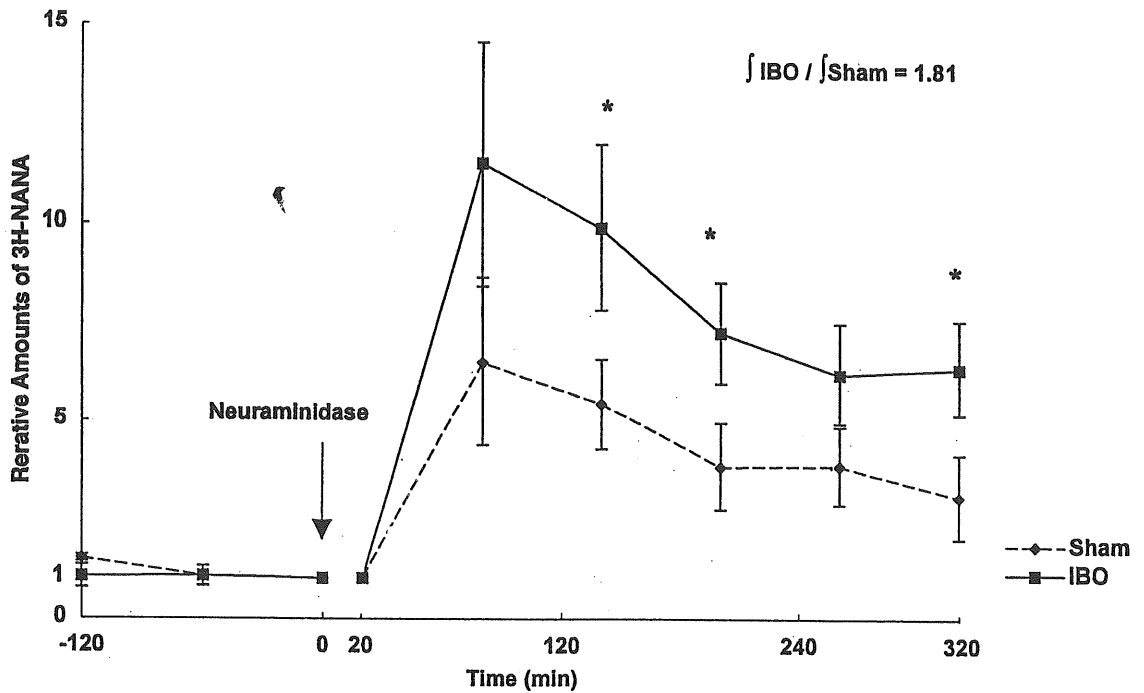


Fig. 4 Analysis of sialoconjugate on the cell surface in hippocampus under the effect of ibotenic acid

Sham : sham operated IBO : ibotenic acid (20 nmol) injected into olfactory bulb

文 献

- 1) 井戸達雄, 佐々木進, 安達倫子 (1994) 微量栄養素研究 11:101-106
- 2) 安達倫子, 藤井明彦, 井戸達雄, 木村修一 (1993) 微量栄養素研究 10:165-170
- 3) Ido, T., Abe, K., Kumagai, H., Kimura, S. and Kawamura, M. (1990) : Neurochemical studies in the brain of the ODS rat In Vitamin C and the scurvy-prone ODS rat, ed by Fjita T., Fukase M. and Konishi, T., Elsevier, New York : pp337-344