アセチルコリン代謝と動作電流

(Nachmansohn のアセチルコリン Cycle 説)

日本医科大学学生化学教室

宿 谷 良 一

Ryoiti Shukuya

ま え が き

1942 年から 1945 年にわたつて Nachmansohn とその協力者たちは、主としてデンキウナギ (Electrophorus electricus) の実験の結果から、神経繊維内の興奮伝導機構を説明する新しい説を提出した^(1,2)。この広汎な研究の結果は、興奮伝導機構の説明としては幾分直接的でない点があるけれども、前から対立している二つの説、すなわち化学物質説と動作電流説との間をアセチルコリン (Ach) をめぐる代謝系による化学的エネルギーを以て結びつけた点ですぐれたものといえる。そしてこの説には未だ確めなければならぬ問題が沢山残っているが、提出された当時に較べて、最近の著しい酵素化学の進歩によつてさらに確実性を増した。しかも彼等の研究の中には、その他の生化学的に重要な反応を解決する糸口となつた実験が含まれている。

以下 Ach 代謝反応系を中心として彼の説の解説を試みようと思う。尙文献は重要なもののみに止めた。

(1)

神経繊維内に於ける興奮の伝導は、ある部位に生じた興奮が隣接静止部位を興奮させることによつてのみ成立すると考えられている。この興奮の伝導は一種の衝撃の伝播と考えられ、そこにこの神経衝撃によつて生ずる興奮が如何なる機構によつて伝播されるのか？ と言う問題が生ずる。伝導によつて神経繊維の末端に達した興奮が、他の神経繊維、また末端の効果器官の細胞の様な他の生理的單位に伝達される場合、これ迄その媒介者として、神経末端から遊離する Ach, アドレナリン、或いはヒスタミン等の如き化学物質をとりあげる考え方と、神経末端の動作電流をとりあげる考え方とが対立している。この対立は神経繊維内の興奮伝導の説明についてもある。すなわち、化学物質説と動作電流説とである。そして、この二つの説に対しては、それぞれに実験的証明がある⁽¹³⁾。

この神経繊維に於ける動作電流の性質に対する Na-

chmansohn の考えは、根本的には、従来から存在した Bernstein の膜説と何等異なるものではない。すなわち、神経軸索はその内側が正に、外側が負に分極された膜にかこまれているもので、今ある点で興奮が生じられた場合、そこに膜の復極が起る。その部位は隣接静止部位に対して低電位となり、電流は静止部位から興奮部位に向つて流れる。興奮はこの変化の繰返しによつて伝達されると考えるのである。従つて、興奮の伝達者として作用するものは、常に動作電流によるものとするのであるから、従来の動作電流説を支持する実験事実と何等矛盾するものではない。

一方細胞膜の内外では K^+ 及び Na^+ の濃度に可成りの勾配があると考えられている。すなわち Na^+ 濃度は膜の内側に比して外側に高く、 K^+ についてはその逆の関係にあつて、しかも膜の内と外とのイオンの動きは静止状態にあつても行われている。すなわちその平衡は動的平衡状態にあると考えられる。今興奮が生じられた場合、そこに Na^+ の内側への、 K^+ の外側への流動が起るもので、これが膜の復極現象である。このことから、神経に於ける動作電流の源をなすものは、膜内外のイオンの濃度勾配にあると一般に考えられている。ここにこのイオンの濃度勾配に急速に変化を与えるものは何であるかと言う最も根本的な問題が生ずる。

Nachmansohn⁽³⁾ の測定によれば、 Na^+ の内側への流入は毎刺戟毎平方糎 4.5×10^{-12} mole であり、これと類似した値が Hodgkin 等によつても得られている。また Hodgkin 等は最近 Na^+ の流入は電位の上昇期に、 K^+ の流出は下降期に起ると述べているが、これによると静止期に於ける膜の透過性は、 Na^+ より K^+ に対して高いものと考えられる。さらに Hodgkin 等によると、 Na^+ に対する膜の透過性は、興奮期には静止期の約 500 倍になる。これらの結果は、興奮期に或特定のイオンに対して膜の透過性が急速に変化することを示すものであるが、この要因として、Nachmansohn

は Ach の急速な出現と分解を起す化学反応を考えた。膜の透過性に起る変化が、化学反応に起因するものであると言う彼の考えは、Cole 及び Curtis⁽⁴⁾ が膜の電気抵抗を測定して、静止期に 1,000 オームのものが興奮期には 40 オームに低下すること、しかも、興奮期に於ける動作電位の上昇期及び下降期の温度係数が夫々 2 及び 3.2 であつたという観察によつても支持される。

(2)

膜の透過性に急速な変化を起すものが化学反応に基づくものとしても、一般に神経の衝撃の伝播に要するエネルギーは極端に小さく、初期熱が毎刺激約 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ gr. calorie であることからわかる様に、興奮が起つた場合、その背後にある化学変化を解析するには実験的な困難がある。この困難を克服するために、Nachmansohn は 1936 年に始めてその実験にデンキウナギの電気器官を使つた。この魚の電気組織の各細胞単位は、夫々が電板を形成して居り、普通の大きさのものでも、電気器官の端から端迄約 5,000 から 6,000 個の電板が直列に配列されている。しかも、各電板は放電に際して 0.1 ボルトの電位差を生ずるから、全体としては 500~600 ボルトという著しく大きい電圧を生ずる。この様に巨大な電気を発生することは、実験に非常に好都合であるばかりでなく、さらにこの器官が発生学的に横紋筋から発生したものであり、ここに発生する電気が一般の神経に見られる動作電流と性質が全く同一であるという利点があつた。

(3)

Nachmansohn は、Ach の急速な出現と分解とが、膜の透過性に変化を与える要因であると考えたが、それには次の実験の結果が一つの根拠となつている。

Ach のコリンと醋酸への分解は、アセチルコリンエステラーゼ（特異的コリンエステラーゼ）及び狭義のコリンエステラーゼ（非特異的コリンエステラーゼ）によつて触媒されるが、神経組織には専ら前者のみが存在する。

又蛙の腓腸筋の運動神経終板に於けるアセチルコリンエステラーゼ濃度は、他の組織に比して数千倍であつた。これに続いて、デンキエイ（*Torpedo marmorata*）やデンキウナギの電気組織について調べた結果、強力な電気器官程アセチルコリンエステラーゼ濃度が高いことが判明した。しかも放電々圧と酵素濃度との関係は、第 1 図⁽⁵⁾に示す如く、両者の間に明らかな

平行関係のあることが見出された。このことは、この器官に於ける物理的变化と化学的变化との間に相關関係のあることを示すもので、重要な結果であつた。放電々圧と平行関係にあるのはこの酵素のみであつて、アデノシン-3-リン酸分解酵素（ATPase）、呼吸酵素、解糖酵素等については平行関係が認められなかつた。

第 1 図

電気組織に於ける放電々圧とアセチルコリンエステラーゼ濃度との関係

ヤリイカ（Squid）の神経繊維は巨大で、ミエリン鞘部と軸索原形質とを別々に取り出すことが出来るが、アセチルコリンエステラーゼはミエリン鞘部に高濃度に存在し、中心の軸索原形質部には殆んど存在しない。この様に、この酵素が神経繊維の表層に、しかも高濃度に存在することから、酵素作用と膜の変化とを結びつけて考えた。

(4)

一般に生化学反応を解析する場合、阻害剤の使用が有効であることが多いが、動作電流と Ach との関係を解明する場合にも、多くのアセチルコリンエステラーゼ阻害剤が用いられた。中でも、この酵素の不可逆的阻害剤であるアルキルフォスフェートによる阻害実験の結果が、この研究の中で大きな意味をもつ。

ダイソプロピルフルオロフォスフェート（DFP）によるアセチルコリンエステラーゼの不可逆的阻害の進行速度と、神経の興奮伝導機能の消失速度との間に厳密な平行関係が存在した。しかも、DFP を動物に注射すると生存群には活性酵素が残存し、死亡群には全く活性酵素の存在がみとめられなかつた⁽⁶⁾。この事実、は、神経の興奮伝導機能にこの酵素が密接な関係をもつていると考える有力な材料となつた。なお、アルキルフォスフェートを使用した他の研究者の結果の中には、Nachmansohn の説と矛盾するものがあつたが、この問題は最近の Wilson によるこの酵素の活性表面

の構造の解析の結果によつて解明された。

こゝに Ach 乃至はアセチルコリンエステラーゼと動作電流とが如何なる機構で結びついているか? が問題となる。この点について、Nachmansohn は動作電流のエネルギー源として Ach の関与する化学反応を考えたのであるが、先づこの反応は筋収縮反応に於けると同じく、高エネルギー磷酸と関係があるものではないかと考えた。この着想は、彼が筋収縮機構に解明を与えた Meyerhof の教室にいたことから当然の事と想像される。

デンキウナギの電気組織の放電の際に分解される Ach 量とクレアチン磷酸量とを測定した結果、それぞれ 5×10^{-6} mM, 3×10^{-6} mM と求められた。この数値から、Ach の合成エネルギーが、高エネルギー磷酸から供給されているのではないかと予想された。また放電によつて遊離する電気エネルギーと、その際分解されるクレアチン磷酸から生ずるエネルギーは、第1表の如く求められた⁽³⁾。遊離する電気エネルギーは、ウナギの大きさによつて変化し、小さいものゝ方が大きい。一方、クレアチン磷酸の分解並びにその際形成される乳酸のエネルギーは、夫々 11,000 cal./mole, 22,000 cal./mole として計算されたものである。この結果から、化学的エネルギーの約 40 % が電気的エネルギーとして遊離することが理解される。さらに、この反応の効率を求める為には、恢復過程に於けるエネルギーを求めなければならないが、このエネルギーは

第 1 表

電気組織の放電により放出される電気エネルギーと化学エネルギーとの関係

ウナギの長さ cm.	組織毎互毎刺激放出される エネルギー, gr.cal. $\times 10^{-6}$				電気エ ネルギー / 化学エ ネルギー %
	電気エネ ルギー	クレアチン 磷酸 (a)	乳酸 (b)	a + b	
103	47 (9)	54.5 (21)	68.5 (21)	123.0 (21)	38
180	24 (6)	35.7 (15)	23.1 (7)	58.8 (7)	45

但し括弧内は実験例数を示す

前反応より高いものと予想される。

一方 Ach 水解の標準遊離エネルギー (ΔF°) は約 3,000 cal./mole であり、又後述する様に、Ach 1 mole の形成には ATP 1 mole が消費されるから、こゝで ATP のエネルギーがどうなるかが問題となる。若し ATP の分解が、コリンのアセチル化反応の最終段階で起るものとすれば、そのエネルギーはエステル結合の形成と、形成された Ach を不活性型に保存する為に、蛋白質との結合の際に用いられると考えられない

ことはない。しかし、後述する様に、ATP エネルギーは Ach 合成反応の中間段階に於て、Ac~CoA (アセチル~Coenzyme A) 形成に利用されることが判明しているから、この考えは当たらない。現在この点は未解決として残されている。

Meyerhof 及び Lohmann の実験によつてよく知られている様に、筋収縮に於ては ATP 分解がクレアチン磷酸分解に先行するもので、後者に由来する無機磷酸は、ADP (アデノシン-2-磷酸) を ATP に磷酸化するのに用いられることがわかつている。すなわち、クレアチン磷酸はエネルギーの“倉庫”として働くことになる。さらに Engelhardt 及び Ljubimova, Nee-dham, Szent-Györgyi 等によつて、ATP は直接筋蛋白と反応して、しかもこの反応が筋収縮の初発反応であることが確められた。

クレアチン磷酸並びに ATP が、神経や電気組織等に存在することが証明されたことと、前述の結果とから、Nachmansohn 等は神経の動作電流のエネルギー機構は、上述の如き筋収縮に於けるエネルギー機構と基本的には同じものであらうと考えた。この考えに従つて、神経に於ても筋収縮と同様に、ATP 分解を第一義的の反応とすれば、こゝに一つの矛盾が起る。それは ATP 分解を触媒する ATPase は、その基質回転数 (単位酵素量によつて単位時間に分解される基質の量) が毎分 8,000 程度で、この数値では神経に於ける化学変化の時間的關係を説明することが出来ないの

である。この矛盾を解決するものとして、Nachmansohn^(3,7) は神経に於ては Ach 分解が第一義的の反応であると考えた。この反応を触媒するアセチルコリンエステラーゼの基質回転数は約 20,000,000 で、ATPase に比べて圧倒的に大きいから前述の矛盾は解決される。すなわち、電流産生に直接結びついた反応は Ach の

遊離と分解で、これは ATP 分解に先行するものである。ATP 分解はコリンのアセチル化反応にエネルギーを供給する第二義的の反応であると考えたのである。

(5)

上述の様に、動作電流のエネルギー機構を筋収縮のエネルギー機構と基本的に同一のものであると考えたが、それをさらに確実にしたものは、1943 年に Nachmansohn⁽⁵⁾ が脳髓からコリンをアセチル化する酵

素“コリンアセチラーゼ”の抽出に成功したことである。すなわち ATP, 醋酸, 及び脳抽出液から成る系にコリンを添加して、試験管的に Ach を合成した。この反応系には ATP の存在を必要とし、醋酸は中間的に活性化されるものと考えられ、次の反応式が提出された。

(コリンアセチラーゼ触媒)

このコリンアセチル化酵素系の発見はその後2炭素化合物の代謝機構を解決する端緒となつたものとして重要である。

第2図

アセチルコリンエステラーゼ活性表面構造と基質結合模型

最近 Lipmann 等⁽⁸⁾によつて、この反応は Coenzyme A の関与する反応で、Ach 合成機構は次式に従うことが解明された。

(但し AMP, PP, CoA は夫々アデノシン-1-リン酸、無機ピロリン酸、coenzyme A を表わす)

一方、Ach はアセチルコリンエステラーゼの作用によつて分解を受けるが、その活性表面の構造は第2図に示す如く推定されている。^(9,10)

すなわち、この酵素の活性中心は2個あり、一つは基質の N^+ と静電的に結合を起す負に荷電した基 (anionic site) であり、他は基質のカルボニール炭素と配位的に結合する基 (esteratic site) である。勿

論この酵素の特異性は anionic site によるものである。esteratic site の方は一般のエステル水解酵素としての性格を規定するもので、この基は酸性基並びに塩基性基として作用するものと推定されている。第2図に示したものは、塩基性基と、基質のカルボニール基の親電子の炭素との結合を示すものである。この様に、esteratic site にさらに二個の作用基を推定することによつて、Wilson⁽¹¹⁾ はこの酵素の DFP による阻害機構を明らかにした。

(6)

Nachmansohn は以上述べて来た実験の結果と考えとに基いて、第3図に示す様な Ach 代謝模型図 (Ach cycle) を提出した^(3,7)。すでに Quastel⁽¹²⁾ によつて推察されていた様に、先づ Ach は細胞の表面で蛋白質と結合して、不活性型として存在する。Ach の合成は、分解反応に比べればエネルギーの供給を要する速度の遅い反応と考えられるから、神経衝撃の瞬間に合成されるとするより、蛋白質と結合して不活性型として存在すると考えた方が矛盾がない。膜のある点に一定の刺激が与えられるとすると、この結果結合-Ach は未だ解決されていない機構によつて遊離して、膜を構成する或特定の蛋白質 (Ach 受容蛋白質: receptor protein) に作用する。このことが膜の抵抗を突然低下させる結果、こゝにイオンの流動が起る。

第3図

アセチルコリン Cycle

Nachmansohn (1951)

これが膜の復極現象であり、動作電流の源となることはすでに述べたところである。Ach 受容蛋白質に作用した遊離 Ach は、アセチルコリンエステラーゼによつて分解を受ける。これによつて受容蛋白質の構

造はエネルギーの供給を要する過程を経て、もとの状態に恢復すると考えるのである。

この模型図に於て、Nachmansohn は不活性 Ach 蛋白質結合体から Ach の遊離に対して H^+ の動揺を、又遊離 Ach が受容蛋白質に作用して膜の透過性に変化を起す要因として受容蛋白質の構造変化を推定している様であるが、その実体は明らかでない。

一般に、酵素蛋白はその基質を分解する場合、中間的に酵素基質結合体を形成し、その段階で基質の活性化を起すと考えられている。この基質の活性化現象は未だ実体的な段階にないが、多くの酵素基質結合反応について、その熱力学的解析、特にエントロピー項の変化から、基質が結合した場合、酵素蛋白の構造にある特有な変化が起ることが示されている。そしてこの蛋白の構造変化こそ基質活性化を起す一つの原因であろうと推定されているが、この酵素反応から得られた知見を、Ach と受容蛋白との反応にあてはめることがゆるされるなら、受容蛋白に Ach が結合し、結合受容蛋白の構造に変化を来す結果、膜の透過性に変化が起ると考えてもそれは甚しい飛躍ではない。

尚こゝに示した模型図は 1951 年の Nachmansohn の報文によつたものであるが、これによると、ATP 分解によつて生じた高エネルギー磷酸根 ($\sim P$) がアセチルキナーゼ系に導入されて、アセチル $\sim CoA$ 形成に働くように示されている。これは其の後 Lipmann(1953) によつてアセチル $\sim CoA$ 形成に与るのは前述の式及び図中カッコ内に示した如くピロ磷酸であることが解明されているから、こゝの機構は今後訂正されなければならないであろう。

む す び

以上述べて来たところが Nachmansohn によつて提出された、アセチルコリン cycle と動作電流との関係の概要である。この説は生理学的に、酵素的に、或いは薬理学的に観察された個々の事実をよく綜合して生物の現わす一つの興奮伝導という複雑な現象をよく説明し得ている。

勿論この説には未だ確めなければならない多くの問題を含んでいるし、又反論もある。Nachmansohn 自

身その綜説の終りに“興奮の伝導機構並びにアセチルコリンの正確な役割についての多くの問題は今後の研究に残されている。筋収縮の個々の反応に関する問題も非常に進歩したとはいえ、その解決からはなお、程遠いものがある。近年新しい蛋白質が発見され、それによつて古い問題が解決された代りに、さらに多くの新しい問題が生じて来た”と述べている如く、今後の研究に期待するところが多い。

稿を終るに当り上代教授の不断の御指導と御高閣に深謝する。

主 要 文 献

- 1) Fulton, J.F., and Nachmansohn, D., Science, **97**, 569 (1943)
- 2) Nachmansohn, D., and Rothenberg M.A., Science, **150**, 454 (1944)
- 3) Nachmansohn, D., Phosphorus metabolism, **1**, 568 (1951)
- 4) Cole, K.S., and Curtis, H.J., J. gen Physiol., **22**, 649 (1939)
- 5) Nachmansohn, D., Cox, R.T., Coates, C.W., and Machado, A.L., J. Neurophysiol., **6**, 383 (1943)
- 6) Nachmansohn, D., and Feld, E.A., J. Biol. Chem., **171**, 715 (1947)
- 7) Nachmansohn, D., and Wilson, I.B., Adv. Enzymol., **12**, 259 (1951)
- 8) Lipmann, F., Bacteriol. Rev., **17**, 1 (1953)
- 9) Wilson, I.B. and Bergmann, F., J. Biol. Chem., **185**, 479; **186**, 683 (1950)
- 10) Wilson, I.B., Bergmann, F., and Nachmansohn, D., J. Biol. Chem., **186**, 781 (1950)
- 11) Wilson, I.B., J. Biol. Chem., **190**, 111 (1951)
- 12) Mann, P.J.G., Tennenbaum, M., and Quastel, J.B., Biochem. J., **32**, 243 (1938); **33**, 822 (1939)
- 13) 長浜博, 科学, **20**, 171 (1950)