



研究ノート

脳微小血管リポキシゲナーゼ

馬場明道* 岩田平太郎**

1. はじめに

細胞膜リン脂質の主要構成脂肪酸であるアラキドン酸（炭素数20，不飽和度4）は，神経細胞を含む多くの細胞系において刺激により細胞膜より遊離し，活性な代謝物に変換され種々の細胞機能の発現に関与している．リン脂質からのアラキドン酸の遊離にはホスホリパーゼ-A₂，-C，シグレセリドリパーゼなどが関与している．細胞内でのその代謝は酸素添加酵素であるシクロオキシゲナーゼとリポキシナーゼにより触媒される．前者の場合，種々の生理作用をもつプロスタグランジン類（PGs），トロンボキサン類（TXs）が生成し，後者の場合，アラキドン酸のヒドロペルオキシ体からヒドロキシ体が生成する（図1）．白血球においてはリポキシゲナーゼ経路からアナフィラキシーの発現とも関連しているロイコトリエン類という生理活性物質が生成することも判ってきた．リ

ポキシゲナーゼは大豆リポキシターゼとして知られていたように植物中にしか存在しないとされていたが，近年の研究から血小板，白血球，肺，腎などに広く存在する酵素でその代謝物が生理的・病理的にも重要なものであることが判明しつつある．

動脈硬化や血栓症は血管腔の狭窄や閉塞をきたし，組織に虚血性の変化をひきおこす．それが脳の動脈に生じると脳梗塞などの重篤な障害をもたらす．また，脳血管攣縮や偏頭痛にもみられるように脳微小循環の障害は心筋の場合と同様に極めて重い機能障害の原因となる．更に老化に伴う脳の機能低下・障害とも関連して近年，脳微小循環の生理・病態に関する興味が増している．脳底動脈などの比較的大きい血管についてはその神経支配，受容体などに関する薬理学的研究も多くあるが，先述の病態との関連において重要である脳微小血管に関する情報は，標品の大量採取が困難なことも加味して乏しい現状である．血栓形成の重要な過程である血管内皮細胞—血小板の動態において，アラキドン酸代謝系はきわめて重要な役割を占めている．血小板のシクロオキシナーゼ代謝物の主要なものにトロンボキサン A₂（TXA₂）があり，これは強力な血小板凝集能・血管平滑筋収縮作用を有している．一方，血管内皮細胞のシクロオキシゲナーゼの主代謝物はプロスタサイクリン（PGI₂）で，これは最も強力な内因性血小板凝集阻害因子でかつ血管平滑筋弛緩作用も有している．このように血管系の TXA₂-PGI₂ のバランスは血栓・動脈硬化の発症・進展に深く関わっておりそのバランスに影響を与える薬物は，抗血栓・抗動脈硬化剤としての開発も期待できる．脳微小血管にも PGI₂ 生成系が存在することからその代謝系が脳微小循環の調節に関与する可能性が示唆されている¹⁾．また，末

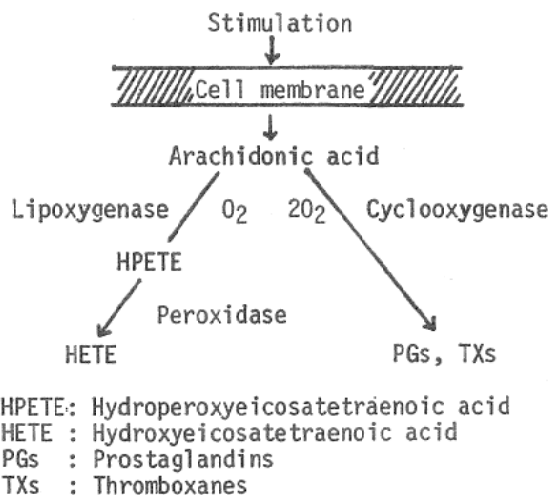


図1 アラキドン酸代謝経路

*馬場明道 (Akemichi BABA), 大阪大学薬学部, 助教授, 薬学博士, 薬理学

**岩田平太郎 (Heitaroh IWATA), 大阪大学薬学部教授, 医学博士, 薬理学

梢血管系においてリポキシゲナーゼの代謝産物が PGI₂ 生合成の調節作用をもつことが知られており²⁾, リポキシゲナーゼ系の生理的役割のひとつとして PGI₂ 生合成系に影響を与え, 間接的に血管の収縮性, あるいは微小循環の調節に関与していることが考えられる. それらの観点から, 脳微小血管にリポキシゲナーゼが存在するか否かを生化学的に検討した.

2. 脳微小血管の調製

脳微小血管はラット脳から牛血清アルブミン密度遠心分離—glass beads カラムクロマトグラフィーを用いて分離精製した. 通常10個のラット脳より 4 mg 蛋白に相当する量が得られる. 得られた標品は細動脈・細静脈の細長い分枝状の血管で, 神経細胞・血球類の混在はほとんどみられない (図2). 生化学的な裏付けとしては, *γ*-glutamyl transpeptidase (*γ*-GTP) は血管内皮細胞に局在する酵素であるので, その比活性の検討を行った. 表1に示されているように *γ*-GTP 活性は出発物質の大脳皮質ホモジ

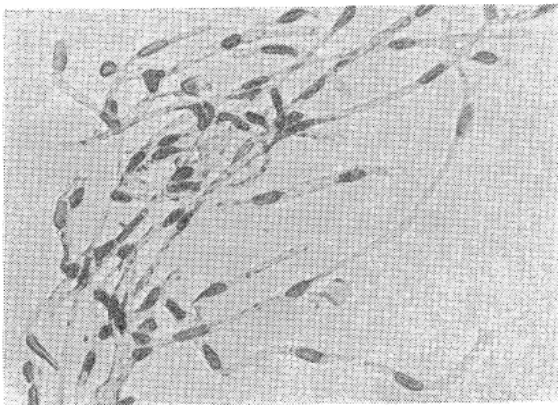


図2 ラット脳微小血管 (ギムザ染色, ×400)

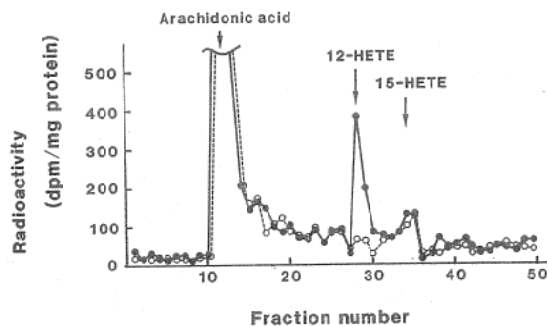


図3 脳微小血管リポキシゲナーゼー反応生成物の高速液体クロマトグラム

表1 ラット脳微小血管 12-リポキシゲナーゼ活性

	12-リポキシゲナーゼ (pmol/mg protein/hr)	<i>γ</i> -GTP	LDH (%)
大脳皮質 ホモジネート	1.4 ± 0.3	299 ± 41	—
微小血管 ホモジネート	50.9 ± 3.2	7363 ± 1769	100
上清分画	63.3 ± 13.5	—	100
膜分画	179.4 ± 73.2	—	0

ネートに比べて24倍に上昇しており, 生化学的にも純度の高いものと判定された.

3. リポキシゲナーゼ活性

リポキシゲナーゼには12-, 15-リポキシゲナーゼなどのいくつかのアイソザイムが知られており, 各々アラキドン酸の対応する炭素に—OOH を付加する. 更にそれらはペルオキシダーゼにより—OH に変換され, 最終産物としてのヒドロキシエイコサテトラエン酸(HETE)が生成する. 脳微小血管のけん濁液 (100~300 μg 蛋白) を 10 μM の [¹⁴C] アラキドン酸, 25mM Tris-HCl LpH 1.4), 1mM グルタチオンと 37°C, 60分間 反応後, 反応生成物を薄層クロマトグラフィーで分離し, その生成物スポットを抽出し, 高速液体クロマトグラフィーで分離した (図3). 図でみられるように生成物の放射活性のピーク (---) は 12-HETE と一致し, 従って本酵素が12-リポキシゲナーゼ (12-LG) であることが判明した. あらかじめ煮沸した酵素標品ではこの活性は検出されなかった (○-○). 表1に示すように, 脳微小血管の 12-LG は大脳皮質ホモジネートに比べて36倍に比活性が増大していた.

血小板には最も高い比活性の可溶性 12-LG が存在することから, 微小血管標品中の 12-LG 活性が混在する可能性のある血小板由来のものでないことを示す必要があった. 脳を取り出す前に麻酔下心室より脳灌流を行い, 脳血管中の血液成分の除去を行い, また先述のようにカラムクロマトグラフィーにより微小血管を精製してあることから最終標品中には顕微鏡下血球成分の混在は確認し難かった. しかしながら血小板の 12-LG 活性が高いことから蛋白量に換算

して1%以下の混在によりみかけ上の活性が得られることになる。1%以下の混在を組織化学レベルで否定することは難かしいことから、脳微小血管 12-LG が血小板由来でないことを他の方法で確認することにした。血小板をホモゲナイズし、更に超音波処理すると 12-LG 活性の 96% が上清分画、残りが膜分画に回収された。一方、脳微小血管標品に同様の処置を行うと、12-LG 活性の 54% が上清分画、46% が膜分画に回収された。LDH 活性の遊離からも細胞が完全に破壊されていることが認められる。このことは、脳微小血管内皮細胞には少なくとも膜結合型のリポキシゲナーゼが存在すること、すなわち血小板の可溶性 12-LG とは異なった型の酵素が存在することを示している。酵素のアラキドン酸に対する K_m 値も脳微小血管では $3.8 \mu\text{M}$ 、血小板では $19 \mu\text{M}$ と異なってい

た。 V_{max} は血小板酵素の方が 600倍高い値を示した。また本酵素に対するいくつかの阻害剤の効果を検討したが、一般に LG に関して得られているのと同様の結果を得た。

先述したように、脳微小血管は PGI_2 生合成能を有していること、 PGI_2 は脳血管平滑筋の収縮および血小板の凝集能に影響を与えること、そしてリポキシゲナーゼの代謝物が PGI_2 生合成の調節作用を示すことから、脳微小血管にリポキシゲナーゼが存在することは脳循環の調節あるいは脳血管障害の病態と関連する可能性を示すものと考えられる。

参考文献

1. Chapleau, C.E., White, R.P. (1979) Prostaglandins 17, 573-580.
2. Greenwald, J.E., Bianchine, J.R., Wong, L.K. (1979) Nature 281, 588-589.

