

Title	ラット脳内Monoamine Oxidaseの局在部位に関する研究
Sub Title	Subcellular localization of monoamine oxidase in rat brain
Author	木村, 都(Kimura, Miyako)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1975
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.20 (1975.) ,p.81- 90
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000020-0081

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ラット脳内 Monoamine Oxidase の局在部位に関する研究

木村 都

Subcellular Localization of Monoamine Oxidase in Rat Brain

MIYAKO KIMURA

(Received September 30, 1975)

Four fractions—nuclear, mitochondrial, microsomal and soluble—were separated from whole rat brain homogenate and approx. 61 % of MAO activity of whole brain homogenate was demonstrated in mitochondrial fraction.

Then, three groups of three mitochondrial membrane fractions—outer membrane, inner membrane and soluble—were prepared by centrifuging after three kinds of treatment (sonication, snake venom phospholipase digestion and defreezing) and the contamination was examined by electron microscopic method. The defreezing method would appear to be more specific for separating the outer membrane fraction than the others. Therefore, the following experiment was done by this method.

In the fraction precipitated at 2,000 ×g for 10 min., the elementary particles fixed cristae were observed and only 6 % of the mitochondrial MAO activity was found. Seventy three percentage of mitochondrial MAO activity appeared in the fraction precipitated at the range 2,000—10,000 ×g for 20 min., in which outer membrane was found. No MAO activity could be recognized in the supernatant obtained by centrifuging at 40,000 ×g for 30 min., which was considered to be soluble fraction.

These results in the present paper will suggest that MAO is localized in the insoluble fraction of mitochondrial outer membrane.

結 言

Monoamine Oxidase : EC. 1.4.3.4. (abr. MAO) は1928年 Hare¹⁾ によって家兎肝臓から分離され, tyramine oxidase として報告された。本酵素は後に norepinephrine, epinephrine にも作用する²⁾ ことが分り, 更に histamine などに作用する diamine oxidase と区別された³⁾。

MAO は哺乳動物の殆んどすべての組織——肝, 腎, 肺, 心, 脳, 消化管など——に存在することが認められており^{4) 5)}, 生体細胞中では mitochondria の外膜に限局して存在し, その不溶性画分に固く結合しているため, 極めて可溶化されにくいといわれ, MAO の可溶化, 精製並びにその酵素化学的性質についての多くの研究がなされている^{6) ~ 8) 11)}。山田⁹⁾ は血漿中の1種の MAO と考えられるアミン酸化酵素を結晶として単離し, 分子量, 補欠分子族, 補因子, 等電点などについて報告している。しかし本酵素は基質特異性は広く, catecholamines, serotonin,

tyramine, tryptamine, benzylamine などの芳香族モノアミン類から butylamine, amylamine などの脂肪族モノアミン類に及ぶ。また動物の種あるいは組織によって基質特異性, 至適 pH, 酵素阻害薬に対する態度などを異にする。これらのことから MAO は単一なものではなく subunit があり, 類似した酵素の集合体で動物種や組織によってその組合せが異なると考えられている^{6), 10)~12)}。

今回, 私はラット脳内 MAO の性質や catecholamines など生体モノアミン類と MAO 活性との関連について研究を進める第一歩として, 酵素 MAO の細胞画分中の存在部位について実験を行った。

実験方法

Sprague-Dawley 系の健康な雄性ラットを温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度55%の空調室で固型餌料 (日本クレア製, CE-2) と水を充分に与えて飼育し, 10週令前後で使用した。

ラットを断頭後直ちに氷令し, 大脳および脳幹部を附着組織を取り除いて重量を測定し, 0.25 M sucrose-0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) を用いて homogenate し, Tipton¹³⁾, Stahl¹⁴⁾ の方法を参照にして nuclei (0~600×g), mitochondria (600~10,000×g), microsome (10,000~40,000×g), soluble 分画 (40,000×g の supernatant) の各分画に分け (Fig. 1), 各々の MAO 活性を測定した。

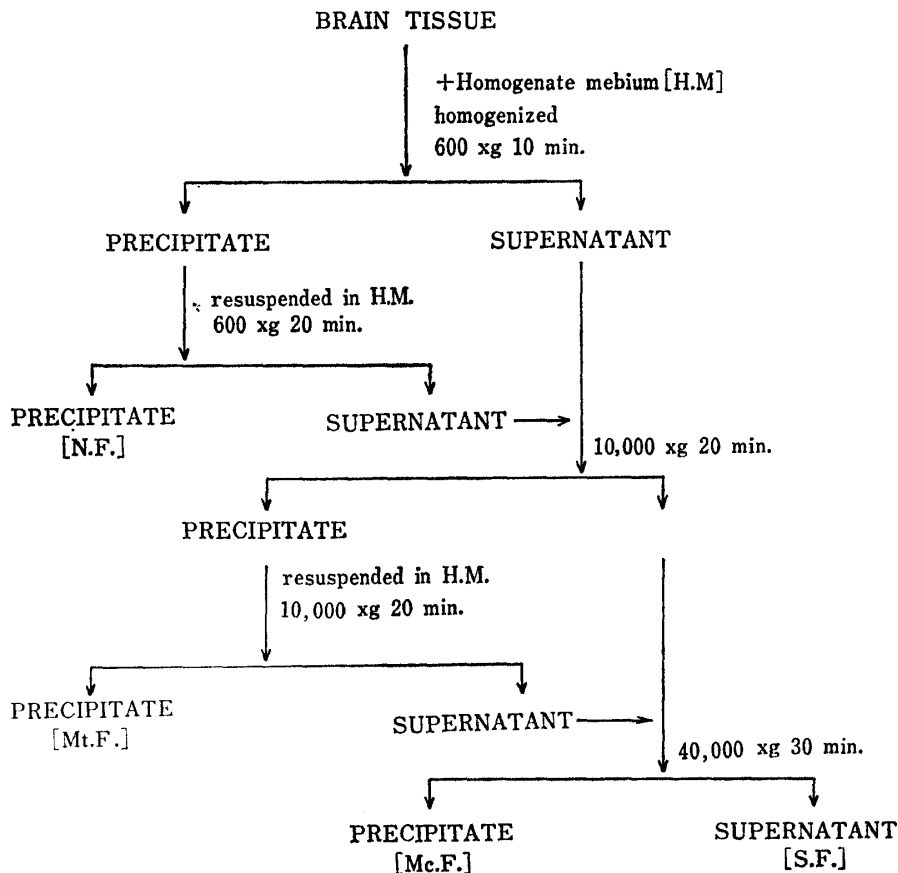


Fig. 1 Scheme for Preparation of Mitochondrial Fraction

Note : All operations were performed at 0°C .

N. F.nuclear fraction Mt. F.mitochondrial fraction
Mc. F.microsomal fraction S. F.soluble fraction

Mitochondria を内膜と外膜の分画に分けるに当り、この膜の破壊の方法として Fig. 1 によって得られた mitochondrial pellet について、ハブ毒による消化、超音波処理あるいは凍結後融解の 3 方法を行い、電子顕微鏡によって形態学的に観察を行い比較した。

Mitochondria の内膜と外膜分画の分離は swelling medium として 0.02 % bovine serum albumin を含む 0.001 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) を用い、これに上記 mitochondrial pellet を懸濁、凍結融解後 Parsons and Williams¹⁵⁾, Tipton⁸⁾ の方法に準じて Fig. 2 に示す手順で行った。更に電子顕微鏡によって内膜および外膜分画の形態学的観察を行った。

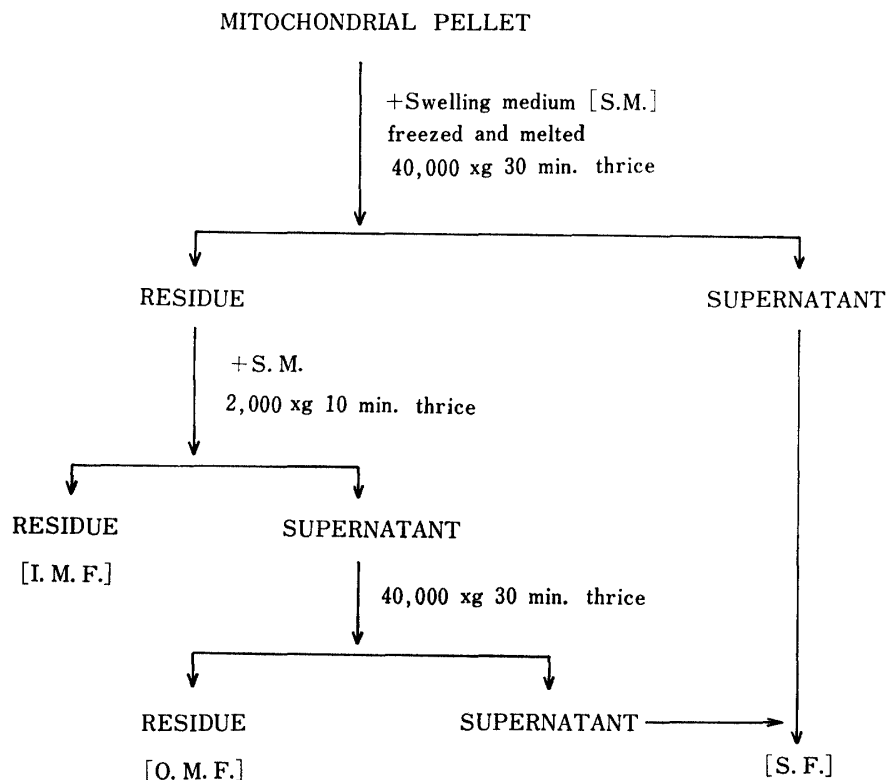


Fig. 2 Scheme for Preparation of Mitochondrial Membrane Fractions

Note: All operations were performed at 0°C.

I. M. F.inner membrane fraction

O. M. F.outer membrane fraction

S. F.soluble fraction

MAO 活性の測定は酸素電極を用いて行い、酵素の酸素消費量、 O_2 μ M/min./tissue 1 g で表わした。測定方法は先に報告した当教室の方法¹⁶⁾ によった。

実験結果

1. Mitochondria 分画の MAO 活性

ラット脳組織を homogenate し、冷凍遠心機を用いて nuclei (0~600×g), mitochondria (600~10,000×g), microsome (10,000~40,000×g), および soluble (40,000×g 遠心の上層) の各分画に分けたとき、各々の MAO 活性は Table 1 に示す如く、homogenate を 100 とすると mitochondria 分画に約 61 % の活性がみられ、MAO が主として細胞中 mitochondria に存在すると推察される。

TABLE 1 MAO Activity of each Fraction of Rat Brain Tissue

Fractions	O_2 μ M/min. /tissue	※ lg	Ratio
Homogenate	31.68 ± 0.145		100
Nuclear F. (0~600×g)	2.68 ± 0.382		8.46
Mitochondrial F. (600~10,000×g)	19.33 ± 1.834		61.04
Microsomal F. (10,000~40,000×g)	1.14 ± 0.052		3.58
Soluble F. (40,000×g over)	1.11 ± 0.971		3.49

※: Mean \pm S. D.

2. Mitochondria の内, 外膜分離と MAO 活性

MAO が mitochondria の内, 外膜のいずれに存在するかを検討するために膜の破壊, 分離を次の3方法によって行い, 比較観察した。

(A) Mitochondrial pellet を 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) に懸濁し, ハブ毒を 50 μ g/ml の濃度で加え, 38°C で 30 分間 incubate した。

(B) Mitochondrial pellet を蒸留水に懸濁, -18°C で凍結後, 室温で融解した。

(C) Mitochondrial pellet を蒸留水に懸濁, 直ちに出力 20KHz, 150W で 20 分間超音波処理を行った。

以上 (A), (B), (C) について 10,000×g, 20 分間 0°C で遠心分離した沈査および無処置の mitochondrial pellet を osmium 固定, alcohol 処理を行って電子顕微鏡下に mitochondria の膜の状態を観察した。Plate 1 にみられるように無処置の mitochondria (D) に対し, ハブ毒を作用させた (A) はかなり swelling を起し, 外膜は破壊されているが, 内膜には顕著な変化を認めなかった。凍結後融解させた (B) は外, 内膜ともに破壊されて mitochondria としての形を全く留めていなかった。超音波処理を施した (C) では外膜は一部破壊されているのが観察されるが, 正常の形を保っていると認められるものもあり, 20KHz, 150W, 20 分間の超音波作用では膜の破壊は完全には行われぬものと考えられる。

凍結融解法によって膜の破壊を行った mitochondria を遠心重力の差によって内膜分画 (0~2,000×g) と外膜分画 (2,000×g 以上) に, 更に外膜分画を 2,000~5,000×g, 5,000~10,000×g, 10,000~20,000×g, 20,000~40,000×g の各分画に分けて (Fig. 3), それぞれの MAO 活性測定と電子顕微鏡による形態観察を行った。Table 2 に示すように, 2,000~40,000×g の外膜分画と考えられる層の MAO 活性は内膜分画と考えられる 0~2,000×g で沈降する分画の約18倍であった。

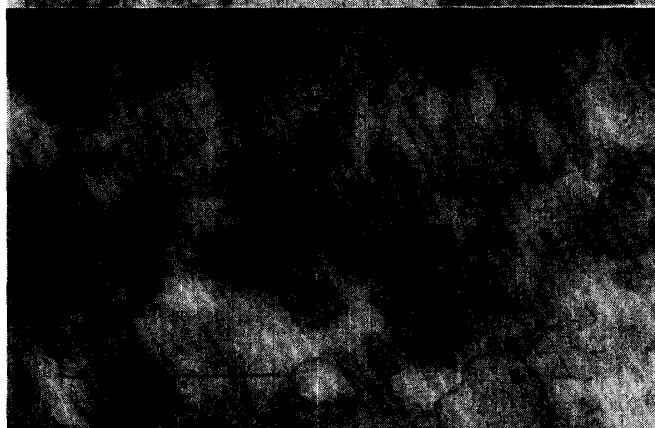
また外膜部分を更に遠心重力によって分けた場合 5,000~10,000×g, 10,000~20,000×g の分画に高い酵素活性がみられ, 両分画の活性値の和は whole mitochondria の活性値の73%に相当した。なお, 40,000×g 遠心の上清部分, 即ち可溶性分画には MAO 活性は認められなかった。これら各分画の電子顕微鏡像を Plate 2, 3 に示した。Plate 2 (A~C) は whole

Plate 1. Electron microscopic findings
of rat brain mitochondria
(positive stain)

(A) treated with snake venom phospholipase digestion



(B) treated with swelling by defreezing



(C) treated with sonication



(D) not treated



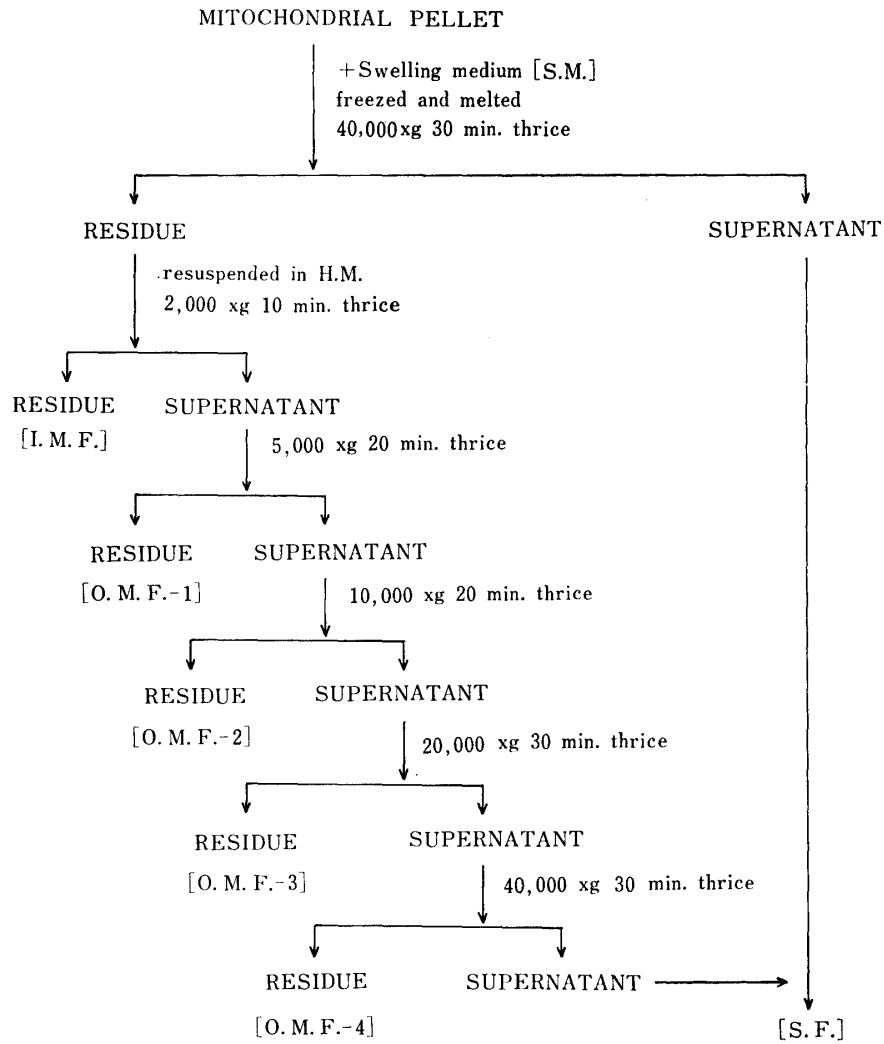


Fig. 3 SHEME for Preparation of Mitochondrial Membrane Fractions

Note : All operations were performed at 0°C.

I. M. F.inner membrane fraction

O. M. F.outer membrane fraction

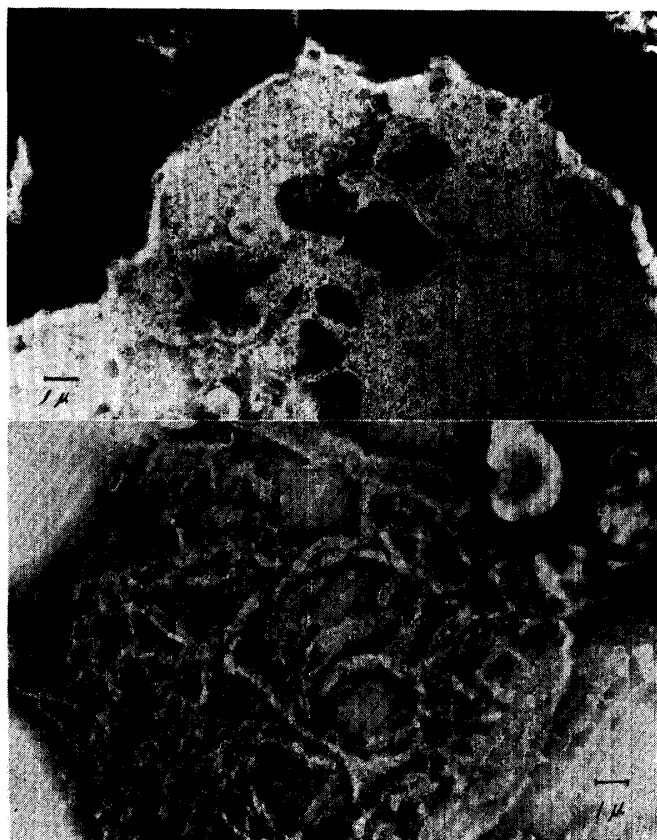
S. F.soluble fraction

Table 2 MAO Activities of Mitochondrial Membrane Fractions

Fraction		MAO activity * O ₂ μ M/min. /tissue g.	Ratio to homogenate	Ratio to whole mito.
Homogenate		31.68 \pm 0.145	100	—
Whole mitochondria		19.33 \pm 1.834	61.0	100
Inner membrane fraction	0~2000 \times g	1.17 \pm 0.612	3.7	6.0
	total	20.11 \pm 0.358	63.5	104.0
Outer membrane fraction	2,000~5,000 \times g	4.31 \pm 0.463	—	22.2
	5,000~10,000 \times g	7.03 \pm 0.412	—	36.3
	10,000~20,000 \times g	7.09 \pm 0.200	—	36.6
	20,000~40,000 \times g	2.15 \pm 0.658	—	11.1
	40,000~ \times g	0	—	0

* : Mean \pm S. D.

mitochondria, その凍結融解したものの 0~2,000 \times g 遠心分画 (内膜) と 2,000~40,000 \times g 遠心分画 (外膜) の negative stain で 0~2,000 \times g 分画には mitochondria の内膜の構造の特徴である cristae に結合した elementary particles が観察された。Plate 3 (A~E) は whole mitochondria を凍結融解した mitochondrial pellet の 0~2,000 \times g, 2,000~5,000 \times g, 5,000~10,000 \times g, 10,000~20,000 \times g, 20,000~40,000 \times g の各遠心分画を positive stain で観察したもので、遠心重力が増すに従って細かく毀れた外膜が re-form closed vesicle を形成しているのが認められた。

Plate 2. Electron microscopic findings
(negative stain)

(A) whole mitochondria

(B) inner membrane fraction



(C) outer membrane fraction

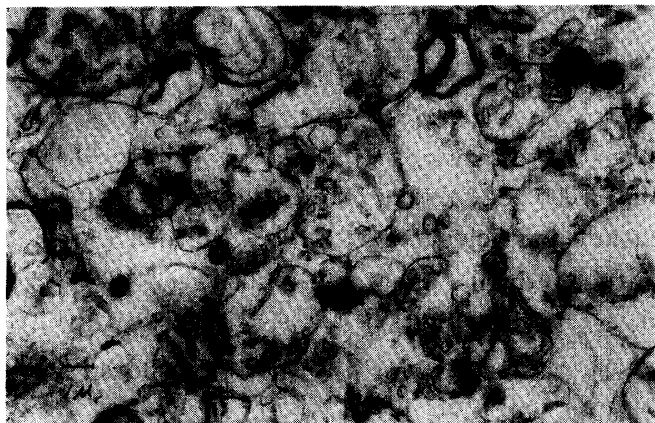
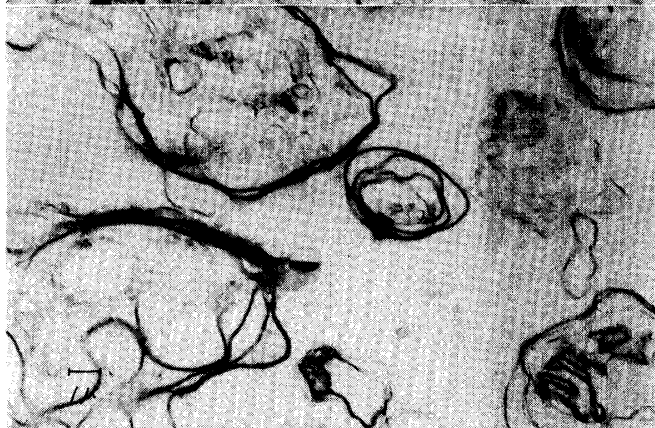
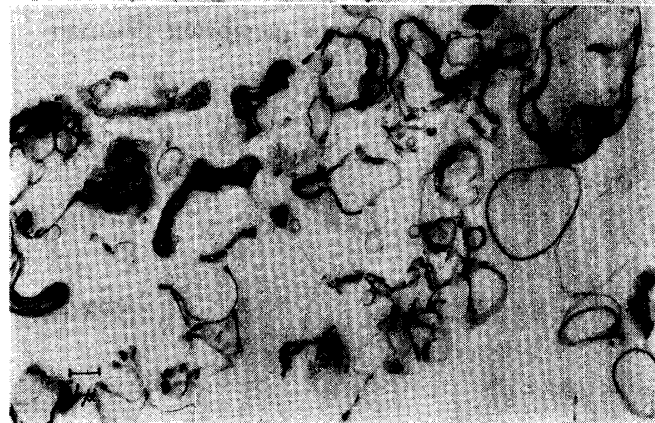


Plate 3. Electron microscopic findings
(positive stain)

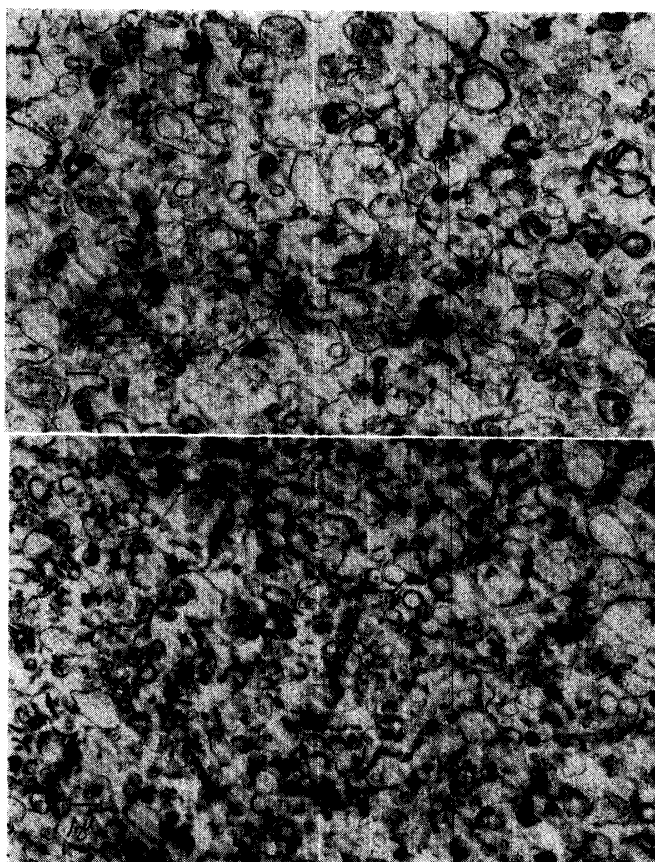
(A) inner membrane fraction (pre-
cipitated at $2,000\times g$, 10 min.)



(B) outer membrane fraction-1
(precipitated at the range
 $2,000 \sim 5,000\times g$, 20 min.)



(C) outer membrane fraction-2
(precipitated at the range
 $5,000 \sim 10,000\times g$, 20 min.)



(D) outer membrane fraction-3
(precipitated at the range
10,000 ~ 20,000×g, 20 min.)

(E) outer membrane fraction-4
(precipitated at the range
20,000 ~ 40,000×g, 30 min.)

考 察

MAO は動物の殆んどすべての組織中に存在し、その細胞分画中 mitochondria に局在、特にその外膜に不溶性に結合しているといわれ、従って MAO を単離し、結晶として得るために可溶化の方法について多くの研究がなされている。MAO の可溶化には mitochondria の膜の破壊と膜からの遊離が必要であり、その手段として氷水中で超音波処理を行う¹³⁾、phospholipase による消化⁸⁾、更に可溶化剤として Triton X-100¹³⁾、Emulgen 810¹⁷⁾、cholic acid¹⁸⁾ を用いるなど多くの方法が試みられている。Tipton⁹⁾ は S-D 系ラットの肝と脳について large-amplitude swelling method とコブラ毒の phospholipase による digestion method の 2 方法によって mitochondria の膜を内膜と外膜に分け、各々の MAO 活性を酸素消費量測定によって検討している。前者の方法では外膜分画に肝で 75%、脳で 50% 以上の MAO 活性が認められたが、phospholipase digestion method では分離が悪く、この理由として肝と脳の lipid 含有量の差が考えられるといつている。今回、私は mitochondria の内、外膜分離のための膜破壊の手段として、ハブ毒による消化、超音波処理、凍結融解法について電子顕微鏡による形態学的検討を加え、凍結融解法が最もよく膜の破壊を起すという結果を得、Tipton の結果を支持した。

0.001 M Tris-HCl buffer (含 0.02 % bovine serum albumin, pH 7.5) に懸濁後、凍結融解によって膜の破壊を行った mitochondria 分画を遠心重力の差によって分けたとき、0~2,000 ×g 10 分間の遠心沈査には mitochondria の内膜の特徴である cristae に結合した elementa-

ry particles を観察することができた。またこの分画の MAO 活性は whole mitochondria の酵素活性の僅か 6% であり、これに対し、外膜分画と思われる 2,000~40,000×g, 20 分間遠心分画の MAO 活性は 0~2,000 遠心分画の約 18 倍であり、更に 40,000×g 遠心の上層液、即ち可溶性分画には酵素活性を認めなかった。

結 論

ラット脳について、その各細胞分画——nuclei, mitochondria, microsome および soluble 分画——の MAO 活性を測定し、更に mitochondria の内、外膜を分離してその各分画の電子顕微鏡による形態観察と MAO 活性の測定を行った結果から、ラット脳内 MAO はその細胞中 mitochondria の外膜に存在し、しかも膜に固く結合して不溶性であることが立証された。

文 献

- 1) Hare, M. L. C. : Biochem. J., **22**, 968, (1928)
- 2) Blaschko, H., et al. : J. Physiol., **90**, 1, (1937)
- 3) Zeller, E. A. : Helv. Clin. Acta, **24**, 539, (1941)
- 4) Bhagvat, K., et al. : Biochem. J., **33**, 1338, (1939)
- 5) Thompson, R. H. and Tickner, A. : Biochem. J., **45**, 125, (1949)
- 6) Ostwald, E. O. and Strittmatter, C. F. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **114**, 668, (1963)
- 7) Schnaitman, C., et al. : J. Cell Biol., **32**, 719, (1967)
- 8) Tipton, K. F. : Biochem. Biophys. Acta, **135**, 910, (1967)
- 9) 山田秀明 : 蛋白質核酸酵素, **9**, 89, (1964)
- 10) Weiner, N : Arch. Biochem. Biophys., **91**, 182, (1960)
- 11) 藤巻達男 : 日薬理誌, **64**, 393, (1968)
- 12) 生田目英一 : 日薬理誌, **67**, 374, (1971)
- 13) Tipton, K. F. : Europ. J. Biochem., **4**, 103, (1968)
- 14) Stahl, W. L., et al. : J. Cell Biol., **19**, 293 (1961)
- 15) Parsons, D. F. and Williams. G. R. : Methods in Enzymology, vol. 10, pp 443, (1967)
- 16) 木村 都 : 共薬年報, **20**, 67, (1975).
- 17) 清水範之 : 昭和医誌, **30**, 283, (1970)
- 18) Sakamoto, Y., et al. : J. Biochem., **54**, 292, (1963)