

Title	Monoamine Oxidaseに関する研究(第3報) : Radioisotopic Assayによるラット脳内Monoamine Oxidase活性測定法の検討
Sub Title	Studies on monoamine oxidase (III) : studies on radiochemical assay procedure of monoamine oxidase activity in rat brain
Author	小林, 礼子(Kobayashi, Reiko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1978
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.23 (1978.) ,p.1- 10
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000023-0001

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.

Monoamine Oxidase に関する研究 (第3報) : Radioisotopic Assay によるラット脳内 Monoamine Oxidase 活性測定法の検討*

小林 礼子

Studies on Monoamine Oxidase (III) : Studies on Radiochemical Assay Procedure of Monoamine Oxidase Activity in Rat Brain

REIKO KOBAYASHI

(Received September 28, 1978)

In previous works, we have used oxygen electrode method or colorimetry for the assay of monoamine oxidase (MAO) activity.

Present investigation was undertaken to find out the best experimental conditions for the assay of rat brain MAO activity in milligram quantities of tissue using the radiochemical method which was originally used for the blood plasma amine oxidase by Otsuka and Kobayashi.

Following conditions were successful :

- (1) Substrate concentration ; The highest MAO activity was obtained in the range of 10^{-3} ~ 2×10^{-3} M tyramine at final concentration.
- (2) Incubation time ; The reaction proceeded linearly for 30 minutes and then it's speed downed gradually. And also, 30 minutes was enough to obtain the sufficient counts of radioactivity. Then, the incubation time was fixed for 30 minutes.
- (3) Buffer system ; The activity of the enzyme incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) was higher than that in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5).
- (4) The following conditions seems most recommendable for the assay of the rat brain MAO activity : rat brain tissue, 1~10 mg (ordinary 5 mg) ; buffer system, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) ; substrate, 10^{-3} M tyramine ; incubation period, 30 minutes at 37 °C.

脳内 monoamine oxidase [monoamine: oxigen oxidoreductase (deaminating) EC: 1.4.3.4] (abr. MAO) 活性の変動を知ることは脳内 amine の変動を検索することと共に脳機能の研究上極めて重要である。しかしながらこの目的のために用いられてきた従来の方法は酸素電極法¹⁾, Warburg 検圧法²⁾, 比色法³⁾ などであり, これにはグラムないしは数百ミリグラムの組織量を必要とするため実験動物の脳の各部位等限られた小部位におけるMAO活性の測定は比較的

* 本論文の一部要旨は第51回日本薬理学会近畿部会 (1977年6月) において発表

- 1) Tipton, K. F. and Dawson, A. P., *Biochem. J.*, 108, 95, 1968.
- 2) Creasey, N. H., *Biochem. J.*, 64, 178, 1956.
- 3) Weissbach, H., Smith, T. E., Daly, J. W., Witkop, B. and Udenfriend, S., *J. Biol. Chem.*, 235, 1160, 1960.

困難であった。

そこで筆者は血漿中の amine oxidase を測定している Otsuka and Kobayashi⁴⁾ の radio-isotopic assay を脳組織内MAOの微量測定に応用するための基礎的検討を行った。

本研究ではラット脳内MAOを組織数ミリグラムの量で測定するための組織量, 基質濃度, 反応時間および酵素反応に使用する buffer 等についての条件を追求すると共にMAO阻害剤の iproniazid を用いての阻害剤の影響からも本法の検討を行った。

実験方法

1) 実験動物および酵素材料の作製

実験には室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度55%の恒温恒湿度室で固型飼料(日本クレア製, CE-2)と水を自由に与えて飼育した9~10週令, 体重200g前後の健康な Sprague-Dawley 系雌性ラットを使用した。動物は全て午前10時に断頭し, 直ちに全脳を摘出して氷冷生理食塩水で血液, 附着物を取り除き全脳重量の9倍量の冷 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) または 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) を加えてテフロン製 Potter-Elvehjem homogenizer で homogenize した。この homogenate は測定時の1回使用組織量に応じて適宜希釈し実験に使用した。なお酵素活性は homogenate 中に含有される組織mg量当りで表示した。

2) 使用薬物

基質としては tyramine-2-¹⁴C-hydrochloride (55mCi/m mole, New England Nuclear Co.) を使用し 0.1ml 当りの activity が 50,000 dpm (ca. 2×10^{-10} M) となるように蒸留水に溶解し, 用時各濃度の非放射性 tyramine で希釈した。¹⁴C-tyramine の放射能測定には Bray 溶液⁵⁾ を使用した。¹⁴C-tyramine の代謝生成物の抽出溶媒としては 0.6% 2,5-diphenyloxazole (PPO) 含有 anisol を使用した。塩酸 tyramine, リン酸 iproniazid, anisol (東京化成) およびその他すべての薬物は特級または分析用を使用した。

3) MAO活性測定法

脳 homogenate 希釈液 0.25 または 0.50 ml をガラス製共栓遠沈管にとり 0.1 M Tris-HCl buffer で全量を 1.80ml とした。実験の目的によっては 0.1M KCN, 0.1M NaN₃ または 0.1M semicarbazide 各 0.2ml (最終濃度 1 mM) あるいは iproniazid 0.2ml (最終濃度 10^{-2} ~ 10^{-7} M) を加え全量を 1.80ml とした。この incubation medium は空气中, 37°C の water bath 中で 2 分間 preincubation を行い, 次いで基質溶液 (tyramine) 0.2ml を添加して反応を開始しその後適当な時間に沸騰水中で 3 分間加熱して反応を停止した。反応液を pH 2 以下とするため 2 M クエン酸 0.2ml を加え, 次に 1,500 r.p.m. で 10 分間遠心分離後, 上清を別の遠沈管に分取し, 残査は 5 ml の anisol-PPO で洗浄し, 洗液を先の上清と合して, この混液を 1 分間振盪して MAO による全代謝生成物を残査洗浄 anisol 液中に抽出し, 1,500 r.p.m. 10 分間遠心分離後, -20°C の冷凍庫内で水層を凍結させた。次に溶媒層を counting vial に採取後, 氷結した水層を室温で融解し, 更に anisol-PPO 抽出を 2 回くり返した。Counting vial に集めたこれら抽出液の放射能は液体 scintillation spectrometer (Aroka, LSC-502) で測定し ¹⁴C-tyramine の代謝生成物量を算出した。MAO 活性は ¹⁴C-tyramine とその代謝生成物の放射能の比から MAO

4) Otsuka, S. and Kobayashi, Y., *Biochem. Pharmacol.*, 13, 995, 1964.

5) Bray, G. A., *Anal. Biochem.* 1, 279, 1960.

により代謝された基質 tyramine の n moles/mg tissue (wet weight) /30min. で表示した。

実験結果

最初にラット脳内MAO活性測定のための使用組織量, 基質濃度, 反応時間, buffer を検討し, 次いでシアン化合物および iproniazid 等によるMAO活性への影響を検討した。

1) 使用組織量の検討

MAO活性測定のために用いる1検体当りの使用組織量について検討した。ラット全脳組織の1, 5, 10および50mgを含む0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) homogenate に基質(最終濃度 10^{-3} M) を添加し 37°C で5, 15, 30分間反応させた際の組織1 mg 当りのMAO活性を測定しその結果を Fig. 1 に示した。組織量1, 5, 10mg/検体では5 mg/検体使用時に最も高い活性が認められ, それらは各々1.69, 4.52, 0.80 n moles/mg tissueであり, 次いで10mg/検体使用時に比較的高い活性が得られたがこれらの組織使用量ではいずれの反応時間でも組織 mg 当りのMAO活性には有意な差は認められなかった。一方使用組織量50mg では代謝生成物量は5, 15, 30

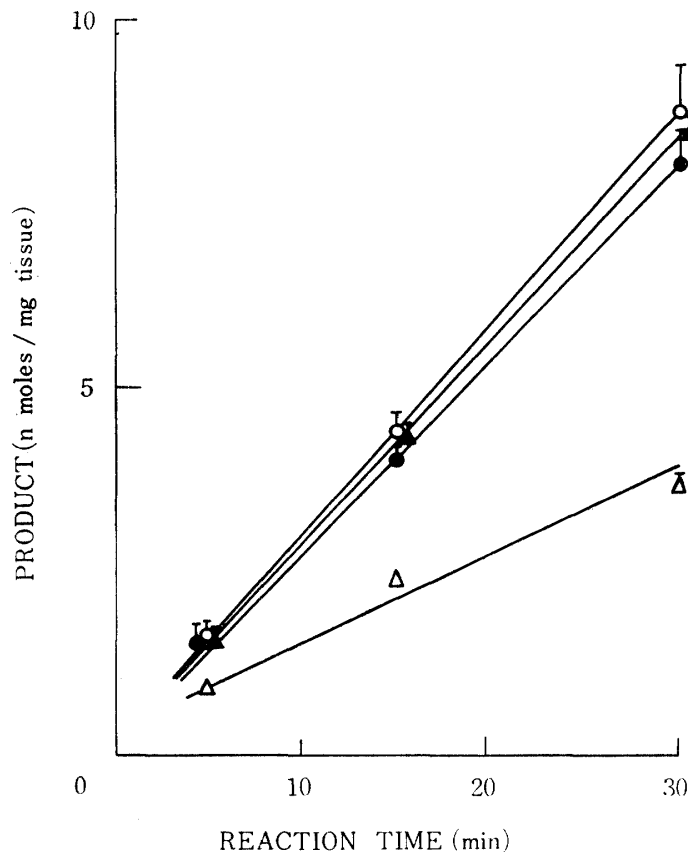


Fig. 1 Relation of tissue weight to monoamine oxidase activity.

Experimental conditions were as follows; rat brain homogenate (●—●; 1 mg, ○—○; 5 mg, ▲—▲; 10 mg, △—△; 50 mg, of tissue) in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) was incubated with substrate (^{14}C -tyramine-tyramine 10^{-3} M, final concentration) at 37°C for 5, 15 or 30 min. Vertical bars represent the standard error of the mean. MAO activity was expressed as reaction product formed from tyramine, n moles/mg tissue.

分のいずれの反応時間においても 1.01, 2.36, 3.63 n moles/mg tissue と最も低く 1, 5, 10 mg使用時の約 $\frac{1}{2}$ の値であった。

単位時間当りの代謝生成量からみた場合は Fig. 2 に示すように、組織使用量の多少に拘らずいずれの場合も反応時間5分で最も高いMAO活性を示した。使用組織 1, 5, 10mg では15分間の反応ではやや減少の傾向がみられたが反応時間30分でも15分間反応を行った場合とほぼ同様の傾向を示した。これに対し 50mg の場合では反応時間の経過と共に活性はほぼ直線的に減少した。

以上の結果より本実験条件では使用組織量 1~10mgの範囲内ではラット脳 1 mg当りのMAO活性値を有効に測定できるものと考えられる。

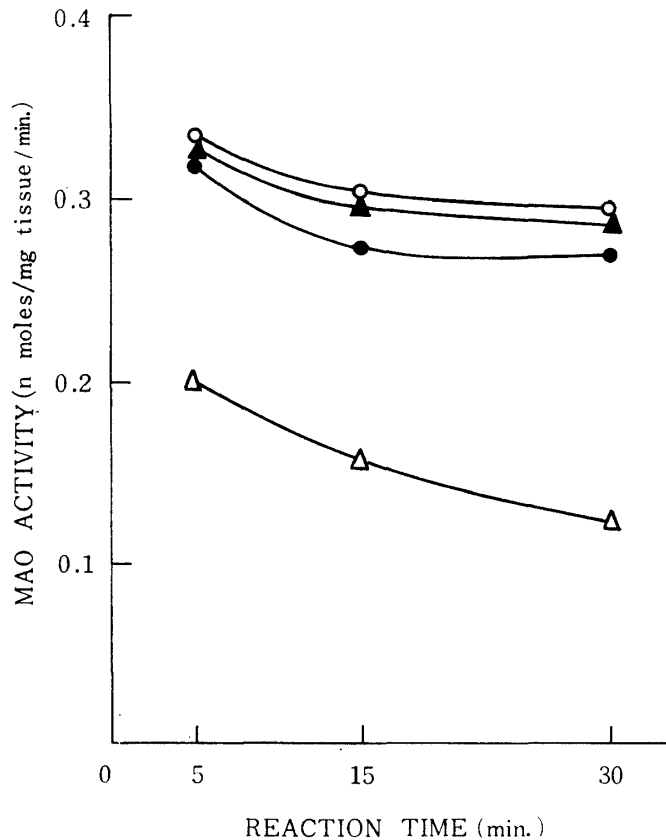


Fig. 2 Effect of tissue weight and incubation time on MAO activity per minute.

Experimental conditions were the same as in Fig. 1.

Tissue weight: ●-●; 1 mg, ○-○; 5 mg, ▲-▲; 10 mg, △-△; 50 mg,

2) 基質濃度の検討

基質として使用する tyramine の至適濃度を知るために基質 tyramine の 10^{-2} , 3×10^{-3} , 10^{-3} , 3×10^{-4} , 10^{-4} M の各濃度におけるMAO活性を測定し、pS 曲線より至適濃度を検討した。またこの実験には組織量として5あるいは10mg/検体を使用し、buffer としては 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) で homogenate を作成し実験に使用した。

Fig. 3 に示すように反応時間15, 30, 45分のいずれの場合もMAO活性は基質濃度が 10^{-4} M より高濃度になるにつれて活性も増加し 10^{-3} M ないしは 3×10^{-3} M で最も高い活性を示すが、

これ以上の高濃度ではむしろ活性は減少しベル型の pS 曲線を示した。また本実験でも脳組織使用量 5 mg および 10 mg / 検体では MAO 活性には著明な相違は認められなかった。

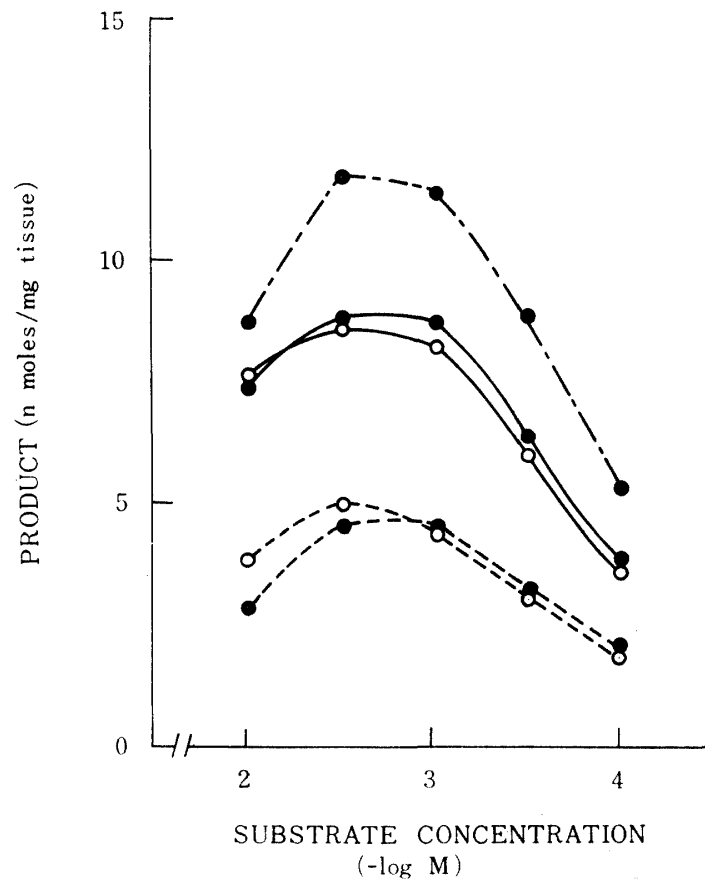


Fig. 3 Effect of substrate concentration on MAO activity in rat whole brain.

Experimental conditions were as follows: rat brain homogenate (5 mg; ● or 10 mg; ○ of tissue) in 0.1 M Tris-HCl buffer was incubated with various concentrations of substrate at 37°C for 15 min ----, 30 min —, or 45 min - - - -.

3) 反応時間の検討

1) および 2) の実験結果から MAO 活性測定のための至適条件として脳組織量は 5 ~ 10 mg, 基質 tyramine の濃度は $3 \times 10^{-3} \sim 10^{-3}$ M が最適であることが明らかとなった。一方, 反応時間については反応開始後 5 ~ 15 分間では測定値が低く不十分であるので, さらに十分に高い活性を求めため組織量を 5 あるいは 10 mg, 基質濃度 10^{-3} M にて反応時間を 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 分と変化させその際の MAO 活性を測定した。

その結果 Fig. 4 に示したごとく組織量 5 あるいは 10 mg のいずれの場合も反応開始より 30 分後までは反応時間と組織 1 mg 当りの MAO 活性との間には直線関係が得られたが, 30 ~ 60 分ではやや反応の増加率が減少することが観察された。上記の結果より反応時間は酵素活性との間に比例関係が得られ, さらに最大の活性が認められた時間 30 分で MAO 活性を測定するのが最良と考えられる。

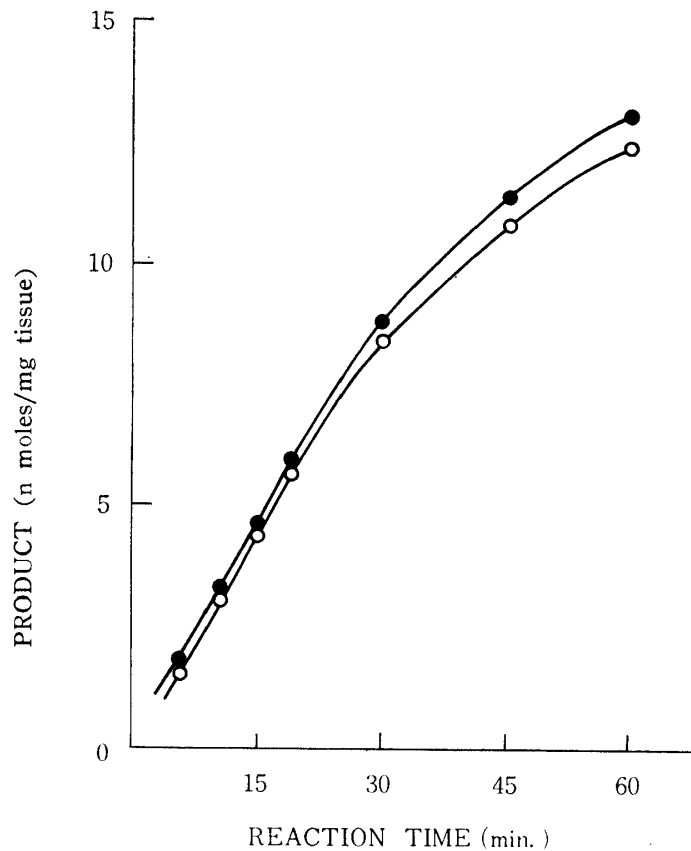


Fig. 4 Time course of monoamine oxidase reaction.

Incubation was carried out at 37°C in the medium containing rat brain homogenate (●—●; 5 mg or ○—○; 10 mg of tissue), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) and substrate (10^{-3} M).

4) Buffer system の検討

ラット脳内MAOの至適 pH は7.5~7.6であることがすでに酸素電極法で確認されている⁶⁾ので本実験では pH を7.5とし Tris-HCl buffer と共に広く使われている phosphate buffer についてMAO活性に与える影響を比較検討した。

Fig. 5 に示すように 0.1 M phosphate buffer では反応初期5~15分においては Tris-HCl buffer より高い MAO活性が得られたが20分以降では反応の直線性は失われた。一方, 0.1 M Tris-HCl buffer ではMAO活性は反応時間30分までは直線的に増加し, 60分で phosphate buffer より高い値を示した。この実験から反応時間30分で良好な結果を示したので以下の実験には 0.1 M Tris-HCl buffer を使用した。

5) KCN, NaN₃ あるいは semicarbazide 添加による影響

Warburg 検圧法, 酸素電極法などでは他の呼吸酵素による内存呼吸あるいはMAOによる代謝産物 aldehyde が更に共存する酸化酵素により酸化されることによる酸素消費量への影響を取り除く目的で KCN, NaN₃⁷⁾ あるいは semicarbazide が添加されている。本法を用いてこ

6) 木村 都, personal communication.

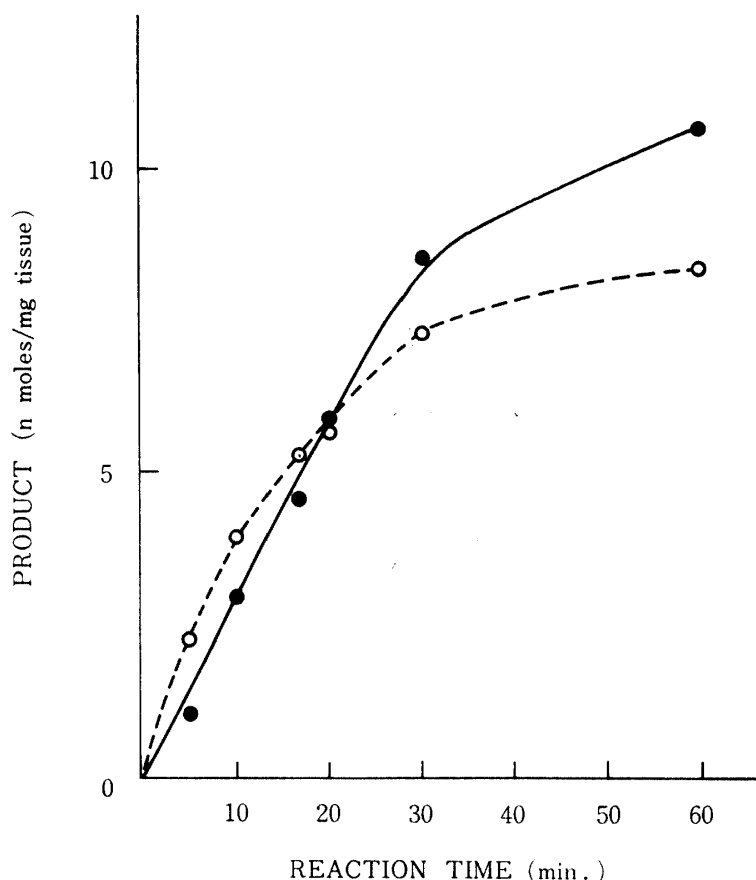


Fig. 5 Effect of buffer system on monoamine oxidase activity.

The buffer systems used were 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) ●—● or 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) ○--○. Incubation temperature: 37°C, rat brain tissue: 5 mg, ^{14}C -tyramine-tyramine (final concentration): 10^{-3}M .

れら化合物の影響を観察する目的でKCN, NaN_3 , semicarbazide を各々 10^{-3}M (以上いずれも最終濃度)を添加した場合とこれらを添加しない場合のMAO活性を比較検討した。組織量 5 mg 基質濃度を 10^{-3}M とし, buffer には0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)を用い, 反応時間30分の条件で比較検討を行った。KCN, NaN_3 , KCN+ NaN_3 あるいは semicarbazide を添加した際のMAO活性は Fig. 6 に示すように対照の各々96, 91, 87, 1.2%といずれの場合もその活性は低下した。特に semicarbazide 10^{-3}M ではMAOには著明な活性低下がみられた。またKCNあるいは NaN_3 も anisol 層へ抽出されるMAOによる tyramine の代謝生成物を減少させることが観察された。

6) MAO阻害剤による本測定法の検討

MAO阻害剤 iproniazid を用いて *in vitro* で実験を行いその影響より本測定法の検討を行った。組織量 5 mg を含む酵素液 (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, homogenate) にリン酸 iproniazid ($10^{-2}\sim 10^{-7}\text{M}$) を添加し空气中, 37°Cで10分間 preincubation を行った後, 基質 tyramine 10^{-3}M を加え30分間反応して得られたMAO活性値を Fig. 7 に示した。Iproniazid

7) 庄 貞行, 杵鞭宏育, 清水範之, 生田目英一, 豊島良枝, 上條一也, 中村泰治, 昭和医誌, 27, 932, 1967.

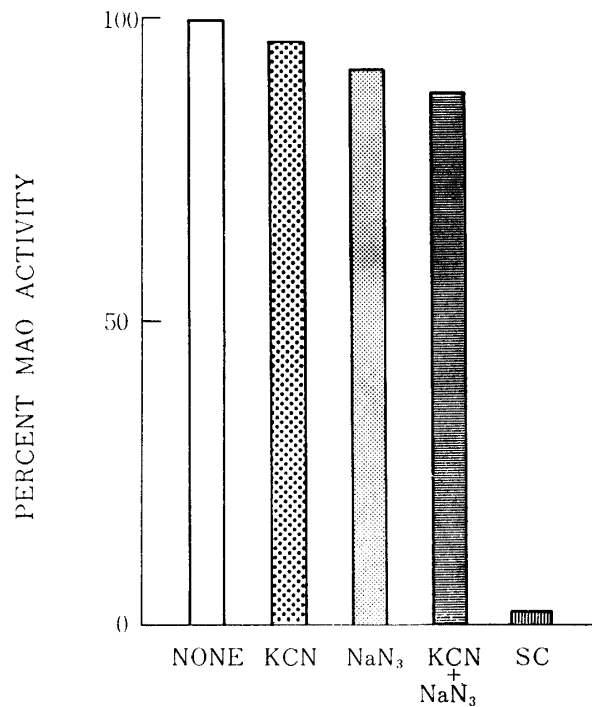


Fig. 6 Effect of KCN, NaN₃ and semicarbazide on monoamine oxidase activity.

Results were expressed as percent activity of control (none).

KCN, NaN₃, KCN and NaN₃, or semicarbazide of final concentration 10⁻³M was added in reaction medium, respectively.

Reaction medium consisted of rat brain tissue 5 mg, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) and substrate, and incubated for 30 min at 37°C.

の10⁻⁷MでもMAO活性は若干阻害され(約2%), 10⁻²Mでは99.6%の阻害作用が認められ, その際の pI₅₀ (50%阻害濃度)は 10^{-3.56}Mであった。この iproniazid によるラット脳内 MAO活性に対する阻害作用の結果は酸素電極法による木村⁶⁾の実験成績とはほぼ一致した。

考 察

MAOは単一酵素ではなく subunit を有する多様性酵素といわれている⁸⁾⁻¹⁰⁾。従って基質特異性の巾が広く動物種あるいは臓器の違いによって特に高い特異性を示す基質の種類が異なる場合がある。ラット脳内MAOは serotonin, dopamine と共に tyramine に対し高い特異性を示すことが知られている¹¹⁾。また radiometry によるMAO活性測定法としては¹⁴C標識の基質が最も一般的に使われている。その原理は酵素を放射性基質と共に一定時間反応させ, 変化しなかった amine と生成された aldehyde とを分離し液体シンチレーション法により定量するものである。そこで本実験で用いた方法には (1) 基質としてラット脳内 MAO に対し高い活性を示す

8) Youdim, M.B.H., Holzbauer, M. and Woods, H. F., *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 12, 11, 1974.

9) Neff, N. H. and Yang, N. Y. T., *Life Sci.*, 14, 2061, 1974.

10) Knoll, J. and Magyar, K., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 5, 393, 1972.

11) Weiner, N., *Arch. Biochem. Biophys.*, 91, 182, 1960.

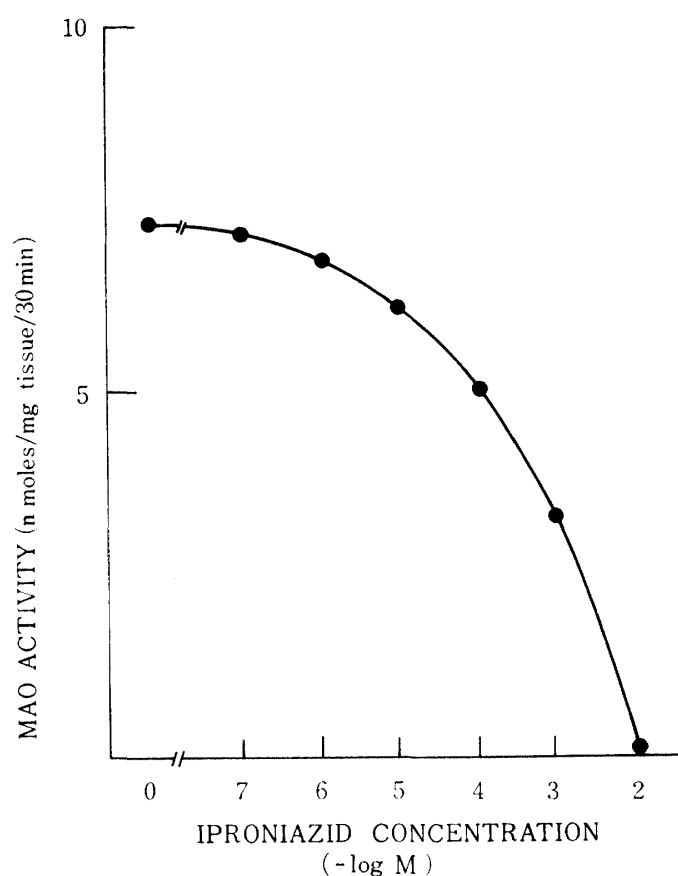


Fig. 7 Inhibition of monoamine oxidase activity with various concentrations of iproniazid.

Enzyme activity was indicated with ●—●. The homogenate of tissue 5 mg in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5) was preincubated for 10 minutes with various concentrations of iproniazid. Substrate (^{14}C -tyramine-tyramine 10^{-8}M , final concentration) was added after this period, and the mixture was incubated at 37°C for 30 minutes.

tyramine を使用すること, (2) 2M クエン酸を用いることにより medium の緩衝力に妨げられずに低 pH で, イオン交換法¹²⁾に比し簡単に, medium 中の amine および amine から生成される MAO 代謝産物である aldehyde を効率よく直接シンチレーターに抽出できる特徴があり, 比較的簡便な方法である。

今回全脳 homogenate を酵素材料としてラット脳内 MAO 活性を少量の組織量で測定し得る条件を見出すため酵素量, 基質濃度, 反応時間, buffer system による影響, cyanide または azide による影響について検討すると共に MAO 阻害剤 iproniazid による影響から本法の検討を行った。1 検体当りの使用酵素量は脳組織 1~10mg の範囲内では反応時間 30 分までは組織 1 mg 当りの tyramine 代謝産物の生成量には差がないことが認められた。50mg では反応時間の経過と共に減少した。これはこの実験に使用した基質濃度 10^{-8}M に対して使用した組織量が多すぎるの

12) Robinson, D. S., Lovenberg, W., Keiser, H. and Sjoerdsma, A., *Biochem. Pharmacol.* 17, 109, 1968.

が原因と考えられる。基質濃度については $3 \times 10^{-3} \sim 10^{-3} \text{M}$ で MAO の最大活性が認められ、更に高濃度 (10^{-2}M) では過剰基質による基質阻害がみられ、double displacement-type enzyme^{13,14)} にしばしばみられるベル型の pS 曲線を示した。Buffer による影響については Tris-HCl buffer と phosphate buffer との間には反応速度に違いがみられ、Tris-HCl buffer では反応開始より30分まで反応の直線性が得られたのに対し、phosphate buffer では反応初期 (5~15分) の活性は高く直線性を示すが、20分以降は反応速度が低下し Tris-HCl buffer の場合より低い値となった。筆者は放射能の計数値が充分あることおよび今後の実験で本酵素活性を初速度よりむしろ pool size で捕えることに重点をおき、反応がより直線的に進行する Tris-HCl buffer を用いて反応時間を30分とする条件を選択した。

MAO代謝産物である aldehyde の抽出溶媒にはトルエン、ベンゼン、酢酸エチル等も用いられているが、本法では anisol を抽出溶媒とした。基質として tyramine を用いた際の anisol 層に抽出される物質は単一の peak を示し、未反応の tyramine は殆んど検出されないこと⁴⁾、抽出物と 2,4-dinitrophenyl hydrazine との反応物質は融点が tyramine の酸化的脱アミノ反応により生ずる p-hydroxybenzaldehyde とこの hydrazine との化合物 p-hydroxybenzaldehyde 2,4-dinitrophenyl hydrazone に等しいことが確認されている⁶⁾。Semicarbazide が MAOにより生成した aldehyde に trap をかけること¹⁵⁾、シアン化合物がある種の irreversible inhibitor に対する本酵素の感受性に影響すること¹⁶⁾ 等も報告されており、本実験でも KCN, NaN₃、あるいは semicarbazide 添加はいずれも放射能の計測値を減ずることが認められ、これら化合物の incubation medium への添加はむしろ酵素活性の低下を示すことが観察された。

以上の結果から組織の 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5) の homogenate を酵素材料とし基質 tyramine の濃度を 10^{-3}M (¹⁴C-tyramine 0.045 μ Ci 相当含有) にて空气中、37°C で30分間反応させた後、tyramine の代謝生成物を anisol で抽出し放射能を計測する本法は少量 (1~10mg) のラット脳内 MAO 活性の測定に適するものと思われる。

謝辞：稿を終るに臨み、御指導を賜りました昭和大学医学部薬理学教室上條一也教授、共立薬科大学薬理学教室中村悦郎教授、木村都講師に心より深謝いたします。

13) Middleton, B., *Biochem. J.*, 126, 35, 1972.

14) Van Woert, M. H. and Cotzias, G. C., *Biochem. Pharmacol.*, 15, 275, 1966.

15) Jain, M., Sands, F. and Van Korff, R. W., *Anal. Biochem.*, 52, 542, 1973.

16) Davison, A. N., *Physiol. Rev.*, 38, 729, 1958.