S2-01

ミトコンドリア酸化系酵素・モノアミンオキシダーゼ (MAO) の基質選択性とアミン代謝

東北薬大 ○櫻井栄一, 野村明生, 山崎誠治, 引地 登,
 東北大・医 櫻井映子
 愛媛大・医 前山一隆
 ウプサラ大・医 Sukhwinder S. Jossan, Lars Oreland

METABOLISM OF AMINES BY MITOCHONDRIAL MONOAMINE OXIDASE AND SUBSTRATE SELECTIVITY

Eiichi Sakurai, Akio Nomura, Seiji Yamasaki, Noboru Hikichi,
 Eiko Sakurai¹⁾, Kazutaka Maeyama²⁾, Sukhwinder S. Jossan³⁾
 and Lars Oreland³⁾

Tohoku College of Pharmacy, ¹⁾Tohoku University School of Medicine,
²⁾Ehime University School of Medicine, ³⁾Uppsala University School
 of medicine (BMC)

【目的】モノアミン酸化酵素 (MAO) は生体内臓器中に広く分布し, 細胞内では主としてミトコンドリア外膜に結合して存在している. MAOは補酵素としてFADをもっており, 多くの脂肪族あるいは芳香族アミンを酸化的に脱アミノ化し, アルデヒドへと変換する. この反応はP450によって触媒される酸化反応と区別される. また, MAOは二つの違ったタイプ, すなわちモノアミン酸化酵素の特異的阻害剤であるクロルジリンの低濃度で抑制されるAタイプとデプレニルの低濃度で抑制されるBタイプがあり, 近年クローニングにより構造が決定されている. また, これら両タイプのMAOは阻害剤感受性のほかに, 基質特異性がある. 本研究では特に脳を中心として, モノアミン酸化酵素の局在と代謝回転, モノアミン酸化酵素の脳内分布とアミン代謝の相関性, MAOの種族あるいは系統間の差, および生理的加齢による変化を検討した. また, これらMAOの性質から基質に対する選択性とアミン代謝について, 生理活性アミンをはじめとして, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)を用いて検討した. さらに, われわれのもう一つの研究テーマである光学異性体薬物の立体選択的体内動態に関して, アミン化合物のMAOによる酸化脱アミノ化に対するキラリ認識についても検討を加えた.

【実験方法・結果・考察】

1. MAO-Bの局在と代謝回転

¹¹C-L-デプレニルを合成し, in vitro オートラジオグラフィーを用いてヒト脳における

Fig.1 Localization of monoamine oxidase in human brain by autoradiographical use of ¹¹C-labelled L-deprenyl

Fig.2 Turnover of monoamine oxidase B in pig brain by positron emission tomography using ¹¹C-labelled L-deprenyl

^{11}C -L-デプレニルの結合を観察したところ、尾状核・被殻、視床、黒質に高いbindingが認められた。これに対し大脳皮質と白質においては高い結合は見られなかった (Fig. 1)。
さらに、ブタ脳におけるMAO-Bの代謝回転速度を ^{11}C -L-デプレニルをリガンドにPositron emission tomography (PET) にて測定したところ、その半減期は6.5日となった。(Fig. 2)。

2. MAO活性の分布と生体内アミン代謝との関係¹⁾

ラット脳各部位(8部位)におけるIntra- and extra-synaptosomal MAO活性をセロトニン(5-HT)およびドパミン(DA)を用いた低基質濃度法で測定した。その結果、Intra-5-HT-MAOは視床下部と線状体で高い活性を示した。また、Intra-DAMAO-Aおよび-Bの活性はともに線状体で顕著に高かった。さらに、セロトニンを基質としてMAO-Aを、 β -フェニルエチルアミンを基質としてMAO-Bをradiometricな方法で測定したところ、両タイプのMAO活性とも視床下部、扁桃核、線状体の順に活性が高く、MAO-A/-B比は約1.6と算出された。同様に、脳を8分画しセロトニンとその代謝物5-hydroxyindole acetic acid(5-HIAA)さらにドパミンおよびその代謝物3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)をHPLC-ECD法にて測定し、前述したMAO活性との相関性を求めた。Table 1からわかるように、MAOと生体内アミンの代謝物、さらにはモノアミン取り込み速度とMAO活性、各アミン濃度との間に高い相関係数が得られ、中枢神経系においてMAOがモノアミンの種類を選択的し、その代謝を調節していることが示唆された。

Table 1.

Correlation coefficients between various MAO activities and serotonin or dopamine uptake rates, transmitters and their metabolites concentrations in different regions of the rat brain

	MAO Intra-5-HT	MAO-A Intra-DA	MAO-B Intra-DA	MAO-A	MAO-B	5-HT conc.	5-HIAA conc.	DA conc.	DOPAC conc.
5-HT uptake	0.98***	—	—	0.84*	0.70†	0.71*	0.68†	—	—
DA uptake	—	0.99***	0.87**	0.15	-0.04	—	—	0.99***	0.99***
Intra 5-HT MAO	—	—	—	0.88**	0.76*	0.73*	0.65†	—	—
Intra DA MAO-A	—	—	0.89**	0.21	0.02	—	—	0.99***	0.99***
Intra DA MAO-B	—	—	—	0.57	0.34	—	—	0.86**	0.86**
MAO-A	—	—	—	—	0.92**	0.62	0.50	0.15	0.16
MAO-B	—	—	—	—	—	0.60	0.31	-0.02	-0.02
5-HT conc.	—	—	—	—	—	—	0.67†	—	—
DA conc.	—	—	—	—	—	—	—	—	0.99***

Abbreviations: Intra-5-HT MAO = intra-serotonin-synaptosomal MAO activity; intra-DA MAO-A = DA oxidation by intra-DA-synaptosomal MAO-A; intra-DA MAO-B = DA oxidation by intra-DA-synaptosomal MAO-B; 5-HT = serotonin; DA = dopamine.

Correlation coefficients: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, † $P < 0.1$.

3. 種族あるいは系統間のMAO活性の違い、および生理的加齢による変化²⁾

MAOの種族(NMRIマウス, Sprague Dowleyラット, サル, ヒトによる活性の違いを線状体において検討した。その結果、マウスとラットとの間にそれほど大きな差は認められなかったが、サルにおいてはMAOのAタイプの活性は測定されず、MAO-Bの活性のみが観察された。また、ヒトの場合マウスやラットと異なりMAO-BがMAO-A活性より高く、MAO-A/-Bの比は逆転していた。

系統間の差についてはマウスのみNMRIとC-57 b1間で、また生理的加齢による変化についてはマウスとラットについて検討したが、その詳細についてはMPTPの代謝との関係において後述する。

4. MAO-Bの活性がMPTP代謝(脱水素化)のための律速段階となり得るか? ³⁾

MPTPは脳に取り込まれると、グリア細胞のMAO-Bによって酸化され、1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)になることが知られている。生成したMPP⁺はドパミン取り込み部位から能動的にドパミン性神経細胞に取り込まれ、選択的な神経毒性を示すので、ドパミン取り込み速度を測定することによりMPP⁺の取り込み量を十分説明することが可能である。本研究ではMAO-B活性のバリエーションがMPTPの神経毒性にどのように関わってくるかについて、それぞれの条件下のMAO-B活性を直接測定し、ドパミン取り込み速度の測定値を指標にして検討した。

1) デプレニルによるMAO-B活性の抑制とMPTPによるドパミン取り込み速度の変化

C-57 b1およびNMRI雄性マウス(12週齢)による検討: MPTPを50 mg/kg i.p.投与12時間前に、MAO-Bの選択的抑制薬デプレニル(0.02-5.0 mg/kg)をC-57 b1マウスに一回腹腔内投与し、線条体におけるMAO-B活性の抑制の程度とMPTPによるドパミン取り込み速度変化の関係を検討した。その結果、MAO-B活性抑制の程度が低い場合、MPTPによる毒性を有意に軽減しなかった。しかし、MAO-B活性の抑制の程度が40%を越えると、ドパミン取り込み速度が上昇し始め、約60%のMAO-B活性の抑制ではMPTPによるドパミン取り込み速度の減少を完全に防ぐことができた。また、NMRIマウスにおいてもほぼ同様の結果が観察された。

2) 生理的加齢による検討

C-57 b1, NMRIマウスおよびSprague Dowleyラットの線条体におけるMAO-B活性は加齢に伴い上昇し、特に生後10日と3週目の間に大きな増加が認められた。このことから両マウスにおける加齢に伴うMAO-Bの活性の上昇はMPTPによるドパミン取り込み速度を減少させることが示唆された。ラットでこのような関係は認められなかった。しかし、MAO-Bはドパミン・シナプトゾーム外膜に局在しているため、加齢に伴うMAO-B活性の上昇はドパミンが再取り込みされる(われわれの実験からドパミン取り込みも加齢により上昇することが認められている。)過

Fig. 3

MAO-B activities with increasing age in the brains of rat and two strains mice and reduction of striatal DA uptake rates produced by MPTP (50 mg/kg, i.p.)

程で過酸化水素の生成を促進し、OHラジカルの反応性を高めている可能性がある(Fig. 3)。これら結果と1)のデータからは、MPTPの神経毒性の発現にMAO-Bの活性は必要ではあるが、MAO-BはMPTPのMPP⁺への変換のための律速酵素とはなり得ないことが示唆された。

一方、線条体におけるMAO-Aの活性の変化は、10日、3週、12週齢においてC-57 b1, NMRIマウスおよびSprague Dowleyラットでいずれも大きな変動は認められなかったが、40週齢のマウスではC-57 b1で40%, NMRIで60%の減少が認められた。ドパミン・シナプトゾームはおもにMAO-A型を含んでいるため、老齢化によるMAO-Aの減少は過酸化水素の生成を抑え、OHラジカルの発生を低下させることが考えられ、老齢におけるこの作用は、MAO-Bのそれとは相反する方向に働くのではないかと推測される。しかし、ラットの場合には、加齢に伴うMAO-Aの活性に有意な変化はなかった。

5. N-tele-メチルヒスタミンの代謝

ヒスタミン・ニューロン内において、ヒスタミンはヒスタミンN-メチル基転位化酵素によりN-tele-メチルヒスタミンとなるが、これがMAO-Bにより1-methyl-4-imidazole acetic acidに代謝される。本研究では、ヒスタミンの遊離と合成を調節するpresynaptic autoreceptor・H3受容体の特異的アゴニスト・ α -メチルヒスタミン⁴⁾とアンタゴニスト・チオペラミド⁵⁾がMAO活性にどのような影響をおよぼすかについて検討した。その結果、N-tele-メチルヒスタミンのN-tele-メチルイミダゾール酢酸への変換は、チオペラミドによって競合的に抑制された。また、この結果とは対照的に α -メチルヒスタミンのMAO-Aおよび-Bに対する抑制効果は僅かなものであった⁶⁾。

6. クロルフェニラミンのMAOによる酸化的脱アミノ化の立体選択性

われわれはこれまでにクロルフェニラミンのラットにおける体内動態において⁷⁾、血漿タンパク質への結合やラット肝CYP2C11によるN-脱メチル化にキラル識別があることを見いだした。MAOは基質として第一級モノアミンや第二級および第三級モノアミン類を代謝することから、クロルフェニラミンはMAOの基質になり得る可能性が十分にある。しかも、この薬物は脳への移行性が大

きく、モノアミン代謝へも影響をおよぼすが、その作用には立体特異性があることを報告してきた^{8,9)}。本研究ではラット脳ミトコンドリア分画を調製し、クロルフェニラミンのMAOによる代謝を検討した。その結果、クロルフェニラミンは脳内モノアミン酸化酵素により酸化的に脱アミノ化されることが認められた。しかし、アルデヒド体の生成はd-体とl-体との間に有意な差が見られなかった。さらに、クロルジリンおよびデプレニルによる抑制作用を検討したところ、デプレニルによっては完全に脱アミノ化がd-体、l-体とも抑えられた。しかし、クロルジリンの添加によりd-体の酸化反応は約50%抑制されたが、l-体の場合、その阻害効果はほとんど認められなかった。

以上のように、中枢性ミトコンドリアMAOによるアミン代謝と基質選択性について検討したが、MAOはうつ病、パーキンソン病など様々な精神神経疾患の発症と深く関わっており、現在ほさらに、銅およびピリドキサルリン酸を補酵素とする血漿MAO^{10,11)}と脳MAOとの関連性を明らかにしながら、病態解明に役立てて行きたいと考えている。

Abstract We studied the metabolism of amines by mitochondrial monoamine oxidase (MAO) and substrate selectivity in mammalian brain. The following conclusions were obtained. 1) The regional distribution of MAO-B in human brain by autoradiographical use of ¹¹C-L-deprenyl was high in the caudate nucleus, putamen, thalamus, substantia nigra. The half-life for the turnover rate of MAO-B in pig brain by positron emission tomography using ¹¹C-L-deprenyl was calculated to be 6.5 days. 2) Relation between serotonin and dopamine uptake rates, monoamine concentrations and MAO activities were estimated in various regions of rat brain. Of main interest is the finding that MAO activities in general (conventional method) were positively correlated to serotonin uptake rates and to intra-5-HT-synaptosomal MAO, but not to dopamine uptake rates or intra-DA-synaptosomal MAO activities. 3) An inhibition of MAO-B of more than 40 % was required to reduce the MPTP toxicity and it was completely prevented at about 60 % MAO inhibition. Moreover, although MPTP toxicity in relation to age, dopamine uptake and MAO activity was investigated in two rodent species, MAO-B activity was not the rate-limiting step for MPTP neurotoxicity. 4) Histamine H₃-ligands inhibited the conversion of N-tele-methylhistamine to N-tele-methylimidazoleacetic acid by MAO-B in the rat brain. 5) The oxidation of racemic chlorpheniramine was catalyzed by mitochondrial MAO of rat brain. Moreover, there was a stereoselective difference in oxidative deamination of chlorpheniramine by MAO-A and -B.

References 1) E. Sakurai, S. Yamasaki, H. Niwa, S.S. Jossan, J. Hallmann, L. Oreland, *Biogenic Amines*, 7, 1-10 (1990). 2) S.S. Jossan, E. Sakurai, L. Oreland, *Pharmacol. Toxicol.* 64, 314-318 (1989). 3) S.S. Jossan, E. Sakurai, L. Oreland, *Biogenic Amines*, 4, 371-379 (1987). 4) S. Yamasaki, E. Sakurai, N. Hikichi, N. Sakai, K. Maeyama, T. Watanabe, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 371-374 (1994). 5) E. Sakurai, E. Gunji, Y. Iizuka, N. Hikichi, K. Maeyama, T. Watanabe, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 209-212 (1994). 6) E. Sakurai, E. H. Sakurai, K. Maeyama, T. Watanabe, S.S. Jossan, L. Oreland, *Biochem. Pharmacol.*, in press (1994). 7) E. Sakurai, S. Yamasaki, Y. Iizuka, N. Hikichi, H. Niwa, *J. Pharm. Pharmacol.*, 44, 44-47 (1991). 8) E. Sakurai, S. Yamasaki, N. Hikichi, K. Onodera, *Jpn. J. Psychopharmacol.*, 11, 237-244 (1991). 9) E. Sakurai, S. Yamasaki, N. Hikichi, K. Onodera, *Tohoku J. Exp. Med.*, 163, 239-244 (1991). 10) J. Hallman, E. Sakurai, L. Oreland, *Acta Psychiatr. Scand.* 81, 73-77, 1990. 11) E. Sakurai, E. Gunji, Y. Iizuka, N. Hikichi, K. Maeyama, T. Watanabe, *J. Pharmacol. Methods*, 29, 105-109 (1993).