— 原 著 —

ラット肝臓 Monoamine oxidase の性質の検討, ならびに鉄欠乏に伴う活性度の変化について*

恩田 圭司

日本医科大学第2生化学教室 (主任: 吉野芳夫教授)

Characterization of rat liver monoamine oxidase and the alteration of their activities in iron deficiency

Keiji Onda

The Second Department of Biochemistry (Chief: Prof. Yoshio Yoshino),
Nippon Medical School

In order to clarify the interrelationship between the monoamine oxidase (MAO) and iron deficiency anemia, the author has performed the following experiments. Sixty Wistar rats, weighing 50 g were divided into sixteen groups. Seven groups were fed on an iron deficient diet (ID). The remaining eight groups were fed on normal diet (C). The last one group was sacrificed at the onset of the experiment and the following biochemical studies were carried out. ① MAO-A and MAO-B activity of the liver mitochondria. ② Concentrations of liver ferritin and DNA. ③ Hb concentration and Ht value. ④ Body weight and liver weight. The studies were performed at the initiation, 2, 4, 6, 7, 8, 10 and 15 weeks. Moreover, the MAO-B was purified from the control group and the molecular weight and iron atoms per molecule were determined. The results obtained were as follows: ① There was no significant difference in body weight, liver weight, and DNA density concentration during the entire course of the experiment in ID and C groups. ② The significant lowered concentrations of liver ferritin and Hb, and Ht value were encountered at 2, 4, 7 weeks in ID group ($p < 0.05$) in comparison with C group. ③ The alteration of the MAO activity was similar in ID and C groups. Moreover, MAO-A activity pattern was similar to that of the MAO-B activity pattern as well. The elevation of activity was encountered at 4 week and the lowest value was seen at 6 week and again the reelevation of value was seen at 8 week. ④ To clarify the further detailed interrelationship between MAO activity and iron deficiency, determination of the MAO activity (activity value of iron deficiency/respective control) has been performed in MAO-A and MAO-B in respective week. The MAO-A activity disclosed concaved pattern, while, the MAO-B activity disclosed convexed pattern. ⑤ The molecular weight of the MAO-B which was obtained from the gel filtration with Sepharose 6 B was 75,000 and that from SDS electrophoresis was 72,000 respectively. The iron content was determined 3 atoms per one molecule. Based on the observations, the MAO activity was influenced by iron deficiency of the rats. Moreover, the activity ratio pattern may be influenced by the inhibitory metabolic factors which compensate the effect of the iron deficiency.

Key words: monoamine oxidase, rat liver, mitochondria, iron deficiency

---

Present address: The Second Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

緒 言

monoamine oxidase (MAO) は、酸素と水の存在下にて生体内 monoamine 類の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素で、その化学反応式は以下のごとくである。

この酵素は、生体内各組織のミトコンドリア外膜に固着しており¹⁾、脂質を含有しているため²⁻⁵⁾精製の困難な酵素¹⁾の一つであるが、セロトニン、ノルエピネフリンなどの生理活性アミンの代謝に関与しているため^{1,6,7)}、生化学的¹⁾に、あるいは薬理的⁸⁾に興味を集めている。

ところで、鉄欠乏小児は時として刺激に過敏 (irritable) であるが、その症状は専門家の観察によると、鉄剤治療から1週間後には回復する場合がある。それは Hb 回復よりも時期がかなり先行するという記載もあり、中等度の鉄欠乏小児では注意力の散漫を起こすという報告もある。鉄欠乏患者に見られる以上の臨床症状は刺激感受性の亢進と考えられるが、その機序として、鉄欠乏に起因する MAO 活性の低下が、neural mediator の崩壊速度を抑制することによってその細胞内濃度を維持させ、興奮性を高めるように影響するのではないかという考察が行われている⁹⁾。文献的にも、貧血患者の血小板 MAO 活性は正常人に比して低いという報告¹⁰⁾、および鉄欠乏飼育ラットの MAO 活性低下を報告した論文¹¹⁾も見られている。しかしながら、MAO の鉄依存性を強く否定する論文¹²⁾もまた発表されている。生体内の鉄欠乏が MAO 活性に及ぼす影響に関しては、いまだ統一された見解がなされていない。そこで、著者はラットを実験動物として、鉄欠乏飼料を投与し、飼育期間中における肝臓 MAO 活性の変化を観察し、生体内鉄欠乏の MAO 活性への影響を検討した。なお現在までのところ、MAO は基質反応性の違い、および阻害剤による阻害効果の違いから、MAO-A と MAO-B の2種類の酵素に分類されているため¹⁾、著者は肝臓内の MAO-A、MAO-B の両酵素の活性を測定した。また飼育期間中の生体内鉄欠乏の指標として、血液の hemoglobin (Hb)、および hematocrit (Ht) の変動と、体内貯蔵鉄量の指標として肝臓 ferritin 濃度の変動を観察した。鉄欠乏だけの原因による MAO 活性の変動を検討するのが本研究の目的であるが、飼育実験の性格上、鉄欠乏食投与による全身栄養障害の結果に起因する2次的な MAO 活性変動を区別する必要がある。このため、

著者は肝臓 DNA 量をも測定し、栄養障害による肝臓細胞数変動の有無をも検討した。

また、対照群として飼育した正常食投与ラットの一部を用いて、MAO の精製および分子量決定を試みた。

実験材料および方法

(1) 実験材料

1) 実験動物

本研究には 60 匹の Wistar 系ラットを使用した。このうち 45 匹を飼育実験に用い、15 匹を MAO 精製および分子量決定に用いた。実験に用いたすべてのラットは離乳期 (体重約 50 g) のものを日本ラットより購入した。

2) 試薬

Sephacrose 6B は Pharmacia 社製、Agar は Difco 社製、Agarose は Hoechst 社製、ATP、Calcium phosphate gel はシグマ社製、MAO-A Test WAKO、MAO-B Test WAKO、Hb Test WAKO は和光純薬工業製、trypsin (bovine pancreas) は Biochemicals 社製をそれぞれ購入し使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

(2) 実験方法

1) 飼育実験の方法および測定実験期日

飼育実験に用いた 45 匹のラットは、1 週間の予備飼育の後に、飼育実験を開始した。まず、各群のラット体重平均値がほぼ一定となるように、各群 3 匹ずつの群を 15 作り、この 15 群を別個のアルミニウム製飼育箱に入れた。各群とも日照時間、飼育箱内温度、その他の環境条件を一定とするようにした。15 群のうちの 1 群は、飼育実験開始日に第 0 週飼育ラット群として測定実験に用いた。残りの 14 群のうち 7 群は鉄欠乏食にて飼育し、7 群は正常食にて飼育を行った。鉄欠乏食はオリエンタル酵母社製の鉄欠乏食 (オリエンタル酵母製、5.5 μg Fe/g の含鉄量¹³⁾) に蒸留水 (100 g 当たり 50 ml) を加えて塊状に調製した。それに対して、鉄欠乏食に硫酸第 1 鉄 650 mg/kg を添加した飼料を正常食とした。実験開始後、2, 4, 6, 7, 8, 10, 15 週経過後の各時点を測定実験期日とし、各測定実験期日には、鉄欠乏食飼育ラット (鉄欠乏群) および正常食飼育ラット (対照群) より任意に各 1 群ずつを選び測定実験に用いた。測定実験に選ばれた各群のラットは、実験当日午前 10 時にエーテル麻酔下に体重測定後、腹大動脈より採血し脱血死させた。次いで肝臓を素早く摘出し、肝重量測定後、各測定実験を行った。

なお、飼育期間中、各群とも飲料水および飼料を任意に摂取させた。

2) ミトコンドリア分画の分離

ミトコンドリア外膜酵素である MAO 活性測定のために、まず摘出肝臓を用いてミトコンドリア分画の分離を行った¹⁴⁾。すなわち、3 g の肝臓組織を 15 ml の 0.25 M ショ糖溶液に加え、Waring blender にて homogenize した後、4°C、2,500 g、10 分間の遠心を 2 回繰り返し、その上清をさらに 4°C、10,000 g、10 分間遠心し、その沈渣を 5 倍量 (v/w) の 0.25 M ショ糖溶液に懸濁した。この懸濁液をミトコンドリア原液とした。

3) Hb の測定¹⁵⁾

ラットの腹大動脈より採取した血液を使用し、シアンメトヘモグロビン法にて測定した。

4) Ht の測定

ラットより採取した血液を毛細管遠沈法にて、10,000 g、15 分間遠心し測定した。

5) 肝臓 ferritin の測定^{16,17)}

ferritin の蛋白質濃度の測定には、Laurell¹⁸⁾ のロケット免疫電気泳動法の変法を用いた。すなわち、ラット肝臓 5~10 g を 2 倍量の蒸留水とともに homogenize し、その homogenate を 3,000 rpm、15 分間遠心分離し、上清を分離してその体積を測定し検体とした。さらに 2% sodium azide を加えて、4°C にて保存した。また電気浸透の少ないアガロースを支持体として用い、イオン強度 0.025 パルビタール緩衝液 pH 8.6 にて溶解した 1.2% アガロース溶液 12.8 ml に抗ラット肝臓 ferritin ウサギ血清 10 μ l を 56°C にて加え攪拌したものにて、平板ゲル (125×85 mm) を作製した。この平板ゲルに ϕ 2 mm の小窩を作り、この小窩中に検体を入れ、イオン強度 0.05 のパルビタール緩衝液 pH 8.6 を電極液として 2 mA/cm の定電流で 4 時間泳動した。泳動後単峰状を形成する免疫沈降反応生成物の先端までの距離を測定した。あらかじめ濃度既知のラット肝臓 ferritin を同時に泳動して検量曲線を作製し、この曲線に基づいて蛋白濃度を決定した。

6) DNA の測定

肝臓 DNA 測定には 0.2 g 肝臓組織を用いて、Kissane and Robins の方法¹⁹⁾に従い蛍光法にて測定した。肝臓組織を homogenize して 0.2 ml の細胞浮遊液に 0.6 N トリクロロ酢酸 0.2 ml を氷冷下で加え、4°C、20,000 g、20 分間遠心後上清を除去した。得

られた沈渣に 0.1 N 酢酸カリウム含有エタノール 6 ml を加えて混和後、氷中に 10 分間放置した。同様に遠心分離を行って、上清を除去した後、沈渣にエタノール 6.0 ml をさらに加えて、遠心洗浄を繰り返しデシケータ内で減圧乾燥させた。乾燥後 40% 3, 5-diaminobenzoic acid (DABA) を 0.1 ml 加え 60°C、30 分間加熱し、冷却後 4 ml の 0.6 N 過塩素酸を加え遠心後、上清を蛍光測定した。標準試料としては子ウシ胸腺 DNA を用いた。

7) ミトコンドリアの蛋白量の決定

ミトコンドリアの蛋白量は Lowry ら²⁰⁾の方法に従い BSA を基準として決定した。

8) MAO 活性の測定

肝臓ミトコンドリアの MAO-A 活性の測定には MAO-A Test WAKO、MAO-B 活性の測定には MAO-B Test WAKO を用いた。本測定法²¹⁻²³⁾は血清用に開発されたものであるが、著者はこれを肝臓ミトコンドリア MAO 活性測定に用いた。

MAO-A 活性の測定に際し、ミトコンドリア原液の 5, 10, 20 倍希釈液 0.5 ml を使用し、ベンジルアミン誘導体を基質とし、37°C、60 分間、incubate して生成したベンズアルデヒドの吸光度を測定した。標準としてアルデヒド体を使用した。なお、酵素として用いたミトコンドリア 1.0 mg 当たり、上記の条件下で生成される p-ベンズアルデヒド μ mol 数を酵素単位として表現した。

同様に MAO-B 活性測定には m-ニトロベンジルアミンを含む基質溶液に検体を加え、37°C、1 時間、incubate し、m-ニトロベンズアルデヒドの生成を反応目標とした。一定時間後に 2,4 ジニトロフェニルヒドラジンを含む発色試薬 A を加えると酵素反応は停止するとともに、生成したアルデヒドは 2,4 ジニトロフェニルヒドラジンと反応してヒドラゾンを形成するので、1.5 N 水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にした後、酢酸イソプロピルを加え抽出する。この抽出液に発色試薬を加えると赤色を呈する。この色を 505 nm にて測定し、MAO-B の吸光度を求める。単位はミトコンドリア 1.0 mg を用い、37°C、1 時間で n-ニトロベンズアルデヒドを 1 μ mol 生成する時、1 酵素単位と表現した。

9) MAO の精製および分子量決定²⁴⁻²⁶⁾

ミトコンドリア MAO の精製は McCauley らの方法を一部修正して行った。

ミトコンドリア分画をさらに 10,000 g で 10 分間遠

心し、その沈渣をラット1匹の肝臓当たり 7.5 ml の 10 mM Tris/phosphate buffer (pH 7.5) に懸濁させ 10 分間静置する。さらに、4 mM ATP, 4 mM MgSO₄ を含む 1.8 M ショ糖液 2.5 ml を懸濁液に加え、10 分間静置後、15 秒間 3 A の電流で超音波破碎する。超音波処理後の懸濁液を 1.2 M ショ糖溶液上に重層し、78,000 g で 3 時間遠心してミトコンドリア外膜を得た。その外膜を 1% sodium cholate, 0.4 M 塩化ナトリウム, 1 mM benzylamine 塩酸を含む 50 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5) にて、4°C, 30 分間可溶化させた。次いで 78,000 g, 30 分間遠心して得られた上清液を 50 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5, 1 mM benzylamine 塩酸を含む) に対して一晩透析した。その後、Triton X-100 を終濃度が 0.5% となるように加え、さらに 2 mg/mg-protein の calcium phosphate gel を加えて 4°C, 10 分間可溶化した。その後 3,000 g, 10 分間の遠心により得られる上清液に 0.1 mg の bovine pancreatic trypsin/mg-protein を加えてさらに 37°C で 20 分間可溶化した後、1% sodium cholate を含む緩衝液で平衡化した Sepharose 6 B カラム (2.5×40 cm) にてゲルろ過を行った。その溶出液の蛋白質は 280 nm における吸光度および MAO-A, MAO-B 活性を測定した。MAO 活性を有する分画を集め、20 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して一晩透析した後、濃縮し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。分子量決定のマーカーとしては耐熱性 RNA ポリメラーゼ B を用いた。また Catalase (m.w. 240,000), Bovine serum albumin (m.w. 68,000), Cytochrome C (m.w. 12,500) をマーカーとしてゲルろ過法による分子量測定も同時に実施した。

10) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

0.1% SDS を含む 5.0% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (0.5×8 cm) を用い Weber ら²²⁾の方法に従って行った。

結 果

1. 体重および肝重量の変動

鉄欠乏群および対照群の体重および肝臓重量の変動を Fig. 1 に示した。実験期間中の発育は両者ともに順調で、両者間に有意差は認められなかった。

2. Hb の推移

Fig. 1 Growth curves of body weight and liver weight in iron deficient rats and supplemented rats
○---○: Body weight of iron supplemented rats (n=3), ●---●: Body weight of iron deficient rats (n=3), △---△: Liver weight of iron supplemented rats (n=3), ▲---▲: Liver weight of iron deficient rats (n=3)

Fig. 2 Alteration of hemoglobin concentrations in rats fed on iron deficient diet and the control
○---○: Iron supplemented rats (n=3), ●---●: Iron deficient rats (n=3)

Hb の推移を Fig. 2 に示した。実験開始後、第 4 週から鉄欠乏群は対照群に比し有意に Hb 減少を示し ($p < 0.05$), 以後、この有意の減少は実験期間中持続した。

3. Ht の推移

Ht の推移を Fig. 3 に示した。実験開始後、両群とも Ht の低下傾向を示したが、鉄欠乏群ではより著明な低下を示し、7 週以後では鉄欠乏群の Ht は対照群のそれに比し有意 ($p < 0.05$) の低下を示した。

Fig. 3 Alteration of hematocrit values in rats fed on iron deficient diet and the control

○---○: Iron supplemented rats (n=3),
●---●: Iron deficient rats (n=3)

4. 肝臓 ferritin 濃度の推移

肝臓 ferritin 濃度の推移を Fig. 4 に示した。鉄欠乏群では、飼育開始後肝臓フェリチンは低下傾向を示し、第2週から鉄欠乏群は対照群に比し有意 ($p < 0.05$) の低値となった。第7週では鉄欠乏群は測定不能となり、以後この低値が持続した。これに比して対照群の肝臓 ferritin は実験開始後増加傾向を示し、第6週に 0.8 mg/g-肝臓と最高値を示した後、緩やかな減少を示し、第15週には 0.4 mg/g-肝臓に至った。

Fig. 4 Alteration of rat liver ferritin contents in rats fed on iron deficient diet and the control

○---○: Iron supplemented rats (n=3),
●---●: Iron deficient rats (n=3)

5. 肝臓 DNA 濃度の変動

肝臓 DNA 濃度の推移は鉄欠乏群、対照群とほぼ同様の傾向を示した (Fig. 5)。

Fig. 5 Alteration of rat liver DNA contents in rats fed on iron deficient diet and the control

○---○: Iron supplemented rats (n=3),
●---●: Iron deficient rats (n=3)

すなわち、実験開始時の肝臓 DNA 濃度は両群とも 2.5 mg/g-肝臓であったのに対し、15 週飼育の時点では両群とも肝臓 DNA 濃度は 2.0 mg/g-肝臓となり、この間肝臓 DNA 濃度は緩慢な減少を示した。また飼育期間中のどの時点においても両群の肝臓 DNA 濃度間に有意差は認められなかった。

6. 肝臓 MAO 活性の変動

(1) MAO-A 活性

肝臓 MAO-A 活性は、鉄欠乏群、対照群ともほぼ同様の動きを示した (Fig. 6)。すなわち、実験開始から第4週にかけて増加傾向をみせ、特に第4週では両群とも、171.47 U/mg-protein, 227.48 U/mg-protein の最高値を示した後、肝臓 MAO-A 活性は急減し、第6週では鉄欠乏群の 25.78 U/mg-protein, 第7週の対照群の 39.45 U/mg-protein となった。この値は両群とも飼育期間を通じて最低値である。その後、両群の肝臓 MAO-A 活性は第8週まで増加を示した後、ともに活性値は横ばい状態となった。つまり肝臓 MAO-A 活性は実験開始後第4週で最高値を示した後、第6, 7 週に最低値を示す変動の大きなパターンを示した。

(2) MAO-B 活性

肝臓 MAO-B 活性も、鉄欠乏群、対照群ともほぼ同様の動きを示した (Fig. 7)。すなわち実験開始から第4週にかけて増加傾向を示した後、第6週で最低値に至るまで急減し、さらに第8週まで急増し、第10

Fig. 6 Alteration of rat liver mitochondrial MAO-A activity in rats fed on iron deficient diet and the control
 ○---○: Iron supplemented rats (n=3), ●—●: Iron deficient rats (n=3)
 MAO-A U/mg mitochondria/h at 37°C: 1 mμmol of p-benzaldehyde-azo-β-naphthol are produced from benzylamine derivatives.

Fig. 7 Alteration of rat liver mitochondrial MAO-B activity in rats fed on iron deficient diet and the control
 ○---○: Iron supplemented rats (n=3), ●—●: Iron deficient rats (n=3)
 MAO-B U/mg mitochondria/h at 37°C: 1 mμmol of m-nitrobenzaldehyde are produced from m-nitrobenzylamine.

週には再度減少を示し、第 15 週まで横ばいを示すという複雑なパターンとなった。第 6 週で最低値を示し、第 4, 8 週で高値を示すパターンは肝臓 MAO-A 活性変動と同様であった。さらに肝臓 MAO-B 活性は最低値 88.36 U/mg-protein から最高値 573.2 U/mg-protein の範囲で変動を示していた。一方、MAO-A 活性値は 15.8 U/mg-protein から 227.48 U/mg-protein の範囲で変動を示しており、全体的に MAO-B 活性のほうが高い数値を示した。

(3) 鉄欠乏群 MAO 活性/対照群 MAO 活性

鉄欠乏群と対照群の MAO 活性の差異を明らかにするために、分子に鉄欠乏群 MAO 活性平均値を、分母に対照群 MAO 活性平均値をそれぞれ対応する週で取り、その比を取ることで MAO-A および MAO-B の活性比率を検討した (Fig. 8)。

その結果、MAO-A 活性比に関しては飼育第 2 週で 2.5 倍であったが、第 7～10 週にかけて 1.0 倍以下を示した後、第 15 週に再度 1.5 倍まで上昇を示すという揺鉢型のパターンを示した。この低値を示した第 7, 8, 10 週の MAO-A 比の平均値を、第 2, 4, 6, 15 週の MAO-A 比の平均値と比較すると、前者は後者に対して有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。これに対し、MAO-B 活性比は第 2, 4, 6, 10, 15 週は約 1.0 を示したのに対し、第 7, 8 週では約 1.7 とやや高値を示し、山型のパターンを示した。すなわち、MAO-A 活性比では揺鉢型のパターンを示したのに対し、MAO-B 活性比では山型のパターンと逆の傾向を示した。

7. MAO-B の性質

trypsin 処理した MAO を Sepharose 6B でゲルろ過した時の溶出曲線を Fig. 9 に示した。得られた MAO 分画は MAO-B 活性が 583.3 U/mg-protein であった。MAO-A 活性はほとんど認められなかった。ゲルろ過から推定した MAO-B の分子量は 75,000、SDS 電気泳動で決定した分子量は 72,000 であった。また蛋白 1 mg 当たりの鉄含量は 2.3 μg であったので、得られた MAO-B は 1 分子当たり 3 原子の鉄を含むと測定された。

考 察

MAO は、生理活性アミンの代謝に関与しているため^{1,6,7)}、生化学的¹⁾のみならず薬理的⁶⁾にも関心を持たれる酵素であり、食餌鉄と MAO 活性の関連についても若干の報告がすでになされている。実験動物に投与する飼料中の含鉄量に応じて MAO 活性が変化を示すという結果を最初に報告したのは Symes ら (1971)¹¹⁾ である。彼らは [¹⁴C] で標識した monoamine (n-amylamine) を腹腔内投与し、呼気中の [¹⁴C]CO₂ を定量した。この場合には [¹⁴C]CO₂ 排出量は実験動物 (SD ラット) の MAO 活性に依存す

Fig. 8 Activity ratio of mitochondrial MAO-A and MAO-B in rat liver, the iron deficiency vs. the control

○—○ : MAO-A activity ratio, ●---● : MAO-B activity ratio

Fig. 9 The elution pattern of gel filtration on Sepharose 6 B for the solubilized mitochondrial membrane by trypsin treatment

●—● : protein, ○—○ : MAO-B activity

る。その結果、3 週間の鉄欠乏食投与で、MAO 活性は対照群の 60% にまで低下をきたし、鉄欠乏食ラットに鉄負荷を始めると 9 日目に対照群と同程度まで回復したと報告している。また、Youdim らは貧血患者の血小板 MAO 活性は、正常人の血小板 MAO 活性

よりも低値であることを報告している¹⁰⁾。以上二つの報告より、in vivo における鉄欠乏が生体内 MAO 活性に影響を与える可能性が示唆されたので、著者は体内鉄量の変動が MAO 活性に及ぼす影響を検討するためにこの実験を施行した。今回著者が材料として離

乳期雄性ラットを選んだ理由は、①成熟ラットでは鉄欠乏を発症させるににくいこと。②雌性ラットの場合には思春期を過ぎると性周期による内分泌変動が著明となり、内分泌変動が MAO 活性に影響を与える可能性の強いこと¹⁾。以上2点を考慮したからである。基質特異性の相違、および阻害剤感受性の違いから、現在のところ MAO は MAO-A および MAO-B の2種類に分けられており^{2,28)}、肝臓は MAO-A と MAO-B を50% ずつ含む組織とされている¹⁾。今回著者は、MAO-A と MAO-B のいずれが鉄欠乏の影響を受けやすいかを検討するために MAO-A と MAO-B を同等に含むとされている肝臓を材料として選んだ。

今回の飼育実験結果のうち、体重、肝臓重量、肝臓 DNA 量の飼育期間中の推移をみると、鉄欠乏群と対照群の間に著明な差異は認められていない。これらの結果は鉄欠乏食投与が体重、肝臓重量、あるいは肝臓 DNA 濃度に影響を与える程度のもではなかったと解釈できる。つまり著者は Hb 濃度または肝臓 ferritin 濃度から認められる鉄欠乏症の発現は確認されるが、しかしその他の栄養状態の指標には群間の相違をきたさない状態において、MAO 活性の変動を検討することを計画した。

今回の実験では、鉄欠乏群および対照群の鉄栄養状態の指標として、Hb, Ht, 肝臓 ferritin 濃度を測定した。このうち、貯蔵鉄の指標と考えられている肝臓 ferritin に関しては、実験開始後速やかに、鉄欠乏群と対照に差異が認められた。しかし Ht に関しては、両群間の差異が明らかとなったのは実験開始後7週からであり、しかも Ht 曲線の推移をみると、鉄欠乏群と同様に対照群も飼育週数の延長に従って低下をきたしている。この結果より考えると、対照群の鉄負荷量(硫酸第1鉄として 650 mg/kg を鉄欠乏食に負荷)はやや少量であったかも知れない。しかし、肝臓 ferritin 濃度の結果からみると、実験開始2週の時点で鉄欠乏群はすでに対照群に比し鉄欠乏が発症し始めていると考えて差し支えないであろう。

飼育実験期間中の MAO 活性パターンは、鉄欠乏群および対照群とも類似していた。また MAO-A 活性パターンは、MAO-B 活性のパターンと類似していた。すなわち、飼育実験開始後4週まで活性値は増加を続けた後、急減をきたし、6~7週にかけて最低値をきたし、さらに8週には増加を示すという複雑な型を示した。この MAO 活性変動パターンは鉄欠乏群のみならず、対照群にも認められたことから、鉄欠乏食

投与により特徴ある変動パターンとなったとは考えにくい。動物飼育室の環境(日照時間および温度、飼育箱内のラット数)はほぼ同様で、臓器摘出操作および測定条件も同一であることから、飼育週数に伴う MAO 活性の複雑な変化は、生理的な変動であろうと示唆される。すなわち、今回の実験で著者は、50 g の雄ラットを1週間の予備飼育を経過した後、15週間にわたり飼育実験を試みた。つまり生後4~19週までの雄ラットの MAO 活性の変動を観察したことになる。ラットの思春期は生後8週といわれていることから²⁹⁾、今回の実験期間中に、著者が研究材料とした雄ラットは成長期、思春期、成熟期を経過している。今回の実験結果では MAO 活性変動パターンは、MAO-A, MAO-B とともに、また鉄欠乏群、対照群が互いに類似した複雑な変化を示したが、これらの変動の原因としてラットの発育に伴う生理的な要素が大きく関与していたと考えられる。鉄欠乏が MAO 活性に与える影響を観察する目的で、MAO 活性比(鉄欠乏群 MAO 活性平均値/対照群 MAO 活性平均値)を取り、実験期間の変動を検討した。その結果 MAO-A 活性比の変動パターンは描鉢型となった。すなわち MAO-A では、飼育開始後2週の値が2.5で、第8週は0.58、第15週は1.63であった。これに対し MAO-B 活性比では第2週の値が0.87、第7週は1.58、第15週は0.93と山型の型であった。

飼育開始期には MAO 活性比は1.0であると考えられるので、MAO-A 活性は鉄欠乏食投与後2週間以内という極めて早い時期に対照群に比して2倍以上に増加をきたしたことになる。この鉄欠乏食投与による MAO 活性の著増という結果は、従来の Symes や Youdim らの結果に反するものとなった。ただし、MAO-A 活性比では第8週に0.58となり、鉄欠乏食投与により MAO-A 活性は低下したといえる。鉄欠乏食投与による MAO-A の変動は、初期(飼育後2週)に活性の増加を、中期(飼育後7~8週)に活性の低下を示すという結果となった。

これに反し、MAO-B 活性比のパターンより、鉄欠乏食投与による MAO-B 活性は、中期(飼育後7~8週)に微増というパターンとなった。血小板 MAO 活性が鉄欠乏によって低下するという報告があり¹⁰⁾、しかも血小板 MAO は MAO-B のみ含有するのが知られているため^{30,31)}、著者は実験前には鉄欠乏食投与により肝臓 MAO-B 活性の低下を予想していたが、今回の実験結果は予想に反するものであった。したがっ

て血小板 MAO 活性の貧血による低下は、肝臓 MAO とは異なった機序によるものと推定される。

以上の結果から、鉄欠乏食投与により肝臓 MAO 活性のうち、特に MAO-A 活性はある程度の影響を受けると認められる。しかしその変動は体内鉄の欠乏の程度に伴って、一定方向に進行するような、いわゆる回帰直線型の単純な代謝形式としては認められなかった。その機序については次のように考えられる。① MAO-A 酵素に対して、鉄イオンが不可欠であるとしても、鉄欠乏の進行に伴う体内鉄の動員に選択性があり、MAO-A の鉄要求はその他の機構が示す鉄要求に優先するために、鉄欠乏の経過に従って、活性値の亢進、低下、そして再度亢進という現象を示すものなのか、または② MAO-A 酵素に鉄を必要とするとしても、その機構は鉄以外の因子によって代償可能であるため、上記のような変動過程を示すものであるのか、などの可能性があるが、さらに検討の必要がある。また Ichinose らはウシ肝臓ミトコンドリア MAO を精製する過程で、MAO 分画の鉄濃度は精製度の上昇に伴って減少するのを認めたために、MAO は鉄依存性でないと報告している¹²⁾。著者の精製結果によると、MAO 分子あたりの鉄原子数は3原子であった。分子レベルにおける鉄の存在が必須のものか否かを追求するには至らなかったが、鉄の存在は否定できないと考えられる。

結 論

離乳期ラットに鉄欠乏食を投与して、鉄欠乏状態における肝臓 MAO-A、および MAO-B 活性の変化を観察した。また同時に正常食投与ラットについても含鉄状態を観察するとともに、肝臓 MAO-A、MAO-B 活性を測定し、MAO 活性比（鉄欠乏群/対照群）を検討した。さらに一部の正常食投与ラット肝臓 MAO の精製単離を試みた。その結果、次のことが明らかにになった。

- 1) 体重および肝臓重量、肝臓 DNA 濃度は鉄欠乏群、対照群間に差を認めなかった。
- 2) 鉄欠乏群の肝臓フェリチンは飼育開始2週から、Hb は第4週から、Ht は第7週から対照群に比して低値を示し ($p < 0.05$)、以後その傾向を持続した。
- 3) 飼育期間中の MAO 活性の変動パターンは、鉄欠乏群、対照群ともに類似していた。また MAO-A と MAO-B の活性パターンは互いに類似したもので

あった。すなわち飼育後第4週まで増加を示した後、第6週に最低値に至るまで急減し、さらに第8週まで増加、以後は横ばいという複雑なものであった。

4) MAO 活性比（鉄欠乏群/対照群）を検討すると、MAO-A では飼育週数に従って播鉢型のパターンをとり、MAO-B では山型のパターンとなった。

5) 精製された MAO-B の分子量は SDS 電気泳動およびゲルろ過法により、72,000 または 75,000 と測定され、分子当たりの鉄原子数は3個であった。

稿を終わるに臨み、直接御指導いただいた第2生化学教室 可世木久幸助手、平井幸彦助手、久安早苗助手、池田由紀研究技術員をはじめとする教室員各位に感謝します。

なお、本論文の要旨は昭和58年、第56回日本生化学大会で発表した。

文 献

- 1) 杵鞭宏育, 上条一也: ミトコンドリア・モノアミン酸化酵素の多様性について。蛋・核・酵, **25**, 1069~1086, 1980.
- 2) Ekstedt, B., and Orelund, L.: Effect of lipid-depletion on the different forms of monoamine oxidase in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 119~124, 1976.
- 3) Fowler, C.J., and Orelund, L.: The effect of lipid-depletion on the kinetic properties of rat liver monoamine oxidase-B. *J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 681~688, 1980.
- 4) Roth, J.A., and Eddy, B.J.: Kinetic properties of membrane bound and triton X-100-solubilized human brain monoamine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 260~266, 1980.
- 5) Naoi, M., and Yagi, K.: Effect of phospholipids on beef heart mitochondrial monoamine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 18~26, 1980.
- 6) Neff, N.H., and Yang, H.Y.: Another look at the monoamine oxidases and the monoamine oxidase inhibitor drugs. *Life Sci.*, **14**, 2061~2074, 1974.
- 7) Hauslay, M.D., and Tripton, K.F.: Multiple forms of monoamine oxidase; Fact and artefact. *Life Sci.*, **19**, 467~477, 1976.
- 8) Horita, A., and Lowe, M.C.: On the extraneuronal nature of cardiac monoamine oxidase in the rat. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 227~242, 1972.
- 9) Dallman, P.R.: Tissue effects of iron deficiency. "Iron in biochemistry and medicine" (Jacobs, A., and Worwood, M. eds.), p. 437~475, Academic Press, New York, 1974.
- 10) Moussa, B.H., Youdim, H.F., Woods, B., Mitchell, D.G., Grahame-Smith, D.G., and Callender, S.: Human platelet monoamine oxidase activity in iron-deficiency anaemia. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **48**, 289~295, 1975.
- 11) Symes, A.L., Missala, K., and Sourkors, T.L.: Iron and riboflavin dependent metabolism of a monoamine in the rat in vivo. *Science*, **174**, 153~155,

- 1971.
- 12) Ichinose, M., Gomes, B., Sanemori, H., and Yasunobu, K.T. : Bovine liver mitochondrial monoamine oxidase is not an iron dependent enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257**, 887~888, 1982.
- 13) 吉野芳夫, 平松芳子, 柳下晃, 寺戸国昭 : 貧血ラットにみられる鉄吸収のこう進について. *栄と食糧*, **24**, 206~210, 1971.
- 14) Johnson, D., Lardy, H., and Schneider, W.C. : Isolation of liver or kidney mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **259**, 176~177, 1948.
- 15) Drabkin, D.L. : Spectroscopy, photometry and spectrophotometry. "Medical Physics", Vol. 2, p. 1039~1089, The Year Book, Chicago, 1950.
- 16) Granick, S. : Structure and physiological function of ferritin. *Physiol. Rev.*, **31**, 489~511, 1951.
- 17) Worwood, M., Aherne, W., Dawkins, S., and Jacobs, A. : The characteristics of ferritin from human tissues, serum and blood cells. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **48**, 441~451, 1975.
- 18) Laurell, L.B. : Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, **15**, 45~53, 1966.
- 19) Kissane, J.M., and Robins, E. : Fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, **233**, 184~188, 1958.
- 20) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
- 21) McEween, C.M., and Harrison, D.C. : Abnormalities of serum monoamine oxidase in chronic congestive heart failure. *J. Lab. Clin. Med.*, **65**, 546~559, 1965.
- 22) 伊藤憲一, 中川潤, 中野博, 芝寿彦, 星加博司 : 肝腺
 維化 (血清モノアミンオキシダーゼによる診断とラシロジエンによる治療). *臨と研*, **48**, 2220~2227, 1971.
- 23) 小野猛, 江藤公喜 : 血清モノアミンオキシダーゼの p-ベンジルアミンアゾーナフトールを基質とする新比色定量法. *臨病理*, **20** (補冊), 73~74, 1972.
- 24) McCauley, R. : Properties of a monoamine oxidase from rat liver mitochondrial outer membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**, 8~13, 1978.
- 25) Martinez, P., and McCauley, R. : Studies on the flavins in rat liver mitochondrial outer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 437~446, 1977.
- 26) McCauley, R. : 7-(¹⁴C) pargyline binding to mitochondrial outer membranes. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2214~2216, 1976.
- 27) Weber, K., and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406~4412, 1969.
- 28) Haug, R.H., and Faulkner, R. : Lipid-protein interactions in the multiple forms of monoamine oxidase, lipases as probes using purified intact rat brain mitochondria. *Mol. Pharmacol.*, **18**, 267~273, 1980.
- 29) 菅野七郎 : 家畜繁殖生理の研究動向とその応用 (7). *畜産の研*, **36**, 924~928, 1982.
- 30) Donnelly, C.H., and Murphy, D.L. : Properties of monoamine oxidase in mouse neuroblastoma NIE-115 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1639~1643, 1976.
- 31) Fowler, C.J., Ekstedt, B., Egashira, T., Kinemuchi, H., and Orelund, L. : The interaction between human platelet monoamine oxidase, its monoamine substrates and oxygen. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 3063~3068, 1979.

(受付: 1984 年 1 月 13 日)