薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
86(6) 479~482 (1966)

UDC 577.158.025:615.785

80. 高木敬次郎, 五味保男^{*1}: モノアミン酸化酵素阻害剤の研究(第3報^{*2})
直鎖脂肪族1級アルコールおよびアミンの作用

Keihiro Takagi and Yasuo Gomi: Studies on Monoamine Oxidase
Inhibitors. III. Action of Aliphatic Primary
Alcohols and Amines.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{*3})

Activities of aliphatic primary alcohols and amines on rat liver monoamine oxidase were investigated. Aliphatic alcohols and amines inhibited monoamine oxidase and, as the number of carbon atoms increased, 50% inhibitory concentration decreased. Comparison of the inhibitory activities of alcohols and amines showed that amines inhibited monoamine oxidase at lower concentration than alcohols having the same number of carbon atoms. Moreover, while the inhibitory action of alcohols was reversible, that of amines was partially irreversible. These results suggest some specific affinity of amines on monoamine oxidase. Some of aliphatic amines were oxidized by monoamine oxidase and a part of their inhibitory action on monoamine oxidase was proved to be the attack of active center of the enzyme, but the inhibitory action of aliphatic alcohols and amines was estimated to be mainly non-competitive.

(Received August 12, 1965)

モノアミン酸化酵素(MAO)は、その活性ならびに基質特異性が、動物種、臓器により異なることから、酵素の単一性についての疑問が持たれ、Blaschko等¹⁾によって、それまでに知られていた adrenaline oxidase,²⁾ tyramine oxidase,³⁾ aliphatic amine oxidase⁴⁾などが同一のMAOであることが指摘された後でも、MAOに関する実験結果は必ずしも一定した値を与えていない。例えば、Alles等⁵⁾は、直鎖脂肪族アミン類を基質とした際の酸化速度と炭素鎖の長さの関係を論じ、ウシ、モルモット、ウサギの肝臓のMAOの間でそれぞれ異なった関係を示すと報告している。この他にも、脂肪族アミンのMAOの基質としての活性を論じた報告がいくつか出されている一方、脂肪族アルコール⁶⁾に酵素阻害作用が報告されているので、本報では、シロネズミ肝臓MAOについての脂肪族アミンの基質および阻害剤としての活性、および脂肪族アルコールの阻害作用を明らかにし、ウシ、モルモット、ウサギなどで報告されたものとの比較、およびアミン、アルコールの間の比較を行なった。

実 験 の 部

実験方法および試験化合物

第1報⁷⁾に記載したシロネズミ肝臓MAO標本を用い、Warburg検圧計によって、pH 7.4, 37.5°におけるO₂消費量を測定した。アミンの酸化の難易は、tyramine HCl (tyr) $1 \times 10^{-2} M$ (tyrが最もよく酸化される濃度)を基質としたときの酸化速度に対する、アミンの酸化速度の百分率で表現した。また阻害活性は、tyr $1 \times 10^{-2} M$ の酸化速度の抑制率で表わし、化合物ごとに2~3濃度について阻害度を測定し、50%阻害濃度をグラフより求めた。試験化合物の阻害作用の可逆性は、次の2方法により検討した。

i) 阻害実験を行なう際と同一組成の反応液を、37.5°, 45 min. incubateし、2容のpH 7.4リン酸ナトリウム緩衝液(以下緩衝液と略)を加えて3000 r.p.m., 30 min. 遠心分離、沈殿をincubateした反応液の3倍量の緩衝

^{*1} Present address: Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine, Kitayobancho, Sendai.

^{*2} 第2報: 本誌, 86, 474 (1966).

^{*3} Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) H. Blaschko, D. Richter, H. Schlossmann: Biochem. J., 31, 2187 (1937).

2) *Idem*: J. Physiol (London), 90, 1 (1937).

3) M. L. C. Hare: Biochem. J., 22, 968 (1928).

4) C. E. M. Pugh, J. H. Quastel: *Ibid.*, 31, 286 (1937).

5) G. A. Alles, E. V. Heegaard: J. Biol. Chem., 147, 487 (1943).

6) H. P. Rang: Brit. J. Pharmacol., 15, 185 (1960).

7) 高木, 五味: 本誌, 82, 1431 (1962).

液に再懸濁して、同一条件で遠心分離する洗浄操作をさらに2回くり返し、得られた沈殿を緩衝液に懸濁して容量を最初と同量に調整して、残存活性を測定し、阻害剤を加えずに同様操作したものを対照として活性度を算出した。

ii) i) と同様に incubate した反応液を、30 倍量の蒸留水に対し、1 夜、冷蔵庫中で透析、透析内液を 3000 r.p.m., 30 min. 遠心分離、沈殿を緩衝液に懸濁し、容量を反応液と同量に調整して、残存活性を測定、i) と同様に活性度を算出した。

試験化合物は $C_1 \sim C_8$ および C_{10} のアルコール、および $C_1 \sim C_6$ のアミン HCl 塩で、いずれも直鎖化合物である。

実験結果

脂肪族アルコール CH_3OH から $C_8H_{17}OH$ までのアルコールを用いた際には、incubate 中に気体の発生があり、開脚側の Brodie 液の上昇を認めたので、各濃度ごとに、基質を加えない対照をとって測定し、補正した。その他のアルコールでは気体の発生も吸収も認められず、endogeneous O_2 consumption にも影響はなかった。

このようにしてアルコールの MAO に対する作用を検討すると、いずれも tyr の酸化を阻害する。アルコールの濃度阻害度曲線は、Fig. 1 に示すように、 $C_1 \sim C_2$ の低級のはきわめて大きい傾斜を有し、他のアルコール

と著しく異なっていた。また C_4 以上のアルコールの傾斜はほぼ 1 であった。Fig. 1 より求めた 50% 阻害濃度は Table I に示すように、炭素数の増加に伴ない低下し、最も弱い CH_3OH では $3.7M$ 、最も強い $C_8H_{17}OH$ では $1.2 \times 10^{-3}M$ であった。

Fig. 1, Table I に示したように、アルコールが MAO を阻害することは明らかとなったが、用いた濃度が比較的高濃度のため、作用の可逆性に疑問がもたれたので、実験方法に記載した2方法により可逆性の検討を行なった。その結果、Table II に示すように、洗浄または透析により活性は完全に回復し、アルコールの MAO 阻害作用は可逆的であることが明らかとなった。低級のアルコールでは、洗浄または透析により、アルコール処理しなかったものより活性が増大し

Fig. 1. Dose-Inhibition Curves of Aliphatic Alcohols

I : methanol II : ethanol III : propanol
IV : butanol V : pentanol VI : hexanol
VII : heptanol VIII : octanol

TABLE I. Activities of Aliphatic Alcohols and Amines as Substrate or Inhibitor of Monoamine Oxidase

R	R-OH 50% Inhibitory concn. (M)	R-NH ₂	
		Max. velocity (tyr=100)	50% Inhibitory concn. (M)
CH ₃	3.7	—	1.1×10^{-1}
C ₂ H ₅	2.1	—	1.0×10^{-1}
C ₃ H ₇	4.4×10^{-1}	—	4.2×10^{-2}
C ₄ H ₉	8.0×10^{-2}	10	2.3×10^{-3}
C ₅ H ₁₁	1.0×10^{-2}	44	—
C ₆ H ₁₃	7.1×10^{-3}	12	9.4×10^{-4}
C ₇ H ₁₅	1.4×10^{-3}	—	—
C ₈ H ₁₇	1.2×10^{-3}	—	—

た。 CH_3OH は阻害を起こさない低濃度 ($2.5M$) で MAO 活性を増大させるが、このことと考えると、低級アルコールは MAO 賦活作用を有しているものと考えられる。

脂肪族アミン 脂肪族アミンは MAO によって酸化された。各濃度ごとに酸化速度を求め、tyr の最大速度 ($1.8 \times 10^{-2}M$) との比を求めたところ Table I に示すように、 $C_6H_{11}NH_2$ ($1.8 \times 10^{-3}M$) が最高で、 C_5 から炭素数の増減に伴ない低下し、 C_3 以下、 C_7 以上では 10% 以下であった。一方、脂肪族アミンは Table I に示すよ

TABLE II. Reversibility of Monoamine Oxidase Inhibition by Aliphatic Alcohols

Alcohol	Treatment	Inhibitory ratio $\pm$ S.E. (%)	
C_2H_5OH		2.0M	
	control	40	
	wash out	5.7 ± 2.7	
	dialysis	-39.7 ± 7.9	
C_4H_9OH		$3.2 \times 10^{-2}M$	$1.0 \times 10^{-1}M$
	control	30.6 ± 7.4	57.1 ± 7.9
	wash out	-8.3 ± 10.9	-21.2 ± 2.1
	dialysis	-4.3 ± 4.4	-23.5 ± 8.1
$C_6H_{11}OH$		$3.2 \times 10^{-3}M$	$3.2 \times 10^{-2}M$
	control	24.4 ± 4.2	72
	wash out	4.2 ± 9.6	8.6 ± 16.4
	dialysis	-1.2 ± 5.2	-7.6 ± 11.4
$C_6H_{13}OH$		$3.2 \times 10^{-3}M$	$1.0 \times 10^{-2}M$
	control	30.2 ± 5.6	57.6 ± 8.0
	wash out	8.5 ± 2.9	1.7 ± 4.3
	dialysis	5.9 ± 6.5	-0.9 ± 13.2

うに, tyr の酸化を阻害した. その阻害濃度は $10^{-1} \sim 10^{-4}M$ であり, 同一炭素数のアルコールよりやや低濃度である. $C_6H_{11}NH_2$ のような tyr にくらべ酸化されがたい基質と tyr とを同時に添加した場合, tyr の酸化が阻害されることは予想され, それぞれの濃度反応曲線から, 併用時の濃度反応曲線が導けるが, この理論曲線は実測値と一致しなかった. そのため, 併用時の酸素消費量のうち tyr に基づく部分の正確な算定ができず, $C_6H_{11}NH_2$ の 50% 阻害濃度を求めることはできなかった. $C_6H_{11}NH_2$ 以外のアミンについては, 基質としての活性がそれほど高くなく, また阻害濃度測定に用いた濃度も低いので, アミン自身に基づく酸素消費量はそれほど大きくないので, tyr, アミンともに同程度阻害されているものと仮定して阻害度を算出した.

次に脂肪族アミンの MAO 阻害作用の可逆性を, アルコールの場合と同様に, 洗浄および透析により検討した. その結果, Table III に示すように, 脂肪族アミンの MAO 阻害作用には, 一部非可逆的な作用も含まれ, その傾向は阻害度の強いほど, また炭素数が多いものほど強かった. この事実は脂肪族アルコールと明らかに異なるが, その作用の本態はまだ明らかになっていない.

TABLE III. Reversibility of Monoamine Oxidase Inhibition by Aliphatic Amines

Amine	Treatment	Inhibitory ratio $\pm$ S.E. (%)	
$C_3H_7NH_2$		$3.2 \times 10^{-2}M$	$3.2 \times 10^{-1}M$
	control	45.6 ± 9.9	77.9 ± 7.8
	wash out	8.6 ± 4.9	21.2 ± 5.3
	dialysis		
$C_4H_9NH_2$		$1.0 \times 10^{-3}M$	$1.0 \times 10^{-2}M$
	control	34.6 ± 12.4	75.6 ± 5.0
	wash out	23.5 ± 6.5	38.4 ± 9.7
	dialysis	13.9 ± 3.6	37.0 ± 14.7
$C_5H_{11}NH_2$		$1.0 \times 10^{-3}M$	$3.2 \times 10^{-3}M$
	control	38	67
	wash out	22.8 ± 10.1	47.8 ± 8.9
	dialysis	21.3 ± 8.7	51.4 ± 8.7
$C_6H_{13}NH_2$		$5.6 \times 10^{-4}M$	$1.8 \times 10^{-3}M$
	control	24.6 ± 10.0	71.9 ± 6.9
	wash out	25.0 ± 7.3	50.6 ± 10.2
	dialysis	25.3 ± 11.8	46.8 ± 5.7

考 察

直鎖脂肪族アミンのうちで、MAO の基質として最も優れているものは何かということは、動物種により、また実験者により結論が異なり、 $C_1 \sim C_7$ のアミンの肝臓 MAO に対する作用についてみても、ウサギでは炭素数の増加に伴ない活性が上昇し、 $C_7H_{15}NH_2$ (同一濃度の tyr の 145%) が最も強く、⁵⁾ モルモットでは C_5 (70%),⁵⁾ C_4 (54%),¹⁾ ネコでは C_5 (83%),⁵⁾ ウシでは C_4 (78%)⁵⁾ といわれている。本実験の結果、シロネズミ肝臓 MAO では C_5 (53%) となり、 $C_4 \sim C_5$ が優れている点で従来の結果に一致した。一方、脂肪族アミンの MAO 阻害作用は、これから予想されたような competitive inhibitor, または partial agonist としての作用ばかりでなく、非可逆的阻害作用をもあわせ有していること、そのため、tyr との併用時の濃度反応曲線が、単純な相加の式から予想されるものとは一致しないこと、また pentylamine の非可逆的阻害は、競合的阻害剤である amphetamine によって一部保護されることから、作用点として MAO の活性中心がある程度関与していると推定できることなどが明らかとなった。

これに対し、脂肪族アルコールの MAO 阻害作用は可逆的であった。またその 50% 阻害濃度が、同一炭素数のアミンより高濃度であったことなどは、アルコールにくらべアミンの MAO に対する親和力が大であることを示唆している。前述したように、アミンにおいては $C_4 \sim C_5$ に基質としての活性の極大があり、これは C_4H_9- , または $C_5H_{11}-$ の MAO に対する親和力が大なるためと言われている。本報の目的の 1 つは、アルコール、アミンの比較からこの関係を明らかにすることにあった。アルコールの阻害作用については、Fig. 1 から C_5 が C_4 と C_6 との間ではなく、むしろ C_6 とほぼ同じ位置で阻害しているところにややその傾向がみられ、アミンの阻害作用については、50% 阻害濃度において、 $C_4 \sim C_6$ が $C_1 \sim C_3$ と離れたところで群を形成していること、非可逆的阻害が、炭素数の増大に伴ない増大していることなどに現われていると言えるが、 C_7 以上のアミンについて測定を行っていないので、断定的なことは言えない。

Cotzias 等⁸⁾ は、シロネズミ肝臓ホモジネートおよびミトコンドリア MAO に対する脂肪族アルコールの作用を、 4° において検討し、 C_5 付近に阻害作用の最高があり、それから炭素数の増減に伴ない効力が弱まるが、 C_{12} に再び極大が現われることを報告している。Cotzias 等の実験は、基質、阻害剤の濃度、反応温度が本実験と異なっているために、同一には論じられないが、本報ではこのような阻害効力の極大は認められなかった。しかし Cotzias 等も、tyr および noradrenaline を基質として、 $C_1 \sim C_3$ のアルコールに MAO 賦活作用を認めており、この点は本報と一致している。本報において MAO 賦活作用が現われたのは methanol のみで、ethanol, butanol については洗浄または透析により初めて現われたものであるが、この場合には、賦活作用が阻害作用でかくされていたものと解釈される。しかし、その作用機構については検討を加えなかった。

脂肪族アミンの非可逆的作用の作用点の 1 つとして、MAO の活性中心が挙げられることは前述したところであるが、脂肪族アルコールにおいてもこの点の検討を試みた。しかし、脂肪族アルコールは脂肪族アミンと異なり、作用が可逆的であり、また阻害に高濃度を要するため、amphetamine による保護実験⁷⁾ でははっきりせず、tyr の濃度を変えて阻害度の変化を調べた結果、ほぼ同じ阻害度を示し、競合的拮抗作用は無いものと思われるが、基質、阻害剤ともに高濃度を用いての実験には無理があり、詳細な検討は加えられなかった。

以上総括して、脂肪族アミン、脂肪族アルコールはいずれもシロネズミ肝臓 MAO を阻害し、炭素数の増加に伴ない 50% 阻害濃度が低下する。しかし、2 系列を比較してみると、同一炭素数の化合物では、アミンがアルコールより低濃度で MAO を阻害した。また、アミンの MAO 阻害作用は一部非可逆的であり、その傾向は炭素数の増加とともに強まったが、それに対しアルコールの MAO 阻害作用は可逆的で、むしろ非可逆的賦活作用を有しており、その傾向は炭素数の少ないものほど強かった。またアミンの阻害作用には、MAO の活性中心との結合も多少関係していることも明らかとなった。

東京大学薬学部

8) G. C. Cotzias, J. J. Greenough: Nature, 185, 384 (1960).