

## ラット monoamine oxidase mRNA の臓器分布と活性値との相関関係

落合 義徳, 駒井 理恵, 伊藤 邦郎, 櫻井 栄一<sup>a)</sup>, 田中 頼久\*

<sup>a)</sup> 青森大・薬

### Correlation between monoamine oxidase mRNA expression and enzymatic activity in rat tissues

Yoshinori OCHIAI, Rie KOMAI, Kunio ITOH, Eiichi SAKURAI<sup>a)</sup> and Yori-hisa TANAKA \*

<sup>a)</sup> Aomori University

(Received November 22, 2004)

Monoamine oxidase A and B (MAO-A and -B, EC 1.4.3.4) are the major enzymes that catalyze the oxidative deamination of neurotransmitters, peripheral vasoactive amines and xenobiotics. MAO-A and -B can be distinguished by difference in substrate preference and inhibitor specificity, tissue and cell distribution, and immunological properties. There are significant discrepancies in the literature concerning the amount of MAO from a number of tissue sources. Using real-time PCR, we measured MAO mRNA expression levels and both amine oxidase activity without the influence of inhibitors. Then we compared tissue amine oxidase activity with the MAO-A and -B mRNA expression level by simple regression analysis. MAO-A mRNA expression level and benzylamine oxidative deamination activity showed good correlation. However, regression analysis of other substrates and mRNA levels showed moderate or no correlation. Further, we recalculated those data using multiple regression analysis. All substrates showed good or moderate correlation. In conclusion, these results indicated that there is a fixed relation of amine oxidase activity in tissues and mRNA expression level.

**Key words** — monoamine oxidase (MAO) ; tissue distribution; mRNA expression level; enzyme activity; multiple regression analysis

## 緒 言

生体内において生理学的, 毒性学的に重要なアミン化合物を代謝する酵素として, amine oxidase が存在している. 特にミトコンドリア局在性の monoamine oxidase-A (MAO-A) と monoamine oxidase-B (MAO-B) がある. これらの酵素は神経伝達物質の代謝に関わっており, 中枢神経系の神経活動に重要な役割を担っている. さらに末梢組織においても外因性アミン化合物の代謝に関係し生体防御機構の一役を担っ

ている. これらの酵素の反応において, アミン化合物は酸化的脱アミノ化され, アルデヒド体, 過酸化水素及びアンモニアが生成する. 1968年 Jonston は, MAO には clorgyline に対して感受性のあるものと, 感受性のないものの二種に区分されると報告した<sup>1)</sup>. 前者を MAO-A とし, 後者を MAO-B とした. その後, 遺伝子工学の発達により, これらの酵素はそれぞれ異なるタンパク質であることが示された<sup>2-7)</sup>. また, MAO の二つのサブタイプの存在によりそれぞれの基質特異性が clorgyline に対する反応性で分類された<sup>1)</sup>.

この分類により, ラット肝においてserotoninがMAO-A<sup>8)</sup>,  $\beta$ -phenylethylamine, benzylamine, 1-methylhistamineがMAO-B<sup>8,9)</sup>, tyramineがMAO-A及びBの基質になることが報告された<sup>10)</sup>. しかし様々な動物種, 臓器を用いた検討が進められていく中で, 二つのサブタイプには分類できない例が現れてきた. 例えば, ヒト血小板においてMAO-Aで代謝されるとされてきたserotoninがMAO-Bで代謝されるという報告<sup>11)</sup>や, またMAO-B特異的基質とされたtyramineがラット心臓においてMAO-Aによって代謝される<sup>12)</sup>などの例である. さらに, MAO-AとMAO-Bを区別する手段として, 特異的阻害剤を用いる検討が行われてきた. しかし, それぞれ特異的とされる阻害剤による当該酵素の阻害に加え, 他酵素の非特異的な阻害が考えられ, どちらか一方の酵素活性を特異的に抑制する阻害剤は皆無であった. 現在, これらの二つのサブタイプの分類は阻害剤感受性を基礎としているが, 阻害剤の特異性を考慮すると必ずしも明確なものではないと考えられる. さらにこれらの酵素の臓器分布は広範囲に及んでいるが, それぞれのサブタイプの割合が異なることが報告されている<sup>13)</sup>. しかし, この報告も阻害剤の存在下で行ったものであり, 実質的な酵素量を示しているものではないと考えられる. Rileyらは, MAOのタンパク質量は活性値よりも高値に出て, 比例せず, タンパク質量とその活性を比較するのは問題があると報告している<sup>14)</sup>. 彼らも, 特異的な阻害剤を用いた条件によって活性値を測定しており, 生理学的な条件下での相関関係について言及していない. さらに, タンパク質量の算出には阻害剤のpargylineをMAO捕捉剤として用いるという問題を含んでいる. また, 近年*in situ* hybridizationを用い, mRNA量とタンパク質量との相関関係の研究も行われ, ヒト肝においてはかなりの相関関係のあることが示されたが, 必ずしもそれが当てはまらない例もあった. 例えば, 内皮細胞においては中程度のMAO mRNA発現が見られたが, タンパク質量はかなり少ないという結果である<sup>15)</sup>. このように, MAOのmRNA発現量, タンパク質発現量さらにその活

性値間に良好な相関性を報告した論文は今のところ見当たらない. 本研究では, この阻害剤の影響がない状態, すなわち生理学的な状態で各臓器の活性を種々の基質を用い測定することを念頭に置いた. さらに, mRNAの測定には高感度かつ定量的に測定可能なreal-time PCRを用いることとした. 従来, 遺伝子発現量はNorthern blotの方法により検討が行われてきた. この方法では感度及び定量性が十分ではないと考えられた. その点real-time PCRは増幅産物の生成の過程を連続して試みるができるため, より正確な定量が可能となる<sup>16)</sup>. ラットのMAO-A及びMAO-BのNorthern blotの結果は既に報告<sup>17)</sup>されているが, 本研究ではreal-time PCRを用いることにより, mRNA発現量を正確に求め, mRNA発現量と様々な基質を用いた活性値との間の相関関係について検討を加えることを目的とした.

## 材料と方法

### 1. 使用動物

実験には9週齢Wistar系雄性ラット(日本SLC, 浜松)を用い, 実験に供するまで固形飼料(日本クレア, CE-2)及び水道水を自由摂取させ, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 明暗サイクル12時間(明期; 9:00-21:00, 暗期; 21:00-9:00)の一定環境下で飼育した. 全ての実験は, 東北薬科大学動物実験ガイドラインに従って行った.

### 2. 試薬

Benzylamine, tyramine,  $\beta$ -phenylethylamine, 1-methylhistamine, 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), 5-hydroxyindole carboxylic acid (5-HICA)及びserotoninはSigma (St. Louis, MO, USA)より購入した. 西洋ワサビペルオキシダーゼ, 4-aminoantipyrine, vanillic acidは和光純薬工業(大阪)より購入した. PCR反応に必要なプライマーは, Sigma Genosys(北海道 石狩)に委託合成したものを使用した. その他の試薬及び溶媒は市販特級品, またLC/MS/MSの溶媒はHPLCグレードのものを使用した.

### 3. ラット各臓器のミトコンドリア画分の調製

ラットを断頭後、肝臓は氷冷した0.15M塩化カリウム溶液で瀉血し、直ちに摘出した。他の臓器（脳、肺、心臓、大動脈、胃、脂肪組織、腎、小腸）は摘出後、同液で洗浄した。それぞれの臓器の重量を測定した後、それらを細切して3倍量の0.25Mスクロース/0.05Mトリス塩酸緩衝液（pH7.4）を加え、ポッター型テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを800×gで10分間遠心分離し、上清を9,000×gで20分間遠心分離した。沈渣をミトコンドリア画分とした。さらに上清を105,000×gで60分間遠心分離して得られた沈渣をミクロソーム画分とした。各画分はそのまま酵素活性測定用試料とした。なお、各画分のタンパク質濃度測定は、ウシ血清アルブミンを標準物質とし、Bradfordの方法<sup>18)</sup>に従った。

### 4. amine oxidase 活性の測定

Benzylamine, tyramine,  $\beta$ -phenylethylamine, 1-methylhistamine を基質とした活性測定はHolt<sup>19)</sup>らの方法に従って行った。すなわち、MAOの反応により生成する過酸化水素が、西洋ワサビペルオキシダーゼの触媒下で4-aminoantipyrine及びvanillic acidと反応し、生成するquinoneimine dyeの490nmにおける吸光度を、Model 680 96well microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い測定した。またserotoninを基質とした活性測定は、Manini<sup>20)</sup>らの方法を一部改変しLC/MS/MS法で行った。MS/MS装置はTSQ Quantum mass spectrometer (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) を用いた。MS/MSの条件は、スプレーノードルポルテージ4.0kV, キャピラリー温度265°C, sheath gas 47, auxiliary gas 25, コリジョンガス圧1.5mTorr, CID -14V コリジョンエネルギー27eVとした。またMS/MSはSRM modeで測定し、セロトニン代謝物である5-HIAAはm/z 190.1→146.3, internal standardとして用いた5-HICAはm/z 176.0→132.1を測定した。LC装置はSuveyor HPLC (Thermo Electron) を用い、カラムはDiscovery RP-Amide C16 (50mm×

2.0mm i.d., 5mm ; Speruco, Bellefonte, PA, USA) を使用した。LC条件は溶離液25%メタノール/0.05%ギ酸, 流速200 $\mu$ L/minで行った。

### 5. mRNA 発現量の検討

ラットを断頭後、直ちに各臓器を摘出し、約0.5gを秤量して液体窒素により凍結させた。その後Wizard SV total RNA extraction kit (Promega, Madison, WI, USA) のプロトコールに従いtotal RNAを得た。得られたtotal RNAをSuperScript first strand system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) のプロトコールに従ってcDNAを作成しtemplateとした。プライマー配列はPrimer Expression Software (PE Applied Biosystem, Warrington, UK) を用い、以下の様にデザインした。MAO-A F:5'-cctctggtatcatgaccagct-3', MAO-A R:5'-tctgtgcctgcaaagtaaactcct-3', MAO-B F:5'-cttgtcagcaacagctcttgtt-3', MAO-B R:5'-tcctaaagccatctttagaaacg-3', GAPDH F:5'-cgacccttcattgacctca-3', GAPDH R:5'-ttgactgtgccgttgaacttg-3'。PCR反応は、全量30 $\mu$ L中にtemplate 1 $\mu$ L, 0.33 mM forward primer, 0.33 mM reverse primer, 2×SYBR Green PCR Master Mix 15 $\mu$ Lとなるように反応液を調製し、以下の条件で行った。50°Cで2分間つづいて95°Cで10分間処理後、1) 95°C, 30秒間, 2) 60°C, 30秒間, 3) 72°C, 30秒間のサイクルを35回行った。また検量線にはMAO-A, -B及びGAPDH cDNAを組み込んだplasmid DNAを作製し、10<sup>2</sup>~10<sup>6</sup>コピー数の5段階の希釈率を調整し、上記条件下における増幅を行い検量線とした。MAO-A, -BそしてGAPDH cDNAは、Genbankデータベースに登録されている配列を参考にラット肝からPCRにより単離した (accession No : MAO-A, D00688 ; MAO-B, M23601 ; GAPDH, X02231)。これらの増幅と検出にはABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) を用いた。

### 6. 統計分析

実験結果は平均値±標準誤差で示した。また回帰分析はExcel上で行った。

## 結 果

## MAO-A mRNA 発現量

MAO-A の mRNA 発現量を real-time PCR により定量したところ, 本研究において検討したすべての臓器で MAO-A mRNA の発現が認められた (Fig. 1). さらに本研究より, 初めて脂肪組織が MAO-A の主要発現部位であることが示された. その相対発現量は, 脂肪組織が最も多く次いで肺, 肝臓, 心臓, 脳 の順であった. また臓器別の発現量の比較を行ったところ, MAO-A で最も高い発現が確認された脂肪組織を, 最も低い腎臓と比較すると約 31 倍の発現量の差があった.

## MAO-B mRNA 発現量

MAO-A 同様, MAO-B mRNA 発現量を real-time PCR により測定した. MAO-A と異なり, 心臓及び大動脈には発現が認められなかった. 最も高い発現は肝臓で認められ, 次いで肺, 小腸, 脳 の順であった. 発現が認められていた臓器の中で比較検討すると, 最も高い発現量の肝臓と最も低い発現量の腎臓との間に約 160 倍の差が認

められた (Fig. 2).

## 臓器別の amine oxidase 活性測定

ミトコンドリア画分を使用し, amine oxidase の活性値を阻害剤の影響のない状態, つまり total monoamine oxidase の活性値として測定した. 今回使用した 5 つの基質はいずれも monoamine oxidase の活性を求める際に利用されている代表的なものである. その結果, 1-methylhistamine 以外の 4 基質を用いた場合, ほほすべての臓器において活性が認められた (Table 1). 全体的に, 使用した基質において活性が高かった臓器は, 肝臓, 肺, 脳であった. Benzylamine を基質にしたときは心臓で, tyramine のときには胃及び小腸で,  $\beta$ -phenylethylamine のときには大動脈, 脂肪組織及び腎臓で活性は認められなかった. これらに共通していることは MAO-A mRNA の発現量が低い臓器であること. あるいは, MAO-A mRNA 発現量は高い値ではあるが MAO-B mRNA 発現が著しく低いか, 又は認められない臓器であった.

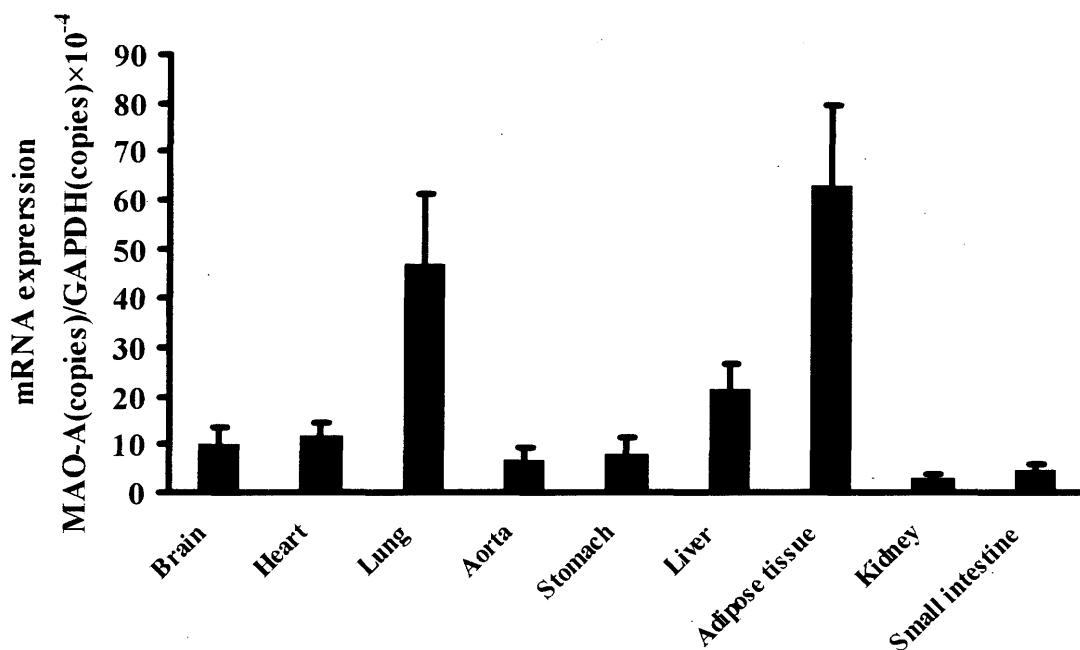


Fig. 1. Tissue distribution of MAO-A mRNA in rat

Total RNAs were isolated from 9 tissues. First-strand cDNAs were synthesized using SuperScript II. Subsequently, real-time PCR was performed using the cDNA as the template and gene-specific primers. The data were normalized to GAPDH. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of triplicate determinations.

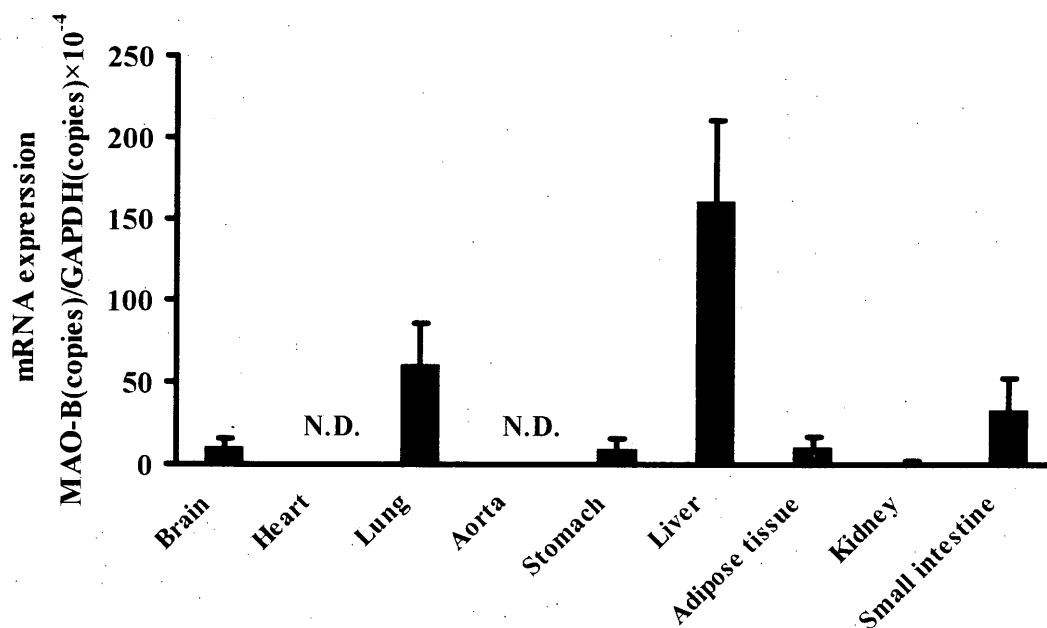


Fig. 2. Tissue distribution of MAO-B mRNA in rat

Total RNAs were isolated from 9 tissues. First-strand cDNAs were synthesized using SuperScript II. Subsequently, real-time PCR was performed using the cDNA as the template and gene-specific primers. The data were normalized to GAPDH. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of triplicate determinations.

Table 1. Amine oxidase activity in rat mitochondria

Tissue	Activity (nmol/mg protein/min)				
	Benzylamine	Tyramine	$\beta$ -Phenylethylamine	1-Methylhistamine	Serotonin
Brain	5.54 $\pm$ 0.65	4.51 $\pm$ 0.10	1.62 $\pm$ 0.05	N.D.	5.15 $\pm$ 0.75
Heart	N.D.	4.61 $\pm$ 0.07	0.85 $\pm$ 0.06	N.D.	7.14 $\pm$ 0.54
Lung	7.77 $\pm$ 0.33	3.42 $\pm$ 0.05	1.35 $\pm$ 0.01	N.D.	5.68 $\pm$ 0.14
Aorta	4.81 $\pm$ 0.01	2.69 $\pm$ 0.11	N.D.	N.D.	9.84 $\pm$ 0.34
Stomach	1.85 $\pm$ 0.07	N.D.	0.84 $\pm$ 0.19	N.D.	4.89 $\pm$ 0.27
Liver	8.50 $\pm$ 0.46	3.64 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.04	N.D.	23.95 $\pm$ 2.84
Adipose tissue	16.93 $\pm$ 0.70	1.18 $\pm$ 0.21	N.D.	N.D.	0.89 $\pm$ 0.11
Small intestine	1.81 $\pm$ 0.22	N.D.	0.78 $\pm$ 0.06	N.D.	1.29 $\pm$ 0.07
Kidney	1.36 $\pm$ 0.03	1.66 $\pm$ 0.07	N.D.	N.D.	21.28 $\pm$ 0.45

Amine oxidase activity in mitochondria of rat tissues was assayed using 100  $\mu$ M of each substrate. The results are expressed as nmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein/min (benzylamine, tyramine,  $\beta$ -phenylethylamine and 1-methylhistamine) and nmol of 5-HIAA/mg protein/min (serotonin). These results represent the means  $\pm$  S.E. of triplicate determinations.

#### 回帰分析

mRNA発現量とミトコンドリア中の酵素の各基質を用いて算出した活性値の相関を、まず単回帰分析の方法でMAO-A及びMAO-Bそれぞれについて行った (Table 2, 3). その結果, benzylamine

酸化活性とMAO-A mRNAとの間に強い相関関係が認められた ( $R=0.882$ ). その他の基質についてはやや相関関係がある (serotonin:  $R=0.332$ ,  $\beta$ -phenylethylamine:  $R=0.229$ ) か, ほぼない結果であった (tyramine:  $R=0.023$ ). またMAO-B

Table 2. Simple regression analysis of MAO-A mRNA expression versus amine oxidase activity in mitochondria of rat tissues

	MAO-A mRNA expression vs amine oxidase activity in mitochondria			
	Benzylamine	Tyramine	$\beta$ -Phenylethylamine	Serotonin
Correlation coefficient:R	0.882	0.023	0.229	0.332
Coefficient of determination:R <sup>2</sup>	0.779	0.001	0.052	0.110

Table 3. Simple regression analysis of MAO-B mRNA expression versus amine oxidase activity in mitochondria of rat tissues

	MAO-B mRNA expression vs amine oxidase activity in mitochondria		
	Benzylamine	Tyramine	$\beta$ -Phenylethylamine
Correlation coefficient:R	0.277	0.242	0.277
Coefficient of determination:R <sup>2</sup>	0.077	0.058	0.077

Table 4. Multiple regression analysis of MAO-A and MAO-B mRNA expression versus amine oxidase activity in mitochondria of rat tissues

	MAO-B mRNA expression vs amine oxidase activity in mitochondria		
	Benzylamine	Tyramine	$\beta$ -Phenylethylamine
Multiple correlation coefficient:R	0.889	0.243	0.400
Multiple coefficient of determination:R <sup>2</sup>	0.790	0.059	0.160

で代謝される基質の酸化的脱アミノ化活性と mRNA 発現量の相関関係は十分高い値は示さなかった ( $R=0.227\sim 0.242$ ).

両タイプの MAO はいずれもミトコンドリア画分に存在していることから, MAO-A 及び MAO-B 両者によって代謝される基質について, 両タイプの mRNA 発現量と活性値との相関関係を重回帰分析により解析することにした. その結果, benzylamine については単回帰分析よりも mRNA 発現量と活性値との間に強い相関係数が得られた ( $R=0.889$ ) (Table 4). また, tyramine ( $R=0.243$ ) 及び  $\beta$ -phenylethylamine ( $R=0.400$ ) についても, 単回帰分析の結果よりも相関係数が高く示された.

## 考 察

monoamine oxidase は生体内に広く分布し, 神経伝達物質の代謝を担う役割を持ち生理学的に極めて重要な酵素である. 今回, 我々は monoamine oxidase の機能を明らかにするために, 臓器分布と活性値との相関性を検討した. まず, 酵素の臓器分布の測定には real-time PCR の手法を用い, mRNA 発現量データを得た. また, これまでの報告では臓器分布と活性値には高い相関関係は示されていないが, この原因には阻害剤を用いた実験に問題があるのではないかと推測し, 阻害剤非存在下で活性を測定した. これらの結果を踏まえ, mRNA 発現量と活性値との間の相関性について検討した.

本研究にて、real-time PCRによりラット各臓器のMAO-A、-BのmRNA量を解析した。KawaharaらはNorthern blotによりラットMAO-A、-Bの臓器発現を報告した<sup>17)</sup>。本研究とKawaharaらの結果を比較すると、MAO-AはNorthern blotでは心臓で多く発現して、他の臓器においては弱いシグナルでしかなく、腎臓ではシグナルが認められなかった。しかしながらreal-time PCRでは用いた全ての臓器でmRNA発現が認められた(Fig. 1)。Northern blotでは主に心臓、肝臓、脳、肺の順でシグナルが強かったが、今回の結果では脂肪組織が最も発現しており、次いで肺、肝、心臓、心臓の順であった。この結果の相違はNorthern blotの場合は感度があまり良くなく、定量性に問題があるためによるものと考えられた。今回は定量性があり高感度検出系であるreal-time PCRを用いたことにより正確な結果が得られたと考えられる。また本研究にて、脂肪組織にてmRNA発現量が最も高いことが示された。脂肪組織では第二のamine oxidaseであるsemicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO)の発現量が多いことが知られており<sup>21,22)</sup>、本研究にて初めてMAO-Aも脂肪組織が主要発現部位であることが示された。脂肪組織にMAO-AやSSAOが多量に発現していることは、脂肪組織でのグルコースの取り込みに対するエピネフリンの関与の可能性を示唆している。つまり、エピネフリンがまずMAO-Aによって代謝されメチルアミンが生成し、さらに、このメチルアミンはSSAOによって代謝される。この際、両方の酸化脱アミノ化反応によって多量の過酸化水素が生成する。この過酸化水素がグルコース取り込みに関与するglucose transporter type 4 (GLUT4)を膜ベシクル上に多くソーティングし、グルコースの取り込みが多くなると考えられているからである<sup>23)</sup>。脂肪組織がMAO-Aの主要発現部位であることを明らかにしたが、このことから、上記の可能性が強く示唆された。MAO-A同様にMAO-BについてNorthern blotの結果と比較したところ、MAO-BはNorthern blotでは肝臓で多く発現しており、次いで精巣、膵臓、脳、肺の順であった。本研究もMAO-Bでは

肝臓が最も発現している臓器であった、しかしNorthern blotでは脳と肺との間のシグナル強度に差は認められなかったが、本研究では肺が脳の約5倍発現していることが認められた。この結果の差は先に述べたようにNorthern blotの定量性に問題があり、数倍の差が判別しにくいのに対し、real-time PCRを用いることでわずかな差を明らかにすることができたと考えられる(Fig. 2)。それに対し、MAO-Bは心臓と大動脈には発現していなかった。最近、心臓で $\beta$ -phenylethylamineが代謝され、心臓にもMAO-Bが存在する可能性が報告された<sup>24)</sup>。しかし、本研究では心臓においてはMAO-B mRNAの発現が見られなかったため、 $\beta$ -phenylethylamineはMAO-Aによって代謝された結果ではないかと考えられた。さらにMAO-AとMAO-Bとの臓器発現分布を比較すると、MAO-Aの相対発現量は低い、すべての臓器で発現していたのに対し、MAO-Bは発現している臓器の相対発現量は高いが限られた臓器にしか発現していないことが示された。このことより、もともと生体内において酸化脱アミノ化反応はMAO-Aが主な役割をしており、MAO-BはMAO-Aを補完する役割をしているのかもしれない。

また本研究において、阻害剤を用いず各臓器での活性を検討した。これまで、MAOの研究では特異的阻害剤を利用しどちらか一方のアミン酸化酵素活性を抑制した条件での実験が主であった。しかしながら、阻害剤のminor-cross inhibitionのために、基質特異性や臓器分布にクリアな結果が得られないと考えられたため、本研究では阻害剤非存在下で測定し、total amine oxidase活性を求めた。今回の実験で、ヒスタミン代謝物である1-methylhistamineがミトコンドリア画分を用いたとき、酸化脱アミノ化反応を受けないという重要な知見が得られた。従来、この1-methylhistamineはMAO-Bによって代謝されると報告されてきたが<sup>9)</sup>、高濃度で行われた実験であり、生理学的にはMAOが1-methylhistamineの代謝に関与するか否かについては再考する必要があると示された。さらに、それぞれの臓器における酸化脱アミノ化の活性値は、

各基質を用い測定したところ, 脳, 肺, 肝臓は高値を示した. このことから, これら臓器はMAO活性が高い臓器といえる. しかしながら, 心臓, 動脈, 脂肪組織, 腎臓において共にMAO-Bの基質であるbenzylamine及び $\beta$ -phenylethylamineを用いた場合, どちらか一方にしか活性が見られないという結果になった. さらに, 胃, 小腸においてMAO-Aの基質であるserotonin, MAO-Bの基質であるbenzylamine,  $\beta$ -phenylethylamineを基質とした際には活性が見られたのにも関わらず, MAO-A, -B両方の基質になることが報告されているtyramineでは活性が得られなかった. この結果はこれまでの報告と一致するものではなかった. その原因としては, 特異的と言われている基質が必ずしも特異的ではないことが上げられる. 基質の特異性の決定には多くの場合阻害剤を用いた系で行われている. Mantleらは阻害剤の感受性で基質特異性を判断するJohnstonの方法は誤解を招くことがあり得ると報告している<sup>25)</sup>. この疑問を明らかにするためには, 阻害剤の影響及び他のamine oxidaseの影響を排除した系で基質特異性を確認する必要がある. そのためにはMAO-A, -Bそれぞれの発現系を構築し, 検討していく必要があると考える.

得られたmRNA発現量及び活性値から回帰分析を行った. まずそれぞれのmRNA発現量と活性値について単回帰分析を行ったところ, MAO-Aとbenzylamineとの相関係数が著しく高く出た. しかしながら, MAO-A mRNAレベルとMAO-Bの基質と言われるbenzylamine活性に相関性が見られ, MAO-B mRNAレベルとbenzylamine,  $\beta$ -phenylethylamine活性に相関性が見られなかった. その理由として, 特異的と言われている基質は必ずしも特異的ではないか, つまりbenzylamine,  $\beta$ -phenylethylamineは両MAOの基質になるのではないかと考えられた. この点が原因となり, 一見矛盾したような結果になったと考えられる.

ミトコンドリア画分には両タイプのMAOが含

まれており単回帰分析の結果で不十分であったのはこのためと考える. そこで, 両タイプの影響を考慮し, 多回帰分析を行ったところ, いずれの基質でも単回帰分析よりも相関係数が高い結果が得られた. Benzylamineでは強い相関性が認められ, tyramine,  $\beta$ -phenylethylamineではやや相関関係が認められた. つまり, mRNAの臓器における発現量と活性値の間にある一定の関係が成り立っており, MAO-AとMAO-Bの発現量との比がreal-time PCRによって正確に求められたことを意味するものと考えられる. すなわち, real-time PCRによるmRNAの発現量の測定は, 臓器に存在するMAOのタンパク質量を正しく反映する値であると考えられた. しかし, 本研究では, 単回帰分析におけるserotonin及び多回帰分析におけるtyramineと $\beta$ -phenylethylamineについてはbenzylamineほど強い相関関係を得るまでに至らなかった. 恐らく, これはserotoninを基質としたときのMAO-Aの, tyramineと $\beta$ -phenylethylamineを基質としたときのMAO-AとMAO-Bの両方のVmaxとなる基質濃度を考慮していないためと考えられる. Vmax値は酵素タンパク質量に依存する値であり, ミカエリス-メンテンの式に従えば0次のところに相当する. それより低い濃度では1次式に従うのでタンパク質量に依存することになる. したがって, これらの基質においても各臓器でのVmax値とreal-time PCRで得られた値とを回帰分析すればより良い値が得られる可能性がある.

本研究では, 各組織におけるMAO mRNA発現量と活性値の相関関係を明らかにすることを目的とし, 多回帰分析による検討を行ない, これまでの報告に比べ, 高い相関を得ることが出来た. これまでMAO mRNA発現量と活性値との間に高い相関関係が得られなかったのは, 特異的阻害剤のMAO-Aと-Bに対するminor-cross inhibitionがあるためと考えられた. このことから, MAOの臓器分布に関して阻害剤を用いて検討した場合, そのデータの解釈は慎重に行う必要があることが示された.



## REFERENCES

- 1) Johnston J.P., *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1285-1297 (1968).
- 2) Bach A. W., Lan N. C., Johnson D. L., Abell C. W., Bembenek M. E., Kwan S. W., Seeburg P. H., Shih J. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4934-4938 (1988).
- 3) Chen Z.Y., Hotamisligil G.S., Huang J.K., Wen L., Ezzeddine D., Aydin-Muderrisoglu N., Powell J.F., Huang R.H., Breakefield X.O., Craig I., Hsu Y.P., *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4537-4541 (1991).
- 4) Weyler W., Hsu Y.P., Breakefield X.O., *Pharma. Ther.*, **47**, 391-417 (1990).
- 5) Hsu Y.P., Weyler W., Chen S., Sims K.B., Rinehart W.B., Utterback M.C., Powell J.F., Breakefield X.O., *J. Neurochem.*, **51**, 1321-1324 (1988).
- 6) Ito A., Kuwahara T., Inadome S., Sagara Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 970-976 (1988).
- 7) Kwan S.W., Abell C.W., *Comp. Biochem. Physiol.B*, **102**, 143-147 (1992).
- 8) Houslay M.D., Tipton K.F., *Biochem. J.*, **139**, 645-652 (1974).
- 9) Hough L.B., Domino E. F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **208**, 422-428 (1979).
- 10) Hall D.W., Logan B.W., Parsons G.H., *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1447-1454 (1969).
- 11) Edward D.J., Chang S.S., *Life Sci.*, **17**, 1127-1134 (1975).
- 12) Fowler C.J., Callingham B.A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 593-597 (1977).
- 13) Huang R.H., Faulkner R., *Mol. Pharmacol.*, **18**, 267-273 (1980).
- 14) Riley L.A. Denney R.M., *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1953-1959 (1991).
- 15) Sivasubramaniam S.D., Finch C.C., Rodriguez M.J., Mahy N., Billett E.E., *Cell Tissue Res.*, **313**, 291-300 (2003).
- 16) Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.*, **6**, 986-994 (1996).
- 17) Kuwahara T., Takamoto S., Ito A., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 253-257 (1990).
- 18) Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 19) Holt A., Sharman D.F., Baker G.B., Palcic M.M., *Anal. Biochem.*, **244**, 384-392 (1997).
- 20) Manini P., Andreoli R., Cavazzini S., Bergamaschi E., Mutti A., Niessen W.M., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **744**, 423-431 (2000).
- 21) Castillo V., Linzcano J.M., Unzeta M., *Neurobiology*, **7**, 263-272 (1999).
- 22) Moldes M., Fève B., Pairault J., *J. Biol. Chem.*, **274**, 9515-9523 (1999).
- 23) O'Sullivan J., Unzeta M., Healy J., O'Sullivan M.I., Davey G., Tipton K.F., *Neurotoxicology*, **25**, 303-315 (2004).
- 24) Guimarães J.T., Vindis C., Soares-da-Silva P., Parini A., *Life Sci.*, **73**, 955-967 (2003).