

モノアミン代謝酵素活性に及ぼす グアニジノ化合物の影響に関する研究

岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設神経情報学部門 (指導: 森 昭胤教授)

福 山 勝 久

(平成4年9月4日受稿)

Key words : guanidino compounds, monoamine oxidase A,
monoamine oxidase B, catechol-O-methyltransferase

緒 言

グアニジノ化合物の研究は1861年に Strecker により guanidine (Gua) が発見命名されたことに始まる¹⁾。グアニジノ化合物は、その分子構造内にグアニジノ基 (-HNC(NH)NH₂) を持つ化合物の総称であり、現在までに約100種類のグアニジノ化合物が自然界より分離同定されている。哺乳動物脳内には arginine(Arg)や creatine (CTN) など、15種類以上のグアニジノ化合物が蛋白質などに結合した、あるいは遊離の状態に含まれていることが報告されている²⁾。

哺乳動物の脳内に含まれるグアニジノ化合物のいくつかは脳内でその生理的役割を担っている。Arg は蛋白構成アミノ酸としてばかりでなく、尿素サイクルの一員として窒素代謝に関与していることが良く知られている。また、guanidoacetic acid (GAA), CTN, 及び creatinine (CRN) などは高エネルギー物質である creatine-phosphate 代謝に関与していることも良く知られている。

一方、脳内に含まれているある種のグアニジノ化合物はけいれん誘発物質としても知られている^{3,4)}。例えば、N²-acetyl-L-(+)-arginine (NAA)⁵⁾, CTN⁴⁾, CRN⁴⁾, creatine-phosphate⁴⁾, GAA⁴⁾, γ -guanidinobutyric acid (GBA)^{6,7)}あるいは Gua⁸⁾をネコやイヌの大槽内に投与すると強直性、間代性あるいは強直性-間代性のけいれんを引き起こす。また、guanidinoethanesulfonic acid (GES)⁹⁻¹²⁾,

α -guanidinoglutaric acid (GGA)^{13,14)}, homoarginine (HArg)¹⁵⁾, あるいは methylguanidine (MGua)¹⁶⁻¹⁸⁾をラットなどの実験動物の側脳室内に注入したり、大脳皮質に直接投与すると、けいれん発作や脳波にスパイク放電などの発作波が誘発される。他方、pentylentetrazole をウサギの静脈内に投与することにより誘発されたけいれん中に脳内では GBA が増加すること⁷⁾, 脳内にコバルトを入れて作成したてんかん焦点の脳組織内で GGA が増加することが知られている¹⁹⁾。以上のような報告から、中枢神経系の異常興奮に際してグアニジノ化合物が何らかの役割を演じていることが示唆されている。

さて、GGA をラットの側脳室内に投与後、大脳皮質では serotonin (5-HT) 量が一過性に増加するが5-HTの代謝産物である5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 量には変化は認められないこと¹⁴⁾から、5-HTの代謝に対するGGAの関与が示唆されている。また、2-guanidinoethanol (GEt) をラットの側脳室内に投与するとdopamine (DA) の代謝産物である3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) が異常に増加するが、DOPAC がさらに代謝されたhomovanillic acid (HVA) は増加しないこと²⁰⁾から、catecholaminesの代謝に対するGEtの関与も示唆されている。このため、ある種のグアニジノ化合物は神経伝達物質として働く5-HT, DA, adrenaline (AD) あるいは noradrenaline (NA) などのモノアミンを代謝する酵素活性に影響を及ぼし中枢神経系の機能に影

響を与える可能性が示唆されていた。

モノアミンは catechol-O-methyltransferase (COMT) [EC 2.1.1.6] と monoamine oxidase (MAO) [EC 1.4.3.4, amine : oxygen oxidoreductase (deaminating) (flavine containing)] とにより代謝されること、さらに、モノアミン代謝に関与する MAO には MAO-A と MAO-B の 2 種類のアイソザイムのあることが知られている^{21,22}。神経伝達物質である DA は、MAO-B により DOPAC に代謝されたのち COMT により HVA に、あるいは、まず COMT により 3-methoxytyramine に代謝されたのち MAO-B により HVA に代謝されることが知られている。また、NA と AD は COMT によりそれぞれ methanephrine と normethanephrine に、MAO-A により 3, 4-dihydroxyphenylglycolaldehyde に代謝されることが知られている。さらに、5-HT は MAO-A により 5-HIAA に代謝されることが知られている。このため、本研究では MAO-A、MAO-B 及び COMT 活性に対するグアニジノ化合物の影響を検討した。さらに、明らかな抑制効果が認められたグアニジノ化合物はその抑制様式を検討することにより、モノアミン代謝酵素活性に及ぼすグアニジノ化合物の影響を調べた。

実 験 方 法

1. 実験動物

研究には体重 250—350 g の Sprague Dawley 系雄ラットを使用した。ラットは室温 25℃、湿度 55%、12 時間の明暗サイクル（午前 7 時より午後 7 時まで明期）のもとで少なくとも 1 週間飼育して使用した。飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製 MF を使用し、水と共に自由に摂取させた。実験に際し、MAO や COMT 活性には日内変動のあることが報告されているので^{23,24}、ラットは午前 9 時から 11 時の間に断頭し、氷盤上で大脳を取り出した。

2. 薬物溶液の調整

酵素活性に対するグアニジノ化合物の影響は最終濃度 5 mM で検討した。このために、MAO-B 活性に対する影響の検討の際には、以下のグアニジノ化合物を蒸留水にて 80mM に溶解し、

NaOH あるいは HCl で pH7.2 に調整して使用した。また、MAO-A 活性及び COMT 活性に対する影響の検討の際には、以下のグアニジノ化合物を蒸留水にて 50mM に溶解し、NaOH あるいは HCl で pH7.8 に調整した。

Arg は片山化学工業株式会社製、MGua は東京化成工業株式会社製、Gua hydrochloride、CRN、CTN、GAA は和光純薬工業株式会社製、guanidinosuccinic acid (GSA)、 β -guanidinopropionic acid (GPA) は Sigma Chemical 社 (U.S.A) 製、HArg は Calbiochem 社 (U.S.A) 製、NAA は Eastman Kodak 社 (U.S.A) 製を使用した。また、GES は小野薬品工業株式会社から、GGA、GBA、 γ -hydroxy-arginine (OH-Arg)、GEt 及び δ -guanidinovaleric acid (GVA) は当教室で合成されたものを使用した。

3. MAO-A 活性の測定法

ラット大脳は 10 倍量の HEPES 緩衝液（和光純薬工業株式会社）(50mM, pH7.6) とともにポリトロンを使用しホモジェナイズ後、4℃で 40 分間遠心分離 (39,000×g) して得られた上清を粗酵素サンプルとした。

MAO-A 活性は 5-HT を基質として使用し、生成した 5-HIAA を定量することにより測定した。すなわち、粗酵素液 50 μ l に蒸留水 150 μ l、HEPES 緩衝液 (600mM, pH7.6) 50 μ l、各種グアニジノ化合物溶液 30 μ l、及び bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., U.S.A) (1.5 mg/ml) 10 μ l を加え、37℃で 5 分間予備加熱後、5-HT (Sigma Chemical Co., U.S.A) (130 μ M) を 10 μ l 加えて 37℃で 20 分インキュベイトした。反応後、6 M の HClO₄ を 25 μ l 加え反応を停止し、4℃で 15 分間遠心分離 (1,650×g) を行った。得られた上清中の 5-HIAA 量を電気化学検出機を装着した柳本制作所製高速液体クロマトグラフィ (HPLC-ECD) を使用して定量した。

測定値は、最終濃度 2 mM の pargyline (Sigma Chemical Co., U.S.A) を加えてインキュベイトして得られた 5-HIAA 値を使用して補正した。

4. MAO-B 活性の測定法

ラット大脳は 10 倍量の磷酸緩衝液 (100mM,

pH7.2)とともにポリトロンを使用してホモジェナイズ後、4℃で10分間遠心分離(1,650×g)して得られた上清を粗酵素サンプルとした。

MAO-B 活性は m-nitrobenzylamine を基質として使用する江藤らの方法に準拠して²⁵⁾、また、基質濃度3.125mM での検討の一部では和光純薬工業株式会社製 MAO B-テストワコー-273-31101も使用して行った。すなわち、m-nitrobenzylamine HCl (Aldrich Chemical Co., U.S.A) を磷酸緩衝液 (100mM, pH7.2) に75 μM~5 mM に溶解して基質緩衝液とし、その1 ml と各種グアニジノ化合物溶液等100 μl を加え、37℃で5分間予備加熱後、粗酵素液500 μl を混合して37℃で1時間インキュベイトした。反応後0.8N塩酸に溶解した2,4-dinitrophenylhydrazine (片山化学) (1 mM) を1 ml 加えることにより反応を停止するとともに、反応により生成した m-nitrobenzaldehyde を hydrazone 誘導体とし、KOH でアルカリ性にした後に isopropyl acetate で hydrazone 誘導体を抽出した。抽出液に 2-pyrrolidone (片山化学) (5.6M) と ethanolamine (6.3M) の混合液を1 ml 加えアルカリ性とし、505nm で吸光度を測定することにより定量した。

測定値は、最終濃度2 mM の pargyline を加えてインキュベイトして得られた値を使用して補正した。

5. COMT 活性の測定法

ラット大脳は10倍量の KCl 溶液 (150mM) とともにポリトロンを使用してホモジェナイズ後、4℃で10分間遠心分離(1,650×g)して得られた上清を粗酵素サンプルとした。

COMT 活性の測定は、DOPAC を基質として使用し、DOPAC から生成する HVA 量を定量する Jarott の方法²⁶⁾を一部改良した秋山らの方法²⁷⁾に準拠して行った。すなわち、磷酸緩衝液(250 mM, pH7.8)200 μl に粗酵素液100 μl, MgCl₂ (18 mM)50 μl, S-adenosylmethionine (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) (1.8mM)50 μl および各種グアニジノ化合物溶液50 μl を加え、37℃で5分間予備加熱後、50 μl の DOPAC (Sigma Chemical Co., U.S.A) (750 μM~6 mM) を加えて37℃で30分間インキュベイトした。

反応は50 μl の HClO₄ (3 M) を加えることにより停止し、4℃で30分間遠心分離(10,000×g)した。得られた上清中に含まれる HVA 量を HPLC-ECD を使用して定量した。

6. 蛋白定量と有意差検定

サンプル内の蛋白量は Lowry らの方法²⁸⁾により定量し、MAO-A 活性は pmol 5-HIAA formation/mg protein/hour で、MAO-B 活性は nmol m-nitrobenzaldehyde formation/mg protein/hour で、COMT 活性は nmol HVA formation/mg protein/hour で表し、得られた結果は paired t-test により有意差を検定した。

7. 阻害様式の検討

有意差検定の結果、危険率5%以下で有意差が認められたグアニジノ化合物のいくつかはさらに阻害様式を検討した。阻害様式の検討には飽和曲線の理論式、及び下記の酵素阻害様式の理論式²⁹⁾を使用して Marquard の方法³⁰⁾により非直線回帰を行うことにより、ミカエリス定数 (Km), 最大速度 (Vmax) 及び阻害定数 (Ki) を直接求めた。さらに、最小の残渣平方和を与える阻害様式を最も適合した阻害様式とした³¹⁾。

(I) 競合阻害

$$V_{\text{obs}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m \cdot (1 + [I]/K_i) + [S]} + \epsilon_i$$

(II) 不競合阻害

$$V_{\text{obs}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S] \cdot (1 + [I]/K_i)} + \epsilon_i$$

(III) 非競合阻害

$$V_{\text{obs}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{(K_m + [S]) \cdot (1 + [I]/K_i)} + \epsilon_i$$

(IV) Linear mixed 型阻害

$$V_{\text{obs}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m \cdot (1 + [I]/K_i) + [S] \cdot (1 + \alpha \cdot [I]/K_i)} + \epsilon_i$$

ただし、V_{obs}: 観測した反応速度、V_{max}: 最大速度、[S]: 基質濃度、K_m: ミカエリス定数、K_i: 阻害定数、[I]: 阻害物質の濃度、ε_i: 実験誤差、残渣平方和 = Σ(ε_i)²

結 果

1. MAO-A 活性に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 $4.33\mu\text{M}$ では対照群のMAO-A活性は 78.7 ± 7.8 (mean \pm SEM, N=16)であった。MAO-A活性をGGAは18.9% (N=8), GESは35.1% (N=7)抑制した。一方, MAO-A活性はArgにより9.3% (N=7), またはNAAより13.0% (N=8)増加した。しかし, Gua,

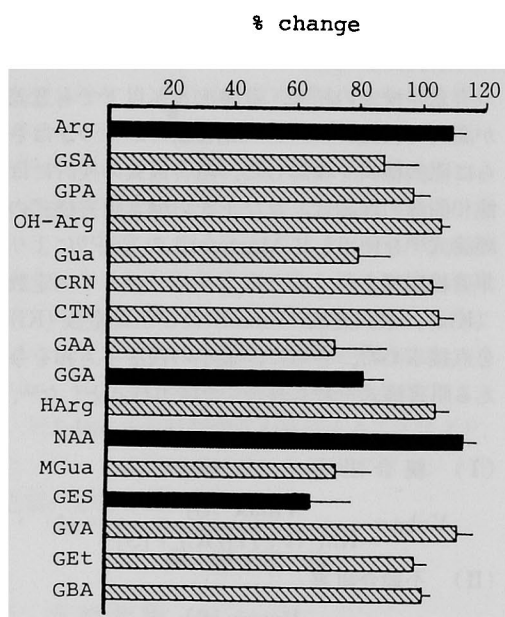


図1 MAO-A 活性に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 $4.33\mu\text{M}$ での対照 MAO-A 活性に対する%変化を示す。有意差検定は paired t-test にて行い危険率5%で有意差を判定した (N=7~8, ただし OH-Arg はN=4)。Arg: arginine, GSA: guanidinosuccinic acid, GPA: β -guanidinopropionic acid, OH-Arg: γ -hydroxyarginine, Gua: guanidine, CRN: creatinine, CTN: creatine, GAA: guanidinoacetic acid, GGA: α -guanidinoglutaric acid, HArg: homoarginine, NAA: N^2 -acetyl-L-arginine, MGua: methylguanidine, GES: guanidinoethanesulfonic acid, GVA: δ -guanidinovaleric acid, GEt: 2-guanidinoethanol, GBA: γ -guanidinobutyric acid.

▨: 有意差なし, ■: $p < 5\%$ で有意。

GSA, GPA, OH-Arg, CRN, CTN, GAA, HArg, MGua, GVA, GEt 及び GBA は MAO-A 活性に対してなんらの影響も及ぼさなかった(図1)。

2. MAO-B 活性に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 3.125mM (K_m 値の約40倍の濃度)では対照群の MAO-B 活性は 52.2 ± 2.1 (mean \pm SEM, N=12)であった。MAO-B 活性を CRN は10.7% (N=6), GVA は8.9% (N=8), また, MGua は3.9% (N=6) 抑制した。さらに, MAO-B 活性は GGA により18.8% (N=8) 増加した。しかし, 基質濃度 3.125mM では Arg, Gua, CTN, GAA, GSA, GPA, HArg, NAA, GES, OH-Arg, GBA, 及び GEt は MAO-B 活性に有意な影響を及ぼさなかった。(図2)。

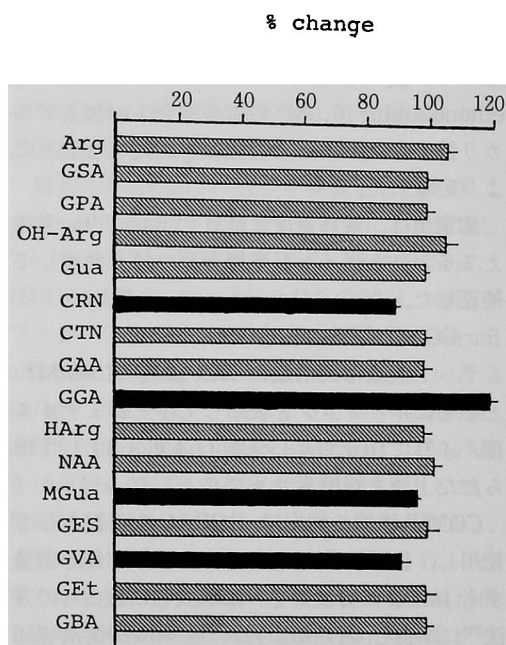


図2 MAO-B 活性 (高基質濃度) に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 3.125mM での対照 MAO-B 活性に対する%変化を示す。有意差検定は paired t-test にて行い危険率5%で有意差を判定した (N=6~8)。略号は図1と同じ。

▨: 有意差なし, ■: $p < 5\%$ で有意。

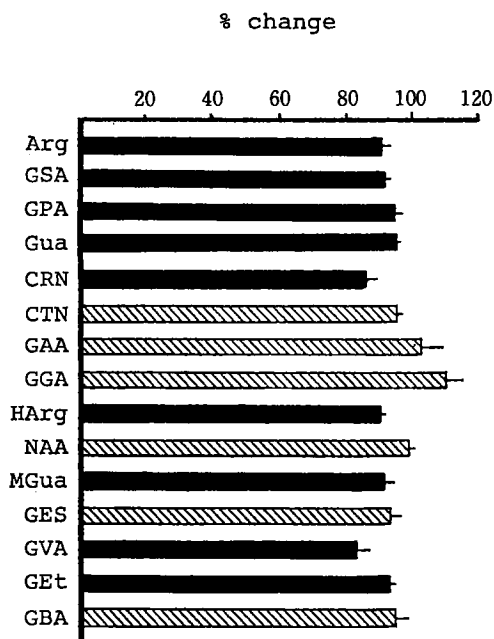


図3 MAO-B 活性 (低基質濃度) に対するグアニジノ化合物の影響
基質濃度62.5 μ M での対照 MAO-B 活性に対する%変化を示す。有意差検定は paired t-test にて行い危険率5%で有意差を判定した (N = 6 ~ 9)。略号は図1と同じ。
▨ : 有意差なし, ■ : p < 5% で有意。

基質濃度62.5 μ M (Km 値の約0.8倍の濃度) では, CRN(9.5%, N = 7), GVA(17%, N = 9), MGua(8.5%, N = 9)の他に, Arg(9.5%, N = 7), Gua(4.9%, N = 7), GSA(8.3%, N = 7), GPA(5.1%, N = 7), HArg(8.9%, N = 7), GEt(7.0%, N = 7)も抑制効果を示した。しかし, GGA, CTN, GAA, NAA, GES, 及び GBA は MAO-B 活性に対し有意な影響を与えなかった (図3)。

次に, 基質濃度3.125mM と62.5 μ M の両濃度で MAO-B 活性抑制効果が認められた CRN,

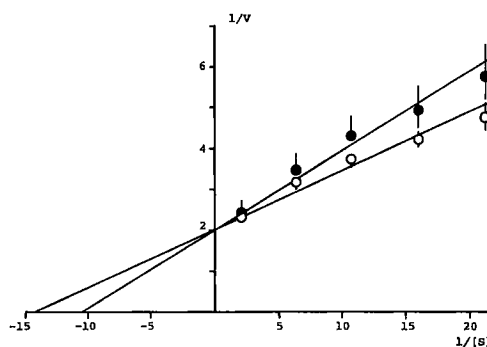


図5 MAO-B 活性に対する creatinine (CRN) の影響
Double reciprocal plot で示す。CRN の阻害様式は競合型阻害が最も良く適合し、計算された K_i は14.5mM であった。
○ : 対照, ● : 5mM の CRN を添加。

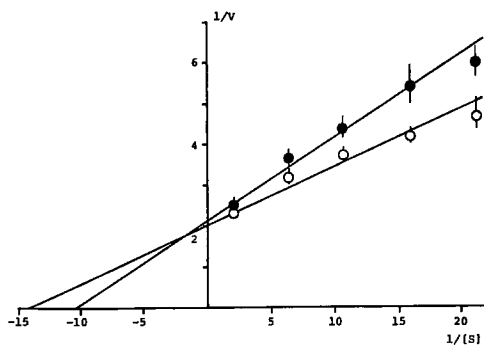


図4 MAO-B 活性に対する guanidinovaleric acid (GVA) の影響
Double reciprocal plot で示す。対照群 MAO-B の K_m は76.0 \pm 9.2 μ M, V_{max} は50.5 \pm 3.7 (mean \pm SEM, N = 6) であった。GVA の阻害様式は競合型阻害が最も良く適合し、計算された K_i は9.47mM であった。
○ : 対照, ● : 5mM の GVA を添加。

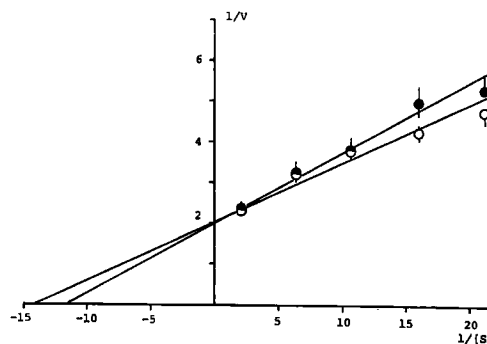


図6 MAO-B 活性に対する methylguanidine (MGua) の影響
Double reciprocal plot で示す。MGua の阻害様式は競合型阻害が最も良く適合し、計算された K_i は29.4mM であった。
○ : 対照, ● : 5mM の MGua を添加。

GVA, MGua の阻害様式を検討した。本研究に使用した方法での MAO-B の K_m は $76.0 \pm 9.2 \mu\text{M}$, V_{max} は 50.5 ± 3.7 (mean \pm SEM, $N=6$) であった。GVA の阻害様式は競合型阻害が最も良く適合し、計算された K_i は 9.47mM であった。また CRN 及び MGua の阻害様式も競合型阻害が最も良く適合し、計算された K_i はそれぞれ 14.5mM 及び 29.4mM であった (図 4 ~ 6)。

3. COMT 活性に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 $600\mu\text{M}$ (K_m 値の約 8 倍²⁷⁾) では COMT 活性は 3.38 ± 0.24 (mean \pm SEM, $N=26$) であった。しかし、影響を調べた 16 種類のグアニジノ化合物は COMT 活性になんらの影響も与えなかった (図 7)。

基質濃度 $75\mu\text{M}$ (K_m 値の約 1 倍) では COMT 活性は 1.03 ± 0.03 ($N=5$) であった。COMT

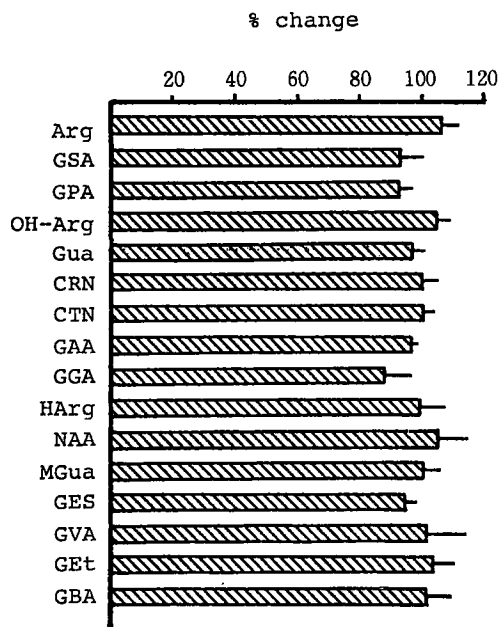


図 7 COMT 活性 (高基質濃度) に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 $600\mu\text{M}$ での対照 COMT 活性に対する % 変化を示す。有意差検定は paired t-test にて行い危険率 5% で有意差を判定した ($N=6 \sim 9$ ただし NAA は $N=5$)。略号は図 1 と同じ。

▨ : 有意差なし, ■ : $p < 5\%$ で有意。

活性は GSA により 14.7%, GVA により 20.6% 抑制されたが, Arg, Gua, GPA, CRN, CTN, GAA, GGA, HArg, NAA, MGua, GES, GEt 及び GBA は COMT 活性に有意な変化は与えなかった (図 8)。

考 察

グアニジノ化合物は自然界に 100 種類以上存在することが確認されているが、その生理的役割や薬理的影響が明らかになっているものは少ない²⁾。しかし、脳内神経伝達物質などの代謝に関連する酵素などに対するグアニジノ化合物の影響がいくつか知られている。Acetylcholine (Ach) の合成酵素である choline acetyltransferase [EC 2.3.1.6] 活性に対し 5 mM の GES, GAA, NAA, GBA, MGua, GPA, GSA, Arg, OH-Arg 及び HArg は影響を与えないが, Ach の分解酵素である acetylcholinesterase [EC 3.1.1.7] を MGua は競合的に阻害 ($K_i=3.6\text{mM}$) することが報告されている³²⁾。また, glutamic acid (Glu) の代謝に関連する酵素である

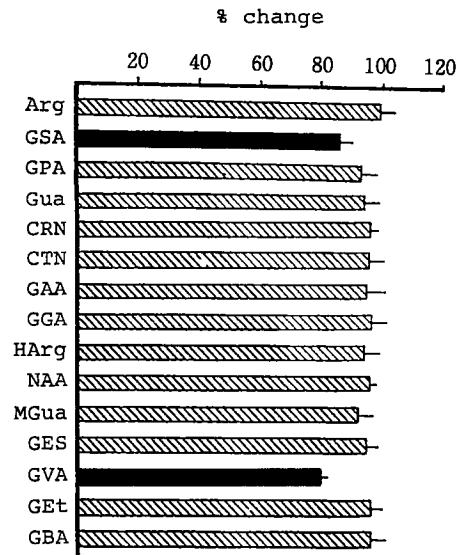


図 8 COMT 活性 (低基質濃度) に対するグアニジノ化合物の影響

基質濃度 $75\mu\text{M}$ での対照 COMT 活性に対する % 変化を示す。有意差検定は paired t-test にて行い危険率 5% で有意差を判定した ($N=8$)。略号は図 1 と同じ。

▨ : 有意差なし, ■ : $p < 5\%$ で有意。

glutamic-oxaloacetic transaminase [EC 2.6.1.1] (GOT)活性, glutamic-pyruvic transaminase [EC 2.6.1.2] (GPT) 活性及び glutamic acid decarboxylase [EC 4.1.1.15]

(GAD)に対する影響が調べられ、400~700 μ M の Gua, MGua, GAA, GPA, GBA, GSA, GGA, Arg, NAA, OH-Arg, HArg, GES, CRN 及び CTN は GOT 活性や GAD 活性には影響しないが、GPT 活性を700 μ M の CTN が12%、及び CRN が20%抑制することが報告されている³⁹⁾。一方、500 μ M の GES, GAA, GSA, NAA, GPA, GBA, Arg, HArg, Gua 及び MGua は神経細胞膜の Mg²⁺-ATPase [EC 3.6.1.3] 活性に影響は与えないが、MGua は Na⁺, K⁺-ATPase [EC 3.6.1.3] 活性を非競合的に33%阻害することが報告され⁴⁴⁾、脳内のいろいろな酵素活性に対するグアニジノ化合物の影響が明らかとなっている。

脳内に含まれるある種のグアニジノ化合物がけいれんを誘発することはすでに述べたが、ラットやヒトの体内に存在することは確認されていても脳内での存在が確認されていない GEt^{35,36)}, GVA^{37,38)}あるいは α -keto- δ -guanidinovaleric acid³⁹⁾にもけいれんや発作脳波を誘発することが報告されている。これらのグアニジノ化合物のけいれん誘発機構にモノアミン作動性神経伝達機構が関与することが示唆されている。すでに述べたように、GGA は5-HT系の、GEt はDA系の神経伝達に影響を及ぼしてけいれんを誘発することが示唆されている^{14,20)}。また、GVAを生理食塩水に10mMに溶解し透析液として使用してラットの線条体を灌流すると、透析液中にDA及び5-HTが著明に増加するにもかかわらず、それらの代謝産物であるDOPAC, HVA及び5-HIAAが増加しないことも報告されている⁴⁰⁾。以上のことなどから本研究ではモノアミン代謝酵素活性に対するグアニジノ化合物の影響を検討した。

本研究でMAO-A活性は基質として添加した5-HTから生成した5-HIAA量を直接定量して求めた。しかし、脳組織中には5-HIAAが含まれているため、MAO-A活性測定の際にはpargylineでMAO-A活性を抑制して5-HIAA

量を定量することによりMAO-A活性を補正した。本研究に基質として使用した5-HTは低濃度ではMAO-Aにより酸化されるが高濃度ではMAO-Bによっても酸化されること⁴¹⁾、またMAO-Bに特異的な阻害剤と報告された(-)deprenylもラット脳の両タイプのMAOを阻害する⁴²⁾ためにMAO-Bに特異的な阻害剤が得られないこと、などから本研究では基質濃度4.33 μ M (Ki値の数分の1)でグアニジノ化合物の影響を検討した。この結果Arg及びNAAはMAO-A活性を有意に亢進すること、及びMAO-A活性はGES及びGGAにより有意に抑制されることが明らかとなった。Arg及びNAAがどのような機序でMAO-A活性を亢進するのか、またその薬理学的意義は不明である。

本研究でMAO-B活性の測定にはMAO-B特異性が高いと報告²⁵⁾のあったm-nitrobenzylamineを基質として使用した。しかし、脳組織には少量ではあるがbenzylamine oxidaseが含まれていることが報告されている^{43,44)}。このため、本研究ではpargylineを用いてMAO-B活性を抑制することにより非特異的oxidase活性を測定し、MAO-B活性を補正した。また、MAO-B活性に対するグアニジノ化合物の影響の検討には、m-nitrobenzylamineに対するKm値にはほぼ等しい基質濃度とKm値の40倍の基質濃度で検討した。次いで両濃度で有意にMAO-B活性に影響の有ったグアニジノ化合物についてその阻害様式を検討した。阻害様式の検討とKiの算出には、従来は最小二乗法による曲線回帰の計算が困難であったために阻害剤の濃度を変化させてDixon-plotなどを使用して、作図によりもとめていた。しかし、Marquardの開発した最小二乗法による曲線回帰の計算法³⁰⁾を本研究では使用して、阻害様式の検討とKiを直接算定した。

本研究では基質濃度が低いと多くのグアニジノ化合物が酵素活性を弱い抑制した。しかし、MAO-A活性を抑制するGGA及びGESにはMAO-B活性抑制効果は認められないことから、多くのグアニジノ化合物は特異的にMAO-B活性を抑制する働きのあることが明らかとなった。また、高基質濃度でも有意な効果が認められた

グアニジノ化合物は、使用する基質濃度を47~470 μM に変化して MAO-B 活性を測定した結果、MAO-B 活性を GVA, CRN 及び Gua が競合的に抑制し、その K_i 値はそれぞれ9.47, 14.5, 29.4mMであることが明らかとなった。しかし、多くの MAO-B 活性抑制剤が報告されているが^{42,45-49}、それらの報告された K_i 値と比較するとグアニジノ化合物は弱い拮抗剤であることも明らかとなった。一方、けいれん誘発性が報告されていない Arg, GSA 及び GPA も低基質濃度で MAO-B 活性を抑制した。これは、MAO-B 活性の抑制がグアニジノ化合物のけいれん誘発機構に直接関連しないことを示唆する。

COMT 活性は DOPAC を基質として添加し生成した HVA を直接定量することにより測定した。しかし、脳組織中には HVA も含まれているため、COMT 活性測定の際には5分間の予備加熱後に3Mの HClO_4 を50 μl 加えて COMT 活性を失活させてインキュベートし HVA を定量することにより COMT 活性を補正した。また、COMT 活性に対するグアニジノ化合物の影響の検討には、DOPAC に対する K_m 値にほぼ等しい基質濃度と K_m 値の8倍の基質濃度で検討した。その結果、低基質濃度で抑制効果の認められた GSA 及び GVA も高基質濃度では COMT 活性に影響を与えなかった。このため両グアニジノ化合物の抑制様式は検討しなかった。

さきに述べたように、GGA 投与により大脳皮質では5-HT 量が一過性に増加するにもかかわらず5-HIAA 量に変化は認められず、また、GGA により誘発されたけいれんの発作中のみ DA 量や NA 量が減少することが報告されている¹⁴。本研究では GGA は MAO-A 活性を抑制するが、MAO-B 活性や COMT 活性は抑制しないことが明らかとなった。これは、GGA により MAO-A 活性が抑制され、放出された5-HT が5-HIAA に酸化されないことを示唆する。また、けいれん発作中には DA や NA の放出が増加するために DA や NA 量は減少するが、GGA は MAO-B 活性や COMT 活性を抑制しないために放出された DA や NA は速やかに代謝されることを示唆する。

一方、GEt は脳内の DOPAC 量を増加する

が HVA 量には影響を与えないことが報告され、GEt の COMT 活性抑制作用が示唆されていた²⁰。しかし、本研究で GEt は COMT 活性に影響を与えないことが明らかとなった。これは GEt が COMT 活性を抑制するのではなく、DOPAC の細胞間輸送系を抑制することにより DOPAC が蓄積することを示唆する。

GVA を10mM となるように生理食塩水に溶解してラット線条体を灌流すると灌流液中の DA 濃度と5-HT 濃度が増加するにもかかわらず、それらの代謝産物である DOPAC, HVA 及び5-HIAA 濃度は増加しないと報告されている⁴⁰。本研究では GVA は MAO-B 活性及び低基質濃度では COMT 活性を抑制した。これは、5-HIAA 濃度が増加しなかったのは GVA により MAO-A 活性が抑制されたためではなく、5-HT の再取り込みが抑制されたことを、また、DOPAC 濃度と HVA 濃度に変化が認められなかったのは MAO-B と COMT 活性が抑制されたために DA が代謝されなかったことを示唆する。

本研究で GES は MAO-A 活性を有意に抑制することが明らかとなった。マウス脳内に注入された150 μg の GES が均一に分布すると仮定すると、その濃度は約2mM となり MAO-A 活性もある程度抑制されると考えられる。しかし、GES をマウスの脳室内に150 μg 投与すると、小脳では投与5分後に5-HT 量が一過性に減少し5-HIAA 量が一過性に増加することが報告されている¹²。これは、GES は5-HT が一過性に枯渇するほどの5-HT 放出を起し、基質の増加により5-HIAA が増加することを、あるいは脳内に注入された GES は均一に分布しないことを示唆する。

脳内モノアミンとけいれん発現機構とは密接な関連があるとの報告が数多くなされているが、一般に脳内モノアミンが増加するとけいれん閾値が上昇し、逆に脳内モノアミンが減少するとけいれん閾値は低下すると考えられている。本研究ではモノアミン分解酵素活性に対するグアニジノ化合物の影響を検討したが、グアニジノ化合物のけいれん誘発機序におけるモノアミン神経系の関与に関しては、さらにモノアミン合成に関与する酵素活性についても詳細な検討を

要すると思われる。

結 論

モノアミンの代謝酵素である MAO-A, MAO-B, 及び COMT 活性に対するグアニジノ化合物の影響を検討した。さらに、明らかな抑制効果が認められたグアニジノ化合物については、その抑制様式を検討することにより、モノアミン代謝酵素活性に及ぼす16種のグアニジノ化合物の影響を調べた。

1. MAO-A 活性は 5-HT を基質として測定し、グアニジノ化合物は 5 mM で検討した。基質濃度 $4.33\mu\text{M}$ で MAO-A 活性を GGA 及び GES は抑制した。一方、MAO-A 活性は Arg 及び NAA により増加した。しかし、Gua, GSA, GPA, OH-Arg, CRN, CTN, GAA, HArg, MGua, GVA, GEt 及び GBA は MAO-A 活性に対しなんらの影響も及ぼさなかった。

2. MAO-B 活性は m-nitrobenzylamine を基質として測定した。基質濃度 3.125mM で MAO-B 活性を CRN, GVA 及び MGua は抑制し、GGA は増加した。基質濃度は $62.5\mu\text{M}$ で MAO-B 活性を CRN, GVA, MGua, Arg, Gua, GSA, GPA, HArg 及び GEt は抑制し

た。

3. 基質濃度 3.125mM と $62.5\mu\text{M}$ の両濃度で MAO-B 活性抑制効果が認められた CRN, GVA, MGua の阻害様式を検討した結果、MAO-B に対する GVA, CRN 及び MGua の阻害様式は競合型阻害が最も良く適合し、計算された K_i はそれぞれ 9.47mM , 14.5mM 及び 29.4mM であった。

4. COMT 活性は DOPAC を基質として測定した。基質濃度 $600\mu\text{M}$ で影響を調べた16種類のグアニジノ化合物は COMT 活性になんらの影響も与えなかった。基質濃度 $75\mu\text{M}$ で COMT 活性は GSA 及び GVA により抑制された。

5. 以上の結果から、ある種のグアニジノ化合物はモノアミン分解酵素系にも働いて脳機能に影響を与えることが示唆された。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授、また直接御指導御協力いただきました横井 功助手、加太英明文部技官に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたりましては終始快く御協力下さいました研究室の皆様にも心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Strecker A : Untersuchungen über die chemischen Beziehungen zwischen Guanin, Xanthin, Theobromin, Caffein und Kreatin. *Ann Chem Pharmac* (1861) **118**, 151—177.
- 2) Robin Y and Marescau B : Natural guanidino compounds ; in Guanidines, Mori, Cohen and Lowenthal eds, Plenum Press, New York (1985) pp 383—438.
- 3) Mori A, Watanabe Y and Akagi M : Guanidino compound anomalies in epilepsy ; in *Advances in Epileptology*, Akimoto, Kazamatsuri, Seino and Ward eds, Raven Press, New York (1982) pp 347—351.
- 4) Jinnai D, Mori A, Mukawa J, Ohkusu H, Hosotani M, Mizuno A and Tye LC : Biochemical and physiological studies on guanidino compounds induced convulsions. *Jpn J Brain Physiol* (1969) **160**, 3668—3673.
- 5) Mori A and Ohkusu H : Isolation and identification of alpha-N-acetyl-L-arginine and its effect on convulsive seizures. *Adv Neurol Sci* (Tokyo) (1971) **15**, 303—306.
- 6) 森 昭胤 : 痙攣発現機構とアミノ酸。とくに γ -グアニジノ酪酸について。第17回日本医学講演集 (1967) **1**, 396—400.
- 7) Jinnai D, Sawai A and Mori A : γ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* (1966) **212**, 617.

- 8) Hayashi T : Neurophysiology and Neurochemistry of Convulsion. Dainihon-Tosyho Co., LTD, Tokyo (1959) pp 177—190.
- 9) 水野 晃 : Taurocyamine 痙攣に関する生理学的ならびに生化学的研究. 阪大医誌 (1971) **23**, 13—20.
- 10) Mizuno A, Mukawa J, Kobayashi K and Mori A : Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits. IRCS Med Sci (1975) **3**, 385.
- 11) Mori A, Katayama Y, Yokoi I and Matsumoto M : Inhibition of taurocyamine (guanidinotaurine)-induced seizures by taurine ; in The Effects of Taurine on Excitable Tissues, Schaffer, Baskin and Kocsis eds, Spectrum Publications, New York (1981)pp 41—48.
- 12) 渡辺駿二 : Guanidinoethanesulfonic acid 誘発痙攣に関する研究—特に脳内モノアミンに及ぼす影響—. 岡山医誌 (1989) **101**, 977—989.
- 13) Shiraga H and Mori A : Convulsive activity of α -guanidinoglutamic acid in rats. IRCS Med Sci (1982) **10**, 855—856.
- 14) Shiraga H, Hiramatsu M and Mori A : Convulsive activity of α -guanidinoglutamic acid and the possible involvement of 5-hydroxytryptamine in the α -guanidinoglutamic acid-induced seizure mechanism. J Neurochem (1986) **47**, 1832—1835.
- 15) Yokoi I, Toma J and Mori A : The effect of homoarginine on the EEG of rats. Neurochem Pathol (1984) **2**, 295—300.
- 16) Matsumoto M, Kobayashi K, Kishikawa H and Mori A : Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits. IRCS Med Sci (1976) **4**, 65.
- 17) Yokoi I, Shimizu Y, Ooba S and Mori A : Effects of GABA-ergic drugs on spike discharges induced by methylguanidine in the rat electrocorticograms. Neurosciences (1990) **16**, 359—364.
- 18) 清水義央 : Methylguanidine の発作発現機構に関する生理学的研究. 岡山医誌 (1990) **102**, 405—417.
- 19) Mori A, Akagi M, Katayama Y and Watanabe Y : α -Guanidinoglutamic acid in cobalt-induced epileptogenic cerebral cortex of cats. J Neurochem (1980) **35**, 603—605.
- 20) Yokoi I, Itoh T, Yufu K, Akiyama K, Satoh M, Murakami S, Kabuto H and Mori A : Effect of 2-guanidinoethanol on levels of monoamines and their metabolites in the rat brain. Neurochem Res (1991) **16**, 1155—1159.
- 21) Johnston JP : Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. Biochem Pharmacol (1968) **17**, 1285—1297.
- 22) Koide Y, Kobayashi K and Shomori T : Monoamine oxidase-A and -B : On the substrate specificities and roles in brain. Neurosciences (1987) **13**, 307—321.
- 23) 庄森敏彦, 土井 亨, 盛政忠臣, 高坂陸年 : ラット大脳部位別モノアミン酸化酵素活性の日内変動に及ぼす加齢の影響. 脳研究会会誌 (1979) **5**, 20—21.
- 24) 原田 豊, 国元憲文, 挟間秀文 : 恒暗条件における, ラット脳神経核 MAO 活性, corticosterone 値および行動量の日内リズム. 脳研究会会誌 (1986) **12**, 100—101.
- 25) 江藤公喜, 小野 猛, 武田雅子, 佐方 由, 宮下佳展, 笠原 閑 : 血清モノアミンオキシダーゼの m-ニトロベンジルアミンを基質とする新比色定量法. 臨床病理 (1972) **20**補冊, 72.
- 26) Jarrott B : Methods for analyzing monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase in nervous tissue ; in Research Methods in Neurochemistry, Vol. 2, Marks N and Rodnight R eds, Plenum Press, New York (1974) pp 377—388.
- 27) 秋山賢次, 清水義央, 加太英明, 横井 功, 森 昭胤, 尾崎正若 : EGC 及び EGCG の脳内 COMT 活性に対する影響. 脳研究会会誌 (1989) **15**, 262—264.
- 28) Lowry OJ, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with folin-phenol

- reagent. *J Biol Chem* (1951) **193**, 265—275.
- 29) Segel IH : *Enzymes* ; in *Biochemical Calculations* (2nd ed), Jhon Wiley & Sons, New York (1976) pp 208—323.
- 30) Marquardt DW : An algorithm for least-squares estimation of nonlinear paramaters. *J Soc Indust Appi Math* (1963) **11**, 431—441.
- 31) Watanabe Y, Yokoi I, Watanabe S, Sugi H and Mori A : Formation of 2-guanidinoethanol by a transamidation reaction from arginine and ethanolamine by the rat kidney and pancreas. *Life Sci* (1988) **43**, 295—302.
- 32) 松本路子, 藤原正昭, 森 昭胤 : ウサギ脳アセチルコリン系酵素に及ぼすグアニジノ化合物の影響. *脳研会誌* (1977) **3**, 128—129.
- 33) 進藤省一郎, 片山泰人, 森 昭胤 : グルタミン酸系酵素におよぼす諸種グアニジノ化合物の作用に付いて. *脳研会誌* (1979) **5**, 96—97.
- 34) Matsumoto M and Mori A : Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na⁺-K⁺ ATPase activity. *J Neurochem* (1976) **27**, 635—636.
- 35) 枝木 彰 : 2-Guanidinoethanol のけいれん誘発作用に関する生理学的研究. *岡山医誌* (1987) **99**, 1333—1347.
- 36) Yokoi I, Edaki A, Watanabe Y, Shimizu Y, Toda H and Mori A : Effects of anticonvulsants on convulsive activity induced by 2-guanidinoethanol ; in *Guanidines II*, Mori, Cohen and Koide eds, Plenum Press, New York (1989) pp 169—181.
- 37) Shindo S, Tsuruta K, Yokoi I and Mori A : Synthesis of δ -guanidinovaleric acid and tis effect on EEG of rats. *Neurosciences (Kobe)* (1984) **10**, 177—182.
- 38) Yokoi I, Tsuruta K, Shiraga H and Mori A : δ -Guanidinovaleric acid as an endogeneous and specific GABA-receptor antagonist, *Electroencephalographic study*. *Epilepsy Res* (1987) **1**, 114—120.
- 39) Marescau B, Hiramatsu M and Mori A : α -Keto- δ -guanidinovaleric acid-induced electroencephalographic epileptiform discharges in rabbits. *Neurochem Pathol* (1983) **1**, 203—209.
- 40) Kabuto H, Iwaya K, Yokoi I and Mori A : Effects of 5-guanidinovaleric acid on monoamine release in rat striatum ; in *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*, De Deyn, Marescau and Stalon eds, John Libbey & Company, London (in press).
- 41) Fowler CJ and Tipton KF : Deamination of 5-hydroxytryptamine by both forms of monoamine oxidase in the rat brain. *J Neurochem* (1982) **38**, 733—736.
- 42) 江頭 亨, モノアミンオキシダーゼ阻害剤 : モノアミンオキシダーゼA・モノアミンオキシダーゼB. *生体の科学* (1991) **42**, 483—487.
- 43) Callingham BA : Comparative aspects of monoamine oxidase. *Vet Res Commun* (1983) **7**, 325—330.
- 44) Lewinsohn R, Glover V and Sandler M : Development of benzylamine oxidase and monoamine oxidase A and B. *Biochem Pharmacol* (1979) **29**, 1221—1230.
- 45) Zreika M, McDonald IA, Bey P and Palfreyman MG : MDL 72145, an enzyme-activated irreversible inhibitor with selectivity for monoamine oxidase type B. *J Neurochem* (1984) **43**, 448—454.
- 46) Chen S, Shih JC and Xu Q-P : Inhibition of monoamine oxidase by phenyl azides. *J Neurochem* (1985) **45**, 940—945.
- 47) Naoi M, Nomura Y, Ishiki R, Suzuki H and Nagatsu T : 4-(O-Benzylphenoxy)-N-methylbutylamine (Bifemeran) and other 4-(0-benzylphenoxy)-N-methylalkylamines as new inhibitors of type A and B monoamine oxidase. *J Neurochem* (1988) **50**, 243—247.

- 48) Kan J-P, Steinberg R, Leclercq J, Worms P and Biziere K : Monoamine oxidase-inhibiting properties of SR 95191, a new pyridazine derivative, in the rat : Evidence for selective and reversible inhibition of monoamine oxidase type A in vivo but in vitro. *J Neurochem* (1988) **50**, 1137—1144.
- 49) Fu RC, Liu X-F and Chen S : Inhibition of monoamine oxidase by 7-chloro-4-nitrobenzofuran. *J Neurochem* (1990) **55**, 813—818.

Effects of guanidino compounds on monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activity

Katsuhisa HUKUYAMA

Department of Neuroscience,
Institute of Molecular and Cellular Medicine,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. A. Mori)

In the central nervous system (CNS) of mammals, monoamine oxidase (EC 1. 4. 3. 4) (MAO), which have been divided into two functional forms (MAO-A and MAO-B), and catechol-O-methyltransferase (EC 2. 1. 1. 6) (COMT) act as catabolic enzymes of catecholamines and serotonin regulating their concentrations. In this study, the effects of guanidino compounds (5mM) on MAO-A, MAO-B and COMT were examined to investigate the role of guanidino compounds in CNS function.

MAO-A activity was decreased by α -guanidinoglutaric acid (GGA) and guanidinoethanesulfonic acid, and increased by arginine (Arg) and N-acetylarginine at a low substrate concentration (4.33 μ M). MAO-B activity was decreased by creatinine (CRN), δ -guanidinovaleric acid (GVA) and methylguanidine (MGua) at a high substrate concentration (3.125mM), and decreased by CRN, GVA, MGua, Arg, guanidine, 2-guanidinoethanol, β -guanidinopropionic acid, guanidinosuccinic acid and homoarginine at a low substrate concentration (62.5 μ M). GVA, CRN and MGua acted as competitive inhibitors on MAO-B and their calculated K_i values were 9.47mM, 14.5mM and 29.4mM, respectively. Although the guanidino compounds tested had no effect on COMT activity at a high substrate concentration (600 μ M), GSA and GVA inhibited COMT activity at a low substrate concentration (75 μ M).

These results suggest that some guanidino compounds influence catabolic enzymes of indoleamine and catecholamines to control CNS function.