

[Japan. J. Pharmacol., 35, 163 (1984)]

### A Simple Assay for Monoamine Oxidase Using Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase

TAMOTSU NAKANO\*, SATOSHI KAWAI, TOSHIHARU NAGATSU\*

グルタチオンパーオキシダーゼとグルタチオンリダクターゼを用いるモノアミンオキシダーゼの簡易測定

中野 完\*, 河合 聡, 永津俊治\*

モノアミンオキシダーゼ (MAO) による酵素的酸化反応は  $H_2O_2$  を生成する。 $H_2O_2$  はグルタチオンパーオキシダーゼ (GSH-P<sub>X</sub>) の作用でグルタチオン (GSH) を酸化し、酸化グルタチオンはグルタチオンリダクターゼ (GR) と NADPH の存在で GSH に戻る。ここに生成する NADP<sup>+</sup> をけい光測定することによって MAO 活性を測定する新測定法が開発された。〔測定法: MAO を含むミトコンドリア画分に 0.1M りん酸緩衝液 (pH7.4), 2mM-GSH, 3mM-Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 充分量の GSH-P<sub>X</sub> と基質 (モノアミン) を加えてインキュベートする。次に 0.05M-Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 3mM-MgCl<sub>2</sub>, 5mM-EDTA, 15 $\mu$ M-NADPH, 2 $\mu$ g の GR を加え, 再び 25°C, 3 分インキュベートし, 励起波長 360nm, けい光波長 460nm でけい光強度を測定する。〕本法はブランク値が高いという欠点があるが, 反応生成物の単離を必要としない利点があり, 10nmol~50nmol の生成  $H_2O_2$  量に対してけい光強度は直線性示す。本法は MAO 阻害剤の研究手段としてきわめて有用であり, クロルジリンとデプレニルについての実験例が示された。またラット脳ミトコンドリアを用いた基質特異性の研究結果も報告されている。

\* 東京工業大学大学院

[BUNSEKI KAGAKU, 33, E 73 (1984)]

### Fluorometric Determination of Hydrogen Peroxide with Catalase-Hantzsch Reaction System Using Methyl Acetoacetate

SATOSHI KAWAI, CHIE TSUTSUI

アセト酢酸メチルエステルを用いたカタラーゼ-Hantzsch 反応による過酸化水素のけい光定量

河合 聡, 筒井千恵

カタラーゼはメタノールの存在下  $H_2O_2$  の酸化反応を触媒して HCHO を生成する。HCHO は Hantzsch 反応によってつよけい光性のルチジン誘導体を生成する。従来, 発けい光試薬としてはアセチルアセトン (AA) またはエチルアセトアセテート (EA) が用いられてきたが (HCHO+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+AA or EA→けい光), メチルアセテート (MA) を用いた場合のけい光挙動について詳細に検討を加えた。AA, EA, MA の 3 者を比較するとき, HCHO-MA はもっともつよけい光強度を示し, 励起極大波長は 375nm, けい光極大波長は 463nm であった。HCHO-MA のけい光強度は HCHO-AA に比べ, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度が 0.1M のとき約 2.5 倍, 1.0M のとき約 4 倍であった。〔 $H_2O_2$  の測定法: 1.5 $\mu$ g 以下の  $H_2O_2$  を含む試料液 1.0ml にメタノール 0.5ml, カタラーゼ水溶液 (1000U/ml) 0.5ml, 0.02M の MA と 0.2M の酢酸アンモニウムを含む試液 2ml を加え, 37°C, 60 分間インキュベートする。室温で 30 分間放置後, 375→463nm でけい光強度を測定する。〕本法は 0.03~1.5 $\mu$ g/ml の  $H_2O_2$  に対して直線性を示し, 0.3 $\mu$ g/ml の  $H_2O_2$  に対する繰り返し実験での変動係数は 1.9% (n=5) であった。本法はアスコルビン酸, 尿酸, エチルアミン, エチレングライコール, アセトンの 3 倍量の共存で影響をうけなかった。