

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590148

研究課題名(和文) 化合物によるカテコール-O-メチル転移酵素の生成物阻害解除機構の解明

研究課題名(英文) Catechol-O-methyl transferase Activator; Its molecular mechanism of action.

研究代表者

飯島 洋 (IIJIMA, Hiroshi)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：30465281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Catechol-O-methyl transferase (COMT)の低活性は慢性腎機能障害の進行、動脈硬化、心不全などに相関する。COMTの反応速度を上昇させる化合物を探索した。酵素反応速度論解析から賦活化物質は「S-アデノシルホモシステイン(SAH)-COMT」複合体からのSAHの解離を促進することを見出した。SAHは基質であるS-アデノシルメチオニンがCOMTに結合することを競合的に阻害する。このことは等温熱量滴定によっても裏付けられた。構造活性相関を調べたところ、構造的に類似している化合物には阻害活性を示すものも存在した。構造の一部の差が相反する効果(阻害、賦活化)に反影する。

研究成果の概要(英文)：Catechol-O-methyl transferase (COMT) plays a critical role in vivo to control peripheral blood concentration of noradrenaline. COMT deficiency is considered to relate with several diseases that include chronic kidney disease, atherosclerosis and cardiac insufficiency. We had discovered compounds that enhance apparent COMT reaction velocity. Enzyme kinetic study revealed that the compounds increase the dissociation of S-adenosylhomocysteine (SAH) from SAH-COMT complex. SAH is a product of COMT reaction and is at the same time a strong inhibitor that competes with S-adenosylmethionine. This mechanism was confirmed by isothermal titration calorimetric experiments. Next we studied the structure-activity relationship of the enhancer compounds. During this study we found some compounds that are structurally very similar to the enhancer compounds exhibit inhibition activity. Difference of molecular volume seemed to explain the converse.

研究分野：医歯薬学

キーワード：カテコール-O-メチル転移酵素 COMT 生成物阻害 S-アデノシルホモシステイン

1. 研究開始当初の背景

血液中のノルアドレナリン(NE)の濃度の維持調節は健康にとって非常に重要である。カテコール-O-メチル転移酵素(COMT)は血中 NE の代謝を担う酵素である。

COMT は、S-アデノシルメチオニン(SAM)をメチル供与基質として最初に結合し、次に NE を結合し COMT/SAM/NE 複合体を形成する(図1)。NE はメチル化されノルメタネフリン(NMN)となり、SAM は S-アデノシルホモシステイン(SAH)となるが、SAH は COMT に対し親和性が高く、生成物阻害 (product inhibition) をかける。

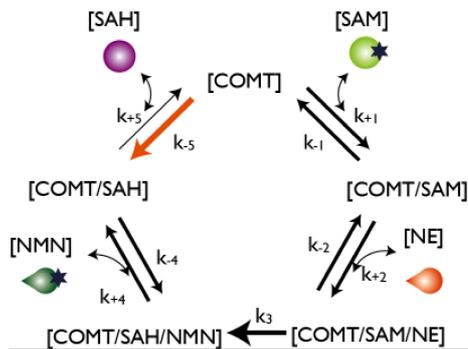


図-1

腎不全患者では血中の NE の濃度が亢進し、透析導入時の NE 血中濃度が高いほど生存率が低下し、その死因は心血管系の機能不全によることが臨床研究で明らかにされている。我々は腎臓傷害モデル動物と生活習慣病由来腎症のモデル動物の両方において、COMT 代謝能力の低下と腎機能の低下に強い相関があることを確認している。心血管系リスクと血中のホモシステイン (SAH と生体内で平衡にある) の濃度に相関があること、ならび、蛋白質としての COMT の発現量は十分であることを考え合わせ、腎機能の低下や心血管系障害進行には、COMT 活性が負の制御を受けていることが関連していると考えた。

また、近年、高い血管保護作用を有する 2-メトキシエストラジオールの生産において COMT が責任酵素であることも明らかになり、COMT の生体内における機能低下が、腎機能低下、血管障害、高血圧などに深く関与していることが確定的になり、COMT 不全症と呼ばれるようになった。

COMT 活性が上がれば腎機能低下防止、あるいは心血管不全の防止につながるということは仮説の域をでるものではないが、もし、COMT の賦活化物質に腎保護作用、透析導入までの期間延長、心血管障害防止などの効果があれば、今日の我が国の総医療費 33 兆円の 5%を占める透析患者の治療に役立つ新規薬

品につながると期待できる。

2. 研究の目的

本研究に先立ち、我々は COMT の賦活化物質を見出すことに成功していた。また、この物質は酵素反応生成物である SAH による阻害 (生成物阻害) を解除することを推定していたが、その詳細な機構は不明であった。本研究では、化合物による賦活化はなぜ起こるのかについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 固定化酵素を利用した SAM、SAH の COMT に対する結合定数の決定: 我々は COMT を GST(グルタチオン S 転移酵素)との融合蛋白 GST-COMT として発現することができる。そこで GSH-sepharose 担体に固定化した GST-COMT を利用して、SAM と SAH に対する結合親和性を評価した。同濃度の SAM と SAH (8.5μM) を含む緩衝液に、固定化した GST-COMT (およそ 12μM 相当)を加えた。上清の SAM と SAH の濃度を測定すると、SAM は 13%結合したのに対し、SAH は 35%が結合していた。このことは COMT の SAH と SAM に対する親和性の差異に相当すると考えられた (図-2)。

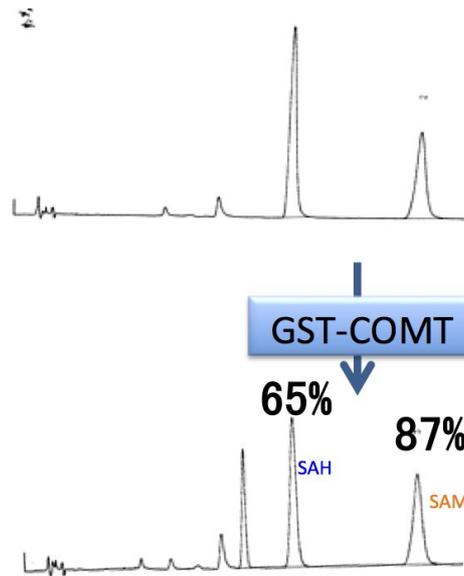


図-2

そこで、この固定化 GST-COMT に濃度を変化させた SAH を加え、液相の非結合(フリー)のリガンド量を HPLC で定量して結合定数を求める試みを計画した。ところが GST-COMT は化合物によって賦活化を受けないことが判明し、この計画は中止した。

(2) 融合タンパク質を利用した固定化 COMT の利用は不適切と判断し、そこで COMT を精製し、その酵素反応速度論解析を行った。図-1 に示す反応メカニズムにおける、最大反応速度 V_{max} 、SAM の K_m 、SAH の阻害定数 K_i は、各

段階の速度定数を用いて下記のように表すことができる (図-3)。

速度論パラメーター	各速度定数の寄与	化合物添加による変化 (増加・減少 倍)
V_{max}	$1/\left(\frac{1}{k_{-3}} + \frac{1}{k_{-4}} + \frac{1}{k_{-5}}\right)$	↑ 1.4 ~ 2.3
K_m^{SAM}	$\frac{1}{k_{-1}} V_{max}$	↑ 1.8
K_m^{NE}	$\frac{k_{-2} + k_{-3}}{k_{-2} k_{-3}} V_{max}$	→ 1.0 ~ 1.3
K_i^{SAH}	$\frac{k_{-5}}{k_{-5}}$	↓ 1.3 ~ 1.5

図-3

化合物 (100 μ M) が共存した時の各パラメーターの変化 (図-3 右列) をみると、 k_{-5} が大きくなる変化 (つまり SAH が SAH-COMT 複合体から解離しやすくなる) が化合物によりもたらされたと考えられた。

(3)等温滴定熱量分析は、リガンドを滴定することで、リガンドとリセプターが結合するときに発する結合熱を測定し、もって結合定数を測定する方法である。本法によっても SAH と COMT の結合定数の低下が確認できた。また、(2)と(3)から、化合物は予測どおり、SAH の結合定数を低下させる効果をもつと結論できた。

(4) 賦活化化合物の構造活性相関：我々は二つの異なる基本骨格 (TAZ 系と OBCN 系 図-4) をもつ賦活化物質をスクリーニングによって見い出していた。このうち、oxabicyclononane (OBCN) 骨格を有する賦活化物質の類似構造体について、COMT 活性への影響を調べた。

13 個の化合物について、COMT 反応への影響を調べたところ、賦活化活性を示す化合物に加え、酵素活性を阻害する化合物も見出された (図-4)。

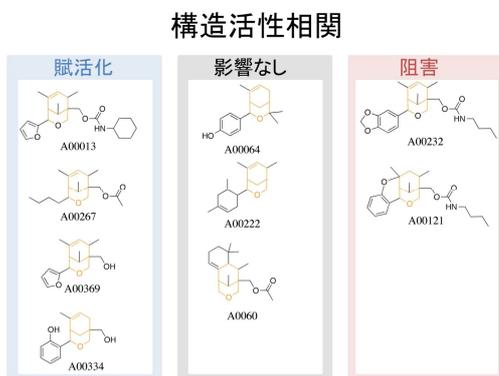


図-4

賦活化物質は阻害物質と構造が類似しているが、分子体積が小さい傾向がある。COMT の同一部位に結合するが、その分子体積の差が、賦活化と阻害の差となる可能性が示唆された。OBCN 系化合物については合成が可能であるので、今後は系統だった構造活性相関データを蓄積し、より活性が強い化合物の取得に結びつけたい。

賦活化物質と類似した阻害剤について、その濃度依存性を調べたところ、その効果はともに濃度依存性であった (図-5)。このことから OBCN 系化合物は COMT に結合する部位があることが示唆される。

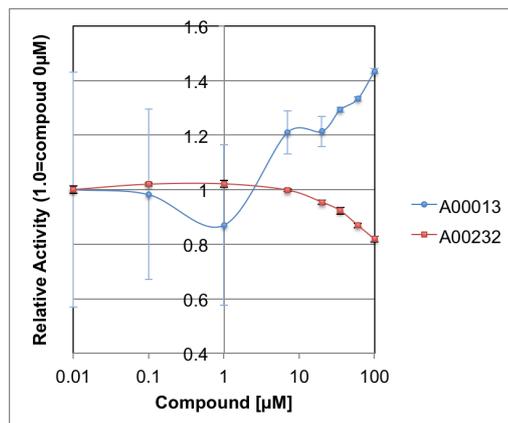


図-5

また、賦活化化合物と阻害化合物を SAH の濃度を変えて評価すると、SAH によって COMT が活性を失って ($[SAH]=30\mu$ 図-6 中央) も賦活化物質は 30%程度の COMT 活性を維持せしめた。中庸な SAH による阻害(右)でも、阻害物質はやはり阻害活性を示した。

SAHによる生成物阻害に対する効果

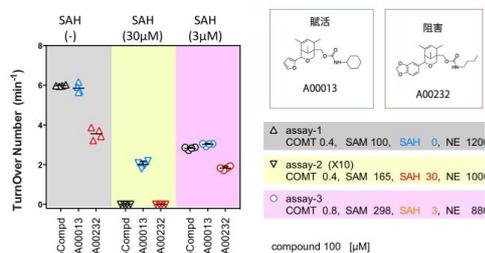


図-6

4. 研究成果

COMT の SAH による強い生成物阻害を解除する賦活化物質を見出した。賦活化化合物は酵素の表面に結合し、SAH-COMT 複合体からの SAH の解離を促進する。また、複合体が賦活化活性を示すためには分子体積が小さめである

ことが必要である。
 今後は賦活化活性を高め、動物実験に供することができる化合物を取得し、COMT 不全の解消が病態にどのような改善効果を示すかを追求したい。

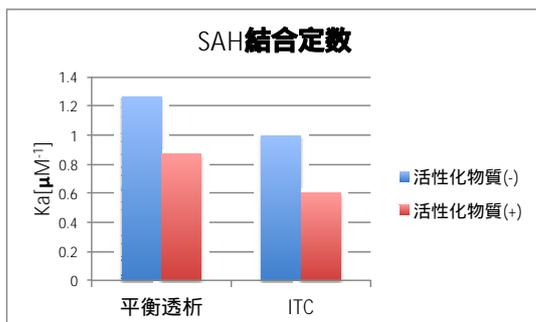


図-7

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 板倉利典、歌川将之、栗城知葉、佐藤知幸、増田衛二、山北絵梨、高宮知子、鈴木守*、飯島洋(*大阪大学蛋白質研究所) カテコール-0-メチル転移酵素賦活化物質
 日本薬学会第135年会 2015.3.28 神戸学院大学(兵庫・神戸)
- (2) 飯島洋、増田衛二、山北絵梨、増田喬行、布施拓也、高宮知子、寒川剛*、鈴木守*(*大阪大学蛋白質研究所) 化合物によるカテコール-0-メチル転移酵素の賦活化
 日本薬学会第134年会 2014.3.28 熊本大学(熊本・熊本)
- (3) 増田 喬行、布施 卓也、川島 洋、宮川 雅樹、高宮 知子、飯島 洋
 化合物によるカテコール-0-メチル転移酵素の賦活化
 日本薬学会第133年会 2013.3.28 パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://biofunctionalorgchem.pha.nihon-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 洋 (IIJIMA, Hiroshi)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：30465281

(2) 研究分担者

鈴木 守 (SUZUKI, Mamoru)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：40280507

高宮 知子 (TAKAMIYA, Tomoko)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：50513917

(3) 連携研究者

()

研究者番号：