

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究スタートアップ  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20890235  
 研究課題名（和文） 腎保護物質の探索  
 研究課題名（英文） Quest for Renoprotective Agents

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

研究成果の概要（和文）：腎機能障害と交感神経系の亢進が相関すること、腎機能障害患者の生存率と血中ノルアドレナリン濃度とは逆相関すること、抹消循環におけるカテコールアミンの代謝は特に腎機能障害患者ではカテコールアミン O-メチル転移酵素(COMT)が司ること、そして、腎機能障害時には COMT 活性が低下することなどから、COMT 活性を向上させることは腎保護作用に結びつくと考えられた。そこで活性化物質の探索を企画し、そのための物質探索系（アッセイ系）の構築と少数の化合物のスクリーニングを実施したところ、化合物濃度 10 $\mu$ M において、酵素反応生成物の量を 10%程度向上させる化合物を複数みいだした。

研究成果の概要（英文）： There are several reports that suggest the importance of COMT in kidney dysfunction. For example, the progress of kidney dysfunction accompanies sympathetic hyperactivity, the mortality of patient with kidney dysfunction inversely correlates with higher blood concentration of NE, and metabolism or clearance of NE depends on COMT. We intended to establish a new screening method to find out a COMT activator. The initial trial of the activator screening resulted in discovery of compounds with which the enzyme reaction increased approximately 10% at 10  $\mu$ M.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,310,000	393,000	1,703,000
21 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,280,000	684,000	2,964,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：カテコールアミン；メチルトランスフェラーゼ；COMT；活性化；腎臓；心血管系障害；代謝

1. 研究開始当初の背景  
 腎機能障害患者では、交感神経の亢進に起因する血中ノルアドレナリン(NE)の濃度が上

昇している。近年、抹消系における NE の主たる代謝酵素であるカテコール O-メチル転位酵素 (COMT) の活性低下が、腎機能障害

に起因する様々な心血管障害に大きな影響を与えているという仮説とそれを支持する事実が明らかにされてきている

しかしながら、未だに、COMTの活性向上が腎機能障害における心血管系保護作用につながるという積極的な根拠は見いだされていない。

## 2. 研究の目的

本計画は、ヒトのカテコール O-メチル転位酵素 (COMT) の酵素活性を高める活性化物質を探索手法を確立し、活性化物質を見いだす。

## 3. 研究の方法

ヒト COMT 遺伝子を含むプラスミド (Invitrogen 社 FL-1002 3503220) から PCR によって COMTc-DNA を増幅した。増幅された DNA を、PCR プライマーに導入されていた制限酵素部位を利用して、発現ベクタープラスミド pGEX-2T (GE Healthcare 社) に挿入し、グルタチオン S-転位酵素 (GST) の C 末端側に、トロンピン消化アミノ酸配列をはさんで、融合タンパク質として COMT (可溶型 S-COMT) を発現させた。このプラスミドで形質転換した大腸菌 BL-21 (Stratagene 社) 菌体から抽出したタンパク質画分をグルタチオン固定化カラムに負荷した。カラムに吸着された GST-COMT 融合タンパク質を、吸着したまま、トロンピンで消化し、次いで緩衝液で溶出することにより、SDS 電気泳動的に均一なタンパク質として精製 COMT を得た。培養 1mL あたり 6 $\mu$ g の COMT を得た。COMT の活性化物質を探索する本計画では、取得した組換え酵素が生体由来の天然の COMT と同等の性質を有していることが前提であるので、組換え COMT の酵素学的な検討を、後述する HPLC による定量系を利用して行った。ノルアドレナリン (NE) に対する  $K_m$  は 160 $\mu$ M, S-アデノシルメチオニン (SAME) に対する  $K_m$  は 70-170 $\mu$ M であった。また、COMT の阻害剤である 3,5-ジニトロカテコールの  $K_i$  値は 2nM, IC<sub>50</sub> 値は 30-60nM となり、組換え S-COMT はヒト赤血球や肝臓の S-COMT と同等性を有するものと判断できた。

酵素反応アッセイは COMT 反応生成物であるメタネフリン (NMN) をイオン交換-イオン対逆相 HPLC で分離し、電気酸化後にエチレンジアミンと反応させ生じるキノキサリンを蛍光により定量した。

## 4. 研究成果

COMT に関しては既知の活性化物質は知られていないため、活性化物質を検出する条件も未知であった。通常、酵素反応の評価は  $K_m$  の数倍以上の基質濃度 (飽和条件) で行われる。しかし、活性化物質を見いだすためには、

飽和条件での反応が適しているとは限らない。

そこで実際に小規模の化合物のスクリーニングを、系の NE 濃度、SAME 濃度をいろいろと変化させて実施した。酵素濃度 0.25 $\mu$ M で反応させるとき、被検化合物 (濃度 1-10 $\mu$ M) が共存する場合と化合物の無い場合での NMN 生成量を比較して活性化を調べたところ、二つの化合物に 10%程度の生成物の増加を認めた。この化合物を利用して、さらに活性化を検出しやすくする条件を調べたところ、SAME の濃度を  $K_m$  程度 (100 $\mu$ M) に下げることが有効であった。NE の濃度には依存性は小さかった。このことから、活性化物質は SAME または SAH と COMT の結合あるいは解離に影響を与えている可能性が示唆された。COMT の代謝回転数は数回/秒と小さいが、このことは COMT の反応機構 (ping-pong Bi-Bi 機構: SAME in - NE in - NMN out - SAH out) における SAH (S-アデノシルホモシステイン) が酵素に対して持つ強い親和性によるとされていることとよく対応すると考えられる。

## 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)

### (1) [雑誌論文] (計 1 件)

Iijima H, Okada Y, Takamiya T, Tsunoda M, Imaki K Quantification of Norepinephrine and its Metabolite in the Plasma of Renal Failure Models *Nephron* in press (2010) 査読あり

### (2) [学会発表] (計 2 件)

① 蕪武高行, 高宮知子, 角田誠, 今井一洋, 飯島洋 組換えヒト S-COMT を用いた化合物スクリーニング系の構築  
日本薬学会第 130 年会 2010.3.29 岡山

② 飯島洋, 岡田雄治, 高宮知子, 角田誠, 今井一洋 腎機能障害モデル動物におけるノルアドレナリンの代謝能力  
日本薬学会第 130 年会 2010.3.30 岡山

### (5) [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) 研究協力者 蕪武 高行 (SOBU TAKAYUKI)

日本大学・薬学部・大学院博士前期課程 1 年