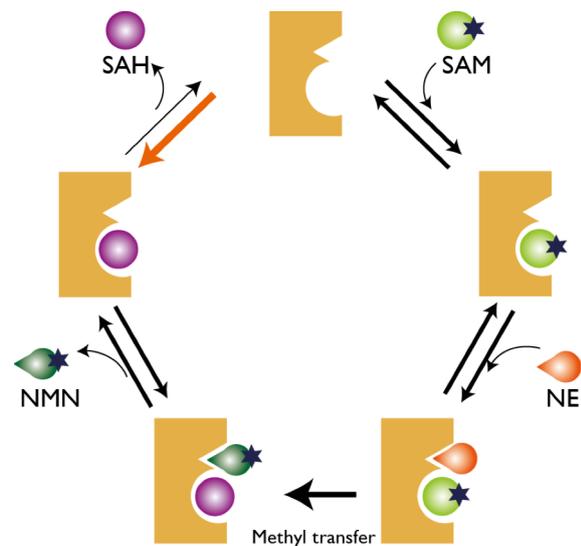


[背景]

カテコール-O-メチル転移酵素 (catechol-O-methyl transferase, COMT) は、ノルアドレナリン (noradrenaline, norepinephrine, NE) やドパミン (dopamine, DA) などのカテコール類の水酸基をメチル化する代謝酵素である。

COMT の反応では、COMT はまず、(i) 第一基質である *S*-adenosylmethionine (SAM) を Mg^{2+} イオンを伴って結合し、(ii) ついで第二基質であるカテコール類例えば NE を結合する。こうして生じた COMT/SAM/ Mg^{2+} /NE 複合体上で第二基質の水酸基が SAM のメチル基に求核反応し、(iii) ノルメタネフリン (Normethanephrine, NMN) が生じる。SAM はメチル基を失い、*S*-adenosylhomocysteine (SAH) となる。ついで酵素から NMN が離脱し、最後に SAH が離脱することで、酵素反応触媒サイクルが 1 回転する。この反応機構 (ordered Bi-Bi) は、COMT の立体構造と酵素化学的検討から強く支持されているものである。



COMT の触媒回転数は数回/分であり、触媒回転数が極めて低い。その理由は、SAH の COMT に対する高い親和性である。我々の測定では、COMT に対する SAM の結合親和性 (K_m^{SAM}) は 60-100 μM 、NE の K_m^{NE} は 100 μM であるが、SAH の結合親和性 (K_i^{SAH}) は 1 μM である。つまり、SAH は COMT にとって強い阻害物質である。生体内の SAM と SAH の濃度は 100 μM 程度であるから、COMT はむしろ活性を抑えられている状況である。体液のホモシステインの濃度が高い場合は、SAH の濃度も高くなり、COMT は強い阻害を受けていると考えられる。

我々は COMT の活性を賦活化 (enhance) する物質を研究している。その背景についてまず説明する。

腎臓透析患者に代表される末期腎不全 (End Stage Renal Disease ESRD) の患者では、交感神経系の亢進が知られており、腎機能の低下との関連性が昔から指摘されている。物理的傷害、酸化ストレス、炎症などにより腎臓が傷害を受けると求神路経由で中枢が刺激され、交感神経系の亢進を引き起こす。その亢進による血圧負荷、局所レニンアンギオテンシン系の亢進などでさらに腎臓の負荷が上昇すると考えられている。腎障害患者の腎臓の求心性の神経を除去すると交感神経系の亢進は低下し、腎機能の低下に歯止めがかかること、モデル動物において、腎臓に障害を与える前にブロッカーを投与しておくことで腎機能の低下が防止されることなどが実験的に示され、腎臓の傷害と交感神経系亢進は原因と

結果が循環している関係である。なお、交感神経亢進の指標として、神経末端の発する時間あたりの電位パルスの数、血中ノルアドレナリンの濃度などが知られている。

腎臓機能障害患者は腎機能が次第に低下し、最終的には透析を導入することになる。この末期腎不全の患者について Zoccali らの行った疫学研究では、血中 NE 濃度は、患者の生存率に最も寄与が大きく、とりわけ心不全による死に関連した。腎臓と心臓は、交感神経系、レニンアンギオテンシン系などの関連をもち密接な関係がある。

7週齢の SD (Sprague-Dawley) ラットは標準的な実験ラットである。このラットの腎臓の 5/6 機能を破壊 (5/6 nephrectomy) すると、術後 8 週間で顕著な腎不全に陥る。この実験モデルは慢性の糸球体障害性腎不全のモデルとされている。我々はこのモデル動物において腎機能低下の進行と COMT 活性の相関を調べた。COMT の活性の指標としては末梢血中の NMN の比率、具体的には、 $[NMN]/([NMN]+[NE])$ を測定した。その結果、腎機能の低下度 (クレアチニンクリアランス CCr と血中尿素窒素濃度 BUN) との間に相関が成り立つことを見出し、COMT の活性と腎臓機能障害には相関がある可能性を確認するに至った。Zucker-Diabetic-Fatty ラットはレプチン受容体の機能欠損と共に糖尿病を発生するラットである。このラットの腎臓を 1/2 機能破壊したラットは糖尿病を背景にした腎不全モデルであるが、このモデルにおいても同様に $[NMN]/([NMN]+[NE])$ 比の低下と腎機能低下は相関した。

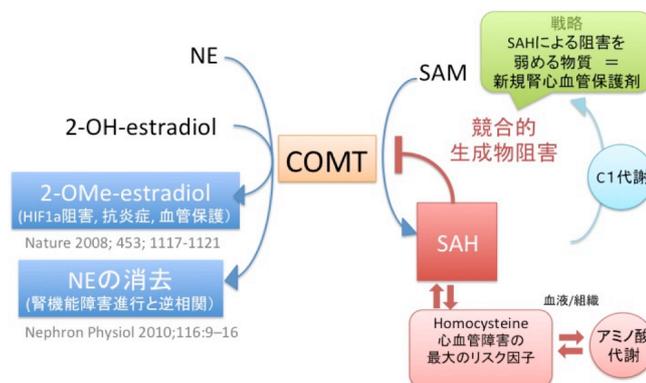
ホモシステインと SAH は生体内では、ATP からの生成と加水分解による分解の関係にあるが、血中のホモシステイン濃度は、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞などの重篤な心血管系障害と強い相関があることがよく知られている。このことは SAH による COMT 活性の低下と結びついていると我々は推測している。実際に、腎機能低下と血中ホモシステイン濃度は相関することは臨床的に知られている。ここで注目したいのは、含硫アミノ酸は正常人においても腎排泄されないため、腎臓患者の高い血中ホモシステイン濃度は腎機能の低下では説明されない点である。

以上を総合して、我々は SAH による COMT の活性の低下、すなわち末梢循環の NE のクリアランスの低下が腎臓障害の進行や血管系障害の進行に関与しているのではないかと考え、COMT の活性を高める物質 (賦活化剤 enhancer) は、腎臓や心血管系の障害を緩和する可能性があると考えている。

この仮説を直接的に証明あるいは否定する研究は我々が知る限りまだなされていない。COMT の活性の低下が SAH によるものであると COMT 遺伝子をノックインした動物を用いても結局活性が出ていないことになるから、COMT 活性を上昇させた実験動物を作ることは難しい。一方、この仮説を間接的に支持していると解釈できる研究はいくつかある。(1) COMT をノックアウトした動物を用いた実験では、COMT がいない動物は容易に腎性高血圧を発症することが示されている。(2) 自然発症高血圧ラット (SHR) は、交感神経系亢進動物であり、血中の NE 濃度が通常のラットよりも高いことが知られている。このラットに SAM を静脈投与すると、つまり、COMT の基質濃度を高くすると、血中の NE 濃度が低下することが示されている。(3) 腎臓はモノアミン酸化酵素を分泌していることも判明している。このモノアミン酸化酵素は renalase と呼ばれる可溶性酵素であるが、プロ酵素として腎臓から血流に分泌され、血中の NE 濃度が上昇すると、プロ酵素から活性酵素が生じて、血中 NE を代謝する働きをもつ。腎臓は自ら末梢循環の NE を代謝する酵素を分泌している。腎臓機能障害によりリナラーゼの分泌が低下すると NE 代謝能力は低下することになる。

COMT 活性の低下が血管系臓器の保護能力を低下させる原因である可能性を支持する事実がある。エストラジオールがさらに酸化されて生じる 2-hydroxyestradiol (2HE)には血管保護作用があることが知られていたが、その活性本体は 2ME が COMT によりメチル化された 2-methoxyestradiol (2ME)であることが判明している。つまり COMT 活性の低下は、末梢 NE の代謝能力の低下と共に 2ME の合成能力の低下につながり、両者とも腎機能低下、心血管系機能低下に結びつく。

COMT不全と腎心血管系障害



[賦活化物質の探索]

我々は 2007 年以来、COMT の賦活化物質を探索してきた。最初に市販のラット肝臓由来の COMT を用いて 5000 化合物のスクリーニングを行った。化合物は 5 万化合物のライブラリからランダムに選んだ。この中から阻害剤が多数見出されたのに対し、10%程度活性を向上させた化合物が 3 つ見出された。この三つの化合物には構造上の特徴として飽和炭化水素環構造をもち、カルボニルあるいは水酸基を有するものであった。ヒット化合物はどれもその立体構造が平面的ではないことに注目し、テルペンないしテルペン類似化合物を Inter Bio Screen 社の天然物化合物ライブラリ 2000 化合物のリストから 350 化合物を選択し評価した。このライブラリは分子量が小さい化合物が多かったこともあり、化合物の選択では回転可能結合数 6 本以下、ClogP が 3 から 6、分子量 235 以上という条件を設定した。回転結合数が多い化合物は多数の配座を持つので構造活性相関を考察する時に不利であるため、ClogP が大きい場合は水溶性の低さや非特異的なタンパク結合などで好ましくなく、小さい場合はタンパクへの結合親和性に不利と判断した。この二つの条件では分子量が小さい化合物にバイアスがかかるので分子量の下限を設定した。

この 350 化合物の中から、30%以上の賦活化活性を示した化合物が 23 化合物得られた。

[活性測定法]

COMT の活性は NE を基質として生成した NMN を定量することで評価した。本研究では賦活化に興味があるので生成物に対して選択的・特異的な分離と検出が行われる必要がある。本研究で採用している活性評価 (NMN 定量法) は下記のような方法である。酵素反応は、酵素蛋白 (2-10 μ g)、Mg²⁺ (2mM)、SAM (100-600 μ M) をリン酸緩衝生理食塩水 (500 μ L) 中 37°C に保温し、NE (1mM) を添加して開始する。実験によっては SAH (10-120 μ M) や化合物 (DMSO 溶液) を添加する。通常 10-15 分の反応を行ったのち、過塩素酸で反応を停止し、除蛋白処理を行った反応液を HPLC で分析する。HPLC は

プレカラムとしてイオン交換担体で塩基性物質をトラップし、溶媒を切り替えてNEやNMNをイオン交換担体から離脱させ、イオンペアクロマトにより、逆相カラムでNEとNMNを分離する。逆相カラムから溶出したNEやNMNは電極酸化ユニットによってキノンに酸化される。このキノンにエチレンジアミンを反応させて生じるキノキサリンの蛍光(励起 401nm 発光 500nm)で検出する。我々の分析系では一分析あたり20分を要する。

[組換え COMT の調製]

COMT は初期スクリーニングでは市販のラット COMT を用いた。それ以降の実験ではヒトの COMT を市販の pGEX2T ベクターに組み込んだ発現プラスミドを構築し、そのプラスミドで形質転換した大腸菌(BL-21 株)によって、 β -ガラクトシラーゼ *lac* プロモーターの下でグルタチオン-S-転移酵素(GST)との融合タンパク質として生産させている。この大腸菌を LB 培地 37°C で培養し、イソプロピル- β -ガラクトシド (ITPG)を加え(500 μ M)、培養温度を 20°C に下げて培養(16hr)すると、1L 培養あたり 8g(湿重量)の菌体を得る。

COMT は、下記の手順で精製した。(1) 菌体質量の 5 倍量の溶菌剤(Bug BasterTM)でタンパク質を抽出、(2) グルタチオン固定化担体に吸着させ、担体を 4mM DTT を含む PBS(DTT/PBS)で洗浄したのち、(3) 担体を DTT/PBS に懸濁させ、トロンピンを加えて一晩室温で消化、(4) 担体から COMT を溶出した。この COMT 画分を 50mM Tris-HCl/1mM DTT に徹底的に透析したのち、(5) Q-spharose クロマトグラフィー(NaCl 0 \rightarrow 0.5M グラジエント)で精製した。COMT 画分を遠心限外濾過濃縮したのち、(6) Superdex75 (DTT/PBS)で精製した。菌体質量 10gr あたりから単量体画分として 4mg 程度の精製 COMT を得ることができる。

最後のゲル濾過では COMT は二量体と単量体のピークに分離する。単量体画分と二量体画分は未変性のポリアクリルアミド電気泳動(Native PAGE)でも連続した(スミアな)バンドとして確認できる。二量体は二分子の COMT が C 末端のヘリックスをお互いに入れ替えあった構造をもつ domain swap dimer である。我々の測定では二量体画分の比活性は単量体の単量体の比活性よりも低い。このことから、賦活化のメカニズムの一つとして、化合物による二量体-単量体平衡の割合の変化も検討する予定である。

我々が生産した COMT は pGEX ベクター由来のトロンピン消化部位に由来する Gly-Ser が N 末端に付加しており、C 末端は pGEX への組み込みのため、天然の COMTC 末7残基 (PGSEAGP)が欠失している。アミノ酸残基レベルでの配列は LC-MS で確認できている。

またヒトの COMT だけでなく、ラットの COMT も同様に pGEX-2T ベクターに組み込み、発現、精製を行った。タンパクの発現量、精製上の挙動、ゲル濾過での二量体の存在などヒト COMT の場合と同様の性質を持っていた。なお、N 末端に二残基の付加はあるが、C 末端の欠失はない。その結果、我々が生産した h-COMT と r-COMT は全く同一のアミノ酸鎖長をもつ(223 残基)。これは、今までになされた既知の COMT の結晶構造解析では C 末端の座標が決まらない(disorder)ことが多いので、結晶構造解析されている実績の多い rat の鎖長に human を揃えるようにプラスミドを設計したことが背景にある。

ラットとヒトの配列の相同性は DNA でもアミノ酸でも 80%である。h-COMT が7つの Cys 残基を有す

るのに対し、ラットは4残基である。我々は結晶化を試みているが、h-COMTよりもr-COMTの方が結晶を取得しやすい感触を得ている。残念ながらまだ化合物との複合体の結晶の取得には至っていない。

[SAHによる生成物阻害]

SAHにより、COMTの活性がどのくらい抑制されているかを検証する目的で、三種類の実験を行った。第一の実験では、COMTの反応系に反応開始時点でSAHを共存させ、見かけの酵素活性の低下を評価した。基質であるSAMが600-1000 μ M、NEが1000 μ Mという反応系に、SAHを初期濃度100 μ M存在させるとその活性は数%程度にまで低下し、反応低下はSAHの濃度依存的であった。SAH30 μ Mの存在で活性は50%程度に低下した。第二の実験では、SAHの阻害様式を酵素反応速度論解析で評価した。その反応機構からSAHはSAMと結合部位を競合し、その結合部位に対するSAHの親和性はSAMのそれよりも高い。つまり、COMT/SAH複合体はCOMT/SAM複合体よりも安定性が高いということになる。COMTはその反応過程で必ずCOMT/SAH複合体を形成する。言い換えるとCOMTはSAHによる生成物阻害を必ず受けていることになる。酵素反応速度論では、理論的にSAHの阻害定数 K_i^{SAH} (1.6-3 μ M)はCOMT/SAH複合体の解離定数 K_d と同一になる。そこで、等温熱滴定(ITC)によってSAHとCOMTの結合親和性を測定したところ、 $K_d=0.6-1.0\ \mu$ Mとよく一致した。平衡透析に第三の実験では、通常COMTの反応系にSAHの分解酵素(S-adenosylhomocystein hydrolaseとAdenin deaminase)を共存させたところ、見かけの反応速度が1.5倍に上昇した。以上から、COMTはSAHによる強い阻害を受けていることが明確になった。前述したように末梢血中のSAH濃度は100 μ M以上である。

[Triazole系化合物]

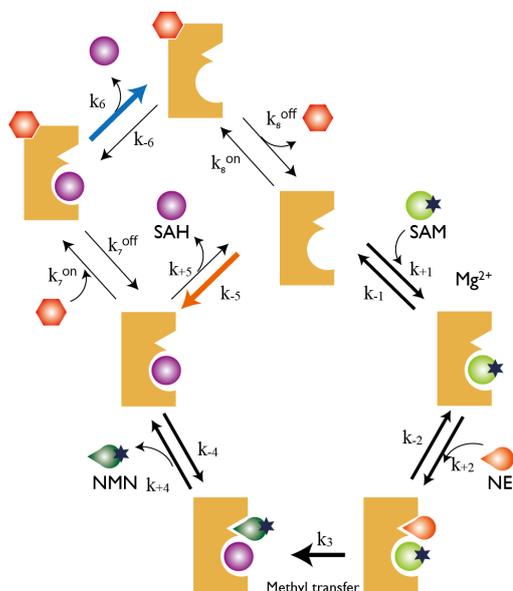
見出した賦活化化合物のうち、triazole骨格をもつ化合物18を使って、その賦活化作用について調べた。化合物18は見出した化合物の中で最も賦活化活性が高く、100 μ MをCOMT反応系に共存させる時、1.4倍程度の反応速度上昇を与える。化合物18は濃度依存的にCOMT活性を高め、反応速度論解析ではSAHの見かけの $^{app}K_i^{SAH}$ を1.5-2倍程度に大きくした。また平衡透析法による測定でもCOMT/SAHの解離定数 $^{app}K_d^{SAH}$ を1.5-2倍程度大きくした。以上から、化合物18はSAHによる生成物阻害を弱めることでCOMTの見かけの活性を上昇させていると考えられた。

[3-Oxabicyclo[3,3,1]nonane系化合物]

見出した賦活化活性を示す化合物として、3-oxabicyclo[3,3,1]nonane (OBCN)系化合物がある。OBCN系化合物については類似構造をもつ12化合物について構造活性相関を見出すことができた。OBCN系化合物の2位に芳香族環置換基をもち、その芳香環に大きすぎない置換基をもつ時に賦活化活性を示す。6位の置換基が大きい時、化合物は酵素活性を阻害する。このことは、OBCN系化合物はCOMTの分子表面に結合部位を有することを強く示唆する。A00013は2位にfuran環をもつ賦活化化合物である。A00232の2位はmethylenedioxyphenyl環で置換され、6位にも分子体積の大きな置換基を持つ。A00232はCOMTを常に阻害する。

OBCN 系化合物の COMT/SAH の解離定数 ${}^{app}K_d^{SAH}$ への影響を平衡透析法で調べたところ、A00013 も A00232 も共に ${}^{app}K_d^{SAH}$ を大きくした。A00232 は COMT と SAH の結合親和性は低下させるが COMT の見かけの反応速度を低下させた。

[迂回路モデル]



COMT/SAH の解離定数を大きくする効果をもつ A00013 と A00232 の関係から、我々は化合物による生成物阻害の解除機構として、「迂回路モデル」を想定している。迂回路モデルでは COMT/SAH 複合体に化合物(賦活化化合物、阻害化合物; effector)が結合し、e/COMT/SAH 複合体を生じるという仮定を設けている。そして、e/COMT/SAH 複合体からの SAH と e/COMT への解離は、COMT/SAH から SAH と COMT への解離よりも起こりやすい ($k_{+5}/k_{-5} < k_{+6}/k_{-6}$) と仮定している。ここで化合物がないときは $K_i^{SAH} = k_{+5}/k_{-5}$ である。

[迂回路モデルの解析]

この迂回路モデルを反応全体に適用して反応速度論解析式を導くことができれば、その理論式に基づいて分子機構を実験的に証明できるのであるが、解析式の導出にはまだ至っていない。そこで、より簡単な「迂回路」部分だけからなる系を考察した。迂回路部分だけの系は閉じた回路であり、COMT/SAH, e/COMT/SAH, e/COMT, COMT の四つの状態は平衡にある。この系は、平衡透析で化合物が SAH の見かけの解離定数へどのような影響を与えるかを調べるために測定した系そのものである。この系では、見かけの ${}^{app}K_d^{SAH}$ は下記のように表現される。

$${}^{app}K_d^{SAH} = \frac{[\text{SAHと結合していないCOMT}][\text{SAH}]}{[\text{SAHと結合したCOMT}]} = \frac{([\text{COMT}] + [\text{e/COMT}])[\text{SAH}]}{[\text{COMT/SAH}] + [\text{e/COMT/SAH}]}$$

平衡状態における COMT の4つの存在状態の終濃度、すなわち $[\text{e/COMT/SAH}]$, $[\text{e/COMT}]$, $[\text{COMT/SAH}]$, $[\text{COMT}]$ は、下記の連立反応速度式が全て 0 となる解である(次ページ)。

通常の平衡では、例えば、 $[\text{COMT}][\text{SAH}]/[\text{COMT/SAH}] = k_{+5}/k_{-5}$ となり一定値であるが、この系は回路であるので平衡時の $[\text{COMT}][\text{SAH}]/[\text{COMT/SAH}]$ は特定の値にはなるが特殊な場合を除いて k_{+5}/k_{-5} とはならない。平衡時濃度は、各段階の速度定数 k_{+5} , k_{-5} , k_{+6} , k_{-6} , k_7^{on} , k_7^{off} , k_8^{on} , k_8^{off} の値と COMT、SAH、e の初期濃度、 $[\text{COMT}]_0$, $[\text{SAH}]_0$, $[\text{e}]_0$ によって決まる。

$$\frac{d[\text{COMT}/\text{SAH}]}{dt} = k_7^{\text{off}}[e/\text{COMT}/\text{SAH}] + k_{-5}[\text{COMT}][\text{SAH}] - k_7^{\text{on}}[e][\text{COMT}/\text{SAH}] - k_{+5}[\text{COMT}/\text{SAH}]$$

$$\frac{d[\text{SAH}]}{dt} = k_{+6}[e/\text{COMT}/\text{SAH}] + k_{+5}[\text{COMT}/\text{SAH}] - k_{-6}[e/\text{COMT}][\text{SAH}] - k_{-5}[\text{COMT}][\text{SAH}]$$

$$\frac{d[\text{COMT}]}{dt} = k_{+5}[\text{COMT}/\text{SAH}] + k_8^{\text{off}}[e/\text{COMT}] - k_8^{\text{on}}[e][\text{COMT}] - k_{-5}[\text{COMT}][\text{SAH}]$$

$$\frac{d[e/\text{COMT}/\text{SAH}]}{dt} = k_7^{\text{on}}[e][\text{COMT}/\text{SAH}] + k_{-6}[e/\text{COMT}][\text{SAH}] - k_7^{\text{off}}[e/\text{COMT}/\text{SAH}] - k_{+6}[e/\text{COMT}/\text{SAH}]$$

$$\frac{d[e/\text{COMT}]}{dt} = k_{+6}[e/\text{COMT}/\text{SAH}] + k_8^{\text{on}}[e][\text{COMT}] - k_{-6}[e/\text{COMT}][\text{SAH}] - k_8^{\text{off}}[e/\text{COMT}]$$

$$\frac{d[e]}{dt} = k_7^{\text{off}}[e/\text{COMT}/\text{SAH}] + k_8^{\text{off}}[e/\text{COMT}] - k_7^{\text{on}}[e][\text{COMT}/\text{SAH}] - k_8^{\text{on}}[e][\text{COMT}]$$

$$[\text{COMT}] + [\text{COMT}/\text{SAH}] + [e/\text{COMT}/\text{SAH}] + [\text{COMT}] = [\text{COMT}]_0$$

$$[e/\text{COMT}] + [e/\text{COMT}/\text{SAH}] + [e] = [e]_0$$

$$[\text{COMT}/\text{SAH}] + [e/\text{COMT}/\text{SAH}] + [\text{SAH}] = [\text{SAH}]_0$$

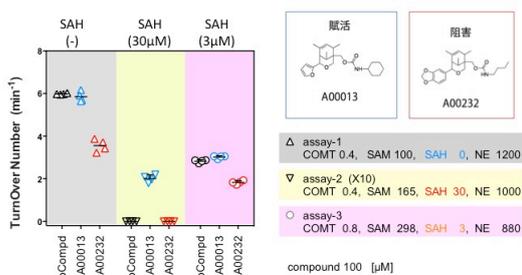
[迂回路モデルの性質]

そこで、 k_{+5}/k_{-5} を平衡実験で求めた K_i^{SAH} と等しく $1\mu\text{M}$ 、 $[\text{COMT}]_0$ は平衡透析実験の標準濃度として設定した $30\mu\text{M}$ に固定し、 $e/\text{COMT}/\text{SAH}$ からの SAH の解離が有利と仮定し、 k_{+6}/k_{-6} を $10\mu\text{M}$ として、 k_7^{on} 、 k_7^{off} 、 k_8^{on} 、 k_8^{off} 、と SAH の初期濃度 $[\text{SAH}]_0$ の値を変化させて、見かけの ${}^{\text{app}}K_d^{\text{SAH}}$ 、平衡到達時の COMT 濃度、 $[\text{COMT}]$ 、への影響を調べた。化合物の存在の下では、 k_8^{on} が 0 でない限り、常に化合物非存在での K_d^{SAH} (k_{+5}/k_{-5} $1\mu\text{M}$) よりも大きな値をとった。さらに、 $[\text{SAH}]_0$ の値に関わらず ${}^{\text{app}}K_d^{\text{SAH}}$ はほぼ一定であり、このことは平衡透析実験で見かけの ${}^{\text{app}}K_d^{\text{SAH}}$ を通常の解析で求めることができたことを裏付ける。

一方、フリーの COMT の平衡到達時濃度 $[\text{COMT}]$ の値は、 $k_8^{\text{on}}/k_8^{\text{off}}$ により変動した。 $k_8^{\text{on}}/k_8^{\text{off}}$ が大きい時、つまり、 e/COMT が安定である時、 $[\text{COMT}]^{\text{化合物あり}}$ の値は化合物が存在していない時よりも小さくなった ($[\text{COMT}]^{\text{化合物あり}}/[\text{COMT}]^{\text{化合物なし}} < 1$)。つまり、化合物が COMT に親和性が高すぎると、 $[\text{COMT}]^{\text{化合物あり}}$ の値は $[\text{COMT}]^{\text{化合物なし}}$ を上回ることはなく、むしろさらに阻害を強化する。一方、 e/COMT が不安定である時、 $[\text{COMT}]^{\text{化合物あり}}$ の値は、 $[\text{COMT}]^{\text{化合物なし}}$ よりも大きくなった。ここでフリーの COMT の存在率 A は $A = [\text{COMT}]^{\text{化合物あり}}/[\text{COMT}]^{\text{化合物なし}}$ で表せるが、迂回路モデルでは、 A の値は

$[\text{SAH}]_0$ に依存し、 $[\text{SAH}]_0$ が小さい時、 A は 1 程度であるが、 $[\text{SAH}]_0$ が大きくなると A の値も大きくなるという性質が見出された。COMT の反応では COMT/SAH から COMT への解離が律速であるから、迂回路モデルの閉じた回路型の平衡における A の値は、SAH が共存するときに化合物がフリーの COMT の減少をどの程度防ぐかという意味をもち、化合物による COMT の反応賦活化率を説明するものとみなすことができる。この

SAHによる生成物阻害に対する効果



ことは、賦活化化合物はSAHによって減少するCOMTの見かけの反応速度の低下を防止することを意味している。この現象について、A00013はSAHの濃度が低い時よりも、SAHの濃度が高い時の方がCOMTの反応賦活化率が高いということを我々は実際に確認している。賦活化化合物はCOMTの活性がSAHによって低下する時、その低下率を抑制するということになり、これを医薬品として考えた場合、興味深い性質であると考えている。

[今後の目標]

今後の目標は、大きく三つである。(1) 化合物がCOMTのどの部位に結合し、どのようにしてSAHとの親和性を弱めるのかを、三次元分子構造のレベルで解明することである。そのために、結晶構造解析の実績があるラットCOMTとの複合体の構造の解明を目指す。(2) 賦活化物質の活性は未だに弱いもので、試験管内で基質大過剰な条件下で化合物濃度100 μ Mを要する。OBCN系化合物の合成を行い、活性の向上を目指す。(3) 賦活化化合物をSHRに投与し、血中のNE濃度が変動するかを確かめる。これらが成功すれば、WKY5/6腎摘出ラットでの腎保護作用を評価する。

[謝辞] 敬称略

学生

蘓武高行、西田千代乃、川島洋/宮川雅樹、布施拓也/増田喬行+根本崇志/則武隆佑、
増田衛二/山北絵梨、板倉利典/歌川将之/栗城知葉/佐藤知幸、鈴木光一/高橋慶伍/渡邊凌、
栗原啓太/見村瑛里、井上雄太/齋藤栄

学内協力者

高宮知子、宮入伸一、齋藤弘明、小林弘子、丹羽典朗、板垣正、矢作忠弘、市丸嘉、大崎愛弓、楠瀬隆生

外部協力

角田誠(東京大)、今井洋一(武蔵野大)、鈴木守、寒川剛(大阪大学)、福澤薫(星薬科大)、池田正幸(森永乳業)、岡田雄治(協和発酵キリン)

本研究の一部には、2016年度日本大学学術研究助成金(総合研究)、2015年度薬学部共同研究助成金のご支援をいただきました。深く感謝いたします。

(2017/2/5)