

課題番号	総 17-026 継続 総 16-025
------	----------------------

注：課題番号を記入してください。

平成28年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 29年 4月 24日

日本大学学長 殿

氏 名 飯 島 洋



所属・資格 薬学部 教授

下記のとおり報告いたします。

退職、転出の場合は、() 書きで受領時の資格を記入

1 研究課題 抗 COMT 不全薬 -新規腎保護薬を目指して		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 飯島 洋	薬学部/教授	生物有機化学
○研究分担者 (学内)		
高宮 知子	薬学部/助教	生物有機化学
齋藤 弘明	薬学部/専任講師	有機化学
丹羽 典朗	薬学部/准教授	数学
小林 弘子	薬学部/准教授	蛋白化学
桑田(楠瀬) 隆生	松戸歯学部/助教	構造生物学
計6名		
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
H29.4.24 時点で獲得した外部資金はない。		

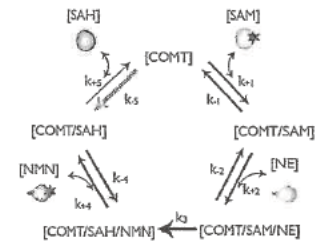
※「6 研究結果」について、ホームページ等での公開 可・否 否 いずれかを○で囲んでください。
否の場合は、理由書を添付して下さい。

部科校名：薬学部

氏名：飯島 洋

4 研究目的

カテコール-O-メチル転移酵素 (COMT) はアドレナリン (NE) や 2-ヒドロキシエストラジオール (2HE) などのカテコール化合物を基質として、その水酸基をメチル化する酵素である。メチル基供与基質はS-アデノシルメチオニン (SAM) である。SAM はメチル基を転移し、S-アデノシルホモシステイン (SAH) に変換される (右図)。



COMT の触媒サイクル

SAH による生成物阻害の強さは k_5 , k_4 によって決まる。

生体内において SAH はホモシステインから導かれる (COMT 自身が生成する SAH は微量である) が、高い血中ホモシステイン濃度は心血管障害 (心筋梗塞、脳梗塞) のリスクファクターとしてよく知られている。ヒトでは血中ホモシステインと SAH 濃度は比例関係にあるから、高い血中ホモシステイン濃度は COMT の活性低下に反映されているはずである。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明らかにされている (COMT 不全)。

以上から、我々は COMT 不全の解消は、新規の腎臓・心血管系保護作用をもたらすと考え、COMT の賦活化物質の探索を行った。スクリーニングの結果、トリアゾール (TRZ) 系の賦活化化合物とオキサピシクロノナン (OBCN) 系を見出した。本研究の最終目標は、複数の研究者の専門性を統合し、(i) OBCN 系化合物の COMT 賦活化機構を実験的数理的に解析し、その結合部位の立体構造を明らかにし、それらの情報に基づいて、(ii) 理論的な分子科学計算を活用することで合理的に現在のリード化合物の活性を高めたリード化合物を合成により創製することである。

5 研究概要

当初目標は下記 4 項目であった。

- (1) OBCN 系化合物は「SAH による COMT の阻害」を解除することで COMT の活性を高めていると推定している。化合物が、SAH と COMT の結合親和性へ与える影響を、酵素反応速度論解析と平衡透析法を使って解明する。担当：飯島、高宮、小林、丹羽
- (2) 化合物と COMT の相互作用 (賦活化を引き起こす相互作用) を計算シミュレーションで解析予測する。さらに量子化学計算をこのような高分子の系で行える FMO 法による精密な計算を行う。担当：飯島
- (3) 化合物/COMT 複合体の結晶構造解析を行い、化合物がどこに結合し、それがどのように賦活化へ結びついているのかを調べ、(2) と合わせて、合理的に高活性化合物の分子設計を行う。担当：楠瀬、齋藤
- (4) 誘導体合成を行い、OBCN 系化合物の構造活性相関を解明すると同時に高活性化合物の取得を目指す。担当：齋藤

H28 年度内には下記の進捗も得られた。

- (5) ラット COMT にもヒト COMT で有効であった化合物は賦活化活性を示すことの確認
- (6) OBCN 系化合物の一部の化合物が基質である可能性

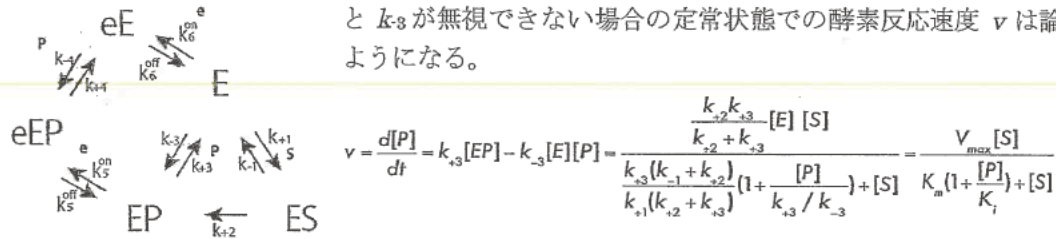
部科校名：薬学部

氏名：飯島 洋

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

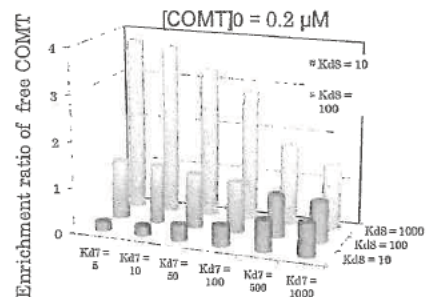
OBCN系化合物は「SAHによるCOMTの阻害」を解除することでCOMTの活性を高めていると推定している。化合物が、SAHとCOMTの結合親和性へ与える影響を、酵素反応速度論解析と平衡透析法を使って解明する。担当：飯島、高宮、小林

COMTの反応は2基質から2生成物が生じる反応である。そこで、簡単な酵素反応系を想定した。酵素Eに基質Sが結合し、ES複合体を形成し、P→Sの反応が起こり、EP複合体が生じる(PはSの結合している部位にそのまま結合しているものとする)。ついでEP複合体が解離し、Pを放出し、何も結合していないE(フリー体)が生じる。ここで、Pの濃度と k_{-3} が無視できない場合の定常状態での酵素反応速度 v は論理的に下記のようになる。



すなわち、PはSの競合阻害剤となる。我々は、賦活化物質eがEPに結合してeEP複合体を形成し、eEP複合体からのPの解離はEP複合体からの解離よりも容易であるというモデルを想定した。(迂回路モデル：図の灰色部分)

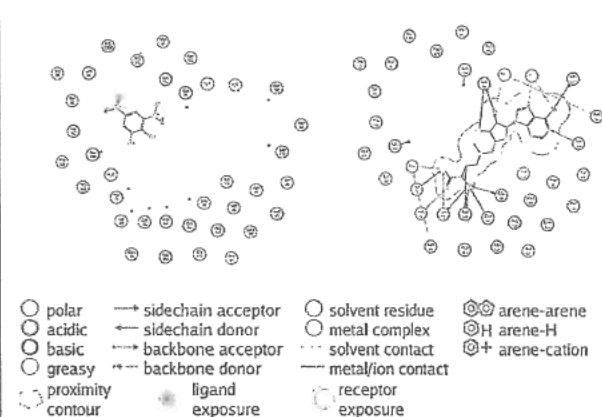
迂回路モデルにおける賦活化物質の性質を検討したところ、(1) 賦活化物質は生成物による阻害を弱める、(2) その賦活化はPのみかけの阻害定数 K_i を大きくするというに加え、(3) K_{d6} (k_{6on}/k_{6off})が小さい場合は化合物が阻害剤になりうる、(4) 賦活化化合物の賦活化率はPの濃度に依存することが示された。迂回路モデルでは、賦活化物質は酵素が阻害された時に賦活化効果を示すことが示唆された。



注： K_{d8} K_{d7} は左上図の K_{d6} と K_{d5} に読替え

化合物とCOMTの相互作用(賦活化を引き起こす相互作用)を計算シミュレーションで解析予測する。さらに量子化学計算をこのような高分子の系で行えるFMO法による精密な計算を行う。担当：飯島

COMTの生成物阻害は基質であるSAMの結合部位に生成物であるSAHの方が高い結合親和性を示すために起こる。



この電子の偏りがMgを経由してDNCの水酸基と相互作用を引き起こしている。そこでこの結晶複合体構造の中でSAMをSAHに置き換え、さらに Mg^{2+} やDNCを取り除くなどのモデリングを行い、COMTとSAHはなぜSAMよりも結合親和性が高いかを計算により説明できるかを試みた。SAH、SAM共にリボース部分とGlu119との相互作用が共通して高い親和性を説明したが、SAHの場合、SAMに見られた Mg^{2+} 経由の安定化がむしろ失われているのみであった。

COMT/SAM/DNC (dinitrocatechol:阻害剤)複合体の結晶構造に基づいて、SAHとSAMの結合親和性をFMO法で解析した。FMO法はタンパク質のような高分子についても適用できる量子化学計算方法であり、タンパク質と結合しているリガンド分子の間の相互作用を残基単位で解析することができる。左の図はCOMT/SAM/DNC複合体でのDNCとSAMが相互作用している残基を模式的に二次元で表現したものである。

SAMはイオウ原子に+1の形式電荷を有するが、この電荷は活性部位に活性に必須なイオンとして存在する Mg^{2+} イオンとの相互作用で緩和されている。以前から推定されていた通り、この電子の偏りがMgを経由してDNCの水酸基と相互作用を引き起こしている。

部科校名：薬学部

氏名：飯島 洋

研究結果 (つづき)

このことから、COMT/SAH の安定化には、COMT の構造変化が伴う可能性が示唆される。COMT/SAH の結晶構造も一例報告されているが、SAM 結合部位は変化が少なく、第二基質である catechol 結合部位の構造変化が大きい。計算については共同研究者の福澤薫博士 (星薬科大学) の支援を得た。

化合物/COMT 複合体の結晶構造解析を行い、化合物がどこに結合し、それがどのように賦活化へ結びついているのかを調べ、(2)と合わせて、合理的に高活性化合物の分子設計を行う。

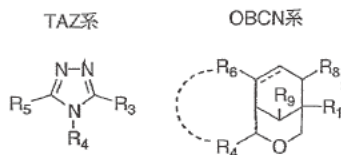
担当：楠瀬

ヒトの COMT を使って結晶化を試みて来たが、結晶は取得できても回析実験に耐える単結晶ではないことが続いていた。そこで結晶構造解析の実績が多いラットの組み換えタンパクの発現を行い、これを用いて結晶化を試み、回析斑点を与える結晶の取得に至った。

結晶に対して、賦活化化合物をソーキング (拡散) によりラット COMT に結合させることを試みた。化合物と COMT の親和性は低いだろうことを反省し、今回は化合物を結晶化沈殿剤 (結晶条件で用いるのは PEG3350) と類似の構造を有する PEG450 に高濃度 (60-70 mM) で溶解した。残念ながらビームを照射すると結晶が崩壊しデータは得られなかった。構造解析については鈴木守博士 (大阪大学) の支援も受けた。

誘導体合成を行い、OBCN 系化合物の構造活性相関を解明すると同時に高活性化合物の取得を目指す。

担当：齋藤



主としてオキサピシクロノナン(OBCN)系化合物の合成を行い、その活性を評価した。R₄ の置換基には、構造活性相関があり、芳香環とその置換基の大きさが重要であると想定された。そこで 10 化合物を合成した。一部の化合物に弱い賦活化活性が見出されたが、シード化合物 (A00013) の活性を上回るものは見だせていない。A00013 と比較して考えると R₁ の置換基の分子体積が不十分である可能性があり、現在も検討をしている。

現在もっとも活性が高いのはトリアゾール(TAZ)系化合物の化合物 18 (A00545) である。数化合物の類似化合物から推定した程度の構造活性相関であるが、この系統の化合物でも R₄ の芳香環とその置換基の大きさが重要であると想定している。現在、TAZ 系化合物の合成ルートを開拓している。R₃ がない構造を持つ化合物の合成ルートを見出したところである。誘導体合成については市丸博士 (PD 研究協力者) の支援も得た。

その他

1. ラット COMT のアミノ酸配列を確認した。担当：小林
2. ラット COMT を用いて、ヒト COMT に有効であった化合物の賦活化活性を評価したところ、同様に活性を示した。このことは、賦活化物質は両酵素で保存されている部位に結合する可能性を示す。また、ラットにおける動物実験が可能であることを支持する。担当：飯島
3. COMT は NE 以外にも catechol 骨格を持つ様々な化合物 (DOPA、2-hydroxyestradiol、カテキン、dihydroxybenzoic acid) を第二基質とすることができる。¹⁴C-SAM を用いた活性評価を実施し、賦活化化合物は第二基質の構造には無関係に賦活化を行うことを確認した。このことは賦活化は COMT/SAH 複合体の乖離促進であるという我々のモデルを支持する。¹⁴C-SAM の活性評価では池田正幸博士 (森永乳業) の支援を得た。

ホームページ等での公開 (可・否)

注：必要に応じて、このページをご使用ください。