

## カテコール O-メチル転移酵素の賦活化物質の探索 COMT activity enhancer

飯島 洋<sup>1\*</sup>, 勝谷拓也<sup>2</sup>, 鈴木守<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> 日本大学薬学部, 〒274-8555 船橋市習志野台 7-7-1

<sup>2</sup> 大阪大学蛋白質研究所, 〒565-0871 吹田市山田丘 3-2

Hiroshi Iijima<sup>1\*</sup> Takuya Katsutani<sup>2</sup>, Mamoru Suzuki<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> School of Pharmacy, Nihon University; 7-7-1. Narashinodai, Funabashi, Chiba. 274-8555, Japan

<sup>2</sup> Institute for Protein Research, Osaka University; 3-2, Yamadaoka, Suita, Osaka. 565-0871 Japan

### 1 はじめに

生体内のノルアドレナリンなどの重要な代謝酵素であるカテコール O-メチル転移酵素(COMT)の活性は、腎機能障害の進行とともに低下することが知られている。透析患者において、透析導入時の血中ノルアドレナリンの濃度はその後の死亡率と強い相関があり、ノルアドレナリン代謝能力は腎機能障害と深い関係がある。生体において末梢循環のノルアドレナリン濃度は COMT と腎臓が分泌する renalase という二つの酵素で調節されている。腎機能障害時には renalase の分泌が低下するので、COMT だけが代謝を司ることになる。

また、COMT は生体内で血管保護作用、耐糖異常改善等のさまざまな効果を持つことが報告されている。2-methoxy estradiol(2ME)の生合成の責任酵素であり、COMT の活性低下は 2ME 生合成低下に直結することが示されている。

我々は COMT の活性が生成物阻害により調節されていることに着目し、その生成物による阻害を解除する化合物(賦活化物質)を見いだすことに成功した。化合物による COMT の賦活化機構を探るため、本酵素を大量に取得、精製し、化合物や生成物との相互作用を蛋白質結晶構造解析により解明することを目的とする。

### 2 実験と結果

遺伝子組換えで生産した COMT(可溶型 COMT, S-COMT)を精製した。精製 COMT の純度分析はゲル濾過クロマト、電気泳動を実施した。COMT と S-adenosyl homocystein (SAH) との結合親和性は、ミクロ平衡透析、等温滴定熱量計 (ITC) により決定した。また、SAH-COMT 複合体の結晶化実験は大阪大学蛋白研およびKEKにおいて実施した。

結果として、

(i) 平衡透析においても、ITC においても、化合物は SAH/COMT 複合体の解離定数(Kd)を約 1.5 倍に増加させた。化合物は SAH の COMT に対する結合親和性を低下させた。

(ii) 平衡透析においても、ITC においても、COMT のモル結合数(n)は 0.6 程度であった。

(iii) 実験に用いた精製 COMT は通常の還元 SDS-PAGE では均一であるが、ゲル濾過クロマトでは高分子量と低分子量の二つのピークが出現した。また、非還元 SDS-PAGE では、二量体に加え、単量体によりも小型の分子種の混在が見られた。

(iv) 以上より、純度検定による品質管理を行いながら精製方法を見直し、再度、平衡透析、ITC による実験を行い、再現性と同時に n 値がより 1 に近い測定を行うことが望まれた。

### 3 まとめ

見出した化合物が SAH-COMT の解離定数を 1 $\mu$ M から 1.5 $\mu$ M に上昇させることを明らかにした。

化合物による COMT 活性の上昇は、SAH の COMT に対する生成物阻害を軽減させるためと考えられる。

計画どおりの行程を歩むことができたが、解離定数への影響を検出したものの、n が小さく、その原因としておそらく COMT 蛋白質の変性などが起きている可能性が見いだされた。結晶化にも着手したが、いまのところ回析データが得られる結晶の取得には至っていない。

### 謝辞

COMT の結晶解析にご尽力いただきました高エネルギー加速器研究機構加藤龍一博士に深く感謝致します。データ測定にあたり P F スタッフの方々に深く感謝いたします。

### 参考文献

[1] 日本薬学会 134 年会 (熊本) 28L-pm02

\* iijima.hiroshi@nihon-u.ac.jp

\*\* mamoru.suzuki@protein.osaka-u.ac.jp