

論文の内容の要旨

論文題目

血圧調節におけるカテコールアミンのメチル化代謝に関する研究

氏名 角 田 誠

<序>

生命現象を真に理解するためには、生物のハードとしてのゲノムが、どのようなソフトによって機能を発揮しているのかを明らかにすることが必要である。ポストシーケンス時代において、トランスクリプトーム(mRNA)解析、プロテオーム(タンパク質)解析と並び、メタボローム(代謝物)解析の重要性が増してきている。私は、機能を担う生体分子の細胞、組織、器官、個体レベルにおける変動を、生物の機能と関連させて解析することによって、生命の本質である調節機能を理解できるのではないかと考えた。そこで、血圧調節機能に着目し、血圧調節に関わる生体分子代謝物の個体レベルにおける変動を測定できる分析法を構築し、それらの量的変動と血圧の関連を追求することによって、その機能の解明を目指した。

血圧調節には、多くの機構が関わっており、中でも、交感神経系が重要な役割を果たしていることが知られている。カテコールアミンは、神経伝達物質や循環血中のホルモンとして血圧調節に関与しており、生体内濃度変動は、合成、神経終末からの放出、神経終末への再取り込み、代謝などにより制御されている。

これまでの血圧調節におけるカテコールアミンの役割に関する研究から、高血圧の成因として

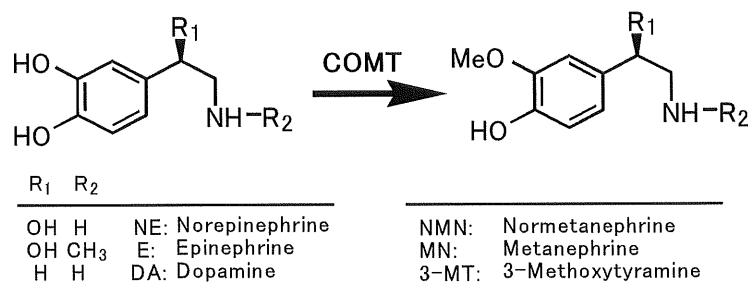


Fig.1 Metabolic pathway of catecholamines by COMT

カテコールアミンが重要であると報告されているものの、その代謝と血圧調節の関連を追求する研究はほとんど報告されていない。カテコールアミンは、monoamine oxidase と catechol-*O*-methyltransferase (COMT)の2つの酵素により代謝、不活性化される。本研究で、私は、血圧調節におけるカテコールアミンの COMT によるメチル化代謝(Fig. 1)の役割を、ラットをモデル動物として用い、カテコールアミンとそれらの 3-*O*-メチル代謝物の変動追跡により明らかにすべく、研究を行った。

1. カテコールアミン及びそれらの 3-*O*-メチル代謝物の高感度同時分析法の開発

血圧調節における個体レベルでのカテコールアミンのメチル化代謝の役割を把握するためには、血中カテコールアミン及びそれらの 3-*O*-メチル代謝物を同時に定量する必要があると考えた。そこで、これまでに Prados らにより開発された HPLC-過シュウ酸エステル化学発光検出法を用いたカテコールアミン分析法を改良して用いることにした。この分析法は、弱酸性陽イオン交換カラムとカラムスイッチング法を用いてオンラインで試料の前処理を行い、ODSカラムでカテコールアミンを分離した後、カテコール環に特有なエチレンジアミンとの蛍光誘導体化反応を行い、TDPO と過酸化水素を用いた過シュウ酸エステル化学発光検出するという方法である。カテコールアミンの 3-*O*-メチル代謝物をオンラインで電気化学的に酸化し、*o*-キノン体に導くことによりエチレンジアミンと反応させ、カテコールアミンと同様に検出できるのではないかと考えた。そこで、従来のカテコールアミン分析法に電気化学的酸化を組み込むことにより、カテコールアミン及びそれらの 3-*O*-メチル代謝物の同時分析法を開発することを試みた。

内部標準物質として選択した 4-メトキシチラミン(4-MT)を含めた 7 種化合物は、60 分以内に十分な分離が達成された(Fig. 2(a))。ラット血漿 50 μ l に適用したところ、3-MT を除く 5 種のカテコールアミン類の定量が可能であった(Fig. 2(b))。カテコールアミン類の定量値は、それぞれ、NE: 1.05 ± 0.03 , E: 0.64 ± 0.02 , DA: 0.19 ± 0.01 , NMN: 0.51 ± 0.02 , MN: 0.26 ± 0.01 pmol/ml (mean \pm SEM, $n=3$)であり、文献値と同等であった。開発した分析法のバリデーションを行った結果、検量線、精度、真度ともに良好であった。検出限界は、3-10 fmol 程度であり、従来の分析法に比べ、10 倍以上高感度化が達成された。必要な血漿量は、50 μ l と従来の報告の 10 分の 1 以下で済むことから、採決による生体への影響を最小限に抑えることが可能になった。

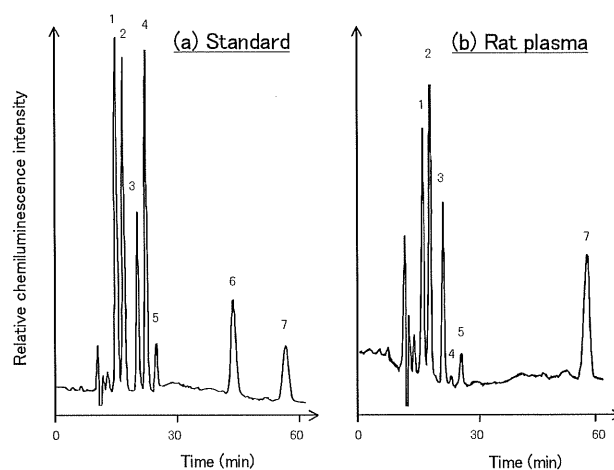


Fig. 2 Chromatograms (a) of a standard mixture of catecholamines (each 250 fmol) and their 3-*O*-methyl metabolites, and (b) obtained from 50 μ l rat plasma sample. Peaks: 1; NE, 2; E, 3; NMN, 4; DA, 5; MN, 6; 3-MT, 7; 4-MT (IS).

2. 高血圧自然発症ラット(SHR)と正常血圧ラット(WKY ラット)における血圧降下時のカテコールアミンのメチル化代謝能の比較

降圧薬(ここでは Ca 拮抗薬であるベニジピン)投与時、圧受容体反射を介し、交感神経末端より放出された NE は、生体にとって血圧上昇要因であり、代謝・不活性化するように COMT が働くことにより、NMN 濃度が増加する、と考えた。この血中 NE 濃度と NMN 濃度の変動を捉えることにより、血圧調節における個体レベルでのカテコールアミンのメチル化代謝能を明らかにできるのではないかと考えた。ベニジピン投与により、段階的に血圧を降下させたとき、血中 NE 濃度と NMN 濃度の上昇がみられた。横軸に血中 NE 濃度、縦軸に血中 NMN 濃度をプロットすると、両濃度には、良好な直線性があり、その傾きは、個体レベルにおけるカテコールアミンのメチル化代謝能を表していると考えられた。SHR と WKY ラットにおいて、この傾きを比較すると、SHR の方が WKY ラットに比べて有意に小さいことが明らかになった ($p < 0.05$)(Fig. 3)。このことから、SHR において、個体レベルにおけるカテコールアミンのメチル化代謝能が減弱していることが示唆された。

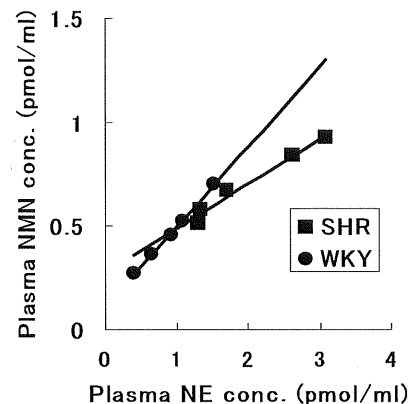


Fig.3 Relationship between plasma NE and NMN concentrations in the face of an acute hypotension.

3. S-adenosyl-L-methionine (S-AdoMet)投与による血圧及び血中 NE, NMN 濃度への影響

上述の結果は、カテコールアミンの COMT によるメチル化代謝を亢進させることにより、血圧を降下させることが出来る可能性を示唆している。COMT の活性化物質は知られていないことから、COMT の補酵素である S-AdoMet 1mg/kg を SHR に静脈内投与した。その結果、有意な血圧の降下がみられた。S-AdoMet 投与前後の血中 NE, NMN 濃度を定量したところ、血中 NE 濃度の有意な低下と血中 NMN 濃度の有意な増加がみられた。この結果は、S-AdoMet 投与により NE から NMN への COMT による酵素反応の亢進により、血中 NE 濃度が低下し、血圧が降下したことを支持するものである。

4. カテコールアミンを基質とした COMT 活性測定法の確立

SHR における個体レベルでのカテコールアミンのメチル化代謝能減弱が明らかになったことから、どの組織における COMT 活性が低下しているのかを明らかにしようと考えた。これまでに COMT 活性測定法は、数多く報告されているものの、dihydroxybenzoic acid (DBA)などの非生理的基質が多く使われており、生体内におけるカテコールアミンのメチル化代謝を正しく捉えることが困難であると考えられた。そこで、カテコールアミンを基質とした COMT 活性測定法を確立することにした。

COMT には、soluble(S)-COMT と membrane-bound(MB)-COMT の 2 つのアイソザイムが存在する。そこで、ラット赤血球をサンプルとして用い、2 つのアイソザイムについて最適条件の検討を行った。S-COMT 画分については、蛍光検出での測定が可能であった。しかしながら、MB-COMT 画分につ

いては、蛍光検出での反応生成物の定量が感度不足により困難であり、化学発光検出する必要があった。至適反応条件下、酵素活性を算出した(Table 1)。カテコールアミンの COMT に対する親和性を算出したところ、MB-COMT に対する親和性が、S-COMT に対する親和性の 20-60 倍ほど高かった。DBA を基質としたときには、S-と MB-COMT に対する親和性はほぼ同じであり、この結果は、カテコールアミンのメチル化代謝には、S-COMT よりも MB-COMT が重要な役割を果たしていることを示唆するものであると考えられる。ラット肝臓、腎臓サンプルについても同様に酵素反応条件の最適化を行い、カテコールアミンを基質とした COMT 活性測定法を確立した。

5. SHR と WKY ラットにおける肝臓、腎臓及び赤血球中 COMT 活性と肝臓中 COMT タンパク量の比較

SHR におけるカテコールアミンのメチル化代謝能減弱の原因がどの組織の COMT 活性に起因するのかを明らかにするために、4.で開発した COMT 活性測定法を用いて、SHR と WKY ラットにおける肝臓、腎臓及び赤血球中 COMT 活性を測定した。その結果、肝臓の MB-COMT 活性のみ

	Tissue	SHR	WKY rats
S-COMT	Liver	3.61 ± 0.10**	2.17 ± 0.33
	Kidney	3.81 ± 0.79*	1.81 ± 0.20
	Erythrocyte	0.037 ± 0.002**	0.027 ± 0.001
MB-COMT	Liver	0.12 ± 0.01*	0.16 ± 0.02
	Kidney	0.085 ± 0.002	0.079 ± 0.009
	Erythrocyte	0.0090 ± 0.0028*	0.0046 ± 0.0006

**: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$ vs. WKY rats.

The values represent the mean ± SEM (nmol/min/mg protein), n=5

が、WKY ラットに比し、SHR において低下していた(Table 1)。この結果より、肝臓に着目し、Western-blotting 法により、SHR と WKY ラットにおける COMT タンパク量の比較を行ったところ、活性の結果と同様に、MB-COMT タンパク量が、SHR において低下していた。SHR において WKY ラットと比べて S-COMT のタンパク量が増加し、一方 MB-COMT は低下していたこと、S-COMT と MB-COMT は同一遺伝子より転写・翻訳され生成することから、転写・翻訳レベルにおいて、SHR では、何らかの障害があるものと考えられる。SHR における肝臓の MB-COMT 活性とタンパク量の低下は、個体レベルでの SHR におけるカテコールアミンのメチル化代謝減弱の結果と一致しており、肝臓の MB-COMT が、循環カテコールアミンの代謝に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

<総括>

本研究において、私は、これまでより更に高感度な分析法を開発すると共に、血圧調節機能におけるカテコールアミンのメチル化代謝を、個体レベルにおける分子変動を追跡することにより初めて明らかにした。このように、カテコールアミンのメチル化代謝は、血圧調節におけるカテコールアミンの生体内濃度調節に関わっていると考えられ、今後、より詳細な局所レベルでの調節機構の解明が期待される。さらに、本研究は、個体レベルにおける代謝物の変動を機能と関連付けて解析することが有用であることを明らかにしたことから、今後、このような研究の発展が期待される。