

## 審査の結果の要旨

氏名 角田 誠

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。角田誠君は、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生体分子が関与しているが、同君は、これまで着目されてこなかったカテコールアミンの catechol-O-methyltransferase (COMT)によるメチル化代謝の役割を、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. 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。これまでに当研究室で開発された 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-メチル代謝物は、この分析法においてカテコールアミンと同様に抽出され ODSカラムで分離される。従って、カラムの後に電解酸化装置を組み込み、オンラインで酸化し、*o*-キノン体に通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予測し検討したところ、内標準の 4-メトキシチラミンを含めた 7 種化合物の分離、検出が可能であった。本法は従来法の 10 分の 1 以下のラット血漿 50  $\mu$ l でカテコールアミン類の定量が可能であり、採血による生体の交感神経系への影響を最小限に抑えることが可能となった。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 程度であった。

2. 降圧薬投与時、交感神経末端より放出された NE(ノルエピネフリン)は生体にとっては血圧上昇要因であり、これを抑制する機構がある。NEはCOMTの働きによりNMN(ノルメタネフリン)へと代謝、不活性化されるので、この血中NE濃度とNMN濃度の変動を捉えることにより、血圧調節におけるカテコールアミンのメチル化代謝の役割を明らかにできると思われた。ベニジピン投与により段階的に血圧を低下させたとき、血中NE濃度とNMN濃度の上昇がみられ、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。高血圧自然発症ラット(SHR)とWistar-Kyoto(WKY)ラットにおいてこの傾きを比較すると、SHRの方がWKYラットに比し有意に緩やかであった。この関係はE(エピネフリン)とMN(メタネフリン)についても得られており、これらのことから、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

ていることが初めて示唆された。

3. この結果は、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*-adenosyl-L-methionine(SAMe)1mg/kg を SHR に静脈内投与したところ、有意な血圧の降下がみられた。SAMe 投与前後の血中 NE、NMN 濃度を定量すると、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。これは SAMe 投与により NE から NMN への COMT による酵素反応が亢進し、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. 次いで、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、どの組織の COMT 活性低下に由来するかを明らかにしようとした。従来の COMT 活性測定法は、dihydroxybenzoic acid 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ため、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とし、soluble(S)-COMT と membrane-bound(MB)-COMT の 2 つのアイソザイムについて最適条件の検討を行った。酵素反応条件については、至適 pH、反応時間の直線性、酵素量の直線性を求め、至適反応条件下、酵素活性を算出した。カテコールアミンのラット赤血球 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。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。

5. 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 活性のみが WKY ラットに比し SHR において低下していた。この結果を基に、肝臓に着目し、Western-blotting 法により SHR と WKY ラットにおける肝 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 ラットと比較し 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。

以上のように、角田誠君は本研究においてカテコールアミン代謝系の従来法よりも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の役割を、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。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。

以上、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研究であり、博士(薬学)に相応しいと認めた。