

化学発光検出法を用いた血圧調節におけるカテコールアミン代謝の役割解明

角田 誠

Role of Catecholamine Metabolism in Blood Pressure Regulation Using Chemiluminescence Reaction Detection

Makoto TSUNODA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

(Received July 29, 2008)

Catecholamines, namely, dopamine, norepinephrine and epinephrine, play important roles in higher animals as neurotransmitters or hormones, and are metabolized by catechol-*O*-methyltransferase (COMT). To elucidate the role of COMT in blood pressure regulation, we have developed simultaneous determination methods for catecholamines and their 3-*O*-methyl metabolites using high-performance liquid chromatography (HPLC)-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. Using the developed method, we have found that inactivation of catecholamines by COMT is attenuated in hypertensive rats compared to normotensive rats. Furthermore, both the activities and the amounts of membrane-bound (MB-)COMT in the liver were found to be lower in hypertensive rats than in normotensive rats, which indicated that liver MB-COMT may be a relevant factor in blood pressure regulation.

Key words—catecholamine; metanephrine; catechol-*O*-methyltransferase; chemiluminescence

1. はじめに

カテコールアミンは3,4-ジヒドロキシフェニル骨格を持つアミンの総称である。生体内においてはノルエピネフリン (NE), エピネフリン (E), ドーパミン (DA) の3種が存在し, 神経伝達物質やホルモンとして重要な役割を果たしている。カテコールアミンの生体内濃度変動は, 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。COMTは, カテコールアミンを含むカテコー

ル環を有する化合物のメタ位の水酸基を *O*-メチル化し, 不活性化する酵素である。^{1,2)} メチル供与体として *S*-adenosyl-L-methionine (SAMe) を, 活性化因子として Mg^{2+} イオンを必要とする。NE, E 及び DA は, COMT により, それぞれ, ノルメタネフリン (NMN), メタネフリン (MN) 及び 3-メトキシチラミン (3-MT) に代謝される (Fig. 1)。われわれは, 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。本誌上シンポジウムでは, その研究の一端を紹介する。

2. カテコールアミンとそれらの 3-*O*-メチル代謝物の同時分析法の開発³⁾

血圧調節における個体レベルでのカテコールアミ

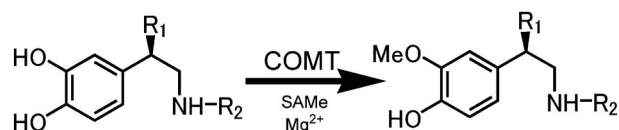


Fig. 1. Metabolic Pathway of Catecholamines by COMT

東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

e-mail: makotot@mol.f.u-tokyo.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 128 年会シンポジウム S16 で発表したものを中心に記述したものである。

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、はじめに、カテコールアミンとそれらの3-O-メチル代謝物の同時分析法の開発を試みた。

2-1. 分析法の高選択性 カテコールアミンとそれらの3-O-メチル代謝物を同時に測定するために、これまでに開発されていたカテコールアミン分析法^{4,5)}を適用することを考えた。

これまでに開発されていたカテコールアミン分析法は、1) カテコールアミンを含むアミン類のみを陽イオン交換カラムを用いて保持させることによりアミンに選択性をもたせる、2) エチレンジアミンがカテコール環と選択的に反応し蛍光物質を生成することを利用し、カテコール環に選択性を持たせることにより、カテコールアミンに対して高選択性を持たせた方法である。

しかし、エチレンジアミンとの蛍光誘導体化反応は、カテコール骨格に選択的であるため、3-O-メチル代謝物をそのまま反応させることはできない。3-O-メチル代謝物は電気化学的酸化や化学的な酸化により、*o*-キノン体に変換することが知られている。そこで、エチレンジアミンとの蛍光誘導体化の前にオンラインでクーロメトリックな電気化学的酸化を行うことにより、カテコールアミンだけでなく3-O-メチル代謝物も検出することが可能になると考えた (Fig. 2)。従来のカテコールアミン分析法の分離カラムと蛍光誘導体化反応コイルの間に、クーロメトリックな電気化学的酸化の可能なフローセルを組み込むことにより、カテコールアミンとそれら

の3-O-メチル代謝物の同時分析を実現した。

2-2. 分析法の高感度化 エチレンジアミンと、カテコールアミンとそれらの3-O-メチル代謝物の反応により生成する蛍光物質を、過シュウ酸エステル化学発光検出法⁶⁾を用いて検出することにより、高感度化を試みた。過シュウ酸エステル化学発光反応は、塩基性触媒存在下、シュウ酸誘導体と過酸化水素から生ずる活性中間体が蛍光物質との間に電荷移動錯体を形成し、そのエネルギーを蛍光物質に与えることにより蛍光物質を励起させ、これが元の基底状態に戻る際に発光すると考えられている。蛍光検出法が光源からの光エネルギーにより分子を励起するのに対し、化学発光検出法では化学反応により励起状態が生ずる。光源に由来する散乱光や迷光などのノイズの影響を抑えることができるため、化学発光検出法は蛍光検出法に比べて高感度検出が可能である。

2-3. 分析法の仕組み 上述の高選択性と高感度性を兼ね備えたカテコールアミンとそれらの3-O-メチル代謝物の分析法を Fig. 3 にブロックダイアグラムで示した。

サンプル注入から検出までを順を追って説明する。

(1) オートサンプラーより注入されたサンプルは、前処理試薬により前処理カラム (陽イオン交換カラム) に導入され、カテコールアミンとそれらの3-O-メチル代謝物を含むアミンのみが前処理カラムに吸着される。

(2) バルブを切り替え前処理カラムに移動相を流し、前処理カラムからカテコールアミンとそれらの3-O-メチル代謝物を脱離させ、分離カラム (ODS

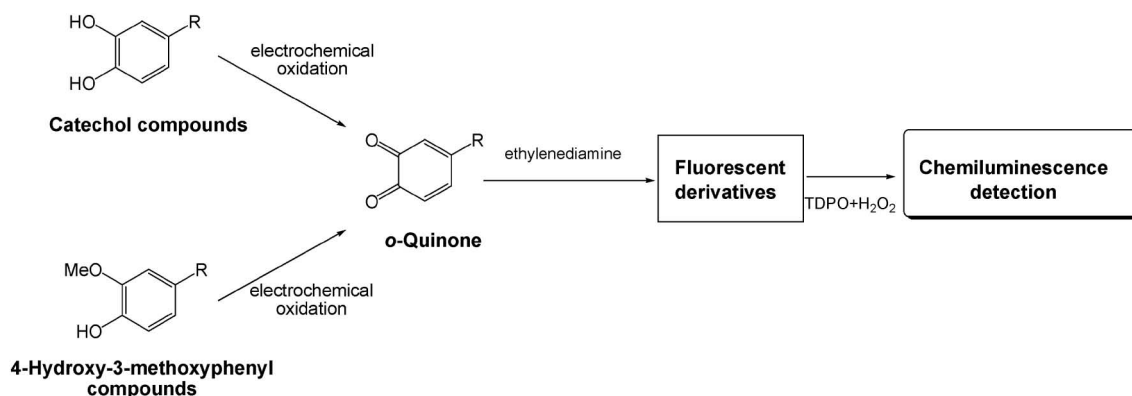


Fig. 2. Electrochemical Oxidation of Catechol and 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Compounds Followed by Ethylenediamine Reaction and Chemiluminescence Detection

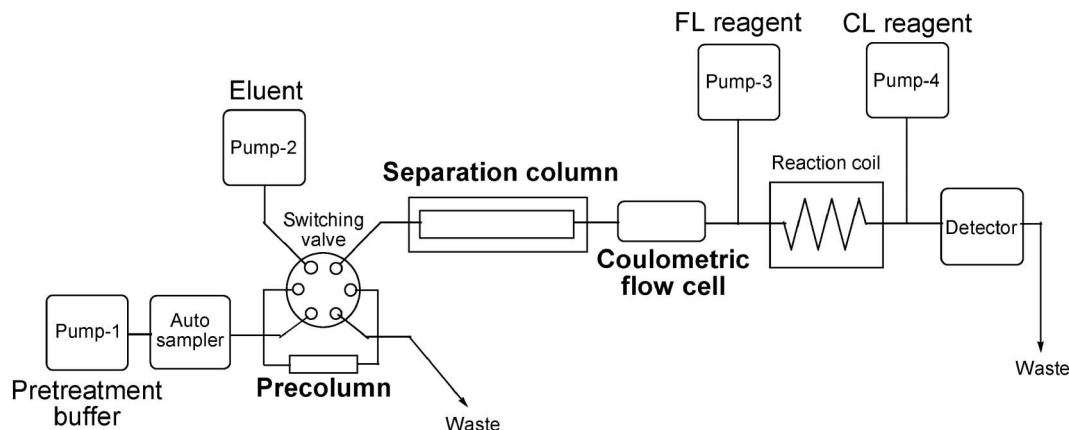


Fig. 3. Block Diagram for the Column-switching HPLC System for the Analysis of Catecholamines and Their 3-*O*-methyl Metabolites

カラム)にてカテコールアミンとそれらの 3-*O*-メチル代謝物を分離する。

(3) 分離されたカテコールアミンとそれらの 3-*O*-メチル代謝物を電気化学的酸化により *o*-キノン体に導く。

(4) *o*-キノン体とエチレンジアミンを反応コイル (90°C, 10 m) 内で反応させ、蛍光物質に導く。

(5) 最後に、シュウ酸エステルと過酸化水素を含む化学発光試薬と、蛍光物質を混合させることにより生ずる発光を化学発光検出器にて検出する。

2-4. クロマトグラムとバリデーション 内標準として選択した 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. 4 (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. 4 (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 S.E., $n=3$) 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⁷⁾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 1/10 以下で済むことから、採血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。

3. 高血圧ラットと正常血圧ラットにおけるカテコールアミンのメチル化代謝能の個体レベルでの比較⁸⁾

生体の血圧調節機構の 1 つに、圧受容体反射があ

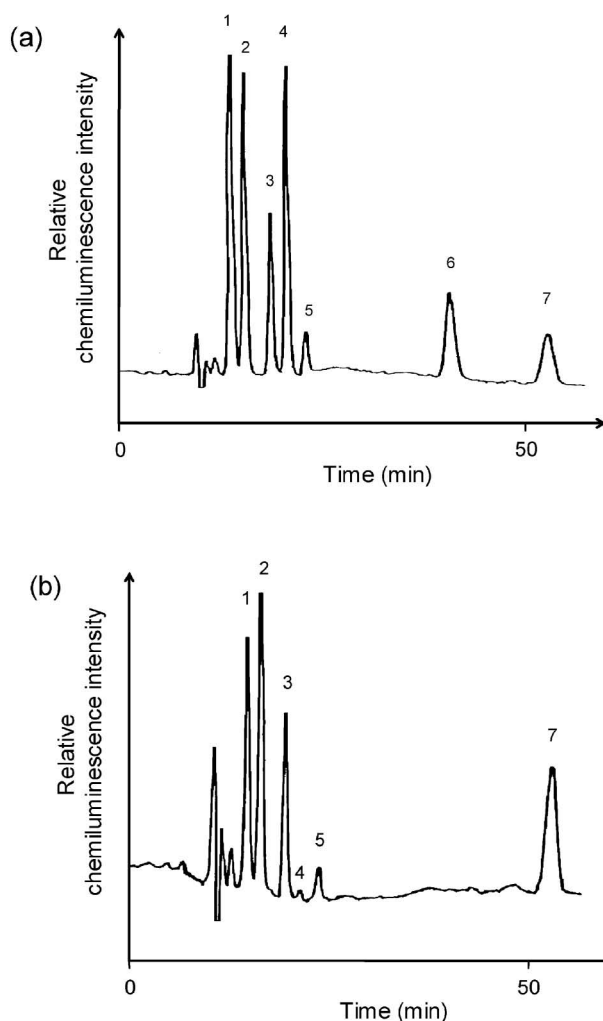


Fig. 4. Representative Chromatogram (a) of Standard Samples of Catecholamines and Their 3-*O*-methyl Metabolites (each 250 fmol) and (b) Obtained from Rat Plasma Sample (45 μ l). Peaks; 1: NE, 2: E, 3: NMN, 4: DA, 5: MN, 6: 3-MT, and 7: 4-MT (IS).

る。生体において血圧が降下すると、圧受容体がこれを感じ、中枢へと信号が送られ、交感神経が活性化し、血圧を上げる方向に働く。この圧受容体反射の機能を、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の評価に用いることにした。すなわち、ラットに降圧薬を投与すると、血圧降下に対して、交感神経末端より NE が放出され、放出された NE は、COMT の働きにより NMN に代謝、不活性化されるはずである。この血中 NE 濃度と NMN 濃度の増加を上述の分析法で同時に捉えることにした。

実際、ラットに Ca 拮抗薬を投与し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。

さらに、ヒトの本態性高血圧のモデルラットである高血圧自然発症ラット (SHR) とその対照である正常血圧 (WKY) ラットにおけるこの変化を比較することにより、血圧調節におけるカテコールアミンのメチル化代謝を明らかにしようと考えた。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. 5)。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低下していることが示唆された。

4. カテコールアミンを基質とした COMT 活性測定法の開発⁹⁻¹³⁾

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低下が明らかになったことから、どの臓器における 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 活性測定法を開発することにした。

COMT 活性は、基質から酵素反応により生成されるメチル代謝物を定量することにより測定され

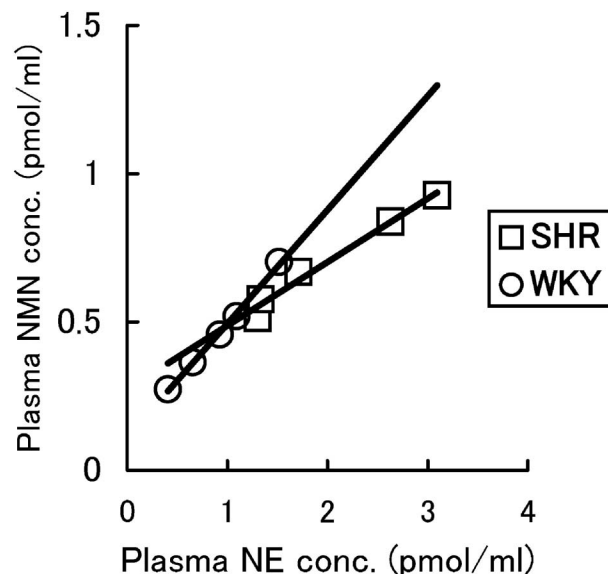


Fig. 5. Relationship between Plasma Norepinephrine (NE) and Normetanephrine (NMN) Concentration in the Face of an Acute Hypotension

る。すなわち、カテコールアミンを基質とすれば、それらの 3-O-メチル代謝物を定量することにより COMT 活性を測定することができる。上述のカテコールアミンとそれらの 3-O-メチル代謝物の同時分析法は、カテコールアミンとそれらの 3-O-メチル代謝物に選択性のある分析法であるため、カテコールアミンを基質とした COMT 活性測定に応用可能であると考えた。

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。NE を基質とし、酵素反応により生成したメチル代謝物 NMN を上述の分析法を用いて測定した。酵素反応は、赤血球サンプルを超遠心分離により S-COMT 画分と MB-COMT 画分に分離し、それぞれに、 Mg^{2+} イオン、補酵素である SAME、基質として NE を加え、 $37^{\circ}C$ で行った。S-COMT 画分については、反応生成物 NMN の蛍光検出での測定が可能であった。しかし、MB-COMT 画分については、蛍光検出での NMN 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。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。同様に、E 及び DA を基

質とした COMT 活性測定法を確立し、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 は、S-COMT よりも 20-60 倍ほど高い親和性を示した。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と考えられる。同時に、既報の方法により、DBA を基質としたときの親和性を算出したところ、S-COMT と MB-COMT に対する親和性は、ほぼ同等であり、既報の方法ではカテコールアミンの代謝を正しく反映しないものと考えられた。確立したカテコールアミンを基質とした COMT 活性測定法は、感度面においても既報の方法¹⁴⁾より優れており、生体内のカテコールアミンのメチル化代謝を調べるのに有用であると考えられた。

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^{15,16)}

SHR におけるカテコールアミンのメチル化代謝能低下の原因がどの臓器の COMT 活性に起因するのかを明らかにするために、上述の 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 活性が、WKY ラットに比し、SHR において低下していた。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、なん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能低下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。

6. おわりに

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代謝系の高感度同時分析法を開発し、血圧降下時の血中カテコールアミンと代謝系の変動を捉えることにより、SHR において、WKY ラットに比し、カテコールアミンのメチル化代謝能が低下していることを明らかにした。さらに、カテコールアミンを基質とした COMT 活性測定法を開発し、検討したところ、SHR において肝臓の MB-COMT 活性が低下していることを明らかにした。また、SHR において肝臓の MB-COMT タンパク量も低下していた。この結果は、肝臓の MB-COMT がカテコールアミンのメチル化代謝において重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。

今後、ヒトにおける検討^{17,18)}などにより、血圧調節におけるカテコールアミンのメチル化代謝のさらなる役割解明が期待される。

謝辞 本研究を遂行するに当たりご指導賜りました東京大学名誉教授今井一洋先生に感謝申し上げます。また、ご助言、ご協力頂きました東京大学大学院薬学系研究科教授船津高志先生をはじめ、共同研究者の方々に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Axelrod J., Tomchick R., *J. Biol. Chem.*, **233**, 702-705 (1958).
- 2) Männistö P., Kaakkola S., *Pharmacol. Rev.*, **51**, 593-628 (1999).
- 3) Tsunoda M., Takezawa K., Santa T., Imai K., *Anal. Biochem.*, **269**, 386-392 (1999).
- 4) Higashidate S., Imai K., *Analyst*, **117**, 1863-1868 (1992).
- 5) Prados P., Higashidate S., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 1-8 (1994).
- 6) Tsunoda M., Imai K., *Anal. Chim. Acta*, **541**, 13-23 (2005).
- 7) Tsunoda M., *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 506-514 (2006).
- 8) Imai K., Tsunoda M., Takezawa K., Mitsuhashi K., Santa T., Nagashima K., Katayama K., Ohmori K., *Proc. Jpn. Acad.*, **75B**, 224-227 (1999).
- 9) Tsunoda M., Takezawa K., Imai K., *Analyst*,

- 126**, 637–640 (2001).
- 10) Masuda M., Tsunoda M., Yusa Y., Yamada S., Imai K., *Ann. Clin. Biochem.*, **39**, 589–594 (2002).
 - 11) Tsunoda M., Takezawa K., Masuda M., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **16**, 536–541 (2002).
 - 12) Masuda M., Tsunoda M., Imai K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 1069–1073 (2003).
 - 13) Tsunoda M., Imai K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **380**, 887–890 (2004).
 - 14) Pihlavisto P., Reenila I., *J. Chromatogr. B*, **781**, 359–372 (2002).
 - 15) Tsunoda M., Tenhunen J., Tilgmann C., Arai H., Imai K., *Hypertens. Res.*, **26**, 923–927 (2003).
 - 16) Masuda M., Tsunoda M., Imai K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 202–205 (2006).
 - 17) Tsunoda M., Nagayama M., Funatsu T., Hosoda S., Imai K., *Clin. Chim. Acta*, **366**, 168–173 (2006).
 - 18) Jordan J., Lipp A., Tank J., Schroder C., Stoffels M., Franke G., Diedrich A., Arnold G., Goldstein D. S., Sharma A. M., Luft F. C., *Circulation*, **106**, 460–465 (2002).