

学位論文内容要旨

論文題目

p-hydroxyacetophenoneアフィニティーレジンによる蛋白質、薬物相互作用の
プロテオミクス研究およびラット alcohol dehydrogenase 簡易精製法

指導(紹介)教授: 若林一郎

申請者氏名: 根来宗孝

〔目的〕 現在プロテオーム研究の潮流として、薬物の肝臓における first-pass metabolism を解明する試みは、緒についたばかりである。本研究では、抗炎症作用の存在が近年明らかとなった薬物である *p*-hydroxyacetophenone (*p*-HAP)と親和性を有する肝臓蛋白質群の同定を試みた。さらに、同定された蛋白質のうちアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) と古典的抗炎症薬であるアセチルサリチル酸 (ASA)との相互作用に関して、酵素学的解明を試みた。

〔方法〕 *p*-HAP をゲル担体に固定化し、アフィニティークラムを作製した (*p*-HAP アフィニティークラム)。本カラムに対し、試料としてラット肝臓細胞質画分を用い、溶出液に *p*-HAP を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。さらに *p*-HAP を用いて溶出された蛋白質群から、透析により *p*-HAP を除き、再びアフィニティークロマトグラフィーを行い、ASA で再度溶出した。得られた複数の蛋白質の内部アミノ酸配列をペプチドマッピング後に解析し、各蛋白質の同定を行った。同定された蛋白質群の中でも比較的高い回収率が認められた ADH の精製をイオン交換カラムを用いて試みた。また、標品として ADH 研究に頻用されるウマ肝臓由来 ADH を用い、エタノールを基質とした ADH 酵素活性に及ぼす ASA の影響を、NADH の産生を指標として解析した。

〔結果〕 1) 既存の蛋白質データベースを用いて蛋白質の同定を行った結果、グリコーゲンフォスフォリラーゼ(94kDa)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(54kDa)、アデノシンキナーゼ(43kDa)、ADH(39kDa)およびグルタチオントランスフェラーゼ(25kDa)の存在が確認された。さらに、これら5種類の蛋白質は ASA によっても *p*-HAP アフィニティークラムから溶出されることが判明した。2) *p*-HAP アフィニティークラムと陽イオン交換カラムを用いて、ADH の簡易な精製方法を開発した。本法による精製度と回収率は、それぞれ 74 倍および 57%であり、精製した酵素の K_m および K_{cat} はそれぞれ 1.3 mM および 62.4 min^{-1} であった。3) エタノールを基質とした場合、生理的濃度 (5 - 500 μM) の ASA は、ADH 活性を有意に上昇させた。

〔結語〕 本研究において同定された5つの蛋白質は、*p*-HAP のみならず ASA にも相互作用する可能性が予測され、この特性を応用することにより、ADH の簡易な精製が可能になった。さらに ASA は、ADH 活性の上昇を惹起することが判明した。

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 根 来 宗 孝

論文題目： Proteomics study of the protein-drug interaction of liver cytosolic proteins that bind to *p*-hydroxyacetophenone resin and development of a new simple method for purification of rat alcohol dehydrogenase
(*p*-hydroxyacetophenone アフィニティーレジンによるタンパク質-薬物相互作用のプロテオミクス研究およびラット alcohol dehydrogenase 簡易精製法)

審査委員：主審査委員 藤 井 順 逸



副審査委員 仲 川 義 人



副審査委員 後 藤 薫



審査終了日：平成 17年 2 月 1 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

経口投与した薬物の多くは吸収された後に主に肝臓で代謝を受けて効果が発現もしくは消失する。薬物の代謝経路とそれに関わる酵素系について知ることは、薬物の有効性を高め新薬の開発にとっても重要である。本研究は互いに関連する三部の内容から構成され、それぞれの目的は次の通りである。(1) 抗炎症などの作用が知られている *p*-hydroxyacetophenone (*p*-HAP) をリガンドとして本薬物に直接相互作用するタンパクを同定する。(2) *p*-HAP に結合する 39 kDa タンパクであるアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) の精製を行う。(3) ADH 活性に対する Acetylsalicylic acid (ASA) の影響を調べる。

結果は以下の通りである。(1) ラット肝臓より調整したホモジネートの硫安分画を *p*-HAP アフィニティーカラムにかけたところ、94, 54, 43, 39 および 25 kDa の 5 種類のタンパクが特異的に結合し、いずれのタンパクも *p*-HAP ならびに ASA によって溶出された。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離したタンパクをゲルより切り出し、酵素消化した後に HPLC によりペプチド断片を分離した。代表的なペプチドのアミノ酸配列決定を行いデータベースを検索した結果、結合タンパクとしてグリコーゲンフォスホリラーゼ (94 kDa)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (54kDa)、アデノシンキナーゼ (43 kDa)、アルコールデヒドロゲナーゼ (39 kDa)、およびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (25 kDa) の 5 種類が同定された。(2) ADH については *p*-HAP から溶出した後、陽イオン交換カラムを用いることにより、簡便でしかも 57% という高い収率で精製できた。(3) 精製酵素を用いて ASA の ADH 活性への影響を調べたところ、生理的濃度の ASA により ADH 活性が促進した。

以上得られた結果は、*p*-HAP が肝臓に含まれる複数の酵素と相互作用することを示している。*p*-HAP 同様に ASA も結合タンパクを溶出することから、同様の相互作用が考えられる。さらに ASA は精製 ADH 活性を促進することから、アルコールと同時に服用した場合 ADH 活性を促進することでアルコール代謝に影響を与える可能性がある。

このように、薬物代謝にかかわると考えられる酵素を同定し、しかも薬物そのものが酵素活性を調節する可能性について示したことは、薬物の代謝経路の解明と持続性のある新薬の開発へとつながる重要な知見である。以上のような医学的な有用性を高く評価し本論文が博士 (医学) の学位論文として価値があると判断した。