



Title	炭酸脱水酵素阻害薬アセタゾラミドの分子薬理学的研究：ウシ炭酸脱水酵素IIとの複合体の核磁気共鳴法による解析
Author(s)	森山, 穂積
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36819
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	森	山	穂	積
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8909	号	
学位授与の日付	平成元年	12月	13日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	炭酸脱水酵素阻害薬アセタゾラミドの分子薬理学的研究：ウシ炭酸脱水酵素IIとの複合体の核磁気共鳴法による解析			
論文審査委員	(主査) 教 授 真鍋 禮三			
	(副査) 教 授 田川 邦夫 教 授 和田 博			

論文内容の要旨

〔目的〕

アセタゾラミドは眼房水産生の抑制薬として緑内障患者の眼圧コントロールに重要な役割を担っている。毛様体には炭酸脱水酵素IIがあり、アセタゾラミドはこれを阻害し、眼房水の産生を抑制する。アセタゾラミドと炭酸脱水酵素IIとの結合様式はすでにX線による結晶解析が行われている。それによるとアセタゾラミドのスルファモイル基は亜鉛と結合し、アセトアミド基はPhe-131の方を向いているとされている。しかし分子軌道法計算では他の構造が予測されたので溶液状態の構造を正確に測定できる核磁気共鳴法を用いて調べることを試みた。

〔方法〕

(1)炭酸脱水酵素II(ウシ赤血球由来), アセタゾラミド, 重水, D_2SO_4 , NaODは市販品を用いた。活性中心の亜鉛をコバルトに置換した酵素(コバルト置換酵素), His-64をカルボキシメチル化した酵素, メチルアミノチアジアゾールスルフォンアミド(2-methylamino-1, 3, 4-thiadiazole-5-sulfonamide)は文献にしたがって調製した。(2)水素核核磁気共鳴(^1H-NMR)の測定酵素のヒスチジン残基のイミダゾール核C₂についての水素核のみを測定した。酵素の終濃度を2mMとし, 0.1M硫酸ナトリウムを含む重水溶液とした。基準物質にはsodium-2, 2-dimethyl-1-2-silapentane-5-sulphonateを用いた。測定温度は37°Cとした。測定装置はパルス, フーリエ変換核磁気共鳴装置で共鳴周波数500MHzと360MHzを用いた。測定方法はスピンエコー法の1つであるCPMG(Carr-Parcell-Meiboom-Gill)法を採用した。(3)pH滴定はNaOD, D_2SO_4 を直接試料管に入れて行い, pHメーターの読みをそのまま測定値とした。pKa値はジグモイド曲線に対して非線形最小自乗

法で近似を行って求めた。(4)阻害定数は p-nitrophenylacetate を基質とするエステラーゼ活性で測定し、50%阻害濃度で表した。

[成 績]

(1)ウシ炭酸脱水酵素IIのpH滴定では、ヒスチジン残基の信号として8本の信号を捕捉した。このうち9.25ppm, 8.45ppm, 7.97ppm (pH8.5) の化学シフト値を持つ3本の信号がpHを変えても変化せず、残り5本の信号 (7.89ppm, 7.82ppm, 7.70ppm, 7.64ppm, 7.63ppm) がpHの変化で影響を受けた。5本の信号の各pKaは6.23, 6.30, 6.40, 6.42, 6.54であった。(2)コバルト置換酵素ではネイティブ酵素のpHで変化しない3本の信号が芳香環領域から消失した。pHで変化する5本の信号は存在していた。アセタゾラミドとの酵素阻害剤複合体ではアセタゾラミド0.4mM以上で8.45ppmに新しい信号が現れ、pHで変化する5本の信号のうち1本が消失した。(3)His-64をカルボキシメチル化した酵素ではネイティブ酵素でみられた7.89ppm (pH8.25) の信号が消失していた。カルボキシメチル基のメチレンに由来する信号とヒスチジン領域の7.88ppm (pH9.08) の信号との間で核オーバーハウザー効果 (NOE) を認めた。(4)アセタゾラミド (50%阻害濃度 0.78×10^{-7} M) との酵素阻害剤複合体のpH滴定ではネイティブ酵素でpHの影響をうける7.89ppm (pH8.5) の信号が消失し、あらたにpHに影響されない信号が8.22ppmに認められた。ネイティブ酵素の7.97ppm (pH8.5) のpHに影響されない信号は酵素阻害剤複合体では7.77ppmにシフトし、pHに影響されなかった。他は、ネイティブ酵素とほぼ同様のプロファイルを描いた。(5)pH7.5でネイティブ酵素濃度を2mMに固定し、アセタゾラミドの濃度を変えてNMRを測定した。アセタゾラミド濃度0.75mM以上で8.22ppmにpHに影響されない信号が現れた。さらにアセタゾラミドのメチル基と8.22ppmの信号との間にNOEが観測された。(6)メチルアミノチアジアゾールスルフォンアミド (50%阻害濃度 2.16×10^{-7} M) との酵素阻害剤複合体のpH滴定は8本の信号のうち4本がpHに影響されなかった。アセタゾラミドの場合と比較すると、pHに影響されない8.22ppmが8.17ppmに、7.80ppmが7.67ppmへ低磁場側にシフトしていた。他の信号には大きな変化はみられなかった。

[総 括]

炭酸脱水酵素IIとアセタゾラミドなどのスルファンアミド阻害剤は酵素の活性中心にある亜鉛と相互作用するとともに、酵素活性中心のくぼみ構造の入口付近にあるHis-64とも相互作用し、より安定な複合体を作つて酵素活性を阻害することが証明された。X線による炭酸脱水酵素IIと阻害剤との解析は結晶での結果であり、溶液状態で測定したNMRの結果とは異なった。しかし溶液状態での情報は酵素が活性を示す生理的な状態に近く、より重要な情報となることが分かった。

論文の審査結果の要旨

眼圧降下剤であるアセタゾラミド (ACZ) と受容体と考えられる炭酸脱水酵素II (CA II) との結合の状態はX線結晶解析によるとACZのアセトアミノ基がCA IIの分子内のPhe-131の方を向いて

いるとされている。しかし分子軌道法計算で His-64との相互作用を指摘する報告もあるので、本研究は His-64の役割に注目し、その重要性を指摘したものである。測定は核磁気共鳴（NMR）装置を用い、薬理学的に意味のある37°Cの溶液中で行われた。

CA IIのNMRスペクトルの芳香環領域にヒスチジンC 2プロトンの共鳴に由来する8個のピークを認め、His-64を特異的にカルボキシメチル化すると8個のピークのなかで7.89ppmにあった1個のピークが消失することから、このピークが His-64であることを同定した。つぎにACZとCA IIとの複合体のNMRスペクトルでは7.89ppmにあった His-64のピークが8.22ppmに移動したことからACZのアセトアミノ基がCA IIの His-64と相互作用していることを証明している。またACZにあるメチル基のピーク（2.17ppm）と8.22ppmのピークとの間で分子間核オーバーハウザー効果を観測したことでも、ACZが His-64と相互作用をしていることを示している。

以上の結果はACZとCA IIの複合体のNMRによる溶液状態での研究の重要性を指摘していると同時に、今後副作用の少ない薬物を開発するうえに重要な情報を提供するもので学位授与に値する。