The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アンジオテンシンⅡレセプターの生化学的性状に関する研究
Author(s)	今井, 信行
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34663
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

【7】

氏名・（本籍）	今井信行（いまい のぶゆき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6801 号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**アンジオテンシンⅡレセプターの生化学的性状に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授 熊原 雄一 （副査） 教授 坂本 幸哉 教授 和田 博

論文内容の要旨

（目　的）

アンジオテンシンII（AII）は血管平滑筋の収縮，副腎皮質よりのアルドステロンの分泌を介して，生体の体液恒常性，血圧維持に重要な役割を演じている。AIIの生理作用を理解するために，最近アンジオテンシンIIレセプター（AIIR）に関する研究が注目されている。放射標識したAIIを用いることにより，AIIRは生体内の広汎な臓器に存在することが確認されてきているが，その生化学的性状に関しては不明な点が多い。本研究では，AIIRを副腎皮質細胞膜から可溶化し，生化学的性状の解明を行うとともに，AIIとAIIRの結合機序についても検討を加えた。

（方法ならびに成績）

i）レセプターの可溶化と結合平衡の検討。

方法；洗浄牛副腎皮質膜分画をプロテアーゼインヒビター（1 mM PMSF，10mM EDTA，それぞれ1 μg／mℓ の antipain，leupeptin，pepstatin A，phosphoramidon）の存在下に，1％の両価性界面活性剤（CHAPS：3−〔（3−cholamidopropyl）dimethylammonio〕−1−propanesulfonate）を混じた5倍容の10 mMリン酸緩衝液に懸濁した。氷上30分間撹拌後，超遠心上清をAIIR溶液とした。AIIR 溶液に ^{125}I ラベルしたAIIを混じ，平衡の得られるまでインキュベーションした。レセプターに結合した ^{125}I AIIの分離は脱塩ゲルをつめたミニカラムによる迅速ゲル濾過法，さらに大量サンプルのアッセイにはポリエチレングリコールによる沈澱法を用いた。非特異的結合は終濃度10 μMの非標識AIIを混じて求めた。

成績；

①界面活性剤の濃度は1％で十分であり，この濃度で15～20％の膜蛋白が可溶化され(蛋白量2.2㎎／mℓ)，60％のAIIが溶出された。これ以上の濃度では，結合はむしろ阻害された。

② AIIとAIIRの結合はpH依存性であり，至適pHは7.40近傍であった。また温度依存性であり，37℃では平衡が得られず，30℃　1時間を反応条件に選んだ。

③ Scatchard plotの結果，2つの結合部位が認められた（Kd＝3，3 nM，Bmax＝5.0 pmol／㎎ protein；Kd＝45nM，Bmax＝48pmol／㎎ protein）。

④ AIIRの結合特異性は，アンジオテンシンIII（AIII）が最も強力であり，以下AII，AIの順であった。AIIアンタゴニストであるSar^{1}-Ile^{8} AIIの結合特異性はAI以下であった。

ブラジキニン，サブスタンスP，バゾプレッシンはAIIRとは結合しなかった。

ii）conformationの変化

方法；AIIRがAIIとの特異的結合を遂げた際にconformationの変化をおこす可能性を明らかにするために，pHの変化やβ－メルカプトエタノールがAIIRの結合活性に及ぼす影響をAIIとの結合前後で検討した。

成績：AIIRはpHの変化，SH試薬等に敏感であり，pH 7以下，β－メルカプトエタノールによる前処理で結合活性は失なわれた。しかしAIIRにAIIが結合すると，両者に抵抗性となり，pH 7以下，β－メルカプトエタノールに対して結合活性は保持された。

iii）AII結合部位の生化学的性状

方法；AIIの3次構造は決定されていないが，全体として環状構造をとり，分子中央部に非極性アミノ酸残基（Val Tyr，Ile／Val，Phe）が集まり，その両端に塩基性アミノ酸残基（Arg，His）が位置していると推定される。そこで，中央部に疎水性アルキル鎖，両端にアミノ基をもつdiaminoalkaneをAII分子のモデルと考え，アルキル鎖長の異なるdiaminoalkaneのAIIとAIIRへの結合に及ぼす影響を検討した。

成績；diaminoalkaneによりAIIとAIIRの結合はアルキル鎖長依存性に阻害された。最大阻害は，炭素数6ないし7個のdiaminohexane，diaminoheptaneで得られた。逆数プロットにより，阻害形式は拮抗的であることが判明した。

（総　　括）

i）AIIRを牛副腎皮質より可溶化して，生化学的検討を行なった。可溶化AIIRは2つの結合部位をもち，AIIに特異的であった。

ii）AIIRが結合活性を保持するには，S＝S結合が必要と思われる。また，AIIRはAIIと結合することによりconformationの変化をきたすと考えられる。

iii）AIIRのAII結合部位は中央部が疎水性に富み，その両端に陰性電荷を有すると考えられる。両陰性電荷の間隔は炭素数6ないし7個のアルキル鎖に相当すると考えられる。AIIはAIIRとの間に，これら疎水結合，静電結合，さらに適宜，水素結合を形成することで，受容体への特異的結合を遂げると考えられる。

論文の審査結果の要旨

アンジオテンシンII レセプター（AIIR） を結合活性を失うことなく，牛副腎皮質より可溶化し，その生化学的性状の検討を行うことを目的とした。AIIRは ^{125}I－アンジオテンシンII（AII）の特異的結合をもって検出し，以下の結論を得た。

1）可溶化 AIIR は AII に特異的であり，解離定数 3.3 nM，45nM の 2 つの結合部位を認めた。

2）可溶化 AIIR の分子量は約 450～500 kDa と計算された。

3） AIIR が結合活性を保持するには，S＝S 結合が必要である。

4） AIIR は AII と結合することにより，conformation の変化をきたすと考えられる。

5） AIIR の AII の結合部位は中央部が疎水性に富み，その両端に陰性電荷を有すと考えられる。両陰性電荷の間隔は，炭素数 6 ないし，7 個のアルキル鎖に相当すると考えられる。

6） AIIR は AII との間に，これら疎水結合，静電結合，さらに適宜，水素結合を形成することで，受容体への特異的結合を遂げると考えられる。

7）本研究は，アンジオテンシン II レセプターの性状を解明した新知見であり意義ある研究と思われる。