



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

氏名・（本籍）	いま	い	のぶ	ゆき
	今	井	信	行
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(1mM PMSF, 10mM EDTA, それぞれ1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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10mMリン酸緩衝液に懸濁した。氷上30分間攪拌後、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2.2mg/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。

②AII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。

③Scatchard plotの結果、2つの結合部位が認められた($K_d=3, 3 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 5.0 \text{ pmol/mg protein}$; $K_d=45 \text{ nM}$, $B_{\text{max}}=48 \text{ pmol/mg protein}$)。

④AIIR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 $\text{Sar}^1\text{-Ile}^8$ 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 (AII R) 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。AII R 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 AII R 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 AII R の分子量は約 450~500 kDa と計算された。
- 3) AII R が結合活性を保持するには、S = S 結合が必要である。
- 4) AII R 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) AII R 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) AII R 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。