

|               |  |
|---------------|--|
| 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      |  |
| Issue Date    |  |
| oaire:version |  |
| URL           | <a href="https://hdl.handle.net/11094/34663">https://hdl.handle.net/11094/34663</a>  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【7】

|         |  |        |         |         |
|---------|--|--------|---------|---------|
| 氏名・(本籍) | いま<br>今                                      | い<br>井 | のぶ<br>信 | ゆき<br>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<br>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)<br>教授 熊原 雄一<br>(副査)<br>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(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 $^{125}\text{I}$ 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 $^{125}\text{I}$ 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  $\mu\text{M}$ 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°Cでは平衡が得られず、30°C 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Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup> 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 $\beta$ -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、pH7以下、 $\beta$ -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、pH7以下、 $\beta$ -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(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 $^{125}\text{I}$ -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。