



Title	メピラミンの結合蛋白（ヒスタミンH1受容体）の可溶化、精製及びその性質
Author(s)	王, 乃平
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36029
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	王	乃	平
学位の種類	医	学	博
学位記番号	第	8096	号
学位授与の日付	昭和63年3月25日		
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻		
	学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	メピラミン結合蛋白(ヒスタミンH ₁ 受容体)の可溶化、 精製及びその性質		
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博		
	(副査) 教授 吉田 博 教授 田川 邦夫		

論文内容の要旨

[目的]

ヒスタミンH₁受容体(メピラミン結合蛋白)は平滑筋膜や神経シナプス後膜に存在し、それぞれ、肥満細胞および神経終末より遊離されたヒスタミンを認識し、その情報を細胞内に伝えている。その情報伝達機構を理解するためにH₁受容体の分子構造及び分子レベルの情報伝達を明らかにすることが必要である。モルモット脳にH₁受容体が多く存在することはすでに知られているが、最近、ラット肝にモルモット脳よりも遙かに高い[³H]メピラミンの結合活性が含まれている事が報告された。われわれはH₁受容体作用のメカニズムを明確にすることを目的として、モルモット脳及びラット肝のメピラミン結合蛋白(H₁受容体)を可溶化し、その性質を調べ、更にラット肝について、その結合蛋白の精製を試みた。

[方法ならびに成績]

1. モルモット脳及びラット肝膜分画の調製: モルモット脳及びラット肝を50mMのNa/Kリン酸緩衝液(pH7.4)にオモゲナイズし、50,000×gで20分間遠心し、膜分画を得た。ほぼ100%の活性が膜分画に回収された。
2. メピラミン結合蛋白の可溶化: 各種の界面活性剤を用いて可溶化の条件を調べた。その結果、界面活性剤として10mM CHAPS, 0.2% (w/v) Tween 60、更に増強剤として30% (w/v) グリセリンを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を用いることにより可溶化できた。回収率は、モルモット脳の場合約30%、ラット肝の場合、約80%であった。可溶化後の結合活性はモルモットの場合、2日で半減したがラット肝のは同じ条件下で17日後でも80%の活性を保存し、よい安定性を示した。

3. 可溶化結合蛋白の [³H] メピラミン結合実験：可溶化モルモット脳メピラミン結合蛋白に結合部位が二つ存在し, K_D が, それぞれ $6.1 \pm 2.5 \text{nM}$ と $29.4 \pm 14.4 \text{nM}$ であり, B_{max} が, それぞれ $49.2 \pm 2.5 \text{fmol/mg protein}$ と $180.4 \pm 70.1 \text{fmol/mg protein}$ であった。可溶化ラット肝メピラミン結合蛋白の結合部位が一つであり, K_D と B_{max} それぞれ $19.6 \pm 5.6 \text{nM}$ と $6.6 \pm 2.1 \text{pmol/mg protein}$ であった。又, 用いた各種の H_1 拮抗薬の [³H] メピラミン結合に対する阻害はモルモット脳においてはすべてが nM オーダーで, ラット肝においてはメピラミンは nM オーダーであったが, 他の H_1 拮抗薬は μM オーダーで [³H] メピラミン結合を阻害した。

4. メピラミン結合蛋白分子量の測定：可溶化メピラミン結合蛋白の分子量を Sepharose CL-4B を用いるゲルfiltration, ショ糖密度勾配遠心及び γ 線照射法により測定した。モルモット脳とラット肝可溶化メピラミン結合蛋白はいずれもゲルfiltration で 670K の分子量であった。更にショ糖密度勾配遠心及び γ 線照射法で測定したラット肝メピラミン結合蛋白の分子量は, それぞれ 800K と 162K であった。

5. ラット肝メピラミン結合蛋白の精製：可溶化標品についてまず Sepharose CL-4B カラムによるゲルfiltration を行い, DEAE-Cellulose を素通りさせ, 易吸着蛋白を除き, さらにジフェンヒドラミン誘導体アフィニティーカラム及びメピラミン誘導体アフィニティーカラムの各ステップを経て, ラット肝メピラミン結合蛋白を精製した。最終標品の [³H] メピラミン結合比活性は $34.7 \text{nmol/mg protein}$ であり, [³H] メピラミンに対する親和性 (K_D) は $18.5 \pm 4.2 \text{nM}$ であった。精製標品は SDS ポリアクリルアミド電気泳動により, 61K, 58K, 54K の 3 本のバンドを示した。そして, それぞれほぼ同量ずつ存在した。3 本の蛋白の分子量の合計は 173K であり, γ 線照射法で得た分子量 (162K) とよい一致を示した。

〔総括〕

1. モルモット脳及びラット肝メピラミン結合蛋白の可溶化法を確立した。
2. ラット肝及びモルモット脳可溶化メピラミン結合蛋白はゲルfiltration による分子量は同じであった (670K)。ショ糖密度勾配遠心及び γ 線照射法で測定したラット肝メピラミン結合蛋白の分子量は, それぞれ 800K と 162K であった。
3. 可溶化メピラミン結合蛋白はラット肝のものは安定性が高いが, モルモット脳のものは不安定であった。モルモット脳のものは [³H] メピラミンの結合部位が二つあったが, ラット肝のものは一つであった。各種ヒスタミン H_1 拮抗薬はモルモット脳に nM オーダーで [³H] メピラミン結合を阻害したが, ラット肝にメピラミン以外の H_1 拮抗薬が μM オーダーを必要とした。ラット肝とモルモット脳メピラミン結合蛋白は上に述べたような異なる性質を示した。
4. 精製用アフィニティーカラム用リガンドを有機合成した。合成したリガンドはラット肝メピラミン結合蛋白に対して高い親和性を示した。
5. 可溶化ラット肝メピラミン結合蛋白アフィニティーカラムを用いることにより約 5,000 倍精製された。精製標品の [³H] メピラミンの結合活性は理論計算より上回った。精製メピラミン結合蛋白標品は SDS ポリアクリルアミド電気泳動により, 61K, 58K, 54K の 3 本の蛋白バンドが検出された。

論文の審査結果の要旨

生理活性アミノの研究には現在受容体の精製が不可欠となつてきている。本論文はヒスタミンH₁受容体について、その精製を目的としたもので、精製材料としてはモルモット脳及びラット肝の細胞膜を用いている。そして、各種の可溶化条件の検討とともに、H₁拮抗薬であるジフェンヒドラミン及びメピラミンの誘導体を合成し、それらをリガンドとしてアフィニティクロマトグラフィーを行い、その結果、約5,000倍の精製倍率で均一の標品を得ることに成功した。ヒスタミン受容体についての単離はこれが最初であり、これによって同受容体の機能、ひいてはヒスタミンの作用機作を分子レベルで解明する道を開いた。本論文は学位論文として価値あるものと言える。