



Title	Purification and Characterization of Neurotensin Receptor From Rat Brain With Special Reference to Comparison Between Newborn and Adult Age Rats
Author(s)	李, 泰豪
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37951
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	李 豪
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 10158 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	Purification and Characterization of Neurotensin Receptor From Rat Brain With Special Reference to Comparison Between Newborn and Adult Age Rats (Neurotensin Receptor の精製とその性質—生直後及び成熟ラットとの比較)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 塩谷弥兵衛 教授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

Neurotensin (NT) は13個のアミノ酸からなるペプチドで、神経伝達物質または神経修飾物質の一つと考えられている。Neurotensin Receptor (NTR) はG蛋白結合受容体であり、中枢及び末梢神経系に広く分布していることが、種々の動物でのアイソトープ標識リガンドを用いた binding assay にて示されているが、その性質および機能については今だ明確にはなっていない。近年、ウシ及びマウスよりNTRが部分精製され、一方ラットよりcDNAがクローニングされた。しかし、部分精製から示唆された分子量及び解離定数とcDNAクローニングから得られたそれらとは大きな差異が存在している。又、In vitro autoradiography を用いての固体発生の研究では、生直後及び成熟ラットにおいてNTRの脳内分布に大きな変化が認められ、NT-NTR系が脳の発生に対し、重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究では、脳発達におけるNTの役割を明らかにするため生直後と成熟ラットにおけるNTRの性質を比較すると共にNTRの精製を試みた。

(方 法)

実験動物としては、生直後(0-3日齢)及び成熟(8週齢)のWistar系雄ラットを用いた。それぞれの動物の大脳皮質と視床下部を取り出し膜分画を得た。生直後ラットの大脳皮質膜分画はさらに2% digitonin を用いて可溶化した。膜分画及び可溶化物に、0.05-40nM の [³H] NTを加え、4℃ 60分間反応させ、B/F分離はGF/B filter にて行った。反応液に1μM の非標識NTを加えたものを非特異的結合とした。Affinity Column は、NT 25mgをAffigel-10 1mlとdimethylformamide 中で4℃一晩反応させ、残った active site をethanolamine でブロックして作製した。生直後ラット大脳皮質可

溶化物を、Affinity Columnに20 ml/hrで添加し、NaCl濃度を500 mMに上昇させることによってColumnよりNTRを溶出させた。溶出物は、SDS-PAGE、銀染色にて観察した。また、Photoaffinity labelingによって分子量の確認を行った。¹²⁵I 40nMとbifunctional crosslinking agentであるSANAH 20mMをdimethylformamide中、暗所にて反応させ、その後、生直後大脳皮質膜分画1 mgを加えてさらに1時間反応させた。反応後、反応液に水銀ランプを30分間照射し、crosslinkingされた膜分画をSDS-PAGE後、オートラジオグラフィーに供した。

(成 績)

膜分画による検討では、生直後大脳皮質には、一種類のNT結合部位のみ存在し、 $K_d = 0.13 \text{ nM}$ 、 $B_{\text{max}} = 710 \text{ fmol/mg protein}$ である。一方、成熟ラット大脳皮質には、二種類のNT結合部位が存在し、High affinity 結合部位 $K_{d1} = 0.11 \text{ nM}$ 、 $B_{\text{max}1} = 27 \text{ fmol/mg protein}$ と、Low affinity 結合部位 $K_{d2} = 22 \text{ nM}$ 、 $B_{\text{max}2} = 423 \text{ fmol/mg protein}$ である。成熟ラット視床下部は、ほぼ大脳皮質と同様の結果であるが、High Affinity 結合部位の B_{max} が大脳皮質の2.4 倍高かった。

生直後ラット大脳皮質より精製されたNTRは、回収率5.2 %、精製度14000倍で、 $K_d = 0.45 \text{ nM}$ 、 $B_{\text{max}} = 9.5 \text{ nmol/mg protein}$ である。SDS-PAGE後の銀染色では、2-mercaptoethanol還元下では分子量55000、非還元下では54000の単一バンドが認められた。Photoaffinity labelingによる検討では、還元下で分子量55000の特異的な単一バンドが認められた。

(総 括)

NT結合部位は、生直後ラット大脳皮質では分子量55000、 $K_d = 0.45 \text{ nM}$ の、High affinity 結合部位のみが存在し、その量は成熟ラット脳と比較してきわめて豊富である。一方、成熟ラット脳では、性状からみて生直後と同様のHigh affinity 結合部位が生直後ラットの約1/20程度に減少するが、これとは全く異なるLow affinity 結合部位が増加する。

論文審査の結果の要旨

NT受容体に関して数多くの研究がなされているが、現在のところその性状については明確になっていない。本研究では、個体発生学的にNTのbinding assayを行い、NT受容体の比較検討を行うと共に、NT受容体の精製を行った。即ち、シナプス形成前の生直後ラットの脳には、high affinityのNT受容体一種類のみが発現しており、かつその発現量は非常に豊富である。生直後のラットの脳を用いてhigh affinityのNT受容体を精製したところ、分子量約55000の単一タンパクが得られた。一方、成熟したラットの脳では、high affinityとlow affinityの二種類のNT受容体が発現するようになり、脳の発達段階においてNT受容体の発現様式が大きく変化することが明らかとなった。以上より、本研究は生直後のシナプス形成時期におけるNTの役割を明らかにする上で多大の貢献をもたらすものであり、学位に値するものと考えらる。