

氏名(本籍)	近藤元宏(三重県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第970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5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Solubilization and characterization of rat lung endothelin receptor. (ラット肺エンドセリン受容体の可溶化と性質検討)		
主査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部功
副査	筑波大学教授	農学博士	宗像英輔
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌

論文の要旨

エンドセリン(Endothelin:ET)は、1988年に、当筑波大学において発見されたペプチドで、ブタ血管内皮細胞の培養上清中より単離、構造決定された。また、染色体遺伝子の解析により三種類のアイソペプチド(ET-1, ET-2, ET-3)の存在が明らかとなった。ETの生理活性は、血管収縮作用、アルドステロン、心房性利尿ペプチド、内皮由来血管弛緩因子などの分泌抑制作用、細胞増殖作用などさまざまである。ETのこのような多岐にわたる生理作用は、標的細胞上のET受容体を介して行われる。そして、このET受容体にも生理学的、生化学的解析により、少なくとも三種類のET受容体サブタイプの存在が明らかとなった。これらのET受容体は、ET-1, -3の結合特性により、ET-1に特異的なET_A受容体、ET-1, -3の両者に特異的なET_B受容体、ET-3に特異的なET_C受容体に分類される。このように、ETは三種類のアイソペプチドからなり、ET受容体も少なくとも三種類存在し、生理作用も多岐にわたることが知られるようになった。しかしながら、アイソペプチド、ET受容体サブタイプ、生理作用の関連性は明らかではない。この関連性の追求において、ETの情報伝達において重要な役割を担っているET受容体の生化学的性質検討が不可欠と考えられる。そこで、本研究においては、その第一歩として、ET受容体の可溶化と可溶化ET受容体の性質検討を目的とした。

まず、ET受容体の性質検討を行う上で必要不可欠である抗体の作製を行った。一般的には精製標品を抗原として抗体を作製する。しかしながら、ET受容体の精製は困難を極めていた。そこで、モノクローナル抗体(mAb)作製の技術を応用し、ラット肺膜分画を抗原にして、抗ET受容体抗体の作製を行った。mAbのスクリーニングには新たに開発した方法を用いた。その方法とは、可溶化ET

受容体に、 ^{125}I -ET-1・ET受容体複合体と、IgG吸着体を添加反応後、ろ過残渣物の放射活性を測定する方法である。ろ過残渣物の放射活性が高いほど、抗体がET受容体をよりよく認識していると言える。このスクリーニングの系を用いて、四種類（A2, E7, G9, G10）のmAbを得ることに成功した。これらのmAbは濃度依存的に ^{125}I -ET-1・ET受容体複合体を免疫沈降した。しかしながら、コントロールに用いたIgG2aは ^{125}I -ET-1・ET受容体複合体をまったく免疫沈降出来なかった。四種類のmAbのうちG9抗体が最も強力に ^{125}I -ET-1・ET受容体複合体を免疫沈降できた。ところで、ラット肺中には、45kDaと32kDaの分子量の異なる二種類のET受容体サブタイプの存在が知られている。そこで、アフィニティーラベリングという手法を用いて、mAbの抗原特異性を検討した。アフィニティーラベリングとは、ET受容体と ^{125}I -ETを化学的に共有結合し、ET受容体の特異的に放射線標識する方法である。アフィニティーラベリング後、免疫沈降実験を行った結果、ラット肺膜分画中の45kDaと32kDaの二種類のET受容体サブタイプのうち、A2, E7, G9抗体は両方のサブタイプを免疫沈降し、G10抗体は45kDaのET受容体のみを免疫沈降することがわかった。さらに、競争置換実験を行い、これらのmAbが明らかにET受容体を認識していることを確かめた。

次に、ラット肺膜分画からのET受容体の可溶化と可溶化ET受容体の性質検討を行った。まず、ET受容体を安定に可溶化できる界面活性剤の探索を行った。界面活性剤は、受容体の可溶化に最も頻繁に使用されるCHAPSとジギトニンを用いた。可溶化は1 mg protein/mlに調製したラット肺膜分画に、界面活性剤を各種濃度で添加し、4°C、1時間攪はんし行った。その結果、どちらの界面活性剤を用いた場合でも、可溶化される蛋白質量はほぼ同程度であるにも関わらず、ET結合活性はジギトニンを用いた場合の方が高い値を示した。また、至適ジギトニン濃度は0.3%であった。以上より、0.3%ジギトニンが、最も効率よくET受容体を可溶化することがわかった。次に、可溶化ET受容体と ^{125}I -ET-1,-3の結合における至適温度と時間を求めた。4, 25, 37°Cの各温度で可溶化ET受容体と ^{125}I -ET-1,-3を反応させると、4°C、25°Cでは2時間で飽和に達したが、37°Cでは1時間後に最大結合量に達し、以後、下降傾向を示した。そこで、可溶化ET受容体と ^{125}I -ET-1,-3の結合の至適測定条件は25°Cで2時間と定めた。次に、可溶化ET受容体が膜結合時の性質を保持しているかどうかの検討が必要である。膜結合時のET受容体は、ETと非可逆的結合を示す。そこで、まず、可溶化ET受容体とETの解離会合特性について検討した。可溶化ET受容体と、 ^{125}I -ET-1,-3を25°Cで反応し、飽和に達した時点で、過剰量の非標識ET-1,または、ET-3を添加し、解離会合特性を検討した。その結果、 ^{125}I -ET-1, ^{125}I -ET-3ともに非標識ETにより置換されなかった。これは、可溶化ET受容体とETの非可逆的結合特性を示しており、膜結合時と同様の性質を保持したまま可溶化に成功したことがわかった。さらに、可溶化ET受容体の解離定数 (Kd) とET結合部位数 (Bmax) を求めるために、Scatchard解析を行った。Scatchard解析により、その傾きからKd値、X切片よりBmax値がもとまる。膜結合時のET受容体とET-1のKd値は32pM, ET-3は27pMであることが知られている。 ^{125}I -ET-1を用いた場合はKd=20pM, Bmax=3.4pmol/mg protein, ^{125}I -ET-3を用いた場合はKd=14pM, Bmax=1.0pmol/mg proteinであった。Kd値に関してはどちらの ^{125}I -ETを用いてもよく似た値を示した。また、膜結合時のKd値とほぼ同値であ

ることを考慮すると、膜結合時の性質を保持したまま可溶化できたことを示している。ところで、¹²⁵I-ET-1を用いた場合と、¹²⁵I-ET-3を用いた場合で、Bmax値は異なる値を示した。これは、可溶化分画中にETアイソペプチド結合特性の異なるET受容体サブタイプが少なくとも二種類以上存在していることを示している。さらに、詳しく検討するために、G 9抗体と、アフィニティーラベリング法を用いて検討を加えた。G 9抗体をもちいたのは、非特異的結合による誤認を避けられるからである。その結果、¹²⁵I-ET-1でアフィニティーラベリングした場合は、45kDaと32kDaの受容体の両者が免疫沈降された。しかしながら、¹²⁵I-ET-3でアフィニティーラベリングした場合は32kDaの受容体のみ確認された。すなわち、45kDaの受容体はET-1に特異的で、32kDaの受容体はET-1とET-3の両者に特異的であることが推定された。さらに、競争置換実験においても可溶性分画中に、ET結合特性の異なる二種類のET受容体の存在が示された。

以上のように、ラット肺膜分画を抗原にし、新たに開発したアッセイ系を用いて四種類のmAbを得る事に成功した。ラット肺膜分画中の45kDaと32kDaの二種類のET受容体サブタイプのうち、A 2, E 7, G抗体9は両方のサブタイプを認識し、G-10抗体は45kDaのET受容体のみを認識することがわかった。また、ラット肺膜分画からのET受容体の可溶化に成功した。可溶化ET受容体は膜結合時と同様の性質を示した。さらに、アフィニティーラベリングとG 9抗体を用いた免疫沈降実験から、可溶性分画中の54kDaの受容体はET-1に特異的で、32kDaの受容体はET-1とET-3の両者に特異的であることがわかった。

審 査 の 要 旨

エンドセリン (ET) は、血管平滑筋収縮作用のみならず、さまざまな生理作用を有する。しかしながら、ETの生理作用発現における情報伝達経路の詳細は明らかではない。本論文では、ETの情報伝達系において、最も重要な働きを担っているET受容体について生化学的性質検討を行った点で評価される。著者は、モノクローナル抗体作製の技術と独自に開発したアッセイ系を用いて、ET受容体を精製することなく抗ET受容体抗体を得ることに成功した。この抗体は、ETアイソペプチド、ET受容体サブタイプ、そしてETの生理作用の関連性を検討するうえで非常に有用である。また、著者は、困難とされたET受容体の可溶化に成功し、さらに、可溶化ET受容体の性質検討を行い、ET結合能の異なる二種類のET受容体を確認している。

以上のように、本論文中の、抗ET受容体抗体、ET受容体可溶化法、そして、可溶化ET受容体の性質検討は、ET受容体研究をさらに発展させるものと期待され、非常に有意義な研究である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。