

氏 名	錦 織 浩 治 にしこ おり ごう じ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 223 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Catecholamine の作用に關与する Cyclic AMP の役割 およびその機構に關する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 山 科 郁 男 教 授 高 木 博 司 教 授 富 田 謙 吉

論 文 内 容 の 要 旨

Cyclic AMP は広く生物界全般に存在しており、多岐にわたる生理反応の情報伝達物質として働いていると考えられている。Catecholamine の作用のうち、 β -adrenergic receptor やある種の dopaminergic receptor を介する作用には、cyclic AMP が関与することが数多くの研究により示唆されている。著者は、catecholamine の作用に關与する cyclic AMP の役割とその機構を解明する目的で、以下に述べる一連の研究を行ない種々の新知見を得た。

1. ラット子宮平滑筋の収縮性の調節に關与する cyclic AMP の役割についての研究を行なった。Dibutylryl cyclic AMP は、 β -adrenergic receptor を介する刺激と同様、子宮平滑筋の弛緩をもたらした。この子宮平滑筋より得た小胞体画分において、cyclic AMP は、生理濃度に近い ATP 存在下での Ca^{2+} とり込みを有意に促進した。Cyclic AMP の効果は特異的で、かつ生理的な濃度で発現した。Mitochondria の Ca^{2+} とり込みは cyclic AMP により促進されず、 NaN_3 により著しく阻害されることから、小胞体の Ca^{2+} とり込みとは明確に区別し得るものであった。この小胞体の Ca^{2+} とり込みの促進が筋弛緩のひき金になるものと考えられる。

2. 更に、この小胞体における Ca^{2+} とり込みの cyclic AMP による促進機構についての研究を行なった。Cyclic AMP は、子宮小胞体に存在する分子量48,000の、ある膜タンパク (Protein A) の内因性リン酸化を特異的に促進した。Protein A のリン酸化促進に必要な cyclic AMP の濃度は、 Ca^{2+} とり込みの促進に必要なそれと極めて近いものであった。Cyclic AMP による Protein A のリン酸化は約10秒で最大に達したが、これは Ca^{2+} とり込みの促進に先立つものであった。更に、他の16種の cyclic nucleotide を用いて、小胞体画分における Protein A のリン酸化および Ca^{2+} とり込みの両活性に及ぼす影響を検討した結果、各 cyclic nucleotide の両活性に対する促進効果は、それぞれ極めて類似したものであり、両者の促進の間には密接な関連があることが示された。また、可溶性 cyclic AMP-依存性 protein kinase を添加しても、小胞体における Protein A の内因性リン酸化や Ca^{2+} とり込みに対する cyclic AMP の促進効果には影響を及ぼさなかった。以上の結果は、ラット子宮小胞体の Ca^{2+} とり込みの促進は、膜

タンパクである Protein A の内因性リン酸化を介して発現することを示唆する。従って、子宮平滑筋の β -adrenergic receptor を介する収縮性の調節に関与する cyclic AMP の役割のひとつとして、小胞体膜タンパクである Protein A のリン酸化を介して Ca^{2+} とり込みを促進し、弛緩をひき起こすという機構を挙げることができる。

3. 続いて、 β -adrenergic receptor と adenylylase の分子的関連性を明らかにする目的で、イヌ小脳シナプス膜 β -adrenergic receptor と adenylylase の特性について研究した。小脳シナプス膜画分への $(-)-[^3\text{H}]\text{dihydroalprenolol}$ の結合は、生理的な receptor への結合であるための多くの条件を満足し、 β -adrenergic ligand により特異的に置換された。これは、この $(-)-[^3\text{H}]\text{dihydroalprenolol}$ の結合が β -adrenergic receptor そのものへの結合であることを示している。同じ膜に存在する adenylylase 活性も β -adrenergic agonist により特異的に促進され、 β -adrenergic antagonist により特異的かつ拮抗的に阻害された。 β -adrenergic-感受性 adenylylase の賦活化には guanine nucleotide が必須であった。光学異性体を含むいくつかの β -adrenergic ligand の adenylylase に対する作用と、 $(-)-[^3\text{H}]\text{dihydroalprenolol}$ 結合で測定した β -adrenergic receptor への親和性の強さは極めて類似したものであった。また、この小脳 β -adrenergic receptor-adenylylase 系は β_2 -型の特性を示した。以上の結果は、小脳シナプス膜に存在する adenylylase は β_2 -adrenergic receptor と特異的に連結していることを示している。

4. 更に、receptor-cyclase の連結機構を明らかにするため、他のひとつの catecholamine である dopamine が関与する尾状核 dopaminergic receptor と adenylylase との関連について研究し、この receptor-cyclase 複合体を膜より可溶化することを試みた。イヌ尾状核における dopamine-感受性 adenylylase 活性およびそれと類似条件下で測定した $[^3\text{H}]\text{dopamine}$ の結合は、同様の細胞内分布を示し、シナプス膜画分に最も高い活性を示した。このシナプス膜への $[^3\text{H}]\text{dopamine}$ の結合は、dopaminergic receptor への結合であるための多くの条件を満足した。Catecholamine や種々の神経弛緩剤の dopamine-感受性 adenylylase および $[^3\text{H}]\text{dopamine}$ 結合性に対する効果は、それぞれ類似したものであった。また、シナプス膜を NaF 存在下に 2% Lubrol PX で処理することにより、dopamine-感受性 adenylylase を可溶化することに成功した。この可溶化した adenylylase は膜酵素と同様な特性を示した。

5. 可溶化した dopamine-感受性 adenylylase を Sephadex G-200 分子篩により adenylylase 画分と $[^3\text{H}]\text{dopamine}$ receptor 画分とに分離し、両画分より dopamine-感受性 adenylylase を再構成することを試みた。分離した adenylylase はもはや dopamine による賦活化を受けなかったが、NaF や Gpp(NH)p により膜酵素の場合と同様な促進を受けた。 $[^3\text{H}]\text{Dopamine}$ receptor の catecholamine や神経弛緩剤に対する親和性は、膜 receptor のそれに極めて近いものであった。分離した両画分を 4°C 、30分間インキューベートすることにより dopamine-感受性 adenylylase 活性を再構成することに成功した。この活性の特性は、膜酵素の場合に近いものであった。以上の結果は、 $[^3\text{H}]\text{dopamine}$ receptor が dopamine-感受性 adenylylase の receptor unit と同一のものであり、可溶化した画分より、膜上に存在する場合と同様な conformation をもった receptor-cyclase 複合体が再

構成されることを示唆する。

以上、著者は catecholamine の作用に関与する cyclic AMP の役割とその機構に関して、多方面からの重要な種々の新知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

サイクリック AMP がホルモンや神経伝達物質に対して第 2 のメッセンジャーとなることが明らかにされているが、その機構の詳細については不明な点が多い。本論文は、医薬品に関係の深いカテコールアミンの作用に関与するサイクリック AMP の役割について分子レベルでの機構を解明せんとしたものである。

まず β -アドレナリン作動性レセプターとサイクリック AMP の関連を知るため、このレセプターを介する筋収縮調節についてラット子宮平滑筋を用いて研究し、サイクリック AMP が膜タンパク質の一つを特異的にリン酸化し、それによって Ca^{2+} のとり込みが促進される結果筋弛緩がおこることを明らかにしている。さらに、レセプターとアデニル酸サイクラーゼとの関連をイヌ小脳シナプス膜を用いて調べ、サイクラーゼ活性が β -レセプター活性物質によって特異的に促進され、拮抗物質によって阻害されることを明らかにしている。

ドパミン作動性レセプターとアデニル酸サイクラーゼの関連についてもイヌ尾状核を用いて研究し、両者を含む膜画分を可溶化することに成功している。さらに、可溶化されたものをゲル 3 過によって分離したのち再構成することによってドパミン感受性のアデニル酸サイクラーゼ活性を復元することに成功している。

以上の知見はカテコールアミンの作用に関与するサイクリック AMP の役割の解明に大きな進歩をもたらしたものである。とくにレセプターとサイクラーゼの複合体の単離および再構成に成功したことは顕著な成果であって今後のこの領域の研究の進展に大きく寄与するものと思われる。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。