



Location in Muscarinic Acetylcholine Receptors of [3H] Propylbenzilylcholine Mustard Binding Site and Phosphorylation Site by Protein Kinase C

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内山, 晴旦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/929

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 76号	学位授与年月日	平成 元年 3月27日
氏 名	内 山 晴 旦		
論文題目	Location in Muscarinic Acetylcholine Receptors of [³H] Propylbenzilylcholine Mustard Binding Site and Phosphorylation Site by Protein Kinase C (ムスカリン性アセチルコリン受容体の[³H]プロピルベンジリルコリンマスタード結合部位およびプロテインキナーゼCによるリン酸化部位)		

Location in Muscarinic Acetylcholine Receptors of [^3H] Propylbenzilylcholine Mustard Binding Site and Phosphorylation Site by Protein Kinase C

(ムスカリン性アセチルコリン受容体の [^3H] プロピルベンジリルコリンマスタード結合部位およびプロテインキナーゼCによるリン酸化部位)

論文の内容の要旨

ムスカリン受容体は細胞膜に存在し、アゴニストの結合によりGTP結合蛋白質(G蛋白質)を活性化する。ロドプシン、 α -および β -アドレナリン受容体等もG蛋白質を活性化する。最近これら受容体のアミノ酸配列がcDNAあるいは遺伝子の解析より明らかにされた。いずれも分子量50-60kDaの一本のペプチド鎖からなり細胞膜を7回横切ると考えられている。そして分子量10-20kDaの糖鎖がN末端近傍に結合している。このアミノ酸配列や構造がどのように機能と関係しているのかは興味のある課題である。本研究ではブタ脳と心房より精製したムスカリン受容体のリガンド結合部位とリン酸化部位の同定を試みた。

ムスカリン受容体は、ブタ脳および心房の膜標品から精製し、不可逆的リガンドである [^3H] プロピルベンジリルコリンマスタード ([^3H] PrBCM) で標識、あるいはプロテインキナーゼCにより [γ - ^{32}P] -ATPを用いてリン酸化した。この標識標品をそのまま、あるいはエンドグリコシダーゼFを作用させた後プロテアーゼにより限定加水分解した。反応停止後SDS電気泳動を行い [^3H] PrBCMまたは ^{32}P リン酸をフルオログラフィー、オートラジオグラフィーでそれぞれ検出した。糖鎖はN末端のアスパラギンに結合していると考えられるので、エンドグリコシダーゼFにより電気泳動上の分子量が減少するペプチドはN末端を含んでいるとした。標品の一部は電気泳動後メンブレンフィルターに電気泳動的に転写し、受容体の部分ペプチドに対する抗体と反応させた。この抗体は部分ペプチド(アミノ酸約20個)をヘモシアニンに架橋したものを抗原としてウサギに免疫して作成した。選んだペプチドは、脳に多いとされるm1のC末端部、およびN末端より数えて3番目の細胞内ループの部分ペプチドと、心房に多いとされるm2の3番目の細胞内ループの部分ペプチドである。電気泳動上の分子量と、糖鎖の有無、抗体との反応性より、N末端あるいはC末端からリガンド結合部位やリン酸化部位までの距離を推測した。

脳あるいは心房のムスカリン受容体からトリプシンおよびリジルエンドペプチダーゼの処理により、いくつかの [^3H] PrBCM結合部位とN末端の糖鎖を合わせもつ断片が生成された。そのうち最少のもの糖鎖を除去した時の分子量は16kDaであった。このことより、 [^3H] PrBCM結合部位はムスカリン受容体のN末端と2番目の細胞内ループの間に存在すると推測された。また [^3H] PrBCM結合部位を含むがN末端領域の大部分を含まない分子量21-22kDaの断片も得られたこと等から、 [^3H] PrBCM結合部位は1番目の膜貫通領域から2番目の細胞内ループの間に限局された。

脳のムスカリン受容体をプロテインキナーゼCで ^{32}P リン酸化した後トリプシンによる部分消化を行うと、12-14kDaの ^{32}P -標識断片が得られた。この断片はm1のC末端部に対する抗体と反応した。この断片の分子量から考えてリン酸化部位は、3番目の細胞内ループのC末端側とC末端の間であろうと推測された。

脳のムスカリン受容体をV8プロテアーゼで処理した時に生じる約17kDaの断片の一部が β -メルカプトエタノール処理により約12kDaの断片となった。このことは β -メルカプトエタノールにより、ジスルフィド結合が還元的に切断されたことを示唆する。さらに、分子量約17kDaの断片は [^3H] PrBCM結合部位とN末端糖鎖結合部位を含む約40kDaの断片から、そのN末端側が切断されて生成することを示す実験結果が得られた。従って分子量約17kDaの断片は2番目の膜貫通領域から4番目の膜貫通領域までの部分に相当し、この部分のCys残基、恐らく1番目の細胞外ループのCys 98と2番目の細胞外ループのCys 178がジスルフィド結合していると推測された。

論文審査の結果の要旨

ムスカリン性アセチルコリン受容体のアミノ酸配列がcDNAの塩基配列から解読され、その結果、本受容体の数個のサブタイプは異なる受容体タンパク質であることが明らかとなった。現在m1-m5の5種類のムスカリン性受容体サブタイプの存在が確かめられているが、そのうちm1は脳に、m2は心臓に多く存在することが知られている。申請者はブタの脳および心臓の膜標品よりムスカリン受容体を精製し、その受容体を用いて、リガンドの結合部位、プロテインキナーゼCによるリン酸化部位、およびS-S結合部位を明らかにする目的で実験を行った。方法として、アイソトープでラベルした不可逆的リガンド($[^3\text{H}]$ プロピルベンジリルコリンマスタード; $[^3\text{H}]$ PrBCM)を結合させた受容体、あるいは $[^32\text{P}]$ ATPを用いてプロテインキナーゼCによりリン酸化した受容体を各種タンパク分解酵素で限定分解し、標識断片をSDS電気泳動により分離した。次いで標識断片の受容体上の位置を糖鎖が存在するか否かおよび部分ペプチドに対して作成した抗体との反応性により推定し、S-S結合の有無をメルカプトエタノールにより開裂するか否かで調べた。

その結果次のことが推測された。

- ① 不可逆的リガンドである $[^3\text{H}]$ PrBCMの結合部位はN末端から数えて1番目の膜貫通領域から2番目の細胞内ループの間にある。
- ② S-S結合は2番目の膜貫通領域から4番目の膜貫通領域の間に存在し、恐らく1番目の細胞外ループのCys 98と2番目の細胞外ループのCys 178を架橋している。
- ③ プロテインキナーゼCによるリン酸化部位は3番目の細胞内ループのC末端側とC末端の間である。

以上の研究に対して次のような質問がなされた。

- (1) PrBCMが非特異的結合をする可能性
- (2) G-タンパク質存在の有無で、PrBCMに対する受容体の親和性が変わるかどうか
- (3) この研究で用いた受容体精製法の特徴
- (4) 部分作動薬と今回用いたPrBCMとでは結合様式が異なるか
- (5) プロテインキナーゼCによるリン酸化の役割
- (6) m1、m2受容体の膜貫通部分の差異
- (7) ゲルを用いた場合とプロットした場合のフルオログラフィの特徴
- (8) タンパク分解酵素の分解能が部位で異なるか
- (9) 膜の有無で作動薬、拮抗薬との結合が変わるか
- (10) 今後の研究の方向

これらの質疑の結果、本論文は医学博士の学位授与に値するものであると全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	中 島 光 好		
	副査	教授	植 村 研 一	副査	教授 藤 井 喜一郎
	副査	教授	藤 瀬 裕	副査	助教授 太 田 英 彦