カテコールアミンのラジオレセプターアッセイ

(1) ^3H -norepinephrine を用いての検討

京都大学 医学部 第2内科

(指導 井村裕夫教授)

大 森 芳 明 ✓

A Radioreceptor Assay for Catecholamines

I. A Study with ^3H -Norepinephrine

Yoshiaki OHMORI

2nd Medical Clinic Department of Medicine,
Medical Faculty, Kyoto University, Kyoto, Japan
Prof. Hiroo Imura

Summary:

A radioreceptor assay for catecholamines(CA) has been established utilizing the microsomal fraction of bovine myocardium as CA receptors and ^3H -norepinephrine(^3H -NA) as a ligand. The bound fraction was separated from the free fraction by filtration through milipore filters. The following results were obtained:

- 1) The optimal amount of the microsomal fraction was $250\mu\text{g}/\text{tube}$, when ^3H -NA of 12,000 c.p.m was used. The appropriate conditions for incubation were 2 hours at 37°C in a pH 7.4 sucrose solution.
- 2) By this method, norepinephrine was detectable in the range from 5 to $100\text{ng}/\text{tube}$.
- 3) Various compounds with catechol nucleus showed a cross-reaction in this radioreceptor assay system.
- 4) Alpha-adrenergic blocking agents inhibited the binding of ^3H -NA, whereas beta-blocking agents were ineffective.

These results suggest that the microsomal fraction of bovine myocardium contains alpha-adrenergic receptors which bind the catechol nucleus of CA.

緒 言

Radioimmunoassay (RIA) の開発により, 各種ホルモンの微量測定が可能となり, 内分泌学は飛躍的に発展をした。しかし, カテコールアミン (CA) は比較的早期に発見されたホルモンにもかかわらず, その血中微量測定法は, まだ確立されず, その生化学的, 薬理学的検索は充分になされていない。最近, competitive protein binding assay の一種で, RIA における抗体に代る結合蛋白として, ホルモンレセプターを精製して用いる radioreceptor assay (RRA) が開発され, ins-

ulin, TSH 等の測定に応用されてきた。しかし, RRA では生物学的活性のあるホルモンを測定するという利点はあるが, 実用性の面では RIA に比し劣るので, ホルモン測定法としては RIA のようには用いられていない。しかし, ホルモンの標的細胞のレセプターとの反応の解析, レセプター数の算定やその調節機構の究明, 抗レセプター抗体の発見など, RRA の貢献も大きい。

我々は, 血中 CA 測定法の開発と CA レセプターの性質の検討を目的として, 牛心筋ミクロソーム分画を用いる CA の RRA を確立し, 興味ある知見を得たので報告する。

実験材料及び方法

1) 牛心筋ミクロソーム分画の精製

Lefkowitz¹⁾らの方法に準じて, 屠殺直後の牛左室心筋の内膜, 外膜, 血管などを除去した後, ハサミで可能な限り細切し, 3 倍量の 0.25M sucrose 液 (0.001M MgCl_2 , 0.005M Tris $\cdot$ HCl pH 7.4) を加え, 電動式テフロンホモジナイザーで, 高速でホモジナイズした。このホモジネートを Beckman 201 型の超遠沈機で, 42-1 型のローターを用いて, 30,000 r.p.m (78,000 $\times$ G) で 5 分間遠沈した上清を, 再び, 30,000 r.p.m 60 分間遠沈して, 赤褐色のペレット, 即ち, ミクロソーム分画を得た。そのペレットを 2.5mg/ml の割合で, 上記 0.25M sucrose 液に懸濁して結合蛋白 (B.P) として使用した。なお, 上記操作は全て 4 $^{\circ}$ C 以下で行った。

2) 放射性 norepinephrine

D-1 [7- ^3H]-norepinephrine (Amersham 8.0 Ci/m mol) (^3H -NA) を標識ホルモンとして使用した。

3) RRA の方法

特に記載した場合を除いて, 標準的な方法としては, B.P 250 μg /tube, ^3H -NA 12,000 c.p.m. 資料 100 μl を加え, 総量 300 μl とし, 37 $^{\circ}\text{C}$, 2 時間のインキュベーションを行った後, 遊離分画(F) と結合分画(B) を milipore filter (pore size 0.45 μ) にて分離した。

4) 放射性資料の測定

上記方法にて得た B を, Bray 氏シンチレーターを使用して, Packard 社製液体シンチレーションカウンターにより, 放射能の測定を行なった。

実験結果

1) 結合蛋白量の検討

7.8 μg /tube より, 2,000mg/tube の B.P を, 0.25M sucrose 液 100 μl に含有するよう調整し, ^3H -NA 12,000 c.p.m, 0.25M sucrose 液 100 μl を加えて, 総量 300 μl とした混合液を, 37 $^{\circ}\text{C}$, 2 時間インキュベートした。次いで, 反応液を milipore filter で, 濾過して, F と B を分離し, その放射能を測定した。その成績は Fig. 1 に示す如く, B.P 31.25 μg /tube より 500 μg /tube の間で B.P と ^3H -NA の結合に直線関係を得た。従って, 我々は, 以後の実験では, B.P 250 μg /tube, ^3H -NA 12,000 c.p.m, 測定しようとする資料 100 μl , 総量 300 μl の反応系を用いた。

2) 至適 pH の決定

反応液の至適 pH を決定するため, 0.25M sucrose 液を 0.1N $\cdot$ HCl で pH 6.5 より pH 10.5 の間に補正し, 上記方法に従い, ^3H -NA と B.P との結合を検討した。その成績は Fig. 2 に示す如くで, ^3H -NA と B.P の結合は pH 7.2 より pH 8.2 の間で, 良好に認められ, 最高の結合は pH 7.4 でみられた。よって, 以後の実験は pH 7.4 で行った。

Fig. 1. Binding of ^3H -norepinephrine to cardiac microsome fraction.

Fig. 2. Effect of pH on ^3H -norepinephrine binding to cardiac microsome fraction.

Fig. 3. Time course of ^3H -norepinephrine binding to cardiac microsome fraction at different temperatures.

3) 反応時間と温度の検討

^3H -NA と B.P の反応を 4°C 、 20°C 、 37°C 、 55°C の温度で、180分まで時間を追って検討した。その結果は Fig. 3 に示す如く、 4°C では180分まで、緩徐に、 ^3H -NA と B.P との結合は上昇した。 20°C では、60分まで急激に上昇したが、以後120分まで上昇カーブは緩徐化し、120分以後、180分まで平衡状態にあった。 37°C では30分まで、急激に結合は上昇したが、それ以後、90分まで上昇カーブは緩徐化、90分より150分までプラトーとなり、180分では結合が軽度の低下を示した。 55°C では、30分まで急速に結合が上昇し、30分で最高結合となり、以後時間の経過とともに低下した。各温度での最高結合は 55°C 、 37°C 、 20°C 、 4°C の順に大きく、最高結合に達する時間は、 55°C 、 37°C 、 20°C 、 4°C の順に短時間であった。以上の成績により、以後インキュベーション温度、時間を 37°C 、2時間とした。

4) 標準曲線の検討

我々の RRA による、norepinephrine (NA) の標準曲線を検討した。NA 100 pg/tube より $100\text{ }\mu\text{g/tube}$ まで、種々の濃度に添加して、 ^3H -NA と B.P との結合への影響を検討した成績を Fig. 4 の (A) に示した。NA 5 ng/tube より 100 ng/tube の間で直線関係にあり、測定可能範囲と考えられ、最小検出量は 5 ng/tube であった。

5) Scatchard plot による解析

標準的な方法で、 ^3H -NA、B.P と 100 pg より $100\text{ }\mu\text{g}$ の非標識 NA を反応させ、Scatchard 解析を行った。その結果は Fig. 4 の (B) に示す如く、NA の B.P に対する反応性は2相性であり、high affinity low capacity 部分の平衡定数 $K_1 = 1.56 \times 10^7\text{ M}^{-1}$ 、最大結合量は $2 \times 10^{-5}\text{ M/g-pellet}$ であり、low affinity high capacity 部分は $K_2 = 1.00 \times 10^4\text{ M}^{-1}$ 、最大結合量は 2 M/g-pellet であった。なお、0点での ^3H -NA の結合 (B/T) は 7.4% であった。

Fig. 4. A): Standard curve in radioreceptor assay of norepinephrine.
B): Scatchard plots of norepinephrine binding to cardiac microsome fraction.

6) 種々の薬剤の交叉反応性の検討

Fig. 5 の(A)に示す如く、各種濃度の dopamine (DA), NA, epinephrine(A), isoproterenol (Iso) を sucrose 液 (pH 7.4) 100 μ l に溶解して、反応液に加え、37 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートし、 3 H-NA と B.P との結合に対する displacement curve を作成し、それら薬剤の相対的結合力の強さを比較検討した。DA, NA, A の 50% displacement は 10ng/tube であり、3 者間の結合能に有意の差は認めなかった。しかし、Iso は前 3 者よりも結合親和性は強く、50% displacement は 5ng/tube と明らかに NA よりも、小さかった。

次に、各種濃度の CA 前駆物質、代謝物質、昇圧あるいは降圧作用を持つ各種薬剤、並びにホルモン、すなわち, phenylalanine, tyrosine, l-dopa, 3-o-methylbopa, dopac, homovanillic acid, normetanephrine, metanephrine, vanillylmandelic acid, tyramine, octopamine, alphas-methyl dopa, glucagon, ACTH, angiotensin II, reserpine, fusaric acid, trichlormethiazide, spironolactone, 等を前記の方法で添加し、 3 H-NA と B.P との結合に対する影響を観察した。

Fig. 5 の(B)に示す如く、l-dopa, dopac, alphas-methyl dopa のみに抑制効果がみられ、他の薬剤は 1mg/tube という大量を加えても、抑制効果を示さなかった。 3 H-NA と B.P との結合に抑制効果を示した薬剤は、l-dopa, DA, A, dopac, Iso であり、全てカテコール核を保持するもののみ、B.P に対する結合を示した。従って、CA レセプターに対する CA の結合部位はカテコール核に存在すると考えられた。

Fig. 5. A): Displacement curves of dopamine, norepinephrine, epinephrine and isoproterenol in radioreceptor assay of norepinephrine.
B): Displacement curves of 1-dopa, dopac, alpha-methyl dopa and other compounds in radioreceptor assay of norepinephrine.

Fig. 6. Blocking action of alpha-(phentolamine, phenoxybenzamine) and beta-(propranolol, bufetolol) adrenergic blocking agents on ^3H -norepinephrine binding to cardiac microsome fraction.

7) ^3H -NA と B.P との結合に対する α -, 及び β -交感神経遮断剤の効果

^3H -NA と B.P との結合に対して, α -遮断剤である phentholamine, phenoxybenzamine, β -遮断剤である propranolol, bufetolol を前記反応液に添加して, その影響からレセプターの性質を検討した。その結果, Fig. 6 に示す如く, β -遮断剤である propranolol, bufetolol は, ^3H -NA と B.P との結合に対して, $10\mu\text{g}/\text{tube}$ の濃度でも, 遮断作用を示さなかったが, α -遮断剤である phentholamine, phenoxybenzamine は共に ng/tube より遮断作用を示し, 50% displacement は phentholamine で $100\text{ng}/\text{tube}$, phenoxybenzamine で $200\text{ng}/\text{tube}$ であった。

考 察

現在までに, CA レセプターとして, 肝形質膜²⁾³⁾⁴⁾, 牛心筋 microsome 分画¹⁾, 犬心筋 microsome⁵⁾, 猫心筋及び冠血管⁶⁾, 脂肪組織⁷⁾, 有核赤血球膜⁸⁾⁹⁾, 脾被膜¹⁰⁾, ラット小脳¹¹⁾, などが報告されている。今回, 我々は比較的容易に, しかも大量に入手しえることから本実験に牛心筋を選択した。

レセプターの精製法に関しては, Lefkowitz¹⁾らの方法に準じたが, osterizer blender で blend するという過程を省略した。これは, ハサミで可能な限り細切する事によって, 充分に心筋をホモジナイズする事ができ, しかも安定したレセプターが得られると考えたからである。事実, 我々が精製したレセプターは十分な結合能を示したので, 適切な CA レセプターの精製法と考える。

B と F の分離に関しては, 本論文には示さなかったが, 我々は milipore filter 法¹⁾, 硫酸沈殿法, polyethylene glycol γ -globulin 法を検討した。その結果 milipore filter 法を用い良好な成績を得た。但し, 本法は多数検体の同時処理, 及び, 手技の複雑性などの点で実用性の面で問題を残しており, 今後の改良が必要である。

RRA の反応液として, Lefkowitz¹⁾らは B.P $2.5\text{mg}/\text{tube}$, ^3H -NA $50,000\text{ c.p.m}$ を使用している。一般に RIA においては, 抗体量, 及び, 標識ホルモン量が少量であればある程, 測定感度の上昇が認められるので, 我々はレセプターの蛋白量を $250\mu\text{g}/\text{tube}$, ^3H -NA $12,000\text{ c.p.m}$ で行い, 十分な結合が得られた。従って, B.P, アイソトープ量共に少量の我々のアッセイ系の方が, Lefkowitz の原法¹⁾より, CA の測定法としては有利であろう。

アッセイ系の至適 pH の問題については, Lefkowitz¹⁾らも, pH 7.4 ないしは 7.5 を至適と報告しており, 我々の成績と一致した。哺乳類の血液 PH が 7.4 前後であることを考慮するとインキュベーション温度が 37°C で, すみやかに平衡に達することと共に, 本実験系が in vivo の条件に酷似しており興味深い。

反応系における CA レセプターと CA の結合はインキュベーション温度の上昇にともなって上昇した。これは, 本反応が化学的反応の一つであることから, 充分に推察し得る所である。Lefkowitz¹⁾も同様の検討を行い, 37°C で 180 分まで漸増傾向を示したことを報告しているが, 我々の結果では 90 分より 150 分まで平衡状態にあった。これはアッセイ系の B.P 量及び, ^3H -NA 量が, Lefkowitz の系に比して, 少量であることによるものかもしれない。なお, 37°C で 180 分, 55°C で 30 分以後, 結合が漸減傾向を示したのは, 比較的高温でのインキュベーションによる B.P の変性によるものと推察される。従って, 我々は ^3H -NA と B.P との結合の平衡状態, 及び, B.P の安定性より考え, インキュベーション条件として, 37°C 2 時間が適切と考えた。

我々の RRA における標準曲線によると, CA の最少検出量は $5\text{ng}/\text{tube}$ であり, 測定可能範囲は $5\text{ng}/\text{tube}$ より $100\text{ng}/\text{tube}$ であった。一方, 種々の方法で測定された血中 CA 濃度は $100\text{pg}/\text{ml}$ 前

后と推定されているので、本法により血中CAを直接測定のためには、1,000倍以上感度を上昇させる事が必要である。従って、このCAのRRAは直ちにCAの測定に応用できるものではない。

Lefkowitz¹²⁾らは、最近、affinity chromatographyを用いて、レセプターの精製、及び、可溶性に成功し、Boが6.2%から、8.8%に上昇したことを報告しており、我々もレセプターの純化を行うと共に、³H-NAの代りに、¹²⁵Iなどγ線の使用することも今後の課題と考える。

Scatchard plotで解析したところ、NAのB.Pへの結合は2相性であり、この結果は、Lefkowitz⁵⁾の報告と一致する。我々の結果は、high affinity low capacity部分の平衡定数 $K_1 = 1.56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、low affinity high capacity部分の平衡定数 $K_2 = 2.00 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であるが、Lefkowitz⁵⁾は $K_1 = 1.04 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_2 = 1.33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と報告しており、我々の成績とほぼ一致している。このCAレセプターの平衡定数は他のホルモンの平衡定数に比し、 10^{-2} から 10^{-8} のオーダー低い値である。その理由はなお明らかでないが、例えば、神経のシナプスの様に、CAの放出部位からレセプターまでの距離が非常に近いことから特に不自然ではないと考えられる。非標織ホルモンを添加しない場合のB/T即ち、Boは我々の成績では7.4%であり、Lefkowitz⁵⁾の6.2%に比べ高値を示した。他のホルモンのRRAと比較して、特に問題があるとは考えられない。

種々の薬剤による³H-NAとB.Pとの結合に対する影響についての検討では、その抑制効果は、 $\text{Iso} > \text{A} = \text{NA} = \text{DA} > \text{l.dopa} = \text{dopac} = \alpha \text{ methyl dopa}$ の順であった。我々の実験でこれら物質の結合親和性の間に有為の差を認めなかった。A、NA、DA3者の心血管系に対する薬理学的作用を考えると、レセプターに対する結合親和性に大差がないという事は興味深い点である。その他、phenylalanine, tyrosine, 3-o-methyl dopa, homovanilic acid, normetanephrine, metanephrine, vanillylmandelic acid, tyramine, octopamine, glucagon, ACTH, angiotensin II, reserpine, fusaric acid, trichlormethiazide, spironolactoneは³H-NAとB.Pとの結合に対して、交叉反応を示さなかった。³H-NAとB.Pとの結合を抑制する薬剤の構造式を検討すると、注目されることは、結合作用を有するものは、カテコール核を共通構造としていること、また逆に結合しない薬剤は全て、カテコール核の水酸基がメチル化されている。あるいは、カテコール核そのものを保持していないなどの構造の相異があることである。従って、我々はB.Pに対するCAの結合部位¹¹⁾はカテコール核と推測した。

次に、精製した牛心筋microsome分画が α -レセプターか β -レセプターかを同定するために、 α -遮断剤ではphentholamine, phenoxybenzamine β -遮断剤であるpropranolol, bufetololを用いて検討したが、³H-NAとB.Pとの結合は α -遮断剤であるphentholamine, phenoxybenzamineで遮断された。Lefkowitz¹¹⁾らは牛心筋microsome分画を α -レセプターと報告しており、我々と全く相反する結果を得ている。Robison¹³⁾らのCAレセプターの仮説によれば、 α -、 β -レセプターはregulatory subunit, catalytic subunitの2個のsubunitから成り、隣接した α -及び β -のregulatory subunitにCAが結合し、 α -レセプターはcatalytic subunitであるadenyl cyclase活性の低下を、 β -レセプターはadenyl cyclase活性の上昇を促すという。 α -及び β -レセプターが隣接しているという仮説に立てば、牛心筋のmicrosome分画に α -、 β -レセプターのいずれが存在してもよいと考えられる。従って、microsome分画採取の過程の僅かな相違により、我々は β -レセプターの結合能力を、そしてLefkowitz¹¹⁾らは α -レセプターの結合能力を失活させたのかも知れない。しかし、この点に関しては我々の結合蛋白のadenyl cyclase活性の測定を含めて、今後の検討が必要である。

結 論

血中 CA の RRA 法の開発を企図し、CA レセプターとして牛心筋 microsome 分画を用いて以下の結果を得た。

- 1) 結合蛋白としては、250 μ g/tube の牛心筋 microsome 分画が最適であった。
- 2) 反応時間としては 37°C、2 時間 pH 7.4 が適当と考えた。
- 3) 本法での norepinephrine の測定範囲は 5 ng/tube より 100 ng/tube であった。
- 4) 結合蛋白への薬剤の結合はカテコール核を保持した化合物に限定され、CA のレセプターへの結合部位はカテコール核と考えられた。
- 5) 結合蛋白に対する 3 H-NA の結合は α -遮断剤により遮断され、 β -遮断剤によっては遮断されなかった。従って、我々の牛心筋 microsome 分画は α -交感神経受容体と推測した。

文 献

- 1) Robert, J. Lefkowitz and Edger Haber, "A fraction of ventricular myocardium that has the specificity of the cardiac beta-adrenergic receptor." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* vol. 68, No. 8, p.p.1773-1777, 1971.
- 2) Tusher, K. Ray, "A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver." *Biochemica et Biophysica.* vol. 196, p.p. 1-9, 1970.
- 3) Marinetti, G.W., Tushar, K. Ray and Vittorio Tomasi, "Glucagon and epinephrine stimulation of adenylyl cyclase in isolated rat liver plasma membranes." *Biochemical and Biophysical Research Communications.* vol. 36, p.p.185-193, 1969.
- 4) V. Tomasi, S. Koretz, T.K. Ray and J. Dunnick, "Hormone action at the membrane level. II. The binding of epinephrine and glucagon to the rat liver plasma membrane." *Biochem. Biophys. Acta.* vol. 211, p.p.31-42, 1970.
- 5) Robert, J. Lefkowitz, Geoffrey, W.G. Sharp and Edger Harber, "Specific binding of beta-adrenergic catecholamines to a subcellular fraction from cardiac muscle." *The Journal of Biological Chemistry.* vol. 248, p.p.342-349, 1972.
- 6) E.J. Cornish and R.C. Miller, "Comparison of the beta-adrenoceptors in the myocardium and coronary vasculature of the kitten heart." *J. Pharm. Pharmac.* vol.27, p.p.23-30, 1975.
- 7) Pairaut, J. and Laudat, M.H., "Selective identification of 'true' beta-adrenergic receptor in the plasma membranes of rat adipocytes." *FEBS Letters.* vol. 50, p.p.61-65, 1975.
- 8) Ivar Øye and Earl, W. Sutherland, "The effect of epinephrine and other agents on adenylyl cyclase in the cell membrane of avian erythrocyte." *Biochim. et Biophysica. Acta.* vol. 127, p.p.347-354, 1966.
- 9) M. Schramm, H. Feinstein, E. Naim, M. Lang and M. Lasser, "Epinephrine binding to the catecholamine receptor and activation of the adenylyl cyclase in erythrocyte membrane." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* vol. 69, p.p.523-527, 1972.
- 10) Saba Fisher de Plazas and Eduard de Robertis, "Isolation of a proteolipid from spleen capsule binding ($\pm$)-(3 H)-norepinephrine." *Biochim. Biophys. Acta.* vol. 266, p.p.246-254, 1972.
- 11) 稲葉 稔: "カテコールアミンの radioreceptor assay" *日本臨床*, ~34 巻 p.p.73-78, 1976.
- 12) Robert, J. Lefkowitz, Edgar Haber and Donald O'Hara, "Identification of the cardiac beta-adrenergic receptor protein; solubilization and purification by affinity chromatography." *Proc. Nat. Acad. USA.* vol. 69, p.p.2828-2832, 1972.

- 13) Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W., "Adenyl cyclase as an adrenergic receptor." Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 139, p.p.703-723, 1967.