d(CH₂)₅[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP のヨード化と ラット肝膜分画への結合

埼玉医科大学第四内科

稲葉 宗通, 片山 茂裕, 赤羽 重樹
丸野 世志子, 板橋 明, 石井 淳

Iodination and Binding Characteristics of ¹²⁵I-d(CH₂)₅
[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP

Munemichi INABA, Shigehiro KATAYAMA, Shigeki AKABANE,
Yoshiko MARUNO, Akira ITABASHI and Jun ISHII

The Fourth Department of Medicine, Saitama Medical School

With iodinated vasopressin analogue, d(CH₂)₅[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP, at position 9, followed by purification by HPLC (specific activity 473–543Ci/mmol), a specific binding was observed in the rat liver plasma membrane fraction. Scatchard analysis indicated a single class of high-affinity binding sites with a K_d of 0.23nM and B_{max} of 142fmol/mg protein. V₂-agonist, DDAVP, did not displace ¹²⁵I-vasopressin analogue. These results suggest that ¹²⁵I-d(CH₂)₅[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP with a high specific activity is a useful tool to investigate V₁-receptors.

Key words: V₁-antagonist, AVP, V₁-receptor

は じ め に

下垂体後葉から分泌されるアルギニンバソプレッシン (AVP) は、血管平滑筋に作用して血管を収縮させ、また腎集合管に作用して水の再吸収を促進する。これらの作用の発現には、まず AVP が細胞膜上の受容体と結合する必要がある。近年、多くの AVP 誘導体が合成され¹⁾、AVP 受容体には血管平滑筋や肝細胞に存在する V₁受容体と、腎集合管やヘンレ係蹄上行脚に存在する V₂受容体に分類されることが明らかにされた²⁾。しかし、リガンドとして比較的比活性の低い³H-AVP (40-80 Ci/mmol) が用いられたことや、¹²⁵I-AVP は2位の Tyr 基がヨード化され受容体への結合能を失う³⁾などの理由で、詳細な検討が不可能であった。最近、新しい V₁-antagonist である d(CH₂)₅[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP (以下 V₁-ant と略) がリガンドとして有用であるとの報告がなされた⁴⁾。そこで、本化合物を用いて、¹²⁵I による標識物の作製と、得られた標識物のラット肝の V₁受容体への結合の特性について検討したので報告する。

方 法

AVP は Sigma 社より, DDAVP は協和発酵より購入した。V₁-ant は M. Manning 教授 (Medical College of Ohio, U.S.A.) より供与された。¹²⁵I による標識は, V₁-ant 2 nmol/10 μ l 0.01 M 酢酸・¹²⁵I-Na 1 mCi・クロラミン T 10 μ g/30 μ l 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) を混和し, 30秒後に HPLC に添加した。カラムは ODS を用い, 0.067%トリフルオロ酢酸 (溶媒 A) と 0.067%トリフルオロ酢酸・60%アセトニトリル (溶媒 B) を 40-75%になるよう, 流速 1ml/分にて 40分間の直線的勾配をかけて溶出した。

膜分画の調整は, 以下のごとく行った。Wistar 系雄ラット (体重 180-200g) より肝・腎を摘出/細切し, 0.25M ショ糖液中でホモジェナイズし, 4℃にて 4,000rpm (1400g) で 15分間遠心した。得られた上清を, さらに 4℃にて 35,000rpm (107,000g) で 60分間遠心した。得られた沈澱を 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4), 120mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA にて可溶化した。蛋白量を測定後, ウシ血清アルブミンを 0.2%となるよう添加した。

上記リガンド (約 20,000cpm) と膜分画を用いて, 室温で種々の時間孵置後の結合能を検討した。B/F の分離には, Whatman GF/C フィルターを用い, 3ml の生理食塩水にて 3度洗浄し, 乾燥後, 液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。なお, 非特異的結合は非標識 AVP を 1 μ M となるよう加えた。

Fig. 1 Elution profiles of an Na¹²⁵I and ¹²⁵I-d(CH₂)₅ [Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP. Separation was performed with a linear 40-75% gradient of solvent B (0.067% trifluoroacetic acid in 60% acetonitrile) in solvent A (0.067% TFA).

結 果

図1に溶出パターンの典型例を示す。分画32に肝膜分画との高い特異的結合を認め, 分画35には結合を認めないことより, 分画32が monoiodinated V₁-ant と考えられた。比活性は 473-543 (501 ± 21.4 (SE), n=3) Ci/mmol であった。肝膜分画の蛋白量を変えて 60分後の結合能をみると, 36 μ g を加えた際には 12%, 72 μ g では 24% の容量依存的な結合を認めた。従って, 以後の実験には蛋白量として 72 μ g の膜分画を用いた。腎の膜分画では, 有意な結合を認めなかった。肝膜分画との

結合の時間的推移を検討すると, 特異的結合が60分まで直線的に増加し, 以後の実験は孵置時間を60分とした。

図2に V₁-ant・AVP・DDAVP を段階的に加えた際の displacement curve を示す。V₁-ant は AVP に比べ約100倍の, DDAVP に比べ約 2×10^4 倍の結合能を示した。Scatchard plots による解析で単一の高親和性の結合が認められ, その最大結合能 (B_{max}) は 142.3 ± 16.4 fmole/mg 蛋白 (n=3) であり, 受容体解離恒数 (K_d) は 0.23 ± 0.04 nM (n=3) であった。

Fig. 2 Competitive inhibition of ^{125}I - $\text{d}(\text{CH}_2)_5$ $[\text{Tyr}(\text{Me})^2 \text{Tyr}(\text{NH}_2)^9]$ AVP binding by unlabelled vasopressin analogue, AVP and DDAVP. Added tracer was 21, 611 cpm (40.2 fmole, i.e. 201 pM).

考 察

今回, 我々が用いた V₁-ant は, 2位の Tyr をメチル化し, 9位の Gly を Tyr に置換したものである⁴⁾。このため, ^{125}I による標識に際しても, ^{125}I が9位の Tyr 基に標識されることとなる。事実, ^{125}I により標識した V₁-ant は, 肝膜分画と特異的に結合した。今回得られた ^{125}I -V₁-ant の比放射能は, 473-543 Ci/mmol であり, ^3H -AVP の6-12倍に達した。Elands らは, さらにもう一回の HPLC による純化を加えることにより, 比放射能が2,000 Ci/mmol に達することを報告している⁴⁾。

このようにして得られた ^{125}I -V₁-ant をリガンドとして用いた場合の肝膜分画への結合は, V₂-agonist である DDAVP ではわずかに阻害されるのみであり, V₁受容体に特異的な結合をみているといえる。今回得られた解離恒数や B_{max} は, 従来の報告にはほぼ一致するもので, 単一の高親和性の結合部位であった⁴⁾⁵⁾。

以上, Elands らの結果を追試し確認した。今後, 本リガンドを用いれば, 血管壁などの V₁受容体の検討が可能になるであろう。

結 語

バゾプレシンの新しい誘導体である $\text{d}(\text{CH}_2)_5$ $[\text{Tyr}(\text{Me})^2, \text{Tyr}(\text{NH}_2)^9]$ AVP の9位をヨード化し, HPLC で純化後 (比放射能473-543 Ci/mmol), これをリガンドとしてラット肝膜分画の結

合を検討した。Kdが0.23nM, Bmaxが142fmol/mg 蛋白の単一の高親和性の結合が存在し、V₂-agonistであるDDAVPによるdisplacementはわずかであった。以上の結果は¹²⁵I-d(CH₂)⁵[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVPは、V₁-受容体を検討するよいリガンドとなることを示している。

謝辞：本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。また、本要旨は第63回日本内分泌学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Manning M, Sawyer WH. Design and uses of selective agonistic and antagonistic analogs of the neuropeptides oxytocin and vasopressin. Trends in Neurosciences 1984; 7: 6-9
- 2) Michell RH, Kirk CJ, Billah MM. Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. Biochem Soc Trans 1979; 7: 861-865
- 3) Jard S, Lombard C, Seyer R, Aumelas A, Manning M, Sawyer W. Iodination of vasopressin analogues with agonistic and antagonistic properties: Effects on biological properties and affinity for vascular and renal vasopressin receptors. Mol Pharmacol 1987; 32: 369-375
- 4) Elands J, Barberis C, Lammek B, Manning M, Sawyer WH, Kloet ER. ¹²⁵I-d(CH₂)₅[Tyr(Me)², Tyr(NH₂)⁹] AVP: Iodination and binding characteristics of a vasopressin receptor ligand. FEBS Let 1988; 229: 251-255
- 5) Copalakrishnan V, Tiggel CR, Sulakhe PV, McNeill JR. Characterization of a specific high affinity [³H]arginine⁸ vasopressin-binding site on liver microsome from different strains of rat and the role of magnesium. Endocrinology 1986; 118: 990-997

(受付日: '92. 8. 5)

(採択日: '92.12. 9)