

正常ラット副腎およびヒト副腎における
カテコールアミン α 受容体の研究

富山医科薬科大学泌尿器科学教室
(主任：片山 喬 教授)

古 田 秀 勝

①

正常ラット副腎およびヒト副腎に
おけるカテコールアミン α 受容体
の研究

古田 秀勝

目 次

緒 言	1
実 験	
(1) 材 料 お よ び 方 法	
1 . ラ ッ ト 副 腎 の 摘 出	3
2 . ヒ ト 副 腎 の 摘 出	3
3 . 副 腎 受 容 体 標 本 の 作 製	4
4 . radioligand binding assay の 方 法	5
結 果	
1 . ラ ッ ト 副 腎 膜 分 画 の time course	8
2 . ラ ッ ト 副 腎 膜 分 画 の saturation binding curve	9
3 . ラ ッ ト 副 腎 膜 分 画 へ の radio- ligand binding curve	9
a . ^3H -prazosin 結 合 に 対 す る nor- epinephrine を 使 用 し た 置 換 曲 線	10
b . ^3H -yohimbine 結 合 に 対 す る clonidine を 使 用 し た 置 換 曲 線	10

4 . ヒト副腎ならびにヒト褐色細胞腫
膜分画の saturation binding

assay	11
a . ヒト副腎皮質膜分画に対して	11
b . ヒト副腎髄質膜分画に対して	11
c . ヒト褐色細胞腫膜分画 に対して	11
考察	14
結語	18
文献	19
表 1	22
図 1	23
図 2	24
図 3	25
図 4	26
図 5	27
図 6	28
図 7	29

緒 言

副腎髄質から分泌されるカテコールアミンは、標的臓器の血管平滑筋のカテコールアミン受容体と結合し主として vasoactive な効果を発現する。カテコールアミン受容体は、様々な組織に幅広く存在すると考えられている。副腎皮質においては α 受容体刺激によりアルドステロン分泌が増強することから¹⁾ α 受容体が存在する可能性が推測されている。交感神経節後線維末端では、カテコールアミン分泌に対する negative feedback 機構にシナプス前アドレナリン作動性 α_2 受容体が関与するといわれている²⁾。交感神経線維と副腎髄質のクローム親和性細胞は、その発生原基が同一であることから³⁾、副腎髄質からのカテコールアミン分泌を modulate する α 受容体が副腎においても存在することが推測される。そこで、われわれは、³H-prazosin, ³H-yohimbine を用いた radioligand receptor assay という直接的な方法によりラットならびにヒト副腎において

α_1 、 α_2 受容体が存在するか否かを検討した。

実 験

(1) 材 料 お よ び 方 法

1 . ラット副腎の摘出

普通固形飼料と水を自由に摂取できる条件下で飼育した生後8週のSprague-Dawley系成熟雄ラット(SDラット)を用いた。体重260~280gのラットにsodium pentobarbital(30mg/kg)の腹腔内注射後開腹した。腹部大動脈および腹部大静脈を露出し、腹腔動脈の直上で、これらの動脈および静脈に鉗子をかけてクランプした。腹部大動脈の最下部からカニユールを挿入し、同時に腹部大静脈の最下部を切開した。カニユールから氷冷した生理食塩水を約30ml緩徐に注入し腎および肝が灰白色を呈するまで灌流し、副腎を摘出した。

2 . ヒト副腎の摘出

ヒト正常副腎は、腎細胞癌患者から得られた

2 例と、脳血管障害患者で死亡後 3 時間以内に autopsy により得られた 1 例の計 3 例を使用した。腎細胞癌患者には total nephrectomy により腎、副腎を一塊として摘出せざるを得ないことを説明し承諾を得た。また副腎は腎癌が被膜をこえていないものを使用した。副腎は皮質と髄質とに分離し使用した。褐色細胞腫については手術により摘出した腫瘍 3 例を用いた。いずれも、遠隔転移を認めない副腎原発で片側性のものを使用した。

3. 副腎受容体標本の作製

SD ラット副腎ではその被膜を剥離後、全副腎を細切した。1 回の assay につき、10 匹分のラット副腎をプールして使用した。

ヒト正常副腎は、副腎を薄くスライスした。これを実体顕微鏡下にて皮質と髄質に切断分離した。褐色細胞腫組織は、肉眼的に明らかな腫瘍組織の部分を採取し細切した。これらの試料に 320 mM sucrose を含む、25 mM Tris/HCl

緩衝液 (pH 7.4) を 10 ~ 20 倍量を加えて Potter 型ガラスホモジナイザーで粉碎均等化した。1,000×g で 10 分間遠沈後、上清を 50,000×g で 20 分間遠沈した。得られた沈渣に 25 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 3 ml を加え、ソニケーターにて攪拌、浮遊させ 50,000×g で 10 分間遠沈した (洗浄)。同様な操作で計 3 回沈渣膜分画を洗浄した後、50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) に浮遊させ、これを受容体粗標本として用いた。

4. radioligand binding assay の方法

radioligand binding assay は Williams⁴⁾ の方法に従った。Bradford 法⁵⁾により受容体粗標本の蛋白質定量を行い、一定濃度に調整した。ラット副腎粗標本の蛋白濃度は 0.3 mg/ml 前後となるようにした。受容体浮遊液 400 μl に放射性リガンド溶液 ³H-prazosin 50 μl または ³H-yohimbine 50 μl を加え全量を 450 μl とした。放射性リガンド溶液の濃度は最終濃度として、³H-prazosin で 0.05 nM から 1.0 nM までの

範囲で、 ^3H -yohimbineでは 0.4 nMから 20 nMまでの範囲で測定した。total bindingとしてこの試験管浮遊液に 50 mM, Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を 50 μl 加えて総量を 500 μl とした。non-specific binding測定には、 ^3H -prazosin に対する cold ligandとして phentolamine を、 ^3H -yohimbine に対しては norepinephrine をそれぞれ使用した。hot ligandの 1000 倍以上の高濃度の cold ligandをこの試験管浮遊液に 50 μl 加えて総量を 500 μl とした。それぞれの non-specific binding preparationと total binding preparation を 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間 incubateした。この incubation mixtureに冷却した 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を 5 ml 加え反応を停止させた後 incubation mixture を Whatman GF/B glass filter にかき結合受容体分画を分離採取した。次いでこの glass-filter をカウンティングバイアルに移し Clear-sol 液体シンチレーター-8 ml を加え、室温にて一晩放置しシンチレーションカウンターにて標識 トリチウム量を測定した (図 1

)。総結合より非特異的結合をさしひくことにより特異的結合を求めた。Scatchard解析はLINEAR(LIFESCIENCE社)を用いて行い求められた B_{max} と K_d は、平均値 \pm SDで表現した。有意差検定は、Student's t testを使用し $p < 0.01$ を有意とした。

結 果

1. ラット副腎膜分画結合の time course

ラット副腎膜分画への ^3H -prazosin 結合の time course については、蛋白量 $0.13\text{mg}/\text{tube}$ 、 ^3H -prazosin 濃度 0.43nM で行った。incubation 後 20 分で plateau に達した。 ^3H -prazosin 結合に対して $10\mu\text{M}$ phentolamine を加えることにより結合の低下が認められ、specific binding の存在が確認された (図 2A)。 ^3H -yohimbine 結合の time course は蛋白量 $0.1\text{mg}/\text{tube}$ 、 ^3H -yohimbine 濃度 4.6nM で行った。incubation 後 20 分で plateau に達することが確認された。 ^3H -yohimbine 結合に対して 1mM norepinephrine を加えることにより低下が認められ、specific binding の存在が確認された (図 2B)。これらの結果から、30 分の incubation time で充分飽和状態が得られるものと結論した。

2 . ラット副腎膜分画の saturation binding curve

ラット副腎の ^3H -prazosin の saturation binding から得られた Scatchard plot は一直線上にのり、結合部位は 1 種類であると結論された。最大結合部位密度 (B_{max}) は $12.5 \text{ fmol/mg protein}$ で解離定数 (K_d) は 0.11 nM であった。 K_d 値における、non-specific binding に対する specific binding の比 (S/N 比) は約 70% であった (図 3A, 3B)。一方 ^3H -yohimbine 結合については 10 点の濃度で測定した。この saturation binding より得られた Scatchard plot も直線になり、結合部位は 1 種類であると結論された。最大結合部位密度 (B_{max}) は、 $22.9 \text{ fmol/mg protein}$ で解離定数 (K_d) は 4.28 nM であった。 K_d 値における S/N 比は約 25% であった (図 3C, 3D)。

3 . ラット副腎膜分画への radioligand binding に対する置換曲線

a. ^3H -prazosin 結合に対する norepinephrine を使用した置換曲線

ラット副腎膜分画への ^3H -prazosin 結合に対し、 ^3H -prazosin 濃度は 0.11nM で、蛋白量は 0.23mg/tube 、総量を 1ml で norepinephrine による置換を行った。置換曲線は 1 相性を呈した (図 4A)。 IC_{50} は $5 \times 10^{-6}\text{M}$ であった。slope factor は 0.82 であった (図 4B)。

b. ^3H -yohimbine 結合に対する clonidine を使用した置換曲線

ラット副腎膜分画への ^3H -yohimbine 結合に対し、 ^3H -yohimbine 濃度は 4.5nM 、蛋白量 0.26mg/tube 、総量を 1ml で clonidine による置換を行った。置換曲線は 1 相性を呈した。 IC_{50} は $1.25 \times 10^{-4}\text{M}$ であった (図 4C)。slope factor は 1.5 であり Cheng and Prusoff の補正式⁶⁾ から K_i 値は $6.09 \times 10^{-5}\text{M}$ であった (図 4D)。これらの薬剤による濃度依存的な置換が認められ、ラット副腎において α_1 、 α_2 受容体への radioligand binding site が存在することが

確認された。

4. ヒト副腎ならびにヒト褐色細胞腫膜分画 の saturation binding assay

a. ヒト副腎皮質膜分画にたいして

ヒト副腎膜分画ならびにヒト褐色細胞腫膜分画について、ラット副腎膜分画と同様な方法で実験を行った。ヒト副腎皮質膜分画にたいする、 ^3H -prazosin の saturation binding から得られた Scatchard plot は一直線にのり結合部位は1種類であると結論された。non-specific binding に対する specific binding の比 (S/N 比) は約 38% であった (図 5A, 5B)。一方 ^3H -yohimbine の saturation binding から得られた Scatchard plot も直線になり結合部位は1種類であると結論された。Kd 値における S/N 比は約 12% であった (図 5C, 5D)。

b. ヒト副腎髄質膜分画にたいして

ヒト副腎髄質膜分画に対する ^3H -prazosin の saturation binding より得られた Scatchard

plotは一直線にのり、結合部位は1種類であると結論された。non-specific bindingに対する specific bindingの比(S/N比)は約39%であった(図6A, 6B)。一方 ^3H -yohimbineの saturation bindingから得られた Scatchard plotも同様に直線になり、結合部位は1種類であると結論された。Kd値における S/N比は約14%であった(図6C, 6D)。

c. ヒト褐色細胞腫膜分画にたいして

ヒト褐色細胞腫膜分画に対する ^3H -prazosin 結合の saturation bindingから得られた Scatchard plot は一直線にのり結合部位は1種類であると結論された。non-specific binding に対する specific bindingの比(S/N比)は約25%であった(図7A, 7B)。一方 ^3H -yohimbine の saturation bindingから得られた Scatchard plotは直線上になり、結合部位は1種類であると結論された。Kd 値における S/N 比は約28%であった(図7C, 7D)。

これらの結果を表1に示す。ヒト褐色細胞腫

ではヒト正常副腎髄質に比べ、 ^3H -yohimbine 結合による B_{max} が有意に大きく、 K_d 値が低値を示した ($p < 0.01$)。またヒト副腎皮質ではヒト副腎髄質に比べ ^3H -yohimbine 結合による B_{max} が有意に大きかった ($p < 0.01$)。

考 察

副腎皮質、髓質に α 受容体の存在することを radioligand binding assayにより証明した。受容体と同定されるには radioligand binding assay において、その binding site が証明されることにより存在の可能性を示し (possible existence) 次いでこの作動薬と共役する機能が証明され (probable extence)、最終的に、受容体の単離、生理活性の同定、またその1次構造決定にいたって、初めて受容体の存在が確定される (definite ex^{is}tence)。従って、この実験で行った binding assay は possible existence について検討したものである。ラットやヒト副腎膜分画は ^3H -prazosin、 ^3H -yohimbine を特異的に結合し、さらにこの結合は一定濃度以上の ligand で飽和された (saturable)。また、特異的結合に対して agonist, antagonist により結合阻害が認められ (displacement)、その解離定数が低いこと

から受容体 (receptor binding site) が存在するものと考えられる。我々は、SDラット腎を用い、腎皮質膜分画の ^3H -prazosin 結合について検討したが⁶⁾、これらの結果では、SDラット腎皮質における B_{max} ならびに K_d 値は既に報告されている他者の値⁷⁾ とほぼ同様な結果が得られており、副腎で得られた実験手技結果は信頼性が充分高いものと考えられる。SDラット腎皮質では、 ^3H -prazosin 結合の B_{max} は $93 \text{ fmol/mg protein}$ 、 K_d は 0.36 nM で、 ^3H -yohimbine 結合の B_{max} は $239 \text{ fmol/mg protein}$ 、 K_d は 20 nM であるとの報告がある⁷⁾。SDラット腎皮質に比べてSDラット副腎では、 B_{max} は低値であり、 K_d 値は小さく親和性は高かった。副腎における α 受容体の存在部位については、副腎皮質細胞や副腎髄質細胞膜以外に副腎の血管も考えられるが、今回の実験では局在の同定はできない。しかしながら、SDラット副腎皮質の glomerulosa cell suspension を使用した実験で、norepinephrine や epinephrine が

aldosterone 遊離を有意に増強させ、この増強した aldosterone の遊離が、prazosin や yohimbine で濃度依存性に抑制されるといわれる¹⁾。また灌流実験で、 α_2 受容体が副腎髄質からのカテコールアミン遊離を modulate するとの報告もある⁸⁾。以上のことから血管だけではなく実質細胞膜にも α 受容体が存在する可能性が充分考えられる。ヒト正常副腎髄質に比べて、ヒト褐色細胞腫の α_2 受容体の B_{max} 、 K_d に有意差がある原因についてはつぎの可能性が考えられる。副腎髄質細胞において α_2 受容体を介したカテコールアミン分泌の negative feedback 機構の存在を仮定した場合、褐色細胞腫ではカテコールアミンが制御されることなく、病的に分泌されているため、 α_2 受容体数が増加し、その親和性が増強することによりその分泌を抑えようとする合目的な変化 (up-regulation) が考えられる。また、褐色細胞腫では受容体の turnover が変化している可能性も考えられる。一般的に受容体は、伝達物質と複合体を形成し、

その一部が細胞内へ移行するといわれる (internalization)。一方で、細胞内で新しく合成された受容体がゴルジ体を介して細胞膜に組み込まれ再生すると考えられている⁹⁾。褐色細胞腫では、この受容体の生合成が亢進している可能性や、受容体の合成過程だけではなく細胞膜への組み込みにもなんらかの異常が生じている可能性も推測される。

結 語

radioligand binding assay により ラット副腎、ヒト副腎細胞の α_1 および α_2 受容体を測定しつぎの結果を得た。

1. ラット副腎、ヒト副腎皮質およびヒト副腎髄質に α 受容体が存在することを明らかにした。
2. ヒト褐色細胞腫の α_2 受容体はヒト副腎髄質のそれに比べ、最大結合部位密度ならびに親和性が有意に高かった ($p < 0.01$)。

副腎髄質に α_1 および α_2 受容体が存在するという結果は、副腎髄質からのカテコールアミン分泌に関して、交感神経節後線維末端におけると類似の feedback 機構や、血管収縮などによる髄質からのカテコールアミン分泌を modulate する機構が存在することを強く示唆するものと考えられる。

文 献

- 1) Horiuchi, T., Tanaka, K. and Shimizu, N. :Effect of catecholamine on aldosterone release in isolated rat glomerulosa cell suspensions. Life Science, 40, 2421-2428, 1987.
- 2) Langer, S. Z. :Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. Br. J. Pharmacol., 60, 481-497, 1977.
- 3) Weston, J. A. :The migration and differntiation of neuronal crest cells. Adv. Morph^o l., 8, 41-114, 1970.
- 4) Williams, L. T., Mullikin, D. and Lefkowitz, R. J. : Identification of α -adrenergic receptor in uterine smooth muscle membrane by ³H-dihydroergocryptine binding. J. Biol. Chem., 251, 6915-6923, 1976.
- 5) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.

- 6) Cheng, Y. and Prusoff, W.H. : Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction.
Biochem. Pharmac., 22, 3099-3108, 1973.
- 7) 古田秀勝、中田瑛浩、片山喬 : 正常SDラット腎におけるカテコールアミン α_1 受容体の研究: ドーパミンがおよぼす影響について
日泌尿会誌, 81, 82-88, 1990.
- 8) Snavely, M.D. and Insel, P.A. : Characterization of alpha-adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex.
Mol. Pharmacol., 22, 532-546, 1982.
- 9) Sakurai, S., Wada, A., Izumi, F., Kobayashi, H. and Yanagihara N. :
Inhibition of α_2 -adrenoceptor agonists of the secretion of catecholamines from isolated adrenal medullary cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 324, 15-19, 1983.
- 10) Hollenberg, M.D. : Receptor models and the action of neurotransmitters

and hormones: Some new perspectives.

In Neurotransmitter receptor binding, 2nd ed., edited by Yamamura, H. I.,
p. 1-39, Raven Press, New York 1985.

表 1 ヒト正常副腎，ヒト褐色細胞腫膜分画への³H-prazosin 結合 および³H-yohimbine 結合による最大結合部位密度，解離定数

tissue	No.	³ H-prazosin		³ H-yohimbine	
		receptor concentration (B max) fmol/mg protein	equilibrium dissociation constant (Kd) nM	receptor concentration (B max) fmol/mg protein	equilibrium dissociation constant (Kd) nM
human adrenal cortex	(1)	14.5	0.33	37.3	4.91
	(2)	14.2	0.36	39.8	5.33
	(3)	20.1	0.32	44.1	5.21
	mean ± SD	16.3 ± 3.3	0.34 ± 0.02	40.4 ± 3.44	5.15 ± 0.22
human adrenal medulla	(1)	14.8	0.24	8.8	5.02
	(2)	14.5	0.26	13.4	5.51
	(3)	19.7	0.32	14.3	5.64
	mean ± SD	16.3 ± 2.92	0.27 ± 0.04	12.2 ± 3.0	5.39 ± 0.33
human pheochromocytoma	(1)	23.0	0.16	34.0	0.96
	(2)	24.0	0.13	33.9	0.95
	(3)	29.8	0.17	39.5	1.32
	mean ± SD	25.6 ± 3.7	0.15 ± 0.02	35.8 ± 3.2	1.08 ± 0.21

Asterisks show statistically significant differences

: ** P < 0.01

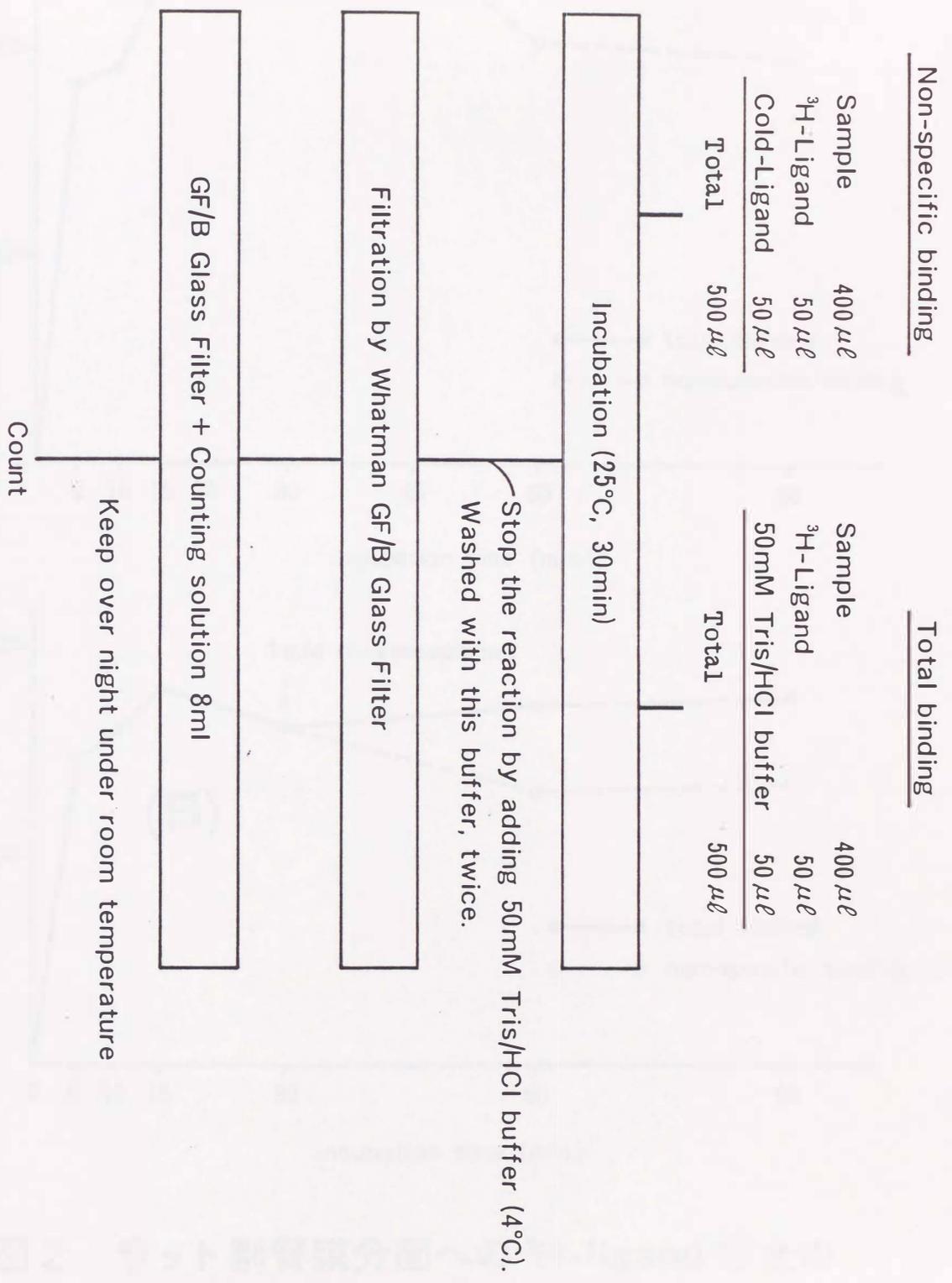


図1 本実験におけるreceptor assay の手順

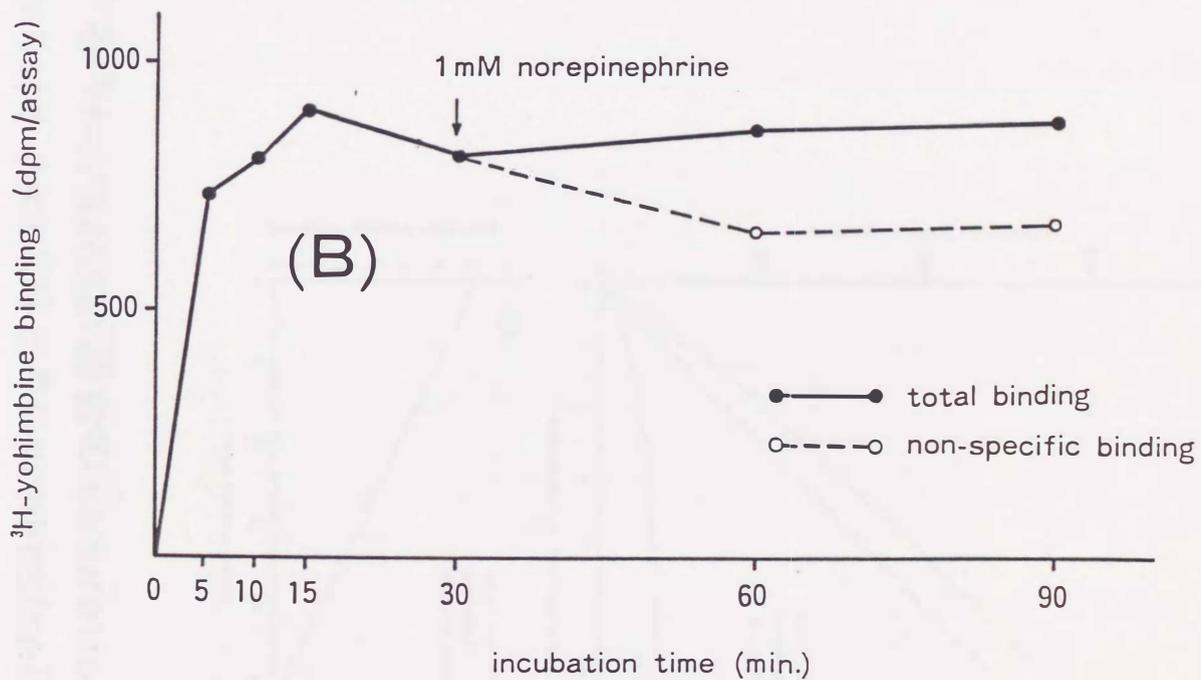
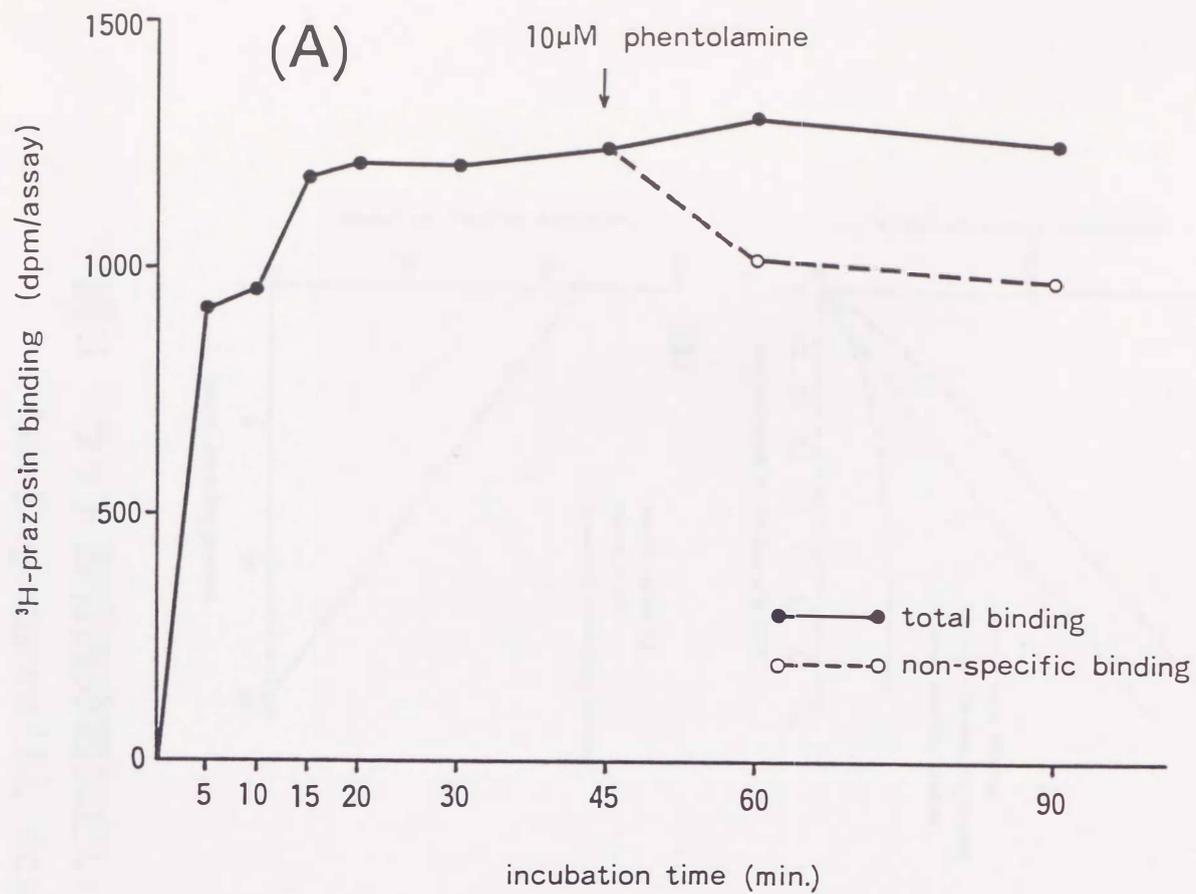


図2 ラット副腎膜分画への ^3H -ligand結合の time course (A) (B).

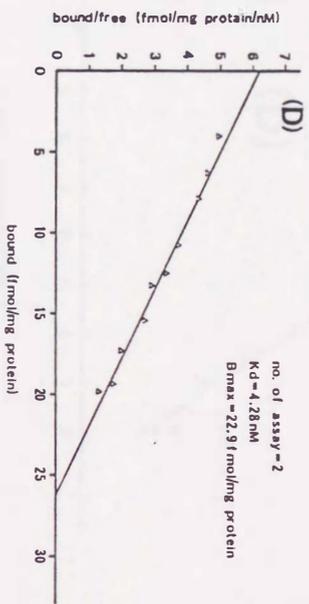
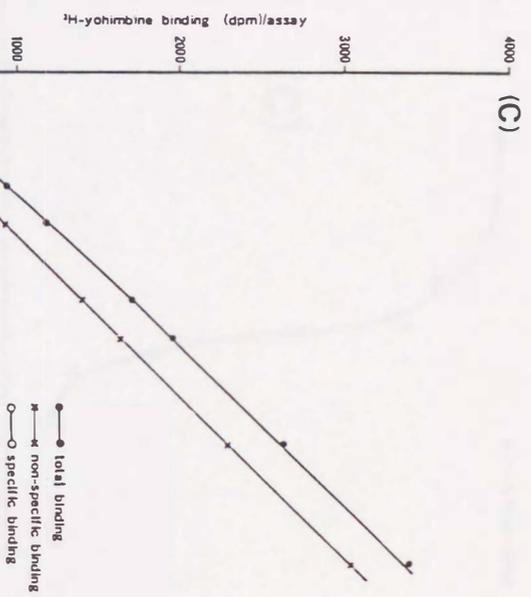
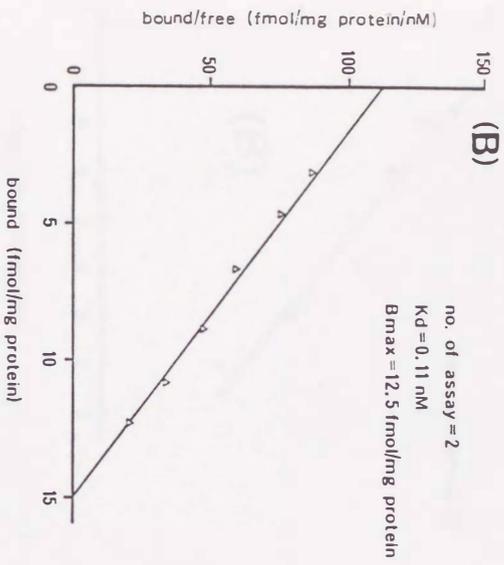
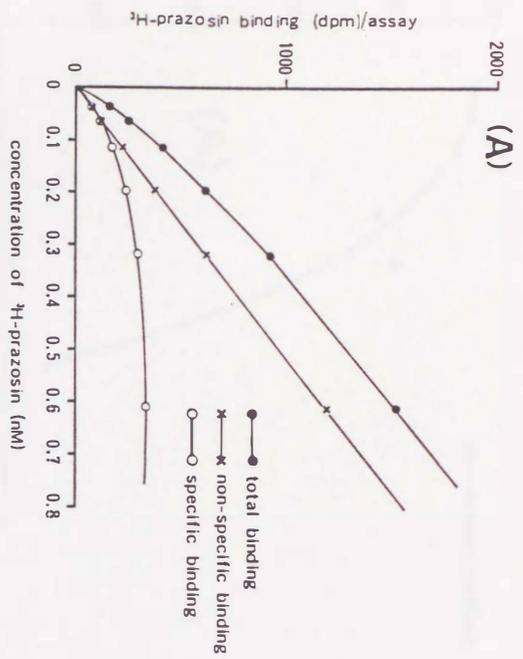


図3 ラット副腎膜分画にたいする ^3H -prazosin結合のsaturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と ^3H -yohimbine結合のsaturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例

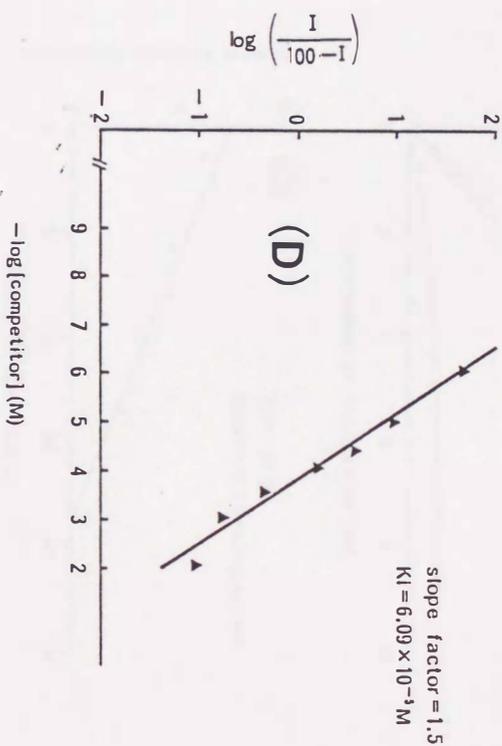
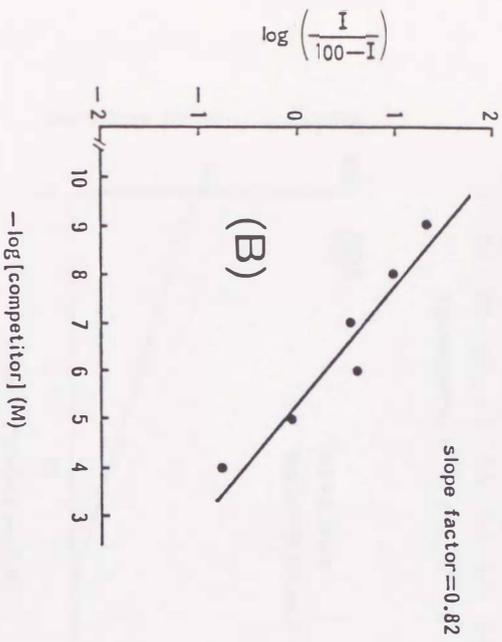
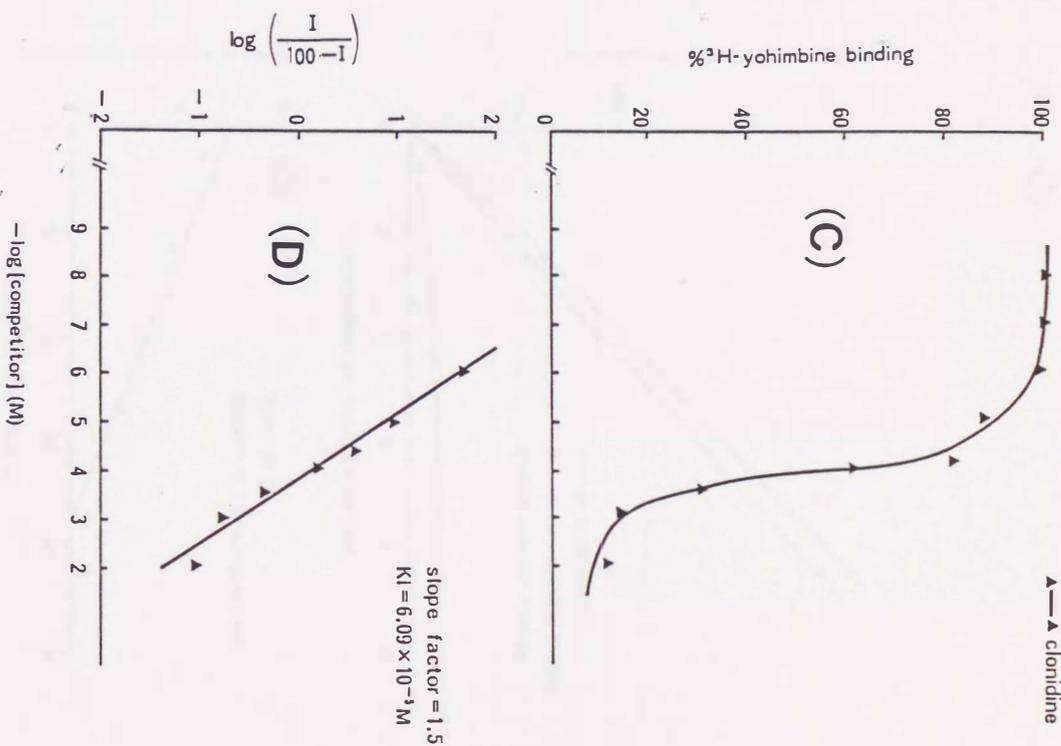
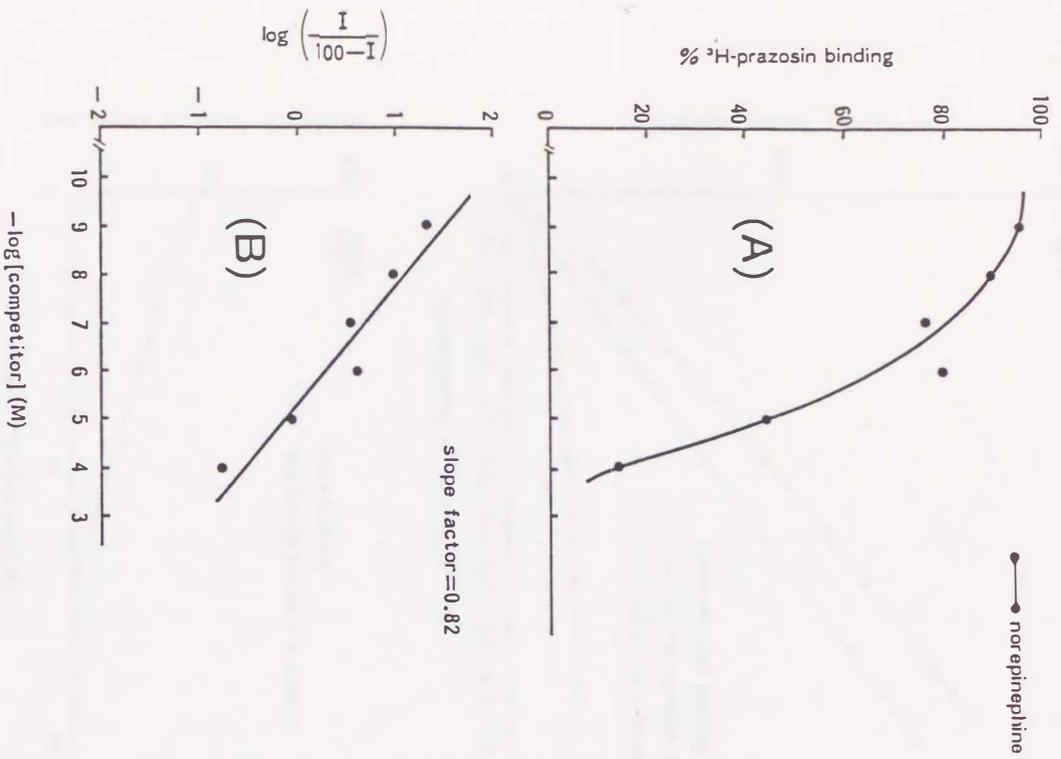


図4 ラット副腎膜分画にたいする³H-prazosin結合の置換曲線(A) およびそのpseudo Hill plot(B)と³H-yohimbine結合の置換曲線(C) およびそのpseudo Hill plot(D).

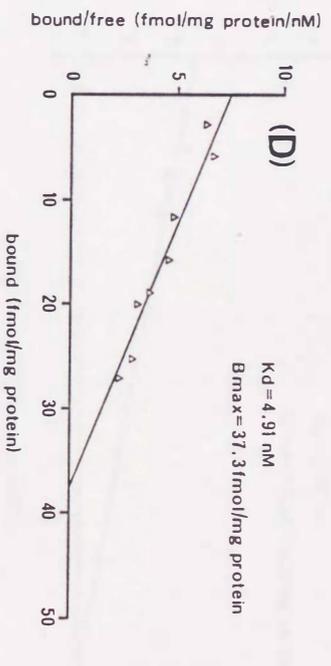
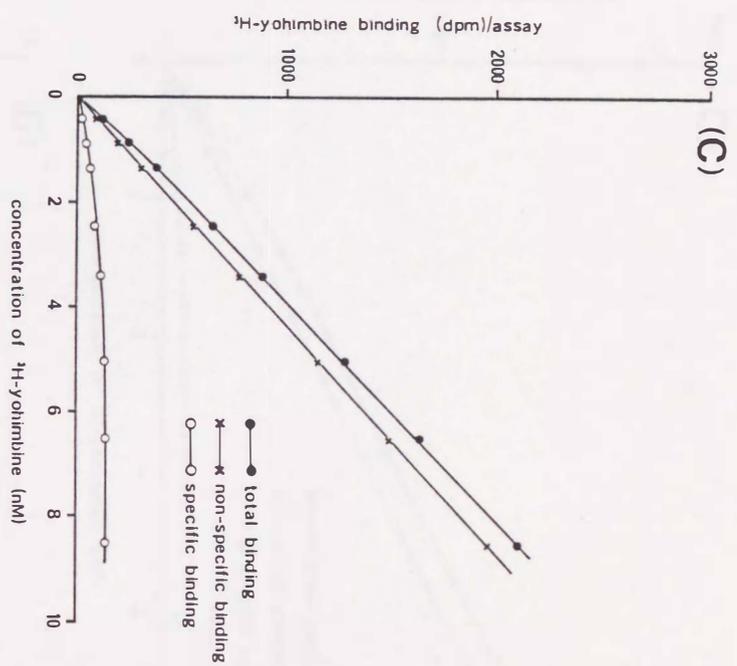
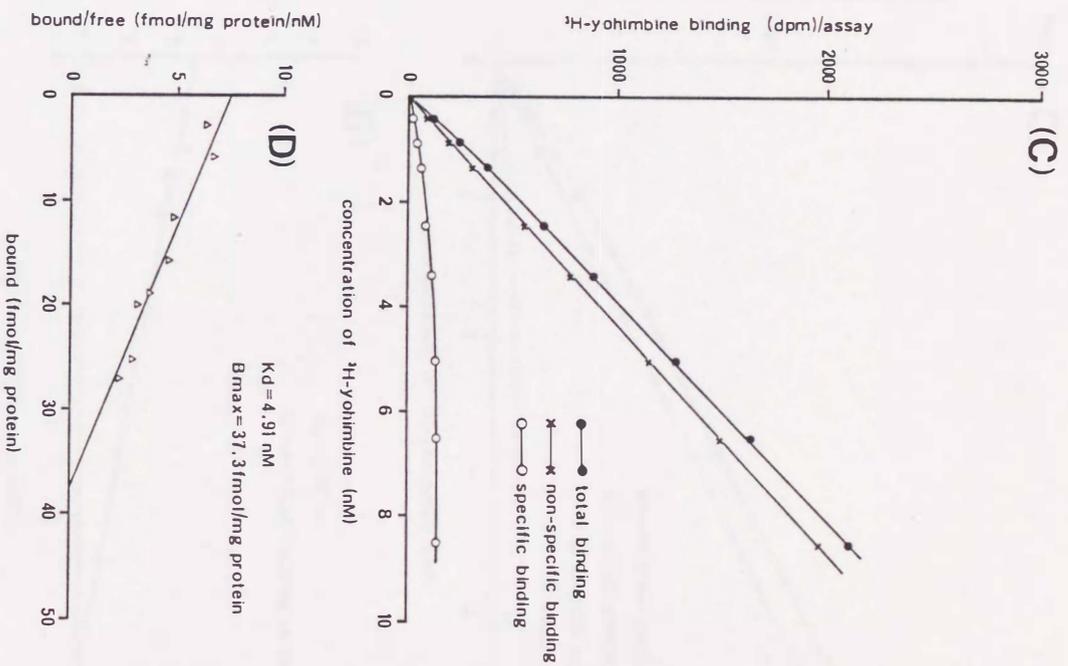
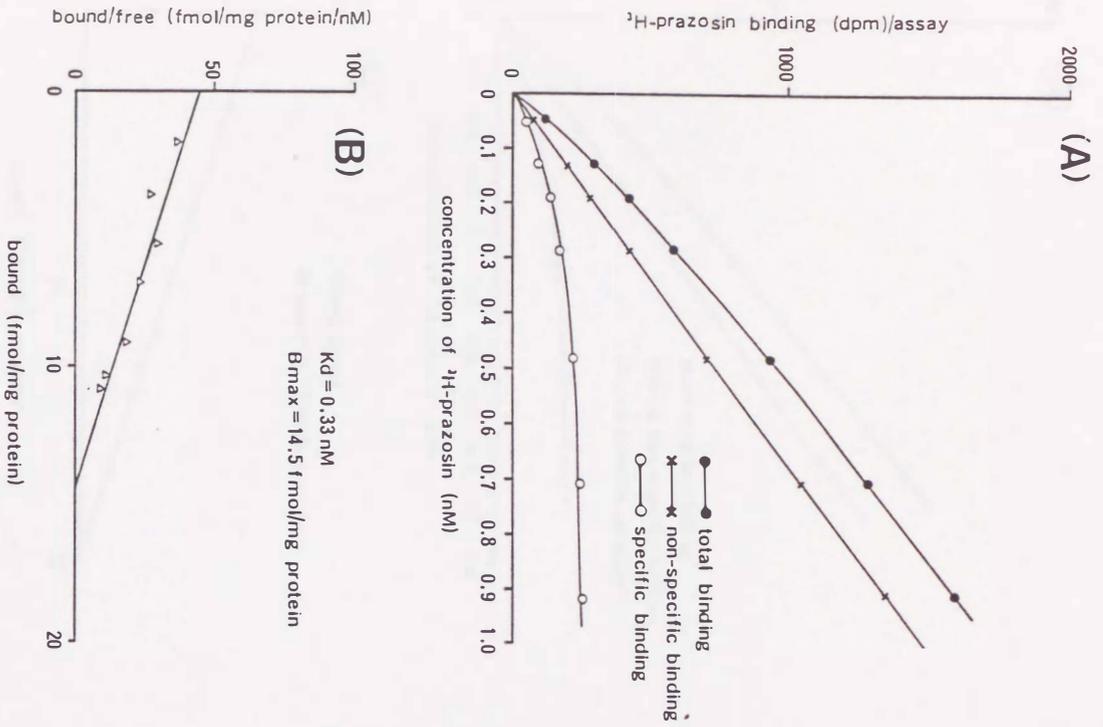


図5 ヒト副腎皮質膜分画にたいする ^3H -prazosin 結合の saturation binding curve (A), Scatcha plot (B) と ^3H -yohimbine 結合の saturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例

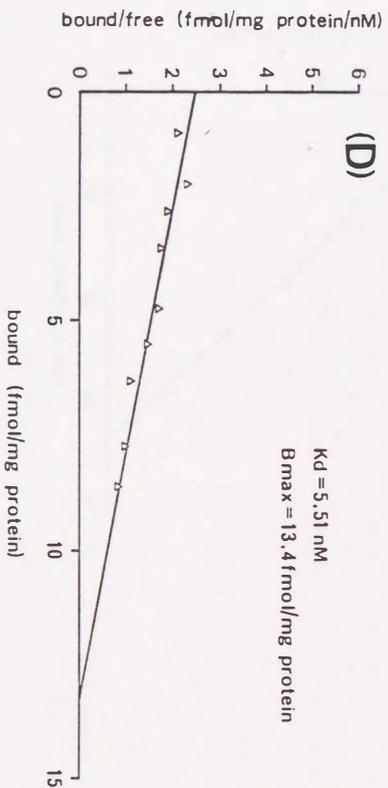
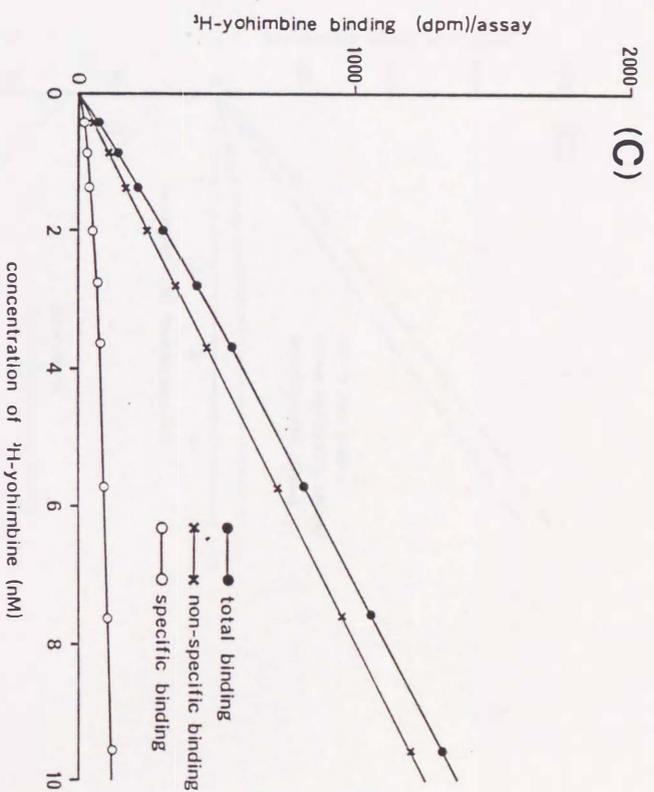
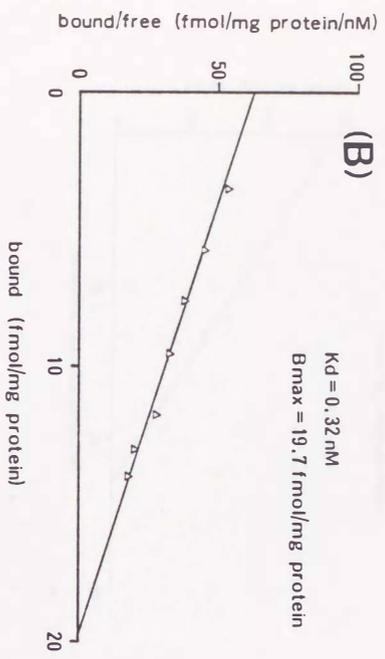
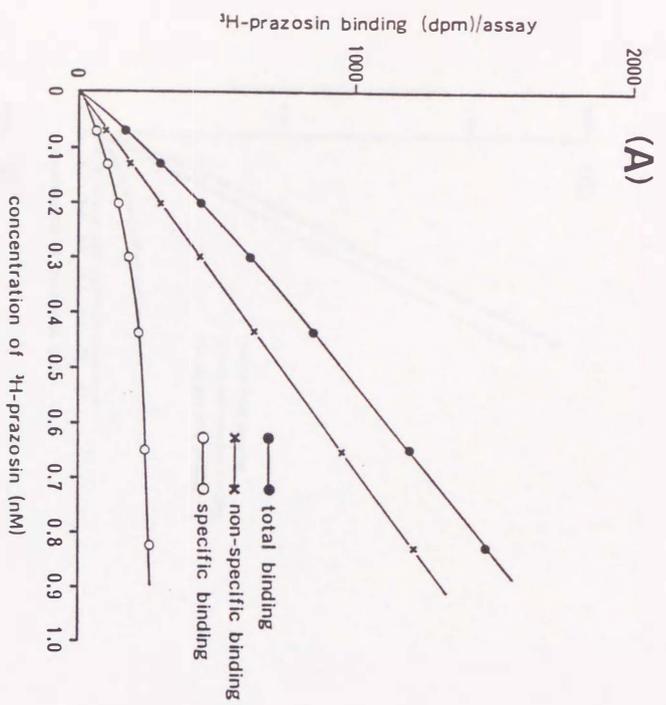


図6 ヒト副腎髄質膜分画にたいする ^3H -prazosin 結合の saturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と ^3H -yohimbine 結合の saturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例

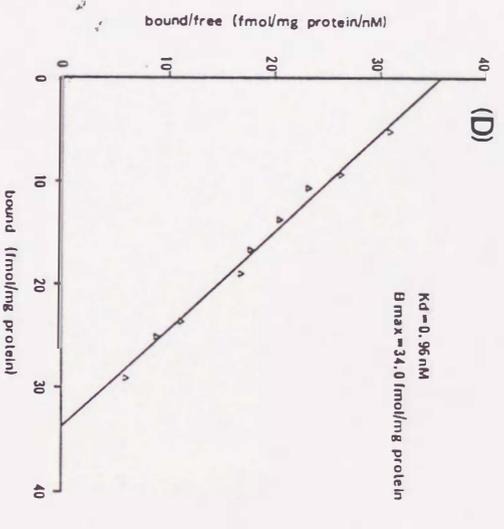
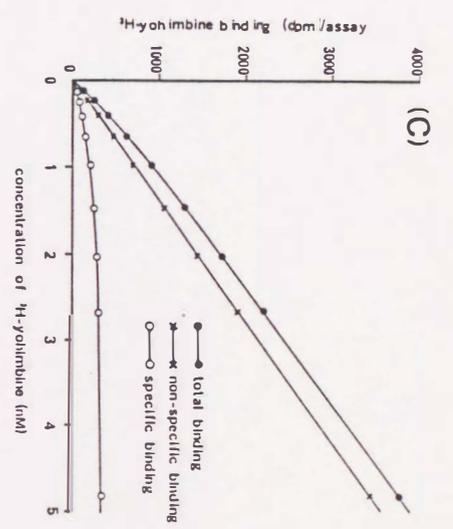
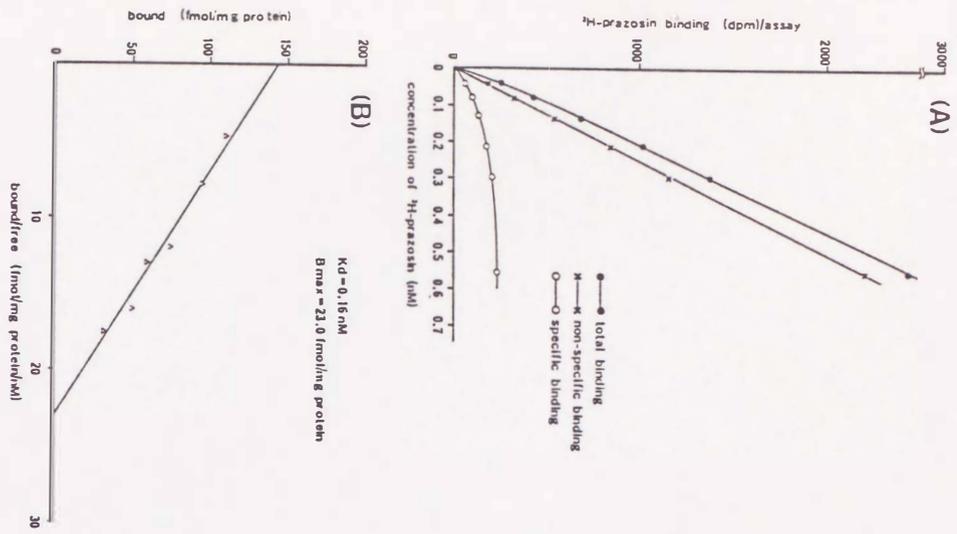


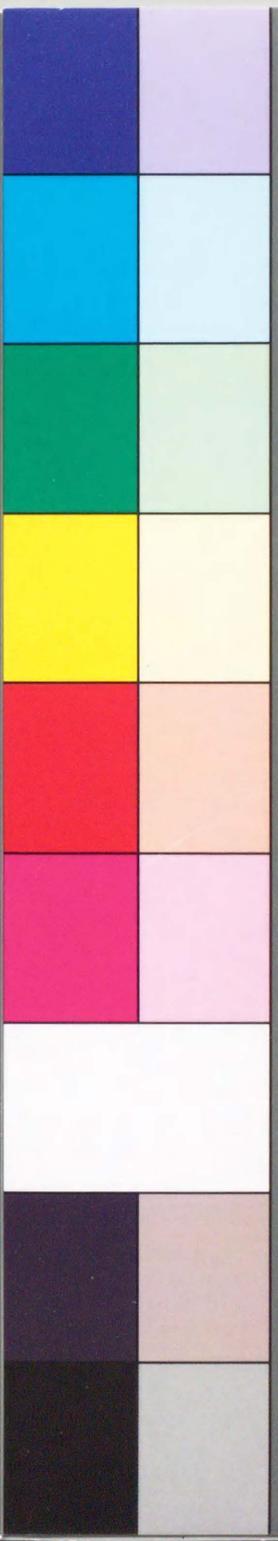
図7 ヒト褐色細胞腫膜分画にたいする³H-prazosin結合のsaturation binding curve (A), Scatchard plot (B) と³H-yohimbine結合のsaturation binding curve (C), Scatchard plot (D) の1例



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

