



## Target size analysis of serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptors in bovine brain membranes

西野, 直樹

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1986-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0581

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000581>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) にし の 西 野 直 なおき樹 (大阪府)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博い第484号

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の日付 昭和61年3月31日

学位論文題目 TARGET SIZE ANALYSIS OF SEROTONIN  
5-HT<sub>1</sub> AND 5-HT<sub>2</sub> RECEPTORS IN  
BOVINE BRAIN MEMBRANES

(ウシ脳膜標品におけるセロトニン 5-HT<sub>1</sub> および  
5-HT<sub>2</sub> 受容体のターゲットサイズ分析)

審査委員 主査 教授 田中千賀子

教授 中井久夫 教授 岡田安弘

### 論文内容の要旨

#### 緒言

serotonin (5-hydroxytryptamine : 5-HT) 受容体には二つの異なるサブタイプ 5-HT<sub>1</sub> および 5-HT<sub>2</sub> 受容体の存在することが、標識化合物を用いた受容体結合実験によって証明されている。5-HT<sub>1</sub> 受容体は serotonin に、5-HT<sub>2</sub> 受容体は spiperone や ketanserin 等 serotonin 拮抗薬に高親和性であり、各受容体の生理機能との関連についても知見が集積されてきている。本研究では、薬理・生理学的に定義されてきた serotonin 受容体の二つのサブタイプが異なる受容体蛋白の存在を意味するか否かを証明する目的で、放射線不活化法を用いて 5-HT<sub>1</sub> および 5-HT<sub>2</sub> 受容体の膜における機能単位としての分子サイズ同定を試みた。

#### 方 法

##### 膜分画の調製

ウシ大脳皮質および線条体組織に氷冷 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、ポリトリオーンでホモジナイズした後、48,000 × g, 10 分間遠沈した。その沈渣を同緩衝液で再浮遊と遠沈を 3 回繰返して洗浄したものを粗膜分画として以下の実験に用いた。

##### 放射線不活化法

粗膜分画を凍結乾燥後、真空封入し、氷冷下<sup>60</sup> Co (32,000 Ci, 線量率 4.5 M rad/h) を線源とし

てガンマ線照射（0.5～12 M rad）を行なった。同時に、内部標準として分子量既知の酵素標品（pyruvate kinase, alcohol dehydrogenase, alkaline phosphatase）を用いた。照射後、膜標品は受容体結合実験を、酵素標品は酵素活性測定を行ない、それぞれ特異結合量および活性の減衰から、serotonin 受容体のターゲットサイズを算出した。

#### 受容体結合実験

ガラス繊維濾紙を用いる急速吸引濾過法により本実験を行なった。放射性リガンドとして、5-HT<sub>1</sub>受容体を標識する目的で [<sup>3</sup>H] serotonin を、5-HT<sub>2</sub> 受容体を標識する目的で [<sup>3</sup>H] spiperone および [<sup>3</sup>H] ketanserin を用いた。

#### 結果および考察

##### serotonin 受容体の薬理学的特性

serotonin および serotonin 拮抗薬（methysergide, pipamperone, spiperone, ketanserin）による [<sup>3</sup>H] serotonin, [<sup>3</sup>H] spiperone および [<sup>3</sup>H] ketanserin 結合に対する影響を薬物置換実験により検討した。 [<sup>3</sup>H] serotonin 結合に対しては serotonin のみが強力に抑制したが、 [<sup>3</sup>H] spiperone および [<sup>3</sup>H] ketanserin 結合に対しては serotonin の抑制効果は弱く、serotonin 拮抗薬がいつも強力な抑制を示した。これらの結果は以前の他種属での動物実験の成績を支持し、かつ serotonin 受容体には薬理学的特性の異なる二つのサブタイプが存在することを確認するものであった。

##### serotonin 受容体の機能的分子サイズ

放射線不活化法によって、 [<sup>3</sup>H] serotonin で標識される 5-HT<sub>1</sub> 受容体のターゲットサイズは、大脳皮質で 57,000, 線状体で 56,000 とほぼ同一であった。一方、 [<sup>3</sup>H] spiperone 結合部位のターゲットサイズは大脳皮質で 145,000, 線条体で 141,000, [<sup>3</sup>H] ketanserin 結合部位のターゲットサイズはそれぞれ 152,000, 150,000 と近似した値を示した。ketanserin, pipamperone は methysergide に比し  $\alpha_1$  アドレナリン受容体に対する親和性が高いことが知られている。従って、 [<sup>3</sup>H] ketanserin 結合部位のターゲットサイズは 5-HT<sub>2</sub> 受容体のみならず、  $\alpha_1$  受容体をも含む可能性が推測された。しかしながら、 [<sup>3</sup>H] ketanserin 特異結合を pipamperone で阻害される量と定義しても、 methysergide で阻害される量と定義しても、得られたターゲットサイズは同一であったことから、この可能性は否定された。

本研究は、 [<sup>3</sup>H] serotonin で標識される 5-HT<sub>1</sub> 受容体の機能的な分子サイズと、 [<sup>3</sup>H] spiperone あるいは [<sup>3</sup>H] ketanserin で標識される 5-HT<sub>2</sub> 受容体の機能的な分子サイズは明らかに異なることを初めて示し、従来、薬理・生理学的に証明されてきた serotonin 受容体の二つのサブタイプは異なる受容体蛋白の存在を意味することを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

生体で産生されるセロトニンの約1～2%が脳に伝達物質として存在し、多くの脳機能を制御していることが知られている。この5HTの受容体は5HT<sub>1</sub>および5HT<sub>2</sub>のサブタイプに分類されている。5HT<sub>1</sub>受容体はセロトニン高親和性の結合部位であり、cAMPをセカンドメッセンジャーとする。一方、5HT<sub>2</sub>受容体は向精神薬やLSDなどセロトニン拮抗薬の高親和性結合部位であり、精神機能との関連が注目されている。申請者は薬理学的に分類された5HT受容体サブタイプが分子レベルで異なる受容体蛋白として存在するかどうかに興味をもち、従来、酵素蛋白の機能単位としての分子サイズを同定するのに用いられた放射線不活化法を用いて5HT受容体サブタイプの分子サイズの同定を試みた。

本法の原理はガンマ線照射により大きい分子から破壊されることから既知の分子量の分子を内部標準として用いてターゲットサイズを測定するもので、示標として用いた機能単位のサイズを表わしている。ウシ大脳皮質および線条体の膜分画を凍結乾燥後、真空封入し、氷冷下<sup>60</sup>Co(32,000Ci、線量率4.5Mrad/h)を線源としてガンマ線照射(0.5～12Mrad)を行った。同時に、内部標準として分子量既知の酵素標品を用いた。照射後、膜標品は受容体結合実験を、酵素標品は酵素活性測定を行い、それぞれ特異結合実験において5HT<sub>1</sub>受容体を標識する目的で[<sup>3</sup>H]serotoninを、5HT<sub>2</sub>受容体を標識する目的で[<sup>3</sup>H]spiperoneおよび[<sup>3</sup>H]ketanserinをリガンドとして用いた。

放射線不活化法によって、[<sup>3</sup>H]serotoninで標識される5HT<sub>1</sub>受容体のターゲットサイズは大脳皮質で57,000、線条体で56,000とほぼ同一であった。一方、[<sup>3</sup>H]spiperone結合部位のターゲットサイズは大脳皮質で145,000、線条体で141,000、[<sup>3</sup>H]ketanserin結合部位のターゲットサイズはそれぞれ152,000、150,000と近似した値を示した。ketanserin、pipamperoneはmethysergideに比しα<sub>1</sub>アドレナリン受容体に対する親和性が高いことが知られている。従って、[<sup>3</sup>H]ketanserin結合部位のターゲットサイズは5HT<sub>2</sub>受容体のみならず、α<sub>1</sub>受容体をも含む可能性が推測された。しかしながら、[<sup>3</sup>H]ketanserine特異結合をpipamperoneで阻害される量と定義しても、methysergideで阻害される量と定義しても、得られたターゲットサイズは同一であったことから、この可能性は否定された。

本研究は、セロトニン受容体について[<sup>3</sup>H]serotoninで標識される5HT<sub>1</sub>受容体の機能的な分子サイズと、[<sup>3</sup>H]spiperoneあるいは[<sup>3</sup>H]ketanserinで標識される5HT<sub>2</sub>受容体の機能的な分子サイズは明らかに異なることを初めて示したものであり、従来、薬理・生理学的に証明されてきたserotonin受容体の二つのサブタイプについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。