

ヒスタミン H₂受容体のリガンド認識機構の研究
—非競合的拮抗薬の理論的創薬—

田 城 孝 雄

目次

研究の背景と目的	1
I. リガンドの構造の検討	
方法	8
1. イヌ・ヒスタミンH ₂ 受容体のクローニング	8
(1) cDNA調整法	8
(2) PCR法を用いたクローニング	8
(3) 遺伝子 library からのクローニング	9
2. ヒスタミンH ₂ 受容体発現培養細胞株の作製	9
(1) 発現ベクターの作製	9
(2) 発現 (トランスフェクション)	11
(3) 発現の確認	11
(4) Northern blotting の方法	11
3. イヌ・ヒスタミンH ₂ 受容体発現培養細胞系を用いた薬効検定	11
(1) 細胞培養法	11
(2) 細胞内cAMP測定法	11
(3) ヒスタミン刺激による用量反応曲線の作製	12
(4) ヒスタミンH ₂ 受容体拮抗薬による拮抗作用	12
(5) T-593 の構造同族体の検討	13
4. データ解析	13
結果	14
1. ヒスタミンによるcAMP産生に対するT-593とranitidineの抑制効果	14
2. (S)-(-)-T-593のヒスタミンH ₂ 受容体拮抗様式	16
3. (S)-(-)-T-593の効果の時間依存性	20
4. cAMP産生に対する(S)-(-)-T-593の可逆性: ranitidineとの比較	21
5. 複素環部分の構造同族体の比較検討	23
6. 側鎖の構造同族体の比較検討	23
考察	28

II。受容体側の検討

序	31
方法	34
1。190 mutation	34
(1) 点変異導入	34
(2) PCR法	34
(3) 点変異受容体発現ベクターの作製	34
(4) 発現	34
(5) Northern Blotting	36
(6) cAMP測定	36
2。単離胃腺の調製	36
(1) ウサギ単離胃粘膜細胞の調製	36
(2) イヌ単離胃粘膜細胞の調製	36
(3) ¹⁴ C-アミノピリン up-take	37
1) ウサギ単離胃粘膜細胞	37
2) イヌ単離胃粘膜細胞	37
(4) ヒスタミン刺激酸分泌に対する薬物の可逆性実験	38
3。ウサギ・ヒスタミンH ₂ 受容体遺伝子のクローニング	38
(1) cAMP調整法	38
(2) PCR法によるクローニング	38
4。ヒスタミンH ₂ 受容体三次元構造モデル	39
結果	40
1。190番アミノ酸変異(T190A)受容体発現細胞におけるT-593の洗浄性	40
2。ヒスタミン刺激酸分泌に対するT-593の可逆性の種差の検討	40
(1) ウサギ胃粘膜細胞	40
(2) イヌ胃粘膜細胞	40
3。ウサギ・ヒスタミンH ₂ 受容体のクローニング	41
4。ヒスタミンH ₂ 受容体三次元構造モデル	41
考察	50

まとめ	54
謝辞	56
文献	57

研究の背景と目的

ヒスタミン H₂受容体拮抗薬

1972 年の Black ら[1]によるヒスタミン H₂受容体拮抗薬, burimamide の発見は、胃酸分泌の制御機構の研究や消化性潰瘍の治療に著明な進歩をもたらした。引き続き 1975 年に cimetidine [2,3], 1979 年に ranitidine [4,5], 1982 年に本邦で famotidine [6,7]が開発され、以後 nizatidine [8] や roxatidine [9]などの薬剤が合成され、現在、臨床で使用されるようになっている。ヒスタミン H₂受容体拮抗薬は、臨床的に有用で、胃酸分泌の制御や消化性潰瘍の治療に著明な進歩をもたらし、1990 年代の前半は、世界中で最も使われた薬剤の一つである。

他の G 蛋白連結型受容体拮抗薬

ヒスタミンH₂拮抗薬以外にも G 蛋白質連結型受容体拮抗薬は、 β 拮抗薬、 α_2 拮抗薬が高血圧症・不整脈の治療薬、 α_1 拮抗薬が前立腺肥大症の治療薬、ヒスタミン H₁拮抗薬は抗アレルギー薬、5HT受容体拮抗薬が制吐薬として、以前から広く臨床応用されている。

さらにうつ病や精神分裂病にドーパミンレセプターが関連することが判明し、セロトニンレセプターのいくつかのサブタイプに対して強い親和性を有するクロゼピンは、治療抵抗性の精神分裂病の治療薬として用いられている。抗精神病薬のリスペリドンは、ドーパミンD2レセプター遮断作用と、その 10 倍強力なセロトニンレセプター遮断作用を持っている。セロトニン・ドーパミン・拮抗薬が、精神分裂病の治療薬として開発されている[10, 11]。

また、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬(AT1 拮抗薬)は、ACE 阻害剤に匹敵する降圧作用を持つ。さらに ACE 阻害剤には、咳の副作用があるが、AT1 拮抗薬にはなく、臨床的に使いやすい薬である[12]。また、AT1 受容体拮抗薬(losartan)は心不全に対する心保護効果に優れている[13]。AT1 受容体拮抗薬は、バルーン障害による血管内膜肥厚を抑制し、動脈硬化の予防薬として期待できる[14]。

さらにケモカイン受容体である CRC4 や、CXCR-5 は、HIV virus の co-receptor であり、その拮抗薬は、HIV の治療薬として期待されている[15, 16, 17]。

G蛋白連結型受容体拮抗薬は、重要な薬剤であり、今後も広く臨床応用されると考えられる。

G蛋白連結型受容体拮抗薬の創薬

ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬だけでなく、他の G 蛋白連結型受容体の非競合的拮抗薬を理論的に創薬出来れば、大きな貢献となる。G蛋白連結型受容体についての知見は多いが、拮抗薬の創薬には生かされておらず、アゴニストの構造式を元に推察し、またはランダムスクリーニングでリード化合物を発見し、構造活性相関によりよりよい化合物を探すという手法が取られている[18]。

G蛋白連結型受容体の創薬は、G蛋白連結型受容体のアミノ酸配列や三次元構造に対する考察が進んだ現在でも、経験と試行錯誤に依っていると言える。この為医薬品の開発に、膨大な時間と費用を要し、医療費の高騰の原因の一つとなっている。

そこで、アンタゴニストと受容体との結合に法則性を見出せば、受容体の三次元構造にフィットする拮抗薬を、受容体の一次構造より理論的に推定し、構造決定して創薬することが可能となると考えられ、多くの治療薬の効率的な開発が可能になると期待できる。

受容体とリガンドの結合の分子レベルの解析

1986 年の β_2 アドレナリン受容体のクローニング以来[19]、G蛋白質結合受容体の研究は進歩した。 β_2 アドレナリン受容体について多くの G 蛋白質結合受容体のクローニングがなされ、アミノ酸配列が解明された。また点変異導入やキメラの作製などの分子生物学の技術を用いて、アゴニストと結合する受容体のアミノ酸残基の特定がなされているコンピューターを用いた解析により、三次元構造の推定がなされている。

分子生物学の進歩により、多くの G 蛋白連結型受容体の遺伝子がクローニングされ、核酸配列が決定された。これにより受容体蛋白のアミノ酸一次配列が決定された。またバクテリオロドプシンの結晶の X 線解析の結果[20]に基き、バクテリオロドプシンの三次元構造をテンプレートとし、コンピューターを用いて、幾つかの G 蛋白結合型受容体の三次元構造の推定・推測が行われている。[21, 22, 23]

非競合的拮抗薬

新しく合成されたヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬 T-593, (±)-(E)-1-[2-hydroxyl-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-3-[2-[[[5-(methylamino)methyl-2-furyl]methyl]thio]ethyl]-2-(methylsulfonyl)guanidine (図 1)[24]は、amino methyl furan と β -hydroxyphenethylamine moiety を flexible chemical chain で結んだ化学構造をしており、複素環部分は ranitidine の構造式に類似している。T-593 は guinea pig の摘出右心房にてヒスタミン刺激による陽性変時作用において、時間依存性に非競合的(unsurmountable[25])な H₂ 受容体拮抗作用を示すことが報告されている[26]。

近年開発されたヒスタミン H₂受容体拮抗薬以外の受容体拮抗薬の中にも、同様に強力で持続時間の長いアンタゴニストがある。 α -アドレナリン受容体拮抗薬[27], β -アドレナリン拮抗薬[28], ヒスタミン H₁拮抗薬[29] などにみられる。薬理学的には、最大反応の抑制, slow associate, slow dissociate が特徴として挙げられ unsurmountable antagonist[25]と分類される。

非競合的拮抗薬(unsurmountable antagonist)は、1955 年に Gaddum らが 5HT antagonist で、初めて報告した[25]。①用量反応曲線を、右にシフトするだけでなく、最大反応を抑制する、②抑制効果は、時間依存性である、③非可逆性抑制作用(難洗浄性)を持つなどの薬理学的特徴を持ち、強力な拮抗作用・長い持続時間を示し、臨床的に有力な拮抗薬である。この選択的で強力・持続時間の長い拮抗薬である unsurmountable antagonists と、従来からある classical competitive antagonists では、受容体分子との結合様式に違いがあるのかを、分子レベルで解明することを、目的とする。

ヒスタミンH₂受容体拮抗作用のアッセイ系の開発

H₂受容体の薬理研究には、摘出心房の陽性変時作用と胃酸分泌量が広く用いられている。また動物の胃より調製された単離胃粘膜細胞や単離胃壁細胞は、ヒスタミン H₂拮抗薬のアッセイにしばしば用いられるが、標本を作製する手技は、単離の際に collagenase 等の酵素を用いることにより、単離胃粘膜細胞、単離胃壁細胞や細胞表面に存在するヒスタミン H₂-受容体蛋白にダメージを与える[30]。また通常は培養細胞株の表面には、ヒスタミン H₂受容体は豊富には存在しない。そこで、ヒスタミン H₂受容体蛋白を発現させた培養細胞系は、新しいヒスタミン H₂受容体拮抗薬の探索と解析に極めて有用であると考えられる[31, 32, 33]。

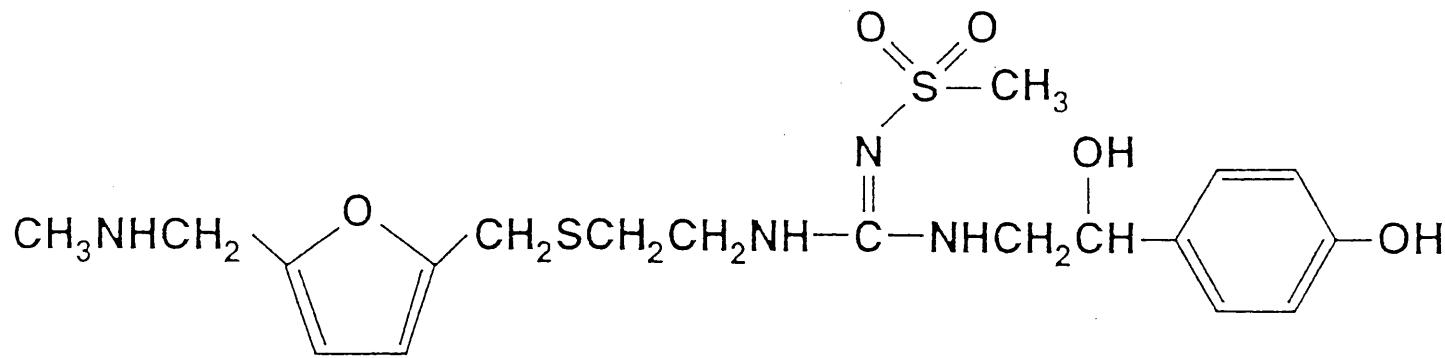
我々は、最近クローニングされたイヌ・ヒスタミン H₂受容体遺伝子(図2)[34, 35] を安定して発現させた Hepa cell(ラット肝癌細胞由来)の培養細胞系を確立し、ヒスタミン H₂拮抗薬の薬効検定に用いることにした。

本研究では、イヌ・ヒスタミン H₂受容体を発現させた Hepa cell において、ヒスタミン刺激による cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) 産生量を指標にして、新しいヒスタミン H₂受容体拮抗薬 T-593 およびその構造同族体(図3)の薬理学的特性を調べた。

目的

以上より本研究は、以下のことを目的としておこなった。

1. 分子生物学の進歩により明らかになった受容体のアミノ酸配列を基に、受容体と ligandとの結合を分子レベルで検討する。
2. 選択的であり、かつ非競合的な拮抗薬と、受容体との結合を分子レベルで検討する。
3. 受容体拮抗薬の創薬は、経験則と試行錯誤に拠るところが大きい。この為、医薬品の開発に、膨大な時間と費用を要する。受容体のアミノ酸配列から最善の拮抗薬を、理論的に創薬し、拮抗薬の開発の糸口とする。



M.W. 456.59

(\pm)-(E)-1-[2-hydroxyl-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-3-[2-[[[5-(methylamino)methyl-2-furyl]methyl]thio]ethyl]-2-(methylsulfonyl)guanidine

Chemical structure of T-593

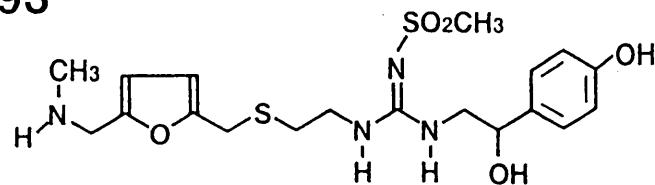
図1

1	ATGATATCTAACGGCACAGGCTCTCCTTTGTCTGGACTCTCCATGCAGGATCACT	60
1	M I S N G T G S S F C L D S P P C R I T	20
61	GTCAGCGTGCCTCCTCACTGTCCATCCTCATCACCATGCCGGCAATGTGGTGGCTGC	120
21	V S V V L T V L I L I T I A G N V V V C	40
121	CTGGCTGTGGCCTGAACGCCGGCTCCGAGTCTGACTAACTGCTTCATTGTGTCGTTG	180
41	L A V G L N R R L R S L T N C F I V S L	60
181	GCTATCACCGATCTGCTCCTCGGCCCTCTGGTGCTGCCCTCTCGGCCCTCTACCAAGCTA	240
61	A I T D L L L G L L V L P F S A F Y Q L	80
241	TCCCTGCAGGTGGAGCTTCGGCAAAGTCTTCTGCAATATCTATACCAGCTGGATGTGATG	300
81	S C R W S F G K V F C N I Y T S L D V M	100
301	CTGTGCACGGCCTCCATCCTAACCTCTCATGATCAGCCTTGACCGGTACTGCGCTGTC	360
101	L C T A S I L N L F M I S L D R Y C A V	120
361	ACTGACCCCCCTGCGCTACCCGTGCTTATCACCCAGTCCGGTGCCTCTCTGTGTC	420
121	T D P L R Y P V L I T P V R V A V S L V	140
421	TTAATTGGGTCACTCCATCACCCCTGTCCTCTGTCTATTCACTCTGGGTGGAACAGC	480
141	L I W V I S I T L S F L S I H L G W N S	160
481	AGGAATGAGACCAAGCAGCTTCAATCACACCATCCCCAGTGCAGTCCAGGTCAACTTG	540
161	R N E T S S F N H T I P K C K V Q V N L	180
541	GTGTATGGCTTGGATGGCTGGCACCTCTACCTGCGCTGCTGGTCATGTGCATC	600
181	V Y G L V D G L V T F Y L P L L V M C I	200
601	ACCTACTACCGCATCTCAAGATTGCCCGGACCAGGCCAAGAGGATCCATCACATGGC	660
201	T Y Y R I F K I A R D Q A K R I H H M G	220
661	TCCTGGAAGGCAGTACCAATTGGGGAGCACAAAGCCACAGTGACACTGGCTGCACTGATG	720
221	S W K A A T I G E H K A T V T L A A V M	240
721	GGAGCCTTCATCATATGCTGGTCCCCTACTTFACTGTGTTGTTACCGTGGCTGAAA	780
241	G A F I I C W F P Y F T V F V Y R G L K	260
781	GGGGATGATGCCATCAATGAGCTTTGAAGCCGTCGTTCTGTGGCTGGCTATGCCAAC	840
261	G D D A I N E A F E A V V L W L G Y A N	280
841	TCGGCCCTGAACCCATCTGTATGCCACACTGAACAGAGACTTCCGCACGGCATACCA	900
281	S A L N P I L Y A T L N R D F R T A Y Q	300
901	CAGCTCTCCGCTGCAGGCCGGCCAGCCACAATGCCAGGAAACTTCTTGAGGTCGAAC	960
301	Q L F R C R P A S H N A Q E T S L R S N	320
961	AGCTCTCAGCTGGCCAGGAATCAAAGCCGAGAACCCATGGCAGGAAGAGAACAGCTG	1020
321	S S Q L A R N Q S R E P M R Q E E K P L	340
1021	AAGCTCCAGGTGTGGAGTGGACAGAGGTACAGCCCCTGAGGAGCCACAGACAGGTAA	1080
341	K L Q V W S G T E V T A P R G A T D R *	360

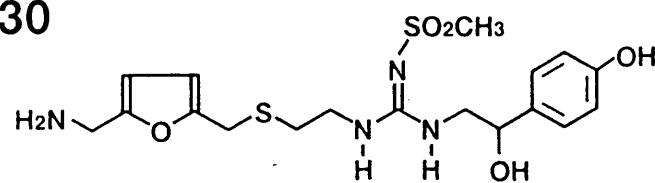
The nucleotide and amino acid sequence (in single-letter code) of the canine histamine H₂ receptor gene.

図2。イヌ・ヒスタミンH₂受容体遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列

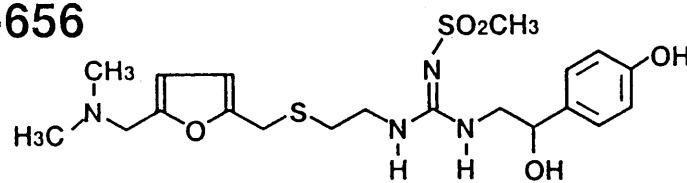
T-593



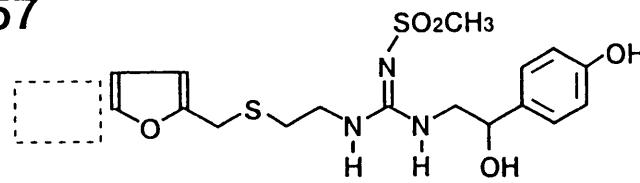
T-630



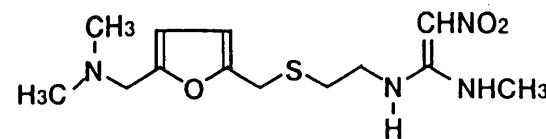
T-656



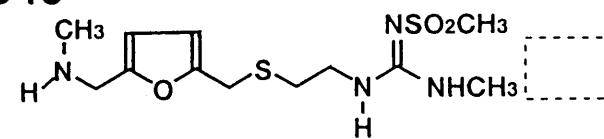
T-657



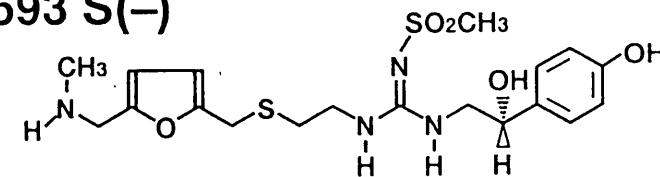
Ranitidine



T-649



T-593 S(-)



T-593 R(+)

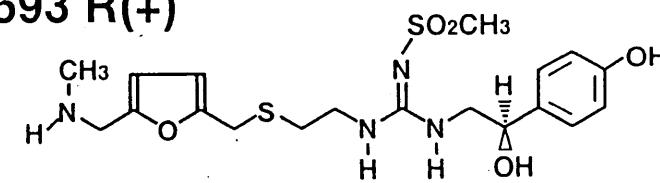


図3。T-593 の構造同族体の構造式

I. リガンドの構造の検討

方法

1. イヌ・ヒスタミン H₂受容体のクローニング

(1) cDNA 調整法

イヌ胃粘膜(fundus)を 0.25 μg/ml の collagenase と 1mM EDTA で処理し, Soll の方法[36]によりエルトリエーターを用いて, 70%の壁細胞を含む分画を得た。この分画から acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 法[37]を用いて, total RNA を抽出し, さらにオリゴ(dT)セルロースカラムを用いて, poly(A)⁺RNA を得た。この poly(A)⁺RNA より avian myeloblastoma virus reverstranscriptase (Seikagaku America, Rockville, MD)を用いて cDNA を得た。

(2) PCR 法を用いたクローニング

Libert ら[38]のデザインしたG蛋白質結合受容体の第3膜貫通部と第6膜貫通部のそれぞれ、各種の受容体で共通して保存されている塩基配列をもとに primer を作製した。primer の塩基配列は、

5' GTCGACCTGTGC/TGC/TC/GATC/TGCIITG/TGAC/TC/AGC/GTAC 3'

3' AAGT/CG/AG/CIAGACGACCGACGGAA/TGAA/TGT/GATTCGAA 5' である。

primer は Applied Biosystemes 380B DNA synthesizer を用いて合成した。

イヌ壁細胞の cDNA を錆型とし、上記の primer を用いて、以下の条件で PCR を行った。

denaturation 94°C 1.5min

annealing 45°C 2min

extension 72°C 4min

反応は 30 cycles 行い、反応産物の 20%を取り出し、新たに buffer, primer, dNTP を加えて、30 cycles 行った。

反応生成物を phenol/chloroform, 1:1 (Vol:Vol)で抽出し、エタノールで沈殿させた。この二重鎖 DNA を、DNA polymerase I klenow fragment で処理し、blunt-ended DNA とした。

この反応生成物を、2% NuSieve / 1% Seaplaque gel (FMC)で、電気泳動し、2本のバンドが得られた。このうち約 400 base pairs の大きさのバンドを gel より切り出し、M13

シークエンス用ベクターに、直接サブクローンした[39]。

DNA の塩基配列は、Sanger らの方法[40]に従い、Sequenase version 2 (United States Biochemical)を用いて、dideoxynucleotide 法により決定した。

(3) 遺伝子 library からのクローニング

PCR 法によって得られた遺伝子の断片を、Vogelstein らの方法[41]により、³²P で random priming 法で radiorabel した。

これをプローブとして、canine genomic library (Clontech)をスクリーニングした。ハイブリダイゼーション条件は、0.9 M sodium chloride / 0.09 M sodium citrate (6 x SSC), 5 x Denhardt's solution (0.1% Ficoll, 0.1% poly vinylpyrrolidine, 0.1% bovine serum albumin), 0.1M HEPES (pH7.0), 100mg / ml salmon sperm DNA, 10mg / ml dextran sulfate, 65°Cであり、洗浄条件は 0.1 x SSC, 55°Cで行った。single positive clone が得られ、ファージ DNA を Tsionis らの plate lysate 法[42]を用いて調製した。

Southern blotting 法[43]にて、制限酵素地図を作成した。XbaI-SauI フラグメントを M13 sequense vector にサブクローンし、前述のごとく sequense version 2 (United States Biochemical)を用いて dideoxy nucleotide 法により決定した。

2. ヒスタミン H₂受容体発現培養細胞株の作製

(1) 発現ベクターの作製

クローニングした遺伝子の翻訳領域は、PCR 法を用いて増幅後、真核細胞の発現ベクターCMVneo にサブクローニングした。

CMV の構造は、PUC13-based vector で、lacUV5-SV40 promoter (440bp), Tn5-neo (1400bp), SV40 splice site and polyadenylation signal (320bp), cytomegalovirus (CMV) promoter (700bp), human growth hormone polyadenylation signal (700bp)を持つ[44]。(図4)

CsCl₂ 法[43]にて、プラスミド DNA を調製し、PCR により変異が導入されていないか調べるために、ヒスタミン H₂受容体翻訳領域の塩基配列を再確認した。

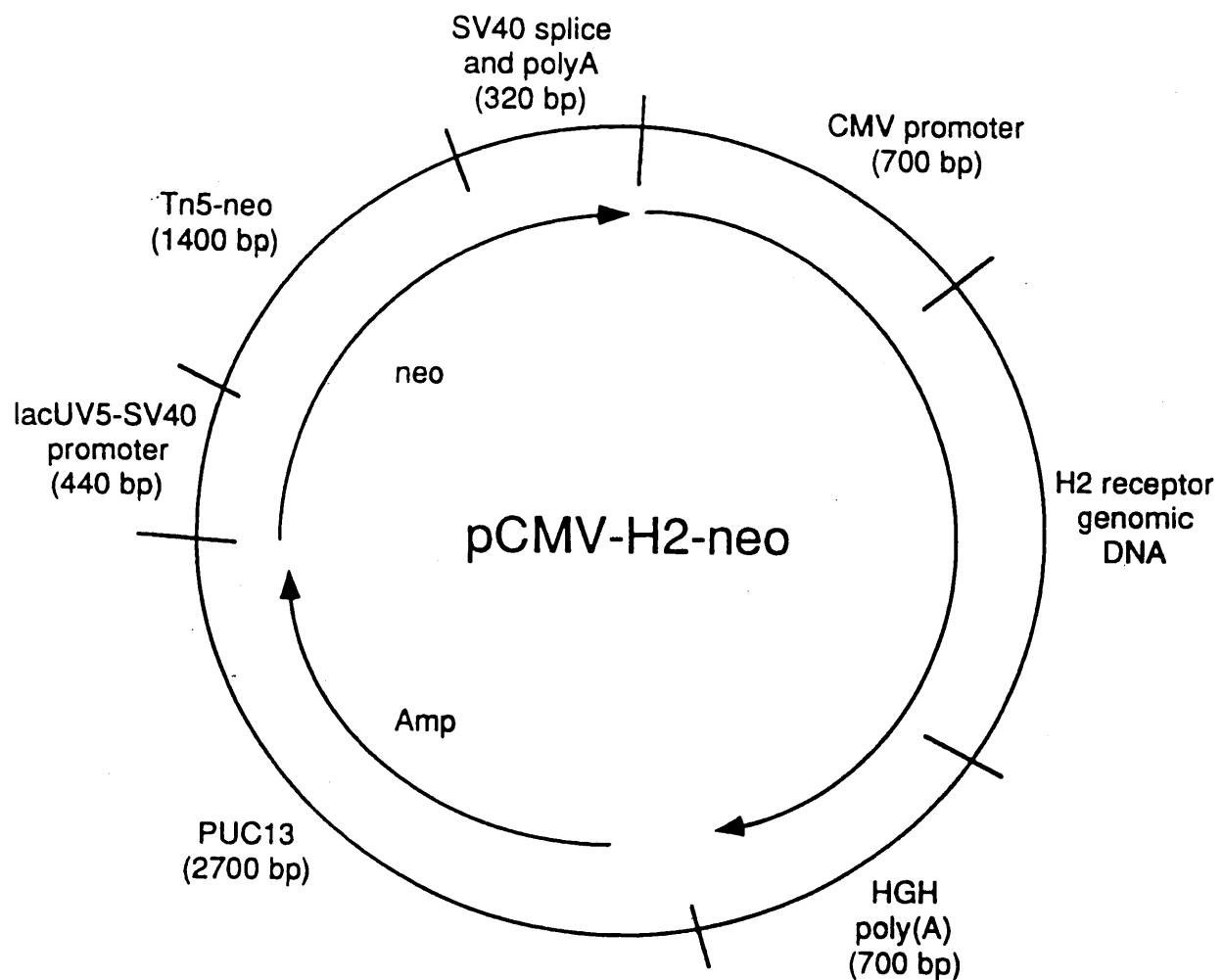


図4。発現ベクターの構造

(2) 発現(トランスフェクション)

(1)で確認したプラスミド DNA を、リン酸カルシウム共沈法[45]にて、Hepa cell(ラット肝癌細胞由来細胞株)に導入し発現させた。CMVneo を発現している Hepa cell を選択するために、neomycin analogue である G418 (geneticin) 0.6~1.0mg / L を液体培地に加えて、遺伝子導入細胞を選択した。

(3) 発現の確認

単一のクローニングを選択後、northern blotting により、イヌ・ヒスタミン H₂受容体の mRNA を発現していることを確認して、以下の実験に用いた。

文献[35]に述べているとおりヒスタミン H₂受容体の発現量は細胞あたり 30,625 個であり、この培養細胞系を用いて、ヒスタミン H₂受容体拮抗薬の薬理活性を調べた。

(4) Northern blotting の方法

培養細胞から前述の方法で、抽出された poly (A)⁺RNA は、1.25% formaldehyde-agaroses gel にて変性条件下で電気泳動し、mRNA のサイズごとに分離し、これをニトロセルロース膜に転写し、80°Cで乾熱固定または紫外線固定した後に、文献[46]に記載されている方法を用いて、50% formamide, 5X SSPE (0.75M NaCl, 0.05M NaH₂PO₄, 5mM Na₂EDTA, pH7.4), 10X Denhart's solution, 100mg / ml Salmon sperm DNA, 2% SDS の溶液で、ヒスタミン H₂受容体遺伝子翻訳領域をランダムプライム法[41]で ³²P ラベルし、これをプローブとして 18 時間ハイブリダイズした。0.1 x SSC 溶液、65°Cで洗浄した後、X線フィルム(XAR-5)に 24~72 時間 autoradiograph し、感光させた。

3. イヌ・ヒスタミン H₂受容体発現培養細胞系を用いた薬効検定

(1) 細胞培養法

イヌ・ヒスタミン H₂受容体遺伝子を発現させた Hepa cell は、10% fetal calf serum (FCS), 100units / ml penicillin, 100mg / streptomycin, 1mM sodium pyruvate を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地に、Geneticin (G418)を 1mg / ml 加えた培地で、維持継代培養した。

(2) 細胞内 cAMP 測定法

細胞内 cAMP は Yamasa 製の cAMP assay Kit を用いて測定した。イヌ・ヒスタミン

H_2 受容体を発現したHepa cellは、測定の48時間前に、12-well (2.4 x 1.7 cm) tissue culture platesに、 0.3×10^6 cells / well 播種し、37°C, 5%CO₂-95%airの条件で培養し、confluenceになるまで培養し、薬効検定実験に用いた。

培養細胞は4.5g / 100ml glucose, 10% fetal calf serum (FCS), 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1 mg/ml Geneticinを含むDulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO)にて、維持した。

測定のためDMEM培地は、吸引により除去し、細胞は10mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid] (pH 7.4), 2mM glutamine, 26.5mM sodium bicarbonate, 100mg / ml bovine serum albuminを含むEarle's balanced salt solutionで2回洗浄した後、0.1mM isobutyl methyl xanthine (IBMX)を加えたEarle's balanced salt solution (EBSS: GIBCO)を0.5ml / well 添加した。

0.5 mlのEBSSに種々の濃度のヒスタミンと拮抗薬を加え、37°Cにて15分または60分反応させた。反応後100%の氷冷ethanolを1.0 ml/well加え、反応を停止させ、細胞内の蛋白質を凝固させる。各well内の変性細胞をscrapeし、反応液と凝固した細胞成分を1.5-mlのEppendorf tubeに移し、1900X gで10分間遠心分離し、その上清をevaporatorを用い、55°Cのホットバスにて窒素ガス流気により乾燥させ、その乾固物を50 mM Tris, 2 mM EDTA (pH 7.5)に溶解させた。この検体中のcAMP量をcAMP assay kit (Yamasa Co.)[47]を用いて、radioimmunoassay法にて測定した。

(3)ヒスタミン刺激による用量反応曲線の作製

Earle's balanced salt solutionで30分間incubateし、吸引によりこれを除去し、Earle's balanced salt solutionで1回洗浄した後、0.1mM isobutyl methyl xanthineと 1×10^{-10} M~ 3×10^{-4} Mのhistamine (Sigma)を加えたEarle's balanced salt solutionを0.5ml / well添加し、60分間37°Cで反応させた。histamineを加えず、0.1mM isobutyl methyl xanthineのみを加えたwellのcAMP産生量をcontrolとした。値は2つのwellの平均値をとった。

(4)ヒスタミン H_2 受容体拮抗薬による拮抗作用

上記、用量反応曲線作製と同様にEarle's balanced salt solutionで30分間incubateし、吸引によりこれを除去し、Earle's balanced salt solutionで1回洗浄した後、それぞれに0.1mM isobutyl methyl xanthineと 10^{-5} Mのhistamine (Sigma)に各濃度のcimetidine, T-593, T-593の構造同族体を加えたEarle's balanced salt solutionを0.5ml / well添加し、60分間37°Cで反応させた。

拮抗薬を加えず、 10^{-5} M hisutamine と 0.1mM isobutyl methyl xanthine のみを加えた well の cAMP 産生量を control とした。値は2つの well の平均値をとった。

(5) T-593 の構造同族体の検討

複素環部分(フラン環)5位の aminomethyl 基の methyl 基の個数を変えた T-630 (N-desmethyl T-593), T-656(N-methyl T-593) と methylaminomethyl 基を取った T-657(desmethylaminomethyl T-593) , および側鎖末端の benzyl 基を取った T-649(desbenzyl T-593) の4種類の構造同族体(図3)を用いて、同様に薬理活性を検討した。

4. データ解析

ヒスタミン刺激によるcAMP 産生量は、ヒスタミンを加えない well の cAMP 産生量を差し引き、 3×10^{-4} M のヒスタミン刺激による cAMP 産生量を 100%として、標準化した。cAMP 産生量のパーセントを拮抗薬濃度に対し、プロットする。コンピュータを用いて、最少自乗法(least squares linear-regression of Logit analysis)にて IC₅₀ 値と EC₅₀ 値を計算した。Arunlakshana と Schild の方法[48]に従い、H₂ 拮抗作用を解析した。EC₅₀ 値は、用量反応曲線より求め、pA₂ 値は、Schild-plots の X 切片より求めた。非競合的拮抗作用の解析のため、pD'₂ 値は、ヒスタミン刺激の最大反応の半分の刺激を与える濃度とした[49]。

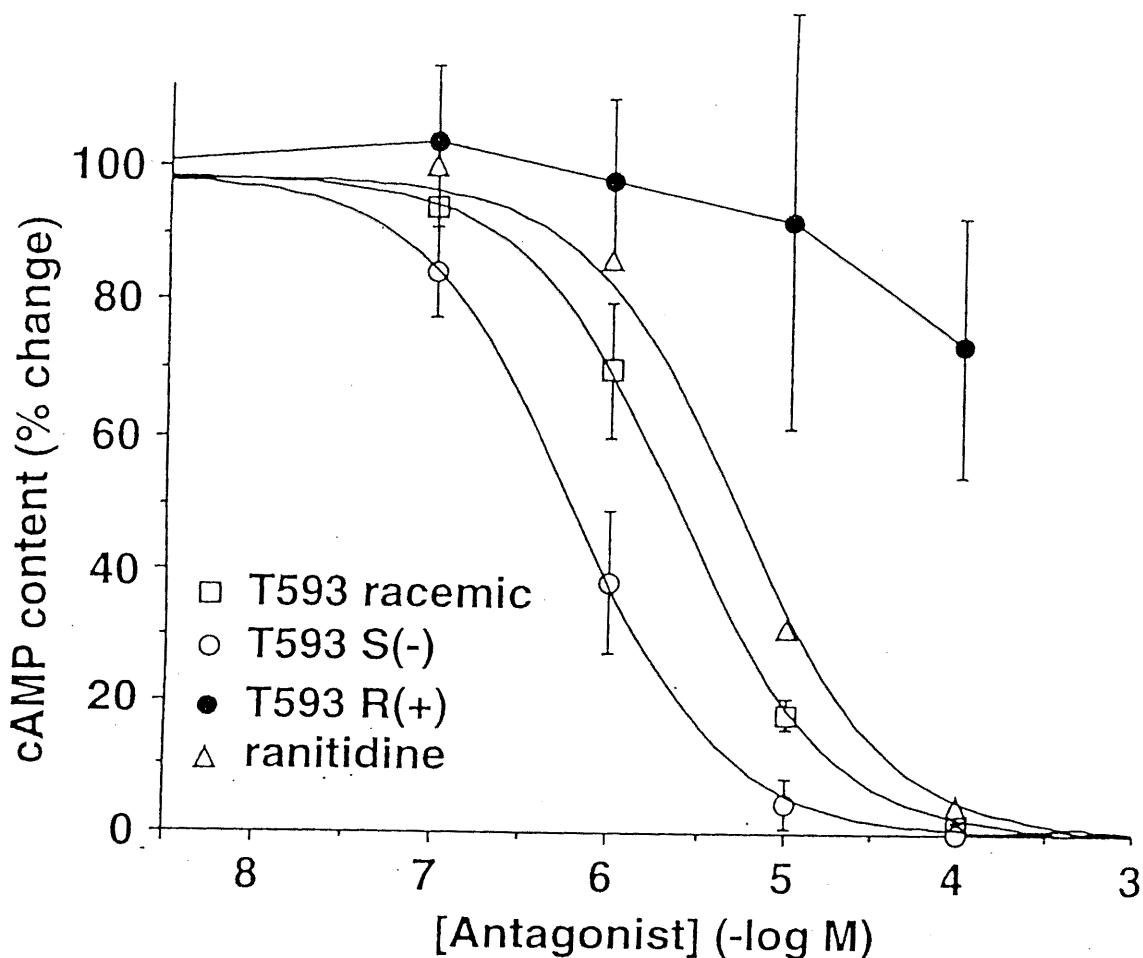
コンピュータープログラム‘SigmaPlot’ (Jandel Scientific Software / SPSS Science, Chicago, IL, USA)を用いて、シグモイド曲線を求めた。

結果

1. ヒスタミンによるcAMP産生に対するT-593とranitidineの抑制効果

イヌ・ヒスタミンH₂受容体を発現させた Hepa cell における 10⁻⁵ M のヒスタミン刺激によるcAMP産生に対するT-593の抑制効果を、 ranitidineの抑制効果と比較した(図5)。 T-593とranitidineは濃度依存性にヒスタミン刺激によるcAMP産生を抑制し、 その IC₅₀ 値は、 それぞれ 2.3 × 10⁻⁶ M と 5.0 × 10⁻⁶ M であった[50]。

T-593は光学異性体があり、 (S)-(-)体と(R)-(+)体よりなっている。我々はそれぞれの異性体の 10⁻⁵ M のヒスタミン刺激によるcAMP産生に対する抑制作用を比較した(図5)。 (S)-(-)-T-593は、 ヒスタミン刺激によるcAMP産生を抑制し、 IC₅₀ 値は 6.1 × 10⁻⁷ M であった。一方、 (R)-(+)-T-593は有意な抑制を示さず、 IC₅₀ 値は決定できなかった[50]。



Comparison of the effects of increasing concentrations of racemic T-593 (□), (S)-(-)-T-593 (○), (R)-(+)-T-593 (●) and ranitidine (△) on cellular cAMP generation stimulated by histamine in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptor. The cells were incubated with the drug mixture, 10⁻⁵ M histamine, 10⁻⁴ M IBMX and each of antagonists for 60 min. The percent increase in cAMP content is plotted against the concentrations of the antagonists. Superimposed are the fitted logistic curves. Data points denote mean ± SEM (n=4) for T-593s and mean data from duplicated determinations for ranitidine.

図5

2. (S)-(-)-T-593 のヒスタミン H₂受容体拮抗様式

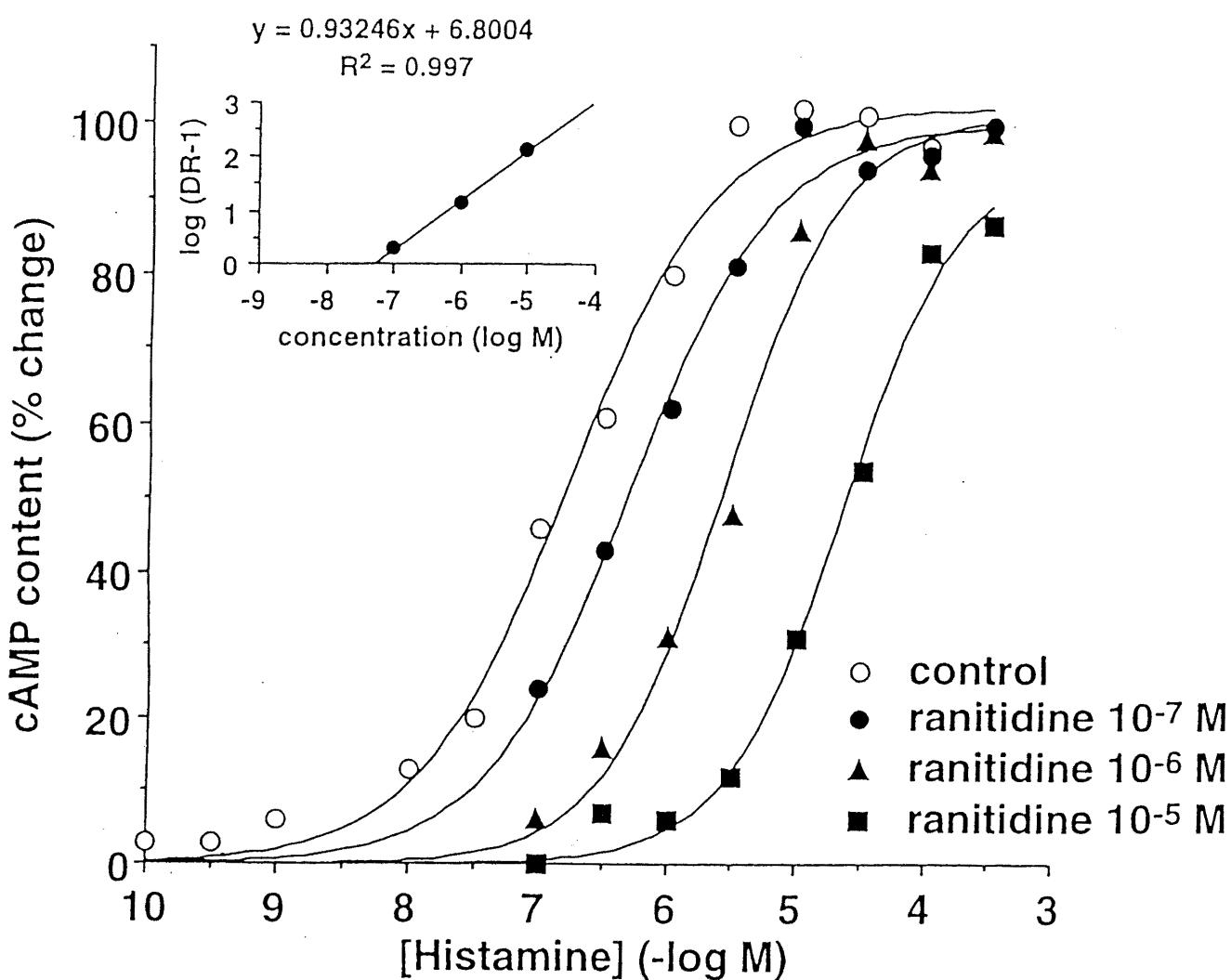
ヒスタミン H₂受容体を発現している Hepa cell において(S)-(-)-T-593 のヒスタミン H₂受容体拮抗様式を検討した。ヒスタミンは、イヌ・ヒスタミン H₂受容体を発現させた Hepa cell において、用量依存性に cAMP 産生を増加させた。ヒスタミン刺激による cAMP 産生の濃度反応曲線は、ヒスタミン濃度 $1 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-4}$ M の範囲で増加し、 10^{-5} M のヒスタミン濃度で最大反応を得た。60 分間の刺激を行った場合、最大反応の 50%を得るヒスタミン濃度 ED₅₀ 値は 1.56×10^{-7} M であった。

Ranitidine は 60 分間の incubation にて、最大反応を抑制せず、ヒスタミンの用量反応曲線を右に平行にシフトした(図6)。すなわち ranitidine はヒスタミンに対して、競合的拮抗作用を示した。一方、(S)-(-)-T-593 は、60 分間の incubation にて、用量反応曲線を右にシフトし、更に最大反応を抑制した(図7)。すなわち非競合的拮抗作用を示した。

Schild plot 解析を行った結果、ranitidine は競合的拮抗作用を示し、その Schild plot の X 軸切片より、その pA₂ 値は 7.29 と計算された。また傾きは 0.93 であった。一方、(S)-(-)-T-593 の場合は pA₂ 値が計算出来ず、代わりに最大反応を 50% に低下させる値 (の -log)、pD'₂ 値は 6.15 と計算された。すなわち $10^{-6.15}$ M の T-593 により、ヒスタミンの用量反応曲線の最大反応が 1/2 に抑えられる。また、(S)-(-)-T-593 存在下、非存在下それぞれの最大反応を 100% として、ヒスタミンの pD₂ 値を算出し、それを元に擬似的に Schild plot を行った結果、その傾きは 1.27 と算出された。

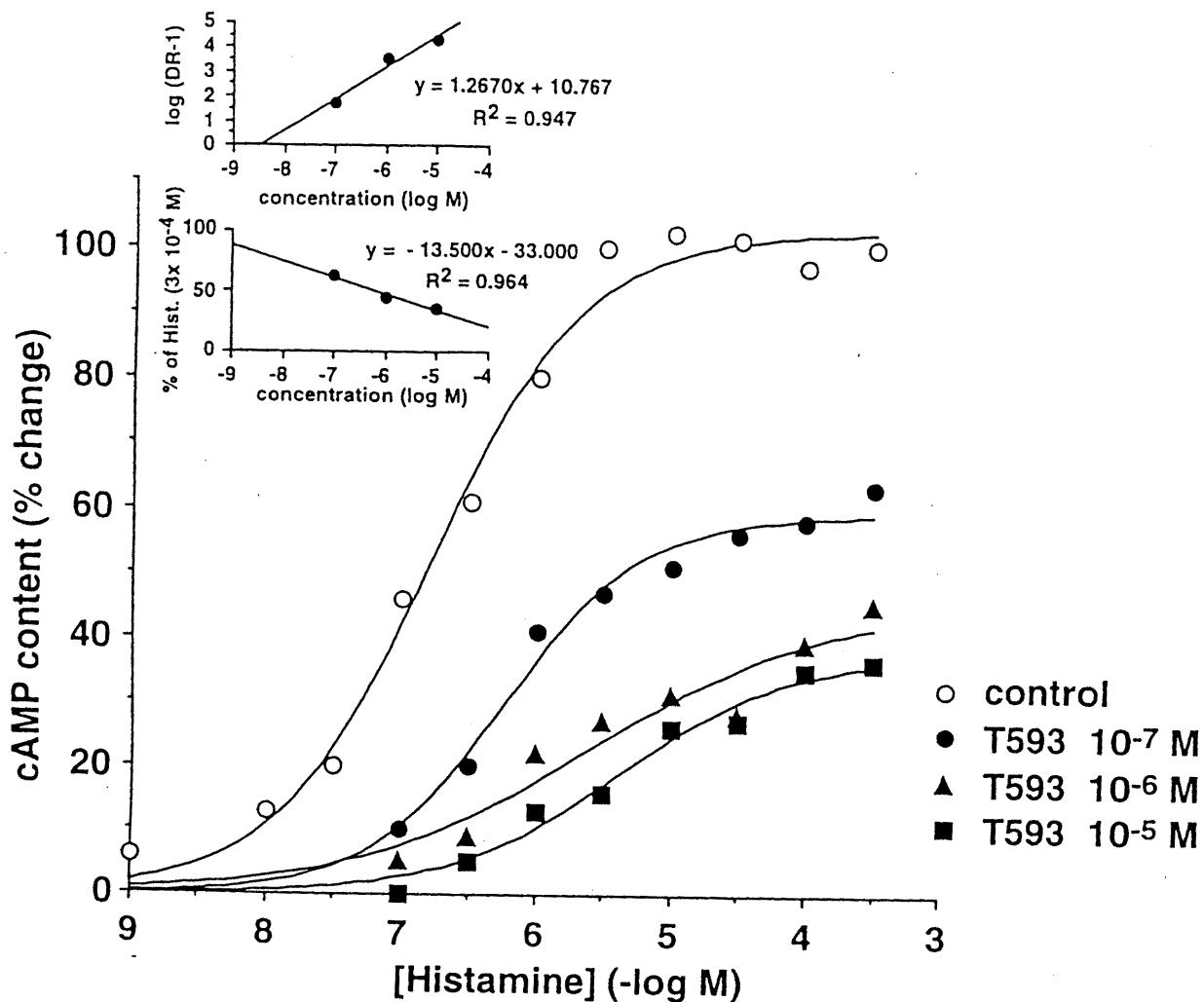
60 分間の刺激時間の結果と対照的に、15 分間の刺激時間では、(S)-(-)-T-593 はヒスタミン H₂受容体に対して競合的拮抗作用を示した。刺激時間が 15 分の際のヒスタミンの ED₅₀ 値は、 2.82×10^{-6} M であった。(S)-(-)-T-593 は 10^{-5} M までは最大反応を抑制することなく、用量反応曲線を右にシフトした(図8)。15 分間の刺激の際は、Schild plot の傾きは 1.178 であり、pA₂ は 6.45 であった。

10^{-7} M または 10^{-6} M の(S)-(-)-T-593 による 10^{-5} M のヒスタミンに対する最大反応の抑制は、15 分では起きず、60 分間処理して初めて達成された。従って (S)-(-)-T-593 の非競合的拮抗作用が、slow onset であることを示唆している[50]。



Concentration-response curves for histamine in the absence (○) and in the presence of ranitidine at concentrations of 10^{-7} M (●), 10^{-6} M (▲) and 10^{-5} M (■) on cAMP generation in Hepa cells expressing canine histamine H_2 -receptors. The cells were incubated for 60 min in the drug mixture. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of histamine ($-\log M$). Data were obtained from duplicated determinations. Fitted logistic curves are superimposed. The inset shows the result of Schild-plot analysis.

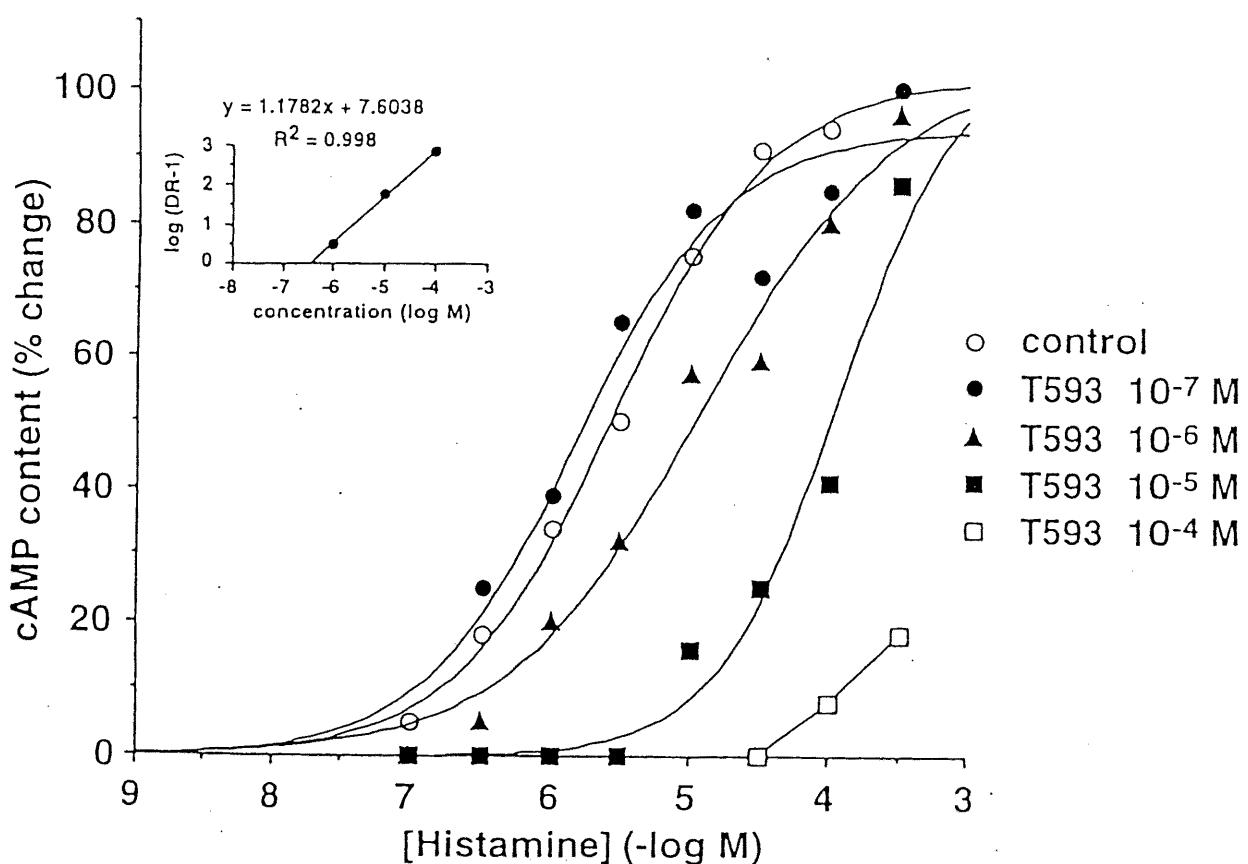
図6。ranitidine の用量反応曲線



Concentration-response curves of histamine in the absence (○) and in the presence of (S)-(-)-T-593 at concentrations of 10^{-7} M (●), 10^{-6} M (▲) and 10^{-5} M (■) on cAMP generation in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptors in incubation for 60 min. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of histamine (-log M). Data are the mean of duplicated determinations. Fitted logistic curves are superimposed, from which EC₅₀ values were calculated.

Insets shows the result of pseudo Schild plot, where EC₅₀ values were estimated by the logit-log plot, and a plot for pD'₂.

図7。T-593 の用量反応曲線(60分)



Concentration-response curves of histamine in the absence (○) and in the presence of (S)-(-)-T-593 at concentrations of 10⁻⁷ M (●), 10⁻⁶ M (▲), 10⁻⁵ M (■) and 10⁻⁴ M (□) on cAMP generation in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptors. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of histamine (-log M). Data are the mean of duplicated determinations. Fitted logistic curves are superimposed, from which EC₅₀ values were calculated.

incubation for 15 min. Inset shows the result of Schild plot, where EC₅₀ value in the presence of 10⁻⁴ M T-593 was estimated by extrapolating the logit-log plot to the logit value of zero.

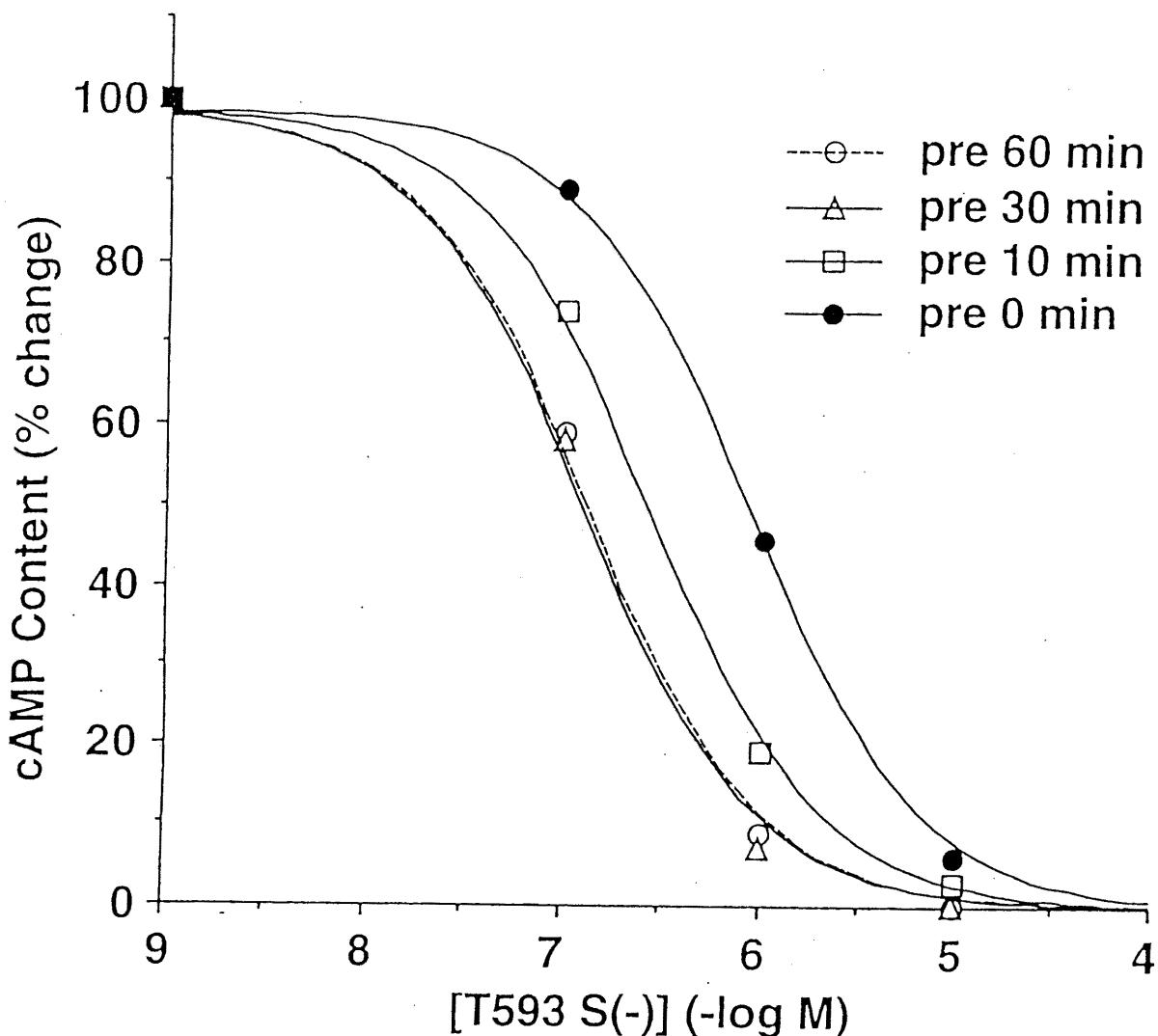
図8。T-593 の用量反応曲線(15分)

3. (S)-(-)-T-593 の効果の時間依存性

(S)-(-)-T-593 の時間依存性を知るために、ヒスタミンによる cAMP 産生に対する、ヒスタミン添加前の(S)-(-)-T-593 の前処置時間の長さの影響を調べた(図9)。(S)-(-)-T-593 の拮抗作用は明白に時間依存性を示し、 IC_{50} 値は前処置時間 0 分、10 分、30 分、60 分で、それぞれ 8.47×10^{-7} M、 2.65×10^{-7} M、 1.23×10^{-7} M、 1.31×10^{-7} M であった。 10^{-7} M の(S)-(-)-T-593 の場合、前処置なしの場合、89%の抑制を示したが、10 分または 30 分の前処置の場合はそれぞれ 74%と 58%の抑制を示した(図9)。60 分の前処置は 30 分の前処置とほぼ同じ反応の抑制を示した。(S)-(-)-T-593 による前処置時間の長さは、拮抗作用を時間依存性を示し、30 分で step-up した。対照的に ranitidine では、前処置時間の長さは、抑制作用に影響を与えたなかった[50]。

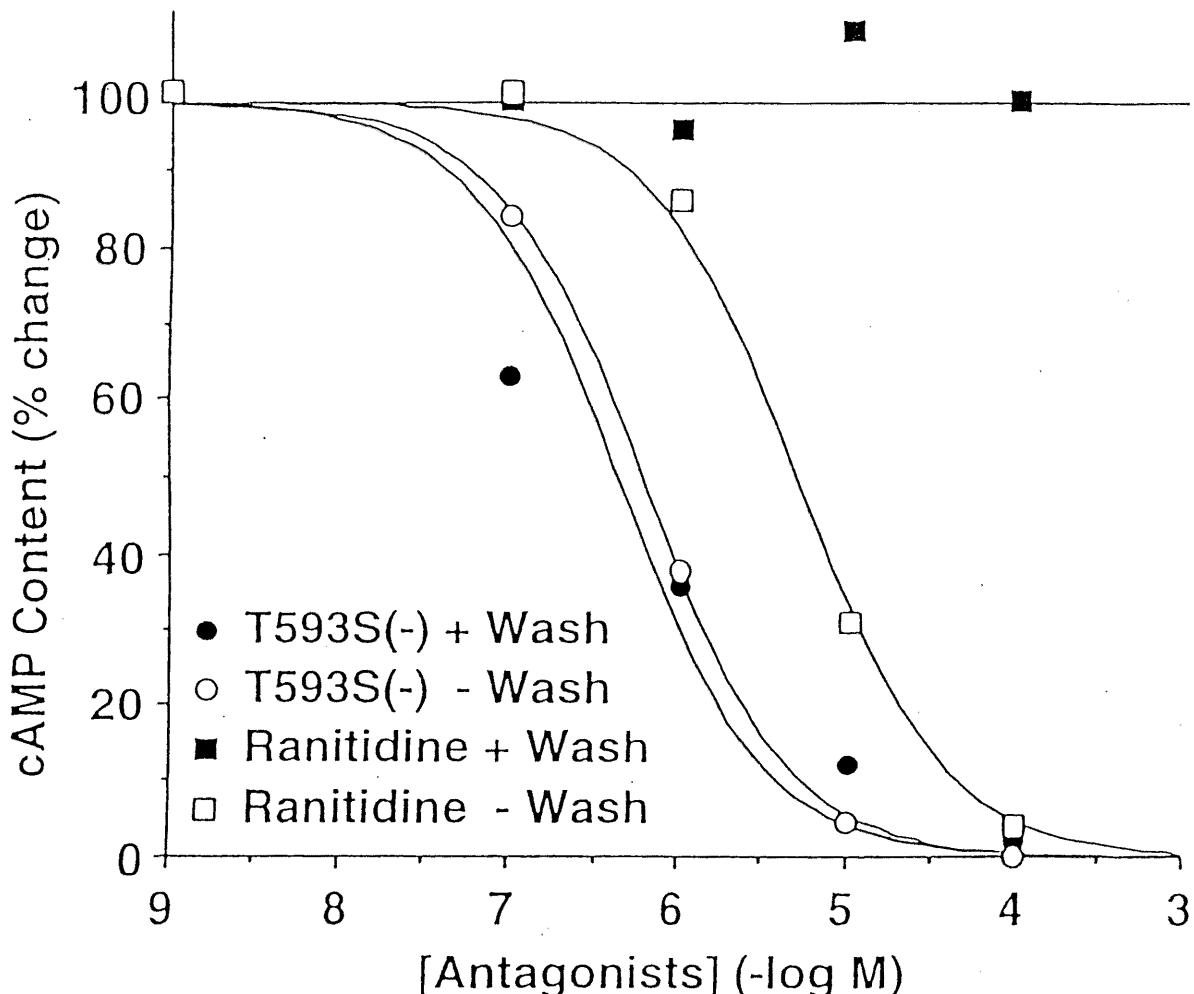
4. cAMP 産生に対する(S)-(-)-T-593 の可逆性: ranitidine との比較

(S)-(-)-T-593 のヒスタミン H_2 受容体拮抗作用の可逆性を調べるために、拮抗薬の洗浄性を調べた。Hepa cell は(S)-(-)-T-593 または ranitidine で 60 分間前処理した後、EBSS で洗浄し 10^{-4} M IBMX 存在下で 10^{-5} M のヒスタミン刺激による cAMP 産生を調べた。ヒスタミン刺激による cAMP 産生に対する(S)-(-)-T-593 の抑制効果は、洗浄による影響をほとんど受けなかった。 IC_{50} 値は 4.32×10^{-7} M で洗浄なしの値とほとんど変わりがなかった。対照的に、ranitidine の拮抗作用は洗浄により消失し、可逆性を示した[50](図10)。



Effect of time for incubation with (S)-(-)-T-593 on the H₂-receptor antagonizing actions of (S)-(-)-T-593 in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptor. The cells were preincubated with (S)-(-)-T-593 for 0 (●), 10 (□), 30 (△) and 60 (○) min and, thereafter, 10⁻⁵ M histamine was subsequently added and further incubated for 30 min. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of (S)-(-)-T-593 (-log M). Data points are from duplicate determinations. Fitted logistic curves are superimposed.

図9。前処置時間



Reversibility of the effect of (S)-(-)-T-593 and ranitidine on cAMP generation in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptor. Cells were preincubated with either (S)-(-)-T-593 (●, ○) or ranitidine (■, □) at each concentration for 60 min, and then, 10⁻⁵ M histamine was added to the cells either after (○, □) or without (●, ■) twice washing with fresh EBSS for further incubation for 30 min. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of antagonists (-log M). Data points were from duplicated determinations. Fitted logistic curves are superimposed.

図10。可逆性

5. 複素環部分の構造同族体の比較検討

T-630, T-656, T-657 と T-593 の比較

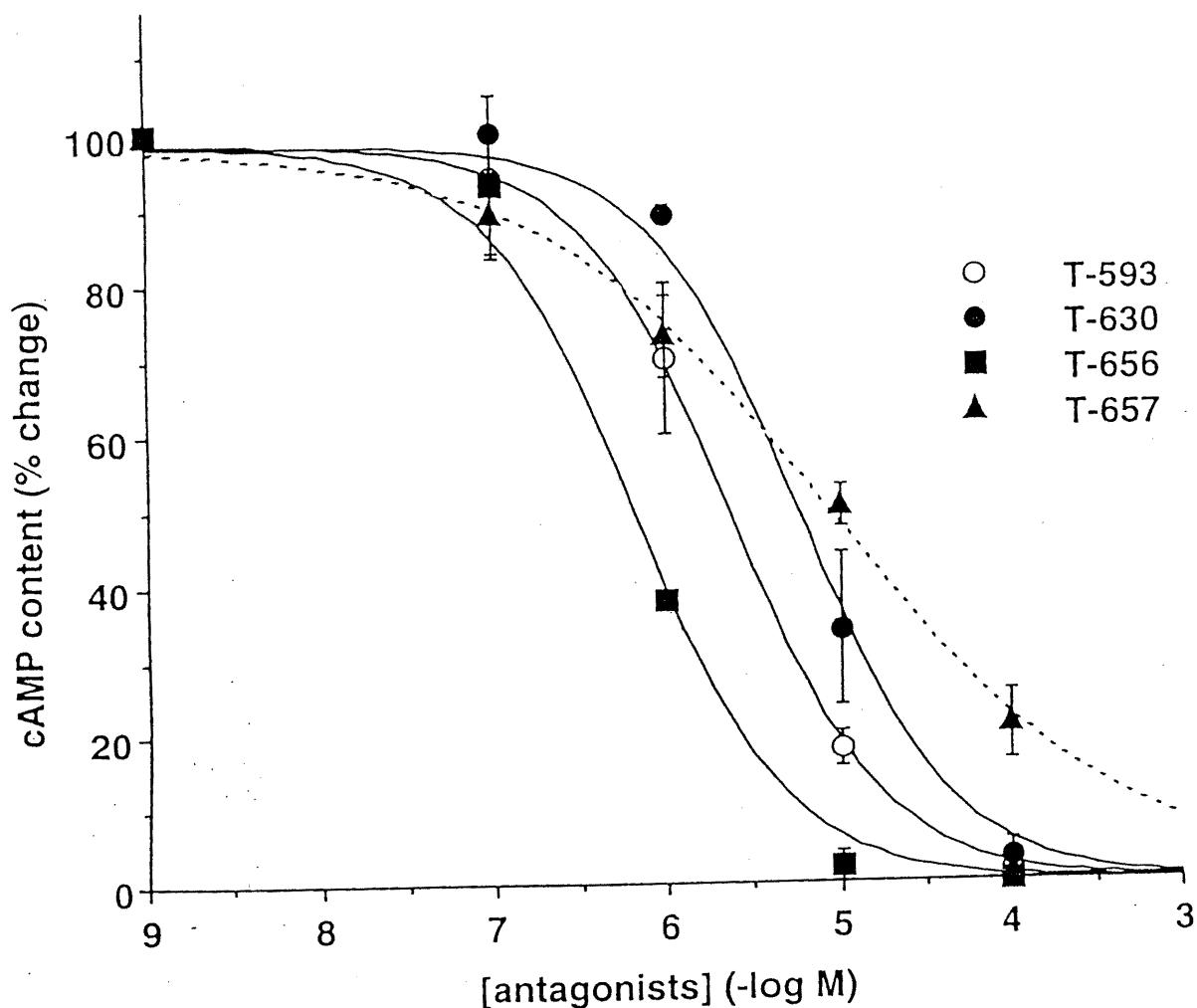
イヌ・ヒスタミン H₂受容体を発現させた Hepa cell における 10⁻⁵ M のヒスタミン刺激による cAMP 産生に対する T-593 の構造異性体 T-630, T-656, T-657 の抑制効果を、T-593 の抑制効果と比較した(図 11)。T-593, T-630, T-656 は濃度依存性にヒスタミン刺激による cAMP 産生を抑制し、その IC₅₀ 値は、それぞれ 2.3 × 10⁻⁶ M, 5.73 × 10⁻⁶ M と 6.49 × 10⁻⁷ M であった。

T-657 の抑制をプロットすると、他の3つの拮抗薬は、Hill 係数が 1 であるのに対してその曲線の Hill 係数は、0.5 と異なり、T-657 は特異的拮抗作用を示さなかった。

T-657 は、ヒスタミン刺激による用量反応曲線に対する影響は小さく、10⁻⁶M, 10⁻⁵M ではほとんどシフトせず、10⁻⁴M の高濃度で、用量反応曲線の右へのシフトがみられた(図 12)。

6. 側鎖の構造同族体の比較検討

T-649 は ranitidine と同様に 60 分間の incubation にて、最大反応を抑制せず、用量反応曲線を右に平行にシフトした(図 13)。

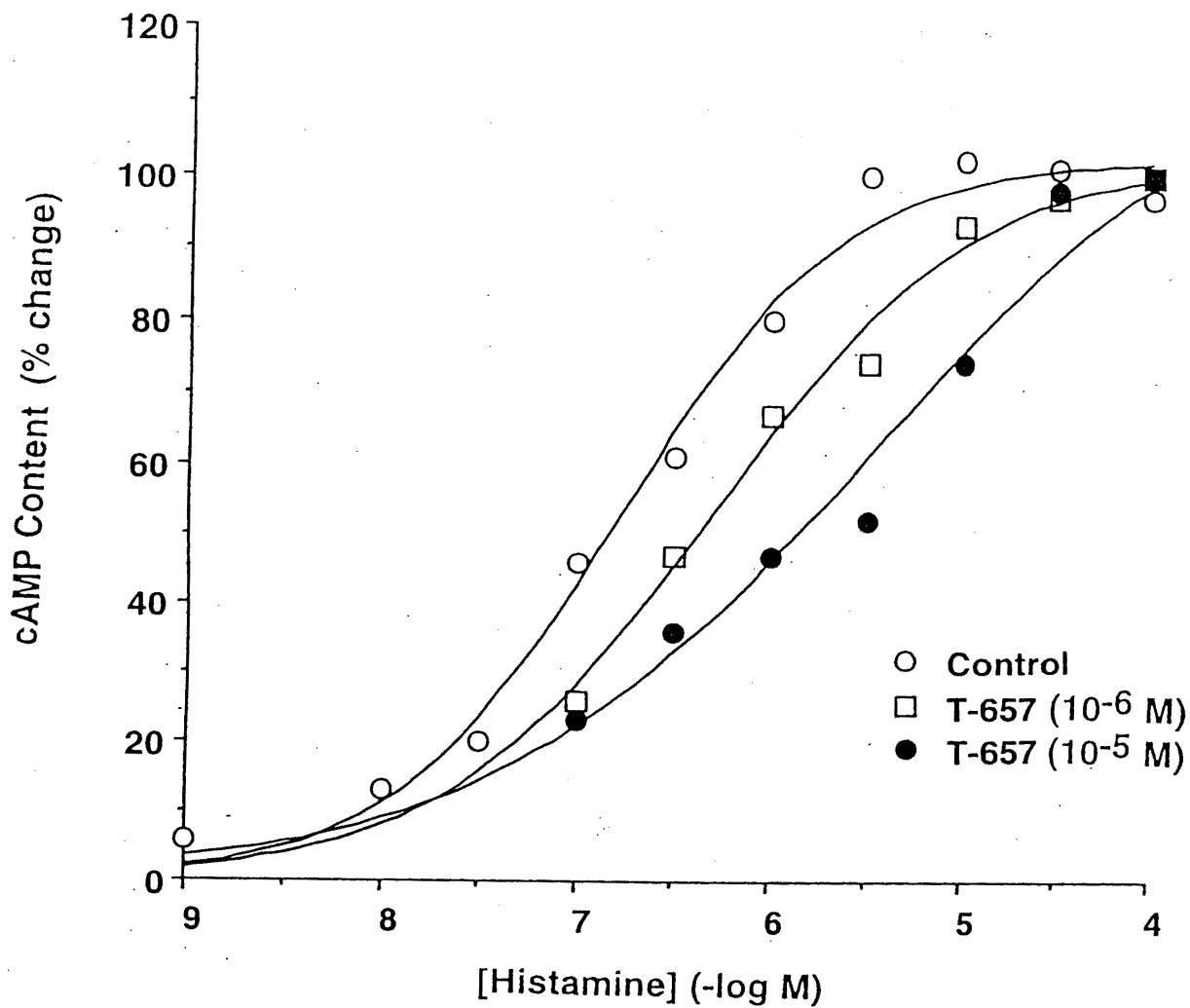


Comparison of the effects of increasing concentrations of (S)-(-)-T-593 (○), T-630 (●), T-656 (■) and T-657 (▲) on cellular cAMP generation stimulated by histamine in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptor. The cells were incubated with the drug mixture, 10⁻⁵ M histamine, 10⁻⁴ M IBMX and each of antagonists for 60 min. The percent increase in cAMP content is plotted against the concentrations of the antagonists. Superimposed are the fitted logistic curves. Data points denote mean ± SEM (n=4)

図11

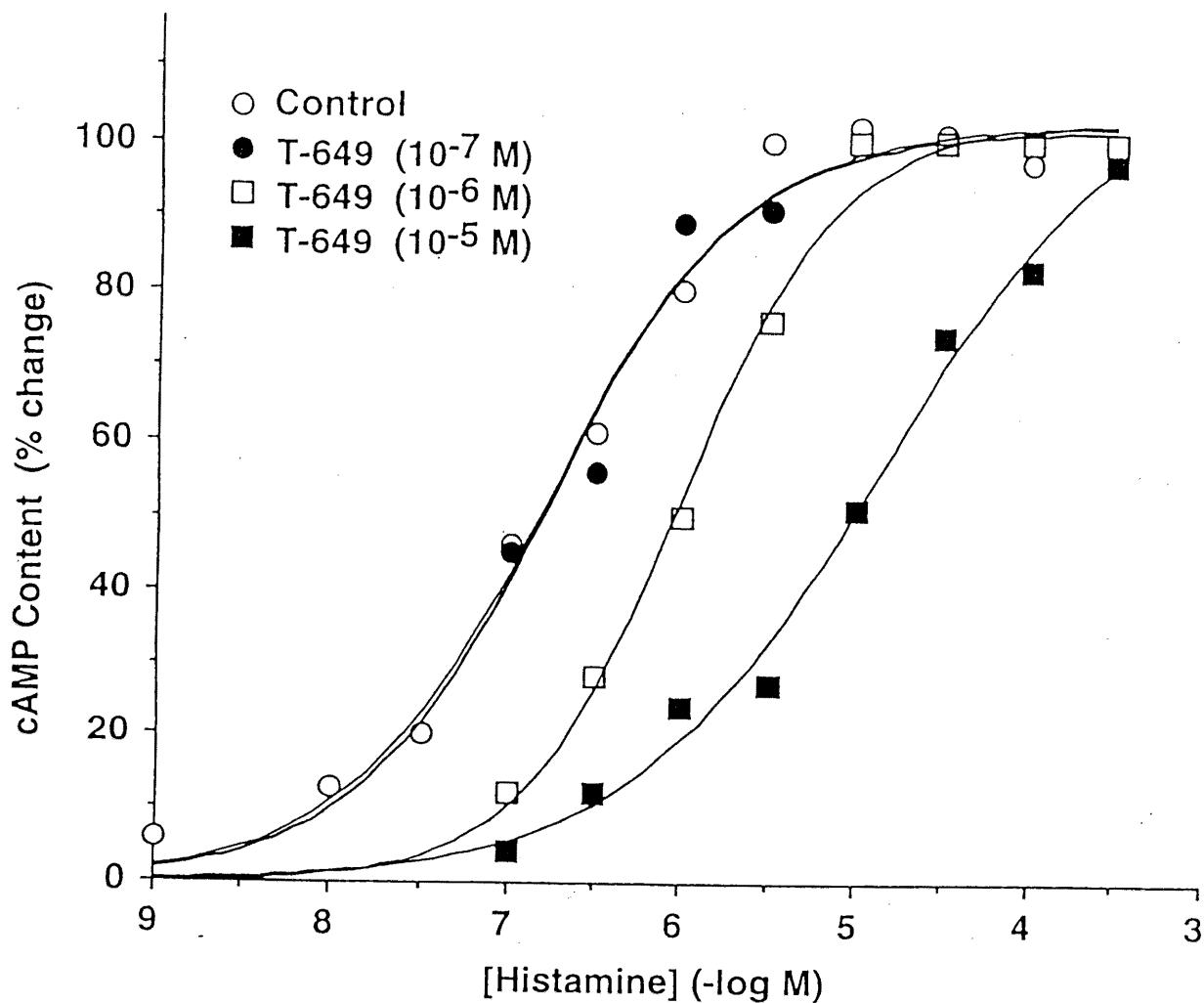
		proton affinity	IC 50	KB
T630		214.12 k cal / mol	5.73E-6	9.08E-8
T593		215.16 k cal / mol	2.30E-6	3.64E-8
T656		216.60 k cal / mol	6.49E-7	1.03E-8

表1。proton affinity



Concentration-response curves for histamine in the absence (○) and in the presence of T-657 at concentrations of 10^{-6} M (□) and 10^{-5} M (●) on cAMP generation in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptors. The cells were incubated for 60 min in the drug mixture. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of histamine (-log M). Data were obtained from duplicated determinations. Fitted logistic curves are superimposed.

図12。T-657 の DR 曲線



Concentration-response curves for histamine in the absence (○) and in the presence of T-649 at concentrations of 10^{-7} M (●), 10^{-6} M (□) and 10^{-5} M (■) on cAMP generation in Hepa cells expressing canine histamine H₂-receptors. The cells were incubated for 60 min in the drug mixture. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of histamine (-log M). Data were obtained from duplicated determinations. Fitted logistic curves are superimposed.

図13

考察

イヌ・ヒスタミン H₂受容体発現細胞における T-593 の薬理作用

ヒスタミン H₂拮抗薬の抑制作用には、2種類の様式がある。Cimetidine [3], ranitidine [5], roxatidine acetate [51]は競合的拮抗薬であり、一方、IT-066 [52], FRG-8813 [53], SK&F94482 [54], BMY-25368 [55, 56, 57], L-642,441 [58,59], loxitidine [60], Wy-45,662 [61]は、非競合的拮抗薬である。Famotidine は幾つかの報告[62, 63, 64, 65]では、競合的拮抗作用を示すと述べられ、他の報告[66, 67]では、非競合的拮抗作用を示すと述べられている。Gaddum ら[25]は、非競合的拮抗作用を、作用の slow onset, 拮抗作用の持続と最大反応の抑制と特徴づけた。イヌ・ヒスタミン H₂受容体を安定して発現する培養細胞系を用いて、我々は(S)-(-)-T-593 がヒスタミンによる cAMP 産生を抑制する事を示した。(S)-(-)-T-593 の拮抗作用は時間依存性に強化された。さらに、(S)-(-)-T-593 の拮抗作用は洗浄により、消失しなかった。これらのデータから(S)-(-)-T-593 は非競合的拮抗薬と分類される。

本研究では、(S)-(-)-T-593 は二段階の拮抗作用を示した。15 分間の刺激時間では、競合的拮抗作用を示し、さらに作用時間を延長すると非可逆的作用により、非競合的拮抗作用を示した。(S)-(-)-T-593 の拮抗作用は刺激の初期は、用量反応曲線を右に平行移動させ、後には最大反応の抑制を伴う。我々が(S)-(-)-T-593 で示したのと同様に、IT-066 も、はじめは競合的拮抗作用を示し、次いで非競合的拮抗作用を示すという二段階の拮抗作用を持つと報告されている[52, 67]。

T-593 は投与された当初は ranitidine と同様にヒスタミンと競合的に拮抗するが、時間経過とともに受容体のある場所と、ranitidine より強い受容体との結合をして、後から添加したヒスタミンと受容体との結合を阻害すると考えられる。しかもその結合が大部分の受容体で形成されるには、15 分間以上 30 分間までの時間が必要である。

Arai らは、guinea pig の摘出右心房において T-593 を添加する 10 分前に、ranitidine を前処置すると陽性変時作用に対する T-593 の非競合的拮抗作用が保護されることを示した[26]。

T-593 分子とヒスタミン H₂受容体蛋白との間の、競合的、非可逆的、slow offset な相互作用の分子機構は未だに知られていない。T-593 と ranitidine の双方は、共に分子内に furan 基を持つ。この二つの拮抗薬の薬理作用の特徴の差と化学構造式の差を比較し、非競合的拮抗薬とヒスタミン H₂受容体の相互作用の分子機構を解明するため、T-593 とヒスタミン H₂受容体の相互作用の分子機構を、構造同族体を用いて検討した。

構造同族体を用いた検討

T-630, T-656 と T-593 の比較により、窒素原子が methyl 化していない T-630 (desmethyl 体), methyl 基が 1 個の T-593 と、2 個の T-656 (dimethyl 体) の窒素原子の proton affinity は、計算上 214.12 k cal / mol, 215.16 k cal / mol, 216.60 k cal / mol であり、IC₅₀ は、それぞれ 9.08×10^{-8} M, 3.64×10^{-8} M, 1.03×10^{-8} M であった [表 1]。methyl 基は、電子対供与体で、窒素原子のような電気陰性度の高い原子に電子対を供与する。methylaminomethyl 基の窒素原子は、aminomethyl < methylaminomethyl < dimethylaminomethyl の順で、負に荷電し、proton affinity が高くなる。10⁻⁵M のヒスタミンに対する抑制効果の IC₅₀ からみると、この順で、拮抗作用が強くなっている。複素環に結合している methylanimomethyl 基の窒素原子が、受容体との結合に関与し、しかもその proton affinity が、拮抗作用の強さに影響を与えていたと考えられた。

T-657 は特異的拮抗作用を示さなかった。T-657 (5H-furan 体) は非常に弱い拮抗作用を示した。ヒスタミン刺激による用量反応曲線に対する影響は小さく、10⁻⁶M, 10⁻⁵M ではほとんどシフトせず、10⁻⁴M の高濃度で、用量反応曲線の右へのシフトがみられた (図 12)。複素環に結合している窒素原子が拮抗作用に必要であると考えられた。

T-649 は ranitidine と同様にヒスタミン刺激の最大反応を抑制しなかった (図 13)。側鎖末端の phenol 基は非競合的拮抗作用に必要であると考えられた。

光学異性体の S(-) 体は強い抑制作用を示すが、その鏡像である R(+) 体は特異的な抑制作用を示さず (図 5)。光学異性体の不斉炭素による各官能基の立体的配置が重要であると考えられる。

T-593 と T-657 の比較により furan 環の 5 位の aminomethyl 基の極性を持つ窒素原子が T-593 の antagonist 活性に必要であることが推測される。さらに、この aminomethyl 基が methyl 化すると、さらに拮抗作用が強くなる事が示された。

2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl 基を持たない T-649 は ranitidine と同様の競合的拮抗作用を示した。T-593, ranitidine, T-649 の構造式 (図 3) を比較すると、ranitidine と T-649 の拮抗力の差は構造式の methylsulfonyl 基と metylnitro 基の違いによる差であり、T-593 の薬理学的特徴である非競合的拮抗作用と非可逆的結合性は 2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl 基に由来していると考えられる。

まとめ

T-593 は ranitidine と同じ複素環 (furan 環) を持つが、競合的拮抗作用をもつ ranitidine と異なり、ヒスタミンの用量反応曲線の最大反応を抑制する非競合的拮抗作

用を示した。さらに、T-593のアナログ体を用いて検討し、T-593の非競合的拮抗作用は、分子に含まれるフェノール環が関与していると推察された。

II. 受容体側の検討

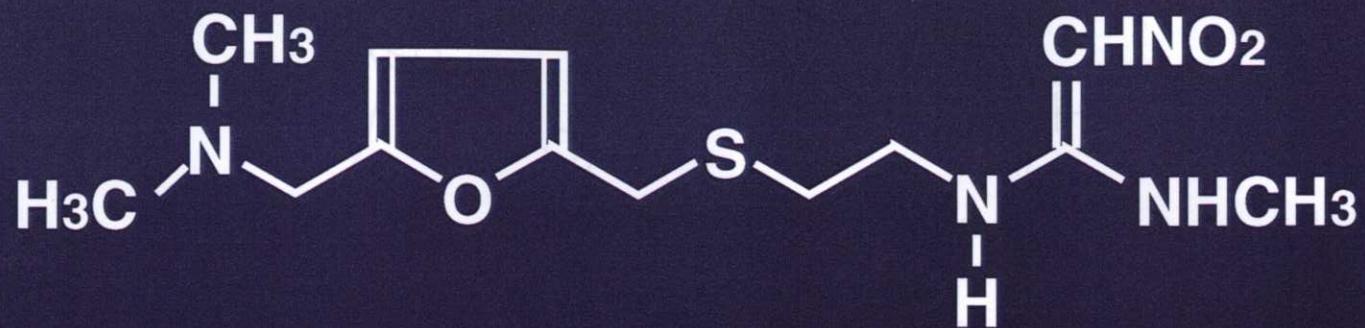
ranitidine と T-593 は複素環部分は共通であり、化学構造式に類似点が多いが、薬理学的特徴に違いがあることが判明した。その違いとは、ranitidine は競合的拮抗作用を持ち、その拮抗作用は易洗浄性であり、一方 T-593 は非競合的拮抗作用を持ち、その拮抗作用は難洗浄性であるという点である。リガンドである競合的拮抗薬と非競合的拮抗薬の構造活性相関の検討を行い、T-593 と ranitidine の化学構造式を比較(図14)すると、この両者の薬理学的特徴を分けているのは、N-2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl 基であると推測された。

次に、この N-2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl 基が、相互作用する相手であるヒスタミン H₂受容体のアミノ酸残基は何かを検討した。

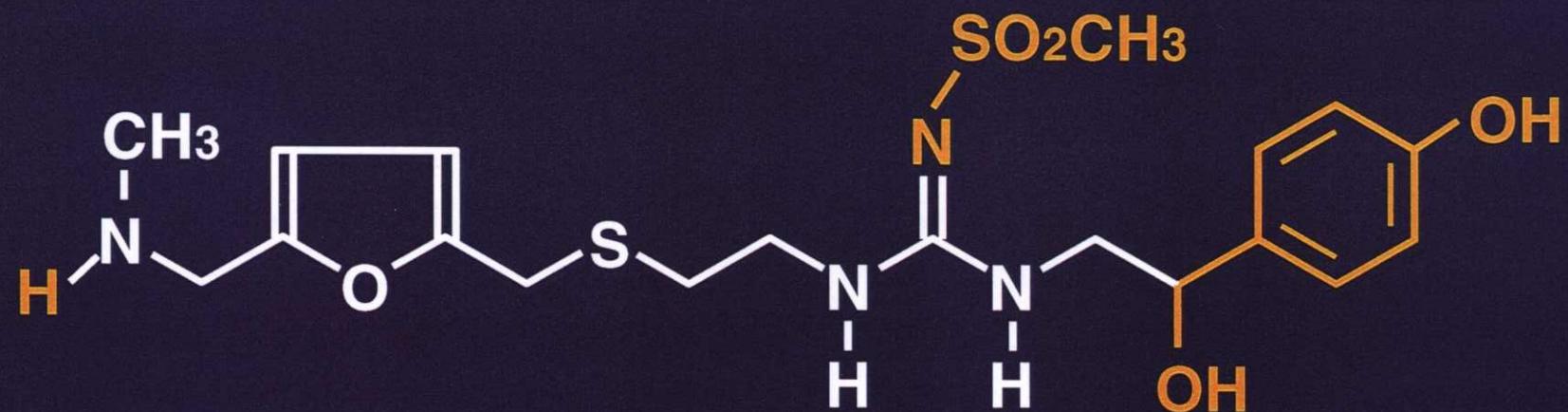
我々は β_2 アドレナリン受容体[68, 69, 70]や他の生理活性アミン受容体での研究[71, 72]を基にし、イヌ・ヒスタミン H₂受容体に点変異を導入した受容体を培養細胞に発現させた系を用いて、ヒスタミンとヒスタミン H₂受容体の結合部位を検討し、ヒスタミン H₂受容体の第3膜貫通領域の 98 番のアスパラギン酸(Asp 98)と、第5膜貫通領域の 186 番のアスパラギン酸残基(Asp 186)、190 番のスレオニン残基(Thr 190)の3つのアミノ酸残基が、ヒスタミンと結合するポケットを形成することが報告されている[73]。しかし、アンタゴニストが受容体分子と結合するモデルの検討はなされていなかった。Ⅱ部では、アンタゴニストが受容体分子と結合するモデルの検討を行う。

ヒスタミン結合部位を検討するために作成した点変異導入遺伝子を発現させた培養細胞を用いた検討、種差によるアミノ酸残基の違いが拮抗薬の薬理特性が異なることを利用した検討、コンピューターを用いて受容体の3次元モデリングを行い受容体・リガンド結合体の最適化計算によりリガンドと相互作用するアミノ酸残基を推察する検討を行った。

Ranitidine



T-593



AKA-34730-02

図14。T-593 と ranitidine の化学構造式の比較

33

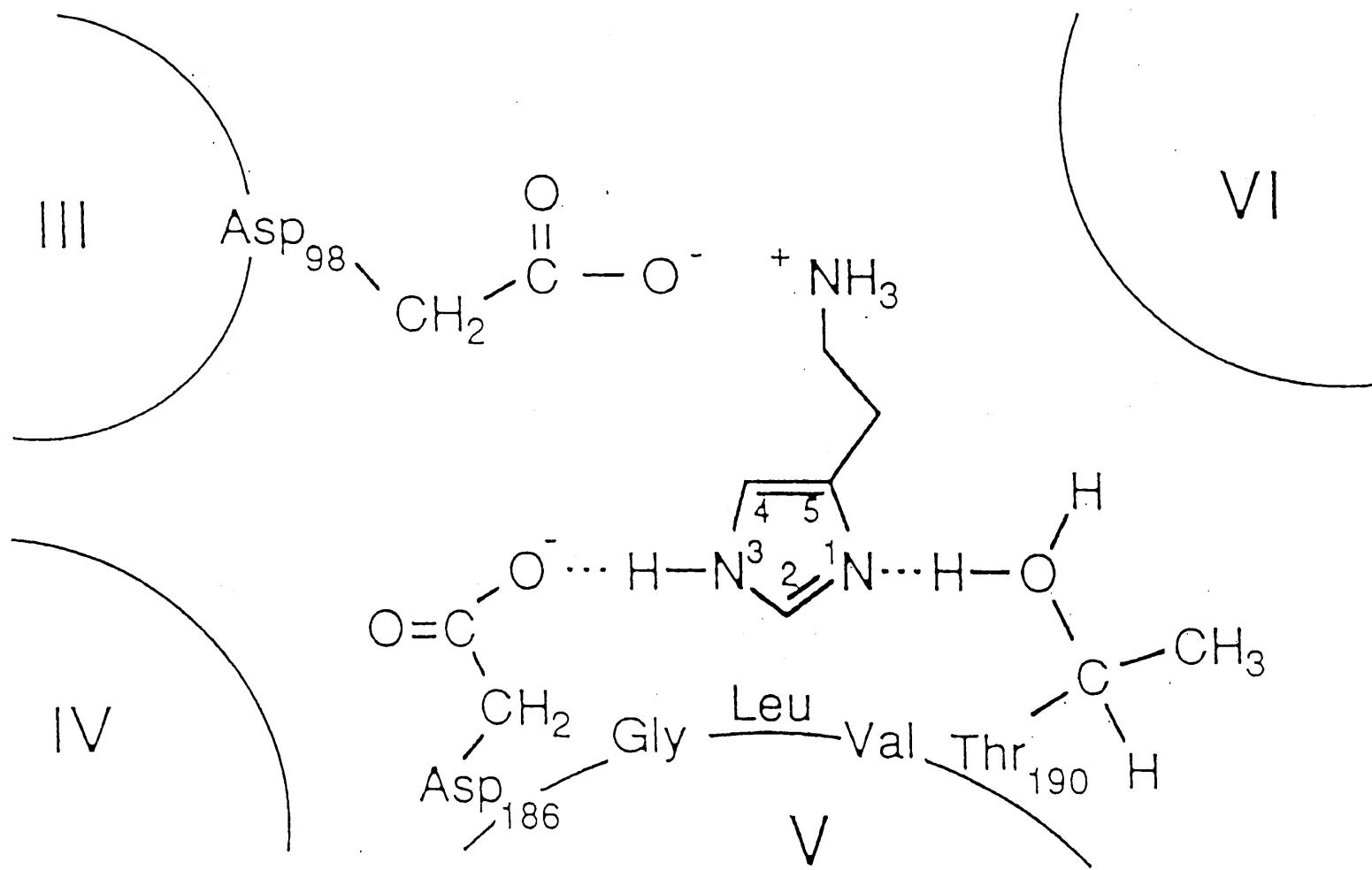


図15。ヒスタミン結合ポケット

方法

1。190 mutation

(1)点変異導入

クローニングされたイヌ・ヒスタミン H₂受容体 wild type(野生型)遺伝子を M13 ベクターにサブクローンし、これを鋳型として、Kunkel の方法[74]を用いて、点変異導入法で、190 番のスレオニンをアラニンに変異させた[73]。(図16)

(2)PCR 法

Bgl II 制限部位核酸配列を、5'側に含んだプライマーを翻訳部位の 5'側端と 3'側端の核酸配列にあわせて作成し、上記 Kunkel 法を用いて変異導入した遺伝子を鋳型に PCR を実行した。

PCR 反応生成物を phenol/chloroform, 1:1 (Vol:Vol) で抽出し、3M sodium acetate で沈殿させた。沈殿物を 80% の ethanol で洗浄した後、制限酵素 Bgl II で処理し、0.7% Seaplaque agarose (FMC) gel で電気泳動した。etidium bromide で染まるバンドを切り出し、有核細胞発現ベクター-CMVneo にサブクローンした。定法により[43]、large scale plasmid preparation を行い、plasmid DNA を CsCl2 法[43]を用いて調製した。

PCR による増幅中に、Taq polymerase による変異がないことを確認するために、double-strand dideoxynucleotide 法を用いて、plasmid vector に組み込まれた(サブクローンされた)変異 H₂受容体遺伝子の翻訳領域の核酸配列を確認した。

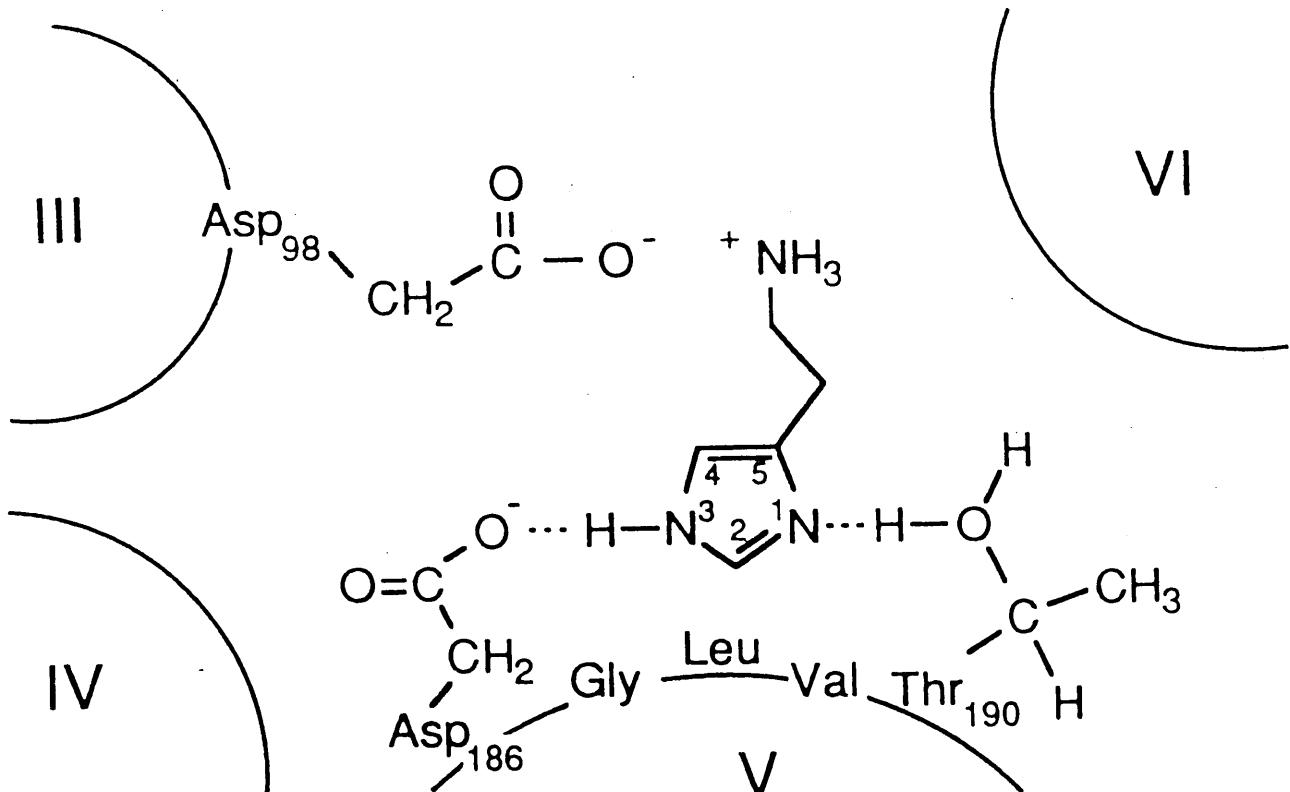
(3)点変異受容体発現ベクターの作製

この遺伝子を PCR 法を用いて増幅した後、有核細胞発現用ベクター-CMVneo[44]の Bgl II site にサブクローンした。

(4)発現

野生型ヒスタミン H₂受容体と同様に、rat hepatoma 由来の hepa cell にリン酸カルシウム共沈法[45]を用いて、T190A 変異 H₂受容体遺伝子 / CMVneo を transfect し、発現させた。

neomycin analogue の G418 1mg/ml を hepa cell 培養用液体培地に添加して培養し、変異遺伝子導入細胞を選択した。



FIFTH TRANSMEMBRANE

WILD TYPE
Ala₁₉₀

186	190
Leu Val Asp Gly Leu Val Thr Phe Tyr	
Leu Val Asp Gly Leu Val Ala Phe Tyr	

図16。T190A mutant

(5) northern blotting

野生型ヒスタミン H₂受容体発現 Hepa cell と同じ方法を用いて, northern blotting 法で, ヒスタミン H₂受容体遺伝子を発現していることを確認した後, northern blotting 上 wild type 受容体遺伝子とほぼ同程度の mRNA を発現しているクローニングを選び, cAMP 産生を調べた。

(6) cAMP 測定

野生型ヒスタミン H₂受容体発現 Hepa cell の測定と同じ方法を用いた。

2. 単離胃腺の調製

イヌおよびウサギの胃粘膜を剥離細切してコラゲナーゼ処理し, 単離胃腺細胞の浮遊液を作製した。

(1) ウサギ単離胃粘膜細胞の調製

ウサギに urethane(40%)を 5~10ml 腹腔投与にて麻酔し, 開腹後, 腹部大動脈に cannulation し, 耳介静脈より heparin (250U/ml)を 2ml 静注後に腹部大動脈から放血して死亡させた。腸間膜中の血管を腸管ごと結紮し腸管への血流を遮断し, さらに開胸して胸部大動脈を cramp し上行血流を遮断して, 腹部大動脈の cannula から, 37°C の PBS を加圧ポンプで 500ml/min の速度で注入した。十分脱血させた後, 胃を摘出し小湾に添って切開し, 胃底部を丸く切り出し PBS で良く洗浄し, 粘液を除去した。胃粘膜をスパーテルで搔き取り, ハサミで mince し, Hank's medium で数回洗浄した。その胃粘膜断片を collagenase (0.1%) buffer (NaCl 130mM, NaHCO₃ 12mM, Na₂HPO₄ 3mM, NaH₂PO₄ 3mM, K₂HPO₄ 3mM, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 1mM, Glucose 4%, Rabbit albumin 2%, Collagenase 0.1%) 55ml 中に加え, 95% O₂ + 5% CO₂を封入し, 37°C, 45 分間攪拌培養し, collagenase で処理した。これを pipetting により分散させた後, nylon mesh (mesh opening 400 μ m)で濾過し単離細胞を得た。これを 700rpm(80xg), 5分間の遠心操作によって Hank's medium (rabbit albumin 1%)で数回洗浄し, 同 medium に再懸濁したものを単離胃粘膜細胞浮遊液とした[75, 76]。

(2) イヌ単離胃粘膜細胞

イヌは実験前日より一晩絶食させた。pentobarbital (50mg/ml)を前肢静脈より6~7 ml 静注して麻酔し, 片側の頸動脈に cannulation (cannula 1.5 x 2.3)した後, 放血屠殺した。胃を摘出後, 小湾に添って切開し, 胃底部を丸く切り出し PBS でよく洗浄し粘液

を除去した。胃底部は氷冷した Hank's medium (NaCl 132.4mM, KCl 5.4mM, Na₂HPO₄ 5.0mM, Na₂H₂PO₄ 1.0mM, MgSO₄ 1.2mM)に浸し、胃粘膜をスパークルで搔き取った。搔き取った胃粘膜をハサミでよく mince し、Hank's medium で数回洗浄した。その胃粘膜断片を collagenase buffer 66ml 中に加え、95% O₂ + 5% CO₂を封入し、37°C, 20 分間の振盪培養を行い collagenase 処理し、分散させた後、nylon mesh (mesh opening 400 μm)で濾過し単離細胞を得た。これを 700rpm(80 x g), 5分間の遠心操作によって Dulbecco's modified Eagle medium で数回洗浄し、再懸濁したものとを単離胃粘膜細胞浮遊液とした。消化・分散されず nylon mesh 上に残った胃粘膜断片は、再び新しい collagenase buffer 66ml の中で同様の操作を繰り返し、得られた細胞浮遊液を合わせた。細胞の収率を上げるために、振盪培養を3回行った[77]。

(3) ¹⁴C-アミノピリン up-take

1) ウサギ単離胃粘膜細胞

重量を秤量した spitz tube に単離胃粘膜細胞浮遊液(2.5~5x10⁶ cell/tube)および ¹⁴C-aminopyrine 0.05 μ Ci と各濃度の薬物を加え 37°C, 15 分間 preincubate した後、histamine を加えて 37°C, 30 分間 preincubate し、反応させた。反応中は 10 分ごとに tube を攪拌した。反応終了後直ちに氷冷し、細胞浮遊液を 3000rpm (1600 x g), 1分間の遠心操作により上清と細胞沈渣に分けた後、上清から 200 μl 取り PCS10ml 加え、そのまま放射活性を測定し、残り上清は捨てた。そして tube ごとの細胞湿重量を秤量した後、乾燥機中で一晩乾燥させて tube ごとの細胞乾燥重量を秤量した。その乾燥細胞に 1N NaOH 400 μl を加え、60°C, 45 分間加温し完全に溶解させた後、Hionic fluor 10ml を加え放射活性を測定した。また、反応液に mitochondria uncoupler である 2,4-dinitrophenol 10⁻⁴M を加えたものを blank として、すべての値から差し引いた。そして Berglindh らの方法[76]に従い、上清と細胞沈渣の放射活性から細胞内、細胞外の aminopyrine 蓄積比(aminopyrine accumulation ratio:AP-AR)を算出して、酸分泌の指標とした。histamine の代わりに medium を加えたものを基礎分泌とし、histamine を加えたものとの差を histamine 刺激の酸分泌とした。

2) イヌ単離胃粘膜細胞

単離胃粘膜細胞浮遊液(2.5~5x10⁶ cells/vial)に ¹⁴C-aminopyrine 0.05 μ Ci と各濃度の薬物を加え 37°C, 15 分間振盪培養した後、histamine を加え O₂ 封入下 37°C, 30 分間振盪培養し反応させた。反応終了後直ちに氷冷し、1200rpm(250 x g), 2分間と 2000rpm(600 x g), 2分間の遠心操作により細胞を洗浄した後、細胞沈渣を 1N NaOH

400 μ l に加温溶解させ、その放射活性を測定した。また、反応液に mitochondria uncoupler である 2,4-dinitrophenol 10-4M を加えたものを blank としてすべての値から差し引いた。放射活性はそのまま aminopyrine 蓄積量(aminopyrine accumulation : AP-A)として酸分泌の指標とした。histamine の代わりに medium を加えたものを基礎分泌とし、histamine を加えたものとの差を histamine 刺激の酸分泌とした。イヌ胃粘膜細胞の場合、内因性 histamine の存在が無視できないので、最大薬物阻害点との差を histamine 刺激酸分泌とした[77]。

(4) ヒスタミン刺激酸分泌に対する薬物の可逆性実験

胃粘膜細胞浮遊液($2.5 \sim 5 \times 10^6$ cells/vial)に T-593 または ranitidine を加え 37°C, 15 分間振盪培養した後、700rpm (80 x g), 5 分間の遠心操作による細胞洗浄を繰り返した。このとき洗浄操作は細胞外液が 10^5 倍以上に希釈されるまで行った。その細胞浮遊液に ^{14}C -aminopyrine 0.05 μ Ci と histamine を加え、上記と同様の方法で aminopyrine 蓄積比・蓄積量を求め、酸分泌の指標とした。

3. ウサギ・ヒスタミン H₂ 受容体遺伝子のクローニング

(1) cDNA 調整法

male New Zealand White rabbit の胃粘膜(fundic mucosa)を、Soll の方法により [36, 77]、粘膜層をガラス製スライドグラスで粘膜下層より鈍的に剥離し、0.1%のウシ血清アルブミン(bovine serum albumin)を含む cold Hank's balanced salt solution 中で、細切した。0.25 (0.35) μ g/ml の collagenase と 1mM EDTA で処理し単離細胞とした後、Beckman JE-6B elutriation system (Beckman) を用いて濃縮した。

70%の壁細胞を含む分画を acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 法 [38]を用いて total RNA を抽出した。この total RNA からオリゴ(dT)セルロースカラムを用いて、poly(A)⁺RNAを得た。この poly(A)⁺RNA より avian myeloblastoma virus reverstranscriptase (seikagaku America, Rockville)を用いて cDNAを得た。

(2) PCR 法によるクローニング

このウサギ壁細胞の cDNAs を鋳型とし、前章で用いたヒスタミン H₂受容体遺伝子翻訳部位の 5'側端と 3'側端の核酸配置にあわせて作製した primer を用いて PCRを行つた。

条件は前章と同じく

denaturation 94°C 1.5min

annealing 45°C 2min

extension 72°C 4min

反応は 30 サイクル行った。

PCR 反応産物を phenol/chloroform, 1:1 (Vol:Vol)で抽出し, 3M sodium acetate で沈殿させた。沈殿物を 80%の ethanol で洗浄した後, 制限酵素 Bgl II で処理し, 0.7% seaplaque agarose (FMC) gel で電気泳動した。

ethidium bromide で染まる約 1kbp(1080bp)のバンドを切り出し, Blue script Vector にサブクローンした。

PCR 産物をサブクローンした Blue script vector を大腸菌に感染させコロニーハイブリダイゼーション法を用いて, ヒスタミン H₂受容体遺伝子を持つクローンを選択した。4つのクローンを選んで mini preparation 法を用いてプラスミド DNA を調製し, これらを double stranded dideoxy nucleotide 法を用いて核酸配列を決定した。PCR によるミスを防ぐために4つのクローンの核酸配列を比較したが, 4つともおなじ塩基配列であった。

4. ヒスタミン H₂受容体三次元構造モデル

コンピュータープログラム “RasMol”を用いて, バクテリオロドシンの構造[20]を基にして, まず β_2 受容体モデルを作成し, ヒスタミン H₂受容体の膜貫通部と β_2 アドレナリン受容体モデルの膜貫通部を比較し[22], ヒスタミン H₂受容体の三次元構造を構築した。

結果

1. 190 番アミノ酸変異(T190A)受容体発現細胞における T593 の洗浄性

変異受容体 T190A を発現した Hepa cell は、ヒスタミン刺激に反応して、濃度依存性に cAMP を產生し、 10^{-4} M でプラトーに達した。変異のない野生型ヒスタミン H₂受容体のヒスタミンの EC₅₀ は、 1.57×10^{-7} M であるが、T190A 受容体の EC₅₀ は、 2×10^{-5} M であった。

T190A 発現 Hepa cell において、T-593 は、ヒスタミン刺激による cAMP 產生を用量依存性に抑制し、ヒスタミン 10^{-5} M 刺激に対する T-593 の IC₅₀ は、 3×10^{-6} M であった。

60 分前処置後2回の洗浄によっても、この T-593 の拮抗作用は消失せず、IC₅₀ に変化は認めなかった。(図17)。

2. ヒスタミン刺激酸分泌に対する T-593 の可逆性の種差の検討

(1) ウサギ胃粘膜細胞

ウサギ胃粘膜細胞に対して、histamine は 10^{-4} M でプラトーに達する酸分泌刺激を示し、最大刺激は基礎分泌の 6.5 倍であった。

ウサギ胃粘膜細胞の histamine 刺激酸分泌に対して、T-593 は抑制作用を示し、 10^{-4} M の histamine 刺激に対する IC₅₀ は、 8.34×10^{-7} M であった。

ウサギ胃粘膜細胞の histamine 刺激酸分泌に対して、T-593 の抑制作用は洗浄操作によって 1 / 166.7 に低下し、IC₅₀ = 1.39×10^{-4} M となった(図18・表2)。ranitidine の拮抗作用は、洗浄操作により消失した。

(2) イヌ胃粘膜細胞

イヌ胃粘膜細胞に対して、histamine は 10^{-6} M から 10^{-4} M まで濃度依存性に酸分泌を刺激し、 10^{-4} M で基礎分泌の 2.9 倍であった。

イヌ胃粘膜細胞の histamine 刺激酸分泌に対して、T-593 は抑制作用を示し、 10^{-4} M の histamine 刺激に対する IC₅₀ は、 1.85×10^{-6} M であった。

イヌ胃粘膜細胞の histamine 刺激酸分泌に対して、T-593 の阻害作用は洗浄操作を行ってもほとんど影響がなく、IC₅₀= 2.24×10^{-6} M であった(図18・表2)。ranitidine の拮抗作用は、洗浄操作により消失した。

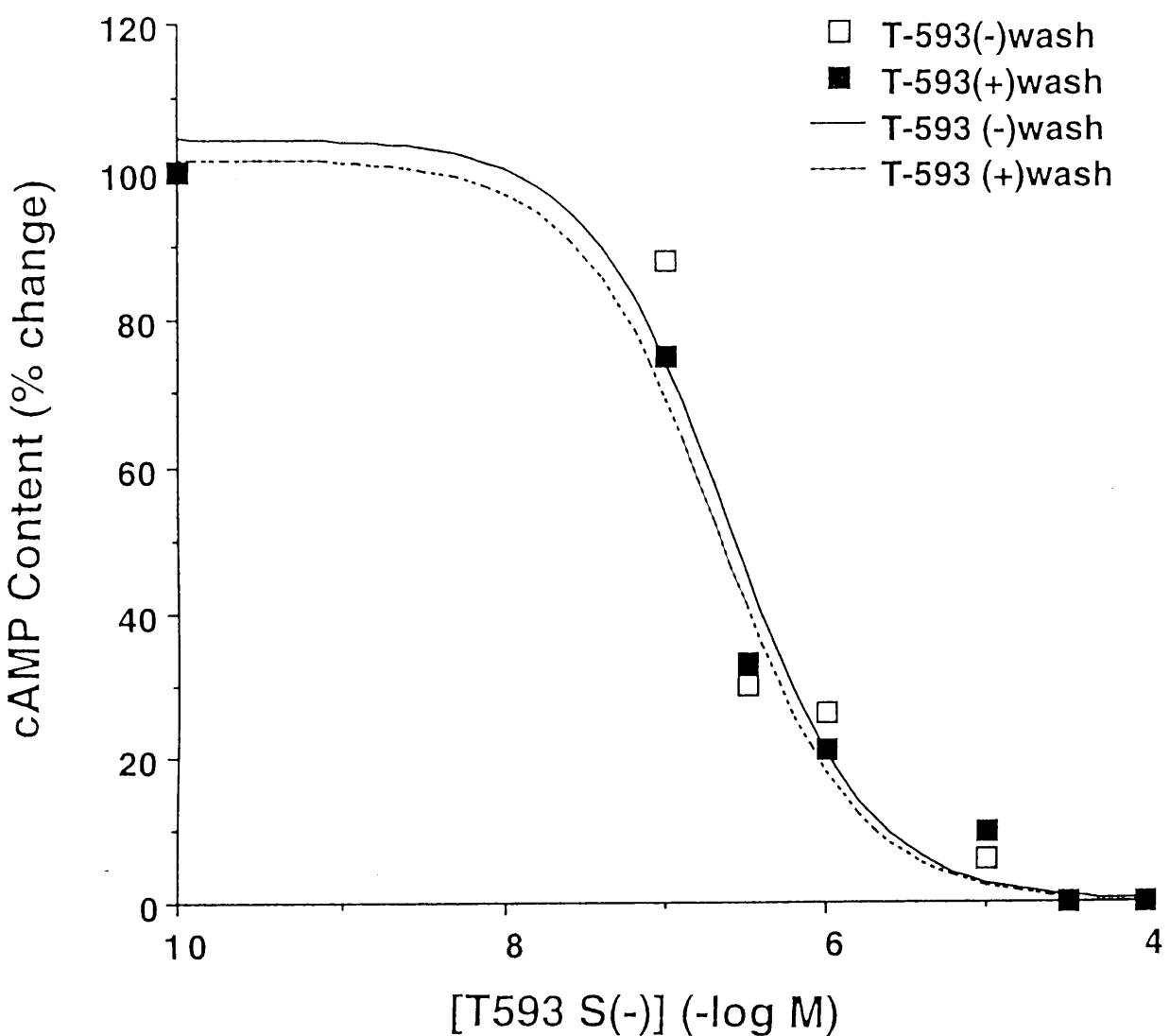
3. ウサギ・ヒスタミン H₂受容体のクローニング

RT-PCRにより、1080bp の PCR 産物が得られた。この遺伝子は、核酸配列において、イヌ・ヒスタミン H₂受容体遺伝子の核酸配列と 84% の相同性を持っており(図19)、ウサギ胃粘膜壁細胞に発現しているウサギ・ヒスタミン H₂受容体遺伝子の cDNA と考えられた。

ヒスタミン H₂受容体蛋白のアミノ酸配列では、ウサギとイヌは 90% の相同性を持っている(図20)。両者を比較すると膜貫通部のアミノ酸配列は比較的共通しており、特にヒスタミンが結合する、⁹⁸Asp, ¹⁸⁶Asp, ¹⁹⁰Thr は、共通して保たれていた。

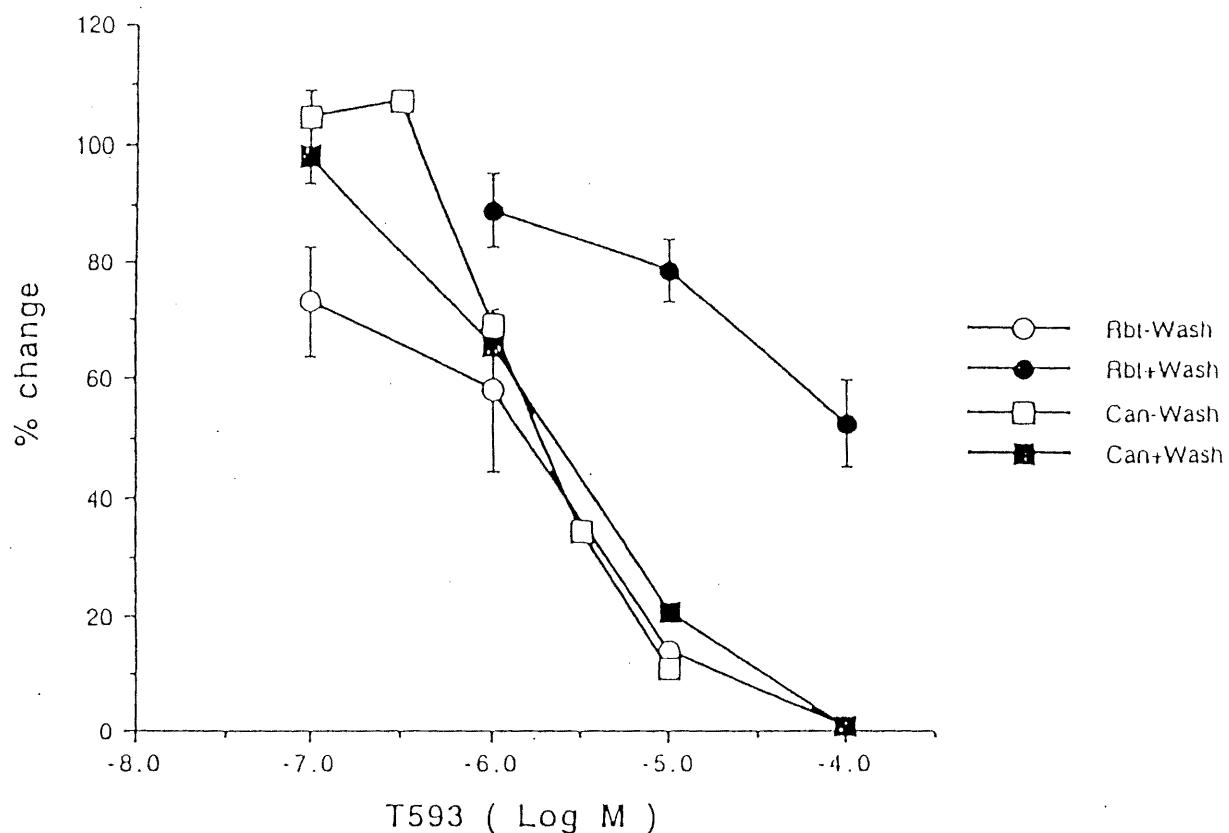
4. ヒスタミン H₂受容体三次元構造モデル

T-593 とヒスタミン H₂受容体がどのように結合しているかを検討するため、コンピューターを用いて、遺伝子クローニングで得られたイヌ・ヒスタミンH₂受容体のアミノ酸一次配列から、受容体の三次元構造モデルを構築した。ついで、リガンドー受容体複合体のエネルギー最小化計算を行い、構造を最適化した結果を図に示す。(図21、図22、図23)



Reversibility of the effect of (S)-(-)-T-593 on cAMP generation in Hepa cells expressing mutant histamine H₂-receptor (T190A). Cells were preincubated with (S)-(-)-T-593 at each concentration for 60 min, and then, 10⁻⁵ M histamine was added to the cells either after (■) or without (□) twice washing with fresh EBSS for further incubation for 30 min. Ordinate; the percent elevation in cAMP content. Abscissa; concentration of antagonists (-log M). Data points were from duplicated determinations.

図17。T190AにおけるT-593の洗浄性



Effects of washing the mucosal cells after treatments with T-593 on ^{14}C -aminopyrine accumulation stimulated by histamine in gastric mucosal cells isolated from rabbit (\circ , \bullet) and canine (\square , \blacksquare).

Cells were preincubated with drug for 15 min and washed with medium until extracellular medium was diluted over 10^5 -fold. Then the cells were added ^{14}C -aminopyrine and histamine 10^{-4} or 10^{-5}M and incubated for 30 min, after (\bullet , \blacksquare) or without (\circ , \square) washing with medium. Each value represents the mean of the percentage of the response stimulated by histamine without T-593. ($N=3\sim 5$)

図18 種差

<u>Animal</u>	<u>without washing</u>	<u>with washing</u>	<u>times</u>
Rabbit	8.34×10^{-7} M	1.39×10^{-4} M	166.7
Canine	1.85×10^{-6} M	2.24×10^{-6} M	1.2

Summary of the IC₅₀ values of T-593 on ¹⁴C-aminopyrine accumulation stimulated by histamine in gastric mucosal cells, or in gastric mucosal cells washed with medium after stimulated by histamine, isolated from rabbit or canine. IC₅₀ values were calculated by linear regression after Logit analysis of each response percentage. Values (times) was ratio obtained from dividing IC₅₀ (with washing) by IC₅₀ (without washing).

表2

1	ATGGCAGCCAATGACACAGCCCTTCGCTTGCCCTGGAATCTACTGCGTTCAAGCTCAC	60
1	M A A N D T A S S S C L E S T A F K L T	20
61	CTCAGTGTGGTCCTCACCGTCCCATCCTCATCACCGGCACCGGGAACGTGGTCGTG	120
21	L S V V L T V L I L I T G T G N V V V C	40
121	CTGGCCGTGGGCTTGAACCGCCGCCCTCCGCAGCCTGACCAATTGCTTCATCGTGTCTG	180
41	L A V G L N R R L R S L T N C F I V S L	60
181	GCCATCACCGACCTGCTCCTCGGCCTCCGGCTCGCTCCCTCTCGGCCATCTACCAGCTG	240
61	A I T D L L L G L L V L P F S A I Y Q L	80
241	TCCCTGCAGGTGGAGCTCGGCAAGGTCTCTGCAATATCTACATCACGCCCTGGACGTGATG	300
81	S C R W S F G K V F C N I Y I S L D V M	100
301	CTGTGCACGGCCTCCATTCTCAACCTCTTCATGATCAGCCTCGACCGGTACTGCCCGTC	360
101	L C T A S I L N L F M I S L D R Y C A V	120
361	ACGGACCCGCTGCGGTACCCCTGTGCTCGTCACCCCAGGCCGGTCACCATCTCGCTGGTC	420
121	T D P L R Y P V L V T P G R V T I S L V	140
421	TCCATCTGGGTCACTCTCCATCACCTGTCTCTGTCATCCACCTGGGCTGAAACAGC	480
141	S I W V I S I T L S F L S I H L G W N S	160
481	AGGAGCACGACCAGCGAGGCCACACACCAGCCCCAAGTGCAAATTCCAGGTCAATGAG	540
161	R S T T S E G H H T S P K C K F Q V N E	180
541	GTGTATGGGTTGGTGGACGGCCTCGTCACCTCTACCTGCTCTGCTGATCATGTGTGTC	600
181	V Y G L V D G L V T F Y L P L L I M C V	200
601	ACCTACTACCGCATCTCAAGATCGCCCGGGAGCAGGCCAGGAGATCAATCACATCAGC	660
201	T Y Y R I F K I A R E Q A R R I N H I S	220
661	TCCTGGCAGGCAGCCACCATCAGGGAGCACAGGCTACTGTGACACTGGCGCCGTGATG	720
221	S W Q A A T I R E H K A T V T L A A V M	240
721	GGGGCCTTCATTGTCTGCTGGTTCCCTACTTCACCCATTTGTTACCGGGGCTCAAA	780
241	G A F I V C W F P Y F T T F V Y R G L K	260
781	GGGGATGACGCCATCAACGAGGTGGAGGCCGTTGTTCTGTGGCTGGCTATGcAAC	840
261	G D D A I N E V V E A V V L W L G Y A N	280
841	TCAGCCTGAACCTATCCTGTACGCTGCCCTGAACAGAGACTTCGCACGCCCTACCA	900
281	S A L N P I L Y A A L N R D F R N A Y Q	300
901	CAGCTCTCTGCTGCAGGCTGGCAGGACGCCGGCTCCCATGAAACGTGCTGAGGTTAAC	960
301	Q L F C C R L A G R G S H E T C L R F N	320
961	AACGCTCTCCGCCAAGGCCAAAGTCAGAGGCCAGGCCAGGCaGGAGGAAGAGAAACCCCTG	1020
321	N A L L P K S Q S Q E P R Q Q E E K P L	340
1021	AAGCTCCAGGTGTGGAGTGGGACAGAAGGCCAGGCCAGGCaGGAGGCCACAGACAGGTAA	1080
341	K L Q V W S G T E A T A P Q G A T D R *	360

The nucleotide and amino acid sequence (in single-letter code) of the rabbit histamine H₂ receptor gene.

図19 ウサギ・ヒスタミンH₂受容体の核酸・アミノ酸配列

H2rdogn	1 MISNGTGSSF CLDSPPCRIT VSVVLTVLIL ITIAGNVVVC LAVGLNRRRLR	I	50
H2rrbtprt	-AA-D-A--S --E-TAFKL- L----- --GT-----		
H2rhumn	-AP---A--- -----TA-K-- IT---A--- --V-----		
H2rdogn	51 SLTNCFIVSL AITDLLLGLL VLPFSAFYQL SCRWSFGKVF CNIYTSLDVM	II	100
H2rrbtprt	----- -----I----- -----I-----		
H2rhumn	N----- -----I----- --K-----		
H2rdogn	101 III LCTASILNLF MISLDRYCAV TDPLRYPVLI TPVRVAVSLV LIWVISITLS	IV	150
H2rrbtprt	----- -----V --G--TI-- S-----		
H2rhumn	----- M-----V -----I-----		
H2rdogn	151 FLSIHLGWNS RNETSSFNHT IPKCKVQVNL VYGLVDGLVT FYLPLLVMCI	V	200
H2rrbtprt	----- -ST--EGH-- S---F---E ----- -----I--V		
H2rhumn	----- KG--- TS-----E ----- -----I--		
H2rdogn	201 TYYRIFKIAR DQAKRIHHMG SWKAATIGEH KATVTLAAVM GAFIICWFYV	VI	250
H2rrbtprt	----- E--R--N-IS --Q---R-- -----V-----		
H2rhumn	-----V-- -----N-IS -----R-----		
H2rdogn	251 FTVFVYRGGLK GDDAINEAFE AVVLWLGYAN SALNPILYAT LNRDFRTAYQ	VII	300
H2rrbtprt	-----T-----VV----- -----A-----N---		
H2rhumn	-----A-----R -----VL- -I----- -----A-----G--		
H2rdogn	301 QLFRCRPASH NAQETSLRSN SSQQLARNQSR EPMRQEEKPL KLQVWSGTEV		350
H2rrbtprt	-----C--L--GR GSH--C--F-- NAL--PKS--Q --RQ----- -----A		
H2rhumn	-----Q--C--L--NR -SHK----- A-Q-S-T----- RQ-----		
H2rdogn	351 TAPRGATDR*		
H2rrbtprt	-----Q-----*		
H2rhumn	-----Q-----*		

Amino acid sequence (in single-letter code) of the canine histamine H₂ receptor. The rabbit histamine H₂ receptor and the human histamine H₂ receptor were identical except as noted by different amino acids beneath the canine receptor sequence. The sequences encoding the seven putative transmembrane regions are indicated by the over lines.

図20。ウサギ H₂受容体、イヌ H₂受容体とヒト H₂受容体のアミノ酸の比較

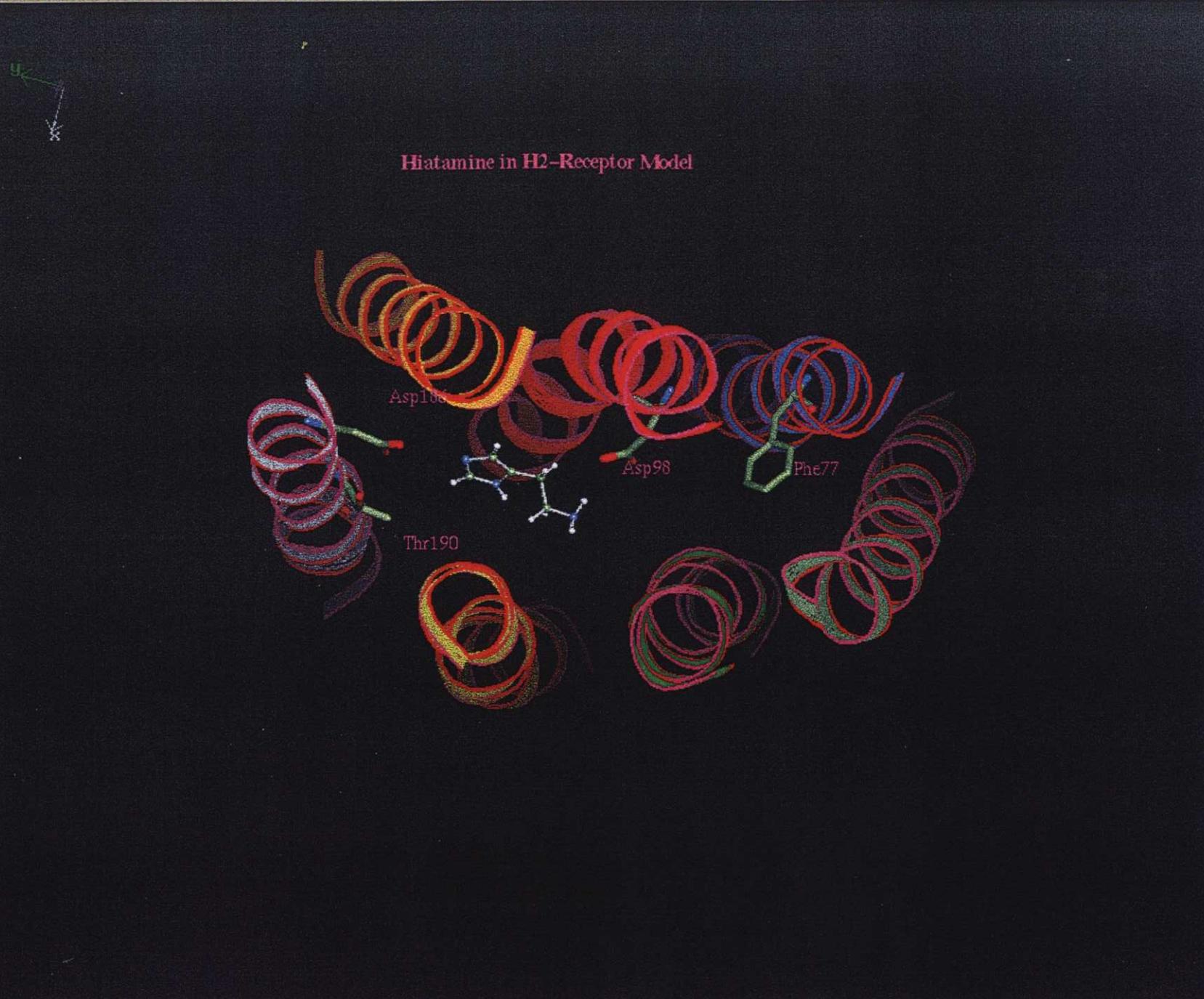


図21。ヒスタミンーヒスタミン H₂受容体複合体の三次元構造モデル

Y
Z

Ranitidine in H₂-Receptor Model

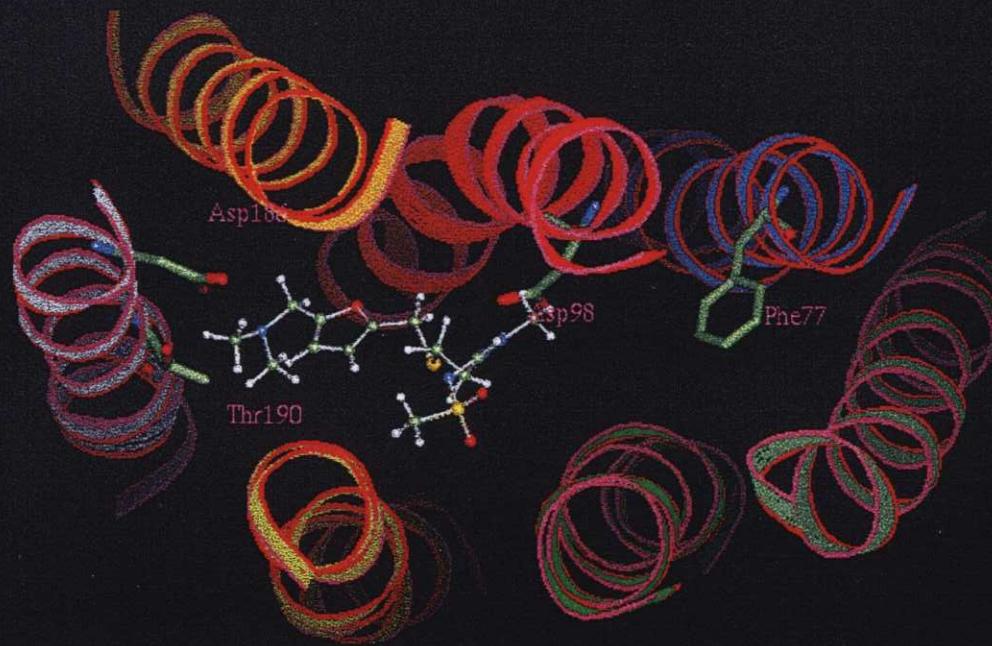


図22。ラニチジン-ヒスタミンH₂受容体複合体の三次元構造モデル



図23。T-593—ヒスタミンH₂受容体複合体の三次元構造モデル

考察

T-593 分子とヒスタミン H₂受容体蛋白との間の、競合的、非可逆的、slow offset な相互作用の分子機構は未だに知られていない。T-593 と ranitidine の双方は、共に分子内に furan 基を持つが、ranitidine は競合的拮抗作用を持ち、その拮抗作用は易洗浄性であり、一方 T-593 は非競合的拮抗作用を持ち、その拮抗作用は難洗浄性であるという点で薬理学的特徴は異なる。この二つの拮抗薬の薬理作用の特徴の差と化学構造式の差を比較し、非競合的拮抗薬とヒスタミン H₂受容体の相互作用の分子機構を解明するため、T-593 とヒスタミン H₂受容体の相互作用の分子機構を、I 部で、構造同族体を用いて検討した。その結果、この両者の薬理学的特徴を分けているのは、N-2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) ethyl 基であると考察された。II 部では、この N-2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) ethyl 基と、相互作用する受容体のアミノ酸残基を検討する。

第一に、ヒスタミン結合ポケットを構成する3つのアミノ酸残基が T-593 の特徴的な薬理作用に関与しているか検討した。

H₂受容体のヒスタミン結合部位のひとつである 190 番のアミノ酸残基のスレオニンを変異させた変異受容体を用いても、難洗浄性は変化しなかった事より、190 番のスレオニンは、T-593 と難洗浄性に関与する結合をしていないと考えることができる。

186 番の変異遺伝子を発現させた細胞は、実験に供することが出来なかつたため、直接データはないが、文献 73 によると、186 番のアスパラギン酸残基は、ヒスタミン H₂拮抗薬に特異的であり、また 186 番のアスパラギン酸を変化させた受容体は、cimetidine や ranitidine の H₂拮抗薬を認識せず、ヒスタミン刺激による cAMP 産生は抑制されない[78]ことを考えると、186 番のアスパラギン酸と、T-593 分子との結合は、ranitidine と T-593 の双方のヒスタミン H₂拮抗作用に必須であり、ranitidine は競合的拮抗作用を持ち、その拮抗作用は易洗浄性であり、一方 T-593 は非競合的拮抗作用を持ち、その拮抗作用は難洗浄性であるという薬理学的特徴の違いを分けている結合には、関与していないのではないかと考えた。

N-2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl 基はヒスタミン H₂受容体の 98 番、186 番、190 番のアミノ酸残基よりなるヒスタミン結合ポケット以外のアミノ酸残基と相互作用している可能性があると推論した。ヒスタミン H₂受容体のどのアミノ酸残基が、T-593 の hydroxyphenyl 基と相互作用(結合)しているか検討するために種差を用いた検討をし

た。

イヌ単離胃腺とウサギ単離胃腺におけるT-593の薬理作用の種差を用いた検討

Beinbornら[79]は、イヌとヒトのCCK-B/gastrin受容体で、種差による1つのアミノ酸の違いにより、アンタゴニストであるL365260とL365218の受容体に対する親和性が異なることを示した。

イヌとウサギの単離胃粘膜細胞におけるT-593の拮抗作用の洗浄性を比較し、イヌではT-593の拮抗作用は洗浄されないが、ウサギ単離胃粘膜細胞では、T-593の拮抗作用が、洗浄により166.7分の1に低下し、種差を示した。

次に、ウサギ壁細胞よりmRNAを抽出し、ウサギ・ヒスタミンH₂受容体遺伝子をcDNAクローニングし、核酸配列を決定しアミノ酸配列を同定した。

イヌのH₂受容体のアミノ酸配列と比較すると、アミノ酸配列では、ウサギとイヌは90%の相同性を持っている。特に膜貫通部のアミノ酸配列は比較的共通しており、特にヒスタミンが結合する、⁹⁸Asp, ¹⁸⁶Asp, ¹⁹⁰Thrは、共通して保たれていた。

イヌとウサギの単離胃粘膜細胞における、T-593による拮抗作用の洗浄性の種差を来しているアミノ酸の違いを検討した。生理活性アミン受容体で、リガンド結合に関与していると考えられる膜貫通部において、イヌ・ヒスタミンH₂受容体のアミノ酸と、ウサギのアミノ酸は、第1膜貫通部で2つ、第2膜貫通部で1つ、第3膜貫通部で1つ、第4膜貫通部で3つ、第5膜貫通部で3つ、第6膜貫通部で2つ、第7膜貫通部で1つの、13個のアミノ酸が異なっていた。この中で、T-593の拮抗作用の洗浄性に影響を与える可能性のあるアミノ酸を同定するために、次のような条件で、イヌ受容体とウサギ受容体のアミノ酸が異なるものを選んだ。

分子間の特異的相互作用のもとになる非共有結合として、(1)イオン結合、(2)水素結合、(3)疎水結合の一つであるπ-π相互作用が挙げられる。蛋白質を構成するアミノ酸のうち、上記の3つの結合に関与するアミノ酸は、塩基性側鎖、酸性側鎖、非荷電極性側鎖、芳香族側鎖を持つアミノ酸である。リガンドと結合すると考えられている膜貫通部のなかで、イヌとウサギのアミノ酸配列を比較して、イヌからウサギへの違いが、強い相互作用を持つ可能性のあるアミノ酸残基から、より弱い相互作用を持つアミノ酸残基に変わっているものを検討すると、(1)77番のフェニルアラニン残基が、イソロイシンに、(2)95番のスレオニンがイソロイシンに、(3)269番のフェニルアラニンがバリンに変わっている3つのアミノ酸の違いが候補に挙がった。

この中で、どのアミノ酸が可能性が高いか検討するために、コンピューターによる3次元モデリングの手法を用いて、検討を行った。

コンピューターによる3次元モデリング

幾つかのG蛋白質連関受容体で、三次元モデリングをコンピューターを用いて、行なわれている[21, 22, 23]。ヒスタミン H₂受容体において、この手法を用いて三次元構造のモデリングを行った。

リガンドー受容体複合体のエネルギー最小化計算を行い、構造を最適化した結果、ヒスタミン-ヒスタミン H₂受容体複合体の三次元構造モデルでは、点変異受容体を発現させた細胞を用いた研究で示された Asp98, Asp186, Thr190 の3つのアミノ酸残基と相互作用する位置にヒスタミンが配位された。(図21)

第一世代 H₂拮抗薬で、競合的拮抗薬のラニチジン-ヒスタミン H₂受容体複合体の三次元構造モデルでは、ラニチジンは、ヒスタミンと同じ3つのアミノ酸残基と相互作用する位置に配位された。(図22)

第二世代 H₂拮抗薬で、非競合的拮抗薬の T-593-ヒスタミン H₂受容体複合体の三次元構造モデルでは、T-593 はヒスタミン結合ポケットを形成する3つのアミノ酸のほかに、イヌとウサギの種差により指摘された第2膜貫通領域の 77 番のフェニルアラニン残基(Phe77) と相互作用できる位置に、配位された。(図23)

以上よりイヌ H₂受容体において T-593 は 77 番のフェニルアラニン残基と相互作用することにより、非常に強い非競合的拮抗作用と難洗浄性を示すと推測される。

フェノール環とフェニルアラニン残基の相互作用としては、ベンゼン環同士の相互作用であるπ-π相互作用が、考えられる。ベンゼン環は、平面分子の上下にドーナツ状の非局在化したπ電子雲を有している。2つのベンゼン環、あるいはより広い意味では芳香環が、分子平面を合わせる形で積み重なった(スタッキング)状態では、相互のπ電子雲間で分子軌道の重なりが生じ、両分子のπ電子はさらに非局在化することによって安定化エネルギーが得られる。これがπ-π相互作用による安定化である[18, 80, 81]。

以上から、ranitidine は、アゴニスト結合部位と同じアミノ酸残基と相互作用し、競合的拮抗作用を示すが、T-593 はヒスタミン結合ポケットのほかに、ヒスタミンと受容体の結合には関与しないアミノ酸とπ-π相互作用することにより、非競合的拮抗作用を示すと考えられた。

ヒトのヒスタミン H₂受容体遺伝子のアミノ酸配列[82]を比較すると、77 番のアミノ酸残基はウサギと同じく、イソロイシンであった(図20)。これにより、ヒトにおいてはウサギと同じく、T-593 は非競合的拮抗薬としてではなく、ranitidine と同様に競合的拮抗薬として、作用する可能性が高いと考えられた。

競合的拮抗作用と非競合的拮抗作用の受容体との結合の違いに対する仮説

アンタゴニストが、アゴニストと同じ結合部位に於いて受容体分子と結合している場合は、高濃度のアゴニストは、質量作用の法則に従って、アンタゴニストを完全に置き換えること(exclude)が可能である。このアンタゴニストは、競合的拮抗薬(competitive antagonist)である。

アンタゴニストが、アゴニストの結合部位以外の結合部位で、アゴニストと受容体の結合より強固な結合をしている場合は、高濃度のアゴニストをもってしても、アンタゴニストを完全に exclude することは出来ない。このアゴニストは、非競合的拮抗薬(unsurmountable antagonist)となる。この結合はヒスタミンで replace 出来ない結合であると考えられる。

受容体分子の内側ポケットにある芳香族アミノ酸残基を探し、その残基と π - π 相互作用可能な位置に配置できる芳香環を持つ拮抗薬をデザインすれば、より強力で持続時間の長い拮抗薬を効率よく分子設計し、創薬できる可能性があると考えられた。

今後の課題

仮説モデルの提唱であり、今後の課題として、イヌ・ヒスタミン H₂受容体の 77 番アミノ酸残基のフェニルアラニンを変異させた遺伝子を発現させた細胞を用いて、T-593 の拮抗作用が洗浄されるか検証する必要がある。また他のアミノ酸残基の関与の可能性を検討する必要がある。

まとめ

1。classical competitive antagonist と unsurmountable antagonist の薬理学的特徴の違いは、これらの antagonist と受容体蛋白分子との相互作用・結合の様式の違いによるものかを、化学構造式の類似しているヒスタミン H₂受容体拮抗薬の ranitidine (classical competitive antagonist) と、T-593 (unsurmountable antagonist) の両者を、リガンドの構造式と、リガンドが結合する受容体蛋白のアミノ酸残基の双方から検討した。

2。リガンドの構造式の検討では、ranitidine, T-593、および T-593 の構造同族体を用いた検討から、複素環部分ではなく、T-593 の tail のフェノール環が、competitive antagonism と unsurmountable antagonism を分けていることが、示された。

3。受容体のアミノ酸残基の検討では、まず、ヒスタミン結合ポケットの3つのアミノ酸残基を、点変異した変異受容体を発現させた Hepa cell を用いて、unsurmountable antagonism は、ヒスタミン結合ポケットを形成する3つのアミノ酸残とは関与しないことが、明らかになった。次いで、T-593 の拮抗作用の非洗浄性に対する、ウサギとイヌの単離胃粘膜細胞の種差と、クローニングにより得られた、核酸配列から推測されるアミノ酸配列の違いより、イヌ・ヒスタミン H₂受容体の 77 番のアミノ酸残基のフェニルアラニンが unsurmountable antagonism に関与することが、示された。

4。この結果は、バクテリオロドプシンの結晶構造をもとに、コンピューターを用いて構築されたヒスタミン H₂受容体の三次元モデルに T-593 を結合させた複合体のエネルギー最小化計算による、最適化した結合体三次元構造モデルにおいて、T-593 と、77 番のアミノ酸残基のフェニルアラニンが相互作用する位置に配位される結果と合致した。

5。ヒスタミン、ranitidine とも、同様の解析を行い、classical competitive antagonist は、agonist と同じアミノ酸残基とのみ結合し、unsurmountable antagonist は、agonist binding pocket 以外のアミノ酸残基とも結合するという分子モデルを提示した。

6。他の多くの膜7回貫通型受容体と、その非競合的拮抗薬との結合に関する分子モデルの情報を集積することにより、アミノ酸の一次配列の判明した受容体の最適な拮抗薬を、理論的に創薬できる可能性が拓かれる。

7. 今後の課題としては、今回明らかになった 77 番のアミノ酸残基のフェニルアラニンの点変異させた変異受容体を発現させ、実際に T-593 の拮抗作用の非可逆性が消失するかを検討する事や、他の受容体と拮抗薬の結合の分子モデルの情報を集積することがあげられる。

謝辞

御指導いただきました木村哲 第一内科教授(現感染症内科教授), 黒川清 前第一内科教授(現東海大学医学部長), 渡辺毅 前第一内科助教授(現福島県立医大第三内科教授)に厚く御礼申し上げます。

また, 共同研究者の小野景義 博士(国立医薬品食品衛生研究所), 井家益和氏, 荒井博敏氏に感謝いたします。さらに, コンピューターによる解析を行って下さった赤羽賢治博士に感謝いたします。

たえず温かい励ましを下さりました東原正明 前第一内科講師(現北里大学第四内科教授), 星野恵津夫 帝京大学内科助教授, 川村紀夫 博士に感謝いたします。

大内尉義 医療社会福祉部部長(老年病科教授), 松下正明 前医療社会福祉部部長, 加我君孝 前医療社会福祉部運営委員長(耳鼻咽喉科教授), 鳥羽研二 老年病科助教授をはじめとする医療社会福祉部の方々にお礼申し上げます。

折にふれ温かい励ましのお言葉を下さりました丹羽寛文 消化器内視鏡学会理事長をはじめとする第一内科第八研究室の諸先輩の皆様に感謝いたします。

最後に, 妻と両親に感謝します。

文献

1. Black J.W., Duncan W.A.M., Durant C.J., Ganellin C.R. and Parsons E.M.: Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236 , 385-390, 1972.
2. Brogden R.N., Heel R.C., Speight T.M. and Avery G.S. : Cimetidine : A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease. *Drugs* 38, 93-131, 1978.
3. Brimblecombe R.W., Duncsn W.A.M., Durant G.J., Emett C.R., Ganelline C.R. and Parsons M.E. : Cimetidine a non-thiourea H₂-receptor antagonist, *J. Int. Med. Res.* 3, 86, 1975.
4. Brogden R.N., Carmine A.A., Heel R.C., Speigt T.M. and Avery G.S. : Ranitidine : A review of its pharmacology and therapeutic use in peptic ulcer disease and other allied diseases. *Drugs* 24, 267-303, 1982.
5. Bradshaw J., Brittan R.T., Clitherow J.W., Daly M.J., Jack D., Price B.J. and Stables R. : Ranitidine (AH19065) : A new potent, selective histamine H₂-receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 66, 464, 1979.
6. Langtry H.D., Grant S.M. and Goa K.L. : Famotidine : An update review of its pharmacodynamic properties, and therapeutic use in peptic ulcer disease. *Drugs* 36, 521-539, 1988.
7. Takeda M., Takagi T., Yashima Y. and Maeno H. : Effect of a new potent H₂-blocker, 3-[[[2-[(diaminomethylene)amino]-4-thiazolyl]methyl]tio]-N2-sulfamoyl propionamide (YM-11170), on gastric secretion, ulcer formation and weight of male accessory sex organs in rats. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 32, 732, 1982.
8. Price A.H. and Brogden R.N. : Nizatidine : A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic potential in peptic ulcer disease. *Drugs* 36, 521-539, 1988.
9. Murdoch D. and McTavish D. : Roxatidine acetate : A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic potential in peptic ulcer disease and related disorders. *Drugs* 42, 240-260, 1991.
10. 松本光之, 山口時男:ドーパミン D₄レセプターの多型と人格傾向, *Molecular*

- Medicine, 35, 1488-1496, 1998.
11. 融道男:セロトニン関連遺伝子変異と内因性精神病, Molecular Medicine, 35, 1498-1505, 1998.
 12. 宮崎 均, 柴田 猛, 藤井宣晴:心血管病変におけるアンギオテンシンII受容体タイプ, 日本臨牀 56 (7), 1998.
 13. Pitt B., et al: Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of losartan in the elderly study, ELITE)
 14. Kim S., Kawamura M., Wanibuchi H., Ohta K., Hamaguchi A., Omura T., Yukimura T., Miura K. and Iwao H. : Angiotensin II type 1 receptor blockade inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. Circulation 92, 88-95, 1995.
 15. 平井浩一 ケモカイン受容体の分子医学:日本臨牀 56 (7), 1807-1812, 1998.
 16. Feng Y., Broder C., Kennedy P. and Berger E. : HIV-1 entry cofactor : functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. Science 272, 872, 1996.
 17. Smith M. W., Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G., Lomb D., Goedert J., O'Brien T., Jacobson L., Kaslow R., Buchbinder S., Vittinghoff E., Vlahov D., Hoots K., Hilgartner M., Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study, O'Brien S. : Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Science 277, 959, 1997.
 18. 野崎正勝, 長瀬 博:創薬化学, 化学同人, 京都, 1995.
 19. Dixon R. A. F., Kobilka B. K., Strader D. J., Benovic J. L., Dohlman H. G., Frielle T., Bolanowski M. A., Bennett C. D., Rands E., Diehl R. E., Mumford R. A., Slater E. E., Sigal I. S., Caron M. G., Lefkowitz R. J. and Strader C. D. : Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. Nature, 321, 75-79, 1986.
 20. Henderson R., Baldwin J. M., Ceska T. Z., Zemlin F., Beckmann E. and Downing K. H. : Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. J. Mol. Biol. 213, 899-929, 1990.
 21. 兼松 顯:オピオイド受容体の構造と機能 一三次元構造モデルの構築と薬物設計への応用一 現代化学 No.301, 46-52, 1996

22. 福井裕行:ヒスタミン H₁ 受容体のリガンド認識と活性化機構. 医学のあゆみ, 188, 169-172, 1999.
23. Inoue Y., Nakamura N. and Inagami T. : A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism. *J. Hypertension* **15**, 703-714, 1997
24. Hirai S., Hirano H., Arai H., Shibata H., Kusayanagi Y. and Hashiba K. : *Jpn. Kokai J. P.* 01, 131-172, 1989.
25. Gaddum J. H., Hammd K. A., Hathway D. E., and Stephens F. F. : Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxytryptamine. *Quart. J. Exp. Physiol.* **40**, 49-74, 1955.
26. Arai H., Nakagawa M., Tanada K., Yamaguchi H. and Hirai S. : Histamine H₂-Receptor Antagonism of T-593 : Studies on Positive Chronotropic Responses in Guinea Pig Atria. *Jpn. J. Pharmacol.* **64**, 251-256, 1994.
27. Honda K., Momose N. and Nakagawa C. : In Vitro Characterization of α -Adrenergic Receptor in Rabbit Detrusor Muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* **44**, 345-353, 1987.
28. Hosohata Y., Sasaki K., Shen Y., Hattori K., Suzuki J. and Nagatomo T. : Bopindol Is a Slowly Dissociatihg β_1 -Arenoceptor Antagonist When Compared to Other β -Blockers. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1066-1071, 1995.
29. Leurs R. : Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol. Ther.* **66**, 413-463, 1995.
30. Fukushima Y., Oka Y., Katagiri H., Saitoh T., Asano T., Ishihara H., Matsuhashi N., Kodama T., Yazaki Y. and Sugano K. : Desensitization of canine histamine H₂ receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190** (3), 1149-1155, 1993.
31. Leurs R., Smit M. J., Meng W. M. B. P. and Timmerman H. : Pharmacological characterization of the human histamine H₂ receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.* **112**, 847-854, 1994.
32. Traiffort E., Ruat M., Arrang J-M., Leurs R., Piomelli D. and Schwartz J-C. : Expression of a cloned rat histamine H₂ receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA 89, 2649-2653, 1992.
33. Fukushima Y., Oka Y., Saitoh T., Katagiri H., Asano T., Matsuhashi N., Takata K., Breda E., Yazaki Y. and Sugano K. : Structural and functional analysis of the canine histamine H₂ receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. Biochem. J. 310, 553-558, 1995.
34. Gantz I, Schaffer M, DelValle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M and Yamada T: Molecular cloning a gene encoding the histamine H₂ receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 429-433, 1991.
35. Delvalle J., Wang L., Gantz I. and Yamada T.: Characterization of H₂ histamine receptor: linkage to both adenylate cyclase and [Ca²⁺]_i signaling systems. Am. J. Physiol. 263, G967-G972, 1992.
36. Soll, A. H. : The actions of secretagogues on oxygen uptake by isolated mammalian parietal ccells. J. Clin. Invest. 61, 370-380, 1978.
37. Chomczynski P. and Sacchi, N. : Single-Step Method of DNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extrction. Anal. Biochem. 162, 156-159, 1987
38. Libert F., Parmentier M., Lefort A., Dinsart C., Van Sande J., Maehaut C., Simonś M. J. , Dumont J.E. and Vassart G. : Selective Amplification and Cloning of Four New Members of the G Protein-Coupled Receptor Family. Science 244, 569-572, 1989.
39. Crouse G. F., Frischauf A. and Lehrach H. : An Integrated and Simplified Approach to Cloning into Plasmids and Single-Stranded Phages. Methods Enzaimol. 101, 78-89, 1983.
40. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-55467, 1977.
41. Feinberg, A. P. and Vogelstain, R. : A technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. Anal. Biochem. 132, 6-13, 1983.
42. Tsonis P. A. and Mans T. : Rapid Phage DNA Isolation without the Use of Enzymes. Biotechniques, 1988.
43. Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. : Molecular cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
44. Brown N., Steofko R.E. and Uhler M.D. : Induction of Alkaline Phosphatase

- in Mouse L Cells by Overexpression of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **265**, 13181-13189, 1990.
45. Okayama H. and Chen C. : High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752, 1987.
46. Campbell V. W., Del Valle J., Hawn M., Park J. and Yamada T. : Carbonic anhydrase II gene expression in isolated canine gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **256**, G651-G636, 1989.
47. Honma M., Satoh T., Takezawa J. and Ui M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.* **18**, 257-273, 1977.
48. Arunlakshana C. and Schild H.O. : Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **14**, 48-58, 1959.
49. Rossum J.M. : Cumulative dose-response curves. *Arch. int. Pharmacodyn.* **143**, 299-330, 1963.
50. Tashiro T., Ono K., Watanabe T., Inoie M., Arai H., Kimura S. and Kurokawa K. : Histamine H₂ Receptor Antagonism by T-593: Studies on cAMP Generation in Hepa Cells Expressing Histamine H₂ Receptor. *Pharmacology* **59**, 1-10, 1999.
51. Tarutani M., Sakuma H., Shiratsuchi K. and Mieda M. : Histamine H₂-receptor Antagonistic Action of N-{3-[3-(1-Piperidinylmethyl)phenoxy]propyl}acetoxyacetamide Hydrochloride (TZU-0460). *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **35** (I), 4, 703-706, 1985.
52. Isobe Y., Muramatsu M., Aihara H. and Otomo S. : H₂-receptor antagonism by a novel compound IT-066 assessed from [14C]aminopyrine accumulation in rabbit parietal cells. *Eur. J. Pharmacol.* **178**, 343-350, 1990.
53. Inaba N., Shibata M., Onodera S., Tanaka M., Suzuki T., Tamura T. and Ohnishi H. : Studies on hisutamine H₂-receptor antagonistic property of FRG-8813, a novel antiulcer drug. *Folia Pharmacol. Jpn.* **105**, 231-241, 1995.
54. Sung C.P., Roberts M.I. Arleth C.A., Ruffolo R.R. Jr. and Nichols A.J. : The kinetics of interaction of SK&F 94482 with histamine H₂-receptors. *FASEB J* **3**, 4657, 1989.
55. Cavanagh R.L., Picino A.W. and Buyniski J.P. : The in vitro and in vivo histamine H₂-receptor antagonist profile of two new agents with prolonged

- activity, BMY-25368 and BMY-25405. Fed. Proc. 43, Abst. 1016, 1984.
56. Ramage J.K., Deakin M., Williams J.G., Milton-Thompson G.J., Manghani K. and Schuwartz S.E. : Comparison of the effects of ranitidine, BMY-25368-01, and placebo on 24-hour intragastric and nocturnal acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. Dig. Dis. Sci. 31, 179S, 1986.
57. Buyniski J.P., Cavanagh R.L., Picio A.W., Algieri A.A. and Crenshaw R.R. : Structure-activity relationships among newer histamine H₂-receptor antagonist. In Highlights in Receptor Chemistry, Edited by Melchiorre C. and Giannalla M. 195-215, Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1984.
58. Torchiana M. L, Pendleton R., Cook P., Hanson C. and Clineschmidt B. V. : Apparent Irreversible H₂-Receptor Blocking and Prolonged Gastric Antisecretory Activites of 3-N-{3-[3-(1-piperidinomethyl) phenoxy] propyl} amino-4-amino-1,2,5-thiadiazole-1-oxide (L-643,441). J. Pharmaco. Exp. Ther. 224, 514-519, 1983.
59. Reeves J. J. and Stables R. : The antisecretory profile of action of the H₂-receptor antagonists, famotidine, loxtidine, ranitidine and L-643,441 on the rat isolated gastric mucosa. Agents and Actions 20, 22-28, 1987.
60. Brittain R.T., Jack D., Reeves J.J. and Stables R. : Pharmacological basis for the induction of gastric cartinoid tumors in the rat by loxtidine, an unsurmountable histamine H₂-receptor blocking drug. Brit. J. Pharmacol. 85, 843-847, 1985.
61. Nielsen S.T. : H₂-receptor antagonist and gastric acid antisecretory properties of Wy-45,662. Agents Actions, 19, 158, 1986.
62. Shepherd-Ross A.J. and Pendleton R.G. : Studies on the H₂-receptor antagonism of MK-208 in isolated rabbit gastric glands. Eur. J. Pharmacol. 106, 423-426, 1985.
63. Humphray J.M., Reeves J.J. and Stables R. : A comparison of the H₂-receptor antagonist and antisecretory effects of famotidine and ranitidine. Br. J. Pharmacol. 88, 390p, 1986.
64. Black J.W., Leff P. and Shankley N.P. : Further analysis of anomalous pKB values for histamine H₂-receptor antagonists on the mouse isolated stomach assay. Br. J. Pharmacol. 85, 581-587, 1985.

65. Sewing K-F. and Hannemann H. : Interaction of ranitidine famotidine with guinea pig isolated parietal cells. *Pharmacology* 33, 274-278, 1986.
66. Pendleton RG, Torchiana ML, Chung C, Cook P, Wiese S and Clineschmidt : Studies on MK-208 (YM-11170) a new, slowly dissociatable H₂-receptor antagonist. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 266, 4-16, 1983.
67. Muramatsu M., Hirose-Kijima H., Aihara H. and Otomo S. : Time-Dependent Interaction of a New H₂-Receptor Antagonist, IT-066, with the Receptor in the Atria of Guinea Pig. *Jpn. J. Pharmacol* 57, 13-23, 1991.
68. Strader C. D., Sigal I. S., Register R. B., Candelore M. R., Rands E. and Dixon R. A. F. : Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 4384-4388, 1987.
69. Strader C. D., Sigal I. S., Candelore M. R., Rands E., Hill W. and Dixon R. A. F. : Conserved Aspartic Acid Residues 79 and 113 of the β -Adrenergic Receptor Have Different Roles in Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 263, 10267-10271, 1988.
70. Strader C. D., Candelore M. R., Hill W. S., Sigal I. S. and Dixon R. A. F. : Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 13572-13578, 1989.
71. Wang C-D., Buck M. and Fraser C. M. : Site-directed Mutagenesis of α_{2A} -Adrenergic receptors : Identification of Amino Acids Involved in Ligand Binding and Receptor Activation by Agonists. *Mol. Pharmacol.* 40, 168-179, 1991.
72. Fraser C. M., Wang C-D., Robinson D. A., Gocayne J. D. and Venter J. C. : Site-Directed Mutagenesis of m₁ Muscarinic Acetylcholine Receptors: Conserved Aspartic Acids Play Important Roles in Receptor Function. *Mol. Pharmacol.* 36, 840-847, 1989.
73. Gantz I., DelValle J., Wang L., Tashiro T., Munzert G. Guo Y., Konda Y. and Yamada T. : Molecular Basis for the Interaction of Histamine with the Histamine H₂ Receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 20840-20843, 1992.
74. Kunkel T. A., Roberts J. D. and Zabour R. A. : Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154, 367-382, 1987.
75. Berglindh T. and Obrink K. J. : A Method for Preparing Isolated Grands

- from the Rabbit Gastric Mucosa. *Acta Physiol. Scnd.* **96**, 150-159, 1976.
76. Berglindh T. : Effects of common inhibitors of gastric acid secretion on secretagogue-induced respiration and aminopyrine accumulation in isolated gastric glands. *Biochem. Biophys. Acta*, **464**, 217-233, 1977.
77. Soll A. H. : Secretagogue stimulation of [¹⁴C] aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells. *Am. J. Physiol.* **238**, G366-G375, 1980.
78. 未発表データ
79. Beinborn M., Lee Y-M., McBride E. W., Quinn S. M. and Kopin A. S. : A single amino acid of the cholecystokinin-B/gastrin receptor determines specificity for non-peptide antagonists, *Nature* **362**, 348-350, 1993.
80. 井上佳久, 和田健彦:分子認識のしくみ 分子認識化学 — 超分子へのアプローチ —, 三共出版, 東京, 1997.
81. Hunter C. A., Singh J. and Thornton J. M. : π - π Interactions : the Geometry and Energetics of Phenylalanine-Phenylalanine Interactions in Proteins. *J. Mol. Biol.* **218**, 837-846, 1994.
82. Gantz I., Munzert G., Tashiro T., Schaffer M., Wang L., DelValle J. and Yamada T. : Molecular Cloning of the Human Histamine H₂ Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178** (3), 1386-1392, 1991.