

# 23PO-am223

## ムスカリン受容体を用いた遠心によるリガンド結合測定方法

○須賀 比奈子<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>昭和女大生活科学, <sup>2</sup>順天堂大医)

【目的】私は、Gタンパク質共役受容体(GPCR)とリガンドとの相互作用の薬理学的解析を行っている。GPCRとリガンドとの相互作用解析にはリガンド結合実験が必要である。しかし、GPCRへの変異導入によりリガンド親和性が減少する 경우가多く、そのような場合リガンド結合測定が困難だった。そこで、本研究では、従来のフィルターによって濾過する方法では検出できないリガンド結合を検出する方法を探った。

【実験方法】(1)野生型 M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M2 受容体) および変異型 M2 受容体を発現させた HEK293 細胞の膜画分を調製し、放射標識アンタゴニスト [<sup>3</sup>H]N-methylscopolamine (NMS) を添加して、30 または 37°C で 60 分間インキュベーションを行った。(2)インキュベーション後、マイクロプレート用セルハーベスターを用いて結合していない [<sup>3</sup>H]NMS を濾過し、マイクロプレート用シンチレーションカウンターを用いてフィルターマットに結合した [<sup>3</sup>H]NMS をカウントした。(3)(1)のインキュベーション後、遠心により膜画分を沈殿させ、上清を除去した。沈殿をバッファーで洗浄後、NaOH で溶解し、Hepes で中和して、シンチレーションカウンターを用いて膜画分に結合した [<sup>3</sup>H]NMS をカウントした。

【結果・考察】(2)の方法で [<sup>3</sup>H]NMS のカウントを全く検出できなかった場合でも、(3)の方法では高いカウントを検出することができた。このことから、(3)の方法を用いれば、(2)の方法より感度が高くリガンド結合を検出できることが分かった。これまで、親和性が高い標識リガンドが無い、あるいは、変異導入により親和性が低くなったなどの理由でリガンド結合実験が行われていない GPCR でも、(3)の方法を用いることにより、リガンド結合を測定できる可能性があると思われる。