

# 肝における histidyl-proline diketopiperazine 結合部位の生化学的研究

岡山大学医学部 脳代謝研究施設機能生化学部門

(指導：森 昭胤教授)

小 原 節 子

(昭和62年2月9日受稿)

**Key words :** histidyl-proline diketopiperazine [cyclo (His-Pro)]  
receptor binding  
liver  
biochemical properties  
sex difference  
testosterone  
down-regulation

## はじめに

Histidyl-proline diketopiperazine, [以下 cyclo (His-Pro) と略す] は thyrotropine releasing hormone (TRH) の代謝産物として報告された<sup>1)</sup> dipeptide で TRH の作用の一部は, cyclo (His-Pro) に変化した後に現われているのではないとも言われた<sup>1)</sup>. しかし, cyclo (His-Pro) の多彩な生物学的作用は, TRH 類似のものから逆に TRH と相反するもの, また TRH の作用とは無関係なものまで様々である<sup>2)</sup>. また, cyclo (His-Pro) は脳をはじめ生体内に広く分布するものの, その分布は TRH とは異なった様相を呈する<sup>5)</sup>. さらに, cyclo (His-Pro) には TRH でみられるような脳内特異的結合がまだ認められていない. 最近 Bataini ら<sup>6)</sup> は, 副腎に cyclo (His-Pro) 結合が存在することを報告したが, その他の臓器への結合はほとんど知られていない.

著者は肝に cyclo (His-Pro) 結合を認めたので, その生化学的検討を行い, さらに, その調節機構を検討した. この過程で, ラット肝の

cyclo (His-Pro) 結合に著しい性差のあることを認めたので, 性ホルモンの影響もあわせて検討した. 本稿においては, 肝の cyclo (His-Pro) 結合部位に関するこれらの成績をまとめる.

## 実験方法

### 1. 実験動物

Cyclo (His-Pro) 結合部位の生化学的検討および調節機構の検討には Sprague-Dawley 系雄ラット (体重 200~250 g) を用いたが, それに加えて性差の検討には雌ラット (体重 200~250 g) も用いた. Cyclo (His-Pro) 結合の cyclo (His-Pro) による down-regulation の検討には ICR 系雄マウス (体重 30 g) を用いた.

### 2. Receptor preparation の作製

Sprague-Dawley ラットの肝を Brinkman Polytron PT-10 を用いて10倍容量の0.32 M sucrose 中でホモゲナイズし, Fig. 1 に示すような分画遠心により, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> 分画を得, 各 pellet を Tris-HCl buffer (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.6) で再懸濁し, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 分画についてはさらに 11,500 × g で20分間再度遠心した.

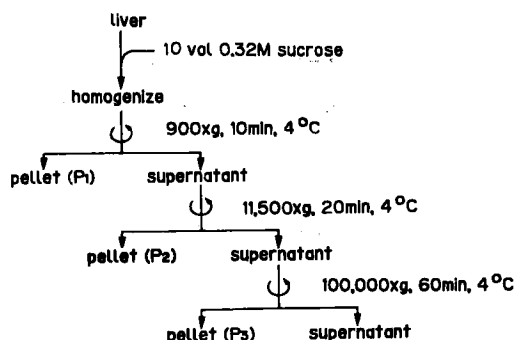


Fig. 1 Method of receptor preparation (I).

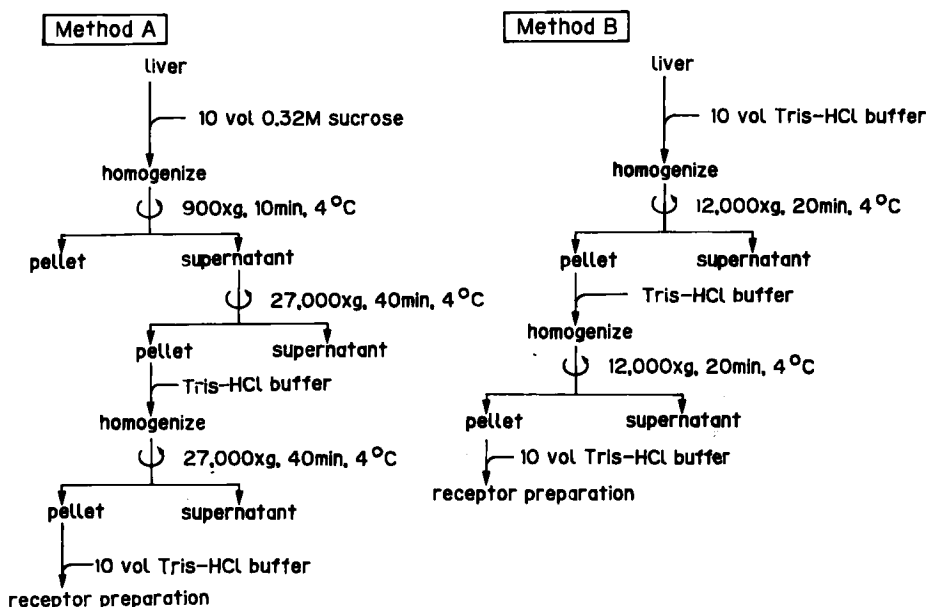


Fig. 2 Method of receptor preparation (II).

また、Fig. 2 に示すように、0.32 M sucrose 中 (Method A), あるいは Tris-HCl buffer 中 (Method B) で肝をホモゲナイズした。Method A では 900×g で10分間遠心した後、その上清を 27,000×g で40分間遠心し、pellet を Tris-HCl buffer に再懸濁して、再度同一条件で遠心し、最終の pellet を10倍容の Tris-HCl buffer に懸濁して−70℃に保存した。Method B では 12,000×g で20分間の遠心を2回繰り返し、その pellet を receptor preparation として使用した。

### 3. Cyclo (His-Pro) の radiolabeled receptor assay

Cyclo (His-Pro) の標準 radiolabeled receptor assay (RRA) (Fig. 3) では、200 μg protein/tube の receptor preparation と最終濃度 2 nM の [<sup>3</sup>H] cyclo (His-Pro) (New England Nuclear, specific activity 56.2 Ci/nmol) とを 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) と 50 μg/ml bacitracin を含む Tris-HCl buffer 1 ml 中で 0℃, 1時間インキュベートし、結合型標識リガンド(B) と遊離型標識リガンド(F) の分離は、グラスファイバー・フィルター (Whatman GF/C) を用いる吸引濾過法に依った。100 μM の非標識 cyclo (His-

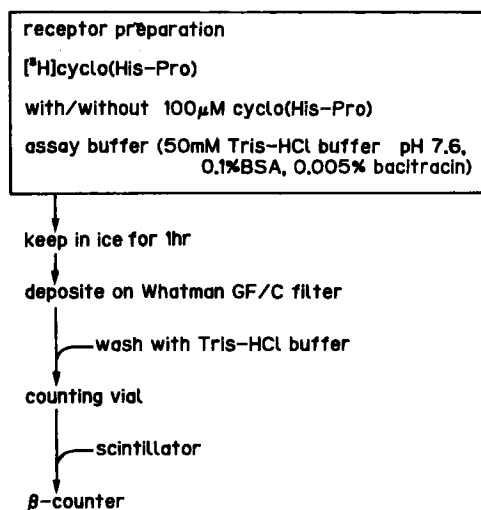


Fig. 3 Standard procedure of cyclo (His-Pro)-RRA.

Pro)存在下の放射活性を非特異的結合と見做した。Cyclo (His-Pro)の飽和実験では $[^3\text{H}]$  cyclo (His-Pro)を1 nM から120 nM まで変化させてRRAを行った。

#### 4. 種々の酵素, 試薬およびイオンの影響

Receptor preparation をそれぞれの酵素, 試薬とともに20°Cで30分間インキュベートし, 遠心して洗浄し, Tris-HCl buffer に再懸濁してcyclo (His-Pro)結合を調べた。なお, SH試薬の場合には標準RRA系に試薬を添加した条件でも検討したがその場合は"with reagent"として明示した。イオンの影響は, 標準RRA系にそれぞれのイオンを添加した。

#### 5. Castration と testosterone の肝 cyclo (His-Pro) 結合に対する影響

雄ラットをketamine 100 mg/kg 腹腔内投与で麻酔しcastrationした。2週間経過した後, testosterone 2.5 mg/kg または, 生理食塩水を1日1回, 3および7日間皮下注射し, それぞれ最終投与1日後に断頭屠殺して肝臓を取り出し, そのcyclo (His-Pro)結合を調べた。

#### 6. Cyclo (His-Pro) 投与による cyclo (His-Pro) 結合の down-regulation とその回復

マウスにcyclo (His-Pro)を3日間腹腔内投与し, 1, 3, 7日後に断頭屠殺し, 肝臓を取り出し, そのcyclo (His-Pro)結合を調べた。

## 実験成績

### 1. Cyclo (His-Pro)-RRA の確立.

まず, receptor preparation 量の特異的結合に及ぼす影響を調べた (Fig. 4)。その結果, タンパク量として500  $\mu\text{g}$  protein/tube まではreceptor preparationを増すとともに, 直線的に特異的結合が増加するが, それ以上の高濃度では, 特異的結合の増加はゆるやかになった。このことから, 用いるreceptor preparationの量は直線部分の中央値である200  $\mu\text{g}$  protein/tubeと決定した。

図示していないが, インキュベート用のbuffer

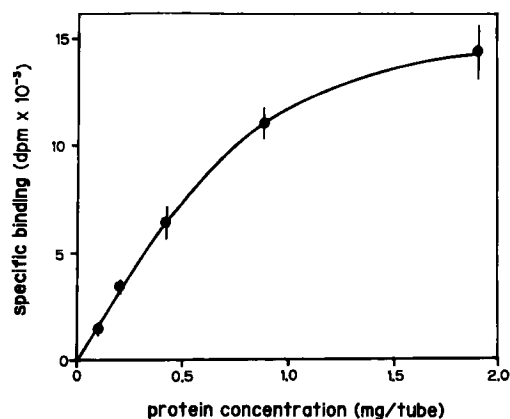


Fig. 4 Effects of amount of receptor proteins on the specific binding of  $[^3\text{H}]$  cyclo (His-Pro). Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations.

Table 1 Specific binding of  $[^3\text{H}]$  cyclo (His-Pro) to subcellular fraction of rat liver.

	specific binding (fmol/mg protein)
P <sub>1</sub>	23.08
P <sub>2</sub>	25.62
P <sub>3</sub>	61.04
Method A	50.14
Method B	43.16

Each fraction (containing 0.2 mg protein) was incubated with 2 nM  $[^3\text{H}]$  cyclo (His-Pro) for 60 min on ice. Values are the means of four experiments.

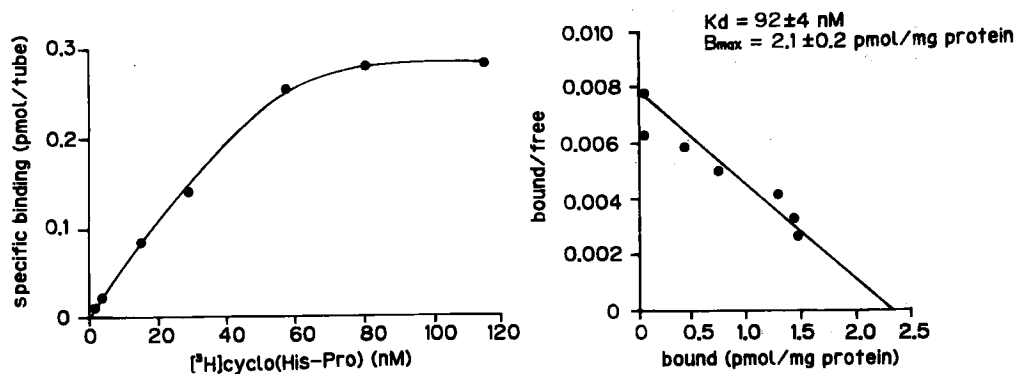


Fig. 5 The typical saturation curve of the cyclo (His-Pro)-RRA, using liver membranes (left panel). Liver membrane (200  $\mu\text{g}$  protein) was incubated with increasing concentrations of  $[^3\text{H}]$  cyclo (His-Pro). The right panel shows the same data plotted as a Scatchard plot. Each value represents the mean of triplicate determinations. The inserted  $K_d$  and  $B_{\text{max}}$  values are calculated from 10 independent assays (mean  $\pm$  SEM).

Table 2 Inhibition of  $[^3\text{H}]$ cyclo(His-Pro) binding by TRH, TRH analogues, L-His and L-Pro.

Compounds	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	Potency(%)
Cyclo(His-Pro)	0.12	100
TRH	8.8	1.4
MK-771	1.3	9.0
DN-1417	3.4	3.5
CG-3509	5.4	2.2
L-His	65.0	0.2
L-Pro	>1000	<0.0005

Each  $\text{IC}_{50}$  determination used five concentrations of analogues, L-His and L-Pro in triplicate in competing standard cyclo (His-Pro) binding assay. Results were converted to the percentage of maximal specific binding and plotted on log-probit paper to estimate the concentration of 50% binding. The experiment was replicated twice.

として、50mM Tris-HCl buffer, 50mM HEPES-KOH buffer, 20mM Na-リン酸 buffer (いずれも pH 7.6) を用いて比較したところ、Tris-HCl buffer を用いた場合に特異的結合が最も大きかった。

Receptor preparation 作製法による cyclo (His-Pro) 結合を検討すると、Table 1 に示したように、 $P_3$  分画でもっとも大きな特異的結合

が得られた。Method A によって作製した receptor preparation も  $P_3$  分画とほぼ同様の受容体結合能を示した。方法の簡便さから主として以後 Method A を用いた。

Method A により作製した receptor preparation を用いて  $[^3\text{H}]$  cyclo (His-Pro) の飽和実験を行った (Fig. 5)。Marquardt (1963)<sup>7)</sup> の方法による Scatchard plot の解析では、 $K_d = 92 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $B_{\text{max}} = 2.1 \text{ pmol/mg protein}$  の binding site であった (Fig. 5)。

## 2. Cyclo (His-Pro)-RRA の特異性の検討

Cyclo (His-Pro) は、TRH の代謝産物であるとされているので、cyclo (His-Pro)-RRA における TRH ならびに TRH analogue の交叉反応を検討した (Table 2)。いずれも交叉反応性は極めて小さく、TRH の交叉反応性は 1.4% にすぎなかった。また、生理的には存在しない強力な TRH analogue は TRH よりやや強い交叉反応性を示したが、cyclo (His-Pro) の構成成分である L-His, L-Pro はほとんど交叉反応を示さなかった。

## 3. Cyclo (His-Pro) 結合の生化学的性状

Cyclo (His-Pro) 結合に対する種々の陽イオンの影響について検討した (Fig. 6)。いずれのイオンも濃度の増加に従って特異的結合は減少した。生理的 血中濃度に相当する  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$

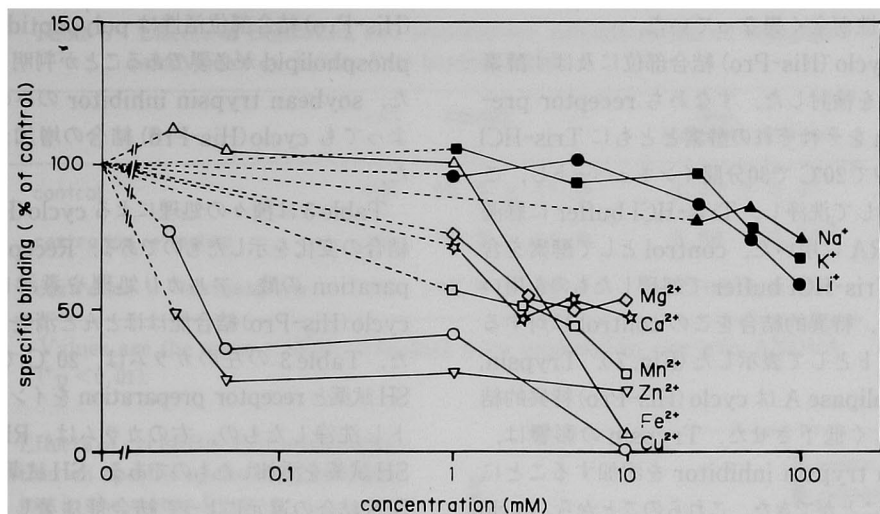


Fig. 6 Effects of various ion species on cyclo (His-Pro) binding to the particulate fraction. The membrane fraction was incubated with [<sup>3</sup>H]-cyclo (His-Pro) in various ion environments. Values are expressed as percent of control.

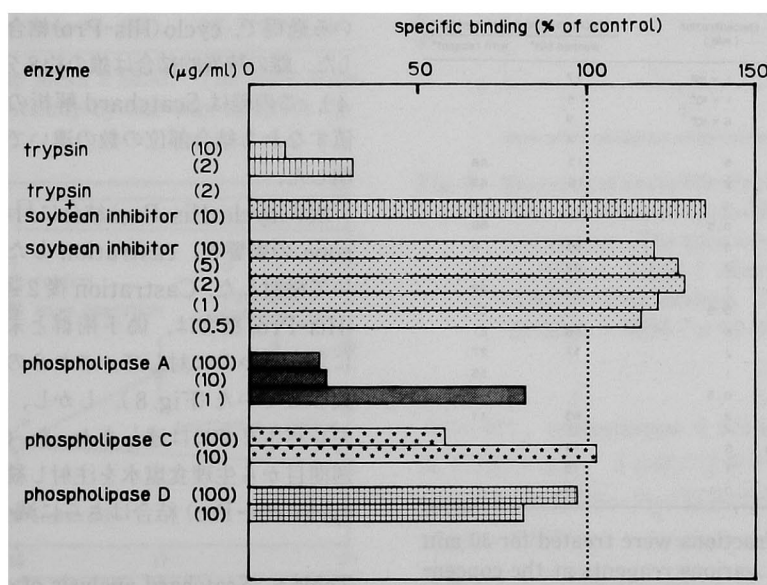


Fig. 7 Effects of enzymes on the specific binding of [<sup>3</sup>H] cyclo (His-Pro). Membrane fractions were incubated with different enzymes at 20°C for 30 min in Tris-HCl buffer. The treated medium was centrifuged at 27000×g for 20 min at 4°C, and the pellet resuspended in the original volume of Tris-HCl buffer and used for receptor binding assay. In controls, fractions were incubated in the same manner but exposed to enzymes. Values are means of triplicate determinations. The experiment was replicated three or four times.

は脳シナプス膜の TRH 受容体結合を著しく増加させるが<sup>8)</sup>, cyclo (His-Pro) の特異的結合を

逆に著しく低下させた。このように、これらの2種のペプチドの膜結合部位は、金属イオンに対

する反応性が全く異なっていた。

次に cyclo (His-Pro) 結合部位に及ぼす酵素類の影響を検討した。すなわち receptor preparation をそれぞれの酵素とともに Tris-HCl buffer 中で 20°C で 30 分間インキュベートし、これを遠心して洗浄し、Tris-HCl buffer に懸濁して、RRA に用いた。control として酵素を含まない Tris-HCl buffer で処理したものをを用いて測定し、特異的結合をこの control に対するパーセントとして表示した (Fig. 7)。Trypsin, phospholipase A は cyclo (His-Pro) 特異的結合を著しく低下させた。Trypsin の影響は、soybean trypsin inhibitor を添加することにより防ぐことができた。これらのことから、cyclo

Table 3 Effects of various treatments on the specific binding of [<sup>3</sup>H] cyclo (His-Pro).

treatment	concentration (mM)	specific binding (% of control)	
		washed out <sup>a</sup>	with reagent <sup>b</sup>
HCl	1 × 10 <sup>2</sup>	17	
NaOH	1 × 10 <sup>2</sup>	5	
urea	6 × 10 <sup>2</sup>	9	
boiling at 100°C 5 min		4	
2-mercaptoethanol	5	115	48
	2	119	69
	1		90
	0.5		86
dithiothreitol	5	83	6
N-ethylmaleimide	2	99	11
	1		22
	0.5		35
N-ethylmaleimide	5	18	21
	2	37	27
	1		35
	0.5		42
dithiothreitol + N-ethylmaleimide	2	63	11
	5		
p-chloromercuribenzoate	5	14	
	1	19	
	0.1	24	

a Membrane fractions were treated for 30 min at 20°C with various reagents at the concentrations shown in the Table. The treated membranes were then centrifuged at 27000×g for 20 min and the pellet was resuspended in the original volume of Tris-HCl buffer. The binding activity of [<sup>3</sup>H] cyclo (His-Pro) was determined in this suspension. In controls, fractions were incubated in the same manner but not exposed to test reagents.

b Each reagent was added to the standard RRA system. Specific binding values are the means of triplicate determination. The experiment was replicated three or four times.

(His-Pro) 結合部位活性は polypeptide 結合や phospholipid が必要であることが判明した。また、soybean trypsin inhibitor のみの添加によっても cyclo (His-Pro) 結合の増加がみられた。

Table 3 は種々の処理による cyclo (His-Pro) 結合の変化を示したものである。Receptor preparation の酸、アルカリ処理や煮沸によって cyclo (His-Pro) 結合能はほとんど消失した。また、Table 3 の左のカラムは、20°C で 30 分間 SH 試薬と receptor preparation をインキュベートし洗浄したもの、右のカラムは、RRA 系に SH 試薬を添加したものである。SH 試薬の修飾、S-S 結合の還元によって結合能は著しく低下した。

#### 4. 肝 cyclo (His-Pro) 結合の性差と testosterone による修飾

Cyclo (His-Pro) 結合の基礎的検討を行っている過程で、cyclo (His-Pro) 結合の性差を見出した。雌の特異的結合は雄の約 8 分の 1 で (Table 4)、この差は Scatchard 解析の結果、Bmax 値すなわち結合部位の数の違いであることが判明した。

次に cyclo (His-Pro) 結合に対する testosterone の影響を、castration した雄ラットを用いて検討した。Castration 後 2 週間目の cyclo (His-Pro) 結合は、偽手術群と未処置群との間に差がないのに対して、これらの約 40% にまで減少していた (Fig. 8)。しかし、この減少は雌のレベルまでには達しなかった。Castration 2 週間目から生理食塩水を注射し続けた群では、cyclo (His-Pro) 結合はさらに減少していった。

Table 4 Scatchard analysis of cyclo (His-Pro) binding sites in male and female rat liver.

	(n)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)
male	(8)	99.2 ± 15.6	1.92 ± 0.13
female	(9)	161.3 ± 57.2	0.27 ± 0.09*

Values are the mean ± SEM. The data were analyzed statistically by one-way ANOVA (\*p < 0.01).

Table 5 Effects of castration and testosterone administration on Scatchard analysis of cyclo(His-Pro) binding sites.

	(n)	Kd(nM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg protein)
control	(13)	98.4 ± 11.8	2.19 ± 0.21
castration + saline	(6)	70.5 ± 14.9	0.56 ± 0.15*
castration + testosterone	(6)	145.9 ± 36.3	2.08 ± 0.77

Values are the mean ± SEM. The data were analyzed by one-way ANOVA (\*p < 0.01).

Table 6 Effects of cyclo(His-Pro) administration on specific cyclo(His-Pro) binding in the mouse liver.

treatment	(n)	specific binding (fmol/mg protein)
control	(10)	50.9 ± 4.4
cyclo(His-Pro) 7.5 mg/kg (5)	(5)	40.7 ± 8.7
cyclo(His-Pro) 15 mg/kg (5)	(5)	28.7 ± 4.6*

Values are the mean ± SEM. The data were analyzed statistically by one-way ANOVA (\*p < 0.01).

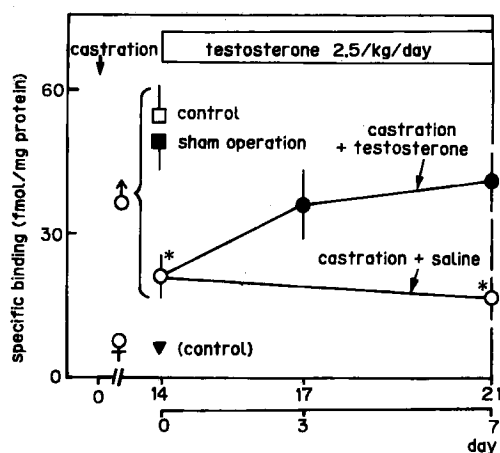


Fig. 8 Effects of castration and testosterone administration on specific cyclo(His-Pro) binding. Samples of each membrane preparation were incubated with 2 nM [<sup>3</sup>H]cyclo(His-Pro). Values are the mean ± SEM of five rats. Asterisks indicate statistically significant differences against control or sham operated groups by one-way ANOVA (\*p < 0.01).

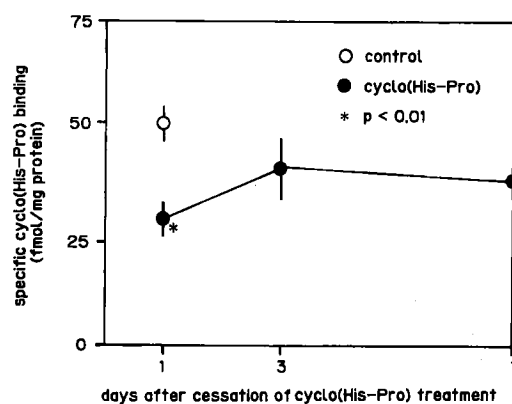


Fig. 9 Recovery of cyclo(His-Pro) binding sites after cessation of cyclo(His-Pro) injection to mice. The mice were decapitated on days 1, 3 and 7 after cessation of cyclo(His-Pro) binding. The values are the mean ± SEM (\*p < 0.01 vs. control).

これに対し、testosteroneを1日1回2.5 mg/kg皮下注射すると、3日間の注射でcontrolのレベルまでcyclo(His-Pro)結合が回復した。Castration 2週間後からtestosteroneまたは生理食塩水を7日間投与した群についてScatchard解析を行った(Table 5)。その結果、control群とこれら2群の間でKd値には有意な差がみられなかったが、B<sub>max</sub>値はcastration + 生理食塩水投与後すなわち、castration 21日後の群で著しく減少し、また、castration + testosterone 7日投与群で回復していた。このようにcyclo(His-Pro)結合のcastrationとtestosteroneによる修飾は、ともに結合部位の数の変化に起因するものであることが判明した。

### 5. 肝 cyclo(His-Pro) 結合の cyclo(His-Pro)

自身による down-regulation とその回復  
マウスに cyclo(His-Pro) を 3 日間腹腔内投与し、1 日後に断頭屠殺して cyclo(His-Pro) 結合を測定した (Table 6). 7.5 mg/kg では有意な差がみられなかったが、15 mg/kg では control の約 60% にまで減少していた。Scatchard 解析の結果、この減少は、主に  $B_{max}$  値の減少によることが判明した。投与中止後の特異的結合の回復過程をみると、Fig. 9 のように、3 日後にはすでに control レベルまで回復していた。

### 考 察

ラットおよびマウスの肝細胞膜分画に cyclo(His-Pro) の特異的結合部位を見出した。肝を Polytron PT-10 でホモゲナイズして分画遠心法を用いた実験では細胞膜のマーカーである 5'-nucleotidase 活性は  $P_3$  分画 (100,000 × g pellet) にもっとも多く含まれるようになり、growth hormone 受容体結合もこの  $P_3$  分画で最大となることが知られているので<sup>9)</sup>、cyclo(His-Pro) 結合部位も肝細胞膜上に存在するものと想定される。

Scatchard 解析から肝細胞膜の cyclo(His-Pro) 結合部位は、Kd が 92 nM の single binding site であることが明らかになった。この Kd 値は、Bataini ら<sup>6)</sup> が牛副腎の cyclo(His-Pro) 結合部位で報告した値の 10 分の 1 であった。この両者の Kd 値の相違の理由は明らかではないが、著者の方法ではタンパク分解阻害剤を添加したことも一要因であろう。

Cyclo(His-Pro) RRA の特異性の検討では (Table 2), cyclo(His-Pro) が TRH の分解産物であると報告されていたにもかかわらず<sup>1)</sup>、TRH はごくわずかの交叉反応性しか示さなかった。結果には示していないが [<sup>3</sup>H]TRH の肝細胞膜に対する結合を調べたところ、ごくわずかの特異的結合しかみられず、しかも大量の cyclo(His-Pro) によっても置換できなかった。加えて脳シナプス膜に対する [<sup>3</sup>H]TRH 結合も大量の cyclo(His-Pro) で置換することができなかった。これらのことから著者が見出した肝細胞膜分画の cyclo(His-Pro) 結合部位は TRH とは無関係な特異性の高いものと考えられる。

Cyclo(His-Pro) 結合に対する陽イオンの検討では (Fig. 6), すべての陽イオンの添加により特異的結合が減少した。興味のあることには生理的血中濃度に相当する (20 μM) Zn<sup>2+</sup> あるいは Cu<sup>2+</sup> の存在下では TRH の脳シナプス膜受容体結合が著しく増加するにもかかわらず<sup>8)</sup>、cyclo(His-Pro) 結合は著しく減少する。このことから cyclo(His-Pro) 結合部位は TRH 結合部位とは全く異なったものであることが示唆される。

膜分画を trypsin または phospholipase A で処理すると cyclo(His-Pro) 結合が著しく低下することから、polypeptide 結合や phospholipid が cyclo(His-Pro) 結合部位の活性維持に重要であることが判明した。これらの cyclo(His-Pro) 結合部位の生化学的性状は他のペプチドの受容体にきわめて類似している<sup>9-12)</sup>。Soybean trypsin inhibitor の添加は cyclo(His-Pro) 特異結合を 20~30% 増加させた (Fig. 7)。このことは内在性の trypsin 様のタンパク分解酵素によって結合部位が破壊されるのを soybean trypsin inhibitor が阻止したのと考えられる。さらに、receptor preparation を酸、アルカリで処理したり煮沸したりすることによって特異的結合は減少ないし消失した (Table 3)。SH 基を修飾したり S-S 結合を還元する薬剤によっても特異的結合は著しく減少した。以上のことから cyclo(His-Pro) 結合部位はタンパク性成分であり他のペプチドの受容体と同様に<sup>10,13,14)</sup> S-S 結合の保持が結合部位活性に重要であることが判明した。

肝 cyclo(His-Pro) 結合に関して雌の特異的結合は雄の約 8 分の 1 という著しい性差があることが判明したので、雄ラットを用いて castration と testosterone 投与の影響を調べた。雄ラットでは castration を施すと、cyclo(His-Pro) 結合は control 群や偽手術群に比較して著しく減少した。この減少は testosterone の投与によって回復した (Fig. 8)。これらの結果は cyclo(His-Pro) 結合部位の調節に testosterone が重要な役割を演じていることを示している。ちなみに脳の opiate 受容体<sup>15)</sup> や肝の prolactin 受容体<sup>16)</sup> は cyclo(His-Pro) 結合の場合とは逆



に, castration によって増加し, testosterone 投与によって減少することが報告されている。

これらの castration による受容体の変化は結合の親和性の変化ではなく, いずれも結合部位数の変化であった。肝 cyclo(His-Pro) 結合の結合部位数を維持するのに testosterone が重要な役割を果していることが明らかとなったが, 性差の生理的意義については不明である。

Cyclo(His-Pro) 結合部位の調節機構に関して, cyclo(His-Pro) 投与による変化を調べたところ 15 mg/kg 3 日間投与で特異的結合が著しく減少することが判明した (Table 6)。Scatchard 解析によって, これは結合部位数の減少に由来するものであり, 親和性には変化はみられなかった。結果には示していないが, TRH 25 mg/kg 投与によって肝 cyclo(His-Pro) 結合には変化がみられなかった。これらのことは, cyclo(His-Pro) 結合部位が cyclo(His-Pro) 自身の投与によって down-regulate されることを示している。Prasad ら<sup>17)</sup> は新生ラットの副腎皮質の cyclo(His-Pro) 結合部位が cyclo(His-Pro) 自身の投与によって同様に down-regulate されることを報告している。Cyclo(His-Pro) 自身の投与によって cyclo(His-Pro) 結合部位が減少し, 投与中止によって回復する現象は他のペプチドの受容体については, しばしばみられる共通した現象である<sup>18-20)</sup>。

## 結 語

ラット肝に cyclo(His-Pro) 特異的結合部位を見出し, その生化学的検討を行い以下の成績を得た。

1) Cyclo(His-Pro) 結合は肝細胞膜分画にもっとも多く認められ,  $K_d=92$  nM,  $B_{max}=\$

2.1 pmol/mg protein の single binding site であった。

2) Cyclo(His-Pro) 結合部位には, その構成成分である L-His や L-Pro はほとんど反応せず, TRH の交叉反応もきわめてわずかで cyclo(His-Pro) に特異的であった。

3) Cyclo(His-Pro) 結合は陽イオン, ことに 2 価の陽イオンによって著しく減少した。

4) 肝細胞膜分画を trypsin や phospholipase A で処理すると, cyclo(His-Pro) 特異的結合は著しく減少し, SH 基や S-S 基の修飾によっても著しく減少することを見出した。これらの性状は他のペプチドの受容体に共通のものである。

5) 肝 cyclo(His-Pro) 結合に著しい性差のあることを見出した。雄ラットの肝における特異的結合は, 雌のもの約 8 倍であり, castration により著減し, testosterone の補充で回復することを明らかにした。

6) Cyclo(His-Pro) 結合は cyclo(His-Pro) 自身の投与によって down-regulate されることを明らかにした。

7) 以上, cyclo(His-Pro) が TRH の代謝産物であると当初報告されたにもかかわらず, 肝に TRH とは無関係の cyclo(His-Pro) 特有の結合部位が存在し, 他のペプチドの受容体と共通の生化学的な性状を有することを明らかにした。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 懇切な御指導, 御校閲を賜りました森 昭胤教授ならびに小川紀雄助教授に深く感謝致します。

本研究の要旨は第39回日本自律神経学会総会において発表した。

## 文 献

1. Prasad C, Matsui T and Peterkofsky A : Antagonism of ethanol narcosis by histidyl-proline diketopiperazine. *Nature* (1977) 268, 142-144.
2. Prasad C, Mori M, Wilber JF, Pierson W, Pagues J and Tayaraman A : Distribution and metabolism of cyclo(His-Pro). A new member of neuropeptide family. *Peptides* (1982) 3, 591-598.
3. Yanagisawa T, Prasad C and Peterkofsky A : The subcellular and organ distribution and natural

- form of histidyl-proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay. *J Biol Chem* (1980) **255**, 10290–10298.
4. Mori M, Mallik T, Prasad C and Wilber JF : Histidyl-proline diketopiperazine cyclo(His-Pro) : Measurement by radioimmunoassay in human blood in normal subjects and in patients with hyper- and hypothyroidism. *Biochem Biophys Res Commun* (1982) **109**, 541–547.
  5. Lamberton RP, Lechan RM and Jackson IMD : Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine in the rat central nervous system and pancreas. *Endocrinology* (1984) **115**, 2400–2405.
  6. Bataini F, Koch Y, Takahara Y and Peterkofsky A : Specific binding to adrenal particulate fraction of cyclo(His-Pro), a TRH metabolite. *Peptides* (1983) **4**, 89–96.
  7. Marquardt DW : An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameter. *J Soc Indust Appl Math* (1963) **11**, 431–441.
  8. Ogawa N, Mizuno S, Kishimoto T, Mori A, Kuroda H and Ota Z : Effects of transition metals on TRH-receptor interaction. *Neurosci Res* (1984) **1**, 363–368.
  9. Tsushima T : Characterization of hepatic growth hormone receptor from pregnant rabbits ; in *Growth and Growth Factors*, Japan Medical Research Foundation ed., University of Tokyo Press, Tokyo (1980) pp. 171–190.
  10. Ogawa N, Yamawaki Y, Kuroda H, Nukina I, Ota Z, Fujino M and Yanaihara N : Characteristics of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors in rat brain. *Peptides* (1982) **3**, 669–677.
  11. Tsushima T, Sasaki N, Imai Y, Matsuzaki F and Friesen HG : Characteristics of solubilized human-somatotropin-binding protein from the liver of pregnant rabbits. *Biochem J* (1980) **187**, 479–492.
  12. Pasternak GW and Snyder SH : Opiate receptor binding, effects of enzymatic treatments. *Mol Pharmacol* (1974) **10**, 183–193.
  13. Ogawa N, Mizuno S, Mori A, Nukina I and Yanaihara N : Properties and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptors in the rat brain. *Peptides* (1985) **6** (Suppl.1), 103–109.
  14. Dufau ML, Ryon D and Catt KJ : Disulphide groups of gonadotropin receptors are essential for specific binding of human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Acta* (1974) **343**, 417–422.
  15. Hahn EF and Fishman J : Changes in rat brain opiate receptor content upon castration and testosterone replacement. *Biochem Biophys Res Commun* (1979) **90**, 819–823.
  16. Aragona C, Bohnet HG and Friesen HG : Prolactin binding sites in the male rat liver following castration. *Endocrinology* (1976) **99**, 1017–1022.
  17. Prasad C and Edwards RM : Downregulation of adrenocortical cyclo(His-Pro)-binding sites by cyclo(His-Pro) administration to neonatal but not adult rats. *Neurosci Lett* (1984) **49**, 165–169.
  18. Gavin JR III, Roth J, Neville DM Jr, DeMeyts P and Buell DN : Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentration : A direct demonstration in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* (1974) **71**, 84–88.
  19. Lesniak MA and Roth J : Regulation of receptor concentration by homologous hormone. *J Biol Chem* (1976) **251**, 3720–3729.
  20. Ogawa N, Mizuno S, Nukina I, Tsukamoto S and Mori A : Chronic thyrotropin releasing hormone (TRH) administration on TRH receptors and muscarinic cholinergic receptors in CNS. *Brain Res* (1983) **263**, 348–350.

**Characteristics of histidyl-proline diketopiperazine  
binding sites in rat liver.**

**Setsuko OHARA**

**Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,  
Okayama University Medical School.**

**(Director : Prof. A. Mori)**

Characteristics of histidyl-proline diketopiperazine [cyclo(His-Pro)] binding sites in the rat liver were studied using  $^3\text{H}$ -labeled cyclo(His-Pro). Scatchard analysis suggested that the rat liver membrane had a single binding site with an apparent dissociation constant ( $K_d$ ) of  $92 \times 10^{-9} \text{M}$ . Pretreatment of membrane preparations with soybean trypsin inhibitor increased cyclo(His-Pro) binding, and the binding activity was sensitive to trypsin and phospholipase A digestion, suggesting that protein and phospholipid moieties are essential for cyclo(His-Pro) binding. Thiol reagents reduced binding activity, suggesting that the thiol group might be an important constituent of the cyclo(His-Pro) binding site. Cross-reactivities of TRH, TRH analogues, L-His and L-Pro were very low (0.2–9%). Cyclo(His-Pro) binding of female rat liver was markedly lower than that of male rat liver. Scatchard analysis showed that the sex difference in cyclo(His-Pro) binding was due to different binding capacity. Cyclo(His-Pro) binding of castrated male rat liver was significantly decreased. Testosterone replacement raised the binding to the control level. These findings indicate that testosterone is an important factor in the regulation of cyclo(His-Pro) binding in the rat liver. Intraperitoneal injections of cyclo(His-Pro) (15 mg/kg/day) to mice for 3 days caused a significant loss of cyclo(His-Pro) binding sites in the liver. This loss depended on the decrease in the number of binding sites and not on the change in affinity. The cyclo(His-Pro)-mediated loss was reversible, and the specific binding returned to the original level within 3 days of the cessation of cyclo(His-Pro). These results suggest that cyclo(His-Pro) participates in regulating its own binding sites in the liver. They also indicate that specific binding sites for cyclo(His-Pro) in the rat liver have similar properties to the receptors for other polypeptides.