

231 ヒト脱落膜細胞からの Endothelin-1 (ET-1)分泌に関する研究

東京医歯大, 同第2内科*

陶守敬二郎, 久保田俊郎, 鎌田周作, 田口 誠, 平田結喜緒*, 丸茂文昭*, 麻生武志

〔目的〕ブタ血管内皮細胞より単離された強力な血管収縮作用を有するET-1は, その胎児・胎盤系での役割も注目され, ヒト羊水中や臍帯血中での存在, rabbit子宮内膜からのET-1分泌などが報告されている。本研究では, 胎児の成長や子宮内環境維持に重要な役割を果たす羊水と特に関連の深い脱落膜に注目し, そのET-1分泌の可能性について検討した。〔方法〕①妊娠初期婦人より採取した脱落膜をcollagenase-DNase処理後, メッシュにてlarge cells (PRL分泌細胞)を分離し, 1×10^6 cells/wellに調整した。10% FCS加RPMI-1640液中にて95% air・5% CO₂下に24時間細胞培養を行ない, 培養液中のET-1濃度をすでに報告した特異的RIAにて測定した。また, この分泌機構に及ぼす細胞内Ca²⁺の影響を検討するため, Ca²⁺ mobilizerのCa²⁺ ionophore (Ca²⁺ INP)やprotein kinase C (PKC) activatorのPMAを培養液に添加した際の脱落膜からのET-1分泌量を, 薬剤を加えないcontrolと比較した。②脱落膜細胞を同様に培養し4日目に, 10⁻⁷ MのET-1で刺激した際の脱落膜細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)の変化を, Fura-2 AM法により測定した。〔成績〕1)脱落膜細胞からのET-1分泌が確認された。24時間後のET-1濃度は, 10⁻⁶ M Ca²⁺ INP群; 13.4±7.2, 10⁻⁶ M PMA群; 4.9±3.7, control; 4.3±2.8 pg/ml (mean±SD)で, Ca²⁺ INP群で増加傾向を示した。2)ET-1刺激後の脱落膜[Ca²⁺]_iには有意な変化はみられなかった。〔結論〕脱落膜からのET-1分泌が証明された。この分泌機構にCa²⁺ channelを介する[Ca²⁺]_iの増加が影響する可能性は示唆されたが, ET-1刺激後の[Ca²⁺]_iには変化がないことが明らかとなった。

232 ヒト LH/hCG レセプター cDNA のクローニング

群馬大学

峯岸 敬, 中村和人, 長谷川喜久, 伊吹令人, 五十嵐正雄

〔目的〕近年ラット、ブタのLH/hCGレセプターcDNAの構造は、明らかとされたが、ヒトのレセプター構造は、未だ解明されていない。ヒトにおける排卵の機序を知る為にも、ヒトLH/hCGレセプターの構造を解明する事が必要で、今回我々はラットLH/hCGレセプターのcDNAをプローベとして用いて、ヒトLH/hCGレセプターのクローニングを試み、その構造を明らかにできたので報告する。〔方法〕既知のラットLH/hCGレセプターcDNAの塩基配列より、PCR法にて600bpの断片を得て、ラットLH/hCGレセプター全長のクローニングを行った。これをプローベとして、自製のヒト卵巣cDNAライブラリーのスクリーニングより二つのクローンを得た。ジデオキシ法にて、シークエンスを行い塩基配列を決定し、アミノ酸構造を推定した。〔成績〕cDNAより推定されるレセプター蛋白は、674アミノ酸(75632 dalton)であり、細胞外に335個、膜貫通領域に267個、更に細胞内に72個のアミノ酸から構成されと考えられる。細胞外ドメインには、6個のN-linkの糖鎖が結合可能部位が存在し、膜貫通領域には、7つの膜貫通箇所が推定され、G蛋白結合レセプターとしての特徴を備えている。膜貫通領域に於ては、ラット、ブタのレセプターと90%以上の、又TSH、FSHレセプターと約70%の相同性を示した。細胞内ドメインには、セリン、スレオニンが多数存在し、protein kinase Cによるリン酸化可能な三箇所を含んでいた。〔結論〕ヒトLH/hCGレセプターcDNAのクローニングを行い、その全構造を明らかに出来た。