

Bradykinin receptor と分娩発来機序

秋田大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 真木正博教授)

竹 内 譲

Bradykinin Receptor and the Mechanism of the Onset of Labor

Yuzuru TAKEUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita

(Director: Prof. Masahiro Maki)

概要 Bradykinin (BK)の子宮収縮に關与する役割を解明する目的で,放射活性 BK を用い radioreceptor assay (RRA) にて BK receptor について研究した。

まず BK receptor 標品の調製法および BK receptor 活性測定法について検討した。BK receptor 標品の調製については,組織をホモゲネートし遠心分離するさいの,遠心条件について検討したところ 5,000×g, 30分間遠心し,その上清を10,000×g, 30分間遠心して得た沈査において,単位タンパクあたりの specific binding は最も大きく145f mole./mg protein であつた。BK receptor 活性測定法については,インキュベートするさいの温度,反応時間,使用する核種および緩衝液中のイオン濃度の効果について検討したところ,それぞれ0℃, 45分間, [³H]BK および5mM 程度の Mg⁺⁺を加えることが適当であると思われた。次に,この検討した方法で,妊娠分娩関連組織の BK receptor について研究し,次の結果を得た。

- 1) ヒト卵膜およびラット子宮において特異的結合 BK receptor の存在を示した。
- 2) ラット子宮については,妊娠周辺時期における association constant (Ka) および maximal binding capacity (MBC) を求め,その変動を明らかにした。妊娠15日において Ka および MBC が最低となつた。このことは子宮の収縮抑制という意味で妊娠の維持に合目的的であると思われる。
- 3) 分娩時には, Ka および MBC ともに妊娠中に比して大きな値を示したが,非妊娠に比して MBC は同程度 Ka は45%程度にとどまつた。
- 4) BK receptor は plasma membrane 上にあると考えられた。

Synopsis Bradykinin (BK) receptor of uterus and chorionic membrane were studied by radioreceptor assay to clarify the role of BK as an agent contracting uterine muscle.

Basic examination revealed that incubation at 0°C for 45 minutes with [³H] BK in buffer containing 5mM Mg⁺⁺ was the most suitable condition for receptor-BK binding. BK receptor assay of several kinds of tissue such as pregnant rat uterus, human chorionic membrane, and placenta was done and the following results were obtained.

1. Specific BK receptor existed in human chorionic membrane and in rat uterus. Ultracentrifugation revealed that it was on the plasma membrane (145 f mole./mg protein: The highest binding in the pellet at 10,000g centrifugation followed by 600g centrifugation).
2. Association constant (Ka) and maximal binding capacity (MBC) showed the lowest level at 15 days gestation in rat uterus. These seemed to effectively maintain pregnancy by inhibiting uterine contraction.
3. Both Ka and MBC were increased in the uterus of intrapartum rat compared with that of prepartum, but the former was about 45%, and the latter was almost the same as, that of non pregnant rat.

Key words: Bradykinin • Bradykinin receptor • Pregnancy • Labor • Cell membrane

緒 言

秋田大学産科婦人科学教室における DIC や ショックに関する研究の一環として,キニン産生系の研究を進めているうちに,次のような意外なことに気づいた。すなわち,(1)プレカリクレイ

ンは,妊娠と共に増量し始め,妊娠末期には非妊時のほぼ2倍となること⁷⁾,(2)プレカリクレインが分娩の開始と共に著減すること⁷⁾,(3)同時に活性型のカリクレインの増加が認められること⁹⁾,(4)カリクレインの基質である低分子およ

び高分子の両キノゲンの低下があること⁸⁾, などである. BKは平滑筋を収縮させることは, ごく前から知られていることであり, 最近BKの平滑筋収縮作用は Prostaglandins (PGS) 産生と関係あるという報告もなされている¹¹⁾¹²⁾. 以上のことから, キニン産生系が, 分娩発来に何らかの形で関与している可能性があると思われる. そこでキニン産生系からみた分娩発来の機序について, とくに BK receptor について研究することとした.

実験方法

1. BK receptor 標品の調製

約8週齢の非妊 Wistar 系 rat 20匹をネブタール麻酔下に子宮を摘出し, 水冷生食でよく洗浄した. 組織をハサミで細片したのち, 約10倍量のホモジネート緩衝液 (50mM Tris pH 6.5, 5mM MgCl₂, 0.01% NaN₃, 1mM dithiothreitol, 0.1 μM Captopril, 0.25M Sucrose を含む) を加え, Polytron (Kinematica) パワーコントロール 6, 30秒で破碎した. ついで glass Teflon homogenizer により10ストローク磨碎し, ガーゼ3枚にて濾過した.

この濾過液を600×g 30分間遠心したのち, その上清を, 10,000×g 30分間遠心して得た沈査を, 沈査と同量のインキュベーション緩衝液 (50mM Tris pH 6.5, 5mM MgCl₂, 0.01% NaN₃, 1mM dithiothreitol, 0.1 μM captopril, 0.2% bovine serum albumin を含む) に懸濁し蛋白量を測定し, 通常蛋白濃度を2mg/100 μl に調製したのち, BK receptor 標品として, -80℃下にアッセイ時まで保存した.

2. BK receptor 活性測定法

Innis et al.の方法¹³⁾に基づき, [³H] BK (New England Nuclear, Code No. NET-706) を用いて ligand binding assay にて測定した. 測定法を図1に示す. 前述の receptor 標品を含むインキュベーション緩衝液100 μl (通常蛋白2mgを含む), [³H] BK (通常10nCi/170f mole.) (hot BK) を含むインキュベーション緩衝液100 μl, 種々濃度の非標識 BK Triacetate Salt (Sigma No. B-1377) (Cold BK) を含むインキュベーション緩衝

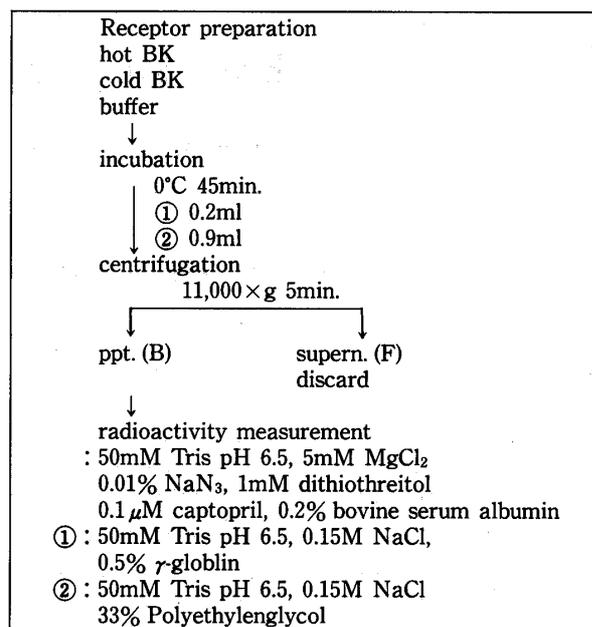


図1 Method of receptor assay

液100 μlの3者を, 0℃45分間インキュベートした.

その後0.5% γ-globulin および0.15M NaClを含む50mM トリス緩衝液 (pH 6.5) 0.2mlと33% Polyethylenglycol 溶液 (50mM Tris pH 6.5, 0.15M NaClを含む) を0.9ml加えよく混合し, 0℃に10分間放置後, 久保田モデル KM 15,200で12,000rpm (11,000×g) 5分間遠心し, receptorと結合した沈査の結合型 BK (B)と, receptorと結合しない上清の遊離型 BK (F)を分離した. 上清をアスピレーションで分離した後, 沈査に水1mlを加えよく沈殿を懸濁し, その500 μlを液体シンチレーションカウンター用バイアルに入れ, プロトゾール (New England Nuclear) 2ml, エコノフルオール (New England Nuclear) 10mlを加え, Aloka Liquid Scintillation System (LSC-700) にて放射活性を測定した.

3. 遠心分画中の BK receptor 活性の測定法

前述の方法で磨碎し, ガーゼ濾過後濾液を, 図2に示すように, 600×g 30分間, 5,000×g 30分間, 10,000×g 30分間, 50,000×g 60分間, 105,000×g 60分間遠心分離した. 沈査は, 各々ほぼ沈査と同量のインキュベーション緩衝液に懸濁した. それぞれの沈査, 上清について前述の BK receptor 活性測定法にて測定した. BK receptor

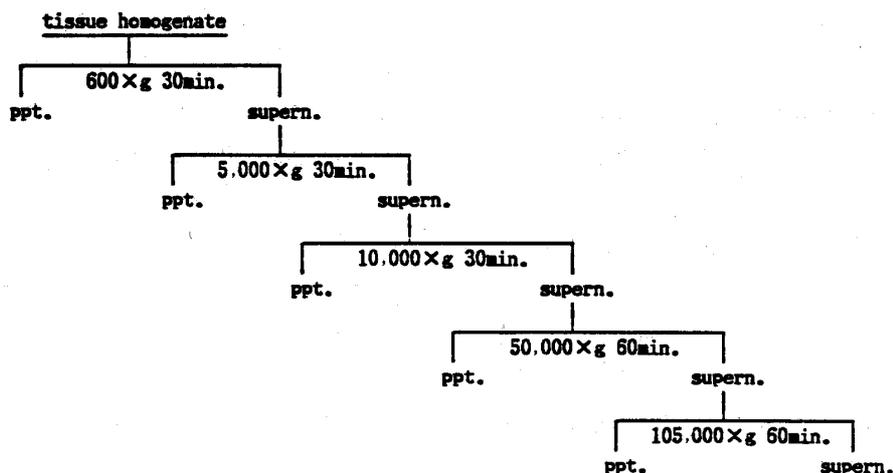


図2 Fractionation of the homogenate by differential centrifugation

活性測定の際、インキュベーション緩衝液は前述の場合と同様で、緩衝液300 μ l中に試量2mg(蛋白量), [3 H] BK (70nCi/921f mole.), 非標識 BK 5n mole. を含むもの、および非標識 BK を含まないものをそれぞれ0 $^{\circ}$ C45分間インキュベートした。

4. BK receptor 活性の測定条件の設定

BKのRRAにおける、(1)核種、(2)インキュベーション温度、(3)インキュベーション時間、(4)緩衝液中の電解質濃度およびキレート剤の効果の4条件について検討した。

4-1 核種の選択

receptor 標品の調製は、Wister系ratの子宮を使用し、前述のとおりに行つた。

放射活性BKは、[3 H] BKと[125 I] BK (8 tyrosine) (NEN No. NEX-097)とを比較した。

インキュベーションは、緩衝液300 μ l中に、(1)試量2mg(蛋白量)、(2)[3 H] BK (130nCi/11.7p mole.)、または、[125 I] BK (8 tyrosine) (50nCi/72.5f mole.)、非標識BKを含まないもの、または非標識BKをそれぞれ4p mole., 40p mole., 400p mole., 4n mole. 含むものの3者を混和し0 $^{\circ}$ C45分間施行した。反応終了後インキュベーション緩衝液を1ml加え混合し、12,000rpm (11,000 \times g) 5分間遠心し、上清をアスピレーションにより除去した。[125 I] BK (8 tyrosine)を用いた系については、沈査をそのままAloka Auto Well Gamma System (ARC 500)にて測定した。[3 H] BKを用いた系については、上清をアスピレー

ション除去後H $_2$ O 1ml加えよく混合し、その500 μ lを前述の方法で測定した。

4-2 インキュベーションの温度および反応時間の設定

温度は、0 $^{\circ}$ Cおよび37 $^{\circ}$ Cについて検討した。反応時間については、5分間から15時間まで検討した。receptor 標品の作製法は、ほぼ前述の通常法と同じであるが、トリス緩衝液のかわりに、25mM potassium phosphate pH 6.5を用いた。RRAには、インキュベーション緩衝液300 μ l中に、[3 H] BK (94nCi/1.74p mole.)、非標識BK 5n mole. 加えたものと加えないもの、receptor 標品(蛋白量2mgを含む)の3者を加えインキュベートした。その後のB.F分離、およびBの測定は前述のとおりである。

4-3 緩衝液中の電解質濃度とキレート剤の効果の検討

receptor 標品の調製法およびRRAは通常の方法と同一である。反応溶液(トリス緩衝液)300 μ l中には、[3 H] BK (90nCi/1.64p mole.)、種々の濃度のCa $^{++}$, Mg $^{++}$, Na $^{+}$, K $^{+}$, EDTA, 非標識BK 5n mole. (加えたものB $_{\infty}$, 加えないものB $_0$)、および蛋白2mgのreceptor 標品を含む。この混合液を0 $^{\circ}$ C45分間インキュベートし、前述のとおり施行した。

5. 蛋白濃度測定法

以上、実験の蛋白濃度測定は、Lowry法¹⁴⁾によつて行つた。

6. BK receptor の Percoll[®]密度勾配遠心法による分析

BK receptor が plasma membrane に結合して存在しているか否かについて、密度勾配遠心法を用いて検討した。生体膜には、固有の酵素(marker enzyme)が分布し、plasma membrane の marker enzyme には、5'-Nucleotidase¹⁵⁾、Na⁺、K⁺-ATPase などがあり、これらが marker として最も多く使用されている⁶⁾。そこで本実験では、5'-Nucleotidase activity を測定し、BK receptor と plasma membrane の関係について検討した。

密度勾配の作製は、Percoll[®] (Pharmacia) を使用した。Percoll[®]は超遠心すると、アングルローターの種類、回転数、回転時間、希釈する溶液の種類により、S字型の勾配を自己形成する¹⁷⁾。通常 Plasma membrane の密度は、1.04附近であるので、この附近の勾配がゆるやかになるような条件をみつけるため、超遠心機を日立65P、ローターを RP 65T、希釈する溶液を0.25M sacrose、とそれぞれ一定にし、回転数、回転時間、Percoll 濃度の3条件を変え、Percoll の説明書の如く一連の標準曲線を作製した。回転数は、30,000rpm (56,350gav) と40,000rpm (110,200gav)、回転時間は25分間45分間、Percoll 濃度は90%、81%、72%、63%、54%、45%、36%、27%、18%、9% について調べ、回転数30,000rpm、回転時間45分間、Percoll 濃度20%とした。

標品は、8週齢 Wistar 系 rat 非妊子宮を、RRA 測定の際の常法にしたがつて作製した。この標品を、20%Percoll (0.25M sucrose)中で、ローター RP 65T 30,000rpm (56,350gav) にて45分間密度勾配遠心し、上層よりエッペンドルフマイクロピペットによつて20の fraction に分け、それぞれの fraction について、5'-Nucleotidase activity, BK receptor specific activity 蛋白量、および密度を測定した。5'-Nucleotidase activity は Michell et al. の方法¹⁵⁾に基づき測定した。すなわち100mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.5 (10mM MgCl₂, 10mM sodium potassium tartate, substrate AMP-Sigma-を含む) 0.2ml を37°C 5分間インキュベートした後、試量0.1mlを加え、37°C 20分間インキュベートした。ついで、10%アスコルビン酸1容と0.42%モリブデン酸アンモニウム0.5M H₂SO₄ 6容との混液を0.7ml加え、45°C 20分間インキュベートすることで反応を止め、日立ダブルビーム分光光度計で820nmの吸光度 (Pi) を測定した。Piの検量線は、NaHPO₄を用いて作製した。BK receptor specific binding activity は前述の方法で作製した。蛋白定量は、Bio-rad のクマシーブリリアントブルーを使用し、対照として20%Percoll (0.25M sucrose)を置き測定した。密度は、Sephadex の誘導体である密度マーカービーズ (Pharmacia) 10タイプにて測定した。

表1 Specific binding activity in fractions obtained from tissue homogenate by differential centrifugation

centrif. (×g)	B ₀ ⁺ [f mole.]	B _{5nM} [#] [f mole.]	protein 量 [mg/100μ]	specific binding [f mole./mg protein]
600 sup.	49.2	32.2		
5,000 sup.	46.2	39.8		
10,000 sup.	37.5	33.8	n.d.*	n.d.*
50,000 sup.	36.9	32.3		
105,000 sup.	30.4	32.4		
600 ppt.	122.1	76.0	1.560	29.6
5,000 ppt.	98.2	61.4	0.888	41.4
10,000 ppt.	81.1	35.8	0.312	145.2
50,000 ppt.	82.6	43.7	0.424	91.7
105,000 ppt.	57.9	40.0	0.336	53.3

+ : bound [³H] BK found in ppt. incubated without cold BK

: bound [³H] BK found in ppt. incubated with 5 n moles cold BK

* : not determined

実験結果

1. 遠心分画中の BK receptor 活性

前述の遠心法(図2)によつて得られた沈査および上清のすべてについて BK receptor 活性を測定した。結果を表1に示す。B₀とB_{5n mole.}との差を specific binding とした。上清については、specific binding が小さいので、沈査についてのみ蛋白量を測定し、蛋白あたりの specific binding を求めた。単位蛋白あたりの specific binding は、5,000×g 30分間遠心し、その上清を10,000×g 30分間遠心して得た沈査において最も大きく145f mole./mg proteinであつた。通常の receptor 標品は、600×g 30分間遠心しその上清を10,000×g 30分間遠心して得た沈査を用いた。

2. BK receptor 測定条件の設定

2-1 核種の選択

放射活性リガンドとして用いる BK について [³H] BK と [¹²⁵I] BK (8 tyrosine) について比較した結果を表2に示す。アッセイ系中に種々の濃度の非標識 BK を加え、receptor と結合した放射活性の割合を%で示した。両者とも非標識 BK 13.4nM を加えた時すでに結合性のかなりの低下が認められるが、さらに1.34μM の非標識 BK を加えると receptor と結合する放射活性 BK の割合は最低になることが分つた。非標識 BK を含まない時の結合率から最低結合率を差し引き、それを specific binding とすれば、specific binding は [¹²⁵I] BK (8 tyrosine) は3.44%、 [³H] BK は12.76%であつた。 [¹²⁵I] BK (8 tyrosine) は8番目のアミノ酸が置換されているので、使用する核種は [³H] BK が適当であると思われる。実際の成績を見ても、 [¹²⁵I] BK (8 tyrosine) よりも

表2 Binding activity of [¹²⁵I] BK and [³H]BK to the receptor

cold BK added [nM]	binding activity (%)	
	[¹²⁵ I] BK	[³ H] BK
0	8.25	16.99
13.4	5.08	8.43
134	4.81	5.07
1,340	4.81	4.23
13,400	4.90	4.30

[³H] BK のほうが specific binding は大きく、放射活性リガンドとして [³H] BK が適しているといえる。

2-2 インキュベーションの温度および時間の設定

インキュベーション温度0℃において、5分間から15時間までにおける、非標識 BK を含まない系での結合(bound) [³H] BK の割合、非標識 BK 5n mole を含む系での結合 [³H] BK の割合および両者の差すなわち receptor と BK との特異的結合 (specific binding) を%で図3に示す。非標識 BK を含まない系での結合 [³H] BK の割合は、3時間ぐらいまではほぼ一定で約18%程度である。15時間では大きく減少して8%となつた。非標識 BK を含む系では、結合 [³H] BK は、10%より時間の経過とともに減少した。特異的結合は、インキュベーション開始後30分ぐらいまで上昇を続け、その後3時間までは10%程度でプラトー状態を示すことが明らかになつた。

インキュベーション温度37℃においては、 [³H] BK と receptor 標品との結合では、特異的結合は、5分間のインキュベーションでピーク5%に達し、その後は減少した。以上の結果よりインキュベーションの温度および時間は0℃45分間が適当

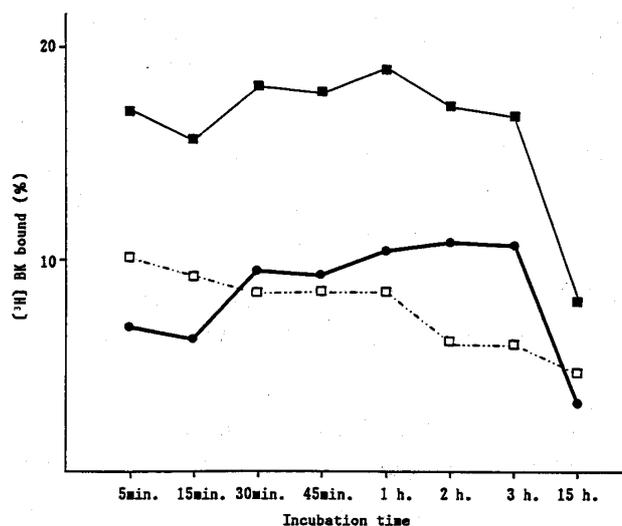


図3 Receptor-BK binding at 0°C. Assay system contained 2mg BK-receptor preparation and 94 nCi/1.71p moles [³H] BK with (B, □---□) or without (A, ■—■) 5n mole. BK. Specific binding (A-B, ●—●)

表3 Effect of ions and EDTA on the receptor-BK binding

agents	conc. mM	addition of non-labeled BK		specific binding (A)-(B) (%)
		(A) none(%)	(B) 5n mole.(%)	
CaCl ₂	0	11.70	3.41	8.29
	1	16.42	2.84	13.58
	10	16.02	2.18	13.84
	100	9.94	1.36	8.58
MgCl ₂	0	11.70	3.41	8.29
	1	16.17	3.28	12.89
	10	15.06	2.52	12.46
	100	10.41	2.51	7.90
NaCl	0	11.70	3.41	8.29
	1	12.52	3.31	9.21
	10	11.68	3.79	7.88
	100	8.48	3.35	5.13
KCl	0	11.70	3.41	8.29
	1	11.48	3.04	8.44
	10	12.31	2.96	9.35
	100	9.78	2.71	7.07
EDTA	0	11.70	3.41	8.29
	1	8.94	3.13	5.81
	10	7.78	3.00	4.78
	100	4.48	1.61	2.87

(A): bound [³H]BK found in ppt. incubated without cold BK(B): bound [³H]BK found in ppt. incubated with 5n moles cold BK

であると考えられる。

2-3 緩衝液中の電解質濃度とキレート剤の効果の検討

RRAの際、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺、Na⁺、K⁺をそれぞれ1 mM、10mM、100mM含む系およびEDTAを1 mM、10mM、100mM含む系について測定を行い、それぞれの影響を明らかにした。測定結果を表3に示す。Ca⁺⁺、Mg⁺⁺、Na⁺、K⁺などの陽イオンは、濃度が1mMより10mM程度の時 specific binding 活性を増大させる。とくにCa⁺⁺およびMg⁺⁺を加えた場合には、活性の増加が著しい。しかしCa⁺⁺はアデニール酸シクラーゼの阻害剤であるので、そのような実験目的の場合には、インキュベーション緩衝液には、Mgイオンのみ5mM程度加えることが適当と思われる。なおEDTAは specific binding 活性を減少させる。

3. 妊娠、分娩に関連する組織のBK receptor 活性

妊娠、分娩に関連する組織として、ヒト卵膜、ヒト臍帯、ヒト胎盤、ラット子宮について、BK receptor 活性を測定した。ヒト臍帯およびヒト胎盤では、非特異的結合はみられたが、非標識BKの濃度を変化させても結合BKの割合は変化せず、特異的結合はきわめて少ないものと考えられる。ヒト卵膜およびラット子宮においては、反応

系に加える非標識BKの濃度を増加させるにつれ receptor 標品に対する結合活性は小さくなる、いわゆる特異的結合が認められた。したがってこれらの標品中には、BK receptor が存在するものと考えられる。

ヒト卵膜におけるBK receptor の displacement curve を図4に、ラット子宮におけるBK receptor の displacement curve を図5に示す。図4および図5は、ともに種々の濃度の非標識BKを加えた場合の(対数目盛り)、標識BKの receptor との結合を%で示している。ヒト卵膜およびラット子宮における specific binding は各々

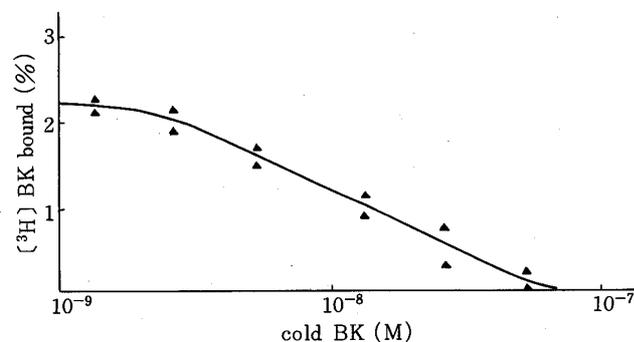


図4 Displacement curve of BK receptor of the fetal membrane. BK-receptor preparation (2mg) of the fetal membrane was incubated with [³H]BK and various concentrations of cold BK at 0°C for 45min.

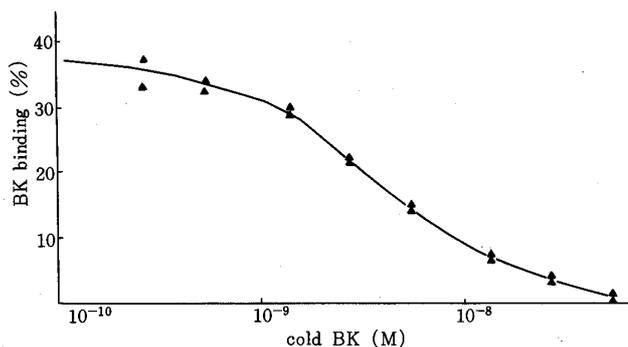


図5 Displacement curve of BK receptor of the non-pregnant rat uterus. BK receptor preparation of the rat uterus was incubated with [^3H] BK and various concentrations of cold BK at 0°C for 45 min.

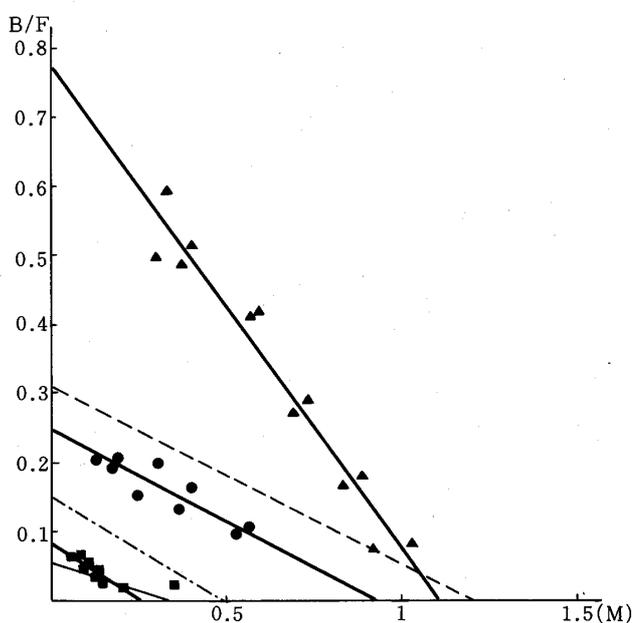


図6 Scatchard plots of interaction between BK and BK-receptor obtained from the rat uterus in various perinatal stage.

: non-pregnant, \blacktriangle \blacktriangle : after delivery-----
 : during delivery, \bullet \bullet : preg. 20 days-----
 : preg. 17 days, \blacksquare \blacksquare : preg. 15 days——

2%および38%であった。

次にラット子宮において、非妊時、妊娠15日、妊娠17日、妊娠20日、分娩中、産直後について BK receptor 活性を測定した。それぞれの Scatchard プロット¹⁹⁾を図6に示す。この図より求めた K_a および MBC を表4に示す。 K_a および MBC は、ともに非妊子宮において最も大きく、 K_a は $6.9 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、 MBC は $160 \text{f mole./mg protein}$ であつ

表4 Change in K_a and MBC^{++} of BK-receptor interaction in rat uterus during various stage

	K_a [M^{-1}]	MBC [f mole./mg protein]
non pregnant	6.9×10^8	160
preg. 15days	1.6×10^8	40
preg. 17days	2.8×10^8	30
preg. 20days	3.1×10^8	60
during delivery	2.7×10^8	120
after delivery	2.6×10^8	130

K_a : Association constant

MBC^{++} : Maximum binding capacity

た。妊娠および分娩中は、 K_a 、 MBC ともに表4に示すように変動し、妊娠15日とともに最低となり、分娩時には再度上昇する傾向がみられた。分娩中には、 MBC はほぼ非妊時と同程度で、 K_a は非妊時の約45%であった。

4. receptor 標品の Percoll 密度勾配遠心法による分析

BK receptor 標品を密度勾配遠心し、各 fraction の密度、蛋白量、BK receptor specific binding activity、5'-Nucleotidase activity を測定した。その結果を図7に示す。密度は、fraction No. 7から fraction No. 19まで 1.035g/ml から 1.133g/ml まで図のように変化した。蛋白量は fraction No. 6より増加し fraction No. 8で最大値 2.25mg/ml となり以後減少した。5'-Nucleotidase activity は fraction No. 8および No. 9で強く、fraction No. 9において最大値 $29.04 \mu\text{gPi/h per mg protein}$ であつた。BK receptor specific binding activity は、fraction No. 8および No. 9で大きく fraction No. 9において、最大値12.40%であつた。このことは、BK receptor が plasma membrane 上にあることを示すものである。

考 察

BK の血中半減期は、ラット、イヌ、ネコで約17秒であり²⁰⁾、BK は肺を1回通過すると78~80%が分解されてしまう¹⁰⁾。これは、血漿中および肺の内皮細胞に局在するキナーゼによるといわれている¹⁾。このように生成されるとすぐに分解されるBKは、他の循環しているホルモンと異なり、局所に生成され、そこで何らかの役割をはたし、すぐに消失するという特有の作用様式を示す⁶⁾。

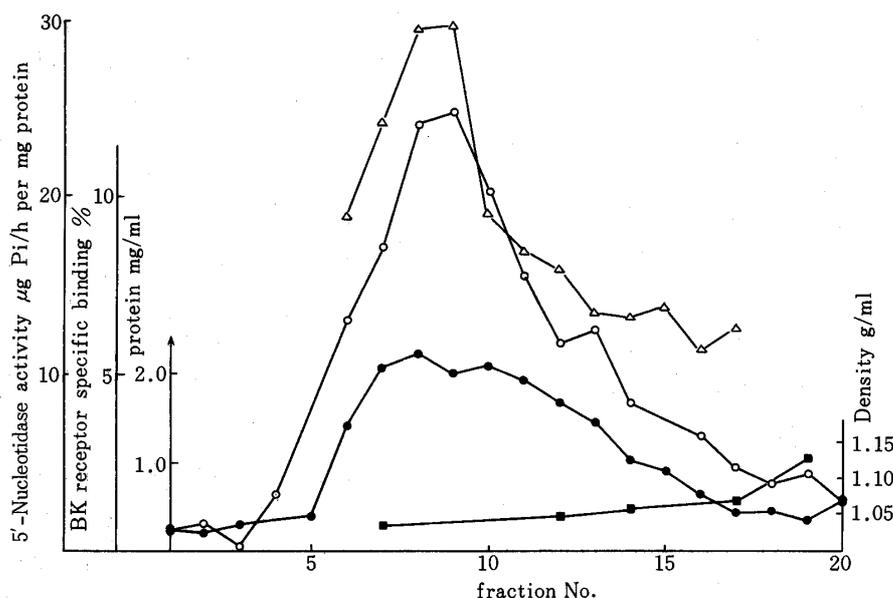


図7 5'-Nucleotidase activity and BK receptor specific binding of 20 fractions of the rat uterus by gradient centrifugation. The marks (Δ - Δ , \circ - \circ , \bullet - \bullet and \blacksquare - \blacksquare) indicate 5'-Nucleotidase activity, BK receptor specific binding, protein and density, respectively.

キニン産生系の、妊娠、分娩への関与を考える場合も、やはり妊娠、分娩に関連する組織局所において、BKが生成され、そこで消費されるという作用様式が充分考えられる。

局所での生成については、非妊時、妊娠時、分娩時、産褥期の各時期における局所の濃度を直接知ることが最も望ましいが、実際は、間接的に局所のBK濃度の上昇が示されているにとどまる。キニン産生に関与する酵素は、血漿カリクレインおよび組織(腺性)カリクレインがあり、前者は血漿中の高分子(HMW)キミノゲンに、後者は低分子(LMW)キミノゲンに作用しBKを産生する²⁾。前述したように、妊娠、分娩中の血漿カリクレイン、HMWキミノゲン、LMWキミノゲンの働きは、局所BK濃度の上昇を示唆する。また、腺性カリクレインとしては膵臓カリクレイン、唾液腺カリクレイン、尿カリクレインなどがあり、妊娠、分娩に関しては、胎児尿カリクレインをとおしての羊水中のカリクレイン活性が重要と思われる。当教室の高橋により、ヒト妊娠末期における羊水中のカリクレイン活性の上昇が示され、血漿カリクレインばかりでなく腺性カリクレインも、妊娠分娩に関連する局所におけるBKの上昇

を示唆する変動を示す。しかし、これらはあくまで間接的に局所におけるBK上昇を示しているのみで、直接的には示していない。また、局所におけるBKの上昇があるとして、血漿カリクレイン、腺性カリクレインのどちらの作用が主であるかは不明である。以上妊娠分娩に関する組織の局所におけるキニンの生成に関しては、それを示唆する多くの報告があり、反面今後解決すべき難解な問題も多い。

局所のBK消費については、妊娠分娩に関連する組織におけるBK receptorの有無およびその変動を知ることは、局所のBK生成を証明することが方法論的に困難ないま、非常に重要であると思われる。

BK receptorに関する研究は、初期においては、ラベル化合物の比活性が低すぎて標的組織に結合したラベル化合物を検出することが困難であったが³⁾、Ody et al.は、放射活性BKとしてTyr¹-カリジン、Tyr⁵-BKおよびTyr⁸-BKの誘導体、receptor標品としてラット子宮とウシ子宮を用いてreceptorの解明にある程度成功した¹⁶⁾。Regoli et al.はBKやカリジンのフラグメントおよび同族体を用いて、ウサギ大動脈や腸間膜動脈

に対する作用を調べ、キニンの receptor が存在するであろうとした¹⁸⁾。Innis et al. は、放射活性 BK として [³H] BK を使用し、モルモット回腸、結腸、十二指腸、ラット子宮における BK receptor の存在を示した¹⁹⁾。

この研究では、Innis et al. の方法に基づき、まず測定法の検討を行った。receptor 標品の調製については Innis et al. は、ガーゼ濾過後50,000×g 10分間2回超遠心し、その沈査を使っているが、この実験では、105,000×g まで遠心し10,000×g の沈査において最も良い結果を得たので、receptor 標品としては、600×g 30分間遠心し、その上清を10,000×g 30分間遠心して得た沈査を用いた。

RRA の際、インキュベーション温度および時間については、ほぼ Innis et al. の成績と同様であった。37℃における結合が非常に不安定であること、0℃における結合は安定で反応開始後90分で解離が始まることなどは、ほぼ同じ結果であった。イオンの影響については、Innis et al. は、80 mM における影響について特異的結合活性は減少するという結果を報告しているが、この実験で種々の濃度について検討したところ、1mM から10mM 程度の濃度では、Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺, K⁺などの陽イオンは、すべて特異的結合活性を増加させた。

以上、BK receptor 標品の調製法、RRA について検討した。その検討した方法で、妊娠、分娩に関連する組織（ヒト卵膜、ヒト臍帯、ヒト胎盤、ラット子宮）について BK receptor 活性を調べ、ヒト卵膜とラット子宮の2カ所において、特異的結合を明らかにした。ラット子宮については、非妊時、妊娠時、分娩時、産褥期における Ka および MBC を求めた。Ka および MBC は、ともに非妊子宮で最大であった。妊娠中は、非妊時に比して Ka および MBC は小さく、妊娠15日でも最低となった。このことは、子宮を収縮させないという意味で、妊娠の維持に非常に合目的的であると思われる。また分娩時に関しては、Ka および MBC ともに非妊時より大きくなることを予想したが、そうはならず、MBC はほぼ非妊時と同程度

にとどまり、Ka は非妊時の約45%であった。しかしこの値も分娩中と比べれば、両方とも大きくなっており、分娩末期の BK の上昇を考えあわせると、BK の分娩への関与として意義のあることと思われる。

さて、一般的には、分子量の大きい親水性物質のペプチドホルモンは、膜を通過することができず、したがって細胞の表面膜つまり形質膜 (plasma membrane) に receptor があり、分子量が小さくてしかも疎水性物質であるステロイドホルモンや甲状腺ホルモンは、形質膜を通過して細胞の中にはいることができ、receptor は細胞質にある⁴⁾。BK は9個のアミノ酸よりなるペプチドであるので、receptor は plasma membrane 上にあると思われる。そこで、Percoll 密度勾配遠心法を用い、plasma membrane の marker enzyme である 5'-Nucleotidase activity と BK receptor specific binding activity を測定し、BK receptor が plasma membrane 上にあることを確認した。

稿を終えるにあたり、終始御指導を賜りました恩師真木正博教授に心から深謝致します。

また多くの御助言を頂きました秋田大学生化学協坂 晟助教授に謝意を表します。

文 献

1. 加藤久雄, 岩永貞昭: キニナーゼ II, 凝固・線溶・キニン(青木延雄ら編), 413, 中外医学社, 東京, 1980.
2. 真木正博: 蛋白分解反応という立場からみた凝固・線溶・キニン系, 血液と脈管, 13: 169, 1982.
3. 守屋 寛, 藤本幸雄: カリクレイン・キニン系の概要と最近の進歩, カリクレイン・キニン(守屋寛ら編), 23, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1982.
4. 野沢義則, 香川靖雄: 膜レセプター, 生体膜と疾患, 29, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1982.
5. 大石幸子, 鹿取 信: キニンの薬理作用, 凝固・線溶・キニン(青木延雄ら編), 417, 中外医学社, 東京, 1980.
6. 佐々木嵩, 牧田 章: 形質膜の純度検定, 生化学実験講座14, 生体膜(日本生化学会編), 228, 東京化学同人, 1978.
7. 曾我賢次: 産科・婦人科における血漿プレカリクレインの生理と病理, 日産婦誌, 34: 1763, 1982.
8. 曾我賢次: 生殖の生理と病理におけるセリンプロテアーゼの意義, 日産婦東北会報, 30: 48, 1982.
9. 曾我賢次, 関美千子, 真木正博: 生殖生理におけ

- る血液カリクレインの意義. 血液と脈管, 13: 484, 1982.
10. *Ferreira, S.H. and Vane, J.R.*: Half-lives of peptides and amines in the circulations. *Nature*, 215: 1237, 1967.
 11. *Hamberg, M., Hedqvist, P., Strandberg, K., Svensson, J. and Samuelsson, B.*: Prostaglandin endoperoxides IV. Effect on smooth muscle. *Life Sci.*, 16: 451, 1976.
 12. *Hamberg, M., Svensson, J., Hedqvist, P., Strandberg, K. and Samuelsson, B.*: Involvement of endoperoxides and thromboxanes in anaphylactic reactions. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 1: 495, 1976.
 13. *Innis, R.B., Manning, D.C., Stewart, J.M. and Snyder, S.M.*: [³H] Bradykinin receptor binding in mammalian tissue membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 2630, 1980.
 14. *Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.*: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
 15. *Michell, R.H. and Hawthorne, J.N.*: The site of diphosphoinosited synthesis in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21: 333, 1965.
 16. *Oda, C.E., Goodfriend, T.L. and Pena, C.*: Bradykinin receptor-like binding studied with iodinated analogues. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 175, 1980.
 17. *Pertoft, H., Laurent, T.C., Laas, T. and Kagedal, L.*: Density gradients prepared from colloidal sillicia particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal. Biochem.*, 88: 271, 1978.
 18. *Regoli, D., Barabe, J. and Park, W.K.*: Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55: 855, 1977.
 19. *Scatchard, G.*: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660, 1949.
 20. *Vane, J.R.*: The release and fate vaso-active hormones in the circulation. *Brit. J. Pharmacol.*, 35: 209, 1969.

(No. 5814 昭60・8・20受付)