

197 クローン化ヒトオキシトシン受容体に対するリガンド結合性・生理的反応性の解析

大阪大

木村 正、東 千尋、井上朋子、菊池知之、久保田康愛、岡田恭芳、徐 東舜、竹村昌彦、佐治文隆、谷澤 修

【目的】オキシトシン受容体 (OTR)の解析は、従来専ら binding assay と生理的反応性を指標に、主に子宮筋と乳腺組織で行われてきた。しかし、これらの組織にはバゾプレッシン (AVP) V_1 受容体 (V_1R) も混在し、ligandとの結合性や反応性の解釈に常に V_1R の存在を考慮する必要がある。今回我々はクローン化OTRcDNAを用い、 V_1R の存在しないCOS-1 cell、Xenopus oocyte上に一過性発現させ、純粋なOTRに対する結合性、生理的反応性を検討した。【方法】OTRcDNAの蛋白コード領域全長を含む断片をpRc/CMVを初めとする種々の発現ベクターに組み込み、COS-1 cellに通常のリン酸カルシウム法を用いて一過性発現をさせた。発現効率を我々が作製した抗OTRポリクローナル抗体を用いた免疫染色にて調べた。最も効率の良いpRc/CMV-OTRを用いてOTRを発現させたCOS-1 cellを浮遊液とし、 3H -OTを用いてbinding assayを行った。試験管内転写法を用いてOTRcRNAを作製し、Xenopus oocyteに微量注入し、種々の ligandに対する生理的反応を、whole cell clump下に膜電流を測定することで電気生理学的に調べた。【成績】抗OTRポリクローナル抗体はOTRを効率よく認識した。OTRのScatchard解析の結果Kd値は6nMであった。他のligandとの競合阻害実験で親和性を比較するとAVPは同じ量の 3H -OTの置換に10倍の濃度が必要であった。生理学的反応性を膜電流の大きさで比較すると100倍量のAVPがOTとほぼ同じ大きさの膜電流を惹起した。子宮収縮能を持つ [Phe², Ile³, Orn⁸]-VPは、OTRに結合するが膜電流を惹起しないことがわかった。【結論】純粋なOTRのligand結合性、生理的反応性を明らかにした。本方法はOTのagonist, antagonistの検討にも有効である。

198 ヒト脱落膜マクロファージ (M ϕ) による血小板活性化因子-アセチルヒドロレース (PAF-AH) の分泌とその意義

大分医大, テキサス大 生化*

榎原久司, 河野康志, 宮川勇生, John M. Johnston*

【目的】ヒト脱落膜での PAFの代謝機構を検討し、PAFの分娩発来における役割を明らかにするため PAFを不活化する酵素 (PAF-AH) の分泌を担う脱落膜細胞成分を分画した。

【方法】帝王切開時の胎盤より脱落膜組織を分離し、collagenase, hyaluronidase 等の酵素処理、Ficoll-Paque比重遠心法、Percoll 非連続的比重遠心法、flow cytometryを用いてその細胞成分を分画、または分析した。それぞれの細胞分画を培養し、上清のPAF-AH活性をMiura (J Clin Invest 82:1983, 1988) の方法により測定した。

【成績】脱落膜組織の酵素処理およびFicoll-Paque 比重遠心法で得られた粗細胞分画の27% に、また、粗細胞分画をさらにPercoll 非連続的比重遠心法で部分精製した分画の52% に M ϕ 表面抗原 (CD14) が認められた。粗細胞分画の培養上清にはPAF-AH活性が時間依存性に蓄積され、Actinomycin Dまたはcycloheximide 添加により濃度依存性に抑制された。蓄積したPAF-AHは血漿型のisozymeであった。培養上清のPAF-AH活性は分画中の M ϕ の比率に正の相関を示した。Flow cytometryを用いて、精製 M ϕ 分画 (96% CD14陽性) および非 M ϕ 分画 (< 5% CD14 陽性) を得た。精製 M ϕ 分画の培養上清には最も強い酵素活性が認められ、非 M ϕ 分画の培養上清からは活性を検出できなかった。また、培養上清のPAF-AHの蓄積は抗CD14抗体および補体の処理で特異的に阻害された。

【結論】ヒト脱落膜には血漿型のPAF-AHを分泌する細胞成分が存在し、その細胞成分は M ϕ であると特定された。脱落膜 M ϕ は分娩発来において PAF の代謝に重要な役割を担っていることが示唆された。