

②

癌化肥満細胞のプロスタグランジンI₂
とE受容体に関する研究

1993

橋 本 均

目 次

緒 言	1
略 語	4
第1章 癌化肥満細胞のPGI ₂ 受容体の同定とその情報伝達系の解析	
実験結果	6
第1節 PGI ₂ の受容体結合反応と促進性G蛋白(Gs)を介する アデニル酸シクラーゼ活性化の解析	7
第2節 光親和性標識法によるPGI ₂ 受容体の同定	15
第3節 PGI ₂ 受容体反応の多様性	25
考 察	31
結 論	38
第2章 癌化肥満細胞のPGE受容体刺激に対する脱感作の解析	
実験結果	39
考 察	46
結 論	49
実験の部	50
謝 辞	57
引用文献	58

緒 言

プロスタグランジン(PG)は、炭素数20個のアラキドン酸などの不飽和脂肪酸から生成する、微量で強い薬理・生理活性を有する一群の脂肪酸の総称で、特徴のあるシクロペンテン構造あるいはトロンパン構造を分子内に有する。生体内ではアラキドン酸に由来するPGが最も多く産生されている。その産生機構が最近明らかにされている。すなわち、細胞が種々の細胞外刺激を受容体で受けると、受容体と共役する機構でホスホリパーゼA₂、あるいはホスホリパーゼCとアシलगリセロールリパーゼが活性化し、細胞膜リン脂質のアラキドン酸を切り出し、アラキドン酸はまずシクロオキシゲナーゼにより酸素分子の添加反応を受け、次いで各種イソメラーゼ作用により、PGI₂、PGE₂、PGD₂、PGF_{2α}、TxA₂など、構造の僅かに異なるPGが多種類生成される¹⁻⁵⁾。生成したPGは細胞外に放出され、自己もしくは周辺の細胞に作用してその機能を調節する⁶⁻⁸⁾。その際、大部分のPGの質的・量的情報は、細胞膜にある受容体に認識され、受容体/G蛋白/エフェクター分子、三者からなる情報伝達系を刺激し、その結果細胞内にセカンドメッセンジャーを生成する。セカンドメッセンジャー作用により細胞代謝が調節される⁹⁾。このPG受容体/情報伝達系の研究は、PGが化学的に不安定なため¹⁰⁾、PGアンタゴニストがほとんど開発されていないため、PG受容体の量が少なく不安定で精製が困難なため^{11,12)}、などの理由で多くの未解決の問題が残されている。

ところで、最近、TxA₂¹³⁾受容体がヒト血小板より精製され¹⁴⁾、ヒト胎盤、巨核芽球細胞の受容体遺伝子のcDNAがクローニングされ、遺伝子cDNAからの受容体一次構造が決定された¹⁵⁾。次いで、TXA₂受容体のcDNA塩基配列を

基にしたホモロジースクリーニングにより、マウス肺のTXA₂受容体のcDNAがクローニングされた¹⁶⁾。さらにその配列を基に、マウス癌化肥満細胞からPGE₂受容体のサブタイプの一つ、EP₃受容体のcDNAがクローニングされ、その受容体の一次構造が明らかにされた¹⁷⁾。しかし、これら以外のPG受容体の構造については依然不明である。

PGI₂はプロスタサイクリンとも呼ばれ、主に血管内皮細胞でアラキドン酸から生成する強い生理活性を示すPGで¹⁸⁾、血小板凝集阻止作用¹⁹⁾や血管平滑筋弛緩作用²⁰⁾を有し、その効果がTXA₂作用に拮抗することから注目されている。しかし、PGI₂の受容体研究は、天然のPGI₂が血液中半減期が約5分と不安定なこと、受容体の組織発現量が少ないこと、アンタゴニストが開発されていないこと、などの理由から他のPGに比しても遅れていた。最近、PGI₂の安定誘導体がいくつか合成され、その放射能標識体も使用が可能となり、PGI₂受容体の研究が可能となった。

ところで、PG受容体の研究は、生命科学の重要課題である生物の情報伝達系の解明に寄与するだけでなく、PGを医薬品として開発する応用研究において有効な基礎知見となるものである。すなわち、現在いくつかのPG^{21,22)}およびその誘導体^{23,24)}が医薬品として使用されており、今後、益々PG類を標的として医薬品開発が行なわれることは明らかである。このPG類の医薬品開発の問題点は、PGが生体のどの組織でも産生され、同じタイプのPGでも組織により、あるいは種差・性差・年齢差などの違いにより効果が異なり、時に相反する効果を示すことがあるという複雑な作用を表わすという事情による。そのため、合成されるアゴニスト、アンタゴニストの作用は、組織等において如何に特異性を高くできるかということであり、そのためにはPG受

容体の構造と機能、情報伝達系、持続的なPG暴露に対する細胞の受容体反応を介する適応現象である脱感作機構を研究することが重要である。

著者は、マウス癌化肥満細胞P-815細胞が、PGI₂とPGE受容体を多量に含有することに着目して²⁵⁻²⁹⁾、PGI₂受容体の情報伝達系、PGI₂受容体の同定とPGE₂受容体の脱感作について研究を行ない、その研究内容をつぎの2章に分けて記載した。

第1章では、まず癌化肥満細胞におけるPGI₂受容体の情報伝達系を解析し、促進性G蛋白(Gs)とカップルし、アデニル酸シクラーゼを活性化するPGI₂に特異的な受容体の存在を明らかにした²⁷⁻²⁹⁾。次にこのPGI₂受容体に対する光親和性標識化合物³⁰⁾を開発し、PGI₂受容体を同定し、分子量を推定した^{31,32)}。さらに、PGI₂受容体が肥満細胞の機能をどのように調節するのかを明らかにするため、トロンピン³³⁾およびATP³⁴⁾による細胞内Ca²⁺動員に対する、PGI₂受容体刺激による作用について調べた³⁵⁾。

第2章では、PGE₁の受容体刺激に対する細胞の脱感作機構に関して解析した。癌化肥満細胞はPGE₁刺激による細胞内cAMP産生に関して、顕著な脱感作を起こすことを観察しその機構を解析した³⁶⁾。脱感作細胞では、PGE₁と受容体が安定な複合体を形成した状態で存在することを見だし、この複合体を部分精製した。その結果、部分精製した複合体中に、分子量60 kDaの新規なGTP結合蛋白質が検出されたことから、複合体の形状としてPGE₁受容体-GTP結合蛋白質(60 kDa)を推察し、これが細胞の脱感作に機能することを示唆した³⁶⁾。

略 語

PG	prostaglandin
PGI ₂	prostaglandin I ₂ , prostacyclin
TxA ₂	thromboxan A ₂
G _s	促進性G蛋白
G _i	抑制性G蛋白
K _d	dissociation constant (解離定数)
B _{max}	binding maximum (最大結合量)
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
cAMP	cyclic AMP
DbcAMP	dibutyl cyclic AMP
8Br-cAMP	8-bromo cyclic AMP
GTPγS	guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)
GDPβS	guanosine-5'-O-(2-thiodiphosphate)
dGTP	2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate
dGDP	2'-deoxyguanosine-5'-diphosphate
dGMP	2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate
cGMP	cyclic GMP
GppNHp	guanylyl-imidodiphosphate
ATPγS	adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)
AppNHp	adenylyl-imidodiphosphate
APNIC	19-(3-azidophenyl)-20-norisocabacyclin
[³ H]APNIC	[15- ³ H ₁]19-(3-azidophenyl)-20-norisocabacyclin
15-epi-APNIC	19-(3-azidophenyl)-15-epi-20-norisocabacyclin

PT	pertussis toxin (百日咳毒素)
IP ₃	inositol-1,4,5-triphosphate
PI	phosphatidylinositol
Fura-2/AM	Fura-2-acetoxymethylester
[Ca ²⁺] _i	cytosolic free Ca ²⁺ concentration
BSA	bovine serum albumin
WGA	wheat germ agglutinin (小麦胚凝集素)
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine
5'-p-FSO ₂ BzGuo	5'-p-fluorosulfonylbenzoilguanosine
SDS	sodium dodecyl sulfate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
UV	ultraviolet
OD	optical density
PBS	phosphate-buffered saline
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

まず、マウス癌化肥満細胞 (P-815細胞株)より粗細胞膜画分を調製し、その膜画分への $[^3\text{H}]$ イロprostの特異的結合について調べた。図2は特異的結合反応の時間と温度に対する依存性を示したものである。インキュベーション温度が高くなると結合速度は増加するが、 37°C では30分以降、結合量が漸減した。 25°C 、60分において最大結合が得られたので、以降の実験はこの温度で行なわれた。

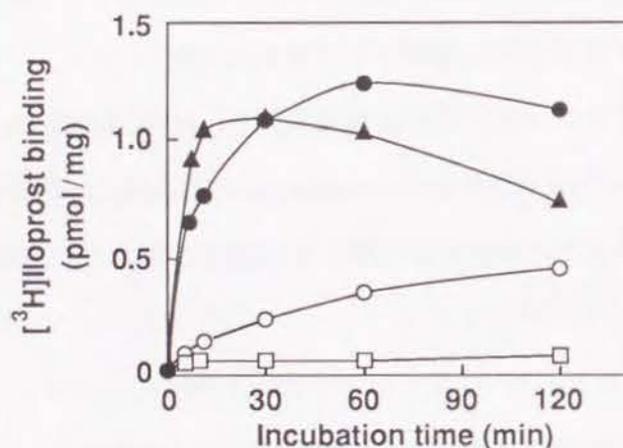


Fig. 2. Time course and temperature dependence of $[^3\text{H}]$ iloprost binding to the membrane fraction.

The membrane fraction was incubated with 20 nM $[^3\text{H}]$ iloprost at 0°C (○), 25°C (●) or 37°C (▲) for total binding. Nonspecific binding assay was carried out at 0, 25 or 37°C , of which 25°C is shown (□). The amounts of bound $[^3\text{H}]$ iloprost were determined at various time intervals.

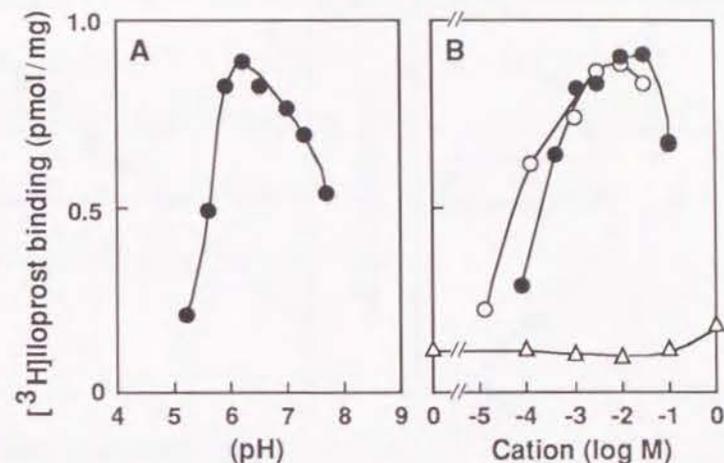


Fig. 3. pH and cation dependencies of $[^3\text{H}]$ iloprost binding.

The membrane fraction was incubated with 20 nM $[^3\text{H}]$ iloprost for 60 min at 25°C in 50 mM potassium phosphate with indicated pH, containing 1 mM EDTA and 10 mM MgCl_2 (A), or in 10 mM potassium phosphate, pH 6.2, containing 1 mM EDTA and the indicated concentrations of MgCl_2 (●), CaCl_2 (○) or NaCl (△) (B). The amounts of bound $[^3\text{H}]$ iloprost were determined as described in the text.

図3に示すように、 $[^3\text{H}]$ イロprostの特異的結合反応は、インキュベーションの際の溶液のpHにより異なり、最大の結合量はpH 6.2で得られた。また、特異的結合反応には Ca^{2+} または Mg^{2+} の二価カチオンが必須であり、ともに10 mMの濃度で最大活性が得られた。しかし、 Na^+ イオンは不要であった。

$[^3\text{H}]$ イロprostの特異的結合の濃度依存性は、図4Aの挿入図に示すように飽和性であり、この結果をScatchard解析した結果から(図4A)、結合部位は一種類であり、その結合解離定数 K_d は10.4 nM、最大結合量 B_{max} は1.12 pmol/mg蛋白質となった。さらにHillプロットの結果、Hill係数は1.0となり、結合には協同性が認められなかった(図4B)。

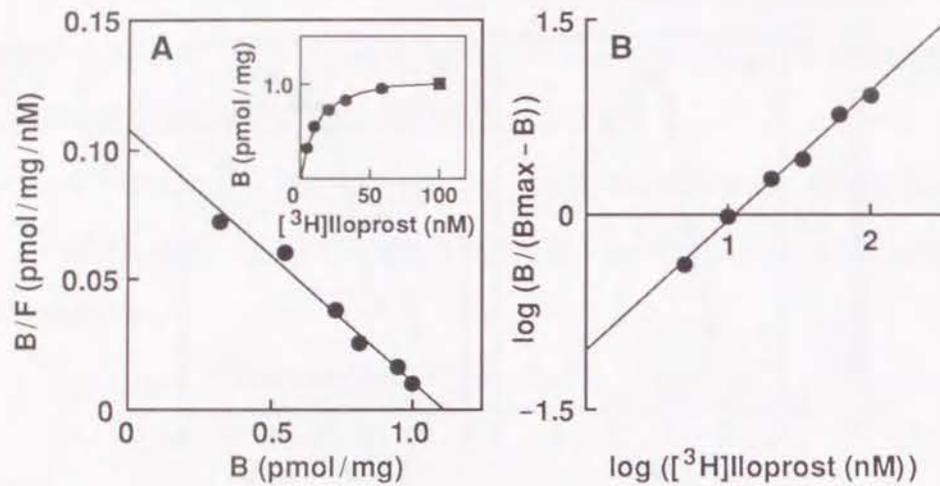


Fig. 4. Plots of specific $[^3\text{H}]$ iloprost binding. The membrane fraction was incubated for 60 min at 25 °C with increasing concentrations of $[^3\text{H}]$ iloprost (1 to 100 nM). Specifically bound $[^3\text{H}]$ iloprost was determined (inset). For the Scatchard (A) and the Hill plot (B) were transformed from the value of specific $[^3\text{H}]$ iloprost binding.

また癌化肥満細胞膜での結合の特異性は、 $[^3\text{H}]$ イロプロストの特異的結合に対する種々の非標識のPGによる阻害曲線より(図5A)、イロプロスト \gg PGE₁ >カルバサイクリン = PGI₂-methyl ester > PGE₂ \gg PGF_{2 α} > PGD₂の順に親和性が高く、PGI₂の類縁体を選択的に親和性が高いことが分かった。既述したように、血小板においてPGE₁はPGI₂受容体にも親和性があることが知られている。このことから考えると、癌化肥満細胞においてPGE₁がPGI₂誘導体に匹敵する高い結合親和性を示すのは、PGI₂受容体への交叉結合の可能性が予想される。

ところで、癌化肥満細胞にはPGI₂受容体に加えて、またPGE (E₁/E₂を結合する)受容体も存在することが知られている²⁵⁾。そこで、PGI₂リガンドのPGE受容体への交叉結合を調べる目的で、 $[^3\text{H}]$ PGE₂結合に対する各種非標識

PGI₂誘導体の阻害作用について調べた(図5B)。その結果PGE₁ \geq PGE₂ \gg イロプロスト \geq カルバサイクリン > PGF_{2 α} > PGD₂の順となり、イロプロストは、 $[^3\text{H}]$ PGE₂の結合部位への親和性は非常に低いことが分かった。以上より癌化肥満細胞には、PGE受容体の他に、PGI₂受容体が存在し、 $[^3\text{H}]$ イロプロストは、PGI₂受容体を選択的に結合していることが明らかとなった。

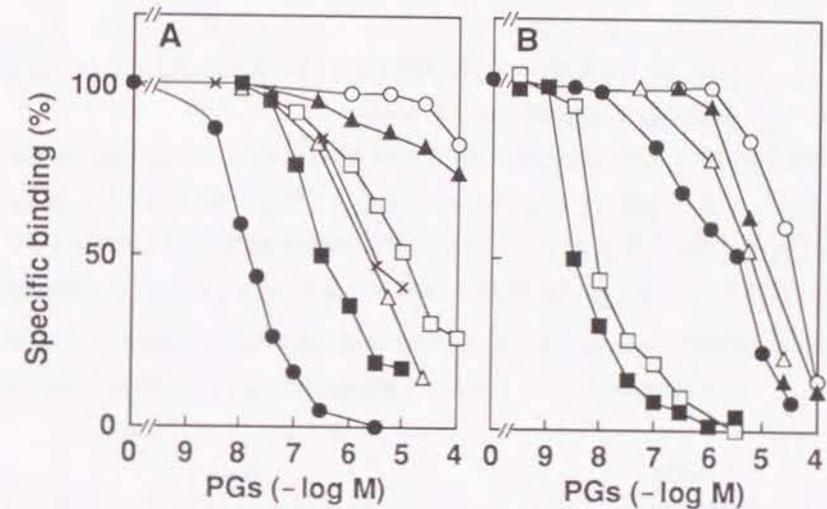


Fig. 5. Effect of unlabeled PG on $[^3\text{H}]$ iloprost and $[^3\text{H}]$ PGE₂ binding.

The membrane fraction was incubated with either 20 nM $[^3\text{H}]$ iloprost (A) or 5 nM $[^3\text{H}]$ PGE₂ (B) in the presence of various concentrations of unlabeled iloprost (●), PGE₁ (■), PGE₂ (□), carbacyclin (△), PGI₂-methyl ester (×), PGF_{2 α} (▲) or PGD₂ (○). All values were corrected for nonspecific binding and are expressed as percent controls. Specific binding in controls was 1 pmol/mg for $[^3\text{H}]$ iloprost and 0.5 pmol/mg for $[^3\text{H}]$ PGE₂.

〔癌化肥満細胞のPGI₂受容体とGsとの機能的会合〕

ところで、いくつかのPG受容体は、G蛋白と会合していることが報告されており、G蛋白と会合する受容体はGTPによりその結合親和性が低下することが知られている。そこで、種々のGTPの誘導体による、結合したイロプロストの解離に対する作用を調べたところ、表1に示すように、GTPやその非水解性誘導体であるGTP γ Sが解離を促進したが、ATPなどではほとんど解離しなかった。

Table I Effect of various nucleotides on the dissociation of bound [³H]iloprost from the membrane fraction.

Membrane fractions were incubated with 100 μ M of various nucleotides for 30 min at 25 °C and remaining amounts of bound [³H]iloprost were determined. About 80% of specifically bound [³H]iloprost remained after incubation for 30 min was taken as 100%. All values are means \pm S.E. of triplicate experiments.

Nucleotide added	Bound [³ H]iloprost (%)
None	100
GTP	65.9 \pm 1.2
GDP	76.6 \pm 1.0
GMP	95.5 \pm 0.69
dGTP	61.1 \pm 0.66
dGDP	77.0 \pm 0.76
cGMP	96.8 \pm 0.83
Guanosine	97.0 \pm 1.5
GppNHp	49.7 \pm 0.92
GTP γ S	16.1 \pm 0.16
GDP β S	18.6 \pm 0.12
ATP	87.7 \pm 0.22
ADP	91.1 \pm 0.52
AppNHp	88.3 \pm 0.75
ATP γ S	87.7 \pm 1.1

また、膜画分に結合した[³H]iloprostの解離を促進するGTP γ Sの効果の用量依存性を図6に示す。100 μ M以上のGTP γ Sで、結合した[³H]iloprostをほぼ完全に解離した。

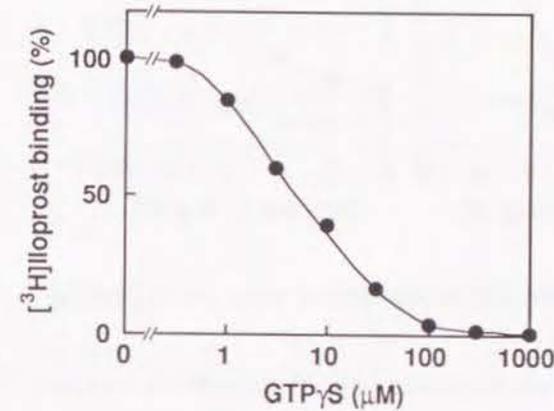


Fig. 6. Effect of GTP γ S on the dissociation of bound [³H]iloprost from the membrane fraction. [³H]iloprost-labeled membrane fractions were incubated in the presence of increasing concentrations of GTP γ S for 30 min at 25 °C, and remaining amounts of bound [³H]iloprost were determined. All values

were corrected for nonspecific binding and are expressed as percent of control. Specific binding of [³H]iloprost was 1 pmol/mg.

PGI₂の細胞作用に関しては、血小板においてPGI₂受容体結合はGsを介してアデニル酸シクラーゼの活性化を起こすことが明らかにされている。癌化肥満細胞においては、PGI₂が細胞内cAMPの上昇を起こすことは知られている²⁵⁾が、その詳細な機構は明らかではなかった。そこで、PGI₂受容体刺激による細胞膜アデニル酸シクラーゼの活性化について検討した。その結果、イロプロストの存在下において、GTPの濃度依存的にアデニル酸シクラーゼ活性が上昇し(図7A)、またGTPの存在下で、イロプロストの濃度依存的にアデニル酸シクラーゼ活性が上昇した(図7B)。

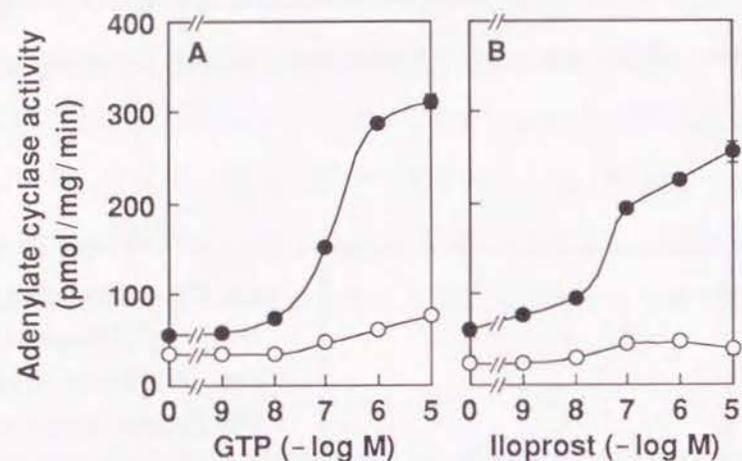


Fig. 7. Effect of iloprost on GTP-dependent adenylate cyclase activity.

A, samples contained indicated concentrations of GTP with (●) or without (○) 1 μ M iloprost. B, samples contained indicated concentrations of iloprost with (●) or without (○) 1 μ M GTP. The samples were assayed for adenylate cyclase activity as described in the text.

これらの実験結果から、癌化肥満細胞には、PGI₂に特異的な受容体が存在し、受容体はGsと機能的に会合して、アデニル酸シクラーゼを活性化することが明らかとなった。

第2節 光親和性標識法によるPGI₂受容体の同定

PGI₂受容体の分子量の決定や、一次構造の解析などを目的とした受容体蛋白質の精製には、効率的な可溶化や精製方法の確立が必要であるが、PGI₂受容体蛋白質は、可溶化やその後のカラムクロマトグラフィーなどの操作により、容易に失活してしまう不安定な蛋白質である¹¹⁾。そこで、光照射により受容体蛋白質と共有結合する、放射性標識安定PGI₂誘導体を合成し、それを用いPGI₂受容体の同定と分子量の推定を行なった^{31,32)}。

[PGI₂受容体に対する光親和性標識化合物の合成]

出発原料として、図8に示した化学的に安定なPGI₂類縁体であるイソカルバサイクリンを用い、それに紫外線によって活性化され、蛋白質のアミノ酸残基と共有結合を形成し得るアジドフェニル基を導入した。

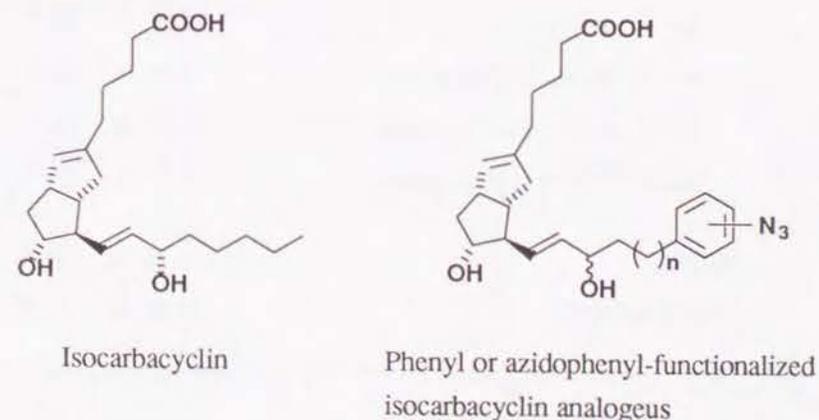


Fig. 8. Chemical structures of isocarbacyclin and phenyl- or azidophenyl-functionalized isocarbacyclin analogues.

表2に、イソカルバサイクリンおよびその ω 鎖にフェニル基またはアジドフェニル基を結合した各誘導体による、 $[^3\text{H}]$ イロprost結合に対する阻害曲線から求めた IC_{50} 値を示す。

Table II IC_{50} of isocarbacyclin derivatives for binding inhibition of $[^3\text{H}]$ iloprost in membrane fractions.

PGs	IC_{50} (M)
Iloprost	0.93×10^{-8}
Isocarbacyclin	3.2×10^{-8}
Carbacyclin	5.7×10^{-6}
Phenylisocarbacyclin derivatives	
n = 1	16.0×10^{-8}
n = 3	3.2×10^{-8}
Azidophenylisocarbacyclin derivatives	
n = 1, p- N_3	25.0×10^{-8}
n = 1, m- N_3 (15S)-epimer	7.9×10^{-8}
n = 3, m-I (15S)-epimer	5.0×10^{-7}
n = 3, m-I (15R)-epimer	6.3×10^{-6}
APNIC	0.30×10^{-8}
15-epi-APNIC	32.0×10^{-8}

$[^3\text{H}]$ イロprost結合に対する阻害曲線から求めた IC_{50} 値で比較すると、癌化肥満細胞膜の PGI_2 受容体は、カルバサイクリンよりもイソカルバサイクリンの方が高い親和性を有していた。そこで、イソカルバサイクリンのアジ

ドフェニルまたはヨードフェニル誘導体を各種合成し、それらの $[^3\text{H}]$ イロprost結合に対する阻害曲線から求めた IC_{50} 値を比較した結果、 ω 鎖の長さ($n=3$)とアジド基を導入する位置(m位)が得られ、 $n=3$, m- N_3 の(15S)-epimerである19-(3-azidophenyl)-20-norisocarbacyclin (APNICと略称)がもっとも優れていることが分かった。APNICの構造式を図9に示す。APNICは表2の結果よりイロprostを上回る高い親和性を有していた。ところで、このAPNICの放射能標識体の合成を検討した結果、 ω 鎖フェニルへのヨード(^{125}I 標識を想定)の導入は親和性の低下を起こしたので、トリチウム標識体の合成を検討し、15位の炭素の水素をトリチウムに置換した放射性標識体を合成した。また、15位の炭素の立体配置がR体である、15-epi-APNICの親和性は大きく低下したことから、トリチウム標識反応によって得られる、15S- および15R-isomerを逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離した。

得られた $[15\text{-}^3\text{H}_1]19\text{-}(3\text{-azidophenyl})\text{-}20\text{-norisocarbacyclin}$ ($[^3\text{H}]$ APNIC) (図9)の比活性は15 Ci/mmolであった。

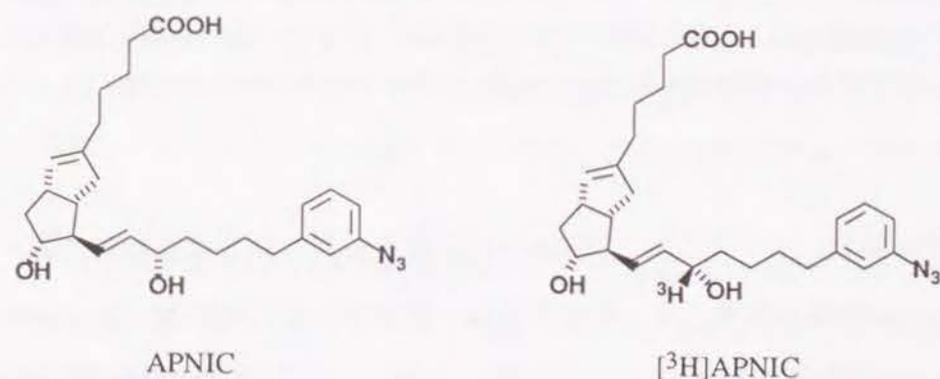


Fig. 9. Chemical structures of APNIC and $[^3\text{H}]$ APNIC.

図10に³H]APNICの癌化肥満細胞膜への結合の経時変化を示す。特異的結合は10分以内に最大となり、総結合量の約70%が特異的結合であった。

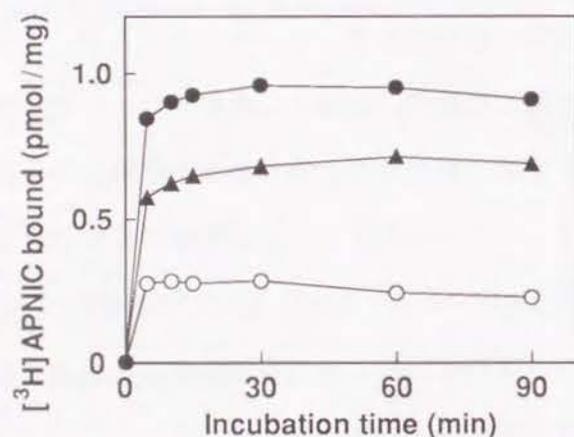


Fig. 10. Time course of [³H]APNIC binding to the plasma membrane.

Plasma membranes (200 μg) were incubated at 30 °C with 13 nM [³H]APNIC for various lengths of time and then assessed for total binding (●) and nonspecific binding (○). The amounts of bound [³H]APNIC were determined at the indicated times as described in the text. The specific binding (▲) was calculated by subtracting the nonspecific binding from the total binding.

また図11に示すように、³H]APNIC結合の特異的結合は飽和性であり、Scatchard解析の結果から、結合部位は一種類で、K_dが4.7 nM、B_{max}が0.58 pmol/mg蛋白質となった。これらの値は、³H]イロプロストの場合とほぼ一致した(第1章 考察)。

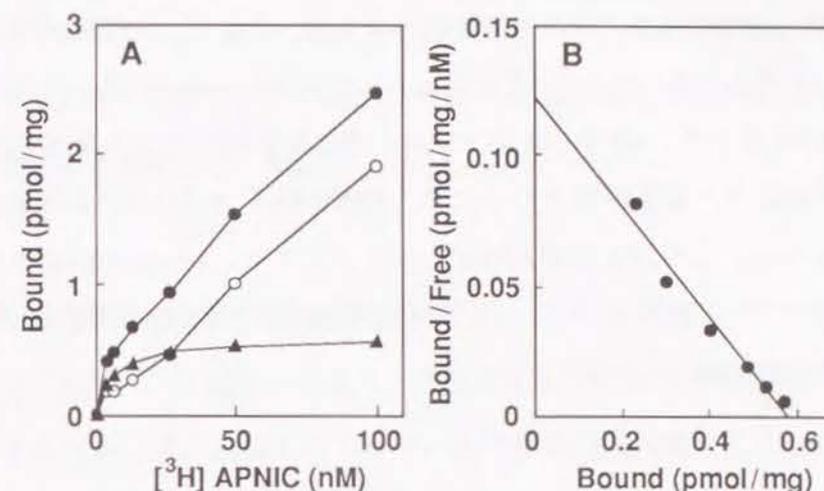


Fig. 11. Scatchard plot for [³H]APNIC binding to the plasma membrane.

Plasma membranes (200 μg) were incubated for 60 min at 30 °C with increasing concentrations of [³H]APNIC (0.2 to 100 nM) in the presence (○) or absence (●) of 100 μM unlabeled iloprost. Bound [³H]APNIC was determined as described in the text. The specific binding (▲) was obtained by subtraction of the nonspecific binding from the total binding at indicated concentrations of [³H]APNIC. The Scatchard plot (B) was transformed from the value of specific binding (A).

第1節でも述べたように、癌化肥満細胞にはPG受容体として、PGI₂受容体以外にPGE受容体が存在している。そこで、APNICがPGI₂受容体のみを特異的に認識しているかどうかを検討するために、³H]APNICの結合特異性について調べた。

図12Aに示すように³H]APNIC結合に対して、非標識APNICはイロプロストと同程度に強く結合を阻害したが、PGE₂はほとんど結合を阻害しなかった。この結果から、APNICはPGI₂受容体を選択的に結合していると考えられた。また、15R-epimer体である15-epi-APNICは³H]APNICの結合阻害作用は弱いものであった。

さらに、APNICのアゴニスト活性について調べるため、APNICが癌化肥満細胞膜のアデニル酸シクラーゼを活性化するかどうかについて調べた(図12B)。1 μM GTP存在下で、APNICは 10^{-9} M以上で濃度依存的にこの酵素を活性化し、 10^{-6} M以上で最大活性となったが、APNICはイロプロストの約80%の活性化であった。この点を除きAPNIC、イロプロスト、15-epi-APNICのそれぞれによるアデニル酸シクラーゼの活性化の程度と、 $[^3\text{H}]$ APNIC結合に対する阻害活性の程度はよく対応した。

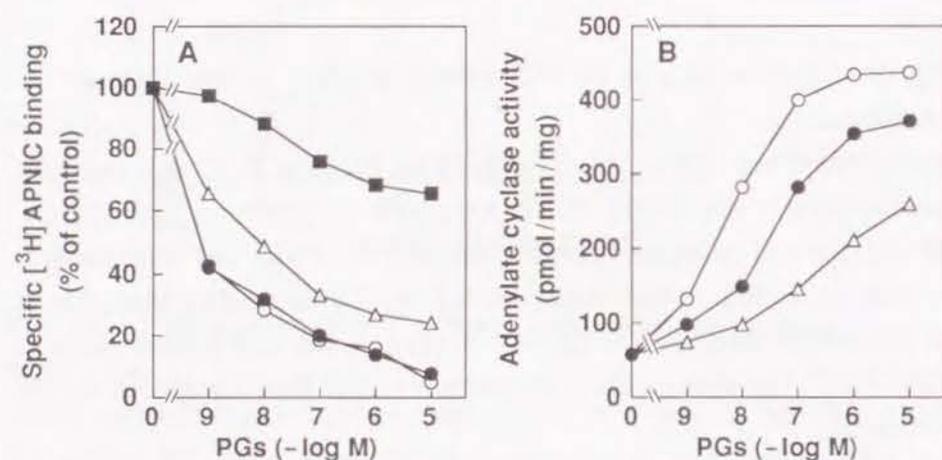


Fig. 12. Effects of unlabeled PGs on the dissociation of bound $[^3\text{H}]$ APNIC from and the stimulation of adenylate cyclase in the plasma membrane.

A, Plasma membranes (200 μg) were incubated with 13 nM $[^3\text{H}]$ APNIC in the presence of various concentrations of unlabeled iloprost (○), APNIC (●), 15-epi-APNIC (△), or PGE₂ (■). All values were corrected for nonspecific binding and are expressed as a percent of the control as described in the text.

B, Plasma membranes (1.9 μg) were incubated with 1 μM GTP in the presence of various concentrations of unlabeled iloprost (○), APNIC (●), 15-epi-APNIC (△). Cyclic AMP formed was measured as described in the text.

これらの結果から、APNICはPGI₂受容体に対して、高い親和性と選択性を有するアゴニストであり、そのPGI₂受容体との結合はアデニル酸シクラーゼを活性化することが分かった。

[光親和性標識化合物 $[^3\text{H}]$ APNICを用いたPGI₂受容体の同定]

$[^3\text{H}]$ APNICがPGI₂受容体蛋白質と、光照射により共有結合を形成することを確認するため、次の実験を行なった。まず癌化肥満細胞膜に $[^3\text{H}]$ APNICを結合させた後、GTP γ Sを添加すると $[^3\text{H}]$ APNICの解離が起こった。しかし細胞膜に $[^3\text{H}]$ APNICを結合させ、254 nmの紫外線を3分間照射した後、GTP γ Sを添加しても $[^3\text{H}]$ APNICがまったく解離しなかった(表3)。

Table III Effects of GTP γ S and UV irradiation on the dissociation of bound $[^3\text{H}]$ APNIC from solubilized membrane fractions.

Membranes prelabeled with $[^3\text{H}]$ APNIC and treated or not by UV irradiation were solubilized and further incubated for 10 min at 30 °C in the presence or absence of 500 μM GTP γ S. The remaining radioactivity was determined as described in the text. All values were corrected for the nonspecific binding.

Treatment	Radioactivity remaining		% Decrease
	- GTP γ S	+ GTP γ S	
	dpm		
None	450 \pm 2.1	211 \pm 8.9	53.1
UV irradiation	388 \pm 11	386 \pm 6.6	0.5

そこで、 $[^3\text{H}]$ APNICを癌化肥満細胞膜の PGI_2 受容体に結合させた後、紫外線を照射し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)により蛋白質を分離した後、X線フィルムに対してフルオログラフィーを約5日間行なった。その結果、図13Bに見られるように、分子量43 kDaと推定される位置にブロードなバンドとして、 $[^3\text{H}]$ APNIC標識受容体が確認された。このバンドは、 $[^3\text{H}]$ APNICを細胞膜に結合させる際に、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ を添加すると減弱すること、また非標識のイロprostを加えるとほぼ完全に消失することから、G蛋白と共役した PGI_2 受容体であることが確認された。尚、電気泳動後のゲルを一定サイズでスライスにし、その放射活性を測定した結果(図13A)からも $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 、イロprostの阻害効果が定量的に確認された。

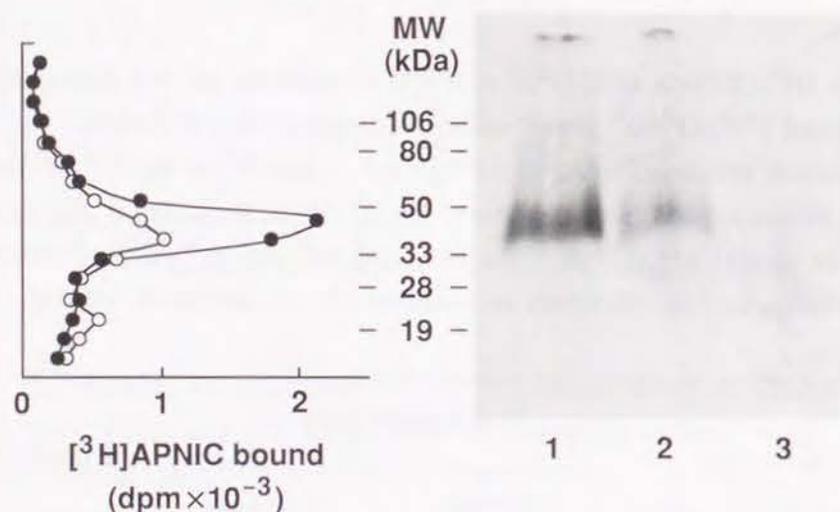


Fig. 13. Photoaffinity labeling of the plasma membrane with $[^3\text{H}]$ APNIC.

Plasma membranes (200 μg) were incubated for 60 min at 30 °C with 13 nM $[^3\text{H}]$ APNIC in the absence (lane 1) or presence of 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (lane 2) or 10 μM iloprost (lane 3). The samples were photolabeled and subjected to SDS-PAGE (4–20%) as described in the text. A, radioactivity in the gel slice; ●, lane 1; ○, lane 2. B, fluorography.

つぎに $[^3\text{H}]$ APNIC結合部位の特異性を調べるために、 $[^3\text{H}]$ APNICを癌化肥満細胞膜に結合させる際に、過剰量の種々の非標識PGを添加後、光親和性標識を行なった(図14)。その結果 PGI_2 の安定誘導体であるイロprost、APNIC、イソカルバサイクリンにより43 kDaのバンドは消失した。また、 PGE_1 でも減弱したが、 PGE_2 、 PGD_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ではコントロールとほとんど変化がなかった。このことから $[^3\text{H}]$ APNIC標識43 kDa蛋白質は、結合リガンドとして PGI_2 (もしくは PGI_2 誘導体)を特異的に認識する、受容体蛋白質であることが分かった。

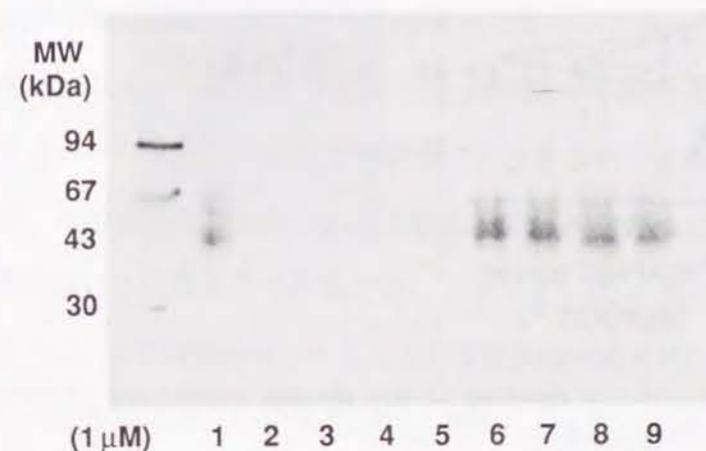


Fig. 14. Effects of unlabeled PGs on photoaffinity labeling with $[^3\text{H}]$ APNIC.

Plasma membranes (200 μg) were incubated for 60 min at 30 °C with 13 nM $[^3\text{H}]$ APNIC in the absence (lane 1 and 9) or presence of 1 μM iloprost (lane 2), APNIC (lane 3), isocarbazycin (lane 4), PGE_1 (lane 5), PGE_2 (lane 6), PGD_2 (lane 7), or $\text{PGF}_{2\alpha}$ (lane 8). The samples were photolabeled and subjected to SDS-PAGE (4–20%) followed by fluorography as described in the text.

さらに同様の方法により、PGI₂受容体の存在が明らかにされているブタ血小板膜を用いて、その分子量を求めた(図15)。その結果、分子量51 kDaのブロードなバンドが認められ、このバンドは癌化肥満細胞における場合と同様に、GTPγSの添加によって弱く、イロプロストの添加によって強く阻害される性質のものであった。

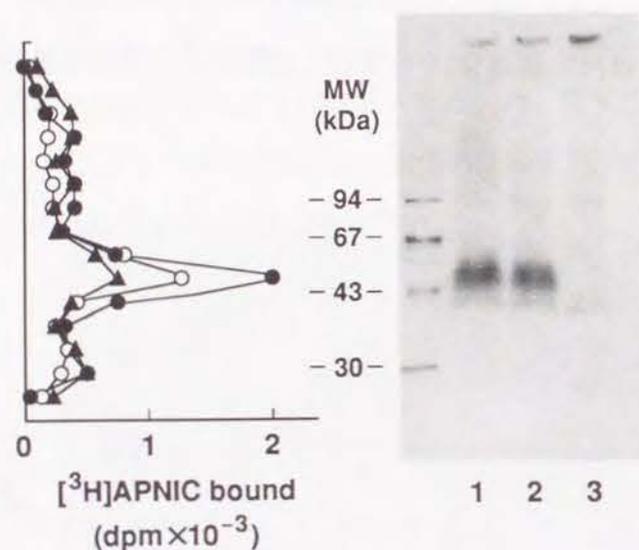


Fig. 15. Photoaffinity labeling of the plasma membrane of porcine platelets with [³H]APNIC.

Porcine platelet plasma membranes (200 μg) were incubated for 60 min at 30 °C with 13 nM [³H]APNIC in the absence (lane 1) or presence of 100 μM GTPγS (lane 2) or 10 μM iloprost (lane 3). The samples were photolabeled and subjected to SDS-PAGE (4–20%) as described in the text. A, radioactivity in the gel slice; ●, lane 1; ○, lane 2; and ▲, lane 3. B, fluorography.

第3節 PGI₂受容体反応の多様性

肥満細胞は、刺激に応じてヒスタミンなどのメディエーターを放出し、炎症反応に関与する細胞である。PGI₂は血管内皮細胞で産生され、血小板や血管平滑筋細胞の機能を調節することはよく知られているが、同じく血管の近傍に多く存在する肥満細胞に対する作用は、ほとんど明らかではなかった。著者は、癌化肥満細胞にATPとトロンビンの受容体があり、両受容体をアゴニスト刺激すると、細胞内の遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が増加し、その結果ヒスタミン放出が促進されることを見いだした。そこで、[Ca²⁺]_i変化を指標にして、PGI₂の受容体刺激で生成するcAMPの効果について調べた。

[Ca²⁺]_iの変化を、Ca²⁺蛍光プローブFura 2を用いて測定した結果を図16に示す。まず、トロンビンで癌化肥満細胞を刺激すると一過性の[Ca²⁺]_i上昇が起こるが、この上昇は細胞外のCa²⁺を除去しても同程度に起こった。しかし百日咳毒素(PT)を前処置した細胞では、トロンビンによる[Ca²⁺]_i上昇が見られなくなった。この結果から、トロンビン受容体はPT感受性Gi蛋白を介して、カルシウム貯留部位からCa²⁺を細胞内に移動させる作用があることが分かった。次に、イロプロストを前処置してからトロンビン刺激を加えると、[Ca²⁺]_i上昇反応が阻害された。一方ATP刺激による[Ca²⁺]_i上昇は、細胞外Ca²⁺を除去すると消失したが、PTの前処置では変化しないことから、ATP受容体を介した細胞外からのCa²⁺流入によるものであることが分かった。このときイロプロストは、ATP受容体刺激による[Ca²⁺]_i上昇をさらに増大させた。

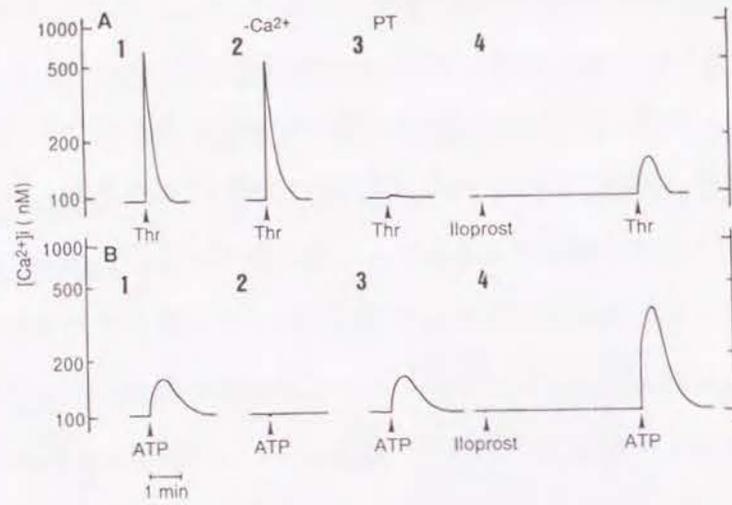


Fig. 16. Effects of iloprost on the thrombin- and ATP-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$.

Fura-2-loaded cells (2×10^6 cells) were stimulated with 0.5 U/ml thrombin (A) or 100 μ M ATP (B) in buffer (1) or in Ca^{2+} -free buffer containing 0.3 mM EGTA (2). Fura-2-loaded cells exposed to 100 ng/ml PT for 3 h were stimulated with thrombin or ATP (3). After fura-2-loaded cells had been preincubated for 5 min at 37 $^{\circ}$ C with 1 μ M iloprost and 0.5 mM IBMX, the cells were stimulated with thrombin or ATP (4). Thrombin or ATP was added at the time indicated by the arrow. The recordings shown are a representative of three independent experiments that yielded similar results.

次に、イロプロスト作用の経時変化と用量依存性について調べた(図17)。イロプロストのATPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する促進作用と、トロンビンに対するその阻害作用の出現は、共に1分間の潜時期の後出現し、約3分で最大に達するという共通なものであった。また5分間前処置したイロプロストの効果は、両刺激に対して同一の効果を示した。これらの結果から、イロプロストによる PGI_2 受容体刺激は、産生する共通のセカンドメッセンジャーの働きを介して、トロンビン受容体とATP受容体を介した、 $[Ca^{2+}]_i$ 作用を調節することが示唆された。

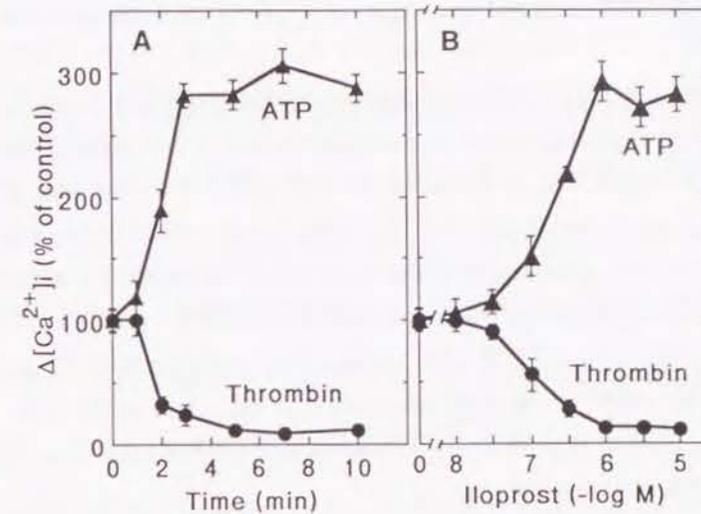


Fig. 17. Time courses and dose dependencies of the effects of iloprost on the thrombin- and ATP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$.

A, Fura-2-loaded cells (2×10^6 cells) were incubated for the indicated times at 37 $^{\circ}$ C with 1 μ M iloprost and 0.5 mM IBMX. B, Fura-2-loaded cells were incubated for 5 min at 37 $^{\circ}$ C with the indicated concentrations of iloprost and 0.5 mM IBMX. The cells stimulated by 0.5 U/ml thrombin (\bullet) and 100 μ M ATP (\blacktriangle), and the peak $[Ca^{2+}]_i$ levels induced by these stimulants were determined as described in the text. The values shown represent percentages of the respective controls and are means \pm S. E. for triplicate experiments. The values of the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in controls were 631 ± 29 nM for thrombin and 41.6 ± 4.1 nM for ATP respectively.

次に、このイロプロストによる $[Ca^{2+}]_i$ 調節作用のPG特異性を調べた(表4)。その結果、イロプロストをはじめ、 PGE_1 、 PGE_2 のような細胞内cAMP産生を引き起こすPGの効果は強く、cAMPを産生しない $PGF_{2\alpha}$ 、 PGD_2 にはほとんど作用が見られなかった。さらに、DbcAMPや8Br-cAMPを添加すると、イロプロストと同様な効果が認められた。これらのことから、イロプロストの作用は、産生されるcAMPの作用を介して発現するものであることが分かった。

Table IV Effects of various PGs, cAMP analogues on the thrombin- and ATP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ and the cellular cAMP level.

After fura-2-loaded cells (2×10^6 cells) had been preincubated for 5 min at 37 °C with or without the indicated agents in the presence of 0.5 mM IBMX, the cells were stimulated with 0.5 U/ml thrombin or 100 μ M ATP. The peak $[Ca^{2+}]_i$ levels induced by these stimulants were determined as described in the text. The values shown represent percentages of the respective controls and are means \pm S. E. for triplicate experiments. For measurement of cAMP, cells (1×10^6 cells) were incubated for 5 min at 37 °C with various PGs in the presence of 0.5 mM IBMX, and then cAMP levels were determined as described in the text. The values of the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in controls were 623 ± 61 nM for thrombin and 42.5 ± 3.5 nM for ATP respectively.

Addition	$\Delta[Ca^{2+}]$		cAMP
	Thrombin	ATP	
	% of control		pmol/ 10^6 cells
1 μ M Iloprost	12.9 \pm 4.5	292 \pm 16	61.5 \pm 2.8
1 μ M PGE ₁	30.3 \pm 6.7	220 \pm 16	34.5 \pm 3.1
1 μ M PGE ₂	60.0 \pm 6.3	187 \pm 21	23.5 \pm 5.6
1 μ M PGF _{2α}	83.1 \pm 8.2	125 \pm 13	4.5 \pm 2.1
1 μ M PGD ₂	95.0 \pm 3.7	112 \pm 10	3.8 \pm 1.8
1 mM DbcAMP	32.9 \pm 8.2	194 \pm 19	
1 mM 8Br-cAMP	38.0 \pm 10	205 \pm 17	

ところで、細胞内カルシウム貯留部位からの Ca^{2+} 動員による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の機構は、ホスファチジルイノシトール(PI)代謝により、ホスファチジルイノシトール-4,5-三リン酸(PIP₂)から特異的ホスホリパーゼC作用で産生される、イノシトール-1,4,5-三リン酸(IP₃)により起こることが知られている。そこで次に、種々の刺激によるPI代謝回転の亢進に対するイロprostの作用について、³Hイノシトール標識細胞を用いて検討した。表5に示すように、トロンビンあるいはATPで細胞を刺激すると、ともに³HIP₃の産生を促進した。細胞を予め、イロprostで5分間前処置しておく、トロンビン刺激による³HIP₃の産生は強く阻害されるが、一方、ATP刺激による³HIP₃の産生は、逆に強く促進された。NaF+AlCl₃は、受容体刺激の代わりにホスホリパーゼにカップルするG蛋白を直接活性化し⁴⁷⁾、ホスホリパーゼCの活性化を介して細胞内 Ca^{2+} の上昇を引き起こす⁴⁸⁾ことが知られている。癌化肥満細胞においても、NaF+AlCl₃処理は、 Ca^{2+} イオノフォアのイオノマイシンと同様に³HIP₃の産生を亢進した。しかし、これらの受容体を介さない刺激による³HIP₃の産生に対しては、イロprostの前処置は無効であった。

この結果から、イロprostの作用点は、ホスホリパーゼCの活性化、あるいはG蛋白によるホスホリパーゼCの活性化ではないことが示唆された。

以上、肥満細胞において、PGI₂受容体刺激により産生するcAMPは、他の受容体刺激により発現する Ca^{2+} 動員を指標にすると、刺激の違いにより全く逆に調節することがあることを示唆するもので、このメカニズムは不明であるが、PGI₂受容体により肥満細胞の機能が多様に調節されることを示す一例となる。

Table V Effect of iloprost on the thrombin, ATP, NaF + AlCl₃ and ionomycin-induced accumulation of IP₃.

After [³H]inositol-labeled cells (2 x 10⁶ cells) had been preincubated for 5 min at 37 °C with or without 1 μM iloprost and 0.5 mM IBMX, the cells were further incubated with 0.5 U/ml thrombin or 100 μM ATP for 30 sec, or with 20 mM NaF plus 10 μM AlCl₃ or 1 μM ionomycin for 5 min. [³H]IP₃ formed was determined as described in the text. The values shown represent percentages of the control and are means ± S. E. for triplicate experiments. The radioactivity of the control was 73.3 ± 2.9 dpm/10⁶ cells for IP₃.

Addition	[³ H]IP ₃ (% of control)	
	None	+ Iloprost and IBMX
0.5 U/ml Thrombin	237 ± 8.5	131 ± 25
100 μM ATP	205 ± 30	289 ± 25
20 mM NaF + 10 μM AlCl ₃	220 ± 4.1	221 ± 5.9
1 μM Ionomycin	235 ± 7.8	233 ± 14

考 察

第1節において著者は、マウス癌化肥満細胞に、PGI₂に特異的な受容体が存在することを明らかにし、その情報伝達系を解析した²⁷⁾。癌化肥満細胞膜への[³H]イロプロストの結合に対する、種々の非標識のPGによる結合阻害の順序は、血小板に報告されている結果¹¹⁾とよく一致しており、PGE₁に比較的高い親和性が認められたが、PGE₂の親和性はイロプロストの100分の1以下であった。一方、癌化肥満細胞膜への[³H]PGE₂結合に対する阻害作用はPGE₁およびPGE₂に選択的であった。これらの結果は癌化肥満細胞に、PGI₂およびPGEのそれぞれに特異的な、2種類の異なるPG受容体が存在することを示すものである。癌化肥満細胞膜における[³H]イロプロスト結合のScatchard解析より求めたBmax (1.12 pmol/mg蛋白質)は、[³H]PGE₂結合のBmax (0.5 pmol/mg蛋白質)の約2倍であり、受容体数においてPGI₂受容体がPGE受容体より多い。またPGI₂受容体の存在が報告されているヒト血小板膜 (Bmax = 1.0 pmol/mg蛋白質)¹¹⁾、マウス神経芽細胞腫とチャイニーズハムスター胎児脳由来細胞の融合細胞NCB-20の細胞膜 (Bmax = 1.28 pmol/mg蛋白質)³⁸⁾、ブタ大動脈平滑筋膜 (Bmax = 0.36 pmol/mg蛋白質)⁴⁰⁾などと比較しても、癌化肥満細胞にPGI₂受容体が豊富に存在していることが分かる。予備的な実験で、ラット腹腔肥満細胞を、イロプロストあるいはPGE₂で刺激することにより、産生される細胞内cAMP量を比較したところ、イロプロスト刺激の方がPGE₂よりも多い結果となった。ラット腹腔肥満細胞を多量に調製することは困難であるため、受容体の結合実験のデータは得られていない。しかし癌化肥満細胞と同様に、肥満細胞にもPGI₂受容体が存在しており、受容体数はPGI₂受容体

がPGE受容体よりも多く、cAMP産生作用とそれに伴う細胞機能の調節作用においても、PGI₂受容体が重要な役割を担っているものと考えられる。

血小板においては、PGI₂によってアデニル酸シクラーゼが、GTP依存的に活性化されることが知られている⁴⁹⁾。癌化肥満細胞膜からの^[3H]イロプロストの解離が、GTPとその非水解性の誘導体で促進されたこと、イロプロストがGTP依存的にアデニル酸シクラーゼを活性化したことから、癌化肥満細胞のPGI₂受容体は、血小板の場合と同様にGsを介してアデニル酸シクラーゼと機能的に会合し、この酵素を活性化して、cAMP産生を促進するものであると考えられる。一方、癌化肥満細胞のPGE受容体もアデニル酸シクラーゼを活性化する²⁵⁾。したがって癌化肥満細胞においては、これら2つの異なるPG受容体がいずれも、cAMPの産生促進系に関与していることになる。

ところで気管、心房や脂肪組織において、PGI₂が直接、[Ca²⁺]_iの上昇を起こすことが示唆されている^{50,51)}。癌化肥満細胞においては、第3節の結果より、イロプロスト単独の刺激によっては、[Ca²⁺]_iの上昇は観察されていない。したがって少なくとも癌化肥満細胞においては、PGI₂受容体が直接、Ca²⁺動因系を活性化する情報伝達系は存在しないものと思われる。

様々な受容体を研究する目的で、光親和性標識リガンドが用いられている³⁰⁾。このようなリガンドの開発においてもっとも重要な点は、母体となるリガンドの構造に修飾を加えて、光親和性標識官能基を導入することにより、受容体に対する親和性と選択性が低下することを、最小限にすることである。PGの受容体に対する光親和性標識リガンドは、これまで多くの報告があり、とくに強力なアンタゴニストが得られ、それを出発原料に利用できるTxA₂の

受容体における成功例が多い⁵²⁻⁵⁶⁾。しかしTxA₂以外のPGについては、利用可能なアンタゴニストがほとんどないこともあって、有効な光親和性標識リガンドの開発の例は比較的少ない。報告されているものとしては、PGE₂自体のα鎖をazidophenacyl esterに変えたPGE受容体に対する光親和性標識リガンド⁵⁷⁾、PGF_{2α}のω鎖にiodoazidophenyl基を結合したPGF_{2α}受容体に対する光親和性標識リガンドなどがある⁵⁸⁾。しかし前者のPGE₂の誘導体では、もとのPGE₂に比べて、受容体に対する親和性が約100分の1に低下しており、後者のPGF_{2α}誘導体の場合でも、PGF_{2α}に比べて約10分の1に低下しているなど、親和性において問題があると思われる。

第2節では、PGI₂受容体に対して親和性と選択性が高く、有効な光親和性標識リガンドAPNICを開発し³²⁾、これを用いて癌化肥満細胞および血小板におけるPGI₂受容体を同定した³¹⁾。APNICの母体であるイソカルバサイクリンは、PGI₂受容体に対する親和性が高く、化学的にも安定な化合物である。ω鎖に光親和性標識官能基を導入した理由は、上述のα鎖をazidophenacyl esterに変えたPGE₂誘導体の親和性の著しい低下の例⁵⁷⁾から、α鎖よりもω鎖を修飾する方が有利であると考えられたからである。癌化肥満細胞膜への^[3H]イロプロスト結合に対する阻害作用のIC₅₀の比較から、APNIC (IC₅₀ = 3 nM)は、母体のイソカルバサイクリン (IC₅₀ = 32 nM)や、イロプロスト (IC₅₀ = 9.3 nM)を上回る高い親和性を有しており、PG受容体に対する光親和性標識リガンドとしては、もっとも高親和性を有する化合物の一つであると言える。

^[3H]APNICの癌化肥満細胞膜に対する結合のK_dは4.7 nMであり、^[3H]イロプロストでは10.4 nMであった。イロプロストは16位のmethyl基の立体配置が16Sと16Rの2つのstereoisomerの混合物であるが、PGI₂受容体に対する親和性

は16S-isomerが高く、16R-isomerの親和性は小さいことが知られている⁵⁹⁾。実験に用いた^[3H]イロプロストは、16S-isomerと16R-isomerの比がおよそ4:6の混合物であるので、主にPGI₂受容体に結合する、16S-isomerの^[3H]イロプロストにおけるKdは、約4 nMであると考えられる。この値は^[3H]APNICのKd値とよく一致する。このことは両者のリガンドが、同一の受容体に結合していることを示唆するものである。

癌化肥満細胞膜に結合した^[3H]APNICの放射活性の約80%が、SDS PAGE後のゲルの43kDaのバンドから回収されたことから、光照射による親和性標識反応により、共有結合が形成される効率は、約80%であると考えられる。APNICのこの値は、TxA₂受容体の光親和性標識実験と同等以上である^{52,55)}。

^[3H]APNICによって、癌化肥満細胞膜に検出された43 kDaのバンドが、非標識のPGI₂誘導体により選択的に消失することは、このバンドの蛋白質がPGI₂を特異的に結合する蛋白質であることを示している。しかしこれだけではPGI₂受容体であるとは言えないが、43 kDaのバンドがGTPγSによって減弱したことは、この蛋白質がG蛋白と会合体を形成する、受容体であることを強く示すものであり、真にPGI₂受容体であると考えられることができる。

ところで43 kDaのバンドは、分子量マーカーと比べても明らかにブロードであるが、この原因は、PGI₂受容体がおそらく糖蛋白質であるためであると思われる。その理由として、癌化肥満細胞に存在するPGE受容体には、予想されるN-glycosylation siteが2ヶ所あること¹⁷⁾、糖鎖合成酵素阻害剤ツニカマイシンを用いた実験から糖蛋白質であり、WGA-agaroseに吸着する性質があることが明らかになっていること⁶⁰⁻⁶²⁾、またヒトおよびマウスの血小板のTxA₂受容体蛋白質にもN-glycosylation siteが2ヶ所あり^{15,16)}、WGA-agaroseに

吸着し、精製された蛋白質のSDS PAGE後の染色の結果も、非常に拡がったバンドであること¹⁴⁾などが知られていることによる。

ブタの血小板のPGI₂受容体の分子量は、^[3H]APNICを用いた結果から、約51 kDaであった。またヒトの血小板を用いた予備的な実験から、そのPGI₂受容体の分子量は、45 kDaであった。これら3つのPGI₂受容体の分子量の違いは、種あるいは組織の違いによるか⁶³⁾、おそらく存在する、糖鎖の分子量の違いによるものであると思われる。一方PGD₂受容体が、りん酸化および脱りん酸化されることによって、その機能が調節されるということが報告されており⁶⁴⁾、PGI₂受容体も同様にりん酸化される可能性がある。PGI₂受容体の分子量が異なるもう一つの可能性として、りん酸化の有無や程度が違うことにより、SDS PAGEの際に移動度が異なるためであるということが考えられる。

PGI₂受容体の分子量に関する研究には、^[3H]イロプロストを用いたtarget size analysisにより、神経融合細胞NCB-20で83 kDaであるという報告⁶⁵⁾や、ヒト血小板のPGI₂受容体をCHAPSで可溶化し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより調べた結果、150 kDa以上であったという報告がある¹¹⁾。これらの推定分子量は、APNICを用いてSDS PAGEにより求めた値よりもかなり大きく、受容体蛋白質と他の何らかの蛋白質との、会合体の分子量が求められているのではないかと思われる。

第3節においては、肥満細胞におけるPGI₂受容体の役割について、トロンビンあるいはATP刺激により惹起される細胞内Ca²⁺動員に対する、PGI₂受容体による調節作用について調べた³⁵⁾。PGI₂受容体刺激により、トロンビン刺

激時に起こる細胞内Ca²⁺動員およびIP₃産生が阻害された。cAMPにより、IP₃産生が低下することが、いくつかの細胞で報告されている⁶⁶⁻⁶⁸)。またトロンビンによる血小板の活性化が、cAMPにより阻害されることが知られており、これにはcAMP依存性リン酸化酵素が、ある特定の蛋白質をリン酸化することが関与していることが報告されている⁶⁹⁻⁷¹)、詳細な機構は明らかにはされていない。

一方、ATPによる細胞内Ca²⁺流入に対する、PGI₂受容体による促進作用の機構は不明である。ATPはおそらくP₂受容体を介してイオンチャンネルを活性化して、Ca²⁺流入を促進し、IP₃産生を増大させると考えられるが、この際のIP₃産生は、ionomycinの場合と同様に細胞外Ca²⁺に依存している。しかしionomycinによるIP₃産生は、PGI₂受容体の刺激により変化がないことから、Ca²⁺受容体刺激の作用点は、ATPによるCa²⁺流入系に特異的な部位であると考えられる。

トロンビンあるいはATPは、肥満細胞において異なるCa²⁺系を動員して、ヒスタミン分泌を促進すると考えられるが、PGI₂受容体刺激による抑制あるいは促進作用は、いずれのCa²⁺動員系が活性化されているかによって異なることになる。

PGI₂受容体は、刺激に応じて主に血管内皮細胞において産生され、血小板凝集放出抑制作用や血管平滑筋弛緩作用など、循環動態の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることはよく知られている。また肥満細胞において、細胞内cAMPの上昇が、ヒスタミンの分泌を抑制することが知られている⁴²⁻⁴⁴)。本研究において明らかにした、肥満細胞に存在するPGI₂受容体の刺激

は、たとえばトロンビンの刺激によって起こる、ヒスタミンなどの炎症メディエーターの分泌を抑制するものであると考えられる。一例として、炎症アレルギーが起こる場合に、血管内皮細胞が産生するPGI₂が、肥満細胞のPGI₂受容体を刺激し、肥満細胞からの炎症メディエーターの分泌が抑制されることによって、アレルギー反応が鎮静化するという、細胞間の相互作用の存在が想定される。

以上、第1章の実験結果は、肥満細胞のPGI₂受容体を標的とした、新たな抗炎症性薬物治療薬の開発における、基礎的な知見となるものと思われる。

結 論

第1章においては、癌化肥満細胞におけるPGI₂受容体とその情報伝達系に関して、

- (1) マウス癌化肥満細胞において、Gsを介してアデニル酸シクラーゼを活性化する、PGI₂受容体が存在することを明らかにした。
- (2) PGI₂受容体に親和性および選択性の高い、光親和性標識リガンドAPNICを開発し、これを用いて癌化肥満細胞に分子量43 kDaのPGI₂受容体を分離・同定した。またPGI₂受容体の存在が知られているブタ血小板膜では、分子量51 kDaの受容体を同定した。
- (3) PGI₂受容体刺激は、細胞内cAMPの増大を介して、トロンピンによるCa²⁺動員を抑制したが、逆にATPによるCa²⁺動員を促進した。この作用は、PGI₂受容体反応による肥満細胞の機能調節の多様性を示唆するものである。

第2章 癌化肥満細胞のPGE受容体刺激に対する脱感作の解析

アゴニストによる刺激を受けた細胞が、時間の経過に伴って、そのアゴニストに対する反応性が減弱するという現象が観察される場合があり、この現象は細胞の脱感作と呼ばれている。脱感作は、細胞が連続する刺激に対して応答を減弱あるいは停止する機構であり、周囲の環境に適応するための生体の重要な調節反応である。アデニル酸シクラーゼの活性化に関与する受容体の脱感作については、βアドレナリン受容体でよく調べられている^{72,73})。肥満細胞のPG受容体の脱感作については、PGD₂受容体のりん酸化と脱りん酸化が脱感作に関与するという報告があるが⁶⁴)、PGE受容体での詳しい検討はされていない。

第2章においては、PGE₁による受容体刺激により脱感作が起こる際に、受容体がPGE₁と安定な結合状態となることが見つかかり、この安定なPGE₁と受容体の結合体を精製することにより、PGE受容体の脱感作機構を解析することを試みた。

[癌化肥満細胞膜における ^3H PGE₁と受容体の安定な結合状態の形成]

癌化肥満細胞をPGE₁で刺激すると速やかにcAMPを産生し、その細胞内cAMP濃度の増加は、1分以内に最大となるベル型の変化をしながらもとのレベルに戻り、PGE₁が存在するにも関わらずcAMPが産生しない、いわゆる細胞のPGE₁に対する脱感作が起こる(図18)。

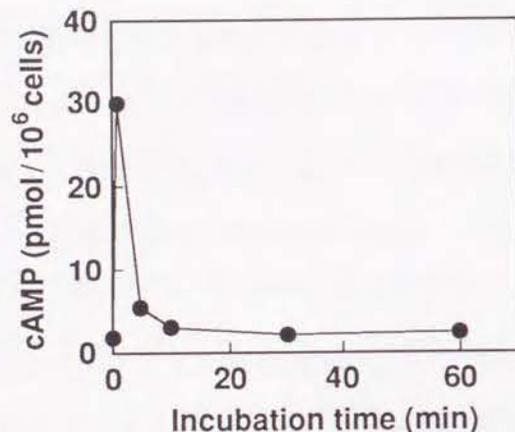


Figure 18. Time course of PGE₁-induced cAMP accumulation in mastocytoma cells.

Mastocytoma cells (2×10^6 cells) were incubated at 37 °C for indicated time in the presence of 5.5 μM PGE₁ and cAMP accumulated were measured as described in the text.

図19に示すように、37 °Cにおける癌化肥満細胞膜のPGE受容体の ^3H PGE₁結合は、飽和性に増大した。つぎに、10分、60分、120分の時点で非標識のPGE₁を添加して、解離する ^3H PGE₁の量を調べると、10分の場合には90%以上の解離が見られたが、60分または120分後では約70%が結合したままであった。PGE₁に加えてGTP γ Sを添加すると、 ^3H PGE₁の解離する量は増大したが、60分、120分で加えた場合では、50%から60%が結合状態にあった。

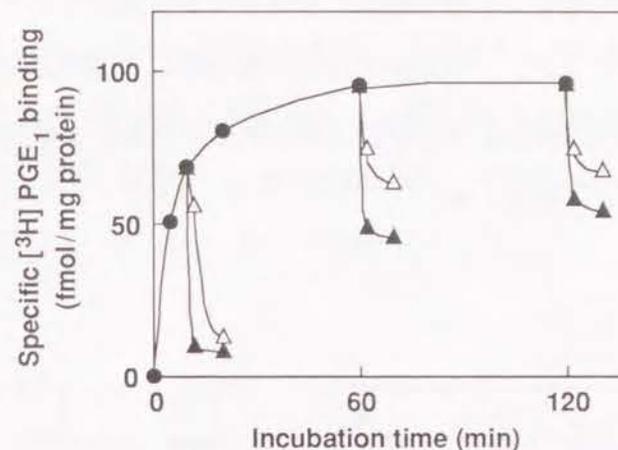


Fig. 19. Time-course of ^3H PGE₁ binding to and dissociation from membrane fractions.

^3H PGE₁ (5 nM) with or without (●) excess unlabeled PGE₁ was added to membrane fractions and incubated at 37 °C. 10, 60, or 120 min after the addition of ^3H PGE₁, unlabeled PGE₁ (5 μM), with (▲) or without (△) 100 μM GTP γ S, was added, followed by further incubation. All values were corrected for the nonspecific binding and are expressed as the mean for triplicate experiments with variability at < 3% of the mean.

[^3H PGE₁—受容体結合体の部分精製とその性質]

次に、癌化肥満細胞膜と ^3H PGE₁を、37 °Cで60分間インキュベーションした後、形成される安定な ^3H PGE₁と受容体の結合体を、6%ジギトニンで可溶化し、Ultrogel AcA44ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより分画した(図20)。その結果、 ^3H PGE₁の放射活性は、 ^35S GTP γ Sの結合活性とともに溶出される、分子量200 kDa以上の画分と、67 kDaの分子量マーカーであるBSAよりもやや前に溶出される画分、およびもっとも低分子側に溶出される画分に分かれた。この最後の画分は、受容体には結合していない遊離の

$[^3\text{H}]\text{PGE}_1$ であると考えられる。またBSAよりもやや前に溶出される画分は、不安定な結合状態にあって、これ以降の精製の操作中に、速やかに減少するものであった。 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合活性とともに溶出される分子量200 kDa以上の画分について、さらに精製した。

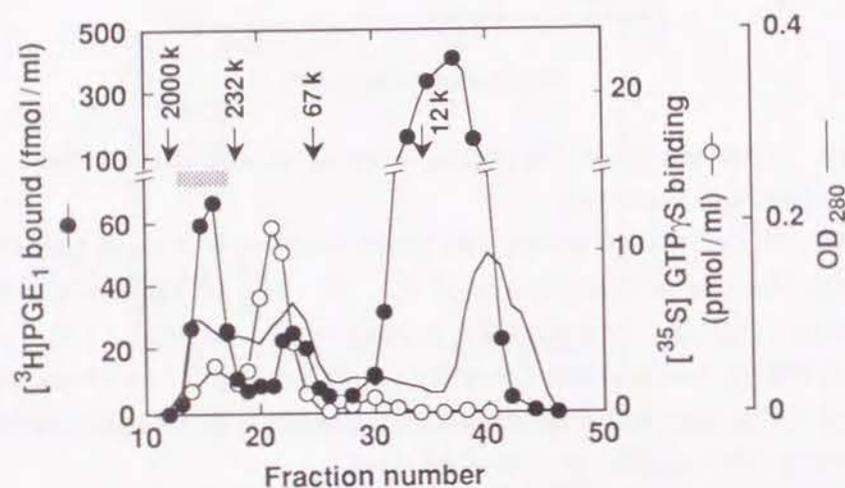


Fig. 20. Ultrigel AcA44 column chromatography of digitonin-solubilized PGE_1 receptors.

$[^3\text{H}]\text{PGE}_1$ binding activity was solubilized with 6% digitonin (20 mg of protein/ml) as described in the text and was fractionated on a column of Ultrigel AcA44 equilibrated with the equilibration buffer at the flow rate of 6 ml/h, and fractions of 2.5 ml each were collected. The radioactivity of 100 μl of each fraction was counted (\bullet). An aliquot of each fraction was assayed for $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding activity (\circ) as described in the text. The line (—) represents the absorbance at 280 nm of each fraction. A shaded box denotes fractions which are pooled and subjected to the next step (Fig. 21).

癌化肥満細胞の PGE 受容体は糖蛋白質であり、WGA-agaroseに親和性があることが分かっていることから⁶²⁾、つぎにWGA-agaroseカラムを用いて精製した(図21)。その結果、0.2 M GlcNAcによって溶出される画分に $[^3\text{H}]\text{PGE}_1$ の放射活性と、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合活性が認められた。

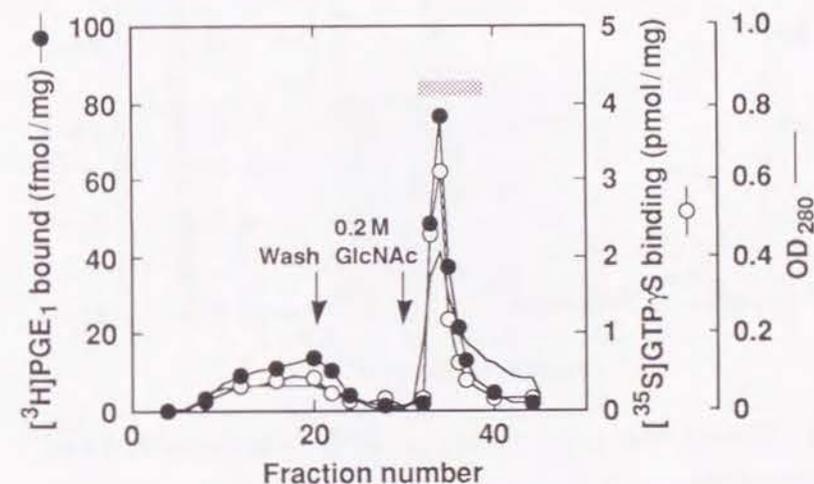


Fig. 21. WGA-agarose column chromatography of PGE_1 receptors.

The pooled fractions from the Ultrigel AcA44 column chromatography were applied to a WGA-agarose column equilibrated with the equilibration buffer. The column was extensively washed with the buffer and then eluted with 0.2 M GlcNAc. Fractions of 4 ml were collected and the radioactivities of 100 μl of each fraction were counted (\bullet). An aliquot was assayed for $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding activity (\circ). The line (—) represents the absorbance at 280 nm. A shaded box denotes fractions which are pooled and subjected to the next step (Fig. 22).

さらにこの溶出画分を、疎水性カラム担体であるphenyl-Sepharose CL-4Bカラムクロマトグラフィーにより精製した(図22)。Lubrol-PXの濃度勾配により溶出を行なったところ、Lubrol-PX 0.8%の付近に $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合活性とともに、 $[^3\text{H}]\text{PGE}_1$ の放射活性が溶出された。

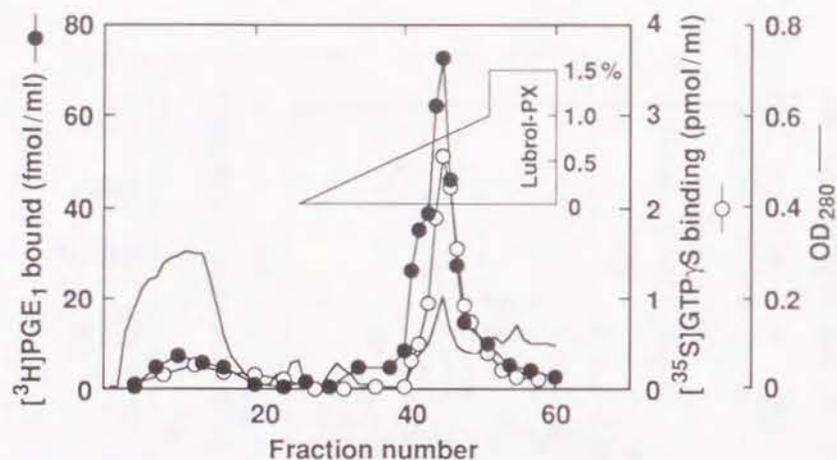


Fig. 22. Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography of PGE_1 receptors.

The fractions of WGA-agarose column eluted with 0.2 M GlcNAc were pooled and applied to a column of phenyl-Sepharose CL-4B which had been equilibrated with the equilibration buffer. The column was extensively washed and PGE_1 receptors were eluted from the column with the gradient of 0 to 1.0% Lubrol-PX in the buffer. The eluate were collected and the radioactivities of 200 μl of each fraction were counted (\bullet). An aliquot of each fraction was assayed for $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (\circ). The line (—) represents the absorbance at 280 nm.

次に、これらの精製によって得られた画分中に存在する、GTP結合蛋白質を同定するため、 $[^{14}\text{C}]\text{5}'\text{-p-FSO}_4\text{BzGuo}$ で標識を行ない、SDS PAGEによりその分子量を求めた(図23)。その結果、各精製段階の画分および最終のphenyl-Sepharose CL-4BカラムクロマトグラフィーのLubrol-PXの溶出画分に、分子量60 kDaの蛋白質が検出された。これらの結果から、 PGE_1 -受容体結合体は、脱感作した状態に移行する際、未知の機能をもつGTP結合蛋白質と会合する可能性があることが示唆された³⁶⁾。

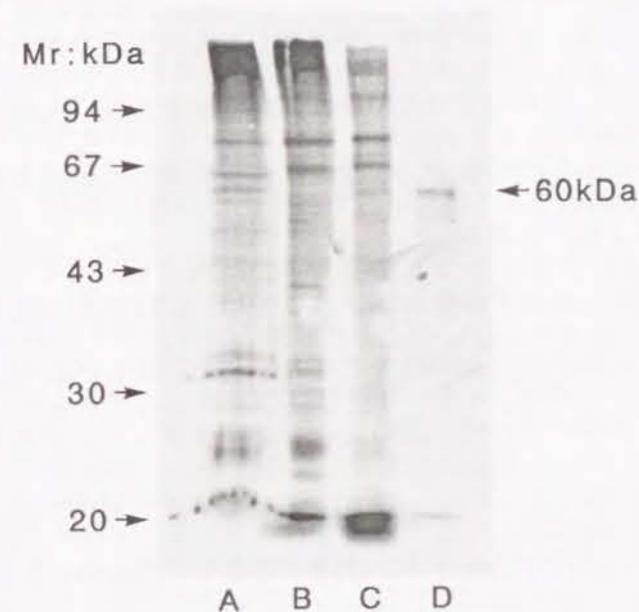


Fig. 23. Affinity-labeling of the GTP-binding protein co-purified with the $[^3\text{H}]\text{PGE}_1$ -bound receptors.

Samples taken at each purification step were affinity-labeled with $[^{14}\text{C}]\text{5}'\text{-p-FSO}_2\text{BzGuo}$ as described in the text. The affinity-labeled proteins visualized on autofluorography of an SDS polyacrylamide gel are shown.

A, solubilized crude membrane; B, Ultragel AcA44; C, WGA-agarose; D, phenyl-Sepharose CL-4B.

考 察

第2章においては、癌化肥満細胞のPGE受容体の脱感作について検討した³⁶⁾。

[³H]PGE₁と受容体を長時間インキュベーションすると、安定な結合状態に移行した。これと同様な結果は、大脳皮質、副腎髄質、赤血球、その他の培養細胞のPGE受容体においても報告されている⁷⁴⁻⁷⁷⁾。この[³H]PGE₁と受容体との結合は、非標識の過剰量のPGE₁を添加しても解離しないもので、おそらく解離定数および結合定数の比が一定のまま、両者ともに小さくなっているものと考えられる。さらにGTPγSを添加しても、安定な結合状態が失われることはなかった。このことは第1章の実験で示された、PGI₂受容体に結合した[³H]イロプロストの解離が、GTPγSによって著しく促進された結果と比べて大きく異なるものである。

一般にG蛋白と会合する受容体においては、GTPやその誘導体を添加すると、受容体の高親和性結合が消失することが知られている⁷⁸⁾。Gsが関与するアデニル酸シクラーゼ活性化系の場合、まずアゴニストにより受容体が刺激されると、Gsのαサブユニット(Gsα)から、それまで結合していたGDPが遊離して、代わりにGTPが結合する。GTPが結合したGsαは活性化状態になり、受容体やGsのβγサブユニットと解離して、アデニル酸シクラーゼを活性化する。Gsと解離した受容体は、リガンドに対する親和性が大きく減少して、受容体からリガンドが解離する。

GTPγSを加えても、安定にリガンドを結合している癌化肥満細胞のPGE受容体の状態は、通常受容体-Gs-アデニル酸シクラーゼ系の相互作用の様式では説明されないもので、アデニル酸シクラーゼを活性化できない状態に

あると考えられる。従って、PGE₁刺激による癌化肥満細胞のcAMP産生における脱感作状態への移行と、PGE受容体がPGE₁との安定な結合状態に移行することに、おそらく関連があると考えられる。

ところで第1章において、PGE₁がPGI₂受容体にも比較的強い親和性を有している結果を得ているが、図5より10⁻⁷ M以下においては、PGI₂受容体への結合量は小さく、第2章において用いた[³H]PGE₁の数十 nMの範囲においては、ほとんどPGE受容体に選択的に結合していると考えられる。

[³H]PGE₁とPGE受容体との結合体の精製過程において、この受容体の蛋白化学的な性質を知る手掛かりとなる、いくつかの有用な知見が得られた。まずゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分画では、[³H]PGE₁の放射活性は、200 kDa以上の高分子量に溶出されており、おそらくPGE受容体は、それ以外の蛋白質成分との会合体として存在することが推定された。WGA-agaroseカラムに吸着する性質は、糖鎖を有していることを示しており、第1章の考察で述べたように、これまでの報告と一致する⁶⁰⁻⁶²⁾。Phenyl-Sepharose CL-4B カラムへの吸着は、この蛋白質が疎水性蛋白質であることを示している。調べた範囲において、非イオン性界面活性剤であるLubrol-PXの濃度勾配による溶出がもっとも有効であったが、高濃度のLubrol-PXではじめて溶出されたことから、この受容体の疎水性が高いことが予想される。

各カラムクロマトグラフィーの[³H]PGE₁の放射活性のピークの画分にはいずれも、[³⁵S]GTPγS結合活性が検出された。このことはPGE受容体が、何らかのGTP結合蛋白質との会合体として存在することを示唆するものである。[¹⁴C]5'-p-FSO₂BzGuoを用いた親和性標識実験により、60 kDaのGTP結合活性を持つ蛋白質と会合している可能性が示唆された。GTP結合蛋白質としては、

Gs、Giなどの分子量がおよそ40-50 kDaのG蛋白や、ras蛋白質⁷⁹⁾などの分子量が20-30 kDaの、いわゆる低分子性G蛋白⁸⁰⁾がある。Gs、Giは癌化肥満細胞にも存在している^{29,81)}。また最近、モルモットおよびラット肝より、分子量100 kDaおよび74 kDaのGTP結合蛋白質が見つかっており⁸²⁻⁸⁴⁾、多様な分子量のGTP結合蛋白質が知られてきている。しかし、60 kDaの分子量のGTP結合蛋白質の報告はなく、これは新規のGTP結合蛋白質であると思われる。

以上、第2章においては、脱感作状態に移行する際に形成されると考えられる、PGE受容体と³H]PGE₁の安定な結合状態を見だし、その部分精製を行なうことにより、受容体蛋白質としての性質の一部を明らかにし、脱感作状態においてPGE受容体が、新規の分子量のGTP結合蛋白質と会合することを示唆する結果を得た。

結 論

第2章においては、癌化肥満細胞のPGE受容体刺激に対する脱感作機構に関して、

- (1) 癌化肥満細胞にPGE₁を作用させると、細胞内cAMP量は1分以内に最大となるが、すぐにもとのレベルに戻る、脱感作現象が見い出された。
- (2) そこで、細胞膜画分と³H]PGE₁をインキュベートし結合反応を調べると、経時的に、PGE₁とGTPγSでも解離しない、安定に結合した³H]PGE₁結合量が増大した。
- (3) この安定なPGE₁-受容体結合体を6%ジギトニンで可溶化し、種々のカラムクロマトグラフィー (Ultrogel AcA44、WGA-agarose、phenyl-Sepharose CL-4B) により部分精製した。
- (4) 得られた画分には³⁵S]GTPγSの結合活性があり、¹⁴C]5'-p-FSO₂BzGuoにより標識される、分子量60 kDaの新規なGTP結合蛋白質が検出された。

これらの結果から、PGE受容体は脱感作した状態に移行する際、未知の機能を持つGTP結合蛋白質と会合することが示唆された。

実験の部

(1) 動物および試薬

実験に用いた動物および試薬の購入先は、次の通りである。

[動物]

BDF ₁ マウス	清水実験動物
ブタ血液	京都中央畜産副生物卸協同組合

[ラジオアイソトープ]

[³H]イロプロスト (14.1 Ci/mmol)

Cyclic AMP [¹²⁵I] assay system

[³H]Inositol (80-120 Ci/mmol)

以上、Amersham Corp.

[5,6,8,11,12,14,15-³H]PGE₂ (185 Ci/mmol)

[5,6-³H]PGE₁ (60 Ci/mmol)

[³⁵S]GTPγS (65 Ci/mmol)

5'-p-[guanosine-¹⁴C]fluorosulfonylbenzoylguanosine (534.2 mCi/mmol)
([¹⁴C]5'-p-FSO₂BzGuo)

Methylated ¹⁴C-labeled molecular weight markers (2-20 μCi/mg protein)
([Methyl-¹⁴C] methylated-phosphorylase B, bovine serum albumin,
ovalbumin, carbonic anhydrase)

以上、Du Pont-New England Nuclear (NEN)

APNICおよび[15-³H]APNIC (15 Ci/mmol)は、小谷野博司博士、鈴木正昭博士、野依良治博士により合成され、また15位のstereoisomerの分離は、伊藤誠二博士により行なわれた。

[試薬、他]

イロプロスト	Amersham Corp.
PGE ₁ 、PGE ₂ 、PGD ₂ 、PGF _{2α} 、PGI ₂ -methyl ester、	カルバサイクリン
	フナコシ薬品
GTP、dGTP、TTP	ヤマサ醤油
GDP、GMP、digitonin	和光純薬
dGDP、cGMP、GppNHp	Sigma
GTPγS、GDPβS、ATP、AppNHp、ATPγS	Boehringer Mannheim
ADP	Kohjin
Fura-2/AM	同仁
百日咳毒素 (PT)、GlcNAc、WGA-agarose	生化学工業
Thrombin	持田製薬
Ultrogel AcA44	LKB
Phenyl-Sepharose CL-4B、分子量マーカーキット	Pharmacia
SDS-濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (4-20%)	TEFCO
Prestained molecular weight marker	Bio-Rad
EN ³ HANCE	Du Pont-NEN
クリアゾル (液体シンチレーションカクテル)	半井テスク
GF/C ガラスフィルター	Whatman
ニトロセルロースフィルター	Schleicher & Schuell

その他の試薬は、通常の方法で入手可能な最高純度品を用いた。

(2) 癌化肥満細胞の維持

マウス癌化肥満細胞 (mastocytoma P-815)は、Potter博士 (National Cancer Institute, NIH)より提供されたものを、BDF₁マウスの腹腔内で経代維持して使用した。P-815細胞をBDF₁マウスに2 × 10⁶個を無菌的に腹腔注射し、7日後に増殖した細胞(約3 × 10⁸個)を腹腔より回収し、氷冷したPBSで2回洗浄して実験に用いた。

細胞数の計数には、Coulter社製の細胞数計測機(モデルZ)を用いた。

(3) 癌化肥満細胞の粗膜画分および原形質膜画分の調製

すべての操作を氷冷下で行なった。

P-815細胞を10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSFおよび20 μM indomethacinよりなるbufferに細胞濃度が1 × 10⁸ cells/mlになるように懸濁し、Ultrasonicator (Branson Sonic Power Co.)を用いて超音波破碎を行なった。得られた細胞ホモジネートを1,000 ×gで10分間遠心し、その上清をさらに26,000 ×gで30分間遠心した沈殿を粗膜画分とし、10 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1 mM EDTAおよび10 mM MgCl₂を含むbuffer (buffer A)に懸濁して用いた。

また原形質膜画分の調製は、粗膜画分を45%(w/v)蔗糖を含む20 mM Tris-HClに懸濁し、この上に36%(w/v)蔗糖を含む20 mM Tris-HClを重ねし、66,000 ×gで60分間遠心して得られた界面をとり、20 mM Tris-HClで洗浄した画分を原形質膜画分とし、buffer Aに懸濁して用いた。

(4) ブタ血小板の原形質膜画分の調製^{14,85)}

ブタ血液を200 ×gで15分間遠心した上清を、1,000 ×gで17分間遠心する操作を数回繰り返して血小板を調製した。次に血小板を5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EGTA, 1 mM benzamidine HCl, 0.43 mM PMSFに懸濁した後、超音波破碎を行なった。得られた細胞ホモジネートを27%(w/v)蔗糖溶液の上に重ねし、66,000 ×gで60分間遠心した後、界面の画分をとり洗浄し、以下の実験に用いた。

(5) [³H]イロプロスト、³H]PGE₂ および ³H]PGE₁ 結合活性の測定

100 μlのbuffer A中で、癌化肥満細胞の粗膜画分(200 μg)を20 nM [³H]イロプロスト(29 nCi)、5 nM [³H]PGE₂(93 nCi)または5 nM [³H]PGE₁(30 nCi)と37 °C、60分間インキュベートした後、氷冷したbuffer Aを2 mlを加えて反応を停止し、すぐにGF/C ガラスフィルターを用いて吸引濾過した。さらにbuffer Aでフィルターを4回洗浄し、フィルターの放射活性をクリアゾル5 mlを用いて、液体シンチレーションカウンターにより測定し、これを総結合量とした。非特

異的結合量は、結合反応液に1,000倍量の非標識のイロプロスト、PGE₂またはPGE₁を加えることにより測定した。また特異的結合量は、総結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた。

(6) [³H]APNIC 結合活性の測定

100 μlのbuffer A中で、癌化肥満細胞の原形質膜画分(200 μg)を13 nM [³H]APNIC (20 nCi)と30 °C、60分間インキュベートした後、以下上記(5)と同様の方法により測定した。ただし反応の停止およびフィルターの洗浄には、MgCl₂を除いたbuffer Aを用いた。

(7) アデニル酸シクラーゼ活性の測定

癌化肥満細胞の粗膜画分(約20 μg)または原形質膜画分(約2 μg)を、50 mM Hepes-NaOH, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM IBMX, 1 mM ATP, 2 mM creatine phosphate, 2 μg creatine phosphate kinase (0.43 units) およびGTPとPGを含む100 μlのbuffer中で、37 °C、10分間インキュベートした後、100 μlの10% trichloroacetic acidを加えて反応を停止した。次に凍結融解を行なった後、1,000 ×gで10分間遠心して上清をとり、水を飽和させたdiethyl etherによりtrichloroacetic acidを抽出除去した。得られた標品中のcAMP量をAmershamのcyclic AMP [¹²⁵I] assay systemを用いて測定した。

(8) 光親和性標識実験

癌化肥満細胞または血小板の原形質膜画分(200 μg)をbuffer A中で13 nM [³H]APNIC (20 nCi)と30 °C、60分間インキュベートした後、300,000 ×gで15分間遠心した沈殿を再びbuffer Aに懸濁し、波長254 nmの紫外線をUV lamp (Vilber Lourmat model VL-6C, Cedex, France)を用いて2 cmの距離から照射した。その後、再び300,000 ×gで15分間遠心した沈殿を、SDS sample bufferに溶解し、4-20%濃度勾配SDS-PAGEを行なった。電気泳動した後、ゲルをLaskyらの方法⁸⁶⁾によりフルオログラフィーを行なった。すなわちゲルを水で10分間、dimethyl sulfoxide (DMSO)中で15分2回振とうし、次に20%(w/v)

2,5-diphenyl-oxazole (in DMSO) 中で15分間、さらに水で30分2回振とうした後、乾燥させ、 -80°C でX線フィルムに約5日間暴露させた。また、電気泳動後のゲルを3 mmの幅に切って、Protosolを加えて 50°C 、1時間インキュベートした後、その放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

(9) 可溶化膜画分に結合した ^{3}H イロプロストの解離に対するGTP γ Sの作用に関する実験

癌化肥満細胞膜に ^{3}H イロプロストを結合させた後、buffer Aで洗浄し、20 mM CHAPS および20% glycerolを含むbuffer Aで可溶化し、 $400,000 \times g$ で20分間遠心した。得られた可溶化上清(2 ml)をSuperose 6 HR fast protein liquid chromatography column (1×30 cm) (Pharmacia)により、流速 0.25 ml/minの10 mM CHAPSを含むbuffer Aで分画した。高分子量に溶出された画分を集め、その一部には 500 μM GTP γ Sを添加して、 30°C 、10分間インキュベートした。次にNegishiらの方法⁸⁷⁾に従い、可溶化画分の ^{3}H イロプロスト結合量を測定した。すなわち、可溶化画分 200 μl に40 μl の20 mg/ml rabbit γ -globulin および200 μl の30% (w/v) polyethylene glycol 6,000を含むbuffer Aを加えて混合し、氷冷下に10分間放置後、GF/Cガラスフィルターを用いて吸引濾過し、8% (w/v) polyethylene glycol 6,000を含むbuffer Aでフィルターを5回洗浄し、フィルター上の放射活性を測定した。

(10) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

細胞をHEPES-buffered saline (15 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 11 mM glucose) で 1×10^8 cells/mlになるように懸濁し、 3 μM fura-2/AMと 37°C 、30分間インキュベートした。0.5% BSAを含むHEPES-buffered salineで2回洗浄し、HEPES-buffered salineに 2×10^6 cells/mlになるように懸濁し、蛍光スペクトルフォトメーター(Jasco, CAF-100)を用いて、励起波長340 nmおよび380 nm、蛍光波長510 nmにより測定した⁸⁸⁾。

(11) ^{3}H IP $_3$ 産生量の測定

細胞を 1×10^7 cells/mlになるように懸濁し、 2 $\mu\text{Ci/ml}$ の ^{3}H inositolと 37°C 、2時間インキュベートして細胞を標識した後、HEPES-buffered salineで3回洗浄し、10 mM LiClを含むHEPES-buffered saline中で 37°C 、10分間プレインキュベート後、試薬を添加して反応を開始した。Trichloroacetic acidを添加して反応を停止し、 ^{3}H IP $_3$ をBio-Rad AG-1X8クロマトグラフィーを用いて分離し、その放射活性を測定した⁸⁹⁾。

(12) 細胞内cAMP量の測定

癌化肥満細胞(1×10^6 cells)を0.5 mM IBMXおよびPGを含むPBS 0.5 ml中で、 37°C において一定時間刺激し、0.5 mlの10% trichloroacetic acidを加えて反応を停止した。以下、(7)と同様の方法を用いてcAMPの定量を行なった。

(13) ^{3}H PGE $_1$ 結合受容体の可溶化

癌化肥満細胞粗膜画分をbuffer B (25 mM Tris-malate, pH 5.5, 2 mM EDTA) に40 mg/mlになるように懸濁し、20 nM ^{3}H PGE $_1$ と 37°C 、1時間インキュベートした後、 $100,000 \times g$ で90分間遠心した。沈殿を6% digitoninを含むbuffer Bに懸濁し、 4°C 、1時間インキュベートして可溶化した後、 $100,000 \times g$ 、90分の遠心により可溶化上清を得た。

(14) 可溶化 ^{3}H PGE $_1$ 結合受容体蛋白質の精製

上記(13)の可溶化上清をequilibration buffer (25 mM Tris-malate, pH 5.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.02% digitonin) で平衡化したUltrogel AcA44 カラム (2.9 cm, inner diameter, $\times 84$ cm, 550 ml) により分画した。 ^{3}H PGE $_1$ 結合受容体蛋白質を含む画分を集め、equilibration bufferで平衡化したWGA-agarose カラム (1.5 cm, inner diameter, $\times 5.5$ cm, 10 ml) に吸着させた。カラムを洗浄した後、0.2 M GlcNAcを含むequilibration bufferにより、 ^{3}H PGE $_1$ 結合受容体蛋白質を溶出した。次にこの溶出画分をphenyl-Sepharose CL-4Bカラム (0.9 cm, inner diameter, $\times 3.1$ cm, 2.0 ml) に吸着させ、equilibration bufferで洗浄した後、

Lubrol-PX 0 から 1.0% の濃度勾配により溶出した。

(15) [³⁵S]GTP γ S の結合活性の測定

上記(14)の各カラムクロマトグラフィーの画分の一部をとり、50 nM [³⁵S]GTP γ S (0.1 μ Ci)を含む、20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 25 mM MgCl₂, 1 mM EDTA および 0.5 mM β -mercaptoethanol 中で 37 °C、1 時間インキュベートした後、[³⁵S]GTP γ S の結合活性をニトロセルロースフィルター上に吸引濾過して捕集し、その放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した⁹⁰⁾。

(16) [¹⁴C]5'-p-FSO₂BzGuo による親和性標識⁹¹⁾

上記(14)の各画分を 62 μ M [¹⁴C]5'-p-FSO₂BzGuo (1 μ Ci)を含む、75 mM Tris-HCl, pH 7.5, 12.5 mM MgCl₂, 1.5 mM EDTA 中で、15 °C、30 分間インキュベートした後、SDS sample buffer を加えて反応を停止した。10% の SDS PAGE の後、ゲルに EN³HANCE を処理して、フルオログラフィーを行なった。

(17) 蛋白定量

蛋白定量は、Lowry 法⁹²⁾ および Bradford 法⁹³⁾ により行ない、牛血清アルブミンを標準蛋白質として用いた。

(18) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) と分子量マーカー

SDS PAGE は Laemmli の方法⁹⁴⁾ により、10% ポリアクリルアミドゲルまたは 4-20% の濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。分子量マーカーは、Pharmacia の分子量マーカーキット、Bio-Rad の Prestained molecular weight marker あるいは NEN の ¹⁴C-標識分子量マーカーを用いた。

謝 辞

本研究に際しまして、終始御親切な御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学薬学部、市川 厚 教授に慎んで深く感謝いたします。

また、貴重な御助言を頂きました、京都大学薬学部、福井 哲也 助教授、根岸 学 助手、日本たばこ産業株式会社医薬基礎研究所、八浪 公夫 博士、神奈川大学理学部、斎藤 光実 教授に深く感謝致します。

本研究の第 1 章において、有益な御助言を頂きました、大阪バイオサイエンス研究所、伊藤 誠二 博士に、また光親和性標識化合物の合成を遂行されました、名古屋大学理学部、野依 良治 教授、同学化学測定機器センター、鈴木 正昭 助教授、同学理学部、小谷野 博司 博士に深く感謝致します。

さらに本研究の一部に御協力頂きました、荻野 涼子 学士、佐伯 容江 学士、藤原 伸子 学士、ならびに教室員の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Murayama, T., Kajiyama, Y., and Nomura, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4290-4295
- 2) Becherer, P. R., Mertz, L. F., and Baenziger, N. L. (1982) *Cell* **30**, 243-251
- 3) Rossi, V., Breviario, F., Ghezzi, P., Dejana, E., and Mantovani, A. (1985) *Science* **229**, 174-176
- 4) Nolan, R. D., Danilowicz, R. M., and Eling, T. E. (1988) *Mol. Pharmacol.* **33**, 650-656
- 5) Hannigan, G. E. and Williams, B. R. G. (1991) *Science* **251**, 204-207
- 6) Smith, W. L. and Marnett, L. J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1083**, 1-17
- 7) DeWitt, D. L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1083**, 121-134
- 8) Sigal, E. (1991) *Am. J. Physiol.* **260**, L13-L28
- 9) Robertson, R. P. (1986) *Prostaglandins* **31**, 395-411
- 10) Andersen, N. H., Hartzell, C. J., and De, B. (1985) *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotrien Res.* **14**, 1-43
- 11) Tsai, A-L., Hsu, M-J., Vijjeswarapu, H., and Wu, K. K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 61-67
- 12) Watanabe, T., Shimizu, T., Nakao, A., Taniguchi, S., Arata, Y., Teramoto, T., Seyama, Y., Ui, M., and Kurokawa, K. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 398-405
- 13) Samuelsson, B., Goldyne, M., Granström, E., Hamberg, M., Hammarström, S., and Malmsten, C. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 997-1029
- 14) Ushikubi, F., Nakajima, M., Hirata, M., Okuma, M., Fujiwara, M., and Narumiya, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16496-16501
- 15) Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S., and Narumiya, S. (1991) *Nature* **349**, 617-620
- 16) Namba, T., Sugimoto, Y., Hirata, M., Hayashi, Y., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1197-1203
- 17) Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6463-6466
- 18) Gryglewski, R. J., Korbut, R., Ocetkiewicz, A. (1978) *Nature* **273**, 765-767
- 19) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., and Vane, J. R. (1976) *Nature* **263**, 663-665
- 20) Kadowitz, P. J., Chapnick, B. M., Feigen, L. P., Hyman, A. L., Nelson, P. K., and Spannhake, E. W. (1978) *J. Appl. Physiol.* **45**, 408-413
- 21) Karim, S. M. M. and Filshie, G. M. (1970) *Lacet* **1**, 157-159
- 22) Karim, S. M. M. and Sharma, S. D. (1971) *Lancet* **2**, 47-48
- 23) Suga, H., Konishi, Y., Wakatsuka, H., Miyake, H., Kori, S., and Hayashi, M. (1978) *Prostaglandins* **15**, 907
- 24) Pulkkinen, M. O. (1978) *Prostaglandins* **15**, 161-167
- 25) Yatsunami, K., Ichikawa, A., and Tomita, K. (1981) *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1325-1332
- 26) Mizuno, Y., Ichikawa, A., and Tomita, K. (1983) *Prostaglandins* **26**, 785-795
- 27) Hashimoto, H., Negishi, M., and Ichikawa, A. (1990) *Prostaglandins* **40**, 491-505
- 28) Negishi, M., Hashimoto, H., Yatsunami, K., Kurozumi, S., and Ichikawa, A. (1991) *Prostaglandins* **42**, 225-237
- 29) Negishi, M., Hashimoto, H., and Ichikawa, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2364-2369
- 30) Fedan, J. S., Hogaboom, G. K., and O'Donnell, J. P. (1984) *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1167-1180

- 31) Ito, S., Hashimoto, H., Negishi, M., Suzuki, M., Koyano, H., Noyori, R., and Ichikawa, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20326-20330
- 32) Suzuki, M., Koyano, H., Noyori, R., Hashimoto, H., Negishi, M., Ichikawa, A., and Ito, S. (1992) *Tetrahedron* **48**, 2635-2658
- 33) Razin, E. and Marx, G. (1984) *J. Immunol.* **133**, 3282-3285
- 34) Cockcroft, S. and Gomperts, B. D. (1980) *Biochem. J.* **188**, 789-798
- 35) Negishi, M., Hashimoto, H., and Ichikawa, A. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 102-107
- 36) Hashimoto, H., Ogino, R., Saeki, H., Yatsunami, K., and Ichikawa, A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1095**, 140-144
- 37) Siegl, A. M., Smith, J. B., Silver, M. J., Nicolaou, K. C., and Ahern, D. (1979) *J. Clin. Invest.* **63**, 215-220
- 38) Blair, I. A. and MacDermot, J. (1981) *Br. J. Pharmacol.* **72**, 435-441
- 39) Shepherd, G. L., MacDermot, J., Blair, I. A., and Lewis, P. J. (1981) *Clin. Sci.* **61**, 29P
- 40) Rücker, W. and Schrör, K. (1983) *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2405-2410
- 41) Ishizaka, T., Conrad, D. H., Schulman, E. S., Sterk, A. R., Ko, C. G. L., and Ishizaka, K. (1984) *Federation Proc.* **43**, 2840-2845
- 42) Loeffler, L. J., Lovenberg, W., and Sjoerdsma, A. (1971) *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2287-2297
- 43) Ichikawa, A., Hayashi, H., Minami, M., and Tomita, K. (1972) *Biochem. Pharmacol.* **21**, 317-331
- 44) Kaliner, M. and Austen, K. F. (1974) *J. Immunol.* **112**, 664-674
- 45) Miller, O. V. and Gorman, R. R. (1979) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **210**, 134-140
- 46) Skuballa, W. and Vorbrüggen, H. (1983) *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotrien Res.* **11**, 299-305
- 47) Blackmore, P. F., Bocckino, S. B., Waynick, L. E., and Exton, J. H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14477-14483
- 48) Eberhard, D. A. and Holz, R. W. (1987) *J. Neurochem.* **49**, 1634-1643
- 49) Lombroso, M., Nicosia, S., Paoletti, R., Whittle, B. J. R., Moncada, S., and Vane, J. R. (1984) *Prostaglandins* **27**, 321-333
- 50) Fassina, G., Tessari, F., and Dorigo, P. (1983) *Pharmacol. Res. Commun.* **15**, 735-749
- 51) Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G., and Négrel, R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11092-11097
- 52) Kattelman, E. J., Arora, S. K., Lim, C. T., Venton, D. L., and Le Breton, G. C. (1987) *FEBS Lett.* **213**, 179-183
- 53) Zehender, H., Witte, E.-C., Wolff, H.-P., and Patscheke, H. (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**, 491-495
- 54) Mais, D. E., Yoakim, C., Guindon, Y., Gillard, J. W., Rokach, J., and Halushka, P. V. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1012**, 184-190
- 55) Mais, D. E., Liel, N., and Halushka, P. V. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1457-1461
- 56) Mais, D. E., Bowling, N. L., True, T. A., Naka, M., Morinelli, T. A., Oatis, J. E. Jr., Hamanaka, N., and Halushka, P. V. (1991) *J. Med. Chem.* **34**, 1511-1514
- 57) Michalak, M., Wandler, E. L., Strynadka, K., Lopaschuk, G. L., Njue, W. M., Liu, H.-J., and Olley, P. M. (1990) *FEBS Lett.* **265**, 117-120
- 58) Balapure, A. K., Rexroad, C. E. Jr, Kawada, K., Watt, D. S., and Fitz, T. A. (1989) *Biochem. Pharmacol.* **38**, 2375-2381
- 59) Tsai, A.-L., Vijjeswarapu, H., and Wu, K. K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **942**, 220-226
- 60) Watanabe, T., Umegaki, K., and Smith, W. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13430-13437
- 61) Negishi, M., Ito, S., Tanaka, T., Yokohama, H., Hayashi, H., Katada, T., Ui, M., and Hayaishi, O. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12077-12084
- 62) Yatsunami, K., Fujisawa, J., Hashimoto, H., Kimura, K., Takahashi, S., and Ichikawa, A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1051**, 94-99

- 63) Armstrong, R. A., Lawrence, R. A., Jones, R. L., Wilson, N. H., and Collier, A. (1989) *Br. J. Pharmacol.* **97**, 657-668
- 64) Yoshimura, S., Mizuno, Y., Kimura, K., Yatsunami, K., Fujisawa, J., Tomita, K., and Ichikawa, A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **981**, 69-76
- 65) Leigh, P. J., Cramp, W. A., and MacDermot, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12431-12436
- 66) Kaibuchi, K., Takai, Y., Ogawa, Y., Kimura, S., and Nishizuka, Y. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 105-112
- 67) Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., and Nishizuka, Y. (1982) *J. Biochem.* **91**, 403-406
- 68) Alava, M. A., DeBell, K. E., Conti, A., Hoffman, T., and Bonvini, E. (1992) *Biochem. J.* **284**, 189-199
- 69) Fox, J. E. B., Reynolds, C. C., and Johnson, M. M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12627-12631
- 70) Kurosawa, M. and Parker, C. W. (1987) *Biochem. Pharmacol.* **36**, 131-140
- 71) Lazarowski, E. R., Winegar, D. A., Nolan, R. D., Oberdisse, E., and Lapetina, E. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13118-13123
- 72) Harden, T. K. (1983) *Pharmacol. Rev.* **35**, 5-32
- 73) Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7094-7101
- 74) Brunton, L. L., Wiklund, R. A., Van Arsdale, P. M., and Gilman, A. G. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 3037-3044
- 75) Lefkowitz, R. J., Mullikin, D., Wood, C. L., Gore, T. B., and Mukherjee, C. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 5295-5303
- 76) Karaplis, A. C. and Powell, W. S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2414-2419
- 77) Yumoto, N., Watanabe, Y., Watanabe, K., Watanabe, Y., and Hayaishi, O. (1986) *J. Neurochem.* **46**, 125-132
- 78) Gilman, A. G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 615-649
- 79) Barbacid, M. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 779-827
- 80) Burgoyne, R. D. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 394-396
- 81) Takahashi, S., Hashida, K., Yatsunami, K., Fukui, T., Negishi, M., Katada, T., Ui, M., Kanaho, Y., Asano, T., and Ichikawa, A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1093**, 207-215
- 82) Udrisar, D. and Rodbell, M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6321-6325
- 83) Im, M.-J. and Graham, R. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18944-18951
- 84) Im, M.-J., Rick, R. P., and Graham, R. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18952-18960
- 85) Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., and Samuelsson, B. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 345-349
- 86) Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1975) *Eur. J. Biochem.* **56**, 335-341
- 87) Negishi, M., Ito, S., Yokohama, H., Hayashi, H., Katada, T., Ui, M., and Hayaishi, O. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6893-6900
- 88) Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450
- 89) Berridge, M. J., Dawson, R. M. C., Downes, C. P., Heslop, J. P. and Irvine, R. F. (1983) *Biochem. J.* **212**, 473-482
- 90) Northup, J. K., Smigel, M. D., and Gilman, A. G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11416-11423
- 91) Limbird, L. E., Buhrow, S. A., Speck, J. L., and Staros, J. V. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10289-10293
- 92) Layne, E. (1957) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Eds.) Vol. 3, pp. 447-454, Academic Press, New York-London
- 93) Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 94) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685