

# 早期発来の内分生化学的研究

## a. ヒト子宮筋における OXYTOCIN BINDING ACTIVITY と GUANYLATE CYCLASE ACTIVITY とに関する研究

日本大学医学部産科婦人科学教室

高木 繁夫・吉田 孝雄  
田 根 培・坂元 秀樹  
深井 博

### 目 的

ヒトの陣痛発来に関連する主要因子の一つにオキソトシン(以下OT)があることに異論はない。しかしその標的臓器である子宮筋では、その収縮機構における動態と作用機序については、なお明らかでなく、殊にその受容体(以下OT-R)との相互作用と、その後の作用段階に關与する、いわゆる second messenger の有無についてもなお報告がない。一方、OT-R assay に際しては、guanylate nucleotides の存在がOT-R binding activity と関係するとの報告もあり、OTのホルモン作用の発現をみる場合には guanylate cyclase (以下Gu-C)との間に關連を持つと考えられるため、我々は、非妊、妊娠初期ならびに妊娠末期のヒト子宮筋においてのOT-R assay を行い、併せてGu-C activity を測定してこの兩者の關係を検討した。

### 方 法

ヒト子宮筋を、非妊婦、妊娠初期および妊娠末期(陣痛発来例、未発来例)よりそれぞれ採取し、OT-R assay ならびにGu-C assay に使用した。

I. OT-R assay : 採取した子宮筋の一部を8倍量のTyrode's solutionと共に4°Cにてhomogenizeし、ついで1,000gにて遠沈しその上澄を更に20,000gで遠沈し、この沈渣を適量の50mM Tris-maleate buffer (pH 7.4)によって稀釈後、その蛋白濃度を測定した。これを5mM  $MuCl_2$  存在下に3H-OTおよびstandard OTを加えて、20°C、90

分間 incubate した。その後これを4°Cにて20,000xg、30分間遠沈し、沈渣をbound fraction、上澄をunbound fractionとし、それぞれの結合動態の指標として、解離定数(Kd)および結合部位数(NBS)をScatchard plotを用いて算定した。

II. Gu-C assay : Gu-C活性に及ぼすOTの作用を検討するため、採取した子宮筋を更に2分し、一部をmembranous Gu-C sampleとし、他をwhole tissue Gu-C sampleとして、それぞれについて活性を測定した。

1) membranous Gu-C sample : 子宮筋を5mM maleate/10mM Tris, 0.3M sucrose, 0.1mM DTT (pH 7.5)とhomogenizeし、Iと同様に分画し、20,000xg沈渣、20,000xg上澄についてはOTあるいは3% Triton X-100存在下に基質 $\alpha^{32}P$  GTPからの $^{32}P$  cyclic GMP生成率を測定した。

2) whole tissue Gu-C sample : 子宮筋を氷冷した50mM Tris-EDTA buffer (pH 7.5)中で洗浄し、細切し(1mm<sup>2</sup>以下)、5mM  $MnCl_2$  存在下にOTを加えてOT-R assay と同一条件にて incubate した後、6倍量のtrichloroacetic acidを加えhomogenizeし、除蛋白を行なった。このhomogenizeを1,000xgにて45分間遠沈し、更に20,000xgにて20分間遠沈し、上澄をcyclic GMP抽出液とした。これを水飽和エーテルにて洗浄し、55°Cにて乾固したうえ2mlの蒸留水に再溶解し、cyclic GMP検体とし、radioimmuno assay に供した。

## 成 績

1) 非妊, 妊娠初期および妊娠末期陣痛未発来例における Kd は, それぞれ,  $3.33 \pm 0.501$ ,  $2.71 \pm 1.032$  および  $1.87 \pm 0.303$  (nM) となり, NBS は  $0.30 \pm 0.121$ ,  $0.50 \pm 0.104$  および  $1.50 \pm 0.502$  (pmol/mg protein) となった (図1)。次に陣痛発来の有無に分け, それぞれ Kd, NBS を見ると,  $1.87 \pm 0.30$ ,  $1.88 \pm 0.40$  そして  $0.74 \pm 0.21$ ,  $1.50 \pm 0.50$  となり図2に示すごとく, Scatchard plot は左方へ移動することを認めた。

2) OT を enzyme activator としての Gu-C assay では, その membranous Gu-C sample を用いた場合は図3に示すように, 非妊, 妊娠初期のいずれにおいても Gu-C の賦活化を認めることなく, 妊娠末期のそれで activation が起ることを認めた。しかしこれは Tritonx-100 による賦活化と有意差を示さなかった。一方, whole tissue sample を用いた成績では, 非妊時には OT による賦活化を認め難く, 妊娠初期, 末期になり activation を見ると同時に, 後者でほぼ 3.5 倍と亢進することを認めた。

## 考 察

ヒト子宮筋の OT に対する感受性は妊娠の進行に伴い亢進するが, 今回の成績から, この現象が子宮筋における OT-R の親和性と結合部位数の

増加, その両者に因ることが示唆された。一方, 従来より cyclic GMP あるいは GTP が cyclic AMP, ATP と相反する動態をとることが示唆されており, 殊に子宮筋では cyclic AMP, ATP が tocolytic な作用に関係し, cyclic GMP, GTP が uterotonic な作用に関連を有するもの, と考えられている。しかし GTP  $\rightarrow$  cyclic GMP を触媒する Gu-C に対する OT 作用については, 殆ど検討されていない。今回の我々の成績からすると, 妊娠時は子宮筋の Gu-C は OT によって賦活化され, しかもこの賦活化が妊娠の進行に伴って増強されることが明らかにされたものと考えられる。また membranous Gu-C sample と whole tissue sample にみる activation の相違は, 前者においては, homogenization その他の過程において receptorezyme unit が壊されるためのものであると考える。したがって, 以上の成績より, ヒト子宮筋では妊娠成立から末期に至る期間において, OT-R activity は漸次亢進すること, 亦それに伴って Gu-C activity も亢進するため, これから陣痛発来機序に関連し, ひいては cyclic GMP が OT に対する second messenger 的役割を営んでいることが示唆されることになる。

Table I. Percent uptake, apparent dissociation constants ( Kd ) and number of binding sites ( NBS ) in the 20,000 xg fraction of nonpregnant, first trimester and full term subjects ( mean  $\pm$  SD )

	No. of subjects	%Uptake (10000dpm)	Kd (nM)	NBS (pmol/mg protein)
Nonpregnant	13	$10.8 \pm 4.90$	$3.33 \pm 0.501$	$0.30 \pm 0.121$
First trimester	11	$18.3 \pm 6.65$	$2.71 \pm 1.032$	$0.50 \pm 0.104$
Term not in labor	10	$35.6 \pm 13.2^*$	$1.87 \pm 0.303^{**}$	$1.50 \pm 0.502^{***}$

\* \*\* \*\*\* Significantly different from first trimester (0.01 < P < 0.05)

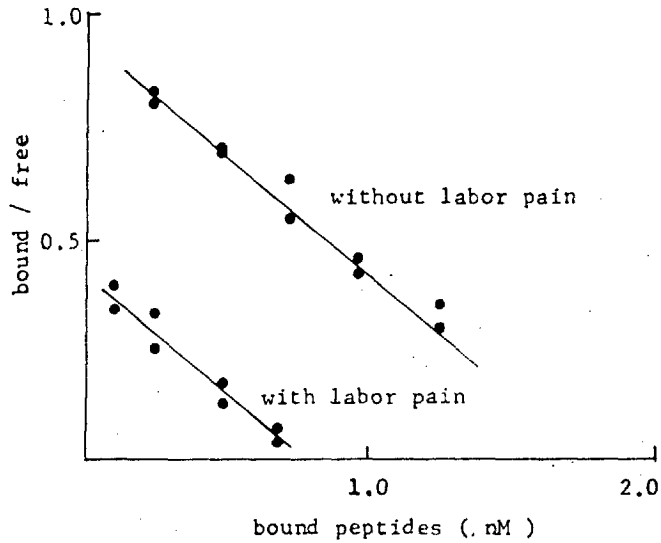
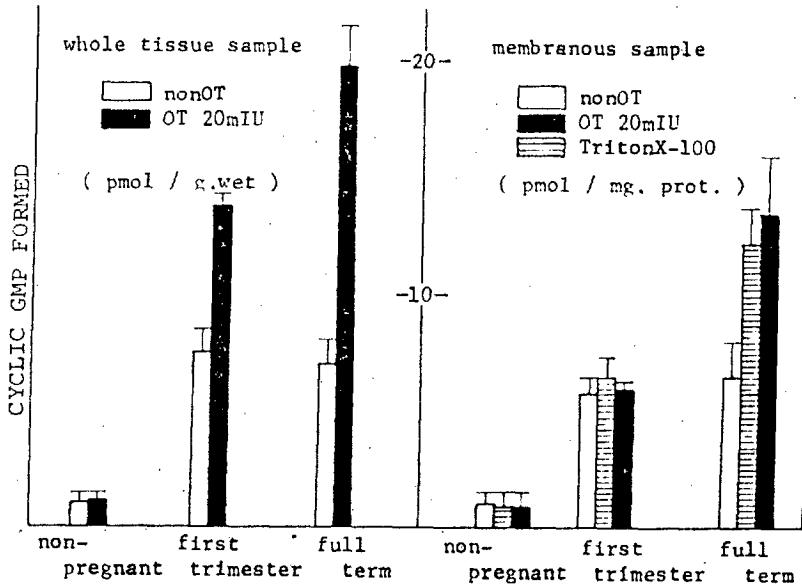


Fig. 1. Scatchard analysis of the cases with and without labor pain. The difference of  $K_d$  and NBS between the cases were significant ( $P < 0.01$ ) to show the left-ward shift of the plots.

GUANYLATE CYCLASE ACTIVITY IN NONPREGNANT, FIRST TRIMESTER MYOMETRIAL PREPARATION : EFFECTS OF OXYTOCIN



本研究に関する刊行および刊行予定

- 1) Sakamoto, H., Den, K., Yamamoto, K., Arai, T., Kawai, S., Oyama, Y., Yoshida, T. and Takagi, S. : Study of Oxytocin Receptor in Human Myometrium Using Highly Specific <sup>3</sup>H-Labelled Oxytocin, Endocrino. Japon., 1979, 26 (4), 515-522.
  
- 2) Takagi, S., Sakamoto, S., Oyama, Y., Fukai, H. and Den, K. : Gestational Changes of Oxytocin Receptor Activities in the Human Myometrium, Am. J. Obstet. Gynecol. 1980, in press



**検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用  
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



## 目的

ヒトの陣痛発来に関連する主要因子の一つにオキシトシン(以下 OT)があることに異論はない。しかしその標的臓器である子宮筋では、その収縮機構における動態と作用機序については、なお明らかでなく、殊にその受容体(以下 OT-R)との相互作用と、その後の作用段階に關与する、いわゆる second messenger の有無についてもなお報告がない。一方、OT-Rassay に際しては、guanylate nucleotides の存在が OT-R binding activity と関係するとの報告もあり、OT のホルモン作用の発現をみる場合には guanylate cyclase(以下 Gu-C)との間に關連を持つと考えられるため、我々は、非妊、妊娠初期ならびに妊娠末期のヒト子宮筋においての OT-Rassay を行い、併せて Gu-C activity を測定してこの両者の關係を檢討した。