

ヒト白血球血小板活性化因子受容体に関する研究

中村元直

# ヒト白血球血小板活性化因子受容体 に関する研究

中村元直

## 目次

	頁
略号	1
要旨	3
序論	
第1節 血小板活性化因子 (PAF) とその受容体	6
第2節 エンドトキシンショックとPAF受容体	10
本論	
第1章 ヒト血小板活性化因子 (PAF) 受容体の クローニングと発現	13
第1節 材料と方法	13
(1) 材料	13
(2) ヒト白血球 poly (A) <sup>+</sup> RNA の調製	13
(3) ヒト白血球 cDNA ライブラリーの作成	14
(4) ヒト白血球 PAF 受容体 cDNA のスクリーニング	14
(5) 塩基配列の決定	15
(6) アフリカツメガエル卵母細胞での発現	15
(7) COS-7 細胞での発現	17

(8) COS-7細胞膜の調製	18
(9) Binding Assay	18
(10) IP <sub>3</sub> Assay	18
(11) 蛋白質定量	18
(12) HEL細胞およびEoL-1細胞の培養と分化	19
(13) ノーザンブロッティング	19
第2節 結果	20
(1) ヒト白血球PAF受容体cDNAのクローニング	20
(2) アフリカツメガエル卵母細胞での発現	25
(3) COS-7細胞での発現	33
(4) PAF受容体活性化に伴うIP <sub>3</sub> 産生	37
(5) PAF受容体mRNAの発現	39
第3節 第1章の考察	41
第2章 エンドトキシン(LPS)によるPAF受容体の 活性化	44
第1節 材料と方法	44
(1) 材料	44
(2) ヒトおよびウサギ血小板の調製	44
(3) 血小板の凝集測定	44
(4) 細胞内カルシウムイオン濃度の測定	44
(5) モルモット好中球およびマクロファージの調製	45
(6) PAF受容体cDNAのCHO細胞への導入	46



(7) CHO細胞からの全脂質の抽出および PAFを含む画分の分離	46
(8) PAFの定量	47
(9) モルモット好中球の遊走性試験 (Boydén法)	47
(10) TNF- $\alpha$ の定量	47
第2節 結果	48
(1) LPS刺激による血小板内カルシウムイオン 濃度の上昇とPAF拮抗剤による抑制	48
(2) LPS刺激によるモルモット好中球内カルシウム イオン濃度の上昇とPAF拮抗剤による抑制	52
(3) 血小板および好中球膜を用いたLPSによる PAF結合阻害実験	57
(4) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた解析	60
(5) CHO細胞発現系を用いた解析	62
(6) LPSによるPAF受容体活性化の 生理学的意義とその限界	68
第3節 第2章の考察	74
糸吉 晋吾	77
謝辞	81
参考文献	82

## 略号

本論文では以下の略語を使用した。

- bp : base pair(s)  
BSA : bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)  
cAMP : cyclic adenosine 3',5'-monophosphate  
cDNA : complementary DNA  
CHO cells : Chinese Hamster Ovary cells  
DMSO : dimethyl sulfoxide  
DTT : dithiothreitol  
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)  
EoL-1 cells : human eosinophilic cell line  
FCS : fetal calf serum (ウシ胎児血清)  
fMLP : N-formylmethionil-leucyl-phenylalanine  
GDP $\beta$ S : guanosine 5'-O-(2-thio)bisphosphate  
GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor  
G蛋白質 : guanine nucleotide-binding protein  
GTP : guanosine 5'-triphosphate  
HBSS : Hank's balanced salt solution (ハンクス液)  
HEL cells : human erythroleukemia cells  
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  
HPRI : human placenta ribonuclease inhibitor  
IAP : islet activating protein (百日咳毒素=pertussis toxin)  
IL-5 : interleukin-5  
IP<sub>3</sub> : D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (イノシトール3リン酸)

kbp : kilobase pair(s)  
Kd : dissociation constant  
LBP : lipopolysaccharide binding protein  
LPS : lipopolysaccharide  
LTB<sub>4</sub> : leukotriene B<sub>4</sub>  
MBS : Modified Barth's Saline  
ORF : open reading frame  
PAF : platelet-activating factor  
PBS : phosphate-buffered saline  
PLC : phospholipase C  
RIA : radioimmunoassay  
SDS : sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)  
S.E.M : standard errors of mean  
SSC : saline sodium citrate  
TLC : thin layer chromatography (薄層クロマトグラフィー)  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$

## 要旨

本研究はヒト白血球 PAF 受容体の構造および諸性質に関する研究をまとめたものであり以下の2つの内容から構成される。

### (1) ヒト血小板活性化因子 (PAF) 受容体 cDNA のクローニングと発現

PAF は微量で強力な生理活性を持つ脂質オートコイドで、起炎作用および降圧作用の他、免疫増強作用など多彩な生物活性を持ち、気管支喘息、エンドトキシンショック、アナフィラキシーショックなどの病因に関与すると考えられている。

既に当教室で発現クローニングにより得られたモルモット肺の PAF 受容体 cDNA をプローブとしてヒト白血球 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ヒト白血球の PAF 受容体ホモログを得た。単離した cDNA から推定される受容体は 342 個のアミノ酸残基から成り、G 蛋白質共役型の受容体スーパーファミリーに特徴的な 7 つの膜貫通領域を持っていた。ついで、*in vitro* で合成した本受容体 mRNA を卵母細胞に注入し、高発現させた後、PAF 刺激に伴うクロライド膜電流を測定したところ、ED<sub>50</sub> 値は約 10 nM、PAF 受容体拮抗剤である WEB 2086 で阻害され、また卵母細胞内に GDP β S を微量注入することで反応は著しく減弱した。なお、PAF の不活性型代謝物であるリゾ-PAF 刺激では何の反応も認められなかった。さらに、本受容体を COS-7 細胞に発現させ、放射性リガンドを用いて結合実験を行った結果、<sup>3</sup>H] WEB 2086 の結合に対する IC<sub>50</sub> は PAF, 0.4 ± 0.2 nM; Y-24180, 1.1 ± 0.6 nM; CV-6209, 7.7 ± 2.1 nM; WEB 2086, 1.3 ± 5 nM であり薬理学的効果と一致した。ヒト PAF 受容体は白血球の他、IL-5 と GM-CSF で分化させた EoL-1 細胞 (好酸球性白血病細胞) で多く発現していることもノーザンブロッティング



解析で明らかとなった。

以上の結果を総合すると、ヒト白血球 cDNA ライブラリーよりクローン化した cDNA は PAF 受容体をコードすること、また構造や GDP  $\beta$  S の効果から、本受容体は G 蛋白質共役型スーパーファミリーの一員に属することが明らかとなった。

## (2) エンドトキシン (LPS) による PAF 受容体の活性化

エンドトキシン (Lipopolysaccharide: LPS) はグラム陰性菌の外膜の主要構成脂質成分であり、血圧降下や多臓器不全等の病態を引き起こすことが知られている。LPS が細胞に作用する際のメカニズムに関しては、血液中に存在する LPS 結合蛋白質 (LPS binding protein: LBP) と LPS との間で LPS-LBP 複合体を形成後、標的細胞 (マクロファージ、好中球等) の細胞膜上に存在する CD14 に結合することがわかっている。しかし、CD14 の機能については解明されておらず、また、その他の LPS 受容体の存在に関しても不明であった。ところで、エンドトキシンショックの治療には PAF 拮抗剤の投与が効果的であることが幾つかの研究グループによって報告されていた。我々は LPS が PAF 受容体を直接活性化している可能性について検討し以下の様な結果を得た。

ヒトおよびウサギの血小板、さらにモルモットの好中球を LPS あるいは LPS の活性部位である Lipid A で刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察され、また、血小板凝集が認められた。これらの反応は種々の PAF 拮抗剤存在下では完全に抑制された。さらに、これらの細胞から調製した細胞膜を用いて結合実験を行った結果、 $[^3\text{H}]$  PAF の PAF 受容体への特異的結合は LPS 存在下で阻害された。PAF 受容体を高発現させたアフリカツメガエル卵母細胞は LPS や Lipid A 刺激でカルシウム依存性クロライドチャネルの開口に伴う内向き膜電流が検出され、PAF 受容体の活性化が確

かめられた。P A F 受容体を安定発現させたChinese hamster ovary (C H O) 細胞をL P S やL i p i d A で刺激すると濃度依存的に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した。蒸留水を微量注入した卵母細胞や、ベクター-D N A のみを導入したC H O 細胞にはこの様な応答は認められなかった。さらに、このP A F 受容体発現細胞の膜画分を用いて結合実験を行った結果、[<sup>3</sup>H] P A F のP A F 受容体への特異的結合は血小板や好中球膜で得られた結果と同様にL P S の存在で阻害されることが確かめられた。以上の結果はL P S がP A F 受容体に直接結合しアゴニストとして作用しうることを示した。

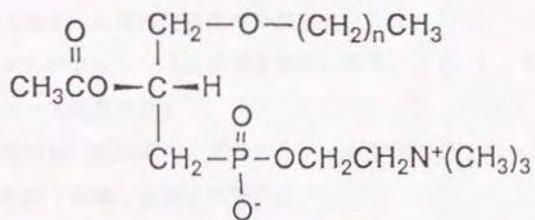
一方、L P S によるモルモット腹腔マクロファージにおけるtumor necrosis factor- $\alpha$  (T N F- $\alpha$ ) 産生はP A F 受容体拮抗剤では阻害を受けず、この反応はP A F 受容体以外の蛋白質を介する可能性が示された。

P A F 受容体とL P S (エンドトキシン) の交叉反応の生理的意義は不明だが、エンドトキシンショックや血小板凝集反応の一部の病態はL P S が直接P A F 受容体を活性化するという新しい可能性を提唱した。

## 序論

### 第1節 血小板活性化因子(PAF)とその受容体

PAF (Platelet-activating factor ; 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) は1972年IgE感作ウサギ好塩基球より抗原刺激により放出され、血小板を活性化する因子として発見された<sup>(1)</sup>。その後、1979年には構造が報告されPAFは分子内にアセチル基を有するアルキルエーテル種のホスファチジルコリンであることが明らかにされた(図1)<sup>(2-5)</sup>。PAFは好中球、好酸球、単球、マクロファージなどの血液細胞をはじめ、血管内皮細胞、肺、腎、網膜など広い範囲にわたる細胞、組織で産生される。PAFの生合成ルートとしては、現在までのところ修復系(ホスホリパーゼA<sub>2</sub>とアセチル-CoA:1-アルキル-GPCアセチルトランスフェラーゼによる)とde novo合成系(コリンホスホトランスフェラーゼによる)の2つが提唱されている。PAFは微量で強力な起炎作用および降圧作用を起こす他、さまざまな生物活性(表1)を有することが明らかにされている<sup>(6-10)</sup>。PAFの生理作用は標的細胞の細胞膜上に存在する特異的受容体に結合して発現され<sup>(11-16)</sup>、受容体に結合したPAFはアセチルヒドロラーゼの作用を受けてリゾ-PAFに変わり、その後速やかに2位の水酸基にアシル基(おもにアラキドン酸)が導入されPAF前駆体であるアルキルアシル型コリンリン脂質に変わることが知られている<sup>(17-21)</sup>。



$n=15$  ,  $\text{C}_{16}\text{-PAF}$

$n=17$  ,  $\text{C}_{18}\text{-PAF}$

図 1. PAFの構造



表 1 PAFの示す生物活性 (文献 22 より)

---

1. 細胞あるいは単離組織を刺激した際の活性

血小板 (凝集、形態変化、放出反応)

好中球 (遊走、活性酸素産生、凝集)

好酸球 (遊走、血管内皮細胞への接着)

単球、マクロファージ (活性酸素産生、凝集、IL-1, TNF- $\alpha$ 産生、  
グルコース消費亢進)

血管内皮細胞 (形態変化、プラスミノゲンアクティベーター産生)

平滑筋細胞 (収縮、回腸、気管支)

腎臓細胞 (レニン分泌阻害)、羊膜細胞 (PGE<sub>2</sub>合成促進)

培養神経細胞 (神経突起形成促進、ドーパミン放出)

骨髄細胞 (DNA合成促進、抗微生物障害活性誘導)

Tリンパ球 (マイトゲン誘発分裂、IL-2産生阻害)

網膜細胞 (電位変動)

2. 灌流あるいは局所投与したとき示す活性

血管透過性亢進 (血漿成分、白血球浸出)

肝臓 (グリコーゲン分解促進)

肺、気管 (気管過敏症、気道抵抗増大、白血球遊走、プロスタノイド産  
生亢進、浮腫形成)

腎臓 (糸球体透過性亢進)、心臓 (不整脈、冠血流量低下)

分泌組織 (アセチルコリン様作用)

3. 全身投与

肺、気道 (気管支収縮、浮腫形成)、胃 (粘膜壊死、毛細血管血流量低  
下)、小腸 (収縮、虚血性壊死)

降圧、血小板活性化および数の減少、白血球数減少、除脈

---

P A F 受容体活性化以降の細胞応答に関してはさまざまな解析がなされており、刺激直後に細胞内で P I 代謝回転が引き起こされ、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すること<sup>(23-25)</sup>、また、これらの情報伝達には G 蛋白質が関与していることなどが推測されていた<sup>(26)</sup>。しかし、P A F 受容体の構造に関する研究、特に蛋白質レベルでの具体的な成果はほとんど得られていなかった。P A F は脂溶性で、細胞膜に対する非特異的結合が高いため、基本的なリガンド結合実験さえ困難を極めることが一因と考えられる。我々は P A F 受容体の構造を知るための手段として遺伝子レベルからアプローチすることを考え、アフリカツメガエル卵母細胞発現クローニング法を駆使してモルモット肺の P A F 受容体 c D N A のクローニングを行った。この方法は P I 代謝回転を引き起こすタイプの受容体 c D N A を蛋白質レベルの情報に頼らずに受容体活性を指標にスクリーニングするもので、現在までセロトニン受容体<sup>(27)</sup>、サブスタンス K 受容体<sup>(28)</sup>、ヒスタミン H 1 受容体<sup>(29)</sup> やオキシトシン受容体<sup>(30)</sup> など多くの受容体 c D N A がこの方法でクローン化されている。我々がこの方法を採用したのは P A F 受容体もこれらの受容体と類似の性質、すなわち情報伝達の過程で P I 代謝回転を活性化することに着目したからである。結果的に我々のグループもこの方法を利用して 1991 年、モルモット肺由来の c D N A ライブラリーからモルモット肺 P A F 受容体 c D N A をクローニングすることに成功した<sup>(31)</sup>。さらに、我々はこのクローンをプローブとしてヒト白血球 c D N A ライブラリーからヒト白血球 P A F 受容体 c D N A のクローニングにも成功し、構造ならびに諸性質について検討することができた<sup>(32, 33)</sup>。本論文の第 1 章はこのヒト白血球 P A F 受容体の構造ならびに諸性質について詳細にまとめたものである。

## 第2節 エンドトキシンショックとPAF受容体

エンドトキシンはグラム陰性細菌の細胞壁の外膜にリポ多糖 (Lipopolysaccharide ; LPS) として存在する。細菌の外膜は通常LPS、外膜蛋白質、リン脂質等から成り、二重膜構造を形成しているが、LPSは二重膜の外側に局在している。LPSはO側鎖、コア領域およびLipid Aの3つの部分から構成されており (図2) <sup>(34, 35)</sup>、中でもLipid A部分は最も活性に重要であると考えられている (図3) <sup>(36, 37)</sup>。Lipid Aは細菌の種類に関係なくほぼ共通の構造をもち、さらに合成Lipid AがLPSと類似の生理活性を持つことから、この部分が活性の本体であることが強く示唆されている。

生体はLPSによる刺激で高熱、低血圧症、全身的な血液凝固や多臓器不全などを引き起こし、致死的ショックに至る例もある <sup>(38, 39)</sup>。マクロファージは代表的なLPS標的細胞の一つで、LPSによる刺激でTNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、活性酸素、プロスタグランジンE<sub>2</sub>等を産生し、他の細胞に重大な影響を及ぼすことが知られている <sup>(40-42)</sup>。その他、白血球は活性酸素の産生、遊走や血管内皮細胞への接着などが確認されており <sup>(43-45)</sup>、血小板はセロトニン放出や凝集反応を起こすことが知られている <sup>(46, 47)</sup>。しかし、刺激応答する細胞がどのようなメカニズムでLPSの作用を細胞内に伝えるかは未だに解明されていない。現在、唯一提唱されているLPS刺激時の情報伝達メカニズムはLPSが血液中のLPS結合蛋白質 (LPS-binding protein ; LBP) と結合してLPS-LBP複合体を形成し、これが細胞膜表面のCD14に結合することによって細胞内に刺激が伝わることである <sup>(48-51)</sup>。しかし、CD14を持たない細胞でもLPSの作用は報告されており <sup>(52-54)</sup>、CD14がLPSの受容体であるか否かは結論が出ていない。



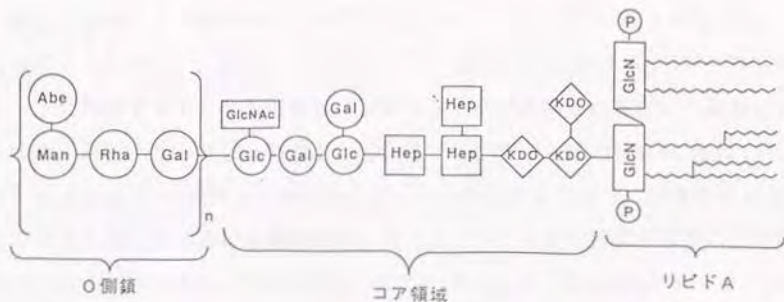


図 2. LPSの構造

GlcN: グルコサミン, KDO: 2-ケト-3-デオキソクトン酸, Hep: ヘプトース, Glc: グルコース, Gal: ガラクトース, GlcNac: N-アセチルグルコサミン, Rha: ラムノース, Man: マンノース, Abe: アベコース, P: リン酸  
 $n = 30 \sim 40$

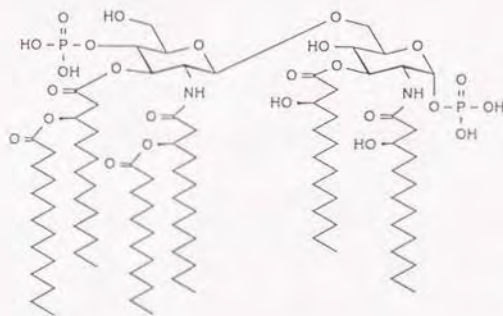


図 3. Lipid Aの構造



最近、各種 PAF 拮抗剤 ( WEB 2086<sup>(55, 56)</sup>、CV-3988<sup>(57)</sup>、BN50739<sup>(58)</sup>、BN52021<sup>(59)</sup>、SR163-675<sup>(60, 61)</sup>等) をラットに投与すると LPS の静注によるショックが抑制されるという現象がいくつかの研究グループより報告されている<sup>(62)</sup>。たとえば Stenzel らは LPS (7.5  $\mu$ g/kg iv) の投与で致死的なダメージを受けるラットに同量の WEB 2086 を経口的あるいは経静脈的に与えるとショックが抑制されることを確かめている<sup>(56)</sup>。また、Terashita らは CV-3988 (5 mg/kg) をラットに投与することによって LPS (15 mg/kg iv) 注入で引き起こされる急激な血圧低下を抑制できると報告している<sup>(57)</sup>。これらの現象は LPS が PAF 産生を促すためか、あるいは LPS が直接 PAF 受容体を活性化するか of the いずれかで説明しうる。クローン化した PAF 受容体を用いて特に後者の可能性について解析した。

## 本論

### 第1章 ヒト血小板活性化因子(PAF)受容体のクローニングと発現

#### 第1節 材料と方法

(1) 材料: cDNA合成キットはPharmacia社製のもの、 $\lambda$ ZAPII cDNAライブラリーキットはStratagene社製のもの、マルチプライマー合成キットはAmersham社製のもの、DNAシーケンシングキットはUSB社製のものそれぞれ購入した。アフリカツメガエルは浜松実験動物教材供給所(株)より購入した。 $[^3\text{H}]$ WEB2086(521.7 GBq/mmol)はDu Pont社製のもの、 $[^3\text{H}]$ PAF(4.23 TBq/mmol)および $\text{IP}_3$   $[^3\text{H}]$  Assay systemはAmersham社製のものを購入した。リコンビナントのマウスIL-5およびヒトGM-CSFはGenzyme社製のものを購入した。PAF拮抗剤であるY-24180、CV-6209、およびWEB2086はそれぞれ吉富製薬(株)、武田薬品(株)、Boehringer Ingelheim社より御供与いただいた。EoL-1細胞は国立相模原病院、斉藤博士より御供与いただいた。OligoTex dT30(Super)、HPR I (ヒト胎盤由来リボヌクレアーゼインヒビター)は宝酒造(株)より購入した。RNA cap structure analog はNew England Biolab社製のものを購入した。T7 RNAポリメラーゼはStratagene社製のものを購入した。

(2) ヒト白血球poly(A)<sup>+</sup>RNAの調製: ヒト白血球(>90%好中球)からグアニジウムチオシアネート法<sup>(63)</sup>を利用して全RNAを抽出した。この全RNAからのpoly(A)<sup>+</sup>RNAの分離精製はOligoTex dT30(Super)を用い、添付のプロトコールに従って行った<sup>(64, 65)</sup>。

(3) ヒト白血球 cDNA ライブラリーの作成：精製した poly(A)<sup>+</sup>RNA (約 5 μg) を材料とし、Pharmacia 社製の cDNA 合成キットを用いて Gubler-Hoffman 法<sup>(66)</sup> でヒト白血球由来の cDNA を合成した。合成した cDNA は両端に E c o R I アダプター (Pharmacia) を結合後、Stratagene 社製の λ Z A P I I (E c o R I サイト切断済み) ファージベクターに連結した。さらに同社の λ ファージパッケージングキットでファージ内にパッケージングし、これを cDNA ライブラリーとした。ブランクを形成させる際の感染細胞は E. coli XL1-Blue を用いた。作成した cDNA ライブラリーは約  $2.5 \times 10^6$  p f u / μg (λ ZAP arm DNA) の力価を有していた。

(4) ヒト白血球 P A F 受容体 cDNA のスクリーニング：(3) で調製したヒト白血球 cDNA ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法でヒト白血球 P A F 受容体 cDNA を単離した。プローブはモルモット肺 P A F 受容体 cDNA を制限酵素 S m a I で切断して得られる DNA 断片 (翻訳領域内の約 800 bp) をマルチプライマーラベリングキットを用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] d C T P でラベルしたものをを用いた。ハイブリダイゼーションは 6 x S S C, 5xDenhardt's solution (0.1% BSA, 0.1% ホリビン<sup>®</sup>、0.1% Ficoll 400), 0.5% SDS, 400 μg/ml 熱変性サケ精子 DNA, 20 μg/ml 大腸菌 DNA, そして [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] d C T P ラベリングプローブ (2x10<sup>6</sup> cpm/ml) を含んだ溶液中で 55℃、17 時間行い、洗浄は 55℃ の 2 x S S C, 0.1% SDS 溶液中で 20 分間、ゆるやかに振とうする処理を 3 回行った。約 30 万クロンの cDNA ライブラリーのスクリーニングからスタートし、2nd、3rd スクリーニングを経て最終的に約 1.8 kb p の挿入 DNA 断片を持つ 1 個の陽性クロンを得た。このファージクロンをヘルパーファージを用いてプラスミドに変換し (p h P A F)、以後の実験に用いた。



(5) 塩基配列の決定: Kilo-sequence Deletion Kit (宝酒造) を使ってクローン化したDNA断片の切断クローンを多種類作製後、アルカリ-SDS法でプラスミドを単離し、これを塩基配列決定の際の鋳型DNAとした。塩基配列の決定はSangerらの方法<sup>(67, 68)</sup>に従い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPおよびT7 DNAポリメラーゼ(Sequenase, ver. 2.0)を用いて行った。

(6) アフリカツメガエル卵母細胞での発現<sup>(69-71)</sup>

(6-1) 卵母細胞の調製: アフリカツメガエルを約30分間氷中に埋め睡眠状態にした後、カエルの左または右の下腹部を7mm程度解剖用ハサミで切り、眼科用精密ピンセットを使って卵母細胞を取り出した。卵母細胞取り出し後は下腹部の傷口は外科用瞬間接着剤で塞いだ。取り出した卵母細胞はMBS (88mM NaCl, 1mM KCl, 2.4mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.14mM CaCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.82mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10units/ml sodium penicillin, 10units/ml streptomycin sulfate, 15mM Tris-HCl(pH 7.6))の入ったシャーレ内で房を裂き、0.2% (w/v) コラゲナーゼを含んだMBS (Ca<sup>2+</sup>-freeとする) 中で1.5時間、室温で反応させた。コラゲナーゼ処理後の卵母細胞はMBSで数回洗浄し、実体顕微鏡下で精密ピンセットを用いてfollicular cellsを除いた。follicular cellsを除いた卵母細胞はmRNAの微量注入に用いるまでMBS中、20℃の恒温槽内で保存した。

(6-2) mRNAの合成 (In vitro transcription): 鋳型とするcDNA (約500ng) を50μlの滅菌水(RNase-free)に溶解し、以下の組成で各試薬を混合した。



鋳型DNA	50 $\mu$ l
(5x) 緩衝液	20 $\mu$ l
0.5M DTT	4 $\mu$ l
2.5mM ATP	2 $\mu$ l
2.5mM UTP	2 $\mu$ l
2.5mM CTP	2 $\mu$ l
2.5mM GTP	2 $\mu$ l
RNA cap structure analog	10 $\mu$ l
BSA (20mg/ml)	1 $\mu$ l
HPRI (100 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
滅菌水 (RNase-free)	5 $\mu$ l
<hr/> Total	<hr/> 99 $\mu$ l

これに1  $\mu$ l (20 units)のT7 RNAポリメラーゼを加えて37℃、1時間反応後、10  $\mu$ lのDNase溶液(5 units、100 unitsのHPRIを含む)を加えてさらに37℃、15分間反応した。反応液はフェノール/クロロホルム処理で除蛋白後、上層をエタノール沈澱し-80℃で保存した。このmRNAは使用する際、15,000rpm、10分間、2℃の遠心分離で回収し、80%エタノールでリンスした後、約1  $\mu$ g/ $\mu$ lの濃度になるように滅菌水に溶解した。

(6-3) mRNAの微量注入：合成したmRNAは卵母細胞への微量注入直前に65℃、5分間熱処理し、水中で急冷した。コントロール装置付電磁弁を使ってガラス微小ピペット内にmRNA溶液を吸入後、Nunclon(60穴)の各穴に1個ずつ並べた卵母細胞の動物極側に約50nlずつmRNA溶液を微量注入した。mRNAの微量注入後、卵母細胞は20℃の恒温槽内で2~3日間培

養した。この間、培養液 (MBS) は毎日交換した。

(6-4) 電気生理学的測定 (ボルテージクランプ法) : 0.5 ml の容積の bath をフロッグリンゲル液 (2mM KCl, 115mM NaCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, 5mM HEPES (pH7.4)) で灌流し、実体顕微鏡下で卵母細胞をボルテージクランプした。クランプ電位はフロッグリンゲル液中でのクロライドのリバーサルポテンシャル<sup>(7,2)</sup>以下 (通常 -50 ~ -80 mV) に設定した。膜電流の値が安定化するのを確認した後、bath 内に 30 秒間 PAF (10<sup>-10</sup>M ~ 10<sup>-6</sup>M) を含んだフロッグリンゲル液を流し、その後リガンドを含まないフロッグリンゲル液で洗浄した。

(7) COS-7 細胞での発現 : p h P A F を制限酵素 B a m H I および X h o I で切断して得られるヒト白血球 P A F 受容体 c D N A 断片 (約 1.8 kb p) を動物細胞発現ベクター p E U K - C 1 (Clontech社製) の B a m H I - X h o I 制限酵素切断部位へサブクローニングし、これを p E U K h P A F と命名した。C O S - 7 細胞は Dulbecco 変法 Eagle 培地 (10% FCS, 0.6g/l L-グルタミン, 1.5g/l 炭酸水素ナトリウム, 100units/ml ヘパリン, 100units/ml ステロマイシンを含む) 中で 5% C O <sub>2</sub> 存在下、37℃ で培養した。p E U K h P A F は DEAE-dextran 法<sup>(7,3)</sup> で C O S - 7 細胞へ導入した。まず C O S - 7 細胞を内径 100 mm の培養シャーレ 1 枚あたり 2 x 10<sup>6</sup> 細胞個ずつ接種して 20 時間培養し、T B S - D (0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% テキストロース, 25mM Tris-HCl (pH7.2)) で細胞を 2 回リンス後、1 ml の DEAE-dextran、pEUKhPAF 混合溶液 (0.5mg DEAE-dextran, 10 μg/ml pEUKhPAF, TBS-D に溶解) を細胞表面に滴下し 5 分間室温で放置した。この処理後、DEAE-dextran、pEUKhPAF 混合溶液はアスピレーションで除去し、C O S - 7 細胞を T B S - D で 2 回洗浄した。さらに C O S - 7 細胞は 10 ml の 0.1 mM クロロキンを含む Dulbecco 変法 Eagle 培地中で 37℃、4 時間培養し、

TBS-Dで1回洗浄後、Dulbecco変法Eagle培地中で72時間培養した。

(8) COS-7細胞膜の調製：形質転換したCOS-7細胞をラバーポリスマンでかき取り4℃、1,000 x g、10分間の遠心分離で回収後、水中で冷却しておいたHEPES緩衝液I (25mM HEPES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25M sucrose, pH 7.4)中に懸濁し、ダウンスホモジェナイザーを用いて水中で細胞を破碎した。細胞破碎液は4℃、800 x g、10分間遠心分離後、上清を更に4℃、100,000 x g、1時間超遠心分離し沈澱物を得た。この沈澱物は氷冷したHEPES緩衝液Iで1回洗浄後、同緩衝液に懸濁して細胞膜画分として以下の結合実験に用いた。

(9) Binding Assay：放射性リガンド [<sup>3</sup>H] PAFあるいは [<sup>3</sup>H] WEB 2086を使った結合実験はDentらの方法<sup>(74)</sup>に従って行った。50 μlのHEPES緩衝液II (25mM HEPES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 7.4), 50 μlの放射性リガンド溶液 (HEPES緩衝液IIに溶解), 100 μlの上述の調製膜画分 (約50 μg蛋白質)を混合後、25℃、90分間インキュベートした。反応は冷却したHEPES緩衝液IIを加えることで停止し、グラスフィルター (Whatman社製、GF/C)で吸引濾過後、フィルターを乾燥して放射活性を測定した。非特異的吸着量はHEPES緩衝液II中に過剰の非放射性リガンドを加えることで算出した。

(10) IP<sub>3</sub> Assay：IP<sub>3</sub>アッセイシステム (Amersham) を利用し、添付のプロトコールに従って測定した。

(11) 蛋白質定量：Bradfordらの方法<sup>(75)</sup>に従って行った。標準品はBSAを用いた。



(12) HEL細胞およびEoL-1細胞の培養と分化: HEL細胞<sup>(76, 77)</sup>の培養およびphorbol 12-tetradecanoyl 13-acetateによる分化誘導はIzumiらの方法<sup>(78)</sup>に従った。EoL-1細胞はRPMI1640培地(GIBCO)(10% FCS, 0.03% L-グルタミン, 100 units/ml ベンチリン, 100 units/ml ストプトマイシンを含む)中で、5% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で培養し、分化誘導は以下の方法で行った。5 × 10<sup>5</sup>細胞個/mlの密度に希釈したEoL-1細胞に50 units/mlのGM-CSFと0.5 mMのn-butyrateを加えて2週間培養後、PBS緩衝液で1回洗浄して、50 units/mlのIL-5と0.5 mM n-butyrate存在下でさらに20時間培養することで分化を誘導した。EoL-1細胞の分化の確認は好酸球性ペルオキシダーゼ活性の発現、Luxol-fast-blueとの反応性、そしてeosinophilに一般的に見られる巨大な球形核の出現を指標とした<sup>(79, 80)</sup>。

(13) ノーザンブロッティング: 2 μgのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを20%のホルムアルデヒドを含む0.8%アガロースゲル中で電気泳動後、Hybond-N<sup>+</sup>ナイロンメンブレン(Amersham)へ転写した。RNAを転写したナイロンメンブレンは80℃で2時間、加熱処理後、[α-<sup>32</sup>P] dCTPでラベルしたpHPAFのインサートcDNA(約1.8 kbp)と65℃の温度条件で17時間ハイブリダイズした。このナイロンメンブレンは65℃の2 × SSC、0.1% SDS中で20分間、1 × SSC、0.1% SDS中で20分間、最後に0.1 × SSC、0.1% SDS中で20分間洗浄した。X線フィルムへの露光は-70℃、5日間行った。



## 第2節 結果

### (1) ヒト白血球PAF受容体cDNAのクローニング

モルモット肺PAF受容体cDNAを制限酵素Sma Iで消化して得られるDNA断片(約800bp: PAF受容体翻訳領域の大部分を含む)をプローブとし、約30万クローンのヒト白血球cDNAライブラリーを比較的弱いハイブリダイゼーション条件(第1節(4)参照)でスクリーニングすることにより1個のポジティブクローンを得た。このクローンをプラスミドレスキュー法でλファージからプラスミドに変換し、以降の解析に用いた(以降、このプラスミドをp h P A Fと称す)。なお、この得られたcDNAインサートの長さは約1800bpであった。

得られたcDNAの全塩基配列および予想されるPAF受容体の推定アミノ酸配列を図4に示す。モルモット肺と同じく342個のアミノ酸をコードする翻訳領域が存在し、112bpの5'-非翻訳領域および639bpの3'-非翻訳領域を保持していた。翻訳領域のアミノ酸配列から推定される蛋白質部分の分子量は39,203であった。ハイドロパシー解析<sup>(81)</sup>の結果からこの蛋白質には7つの疎水性領域(それぞれ約22個のアミノ酸から成る)が存在し、G蛋白質共役型受容体スーパーファミリーに特徴的な構造<sup>(82-84)</sup>が見いだされた。第2、第3細胞外領域にはS-S結合をするであろう2つのシステイン残基が存在し、C末端細胞内領域にはパルミトイル化されるシステイン残基も存在した<sup>(85)</sup>。膜貫通領域内には $\alpha$ -helixを遮断し、リガンド結合ポケットを形成することが予想される5個のプロリン残基も存在した。第4膜貫通領域の中央部にはこの受容体ファミリーに特徴的なトリプトファン残基も保持されていた。また、細胞質内第3ループおよびC末端細胞内領域には5個のセリン、6個のスレオニン残基が存在しこれらがリン酸化されることによりPAFに対

する脱感作が起こることが予想された<sup>(86-88)</sup>。





モルモット肺P A F受容体も342個のアミノ酸から成ることが既に報告されているので<sup>(81)</sup>ヒト白血球P A F受容体はモルモット型と同数のアミノ酸から構成されることになる。両者の構造比較をしたモデルを図5に示す。両者のアミノ酸配列レベルの相同性は全体で83%、膜貫通領域だけを比較すると91%であった。膜貫通部分の相同性が特に高いことはこの部分が受容体の機能に重要であることを示唆している。上述したG蛋白質共役型受容体に特徴的な幾つかのアミノ酸残基、たとえばS-S結合を形成するであろう2つのシステイン残基、パルミトイル化が報告されているシステイン残基、あるいは膜貫通領域中のプロリン残基などは両者の間で全て保存されていた。しかし、モルモット肺の受容体と異なり、ヒト白血球型ではN末端細胞外領域にN型糖鎖付加部位が存在せず、このN末端細胞外領域の糖鎖付加は受容体の機能には特に重要ではないことが予想された。なお、第3細胞外ループ領域にもN型糖鎖付加部位が存在するが、この部位に関しては両受容体間で保存されていた。



## (2) アフリカツメガエル卵母細胞での発現

クローン化したcDNAがPAF受容体をコードすることを確認するための手段としてアフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用した。卵母細胞はG蛋白質の活性化後、ホスホリパーゼCの活性化→IP<sub>3</sub>産生→細胞内カルシウムイオン濃度の上昇→カルシウム依存性クロライドチャネルの開口という一連の情報伝達メカニズムを持っている。従って、もしクローン化したcDNAがPAF受容体をコードするものであるならば、このcDNAを鋳型として合成したmRNAを微量注入することでPAF受容体蛋白質が合成され、卵母細胞の細胞膜に輸送される。さらにこの受容体の検出は、クロライドチャネルの開口に伴う内向き膜電流がPAF刺激によって引き起こされることを指標として判断できるはずである(図6)。そこでクローン化したPAF受容体cDNAを鋳型としてIn vitroでmRNAを合成してアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入し、2~3日間、20℃で培養後にボルテージクランプ法を利用して電気生理学的解析を行った。



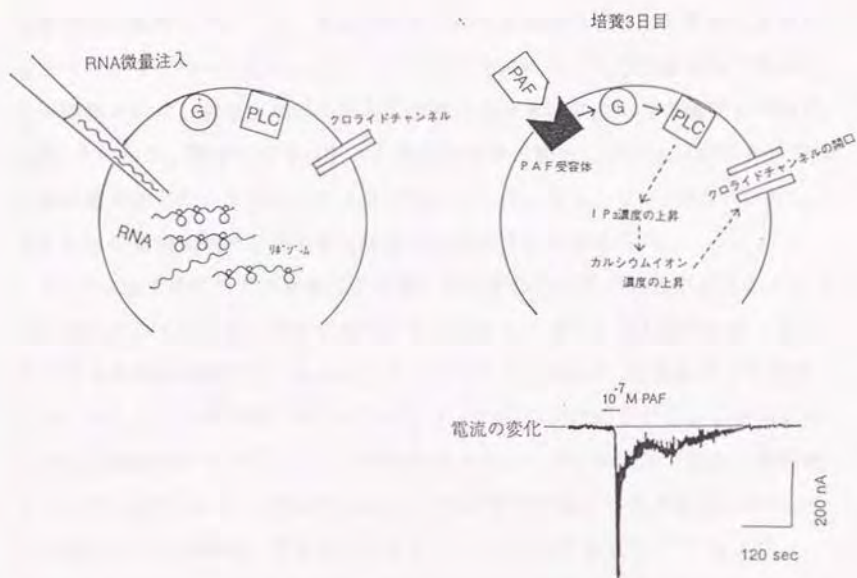


図 6. アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用した PAF 受容体の検出法

右下にヒト白血球 mRNA を微量注入した卵母細胞の膜電流（下向きが内向き膜電流）を示す。PAF 刺激により膜電流の変化が見られる。G : G 蛋白質、PLC : ホスホリパーゼ C

図 7 に示す様にクローン化した cDNA を鋳型として合成した mRNA を微量注入した卵母細胞は 10 nM の PAF 刺激により 600 ~ 900 nA の内向き膜電流が観察され、一方、蒸留水を注入した卵母細胞では何の変化も見られなかった。すなわち、この cDNA が PAF 受容体をコードするものであることが確認された。刺激に用いた PAF 濃度と内向き膜電流応答の強度との関係を図 8 に示す。膜電流応答は PAF 濃度依存的に増加し、1  $\mu$ M の PAF ではほぼ最大値を示した。ED<sub>50</sub> は約 10 nM であった。なお、リゾ-PAF に対しては 1  $\mu$ M の濃度で刺激しても全く膜電流応答は得られなかった。

図 7 に示す様に PAF 刺激で引き起こされる細胞応答は刺激を繰り返すことで急激に小さくなった。完全に細胞応答が消失するまで PAF 刺激を繰り返した後でも卵母細胞内に 0.2 pmol (50 nl) の I P<sub>3</sub> を微量注入すればカルシウムイオン依存性クロライドチャネルの開口が起ることから細胞応答の消失は細胞内カルシウムストア内のカルシウムイオンの枯渇ではなく受容体から I P<sub>3</sub> 産生に至るいずれかのステップの脱感作であることが予想された。3 種類の PAF 拮抗剤、WEB 2086<sup>(80)</sup>、CV-6209<sup>(81)</sup> および Y-24180<sup>(82)</sup> の PAF 刺激抑制効果を PAF 受容体高発現卵母細胞の応答の抑制を指標に調べた結果を図 9 に示す。10 nM の PAF 刺激で引き起こされる細胞応答に対する阻害効果は WEB 2086、CV-6209、Y-24180 (10 nM) でそれぞれ 約 82 ± 12%、約 70 ± 16% および 約 89 ± 4% (平均 ± S.E.M., n = 5) であった。

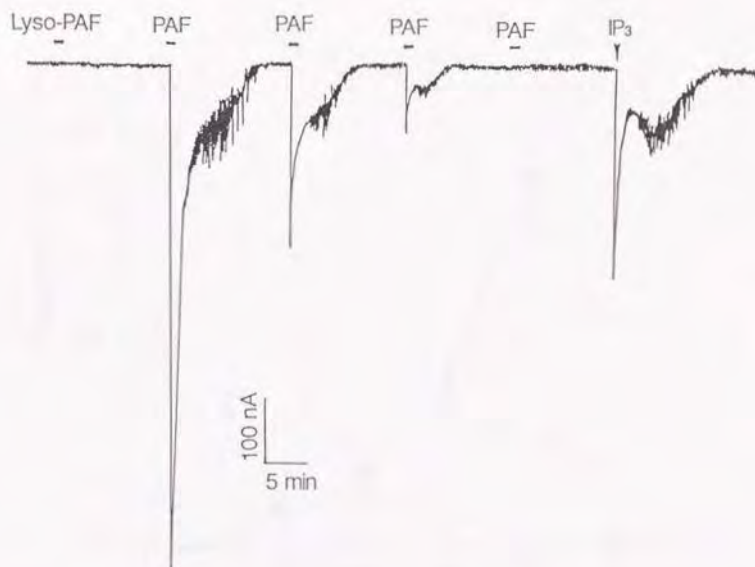


図 7. アフリカツメガエル卵母細胞発現系における PAF 刺激に伴う膜電流応答とその脱感作

PAF 受容体 mRNA (約 10 ng) を微量注入し、20℃で2日間培養した卵母細胞を用いた。反応は細胞膜電位を -60 mV に固定した条件下で記録した。下向きシグナルが内向き膜電流の変化を示す。

用いた薬剤の量はそれぞれ PAF (10 nM)、リゾ-PAF (10 nM)、IP<sub>3</sub> (0.2 pmol) である。



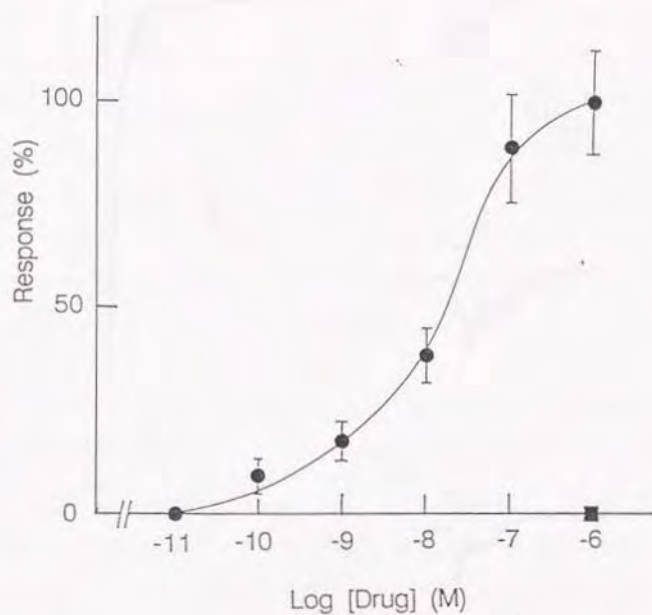


図 8. アフリカツメガエル卵母細胞における PAF に対する応答の濃度依存性

1  $\mu$ M の PAF 刺激で誘導される膜電流応答の平均 (平均 900 nA、 $n = 6$ ) を 100% とした。その他の濃度における各点 (●) と縦棒はそれぞれ平均と S.E.M. を示す ( $n = 5$ )。リゾ-PAF (■) は 1  $\mu$ M の濃度においても全く反応はなかった。

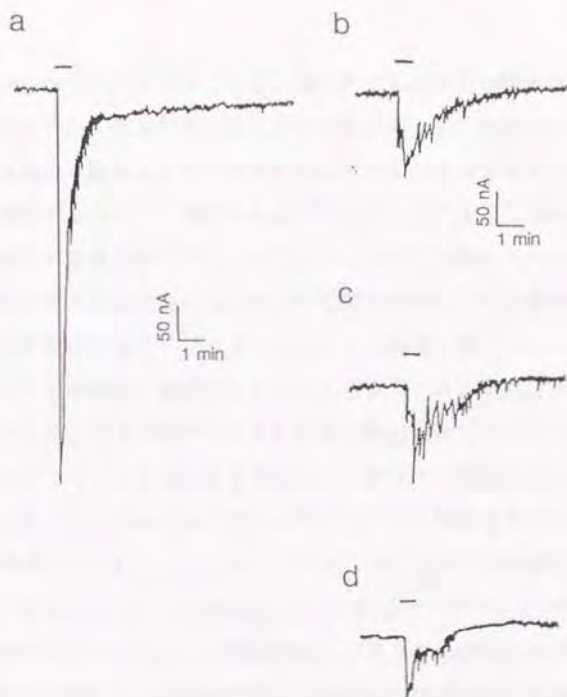


図 9. PAF拮抗剤によるPAF刺激に伴う膜電流応答の抑制

PAF拮抗剤存在または非存在下でのPAF受容体発現卵母細胞のPAF刺激に伴う膜電流応答を示す。個々の卵母細胞は測定前に拮抗剤を含むMBS溶液中に5分間放置した。なお、測定の際の灌流液ならびにリガンド液中にも拮抗剤を加えた。横棒はPAF刺激(10 nM)の時間を示す。

a : 拮抗剤非存在, b : WEB 2086 (10 nM), c : CV-6209 (10 nM), d : Y-24180 (10 nM)

GDPβSはGTPに比べてG蛋白質に対する親和性が数十倍高く、GTPと置換しにくい代表的なG蛋白質の不活化剤として使用されている<sup>(93)</sup>。これを卵母細胞へ微量注入すれば卵母細胞内でのG蛋白質を介した情報伝達を効果的に抑制できるという報告もある<sup>(94)</sup>。そこでPAF受容体の活性化以降の情報伝達系にG蛋白質が関与しているかどうかを確認するためにPAF受容体を高発現させた卵母細胞にGDPβSを微量注入してその影響を調べた。図10に示す様にボルテージクランプ法による測定の前に500 pmolのGDPβSを卵母細胞に微量注入することによりPAF刺激による細胞応答が著しく減弱した。この実験でのPAF刺激の際の内向きクロライド膜電流の値はコントロールとしてGDPβSの代わりに蒸留水を微量注入した卵母細胞が $650 \pm 50$  nAであったのに対し、GDPβSの場合は $230 \pm 50$  nAであった(平均±S.E.M., n=10)。なお、GDPβSを微量注入した卵母細胞においてもIP<sub>3</sub>を0.2 pmol注入することでコントロールと同程度の細胞応答が得られたことから、この結果はGDPβSの注入による卵母細胞の非特異的傷害ではないことが確認できた。これらの結果から、卵母細胞においてはクローン化したPAF受容体を介する細胞内情報伝達にはG蛋白質が関与していることが示唆された。百日咳毒素(IAP、PT)は卵母細胞膜を通過しないため、このG蛋白質がいずれの種類かを同定することはできなかった。なお、GDPβSによる抑制メカニズムについては、蛋白質合成の阻害も否定できず、これは今後の課題である。



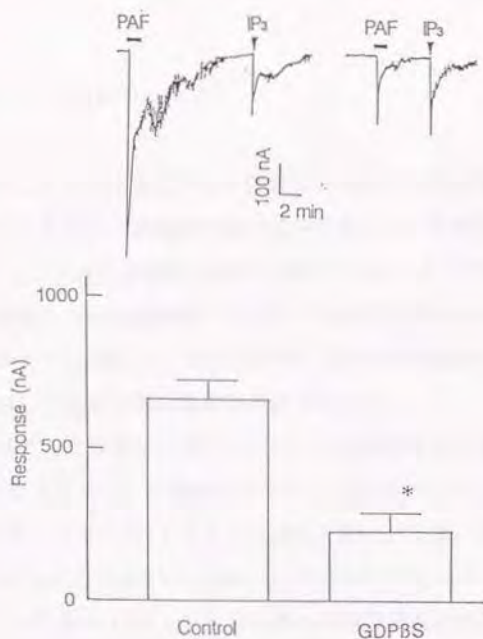


図 10. GDPβSを卵母細胞に微量注入した場合のPAF刺激細胞応答に及ぼす効果

測定の前約12時間前、PAF受容体mRNAを微量注入した卵母細胞に500 pmolのGDPβSを注入し、これらの卵母細胞はボルテージクランプ条件下でPAF刺激の際の反応(内向き膜電流)を測定した。なおコントロールはGDPβSの代わりに蒸留水を注入した。上図は代表的な反応のトレースを示し、下図は内向き膜電流の測定値の平均をまとめたものを示す。

用いた薬剤の濃度はPAF(10 nM)、IP<sub>3</sub>(0.2 pmol)である。

\*Significant difference ( $p < 0.01$ , Student's t test)

### (3) COS-7細胞での発現

クローン化したヒト白血球PAF受容体の薬理的諸性質を調べることを目的とし、PAF受容体の動物細胞発現系を作製した。動物細胞内発現ベクター、pEUK-C1にPAF受容体cDNAをサブクローニングし、これをアフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞(COS-7細胞)へDEAE-dextran法で一過性に導入してCOS-7細胞でヒト白血球PAF受容体を高発現させた。この形質転換細胞を利用した薬理学的実験結果を以下に示す。

ヒト白血球PAF受容体を導入し、約72時間の培養で高発現させたCOS-7細胞の膜画分を用い、各種放射性リガンドを用いて行った結合実験の結果を図11に示す。まず $[^3\text{H}]$ PAFに対して調べた結果、 $K_d$ および $B_{max}$ は $1.3 \pm 0.3$  nM および  $9.2 \pm 0.3$  pmol/mg protein であった(図11a)。

図11aに示す通り $[^3\text{H}]$ PAFは膜への非特異的結合が非常に高く(70~80%)、過剰発現させた細胞の膜画分を用いても薬理的な実験を行うには不適切と判断し、PAF拮抗剤である $[^3\text{H}]$ WEB2086を用いて同様の解析を行った。図11bに示す様にこの化合物に対する $K_d$ および $B_{max}$ は $9.1 \pm 2.8$  nM および  $25.3 \pm 6.3$  pmol/mg protein であった。 $[^3\text{H}]$ WEB2086の $K_d$ 値はヒト好中球膜を用いた結合実験結果として報告されている値( $18.9 \pm 0.6$  nM)<sup>(95)</sup>とほぼ一致した。なお、ベクタープラスミド(pEUK-C1)のみを導入したCOS-7細胞の膜には $[^3\text{H}]$ WEB2086の特異的結合活性は全く検出されなかった。

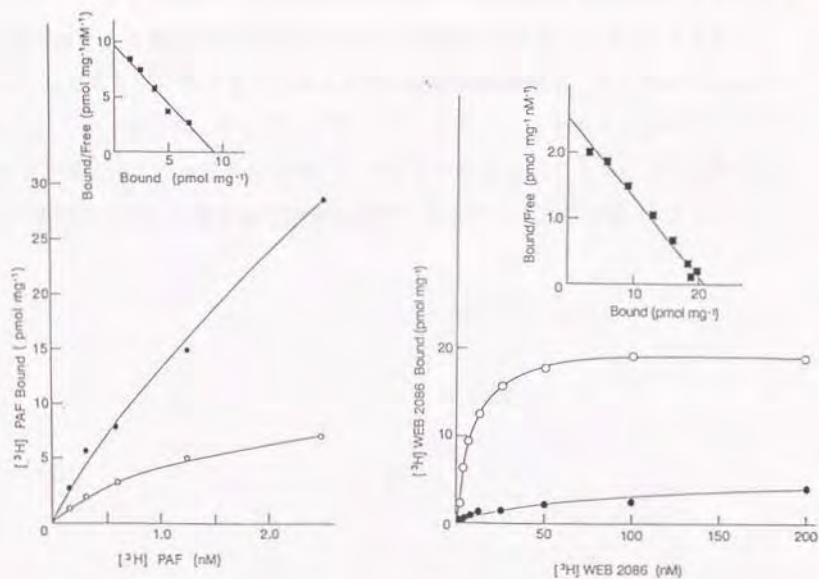


図 11. ヒト白血球 PAF 受容体 cDNA で形質転換した COS-7 細胞膜への  $[^3\text{H}]$  PAF (a) および  $[^3\text{H}]$  WEB 2086 (b) の特異的結合

$[^3\text{H}]$  PAF および  $[^3\text{H}]$  WEB 2086 の濃度-結合曲線と Scatchard plot (inset) を示す。○、■ は特異的結合、● は非特異的結合を表し、各点は duplicate の平均を示す。これらの結果はそれぞれ独立した 3 回の実験の内の 1 つである。



ついで、10 nMの [<sup>3</sup>H] WEB 2086 の特異的結合に対する PAF および種々の PAF 拮抗剤の阻害効果を調べた結果、PAF > Y-24180 > CV-6209 > WEB 2086 の順に阻害効果が強く、各々の IC<sub>50</sub> は PAF, 0.4 ± 0.2 nM ; Y-24180, 1.1 ± 0.6 nM ; CV-6209, 7.7 ± 2.1 nM ; WEB 2086, 13 ± 5 nM であった。この差はそれぞれの阻害薬の強さを反映すると考えられた (図 12)。

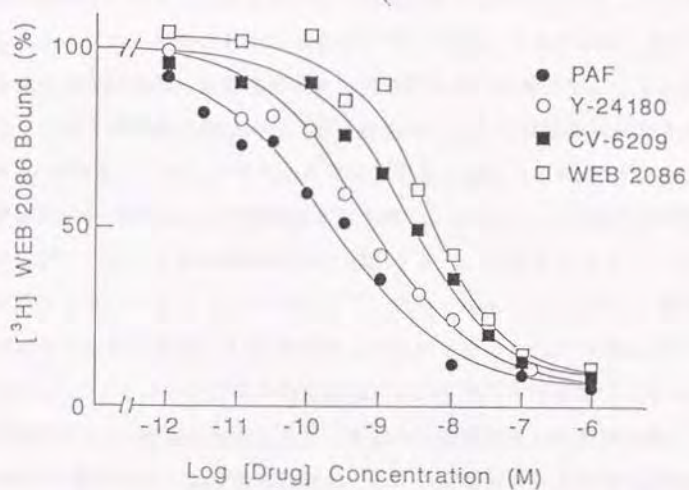


図 12. 10 nM の  $[^3\text{H}]$  WEB 2086 の結合に対する各種薬剤の阻害効果

種々の濃度の PAF (●)、Y-24180 (○)、CV-6209 (■)、WEB 2086 (□) が 10 nM の  $[^3\text{H}]$  WEB 2086 の結合を阻害する効果について調べた。結果は阻害剤のない条件下での特異的結合を 100% として表している。ここに示す結果は 3 回の独立した実験の内の 1 つである。

#### (4) PAF受容体活性化に伴うIP<sub>3</sub>産生

細胞や組織をPAFで刺激するとPI代謝回転が活性化されることが既に幾つかのグループから報告されているが<sup>(96-98)</sup>、実際、クローン化したPAF受容体の活性化が結果的に細胞内でのPI代謝回転を引き起こし、IP<sub>3</sub>が産生されることを以下の実験で確かめた。ヒト白血球PAF受容体を高発現させたCOS-7細胞を100 nMのPAFで刺激すると細胞内IP<sub>3</sub>濃度は15～30秒後に500～800 pmol/10<sup>5</sup>細胞個まで上昇し、さらに、この濃度は時間と共に急速に低下していくのが観察された(図13)。ネガティブコントロールとしてプラスミドベクター(pEUK-C1)のみを導入したCOS-7細胞で同様の測定を行ったが顕著なIP<sub>3</sub>の産生はみられなかった(50～100 pmol/10<sup>5</sup>細胞個)。また、アフリカツメガエル卵母細胞においてもPAF刺激(100 nM)に伴う細胞内IP<sub>3</sub>産生を定量したが、蒸留水を微量注入した卵母細胞では全くIP<sub>3</sub>産生が認められなかったのに対し、ヒト白血球PAF受容体を高発現させた卵母細胞ではPAF刺激に伴い16～18 pmol/20 oocytesのIP<sub>3</sub>の産生が確認された。これらの結果から、クローン化したPAF受容体はリガンド刺激で活性化されると結果的に細胞内でPI代謝回転を引き起こし、IP<sub>3</sub>を産生することが示唆された。高濃度でIP<sub>3</sub>産生が抑制されるメカニズムは不明である。



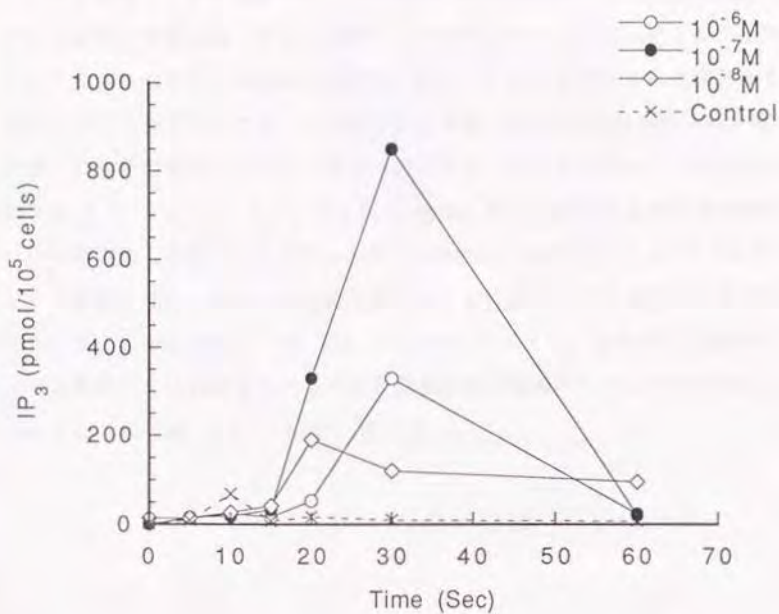
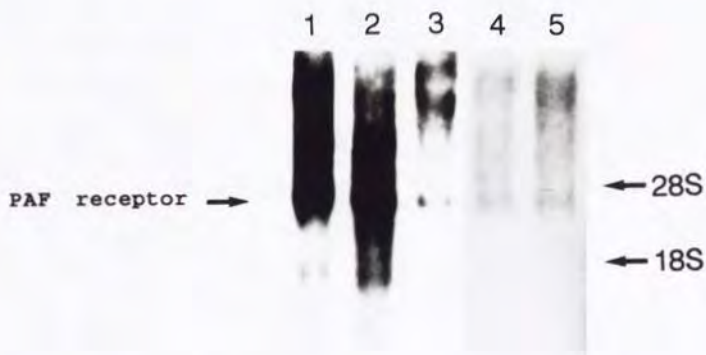


図 13. ヒト白血球 PAF 受容体 cDNA で形質転換した COS-7 細胞での PAF 刺激に伴う IP<sub>3</sub> 産生

ヒト PAF 受容体 cDNA を導入した COS-7 細胞を 10 nM, 100 nM および 1 μM の PAF で刺激した際の細胞内 IP<sub>3</sub> 濃度の経時的变化を IP<sub>3</sub> アッセイキットを用いて測定した。コントロールはベクタープラスミドのみを導入した細胞を意味する。

#### (5) PAF受容体mRNAの発現

ヒト白血球 (>90%好中球)、好酸球性の培養細胞 (EoL-1細胞) および血小板性の培養細胞 (HEL細胞) についてノーザンブロッティング法で PAF受容体mRNAの発現を調べた。約1.8 kbpのヒト白血球PAF受容体cDNAをプローブとして白血球から単離、精製したpoly(A)<sup>+</sup>RNAを調べた結果、PAF受容体mRNAと考えられる約3.8 kbpのバンドが検出された (図 14 lane 1)。EoL-1細胞に関しては未分化の状態では低レベルの発現量しか検出できなかったが、n-butyrate存在下、IL-5とGM-CSFで好酸球性の細胞へと分化誘導することによりかなり強力に転写が活性化されることがわかった (図 14 lane 2、3)。なおHEL細胞はTPA刺激で分化誘導させてもPAF受容体発現の転写レベルでの活性化は見られなかった (図 14 lane 4、5)。



Lane

- 1 Leukocytes
- 2 EoL Cells (differentiated)
- 3 EoL Cells (undifferentiated)
- 4 HEL Cells (differentiated)
- 5 HEL Cells (undifferentiated)

図 14. ヒト白血球 PAF 受容体 mRNA のノーザンブロット解析

以下に示す細胞から調製した poly(A)<sup>+</sup>RNA をそれぞれ 2  $\mu$ g ずつ解析に用いた。lane 1、ヒト白血球 (>90% 好中球)；lane 2、分化 EoL-1 細胞；lane 3、未分化 EoL-1 細胞；lane 4、分化 HEL 細胞；lane 5、未分化 HEL 細胞。矢印は主な転写産物を示す。ヒト rRNA s (18S、28S) をマーカーとして用いた。



### 第3節 第1章の考察

本章はヒト白血球P A F受容体c D N Aのクローニングおよび諸性質についてまとめたものである。同受容体は342個のアミノ酸から成り、推定分子量は39,203、薬理的諸性質は従来報告されているP A F受容体の性質とよく一致していた。ヒト型P A F受容体遺伝子のクローニングは我々の発表以後、最近に至るまで他の幾つかのグループによっても報告されてきている。それらは単離に用いたライブラリーの由来こそ異なるが(HL-60細胞c D N Aライブラリー<sup>(99)</sup>、U937細胞c D N Aライブラリー<sup>(100)</sup>、ゲノムライブラリー<sup>(101)</sup>等)、翻訳領域はいずれも同一の遺伝子配列のものであった。その中で、Yeらは最近、市販され始めたヒト臓器別m R N Aトランスフェーマンブレン(ノーザン解析用)を用いて組織別の発現量を調べているが、結果はモルモットでの発現パターンとほぼ同様、肺、脾臓、腎臓などで高発現が認められていた<sup>(98)</sup>。

ヒト白血球P A F受容体とモルモット肺P A F受容体との相同性はアミノ酸配列レベルで全体で83%であった。種差間の相同性については他の受容体、たとえば $\beta_1$ -アドレナリン受容体<sup>(102)</sup>、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体<sup>(103)</sup>、D<sub>2</sub>-ドーパミン受容体<sup>(104)</sup>やムスカリンM1-M5受容体<sup>(105)</sup>などでも議論されているが、これらはいずれも種差間で90~95%程度の相同性が保たれており、これらの場合と比較すると今回の種差間の相同性は低い数値と言える。薬理的実験結果からP A F受容体はサブタイプが存在が予測されているものの現在のところ単離はされていない。

モルモット肺P A F受容体と異なりクローン化したヒト白血球P A F受容体にはN末端側細胞外領域にN-結合型糖鎖付加部位が存在しなかった。N-結合型糖鎖付加部位はG蛋白質共役型受容体の代表的な特徴として認識されているが、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体を材料としたエンドグリコシダーゼによる糖鎖切

断実験からこの部位にN-結合型糖鎖が付加することは受容体の機能において本質的なことではないという結果も得られている<sup>(106)</sup>。ヒト白血球PAF受容体のN末端細胞外領域にN-結合型糖鎖付加部位が存在しないことからモルモット肺PAF受容体のN末端領域に付加したN-結合型糖鎖は受容体の機能には特に重要ではないことが予想された。なお、ヒト白血球PAF受容体と同様、N末端側細胞外領域にN-結合型糖鎖付加部位が存在しない受容体としてはアデニン受容体(A1<sup>(107)</sup>およびA2<sup>(108)</sup>タイプ)が知られている。

最近、我々のグループはヒト白血球PAF受容体cDNAをプローブとしてヒトゲノムライブラリーよりヒトPAF受容体ゲノム遺伝子を単離することに成功した<sup>(89)</sup>。これにより、プライマー伸長法による解析やクローニングcDNAとの比較からヒト白血球PAF受容体遺伝子には翻訳領域内イントロンは存在しないものの5'非翻訳領域内に大きなイントロン(10kbp以上)が存在し、また転写開始部位も2種類存在することが明かにされた。2つの転写開始部位の上流にはそれぞれ独立したプロモーターの存在が予想され、組織や細胞により機能するプロモーターが異なることが示唆された<sup>(89, 109)</sup>。RT-PCR解析などの結果から両プロモーターの転写活性の強さにはかなり差があり、細胞はこのプロモーターを使い分けることによりPAF受容体の発現量をコントロールしているのかもしれない。

白血球遊走因子に対する受容体cDNAはPAF以外にもfMLP<sup>(110, 111)</sup>、C5a<sup>(112, 113)</sup>、IL-8(高親和性<sup>(114)</sup>、低親和性<sup>(115)</sup>の2種)に特異的なものが血球系の細胞からクローニングされており、いずれもG蛋白質共役型で7回膜貫通受容体ということが明らかにされている。PAF受容体を介する情報伝達は、これらの受容体と比較すると受容体活性化に伴い細胞内カルシウムイオン濃度が上昇するという点は共通するものの、卵母細胞内での発現を比較した場合、次の様な異なった特徴を持つ。第2節(2)で示した様にcRNAの微量注入により高発現させたPAF受容体は卵母細胞が保持する情

報伝達系（G蛋白質等）と効率よくカップリングすることができるが、一方、fMLP受容体やC5a受容体は受容体のみの単独発現では卵母細胞内でリガンド刺激に伴う情報伝達をすることができず、たとえば、未分化HL-60細胞由来のmRNAを同時に微量注入した時のみ細胞内に情報を伝達することができるという実験結果が報告されている<sup>(116, 117)</sup>。この違いはPAF受容体がfMLP受容体やC5a受容体とは共役するG蛋白質やPLCが異なることを予想させる。実際、好中球を用いた実験でPAF受容体はIAP非感受性のG蛋白質に、一方、C5aやfMLP受容体はIAP感受性のG蛋白質に共役しているというデータも報告されている<sup>(118, 119)</sup>。PAFが血球系細胞や平滑筋で実際にどのG蛋白質に共役しているかは今後の課題である。



## 第2章 エンドトキシン (LPS) によるPAF受容体の活性化

### 第1節 材料と方法

(1) 材料: *E. coli*. 0127:B8株由来のLPSはSigma社およびDifco社より、また、*E. coli*. 0111:B4株由来のLPSはDifco社より購入した。合成lipid Aは第一化学薬品(株)より購入した。[<sup>125</sup>I] PAF ラジオイムノアッセイキットおよび[<sup>3</sup>H] LTB<sub>4</sub>(6.438 TBq/mmol)はDu Pont社より購入した。Fura-2/AMはDojin社より購入した。PAF拮抗剤であるTCV-609は武田薬品工業(株)から御供与いただいた。

(2) ヒトおよびウサギ血小板の調製: ヒトあるいはウサギの末梢血を採血し、1/9容量の3.8%(w/v)のクエン酸三ナトリウム溶液を混合した。300×g、15分間の遠心分離でPRP(platelet-rich plasma)画分を得た。血小板はPRP画分を1,500×g、15分間遠心分離することで沈澱として得ることができ、これをHEPES/Tyrode緩衝液(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.49mM MgCl<sub>2</sub>, 0.37mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM glucose, 25mM HEPES, pH 7.4)に浮遊させて血小板浮遊液とした。

(3) 血小板の凝集測定: 血小板の凝集測定はBornらの方法<sup>(120)</sup>に従って37℃、300rpmで攪はんしながら、CAF-100蛍光光度計(JASCO, Inc.)を利用して行った。各種PAF拮抗剤が血小板凝集反応に及ぼす効果の実験はこれらを血小板浮遊液に加えて5分間プレインキュベートした後に刺激因子を添加することで調べた。

(4) 細胞内カルシウムイオン濃度の測定<sup>(121)</sup>: 調製した細胞(血小板、

好中球、CHO細胞等)をHEPES/Tyrode緩衝液に浮遊させ(1 x 10<sup>7</sup>細胞個/m<sup>1</sup>)、終濃度3 μMのFura-2/AMを加えて室温(約15℃)で遮光して放置した。1.5時間後、細胞をHEPES/Tyrode緩衝液で2回洗浄して細胞外にあるFura-2/AMを除いた後、1 x 10<sup>6</sup>細胞個/m<sup>1</sup>の密度になるようにHEPES/Tyrode緩衝液中に浮遊させた。測定はCAF-100を用いて行った。試験管に500 μlの細胞浮遊液を入れて装置に入れ(37℃、1000 rpm)、マイクロシリンジで終濃度1 mMになるようにCaCl<sub>2</sub>を加えた後、リガンド類(5 μl)を注入して反応を測定した。各種PAF拮抗剤による阻害効果はマイクロシリンジでPAF拮抗剤を細胞浮遊液内に注入し、5分間プレインキュベートした後、リガンド刺激に対する反応を測定することで調べた。測定は340 nmと380 nmで励起し、510 nmの蛍光を測定して340/380比をモニターした。遊離カルシウムイオン濃度の計算は以下の式に従った<sup>(122)</sup>。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d [(F - F_{min}) / (F_{max} - F)]$$

K<sub>d</sub> : Ca<sup>2+</sup>の結合解離定数(Fura-2の場合は224 nM)

F : 510 nmの蛍光値

F<sub>max</sub> : 510 nmの蛍光値の最大値(1 mM CaCl<sub>2</sub>存在下で0.1% Triton X-100を加えて細胞膜を破壊した際の値)

F<sub>min</sub> : 510 nmの蛍光値の最小値(5 mM EDTAを加え、カルシウムイオンをキレートした際の値)

#### (5) モルモット好中球および腹腔マクロファージの調製<sup>(123, 124)</sup> :

一晚絶食させたモルモット(ハートレー系、メス、体重350 g程度)の腹腔内に約35 mlの2% (w/v) カゼイン溶液を注入し、一晚(約18時間)経過後、腹腔内に約50 mlの生理食塩水を注入し、この液をシリンジで回収することにより腹腔内に浸潤してきた好中球を採集した。採集した好中球は生

理食塩水で2回洗浄後、HEPES/Tyrode緩衝液中に浮遊させ好中球浮遊液とした。モルモット1匹あたり約 $2 \times 10^8$ 細胞個の好中球が得られた。モルモットの腹腔マクロファージは15mlのパラフィンモルモット腹腔内に注入し、3日後に好中球の場合と同様の方法で回収後、10% FCSを含むRPMI1640培地中に浮遊させて腹腔マクロファージ調製液とした。

(6) PAF受容体cDNAのCHO細胞への導入：モルモット肺PAF受容体cDNAの全長を動物細胞内発現ベクターであるpRc/CMV (Invitrogen)へサブクローニングし、形質転換用プラスミドとした。このプラスミドをCHO-K1細胞へ電気穿孔法(静電容量:0.45 $\mu$ F, 電圧:25mV)で導入し、ネオマイシン耐性を指標として形質転換体を選抜して、PAF受容体cDNAが染色体中に組み込まれPAF受容体を高発現する形質転換細胞を作製した(CHO(gpPAFR)細胞と命名した)。

(7) CHO細胞からの全脂質の抽出およびPAFを含む画分の分離：Sugiuraらの方法<sup>(125)</sup>に従って行った。4 $\times 10^8$ 細胞個/培養皿(内径10cm)の密度になるまで培養したCHO(gpPAFR)細胞をラバーポリスマンでかき取り(培養皿30枚分)、800 $\times$ g、5分間の遠心分離で細胞を集め、HEPES-Tyrode緩衝液で1回洗浄後、30mlの同緩衝液に浮遊させた(4 $\times 10^8$ 細胞個/ml)。この細胞浮遊液を1mlずつ15ml試験管へ分注して37 $^{\circ}$ C、5分間ブレインキュベートし、細胞刺激物質を各試験管に加えて設定時間インキュベート後、反応液に3mlのクロロホルム/メタノール(1:2, v/v)溶液を混ぜ反応を停止した。以下、Bligh & Dyer法<sup>(126)</sup>に従い細胞から脂質を抽出した。酢酸60 $\mu$ l, クロロホルム1ml, 蒸留水0.8mlをそれぞれの試験管に加え5分間振とうし、2,500 $\times$ g、5分間の遠心分離後、下層のクロロホルム層を取り、N<sub>2</sub>ガスにて乾固させた。この操作は2回



行い、最終的に乾固させた各試験管の試料は50  $\mu$ lのクロロホルムに溶解した。続いてシリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開溶媒はクロロホルム:メタノール:水=65:35:6, v/v/v, Kieselgel 60, Merck)を行い標準品を目安としてPAF画分をかき取り、シリカゲルからBligh & Dyer法により脂質を抽出しPAF含有試料として用いた。

(8) PAFの定量: [ $^{125}$ I] PAFラジオイムノアッセイキット (Du Pont)を利用し添付のマニュアルに従って行った。

(9) モルモット好中球の遊走性試験(Boyden法)<sup>(127-128)</sup>: 96穴走化チャンパー(Neuro Probe)を利用し測定を行った。すなわち、HBSS緩衝液に溶解した走化性因子の溶液約30  $\mu$ lをチャンパーの下層の凹み(下室)に満たし、次いで孔径3  $\mu$ m、厚さ約10  $\mu$ mのポリカーボネート製メンブランフィルター(Neuro Probe)、およびシリコン製ガスケットを装着した。そしてトッププレートを取り付け、各凹み(上室)に好中球浮遊液を250  $\mu$ l ( $2 \times 10^6$ 細胞個/ml)ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で1時間インキュベートした。インキュベーション終了後、メンブランフィルター上の遊走細胞をディフ・クイック(鑑別用血液染色液、国際試薬)で染色し、プレートリーダーによる吸光度測定(A<sub>560nm</sub>)、および光学顕微鏡を用いて遊走好中球数の測定を行った。

(10) TNF- $\alpha$ の定量: 24穴プレートの各穴にモルモットの腹腔マクロファージ浮遊液を加え、5%CO<sub>2</sub>存在下で37 $^{\circ}$ Cに2時間放置して腹腔マクロファージを付着させた後、未付着の細胞を除去し、0.5mlのHBSS緩衝液で付着腹腔マクロファージを1回洗浄した。刺激因子を含んだRPMI1640培地を1mlずつ各穴に加え、5%CO<sub>2</sub>存在下、37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベーション



オン後、上清に存在するTNF- $\alpha$ を定量した。TNF- $\alpha$ の定量はNedwinらの方法<sup>(130)</sup>に従って行った。L929 fibroblast細胞を約 $5 \times 10^5$ 細胞個/mlの密度で10% FCSを含むRPMI1640培地に浮遊させ、この細胞液0.1 mlと $1 \mu\text{g/ml}$ のアクチノマイシンDを96穴のflat bottomプレートの各穴に入れた。これらの細胞を5% CO<sub>2</sub>存在下で37℃、2時間放置後、目的の試料を0.1 mlずつ各穴に加え、さらに18時間インキュベーションした。各穴をゆるやかに洗浄して死細胞を除き、50%エタノール、5%ホルマリン、0.05%クリスタルバイオレットを含む溶液で10分間染色した。この際、余分な染色液は水で洗浄することで除いた。染色した各穴を乾燥後、0.1 mlの50%エタノールで色素を抽出し、各々の色素抽出液の595 nmにおける吸光を測定した。なお、50%のL929細胞を死滅させるのに必要なTNF- $\alpha$ の量を1 unitと定義した。

## 第2節 結果

### (1) LPS刺激による血小板内カルシウムイオン濃度の上昇と PAF拮抗剤による抑制

ヒト血小板をLipid Aで刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することが最近報告されたが<sup>(131)</sup>、この現象にPAF受容体が関与しているかどうかを調べるために以下のような実験を行った。ウサギ末梢血から調製した血小板にFura-2/AMを封入し、まずPAF、LPSおよびLipid Aで刺激した際に細胞内カルシウムイオンが上昇することを確認した。図15に示す様にウサギ血小板をPAF(10 nM)で刺激すると直後に急激な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇(約200 nMの上昇)が見られ、LPS(50  $\mu\text{g/ml}$ )およびLipid A(2  $\mu\text{M}$ )の刺激でも瞬時に約50 nMの細胞内

カルシウムイオン濃度の上昇が確認できた。ところで、これらの反応はリガンド刺激前に PAF 拮抗剤である Y-24180 ( $1\mu\text{M}$ ) で 5 分間処理することにより完全に抑制されることから (図 15) LPS および Lipid A 刺激で誘導されるカルシウムレスポンスには PAF 受容体が関与している可能性が予想された。同様の実験結果はヒト血小板を材料にして測定した場合にも得られ (図 16)、LPS および Lipid A 刺激による細胞内カルシウムイオン応答への PAF 受容体の関与は、種差の制限なく血小板に共通して見られる現象であることが予想された。

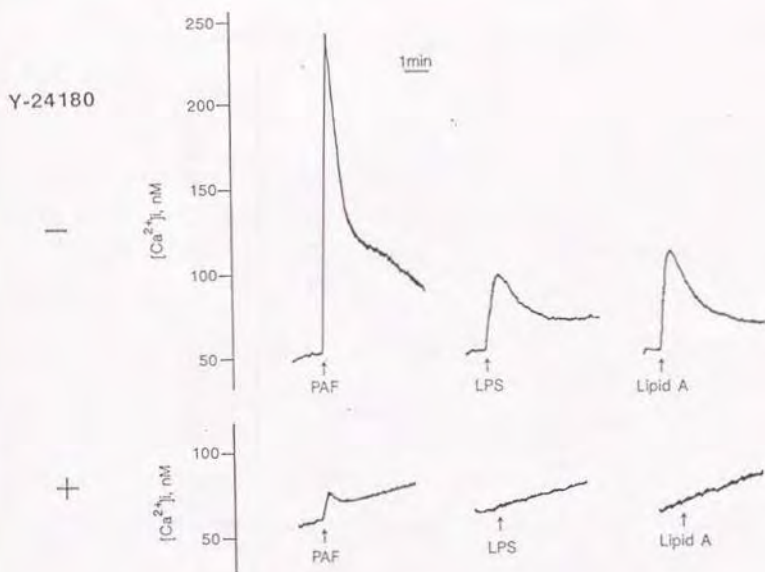


図 15. ウサギ血小板におけるカルシウムイオン濃度の上昇と PAF 拮抗剤の効果

Fura-2/AMを封入したウサギ血小板を PAF (10 nM)、LPS (*E. coli* 0127:B8、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) および Lipid A (2  $\mu\text{M}$ ) で刺激した際の細胞内カルシウムイオン濃度の変動を示す。

PAF 拮抗剤である Y-24180 (1  $\mu\text{M}$ ) はリガンド刺激 5 分前に加えた。

Y-24180

-

+

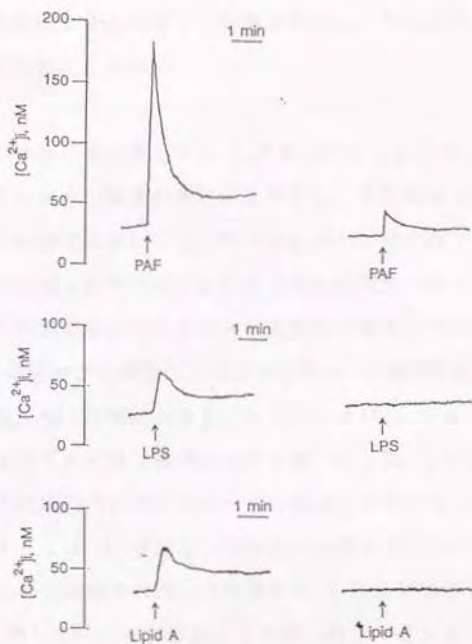


図 16. ヒト血小板におけるカルシウムイオン濃度の上昇と PAF 拮抗剤の効果

ヒト血小板 ( $1 \times 10^8$  細胞個/ml) を用い、図 15 と同様の実験を行った。



(2) LPS刺激によるモルモット好中球内カルシウムイオン濃度の上昇と  
PAF拮抗剤による抑制

マクロファージや血小板に関しては LPS や Lipid A の刺激によって細胞内カルシウムイオン濃度が瞬時に上昇することが報告されており<sup>(131)</sup>、<sup>(132)</sup>、前述の様に本研究においてもウサギおよびヒト血小板でこの現象が確認できた。この節ではさらに好中球においても同様の現象が起こるものかどうかを検討し、LPS刺激応答におけるPAF受容体の関与についても検討してみた。モルモットの腹腔から調製した好中球にFura-2/AMを封入し、CAF-100を用いて血小板と同様、PAF、LPSおよびLipid Aで刺激した際の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を調べた。図17に示す様にPAF刺激が濃度依存的に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるのと同様に、LPSおよびLipid Aを投与した場合にも濃度依存的に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察された。この場合のED<sub>50</sub>の値はPAF、LPS、Lipid Aに対してそれぞれ約2.5 nM、約1.8 μg/ml、約450 nMであった。また、これらの細胞内カルシウムイオン応答はPAF拮抗剤であるY-24180、TCV-309<sup>(133)</sup>あるいはWEB2086で事前に5分間処理することによって濃度依存的に抑制され、この場合の拮抗剤濃度に依存した細胞応答の減少変化はPAFに対する反応が抑制される場合のパターンとはほぼ一致した(図18)。なお、各種PAF拮抗剤による処理はLTB<sub>4</sub>(10 nM)刺激に伴う細胞内カルシウムイオン応答(約150 nMのカルシウムイオン濃度の上昇)には全く影響を及ぼさないことからPAF拮抗剤が細胞に非特異的な傷害を与えているわけではないと判断した。

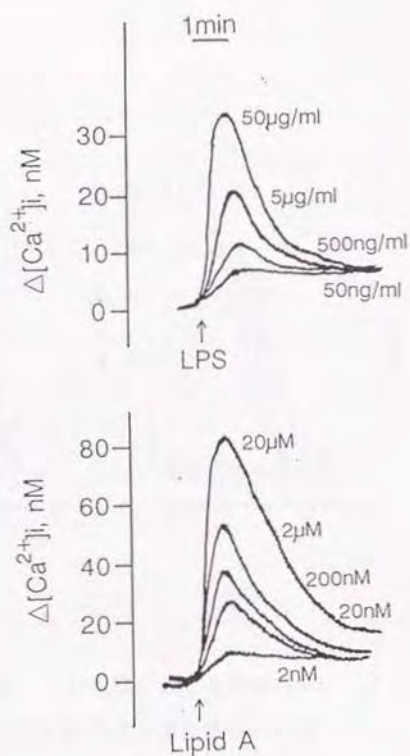


図 17. モルモット好中球における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇

Fura-2/AMを封入したモルモット好中球 ( $1 \times 10^6$ 細胞個/ml) を種々の濃度のLPS (*E. coli* 0127:B8) およびLipid Aで刺激した際の細胞内カルシウムイオン濃度の経時的变化を示す。

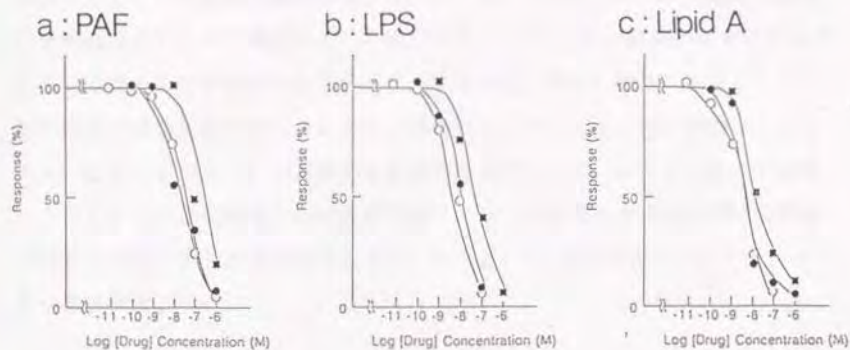


図 18. モルモット好中球における細胞内カルシウムイオン応答の PAF拮抗剤による濃度依存的抑制

3種類のPAF拮抗剤、Y-24180 (○)、TCV-609 (●) および WEB2086 (■) がPAF (10 nM、a)、LPS (*E. coli* 0127:B8、50  $\mu$ g/ml、b) および Lipid A (2  $\mu$ M、c) 刺激による細胞内カルシウムイオン応答を濃度依存的に抑制することを示す。各々の点はPAF拮抗剤非存在下での反応を100%とした時の割合で表している。

第1章で述べたようにクローン化したPAF受容体はリガンド刺激により急激に脱感作する。同様にPAF刺激後にLPSに対する反応が消失するかどうかを調べた。図19に示す様にLPSおよびLipid Aによって誘導される細胞内カルシウムイオン応答は直前に過剰のPAF(1 $\mu$ M)で好中球を刺激してPAF受容体を脱感作させることによって消失した。この場合、直前に過剰濃度のPAFで刺激することはLTB<sub>4</sub>(10 nM)刺激に対する同様の応答にはほとんど影響を与えなかった。すなわち、PAF刺激によるLPS反応の脱感作は特異的であった。また、過剰のLTB<sub>4</sub>(1 $\mu$ M)刺激はLPSあるいはLipid Aの細胞応答を減弱させなかった。よって、PAF刺激によるLPS反応の脱感作は特異的であり、以上の結果は血小板を用いた実験の場合と同様、PAF受容体とLPS、Lipid Aとのクロスリアクションを予想させた。



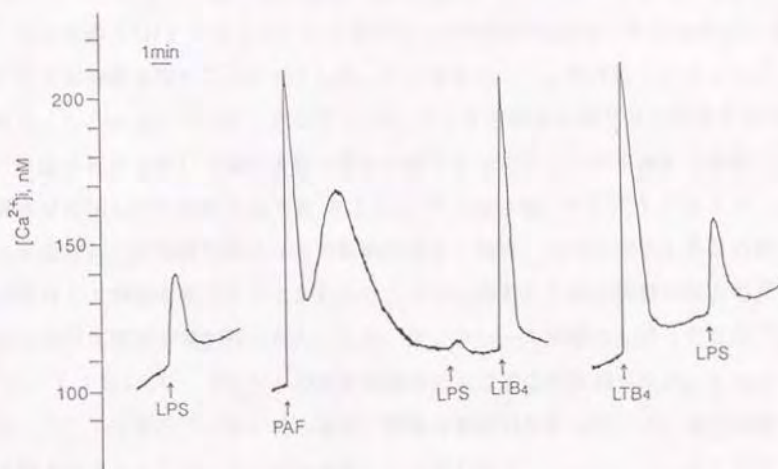


図 19. PAF刺激によるLPSに対する応答の脱感作

モルモット好中球にFura-2/AMを封入後、矢印で示す時点でPAF (10 nM)、LPS (*E. coli* 0127:B8、50  $\mu$ g/ml) あるいはLTB<sub>4</sub> (10 nM)を加えて細胞を刺激した。

### (3) 血小板および好中球膜を用いたLPSによるPAF結合阻害実験

前節までの結果から予想されるクロスリアクション現象が実際に起こっているのならば、PAFとPAF受容体との特異的結合を過剰濃度のLPSが阻害することが期待される。この予測を確認するためにヒト血小板膜を調製し、 $[^3\text{H}]$  PAFを用いて結合阻害実験を行った。図20に示す結果の通り、0.5 nMの $[^3\text{H}]$  PAFのPAF受容体への特異的な結合の割合は共存させるLPSの濃度を増すごとに低下した。この場合の $\text{IC}_{50}$ 値は約 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSで $[^3\text{H}]$  PAFの結合は約90%阻害された。

ヒト血小板膜を用いた結合実験と同様の解析をモルモット好中球から調製した膜画分に関する実験した(図21)。0.5 nMの $[^3\text{H}]$  PAFのPAF受容体への特異的結合は血小板膜の場合と同様、共存させるLPSの濃度に依存して抑制を受けることがわかり、 $\text{IC}_{50}$ 値もヒト血小板膜の場合のデータとほぼ同程度の値が得られた。なお、コントロール実験としてLPSが $[^3\text{H}]$  LTB<sub>4</sub> (0.5 nM)の特異的結合に及ぼす効果を調べたが、 $1 \text{mg}/\text{ml}$ のLPS存在下においても顕著な影響は見られなかった。ここまでの結果を総合するとLPS、特にその活性中心と言われるLipid AはPAF受容体に結合し受容体を活性化しうることが強く予想された。この予想を実証するためにはクローン化したPAF受容体cDNAの発現系(アフリカツメガエル卵母細胞およびCHO細胞)を用いて実験を進めるべきと考え以下の実験を行った。

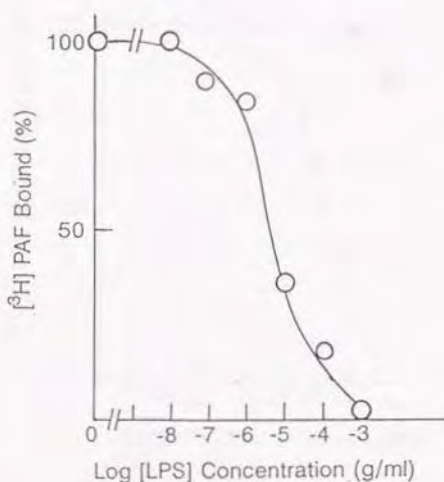


図 20. ヒト血小板膜を用いたLPSによる [<sup>3</sup>H] PAF 結合阻害実験

[<sup>3</sup>H] PAF (0.5 nM) の特異的結合がLPS (*E. coli* 0127:B8) 濃度に依存して阻害されることを示す。各点はLPS非存在下での特異的結合を100%とした場合の割合を示し、それぞれduplicateの平均を示す。結合反応は25℃で120分間行った。この結果は独立した3回の実験の内の1つである。

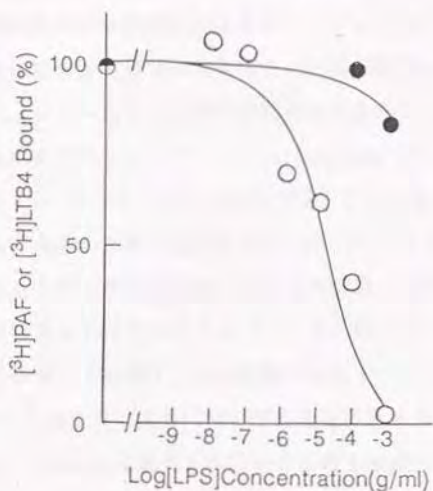


図 21. モルモット好中球膜への [<sup>3</sup>H] PAF 結合に対する LPS の  
阻害実験

[<sup>3</sup>H] PAF (0.5 nM) の特異的結合 (○) は LPS (*E. coli* 0127: B8) 濃度に依存して阻害されるが、 [<sup>3</sup>H] LTB<sub>4</sub> (0.5 nM) の特異的結合 (●) はほとんど影響を受けないことを示す。各点は LPS 非存在下での結合を 100% とした場合の割合を意味し、それぞれ duplicate の平均を示す。結合反応は 25℃ で 120 分間行った。この結果は独立した 3 回の実験の内の 1 つである。



#### (4) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた解析

In vitro で合成したヒト白血球 PAF 受容体 mRNA を微量注入し、PAF 受容体を高発現させた卵母細胞を実験系の一つとして以下の解析を行った。第 1 章で述べた様に PAF 受容体を発現させた卵母細胞における PAF 刺激に対する応答はイノシトールリン脂質代謝回転を引き起こし、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させた (図 22)。この卵母細胞を LPS ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは Lipid A ( $2 \mu\text{M}$ ) で刺激すると PAF 刺激の際の応答と比べると弱いながらも、有意の応答が確認できた (図 22 b)。なお、ネガティブコントロールとして蒸留水を微量注入した卵母細胞で同様のリガンド刺激を行ったが全く応答は見られなかった ( $n = 75$ 、図 22 a)。PAF 受容体発現卵母細胞を事前に 5 分間 PAF 拮抗剤である Y-24180 ( $10^{-7}\text{M}$ ) あるいは WEB2086 ( $10^{-7}\text{M}$ ) で処理すると PAF だけでなく LPS および Lipid A によって誘発されていた応答も完全に抑制された。これらの結果は異なったロットや異なった菌種由来の LPS (*E. coli* 0111:B4 (Difco); *E. coli* 0127:B8 (Difco および Sigma)) を用いても再現された。図 22 c に示す様に LPS や Lipid A で引き起こされる細胞応答は PAF の場合と同様、急激に脱感作することが観察され、さらに  $10 \text{ nM}$  の PAF 刺激で応答 (検出される膜電流は  $1 \mu\text{A}$  程度) を起こした卵母細胞は、その後 Lipid A、LPS どちらで刺激しても応答を示さなかった。なお、図 22 と同様の結果はモルモット肺 PAF 受容体を高発現させた卵母細胞においても得られた。以上の結果は LPS、特にその活性部位である Lipid A が PAF 受容体に直接作用し、細胞内カルシウム系を動員することを示した。

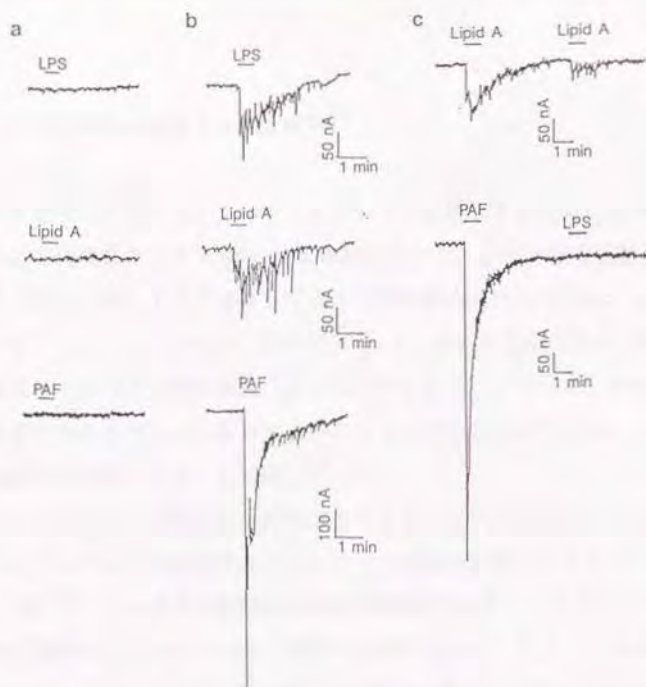


図 22. アフリカツメガエル卵母細胞内で発現した PAF 受容体の LPS  
あるいは Lipid A による活性化

ヒト白血球 PAF 受容体 mRNA あるいは蒸留水を微量注入し、 $20^{\circ}\text{C}$  で 3 日間培養した卵母細胞を PAF ( $10\text{ nM}$ )、LPS (*E. coli* 0127:B8、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) または Lipid A ( $2\text{ }\mu\text{M}$ ) で刺激した際の内向き膜電流の変化を示す。(a) 蒸留水を微量注入した卵母細胞を刺激した場合の結果。(b) ヒト白血球 PAF 受容体 mRNA を微量注入した卵母細胞を刺激した場合の結果。(c) Lipid A に対する応答の脱感作と PAF ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ) 刺激による LPS に対する応答の消失。

### (5) CHO細胞発現系を用いた解析

PAF受容体とLPSとのクロスリアクションを証明するため、もう1つのPAF受容体発現系としてCHO-K1細胞を用いて、以下の様な実験を行った。まず、モルモット肺PAF受容体cDNAを動物細胞発現ベクター、pRc/CMVへサブクローニング後、これをCHO-K1細胞に電気穿孔法で導入した。PAF受容体cDNAが染色体内に組み込まれCMVプロモーター支配下、高発現する細胞をネオマイシン耐性およびPAFに対する反応を指標にして選抜し(CHO(gpPAFR)細胞)、以下の実験に用いた。

Fura-2/AMを封入したCHO(gpPAFR)細胞をPAF、LPSおよびLipid Aで刺激し、その直後の細胞内カルシウムイオン濃度の変動をCAF-100で測定した。図23bに示す様にCHO(gpPAFR)細胞をPAF(10nM)で刺激すると急激な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が見られ、LPS(50 $\mu$ g/ml)およびLipid A(2 $\mu$ M)で刺激した場合も、やはり瞬時にカルシウムイオン濃度の上昇が観察された。いずれも応答はリガンド濃度依存的に増加し、その範囲はLPSが5 $\times 10^{-8}$ g/mlから5 $\times 10^{-6}$ g/ml、Lipid Aが2 $\times 10^{-8}$ Mから2 $\times 10^{-6}$ Mの濃度範囲で観察された(図24)。それぞれのリガンドに対するED<sub>50</sub>値はPAF、LPS、Lipid Aの順に約1.7nM、約1.5 $\mu$ g/ml、約280nMであり、この濃度は第2節(2)で述べたモルモット白血球を刺激した場合のED<sub>50</sub>とほぼ一致した。なお、リゾ-PAFに対しては1 $\mu$ Mの濃度で刺激しても全く応答はなかった。また、ベクタープラスミド(pRc/CMV)のみを導入したネガティブコントロール細胞(CHO(Vec)細胞)においてはPAFだけがわずかに応答を示すもののLPSやLipid Aに対しては全く応答を示さなかった(図23a)。なお、CHO-K1細胞にLPS結合能を持つ蛋白質が存在しないことは他の研究グループによっても確かめられている<sup>(134, 135)</sup>。



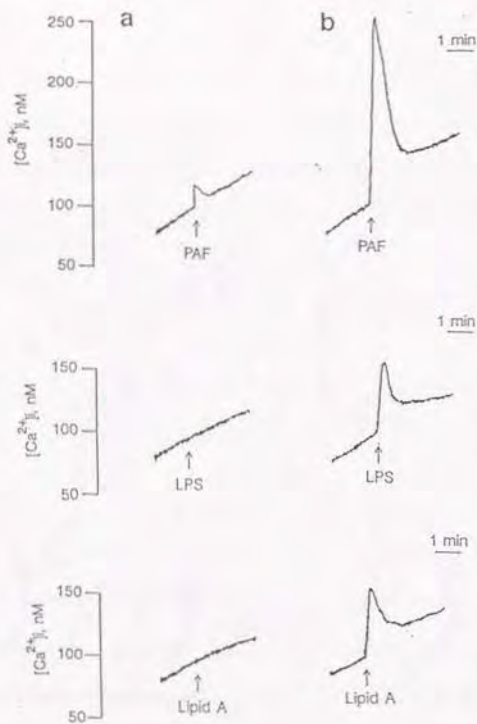


図 23. CHO(gpPAFR)細胞におけるリガンド刺激に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇

(a) CHO(Vec)細胞を PAF (10 nM)、LPS (*E. coli* 0127:B8、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは Lipid A (2  $\mu\text{M}$ ) で刺激した場合の細胞内カルシウムイオン濃度変化。(b) CHO(gpPAFR)細胞を PAF (10 nM)、LPS (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは Lipid A (2  $\mu\text{M}$ ) で刺激した場合の細胞内カルシウムイオン濃度変化。



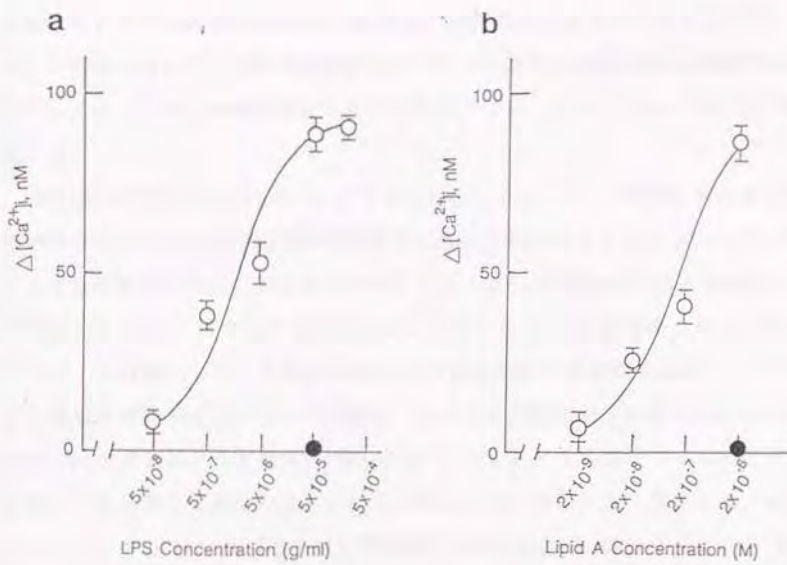


図 2 4. CHO(gpPAFR)細胞における細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する濃度依存性

(a) LPS (*E. coli* 0127:B8)の濃度に依存したカルシウムイオン濃度の上昇 (○)。各点は平均±S.E.M. (n=3)を示す。(b) Lipid Aの濃度に依存したカルシウムイオン濃度の上昇 (○)。各点は平均±S.E.M. (n=3)を示す。(●)はY-24180 (1 μM)で5分間処理した後の応答を示す。

これらLPSやLipid Aによる細胞内カルシウムイオン応答はY-24180 ( $10^{-6}$ M)による前処理で完全に抑制された(図24)。この場合、使用したPAF拮抗剤がCHO(gpPAFR)細胞に非特異的な変化を与えていないことは、CHO細胞が内在的に受容体を保持するトロンビン刺激の際の細胞内カルシウムイオン応答に影響を及ぼさないことをポジティブコントロールとして確認した。

CHO(gpPAFR)細胞において、LPSあるいはLipid A刺激が引き起こす細胞内カルシウムイオン応答が刺激直後に産生されるPAFによるものでないことを証明するためにLPSあるいはLipid A刺激後のPAF産生について検討してみた。まずLPSあるいはLipid Aで刺激直後、あるいは15秒、30秒、1分、2分後のCHO(gpPAFR)細胞から全脂質を抽出し、シリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開後、PAFを含む画分をかき取った。この画分中に含まれるPAF量はDu Pont社の $[^{125}\text{I}]$ PAFラジオイムノアッセイキットを利用して測定した。このシステムにおいてLPS ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )あるいはLipid A ( $2\mu\text{M}$ )で刺激したCHO(gpPAFR)細胞 ( $4 \times 10^6$ 細胞個)では刺激後2分間以内に検出範囲レベル( $30\text{pg} \sim 3000\text{pg}$ )のPAF産生は確認できなかった。また抽出したPAF画分をCHO(gpPAFR)細胞に投与しても図23に示される様な応答は得られなかった。前節までの結果からLPSあるいはLipid Aを投与した際の細胞内カルシウムイオン応答が刺激直後(少なくとも5秒以内)に引き起こされることとあわせて、CHO細胞での細胞内カルシウムイオン応答がLPSあるいはLipid Aにより産生されるPAFによって起こる二次的応答とは考えにくい。

LPSがPAF受容体を活性化する際、受容体に直接結合しうることを証明するために血小板膜や好中球膜を調製して行った結合阻害実験(図20、21)と同様の実験をCHO(gpPAFR)細胞膜を調製して行った。図25aに示す様に  $0.5\text{nM}$ の $[^3\text{H}]$ PAFのPAF受容体への特異的結合はLPSの濃度依存

的に抑制され、この結果はヒト血小板膜やモルモット好中球膜を用いて行った結合実験(図 20、21)とほぼ一致した。なお、この実験から  $IC_{50}$  値は約  $5 \mu g/ml$ 、 $0.5 nM$  の  $[^3H]$  PAF 結合を  $90\%$  抑制する濃度は約  $50 \mu g/ml$  という結果が得られた。この  $IC_{50}$  値は CHO(gpPAFR) 細胞のカルシウムイオン応答を引き起こす LPS の  $EC_{50}$  値に近い数値と言える。

さらに  $0.5 nM$  の  $[^3H]$  PAF の結合反応を開始して  $30$  分後、 $100 \mu g/ml$  の LPS を反応液中に加えてからの解離曲線を図 25 b に示す。

$[^3H]$  PAF の特異的結合は経時的に減少し、約  $60$  分後には  $50\%$  の  $[^3H]$  PAF の解離が観察された。以上の全ての結果は LPS がクローン化した PAF 受容体に直接結合していることを強く示唆する。

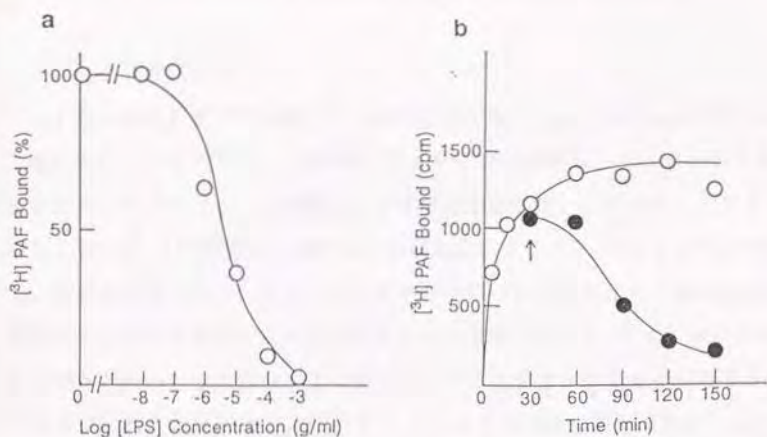


図 25. CHO(gpPAFR)細胞膜を用いた  $[^3\text{H}]$  PAF の displacement と dissociation 実験

(a) LPS (*E. coli* 0127:B8)濃度に依存した  $[^3\text{H}]$  PAF (0.5 nM) の displacement. 各点は LPS 非存在下での結合を 100%とした場合の割合を示し、それぞれ duplicate の平均を示した。この結果は独立した 3 回の実験の内の 1 つである。(b)  $[^3\text{H}]$  PAF (0.5 nM) の結合反応をスタートして 30 分後 (矢印)、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の LPS を加えることによって起こる  $[^3\text{H}]$  PAF の解離 (●)。(○) は LPS の代わりに緩衝液を加えた場合の結果を示す。各点は duplicate の平均を示す。この結果は独立した 3 回の実験の内の 1 つである。



## (6) LPSによるPAF受容体活性化の生理的意義とその限界

### 1) 血小板凝集反応

ヒト血小板をLPSで刺激すると凝集反応が起こることがGragarekらによって報告されている<sup>(136)</sup>。この現象にPAF受容体が関与しているかどうか確かめるために第2節(1)で調製したウサギ血小板を用い、PAF、LPSおよびLipid Aで刺激した際の血小板凝集反応をCAF-100を用いて調べた。従来から知られているようにウサギ血小板はPAFによって濃度依存的に凝集反応が活性化され、この反応はPAF拮抗剤であるY-24180で効率よく抑制された。たとえば0.1 nMのPAFで活性化される血小板凝集反応(透過度は約65%)は1  $\mu$ MのY-24180で完全に抑制された(図26)。一方、LPS(50  $\mu$ g/ml)あるいはLipid A(2  $\mu$ M)も凝集反応を引き起こすことが確認でき(両者とも透過度は約25%)、PAF刺激の場合と同様1  $\mu$ MのY-24180で完全に抑制された(図26)。これらの結果から、ウサギ血小板において観察されるLPS刺激に伴う凝集反応にはPAF受容体が関与していることが予想された。

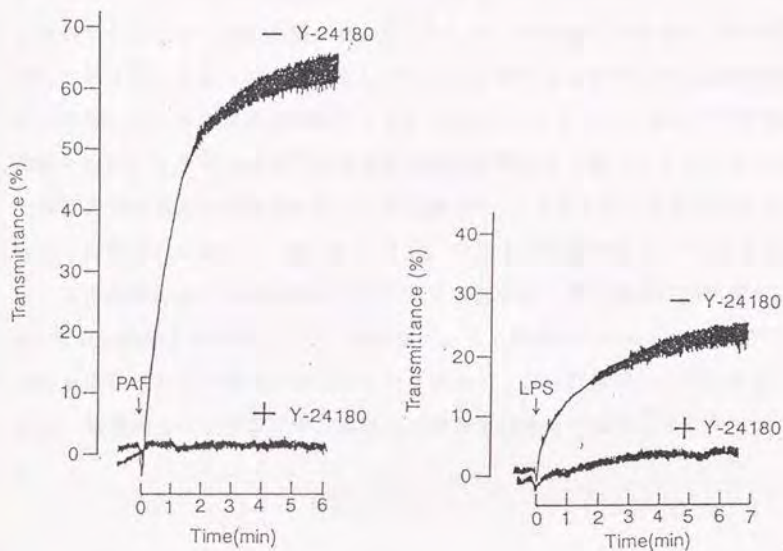


図 26. PAFおよびLPS刺激によるウサギ血小板の凝集反応

ウサギ血小板 ( $2 \times 10^8$ 細胞個/ml) をPAF (0.1 nM、左) あるいはLPS (*E. coli* 0127:B8、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、右) で刺激した際の凝集反応。刺激5分前にY-24180 ( $1 \mu\text{M}$ ) あるいは緩衝液を加えた。

## 2) 好中球の遊走性

ヒト白血球はLPSおよびLipid A刺激によって遊走反応を示すことが既に報告されている<sup>(137)</sup>。モルモット好中球においても同様の現象が観察できるか、さらに好中球遊走が引き起こされた場合PAF拮抗剤によってこの現象を抑制することができるか調べた。図27aに示す様にモルモット好中球に対してPAFは10nMを最大として0.1nMから100nMの範囲で遊走を引き起こし、さらにこの現象は100nMのY-24180存在下では完全に抑制された。LPSは従来報告通り比較的高濃度の刺激(1 $\mu$ g/ml以上)で同様の好中球遊走が誘導され、この現象はY-24180(1 $\mu$ M)存在下でも全く抑制されなかった(図27b)。前述までの結果から、Y-24180はLPS刺激に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を完全に抑制する。図27の結果から判断してLPS刺激によって誘導されるモルモット好中球の遊走反応にはPAF受容体とのクロスリアクションは直接関与しておらず、また、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も十分条件ではないことが推測された。

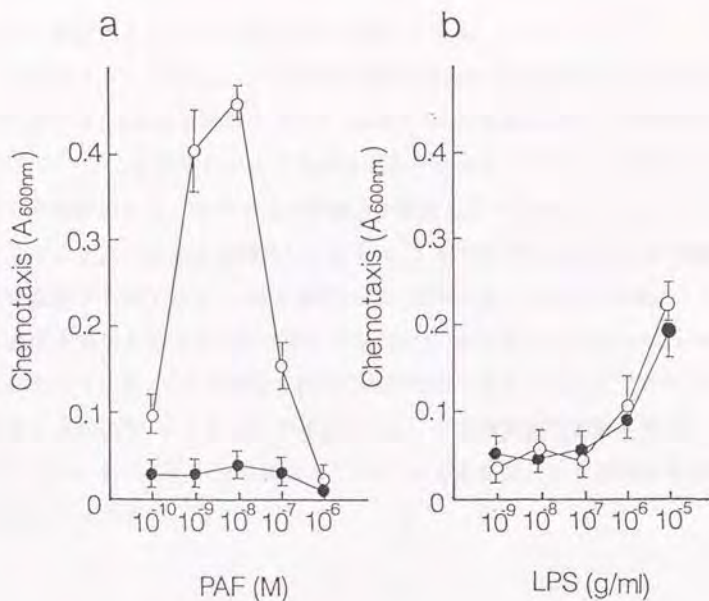


図 27. PAFおよびLPS刺激によるモルモット好中球の遊走反応

モルモット好中球 ( $2 \times 10^6$  細胞個/ml) を種々の濃度の PAF (a) および LPS (*E. coli* 0127:B8) (b) で刺激し、遊走してメンブレンに付着した細胞を染色後、これらの吸光度 (A<sub>600</sub>) を測定することで遊走反応を評価した。なお、2種類のリガンドによる刺激は全て Y-24180 ( $1 \mu\text{M}$ ) 存在 (●) あるいは非存在下 (○) で行った。各点は平均  $\pm$  S.E.M. (n=3) を示し、この結果は独立した3回の実験の結果の内の1つである。



### 3) 腹腔マクロファージによるTNF- $\alpha$ 産生

マクロファージはLPSの代表的な標的細胞の一つであり、LPSあるいはLipid Aによる刺激でTNF- $\alpha$ やIL-1を産生することが知られている(138, 139)。この反応にPAF受容体とのクロスリアクションが関与しているかどうかを検討した。モルモット腹腔より調製したマクロファージに0.1 ngから1  $\mu$ gまでの濃度範囲のLipid Aをそれぞれ投与し18時間の培養の間に産生されるTNF- $\alpha$ 量を測定した。結果は図28に示す様にLipid A濃度を増加させるにつれて約500 units/mlから1500 units/mlの範囲にわたってTNF- $\alpha$ が産生されることが確認できた。さらにこのTNF- $\alpha$ 産生は1  $\mu$ MのY-24180の存在下においても抑制的な影響を受けないことがわかった。従って、LPSによるTNF- $\alpha$ の産生はPAF受容体を介さないことがわかった。

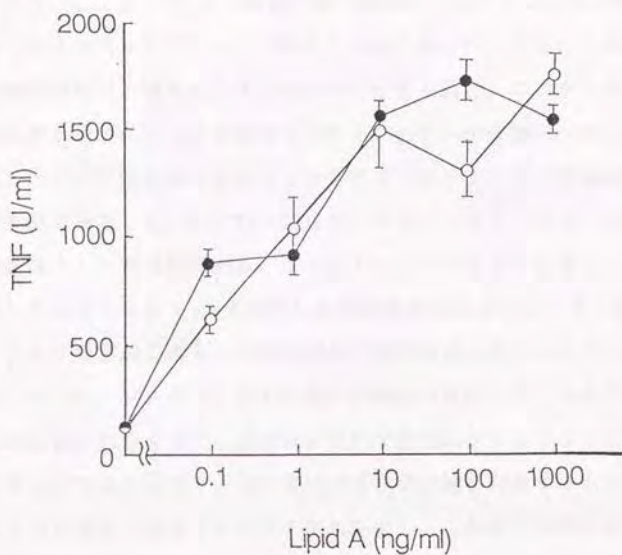


図 28. Lipid Aで刺激したモルモット腹腔マクロファージによる TNF- $\alpha$  産生

Lipid A濃度に依存したモルモット腹腔マクロファージによる TNF- $\alpha$  の産生を示す。これらの実験は Y-24180 ( $1 \mu\text{M}$ ) 存在 (●)、あるいは非存在下 (○) で行った。各点は平均  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ) を示す。

### 第3節 第2章の考察

本研究において、ウサギ、ヒト血小板やモルモット好中球でのエンドトキシン (LPS、Lipid A) 刺激に伴う細胞内カルシウムイオン応答がPAF受容体とのクロスリアクションであることを示唆した。即ち、これらの細胞応答は数種類の異なる構造のPAF拮抗剤で阻害された。エンドトキシンに対する細胞応答が確かにPAF受容体を介するかどうかを直接確かめる目的でクローン化したPAF受容体を高発現させたアフリカツメガエル卵母細胞およびCHO細胞で検討した。いずれの場合も、ネガティブコントロールである蒸留水を微量注入した卵母細胞あるいはコントロールベクターを導入したCHO細胞ではLPSやLipid A刺激による細胞内カルシウムイオン応答は誘発されず、PAF受容体を導入した細胞のみで細胞内カルシウムイオン応答が検出された。さらに、PAFとLPSは互いに脱感作を起こすことも見いだした。

以上の結果を総合すると、従来報告されてきたエンドトキシンによる血小板や白血球の活性化の少なくとも一部はPAF受容体を利用するものと考えられた。LPSが局所で微量のPAFの産生を促し、これが二次的に自らの細胞のPAF受容体に作用している可能性も否定できないが、少なくとも定量しうるだけのPAFは産生されておらず、またCHO細胞のPAF産生能に関しても報告されていない。

一方、このPAF受容体を介する細胞内カルシウムイオン応答の生理的意義については血小板凝集とは直接かかわっているが、白血球における遊走性や活性酸素の発生(データ未発表)、また、マクロファージでのTNF- $\alpha$ 産生とは直接関係がなく、これらの作用は、LPSが、PAF受容体とは別の固有の受容体に働いて引き起こす現象と考えられた(図29)。

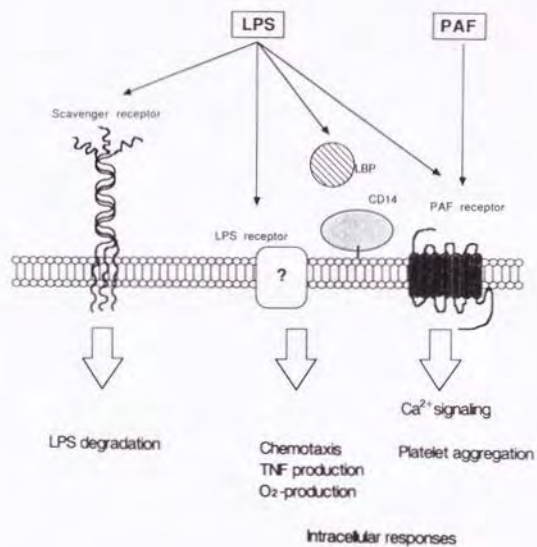


図 29. LPS 刺激の際の情報伝達機構 (想定図)

細胞膜上に存在する主なLPS結合蛋白質を模式的に示した。スカベンジャー受容体は血中のLPSと結合し、これを不活性型に変換する機能を持つことが報告されている<sup>(140)</sup>。



第2章の結果の問題点として刺激に用いたLPSの濃度の問題があげられる。LPSが生理的作用を及ぼすのに必要な濃度は約数10ng/mlと言われているが、本研究では第2節(4)、(5)で示した様にPAF受容体の活性化には少なくとも数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSを必要とした。Lipid Aに関しても数100nMを必要とし、これはPAFよりも数100倍親和性が低いと言える。実際、生体内でこれほどの高濃度LPSで細胞が刺激を受けることがあるだろうか？生体内で局所的にLPSが高濃度で存在しうることも否定できない。最近、WorthenらはLPS刺激した白血球を血管内皮細胞へ接着させる際のLBPの重要性を報告している<sup>(141)</sup>。彼らは、LPSはLBPと複合体を形成後、白血球膜上のCD14に結合して白血球の接着活性を誘発すると主張しているが、この際に必要とされるLPS濃度はLBP非存在下では数10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるのに対し、LBP存在下では約数ng/mlになると述べている。LPSのCD14を介する細胞刺激におけるLBPの重要性に関しては他にも幾つか報告されている<sup>(142-146)</sup>。LPSとPAF受容体との関係においても、このような性質を持つ未同定因子が存在することで生体内では高親和的に作用している可能性も否定できない。

## 糸吉 言吾

本論文はヒト白血球P A F受容体のクローニングと構造決定、およびエンドトキシンとの反応性についてまとめたものである。

モルモット肺P A F受容体c D N Aをプローブとしてハイブリダイゼーションによりクローニングしたヒト白血球P A F受容体はモルモット肺型と同様G蛋白質共役タイプで7回膜貫通型受容体スーパーファミリーに属するものであった。モルモット型とのアミノ酸レベルでの相同性は全体で約83%であり、7つの膜貫通領域だけを比較すると約91%もの相同性を示した。また、アフリカツメガエル卵母細胞におけるP A F反応性はG蛋白質不活化剤であるG D P  $\beta$  Sの作用で大幅に減弱し、P A F受容体以降の情報伝達にG蛋白質が関与することが示唆された。さらに、本受容体はリガンド刺激により急激に脱感作することも示された。P A F受容体を高発現させたC O S - 7細胞の膜画分を用いて薬理的解析を行った結果、 $[^3\text{H}]$  W E B 2 0 8 6の特異的結合に対する各種P A F拮抗剤の阻害効果はY - 2 4 1 8 0 > C V - 6 2 0 9 > W E B 2 0 8 6の順に強く、この順序はそれぞれの薬理的阻害効果の強さと一致した。

クローン化したP A F受容体はP A Fだけでなくエンドトキシンショックの原因となるL P Sによっても活性化されることが以下の実験結果から示唆された。ヒトおよびウサギ血小板、さらにモルモット好中球をL P Sで刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察されるが、この現象はP A F拮抗剤によって完全に抑制された。アフリカツメガエル卵母細胞内発現系においてL P S刺激はP A F受容体を高発現させた卵母細胞のみ内向き膜電流の応答を示すことができ、L P S刺激に伴いP A F受容体が活性化されたことが予想された。また、P A F受容体を高発現させたC H O細胞においてもL P S刺激で細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することが確認され、この細胞の膜画分を用いた $[^3\text{H}]$  P A F結合阻害実験より、L P SはP A F受容体に直接結合して

活性化していることが示唆された。P A F 受容体とL P S のクロスリアクシ  
ョンの生理学的意義を明らかにするために血小板凝集反応、好中球遊走現象お  
よび腹腔マクロファージのT N F -  $\alpha$  産生への関与を検討してみたが、血小板凝集  
反応にのみ関与の可能性が示唆され、他の2つの現象に関しては別の特異的な  
L P S 受容体を介していることが予想された。以上のことから、エンドトキシ  
ンショックの病態の少なくとも一部はP A F 受容体の直接の活性化の結果であ  
ることが示された。



本研究は以下の論文に報告した。

[第1章]

1. Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M. and Shimizu, T., Molecular cloning of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 20400-20405, 1991.
2. Shimizu, T., Honda, Z., Nakamura, M., Bito, H. and Izumi, T., Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* 44: 1001-1008, 1992.
3. Nakamura, M., Honda, Z., Matsumoto, T., Noma, M. and Shimizu, T., Isolation and properties of platelet-activating factor receptor cDNAs. *J. Lipid Med.* 6: 163-168, 1993.

[第2章]

1. Nakamura, M., Honda, Z., Waga, I., Matsumoto, T., Noma, M. and Shimizu, T., Endotoxin transduces  $Ca^{2+}$  signaling via platelet-activating factor receptor. *FEBS lett.* 314: 125-129, 1992.

なお、本研究は以下の学会にも報告した。

[第1章]

1. 中村元直、本田善一郎、脊山洋右、松本隆志、野間正名、清水孝雄  
第64回日本生化学会大会、10/2~5 (1991)、東京
2. 中村元直、本田善一郎、脊山洋右、松本隆志、野間正名、清水孝雄  
1991年度日本分子生物学会、12/19~22 (1991)、福岡



3. Nakamura, M., Honda, Z., Matsumoto, T., Noma, M. and Shimizu, T.  
8th International Conference on Prostaglandins and Related  
Compounds. July / 26~31 (1992), Montreal

[第2章]

1. 中村元直、和賀巖、清水孝雄、第66回日本生化学会大会、10/1~4  
(1993)、東京
2. 中村元直、和賀巖、清水孝雄、1993年度日本分子生物学会、  
12/16~19 (1993)、幕張

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり終始御指導戴きました、東京大学医学部第2生化学教室、清水孝雄教授に感謝いたします。本研究において御指導戴きました東京大学医学部栄養学教室、脊山洋右教授、ならびにアフリカツメガエル卵母細胞の電気生理学実験を御指導戴きました東京大学医学部神経生物学教室、高橋國太郎教授に感謝いたします。実験の御援助ならびに御助言を戴きました東京大学医学部第2生化学教室の本田善一郎、和泉孝志、桑和彦、岸本成史、坂中千恵、高野朋子、高橋利枝、尾藤晴彦、南道子、武藤弘行、森樹郎、横溝岳彦の各先生に御礼申し上げます。また、種々の激励や御助言を戴きました東京大学医学部栄養学教室、加納和孝、塩田正樹、堀チヨの各先生、ならびに第三内科、大石展也先生、第一内科、渡辺毅助教授、中尾彰先生、他教室の皆様感謝致します。

本研究を進めるにあたり終始御援助、御助言を戴きました日本たばこ産業（株）医薬基礎研究所、和賀巖 主任研究員、ならびに日本たばこ産業（株）生命科学研究所、佐々木壮 所長、野間正名 副所長、松本隆志 副所長、児玉久 主任研究員、石井聰研究員に感謝いたします。

本研究は私が日本たばこ産業（株）生命科学研究所から受託研究員として東京大学医学部栄養学教室および第2生化学教室に派遣中に行われたものである。生命科学研究所ならびに日本たばこ産業（株）の関係者の方々に感謝いたします。

## 参考論文

1. Benveniste, J., Henson, P. M., and Cochrane, C. G., Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136: 1356-1377, 1972.
2. Benveniste, J., Le Couedic, J. P., Plonsky, J. and Tence, M., Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature* 269: 170-171, 1977.
3. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N., and Hanahan, D. J., platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* 254: 9355-9358, 1979.
4. Blank, M. L., Snyder, F., Byers, L. W., Brooks, B., and Muirhead, E. E., Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 1194-1200, 1979.
5. Polonsky, J., Tence, M., Varenne, P., Das, B. C., Junel, J., and Benveniste, J., Release of 1-O-alkylglyceryl-3-phosphorylcholine, O-deacetylplatelet-activating factor, from leukocytes: chemical ionization mass spectrometry of phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 7019-7023, 1980.
6. O'Flaherty, J. T., Wykle, R. L., Miller, C. H., Lewis, J. C., Waite, M., Bass, D. A., McCall, C. E., and DeChatelet, L. R., 1-O-alkyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholines: a novel class of neutrophil stimulants. *Am. J. Pathol.* 103: 70-79, 1981.



7. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M., Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 265: 17381-17384, 1991.
8. Hanahan, D. J., Platelet activating factor, A biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 483-509, 1986.
9. Snyder, F. (Ed.), Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators, Plenum Press, New York, 1987.
10. Shukla, S. D., Inositol phospholipid turnover in PAF transmembrane signalling. *Lipids* 26: 1028-1033, 1991.
11. Valone, F. H., Coles, E., Reinhold, V. R. and Goetzl, E. J., Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. *J. Immunol.* 129: 1637-1641, 1982.
12. Hwang, S. B., Lee, C. S. C., Cheah, M. J. and Shen, T. Y., Specific receptor sites for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor) on rabbit platelet and guinea pig smooth muscle membranes. *Biochemistry* 22: 4756-4756, 1983.
13. Valone, F. H., Isolation of a platelet membrane protein which binds the platelet activating factor. *Immunology* 52: 169-174, 1984.
14. Hwang, S. B., Lam, M. H. and Shen, T. Y., Specific binding sites for platelet activating factor in human lung tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 972-979, 1985.
15. Hwang, S. B., Chang, M. N., Garcia, M. L., Han, Q. Q., Huang, L., King, V. F., Kaczorowski, G. J. and Winquist, R. J., L-652,469- a dual receptor antagonist of platelet activating factor and dihydropyridines from Tussilago farfara L. *Eur. J. Pharmacol.* 141: 269-281, 1987.



16. Stewart, A. G., Dubbin, P. N., Harris, T. and Dusting G. J., Evidence for an intracellular action of platelet-activating factor in bovine cultured aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 96: 503-505, 1989.
17. Alam, I., Smith, J. B. and Silver, M. J., Metabolism of platelet-activating factor by blood platelets and plasma. *Lipids* 18 : 534-538, 1983.
18. Touqui, L., Jacquemin, C., Dumarey, C. and Vargaftig, B. B., 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine is the precursor of platelet-activating factor in stimulated rabbit platelets. Evidence for an alkylacetyl-glycerophosphorylcholine cycle. *Biochem. Biophys. Acta.* 833: 111-118, 1985.
19. Kramer, R. M., Patton, G. M., Pritzker, C. R. and Deykin, D., Metabolism of platelet-activating factor in human platelets. Transacylase-mediated synthesis of 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem.* 259: 13316-13320, 1984.
20. Malone, B., Lee, T.-c. and Snyder, F., Inactivation of platelet activating factor by rabbit platelets. Lyso-platelet activating factor as a key intermediate with phosphatidylcholine as the source of arachidonic acid in its conversion to a tetraenoic acylated product. *J. Biol. Chem.* 260 : 1531-1534, 1985.
21. Chilton, F. H., O'Flaherty, J. T., Ellis, J. M., Swendsen, C. L. and Wykle, R. L., Selective acylation of lyso platelet activating factor by arachidonate in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 258: 7268-7271, 1983.

- 2 2. 野島庄七, 唐沢健 「血小板活性化因子」, 現代化学増刊  
17、(和久敬蔵, 井上圭三 編) ; p. 1-6、1989.
- 2 3. Berridge, M. J., Inositol trisphosphate and diacylglycerol as  
second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360, 1984.
- 2 4. Shukla, S. D. and Hanahan, D. J., An early transient decrease in  
phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate upon stimulation of  
rabbit platelets with acetylglycerylether phosphorylcholine  
(platelet activating factor) *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 458-  
466, 1983.
- 2 5. MacIntyre, D. E. and Pollock, W. K., Platelet-activating factor  
stimulates phosphatidylinositol turnover in human platelets.  
*Biochem. J.* 212: 433-437, 1983.
- 2 6. O'Flaherty, J. T., Platelet-activating factor: Mechanisms  
of Cellular activation. in *Platelet Activating Factor and  
related Lipid Mediators.* (ed. Snyder, F.) pp. 283-298, 1987.
- 2 7. Julius, D., MacDermott, A. B., Axel, R. and Jessell, T. M., Molecular  
characterization of a functional cDNA encoding the serotonin  
1c receptor. *Science* 241: 558-564, 1987.
- 2 8. Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. and Nakanishi,  
S., cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte  
expression system. *Nature* 329: 836-838, 1987.
- 2 9. Yamashita, M., Fukui, H., Sugama, K., Horio, Y., Ito, S., Mizoguchi, H.  
and Wada, H., Expression cloning of a cDNA encoding the bovine  
histamine H1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11515-11519  
, 1991.

- 3 0. Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J. and Okayama, H., Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356: 526-529, 1992.
- 3 1. Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., and Shimizu, T., Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 349: 342-346, 1991.
- 3 2. Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M. and Shimizu, T., Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 20400-20405, 1991.
- 3 3. Shimizu, T., Honda, Z., Nakamura, M., Bito, H. and Izumi, T., Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* 44: 1001-1008, 1992.
- 3 4. Raetz, C. R. H., Ulevitch, R. J., Wright, S. D., Sibley, C. H., Ding, A. and Nathan, C. F., Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* 5: 2652-2660, 1991.
- 3 5. Tobias, P. S., Mathison, D. M., Lee, J. -D., Kravchenko, V., Kato, K., Pugin, J. and Ulevitch, R. J., Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7: 239-245, 1992.



36. Galanos, C., Lhmann, V., Luderitz, O., Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. *Eur. J. Biochem.* 140: 221-227, 1984.
37. Raetz, C. R. H., Brozek, K. A., Clementz, T., Coleman, J. D., Galloway, S. M., Golenbock, D. T. and Hampton, R. Y., Gram-negative endotoxin : a biologically active lipid. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LIII: 973-982, 1988.
38. Morrison, D. C., and Ryan, J. L., Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* 38: 417-432, 1987.
39. Raetz, C. R. H., Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 129-170, 1990.
40. Chang, H. R., Grau, G. E. and Pechere, J. C., Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, 69: 33-37, 1990.
41. Fenton, M. J., Vermeulen, M. W., Clark, B. D., Webb, A. C. and Auron, P. E., Human pro-IL-1 $\beta$  gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. *J. Immunol.* 140: 2267-2273, 1988.
42. Takasuka, N., Tokunaga, T. and Akagawa, K., Preexposure of macrophages to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA but not of IL-1 $\beta$  mRNA. *J. Immunol.* 146: 3824-3830, 1991.



- 4 3. Guthrie, L. A., McPhail, L. C., Henson, P. M. and Johnston, R. B., Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J. Exp. Med.* 160: 1656-1671, 1984.
- 4 4. Young, S. K., Worthen, G. S., Haslett, C., Tonnesen, M. G. and Henson, P. M., Interaction between chemoattractants and bacterial lipopolysaccharide in the induction and enhancement of neutrophil adhesion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2: 523-532, 1990.
- 4 5. Lynn, W. A. and Golenbock, D. T., Lipopolysaccharide antagonists. *Immunology Today* 13: 271-276, 1992.
- 4 6. Hawiger, J., Hawiger, A., Steckley, S. and Cheng, C., Membrane changes in human platelets induced by lipopolysaccharide endotoxin. *British J. Haematology.* 35: 285-299, 1977.
- 4 7. Landes, R. R. and Morrison, D. C., Biochemical mechanisms of lipid A-mediated enhancement of platelet secretory responses to aggregated Immunoglobulins. *Am. J. Pathol.* 104: 196-205, 1981.
- 4 8. Schuman, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J., Structure and function of lipopolysaccharide (LPS) binding protein : a plasma protein that controls the response of macrophages to LPS. *Science* 249: 1429-1431, 1990.
- 4 9. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C., CD14 serves as the cellular receptor for complexes of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1431-1433, 1990.

- 5 0 . Wright, S. D. , Ramos, R. A. , Hermanowski-Vosatka, A. H. , Rockwell, P. and Detmers, P. A. , Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin : dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* 173: 1281-1286, 1991.
- 5 1 . Ziegler-Heitbrock, H. W. L. and Ulevitch, R. J. , CD14 : Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today* 14: 121-125, 1993.
- 5 2 . Sibley, C. H. , Terry, A. and Raetz, C. R. H. , Induction of  $\kappa$  light chain synthesis in 70Z/3 B cell lymphoma cells by chemically defined lipid A precursors. *J. Biol. Chem.* 263: 5098-5103, 1988.
- 5 3 . Gadd, S. , M3, cluster report : CD14. In *Leukocyte Typing IV*. (Knapp, W. , Dorken, B. , Gilks, W. R. , Riber, E. P. , Schmidt, R. E. , Stein, H. and von dem Borne, A. E. G. Kr. , eds) pp. 787-789. Oxford University Press, Oxford England, 1989.
- 5 4 . Pugin, J. , Schurer-Maly, C-C. , Leturcq, D. , Moriarty, A. , Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S. , Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2744-2748, 1993.
- 5 5 . Chang, S-W. , Fernyak, S. and Voelkel, N. F. , Beneficial effect of a platelet-activating factor antagonist, WEB 2086, on endotoxin-induced lung injury. *Am. J. Phy.* 258: H153-H158, 1990.
- 5 6 . Casals-Stenzel, J. , Protective effect of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in endotoxin shock. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 117-122, 1987.

- 5 7. Terashita, Z., Imura, Y., nishikawa, K. and Sumida, S., Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock?  
European J. Pharmacol. 109: 257-261, 1985.
- 5 8. Rabinovici, R., Yue, T., Farhat, M., Smith III, E. F., Esser, K. M., Slivjak, M. and Feuerstein, G., Platelet activating factor (PAF) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) interactions in endotoxemic shock: Studies with BN50739, a novel PAF antagonist.  
J. Pharmacol. and Experi. Therap. 255: 256-263, 1990.
- 5 9. Myers, A. K., Robey, J. W. and Price, R. M., Relationships between tumour necrosis factor, eicosanoids and platelet-activating factor as mediators of endotoxin-induced shock in mice.  
Br. J. Pharmacol. 99: 499-502, 1990.
- 6 0. Olson, N. C., Joyce, P. B. and Fleisher, L. N., Role of platelet-activating factor and eicosanoids during endotoxin-induced lung injury in pig. Am. J. Phy. 258: H1674-H1686, 1990.
- 6 1. Tolins, J. P., Vercellotti, G. M., Wilkowske, M., Jacob, B. HA. H. S. and Raij, L., Role of platelet activating factor in endotoxemic acute renal failure in the male rat. J. Lab. Clin. Med. 113: 316-324, 1989.
- 6 2. Braquet, P. and Hosford, D., Platelet-activating factor and endotoxin., in : Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions (Nowotny, A. ed.) pp. 295-303. Elsevier, Amsterdam, 1990.



63. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J., Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299, 1979.
64. 東京大学医科学研究所制癌研究部(編), 組織細胞株からのRNAの調製. 細胞工学実験プロトコール, 秀潤社, pp. 24-37, 1991.
65. 濱田博司, mRNAの調製法. 実験医学別冊, 遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, pp. 36-40, 1991.
66. Gubler, U. and Hoffman, B. J., A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25: 263-269, 1983.
67. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467, 1977.
68. Vieira, J. and Messing, J., The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertional mutagenesis and sequencing with synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene (Amst.)* 19: 259-268, 1982.
69. 澄川勝美, レセプターmRNA導入方法. 実験医学別冊, 神経生化学マニュアル, 羊土社, pp. 10-19, 1990.
70. 中村元直, アフリカツメガエル卵母細胞の実験. 実験医学別冊, バイオシグナル実験法, 羊土社, pp. 30-38, 1993.
71. 中村元直, アフリカツメガエル卵母細胞を用いたレセプター遺伝子の発現クローニング. 実験医学別冊, バイオテクノロジー実験法, 羊土社, pp. 138-156, 1993.

- 7 2. Dascal, N., Landan, E. M. and Lass, Y., Xenopus oocyte resting potential, muscarinic responses and the role of calcium and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J. Physiol. (Lond)* 352: 551-574, 1984.
- 7 3. Sambrook, J., Fritsch, F., and Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*- 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 7 4. Dent, G., Ukena, D., Sybrecht, G. W., and Barnes, P. J., [<sup>3</sup>H]WEB 2086 labels platelet activating factor receptors in guinea pig and human lung. *Eur. J. Pharmacol.* 169: 313-316, 1989.
- 7 5. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- 7 6. Martin, P., Papayannopoulou, T., HEL Cells: A new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*, 216: 1233-1235, 1982.
- 7 7. Tabillo, A., Rosa, J. -P., Testa, U., Kieffer, N., Nurden, A. T., Del. M. C., Breton-Gorius, J. and Vainchenker, W., Expression of platelet membrane glycoproteins and  $\alpha$ -granule proteins by a human erythroleukemia cell line (HEL). *EMBO J.* 3: 453-459, 1984.
- 7 8. Izumi, T., Hoshiko, S., Radmark, O., and Samuelsson, B., Cloning of the cDNA for human 12-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 7477-7481, 1990.

79. Long, M. W., Heffner, C. H., Williams, J. L., Peters, C. and Prochownik, E. V., Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythro-leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 85: 1072-1084, 1990.
80. Saito, H., Bourinbaiar, A., Ginsburg, M., Minato, K., Ceresi, E., Yamada, K., Machover, D., Breard, J., and Mathe, G., Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* 66: 1233-1240, 1985.
81. Kyte, J., and Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein: A C program for evaluating the hydropathic character of sequence segments. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132, 1982.
82. Dohlman, H. G., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26: 2657-2664, 1987.
83. Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 653-688, 1991.
84. Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J. and Sealson, S. C., Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA and Cell Biol.* 11: 1-20, 1992.
85. Konig, B., arendt, A., McDowell, J. H., Kahlert, M., Hargrave, P. A. and Hofman K. P., Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6878-6882, 1989.
86. Benovic, J. L., Mayor, F. Jr., Somers, R. L., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J., Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *Nature* 321: 869-872, 1986.



- 8 7. Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J., Functional desensitization of the isolated  $\beta$ -adrenergic receptor by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase : Potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8879-8882, 1987.
- 8 8. Schwertschlag, U. S. and Whorton, R., Platelet-activating factor-induced homologous and heterologous desensitization in cultured vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 263: 13791-13796, 1988.
- 8 9. Mutoh, H., Bito, H., Minami, M., Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Nakata, R., Kurachi, Y., Terano, A. and Shimizu, T., Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet-activating factor receptor. FEBS Lett. 322: 129-134, 1993.
- 9 0. Casals-Stenzel, J., Muacevic, G., and Weber, K.-H., Pharmacological actions of WEB 2086, a new and specific antagonist of platelet activating factor (PAF). J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 974-981, 1987.
- 9 1. Terashita, Z., Imura, Y., Takatani, M., Tsushima, S., and Nishikawa, K., CV-6209- a highly potent platelet activating factor (PAF) antagonist. in Abstract of the Second International Conference on Platelet-activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, Gatlinburg, TN. p. 29, Oct. 1986.

- 9 2. Terasawa, M., Mikashima, H., Takehara, S., Moriwaki, M., Setoguchi, M., and Tahara, T. in Abstract of the Third International Conference on Platelet Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, Tokyo, Japan, p.10, May, 1991.
- 9 3. Eckstein, F., Cassel, D., Levkowitz, H., Lowe, M., and Selinger, Z., Guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), an inhibition of adenylate cyclase stimulation by guanine nucleotide and fluoride ions. *J. Biol. Chem.* 254: 9829-9834, 1979.
- 9 4. Nomura, Y., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S. and Sugiyama, H., Inositol phosphate formation and chloride current responses induced by acetylcholine and serotonin through GTP-binding proteins in *Xenopus* oocyte after injection of rat brain messenger RNA. *Mol. Brain Res.* 2: 113-123, 1987.
- 9 5. Dent, G., Ukena, D., Chanez, P., Sybrecht, G. W., and Barnes, P., Characterization of PAF receptors on human neutrophils using the specific antagonist, WEB 2086, Correlation between receptor binding and function. *FEBS Lett.* 244: 365-368, 1989.
- 9 6. Naccache, P. H., Molski, M. M., Volpi, M., Becker, E. L. and Sha'afi, R. I., Unique inhibitory profile of platelet activating factor induced calcium mobilization, polyphosphoinositide turnover and granule enzyme secretion in rabbit neutrophils towards pertussis toxin and phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 677-684, 1985.

- 9 7 . Brass, L. F., Woolkalis, M. J. and Manning, D. R., Interaction in platelets between G proteins and the agonists that stimulate phospholipase C and inhibit adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 263: 5348-5355, 1988.
- 9 8 . Barzaghi, G., Sarau, H. M. and Mong, S., Platelet-activating factor-induced phosphoinositide metabolism in differentiated U937 cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 559-565, 1989.
- 9 9 . Ye, R. D., Prossnitz, E. R., Zou, A. and Cochrane, C. G., Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 105-111, 1991.
- 1 0 0 . Kunz, D., Gerard, N. P. and Gerard, C., The human leukocyte platelet-activating factor receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 9101-9106, 1992.
- 1 0 1 . Seyfried, C. E., Schweickart, V., Godiska, R. and Gray, P. W., The human platelet-activating factor receptor gene (PAFR) contains no introns and maps to chromosome 1. *Genomics* 13: 832-834, 1992.
- 1 0 2 . Machida, C. A., Bunzow, J. R., Searles, R. P., Van Tol, H., Tester, B., Neve, K. A., Teal, P., Nipper, V., and Civelli, O., Molecular cloning and expression of the rat  $\beta$ 1-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* 265: 12960-12965, 1990.



- 1 0 3. Kobilka, B. K., Dixon, R. A. F., Frielle, T., Dohlman, H. G., Bolanowski, M. A., Sigal, I. S., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., cDNA for the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: A protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 46-50, 1987.
- 1 0 4. Grandy, D. K., Marchionni, M. A., Makam, H., Stofko, R. E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J. B., Burke-Howie, K. J., Bunzow, J. R., Server, A. C., and Civelli, O., Cloning of the cDNA and gene for a human  $D_2$  dopamine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 9762-9766, 1989.
- 1 0 5. Bonner, T., Buckley, N. J., Young, A. C. and Brann, M. R., Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. Science. 237: 527-532, 1987.
- 1 0 6. Boege, F., Jurss, R., Cooney, D., Hekman, M., Keenan, A. K. and Helmreich, E. J. M., Functional and structural characterization of the two  $\beta_2$ -adrenoceptor forms in turkey erythrocytes with molecular masses of 50 and 40 kilodaltons. Biochemistry. 26: 2418-2425, 1987.
- 1 0 7. Libert, F., Schiffmann, S. X., Lefort, A., Parmentier, M., Gerard, C., Dumont, J. E., Vanderhaeghen, J.-J. and Vassart, G., The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. EMBO J. 10: 1677-1682, 1991.

- 1 0 8. Maenhaut, C., Van sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaeghen, J.-J., Dumont, J. E., Vassart, G. and Schiffmann, S., RDC8 codes for an adenosine A<sub>2</sub> receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1169-1178, 1990.
- 1 0 9. Sugimoto, T., Tsuchimochi, H., McGregor, C. G., Mutoh, H., Shimizu, T. and Kurachi, Y., Molecular cloning and characterization of the platelet-activating factor receptor gene expressed in the human heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 617-624, 1992.
- 1 1 0. Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P., Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 1103-1109, 1990.
- 1 1 1. Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P., The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29: 11123-11133, 1990.
- 1 1 2. Gerard, N. P. and Gerard, C., The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349: 614-617, 1991.
- 1 1 3. Gerard, C., Bao, L., Orozco, O., Pearson, M., Kunz, D. and Gerard, N. P., Structural diversity in the extracellular faces of peptidergic G-protein-coupled receptors., Molecular cloning of the mouse C5a anaphylatoxin receptor. *J. Immunol.* 149: 2600-2606, 1992.

- 1 1 4 . Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C. and Wood, W. I.,  
Structure and functional expression of a human interleukin-8  
receptor. *Science* 253: 1278-1280, 1991.
- 1 1 5 . Murphy, P. M. and Tiffany, H. L., Cloning of complementary DNA  
encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*  
253: 1280-1283, 1991.
- 1 1 6 . Murphy, P. M. and McDermott, D., Functional expression of the  
human formyl peptide receptor in Xenopus oocytes requires a  
complementary human factor. *J. Biol. Chem.* 266: 12560-12567,  
1991.
- 1 1 7 . Kroll, B., Emde, M., Jeromin, A., Penner, L., Rechkemmer, G.,  
Kretzschmar, T., Klos, A., Kohl, J. and Bautsch, W., Functional  
expression of a human C5a receptor clone in Xenopus oocytes  
requires additional RNA. *FEBS Lett.* 291: 208-210, 1991.
- 1 1 8 . Polakis, P. G., Uhing, R. J. and Snyderman, R., The formylpeptide  
chemoattractant receptor copurifies with a GTP-binding protein  
containing a distinct 40-kDa pertussis toxin substrate.  
*J. Biol. Chem.* 263: 4969-4976, 1988.
- 1 1 9 . Murphy, P. M., Gallin, E. K. and Tiffany, H. L., Characterization of  
human phagocytic cell receptors for C5a and platelet  
activating factor expressed in Xenopus oocytes. *J. Immunol.*  
145: 2227-2234, 1990.
- 1 2 0 . Born, G. V. R., Aggregation of blood platelets by adenosine  
diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-929, 1962.



- 1 2 1. Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y., A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.
- 1 2 2. 唐木英明、工藤佳久、第1部. 細胞内カルシウム濃度の測定. 実験医学別冊、細胞内カルシウム実験法、羊土社、pp 26-49、1989.
- 1 2 3. Ochi, K., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Taniguchi, K. and Miyamoto, T., Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 258: 5754-5758, 1983.
- 1 2 4. 柿沼カツ子, 白血球と食作用, 講談社、pp 196、1979.
- 1 2 5. Sugiura, T., Fukuda, T., Masuzawa, Y. and Waku, K., Ether lysophospholipid-induced production of platelet-activating factor in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1047: 223-232, 1990.
- 1 2 6. Bligh, E. G. and Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- 1 2 7. Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E. J., Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J. Immunol. Methods* 37: 39-45, 1980.
- 1 2 8. Harvath, L. and Leonard, E. J., Two neutrophil populations in human blood with different chemotactic activities: Separation and chemoattractant binding. *Infection and Immunity.* 36: 443-449, 1982.

- 1 2 9. 塚本芳雄、福谷幸子、大浦清、9 6 穴ケモタキシスチャンバーを用いた白血球走化性試験—マイクロプレートリーダーによる走化性の定量的評価—、炎症 13 : p p 51—54, 1993.
- 1 3 0. Nedwin, G. E., Svedersky, L. P., Bringman, T. S., Palladino, M. A. and Goeddel, D. V., Effect of interleukin 2, interferon- $\gamma$ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$ . *J. Immunol.* 135: 2492-2495, 1985.
- 1 3 1. Romano, M., Molino, M. and Cerletti, C., Endotoxic lipid A induces intracellular  $Ca^{2+}$  increase in human platelets. *Biochem. J.* 278 : 75-80, 1991.
- 1 3 2. Prpic, V., Weiel, J. E., Somers, S. D., DiGiuseppi, J., Gonias, S. L., Pizzo, S. V., Hamilton, T. A., Herman, B. and Adams, D. O., Effects of bacterial lipopolysaccharide on the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 139: 526-533, 1987.
- 1 3 3. Takatani, M., Maezaki, N., Imura, Y., Terashita, Z., Nishikawa, K. and Tsushima, S., Platelet activating factor (PAF) antagonists : Development of a highly potent PAF antagonist. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research.* 21: 943-946, 1990.
- 1 3 4. Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M., and Raetz, C. R. H., Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352: 342-344, 1991.

- 1 3 5. Hara-Kuge, S., Amano, F., Nishijima, M. and Akamatsu, Y., Isolation of lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant, with defective LPS binding, of cultured macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 265: 6606-6610, 1990.
- 1 3 6. Gragarek, J., Timmons, S. and Hawiger, J., Modulation of human platelet protein kinase C by endotoxic lipid A. *J. Clin. Invest.* 82: 964-971, 1988.
- 1 3 7. Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Takahashi, I., Ikeda, T., Otsuka, K., Shimauchi, H., Kasai, N., Mashimo, J., Nagao, S., Tanaka, A., Tanaka, S., Harada, K., Nagaki, K., Kitamura, H., Shiba, T., Kusumoto, S., Imoto, M., Nagaki, K., Kitamura, H., Shiba, T., Kusumoto, S., Imoto, M. and Yoshimura, H., Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* Re-mutant. *Infection and Immunity* 49: 225-237, 1985.
- 1 3 8. Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K. and Durum, S. K., There is more than one interleukin 1. *Immunology Today* 7: 45-56, 1986.
- 1 3 9. Zhang, X. and Morrison, D. C., Pertussis toxin-sensitive factor differentially regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150: 1011-1018, 1993.
- 1 4 0. Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M., and Raetz, C. R. H., Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptor. *Nature* 352: 342-344, 1991.



- 1 4 1. Worthen, G. S., Avdi, N., Vukajlovich, S. and Tobias, R. S., Neutrophil adherence induced by lipopolysaccharide in vitro. - Role of plasma component interaction with lipopolyaccharide. *J. Clin. Invest.* 90: 2526-2535, 1992.
- 1 4 2. 山本俊輔、瀬戸口美保子、松浦恵子、樋口安典、, 顆粒球・単球系細胞の高感度LPS刺激系〜CD14とLPS結合蛋白質の遺伝子および蛋白質の構造と機能, 代謝、増刊号、免疫'91. 28: 131-140、1991.
- 1 4 3. Mathison, J. C., Tobias, P. S., Wolfson, E. and Ulevitch, R. J., Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. - A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J. Immunol.* 149: 200-206, 1992.
- 1 4 4. Heumann, D., Gallay, P., Bsrras, C., Zaech, P., Ulevitch, R. J., Tobias, P. S., Glauser, M-P. and Baumgartner, J. D., Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 148: 3505-3512, 1992.
- 1 4 5. Tobias, P. S., Soldau, K., Kline, L., Lee, J. -D., Kato, K., Martin, T. P. and Ulevitch, R. J., Cross-linking of lipopolysaccharide (LPS) to CD14 on THP-1 cells mediated by LPS-binding protein. *J. Immunol.* 150: 3011-3021, 1993.
- 1 4 6. Pugin, J., Schurer-Maly, C-C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S., Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2744-2748, 1993.



