

Cyclic AMP による培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞からの カテコールアミン遊離増強機序に関する研究

奈良県立医科大学薬理学教室

南 尚 希

STUDIES ON THE MECHANISMS OF CYCLIC AMP FACILITATION OF STIMULATION-EVOKED CATECHOLAMINE RELEASE FROM CULTURED BOVINE ADRENAL CHROMAFFIN CELLS

NAOKI MINAMI

The Department of Pharmacology, Nara Medical University

Received November 29, 1993

Abstract: The mechanism by which cyclic AMP facilitates secretagogue stimulated catecholamine(CA) release from cultured bovine adrenal chromaffin cells was investigated. 8-Br cyclic AMP and forskolin enhanced CA release induced by acetylcholine(ACh). Ouabain, omission of extracellular K^+ or veratrine enhanced ACh-evoked CA release and counteracted the effects of 8-Br cyclic AMP and forskolin. Cyclic AMP decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity of microsomes from bovine adrenal medulla. 8-Br cyclic AMP, forskolin and catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase(A-PK) reduced [γ - ^{32}P]ATP hydrolysis in digitonin-permeabilized chromaffin cells. This reduction of ATP hydrolysis was abolished in the presence of ouabain and thus suggested to be due to an inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase. 8-Br cyclic AMP and forskolin alone slightly increased ^{22}Na uptake, intracellular Na^+ concentration($[Na^+]_i$), depolarization and raised intracellular free Ca^{2+} concentration($[Ca^{2+}]_i$), and encouraged these ACh-induced responses. 8-Br cyclic AMP and Forskolin enhanced CA release elicited by ACh in the presence of Ca^{2+} channel blockers. Potentiations by 8-Br cyclic AMP or forskolin of stimulation-evoked CA release, increase in ^{22}Na uptake, $[Na^+]_i$, depolarization and rise in $[Ca^{2+}]_i$ were antagonized by tetrodotoxin, amiloride, or by the removal of Na^+ from the medium, but not affected by K^+ channel blockers. Ouabain, removal of K^+ or veratrine mimicked the effects of cyclic AMP and these agents counteracted each other. 8-Br cyclic AMP enhanced CA release, ^{45}Ca efflux and $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by caffeine in the absence of extracellular Ca^{2+} . These results may suggest that further enhancement of Ca^{2+} influx through the Na^+/Ca^{2+} exchange mechanism and mobilization of intracellular Ca^{2+} from its stores due to reduction of the Na^+ gradient as a result of inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase by cyclic AMP, is involved in the facilitation of CA release elicited by cyclic AMP.

Index Terms

adrenal medulla, cyclic AMP, catecholamine release, calcium, Na^+ , K^+ -ATPase

緒 言

神経系を含む多くの細胞において受容体刺激から開口分泌に至る過程はいくつかのセカンドメッセンジャーにより調節を受けており、ある種の細胞では cyclic AMP が主要な役割を果たしていることが知られている¹⁾。副腎髄質クロマフィン細胞においても cyclic AMP がカテコールアミン(CA)の刺激遊離を促進的に調節していることを示す知見が集積してきている。例えば cyclic AMP, adenylylase 活性化剤, phosphodiesterase 阻害剤等は安静時の遊離には僅かな作用しか有さないが、刺激遊離を著明に増強する²⁾⁻⁸⁾。さらに ACh 刺激により Ca^{2+} -calmodulin を介して adenylylase が活性化され、cyclic AMP 濃度が CA 遊離に先立って増加する⁹⁾⁻¹¹⁾。これらのことから刺激に応じて内在性に産生された cyclic AMP が CA 遊離調節に働いているものと考えられる。副腎髄質からの CA 分泌は、同時に分泌されるアミンやペプチド等の種々な生理物質により調節をうけている。この中のいくつかの受容体は adenylylase に促進的あるいは抑制的に共役している。従って adenylylase-cyclic AMP 系が神経伝達物質或いは神経調節因子の細胞内セカンドメッセンジャーとして刺激-分泌連関の調節的役割を演じているものと思われる^{2),12)}。最近、cyclic AMP は記憶や学習あるいは環境に対する脳機能の適応の基礎にあると考えられているシナプス可塑性の制御機構の一翼を担っているとの報告が相次ぎ¹³⁾⁻¹⁶⁾、cyclic AMP の刺激-分泌連関における役割およびその機構解明は一層重要性を増してきている。

cyclic AMP-dependent protein kinase(A-PK)は細胞膜神経伝達物質受容体、イオンチャンネル、細胞骨格、phosphatase inhibitor の他伝達物質の生合成、分泌に関与する多くのタンパク質をリン酸化することが知られており、多彩な機序でその作用を発現しているものと考えられる¹⁷⁾。このような cyclic AMP の刺激-分泌連関における役割はその分子機構が明らかになるにつれ cyclic AMP が重要な担い手であることがより一層明らかとなってきている。

cyclic AMP がイオンチャンネルをリン酸化してその活性を調節していることについては幾多の証拠がある^{18),19)}。例えば cyclic AMP はラット新生児脊髄後根神経節の電位依存性 Ca^{2+} 電流を増加させる²⁰⁾。アメフラシ感覚神経では A-PK の細胞内投与により K^+ チャンネル活性が抑制され、活動電位の振幅と持続時間を増大させることにより電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを調節する²¹⁾。このことが cyclic AMP によるシナプス伝達増強の説明

として示されている。

PC 12 細胞において Rabe ら²²⁾は forskolin が Ca^{2+} 動態に影響することなく伝達物質の刺激遊離を促進することを認め、cyclic AMP は Ca^{2+} influx に続いて起こる分泌過程のいずれかの要素を促進することを示唆した。しかしながら、ウシ副腎髄質クロマフィン細胞においては ACh による ^{45}Ca uptake を forskolin あるいは cyclic AMP が増強し、forskolin による CA 遊離増強と ^{45}Ca uptake 増強の用量-反応曲線はよく一致している²³⁾。加えて cyclic AMP は ACh のみならず excess KCl さらには外液 Ca^{2+} 除去下 caffeine による CA 遊離と ^{45}Ca efflux を共に増強する^{4),23)}。以上の結果は cyclic AMP が細胞膜を通る Ca^{2+} uptake の促進、さらには細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員或いは Ca^{2+} 貯蔵部位への取り込み阻害等、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の homeostasis を変化させることにより $[Ca^{2+}]_i$ を増加させていることを示唆している。このように副腎髄質クロマフィン細胞では cyclic AMP は分泌過程における Ca^{2+} の利用率を増加させることで CA 遊離を増加していると考えられるがその詳細は不明である。本研究では cyclic AMP による分泌反応増強の機構をとくに $[Ca^{2+}]_i$ 増加の機序に焦点を絞って検索を加えた。

実験方法

実験には以下の薬物を使用した。

Acetylcholine chloride(第一製薬). caffeine(片山化学工業). hexamethonium chloride(東京化成工業). atropine sulfate, adrenaline, ouabain(Merk). bepridil hydrochloride, physostigmine salicylate, 5'-adenosine triphosphate trisodium salt, amiloride hydrochloride, 8-bromo adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate sodium salt, diltiazem hydrochloride, nicardipine hydrochloride, veratrine, veratridine, cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit and its endogenous inhibitor(Sigma). forskolin, inositol calcium salt(CALBIOCHEM, Corp.). fetal calf serum(ICN Biochemicals Co., Ltd.). guanosine 5'-monophosphate(Boehringer mannheim). adenosine-3', 5'-cyclic monophosphothioate, Rp-diastereomer(Rp-cAMPS)sodium salt(BIOLOG Life Science Institute). bis-(1, 3-diethyl-thiobarbituric acid)trimethine oxonol(bis-oxonol), SBF1 acetoxymethyl ester(Molecular Probes, Inc.). trypsin inhibitor(Worthington Biochemical, Corp.). adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate monosodium salt, guanosine-3', 5'-

cyclic monophosphate monosodium salt(Yamasa Shoyu Co., Ltd.). fura-2 and its acetoxymethyl ester(同仁化学研究所). tetrodotoxin(三共). verapamil hydrochloride(エーザイ). digitonin(和光純薬). collagenase S-1(新田ゼラチン). DMEM 培地(日本製薬). $^{45}\text{CaCl}_2$ (1.15-1.55 GBq/mg Ca), $^{22}\text{NaCl}$ (34.14 GBq/mg Na), $^{86}\text{RbCl}$ (62.16 Mbq/mg Rb), [γ - ^{32}P] adenosine 5'-triphosphate tetraethylammonium salt (111 TBq/mmol)(New England Nuclear). 他の一般試薬はすべて試薬特級を用いた.

1. 細胞の単離培養法

ウシ副腎髄質からのクロマフィン細胞の単離は Fenwick ら²⁴⁾の方法を一部改変して行った⁵⁾. 即ち, 副腎を Ca^{2+} , Mg^{2+} free Krebs-Ringer phosphate(KRP)液 (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgSO_4 1.1 mM, Na_2HPO_4 2.15 mM, NaH_2PO_4 0.85 mM and glucose 10 mM, pH 7.4)の灌流により血液を洗い流した後 0.0175% collagenase, 0.004% trypsin inhibitor, 0.5% BSA を含む Ca^{2+} , Mg^{2+} free KRP 液で 37°C, 40 分間マグナス槽にて再循環しながら灌流した. 副腎髄質を皮質から分離し細切した後, 新しい酵素液中で 37°C, 20 分間 O_2 を通気しながら激しく振盪することにより細胞を単離した. 単離した副腎髄質クロマフィン細胞を遠心(10×g, 10 分間)にて 3 回洗浄後 10% ウシ胎児血清, 100 unit/ml penicillin G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 0.1 mM ascorbate, 5 mM HEPES を含む Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM 培地)中に浮遊させ, $1.0\text{--}4.0 \times 10^6$ cells/dish の密度で培養用プラスチックシャーレ(直径 35 mm)に添加し, 単層培養を行った. 培養は 5% CO_2 , 95% 空気とした気相下 37°C に恒温維持した CO_2 インキュベーター中で行い, 培養液は 2~3 日毎に交換した. 実験には培養 5~7 日目の細胞を用いた. なお, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 細胞内 Na^+ 濃度($[\text{Na}^+]_i$)および膜電位の測定には Erlenmeyer plastic flask に 5×10^5 cells/ml の密度で 24~72 時間浮遊培養した細胞を使用した.

2. カテコールアミン遊離

培養細胞は予め培養液を KRP 液と交換し, 室温にて 24 時間放置した後実験に供した. 新しい KRP 液あるいは前処置薬物を含む液 1 ml と交換し, 37°C で 3 分間 preincubation した後, 各種薬物を含む液を付加することにより反応を開始した. 一定時間 incubation した後反応液より 0.5 ml 採取し, これに含まれる全 CA 量を adrenaline を標準とし Euler and Lishajko²⁵⁾の trihydroxyindole 法を用い励起波長 405 nm, 蛍光波長 515 nm で蛍光的に定量した.

3. ^{22}Na uptake の測定

4×10^6 cell/dish で単層培養した副腎クロマフィン細胞を正常 KRP 液あるいは前処置薬物を含む液で 3 分間 37°C で preincubation した後 154 mM $^{22}\text{NaCl}$ (74 KBq/ml, specific activity 31.14 GBq/mg Na)と薬物を含む液に交換し反応を開始した. 一定時間の後反応液を取り除き, 直ちに氷冷した KRP 液を付加することにより反応を停止し, 30 秒以内にさらに 5 回 KRP 液で細胞を洗浄し, 細胞外の ^{22}Na を除去した. 1 N-NaOH を付加して細胞を掻き取り, バイアルに移した後 1 N-HCl で中和し, 放射活性をガンマシンチレーションカウンターにて測定した.

4. ^{45}Ca efflux の測定

細胞を Ca^{2+} を除去した KRP 液で洗浄後 ^{45}Ca (74 KBq/ml)を含む KRP 液で 30 分間 incubation することにより ^{45}Ca で標識し, 細胞外 ^{45}Ca を除去するため Ca^{2+} free KRP 液で 10 分間隔で 4 回洗浄し, さらに EGTA(1 mM)を含む Ca^{2+} free KRP 液で 2 回洗浄した. この細胞を 3 分間 preincubation し, 刺激薬と incubation 後反応液を分離し CA 測定と放射活性の測定に供した. 細胞に含まれる放射活性は上記の方法により液体シンチレーションカウンターにて測定した. ^{45}Ca efflux は全放射活性に対する比[溶液中への遊離量/(溶液中への遊離量+細胞に含まれる量)]で表した.

5. K^+ チャンネル活性の測定

Rb はその電氣的, 化学的, 物理的性質および生物学的効果が K に極めて類似しており²⁶⁾, ^{86}Rb は K^+ 輸送の指標として実験的によく用いられている²⁷⁾. K^+ チャンネルの活性化は K^+ の細胞外への流出をひきおこす. そこで K^+ のトレーサーとして ^{86}Rb を用い, ^{86}Rb efflux を指標として K^+ チャンネル活性を評価した.

^{86}Rb efflux の測定: 細胞を KRP 液で洗浄後 ^{86}Rb (148 KBq/ml, specific activity 62.16 MBq/mg Rb)を含む KRP 液で 37°C, 60 分間 incubate することにより標識し, KRP 液で 4 回洗浄により細胞外 ^{86}Rb を除去した後, ouabain(1 mM)を含むあるいは含まない KRP 液で 3 分間 preincubation を行い, 種々の薬物を含む KRP 液で一定時間 incubation 後反応液を分離し放射活性と CA の測定に供した.

6. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および $[\text{Na}^+]_i$ 測定法

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び $[\text{Na}^+]_i$ の測定はクロマフィン細胞に Ca^{2+} indicator, fura-2 及び Na^+ indicator, SBFI を負荷し, 二波長蛍光測光により測定した.

浮遊培養した副腎クロマフィン細胞を NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 1.3 mM, glucose 5

mM, BSA 0.5%, HEPES-Tris buffer 10 mM (pH 7.4±0.1)を含むmediumで洗浄後, fura-2/AM (1 μM)あるいはSBFI-AM (15 μM)を含む溶液に浮遊し, 32°C, 40分間 incubation することにより細胞に負荷した後, さらに2倍量のmediumを加え40分間 incubation することにより細胞に取り込まれた acetoxymethyl ester の加水分解を充分に行なった. SBFI-AM は 12.5% pluronic acid を含む Me₂SO に溶解し, 最終 15 μM となるように medium と混和し, 超音波処理することにより SBFI-AM 溶液とした. fura-2 あるいは SBFI を負荷した細胞を遠心 (10×g, 10分間) にて2回洗浄した後, 細胞浮遊液 (5×10⁷ cells/ml) を調整した.

[Ca²⁺]_i, [Na⁺]_i の測定には Hitachi F 2000 蛍光分光光度計を用い, 細胞浮遊液 (細胞密度は各々 3×10⁶ cells/ml, 6×10⁶ cells/ml) をキューベット中でゆっくり攪拌しつつ, 32°C で二つの励起波長 (340 nm, 380 nm) での蛍光強度 (蛍光波長 510 nm) の比から以下の式により計算した.

$$[Ca^{2+}]_i = K_D [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \cdot [F_{min}(\lambda 380) / F_{max}(\lambda 380)]$$

$$R = [F(\lambda 340) - Z(\lambda 340)] / [F(\lambda 380) - Z(\lambda 380)]$$

$$[Na^+]_i = [F(\lambda 340) - Z(\lambda 340)] / [F(\lambda 380) - Z(\lambda 380)]$$

R_{max}: 飽和 Ca²⁺ 下での fura-2 の R 値

R_{min}: 無 Ca²⁺ 下での fura-2 の R 値

Z: サンプルのみの自己蛍光

K_D, 解離定数は 224 nM を使用した²⁸⁾.

digitonin (100 μM) で細胞膜透過性とするにより F_{max} を, またアルカリ条件下 EDTA (10 mM) で Ca²⁺ をキレートすることにより F_{min} を求めた.

溶液の組成を変化させたときは測定直前に遠心 (500×g, 30秒) にて洗浄することにより細胞外液の組成を変化させた.

7. Na⁺, K⁺-ATPase 活性測定法

酵素標本の調整: 副腎髄質粗ミクロゾーム画分を遠心分画法にて調節した. 副腎髄質を 0.25 M sucrose でホモジナイズ (1:9) し, 4°C, 15分間 7,000×g にて遠心後上清をさらに 4°C, 30分間 105,000×g で遠心分離し, 沈渣を粗ミクロゾーム画分として得た. この粗ミクロゾーム画分は ATPase 活性に影響する CA 及び Ca²⁺ を高濃度含有しているため調製直後超純水を用いて低張処理し, 3度洗浄後酵素標本とした.

Na⁺, K⁺-ATPase 活性の測定: Na⁺, K⁺-ATPase 活性は total ATPase 活性から Mg²⁺-ATPase 活性を差

し引くことにより求めた. total ATPase 活性は 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を含む medium で 37°C, 10分間酵素標本と反応させ遊離する無機リン量より求めた. Mg²⁺-ATPase 活性は 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ouabain, 5 mM ATP, 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を含む medium で同様に反応させ求めた. 遊離した無機リン量は反応液に2倍量の chloroform-methanol (2:1, v/v) を加え反応を停止し²⁹⁾, 除蛋白後水層中の無機リンを Fiske and Subbarow³⁰⁾ の方法により定量して求めた.

タンパク質の定量は Lowry 法³¹⁾ により標準タンパク質として BSA を用いて測定した.

8. digitonin 膜透過性副腎クロマフィン細胞で [γ-³²P] ATP 加水分解の測定

単層培養したクロマフィン細胞を KRP 液で洗浄後 vehicle, forskolin, 8-Br cyclic AMP で 37°C, 3分間 preincubation し, ATPase 活性測定 medium 2 ml で洗浄後直ちに 10 μM digitonin および 5 mM [γ-³²P] ATP (37 KBq/ml) を含む新しい assay medium に交換することにより反応を開始した. A-PK の触媒サブユニット (A-PK C. S.) および内因性阻害物質 (A-PK I.) の使用にあたっては, digitonin で膜透過性とした後, vehicle あるいは新たに溶解した A-PK I. で3分間 preincubation し, [γ-³²P] ATP および A-PK C. S. あるいは A-PK I. を含む反応液に交換することにより反応を開始した. 反応は TCA (最終濃度 8%) を添加することにより終結させ, この除蛋白液に6倍量の isobutanol-2% sodium molybdate-0.75 M H₂SO₄ (4:1:1, v/v) を加え, 直ちに激しく振盪することにより [γ-³²P] ATP の加水分解で生じた [³²Pi] をリンモリブデン酸塩として isobutanol 層に抽出し, 遠心にて水層と分離後 isobutanol 層の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した.

9. 膜電位変化の測定法

膜電位の変化は蛍光指示薬 bis-oxonol を用いて評価した. bis-oxonol は膜電位に応じて膜への移行が変化し, 脱分極により蛍光強度が増加することが報告されている^{32),33)}.

浮遊培養したウシ副腎クロマフィン細胞を [Ca²⁺]_i 測定に使用した medium で2回洗浄後, 再浮遊 (2×10⁷ cells/ml) し測定に供した. 膜電位測定直前に BSA を除去した medium で細胞を遠心 (500×g, 30秒) により洗浄した後 bis-oxonol (0.2 μM) を添加した BSA 除去 medium に浮遊 (10⁶ cells/ml) させ励起波長 540 nm, 蛍光波長 565 nm の蛍光強度から求めた. 細胞はキューベッ

ト中で32°Cでゆっくり攪拌しつつ蛍光が一定になるまで放置後(5~10分間)薬物を添加した。

実験結果

I. cyclic AMPの副腎CA遊離に対する影響

cyclic AMPのCA遊離に対する作用について図1に示す。8-Br cyclic AMP(0.5 mM)は安静時CA遊離を僅かに促進し、ACh(5 μ M)によるCA遊離を約2倍にまで増強した(Fig. 1A)。8-Br cyclic AMP(0.5 mM), forskolin(1 μ M)は共にAChの用量-反応曲線を左に同程度平行移動し、最大反応には影響しなかった(Fig. 1B)。

II. cyclic AMPのCA遊離増強作用におけるNa⁺の関与

特異的にNa⁺チャンネルを阻害するtetrodotoxin(TTX)あるいはKRP液中からのNa⁺除去の効果について検討した(Fig. 2)。TTX(1 μ M)はACh(5 μ M), excess KCl(20 mM)によるCA遊離を各々39.6 \pm 4.3, 24.0 \pm 3.2%抑制した。TTX処置あるいは外液Na⁺除去はforskolin(1 μ M)のCA遊離増強作用を顕著に抑制した。8-Br cyclic AMP(0.5 mM)のCA遊離増強作用についても同様の結果を得た(図示せず)。

III. cyclic AMPによるCA遊離増強作用のNa⁺, K⁺-ATPase阻害剤およびveratrineによる拮抗

cyclic AMPのCA遊離増強作用にNa⁺が関与する可能性が示されたのでこの点について更に検討した。即ちouabainや外液K⁺除去によるNa⁺, K⁺-ATPase活性阻害あるいはveratrine等予め[Na⁺]_iを増加させる処置のAChによるCA遊離およびcyclic AMP遊離増強作用に対する影響を検討した(Fig. 3)。ouabain(0.3~50 μ M)の前処置はACh(3 μ M)によるCA遊離を著明に促進し、10 μ Mで最高310 \pm 23%の増加を示した。各濃度のouabainとforskolin(1 μ M)の併用によりCA遊離増強の最大値は、より低濃度のouabainで得られ、その最大反応はouabain単独のそれを越えなかった。同様の結果はouabainの代わりに外液K⁺除去によりNa⁺, K⁺-ATPase活性を阻害しても認められた。veratrine(1 μ g/ml)処置によってもAChによるCA遊離は268 \pm 18%増強され、veratrine存在下8-Br cyclic AMP, forskolinを併用してもそれ以上の増強作用は認められなかった。さらにouabain, K⁺除去あるいはveratrine存在下でのforskolin, 8-Br cyclic AMPのCA遊離増強作用の消失は分泌反応が最高値に達したためではないことは、より強力なCA遊離を引き起こすACh(10 μ M)によるCA遊離をforskolinがさらに増強する

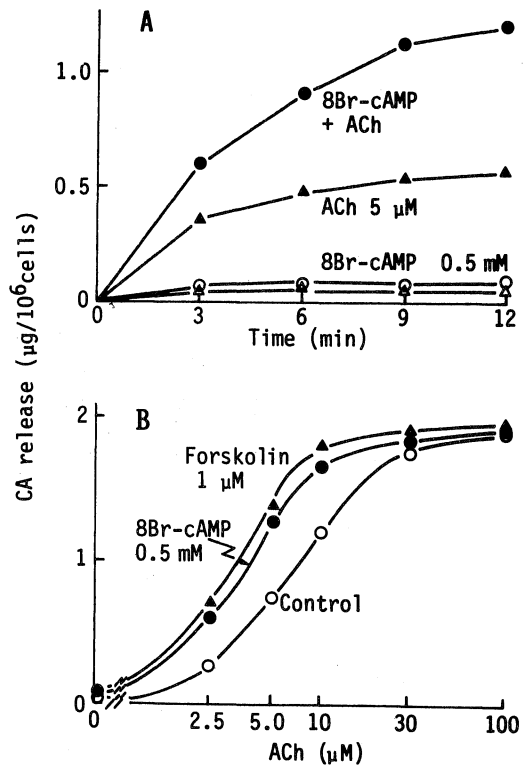


Fig. 1. Effects of 8-Br cyclic AMP and forskolin on CA release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. A: Time courses of 8-Br cyclic AMP facilitation of CA release induced by ACh from adrenal chromaffin cells. Cells were preincubated with or without 8-Br cyclic AMP (0.5mM) for 3min. The medium was replaced with fresh medium containing no drug (Δ - Δ), 8-Br cyclic AMP (\circ - \circ), ACh (\blacktriangle - \blacktriangle) and ACh+8-Br cyclic AMP (\bullet - \bullet). B: Effects of 8-Br cyclic AMP and forskolin on CA release induced by various concentrations of ACh. Following 3 min pretreatment with 8-Br cyclic AMP or forskolin, cells were incubated for 6 min in the medium containing various concentrations of ACh and 8-Br cyclic AMP or forskolin. Each point represents the mean of triplicate assays of single experiment.

ことから明かである。さらに ouabain, K⁺除去によるCA遊離増強作用も TTX, Na⁺除去により顕著に抑制されることを認めた(図示せず)。

IV. Na⁺, K⁺-ATPaseに対する作用

前述のように cyclic AMP の作用の Na⁺ 依存性, 又 Na⁺, K⁺-ATPase 活性阻害による CA 遊離増強作用様

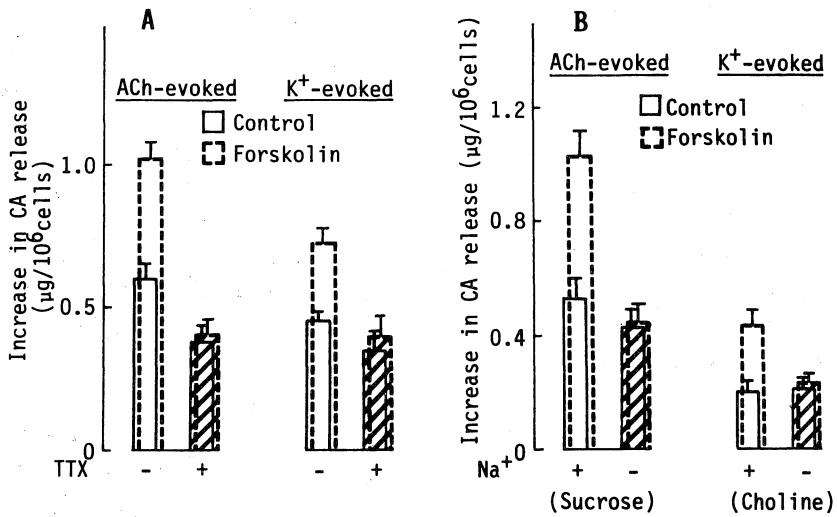


Fig. 2. Effects of Na⁺ channel blocker, tetrodotoxin (TTX) (A) and removal of external Na⁺ (B) on forskolin potentiation of CA release induced by ACh (5 μM) and excess KCl (20 mM). Experimental design was similar to Fig. 1. Following 3 min pretreatment with forskolin (1 μM), cells were incubated in fresh medium containing the indicated agents. NaCl was replaced by its osmotic equivalent of sucrose or choline chloride. The cells are exposed to TTX containing or Na⁺-depleted medium for 6 min prior to forskolin pretreatment. Stimulation-evoked CA release represents CA release from which basal CA release in the presence or absence of indicated pretreated-agents has been subtracted. Respective controls were made with the same schedule without addition of each agents. Values are the mean ± SEM of 5-8 experiments assayed in triplicate.

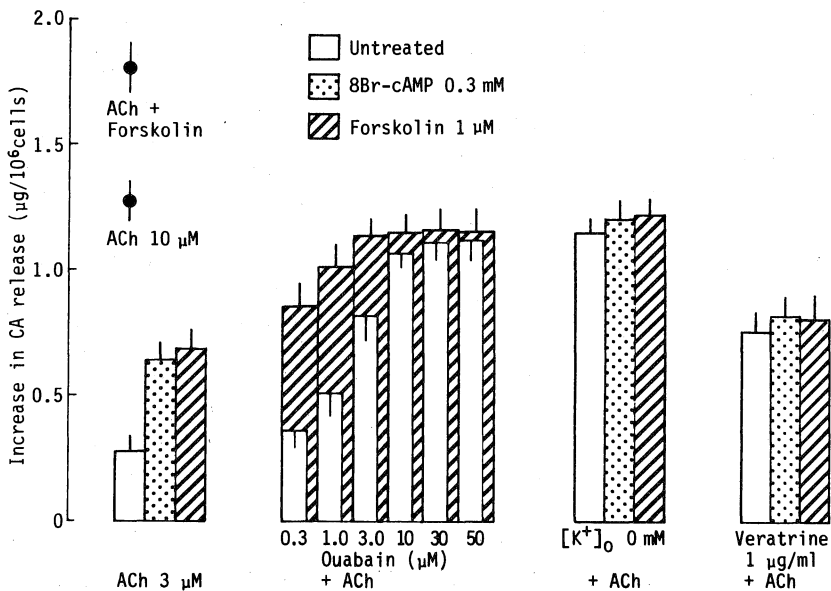


Fig. 3. Effects of ouabain, K⁺ deprivation from medium and veratrine on ACh-evoked CA release and on the facilitation of the release by forskolin and 8-Br cyclic AMP. Experimental design was similar to Fig. 1. Cells were treated with ouabain, K⁺-deprived medium and veratrine for 3 min before preincubation with or without forskolin and 8-Br cyclic AMP 3 min prior to a 6 min stimulation with ACh (3 μM).

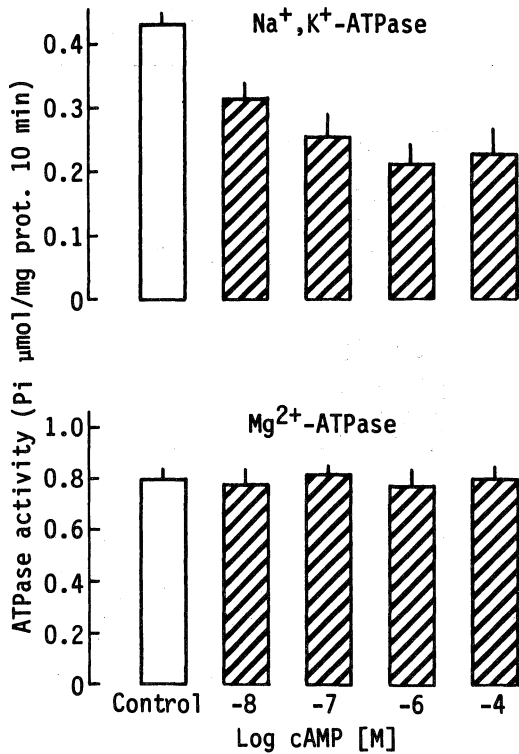


Fig. 4. Effects of cyclic AMP on Na⁺, K⁺-ATPase activity and Mg²⁺-ATPase activity from adrenal medullary microsomes. ATPase activity was assayed by incubation in the presence of NaCl (120 mM), MgCl₂ (5 mM), EGTA (0.1 mM) and ATP (5 mM) with or without the addition of KCl (5 mM) and ouabain (1 mM) to differentiate Na⁺, K⁺-ATPase from Mg²⁺-ATPase.

式との相同性と相互作用から cyclic AMP の作用が Na⁺, K⁺-ATPase 活性阻害による [Na⁺]_i の増加に起因することが推測された。そこで Na⁺, K⁺-ATPase 活性に対する cyclic AMP の作用について検討した。

1. 膜酵素標本に対する作用

cyclic AMP は 10⁻⁸~10⁻⁴M の広範囲で Na⁺, K⁺-ATPase 活性を 25~60% 抑制した。Mg²⁺-ATPase 活性には無影響であった (Fig. 4)。5'-ATP, 5'-ADP, cyclic GMP, 5'-GMP, cyclic IMP は 10⁻⁴M の高濃度まで Na⁺, K⁺-ATPase 活性に対してほとんど作用は認められなかった (各々対照の 93.8, 93.6, 89.3, 94.0, 109% であった)。

2. digitonin 膜透過性細胞での ATP 加水分解に対する作用

Na⁺, K⁺-ATPase 活性は種々の細胞内因子で調節さ

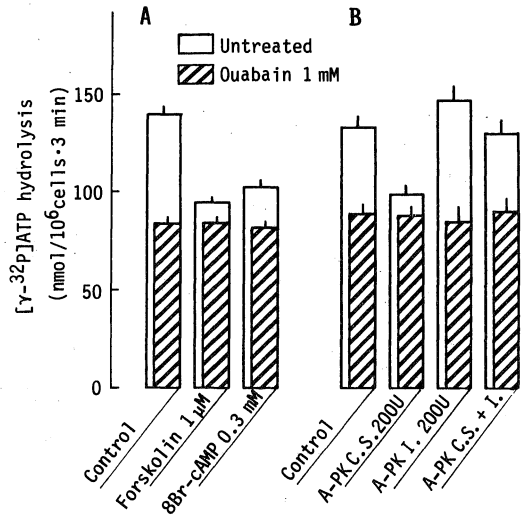


Fig. 5. Inhibition of [γ-³²P]ATP hydrolysis by cyclic AMP in digitonin permeabilized chromaffin cells. A: Following 3 min preincubation with forskolin or 8-Br cyclic AMP, cells were washed and assay was started by incubating the cells with 1 ml of assay mixtures containing 10 μM digitonin and 5 mM [γ-³²P]ATP (37 KBq/ml) with or without ouabain. B: Following a 6 min preincubation with 10 μM digitonin, cells were washed and assay was started by incubating the cells with assay mixtures which contained freshly dissolved cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit (A-PK C. S., 46 U/μg of protein) and/or its inhibitor (A-PK I., 1.0 U/μg of protein) in a solution containing 0.5 mg/ml dithiothreitol. The control contained dithiothreitol at appropriate concentration.

れていることが知られている³⁴⁾。そこで実際細胞レベルでも cyclic AMP が Na⁺, K⁺-ATPase 活性を阻害するか否かについて検索を加えた。この目的のため、まず digitonin で膜透過性とした副腎クロマフィン細胞を用いて検討を試みた。Fig. 5 に示すように forskolin (1 μM), 8-Br cyclic AMP (0.3 mM) の前処置は digitonin で膜透過性とした細胞で [γ-³²P]ATP の加水分解を有意に抑制した。ouabain (1 mM) は [γ-³²P]ATP の加水分解を約 60% 抑制した。forskolin, 8-Br cyclic AMP の [γ-³²P]ATP 加水分解抑制作用は ouabain 存在下では認められなかった。それゆえ、forskolin, 8-Br cyclic AMP による [γ-³²P]ATP 加水分解の減少は Na⁺, K⁺-ATPase 活性の阻害によることが示された。A-PK の触媒サブユニットも同様に [γ-³²P]ATP 加水分解を抑制

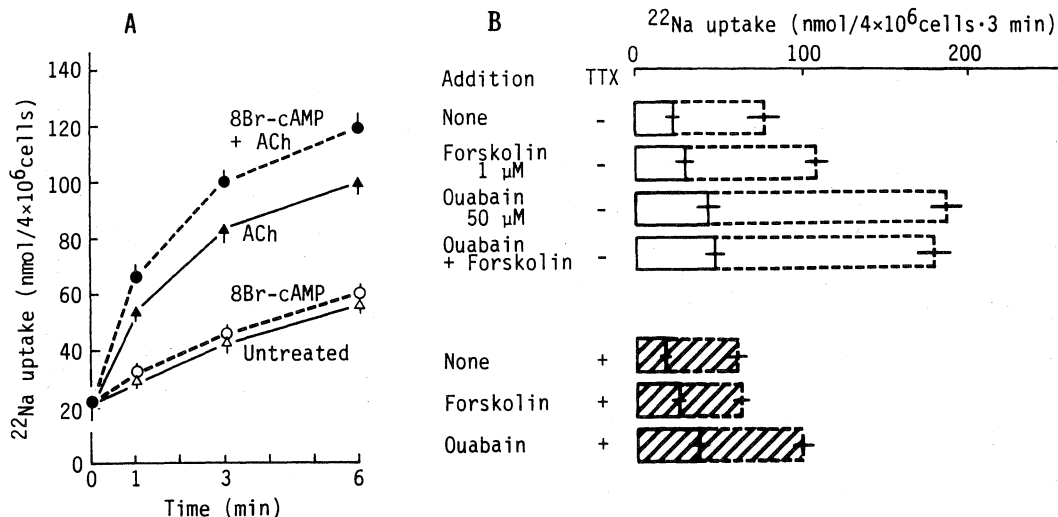


Fig. 6. A : 8-Br cyclic AMP induced facilitation of evoked ²²Na uptake in cultured bovine adrenal chromaffin cells. Following 3 min preincubation with or without 8-Br cyclic AMP (0.5 mM), cells were incubated in fresh medium containing 154 mM NaCl with ²²NaCl (74 KBq/ml) and the indicated agents. B : Effects of TTX on forskolin- and ouabain-facilitation of ACh (5 μM)-induced ²²Na uptake in cultured adrenal chromaffin cells. TTX (1 μM) was treated 3 min before preincubation with indicated agents. ²²Na uptake in the presence or absence of ACh was represented by dotted and solid columns, respectively.

した。さらに A-PK の内因性阻害物質が[γ-³²P]ATP 加水分解を軽度促進し、A-PK の触媒サブユニットの抑制作用に拮抗した。

3. 無傷細胞での検討

Na⁺, K⁺-ATPase 活性が阻害されると[Na⁺]_iの汲み出しおよびK⁺の取り込みが抑制される。無傷細胞でのNa⁺, K⁺-ATPase 活性に対するcyclic AMPの抑制作用を確かめるために²²Na uptake および[Na⁺]_iの変化について検討を加えた。

1) ²²Na uptake に対する作用

副腎クロマフィン細胞への²²Na uptake に対する forskolin と 8-Br cyclic AMP の作用を(Fig. 6)に示す。ACh は投与後約 3 分で最高となるクロマフィン細胞への²²Na uptake をひきおこした。8-Br cyclic AMP(0.5 mM)は単独で²²Na uptake を軽度促進し、ACh による²²Na uptake を 1 分、3 分、6 分で各々136, 140, 147% 増強することを認めた(Fig. 6A)。forskolin も 8-Br cyclic AMP と同様の作用を示した(Fig. 6B)。さらに ouabain も 8-Br cyclic AMP, forskolin と同様単独で²²Na uptake を促進し、ACh と併用することにより ACh による²²Na uptake を 250%増強した。ouabain 存在下に forskolin を処置しても ouabain 単独による増強以上の促進は認められなかった。TTX 前処置は ACh(5

μM)による²²Na uptake を 25%抑制し、forskolin, ouabain の増強作用を著明に抑制したが、forskolin, ouabain の単独作用には軽微な抑制しか示さなかった(Fig. 6B)。

2) [Na⁺]_iの動態におよぼす影響

Na⁺ indicator, SBFI を負荷したクロマフィン細胞を用い蛍光強度の変化から[Na⁺]_iの変動を検討した。ACh および excess KCl 添加は用量依存性に蛍光強度の比を増加させた。ACh による蛍光変化は atropine(1 μM)+C₆(50 μM)により著明に抑制された。veratridine (20 μM)は[Na⁺]_iの持続した増加を示し、この増加は TTX(1 μM)処置で拮抗された。Na⁺ ionophore である monensin(10 μM)添加により最大反応が得られた(Fig. 7)。

forskolin(1 μM)は単独で[Na⁺]_iを軽度増加し、ACh(5 μM)による[Na⁺]_i上昇を増強した(Fig. 8A, 8B)。また ouabain(100 μM)も forskolin と同様の作用を示し、ouabain 前処置により forskolin の作用は認められなかった(Fig. 8C, 8D)。さらに TTX 処置は ACh による[Na⁺]_i上昇を軽度抑制した。TTX は forskolin, ouabain 単独作用にはほとんど影響しなかったが forskolin および ouabain の増強作用を抑制した(Fig. 8D)。

V. cyclic AMP による[Ca²⁺]_iの増強機序の検索

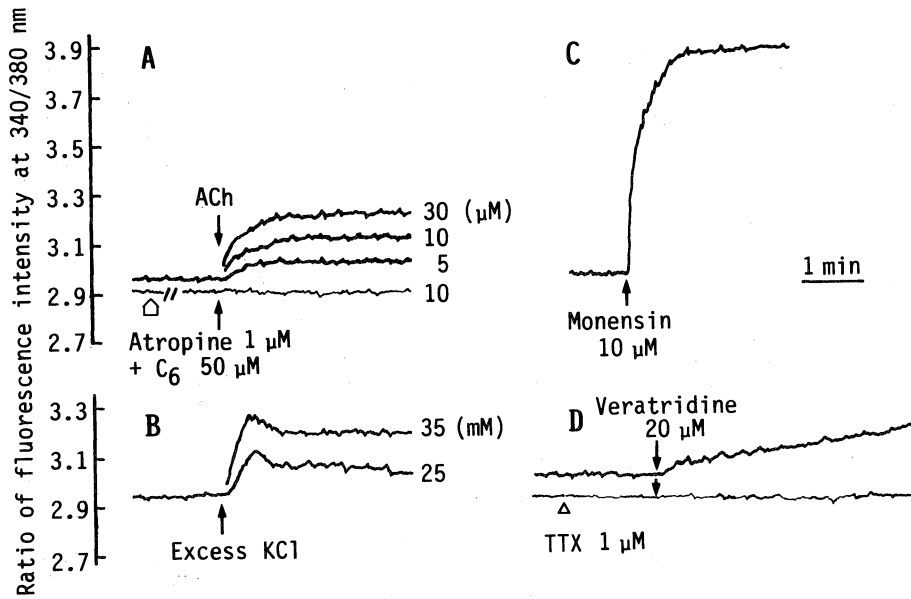


Fig. 7. Changes of intracellular free Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_i$) in response to various stimuli in bovine adrenal chromaffin cells. Each trace was induced in parallel samples of the same cell suspension loaded with SBF1. Cells were preincubated at 32°C for 7 min, and then challenged with indicated agents.

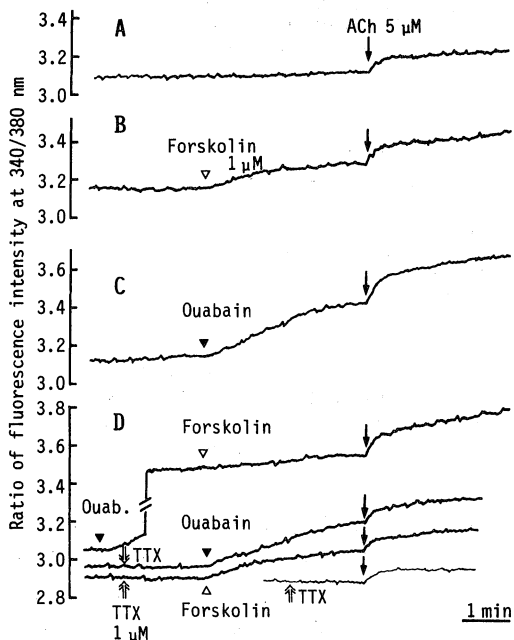


Fig. 8. Effects of forskolin and/or ouabain on spontaneous and ACh-evoked rise in $[\text{Na}^+]_i$ in bovine adrenal chromaffin cells. Experimental design was similar to Fig. 7. Following pretreatments, cells were preincubated, and then challenged with indicated agents.

Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害は Na^+ 汲み出し阻害に基づく $[\text{Na}^+]_i$ の増加, 細胞膜の脱分極をもたらし, その結果電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通じた Ca^{2+} 流入あるいは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構に影響することにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を引き起こすことが種々の組織で示されている³⁵⁾. cyclic AMP による分泌反応の増強作用にもこの機構が寄与している可能性を考え膜電位, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する forskolin, 8-Br cyclic AMP の作用について検討を加え, さらに ouabain, K^+ 除去, veratrine の作用と比較検討した.

1. 膜電位に対する影響

膜電位に対する cyclic AMP の影響を検討する目的で, 膜電位の脱分極に伴い蛍光強度が増加することが知られている蛍光指示薬 bis-oxonol を用いて膜電位変化を測定した. Kitayama ら³⁶⁾は副腎クロマフィン細胞で bis-oxonol の蛍光変化を指標として脱分極反応を観察できることを報告している.

1) cyclic AMP の膜電位に対する作用

細胞浮遊液の bis-oxonol 蛍光が平衡に達した後 excess KCl 添加により bis-oxonol 蛍光の増加を認めた (Fig. 9A 左). KCl を漸加的に添加すると bis-oxonol 蛍光変化は $[\text{K}^+]_i$ の対数値に対し直線性を示し, これは Goldman の定電場方程式から $[\text{K}^+]_i = 125 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+]_i = 30 \text{ mM}$, $[\text{Na}^+ + \text{K}^+]_o = 148 \text{ mM}$, $\alpha = 0.05$ のパ

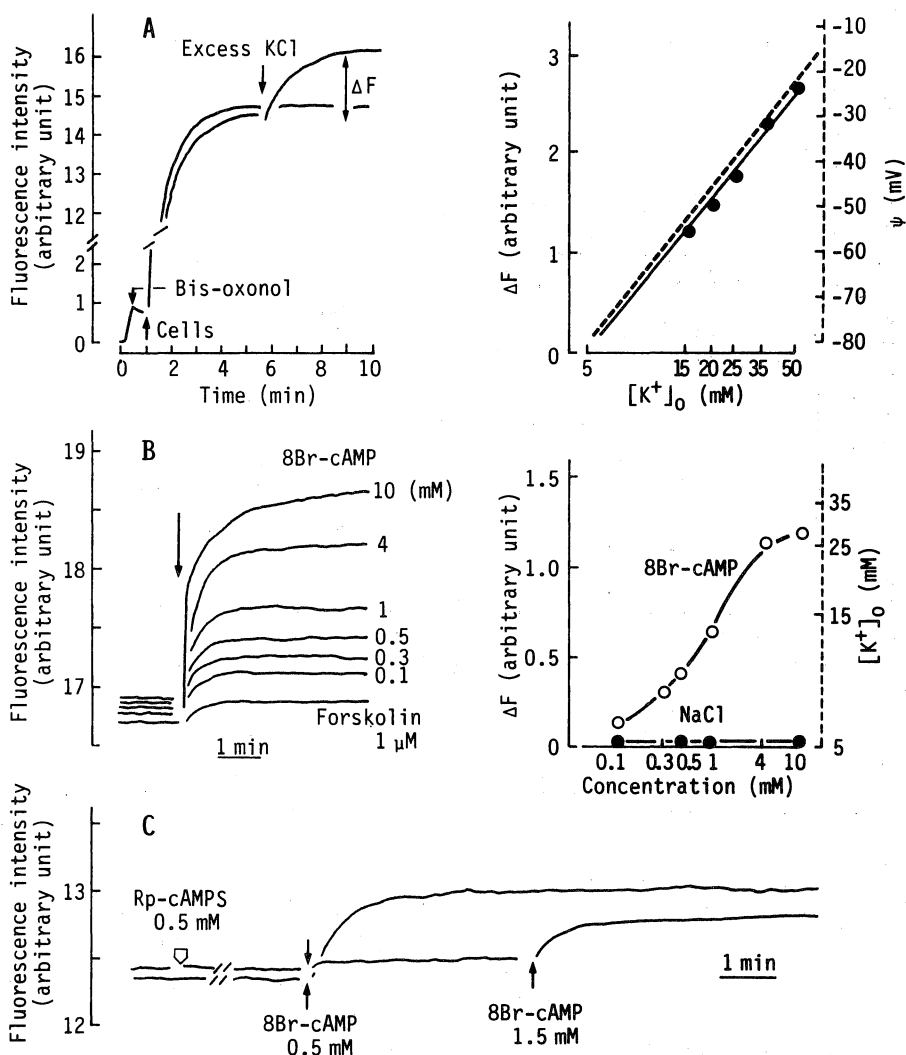


Fig. 9. Changes of bis-oxonol fluorescence in bovine adrenal chromaffin cells in response to excess KCl (A), 8-Br cyclic AMP (B), and the effects of Rp-cAMPS (C). Cells (10^6 cells/ml) were incubated at $32^\circ C$ with $0.2 \mu M$ bis-oxonol until fluorescence leveled off. Rp-cAMPS was added 20 min before the addition of 8-Br cyclic AMP. These and the following experiments are representative examples of experiments performed with very similar results in at least three different batches of cells.

ラメーターで計算した膜電位の値とよく一致していた (Fig. 9A 右)。8-Br cyclic AMP 添加により 1~2 分で最高値をとる急速で持続性の bis-oxonol の蛍光強度の増加が観察された (Fig. 9B)。この蛍光強度の増加は $0.1 \sim 10$ mM の範囲で用量依存的であった。forskolin ($1 \mu M$) も蛍光強度の軽度の増加を示した。この応答は A-PK を阻害する Rp-cAMPS (0.5 mM) ではほぼ完全に抑制され、A-PK の活性化を介することが明かとなった (Fig. 9C)。細胞を excess KCl (56 mM), gramicidin D

(200 nM) で脱分極した後では 8-Br cyclic AMP (0.5 mM) による蛍光変化は認められず、8-Br cyclic AMP による bis-oxonol の蛍光強度の変化は細胞膜電位の脱分極に起因していることを示唆した (Fig. 10 A)。ouabain ($50 \mu M$) 処置あるいは K^+ 除去によっても脱分極を引き起こし、これらの前処置は 8-Br cyclic AMP の脱分極を消失させた (Fig. 10 B)。8-Br cyclic AMP による脱分極は TTX 存在下でもほぼ同程度認められた (Fig. 11A)。medium 中の NaCl を sucrose あるいは

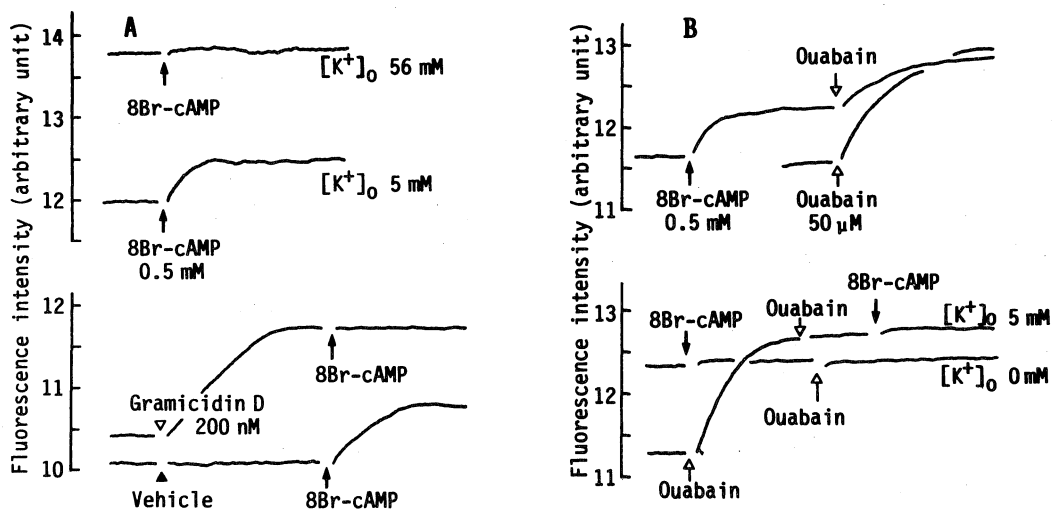


Fig. 10. A: Effects of 8-Br cyclic AMP on bis-oxonol fluorescence in adrenal chromaffin cells depolarized with excess KCl or gramicidin D. B: Counteraction of 8-Br cyclic AMP-induced increase of bis-oxonol fluorescence by ouabain or the removal of K⁺ from the medium.

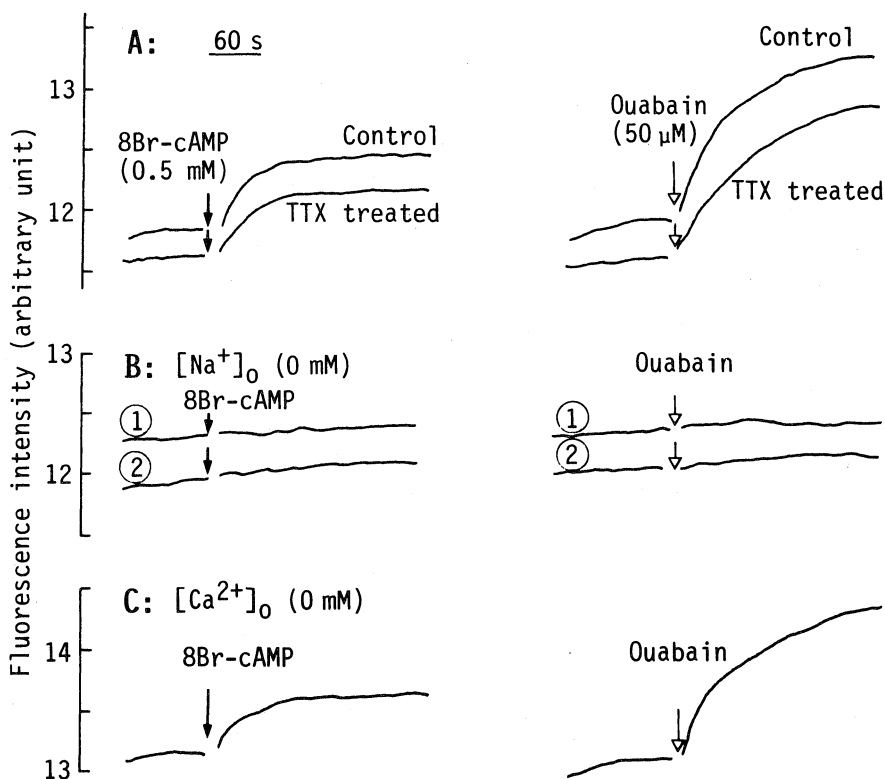


Fig. 11. Effects of several treatments on 8-Br cyclic AMP- and ouabain-induced changes of bis-oxonol fluorescence. The cells were washed and resuspended in normal (A), Na⁺-depleted (B) and Ca²⁺-depleted (C) medium prior to assay. NaCl was replaced with osmotically equivalent of sucrose ① and choline chloride ②.

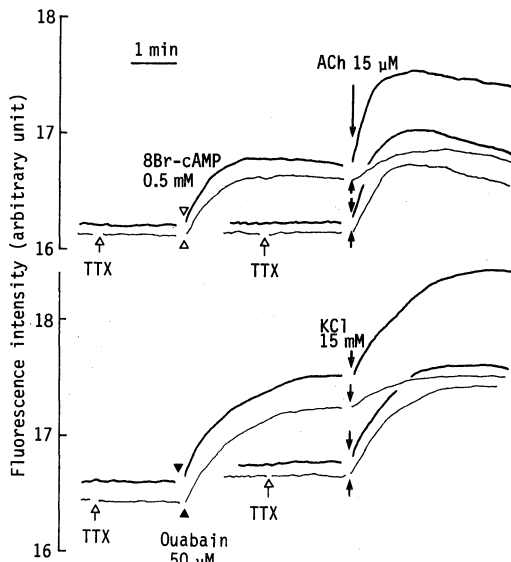


Fig. 12. Effects of 8-Br cyclic AMP and ouabain on ACh- or excess KCl-induced changes of bis-oxonol fluorescence. Experimental design was similar to Fig. 9. TTX ($1 \mu\text{M}$) was added 1 min before the addition of 8-Br cyclic AMP or ouabain.

choline Cl で置換すると 8-Br cyclic AMP の脱分極応答は消失した (Fig. 11B). medium 中の Ca^{2+} を除去しても 8-Br cyclic AMP による脱分極は認められた (Fig. 11C). ouabain による脱分極作用もこれらの処置により同様の結果を得た (Fig. 11A-C).

2) ACh, excess KCl による脱分極に対する作用

8-Br cyclic AMP 前処置下に ACh ($10 \mu\text{M}$), excess KCl (15mM) を添加すると bis-oxonol の蛍光強度は相加的あるいはそれ以上に増加し, cyclic AMP が ACh による脱分極を増強していることが窺えた. TTX は 8-Br cyclic AMP の脱分極に影響することなく, 8-Br cyclic AMP 処置後の ACh の蛍光強度の増加を抑制し (Fig. 12), cyclic AMP による ACh の脱分極増強に TTX 感受性 Na^+ チャンネルが関与していることを示した. さらに ouabain の脱分極応答においても 8-Br cyclic AMP の場合と同様の結果を得た (Fig. 12).

2. CA 遊離増強作用と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態

副腎髄質クロマフィン細胞からの CA 遊離に Ca^{2+} が中心的役割をはたしていることはよく知られている. Morita ら²³⁾ は forskolin が ACh の ^{45}Ca uptake を増強することを示している. 従って cyclic AMP は刺激-分泌連関のための $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態に何らかの影響を及ぼして

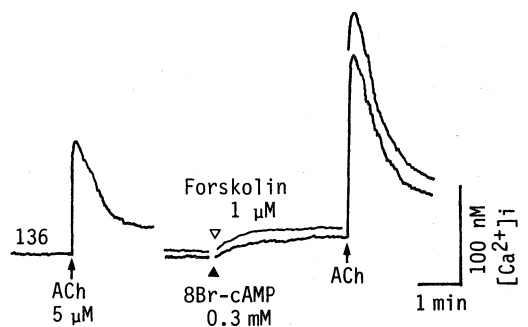


Fig. 13. Effects of forskolin and 8-Br cyclic AMP on basal level and ACh-induced elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in bovine adrenal chromaffin cells. Each trace of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient was parallel samples of the same cell suspension loaded with fura-2. Cells were preincubated at 32°C for 7 min, and then challenged either with or without forskolin and 8-Br cyclic AMP for 3 min followed by ACh ($5 \mu\text{M}$). The arrows on the trace indicate addition of appropriate stimulants. Each basal value of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was represented by Arabic numerals. These experiments are representative examples of experiments performed with very similar results in at least three different batches of cells.

いるものと推測される. そこで cyclic AMP の CA 遊離増強機序を解明するの一助として $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態に対する cyclic AMP の影響とその機序について検索した.

1) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する cyclic AMP の作用

副腎髄質クロマフィン細胞に ACh ($5 \mu\text{M}$) を添加すると Fig. 13 に示すように急峻で一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加 (安静時 $118 \pm 15 \text{nM}$ から $108 \pm 11 \text{nM}$ 上昇) を認めた. forskolin および 8-Br cyclic AMP は共に単独で軽度の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加 ($13 \sim 27 \text{nM}$ 上昇) を示し, ACh による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を各々対照の 196 ± 18 , $210 \pm 36 \%$ に増強した (Fig. 13, Fig. 14). ouabain ($100 \mu\text{M}$) も単独で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させ, ACh による上昇を著明に増強 (約 280%) した (Fig. 14). 加えて ouabain 存在下では forskolin の作用は消失した. TTX ($1 \mu\text{M}$) 前処置は ACh ($5 \mu\text{M}$) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を約 40% 抑制し, forskolin, ouabain の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増強作用をほぼ完全に抑制した. forskolin, ouabain の単独作用に対して TTX は軽微な抑制を示すに留まった. さらに Na^+ を sucrose で置換すると, これらの作用は消失した (Fig. 14). 以上, cyclic AMP の CA 遊離, ^{22}Na uptake, $[\text{Na}^+]_i$, 脱分極, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用はいずれも TTX, Na^+ 除去, ouabain 前処置等により同様な影響を受け, cyclic AMP のこれらの

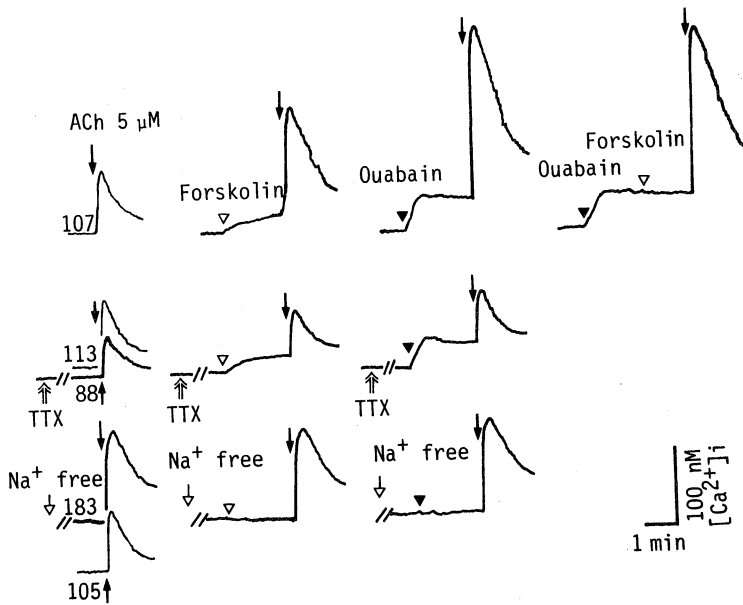


Fig. 14. Effects of TTX (1 μ M) or Na⁺-deprivation from the medium on forskolin (1 μ M)- and ouabain (50 μ M)-induced rise of [Ca²⁺]_i, and ACh-induced rise with or without forskolin and ouabain in bovine adrenal chromaffin cells. Experimental design was similar to Fig. 13. The cells were washed and resuspended in normal and Na⁺-depleted medium prior to assay. NaCl was replaced with osmotically equivalent of sucrose.

作用はNa⁺, K⁺-ATPase 阻害に基づく一連の反応であることが示唆された。

2) Ca²⁺チャンネル阻害剤の影響

cyclic AMP のCA 分泌増強機構における電位依存性Ca²⁺チャンネルの関与について検索するためCa²⁺チャンネル阻害剤の作用について検討を加えた(Fig. 15). verapamil, nifedipine, diltiazem はACh(5 μ M)によるCA 遊離を濃度依存的に抑制し, 各々30 μ M, 1 μ M, 30 μ Mで対照の6, 12および5%に減少させた(Fig. 15A). forskolin はこれらCa²⁺チャンネル阻害剤存在下にAChのCA 遊離を促進することを認めた。さらに forskolin はCa²⁺チャンネル阻害剤に感受性の低いionomycin(5 μ M)あるいはveratrine(10 μ g/ml)によるCA 遊離についても増強し, Ca²⁺チャンネル阻害剤存在下でも非存在時と同程度のCA 遊離増強作用を示した(Fig. 15B)。加えてouabain, 外液K⁺除去等のNa⁺, K⁺-ATPase 活性阻害処置によるCA 遊離増強作用もCa²⁺チャンネル阻害剤存在下に認められ, cyclic AMP のそれと同じ動態を示した(図示せず)。

3) K⁺チャンネルに対する作用

cyclic AMP が各種K⁺チャンネルを阻害して電位依存性Ca²⁺チャンネルの開口を助長し, 神経伝達を促進する機構が提唱されている²¹⁾。そこで⁸⁶RbをK⁺の擬似

トレーサーとして⁸⁶Rb efflux を測定することによりK⁺チャンネル活性に対するcyclic AMPの作用について検討を加えた(Fig. 16)。

8-Br cyclic AMP(0.5 mM)は副腎クロマフィン細胞からの安静時⁸⁶Rb efflux に影響しなかった。ACh(5 μ M)添加により⁸⁶Rb efflux は約2倍に増加した。8-Br cyclic AMPはAChによる活性化に対しても影響を認めなかった。ouabain(1 mM)は安静時⁸⁶Rb effluxには影響しなかったが, AChによる⁸⁶Rb effluxを軽度促進した。先にcyclic AMPがNa⁺, K⁺-ATPase 活性を阻害することを認めた。従ってcyclic AMPがK⁺チャンネルを阻害してもNa⁺, K⁺-ATPase 活性阻害作用により掩蔽されている可能性が考えられる。そこでouabain存在下での8-Br cyclic AMPの作用について検討を加えた。8-Br cyclic AMPはouabain(1 mM)存在下⁸⁶Rb efflux に影響しなかった。

4) K⁺チャンネル阻害剤の効果

種々のK⁺チャンネルを阻害する4-aminopyridine(4AP, 1 mM), tetraethylammonium(TEA, 10 mM), apamine(1 μ M)およびCsCl(10 mM)はACh(5 μ M)あるいはexcess KCl(20 mM)によるCA 遊離を増強したが, これらK⁺チャンネル阻害剤存在下forskolinおよび8-Br cyclic AMPのCA 遊離増強作用は影響されな

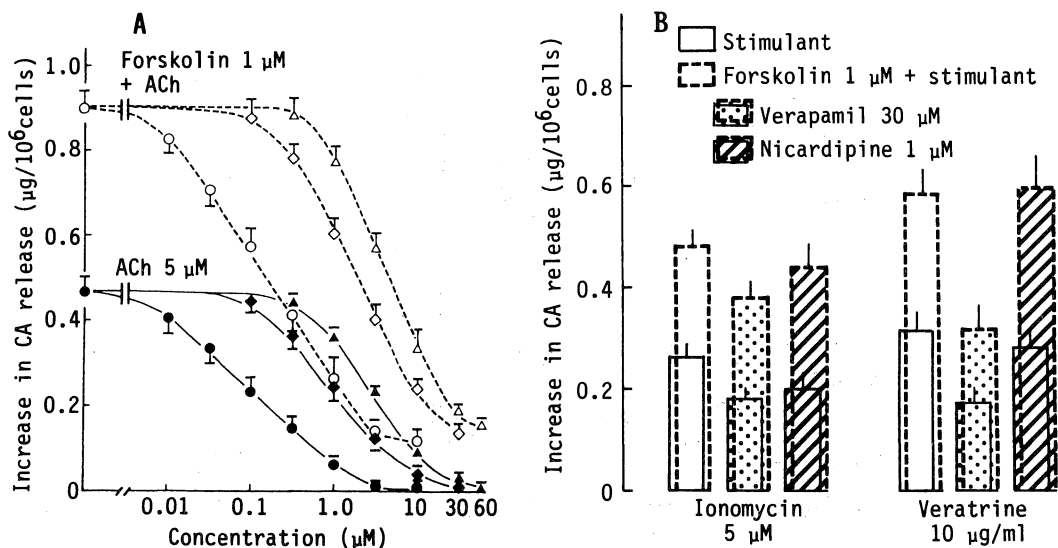


Fig. 15. Effects of Ca^{2+} channel blockers on the facilitation by forskolin of ACh-(A), ionomycin- and veratrine-(B) evoked CA release. Cells were preincubated for 3 min with various concentrations of verapamil (\blacklozenge , \diamond), nicardipine (\bullet , \circ) and diltiazem (\blacktriangle , \triangle), and for the additional 3 min with Ca^{2+} channel blockers and forskolin (1 μM), and then incubated for 6 min in the presence of ACh (5 μM), ionomycin (5 μM) or veratrine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

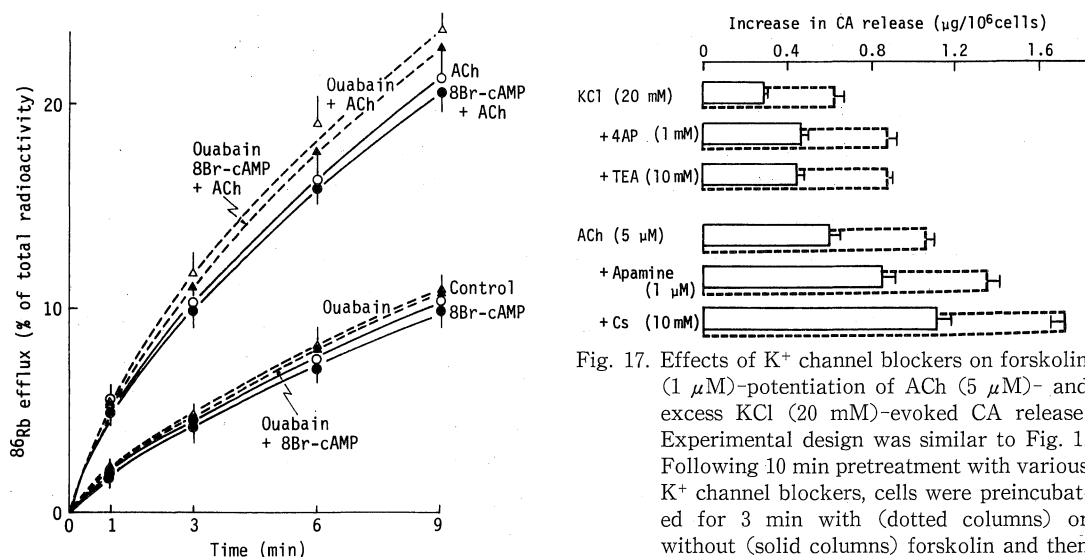


Fig. 16. Effects of 8-Br cyclic AMP on ^{86}Rb efflux from cultured chromaffin cells. Cells were preloaded with ^{86}Rb as described in Material and Method. Then, cells were challenged either with or without ouabain (1 mM) (6 min before) or 8-Br cyclic AMP (0.5 mM) (3 min before) to ACh (5 μM).

Fig. 17. Effects of K^+ channel blockers on forskolin (1 μM)-potentiation of ACh (5 μM)- and excess KCl (20 mM)-evoked CA release. Experimental design was similar to Fig. 1. Following 10 min pretreatment with various K^+ channel blockers, cells were preincubated for 3 min with (dotted columns) or without (solid columns) forskolin and then incubated for additional 6 min with indicated agents. CsCl was treated 1 hr before preincubation with forskolin.

かった(Fig. 17).

IV. forskolin, ouabain, veratrine による刺激誘発 CA 遊離増強作用における amiloride の作用

細胞内に増加した Na^+ は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構により Ca^{2+} 流入と対向して細胞外に放出される³⁷⁾. そこで $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構の阻害作用を有する amiloride⁶³⁾ の作用について検討した.

amiloride (0.1 mM) は ACh (5 μM) による CA 遊離を 34% 抑制したが, excess KCl の CA 遊離に対しては軽度促進した. amiloride 前処置により forskolin, 8-Br cyclic AMP, ouabain, veratrine による CA 遊離増強作用はいずれも著明に抑制された(Fig. 18). さらに $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter 分子上で amiloride とは異なる部位に作用する bepridil によってもこれら薬物の CA 遊離増強作用は強力に抑制された(図示せず).

VII. caffeine による $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ^{45}Ca efflux に対する cyclic AMP の作用

cyclic AMP が種々の機構で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増強することが窺えたので Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員機構に対する cyclic AMP の作用について検討を加えた(Fig. 19). 外液から Ca^{2+} を除去しても caffeine (50 mM) は培養ウシ副腎クロマフィン細胞から CA 遊離をひきおこし, この時 ^{45}Ca efflux も顕著に増加した. caffeine は 5 mM で急峻で一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇(安静時 39 ± 8 から 73 ± 8 nM 上昇)を認めた. 8-Br cyclic AMP (0.5 mM) 処置は caffeine による CA 遊離を $152 \pm 7\%$ 増強し, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および ^{45}Ca efflux も各々対照の 160 ± 12 , $139 \pm 5\%$ に増強した.

考 察

cyclic AMP の副腎 CA 遊離増強作用

ウシ副腎髄質クロマフィン細胞では ACh 刺激時の CA 遊離はニコチン様アセチルコリン受容体を介しておこる. cyclic AMP は安静時の CA 遊離を軽度促進し, ACh による CA 遊離を顕著に増強した. ニコチン様アセチルコリン受容体の γ , δ サブユニットおよび α サブユニットは A-PK によりリン酸化され, 前者により脱感作を, 後者により反応性の促進という複雑な調節をうけている¹⁷⁾. 著者らの研究グループはこれまで膜透過性 cyclic AMP 誘導体⁴⁾, adenylate cyclase 活性化物質^{5), 6), 23)}, phosphodiesterase 阻害剤^{4), 5)} 投与等細胞内 cyclic AMP 濃度を増加させる処置により ACh 以外にも種々の分泌促進剤による CA 遊離を同程度増強することを示してきた. 従って cyclic AMP の CA 遊離増強作用はニコチン様アセチルコリン受容体に対する作用より

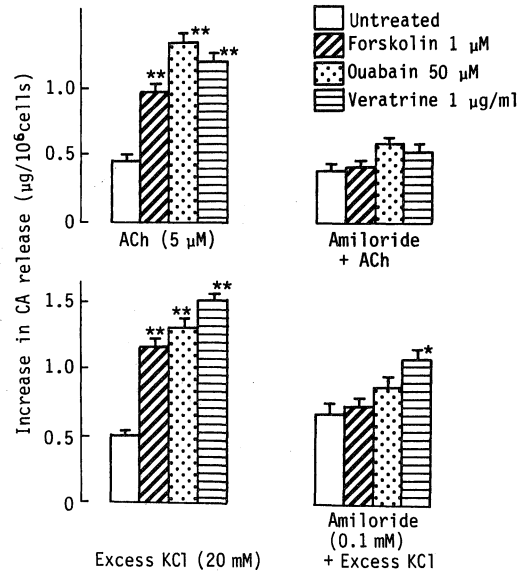


Fig. 18. Effects of amiloride on facilitation of stimulation-evoked CA release induced by forskolin, ouabain and veratrine from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Experimental design was similar to Fig. 1. Amiloride was treated 1 hr before preincubation with or without forskolin, ouabain and veratrine. Significantly different from the corresponding control at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

はむしろ刺激一分泌連関の共通したいくつかの過程に作用していることが考えられる. ゆえに受容体以後 Ca^{2+} 動態に至るまでの要素に分けて検討を加えた.

cyclic AMP の CA 遊離増強作用と Na^+ 動態

cyclic AMP による CA 分泌増強作用は $^{22}\text{Na}^+$ の細胞への取り込み促進を伴い(実際この時 $[\text{Na}^+]_i$ が増加していた), TTX や細胞外 Na^+ 除去により抑制されるといふ Na^+ 依存性を示した. 加えて cyclic AMP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増強も TTX や Na^+ 除去により抑制された. このことは cyclic AMP が第一義的に細胞膜を通過する Na^+ flux に影響し, このことが cyclic AMP による CA 遊離増強機序に含まれることを示唆している. 電位依存性 Na^+ チャンネルについてはその分子構造が解明されてきており, その α サブユニットが A-PK によってリン酸化されることが明らかとなった³⁸⁾. しかしながら, 生理的条件下でのチャンネルリン酸化の役割については解明されていない. forskolin, 8-Br cyclic AMP は単独で ^{22}Na uptake を軽度促進するが, この効果は TTX 存在時でも観察され, 少なくとも cyclic AMP が Na^+ チャ

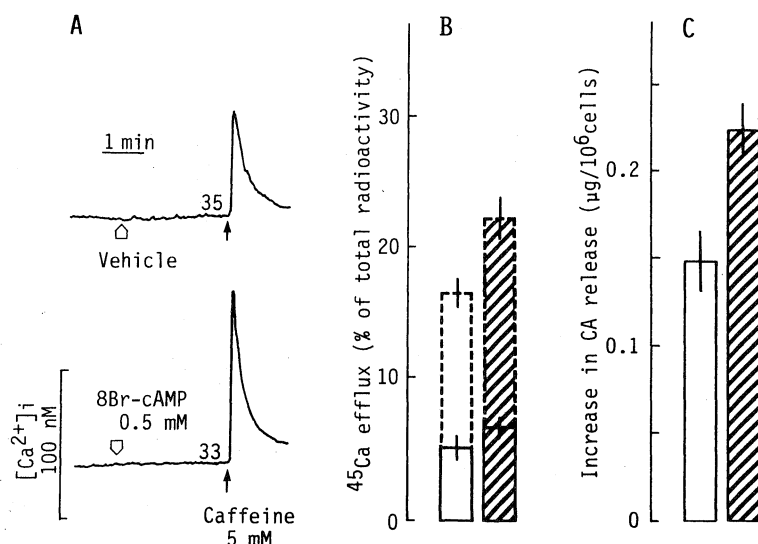


Fig. 19. Effects of 8-Br cyclic AMP on caffeine-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ in chromaffin cells (A), and ^{45}Ca efflux (B) and CA release (C) from chromaffin cells in Ca^{2+} -depleted medium. A: Cells were loaded with fura-2 as described in Materials and Methods. Cells were washed with Ca^{2+} free, EGTA (0.1 mM) containing medium with rapid centrifugation and resuspended immediately before use. B: Cells were washed with Ca^{2+} free medium and preloaded with ^{45}Ca as described in Materials and Methods. Then, cells were exposed to Ca^{2+} free medium containing no drug (\square) or 8-Br cyclic AMP (hatched) for 3 min. Following the preincubation, cells were incubated for 6 min in the medium containing caffeine (\square) and caffeine (50 mM) with 8-Br cyclic AMP (0.5 mM) (hatched) as indicated. C: Cells were washed with Ca^{2+} free medium and preincubated for 3 min with medium in the absence (\square) or presence (hatched) 8-Br cyclic AMP (0.5 mM) and then preparation was incubated for 6 min with medium containing caffeine (50 mM) and/or 8-Br cyclic AMP. All incubations were carried out in Ca^{2+} free, EGTA (0.1 mM)-containing medium.

ンネルを直接活性化する可能性は低いと考えられる。

Na^+ , K^+ -ATPase 活性は Na^+ 輸送に影響し、間接的に Ca^{2+} 動態を修飾することにより神経伝達物質及び他の生理活性物質の遊離に調節的な役割を果たしている³⁵⁾。ouabain や細胞外 K^+ 除去により Na^+ , K^+ -ATPase を阻害するとゆっくりとした神経伝達物質分泌がみられ、刺激分泌を著明に増強する³⁵⁾。副腎髄質においても Na^+ , K^+ -ATPase 阻害剤は分泌促進剤による CA 遊離の増強と Na^+ uptake および Ca^{2+} uptake を増強することが知られている。本実験で cyclic AMP による副腎 CA 遊離は Na^+ , K^+ -ATPase 阻害処置によりみられる CA 遊離と類似した性質があり、又このような阻害処置下では cyclic AMP の効果は打消された。従って cyclic AMP は Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害して CA 遊離促進をもたらすことが推測される。そこで Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対する cyclic AMP の作用について検討した。

cyclic AMP による Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害

cyclic AMP はイヌ副腎髄質粗ミクロソーム画分の

Na^+ , K^+ -ATPase 活性を最高 60% 阻害した。cyclic AMP による Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制は脳^{39), 40)}、肝臓⁴¹⁾、腎臓⁴²⁾⁻⁴⁴⁾、胃粘膜⁴⁵⁾及び子宮⁴⁶⁾でも知られており、さらに adenylate cyclase を活性化する forskolin, cholera toxin, isoproterenol 等によっても抑制されることが腎皮質⁴²⁾、腸管粘膜⁴⁷⁾で示されている。しかし、腎皮質⁴²⁾、胃平滑筋⁴⁸⁾、顎下腺⁴⁹⁾では A-PK により活性が増加し、さらにラット大脳皮質では cyclic AMP が ouabain 結合部位を増加させることも報告されており⁵⁰⁾、果たして無傷細胞で cyclic AMP が Na^+ , K^+ -ATPase にどのような影響を及ぼすかは重要な課題である。このことについては本研究ではより無傷に近い実験系として digitonin で膜透過性とした細胞における ATP 加水分解を測定する方法を試みた。cyclic AMP 或いは forskolin は digitonin で膜透過性とした細胞で $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP 加水分解を抑制し、この抑制は ouabain の存在下消失することから Na^+ , K^+ -ATPase による加水分解の抑制に起因すると考えられた。加えて A-PK の触媒サブ

ユニットにおいても ouabain 感受性 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 加水分解を抑制し、これは A-PK の内因性阻害物質によって回復したことから、A-PK によるリン酸化を介して Na^+ , K^+ -ATPase が抑制されるものと思われる。cyclic AMP による Na^+ , K^+ -ATPase 阻害の機序に関しては、例えば脳では酵素を精製すると cyclic AMP による阻害は消失し、膜可溶性成分を加えることにより回復する³⁹⁾。子宮筋では Na^+ , K^+ -ATPase の Ca^{2+} による阻害は sodium dodecyl sulfate で処理することにより消失するが A-PK の触媒サブユニットの添加により Ca^{2+} 感受性が回復し⁴⁶⁾、Mayanil and Baquer⁴⁰⁾は A-PK 活性化に Ca^{2+} が必要であると報告している。このような成績は A-PK は他の因子を介して間接的に作用することを示唆するものであるが、最近 A-PK が Na^+ , K^+ -ATPase の α サブユニットをリン酸化し、その活性を阻害するとの報告もなされている⁵¹⁾。従って cyclic AMP が直接 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害することも考えられる。さらに Kinne ら⁴³⁾; Brauhler and Corder⁴⁴⁾は細胞膜のリン酸化量と Na^+ , K^+ -ATPase 活性の関係を詳細に調べ、リン酸化量と Na^+ , K^+ -ATPase 活性が反比例していることを示している。以上の知見は A-PK が Na^+ , K^+ -ATPase 活性の調節因子として *in vivo* でも働いていることを示唆するものである。そこで cyclic AMP による CA 遊離増強作用機序について Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害に起因するかどうか、ouabain の CA 遊離増強作用と比較しながら検索を加えた。

脱分極作用

cyclic AMP は副腎髄質クロマフィン細胞で細胞膜の脱分極を引き起こし、この脱分極作用は外液 Na^+ に依存したもので Na^+ 流入に起因することが示唆された。しかし TTX による抑制は僅かであり電位依存性 Na^+ チャンネルの関与は少ないものと思われる。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害すると細胞内 Na^+ の汲み出しが障害され、 $[\text{Na}^+]_i$ 貯留が起こり電気化学ポテンシャル勾配が減少し、細胞膜が脱分極することはよく知られている³⁵⁾。事実 ouabain でも同様の脱分極作用を示した。しかも ouabain 脱分極下では cyclic AMP の脱分極作用はもはや認められないことは cyclic AMP は ^{22}Na uptake, $[\text{Na}^+]_i$ の増加と併せ cyclic AMP が無傷細胞においても Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害し、その結果脱分極を引き起こしたことを示唆している。さらに cyclic AMP は ACh による脱分極を増強した。この脱分極の増強は TTX で抑制されることから電位依存性 Na^+ チャンネルを通る Na^+ 流入に依存して生じたものと考えられる。同様の結果は ouabain でも得られた。cyclic AMP

による細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害は脱分極を引き起こし、その結果 ACh あるいは excess KCl による脱分極を増幅し、電位依存性 Na^+ チャンネルの活性化を増強させ $[\text{Na}^+]_i$ をさらに急速に増加せしめ、これにより Ca^{2+} の流入を促進するとの機構が考えられる。

Ca^{2+} 流入機序

本研究において cyclic AMP が ACh による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を増強することを認めた。この事は cyclic AMP が CA 遊離過程に対する Ca^{2+} 利用率を増加することにより分泌反応を増加していることを示すものである。ACh による副腎 CA 遊離に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通る Ca^{2+} influx が必須であることはよく知られている。cyclic AMP は種々の組織で蛋白リン酸化を介して Ca^{2+} チャンネル活性を制御していることが示されてきている。ゆえに cyclic AMP の Ca^{2+} チャンネルに対する直接作用も考慮しなくてはならないであろう。dihydropyridine 感受性 L 型 Ca^{2+} チャンネルの α_1 , β サブユニットは A-PK によってリン酸化され、チャンネル不活性化を抑制し開口確率を高め開口数を増加させ、チャンネルの活性を調節していることが心筋等で示されている⁵²⁾。神経系においても同様に cyclic AMP によるリン酸化を受けて Ca^{2+} チャンネルの反応性が維持されると考えられている。例えば GH₃ 脳下垂体由来細胞や神経節においてはチャンネルリン酸化による構造変換が膜の脱分極に応答するチャンネル開口に必須の条件であるかも知れないことを示している⁵³⁾。実際、cyclic AMP が脊髄後根神経節²⁰⁾、海馬歯状回顆粒細胞⁵⁴⁾、neuroblastoma cells(NIE-115)⁵⁵⁾の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化を増強することが報告されている。一方 N 型 Ca^{2+} チャンネルについては、最近脳の ω -conotoxin(ω -CgTx)感受性 Ca^{2+} チャンネルの α_1 様サブユニットが A-PK でリン酸化されることが示され⁵⁶⁾、N 型 Ca^{2+} チャンネルも A-PK によるリン酸化をうけてその活性が調節されるものと思われる。実際、卵母細胞に脳より得た mRNA を注入して発現した ω -CgTx 感受性 Ca^{2+} チャンネルの活性は cyclic AMP により増強されることが知られている⁵⁷⁾。

神経細胞には複数の K^+ チャンネルがあって神経活性を調節している。これらの K^+ 電流はチャンネル或いはこれに関連するタンパクのリン酸化による調節を受けている。cyclic AMP は海馬錐体細胞⁵⁸⁾、赤核細胞⁵⁸⁾、ヒツジ脳下垂体向生殖腺細胞⁵⁹⁾および腸筋神経⁵⁰⁾で Ca^{2+} -activated K^+ チャンネルを抑制し、アメフラシの感覚神経では電位依存性 K^+ チャンネルを抑制して脱分極を引き起こすことが示されている。cyclic AMP による K^+

チャンネルの抑制は活動電位の振幅と持続時間を延長し、それ故に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開口を助長して Ca^{2+} 流入を促進する。このことが cyclic AMP によるシナプス伝達促進の一機序をなすと考えられている⁶¹⁾。

もし cyclic AMP が Ca^{2+} チャンネルに直接或いは間接的に作用しているとすると Ca^{2+} チャンネル阻害剤は cyclic AMP の遊離増強作用に拮抗するはずである。しかしながら、本研究においては cyclic AMP の分泌増強作用に対し Ca^{2+} チャンネル阻害剤が無効であることが Ca^{2+} チャンネル阻害剤に感受性の低い ionomycin, veratrine による CA 遊離に対してより明確に認められた。加えて cyclic AMP は ^{86}Rb efflux を変化させないことから K^+ チャンネル活性には影響しないことを認めた。実際、種々の異なったタイプの K^+ チャンネルを阻害する 4 AP, TEA, Cs⁺ 或いは Ca^{2+} -activated K^+ チャンネルを阻害する apamine 存在下でも cyclic AMP による CA 遊離増強作用は認められた。これらの事実は cyclic AMP による CA 遊離増強作用に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通過する Ca^{2+} 流入の関与は少ないことを示唆するものである。しかし最近 Doupink and Pun⁶²⁾ は副腎髄質クロマフィン細胞でも L 型 Ca^{2+} チャンネルが A-PK によりリン酸化され、チャンネルの開閉特性が調節されることを報告しているが同時にチャンネルの不活性化に要する時間も短縮されることを認めており、分泌における Ca^{2+} チャンネルリン酸化の役割は明確でない。又神経細胞には幾つもの種類の Ca^{2+} チャンネルの存在が知られている故に、副腎クロマフィン細胞においても cyclic AMP がこれら Ca^{2+} チャンネルに直接作用して CA 遊離増強をもたらす可能性は完全には否定できない。cyclic AMP による CA 遊離、 ^{22}Na uptake, $[\text{Na}^+]_i$, 脱分極、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用においてそれ自身の作用は Na^+ 依存性にもかかわらず TTX によって抑制されない。しかし、刺激によって誘発されるこれらの細胞応答に対する増強作用は TTX 感受性であった。このような特性は ouabain においても全く同様に観察された。細胞内に増加した Na^+ は細胞膜 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構を介して Ca^{2+} 流入を促進することが考えられる³⁷⁾。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange による Ca^{2+} 輸送は副腎髄質を含む多くの組織で確かめられている^{63), 64)}。 amiloride は Na^+/H^+ exchange 機構を阻害するが $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構の阻害作用も有している⁶⁵⁾。本研究において amiloride は ACh による CA 遊離を一部抑制し、forskolin による CA 遊離増強作用をより強く抑制した。 amiloride はシナプトゾームの Na^+ チャンネル阻害を含む種々の膜イオン輸送機構に影響することが知られて

いる⁶⁵⁾。しかし excess KCl による CA 遊離に僅かな作用しか示さない濃度で forskolin の CA 遊離増強作用を完全に抑制した。同様の結果は amiloride とは作用点の異なる bepridil を用いても得られた(未発表)。 amiloride はまた ouabain, veratrine による分泌増強作用も同様に抑制した。これらのことは cyclic AMP による Na^+ , K^+ -ATPase の阻害の結果として Na^+ 勾配の減少による $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構の活性化が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加をもたらすことを示すものと考えられる。この系は TTX 非感受性であることから cyclic AMP や ouabain の単独作用は TTX によって抑制され得ないことが理解できる。一方 cyclic AMP による CA 遊離増強作用は TTX により抑制された。このことは Na^+ 勾配の減少に基づく脱分極が分泌促進剤による脱分極を助長し、TTX 感受性 Na^+ チャンネルを通る Na^+ 流入の増強による $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構の活性化を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増強が cyclic AMP の CA 遊離増強作用に含まれることを示唆している。電位依存性 Ca^{2+} チャンネルには作用することなく、TTX 感受性 Na^+ チャンネルを活性化する機構が cyclic AMP の作用に含まれることについては電位依存性 Na^+ チャンネルは Ca^{2+} チャンネルに比べ、より負の膜電位で活性化されることが知られており、cyclic AMP および Na^+ , K^+ -ATPase 阻害による脱分極が Ca^{2+} チャンネルの活性化に至らない程度であれば、このことより説明できるかもしれない。

細胞内 Ca^{2+} 動員機構に対する cyclic AMP の作用

caffeine は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} を遊離させ、CA 遊離をひきおこすとされている⁶⁶⁾。 caffeine は外液 Ca^{2+} 除去時ウシ副腎クロマフィン細胞において CA 遊離、 ^{45}Ca efflux および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加し、cyclic AMP はこれらを増強することから、cyclic AMP は細胞内 Ca^{2+} homeostasis のための機構に作用し、 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} を動員して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増強を引き起こすと考えられる。この現象も前述の作業仮説に立脚すると以下のように説明することが出来る。cyclic AMP は Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害することにより脱分極を引き起こし、電位依存性 Na^+ チャンネルの開口を助長し、 Na^+ 流入の促進、 $[\text{Na}^+]_i$ の増加をもたらす。ミトコンドリア等の細胞内小器官には Na^+ -induced Ca^{2+} release 機構を有し Ca^{2+} 動員機構を形成している³⁷⁾。副腎髄質においてもクロマフィン顆粒、ミトコンドリアには Na^+ -induced Ca^{2+} release 機構が存在する(未発表)。それ故 cyclic AMP による $[\text{Na}^+]_i$ の増加が caffeine により増加した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の細胞外への放出阻害或いは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位への取り込み阻害等 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 除去機構を抑制し、

結果的に $[Ca^{2+}]_i$ およびCA遊離を増強すると考えられる。

最近 inositol 1, 4, 5-trisphosphate(IP_3)受容体がA-PKによってリン酸化されることが示された⁶⁷⁾が、 IP_3 による Ca^{2+} 動員は抑制^{68),69)}、促進⁷⁰⁻⁷²⁾あるいは変化しない⁷³⁾とする報告もあり、まだ一定した見解が得られていない。さらに caffeine の作用部位と目される ryanodine 受容体もA-PKでリン酸化され、ryanodine 結合活性が増加する^{74),75)}ことも報告され、これら Ca^{2+} 貯蔵部位に対する作用については今後の解明が待たれる。cyclic AMPがこれらの部位に作用して Ca^{2+} 動員を促進している可能性も考慮しなければならない。

以上のことを合わせ考えると cyclic AMPによるCA遊離増強作用機序は次のように考えられる。cyclic AMPはA-PKの活性化を介して Na^+ , K^+ -ATPase活性を阻害する。 Na^+ , K^+ -ATPaseが阻害されると $[Na^+]_i$ の貯留と K^+ の流出が起こり電気化学ポテンシャル勾配が減少して膜が脱分極し、電位依存性 Na^+ チャンネルを活性化し、結果として前述のように Na^+/Ca^{2+} exchange機構を活性化して細胞膜を通る Ca^{2+} influxの増加を引き起こす。 $[Na^+]_i$ の増加は細胞膜及び細胞内小器官のreversed Na^+/Ca^{2+} exchange機構の亢進、forward Na^+/Ca^{2+} exchange機構の抑制、あるいは細胞内貯蔵部位からの Na^+ -induced Ca^{2+} release等細胞内 Ca^{2+} homeostasisを変化させることにより $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こる。 Na^+ 汲み出し機構が阻害された状態で分泌刺激により急激な Na^+ 流入がおこると、 $[Na^+]_i$ がさらに増加し、分泌刺激による脱分極を増幅し電位依存性 Na^+ チャンネルを通る Na^+ 流入を助長し $[Na^+]_i$ をさらに上昇させ、上記の機序により分泌刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を増強し、分泌反応を増強することが理解できる。さらにreversed Na^+/Ca^{2+} exchange機構の活性化には Ca^{2+} が必須であり、その $K_{1/2}$ は $0.6 \mu M$ である。加えてこの系は脱分極に依存して著しく活性化されることが示されている³⁷⁾。cyclic AMPは単独のCA遊離は僅かであるにもかかわらずCA遊離増強作用が強い。これは Na^+/Ca^{2+} exchange機構のこのような性質によるのかも知れない。

以上、cyclic AMPにより副腎髄質クロマフィン細胞からのCA遊離増強機序は Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害に基づく Ca^{2+} 動態の変化によることを明らかにした。これらの結果と考察を要約してFig. 20に示した。

結 論

cyclic AMPが副腎髄質からのCA刺激遊離を増強す

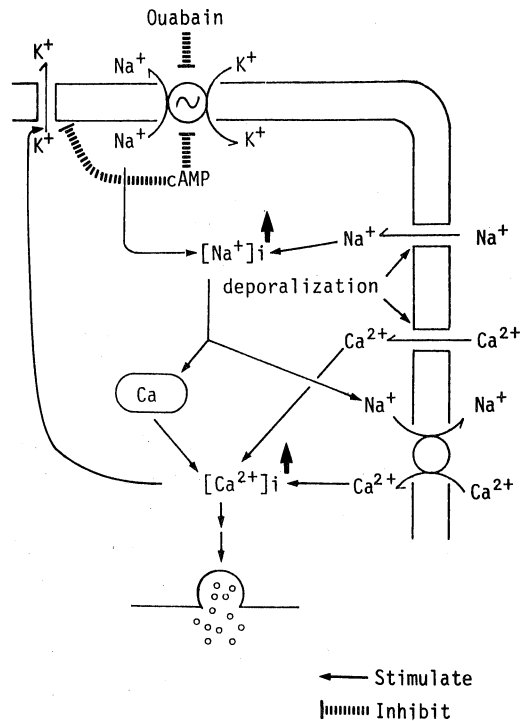


Fig. 20. Schematic representation of the possible site of action of cyclic AMP in adrenal chromaffin cells. For details, see text.

る機序についてウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞を用いて検索し以下の結果を得た。

1) 8-Br cyclic AMP および forskolin はACh($5 \mu M$)によるCA遊離を約2倍に増強した。しかし、最大のCA遊離を示すACh($30 \mu M$)によるCA遊離に対しては増強は認められなかった。

2) Na^+ チャンネル阻害剤TTX($1 \mu M$)はAChによるCA遊離を軽度抑制し、8-Br cyclic AMP および forskolin のCA遊離増強作用を顕著に抑制した。

3) ouabain, 外液 K^+ 除去あるいはveratrine等の $[Na^+]_i$ を増加させる処置は共にAChによるCA遊離を著明に増強した。これら処置下では8-Br cyclic AMP および forskolin のCA遊離増強作用は消失し、またこれらは相互に拮抗することを認めた。

4) cyclic AMP($10^{-8} \sim 10^{-4} M$)は粗ミクロゾーム画分の Na^+ , K^+ -ATPase活性を抑制した。また digitonin で膜透過性としたクロマフィン細胞に8-Br cyclic AMP, forskolin およびA-PK触媒サブユニット(A-PK C.S.)を添加すると $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ の加水分解を抑制した。A-PK C.S.のinhibitorはA-PK C.S.の作用に拮抗した。このATP加水分解の抑制はouabain存在下

ではみられず、 Na^+ , K^+ -ATPase の抑制であることを示した。

5) 8-Br cyclic AMP および forskolin は単独で ^{22}Na uptake, $[\text{Na}^+]_i$ を僅かに増加させ、ACh によるそれらの増加を増強した。ouabain (50 μM) 添加は cyclic AMP の作用を模倣し、ouabain 前処置は cyclic AMP の作用と拮抗した。TTX 前処置は ACh の ^{22}Na uptake, $[\text{Na}^+]_i$ 上昇に対する cyclic AMP, ouabain の増強作用を共に抑制した。

6) 蛍光指示薬 bis-oxonol を用いて細胞膜電位変化を測定し、8-Br cyclic AMP ($\geq 0.1 \text{ mM}$) で脱分極を引き起こすことを認めた。cyclic AMP の脱分極作用は外液 Na^+ 除去により消失したが、TTX 処置によって変化せず、ouabain 処置により相互に拮抗することから Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害に基づく $[\text{Na}^+]_i$ 貯留によることを示した。さらに cyclic AMP および ouabain は ACh あるいは excess KCl による脱分極も増強し、これは TTX により抑制された。

7) 8-Br cyclic AMP, forskolin は共に単独で僅かに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加し、ACh による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を増強した。ouabain も cyclic AMP と同様の作用を示し、相互に拮抗した。TTX 処置により cyclic AMP, ouabain の増強作用は著明に抑制されたが、単独作用はほとんど影響されなかった。外液 Na^+ 除去により cyclic AMP, ouabain の作用は消失した。

8) Ca^{2+} チャンネル阻害剤 verapamil, nifedipine, diltiazem は ACh による CA 遊離を顕著に抑制した。 Ca^{2+} チャンネル阻害剤存在下でも forskolin は ACh による CA 遊離を増強した。 Na^+ , K^+ -ATPase 阻害剤による CA 遊離増強作用も Ca^{2+} チャンネル阻害剤存在下に認められた。

9) K^+ チャンネルに対する cyclic AMP の作用を窺う目的で、予め ^{86}Rb で標識したクロマフィン細胞からの ^{86}Rb efflux に対する作用を検討し、cyclic AMP は K^+ チャンネルを通るイオン動態に影響しないことを示した。さらに種々の K^+ チャンネル阻害剤処置により ACh あるいは excess KCl の CA 遊離は顕著に増強されたが、これらチャンネル阻害剤存在下でも 8-Br cyclic AMP, forskolin の CA 遊離増強作用は影響されなかった。

10) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構を阻害する amiloride 前処置により forskolin, ouabain, veratrine の CA 遊離増強作用は著明に抑制された。

11) 8-Br cyclic AMP は外液 Ca^{2+} 除去時でも caffeine による CA 遊離を増強した。この時 caffeine によ

る ^{45}Ca efflux および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇も増強することを認めた。

以上、cyclic AMP は副腎 CA 遊離を増強することを示した。cyclic AMP は一義的には Na^+ , K^+ -ATPase を阻害し、 $[\text{Na}^+]_i$ の蓄積をきたし、脱分極をひき起こす。この機序は ACh による脱分極を助長し、 Na^+ チャンネルの開口を増強し、 $[\text{Na}^+]_i$ 上昇を増強させる。その結果、細胞膜の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 機構あるいは Ca^{2+} 貯蔵部位からの Na^+ -induced Ca^{2+} release 機構を修飾し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を増強することにより CA 遊離を増強する機序が示唆された。

(稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、御指導、御校閲を賜った恩師辻本 明広島大学名誉教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御指導、御校閲を賜った広島大学歯学部歯科薬理学講座土肥敏博教授に心から感謝いたします。また御校閲賜った奈良県立医科大学薬理学講座中嶋敏勝教授に深謝します。さらに研究遂行にあたり有益な御教示をいただいた歯科薬理学講座森田克也講師に感謝するとともに、御協力を戴いた歯科薬理学講座の諸兄姉に心からお礼申し上げます。なお、本研究に際し verapamil hydrochloride を御提供いただいたエーザイ、ウシ副腎を御供与いただいた広島市食肉衛生検査所ならびに JA 広島経済連三次食肉加工センターに感謝いたします。)

文 献

- 1) Harper, J. F.: Adv. Second Messenger Protein Phosphorylation Res. 22: 193, 1988.
- 2) Tsujimoto, A., Morita, K. and Dohi, T.: *in* Presynaptic Regulation of Neurotransmitter Release: A Handbook (Feigenbaum, J. and Hanani, M., eds.). Freund Publishing, London, p1085, 1991.
- 3) Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S. and Tsujimoto, A.: Archs Int. Pharmacodyn. Ther. 275: 208, 1985.
- 4) Tsujimoto, A., Morita, K., Kitayama, S. and Dohi, T.: Archs Int. Pharmacodyn. Ther. 279: 304, 1986.
- 5) Dohi, T., Morita, K., Kitayama, S. and Tsujimoto, A.: J. Neural. Transm. 67: 57, 1986.
- 6) Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Koyama, S. and Tsujimoto, A.: J. Neurochem. 48: 243, 1987.

- 7) **Dubin, A. E., Rathouz, M. M., Mapp, K. S. and Berg, D. K.** : Brain Res. **586** : 344, 1992.
- 8) **Burgoyne, R. D.** : Biochim. Biophys. Acta **1071** : 174, 1991.
- 9) **Morita, K., Dohi, T. and Tsujimoto, A.** : Jpn. J. Pharmacol. **40** : 265, 1986.
- 10) **Tsujimoto, A., Morita, K., Nishikawa, T. and Yamada, S.** : Archs Int. Pharmacodyn. Ther. **245** : 262, 1980.
- 11) **Keogh, R. and Marley, P. D.** : J. Neurochem. **57** : 1721, 1991.
- 12) **Dohi, T., Morita, K. and Tsujimoto, A.** : *in* Presynaptic Regulation of Neurotransmitter Release: A Handbook (Feigenbaum, J. and Hanani, M., eds.). Freund Publishing, London, p1117, 1991.
- 13) **Dudai, Y.** : CRC Crit. Rev. Biochem. **22** : 221, 1987.
- 14) **Kandel, E. R.** : *in* Principles of Neural Science (Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessel, T. M., eds.). Elsevier, New York, p1009, 1991.
- 15) **Frey, U., Huang, Y. -Y. and Kandel, E. R.** : Science **260** : 1661, 1993.
- 16) **Morimoto, B. H. and Koshland, D. E. Jr.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88** : 10835, 1991.
- 17) **Walass, S. I. and Greengard, P.** : Pharmacol. Rev. **43** : 299, 1991.
- 18) **Catterall, W. A.** : Science **242** : 50, 1988.
- 19) **Kaczmarek, L. K.** : Adv. Second Messenger Protein Phosphorylation Res. **22** : 113, 1988.
- 20) **Kostyuk, P. G.** : Biochim. Biophys. Acta **650** : 128, 1981.
- 21) **Kandel, E. R. and Schwartz, J. H.** : Science **218** : 433, 1982.
- 22) **Rabe, C. S., Schneider, J. and McGee, R. Jr.** : J. Cyclic Nucleotide Res. **8** : 371, 1982.
- 23) **Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Koyama, S. and Tsujimoto, A.** : J. Neurochem. **48** : 248, 1987.
- 24) **Fenwick, E. M., Fajdiga, P. B., Home, N. B. S. and Livett, B. G.** : J. Cell Biol. **76** : 12, 1978.
- 25) **von Euler, U. S. and Lishajko, F.** : Acta Physiol. Scand. **51** : 348, 1961.
- 26) **Edelman, I. S.** : *in* Techniques for Measuring Body Composition (Brozek, J. and Henschel, A., eds.). National Academy of Sciences-National Research Council, Washington, D. C. p 140, 1961.
- 27) **Yamamoto, S., Akera, T. and Brody, T. M.** : Eur. J. Pharmacol. **49** : 121, 1978.
- 28) **Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.** : J. Biol. Chem. **260** : 3440, 1985.
- 29) **Luthra, M., Hildenbrandt, G. R. and Hanahan, D. J.** : Biochim. Biophys. Acta **419** : 164, 1976.
- 30) **Fiske, C. H. and Subbarow, Y.** : J. Biol. Chem. **66** : 375, 1925.
- 31) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** : J. Biol. Chem. **193** : 265, 1951.
- 32) **Rink, T. J., Montecucco, C., Hesketh, T. R. and Tsien, R. Y.** : Biochim. Biophys. Acta **595** : 15, 1980.
- 33) **Tsien, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T. J.** : Nature **295** : 68, 1982.
- 34) **Vizi, E. S.** : *in* Presynaptic Regulation of Neurotransmitter Release: A Handbook (Feigenbaum, J. and Hanani, M., eds.). Freund Publishing, London, p291, 1991.
- 35) **Török, T. L.** : Prog. Neurobiol. **32** : 11, 1989.
- 36) **Kitayama, S., Ohtsuki, H., Morita, K., Dohi, T. and Tsujimoto, A.** : Neurosci. Lett. **116** : 275, 1990.
- 37) **Dipolo, R. and Beauge, L.** : Biochim. Biophys. Acta **947** : 549, 1988.
- 38) **Rossie, S. and Catterall, W. A.** : J. Biol. Chem. **264** : 14220, 1989.
- 39) **Lingham, R. B. and Sen, A. K.** : Biochim. Biophys. Acta **688** : 475, 1982.
- 40) **Mayanil, C. S. K. and Baquer, N. Z.** : J. Neurochem. **44** : 25, 1985.
- 41) **Tria, E., Luly, P., Tomasi, V., Trevisani, A. and Barnabei, O.** : Biochim. Biophys. Acta **343** : 297, 1974.
- 42) **Giesen, E. M., Imbs, J. L., Grima, M., Schmidt, M. and Schwartz, J.** : Biochem. Biophys. Res. Commun. **120** : 619, 1984.
- 43) **Kinne, R., Shlutz, L. J., Kinne-Saffran, E. and Schwartz, I. L.** : J. Memb. Biol. **24** : 145, 1975.
- 44) **Braugher, J. M. and Corder, C. N.** : Biochem. Biophys. Res. Commun. **71** : 408, 1976.
- 45) **Mózsik, Gy.** : Eur. J. Pharmacol. **9** : 207, 1970.
- 46) **Turi, A. and Somogyi, J.** : Biochim. Biophys.

- Acta 940 : 77, 1988.
- 47) Parkinson, D. K., Ebel, H., DiBona, D. R. and Sharp, G. W. G. : J. Clin. Invest. 51 : 2292, 1972.
- 48) Scheid, C. R., Honeyman, T. W. and Fay, F. S. : Nature 277 : 32, 1979.
- 49) Komabayashi, T., Izawa, T., Nakamura, T., Suda, K., Shinda, S. and Tsuboi, M. : Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 60 : 137, 1988.
- 50) Swann, A. C. and Steketee, J. D. : J. Neurochem. 52 : 1598, 1989.
- 51) Bertorello, A. M., Aperia, A., Ivar Walass, S., Nairn, A. C. and Greengard, P. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 : 11359, 1991.
- 52) Nunoki, K., Florio, V. and Catterall, W. A. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 6816, 1989.
- 53) Chad, J., Kalman, D. and Armstrong, D. : Soc. Gen. Physiol. Ser. 42 : 167, 1987.
- 54) Gray, R. and Johnston, D. : Nature 327 : 620, 1987.
- 55) Narahashi, T., Tsunoo, K. and Yoshii, M. : J. Physiol. 383 : 231, 1987.
- 56) Ahlijanian, M. K., Striessnib, J. and Catterall, W. A. : J. Biol. Chem. 266 : 20192, 1991.
- 57) Kaneko, S. and Nomura, Y. : Neurosci. Lett. 83 : 123, 1987.
- 58) Madison, D. V. and Nicoll, R. A. : Nature 299 : 636, 1982.
- 59) Mason, W. T., Rawlings, S. R., Cobbet, P., Sikder, S. K., Zorec, R., Akerman, S. N., Benham, C. D., Berridge, M. J., Cheek, T. and Moreton, R. B. : J. Exp. Biol. 139 : 287, 1988.
- 60) Nemeth, P. R., Palmer, J. M., Wood, J. D. and Zafirov, D. H. : J. Physiol. 376 : 439, 1986.
- 61) Kandel, E. R. and Schwartz, J. H. : Science 218 : 433, 1982.
- 62) Doupnik, C. A. and Pun, R. Y. K. : Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 420 : 61, 1992.
- 63) Esquerro, E., Garcia, A. G., Hernandez, M., Kirperkar, S. M. and Prat, J. C. : Biochem. Pharmacol. 29 : 2669, 1980.
- 64) Sorimachi, M. and Nishimura, S. : Jap. J. Physiol. 34 : 19, 1984.
- 65) Kleyman, T. R. and Cragoe, E. J. Jr. : J. Membr. Biol. 105 : 1, 1988.
- 66) Poisner, A. M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 : 103, 1973.
- 67) Ferris, C. D., Haganir, R. L., Breddt, D. S., Cameron, A. M. and Snyder, S. H. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 2232, 1991.
- 68) Supattapone, S., Danoff, S. K., Theibert, A., Joseph, S. K., Steiner, J. and Snyder, S. H. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 8747, 1988.
- 69) Ohta, T., Ito, S., Noto, T., Tachibana, R., Nakazato, Y. and Ohga, A. : J. Physiol. 453 : 367, 1992.
- 70) Volpe, P. and Alderson-Lang, B. H. : Am. J. Physiol. 258 : C1086, 1990.
- 71) Burgess, G. M., Bird, G. St. J., Obie, J. F. and Putney, J. W. Jr. : J. Biol. Chem. 266 : 4772, 1991.
- 72) Enouf, J., Giraud, F., Bredoux, R., Bourdeau, N. and Levy-Toledano, S. : Biochim. Biophys. Acta 928 : 76, 1987.
- 73) O'Rourke, F., Zavoico, G. B. and Feinstein, M. B. : Biochem. J. 257 : 715, 1989.
- 74) Strnd, M. A., Louis, C. F. and Mickelson, J. R. : Biochim. Biophys. Acta 1175 : 319, 1993.
- 75) Takasago, T., Imagawa, T., Furukawa, K., Ogurusu, T. and Shigekawa, M. : J. Biochem. 109 : 163, 1991.