

Title	プタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネル : サブタイプと脱分極によるfacilitationについて
Author(s)	北村, 直樹
Citation	 北海道大学. 博士(獣医学) 甲第4459号
Issue Date	1998-03-25
DOI	10.11501/3137175
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51477
Туре	theses (doctoral)
File Information	000000322365.pdf



博士論文

0

ブタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネル ~サブタイプと脱分極によるfacilitationについて~

北村直樹

北海道大学大学院獣医学研究科

比較形態機能学講座薬理学教室

			頁
Ι	緒	論	1
II	方	法	4
	A	細胞分離法	4
	В	細胞培養法	7
	C	カルシウム (バリウム)電流測定法	8
		1 電極作製法	8
		2 実験装置	8
		3 ホールセルクランプ法	10
	D	細胞内カルシウム濃度の測定	12
	E	カテコールアミン放出実験	14
	F	使用溶液	15
		1 細胞外液	15
		2 細胞内液	16
	G	使用薬物	16
	Η	統計処理	17
	• •		
III	結	果	18
	A	ブタ副腎髄質細胞のカルシウムチャネルのサブタイプ	18
		1 培養ブタ副腎髄質細胞のカルシウム電流の電位-電流関係	18

次

目

2 カルシウム電流の不活化曲線
 3 カルシウムチャネル抑制薬の作用
 4 カルシウムチャネル抑制薬によるカルシウム電流抑制反応の濃度依存性
 23

	5	カルシウム電流の電位-電流関係に対するカルシウムチャネル抑制						
		薬の作用	25					
	6	多種のサブタイプのカルシウムチャネルの共存	25					
	7	カルシウムチャネル抑制薬のカルシウム電流の不活化に対する作用	25					
	8	高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇に対するカル						
		シウムチャネル抑制薬の作用	29					
	9	高濃度カリウム刺激によるカテコールアミン放出反応に対するカル						
		シウムチャネル抑制薬の作用	33					
В	脱分	}極プレパルスによるバリウム電流の増強とそのメカニズム	38					
	1	バリウム電流に対する脱分極プレパルスの効果	38					
	2	プレパルスの電位に依存するバリウム電流のfacilitation	38					
	3	プレパルス持続時間に依存するバリウム電流のfacilitation	41					
	4	プレパルスとテストパルスの間隔に依存するバリウム電流の						
		facilitation	41					
	5	サイクリックAMP類似物質とforskolinの作用	45					
	6	GTPySとGDPBSの作用	45					
	7	カルシウムチャネル抑制薬の作用	49					
	8	百日咳毒素とコレラ毒素の作用	56					
考	察		59					
A	ブタ副腎髄質細胞のカルシウムチャネルのサブタイプ 59							
В	カテコールアミン放出に対する電位依存性カルシウムチャネルの関与 60							

C カルシウムチャネル電流 (バリウム電流)のfacilitationを担う機構
D Facilitationに関与するカルシウムチャネルのサブタイプ
E カルシウムチャネルを抑制するG蛋白のサブファミリー
67

III

IV 総 拈	65
謝辞	72
参考文献	7:
英文抄録	75

A statistical descent of the second statistical descent of the se

於基金由其的國際總統開催和自該當時僅以以這個百姓也在於大主主主要也從為於

I 緒 論

電位依存性カルシウムチャネルは電気生理学的特徴から2種類に分類されてい る. 即ち,小さな脱分極により開口する低閾値型 (low voltage-activated type)と開口 に比較的大きな脱分極が必要な高閾値型 (high voltage-activated type)カルシウムチャ ネルである (Spedding & Paoletti, 1992). 後者は更に薬理学的にいくつかのサブタイ プに分類されている.即ち,ジヒドロピリジン感受性のL型カルシウムチャネル,ω -conotoxin GVIA感受性のN型カルシウムチャネル,ω-agatoxin IVA感受性のP/Q型カ ルシウムチャネルなどである (Spedding & Paoletti, 1992; Olivera et al., 1994). また, カルシウムチャネルは様々な機構により調節を受けている. 例えば、心筋細胞にお いてはアデニル酸シクラーゼを刺激したり, 膜透過性のサイクリックAMP類似物質 を適用することによりプロテインキナーゼA (PKA)を活性化するとL型カルシウムチャ ネルを介したカルシウム電流が増大する (Cachelin et al., 1983). また, 様々な神経細 胞や神経内分泌細胞においてGTP結合蛋白質 (G蛋白)結合型受容体をアゴニストで活 性化するとカルシウム電流が抑制される (Anwyl, 1991; Dolphin, 1995). 脱分極プレパ ルスは、発現された脳および心筋のa₁。L型チャネルを通る電流をPKA依存性リン酸 化機構により増大したり (Sculptoreanu et al., 1993; Bourinet et al., 1994), 上頚神経節 ニューロンのカルシウムチャネル (Ikeda, 1991)や発現されたa₁₈カルシウムチャネル (Toth et al., 1996)を介する電流を、G蛋白によるカルシウムチャネルの抑制を解除す ることにより増大させる.

神経堤由来の副腎髄質細胞には高閾値型電位依存性カルシウムチャネルのみが

存在していると報告されている (Fenwick et al., 1982; Albillos et al., 1994). 副腎髄質 細胞のカルシウムチャネルは選択的な抑制薬によりω-conotoxin GVIA感受性のN型, ジヒドロピリジン感受性のL型およびω-agatoxin IVA感受性のP/Q型あるいはωconotoxin MVIIC感受性のQ/O型に分類されるが、ω-conotoxin MVIICの選択性には議

-1-

論の余地が残っている (Artalejo *et al.*, 1991; Albillos *et al.*, 1993; Gandía *et al.*, 1993; Albillos *et al.*, 1994; Artalejo *et al.*, 1994; Lopéz *et al.*, 1994b; Gandía *et al.*, 1995; Albillos *et al.*, 1996a). 脱分極パルスによるカルシウム電流に対するこれらの異なったサブタ イプのカルシウムチャネルの寄与の程度は動物種によって差があると報告されてい る. 即ち, ウシの副腎髄質細胞のL型カルシウムチャネルは, あらかじめ脱分極刺 激を行ったり, D₁ドーパミン受容体を刺激することにより活性化されるようになる が, これらの刺激がないと活性化されないこと (Artalejo *et al.*, 1990; Artalejo *et al.*, 1994), ω-conotoxin GVIA感受性のN型チャネルは細胞間で不均一に分布しており, このチャネルが存在しない細胞も報告されている (Artalejo *et al.*, 1992a). これに対し てネコやラットの副腎髄質細胞のL型カルシウムチャネルは脱分極によるカルシウ ム電流に常に寄与している (Albillos *et al.*, 1994; Gandía *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995).

副腎髄質細胞において、電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内に流入 したカルシウムイオンがカテコールアミン放出に重要な役割を持っていることはよ く知られている.これに関して、カルシウムチャネルを通って流入したカルシウム イオンがカテコールアミン分泌を起こす際、その効率は、サブタイプの違いによっ て差があることが示されている。例えば、ウシ (Artalejo et al., 1994; Lopéz et al., 1994b)及びネコ (Lopéz et al., 1994a)の副腎髄質細胞において、L型カルシウムチャネ ルあるいはL型およびQ型カルシウムチャネルが、他のサブタイプのカルシウムチャ ネルよりも効果的にカテコールアミン放出を起こすことが報告されている。一方、 ラット副腎髄質細胞においてはこのような結果は得られず、いずれのサブタイプの カルシウムチャネルを通って流入してきたカルシウムも同程度にカテコールアミン 放出を引き起こす (Kim et al., 1995).

ウシ副腎髄質細胞において膜透過性のサイクリックAMP類似物質やD₁ドーパミン受容体のアゴニストがL型カルシウムチャネルを通る電流を増大すること (Artalejo et al., 1990; Artalejo et al., 1991), 脱分極プレパルスによりL型カルシウムチャネルのリン酸化を介してカルシウムチャネル電流が増大すること (Artalejo et al., 1992b), ネ

-2-

コおよびウシの副腎髄質細胞において,脱分極プレパルスはG蛋白によるカルシウ ムチャネルの抑制を解除することによりカルシウムチャネル電流を増大させること が報告されている (Albillos *et al.*, 1994; Doupnik & Pun, 1994; Albillos *et al.*, 1996a; Albillos *et al.*, 1996b; Currie & Fox, 1996). 一方,細胞をATPやオピオイドなどのG蛋 白結合型受容体のアゴニストで刺激するとL型以外のカルシウムチャネルが抑制さ れることが示されている (Albillos *et al.*, 1996a; Albillos *et al.*, 1996b; Currie & Fox, 1996). これらの報告から,少なくともウシ副腎髄質細胞においては,脱分極プレパ ルスによるカルシウムチャネル電流のfacilitationには,カルシウムチャネルのリン 酸化を介する機構とG蛋白によるカルシウムチャネルの抑制の解除という2つの異なっ た機構が関与していることが示唆されている.しかしながら,これらの異なった2 つの機構が1つの同じ副腎髄質細胞おいて作動するのかどうか全く不明である.

ブタの培養副腎髄質細胞では他の種と同様に高濃度カリウム刺激やニコチンに よる刺激に応じて細胞外のカルシウム依存性にカテコールアミン放出をおこすこと (Xu et al., 1991),及びこれはL型カルシウムチャネル抑制薬のnifedipineにより部分的 に抑制されることが知られている (Forsberg et al., 1995).従って,ブタ副腎髄質細胞 においても脱分極性刺激に応じたカテコールアミン放出反応にL型以外のサブタイ プのカルシウムチャネルも関与していると思われるが、それ以外のサブタイプの関 与の詳細やそれらの制御機構については全く不明である.

それ故,本研究では,ブタ副腎髄質細胞に存在する電位依存性カルシウムチャ ネルのサブタイプを明らかにすると共に,各サブタイプのカルシウムチャネルのカ テコールアミン放出に対する寄与の程度を調べることを目的として,脱分極パルス によるカルシウム電流,高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応

及びカテコールアミン放出反応に対するnifedipine, ω-conotoxin GVIAおよびω-

agatoxin IVAの作用を観察した.

なお、本成績の一部は既に誌上公表されている (Kitamura et al., 1997; Kitamura

- 3 -

et al., 1998).

II 方法

A 細胞分離法(図1)

Brooks (1977)の方法に基づいて細胞を分離した.細胞を分離する際には以下の 組成の液を使用した (mM): 154 NaCl, 5.6 KCl, 1.2 MgCl₂, 10 glucose, 10 N-2hydroxyethyl-piperazine-2-ethanesulfonic acid (HEPES). 1000mlのこの液を作製し NaOHでpHを7.1に調整し, 350 ml (A)と650 ml (B)に分けた. Bは更にNaOHを加 え, pHが7.4になるよう調整した. Aの250 mlにはウシ血清アルブミン (1~5 mg/ ml)を, 100 mlにはウシ血清アルブミン (1~5 mg/ml)とコラゲナーゼ (100~250 U/ ml)を添加してボトルトップフィルター (Nalgen, 0.2 μ mあるいはMillipore, Steritop GV, 0.2 μ m)で濾過滅菌した. コラゲナーゼ (Worthington, Type I)の濃度は製品の ロットにより調整し, 至適濃度で使用した. すべての液にpenicillin G (100 U/ ml), streptomycin (100 μ g/ml)およびfungizone (2.5 μ g/ml)を添加した. 液を濾過減 菌する場合にはfungizoneは濾過後に添加した. 細胞分離に用いたガラス器具はすべ てシリコン加工 (シリコナイズ, L-25, 富士システムズ)を施し, 細胞のガラス面へ の接着を防いだ. また, ガラス器具は乾熱減菌 (160℃, 1時間)を, チップ, シリコ ン球等は高圧蒸気減菌 (121℃, 2気圧, 20分)を行った.

と畜場よりブタ副腎を10~20個入手し,氷冷したB液中に浸漬して実験室に持ち帰った.以降の恒温槽での振盪処理以外の操作にはすべて氷冷したこの液を用いた.まず初めに副腎周囲の脂肪組織をハサミでできる限り除去した.この際に細菌等の混入を押さえるためにできるだけ無傷な副腎組織7~8個を選択した.副腎をシリコンラバーを敷いたシャーレ上に虫ピンで固定し,皮質組織をハサミで除去した.この時点で肉眼で確認できる血管などはできるだけ取り除いた.この操作で得られる髄質組織のうち2.5~3gを以降の操作に供した.この作業は細菌等の混入を減少

-4-



図1 ブタ副腎髄質細胞の分離法の概略

ブタ副腎より髄質部分を切り出し、鋏で細切した後、コラゲナーゼ処理により 髄質細胞を遊離させた.詳細は本文を参照.

- 5 -

させるために濾過フィルター (SS-MAC, Air Tech社)を装備した簡易クリーンベンチ の中で行った.これ以降の作業はすべて紫外線殺菌ランプと濾過フィルターを装備 したクリーンベンチ (昭和科学)内で行った.

皮質より分離した髄質組織を50 mlのコニカルビーカーに水気を切りながら移 し、 混入している細菌や真菌を減少させるため滅菌栄養液を数回交換し、洗浄した. 液を除去する際にはクリーンベンチ内に設置したアスピレーターを用いた.次に副 腎髄質組織をコニカルビーカー内でハサミを使って一辺2mm程度のの塊になるよう に細切した。細切後,再び液交換を行いコラゲナーゼを含むカルシウム除去液を10 ml添加した. 髄質組織を径の大きい(直径3~5 mm)ピペットで容量50 mlの三角フラ スコに移してシリコン栓をし、恒温槽中 (34~37℃)で30分間振盪した (毎分150) 回). 振盪後, フラスコを速やかに氷冷し, フラスコ内の液と組織を2本の15 ml遠心 管にピペットで均等に移し、組織を吸い込み吹き出す操作をそれぞれの遠心管につ き80回繰り返し機械的に細胞の遊離を促した、遠心管を静置し、未消化の髄質組織 を管底に沈降させたのち遊離された細胞を含む上清をピペット(先端の直径約1 mm) で回収し別の遠心管に移した.未消化の組織にコラゲナーゼを含まないA液を約3 ml添加して更に20回ピペットでの吸い込み吹き出し操作を行った。再び、遠心管を 静置し髄質組織を沈降させ、上清をピペットで回収し前に回収した上清と合わせた. 残った髄質組織に新鮮なコラゲナーゼを含むA液を10 ml加え同様な行程を5~8回 繰り返し、髄質組織をできるだけ消化した.

それぞれの恒温槽での酵素処理により得られた上清は速やかに200xg,2分間遠 心し,分離した細胞を沈澱させた.上清をアスピレーターで除去したのち,新鮮な A液を5ml加え再懸濁し,更に200xgで2分間遠心した.この2回の遠心洗浄操作に

よりコラゲナーゼを除去した.それぞれの酵素処理により得られた分離細胞を顕微 鏡で観察し,細胞が少ないものや,不純物の多いものは廃棄した.このようにして 得られた細胞懸濁液をすべて合わせ未消化の組織や,比較的大きな不純物を除去す るために,ナイロンメッシュ (Cell Strainer, Falcon)で濾過し,50 mlのポリプロピ

- 6 -

レン遠心管 (Falcon)に回収した. 濾過後, 更に200xg, 5分間遠心し細胞を沈澱させ 培養液に懸濁した.

ー連の操作で得られた細胞の生存率をトリパンブルーあるいはエリスロシンB 染色により測定したところ約80%であった.また,カテコールアミン含有細胞の純 度はニュートラルレッド染色により95%以上であることが確認された.上述の細胞 分離操作1回で得られる細胞数は約10⁸個であった.

B 細胞培養法

培養液には、約10%のウシ胎児血清あるいは新生仔ウシ血清を添加したダルベッ コ改変イーグル培地 (4.5 g/l glucose, 25 mM HEPESを含む)を用いた.培養液の作 製には超純水 (Milli Q)を使用し、pHが7.0~7.1であることを確認した後、ボトルトッ プフィルターで濾過滅菌した (pHの調整が必要な場合にはNaOHとHCIを使用した). 血清は濾過滅菌後に添加した.また、培養液には線維芽細胞の増殖を抑制するため に10 μ M cytosine arabinosideと25 μ M fluorodeoxyuridineを、細菌の増殖を抑制する ために100 U/ml penicillin Gと100 μ g/ml streptomycinを添加した.真菌類の混入が 予想される場合には1~2.5 μ g/ml fungizoneを濾過滅菌後に添加した.

カルシウム (バリウム)電流測定実験,細胞内カルシウム濃度測定実験に用いた 細胞は薄い丸形カバーグラス (15丸No1,松浪硝子)上で,カテコールアミン放出実 験に用いた細胞は48穴プレート (岩城硝子)中で培養した.カバーグラス上に細胞を 蒔く際には,重ならないようにカバーグラスを15枚ずつ直径9 cmのシャーレに敷き, 細胞密度が約10⁵ cells/ml以下になるように懸濁し,カバーグラス1枚につき細胞懸

濁液を150~250 mlずつ滴下した.48穴プレートに蒔く際には細胞密度10⁶ cells/ml の細胞懸濁液を1穴につき400 µl滴下した. CO_2 インキュベーター (三洋電機)内で37 ℃,5% CO_2 – 95% Airという条件で細胞を培養した.インキューベーターの下部 には滅菌蒸留水をためて気相を水蒸気で飽和させた.培養液は2日毎に新鮮な液に

-7-

交換し、培養開始後3~10日の細胞を実験に供した.

C カルシウム (バリウム)電流測定法

膜電流反応は一般的な全細胞膜電流測定法 (Hamill *et al.*, 1981)により測定した. Ca²⁺あるいはBa²⁺をcharge carrierとして電位依存性カルシウムチャネルを通る電流 を測定した.

1 電極作製法

パッチクランプ用電極 (パッチ電極)は芯入ガラス管 (GD-15,成茂科学器械研究 所)を専用の微小電極作製器 (PP-83,成茂科学器械研究所)を用いて2段引きすること により作製した. 微小電極作製器のヒーター調節目盛りを1段目は11.10に固定し, 2段目のヒーターの強度を調整 (7.70~7.90)することにより作製するパッチ電極の先 端抵抗を調整した. 2段目の牽引は1段目の牽引が終わりヒーターの赤色が消失した ら直ちに行った. その後,パッチ電極先端を顕微鏡下 (200倍)でその形状を確認し ながら,ガラスで被覆したニクロム線で熱処理を施した (ヒートポリッシュ). これ らの一連の操作により,先端抵抗が2~4MΩのパッチ電極を作製した.

2 実験装置(図2)

実験槽を倒立顕微鏡のステージ上に設置した.アクリル板を直径約1.5 cmにく

り貫き,底面にはマイクロカバーガラスをシリコングリースによりアクリル板と密着させ,容量約0.5 mlの実験槽とした.この槽に,先端を細く引いたガラス管を設置してアスピレーターと接続し実験液の吸引除去を行った.不関電極は液間電位を小さくするため,先端に塩橋として4%アガロースを含む3 M KCl液を充填し,更に

- 8 -



図2 膜電流測定装置の概略

パッチクランプ増幅器により測定した膜電流反応はA/Dコンバータを介してパーソ ナルコンピューターのハードディスク上に記録した.詳細は本文を参照.



その後部に3 M KCI液を入れ,銀線を挿入して作製した.電流を測定する細胞から 約200 µmの位置に先端の直径が約0.5 mmのピペットを静置し,このピペットより 常に新鮮な実験液を流すことにより細胞を灌流した.不関電極の銀線は,パッチク ランプ用増幅器のプローブ (JZ-230J,日本光電)の不関電極入力部に接続した.プロー ブに電極ホルダーを接続し,プローブ本体を三次元水圧マニピュレーター (WR-91, 成茂科学器械研究所)に固定した.また,銀線をプローブのパッチ電極入力部に接続 し,パッチ電極装着時には電極ホルダーを通して銀線先端が電極内液に浸るように した.分極を抑えるためパッチ電極及び不関電極用の銀線は,0.1 M KCI液中で銀線 (正極)と白金線 (負極)の間に1.8~2 Vの直流電圧をかけることにより銀塩化銀化加工 を施した.また,電極ホルダーの側管に1.5 m程度のポリエチレンチューブを介して 三方活栓と1 mlの注射筒を接続し,呼気と吸気を用いて電極内圧を調節できるよう にした.

パッチ電極より検出される電流反応はパッチクランプ用増幅器 (CEZ-2300,日本光電)で測定した.パッチクランプ用増幅器にパーソナル・コンピューター (Macintosh, Apple)で制御されたアナログ/デジタル-デジタル/アナログ・コンバー ター (A/D-D/Aコンバーター, MacLab, AD Instruments)を接続し,ソフトウェア (Scope, AD Instruments)上でパッチ電極と不関電極間の電圧を制御しながら両電極 間を流れる電流を記録した.通常,データの取り込みは10~40 kHzで行った.

3 ホールセルクランプ法

カバーグラス上で培養した細胞を正常実験液中に移し使用するまで冷蔵庫内に

保存した.培養液より取り出した細胞は10時間以内に実験に用いた.細胞が接着したカバーグラスを実験槽底部に固定し,拡大倍率400倍で適当な髄質細胞(辺縁が明瞭で細胞質が均質な,直径10~15 mmの球形の細胞)を選択し視野のほぼ中央に見えるように顕微鏡のステージを調節した.パッチ電極に電極内液を先端より0.5~1 cm

- 10 -

の位置まで満たし,電極ホルダーに装着した.電極内液を充填する際には,ポリエ チレンチューブを加熱し細く引いたものを導入管として使用し,電極後部より1 ml 注射筒で注入した.パッチ電極内に気泡が生じた場合,電極の横を指先で軽くたた いて除去した.パッチ電極の実験槽液中への挿入に先立ち,パッチ電極先端への異 物の付着,細胞外液のパッチピペット内への混入を避けるため,電極ホルダー側管 につないだ注射筒より息を軽く吹き込みながら三方活栓を閉じてパッチ電極内を陽 圧にした.

マニピュレーターを操作してパッチ電極先端が目的の細胞と同一視野にはいる ようにした.この時点で、増幅器をSEARCHモードにして電源を入れ、液間電位を 考慮して不関電極とパッチ電極間の電位差のゼロ調整を行った。以降の操作は、D/ Aコンバーターを介してパッチ電極に電圧パルス (-1 mV)を頻度2 Hzで与え, それに よって生じる電流をコンピューターのモニター画面上で確認しながら行った.まず. 電流波形から電極抵抗を計算し、適当な電極抵抗 (2~4 MΩ)であるかどうかを確認 した.パッチ電極先端を目的の細胞に押し当てると、電極先端抵抗の増加を反映し て画面上の電流波形はわずかに減少した.次いで三方活栓を操作しパッチ電極内の 陽圧を解除すると、通常更に抵抗は増大した、穏やかに吸引をかけることにより抵 抗値を更に増大させることができた、このような一連の操作により細胞はパッチ電 極先端に密着し(パッチ膜の形成),最終的に抵抗値は2~10GΩまで上昇した (ギガシールの形成). このギガシールは穏やかに吸引することにより徐々に形成さ れたり、時には陽圧の解除を行っただけで形成されたりした。ギガシールが形成さ れたことを確認するため、電極に与える電圧を-10 mVまで増加させた、ギガシール が形成されていれば、電流波形は電圧刺激の開始時と終了時に生じるパッチ電極の 容量性電流のみが確認でき、電位変化による電流の変化は5 pA以下となる.この、 パッチ電極の容量性電流の大きさを最小限に抑えるようにC-fastと τ-fastの値を調整 した.次に, 増幅器をVC (voltage clamp)モードに切り替え, 電極内電圧を-80 mVに 固定した.この状態で更にパッチ電極内を吸引することによりパッチ膜を破壊した.

- 11 -

パッチ膜の破壊によるパッチ電極内と細胞内の電気的接触により容量性電流波形が 再び現れる.これは、電極内と細胞内が電気的に通じることにより、細胞全体の容 量性電流を検出するようになったためである.この電流が見られれば直ちに吸引を やめ、C-slowダイヤルと r-slowダイヤルを調整しこの電流をできるだけ小さくした. 通常、C-slow値は4~15 pFであり、この値は電位固定している細胞の膜容量を表し ている.次に、電位固定している細胞が興奮性を持った副腎髄質細胞であることを 確認するため、0 mVまでの脱分極パルスを細胞に与え内向きのナトリウムおよびカ ルシウム電流が発生するかどうかを確認した.その後、細胞灌流液を高濃度のCa²⁺ (5あるいは10 mM)またはBa²⁺ (5 mM)とtetrodotoxin (0.2 µM)を含む液に切り替え、 ナトリウム電流を消去しカルシウムチャネルを介した電流のみが観察できるように した.細胞内液には以下の節で示すような、カリウムチャネルに対する透過性の低 い1価イオンであるセシウムを主体とした液を用いてカリウム電流を抑制した.カ ルシウム (バリウム)電流は測定開始後3~4分間は増大する傾向にあったので、カル シウム (バリウム)電流の振幅が安定してから各々の実験を開始した.

D 細胞内カルシウム濃度の測定

細胞内カルシウム濃度の測定は、カルシウム蛍光指示薬であるfura-2を負荷した細胞を紫外光により励起したときに発する蛍光の強度変化を指標として行った。細胞へのfura-2の負荷には細胞膜透過性の高いfura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM)を用いた.培養液より取り出した細胞が接着しているカバーグラス上にfura-2/AM (5 μ M)を含むカルシウム除去液 (後述)をカバーグラス1枚につき200 μ lずつ滴下し、45分間、CO₂インキューベーター内に静置した.その後、カバーグラスを正常液中に移し使用する直前まで冷蔵庫内に保存した.fura-2/AMを負荷した細胞は12時間以内に実験に使用した.

- 12 -

Fura-2/AMを負荷した細胞が接着しているカバーグラスを,2波長励起光発生 装置と光電子増倍管を装備した細胞内カルシウム濃度測定装置(CAM-200,日本分 光)を取りつけた倒立顕微鏡のステージ上の実験槽の底部に固定した(実験槽,細胞 灌流法はカルシウム電流の測定時の方法に準じる).また,単一細胞の細胞内のfura-2蛍光変化を測定するために対物レンズと光電子増倍管の間に設置した絞りを調整 し,目的とする1個の細胞からの蛍光のみが光電子増倍管に入射するようにした. Fura-2を340 nmと380 nmの2波長の励起光で励起し発生した500 nm付近の蛍光を ダイクロックミラー(450 nm)とバンドパスフィルター(500±10 nm)を介して測定 した.2波長の励起光は1 kHzで切り替えて照射した.細胞内カルシウム濃度測定装 置で測定したfura-2の蛍光強度を,前述のコンピューターに接続したA/D-D/Aコン バーターで変換しソフトウェア上でハードディスクに記録した(取り込み周波数20 Hz).得られた蛍光強度から2波長励起による蛍光比を計算した.細胞内カルシウム 濃度は以下の式を用いて計算した(Grynkiewicz et al., 1985).

$[Ca]_i = Kd \bullet \beta (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$

本研究で使用したカルシウム濃度測定装置でのfura-2とカルシウムイオンの解離定数を、カルシウム・バッファー液 (Molecular Probe)とfura-2 (1 μ M)を用いてカバー グラス上で測定したところ890 nMであったので、この値を用いて蛍光比より細胞内 カルシウム濃度へ換算した.また、細胞内ではfura-2の2波長励起による蛍光比 (F340/F380)は15%小さく見積もられるので (Poenie *et al.*, 1986)、この分を補正した.

高濃度カリウム液による刺激は細胞外液灌流用ピペットの先端よりA/D-D/Aコ



E カテコールアミン放出実験

カテコールアミンの放出実験は48穴プレート中で単層培養した細胞を用いて行っ た.まず、培養液を取り除きウシ血清アルブミンを含む正常実験液を0.5 ml/well投 与し、37℃で10分間インキュベーションした (プレインキュベーション).カルシウ ムチャネル抑制薬を投与する場合には抑制薬非存在下で5分間,次いで抑制薬存在 下で5分間プレインキュベーションを行った.その後、プレートを氷上に静置しウェ ル中の液を氷冷した実験液で3回交換し(0.5 ml/回), プレインキュベーション中に 放出されたカテコールアミンやウェル底部に接着していない細胞などを除去した. その後、ウェル内に正常実験液および高濃度カリウム液を0.8 ml投与し、15分間、 37℃でインキュベーション (テストインキュベーション)し細胞からカテコールアミ ンを放出させた、テストインキュベーション終了後プレートを速やかに氷上に静置 しカテコールアミン放出反応を停止した. 放出されたカテコールアミンを含む上清 (0.4 ml)をサンプルチューブに採取し、サンプルチューブ内に0.4 mlの0.8 M 過塩素 酸を加え、サンプル中の蛋白を変性、凝集させた、ウェル内に残った液にも同様に 最終濃度0.4 Mとなるように過塩素酸を加え、小さなスターラーバー(長さ5 mm)を 入れスターラーで撹拌し、細胞を破壊するとともに蛋白を変性、凝集させた.得ら れたサンプルを滅菌用のフィルター (Ultrafree C3, Millipore)付きのサンプルチュー ブで更に遠心, 濾過し, 除蛋白と混入物の除去を行いカテコールアミン濃度測定に 用いた (Salzman & Sellers, 1982). 上部と下部の液中のそれぞれのカテコールアミン 濃度から放出されたカテーコールアミンの細胞含有量に対する百分比を計算した. テストインキュベーションを行う際には常に、対照としての細胞を、テストインキュ ベーションと同じ時間,氷上に静置し、このプレートウェル内の細胞からのカテコー ルアミン放出は細胞破壊などによるものと考え各々のデータから差し引いた. 高速液体クロマトグラフィーによりアドレナリンとノルアドレナリンに分離し, カテコールアミン濃度を電気化学検出器で定量した.分離カラムには多孔性シリカ - 14 -

ゲル表面に、オクタデシルシランを化学結合した逆相系のカラム (Eicompak MA-50DS, エイコム)を用い, 分離能を保持するためにプレカラム (AC ODS充填剤, エ イコム)を使用した.カラムは分離条件を一定にするためカラムオーブン (860-CO, 日本分光)内に設置し保温した. 電気化学検出器 (EC-100, 日本分光)にグラッシーカー ボン電極を装着し、+700 mVの電圧を負荷しサンプルの酸化電流を測定してサンプ ル中のカテコールアミン濃度をその電流の振幅により定量した. 高速液体クロマト グラフィーの移動相には0.1 M H₃PO₄-KH₂PO₄ buffer, 10~17 % methanol, 0.25 g/l sodium 1-octasulfonate, 0.02 g/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-2Naを用い た. 移動相中のmethanol濃度は分離カラムの分離能に応じて適当に調整し,移動相 の流速は1 ml/minとした、培養ブタ副腎髄質細胞が含有しているノルアドレナリン とアドレナリンの比率に関しては, 培養の日数とともに後者が減少していく傾向が 見られた(ノルアドレナリン/アドレナリン=3~25). これは、副腎髄質細胞に含 まれるノルアドレナリンをアドレナリンに変換する酵素, phenylethanolamine-Nmethyl transferaseの活性が副腎皮質ホルモンによって維持される (Waymire et al., 1983)ということで説明されている、それ故、本研究ではノルアドレナリンの放出を 指標とした.

F 使用溶液

1 細胞外液

すべての実験液は以下に示す正常実験液のカルシウム濃度を変化させて作製し

正常実験液 (mM): 134 NaCl, 6 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.7 CaCl₂, 10 glucose, 10 HEPES (pH=7.4にNaOHで調整)

カルシウム除去液は正常液からCaCl2のみを除いて作製した。細胞内カルシウム濃度

- 15 -

測定実験とカテコールアミン放出実験は上記の正常液を用いて行った. カルシウム 電流を測定する場合には $CaCl_2$ 濃度を5あるいは10 mMとし,バリウム電流を測定す る場合には $CaCl_2$ を5 mM BaCl_2に置換した. 高濃度 (60 mM)K液はNaClをKClで等モ ル置換して作製した.

2 細胞内液

カルシウム (バリウム)電流を測定する際のパッチ電極内液 (細胞内液)の組成は 以下のとおりである. (mM)

120 CsCl, 20 tetraethylammonium chloride (TEACl), 1.2 MgCl₂, 1.2 adenosine-5'triphosphate-Na₂ (ATP-Na₂), 0.2 guanosine-5'-triphosphate-Na₂ (GTP-Na₃), 10 ethylene glycol bis (2-amino-ethyl-ether)tetraacetic acid (EGTA), 10 HEPES (pHはCsOHで7.2に調整).

GTP除去細胞内液はこの液からGTP-Na₃を取り除いて作製した.GTP γ Sならびに GDP β Sを添加する場合にはGTP-Na₃は取り除かなかった.液を作製後,混入してい る不純物を取り除くために滅菌用のシリンジフィルター (Millex-GS, Millipore)で濾 過し、サンプルチューブに0.2~0.5 mlずつ分注し冷凍保存した.

G 使用薬物

使用した薬物と試薬は以下のとおりである. ω-Agatoxin IVA (ペプチド研), ATP (adenosine-5'-triphosphate, Bohelinger

Ingerheime), Bay K 8644 (Bayer), bovine serum albumin (fraktion V, Boheringer

Ingelheime), 8-Br-cAMP (8-bromo-adenosine-3',5'-cyclicmonophosphate, Sigma), cholera toxin (Calbiochem), collagenase (Worthington, type I), ω-conotoxin GVIA (ペプチド研),

cytosine-β,D-arabino-franoside-5'-monophosphate (Sigma), DMEM (Dulbecco's modified

- 16 -

Eagle's medium, Gibco), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 同仁), sodium 1octasulfonate (和光純薬), EGTA

(ethylene glycol bis (2-amino-ethyl-ether)tetraacetic acid, 同仁), fetal bovine serum (PAA, lot No:01055), fluorodeoxyuridine (和光純薬), forskolin (Sigma), fungizone (ブリ ストル・マイヤーズ スクイブ), fura-2/AM (fura-2 acetoxymethyl ester, 同仁), GDPβS (guanosine 5'-O- (2-thiodiphosphate), 和光純薬), GTP (guanosine-5'triphosphate), GTPγS (guanosine 5'-O- (3-thiotriphosphate), 和光純薬), HEPES (N-2hydroxyethyl-piperazine-2-ethanesulfonic acid, 同仁), newborn calf serum (Gibco), nifedipine (和光純薬), penicillin (明治製薬), pertussis toxin (islet activating protein, IAP, 科研製薬), Rp-cAMPS (adenosine-3',5'-cyclicmonophosphothioate Rp-isomer, Biolog Life Science Institute), streptomycin (萬有製薬), TEACI (tetraethylammonium chloride, Nacalai chemical), tetrodotoxin (和光純薬)

GTP γ S, GDP β S, Rp-cAMPS, ω -conotoxin GVIA, ω -agatoxin IVAは蒸留水に溶解後, 分注,凍結乾燥し冷凍保存した. Nifedipine, Bay K 8644はジメチルスルホキシド に溶解して冷凍保存し、ジメチルスルホキシドの実験液中の最終濃度が0.1%を越え ないようにした.その他の試薬は和光純薬の特級以上のものを用いた.

H 統計処理

本文中及び図中のデータは平均値±標準誤差 (n = 例数)で表示した. 有意差検 定はStudentの t 検定を用いて行い, 5%を統計学的有意水準とした. 直線, 指数曲

線,正規分布曲線への回帰は統計用ソフトウェア (Igor Pro, Wave Metrics)を用いて 行った.

- 17 -

III 結 果

A ブタ副腎髄質細胞のカルシウムチャネルのサブタイプ

1 培養ブタ副腎髄質細胞のカルシウム電流の電位-電流関係

直径8~15 mmの細胞を選択してカルシウム電流を観察した。 増幅器のC-slow 目盛りから読んだ細胞1個当たりの膜容量は5.2±0.2 pF (n = 90)であった.10 mM の外液CaCl2存在下で細胞を電位固定したのち、保持電位-80 mVから+15 mVへの脱 分極パルス与えたところ内向きの電流が見られた.この電流は外液に5 mMのCoCl₂ を添加することにより消失したので、電位依存性カルシウムチャネルを通るカルシ ウム電流であると同定した. 10 mM CaCl。存在下,保持電位-80 mVでの保持電流は-11.5 ± 0.9 pA (n = 90)であった. パッチ膜を破壊し, 電位固定を開始した直後, 20 秒間隔で与えた脱分極パルスによるカルシウム電流は徐々に増大していく傾向にあっ たので、カルシウム電流の振幅が安定するのを待ってから実験を開始した(3~5分 間). +15 mVまでの持続時間25 msの脱分極パルスで得られるカルシウム電流の振 幅の最大値は-341 ± 13 pA (n = 90)であった.まず,始めにカルシウム電流の電位-電流関係を調べた.保持電位-80 mVで様々な電位 (-70~+100 mV)までの脱分極パ ルスを20秒間隔で与えた、その時の典型的なカルシウム電流の波形を図3Aに示し た. 内向きカルシウム電流は-30 mVより正の電位へのパルスにより見られ、与えた 電位の上昇に連れて増大し+10 mVで最大となった. それ以上の電位では逆に, 内 向き電流は減少し、+70~+80 mV付近で電流は外向きになった(図3B). 10 mM $CaCl_2存在下のカルシウム電流の反転電位は+74 \pm 2 mV (n = 9) であった. この電位-$ 電流関係は保持電位を-100 mVから-60 mVまで変化させても影響されなかった.同 一細胞での5 mM CaCl。存在下の内向きカルシウム電流を観察したところ、振幅は減

- 18 -



図3 ブタ副腎髄質細胞のカルシウム電流の電位-電流関係

A: 10 mM CaCl₂存在下で培養ブタ副腎髄質細胞に保持電位-80 mVから10 mVずつ

電位を上げた脱分極パルスを20秒間隔で適用したときの電流反応. B: Aの細胞での 10 mM (○)および5 mM CaCl₂ (●)存在下のカルシウム電流の電位-電流関係.

- 19 -

少し,振幅が最大となる電位はわずかに負の方向に移動した(図3B).いくつかの細胞で,+10 mV付近の様々な電位のパルスによるカルシウム電流を10 mM CaCl₂存在 下で調べたところ,ほとんどの細胞で+15 mVへの脱分極パルスによるカルシウム 電流が最も大きかったので,10 mM CaCl₂存在下でカルシウム電流に対する薬物の 作用を観察する場合には,+15 mVへの脱分極パルスを用いることにした.

2 カルシウム電流の不活化曲線

保持電位を・80 mVから0 mVまで変化させながら、+15 mVまでのパルスにより カルシウム電流を起こした.1個の細胞で、ある保持電位でのカルシウム電流の振 幅が安定してから、より正の保持電位へ変化させた.カルシウム電流は、時間とと もに振幅が減少する (rundown)傾向があったので、このrundownの不活化曲線への影 響を少なくするため1細胞につき、3もしくは4種の保持電位でのカルシウム電流の 観察にとどめた.図4に保持電位・80 mVでのカルシウム電流の振幅の最大値に対す る、各保持電位でのカルシウム電流の最大値の相対値を示した.カルシウム電流は 保持電位-50 mV以上で減少し始め、保持電位約-40mVで1/2まで減少し、保持電位-10 mVで消失した.

3 カルシウムチャネル抑制薬の作用

カルシウム電流を20秒間隔で発生させながらL型カルシウムチャネル抑制薬で あるnifedipine (10 μM), N型カルシウムチャネル抑制薬であるω-conotoxin GVIA (1

 μ M)あるいはP/Q型カルシウムチャネル抑制薬である ω -agatoxin IVA (0.1 μ M)を適用 した (図5). Nifedipineは40秒以内 (投与後2回目の刺激)にカルシウム電流を減少さた. ω -Agatoxin IVAはカルシウム電流を徐々に減少させ、2分以内に最大抑制となった. ω -Conotoxin GVIAによるカルシウム電流の抑制はゆっくりと進行し、最大抑制に達

- 20 -



図4 電位依存性カルシウム電流の不活化曲線

10 mM CaCl₂存在下で保持電位を-80 mVから正の方向へ0mVまで変化させながら 20秒間隔で+15 mVへの脱分極パルスを適用した.各保持電位でのカルシウム電流 の振幅が安定してから次の保持電位へと変化させた.〇印は,各細胞の保持電位-80 mVでの振幅に対する相対値を表す.実線はBoltzmanの式により回帰した曲線である. 振幅が半減した電位は約-40 mVであった.





図5 カルシウム電流に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

10 mM CaCl₂存在下で保持電位-80 mVから+15mVまでの脱分極パルスを20秒間隔 で与えカルシウム電流を誘発しながら、0sの時点からnifedipine (〇, 10 μ M)、 ω agatoxin IVA (Δ , 0.1 μ M)および ω -conotoxin GVIA (\Box , 1 μ M)を適用した.

- 22 -

するのに284±31 秒 (n = 5)を要した. この ω -conotoxin GVIAによるカルシウム電流の抑制の時間経過を1次指数関数と仮定した場合,時定数は135±17秒 (n = 5)であった. ω -Conotoxin GVIA (1 μ M), nifedipine (10 μ M)および ω -agatoxin IVA (0.1 μ M)存在下のカルシウム電流は、それぞれ抑制薬投与前の22±3% (n = 9), 85±4% (n = 5), 94±3% (n = 7)であった. Nifedipineによるカルシウム電流の抑制は薬物洗浄後に部分的に回復したが、 ω -conotoxin GVIAおよび ω -agatoxin IVAによるカルシウム電流の抑制は非可逆的であった.

4 カルシウムチャネル抑制薬によるカルシウム電流抑制反応の濃度依存性

保持電位-80 mVから持続時間25 msの+15 mVへの脱分極パルスでカルシウム 電流を起こしながら、様々な濃度のカルシウムチャネル抑制薬を適用した. カルシ ウム電流は繰り返し脱分極パルスを与えることにより減少 (rundown)する傾向があっ たので、1個の細胞につき2種の濃度のカルシウムチャネル抑制薬を適用し、濃度依 存性曲線を調べた. 図6に各濃度の抑制薬存在下で得られたカルシウム電流の最大 振幅を、薬物投与前の値に対する相対値で示した. ω-Conotoxin GVIAはカルシウム 電流を濃度依存性に抑制し、1~3 μ Mで最大となった. 3 μ M ω-conotoxin GVIA存在 下のカルシウム電流は投与前の13 ± 3% (n = 4)であった. Nifedipineとω-agatoxin IVAも濃度依存性にカルシウム電流を抑制した. ω-Agatoxin IVAは他の2種の抑制薬 と比較して量的に抑制作用は弱かったが、より低濃度でカルシウム電流を抑制した. Nifedipineは3~10 μ M, ω-agatoxin IVAは0.1 μ Mで最大抑制となり、10 μ M nifedipineと0.1 μ M ω-agatoxin IVA存在下ではそれぞれ抑制薬投与前の81 ± 2% (n =

4), 85±3% (n=5)となった. これらの値は最大抑制濃度の抑制薬を最初に適用した場合よりも小さかった. この結果は抑制薬 (特にω-agatoxin IVA)によるカルシウム電流の抑制が, rundownにより大きめに見積もられたことによると考えられる.

- 23 -



Relative Ca current

図6 カルシウムチャネル抑制薬によるカルシウム電流抑制の濃度依存性

10 mM CaCl₂存在下で保持電位-80 mVから+15 mVへの脱分極パルスを与えカルシ ウム電流を20秒間隔で誘発しながらカルシウムチャネル抑制薬を適用した.カルシ ウム電流の"rundown"によりカルシウムチャネル抑制薬の作用が大きく見積もられ るのを避けるため各々の細胞に適用するカルシウム抑制薬の濃度は2点にとどめた. 図中にはnifedipine (〇)およびω-agatoxin IVA (△)適用後2分,ω-conotoxin GVIA (□)適用後4分のカルシウム電流の振幅の最大値を,各々の細胞のカルシウム チャネル抑制薬非存在下の値に対する相対値で示した.

				- 24 -							

カルシウム電流の電位-電流関係に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用 5

細胞をnifedipine (10 µM), ω-conotoxin GVIA (1 µM)およびω-agatoxin IVA (0.1 µM)でそれぞれ2分間,4分間および2分間処置し,その前後で保持電位-80 mVから 各電位までのパルスによってカルシウム電流を起こし、電位-電流関係を調べた(図 7). カルシウム電流はいずれのカルシウムチャネル抑制薬の存在下でも+15 mVで 最大となり、電位-電流関係はカルシウムチャネル抑制薬では影響を受けなかった.

6 多種のサブタイプのカルシウムチャネルの共存

これまでの結果から、ブタ副腎髄質細胞にはnifedipine感受性のL型チャネル、 ω-conotoxin GVIA感受性のN型チャネルおよびω-agatoxin IVA感受性のP型チャネル が存在していることが示唆された. そこでこれら3種のチャネルが1つの細胞に共存 しているのかどうかを検討した.細胞に20秒間隔で+15 mVまでの脱分極パルスを 与えながら0.3 μ M ω -agatoxin IVA, 1 μ M ω -conotoxin GVIAおよび10 μ M nifedipine を適用した(図8).いずれのカルシウムチャネル抑制薬の適用によってもカルシウム 電流は減少し、3種の薬物の併用によりほぼ完全に抑制された.しかし、10細胞中3 細胞でこれら3種のカルシウム抑制薬処置後にも小さな内向き電流 (44 ± 11 pA) が 観察され、この電流は5 mM CoCl₂により消失した.

7 カルシウムチャネル抑制薬のカルシウム電流の不活化に対する作用

カルシウムチャネルには, 脱分極状態が持続すると不活化し閉口するという性 質がある.この不活化の時間経過がカルシウムチャネルのサブタイプによって異な ることが知られているので、カルシウムチャネル抑制薬のカルシウム電流の不活化 に対する作用を調べた.10 mM CaCl。存在下で細胞に持続時間1秒の+15 mVまでの

- 25 -

Relative Ca current Test pulse potential (mV) 100 50 -50 0.2 0.4 0.6 -0.8 -1.0 -00 100 -50 0. 0.4 0.6 -0.8 -1.0 --0.2 -50 100 -50 0.Z 0.4



図7.カルシウム電流の電位-電流関係に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

10 mM CaCl₂存在下, nifedipine (10 µM, ●), ω-conotoxin GVIA (1 µM, ■), ω -agatoxin IVA (0.1 µM, ▲)の存在下および非存在下 (〇, □, △)で保持電位-80 mVから様々な電位 (-70から+110 mV)への脱分極パルスを20秒間隔で適用した. 図中には誘発されたカルシウム電流の振幅の最大値を+15 mVの脱分極パルスによ るカルシウム電流の最大値に対する相対値で示した.





図8 同一細胞における3種のカルシウムチャネル抑制薬の作用

10 mM CaCl₂存在下で脱分極パルスによりカルシウム電流を20秒間隔で誘発しなが らω-agatoxin IVA, ω-conotoxin GVIAおよびnifedipineを順に適用した. 下段の 図中の1~4に対応したカルシウム電流の波形を上段に示した.

- 28 -

脱分極パルスを与えたところ,顕著な不活化を伴ったカルシウム電流が観察された (図9). この不活化の時間経過は2次指数関数的であり、その時定数は96±25 msと 793 ± 110 ms (n = 19)であった。Nifedipineとω-agatoxin IVAは1秒間のパルスの終 了時のカルシウム電流を電流の最大振幅の時点よりも大きく抑制した.即ち,wagatoxin IVA (0.1 µM)によるカルシウム電流の抑制は、最大振幅を3.4 ± 0.5%、パル ス終了時で31±3% (n = 6), nifedipine (10 µM)の場合, 最大振幅が15±2%, パル ス終了時が52 ± 3% (n = 6)であった.一方,ω-conotoxin GVIAは電流の最大振幅と パルス終了時の振幅をそれぞれ65±4%, 61±3% (n=7)と同程度に抑制した. 図9 中に点線で示したように、ω-conotoxin GVIAに感受性のカルシウム電流は1秒間の パルス中にその振幅が徐々に減少した.この時間経過は2次指数関数で回帰でき, 時定数は74 msと732 msであった.これに対し, nifedipine感受性カルシウム電流と ω-agatoxin IVA感受性電流はゆっくりと活性化し、不活化を起こさなかった.ブタ 副腎髄質細胞にnifedipine, ω-conotoxin GVIAおよびω-agatoxin IVA感受性の3種のカ ルシウムチャネルしか存在していないと仮定すれば, ω-agatoxin IVAとω-conotoxin GVIAの両抑制薬に耐性の電流がnifedipine感受性の電流であると考えられる.しか しながら, nifedipine感受性のカルシウム電流と異なり, ω-agatoxin IVAとωconotoxin GVIAに耐性の電流は1秒間のパルス中に徐々に減少する不活化を伴った カルシウム電流であった.

高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇に対するカルシウムチャ 8 ネル抑制薬の作用

Fura-2/AMを負荷した細胞に7分間隔で60 mMカリウム液を投与し、細胞内

fura-2の蛍光変化を測定した。細胞内カルシウム濃度は高濃度カリウム液を投与し ている間上昇し、カリウム濃度を6 mMに戻すと約1秒の潜時の後、下降し始めた

(図10). 静止時の細胞内カルシウム濃度は34 ± 2 nMで60 mM カリウムで刺激した

- 29 -



- 30 -

図9 カルシウム電流の不活化に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

10 mM CaCl₂存在下で保持電位-80 mVから+15 mVまでの1秒間の脱分極パルスを 細胞に与えカルシウム電流を誘発した.(上段)Nifedipine (10 µM)あるいはωconotoxin GVIA (1 µM)の存在下および非存在下のカルシウム電流波形.(下段)ωconotoxin GVIA (1 µM),ω-agatoxin IVA (0.1 µM)あるいはnifedipine (10 µM)存 在下(それぞれ■,▲,●)及びカルシウムチャネル抑制薬非存在下(〇,□,△)で 得られたバリウム電流の振幅をそれぞれの細胞でのバリウム電流の最大振幅に対す る相対値で表し,パルス開始からの時間に対してプロットした.また,これらのカ ルシウムチャネル抑制薬により抑制されたカルシウム電流(薬物非存在下の電流 – 薬 物存在下の電流)を点線で表示した.さらに,ω-conotoxin GVIA及びω-agatoxin IVAを適用した場合の結果も表示した(▽,▼).




図10 高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応

Fura-2/AMを処置した細胞に5秒間,高濃度カリウム(60 mM)を適用したときの細胞内カルシウム濃度の経時変化を示した.典型的な一例を示す.



時には314±2 nMまで上昇した. この反応は繰り返し刺激により徐々に減少する傾向にあり,通常前の反応の10~20%ずつ減少した. カルシウムチャネル抑制薬の作用は3回目の反応について観察した(図11). その後,カルシウムチャネル抑制薬を除去し,4回目の反応を観察した.表1に1回目から4回目までの高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇反応の大きさをまとめた.薬物未処置の対照群,nifedipine,ω-conotoxin GVIAおよびω-agatoxin IVA存在下の反応は、1回目の反応のそれぞれ65%、31%、32%および67%であった.繰り返し高濃度カリウム刺激による反応の減衰を考慮に入れると、細胞内カルシウム濃度上昇反応はω-agatoxin IVAでは抑制されず、ω-conotoxin GVIAとnifedipineによってはそれぞれ50%ずつ抑制されたことになる. Nifedipineによる抑制は薬物除去後に部分的に回復したが、ω-conotoxin GVIAによる抑制は回復しなかった.

9 高濃度カリウム刺激によるカテコールアミン放出反応に対するカルシウムチャ ネル抑制薬の作用

培養ブタ副腎髄質細胞を正常液で15分間、37℃でインキュベーションすると細胞含量の2.4±0.3% (n = 20)の自発的なカテコールアミン放出が見られた.この、 正常液中での自発的なカテコールアミン放出はω-agatoxin IVA (0.1 μ M)、 ω conotoxin GVIA (1 μ M)およびnifedipine (10 μ M)で影響を受けなかった。細胞を60 mMカリウム液中でインキュベーションすると有意なカテコールアミン放出反応が 認められ、この反応をnifedipine (10 μ M)は53±9% (n = 6)、 ω -conotoxin GVIA (1 μ M)は48±12% (n = 6)抑制したが、 ω -agatoxin IVAは抑制しなかった (図12).





1min



図11 高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応に対するカルシウ ムチャネル抑制薬の作用

Fura-2/AMを処置した細胞に7分間隔で高濃度カリウム (60 mM, 5秒間)による刺激 をくり返し行い,3回目の刺激の3分前から10 μM nifedipine,1 μM ω-conotoxin GVIAあるいは0.1 μM ω-agatoxin IVAを適用した.



表1 高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応に対するカルシウ ムチャネル抑制薬の作用

			a second second second second second second second		
	1st	2nd	3rd	4th	n
Control	351±59	279±50	231±37		14
Nifedipine	367±57	318±40	115±25**	167±25	10
ω -Conotoxin GVIA	324±87	285±61	106±28*	97±22	5
ω-Agatoxin IVA	275±69	255±66	186±54	149±39	10
				(Δ[Ca	$[2^{2+}], nM)$

高濃度カリウム(60 mM)刺激は7分間隔で5秒間ずつ行った.3回目の刺激 はそれぞれカルシウムチャネル抑制薬非存在下(Control), nifedipine (10 μ M), ω conotoxin GVIA (1 μ M)および ω -agatoxin IVA (0.1 μ M)存在下で行った.表中に は静止時の細胞内カルシウム濃度を差し引いた,高濃度カリウム刺激による正味の カルシウム濃度上昇の値を示した.*P<0.05, **P<0.01 (各々細胞群の前の反 応に対して).







図12 高濃度カリウム刺激によるカテコールアミン放出反応に対するカルシウムチャ ネル抑制薬の作用

細胞を正常液中で37℃,20分間あらかじめインキュベーションした後,正常液中および高濃度カリウム液中で15分間インキュベーション(テストインキュベーション) し、その間に細胞から放出されたカテコールアミン量を細胞含量に対する百分比で 示した.カルシウムチャネル抑制薬を適用する場合には、刺激5分前から刺激終了 まで適用した.氷上に25分間静置した細胞からのカテコールアミン放出量を細胞の 障害による放出と考え、得られた値より差し引いた.****P*<0.001 vs basal. †† *P*<0.01, ††† *P*<0.001 vs 60 K.



B 脱分極プレパルスによるバリウム電流の増強とそのメカニズム

1 バリウム電流に対する脱分極プレパルスの効果

培養ブタ副腎髄質細胞に5 mM BaCl₂存在下で,保持電位-80 mVから様々な電位 (-70~+70 mV)への脱分極パルスを与えると、バリウムイオンの細胞内への流入に 起因する内向きの電流が観察された.このバリウム、電流の電位-電流関係から内向 き電流の振幅は0mVで最大となることが示されたので、以下の実験では0mVへの 脱分極パルスをテストパルスとして用いた。細胞を電位固定したのち20秒間隔でテ ストパルスを与えてバリウム電流を観察した.その結果,電流の振幅は測定開始か ら徐々に増大し、3分以内に安定した.それ故、以下の実験はバリウム電流の振幅 が安定してから行った.5 mM BaCl2存在下における保持電位-80 mVでの保持電流は -8.9±0.8 pA (n = 134), 0 mVへのテストパルスによるバリウム電流の最大振幅は-422 ± 19 pA (n = 134)であった. テストパルス (0 mV, 50 ms)に先立ち, 持続時間 150 msの+100 mVへの脱分極パルス (プレパルス)を適用すると、テストパルスによっ て誘発されたバリウム電流の振幅が増大した (バリウム電流のfacilitation,図13A). 図13Bに136細胞で得られたプレパルスによるバリウム電流の増強率のヒストグラ ムを示した。
増強率はテストパルス開始から10 ms後のバリウム電流の振幅から計 算した.バリウム電流は上記の条件のプレパルスによって平均 1.14 ± 0.02 (n= 134)倍まで増大した.また、図13Bの挿入図に示したように増強率は各々の細胞の バリウム電流の振幅には依存していなかった.

2 プレパルスの電位に依存するバリウム電流のfacilitation

細胞に持続時間150 msの様々な電位のプレパルスを与えた後, 10 msの間隔を

おいて与えたテストパルス (0 mV, 25~50 ms)によるバリウム電流の振幅を、プレ

- 38 -





図13 脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大(facilitation)

A: 5mM BaCl₂存在下で保持電位-80mVから0mVまでの脱分極パルス (テストパルス)に先立って、+100mVへの持続時間150msのパルス (プレパルス)を適用した (●). プレパルス終了からテストパルスの開始までの時間 (パルス間隔)は10msとした. この細胞では約20%の振幅の増大が見られた. B: バリウム電流の脱分極プレパルスによる増強率の134細胞でのヒストグラム. 挿入図には各細胞のバリウム電流の振幅とプレパルスによる増大率との相関関係を示した.



パルスを与えなかったときの振幅と比較した (図14). -20 mVおよび0 mVへのプレ パルスは,それに引き続いて適用したテストパルスによるバリウム電流を減少させ た.+20 mV以上へのプレパルスはテストパルスによるバリウム電流を増大させ, 増大率は+80 mVのプレパルス電位で最大となった.

3 プレパルス持続時間に依存するバリウム電流のfacilitation

バリウム電流のfacilitationが生じるのに必要なプレパルス持続時間を調べるために、様々な持続時間 (5~150 ms)のプレパルス (+100 mV)を与えた後、10 msの間隔をおいてテストパルス (0 mV, 25~50 ms)を与え、得られたバリウム電流の振幅を、プレパルスを与えなかったときの振幅と比較した (図15). バリウム電流の増大率はプレパルスの持続時間の延長に伴って上昇し、持続時間50 msでほぼ最大となった. この時間経過は、時定数約10 msの1次指数関数で回帰できた.

4 プレパルスとテストパルスの間隔に依存するバリウム電流のfacilitation

脱分極プレパルスの効果が保持電位において消失するのに必要な時間を調べる ために,細胞に持続時間 150 msの+100 mVへのプレパルスを与えた後,様々な時 間 (パルス間隔,10~800 ms)をおいてから与えたテストパルス (0 mV,25~50 ms) によるバリウム電流の振幅を,プレパルスを与えなかったときの振幅と比較した (図16).バリウム電流の増大率はパルス間隔の延長に伴って減少し,パルス間隔 800 msで明白なfacilitationは見られなくなった.この時間経過は時定数約300 msの

1次指数関数で回帰できた. - 41 -



図14 バリウム電流のfacilitationのプレパルス電位依存性

5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80 mVから0 mVへの脱分極パルス (テストパルス)に 先行して,様々な電位への持続時間150 msのパルス (プレパルス)を適用した.パル ス間隔は10 msに固定した.図中にはプレパルスを与えないときのバリウム電流の振 幅に対するプレパルス適用後のバリウム電流の振幅の相対比を示した.以降の実験 では+100 mVまでのプレパルスを用いた.上段には用いたパルスプロトコールを示





図15 バリウム電流のfacilitationのプレパルス持続時間依存性 5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80 mVから0 mVまでのテストパルスに先行して、パ

ルス間隔10 msで+100 mVまでの様々な持続時間のプレパルスを適用した. 図中の 実線は時定数10 msの1次指数曲線. 図中にはプレパルスを与えないときのバリウム 電流の振幅に対するプレパルス適用後のバリウム電流の振幅の相対比を示した. 上 段には用いたパルスプロトコールを示した.

- 43 -



図16 バリウム電流のfacilitationのパルス間隔時間依存性

5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80 mVから0 mVへのテストパルスに先行して,様々 なパルス間隔で+100 mVまでの持続時間150 msのプレパルスを適用した.図中の 実線は時定数300 msの1次指数曲線.図中にはプレパルスを与えないときのバリウ ム電流の振幅に対するプレパルス適用後のバリウム電流の振幅の相対比を示した. 上段には用いたパルスプロトコールを示した.

- 44 -

5 サイクリックAMP類似物質とforskolinの作用

ウシの培養副腎髄質細胞において、ジヒドロピリジン感受性のL型カルシウム チャネルは、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA)によってリン酸化 されるとチャネルを通る電流が増大すること、更にこの機構が脱分極プレパルスに よるカルシウムチャネル電流の増大に関与していることが報告されている (Artalejo et al., 1990; Artalejo et al., 1991; Artalejo et al., 1992b). そこで, 細胞膜透過性のサイク リックAMP類似物質である8-Bromo-cAMPとアデニル酸シクラーゼの活性化薬であ るforskolinのバリウム電流に対する作用を調べた。用いたパルス・プロトコールは 図13Aと同様である. 8-Bromo-cAMP (1 mM)およびforskolin (10 µM)を細胞に投与す ると、バリウム電流はそれぞれ81.8 ± 4.2% (n = 20)および79.9 ± 2.7% (n = 21)まで 減少した (図17A, B). この, バリウム電流の減少は薬物除去後も回復しなかった. また, forskolinの抑制作用はPKAのサイクリックAMP拮抗薬であるRp-cAMPS (Van Haastert et al., 1984; Kozlowski et al., 1994)でも阻害されなかった. この結果から forskolinによるバリウム電流の抑制はPKAの活性化を介していないと考えられた. 一方, 8-Bromo-cAMP, forskolinともバリウム電流のプレパルスによる増大率には影 響を与えなかった (図17). 更に、細胞内にパッチ電極を介してRp-cAMPSを適用し てもバリウム電流の振幅(対照:-435±115 pA, n = 4, Rp-cAMPS存在下:-317± 39 pA, n = 7), プレパルスによる増大率ともに影響されなかった (図18B).

6 GTPγSとGDPβSの作用

ニューロン (Carbone & Swandulla, 1989)や副腎髄質細胞 (Albillos et al., 1994;

Doupnik & Pun, 1994; Albillos et al., 1996b)では, 脱分極がGTP結合蛋白 (G蛋白)によるカルシウムチャネルの抑制を解除すること, この機構がプレパルスによるカルシウムチャネル電流のfacilitationを担っていることが報告されている. この仮説を検

- 45 -





図17 バリウム電流のfacilitationに対するforskolinおよび8-Bromo-cAMPの作用

A,B: forskolin (10 µM)あるいは8-Bromo-cAMP (3 mM)の存在下と非存在下でバリウム電流のfacilitationを観察した.5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80mVから0mVへのテストパルスに先行して、パルス間隔10 msで+100 mVへの持続時間150msのプレパルスを適用した.C: forskolinあるいは8-Bromo-cAMP適用前(白カラム)と適用後(斜線カラム)の脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大率の平均値を示した.

- 47 -



図18 バリウム電流のfacilitationに対するRp-cAMPSの作用

THE STREET CONTRACTOR

A: 細胞内にRp-cAMPS (1 mM)を添加した細胞に5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80 mVから0 mVまでのテストパルスと、これに先行してパルス間隔10 msで+100 mV

までの持続時間150 msのプレパルスを適用した(●). B:細胞内にRp-cAMPSを添加した細胞群(黒カラム)と添加していない細胞群(白カラム)での脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大率の比較.

- 48 -

証する目的で、細胞内にパッチ電極を介してダアニンヌクレオチド類似物質である GTPγSとGDPβSを適用し、バリウム電流とそのfacilitationに対する作用を検討した. 用いたパルス・プロトコールは図13Aと同様である.細胞内をGTPを含まない細胞 内液で灌流すると、プレパルスによるバリウム電流の増大率は0.2 mM GTP存在下 と比較して有意に減少した(1.07 ± 0.03, *n* = 11).細胞内にG蛋白活性化薬である GTPγS(100 μM)を適用すると、バリウム電流の活性化は著しく緩徐になり25 msの テストパルス中には最大に達しなかった(図19A).バリウム電流の振幅をテストパ ルスの開始から10 msの時点で測定したところ、GTPγS非存在下と比較して有意に バリウム電流の振幅は増大する傾向にあった.一方、プレパルス適用後のテストパ ルスによるバリウム電流の振幅はGTPγS、GDPβSの有無に関わらず一定であった (図19B). これらの結果、プレパルスによるバリウム電流の増大率はGTPγS存在下で 有意に増大し、GDPβS存在下で有意に減少することを示している(図19C).

7 カルシウムチャネル抑制薬の作用

初めに、どのサブタイプのカルシウムチャネルがG蛋白により抑制されるかを 調べた (図20). 細胞内をGTP, GTPγS,あるいはGDPβSを含む細胞内液で灌流し、バ リウム電流に対するω-conotoxin GVIA, nifedipineおよびω-agatoxin IVAの抑制作用 を比較検討した. 0.2 mM GTPを含む細胞内液で灌流した細胞では、ω-agatoxin IVA (0.1 μ M), nifedipine (10 μ M)およびω-conotoxin GVIA (1 μ M)はバリウム電流をそれぞ れ10.1 ± 1.6% (n = 8), 14.0 ± 1.3% (n = 5), 78.3 ± 3.5% (n = 5)抑制した. 図19に

示したようにGTP_YS (100 μ M)はバリウム電流の振幅を減少させた.逆にGDP_βSはバ リウム電流の振幅を増大させる傾向を示した. ω -conotoxin GVIAによるバリウム電 流の抑制率は, GTP_YSを適用した細胞の方がGTPを適用した細胞より大きく, nifedipineによるバリウム電流の抑制率は小さかった. GTPを適用した細胞群と

- 49 -





図19 バリウム電流とそのfacilitationに対するGTPγSおよびGDPβSの作用

正常細胞内液 (0.2 mM GTPを含む)および0.1 mM GTPγSあるいは0.1 mM GDPβS を添加した細胞内液で灌流した細胞に、5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80 mVから0 mVまでのテストパルスと、その前にパルス間隔10 msで+100 mVへの持続時間150 msのプレパルスを適用した.A: プレパルス有り(●)および無し(○)の典型的な電流 反応.B: プレパルス有り(白カラム)および無し(黒カラム)のバリウム電流の振幅の 平均値.C: バリウム電流の脱分極プレパルスによる増大率の平均値.**P*<0.05,*** *P*<0.001 vs GTP.





図20 GTPγSおよびGDPβSを添加した細胞のバリウム電流に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

正常細胞内液 (0.2 mM GTPを含む)および0.1 mM GTPγSあるいは0.1 mM GDPβS を添加した細胞内液で灌流した細胞に5 mM BaCl₂存在下で保持電位-80 mVから0 mVまでのテストパルスによりバリウム電流を惹起した. 図中にはカルシウムチャネ ル抑制薬適用前 (白カラム)と0.1 μM ω-agatoxin IVA (斜線カラム), 10 μM nifedipine (ドットカラム)および1 μM ω-conotoxin GVIA (黒カラム)適用後のバリ ウム電流の振幅の平均値を示した.



GDPβSを適用した細胞群の間では、いずれのカルシウムチャネル抑制薬によるバリ ウム電流の抑制率にも差は見られなかった.また、ω-conotoxin GVIA処置後のバリ ウム電流の振幅は、細胞内をGTP、GTPγS、GDPβSのいずれで灌流した細胞でもほと んど同じであった.これらの結果はG蛋白により主にN型カルシウムチャネルが抑 制されていることを示している.

次に,脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大に関与しているカルシウム チャネルのサプタイプを検討した.図21ではGTPγS (100 μM)を適用した細胞にテス トパルスをプレパルスの存在下と非存在下で交互に20秒間隔で適用したときのバリ ウム電流の波形と振幅を示した.バリウム電流の振幅はテストパルスの開始から10 msで測定した.プレパルスの存在下と非存在下のバリウム電流の振幅が安定してか ら、ωagatoxin IVA (0.1 μM), nifedipine (10 μM)およびωconotoxin GVIA (1 μM)を 順次適用した.ωagatoxin IVAとnifeidpineはいずれもプレパルス存在下と非存在下 のバリウム電流を同程度に抑制し、その差分の電流には影響しなかった.ω Agatoxin IVAとnifedipineの処置後に残ったバリウム電流は、その後のωconotoxin GVIAの適用によりプレパルスの存在下、非存在下ともにほとんど消失した.図22 にはGTPγS (100 μM)を適用した細胞のカルシウムチャネル抑制薬存在下、及び非存 在下のプレパルスによるバリウム電流の増大率を示した。Nifedipineの適用によりバ リウム電流の増大率は上昇し、ωconotoxin GVIAにより減少し、その値はほぼ1に なった。即ち、いずれの細胞においてもωconotoxin GVIAによりバリウム電流の facilitationは消失した.

GTPγSの非存在下においてもω-conotoxin GVIAはプレパルスによるバリウム電流のfacilitationを消失させた.それに加えて, Bay K 8644 (1 μM)を細胞に適用する

とプレパルス非存在下および存在下ともにバリウム電流の振幅は増加した (それぞ れ, 183 ± 59%および183 ± 63%, n = 5). プレパルスにより増大したバリウム電流 の振幅はBay K 8644非存在下で-50.2 ± 33.2 pA, 存在下で-41.0 ± 18.7 pA (n = 5) となり, 差は見られなかった.

- 53 -





縮高にアスドバルスをフレバルスの有りと無して又互に200%間隔で通加しパリアム 電流を発生させた.上段の1~4'で示した電流波形は下段の1~4'の反応と対応して いる.横線で表示した時間 ω -agatoxin IVA, nifedipineおよび ω -conotoxin GVIA を適用した.

- 54 -



図22 GTPyS存在下のバリウム電流のfacilitationに対するカルシウムチャネル抑制 薬の作用

 ω -Agatoxin IVA (0.1 μ M), nifedipine (10 μ M)および ω -conotoxin IVA (1 μ M)適 用前(白カラム)と適用後(斜線カラム)の脱分極プレパルスによるバリウム電流 の増強率の平均値を示した. * P<0.05, *** P<0.001, n.s. not significant.



図19に示したように、細胞内にGTPγSを適用するとバリウム電流の発生速度が 著しく遅くなった(活性化の遅延, kinetic slowing). そこで、バリウム電流の活性化 の速度を比較するために持続時間の長いテストパルス(1秒)をプレパルスの存在下と 非存在下で細胞に与えた(図23). GDPβS(100 μ M)を適用した細胞ではバリウム電流 の活性化の遅延は見られず、バリウム電流の振幅はテストパルスの開始から9.7 ± 0.5 ms (n = 21)で最大となった. GTPγS(100 μ M)を適用した細胞ではバリウム電流 の活性化の遅延が生じ、バリウム電流の最大振幅はテストパルスの開始から342 ± 32 ms (n = 6)で得られた. GTPγSを適用した細胞に脱分極プレパルスを適用するこ とにより活性化の遅延は消失し、バリウム電流の振幅は9.2 ± 0.6 ms (n = 6)で最大 となった. また、GTPγSを適用した細胞に吸っても ms (n = 6)で最大 となった. また、GTPγSを適用した細胞に吸ったす。 (図21参照). これらの結果は ω -conotoxin GVIAを適用することによっ ても活性化の遅延は消失したが、 ω -agatoxin IVAやnifeidpineでは消失しなかった (図21参照). これらの結果は ω -conotoxin GVIA感受性のN型カルシウムチャネルが脱 分極プレパルスにより増大し、G蛋白によりその活性化が抑制されていることを示 している.

8 百日咳毒素とコレラ毒素の作用

百日咳毒素とコレラ毒素は種々の細胞における生物学的反応へのG蛋白の関与 を調べる道具として用いられてきた (Gilman, 1987). 培養ブタ副腎髄質細胞を百日咳 毒素 0.5~1 µg/mlを含む培養液中で予めインキュベーション (5~12時間)すること により, Met-Enkephalinによるバリウム電流の抑制反応は減少した. しかしながら, バリウム電流の振幅および脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大率には影響

を与えなかった (図24). 一方, 細胞をコレラ毒素 1 µg/mlを含む培養液中で予めイ ンキュベーション (5時間)すると, バリウム電流の振幅は変化せずにプレパルスによ る増大率は有意に上昇した (図24).

- 56 -



A:細胞内にGTPγSおよびGDPβSを添加した細胞に、持続時間1sの保持電位-80mV

から0mVまでのテストパルスを適用した.GTPγSを添加した細胞ではプレパルス適 用後の電流も観察した.バリウム電流の波形はそれぞれの電流の振幅の最大値で標 準化して表示した.B:ω-conotoxin GVIA適用前後のプレパルス有り(●)および無 し(○)でのバリウム電流.

- 57 -



図24 バリウム電流とそのfacilitationに対する百日咳毒素およびコレラ毒素の作用

A: 百日咳毒素存在下 (0.5~1 µg/ml, 5~12 h)と非存在下,およびコレラ毒素存在下 (1 µg/ml, 5 h)と非存在下でであらかじめインキュベーションした細胞に保持電 位-80 mVから0 mVまでのテストパルスをプレパルス (100 mV, 150 ms, パルス 間隔10 ms)有り (黒カラム)と無し (白カラム)で適用してバリウム電流を惹起した. 図中にはバリウム電流の振幅の平均値を示した. B: Aの実験から得られた脱分極パ ルスによるバリウム電流の増大率の平均値を示した. * P<0.05, n.s. not significant.

- 58 -

IV 考察

A ブタ副腎髄質細胞のカルシウムチャネルのサブタイプ

カルシウム電流の電位・電流関係からブタ副腎髄質細胞には高閾値型 (High voltage-activated type)カルシウムチャネルのみが存在していることが明らかになった.最大濃度のω-conotoxin GVIA, nifedipineおよびω-agatoxin IVAはカルシウム電流をそれぞれ78%, 15%, 6%抑制した.カルシウムチャネルの選択的な抑制薬によるサブタイプの一般的な分類に基づくと,この結果はブタ副腎髄質細胞には少なくともジヒドロピリジン感受性のL型,ω-conotoxin GVIA感受性のN型およびω-agatoxin IVA感受性のP/Q型カルシウムチャネルの3種のサブタイプのカルシウムチャネルが存在していることを示唆している.同様の結果がウシ (Albillos *et al.*, 1993; Artalejo *et al.*, 1994)及びネコ (Albillos *et al.*, 1994)の副腎髄質細胞においても報告されている.使用したいずれのカルシウムチャネル抑制薬もカルシウム電流の電位-電流関係には影響せずにカルシウム電流の振幅を減少させたことから,これらの3種のサブタイプのカルシウムチャネルの活性化電位はほぼ類似していることが分かった.

ウシの副腎髄質細胞において、ω-conotoxin GVIAに感受性のない細胞や、カル シウム電流がω-conotoxin GVIAによって完全に消失してしまう細胞が存在すること が報告されている (Artalejo et al., 1992a). Artalejoらはこの結果からN型カルシウム チャネルが細胞間で不均一に存在していると考えた.また、L型カルシウムチャネ ルを介するカルシウム電流は通常のカルシウム電流には寄与しておらず、テストパ ルスの前に予め脱分極プレパルスを与えること (Artalejo et al., 1992b)やD₁ドーパミ ン受容体を刺激すること (Artalejo et al., 1990)によってはじめて出現すると報告され ている.しかし、本研究で得られたブタ副腎髄質細胞での実験成績はこれらのウシ 副腎髄質細胞での結果と大きく異なっている.同一の細胞に3種のカルシウムチャ

- 59 -

ネル抑制薬を順次適用した場合,いずれの細胞でも各カルシウムチャネル抑制薬は カルシウム電流を抑制した.即ち、全ての細胞にN型、L型、P/Q型の3種のカルシ ウムチャネルが存在しており, それぞれのサブタイプに特有の割合でカルシウム電 流に寄与していると考えられる.また、実験に用いた10細胞中3細胞で、上記の3種 のカルシウムチャネル抑制薬の存在下でも小さな内向き電流が残存したことはウシ の副腎髄質細胞での報告 (Albillos et al., 1993; Gandía et al., 1993; Gandía et al., 1995)と 一致しており,R型カルシウムチャネルの存在を示唆するものである.

ウシ (Artalejo et al., 1992a)およびネコ (Albillos et al., 1994)の副腎髄質細胞におい てω-conotoxin GVIAを適用した場合,カルシウム電流の抑制は2分以内に最大とな り、その後、電流の振幅は一定になるといわれている.しかし、ブタ副腎髄質細胞 ではω-conotoxin GVIAによるカルシウム電流の抑制はゆっくり進行し、定常状態に 到達するのに3分以上を要した。細胞周囲を灌流する液は200ms以内に完全に交換 できるので、ω-conotoxin GVIAによるカルシウム電流の抑制がゆっくり進行するの は液交換が遅いためとはいえない.また、カルシウムチャネルを介した電流の charge carrierにBa²⁺を用いた場合でも、ω-conotoxin GVIAによるバリウム電流の抑 制はゆっくりと進行したので、この結果は高濃度のCa²⁺によるω-conotoxin GVIAのN 型カルシウムチャネルへの結合阻害 (Ballesta et al., 1989)でも説明できない. ウシの 副腎髄質細胞のω-conotoxin GVIA感受性チャネルがニューロンのN型カルシウムチャ ネルと異なった電気生理学的特徴を有していることが報告されており (Artalejo et al., 1992a), 副腎髄質細胞のN型カルシウムチャネルには薬理学的特徴にも動物種差があ るのかも知れない.

B カテコールアミン放出に対する電位依存性カルシウムチャネルの関与

ウシとネコの副腎髄質細胞では、L型カルシウムチャネルの方がN型よりも効 率的にカテコールアミン放出を起すこと (Artalejo et al., 1994; Lopéz et al., 1994a;

- 60 -

Lopéz et al., 1994b), 一方ラット副腎髄質細胞では、いずれのサブタイプのカルシウ ムチャネルを介したカルシウム流入も同じ効率でカテコールアミン放出を起すこと が報告されている (Kim et al., 1995). ω-Conotoxin GVIAとnifedipineは60 mM カリウ ムによる細胞内カルシウム濃度の上昇反応をそれぞれ約50%抑制したが、ω-agatoxin IVAはまったく無効であった. ω-Agatoxin IVAがこの高濃度カリウム刺激による細 胞内カルシウム濃度上昇反応を抑制しなかったのはカルシウム電流に対する抑制反 応が小さかった、即ち、脱分極時の細胞外からのカルシウム流入に対するωagatoxin IVA感受性カルシウムチャネルの寄与の程度が小さいためであると考えら れる. ω-Conotoxin GVIA (1 μM)およびnifedipine (10 μM)の両薬物の処置後には, 高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応は8±2%(n=4)まで減少 した. この結果は、高濃度カリウム刺激時の細胞外からのカルシウム流入経路はL 型とN型カルシウムチャネルであることを示唆している。細胞内カルシウム濃度上 昇反応と同様に高濃度カリウム刺激によるカテコールアミン放出反応も,ωconotoxin GVIAとnifedipineにより約50%ずつ抑制されたが、ω-agatoxin IVAはほと んど作用を示さなかった.従って、ブタ副腎髄質細胞では、高濃度カリウム刺激に 応じてカテコールアミン放出を引き起こすカルシウムの流入経路は主にw-conotoxin GVIA感受性のN型カルシウムチャネルとnifedipine感受性のL型カルシウムチャネル であり、いずれのカルシウムチャネルを介して流入してきたカルシウムイオンも同 程度にカテコールアミン放出に関与するものと思われる.

ω-Conotoxin GVIAはカルシウム電流の振幅を約80%抑制したのに対して,高濃 度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇とカテコールアミン放出を約 50%抑制した.逆に,nifedipineはカルシウム電流の振幅を約20%抑制したのに対し て,高濃度カリウム刺激による両反応を約50%抑制した.このように両カルシウム チャネル抑制薬によるカルシウム電流の抑制率と高濃度カリウム刺激によるカテコー ルアミン放出の抑制率は一致していない.1秒間の脱分極パルスを用いた実験から, ω-conotoxin GVIA感受性のN型カルシウム電流の方が,ω-agatoxin IVA感受性のP/Q

- 61 -

型あるいはnifedipine感受性のL型カルシウム電流より速く不活化することが分かっ た. この結果はニューロンでの報告と一致している (Spedding & Paoletti, 1992; Miljanich & Ramachandran, 1995). 即ち, L型カルシウムチャネルを介したカルシウ ム電流はN型チャネルを介した電流よりも振幅は小さいが、不活化されにくいため により多くのカルシウムイオンを流入させることができると考えられる.

Nifedipineなどのジヒドロピリジン系のカルシウムチャネル抑制薬は一般的に脱 分極が持続すると、その抑制作用が強まることが知られている(Spedding & Paoletti, 1992). ブタ副腎髄質細胞に3種のサブタイプのカルシウムチャネルしか存在してい ないと仮定すると、ω-conotoxin GVIAおよびω-agatoxin IVAの両薬物に抑制されな いカルシウム電流とnifedipine感受性のカルシウム電流は、同じL型カルシウムチャ ネルを介した電流ということになる.しかし、この2つのカルシウム電流を比較し た結果大きな相違が認められた.即ち、1秒間の脱分極パルスを与えたとき、後者 はまったくその振幅が減少しないのに対して,前者は速やかな活性化の相と不活化 の相から成っていた.この結果は、前述の仮定が正しければ、膜電位+15 mVでは nifedipineによるカルシウム電流の抑制は時間とともに大きくなることを示している. カルシウム電流に対する抑制薬の作用を調べる際には、短い持続時間の脱分極パル スを用いて誘発した電流の振幅を測定したのに対して、高濃度カリウム刺激(5秒)は 長時間行ったので, nifedipineによっては高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウ ム濃度上昇反応の方がカルシウム電流よりも大きく抑制されたのかも知れない.

C カルシウムチャネル電流 (バリウム電流)のfacilitationを担う機構

カルシウムチャネルの電気生理学的な特徴の一つに脱分極プレパルスによるカ ルシウムチャネル電流のfacilitationがある (Dolphin, 1996). 本実験においても同様の 現象が見られた.-20 mVおよび0 mVへのプレパルスを与えると、その後に適用し たテストパルスによるバリウム電流の振幅は減少し、20mV以上の電位へのプレパ

- 62 -

ルスによって増大した.バリウム電流の振幅の減少はカルシウムチャネルの電位依存性不活化に起因しており,増加は電位依存性のバリウム電流のfacilitationに起因しているものと考えられ、ラット上頚神経節ニューロンでの報告と一致する (Ikeda, 1991).

副腎髄質細胞でのカルシウム (バリウム)電流のfacilitationを担っている機構に は2つの可能性が示されている.1つはG蛋白により定常的にかかっているカルシウ ムチャネルの抑制が脱分極により解除されるという機構であり (Albillos *et al.*, 1994; Doupnik & Pun, 1994; Albillos *et al.*, 1996a; Albillos *et al.*, 1996b; Currie & Fox, 1996), もう1つは,脱分極によりPKAが活性化されチャネルのリン酸化が起こるという機 構である (Artalejo *et al.*, 1992b).

ブタ副腎髄質細胞をGTPを含まない細胞内液で灌流すると、プレパルスによる バリウム電流の増大率はGTP存在下に比べて減少した.G蛋白を活性化するGTPγS の細胞内への適用は、バリウム電流の振幅を減少させプレパルスによる増大率を増 加させた.逆にGDPβSの適用によりバリウム電流の振幅は増大し、facilitationは消 失した.GTPγSによる増大 (facilitation)率の上昇はコントロールのバリウム電流の振 幅の減少と、GDPβSによるfacilitationの消失はコントロールのバリウム電流の振幅 の増加とそれぞれ関連があるようである.これらの結果からG蛋白の活性化はカル シウムチャネルの抑制を起こし、脱分極プレパルスによって解除されることが示唆 された.

図25にこの機構を1個のチャネルで模式的に示した. 静止状態 (Resting state)の 細胞ではカルシウムチャネルにG蛋白が結合した状態 (+G)と解離した状態 (-G)が平 衡状態にある.-G状態にあるカルシウムチャネルは脱分極テストパルスに応じて直 ちに開口できる (A)が, +G状態のチャネルは-G状態に移行してからでないと開口で きない. アゴニストやGTPγSによりG蛋白が活性化されると, +G状態のカルシウム チャネルの割合が増え, テストパルスによるカルシウム (バリウム)電流は小さくな る. 逆にGDPβSを適用したり, 脱分極プレパルスを与えると-G状態のカルシウムチャ

- 63 -



図25 G蛋白によるカルシウムチャネルの抑制とその解除

カルシウムチャネル (-G)にG蛋白が結合すると、カルシウムチャネルは開口をさま たげられた状態 (+G)になる.細胞が脱分極プレパルスを細胞に与えると、カルシウ ムチャネルに結合していたG蛋白が解離し、カルシウムチャネルが開口できる状態に 戻る (-G).その後、脱分極テストパルスを与えると、カルシウムチャネルは開口状 態となり (A)、細胞外よりカルシウムイオンが流入する.



ネルの割合が増え、テストパルスによる電流反応は大きくなる.

GTPvSを細胞内に適用すると特徴的なバリウム電流の活性化の遅延 (kinetic slowing)が起きた.同じ現象がネコ副腎髄質においても観察されている (Albillos et al., 1994). このカルシウムチャネル電流の活性化の遅延は予めかかっていたカルシ ウムチャネルへの抑制が, 脱分極パルス (テストパルス)中に徐々に解除されていく ことに起因すると考えられている (Carbone & Swandulla, 1989; Diversé-Pierlussi & Dunlap, 1993). これらの結果は脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大が, G 蛋白によるカルシウムチャネルの抑制が解除されることによるものであるという仮 説を更に裏づけるものである.

ブタ副腎髄質細胞のカルシウムチャネル電流の脱分極プレパルスによる facilitationにPKAによるチャネルのリン酸化が関与しているのであれば、ウシ副腎 髄質細胞で報告されているようにforskolinや8-Bromo-cAMPの適用によりカルシウム チャネル電流の振幅の増加が予測される (Artalejo et al., 1990; Artalejo et al., 1992b; Doupnik & Pun, 1992). しかし, 今回の実験ではこれらの結果は再現できなかったの に加えて、細胞内にPKA拮抗薬であるRp-cAMPSを添加しても、プレパルスによる バリウム電流のfacilitationに変化は見られなかった.また,最近,Artalejoらの結果 がウシ副腎髄質細胞でも追試できなかったとも報告されている (Albillos et al., 1996b; García & Carbone, 1996).

Dolphin (1996)は、チャネルのリン酸化を介したfacilitationのほうがG蛋白によ るチャネルの抑制の解除によるfacilitationより持続時間の長いプレパルスが必要で あると述べている.実際,心筋細胞ではリン酸化によるカルシウムチャネル電流の facilitationの立ち上がりを2次指数関数で回帰するとその時定数は130 msと8 sとな る (Sculptoreanu et al., 1993)のに対してG蛋白依存性に起こるニューロンのカルシウ

ムチャネル電流のfacilitationの立ち上がりは、時定数6.1 ms (Golard & Siegelbaum,

1993)あるいは15.6 ms (Ikeda, 1991)の1次指数関数で回帰できると報告されている.

本研究で得られたブタ副腎髄質細胞におけるバリウム電流のfacilitationの立ち上が

- 65 -

りの時定数は11 msであり、心筋細胞 (Sculptoreanu et al., 1993)よりも交感神経 ニューロン (Ikeda, 1991; Golard & Siegelbaum, 1993)のそれに近かった. この結果から も、心筋細胞のようにサイクリックAMP依存性の機構によりバリウム電流の facilitationが起こるにしてはプレパルスの持続時間が短すぎるようであり、 ブタ副 腎髄質細胞のバリウム電流の facilitation はG蛋白依存性機構によっていることが示 唆された.

Facilitationに関与するカルシウムチャネルのサブタイプ D

ウシ副腎髄質細胞においてリン酸化によるカルシウムチャネル電流の facilitationにL型カルシウムチャネルが関わっているのに対して (Artalejo et al., 1992b), G蛋白依存性機構にはL型以外のカルシウムチャネルが関与していると報告 されている (Albillos et al., 1994; Doupnik & Pun, 1994; Albillos et al., 1996a; Albillos et al., 1996b; Currie & Fox, 1996). また,発現されたN型カルシウムチャネルも同様にG 蛋白により抑制されると報告されている (Toth et al., 1996). ブタ副腎髄質細胞ではL 型カルシウムチャネル活性化薬であるBay K 8644は、ウシ副腎髄質細胞での報告と は異なり (Artalejo et al., 1991), プレパルスの存在下, 非存在下ともにバリウム電流 の振幅を増加させ、その差分の電流には影響を与えなかった. GTPySをブタ副腎髄 質細胞に適用するとGTPγS非存在下に比べてω-conotoxin GVIAによるバリウム電流 の抑制の程度が小さくなった.更に、ω-conotoxin GVIA処置後のバリウム電流の振 幅はGTPyS, GDPBSの処置に関わらず、ほぼ同じであった. 逆に、GTPySを適用す るとバリウム電流のnifedipineによる抑制率が増大した.即ち,GTPySにより抑制さ れるカルシウムチャネルは、ω-conotoxin GVIAに感受性がありnifedipineには感受性

がないことを意味している.また,GTPySによるバリウム電流の活性化の遅延

(kinetic slowing)もω-conotoxin GVIAの適用により消失したが、ω-agatoxin IVAなら

びにnifedipineの適用によっては消失しなかった.プレパルスによるバリウム電流の

- 66 -

増大もω-agatoxin IVAやnifedipineでは影響されなかったが、ω-conotoxin GVIA処置 後には消失した.これらの結果から、G蛋白により抑制され、脱分極プレパルスに より増大するバリウム電流は、主にω-conotoxin GVIA感受性のN型カルシウムチャ ネルであることが示された.

E カルシウムチャネルを抑制するG蛋白のサブファミリー

背根神経節ニューロンや副腎髄質細胞において、カルシウムチャネル電流が ATPやオピオイドなどのG_{i/o}サブファミリーのG蛋白に結合した受容体の刺激物質に よって抑制され、この抑制は脱分極プレパルスにより部分的に解除されることが報 告されている (Campbell *et al.*, 1993; Doupnik & Pun, 1994; Albillos *et al.*, 1996a; Albillos *et al.*, 1996b; Currie & Fox, 1996; Otsuguro *et al.*, 1996). ウシ副腎髄質細胞において、 細胞を持続的に灌流している条件下よりも灌流を停止した場合の方がカルシウム (バリウム)電流の振幅が小さいこと、脱分極プレパルスによるfacilitationが大きいこ とから、副腎髄質細胞から自発的に放出された内因性のATPやオピオイドがプリン 受容体やオピオイド受容体を介して影響を与えている可能性が示唆されている (Doupnik & Pun, 1994; Albillos *et al.*, 1996b; Currie & Fox, 1996). しかし、本研究では, G_{i/o}サブファミリーのG蛋白と受容体との結合を阻害する百日咳毒素 (West *et al.*, 1985; Katada *et al.*, 1986; Hoshino *et al.*, 1990)で細胞を処置しても、バリウム電流の振 幅やプレパルスによるfacilitationには影響が見られなかった. この結果は、細胞を 常に灌流する今回の実験条件下では、G_iサブファミリーのG蛋白結合型受容体の活 性化は生じていないことを示している. 即ち、G_iサブファミリーとは異なるG蛋白

によるカルシウムチャネルの持続的な抑制がかかっていることが示唆される.

コレラ毒素はG。サブファミリーのG蛋白をGTPase活性を低下させることにより

非可逆的に活性化することが知られている (Neer, 1995).本実験では、コレラ毒素は

- 67 -
バリウム電流の振幅には影響を与えずに、プレパルスによるバリウム電流の増大率 を上昇させた.上頚神経節ニューロンではコレラ毒素感受性のG_sサブファミリーの G蛋白が、VIP (vasoactive intestinal polypeptide)によるカルシウムチャネル電流の 抑制を仲介していると報告されている (Zhu & Ikeda, 1994). 従って、コレラ毒素は G_s蛋白依存性機構によりバリウム電流のプレパルスによる増大を亢進させているの かもしれない.しかし、プレパルスを与えなかったときのバリウム電流の振幅を減 少させるというGTP_YSの作用とは異なり、コレラ毒素はバリウム電流の振幅そのも のには影響しなかった.このGTP_YSとコレラ毒素の作用の差はG_s蛋白に対する活性 化作用がコレラ毒素の方が弱いためであるということで説明できる.コレラ毒素は 一般的に細胞内サイクリックAMP濃度を上昇させPKAを活性化するといわれている (Gilman, 1987; Neer, 1995). 細胞をコレラ毒素存在下でインキュベーションしている 間にカルシウムチャネル自身、あるいはプレパルスによるカルシウム電流の facilitationに関連した何らかの蛋白のリン酸化が起こっているのかもしれない.こ のコレラ毒素のカルシウムチャネル電流の作用については更に検討することが必要 である.



V総括

ブタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネルの性質を調べるために,培 養細胞を用いて,whole-cell voltage clamp法によるカルシウム (バリウム)電流の測定, 高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応ならびにカテコールアミ ン放出反応の測定を行い,以下の成績を得た.

- カルシウム電流の電位・電流関係からブタ副腎髄質細胞には高閾値型カルシウ ムチャネルのみが存在していることが明らかになった.このカルシウム電流は w-conotoxin GVIA, nifedipineおよびw-agatoxin IVAにより,程度に差はあった が,それぞれ濃度依存性に抑制された.最大濃度による抑制の割合はそれぞれ 78%,15%,6%であった.また,これら3種の薬物を同一細胞に適用するとカ ルシウム電流は相加的に抑制された.
- カルシウムチャネル抑制薬の存在下で1秒間の脱分極パルスを与えカルシウム電流の不活化の時間経過を観察したところ、ω-conotoxin GVIA感受性の電流の方がnifedipineあるいはω-agatoxin IVA感受性の電流より速く不活化した.
- ω-Conotoxin GVIA (1 μM)とnifedipine (10 μM)は,高濃度カリウム刺激による 細胞内カルシウム濃度上昇反応とカテコールアミン放出反応を約50%ずつ抑制 したが、ω-agatoxin IVA (0.1 μM)は無効であった.ω-Conotoxin GVIAと nifedipineの併用により両反応はほとんど完全に抑制された.
- 4. 保持電位-80 mVから0 mVへのテストパルスに先行して,強い脱分極 (+100 mV)パルス (プレパルス)を与えると,テストパルスによるバリウム電流の振幅

は約1.2倍に増大した (バリウム電流のfacilitation). このfacilitationはプレパル ス電位の上昇 (+20 mV以上で)もしくは持続時間の延長にしたがって増大した. また,プレパルスとテストパルスの間隔の延長によってfacilitationは減少した.

- 69 -

- 細胞に8-Bromo-cAMP (1 mM)あるいはforskolin (10 µM)を適用するとバリウム 電流の振幅は減少したが、プレパルスによるバリウム電流のfacilitationには影 響がなかった.また、細胞内のRp-cAMPSはバリウム電流の振幅、facilitation ともに影響を与えなかった.
- 細胞内にGTPγSを添加するとバリウム電流の振幅は減少したが、プレパルス により増強されたバリウム電流の振幅はGTPγS非存在下と差がなかった、一方、 GDPβSを添加するとバリウム電流の振幅は増大する傾向となったが、プレパ ルスにより増強されたバリウム電流の振幅はGDPβS非存在下と差がなかった.
 その結果、GTPγS存在下ではプレパルスによるバリウム電流のfacilitationは大 きく増大し、GDPβS存在下ではほぼ消失した.
- GTPγSで抑制されたバリウム電流はω-conotoxin GVIAに感受性であったが、 nifedipineには非感受性であった.また、プレパルスによるバリウム電流の facilitationはω-conotoxin GVIAによって消失したが、ω-agatoxin IVAおよび nifedipineでは影響されなかった.更に、Bay K 8644 (1 μM)はバリウム電流を 約80%増大させたが、プレパルスによるfacilitationには影響を与えなかった.
- 細胞内にGTPγSを添加するとバリウム電流の活性化の遅延 (kinetic slowing)が 生じた、このバリウム電流の活性化の遅延をω-conotoxin GVIAおよび脱分極プ レパルスは消失させた.
- 9. バリウム電流の振幅とプレパルスによるfacilitationは共に百日咳毒素では影響を受けなかったが、コレラ毒素はバリウム電流のfacilitationを増大させた.

以上の成績から、ブタ副腎髄質細胞にはω-conotoxin GVIA感受性のN型, nifedipine 感受性のL型およびω-agatoxin IVA感受性のP/Q型チャネルが存在しており、脱分極 時の細胞内カルシウム濃度の上昇およびカテコールアミン放出には主にN型とL型の カルシウムチャネルが寄与していることが明らかになった.また、脱分極プレパル スによるバリウム電流のfacilitationには主にN型カルシウムチャネルが関与しており、

- 70 -

その機構は脱分極によりプロテインキナーゼAによるカルシウムチャネルのリン酸 化が起こるのではなく,あらかじめかかっていたカルシウムチャネルのG蛋白によ る抑制が解除されることであることが示された.更に,この機構にはG_iサブファミ リーではなくG_sサブファミリーのG蛋白が関与している可能性が示された.



謝 辞

稿の終わり臨み,終始御指導,御校閲くださいました中里幸和教授ならびに 伊藤茂男助教授に厚くお礼申し上げます.御校閲いただきました北海道大学大学院 獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室 葉原芳昭教授ならびに生化学教室 斉藤昌之教授にお礼申し上げます.本論文を作成するにあたり終始御指導ください ました診断治療学講座臨床分子生物学教室 太田利男助教授にお礼申し上げます. また,ブタ副腎の入手にあたり便宜を取り計らっていただいた北海道江別食肉検査 事務所の皆様にお礼申し上げます.最後に,種々の御協力をくださいました薬理学 教室の教室員の皆様に感謝いたします.

About 1 to the there will be a construction of the state of the state

A Resident dit in eiter signische States in der States

ADA ALTERS C.B., DALEMER, M.K., PEBLALAN, L., ALE C. A.F. (1999). The application of the second second second states of the second second



参考文献

- ALBILLOS, A., ARTALEJO, A.R., LÓPEZ, M.G., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. & 1. CARBONE, E. (1994). Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. J. Physiol., 477, 197-213.
- ALBILLOS, A., CARBONE, E., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. & POLLO, A. 2. (1996a). Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells selectivity of action and voltage-dependence. Eur. J. Neurosci., 8, 1561-1570.
- ALBILLOS, A., GANDÍA, L., MICHELENA, P., GILABERT, J.A., DELVALLE, 3. M., CARBONE, E. & GARCÍA, A.G. (1996b). The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. J. Physiol., 494, 687-695.
- ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. & GANDÍA, L. (1993). ω-Agatoxin-IVA-sensitive 4. calcium channels in bovine chromaffin cells. FEBS Lett., 336, 259-262.
- ANWYL, R. (1991). Modulation of vertebrate neuronal calcium channels by 5. transmitters. Brain Res. Rev., 16, 265-281.
- ARTALEJO, C.R., ADAMS, M.E. & FOX, A.P. (1994). Three types of Ca²⁺ channel 6. trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature, 367, 72-76.
- ARTALEJO, C.R., ARIANO, M.A., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1990). 7. Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D₁ dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. Nature, 348, 239-242.
- ARTALEJO, C.R., DAHMER, M.K., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1991). Two 8. types of Ca²⁺ currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. J. Physiol., 432, 681-707.

- 73 -

ARTALEJO, C.R., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1992a). w-Conotoxin GVIA 9. blocks a Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. Neuron, 8, 85-95.

- ARTALEJO, C.R., ROSSIE, S., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1992b). Voltagedependent phosphorylation may recruit Ca²⁺ current facilitation in chromaffin cells. *Nature*, 358, 63-66.
- BALLESTA, J.J., BORGES, R., GARÍA, A.G. & HIDALGO, M.J. (1989). Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. J. Physiol., 418, 411–426.
- BOURINET, E., CHARNET, P., TOMLINSON, W.J., STEA, A., SNUTCH, T.P. & NARGEOT, J. (1994). Voltage-dependent facilitation of a neuronal α_{1C} L-type calcium channel. *EMBO J.*, 13, 5032–5039.
- 13. BROOKS, J.C. (1977). The isolated bovine adrenomedullary chromaffin cell: a model of neuronal excitation-secretion. *Endocrinology*, **101**, 1369–1378.
- CACHELIN, A.B., PEYER, J.E.D., KOKUBUN, S. & REUTER, H. (1983). Ca²⁺ channel modulation by 8-bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature*, 304, 462–464.
- 15. CAMPBELL, V., BERROW, N. & DOLPHIN, A.C. (1993). GABA_B receptor modulation of Ca²⁺ currents in rat sensory neurones by the G protein G_o: antisense oligonucleotide studies. J. Physiol., 470, 1–11.
- 16. CARBONE, E. & SWANDULLA, D. (1989). Neuronal calcium channels: Kinetics, blockade and modulation. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **54**, 31–58.
- 17. CURRIE, K.P.M. & FOX, A.P. (1996). ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca²⁺ channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 16, 1027-1036.
- DIVERSÉ-PIERLUSSI, M. & DUNLAP, K. (1993). Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron*, 10, 753-760.
- 19. DOLPHIN, A.C. (1995). Voltage-dependent calcium channels and their modulation
- by neurotransmitters and G proteins. *Exp. Physiol.*, **80**, 1-36.
- DOLPHIN, A.C. (1996). Facilitation of Ca²⁺ current in excitable cells. Trends Neurosci., 19, 35-43.
- 21. DOUPNIK, C.A. & PUN, R.Y.K. (1992). Cyclic AMP-dependent phosphorylation

- 74 -

modifies the gating properties of L-type Ca2+ channels in bovine adrenal chromaffin cells. Pflügers Arch., 420, 61-71.

- DOUPNIK, C.A. & PUN, R.Y.K. (1994). G-protein activation mediates prepulse 22. facilitation of Ca²⁺ channel currents in bovine chromaffin cells. J. Membr. Biol., 140, 47 - 56.
- FENWICK, E., MARTY, A. & NEHER, E. (1982). Sodium and calcium channels in 23. bovine chromaffin cells. J. Physiol., 331, 599-635.
- FORSBERG, E.J., LI, Q. & XU, Y. (1995). Cation channel activated by muscarinic 24. agonists on porcine adrenal chromaffin cells. Am. J. Physiol., 269, E43-E52.
- GANDÍA, L., ALBILLOS, A. & GARCÍA, A.G. (1993). Bovine chromaffin cells 25. possess FTX-sensitive calcium channels. Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 671-676.
- GANDÍA, L., BORGES, R., ALBILLOS, A. & GARCÍA, A.G. (1995). Multiple 26. calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. Pflügers Arch., 430, 55-63.
- GARCÍA, A.G. & CARBONE, E. (1996). Calcium-current facilitation in chromaffin 27. cells. Trends. Neurosci., 19, 383-384.
- GILMAN, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor generated signals. Annu. 28. Rev. Biochem., 56, 615-649.
- GOLARD, A. & SIEGELBAUM, S.A. (1993). Kinetic basis for the voltage-29. dependent inhibition of N-type calcium current by somatostatin and norepinephrine in chick sympathetic neurons. J. Neurosci., 13, 3884-3894.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. (1985). A new generation of Ca2+ 30. indicator with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem., 260, 3440-3450.

- 31. HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch., 391, 85-100.
- HOSHINO, S., KIKKAWA, S., TAKAHASHI, K., ITOH, H., KAZIRO, Y., 32. KAWASAKI, H., SUZUKI, K., KATADA, T. & UI, M. (1990). Identification of sites

- 75 -

for alkylation by N-ethylmaleimide and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation on GTP-binding proteins. *FEBS Lett.*, **276**, 227–231.

- 33. IKEDA, S.R. (1991). Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. J. Physiol., 439, 181–214.
- KATADA, T., OINUMA, M. & UI, M. (1986). Two guanine nucleotide-binding proteins in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. J. Biol. Chem., 261, 8182-8191.
- KIM, S.J., LIM, W. & KIM, J. (1995). Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain. Res.*, 675, 289-296.
- 36. KITAMURA, N., OHTA, T., ITO, S. & NAKAZATO, Y. (1997). Calcium channel subtypes in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, **434**, 179–187.
- 37. KITAMURA, N., OHTA, T., ITO, S. & NAKAZATO, Y. (1998). Calcium channel current facilitation in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, (in press).
- KOZLOWSKI, R.Z., GOODSTADT, L.J., TWIST, V.W. & POWELL, T. (1994). Modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels by GTPγS in response to isoprenaline, forskolin and photoreleased nucleotides. *Br. J. Pharmacol.*, 111, 250-258.
- LOPÉZ, M.G., ALBILLOS, A., DELAFUENTE, M.T., BORGES, R., GANDÍA, L., CARBONE, E., GARCÍA, A.G. & ARTALEJO, A.R. (1994a). Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, 427, 348-354.
- LOPÉZ, M.G., VILLARROYA, M., LARA, B., MARTINEZ SIERRA, R., ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. & GANDÍA, L. (1994b). Q- and L-type Ca²⁺ channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, 349, 331-337.
- MILJANICH, G. & RAMACHANDRAN, J. (1995). Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function and therapeutic implications. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 35, 707-734.
- 42. NEER, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals.

- 76 -

Cell, 80, 249-257.

- OLIVERA, B.M., MILJANICH, G.P., RAMACHANDRAN, J. & ADAMS, M.E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω-conotoxins and ω-agatoxins. Annu. Rev. Biochem., 63, 823-867.
- OTSUGURO, K., OHTA, T., ITO, S. & NAKAZATO, Y. (1996). Modulation of calcium current by ATP in guinea-pig adrenal chromaffin cells. *Pfügers Arch.*, 431, 402-407.
- POENIE, M., ALDELTON, J., STEINHARDT, R. & TSIEN, R. (1986). Calcium rise abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science*, 233, 886-889.
- SALZMAN, S. & SELLERS, M. (1982). Determination of norepinephrine in brain perfusates using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromat., 232, 29-37.
- 47. SCULPTOREANU, A., ROTMAN, E., TAKAHASHI, M., SCHEUER, T. & CATTERALL, W.A. (1993). Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel α1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10135–10139.
- 48. SPEDDING, M. & PAOLETTI, R. (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.*, 44, 363-376.
- TOTH, P.T., SHEKTER, L.R., MA, G.H., PHILIPSON, L.H. & MILLER, R.J. (1996). Selective G-protein regulation of neuronal calcium channels. J. Neurosci., 16, 4617-4624.
- VAN HAASTERT, P.J.M., VAN DRIEL, R., JASTORFF, B., BARANIAK, J., STEC, W.J. & DE WIT, R.J.W. (1984). Competitive cAMP antagonists for cAMPreceptor proteins. J. Biol. Chem., 259, 10020-10040.
- 51. WAYMIRE, J., BENNETT, W., BOEHME, R., HANKINS, L., GILMER-WAYMIRE, K. & HAYCOCK, J. (1983). Bovine adrenal chromaffin cells: high-yield purification and viability in suspension culture. J. Neurosci. Meth., 7, 329-351.

- 77 -

52. WEST, R.E., MOSS, J., VAUGHAN, M., LIU, T. & LIU, T.Y. (1985). Pertussis

toxin-catalysed ADP-ribosylation of transducin: cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. J. Biol. Chem., 260, 14428-14430.

- XU, Y.P., DUARTE, E.P. & FORSBERG, E.J. (1991). Calcium dependency of muscarinic and nicotinic agonist-induced ATP and catecholamine secretion from porcine adrenal chromaffin cells. J. Neurochem., 56, 1889-1896.
- 54. ZHU, Y. & IKEDA, S.R. (1994). VIP inhibits N-type Ca²⁺ channels of sympathetic neurons via a pertussis toxin-insensitive but cholera toxin-sensitive pathway. *Neuron*, 13, 657-669.

Notes we check it is shown as a reasonable by a new second sec

- 2. The state of the second second
 - A parent de locaardinge prinse in propulse is a "all only parent" is rear to a trait point? (served shetar 20% because of bourders is of bemann manners and believely due test point? (technist and de bookers commune) is a degree of the beckerson of beckers more that was

- 78 -

VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM CHANNELS IN PORCINE ADRENAL CHROMAFFIN CELLS: CHANNEL SUBTYPES AND MECHANISMS OF THEIR FACILITATION.

Naoki KITAMURA

Laboratory of Pharmacology Department of Biomedical Sciences The Graduate School of Veterinary Medicine Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

To study the characteristics of voltage-dependent calcium channels in porcine adrenal chromaffin cells, calcium (barium) currents, rise of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and catecholamine release responses induced by stimulation with high K⁺ (60 mM) were measured by whole-cell voltage clamp technique, microfluorometry and HPLC-ECD method, respectively. The results obtained were as follows:

- 1. Voltage-current relationship of calcium current indicated that porcine adrenal chromaffin cells possess only high voltage-activated type of calcium channels. The calcium current was inhibited by ω -conotoxin GVIA, nifedipine and ω -agatoxin IVA dose-dependently, though the magnitudes of inhibition were various. The degree of inhibition by maximal doses of these three agents was 78%, 15% and 6%, respectively. When these three agents were applied onto the same cell, calcium current was inhibited additively.
- When 1-s depolarizing pulses were applied in the absence and presence of calcium channel blockers, ω-conotoxin GVIA-sensitive currents inactivated faster than nifedipine or ω-agatoxin IVA-sensitive currents.
- 3. Rises in $[Ca^{2+}]_i$ and catecholamine release in response to stimulation by high K⁺ were inhibited to about 50% by either ω -conotoxin GVIA (1 μ M) or nifedipine (10 μ M) but not by ω -agatoxin IVA (0.1 μ M). In addition, these responses were almost abolished by the combined application of ω -conotoxin GVIA and nifedipine.
- 4. A strong depolarizing pulse (a prepulse to +100 mV) applied prior to a test pulse caused about 20% increase of amplitude of barium current evoked by the test pulse (facilitation of barium currents). The degree of the facilitation of barium currents was

increased with the increase in the voltage (in a range over +20 mV) and duration of the prepulses. Moreover the facilitation of barium currents was decreased with increase in intervals between the prepulses and the test pulses.

- 79 -

5. The application of 8-Bromo-cAMP (1 mM) or forskolin (10 μ M) decreased the

amplitudes of barium currents without affecting the degree of facilitation of barium currents by the prepulses. In addition, an intracellular application of Rp-cAMPS, an inhibitor of PKA, did not have any effects on the amplitudes of barium currents and the degree of facilitation of barium currents.

- 6. The intracellular application of GTP γ S (100 μ M) decreased the amplitudes of barium currents, but not affected those in the presence of prepulses. On the other hand, the application of GDP β S (100 μ M) caused a slight increase in the amplitudes of barium currents but had no effects on the amplitudes of barium currents in the presence of prepulses. Consequently, the degree of facilitation increased in the presence of GTP γ S and decreased in the presence of GDP β S.
- 7. GTPγS-sensitive component of barium current was sensitive to ω-conotoxin GVIA but not to nifedipine. The facilitation of barium currents by the prepulses was abolished by ω-conotoxin GVIA but not by either ω-agatoxin IVA or nifedipine. Furthermore, Bay K 8644 caused about 80% increase of barium currents in amplitude but showed no effect on the facilitation by prepulses.
- GTPγS applied intracellularly slowed the time course of activation of barium current (kinetic slowing). The kinetic slowing of barium currents by GTPγS was abolished by ω-conotoxin GVIA or the depolarizing prepulses.
- 9. Pertussis toxin did not affect the amplitude of barium currents and the degree of facilitation of barium currents. Cholera toxin, however, increased the degree of facilitation of barium currents without effects on the amplitudes of barium currents.

Based on these results, it is clarified that porcine adrenal chromaffin cells possess ω conotoxin GVIA-sensitive N- and nifedipine-sensitive L- and ω -agatoxin IVA-sensitive P/Q-type calcium channels and that L- and N-type channels mainly contribute to the rise in [Ca²⁺]_i and catecholamine release by depolarizing the cells. N-type calcium channels are mainly involved in the depolarizing prepulse-induced facilitation of barium currents. The facilitation seems to result from the prepulse-induced relief of tonic inhibition on calcium channels by G-protein but not from PKA-induced phosphorylation of channels during the prepulse. Moreover, G_s-type but not G_i-type G-protein may be involved in this mechanism.



ernetali e a ... terrent. Comisió e fideres all'idente din deglas al alculation della den seconda les des societes e la additione, un dimandil des application el Ilp-societica, un initiaje societ de la vecteure adj-alfante do dia complicador al initiaje migrato ind de doute esti (a dinace el barnes companis

- College an answer of a property of the second se
- (ITPS applies for a finisity signist as the second of second second second and the second second

3) Perinteta tadin and ny arites the applitude of materia and ear is greable tradicticities of hadrine contraint. Clickers in all, introvenes, based and despise of file/balance of hadrine contraints of high and the second despise of descine of high and the rest of all of the second despite of the provide by descine of the second hadrine contraints of the second despite descine of the second despite of the second of the second despite descine of the second despite of the second despite of the second despite despite the second despite of the second despite of the second despite despite of the second despite of the second despite of the second despite despite of the second despite of the second despite of the second despite (C.T.T.), and entropy the second despite of the second despite of the second despite of the line second to despite the second despite despite despite of the second despite of the line second to despite the second despite despite despite of the despite of the second despite despite despite despite despite of the despite despite



A 1			Blue	cm 1
N			lep	2 -1
Gra 3)		Cyan Cyan	3
y 5 4)		lor	4 - 2
5 cale		1 V	Cor	5
ຓ			ntro	6
Z			Pat	7 8
œ			w	
9			Re	14
10			þ	
=	?		Ma	
12			genta	2 5
13	3			3 1
4	3		White	4 1
ភ				5
			© 3/Co	6 1
Ko			O Ko	7

