



Title	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
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
Type	theses (doctoral)
File Information	000000322365.pdf



[Instructions for use](#)

①

博士論文

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

目 次

	頁
I 緒 論	1
II 方 法	4
A 細胞分離法	4
B 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
H 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
2 カルシウム電流の不活化曲線	20
3 カルシウムチャネル抑制薬の作用	20
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ンネル抑制薬の作用	25
6	多種のサブタイプのカルシウムチャンネルの共存	25
7	カルシウムチャン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ンネル抑制薬の作用	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ンネル抑制薬の作用	33
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	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	GTP γ SとGDP β Sの作用	45
7	カルシウムチャンネル抑制薬の作用	49
8	百日咳毒素とコレラ毒素の作用	56
III	考 察	59
A	ブタ副腎髄質細胞のカルシウムチャンネルのサブタイプ	59
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ンネルの関与	60
C	カルシウムチャンネル電流(バリウム電流)のfacilitationを担う機構	62
D	Facilitationに関与するカルシウムチャンネルのサブタイプ	66
E	カルシウムチャンネルを抑制するG蛋白のサブファミリー	67

IV 総括

69

謝辞

72

参考文献

73

英文抄録

79

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 α_{1c} 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)、上頸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 α_{1B} 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 ω -conotoxin 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

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; López *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し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、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; López *et al.*, 1994b)及びネコ (López *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し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

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に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 *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-2-hydroxyethyl-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。液を濾過滅菌する場合には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, ガラス器具は乾熱滅菌 (160 $^{\circ}$ C, 1時間)を, チップ, シリコン球等は高圧蒸気滅菌 (121 $^{\circ}$ C, 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髓質組織のうち2.5~3 gを以降の操作に供した。この作業は細菌等の混入を減少

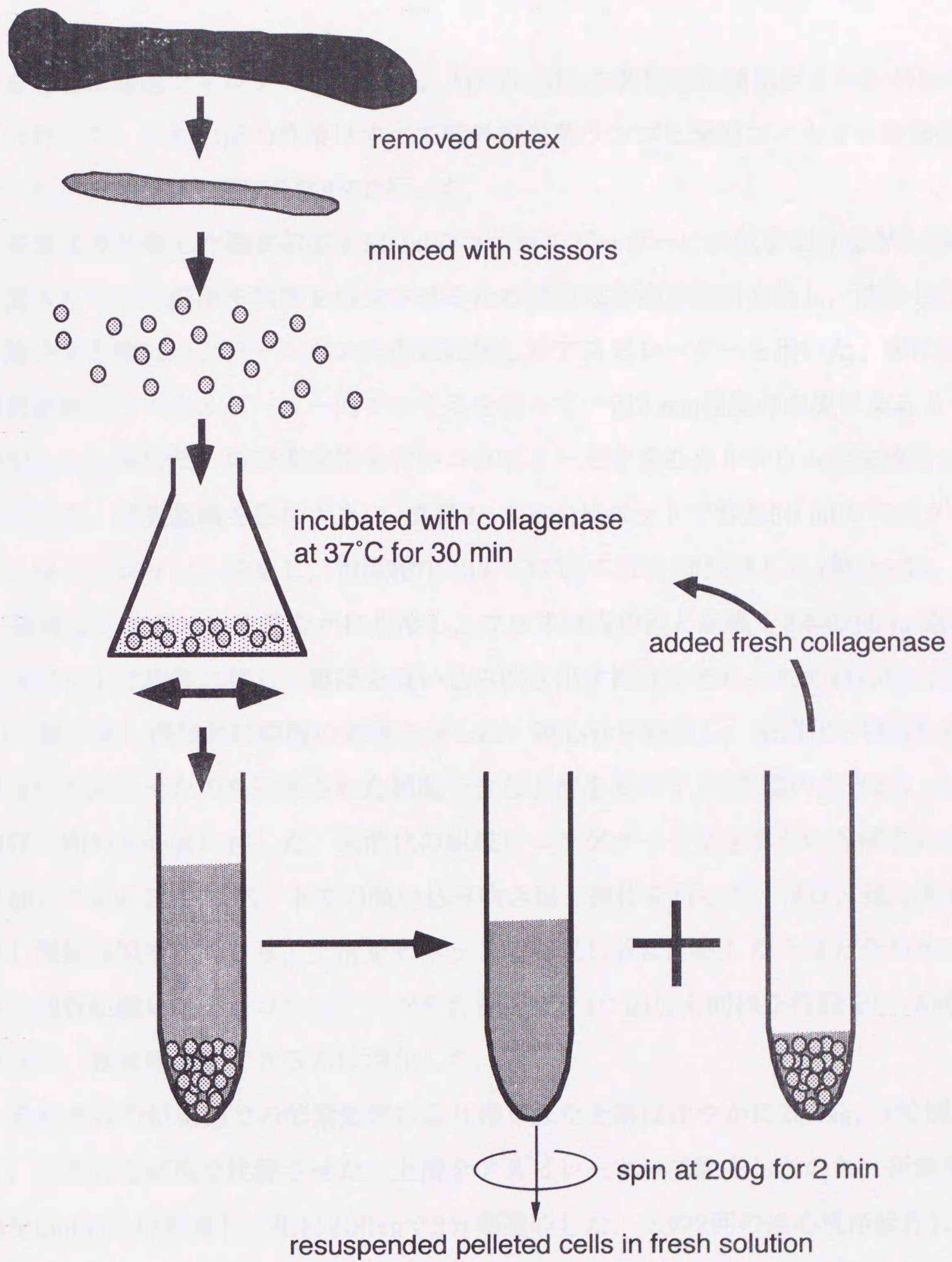


図1 ブタ副腎髄質細胞の分離法の概略

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。

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2 mm程度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°C)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

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。

一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 10^8 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HCl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 10^5 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 10^6 cells/mlの細胞懸濁液を1穴につき400 μ l滴下した。CO₂インキュベーター (三洋電機)内で37℃，5% CO₂ — 95% Airという条件で細胞を培養した。インキュ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

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2～4M Ω 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

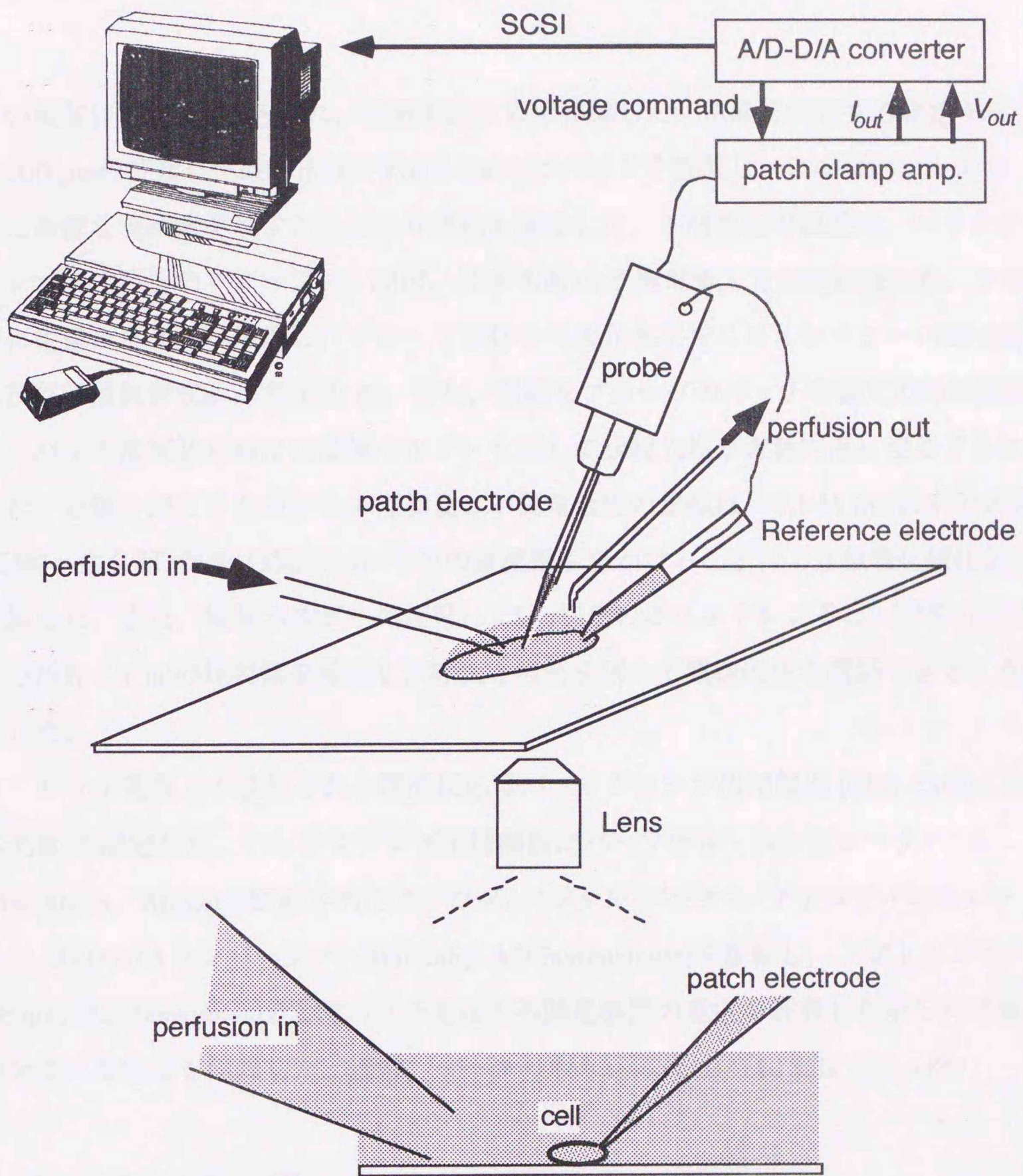


図2 膜電流測定装置の概略

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 KCl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 KCl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

カバーガ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ガ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

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 M Ω)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2~10 G Ω 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。

パッチ膜の破壊によるパッチ電極内と細胞内の電氣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氣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 τ -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 μ M)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ン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、カリウムチャン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20秒毎に脱分極パルスを与えることにより起こした。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。

Fura-2/AMを負荷した細胞が接着しているカバーガラスを、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)。

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

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 μM)を用いてカバーガ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コンバーターで制御したポンプ (Minipulse, Gilson)を介して7分毎に細胞に投与して行った。

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)。カルシウムチャン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攪拌し、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

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プン (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 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 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-N-methyl 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)ということと説明されている。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た。

正常実験液 (mM): 134 NaCl, 6 KCl, 1.2 MgCl_2 , 1.7 CaCl_2 , 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 CaCl_2 のみを除いて作製した。細胞内カルシウム濃度

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 MgCl_2 , 1.2 adenosine-5'-triphosphate- Na_2 (ATP- Na_2), 0.2 guanosine-5'-triphosphate- Na_2 (GTP- Na_3), 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- Na_3 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- Na_3 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

Eagle's medium, Gibco), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 同仁), sodium 1-octasulfonate (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), GDP β S (guanosine 5'-O- (2-thiodiphosphate), 和光純薬), GTP (guanosine-5'-triphosphate), GTP γ S (guanosine 5'-O- (3-thiotriphosphate), 和光純薬), HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-2-ethanesulfonic acid, 同仁), newborn calf serum (Gibco), nifedipine (和光純薬), penicillin (明治製菓), pertussis toxin (islet activating protein, IAP, 科研製菓), Rp-cAMPS (adenosine-3',5'-cyclicmonophosphothioate Rp-isomer, Biolog Life Science Institute), streptomycin (萬有製菓), TEACl (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 \pm 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。

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 CaCl₂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 CaCl₂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 CaCl₂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

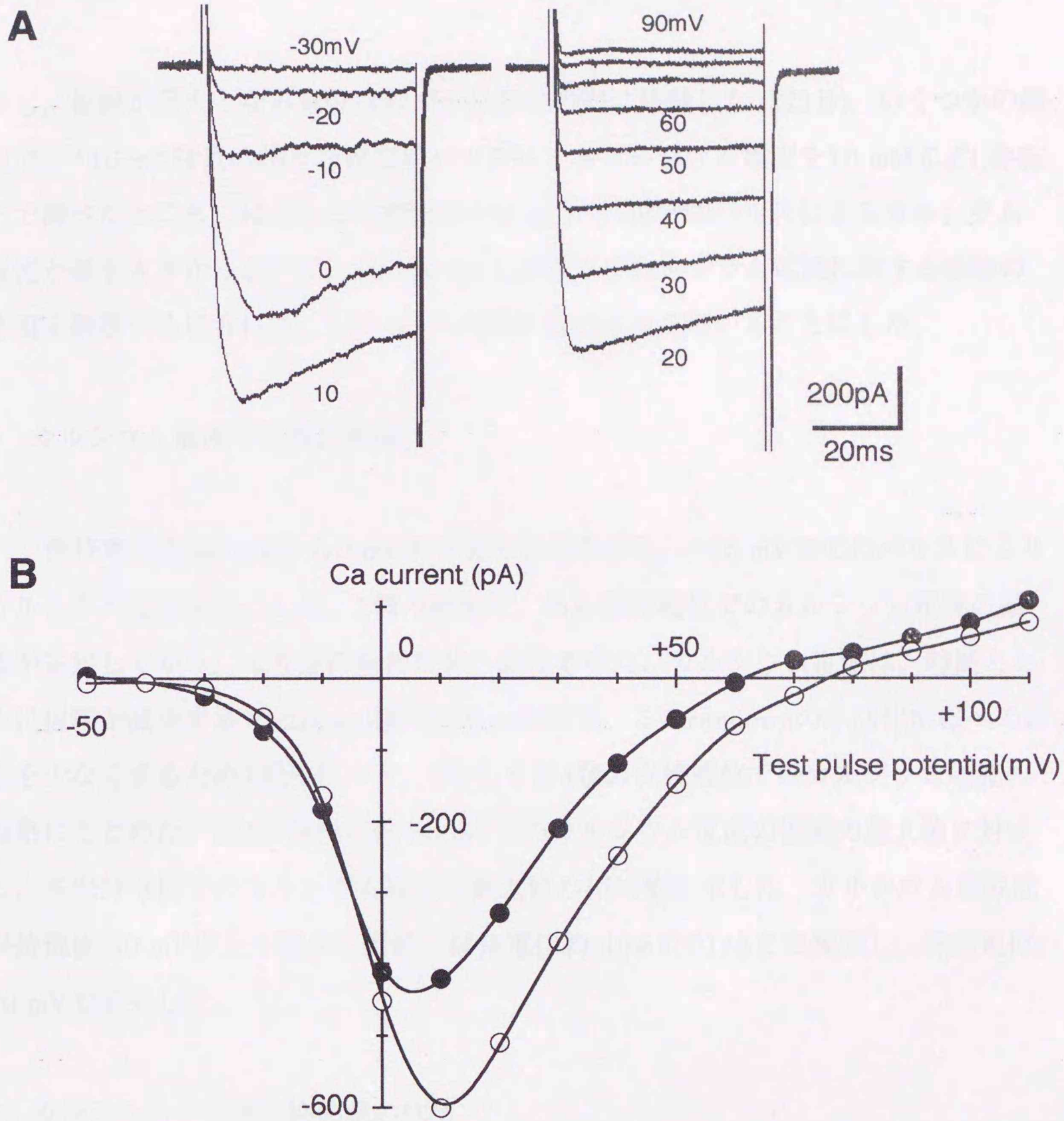


図3 ブタ副腎髄質細胞のカルシウム電流の電位-電流関係

A: 10 mM CaCl_2 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用いたときの電流反応. B: Aの細胞での10 mM (○)および5 mM CaCl_2 (●)存在下のカルシウム電流の電位-電流関係.

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 CaCl_2 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 CaCl_2 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 μM)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 μM)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せた。 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

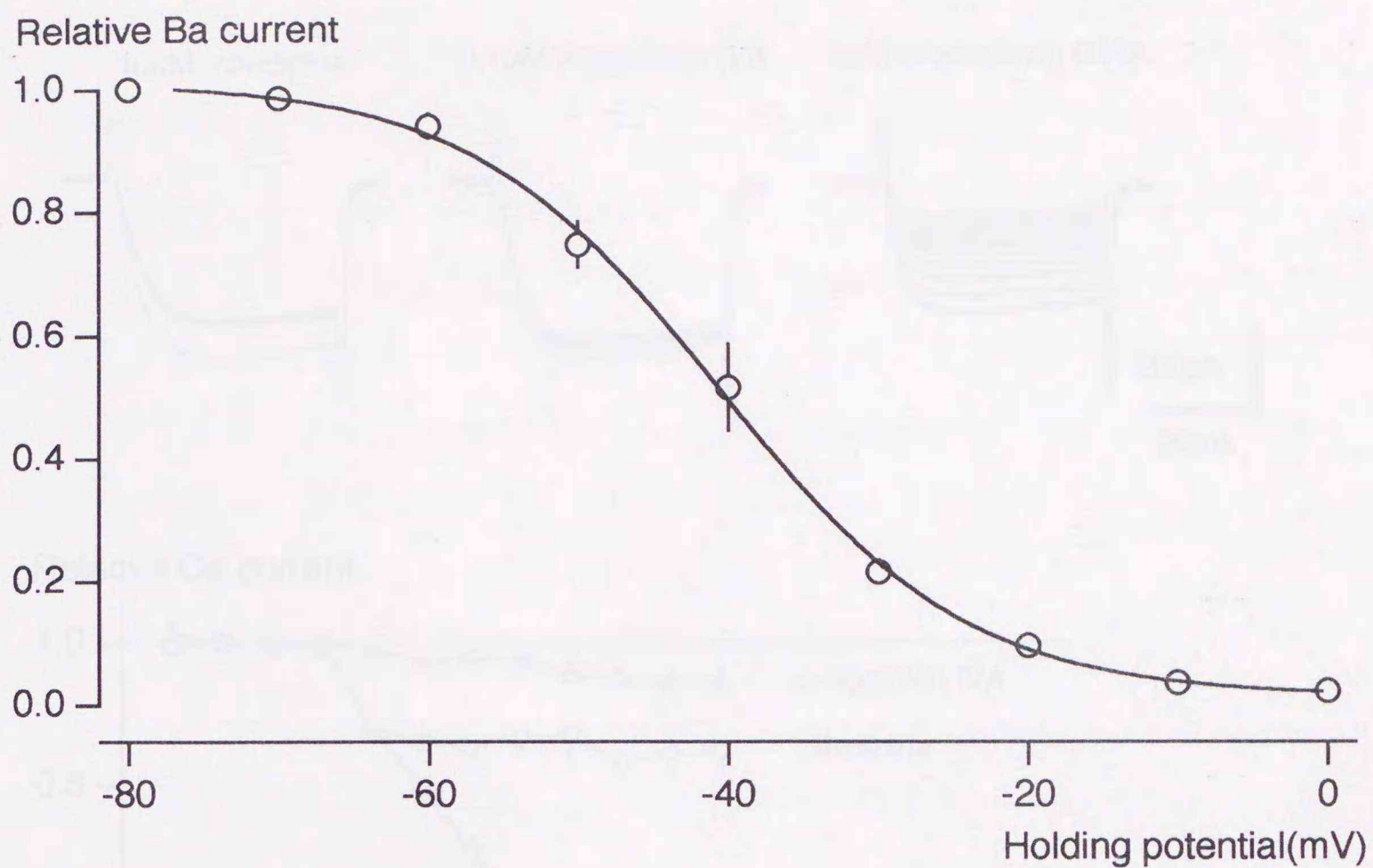


図4 電位依存性カルシウム電流の不活化曲線

10 mM CaCl_2 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した。○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。

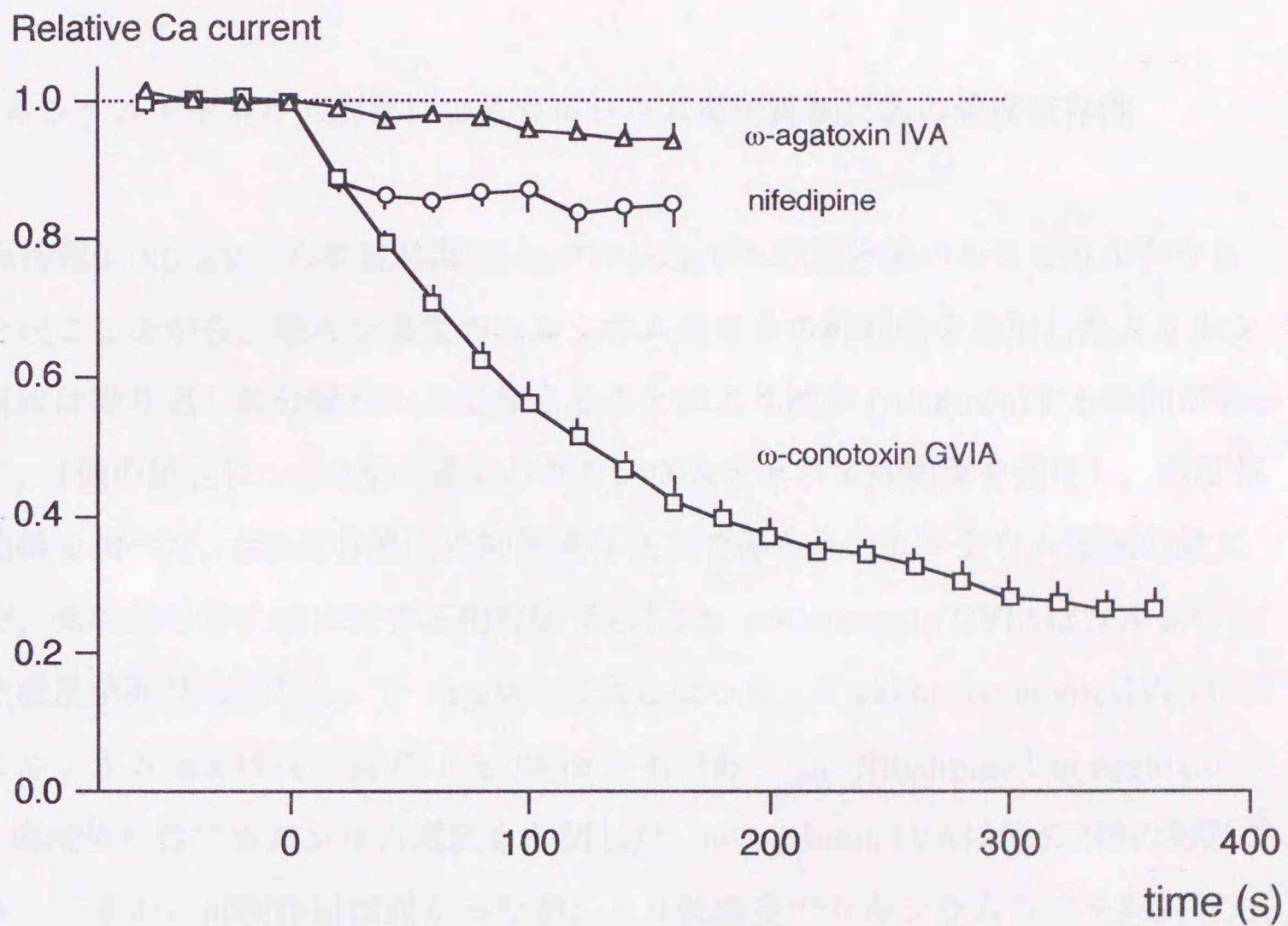
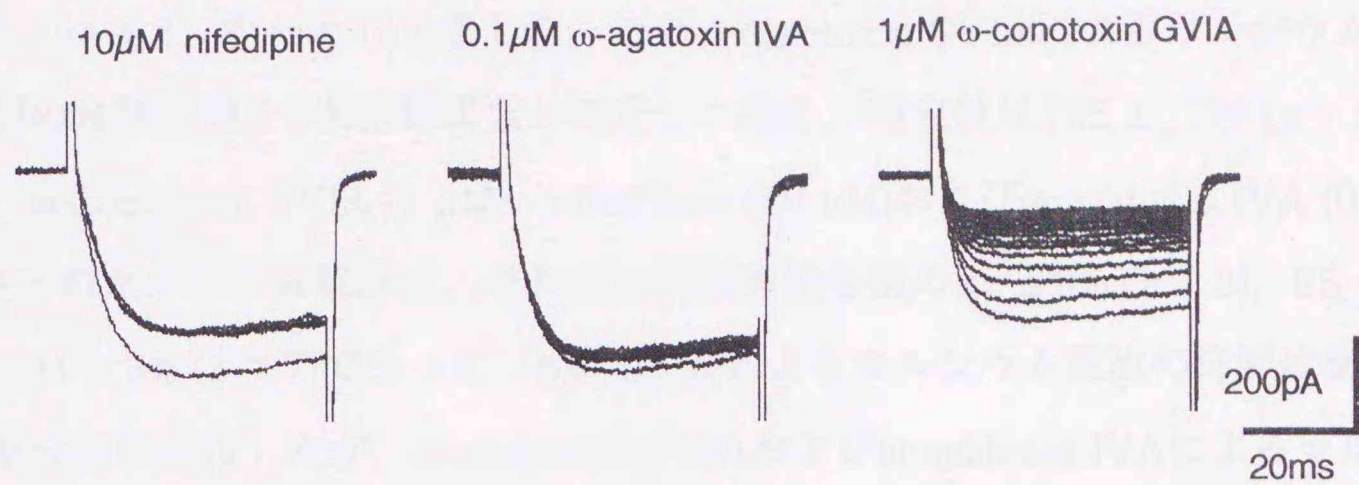


図5 カルシウム電流に対するカルシウムチャンネル抑制薬の作用

10 mM CaCl_2 存在下で保持電位 -80 mVから $+15$ mVまでの脱分極パルス 20 秒間隔で与えカルシウム電流を誘発しながら、 0 sの時点からnifedipine (\circ , 10 μ M), ω -agatoxin IVA (Δ , 0.1 μ M)および ω -conotoxin GVIA (\square , 1 μ M)を適用した。

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 ($1 \mu\text{M}$), nifedipine ($10 \mu\text{M}$)および ω -agatoxin IVA ($0.1 \mu\text{M}$)存在下のカルシウム電流は、それぞれ抑制薬投与前の $22 \pm 3\%$ ($n = 9$), $85 \pm 4\%$ ($n = 5$), $94 \pm 3\%$ ($n = 7$)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、 $1 \sim 3 \mu\text{M}$ で最大となった。 $3 \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA存在下のカルシウム電流は投与前の $13 \pm 3\%$ ($n = 4$)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 $3 \sim 10 \mu\text{M}$, ω -agatoxin IVAは $0.1 \mu\text{M}$ で最大抑制となり、 $10 \mu\text{M}$ nifedipineと $0.1 \mu\text{M}$ ω -agatoxin IVA存在下ではそれぞれ抑制薬投与前の $81 \pm 2\%$ ($n = 4$), $85 \pm 3\%$ ($n = 5$)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。

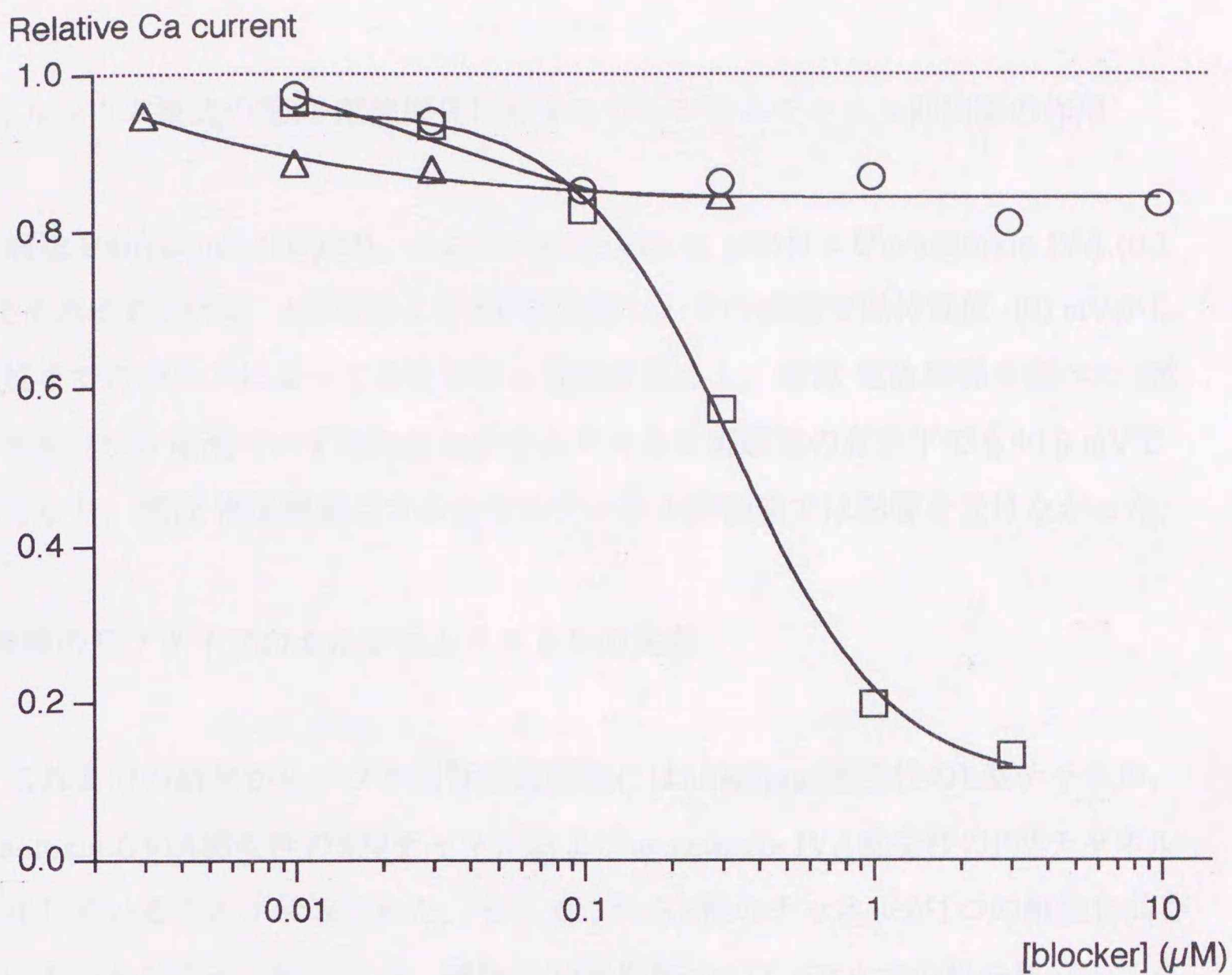


図6 カルシウムチャネル抑制薬によるカルシウム電流抑制の濃度依存性

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 (○)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。

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ンネル抑制薬の作用

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ン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ン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ンネルの共存

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型チャンネル, ω -conotoxin GVIA感受性のN型チャンネルおよび ω -agatoxin IVA感受性のP型チャンネルが存在していることが示唆された. そこでこれら3種のチャンネルが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 μM ω -agatoxin IVA, 1 μM ω -conotoxin GVIAおよび10 μM nifedipineを適用した (図8). いずれのカルシウムチャン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 CoCl_2 により消失した.

7 カルシウムチャンネル抑制薬のカルシウム電流の不活化に対する作用

カルシウムチャンネルには, 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ン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, カルシウムチャン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_2 存在下で細胞に持続時間1秒の+15 mVまでの

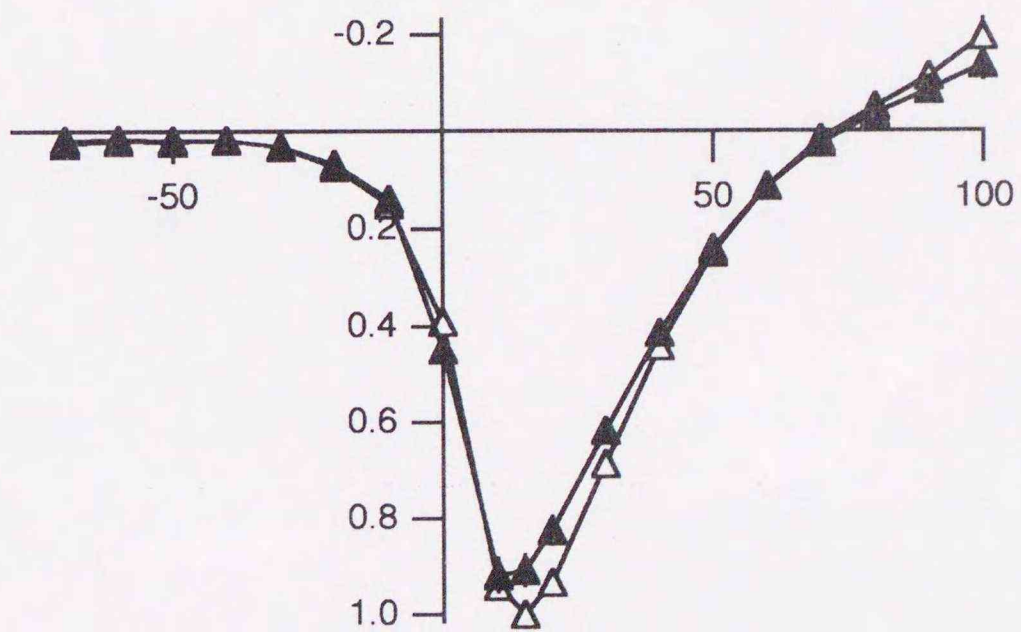
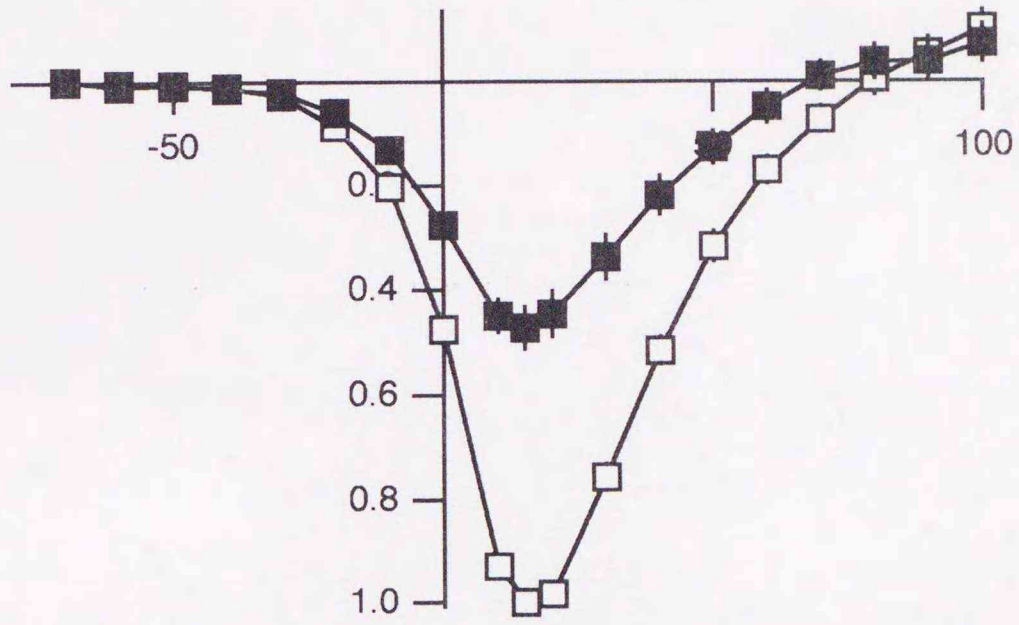
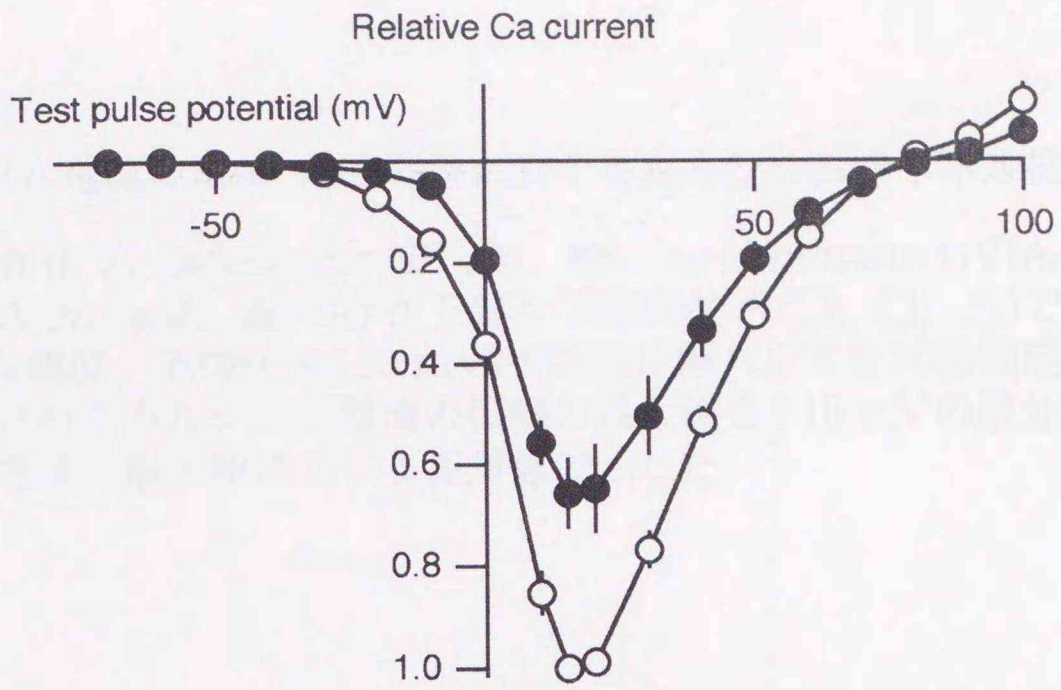
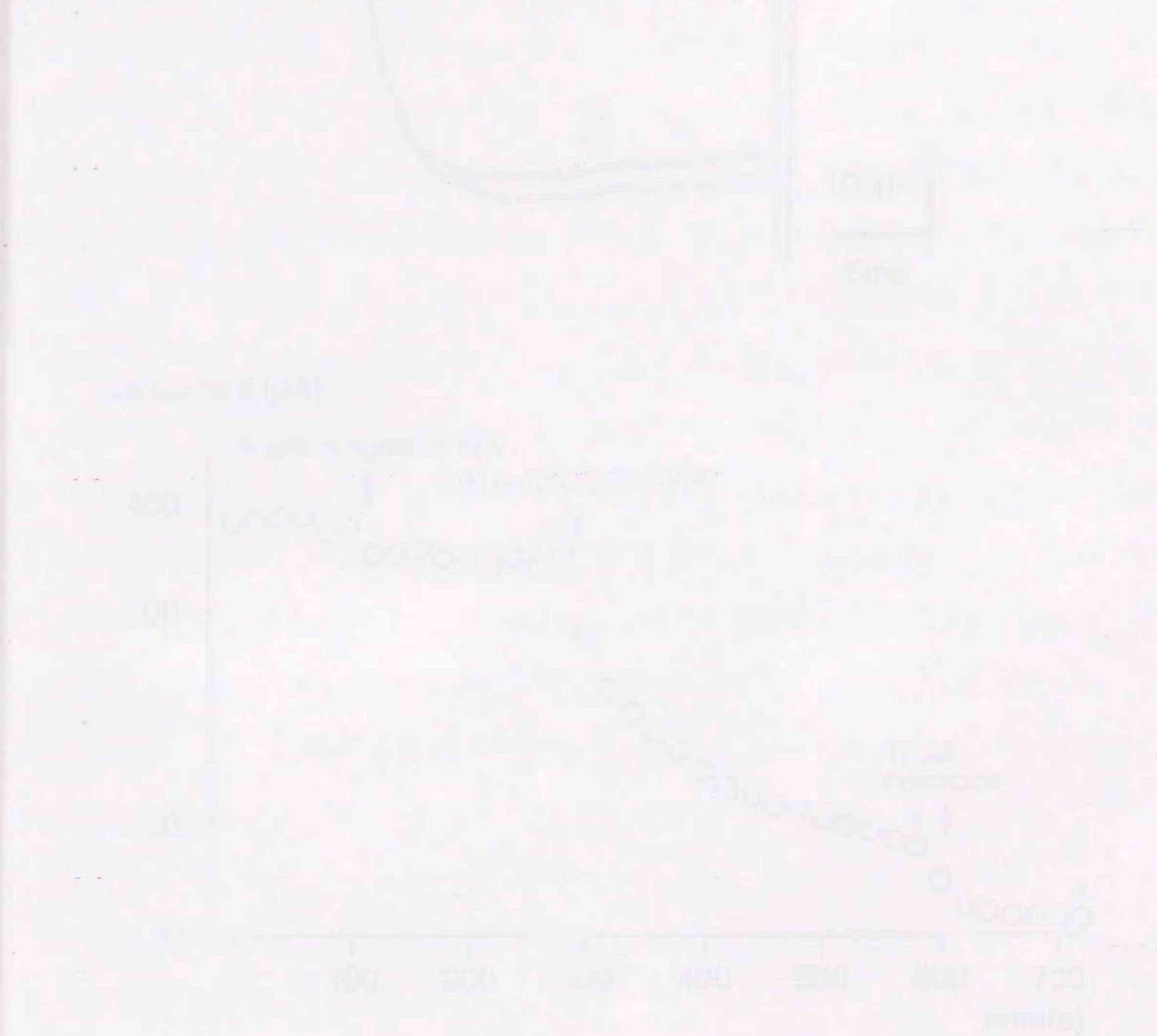


図7. カルシウム電流の電位-電流関係に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

10 mM CaCl_2 存在下, nifedipine ($10 \mu\text{M}$, ●), ω -conotoxin GVIA ($1 \mu\text{M}$, ■), ω -agatoxin IVA ($0.1 \mu\text{M}$, ▲)の存在下および非存在下 (○, □, △)で保持電位 -80 mV から様々な電位 (-70 から $+110 \text{ mV}$)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 $+15 \text{ mV}$ 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.



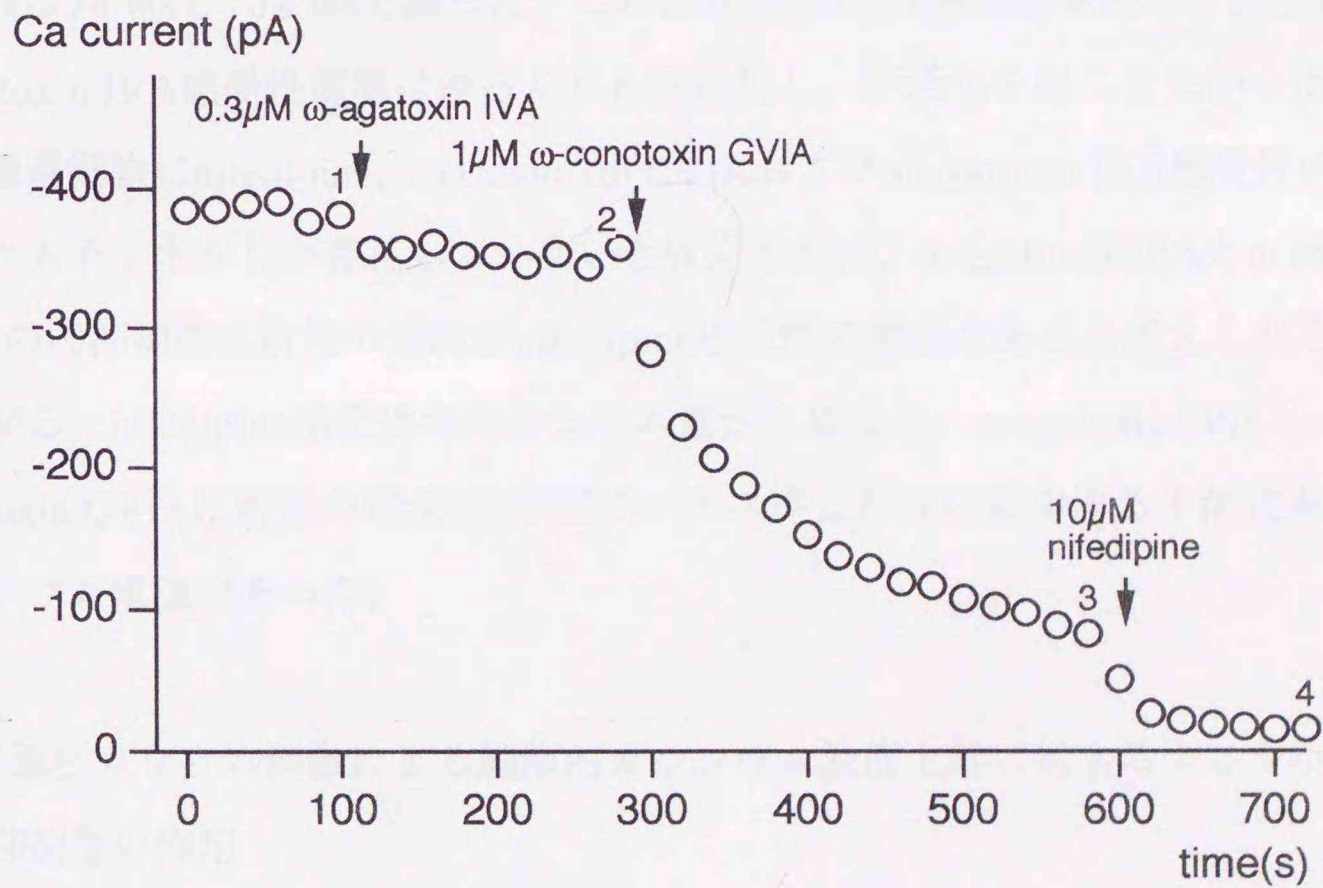
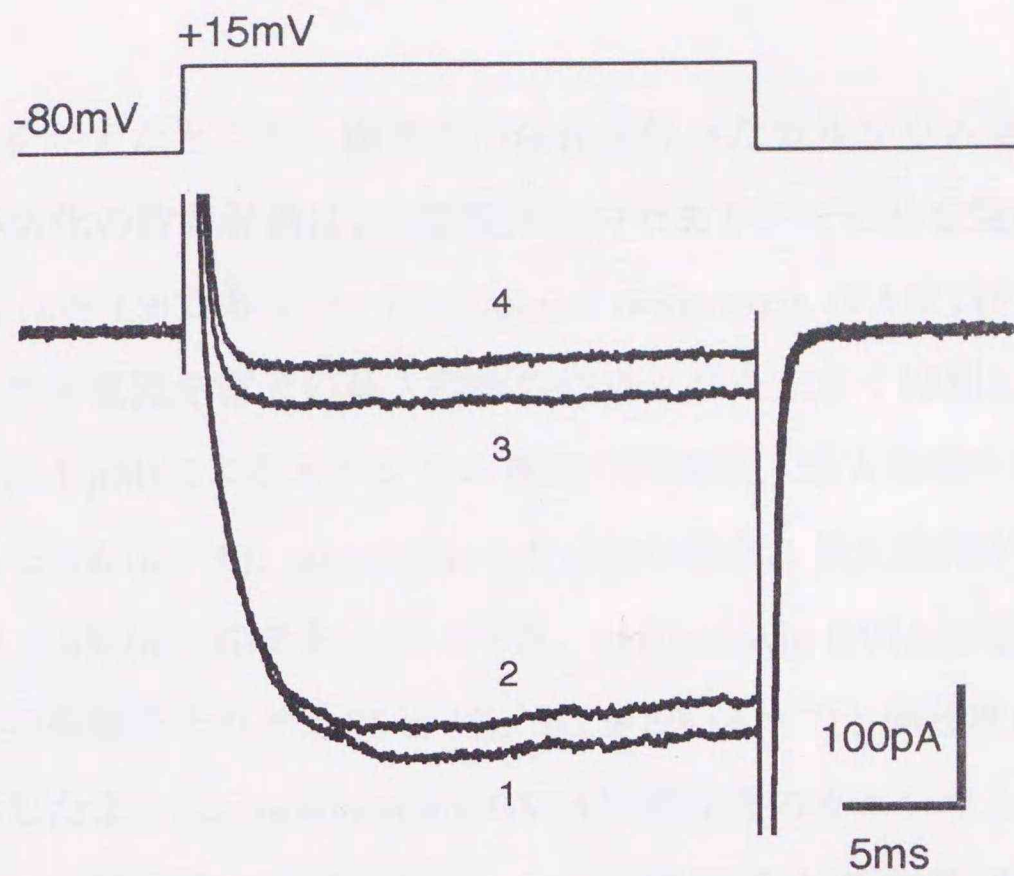


図8 同一細胞における3種のカルシウムチャンネル抑制薬の作用

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.

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、 ω -agatoxin IVA ($0.1 \mu\text{M}$)によるカルシウム電流の抑制は、最大振幅を $3.4 \pm 0.5\%$ 、パルス終了時で $31 \pm 3\%$ ($n = 6$)、nifedipine ($10 \mu\text{M}$)の場合、最大振幅が $15 \pm 2\%$ 、パルス終了時が $52 \pm 3\%$ ($n = 6$)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 $65 \pm 4\%$ 、 $61 \pm 3\%$ ($n = 7$)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 ω -conotoxin 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。

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

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

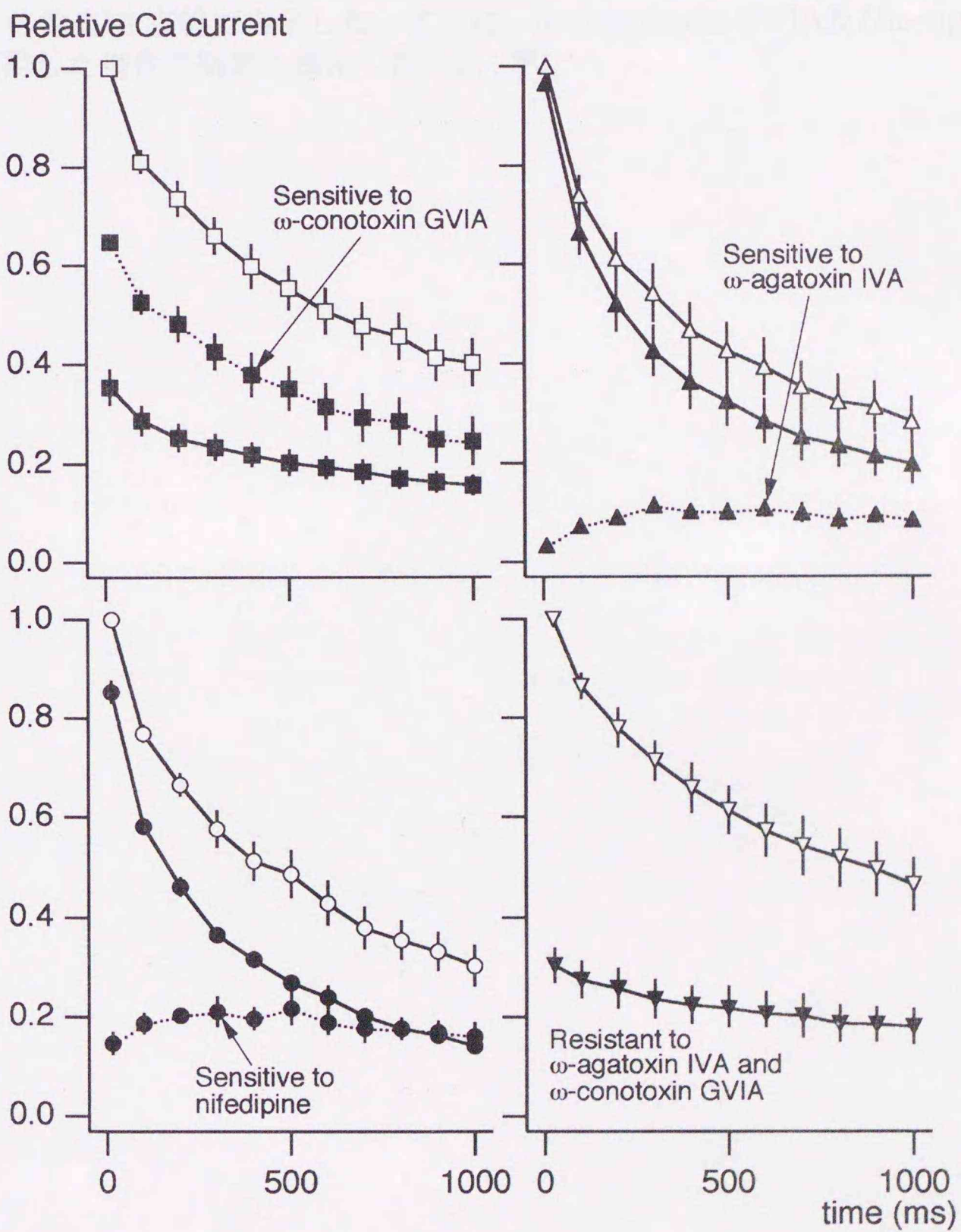
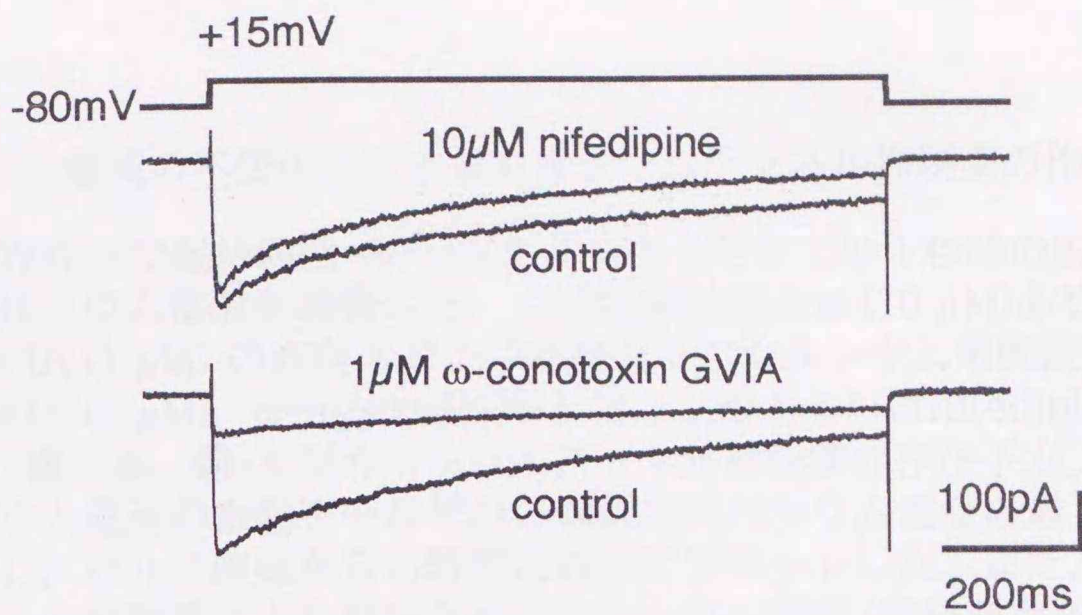


図9 カルシウム電流の不活化に対するカルシウムチャンネル抑制薬の作用

10 mM CaCl_2 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与えカルシウム電流を誘発した。(上段)Nifedipine ($10 \mu\text{M}$)あるいは ω -conotoxin GVIA ($1 \mu\text{M}$)の存在下および非存在下のカルシウム電流波形。(下段) ω -conotoxin GVIA ($1 \mu\text{M}$), ω -agatoxin IVA ($0.1 \mu\text{M}$)あるいはnifedipine ($10 \mu\text{M}$)存在下(それぞれ■, ▲, ●)及びカルシウムチャンネル抑制薬非存在下(○, □, △)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ン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(▽, ▼)。

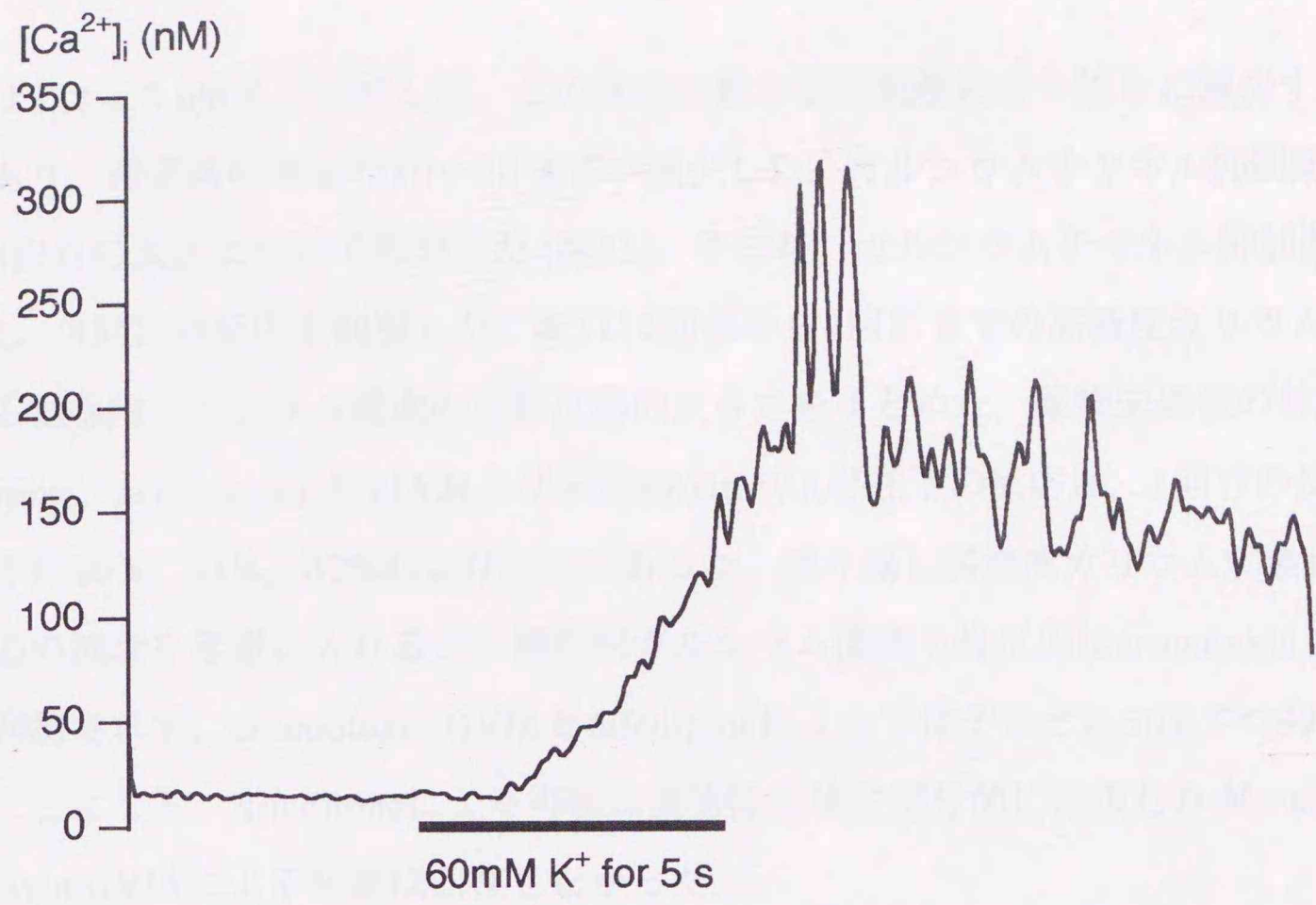


図10 高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応

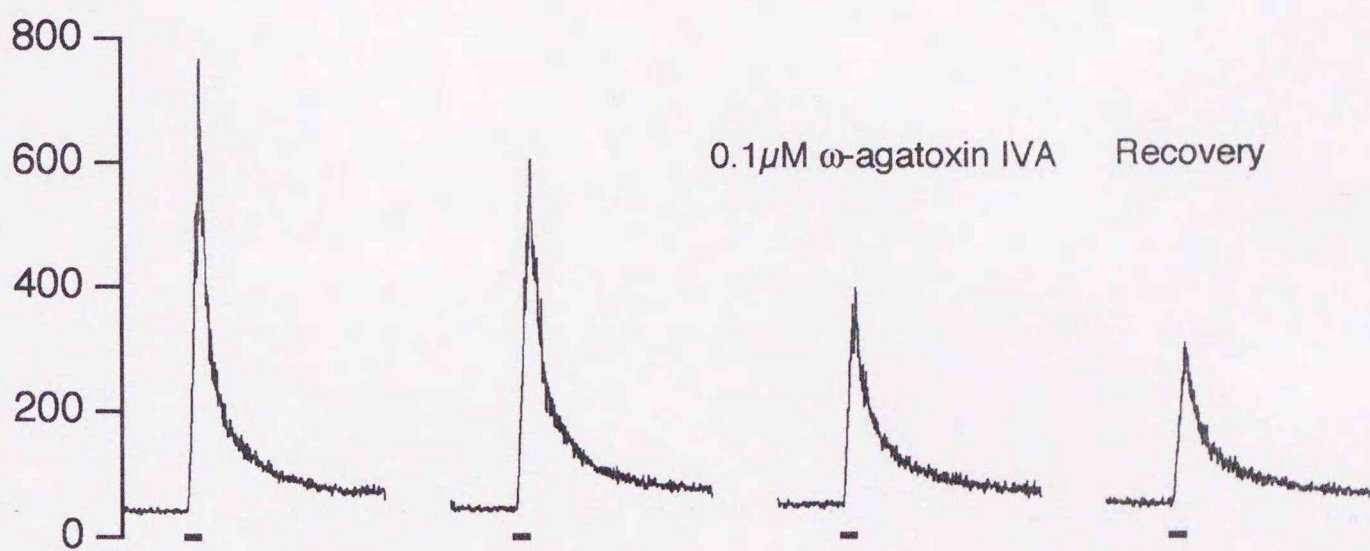
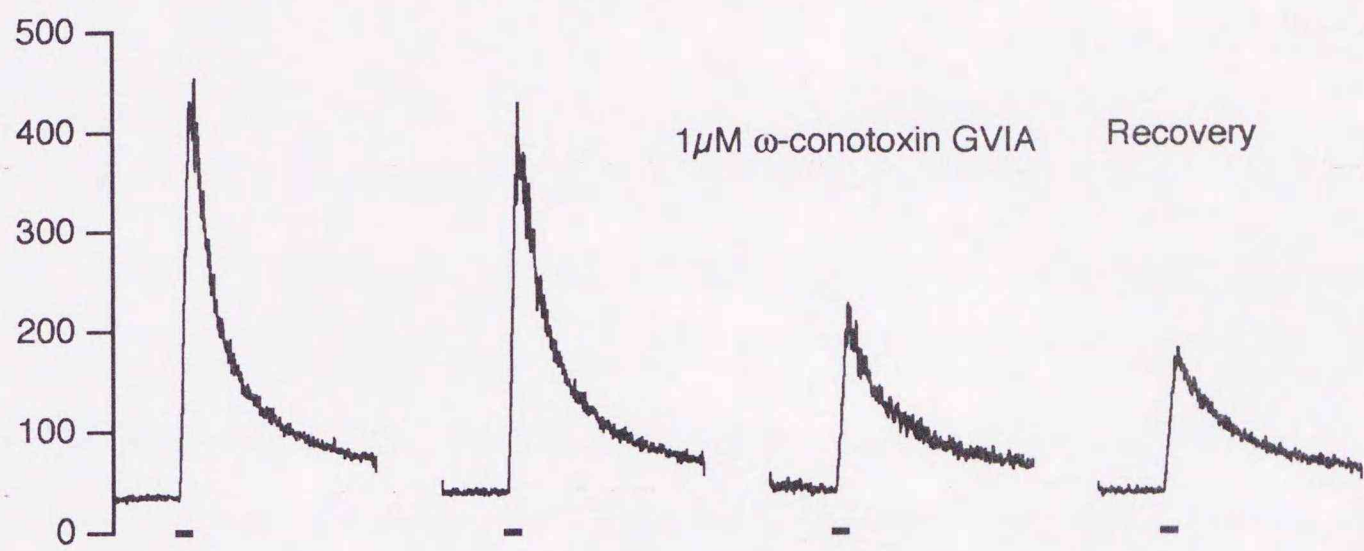
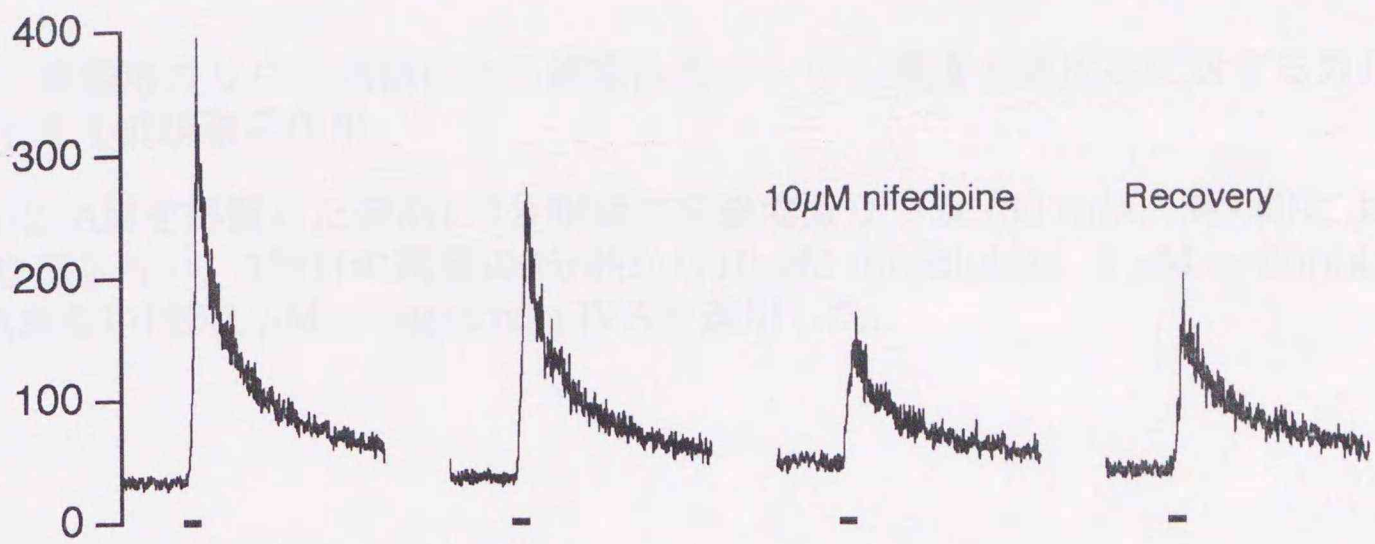
Fura-2/AMを処置した細胞に5秒間、高濃度カリウム (60 mM)を適用したときの細胞内カルシウム濃度の経時変化を示した。典型的な一例を示す。

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)。

$[Ca^{2+}]_i$ (nM)



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ンネル抑制薬の作用

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 μ M nifedipine, 1 μ M ω -conotoxin GVIAあるいは0.1 μ M 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ンネル抑制薬の作用

	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[Ca²⁺]_i, 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ンネル抑制薬非存在下(Control), nifedipine (10 μM), ω-conotoxin GVIA (1 μM)およびω-agatoxin IVA (0.1 μM)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)。

CA release (% of content)

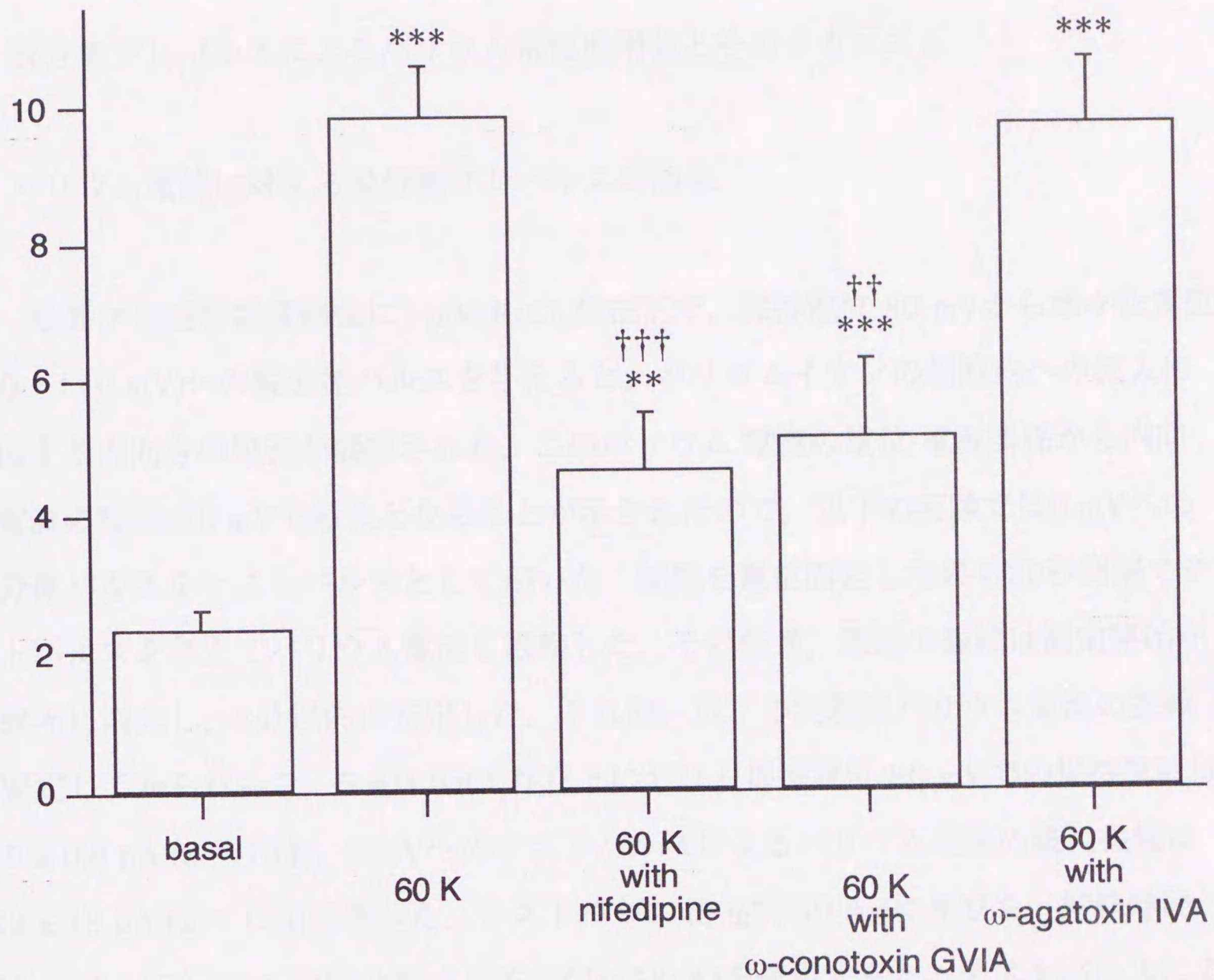


図12 高濃度カリウム刺激によるカテコールアミン放出反応に対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

細胞を正常液中で37°C, 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0 mVで最大となることが示されたので、以下の実験では0 mV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の間隔を置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

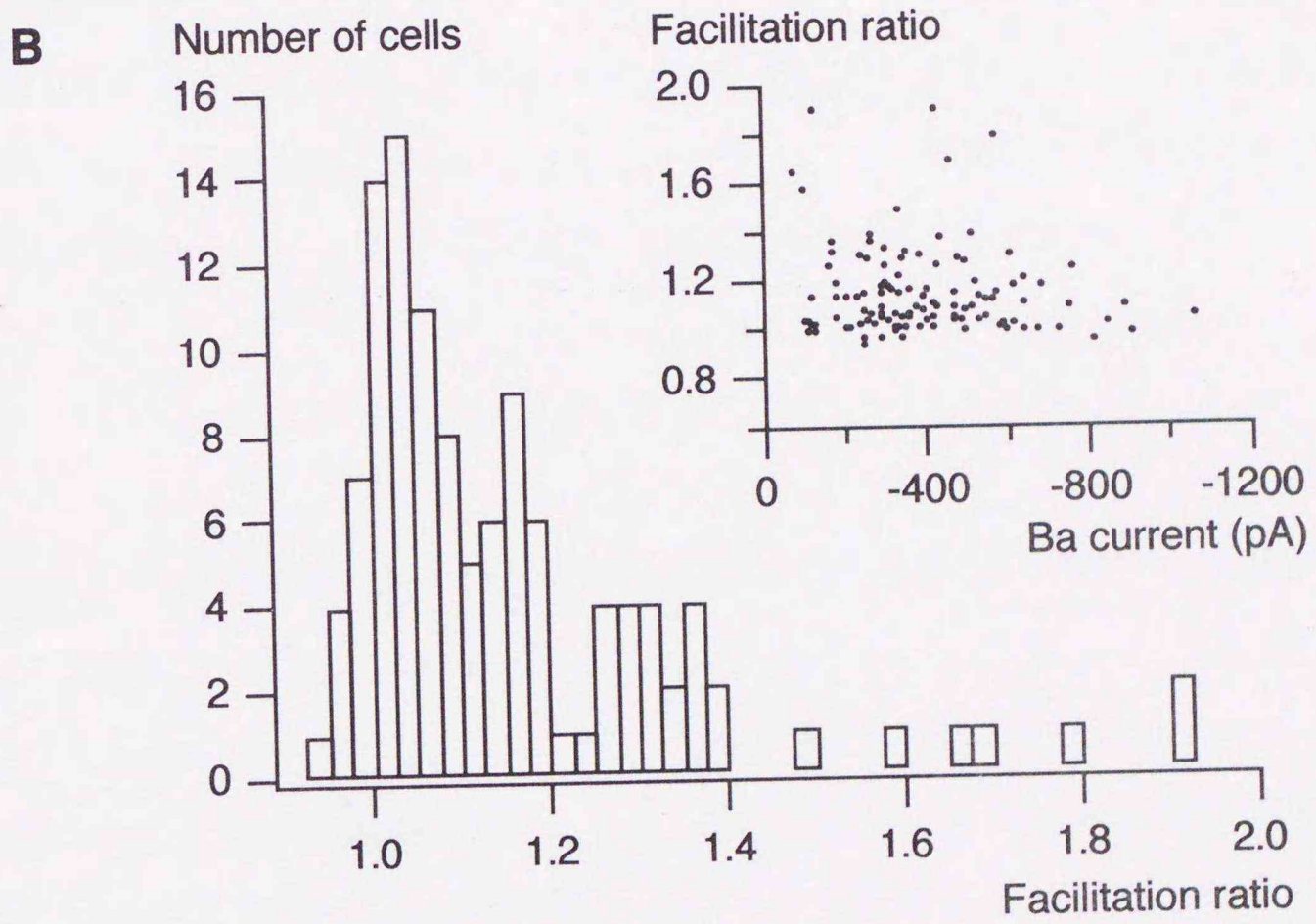
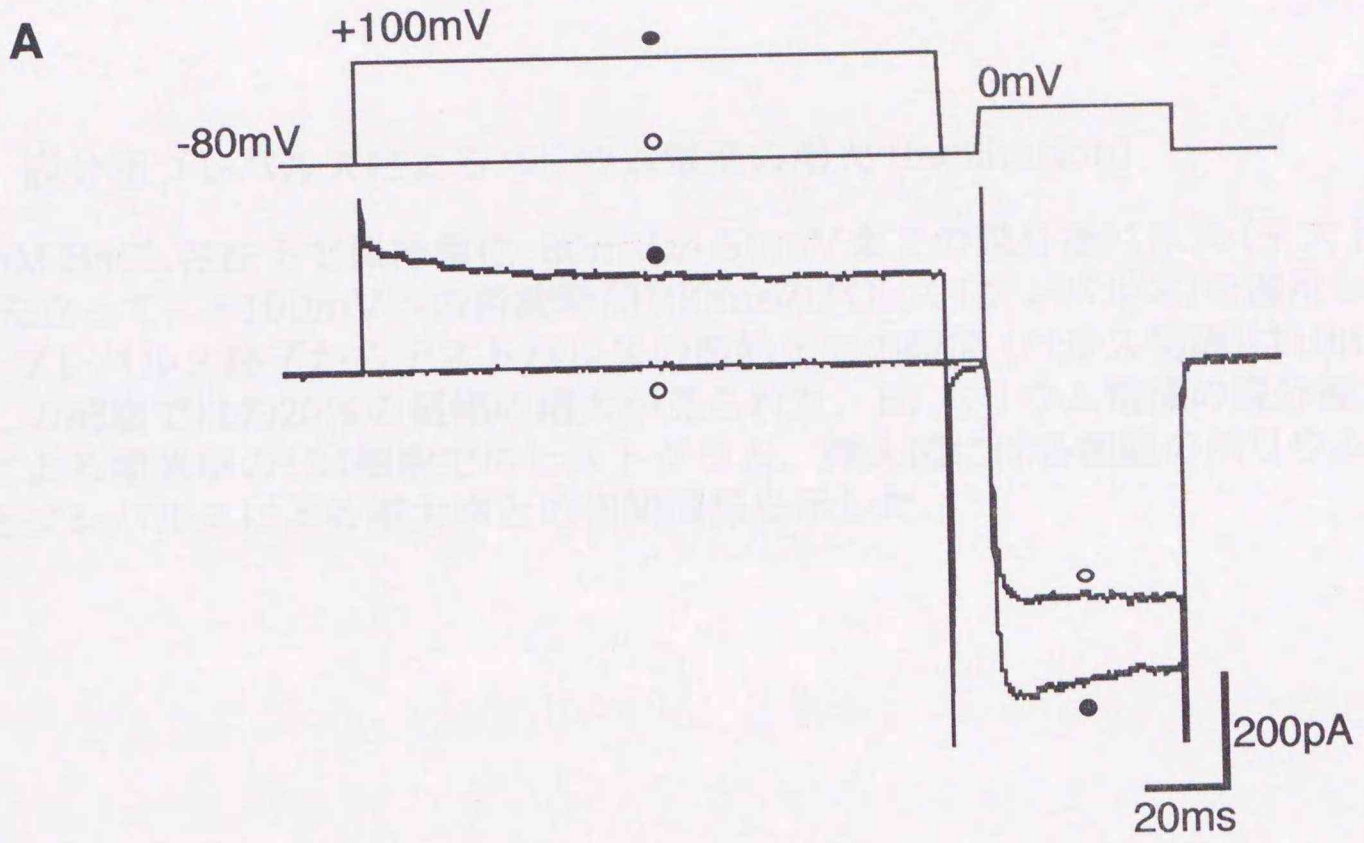


図13 脱分極プレパルスによるバリウム電流の増大 (facilitation)

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. $+20\text{ mV}$ 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 $+80\text{ mV}$ 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($+100\text{ mV}$)を与えた後, 10 msの間隔に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 $+100\text{ mV}$ 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.

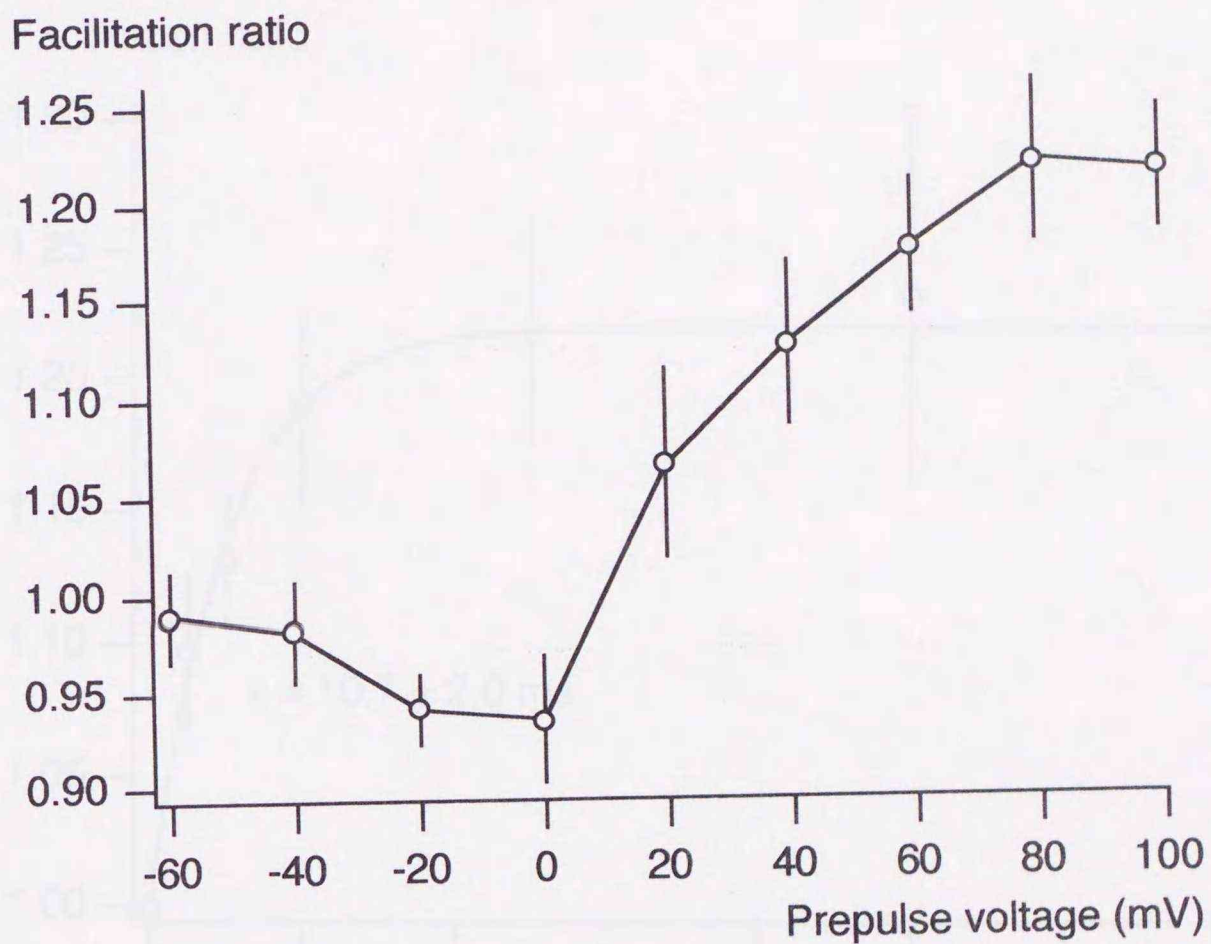
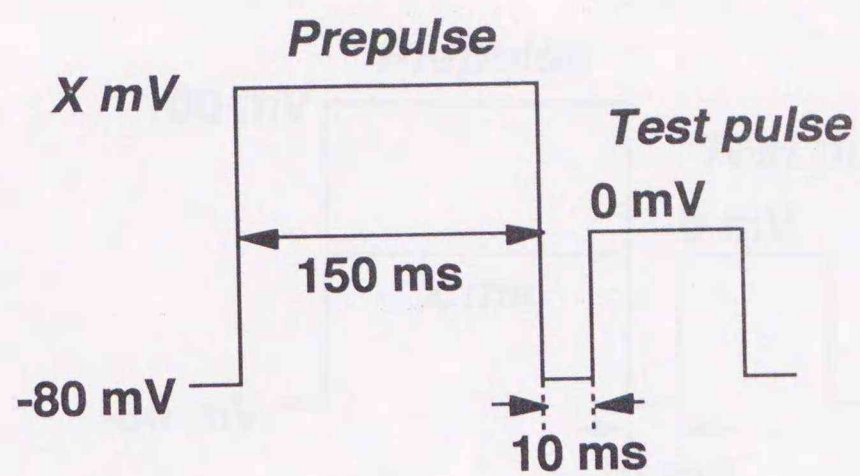


図14 バリウム電流のfacilitationのプレパルス電位依存性

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した。

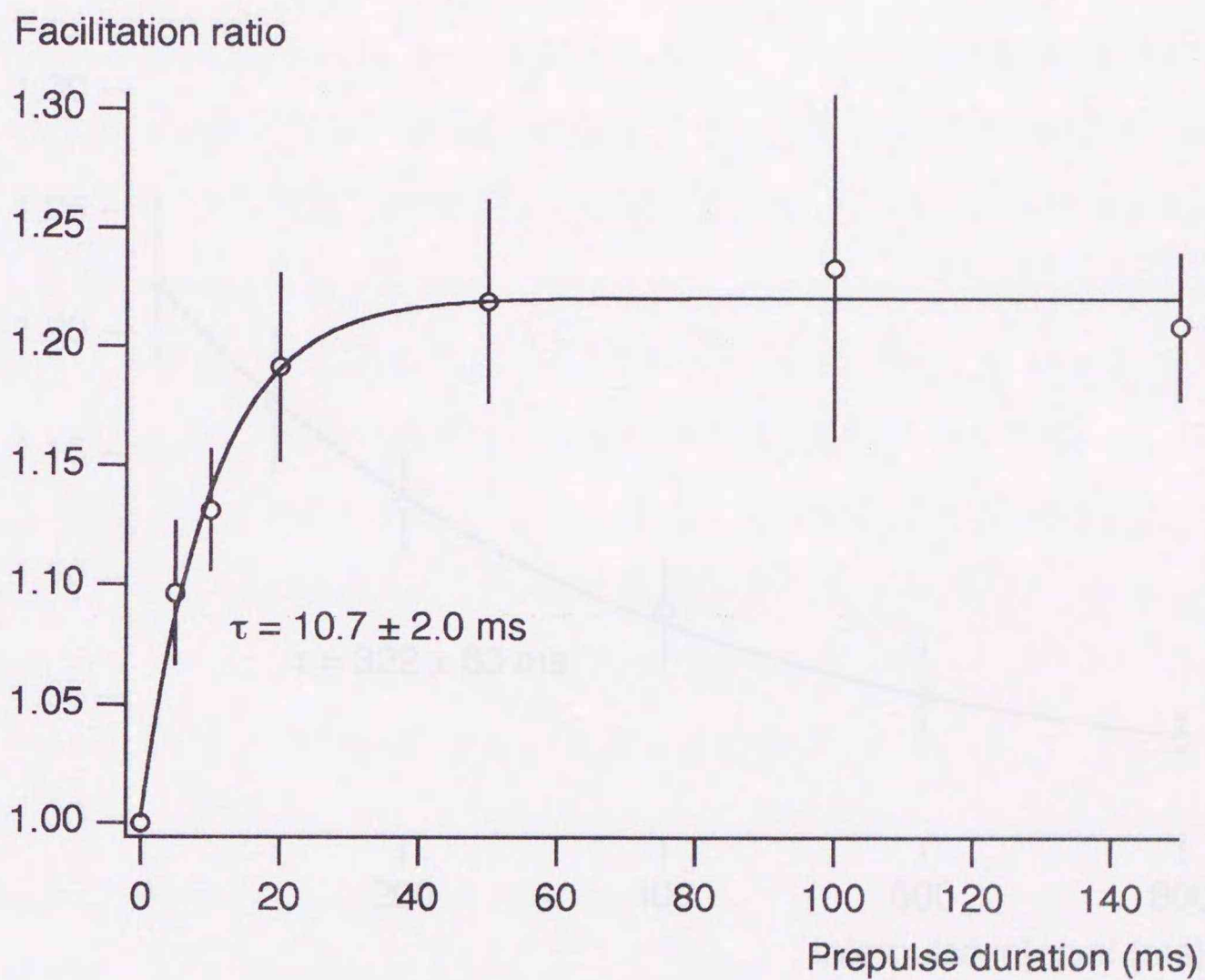
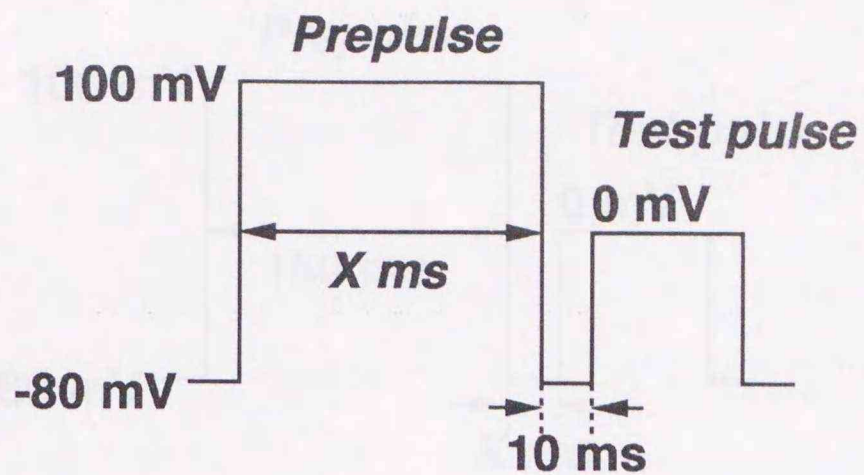


図15 バリウム電流のfacilitationのプレパルス持続時間依存性

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。

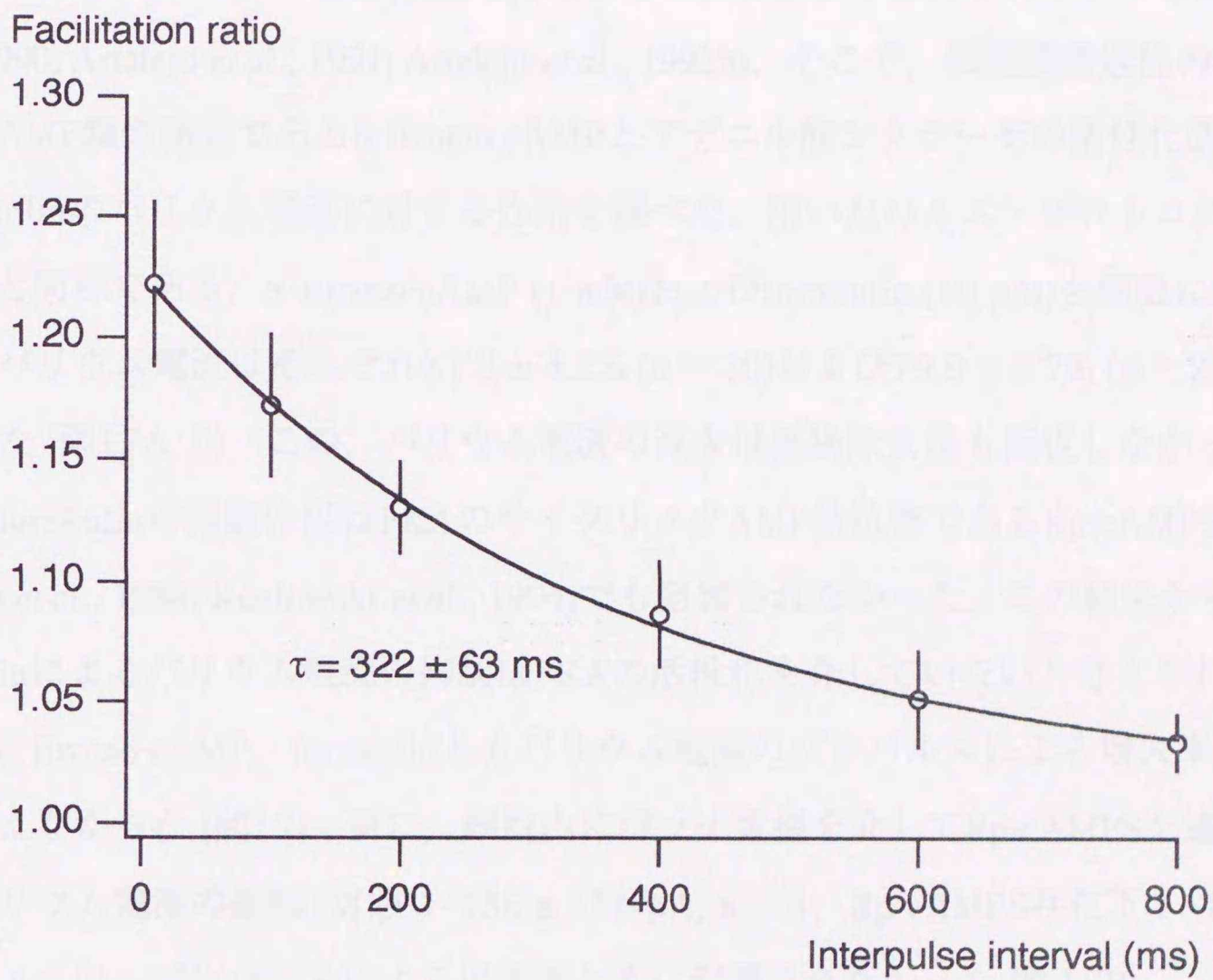
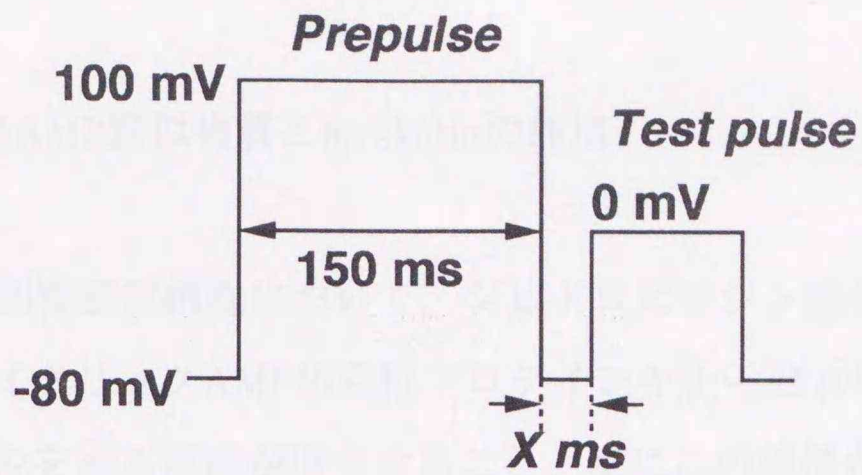


図16 バリウム電流のfacilitationのパルス間隔時間依存性

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。

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型カルシウムチャンネルは、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ン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ン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 μ M)を細胞に投与すると、バリウム電流はそれぞれ $81.8 \pm 4.2\%$ ($n = 20$)および $79.9 \pm 2.7\%$ ($n = 21$)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 GTP γ SとGDP β S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ン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ンネル電流のfacilitationを担っていることが報告されている。この仮説を検

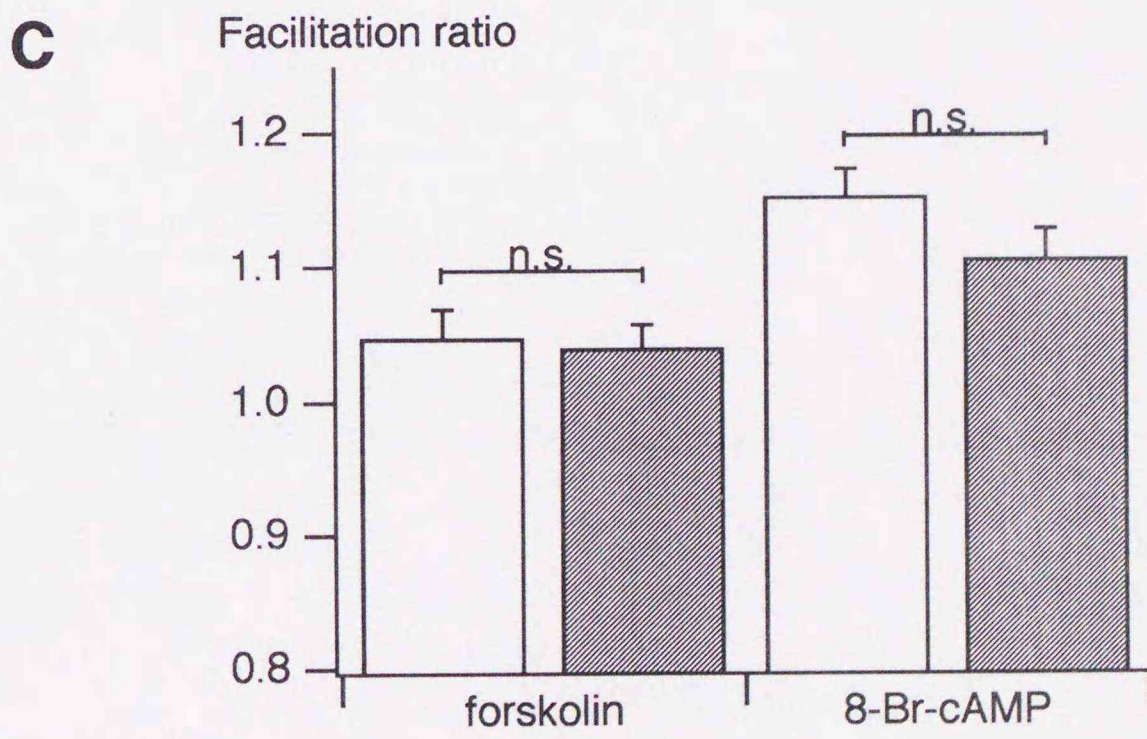
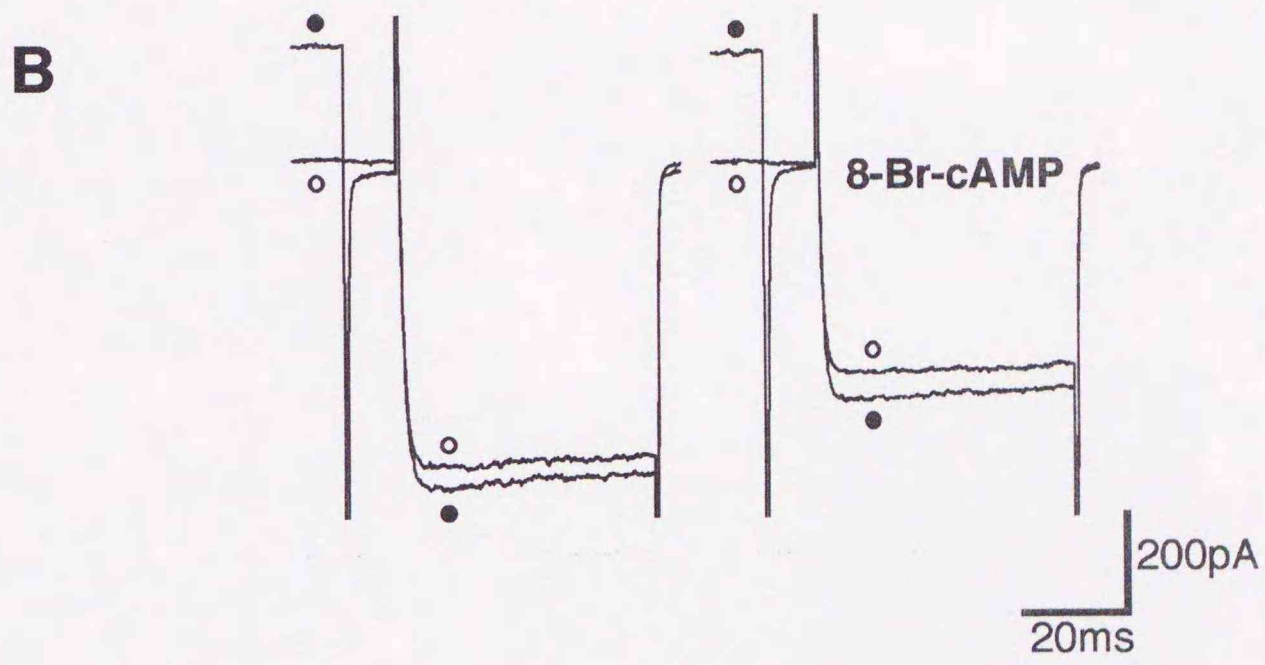
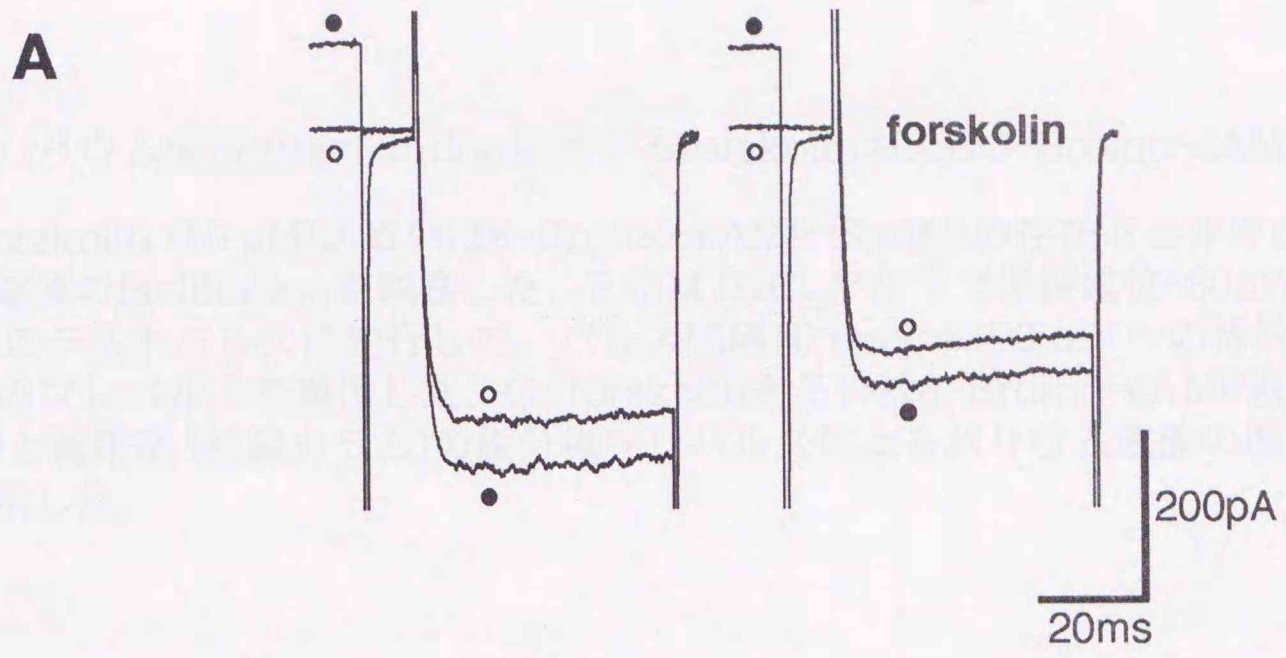


図17 バリウム電流のfacilitationに対するforskolinおよび8-Bromo-cAMPの作用

A,B: forskolin (10 μ M)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.

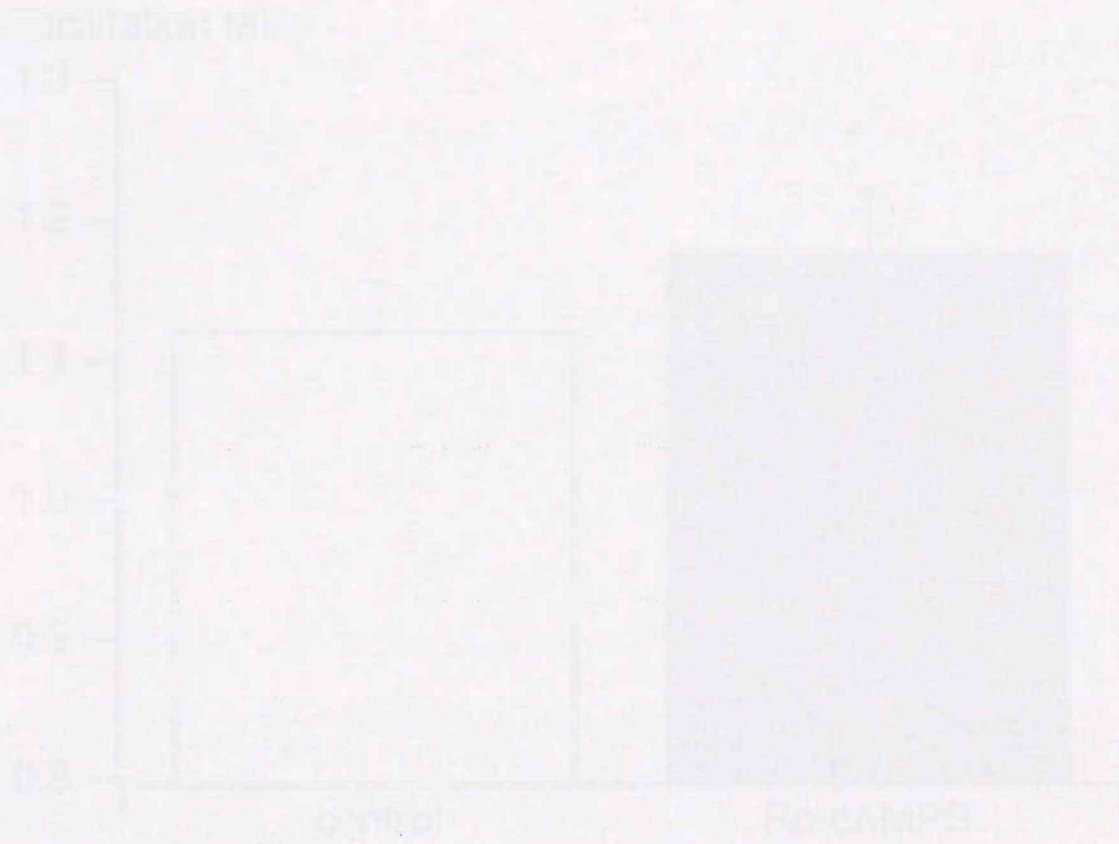


図18 バリウム電流のfacilitationに対するforskolinおよび8-Bromo-cAMPの作用

A: 細胞内に8-Bromo-cAMPを注入し、その作用を観察した. B: forskolinを注入し、その作用を観察した. C: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. D: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. E: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. F: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. G: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. H: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. I: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. J: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. K: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. L: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. M: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. N: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. O: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. P: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. Q: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. R: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. S: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. T: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. U: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. V: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. W: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. X: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. Y: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した. Z: 細胞内にBaCl₂を注入し、その作用を観察した.

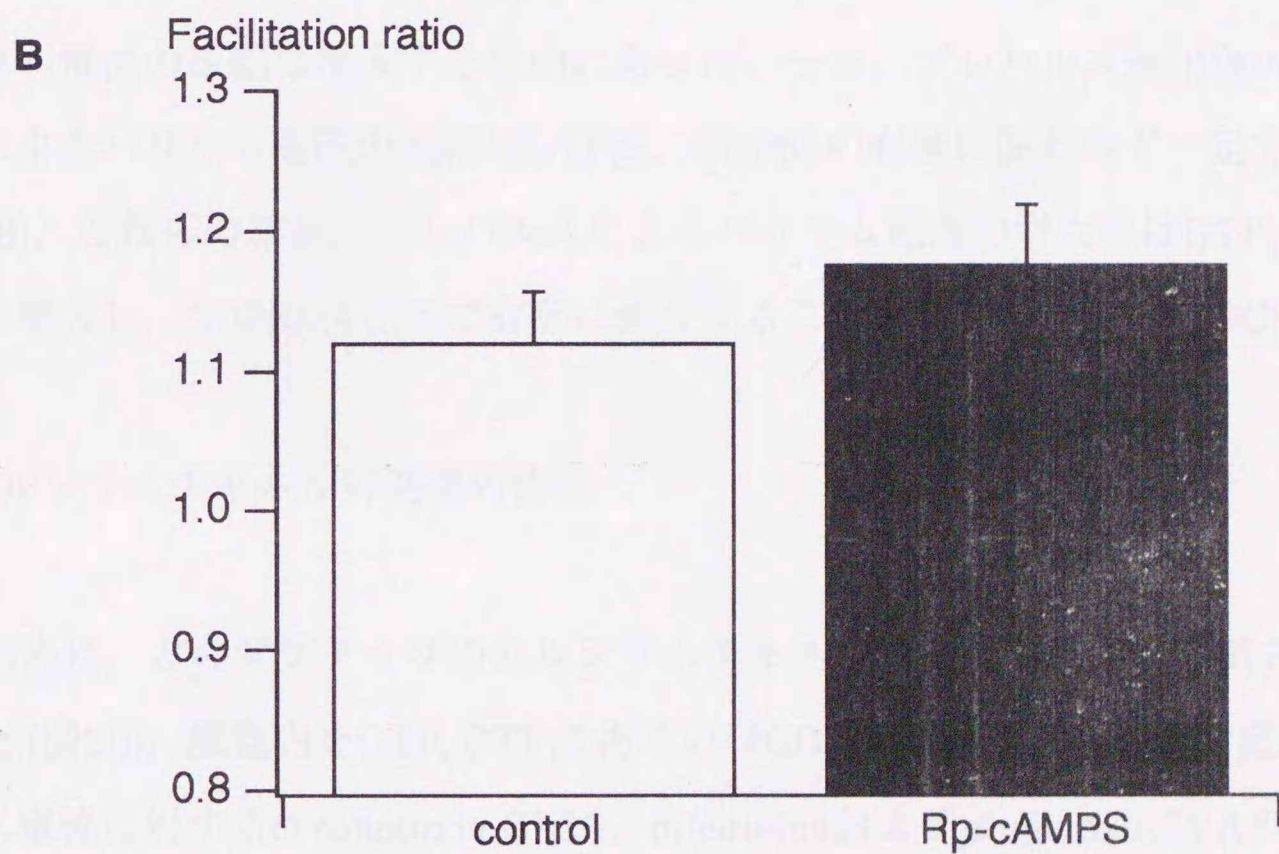
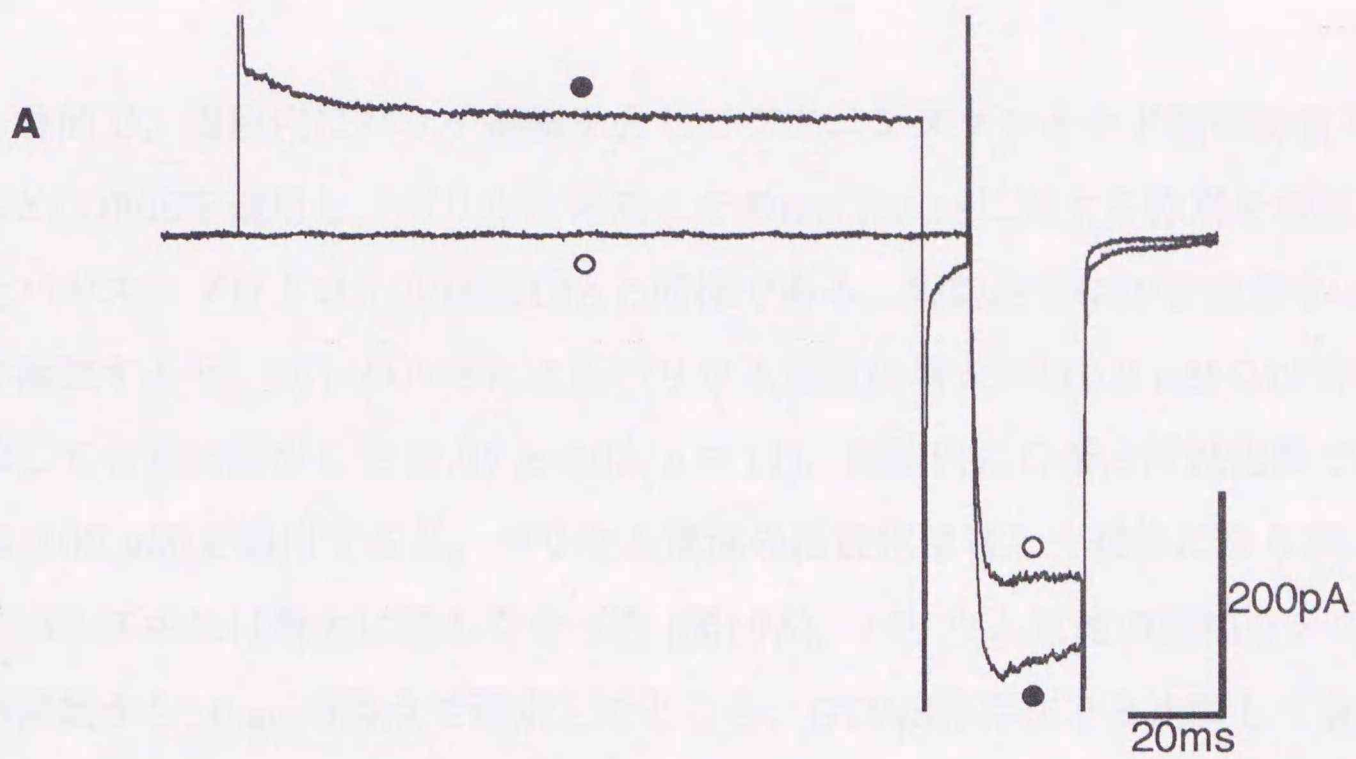


図18 バリウム電流のfacilitationに対するRp-cAMPSの作用

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.

証する目的で、細胞内にパッチ電極を介してグアニンヌクレオチド類似物質であるGTP γ SとGDP β S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GTP γ S (100 μ M)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、GTP γ S非存在下と比較して有意に小さかった。これに対して、細胞内にG蛋白を抑制するGDP β Sを適用した場合には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GTP γ S, GDP β S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GTP γ S存在下で有意に増大し、GDP β S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, GTP γ S,あるいはGDP β S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 $10.1 \pm 1.6\%$ ($n = 8$), $14.0 \pm 1.3\%$ ($n = 5$), $78.3 \pm 3.5\%$ ($n = 5$)抑制した。図19に示したようにGTP γ S (100 μ M)はバリウム電流の振幅を減少させた。逆にGDP β S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 γ S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

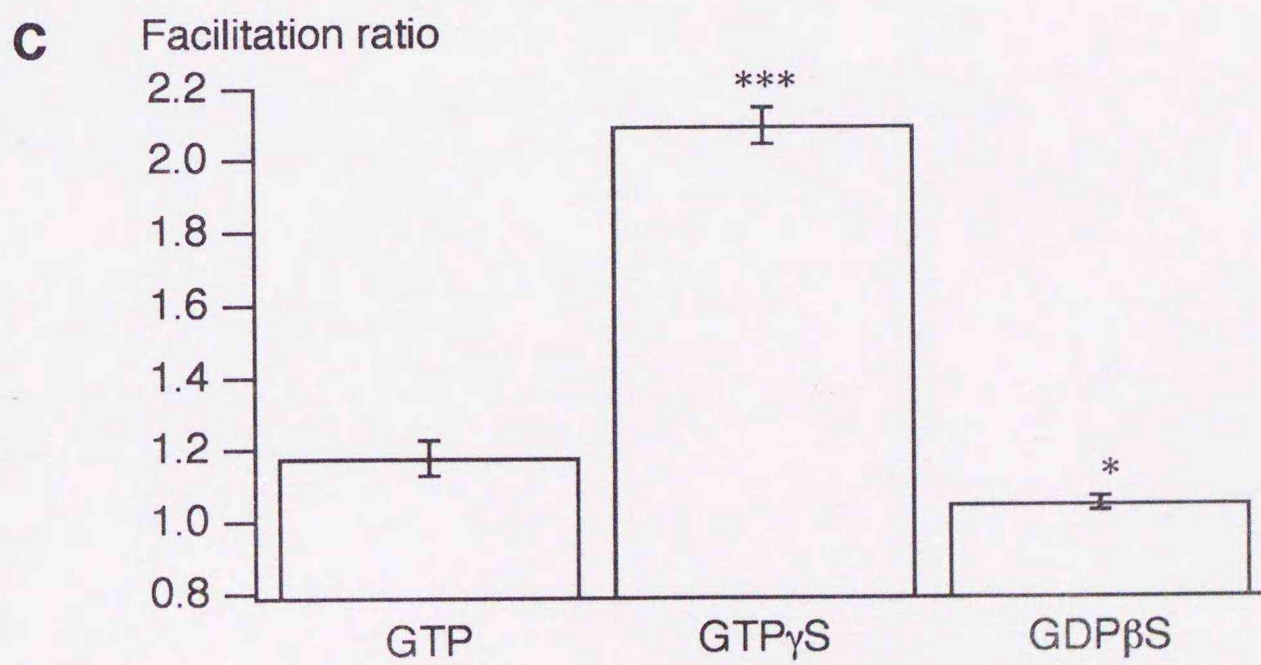
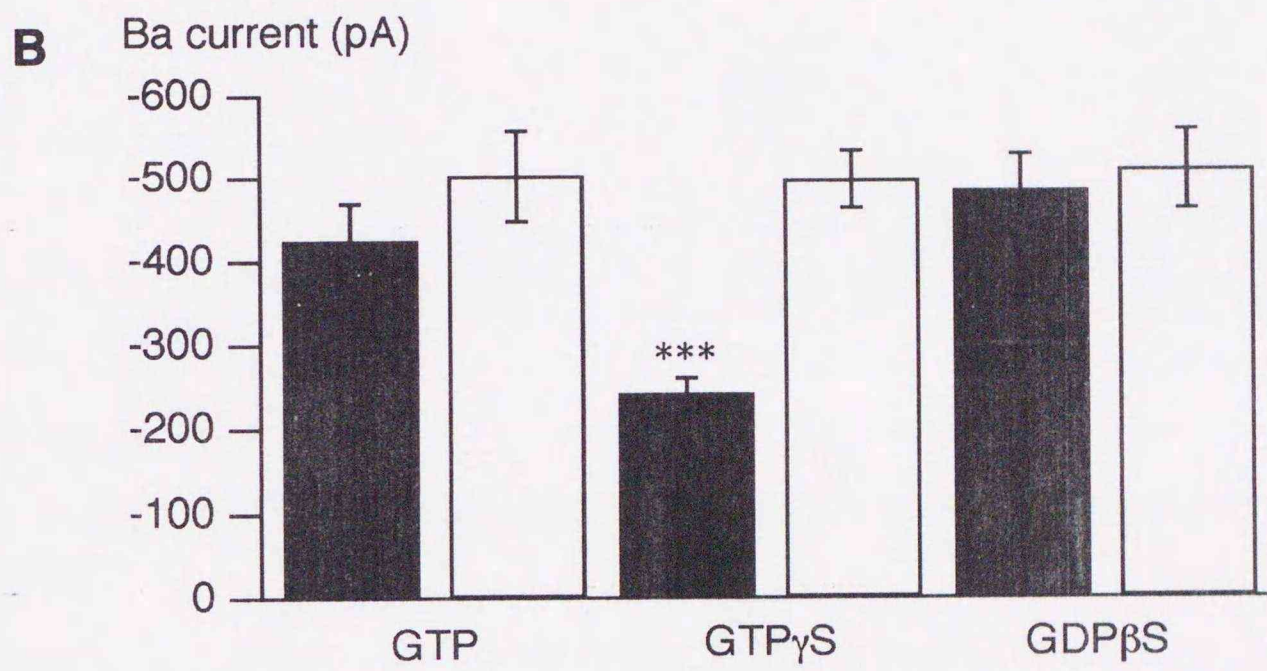
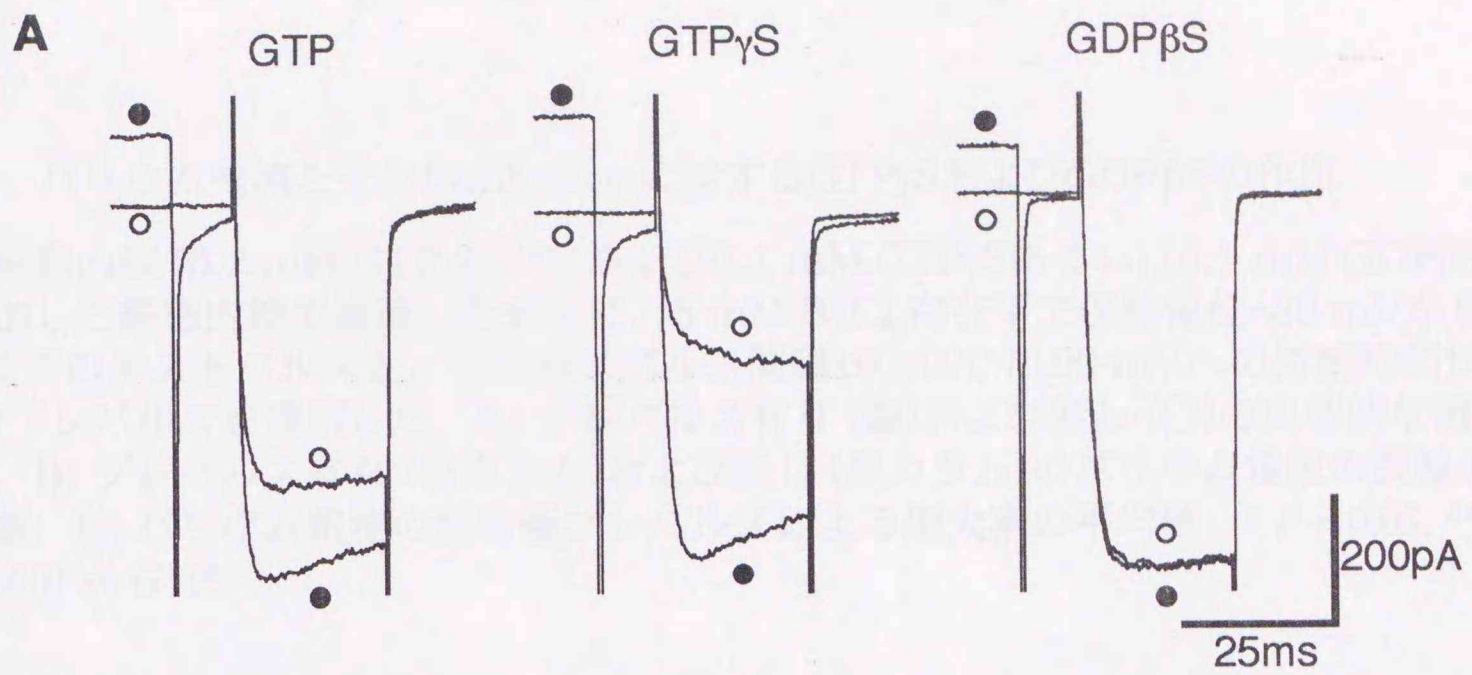
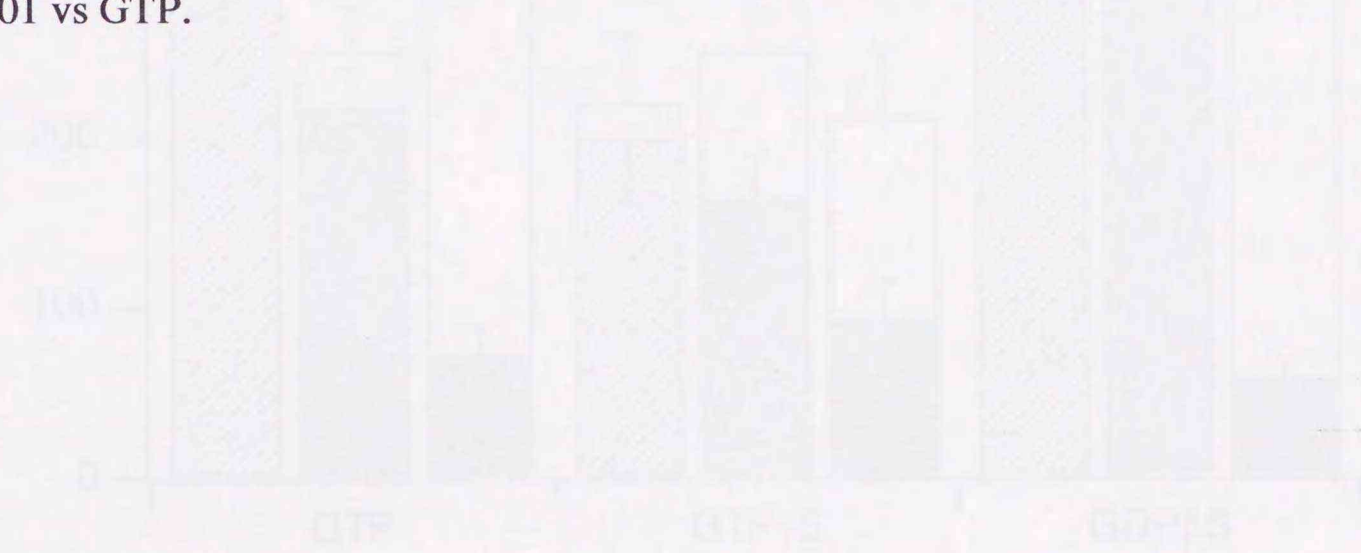


図19 バリウム電流とそのfacilitationに対するGTP γ SおよびGDP β Sの作用

正常細胞内液 (0.2 mM GTPを含む) および0.1 mM GTP γ Sあるいは0.1 mM GDP β S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.



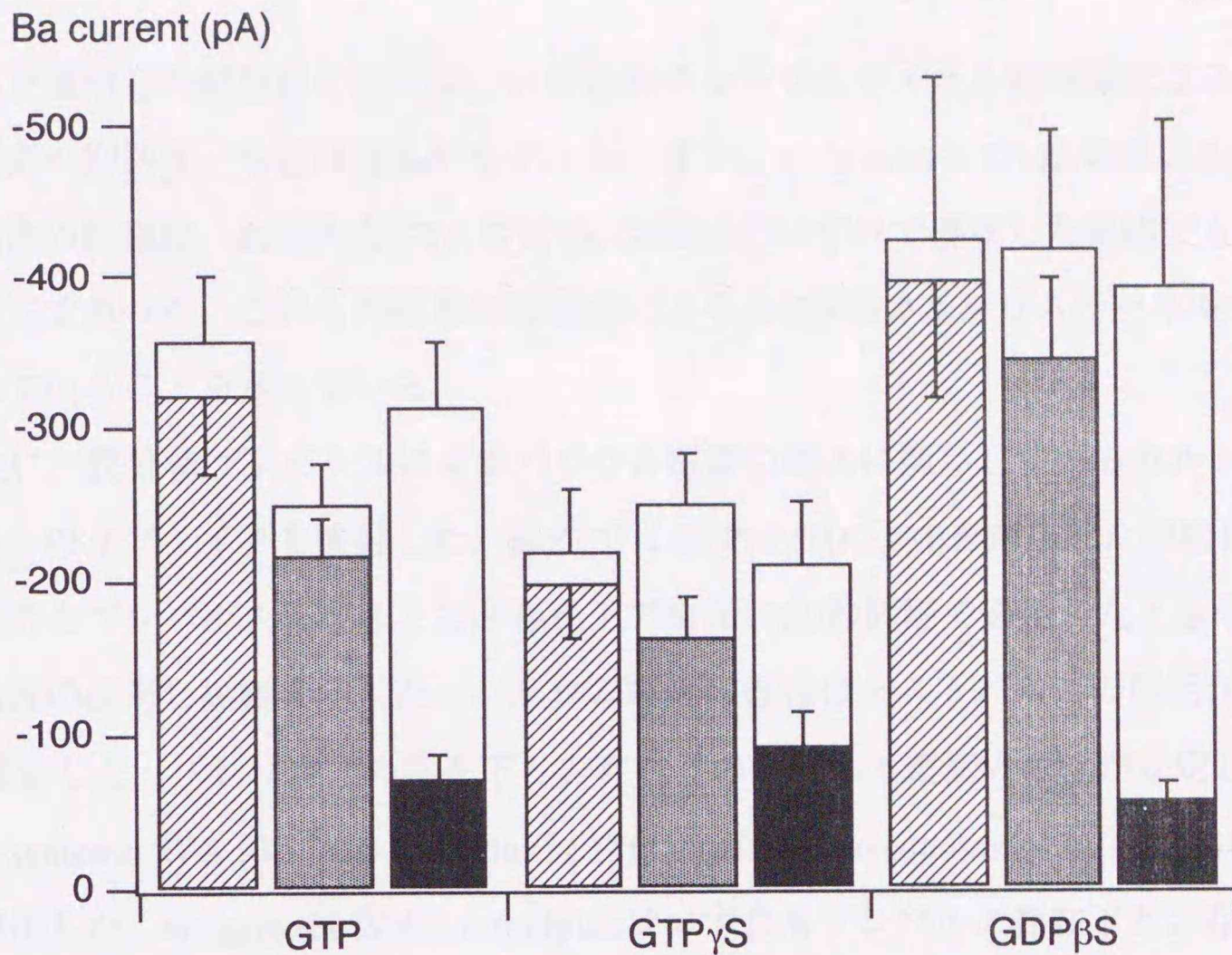


図20 GTP γ SおよびGDP β Sを添加した細胞のバリウム電流に対するカルシウムチャンネル抑制薬の作用

正常細胞内液 (0.2 mM GTPを含む)および0.1 mM GTP γ Sあるいは0.1 mM GDP β S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ンネル抑制薬適用前 (白カラム)と0.1 μ M ω -agatoxin IVA (斜線カラム), 10 μ M nifedipine (ドットカラム)および1 μ M 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ン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, GTP γ S, 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型カルシウムチャン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ンネルのサブタイプを検討した。図21ではGTP γ S (100 μ M)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、 ω -agatoxin IVA (0.1 μ M), nifedipine (10 μ M)および ω -conotoxin GVIA (1 μ M)を順次適用した。 ω -agatoxin IVAとnifedipine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 ω -conotoxin 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GTP γ S (100 μ M)を適用した細胞のカルシウムチャンネル抑制薬存在下、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、 ω -conotoxin 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 ω -conotoxin GVIAによりバリウム電流のfacilitationは消失した。

GTP γ S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 μ M)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、 $183 \pm 59\%$ および $183 \pm 63\%$, $n = 5$)。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。

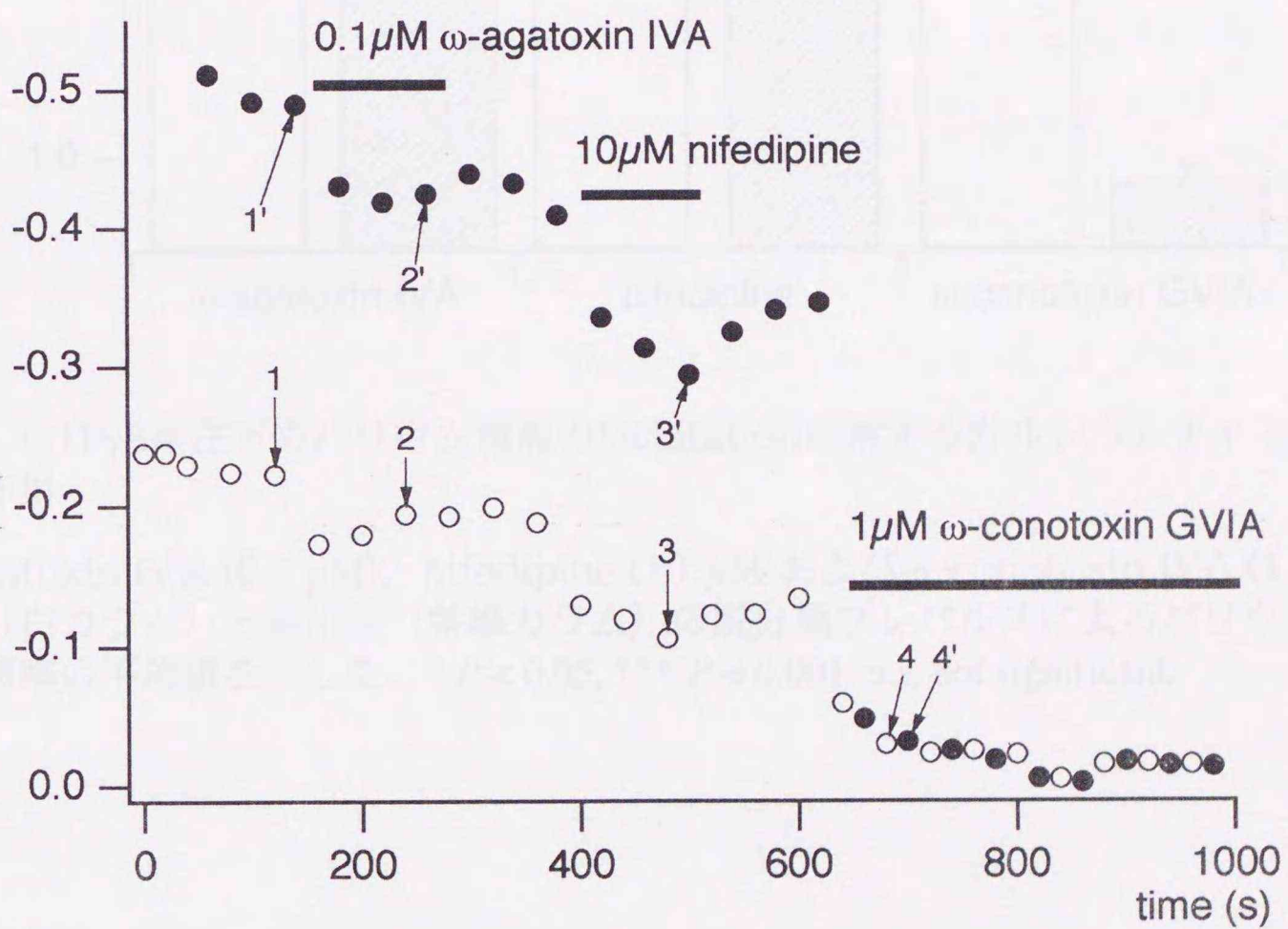
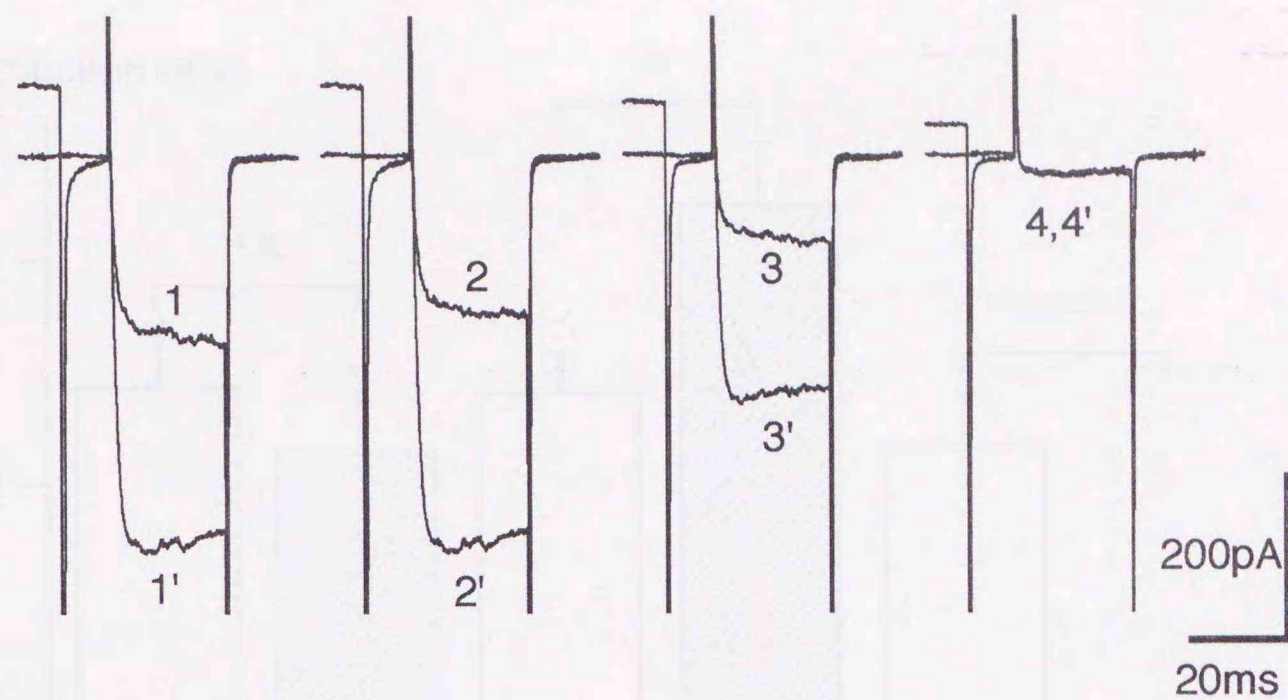


図21 GTP γ S存在下のバリウム電流に対するカルシウムチャンネル抑制薬の作用

細胞にテストパルスとプレパルスの有り無しで交互に20秒間隔で適用しバリウ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。

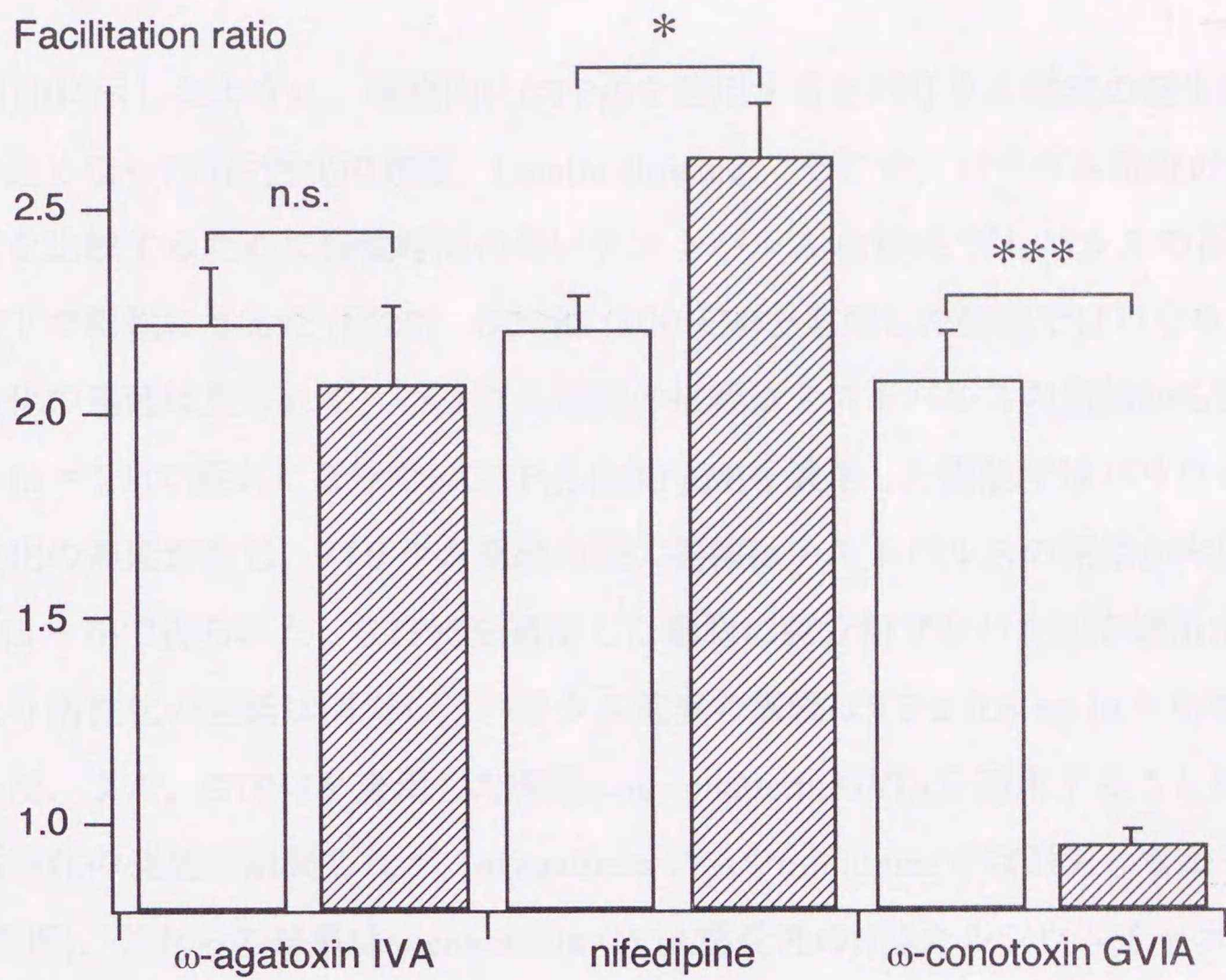


図22 GTP γ S存在下のバリウム電流のfacilitationに対するカルシウムチャネル抑制薬の作用

ω -Agatoxin IVA ($0.1 \mu\text{M}$), nifedipine ($10 \mu\text{M}$)および ω -conotoxin IVA ($1 \mu\text{M}$)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GTP γ S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). GDP β S (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. GTP γ S (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. GTP γ S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、GTP γ Sを適用した細胞に 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nifedipine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型カルシウムチャン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 μ g/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 μ g/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).

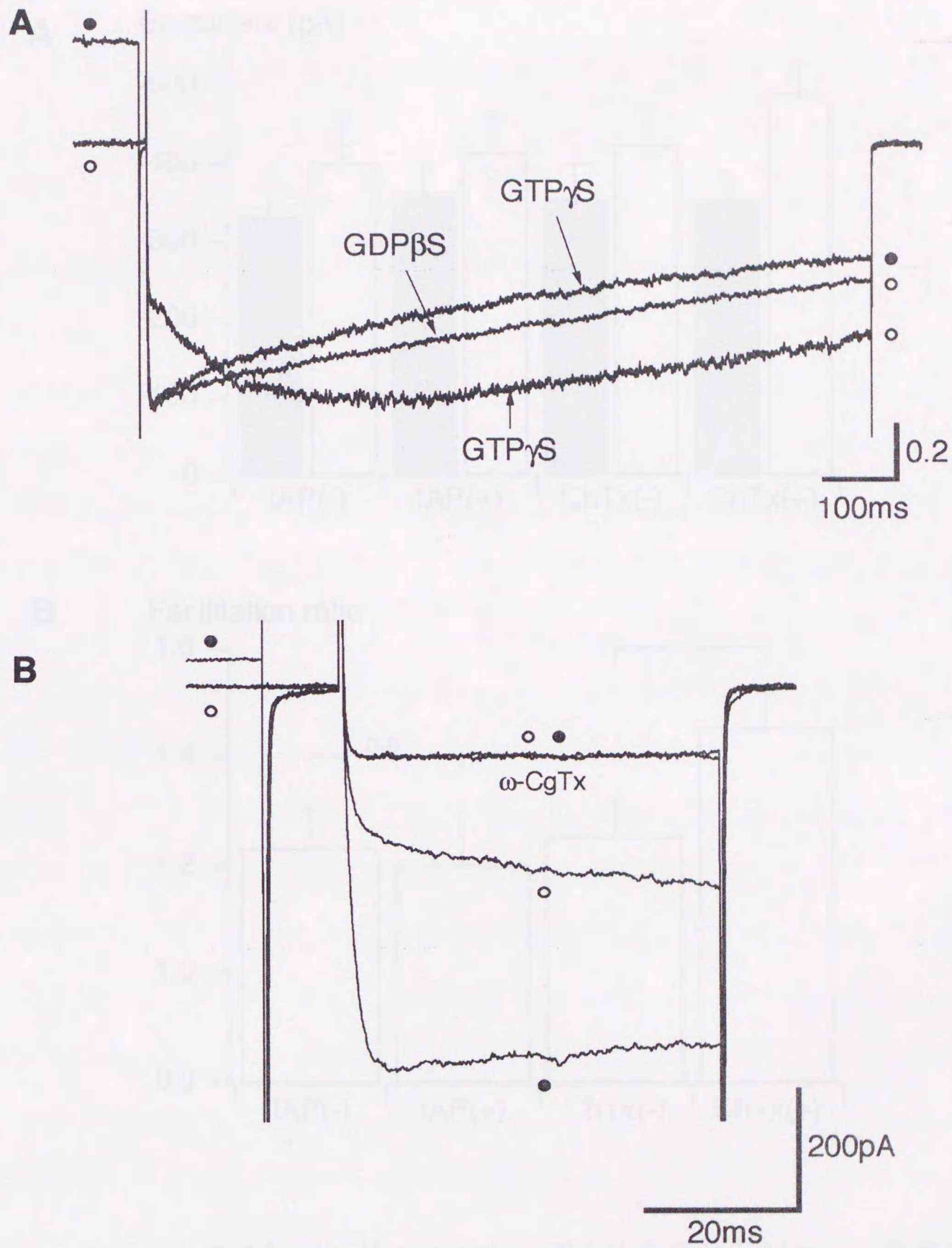


図23 バリウム電流の活性化速度に対するGTP γ Sと ω -conotoxin GVIAの作用

A: 細胞内にGTP γ SおよびGDP β S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。GTP γ S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。

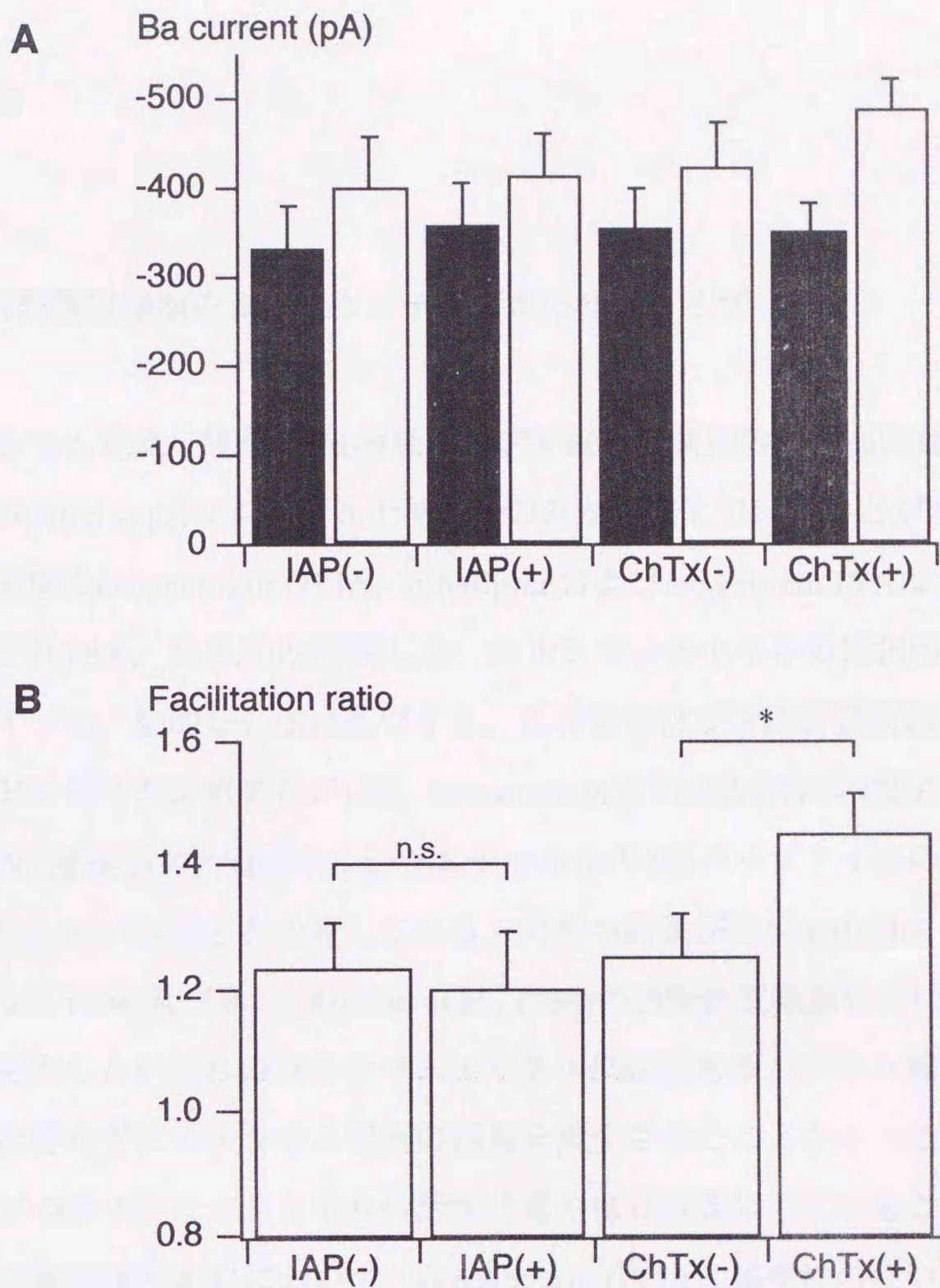


図24 バリウム電流とそのfacilitationに対する百日咳毒素およびコレラ毒素の作用

A: 百日咳毒素存在下 ($0.5 \sim 1 \mu\text{g/ml}$, $5 \sim 12 \text{ h}$)と非存在下, およびコレラ毒素存在下 ($1 \mu\text{g/ml}$, 5 h)と非存在下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とプレパルス (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.

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

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ン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ン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ン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型カルシウムチャン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200 ms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、カルシウムチャンネルを介した電流のcharge carrierに Ba^{2+} 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 Ca^{2+} による ω -conotoxin GVIAのN型カルシウムチャンネルへの結合阻害 (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感受性チャンネルがニューロンのN型カルシウムチャン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型カルシウムチャン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ンネルの関与

ウシとネコの副腎髄質細胞では、L型カルシウムチャンネルの方が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;

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ン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 ω -agatoxin IVA感受性カルシウムチャン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 μ M)およびnifedipine (10 μ M)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 $8 \pm 2\%$ ($n = 4$)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型カルシウムチャン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, ω -conotoxin 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 ω -conotoxin GVIA感受性のN型カルシウムチャンネルとnifedipine感受性のL型カルシウムチャンネルであり, いずれのカルシウムチャン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ン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

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、20 mV以上の電位へのプレパ

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、ラット上頸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GTP γ S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GDP β S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。GTP γ S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、GDP β S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GTP γ S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GDP β S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

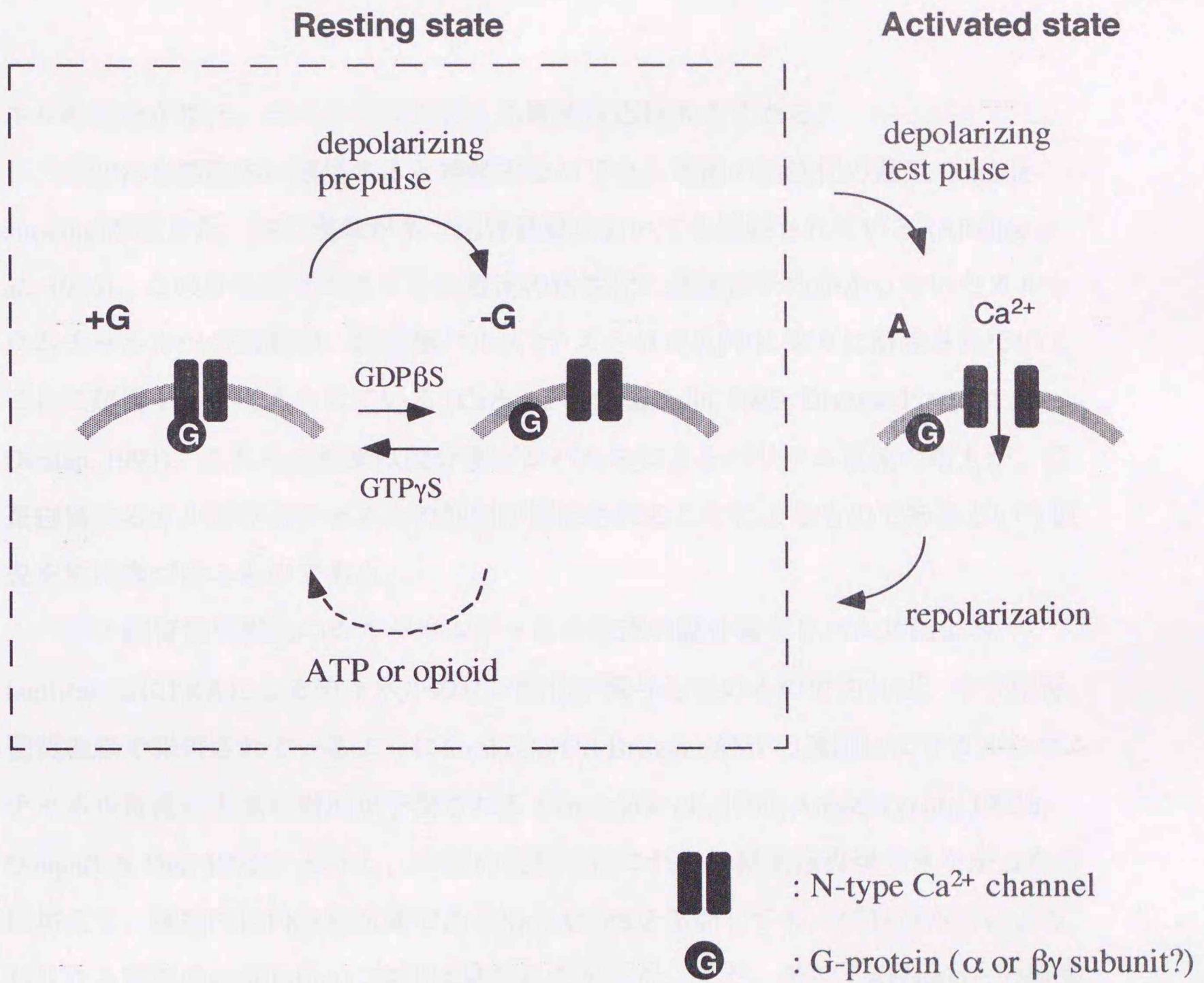


図25 G蛋白によるカルシウムチャネルの抑制とその解除

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。

GTP γ S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-Pierluzzi & 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

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.

D Facilitationに関与するカルシウムチャネルのサブタイプ

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. GTP γ Sをブタ副腎髄質細胞に適用するとGTP γ S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GTP γ S, GDP β Sの処置に関わらず, ほぼ同じであった. 逆に, GTP γ S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, GTP γ S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, GTP γ S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ならば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

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_s 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

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。上頸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GTPγS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GTPγS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の説明できる。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。

1. 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 ω -conotoxin GVIA, nifedipineおよび ω -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。
2. 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。
3. ω -Conotoxin GVIA (1 μ M)とnifedipine (10 μ M)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 μ M)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)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。

5. 細胞に8-Bromo-cAMP (1 mM)あるいはforskolin (10 μ M)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。
6. 細胞内にGTP γ S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GTP γ S非存在下と差がなかった。一方、GDP β S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GDP β S非存在下と差がなかった。その結果、GTP γ S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、GDP β S存在下ではほぼ消失した。
7. GTP γ S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 μ M)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。
8. 細胞内にGTP γ S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型チャン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ン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型カルシウムチャンネルが関与しており、

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 齊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。

参考文献

1. ALBILLOS, A., ARTALEJO, A.R., LÓPEZ, M.G., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. & CARBONE, E. (1994). Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J. Physiol.*, **477**, 197–213.
2. ALBILLOS, A., CARBONE, E., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. & POLLO, A. (1996a). Opioid inhibition of Ca^{2+} channel subtypes in bovine chromaffin cells selectivity of action and voltage-dependence. *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 1561–1570.
3. ALBILLOS, A., GANDÍA, L., MICHELENA, P., GILABERT, J.A., DELVALLE, M., CARBONE, E. & GARCÍA, A.G. (1996b). The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **494**, 687–695.
4. ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. & GANDÍA, L. (1993). ω -Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **336**, 259–262.
5. ANWYL, R. (1991). Modulation of vertebrate neuronal calcium channels by transmitters. *Brain Res. Rev.*, **16**, 265–281.
6. ARTALEJO, C.R., ADAMS, M.E. & FOX, A.P. (1994). Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature*, **367**, 72–76.
7. ARTALEJO, C.R., ARIANO, M.A., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1990). Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D_1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature*, **348**, 239–242.
8. ARTALEJO, C.R., DAHMER, M.K., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1991). Two types of Ca^{2+} currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. *J. Physiol.*, **432**, 681–707.
9. ARTALEJO, C.R., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1992a). ω -Conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron*, **8**, 85–95.

10. ARTALEJO, C.R., ROSSIE, S., PERLMAN, R.L. & FOX, A.P. (1992b). Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} current facilitation in chromaffin cells. *Nature*, **358**, 63—66.
11. BALLESTA, J.J., BORGES, R., GARÍA, A.G. & HIDALGO, M.J. (1989). Secretary and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J. Physiol.*, **418**, 411—426.
12. 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.
14. CACHELIN, A.B., PEYER, J.E.D., KOKUBUN, S. & REUTER, H. (1983). Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*, **16**, 1027—1036.
18. 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.
20. DOLPHIN, A.C. (1996). Facilitation of Ca^{2+} current in excitable cells. *Trends Neurosci.*, **19**, 35—43.
21. DOUPNIK, C.A. & PUN, R.Y.K. (1992). Cyclic AMP-dependent phosphorylation

modifies the gating properties of L-type Ca^{2+} channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, **420**, 61—71.

22. DOUPNIK, C.A. & PUN, R.Y.K. (1994). G-protein activation mediates prepulse facilitation of Ca^{2+} channel currents in bovine chromaffin cells. *J. Membr. Biol.*, **140**, 47—56.
23. FENWICK, E., MARTY, A. & NEHER, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **331**, 599—635.
24. FORSBERG, E.J., LI, Q. & XU, Y. (1995). Cation channel activated by muscarinic agonists on porcine adrenal chromaffin cells. *Am. J. Physiol.*, **269**, E43—E52.
25. GANDÍA, L., ALBILLOS, A. & GARCÍA, A.G. (1993). Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 671—676.
26. GANDÍA, L., BORGES, R., ALBILLOS, A. & GARCÍA, A.G. (1995). Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, **430**, 55—63.
27. GARCÍA, A.G. & CARBONE, E. (1996). Calcium-current facilitation in chromaffin cells. *Trends. Neurosci.*, **19**, 383—384.
28. GILMAN, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 615—649.
29. GOLARD, A. & SIEGELBAUM, S.A. (1993). Kinetic basis for the voltage-dependent inhibition of N-type calcium current by somatostatin and norepinephrine in chick sympathetic neurons. *J. Neurosci.*, **13**, 3884—3894.
30. GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. (1985). A new generation of Ca^{2+} 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.
32. HOSHINO, S., KIKKAWA, S., TAKAHASHI, K., ITOH, H., KAZIRO, Y., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., KATADA, T. & UI, M. (1990). Identification of sites

- 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.
 34. 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.
 35. 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).
 38. KOZLOWSKI, R.Z., GOODSTADT, L.J., TWIST, V.W. & POWELL, T. (1994). Modulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels by $GTP\gamma S$ in response to isoprenaline, forskolin and photoreleased nucleotides. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 250—258.
 39. 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.
 40. LOPÉZ, M.G., VILLARROYA, M., LARA, B., MARTINEZ SIERRA, R., ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. & GANDÍA, L. (1994b). Q- and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **349**, 331—337.
 41. 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.

Cell, **80**, 249—257.

43. 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.
44. OTSUGURO, K., OHTA, T., ITO, S. & NAKAZATO, Y. (1996). Modulation of calcium current by ATP in guinea-pig adrenal chromaffin cells. *Pfugers Arch.*, **431**, 402—407.
45. 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.
46. 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 $\alpha 1$ 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.
49. 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.
50. 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 cAMP-receptor 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.
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.

53. 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 Ca^{2+} channels of sympathetic neurons via a pertussis toxin-insensitive but cholera toxin-sensitive pathway. *Neuron*, **13**, 657—669.

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.
2. 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.
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. GTP γ S-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.
8. GTP γ S applied intracellularly slowed the time course of activation of barium current (kinetic slowing). The kinetic slowing of barium currents by GTP γ S 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 $[Ca^{2+}]_i$ 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.

...the ... of ... in ...

...the ... of ... in ...

...the ... of ... in ...

...the ... of ... in ...

...the ... of ... in ...

...the ... of ... in ...

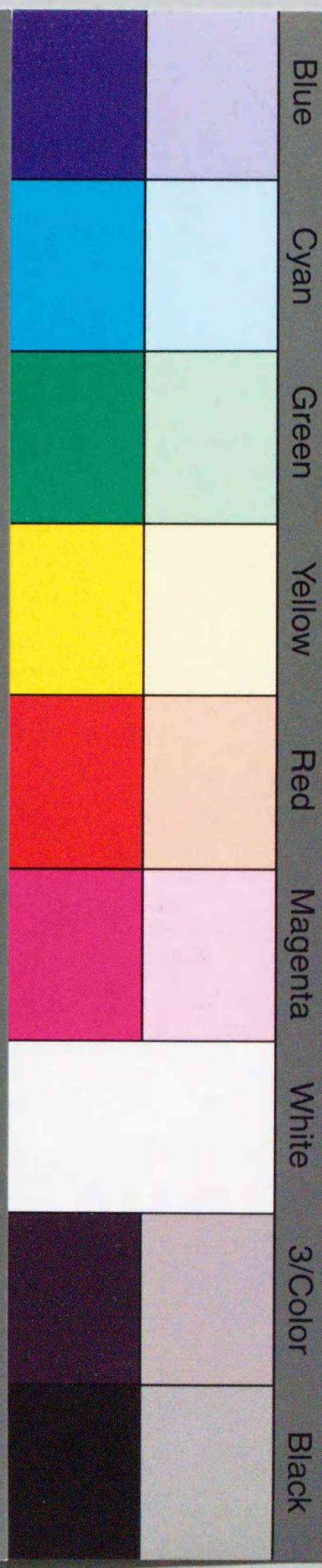
...the ... of ... in ...

...the ... of ... in ...

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

