

## エンドセリンによる副腎髄質カテコールアミン遊離に関する研究

竹 中 昭 宏

### Studies on Catecholamine Release of Adrenal Gland Evoked by Endothelin

Akihiro Takenaka

(平成6年2月2日受付)

#### 緒 言

血管内皮細胞から産生されるエンドセリン (ET) は、21 アミノ残基よりなるペプチドで、ET-1, ET-2, ET-3 の3種類のアイソフォームからなるファミリーを形成している<sup>1)</sup>。ET の産生遊離は、血栓や血小板凝集に関係する因子 (トロンビン, TGF- $\gamma$ ), 炎症に関連したサイトカイン (IL-1, TNF), 炎症のケミカルメディエーター (PAF, エンドトキシン, プラジキニン), 血管作動性ホルモン (アンジオテンシン, バゾプレシン), および血流による物理的因子 (剪応力) 等で促進される<sup>2,3)</sup>。一方, Na 利尿ペプチドファミリー (ANP, BNP, CNP) や nitric oxide (NO) 等は cyclic GMP を介して ET の産生分泌を抑制する<sup>4,5)</sup>。

ET は産生された局所でパラクリン, オートクリン的に作用し, 血管平滑筋の ET<sub>A</sub> 受容体を介した血管収縮, 血管内皮細胞の ET<sub>B</sub> 受容体刺激による NO 産生による血管の弛緩両方向の調節を介して血管の緊張性を調節し, 血流動態の変化及びその維持に関与すると考えられている<sup>6,7)</sup>。これらの調節機構における平衡の破綻は血管に緊張性の異常をきたし, 高血圧あるいは血管攣縮性疾患の発症維持に関わる因子として注目されている<sup>3,8)</sup>。これらの病態の多くは, その発症にストレスの関与が強く示されており, 外科的侵襲<sup>9,10)</sup>, 外傷<sup>11)</sup> 等のストレスで長時間にわたる血中 ET 濃度の上昇がみられることから, ET は長期ストレスに関連するペプチド因子である可能性が考えられている<sup>3)</sup>。

血管以外の組織においても, その産生と受容体の存在が明らかにされ, 各組織における局所的調節因子としての役割が注目されている<sup>3,7)</sup>。近年, 脳神経組織においても ET 受容体の存在<sup>12,13)</sup>, preproET-mRNA の発現<sup>12,13)</sup>, 神経伝達物質の遊離に対する作用, 例えば ET-3 の大脳皮質および線状体におけるノルアドレナリン, ドーパミン分泌促進作用等が明らかにされている<sup>14,15)</sup>。末梢神経系では, 交感神経終末および副交感神経終末において, 神経伝達物質の遊離を促進的, あるいは抑制的に調節していることが報告され<sup>16-20)</sup>, 局所ホルモ的に, あるいは神経伝達物質として働いている可能性が示唆されている。

副腎髄質は高度に毛細血管の発達した組織で, その主要細胞はクロマフィン細胞と血管内皮細胞であり, 血管内皮細胞と神経系の相互作用を研究するモデルとして有用である。副腎髄質クロマフィン細胞には, ET の高親和性結合部位が存在することや<sup>21)</sup>, ET-1 がカテコールアミン (CA) 遊離作用を有することが報告されている<sup>22-26)</sup>。しかし, その作用の詳細や生理的意義は不明である。副腎髄質 CA は, 疼痛, 外科的侵襲や各種ストレスに対する恒常性維持のために分泌されることはよく知られている。その分泌は, 大内臓神経を介して主に中枢性に支配されているが, 本研究では, 血管由来の ET が, 副腎髄質 CA 遊離に対して局所的に調節作用している可能性を考え, ET の CA 遊離作用とその機序について, イヌ灌流副腎およびウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞を用いて検討した。

#### 材料ならびに方法

##### I. イヌ副腎灌流実験

実験には室温 (23±3°C) で飼育した体重 9-25 kg

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 石川武憲教授) 本論文の要旨の一部は, 第34回歯科基礎医学会総会 (平成4年10月) において発表した。

の健康な雌雄の雑種成犬を実験に使用した。Sodium pentobarbital (30 mg/kg i.v.) で麻酔したイヌの両側副腎を速やかに摘出後、Robinson<sup>27)</sup>の方法に準拠し逆灌流を行った<sup>28)</sup>。灌流は、100% O<sub>2</sub> ガスで飽和した modified Krebs-Ringer phosphate 液 (NaCl 137.5 mM, KCl 5.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.38 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.38 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.6 mM, glucose 8.5 mM, pH 7.3) で水柱 60 cm の压力下 (灌流量 1.2 ~ 4.0 ml/min) に 30 ± 1°C の条件で行った。流出灌流液は、15秒毎で連続的に試験管に採取し、CA の測定に供した。

## II. クロマフィン細胞を用いた実験

### 1. 細胞の単離法と培養法

ウシの副腎髓質からクロマフィン細胞の単離は Fenwick<sup>29)</sup>らの方法の改良法で行った<sup>30)</sup>。すなわち、副腎を Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free-Krebs Ringer phosphate (KRP) 液 (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.15 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.85 mM and glucose 10 mM, pH 7.4) で灌流し、血液を洗浄後、0.0175% collagenase, 0.004% trypsin inhibitor, 0.5% bovine serum albumin (BSA) を含む Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free-KRP 液を用い 37°C の条件で40分間循環灌流した。副腎髓質を皮質から分離し細切した後、新しい酵素液中で 37°C 下に、20分間 O<sub>2</sub> を通気しながら強く振盪して細胞を単離した。単離した副腎髓質クロマフィン細胞を遠心 (10×g, 10分間) して3回洗浄後、10%ウシ胎児血清, 100 unit/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin, 0.1 mM ascorbate, 5 mM HEPES を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM 培地) 中に浮遊させた。CA 遊離実験には、培養用プラスチックシャーレ (35 mm 径) に 10<sup>6</sup> cells/2 ml/dish で単層培養を行った。培養は 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空気とした気相下 37°C に恒温した CO<sub>2</sub> インキュベータ中で行い、培養液は 2 - 3 日毎に交換した。実験には培養 5 - 7 日目の細胞を用いた。細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]i) の測定には 5 × 10<sup>5</sup> cells/ml に調整した細胞浮遊液 80 ml を Erlenmeyer plastic flask に分注し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中にて 24 - 72 時間浮遊培養した細胞を使用した。

### 2. CA 遊離実験

単層培養細胞は、予め培養液を KRP 液と交換し、室温にて 2 時間放置した後、実験に供した。新しい KRP 液あるいは前処置薬物を含む液 1 ml と交換し、37°C で 3 分間のプレインキュベーション後、さらに各種薬物を含む KRP 液と交換することにより反応を開始した。一定時間インキュベーションした後、反応

液より 0.5 ml 採取し、CA 量の定量に供した。

### 3. [Ca<sup>2+</sup>]i 測定

[Ca<sup>2+</sup>]i の測定は、クロマフィン細胞に Ca<sup>2+</sup> indicator, fura-2 を負荷し、二波長蛍光測光により測定した<sup>31)</sup>。

浮遊培養した副腎クロマフィン細胞を NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, glucose 5 mM, BSA 0.5%, HEPES-Tris buffer 10 mM (pH 7.4 ± 0.1) を含む medium で洗浄後、fura-2/AM (1 μM) を含む溶液に浮遊し、32°C, 40分間インキュベーションすることにより細胞に負荷した後、さらに 2 倍量の medium を加え 40分間インキュベーションすることにより細胞に取り込まれた acetoxymethylester の加水分解を十分におこなった。Fura-2 を負荷した細胞を遠心 (10×g, 10分間) にて 2 回洗浄した後、細胞浮遊液 (5 × 10<sup>7</sup> cells/ml) を調整した。

[Ca<sup>2+</sup>]i の測定には、Hitachi F2000 蛍光分光光度計を用い、細胞浮遊液 (細胞密度 3 × 10<sup>6</sup> cells/ml をキュベット中でゆっくり攪拌しつつ、32°C で二つの励起波長 (340 nm, 380 nm) での蛍光強度 (蛍光波長 510 nm) の比から以下の式により計算した。

$$[Ca^{2+}]i = K_D \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \cdot \frac{F_{min}(\lambda 380) / F_{max}(\lambda 380)}{R = \frac{F(\lambda 340) - Z(\lambda 340)}{F(\lambda 380) - Z(\lambda 380)}}$$

R<sub>max</sub>: 飽和 Ca<sup>2+</sup> 下での fura-2 の R 値

R<sub>min</sub>: 無 Ca<sup>2+</sup> 下での fura-2 の R 値

Z : サンプルのみの自己蛍光

K<sub>D</sub>, 解離定数は 224 nM を使用した (Grynkiewicz<sup>32)</sup> ら)。

Digitonin (100 μM) で細胞膜を透過性とするこにより F<sub>max</sub> を、またアルカリ条件下 EDTA (10 mM) で Ca<sup>2+</sup> をキレートすることにより F<sub>min</sub> をもとめた。

細胞外液の組成を変化させるときは、遠心 (500 × g, 30秒) にて洗浄後、組成を変化させた溶液に細胞を浮遊させた。

### 4. Ba<sup>2+</sup> 流入の測定

Ba<sup>2+</sup> は Ca<sup>2+</sup> チャンネルを通して流入し、細胞内で再分配 (Ca<sup>2+</sup> ポンプによる細胞内小器官への取り込み、あるいは細胞外への汲み出し) を受けず細胞内に維持されることから Ca<sup>2+</sup> 流入を、よりの確に反映する指標となる<sup>33,34)</sup>。さらに、Ba<sup>2+</sup> は fura-2 と結合し、340 nm, 380 nm の蛍光を Ca<sup>2+</sup> と同様に変化させることから、fura-2 を用い [Ba<sup>2+</sup>]i の変動を測定した。

Ba<sup>2+</sup> 流入は, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の測定と同様に, fura-2 を負荷したクロマフィン細胞を外液 Ca<sup>2+</sup> を除去した medium に浮遊後, Ba<sup>2+</sup> の 10 μM を添加し、蛍光光度の比 (340/380 nm) の変化から求めた。

#### 5. Digitonin で膜透過性とした副腎クロマフィン細胞からの Ca<sup>2+</sup> による CA 遊離の測定

単層培養したウシ副腎クロマフィン細胞を KRP にて洗浄後, 1 mM EGTA を含む Ca<sup>2+</sup> free-KRP 液で 2 回洗浄して外液 Ca<sup>2+</sup> を除去し, 更に Ca<sup>2+</sup> free-KG medium (150 mM glutamate potassium, 10 mM PIPES, 5 mM nitrilotriacetic acid, 0.5 mM EGTA, 5 mM Mg-ATP, 4.5 mM magnesium acetate, 0.2% BSA, pH 7.0) で 1 回洗浄後, 10 μM digitonin を含む KG medium により 5 分間のインキュベーションにより膜透過性とした。種々の Ca<sup>2+</sup> 濃度の KG medium と交換して反応を開始した。37°C にて 20 分間のインキュベーション後, 反応液を分離し, 6% trichloroacetic acid (TCA) により除蛋白した後, 上清を CA 量の定量に供した。8-bromo cyclic AMP (8-Br cyclic AMP), cyclic AMP dependent protein kinase (A-PK) の触媒サブユニット (A-PK C.S.) は Ca<sup>2+</sup> と同時に添加した。遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度の調整は, カルシウムイオン電極 Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素 fura-2 により調整し, 遊離 Mg<sup>2+</sup> 濃度は nitrilotriacetic acid と magnesium acetate を用い 1 mM に固定した。

#### 6. Cyclic AMP 含量の定量

単層培養した副腎クロマフィン細胞を用い, CA 遊離実験と同様の方法で薬物を添加し, インキュベーション終了後, 反応液を除去した直後に, 細胞を液体チッ素で凍結した。定量時には解凍し, 5% 過塩素酸でホモジナイズした後, 超音波処理により cyclic AMP を抽出した。抽出液を遠心分離 (2,000×g, 4°C, 15分間) して除蛋白後, 上清 0.3 ml を 1 ml の Freon (1,1,2-trichlorotrifluoro-ethane):ti-n-octylamine, 1:1 (V/V) 混合物と激しく振盪して過塩素酸を中和し, 遠心 (2,000 rpm, 10分間) により水層の分離後, cyclic AMP の定量を行った。

cyclic AMP の定量には, cyclic AMP assay kit (ヤマサ) を用いて radioimmunoassay を行った。放射活性は, ガンマシンチレーションカウンター (Packard Auto Gamma 500C) で測定した。

### III. CA の定量

採取した試料の全 CA 量は, アドレナリンを標準とし, Euler and Lishajko<sup>35)</sup> の trihydroxyindole 法に従い, 励起波長 405 nm, 蛍光波長 515 nm で蛍光測定した。

### IV. Adenylate cyclase 活性の測定

副腎髄質を皮質より分離後, 氷冷した 9 倍量の 0.25 M sucrose/10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 でホモジナイズした後, 遠心分離 (7,000×g, 4°C, 15分間) し, その上清を酵素標本とした。Adenylate cyclase 活性は, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM theophylline, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP を含む medium 100 μl により, 37°C で 10 分間酵素標本と反応させ cyclic AMP 産生量より求めた。1 ml の 300 mM imidazole buffer (pH 6.5) を添加後, 90°C で 3 分間加熱することにより反応を停止した。cyclic AMP 産生量は, 上記の radioimmunoassay で測定した。

蛋白質の定量は, Lowry<sup>36)</sup> 法により標準蛋白質として BSA を用いて測定した。

### V. 統計処理

本研究の統計処理は, Student's *t* 検定により行った。

### VI. 主な使用薬物

Endothelin-1, endothelin-3, ω-conotoxin, bradykinin (ペプチド研究所), BQ-123, BQ-3020 (萬有製薬), FR139317 (藤沢薬品工業), H-89, HA1004 (生化学工業), guanosin-5'-O- (3-thiotriphosphate) (GTPγS) tetralithium salt (Boehringer Mannheim), Ro20-1724 (Hoffmann-La Roche), SK & F 96365 (SmithKline Beecham), U73122 (Upjohn Company), thapsigargin (LC Services Corporation), 5'-adenosine triphosphate (ATP) magnesium salt, 8-bromo adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-br cyclic AMP) sodium salt, diltiazem hydrochloride, econazole, neomycin sulfate, nifedipine hydrochloride, cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit (Sigma), forskolin, isobutylmethylxanthine (IBMX) (Calbiochem), adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate, Rp-diastereomer (Rp-cAMPS) sodium salt (BIOLOG Life Science Institute), guanosin-5'-triphosphate (GTP) trisodium salt (Yamasa Shoyu Co., Ltd.), fura-2 acetoxymethylester, nitrilotriacetic acid (同仁化学研究所), verapamil hydrochloride (エーザイ), digitonin, theophylline (和光純薬)。他の一般試薬はすべて特級の試薬を用いた。

## 結 果

### I. ET による副腎カテコールアミン遊離

ET の副腎 CA 遊離について, イヌ摘出灌流副腎およびウシ培養副腎クロマフィン細胞を用いて検討し

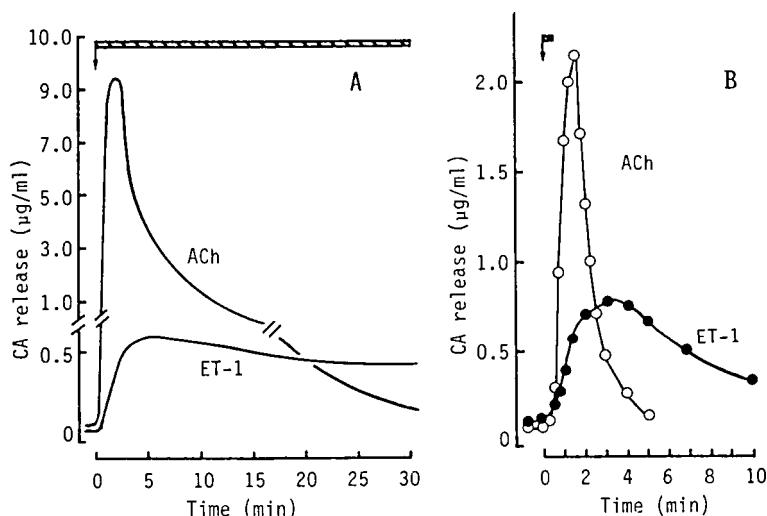


図1 イヌ摘出灌流副腎における acetylcholine (ACh,  $5 \mu\text{M}$ ) および endothelin-1 (ET-1)  $30 \text{ nM}$  の持続的あるいは30秒間の刺激による CA 遊離の経時変化。

▨▨▨▨: 30分間の持続刺激 (A), 30秒間の一時性刺激 (B)。

た。

イヌ摘出灌流副腎からの CA 自然遊離量は  $0.71 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{min}$ , 灌流流出液濃度は,  $0.29 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $n=30$ ) であった。

ET と ACh による CA 遊離の典型的な時間経過を図1に示す。イヌ摘出灌流副腎を ET-1 ( $100 \text{ nM}$ ) で持続灌流すると5分前後でピークとなり, 以後持続する CA 遊離を認めた。ACh ( $10 \mu\text{M}$ ) の持続灌流は, 投与直後から急速な CA 遊離を引き起こし, 2分前後でピークとなり以後急速に減少した (図1-A)。また, ET による CA 遊離は ACh に比べ onset が遅かった。ET-1 の30秒間の投与によっても長時間持続する CA 遊離を認めた (図1-B)。

ウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞でも ET-1 ( $100 \text{ nM}$ ) の添加により持続的な CA 遊離を認めた (図2)。

ET 受容体には,  $\text{ET}_{\text{A,B,C}}$  の3種のサブタイプがクローニングされている<sup>3,6,37</sup>。ラットの副腎髄質には ET-1 および ET-3 に高親和性結合部位の存在することが報告されているが, 詳細は不明である<sup>21</sup>。そこで, 副腎 CA 遊離に関与する ET 受容体の同定を試みた。

ウシ培養副腎クロマフィン細胞に ET-1 を添加すると,  $30 \text{ pM}$  から CA 遊離を生じ, 最大反応は  $10-30 \text{ nM}$  で最大となる CA 遊離を認めた (図3)。ET-3 ( $30-100 \text{ nM}$ ) も CA 遊離を生じ, その用量-反応曲線は ET-1 のものとよく一致していた。特異的  $\text{ET}_{\text{B}}$  受容体賦活薬 BQ-3020<sup>38</sup>) ( $0.1-100 \text{ nM}$ ) も ET-1 と

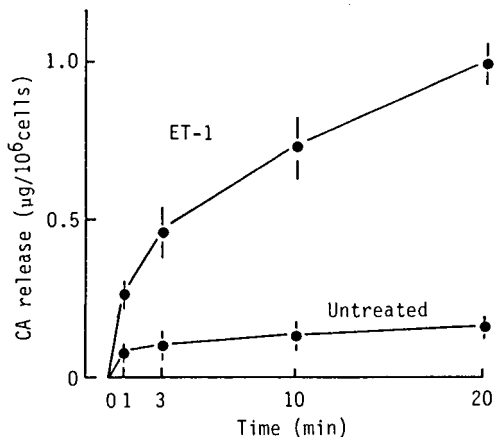


図2 ET-1 ( $100 \text{ nM}$ ) によるウシ培養副腎クロマフィン細胞から遊離される CA の経時変化。

細胞を反応液で洗浄後3分間プレインキュベーションを行い, ET-1 を含む反応液に交換することにより反応を開始した。表記の時間インキュベーション後, 反応液中に遊離された CA 量を測定した。

各値は3例の平均  $\pm$  S.E.M. を示す。

ET-3 とほぼ同程度の CA 遊離を引き起こした (図3)。

特異的  $\text{ET}_{\text{A}}$  受容体の拮抗薬 FR 139317<sup>38</sup>) ( $0.1 \text{ nM}-10 \mu\text{M}$ ) および BQ-123<sup>38</sup>) ( $0.1 \text{ nM}-10 \mu\text{M}$ ) の前処置によっては, ET-3 ( $30 \text{ nM}$ ) による CA 遊離は軽度には抑制されなかった (図4)。従って, ET は  $\text{ET}_{\text{B}}$  受容体を介して CA 遊離を引き起こしているこ

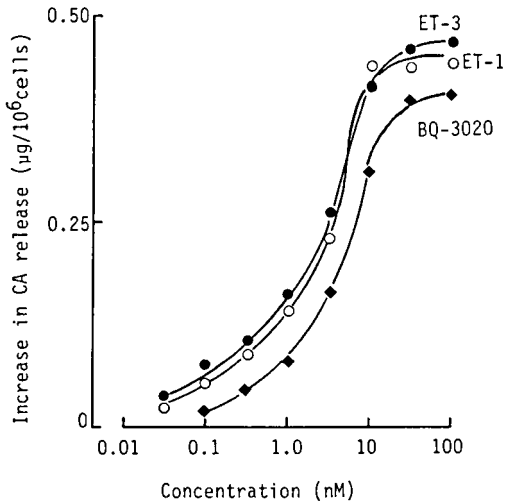


図3 ウシ培養副腎クロマフィン細胞における ET-1, ET-3 および BQ-3020 による CA 遊離の用量-反応曲線。各種薬物で 9 分間インキュベーションした時の遊離量を自然遊離量との差から求めた。各値は 3 例の平均値を示す。

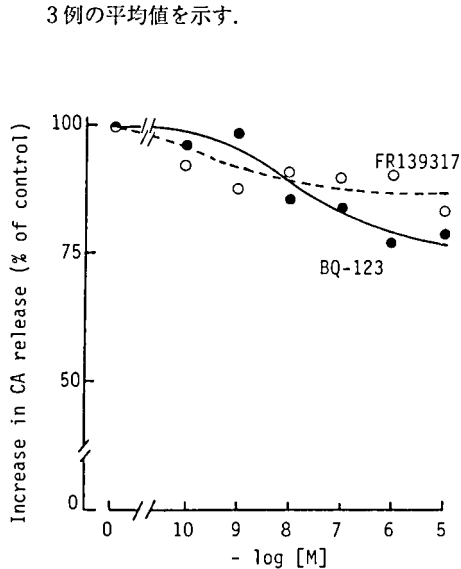


図4 ウシ培養副腎クロマフィン細胞からの ET-3 (30 nM) による CA 遊離に対する endothelin A 受容体拮抗薬 BQ-123 および FR 139317 の影響。BQ-123 および FR 139317 は、ET 添加の 5 分前に処置した。実験は図 2 と同じ方法で行った。各値は 3 例の平均値を示す。

とが考えられる。そこで以下の実験では、ET<sub>B</sub> 受容体に高親和性で ET<sub>A</sub> 受容体には親和性の低い ET-3 を使用した。

## II. ET の副腎 CA 遊離における Ca<sup>2+</sup> の役割

### 1. ET による CA 遊離に対する Ca<sup>2+</sup> チャンネル阻害剤および外液 Ca<sup>2+</sup> 除去の影響

副腎クロマフィン細胞からの CA 遊離には Ca<sup>2+</sup> が中心的役割を演じていることはよく知られている。

ET-3 による CA 遊離は、外液 Ca<sup>2+</sup> を除去すると、ほとんど消失した (図 5)。ACh, excess KCl による CA 遊離をほぼ完全に抑制する濃度の L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル阻害剤 nicardipine (3 µM), diltiazem (30 µM) は、ET-3 による CA 遊離を各々 39%, 40%抑制した。N 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを阻害する ω-conotoxin でも軽度の抑制を認めたのみであった (図 5)。一方、非選択的に Ca<sup>2+</sup> の流入を阻害する Cd<sup>2+</sup> (100 µM) は CA 遊離をほぼ完全に抑制した (図 5)。従って、ET による CA 遊離は電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル以外の機構による Ca<sup>2+</sup> 流入により引き起こされると考えられる。

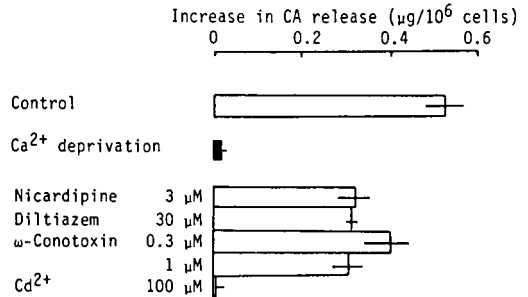


図5 培養副腎クロマフィン細胞からの ET-3 (30 nM) による CA 遊離に対する外液 Ca<sup>2+</sup> 除去および Ca<sup>2+</sup> チャンネル阻害剤の影響。外液 Ca<sup>2+</sup> 除去は ET-3 投与 5 分前に EGTA (10 µM) を含む Ca<sup>2+</sup> free 反応液で細胞を 2 回洗浄し、実験に供した Ca<sup>2+</sup> チャンネル拮抗剤は 3 分前に処置した。各値は 3 - 5 例の平均 ± S.E.M. を示す。

### 2. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> に対する ET の作用

ET による CA 遊離に Ca<sup>2+</sup> 流入の関与が考えられたので、次に ET の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 動態に及ぼす影響ならびにその機序について検討した。

図 6 に ET および各種刺激薬によって引き起こされる [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化の時間経過を示す。ET-3 (30 nM) の添加により一過性的上昇と、それに続く徐々に増加する二相の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が観察された。Bradykinin (BK, 1 nM) 添加は一過性的上昇とそれに続くプラトー相よりなる [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増加を示し、ACh (10 µM), excess KCl (12 mM) 添加では一過性的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

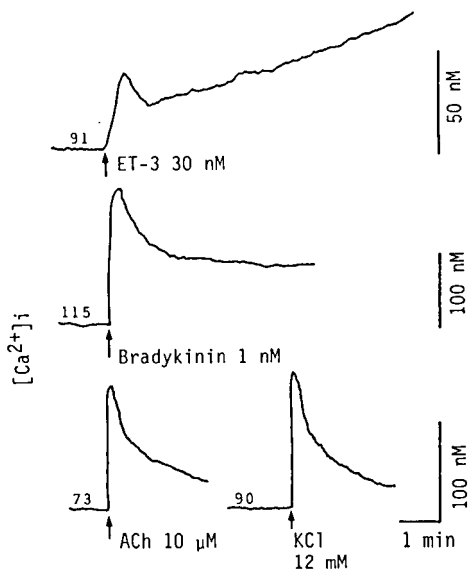


図6 ウシ培養副腎クロマフィン細胞における種々の薬物による  $[Ca^{2+}]_i$  の変化。各薬物添加後の  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を経時的に測定した。  $[Ca^{2+}]_i$  は励起波長 340 nm および 380 nm における蛍光波長 510 nm での蛍光強度の比から計算した。各薬物 (10  $\mu$ M) は、最終濃度が表記の濃度となるように投与した。アラビア数字は静止時の  $[Ca^{2+}]_i$  を示す。

の上昇が顕著であった。さらに ET による一過性上昇のピークまでの所要時間は他の刺激薬に比べ長く、異なったパターンを示した。

電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤 diltiazem 前処置は ET による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に影響しなかった (図 7A)。一方、同処理により ACh による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は消失し、BK の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は抑制されなかった (図 7A)。Verapamil (30  $\mu$ M) によっても同様の結果であった (図示せず)。外液  $Ca^{2+}$  を除去すると、ET による  $[Ca^{2+}]_i$  の一過性のピークは著明に抑制され、それに続く第二相の増加は消失した (図 7B)。ACh による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇も消失したが、BK による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は一過性のピークにはほとんど影響せずプラトー相のみ消失した (図 7B)。

ET 受容体は phospholipase C (PLC) と共役していることが、多くの組織で示されている<sup>3,7)</sup>。そこで、PLC 阻害薬の作用について検討を加えた。PLC を阻害する neomycin, U73122 の 10 分間の前処置は外液  $Ca^{2+}$  (1.3 mM) 存在下では ET-3 による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇にはほとんど影響しなかった (図 8)。外液  $Ca^{2+}$  を除去すると、残存する ET-3 による  $[Ca^{2+}]_i$  の僅か

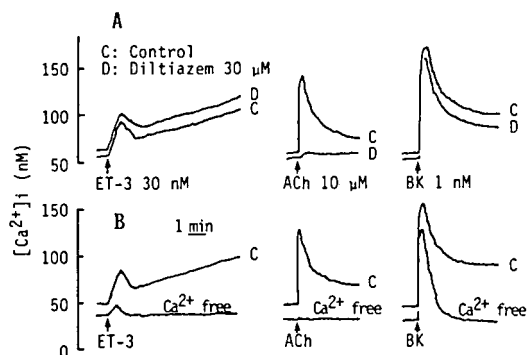


図7 ウシ培養副腎クロマフィン細胞における ET-3, ACh および BK による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤 diltiazem (A) および外液  $Ca^{2+}$  除去 (B) の影響。Diltiazem は ET-3 添加 5 分前に処置した。外液  $Ca^{2+}$  除去は遠心にて EGTA (10  $\mu$ M) を含む  $Ca^{2+}$  free 反応液に交換し、5 分に ET-3 の添加を行った。

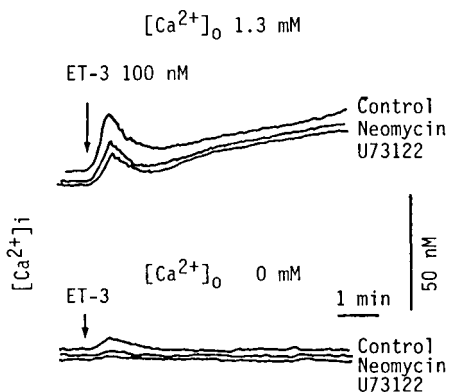


図8 細胞外  $Ca^{2+}$  存在下および非存在下でのウシ培養副腎クロマフィン細胞の ET-3 による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する phospholipase C 阻害剤 neomycin および U73122 の効果。Neomycin (0.5 mM) および U73122 (3  $\mu$ M) は ET-3 添加 5 分前に処置した。

な上昇はこれらの処置ではほぼ消失した (図 8)。さらにこれら PLC 阻害剤は ET の CA 遊離には影響しなかった (図示せず)。

細胞内 Ca プールの Ca ポンプを特異的に阻害し、 $Ca^{2+}$  遊離と、プールの Ca を枯渇させる作用を有する thapsigargin (TG, 1  $\mu$ M)<sup>39)</sup> の添加により、大きな持続する  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を引き起こした。ET-3 は TG 前処置下でも TG 非存在時と同等の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を認めた (図 9)。一方、BK による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は TG 処置後ではもはや認められなかった (図 9)。

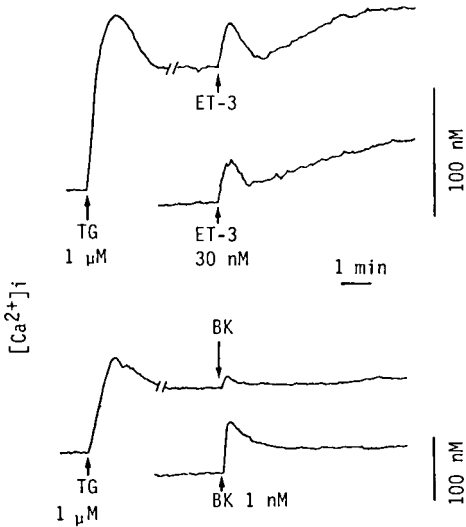


図9 ウシ培養副腎クロマフィン細胞における thapsigargin (TG) による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と TG 存在下での ET-3 および bradykinin (BK) の作用。TG (1  $\mu$ M) は ET-3 および BK 添加10分前に処置した。

III. ET による  $Ca^{2+}$  流入

クロマフィン細胞を細胞外  $Ca^{2+}$  が存在しない条件 ( $Ca^{2+}$  free, EGTA 10  $\mu$ M 含有 medium) に放置後,  $CaCl_2$  (最終濃度 1.3 mM) を添加すると  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が認められた (図10)。この  $CaCl_2$  添加による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は細胞外  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入を反映するものと考えられており、このパラダイムは受容体を介する  $Ca^{2+}$  流入機構を研究するうえで非常に有用である。

このような条件下で ET-3 を添加すると  $[Ca^{2+}]_i$  は一

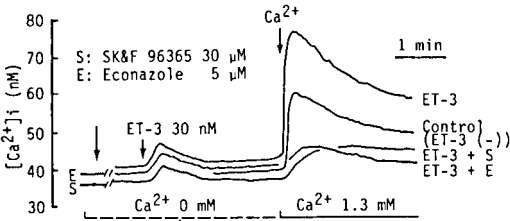


図10 ウシ培養副腎クロマフィン細胞における ET-3 による  $Ca^{2+}$  流入に対する SK & F 96365 および econazole の作用。 $Ca^{2+}$  流入は細胞外  $Ca^{2+}$  を除去 ( $Ca^{2+}$  0 mM, EGTA 10  $\mu$ M 含有) した反応液に浮遊した後,  $CaCl_2$  (最終濃度 1.3 mM) を添加した時の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の程度で表した。SK & F 96365 (30  $\mu$ M) および econazole (5  $\mu$ M) は ET-3 添加10分前に処置した。

過性の上昇後静止レベルに回復するが、この後,  $CaCl_2$  を添加すると、より大きな  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を認めた (図10)。

受容体を介する  $Ca^{2+}$  流入を特異的に抑制する薬物は未だ知られていないが、その可能性のある薬物がいくつか報告されている。これらの一つである SK & F 96365 (30  $\mu$ M) 前処置は ET による一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には影響せず、 $CaCl_2$  添加による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を ET-3 非存在時以下にまで抑制した (図10)。チトクローム P-450 阻害作用を有する econazole (5  $\mu$ M) 前処置でも SK & F 96365 と同様の結果を得た (図10)。

細胞外液  $Ca^{2+}$  (1.3 mM) 存在下では SK & F 96365 (30  $\mu$ M) および econazole (5  $\mu$ M) 10分間前処置は ET-3 による最初の過性のピークには影響せず、それに続く第二相の上昇を著明に抑制した (図11)。同様の作用は BK による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇においても認めた。

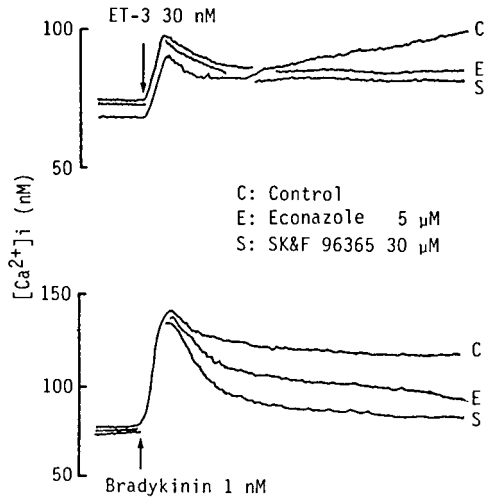


図11 ウシ培養副腎クロマフィン細胞での ET-3 (30 nM) および BK (1 nM) による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する SK & F 96365, econazole の影響。SK & F 96365 (30  $\mu$ M) および econazole (5  $\mu$ M) は ET-3 あるいは BK 添加10分前に処置した。

図12は  $Ba^{2+}$  流入による fura-2 蛍光値の比の上昇を示している。ET-3 添加により、 $[Ba^{2+}]_i$  の著明な上昇を認め、ET が  $Ca^{2+}$  流入を促進していることが示唆された。この ET による蛍光比増大は econazole により完全に抑制された (図12)。

SK & F 96365 (30  $\mu$ M) および econazole (5  $\mu$ M) の10分間前処置は ET-3 (30 nM) の CA 遊離をそれぞれ 93%および91%と著明に抑制した。

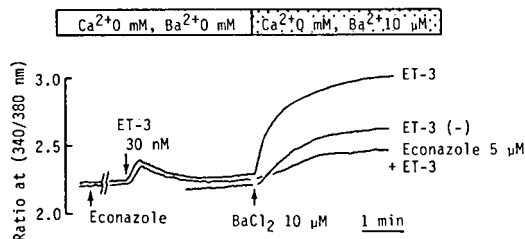


図12 ウシ培養副腎クロマフィン細胞での ET-3 (30 nM) による  $Ba^{2+}$  流入に対する econazole の効果.

$Ba^{2+}$  流入は細胞を ( $Ca^{2+}$  0 mM, EGTA 10  $\mu$ M) を含む反応液に浮遊後  $BaCl_2$  10  $\mu$ M を添加し,  $[Ba^{2+}]_i$  の変化より求めた.

$[Ba^{2+}]_i$  は励起波長 340 nm/380 nm の蛍光強度の比より求めた.

ET-3 は  $BaCl_2$  添加3分前に添加し, econazole は ET-3 添加10分前より処置した.

#### IV. Cyclic AMP の関与

ET 受容体は種々の組織で adenylyl cyclase と共役し cyclic AMP 産生を促進あるいは抑制することが知られている。さらに副腎髄質クロマフィン細胞においては CA 遊離に際し, cyclic AMP 濃度が増加すること<sup>28,30)</sup>, cyclic AMP が CA 遊離を促進的に修飾していることが明らかにされている<sup>30,40)</sup>。そこで, ET の CA 遊離作用に対する cyclic AMP の関与について検索した。

ET による副腎クロマフィン細胞の cyclic AMP 含量の変化について図13に示す。ウシ培養クロマフィン細胞の静止時 cyclic AMP 濃度は,  $1.89 \pm 0.27$  pmol/ $10^6$  cells ( $n=7$ ) であった。培養クロマフィン細

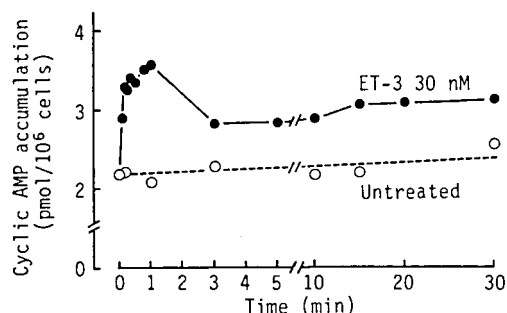


図13 ウシ培養副腎クロマフィン細胞における ET-3 による cyclic AMP 含量の経時変化.

図2と同様の方法により ET-3 を作用させ, 表記の時間インキュベーション後反応液を除去し, クロマフィン細胞に含まれる cyclic AMP 含量を radioimmunoassay により測定した。各値は3例の平均値を示す。

胞に ET-3 (30 nM) を添加すると, 5秒後ですでに cyclic AMP の増加を認め, 1分前後でピーク ( $3.36 \pm 0.45$  pmol/ $10^6$  cells,  $n=3$ ) となり, その後持続した cyclic AMP 濃度の上昇を認めた。

ET-3 (0.3–100 nM) の1分間処置により副腎クロマフィン細胞の cyclic AMP 含量は, 用量依存性に増加した。さらにこの cyclic AMP 含量の増加は, 外液  $Ca^{2+}$  を除去することにより消失した (図14)。

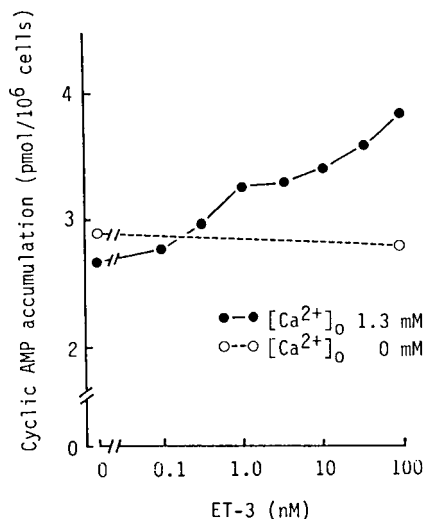


図14 細胞外  $Ca^{2+}$  存在下および非存在下における, ウシ培養副腎クロマフィン細胞 cyclic AMP 含量の ET-3 による用量-反応曲線.

副腎クロマフィン細胞 cyclic AMP 含量は, 図13の実験と同様に測定した。インキュベーションは  $37^\circ C$  で1分間行った。各値は3例の平均を示す。

ET による cyclic AMP 含量の増加は, ET が直接 adenylyl cyclase を活性化したことによるものかを副腎髄質粗膜分画を用いて検討した。副腎髄質 adenylyl cyclase 活性は, ET-3 (30 nM) 添加によりほとんど増加せず, GTP 非水解性アナログ GTP $\gamma$ S (50  $\mu$ M) により45%の活性増加をみとめ, GTP $\gamma$ S 存在下, ET-3 の添加により若干の活性増加を認めた (表1)。

ET が cyclic AMP 濃度を増加させたことにより, この cyclic AMP が ET の CA 遊離に関与するかどうかについて検索した。Cyclic AMP dependent protein kinase (A-PK) 阻害剤の ET による CA 遊離に対する作用を図15に示す。H-89, HA1004 および Rp-cAMPS の10分間前処置により ET-3 による CA 遊離は30–40%抑制された。逆に, phosphodiesterase を阻害し cyclic AMP 濃度を増加させる IBMX 並びに Ro20-



表1 ウシ副腎髄質粗膜分画 adenylate cyclase 活性に対する ET-3 の影響

Addition	Cyclic AMP formed (pmol/mg protein/min)	
	-ET-3	+ET-3 (30 nM)
None (100 μM)	18.3	23.5
GTP (100 μM)	19.0	25.6
GTPγS (50 μM)	26.5	43.0

ATP 添加により反応を開始し、10分間インキュベーションした後、産生された cyclic AMP を radioimmunoassay にて測定した。

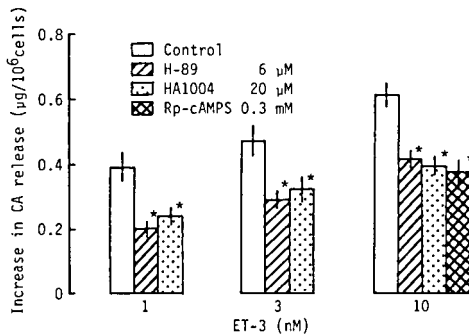


図15 ウシ培養副腎クロマフィン細胞からの ET-3 による CA 遊離に対する cyclic AMP dependent protein kinase 阻害剤の効果。実験は図2と同様に行った。cyclic AMP dependent protein kinase 阻害剤は ET-3 適用前20分間前処置した。各値は3-4例の平均値 ± S.E.M. を示す。\*p<0.01。

1724 は濃度依存性に ET-3 による CA 遊離を増強した (図16)。

Cyclic AMP が ET による CA 遊離に一部関与することが示唆されたことより、次に cyclic AMP の作用が Ca<sup>2+</sup> 流入の過程に対する作用か、あるいはそれ以後に作用したものかについて検討を加えた。

図17A に ET-3 による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に対する A-PK 阻害剤、H-89 の作用を示す。H-89 (5 μM) 20分間前処置は ET-3 による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇には、ほとんど影響を認めなかった。

一方、図17B に示すように、digitonin (10 μM) で膜透過性としたクロマフィン細胞は、Ca<sup>2+</sup> (100 nM - 30 μM) によって直接 CA 遊離が引き起こされる。8-Br cyclic AMP (50 μM) は、この Ca<sup>2+</sup> による CA 遊離の用量-反応曲線をシフトすることなく増強し、最高62%の増強を示した (図17B)。同様の結果は A-PK の触媒サブユニット (A-PK C.S.) の添加によって

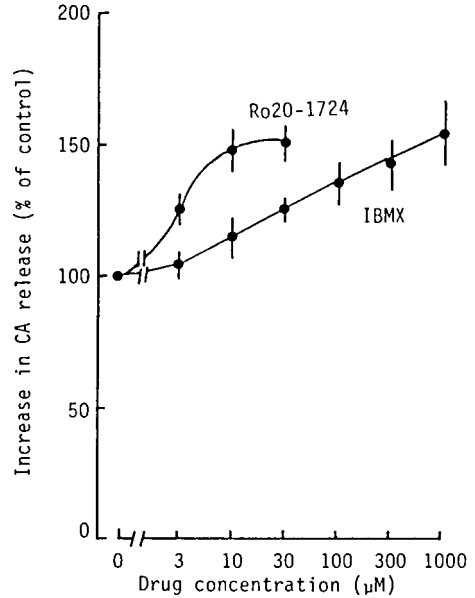


図16 ウシ培養副腎クロマフィン細胞において ET-3 が引き起こす CA 遊離に対する phosphodiesterase 阻害剤 IBMX および Ro20-1724 の効果。Phosphodiesterase 阻害剤は ET-3 適用10分前から処置した。各値は4-6例の平均値 ± S.E.M. を示す。

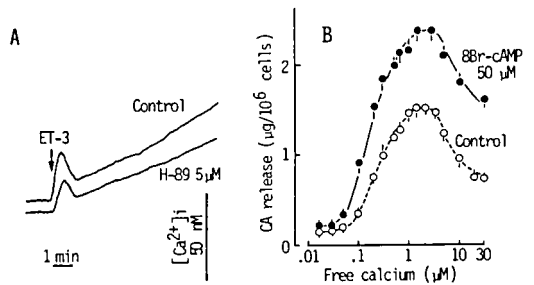


図17 A. ウシ培養副腎クロマフィン細胞で ET-3 (30 nM) による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に対する H-89 の効果。H-89 は ET-3 添加20分前に処置した。B. Digitonin で膜透過性としたウシ培養副腎クロマフィン細胞での Ca<sup>2+</sup> による CA 遊離に対する 8-Br cAMP の効果。Digitonin 10 μM で5分間インキュベーションすることにより膜透過性としたクロマフィン細胞を、Mg-ATP 存在下に各種濃度の Ca<sup>2+</sup> を含む反応液で20分間インキュベーションを行い、反応液中に遊離した CA 量を測定した。8-Br cAMP は Ca<sup>2+</sup> と同時に添加した。各値は5-6例の平均値 ± S.E.M. を示す。

も確められた (図示せず)。従って cyclic AMP は  $\text{Ca}^{2+}$  流入以後の開口分泌に至る過程を促進して、ET の CA 遊離作用に関与していることが示された。

### V. 刺激誘発 CA 遊離に対する ET の作用

次に ET の局所的な調節因子としての生理的役割を探る目的で、ACh や他の刺激誘発 CA 遊離に対する作用とその機序について検討した。

ET-3 (0.1–100 nM) の3分間の前処置は ACh (5  $\mu\text{M}$ ) による CA 遊離を 0.1 nM より用量依存性に増強し、30 nM で最高230%の増強を示した (図 18A)。Excess KCl (20 mM) による CA 遊離に対しても ET-3 は同様の増強作用を示した。また、BQ-3020 でも同様に ACh による CA 遊離の増強作用を認めた (図 18A)。各種の ACh 濃度 (3–30  $\mu\text{M}$ ) による CA 遊離に対する ET-3 (30 nM) の作用について図 18B に示した。ET は ACh 低濃度による CA 遊離を強く増強し、最大 CA 遊離は増強しなかった。

ET (30 nM) は ACh (5  $\mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇をそのパターンを変化させることなく有意に増強 (37%) した (図 19A, B)。ET の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増強作用は excess KCl による刺激時にも同様に認められた (図 19B)。

図 20 は A-PK 阻害剤の ACh による CA 遊離ならびに ET の ACh による CA 遊離の増強作用に対する影響を示している。H-89, HA1004, Rp-cAMPS の前処置

は、ACh による CA 遊離を 40–50% 抑制した。これら A-PK 阻害剤存在下では、ET-3 の ACh による CA 遊離増強作用は消失した。

## 考 察

ET が副腎 CA 遊離を引き起こすことについてはウシ培養クロマフィン細胞<sup>22–25)</sup> やイヌ *in vivo*<sup>26)</sup> 実験で報告があるが、詳細は不明である。

本研究では、ET-1 および ET-3 は、イヌ摘出灌流副腎およびウシ培養副腎クロマフィン細胞から CA 遊離を引き起こした。その分泌パターンは ACh は急峻でシャープな CA 遊離を引き起こすのに比べ ET-1, ET-3 では分泌の開始に時間を要し、持続性で、洗浄され難い特徴を示した。これはブタの冠状血管条片における収縮反応<sup>41)</sup> に代表される ET-1 の作用とよく似ていた。

ET による CA 遊離は 30 pM という低濃度からみられ、30–100 nM で最大遊離を引き起こした。血中 ET 濃度は 1 pM 以下であり、血中 ET 濃度が種々の疾患で増加することが知られているが、最大でも 10 pM 程度である<sup>3)</sup>。しかし、副腎髄質では毛細血管が非常に発達し、血管内皮細胞に富んだ組織であること、さらに ET の作用がオートクリンあるいはパラクリンの働いていることを考えれば、局所では、ET はかなりの高濃度で作用していると思われる。ET は主に血管内皮細胞で産生されるが、実質臓器でも産生

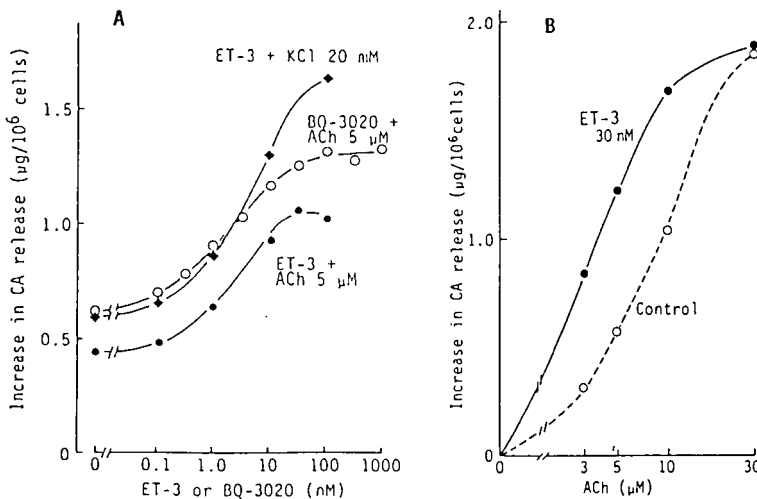


図 18 A. ウシ培養副腎クロマフィン細胞での CA 刺激遊離に対する ET-3 および BQ-3020 の増強作用。  
B. ウシ培養副腎クロマフィン細胞で CA 遊離における ACh の用量-反応曲線に対する ET-3 の影響。

CA 遊離量は ET-3 および BQ-3020 で 3 分間前処置後 ACh および excess KCl を含む反応液で 9 分間インキュベーションした時の反応液中に遊離される CA 量から、ET-3 および BQ-3020 単独の CA 遊離量を差し引いて示した。

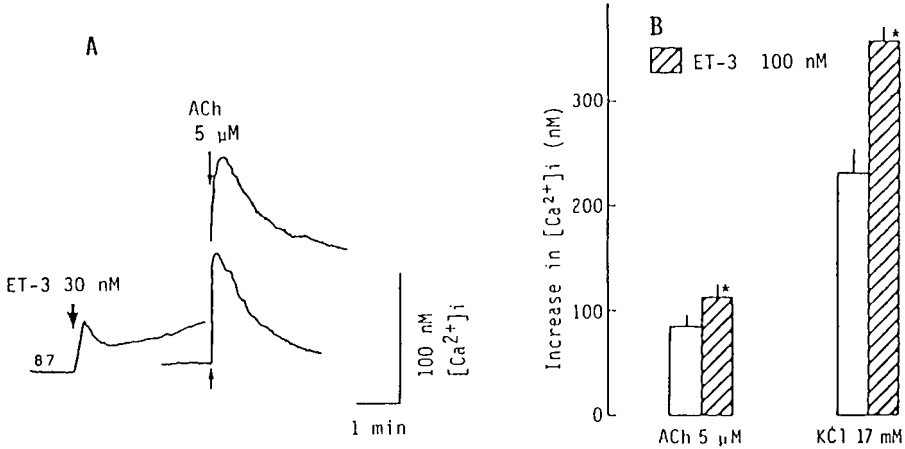


図19 ET-3のAChおよびexcess KClによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に対する効果。

A. 典型的なパターンを示す。

B. AChおよびKClによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇のピーク値で比較した。

ET-3はACh, excess KCl添加3分前に処置した。各値は4~6例の平均値±S.E.M.を示す。\*p<0.05。

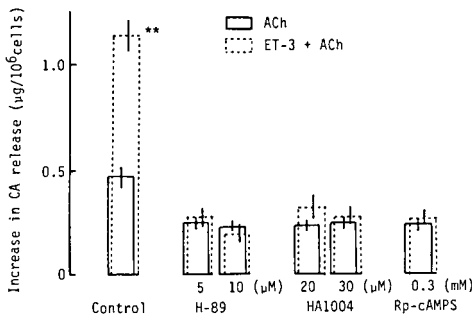


図20 ウシ培養副腎クロマフィン細胞におけるACh 5 μM誘発CA遊離のET-3 30 nMによる増強作用に対するcyclic AMP dependent protein kinase阻害剤の影響。

実験は図19と同様に行った。cyclic AMP dependent protein kinase阻害剤はET-3前処置の20分前に処置した。各値は5~6例の平均値±S.E.M.を示す。\*\*p<0.01。

されることが明らかになってきている。副腎髄質においてもpreproET-mRNAの発現<sup>42)</sup>, ET-1, ET-3様免疫活性<sup>43)</sup>, convertinenzyme<sup>44)</sup>の存在が確認されており、副腎髄質でもETが産生されているものと考えられる。しかしながら実質細胞より産生されるETは血管内皮由来のETに比べ極めて少ないとされており、副腎髄質のCA遊離に影響を及ぼす濃度のETが分泌されるかどうかは現在明かでない。

ET受容体は、ET-1やET-2に選択的に高親和性を示すET<sub>A</sub>受容体、ET-1, ET-2, ET-3に同等の親和性

を示すET<sub>B</sub>受容体、ET-3に選択性を示すET<sub>C</sub>受容体の3種のアイソフォームがクローニングされている<sup>3,6,37)</sup>。Wilkes and Boarder<sup>21)</sup>は、ラット副腎髄質にET-1およびET-3の高親和性結合部位を認めている。本研究でも、副腎CA遊離に関係する受容体サブタイプは、受容体賦活薬や拮抗薬を用いた実験から、ET<sub>B</sub>受容体であることを示唆した。

ETの作用は広範であり、また細胞内情報伝達系も多岐にわたる。細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇、PLC活性化によるイノシトールリン脂質代謝の亢進、各種イオンチャネルに対する作用、cyclic AMP産生の促進、あるいは抑制、NO産生、アラキドン酸代謝等のあらゆる系と関連することが報告されている<sup>3,7)</sup>。そこでETのCA遊離機序について検索した。

副腎CA遊離は[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇により引き起こされ、Ca<sup>2+</sup>が中心的役割を演じていることは一般に認められている。そこで、まずETのCA遊離についてCa<sup>2+</sup>の影響から検討を加えた。

ET-3は、一過性の上昇とそれに続く時間経過と共に上昇する[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動を引き起こした。ET-3によるCA遊離および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は共に外液Ca<sup>2+</sup>除去により著明に抑制され、外液Ca<sup>2+</sup>の流入に依存することが示唆された。ETはブタ冠血管では脱分極を起こすことなく、L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを活性化するが、その活性化機序は現在不明である<sup>45)</sup>。副腎クロマフィン細胞には、L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルが豊富に存在する。Boarder and Marriott<sup>23)</sup>およびOhara-Imaizumi and Kumakura<sup>24)</sup>はウシ培養ク

ロマフィン細胞での ET-1 による  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 CA 遊離に L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが一部関与し、Yamaguchi<sup>26)</sup> は *in vivo* のイヌ実験で ET-1 の局所投与による副腎 CA 遊離を L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤が抑制することを示している。しかし、本研究においては電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤による CA 遊離の抑制は軽度であった。また、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤は ET の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態に影響しなかったこと、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇が長時間持続することから、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの関与は考えにくい。一方、非選択的に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を阻害する  $\text{Cd}^{2+}$  は CA の遊離を完全に阻害した。従って、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル以外の機構による  $\text{Ca}^{2+}$  流入により CA 遊離が引き起こされると考えられる。ET は  $\text{ET}_A$  受容体 cDNA をトランスフェクトした CHO-kl 細胞で dihydropyridine 非感受性受容体作動性カチオンチャンネルを活性化し、持続性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を生じるとされている<sup>46)</sup>。副腎クロマフィン細胞においても、このような機構が関与するのかもしれない。ACh はニコチン様 ACh 受容体に作用し、細胞を脱分極することによる電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性化とそれに続くチャンネル不活性化に伴う  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性の増加をもたらす。このような ET と ACh による  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態の違いが CA 分泌パターンの違いの要因であると考えられる。

多くの受容体は PLC と共役し、その受容体刺激は phosphatidylinositol (PI) 代謝回転を促進し、産生された  $\text{IP}_3$  により細胞内 Ca プールから  $\text{Ca}^{2+}$  動員とそれに続く  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすことが知られている<sup>47)</sup>。副腎髄質クロマフィン細胞においては BK 受容体、ムスカリン様 ACh 受容体は PLC と共役し、CA 遊離を惹起する代表例である<sup>48)</sup>。ET 受容体は、PLC と共役していることが神経系を含む多くの組織で示されている<sup>3)</sup>。しかし、本研究において、ET による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は BK、ACh による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇とは異なり、ゆっくりとした、時間と共に増加したこと、PLC を阻害する neomycin および U73122 は BK による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇を抑制する濃度で、ET による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇に影響しなかったこと等から、ET の作用に PLC の関与は少ないことが示された。Rasmussen and Printz<sup>49)</sup> および Wilkes and Boarder<sup>21)</sup> も、副腎クロマフィン細胞で ET は PI 代謝回転を促進しないことを示している。さらに、TG の処置により BK の作用は抑制される条件（細胞内 Ca プールの涸渇が考えられる状態）でも、ET の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は同程度認められたことは上記の考えを支持するもので

ある。但し、外液  $\text{Ca}^{2+}$  を除去しても僅かに残存する  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、PLC 阻害剤で抑制されたことから、この部分については PI 代謝回転促進による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員系が一部関与するものと思われる。

ET が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位への取り込み機構あるいは細胞膜を介した  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構に抑制的に作用している可能性については、ET がこれらの過程に作用しないことを示唆する結果を得ている。

次に、ET 受容体作動性の  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構について考察する。受容体作動性の  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構として細胞内 Ca プールからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離あるいはプールの涸渇が誘因となる  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構が提唱されている<sup>50-53)</sup>。このような機構は特に非興奮性細胞において発達している。しかし、Ca プールからどのような情報が伝達され、どのような機序で  $\text{Ca}^{2+}$  流入が促進されるかは解っていない。最近涸渇した Ca プールから  $\text{Ca}^{2+}$  流入を促進する因子 (CIF) が遊離されることが報告された<sup>54)</sup>。CIF は低分子量陰イオン性リン酸化合物のようであるが、その物質の同定はされていない<sup>55)</sup>。また、遊離機構（イオンチャンネル）に関しても不明である。他に、チトクローム P-450<sup>56,57)</sup>、guanylate cyclase<sup>58)</sup> あるいは tyrosine kinase<sup>59)</sup> が  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関与している可能性も示唆されている。副腎クロマフィン細胞でも、受容体を介することなく Ca プールの Ca 遊離・涸渇を引き起こす TG 処置により  $\text{Ca}^{2+}$  流入が起こることから、同様の機構が存在するものと考えられる<sup>60)</sup>。本研究においては、チトクローム P-450 阻害薬である econazole により ET による  $\text{Ca}^{2+}$  流入および  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の第二相の増加は著明に抑制された。このことより、 $\text{Ca}^{2+}$  流入機構にチトクローム P-450 の関与の可能性も考えられる。SK & F 96365 は  $\text{Ca}^{2+}$  流入を比較的、特異的に抑制する薬物として報告されている<sup>61)</sup>。SK & F 96365 は ET による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性の増加には影響することなく、第二相の持続する増加を抑制した。さらに、これらの薬物により ET による CA 遊離も著明に抑制された。Econazole、SK & F 96365 は BK による  $\text{Ca}^{2+}$  流入も同様に抑制した。このことは、Ca プールからの涸渇が誘因となることを示唆するものであるが、ET には PI 代謝系を介する情報伝達系の関与は少なかったことから、 $\text{Ca}^{2+}$  流入機構を ET がいかにして活性化するかについては今後の課題である。

他の細胞内情報伝達系については、ET-3 による CA 遊離は、protein kinase C 阻害剤 staurosporine、cyclooxygenase 阻害剤 indomethacin、および NO synthetase 阻害剤  $\text{N}^\omega$ -nitro-L-arginine の処置によっては影響されず、ET による CA 遊離へのこれら細胞内情報

伝達系の関与は否定的であった。

ET は種々の組織で cyclic AMP の産生を促進的あるいは抑制的に調節している。そのような組織では、ET<sub>A</sub> 受容体は adenylate cyclase と促進的に、ET<sub>B</sub> 受容体は抑制的に共役しているとされる<sup>3)</sup>。本研究において、ET は副腎クロマフィン細胞で Ca<sup>2+</sup> に依存して cyclic AMP 含量を増加させることを認めた。副腎髄質 adenylate cyclase 活性に対して、ET の促進の作用は軽度であった。従って副腎髄質では、ET 受容体が adenylate cyclase と共役している可能性は少なく、ET による cyclic AMP の細胞内含量の増加は、ET 刺激により細胞内に増加した Ca<sup>2+</sup> により adenylate cyclase が活性化されたことによるものと考えられる。実際、副腎髄質膜分画の adenylate cyclase 活性は、Ca<sup>2+</sup> により活性化されることが認められている<sup>62)</sup>。

Cyclic AMP の副腎 CA 遊離における役割については詳しく研究されており、cyclic AMP は CA 遊離を促進的に調節していることが明らかにされている<sup>30,40)</sup>。ET による CA 遊離は A-PK の阻害剤で一部抑制され、phosphodiesterase 阻害剤により増強されることより、cyclic AMP が ET による CA 遊離作用に一部関与していることが示唆された。

Cyclic AMP の CA 遊離増強作用は、後述のように Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性を阻害することにより間接的に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇を増強することによる。しかし、ET による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇は、A-PK 阻害剤により抑制されなかった。従って、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇以降の分泌過程に作用していることが推定された。

Digitonin 処理により細胞膜透過性を亢進させたウシ培養クロマフィン細胞で、cyclic AMP と A-PK C.S. が Ca<sup>2+</sup> により誘発される CA 遊離を軽度促進し、この作用は Ca<sup>2+</sup> の最大反応をも促進した。これらの事実は cyclic AMP が細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加に続く exocytosis のカスケードにも作用している可能性を示唆している。A-PK によってリン酸化される蛋白質は極めて多種類ある<sup>63)</sup>。特に、神経伝達物質の分泌に関与する蛋白質として注目されているものに synapsin (I a, I b, II a, II b), Ca<sup>2+</sup>/リン脂質結合蛋白である Annexin ファミリー (annexin I - VIII: calpactin, calelectrin, P68, synexin, chromobindin, lipocortin), neurofilament, tubulin, MAP-2, tau factor 等の細胞骨格, MA-RCKS protein, GAP-43 等があり、リン酸化一脱リン酸化を介して顆粒の形成、移動、神経伝達物質分泌に関わっていると思われるが、その詳細は解明されていない。

ET は、低濃度の ACh や excess KCl による sub-

maximal な CA 遊離を強く増強した。刺激誘発 CA 遊離に対する ET の増強作用は、ウシ培養クロマフィン細胞<sup>24)</sup> やイヌの *in vivo*<sup>64)</sup> 実験で軽度認められたとするものや、逆に増強作用は認められない<sup>23,25)</sup> との報告もあり、一致した見解はない。この点につき、ET による CA 遊離増強作用は、少量の分泌刺激時には顕著であり、強い CA 分泌刺激時では減少し、最大 CA 遊離濃度ではほとんど影響しなかった。従って、これらの矛盾した結果は、CA 分泌刺激強度の違いに起因すると考えられる。ET は ACh や excess KCl による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇も増強した。従って、ET は [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を増強することにより、CA 遊離を増強する可能性が考えられる。この増強作用は、A-PK 阻害剤で完全に抑制され、cyclic AMP を介することを明らかにした。

CA 刺激遊離に対する cyclic AMP の増強作用については以下の機構が証明されている<sup>65,66)</sup>。すなわち、cyclic AMP は A-PK の活性化を介して Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性を阻害する。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の阻害は細胞内 Na<sup>+</sup> の貯留と K<sup>+</sup> の流出をもたらす。その結果、膜の脱分極による電位依存性イオンチャンネルの活性化、Ca<sup>2+</sup> influx の増加、細胞膜及び細胞内小器官の reversed Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange 機構の亢進、forward Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange 機構の抑制、あるいは細胞内貯蔵部位からの Na<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release 等細胞内 Ca<sup>2+</sup> homeostasis の変化等をもたらす。このような条件下で分泌刺激により急速な Na<sup>+</sup> 流入が起こると、[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> がさらに増加し、分泌刺激による脱分極を深め、上記の機序により分泌刺激による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇を増強し、分泌反応を増強するとされている。

ET 単独による CA 遊離は、tetrodotoxin 非感受性で、細胞外 Na<sup>+</sup> 除去によりほとんど影響されなかった。このことは、ET による CA 遊離は Na<sup>+</sup> 流入を伴わないことを示唆している。従って、ACh のような脱分極刺激を伴わない状態では、cyclic AMP により Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase が阻害されても著明な [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> の上昇は生じず、前述の機序は駆動されず、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇以降の分泌過程に対する増強作用が顕著に現れたものと考えられる。

## 総 括

イヌ摘出灌流副腎ならびに培養クロマフィン細胞を用いて、エンドセリン (ET) の副腎カテコールアミン遊離機構について検索し、以下の結果を得た。

1. ET は、イヌ摘出灌流副腎およびウシ培養クロマフィン細胞で、ET<sub>B</sub> 受容体に作用し、持続した CA 遊離を惹起した。

2. ET は、一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加と引き続き、経時的にさらに上昇する二相性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加を引き起こした。

3. ET による CA 遊離,  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は外液  $Ca^{2+}$  に依存したが、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル, phosphatidylinositol 代謝回転の関与は少なく, ACh や bradykinin とは異なった機序による可能性を示した。

4. ET は  $Ca^{2+}$  流入を促進した。この  $Ca^{2+}$  流入は, SK & F 96365 及び econazole により抑制された。

5. ET は細胞内 cAMP 濃度を増加させた。この cyclic AMP 濃度の増加は,  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇に起因することを示した。

6. ET の CA 遊離作用には, cyclic AMP が一部関与していた。cyclic AMP は,  $Ca^{2+}$  による開口分泌過程を促進した。

7. ET は ACh や脱分極刺激による CA 遊離を増強し, この作用は cyclic AMP を介することを明らかにした。

以上より, ET は  $ET_B$  受容体を介して,  $Ca^{2+}$  流入を促進し, 持続性の CA 遊離を引き起こすこと, ACh による CA 遊離を増強すること, これらの作用に cyclic AMP が関与することを明らかにし, ET は末梢において CA 刺激遊離を促進的に調節していることを示唆した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御懇篤なる御指導と御校閲を賜った口腔外科学第二講座石川武憲教授ならびに本学部歯科薬理学講座土肥敏博教授に衷心より感謝の意を表します。また, 御懇篤なる御指導を賜った下里常弘名誉教授および辻本明名誉教授に深く感謝いたします。また, 本論文作成にあたり御校閲を賜りました本学部口腔外科学第一講座高田和彰教授に深謝いたします。また, 研究, 論文作成上終始御指導, 御助言を頂いた歯科薬理学講座森田克也講師ならびに北山滋雄講師に感謝いたします。同時に本研究遂行上, 多大なる御支援を頂きました歯科薬理学講座および口腔外科学第二講座の諸氏に厚く御礼申し上げます。

なお, 本研究に際し, BQ-123, BQ-3020, を御供与いただいた萬有製薬, FR 139317 を御供与いただいた藤沢薬品工業, Verapamil hydrochloride を御供与いただいたエーザイ, U73122 を御供与いただいた Upjohn Company, SK & F 96365 を御供与いただいた Smith-Kline Beechem およびウシ副腎を御供与いただいた広島市食肉衛生検査所ならびに JA 広島経済連三次食肉加工センターに感謝致します。

## 文 献

- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyuchi, T., Gotoh, K. and Masaki, T.: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2863-2867, 1989.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415, 1988.
- Huggins, J.P., Pelton, J.T. and Miller, R.C.: The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmacol. Ther.* **59**, 55-123, 1993.
- Kohnno, M., Yasunari, K., Yokokawa, K., Murakawa, K., Horio, T. and Takeda, T.: Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin-II and thrombin of cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **87**, 1999-2004, 1991.
- Boulanger, C. and Lusher, T.F.: Release of endothelin from the porcine aorta. *J. Clin. Invest.* **85**, 587-590, 1990.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M. and Masaki, T.: Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 103-131, 1992.
- Masaki, T.: Endothelins: Homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocr. Rev.* **14**, 256-268, 1993.
- Miller, R.C., Pelton, J.T. and Huggins, J.P.: Endothelins from receptors to medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 54-60, 1993.
- Hirata, Y., Itoh, K., Ando, K., Endo, M. and Marumo, F.: Plasma endothelin levels during surgery. *New Engl. J. Med.* **321**, 1686, 1989.
- Onizuka, M., Miyauchi, T., Morita, R., Akaogi, E., Mitsui, K., Suzuki, N., Fujino, M., Yanagisawa, M., Goto, K., Masaki, T. and Hori, M.: Increased plasma concentrations of endothelin-1 during and after pulmonary surgery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**, S402-S403, 1991.
- Koller, J., Mair, P., Wieser, C., Pomaroli, A., Puschendorf, B. and Herold, M.: Endothelin and big endothelin concentrations in injured patients. *New Engl. J. Med.* **325**, 1518, 1991.
- Stojilkovic, S.S. and Catt, K.J.: Neuroendocrine actions of endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 385-391, 1992.
- Greenberg, D.A., Chan, J. and Sampson, H.A.: Endothelins and the nervous system. *Neurology* **42**, 25-31, 1992.
- Konya, H., Nagai, K., Masuda, H. and Kakishita, E.: Endothelin-3 modification of dopamine re-

- lease in anaesthetised rat striatum: An *in vivo* microdialysis study. *Life Sci.* **51**, 499–506, 1992.
- 15) Koizumi, S., Kataoka, Y., Niwa, M. and Kumakura, K.: Endothelin-3 stimulates the release of catecholamine from cortical and striatal slices of the rat. *Neurosci. Lett.* **134**, 219–222, 1991.
  - 16) Wong-Dusting, H.K., Reid, J.J. and Rand, M.J.: Paradoxical effects of endothelin on cardiovascular noradrenergic neurotransmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **16**, 229–233, 1989.
  - 17) Suzuki, Y., Matsumura, Y., Umekawa, T., Hayashi, K., Takaoka, M. and Morimoto, S.: Effects of endothelin-1 on antidiuresis and norepinephrine overflow induced by stimulation of renal nerves in anaesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**, 905–910, 1992.
  - 18) Wiklund, N.P., Ohlen, A. and Cederqvist, B.: Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in guinea-pig femoral artery. *Acta Physiol. Scand.* **134**, 311–312, 1988.
  - 19) Tabuchi, Y., Nakamura, M., Rakugi, H., Nagano, M., Mikami, H. and Ogihara, T.: Endothelin inhibits presynaptic adrenergic neurotransmission in rat mesenteric artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 803–808, 1989.
  - 20) Wiklund, N.P., Wiklund, C.U., Ohlen, A. and Cederqvist, B.: Cholinergic neuromodulation by endothelin in guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.* **101**, 342–345, 1989.
  - 21) Wilkes, L.C. and Boarder, M.R.: Characterization of the endothelin binding site on bovine adrenomedullary chromaffin cells: Comparison with vascular smooth muscle cells. Evidence for receptor heterogeneity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 628–633, 1991.
  - 22) Boarder, M.R. and Marriott, D.B.: Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S223–S224, 1989.
  - 23) Boarder, M.R. and Marriott, D.B.: Endothelin-1 stimulation of noradrenaline and adrenaline release from adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 521–526, 1991.
  - 24) Ohara-Imaizumi, M. and Kumakura, K. Dynamics of the secretory response evoked by endothelin-1 in adrenal chromaffin cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17** (suppl 7), S156–S158, 1991.
  - 25) Borges, R., vonGrafenstein, H. and Knight, D.E.: Tissue selectivity of endothelin. *Eur. J. Pharmacol.* **165**, 223–230, 1989.
  - 26) Yamaguchi, M.: Inhibition by nifedipine of endothelin-induced adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 301–305, 1993.
  - 27) Robinson, R.L.: Stimulation of the release of catecholamine from isolated adrenal glands by tyramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **151**, 55–58, 1966.
  - 28) Tsujimoto, A., Morita, K., Nishikawa, T. and Yamada, S.: Cyclic Nucleotide elevation preceding catecholamine release in isolated dog adrenals. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **245**, 262–270, 1980.
  - 29) Fenwick, E.M., Fajdiga, P.B., Home, N.B.S. and Livett, B.G.: Functional and morphological characterization of isolated bovine adrenal medullary cells. *J. Cell Biol.* **76**, 12–30, 1978.
  - 30) Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Koyama, Y. and Tsujimoto, A.: Enhancement of stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells by forskolin. *J. Neurochem.* **48**, 243–247, 1987.
  - 31) Tsien, R.Y., Rink, T.J. and Poenie, M.: Measurement of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* **6**, 145–157, 1985.
  - 32) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.: A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450, 1985.
  - 33) Kwan, C.Y. and Putney, J.W.: Uptake and intracellular sequestration of divalent cations in resting and methacholine-stimulated mouse lacrimal acinar cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 678–684, 1990.
  - 34) Schiling, W.P., Rajan, L. and Strobl-Jager, E.: Characterization of the bradykinin stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 12838–12848, 1989.
  - 35) VonEuler, U.W. and Lishajko, F.: Improved technique for the fluorometric estimation of catecholamines. *Acta Physiol. Scand.* **51**, 348–356, 1961.
  - 36) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275, 1951.
  - 37) Suresh, K., Channa, K.J. and Michael, R.L.: Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor ( $ET_C$  receptor) from xenopus laevis dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268**, 19126–19133, 1993.
  - 38) Haynes, W., Davenport, A.P. and Webb, D.J.: Endothelin: Progress in pharmacology and physiology. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 225–228, 1993.
  - 39) Thastrup, O., Cullen, P.J., Dorbak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P.: Thapsigargin, a tumor promoter, discharge intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum

- Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466–2470, 1990.
- 40) Tsujimoto, A., Morita, K. and Dohi, T.: Role of cAMP in facilitating norepinephrine release in the peripheral nervous system; in Presynaptic regulation of neurotransmitter release (Feigenbaum, J., Hanani, M., eds). Freund Publishing House, London, 1085–1116, 1991.
  - 41) Yanagisawa, M., Kurihara, H. and Kimura, S.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322, 411–415, 1988.
  - 42) Nunez, D.J.R., Brown, M.J., Davenport, A.P., Neylon, C.B., Schofield, J.P. and Wyse, R.K.: Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *Clin. Invest.* 85, 1537–1541, 1990.
  - 43) Nakamura, S., Naruse, M., Naruse, K., Shioda, S., Nakai, Y. and Uemura, H.: Colocalization of immunoreactive endothelin-1 and neurohypophysical hormones in the axons of the neural lobe of the rat pituitary. *Endocrinology* 132, 530–533, 1993.
  - 44) Sawamura, T., Kimura, S., Shimmi, O., Sugita, Y., Yanagisawa, M., Goto, K. and Masaki, T.: Purification and characterization of putative endothelin converting enzyme in bovine adrenal medulla: Evidence for a cathepsin D-like enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 1230–1236, 1990.
  - 45) Goto, K., Kasuya, Y., Ishikawa, T., Kurihara, H., Takawa, Y., Matuki, N., Yanagisawa, M. and Masaki, T.: Endothelin activates the dihydropyridine sensitive, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3915–3918, 1989.
  - 46) Lin, H.Y., Kaji, E.H., Winkel, G.K., Lves, H.E. and Lodish, H.F.: Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3185–3189, 1991.
  - 47) Berridge, M.J.: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325, 1993.
  - 48) Kim, K-T. and Westhead, E.W.: Cellular response to Ca<sup>2+</sup> from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and secretion from bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9881–9885, 1989.
  - 49) Rasmussen, K. and Prinz, M.P.: Depolarization potentiates endothelin induced effects on cytosolic calcium in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 306–311, 1989.
  - 50) Putney, J.W.Jr.: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12, 1986.
  - 51) Takemura, H., Hughes, A.R., Thastrup, O. and Putney, J.W., Jr.: Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells: evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulate calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 264, 12266–12271, 1989.
  - 52) Hoth, M. and Penner, R.: Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353–356, 1992.
  - 53) Irvine, R.F.: 'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates—a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263, 5–9, 1990.
  - 54) Randriamampita, C. and Tsien, R.Y.: Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* 364, 809–814, 1993.
  - 55) Parekh, A.B., Terlau, H. and Stuhmer, W.: Depletion of InsP<sub>3</sub> stores activates a Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364, 814–818, 1993.
  - 56) Alvarez, J., Montero, M. and Garcia-Sancho, J.: Cytochrome P-450 may link intracellular Ca<sup>2+</sup> stores with plasma membrane Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem. J.* 274, 193–197, 1991.
  - 57) Sargeant, P., Clarkson, W.D., Sage, S.O. and Heemskerk, J.W.M.: Calcium influx evoked by Ca<sup>2+</sup> store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome P-450 inhibitors than receptor-mediated calcium entry. *Cell Calcium* 13, 553–564, 1992.
  - 58) Bahnson, T.D., Pandol, S.J. and Dionne, V.E.: Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10808–10812, 1993.
  - 59) Lee, K., Toscas, K. and Villereal, M.L.: Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced Ca<sup>2+</sup> entry by tyrosine kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 268, 9945–9948, 1993.
  - 60) Xu, Y., Purate, E.P. and Forsberg, E.J.: Role of thapsigargin-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> pools in secretion induced by muscarinic agonists in porcine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 59, 2224–2229, 1992.
  - 61) Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E. and Rink, T.J.: SK & F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.* 271, 515–522, 1990.
  - 62) Morita, K., Dohi, T. and Tsujimoto, A.: Stimulation-evoked cyclic nucleotides efflux from isolated perfused dog adrenals and possible involvement of



- calcium. *Jpn. J. Pharmacol.* **40**, 265-271, 1986.
- 63) Walaas, S.I. and Greengard, P.: Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol. Rev.* **43**, 349, 1991.
- 64) Takeuchi, A., Kimura, T. and Satoh, S.: Enhancement by endothelin-1 of the release of catecholamines from the canine adrenal gland in response to splanchnic nerve stimulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **19**, 663-666, 1992.
- 65) Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S. and Tsujimoto, A.: Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells-I. Evidence for enhancement of evoked increase in cytosolic free  $\text{Na}^+$  concentration by cyclic AMP elevation. *Neurochem. Int.* **19**, 71-79, 1991.
- 66) Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Minami, N. and Tsujimoto, A.: Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells-II. Inhibition of  $\text{Na}^+ . \text{K}^+ \text{-ATPase}$  by cyclic AMP. *Neurochem. Int.* **90**, 186-197, 1990.