

9246 二価イオンによる副腎髄質カテコラミン分泌の制御機構の研究

助成研究者: 藁科 彬(新潟大学 医学部)

共同研究者: 藤原 直士(新潟大学)

摘出ラット副腎を標準クレス液(2 mM Ca^{2+} を含む) およびクレス液中の Ca^{2+} を Sr^{2+} 、 Ba^{2+} で置換した液で灌流した標本を使用し、カテコラミン分泌応答の特性を調査した。分泌応答の解析は、灌流液中のカテコラミンをカーボン電極により酸化し、その酸化電流を連続計測することで行った。標準溶液中で、ニコチンおよび外液高カルシウムによる脱分極性の刺激を行うとジヒドロピリジン感受性の電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入が生じ、分泌が誘導された。ムスカリン、ブラジキニン、ヒスタミンなどのレセプター刺激では、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離に基づく初期応答、および上記の Ca^{2+} チャネルとは異なる経路による細胞外 Ca^{2+} の導入による持続的分泌応答がみられた。 Sr^{2+} は Ca^{2+} チャネル、レセプターにより開かれる Ca^{2+} 導入経路のいずれからも細胞内に流入して、分泌を誘導した。しかし、 Sr^{2+} 置換クレス液中では、レセプター刺激による分泌の初期成分が顕著に抑制された。この理由として、標準液中では、細胞外からの流入 Ca^{2+} を引金とする細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離が行われるが、 Sr^{2+} の流入ではこの過程が生じない可能性が示唆された。一方、 Ba^{2+} 置換クレス液中では、 Ba^{2+} は Ca^{2+} や Sr^{2+} と異なり、他の刺激物質が不在のときでも細胞内に自然流入し分泌を引き起こした。この自然流入は主に電位依存性 Ca^{2+} チャネルを透過するものであり、ジヒドロピリジン系 Ca^{2+} チャネル遮断剤である PN200-110 により強く抑制された。また、この Ba^{2+} の自然流入(外液 Ba^{2+} 濃度 1 mM) による分泌は外液に Ca^{2+} が約 80 μ M 共存すると半減し、640 μ M 以上存在するとほとんど完全に抑制された。このことより、 Ca^{2+} チャネルの外液側に Ca^{2+} 結合部位が存在し、ここでの Ca^{2+} 結合状態により Ba^{2+} の透過性に変化が生ずることが示唆された。 Ba^{2+} の自然流入による分泌は S 字状曲線により増大し、外液 Ba^{2+} 濃度に依存した飽和レベルを示したが、 Ba^{2+} 濃度が高いと、細胞内カテコラミンの枯渇によると思われる飽和分泌レベルの漸減や飽和に達する以前に下降が生じた。また、分泌の飽和レベルは、外液 Ba^{2+} 濃度の約 2 乗に比例した (Ba^{2+} 濃度 4 mM 以下; 160 μ M Ca^{2+} 存在下)。 Ba^{2+} から Ca^{2+} への再置換後、分泌は指数関数的に速やかに終息した。これら特性を説明するため、細胞内外への Ba^{2+} の動きを記述する簡単な動力学式の提案を行った。

9246 二価イオンによる副腎髄質カテコラミン分泌の制御機構の研究

助成研究者: 藁科 彬(新潟大学 医学部)

共同研究者: 藤原 直士(新潟大学)

1. 研究目的

副腎髄質細胞の刺激受容によるカテコラミン分泌に対する細胞外液の塩組成の影響を調べる過程で、Douglas (1) らは、分泌の維持に外液中の Ca^{2+} イオンの存在が必須であることをつきとめた。以来、この Ca^{2+} の役割の究明は「刺激-分泌」連関に関する研究の主要なテーマとなり、副腎髄質のみならず、種々の細胞における分泌応答、神経伝達物質の放出機構とも関連して、多くの研究者の注目を集めてきた。実際、副腎髄質細胞では、刺激受容による Ca^{2+} の動員機構、 Ca^{2+} による開口放出過程の賦活機構、細胞内 Ca^{2+} の貯蔵や放出過程などが詳しく調べられてきた。しかし、まだ、多くの点で解明されるべき点を残している。このような研究のアプローチの一つに、 Ca^{2+} 以外の2価イオンの細胞内での動態を分析し、 Ca^{2+} のそれと比較する方法で、 Ca^{2+} の役割をより明確にするという方法が考えられる。この目的に沿い、本研究では、 Ca^{2+} と同様開口放出によりカテコラミンの分泌を誘導することが知られている(2,3) Sr^{2+} および Ba^{2+} による分泌応答特性の観測・分析を行った。

2. 研究方法

ペントバルビタール麻酔下のラット(オス:300-450 g)を開腹し、左側副腎を摘出後、直ちに副腎静脈より逆向性に灌流した。副腎より出た灌流液を glassy carbon 電極が埋め込まれた flow cell (BAS社:TL-5) 内に導き、液中のカテコラミン(アドレナリン + ノルアドレナリン)量を電極による酸化電流強度として電流測定器(BAS社:LC-4B)により検出した(4)。結果は12ビット A/D コンバーターを介し、磁気デスクに記録した。

灌流のための標準溶液(standard medium)の組成(mM濃度)は、 NaCl (150)、 KCl (5.6)、 CaCl_2 (2)、 MgCl_2 (1)、 glucose (5.6)、 NaH_2PO_4 (1)- HEPS (10) (pH 7.3)、とした。 Sr^{2+} 置換溶液(Sr^{2+} -medium)は、標準溶液中の CaCl_2 全量(2 mM)を等モルの SrCl_2 で置き換えた。 Ba^{2+} 置換溶液(Ba^{2+} -medium)は標準溶液に必要な量の BaCl_2 を添加するとともに、 CaCl_2 濃度を目的に応じ適宜調節した。これらの溶液、およびこれらの溶液にニコチン、ブラジキニン、ムスカリンなどの刺激物質を含む溶液は、使用前に100%酸素で通気した。実験は全

て、室温 (23-26 °C) で行われた。

3. 研究結果

3. 1. Sr^{2+} 流入による分泌応答

標準溶液 (2 mM Ca^{2+} を含有) 中での各種分泌刺激は Sr^{2+} 置換溶液中においてもカテコラミン分泌応答を示したが、両者の分泌パターンには差異が認められた。例えば、標準溶液中でのブラジキニンによる 10 分間の連続刺激による分泌応答 (Fig. 1 a) を記録後、同じ刺激を、 Sr^{2+} 置換溶液中で行うと図 1 b のようになった。即ち、持続的分泌の大きさは保持されたが、初期応答成分が顕著に抑制された。初期応答は、灌流溶液を標準溶液に再切り替えることで回復した (Fig. 1 c)。同様の結果がムスカリン刺激の場合にもみられた (Fig. 1 d, e)。また、 Sr^{2+} 置換溶液中のニコチン刺激でも、分泌の初期段階は抑制されたが、ニコチン連続刺激の脱感作による減衰速度はむしろ Sr^{2+} 置換溶液中の方が遅かった (Fig. 1 f, g)。また、これら初期相の減少は、外液の Sr^{2+} 置換直後からおこり、細胞内への Sr^{2+} の蓄積とは関係しないようであった。

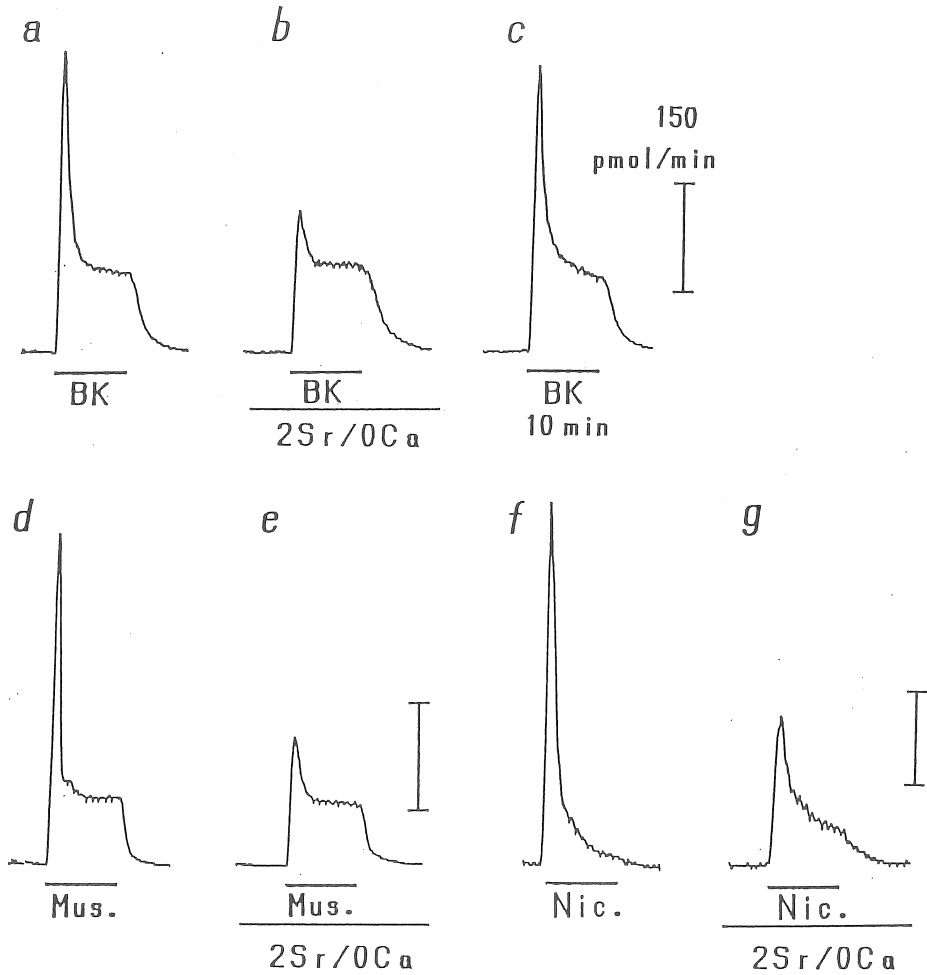
3. 2. Ba^{2+} の流入とカテコラミン分泌

3. 2. 1. 共存 Ca^{2+} の影響

Ba^{2+} は Ca^{2+} 、 Sr^{2+} と異なり、外液中に存在すると、他の刺激物質の助けを借りることなく、細胞内に自然流入し、それ自身が強い分泌刺激となる。この分泌応答は Fig. 2 A にみられるように S 状曲線に沿い増大し 10 分程度で飽和し、そのレベルを保った。ただし、外液 Ba^{2+} 濃度が高い場合には、飽和レベルが極端に大きくなり、細胞含有のカテコラミンの枯渇のためと思われる分泌の時間的減少が、飽和後あるいは飽和に達する以前から生じた。この Ba^{2+} による分泌は外液中に Ca^{2+} が共存すると減少した。 Ba^{2+} 濃度を一定 (1 mM) にして、共存 Ca^{2+} 濃度を変えたときの応答パターンは Fig. 2 A (a-d) のようになった。また、10 分間に分泌されたカテコラミンの相対量は Fig. 2 B のようになり、1 mM の Ca^{2+} が共存すると分泌は殆ど完全に抑制された。

3. 2. 2. Ba^{2+} の流入経路

外液 Ba^{2+} の細胞内への流入経路を同定するため、Fig. 3 に示すような実験を行った。外液 1 mM Ba^{2+} による分泌 (Fig. 3 a) は、ジヒドロピリジン系 Ca^{2+} チャネル遮断



- Fig. 1. -

The influence of Sr^{2+} replacement for Ca^{2+} on stimulant-evoked catecholamine secretion from rat adrenal medullae. The medulla was stimulated for 10 min by 200 nM bradykinin (BK) in the standard medium (a), in Sr^{2+} -medium (b) and again in the standard medium (c). The medulla was rested for 30 min between the measurements. Similarly, 10-min stimulation with 100 μ M muscarine (Mus.) was delivered in the standard medium (d) and in Sr^{2+} -medium (e); 10 μ M nicotine (Nic.) in the standard medium (f) and in Sr^{2+} -medium (g). The Sr^{2+} -medium contained 2 mM $SrCl_2$ in the replacement of 2 mM $CaCl_2$ in the Krebs solution.

剤である PN200-110 (1 μ M) により大部分が抑制された (Fig. 3 b)。PN200-110 存在下では、Ba²⁺ 自身による分泌が抑制されると共に、ニコチン (10 μ M) 刺激もほとんど無効であった (Fig. 3 c)。一方、PN200-110 非存在下では、ニコチン (Fig. 3 f) や外液高カリウム (40 mM) (Fig. 3 g) 等の脱分極性刺激は、自然流入を上回る Ba²⁺ の流入を促し、急速な分泌の上昇をもたらした。また、ブラジキニン (Fig. 3 d) やヒスタミン (Fig. 3 e) レセプターの刺激は、PN200-110 存在下であっても、Ba²⁺ 流入経路を新たに開き、分泌を顕著に増大させることが示された。

3. 2. 3. 外液 Ba²⁺ 濃度と分泌量

Fig. 4 A は外液の Ba²⁺ 濃度を 4 mM (160 μ M Ca²⁺ を含む) とし、分泌を 5 分間測定後、3, 2, 1 mM とステップ状に 6 分間隔で Ba²⁺ 濃度を変えたときの分泌速度の変化を示したものである。横軸 Ba²⁺ 濃度、縦軸分泌速度とした両対数グラフに上記の結果およびその他同様の 2 実験の結果をプロットすると、Fig. 4 B のようになり、その勾配は 2 に近かった。

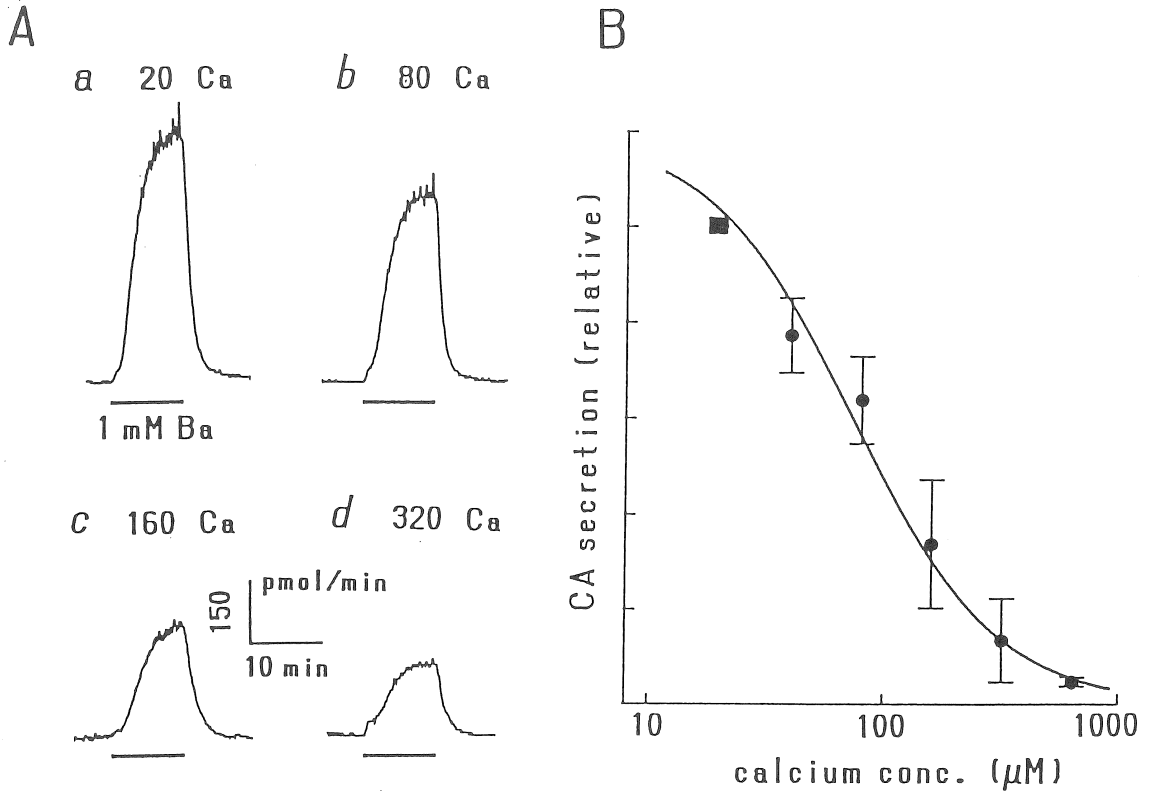
4. 考察

4. 1. 2 価イオンの流入経路

Sr²⁺、Ba²⁺ の副腎髄質細胞へ流入経路として、まず、Ca²⁺ の流入と共通の経路を考える必要がある。報告者のこれまでの研究により (4, 5, 6)、ラット副腎細胞では、この Ca²⁺ の流入に関しては少なくとも 2 経路が確認されている。一つは電位依存性 Ca²⁺ チャネルであり、副腎髄質細胞がニコチンや外液高カリウムなどの脱分極性刺激を受容したときの Ca²⁺ の流入経路となる。このチャネルは L 型に近い性質を持ち、ジヒドロピリジン系の薬剤により遮断される。もう一つは、ムスカリン、ブラジキニン、ヒスタミンなどの受容体刺激により開かれる Ca²⁺ 導入の経路 (Ca²⁺ 透過性チャネルである可能性が高い) であり、不活性化は著しく遅く、これらのアゴニストで連続刺激を行ったときの持続的分泌を支える Ca²⁺ 源となる。

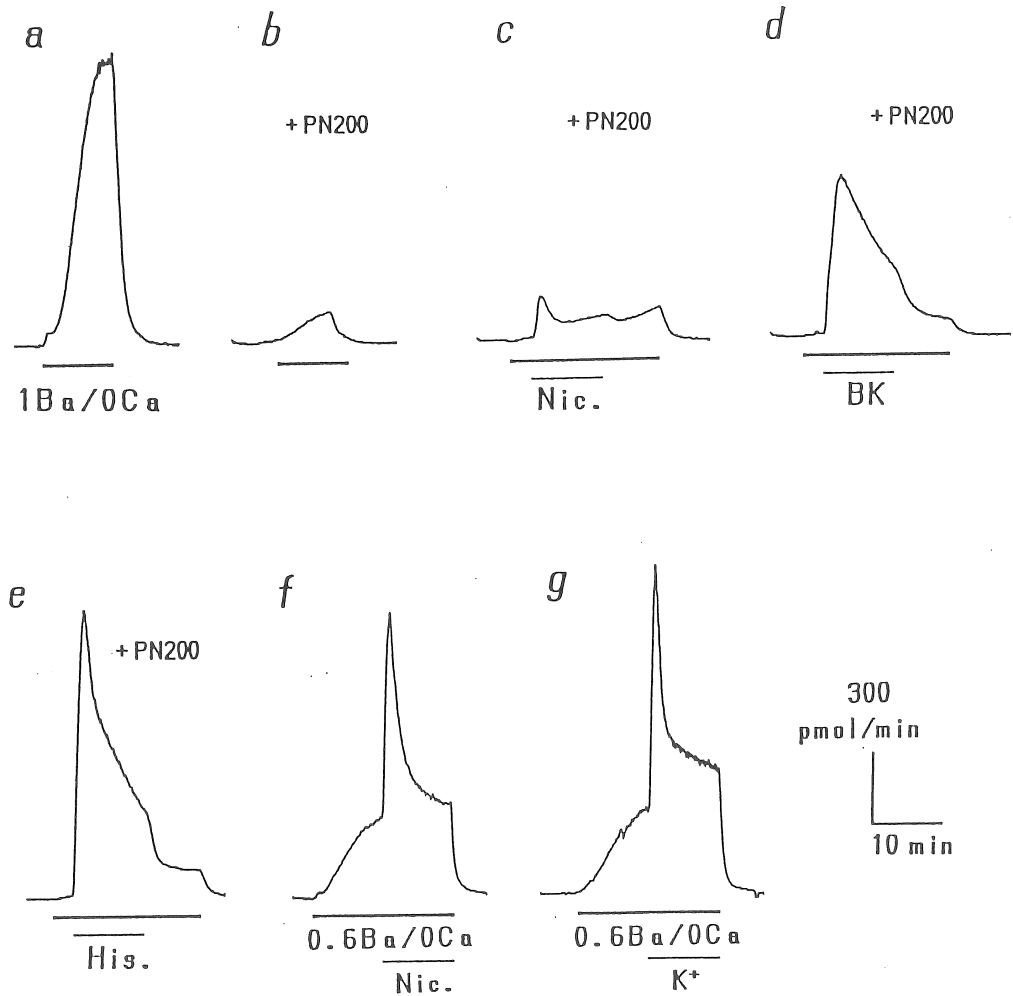
4. 2. Sr²⁺ による分泌応答

Sr²⁺ が電位依存性 Ca²⁺ チャネルを透過することはよく知られた事実であるが、Sr²⁺ 置換溶液中のニコチン刺激による分泌応答 (Fig. 1 b) の存在はこの事実と合致する。更に、ブラジキニン (Fig. 1 b)、ムスカリン (Fig. 1 e) による連続刺激で持続的分泌



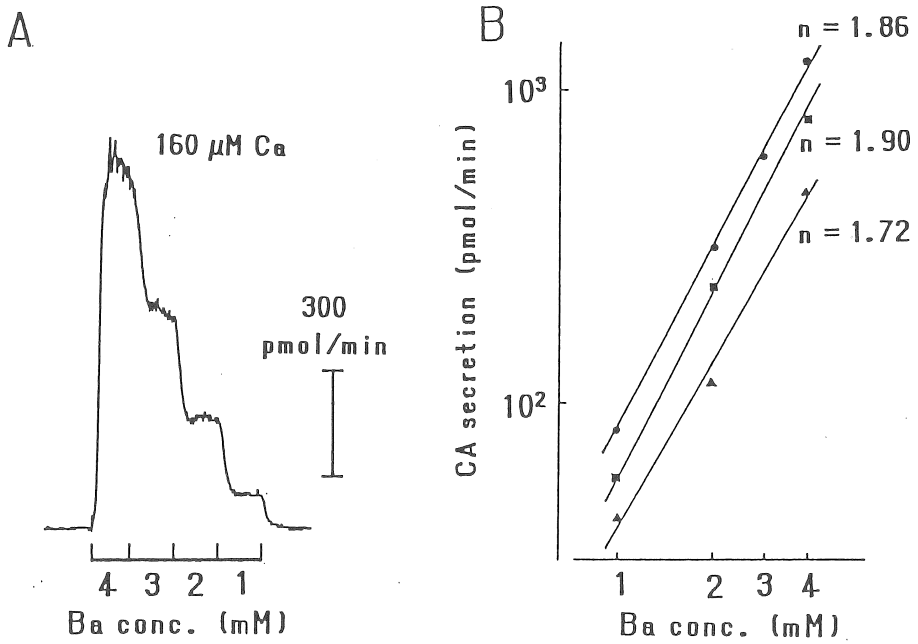
- Fig. 2. -

Inhibition by extracellular Ca^{2+} of the catecholamine secretion induced in Ba^{2+} -medium. (A) Secretion was evoked by exposing an adrenal medulla for 10 min each to 1 mM Ba^{2+} -containing Krebs solution which concomitantly contained Ca^{2+} at concentrations of (a) 20 μM ; (b) 80 μM ; (c) 160 μM ; (d) 320 μM . The medulla was rested for 20 min in the standard medium between the measurements. (B) The amount of secretion during the 10 min exposure to the Ba^{2+} -medium was plotted as a function of the extracellular Ca^{2+} concentration. The data are normalized to the level at 20 μM Ca^{2+} and expressed as mean \pm SD (n=4).



- Fig. 3. -

Secretory responses induced by exposure of adrenal medullae to Ba²⁺-medium containing 1 mM Ba²⁺ (a-e) and 0.6 mM Ba²⁺ (f and g). The Ba²⁺-medium itself (a, f, g) evoked secretion and the addition of 10 μM nicotine (f) or the elevation of the extracellular K⁺ concentration to 40 mM (g) caused further increases in the secretion. In the presence of a Ca²⁺ channel blocker PN200-110 (1 μM), the secretion evoked by the exposure to the Ba²⁺-medium (b) and by the addition of 10 μM nicotine (c) was inhibited, but the addition of 200 nM bradykinin (d) or 100 μM histamine (e) elicited large responses in the presence of PN200-110.



- Fig. 4 -

The relation between extracellular Ba²⁺ concentration and the rate of catecholamine secretion. (A) The secretion was evoked by exposure of an adrenal medulla to Krebs solution containing 4 mM Ba²⁺ for 5 min. Then Ba²⁺ concentration was reduced stepwise from 3 to 1 mM at 6-min intervals. (B) The secretion rates obtained at various Ba²⁺ concentrations were plotted in logarithmic coordinates.

応答がみられることから、レセプターを介し賦活される Ca^{2+} の導入経路からも Sr^{2+} が流入することが示された。 Sr^{2+} の流入量に関する情報は今のところ欠落しているが、 Ca^{2+} のそれを越えるものではないと仮定すると、細胞内での Sr^{2+} の分泌誘導能力は Ca^{2+} に匹敵するか、それを越えるものと考えられる。

ところで、 Sr^{2+} 置換溶液中で、何故分泌の初期相が抑制されるかが問題となる。標準溶液中のブラジキニン、ムスカリン刺激においては、この相の形成に細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離が関与しているが(5,6)、これには 1) レセプター刺激により産生される2次メッセンジャー(イノシトール3リン酸と思われる)に誘発される成分と、2) 細胞外より流入した Ca^{2+} および 1) により遊離した Ca^{2+} により誘発される Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) の二過程が関係すると考えられる。このうち、分泌に主として関係するものは 2) の過程であると推測される。このことから、 Sr^{2+} 置換溶液中での初期相の抑制の原因として、 Sr^{2+} が Ca^{2+} に比較し、CICR の誘起に有効に働かない可能性を挙げることができる。

4. 3. Ba^{2+} による分泌応答

4. 3. 1. Ba^{2+} の細胞への流入と分泌の誘発にみられる性質

Ba^{2+} は Ca^{2+} 、 Sr^{2+} と異なり、他の刺激物質が不在のときにも、自然流入し、分泌を引き起こす。この自然流入の主たる経路が電位依存性 Ca^{2+} チャネルであることが本研究で明らかにされた (Fig. 3 b)。ニコチンや外液高カリウムによる脱分極でチャネルを開くと更に急激な Ba^{2+} の流入と分泌がみられるので (Fig. 3 f, g)、この自然流入は漏洩とでもいえる暖やかなものと考えられる。また、外液に Ca^{2+} が共存すると、 Ca^{2+} 濃度依存的に、 Ba^{2+} の自然流入が抑制されたが (fig. 2)、この原因として 1) Ca^{2+} チャネルの細胞外面側に Ca^{2+} 結合部位があり、ここに Ca^{2+} が不在であるときのみ Ba^{2+} の自然流入が生ずる、2) 外液 Ca^{2+} 除去が Ca^{2+} の濃度に依存した脱分極を起こし、これが Ba^{2+} 流入の原因になっている、などの可能性が考えられるが、この点については更に研究が必要である。

Ca^{2+} チャネル遮断剤 PN200-110 を含む Ba^{2+} 置換溶液中では、ニコチン刺激の効果が少ない (Fig. 3 c) のに比べ、ブラジキニン (Fig. 3 d)、ヒスタミン (Fig. 3 e) 刺激により、分泌が大きく増強された。このことは、ブラジキニンなどのレセプター刺激により電位依存性 Ca^{2+} チャネルとは異なる Ca^{2+} の導入経路が開かれるという、報告者らのこれまでの推論を、証明したことになる。

本研究で、分泌が細胞外の Ba^{2+} 濃度の 2 乗に近い依存性を持つことが示された (Fig. 4)。最近、Augustine & Neher (7) は副腎髄質細胞のカテコラミン分泌は細胞

内遊離 Ca^{2+} 濃度の 2 乗に比例する報告している。このことは、 Ca^{2+} と Ba^{2+} の細胞内における分泌誘導機構に共通性があるという考えと矛盾しない。

4. 3. 2. Ba^{2+} の自然流入による分泌応答に関する動力学

Ba^{2+} の自然流入による分泌は、外液 Ba^{2+} 濃度に依存した飽和レベルを示す。各濃度の飽和点では、 Ba^{2+} の流入とくみ出しが均衡して、細胞内 Ba^{2+} 濃度が一定であると思われる。そのことは、分泌速度が細胞内 Ba^{2+} 濃度で一義的に決まることを意味しており、この分泌応答が簡単な動力学により解析できる可能性を示している。 Ba^{2+} が Ca^{2+} チャネルより細胞に k_i^+ の速度定数で入り、 k_i^- で出るとし、また、 k_o で細胞からくみ出されるという最も簡略化したモデルを採用すると、細胞内 Ba^{2+} 濃度 ($[Ba^{2+}]_i$) は外液 Ca^{2+} を Ba^{2+} で置換後、

$$[Ba^{2+}]_i = A \cdot [Ba^{2+}]_o \cdot (1 - \exp(-c \cdot t)) \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{ただし } A &= k_i^+ / c ; \quad c = k_o + k_i^- \\ k_i^- &= k_i^+ \cdot \exp(2FV_m / RT) \end{aligned}$$

(F: Faraday const. R: gas const. V_m : membrane potential)

で上昇飽和し、 Ca^{2+} への再置換後は、初期細胞内 Ba^{2+} 濃度 B から

$$[Ba^{2+}]_i = B \cdot \exp(-c \cdot t) \quad (2)$$

で減少する。現在のところ、分泌が細胞内 Ba^{2+} 濃度のどのような関数であるのか不明であるが、自然流入による分泌の立ち上がりがS字状であること、などから一般化して、 $[Ba^{2+}]_i$ と分泌速度 (CR) の関係は次の Hill 式で書けるものと仮定する。

$$CR = CR_{max} / [1 + (K / [Ba^{2+}]_i)^n] \quad (3)$$

ただし CR_{max} は最大分泌速度、 K は相互作用に関係する定数

これらの式に従えば、細胞内 Ba^{2+} 濃度は (1) (2) に従い、指数関数的に上昇、下降する。一方、実験でみられる $[Ba^{2+}]_i$ と分泌量の関係 (Fig. 4) を考慮し、(3) 式で $n = 2$ とすることにより、分泌は実験でみられるように、S字状に上昇し、速やかに下降する。

5. 今後の課題

Ba^{2+} 自然流入による分泌が実際に上記の解析のような過程で誘導されているとことを証明するためには、 $[Ba^{2+}]_i$ の計算値と実測値が一致する必要がある。fura-2 など Ba^{2+} と結合し、その蛍光が変化する色素を使用すれば、細胞内 Ba^{2+} 濃度の計測は可能であると思われる。

文献

- 1) Douglas, W. W. & Rubin, R. P. (1961) The role of calcium in the secretory release of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.* 159: 40-57.
- 2) Izumi, F., Toyohira, Y., Yanagihara, N., Wada, A. & Kobayashi, H. (1986) Barium-evoked release of catecholamines from digitonin-permeabilized adrenal medullary cells. (1986) *Neurosci. Lett.* 69: 172-175.
- 3) Furuya, S., Edwards, C. & Ornberg, R. L. (1989) Exocytosis of bovine chromaffin granules in ficoll captured by rapid freezing. *J. Electron Microsc.* 2: 143-147.
- 4) Warashina, A., Fujiwara, N. & Shimoji, K. (1990) Characteristics of nicotinic and muscarinic responses in the rat adrenal medulla studied by real-time monitoring of catecholamine release. *Biomed. Res.* 10: 157-164.
- 5) Warashina, A. (1990) Bradykinin-induced calcium mobilization and catecholamine secretion in rat adrenal medullary cells. *Biomed. Res.* 11: 219-229.
- 6) Warashina, A. (1992) Calcium mobilization and catecholamine secretion in histamine-stimulated rat adrenal medullary cells. *Biomed. Res.* 13: 415-421.
- 7) Augustine, G. J. & Neher, E. (1992) Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450: 247-271.

Studies on the divalent cation-controlled catecholamine secretion in adrenal medullary cells

Akira Warashina and Naoshi Fujiwara
Niigata University School of Medicine

Summary

Catecholamine (CA) secretory responses were studied using the isolated rat adrenal medulla perfused with the standard krebs solution (containing 2 mM Ca^{2+}) and with Sr^{2+} - or Ba^{2+} -medium in which CaCl_2 in the Krebs solution was replaced by SrCl_2 or BaCl_2 . The perfusate was directly led into a flow cell for continuous electrochemical detection of CA in the medium. In the standard solution, stimulation with nicotine or high extracellular K^+ concentration evoked CA secretion derived from Ca^{2+} influx through dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channels. On stimulating receptors with muscarine, bradykinin and histamine, Ca^{2+} release from intracellular stores caused an initial transient secretion whereas receptor-mediated Ca^{2+} influx produced a sustained secretion. Sr^{2+} could permeate both Ca^{2+} channels and the receptor-operated pathway for Ca^{2+} introduction and elicited CA secretion. However, the initial transient secretion following the receptor stimulation was largely inhibited in Sr^{2+} -medium. This may imply the absence of capability for Sr^{2+} influx to induced Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores, which may takes place with Ca^{2+} influx in the standard solution to generate the initial phase of secretion. Unlike Ca^{2+} and Sr^{2+} , Ba^{2+} entered adrenal medullary cells without help of stimulants to cause CA secretion in Ba^{2+} -medium. This Ba^{2+} influx mainly passed through voltage-dependent Ca^{2+} channels and was inhibited by a dihydropyridine type of Ca^{2+} channel blocker, PN200-110. CA secretion evoked by exposure of adrenal medullary cells to Ba^{2+} (1 mM)-medium was suppressed by about half due to the concomitant presence of 80 μM Ca^{2+} in the Ba^{2+} -medium and almost completely inhibited by 640 μM Ca^{2+} . There might exist a Ca^{2+} binding site at a some point facing to the outer surface of the Ca^{2+} channel and Ca^{2+} occupation of this site may determine the permeability of Ba^{2+} . Ba^{2+} -induced CA secretion in the absence of other stimulants increased with a sigmoidal manner and saturated at the level which was roughly proportional to the second power of the external Ba^{2+} concentration. On replacing Ba^{2+} -medium by the standard medium, CA secretion decreased exponentially. To elucidate these characteristics of Ba^{2+} -induced CA secretion, a simple kinetic equation was proposed.