

## 小胞体 Ca-ATPase 阻害薬 thapsigargin の Ca<sup>2+</sup> 動員作用

竹 村 晴 夫

札幌医科大学薬理学講座 (主任 大鹿英世 教授)

Ca<sup>2+</sup>-mobilizing action of  
the microsomal Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor thapsigargin.

Haruo TAKEMURA

(Department of Pharmacology, Sapporo Medical University, School of  
Medicine, S. 1, W. 17, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan).

**ABSTRACT** Ca<sup>2+</sup> mobilization evoked by the activation of drug receptors is due to Ca<sup>2+</sup> entry from the extracellular medium into cells as well as Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores. However, the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores are diverse and the mechanism of Ca<sup>2+</sup> entry is unknown. Thapsigargin (TG), a sesquiterpene lactone extracted from the root of the umbelliferous plant *Thapsia garganica*, is a non-phorbol ester type tumor promoter. Since it has been found that TG has a specific inhibitory action on microsomal Ca<sup>2+</sup>-ATPase, TG is widely used for the analysis of the nature of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and the mechanism of Ca<sup>2+</sup> mobilization. This article reviews the recent studies on Ca<sup>2+</sup> mobilization of TG in several kinds of cells.

TG mobilizes Ca<sup>2+</sup> from extracellular medium as well as from intracellular stores in many types of cells. Based on the action of TG on intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, it was found that the intracellular Ca<sup>2+</sup> store in parotid acinar cells has at least two compartments, and that an agonist- and inositol trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool in pancreatoma AR4-2J cells exists in or closely associated with the nuclear envelope. Ca<sup>2+</sup> entry induced by TG is called capacitative Ca<sup>2+</sup> entry, by which depletion of Ca<sup>2+</sup> in the intracellular store activates Ca<sup>2+</sup> entry. In this review TG, as an excellent tool for the study of Ca<sup>2+</sup> mobilization and cellular function compared to other Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors, is also discussed.

(Received July 29, 1996 and accepted August 28, 1996)

**Key words:** Thapsigargin, Calcium pool, Calcium entry

### 1 はじめに

薬物受容体の活性化による細胞の Ca<sup>2+</sup> 動員は、細胞内貯蔵部位からの遊離ばかりか細胞外液から細胞内への流入に起因する<sup>1)</sup>。この細胞内貯蔵部位にはイノシトール 1, 4, 5-三リン酸(IP<sub>3</sub>)の受容体が存在して Ca<sup>2+</sup>

の遊離を調節している。また、遊離により減少した Ca<sup>2+</sup> は細胞内貯蔵部位に存在する Ca pump により貯蔵部位へ再び取り込まれる。しかしながら、IP<sub>3</sub> 受容体を持たない細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位も見いだされ、Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位自体についても未だ良く分かっていない<sup>2,3)</sup>。さらに、薬物受容体の活性化による細胞外液から細胞内への

#### Abbreviations:

IP<sub>3</sub> : inositol trisphosphate

TG : thapsigargin

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration

MCh : methacholine

SP : substance P

Ca<sup>2+</sup> 流入の機序についてはほとんど知られていない。

セリ科の植物 *Thapsia garganica* より抽出された thapsigargin (TG) はフォルボルエステルとは異なるタイプの tumor promoter であるが、近年、小胞体の Ca<sup>2+</sup>-ATPase を特異的に阻害することが報告され、細胞内貯蔵部位の性質を検討する上で非常に有益であることが示唆されている<sup>4,5)</sup>。本総説では主として外分泌腺を用い、種々の細胞での TG の Ca<sup>2+</sup> 動員作用を検討することにより、薬物受容体活性化による Ca<sup>2+</sup> 遊離と関連する細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位の多様性や Ca<sup>2+</sup> 流入の活性化機構について、我々の知見に基づき考察する。

## 2 種々の細胞における TG の Ca<sup>2+</sup> 動員作用

外分泌腺のラット耳下腺腺房細胞<sup>6)</sup>、マウス涙腺腺房細胞<sup>7)</sup>、ラット膵臓癌細胞 AR4-2J<sup>8)</sup> 及び神経性細胞であるラット pheochromocytoma PC12 細胞<sup>9)</sup> 及びマウス neuroblastoma とラット glioma の hybrid である NG108-15 細胞<sup>9)</sup> におけるそれぞれの細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を fura-2 により測定し、その結果を Fig. 1 に示した。細胞外液 Ca<sup>2+</sup> 非存在下において、いずれの細胞も TG により上昇した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は TG を加える前の静止レベルにまで減少する。つまり、TG はこれらの細胞の細胞内貯蔵部位から Ca<sup>2+</sup> を遊離する事が示される。これに対し、細胞外液に Ca<sup>2+</sup> が存在するときには細胞の種類により異なり、上昇した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> はそのまま或いは僅かに減少するが、静止レベルより高いレベルを維持する。耳下腺や涙腺細胞で見られるように、この持続的な上昇は EGTA を添加すると減少する。また、涙腺細胞及び AR4-2J 細胞で見られるように、細胞外液 Ca<sup>2+</sup> 非存在下で、TG により静止レベルに回復した後、細胞外液に Ca<sup>2+</sup> を添加すると [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は上昇し、高いレベルを維持する。これらのことから、TG は細胞内貯蔵部位から Ca<sup>2+</sup> を遊離するばかりか細胞外液から Ca<sup>2+</sup> を流入させることが示唆される。このことは我々が用いた以外の種々の細胞においても認められている<sup>10)</sup>。

## 3 TG 感受性細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位

### 3-1 IP<sub>3</sub> 感受性細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位との関連性について

これに関しては、細胞外液 Ca<sup>2+</sup> を除去した条件下で、TG と IP<sub>3</sub> を生成する薬物とを組み合わせた時の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を測定することにより検討した。耳下腺細胞では、TG 添加後、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が静止レベルに回復してからコリン作動薬である methacholine (MCh) を与えるとごく僅かな増加しか得られない。また、逆に、MCh 添加後に TG

を与えるとやはりごく僅かな上昇しか認められない<sup>6)</sup>。このことから、耳下腺細胞では TG 及び IP<sub>3</sub> 感受性細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位はほぼ同じであろうと思われる。しかし、涙腺細胞では TG 処置後、MCh の添加で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は全く増加しないが、MCh 添加後、TG は単独の時に比べ少ないながら [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させる<sup>7)</sup>。従って、この細胞では TG 感受性細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位は IP<sub>3</sub> 感受性貯蔵部位に比べ大きいものと考えられる。このことは神経性細胞である PC12 細胞や NG108-15 細胞で顕著に現れる。すなわち、細胞外液 Ca<sup>2+</sup> 除去条件下で、TG 前処置後、carbachol や bradykinin により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は全く上昇しない。しかし、同条件下で、car-

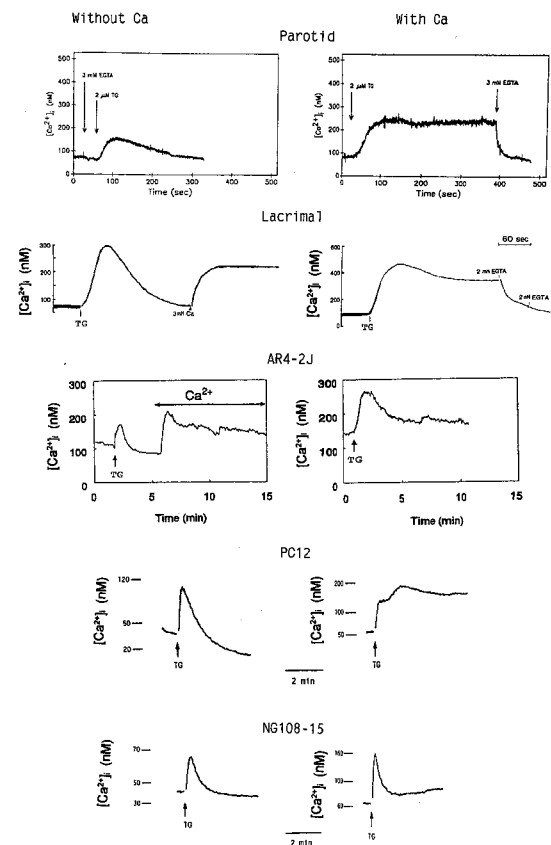


Fig. 1 Effects of thapsigargin (TG) on Ca<sup>2+</sup> mobilization in various types of cells in the presence (right) and absence (left) of extracellular Ca<sup>2+</sup>. Fluorescence of fura-2-loaded parotid, lacrimal, PC12 and NG108-15 cells was measured in cell suspension. Fura-2 acid was microinjected into AR4-2J cell and the fluorescence was measured by microfluorimetry. (Modified from ref. 6-9).

bachol や bradykinin 前処置後でも TG は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を増加させる<sup>9)</sup>。従って、これらの細胞では、TG 感受性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位は  $\text{IP}_3$  感受性貯蔵部位に比べるとかなり大きいものと思われる。このように細胞により TG 感受性貯蔵部位は多様性を持っていると考えられ、このことを耳下腺細胞と AR4-2J 細胞でさらに検討する。

### 3.2 耳下腺細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位の compartment について

ラット耳下腺細胞をサポニン処理して透過性を高め、ATP, ATP regenerating system 及びミトコンドリア阻害薬存在下で  $\text{IP}_3$  を添加すると、 $\text{Ca}^{2+}$  の遊離が認められるが、 $\text{IP}_3$  が存在しているにもかかわらず、遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  は再び取り込まれてしまう<sup>11)</sup>。これには小胞体での  $\text{IP}_3$  受容体の脱感作あるいは  $\text{IP}_3$  が代謝されたためと考えられる。しかし、 $\text{IP}_3$  添加後遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  が再び取り込まれてから、同じ濃度の  $\text{IP}_3$  を再添加しても再遊離が認められるし、他の細胞でも  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用は脱感作しないことが報告されている<sup>12-14)</sup>。さらに、代謝され難い  $\text{IP}_3$  の類似体や  $\text{IP}_3$  の代謝阻害薬を前処置した条件でも遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  の再度の取り込みが観察される<sup>11)</sup>。従って、 $\text{IP}_3$  による遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  の再度の取り込みは  $\text{IP}_3$  受容体の脱感作や  $\text{IP}_3$  の代謝とは関連しないと思われる。これに対し、透過性を高めた条件下で TG を与えると徐々に  $\text{Ca}^{2+}$  が遊離され、再度の取り込みは認められない。そこで、 $\text{IP}_3$  を処置して遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の再度の取り込みが生じた後、TG を与えると TG 単独の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離に比べて明らかに、遊離の速度が速くなる<sup>11)</sup>。また、この細胞では  $\text{IP}_3$  感受性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位と TG 感受性貯蔵部位はほぼ同じであると思われる<sup>9)</sup>。以上のことから、Fig. 2 のように  $\text{IP}_3$  感受性細胞内貯蔵部位には少なくとも 2 つの compartment があると仮定される。すなわち、静止状態では 1 つの compartment からリークした  $\text{Ca}^{2+}$  は直ちに Ca pump によりもう一方の compartment に再び取り込まれる。Ca pump による compartment への  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の速度定数  $k_1$  は、この compartment から  $\text{IP}_3$  受容体がある compartment への  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の速度定数  $k_2$  よりも大きいので、 $\text{IP}_3$  が存在するときにも遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  は再び取り込まれる。この後に TG を与えると再び取り込まれた  $\text{Ca}^{2+}$  はリークばかりか  $\text{IP}_3$ -gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel を介して放出されるために TG 単独による放出に比べ、その速度は早いことになる。しかしながら、このような再度の取り込み機構は細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  を除去した条件下での intact 細胞では働かないようである。それは、細

胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、MCh による持続的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇が認められた後、アトロピンを添加し、さらに EGTA により細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートしてから substance P (SP) を与えると SP 単独と同じような  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇が見られるからである<sup>11)</sup>。つまり、この場合は遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内貯蔵部位に再び取り込まれる。他方、MCh 添加後、先に EGTA で細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートしてからアトロピンを添加し、続いて SP を与えても  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は著しく抑制される<sup>11)</sup>。このよう

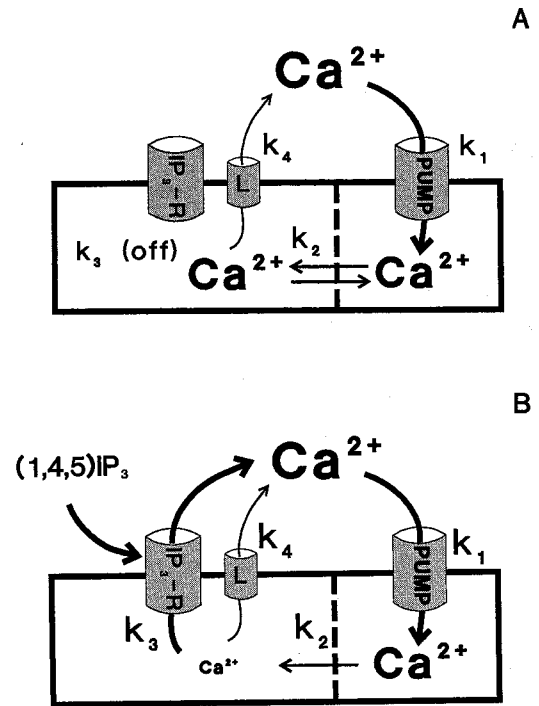


Fig. 2 Two compartment models for kinetic and spatial separation between  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and release sites in the (1, 4, 5) $\text{IP}_3$ -sensitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store in parotid cells. In the resting state (A), leak (L) of  $\text{Ca}^{2+}$  pool permits accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in the vicinity of release sites ( $k_2 > k_4$ ). (1, 4, 5) $\text{IP}_3$  rapidly increases the permeability of the  $\text{Ca}^{2+}$  store via opening of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $k_3$ ) and  $\text{Ca}^{2+}$  in the store is depleted ( $k_3 > k_2 > k_4$ ). The rate of  $\text{Ca}^{2+}$  pumping is greater than the leak through the permeability barrier of the  $\text{Ca}^{2+}$  store ( $k_1 > k_2$ ) resulting in  $\text{Ca}^{2+}$  re-sequestration. However, since the leak through the permeability barrier of the  $\text{Ca}^{2+}$  store is greater than that of the limiting membrane ( $k_2 > k_4$ ) the rate of efflux after thapsigargin is higher in the presence of (1, 4, 5) $\text{IP}_3$  than in its absence. (Modified from ref. 33)

に、細胞内貯蔵部位から遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  は、細胞内貯蔵部位に存在する Ca pump よりは形質膜に存在する Ca pump により細胞外液に汲み出されるとされる。

### 3.3 AR4-2J 細胞での細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位について

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定のために fura-2/AM を負荷しても、fura-2 が細胞質中に均一に分布せず、細胞内小器官に細胞内分画化する細胞も多くある<sup>15)</sup>。ラット膵臓癌 AR4-2J 細胞もその一つで、細胞を  $2 \mu\text{M}$  fura-2/AM で  $37^\circ\text{C}$ 、45 分間負荷し、単一細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度分布と細胞内 fura-2 の分布を画像解析すると、いずれの分布も細胞内で均一にはならない<sup>16)</sup>。これに対し、AR4-2J 細胞に fura-2 を直接細胞内に注入すると、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度分布及び fura-2 の分布がほぼ一様な分布となる。つまり、fura-2/AM で load すると、この細胞では細胞内分画化することが示される。そこで、細胞内の不均一性を各部位に対応させると、ミトコンドリアや核では  $\text{Ca}^{2+}$  濃度はほぼ同程度で低いが細胞質は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高いことが認められる (Fig. 3)<sup>16)</sup>。これに対し、fura-2 の分布を見るとミトコンドリアがかなり高く、他の部位は低い。ミトコンドリアに fura-2 が蓄積することは内皮細胞<sup>17)</sup>、肝細胞<sup>18)</sup> やマクロファージ<sup>19)</sup> で報告されている。このようにミトコンドリアにかなり fura-2 が分布しているにもかかわらず、この部位の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低いということは静止状態でのミトコンドリアマトリックスの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低いことを反映しているものと思われる。事実、心筋細胞<sup>20)</sup> や synaptosome<sup>21)</sup> のミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $10^{-7}$  M 程度である。次に、薬物で刺激した時の核、ミトコンドリア及び細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を検討した (Fig. 3)。 $100 \mu\text{M}$  MCh を与えるとミトコンドリアでも核でも同じような  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が得られるが、減少の程度は核の方が速い。これに対し、細胞質は静止レベルが核やミトコンドリアに比べ高いが  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化は核とほぼ同じである。心筋細胞においても、ノルアドレナリン存在下での pacing 刺激により、ミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が約 6 倍に上昇することが知られている<sup>20)</sup> が、このようなミトコンドリアでの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は、ホルモン刺激によるミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  輸送への直接的効果<sup>22)</sup> というよりは、ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  輸送系による上昇した  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  のミトコンドリアへの取り込みによるもの<sup>23,24)</sup> であろうと思われる。次に、TG を与えると、どの部位でも緩やかで僅かな  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加する。その後 MCh を添加すると、ミトコンドリアや核でさらに上昇した後減少し、静止レベルに回復する。しかし、細胞質は TG を与える前のレベルよりも

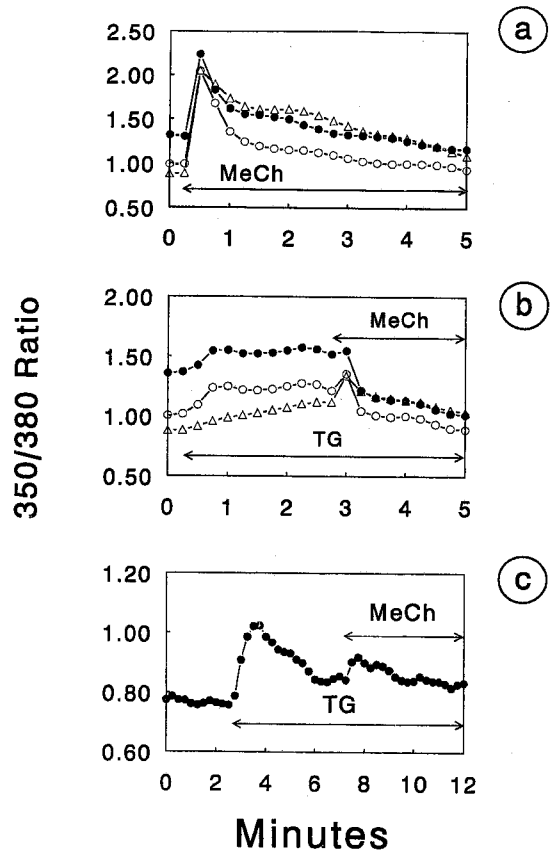
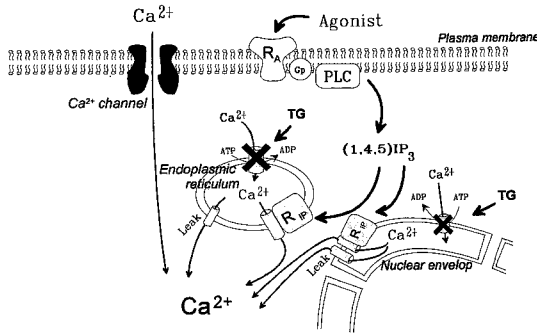


Fig. 3 Time course of changes in apparent  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in defined regions of fura-2/AM-loaded AR4-2J cells (a and b) and fura-2-injected cells (c). Pixel intensity in the 350/380 nm ratio images in mitochondrial region (open triangles), nuclear region (open circles) and cytoplasmic region (filled circles) was determined at various times in response to stimulation with  $100 \mu\text{M}$  methacholine (MCh, a) in response to stimulation with  $2 \mu\text{M}$  thapsigargin (TG) followed by MCh (b and c). Similar results were obtained from the 350/385 nm ratio images<sup>38)</sup>.

さらに  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は減少する。他方、fura-2 を細胞内に直接注入した時には、TG 単独でも Fig. 1 と同じような  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇が見られ、また、その後 MCh を添加しても静止レベル以下の減少は認められない (Fig. 3c)。これらのことから、細胞質にはさらに fura-2 が細胞内分画化している領域があり、TG と MCh の刺激によりこの領域内の fura-2 に結合した  $\text{Ca}^{2+}$  がさらに細胞質へ遊離されるため、静止レベル以下に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が減少すると考えられる。つまり、この領域は細胞質と fura-2 が



**Fig. 4** Diversity of the (1,4,5)IP<sub>3</sub>- and thapsigargin (TG)-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in the rat pancreatoma cell line AR4-2J. Activation of surface membrane receptors (R<sub>A</sub>) by agonists, through the action of a GTP-binding protein (G<sub>p</sub>) leads to the activation of phospholipase C (PLC) which catalyzes the breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and release of (1,4,5)IP<sub>3</sub>. Similar (1,4,5)IP<sub>3</sub> receptor (R<sub>IP</sub>) and TG-sensitive Ca<sup>2+</sup> pump on endoplasmic reticulum or calciosome are present in the membrane of nuclear envelope. However, endoplasmic reticulum might connect to the outer membrane of nuclear envelope.

局在している微少な小胞体が混在しており、細胞質として Ca<sup>2+</sup> 濃度を測定すると小胞体での高い Ca<sup>2+</sup> 濃度が反映されるのである。そこで水平面に細胞の断面を、縦軸に蛍光比を画像処理すると、細胞質はもちろんのこと、この部位内でも核を取り囲んでいる周辺領域の蛍光が強いことが観察される。そして、TG と MCh の処置によりこの周辺領域の蛍光は減少する。以上の結果を模式化したのが Fig. 4 で、核の外膜か、この近傍の小胞体、或いは両者が考えられるが、IP<sub>3</sub> 受容体や TG で抑制される Ca pump が存在し、小胞体と同じような細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位として機能するものと思われる。最近、このことを裏付ける報告がなされ、核膜に IP<sub>3</sub> 受容体や TG で抑制される Ca pump が存在し、核膜から Ca<sup>2+</sup> が遊離する<sup>25-27)</sup>。

#### 4 TG による細胞外液からの Ca<sup>2+</sup> の流入

##### 4-1 流入活性化機序の考察

TG が直接 Ca<sup>2+</sup> 流入を増加させるのではないかと考えられるが、肝細胞から membrane vesicle を精製し、この vesicle からの Ca<sup>2+</sup> efflux に対する影響を検討すると、TG は全く影響を与えないが、Ca イオノフォアでは著しい Ca<sup>2+</sup> efflux が認められる<sup>5)</sup>。即

ち、TG は直接 Ca<sup>2+</sup> 流入を増加しないと考えられる。

受容体作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入には IP<sub>3</sub> とイノシトール 1,3,4,5-四リン酸 (IP<sub>4</sub>) の両者が関与するという報告がある<sup>28,29)</sup>。しかし、ラット耳下腺での IP<sub>3</sub> と IP<sub>4</sub> の生成量を HPLC で測定すると、TG は単独でも、MCh による IP<sub>3</sub> 及び IP<sub>4</sub> 産生に対しても影響を及ぼさない<sup>6)</sup>。さらに、耳下腺ばかりではなく他の細胞でも TG はイノシトールリン酸に影響を及ぼさない<sup>7-9)</sup>。従って、イノシトールリン酸は Ca<sup>2+</sup> 流入に直接作用しないと考えられる。

神経性細胞においても TG により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の持続的な上昇が見られた (Fig. 1)。これは nimodipine 及び ω-conotoxin で影響を受けなかった<sup>9)</sup> ことから、これらの細胞での TG による Ca<sup>2+</sup> 流入は膜電位依存性 Ca<sup>2+</sup> channel を介したものではないと思われる。

従って、TG による細胞外液からの細胞への Ca<sup>2+</sup> の流入の活性化の機序に関しては、別な考え方をしなければならぬ。

##### 4-2 容量性 Ca<sup>2+</sup> 流入

我々は細胞内貯蔵部位の Ca<sup>2+</sup> の減少が Ca<sup>2+</sup> 流入を引き起こすのではないかと仮説、即ち、容量性 Ca<sup>2+</sup> 流入を提唱している<sup>1)</sup>。この仮説の直接的な発端を簡単に述べると以下のような実験から導かれる<sup>30)</sup>。即ち、細胞外液 Ca<sup>2+</sup> を除去した耳下腺細胞に MCh を与えると [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は急激に上昇するが、この Ca<sup>2+</sup> は細胞膜の Ca pump により細胞外へ汲み出され、上昇した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は薬物を加える前のレベルに回復する。続いてアトロピンを添加すると、MCh により上昇した IP<sub>3</sub> は急速に減少する<sup>31)</sup>。つまり、IP<sub>3</sub> が産生されず、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位が枯渇した条件が得られたことになる。ここで、細胞外液に Ca<sup>2+</sup> を添加すると、一過性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇、つまり、Ca<sup>2+</sup> の流入が認められ、この Ca<sup>2+</sup> 流入は細胞外液に加える Ca<sup>2+</sup> 濃度に比例する<sup>30)</sup>。これらことは、IP<sub>3</sub> が直接的に Ca<sup>2+</sup> 流入を活性化するのではなく、IP<sub>3</sub> 感受性細胞内貯蔵部位の Ca<sup>2+</sup> が減少すると Ca<sup>2+</sup> channel が開口するという容量性 Ca<sup>2+</sup> 流入の存在を強く示唆する。しかし、この実験では貯蔵部位の再充填過程に関連する Ca<sup>2+</sup> 流入を反映しているにすぎず、agonist が存在しているときにも容量性 Ca<sup>2+</sup> 流入の活性化が持続しているかどうか不明である。容量性 Ca<sup>2+</sup> 流入が存在するのであれば、IP<sub>3</sub> を介さずに細胞内貯蔵部位の Ca<sup>2+</sup> を減少させると、持続した Ca<sup>2+</sup> 流入が観察されることが推測される。そこで TG を投与すると、小胞体からリークした Ca<sup>2+</sup> が小胞体に再取り込みされず、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は徐々に上昇することが観察され

る。つまり、TGによる持続的な $\text{Ca}^{2+}$ の流入こそ容量性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入を反映するのである。

この流入経路に2通りが考えられる。つまり、流入経路と貯蔵部位とが直接結合していることと、流入経路は貯蔵部位へではなく細胞質へ通じていることである (Fig. 5)。以下の、幾つかの観察から、左側のモデルが示唆されるようである。すなわち、①右側のモデルによれば、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが活性化された時には、細胞膜、小胞体そして細胞質へと筒抜けになった状態である。従って、TG添加後にMChを添加すると細胞内プール内に残っている $\text{Ca}^{2+}$ の急速な減少が直接に $\text{Ca}^{2+}$  channelをさらに活性化するので、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入の割合は常に増加することができると考えられるが、持続レベルは変化しなかった<sup>6)</sup>。②細胞内貯蔵部位が $\text{Ca}^{2+}$ で再充填される時、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のovershootが見られた<sup>30)</sup>。③細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入及び細胞外への $\text{Ca}^{2+}$ 流出の両者が抑制された条件下では、細胞内への再充填は増加した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位によっても引き起された<sup>7)</sup>。④ $\text{Ca}^{2+}$ 動員薬物により、 $\text{Ba}^{2+}$ は $\text{Ca}^{2+}$  channelを介して流入したが、細胞内貯蔵部位へは再充填されなかった<sup>32)</sup>。しかし、 $\text{IP}_3$ 感受性貯蔵部位は、小胞体以外にも、形質膜のごく近傍、あるいは形質膜と結合して存在しているという組織化学的、及び生理学的報告<sup>33,34)</sup>があり、今後さらに詳細な研究が必要であると思われる。

## 5 おわりに

TGによる持続的な $\text{Ca}^{2+}$ 流入は本総説で述べた細胞以外に、種々の細胞で認められている<sup>10)</sup>。さらに、TG以外の小胞体Ca pump阻害薬である2,5-t-butylhydroquinone及びcyclopiazonic acidでも報告されている<sup>35-39)</sup>が、持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が認められない細胞もある<sup>40,41)</sup>。しかし、以上で述べたように、TGは細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位の検討や細胞外液からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入の検討に非常に好都合な薬物である。特に、細胞外液からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入の検討には、2,5-t-butylhydroquinoneやcyclopiazonic acidよりもTGが有益であるという報告<sup>42)</sup>もあり、分泌や筋収縮等純粋に $\text{Ca}^{2+}$ を介した細胞機能の解析にも好都合であると思われる。

本稿をまとめるにあたり有益な御助言をいただきました札幌医科大学医学部薬理学講座大鹿英世教授に深謝致します。

## 参考文献

1. 竹村晴夫, 大鹿英世. 非興奮性細胞におけるカルシウ

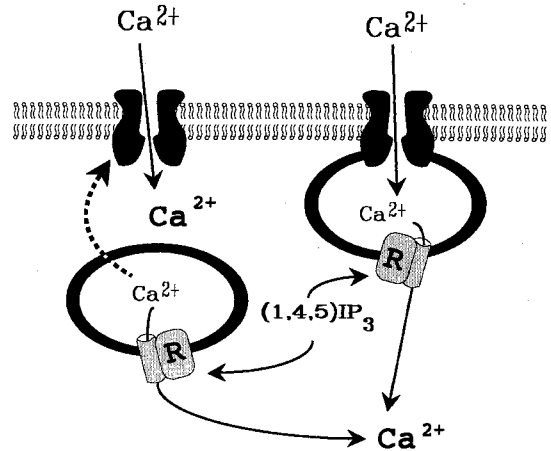


Fig. 5 Direct versus indirect routes of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. Left shows that the depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store activates a pathway for direct entry of  $\text{Ca}^{2+}$  to the cytosol. Right shows that  $\text{Ca}^{2+}$  entered the cell by directly entering the store and then entering the cytosol via the (1,4,5) $\text{IP}_3$ -activated channel.

ム流入の活性化機構. 日本薬理誌 1991, 97: 319-327.

2. Schulz I, Thevenod F, Dehlinger-Kremer M. Modulation of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by  $\text{IP}_3$ -sensitive and  $\text{IP}_3$ -insensitive nonmitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  pools. *Cell Calcium* 1989, 10: 325-336.
3. Meldolesi J, Madeddu L, Pozzan T. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage organelles in non-muscle cells: heterogeneity and functional assignment. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1055: 130-140.
4. Thastrup O. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in regulation of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, as studies with the selective microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions* 1990, 29: 8-15.
5. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 2466-2470.
6. Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 1989, 264: 12266-12271.
7. Kwan CY, Takemura H, Obie JF, Thastrup O, Putney JW Jr. Effects of methacholine, thapsigargin and  $\text{La}^{3+}$  on plasmalemmal and intracellular

- $\text{Ca}^{2+}$  transport in lacrimal acinar cells. *Am J Physiol* 1990, 258: C1006-C1015.
8. Bird GSTJ, Takemura H, Thastrup O, Putney JW Jr, Menniti FS. Mechanisms of activated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the rat pancreatoma cell line, AR4-2J. *Cell Calcium* 1992, 13: 49-58.
  9. Takemura H, Ohshika H, Yokosawa N, Oguma K, Thastrup O. The thapsigargin-sensitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool is more important in plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  entry than the  $\text{IP}_3$ -sensitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool in neuronal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 180: 1518-1526.
  10. Putney JW Jr, Bird GSTJ. The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev* 1993, 14: 610-631.
  11. Menniti FS, Bird GSTJ, Takemura H, Thastrup O, Potter BVL, Putney JW Jr. Mobilization of calcium by inositol polyphosphates from permeabilized rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 1991, 266: 13646-13653.
  12. Prentki M, Corkey BE, Matschinsky FM. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate and the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  cycle of a rat insulinoma cell line. *J Biol Chem* 1985, 260: 9185-9190.
  13. Leslie BA, Burgess GM, Putney JW Jr. Persistent inhibition by inositol 1, 4, 5-trisphosphate of oxalate-dependent  $^{45}\text{Ca}$  accumulation in permeable guinea-pig hepatocytes. *Cell Calcium* 1988, 9: 9-16.
  14. Satuderman KA, Harris GD, Lovenberg W. Characterization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-stimulated calcium release from rat cerebellar microsomal fractions. *Biochem J* 1988, 255: 677-683.
  15. Di Virgilio F, Steinberg TH, Silverstein SC. Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium* 1990, 11: 57-62.
  16. Glennon MC, Bird GSTJ, Takemura H, Thastrup O, Leslie BA, Putney JW Jr. *In situ* imaging of agonist-sensitive calcium pools in AR4-2J pancreatoma cells. *J Biol Chem* 1992, 267: 25568-25575.
  17. Steinberg SF, Bilezikian JP, Al-Awqati Q. Fura-2 fluorescence is localized to mitochondria in endothelial cells. *Am J Physiol* 1987, 253: C744-C747.
  18. Gunter TE, Restrepo D, Gunter KK. Concession of esterified fura-2 and indo-1 to  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive forms by mitochondria. *Am J Physiol* 1988, 255: C304-C310.
  19. Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC. Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* 1987, 105: 2695-2702.
  20. Miyata H, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG. Measurement of mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1991, 261: H1123-H1134.
  21. Martinez-Serrano A, Satrustegui J. Regulation of cytosolic free calcium concentration by intrasynaptic mitochondria. *Mol Biol Cell* 1992, 3: 235-248.
  22. Crompton M, Kessar P, Al-Nasser I. The  $\alpha$ -adrenergic-mediated activation of the cardiac mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter and its role in the control of intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo*. *Biochem J* 1983, 216: 333-342.
  23. Shears SB, Kirk CJ. Determination of mitochondrial calcium content in hepatocytes by a rapid cellular fractionation technique. *Biochem J* 1984, 220: 417-421.
  24. Denton RM, McCormack JG.  $\text{Ca}^{2+}$  transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am J Physiol* 1985, 249: E543-E554.
  25. Nicotera P, Orrenius S, Nilsson T, Berggren PO. An inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 6858-6862.
  26. Lanini L, Bachs O, Carafoli E. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992, 267: 11548-11552.
  27. Himpens B, De Smedt H, Droogmans G, Casteels R. Differences in regulation between nuclear and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992, 263: C95-C105.
  28. Morris AP, Gallacher DV, Irvine RF, Petersen OH. Synergism of inositol trisphosphate and tetrakisphosphate in activating  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels. *Nature* 1987, 330: 653-655.
  29. Changya L, Gallacher DV, Irvine RF, Potter BVL, Petersen OH. Inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate is essential for sustained activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  current in single internally perfused mouse lacrimal acinar cells. *J Membrane Biol* 1989, 109: 85-93.
  30. Takemura H, Putney JW Jr. Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem J*

- 1989, 258: 409-412.
31. Hughes AR, Takemura H, Putney JW Jr. Kinetics of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol cyclic 1:2,4,5-trisphosphate metabolism in intact rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 1988, 263: 10314-10319.
  32. Kwan CY, Putney JW Jr. Uptake and intracellular sequestration of divalent cations in resting and methacholine-stimulated mouse lacrimal acinar cells. *J Biol Chem* 1990, 265: 678-684.
  33. Foskett JK, Gunter-Smith PJ, Melvin JE, Turner RJ. Physiological localization of an agonist-sensitive pool of  $Ca^{2+}$  in parotid acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 167-171.
  34. Fujimoto T, Nakade, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* 1992, 119: 1507-1513.
  35. Llopis J, Chow SB, Kass GEN, Gahm A, Orrenius S. Comparison between the effects of the microsomal  $Ca^{2+}$ -translocase inhibitors thapsigargin and 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone on cellular calcium fluxes. *Biochem J* 1991, 277: 553-556.
  36. Llopis J, Kass GEN, Gahm A, Orrenius S. Evidence for two pathways of receptor-mediated  $Ca^{2+}$  entry in hepatocytes. *Biochem J* 1992, 284: 243-247.
  37. Demaurex N, Lew DP, Krause KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular  $Ca^{2+}$  stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1992, 267: 2318-2324.
  38. Robinson IM, Cheek TR, Burgoyne RD.  $Ca^{2+}$  influx induced by the  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitors 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem J* 1992, 288: 457-463.
  39. Sargeant P, Clarkson WD, Sage SO, Heemskerk JWM. Calcium influx evoked by  $Ca^{2+}$  store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome P-450 inhibitors than receptor-mediated calcium entry. *Cell Calcium* 1992, 13: 553-564.
  40. Jackson TR, Patterson SI, Thastrup O, Hanley MR. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J* 1988, 253: 81-86.
  41. Baro I, Eisner DA. The effects of thapsigargin on  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated rat mesenteric artery vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1992, 420: 115-117.
  42. Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, Casteels R. 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and cyclopiazonic acid decrease the  $Ca^{2+}$  permeability of endoplasmic reticulum. *Eur J Pharmacol* 1992, 227: 391-394.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学医学部薬理講座 竹村晴夫