

# 眼圧調整機構におけるイノシトール燐脂質代謝回転系の関与 —毛様体上皮細胞を中心として—

永田 淳士

広島大学医学部眼科学教室

## 要 約

イノシトール燐脂質代謝回転系を活性化する薬剤の眼圧に及ぼす影響について検討し、さらに、プロテインキナーゼC (PKC) とイノシトール 1,4,5-三燐酸 ( $IP_3$ ) の各種眼圧下降剤刺激による変動を培養毛様体上皮細胞で検討した。白色家兎眼に直接 PKC を活性化させるホルボルミリストートアセテート (PMA) ( $10 \mu M$ ) とカルシウムイオノフォアの一つである A 23187 ( $15 \mu M$ ) の単独点眼ではわずかな眼圧下降を認めた。しかし、同濃度の PMA と A 23187 を続けて点眼すると、著明な眼圧下降 (最大眼圧差 5.0 mmHg) が認められ、この著明な眼圧下降は PKC 阻害剤スタウロスポリン ( $0.5 \mu M$ ) の前処置により抑制された。毛様体上皮細胞での PKC 活性と  $IP_3$  量の変動を観察すると、カルバコール刺激では PKC 活性の上昇と  $IP_3$  量の一過性の上昇が認められた。イソプロテレノール、エピネフリン、チモロール刺激では、むしろ  $IP_3$  量の減少が認められた。これらの結果から、イノシトール回転系が眼圧調整機構に何らかの関与の可能性が示唆された。(日眼会誌 96: 865-871, 1992)

キーワード: イノシトール燐脂質代謝回転系, プロテインキナーゼC (PKC), イノシトール 1,4,5-三燐酸 ( $IP_3$ ), 毛様体上皮, 眼圧調整機構

---

## Possible Mechanisms of Inositol Phosphate-diacylglycerol Signalling Pathway in the Regulation of Intraocular Pressure

Atsuhito Nagata

*Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine*

### Abstract

To clarify the role of the inositol phosphate diacylglycerol (IP/DAG) signalling pathway in the regulation of intraocular pressure (IOP), the effect of tumor promoter phorbol ester (PMA) and Ca ionophore (A23187) on IOP responses was examined in albino rabbits. PMA stimulates protein kinase C (PKC) directly and A23187 elevates intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. In this study, the topical application of  $10 \mu M$  PMA or  $15 \mu M$  A23187 slightly reduced IOP. However topical application of both  $10 \mu M$  PMA and  $15 \mu M$  A 23187 significantly reduced IOP. The maximum IOP decrease was 5.0 mmHg. This decrease was inhibited by pretreatment with  $0.5 \mu M$  staurosporin, a PKC inhibitor. Quantitative changes of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) and PKC activity in cultured ciliary epithelia (CE), stimulated with several ocular hypotensive agents were also studied. When cultured CE was stimulated with  $50 \mu M$  carbachol, the PKC activity and  $IP_3$  content rapidly increased. When CE was stimulated

---

別刷請求先: 734 広島市南区霞 1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 永田 淳士  
(平成3年6月7日受付, 平成4年2月14日改訂受理)

Reprint requests to: Atsuhito Nagata, M.D. Department of Ophthalmology, Hiroshima University  
School of Medicine. 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan  
(Received June 7, 1991 and accepted in revised form February 14, 1992)

with 50  $\mu$ M epinephrine, isoproterenol or timolol, PKC activity did not show any change and IP<sub>3</sub> level declined. These studies suggest that the IP/DAG signalling pathway somehow mediates aqueous dynamic changes in ciliary epithelia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 865-871, 1992)

**Key words:** Inositol/diacylglycerol signalling pathway, Protein kinase C (PKC), Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), Ciliary epithelia, Regulation mechanism of intraocular pressure

## I 緒 言

生体内の恒常性を維持するための情報は、その多くが細胞表面に存在する受容体を介して伝達される。受容体まで到達した情報はcAMP系やイノシトール燐脂質(PI)代謝回転系などの細胞内情報伝達系を介して伝達され、細胞の生理機能が調節されると言われている<sup>1)</sup>。

1974年 Neufeld ら<sup>2)</sup>が初めて、cAMPが眼圧調整に関与していることを報告して以来、眼圧調節機構を毛様体上皮細胞の細胞内情報伝達系と関連づけて解明しようとする試みが、cAMP系を中心に行われてきた<sup>2)-4)</sup>。これまでにコレラトキシン<sup>3)</sup>、フォルスコリン<sup>4)</sup>、グリセオール酸<sup>5)</sup>が、毛様体上皮細胞内のcAMP濃度を上昇させcAMP依存性のプロテインキナーゼを活性化し、房水産生を抑制し眼圧下降を生じさせる可能性が示唆されている。

近年、家兎毛様体中にPI代謝回転系に関するカルシウム依存性のタンパク燐酸化酵素の存在が示され<sup>6)</sup>、この酵素が毛様体上皮細胞の細胞骨格の一部を構成しているビメンチンを燐酸化することが明らかにされている<sup>7)</sup>。また、プロテインキナーゼC(PKC)を活性化するホルボールエステルの硝子体注入で著明な眼圧下降の生じることが示され<sup>8)</sup>、PI代謝回転系の眼圧調整における役割が注目されている。

今回、毛様体上皮細胞におけるPI代謝回転系の眼圧調節機構に及ぼす役割を検討するため、PI代謝回転系に影響を与える種々の薬剤の眼圧動態に及ぼす影響を検討し、さらに、培養した毛様体上皮細胞を各種眼圧下降剤で刺激した時のPKC活性とイノシトール1,4,5-三燐酸(IP<sub>3</sub>)量の測定を行ったので報告する。

## II 方 法

### 1. 点眼実験

1) 使用薬剤: ホルボールミリステートアセテート(PMA), 4 $\alpha$ -ホルボールディデカネート(4 $\alpha$ -PDD), カルシウムイオノフォア A 23187 及びスタロスポリ

ンを燐酸緩衝液(pH 6.5)に溶解して使用した。PMAと4 $\alpha$ -PDDは100%ジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解して使用したため、最終濃度は0.5% DMSO溶液となった。

2) 使用動物: 体重2.5 kg前後の健常白色家兎の雄8匹を1組として5組、合計40匹を使用した。各点眼実験はその間隔を最低4週間あけて行った。

3) 点眼方法: 一眼に薬剤50  $\mu$ l点眼し、反対眼に薬剤溶解液50  $\mu$ lを点眼して対照とした。複数の薬剤を組み合わせて点眼する場合には、30分間の間隔をあけて点眼した。

4) 測定方法: 眼圧測定には0.4%塩酸オキシプロコイン点眼液で点眼麻酔後、Alcon Applanation Pneumatograph<sup>®</sup>を使用し、暗室にて、同一検者が同じ時間帯に測定した。尚、点眼実施者と眼圧測定者は別の人物とし、眼圧測定者には薬剤点眼側が判らないようにした。

### 2. 生物学的検討

1) 培養細胞: Mishima ら<sup>9)</sup>の方法に従い、家鶏胚11日の毛様体突起部から分離した無色素上皮と色素上皮細胞を牛胎児血清を10%含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で2~3週間初代培養し、コンフルエントの状態のものを使用した。

2) 使用薬剤: PMA, 4 $\alpha$ -PDD, カルバコール, イソプロテレンオール, エピネフリン, チモロールをDMEMに溶解して使用した。

3) PKC活性の測定: (1) サンプル抽出: 培養細胞浮遊液(10<sup>7</sup>cell/ml)に各薬剤を添加して、0, 5, 15, 30, 60分間、37°Cでインキュベートした後、反応液を交換し4°Cに急冷し反応を停止した。この細胞浮遊液を0.2容量の0.25 M スクロール溶液(25 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.0, 2 m MEGTA, 0.001%ロイペプチン, 50 mMメルカプトエタノールを含む)とともにホモジネート後、100,000 $\times$ gで60分間の超遠心操作を行った。この上澄みを緩衝液A(20 mM トリス塩酸 pH 7.0, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mMメルカプトエタノール)にて平衡化したDEAEセルロー

スカラムに吸着させた。次に、同溶液中の塩化ナトリウム濃度を0.2 Mにした溶液1 mlで溶出し、これを細胞質画分とした。一方、超遠心で得られた沈澱物は1% TritonX-100で30分間攪拌し可溶化させたのち、再び100,000×gで60分間の超遠心操作を行った。得られた上澄みを先の手技と同様にセルロースカラムでイオン交換して、膜画分とした。

(2) アッセイ方法：PKC活性の測定は、Amershamのアッセイキットを用いて行った。その原理はPKCにより特異的に燐酸化される合成蛋白（上皮細胞増殖因子の受容体の一部分で、8個のアミノ酸残基から成る）を基質として使用し、 $[^{32}\text{P}]$  ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , PMA, フォスファヂルセリンの存在下でサンプル中に含まれるPKCにより燐酸化された蛋白を結合用紙に吸着させ、その $[^{32}\text{P}]$ の放射能活性を計測し、サンプル中のPKC活性を定量するものである<sup>10)</sup>。

4)  $\text{IP}_3$ の定量：(1) サンプル抽出：培養細胞浮遊液( $5 \times 10^6$  cell/ml)に各種薬剤を添加して、0, 5, 15, 30, 60秒間、37°Cでインキュベートした後、0.2容量の氷冷20%過塩素酸を混合し、氷上に20分間放置した。2,000×gで15分間の遠心操作で得られた上澄みを10 NのKOHでpH 7.5に調整した。過塩素酸カリウムは2,000×g、15分間の遠心操作で沈澱除去した。

(2) アッセイ方法： $\text{IP}_3$ の定量はAmershamの $\text{IP}_3$ アッセイキットを用いて行った。その原理は牛副腎皮質ミクロソーム画分から抽出した $\text{IP}_3$ に特異的に結合する蛋白を用い、 $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ とサンプル中に含まれる $\text{IP}_3$ を競合的に結合させ、蛋白に結合した $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ の放射能活性を計測することによりサンプル中の $\text{IP}_3$ 量を定量するものである<sup>11)</sup>。

なお、得られた結果は平均値±標準誤差で表した。測定値はStudent's T testで統計的解析を行い、 $p < 0.01$ 以下を有意とした。

### III 結 果

#### 1. 点眼実験

5  $\mu\text{M}$ のPMA, 5  $\mu\text{M}$ のA 23187, 10  $\mu\text{M}$ の4  $\alpha$ -PDD, 及び0.5  $\mu\text{M}$ のスタウロスポリンの単独点眼ではほとんど眼圧は変動しなかった。10  $\mu\text{M}$ のPMAと15  $\mu\text{M}$ のA 23187の単独点眼では、その左右眼の最大眼圧差は、PMAでは $1.56 \pm 0.34$  mmHg, A 23187では $1.64 \pm 0.56$  mmHgと、わずかながら有意の眼圧下降が認められた(図1)。10  $\mu\text{M}$ のPMA点眼30分後に15  $\mu\text{M}$ のA 23187を点眼したところ、A 23187点眼後

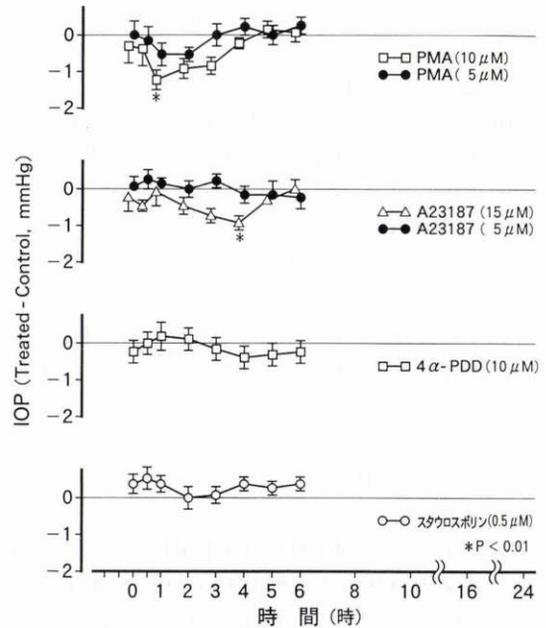


図1 PMA, 4  $\alpha$ -PDD, A 23187, スタウロスポリン単独点眼の家兎眼圧に及ぼす影響。各値は処置眼と対照眼の眼圧の差の平均値と標準誤差(N=8)を示した。

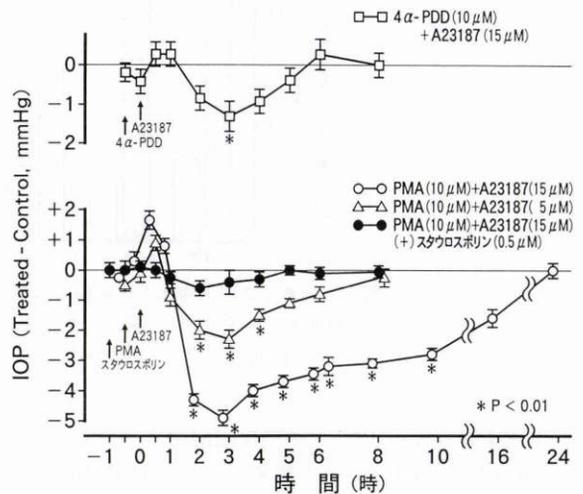


図2 PMA, 4  $\alpha$ -PDD, A 23187, スタウロスポリン組合せ点眼の家兎眼圧に及ぼす影響。各値は処置眼と対照眼の眼圧の差の平均値と標準誤差(N=8)を示した。

30分から1時間での一過性に眼圧上昇した後、16時間わたる有意の眼圧下降が認められ、左右眼の最大眼圧差は点眼後3時間の時点で $5.0 \pm 0.56$  mmHgで

あった。この有意の眼圧下降は、0.5  $\mu$ M スタロスポリンの 50  $\mu$ l を前もって点眼することにより抑制された。10  $\mu$ M の 4  $\alpha$ -PDD 点眼 30 分後に 15  $\mu$ M の A 23187 を点眼したところ、A 23187 点眼後 3 時間の時点で 1.87  $\pm$  0.44 mmHg とわずかに有意の眼圧下降が認められた (図 2)。

2. 生化学的検討

1) PKC 活性：培養毛様体上皮細胞の PKC 活性は、定常状態ではその約 25% が膜画分に存在し、約 75% が細胞質画分に存在した。200 nM の PMA 刺激後、細胞質画分の PKC 活性は急激に減少し、60 分後も減少したままであった。一方、膜画分の PKC 活性は PMA 刺激後急激に増加し、30 分後にピークに達した後、減少に転じ、60 分後には元のレベルに戻った (図 3)。各 50  $\mu$ M のエピネフリン、イソプロテレノール、チモロール、及び 200 nM の 4  $\alpha$ -PDD による刺激 30 分後に培養毛様体上皮細胞の PKC 活性を測定すると、細胞質画分と膜画分の PKC 活性は、対照と比べは

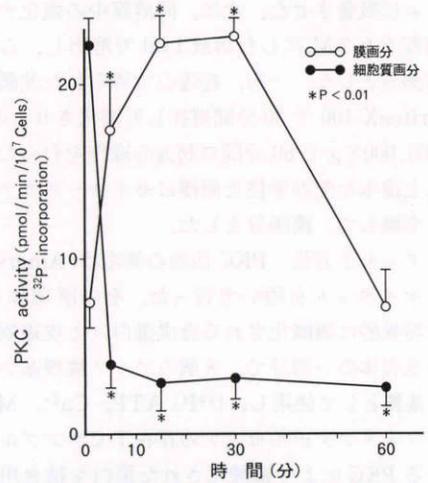


図 3 培養家鶏胚毛様体上皮細胞の PMA (200 nM) 刺激による PKC 活性の経時的変化。各値は duplicate で行った 3 回実験の平均値  $\pm$  標準誤差を示した。

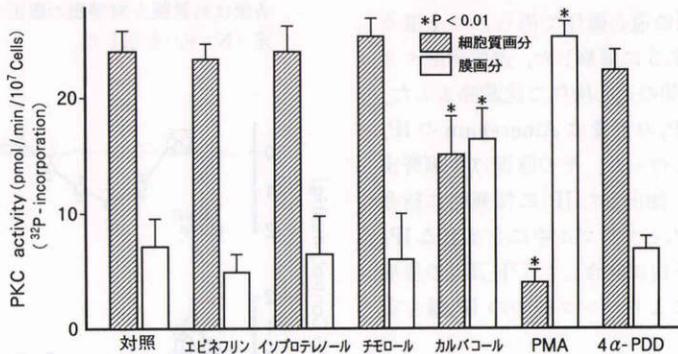


図 4 培養家鶏胚毛様体上皮細胞の各種眼圧下降剤 (50  $\mu$ M) とホルボールエステル (200 nM) 刺激による PKC 活性の変化。各値は duplicate で行った 3 回実験の平均値  $\pm$  標準誤差を示した。

ほとんど変化しなかった。一方、50  $\mu$ M のカルバコールと 200 nM の PMA による刺激においては膜画分の PKC 活性の有意の上昇と細胞質画分の PKC 活性の有意の低下が認められた (図 4)。なお、各種眼圧下降剤 5  $\mu$ M の刺激では PKC 活性に変化はなかった。

2) IP<sub>3</sub> の定量：図 5 に培養毛様体上皮細胞を各種眼圧下降剤 50  $\mu$ M で刺激にした時の IP<sub>3</sub> 量の経時的変化を示した。イソプロテレノール、チモロールによる刺激では、5 ~ 15 秒後に細胞内の IP<sub>3</sub> 量は、対照に比べ 25 ~ 35% の有意の減少が認められた。エピネフリンに

よる刺激でも、IP<sub>3</sub> 量の減少傾向がみられたが、有意差は認められなかった。その後 IP<sub>3</sub> 量は次第に回復し、60 秒後には対照レベルに戻った。一方、カルバコールによる刺激では、IP<sub>3</sub> 量は有意に増大し 5 ~ 15 秒後で約 2 倍となり、ピークに達したのち急速に減少し、30 ~ 60 秒で元のレベルに戻った。図 6 に、各種薬剤の刺激濃度を変化させたときの IP<sub>3</sub> 量の変動を示した。イソプロテレノールとチモロールによる刺激では、5  $\mu$ M 以下では IP<sub>3</sub> 量に変動はなかったが、50  $\mu$ M 以上では IP<sub>3</sub> 量の有意な減少が認められた。一方、カルバコール

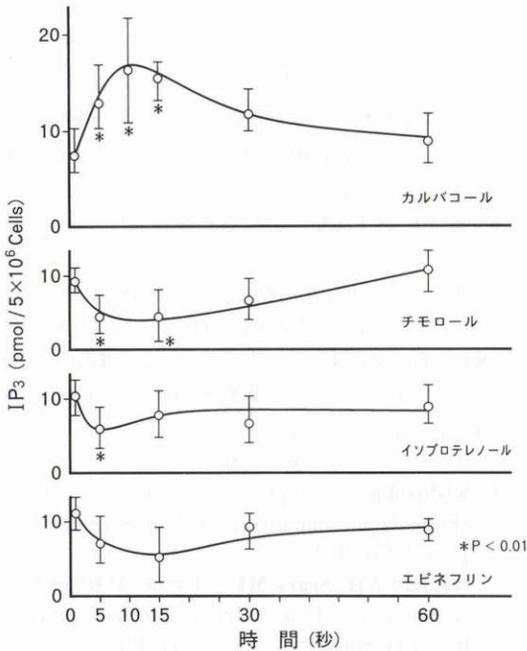


図 5 培養家鶏胚毛様体上皮細胞の各種眼圧下降剤 (50  $\mu$ M) 刺激による IP<sub>3</sub> 量の経時的変化。各値は duplicate で行った 3 回実験の平均値  $\pm$  標準誤差を示した。

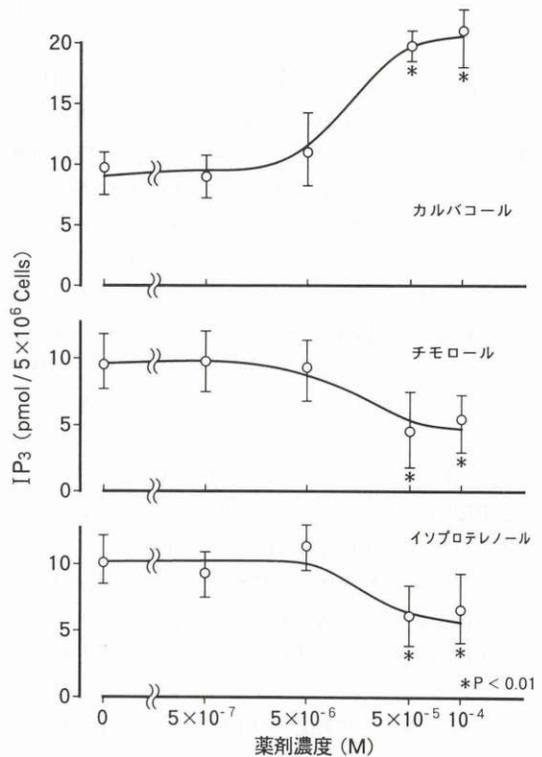


図 6 培養家鶏胚毛様体上皮細胞の各種眼圧下降剤の刺激濃度変化による IP<sub>3</sub> 量の変動。各値は duplicate で行った 3 回実験の平均値  $\pm$  標準誤差を示した。測定は薬剤刺激 15 秒後に行った。

による刺激では 50  $\mu$ M 以上で IP<sub>3</sub> 量は有意に増加した。

#### IV 考 按

今回、PKC を直接活性化させると PMA と、細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度を上昇させるカルシウムイオノフォア A 23187 との家兎眼への点眼実験を行った。それぞれの単独点眼ではわずかな眼圧下降があり、両者の組み合わせ点眼では著明な眼圧下降が認められた。さらに、この著明な眼圧下降は、PKC の阻害剤であるスタウロスピリンの前処置により抑制された。また、PMA の異性体で PKC 活性化作用のない 4  $\alpha$ -PDD の点眼では、A 23187 との組み合わせ点眼でも著明な眼圧下降は生じなかった。これらの薬剤の眼内移行については不明であるが、それぞれの組織移行性はよく微量で作用しうるため、点眼投与でも十分に眼内に移行しうるものと思われる。これらのことから、PMA と A 23187 の組合せ点眼により生じた眼圧下降は PKC の活性化と細胞内への Ca<sup>2+</sup> 動員により生じたものと考えられ、眼圧調節機構に、PI 代謝回転系の関与の可能性を強く示唆しているものと思われる。血小板では、PMA や

A 23187 の単独添加ではセロトニンの分泌反応はわずかだが、両者を同時に添加すると著明なセロトニンの分泌反応が起こる。この作用には、ジアシルグリセロール (DG) と Ca<sup>2+</sup> 動員とが共同的に働いていることが知られている<sup>12)</sup>。今回の実験で、著明な眼圧下降は PMA と A 23187 の組合せ点眼のみに生じたことから、PKC の活性と IP<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup> 動員の両方が、PI 代謝回転系による眼圧下降作用の発現にも必要ではないかと考えられる。

次に、眼圧調節に大きく関与していると思われる毛様体上皮細胞における PI 代謝回転系の動態について検討してみた。イノシトールの分解産物である DG により活性化される PKC は、不活性の状態では一般に細胞質内に存在し、PKC が活性化すると細胞膜に移行すると考えられている<sup>13)</sup>。一度細胞膜に移行した PKC は、さらに代謝され、酵素活性の低下が認められる<sup>13)</sup>。これらの現象は、白血球を初めとして種々の細胞や組織で、PKC に関して一般に認められ<sup>14)15)</sup>、PKC の細胞

質画分から膜画分へのトランスローケーションと、膜画分におけるダウンレギュレーションとして知られている<sup>13)</sup>。今回、培養した毛様体上皮細胞を使用し、PMAの刺激で、細胞質画分のPKC活性の低下と膜画分のPKC活性の一過性上昇、その後の膜画分のPKC活性の低下が認められた。これは、毛様体上皮細胞でのPKCのトランスローケーションとダウンレギュレーションが、他の細胞や組織での報告と同様に認められたことを示したものと思われる。このことから、毛様体上皮細胞にはPKCが確かに存在しており、PI代謝回転系は毛様体上皮細胞でも他の細胞や組織と同様のメカニズムで機能しているのではないかと考えられた。

今回、カルバコールによる刺激で、IP<sub>3</sub>量の一過性上昇とPKC活性の上昇が認められ、コリン作動薬が毛様体上皮細胞のPI代謝回転系を活性化することが明らかとなった。毛様体上皮細胞では、すでにムスカリン受容体の存在が報告されている<sup>16)</sup>。ムスカリン受容体はPI代謝回転系と共役していることが明らかとなっている<sup>17)</sup>。カルバコールはこのムスカリン受容体を介して毛様体上皮細胞のPI代謝回転系を活性化したものと考えられた。

一方、エビネフリンとプロテレノールによる刺激や、チモロールによる刺激ではPKC活性の上昇もIP<sub>2</sub>量の増加も認められず、これらの薬剤ではPI代謝回転系は活性化されなかった。イソプロテレノール50 μM以上の刺激では、PKC活性に変動は認められなかったが、IP<sub>3</sub>の一過性減少が認められた。多くの細胞や組織でcAMP系とPI代謝回転系が、ある場合には共同的に、またある場合には拮抗的に作用し合うことが知られており<sup>12)18)</sup>、cAMP系刺激でPI代謝回転系が抑制されることが示されることも報告されている<sup>18)19)</sup>。毛様体上皮細胞でもこの様なcAMP系によるPI代謝回転系の抑制機構が存在しているのかも知れない。

今回はまた、β-遮断剤のチモロールが50 μM以上の濃度でIP<sub>3</sub>量の一過性減少が認められた。近年、cAMP系を抑制するβ-遮断剤のチモロールが、虹彩においてIP<sub>3</sub>の産生を抑制するとの報告<sup>19)</sup>や、β-遮断剤のプロプラノロールがフォスフォヒパーゼDを抑制し、DG産生を抑制するとの報告<sup>20)</sup>がある。チモロールをはじめとするβ-遮断剤の毛様体上皮での房水産生抑制機序は今もって不明の点が多い。β-遮断剤のこのようなPI代謝回転系の抑制作用が房水産生抑制機序に関係しているのかもしれない。

今回の結果から、現在眼圧下降剤として広く使用されているエビネフリンやチモロールが、毛様体上皮細胞のPI代謝回転系を直接活性化する可能性は大きくないように思われた。しかし、今回の点眼実験の結果から明らかのように、PI代謝回転系が、眼圧調節機構に関与している可能性は大きいと思われる。今後PI代謝回転系の眼圧調整における役割は大いに注目されよう。

本研究は文部省科学研究費一般研究C 02672788の支援を受けた。記して謝意を表す。稿を終えるに当たり、調枝寛治教授の御校閲に深謝します。また、ご指導頂いた三嶋弘助教授、ご助言いただいた薬効解析科学教室岡村直樹助手に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Nishizuka Y: Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225: 1365-1370, 1984.
- 2) Neufeld AH, Sears ML: Cyclic AMP in the ocular tissues of the rabbit, monkey and human. *Invest Ophthalmol* 13: 475-477, 1974.
- 3) Gregory D, Sears ML, Baudsher L, et al: Intraocular pressure and aqueous flow are decreased by cholera toxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 371-381, 1981.
- 4) 三嶋 弘, 柴田哲夫, 木内良明, 他: Forskolin 点眼による緑内障治療の可能性. *眼紀* 39: 2113-2120, 1988.
- 5) Mishima HK, Kiuchi Y, Yokoyama Y: A cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, 8'-pivaloyloxymethyl ester (POM-ester) of griseolic acid lowers rabbit intraocular pressure. *Curr Eye Res* 10: 817-822, 1991.
- 6) Yoshimura N, Mittag TW, Podos SM: Calcium-dependent phosphorylation of proteins in rabbit ciliary processes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 723-730, 1989.
- 7) Lopez-Brioes L, Wax M, Coca-Prados M: Regulation of protein phosphorylation in ocular ciliary epithelial cells by A, C and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinases. *Exp Eye Res* 51: 277-286, 1990.
- 8) Mittag TW, Yoshimura N, Podos SM: Phorbol Ester: Effect on intraocular pressure, adenylate cyclase, and protein kinase in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 2057-2066, 1987.
- 9) Mishima H, Ono H, Sakuma O, et al: The Ciliary Epithelia in Culture. *Acta XXV Concilium Ophthalmol, Milano, Kugler & Ghedini*, 675-678, 1986.

- 10) **Hannun Y, Loomis C, Bell R**: Activation of protein kinase C by triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine. *J Bio Chem* 260: 10039—10043, 1985.
- 11) **Palmer S, Hughes KT, Lee DY**, et al: Development of a novel,  $\text{ins (1,4,5) P}_3$ -specific binding assay. Its use to determine the intracellular concentration of  $\text{ins (1,4,5) P}_3$  in unstimulated and vasopressin-stimulated rat hepatocytes. *Cellular Signalling* 1: 147—156, 1989.
- 12) **Nishizuka Y**: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature (London)* 308: 693—698, 1984.
- 13) **Darbon J, Issandou M, Delassus F**, et al: Phorbol esters induce both intracellular translocation and down-regulation of protein kinase C in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 137: 1159—1166, 1986.
- 14) **Chen Z, Coggeshall K, Cambier J**: Translocation of protein kinase C during membrane immunoglobulin-mediated transmembrane signaling in B lymphocytes. *J Immunol* 136: 2300—2304, 1986.
- 15) **Neary J, Norenberg L, Norenberg M**: Protein kinase C in primary astrocyte cultures: Cytoplasmic localization and translocation by a phorbol ester. *J Neurochem* 50: 1179—1184, 1988.
- 16) **Wax MB, Coca-Prados M**: Receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in human ocular ciliary epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1675—1679, 1989.
- 17) **Aktar RA, Abdel-latif AA**: Carbachol causes rapid phosphodiesteric cleavage of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and accumulation of inositol phosphates in rabbit iris smooth muscle; prazosin inhibits noradrenaline and ionophore A23187 stimulated accumulation of inositol phosphates. *J Biochem* 93: 291—300, 1984.
- 18) **Kawahara Y, Takai Y, Minakuchi R**, et al: Phospholipid turnover as a possible transmembrane signal for protein phosphorylation during human platelet activation by thrombin. *Biochem Biophys Res Comm* 97: 309—317, 1980.
- 19) **Tachado SD, Akhtar RA, Abdef-Latif AA**: Activation of beta-adrenergic receptors causes stimulation of cyclic AMP, inhibition of inositol triphosphate, and relaxation of bovine iris sphincter smooth muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2232—2239, 1989.
- 20) **Billah M, Eckel S, Mullmann T**, et al: Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatide and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *J Biol Chem* 264: 17069—17077, 1989.