

細胞外アデノシン三リン酸により惹起される細胞内情報伝達系を介した ウサギ脈絡上板の細胞内カルシウム濃度上昇

申 英蘭, 平井 恵二

東京医科歯科大学難治疾患研究所神経疾患研究部門自律生理

要 約

有色家兎の眼球脈絡上板摘出標本に fura-2 の蛍光顕微測光法を適用して細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定した。アデノシン三リン酸 (ATP) 1~100 μ M を灌流投与すると、脈絡上板の $[Ca^{2+}]_i$ が著明に上昇した。この作用は Ca^{2+} を添加しない Krebs 液あるいはマグネシウムイオンを過剰に添加した Krebs 液の灌流により抑制された。ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇効果は温度依存性を示し、compound 48/80 でフォスホリパーゼ C 活性を抑制すると減弱された。以上の結果から、ATP の作用発現には細胞外 Ca^{2+} が必要であると同時に、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を引き起こす細胞内情報

伝達系が関与する可能性があることがわかった。ATP 関連プリン誘導体の作用強度は $ATP \geq ATP-\gamma-S >$ アデノシン二リン酸 (ADP) でアデノシン一リン酸 (AMP) とアデノシンは無効であった。以上の結果から、脈絡上板には ATP の P_2 -受容体を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる機構が存在し、何らかの生理学的機能を有すると結論された。(日眼会誌 98:69-74, 1994)

キーワード: 脈絡上板, アデノシン三リン酸, 細胞内カルシウムイオン濃度, 細胞内情報伝達系, Fura-2

Extracellular Adenosine-5'-triphosphate Increases Intracellular Calcium Concentration of the Rabbit Eye Suprachoroid via Activation of the Intracellular Signal Transduction.

Ying-Lan Shen and Keiji Hirai

Department of Autonomic Physiology, Medical Research Institute,
Tokyo Medical and Dental University

Abstract

Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of the rabbit eye suprachoroid was measured with microfluorophotometry using fura-2. Adenosine-5'-triphosphate (ATP) 1~100 μ M, added to a perfusing solution, elicited an increase in $[Ca^{2+}]_i$ of the suprachoroid. This action of ATP was inhibited when preparations were perfused with a nominally zero Ca^{2+} Krebs solution or a high magnesium Krebs solution. The $[Ca^{2+}]_i$ -increasing action of ATP was attenuated either by lowering temperature or by a phospholipase C inhibitor, compound 48/80. These results indicate that extracellular Ca^{2+} is necessary to the ATP action and also suggest that the ATP action may be mediated by the intracellular signal transduction which exerts a Ca^{2+} -release from

intracellular Ca^{2+} -store sites. The potency order of ATP-related purine nucleotides was $ATP \geq ATP-\gamma-S >$ adenosine-5'-diphosphate (ADP). Adenosine-5'-monophosphate (AMP) and adenosine were not effective. It is concluded that P_2 -purinoceptors exist on the surface of the suprachoroid and are involved in mechanisms underlying the ATP-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ of the suprachoroid. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:69-74, 1994)

Key words: Suprachoroid, Adenosine-5'-triphosphate, Fura-2, Intracellular calcium concentration, Intracellular signal transduction

別刷請求先: 101 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10 東京医科歯科大学難治疾患研究所自律生理 平井 恵二
(平成5年3月31日受付, 平成5年7月30日改訂受理)

Reprint requests to: Keiji Hirai, Ph.D. Department of Autonomic Physiology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101, Japan.

(Received March 31, 1993 and accepted in revised form July 30, 1993)

I 緒 言

アデノシン三リン酸 (ATP) は細胞のエネルギー供給源であるだけでなく、神経終末から他の伝達物質とともに放出され、特定の受容体と結合して応答を引き起こす神経伝達物質でもある。現在、ATP 受容体は少なくとも P_{2X} , P_{2Y} , P_{2Z} , P_{2T} の4つに分類されており¹⁾²⁾、その作用様式も、カリウムイオンチャネルを閉じて膜を脱分極させる³⁾、カルシウムイオン (Ca^{2+}) チャネルを開いて Ca^{2+} を流入させる⁴⁾⁵⁾、細胞内情報伝達系を介して細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} を遊離させる^{6)~8)} など様々なものが報告されている。我々⁹⁾ は、細胞外投与した ATP がウサギ脈絡上板 (suprachoroid) の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させることを発見し報告した。今回は、その作用の細胞内機序について新たな知見を得たので報告する。

II 実験方法

実験には雄のダッチ種家兎 (体重 1.5~2.5 kg) を使用した。ペントバルビタールナトリウム麻酔下 (25 mg/kg i.v.)、空気約 20 ml を耳静脈内に急速注入し、心停止確認後眼球を摘出、赤道部にて半割し、95% O_2 , 5% CO_2 飽和 Krebs 液に浸漬した。後極部から 5×5 mm の眼球壁を切り出し、実体顕微鏡下に網膜、脈絡膜の毛細血管板および大血管層を剝離し、単層の脈絡膜上板小片 (2~3 mm 四方) を摘出して標本灌流槽の軟性レジン床に直径 20 μ m のピンで伸展固定した。Krebs 液 100 ml に fura-2/AM (1 mM DMSO 溶液 0.1 ml) を超音波懸濁し、40 分間標本を灌流して fura-2 染色した。標本面で直径約 50 μ m (メラニン細胞一個強) の範囲に波長 340, 360, 380 nm の紫外光を照射し、光電子増倍管で測定した fura-2 蛍光の強度をそれぞれ F 340, F 360, F 380 と表した。一般に fura-2 の実験では F 340/F 380 を用い Ca^{2+} 緩衝液中で作成した較正曲線から $[Ca^{2+}]_i$ を算出するが¹⁰⁾、細胞内環境は Ca^{2+} 緩衝液中と異なること、実験毎に正確な背景蛍光を差引くことが困難などの理由から、最近では $[Ca^{2+}]_i$ の絶対値を求めず、単波長測光による $[Ca^{2+}]_i$ の相対的変動のみを観測することが多い。本実験では光学系の透過率が最も高く細胞毒性が最も弱い 380 nm の紫外光を主に使用し、F 380 を $[Ca^{2+}]_i$ の相対的変動の指標とした。薬物適用前後や応答のピーク時など必要に応じて F 340, F 360 を記録、F 380 との比から $[Ca^{2+}]_i$ を算出し、あるいは F 360 によって細胞内 fura-2 濃度変化を監視した。薬物作用を検定あるいは作用強度を比較する場合は常に ATP 10 μ M の効果を基準とした。すなわち、ATP 10 μ M, 1 分間灌流を一定間隔 (7~10 分毎) で繰り返し、途中で目的の薬物を溶解した灌流液に切り換え、あるいは比較する薬物を ATP の代わりに灌流した。実験方法の詳細は文献⁹⁾¹¹⁾ を参照されたい。使用した薬物

は 2-methylthio ATP (Research Biochem 社), compound 48/80 (Biomol 社), fura-2/AM (同仁化学) 以外はすべて Sigma 社製である。

III 結 果

1. 脈絡上板の $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす ATP の作用

脈絡上板の $[Ca^{2+}]_i$ は、Krebs 液灌流下で 137 ± 36 nM (平均値 \pm 標準誤差) であった (72 例)。ATP 10 μ M 灌流時の fura-2 蛍光強度変化の典型例を図 1 に示す。ATP 灌流により F 340 は上方に、F 380 は下方に変移し、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。F 360 が ATP 灌流中に変化しないことは、細胞内 fura-2 濃度や有効紫外線強度の変化、薬物蛍光などではないことを示している。

ATP (1~100 μ M) を灌流すると F 380 は急速に減弱し、ATP 灌流中に一度わずかに戻りかける場合もあったが通常はほぼ一定値を保ち、ATP 灌流停止後速やかに回復した (図 2)。ATP の作用は用量依存性で 1 μ M から発現し、10 μ M で概ね最大になった。この時 $[Ca^{2+}]_i$ は 514 ± 67 nM (平均値 \pm 標準偏差) であった (54 例)。10 μ M 以上の濃度の ATP を適用しても反応の最大値は変わらなかったが、立ち上がり急峻になり、回復が遅くなった。

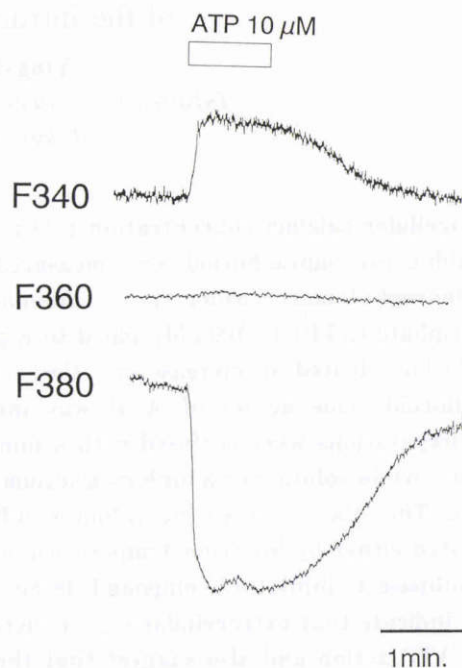


図1 Fura-2 蛍光に及ぼす ATP の効果の典型例。各トレースは、ATP 10 μ M を同一細胞に 3 回繰り返し灌流投与し、順次記録した fura-2 蛍光強度 F 340, F 360, F 380 の変化を示す。上のバーで示した期間 (1 分間)、ATP 10 μ M を灌流投与した。F 340 が上方に、F 380 が下方に変移することは $[Ca^{2+}]_i$ が上昇したことを示すと同時に、F 360 に変化が認められないことから自家蛍光や薬物蛍光などのアーチファクトの可能性が除外される。

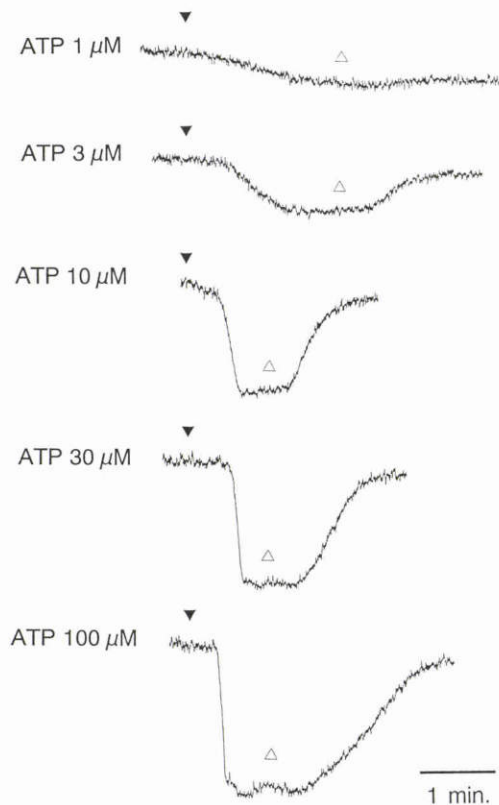


図 2 脈絡上板の $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす ATP の作用の濃度依存性。

各トレースは、同一細胞から順次記録した fura-2 蛍光強度 F 380 を示す。黒三角から白三角の間で各トレース左に示した濃度の ATP を灌流投与した。F 380 の下方および上方変移はそれぞれ $[Ca^{2+}]_i$ の増加と減少を示す。なお、それぞれの記録の前後に F 340 と F 360 を記録し、細胞内 fura-2 濃度および $[Ca^{2+}]_i$ が極端に変化していないことを確認した。

2. P_2 -受容体作働薬の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用および ATP 作用に対する P_2 -受容体遮断薬の効果

プリン系 ATP 関連化合物のうち、アデノシンとアデノシン一リン酸 (AMP) は $100 \mu M$ で無効であったが (各 5 例)、アデノシン二リン酸 (ADP) $100 \mu M$ は ATP $10 \mu M$ と同等かやや弱い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を示した (図 3, 7 例)。グアノシン三リン酸 (GTP) $30 \mu M$ は作用しなかった (5 例)。ATP- γ -S $10 \mu M$ の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は ATP とほぼ同等であったが、その作用発現および回復は遅かった (図 3, 6 例)。

P_{2X} -受容体作働薬の β , γ -methylene ATP⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ および P_{2Y} -受容体選択性の 2-methylthio ATP⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ は $100 \mu M$ で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を示さなかった (各 4 例)。 P_{2Y} -受容体遮断剤 brilliant blue G⁽¹³⁾ $100 \mu M$ は ATP $10 \mu M$ の作用に全く影響しなかった (4 例)。 P_{2Y} -受容体遮断薬とされている reactive blue 2⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ (cibacron blue 3 GA) は $1 \mu M$ 以上の濃度で、それ自体が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を示したため (5 例)、ATP 拮抗作用は検討できなかった。

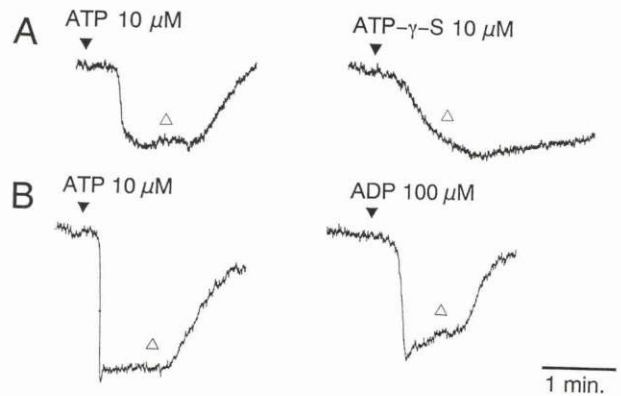


図 3 ATP 関連物質の作用強度比較。

各トレースは、同一細胞から順次記録した fura-2 蛍光強度 F 380 を示す。黒三角から白三角の間で薬物を適用した。A: ATP $10 \mu M$ および ATP- γ -S $10 \mu M$ を順次灌流投与し、その作用を比較した。B: ADP $100 \mu M$ の効果を ATP $10 \mu M$ と比べた。F 380 の下方および上方変移はそれぞれ $[Ca^{2+}]_i$ の増加と減少を示す。なお、それぞれの記録の前後に F 340 と F 380 を記録し、細胞内 fura-2 濃度および $[Ca^{2+}]_i$ が極端に変化していないことを確認した。

3. 細胞外 ATP によって増加した細胞内 Ca^{2+} の供給源について

Ca^{2+} を添加しない Krebs 液中では ATP 作用が発現しなかったが、正常 Ca^{2+} 濃度 (2.5 mM) にすると速やかに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇効果が発現し、再び Ca^{2+} を除去すると ATP 作用は速やかに消失した (図 4 A, 5 例)。ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は高濃度 Mg^{2+} (7.2 mM) で可逆的に抑制された (図 4 B, 4 例)。

細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を抑制する TMB-8⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾、または ryanodine⁽¹⁷⁾ $10 \mu M$ を含む Krebs 液を 15 分以上灌流しても、ATP $10 \mu M$ の効果は影響されなかった (各 3 例)。

各種 Ca^{2+} -チャネル遮断薬 (nicardipin および diltiazem $10 \mu M$, ω -conotoxin $0.33 \mu M$) および Ca^{2+} -チャネル作働薬である BAY-K 8644 $3 \mu M$ を含む Krebs 液灌流下に ATP $10 \mu M$ を適用しても、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は ATP 単独の時と変わらなかった (各 4 例)。

4. 脈絡上板における ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用における細胞内情報伝達系の関与

灌流液温を $37^\circ C$ から $24^\circ C$ に下げると fura-2 蛍光が強くなり、ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用が見かけ上増強された (図 5, 4 例)。これは fura-2 自体の温度特性によるもので、2 波長比から求めた $[Ca^{2+}]_i$ は $37^\circ C$ の場合と大差なかった。しかし、最大作用発現時間が約 3 倍に延長した。

フォスファチジルイノシトール (PI) 代謝系の初期段階酵素、フォスホリパーゼ C (PLC) の阻害剤、compound 48/80⁽¹⁸⁾ $159 \mu M$ はそれ自体が $[Ca^{2+}]_i$ を緩徐に上昇させたが、薬物を洗浄除去し、作用が回復した後も ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を強く抑制した。Compound

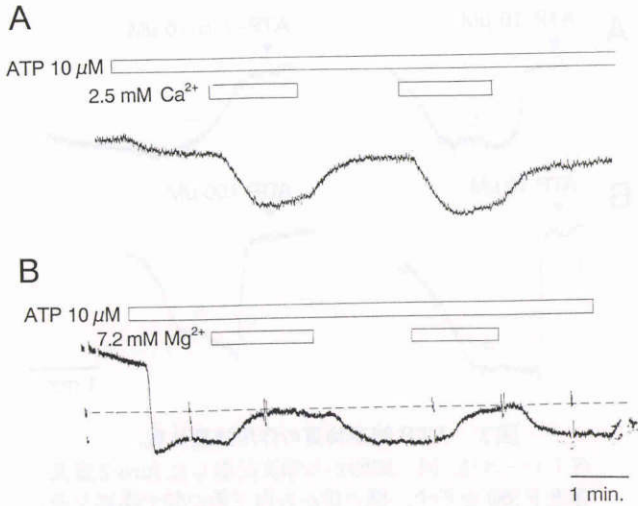


図4 ATPの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用に対する細胞外液中 Ca^{2+} および Mg^{2+} の効果。

2つの細胞から記録した fura-2 蛍光 F 380 の変化を示す。A: Ca^{2+} を添加しない Krebs 液中 (Mg^{2+} は正常濃度のまま) で ATP $10 \mu M$ を持続投与した(上のバー)。下のバーで示す期間, ATP 存在下に外液 Ca^{2+} 濃度を正常 (2.5 mM) に戻した。B: 正常濃度の Ca^{2+} (2.5 mM) および Mg^{2+} (1.2 mM) 存在下に ATP $10 \mu M$ を持続灌流し(上のバー), 下のバーで示す期間で Mg^{2+} を 7.2 mM に増加した, F 380 の下方および上方変移はそれぞれ $[Ca^{2+}]_i$ の増加と減少を示す。図中の破線は, 実験前後に記録した F 360 を結んだもので, 細胞内 fura-2 の退色率を示す。なお, 記録の途中で F 340 と F 360 を記録し, 細胞内 fura-2 濃度が極端に変化していないことを確認した。

48/80 の抑制作用の完全回復には約 20 分を要した (図 6, 4 例)。

IV 考 按

1. 脈絡上板における細胞外 ATP の作用に関与する受容体の種類について

脈絡上板における ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は, ATP 関連プリン誘導体の作用強度順位から, 燐酸の酵素的加水分解や P_1 -受容体を介するものではなく, ATP を主な作働薬とする P_2 -受容体¹⁾²⁾¹²⁾¹⁴⁾を介するものと思われる。しかし, 本実験で試みた受容体作働薬, 遮断薬の範囲では P_2 -受容体サブタイプを明確にできなかった。 P_{2Y} -受容体は PI 代謝系を活性化する¹⁾⁷⁾⁸⁾ことが知られている。脈絡上板では P_{2Y} -受容体遮断薬の reactive blue 2 は, それ自身が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を発現した。この薬物は glutamate-受容体遮断作用を併せ持つなど, あまり特異的な P_{2Y} -受容体遮断薬ではない¹⁴⁾が, 弱い受容体活性化作用を持つ partial-agonist ならば, 脈絡上板における ATP の作用に P_{2Y} -受容体に関与する可能性もある。しかし, P_{2Y} -受容体作働薬, 2-methylthio ATP が不活性であることから, これまでに知られていないサブタイプの

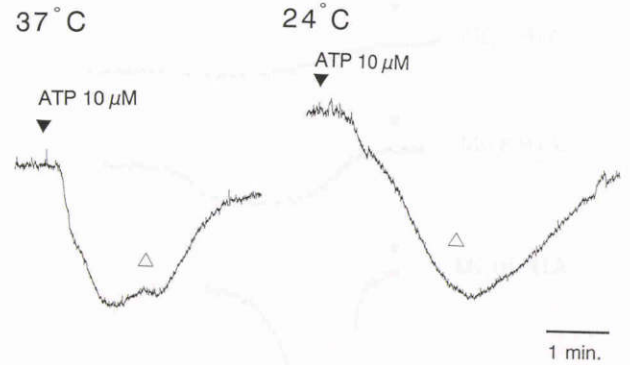


図5 脈絡上板における ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用の温度依存性。

異なる温度で記録した同一細胞の fura-2 蛍光 F 360 の変化を示す。黒三角から白三角の部分で ATP $10 \mu M$ を灌流投与した。左のトレースは灌流液温 $37^\circ C$ で, 右のトレースは $24^\circ C$ で記録した。蛍光色素はそれ自身が温度依存性を持つため低温では蛍光強度が増大するが, 蛍光強度比などの基本的特性はあまり影響されない。 $37^\circ C \sim 24^\circ C$ 程度の変化では $[Ca^{2+}]_i$ はほとんど変らなかった。低温では ATP の作用が見かけ上増強されているが, 蛍光強度比から算出した $[Ca^{2+}]_i$ の最大値は $37^\circ C$ のときと大差ない。

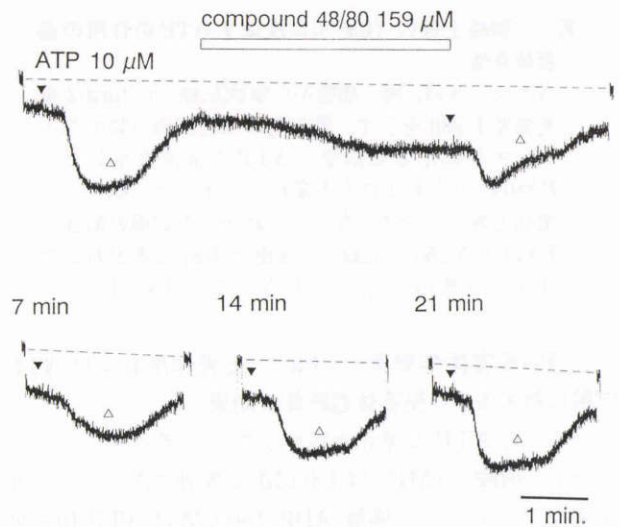


図6 ATPの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用に対するフォスホオリパーゼC抑制剤 compound 48/80 の効果。

単一細胞における fura-2 蛍光 F 380 の変化を示す。黒三角から白三角の部分で ATP $10 \mu M$ を灌流投与した。上のバーで示した期間(4分間) compound 48/80 $159 \mu M$ を灌流投与した。下の各トレースは, compound 48/80 投与中止後, 7, 14, 21 分経過の ATP の作用を示す。図中の破線は, 実験前後に記録した F 360 を結んだもので, 細胞内 fura-2 の退色率を示す。F 380 の下方および上方への変移はそれぞれ $[Ca^{2+}]_i$ の増加と減少を示す。

受容体に関与している可能性も残されている。

2. 細胞外 ATP によって増加する細胞内 Ca^{2+} の供給源について

脈絡上板における ATP の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は, 外液中

の Ca^{2+} を除去したり, Ca^{2+} に拮抗する作用を持つ Mg^{2+} の濃度を高くすると強く, 可逆的に抑制された。また, 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官からの Ca^{2+} 遊離を抑制する ryanodine や TMB-8 は ATP の作用に影響しなかった。これらの結果は, ATP の刺激により細胞外から Ca^{2+} が流入した可能性を示している。

3. 脈絡上板における細胞外 ATP の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用の細胞内機序について

脈絡上板における ATP の作用は灌流液温を下げると緩徐になったことから, 何らかの代謝的過程の関与が考えられる。また, ATP の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用は, PLC 阻害剤である compound 48/80¹⁸⁾ で抑制された。PLC は細胞膜磷脂質からイノシトール 1, 4, 5-三磷酸 (IP_3) を産生する酵素で PI 代謝系の初段にあたり, ATP が細胞内 IP_3 を介して細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官から Ca^{2+} を遊離させた可能性を示している。Calciosome と呼ばれる細胞内 Ca^{2+} 貯蔵・放出器官¹⁹⁾²⁰⁾ は, ryanodine や TMB-8 など骨格筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を抑制する薬物では影響されず, IP_3 によって Ca^{2+} 遊離を起こし, 細胞外液から直接に Ca^{2+} を補充するとされている。したがって, ATP の作用が外液中 Ca^{2+} 濃度に強く影響されることだけから細胞外からの流入と結論することは出来ず, ATP が細胞内小器官からの Ca^{2+} 遊離を引き起こした可能性も残される。本研究では IP_3 の関与について直接的検証は行っていないが, 人眼で脈絡膜中に高濃度の IP_3 -受容体が見出されていること²¹⁾ も, この可能性を支持すると考えられる。

4. 他の標本における細胞外 ATP の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用について

細胞外 ATP の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用は極めて多種類の細胞で報告されていて, その作用機序や受容体分類も様々で統一されていない。ATP-受容体は現在のところ, P_{2X} , P_{2Y} , P_{2Z} , P_{2T} に分類するのが一般的である¹⁾²⁾¹²⁾。 P_{2X} -受容体には ATP より α , β -methylene ATP または β , γ -methylene ATP が効力が強く, P_{2Y} -受容体は逆であるが reactive blue 2 で抑制される。 P_{2Z} は brilliant blue G で抑制され, P_{2T} には ADP のみが有効といわれている。 P_{2Y} -受容体は Ca^{2+} チャネルと連動して Ca^{2+} 流入を引き起こす場合と, GTP 結合蛋白-PI 代謝系を介した細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出を起こす場合が報告されている¹⁾¹²⁾。一方, ラット褐色細胞腫由来 PC 12 細胞でこれらの受容体分類法に当てはまらない細胞外 ATP の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用が報告されており²²⁾, これは細胞内 IP_3 濃度上昇を伴うだけでなく, 細胞外 Ca^{2+} の存在を必要とする点でも脈絡上板における ATP の作用と良く一致する。

5. 脈絡上板における ATP の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用の生理的意義について

脈絡上板の生理学的機能, 存在理由は未だ不明である

が, P_2 -受容体を介する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節機構を備えることは何らかの生理的役割を持つことを示す。ウサギ脈絡上板は, 大小多数の穴が開いた 5~6 層の膜から構成され, 隣接する層が開口部で互いに連絡しあった「多層一面構造」と表現される特異的形態を成し, 一体でありながら大きな表面積を持つという特徴がある。脈絡膜の主な構成要素であるメラニン細胞は互いにギャップ結合を持ち, 脈絡上板が全体として機能していると考えられている²³⁾。こうした形態的, 機能的特徴は, 周囲組織液との物質交換に有利と考えられ, 脈絡上板が脈絡膜循環における房水の組成調節などに関与している可能性を示唆する。脈絡上板中には交感神経終末が存在し⁹⁾, 伝達物質とともに ATP が放出されて脈絡上板の機能を神経性に調節している可能性が高い。また, 一般的に細胞は高濃度 ATP を含有することから, 眼組織が傷害された場合など, 傷害細胞由来の ATP が脈絡上板機能を活性化し, 組織を防御する機能を持つなども考えられる。

本研究は文部省科学研究費補助金 (一般研究 B) 03454413 の援助により実施した。

文 献

- 1) 井上和秀, 中沢憲一: ATP 受容体と神経伝達物質放出. 生化学 64: 172-177, 1992.
- 2) Gordon JL: Extracellular ATP: Effects, sources and fate. Biochem J 233: 309-319, 1986.
- 3) Harms L, Finta EP, Tschopl M, Illes P: Depolarization of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate. Neuroscience 48: 941-952, 1992.
- 4) Sasaki T, Gallacher DV: Extracellular ATP activates receptor-operated cation channels in mouse lacrimal acinar cells to promote calcium influx in the absence of phosphoinositide metabolism. FEBS Lett 264: 130-134, 1990.
- 5) Benham CD: ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery. J Physiol 419: 689-701, 1989.
- 6) Ishihata A, Endoh M: Subcellular mechanism of desensitization of ATP-induced Ca^{2+} mobilization in human umbilical vein endothelial cells: Role of intracellular Ca^{2+} stores. Life Sci 48: 583-591, 1991.
- 7) DUBYAK GR: Extracellular ATP activates polyphosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization in Ehrlich Ascites tumor cells. Arch Biochem Biophys 245: 84-95, 1986.
- 8) DUBYAK GR, De Young MB: Intracellular Ca^{2+} mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells. J Biol Chem 260: 10653-10661, 1985.
- 9) 廣瀬 晶, 船田みどり, 所 敬, 平井恵二, 片山芳文: 脈絡上板組織のカルシウムイオン取り込みに対する ATP の作用. 眼紀 42: 1385-1392, 1991.
- 10) Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RG: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly im-

- proved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.
- 11) 片山芳文, 平井恵二: 腸管壁内在神経細胞における細胞内カルシウム濃度と電気的活動の同時測定. *実験医学* 7: 697-702, 1989.
 - 12) Burnstock G, Kennedy C: Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-440, 1985.
 - 13) Inoue K, Nakazawa K, Ohara-Imaizumi M, Obama T, Fujimori K, Takanaka A: Antagonism by reactive blue 2 but not by brilliant blue G of extracellular ATP-evoked responses in PC12 pheochromocytoma cells. *Br J Pharmacol* 102: 851-854, 1991.
 - 14) Allen TGJ, Burnstock G: The actions of adenosine 5'-triphosphate on guinea-pig intracardiac neurones in culture. *Br J Pharmacol* 100: 269-276, 1990.
 - 15) Himmel HM, Ravens U: TMB-8 as a pharmacological tool in guinea-pig myocardial tissues. II. Effects of TMB-8 on membrane currents in isolated ventricular cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 300-304, 1990.
 - 16) Chiou CY, Malagodi MH: Studies on the mechanism of action of a new Ca²⁺ antagonist, 8-(N, N-diethylamino) octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br J Pharmacol* 53: 279-285, 1975.
 - 17) Iino M, Kobayashi T, Endo M: Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 417-422, 1988.
 - 18) Bronner C, Wiggins C, Monte D, Marki F, Capron A, Landry Y, et al: Compound 48/80 is a potent inhibitor of phospholipase C and a dual modulator of phospholipase A₂ from human platelet. *Biochim Biophys Acta* 920: 301-305, 1987.
 - 19) Volpe P, Krause K-H, Hashimoto S, Zorzato F, Pozzan T, Meldolesi J, et al: "Calciosome", a cytoplasmic organelle: The inositol 1,4,5-triphosphatesensitive Ca²⁺ store of nonmuscle cells? *Proc Natl Sci USA* 85: 1091-1095, 1988.
 - 20) Arkhammar P, Hallberg A, Kindmark H, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO: Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. *Biochem J* 265: 203-211, 1990.
 - 21) Gupta N, McAllister R, Drance SM, Cynader MS: Inositol triphosphate (IP₃) receptor and protein kinase C (PKC) localization in the human eye. *Society for Neurosci, Abstracts* 18: 97, 1992.
 - 22) de Souza L, Raha S, Lange A, Reed JK: Nucleotide receptors in pheochromocytoma (PC12) cells. *Society for Neurosci, Abstracts* 18: 1000, 1992.
 - 23) 船田みどり: 脈絡膜メラニン細胞の細胞間結合. *眼科* 31: 1525-1531, 1989.