Ca2+チャネル電流と細胞内Ca2+濃度に対するμオピオイド受容体アゴニスト,エンドモルフィンの効果

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第3号　330－335（1999）

Ca^{2+}チャネル電流と細胞内Ca^{2+}濃度に対するμオピオイド受容体アゴニスト，エンドモルフィンの効果

金沢大学大学院医学研究科生理系専攻神経情報物性学講座（主任：東田陽博教授）
Rimma Knijnik

エンドモルフィン1と2のミュー（μ）オピオイド受容体を介する効果をμオピオイド受容体を大量発現するNGMO-251細胞で観察した．NGMO-251細胞を－40mVの保持電位から脱分極すると急激に活性化される内向きCa^{2+}チャネル電流を生じた．100μM，3μlのエンドモルフィン1，または2を滴下したところ，Ca^{2+}チャネル電流は抑制された．Ca^{2+}チャネル電流の平均の抑制率は，エンドモルフィン1で，27.3％，エンドモルフィン2で19.7％であった．エンドモルフィン1や2のCa^{2+}チャネル電流抑制に対するGタンパク質の関与をみるために，100μMN－メチルマレイミド存在下や，細胞をあらかじめ百日咳毒素で処理しておくと，エンドモルフィン1や2を投与しても抑制がかからなくなった．また，エンドモルフィン1と2はCa^{2+}チャネル電流の電圧依存性を大きく変えることなく抑制した．各エンドモルフィンの効果は濃度－反応曲線からIC_{50}値が10.2nMと22.6nMと計算された．

次に，細胞内Ca^{2+}濃度に対するエンドモルフィンの効果を他のアゴニストと比較しながら調査した．ブラジキニンは投与前のレベルより平均403.2％の細胞内Ca^{2+}上昇を生じたが，10～100nMのエンドモルフィン1や2の投与では，そのような細胞内Ca^{2+}上昇は観察されなかった．以上の結果は，エンドモルフィンが，生体内でμオピオイド受容体を刺激し，膜電位依存性Ca^{2+}チャネルを抑制し，神経伝達物質として機能していることを示唆する．

Key words endomorphins, μ-opioid receptors, Ca^{2+} channel currents, intracellular Ca^{2+} concentration

エンドモルフィン（endomorphin）1と2は，牛脳より抽出された，それぞれTyr-Pro-Trp-Phe-NH_2とTyr-Pro-Phe-Phe-NH_2の4残基のアミノ酸から成るペプチドである[1]．

エンドモルフィンは，μオピオイド受容体に高い親和性で結合する．エンドモルフィン様の免疫反応産物が視床，視床下部，線状体や前脳等で見出されており，その部位にμオピオイド受容体も集積していることがわかっている[1]．エンドモルフィンが，鎮痛作用やオピオイド依存性や神経内分泌活性を生じる神経伝達物質であるとする仮説がある．もし，そうであるなら，エンドモルフィンは，Gタンパク質の活性を変えたり，効果器酵素に影響を与え，セカンドメッセンジャーの産生を変えるような生理活性を示す必要がある．また，エンドモルフィンは，μオピオイド受容体を介してイオンチャネル活性を変化させることも期待される．

上記の仮説を実証するために，私は，今回，μオピオイド受容体を大量発現するNGMO-251細胞を使用し実験することにした[2)~4)]．この細胞は，ニューロブラストーマとグリオーマをかけ合わせた雑種NG108-15細胞に[2]，福田らがクローニングしたラットμオピオイド受容体cDNA[3]を導入（トランスフェクション）した神経腫瘍細胞である．この細胞は，親のNG108-15細胞で記述されたのと同様な低閾値と高閾値の両Ca^{2+}内向き電流を持つ[4]．従って，NGMO-251細胞は，オピオイド受容体を介するイオンチャネル活性変調を調査するのに適した細胞といえる．すでに当教室の成果として，μアゴニストである[D-Ala^2, N-Me-Phe^4, Gly^5-ol]-enkephalin (DAMGO) やデルタ（δ）アゴニスト[D-Pen^2, D-Pen]-enkephalin (DPDPE) がこの細胞の持つω-コノトキシン感受性（N-タイプ）のCa^{2+}チャネル電流を抑制することを示した[5]．その時は，－80mVからの脱分極に対して生じた内向きCa^{2+}チャネル電流へのエンドモルフィンの効果を観察したが[5]，それ以外の実験条件による高閾値Ca^{2+}電流に対しては調査していない．そこで，今回，保持電圧を－40mVにし，その電位でも失活していないCa^{2+}電流成分について，エンドモルフィンの効果を新たに確認することにした．

ところで，δオピオイド受容体はGタンパク質βγサブユニットによりホスホリパーゼCに連結しており，イノシトール三リン酸を産生する結果，細胞内Ca^{2+}プールからCa^{2+}の動員をすることが報告されている[6)7)]．一方，μオピオイド受容体については情報が少なく，良く解っていない．そこで，エンドモルフィンによるμオピオイド受容体刺激が，細胞内Ca^{2+}濃度を変えるかどうかを，フラ（Fura）-2 Ca^{2+}蛍光試薬[8]により測定した．

平成11年2月1日受付，平成11年3月29日受理

Abbreviations：DPDPE, [D-Pen^2, D-Pen]-enkephalin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SEVC, single electrode voltage clamp; ND, not determined

その結果，エンドモルフィンはμオピオイド受容体を介してCa^{2+}セカンドメッセンジャー系には少なくともこの細胞では，連結していないことを示す結果を得たので報告する．

材料および方法

Ⅰ．細　胞

本研究において用いた細胞は，NG108-15細胞（マウス神経芽腫細胞N18TG-2とラットグリオーマC6BU-1との雑種細胞）とこの細胞にμオピオイド受容体をコードするcDNAをトランスフェクションしたNGMO-251細胞である[4]．μオピオイド受容体遺伝子のトランスフェクションには哺乳動物発現ベクターとして，pKNH[4]を用いた．このベクターはpBR322とpBR327を骨格にもち，クローニング部位の上流にSV40の初期プロモーターと下流にはβ－グロビン遺伝子のポリアデニル化シグナルが加えられている．また形質転換細胞を選択できるようにネオマイシン耐性遺伝子も組み込まれている．

PKNHのクローニング部位に，μオピオイド受容体をコードする塩基配列を挿入し，プラスミドpRORS15-1[3]を得た．このプラスミドをNG108-15細胞にカルシウムリン酸法でトランスフェクションした．μオピオイド受容体を発現する細胞株は，ネオマイシン（800 μg/ml）存在下で生存した細胞として選択した．次にノーザンブロット法でトランスフォームされたクローンが実際にμオピオイド受容体を発現していることを確認し，NGMO-251株 細胞を得た[4]．他方，この細胞は親株細胞由来の内在性のδオピオイド受容体も持っている．

これらの細胞は5％ウシ胎児血清（Gibco, NewYork, USA）を含有するダルベッコ変法イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco）にて，37℃，CO_2 10％の濃度下で培養した[9]．培地にはさらに，100 μMヒポキサンチン，0.1 μMアミノプテリンおよび16 μMチミジンをくわえた．分化の誘導はプラスチック培養皿（Falcon社製，Becton Dickson, New Jersey, USA）に1％ウシ胎児血清，100 μMヒポキサンチン，16 μMチミジン，0.25mMジブチルサイクリックAMP〔ヤマサ醤油，千葉）を加え，CO_2インキュベータ内で10％CO_2を含む空気下に，37℃，湿度100％の条件[9]で2～3週間培養を行った．培養中は培地を2日おきに交換した．プラスチック培養皿底面全体には，0.01％ポリオルニチン（Sigma, St. Louis, USA）［150mM ホウ酸緩衝液（pH8.1）に溶解し，メンブランフィルター（MILEX-GS, Millipore, 東京）を通して無菌化］液1～2滴を滴下し塗布した．

Ⅱ．記録準備

上記の培養皿と3M KClを満たした容器とを寒天ブリッジにて電気的に連結した．さらに上記の容器中においた，銀－塩化銀電極を介して下記の増幅器に接続した．灌流液の温度を一定にするため，上記の皿をのせた培養顕微鏡ステージの下に張りめぐらした電熱線を直流電源（PS-41XM, Daiwa, 大阪）に接続した．灌流液温度を灌流中においた温度センサープローブ（511, Yellow Springs Instrument, Ohio, USA）と温度モニター（YSI72A, Yellow Springs Instrument）によって33～35℃に保持した．実験台の周囲を金網張りの衝立でさえぎりこれを接地した．さらに交流雑音の原因となりうる全周辺機器［実験台，倒立顕微鏡（オリンパス，東京），オシロスコープ（V-212, VC-6020, 日立，東京），刺激発生装置（DPS-165B, Dia Medical System, 東京），マイクロマニュピュレーター（Leitz, Germany），記録計（RJG-4124，日本光電，東京）など］を接地した．灌流液を重力によって滴下し，培養皿の反対側から吸引排除した．

Ⅲ．膜電流の測定

微小電流増幅器（Axoclamp-2A, Axon Instruments, Foster City, USA）を用いて単電極膜電位固定法 single electrode voltage clam, (SEVC)によって膜電流を測定した．N型およびL型Ca^{2+}電流の測定には，ホールセルパッチクランプ法を用いた．Ba^{2+}を主なキャリアーとするN型およびL型チャネル電流を，Ba^{2+}を含む次の様な組成の細胞外液［50 mM $BaCl_2$, 30mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM CsCl, 20 mM D-グルコース, 20 mM 塩化テトラエチルアンモニウム（Nacaleitesc，京都），0.1 μMテトロドトキシン，N-2-hydroxyetyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (Hepes) (Sigma) 10mM, pH 7.2］で灌流した[9][10]．パッチガラス電極（G 1.5, 成茂）を2段プラー（成茂）で引いて作製し，次に示す組成の溶液［150 mM CsCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM etyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) N, N'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma), 1 mM ATP (Sigma), 10 mM Hepes, pH 7.3］で満たした．まず，ブリッジモードで電極の電気抵抗をモニターしながら電極を細胞膜に接触したさいの電気抵抗の上昇を観察した後に1.0 Hz，10ミリ秒，0.1 nAの電気刺激を与え，吸引により電極の電気抵抗が1GΩ以上に上昇するのを待ち，さらに吸引すると電気抵抗が突然減少した．次に，DDCモードに切り替え，モニター電圧がく形波状となるまで帰還回路の電気容量を上げ，SEVCモードに切り替えDCクランプにして20mV，10ミリ秒，10Hzの電気刺激を加え，帰還回路の電気容量を最小にしながら増幅器のゲインを上げた．膜電位を，－40mVに保持し，＋10～＋80mVの1秒のステップパルスを加えるとL型とN型の高閾値Ca^{2+}チャネル電流が得られた．

Ⅳ．細胞内Ca^{2+}測定

Fura-2対応の倒立型の落射蛍光顕微鏡（オリンパスIMT-2）を用いた透過観察には接眼レンズに15X，対物レンズ（位相差ではない）に20Xを用い，中間変倍率を1.5Xとして450倍とした．Ca^{2+}測光装置には，フォトマルを用いたスポット測光装置（オリンパス0SP-3）を用いた[8]．この装置ではスポットをあてた1つの細胞全体のCa^{2+}濃度しか見られないが，0.1秒間隔で測定できるという点で，短い間隔で早いCa^{2+}濃度変化をとらえられた．

Fura-2による2波長励起，1波長（510 nm）測光をおこなった．Ca^{2+}に関しては，波長340 nmで励起した時に発生する蛍光は，細胞内Ca^{2+}濃度増加にしたがい増大し，380 nm励起では逆に減少する．一方360 nmでは，Ca^{2+}濃度によらずほぼ一定強度の蛍光を出す（実際には細胞内Ca^{2+}濃度が増加すると，360 nmでの蛍光強度は少し減少する．そこでCa^{2+}流入測定には340 nm励起用フィルターと380 nm励起用のフィルターをセットして，蛍光強度比（I 340 / I 380）をしらべた．同時に340 mm波長でCa^{2+}濃度の変化をモニターした[8]．

培養皿はカバーグラス（40 X 50 mm, No1 thickness, マツナミ）の上に，内径19 mm，外径25 mmのシリコンチューブを7mm位に切断して載せ，これらを市販のシリコン系充てん剤（防カビ剤なし）で接着させる．そして2－3日間以上乾燥させた後，オートクレーブする．この培養皿を，短冊型の濾紙を両端に敷いた100 mm径デイッシュの中にいれる．ガラス面は細胞が生えにくいので，この培養皿にポリリジンを加えて2日以上，10％ CO_2インキュベーター内に入れておいた．ついでポリ

リジンを除き，培養液 (DMEM) で洗った後，10％FCSを含むDMEMを1.5ml入れ，インキュベーター内に1時間位おいた．そこへNG108-15細胞を1-1.5x10^2 cells/mm^{2}になるように加え，翌日実験を行った．

Fura-2 AM (50 μg/バイアル) (同仁) にDMSO 50 μlを加え，Fura-2 AM溶液を作り，3 μlずつあらかじめ分注しておいた．実験時，培養液の血清濃度を1％以下にした．上記のFura-2 AM液3 μlを，培養液約50 μlにピペッティングにより希釈し，上から静かに皿全体にまんべんなくかけ，CO_2インキュベーター内に置いた．1時間後，Fura-2 AM入りの培養液を実験溶液に変えた．励起波長340 nm用と380 nm用のフィルターをセットし，目的とする1つの細胞にスポットをあてる．フォトマル電圧の感度をあげていき，細胞内Ca^{2+}濃度が生理範囲内にあることを確認 (本実験では60 nM～100 nM) した[9]．

成　　績

NGMO-251細胞の膜電位を－80 mVに保持し，1秒間＋20 mV に脱分極刺激を加えると，Ba^{2+}をチャージキャリアーとする内向き電流が生じた．その内向き電流は，10ないし100 nMのエンドモルフィン1とエンドモルフィン2の細胞外還流または，3 μl のパフ投与により，抑制された．その抑制は，テスト刺激前に－20 mV まで脱分極をするダブルパルス法による前回の結果[9]とほぼ同様であった．

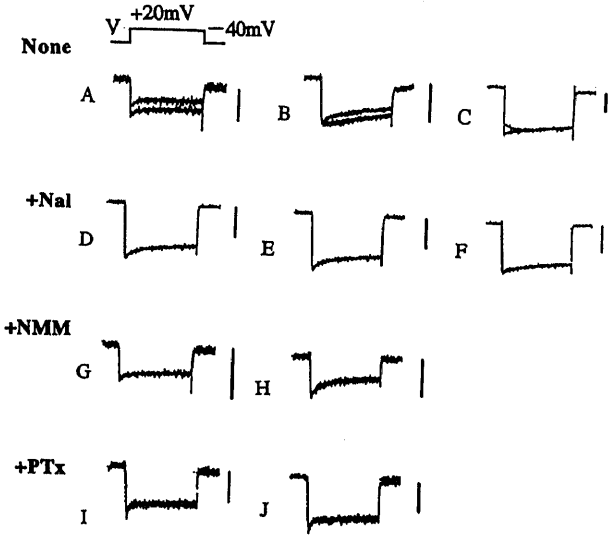

Fig. 1. Effect of endomorphin 1 (EM1), endomorphin 2 (EM2) and DPDPE on high-threshold Ca^{2+} channel currents in NGMO-251 cells.
Upper shows a voltage protocol. Every 30 s, 200 ms depolarization to + 20 mV from − 40 mV was applied. Lower traces show current records evoked before, at 15-20 s after application of 100 nM EM1 (A, D, G and I), EM2 (B, E, H and J), and DPDPE (C and F), and 2-3 min after application at recovery (A-F). Current traces were recorded from two cells in the absence (A-C) and presence of 10 μM naloxone (Nal, D-F), cells during superfusion with 100 μM N-methylmaleimide (NMM, G and H) or cells treated with 100 ng/ml pertussis toxin (PTx) for 18 hr (I and J). Control, test and/or recovery currents were superimposed. Note that the current was suppressed by three peptides only in the control condition (A-C). Scale bars represent 2 nA for A and 5 nA for B-J

次に，Kasai[11]により報告された，－40 mVの保持電位から脱分極すると急激に活性化されるCa^{2+}チャネル電流を測定した．この方法でも，やはりBa^{2+}をチャージキャリアーとした．その時，弱い不活性化しかみられず，Ca^{2+}チャネル電流を測定するのに好都合と言われている．ここでは前回と異なり，ダブルパルス法を使わず，単発脱分極刺激で誘発されるCa^{2+}チャネル電流に対するエンドモルフィン1と，エンドモルフィン2の効果を調べた．

図1は，そのようなCa^{2+}チャネル電流がそれぞれ100 nM のエンドモルフィン1 (図1A)，エンドモルフィン2 (図1B)，ならびにDPDPE (図1C) の投与により抑制される事を示す．平均のCa^{2+}チャネル電流の抑制率は，エンドモルフィン1で27.3 ± 2.60％ (X ± SEM, n=26)，エンドモルフィン2で19.7 ± 2.0％ (n=21) であり，DPDPEの23.2 ± 3.94 ％ (n=10) と同じか，あるいはそれ以上の有意な抑制であった (表1)．オピオイド受容体の拮抗剤である10 nMナロキソンとの同時投与ではこの抑制はみられなかった (図1D, EとF)．

また，エンドモルフィン1と2のCa^{2+}チャネル電流抑制に対するGタンパク質の関与をみるために，100 μM N-メチルマレイミド存在下 (図1GとH) や細胞をあらかじめ百日咳毒素で処理しておくと (図1 IとJ)，エンドモルフィン1や2を投与しても抑制はほとんど生じなかった (表1)．

図2は，ここで観察したCa^{2+}チャネル電流の膜電位依存性 (I-V 曲線) を示す．＋20 mV付近にピークを持っていた．エンドモルフィン1(Fig. 2A) とエンドモルフィン2 (図2B) はこの高閾値Ca^{2+}チャネル電流の持つ電圧特性 (依存性) を大きく変えることなく抑制した．またエンドモルフィンの洗浄除去後，I-V関係はおおよそ元に回復した．

各エンドモルフィン濃度での抑制率を図3にプロットした．それぞれの曲線から50％反応抑制濃度値は10.2 nMと22.6 nMと計算された．

Table 1. Inhibition of hight-threshold Ca^{2+}channel currents [ICa (h)] by endomorphin 1 (EM1), endomorphin 2 (EM2) and DPDPE in NG108-15 cells and transformed NG108-15 cells expressing μ-opioid receptors

Drug	Pretreament	Inhibition of peak ICa (h) (%)	
		NGMO-251	NG108-15
EM1	None	27.3±2.60 (26) *	0.50±1.13 (6)
	NMM	1.63±2.13 (7)	ND
	PTx	−2.08±2.24 (7)	ND
EM2	None	19.7±2.00 (21) *	0.21±1.38 (5)
	NMM	0.12±1.13 (8)	ND
	PTx	1.77±1.59 (4)	ND
DPDPE	None	23.2±3.94 (10) *	30.7±4.90 (7) *
	NMM	2.72±2.51 (7)	1.77±2.40 (3)
	PTx	1.23±2.77 (6)	ND

ICa (h) was evoked as shown in Fig. 1. EM1, EM2 and DPDPE (100 nM each) were applied by pressure-ejection from a micropiprette onto the cell soma. Cells were pretreated with or without 100 μM N-methylmaleimide (NMM) for 20 min or 100 ng/ml PTx for 18 hr. ND, not determined. Data are $\bar{x}$± SEM of percentages of peak ICa (h) inhibition (no. of cells tested). *Significantly different from zero inhibition by no application at $P<0.01$.

次に，細胞内Ca^{2+}濃度に対するエンドモルフィンの効果を他のアゴニストと比較しながら調査した (図4)．アゴニストの1つブラジキニンはNG108-15細胞でホスホリパーゼCを活性化し，細胞内Ca^{2+}プールからのCa^{2+}動員をはかり，細胞内Ca^{2+}濃度を上昇させることが知られている[12]．ブラジキニン (100 nM, 図4AとB)やDPDPE (100 nM, データは示さず) で，投与前のレベルよりそれぞれ平均403.2±28.6% (n=25)と186.1±36.7% (n=10) の細胞内Ca^{2+}上昇が記録できた．一方，10～100 nM のエンドモルフィン1 (図4A) や2 (図4B) の投与では，そのような細胞内Ca^{2+}上昇は観察されなかった (n=15-22)．

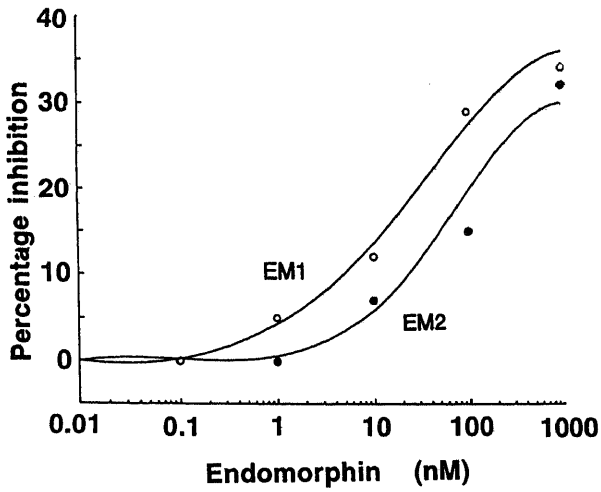

Fig. 3. Dose-response relationship for inhibition of high-threshold Ca^{2+} channel currents by endomorphin 1 (EM1) and 2 (EM2).
Currents were evoked every 30 s, as in Figure 1. Mean percent inhibition of 3-7 cells during superfusion with various concentrations of endomorphins. Curves are least-squares fits to the equation y=x/(x+K) where y= % inhibition, x=agonist concentration and K is a constant.

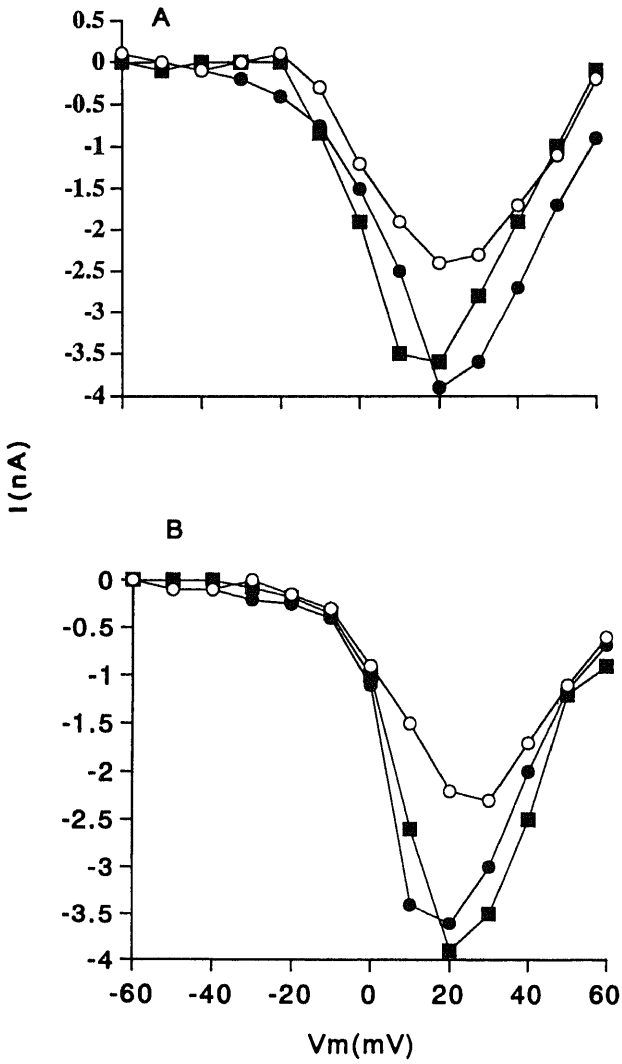

Fig. 2. Endomorphin 1- and endomorphin 2-induced depression of high-threshold Ca^{2+} channel currents recorded from NGMO-251 cells.
Graphs show peak currents plotted against command potential, recorded before, after and during superfusion with 10 nM endomorphin 1 (A) or endomorphin 2 (B). Currents were evoked by the same protocol as in Figure 1, except that 200 ms test pulses were stepped to -60 or to +60 mV with 10 mV increments.

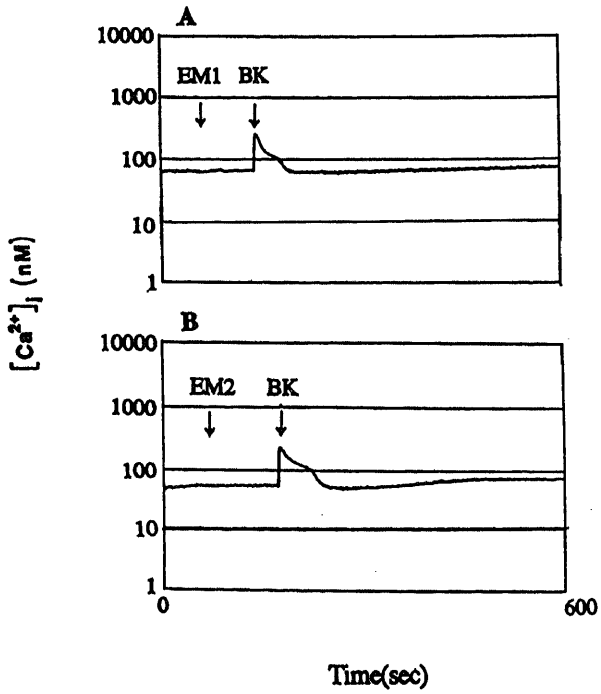

Fig. 4. Fluometrical recording of intracellular Ca^{2+} concentrations from two NGMO-251 cells.
Fluorescence change in response to endomorphin 1 (EM1, A) or endomorphin 2 (EM2, B) or bradykinin (BK, A and B). Arrows indicate the addition of 25 ml of 200 nM EM1, 20 mM EM2 and 2 mM BK, which gave final concentrations of 10 nM EM1, 1000 nM EM2 and 100 nM BK, respectively.

考　　察

今回の実験で，脳に存在する神経ペプチドであるエンドモルフィンが高閾値Ca^{2+}チャネル電流を抑制することがわかった．今回と前回[4]，異なるCa^{2+}チャネル電流発生の条件で同様な結果が得られたことから，エンドモルフィンはμオピオイド受容体を刺激して，Ca^{2+}チャネル活性を制御することが明確になった．この反応がナロキソンで阻害されたことからもこのことが支持される．この電流がNタイプであるか，その他のタイプのCa^{2+}チャネル電流であるかについては今回は実験しなかった．前報[4]でも述べた様にNG108-15細胞のこの電流[13]がω－コノトキシン感受性であることからNタイプと推定されるが将来この点を明確にする必要がある．

Nーメチルマレイミドや百日咳毒素処理により[11][14]，エンドモルフィンによる抑制が消失したことは，μオピオイド受容体からCa^{2+}チャネル分子へ至る膜内情報変換がG_iやG_oタイプのGタンパク質で行われている事を示している．G_iやG_oタイプのGタンパク質のαかβγのどちらのサブユニットが関与しているかについては今後検討する必要がある．

本報告の最重要結果は，エンドモルフィンにより細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が見られなかったことである．このことは，μオピオイド受容体はδオピオイド受容体と異なり[9]，ホスホリパーゼCには連結していないことを示唆している．以上，今回の実験から，エンドモルフィン→μオピオイド受容体→Gi/Go →Ca^{2+}チャネル，という信号伝達機構が生体に存在することを示している．

今回用いた，μオピオイド受容体cDNAは，δオピオイド受容体cDNAの塩基配列の情報から京都大学の福田ら[3]により分離されたものである．μオピオイド受容体のアミノ酸配列の特徴は，Gタンパク質に連関する7回膜貫通型の受容体あることを示している．以前から，μおよびδ受容体がG_iを介してアデニル酸シクラーゼの抑制とK＋チャネルの開口に共役し，G_oを介してCa^{2+}チャネルの抑制に連結することが報告されている[13]~[18]．今回のエンドモルフィンを用いての実験結果もこのような報告と同一線上にある．

μオピオイド受容体を介した生理薬理的作用として，鎮痛作用に関与していると考えられているが，モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の作用にはμ受容体がとくに重要であるとされている[1]．従って，μオピオイド受容体を発現する視床，線条体や視床下部等の部位[19]~[21]に関係する神経細胞がエンドモルフィンを分泌し，μオピオイド受容体を直接刺激することにより，鎮痛等に関係していると思われる．今後実際これらの部位の細胞のCa^{2+}チャネル等への効果を研究する必要がある．

結　　論

エンドモルフィン1と2のμオピオイド受容体を介する内向きCa^{2+}チャネル電流と細胞内Ca^{2+}濃度に対する効果をμオピオイド受容体を大量発現するNGMO-251細胞で観察した．NGMO-251細胞を－40mVの保持電位から脱分極するとCa^{2+}チャネル電流を生じた．エンドモルフィン1と2の投与によりCa^{2+}チャネル電流は抑制された．Nーメチルマレイミド存在下や細胞をあらかじめ百日咳毒素で処理しておくと，エンドモルフィン1や2の反応が消失したことから，Gタンパク質の関与が証明された．また，エンドモルフィン1と2はCa^{2+}チャネル電流の電圧特性を変えることなく抑制した．各エンドモルフィンの有効濃度はナノモルの程度と計算された．エンドモルフィン1や2の投与では，細胞内Ca^{2+}上昇は観察されなかった．以上の結果は，エンドモルフィンが生体内でμオピオイド受容体を刺激し，膜電位依存性Ca^{2+}チャネルを抑制し，神経伝達物質として機能していることを示唆する．

文　　献

1） Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the μ-opiate receptor. Nature 386: 499-502, 1997

2） Nirenberg M, Wilson S, Higashida H, Rotter A, Krueger K, Busis N, Ray R, Kenimer JG, Adler M. Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. Science 222: 794-799, 1983

3） Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H. Primary structures and expression from cDNA of rat opioid receptor δ and μ subtypes. FEBS Lett 327: 311-314, 1993

4） Morikawa H, Fukuda K, Kato S, Mori K, Higashida H. Coupling of the cloned m-opioid receptor with the ω-conotoxin-sensitive Ca^{2+} current in NG108-15 cells. J Neurochem 65: 1403-1406, 1995

5） Higashida H, Hoshi N, Knijnik R, Zadina JE, Kastin AJ. Endomorphins inhibit high-threshold Ca^{2+} channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing μ-opioid receptors. J Physiol 507: 71-75, 1998

6） Okajima F, Tomura H, Kondo Y. Enkephalin activates the phospholipase C/Ca^{2+} system through cross-talk between opioid receptors and P2-purinergicor bradykinin receptors in NG108-15 cells. Biochem J 290: 241-247, 1993

7） Tomura H, Okajima F, Kondo Y. Enkephalin induces Ca^{2+} mobilization in single cells of bradykinin-sensitized differentiated neuroblastoma hybridoma (NG108-15) cells. Neurosci Lett 148: 93-96, 1992

8） Hashii M, Nozawa Y, Higashida H. Bradykinin-induced cytosolic Ca^{2+} oscillations and inositol tetrakisphosphate-induced Ca^{2+} influx in voltage-clamped ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. J Biol Chem 268: 19403-19410, 1993

9） Higashida H, Hashii M, Fukuda K,Caulfield MP, Numa S, Brown DA. Selective coupling of different muscarinic acetylcholine receptors to neuronal calcium current in DNA-transfected cells. Proc R Soc Lond 242: 68-74, 1990

10) Tsunoo A, Yoshii M, Narahashi T. Block of calcium channels by enkephalin and somatostatin in neuroblastoma-glioma hybrid NG108-15 cells. Proc Nat Acad Sci USA 83: 9832-9836, 1986

11) Kasai H. Tonic inhibition and rebound facilitation of a neuronal calcium channel by a GTP-binding protein. Proc Nat Acad Sci USA 88: 8855-8859, 1991

12) Ogura A, Myojo Y, Higashida H. Bradykinin-evoked acetylcholine release via inositol trisphosphate-dependent elevation in free calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. J Biol Chem 265: 3577-3584, 1990

13) Brown DA, Docherty RJ, McFadzean I. Calcium channels

in vertebrate neurons. Experimentson a neuroblastoma hybrid model. Annl NY Acad Sci 560: 358-372, 1989

14) Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B. Modulation of Ca^{2+} channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. J Neurosci 14: 7109-7116, 1994

15) Hustler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP-binding protein Go regulates neuronal calcium channels. Nature 325: 445-447, 1989

16) Moses HC, Rusin KI, MacDonald RL μ-Opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a Go-type GTP-binding protein. J Neurosci 14: 3842-3851, 1994

17) Nomura K, Reuveny E, Narahashi T. Opioid inhibition and desensitization of calcium channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. J Pharmcol Exp Ther 270: 466-474, 1994

18) Noda M, Ishizaka N, Yokoyama S, Hoshi N, Kimura Y, Hashii M, Taketo M, Egorova A, Knijnik R, Fukuda K, Morikawa H, Brown DA, Higashida H. Inositol trisphosphate/Ca^{2+} as messengers of bradykinin B_2 and muscarinic acetylcholine m1-m4 receptors in neuroblastoma-derived hybrid cells. J Lipid Mediat Cell Signal 14: 175-185, 1996.

19) Bunzow JR, Zhang G, Bouvier C, Saez C, Ronnekleiv OK, Kelly MJ, Grandy DK. Characterization and distribution of a cloned rat μ-opioid receptor. J Neurochem 64: 14-24, 1995

20) George SR, Zastawny RL, Briones-Urbina R, Cheng R, Nguyen T, Heiber M, Kouvelas A, Chan AS, O'Dowd BF. Distinct distributions of μ, δ and κ opioid receptor mRNA in rat brain. BBRC 205: 1438-1444, 1994

21) Goldberg IE, Rossi GC, Letchworth SR, Mathis JP, Moro J, Leventhal L, Su W, Emmel D, Bolan EA, Pasternak GW. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. J Pharmcol Exp Ther 286: 1007-1013, 1998

Effects of μ-opioid Agonists, Endomorphin 1 and 2, on Ca^{2+} Channel Currents and Intracellular Ca^{2+} Concentrations. Rimma Knijnik, Department of Biophysical Genetics, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108,** 330 — 335 (1999)

Key words endomorphins, μ-opioid receptors, Ca^{2+} channel currents, intracellular Ca^{2+} concentration

Abstract

Endomorphin 1 (EM1) and endomorphin 2 (EM2), recently isolated from the brain, are the first endogenous mammalian peptides with highest specificity and affinity for the μ-opioid receptor. However, the physiology of these peptides is not known. Therefore, we investigated the effect of EM1 and EM2 on high threshold Ca^{2+} channel currents in NGMO-251 cells, which were the NG108-15 mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cells overexpressing cloned rat μ-opioid receptors. Ca^{2+} channel currents were measured by the whole-cell voltage-clamp method. EM1 and EM2 inhibited the high threshold Ca^{2+} channel current by 27.3 % and 19.7 %, respectively; but they did not induce the identical inhibition in the parental NG108-15 cells expressing endogenous δ-receptors. The IC_{50} for EM1 and EM2 was 10.2 and 22.6 nM, respectively. Pretreatment of NGMO-251 cells with 100 mM N-methylmaleimide or 100 ng/ml pertussis toxin blocked the EM-induced Ca^{2+} channel current inhibition. Applications of endomorphins did not elevate intracellular Ca^{2+} concentrations, while bradykinin did. Our results indicate that EMs induce the μ-receptor-mediated inhibition of Ca^{2+} channels via G_i/G_o-type of G proteins, and suggest that endomorphins function as neuromodulators in the brain.