

Effects of cromakalim (K⁺ channel opener) on Ca²⁺ and K⁺ channels: electrophysiological study in NG108-15 cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8295

クロマカリン (K^+ チャネルオープナー) の Ca^{2+} チャネルと K^+ チャネルに対する作用： NG108-15 細胞における電気生理学的検討

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任：竹田亮祐教授)

伊藤 裕 二

(平成4年1月8日受付)

クロマカリンは多くの平滑筋組織において筋弛緩作用を有する新しい種類の降圧薬である。クロマカリンの主な作用部位は ATP 依存性 K^+ チャネルであると考えられているが、最近クロマカリンが内向き Ca^{2+} 電流に直接的に作用する可能性も報告された。ニューロブラストーマ×グリオーマ雑種 NG108-15 細胞は2種類の膜電位依存性 Ca^{2+} (T型およびL型) 電流を有しているが、この細胞において強い脱分極刺激で活性化される Ca^{2+} 電流の中に速く不活性化成分 (N型) が最近発見された。本研究ではクロマカリンがどの型の Ca^{2+} 電流に感受性を有するのかを明らかにすることを目的として3種類の膜電位依存性 Ca^{2+} 電流と K^+ 電流に及ぼすクロマカリンの作用を NG108-15 細胞を用いて検討した。500 μ M クロマカリンの細胞外液灌流によって弱い脱分極刺激で活性化される一過性の Ca^{2+} (T型) 電流は22~66%抑制された。強い脱分極刺激で活性化する持続性の Ba^{2+} 電流 (L型 Ca^{2+} 電流) は29~73%抑制されたが、強い脱分極刺激で活性化しすばやく不活性化する Ba^{2+} 電流 (N型 Ca^{2+} 電流) はほとんど影響されなかった。T型とL型電流に対する IC_{50} は共に約100 μ M で等しかった。上記の抑制作用は比較的速く現れ、また可逆的であった。500 μ M クロマカリンにより膜電位は過分極しなかったが、 Ca^{2+} の活動電位の最大振幅は投与前に比べ47 \pm 6% (n=8) 減少した。さらに、 K^+ の外向きテールカレント (すなわち活動電位後過分極を形成する電流) の速い成分も同様に500 μ M クロマカリンによって45 \pm 6% (n=10) 抑制された。以上により NG108-15 細胞においてクロマカリンは T型およびL型 Ca^{2+} 電流を抑制するが、N型 Ca^{2+} 電流を抑制しないことが判明した。この所見は、クロマカリンの作用は非特異的ではなく非常に選択的であることを意味しており、クロマカリンが異なる Ca^{2+} チャネル分子に直接的に作用する可能性が考えられた。この結果から、クロマカリンが血管平滑筋弛緩をもたらす機序の1つが T型およびL型 Ca^{2+} チャネルを通る Ca^{2+} 流入の抑制である可能性が示唆された。

Key Words Cromakalim, Ca^{2+} inward current, T-type, L-type, NG108-15 cell

クロマカリン (Cromakalim : BRL38227 : (-)-trans-6-cyano-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-4-(2-oxo-1-pyrrolidiny)-2H-1-benzo-[b]pyran-3-ol, L体のみはリマカリンとも呼ばれる) はニコランジル、ピナジジルなどと共に K^+ チャネルに作用する新しい種類の降圧薬として近年開発された¹⁾。クロマカリンは多くの血管および臓器平滑筋において著明な筋弛緩作用を有し、高血圧および正常血圧動物で末梢血管の直接的な拡張をもたらす降圧作用を示す^{1)~3)}。クロマカリンの主な作用部位は K^+ チャネルと考えられており²⁾、その作用機序としては血管平滑筋細胞膜の ATP 依存性 K^+ チャネルを開口することにより膜電位を過分極することがラット大動脈・門脈²⁾、モルモット門脈³⁾・腸間膜動静脈⁴⁾などの血管床において報告されている。

しかし、最近になってクロマカリンが膜電位の変化をまったく伴わずに Ca^{2+} の自発放電を抑制したり⁵⁾、過分極が始まる以前から Ca^{2+} の活動電位を抑制したりするなどの報告があり⁶⁾、クロマカリンには K^+ チャネルに対する作用に加えてそれ以外

の何らかの作用機序 (おそらく Ca^{2+} チャネルの抑制作用) が存在することが推定されている。培養神経腫瘍細胞 NG108-15 には ATP 依存性 K^+ チャネルが存在しないと考えられている。したがって本研究においては ATP 依存性 K^+ チャネル以外のチャネルへのクロマカリンの作用を NG108-15 細胞で検討した。また一般に膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルは電気生理学的に T型、N型およびL型の3型に分類されるが⁷⁾、このうちN型の Ca^{2+} 電流の存在は血管などの平滑筋細胞では認められておらず神経系の細胞においてのみ確認されている⁸⁾。NG108-15 細胞においては最近 T型やL型以外に N型 Ca^{2+} 電流の存在が発見された⁷⁾。本研究ではこの細胞を用いてクロマカリンがどの型の Ca^{2+} チャネルに作用するのかを検討した。

材料および方法

1. 材 料

本研究において用いた細胞は、培養神経腫瘍細胞 NG108-15

Abbreviations: DCC, direct current mode; DHP, dihydropyridin; DMSO, dimethyl sulfoxide; Hepes, N-2 hydroxyethyl-piperadine-N'-2-ethane sulfonic acid; IC_{50} , half inhibition concentration; SEVC, single electrode voltage clamp; TEA, tetraethylammonium chloride; TTX, tetrodotoxin

(マウスニューロblastoma (N18TG-2) × ラットグリオーマ (C6BU-1) 雑種細胞) である。プラスチック培養皿 (Becton Dickson, New Jersey, USA) で 1% ウシ胎児血清 (Fatal bovine serum) (Hazleton, St. Lenexa, USA), 100 μ M ヒポキサントシン (Gibco, Gland Island, USA), 16 μ M チミジン (Gibco), 0.25mM ジブチリルサイクリック AMP (ヤマサ醤油, 千葉) を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (Gibco) において, CO_2 インキュベーター内で 10% CO_2 を含む空気下に 37°C で湿度 100% の条件で 2~3 週間培養を行い分化を誘導した細胞を使用した。培養中には培地を 2 日おきに交換した。プラスチック培養皿の底面全体には, 0.01% ポリオルニチン (Sigma, St. Louis, USA) を 150mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.1) に溶解しメンブランフィルター (MILLEX-GS, Millipore, 東京) で無菌化した液 1~2 滴を滴下し塗布した。

II. 方法 (電気生理学的方法)

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氣的に連結した。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基台の下にはりめぐらした電熱線を

直流電源 (PS-41XM, Daiwa, 大阪) に接続した。灌流液温度を灌流液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 (YSI, Yellow Springs Instrument) によって 33~35°C 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 (日本光学, 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), マイクロマンピレーター (Leitz, Germany), 増幅器 (後述), 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。

1. 膜電位と活動電位の測定

1M K^+ citrate で満たした微小ガラス電極 (Glass 1BBL, World Precision Instruments, New Haven, USA) (10~40M Ω) を培養細胞に刺入し, 微小電位用前置増幅器 (DPZ-16, Dia Medical System) にて膜電位を記録した。静止膜電位が -30~-60mV の細胞を用い, 静止膜電位がこれより脱分極している細胞は除外した。ホイーストンブリッジ回路を内蔵した前置増幅器にて, 5 秒間隔で 0.05~1.0nA の細胞内電流通電を 0.5 秒間加えた後に発生する Ca^{2+} 活動電位と活動電位後過分極

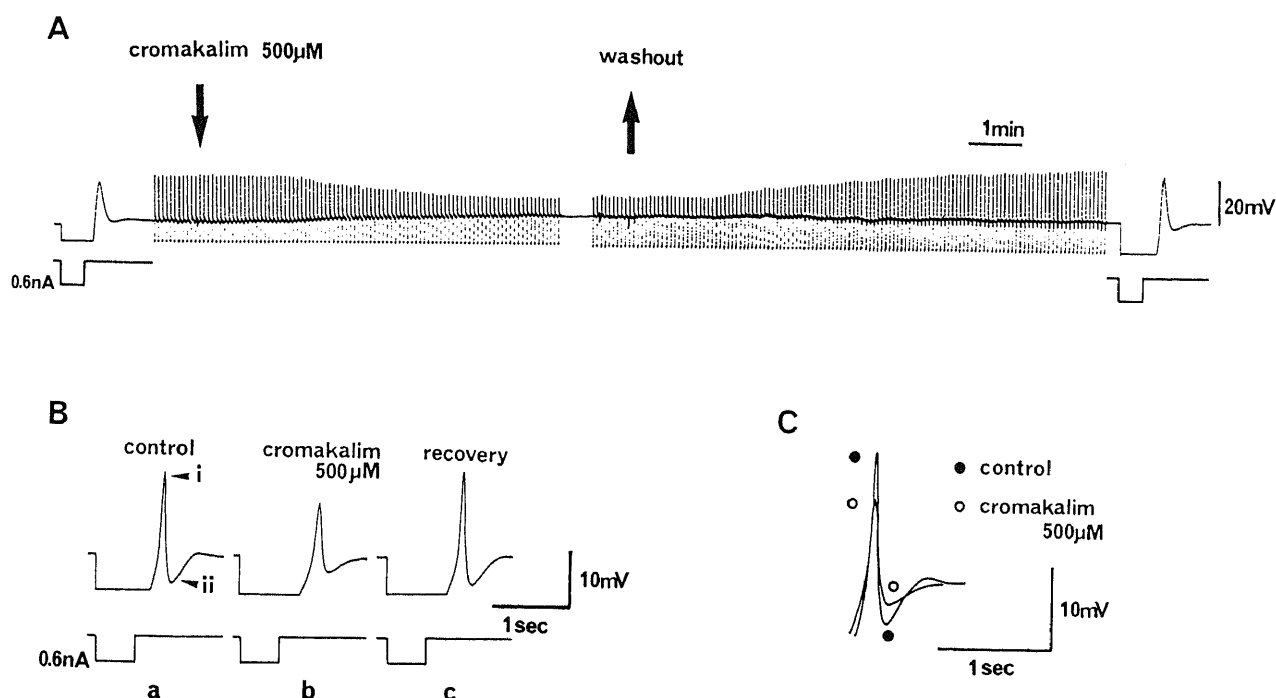


Fig. 1. Effects of cromakalim on the resting membrane potential, Ca^{2+} action potentials and spike afterhyperpolarizations of an NG108-15 cell. The cell was perfused with Tris-HCl-buffered saline (NaCl 140mM, KCl 5.4mM, $CaCl_2$ 1.8mM, $MgCl_2$ 0.8mM, D-glucose 20mM, TTX 0.5 μ M, Tris-HCl 20mM, pH 7.2) plus 1% DMSO with or without 500 μ M, cromakalim. The NG108-15 cell was stimulated by applying a constant 0.6nA current for 0.5 sec, as indicated by the downward rectangular deflections. Ca^{2+} action potentials (anode break spikes) were evoked at the cessation of current stimulation. The potentials were led off through an impaled microelectrode (filled with 1M K^+ citrate, 10M Ω) using a conventional current-clamp recording method. Amplification was saturated during hyperpolarization by extrinsic current. Upward and downward arrows in A indicate, respectively, the onset and washout of 500 μ M cromakalim. Note that the resting membrane potential was depolarized slightly and the Ca^{2+} action potentials were suppressed by 500 μ M cromakalim. The amplitude of the Ca^{2+} action potentials began to decrease with a latency of 1.6 min, and decreased to a minimum at 6.7 min after the onset of cromakalim. The traces in B are typical examples of the Ca^{2+} action potential (i) and the spike afterhyperpolarization (ii) on an expanded time scale in the absence of cromakalim (a), at 7 min after the onset of 500 μ M cromakalim (b) and at 10 min after washout (c). Note that cromakalim partially and reversibly suppressed the Ca^{2+} action potential and the spike afterhyperpolarization. Traces obtained before (●) and during (○) the addition of 500 μ M cromakalim are superimposed in C.

を記録した。細胞外液をトリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl-buffered saline) [NaCl 140mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 0.8 mM, D-グルコース 20mM, テトロドトキシン (TTX) (三共, 東京) 0.5 μM, Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris)-HCl (Sigma) 20mM, pH 7.2] で灌流した。微小ガラス電極の作製には、微小電極製作機 (成茂, 東京) を用いた。

2. 膜電流の測定

微小電流増幅器 (Axoclamp-2A, Axon Instruments, Burlingame, USA) を用いて単電極膜電位固定法によって膜電流を測定した。NG108-15 細胞の外液をトリス塩酸緩衝液 (同上) で灌流した状態で、1M K⁺ citrate で満たした抵抗約 10MΩ の微小ガラス電極を細胞に刺入して T 型 Ca²⁺ 電流と K⁺ 電流を測定した。まず、電極を細胞に刺入し、ブリッジモードで細胞内電位を記録し、0.1nA, 10ミリ秒の刺激を 10Hz で繰り返し与えブリッジバランスを合わせた。ついでダイレクトカレントモード (direct current mode, DCC) にて矩形波電圧を入力し出力波形が可及的に矩形波に近似するように上記の微小電流増幅器に内蔵する帰還回路の電気容量を加減した。次にシングルエレクトロードボルテージクランプ (single electrode voltage clamp, SEVC) モードでディスコンティニウアスクランプにし (スイッチモード: 2~6 Hz), 上記の増幅器に内蔵のステップコマンドもボルテージコマンドモードに切り替え 20mV のステップで頻回刺激し、増幅器の利得を上げていっ

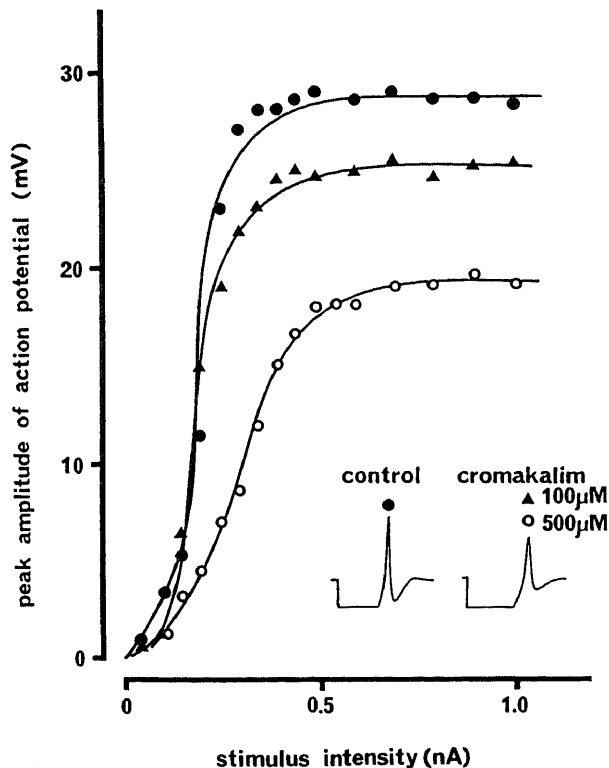


Fig. 2. Amplitudes of the Ca²⁺ action potentials (anode break spikes) as a function of stimulus current intensity in the absence of cromakalim (●), at 7~10 min after the onset of 100 μM (▲) and 500 μM (○) cromakalim. The action potentials were evoked after applying a current of 0.05~1.0nA for 0.5 sec. Note that the peak of the action potentials was depressed 47±6% (n=8) by 500 μM cromakalim and 20±6% (n=3) by 100 μM cromakalim.

た。ホールディングポジションを調節し膜電位を -80mV に保持し、0.3秒のステップを +10mV ずつ増加しながら加えてゆくと T 型 Ca²⁺ 電流が現れた。

N 型および L 型 Ca²⁺ 電流の測定にはホールセルパッチクランプ法を用いた。N 型および L 型チャンネルでは Ba²⁺ を主なキャリアーとするので Ba²⁺ を含む次の様な組成の細胞外液 [BaCl₂ 50mM, NaCl 30mM, MgCl₂ 1mM, CsCl 5mM, D-グルコース 20mM, 塩化テトラエチルアンモニウム (tetraethylammonium chloride, TEA) (ナカライテスク, 京都) 20mM, TTX 0.1 μM, N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (Hepes) (Sigma) 10mM] で灌流し、その pH は 7.2 であった。パッチガラス電極 (G1.5, 成茂) を 2 段階プレー (成茂) で引いて作製し、次に示す組成の溶液 [CsCl 150mM, MgCl₂ 1mM, ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) N, N'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma) 10mM, ATP (Sigma) 1mM, Hepes 10mM, 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 1.0Hz, 10ミリ秒, 0.1nA 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、DCC モードに切り替えモニター電圧が矩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か増幅器の利得を上げた。膜電位を -80mV に保持し、+40~+150mV の 1 秒のステップパルスを加えると L 型と N 型 Ca²⁺ 電流が得られた。

クロマカリンを 100% ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (和光純薬, 大阪) に溶解し、50mM の濃度で保存し、使用の際に各実験に使用する緩衝液で希釈した。1% の DMSO を加え前記の方法で 33~35℃ に保った上記の緩衝液で細胞を灌流し、本研究における試験薬剤 (クロマカリン, TEA) を含む溶液もそれらの薬剤を含まない緩衝液と同様の経路で灌流した。溶媒の影響を除外するため、0.1% エタノール溶液中にクロマカリンを溶解し同様の実験を行ったが、これらの 2 種の溶媒の間ではクロマカリンの作用に差は認められなかった。クロマカリンはスミスクライン・ビーチャム製薬 (London, UK) からの好意により入手した。

成 績

1. 静止膜電位, Ca²⁺ 活動電位および活動電位後過分極に対する作用

クロマカリン 100~500 μM の NG108-15 細胞への投与によって、図 1A に示すように静止膜電位は変化しないかむしろわずかに脱分極する傾向を示し (n=15 細胞)、過分極する細胞はなかった。しかし、過分極刺激の中止により誘発される Ca²⁺ の活動電位 (off spike) の最大振幅は膜電位の脱分極を伴い著明に抑制された (図 1A)。その抑制作用はクロマカリン投与中一定に持続し、投与中止により可逆的に元に復した (図 1B と C)。Ca²⁺ 活動電位に対するクロマカリンの抑制作用の発現は迅速で、灌流回路中を溶液が流れるのに要する時間 (1.6 分) を考慮するとほぼ数秒のうちに抑制し始め、最大抑制は薬剤灌流開始後 6.7±1.0 分 (n=7) で得られた。

図 2 は Ca²⁺ 活動電位誘発のために与えた過分極刺激の強さ (nA) とそれによって生ずる Ca²⁺ 活動電位の最大振幅との関係

を示す。クロマカリン $500 \mu\text{M}$ 存在下では Ca^{2+} 活動電位の最大振幅はベヒクル (DMSO) 存在下のコントロールより平均 $47 \pm 6\%$ ($n=8$) 減少したが、クロマカリン $100 \mu\text{M}$ では $20 \pm 6\%$ ($n=3$) の減少にとどまり、クロマカリンの抑制作用は用量依存性であった。

さらに、活動電位後過分極 (spike afterhyperpolarization) もまたクロマカリンによって可逆的に抑制された (図1C)。

そこで以下では膜電位固定法にて Ca^{2+} と K^{+} の全細胞膜電流を測定し、それぞれのイオン電流に対するクロマカリンの作用を調べた。

II. Ca^{2+} 電流に対する作用

クロマカリンの Ca^{2+} チャンネルに対する抑制作用を3種類 (T型, N型およびL型) の膜電位依存性 Ca^{2+} 電流について検討した。

1. T型 Ca^{2+} 電流に対する作用

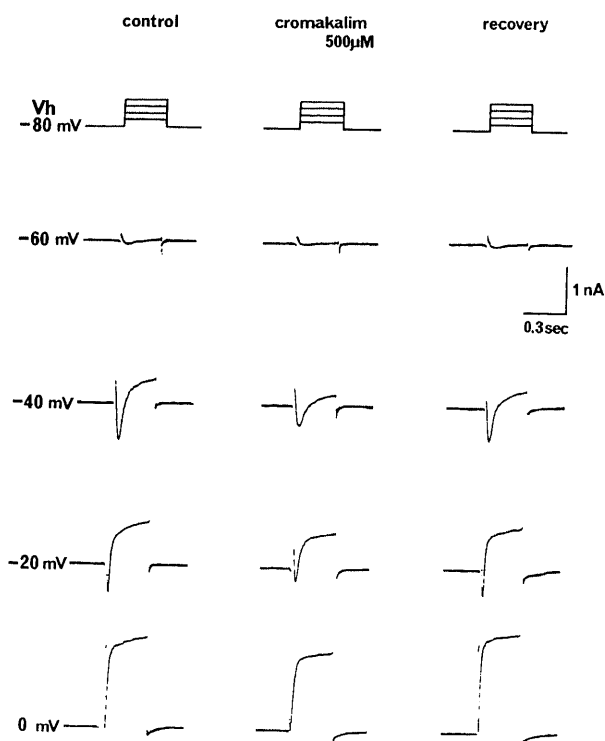


Fig. 3. Effects of cromakalim on low-threshold transient Ca^{2+} currents in an NG108-15 cell. Membrane currents were measured by a discontinuous single-electrode voltage-clamp technique with the Axoclamp-2A amplifier in a switching mode operating at 2~6 kHz. Membrane currents were led off through sharp microelectrodes (filled with 1M K^{+} citrate, $10\text{M}\Omega$) by impaling cells soaked in Tris-HCl-buffered saline. Uppermost trace: 0.3 sec step pulses of -60 , -40 , -20 and 0mV from a holding potential of -80mV . Lower four traces: inward Ca^{2+} currents evoked by the voltage steps indicated at the beginning of the current traces from -80mV in the absence of cromakalim (left), at 7~10 min after the onset of $500 \mu\text{M}$ cromakalim (center) and at 10 min after washout (right). Note that $500 \mu\text{M}$ cromakalim caused a reversible decrease in the inward current of $42 \pm 5\%$ ($n=10$), as well as in the outward current. Cromakalim attenuated the transient inward Ca^{2+} current at each tested potential.

典型例を図3に示す。細胞には $0.5 \mu\text{M}$ の TTX の存在下に -80mV の固定膜電位から各膜電位へ0.3秒の脱分極刺激が加えられている。 $+30\text{mV}$ 以上の脱分極刺激によって、一過性で速やかに不活性化する内向き電流 (T型 Ca^{2+} 電流) が発生し、それに引きつづいて持続性の外向き電流 (遅延整流 K^{+} 電流および Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流) が現れた。クロマカリン $500 \mu\text{M}$ 投与によりこの T型 Ca^{2+} 電流は $42 \pm 5\%$ ($n=10$) 減少し、それ

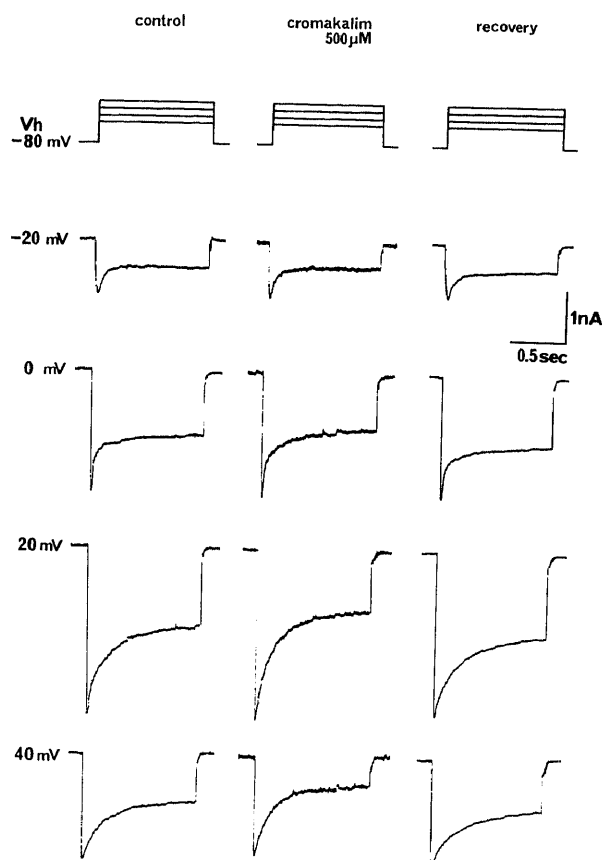


Fig. 4. Effects of cromakalim on high-threshold Ca^{2+} currents in an NG108-15 cell. The patch voltage-clamp technique was used to record the high-threshold Ca^{2+} (N- and L-like) currents, with Ba^{2+} as a charge carrier ion in an extracellular solution of the following composition: BaCl_2 50mM, NaCl 30mM, MgCl_2 1mM, CsCl 5mM, D-glucose 20mM, TEA 20mM, TTX $0.1 \mu\text{M}$, Hepes 10mM, pH 7.24. The patch electrodes contained a solution of the following composition: CsCl 150mM, MgCl_2 1mM, EGTA 10mM, ATP 1mM, Hepes 10mM, pH 7.3. Uppermost trace: 1 sec step pulses of -20 , 0 , 20 and 40mV from a holding potential of -80mV . Lower four traces: Ba^{2+} currents evoked by voltage steps indicated at the beginning of the current traces from -80mV in the absence of cromakalim (left), at 7~10 min after the onset of $500 \mu\text{M}$ cromakalim (center) and at 10 min after washout (right). In a hybrid cell depolarized to $+20\text{mV}$, this current was at a maximum immediately after a voltage step (the N-like current) and decreased progressively thereafter, and the long-lasting current persisted at the end of the 1 sec depolarizing step (the L-like current). Note that $500 \mu\text{M}$ cromakalim reduced reversibly the long-lasting current by $55 \pm 4\%$ ($n=12$), although it had little or no effect on the peak current evoked by any tested command potential.

とともに外向き電流も減少した。この一過性 Ca^{2+} 内向き電流に対するクロマカリンの抑制作用は図3からプロットした電流-電圧関係曲線から判断すると、ステップパルスを加えたすべての膜電位 ($-60 \sim -10 \text{mV}$) において認められ、その作用は可逆的であった (文献8の図1参照)。また、この作用は用量依存性であり、half inhibition concentration (IC_{50}) は $103 \pm 4 \mu\text{M}$ ($n=4$) であった。

2. L型, N型 Ca^{2+} 電流に対する作用

NG108-15細胞では 50mM BaCl_2 溶液で灌流した状態で細胞に強い脱分極刺激を加えることにより、 Ba^{2+} をイオンキャリアーとする特徴ある高閾値 Ca^{2+} 電流が記録される。雑種細胞

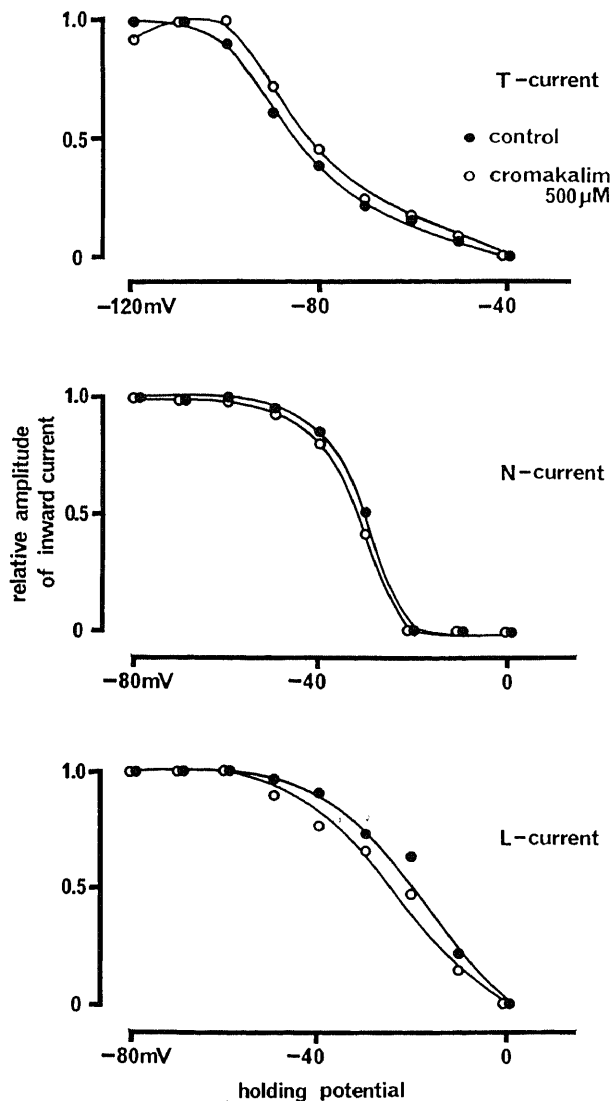


Fig. 5. Normalized steady-state inactivation curves for 3 components of Ca^{2+} currents constructed in the absence of cromakalim (●) and at 7~10 min after the onset of $500 \mu\text{M}$ cromakalim (○). The graph shows T-like Ca^{2+} currents (upper), N-like (middle) or L-like (lower) Ba^{2+} currents. Steady-state inactivation curves obtained by measuring Ca^{2+} and Ba^{2+} currents at constant command potentials (-40mV and 0mV) from different holding potentials ($n=3$, each) were normalized. Note that the curves in the absence and presence of cromakalim were almost identical.

の膜電位を -80mV に保持した状態から $-20 \sim +40 \text{mV}$ 付近へ脱分極刺激を加えた際に、図4に示すように立ち上がりの速い一過性の内向きトランジェント (N型) 電流が流れ、引きつづきこれが速やかに不活性化され1秒後には持続性の (L型) 電流のみが残された。不活性化の程度は細胞間でかなり異なったが1秒後には上記の一過性の内向き N型電流の $58 \pm 5\%$ ($n=25$) にまで不活性化した。

クロマカリン $500 \mu\text{M}$ 投与により、1秒刺激の最後の振幅でみる持続性の L型電流は可逆的にクロマカリン投与前の $55 \pm 4\%$ ($n=12$) 減少したが、一過性の N型ピーク電流はほとんどもしくは全く抑制されなかった (図4)。図4や文献8の図2のように -80mV の膜電位から各膜電位に各々1秒間の脱分極刺激を加えた際の L型および N型電流からプロットした電流-電圧関係曲線から判断すると、L型電流に対するクロマカリンの抑制作用は刺激電圧依存性で最大抑制は $0 \sim +40 \text{mV}$ に脱分極した際に得られ、その作用は用量依存性であり IC_{50} は 102

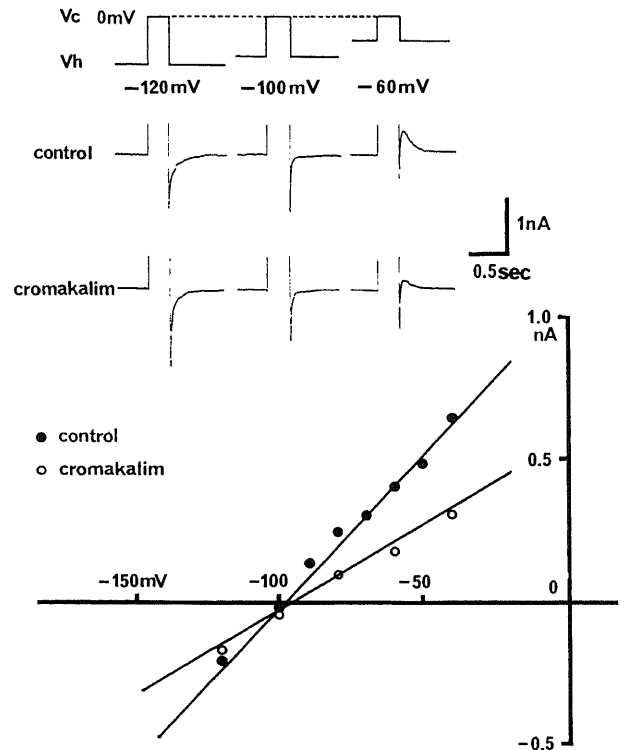


Fig. 6. Effects of cromakalim on outward tail currents evoked at the cessation of a 0.3 sec depolarizing voltage step to 0mV (V_c) from various holding potentials (V_h). Outward tail currents were obtained in the absence of cromakalim (2nd row) and at 7~10 min after the onset of $500 \mu\text{M}$ cromakalim (3rd row) under the same conditions as in Fig. 3. The depolarizing pre-pulse induced an inward Ca^{2+} current followed by an outward current. These currents were higher than could be measured on the amplification setting scale. Note that $500 \mu\text{M}$ cromakalim suppressed by $45 \pm 6\%$ ($n=10$) the peak amplitude of the outward tail current. The lower graph shows the relationship between the peak amplitudes of the outward tail currents and the post-pulse potentials. These currents reversed at post-pulse potentials of about -90mV before (●) and -85mV during (○) the addition of $500 \mu\text{M}$ cromakalim. Note that cromakalim did not alter the reversal potential.

± 5 μM (n=4) であった。一方、N 型電流は -30~+50mV の範囲のいかなる刺激電圧を加えてもクロマカリンでは抑制されなかった。

3. Ca^{2+} 電流に対する作用動態についての検討

さらに、NG108-15 細胞の 3 種類の膜電位依存性 Ca^{2+} 電流の steady-state 不活性化動態を調べた。各々異なる膜電位から T 型電流では -40mV へ脱分極刺激を加えた際の Ca^{2+} 電流を、N 型および L 型電流では 0mV へ脱分極刺激を加えた際の Ba^{2+} 電流を測定した (各々 n=3)。500 μM クロマカリンによる T 型電流の抑制は固定膜電位が -70mV より負にある状態では明らかとなり、L 型電流の抑制は -10mV より負で明らかとなった (文献 8 の図 3 参照)。一方、N 型電流の不活性化曲線はクロマカリン投与によって変化しなかった。ところが、各々求めた不活性化曲線を標準化したところ、図 5 に示すように不活

性化曲線はクロマカリンの有無によりほとんど変化しなかった。このことは、クロマカリンは T 型および L 型電流のカイネティクスを変えずに最大振幅のみを減らすように抑制していることを示唆する。

III. Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流に及ぼす影響

脱分極刺激を止めると、それまで流れていた外向き電流がいったん途切れ、一瞬のアーチファクト電流ののち、ふたたび外向き電流が流れる。後者の外向き電流がテールカレントと呼ばれ、これには速く現れ速く減衰する成分 (fast) とゆっくり減衰する成分 (slow) がある。各々 Big K^{+} および Small K^{+} と呼ばれる 2 種類の Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流により形成されていることが判明している (文献 9 の図 2 参照)。

図 6 に各固定膜電位から 0mV への脱分極刺激を 0.3 秒で中止した後に発生するテールカレントのピーク値をグラフで示

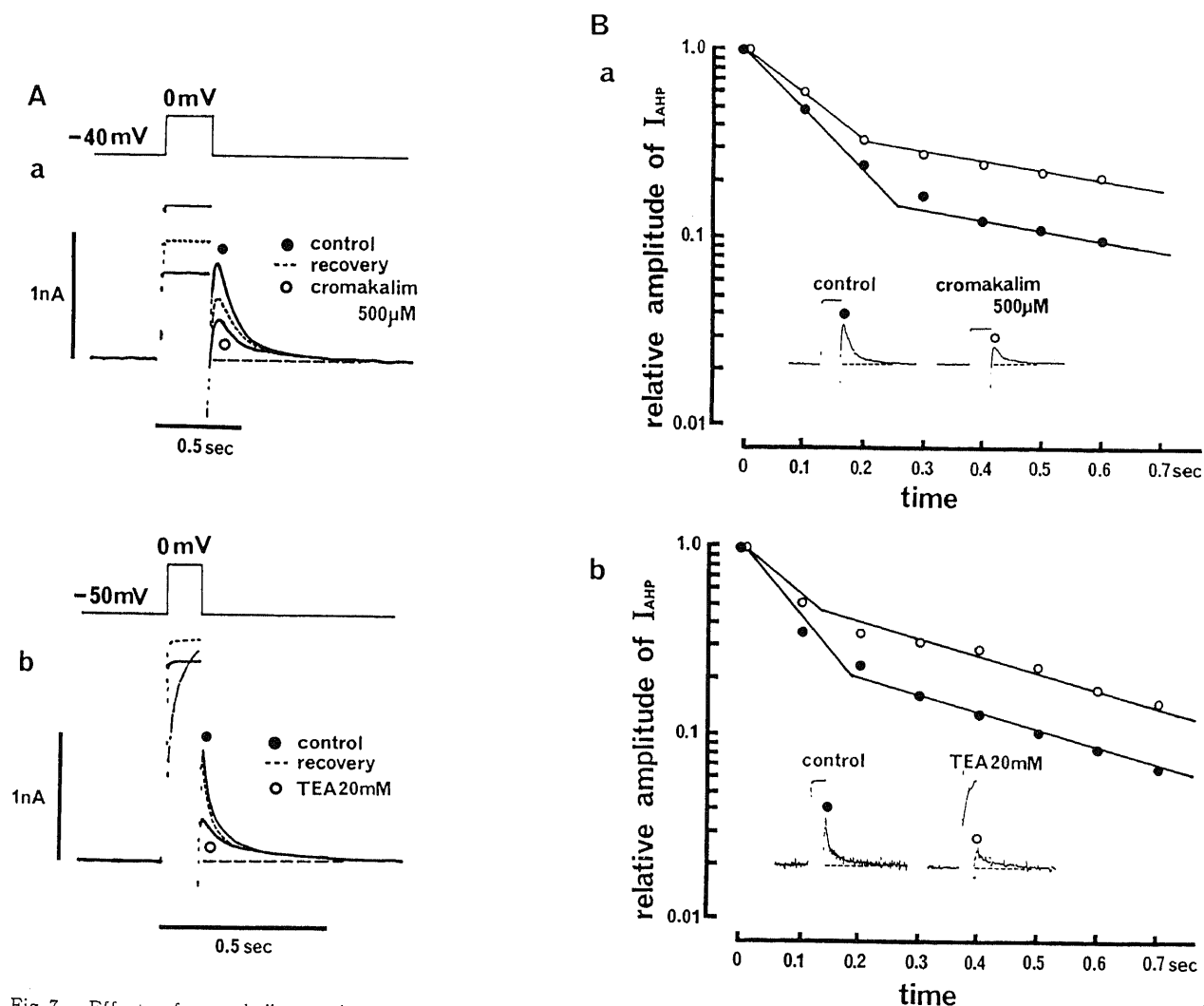


Fig. 7. Effects of cromakalim on the two components of the outward tail current. NG108-15 hybrid cells possess two types of Ca^{2+} activated tail currents: the fast component which is inhibited selectively by TEA and the slow component which is inhibited by dTC or apamin. A: outward tail currents evoked at the cessation of a 0.3 sec (a) or a 0.1 sec (b) depolarizing pre-pulse to 0mV from holding potential of -40mV (a) or -50mV (b), as indicated by the upward rectangular deflections, before (●) and at 10 min after (○) the onset of 500 μM cromakalim (a) or 20mM TEA (b). Cells in (a) and (b) were different. B: semilog plot of the decay of the outward tail current in the presence (○) and absence (●) of 500 μM cromakalim (a) or 20mM TEA (b). Data points represent the relative amplitudes of the outward tail current measured in A. The fast component of the tail current, which was inhibited by 20mM TEA, was also suppressed by 500 μM cromakalim. The slow component remained unchanged.

す。テールカレントはクロマカリン 500 μ M 投与により45 \pm 6% (n=10) 抑制された。しかし、この電流が K^+ イオンの透過性によることを示す反転電位はほとんど変化しなかった(クロマカリン投与前 90 \pm 5mV, クロマカリン投与後 85 \pm 5mV)。さらに、テールカレントに対する抑制作用について、クロマカリンと TEA とを比較した(図7)。図7A に示すように、500 μ M クロマカリン(a)や20mM TEA(b)ではテールカレントの速い成分は抑制され、遅い成分は残った。図7B に不活性化の時間経過を示す。速い成分の不活性化は遅延化したが遅い成分の不活性化は影響されなかった。また、この作用は薬剤の投与中止により可逆的に元に戻った。

考 察

I. NG108-15 細胞の特徴：イオンチャネルの特異的発現

ニューロblastoma (神経芽細胞腫) C1300 は、1940年に米国ジャクソン研究所の A/J マウス腹腔内に発見された原発性の交感神経節の腫瘍である^{10)~12)}。この腫瘍細胞は生体内(マウス \rightarrow マウス)の移植により維持され、1968年に組織培養に移され長い突起¹⁰⁾¹¹⁾と興奮性の膜¹²⁾¹³⁾をもつなどの神経細胞様の性質を有することが明らかとなった。さらにこの細胞はコリンアセチルトランスフェラーゼやタイロシンヒドロキシラーゼ活性を有する点¹⁴⁾¹⁵⁾から、生化学的にも神経細胞機能を備えていることが示され、神経機能研究のモデルとして広く用いられるようになった。これらの培養細胞神経伝達物質合成酵素活性の面からコリン性、アドレナリン性、セロトニン性、無活性型などのクローン細胞¹⁰⁾¹¹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾が確立された。

その後、米国 NIH の Nirenberg 研究室では、ニューロblastoma N18¹⁷⁾のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を欠く変異株 N18TG-2 (チオグアニン抵抗性)細胞¹⁸⁾と他の種々の細胞をセンダイウイルスを利用して細胞融合した雑種細胞を作りだし、神経機能発現の遺伝的解析に使用した¹³⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。今回、著者が用いた培養神経腫瘍細胞 NG108-15 はその中の1つであり、N18TG-2細胞とラット・グリオーマ C6BU-1 (チミジンキナーゼ欠損、プロモデオキシウリジン抵抗株)²⁰⁾との雑種細胞である。この細胞は両親細胞由来のマウスとラット両方の染色体約142本を有し約4倍体であるためか、何代もの継代培養中その生理的、薬理的諸性質が比較的安定して発現していることから²¹⁾、シナプス形成の様な細胞間認識過程や神経活動の分子レベルでの解析などの研究にすぐれた材料として注目されている。

NG108-15 細胞は未分化な状態ですでにアセチルコリン、セロトニン、ドーパミン、ブラジキニン、プロスタグランジンなどに反応し、それらの反応は細胞が発現している各々の受容体によって媒介されていると考えられている^{22)~25)}。この細胞が持つとされる受容体にはムスカリン性アセチルコリン m4 タイプ²²⁾²³⁾、アドレナリン性 α_2 タイプ、セロトニン 5HT₃ タイプ、オピオイド δ 受容体、ドーパミン、ブラジキニン²⁴⁾、アンジオテンシン II、ニューロテンシン、ソマトスタチン、セクレチン、E₂, F₂ α , D₂, E₁, I₂ などのプロスタグランジン類の受容体、アデノシン、ATP、エンドセリン²⁵⁾ 受容体などがある。さらに、この細胞はこれらの受容体のみならず、分化を誘導することによって、Na⁺ チャネル、T 型・L 型・N 型膜電位依存性 Ca²⁺ チャネル²⁶⁾、遅延整流型 K⁺ チャネル、膜電位依存性 M 型 K⁺ チャネル、f 型・s 型 Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネル、カチオン

クチャネルなどの多くのイオンチャネルを発現してくることも知られている²⁶⁾。

II. クロマカリンと ATP 依存性 K⁺ チャネル

現在までに、K⁺ チャネルには上記のものも含め多くの種類が発見されており⁹⁾、K⁺ チャネルオプナーとしてクロマカリンがどのタイプの K⁺ チャネルに作用するかについて以下に示すような種々の検討がなされてきた。以前より経口血糖降下剤として知られているグリベンクラミドが摘出血管標本においてクロマカリンの血管平滑筋弛緩作用や⁸⁶Rb⁺ 流出作用を阻害することが報告され²⁷⁾²⁸⁾、また実際に生体においても正常血圧ラットでグリベンクラミドがクロマカリンの降圧作用を抑制することが示された²⁹⁾。グリベンクラミドは β 細胞や心筋細胞において ATP 依存性 K⁺ チャネルを抑制することが既に知られており³⁰⁾³¹⁾、クロマカリンが ATP 依存性 K⁺ チャネルに作用する可能性が強く示唆された。さらに、Escande ら³²⁾は心筋細胞においてインサイドアウトパッチクランプ法を用いたシングルチャネル電流の記録によって、クロマカリンが ATP 依存性 K⁺ チャネルの開口時間を延長させることを直接的に証明し、また Standen ら³³⁾も家兎腸間膜動脈において同様にクロマカリンが ATP 依存性 K⁺ チャネルを開きさせることを報告し、クロマカリンの主な作用部位は ATP 依存性 K⁺ チャネルであると考えてよいであろう。

ところが最近 K⁺ チャネルへの作用に加えてクロマカリンが Ca²⁺ チャネルの内向き電流を抑制することがラット門脈平滑筋において報告され³⁴⁾、Ca²⁺ チャネルへのクロマカリンの作用も注目されはじめている。しかしながら、平滑筋細胞は一般に ATP 依存性 K⁺ チャネルを持っており、Ca²⁺ チャネルへのクロマカリンの作用が K⁺ チャネルの開口による2次的変化である可能性も否定できない。すなわち、K⁺ チャネルの開口が細胞の電気的活動性を変え機械的な弛緩を引き起こす機序として、K⁺ チャネルの開口により膜電位が K⁺ の平衡電位へと移行することによって膜電位依存性 Ca²⁺ チャネルが2次的に抑制され細胞内 Ca²⁺ 濃度が低下し筋弛緩作用が発現する可能性も考えられる。またそのほかにも膜の過分極が Na⁺/Ca²⁺ 交換系を刺激したり³⁵⁾、受容体を介して細胞内 Ca²⁺ ストアへの Ca²⁺ 貯蔵を阻害する³⁶⁾などの機序もあると考えられており、これらに関してはなお一層の解明が必要である。

しかし、今回著者が用いた培養神経腫瘍細胞 NG108-15 には現在まで ATP 依存性 K⁺ チャネルの存在が確認されておらず、一般にこのチャネルを欠如した細胞と考えられている。したがって NG108-15 細胞を用いることによって、ATP 依存性 K⁺ チャネルを介さないそれ以外のクロマカリンの作用機序について検討することが可能である。実際、今回の実験でクロマカリンが NG108-15 細胞の膜電位を過分極させず(図1)、また活動電位後過分極を形成する K⁺ の外向キテールカレントはむしろ抑制されており(図6)、NG108-15 細胞には ATP 依存性 K⁺ チャネルを含めクロマカリンによって活性化される K⁺ チャネルは存在しないと考えられる。しかしそれにもかかわらず、Ca²⁺ の活動電位はクロマカリンによって著明に抑制されており(図1)、クロマカリンが K⁺ チャネルを介することなく直接的に Ca²⁺ チャネルに作用する薬物である可能性が本研究において強く示唆される。そこで、さらにどの種類の膜電位依存性 Ca²⁺ チャネルに作用するかを詳細に検討した。

III. Ca²⁺ チャネルの種類とクロマカリン作用

膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルは、骨格筋、心筋、平滑筋、などの筋肉や神経細胞などに広く分布し⁹⁾、細胞膜を通して Ca^{2+} の流入を調節し筋収縮や神経伝達物質の放出に直接関与している⁹⁾。膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルは、細胞の静止膜電位が脱分極することにより活性化するチャネルであり、Tsien ら³⁷⁾ は電気生理学的、薬理学的に Ca^{2+} チャネルを T 型、L 型および N 型の 3 型に分類した。T 型チャネルは低閾値で活性化し(活性化電位は -70mV 以上)、速やかに不活性化するので、小さな脱分極によってまず最初に開口し、血管平滑筋の収縮反応³⁸⁾ や副腎球状層細胞³⁹⁾ からのホルモン分泌反応などの最初の段階に直接関与していると考えられている。しかし、T 型チャネルは Ca^{2+} のパルスの流入を惹起するので細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響は比較的少ない。T 型チャネルには低濃度で特異的に作用する薬物はまだ発見されていないが、その電気生理学的特徴から他の型と容易に識別できる。現在までに知られているやや特異的に T 型チャネルに作用する薬剤としては、ジフェニルヒダントイン⁴⁰⁾、オクタノール (Octanol)⁴¹⁾、アミロライド (Amiloride)⁴²⁾ がある。L 型チャネルは、閾値電流が高いチャネルで(活性化電位は -10mV 以上)、不活性化が非常に遅く、 Ba^{2+} に対するイオン選択性が高くしたがって大きな Ba^{2+} 電流を運ぶことができる(スローコンダクタンス, 25pS)³⁷⁾。L 型チャネルの不活性化は遅いので、このチャネルは持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を必要とする反応に関係すると考えられ⁹⁾、心筋の収縮反応や未分化な副腎髄質細胞 (PC-12) からのノルエピネフリン放出などのホルモン分泌に関与している⁴³⁾。L 型チャネルのみに低濃度で選択的に作用する薬剤にジヒドロピリジン (dihydropyridin, DHP) 系の Ca^{2+} チャネル阻害薬があり⁴⁴⁾、L 型チャネルの α_1 サブユニットが DHP の結合部位と考えられている⁴⁵⁾。N 型チャネルも高閾値(活性化電位は -20mV 以上)のチャネルであるが、L 型と異なるのは不活性化の速度が速いこととされている³⁷⁾。T 型および L 型チャネルは神経細胞を含め血管平滑筋、心筋細胞など多くの組織の細胞に見出されているが、N 型チャネルは神経細胞でのみその存在が確認されている⁹⁾。アンボイナ貝 (Conus geographus) の毒素である ω -コントキシン (ω -conotoxin)⁴⁶⁾ はある種の動物神経細胞の N 型チャネルを不可逆的に強く阻害する⁴⁶⁾。McFadzean ら⁴⁷⁾ によれば NG108-15 細胞ではアセチルコリンが選択的にこのチャネルを阻害することが示されている。今回の実験でも、 Ba^{2+} をキャリアーとしてパッチクランプ法で測定した Ba^{2+} のピーク電流は同様にアセチルコリンによって選択的に抑制を受けており、このピーク電流が N 型であることは確実である。N 型チャネルの生理的意義としてはこのチャネルは ω -コントキシンに感受性を有し DHP では阻害されないことから、シナプスにおける伝達物質放出(たとえば交感神経系ニューロンからのノルエピネフリン放出)に主要な役割を果たしていると考えられている⁵⁰⁾。これらの膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルのうち、これまでに単離精製されてその構造について解析がなされたのは骨格筋の T 管膜に存在する L 型チャネルのみであり⁵¹⁾、T 型および N 型チャネルについてはまだチャネルタンパク質の同定すら行なわれていない状態で、今現在、これらのチャネル研究は急速に進歩しつつある分野である。

本研究により、NG108-15 細胞においてクロマカリンは T 型および L 型 Ca^{2+} 電流を抑制するが、N 型電流を抑制しないことが新たに明らかとなった。この結果はクロマカリンの作用が

非常に選択的であることを示しており、このことからクロマカリンが膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルに直接作用する可能性が示唆される。ラット門脈における検討でクロマカリンが Ca^{2+} の内向き電流 (L 型) を抑制するという報告³⁴⁾ もあわせて考えると、クロマカリンは K^{+} チャネルのみではなく膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルをも標的としていることは間違いないものと思われる。

また、3 種類の Ca^{2+} 電流の不活性化曲線を標準化したところ、クロマカリンの有無で不活性化曲線は変化しなかった (図 5)。このことはクロマカリンが 3 種類の Ca^{2+} 電流の時間依存性および膜電位依存性のある不活性化のカイネティクスには影響を及ぼさないことを意味している。

IV. K^{+} チャネルに対するクロマカリン間接作用

外向キテールカレントは、時定数的に速い成分と遅い成分とに分けられる。このうち、速い成分は TEA により容易に抑制されるが遅い成分は TEA では抑制されずに残り (図 7)⁵²⁾、 $1\ \mu\text{M}$ 以下の少量のハチ毒のアバミン⁵³⁾ や $200\ \mu\text{M}$ 程度のクラレ⁵⁴⁾ によって抑制される。このテールカレントの遅い成分は細胞外液に加えたカドミウムで抑制され、 -80mV で極性が反転するので Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流と考えられている⁹⁾。また速い成分も TEA 感受性を有するので Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流と考えられているが⁵²⁾、この成分がクロマカリンにより特異的に抑制されることが今回示されたわけであり、この事実はクロマカリンにより細胞内への Ca^{2+} 流入が実際に減少したことを示唆している。

これまでの血管平滑筋における検討では $10\ \mu\text{M}$ 程度のクロマカリンによって K^{+} 電流が著明に増強され⁹⁾、また実際に $6\ \mu\text{M}$ のクロマカリンによって血管平滑筋弛緩作用が現れているが⁹⁾、この濃度に比して今回の著者の研究では $100\sim 500\ \mu\text{M}$ と非常に高濃度のクロマカリンが Ca^{2+} 電流の抑制の発現に必要であった。しかし、その IC_{50} は海馬神経における遅延整流電流に関する検討⁵⁵⁾ とほぼ同程度であり、おそらく神経系の細胞では血管平滑筋細胞などに比べてクロマカリンに対する感受性が低いと思われる。一方、Arch ら⁵⁶⁾ はモルモットにおいてプロスタグランジン E_2 、セロトニンおよびヒスタミンによる気管平滑筋収縮をクロマカリンが抑制することを確かめておりその IC_{50} は血管平滑筋での値とほぼ同程度であり、今後、クロマカリンは降圧薬としての使用ばかりでなく気管支拡張薬として利用される可能性もある。以上のような臓器特異性のみならず、クロマカリンの作用には血管による特異性の違いがあり、Benjamin ら⁵⁷⁾ は正常成人男性上肢での検討でクロマカリンは静脈よりも抵抗血管において著しい血管拡張作用を有することを報告している。また Nakao ら⁹⁾ はモルモットの腸間膜においてクロマカリンは動脈より静脈でより強力に持続性の膜電位の過分極作用を有すると報告している。

今回、著者は、主に ATP 依存性 K^{+} チャネル以外の K^{+} チャネルおよび膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルに対するクロマカリンの作用を検討したが、さらにより詳細な検討を行うことにより、その他のチャネルに対する作用も明らかとなるかもしれない。実際、Okabe ら³⁴⁾ によってクロマカリンは Na^{+} チャネルなどにもある程度の作用を及ぼす可能性が報告されている。クロマカリンは、臨床的には先にも述べたように末梢血管弛緩作用を有する降圧薬としてのみならず、心血管に働く狭心症治療薬、気管支に作用する喘息治療薬として、また心筋細胞に働く

不整脈治療薬として注目されているが、さらには神経系作動薬としてのクロマカリンの広い臨床応用への道が開拓されつつある。さらに、基礎研究においても、薬理学的に膜電位依存性 Ca^{2+} 電流を分離識別する1つの手段として、日々進歩するイオンチャネル研究にクロマカリンは大いに活用されると期待される。

結 論

K^+ チャネルオプナーとして知られる新しい種類の降圧薬であるクロマカリンの K^+ チャネルおよび Ca^{2+} チャネルに対する作用を培養神経腫瘍 NG108-15 細胞を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 500 μ M クロマカリンにより膜電位は過分極せず、NG108-15 細胞にはクロマカリン感受性の K^+ チャネルは存在しないと考えられた。一方、 Ca^{2+} の活動電位の最大振幅はクロマカリンによって47%減少し、その作用は可逆的であった。

2. 500 μ M クロマカリンにより3種類の膜電位依存性 Ca^{2+} 電流のうちT型電流は42%抑制され、L型電流も55%抑制されたが、N型電流はほとんど影響されなかった。T型とL型電流に対するクロマカリンの抑制作用は用量依存性で、 IC_{50} は各々 103 μ M, 102 μ M とほぼ等しかった。これらの作用は速やかに現れ、また可逆的であった。

3. 500 μ M クロマカリンによって K^+ の外向きテールカレントの速い成分のみが可逆的に45%抑制された。これはクロマカリンの Ca^{2+} チャネル抑制作用によって2次的にもたらされたと考えられた。

4. NG108-15 細胞において膜電位依存性 Ca^{2+} 電流に対するクロマカリンの作用は非常に選択的であり、クロマカリンが K^+ チャネルのみではなく膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルにも直接作用することが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただきました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導を頂きました金沢大学神経情報研究施設神経物性部門の東田博陽教授に心から感謝致します。また多大なる御協力を頂いた金沢大学医学部第二内科学教室並びに金沢大学神経情報研究施設神経物性部門の皆様に深謝致します。この研究の一部は医学部特別設備「総合核酸検査システム」の機器を使用し、また松原三郎記念精神医学育成基金の補助があった。

文 献

- 1) Hamilton, T. C. & Weston, A. H.: Cromakalim, nicorandil and pinacidil; novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmacol.*, **20**, 1-9 (1989).
- 2) Hamilton, T. C., Weir, S. W. & Weston, A. H.: Comparison of the effects of BRL34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **88**, 103-111 (1986).
- 3) Quast, U.: Effect of the K^+ efflux stimulating vasodilator BRL34915 on $^{86}Rb^+$ efflux and spontaneous activity in guinea-pig portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **91**, 569-578 (1987).
- 4) Nakao, K., Okabe, K., Kitamura, K., Kuriyama, H. & Weston, A. H.: Characteristics of cromakalim-induced relaxations in the smooth muscle cells of guinea-pig

mesenteric artery and vein. *Br. J. Pharmacol.*, **95**, 795-804 (1988).

- 5) Fox, A. P., Nowycky, M. C. & Tsien, R. W.: Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J. Physiol.*, **394**, 149-172 (1987).
- 6) Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R. & Fox, A. P.: Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.*, **11**, 431-438 (1988).
- 7) Docherty, R. J. & McFadzean, I.: Noradrenaline-induced inhibition of voltage-sensitive calcium currents in NG108-15 hybrid cells. *Eur. J. Neurosci.*, **1**, 132-140 (1989).
- 8) Ito, Y., Miyamori, I., Matsubara, T., Takeda, R. & Higashida, H.: Cromakalim, a vasodilator, differentially inhibits Ca^{2+} currents in NG108-15 neuroblastoma \times glioma hybrid cells. *FEBS Lett.*, **262**, 313-316 (1990).
- 9) Brown, D. A. & Higashida, H.: Voltage- and calcium-activated potassium currents in mouse neuroblastoma \times rat glioma hybrid cells. *J. Physiol.*, **397**, 149-165 (1988).
- 10) Augusti-Tocco, G. & Sato, G.: Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 311-315 (1969).
- 11) Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C. & Cohn, M.: In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 316-323 (1969).
- 12) Nelson, P., Ruffner, W. & Nirenberg, M.: Neuronal tumor cells with excitable membranes grown in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 1004-1010, (1969).
- 13) Minna, J., Glazer, D. & Nirenberg, M.: Genetic dissection of neuronal properties using somatic cell hybrids. *Nature*, **235**, 225-231 (1972).
- 14) Nelson, P. G.: Nerve and muscle cells in culture. *Physiol. Rev.*, **55**, 1-61 (1975).
- 15) Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J. H., Culp, W. & Brandt, B. L.: Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature*, **249**, 224-227 (1974).
- 16) Narotzky, R. & Bondareff, W.: Biogenic amines in cultured neuroblastoma and astrocytoma cells. *J. Cell Biol.*, **63**, 64-70 (1974).
- 17) Amano, T., Richelson, E. & Nirenberg, M.: Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 258-263 (1972).
- 18) Minna, J. D., Yavelow, J. & Coon, H. G.: Expression of phenotypes in hybrid somatic cells derived from the nervous system. *Genetics (Suppl.)*, **79**, 373-383 (1975).
- 19) Nirenberg, M., Wilson, S., Higashida, H., Rotter, A., Krueger, K., Busis, N., Ray, R., Kenimer, J. G. & Adler, M.: Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. *Science*, **222**, 794-799 (1983).
- 20) Amano, T., Hamprecht, B. & Kemper, W.: High activity of choline acetyltransferase induced in neuroblastoma \times glioma hybrid cells. *Exp. Cell Res.*, **85**, 399-408 (1974).

- 21) **Hamprecht, B.**: Structural, electrophysiological, biochemical and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. *Int. Rev. Cytol.*, **49**, 99-170 (1977).
- 22) **Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. & Numa, S.**: Selective coupling with K^{+} currents of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in NG108-15 cells. *Nature*, **335**, 355-358 (1988).
- 23) **Higashida, H.**: Acetylcholine release by bradykinin, inositol 1,4,5-trisphosphate and phorbol dibutyrate in rodent neuroblastoma cells. *J. Physiol.*, **397**, 209-222 (1988).
- 24) **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).
- 25) **Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. & Masaki, T.**: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415 (1988).
- 26) **Higashida, H., Hashii, M., Fukuda, K., Caulfield, M. P., Numa, S. & Brown, D. A.**: Selective coupling of different muscarinic acetylcholine receptors to neuronal calcium currents in DNA-transfected cells. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **242**, 68-74 (1990).
- 27) **Quast, U. & Cook, N. S.**: Potent inhibitor of the effects of the K^{+} channel opener BRL34915 in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 204 (1988).
- 28) **Winqvist, R. J., Illeaney, L. A. & Baskin, E. P.**: Blockade of the relaxation to BRL34915 (BRL) and minoxidil by glyburide in isolated rat portal veins. *FASEB. J.*, **2**, A786 (1988).
- 29) **Cavero, I., Mondot, S. & Mestre, M.**: Vasorelaxant effects of cromakalim in rats are mediated by glibenclamide-sensitive potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 1261-1268 (1989).
- 30) **Cook, D. L. & Hales, C. N.**: Intracellular ATP directly blocks K^{+} channels in pancreatic B-cells. *Nature*, **311**, 271-273 (1984).
- 31) **Noma, A.**: ATP-regulated K^{+} channels in cardiac muscle. *Nature*, **305**, 147-148 (1983).
- 32) **Escande, D., Thuringer, D., Le Guern, S., Courteix, J., Laville, M. & Cavero, I.**: Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K^{+} channels in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflügers Arch.*, **414**, 669-675 (1989).
- 33) **Standen, N. B., Quayle, J. M., Davies, N. W., Brayden, J. E., Huang, Y. & Nelson, M. T.**: Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^{+} channels in arterial smooth muscle. *Science*, **245**, 177-180 (1989).
- 34) **Okabe, K., Kajioaka, S., Nakao, K., Kitamura, K., Kuriyama, H. & Weston, A. H.**: Actions of cromakalim on ionic currents recorded from single smooth muscle cells of the rat portal vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 832-839 (1990).
- 35) **Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., King, V. F. & Slaughter, R. S.**: Development of inhibitors of sodium, calcium exchange. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **88**, 163-183 (1988).
- 36) **Bray, K. M., Weston, A. H., McHarg, A. D., Newgreen, D. T., Southerton, J. S. & Duty, S.**: Further studies on the actions of the K^{+} -channel openers, cromakalim (BRL34915) and pinacidil, in rabbit aorta. *Pflügers Arch.*, **411**, R202 (1988).
- 37) **Nowycky, M. C., Fox, A. P. & Tsien, R. W.**: Three types neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, **316**, 440-443 (1985).
- 38) **Sturek, M. & Hermsmeyer, K.**: Calcium and sodium channels in spontaneously contracting vascular muscle cells. *Science*, **233**, 475-478 (1986).
- 39) **Cohen, C. J., McCarthy, R. T., Barrett, P. Q. & Rasmussen, H.**: Ca channels in adrenal glomerulosa cells.: K^{+} and angiotensinII increase T-type Ca channel current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2412-2416 (1988).
- 40) **Narahashi, T., Tsunoo, A. & Yoshii, M.**: Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.*, **383**, 231-249 (1987).
- 41) **Yaari, Y., Hamon, B. & Lux, H. D.**: Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*, **235**, 680-682 (1987).
- 42) **Llinas, R. & Yarom, Y.**: Specific blockage of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **12**, 174 (1986).
- 43) **Tang, C. M., Presser, F. & Morad, M.**: Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science*, **240**, 213-215 (1988).
- 44) **Kongsamut, S. & Miller, R. J.**: Nerve growth factor modulates the drug sensitivity of neurotransmitter release from PC-12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2243-2247 (1986).
- 45) **Reuter, H., Porzig, H., Kokubun, S. & Prod'hom, B.**: 1,4-Dihydropyridines as tools in the study of Ca^{2+} channels. *Trends Neurosci.*, **8**, 396-400 (1985).
- 46) **Takahashi, M., Seager, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. X. & Catterall, W. A.**: Subunit structure of dihydropyridin-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5478-5482 (1987).
- 47) **Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Luque, F. A. & Gray, W. R.**: Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry*, **23**, 5087-5088 (1984).
- 48) **Kasai, H., Aosaki, T. & Fukuda, J.**: Presynaptic Ca-antagonist ω -conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci. Res.*, **4**, 228-235 (1987).
- 49) **McFadzean, I., Mullaney, I., Brown, D. A. & Milligan, G.**: Antibodies to the GTP binding protein, G_o , antagonize noradrenalin-induced calcium current inhibition in NG108-15

hybrid cells. *Neuron*, **3**, 177-182 (1989).

50) Hirning, L. D., Fox, A. P., McCleskey, E. W., Olivera, B. M., Thayer, S. A., Miller, R. J. & Tsien, R. W.: Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*, **239**, 57-61 (1988).

51) Curtis, B. M. & Catterall, W. A.: Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, **23**, 2113-2118 (1984).

52) Adams, P. R., Constanti, A., Brown, D. A. & Clark, R. B.: Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current in vertebrate sympathetic neurons. *Nature*, **296**, 746-749 (1982).

53) Hugues, M., Romey, G., Duval, D., Vincent, J. P. & Lazdunski, M.: Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: Voltage-clamp and biochemical characterization of the

toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1308-1312 (1982).

54) Kawai, N. & Watanabe, M.: Blockade of Ca-activated K conductance by apamin in rat sympathetic neurones. *Br. J. Pharmacol.*, **87**, 225-232 (1986).

55) Politi, D. M. T., Suzuki, S. & Rogawski, M. A.: BRL34915 (cromakalim) enhances voltage-dependent K^+ current in cultured rat hippocampal neurons. *Pflügers Arch.*, **168**, 7-14 (1989).

56) Arch, J. R. S., Buckle, D. R., Bumstead, J., Clarke, G. D., Taylor, J. F. & Taylor, S. G.: Evaluation of the potassium channel activator cromakalim (BRL34915) as a bronchodilator in the guinea-pig: comparison with nifedipin. *Br. J. Pharmacol.*, **95**, 763-770 (1988).

57) Benjamin, D. J. W., Vallance, P. J. T. & Collier, J. G.: BRL34915 is a selective arteriolar dilator in upper limb vessels in man. *Clin. Sci. Abstr.*, **75** (suppl. 19), 46 (1988).

Effects of cromakalim (K^+ channel opener) on Ca^{2+} and K^+ channels: electrophysiological study in NG108-15 cells Yuji Ito, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **101**, 46—56 (1992)

Key words Cromakalim, Ca^{2+} inward current, T-type, L-type, NG108-15 cell

Abstract

Cromakalim is a novel class of antihypertensive drugs which cause relaxation in smooth muscle preparations. The principal site of action of cromakalim is thought to be ATP-sensitive K^+ channels. In addition, it has recently been reported that cromakalim has a direct effect on inward Ca^{2+} currents. NG108-15 neuroblastoma × glioma hybrid cells have been reported to possess two types of Ca^{2+} (T- and L-like) currents. A rapidly inactivating (N-like) component of the high-threshold Ca^{2+} current was recently found in NG108-15 cells. Therefore, it is worth examining to find out to which species of Ca^{2+} currents cromakalim is sensitive in NG108-15 cells. In this report, the author examined the effects of cromakalim on 3 classes of Ca^{2+} currents and several K^+ currents in NG108-15 cells. Extracellular perfusion with 500 μM cromakalim produced an inhibition of 22~66% in the low-threshold transient Ca^{2+} (T-like) current in NG108-15 hybrid cells. Cromakalim suppressed the high-threshold and long-lasting Ba^{2+} current (L-like Ca^{2+} current) by 29~73%, but had almost no effect on the high-threshold and inactivating Ba^{2+} current (N-like Ca^{2+} current). IC_{50} for T-like and L-like currents was the same at about 100 μM . The inhibitory effect of 500 μM cromakalim on Ca^{2+} currents resulted in depolarization of the membrane potential, and decrease of the peak amplitude of Ca^{2+} action potentials down to $47 \pm 6\%$ ($n=8$) of the control level before cromakalim. Furthermore, the tail K^+ outward current, namely the fast component of afterhyperpolarization currents, was also suppressed by 500 μM cromakalim ($45 \pm 6\%$, $n=10$). The results clearly indicate that cromakalim inhibited T- and L-like Ca^{2+} currents of NG108-15 cells. Cromakalim did not inhibit the N-like Ca^{2+} current. The present study demonstrates that cromakalim may act directly on different Ca^{2+} channel molecules rather than having a non-specific action. The results further suggest that inactivation of the Ca^{2+} entry through the L- and T-type channels may also contribute to a cromakalim-induced relaxation of vascular tissues.