Epinephrine 刺激による灌流ラット脂肪細胞の Glycerol および cAMP 放出動態

兵庫医科大学中央臨床検査部

(主任: 松岡 瑛教授)

川 室 厚 子, 高 嶋 隼 二, 松 岡 瑛

The Dynamics of Glycerol and cAMP Release from Perifused Isolated Rat Fat Cells with Epinephrine Stimulation

**Atsuko KAWAMURO, Shunji TAKASHIMA
and Akira MATSUOKA**

Department of Clinical Pathology and Clinical Laboratory,
Hyogo College of Medicine,
Nishinomiya, Japan

We investigated the role of Ca^{++} and 3', 5'-cyclic AMP (cAMP) in epinephrine-induced lipolysis in rat fat cells using the fat cell perfusion system with several agents which have some influence on calcium transport. This perfusion system was of great advantage for observing minute-to-minute changes in glycerol and cAMP release from fat cells and the relationship between them.

Isolated fat cells were prepared from the epididymal adipose tissue of male Wistar strain rats by the method of Rodbell. Packed fat cells were placed in a plastic column (0.4 by 13.5cm) maintained at 37°C. Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing 1% (W/V) bovine serum albumin, 2mM glucose and 1.27mM Ca^{++} was used as the basal perfusion medium, and epinephrine, verapamil, lidocaine or 2, 4-dinitrophenol were added when necessary. The flow rate of the perfusion medium was 0.5 ml per min, and the perfusate collected every 2 min from the bottom of the column was assayed for glycerol and cAMP.

Fat cells were perfused for a 10-min equilibrium period, and over the next 10-min period several samples were taken for determination of basal rates of lipolysis. The infusion of 10^{-5}M epinephrine induced the plateau of glycerol release in 20 min by 41.8 n moles/2 min/100 mgTG, and its level was maintained. On the other hand, the level of cAMP release reached the maximal value of 110 f moles/2 min/100 mgTG in 10 min and decreased gradually. Omission of epinephrine from the perfusion medium made lipolysis return rapidly to the basal level.

The increase of Ca^{++} concentration from 0 to 1.27 mM was enhanced by 38% in epinephrine-induced lipolysis; however, there was no change in cAMP release. The addition

of verapamil, a potent Ca^{++} antagonist, caused epinephrine-induced glycerol release to decrease, and moreover the 30-min verapamil pretreatment strongly inhibited epinephrine-induced lipolysis, but there was no effect on cAMP release. Lidocaine, a local anaesthetic, inhibited epinephrine-induced glycerol release, though it further elevated the cAMP release. 2, 4-Dinitrophenol, an oxidative phosphorylation inhibitor, completely blocked epinephrine-induced glycerol and cAMP release.

These data suggest that it isn't necessary to maintain a high level of intracellular cAMP in order to induce lipolysis, and that calcium ion plays an important role after cAMP production in lipolysis.

緒 言

近年, epinephrine の脂肪分解作用機序における second messenger として cAMP³⁾²⁰⁾ 以外にも cGMP, Ca^{++} ¹⁶⁾²⁰⁾ などが注目されている。Epinephrine と同様に強い脂肪分解作用を示す ACTH の場合には Ca^{++} の存在が必要であることが知られている¹¹⁾¹³⁾。しかしながら, epinephrine の脂肪分解に関与する Ca^{++} の役割は, 未だ完全に明らかにされていない。

著者らは酸化的磷酸化の uncoupler である 2,4-dinitrophenol (DNP)⁷⁾, 脂肪膜を介してのカチオン輸送に影響を与える lidocaine¹²⁾¹⁹⁾²⁰⁾, および Ca^{++} の細胞内への取り込みを阻害する verapamil²⁾⁴⁾¹⁴⁾ を用い, epinephrine 刺激によるラット単離脂肪細胞の glycerol および cAMP 放出動態について検討をした。特に放出量の経時の変化を明らかにするため, 脂肪細胞灌流法¹⁾¹⁰⁾を採用した。Glycerol および cAMP 放出動態から epinephrine の脂肪分解作用を cAMP とカチオン, 特に Ca^{++} との関連において考察した。

実験材料と方法

1 試薬

- 1) L-Epinephrine, Collagenase (Type II) (Sigma Chemical, Co., U.S.A.)
- 2) D-Glucose, Calcium chloride, 2,4-Dinitrophenol (DNP), Disodium ethylenediamine-tetraacetate (EDTA) (試薬特級, 和光純薬工業)
- 3) Bovine serum albumin (BSA, Fraction V) (Armour Pharmaceutical Co., U.S.A.)
- 4) Lidocaine hydrochloride (藤沢薬品工業)
- 5) Verapamil hydrochloride (エーザイ)

2 遊離脂肪細胞の調製

体重約200 g の Wistar 系雄性ラット (日本クレア) を用い, Rodbell の方法¹⁷⁾に従い副腎丸脂肪組織より collagenase 処理 (20mg/10ml, 37°C, 30~45分, 振盪保温) し, 遊離脂肪細胞を調製した。

3 基本 medium

2 mM glucose を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer (以下 KRBB と略す) に混合ガス (O_2 : CO_2 , 95 : 5, v/v) を通気して pH7.4 に調整後, 1 % になるように BSA を添加し, 基本medium を作製した。また, medium の Ca^{++} 濃度は通常 1.27mM とし, 必要に応じて KRBB 作製時に CaCl_2 を除いて Ca^{++} -free medium を作製した。灌流には基本 medium に epinephrine, DNP, verapamil, lidocaine を添加して用いた。

4 脂肪細胞灌流法

灌流方法は基本的には Katocs らの方法¹⁰⁾に従った。灌流時, chamber 内上層部の脂肪細胞層内へ, 先端を閉鎖したポリエチレンチューブをさし込み, その側部に多数の小孔をあけ, 灌流液がシャワー状に噴出するようにした。この灌流液の対流により脂肪細胞が流出する事なく, chamber 内でゆるやかに混和されるようにした。

調製した脂肪細胞の浮遊液(約620mgTG/ml, 0.5ml)を incubation chamber (内径4mm, 長さ13.5cm)に入れ, 37℃の恒温槽に垂直に孵置した。Perstaltic pump を用い0.5ml/minの流速で灌流し, incubation chamber より流出する灌流液を2分毎に分取した(Fig. 1)。採取した灌流液はcAMP, glycerol の測定まで-20℃で凍結保存した。すべての灌流実験において基本mediumによる20分間の前灌流を行なった。10~20分間の灌流液中の平均cAMP, glycerol 量を基礎値とした。20分後に各薬物を含有するmediumに切り換え, さらに90分間灌流した。

5 Glycerol, cAMP および triglyceride (TG) 濃度の測定

灌流液中に放出された glycerol は酵素法(グリセロール・中性脂肪テスト, ペーリンガー・マンハイム), cAMP は radioimmunoassay (YAMASA cAMP Assay Kit, ヤマサ醤油)で測定した。灌流実験に用いた脂肪細胞量はアセチルアセトン法(トリグリセライドテスト, 和光純薬工業)で測定した triglyceride 値でもって表示した。Glycerol の放出量は n moles/100mg TG, cAMP 放出量は f moles/100mg TG で表示した。体重200g のラットの場合, 脂肪細胞の平均直径は約60 μ mで, triglyceride 100mg は脂肪細胞約 9.8×10^5 個に相当した。細胞内cAMPはSteinerらの方法²³⁾に従って脂肪細胞を処理した後, YAMASA cAMP Assay Kit を用いて測定した。

Fig. 1. Scheme of fat cells perfusion system.

実験成績

1 Epinephrine 刺激による脂肪細胞からの glycerol と cAMP の放出動態

脂肪細胞を 10^{-5} M epinephrine で灌流した場合, glycerol 放出量は急速に上昇し 20 分後に頂値(41.8 n moles/2min/100mg TG)に達し, 灌流中はほぼ同レベルを維持した。一方, cAMP 放出量は 10分後に頂値(110 f moles/2min/100mg TG)に達した後漸減し, 70分後には基礎値まで低下した。なお, glycerol の基礎放出量は 1.9n moles/2min/100mg TG であった(Fig. 2)。

脂肪細胞を 10^{-5} M epinephrine で刺激した場合の細胞内cAMP濃度は epinephrine 添加後, 細胞外cAMPの放出動態と同様に急速に上昇し, 5分後に頂値(507 ± 108.3 f moles/mg TG)に達した。その後漸減し, 30分後には 337 ± 87.9 f moles/mg TG となった(Fig. 3)。

Fig. 2. Epinephrine-induced glycerol and cAMP release from perfused rat fat cells. Following a basal medium perfusion for 20 min, rat fat cells were perfused with 10^{-5} M epinephrine for 90 min.

Fig. 3. Time course of epinephrine-induced intracellular cAMP accumulation. Fat cells were incubated with 10^{-5} M epinephrine at 37°C . The point at 0 min represents basal level of cAMP. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of the four observations. * $P < 0.05$ vs. basal level

10^{-5} M epinephrine で30分間灌流し、次いで基本 medium に切り換え30分間の灌流後、再び 10^{-5} M epinephrine で灌流した。2 回目の epinephrine 刺激による glycerol 放出量は初回刺激に比べやや高値を示した。一方、cAMP 放出は逆に 1 回目より低値であった (Fig. 4)。

Fig. 4. Changes of glycerol and cAMP release from rat fat cells by two pulse stimulation of epinephrine. Fat cells were initially exposed to 10^{-5} M epinephrine for 30 min. After a buffer wash for 30 min, cells were re-exposed to 10^{-5} M epinephrine for 30 min.

Fig. 5. Effect of step-wise increases in epinephrine concentration on glycerol and cAMP release from perfused fat cells. Fat cells were perfused with 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M epinephrine, and each perfusion time was 30 min.

Fig. 6. Effect of calcium ion on epinephrine-induced glycerol and cAMP release from rat fat cells. Following the perfusion with Ca^{++} depleted medium containing 10^{-5} M epinephrine for 30 min, fat cells were perfused with 1.27mM Ca^{++} added medium.

Fig. 7. Effect of 2, 4-dinitrophenol on epinephrine-induced glycerol and cAMP release from rat fat cells.

Following the perfusion with 10^{-3} M 2, 4-dinitrophenol in addition to 10^{-5} M epinephrine for 30 min, fat cells were perfused only with 10^{-5} M epinephrine.

DNP: 2, 4-dinitrophenol

Epinephrine 濃度を30分間隔で 10^{-7} M, 10^{-6} M および 10^{-5} M と順次高めた場合, glycerol, cAMP の両放出量は epinephrine 濃度に対し用量反応的に増大した (glycerol: 6.6, 31.4, 39.1 n moles/2 min/100mg TG; cAMP: 21, 89, 146 f moles/2min/100mg TG)(Fig. 5)。

2 Epinephrine 刺激による脂肪細胞からの glycerol, cAMP 放出動態に対する Ca^{++} の効果

1 mM EDTA を含む Ca^{++} -free KRBB による20分間の前灌流後, 10^{-5} M epinephrine 刺激による glycerol, cAMP 放出動態を最初の30分間は Ca^{++} -free の条件下で次の30分間は 1.27 mM Ca^{++} 存在下で調べた。 Ca^{++} -free medium に比べ 1.27 mM Ca^{++} 存在下では, epinephrine 刺激による glycerol 放出量は約38%の増加が認められたが, cAMP 放出動態は特に影響を受けなかった (Fig. 6)。

3 Epinephrine 刺激による脂肪細胞からの glycerol と cAMP 放出動態に対する各種薬物の効果

1) DNP の効果

10^{-5} M epinephrine に 10^{-3} M DNP を添加した medium で30分間灌流し, 次いで DNP を含まない epinephrine のみの medium で灌流した (Fig. 7)。DNP の共存する場合, epinephrine 刺激による glycerol 放出動態は10分後に一過性のピーク (15.8 n moles/2min/100mg TG) を示した後強く抑制され, DNP 除去後も十分な回復は認められず, 10^{-5} M epinephrine のみの刺激による場合の約43% であった。同様に cAMP 放出も DNP により強く抑制された。

この cAMP 放出の抑制が cAMP 生成障害によるか否かを明らかにするために脂肪細胞を 10^{-5} M epinephrine 存在下で incubate し, 各時点での細胞内 cAMP 量を測定した。細胞内 cAMP は細胞外への放出 (Fig. 7) と同様に強く抑制された (0分: 108 ± 2.1 , 5分: 86 ± 9.2 , 10分: 98 ± 22.6 , 30分: 48 ± 0 f moles/mg TG)。

2) Lidocaine の効果

10^{-5} M epinephrine と 10^{-2} M lidocaine を添加した medium による30分間の灌流後, lidocaine を除き, 10^{-5} M epinephrine のみを含む medium でさらに30分間灌流した (Fig. 8)。Lidocaine 添加により epinephrine 刺激による glycerol 放出動態は15分後に一過性のピーク (18.3 n moles/2min/100mg TG) を示し, その後抑制された。Lidocaine 除去30分後には 46.3 n moles/2min/100mg TG と glycerol 放出の十分な回復が認められた。一方, cAMP 放出動態は lidocaine 添加により, glycerol のピークに一致して一過性の放出 (212 f moles/2min/100mg TG) が認められ, lidocaine 非添加の場合に比べ, むしろ増大した。

3) Verapamil の効果

最初の30分間, 10^{-5} M epinephrine と 10^{-3} M verapamil を含む medium で灌流し, 次いで 10^{-5} M epinephrine のみを含む medium で灌流した (Fig. 9)。Glycerol 放出動態は10分後に一過性のピーク (44.3 n moles/2min/100mg TG) を示した後, 抑制された。Verapamil 除去により glycerol 放出量は 48.7 n moles/2min/100mg TG まで上昇し, 十分な回復がみられた。一方, cAMP 放出に対しては著明な影響はみられなかった。

次に 10^{-3} M verapamil で30分間の灌流後, 10^{-5} M epinephrine を添加し30分間灌流した。次いで verapamil を除き epinephrine のみで灌流した場合の glycerol と cAMP の両放出動態をしらべた (Fig. 10)。Glycerol 放出は強く抑制され, verapamil を除いても回復の傾向がみられなかった。一方, cAMP 放出動態は epinephrine 添加8分後にピーク (113 f moles/2min/100mg TG) を示し, epinephrine のみによる場合と類似の放出動態を示し, verapamil で抑制されなかった。

Fig. 8. Effect of lidocaine on epinephrine-induced glycerol and cAMP release from rat fat cells.
Following the perfusion with 10^{-2} M lidocaine in addition to 10^{-5} M epinephrine for 30 min, fat cells were perfused only with 10^{-5} M epinephrine.
Lid: lidocaine

Fig. 9. Effect of verapamil on epinephrine-induced glycerol and cAMP release from rat fat cells.
Following the perfusion with 10^{-3} M verapamil in addition to 10^{-5} M epinephrine for 30 min, fat cells were perfused only with 10^{-5} M epinephrine.
Ver: verapamil

Fig. 10. Effect of verapamil pretreatment on epinephrine-induced glycerol and cAMP release from rat fat cells.

Following the perfusion with 10^{-3} M verapamil for 30 min, fat cells were perfused with both 10^{-5} M epinephrine and 10^{-3} M verapamil for 30 min. Over the next 30 min period, they were only exposed to 10^{-5} M epinephrine.

考 察

1973年 Allen ら¹⁾により報告された脂肪細胞灌流法は同一細胞を用い適時条件を変えて生体反応(脂肪分解)の経時変化を観察することが可能であり、また adenosine⁵⁾, free fatty acid⁶⁾などの代謝産物の蓄積による影響を少なくできる等の利点を有している。しかし、脂肪細胞灌流法を用いた報告は epinephrine¹⁾¹⁰⁾, ACTH¹¹⁾など脂肪分解ホルモンによる glycerol 放出のみをみたものがほとんどで、medium 中へ放出された cAMP 量を測定し、両者の関係を論じたものは著者らの知る限りではいまだない。細胞外へ放出された cAMP の意義については十分に解明されていないが、今回の成績では細胞内 cAMP とほぼ同様の経時的変動を示した。すなわち、脂肪細胞よりの cAMP 放出量は epinephrine 刺激により急速に増加し一過性のピークを示した後、漸減するパターンを示し、Siddle ら²⁰⁾の報告や、今回同時に測定した細胞内 cAMP 濃度の経時変化とよく一致していた。従って細胞外への cAMP 放出量は細胞内の変動をよく反映しているものと考えられた。

Epinephrine 刺激による脂肪細胞からの cAMP と glycerol の両放出動態を比較すると cAMP 放出が一過性であるのに対し、glycerol 放出は持続すること、また epinephrine の間けつ刺激における2回目の刺激で cAMP 放出は低下したが glycerol 放出はやや増加したことなど必ずしも両放出動態は平行しなかった。一方、epinephrine 濃度を段階的に高めると、cAMP および glycerol 放出は共に用量反応的に上昇した。これらの結果より、段階刺激でみられる cAMP 放出の増加は細胞膜上の β -adrenergic receptor と epinephrine の結合の増加に伴う adenylyl cyclase の活性化²⁸⁾によるものと推定された。しかし、glycerol 放出の持続に cAMP level の維持が必ずしも必要でないことより、cAMP が脂肪分解系酵素の機能調節の“switch on”の役割²⁸⁾をしているものと思われた。

Siddle ら²¹⁾ も epinephrine 添加後急激に増加する cAMP は, cAMP dependent protein kinase を活性化するには必要以上の量であり, 実際には cAMP のわずかな濃度変化が脂肪分解の速度を調節するのに関与しているらしいと報告している。しかし, わずかな cAMP の増加がどのようにして代謝過程で大きな効果を示すかという点は完全には解明されていない。また, 細胞内 cAMP の存在様式は単一なものではなくコンパートメントに分ける考え方もあり²¹⁾, 必ずしも細胞内総濃度の増加を cAMP 放出が反映していない可能性も考慮に入れる必要があろう。Wise ら²⁷⁾ は epinephrine による脂肪分解において cAMP-protein kinase 系を介する lipase の活性化に加えて, 基質側に epinephrine が作用し lipase を活性化するという second pathway の存在を推測させる成績を報告している。

Epinephrine による間けつ刺激において 2 回目の刺激による cAMP 放出の低下は, 一般に細胞をカテコールアミンで長時間刺激した際にみられる β -receptor 数の減少, adenylyl cyclase の感受性低下などの“脱感受性”²²⁾ によるか, 或いは細胞内 phosphodiesterase 活性の上昇¹⁸⁾ などによるものかもしれない。

Ca^{++} -free medium 中での epinephrine 刺激による glycerol 放出はコントロールの約 62% に低下した。従って, epinephrine 刺激による脂肪分解に Ca^{++} は不可欠ではないが, 正常なホルモン作用の発現には必要と考えられる。しかし, cAMP 放出には Ca^{++} 除去による影響は全く認められなかった。この事実から Ca^{++} は細胞内での cAMP 産生以後の過程で脂肪分解に影響していることが示唆された。

細胞膜でのカチオン輸送系を阻害する 3 種類の薬物により脂肪分解の抑制がみられた。すなわち, verapamil による細胞外からの Ca^{++} 取り込みの抑制^{21) 4) 14)}, lidocaine による細胞膜における Ca^{++} 輸送の阻害^{12) 19) 20)}, また DNP による酸化的磷酸化 (ATP, cAMP 合成など) の阻害に基づく Ca^{++} 輸送系の阻害⁷⁾ などであるが, これらのカチオン輸送の阻害作用は細胞内 Ca^{++} 再分布に影響を与え, ひいてはホルモン効果発現の刺激となりうる cytosol Ca^{++} 濃度の変化を阻害したためと推定された¹⁵⁾。さらに verapamil や lidocaine により cAMP 放出が阻害されず glycerol 放出が抑制されたことより, これらの Ca^{++} 輸送阻害は cAMP 生成以後の過程に影響しているものと考えられた。一方, DNP による脂肪分解の抑制は Ca^{++} 輸送阻害によるだけでなく, cAMP 合成系の阻害も要因の一つと考えられた。

Verapamil で前処理をしなかった場合, verapamil による glycerol 放出の抑制がすみやかに現われなかったことは, 細胞内 Ca^{++} 分布の変化に時間を要したためと思われた。

Lidocaine など局所麻酔剤は生体膜へ作用し, 膜構造の秩序性を低下させ, その結果膜の流動性が高められることはよく知られている⁹⁾。最近, 平田ら⁸⁾ により生体膜の流動性の変化と adenylyl cyclase の活性化が関連していることが報告された。従って, lidocaine により観察された cAMP 放出の促進も膜の流動性に関与しているのかもしれない。

以上より, epinephrine による脂肪分解において細胞内 cAMP は高濃度を持続する必要のないこと, また medium 中の Ca^{++} の存在は glycerol の放出を高めるが cAMP の放出とは必ずしも平行しないこと, および verapamil や lidocaine により cAMP の放出は阻害されないが glycerol 放出は抑制されたことなどから Ca^{++} が cAMP 産生以後の過程で脂肪分解機序に関与している可能性が考えられた。

結 語

ラット脂肪細胞灌流法を用い, epinephrine 刺激による glycerol 放出 (脂肪分解) と cAMP 放出の関連性, ならびに Ca^{++} の影響を経時的に観察し以下の成績を得た。

1) Epinephrine 刺激により glycerol 放出は急速に増加した後, epinephrine の存在する限り一定レベルを維持したが, cAMP 放出は一過性であった。また, この細胞外への cAMP 放出は細胞内濃度と同様の経時的変動を示した。

2) Epinephrine による間けつ刺激において 2 回目の刺激に対し cAMP 放出は低下し, glycerol 放出はわずかに増加した。

3) Epinephrine 濃度を 10^{-7} M から 10^{-5} M に段階的に高めた場合 glycerol, cAMP 放出は epinephrine 濃度に依存して増大した。

4) Medium 中の Ca^{++} 濃度を 0 mM から 1.27 mM に変えた時, epinephrine 刺激による glycerol 放出は 38% 増大したが, cAMP 放出動態は変化しなかった。

5) Epinephrine 刺激による glycerol と cAMP 放出に対する各種薬物の影響について検討した。2,4-Dinitrophenol により glycerol, および cAMP 放出は共に抑制された。Lidocaine は glycerol 放出を抑制したが cAMP 放出はむしろ増大した。Verapamil は cAMP 放出に影響を与えず, glycerol 放出のみを抑制した。また, verapamil で前処理をした場合, cAMP 放出動態は変化なかったが glycerol 放出は強い抑制がみられ, verapamil 除去後も回復がみられなかった。

以上の結果より, カテコールアミンの脂肪分解機序において, epinephrine 刺激による脂肪細胞からの glycerol および cAMP の両放出動態が必ずしも平行しないことが観察され, Ca^{++} が cAMP 産生過程以後で脂肪分解に関与していることが示唆された。

本論文の要旨は第26回日本内分泌学会西部部会総会 (1978年) において発表した。

稿を終えるにあたり, 貴重な御助言を頂いた本学中央臨床検査部小林邦夫博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Allen, D.O., Largis, E.E., Miller, E.A. and Ashmore, J.: Continuous monitoring of lipolytic rates in perfused isolated fat cells. *Journal of Applied Physiology*, 34: 125–127, 1973.
- 2) Arqueros, L. and Daniels, A.J.: Analysis of the inhibitory effect of verapamil on adrenal medullary secretion. *Life Sciences*, 23: 2415–2422, 1978.
- 3) Butcher, R.W., Ho, R.J., Meng, H.C. and Sutherland, E.W.: Adenosine 3', 5'-monophosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.*, 240: 4515–4523, 1965.
- 4) Campbell, A.K. and Siddle, K.: Effect of replacement of extracellular sodium ions and of D-600 on the activation by adrenaline of adenylate cyclase in intact pigeon erythrocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 11: 79–89, 1978.
- 5) Fain, J.N., Pointer, R.H. and Ward, W.F.: Effects of adenosine nucleosides on adenyl cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine monophosphate accumulation and lipolysis in fat cells. *J. Biol. Chem.*, 247: 6866–6872, 1972.
- 6) Fain, J.N. and Shepherd, R.E.: Free fatty acids as feedback regulators of adenylate cyclase and cyclic 3', 5'-AMP accumulation in rat fat cells. *J. Biol. Chem.*, 250: 6586–6592, 1975.
- 7) Giudicelli, Y., Pecquery, R., Proven, J.

- D., Agli, B. and Nordmann, R.: Regulation of lipolysis and cyclic AMP synthesis through energy supply in isolated human fat cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 486: 385–398, 1977.
- 8) Hirata, F., Strittmatter, W.J. and Axelrod, J.: β -Adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity and β -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 368–372, 1979.
- 9) Hubbell, W.L., Metcalfe, J.C., Metcalfe, S.M. and McConnell, H.M.: The interaction of small molecules with spin-labelled erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 219: 415–427, 1970.
- 10) Katocs, A.S., Largis, E.E., Allen, D.O. and Ashmore, J.: Perfused fat cells. Effect of lipolytic agents. *J. Biol. Chem.*, 248: 5089–5094, 1973.
- 11) Katocs, A.S., Largis, E.E. and Allen, D.O.: Role of Ca^{++} in adrenocorticotrophic hormone-stimulated lipolysis in the perfused fat cell system. *J. Biol. Chem.*, 249: 2000–2004, 1974.
- 12) Kissbah, A.H., Tulloch, B.R., Vydelingum, N., Hope-Gill, H., Clarke, P. and Fraser, T.R.: The role of calcium in insulin action. II effects of insulin and procaine hydrochloride on lipolysis. *Horm. Metab. Res.*, 6: 357–364, 1974.
- 13) Lopez, E., White, J.E. and Engel, F.L.: Contrasting requirements for the lipolytic action of corticotropin and epinephrine on adipose tissue in vitro. *J. Biol. Chem.*, 234: 2254–2258, 1959.
- 14) Malaisse, W.J., Herchuelz, A., Levy, J. and Sener, A.: Calcium antagonists and islet function-III (The possible site of action of verapamil). *Biochemical Pharmacology*, 26: 735–740, 1977.
- 15) Rasmussen, H.: Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. *Science*, 170: 404–412, 1970.
- 16) Rasmussen, H. and Goodman, D.B.P.: Calcium and cyclic AMP as interrelated intracellular messengers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 253: 789–796, 1975.
- 17) Rodbell, M.J.: Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, 239: 375–380, 1964.
- 18) Schimmel, R.J.: Responses of adipose tissue to sequential lipolytic stimuli. *Endocrinology*, 94: 1372–1380, 1974.
- 19) Schimmel, R.J.: Calcium antagonists and lipolysis in isolated rat epididymal adipocytes. Effects of tetracaine, manganese, cobaltous and lanthanum ions and D600. *Horm. Metab. Res.*, 10: 128–134, 1978.
- 20) Siddle, K. and Hales, C.N.: The action of local anaesthetics on lipolysis and on adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate content in isolated rat fat cells. *Biochem. J.*, 142: 345–351, 1974.
- 21) Siddle, K. and Hales, C.N.: The relationship between the concentration of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate and the anti-lipolytic action of insulin in isolated rat fat cells. *Biochem. J.*, 142: 97–103, 1974.
- 22) Smith, U., Sjöström, L., Stenström, G., Isaksson, O. and Jacobsson, B.: Studies on the catecholamine resistance in fat cells from patients with pheochromocytoma. *Eur. J. Clin. Invest.*, 17: 355–361, 1977.
- 23) Steiner, A.L., Pagliara, A.S., Chase, L.R. and Kipnis, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem.*, 247: 1114–1120, 1972.
- 24) Sutherland, E.W., Øye, I. and Butcher, R.W.: The action of epinephrine and the role of the adenylyl cyclase system in hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.*, 21: 623–642, 1965.

- 25) 高井義美：細胞内作用伝達物質と protein kinase. 第10回河口湖カンファレンス. ホルモンの作用機序 94-108, 1977. 26) Williams, L.T., Jarett, L. and Lefkowitz, R.J.: Adipocyte β -adrenergic receptors. J. Biol. Chem., 251, 1976. 27) Wise, L.S. and Jungas, R.L.: Evidence for a dual mechanism of lipolysis activation by epinephrine in rat adipose tissue. J. Biol. Chem., 253: 2624-2627, 1978.

(受付日：55. 7. 8)