原 著

順天堂医学 36 (4)
P. 517~526 (1991)

モルモット単一心室筋におけるアデノシンの

カルシウムチャネル電流抑制の機序

Mechanism of depression of calcium channel current by
adenosine in guinea-pig ventricular cells

加 藤 理*

MAKOTO KATO, M.D.

アデノシン (Ado) の Ca^{2+} チャネル電流抑制の機序を解明する目的でモルモット単一心室筋細胞に細胞接着型パッチクランプ法を行い、単一 Ca^{2+} チャネル電流を記録した。電極は 50mM あるいは 100mM- Ba^{2+} を含むものを使用した。 Ca^{2+} チャネル電流の平均電流は、100nM-イソプロテレンール (ISO) で対照の 2~3 倍まで増加したが、0.1mM-Ado の灌流液中への添加で対照レベルまで減少した。この一連の変化は 1000nM-BAY K8644 存在下でも認められた。チャネルの開孔を含む掃引の割合 (利用可能性 Ps) は ISO で増加し、Ado はこれを減少した (対照 0.29 ± 0.09 ; ISO 0.62 ± 0.13 ; Ado および ISO 0.37 ± 0.15 ; 平均 $\pm$ S.D. 5 例)。 Ca^{2+} チャネル電流を含む掃引でみた開確率 (Po) はほとんど影響をうけなかった (対照 0.08 ± 0.06 ; ISO 0.08 ± 0.06 ; Ado および ISO 0.06 ± 0.03)。 BAY K8644 存在下で求めた単一 Ca^{2+} チャネルコンダクタンスは約 24pS で、ISO および Ado に影響されなかった。チャネル利用可能状態の平均持続時間は ISO で増加し、Ado の添加で減少した。一方、チャネル非利用状態の平均持続時間は ISO で減少し、Ado の添加で増加した。以上より、Ado はチャネルの遅いゲート過程を修飾しチャネル利用可能性を減少することにより、 Ca^{2+} チャネル電流を抑制すると結論された。

索引用語: カルシウムチャネル, アデノシン, 心筋

Key words: calcium channel, adenosine, cardiac muscle

緒 言

ATP の代謝産物¹⁾であるアデノシンは血管拡張作用ばかりでなく、種々のレベルで心機能に影響する。たとえば、洞房結節の歩調取り機能・房室結節の伝導、および β アドレナリン性刺激下での心室ポンプ機能を抑制する²⁾。これらのうち、

陰性変周期作用、陰性変伝導作用はカリウムチャネルのコンダクタンスの増加による³⁾。一方、心室筋への陰性変力の作用は、サイクリック AMP の減少を介したカテコラミンで増加した内向き Ca^{2+} 電流の減少による^{4)~6)}。さらにモルモット心房筋で、アデノシンは基礎的 Ca^{2+} 電流をほとんど減らさないといわれる⁷⁾。これらのアデノシンのアデニールサイクラーゼ活性抑制作用、および収縮力抑制作用⁸⁾はテオフィリンにより抑制され、膜のプリンレセプター (P1) にアデノシンが結合して起こるとされている^{1)~9)}。

本研究はアデノシンの単一 Ca^{2+} チャネル電流への影響を調べることを目的とした。実験はイソ

* 順天堂大学医学部循環器内科学講座

Division of Cardiology, Department of Internal
Medicine, Juntendo University School of Medicine,
Tokyo, Japan

〔Nov. 13, 1989 原稿受領〕 (Dec. 21, 1989 掲載決定)

プロテレノールの存在下で行い、アデノシンの Ca^{2+} チャンネル電流を含む掃引中の開確率 (P_o)、および利用可能性 (P_s) への作用について解析した。

方 法

単一心室細胞は成熟モルモット心室筋より単離した¹⁰⁾。すなわち、モルモットを塩化ペントバルビタール (500mg/kg) で麻酔し、人工呼吸管理下で心臓を摘出し、以下の溶液を用いて順次 Langendorff 灌流を行った。溶液は正常 タイロード溶液・ Ca^{2+} -free タイロード溶液・コラゲナーゼ溶液 (10分～20分)・高カリウム・ Ca^{2+} -free (Kraftbrue, KB) 溶液の順で使用した。灌流終了後、単離した心室筋細胞は KB 溶液にいれ 4°C で保存した。

単離した心室筋細胞を、倒立顕微鏡 (TMS, Nikon, Japan) のステージ上に固定したチャンバーのガラス底に置き、高カリウム溶液で KB 溶液を洗い流した後、正常タイロード液で持続灌流した。実験はすべて 25°C で行った。

単一チャンネル電流は細胞接着型パッチクランプ法を用いて記録した¹¹⁾。保持電位から試験電位への脱分極パルス (100ms , 2Hz) をパーソナルコンピュータ (PC-9801 UV 2, NEC, Japan) を用いて与えた。

各溶液の組成は (mM)：正常タイロード溶液：NaCl 135；KCl 5.4； CaCl_2 1.8； MgCl_2 1；HEPES-Tris 5；glucose 10 (pH 7.4)； Ca^{2+} -free 溶液：正常タイロード溶液より Ca^{2+} を除いたもの；KB 溶液：KCl 25；タウリン 10；シュウ酸 10；グルタミン酸 70； KH_2PO_4 10；EGTA-Tris 0.5；HEPES-Tris 5；グルコース 10 (KOH の滴下で pH7.4)；高カリウムタイロード溶液： Ca^{2+} -free タイロード溶液中の NaCl を等モルの KCl で置換。ピペット内溶液の組成は (mM)： BaCl_2 50 または 100；塩化コリン 75 または 0；HEPES-Tris 5；テトロドトキシン (三共) 0.03 (pH7.4) とした。塩酸イソプロテレ

ノール (Sigma, U.S.A.) アデノシン (Sigma U.S.A.) デオフィリン (Sigma U.S.A.) は正常タイロード溶液に溶解し、灌流液中に添加した。

PCM-データレコーダを用いてビデオテープに記録したデータを 12ビットの A/D 変換器 (AD-1240 インテリジェント A/D コンバータ 日本フェニックス) でデジタル化した後、モニター上に描出し、パーソナルコンピュータを用いて解析した。基線および単一チャンネル電流の大きさは肉眼で調節した。開状態と閉状態の間の移行は単一チャンネル電流の大きさの半分のレベルで判定した。チャンネル電流を含む掃引について、単一チャンネルの開確率を試験パルスの持続時間に対する全開孔時間の比として計算した。データの比較には Student's unpaired t 検定を用いた。

結 果

静止電位から静止電位 $+70\sim 90\text{mV}$ への脱分極パルス (パルス幅 100ms) を 2Hz の頻度で反復し、単一 Ca^{2+} チャンネル電流を記録してアデノシン (Ado) の効果を調べた。図-1 に典型的な記録の 1 例を示す。チャンネル電流を含む掃引 (ノンブランク) とチャンネル電流を含まない掃引 (ブランク) の 2 つの型の掃引がそれぞれ群れをなして記録されている。図-1 中にみられるように、ノンブランク掃引の数は 100nM -イソプロテレノール (ISO) の添加により著明に増加した。約 1,000 個の掃引についてのノンブランク掃引の割合、すなわち利用可能性 (P_s) は 0.29 から 0.78 へ約 3 倍に増加した。それに伴い、約 1,000 個の掃引から得た平均電流は ISO によって約 3 倍に増大した。 0.1mM -アデノシン (Ado) の添加はこの P_s および平均電流を明らかに減少させた。次いで心筋の P1 プリンレセプターを、拮抗的に阻害することが知られている 0.1mM -デオフィリン (Teo) を添加したところ、上記の Ado の抑制作用は部分的に減弱され、ノンブランク掃引の数および平均電流が増大した。Ado を洗い流すと P_s は Teo 非存在時とほぼ同程度にまで回復した (図-1 B, E)。

図-1 単一 Ca チャネル電流に対するイソプロテレンール (ISO)・アデノシン (Ado)・テオフィリン (Teo) の作用
 静止電位から静止電位 +90mV への、パルス幅 100ms の脱分極パルスを 2 Hz の頻度で約1000回繰り返した。A, 対照 ; B, 100nM-ISO ; C, 0.1mM-Ado および ISO ; D, ISO, Ado および Teo ; E, ISO および Teo. a : 単一 Ca チャネル電流の連続記録, フィルターの遮断周波数は 1 kHz. b : 全掃引から得た平均電流. Ps : チャネル電流を含む掃引の全掃引に対する割合。ピペット内溶液は 100mM-Ba²⁺を含む。

したがって, Teo の増加作用はホスホジエステラーゼの阻害によるものではない¹⁾。

平均電流の変化の要因である単一 Ca²⁺チャネル特性の変化について統計的に解析した。

1. Ca²⁺チャネル開確率・開孔時間・閉鎖時間に対するアデノシンの効果

チャネル電流を含む掃引について, 5つのパッチより計算した開確率 (Po) は対照時 0.08±0.06, ISO 添加時 0.08±0.06, Ado および ISO 添加時 0.06±0.03 であり, ISO・Ado のいずれによっても有意な影響をうけなかった。図-2に ISO・Ado・Teo の開孔時間ヒストグラムに対する効果を示す。対照時における開孔時間ヒストグラムの分布は一次指数曲線で近似され, その時定数は 0.5 ms であった。同様に他の灌流液, すなわち ISO, ISO および Ado, ISO・Ado および Teo, ISO および Teo を含む灌流液中でも一次指数曲線で近似され, その時定数は ISO 添加では 0.38ms, ISO および Ado 添加では 0.54ms, ISO・Ado および Teo 添加では 0.46ms, ISO および Teo 添加では 0.46ms であった。また各条件下での平均開孔時間はそれぞれ 0.65ms 0.63ms 0.62ms 0.72ms 0.70ms であった。開孔時間ヒストグラム・平均開孔時間とも ISO・Ado・Teo の灌流液

図-2 イソプロテレンール (ISO)・アデノシン (Ado) およびテオフィリン (Teo) の開孔時間ヒストグラムに対する効果

図-1に示した実験から得た結果を示す。各ヒストグラムの縦軸は事象の数, 横軸は持続時間を表す。各ヒストグラムは一つの指数曲線に適合し, その時定数は: A, 対照 0.50ms; B, 100nM-ISO 0.38ms; C, ISO および 0.1mM-Ado 0.54ms; D, ISO, Ado および 0.1mM-Teo 0.46ms; E, ISO および Teo 0.46ms。Bin width は 0.2ms。

への添加によりほとんど影響されなかった。

図-3は同じ実験における ISO・Ado・Teo の閉鎖時間ヒストグラムに対する影響を示す。これらの灌流液中での閉鎖時間ヒストグラムはいずれ

図-3 イソプロテノール (ISO)・アデノシン (Ado) およびテオフィリン (Teo) の閉鎖時間ヒストグラムに対する効果

図-1に示した実験結果から得た。各ヒストグラムで縦軸は事象の数、横軸は持続時間を表す。各ヒストグラムは二つの指数曲線で近似される。A, 対照, $y = 752 \exp(-x/0.5) + 140 \exp(-x/4.0)$; B, 100nM-ISO, $y = 551 \exp(-x/0.7) + 63 \exp(-x/5.4)$; C, ISO および 0.1mM-Ado, $y = 1520 \exp(-x/0.7) + 219 \exp(-x/5.1)$; D, ISO, Ado および 0.1mM-Teo, $y = 881 \exp(-x/0.75) + 185 \exp(-x/5.1)$; E, ISO および Teo, $y = 974 \exp(-x/0.8) + 322 \exp(-x/4.0)$. Bin width は 0.2ms.

もふたつの指数曲線で近似され、その速い成分の時定数は 0.5ms から 0.8ms の範囲にあり、遅い成分の時定数は 4.0ms から 5.4ms の範囲にあった。平均閉鎖時間は 4.0ms から 6.8ms の範囲にあり、各溶液間で有意な差は認めなかった。

2. Ca^{2+} チャネル利用可能性に対するアデノシンの効果

図-4 a に示したように全掃引に対するノンブランク掃引の割合を意味する利用可能性 (P_s) は、ISO 添加により 0.29 ± 0.09 (平均 $\pm$ S.D. $n = 5$) から 0.62 ± 0.10 ($p < 0.01$) へ増加し、Ado 添加により 0.37 ± 0.15 ($p < 0.05$) に減少した。この P_s の減少が Ado 添加による平均 Ca 電流減少の理由と思われた。

Teo の存在下では ISO により増加した P_s の Ado 添加による減少は認められなかった (図-5 a)。 P_s は ISO により 0.27 ± 0.04 から 0.71 ± 0.08 に増加したが ($p < 0.01$)、Teo を添加してもほとんど変化しなかった (0.71 ± 0.09)。さら

図-4 開確率 (P_o)・利用可能性 (P_s)・利用可能状態の平均持続時間 (mS)・非利用可能状態の平均持続時間 (mF) に対するイソプロテノール (ISO)・アデノシン (Ado) の効果 (標本数は 5 個)

- a, P_o および P_s に対する 100nM-ISO および 0.1mM-Ado の効果。 P_s は対照と ISO 添加の間 ($p < 0.01$)、ISO 添加と ISO および Ado 添加の間 ($p < 0.05$) で有意差を認めた。
b, mS および mF に対する ISO および Ado の効果。 mS は対照と ISO 添加の間 ($p < 0.01$)、ISO 添加と ISO および Ado 添加の間 ($p < 0.01$) で、 mF は対照と ISO 添加の間 ($p < 0.01$) で有意差を認めた。

に続けて Ado を添加しても P_s は有意な変化を示さなかった (0.64 ± 0.09)。すなわち Ado の P_s を減少させる作用は、Teo により阻害された。

3. 利用可能状態および非利用可能状態の持続に対するアデノシンの効果

図-1に示したように反復して脱分極パルスを与えると、チャネル電流を含む掃引と含まぬ掃引がどの条件下でも群れをなして出現する傾向が認められた。連続した掃引でブランク掃引が群れをなす程度と、ノンブランク掃引が群れをなす程度を連解析 (run analysis)^{12)~14)}を用いて調べ、無秩序性 (Z) を次の式により求めた。

$$Z = -(R - 2nPs(1 - Ps)) / 2\sqrt{nPs(1 - Ps)}$$

図-5 テオフィリン (Teo) 存在下における, 開確率 (Po)・利用可能性 (Ps)・利用可能状態の平均持続時間 (mS)・非利用可能状態の平均持続時間 (mF) に対する, イソプロテレノール (ISO)・アデノシン (Ado) の効果. (標本数は図-1 に示したものを含め3または4個)

対照と ISO 添加の間でのみ Ps ($p < 0.01$)・mS ($p < 0.01$)・mF ($p < 0.01$) に有意差を認めた.

ただし R は連の数, n は全掃引数, Ps はノンブランク掃引数を n で除した商とする.

たとえば図-1 に示した実験では, Z は対照18.9 ISO 添加時 17.1, ISO および Ado 添加時 18.1 であったごとく, Z は薬物の存在によらず正の大きな値を示したことにより, ブランクおよびノンブランクの起こり方は無秩序ではないことが示された. またノンブランクの連, およびブランクの連の持続時間を, 以前の報告¹⁰⁾におけると同様に各連に含まれる掃引の数を数えて求めた. ISO・Ado の遅いゲート過程に対する効果を検討する目的で, それらの添加前後の利用可能状態の平均持続時間 (mS), および非利用可能状態の平均持続時間 (mF) を比較した. 図-4 b に示したように mS は ISO 添加により $1.25 \pm 0.37s$ (平

均 $\pm S.D.$, $n = 5$) から $2.35 \pm 0.62s$ へ増加し ($p < 0.01$), ISO および Ado 添加で $1.31 \pm 0.41s$ に減少した ($p < 0.01$). MF は ISO 添加で $3.16 \pm 0.78s$ から $1.42 \pm 0.53s$ へ減少し ($p < 0.01$), ISO および Ado 添加で $2.55 \pm 1.43s$ に増加した.

ISO・Ado による mS・mF の変化に対する Teo の効果を図-5 b に示す. MS は ISO で $1.08 \pm 0.19s$ から $3.31 \pm 1.16s$ へ増加したが ($p < 0.01$), さらに Teo および Ado を添加しても, それぞれ $2.91 \pm 0.49s$, $2.57 \pm 0.93s$ と有意な変化は示さなかった. MF は ISO で $2.91 \pm 0.25s$ から $1.25 \pm 0.31s$ へ減少し ($p < 0.01$), さらに Teo および Ado を添加してもそれぞれ $1.20 \pm 0.35s$, $1.34 \pm 0.22s$ と有意な変化は示さなかった.

4. 単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスに対するアデノシンの効果

1000nM-BAY K8644 存在下で, 細胞接着型パッチクランプ法により記録した多 Ca^{2+} チャンネル電流に対する ISO および Ado の効果を図-6 に示す. 静止電位 (RP) から RP+70mV への脱分極パルス (パルス幅 100ms) を 2Hz の頻度で反復して加えた. BAY K8644 は開孔時間をいちじるしく延長したため, 開孔状態にある Ca^{2+} チャンネルの数が明らかになった (図-6 a). 単一 Ca^{2+} チャンネル電流記録の重なりの変化を伴って平均電流は ISO で増加し (図-6 B), Ado の添加で減少した (図-6 C). また図-7 に示すように BAY K8644 存在下で脱分極パルス中 (静止電位 +70mV) および直後 (静止電位) の単一 Ca^{2+} チャンネル電流を記録すると, 単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスを正確に測定することが可能であった. すなわち, 図-7 右に示すように縦軸に単一 Ca^{2+} チャンネル電流の大きさ, 横軸に膜電位をプロットし, その傾きとして単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスを計算し求めた. 平均 Ca^{2+} 電流には明らかな変化を認めたにもかかわらず, 単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスは $23.7 \sim 24.0$ pS で ISO・Ado のいずれによっても影響されなかった.

図-6 BAY K8644 存在下におけるイソプロテレノール (ISO) とアデノシン (Ado) の Ca チャネル電流に対する作用
1000nM-BAY K8644 は灌流液中へ加えた。静止電位から静止電位 +70mV への、パルス幅 100ms の脱分極パルスを 2 Hz の頻度で反復した、ピペットは 50mM-Ba²⁺を含むものを用いた。A, BAY K8644 ; B, 100nM-ISO および BAY K ; C, 0.1mM-Ado, ISO および BAY K. a : 多 Ca チャネル電流記録, b : 平均電流. 平均電流は A では1169個の掃引から, B および C では約560個の掃引から求めた。

図-7 BAY K8644, イソプロテレノール (ISO)・アデノシン (Ado) の単一 Ca チャネルコンダクタンスに対する作用
単一 Ca チャネルコンダクタンスは、脱分極パルス中および終了直後の単一 Ca チャネル電流の大きさから求めた。
左図：チャネル電流記録, A : 対照, B : 1000nM-BAY K8644, C : 100nM-ISO および BAY K8644, D : ISO, 0.1mM-Ado および BAY K8644. 右図：縦軸：Ca チャネル電流の大きさ (pA), 横軸：膜電位 (mV). 単一 Ca チャネルコンダクタンスは A, B : 23.7 pS, C, D : 24.0pS.

考 察

近年パッチクランプ法¹¹⁾が発達した結果、単一 Ca^{2+} チャンネル電流を記録し種々の生理学的、ならびに臨床的に重要な要因による Ca^{2+} チャンネルの変化を直接的に検討することが可能になった。そして、すでに交感神経 β 受容体刺激は Ca^{2+} チャンネルの開確率 (P_o) および利用可能性 (P_s) の両者を増大することにより、 Ca^{2+} チャンネル電流を増すことが報告されている¹⁵⁾。本研究ではそのような β 受容体刺激下に、Ado によって生じる Ca^{2+} 電流減少時の Ca^{2+} チャンネルの変化について検討したところ、 P_s の減少は認めたものの P_o は ISO・Ado のいずれによってもほとんど変化しなかった。すなわち、 Ca^{2+} チャンネルの開孔時間および閉鎖時間の分布は、それぞれ単一および二重の指数曲線に適合し、その時定数は ISO、ISO および Ado 添加の前後で実質上不変であった。ISO により P_o の変化なしに P_s が増大したことは、大地らがアドレナリン¹⁶⁾¹⁷⁾を用いて行った検討の結果とよく一致する。これらの結果から Ado による平均 Ca^{2+} 電流の減少、および巨視的 Ca^{2+} 電流の減少²⁾¹⁶⁾は主として Ca^{2+} チャンネル利用可能性の低下によると結論された。

Ado による P_s の減少は、利用可能状態の平均持続時間 (mS) および非利用状態の平均持続時間 (mF) の変化によるものであった。Ado は予め ISO により増大した mS を減少させる一方、ISO により減少した mF を ISO 使用前のレベル近くにまで増大させた (図-4b)。 P_s は $mS / (mS + mF)$ によって与えられることから、この Ado による $mS \cdot mF$ 両者の変化が利用可能性 (P_s) を減少させたと考えられた。今回の研究で用いたように過分極レベルで電位を保持した場合には、非利用可能状態の持続は単一指数関数として分布し、 mS および mF の両者は広範囲の過分極電位で一定であり、不活性化過程はブランク状態の発生にほとんどかわらないことが示唆されている¹⁰⁾。Ado はいちじるしい過分極レベルに電位を保持した場合には、 $mS \cdot mF$ に反映され

る非電位依存性の遅いゲート過程を変化することにより、 P_s を減少するように思われる。

細胞全体の Ca^{2+} 電流のゆらぎ解析によれば、交感神経 β 受容体刺激は単一 Ca^{2+} チャンネルのコンダクタンスには影響しないとされている¹⁸⁾。開孔時間を著明に延長する BAY K8644¹⁹⁾存在下では、単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスに対する調節因子の影響を評価することができるが、図-7に示したように ISO・Ado とともに単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスに影響しなかった。したがって、単一 Ca^{2+} チャンネルコンダクタンスは、Ado による Ca^{2+} 電流の減少に関与する要因の中に含まれないと思われた。

パッチ内にあるチャンネルは、ISO・Ado・Teo のいずれにも直接には接していないため、平均電流の増減は細胞内セカンドメッセンジャーを介するチャンネルへの修飾によるものである。最近、生化学的・電気生理学的研究によって心筋の Ca^{2+} チャンネルの β アドレナリン性修飾や、Ado による修飾の信号伝達系が解明された²⁾。 β 受容体刺激剤は心筋細胞膜の β 受容体と結合し、GTP 結合蛋白質 (G_s) を活性化してアデニールサイクラーゼ (AC) の触媒作用活性を刺激する。サイクリック AMP は、サイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼとの相互作用により²⁰⁾ATP の終末磷酸塩の Ca^{2+} チャンネルを含む細胞内の種々の蛋白への移動を起こす²¹⁾。Ado はメチルキサンチンによって競合的に阻害される P1 プリン受容体を活性化し、もう一つの GTP 結合蛋白質 (G_i) を介して心筋の AC に働き、サイクリック AMP 蓄積の変化ならびに Ca^{2+} 流入の減少を生じる¹⁾。上に示したように、Teo 存在下では ISO によって増加した Ca^{2+} チャンネルの P_s は Ado によりほとんど変化せず、Teo で前処理した場合は利用可能状態および非利用可能状態の持続 ($mS \cdot mF$) は、Ado によりあまり変化しなかった (図-5)。これらの所見は Ado は心筋細胞膜の P1 プリン受容体を刺激し、 G_i を介して AC に ISO の作用を減弱するとの考えを支持する。すなわち、Ado は Ca^{2+} チャンネルを脱磷酸化させてチャンネルの

利用可能性を減少することによって、ISO による Ca^{2+} チャネル電流の増加を抑制すると思われる。

結 語

1. アデノシン (Ado) は、 β -アゴニストによって増大した Ca^{2+} チャネル電流を β -アゴニスト存在下で抑制した。

2. Ca^{2+} チャネル電流は BAY K8644 存在下でも、非存在下と同様に β -アゴニスト・Ado により修飾された。

3. Ado・ β -アゴニストは、単一 Ca^{2+} チャネルコンダクタンスを変化させなかった。

4. テオフィリン (Teo) は、 β -アゴニストによって増大した Ca^{2+} チャネル電流を抑制する Ado の作用を抑制した。

5. β -アゴニスト・Ado・Teo は、チャネルの平均開孔時間・開孔時間ヒストグラム・閉鎖時間ヒストグラム・開確率 (P_o) に有意な影響を与えなかった。

6. 利用可能性 (P_o) は、 β -アゴニストでチャネル電流を含む掃引の連続数を増加し、Ado 添加でこの連続数を減少するために有意に減少した。Teo 存在下でも β -アゴニストの作用は影響を受けなかった。しかし Teo 存在下では、Ado 添加しても P_s の有意な減少は認められなかった。

7. Ado の β -アゴニスト存在下での Ca^{2+} チャネル電流抑制は、膜の P1-receptor (プリンレセプター) を介し β -アゴニストの遅いゲート過程に対する効果を打ち消すことによると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜った大地陸男教授に深甚なる謝意を表します。また、研究の機会を与えて頂いた山口 洋教授、ならびに循環器内科学教室一同の皆様深く感謝いたします。さらに、パルスプログラム DAAD-12 system (Ver. 2.0) を提供してくださいました明治乳業ヘルスサイエンス研究所生理生化学研究室の吉井光信氏に深謝いたします。なお、この結果の要旨は第53回日本循環器学会総会 (1989) にて発表した²²⁾。

文 献

- 1) Buranstock G : Purinergic receptors in the heart. Supp. I, Circ. Res., **46** : 1~175, 1980
- 2) Belardinelli L, Klockner U and Isenberg G : Modulation of potassium and calcium currents in atrial and nodal cells : ISOLATED ADULT CARDIOMYOCYTES, Piper H.M. & Isenberg G (ed.), CRC-press, vol. II : 155~180, 1989
- 3) Kurachi Y, Nakajima T & Sugimoto T : On the mechanism of activation of muscarinic K channels by adenosine in isolated atrial cells : involvement of GTP-binding proteins, Pflugers Arch., **407** : 264, 1986
- 4) James G Dobson, Jr. : Reduction by adenosine of the isoproterenol-induced increase in cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate formation and glycogen phosphorylase activity in rat heart muscle. Circ Res., **43** : 785~792, 1978
- 5) Richard A Fenton and James G Dobson, Jr. : Adenosine and calcium alter adrenergic-induced intact heart protein phosphorylation. Am. J. Physiol., **246** : H559~565, 1984
- 6) Isenberg G, Belardinelli L : Ionic basis for the antagonism between adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes. Circ. Res., **55** : 309~325, 1984
- 7) Cerbai E, Klockner U, Isenberg G : Ca-antagonistic effects of adenosine in guinea pig atrial cells. Am. J. Physiol., **255** : H872~878, 1988
- 8) Schrader J, Baumann G, Gerlach E : Adenosine as inhibitor of myocardial effects of catecholamines. Pflugers Arch., **372** : 29, 1977
- 9) Burnstock G : A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In cell membrane receptors for drugs and hormones : A multidisciplinary Approach, Bolis L, Straub RW (ed.) New York, Raven Press, PP 107~108, 1978
- 10) Kawashima Y, Ochi R : Voltage-dependent decrease in the availability of single calcium

- channels by nitrendipine in guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology.*, **402** : 219, 1988
- 11) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membranepatches : *Pflugers Arch.*, **391** : 85, 1981
- 12) Horn R, Vandenberg CA, Lange K : Statistical analysis of single sodium channels. Effects of N-bromoacetamide. *Biophys. J.*, **45** : 323~335, 1984
- 13) Standen NB, Stanfield PR and Ward TA : Properties of single potassium channels in vesicles formed from the sarcolemma of frog skeletal muscle., *J. Physiol.*, **364** : 339~358, 1985
- 14) Cavalié A, Pelzer D, Trautwein W : Fast and slow gating behaviour of single calcium channels in cardiac cells : Relation to activation and inactivation of calcium current. *Pflugers Arch.*, **406** : 241~258, 1986
- 15) Hescheler J, Trautwein W : Modulation of calcium currents of ventricular cells : ISOLATED ADULT CARDIOMYOCYTES, Piper H.M. & Isenberg G (ed.), CRC-press, **II** : 129~154, 1989
- 16) Ochi R, Hino N, Niimi Y : Action of adre-
naline and BAY K 8644 on the single calcium channels of cardiac muscle (in Japanese). *Vas Sanguina.*, **8** : 201, 1984
- 17) Ochi R, Hino N & Okuyama H : Beta-Adrenergic modulation of the slow gating process of cardiac calcium channels. *Japanese Heart Journal.*, suppl. **27** : 51, 1986
- 18) Bean BP, Nowicky MC, Tsien RW : Beta-Adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells. *Nature*, **307** : 371~375, 1984
- 19) Ochi R, Hino N and Niimi Y : Prolongation of calcium channel open time by the dihydropyridine derivative BAY K 8644 in cardiac myocytes. *Proc. Jpn. Acad.*, **60** : Ser B, 153, 1984
- 20) Kameyama M, Hofmann F, Trautwein W : On the mechanism of Beta-adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart. *Pflugers Archiv.*, **405** : 285, 1985
- 21) Martin Rodbell : The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, **284** : 17, 1980
- 22) Kato M, Yamaguchi H, Murakami H, Ochi R : Depression of calcium channel current by adenosine in guinea-pig ventricular cells. *Jpn. Circ. J.*, **53** : 1989

Original Paper

Summary**Mechanism of depression of calcium channel current by adenosine in guinea-pig ventricular cells**

The mechanism of the modulation of Ca current of cardiac muscle by adenosine was studied by recording the Ca-channel currents from cell-attached patches on isolated guinea-pig ventricular cells. The mean Ca-channel current from multi-channel Ba currents was augmented 2~3 times by the application of 100nM-isoproterenol (ISO) to the bath, and was diminished almost to the control level by the addition of 0.1mM-adenosine. Adenosine has little effect on the mean current in the absence of ISO. The adenosine-induced depression of the mean current was reduced by 0.1mM-theophylline (TEO). The increase of the mean current by ISO and its reversal by adenosine occurred also in the presence of 1000nM-BAY K8644. In single-channel recordings, adenosine decreased the rate of current-containing sweeps (availability, P_o) in the presence of ISO. In five patches, P_o was increased by 100nM-ISO from 0.29 ± 0.09 (mean $\pm$ s.d.) to 0.62 ± 0.13 and was decreased by the addition of 0.1mM-adenosine to 0.37 ± 0.15 . In these experiments the mean duration of the available state (mS) was prolonged by ISO and shortened by adenosine (control 1.3 ± 0.4 s ; ISO 2.4 ± 0.6 s ; ISO and Ado 1.3 ± 0.4 s), while the mean duration of the unavailable state (mF) was shortened by ISO and prolonged by adenosine (control 3.2 ± 0.8 s ; ISO 1.4 ± 0.5 s ; ISO and adenosine 2.6 ± 1.4 s). It was not accompanied by significant changes in the open time, the close time, the open state probability or the single-channel conductance. We conclude that the decrease in the availability of the Ca-channel is responsible for the adenosine-induced inhibition of the Ca current.

Key words : calcium channel, adenosine, cardiac muscle

MAKOTO KATO, M.D.

*Division of Cardiology, Department of Internal
Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*