

バナジウム化合物によるリポ蛋白質リパーゼ 活性放出促進機構

本屋敷敏雄、植木 寛

Mechanisms of Stimulatory Release of Lipoprotein Lipase Activity by Vanadium Compounds

Toshio Motoyashiki, Hiroshi Ueki

Abstract

Lipoprotein lipase (LPL) catalyzes the hydrolysis of plasma triglycerides and thereby regulates the uptake of their constituent fatty acids by tissues such as adipose tissue, cardiac and skeletal muscles, and mammary gland. Vanadium is an essential trace element for animals owing to its physiological and biochemical activities. Vanadium compounds mimic many *in vitro* and *in vivo* effects of insulin including the stimulation of glucose transport, the stimulatory phosphorylation of insulin receptor in isolated rat adipocytes, and the normalization of blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic rats. In this review, we found that vanadium compounds stimulates the release of LPL activity from isolated rat fat pads through a transient increase in cellular content of cAMP and *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (1,4,5-IP₃), leading to an intracellular Ca²⁺ concentration.

1. はじめに

近年、食習慣の欧米化に伴い、肥満や高脂血症が成人のみならず若年者においてもしばしばみられ、動脈硬化症や虚血性心疾患の原因となることから社会問題になっており、これらの疾患に対する治療薬の開発を早急に行う必要性が生じている。

リポ蛋白質リパーゼ(LPL)は、脂肪組織などで合成される分泌蛋白の一種で、食餌由来のキロミクロンやVLDL中のトリグリセリドを加水分解する重要な脂質代謝酵素である。このLPLが円滑に作用しない場合、高脂血症を引き起こすことが知られ、LPLの欠損症が報告されている¹⁾。LPLが正常に働くためにはインスリンの存在が必要とされており、インスリン依存性の重症糖尿病患者では、高度の高脂血症を引き起こす原因となる。LPL活性の調節についてのこれまでの報告によると、インスリンは、メッセンジャーRNAや蛋白合成などの段階に作用して脂肪組織中のLPL活性を増加させる^{2,3)}。またヘパリンは、LPLとの直接的な相互作用、あるいは細胞表面の結合部位での競合によりLPLを放出し⁴⁾、さらに単離脂肪細胞⁵⁻⁸⁾、単離心筋細胞^{9,10)}、および培養脂肪細胞¹¹⁻¹⁵⁾からのLPL放出促進作用を有し、貯蔵部位から細胞表面への移送に作用することが認められているが、詳細な活性調節機構に関しては、種々の意見があり、未だに不明である。

バナジウムは、原子番号23、原子量50.94の元素で自然界に広く分布し、化学的性質としては、高い硬度と融点を持ち、多くの酸化状態(+2~+5)をとることから、種々の鋼鉄の製造や化学工業の触媒などに利用されている。生物においてバナジウムは重要な役割を果たしていると考えられており、その欠乏動物では血中の中性脂肪量増加、また長期間の暴露では血中コレステロールの低下が知られ、脂質代謝への関与が想定されていた。本研究室では、種々のインスリン様作用を有する5価のバナジウム化合物のバナデート(Na_3VO_4)がFig. 1-1に示す過程に作用して、インスリンと同様にラット脂肪組織中のLPL活性を著しく増強し、またヘパリンと同様に反応液中へLPL活性を放出することを報告している。このバナデートによるLPL活性放出促進作用は、時間および濃度依存的に認められ(Fig. 1-2)、そ

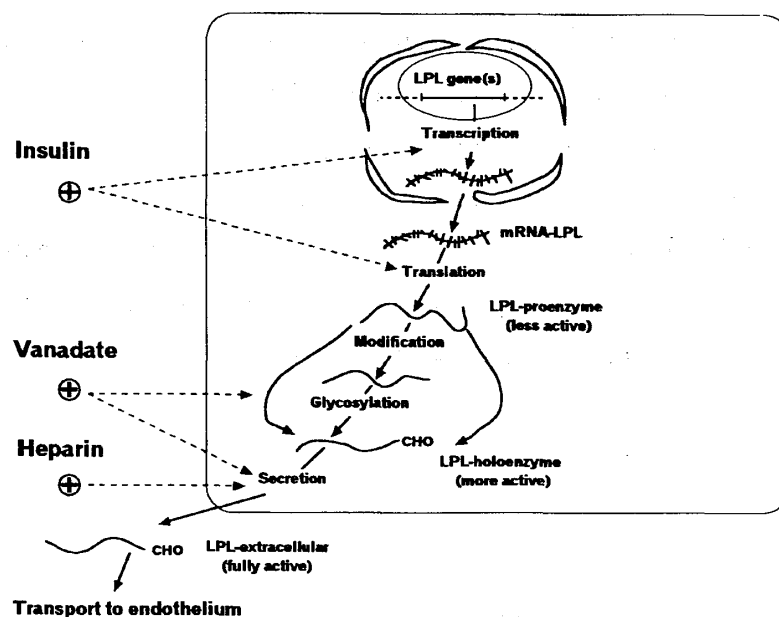


Fig. 1-1. Synthesis, Processing, and Secretion of LPL in Adipocyte

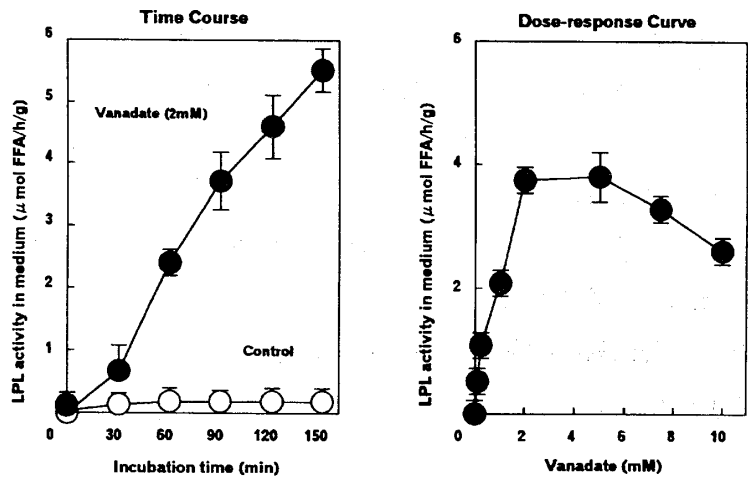


Fig.1-2. Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadate

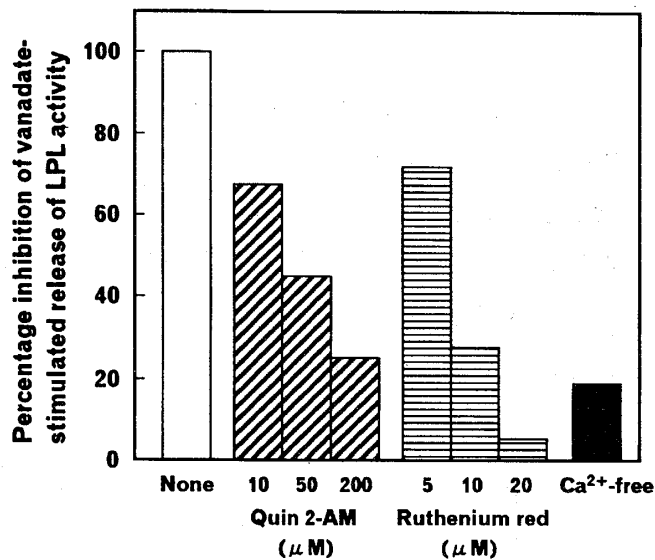


Fig. 1-3. Inhibitory Effects of Quin 2-AM, Ruthenium Red, or Ca²⁺-Free on Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadate

KRBGA (complete buffer) was composed of 119mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 4.8mM KCl, 1.3mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄ and MgSO₄, 5mM glucose, 2% BSA.

The Ca²⁺-free buffer was prepared by omission of 1.3mM CaCl₂ from the complete buffer.

The fat pads were preincubated with quin 2-AM in KRBGA containing 10mM sodium pyruvate for 15 min or with ruthenium red in KRBGA for 15 min, then further incubated with or without vanadate (2mM) for 90 min.

The fat pads were incubated with or without vanadate (2mM) in Ca²⁺-free buffer for 90 min.

してFig. 1-3に示すように、細胞膜透過性の細胞内Ca²⁺キレーターであるquin 2-AM¹⁶⁾で脂肪組織を前処理し、細胞内Ca²⁺をキレートしていくと、バナデートの作用はquin 2-AM

の濃度依存的に抑制され、また、 Ca^{2+} トランスポートを阻害するルテニウムレッド¹⁷⁻¹⁹⁾も同様な傾向を示した。さらに、 Ca^{2+} を含まない反応液でインキュベートすると著しく抑制されることから、バナデートの作用は細胞内 Ca^{2+} 変動に依存的であることが示唆されているが、詳細な活性調節機構は不明である。

そこで本研究では、バナデートによるLPL活性放出促進作用機構の解明のために、先ず小胞体からの Ca^{2+} 動員作用を有するイノシトール1,4,5-三リン酸(1,4,5- IP_3)やその他のイノシトールポリリン酸代謝の関与について検討を行い、また重要な細胞内情報伝達物質であるcAMP含量の変動についても検討した。さらに4価化合物のバナジル(VO_4)についても検討を行った。

2. バナデートによるラット脂肪組織からのLPL活性放出促進作用に対するイノシトールポリリン酸代謝の関与

イノシトール1,4,5-三リン酸(1,4,5- IP_3)は、種々のホルモン、細胞増殖因子やオータコイドなどによる細胞刺激によって生成されるイノシトールポリリン酸の一つで、非ミトコンドリア性細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官である小胞体からの Ca^{2+} 動員を引き起こし、これによって細胞内 Ca^{2+} 濃度が大幅に増加して、種々の細胞応答を誘導する重要なセカンドメッセンジャーである²⁰⁻²⁵⁾。生成された1,4,5- IP_3 はその後、脱リン酸化または、リン酸化され多彩なイノシトールポリリン酸へ代謝されることが知られている^{20, 21)}ので、これらの関与について検

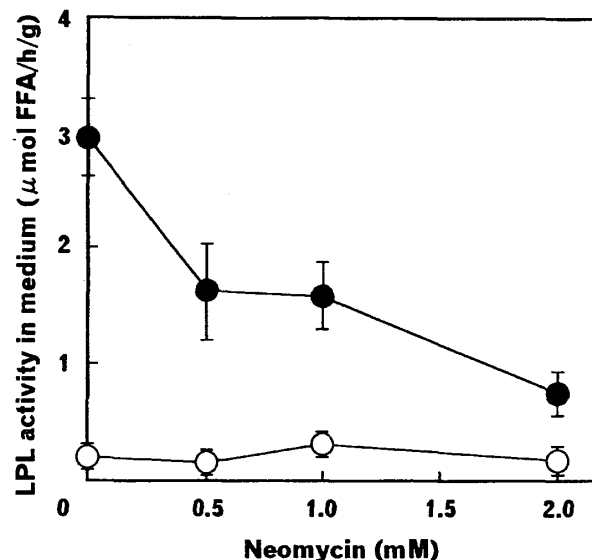


Fig. 2-1. Effect of Neomycin on Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadate

The fat pads were preincubated with neomycin at the indicated concentrations for 15 min, then further incubated with (●) or without (○) vanadate (2mM) for 90 min.

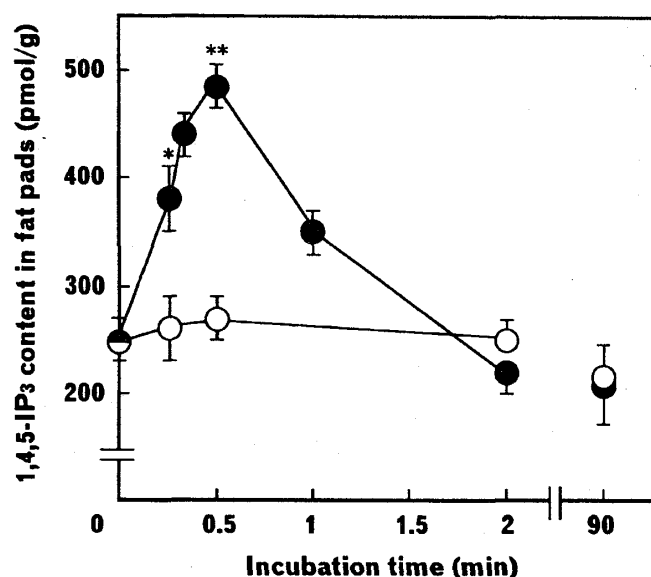


Fig. 2-2. Time Course of Increase in 1,4,5-IP₃ Content in Fat Pads by Vanadate

The fat pads were incubated with (●) or without (○) vanadate (2mM) in KRBGA for the indicated periods. Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

討した。

イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC (PLC)の特異的阻害剤であるネオマイシン^{26, 27)}で脂肪組織を前処理することによって、バナデートによるLPL活性放出促進作用は濃度依存的に抑制された(Fig. 2-1)。

Figure 2-2は、2mM バナデートを作用させた脂肪組織のトリクロロ酢酸(TCA)可溶性画分中の1,4,5-IP₃含量の変動を示している。脂肪組織中の1,4,5-IP₃含量は、30秒の短時間のインキュベーションによって最大値(コントロールの約1.8倍)となり、以後急速に減少し120秒後には、ほぼ元のレベルにまで減少した。また、90分間のインキュベーションにおいては、コントロールとの差は認められなかった。さらに、バナデートとの短時間インキュベーションによる1,4,5-IP₃含量の増加は、LPL活性放出促進作用を著しく抑制する濃度である2mM ネオマイシンで脂肪組織を前処理することによって消失した(Fig. 2-3)。この結果は、バナデートがPLCの活性化を介してLPL活性放出促進作用を発現させることを強く示唆している。

次に、バナデート処理した脂肪組織からの1,4,5-IP₃含量測定に用いたTCA可溶性画分によって、実際に⁴⁵Ca²⁺を負荷した小胞体画分から⁴⁵Ca²⁺の動員が起こるかについて検討した。

Table 2-1は、⁴⁵Ca²⁺を負荷した小胞体に対する各種薬物の直接作用を示す。調製した小胞体画分は、50 μM 1,4,5-IP₃による⁴⁵Ca²⁺の放出およびCa²⁺イオノファー A23187による⁴⁵Ca²⁺の放出能を有していることが確認された。また2mM バナデートを直接作用させ

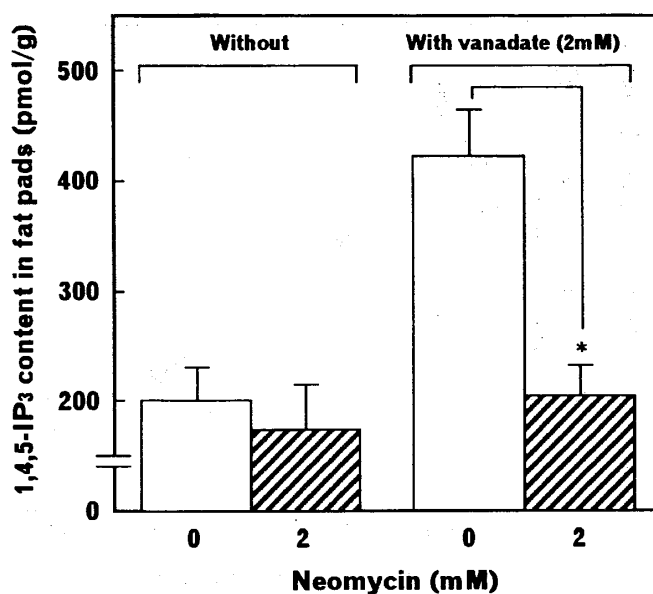


Fig. 2-3. Inhibitory Effect of Neomycin on Increase in Cellular 1,4,5-IP₃ Content by Vanadate

The fat pads were preincubated with or without neomycin (2 mM) for 15 min and further incubated with or without vanadate (2 mM) in KRBGA for 30 s.

Significant differences compared with group without neomycin:

* $p < 0.05$.

Time after addition (min)	Remaining ⁴⁵ Ca ²⁺ content in ER (%)		
	0	1	3
1,4,5-IP ₃ (50 μM)	100	78 ± 5.0*	74 ± 4.1*
A23187 (5 μM)	100	46 ± 2.2*	52 ± 5.1*
Vanadate (2mM)	100	95 ± 5.2	98 ± 5.1

Table 2-1. Effect of 1,4,5-IP₃, A23187, or Vanadate on Ca²⁺ Content in ER

⁴⁵Ca²⁺-loaded ER was incubated with 1,4,5-IP₃, A23187, or vanadate for the indicated periods.

Significant differences compared with no addition of reagent:

* $p < 0.05$.

ても、⁴⁵Ca²⁺の放出は認められなかったもので、バナデートが直接小胞体に作用してCa²⁺の放出促進を行う可能性は否定された。⁴⁵Ca²⁺を負荷した小胞体に50 μM 1,4,5-IP₃を反応させると、取り込まれた⁴⁵Ca²⁺の約30%が放出されたことにより、調製した小胞体画分は1,4,

Time after addition (min)	Remaining $^{45}\text{Ca}^{2+}$ content in ER (%)		
	0	1	3
TCA-soluble fraction			
Treated for 30 sec.			
Control	100	102 ± 2.5	98 ± 3.0
Vanadate (2mM)	100	73 ± 3.8*	69 ± 5.4*
Treated for 90 min			
Control	100	99 ± 1.2	97 ± 2.3
Vanadate (2mM)	100	98 ± 3.2	96 ± 5.1

Table 2-2. Effects of TCA-Soluble Fractions on Ca^{2+} Content in ER

The fat pads were incubated with or without vanadate (2mM) for 30 s or 90min in KRBGA at 37°C. The incubated fat pads were quickly frozen to terminate the reaction and homogenized in chilled 12.5% TCA. After centrifugation at 16000xg for 10min, the resultant supernatant was extracted with chilled H_2O -saturated diethyl ether to remove TCA (TCA-soluble fractions). $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -loaded ER was incubated with TCA-soluble fractions for the indicated periods. Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$.

5- IP_3 に感受性を示すことが示唆され、この結果は脂肪細胞において1,4,5- IP_3 が細胞膜ではなく小胞体からの Ca^{2+} 動員を行うというDelfertら²³⁾の報告と一致する。この小胞体画分にバナデートと30秒間インキュベートした脂肪組織から得たTCA可溶性画分を作用させると、50 μM 1,4,5- IP_3 作用時と同程度の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 放出が認められた。一方、90分間のインキュベートによって得られたTCA可溶性画分では、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の放出は認められなかった(Table 2-2)。

アゴニスト刺激により生成された1,4,5- IP_3 は、リン酸化あるいは脱リン酸化されて多種多様なイノシトールポリリン酸に代謝されることが報告されている^{20, 21)}ので、 ^3H イノシトールを前負荷した脂肪組織を用いて、バナデートのイノシトールポリリン酸代謝に及ぼす影響を検討した(Fig. 2-4)。 IP_3 は30秒という短時間のインキュベートで一過性に増加したのち減少傾向が見られ、その後徐々に増加し、90分間のインキュベートではコントロールの約4倍に増加した。Figure 2-2における1,4,5- IP_3 含量の変動パターンを考慮すると、初期の一過性に増加する IP_3 は1,4,5- IP_3 であり、以後代謝され90分においては1,4,5- IP_3 以外の IP_3 が生成されていると考えられる。また、 IP_4 は IP_3 の増加に比べ、やや遅れて増加することが確認された。さらに、 IP_1 および IP_2 は時間の経過とともに徐々に増加した。1,4,5- IP_3 の3位をリン酸化する酵素すなわち1,4,5- IP_3 3キナーゼの存在が報告されている²⁸⁾。

1,3,4,5- IP_4 は、1,4,5- IP_3 から本酵素のリン酸化反応によって生成され、細胞外からの Ca^{2+} 流入に深く関わっているとされている^{28, 29)}。したがって、本実験において増加した IP_4 は、おそらく1,3,4,5- IP_4 であると推定される。一方、1,4,5- IP_3 の5位を脱リン酸化する酵素がConnollyら³⁰⁾によって報告され、1,4,5- IP_3 は本酵素によって1,4- IP_2 に脱リン酸化され

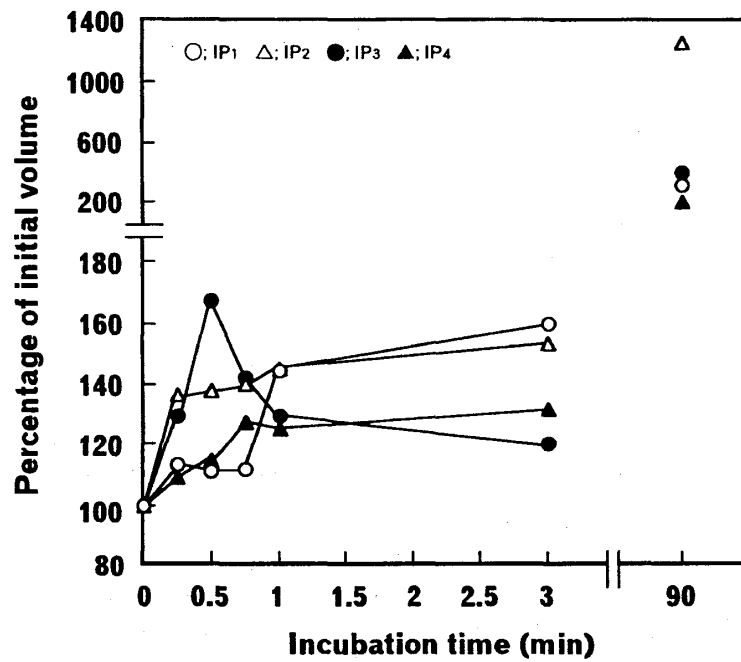


Fig. 2-4. Time Course of Changes in Inositol Polyphosphate Contents in Fat Pads by Vanadate

The fat pads were incubated with vanadate (2mM) in KRBGA for the indicated periods.

る。 1,3,4,5-IP₄も本酵素の基質となり、1,3,4-IP₃を生成する。この1,3,4-IP₃による小

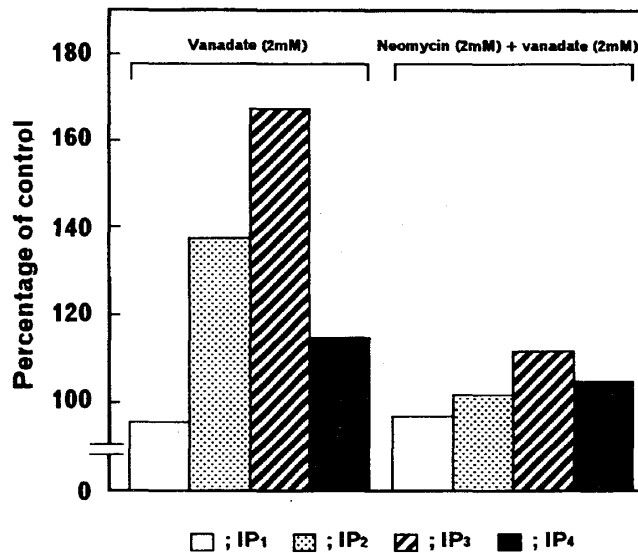


Fig. 2-5. Effect of Vanadate on Inositol Polyphosphate Contents in Fat Pads Pretreated with or without Neomycin

The fat pads were preincubated with or without neomycin (2mM) for 15 min, then further incubated with or without vanadate (2mM) for 30 s.

胞体からのCa²⁺動員作用は、非常に弱く1,4,5-IP₃の約1/100であると報告されている^{31, 32}。

バナデートとの30秒という短時間のインキュベーションによるイノシトールポリリン酸代謝の促進は、2mM ネオマイシンで脂肪組織を前処理することによって、著しく抑制された(Fig. 2-5)。この結果は、バナデートがPLCの活性化を介して1,4,5-IP₃含量を増加させ、その後、順次リン酸化および脱リン酸化反応が行われていくことを示唆している。そして、90分の長時間インキュベーションにおけるバナデートの作用に対してネオマイシンは弱い抑制効果を示した(Fig. 2-6)。これはバナデートのPLC活性化以外の機構によるイノシトールポリリン酸の増加であると考えられる。

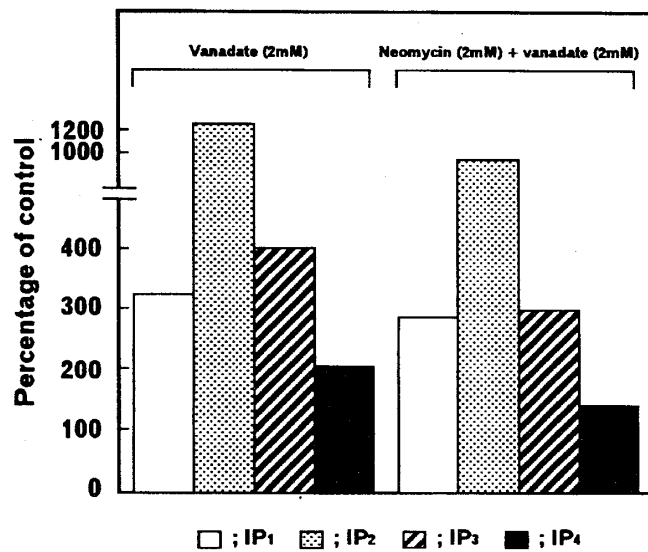


Fig. 2-6. Effect of Vanadate on Inositol Polyphosphate Contents in Fat Pads Pretreated with or without Neomycin

The fat pads were preincubated with or without neomycin (2mM) for 15 min, then further incubated with or without vanadate (2mM) for 90 min.

以上の結果からバナデートは、PLCの活性化を介し1,4,5-IP₃含量を増加させ、細胞内Ca²⁺貯蔵器官である小胞体に作用しCa²⁺動員を引き起こす経路に加え、1,4,5-IP₃の代謝物である1,3,4,5-IP₄により細胞外からのCa²⁺流入を促進する経路によって、反応液中へのLPL活性の放出を促進することが明らかになった。

3. バナデートによるラット脂肪組織からのLPL活性放出促進作用に対するcAMPの関与

バナデートはラット脂肪組織中のLPL活性³³)およびcAMP分解酵素ホスホジエステラーゼ活性の増強作用³⁴)やグリコーゲン合成促進³⁵)、インスリン受容体のリン酸化促進³⁶)などのインスリン様作用を有することが報告されているが、インスリン受容体のチロシンのリン

酸化に対し、インスリンとは異なり非特異的で作用が弱いことが示唆されている³⁷⁾。同時にバナデートは、ラット脂肪細胞³⁸⁾や副腎³⁹⁾、ウサギ眼の毛様体膜⁴⁰⁾においてアデニレートサイクラーゼを活性化させることが知られ、さらにラット肝細胞において肝性リパーゼ活性の反応液中への分泌は、急速なcAMP含量の上昇と、それに伴うcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の活性化に依存するなど、アドレナリンが持つ作用の一部を併せ持つことが報告されている⁴¹⁾。そこで、バナデートによるラット脂肪組織からのLPL活性放出促進作用に対する組織中のcAMP含量の変動およびPKA活性の関与について検討した。

クエルセチンは脂肪細胞において、インスリンによるインスリン受容体チロシンキナーゼの活性化、グルコースの細胞内への取り込み促進や酸化作用、脂肪合成作用に対し強力な阻害作用を示すことが報告されている⁴²⁾ので、バナデートによるLPL活性放出促進作用に対するクエルセチンの影響について検討した。クエルセチンによって、バナデートによる反応液中へのLPL活性放出は抑制されず、むしろ増強された(Fig. 3-1)。これは、クエルセチンがlipolysis 促進作用を示すという報告⁴³⁾があることから、アドレナリンの β 受容体を介する効果に類似する機構による増強作用が想定されたので、次に、 β -アドレナリン受容体拮抗薬であるプロプラノロール⁴⁴⁾の効果について検討した。バナデートによるLPL活性放出促進作用は、脂肪組織をプロプラノロールで前処理することによって、濃度依存的に抑制され200 μ Mで35%まで阻害された(Fig. 3-2)ので、作用機構の一部に β -アドレナリン受容体にリンクしたアデニレートサイクラーゼの活性調節が深く関わっていると思われる。

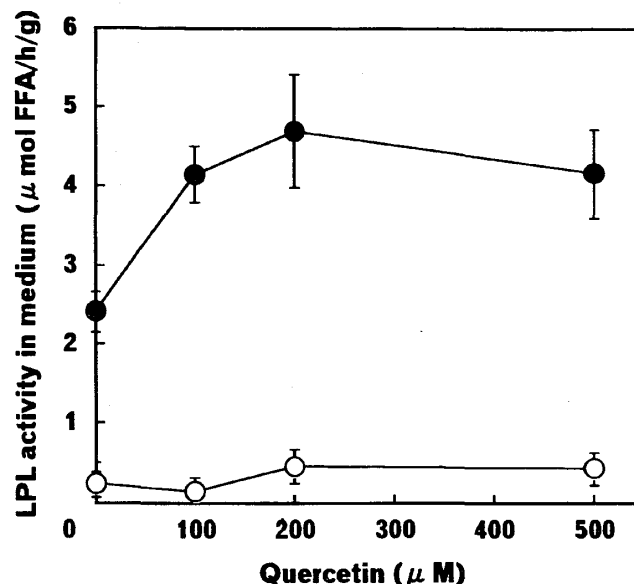


Fig. 3-1. Effect of Quercetin on Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadate

The fat pads were preincubated with quercetin at the indicated concentrations for 15 min, then further incubated with (●) or without (○) vanadate (2mM) for 90 min.

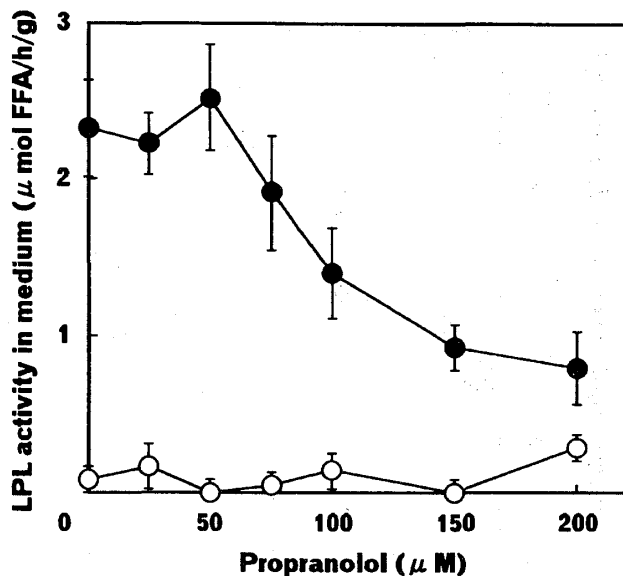


Fig. 3-2. Effect of Propranolol on Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadate

The fat pads were preincubated with propranolol at the indicated concentrations for 15 min, then further incubated with (●) or without (○) vanadate (2mM) for 90 min.

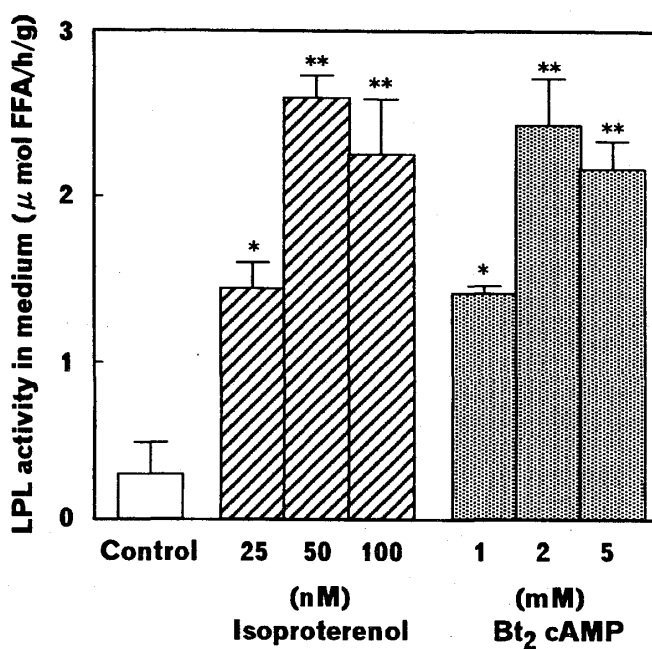


Fig. 3-3. Stimulatory Effect of Isoproterenol or Bt2cAMP on Release of LPL Activity from Fat Pads

The fat pads were incubated with isoproterenol or Bt2cAMP for 90 min.
 Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

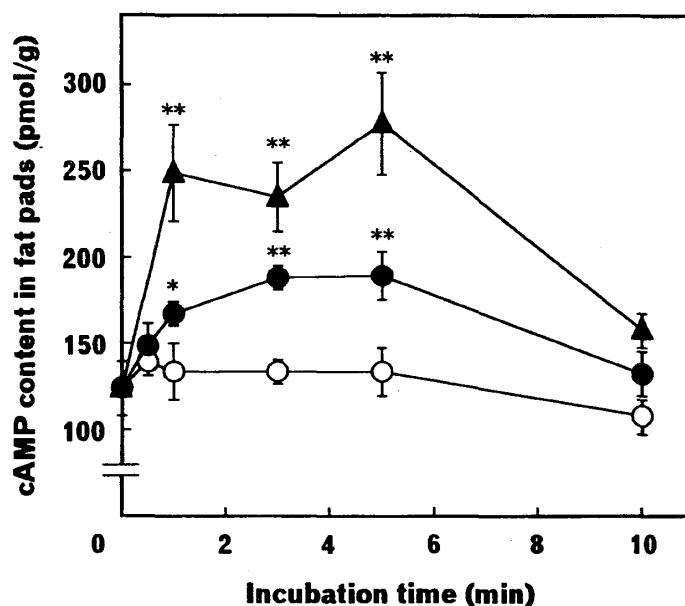


Fig. 3-4. Time Course of Increase in cAMP Content in Fat Pads by Vanadate or Isoproterenol

The fat pads were incubated with vanadate (2mM, ●) or isoproterenol (50nM, ▲) or without either one (○) for 0-10 min. Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

これまでに β 受容体の刺激薬であるイソプロテレノール⁴⁵⁾によるLPL活性の放出に関する報告はないが、脂肪細胞のカテコールアミン受容体を介してアデニレートサイクラーゼを活性化し、cAMPを生成することは知られている⁴⁶⁾。また培養細胞におけるジブチリルcAMP(Bt₂cAMP)によるLPL活性の調節はすでに報告されており、Bt₂cAMPとpreadipocytesを24時間インキュベートすることによって、反応液中へのLPL活性の分泌が促進する⁴⁷⁾ので、両薬物について検討した。Bt₂cAMPは、イソプロテレノールやバナデートと同様に90分間のインキュベートによって反応液中へのLPL活性の放出を促進した(Fig. 3-3)。それでは実際に脂肪組織中で、バナデートによってcAMP含量の変動が生じているかについて検討した。Figure 3-4は脂肪組織とバナデートまたはイソプロテレノールをインキュベートしたときの組織中cAMP含量の変動を示している。最大効果は、50nM イソプロテレノールで5分、2mM バナデートで3から5分という短時間のインキュベートで認められた。またこれらの作用は、200 μ M プロプラノロールの前処理によってほぼ完全に阻害された(Fig. 3-5)。

強力なPKA阻害剤であることが知られているH-8⁴⁸⁾は、バナデートによるLPL活性放出促進作用を濃度依存的に抑制し、2mMでほぼ完全に抑制が認められた(Fig. 3-6)。

Figure 3-7は2mM バナデートまたは100nM イソプロテレノールによる組織中のPKAの活

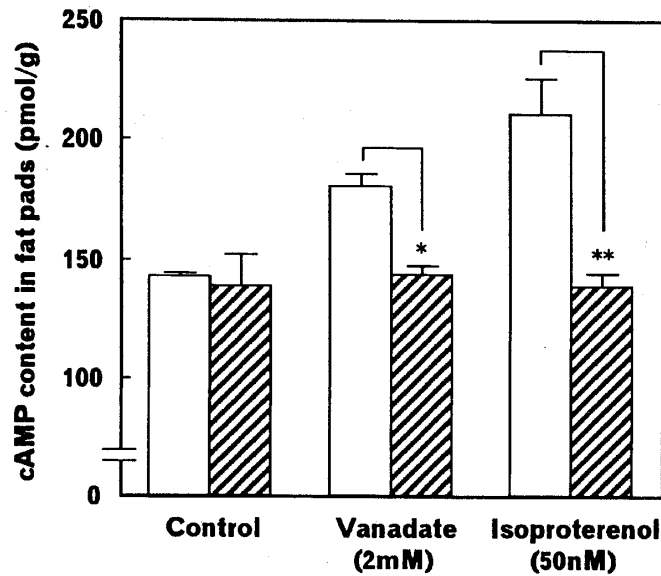


Fig. 3-5. Effect of Propranolol on cAMP Content in Vanadate- or Isoproterenol-Treated Fat Pads

The fat pads were preincubated with propranolol (200 μM, hatched bars) or without it (white bars) for 15 min, then further incubated with vanadate (2mM) or isoproterenol (50nM) for 3 min. Significant differences compared with each group without propranolol: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

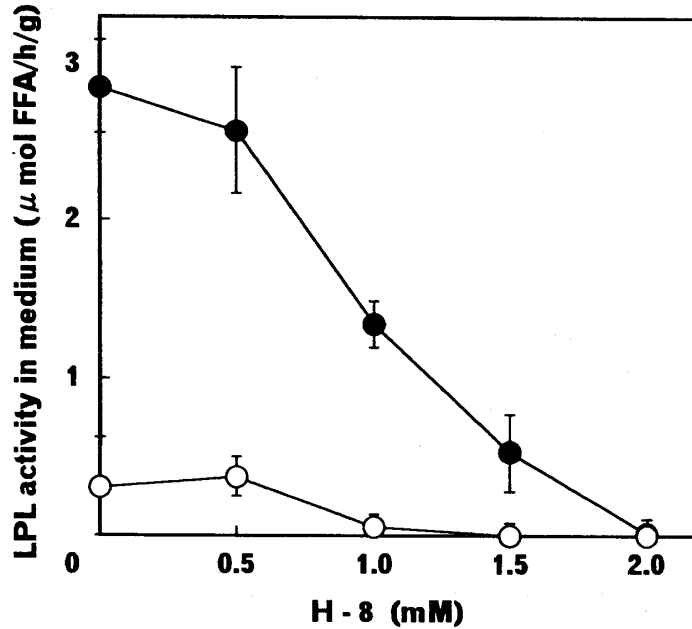


Fig. 3-6. Effect of H-8 on Vanadate-Stimulated Release of LPL Activity from Fat Pads

The fat pads were preincubated with H-8 at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with (●) or without (○) vanadate (2mM) for 90 min.

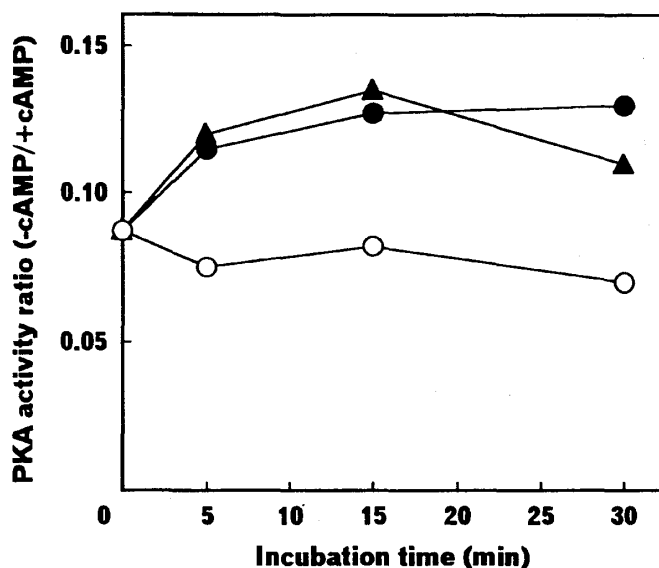


Fig. 3-7. Time course of Increase in PKA Activity Ratios in Fat Pads by Vanadate or Isoproterenol

The fat pads were incubated with vanadate (2mM, ●) or isoproterenol (100nM, ▲) or without either one (○) for 0-30 min.

活性化を示す。バナデートはインキュベート時間30分まで、またイソプロテレノールは15分まで時間依存的にPKAを活性化した。これらの結果は、バナデートがPKAの活性化を介し、LPL活性の放出を促進することを示唆している。細胞内のcAMP含量はATPからcAMPの変換を触媒するアデニレートサイクラーゼ活性と、cAMPから5'-AMPへ分解するcAMPホスホジエステラーゼ(PDE)活性の2つによって調節されている。バナデートはインスリン感受性PDEを活性化することが知られているので、少なくともcAMP含量の増加は分解系の抑制に基づくものではないと考えられる。したがって、バナデートによる脂肪組織中のcAMP含量の急速な増加は、アデニレートサイクラーゼの活性化によるものと思われる。哺乳類の組織において膜結合型アデニレートサイクラーゼは、タイプI~VIII型の8つのアイソマーが精製されているが⁴⁹⁾、バナデートによって活性化されるアデニレートサイクラーゼの詳細は不明である。

以上の結果から、バナデートは β 受容体系を介しcAMP含量を増加させ、それに伴うPKAを活性化する経路によって、LPL活性の放出を促進することが明らかになった。

4. バナデートによるラット脂肪組織中のcAMP含量増加作用に対するアデノシンの関与

アデノシンは多くの組織で神経伝達やその他多様な生理機能を調節しているが、特別な細胞や組織で生成され、特別な貯蔵顆粒に貯えられ、刺激に応じて放出されるという証拠はな

い。したがって伝達物質というより調節物質とみなされている。cAMP含量の増加にアデノシンが関与していることがモルモット大脳切片で最初に見いだされ、この作用がテオフィリンによって抑制されることからアデノシン受容体の存在が明らかになった^{50, 51)}。脂肪組織においても、アデニレートサイクラーゼ活性に対して、抑制性的アデノシンA₁受容体および促進性的アデノシンA₂受容体の存在が報告されている⁵²⁻⁵⁵⁾。しかしながら、バナデートが脂肪組織においてアデノシン量を調節するという報告は全くない。そこで、このバナデートによる組織中のcAMP含量の増加を介するLPL活性放出促進作用に対するアデノシンの関与、特に組織中のcAMP含量増加作用への影響について検討した。

バナデートによる脂肪組織中のcAMP含量の上昇が、短時間のインキュベートによって認められたことから、LPL活性放出促進作用との時間的な関連性について検討した。脂肪組織を0~30分間、2mM バナデートとインキュベートすると10分から反応液中へのLPL活性の放出が認められた(Fig. 4-1)。次に、このバナデートによるLPL活性放出促進作用に対するアデノシンの影響について検討した。アデノシン分解酵素であるアデノシンデアミナーゼを阻害するEHNA共存下において、アデノシンは100nM以上の濃度でバナデートによるLPL活性放出促進作用を抑制した(Fig. 4-2)。バナデートによる組織中のcAMP含量増加作用に対するアデノシンの影響についても、LPLに対する影響と同様な傾向を示した(Fig. 4-3)。これらの結果は、細胞外アデノシンレベルの変動が、脂肪組織からのLPL活性放出促進作用機構の一部であることを示唆している。脂肪細胞においては、アデニレー

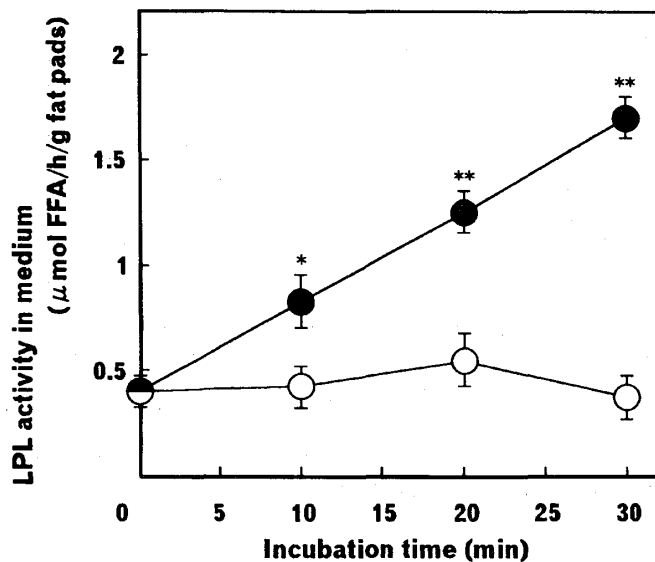


Fig. 4-1. Effect of Vanadate on Release of LPL Activity from Fat Pads

The fat pads were incubated with (●) or without (○) vanadate (2 mM) for 0-30 min.

Significant differences compared with the control (without vanadate):

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

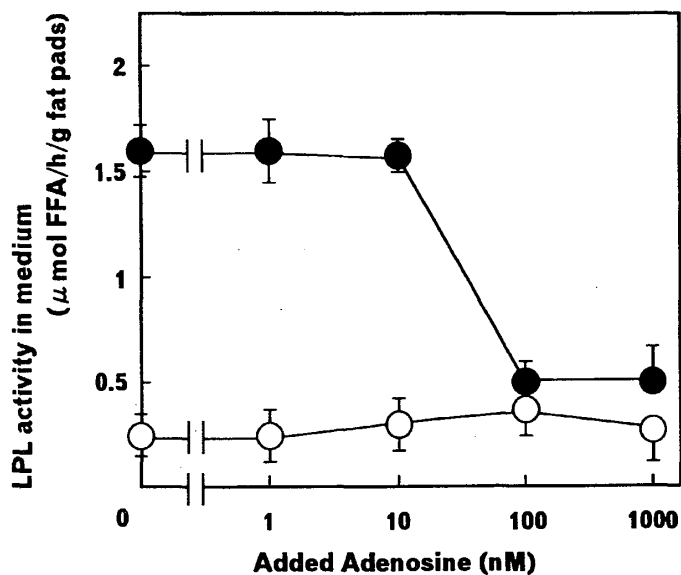


Fig. 4-2. Effect of Exogenous Adenosine on Vanadate-Stimulated Release of LPL Activity from Fat Pads

The fat pads were incubated with (●) or without (○) vanadate (2 mM) for 30 min after the addition of adenosine at the indicated concentrations, in the presence of 10 μ M EHNA.

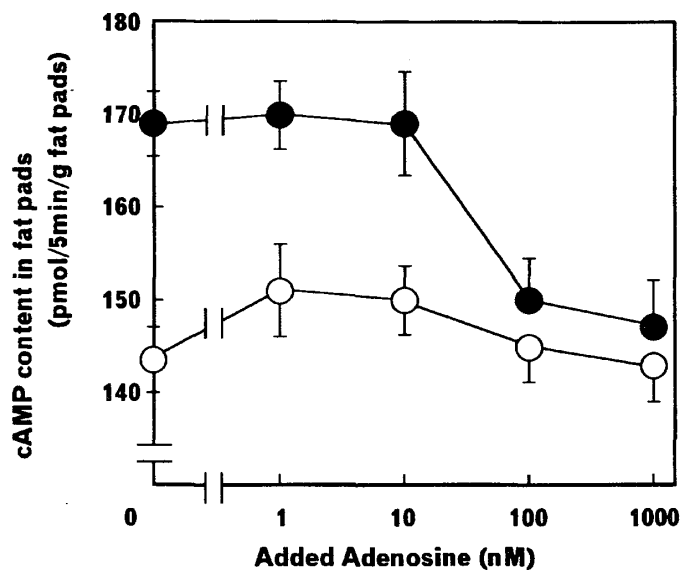


Fig. 4-3. Effect of Exogenous Adenosine on Vanadate-Increased cAMP Content in Fat Pads

The fat pads were incubated with (●) or without (○) vanadate (2 mM) for 5 min after the addition of adenosine at the indicated concentrations, in the presence of 10 μ M EHNA.

トサイクラーゼ活性に対する促進性のアデノシン A_2 受容体よりも抑制性の A_1 受容体の方が優位であることが知られている^{53, 55}。 アデニレートサイクラーゼ活性に対する抑制の解

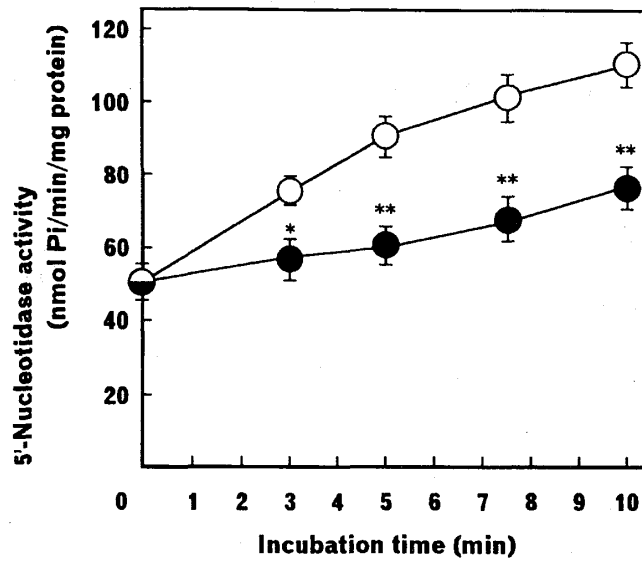


Fig. 4-4. Effect of Vanadate on 5'-Nucleotidase Activity

The fat pads were incubated with (●) or without (○) vanadate (2 mM) for 0-10 min, homogenized, and centrifuged to separate a particulate containing plasma membrane. The enzymatic activity was determined as described by Heppel et al.⁷⁶.

Significant differences compared with the control (without vanadate):

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

除は、細胞内cAMP含量が増加し、アドレナリンのcAMP含量増加作用に類似した作用を示すことになる。アデノシン受容体は、促進性G蛋白のGsにカップルしたA₂受容体と、抑制性G蛋白のGiにカップルしたA₁受容体によりアデニレートサイクラーゼ活性を調節している^{55, 56}。ラットの肝臓や脂肪細胞の細胞膜から調製した酵素を用いた結果から得られた仮説によると、バナデートによるアデニレートサイクラーゼの活性化は、GTP依存性の活性調節部位において、GTPに代わりGDP-VO₄³⁻錯体が結合することによるとされている⁵⁷。

しかしながら、脂肪組織においてアデニレートサイクラーゼはA₁受容体-Giシステムによって抑制性が有意に調節されている^{53, 55}。脂肪細胞と放射性物質である1mM [⁴⁸V]バナデートとの2時間のインキュベートでは、ゆっくりとした取り込みが見られ、0.8nMのバナデートが細胞内へ取り込まれる結果が報告されている⁵⁸。細胞反応を起こすには、この細胞内へ取り込まれたバナデートの濃度ではあまりにも低濃度であり、さらに2mMバナデートによるcAMP含量増加作用が100nMアデノシンによって完全に消失することなどから、脂肪組織では、バナデートがGDP-VO₄³⁻錯体を形成し、作用する可能性は否定される。次に、バナデートが組織外のアデノシンレベルの上昇を抑制する可能性が示唆されるので、AMPからアデノシンを生成する5'-ヌクレオチダーゼ活性の変動について検討した。脂肪組織を薬物非存在下、10分間インキュベートすると、膜結合型5'-ヌクレオチダーゼが活性化された。しかし、この活性化はバナデートによって、時間および濃度依存的に抑制され

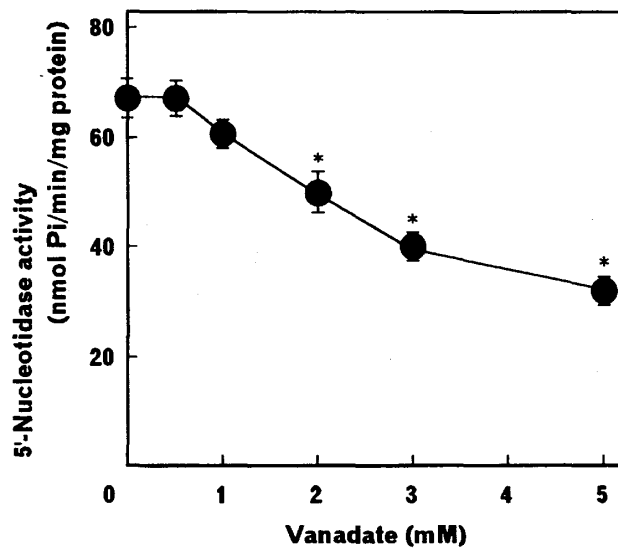


Fig. 4-5. Dose-Dependent Curve for Suppression of Elevated 5-Nucleotidase Activity by Vanadate

The fat pads were incubated with vanadate at the indicated concentrations for 10 min.

Significant differences compared with the control (without vanadate):

* $p < 0.05$

た (Fig. 4-4, 5)。

以上の結果から、バナデートによる脂肪組織中のcAMP含量増加を介したLPL活性放出促進機構の一部に、アデノシン生成系の抑制による細胞外のアデノシンレベルの減少によってアデニレートサイクラーゼが相対的に活性化されるプロセスを含むことが明らかになった。

5. バナデートによるLPL活性放出促進作用に対する黄杞茶成分アスチルビンの増強効果

黄杞茶は、中国の南部地域に野生するクルミ科の常緑高木、黄杞 (*Engelhardtia Chrysolepis* Hance) の葉を利用したもので、この地域では古くから清熱、解毒、減肥の目的で飲用されてきた。味はわずかに甘く、口当たり、のどごしが良いのが特徴で、主成分はジヒドロフラボノール配糖体のアスチルビンである^{59, 60}。アスチルビンは多様な生理作用を有し、肝における総コレステロール低下作用⁶¹、肝ミトコンドリアの酸化的ダメージからの保護作用や抗溶血作用⁶²、水晶体のアルドース還元酵素を阻害し糖尿病患者の白内障を防ぐ作用⁶³などが報告されている。先に、デヒドロフラボンであるクエルセチンの前処理によって、バナデートによるLPL活性の放出を増強することを示した。そこで、バナデートによるLPL活性の放出に対するクエルセチンと構造的に類似するアスチルビンの効果について検討した。

Figure 5-1は、バナデートによる反応液中へのLPL活性放出促進作用に対するアスチルビ

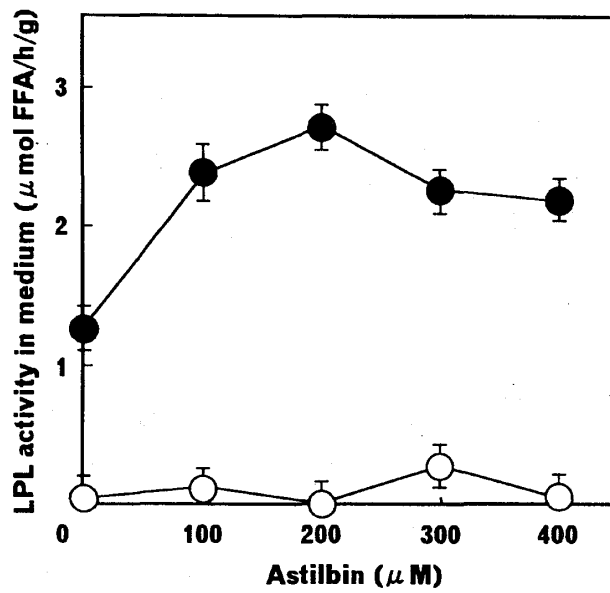


Fig. 5-1. Dose-Dependency of Astilbin on Stimulated Release of LPL Activity by Vanadate

The fat pads were preincubated with astilbin at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with (●) or without (○) vanadate (1 mM) for 90 min.

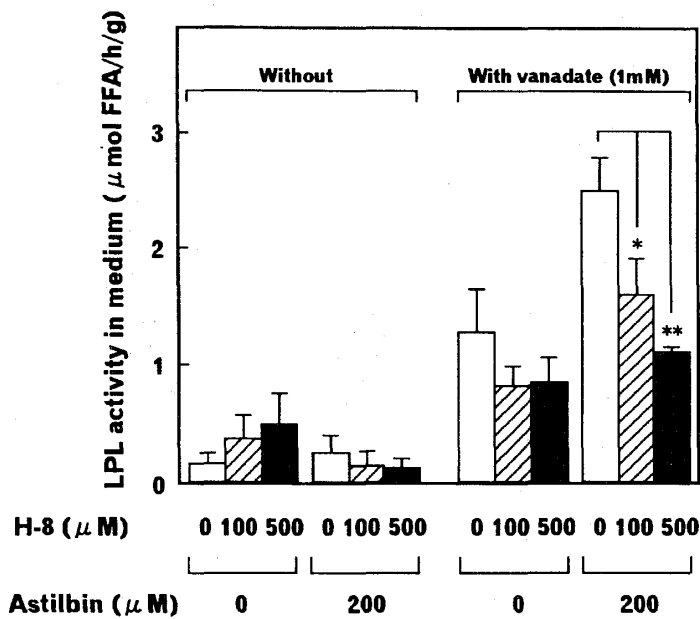


Fig. 5-2. Effect of H-8 on Enhancement of Vanadate-Stimulated Release of LPL Activity by Astilbin

The fat pads were preincubated with H-8, then astilbin at the indicated concentrations for 15 min each and further incubated with or without vanadate (1 mM) for 90 min. Significant differences compared with the vanadate-stimulated release group without H-8: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

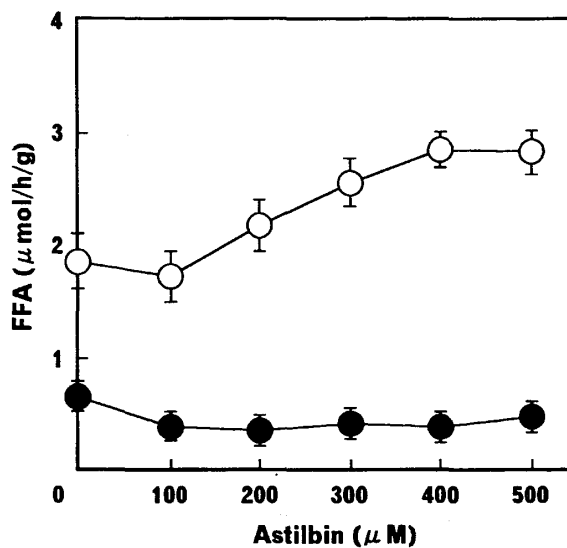


Fig. 5-3. Effect of Astilbin on Lipolysis in Fat Pads in the Presence or Absence of Vanadate

The fat pads were preincubated with astilbin at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with (●) or without (○) vanadate (1 mM) for 90 min.

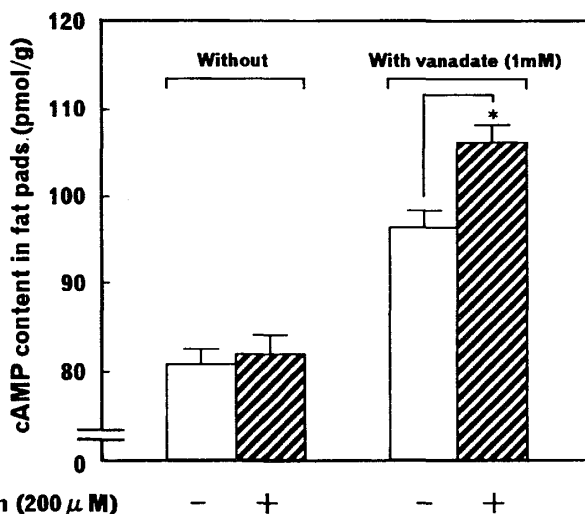


Fig. 5-4. Effect of Astilbin on Increase in Cellular cAMP Content by Vanadate

The fat pads were preincubated with or without astilbin (200 μM) for 15 min and further incubated with or without vanadate (1 mM) for 3 min.
Significant differences compared with the vanadate-treated group without astilbin: * $p < 0.05$.

の影響を示す。脂肪組織を400 μMまでのアスチルビンでプレインキュベートした後、さらに1mM バナデートを加えてインキュベートすると、バナデートの作用は増強された。この時、アスチルビン単独でのLPL活性放出は認められなかった。この増強効果は、脂肪

組織をPKA阻害剤のH-8⁴⁸⁾で前処理することによって抑制されたことから、アスチルピンは、PKAの活性化を介してバナデートの作用を増強させるものと考えられる(Fig. 5-2)。

Figure 5-3は、脂肪組織におけるlipolysisを示す。アスチルピンと脂肪組織をインキュベートすることによって、アスチルピンの濃度依存的にlipolysisが促進され、この作用はバナデート共存下で消失した。アスチルピンがLipolysis促進効果を示したことから、アドレナリンの β 受容体を介する効果に類似する作用を有すると考えられる。そこで次に組織中のcAMP含量について検討した。200 μ Mのアスチルピン単独作用時においては、組織中のcAMP含量の増加はわずかであったが、バナデートのcAMP含量増加作用に対しては増強効果を示した(Fig. 5-4)。これはアスチルピンが有する β 受容体を介する効果に類似する機構によって、バナデートの作用を増強したものと考えられる。またバナデートはcAMP含量を増加させるが⁶⁴⁾、一方でイソプロテレノールによるLipolysisに対しては、抑制効果を示すことが知られている⁶⁵⁾。細胞内のcAMP含量は主として、ATPからcAMPを生成するアデニレートサイクラーゼ活性と、cAMPを5'-AMPに分解するPDE活性とのバランスによって調節されている。我々は種々のPDEアイソザイムの中でcGMPで抑制されるIII型のPDEが、脂肪組織の膜顆粒画分に存在し、インスリンと同様にバナデートによって活性化され、さらにこのバナデートによるPDEの活性化はプロテインキナーゼC(PKC)の活性化を介して発現することをすでに見いだしている⁶⁶⁾。さらに本PDE活性に対する検

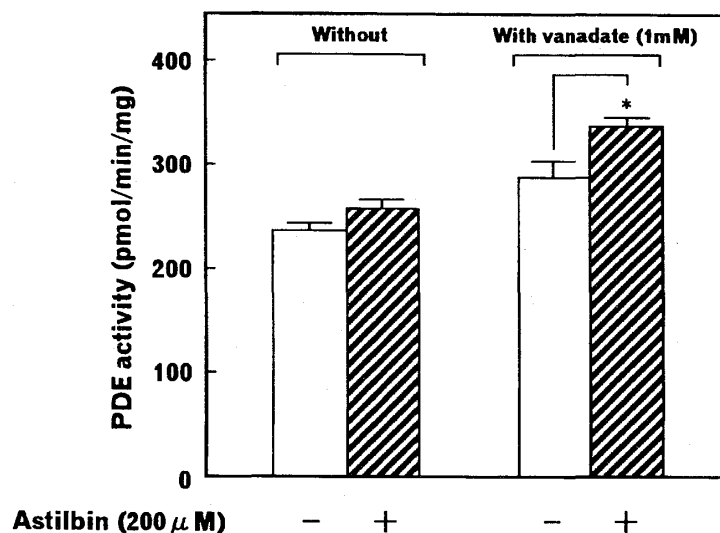


Fig. 5-5. Effects of Astilbin on Stimulation of PDE Activity in Particulate Fraction of Fat Pads by Vanadate

The fat pads were preincubated with or without astilbin (200 μ M) for 15 min and further incubated with or without vanadate (1 mM) for 60 min.

Significant differences compared with the vanadate-treated group without astilbin : * $p < 0.05$.

討を行うと、アスチルピンはバナデートのPDE活性化作用に対しても増強効果を示すことが確認された(Fig. 5-5)。したがって、バナデートによるLPL活性の放出においては、急速なcAMP含量の増加すなわちアデニレートサイクラーゼの活性化および、それに引き続き、上昇したcAMPを分解するPDEの活性化の過程が必須であると考えられる。

以上の結果から、アスチルピンはバナデートによって生成されるcAMP含量を増加させ、より大きなPKAの活性化を生じさせると同時に、PDEの活性化も増強し過剰なcAMPを分解することが示唆される。これらの作用によって、アスチルピンは、バナデートのLPL活性放出を増強させることが明らかになった。

6. バナジルによるラット脂肪組織からのLPL活性放出促進作用

5価のバナジウム化合物であるバナデートによるラット脂肪組織からのLPL活性の放出促進は、即時性の1,4,5-IP₃含量およびcAMP含量の増加に伴う細胞内Ca²⁺の増加とPKAの活性化を介し発現することをこれまでの1~5章で明らかにした。

バナジウム化合物の酸化状態は、生理的条件下で容易に変化することが知られている⁶⁷⁾。4価のバナジウム化合物であるバナジルは、37℃のHepes buffer (pH 7.4) 中で、半減期1.0±0.1時間で、バナデートへ酸化されることが報告されている⁶⁸⁾。反応液にグルタチオンを共存させても、酸化速度にほとんど影響を及ぼさない。5価化合物は、VO₃⁻ (メタバナデート) やVO₄³⁻ (バナデート) などの陰イオン性であるのに対し、4価化合物は、VO²⁺ (バナジル) のように陽イオン性である。また、バナデートに比してバナジルは、蛋白質と容易に結合することが知られている⁶⁷⁾。脂肪組織や脂肪細胞とバナジルをインキュベートし、その生理作用を検討する場合は、一般にウシ血清アルブミン(BSA)の共存下で行う。

さらに *in vivo* または *in vitro* 実験においてバナジルは、細胞との反応の前に、すみやかに5価へ酸化されるか、または血清蛋白、主にアルブミンと結合し錯体を形成する。したがって、バナジルが4価または5価のどちらの酸化状態で生理作用を及ぼすのかは不明であり、ラット脂肪組織のLPL活性に及ぼすバナジルの作用は報告されていない。そこで、BSAとの錯体形成により安定化したバナジル-BSA錯体(バナジル-BSA)のラット脂肪組織のLPL活性に対する作用を検討した。

バナジルはBSAと錯体を形成することにより、バナジル単独に比べ、4価の酸化状態を長く維持するという結果を得た(Fig. 6-1)。すなわち、バナジル単独では37℃のKRBG下での5価への酸化時間の $t_{1/2}$ は0.9±0.01時間であるのに対し、バナジル-BSAの $t_{1/2}$ は7.3±0.01時間へ延長された。またバナジル-BSAは、少なくとも2.5時間まで4価の状態が保持された。

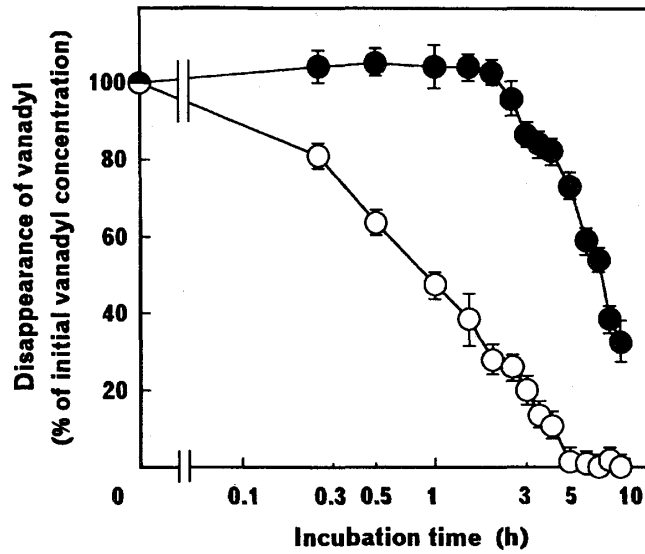


Fig. 6-1. Stability of Vanadyl in the Presence or Absence of BSA

Vanadyl (3mM) was incubated with (●) or without (○) BSA (0.3mM) in KRBG at 37°C. At indicated times, aliquots were acidified with HCl and the amount of vanadyl in the V⁴⁺ oxidation state was calculated as described by Gupta et al.^{77).}

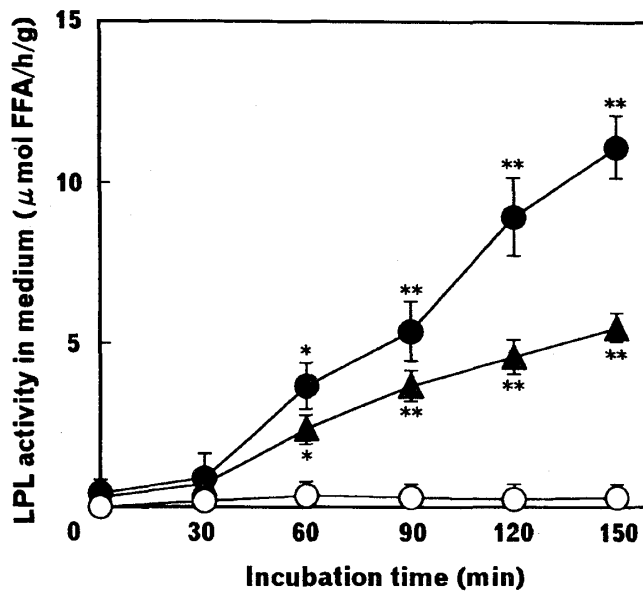


Fig. 6-2. Time Course of Stimulatory Effects of Vanadyl-BSA and Vanadate on Release of LPL Activity from Fat Pads

The fat pads were incubated with 2mM vanadyl-BSA (●) or vanadate (▲) or without either one (○) in KRBGA up to 150 min. Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 6-2は、インキュベート時間150分までの2mM バナジル-BSAまたはバナデートによる脂肪組織からのLPL活性放出促進作用について示している。バナジル-BSAはバナデー

トと同様、時間依存的にLPL活性の放出を促進し、インキュベート時間120分および150分におけるこのバナジル-BSAの作用はバナデートのおよそ2倍の作用を示した。コントロールにおけるLPL活性の放出は認められなかった。脂肪組織との90分間のインキュベートにおけるバナジル-BSAまたはバナデートの濃度依存性は、両者ともに2mMまで直線的な増加が認められた (Fig. 6-3)。そのバナジル-BSAの最大効果は、バナデートのおよそ1.5倍の高値を示した。

Figure 6-4は、バナジル-BSAによるLPL活性放出促進作用および脂肪組織中のLPL活性の増強作用に対する各種阻害剤の効果を示している。β-アドレナリン受容体拮抗薬のプロプラノロール⁴⁴⁾、PKA阻害剤のH-8⁴⁸⁾、細胞内Ca²⁺キレーターであるquin 2-AM¹⁶⁾、Ca²⁺トランスポートを阻害するルテニウムレッド¹⁷⁻¹⁹⁾、およびPLCの阻害剤であるネオマイシン^{26, 27)}の以上の薬物によって、バナジル-BSAによるLPL活性の放出促進作用が著しく抑制されたが、インスリン受容体を含むチロシンキナーゼ阻害剤であるクエルセチン⁴²⁾では、ほとんど阻害されなかった。これらの結果は、cAMP系、および1,4,5-IP₃系の関与を示唆するものであるので、さらに検討を行った。

Figure 6-5は、2mM バナジル-BSAによる脂肪組織中cAMP含量の変動についての時間依存性を示している。cAMP含量は、0.5~3分という短時間のインキュベートにより約1.6倍に増加し、5分後には、ほぼ元のレベルにまで減少した。インキュベート時間3分におけ

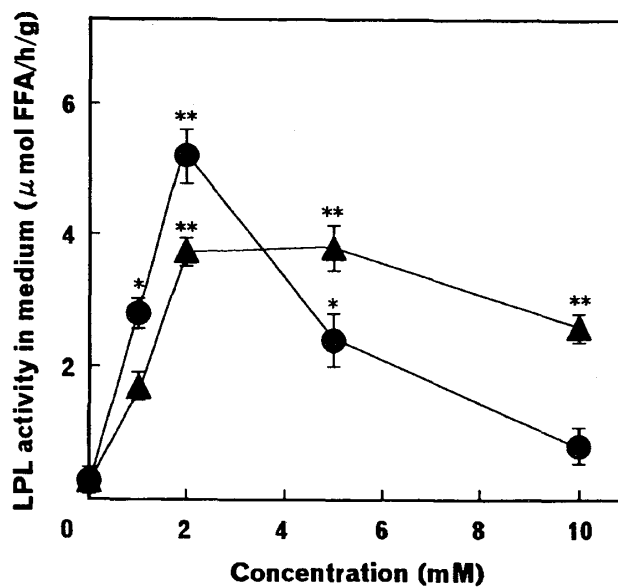


Fig. 6-3. Dose-Response Curves for Stimulatory Effects of Vanadyl-BSA and Vanadate on Release of LPL Activity from Fat pads

The fat pads were incubated with vanadyl-BSA (●) or vanadate (▲) in KRBGA for 90 min at the indicated concentrations. Significant differences compared with the control (without vanadyl-BSA or vanadate): * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

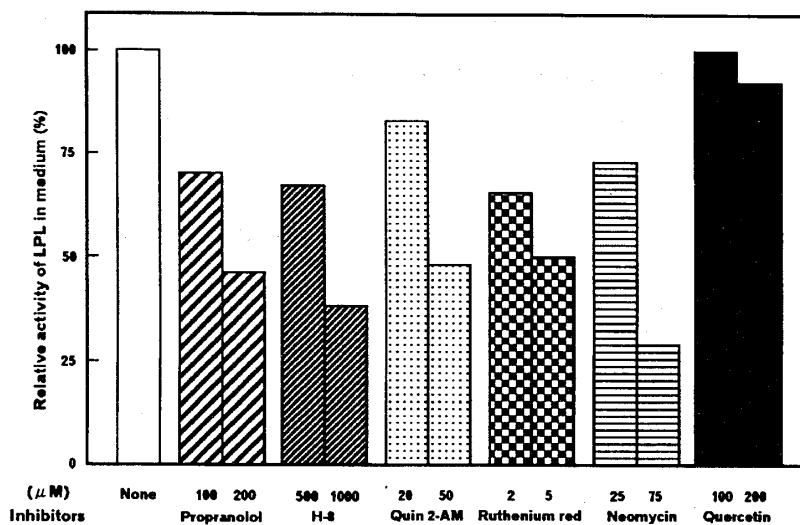


Fig.6-4. Effects of Various Inhibitors on Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadyl-BSA

The fat pads were preincubated with or without inhibitors for 15 min and further incubated with or without 2 mM vanadyl-BSA in KRBGA for 90 min.

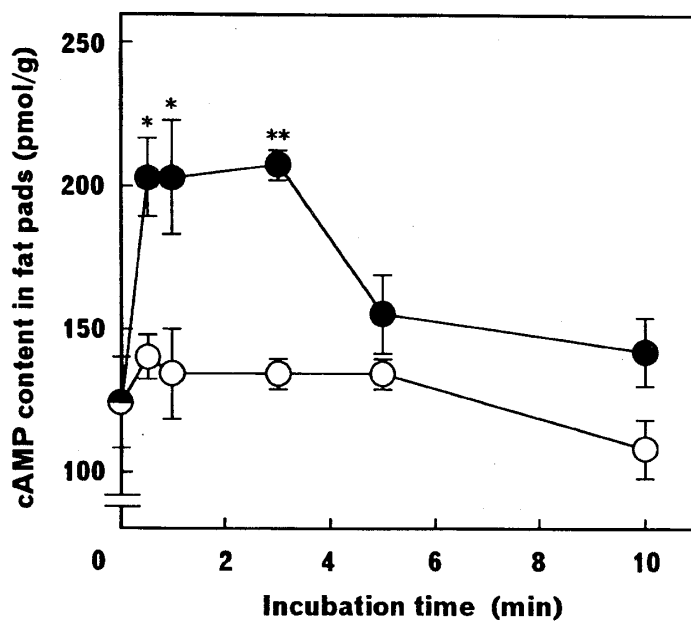


Fig. 6-5. Time Course of Increase in cAMP Content in Fat Pads by Vanadyl-BSA

The fat pads were incubated with (●) or without (○) 2mM vanadyl-BSA in KRBGA up to 10 min.
 Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

る10mMまでのバナジル-BSAの濃度依存性については、2mMで最大効果が得られ、5およ

び10mMでは減少した(Fig. 6-6)。さらにバナジル-BSAによる脂肪組織中のcAMP含量増加作用は、100および200 μ M プロプラノロールの前処理によって抑制された(Fig. 6-7)。

細胞内cAMPに依存するL型Ca²⁺チャンネルの調節が、肝細胞⁶⁹⁾、心筋⁷⁰⁾、部分精製された心臓の α_1 サブユニット⁷¹⁾で報告されている。これらは、アデニレートサイクラーゼの活性化およびcAMPに依存したCa²⁺チャンネルのリン酸化が細胞内Ca²⁺濃度を増加させることを示している。したがってバナジル-BSAの作用機構においても、PKAによるCa²⁺チャンネルの活性化によるCa²⁺動員が含まれると考えられる。

Figure 6-8は、2mM バナジル-BSAによる脂肪組織中1,4,5-IP₃含量の変動についての時間依存性を示している。1,4,5-IP₃含量は、15秒間のインキュベートで最大となり元のレベルの1.5倍にまで増加し、以後急速に減少して120秒後には、ほぼ元のレベルに減少した。

インキュベート時間15秒における10mMまでのバナジル-BSAの濃度依存性については、2mMで最大効果が得られ、5および10mMでは減少した(Fig. 6-9)。このバナジル-BSAによる脂肪組織中の1,4,5-IP₃含量増加作用は、50および100 μ M ネオマイシンの前処理によって抑制された(Fig. 6-10)ので、バナジル-BSAによるLPL活性放出促進作用も、バナデートと同様にPLCの活性化を介し1,4,5-IP₃含量を増加させ、細胞内Ca²⁺貯蔵器官である小胞体に作用しCa²⁺動員を引き起こす経路の存在が示唆される。細胞からの蛋白の分泌は、一

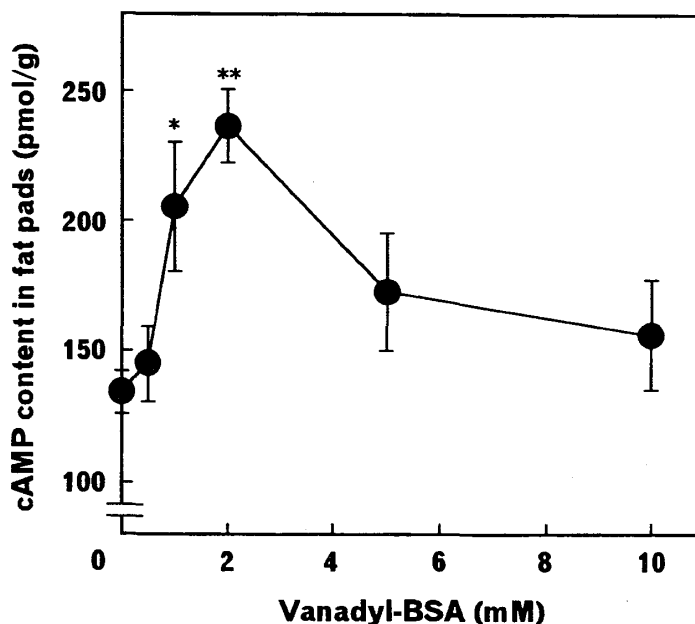


Fig. 6-6. Dose-Response Curve for Increase in cAMP Content in Fat Pads by Vanadyl-BSA

The fat pads were incubated with vanadyl-BSA (●) in KRBGA for 3 min at the indicated concentrations. Significant differences compared with the control (without vanadyl-BSA): * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

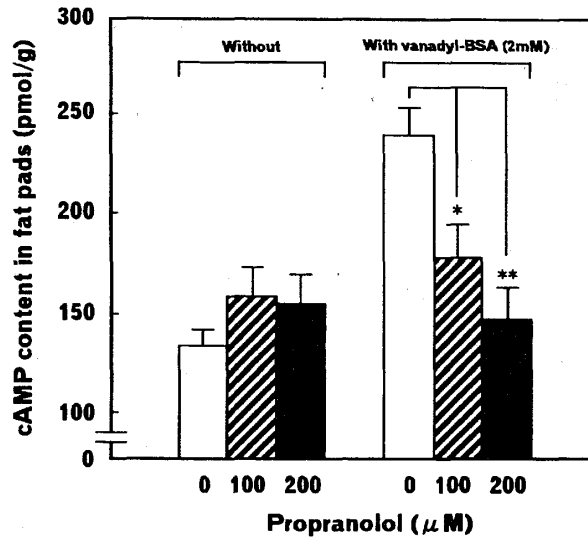


Fig. 6-7. Inhibitory Effect of Propranolol on Increase in Cellular cAMP Content by Vanadyl-BSA

The fat pads were preincubated with or without 100 and 200 μ M propranolol for 15 min and further incubated with or without 2 mM vanadyl-BSA in KRBGA for 3 min. Significant differences compared with the vanadyl-BSA-treated group without propranolol: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

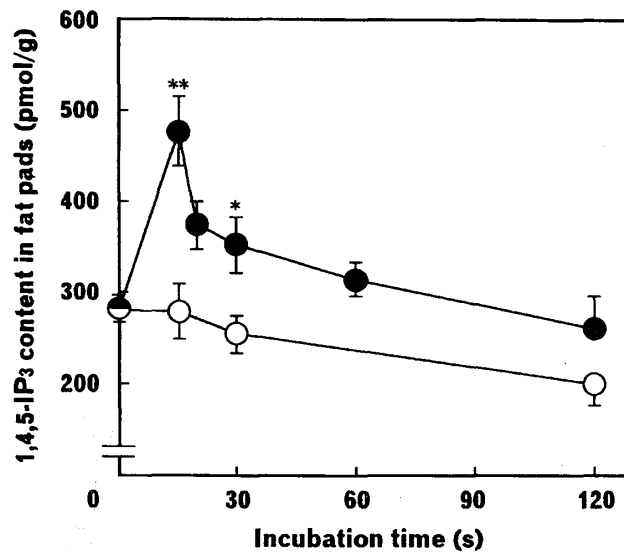


Fig. 6-8. Time Course of Increase in 1,4,5-IP₃ Content in Fat Pads by Vanadyl-BSA

The fat pads were incubated with (●) or without (○) 2mM vanadyl-BSA in KRBGA up to 120 s. Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

一般的に調節性分泌および調節を受けずに常時分泌されるものの2つのタイプが存在する⁷²⁾。内分泌細胞のような調節性分泌細胞においては、新たに精製された蛋白は刺激を受けるまで

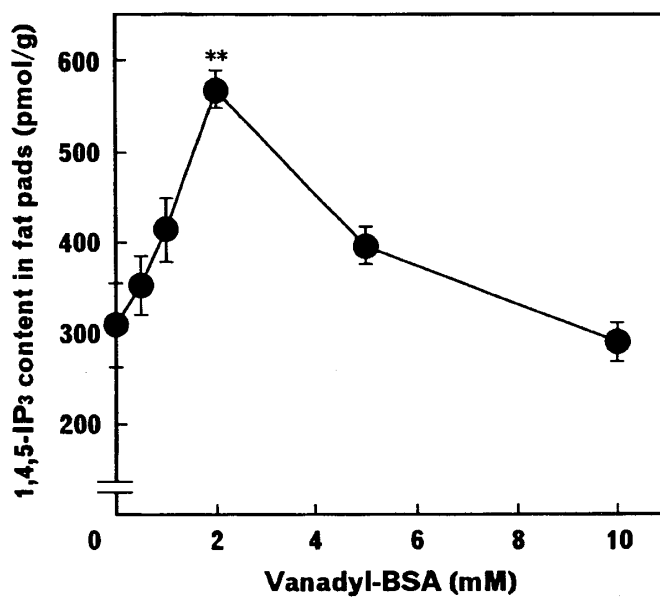


Fig. 6-9. Dose-Response Curve for Increase in 1,4,5-IP₃ Content in Fat Pads by Vanadyl-BSA

The fat pads were incubated with vanadyl-BSA (●) in KRBGA for 15 s at the indicated concentrations. Significant differences compared with the control (without vanadyl-BSA): ** $p < 0.01$.

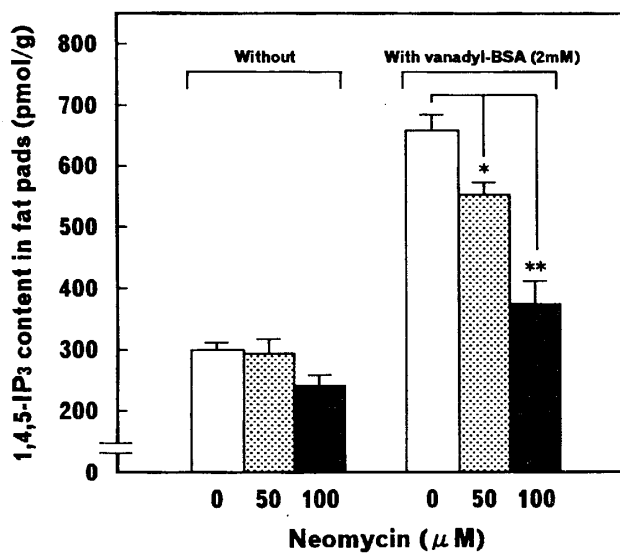


Fig. 6-10. Inhibitory Effect of Neomycin on Increase in Cellular 1,4,5-IP₃ Content by Vanadyl-BSA

The fat pads were preincubated with or without 50 and 100 μM neomycin for 15 min and further incubated with or without 2 mM vanadyl-BSA in KRBGA for 15 s. Significant differences compared with the vanadyl-BSA-treated group without neomycin: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

は、分泌顆粒中で高濃度に貯えられている。分泌顆粒は細胞質のメッセンジャー、ほとんどの場合は Ca^{2+} であるが、この Ca^{2+} の上昇が生じなければ細胞膜との融合は起こらない。エキソサイトーシスによる蛋白の分泌では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が分泌顆粒と細胞膜との融合時に必須であるとされている。一方、肝細胞や繊維芽細胞、筋肉細胞などの非調節性細胞では、生合成された蛋白は細胞内に貯蔵されることなく、すみやかに細胞外へ分泌される。脂肪組織において、刺激なしに分泌されるLPLはほとんどなく、LPL活性の放出は、バナジル-BSAまたはバナデートを加えた時にのみ見られた。これらのことを踏まえると、バナジル-BSAによる脂肪組織からのLPL活性の放出は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した調節性分泌である。

バナジウム化合物は当初、インスリン受容体 β サブユニットのリン酸化促進によってインスリン様作用を示す³⁵⁾と考えられていたが、最近の研究によると、インスリン受容体チロシンキナーゼのリン酸化に非依存的であるといわれている⁷²⁻⁷⁵⁾。想定されるバナジウム作用メカニズムの1つとしては、細胞内に取り込まれたバナジウムが、チロシンホスファターゼを阻害することによって、インスリンのシグナルカスケード上のリン酸化された重要な物質の脱リン酸化を防止することによるのかもしれない⁷⁵⁾。我々の結果において、一過性の組織中のcAMPおよび1,4,5- IP_3 含量の増加は、短時間のインキュベーションによって生じていることから、細胞膜を介する反応と考えられる。その後、バナジルが細胞内へ取り込まれLPL活性の放出を促進するのかは不明である。

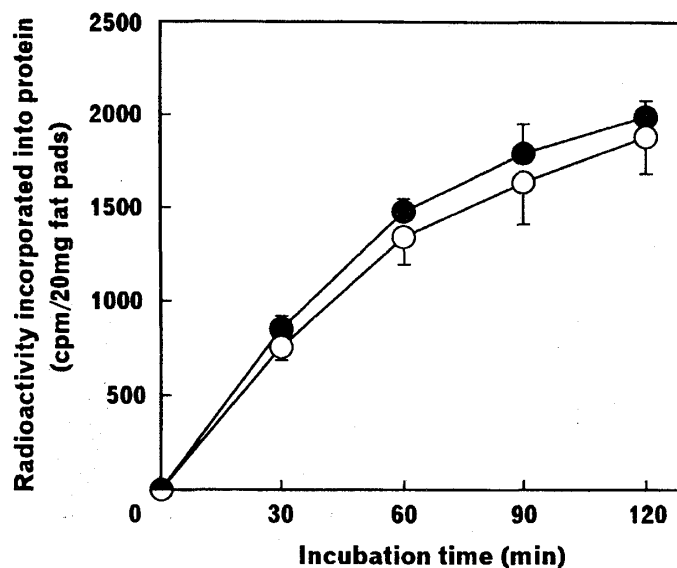


Fig. 6-11. Incorporation of $[^3\text{H}]$ Leucine into Protein of Fat Pads by Incubated with or without Vanadyl-BSA

The fat pads were incubated with (●) or without (○) 2mM vanadyl-BSA in 1ml of KRBGA containing $[^3\text{H}]$ leucine (18.5 kBq) up to 120 min.

次に、バナジル-BSAによる反応液中へのLPL活性放出促進作用および組織中のLPL活性増強作用が、蛋白合成に依存するかについて検討した。脂肪組織の蛋白への $[^3\text{H}]$ leucineの取り込みに対して、バナジル-BSAとコントロールとの間に明らかな差は認められなかつ

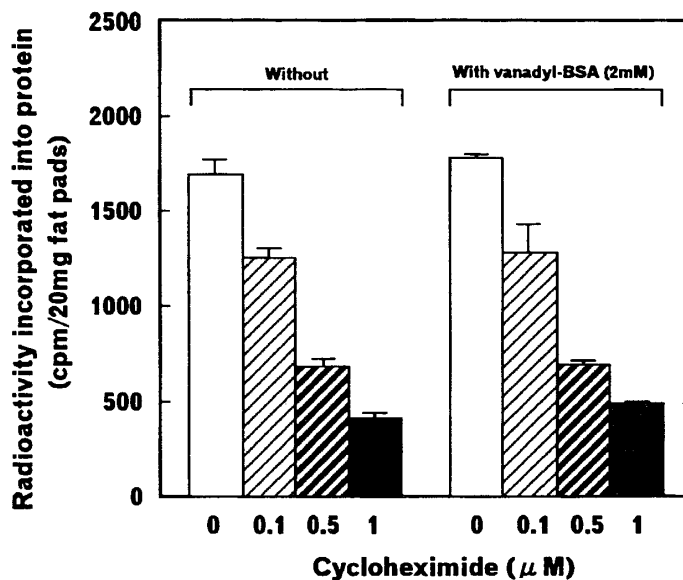


Fig. 6-12. Effect of Cycloheximide on Incorporation of $[^3\text{H}]$ Leucine into Protein of Fat Pads

The fat pads were incubated with cycloheximide for 90 min at the indicated concentrations, as described in the legend of Fig. 6-11.

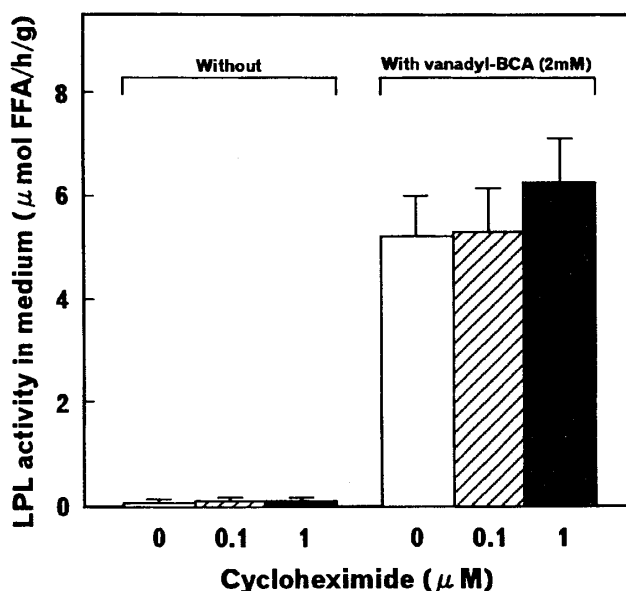


Fig. 6-13. Effect of Cycloheximide on Stimulatory Release of LPL Activity from Fat Pads by Vanadyl-BSA

The fat pads were incubated with or without 2mM vanadyl-BSA for 90 min in the presence of cycloheximide.

た(Fig. 6-11)。 Figure 6-12に示されるように、脂肪組織の蛋白合成を73および28%に阻害するシクロヘキシミドの濃度0.1および1 μ M 存在下でも、バナジル-BSAによるLPL活性放出促進作用は、全く阻害されなかった(Fig. 6-13)。

以上の結果から、バナジル-BSAはバナジルの4価から5価への自然的な酸化を保護し、脂肪組織中のcAMPおよび1,4,5-IP₃含量を一過性に増加させ、続いて細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き起こすと考えられる。これらの過程がLPL活性の放出促進機構に含まれていることが明らかとなった。

7. おわりに

本研究では、Fig. 7-1 に示すように、バナジウム化合物をbiological toolとして用いることによって、今まで不明であったLPLの組織外への分泌機構に、組織中の1,4,5-IP₃およびcAMP含量の増加を介する細胞内Ca²⁺動員が重要な役割を果たしていることを解明した。

本研究の成果は、より副作用の少ない高脂血症治療薬をはじめ、動脈硬化症や脳梗塞、虚血性心疾患予防薬の開発への一助になると考える。

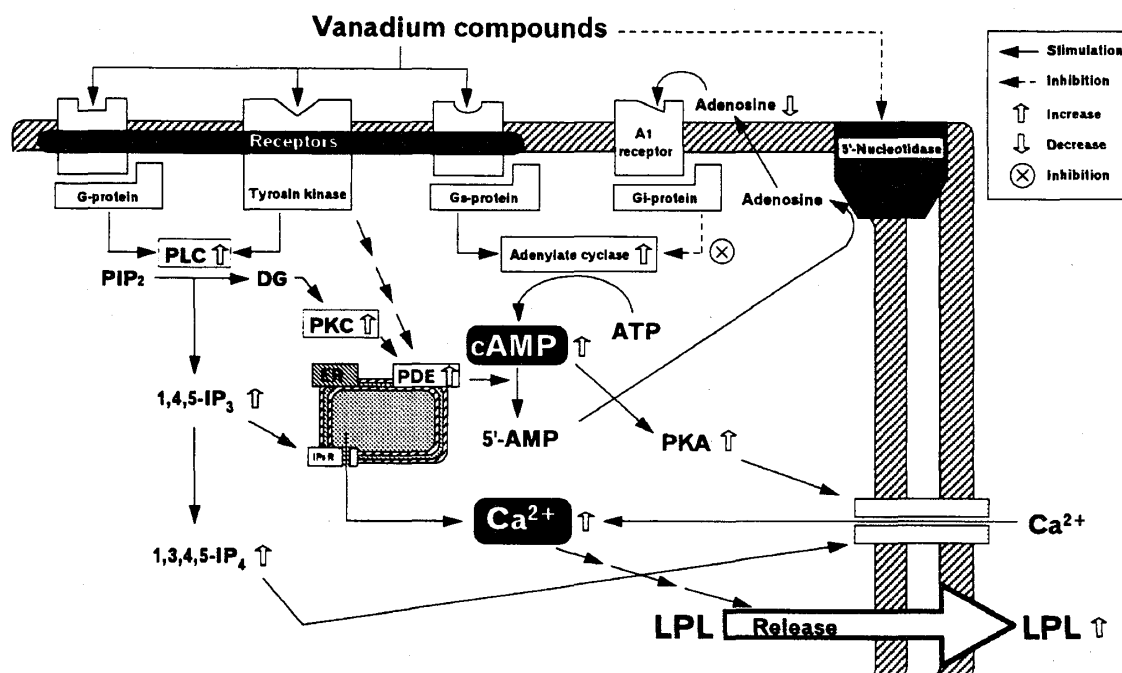


Fig. 7-1. Possible Mechanisms of Vanadium Compound Actions

本総説は、学位論文（本屋敷敏雄、福山大学、1999年11月）の要録である。

参考文献

- 1) Havel R., Gordon R. S. Jr., *J. Clin. Invest.*, **39**, 1777-1796 (1960).
- 2) Ong J. M., Kirchgessner T. G., Schotz M. C., Kern P. A., *J. Biol. Chem.*, **263**, 12933-12938 (1988).
- 3) Ashby P., Bennett D. P., Spencer I. M., Robinson D. S., *Biochem. J.*, **176**, 865-872 (1978).
- 4) Olivecrona T., Bengtsson G., Marklund S., Lindahl V., Höök M., *Fed. Proc.*, **36**, 60-65 (1977).
- 5) Stewart J. E., Schotz M. C., *J. Biol. Chem.*, **249**, 904-907 (1974).
- 6) Cryer A., McDonald A., Williams E. R., Robinson D. S., *Biochem. J.*, **152**, 717-721 (1975).
- 7) AL-Jafari A. A., Cryer A., *Biochem. J.*, **238**, 239-246 (1986).
- 8) Cupp M., Bensadoun A., Melford K., *J. Biol. Chem.*, **262**, 6383-6388 (1987).
- 9) Stam H., Hüsmann W. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **794**, 72-82 (1984).
- 10) Severson D. L., Carroll R., Kryski A. Jr., Ramirez I., *Biochem. J.*, **248**, 289-292 (1987).
- 11) Vannier C., Amri E-Z., Etienne J., Négrel R., Ailhaud G., *J. Biol. Chem.*, **260**, 4424-4431 (1985).
- 12) Amri E-Z., Vannier C., Etienne J., Ailhaud G., *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 334-343 (1986).
- 13) Olivecrona T., Chernick S. S., Bengtsson-Olivecrona G., Garrison M., Scow R. O., *J. Biol. Chem.*, **262**, 10748-10759 (1987).
- 14) Vannier C., Etienne J., Ailhaud G., *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 344-354 (1986).
- 15) Glick J., Rothblat G. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 163-172 (1980).
- 16) Tsien R. Y., Pozzan T., Rink T. J., *J. Cell Biol.*, **94**, 325-334 (1982).
- 17) Cittadini A., Scarpa A., Chance B., *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 246-259 (1973).
- 18) Chiesi M., Schwaller R., Calviello G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 1-8 (1988).
- 19) Brunder D. G., Dettbarn C., Palade P., *J. Biol. Chem.*, **263**, 18785-18792 (1988).
- 20) Downes C. P., Macphee C. H., *Eur. J. Biochem.*, **193**, 1-18 (1990).
- 21) Shears S. B., *Biochem. Biophys. Acta*, **1436**, 49-67 (1998).
- 22) Chilvers E. R., Batty I. H., Challiss R. A. J., Barnes P. J., Nahorski S. R., *Biochem. J.*, **275**, 373-379 (1991).
- 23) Delfert D. M., Hill S., Pershadsingh H. A., Sherman W. R., McDonald J. M.,

- Biochem. J.*, **236**, 37–44 (1986).
- 24) Föhr K. J., Scott J., Ahnet-Hilger G., Gratzl M., *Biochem. J.*, **262**, 83–89 (1989).
 - 25) Rossier M. F., Bird G. S. J., Putney J. W. Jr., *Biochem. J.*, **274**, 643–650 (1991).
 - 26) Downes C. P., Michell R. H., *Biochem. J.*, **198**, 133–140 (1981).
 - 27) Streb H., Heslop J. P., Irvine R. F., Schulz I., Berridge M. J., *J. Biol. Chem.*, **260**, 7309–7315 (1985).
 - 28) Irvine R. F., Letcher A. J., Heslop J. P., Berridge M. J., *Nature(London)*, **320**, 631–634 (1986).
 - 29) Irvine R. F., Moor R. M., *Biochem. J.*, **240**, 917–920 (1986).
 - 30) Connolly T. M., Bross T. E., Majerus P. W., *J. Biol. Chem.*, **260**, 7868–7874 (1985).
 - 31) Nahorski S. R., *Trends Neurosci.*, **11**, 444–448, (1988).
 - 32) Ferris C. D., Haganir R. L., Supattapone S., Snyder S. H., *Nature(London)*, **342**, 87–89 (1989).
 - 33) Sera M., Tanaka K., Morita T., Ueki H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**, 291–297 (1990).
 - 34) Ueki H., Okuhama R., Sera M., Inoue T., Tominaga N., Morita T., *Endocrinology*, **131**, 441–446 (1992).
 - 35) Tamura S., Brown T. A., Whipple J. H., Fujita-Yamaguchi Y., Dubler R. E., Cheng K., Larner J., *J. Biol. Chem.*, **259**, 6650–6658 (1984).
 - 36) Duckworth W. C., Solomon S. S., Liepnieks J., Hamel F. G., Hand S., Peavy D. E., *Endocrinology*, **122**, 2285–2289 (1988).
 - 37) Mooney R. A., Bordwell K. L., Luhowskyj S., Casnellie J. E., *Endocrinology*, **124**, 422–429 (1989).
 - 38) Schwabe U., Puchstein C., Hannemann H., Söchting E., *Nature(London)*, **277**, 143–145 (1979).
 - 39) Hayashi Y., Kimura T., *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 29–36 (1986).
 - 40) Mittag T. W., Guo W.-B., Taniguchi T., *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1311–1316 (1993).
 - 41) Morita T., Sakata K., Kanagawa A., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 577–580 (1994).
 - 42) Shisheva A., Shechter Y., *Biochemistry*, **31**, 8059–8063 (1992).
 - 43) Kuppusamy U. R., Das N.P., *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 521–529 (1994).
 - 44) Barrett A. M., Cullum V. A., *Br. J. Pharmacol.*, **34**, 43–55 (1968).
 - 45) Lands A. M., Luduena F. P., Buzzo H. J., *Life Sci.*, **6**, 2241–2249 (1967).

- 46) Bousquet-Mélou A., Galitzky J., Moreno C. M., Berlan M., Lafontan M., *Eur. J. Pharmacol.*, **289**, 235-247 (1995).
- 47) Friedman G., Chajek-Shaul T., Stein O., Stein Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **752**, 106-117 (1983).
- 48) Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y., *Biochemistry*, **23**, 5036-5041 (1984).
- 49) Taussig R., Gilman A. G., *J. Biol. Chem.*, **270**, 1-4 (1995).
- 50) Sattin A., Rall T. W., *Mol. Pharmacol.*, **6**, 13-23 (1970).
- 51) Olsson R. A., Pearson J. D., *Physiol. Rev.*, **70**, 761-845 (1990).
- 52) Londos C., Cooper D. M. F., Schlengel W., Rodbell M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5362-5366 (1978).
- 53) García-Sáinz J. A., Torner M. L., *Biochem. J.*, **232**, 439-443 (1985).
- 54) Fredholm B. B., *Methods Pharmacol.*, **6**, 337-357 (1985).
- 55) Ramkumar V., Pierson G., Stiles G. L., *Prog. Drug Res.*, **32**, 195-247 (1988).
- 56) Gilman A. G., *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 615-649 (1987).
- 57) Combest W. L., Johnson R. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 916-927 (1983).
- 58) Dubyak G. R., Kleinzeller A., *J. Biol. Chem.*, **255**, 5306-5312 (1980).
- 59) Kasai R., Hirono S., Chou W. -H., Tanaka O., Chen F. -H., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4167-4170 (1988).
- 60) Kasai R., Hirono S., Chou W. -H., Tanaka O., Chen F. -H., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1871-1872 (1991).
- 61) Igarashi K., Uchida Y., Murakami N., Mizutani K., Masuda H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 513-515 (1996).
- 62) Haraguchi H., Mochida Y., Sakai S., Masuda H., Tamura Y., Mizutani K., Tanaka O., Chou W. -H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 945-948 (1996).
- 63) Haraguchi H., Ohmi I., Masuda H., Tamura Y., Mizutani K., Tanaka O., Chou W. -H., *Experientia*, **52**, 564-567 (1996).
- 64) Motoyashiki T., Morita T., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1412-1416 (1996).
- 65) Li J., Elberg G., Sekar N., He Z. B., Shechter Y., *Endocrinology*, **138**, 2274-2279 (1997).
- 66) Ueki H., Mitsugi S., Kawashima Y., Motoyashiki T., Morita T., *Endocrinology*, **138**, 2784-2789 (1997).
- 67) Chasteen N. D., *Struct. Bonding*, **53**, 105-138 (1983).
- 68) Li J., Elberg G., Crans D. C., Shechter Y., *Biochemistry*, **35**, 8314-8318 (1996).
- 69) Staddon J. M., Hansford R. G., *Eur. J. Biochem.*, **179**, 47-52 (1989).

- 70) Skeberdis V. A., Jurevicius J., Fischmeister R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 452–461 (1997).
- 71) Vannier C., Ailhaud G., *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 324–333 (1986).
- 72) Kelly R. B., *Science*, **230**, 25–31 (1985).
- 73) Elberg G., Li J., Shechter Y., *J. Biol. Chem.*, **269**, 9521–9527 (1994).
- 74) Shechter Y., Li J., Meyerovitch J., Gefel D., Bruck R., Elberg G., Miller D. S., Shisheva A., *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, 39–47 (1995).
- 75) Pandey S. K., Chiasson J. L., Srivastava A. K., *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, 69–78 (1995).
- 76) Heppel L. A., Hilmoe R. J., *Methods Enzymol.*, **2**, 546–549 (1955).
- 77) Gupta K. K. S., Chatterjee H. R., *Inorg. Chem.*, **17**, 2429–2431 (1978).