

プラゾシンによる 肝性リパーゼ分泌促進機構の解析に関する研究

中村 徹也

The Stimulatory Release of Hepatic Lipase by Prazosin

Tetsuya Nakamura

ABSTRACT

Prazosin is an alpha 1 adrenoceptor antagonist used in pharmacotherapy for the hypertension. Prazosin improves lipid metabolism *in vivo*, but the involved mechanism is not fully understood. Here, we demonstrated that prazosin stimulates the release of hepatic triacylglyceride lipase (HTGL) from primary cultured rat hepatocytes. Prazosin increased phospholipase C (PLC), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK-II) and protein kinase A (PKA) activity in the hepatocytes in a time- and dose- dependent manner. The increased PLC activity of prazosin-stimulated hepatocytes was decreased by incubation with tyrosine kinase (TK) inhibitors. Furthermore, the increased PKA activity was markedly decreased by PLC and CaMK inhibitors. It was also observed that prazosin increased cAMP content in the hepatocytes in a time- and dose- dependent manner. These results suggest that the prazosin-stimulated release of HTGL from primary cultured rat hepatocytes is caused by activation of PLC through non-receptor tyrosine kinase followed by activation of PKA associated with stimulation of CaMK-II activity.

はじめに

食餌由来の脂質や肝臓および脂肪組織で合成された脂質は、血中を移動し種々の組織や器官へ輸送される際、個々の分子の形では存在せず、アポリポタンパク質と結合することにより可溶性を持つリポタンパク質として存在している¹⁾。この食餌による脂質は、小腸で吸収されカイロミクロンとなり血中に移行する。また肝臓に取り込まれ再合成を受けたりリポタン

パク質は、超低比重リポタンパク質 (VLDL) としてトリアシルグリセロール (TG) を輸送しており、これらのリポタンパク質中に多く含まれる TG は血管内皮に係留されているリポタンパク質リパーゼ (LPL; Lipoprotein Lipase, EC 3.1.1.34) によって加水分解を受ける²⁾。この LPL と反応することによって生じたより高比重のリポタンパク質は、次いで肝性リパーゼ (HTGL; Hepatic Triacylglyceride Lipase, EC 3.1.1.3) によりリポタンパク質中の TG は加水分解を受けさらに一層高比重のリポタンパク質と遊離脂肪酸 (FFA) およびグリセロールを生じ、生成された FFA は各組織や癌細胞などのエネルギーとして利用される^{2,3)}。またこの HTGL は、高比重リポタンパク質 (HDL) の末梢からのコレステロール除去作用に関与するとされており、主に HDL₃ が末梢などのコレステロールを引き抜き、より大きな HDL₂ となったりリポタンパク質の TG を加水分解することで HDL₃ へと戻る^{4,5)} (Fig. 1)。

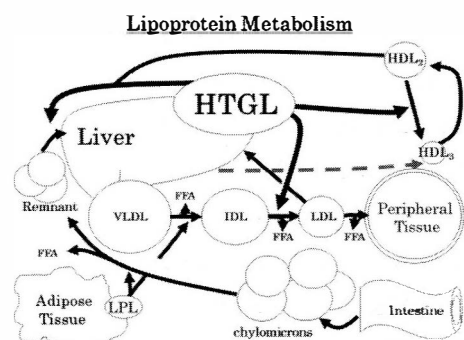


Fig.1. Lipoprotein Metabolism

HTGL hydrolyzes TG in HDL and intermediate density lipoprotein (IDL), and it is considered to play an important role in lipid metabolism.

すなわち HTGL は、生体における TG や FFA などのレベルを調節することで脂質代謝上、極めて重要な一役を担っていると言える。そのため HTGL の欠損は、TG と VLDL の蓄積を生じ、脂質異常症を発症する⁶⁾。この HTGL は分泌型糖タンパク質として肝実質細胞において合成され、糖の修飾を受け、成熟した HTGL として分泌される。分泌された HTGL は類洞に面した肝細胞と内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して係留されているが、分泌過程や触媒活性調節機構の詳細は未だ不明瞭である⁷⁾。一方、プラゾシン (1-[4-amino-6,7-dimethoxy-quinazolin-2-yl]-4-[2-furoyl]piperazine) は 1965 年に開発され、交感神経の α_1 アドレナリン受容体を選択的に遮断する作用があることが見出されたため血圧を低下させる初めての α_1 アドレナリン受容体選択的遮断薬として用いられてきている⁸⁾。現在においては、本態性高血圧症、腎性高血圧症や褐色細胞種、前立腺肥大症に伴う排尿障害に用いられる。その後の作用機序の解析が進み血管平滑筋の α_{1B} アドレナリン受容体を遮断することで降圧作用を示し、前立腺において尿道括約筋の $\alpha_{1A/1D}$ アドレナリン受容体を遮断することで括約筋を弛緩させ排尿障害の改善がなされている^{9,10)}。薬物動態としては血中に移行したプラゾシンは血漿タンパク質とその大部分が結合し、さらには投与量の大部分が肝臓に取り込まれグルクロン酸抱合等の多岐にわたる代謝を受け胆汁中に排泄される^{11,12)}。このプラゾ

シンを含む quinazoline 系 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬は、 α_1 アドレナリン受容体拮抗作用による影響とは別に α_1 アドレナリン受容体を介していないとされる作用の報告が多く行われている。例えば、高血圧患者におけるプラゾシンの長期投与での HDL 上昇およびコレステロール比 (HDL コレステロール / VLDL コレステロール + LDL コレステロール) の上昇や 3- ヒドロキシ-3- メチルグルタリル (HMG)-CoA 還元酵素の活性抑制によるコレステロールの低下などが知られており、さらにプラゾシンはショ糖食摂取ラットの褐色脂肪組織において LPL 活性の増強やショ糖食摂取ラットでの肝 TG 分泌速度の減少など脂質代謝に影響を生じることが臨床知見から認められている¹³⁻¹⁵⁾。このようにプラゾシンは脂質代謝に対し種々の作用を示す事が報告されているが、肝臓への作用は不明瞭な点が多く、HTGL 分泌については不明である。

すなわち脂質代謝において HTGL の分泌や活性調節におけるシグナル伝達機構を明らかにすることは、極めて重要であると考えられる。そこで本研究においてはプラゾシンによる脂質代謝の挙動を調べることで、本酵素の分泌過程を含む活性調節機構やプラゾシンのそれらへの関与を解析するため検討を行った。

1. プラゾシンによる初代培養ラット肝細胞からの Hepatic Triacylglyceride Lipase の分泌に対する受容体の関与

脂質代謝に影響を与える薬剤は数多く存在しており、中でも quinazoline 系骨格を持つ α_1 アドレナリン受容体拮抗薬は、脂質代謝に影響を与える事が以前から示唆されている¹³⁻¹⁵⁾。反対に非選択性 β アドレナリン受容体拮抗薬やループ系、チアジド系利尿薬では LPL 活性の減少、コレステロール生合成の増加や HDL の低下、VLDL および LDL の増加の増加など脂質代謝に影響を与える事が報告されている^{16,17)}。

プラゾシンなど α_1 アドレナリン受容体拮抗薬に分類される薬剤の特異的な作用は多く、近年の報告では α_1 アドレナリン受容体に非依存的な作用としての報告も少なくない^{18,19)}。さらにプラゾシンは、肝臓にも発現している有機カチオントランスポーター (OCT)1 の強力な阻害剤としても知られており、多様な作用が認められている²⁰⁾。またラット副睾丸脂肪組織においてバナジン酸ナトリウムによる LPL の遊離や初代培養ラット肝細胞においてヘパリンによる HTGL の遊離に膜受容体型チロシンキナーゼの関与^{21,22)} が報告されており、プラゾシンでも関与が推測される。そこで、プラゾシンの標的として α_1 アドレナリン受容体を含む、細胞膜受容体の関与を考慮し、脂質代謝関連酵素である HTGL の分泌に対し検討を行った。

プラゾシンによる HTGL の分泌評価を行うため、Wistar 系雄性ラットの肝臓より初代培養ラット肝細胞を作製した。肝細胞とプラゾシン共存下、温置時間の経過およびプラゾシンの濃度の増加に伴い HTGL の分泌促進が認められた (Fig. 1A)。また HTGL タンパク質は、活性の増加に比例して時間依存的および濃度依存的に増加した (Fig. 1B)。次に、この HTGL 分泌促進作用がプラゾシンに特異的な作用であるか検討を行うために quinazoline 系 α_1 アドレナ

リン受容体拮抗薬としてプラゾシン、ドキサゾシン、テラゾシンを用い、また異なる骨格の α_1 受容体拮抗薬である 5-メチルウラピジルを用いてこれらの濃度変化による HTGL の分泌について検討を行った。HTGL の分泌はプラゾシン特異的に促進が認められ、また母核である quinazoline 自体を肝細胞と共に温置しても HTGL 分泌作用は認められなかった (Fig. 2A)。HTGL タンパク質は、プラゾシンのみ濃度依存的に増加したが、ドキサゾシン、テラゾシン、5-メチルウラピジルおよびキナゾリンの濃度を増加させても HTGL タンパク質の分泌は認められなかった (Fig. 2B)。このプラゾシンによる HTGL 分泌に対する細胞内外の HTGL 活性の変化を検討したところ、プラゾシンと肝細胞との温置により細胞外の HTGL 活性は増加したのに対し、細胞内 HTGL 活性は低下した (Fig. 3A)。さらに HTGL タンパク質では、プラゾシン非添加群における細胞内 HTGL タンパク質は保持されたが、プラゾシン添加群では細胞内 HTGL タンパク質は、時間依存的に減少が認められた (Fig. 3B)。

このプラゾシンによる特異的な作用がアドレナリン受容体を介しているかどうか α, β アドレナリン受容体刺激薬による競合の検討を行ったところ、活性およびタンパク質への影響は認められなかった (Fig. 4)。さらにヘパリンによる HTGL の遊離に膜受容体型チロシンキナーゼの関与^{21,22)}が報告されていることから、プラゾシンの作用も膜受容体型のチロシンキナーゼが関与するのではないかと推察されたが、膜受容体型のチロシンキナーゼ阻害剤による HTGL の活性およびタンパク質への影響はほとんど認められなかった (Fig. 5)。しかし非受容体型チロシンキナーゼについて検討を行ったところ、Src チロシンキナーゼの選択的阻害剤で

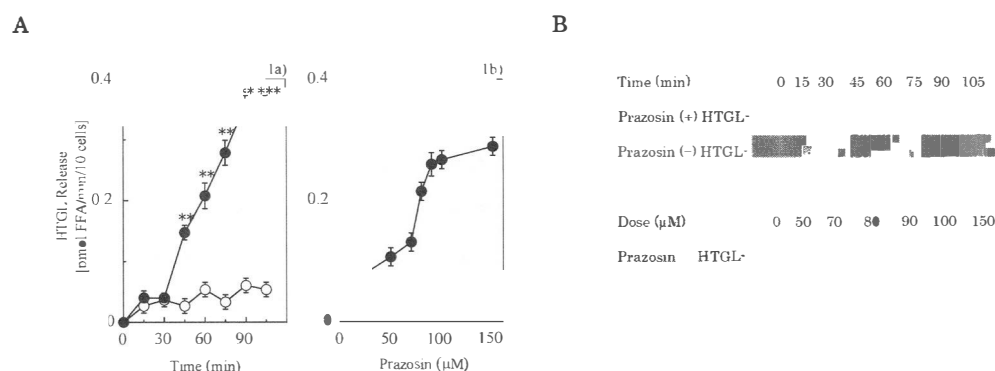


Fig. 1. The Time Course of HTGL Release from Hepatocyte by Stimulated Prazosin and the Prazosin Concentration Dependence on release of HTGL

(A) 1a) The hepatocytes were incubated for 0-105 min either with (●) or without (○) 100 μM prazosin. 1b) The hepatocytes were incubated for 60 min with various concentrations (0-150 μM) of prazosin. Significant differences compared with the control: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. HTGL protein is released by prazosin time- and dose-dependent manner. The incubation time is 0-105 min with (±) 100 μM prazosin, and dose response is incubated 60 min with 0-150 μM concentrations prazosin.

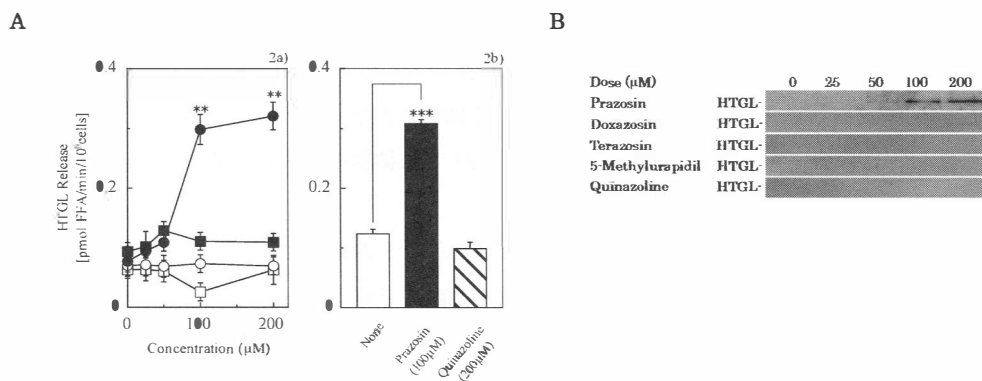


Fig. 2. Comparison of HTGL Release by Alpha 1 Adrenoceptor Antagonists and Effect of Quinazoline Structure on Release of HTGL from Hepatocyte

(A) 2a) The hepatocytes were incubated for 60 min with various alpha 1 adrenoceptor antagonists; prazosin (●), doxazosin (○), terazosin (■), 5-methylurapidil (□). 2b) The hepatocytes were incubated for 60 min with prazosin (black bar) or quinazoline (slash bar).

Significant differences compared with each alpha 1 adrenoceptor antagonists: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with 0-200 μM of various alpha 1 adrenoceptor antagonists and quinazoline, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

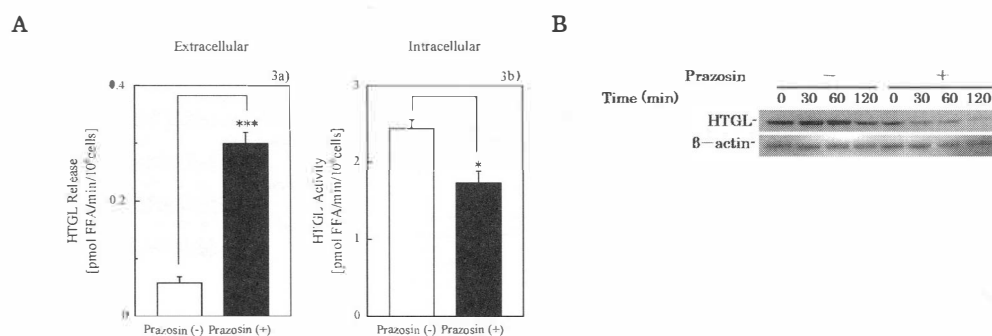


Fig. 3. Extracellular HTGL Release from the Hepatocyte and Intracellular HTGL Activity of the Hepatocyte

(A) 3a) The HTGL release from hepatocytes were increased to incubate for 60 min with prazosin (black bar). 3b) The intracellular HTGL activity in the hepatocytes were decreased to incubate for 60 min with prazosin (black bar).

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

(B) The hepatocytes were incubated for 0-120 min with (±) prazosin, the hepatocytes were lysated and centrifuged for western blot analysis with an HTGL antibody. The β-actin antibody is used for the loading control.

ある PP2²³⁾ により、プラゾシンによる HTGL の分泌は大きく抑制された。一方、Src チロシンキナーゼに阻害作用はなく、PP2 のネガティブコントロールである PP3²⁴⁾ ではほとんど効果が認められなかった。また Src のシステイン残基の SH 基と反応し Src チロシンキナーゼを阻害する Herbimycin A²⁵⁾ の濃度増加に伴い著しく抑制された (Fig. 6A)。同様に HTGL タンパク質においても PP2 では抑制が認められたが、PP3 では抑制が認められず、Herbimycin A では濃度依存的に抑制が認められた (Fig. 6B)。

プラゾシンは OCT を阻害することが知られており²⁰⁾、肝臓には OCT1 が発現していることから OCT1 阻害剤について検討を行った。OCT1 阻害剤である Tetrabutylammonium(TBA) によるトランスポーター阻害では HTGL 分泌に変化は認められなかった (Fig. 7A-7a)。一方、プラゾシンは肝臓に取り込まれることで代謝を受けることから、非特異的なチトクローム P450(CYP) の阻害剤である SKF-525A²⁶⁾ による影響を検討したところ著しい HTGL 分泌抑制が認められた (Fig. 7A-7b)。同様に HTGL タンパク質においても著しい抑制が認められた (Fig. 7B-7b)。

Fig. 2. に示すようにアドレナリン α_1 受容体遮断薬の中でプラゾシンによる HTGL 分泌作用は特異的であり、受容体を刺激しても変化がないことから、細胞膜上のアドレナリン受容体の関与は低いことが示唆された。しかし Fig. 6. に示すように非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤におけるプラゾシンによる HTGL 分泌は抑制が認められ、Fig. 7. において CYP 阻害剤の作用が大きく認められた事より、プラゾシンは細胞内に入ること何らかの影響により HTGL の分泌を促進していることが示唆された。Erve らによると、プラゾシンはその構造中

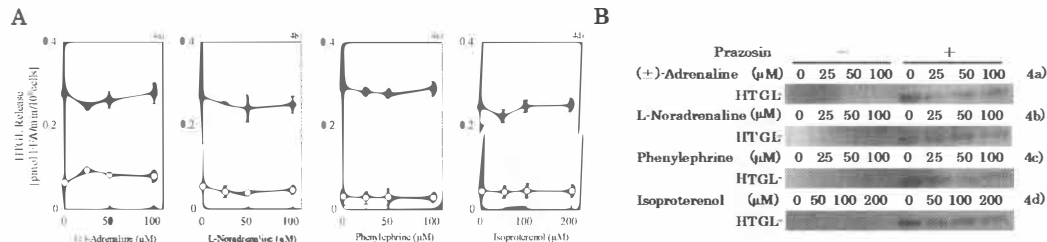


Fig. 4. Effects of Adrenoceptor agonists on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 4a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of (±)-adrenaline. 4b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of L-noradrenaline. 4c) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of phenylephrine. 4d) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of isoproterenol.

No significant differences.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of 0-200 μM of various adrenoceptor agonists, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

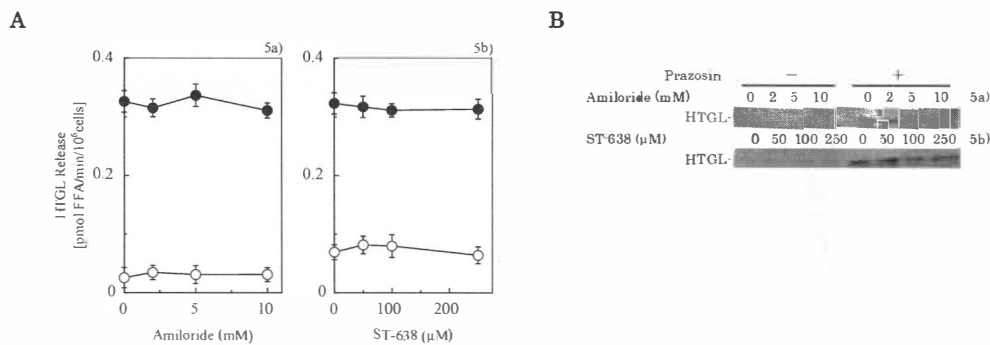


Fig. 5. Effects of Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 5a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of amiloride. 5b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of ST-638.

No significant differences.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of receptor tyrosine kinase inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

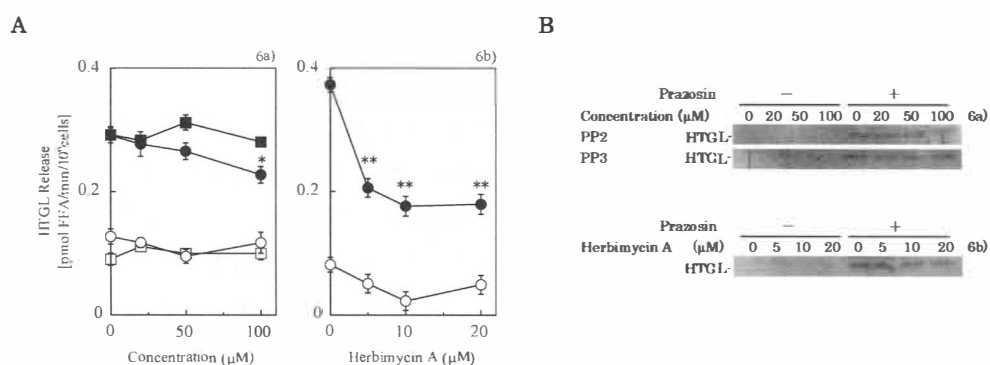


Fig. 6. Effects of Non-receptor Tyrosine Kinase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 6a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●, ■) or without (○, □) in the presence of PP2 (○, ●) and PP3 (□, ■). 6b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of herbimycin A.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of non-receptor tyrosine kinase inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

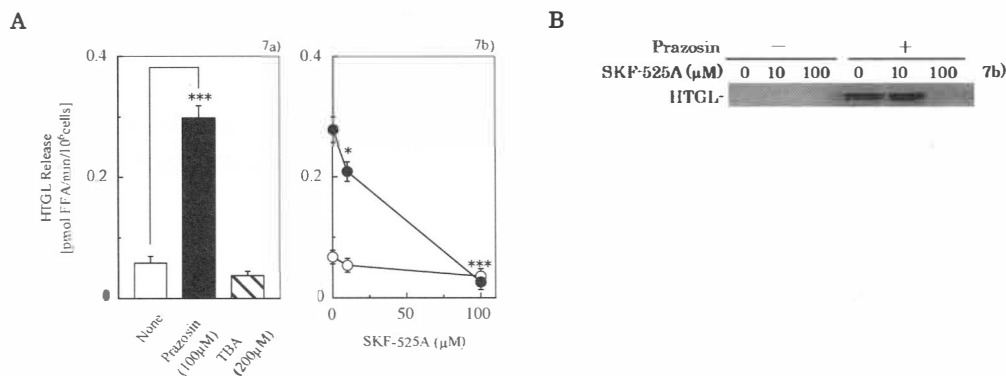


Fig. 7. Effects of Organic Cation Transporter Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 7a) The hepatocytes were incubated for 60 min with prazosin (black bar) or TBA (slash bar). 7b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of SKF-525A.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of 0-100 μM SKF-525A, the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

のフラン骨格の代謝物が細胞に影響を与えると報告している¹²⁾。近年、プラゾシンや他のアドレナリン受容体関連薬において受容体に対する元々の作用とは違ったそれぞれ特異的な作用が数多く報告されており、プラゾシンによる HTGL 分泌にもその可能性が示唆される。

すなわち、プラゾシンによる HTGL 分泌は、肝細胞内に移行したプラゾシンが CYP 代謝を受ける事により、何らかの生物活性を得ることで、おそらく非受容体型チロシンキナーゼ、なかでも Src チロシンキナーゼを介して HTGL の分泌を促進している事が示唆された。

2. プラゾシンによる HTGL の分泌に対するホスホリパーゼ C の関与

プラゾシンによる HTGL の分泌は非受容体型 Src チロシンキナーゼを介することが示唆された。近年、Src チロシンキナーゼはホスホリパーゼ C (PLC) のリン酸化と活性化を惹起することが報告されている²⁰⁾。PLC の活性化によってホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) を分解しイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) の 2 つのセカンドメッセンジャーを産生することで生体内へのシグナル伝達を通して様々な細胞機能の調節に関与している²¹⁾。Kerakawati らの報告によるとエンドセリン-1 によるマウスエールリッヒ腹水癌細胞からの LPL 分泌は細胞内の PLC を介することが報告されていることより HTGL においても関与が考えられる²²⁾。そこで、プラゾシンによる HTGL の分泌に対するチロシン

キナーゼの影響を受ける因子として PLC の関与について検討を行った。

プラゾシンによる HTGL 分泌促進作用は PLC に特異的な阻害剤である U-73122³⁰⁾ の濃度増加に伴いプラゾシンによる HTGL の分泌は著しく抑制された。一方、U-73122 の構造類似体で PLC 阻害作用が極めて低い U-73343³¹⁾ では濃度を増加してもほとんど変化は認められなかった (Fig. 8)。これらの結果をふまえ肝細胞とプラゾシン共存下、細胞内 PLC 活性の変化について検討を行ったところ、肝細胞とプラゾシンの温置時間の経過における細胞内 PLC 活性は約 1.5 倍の上昇を示した。さらにプラゾシンの濃度増加に伴い肝細胞内 PLC 活性は上昇した (Fig. 9)。そこでプラゾシンによる細胞内 PLC 活性の上昇に対する非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤および PLC 阻害剤の影響について検討を行ったところ、非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である PP2、Herbimycin A 存在下、阻害が認められた。また PLC 阻害剤である U-73122 存在下、阻害は認められたが、U-73122 の構造類似体で PLC 阻害作用の低い U-73343 存在下では阻害作用は低かった (Fig. 10)。

Xu らの報告によると細胞外マトリックスによる c-Src を介した PLC の活性化が報告されている³²⁾。すなわち前述の結果でプラゾシンによる HTGL の分泌は G タンパク質との関与は低いことが示唆されるため、プラゾシンによる HTGL の分泌は、おそらくプラゾシンが細胞内に移行することで非受容体型チロシンキナーゼを刺激し自己リン酸化を引き起こし、PLC を活性化させる事で IP₃ および DAG の産生が関与している事が示唆された。

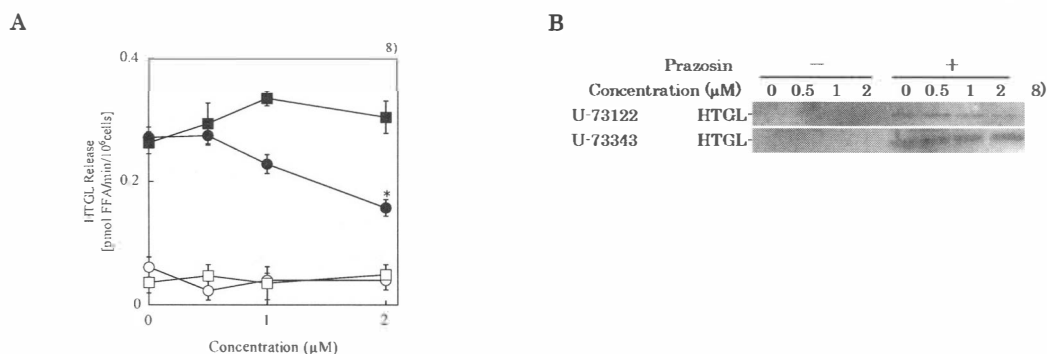


Fig. 8. Effects of Phospholipase C Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●, ■) or without (○, □) in the presence of U-73122 (○, ●) and U-73343 (□, ■).

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of PLC inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

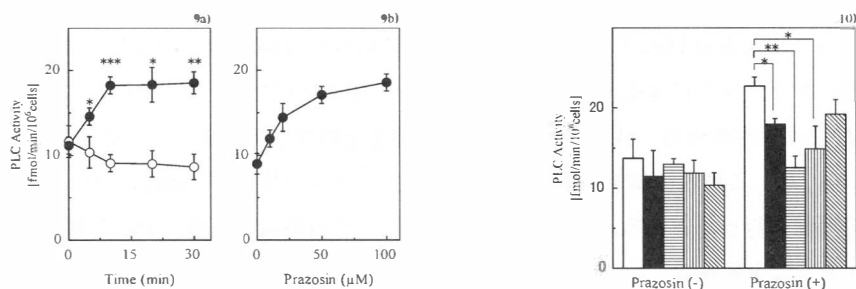


Fig. 9. Increasing Effect of Prazosin Phospholipase C Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) over a 30-min period.
 (b) The hepatocytes were incubated for 30 min with prazosin various concentrations (0-100 μM) of prazosin.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Fig. 10. Effect of Non-receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Phospholipase C Inhibitors on Increase in Phospholipase C Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with 100 μM prazosin or without (white bar) in the presence of PP2 (black bar), herbimycin A (cross bar), U-73122 (vertical bar), U-73343 (slash bar).

Significant differences compared with the prazosin-treated group and without inhibitors: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

3. プラゾシンによる HTGL の分泌に対する Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の関与

チロシンキナーゼの活性化に伴いリン酸化された PLC γ は PIP_2 を分解し IP_3 と DAG の 2 つのセカンドメッセンジャーを産生することが知られている。この IP_3 は小胞体に作用する事で細胞内に Ca^{2+} を動員し、DAG は Ca^{2+} と共にプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化と DAG キナーゼ (DGK) 活性化によるホスファチジン酸の生成を行うことが知られている。Motoyashiki らの報告によると硫酸バナジル-BSA によりラット脂肪組織からの LPL 分泌に IP_3 の関与が明らかとされている³³⁾。また、 IP_3 により上昇した細胞内 Ca^{2+} は細胞内のタンパク質機能発現を調節する事が知られており、その代表的な Ca^{2+} シグナル伝達経路として PKC 経路、カルモジュリンを介した Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) 経路などが挙げられる。特にこのカルモジュリンは多彩な酵素やタンパク質と結合し、細胞のシグナル伝達やイオン輸送、細胞死などに関係する重要な酵素を活性化させるなど多機能に渡り作用するとされており³⁴⁾、カルモジュリン発見の端緒となった PDE やアデニル酸シクラーゼ、NO 合成酵素などへのシグナル伝達も担っている³⁵⁾。Tagashira らの報告によると CaMK ファミリーである Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 型 (CaMK-II) はヘパリン刺激によるラット肝細胞からの HTGL 分泌において関与することが明らかになっている³⁶⁾。肝細胞で

のCaMK-IIの役割においては、やはり多岐にわたる機能が報告されていることより、プラゾシンによるHTGLの分泌に対する細胞内Ca²⁺上昇によって調節を受ける因子として特にカルモジュリンおよびCaMK-II活性の関与について検討を行った。

まずプラゾシンによるHTGL分泌に対するPLC以降のシグナル伝達において、小胞体IP₃受容体刺激における作用とPKCの関与について検討を行ったところIP₃受容体阻害剤であるXestospongin C³⁷⁾によりプラゾシンによるHTGLの分泌は阻害剤の濃度増加に伴い抑制された。しかし、PKC阻害剤であるCalphostin C³⁸⁾やChelerythrine Chloride³⁹⁾の濃度を増加しても影響は認められなかった (Fig. 11A)。同様にHTGLタンパク質においても、Xestospongin Cにより抑制が認められたが、Calphostin CおよびChelerythrine Chlorideでは抑制が認められなかった (Fig. 11B)。DAGによる刺激を模倣しPKCを持続的に活性化するPhorbol 12-Myristate 13-Acetate (TPA)⁴⁰⁾によるHTGLの分泌は認められず、プラゾシン共存下において競合的阻害も認められなかった。さらに、DGK阻害剤であるR59949⁴¹⁾共存下でのプラゾシンによるHTGL分泌に対する影響は認められなかった (Fig. 12)。次に細胞内Ca²⁺変動の関与について検討を行ったところCa²⁺キレート剤であるQuin2/AM⁴²⁾の濃度増加に伴い抑制された (Fig. 13)。Ca²⁺のシグナル伝達としてPKCの関与は低いことが示唆されたので、カルモジュリンの関与を検討したところ、フェノチアジン誘導体でCa²⁺依存的にカルモジュリンに結合する阻害剤Trifluoperazine⁴³⁾、ナフタレンスルホンアミド誘導体でCa²⁺存在下カルモジュリンを阻害するW-7⁴⁴⁾の濃度増加に伴い著しく抑制された。またW-7の脱Cl体でカルモジュリン阻害作用

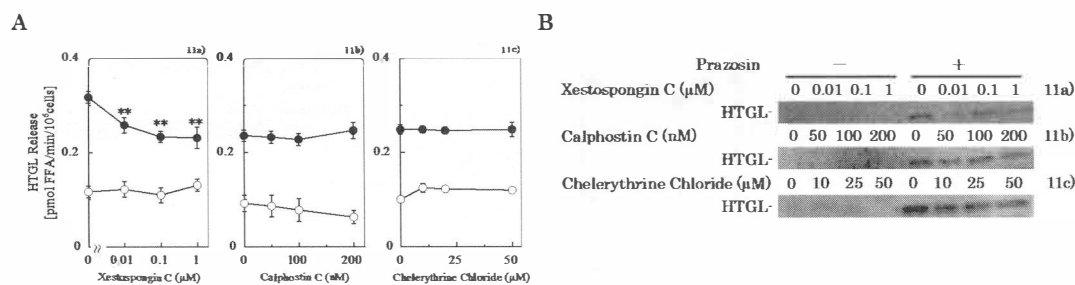


Fig. 11. Effects of Inositol-1,4,5-triphosphate Inhibitor and Protein Kinase C Inhibitors and Diacylglycerol Kinase Inhibitor on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 11a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Xestospongin C. 11b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Calphostin C. 11c) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Chelerythrine Chloride. Significant differences compared with control: ***p*<0.01.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of IP₃ receptor inhibitor and PKC inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

の極めて弱い構造類似体である W-5⁴⁵⁾ では濃度を増加しても抑制はほとんど認められなかった (Fig. 14A)。さらに HTGL タンパク質においても Trifluoperazine、W-7 の濃度依存的に抑制が認められたが、W-5 では抑制が認められなかった (Fig. 14B)。さらに CaMK-II に特に強い阻害作用を示すが、CaMK-I や IV など広いスペクトルの阻害や自己リン酸化した CaMK-II に阻害作用を示さないと報告のある KN-62⁴⁴⁾ の濃度増加に伴い HTGL 分泌は抑制された。また CaMK-II の特異的な阻害剤である KN-93⁴⁶⁾ の濃度増加に伴いプラゾシンの作用は抑制されたが KN-93 の構造類似体であり CaMK-II 阻害作用の極めて弱い KN-92⁴⁷⁾ によっては濃度を増加しても抑制は認められなかった (Fig. 15A)。HTGL タンパク質においても KN-62、KN-93 の濃度依存的に抑制が認められたが、KN-92 では抑制が認められなかった (Fig. 15B)。これらの結果をふまえ肝細胞とプラゾシン共存下、細胞内 CaMK-II 活性の変化について検討を行ったところ、肝細胞とプラゾシンの温置時間の経過における細胞内 CaMK-II 活性は約 2.0 倍の上昇を示した。さらにプラゾシンの濃度増加に伴い肝細胞内 CaMK-II 活性は上昇した (Fig. 16)。

これらの結果からプラゾシンによる HTGL の分泌促進に IP₃ に続く細胞内 Ca²⁺ 上昇が重要である。一方、DAG と Ca²⁺ は PKC の活性化を引き起こすが、PKC および DGK によるホスファチジン酸の生成の関与は極めて低い事が示唆された。この上昇した細胞内 Ca²⁺ はカルモジュリンと結合し、CaMK ファミリーのうち CaMK-II を活性化が密接に関与していることが示唆された。

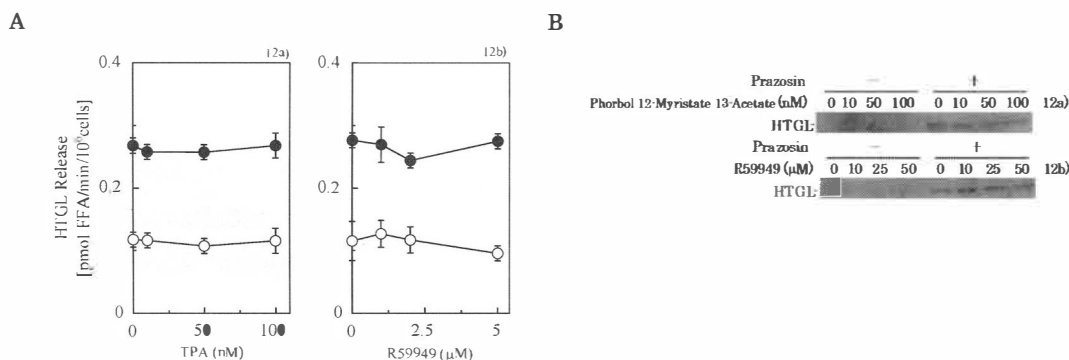


Fig. 12. Effects of Diacylglycerol analog as Protein Kinase C activator and Diacylglycerol Kinase Inhibitor on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 12a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of TPA. 12b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of R59949.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of PKC activator and DGK inhibitor, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

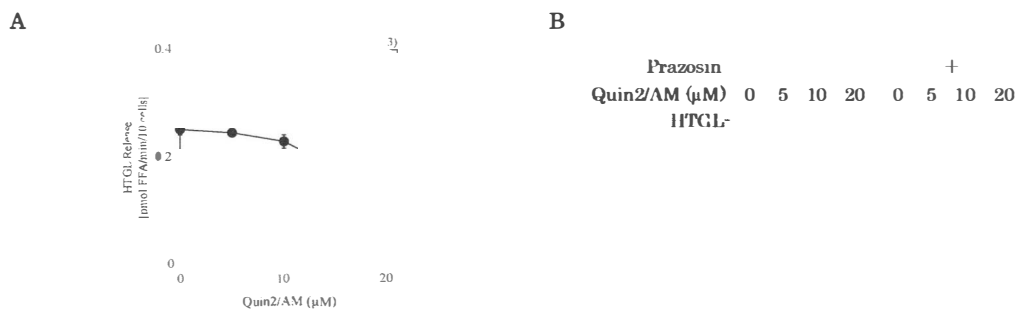


Fig. 13. Effects of Ca^{2+} -chelator on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Quin2/AM.

Significant differences compared with the control: ** $p < 0.01$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of Ca^{2+} -chelator, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

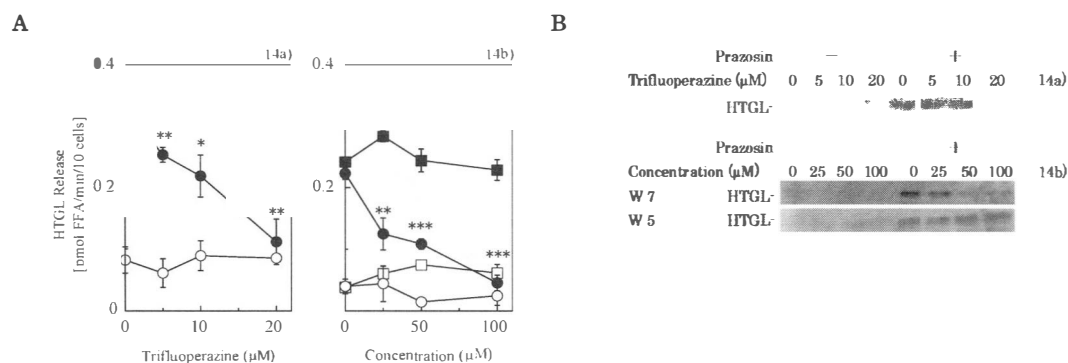


Fig. 14. Effects of Calmodulin Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 14a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of Trifluoperazine. 14b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●, ■) or without (○, □) in the presence of W-7 (○, ●) and W-5 (□, ■).

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of calmodulin inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

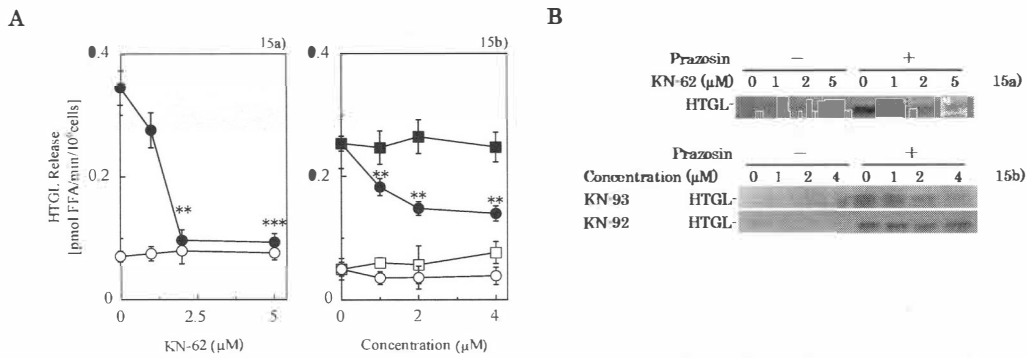


Fig. 15. Effects of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 15a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of KN-62. 15b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●, ■) or without (○, □) in the presence of KN-93 (○, ●) and KN-92 (□, ■).

Significant differences compared with control: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of CaMK-II inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

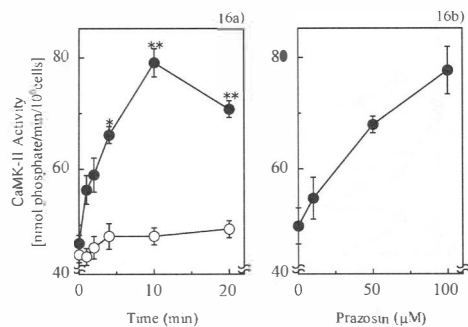


Fig. 16. Increasing Effect of Prazosin on Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) over a 20-min period. (b) The hepatocytes were incubated for 10-min with various concentrations (0-100 μM, ●) of Prazosin.

Significant differences compared with control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

4. プラゾシンによる HTGL の分泌に対する cyclic AMP およびプロテインキナーゼ A の関与

カルモジュリン結合タンパク質には前章の CaMK の他にアデニル酸シクラーゼ (AC) やホスホジエステラーゼ (PDE) などが報告されている³⁵⁾。AC は ATP をセカンドメッセンジャーである cAMP に変換する酵素であり、cAMP は PDE により 5'-AMP に分解される。この cAMP は、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) を活性化することで多くの細胞機能に関与することが知られているが⁴⁸⁾、最近では cAMP が PKA の他に cAMP 依存性交換タンパク質 (Epac) に結合することでインスリンや胆汁酸の分泌に関与するという報告もある^{49,50)}。さらにはデキストラン硫酸による癌細胞からの LPL 分泌に細胞内 cAMP 量の上昇が関与していることが報告されている⁵¹⁾。またプラゾシンは、細胞内 PDE 阻害作用を持つことが知られており⁸⁾、そこでプラゾシンによる HTGL の分泌に対する細胞内 cAMP 量の挙動の関与とそれに伴う PKA の活性化の関与について検討を行った。

プラゾシンによる HTGL 分泌促進作用は AC の競合的阻害剤である 2',5'-Dideoxyadenosine⁵²⁾ の濃度増加に伴い HTGL 分泌は抑制され、非競合的阻害剤である MDL-12,330A⁵³⁾ の濃度増加に伴い著しく抑制が認められた (Fig. 17)。続いて PKA 阻害剤の効果について検討を行ったところ、それぞれ異なるタイプの PKA 阻害剤である H-89⁵⁴⁾ および KT-5720⁵⁵⁾ の共存下、HTGL 分泌は阻害剤の濃度上昇に伴い抑制された (Fig. 18)。

これらの結果をふまえ肝細胞とプラゾシン共存下、細胞内 cAMP 量の変動および PKA 活性の変化について検討を行ったところ、細胞内 cAMP 量はコントロールと比較し約 1.5 倍

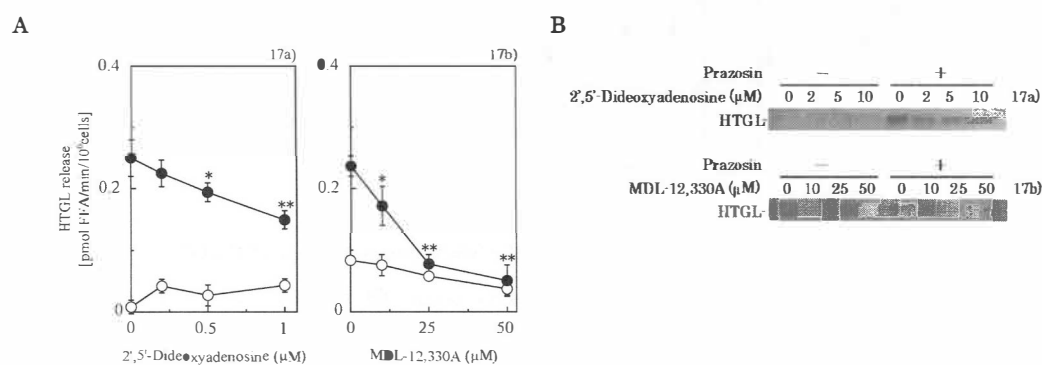


Fig. 17. Effects of Adenylate Cyclase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 17a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of 2',5'-dideoxyadenosine. 17b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of MDL-12,330A.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of AC inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

の増加を示した。さらにプラゾシンの濃度増加に伴い肝細胞内 cAMP 量は大きく増加した (Fig. 19)。この細胞内 cAMP 量の増加は AC 阻害剤である 2',5'-Dideoxyadenosine および MDL-12,330A 共存によって各阻害剤の濃度増加に伴い抑制された (Fig. 20)。細胞内 PKA 活性は肝細胞とプラゾシンとの温置時間の経過に伴い上昇し、さらにプラゾシンの濃度増加に伴い上昇した (Fig.21)。この細胞内 PKA 活性上昇は PLC 阻害剤である U-73122 の共存によって抑制され、U-73122 の構造類似体で PLC 阻害作用が極めて低い U-73343 の共存では、ほとんど変化が認められなかった (Fig.22)。同様にカルモジュリンや CaMK-II 阻害剤である Trifluoperazine および KN-93 の共存によって、細胞内 PKA 活性上昇は阻害剤の濃度増加に伴い抑制された (Fig.23,24)。

Morita らによるとルテニウムレッドにより肝細胞からの HTGL 分泌促進が認められる際、細胞内 cAMP 量は温置時間 30 秒において一過的な増加を示すことが報告されている⁵⁶⁾。しかし、本実験結果によると細胞内 cAMP 量は一過的な増加ではなく時間依存的に増加している。これはプラゾシンによる肝細胞内の PDE 阻害作用の影響があると考えられる⁸⁾。実際に、肝細胞にプラゾシンと PDE 阻害剤である IBMX とを温置しても HTGL 分泌は保持されたままであった (data not shown)。また cAMP アナログ (ジブチリル cAMP) は、HTGL の分泌を抑

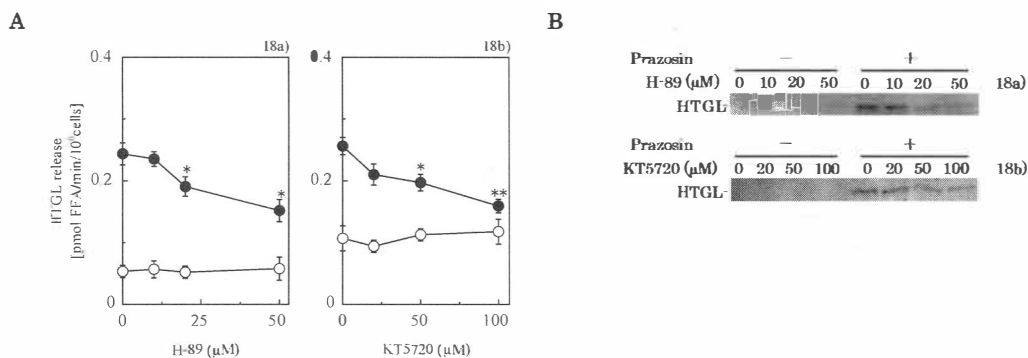


Fig. 18. Effects of Protein Kinase A Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL by Prazosin

(A) 18a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of H-89. 18b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100μM, ●) or without (○) in the presence of KT5720.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

(B) Western blot analysis with an HTGL antibody. The hepatocytes were incubated for 60 min with (±) prazosin after pre-incubated for 10 min in the presence of PKA inhibitors, and the supernatants were harvested for western blot analysis with an HTGL antibody.

制すると報告⁵⁷⁾もあるが、1mM ジブチリル cAMP による HTGL の分泌は、まったく変化が認められなかった (data not shown)。これらのことより、肝細胞からの HTGL 分泌にはある程度の cAMP 量が必要であり、また単一な cAMP 量の増加では HTGL 分泌は行われなことが示唆される。加えて肝細胞内の PKA 活性は、プラゾシンと肝細胞の温置時間の経過およびプラゾシンの濃度の増加に伴い上昇し、cAMP 量の増加と相関が認められる。

これらの結果からプラゾシンによる HTGL の分泌促進に AC の活性化および PDE 抑制を介する肝細胞内の cAMP 量の増加が関与していることが示唆された。それに伴い cAMP 増加による PKA の活性化が密接に関与していることが示唆された。さらにはこの cAMP 増加に伴う PKA の活性化は、一部 Ca^{2+} 放出に次ぐカルモジュリンとの結合による CaMK-II の活性化が関与していることが示唆された。

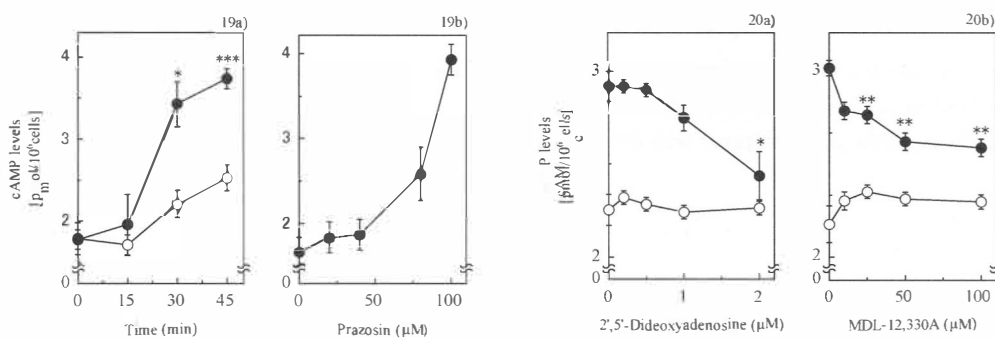


Fig. 19. Increase in cyclic AMP Content in Hepatocytes by Prazosin

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM , ●) or without (○) over a 45-min period. (b) The hepatocytes were incubated for 45-min with various concentrations (0-100 μM , ●) of Prazosin. Significant differences compared with control: * $p<0.05$ and *** $p<0.001$.

Fig. 20. Increase in cyclic AMP Content in Hepatocytes by Prazosin

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM , ●) or without (○) in the presence of 2',5'-dideoxyadenosine. (b) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM , ●) or without (○) in the presence of MDL-12,330A.

Significant differences compared with control: * $p<0.05$ and ** $p<0.01$.

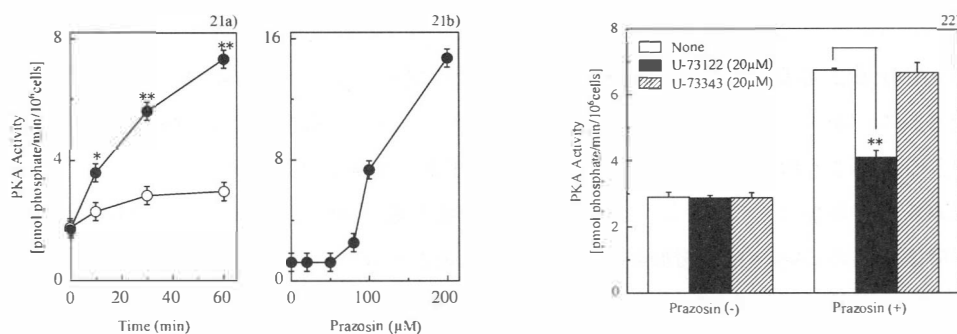


Fig. 21. Increasing Effect of Prazosin on Protein Kinase A Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) over a 60-min period.
 (b) The hepatocytes were incubated for 60-min with various concentrations (0-100 μM, ●) of Prazosin.
 Significant differences compared with control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Fig. 22. Effect of Phospholipase C Inhibitors on Increase in Protein Kinase A Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with 100 μM prazosin or without (white bar) in the presence of U-73122 (black bar), U-73343 (cross bar).

Significant differences compared with the prazosin-treated group and without inhibitors: ** $p < 0.01$.

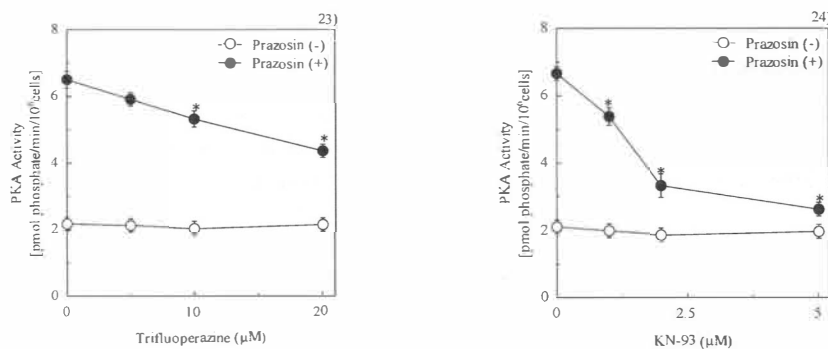


Fig. 23. Effect of Calmodulin Inhibitors on Increase in Protein Kinase A Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of Trifluoperazine. Significant differences compared with control: * $p < 0.05$.

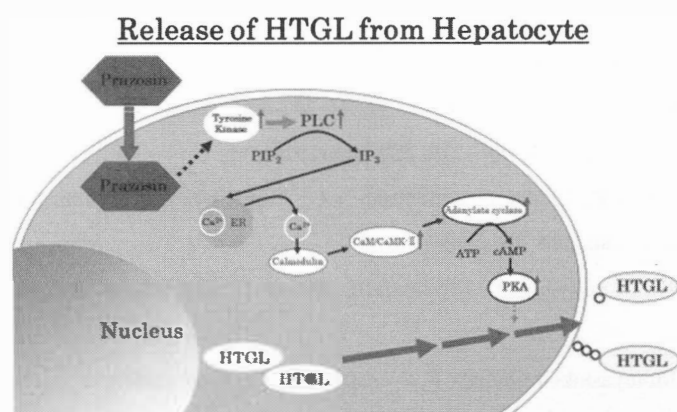
Fig. 24. Effect of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibitors on Increase in Protein Kinase A Activity by Prazosin

The hepatocytes were incubated with prazosin (100 μM, ●) or without (○) in the presence of KN-93. Significant differences compared with control: * $p < 0.05$.

おわりに

これまでの結果をふまえ、プラゾシンはおそらく肝細胞の細胞膜受容体に作用することなく細胞内において非受容体型チロシンキナーゼを活性化し、PLCの活性上昇、次いでIP₃の産生増加を惹起し、小胞体のIP₃受容体を刺激することで細胞内Ca²⁺の増加を生じ、カルモジュリンの結合、それに伴うCaMK-IIの活性化を引き起こす。そしてさらにACが活性化され、細胞内cAMP量の上昇とそれに伴うPKAの活性化を促進する。

すなわちHTGLの分泌は細胞内Ca²⁺の変動によるCaM/CaMK-II系とCaM/AC/PKA系によって調節されており、プラゾシンはこれらの系を活性化することによりHTGLの分泌を促進していることが示された。プラゾシンによる初代培養ラット肝細胞からのHTGL分泌促進は、これらの細胞内シグナル伝達過程により引き起こされることが明らかとなった。



Scheme 1.
HTGL signal
transduction pathway by
Prazosin

引用文献

- 1) Smith L.C., Pownall H.J., Gotto A.M. Jr., *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 751-757 (1978).
- 2) Nilsson-Ehle P., Garfinkel A.S., Schotz M.C., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 667-693 (1980).
- 3) Landin B., Nilsson A., Twu J.S., Schotz M.C., *J. Lipid Res.*, **25**, 559-563 (1984).
- 4) Connelly P.W., *Clin. Chim. Acta*, **286**, 243-255 (1999).
- 5) Arai T., Yamashita S., Hirano K., Sakai N., Kotani K., Fujioka S., Nozaki S., Keno Y., Yamane M., Shinohara E., *Arterioscler Thromb.*, **14**, 1129-1136 (1994).
- 6) Chatterjee C., Sparks D.L., *Am. J. Pathol.*, **178**, 1429-1433 (2011).
- 7) Perret B., Mabile L., Martinez L., Tercé F., Barbaras R., Collet X., *J. Lipid Res.*, **43**, 1163-1169 (2002).
- 8) D'Armiento M., Lacerna F., Lauro R., Modesti A., Verna R., Ceccarelli G., *Eur. J. Pharmacol.*, **65**, 243-247 (1980).

- 9) Armenia A., Munavvar A.S., Abdullah N.A., Helmi A., Johns E.J., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 719-726 (2004).
- 10) Lepor H., *Urol. Clin. North. Am.*, **17**, 651-659 (1990).
- 11) Jaillon P., *Clin. Pharmacokinet.*, **5**, 365-376 (1980).
- 12) Erve J.C., Vashishtha S.C., Demaio W., Talaat R.E., *Drug. Metab. Dispos.*, **35**, 908-916 (2007).
- 13) Takabatake T., Ohta H., Maekawa M., Yamamoto Y., Ishida Y., Hara H., Hattori N., *Am. J. Med.*, **76**, 113-116 (1984).
- 14) Jansen H., Lammers R., Baggen M.G., Birkenhäger J.C., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**, s5-s10 (1989).
- 15) Belahsen R., Deshaies Y., *J. Nutr.*, **123**, 520-528 (1993).
- 16) Krone W., Müller-Wieland D., Nägele H., Behnke B., Greten H., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **10**, s199-s202 (1987).
- 17) Cutler R., *Am. J. Caldiol.*, **51**, 628-631 (1983).
- 18) Hu Z.W., Shi X.Y., Hoffman B.B., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**, 833-839 (1998).
- 19) Gee E., Mikiewicz M., Haas T.L., *J. Cell. Physiol.*, **222**, 120-126 (2010).
- 20) White D.L., Saunders V.A., Dang P., Engler J., Zannettino A.C., Cambareri A.C., Quinn S.R., Manley P.W., Hughes T.P., *Blood.*, **108**, 697-704 (2006).
- 21) Ueki H., Yamasaki Y., Higo K., Motoyashiki T., Kawabata H., Mortia T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 214-218 (1995).
- 22) Tagashira H., Kerakawati R., Motoyashiki T., Morita T., *J. health. Sci.*, **52**, 85-90 (2006).
- 23) Gates A., Hohenester S., Anwer M.S., Webster C.R., *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver. Physiol.*, **296**, 764-774 (2009).
- 24) Chen M.C., Solomon T.E., Perez Salazar E., Kui R., Rozengurt E., Soll A.H., *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver. Physiol.*, **283**, 893-899 (2002).
- 25) Uehara Y., Fukazawa H., Murakami Y., Mizuno S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 803-809 (1989).
- 26) Guzelian P.S., Bissell D.M., Meyer U.A., *Gastroenterology.*, **72**, 1232-1239 (1977).
- 27) Bardelli A., Maina F., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., Comoglio P.M., Ponzetto C., *Oncogene.*, **7**, 1973-1978 (1992).
- 28) Kin M.J., Kim E., Ryu S.H., Suh P.G., *Exp. Mol. Med.*, **32**, 101-109 (2000).
- 29) Kerakawati R., Morita T., *J. health. Sci.*, **56**, 467-471 (2010).
- 30) Kayali A.G., Eichhorn J., Haruta T., Morris A.J., Nelson J.G., Vollenweider P., Olefsky J.M., Webster N.J., *J. Biol. Chem.*, **273**, 13808-13818 (1998).
- 31) Thompson A.K., Mostafapour S.P., Denlinger L.C., Bleasdale J.E., Fisher S.K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 23856-23862 (1991).

- 32) Xu G.G., Geng Z., Zhou X.C., He Y.G., He T.T., Mei J.X., Yang Y.J., Liu Y.Q., Xu C.S., *Genet. Mol. Res.*, **14**, 5710-5723 (2015).
- 33) Motoyashiki T., Miyake M., Yoshida A., Morita T., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 780-786 (1999).
- 34) Manalan A.S., Klee C.B., *Adv.Cyclic. Nucleotide. Protein. Phosphorylation. Res.*, **18**, 227-278 (1984).
- 35) Kakiuchi S., Yamazaki R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1104-1110 (1970).
- 36) Tagashira H., Nakahigashi S., Kerakawati R., Motoyashiki T., Morita T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 409-412 (2005).
- 37) Mijares A., Altamirano F., Kolster J., Adams J.A., Lopez J.R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **452**, 1054-1059 (2014).
- 38) Adachi T., Nakashima S., Nakamura T., Nozawa Y., *Hepatology.*, **23**, 1225-1253 (1996).
- 39) Kanuck M.P., Ellsworth J.L., *Life. Sci.*, **57**, 1981-1991 (1995).
- 40) Moteki H., Kimura M., Ogihara M., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 980-986 (2011).
- 41) Baldanzi G., Mitola S., Cutrupi S., Filigheddu N., van Blitterswijk W.J., Sinigaglia F., Bussolino F., Graziani A., *Oncogene.*, **23**, 4828-4838 (2004).
- 42) Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J., *J. Cell Biol.*, **94**, 325-334 (1982).
- 43) Melien O., Nilssen L.S., Dajani O.F., Sand K.L., Lversen J.G., Sandnes D.L., Christoffersen T., *BMC. Cell Biol.*, **3**, 5 (2002).
- 44) Hidaka H., Sasaki Y., Tanaka T., Endo T., Ohno S., Fujii Y., Nagata T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4354-4357 (1981).
- 45) Holen I., Gordon P.B., Seglen P.O., *Biochem. J.*, **284**, 633-636 (1992).
- 46) Rezazadeh S., Claydon T.W., Fedida D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 292-299 (2006).
- 47) Wie L.H., Chen F., Karagueuzian H.S., Weiss J.N., *Circ. Res.*, **104**, 79-86 (2009).
- 48) Scott J.D., *Pharmacol. Ther.*, **50**, 123-145 (1991).
- 49) Fu D., Wakabayashi Y., Lippincott-Schwartz J., Arias I.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 1403-1408 (2011).
- 50) Shibasaki T., Takahashi T., Takahashi H., Seino S., *Diabetes. Obes. Metab.*, **16**, 118-125 (2014).
- 51) Morita T., Ueki H., Kanagawa A., *Cancer. Lett.*, **122**, 37-42 (1998).
- 52) Olaus T.H., Anand-Srivastava M.B., Johnson R.A., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **26**, 269-279 (1982).
- 53) Guinzberg R., Uribe S., Díaz-Cruz A., Hernández Cruz A., Piña E., *Life Sci.*, **79**, 382-390 (2006).
- 54) Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H., *J. Biol. Chem.*, **265**, 5267-5272 (1990).
- 55) Li J., Yang S., Billiar T.R., *J. Biol. Chem.*, **275**, 13026-13034 (2000).
- 56) Morita T., Sakata K., Kanagawa A., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 577-580 (1994).
- 57) Sundaram G.S., Shakir K.M., Barnes G., Margolis S., *J. Biol. Chem.*, **253**, 7703-7710 (1978).

