

培養牛副腎髄質細胞からのカテコールアミン
分泌におけるタンパク質リン酸化の役割

古町克郎

岩手医科大学医学部，薬理学講座

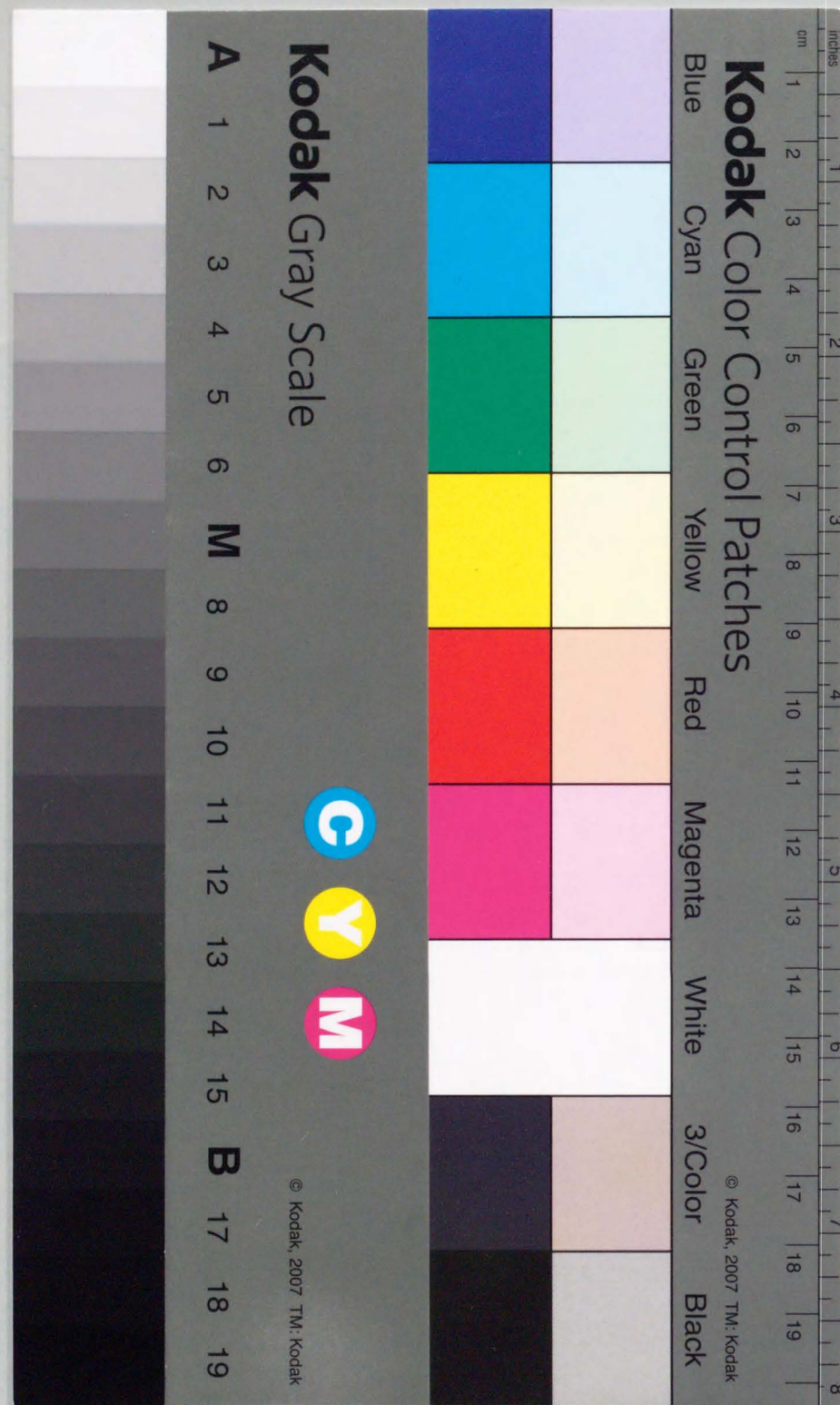
(主任： 檜本威志教授)

岩手医科大学医学部，整形外科科学講座

(主任： 阿部正隆教授)

ランニングタイトル

CA 分泌におけるタンパク質リン酸化の役割



Role of Protein Phosphorylation in
Catecholamine Secretion from Bovine
Adrenal Medullary Chromaffine Cells

Katsuro Furumachi

Department of Pharmacology, School of
Medicine, Iwate Medical University,
Morioka, Japan (Prof.T.Kashimoto)

Department of Orthopedic Surgery,
School of Medicine, Iwate Medical
University, Morioka, Japan (Prof.M.Abe)

key words: phosphorylation, catecholamine
secretion, protein kinase, okadaic acid,
adrenal medulla

Abstract

The catecholamine secretion from the adrenal medullary cells is triggered by the increase of intracellular Ca^{2+} concentration (Ca^{2+} -dependent catecholamine secretion). However the actual mechanism of inducing the secretion is still unclear. Protein phosphorylation is considered to be a candidate of the site of action of elevated Ca^{2+} concentration. Proteins are phosphorylated by protein kinases and subsequently dephosphorylated by phosphatases in vivo. Phosphorylation-dephosphorylation modulates the activity of proteins by causing its conformational change. In this study, the influence of the protein phosphorylation was investigated by measuring the catecholamine secretion from the digitonin-permeabilized cells. Concentrations of free Ca^{2+} (0.1-10 μ M) in the medium increased the catecholamine secretion in a dose-dependent manner. The catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase (20-200 units) enhanced the catecholamine secretion under the existence of ATP and Mg^{2+} . The regulatory unit of the same kinase had no effect. Okadaic acid, a specific inhibitor of the protein

phosphatases also enhanced the catecholamine secretion. These effects were not significant at a higher level of free Ca^{2+} concentration (more than 10 μM). These results indicate that the protein phosphorylation by protein kinases is involved in the catecholamine secretion from bovine adrenal medullary cells.

I 緒言

交感神経のモデルとしても利用される副腎髄質は、細胞膜のニコチン受容体が刺激され、開口分泌 (exocytosis) によりカテコールアミン (CA) を血中に放出する内分泌器官である。CA 分泌は受容体刺激の際生じる細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入による細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加が引き金となっている。この様に副腎髄質からの CA 分泌は Ca^{2+} 依存性である。しかし Ca^{2+} が CA 分泌をおこすメカニズムは理解されておらず、 Ca^{2+} の細胞内作用部位 (標的物質) は不明である。

近年多くの細胞系において細胞応答がプロテインキナーゼ (タンパク質リン酸化酵素) によるタンパク質リン酸化を介して発現する事が知られている。副腎髄質を刺激すると各分子量のタンパク質が Ca^{2+} に依存してリン酸化され、それに平行して CA 分泌が観察される¹⁾。生理機能に関与している代表的なキナーゼは、 Ca^{2+} / ホスホリピッド - 依存性 (C キナーゼ)、 Ca^{2+}

／カルモデュリン-依存性、cyclic AMP-依存性（Aキナーゼ）プロテインキナーゼの3者である。これらいずれかのキナーゼが副腎髄質からのCA分泌において Ca^{2+} のターゲットになっている可能性が考えられる。当研究室の立川ら²⁾は、Cキナーゼの活性化剤と阻害剤を利用した実験から、Cキナーゼは牛副腎髄質細胞からの Ca^{2+} 依存性CA分泌をモジュレートするが、分泌には必須ではないことを示唆した。

そこで今回Aキナーゼの Ca^{2+} 依存性CA分泌における関与をジギトニン処理副腎髄質細胞を用いて検討した。

II 実験方法

1) 副腎髄質細胞の採取³⁾、培養

牛副腎を採取後、速やかに周囲組織を除去し Ca^{2+} -free KRP solution (154mM NaCl, 5.6mM KCl, 1.6mM $MgSO_4$, 10mM Glucose, 3.0 mM Sodium Phosphate Buffer)(pH 7.4)にて37°C、10分間、5ml/minの速度で灌流した。スライサ

-にて厚さ約0.2mmの副腎髄質のみの切片を作成し、0.05% collagenase、0.003% trypsin inhibitor、0.5% bovine serum albuminを含んだ Ca^{2+} -free および2.2 mM $CaCl_2$ 含有 KRP 液にて100%酸素通気下に振盪法にて分離細胞を調製した。細胞をEagle MEM培地（以下を含有：10% calf serum, 100 u/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.3 μ g/ml amphotericin B)に懸濁し、35mm径 dish あたり 2×10^6 の細胞密度で分配した。これらをCO₂インキュベーター中にて37°C、4日間培養し反応に供した。

2) 透過性処理細胞よりのCA遊離

37°C、pH 7.4のKrebs-Ringer-HEPES Buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.6mM $CaCl_2$, 1.2mM $MgSO_4$, 25mM HEPES, 5.6mM glucose)にて培養細胞を洗浄し、10分間のpre-incubationをした。続いてpH 7.4のpotassium-glutamate-HEPES buffer (150mM potassium-glutamate, 15mM HEPES-KOH, 5mM EGTA, 5.6mM glucose)にサポニンの一種 digitonin を低濃

度 ($20 \mu\text{g/ml}$)で添加して5分間、透過性処理をした。これにより細胞膜は 200 nm 以下のporeを有すleaky cellとなる。 Ca^{2+} などのイオンや分子量およそ10万以下のタンパク質は自由に通過するが、顆粒内に存在する酵素 Dopamine β hydroxylase (DBH) は漏出しないことが知られている^{4) 5)}。反応は、得られた透過性細胞を用いて potassium-glutamate-HEPES buffer 中にて 2 mM ATP、 2 mM MgSO_4 、各試薬の存在下および非存在下で15分間おこなわれた。遊離 Ca^{2+} 濃度は pH 7.4 にて EGTA- Ca^{2+} buffer により調整した^{6) 7)}。反応液中の CA を 0.4 M 過塩素酸にて抽出し、水酸化アルミニウムに吸着後、エチレンジアミン縮合法にて蛍光定量した⁸⁾。CA量は細胞の全CA含量の%で表した。

III 結果

1) A キナーゼの CA 分泌に対する効果

Fig. 1 は各濃度の A キナーゼの catalytic subunit (CU) の透過性細胞からの CA 分泌に対

する影響を示している。ATP、 Mg^{2+} の存在下で 600 nM の遊離 Ca^{2+} により、 $11 \pm 0.84\%$ の分泌が生じた。一方遊離 Ca^{2+} と ATP、 Mg^{2+} のいずれか、または両者の非存在下では CA 分泌レベルは 5% 前後にとどまった。両者の存在下で CU は 10 U/ml より有意に分泌を促進し、その効果は 200 U/ml で maximal に達した (half maximal = 50 U/ml)。CU による分泌増加は Ca^{2+} 非存在下でも約 3% 残存したが ATP、 Mg^{2+} 非存在下では消失した。CU は用量依存性に CA 分泌を促進したが、この作用は ATP、 Mg^{2+} の存在を必要とした。A キナーゼは 2 mol の CU と dimer の regulatory unit (RU) からなる不活性型の tetramer を形成しており、cAMP の存在下に RU がはずれることにより CU が活性型となる。Fig. 2 に CA 分泌に対する CU と RU の影響を示した。 100 U/ml 、 200 U/ml の CU による分泌は、それぞれ $13.9 \pm 0.7\%$ 、 $14.8 \pm 0.63\%$ と Ca^{2+} 依存性分泌をそれぞれ 50% 、 65% 増強した。一方同濃度の RU は影響を与えなかった。

CU による分泌の促進はタンパク質の非特異的な作用ではなく、そのリン酸化作用によると思われる。

2) オカダ酸の CA 分泌に対する効果

Fig. 3 は種々の濃度のオカダ酸の CA 分泌に対する影響を示している。type 1 および 2A protein phosphatase を選択的に阻害するオカダ酸は ATP、 Mg^{2+} 存在下に Ca^{2+} 依存性分泌を用量依存性に促進し、その効果は $10^{-7} M$ で maximal で、その値は $17.8 \pm 0.92 \%$ に達した。medium より Ca^{2+} または ATP、 Mg^{2+} いずれかを除いても約 3% のオカダ酸に依存した分泌が残存したが、両者を除くと消失した。

3) Time course

Fig. 4 に $100 U/ml$ の CU および $10^{-7} M$ のオカダ酸による分泌の反応時間依存性をともに示した。分泌は 10 分間ほぼ直線的に増加し 20 分を過ぎるとほぼ maximal に達した。

4) CU とオカダ酸の CA 分泌に対する free

Ca^{2+} 濃度変化の影響

Fig. 5 は digitonin 透過性細胞からの CA 分泌の遊離 Ca^{2+} 依存性を示している。5% 以下の Ca^{2+} 非依存性分泌 ($5 mM$ EGTA 存在下) は遊離 Ca^{2+} 濃度 $10^{-7} M$ より増加し $10^{-5} M$ で最大となった。 $100 U/ml$ の CU、 $10^{-7} M$ のオカダ酸はともに曲線を左方に移動させ、half maximal に相当する Ca^{2+} 濃度 $600 nM$ ($pCa = 6.22$) 付近でその効果は最大であった。CU、オカダ酸ともに高濃度 Ca^{2+} による最大分泌レベルには影響を与えなかった。

5) プロテインキナーゼ阻害剤の CU による

CA 分泌に対する効果

Fig. 6 は各プロテインキナーゼにほぼ等しく作用する強力な阻害剤である K252a ($K_i = 16 nM$; A kinase, $25 nM$; C kinase, $15 nM$; G kinase) の $600 nM$ Ca^{2+} および $100 U/ml$ CU に依存した分泌に対する効果を示している。低濃度 K252a は CU による分泌を抑制したが (阻害率 38.4%、 $10^{-8} M$ K252a)、同じように Ca^{2+} 依存性分泌も抑制した (34.9%、 $10^{-8} M$ K252a)。一方

K252a と同じく放線菌由来の抗生物質で類似の構造を有しごく弱い阻害活性を持つ KT 5823 は、同濃度でこの抑制作用を示さなかった。

IV 考察

1) A キナーゼによる CA 分泌

本研究では培養牛副腎髄質細胞を交感神経系のモデルとして用い、タンパク質リン酸化の影響をみた。本研究により A キナーゼの catalytic subunit が digitonin 処理培養牛副腎髄質細胞よりの CA 分泌を増強することが示された (Fig. 1)。牛副腎髄質細胞ではニコチン性レセプターの刺激により Ca^{2+} の流入が起こり細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇する (Fig. 7)。この上昇した Ca^{2+} がシグナルとなってそれに続く細胞応答が引き起こされる事が知られているが (刺激 - 分泌関連)⁹⁾、 Ca^{2+} の具体的な作用点とカスケードは依然不明である。プロテインキナーゼによるタンパク質リン酸化はこの作用点の候補の 1

つである。Fig. 8 はリン酸化 - 脱リン酸化関連の模式図である。基質タンパク質は ATP、 Mg^{2+} の存在下にプロテインキナーゼにより γ 位のリン酸を受取ることにより構造変化をうけ、酵素活性などが調節を受ける。ついで速やかに脱リン酸化酵素、フォスファターゼにより脱リン酸化を受ける。今日、種々の細胞応答がタンパク質リン酸化を介していることが知られている。直接プロテインキナーゼを用いた報告として、ヤリイカ巨大軸策にカルモジュリンキナーゼを注入することにより生じた synapsin 1 のリン酸化がシナプス伝達を促進したという報告¹⁰⁾ や、心筋細胞にて cAMP 依存性プロテインキナーゼ (A キナーゼ) の Catalytic subunit 注入が活動電位の duration を増加したという報告がある¹¹⁾。分泌細胞ではキナーゼの注入による分泌増強の報告をみないが、protozoa の一種 *Paramecium tetraurelina* よりの trichocyst 分泌が picric acid による 65K 蛋白の脱リン酸化により生ずるという¹²⁾。分泌細胞の性格と神

経細胞の性格を合わせもつ、副腎クロム親和細胞でリン酸化が分泌に関与するか否かは興味深い。われわれの系においても、リン酸化の過程が上昇した細胞内 Ca^{2+} の target となり、またある基質タンパク質のリン酸化が CA 分泌を引き起こし、脱リン酸化がこれを終息させる、という対応を仮定することは可能である。

2) オカダ酸による CA 分泌

オカダ酸はクロイソカイメンより抽出された poly-ether (MW=805.02) で non-phorbol の tumor-promoter である。オカダ酸は protein phosphatase の特異的阻害剤で以下のように性質がよく研究されている。1) Cohen の分類¹³⁾における type 1 および 2A phosphatase に特異的である。2) A キナーゼ、C キナーゼ、カルモデュリン依存性キナーゼを含むすべてのキナーゼに直接影響を与えない^{14) 15)}。3) 抑制される type 1 および 2A phosphatase はカルモデュリン、 Mg^{2+} などを要求しない。非透過性の副腎髄質細胞にてオカダ酸によるリン酸化は

おそらくイオンチャンネル、レセプターに作用して、CA 分泌を抑制する¹⁶⁾。digitonin 処理培養牛副腎髄質細胞にオカダ酸を用いて、本研究と異なり、 Ca^{2+} -依存性分泌よりも非依存性分泌をより大きく促進するとの報告もみられる¹⁷⁾。一方本研究の結果はオカダ酸が Ca^{2+} 依存性分泌をより大きく増強することを示している (Fig. 3)。これは両者の細胞分離法、Buffer の条件の差異によると考える。オカダ酸により抑制される phosphatase は広汎な基質選択性を有するため分泌における具体的な作用点の類推は困難であるが、脱リン酸化の抑制により分泌の促進がみられたことはやはりリン酸化の関与を裏付ける。

3) Ca^{2+} 依存性 CA 分泌における A キナーゼの役割

多くの分泌細胞において細胞内 Ca^{2+} の上昇が細胞応答の引金となり、その応答が Ca^{2+} 濃度に大きく依存する範囲は $10^{-7} \text{ M} \sim 10^{-5} \text{ M}$ であることが高電位による透過性処理細胞で示されてい

る¹⁸⁾。キナーゼによるリン酸化が Ca^{2+} 感受性に影響を与えることにより Ca^{2+} 依存性の sigmoid curve を細胞系に特異的なパターンで移動させること、がCキナーゼの activator であるPMAを用いて検討されている¹⁹⁾。本研究においてCUとオカダ酸は 10^{-5}M 以上の遊離 Ca^{2+} による maximal のCA分泌レベルに影響を与えなかった(Fig. 4)。このことはリン酸化が Ca^{2+} 感受性を変化させることにより生理的な分泌メカニズムに関与することを示唆している。またAキナーゼの活性化に必要な細胞内 cyclic AMP 濃度の上昇がアセチルコリン刺激、高 K^+ 刺激などにより生じることが、培養牛副腎髄質細胞²⁰⁾、PC12ラット褐色細胞腫細胞²¹⁾で報告されている。

透過性細胞における本研究の結果からリン酸化がどの step に関与しているか類推してみる。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、クロム親和性顆粒の内容物が放出されるまでには、顆粒の移動、細胞膜との接合、融合、融合部位での開裂、などの過程がある。Aキナーゼは Arg-Arg-X-Ser な

どの塩基性アミノ酸に囲まれた sequence に親和性を有し、serine または threonine をリン酸化する²²⁾。具体的には histone、myelin-basic-protein、microtubule-associated protein (MAP) などが基質となることが知られている²³⁾。MAPは細胞骨格成分の1つであり、前述の開口放出の準備段階のうちの移動に関連して候補の1つと言える。副腎髄質細胞には種々のプロテインキナーゼが存在するがそのうちAキナーゼ、Cキナーゼ、カルモデュリン依存性キナーゼは多機能プロテインキナーゼと呼ばれ多くの細胞応答に関与している。前述のとおりTachikawa, E.らによるとCキナーゼの直接の activator であるPMAは Ca^{2+} 依存性CA分泌を促進するがその作用は必須ではなく modulatory である。またPMAによる分泌とCUによる分泌は additive、一方CUとオカダ酸のそれは non-additive であった (data not shown)。しかしながら本研究のCUの作用は各キナーゼに特異的とは考え難い。この意味でカルモデュリ

ン依存性キナーゼの関与は否定できない。リン酸化の pathway は単一ではなく複雑な相互作用を有している事が示唆された。

V 結語

交感神経系のモデルとして培養牛副腎髄質細胞を用い、タンパク質リン酸化の影響を検討した。実験には低濃度ジギトニンで処理した透過性細胞を用いた。

1) 600 nM の Ca^{2+} の存在下プロテインキナーゼの Catalytic subunit (10-200 units) は CA 分泌を増強した。しかし Regulatory unit にはこの作用は無かった。

2) プロテインフォスファターゼの阻害剤オカダ酸は CA 分泌を増強した。

3) これらの効果は高濃度 Ca^{2+} (10 μM 以上) 存在下では認められなかった。

4) 以上の結果は牛副腎髄質からの CA 分泌にプロテインキナーゼによるタンパク質リン酸化が関与していることを示唆している。

稿を終えるにあたり、ご指導、御校閲を賜りました本学薬理学講座榎本威志教授、整形外科学講座阿部正隆教授に深謝致します。また直接御教示、御鞭撻を頂きました薬理学講座立川英一助教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Baker, P.F., Knight, D.E. and Verena, N.: Protein phosphorylation accompanies calcium-dependent exocytosis in leaky bovine adrenal medullary cells. *J. Physiol.* 332, 118-124, 1978.
- 2) Tachikawa, E., Takahashi, S., Kashimoto, T. et al: Role of Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase in catecholamine secretion from bovine adrenal medullary chromaffine cells. *Biochem. Pharm.* 40(7), 1505-1513, 1990.
- 3) 樫本 威志: 副腎髄質細胞におけるカテコールアミン遊離の実験方法. *岩手医誌* 33, 1-5, 1981.
- 4) Dunn, L.A. and Holz, R.W.: Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 258, 4989-4993, 1983.
- 5) Wilson, S.P. and Kirschner, N.: Calcium-evoked secretion from digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 258,

4994-5000, 1983.

- 6) Portzehl, H., Cagldwell, P.C. and Rugg, J.C.: The dependence of contraction and relaxation of muscle fibers from the crab *Maisa Squinado* on the internal concentration of the free calcium ions. *Biochem. Biophys. Acta* 79, 581-589, 1964.
- 7) Harafuji, H. and Ogawa, Y.: Re-examination of the apparent binding constant of Ethylene Glycol Bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid with calcium around neutral pH: *J. Biochem.* 87, 1305-1312, 1980.
- 8) Weil-Malherbe, H. and Bone, A.D.: The chemical estimation of adrenaline-like substances in blood. *Biochem. J.* 51, 311-318, 1952.
- 9) Douglas, W.W.: Secretomotor control of adrenal medullary secretion; synaptic, membrane and ionic events in stimulus-secretion coupling. *Handbook of Physiology*, pp. 367-388, American Physiological Society, 1975.

10) Llinas, R., McGuinness, T.L., Greengard, P. et al:
Intraterminal injection of Synapsin I or
Calmodulin-kinase II. Proc.Natl.Acad.Sci. 82,
3035-3041, 1985.

11) Osterrieder, W.: Injection of cyclic
AMP-dependent protein kinase into cardiac
myocytes modulates Ca^{2+} current. Nature
298, 576-578, 1972.

12) Momayezi, M., Lumpert, C.J., Plattner, H.:
Exocytosis induction in *Paramecium tetraurelia*
cells by exogenous phosphoprotein phosphatase in
vivo and in vitro. J.Cell Biol. 105, 181-189,
1987.

13) Cohen, P.: The role of protein
phosphorylation in neural and hormonal control
of cellular activity. Nature 296, 613-620,
1982.

14) Suganuma, M., Fujiki, H., Sugimura, T. et al:
Okadaic acid; An additional
non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-
type tumor promoter. Proc.Natl.Acad.Sci.
85, 1768-1771, 1988.

15) Haystead, T.A.J., Sim, A.T.R. and Cohen, P.:
Effects of the tumor promoter, okadaic acid on
intracellular protein phosphorylation and
metabolism. Nature 337, 78-81, 1989.

16) Yanagihara, N., Toyohira, N., Izumi, F. et al: In
hibitory effect of okadaic acid on
carbachol-evoked secretion of
catecholamines in cultured bovine adrenal cells.
Biochem.Biol.Res.Comm. 174(1), 77-83, 1991.

17) Wu, Y.N. and Wapner, P.D.: Effects of
protein phosphatase inhibitors and a
protein phosphatase on norepinephrine
secretion by permeabilized bovine
chromaffine cells. Biochem.Biophys.Acta
384-390, 1991.

18) Knight, P.E. and Baker, P.F.: Exocytosis from the vesicular view point. Ann. New York Acad. Sci. 493-523, 1987.

19) Ronning, S.A. and Martin, T.F.: Characterization of Phorbol Ester- and Diacylglycerol-stimulated secretion in permeable GH₃ pituitary cells. J. Biol. Chem. 261 (17), 7840-7845, 1986.

20) Keogh, R. and Marley, P.D.: Regulation of cyclic AMP levels by calcium in bovine adrenal medullary cells. J. Neurochem. 57, 1721-1728, 1991.

21) Baizer, L. and Weiner, N.: Regulation of dopamine release from PC12 pheochromocytoma cell cultures during stimulation with elevated potassium or carbachol. J. Neurochem. 44, 495-501, 1985.

22) Bramson, H.N., Mildvan, A.S., Kaiser, E.T. et al: Mechanistic studies of cAMP-dependent protein kinase action. CRC Crit. Rev. Biochem. 15, 93-124, 1984.

23) Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase-C. Science 233, 305-312, 1986.

Fig.1 Effects of the catalytic subunit (CU) of the cAMP-dependent protein kinase on the Ca^{2+} and ATP + Mg^{2+} dependent or independent CA secretion. The digitonin-permeabilized cells were incubated for 15 min at 37°C with different concentrations of CU in Ca^{2+} -free (with 5 mM EGTA, ▲), 600nM Ca^{2+} and 2 mM ATP + 2 mM Mg^{2+} containing (●), Ca^{2+} -free and 2 mM ATP + 2 mM Mg^{2+} containing (■), or 600 nM Ca^{2+} containing and ATP+Mg²⁺-free (○) medium. Data are means ± SD from 3 experiments. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ Significantly different from CU-free secretion.

Fig.2 The effects of the catalytic subunit (CU) and of the regulatory subunit (RU) on the CA secretion. The permeabilized cells were incubated for 15 min at 37°C in a Ca^{2+} -free medium (control, open bar), a medium containing 600 nM Ca^{2+} (dotted bar), or 600 nM Ca^{2+} with 100 U/ml (shaded bars) or

200 U/ml (striped bars) of CU or RU.

Fig.3 The effects of okadaic acid (OA) on CA secretion. The digitonin-permeabilized cells were incubated for 15 min at 37°C with different concentrations of OA in Ca^{2+} -free (with 5 mM EGTA, ▲), 600nM Ca^{2+} and 2 mM ATP + 2 mM Mg^{2+} containing (●), Ca^{2+} -free and 2 mM ATP + 2 mM Mg^{2+} containing (■), or 600 nM Ca^{2+} containing and ATP+ Mg^{2+} -free (○) medium. Data are means ± SD from 3 experiments. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ Significantly different from CU-free secretion.

Fig.4 The time course of the 600 nM Ca^{2+} (○), 600 nM Ca^{2+} + 10^{-7} M OA (■), and 600 nM Ca^{2+} + 100 U/ml CU (●) evoked, and Ca^{2+} -independent (with 5mM EGTA, ▲) CA secretion.

Fig.5 The Ca^{2+} dependence curves of the CA secretion from digitonin-permeabilized bovine adrenal medullary cells. The permeabilized cells were subsequently incubated in a medium containing different concentrations of free Ca^{2+} , without following agents (\bigcirc), with 10^{-7}M OA (\blacksquare), or with 100 U/ml CU (\bullet).

Fig.6 The effects of K 252a and KT 5823 on CA secretion evoked by 600 nM Ca^{2+} and 100 U/ml CU. The permeabilized cells were incubated in the different concentrations of K 252a, with Ca^{2+} -free (with 5 mM EGTA, \blacktriangle), with medium containing 600 nM Ca^{2+} (\bigcirc) or 600 nM Ca^{2+} + 100 U/ml CU (\bullet), and different concentrations of KT 5823, with medium containing 600 nM Ca^{2+} (\square) or 600 nM Ca^{2+} + 100 U/ml CU (\blacksquare).

Fig.7 A schematic representation of the intra-cellular signal transduction in bovine adrenal medullary cells.

Fig.8 A schematic drawing of the phosphorylation-dephosphorylation coupling.

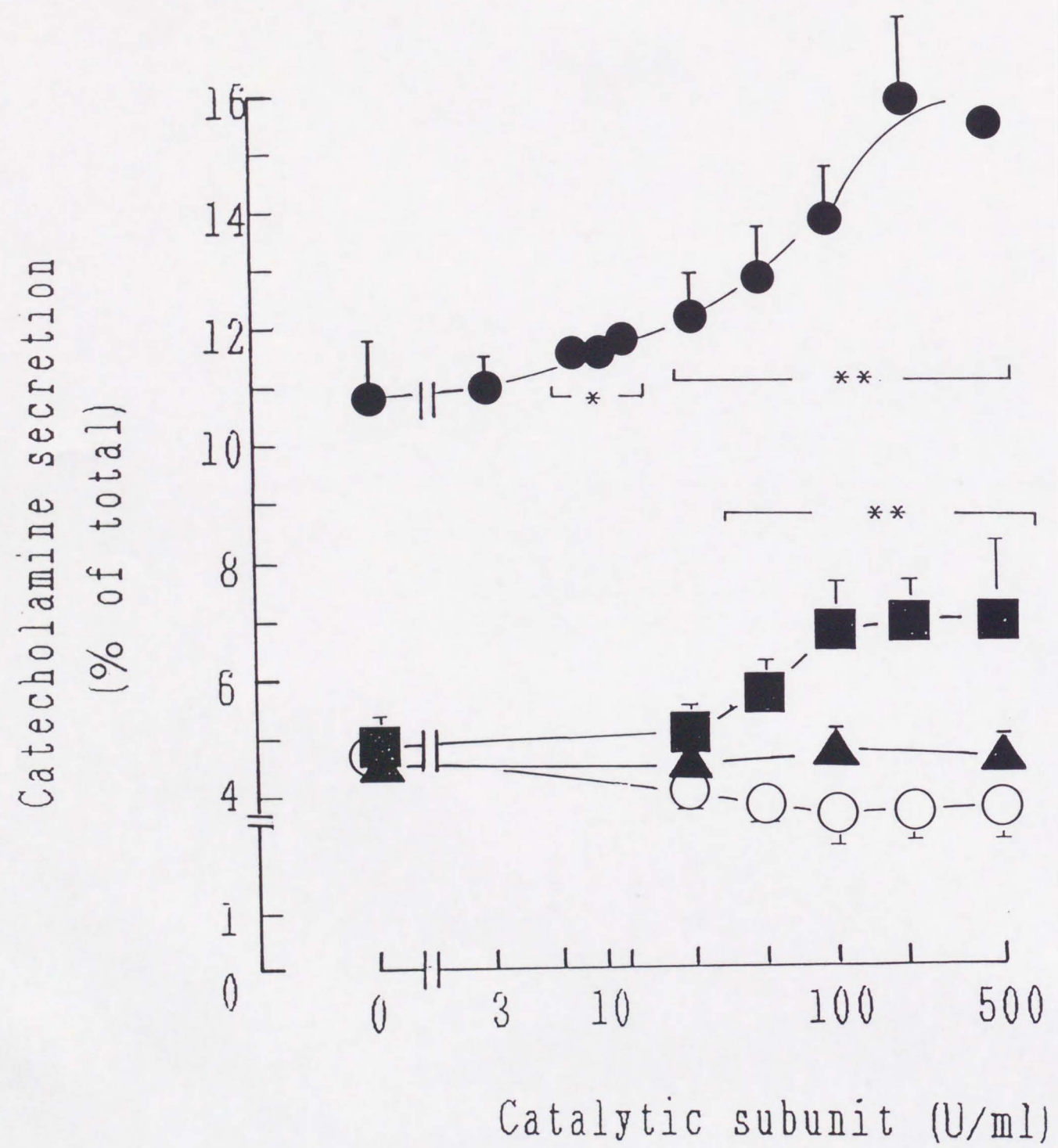


Fig. 1

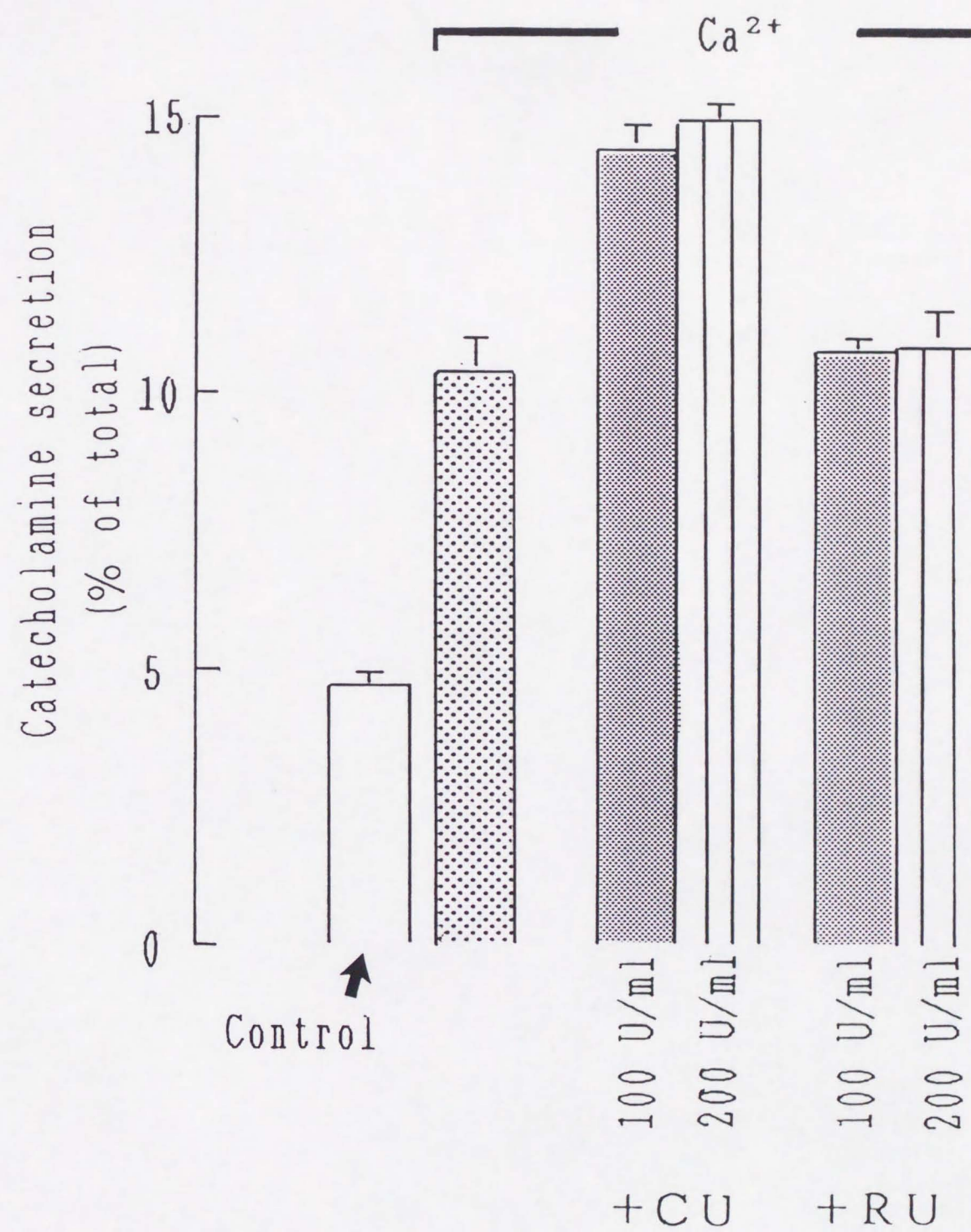


Fig. 2

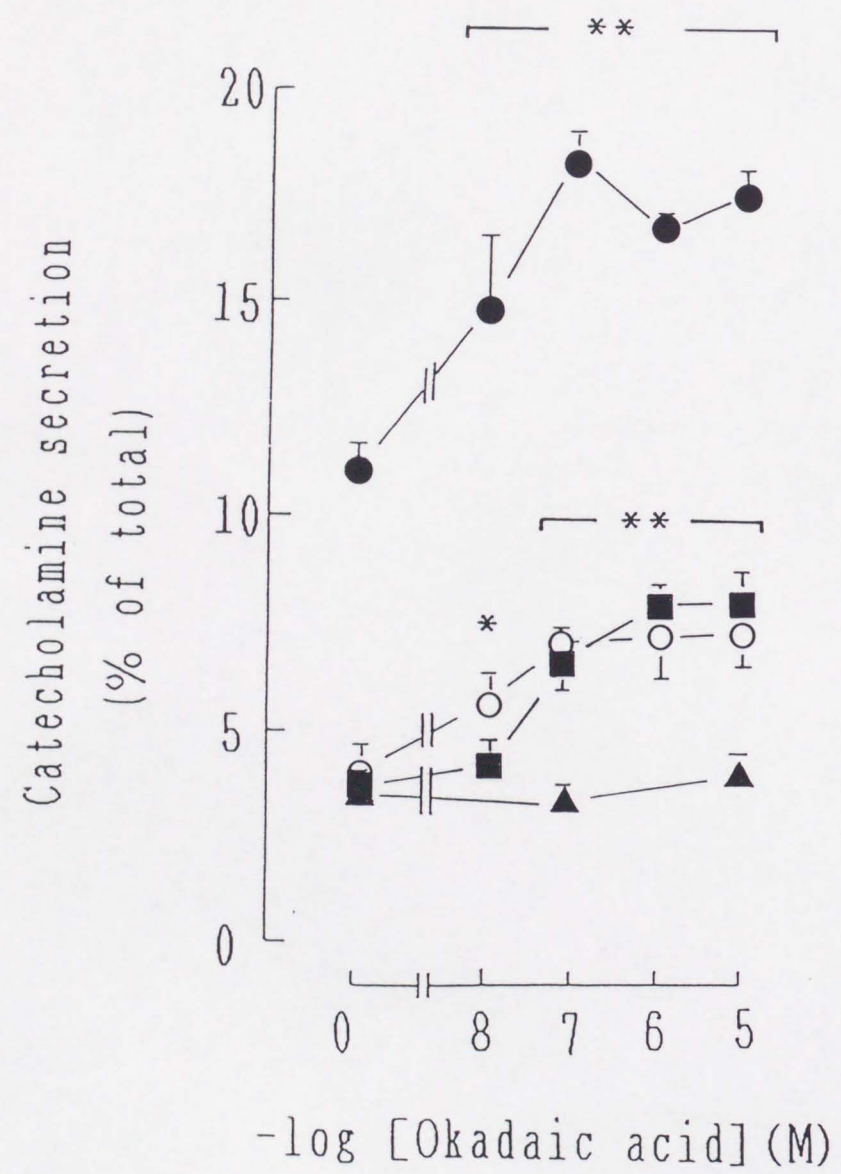


Fig. 3

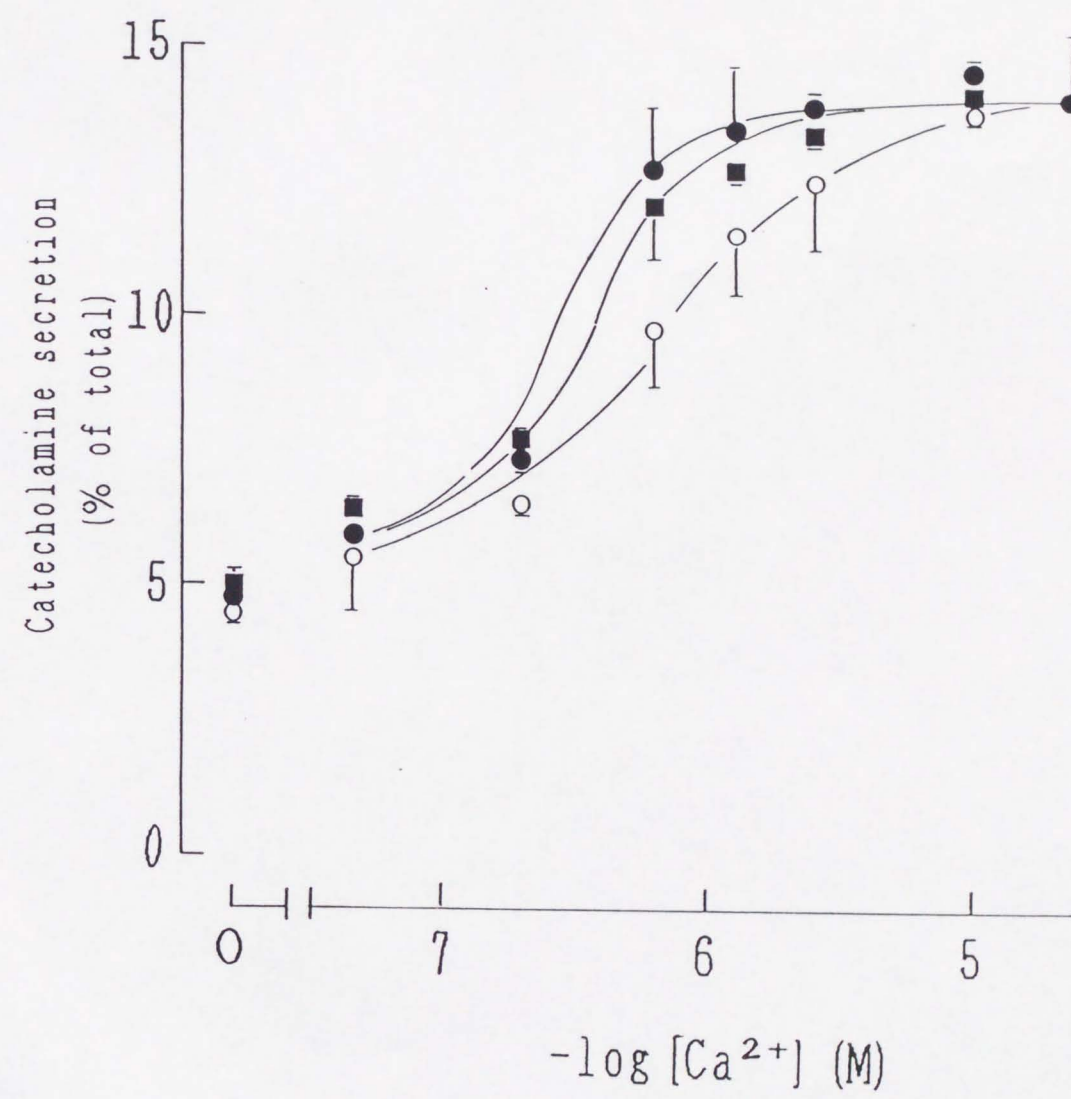


Fig. 4

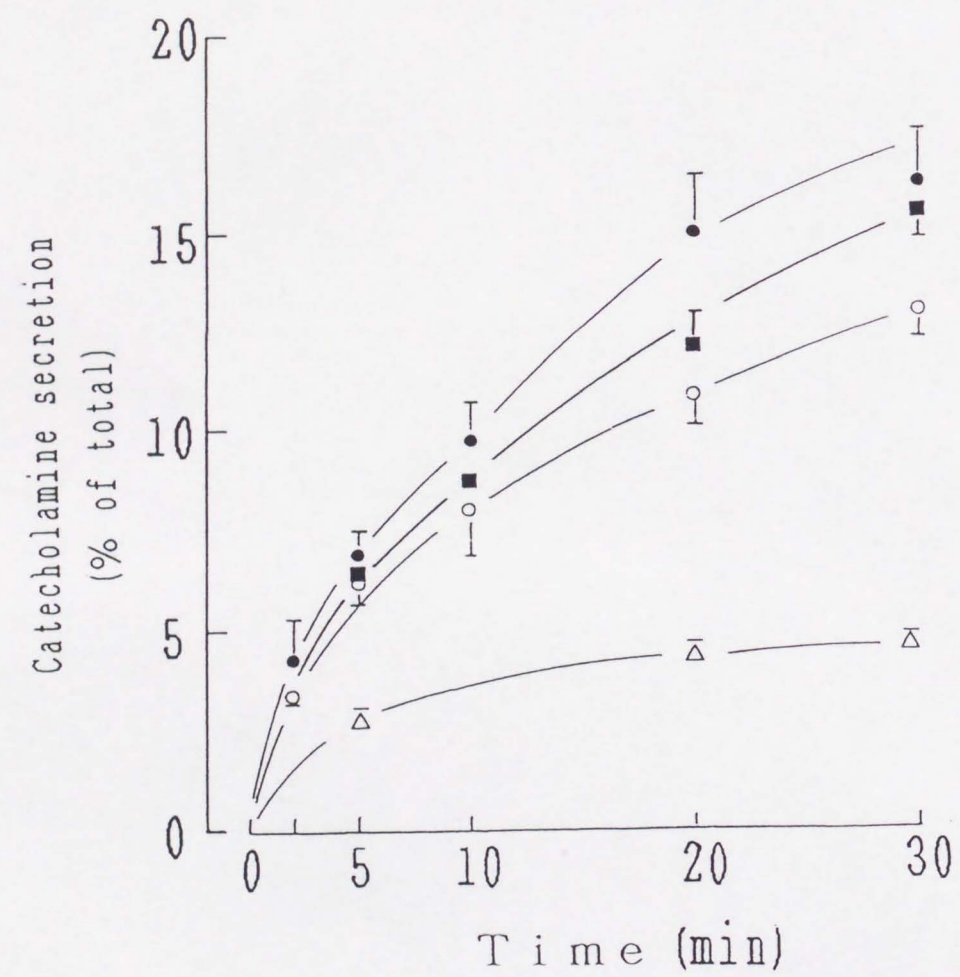


Fig. 5

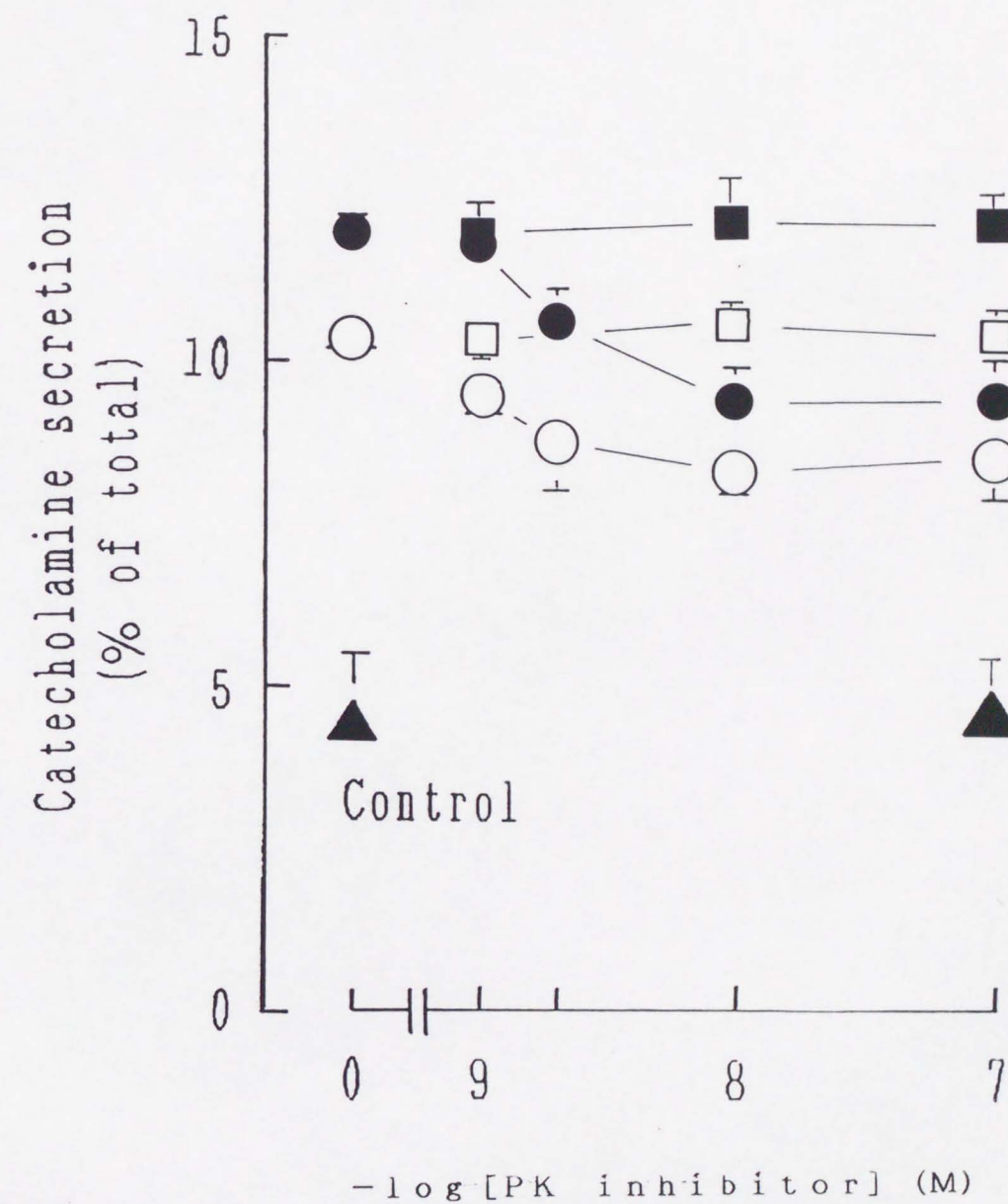


Fig. 6

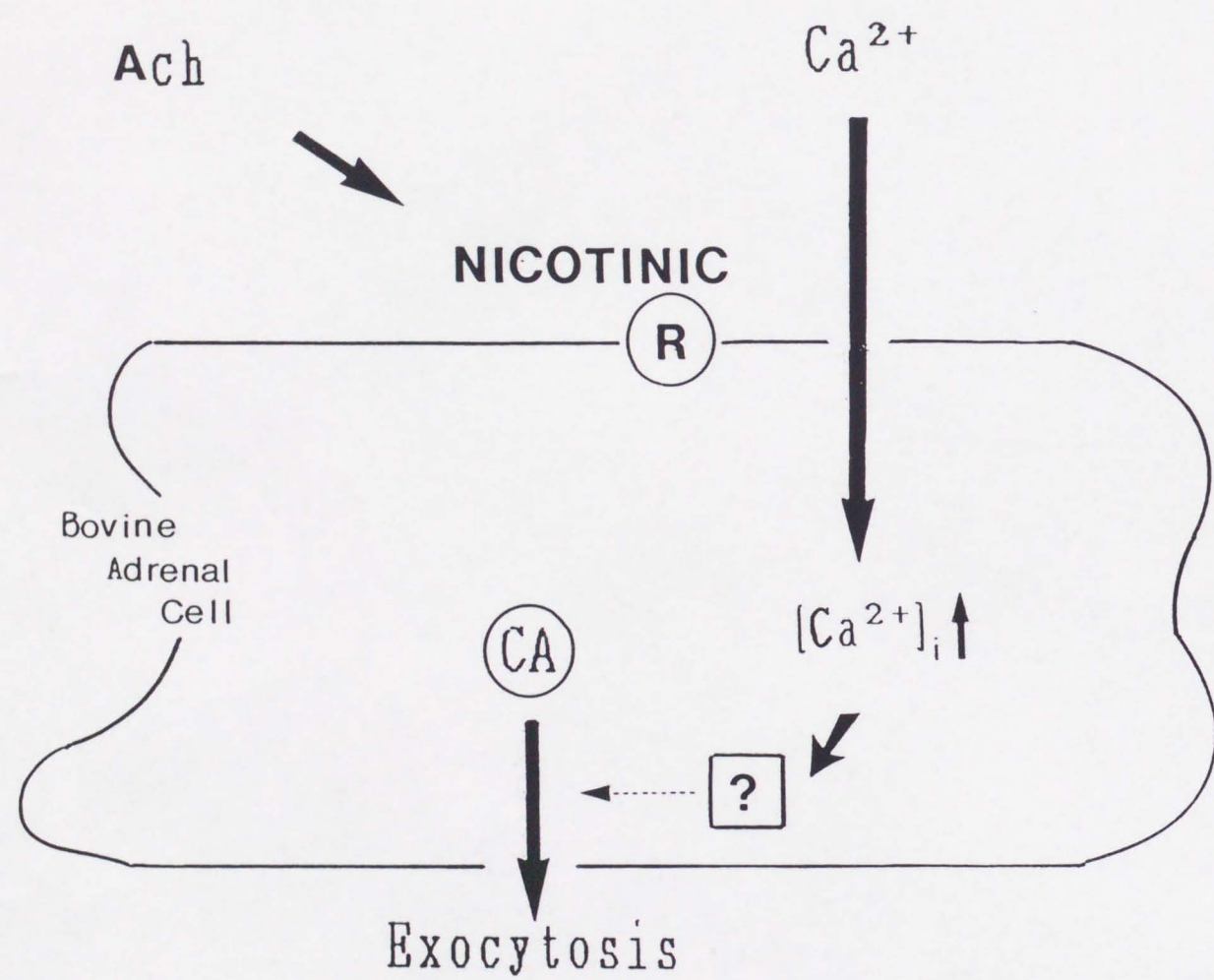


Fig. 7

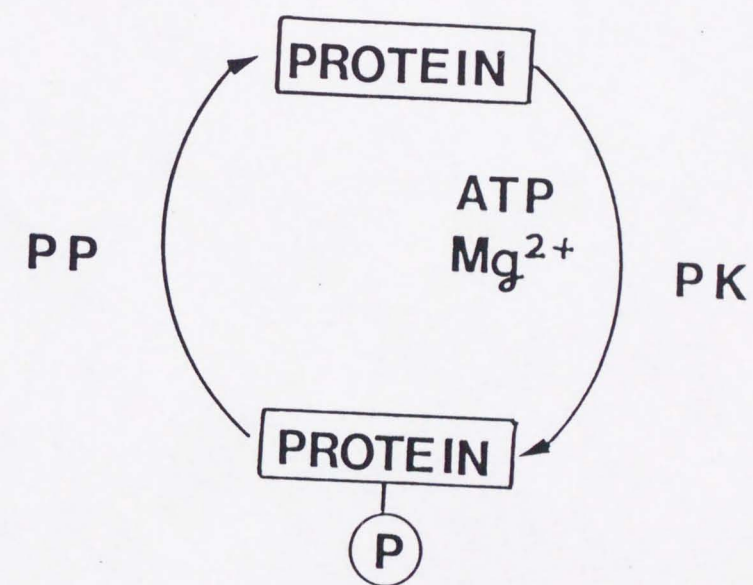


Fig. 8