

カテコールアミンニューロンの刺激分泌連関に関する研究
——神経ペプチド PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) の役割——

東 満美

Possible Role of a Neuropeptide PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) on Stimulus-Secretion Coupling in Catecholamine Neuron

Mami AZUMA

*Division of Pharmacy, Tokushima University Hospital, 2-50-1,
Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan*

(Received June 7, 2002)

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide first isolated from ovine hypothalamic tissue. This peptide stimulates adenylate cyclase activation. However, few details were known of the function of this peptide on stimulus-secretion coupling in neuronal cells. The authors have investigated the role of PACAP on catecholamine biosynthesis and secretion using cultured bovine adrenal chromaffin cells as a model for catecholamine-containing neurons. PACAP38, the 38-amino acid form of PACAP, increased cAMP formation in bovine adrenal chromaffin cells. In addition, PACAP38 increased $[Ca^{2+}]_i$ associated with PI turnover and Ca^{2+} influx into the cells. The synthesis of catecholamine and the phosphorylation of tyrosine hydroxylase, a rate-limiting enzyme of catecholamine biosynthesis, stimulated by the maximal effective concentration of dibutyryl cAMP or a high concentration (56 mM) of K^+ were further enhanced by PACAP38. Thus PACAP38 stimulated the pathway of catecholamine biosynthesis mainly by both activation of cAMP- and Ca^{2+} -dependent protein kinases. On catecholamine secretion from the cells, the effect of PACAP38 was markedly potentiated by addition of ouabain, an inhibitor of Na^+/K^+ ATPase. This markedly potentiated secretion was greatly reduced with Na^+ omitted – sucrose medium. PACAP38 increased $^{22}Na^+$ influx into the cells treated with ouabain. Thus PACAP38 with ouabain stimulated catecholamine secretion by accumulation of intracellular Na^+ , resulting in an increase in Ca^{2+} influx. These results indicate that the neuropeptide PACAP has an important role in stimulus-secretion coupling in adrenal chromaffin cells.

Key words — PACAP; catecholamine; biosynthesis; secretion

1. はじめに

カテコールアミンニューロンにおいてカテコールアミンは、細胞内で生合成系の律速酵素であるチロシン水酸化酵素によりチロシンから生合成され、特定の分泌顆粒中で貯蔵されている。カテコールアミンニューロンはカテコールアミンを刺激に応じて細胞外へ開口分泌 (exocytosis) する機構を有しており、この機構を“刺激分泌連関”と称する。内分泌臓器である副腎髄質のクロマフィン細胞は、内臓神経末端から放出されたアセチルコリンに応答してカ

テコールアミンを分泌する機能をもつことから、また発生学的見地からも、カテコールアミンニューロンのモデルとして“刺激分泌連関”の解析に繁用されている。¹⁻⁷⁾ 副腎髄質クロマフィン細胞におけるカテコールアミン生合成及び分泌は Ca^{2+} に依存した反応であることが知られている。^{8,9)}

一方、PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) は、ラット下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼ活性化作用を指標として、ヒツジ脳視床下部から単離された脳内神経ペプチドである。^{10,11)} しかしその分布は視床下部のみならず脳内各部位、交感神経節、脾臓、呼吸器、消化器、生殖器と広範で、末梢では副腎にも比較的多く発現している。¹²⁾ PACAP には 38 個のアミノ酸からなる PACAP38 とその N 末端 27 個のアミノ酸からなる

徳島大学医学部附属病院薬剤部 (〒770-8503 徳島市蔵本町 2 丁目 50-1)

e-mail: mamichan@clin.med.tokushima-u.ac.jp

*本総説は、平成 13 年度日本薬学会中国四国支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

PACAP27 の 2 種類がある。PACAP は VIP (vasoactive intestinal polypeptide)/セクレチン/グルカゴンファミリーに属し、PACAP27 の構造は VIP と 70% の相同性をもつが、PACAP のアデニル酸シクラーゼ活性化作用は VIP の 1000 倍以上とされている。^{10,11)} PACAP の生理作用としては、神経細胞の増殖・分化・生存維持や脳下垂体細胞からの各種ホルモン分泌促進作用のみならず、精子形成作用、膵 β 細胞からのインスリン分泌促進作用など多岐にわたっている。¹³⁾

本研究では、カテコールアミンニューロンでの“刺激分泌連関”における PACAP の役割を明らかにすることを目的に、培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞を用いて、カテコールアミン生合成及び分泌における PACAP38 の作用及びその機構について検討した。

2. PACAP のカテコールアミン生合成に及ぼす作用

培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞で PACAP は、100 pM—100 nM において濃度依存的に [¹⁴C] チロシンからの [¹⁴C] カテコールアミン生合成を促進した。しかし [¹⁴C] ドーパからの [¹⁴C] カテコールアミン生合成には影響を及ぼさなかったため、PACAP のカテコールアミン生合成促進作用にはチロシン水酸化酵素が関与するものと考えられた。チロシン水酸化酵素はカテコールアミン生合成系の律速酵素で、cAMP/フォルスコリン (アデニル酸シクラーゼ活性化剤) によってリン酸化され活性化される。^{1,14)} 100 nM PACAP はその名の通り cAMP 生成を 609% 増加させた。この作用は 1 μ M フォルスコリンに匹敵する。チロシン水酸化酵素は、他にも細胞のニコチン受容体刺激や脱分極刺激、Ca²⁺ イオノフォアによる細胞内 Ca²⁺ レベル ([Ca²⁺]_i) の上昇、ホルボールエステル (C キナーゼ活性化剤) によってもリン酸化され活性化される。^{1,15)}

PACAP のカテコールアミン生合成促進作用における細胞内外の Ca²⁺ の関与について検討した。反応液中の Ca²⁺ を除去すると PACAP のカテコールアミン生合成促進作用は 43% 減少した。また培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞に [³H] イノシトールを作用させた実験で、100 nM PACAP は [³H] イノシトールリン酸類の生成を 141% 増加させた。イノシトールリン酸類に含まれる 1,4,5-トリホスホ

イノシトール (IP₃) はホスホリパーゼ C の働きにより生成され、細胞内貯蔵部位よりサイトゾールへ Ca²⁺ を遊離させる。¹⁶⁾ 蛍光 Ca²⁺ プローブ Fura-2 を用いた実験では、PACAP100 nM による [Ca²⁺]_i の上昇は二相性を示し、その最大値は 618 nM を示した。IP₃ 刺激によって細胞内貯蔵部位から Ca²⁺ を遊離させる 1 μ M ブラジキニンや細胞を脱分極させ電位依存性 Ca²⁺ チャネルを活性化する高濃度 (56 mM) K⁺ では、[Ca²⁺]_i の最大値はそれぞれ 430 nM, 890 nM で、これらと比較すると 100 nM PACAP の 618 nM は中間に位置している。細胞外からの ⁴⁵Ca²⁺ の流入について確認すると、刺激を行わなかったときと比較し 56 mM K⁺ で 149% の増加、100 nM PACAP では 102% の増加が確認された。これらのデータは、PACAP が細胞内貯蔵部位からの遊離、細胞外液からの流入の両経路を刺激して [Ca²⁺]_i を上昇させている可能性を示唆するものである。

ウシ副腎クロマフィン細胞においてチロシン水酸化酵素のリン酸化や活性化は、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (A キナーゼ)、Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼ (C キナーゼ、CaM キナーゼ) によって調節されていることが報告されている。^{1,17,18)} ジブチリル cAMP (dBcAMP) は A キナーゼ、高濃度 K⁺ は Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼを介してカテコールアミン生合成を増加させる。^{1,19)} 我々の実験系でも、7 mM dBcAMP, 56 mM K⁺ はカテコールアミン生合成をそれぞれ 120%, 152% 増加させ、両者の併用では 276% と相加的な効果を示した。100 nM PACAP は単独でカテコールアミン生合成を 90% 増加させるが、7 mM dBcAMP, 56 mM K⁺ との併用ではそれぞれ 196%, 228% と増強効果は認められるものの相加的効果には及ばなかった。使用した各薬物濃度はカテコールアミン生合成において単独で最大の反応を引き起こす濃度であることから、PACAP によるカテコールアミン生合成は、cAMP 依存性及び Ca²⁺ 依存性両者のプロテインキナーゼによって調節されている可能性が示唆された。しかし PACAP のカテコールアミン生合成促進作用は、C キナーゼ阻害剤スタウロsporin (1 μ M) や C キナーゼのダウンレギュレーションを惹起させる 1 μ M TPA (12-O- tetradecanoyl phorbol 13-acetate) 24 時間処理によっては影響されなかった。²⁰⁻²³⁾ し

たがって PACAP のカテコールアミン生合成促進作用におけるチロシン水酸化酵素のリン酸化に C キナーゼはあまり重要ではないかもしれない。

チロシン水酸化酵素のリン酸化について検討したのが Fig. 1 である。100 nM PACAP は単独でチロシン水酸化酵素のリン酸化を 145% 増加させた。同様に 7 mM dBcAMP で 116%, 56 mM K⁺ で 259% チロシン水酸化酵素のリン酸化を増加させたが、これらに 100 nM PACAP を併用すると、リン酸化の増加はそれぞれ 225%, 312% にまで増強された。しかしカテコールアミン生合成同様、相加的なレベルにまでは達していないと言える。

以上の成績から、PACAP は Ca²⁺ 及び cAMP 依存性の機構によりチロシン水酸化酵素のリン酸化及び活性化を惹起し、カテコールアミン生合成を促進することが示唆された。^{3,4)}

3. PACAP のカテコールアミン分泌に及ぼす作用

PACAP は単独で培養ウシ副腎クロマフィン細胞からのカテコールアミン分泌を惹起した。この反応は PACAP 100 pM—100 nM において濃度依存적であるが、30 分間の分泌量は最大でも細胞含有総カテコールアミン量の 1—2% 程度であった。ウシ副腎クロマフィン細胞からの PACAP によるカテコールアミン分泌は、生理的刺激剤であるアセチル

コリンや高濃度 (56 mM) K⁺ による脱分極刺激が 2 分以内に 10—20% という急速で大きな分泌を引き起こすのに比較し、40 分まで非常に緩徐で持続的であった。

そこで PACAP によるカテコールアミン分泌作用に Ca²⁺ 以外に Na⁺ の関与を考え、反応系に Na⁺/K⁺-ATPase 阻害剤ウアバインを適用した。^{24—28)} 10 μM ウアバインは Na⁺ の細胞外流出をほぼ 100% 阻害し、30 分で 2—3% 程度のカテコールアミン分泌を惹起する。100 nM PACAP と 10 μM ウアバインの併用は、30 分間で約 7% を分泌した。さらに Ca²⁺ 流入過程を一連の反応から分離する 2 段階の反応方法を試みた。まず第一段階で反応液から Ca²⁺ を除去し PACAP 及びウアバインを含む反応液で細胞を 30 分間前処理し、第二段階では反応液から PACAP やウアバインを除いて 10 分間 Ca²⁺ を添加する。この方法により、Ca²⁺ の流入以前に惹起された現象、特に Na⁺ の蓄積を観察することが可能となった。ウアバインの併用により、PACAP によるカテコールアミン分泌は著明に増強され 15—20% にまで達した。

この二段階反応において、第一段階で 100 nM PACAP と 10 μM ウアバインを作用させたときのカテコールアミン分泌は、第二段階反応液の Ca²⁺ 濃度 (0—2.2 mM) に依存し、2.2 mM Ca²⁺ で

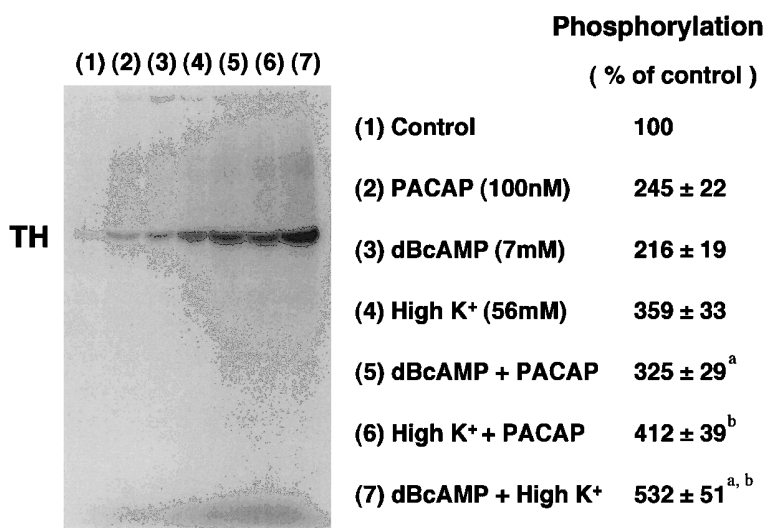


Fig. 1. Effects of PACAP, Dibutyl cAMP (dBcAMP) and High K⁺ on Phosphorylation of Tyrosine Hydroxylase in Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells

Cells were incubated at 37°C for 30 min in the presence or absence of 100 nM PACAP, 7 mM dBcAMP or 56 mM high K⁺. Tyrosine hydroxylase phosphorylation is expressed as a percentage of control value. Data are means ± SE for 3 separate experiments. a: Significantly greater than the value with dBcAMP, b: Significantly greater than the value with high K⁺ (both *p* < 0.01).

は 0 mM Ca^{2+} に対し 345% の増加を示した. そこで反応液中の Ca^{2+} が細胞内に流入していることを確認するため, 第二段階反応液に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を添加した. その結果, 第一段階で 100 nM PACAP と 10 μM ウアバインを作用させた細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の蓄積 (流入) は著明に増加し, 定常状態 (第一段階で PACAP やウアバインを作用させないとき) の約 9 倍, ウアバインのみを作用させたときの約 2 倍となった. 次に, 第一段階の PACAP, ウアバインを含む反応液から Na^+ を除去すると, 第二段階でのカテコールアミン分泌は 79% 阻害された (Fig. 2). また第一段階で反応液に $^{22}\text{Na}^+$ を添加すると, 細胞内への $^{22}\text{Na}^+$ の蓄積 (流入) は定常状態の約 12.6 倍に増加した. ウアバインは細胞からの Na^+ 排出機構である Na^+/K^+ -ATPase を阻害するため, 結果的に $^{22}\text{Na}^+$ の細胞内蓄積量を増加させることは容易に予測できる. しかし第一段階でウアバインのみを作用させたときの $^{22}\text{Na}^+$ 蓄積量は定常状態の約 9.3 倍に止まり, PACAP の存在が有意に細胞内 $^{22}\text{Na}^+$ の蓄積量を増加させていることが確認された. この反応系において, ウアバイン存在下 PACAP のカテコールアミン分泌促進作用は, 第一段階での細胞内 Na^+ の蓄積とそれに続く第二段階での Ca^{2+} 流入促進によって惹起されているものと考えられた.

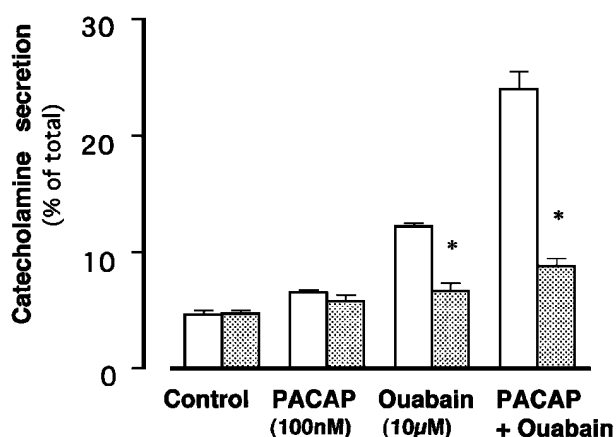


Fig. 2. Effects of Extracellular Na^+ on Catecholamine Secretion from Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells

Cells were incubated at 37°C for 30 min with 100 nM PACAP and/or 100 μM ouabain in Ca^{2+} -free medium in the presence (open column) or absence (dotted column) of Na^+ and then stimulated for 15 min with Ca^{2+} -medium in the presence of Na^+ without PACAP and ouabain. Catecholamine secretion is expressed as a percentage of the total cellular content. Data are means \pm SE for 3-6 experiments. *: Significantly less than the corresponding value ($p < 0.01$).

PACAP の名前の由来であるアデニル酸シクラーゼ系の関与について検討した. cAMP 生成を 100 nM PACAP は約 7 倍, 1 μM フォルスコリンは約 8.5 倍に増加させた. これに比して第一段階に 10 μM ウアバインを適用したときのカテコールアミン分泌は, 100 nM PACAP の添加により約 1.8 倍に増強されたが, 1 μM フォルスコリンの添加では影響は認められなかった. これは, ウアバイン存在下 PACAP のカテコールアミン分泌促進作用に, アデニル酸シクラーゼの活性化ひいては cAMP や A キナーゼはあまり関与していない可能性を示唆するものである.

PI レスポンスや C キナーゼの関与についても検討した. 前述のように, 100 nM PACAP は [^3H] イノシトールリン酸類の生成を約 2.4 倍に増加させている. ウアバインを適用した二段階反応でのカテコールアミン分泌では, 第一段階での 100 nM PACAP の添加で約 1.8 倍の分泌が観察されたが, 同時に C キナーゼを阻害するスタウロスポリン (1 μM) を添加すると分泌は 1.2 倍程度にまで抑制された. また第一段階でウアバインと共に C キナーゼを活性化する 1 μM TPA を添加すると 100 nM PACAP と同様に約 1.8 倍の分泌増強効果が観察された. これらの結果より, ウアバイン存在下 PACAP のカテコールアミン分泌促進作用の細胞内機構に PI レスポンスを通じた C キナーゼの活性化が関与していると考えられた.

他種の動物を用いた実験で, PACAP は主として電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化を通してクロマフィン細胞からのカテコールアミン分泌を惹起しているとの報告がある.^{29,30} 我々の実験系において二段階反応の第一段階で PACAP とウアバインを適用したときのカテコールアミン分泌は, 第二段階で電位依存性 Ca^{2+} チャネルを阻害する 1 μM ニフェジピン又は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を阻害する 5 mM アミロライドを添加するとそれぞれ 25%, 36% 抑制された. しかし第一段階でウアバインのみを適用したときの分泌抑制率は, ニフェジピン, アミロライドそれぞれ 37%, 18% となった. このことは, 培養ウシ副腎クロマフィン細胞において PACAP はウアバイン存在下膜の脱分極による電位依存性チャネルの活性化あるいは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介した Ca^{2+} 流入の結果によりカテコールアミン分泌を惹起してい

るが、PACAPの作用に関連した Ca^{2+} 流入機構には電位依存性 Ca^{2+} チャンネルよりむしろ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の関与が大きいことを示唆しているのかもしれない。

以上の成績から、ウバイン存在下PACAPは細胞内への Na^+ の蓄積に続く Ca^{2+} の流入を介してカテコールアミン分泌を促進させており、その細胞内機構にはアデニル酸シクラーゼ系よりむしろPIレスポンスを介したCキナーゼの活性化が重要であることが示唆された。⁵⁾

4. まとめ

本研究では、培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞を用いて、カテコールアミン生合成及び分泌におけるPACAP38の作用及びそれに関わる細胞内機構について検討した。PACAP38は、 Ca^{2+} 及びcAMP依存性の機構によりチロシン水酸化酵素のリン酸化及び活性化を通してカテコールアミン生合成を促進させた。またウバインを併用した実験より、PACAP38は主にPIレスポンスを介したCキナーゼの活性化を通して細胞内に Na^+ を蓄積させ、それに続く Ca^{2+} 流入ひいてはカテコールアミン分泌を促進させたと考えられた。³⁻⁵⁾

ウシ副腎クロマフィン細胞に存在するPACAP受容体には、アデニル酸シクラーゼを活性化する系とPIレスポンスを亢進させる系が併存している。¹³⁾本研究結果より、主にアデニル酸シクラーゼ

系がカテコールアミン生合成に、PIレスポンス系がカテコールアミン分泌に関与していると考えられた。Figure 3に考えられる細胞内活性化経路を示した。アデニル酸シクラーゼの活性化はcAMPの生成を亢進させAキナーゼを活性化させる。また電位依存性チャンネルの活性化で細胞外から流入したり、PIレスポンスの亢進で生じた IP_3 により細胞内 Ca^{2+} プールから分泌されて増加した細胞内 Ca^{2+} は、CaMキナーゼやCキナーゼを活性化させる。これらの活性化リン酸化酵素、特にAキナーゼ、CaMキナーゼが、チロシン水酸化酵素をリン酸化し活性化させてカテコールアミン生合成を促進させる。

一方PIレスポンスの亢進により生じたジアシルグリセロールはCキナーゼを活性化する。Cキナーゼはそれ自身でもカテコールアミン分泌を促進するが、一方で Na^+/H^+ アンチポートシステムの活性化などにより細胞内に Na^+ を流入させる。³¹⁾ウバインの添加によって Na^+/K^+ -ATPaseが阻害され Na^+ は能動的に細胞外へ汲み出されないため細胞内に蓄積し、細胞は脱分極状態となり電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを開かせる。また細胞内に蓄積した Na^+ は Ca^{2+} の排出機構として知られる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を逆方向に作動させ、細胞内 Na^+ と細胞外 Ca^{2+} を交換させる。すなわち細胞内へ Ca^{2+} を導入しカテコールアミン分泌を惹起すると

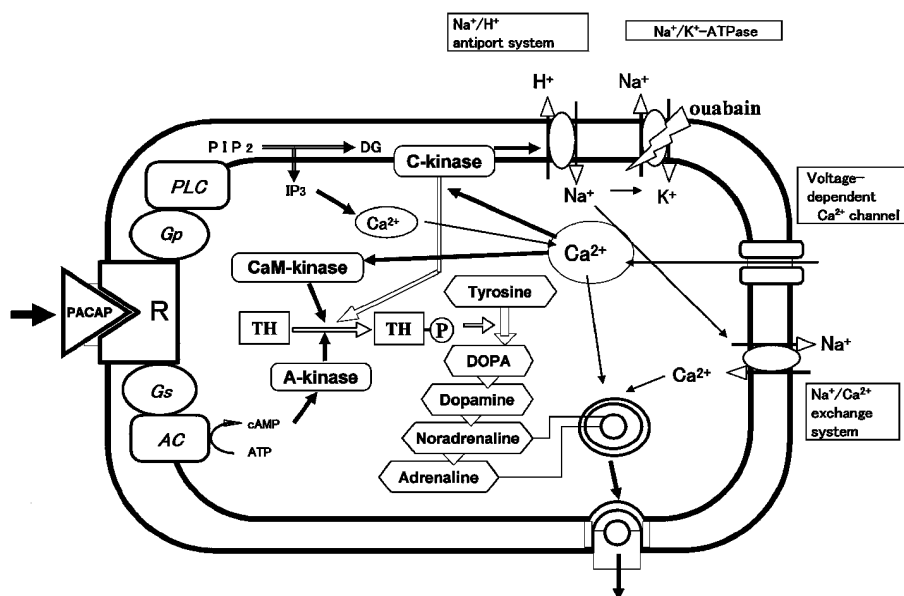


Fig. 3. Schematic Stimulus-Response Coupling in Adrenal Chromaffin Cells Stimulated by PACAP

いう機構が考えられた。

謝辞 本研究は、著者が調剤薬局勤務の傍ら徳島大学医学部専攻生として研究を始めてから徳島大学医学部附属病院薬剤部に勤務する今日に至るまで、細く長く継続してきた研究成果の一端です。その間不断の御指導と御助言を賜りました徳島大学医学部附属病院薬剤部水口和生教授、芳地一助教授に心より感謝いたします。また研究の機会を与え御指導を賜りました元徳島大学医学部薬理学講座岡源郎教授、ご協力いただきました共同研究者並びに陰ながら支えて下さった職場の皆様方にこの場をお借りして深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Masserno J. M., Vulliet P. R., Tank A. W., Weiner N., "Catecholamines, Handbook of Experimental Pharmacology," ed. by Trendelenburg U., Weiner N., Springer, Berlin, 1990, pp. 427-469.
- 2) Oka M., Isosaki M., Yanagihara N., "Catecholamines, Basic and Clinical Frontiers, Vol. 1," ed. by Usdin E., Kopin I. J., Barchas J., Pergamon Press, Oxford, 1979, pp. 70-72.
- 3) Houchi H., Hamano S., Masuda Y., Ishimura Y., Azuma M., Ohuchi T., Oka M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **66**, 323-330 (1994).
- 4) Houchi H., Azuma M., Kitamura K., Okuno M., Oka M., *Hypertens. Res.*, **18**, S169-171 (1995).
- 5) Azuma M., Minakuchi K., Takasugi M., Houchi H., Oka M., *J. Med. Invest.*, **43**, 113-119 (1996).
- 6) Ozawa Y., Houchi H., Teraoka K., Azuma M., Kamimura T., Yoshizumi M., Tsuchiya K., Tamaki T., Minakuchi K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, S15-8, (2000).
- 7) Houchi H., Azuma M., Yoshizumi M., Tamaki T., Minakuchi K., *J. Med. Invest.*, **46**, 1-9 (1999).
- 8) Douglas W. W., "Handbook of Physiology, Adrenal Grand," ed. by Blashko H., Sayer G., Smith A. D., American Physiological Society, 1975, pp. 367-388.
- 9) Viveros O. H., "Handbook of Physiology, Adrenal Grand," ed. by Blashko H., Sayer G., Smith A. D., American Physiological Society, 1975, pp. 389-426.
- 10) Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler D. M., Coy D. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 567-574 (1989).
- 11) Miyata A., Jiang L., Dahl R. R., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N., Arimura A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 643-648 (1990).
- 12) Arimura A., Somogyvari-Vigh A., Miyata A., Mizuno K., Coy D. H., Kitada C., *Endocrinology*, **129**, 2787-2789 (1991).
- 13) David V., Bruno J. G., Magali B., Laurent Y., Alain F., Hubert V., *Pharmacological Reviews*, **52**, 269-324 (2000).
- 14) Meligeni J. A., Haycock J. W., Bennett W. F., Waymire J. C., *J. Biol. Chem.*, **257**, 12632-12640 (1982).
- 15) Pocotte S. L., Holz R. W., *J. Biol. Chem.*, **261**, 1873-1877 (1986).
- 16) Berridge M. J., Irvine R. F., *Nature (Lond.)*, **312**, 315-321 (1984).
- 17) Vulliet P. R., Woodgett J. R., Cohen P., *J. Biol. Chem.*, **259**, 13680-13683 (1984).
- 18) Griffith L. C., Schulman H., *J. Biol. Chem.*, **263**, 9542-9549 (1988).
- 19) Tachikawa E., Tank A. W., Yanagihara N., Mosimann W., Weiner N., *Mol. Pharmacol.*, **30**, 476-485 (1986).
- 20) Rodriguez-Pena A., Rozengut E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 1053-1059 (1984).
- 21) Ballester R., Rosen O. M., *J. Biol. Chem.*, **260**, 15194-15199 (1985).
- 22) Matthies H. J., Palfrey H. C., Hirning L. D., Miller R. J., *J. Neurosci.*, **7**, 1198-1206 (1987).
- 23) Grove D. S., Mastro A. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 94-99 (1988).
- 24) Aunis D., Garcia A. G., *Br. J. Pharmacol.*, **72**, 31-40 (1981).
- 25) Garcia A. G., Hernandez M., Horga J. F., Sanchez-Garcia P., *Br. J. Pharmacol.*, **68**, 571-583 (1980).
- 26) Pocock G., *Mol. Pharmacol.*, **23**, 671-680 (1983).
- 27) Pocock G., *Mol. Pharmacol.*, **23**, 681-697 (1983).

-
- 28) Wakade A. R., *J. Physiol.*, **313**, 481–498 (1981).
- 29) Watanabe T., Masuo Y., Matsumoto H., Suzuki N., Ohtaki T., Masuda Y., Kitada C., Tsuda M., Fujino M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 403–411 (1992).
- 30) Isobe K., Nakai T., Takuwa, Y., *Endocrinology*, **132**, 1757–1765 (1993).
- 31) Tanaka T., Yokohama H., Negishi M., Hayashi H., Ito S., Hayaishi O., *J. Neurochem.*, **54**, 86–95 (1990).