

ウシ副腎皮質束状層細胞における糖質コルチコイド産生に 対する電位作動性カルシウムチャネルの関与

東京慈恵会医科大学薬理学講座第1

村 上 稔 松 本 康 訓 甲 斐 郁 代

東京慈恵会医科大学麻酔科学講座

近 藤 一 郎

(受付 平成14年6月12日)

VOLTAGE-OPERATED CALCIUM CHANNEL IS INVOLVED IN CORTICOIDOGENESIS IN BOVINE ADRENOCORTICAL FASCICULATA CELLS

Minoru MURAKAMI, Yasunori MATSUMOTO, and Ikuyo KAI

Department of Pharmacology (I), The Jikei University School of Medicine

Ichiro KONDO

Department of Anesthesiology, The Jikei University School of Medicine

The voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCs) may be involved in the regulation of corticoidogenesis by adrenocorticotrophic hormones in isolated bovine adrenocortical cells. To confirm the presence of VOCs in adrenocortical cells, we examined the effect of high extracellular concentrations of K^+ , which causes membrane depolarization, on corticoidogenesis and on the mobilization of intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) using primary cultured bovine adrenocortical fasciculata cells (BAFCs). In the presence of extracellular Ca^{2+} (1.2 mM), K^+ (12.5-60 mM) enhanced corticoidogenesis in a concentration-dependent manner. The effect of K^+ was greatest at a concentration of 30 mM. The addition of 30 mM K^+ in the presence of extracellular Ca^{2+} caused a sustained rise in $[Ca^{2+}]_i$. However, the effect of K^+ on $[Ca^{2+}]_i$ was not observed in the absence of extracellular Ca^{2+} . Therefore, membrane depolarization due to a high concentration of extracellular K^+ elicits Ca^{2+} influx from an extracellular pool in BAFCs. The VOC inhibitors nifedipine, nicardipine, verapamil, and diltiazem completely inhibited the corticoidogenesis induced by 30 mM K^+ . The effect of 30 mM K^+ on $[Ca^{2+}]_i$ was also attenuated by nifedipine in BAFCs. These results indicate that the corticoidogenesis-linked L-type VOCs are present in BAFCs.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 315-22)

Key words: Calcium channel, Ca^{2+} , adrenal cortex, steroidogenesis

I. 緒 言

副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) が副腎皮質束状層細胞におい

て adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) を介し, 糖質コルチコイド (glucocorticoid: GC) 産生を刺激することはよく知られている¹⁾. しかしながら, ラット副腎皮質細胞の

ACTH による GC 産生には細胞外 Ca^{2+} が必要であると報告されて以来, GC 産生と Ca^{2+} の関係が注目されはじめた²⁾. Yanagibashi はウシ副腎皮質遊離細胞においても, ACTH による GC 産生には細胞外 Ca^{2+} が重要な役割を持ち, 細胞に ACTH で活性化される電位作動性カルシウムチャネル (voltage-operated Ca^{2+} channel: VOC) が存在することを示唆した³⁾. しかしながら, 彼等は trypsin 処理した副腎皮質遊離細胞を用い, VOC 阻害薬による ACTH の GC 産生促進作用の抑制から間接的に示唆している⁴⁾. そして, 高濃度 K^+ による細胞内への Ca^{2+} 流入に対する直接的効果については観察していない. さらに, trypsin 処理は細胞膜表面の構造に影響することが報告されており⁵⁾, また VOC 活性に対する細胞骨格の関与も示唆されている^{6,7)}. そして細胞骨格構造と細胞膜には密接な関係があるといわれていることから, trypsin 処理によって調製し, 直ちに実験に供した遊離細胞から得られた結果はそのまま受け入れにくい. したがって, 細胞膜に異常が無いと考えられる細胞を用いて VOC の存在を確認する必要がある. 今回, 我々は細胞膜障害の影響をできるだけ除くために, 初代培養 3 日目のウシ副腎皮質束状層細胞 (bovine adrenocortical fasciculata cell: BAFC) を用いて実験した. そして, 細胞膜を脱分極する高濃度 K^+ による GC 産生に対する特異的 VOC 阻害薬である dihydropyridine (DHP) 系薬物と比較的特異性の低い VOC 阻害薬である verapamil や diltiazem の効果を検討した⁸⁾. また, 蛍光性 Ca^{2+} 指示薬である fura 2 を取り込ませた BAFC を用いて VOC の存在の直接的な証明を試みた.

II. 方 法

1. BAFC の初代培養

BAFC は, collagenase I を用いて無菌的に調製し初代培養した⁹⁾. その方法を簡単に述べると, 可及的速やかに屠畜場より運んできたウシ副腎を周囲の脂肪除去後に火炎滅菌した. 次いで, 滅菌した Krebs-Ringer bicarbonate glucose albumin buffer (pH 7.4) (123 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25.3 mM NaHCO_3 , 1.2 mM CaCl_2 , 2 mg/ml glucose, 3

mg/ml bovine serum albumin (BSA), 0.01 mM EGTA) (KRBGA) にて洗浄し, 髄質除去後に皮質を細切した. 細切皮質片を 0.1% collagenase I および 0.005% deoxyribonuclease I を含有する KRBGA 中で 5% CO_2 気相下で 37°C にて 1 時間インキュベート後, 駒込ピペットで細胞を遊離した. 細胞懸濁液を 80 メッシュ白金フィルターでろ過し副腎皮質細胞浮遊液を得た. 細胞浮遊液を 4°C, 1,000 rpm にて 10 分間遠心して得た細胞を, 5% ウシ胎児血清, 10% ウシ新生児血清, 2.5% ウマ血清および抗生物質を含む Ham F-10 培養液にて懸濁し, 24 ウェルタイプの培養皿に播種し, 炭酸ガス (5% CO_2) 培養器で 37°C で初代培養した¹³⁾. 以上の操作はすべて無菌的に行った. 今回の実験には初代培養 3 日目の細胞を用いた.

2. GC 産生活性の測定

24 ウェルタイプの培養皿に培養した単層培養細胞 (15-20 万細胞/ウェル) を, 低濃度 K^+ 含有 Krebs-Ringer bicarbonate glucose albumin buffer (pH 7.4) (129.3 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25.3 mM NaHCO_3 , 1.2 mM CaCl_2 , 2 mg/ml glucose, 3 mg/ml BSA, 0.01 mM EGTA) (low K^+ -KRBGA) (pH 7.4) で数回洗浄後, 様々な条件下で 5% CO_2 気相下にて 37°C, 1 時間インキュベートした. インキュベーション液の総量は 1 ml とし, インキュベート終了後インキュベーション液を 0.5 ml 採取して, その中に含まれる GC 量を硫酸蛍光法で測定した¹⁰⁾. 標準 GC として cortisol を用いた. 各試料において GC 産生活性の最大値が異なるので, 結果は最大値に対する % で表した.

3. 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は Mastui の方法を用いて行なった¹¹⁾. すなわち, ガラス板上に培養した単層細胞を 0.02% cremophor EL 含有 Krebs-Ringer bicarbonate glucose HEPES buffer (pH 7.4) (123 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES, 1.2 mM CaCl_2 , 2 mg/ml glucose, 0.01 mM EGTA) (KRBGH) 中で fura 2/acetoxymethyl ester と共にインキュベートし, 蛍光性 Ca^{2+} 指標薬である fura 2 を取り込ませた. 細胞の蛍光強度は HITACHI F-

2000 蛍光分光光度計で 340 nm と 380 nm の励起波長を 0.5 秒ごとに交換させながら 510 nm 蛍光波長で測定した。測定は 30°C の K⁺ 無添加 HEPES buffer (143 mM NaCl, 1.2 mM MgSO₄, 2 mg/ml glucose, 20 mM HEPES, 0.01 mM EGTA) (pH 7.4) 中に行なった。[Ca²⁺]_i の変動は 340 nm と 380 nm の比率で示し 340 nm/380 nm (F340/F380) で表した。VOC を介する [Ca²⁺]_i の上昇は 30 mM KCl を添加することにより惹起し、各種カルシウムチャンネル阻害薬は KCl を添加する 50 秒前に加えた。

4. 統計処理

Student's *t*-test を行い、*p* < 0.05 を統計的に有意差ありとした。

5. 試薬

Collagenase I はフナコシ社(東京)より、deoxyribonuclease I, nifedipine, nifedipine, nifedipine, verapamil, diltiazem は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より、fura 2/acetoxymethyl ester は Dojindo Lab (熊本) より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

III. 結 果

1. BAFC における GC 産生に対する細胞外 K⁺ の効果

1.2 mM Ca²⁺ 存在下で K⁺ 無添加の KRBGA

を用いて、GC 産生に対する細胞外 K⁺ の効果を実験した。細胞外 K⁺ は 7.5 mM 以上で濃度依存的に GC 産生を増強し、さらに 30 mM でその作用は最大に達した (Fig. 1)。この結果から、30 mM K⁺ を以後の実験に用いた。K⁺ 無添加条件下でも、わずかながらではあるが GC 産生がみられた。このことは細胞外に K⁺ を添加していないと、細胞膜の Na⁺-K⁺ ATPase が抑制され Na⁺ が細胞内に蓄積し、その結果 Na⁺-Ca²⁺ 交換系が作動し細胞外からの Ca²⁺ 流入が促進された可能性が考えられる。

したがって、我々はこの可能性を防ぐために以後の実験において、それ自身では GC 産生を促進しない 3 mM K⁺ 含有 KRBGA (low K⁺-KRBGA) を使用した。Fig. 2 で示すように、30 mM K⁺ を加えた Ca²⁺ 非添加 low K⁺-KRBGA において、細胞外に Ca²⁺ を添加することにより、Ca²⁺ 濃度依存的 (0.3-2.4 mM) に GC 産生が刺激されたが、Ca²⁺ 無添加では GC 産生は観察されなかった。

2. 1.2 mM Ca²⁺ 存在下の 30 mM K⁺ 添加による GC 産生に対するカルシウムチャンネル阻害薬の効果

Fig. 3 で示すように、verapamil と diltiazem は 30 mM K⁺ 添加による GC 産生を濃度依存的 (6.25-100 μM) に抑制し、それぞれの IC₅₀ (μM)

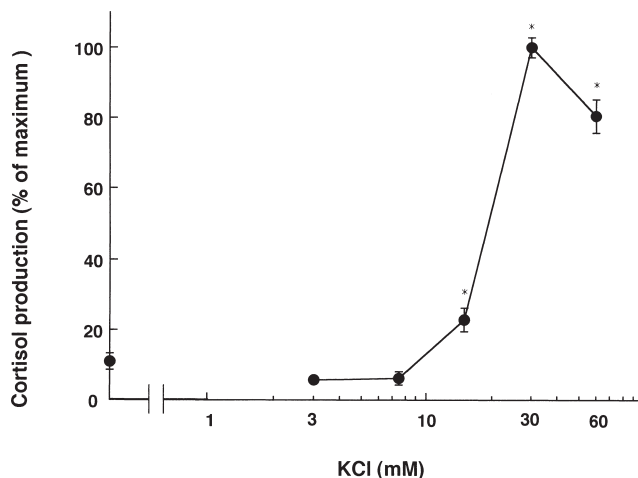


Fig. 1. Effect of extracellular K⁺ on corticoidogenesis in BAFC. BAFC was incubated with various concentration of K⁺ in K⁺-free KRBGA in the presence of 1.2 mM Ca²⁺ at 37°C for 1 hr. The maximum cortisol production was taken as 100%. Each point represents the mean ± S.E. from 3 separate experiments. Each experiment was triplicate determinations. *Statistically significant from control value (*p* < 0.05).

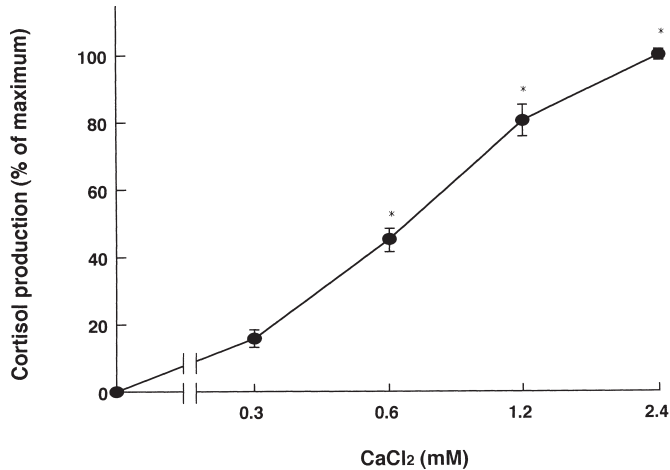


Fig. 2. Effect of extracellular Ca^{2+} on 30 mM K^{+} -induced corticoidogenesis in BAFC. BAFC was incubated in low K^{+} -KRBGA in the presence of various concentration of Ca^{2+} at 37°C for 1 hr. The maximum cortisol production was taken as 100%. Each point represents the mean \pm S.E. from 3 separate experiments. Each experiment was triplicate determinations. *Statistically significant from control value ($p < 0.05$).

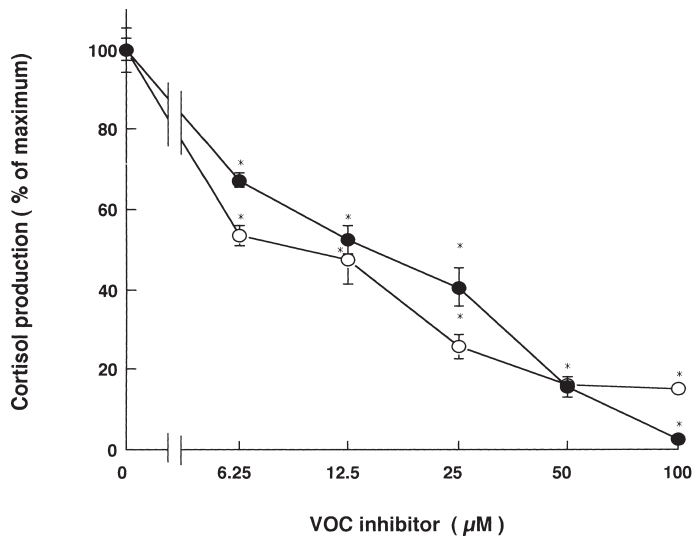


Fig. 3. Effects of verapamil and diltiazem on 30 mM K^{+} -induced corticoidogenesis in BAFC. BAFC was incubated in low K^{+} -KRBGA in the presence of 30 mM K^{+} and 1.2 mM Ca^{2+} at 37°C for 1 hr. The maximum cortisol production was taken as 100% (verapamil: \circ - \circ , diltiazem: \bullet - \bullet). Each point represents the mean \pm S.E. from 3 separate experiments. Each experiment was triplicate determinations. *Statistically significant from control value ($p < 0.05$).

は 9.8 ± 2.1 と 16.7 ± 1.8 (mean \pm S.E.) であった (Table 1). また DHP 系薬物である nifedipine と nifedipine は μM 濃度以下で濃度依存的な抑制をした (Fig. 4). nifedipine と nifedipine の IC_{50} (μM) はそれぞれ, 0.055 ± 0.0008 と 0.042 ± 0.01 (mean \pm S.E.) であった (Table 1). すなわ

ち, DHP 系薬物は verapamil と diltiazem よりも強い抑制作用を示した (nifedipine = nifedipine \gg verapamil $>$ diltiazem). この結果は 30 mM K^{+} による GC 産生が L 型 VOC を介した Ca^{2+} 流入により促進されたことを示唆している.

Table 1. IC_{50} of the Ca^{2+} channel antagonists on 30 mM K^{+} -induced corticoidogenesis in BAFC.

	IC_{50} (μM)
nifedipine	0.055 ± 0.008
nicardipine	0.042 ± 0.010
verapamil	9.8 ± 2.1
diltiazem	16.7 ± 1.8

Values are the mean \pm S.E. from 3 separate experiments. Each experiment was triplicate determinations.

3. BAFCにおける $[Ca^{2+}]_i$ に対する細胞外 K^{+} 添加の影響

VOCの存在を直接的に証明するために, fura 2を取り込ませたBAFCを用いて $[Ca^{2+}]_i$ に対する細胞外 K^{+} の効果について検討した. まず, Ca^{2+} 非存在下で K^{+} 無添加HEPES bufferでインキュベートし, 続いて K^{+} と Ca^{2+} を添加した. Fig. 5で示すように, K^{+} 前処理後1.2 mM Ca^{2+} を添加すると, K^{+} 濃度に依存して $[Ca^{2+}]_i$ は増加した. 細胞に Ca^{2+} を添加しないと, K^{+} 処理により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はみられなかった. さらに,nifedipine (0-10 μM) 存在下において30 mM K^{+} で処置し, 1.2 mM Ca^{2+} を添加すると $[Ca^{2+}]_i$ の

上昇はnifedipineの濃度依存的に抑制された(Fig. 6). したがって, 30 mM K^{+} による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はL型VOCの活性化によることが示唆された.

IV. 考 察

様々な細胞の機能調節に Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることはよく知られている. 副腎皮質束状層細胞において, 生理的活性物質であるACTHはadenylyl cyclase-cAMP-protein kinase A系を介して, GC産生を促進する¹⁾. しかしその作用発現には細胞外 Ca^{2+} が必須である²⁾⁻⁴⁾. また, 細胞外から Ca^{2+} が流入することにより, 顕著なcAMP産生が見られなくてもGC産生は促進される³⁾⁴⁾. したがって, 副腎皮質細胞における Ca^{2+} 流入機構について知ることはGC産生調節機序を知る上で重要である. 細胞内への Ca^{2+} 流入経路には少なくとも3つあるといわれている¹²⁾. それはVOC, リガンドゲート型非特異的イオンチャンネル, 受容体作動性カルシウムチャンネルである.

Yanagibashiらはウシ副腎皮質遊離細胞においてACTHによりVOCが活性化され Ca^{2+} が流入しGC産生が促進される可能性を報告した⁴⁾. しかし, 彼等はtrypsin処理により遊離された細

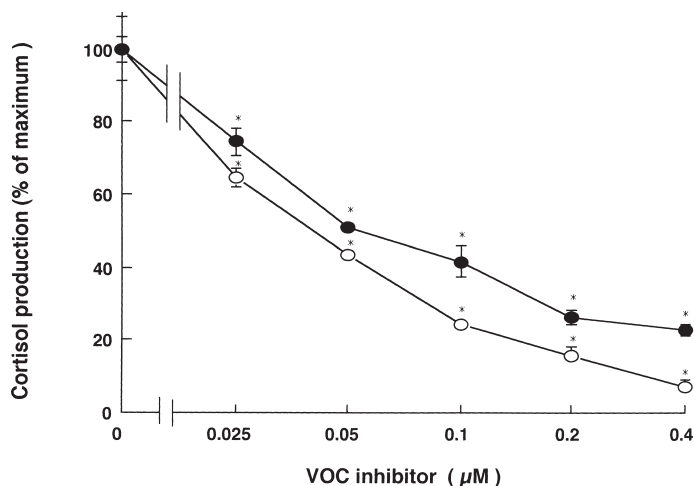


Fig. 4. Effects of nicardipine and nifedipine on 30 mM K^{+} -induced corticoidogenesis in BAFC. BAFC was incubated in low K^{+} -KRBGA in the presence of 30 mM K^{+} and 1.2 mM Ca^{2+} at 37°C for 1 hr. The maximum cortisol production was taken as 100% (nicardipine: \circ - \circ , nifedipine: \bullet - \bullet). Each point represents the mean \pm S.E. from 3 separate experiments. Each experiment was triplicate determinations. *Statistically significant from control value ($p < 0.05$).

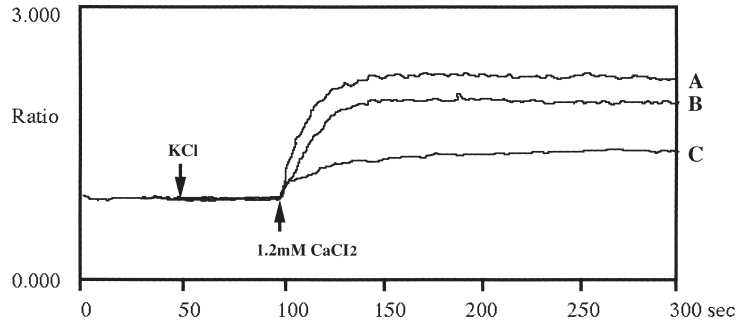


Fig. 5. Effect of extracellular K^+ on the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in BAFC. Fura 2-loaded BAFC on coverslip was incubated in K^+ -free HEPES buffer at $30^\circ C$ in quartz cell with continuous stirring. Added K^+ , A: 30 mM, B: 15 mM, C: 7.5 mM. There are results from the typical experiment. Two such experiments were performed.

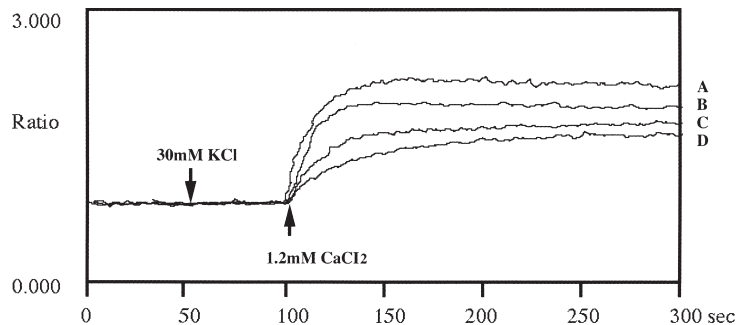


Fig. 6. Effect of nifedipine on 30 mM K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in BAFC. Fura 2-loaded BAFC on coverslip was incubated in K^+ -free HEPES buffer at $30^\circ C$ in quartz cell with continuous stirring. Added nifedipine, A: 0, B: $2.5 \mu M$, C: $5 \mu M$, D: $10 \mu M$. There are results from the typical experiment. Two such experiments were performed.

胞を用いて、VOC 阻害薬による間接的な薬理的検討をしている。しかしながら、trypsin で処理する事によって細胞膜がなんらかの影響を受けている可能性があるため、今回は trypsin ではなく、より作用の弱い collagenase で処理し 3 日間初代培養した BAFC を用いて、VOC が GC 産生と関連しているかについて実験した。

高濃度 K^+ を用いて実験したところ、GC 産生は細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存して増強された。逆に細胞外 Ca^{2+} 存在下の GC 産生に対する細胞外 K^+ の効果も濃度依存的だったが、細胞外に Ca^{2+} を添加していない状態ではその効果は観察されなかった。これらの結果から BAFC において、細胞外の高濃度 K^+ 存在下では細胞外 Ca^{2+} は GC 産生に必須であり、遊離細胞を用いた実験と同様 BAFC に GC と関連する VOC が存在することが示唆された。また、用いたいずれの VOC 阻害薬も

高濃度 K^+ による GC 産生を抑制した。しかし、Table 1 に示すように、nifedipine と nicardipine の IC_{50} は verapamil と diltiazem より 100 倍も低濃度であった。Nifedipine と nicardipine は VOC 選択性阻害薬であり、verapamil と diltiazem は VOC 選択性の低い阻害薬であることから、この結果は上記で述べた仮説を支持している⁸⁾¹³⁾。一方、これまで BAFC の細胞膜の脱分極による $[Ca^{2+}]_i$ の増加の直接的証明は報告されていない。したがって、今回我々は蛍光性 Ca^{2+} 指示薬である fura 2 を取り込ませた BAFC を用いて、高濃度 K^+ 添加による $[Ca^{2+}]_i$ に対する効果を実験した。1.2 mM Ca^{2+} 存在下で、30 mM K^+ は $[Ca^{2+}]_i$ の持続的な増加を引き起こしたが、細胞外 Ca^{2+} 非存在下では、高濃度 K^+ によっても $[Ca^{2+}]_i$ の増加は起こらなかった。さらに、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する高濃度 K^+ の作用は VOC 選択

性阻害薬である nifedipine によって抑制された。これらの結果から、高濃度 K^+ は VOC を活性化し細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進することが示された。ただし、高濃度 K^+ による GC 産生に対する nifedipine の IC_{50} と、高濃度 K^+ による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制するのに必要なそれには大きな濃度の差がある。この差が現われた原因として、二つの可能性がある。まず、GC 産生に対する影響は細胞を nifedipine 存在下で 1 時間インキュベートした結果であるのに対して、 $[Ca^{2+}]_i$ に対する結果は nifedipine の 100 秒前処置によるもので、処理時間の相違が考えられる。一方、nifedipine は光感受性が高いため、 $[Ca^{2+}]_i$ に関する実験では連続して励起波長を照射したため、nifedipine が分解されたとも考えられる。GC 産生に関する実験においては、インキュベートを CO_2 インキュベーター内で行うため、暗室状態に保たれているので分解されない。

VOC には、少なくとも L 型、T 型、N 型の 3 タイプがあり¹⁴⁾、Matsunaga ら¹⁵⁾ と Cohen ら¹⁶⁾ はホールセルパッチクランプ法を用いて、ウシ副腎皮質顆粒層細胞において T 型と L 型の存在を示唆している。また、彼等はウシ副腎皮質顆粒層細胞では高濃度 K^+ により最初に T 型チャンネルが活性化され、ついで L 型チャンネルを介して細胞外から Ca^{2+} の持続的流入が起こることを報告している。さらに、Burnay ら¹⁷⁾ も fura 2 を取り込ませたウシ副腎皮質顆粒層細胞に用いて、T 型と L 型の VOC の存在を示唆している。一般的には DHP 系薬物は T 型と L 型 VOC の両方を抑制すると言われている。しかし、DHP 系薬物である nifedipine は T 型および L 型チャンネルを抑制するが、もう 1 つの DHP 系薬物である nifedipine は T 型チャンネルを抑制しない。一方、Mlinar ら¹⁸⁾ はホールセルパッチクランプ法にて BAFC は T 型チャンネルのみ持つと報告したが、彼等は非特異的なカルシウムチャンネル阻害薬である Ni^{2+} と La^{3+} を用いて実験し、DHP 系薬物は使用していない。我々の実験条件では、nifedipine だけでなく nifedipine でも BAFC における高濃度 K^+ による GC 産生を完全に抑制した。そして高濃度 K^+ による細胞内への Ca^{2+} 流入は nifedipine により抑制された。以上の結果より、BAFC には少なく

とも L 型の VOC が存在し、それが GC 産生に関連していることが考えられる。しかしながら、BAFC における T 型 VOC の存在の有無およびその生理的役割については今後検討する必要がある。

V. 結 語

1. ウシ副腎皮質束状層細胞における GC 産生に関連する VOC の存在について検討した。
2. 細胞外 Ca^{2+} 存在下で、細胞外 K^+ は濃度依存的に GC 産生を促進し、また、高濃度 K^+ 存在下では細胞外 Ca^{2+} も濃度依存的に GC 産生を促進した。
3. 高濃度 K^+ による GC 産生は L 型 VOC 特異的阻害薬である nifedipine, nifedipine, nicardipine により強く抑制され、VOC 非特異的阻害薬である verapamil, diltiazem によっても抑制された。その阻害作用の強さは nifedipine = nicardipine \gg verapamil > diltiazem であった。
4. Fura 2 を取り込ませたウシ副腎皮質束状層細胞において、細胞外 K^+ は濃度依存的に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、その作用は nifedipine で濃度依存的に抑制された。
5. 以上の結果より、ウシ副腎皮質束状層細胞には、GC 産生に関連した L 型 VOC が存在することが確認された。

本論文を作成するにあたり、御指導、御校閲を賜りました川村将弘教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、本研究に御協力いただきました東京慈恵会医科大学薬理学講座第 1 の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Moyle WR, Kong YC, Ramachandran J. Steroidogenesis and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in rat adrenal cells: divergent effects of adrenocorticotropin and its o-nitrophenylsulfenyl derivative. J Biol Chem 1973; 248: 2409-17.
- 2) Birmingham MK, Elliot FH, Valve PHL. The need for the presence of calcium for the stimulation *in vitro* of rat adrenal glands by adrenocorticotrophic hormone. Endocrinology 1953; 53: 687-9.
- 3) Yanagibashi K. Calcium ion as "second mes-

- senger" in corticoidogenic action of ACTH. *Endocrinol Jpn* 1979; 26: 227-32.
- 4) Yanagibashi K, Kawamura M, Hall PF. Voltage-dependent Ca^{2+} channels are involved in regulation of steroid synthesis by bovine but not rat fasciculata cells. *Endocrinology* 1990; 126: 311-8.
 - 5) Stiles GL, Lefkowitz RJ. Hormone-sensitive adenylate cyclase: delineation of a trypsin-sensitive site in the pathway of receptor-mediated inhibition. *J Biol Chem* 1982; 257: 6287-91.
 - 6) Galli A, De Felice LJ. Inactivation of L-type Ca channels in embryonic chick ventricle cells: dependence on the cytoskeletal agents colchicine and taxol. *Biophys J* 1994; 67: 2296-304.
 - 7) Thion L, Mazars C, Thuileau P, Graziana A, Rossignol M, Moreau M, et al. Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cell. *FEBS Lett* 1996; 393: 13-8.
 - 8) Glossmann H, Striessnig J. Calcium channels. *Vitamins and Hormones* 1988; 44: 155-328.
 - 9) Kawamura M, Matsui T. Primary culture of bovine adrenocortical cells (in Japanese). *Folia Pharmacol Japan* 1994; 103: 43-8.
 - 10) Slavinski EA, Jull JW, Auersperg N. Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation. *J Endocrinol* 1976; 69: 385-94.
 - 11) Matsui T, Kondo T, Niitsu A, Tou S, Murakami M, Kawamura M. Intracellular calcium mobilization caused by acetylcholine in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Jikeikai Med J* 1991; 38: 269-75.
 - 12) Barritt GJ. Receptor-activated Ca^{2+} influx in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} -signaling requirements. *Biochem J* 1999; 337: 153-69.
 - 13) Janis RA, Triggle DJ. New development of Ca^{2+} channel antagonists. *J Med Chem* 1983; 26: 775-85.
 - 14) Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440-3.
 - 15) Matsunaga H, Yamashita N, Maruyama Y, Kojima I, Kurokawa K. Evidence for two distinct voltage-gated calcium channel currents in bovine adrenal glomerulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 1049-54.
 - 16) Cohen CJ, McCathy RT, Barrett PQ, Rasmussen H. Ca channels in adrenal glomerulosa: K^+ and angiotensin II increase T-type Ca channel current. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2412-6.
 - 17) Burnay MM, Python CP, Vallotton MB, Capponi AM, Rossier MF. Role of the capacitance calcium influx in the activation of steroidogenesis by angiotensin II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 1994; 135: 751-8.
 - 18) Mlinar B, Biagi BA, Enyeart JJ. Voltage-gated transient currents in bovine adrenal fasciculata cells. I T-type Ca^{2+} current. *J Gen Physiol* 1993; 102: 217-37.