

心臓・血管の機能調節の分子機構に関する研究

所属機関 東京慈恵会医科大学 医学部  
研究者名 栗原 敏

## 《研究の概要》

我が国における生活習慣が欧米型に移行し、主な死因の一つとなっている心臓・血管系の疾病の病態解明と治療は、高齢社会を迎えた我が国の医学研究における緊急課題である。この研究では、心臓、および血管の機能調節のメカニズムを、細胞、分子および遺伝子のレベルで解明し、心臓・血管系における病気の病態解明と治療の基礎的基盤を作ることを目的とした。

心臓は組織の酸素要求に応じて絶え間なく血液を全身に送っており、血管は内径を変化させることにより、各臓器の血流配分を調節している。心臓が血液を円滑に全身に送るには、心臓を構成している心筋細胞が同期して収縮・弛緩することが必要である。このような心筋の収縮や弛緩の調節は細胞内でわずかに  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が変化することにより行われている。また、病的な状態に細胞が陥ると、細胞内が酸性化したり ATP が減少して磷酸 (P) が蓄積して、これらのイオンが  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度調節機構や収縮装置そのものに影響して収縮を阻害することが指摘されている。血管は平滑筋から構成されており、平滑筋の収縮・弛緩は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化だけでなく、収縮装置そのものにおける生化学的反応（磷酸化と脱磷酸化）により調節されている。従って、磷酸化や脱磷酸化に関係している酵素の働きに関係している因子が血管平滑筋の収縮・弛緩に影響する。これらの問題を明らかにするために、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$ 濃度を調節している  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換系、 $\text{Na}^+-\text{H}^+$ 交換系の働きの分子機構を調べた。また、心筋の収縮装置と  $\text{Ca}^{2+}$ との反応は筋の伸張程度により影響を受けるので、そのメカニズムも調べた。さらに血管平滑筋の収縮装置のミオシン軽鎖を磷酸化するメカニズムや、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に関与している生理活性物質とその受容体の生理学的特性を調べた。心臓も血管も自律神経支配下にあり、呼吸・循環系として両機能は密接な関係にある。これらの機能がどのような遺伝子により支配されているのか、血管を収縮させるエンドセリン受容体やエンドセリン合成酵素の遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて調べた。

## 研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
栗原 敏	東京慈恵会医科大学 医学部 教授	心筋の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 及び収縮調節の分子機構
野間昭典	京都大学 医学部 教授	$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の細胞内調節機序
重川宗一	国立循環器病センター研究所 部長	$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構及び $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ 交換機構の分子メカニズム
金出英夫	九州大学 医学部 教授	血管平滑筋の緊張制御の分子メカニズム
熊田 衛	聖路加看護大学 教授 (平成 8-9 年度分担者)	呼吸循環系の調節に関与している遺伝子の解明
桑木共之	千葉大学 医学部 講師 (平成 10 年度分担者)	同上

## 研究報告

### I 研究目的

近年、我が国における生活習慣、特に食生活が欧米型に移行し、その結果、心臓・血管系の疾病が癌と共に主たる死因となっている。従って、心臓・血管系の疾病の予防と治療は医学分野の重要な課題となっている。また、高齢社会を迎えた我が国における社会的な問題でもある。

これまで、心臓・血管の機能については多くの生理学的あるいは生化学的研究が積み重ねられてきている。しかし、最近、細胞内イオン動態の測定法、イオンチャネルの解析、分子生物学の発達により、心筋や平滑筋の機能が分子レベルで調べられるようになってきた。また、機能調節に関係しているイオン輸送体やチャネルの分子構造も調べられており、分子レベルで構造-機能連関が論じられるようになってきた。さらに、遺伝子操作の手法を用いることにより、心筋や平滑筋の受容体や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節にあずかっている筋小胞体や  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構と遺伝子との関係も明らかになりつつある。しかし、分析的な研究が進めば進むほど、それらの研究成果を統合して考えることが疎かになりがちである。

この研究事業では、心臓や血管の生理機能のうち、特に、収縮・弛緩に関係のある細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{H}^+$  濃度調節機構や、収縮蛋白の磷酸化・脱磷酸化機構を最近開発された研究手法により調べた。また、呼吸・循環調節とエンドセリン受容体やリアノジン受容体、およびそれらの遺伝子との関係を遺伝子操作マウスを用いて調べ、これらの結果を統合して考察した。

心臓・血管系の病態解明には多角的で、より多くの研究者による研究の推進が必要であるので複数の研究者によるプロジェクト研究を計画した。本研究は心臓・血管における病態解明の基礎となり、それにより予防と治療への展望が開けていくことが期待される。

## II 研究計画及び材料と方法

### 1. 心筋の収縮を調節する細胞内機序

フェレット腹腔内にペントバルビタールを注射して開胸し、右心室から乳頭筋を摘出して、張力と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を同時測定した。標本の一端は張力測定用のトランスデューサーにまた、他端は長さ変化用のモーターのレバーに取り付けた。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の測定には、発光蛋白エクオリン用い、張力と光信号を同時測定した。初期長や収縮中の筋長をモーターを用いて変化させ、この時の張力と光信号の変化を測定した。また、麻酔下にラットから心臓を摘出してランゲンドルフの灌流装置に取り付け、コラゲナーゼを用いて単一心筋細胞を単離し、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬、fura-2AM を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と細胞の短縮率を同時に測定した。また、細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  は収縮や筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出に影響する重要な因子である。そこで、単一心筋細胞に細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  指示薬 fraptra ( $\text{Mg}$ -fura) を負荷して、細胞内  $\text{Mg}^{2+}$  濃度を経時的に種々の条件下で測定し、 $\text{Mg}^{2+}$  濃度調節機構を調べた。

### 2. 筋長効果に対するトロポニン I の燐酸化の効果

心筋の収縮は筋の長さに依存して変化し（スターリングの心臓の法則）、筋の伸張は  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を増加させる。一方、プロテインキナーゼ A によるトロポニン I の燐酸化は収縮蛋白系の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を低下させることが知られている。そこで、我々は  $\beta$  受容体刺激時に、筋長効果がどのように変化するかを調べるために、右心室肉柱をトリトン X-100 で処理してスキンド標本を作成し、その標本の内因性トロポニンを燐酸化した外来トロポニン I と入れ換える前後で pCa-張力関係に対する筋長変化の効果を観察して、トロポニン I 燐酸化の生理学的意義を考察した。また、 $\text{MgATP}$  濃度-張力関係に対する筋長効果を調べ、thin filament を直接活性化したときの張力発生に対するトロポニン I の燐酸化効果についても検討した。

### 3. $\text{Na}^+$ ポンプと $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換系との相互作用。

$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換などの二次性能動輸送担体は、 $\text{Na}^+$ ポンプにより維持される細胞内外の  $\text{Na}^+$ 電気化学的ポテンシャル差を利用して働いている。そのため、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換活性は  $\text{Na}^+$ ポンプ活性に依存するが、この相互依存性の定量的解析は未だ行われていない。また、細胞膜直下の  $\text{Na}^+$ 濃度変化はトランスポータ機能に直接影響するが、現在のところ細胞膜直下のイオン濃度を測定することはできない。そこで我々は  $\text{Na}^+$ ポンプ活性化による細胞内  $\text{Na}^+$ 濃度減少が  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換活性に与える影響を調べるとともに、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換電流の逆転電位を測定することにより、 $\text{Na}^+$ ポンプ活性化による細胞膜直下の  $\text{Na}^+$ 濃度変化を推測することを計画した。この実験のためには、コラゲナーゼ処理により単離したモルモット心室筋細胞からパッチ膜電位固定法により全細胞膜電流を記録した。既知のイオンチャネルやトランスポータ電流を抑制した状態で、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換電流は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発電流もしくは、阻害剤である  $\text{Ni}^{2+}$ 感受性電流として記録した。

### 4. マクロパッチ法の開発と細胞内 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、ATP による $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換活性制御の研究

細胞内因子による  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換活性制御を検討するためには inside-out パッチ法による解析が望ましい。しかし、通常の inside-out パッチ法で得られるパッチ膜は小さいために

Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流の記録は不可能と考えられてきた。それに替わる方法として心室筋由来の“ブレブ”からパッチ膜を得るジャイアントパッチ法が Hilgemann により開発され研究が行われてきた。しかし“ブレブ”膜が生理的細胞膜と同じであるかどうか検討が必要である。我々はこの問題点を克服するために“ブレブ”膜ではなく、直接心室筋細胞から大きなパッチ膜を作成する方法（マクロパッチ法）を開発し、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流を記録することに成功した。このマクロパッチを用いて細胞内因子による Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流の調節機構を詳細に検討した。マクロパッチは単離モルモット心室筋細胞から作成し、細胞質側の Na<sup>+</sup>または Ca<sup>2+</sup>誘発電流として Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流を単離した。

#### 5. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送系の生理活性因子による活性調節機構の検討、および Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換輸送系の分子構造と構造・機能相関に関する研究

心筋細胞に発現する Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送体 (NCX1) と Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE1) および他の細胞系に発現するそれらのアイソフォーム (NCX2、NCX3 および NHE2) の cDNA に様々な変異を導入し、交換輸送活性をほとんど持たない CCL39 又はこれに由来する細胞系に発現させた。その後、交換系の活性をアイソトープトレーサーを用いて測定、解析した。また、発現した輸送体の細胞内分布を免疫蛍光染色法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、同じ顕微鏡を用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup>測定および Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。

#### 6. 平滑筋における細胞内情報伝達系の解析

血管の内皮・中膜標本を実験試料として、光学的連続観察システムを用い、Ca<sup>2+</sup>伝達系、cAMP 系、cGMP 系、C キナーゼ系がどのように相互作用して、血管の機能に影響しているのかを解析した。また、平滑筋細胞の収縮装置の Ca<sup>2+</sup>感受性増大機序を調べた。

#### 7. 平滑筋の細胞周期の同定

細胞周期を周期特異核抗原の多重免疫蛍光染色法を用いて同定し、細胞周期と細胞の電氣的性質や収縮性との相関を明かにした。

#### 8. 細胞内の機能・構造蛋白質の作用機序

スキンド標本を用いて、細胞内蛋白質の働きを同定し、細胞機能と蛋白質の関係を明らかにした。

#### 9. 呼吸・循環器系の機能に関する遺伝子の解析

エンドセリン (ET) -1、ET-3、ET-A 受容体、ET-B 受容体、ET 合成酵素 (ECE-1)、リアノジン受容体タイプ-3 の各々のノックアウトマウスを、それぞれの開発者 (ET-1; 栗原裕基・東京大学医学部循環器内科、ET-3、ET-A 受容体、ET-B 受容体、ECE-1; 柳沢正史・テキサス大学分子遺伝学、リアノジン受容体タイプ-3; 竹島浩・東京大学医学部薬理) から提供を受けた。これらを交配・維持し、不完全欠損体どうしの掛け合わせから完全欠損体を随時作成し、以下の実験に供した。出生直後に死亡する ET-A 受容体および ET-1 完全欠損マウスについては、出産予定日に帝王切開により胎児を摘出して、すでに確立した気管切開による延命術により 24 時間程度個体として維持し実験に用いた。その他のマウスは自然

分娩により得た。対照としては、各々のマウスについて、遺伝背景が同一の野性型マウスを用いた。

#### 10. 成熟マウスの無麻酔無拘束での血圧・心電図の記録

ハロセン麻酔下に血圧測定用カテーテルを大腿動脈に留置する手術を行った。手術後 24 時間以上経過し 2 分に回復したマウスの血圧を、無麻酔・無拘束の状態、外乱の入りにくい静かな環境で 2 時間以上測定した。概日リズムを考慮して実験は常に一定時刻から開始し、環境への馴化を待ってから実際の測定を開始した。心拍数は血圧信号からタコメーターで計測し、四肢に取り付けた電極から心電図も記録した。測定終了後に、カテーテルから動脈血を採取し、血液の pH、酸素分圧、二酸化炭素分圧を測定した。また、血圧と心電図のデータを周波数解析する事によって、交感神経活動、副交感神経活動を間接的に評価した。

#### 11. 新生児および成熟マウスの無麻酔無拘束での呼吸測定

Whole body plethysmography 法を用いて、一回換気量と呼吸数を計測し、その積として分時換気量を計算した。測定箱内のガスを、通常室内気から低酸素 (10%O<sub>2</sub>) ガス、または、高二酸化炭素 (5 または 10%CO<sub>2</sub>) ガスに変更した後に同様の測定を行い、反射性呼吸調節を評価した。

#### 12. 成熟マウスの麻酔下での腎臓交感神経活動・横隔神経活動測定

ウレタン麻酔、人工呼吸下でマウスの腎臓交感神経または横隔神経を露出し、金属微小電極にのせた。Multi fiber の活動電位を 1~3 万倍に増幅し、オシロスコープで観察すると共にチャートに記録した。人工呼吸に用いるガスを低酸素または高二酸化炭素ガスに変えた時の化学受容器反射と、フェニレフリンまたはニトロプルシッドの静脈内投与によって血圧を上下させた時の動脈圧受容器反射も測定した。

### III 研究成果

#### 1. 心筋の発生張力と Ca<sup>2+</sup>感受性に関する研究

- (1) 生筋を急速に短縮すると発生張力が低下してからわずかに回復した。発生張力の低下に一致して細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が一過性に増加した (extra-Ca<sup>2+</sup>と称する)。この extra-Ca<sup>2+</sup>はトロポニン C の Ca<sup>2+</sup>親和性が張力変化により変化した結果と考えられている。筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>取り込み速度を速くすると、みかけ上 extra-Ca<sup>2+</sup>は減少した。また、筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>取り込み速度を遅くすると extra-Ca<sup>2+</sup>は増加した。
- (2) スキンド標本の pCa-張力関係は筋の伸張により左方移動した。しかし、この関係の傾き (Hill 係数) には有意な変化は認められなかった。スキンド標本に A キナーゼの触媒部位を作用させてトロポニン I を燐酸化すると pCa-張力関係は右方移動した。これは生筋に強縮を起こさせて pCa-張力関係に対するイソプロテレノールの効果と同じであった。但し、生筋では Hill 係数が低下したが、スキンド標本では Hill 係数に有意な変化は認められなかった。トロポニン I の燐酸化により筋長変化による pCa 張力関係の変化の程度は減少した。従って、トロポニン I の燐酸化は筋長効果 (スターリング効果) を

減弱させることがわかった。トロポニン I の燐酸化は電気泳動により確認した。また、内因性トロポニン I を燐酸化した外来性トロポニン I と入れ換えても同様な結果が得られた。

- (3) 溶液中の MgATP 濃度を低下させると筋は硬直状態 (rigor state) になり、硬直張力を発生する。この pMgATP-張力関係も筋長変化の影響を受け、筋の伸張によりわずかな MgATP 濃度の低下により張力が発生した。また、Tn1 の燐酸化は筋長変化による MgATP 感受性の増大を減弱させた。これらの結果は、thin filament 自身も筋長を感じるメカニズムがあることを示唆している。

## 2. 細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度調節機構に関する研究

- (1) 平滑筋の収縮やイオンチャネルの調節にあずかっている細胞内 Mg<sup>2+</sup>の調節には細胞外 Na<sup>+</sup>に依存した排出機構があり、Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>の交換比は 3 : 1 であった。この Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>交換系は逆回転でき、また電位依存性があった。

## 3. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換活性とその調節に関する研究

- (1) 全細胞電流記録において、細胞外に K<sup>+</sup>を投与して Na<sup>+</sup>ポンプを刺激すると、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流の逆転電位は脱分極側に著しく移動した。逆転電位の移動は Na<sup>+</sup>ポンプの刺激時間に依存し、細胞膜直下 Na<sup>+</sup>濃度変化に起因すると考えられた。逆転電位の変化量から計算すると、細胞膜直下では Na<sup>+</sup>濃度がコントロール値の 1/2 以下に減少することが示唆された。Na<sup>+</sup>ポンプ電流を時間積分し排出された Na<sup>+</sup>量を求め、この値から細胞全体の平均 Na<sup>+</sup>濃度変化を求めたところ、細胞膜直下では細胞全体の平均値より 5 倍以上 Na<sup>+</sup>濃度が減少することが明らかになった。そして Na<sup>+</sup>濃度が著しく変化する領域は細胞容量の約 14%に相当すると推測された。この領域での Na<sup>+</sup>濃度変化を介して、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプと Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換活性が緊密に相互依存することが明らかになった。
- (2) 先端直径 3-7 μm のガラス電極を用いて通常の inside-out パッチより 10-50 倍膜面積が大きいパッチ膜 (マクロパッチ) を作成することに成功した。このマクロパッチから心筋 “ブレブ” の Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流と同様の性質を有する Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流が記録できた。細胞質側イオン濃度と Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流振幅の関係は Na<sup>+</sup>と Ca<sup>2+</sup>に対する半飽和濃度がそれぞれ約 20mM と 7 μM で説明できた。さらに、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流は細胞質側 Na<sup>+</sup>が増加すると、不活性化状態に移行し交換電流は抑制された (Na<sup>+</sup>依存性不活性化)。細胞質側の Ca<sup>2+</sup>は Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換活性を増強した (Ca<sup>2+</sup>による活性化)。細胞質側 ATP は Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流をわずかであるが増強した (平均 10%程度)。これらの調節機構はパッチ膜内側を trypsin 処理することで消失した。Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流の特徴はジャイアントパッチや全細胞記録からの報告と類似するが、交換電流の逆転電位の測定から Na<sup>+</sup>と Ca<sup>2+</sup>の交換比率を検討したところ、従来定説とされていた 3Na<sup>+</sup> : 1Ca<sup>2+</sup>交換よりもむしろ 4Na<sup>+</sup> : 1Ca<sup>2+</sup>交換を示唆した。
- (3) 血管平滑筋並びに心筋細胞に発現する Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送体 (NCX1) が、エンドセリン-1、PDGF などの生理活性因子刺激により C キナーゼを介して燐酸化され、同時に、その活性が増大することが明らかになった。
- (4) 神経組織、骨格筋に発現する NCX2 及び NCX3 を CCL39 細胞に発現させて検討したとこ

ろ、これらの生理活性因子による刺激は NCX3 を活性化させたが、NCX2 には影響を及ぼさず、また、NCX2 及び NCX3 輸送体自体の磷酸化は引き起こさなかった。活性制御における NCX1 輸送体磷酸化の意義を明らかにするため、まず、C キナーゼによる輸送体の磷酸化部位を同定し、Ser<sup>325</sup> が主な磷酸化部位であることを明らかにした。

- (5) 変異導入により磷酸化能を失った NCX1 を細胞に発現させ、NCX1 輸送活性に及ぼす生理活性因子の作用を検討したところ、これらの因子の活性化作用は、正常な NCX1 の場合と同様に観察された。以上の結果から、これらの生理活性因子による Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送体の活性化には輸送体自身の磷酸化は関与せず、おそらく細胞質の他の磷酸化蛋白質が関与すると結論された。

#### 4. 細胞膜 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE1) の構造・機能相関

- (1) 種々の細胞外シグナルによる Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換輸送系 (NHE1) の活性制御には、輸送体分子のカルボキシ末端側半分を占める細胞質ドメインのいくつかの特定のセグメントが関与することが判明した。このドメインのアミノ末端側 80 個のアミノ酸から成るセグメントは、この輸送体が高い細胞内 H<sup>+</sup>親和性を保つのに不可欠であり、また、細胞増殖因子などによるプロテインキナーゼを介する活性化に必要であること、細胞 ATP depletion によるこの輸送系の活性阻害に関与する事が明らかになった。また、細胞質ドメインの中央部 20 個のアミノ酸から成る部分はカルモジュリン結合部位であり、Ca<sup>2+</sup>カルモジュリンによる輸送系の活性化に関与することが判明した。また、カルモジュリン結合部位は細胞内 H<sup>+</sup>親和性に対しては自己阻害部位として作用すること、この作用にはカルモジュリン結合部位の特定の amino 酸が重要であることが判明した。
- (2) 上述した NCX1 高発現細胞を用いて、Ca<sup>2+</sup>カルモジュリンの関与が種々の生理活性因子による NHE1 の活性化にどの程度重要であるか検討した。細胞内 Ca<sup>2+</sup>の関与の程度は刺激の種類によって異なり、トロンビン > PDGF > PMA 及び高浸透圧刺激の順であった。トロンビンによる NHE1 の活性化は、結局、Ca<sup>2+</sup>と C キナーゼのみによっておこることが判明した。

#### 5. 平滑筋や内皮細胞の細胞内情報伝達系 (Ca<sup>2+</sup>系、c-AMP 系、c-GMP 系、C キナーゼ系) の相互作用、細胞機能の Ca<sup>2+</sup>感受性制御機序の解明。

- (1) 冠動脈および腎動脈におけるアドレノメジュリンの産生と機能について検討した。前収縮させた冠動脈や腎動脈中膜標本の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> と張力を、アドレノメジュリンは減少させた。これらの血管にはアドレノメジュリン mRNA が発現していることからアドレノメジュリンはオートクリン/パラクリン型の緊張調節機能を有することが明らかとなった。
- (2) 豚冠動脈平滑筋にプレプロエンドセリン 1、プレプロエンドセリン 3、エンドセリン A 受容体、エンドセリン B 受容体、エンドセリン転換酵素 1 の mRNA 発現を証明した。エンドセリンはオートクリン型の冠血管緊張制御を行うことが示唆された。

#### 6. 平滑筋や内皮細胞の細胞周期と機能変化との相関に関する解析。

- (1) ラット大動脈初代培養平滑筋細胞において、アドレノメジュリンは細胞の周期進行 (G0→G1) と共に c-fos mRNA を発現させることを明らかにした。その機序は A-キナー

ゼ依存性、かつ $[Ca^{2+}]_i$ 非依存性であった。

- (2) 初代培養平滑筋細胞では平滑筋型トロポミオシン $\alpha$ の発現が優勢であるが、血清添加によって増殖を刺激すると、非平滑筋型トロポミオシン $\alpha$ の発現が増加する。非平滑筋型トロポミオシン $\alpha$ の発現調節にCキナーゼの関与が示唆された。

#### 7. 精製あるいは合成した機能・構造蛋白質と血管あるいは平滑筋細胞の細胞機能・構造との関係に関する研究

- (1) 位置指定変異導入法を用いて、カルモジュリンの4つの $Ca^{2+}$ 結合部位のグルタミン酸をグルタミンに置換した変異体を作製し、その機能をスキンド家兎腸間膜動脈の収縮を指標として検討した。血管平滑筋の収縮活性化機構には $Ca^{2+}$ 結合の第4ドメインがもっとも重要な役割を担っていることが明らかとなった。
- (2) 血管平滑筋ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素は触媒サブユニット(38KD)と大(130KD)、小(20KD)の調節サブユニットからなる3量体である。トライトンX-100スキンド血管標本の発生張力を測定し、 $Ca^{2+}$ 収縮に及ぼす130KDとその変異体の影響を解析したところ、130KDのN末端領域は、脱リン酸化酵素を阻害することで、血管平滑筋収縮を増強( $Ca^{2+}$ 感受性増大)することが明らかとなった。この作用には酸性アミノ酸集積領域が重要であった。

#### 8. 呼吸・循環系に関与している遺伝子の解明に関する研究

- (1) ET-1欠損マウスは対照マウスにくらべて、約10mmHgの有意な高血圧、低酸素血、高二酸化炭素血傾向、交感神経活動の亢進(間接法および直接測定の方法において)、動脈圧受容器反射のリセット、呼吸反射の減弱、横隔神経活動の化学受容器反射による増大の減弱(in vivoおよびin vitro双方で)が観察された。これらの異常は不完全欠損体(ヘテロ接合体)でも観察されたが、完全欠損体(ホモ接合体)の方が異常の程度がより大きかった。
- (2) ET-3完全欠損マウスでは、調べた限りの項目において異常は検出されなかった。ET-A受容体完全欠損マウスでは、化学受容器反射による横隔神経活動調節の減弱が観察された。
- (3) ET-B受容体が正常の13%しか存在しないマウスでは、約20mmHgの有意な高血圧が観察されたが、血液ガス、呼吸調節、横隔神経活動、交感神経活動、副交感神経活動は全て正常であった。正常マウスにET-B受容体阻害薬を投与すると、約20mmHgの血圧上昇が観察されたが、ET-B受容体欠損マウスにET-B受容体阻害薬を投与しても血圧は変化しなかった。正常マウスにET-B受容体阻害薬を投与した時の昇圧は、プロスタグランジン合成酵素阻害剤の前投与によって抑制された。
- (4) ECE-1欠損マウスはヘテロ接合体でのみ実験をおこなった。ECE-1が正常の1/2になっただけでは、なんら異常を発現しなかった。
- (5) リアノジン受容体タイプ-3完全欠損マウスの平均血圧、呼吸反射は正常であったが、心拍のゆらぎが異常に少なく、呼吸の変動は有意に大きかった。

#### IV 考察

本研究では心筋および平滑筋の収縮・弛緩を直接制御している細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と収縮・弛緩との関係や、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に関係している  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系の分子機構の一部が明らかになった。心筋では収縮・弛緩が収縮調節蛋白トロポニンへの  $\text{Ca}^{2+}$  結合により調節されていると共に、収縮や弛緩、言い換えれば細いフィラメントに結合しているクロスブリッジの状態によって、トロポニン C と  $\text{Ca}^{2+}$  との結合（トロポニン C の  $\text{Ca}^{2+}$  親和性）が変化する。このようなフィードバックメカニズムは、収縮・弛緩を円滑に行うために重要な生理機構であり、Frank-Starling の心臓の法則を説明する機序の一つとして注目されている。トロポニン C の  $\text{Ca}^{2+}$  親和性はその他の外因性機構による収縮制御にも重要であり、例えば、細胞内の酸性化（アシドーシス）、磷酸の蓄積、 $\beta$  受容体刺激時の cAMP によるトロポニン I の磷酸化などによっても変化するもので、その分子メカニズムは今後、心筋の収縮制御機構を考える上で重要な問題となることが予想される。また、強心薬の開発は  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増強薬に向けて進められており、不全心の治療の上からも注目されている。さらに、平滑筋の収縮に関してもいろいろな生理活性物質が  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を変化させて、血圧などの循環機能を調節していることが明らかにされており、本研究でもミオシン軽鎖脱磷酸化酵素のサブユニットが脱磷酸化酵素を阻害して、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性を増大させて血管平滑筋収縮を増強することが明らかになった。また、心筋では、トロポニン I が cAMP により磷酸化されると  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が低下するばかりでなく、Frank-Starling 効果（心筋の伸張による張力の増大効果）を減弱するように働くことが明らかになり、トロポニン C と I の相互関係が筋の伸張による収縮増強効果に必須であることが示唆された。

このように循環器系の機能調節に必須である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節は、筋小胞体のほか  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系によって行われている。本研究では  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系のイオン交換輸送比が  $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  交換よりもむしろ  $4\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  交換であることが示唆された。この結果は、これまで以上にこの交換系の活性により膜電位が影響を受けることを示唆しており、病態時に細胞内  $\text{Na}^+$  や  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が変化すると、この交換系による膜電位変化とそれに伴う不整脈が容易に誘発されやすいこと示唆している。また、細胞内  $\text{Na}^+$  濃度は細胞内で一様に増加するのではないという結果は細胞膜直下での  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系によるイオン輸送の重要性を示しており、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加を介する強心配糖体による収縮増強作用のメカニズムを考える上でも重要である。

本研究では  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換系の分子レベルにおける構造・機能相関の研究を行い、分子内ドメインの同定と細胞内情報伝達系に関して重要な知見が得られた。また、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体における分子種間のキメラ解析からこの輸送体のイオン輸送に関与する膜内機能部位が同定された。また、この輸送体の初めての特異的阻害剤の開発が試みられ、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込みモードを選択的に阻害する薬剤（KB-R7943）が開発された。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と共に細胞機能を修飾している重要なイオンに  $\text{H}^+$  がある。細胞内  $\text{H}^+$  は細胞外  $\text{Na}^+$  と交換輸送されている。本研究では  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  交換輸送系についても分子レベルでの構造・機能相関の研究が行われ、両輸送系の活性制御に関する分子内ドメインの同定、および、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体との関係が明らかにされ、細胞内  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  と共に細胞内  $\text{H}^+$  の調節機序が分子レベルで明らかになった。今後は、これらの系を調節している情報伝達系のクロストークがさらに解明されることが期待される。

血圧調節に関係している血管平滑筋の細胞内情報伝達系を活性化する生理活性物質の一部は、オートクリンやパラクリンにより平滑筋に作用していることが明らかになった。また、細胞増殖に影響する因子とそのメカニズムが明らかになった。平滑筋の収縮・弛緩にはカルモジュリンが関与しているが、カルモジュリンにおける  $Ca^{2+}$  の結合部位のうち重要なのは第4ドメインであることが明らかになった。平滑筋における  $Ca^{2+}$  感受性変化は収縮の調節において重要な働きをしているが、そのメカニズムの一つとして、脱リン酸化酵素の関与が示唆された。

これまで血管平滑筋の収縮調節に重要な役割を果たしていることが知られていたエンドセリンは、呼吸機能や循環機能にも影響していることがノックアウトマウスを用いて明らかになった。特に、エンドセリン-1 はエンドセリン受容体-A を介して呼吸中枢に作用していること、エンドセリン-1 が欠損すると呼吸異常に伴って二次的に高血圧が招来されることなどが明らかになった。エンドセリン-B 受容体は末梢血管を介した循環調節に関与しているが、呼吸調節にはあまり関与していないことも分かり、血管平滑筋に作用すると考えられていたエンドセリンが中枢にも作用するという新しい知見が得られた。さらに、中枢神経系に多いリアノジン受容体タイプ-3 は、交感神経と呼吸活動のリズム形成に関与していることが分かり、今後、この受容体を介した細胞内  $Ca^{2+}$  放出が呼吸活動のリズム形成とどのような関係があるのか興味あるところである。このように、これまで考えられていなかったような機能と生理活性物質との関係が明らかになったのも、遺伝子操作技術を駆使し、それを動物全体のシステムとしての機能と関係づけて研究した結果と考えられる。

研究プロジェクトとしては多少多くの課題について検討したきらいはあるが、循環機能調節という立場からはこれまでとは異なった多くの貴重な知見が得られた。

## V 研究成果の発表

1. Kurihara S, Komukai K. Cross-bridge-dependent changes in the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in mammalian cardiac muscles. *Jpn Heart J* 37: 143-152, 1996
2. Komukai K, Kurihara S. Mechanisms of the inotropic effects of UD-CG 212 Cl, an active metabolite of pimobendan, on ferret papillary muscles. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 673-679, 1996
3. Kawai M, Konishi M, Kurihara S. Magnesium and hydrogen ions inhibit sarcoplasmic reticulum function in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1401-1413, 1996
4. Komukai K, Kurihara S. Effect of developed tension on the time courses of  $Ca^{2+}$  transients and tension in twitch contraction in ferret myocardium. *Cardiovasc Res* 32: 384-390, 1996
5. Kurihara S, Komukai K, Kawai M, Tanaka E, Konishi M. Intracellular  $Ca^{2+}$  transients in response to step length changes in aequorin-injected ferret

- papillary muscle. Pathophysiology of Heart Failure, Eds. Dhalla NS, Singal PK, Takeda N & Beamish RE. Kluwer Academic Publishers, 253-261, 1996
6. Komukai K, Kurihara S. Physiological significance of the change in the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the contractile elements in cardiac muscle. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Regulation, Eds. Endoh M, Morad M, Scholz H & Iijima T, Springer-Verlag, 281-290, 1996
  7. Tanaka T, Kawai M, Kurihara S. Inotropic effects of DN-9693: A selective cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. Cardiovasc Drug Rev 14(3): 246-255, 1996
  8. 栗原 敏. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化による心筋の収縮制御. 東京慈恵会医科大学雑誌 111:265-278, 1996
  9. Tanaka E, Kurihara S. Contribution of mitochondria to the removal of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  induced by caffeine and rapid cooling at low temperatures in ferret ventricular muscles. Jpn J Physiol 47: 251-262, 1997
  10. Tanaka E.  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by rapid cooling and caffeine in ferret ventricular muscles. Jpn J Physiol 47: 263-272, 1997
  11. Tanaka E, Kawai M, Kurihara S, Hotta Y, Soji T. Effects of ruthenium red on the cellular functions and ultrastructure in intact ferret ventricular muscle. Jpn J Physiol 47: 273-281, 1997
  12. Tashiro M, Konishi M.  $\text{Na}^+$  gradient-dependent  $\text{Mg}^{2+}$  transport in smooth muscle cells of guinea pig tenia cecum. Biophys J 73: 3371-3384, 1997
  13. Tashiro M, Konishi M. Basal intracellular free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration in smooth muscle cells of guinea pig tenia cecum :in tracellular calibration of the fluorescent indicator furaptra. Biophys J 73: 3358-3370, 1997
  14. Komukai K, Kurihara S. Length dependence of  $\text{Ca}^{2+}$ -tension relationship in aequorin-injected ferret papillary muscles. Amr J Physiol 273: H1068-H1074, 1997
  15. 栗原 敏, 梶原秀俊. 心筋細胞内カルシウム動態と強心薬. Clinical Calcium 7(11): 12-17, 1997

16. 石川哲也, 梶原秀俊, 栗原 敏. 心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態と強心薬. Lisa 4: 1028-1040, 1997
17. Komukai K, Ishikawa T, Kurihara S. Effects of acidosis on  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of contractile elements in intact ferret papillary muscles. Amr J Physiol 274: H145-H154, 1998
18. Konishi M, Watanabe M. Steady state relation between cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and force in intact frog skeletal muscle fibers. J Gen Physiol 111: 505-519, 1998
19. Hongo K, Kusakari Y, Konishi M, Kurihara S, Mochizuki S. Estimation of myofibrillar responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  in isolated rat ventricular myocytes. Pflugers Arch-Eur J Physiol 436: 639-645, 1998
20. Saeki Y, Kurihara S, Komukai K, Ishikawa T, Takigiku K. Dynamic relations among length, tension, and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in activated ferret papillary muscles. Amr J Physiol 275: H1957-H1962, 1998
21. Konishi M, Kurihara S. The use of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators. Current Methods in Muscle Physiology: Advantages, Problems and Limitations, Ed. Sugi H. Oxford University Press, 305-328, 1998
22. Konishi M. Cytoplasmic free concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in skeletal muscle fibers at rest and during contraction. Jpn J Physiol 48: 421-438, 1998
23. 栗原 敏. 第3章心筋の構造および心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化と心筋収縮制御. よくわかるPDE3阻害薬の基礎と臨床(永井良三編), Excerpta Medica 28-38, 1998
24. 栗原 敏. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化による心筋の収縮制御とPDE阻害薬の作用機序. Lisa 5: 54-64, 1998
25. 石川哲也, 梶原秀俊, 栗原敏. 糖尿病ラット心室筋の短縮と  $\text{Ca}^{2+}$ transient. 心筋の構造と代謝—1997-20: 165-169, 1998
26. 梶原秀俊, 栗原 敏. カルシウム感受性. 呼吸と循環 46(3):267-275, 1998
27. Ishikawa T, Kajiwara H, Kurihara S. Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  removal in hyperthyroid myocardium. Amr J Physiol 276: H289-H299, 1999

28. Ishikawa T, Kajiwara H, Kurihara S. Alterations in contractile properties and  $\text{Ca}^{2+}$  handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Amr J Physiol* (submitted)
29. Kajiwara H, Morimoto S, Fukuda N, Ohtsuki I, Kurihara S. Effect of troponin I phosphorylation by protein kinase A on length-dependence of tension activation in skinned cardiac muscle. (submitted)
30. Guo J, Ono K, Noma A. Monovalent cation conductances of low-threshold and sustained inward current in rabbit sinoatrial node cells. *Pflügers Archiv* 433: 209-211, 1996
31. Wang Z, Mitsuiye T, Noma, A. Cell distension-induced increase of the delayed rectifier  $\text{K}^+$  current in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation Research* 78: 466-474, 1996
32. Matsuoka S, Philipson KD, Hilgemann DW. Multiple functional states of the cardiac  $\text{Na}^+\text{-ca}^{2+}$  exchanger. Whole-cell, native-excised, and cloned excised properties. *Annals of the New York Academy of Sciences* 779: 159-170, 1996
33. Nicoll DA, Hryshko LV, Matsuoka S, Frank JS, Philipson KD. Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+\text{-ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13385-13391, 1996
34. Hryshko LV, Matsuoka S, Nicoll DA, Weiss JN, Schwarz EM, Benzer S, Philipson KD. Anomalous regulation of the *Drosophila*  $\text{Na}^+\text{-ca}^{2+}$  exchanger by  $\text{Ca}^{2+}$ . *Journal of General Physiology* 108: 67-74, 1996
35. Wang Z, Mitsuiye T, Rees SA, Noma A. Regulatory volume decrease of cardiac myocytes induced by  $\beta$ -adrenergic activation of the  $\text{Cl}^-$  channel in guinea pig. *Journal of General Physiology*. 110: 73-82, 1997
36. Xie LH, Takano M, Noma A. Development of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel family in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* 272: H1741-H1750, 1997
37. Guo J, Mitsuie T, Noma A. The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea pig heart. *Pflügers Archiv* 433: 390-396, 1997

38. Takano M, Noma A. Development of the muscarinic potassium current in fetal and neonatal rat heart. *American Journal of Physiology* 272: H1188-H1195, 1997
39. Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Temperature dependence of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel gating in guinea-pig ventricular cells. *Japanese Journal of Physiology* 47:73-79, 1997
40. Guo J, Noma A. Existence of a low-threshold and sustained inward current in rabbit atrio-ventricular node cells. *Japanese Journal of Physiology* 47: 355-359, 1997
41. Zhao H, Matsuoka S, Fujioka Y, Noma, A. Effects of dopamine on L-type Ca<sup>2+</sup> current in single atrial and ventricular myocytes of the rat. *British Journal of Pharmacology* 121: 1247-1254, 1997
42. Matsuoka S, Nicoll DA, He Z, Philipson KD. Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup>-ca<sup>2+</sup> exchanger by the endogenous XIP region. *Journal of General Physiology*. 109: 273-286, 1997
43. Fujioka Y, Matsuoka S, Ban T, Noma A. Interaction of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup>-ca<sup>2+</sup> exchange via [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> in a restricted space of guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology* 509: 457-470, 1998
44. 松岡 達, 野間昭典. Na<sup>+</sup>-ca<sup>2+</sup>交換機構. カルシウムイオンとシグナル伝達. 御子柴克彦, 遠藤 實, 宮本英七編. 蛋白質 核酸 酵素 43(12):1555-1560, 1998
45. Xie L H, Takano M, Kakei M, Okamura M, Noma A. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinases, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2/SUR2A channels. *Journal of Physiology* 514: 655-665, 1998
46. Takano M, Xie L, Otani M, Noma A. Cytoplasmic terminus domains of Kir6.x confer different nucleotide-dependent gating on the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Journal of Physiology* 512: 395-406, 1998
47. Xie LH, Takano M, Noma A. Inhibitory effect of propranolol on the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in neonatal rat heart. *British Journal of Pharmacology* 123: 599-604, 1998
48. Sasaki N, Mitsuiye T, Noma A, Powell T. Sarcomere length during contraction of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Archiv* 437: 804-811,

1999.

49. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in cells expressing NCX1 J Biol Chem 271: 22391-22397, 1996
50. Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka H, Shigekawa M. Phosphorylation-dependent regulation of cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger via protein kinase C. J Biol Chem 271: 13609-13615, 1996
51. Shigekawa M, Iwamoto T, Wakabayashi S. Phosphorylation and modulation of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in smooth muscle cells. Ann N Y Acad Sci 779: 249-257, 1996
52. Maeda A, Nishimura S, Kameda K, Imagawa T, Shigekawa M, Barsoumian EL. Generation of cell transfectants expressing cardiac calcium ion channel and calcium indicator protein aequorin. Anal Biochem 242: 31-39, 1996
53. Iwata Y, Pan Y, Hanada H, Yoshida T, Shigekawa M. Dystrophin-glycoprotein complex purified from hamster cardiac muscle: Comparison of the complexes from cardiac and skeletal muscles of hamster and rabbit. J Mol Cell Cardiol 28:2501-2509, 1996
54. Yoshida T, Hanada H, Iwata Y, Pan Y, Shigekawa M. Expression of a dystrophin-sarcoglycan complex in serum-deprived BC<sub>3</sub>H1 cells and involvement of  $\alpha$ -sarcoglycan in substrate attachment. Biochem Biophys Res Commun 225: 11-15, 1996
55. Schmitt MB, Ikeda T, Shigekawa M, Wakabayashi S. The regulatory cytoplasmic domain of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, Ed. Fliegel L, R.G. Landes Company, 149-170, 1996,
56. Ikeda T, Schmitt B, Pouyssegur J, Wakabayashi S, Shigekawa M. Identification of cytoplasmic subdomains that control pH-sensing of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE1): pH-maintenance, ATP-sensitive, and flexible loop domains. J Biochem 121: 295-303, 1997
57. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. Physiol Rev 77: 51-74, 1997
58. Wakabayashi S, Ikeda T, Iwamoto T, Pouyssegur J, Shigekawa M. Calmodulin-

- binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange NHE1 through sequence-specific interaction. *Biochemistry* 36: 12854-2861, 1997
59. Uehara A, Iwamoto T, Shigekawa M, Imanaga I. Whole-cell currents from a cloned canine cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger NCX1 overexpressed in a fibroblast cell CCL39. *Pflugers Arch* 434: 335-338, 1997
  60. Hanada H, Yoshida T, Pan Y, Iwata Y, Nishimura M, Shigekawa M. mRNA expression and cDNA sequences of  $\beta$ - and  $\gamma$ -sarcoglycans are normal in cardiomyopathic hamster heart. *Biol Pharma Bull* 20: 134-137, 1997
  61. Ikeda T, Iwamoto T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Overexpression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger reveals a critical role of  $\text{Ca}^{2+}$  in growth factor-induced activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE1). *Amr J Physiol* 274: C1537-1544, 1998
  62. Iwata Y, Pan Y, Yoshida T, Hanada H, Shigekawa M.  $\alpha$ 1-Syntrophin has distinct binding sites for actin and calmodulin. *FEBS Lett* 423: 173-177, 1998
  63. Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M. Bi-directional signaling between sarcoglycans and integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* 73: 1583-1590, 1998
  64. Iwamoto T, Wakabayashi S, Imagawa T, Shigekawa M.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger overexpression impairs calcium signaling in fibroblasts: Inhibition of  $[\text{Ca}^{2+}]$  rise at cell periphery and retardation of cell adhesion. *Eur J Cell Biol* 76: 228-236, 1998
  65. Ikeda T, Iwamoto T, Wakabayashi S, Shigekawa, M. Overexpression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger reveals a critical role of  $\text{Ca}^{2+}$  in growth factor-induced activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE1). *Amr J Physiol* 274: C1537-C1544, 1998
  66. Iwamoto T, Shigekawa M. Differential inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. *Amr J Physiol* 275: C423-C430, 1998
  67. Iwamoto T, Pan Y, Nishitani T, Wakabayashi, S, Shigekawa M. Protein kinase C-dependent regulation of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry* 49: 17230-17238, 1998.
  68. Shigekawa M, Ikeda T, Iwamoto T, Wakabayashi S. Regulatory mechanism of NHE1

- isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in cardiac and other tissues. Protection Against Ischemia/Reperfusion Damage of the Heart (Abiko, Y. and Karmazyn, M., eds.) Springer-Verlag, Tokyo, pp.3-21, 1998
69. Ikeda T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Mechanism of inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) by ATP depletion: Implication to myocardial ischemia. The Ischemic Heart, Eds. Mochizuki N. et al, Kluwer Publishers, Boston, 189-197, 1998
  70. Wakabayashi S, Ikeda T, Shigekawa M. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and volume regulation. The Cell Volume Regulation: The molecular mechanism and volume sensing machinery, Ed Okada Y, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 167-171, 1998
  71. Iwamoto T, Nishitani T, Pan Y, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M. Unique topology of the internal repeats in the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. FEBS Lett 446: 264-268, 1999
  72. Iwamoto T, Uehara A, Nishitani T, Imanaga I, Shigekawa M. Chimeric analysis of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers NCX1 and NCX3 reveals structural domains important for differential sensitivity to external Ni<sup>2+</sup> or Li<sup>+</sup>. J Biol Chem (in press)
  73. Kobayashi Y, Pang T, Iwamoto T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Lithium activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: Isoform specificity and inhibition by genistein. (Submitted)
  74. Pan Y, Iwamoto T, Uehara A, Nakamura T, Y, Imanaga I, Shigekawa M. Physiological significance of the intracellular Ca<sup>2+</sup>- or Na<sup>+</sup>-dependent regulation of activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX1. (Submitted)
  75. Jahan H, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H. Endothelin-1 and angiotensin II act as progression but not competence growth factors in vascular smooth muscle cells. J Pharmacol 295: 261-269, 1996
  76. Abe S, Nakamura M, Kanaide H. Some effects of nipradilol, a  $\beta$ - antagonist possessing a nitroxy group, on smooth muscle of the pig coronary artery. Br J Pharmacol 117: 1707-1715, 1996
  77. Seguchi H, Nishimura J, Toyofuku K, Kobayashi S, Kumazawa J, Kanaide H. The mechanism of relaxation induced by atrial natriuretic peptide in the porcine

- renal artery. *Br J Pharmacol* 118: 343-351, 1996
78. Miyagi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. Dual regulation of cerebrovascular tone by UTP: P2U receptor-mediated contraction and endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 118: 847-856, 1996
79. Sakihara C, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Kanaide H. Expression of calponin mRNA in porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 195-200, 1996
80. Miyagi Y, Kobayashi S, Ahmed A, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. P2U purinergic activation leads to the cell cycle progression from the G1 to the S and M phases but not from the G0 to G1 phase in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 652-658, 1996
81. Miyagi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. P2U receptor is linked to cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient and release of vasorelaxing factor in bovine endothelial cells in situ. *J Physiol* 492: 751-761, 1996
82. Fukuizumi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H. The effects of calcitonin gene-related peptide on the cytosolic calcium concentration and force in the porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 220-231, 1996
83. Higuchi Y, Nishimura J, Kobayashi S, Kanaide H. CPA induces a sustained increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of endothelial cells in situ and relaxes porcine coronary artery. *Am J Physiol* 270: H2038-H2049, 1996
84. Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res* 79: 14-19, 1996
85. Sakihara C, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Kanaide H. Direct inhibitory effect of chlorpromazine on smooth muscle of the porcine pulmonary artery. *Anesthesiology* 85: 616-625, 1996
86. Nishimura J, Sakihara C, Zhou YB, Kanaide H. Expression of rho A and kinase mRNAs in porcine vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 750-754, 1996
87. Kai T, Takahashi S, Kanaide H. Halothane counteracts acetylcholin-induced

- increase in  $Ca^{2+}$  sensitivity of the contractile apparatus in airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 315: 313-318, 1996
88. Hiroishi G, Kobayashi S, Nishimura J, Inomata H, Kanaide H. Differential effects of diltiazem and nitroglycerin on cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration and on force in the bovine ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2612-2623, 1996
89. Nishimura J, Seguchi H, Sakihara C, Kureishi Y, Yoshimura H, Kobayashi S, Kanaide H. The relaxant effect of adrenomedullin on particular smooth muscles despite a general expression of its mRNA in smooth muscle, endothelial and epithelial cells. *Br J Pharmacol* 120: 193-200, 1997
90. Eguchi D, Nishimura J, Kobayashi S, Komori K, Sugimachi K, Kanaide H. Mechanism of contraction induced by bradykinin in the rabbit saphenous vein. *Br J Pharmacol* 120: 371-387, 1997
91. Niino N, Nishimura J, Sakihara C, Nakano H, Kanaide H. Up-regulation of rho A and rho-kinase mRNAs in the rat myometrium during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 356-359, 1997
92. Chen X, Miyagi Y, Nishimura J, Kobayashi S, Fukui M, Kanaide H. Resting load and modulation of the myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity in rabbit cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 236-240, 1997
93. Kawasaki J, Kobayashi S, Miyagi Y, Nishimura J, Fujishima M, Kanaide H. The mechanisms of the relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 121: 977-985, 1997
94. Kozai T, Shimokawa H, Fukumoto Y, Kobayashi S, Owada M, Kadokami T, Ito A, Kuwata K, Egashira K, Shiraishi T, Kanaide H, Takeshita A. Tyrosine kinase inhibitor markedly suppresses the development of coronary lesions induced by long-term treatment with platelet-derived growth factor in pigs in vivo. *J Cardiovascular Pharmacol* 29: 536-545, 1997
95. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 272: 12257-12260, 1997

96. Eguchi D, Nishimura J, Kobayashi S, Komori K, Sugimachi K, Kanaide H. Down-regulation of endothelin B receptors in autogenous saphenous veins grafted into the arterial circulation. *Cardiovas Res* 35: 360-367, 1997
97. Sumiyoshi R, Nishimura J, Kawasaki J, Kobayashi S, Takahashi S, Kanaide H. Diadenosine polyphosphates directly relax porcine coronary arterial smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 548-556, 1997
98. Yoshimura H, Nishimura J, Sakihara C, Kobayashi S, Takahashi S, Kanaide H. Expression and function of endothelins, endothelin receptors, and endothelin converting enzyme in the porcine trachea. *Amr J R espir Cell Mol Biol* 17: 471-480, 1997
99. Zhou YB, Nishimura J, Seguchi H, Hirano K, Kanaide H. Expression and function of  $\alpha$ -adrenoceptor subtypes in the porcine renal artery. *Eur J Pharmacol* 341: 95-103, 1998
100. Ahmed A, Kobayashi S, Shikasho T, Nishimura J, Kanaide H. Differential effects of  $Ca^{2+}$  channel blockers on  $Ca^{2+}$  transients and cell cycle progression in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 344: 323-331, 1998
101. Seguchi H, Nishimura J, Zhou YB, Niuro N, Kumazawa J, Kanaide H. Expression of  $\beta$ -adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. *J Urology* 159: 2197-2201, 1998
102. Mizuno O, Hirano K, Nishimura J, Kubo C, Kanaide H. Mechanism of endothelium-dependent relaxation induced by thrombin in the pig coronary artery. *Eur J Pharmacol* 351: 67-77, 1998
103. Niuro N, Nishimura J, Hirano K, Nakano H, Kanaide H. Mechanisms and mode of action for galanin-induced contraction in the rat myometrium. *Br J Pharmacol* 124: 1623-1632, 1998
104. Kawasaki J, Hirano K, Nishimura J, Fujishima M, Kanaide H. Mechanisms of vasorelaxation induced by troglitazone, a novel antidiabetic drug, in the porcine coronary artery. *Circulation* 98: 2446-2452, 1998
105. Hirano M, Niuro N, Hirano K, Nishimura J, Hartshorne DJ, Kanaide H. Expression, subcellular localization and cloning of the 130 kDa regulatory subunit of myosin phosphatase in porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res*

Commun 254: 490-496, 1999

106. Yasutsune T, Kawakami N, Hirano K, Nishimura J, Kitamura K, Kanaide H. Vasorelaxation and inhibition of the voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels by FK506 in porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 126: 717-729, 1999
107. Zhou YB, Nishimura J, Hirano K, Kanaide H. The exogenously added small subunit of smooth muscle myosin phosphatase increase the  $Ca^{2+}$  sensitivity of the contractile apparatus in the permeabilized porcine renal artery. *Biochem Biophys Res Commun* (in press, 1999)
108. Zhou YB, Hirano K, Sakihara C, Nishimura J, Kanaide H. NH<sub>2</sub>-terminal fragments of 130 kDa subunit of myosin phosphatase increases  $Ca^{2+}$  sensitivity of the porcine renal artery. *J Physiol* (in press, 1999)
109. Kanaide H. Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in smooth muscle strips using front-surface fluorometry. In: Lambert D.G. (ed): "Methods in Molecular Biology" series. Vol. 114-Calcium signaling protocols, pp269-277, Humana press, Totowa, NJ, U.S.A. 1999
110. Ono A, Kuwaki T, Kumada M, Fujita T. Differential central modulation of baroreflex by salt loading in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29: 808-814, 1997
111. Kuwaki T, Kurihara H, Cao WH, Kurihara Y, Yazaki Y, Kumada M. Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Prog Neurobiol* 51: 545-579, 1997
112. Tezuka K, Sugishita C, Kuwaki T, Higurashi M, Kumada M. Effects of compression stockings on blood pressure and its orthostatic change in female subjects. *J Pathophysiol* 4: 81-86, 1997
113. Onodera M, Kuwaki T, Kumada M, Masuda Y. Determination of ventilatory volume in mice by whole body plethysmography. *Jpn J Physiol* 47: 317- 326, 1997.
114. Ju KH, Kuwaki T, Takeshima H, Iino M, Kumada M. Power spectral analysis of heart rate variability in ryanodine receptor type-3 knockout mice. *Proceedings of 16th Southern Biomedical Engineering Conference*; 120-123, 1997.
115. Ju KH, Kuwaki T, Kumada M. Power spectral analysis of variability of blood

- pressure and R-R intervals of the electrocardiogram: Effect of environmental and genetic factors. *The Autonomic Nervous System* 34: 214-218, 1997
116. Kuwaki T. Endothelin-B receptor and endothelin-3 knockout mice: Novel model animals for the study of Hirschsprung disease. *JpnJ Pediatr Surg* 29: 217-222, 1997
117. 桑木共之. 循環調節へのストレスの生理学的インパクト. *Cardioangiology* 42: 387-391, 1997
118. 熊田衛, 桑木共之. 循環中枢の新しい考え方. *Clinical Neuroscience*, 中外医学社 15(4): 377-379, 1997
119. 熊田衛, 桑木共之. ノックアウトマウス: 循環研究の新しい資源. *心臓* 29 (特別号 2) :77-79, 1997
120. 熊田衛, 桑木共之, 周起煥. 「中枢神経系・自律神経系」(高血圧症における神経・心血管・腎応答機能). *日本臨床* 55(8):1982-1987 (100-105), 高血圧特集号 1997
121. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125: 813-824, 1998
122. Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, Cao WH, Kume K, Fukuchi Y, Ikuta K, Miyazaki J, Kumada M, Shimizu T. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* 187: 1779-1788, 1998
123. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, hyperglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest* 101: 1784-1788, 1998
124. Li W, Liu X, Kumada M, Sato A. Excitation of baroreceptors depresses A-and C-components of the somato-sympathetic reflex in anesthetized rats. *Jpn J Physiol* 48: 261-266, 1998
125. Ling GY, Cao WH, Onodera M, Ju KH, Kurihara H, Kurihara Y, Yazaki Y, Kumada M, Fukuda Y, Kuwaki T. Renal sympathetic nerve activity in mice: comparison between mice and rats and between normal and endothelin-1 deficient mice.

Brain Res 808: 238-249, 1998

126. Morita H, Kurihara H, Kurihara Y, Shindo T, Kuwaki T, Kumada M, Yazaki Y. Systemic and renal response to salt loading in endothelin-1 knockout mice. J Cardiovasc Pharmacol 31: S557-S560, 1998
127. Ju K, Kuwaki T, Takeshima H, Iino M, Kumada M. Impaired autonomic nervous activity in the gene targeted mice assessed by power spectra of heart rate and arterial blood pressure variabilities. Proc 20th Ann Int ConfIEEE Engi Med Biol Soc. 20(1): 302-305, 1998.
128. Hong B, Ju K, Kumada M, Ueno S. Physiological effects of transcranial electrical stimulation of the brain in spontaneously hypertensive rat. Proc 20th Ann Int ConfIEEE Engi Med Biol Soc. 20(4): 2099-2101, 1998
129. Matsui N, Ju K, Sugishita G, Kumada M. Quantitative analysis of autonomic nervous activity during passive leg cycle exercise. Proc 20th Ann Int ConfIEEE Engi Med Biol Soc. 20(3): 1614-1616, 1998
130. Ichimaru Y, Kuwaki T. Development of an analysis system for 24-hour blood pressure and heart rate variability in the rat. Psychiatry Clin Neurosci 52: 169-172, 1998
131. 松井典子, 周起煥, 熊田衛, 杉下知子. 虚弱高齢者におけるジェット水流運動の効果. 自律神経 35:419-423, 1998
132. 桑木共之, 熊田衛. III 高血圧の分子生物学. 2 血圧の中樞性調節機構. In 循環器 NOW 16. 分子循環器病学 (南江堂, 東京, 1998) 編集主幹: 矢崎義雄, 編集: 矢崎義雄, 71-75
133. 熊田衛. 高血圧の病態生理. In 循環器系治療薬の作用メカニズム (南江堂, 東京, 1998) 編集: 戸田昇, 我孫子保, 211-215
134. 桑木共之. 遺伝子操作マウスを用いた循環・呼吸研究. 薬理と臨床 8: 577-586, 1998.
135. Kuwaki T. Use of knockout mice in the cardiovascular research. Ther Res 20: 350-352, 1999
136. Ichimaru Y, Kuwaki T. Spectral characteristics of heart rate, blood pressure and renal sympathetic nerve activity under cessation of breathing. Ther Res

20: 345-349, 1999

137. Ju KH, Kuwaki T, Kumada M. Sympathetic nervous activity in mice target-disrupted and overexpressing endothelin-1 gene. *Ther Res* 20: 353-355, 1999
138. Morita H, Kurihara H, Kurihara Y, Kuwaki T, Shindo T, Ohhashi Y, Kumada M, Yazaki Y. Responses of blood pressure and catecholamine metabolism to high salt loading in endothelin-1 knockout mice. *Hypertens Res* 22: 11-16, 1999
139. Ohuchi T, Kuwaki T, Ling GY, Dewit D, Ju KH, Onodera M, Cao WH, Yanagisawa M, Kumada M. Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of endothelin-B receptor in mice. *Amr J Physiol* 276: 1071-1077, 1999
140. Ando K, Ito Y, Kumada M, Fujita T. Oxidative stress increases adrenomedullin mRNA levels in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension Res* (submitted)
141. 桑木共之. 心拍変動のスペクトル解析. KEY WORD 1999-2000 高血圧, 先端医学社, 東京, 1999, 編集: 日和田邦男, 荻原俊男, 藤田俊郎, pp.150-151