

修 士 学 位 論 文

論 文 題 名

ミオシンⅡ阻害薬(2,3-Butanedione monoxime)がモルモット
ト盲腸紐平滑筋スキンド標本弛緩過程に及ぼす影響

Effect of myosin II inhibitors (2,3-Butanedione monoxime) on the
relaxation process of skinned taenia cecum smooth muscle from guinea pig

(西暦) 2016 年 1 月 8 日 提出

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻

フロンティアヘルスサイエンス学域

学修番号 : 14898602

氏 名 : 河田 晋一

(指導教員名 : 渡辺 賢)

(西暦) 2015 年度 博士前期課程学位論文要旨

学位論文題名 (注: 学位論文題名が英語の場合は和訳をつけること)

ミオシン II 阻害薬 (2,3-Butanedione monoxime) がモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本弛緩過程に及ぼす影響

学位の種類: 修士 (健康科学)

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻

フロンティアヘルスサイエンス学域

学修番号 14898602

氏名: 河田 晋一

(指導教員名: 渡辺 賢)

注: 1 ページあたり 1,000 字程度 (英語の場合 300 ワード程度) で、本様式 1~2 ページ (A4 版) 程度とする。

2,3-Butanedione monoxime (BDM) は、ミオシン II 阻害薬としてミオシン・アクチン相互作用を直接的に阻害することにより、骨格筋収縮を可逆的に抑制することが知られている。また、BDM は平滑筋収縮も阻害するが、その作用機序は、ミオシン・アクチン相互作用阻害に起因するというよりは、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制によるものと考えられてきた (Lang RJ, Paul RJ: J Physiol, 433: 1-24, 1991)。最近、別のミオシン II 阻害薬 blebbistatin が、ミオシン・アクチン相互作用を直接的に阻害することで、平滑筋収縮抑制および弛緩促進を惹起することが報告された (Watanabe: J Physiol Sci, 62: S160, 2012)。本研究では、平滑筋のミオシン・アクチン相互作用に対する BDM の影響の詳細を明らかにする目的で、細胞膜を化学的に破壊したモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本を用いて、その弛緩過程に対する BDM の影響を 2 つの温度条件で検討した。BDM は、10mM 以下では平滑筋弛緩過程に影響を及ぼさなかったが、30mM で弛緩を促進させた。弛緩時間過程の解析から、BDM は速い活性化クロスブリッジの解離を促進させることで、弛緩を促進させることが示唆された。

2,3-Butanedione monoxime (BDM) is known as a myosin II inhibitor, reversibly suppressing skeletal muscle contraction by direct inhibition of myosin-actin interaction. BDM also inhibits smooth muscle contraction, but the mechanism of the force suppression has been thought to interfere with intracellular Ca^{2+} handling rather than that with myosin-actin interaction. Recently, it has been reported that blebbistatin, another myosin II inhibitor, induced suppression of contraction and acceleration of relaxation in smooth muscle by direct inhibition of myosin-actin interaction. To investigate the effects of BDM on the myosin-actin interaction in smooth muscle in detail, the present study aimed to examine BDM effects on the relaxation process of cell membrane permeabilized (skinned) taenia cecum from guinea pig under two different experimental (temperature) conditions. BDM did not affect relaxation time courses at 10 mM or lower, but accelerated the relaxation at 30 mM. Analysis of the relaxation time course suggests that BDM accelerated dissociation of fast-cycling cross-bridge, inducing rapid tension decay during relaxation.

Key words: 平滑筋, 2,3-Butanedione monoxime (BDM), blebbistatin,

ミオシン・アクチン相互作用

要旨

2,3-Butanedione monoxime (BDM)は、ミオシンII阻害薬としてミオシン・アクチン相互作用を直接的に阻害することにより、骨格筋収縮を可逆的に抑制することが知られている。また、BDMは平滑筋収縮も阻害するが、その作用機序は、ミオシン・アクチン相互作用阻害に起因するというよりは、細胞内Ca²⁺濃度上昇の抑制によるものと考えられてきた (Lang RJ, Paul RJ: J Physiol, 433: 1-24, 1991.)。最近、別のミオシンII阻害薬blebbistatinが、ミオシン・アクチン相互作用を直接的に阻害することで、平滑筋収縮抑制および弛緩促進を惹起することが報告された(Watanabe: J Physiol Sci, 62: S160, 2012.)。本研究では、平滑筋のミオシン・アクチン相互作用に対するBDMの影響の詳細を明らかにする目的で、細胞膜を化学的に破壊したモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本を用いて、その弛緩過程に対するBDMの影響を2つの温度条件で検討した。BDMは、10mM以下では平滑筋弛緩過程に影響を及ぼさなかったが、30mMで弛緩を促進させた。弛緩時間過程の解析から、BDMは速い活性化クロスブリッジの解離を促進させることで、弛緩を促進させることが示唆された。

2,3-Butanedione monoxime (BDM) is known as a myosin II inhibitor, reversibly suppressing skeletal muscle contraction by direct inhibition of myosin-actin interaction. BDM also inhibits smooth muscle contraction, but the mechanism of the force suppression has been thought to interfere with intracellular Ca²⁺ handling rather than that with myosin-actin interaction. Recently, it has been reported that blebbistatin, another myosin II inhibitor, induced suppression of contraction and acceleration of relaxation in smooth muscle by direct inhibition of myosin-actin interaction. To investigate the effects of BDM on the myosin-actin interaction in smooth muscle in detail, the present study aimed to examine BDM effects on the relaxation process of cell membrane permeabilized (skinned) taenia cecum from guinea pig under two different experimental (temperature) conditions. BDM did not affect relaxation time courses at 10 mM or lower, but accelerated the relaxation at 30 mM. Analysis of the relaxation time course suggests that BDM accelerated dissociation of fast-cycling cross-bridge, inducing rapid tension decay during relaxation.

Key words : 平滑筋, 2,3-Butanedione monoxime (BDM), blebbistatin,
ミオシン・アクチン相互作用

緒言

平滑筋は、横紋構造を持たない筋細胞の合胞体からなる不随意筋であり、消化管や血管壁に存在する。平滑筋の収縮弛緩のメカニズムについては、 Ca^{2+} 濃度および反応温度に依存することが知られ、横紋筋と相同の細胞内装置を持っているが、その作用制御機構はかなり異なり解明途中である 1)2)3)。横紋筋との相違点の一つに、平滑筋収縮・弛緩は、基本的にはミオシン調節軽鎖のリン酸化・脱リン酸化によって制御されることが挙げられる。ミオシン軽鎖リン酸化機構は、 Ca^{2+} イオンの動員により細胞内カルモジュリン(CaM)と結合し、 Ca^{2+} - CaM 複合体を形成する。 Ca^{2+} - CaM 複合体が、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)と結合すると、MLCK が活性化され、ミオシン調節軽鎖 19 番目のセリンのリン酸化が起こる。それによって、ミオシンのアクチン活性化 ATPase 活性が増加し、アクチンとミオシン頭部で形成されるクロスブリッジが回転して、ATP を消費しながら収縮がはじまる。 Ca^{2+} 濃度が減少すると Ca^{2+} - CaM 複合体と MLCK の結合が解離し、MLCK が不活性化される。リン酸化されたミオシン軽鎖(MLC)は、ミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) によって脱リン酸化され、アクチン活性化 ATPase 活性が減少し、ミオシンとアクチンが解離して弛緩が生じる。筋型ミオシン (ミオシン II) 阻害薬である 2,3-Butanedione monoxime(BDM)や blebbistatin は、骨格筋、心筋および平滑筋の収縮を可逆的に抑制することが知られ 4)10)11)13)、blebbistatin は、骨格筋ミオシン II ATPase の活性化を抑制することで収縮を抑制することが知られている 11)16)17)22)。さらに最近 Watanabe らは、blebbistatin が平滑筋の張力保持メカニズム (ラッチ: ゆっくりとしてクロスブリッジ回転を引き起こす) 形成を抑制することで、弛緩を促進することを見出した 23)。BDM は、様々な種類の平滑筋において、2~10mM で、膜電位の脱分極によって開口する電位依存性 Ca^{2+} チャネルへの Ca^{2+} 流入を阻害し 12)13)14)15)24)25)26)、結果、平滑筋の収縮を抑制することが報告されている。Watanabe によれば、20mM 以下の BDM はミオシン・アクチン相互作用にはほとんど影響しない 10)。しかし更に高濃度の BDM はミオシン・アクチン相互作用を抑制する可能性がある。そこで、本研究では界面活性剤 β -escin により細胞膜を破壊し、細胞内環境を人為的に自由に固定・変化することを可能にするモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本を用いて、 Ca^{2+} 濃度調節機構に関わりなく BDM が blebbistatin と同様にラッチ機構を抑制して平滑筋弛緩過程を促進するか、検討を行った。

方法

本実験は日本学術会議が策定した「動物実験を適正に行うためのガイドライン」に則り、首都大学東京南大沢キャンパス研究安全倫理委員会により学内動物実験の承認を受けた動物実験計画を遵守して実施した (A27-1)。実験動物は、体重 250g のオス Hartley 系モルモットの腹腔内にソムノペンチル (共立製薬, 東京) を過剰投与することにより安楽死させ、盲腸紐を摘出し、人工細胞外液にて保存した。

摘出した盲腸紐は、自由に細胞内環境を変化、保持可能なスキンド標本を作成するため、 β -escin (SIGMA, St. Louis, MO, USA) を $100\ \mu\text{M}$ 含んだ標準溶液 (下記参照) に 30 分間浸し、さらに、 $10\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} ionophore A-23187 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) で筋小胞体を 10 分間処理した後 5)、50% glycerol (ナカライテスク, 京都) 含有弛緩液に浸し、 -15°C で保存した。スキンド標本に付着した粘膜等の組織をピンセットで除去した後、 $3.0 - 4.0\ \text{mm} \times 0.1 - 0.2\ \text{mm}$ の小切片を作成し、絹糸で切片の両端を一方に張力測定器がついたタングステン製フックに装着し、測定を行った。

張力測定器 (ULA-10GR; MINEBEA Japan) により張力の変化を電圧に変換し、増幅器 (AM30; ユニパルス株式会社 東京) で信号を増幅した後、A-D (アナログ-デジタル) 変換器 (PowerLab2/26; ADInstruments Japan, 東京) によりデジタル信号に変換した上で、Labchart (v.7.1; ADInstruments Japan, 東京) でパソコン上に記録した 6)7)。

溶液温度は、恒温水槽 (LTB-125; アズワン株式会社, 大阪) により $30.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ および $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ に維持し、バルブプレートシステム (9 穴・各 0.135ml) を利用して切片の移動浸漬を行った 8)。

人工細胞内溶液

全ての溶液のイオン強度は、K(methanesulfonate)(東京化成, 東京)の添加により 200mM を保ち、 20mM 1,4-piperazine-bis(2-ethanesulphonic acid)(PIPES)(同仁化学研究所, 熊本)と KOH により、 25°C で pH7 に調整した。スキンド盲腸紐の標準溶液は、通常の盲腸紐における Mg^{2+} 、MgATP および creatine phosphate(Crp)(ナカライテスク, 京都)の濃度をもとに 0.85mM Mg^{2+} (2.1mM Mg [methanesulfonate]₂)、 1mM MgATPNa₂(1.35mM total ATP) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、 2mM creatine phosphate Na₂(Crp)(ナカライテスク, 京都)、 10mM ethylene glycol-bis(2-aminoethyl) tetraacetic acid(EGTA)(同仁化学研究所, 熊本)を用いて調整した 9)。また、 $10^{-5.0}\text{M}$ Ca^{2+} (10mM total Ca[methanesulfonate]₂)(東京化成, 東京)に $1\ \mu\text{M}$ bovine brain calmodulin(和光純薬, 大阪)を添加したものを Ca^{2+} 溶液とした 3)。

実験手順

張力測定器に固定した標本を標準溶液中で静止長の 3-5% 伸長したのち、張力が安定するのを待ち(静止張力)、その後 Ca^{2+} 溶液に浸漬し、収縮を開始させた。収縮張力が最大かつ定常値まで達したら(最大収縮張力)、標本を弛緩液に浸漬し、弛緩反応を 15 分間記録した(図 1)。BDM (SIGMA, St. Louis, MO, USA) のミオシン軽鎖リン酸化、脱リン酸化への影響を除外しミオシン・アクチン相互作用への影響のみを検討するため、弛緩に用いる弛緩液の ATP をリン酸化の基質にはならないが、ミオシン ATPase の基質になる cytidine triphosphate(CTP)(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)に置換した 27)28)。

弛緩におけるデータの解析

スキンド標本の張力測定から得られたデータは以下の相対値として表した。

相対張力 = (観察された張力 - 静止張力) / (最大収縮張力 - 静止張力)

結果は、平均値 ± 標準誤差で表し、統計的処理は、対比サンプルの平均値を Student の t 検定により、 $P < 0.05$ の場合有意差ありとした。また、KaleidaGraph 日本語版 (v.4.1; Hulinks, 東京) により回帰分析を行った。

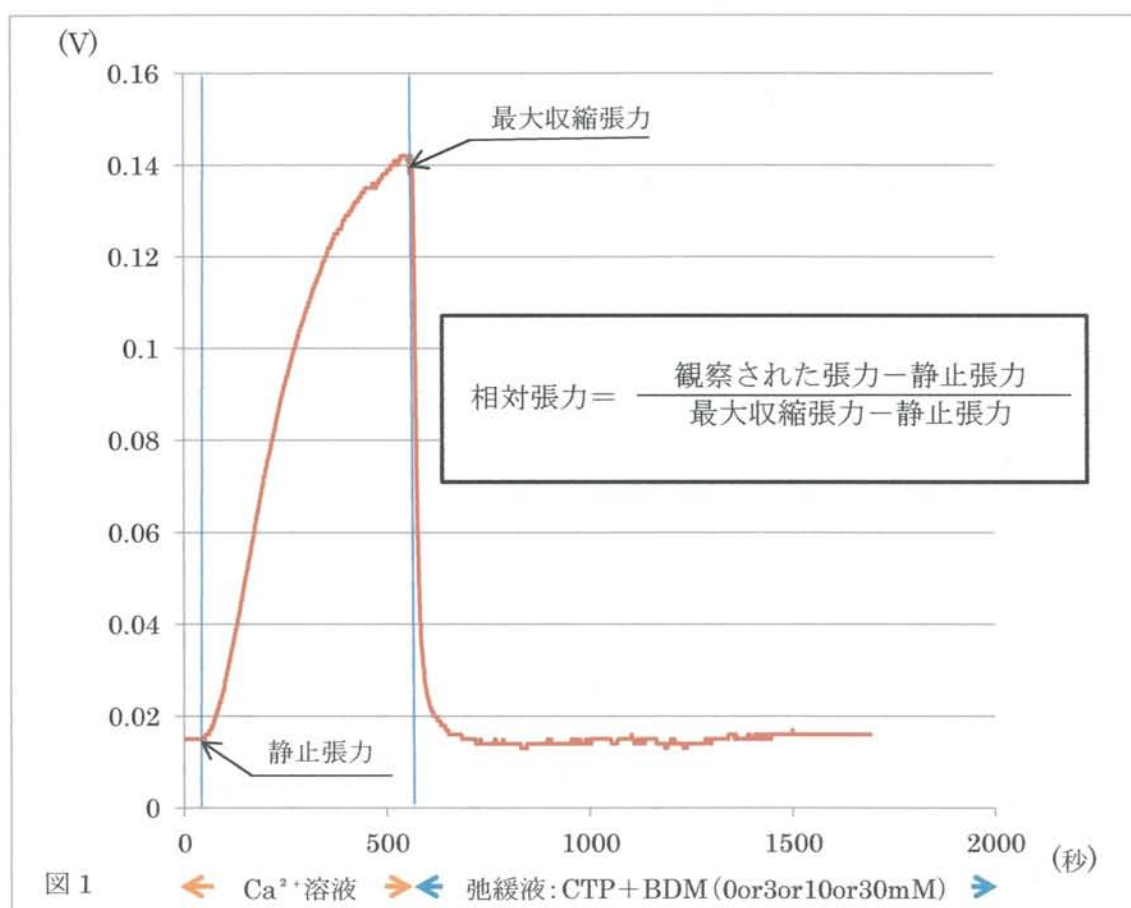


図 1 Labchart による記録図および相対張力計算式

縦軸を電圧 (相対張力)、横軸を時間 (秒) とし、Ca²⁺溶液による Ca²⁺依存性収縮が最大となったところで、control (0mM)、3mM、10mM、30mMBDM 含有弛緩液に標本を移し、その弛緩過程を 15 分間記録する。記録中の溶液温度は、 $30.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ および $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ に維持する。

結果

図 2 は、30℃におけるモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本弛緩に及ぼす 2,3-Butanedione monoxime (BDM)の影響について、縦軸を相対張力、横軸を時間として各濃度の BDM 溶液 (●: control (0mM)、▲: 30mM、◆: 10mM、×: 3mM) に浸漬した時の平滑筋スキンド標本の弛緩力を継時的に示す。600 秒以降は相対張力が平坦化するため省略した。30mMBDM において、10~70 秒間で平滑筋スキンド標本の弛緩過程を促進させることが示唆された。10mMBDM 以下では、有意な弛緩促進効果は認められなかった。

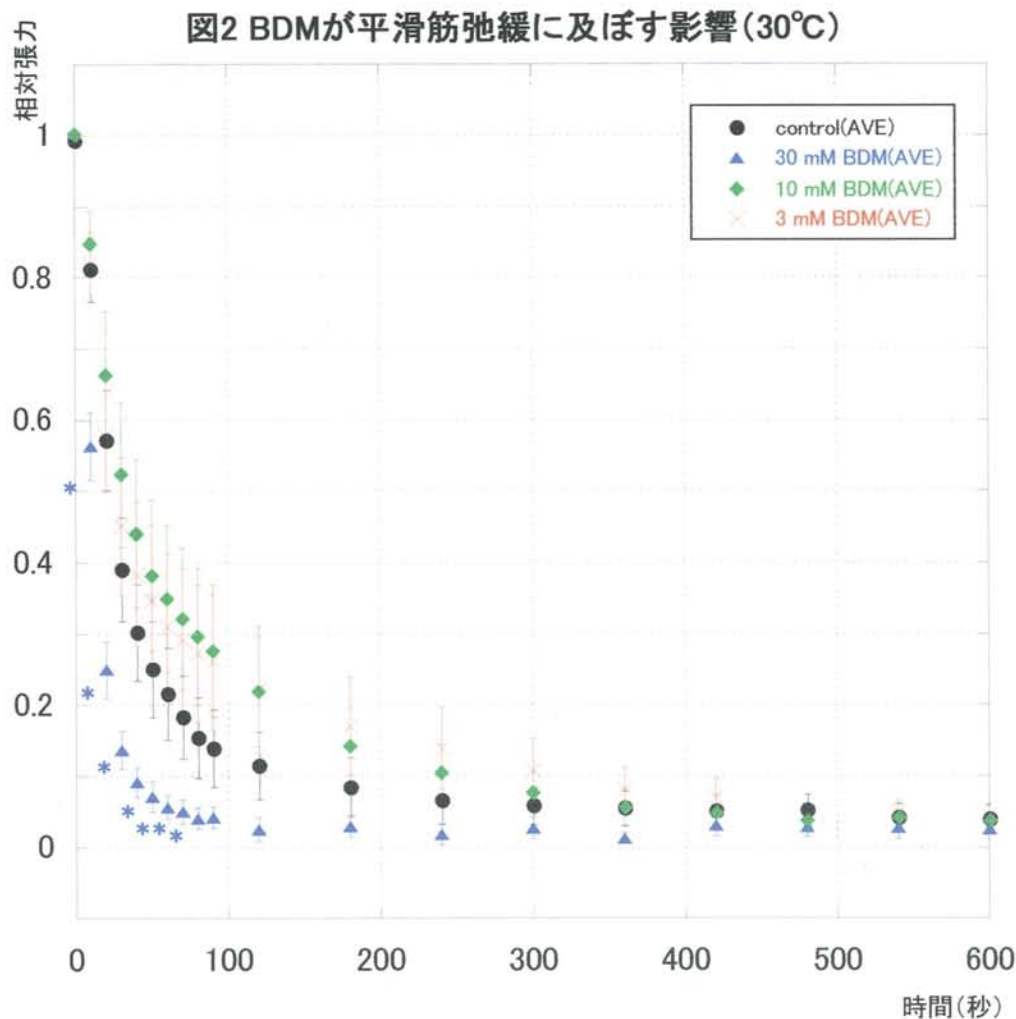


図 2. 30℃におけるモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本弛緩に及ぼす 2,3-Butanedione monoxime (BDM)の影響

縦軸を相対張力、横軸を時間として各濃度の BDM 溶液 (●: control、▲: 30mM、◆: 10mM、×: 3mM) に浸漬した時の平滑筋スキンド標本の弛緩力を継時的に示している。600 秒以降は相対張力が平坦化するため省略した。データは、10 回の実験による平均値±標準誤差で示している。※印は、control と比較して $P < 0.05$ となり、有意差があることを示している。

図 3 は、25℃におけるモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本弛緩に及ぼす 2,3-Butanedione monoxime (BDM)の影響について、縦軸を相対張力、横軸を時間として各濃度の BDM 溶液（●：control (0mM)、▲：30mM、◆：10mM、×：3mM）に浸漬した時の平滑筋スキンド標本の弛緩力を継時的に示す。600 秒以降は相対張力が平坦化するため省略した。30mMBDM において 10～120 秒間で、10mMBDM において 20～120 秒間で平滑筋スキンド標本の弛緩を促進させることが示唆された。3mMBDM 以下では、有意な弛緩促進効果は認められなかった。

図3 BDMが平滑筋弛緩に及ぼす影響 (25℃)

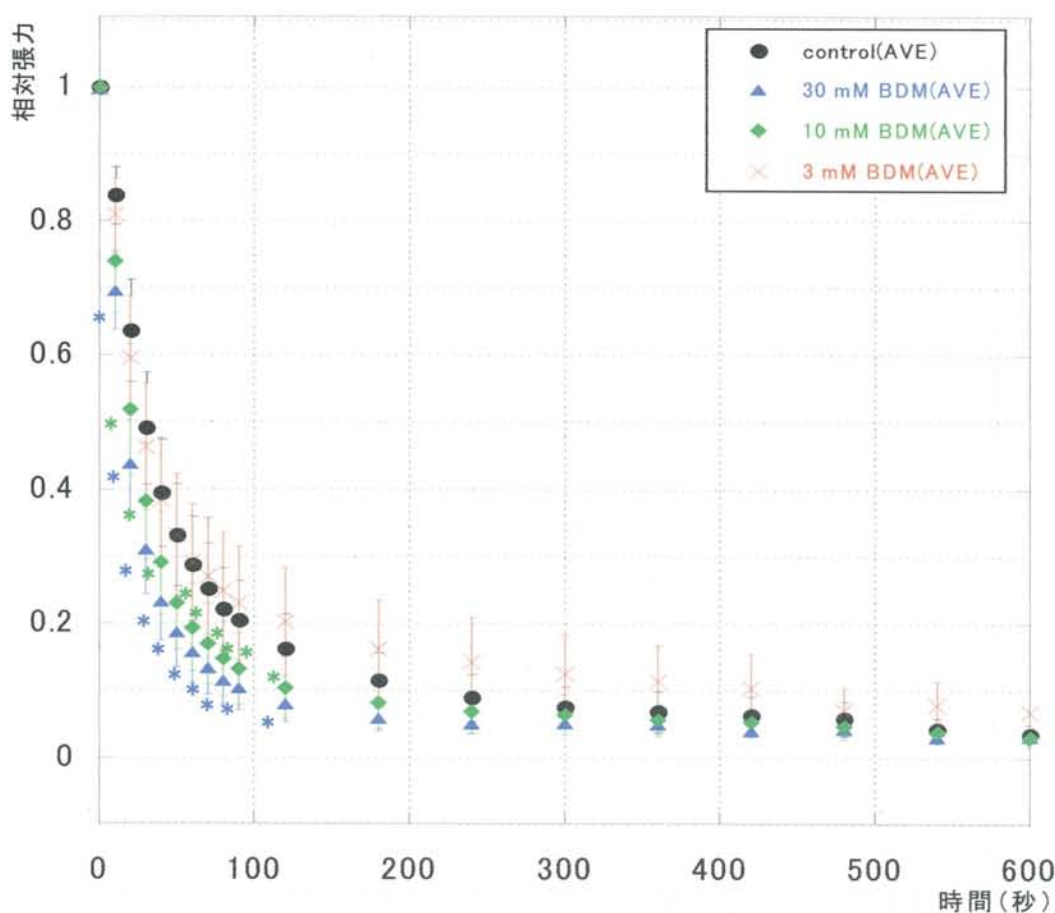


図 3. 25℃におけるモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本弛緩に及ぼす 2,3-Butanedione monoxime (BDM)の影響

縦軸を相対張力、横軸を時間として各濃度の BDM 溶液（●：control、▲：30mM、◆：10mM、×：3mM）に浸漬した時の平滑筋スキンド標本の弛緩力を継時的に示している。600 秒以降は相対張力が平坦化するため省略した。データは、8 回の実験による平均値 ± 標準誤差で示している。※印は、control と比較して $P < 0.05$ となり、有意差があることを示している。

平滑筋弛緩におけるアクチン-ミオシン間で行われる結合解離の関係をモデル化し、BDM が平滑筋弛緩のどの経過段階で作用しているのかを検討した (図 4)。平滑筋弛緩の経過は、①クロスブリッジの解離期 (τ_{fast}) を経て、②ラッチブリッジへの移行期 ($\tau_{\text{latch-attach}}$)、で一度アクチンから解離したミオシンがある割合 A で再びゆっくりとアクチンと結合するラッチブリッジを形成し、③ラッチブリッジの解離期 ($\tau_{\text{latch-detach}}$) へと 3 段階に分けて説明することができる (20)(21)。発生している相対張力 ($\text{Force}(t)$) は、アクチンと結合するミオシン数に比例すると考えると、

$$\text{Force}(t) = \text{Force}(0) \times [e^{(-t/\tau_{\text{fast}})} + A \times (1 - e^{(-t/\tau_{\text{fast}})}) \times (1 - e^{(-t/\tau_{\text{latch-attach}})}) \times e^{(-t/\tau_{\text{latch-detach}})}]$$

として表すことができる。

表 1 は、上記の式をもとに得られたデータを回帰解析し、時定数として示したものである。これより、30mMBDM は 25℃において、クロスブリッジの解離期 (τ_{fast}) の値で有意に小さかったことから、速い活性化クロスブリッジの解離を促進させることが考えられる。

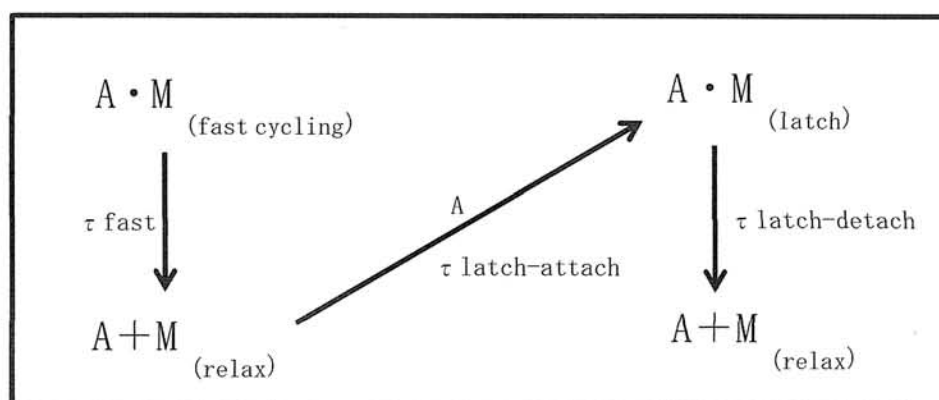


図 4 平滑筋弛緩におけるアクチン-ミオシン間で行われる結合解離の関係
A : アクチン M : ミオシン

30℃	control(0mM)		3mM			10mM			30mM		
	平均	標準誤差	平均	標準誤差	t検定	平均	標準誤差	t検定	平均	標準誤差	t検定
τ_{fast}	39.3893	13.47532	47.1837	13.53575	0.497078	59.3884	16.817	0.432406	15.8788	1.72277	0.131807
$\tau_{\text{latch-attach}}$	2808.3317	2565.0396	95.37937	48.31896	0.343792	9262.912	8188.128	0.507687	593.6755	326.2108	0.443324
$\tau_{\text{latch-detach}}$	1798.558	400.51588	1623.872	395.6767	0.773487	1779.822	482.1844	0.979392	1752.458	488.8443	0.950558
A	0.125501	0.0325594	0.103505	0.019473	0.479314	0.227388	0.075998	0.237758	0.082405	0.021977	0.286517
25℃	control(0mM)		3mM			10mM			30mM		
	平均	標準誤差	平均	標準誤差	t検定	平均	標準誤差	t検定	平均	標準誤差	t検定
τ_{fast}	47.11775	12.100723	94.6895	54.37484	0.344451	41.33988	12.63218	0.151897	29.23438	5.289555	*0.04354
$\tau_{\text{latch-attach}}$	99.480481	39.836488	967.3928	711.8181	0.288723	9853.22	8778.769	0.340814	1559.372	1318.115	0.339483
$\tau_{\text{latch-detach}}$	1348.9475	407.05473	1394.15	483.0982	0.938422	816.2624	389.8183	0.308942	1272.045	475.8548	0.886194
A	0.13338	0.0406882	0.227141	0.108594	0.450657	0.182308	0.083967	0.574735	0.175882	0.065346	0.611328

表 1 BDM が平滑筋弛緩に及ぼす影響の回帰解析結果

* : 有意差あり

考察

平滑筋の収縮・弛緩は、 Ca^{2+} 濃度および温度に依存することが知られる。筋型ミオシン（ミオシンII）の阻害薬である blebbistatin や BDM は、骨格筋、心筋および平滑筋の収縮を可逆的に抑制することが知られ 4)10)11)13)、blebbistatin は、平滑筋アクトミオシン ATPase 活性を $10\mu\text{M}$ 程度で抑制することが知られている 11)16)17)22)。最近 Watanabe らは、blebbistatin はスキンド盲腸紐平滑筋の収縮張力を抑制しても収縮の Ca^{2+} 感受性やミオシン軽鎖リン酸化レベルには影響を与えないことを報告している 17)。さらに、平滑筋の張力保持メカニズム（ラッチ：ゆっくりとしてクロスブリッジ回転を引き起こす）形成を抑制することで、弛緩を促進することを見出した 23)。BDM は、様々な種類の平滑筋において、2~10mM で、膜電位の脱分極によって開口する電位依存性 Ca^{2+} チャネルへの Ca^{2+} 流入を阻害し 12)13)14)15)24)25)26)、結果、平滑筋の収縮を抑制することが報告されている。Watanabe によれば、20mM 以下の BDM はミオシン・アクチン相互作用にはほとんど影響しない 10)。しかし更に高濃度の BDM はミオシン・アクチン相互作用を抑制する可能性がある。そこで、本研究では界面活性剤 β -escin により細胞膜を破壊し、細胞内環境を人為的に自由に固定・変化することを可能にするモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本を用いて、 Ca^{2+} 濃度調節機構に関わりなく BDM が blebbistatin と同様にラッチ機構を抑制して平滑筋弛緩過程を促進するか、検討を行った。

今回我々は、BDM のミオシン軽鎖リン酸化、脱リン酸化への影響を除外しアクチン・ミオシン相互作用への影響のみを検討するため、弛緩に用いる弛緩液の ATP をリン酸化の基質にはならないが、ミオシン ATPase の基質になる cytidine triphosphate(CTP)(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)に置換して実験を行った 27)28)。

この実験条件で、BDM は、盲腸紐平滑筋スキンド標本の弛緩過程において溶液温度 25°C では 10mM 以上で、 30°C では 30mM 以上で弛緩を促進させた。回帰解析の結果では、 25°C 、30mM で、クロスブリッジの解離期 (τ_{fast}) の値が有意に小さかったことから、速い活性化クロスブリッジの解離を促進させ、その効果には温度依存性がみられた。温度効果について、以前から報告されている骨格筋や心筋のデータと同様の傾向がみられたことから 4)8)13)、この速い活性化クロスブリッジ解離促進のメカニズムは横紋筋と本質的には同様であることが示唆された。これまでの研究では、ミオシンII ATPase 阻害薬は、一度アクチンから解離したミオシンがある割合 A で再びゆっくりとアクチンと結合するラッチブリッジの形成を阻害し、ラッチブリッジの解離 ($\tau_{\text{latch-detatch}}$) を促進させることで、盲腸紐平滑筋スキンド標本の弛緩を促進することが示唆されてきた。しかし、本研究の結果より、BDM と blebbistatin では、同じミオシンII阻害薬ではあるが、平滑筋弛緩過程におけるアクチン-ミオシン間で行われる結合解離の作用部位が異なることが考えられる。

参考文献

- 1) 伊藤猛雄, 鈴木聡: 平滑筋収縮弛緩と細胞内カルシウム動態. 蛋白質核酸酵素 / 共立出版株式会社 [編], 05.36(6): 885-895, 1991.
- 2) Richard A. Murphy, A.B., Ph, D: Myosin Phosphorylation and Crossbridge Regulation in Arterial Smooth Muscle. SUPP II, HYPERTENSION, 4: 3, 1982.
- 3) Sakurada K, Seto M, and Sasaki Y: Dynamics of myosin light chain phosphorylation at Ser¹⁹ and Thr¹⁸/Ser¹⁹ in smooth muscle cells in culture. The American Physiological Society, C1563-72, 1998.
- 4) R. S. Kirton, A. J. Taberner, P. M. F. Nielsen, A. A. Young, and D. S. Loiselle: Effects of BDM, [Ca²⁺]_o, and temperature on the dynamic stiffness of quiescent cardiac trabeculae from rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 288: H1662-H1667, 2005.
- 5) Yoshino Y, Sakurai W, Morimoto S, Watanabe M: Synthetic peptides of actin-tropomyosin binding region of troponin I and heat shock protein 20 modulate the relaxation process of skinned preparations of taenia caeci from guinea pig. Jpn J Physiol, 55: 373-378, 2005.
- 6) Sakurai W, Watanabe M, Yamashina A, Konishi M: Effects of hydrogen peroxide on contraction of skinned aorta from guinea pigs. Jpn J Physiol, 53: 471-474, 2003.
- 7) Watanabe M, Takano-Ohmuro H: Extensive skinning of cell membrane diminishes the force-inhibiting effect of okadaic acid on smooth muscles of guinea pig hepatic portal vein. Jpn J Physiol, 52: 141-147, 2002.
- 8) Horiuti, K: Mechanism of contracture on cooling of caffeine-treated frog skeletal muscle fibres. J. Physiol, 398: 131-148, 1988.
- 9) Nakayama S and Clark JF: Smooth muscle and NMR review: an overview of smooth muscle metabolism. Mol Cell Biochem, 244: 17-30, 2003.
- 10) Watanabe M: Effects of 2,3-butanedione monoxime on smooth-muscle contraction of guinea-pig portal vein. Pflugers Arch, 425: 462-468, 1993.
- 11) Yumoto M, Watanabe M: Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses Ca²⁺-induced and "sensitized"-contraction of skinned tracheal muscles from guinea pig. J. Smooth Muscle Res, 49: 89-98, 2013.
- 12) Higuchi H, Takemori S: Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. J Biochem, 105: 638-643, 1989.
- 13) Fryer MW, Neering IR, Stephenson DG: Effects of 2,3butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres. J Physiol, 407: 53-75, 1988.
- 14) Kagawa K, Horiuti K, and Yamada K: BDM Compared with Pi and Low Ca²⁺ in the

Cross-Bridge Reaction Initiated by Flash Photolysis of Caged ATP. *Biophysical Journal*, 69: 2590-2600, 1995.

- 15) D.J.K.Lyster and D.G.Stepheson: Contractile activation and measurements of intracellular Ca^{2+} concentration in cane toad twitch fibres in the presence of 2,3-butanedione monoxime. *Experimental Physiology*, 80: 543-560, 1995.
- 16) Judith K. Gwathmey, Roger J. Hajjar, and R. John Solaro: Contractile Deactivation and Uncoupling of Crossbridges Effects of 2,3-Butanedione Monoxime on Mammalian Myocardium. *Circulation Research*, 69: 1280-1292, 1991.
- 17) Masaru Watanabe, Masatoshi Yumoto, Hideyuki Tanaka, Hon Hui Wang, Takeshi Katayama, Shinji Yoshiyama, Jason Black, Sean E. Thatcher, and Kazuhiro Kohama: Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses contraction and disrupts contractile filaments organization of skinned taenia cecum from guinea pig. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298: C1118–C1126, 2010.
- 18) LI-HONG YE, HIROKO KISHI, AKIO NAKAMURA, TSUYOSHI OKAGAKI, TAKESHI TANAKA, KAZUHIRO OIWA, AND KAZUHIRO KOHAMA: Myosin light-chain kinase of smooth muscle stimulates myosin ATPase activity without phosphorylating myosin light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry*, 96: 6666–6671, 1999.
- 19) Richard A. Murphy: What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation. *The FASEB Journal*, 8: 311-318, 1994.
- 20) Kuhn, H., Tewes, A., Gagelmann, M., Guth, K., Arner, A. and Ruegg, J.C.: Temporal relationship between force, ATPase activity, and myosin phosphorylation during a contraction/relaxation cycle in a skinned smooth muscle. *Pflugers Arch*, 416: 512-518, 1990.
- 21) Kerstin Albrecht, Alexandra Schneider, Claudia Liebetrau, J. C. Rüegg, Gabriele Pfitzer: Exogenous caldesmon promotes relaxation of guinea-pig skinned taenia coli smooth muscles: inhibition of cooperative reattachment of latch bridges? *Pflügers Archiv*, 434: 534-542, 1997.
- 22) Melanie Stewart, Kathy Franks-Skiba, Roger Cooke: Myosin regulatory light chain phosphorylation inhibits shortening velocities of skeletal muscle fibers in the presence of the myosin inhibitor blebbistatin. *J Muscle Res Cell Motil*, 30: 17–27, 2009.
- 23) Watanabe M, Yamamura S: Myosin II inhibitors accelerate relaxation of skinned taenia cecum. *J Musc Res Cell Motil*, 35: 246, 2014.
- 24) Julien S. Davis, Colleen L. Satorius, and Neal D. Epstein. Kinetic: Effects of Myosin Regulatory Light Chain Phosphorylation on Skeletal Muscle Contraction.

- Biophysical Journal, 83: 359–370, 2002.
- 25) Lang RJ, Paul RJ: Effects of 2,3-butanedione monoxime on whole-cell Ca^{2+} channel currents in single cells of the guinea-pig taenia caeci. *J Physiol*, 433: 1–24, 1991.
 - 26) Jürgen borlak and Carolin zwadlo: The Myosin ATPase Inhibitor 2,3-Butanedione monoxime Dictates Transcriptional Activation of Ion Channels and Ca^{2+} –Handling Proteins. *Mol Pharmacol*, 66: 708–717, 2004.
 - 27) Cassidy P, Kerrick WG: Superprecipitation of gizzard actomyosin, and tension in gizzard muscle skinned fibers in the presence of nucleotides other than ATP. *Biochim Biophys Acta*, 705: 63–69, 1982.
 - 28) Flockhart DA, Freist W, Hoppe J, Lincoln TM, Corbin JD: ATP analog specificity of cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase, and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, 140: 289–295, 1984.

研究倫理審査通知書(動物)

渡辺 賢 殿

平成27年3月30日

首都大学東京 学長 原島 文雄

下記実験計画の審査結果を通知します。

受理番号		A27-1		
区分		所属(職名)	氏名	連絡先
申請者	動物実験責任者	人間健康科学研究科教授	渡辺 賢	03-3819-7352
	動物実験の経験及び教育訓練の経歴	昭和61年より現在まで、本務校の東京慈恵会医科大学、東京医科大学(平成12-22年)およびSPring-8(平成17年-)において動物実験に従事 平成18年および平成22年に東京医科大学で、平成26年に首都大学東京で開催された教育訓練を受講		
	動物実験実施者(分担者)	渡辺 賢		
研究課題		平滑筋における化学・力学変換過程変調の生理的意義		
研究目的		平滑筋標本の筋収縮タンパク質構造変化と化学・力学変換過程を、経時的・定量的に測定し、筋構造・機能連関を解明する。なお、本研究の一部は(財)高輝度光科学研究センター(Spring-8)で実施を計画しており、研究課題受理後に当該施設での動物実験実施の承認を受ける予定でいる。		
南大沢キャンパス研究安全倫理委員会から学長への助言		承認すべき 平成27年3月25日		
理由又は勧告		なし		
申請に対する決定		承認		