

修士学位論文

論文題名

Blebbistatin による気管平滑筋スキンド標本
弛緩促進作用のメカニズム

Mechanisms of accelerating effect of blebbistatin
on relaxation process of skinned tracheal smooth muscle

(西暦) 2017年 1月 5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：15898604

氏名：三橋 里子

(指導教員名： 渡辺 賢)

要旨

[緒言] ミオシン II 阻害薬である **blebbistatin** は、平滑筋アクチン ATPase 活性を 10 μM 程度で抑制する。**blebbistatin** は平滑筋標本においては収縮の Ca^{2+} 感受性やミオシン軽鎖リン酸化レベルには影響は与えず、アクチン・ミオシン相互作用を直接抑制することにより、その収縮を抑制するといわれている。**blebbistatin** はミオシン ATPase 加水分解サイクルに伴うミオシンのアクチンへの結合・解離に影響を及ぼすことが考えられることから、弛緩過程におけるクロスブリッジの解離にも影響を与えることが推察される。そこで本研究では、細胞膜を化学的に破壊して気管平滑筋スキンド標本の Ca^{2+} 収縮後の弛緩過程とミオシン ATPase サイクルの影響を受けない rigor 形成・解離に対する **blebbistatin** の効果を動力学的に検討した。[方法] モルモット気管平滑筋に 100 μM の β -escin で処理をしてスキンド標本作製し、圧トランスデューサーに取り付けて等尺性張力を測定した。 Ca^{2+} による最大収縮の後、EGTA により Ca^{2+} を素早く除去して弛緩させ、同時に **blebbistatin** を添加し 15 分間計測した。また、 Ca^{2+} 収縮後の rigor 状態における **blebbistatin** についても同様の方法で検討した。統計処理は t-test を使用し $P < 0.05$ を有意水準とした。[結果] Ca^{2+} 収縮後の弛緩過程において、気管平滑筋スキンド標本は 30 μM 程度で弛緩過程を促進し、回帰分析の結果からラッチの解離を速めていた。一方、 Ca^{2+} 収縮後の rigor 状態では相対張力において有意な弛緩はみられなかったが、回帰分析の結果、30 μM で rigor の解離の抑制と収縮後一度外れたクロスブリッジが rigor に移行する割合がコントロール群と比較して少ない値を示した。[考察] **Blebbistatin** は、ATP やアクチンのミオシンへの結合を直接阻害するのではなく、ミオシン頭部構造変化に影響してアクチン・ミオシン結合を弱めることが知られている。ATP の有無によって、 Ca^{2+} 収縮で発生した収縮張力の Ca^{2+} 除去後の減衰過程に対する **blebbistatin** の影響が異なるのは、**blebbistatin** がミオシン頭部構造変化に与える効果はミオシン頭部への ATP の結合の有無によって変化することを強く示唆する。平滑筋細胞において無酸素状態における力学反応の実態は不明であるが、**blebbistatin** はその解明に向けて研究において有用なツールになると考えられる。

キーワード：気道平滑筋、ラッチ、ブレビスタチン、アクチン・ミオシン相互作用

Blebbistatin, an inhibitor of myosin II, has an inhibitory effect on smooth muscle actomyosin ATPase activity at around 10 μ M. Blebbistatin is also known to suppress the smooth contraction by direct inhibition of myosin-actin interaction without any effects on Ca²⁺ sensitivity to the force or phosphorylation level of myosin light chain. In the present study, to assess the blebbistatin effects on actin-myosin interaction in detail, we investigated effect of blebbistatin in the relaxation process and the reducing rigor tension after the Ca²⁺-induced contraction using with skinned tracheal smooth muscle kinetically. A tracheal muscle preparation skinned (cell membrane permeabilized) with 100 μ M β -escin was attached to a force transducer to measure tension mechanical force. After contractile force induced with 10 μ M Ca²⁺ reached a steady level, Ca²⁺ was quickly removed in the absence or presence of ATP, resulting in relaxation process or reducing rigor tension respectively, with or without blebbistatin for 15 min. The relaxation process after the Ca²⁺-removal was accelerated in the presence of 30 μ M blebbistatin and this effect of blebbistatin seemed to result from acceleration of detach from so called "latch" state. On the other hand, blebbistatin at 30 μ M accelerated detachment of rigor bridge and reduced the forming rigor bridges in the absence of ATP, although the agent did not significantly changes in the tension level during decrease in the rigor tension after Ca²⁺ removal. The difference of the blebbistatin effects on the force between relaxation process and reducing rigor tension seems to be due to distinct effects of the agent on conformational changes of myosin in the absence and presence of ATP, because blebbistatin is known not to directly inhibit ATP binding to myosin, but to actin binding affinity of myosin.

Key words : airway smooth muscle, latch, blebbistatin, actin-myosin interaction

緒言

ミオシン II 阻害薬である blebbistatin は、平滑筋アクチン ATPase 活性を $10\mu\text{M}$ 程度で抑制することがわかっている¹⁾⁵⁾。アクチン・ミオシン相互作用の抑制メカニズムは、クロスブリッジのサイクルに影響を与える ATPase の抑制であると考えられ、収縮においても抑制する⁶⁾⁷⁾。そして、blebbistatin は収縮の 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ず、アクチン・ミオシン相互作用を直接抑制するといわれている³⁾。Watanabe らは盲腸紐スキンド標本で $10\mu\text{M}$ 以上の blebbistatin で Ca^{2+} 活性化収縮張力を抑制したことを示し³⁾、さらに Yumoto らは気管平滑筋スキンド標本においても収縮を抑制する効果があることを明らかにした⁸⁾。Blebbistatin が ATPase、さらには ATP 加水分解のサイクルに影響を及ぼすことが考えられることから、弛緩過程におけるクロスブリッジの結合、解離にも影響を与えることが推察される。

本研究では、気管平滑筋スキンド標本の Ca^{2+} 収縮後の弛緩過程における blebbistatin の効果、さらには ATP が存在しない rigor (硬直) 状態で blebbistatin がどのような影響を与えるか検討を行った。

方法

本実験は、日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に則り、首都大学東京研究倫理委員会から承認を受けた動物実験計画 (A28-1 動物実験責任者：渡辺賢) を遵守して実施した。

過剰量のソムノペンチル (共立製薬、東京) 腹腔内投与により安楽死させたハートレー系モルモット (オス、250g 位) から摘出した気管を $100\mu\text{M}$ の β -escin (Sigma, St. Louis, MO, USA) で 30 分間、 $20\mu\text{M}$ の Ca ionophore A23187 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で 10 分間処理して細胞膜を破壊したスキンド標本を作製、その上 -20°C 、50% glycerol (和光純薬、大阪) で凍結防止の上保存した標本を使用した⁹⁾¹¹⁾。保存標本を人工細胞内液 (後述) の中で気管軟骨及び結合組織を除去して、幅 $0.1\sim 0.2\text{mm}$ 、長さ 3mm の平滑筋小切片を作製した。標本は、人工細胞内液存在下に絹糸で一对のテングスワイヤーに取り付け、もう一方は等尺性張力を測定するために圧トランスデューサーに取り付けて ULA-10GR

(ミネベア、東京)にて張力の変化を電圧に変換し、増幅器 (AM32AZ;ユニパルス株式会社、東京) で信号を増幅させた後、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⁹⁾¹⁰⁾。素早く溶液の変換を行うために、6の穴 (各々0.135ml) のあるバブルプレートシステムを利用した¹²⁾。実験中の溶液の温度は、標本の劣化と blebbistatin (Toronto Research Chemicals Inc, North York ON, Canada)の沈殿防止として $30.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ とした³⁾。

溶液

スキンド標本の人工細胞内液は、 0.85mM Mg^{2+} ($2.1\text{ mM Mg(methanesulfonate)}_2$)、 1mM MgATP ($1.35\text{ mM total ATP Na}_2$) (Roche, Indianapolis, IN, USA)、 $20\text{mM creatine phosphate Na}_2(\text{CrP})$ (Nacalai Tesque, 京都)、 $10\text{mM ethylene glycole-bis (2-aminoethyl) tetraacetic acid (EGTA)}$ (Nacalai Tesque) とし、Horiuti (1988) の方法によって作製した¹²⁾¹⁴⁾。イオン強度は K (methanesulfonate) (東京化成、東京) の付加により 200mM で維持し、pH は 20mM 1, 4-piperazinediethanesulphonic acid (PIPES) (Nacalai Tesque) と水酸化カリウム (KOH) (和光純薬) で、 25°C で pH7.0 になる様に調節した¹⁴⁾。

Ca^{2+} 溶液には人工細胞内液に $\text{Ca (methanesulfonate)}_2$ ($10^{-4.35}\text{ M Ca}^{2+}$) (東京化成、東京) と $1\mu\text{M bovine brain calmodulin}$ (和光純薬) を加えた。 Ca^{2+} -EGTA の解離定数は、 $10^{6.4}\text{ M}^{-1}$ と仮定した⁸⁾¹⁴⁾。詳細に弛緩過程を解析するために、CrP は弛緩経時変化を速めることが知られていることから弛緩溶液において CrP は含めなかった¹¹⁾¹⁴⁾。

弛緩溶液には、EGTA と ATPase の基質になるがミオシン軽鎖リン酸化の基質とはならない cytidine triphosphate (CTP) (Sigma) を使用した。

Rigor 溶液は、 0.85mM Mg^{2+} ($2.1\text{ mM Mg(methanesulfonate)}_2$)、 10mM EGTA で作製し、イオン強度は K (methanesulfonate) の付加により 200mM で維持し、pH は 20mM PIPES と KOH で、 30°C で pH7.0 に調節した。

Blebbistatin は 1% Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma) に溶解、コントロール実験では同量の DMSO を添加した。

実験プロトコル

気管平滑筋スキンド標本は、同標本の人工細胞内液で約 10 μ N のストレスを生じさせるよう伸張した⁸⁾¹⁴⁾。受動的に伸張させた後、標本を Ca²⁺誘発性収縮を引き起こすために 10^{-5.0}M Ca²⁺溶液に浸し、収縮張力が最大値となったところで弛緩溶液により弛緩させた⁸⁾。弛緩の際には、30 μ M、10 μ M の blebbistatin とコントロール群として DMSO をそれぞれ同時に添加し 15 分間測定した。一方、rigor 状態における測定は、上記同様に標本を Ca²⁺溶液で収縮させ、収縮張力が最大値になったところで rigor 溶液に弛緩過程の測定と同様に 30 μ M、10 μ M の blebbistatin とコントロール群として DMSO をそれぞれ同時に添加し 15 分間測定した。測定は、Labchart を使用し記録した (図 1)。

Labchart からデータを Microsoft Excel (日本マイクロソフト, 東京) に移動して相対張力を表した。

$$\text{相対値} = (\text{観察された張力} - \text{静止張力}) / (\text{最大 Ca}^{2+}\text{誘発性張力} - \text{静止張力})$$

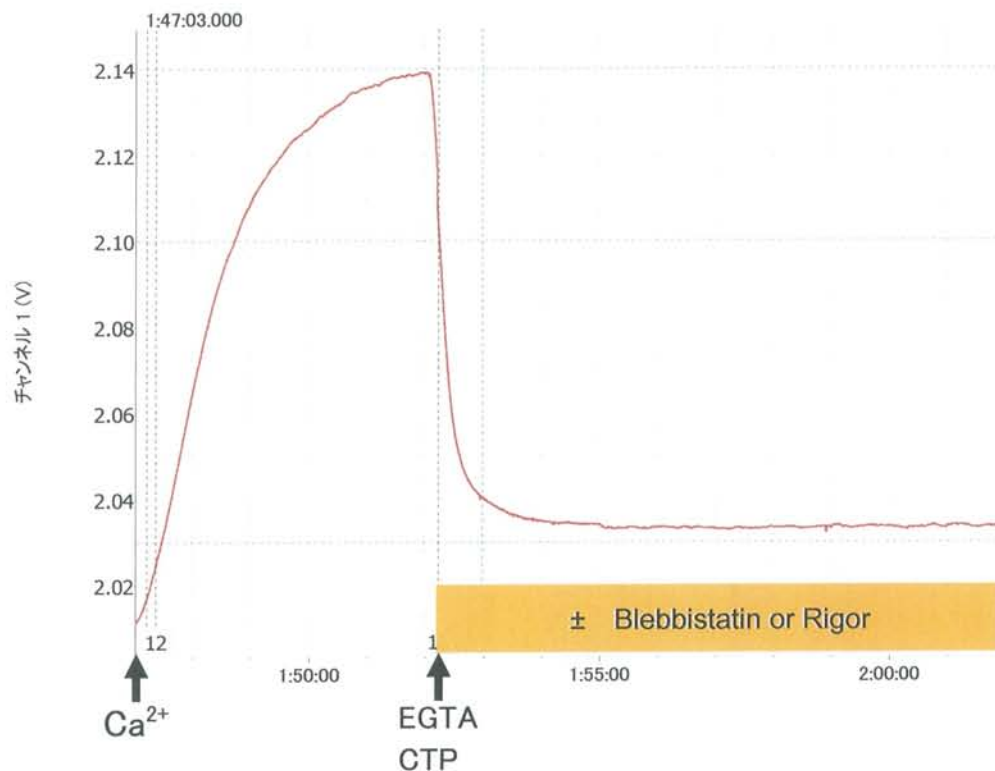


図 1 : 実験方法

Ca²⁺による収縮の後、EGTA と CTP により弛緩させ、同時に blebbistatin または rigor 溶液を添加した。

統計分析

結果は、means±standard errors(SEM)で記載した。統計処理は Microsoft Excel の対応ある Student's t-test を使用し、 $P < 0.05$ の場合有意差ありとした。回帰分析は Kaleida Graph (v.4.1 日本語版; Hulinks, 東京) を使用し、次の式に当てはめて解析した¹⁵⁾。

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

$e^{-(t/\tau_{\text{fast}})}$; 活性化クロスブリッジ数、 $(1 - e^{-(t/\tau_{\text{fast}})})$; 解離クロスブリッジ数、 $1 - e^{-(t/\tau_{\text{latch-attach}})}$; ラッチ形成数、 $e^{-(t/\tau_{\text{latch-detach}})}$; ラッチ解離数、 a ; ラッチを形成する割合

結果

Blebbistatin が気管平滑筋スキンド標本における Ca^{2+} 除去後の弛緩過程に与えた影響

図 2 は、気管平滑筋スキンド標本の Ca^{2+} 除去後弛緩過程における blebbistatin の効果を示す。標本は、blebbistatin の有無関係なく、 Ca^{2+} 除去後急激に弛緩した後、ゆるやかな弛緩をみせた。30 μM 程度の blebbistatin ではコントロール群と比較して相対張力は低下し、700 秒過ぎからはコントロール群に対して有意に弛緩を促進した。

筋収縮後の弛緩過程には、活性化した速いクロスブリッジが一旦解離してラッチを形成し、その後ゆっくりと解離していくことがわかっている¹⁵⁾。弛緩過程にみられた張力は、次のような式に当てはめることができる。

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

$e^{-(t/\tau_{\text{fast}})}$; 活性化クロスブリッジ数、 $(1 - e^{-(t/\tau_{\text{fast}})})$; 解離クロスブリッジ数、 $1 - e^{-(t/\tau_{\text{latch-attach}})}$; ラッチ形成数、 $e^{-(t/\tau_{\text{latch-detach}})}$; ラッチ解離数、 a ; ラッチに移行する割合

Blebbistatin が Ca^{2+} 除去後の弛緩過程においてクロスブリッジの解離やラッチの形成及び解離に対してどのように影響したか回帰分析を行った。表 1 は回帰分析による時定数である。30 μM の blebbistatin において、 $\tau_{\text{latch-detach}}$ で有意に低い値を示した。これは、ゆっくりとしたラッチの解離を促進したことを意味する。

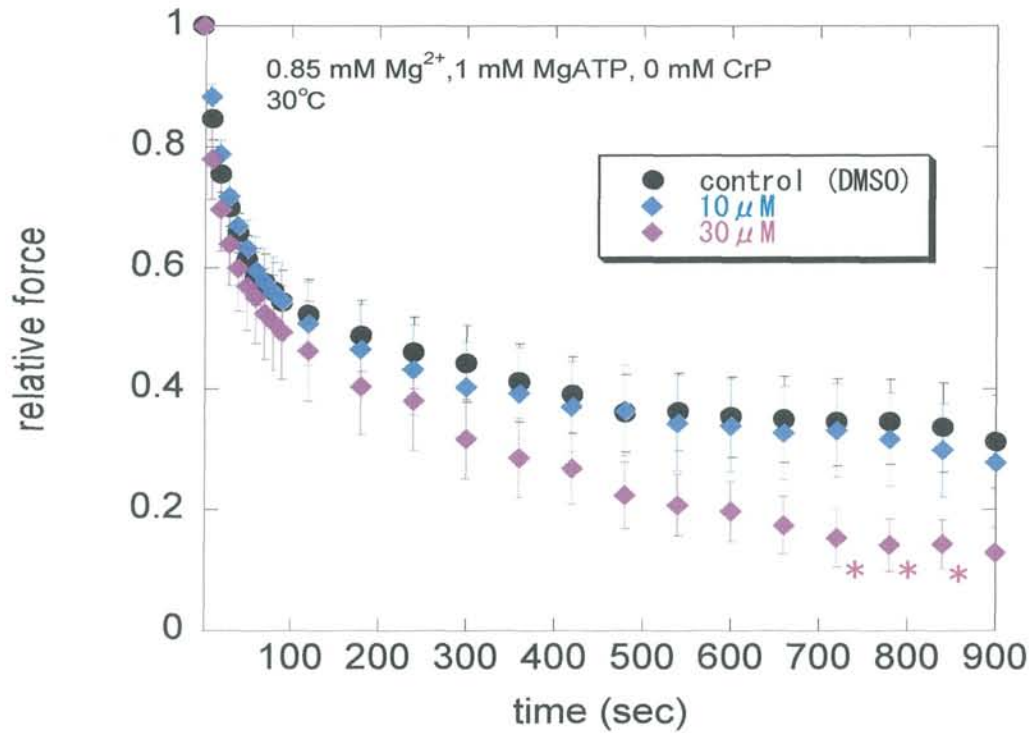


図 2 : Blebbistatin が気管平滑筋スキンド標本の Ca^{2+} 除去後弛緩過程に与えた影響
縦軸は相対張力、横軸は時間を示す。コントロール群に対して、 $30\mu\text{M}$ では 700 秒過ぎで有意差がみられた。値は 11 実験の平均 \pm SEM。 $30.0\pm 1.0^\circ\text{C}$ 。* $P < 0.05$ 。

表 1 : Blebbistatin が弛緩過程に与えた効果の回帰分析結果

	control	$10\mu\text{M}$	t-test	$30\mu\text{M}$	t-test
τ fast	47.696 ± 5.560	66.155 ± 6.376	0.055	79.571 ± 26.484	0.236
τ latch-attach	59.613 ± 36.097	59.212 ± 32.068	0.994	51.894 ± 14.825	0.82
τ latch-detach	1826.743 ± 412.898	1864.419 ± 430.983	0.952	* 774.213 ± 218.075	0.031
a	0.556 ± 0.057	0.518 ± 0.077	0.546	0.536 ± 0.097	0.839

$30\mu\text{M}$ で τ latch-detach の低値を示した。 τ fast : クロスブリッジの解離、 τ latch-attach : ラッチブリッジの形成、 τ latch-detach : ラッチブリッジの解離、a : ラッチブリッジに移行する割合。値は 11 実験の平均時定数 \pm SEM。* $P < 0.05$ 。

Blebbistatin が気管平滑筋スキンド標本 Ca^{2+} 収縮後の rigor 状態に与えた影響

図3は、気管平滑筋スキンド標本 Ca^{2+} 収縮後の rigor 状態における blebbistatin の効果を示したものである。標本は、 Ca^{2+} 除去後の弛緩過程と同様に一旦急激な張力低下をみせたが、その後の低下の程度は緩慢であり、その経過には標本によりばらつきがあった。また、コントロール群と比較し blebbistatin を添加した群は相対張力が高めであったが、統計的に有意な差はみられなかった。

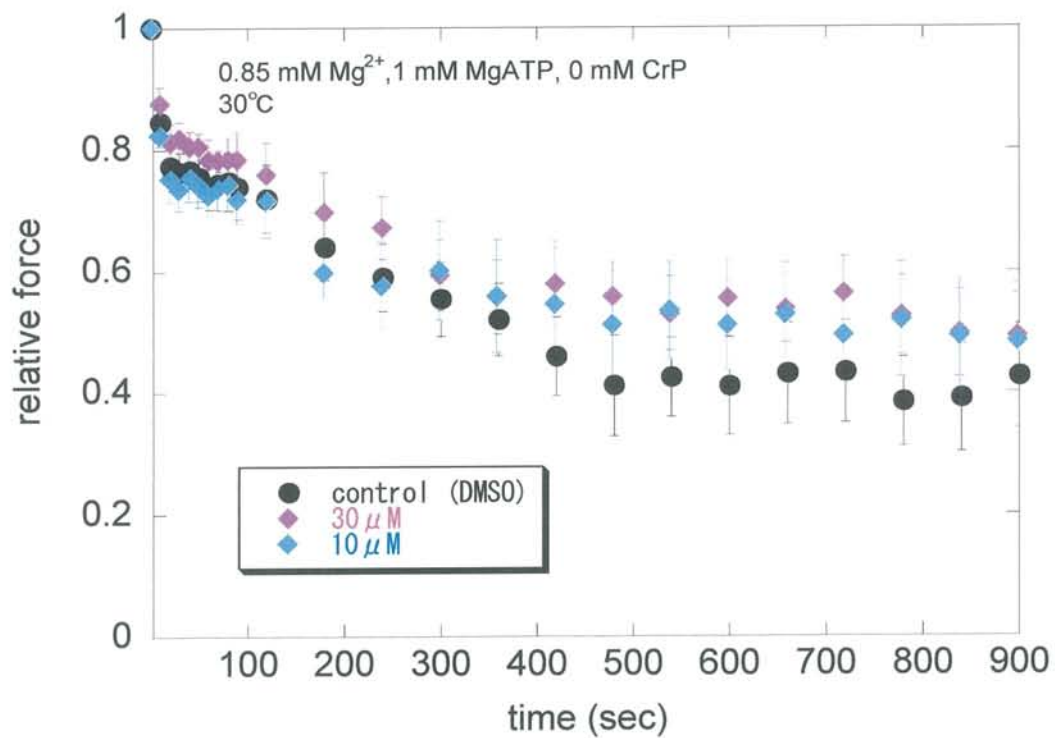


図3 : Blebbistatin が気管平滑筋スキンド標本 Ca^{2+} 収縮後 rigor 状態に与えた影響
縦軸は相対張力、横軸は時間を示す。いずれの濃度においても有意な変化は認められなかった。
値は7実験の平均 \pm SEM。30.0 \pm 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 。*P<0.05。

図 3 より、濃度による有意な力の変化はみられなかったが、CTP による弛緩において blebbistatin は 30 μ M で有意に弛緩させたことから、同濃度の rigor 状態において、クロスブリッジの解離や rigor の形成および解離に対してどのような効果を及ぼしたか以下の式を用いて回帰分析を行った (表 2)。

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

$e^{-(t/\tau_{\text{fast}})}$; 活性化クロスブリッジ数、 $(1 - e^{-(t/\tau_{\text{fast}})})$; 解離クロスブリッジ数、 $1 - e^{-(t/\tau_{\text{rigor-attach}})}$; rigor 形成数、 $e^{-(t/\tau_{\text{rigor-detach}})}$; rigor 解離数、 a ; rigor に移行する割合

30 μ M では $\tau_{\text{rigor-detach}}$ で有意に高い値を示した。これは、つくられた rigor が解離していく速度が遅かったことを示す。さらに、コントロール群と比較して、外れたクロスブリッジが rigor に移行する割合が有意に少なかったことが示された。

表 2 : Blebbistatin が rigor 状態に与えた効果の回帰分析結果

	control	30 μ M	t-test
τ_{fast}	77.994 \pm 13.042	126.351 \pm 16.588	0.07
$\tau_{\text{rigor-attach}}$	42.329 \pm 3.986	46.309 \pm 8.155	0.501
$\tau_{\text{rigor-detach}}$	1502.754 \pm 380.631	* 3585.257 \pm 14.743	0.0019
a	0.648 \pm 0.050	* 0.526 \pm 0.089	0.0481

30 μ M では $\tau_{\text{rigor-detach}}$ で高値を示し、クロスブリッジが rigor に移行した割合はコントロール群と比べ少なかった。 τ_{fast} : クロスブリッジの解離、 $\tau_{\text{rigor-attach}}$: rigor の形成、 $\tau_{\text{rigor-detach}}$: rigor の解離、 a : 外れたクロスブリッジが rigor に移行する割合。値は 7 実験の平均時定数 \pm SEM。* $P < 0.05$ 。

考察

本研究では、モルモットからの気管平滑筋スキンド標本において、blebbistatin は Ca^{2+} 収縮後の弛緩過程において $30\mu\text{M}$ 程度で弛緩を促進し、それは平滑筋特有のゆっくりとした収縮維持過程であるラッチの解離の促進による可能性が高いことを明らかにした。まず、濃度について考える。Blebbistatin は、盲腸紐スキンド標本の弛緩過程を $10\mu\text{M}$ 程度で促進することがわかっている³⁾¹⁵⁾。本実験結果から、気管平滑筋スキンド標本が盲腸紐と比較して高濃度で弛緩を促進したことから blebbistatin の感受性が低いことが示唆される。次に、ラッチの解離促進についてであるが、筋収縮は、ATP の加水分解により ADP と無機リン酸に分解する際に発生するエネルギーによって起こる。Blebbistatin は平滑筋アクチン・ミオシン ATPase 活性を抑制し、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ず、アクチン・ミオシン相互作用を直接作用する³⁾。CTP はミオシン ATPase の基質であるが、ミオシン軽鎖リン酸化の基質にはならず¹⁶⁾¹⁷⁾、アクチン・ミオシンの相互作用に直接影響を与えるものと考えられる。 $30\mu\text{M}$ 程度での blebbistatin によりラッチの解離を促進したのは、ラッチはミオシン軽鎖の脱リン酸化の程度に依存しないで形成されるため、そのゆっくりとした ATP 加水分解サイクルに直接作用したと考えられる。

一方、rigor 状態において blebbistatin の濃度差による相対張力の変化は統計的な有意差がみられなかったが、回帰分析の結果から、 $30\mu\text{M}$ 程度で rigor の解離速度を抑制し、収縮状態から一旦解離したクロスブリッジが rigor に移行する割合が低いことが示された。ラッチは ATP 加水分解に伴った現象である。rigor は、細胞内の ATP が消費された後にミオシンにアクチンが強く結合した状態であり、その解離過程は通常 ATP 結合及び加水分解サイクルに伴う弛緩過程とは異なると考えられる。blebbistatin はミオシンに結合することからミオシンの形態構造変化が起こり、それによってミオシンにおける ATP 加水分解サイクルが影響を受けて収縮を抑制する⁶⁾。そのため、rigor 条件では ATP は存在しないために ATP 加水分解サイクルは停止した状態であり、ATP 存在下とは別のメカニズムで rigor 結合の抑制及び rigor 解離の抑制を行っていると考えられる。

Blebbistatin は、ミオシン頭部のヌクレオチド結合ポケットやアクチン結合部位には結合せず、活性化サイトの別部位に結合してミオシン頭部構造変化を起こし、結果的にミオシンのアクチン結合力を弱めると考えられる⁶⁾。即ち、ATP の有無によって Ca^{2+} 収縮

で発生した収縮張力の Ca^{2+} 除去後の減衰過程に対する blebbistatin の影響が異なるのは、blebbistatin がミオシン頭部構造変化に与える効果はミオシン頭部への ATP の結合の有無によって変化することを強く示唆する。特に、結合したミオシン・アクチンの解離に対して、ATP の有無で逆の影響を持つことから、いわゆる rigor 状態からの解離過程が、ATP 加水分解サイクルに伴う latch 状態からのミオシン・アクチン解離とは全く異なるメカニズムによると考えられる。Rigor 状態は無酸素状態において発生するが、臓器虚血や気管支喘息など異常収縮持続など病的な状態では気道でも一時的にせよ無酸素状態による rigor 状態の発生が起こる可能性がある。平滑筋における rigor の力学反応の実態は不明であるが、blebbistatin はその解明に向けての研究において有用なツールになると考えられる。また、blebbistatin は、ミオシン頭部構造変化に影響を与え、収縮・弛緩反応の最下流であるアクチン・ミオシンの相互作用に直接的に作用することが示唆されたことから、機械的な伸展によってミオシン軽鎖リン酸化に影響を与えたとしても blebbistatin が有効に収縮抑制や弛緩促進に働くことが期待される。

参考文献

- 1) Eddinger TJ, Meer DP, Miner AS, Meehl J, Rovner AS, Ratz PH: Potent inhibition of arterial smooth muscle tonic contractions by the selective myosin II inhibitor, blebbistatin. *J Pharmacol Exp Ther*, 320(2): 865-870, 2007.
- 2) Katayama T, Yoshiyama S, Tanaka H, Wang HH, Nakamura A, Kohama K: Blebbistatin inhibits sphingosylphosphorylcholine-induced contraction of collagen-gel fiber populated by vascular smooth-muscle cells. *J Pharmacol Sci*, 102(3): 339-342, 2006.
- 3) Watanabe M, Yumoto M, Tanaka H, Wang HH, Katayama T, Yoshiyama S, Black J, et al.: 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(5): C1118-1126, 2010.
- 4) Ekman M, Fagher K, Wede M, Stakeberg K, Arner A: Decreased phosphatase activity, increased Ca²⁺ sensitivity, and myosin light chain phosphorylation in urinary bladder smooth muscle of newborn mice. *J Gen Physiol*, 125(2): 187-196, 2005.
- 5) Wang HH, Tanaka H, Qin X, Zhao T, Ye LH, Okagaki T, et al.: Blebbistatin inhibits the chemotaxis of vascular smooth muscle cells by disrupting the myosin II-actin interaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(5): H2060-2068, 2008.
- 6) Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Sellers JR: Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, 279(34): 35557-35563, 2004.
- 7) Limouze J, Straight AF, Mitchison T, Sellers JR: Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil*, 25(4-5): 337-341, 2004.
- 8) 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.

- 9) Sakurai W, Watanabe M, Yamashina A, Konishi M: Effects of hydrogen peroxide on contraction of skinned aorta from guinea pigs. *Jpn J Physiol.* 2003; 53(6): 471-474.
- 10) 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(2): 141-147, 2002.
- 11) 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.
- 12) Horiuti K: Mechanism of contracture on cooling of caffeine-treated frog skeletal muscle fibres. *J Physiol Lond*, 398: 131-148, 1998.
- 13) Nakayama S, Clark JF: Smooth muscle and NMR review; overview of smooth muscle metabolism. *Mol Cell Biochem*, 244: 17-30, 2003.
- 14) Hashimoto R, Yumoto M, Watanabe M, Konishi M, Haraoka J, Miki T: Differential effects of an expected actin-tropomyosin binding region of heat shock protein 20 on the relaxation in skinned carotid artery and taenia cecum from guinea pig. *J Smooth Muscle Res*, 45(1): 63-74, 2009.
- 15) Watanabe M, Yamamura S: Myosin II inhibitors accelerate relaxation of skinned taenia cecum Regulatory Circuits in Cell Motility. *J Musc Res Cell Motil*, 35:246, 2014.
- 16) Cassidy P, and Kerrick WG: Superprecipitation of gizzard actomyosin, and tension in gizzard muscle skinned fibers in the presence of nucleotides other than ATP. *Biochem Biophys Acta*, 705: 63-69, 1982.
- 17) Flockhart DA, Freist W, Hoppe J, Lincoln TM, and Corbin JD: ATP analog specificity of cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase, and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, 140: 289-295, 1984.