

## 血管平滑筋の弛緩機構

陳 貴 発\* 章 国 良\* 栗 山 熙\*

## 1. いとぐち

血管は血液輸送器であり筋性血管の収縮と弛緩が血液輸送と血圧維持に大きな役割をはたしている。血管平滑筋の弛緩は血圧降下や狭心症予防などの目的で種々の薬物を用いて誘発されている。究極的には血管弛緩とは血管平滑筋内のアクチン (actin) とミオシン (myosin) の架橋 (bridge) のサイクリングを低下または消失させて機械的な張力発生を抑制することである。そこでこの様な最終的な収縮を発生させる各過程を抑制することにより筋弛緩をもたらすことが出来る。この各過程とは神経性制御機構、内皮細胞性調節機構および筋細胞の直接的ならびに上述の2つの機構を介した間接的な調節過程であり、平滑筋に関しての細胞膜におけるイオン透過制御機構と受容器活性化によるイオン制御とセカンドメッセンジャー (second messenger, signal transductor) の産生の制御、筋小胞体における Ca 動態の制御、収縮タンパクにおける Ca-カルモジュリン (calmodulin) の作用とミオシン軽鎖 (myosin light chain) を介した収縮過程、ミオシン ATP 分解酵素とフォスファターゼ (phosphatase) の制御ならびに収縮タンパク質 (actomyosin) の架橋のサイクルの直接制御などがある。そこでこれらの調節過程を中心に現在知られている薬物の作用を含めて血管平滑筋の弛緩機構についてのべる。

## 2. 細胞膜を介した弛緩調節機構

## a. 電位依存性Ca チャンネル (Voltage dependent Ca channel)

細胞内の自由 (遊離; free) Ca 量は aequorin,

fura-2 や quin 2 を用いた結果やX-線プローブを用いた方法によってほぼ 100-180 nM とされている<sup>18, 20, 54, 67, 83, 84, 87, 99</sup>。この Ca 量は細胞膜を介した機構と筋小胞体の動員機構とを介して調節されている。細胞膜においては Ca の流入と排出が行なわれるが前者は主として電位依存性 (Voltage dependent; VOC) と受容器を介した (receptor operated; ROC) Ca 流入であり<sup>8, 13, 48</sup>、後者は Ca 能動輸送 (pump)<sup>11, 12</sup> と Na-Ca 交換拡散 (exchange diffusion)<sup>7, 9</sup> によると考えられている。電位依存性 Ca 流入は Ca チャンネル (channel) を介するものである。単離平滑筋細胞を用いた電位固定法によるマクロカレント (macro current) 研究によって Ca channel は2種に分類され (心筋のLとT型に相当)<sup>2, 23, 28, 51, 78</sup>、それぞれ異なる性質をもつ事が明らかになりつつあり薬理的には Ca 拮抗薬感受性と非感受性 channel に分類されている。またパッチ固定法 (patch clamp) によって消化管で unit current の振幅から2種類の channel の存在が報告されている。ただこれらの2つの channel の生理機能についてはまだ不明な点が多く、unit current と macro current の相関などは今後の研究課題である。電位依存性 Ca channel の活性化が細胞内自由 Ca 量をただちに上昇させるとは限らない。すなわち流入した Ca が収縮タンパク系を活性化する前に筋小胞体にとりこまれる可能性が報告されており、たとえば局麻のプロカインは筋小胞体からの Ca 放出抑制作用をもつがさらに活動電位を抑制しないで収縮のみを抑制する興奮-収縮連関機構の脱機構作用 (decoupler of excitation contraction coupling) をもつ事が知られている<sup>37, 40</sup>。

電位依存性 Ca 流入を抑制し筋弛緩をもたらすためには一般に Ca 拮抗薬が使用されている<sup>92</sup>。

\*九州大学医学部薬理学教室

この薬物には化学構造の異なる dihydropyridine 誘導体 (nifedipine, nicardipine, nitrendipine, nisoldipine など), diltiazem, verapamil, flunarizine, bepridil などがある<sup>13, 22, 30, 31, 39</sup>。これらの薬物は Ca channel に選択性の高いもの、channel に対して use-dependency や voltage-dependency を示すもの、また Ca current の inactivation process におよぼす効果から異なる性質を持つことが明らかになって来た<sup>43, 61, 63, 90, 91</sup>。さらに心筋と血管平滑筋では Ca 拮抗薬感受性をもつ電位依存性 Ca channel の性質が異なることが知られており、心筋では verapamil や D600 (gallopamil) などは細胞膜内面から作用するとされているのに対し血管平滑筋では細胞膜外部より作用する。さらにこの channel は心筋では cyclic AMP を投与することにより活性化されるのに反し平滑筋では増強されない<sup>64</sup>。

薬理的に電位依存性 Ca 流入を促進するためには Ca agonist (たとえば Bay K8644 などの dihydropyridine 系化合物)<sup>43, 78</sup> や過剰Kを用いるが過剰K液による収縮の大きさと細胞内自由 Ca 量を fura-2 や aequorin を用いた測定結果とでは完全に一致しない。すなわち自由 Ca 量の減少が収縮の減少より速くあらわれ、その時期にはミオシンの磷酸化も減少し、筋の短縮速度から推測されるミオシンとアクチンの架橋のサイクル速度 (cycling rate of cross bridges) も減少する。そこでこの現象には latch 現象として説明されている<sup>15, 29</sup>。

電位依存性 Ca 流入を抑制する他の要因として活動電位発生の際の閾値を上昇させるか、膜電位を過分極側に移動させることも可能である。膜を過分極させ閾値を上昇させる典型的な薬物として nicorandil<sup>27, 34, 100</sup> や BRL 34915<sup>32, 97, 98</sup> などがある。これらの薬物は膜を過分極させることにより自発放電を抑制すると共に活動電位発生までの閾値を高めるために収縮抑制をもたらす (K channel opener)。また nicorandil は薬物はニトログリセリン様作用を示し cyclic GMP を増加する。Nicorandil による過分極要因は Ca 非依存性K透過性を促進するためであり Ca 依存性K透過性には効果がない。すなわち Ca 欠徐液や Mn 存在液中でも nicorandil は過分極をもたらすために ATP やアパミン (apamin; ハチ毒) の作用と関

連した Ca 依存性 K channel を介した過分極とは異なるわけである。BRL 34915 もアパミンの作用と関係がないと報告されている<sup>97, 100</sup>。K channel opener について今後新しい血圧降下薬の分類が可能であろう。

### b. 受容器活性化による Ca 流入 (receptor operated Ca influx)

アセチルコリン (ACh) やヒスタミンなどは血管平滑筋で収縮を発生する場合やまた EDRF を介した弛緩をもたらす効果もある。この場合収縮の際には膜の脱分極を発生させる組織や膜電位に変化を示さない組織もある。膜の電気現象に変化を与えないで収縮を発生する機構を pharmacomechanical (contraction) coupling とよばれている<sup>48, 49, 82</sup>。この場合は後述のように second messengers の産生がその要因とされているが、脱分極の場合は主として Na 透過性を高めその結果として電位依存性 Ca 流入を促進する場合と受容器活性化による Ca 流入が発現する可能性がある。この受容器活性化による Ca 流入は電位固定法、イオン流束測定法や patch clamp 法を用いて現在多くの研究が行なわれており ATP により開くチャンネルがみつけれられた<sup>102</sup>。心筋では ACh による受容器活性化によって発生する K 透過性の亢進は GTP 結合タンパク質 (GTP binding protein) の  $\beta$  と  $\gamma$  調節 subunit が関与すると報告されている<sup>47</sup>。しかし  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  3つの subunits が共に K channel の活性化に関与するとも考えられている<sup>16, 69</sup>。はたして Ca 透過性のみを促進する受容器活性化機構が存在するかいなかまたは他のイオンと共に非選択的に増加するかは近い将来に解決されるであろう。平滑筋では Ca 欠除 ( $10^{-5}$  M 以下) 液中では Ca channel を Na が透過することが知られているがこれは Na と Ca が共に通過するのではなく外液の Ca の量が少ない時のみ Na が通過する<sup>62</sup>。しかし Na channel を Ca が通過するという報告は得られていない。この受容器活性化の抑制はそれぞれの拮抗薬 (遮断薬) を用いることによって行なわれ  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  遮断薬,  $M_1$ ,  $M_2$  遮断薬,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  遮断薬,  $H_1$ ,  $H_2$  遮断薬がそれぞれ使用されている。

### c. 細胞膜を介した Ca の排出

Ca の排出には ATP を介して Mg 感受性 ATPase の活性化による Ca 排出機構<sup>11, 12</sup> と Na-Ca

交換拡散<sup>7,9)</sup>が関与すると考えられている。心筋においては後者が主作用であると考えられているが平滑筋では前者が主であり、後者の存在を認めてもその作用は生理機能としては小さな役割をなしていると考えられる。Ca 能動輸送に関与するタンパク質についての研究も種々おこなわれ、135 K dalton タンパクが Ca 能動輸送に関係し、この性質は SR のそれとは異なることが知られている。血管平滑筋における Na-Ca 交換拡散の存在を完全に否定にする根拠はない。例えば Na 欠徐液中で平滑筋は収縮を発生し、1-5 mM Na を添加するとただちに弛緩するという現象も細胞外液の Na を減少させるか細胞内 Na を増加 (ouabain により Na-K 能動輸送の抑制) させると Na-Ca 交換拡散の逆回転または Na-Ca 交換拡散の抑制による Ca の細胞内によって細胞内 Ca が増加し、収縮が発生することも考えられる。しかし正常筋において Na-Ca 交換拡散を抑制するか逆回転をもたらすようなイオン量の変化の生じることは少ないだろう。他方遺伝性高血圧ラット (spontaneous hypertensive rat, SHR) では Na-Ca 交換拡散の変化による血圧上昇作用を想定する研究者もいる<sup>7)</sup>。おそらくは生理条件下では Ca 能動輸送が主要な役目をはたし Na-Ca 交換拡散は補助的な役割をはたしているが病的条件下ではその割合が変化しうるかも知れない。

### 3. 筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, S. R.) による Ca の再吸収と放出

骨格筋や心筋と共に SR が細胞内 Ca 貯蔵部が細胞内 Ca 動態に重要な機能をもっている。血管平滑筋の SR のうち、細胞膜の直下に存在するのが収縮を中心とした Ca 動態に関係し、中心部にする SR の Ca はさほど関与しないとされている<sup>84)</sup>。SR における Ca の再吸収は Ca ATPase を介したものであり ATP を必要とする。SR からの Ca の放出部位は Ca ポンプの部位と異なり、channel を介した機構であり、従来脱分極で促進されると考えられていたが、イノシトール3リン酸 (inositol trisphosphate; InsP<sub>3</sub>) が Ca 放出を促進する結果が得られている<sup>5,6,33,81,85,101)</sup>。現在、脱分極による放出に関してまだ十分な確証は得られていない。しかし SR からの Ca の放出には Ca による Ca 放出 (Ca-induced Ca release) 機構

が生理的役割をはたしていると考えられている<sup>19,21,37,40)</sup>。InsP<sub>3</sub> の作用が明らかになった現在でも Ca による Ca 放出機構の生理的意義に関する考えを変える必要はないと思われる。心筋や骨格筋ではこの機構が生理機能と関連があるかいなかについてはまだ問題が残されているだろうが平滑筋では SR 中にある一定量以上の Ca が存在すれば Ca によって Ca 放出機構が活性化されて Ca を放出するという。Caffeine はこの Ca による Ca 放出機構と同様な機序で Ca を放出し、その作用は procaine によって抑制される<sup>40,41,92)</sup>。後述するが procaine はセコンドメッセンジャーの産生を抑制するし<sup>92)</sup>、K channel の作用をも抑制する作用をもっている<sup>40)</sup>。しかし procaine による Ca 放出抑制作用は InsP<sub>3</sub> による放出作用には弱いので InsP<sub>3</sub> と caffeine による放出機構は必ずしも同一機序によるものではないと考えられている<sup>92)</sup>。

### 4. 血管平滑筋における収縮タンパク質の性質と弛緩

細胞形質内に自由 Ca が  $10^{-7}M$  以上に増加すると4個の Ca と calmodulin との結合、それにひきつづきミオシン軽鎖キナーゼ (myosin light chain kinase, MLCK) と三量体を形成することによって ATP によって MLC が磷酸化され、その結果ミオシンとアクチンの架橋 (bridge) 間のサイクル (cross bridge cycling) が発生し、収縮を誘発することが myosin の磷酸化説として平滑筋の収縮発生機序と考えられている<sup>14,17,29,74,80,96)</sup>。磷酸化された MLC は phosphatase によって脱磷酸化されると自由 Ca の減少とあいまって弛緩現象を発現する。MLC の磷酸化とは MLC 中の 20 K dalton タンパク質の磷酸化によるが MLC や MLCK には磷酸化される部位は1ヶ所ではない<sup>68)</sup>。そこで収縮抑制機序としては Ca 量の減少のみならず calmodulin の抑制機構、MLC の磷酸化の抑制、MLCK の Ca-calmodulin 系でない部位の磷酸化によって Ca-calmodulin を介した正常の MLC の磷酸化の抑制、さらに phosphatase の活性化が考えられる。Calmodulin の抑制剤としては3環系抗うつ剤、chlorpromazine, trifluoperazine, benzperidol などが知られているし、W-7<sup>93)</sup> も calmodulin 抑制剤とし

て合成されている。後述する環状ヌクレオチド (cyclic nucleotides) は Ca-calmodulin による MLC の磷酸化を MLCK の磷酸化によって抑制することが知られている<sup>57,58</sup>。このように細胞内における Ca の動態を介した myosin の磷酸化による収縮発生機構の抑制剤を日高弘義教授は細胞内 Ca 拮抗薬と呼んでいる<sup>87</sup>。

MLC の磷酸化と収縮の大きさと cross bridge の cycling rate との相関を観察してみると myosin の磷酸化説によると収縮の大きさは MLC の磷酸化と平行した関係にあるはずである。たしかにある範囲内では両者には相関があるが ACh によって発生した収縮の大きさは磷酸化と平行しない。また急速弛緩法 (quick release method) によって最大収縮速度から推定した cross bridge の cycling rate と収縮の大きさととは相関があるが磷酸化とは限られた範囲でしか関係はない (藤原, 伊藤, 窪田, J. Physiol. in press)。Fura-2 や quin 2 また aequorin を用いた細胞内 Ca 量の測定結果によると ACh による血管収縮の持続と自由 Ca 量とは平行しない。この現象は latch 現象とは異なる。すなわち latch 現象とは細胞内 Ca 量と磷酸化と cross bridge の cycling rate の減少または消失するにもかかわらず収縮を持続する機構であるが, ACh による収縮の持続は Ca 量の減少と平行した cross bridge cycling の著明な減少は認められない (未発表)。少くとも Ca 量に依存しない収縮増強または持続機構も存在することが考えられ, この機構と second messenger との関係も考察されている。しかし生理的条件下での収縮発生には Ca が必要であるが myosin の磷酸化のみでは血管平滑筋の収縮のすべてが説明出来ないことも事実であろう<sup>74</sup>。

## 5. 筋弛緩現象と second messengers

現在 second messenger として Ca-calmodulin 系 cyclic AMP-cyclic AMP 依存性タンパクキナーゼ (cAMP dependent protein kinase; A kinase), cyclic GMP-cyclic GMP 依存性タンパクキナーゼ (G-kinase), InsP<sub>3</sub>, 1,2-diacylglycerol (DG)-protein kinase C (C kinase) が知られている。このうち弛緩現象に関係するものは cyclic AMP と cyclic GMP を介した機構で一部では DG-Ckinase を介した機構も関係すると報告され

ている<sup>36</sup>。また収縮に関しては InsP<sub>3</sub> や DG-Ckinase を介した機構が関与する。Cyclic nucleotides の作用もタンパク質の磷酸化を介した反応である。cyclic AMP は  $\beta$ -受容器 ( $\beta$ -adrenoceptor), prostaglandin I<sub>2</sub> (prostaglandin, PGI<sub>2</sub>) や vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の受容器の活性化を介して ATP から産生される。cyclic AMP 産生に必要な adenylate cyclase の活性化は受容器-GTP 結合タンパク質-adenylate cyclase 系を介するものとされている。GTP 結合タンパク質 ( $\alpha$ ; 触媒サブユニット,  $\beta$  と  $\gamma$ ; 調節サブユニット) のうち adenylate cyclase を活性化するのは Ge (または Ne), そして抑制する系は Gi (または Ni) と呼ばれており, 両者の差は  $\alpha$  サブユニット ( $\alpha$ -catalytic subunit) の差であるとされている。前者はコレラ毒素によって抑制され後者は百日咳毒素 (pertussis toxin IAP) によって抑制される<sup>53,56,65,66</sup>。その結果前者によって cyclic AMP 産生は抑制され後者によって促進される。 $\alpha_2$ -adrenoceptor の活性化は Gi を活性化して cyclic AMP の産生を抑制するとされている<sup>65</sup>。cyclic AMP の産生とほぼ同様な機序で GTP から cyclic GMP が産生されるが, muscarinic receptor の活性化<sup>55</sup>, 内皮細胞依存性弛緩因子 (endothelium dependent relaxing factor; EDRF)<sup>25,26,70,71,94</sup>, 心房性 Na 利尿ペプチド受容器 (atrial natriuretic peptide; ANP)<sup>24,72</sup> の活性化によっても産生される。

cyclic AMP の A kinase を介した作用として細胞内自由 Ca 量の減少と収縮タンパク質の抑制による弛緩機構が報告されている<sup>3,4,52,75</sup>。細胞内自由 Ca 量の減少は形質膜と SR における Ca ポンプの促進機構 (Ca ATPase の活性化) による<sup>86</sup>。また, cyclic AMP の収縮タンパク質作用については MLCK の磷酸化によって Ca-calmodulin による MLC の磷酸化の抑制をもたらす。この機序に関しては近年疑問もなげかけられている<sup>42</sup>。cyclic AMP による自由 Ca 量の減少は蛍光色素を用いた測定法によってたしかめられている。

cyclic GMP の G kinase を介した作用には形質膜における Ca ポンプの促進と収縮タンパク質における Ca-calmodulin による MLC の磷酸化の抑制によると考えられ, SR における Ca ポンプ

の促進作用はないとされている<sup>45,46,86)</sup>。しかし cyclic GMP の産生と作用についてはまだ不明な点が多い。たとえば狭心症治療薬としての亜硝酸化合物 (nitroglycerin; isosorbide dinitrate, nitroprusside など)<sup>71)</sup> や先へのべた EDRF は細胞内で cyclic GMP を産生し<sup>71)</sup>, ANP ( $\alpha$ hANP) は形質膜で cyclic GMP を産生し<sup>72)</sup>, 前者は methyleneblue で抑制されるが後者は抑制されない。そこで guanylate cyclase の分布とその生理機能の制御機構についてさらに詳細な研究が必要であろう。

収縮を誘発する代表的な second messenger として  $\text{InsP}_3$  が存在する。 $\alpha_1$  や muscarinic 受容器その他多くの受容器が活性化によって phosphatidil inositol 4,5-bisphosphate ( $\text{PI-P}_2$ ) の加水分解により  $\text{InsP}_3$  と DG が産生される<sup>1,5,6,59,60,77)</sup>。この場合もフォスホオリパーゼ C (phospholipase C) の活性化には GTP 結合タンパク質の活性化をとまなう。この GTP 結合タンパク質は  $G_i$  に似た性質をもつという報告と<sup>66)</sup>, 異なるものであるという報告もある<sup>76,95)</sup>。産生された  $\text{InsP}_3$  は SR から Ca を放出する。そこで  $\text{InsP}_3$  の産生を抑制する機序は筋弛緩をもたらす<sup>33,81,85,101)</sup>。また protein kinase C は DG と phosphatidylserine (PS) の存在下で活性化されるが, DG が不安定のために癌誘発物質である phorbol ester を用いて研究が行なわれている<sup>10,44,88)</sup>。Phorbol ester の作用は多岐にわたっているが, 平滑筋では Ca の濃度と MLC の磷酸化を増加しないで収縮と cross bridge の cycling rate を増加させる<sup>38,73)</sup>。しかし phorbol ester は Ca によらない収縮 (Ca-independent contraction) には作用しない<sup>38)</sup>。また phorbol ester による収縮や cycling rate の増加は, protein kinase C の抑制薬である H-7<sup>35,36)</sup> で抑制される<sup>38)</sup>。ACh によって産生された DG によって活性化された protein kinase C は負の制御機構 (negative feedback control) として  $\text{InsP}_3$  の産生を抑制する (Itoh et al., J. Physiol. in press)。そこでこの抑制機構は ACh による受容器の不活性化 (inactivation) または脱感作機構 (desensitization) と関連した機序であろう。また, protein kinase C は F-actin の作用の抑制と共に MLC を磷酸化して収縮蛋白質を抑制し筋弛緩をもたらすことも報告

されている。

## 6. むすび

血管平滑筋の弛緩と関連して膜の電気現象, SR, 収縮タンパク質の性質そして second messenger の作用を簡単に紹介した。血管平滑筋の弛緩は直接的な作用または間接的なオータコイドや EDRF を介した作用によってももたらされる。従来薬理学の研究対象として agonist の受容器活性化に対するの抑制薬としての拮抗薬が種々研究され, その結果受容器の亜型の分類は著しく進歩した。今後は細胞内機序を調節または変調させる作用機序をもつ抗高血圧薬や抗狭心症薬が開発されることを希望する。

## 文 献

- 1) Abdel-Latif, A. A. (1986): Calcium-mobilizing receptors, polyphospho-inositides, and the generation of second messengers. *Pharmac. Rev.*, **38**: 227-272.
- 2) Bean, B. P., Sturek, M., Puga, A. and Herm-smeyer, K. (1986): Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: Modulation by dihydropyridine drugs. *Circ. Res.*, **59**: 229-235.
- 3) Beavo, J. A. and Murphy, M. C. (1982): Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. Ed. by Nathanson, J. A. and Kebabian, J. W. In *Handb. Exp. Pharmac., Cyclic Nucleotides, Part 1; Biochemistry*, **58**:363-392. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- 4) Adelstein, R. S. and Eisenberg, E. (1980): Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**:921-956.
- 5) Berridge, M. J. (1984): Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.*, **220**:345-360.
- 6) Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**:315-321.
- 7) Blaustein, M. P. (1977): The role of Na-Ca exchange in the regulation of tone in vascular smooth muscle. pp. 101-108. In: *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, ed. by R. Casteels, T. Godfraind and J. C. Rüegg. Amsterdam; Elsevier/North-Holland.
- 8) Bolton, T. B. (1979): Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, **59**:606-718.
- 9) Brading, A. F. (1981): Ionic distribution and mechanisms of transmembrane ion movements in smooth muscles. pp. 65-92, In *Smooth Muscle* Ed. E. Bülbring, A. F. Brading, A. W. Jones and T. Tomita. London, Arnold.
- 10) Castaga, M., Takagi, Y., Kaibuchi, K., Sano, K.,



- Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982): Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**:7847-7851.
- 11) Casteels, R. (1976): The relation between the membrane potential and the ion distribution in smooth muscle cells. In *Smooth Muscle*, pp. 70-90 ed. by E. Bülbbring, A. F. Brading. A. W. Jones and T. Tomita, Edward Arnold: London.
  - 12) Casteels, R., Goffin, J., Raeymaekers, L. and Wuytack, F. (1973): Calcium-pumping in the smooth muscle cells of taenia cole. *J. Physiol. (Lond.)*, **231**:19p.
  - 13) Cauvin, C., Loutzenhiser, R. and van Breemen, C. (1983): Mechanisms of calcium antagonist-induced vasodilation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**:373-396.
  - 14) Chacko S., Conti, M. A. and Adelstein, R. S. (1977): Effects of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and  $Ca^{2+}$  regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**:129-133.
  - 15) Chatterjee M. and Murphy R. A. (1983): Calcium-dependent stress maintenance without myosin phosphorylation in skinned smooth muscle. *Science* **221**:464-466.
  - 16) Codina, J., Yatani, A., Grenet, D. and Brown, A. M., (1987): The alpha subunit of the GTP binding protein GK opens atrial potassium channels. *Science* **236**:442-444.
  - 17) Conti, M. A. and Adelstein, R. S. (1981): The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **256**:3178-81.
  - 18) Devine, C. E., Somlyo, A. V. and Somlyo, A. P. (1972): Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.*, **52**:690-718.
  - 19) Endo, M. (1977): Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.*, **57**:71-108.
  - 20) Fay, F. S., Shlevin, H. H., Granger, V. C. and Taylor, S. R. (1979): Aequorin luminescence during activation of single smooth muscle cells. *Nature* **280**:506-508.
  - 21) Fabiato, A. (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, **245**:C1-C14.
  - 22) Fleckenstein, A. (1983): *Calcium Antagonism in Heart and Smooth Muscle*. Wiley, New York.
  - 23) Friedman, M. E., Suarez-Kurts, G., Kaczorowski, G. J., Katz, G. M. and Reuben, J. P. (1986): Two calcium currents in a smooth muscle cell line. *Am. J. Physiol.*, **250**:H699-703.
  - 24) Fujii, K., Ishimatsu, T. and Kuriyama, H. (1986): Vasodilation induced by  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide in rabbit and guinea-pig renal arteries. *J. Physiol. (Lond.)*, **377**:315-332.
  - 25) Furchgott, R. F. (1984): The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**:175-197.
  - 26) Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-376.
  - 27) Furukawa, K., Itoh, T., Kajiwara, M., Kitamura, K., Suzuki, H., Itoh, H. and Kuriyama, H. (1981): Vasodilating actions of 2-nicotinamido ethyl nitrate on porcine and guinea-pig coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**:248-259.
  - 28) Ganitkevich, V. Y. A., Shuba, M. F. and Smirnov, S. V. (1986): Potential dependent Ca current in a single isolated smooth muscle cell of the guinea-pig taenia caeci. *J. Physiol. (Lond.)*, **380**:1-16.
  - 29) Gerthoffer, W. T., Trevethick, M. A. and Murphy R. A. (1984): Myosin phosphorylation and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in relaxation of arterial smooth muscles by vasodilators. *Circ. Res.*, **54**:83-89.
  - 30) Godfraind, T. (1985): Pharmacology of calcium antagonists. pp.170-203, in *Calcium and Cell Physiology*, Ed. Marme, D. Sprüger-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
  - 31) Godfraind, T., Miller, R. and Wibo, M. (1986): Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmac. Rev.*, **38**:321-416.
  - 32) Hamilton, T. C., Wier, S. W. and Weston, A. H. (1986): Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **88**:103-111.
  - 33) Hashimoto, T., Hirata, M., Itoh, T., Kanmura, Y. and Kuriyama, H. (1986): Inositol 1,4,5-trisphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *J. Physiol. (Lond.)*, **370**:605-618.
  - 34) Inoue, T., Kanmura, Y., Fujisawa, K., Itoh, T. and Kuriyama, H. (1984): Effects of 2-nicotinamide ethyl nitrate (nicorandil; SG-75) and its derivatives on smooth muscle cells of the canine mesenteric artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**:793-802.
  - 35) Inagaki, M., Kawamoto, S. and Hidaka, H. (1984): Serotonin secretion from human platelets may be modified by  $Ca^{2+}$ -activated, phospholipid-dependent myosin phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **259**:14321-14323.
  - 36) Inagaki, M., Yokokura, H., Itoh, H., Kanmura, Y., Kuriyama, H. and Hidaka, H. (1987): Purified rabbit brain protein kinase C relaxes skinned vascular smooth muscle and phosphorylates myosin light chain., *Arch. Biochem. Biophys.* **254**:136-141.
  - 37) Itoh, T., Kajiwara, M., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1982): Roles of stored calcium on the mechanical response evoked in smooth muscle cells of the porcine coronary artery. *J. Physiol. (Lond.)*, **322**:107-125.
  - 38) Itoh, T., Kanmura, Y., Kuriyama, H. and

- Sumimoto, K. (1986): A phorbol ester has dual actions on the mechanical response in the rabbit mesenteric and porcine coronary arteries. *J. Physiol. (Lond.)*, **375**:515-534.
- 39) Itoh, T., Kanmura, Y., Kuriyama, H. and Suzuki, H. (1984): Nisoldipine-induced relaxation in intact and skinned smooth muscles of rabbit coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **83**:243-258.
- 40) Itoh, T., Kuriyama, H. and Suzuki, H. (1981): Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J. Physiol. (Lond.)*, **321**:513-535.
- 41) Itoh, T., Ueno, H. and Kuriyama, H. (1985): Calcium-induced calcium release mechanism in vascular smooth muscles—assessments based on contractions evoked in intact and saponin-treated skinned muscles. *Experientia*, **41**:989-996.
- 42) Kamm, K. E. and Stull, J. T. (1985): The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**:593-620.
- 43) Kanmura, Y., Itoh, T. and Kuriyama, H. (1984): Agonist actions of Bay K 8644, a dihydropyridine derivative, on the voltage dependent calcium influx in smooth muscle cells of the rabbit mesenteric artery. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **231**:717-723.
- 44) Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. and Nishizuka, Y. (1983): Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **258**:11442-11445.
- 45) Kukovetz, W. R., Halzmann, S., Wurm, A. and Poch, G. (1979): Evidence for cyclic-GMP mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, **310**:129-138.
- 46) Kuo, J. F. Shoji, M. (1982): Cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. In: Nathanson J. A. and Keabian J. W. (eds). *Cyclic Nucleotides, part I: Biochemistry*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **58**:393-424.
- 47) Kurachi, T., Nakajima, T. and Sugimoto, T. (1986): Role of intracellular  $Mg^{2+}$  in the activation of muscarinic  $K^+$  channel in cardiac atrial cell membrane. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **407**:572-574.
- 48) Kuriyama, H., Ito, Y., Suzuki, H., Kitamura, K. and Itoh, T. (1982): Factors modifying contraction-relaxation cycle in vascular smooth muscles. *Am. J. Physiol.*, **243**:H641-662.
- 49) Kuriyama, H., Osa, T., Ito, Y. and Suzuki, H. (1975): Excitation-contraction coupling mechanism in visceral smooth muscle. *Adv. Biophys.*, **8**:115-190.
- 50) Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J. and Clapham, D. E. (1987): The  $\beta$ -subunit of GTP binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  channel in heart. *Nature*, **325**:321-326.
- 51) Loirand, G., Pacaud, P., Mironneau, C. and Mironneau, J. (1986): Evidence for two distinct calcium channels in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **407**:566-568.
- 52) Meisheri, K. D. and Rüegg, J. C. (1983): Dependence of cyclic-AMP induced relation on  $Ca^{2+}$  and calmodulin in skinned smooth muscle of guinea pig taenia coli. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **399**:315-20.
- 53) Molski, T. F. P., Nacache, P. H., Massh, M. L., Kermodé, J., Buecher, E. L. and Shaafi, R. T. (1984): Pertussis toxin inhibits the rise in the intracellular concentrations of free calcium that is induced by chemotactic factors in rabbit neutrophils: Possible role of the "G proteins" in calcium mobilization. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **124**:644-650.
- 54) Morgan, J. P. & Morgan, K. G. (1982): Vascular smooth muscle: the first recorded  $Ca^{2+}$  transients. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **395**:75-77.
- 55) Murad, F. (1986): Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. Invest.*, **78**:1-5.
- 56) Nakamura, T., Ui, M. (1985): Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. *J. Biol. Chem.*, **260**:3584-3593.
- 57) Nishikawa, M., Hidaka, H. and Adelstein, R. S. (1983): Phosphorylation of smooth muscle heavy meromyosin by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. The effect of actin-activated Mg ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, **258**:14069-14072.
- 58) Nishikawa, M., Sellers, J. R., Adelstein, R. S. and Hidaka, H. (1984): Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of the smooth muscle heavy meromyosin by myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.*, **259**:8808-8814.
- 59) Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, **308**:693-698.
- 60) Nishizaka, Y. (1986): Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**:305-312.
- 61) Ohya, Y., Terada, K., Satoh, S., Fujiwara, T., Nagao, T., Komori, K., Nozaki, M., and Kuriyama, H. (1986): Action of calcium antagonism on smooth muscle cells of vascular tissues. Current knowledge and actions of Ca antagonists, pp. 81-94. In *Essential Hypertension. Calcium mechanism and treatment*. Ed. K. Aoki Springer-Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris.
- 62) Ohya, Y., Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1986): Membrane currents recorded from a fragment of rabbit intestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **251**:C335-C346.
- 63) Ohya, Y., Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987): D 600 blocks the  $Ca^{2+}$  channel from the outer surface of smooth muscle cell membrane of the rabbit intestine and portal vein.

- Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 408:80-82.
- 64) Ohya, Y., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987): Modulation of ionic currents in smooth muscle balls of the intestine by intracellularly perfused ATP and cyclic AMP. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 408:465-473.
- 65) Okajima, F. and Ui M. (1984): ADP-ribosylation of the specific membrane protein by islet-activating protein, pertussis toxin, associated with inhibition of a chemotactic peptide-induced arachidonate release in neutrophils: a possible role of the toxin substrate in  $Ca^{2+}$ -mobilizing biosignaling. J. Biol. Chem., 259:13863-13871.
- 66) Okajima, F., Katada, T. and Ui, M. (1985): Coupling of the guanine nucleotide regulatory protein to chemotactic peptide receptors in neutrophil membranes and its uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin. J. Biol. Chem., 260:6761-6768.
- 67) Parker, I., Ito, Y., Kuriyama, H. and Miledi, R. (1987):  $\beta$ -adrenergic agonists and cyclic AMP decrease intracellular resting free-calcium concentration in ileum smooth muscles. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 230:207-214.
- 68) Persechini, A., Kamm, K.E. and Stull, J. T. (1986): Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle. J. Biol. Chem., 261:6263-6299.
- 69) Pfeuffer, T. (1979): Guanine nucleotide-controlled interactions between components of adenylate cyclase. FEBS Lett., 101:85-89.
- 70) Rapoport, R. M., Drazini, M. B. and Murad, F. (1982): Sodium nitroprusside-induced protein phosphorylation in intact rat aorta is mimicked by 8-bromo cyclic GMP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:6470-6474.
- 71) Rapoport, R. M. and Murad, F. (1983a): Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle; Roles of cyclic GMP. J. Cyclic. Nucl. and Protein Phos. Res., 9:281-296.
- 72) Rapoport, R. M., Waldman, S. A., Schwartz, K., Winquist, R. J. and Murad, F. (1985): Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. Eur. J. Pharmacol., 115:219-229.
- 73) Rasmussen, H., Forden, J., Kojima, I. and Scriabine, A. (1984): TPA induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle. Biochem. Biophys. Res. Comm., 122:776-784.
- 74) Rüegg, J. C. (1986): Calcium in muscle activation—a comparative approach. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- 75) Rüegg, J. C., Sparrow, M. P. and Mrwa, U. (1981): Cyclic-AMP mediated relaxation of chemically skinned fibres of smooth muscle. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 390:198-201.
- 76) Sasaguri, T., Hirata, M., Itoh, T., Koga, T. and Kuriyama, H. (1986): Guanine nucleotide binding protein involved in muscarinic responses in the pig coronary artery is insensitive to islet-activating protein. Biochem. J., 239:567-574.
- 77) Sasaguri, T., Hirata, M. and Kuriyama, H. (1985): Dependent on  $Ca^{2+}$  of the activities of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase and inositol 1,4,5-trisphosphate phosphatase in smooth muscles of the porcine coronary artery. Biochem. J., 231:497-503.
- 78) Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. and Franckowiak, G. (1983): Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of  $Ca^{2+}$  channels. Nature, 303:535-537.
- 79) Silver, P. V., Holroyde, M. J., Solaro, R. J. and Disalvo, J. (1981):  $Ca^{2+}$ , calmodulin and cyclic AMP-dependent modulation of actin-myosin interactions in aorta. Biochim. Biophys. Acta., 674:65-70.
- 80) Sobieszek, A. (1977): Vertebrate smooth muscle myosin. Enzymatic and structural properties. In The Biochemistry of Smooth Muscle, ed. N. L. Stephens, pp. 413-43. Baltimore: Univ. Park.
- 81) Somlyo, A. V., Bond, M., Somlyo, A. P. and Scappa, A. (1985): Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:5231-5235.
- 82) Somlyo, A. V. and Somlyo, A. P. (1968): Electro mechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther., 159:129-159.
- 83) Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. and Shuman, H. (1978): Ca and Cl distribution in vascular smooth muscle electron probe analysis. Blood vessels, 15:213-214.
- 84) Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Shuman, H. and Garfield, R. E. (1976): Calcium compartments in vascular smooth muscle: electron probe analysis. In Ionic Action on Vascular Smooth Muscle, p. 17-20. Ed by E. Betz Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- 85) Suematsu, E., Hirata, M., Hashimoto, T. and Kuriyama, H. (1984a): Inositol 1,4,5-trisphosphate releases  $Ca^{2+}$  from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. Biochem. Biophys. Res. Comm., 120:481-485.
- 86) Suematsu, E., Hirata, M. and Kuriyama, H. (1984b): Effects of cAMP and cGMP-dependent protein kinase and calmodulin on  $Ca^{2+}$  uptake by highly purified sarcolemmal vesicles of vascular smooth muscles. Biochem. Biophys. Acta, 773:83-90.
- 87) Sumimoto, K. and Kuriyama, H. (1986): Mobilization of free  $Ca^{2+}$  measured during contraction-relaxation cycles in smooth muscle cells of the porcine coronary artery using quin 2. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 406:173-180.
- 88) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nisizuka, Y. (1979): Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent pro-



- tein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **91**:1218-1224.
- 89) Tanaka, T., Inagaki, M., Itoh, M. and Hidaka, H. (1985): Calmodulin antagonist and protein kinase C. In *Calmodulin Antagonists and Cellular Physiology*, Ed Hidaka, H. and Hartshorne, D. J. pp. 525-530 Academic Press. London.
- 90) Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987a): Blocking actions of  $Ca^{2+}$  antagonists on the  $Ca^{2+}$  channels in smooth muscle cell membrane of rabbit small intestine. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **408**:552-557.
- 91) Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987b) Different inhibition of the voltage-dependent  $K^+$  current by  $Ca^{2+}$  antagonists in the smooth muscles cell membrane of rabbit small intestine. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **408**:558-564.
- 92) Ueno, H., Sumimoto, K., Hashimoto, T., Hirata, M. and Kuriyama, H. (1987): Effects of procaine on pharmacomechanical coupling mechanisms activated by acetylcholine in smooth muscle of the porcine coronary artery. *Circ. Res.*, **60**:354-362.
- 93) Umekawa, H., Naka, M., Inagake, M. and Hidaka, H. (1985): Interaction of W-7, a calmodulin antagonist, with another  $Ca^{2+}$ -binding protein. In *Calmodulin Antagonists and Cellular Physiology*. Eds. Hidaka, H. and Hartshorne, D. J. Academic Press, London.
- 94) Vanhoutte, P. M., Rubanyi, G. M., Miller, J. M. and Houston, D. S. (1986): Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**:307-320.
- 95) Volpi, M., Naccache, P. H., Molsbi, T. F. P., Shetcyk, J. Huang, C. K., Marsk, M. L., Munoz, J., Becker, E. L. and Shaafi, R. I. (1985): Pertussis toxin inhibits f-Met-Leu-Phe but not phorbol ester stimulated changes in the rabbit neutrophils: role of G proteins in excitation response coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**:708-712.
- 96) Walsh, M. P. (1985): Calcium regulation of smooth muscle contraction. In *Calcium and Cell Physiology* Ed. D. Marme, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- 97) Weir, S. W. and Weston, A. H. (1986a): Effect of apamin on response to BRL 34915, nicorandil and other relaxants in the guinea-pig taenia caeci. *Br. J. Pharmac.*, **88**:113-120.
- 98) Wier, S. W. and Weston, A. H. (1986b): The effect of BRL 34915 and nicorandil on electrical and mechanical activity and on  $^{86}Rb$  efflux in rat blood vessels. *Br. J. Pharmac.*, **88**:121-128.
- 99) Williams, D. A., Fogarty, K. E., Tsien, R. Y. and Fay, F. S. (1985): Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature*, **318**:558-561.
- 100) Yamanaka, K., Furukawa, K. and Kitamura, K. (1985): The different mechanisms of action of nicorandil and adenosine triphosphate on potassium channels of circular smooth muscle of the guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, **331**:96-103.
- 101) Yamamoto, H. and van Breemen, C. (1985): Inositol-1,4,5-trisphosphate releases calcium from skinned cultured smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **130**:270-274.
- 102) Benham, C. D. and Tsien, R. W. (1987) A novel receptor-operated  $Ca^{2+}$ -per meable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*, **328**:275-278.