

エ ン ド セ リ ン

桜井 武* 柳沢正史*
後藤勝年* 真崎知生*

見逃されがちであった血管内皮細胞の機能に近年注目が集められている。1980年、アセチルコリンの血管弛緩作用が血管内皮由来血管弛緩因子(EDRF)に依存していることがFurchgottらによって示されて以来¹⁾、血管平滑筋トーンの調節においても内皮細胞が果たす役割が重視されている。現在ではアセチルコリンだけではなく、多くの化学的・物理的・生物学的刺激がEDRFの生成を促すと考えられている。最近Moncadaらが、EDRFの本体は一酸化窒素(nitric oxide)またはそれに近い亜硝酸化合物であり²⁾、内皮細胞においてL-arginineから生成される³⁾と報告している。つまり、古くから用いられてきた亜硝酸薬に対応する内因性物質とも言うべき物が血管内皮細胞で作られていたことになる。

一方、内皮細胞が血管収縮に果たす役割にも注目が集まり、1982年、Vanhoutteらによって血管内皮由来血管収縮因子(EDCF)の存在が示唆され⁴⁾、以後多くの研究者たちがEDCFに注目してきた。その結果、EDCFは単一の物質ではなく、プロスタノイド、フリーラジカル、ペプチドなど複数のものからなっていると考えられている⁵⁾⁻⁸⁾。1985年、Highsmithらはウシ大動脈内皮細胞培養上清中に血管収縮活性を見だし、その活性はペプチダーゼで処理すると消失すると報告した⁹⁾。O'Brienらも同様の実験により血管収縮活性を確認し、その活性の本体は分子量約3000 Daのポリペプチドであると推測した¹⁰⁾。

我々のグループは、これらの報告をもとに、ブタ大動脈内皮細胞培養上清から強力な血管収縮活性を持つペプチドを単離・精製し、その一次構造

およびcDNA構造を決定することに成功した¹¹⁾。「エンドセリン(Endothelin)」と命名されたこのペプチドは、循環器系の研究分野における一つのトピックスを提供している。その後エンドセリンは、少なくとも3種類の類似のペプチドからなるペプチドファミリーの一員であり¹⁵⁾、血管内皮のみならず、様々な組織において発現・機能している可能性が明らかとなってきた(後述)。本稿では、この新しい生理活性ペプチドについてこれまでに得られた知見の一端を紹介し、その作用と機能について簡単に述べる。

1. エンドセリン-1(ET-1)の構造

エンドセリンのはブタ大動脈内皮細胞を大量培養して得られた無血清培養上清から、ブタ冠動脈螺旋標本に対する収縮作用を指標として精製された。

濃縮・脱塩後、3段階のFLPC・HPLCを行ない、最終段階の逆相HPLCのピークの一つに収縮活性が認められた。気相エドマン法、ヒドラジン分解によるC末端解析によりアミノ酸21残基からなる全一次構造が決定された¹¹⁾。当初エンドセリンと命名されたこのペプチドは、後に多くの哺乳類で生産されると考えられる3種類の類似のペプチドのうちの一つであることが分かり¹⁵⁾、現在「エンドセリン-1(ET-1)」と呼ばれている。

図1に示すように、ET-1はアミノ酸21残基からなる分子量2492のポリペプチドであり、鎖内に2対のジスルフィド結合を有する。この構造は、下等動物の産生するある種のペプチド性の神経毒に類似性を持つ。特に、システイン残基の位置関係はハチ毒であるアパミンと完全に一致している¹¹⁾。これらの神経毒は、テトロドトキシン感受

*筑波大学基礎医学系薬理学教室

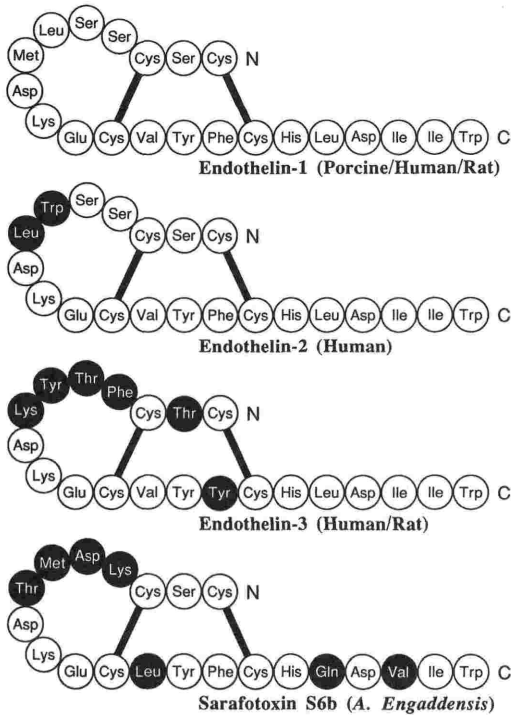


図1 エンドセリンファミリーとサラフトキシン S6b の構造。(注) ラット ET-1 は最近われわれによってクローニングされ、ヒトおよびブタと共通の構造を持っていることが確かめられた。

性 Na⁺ チャネル, Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネル等, 細胞膜上のイオンチャネルに作用するものである。このことは後述する ET-1 の作用機序を考える上で興味深い。さらに、最近、高崎らによって報告された、イスラエル産のアナヘビの一種、モールパイパーが産生するヘビ毒であるサラフトキシン S6^{12), 13)} は、アミノ酸21残基からなり4つのシステイン残基の位置関係も、ET-1 と全く同一であった。しかも、ET-1 の収縮活性に不可欠であるC末端の Trp²¹ も一致していた。サラフトキシン S6 には3つの分子種が確認されているが、うち S6b は21残基中14残基が ET-1 と相同であった (図1)。

このことから、哺乳動物の生理活性ペプチドである ET-1 とヘビ毒であるサラフトキシン S6 は同一の遺伝子から進化したものと考えられる。しかも、サラフトキシン S6 は ET-1 と同様に哺乳類の血管平滑筋を強力に収縮させ、逆に、ET-1 を大量に (4-6 nmol/kg) 投与すれば、

サラフトキシン S6 と同様に主に冠動脈攣縮による心筋虚血によって動物を死にいたらしめる。さらに、ラットの心筋細胞において、ET-1 とサラフトキシン S6 は同一の結合部位を共有することが明らかにされている¹⁴⁾。こうした事実は、ET-1 は生理的条件下では、その分泌状態が緻密に調節され、循環動態の制御などに役立っているが、こうした調節のみだれが生ずれば、“endogenous toxin” として、血管攣縮などの危険な病態をもたらしうることを物語っている。

2. エンドセリン・ファミリー

以上のように、ET-1 は毒ヘビの外分泌腺において産生されるある種のペプチドとホモロジーをもっているが、哺乳動物においては、それまでに知られていないペプチド類とも類似性が認められていない。しかし、ヒトのゲノム DNA ライブラリーから、ET-1 のアミノ酸配列に基づいた合成 DNA プローブによって、弱いハイブリダイゼーション条件のもとにエンドセリン関連の遺伝子をスクリーニングしたところ、3種類の類似のペプチドをコードする遺伝子が発見された。さらにサザンブロット分析により、ヒトのみではなくラットおよびブタにも3種の対応する遺伝子が確認された¹⁵⁾。

これらの遺伝子がコードするペプチドは、すべて4残基のシステインを同位置に含む21残基のアミノ酸配列を持ち、2組のジスルフィド結合による分子内ループを形成していると推定される。それぞれ“エンドセリン-1 (ET-1: 最初に構造が決定された血管内皮細胞由来のペプチド)”, “エンドセリン-2 (ET-2: ET-1 とアミノ酸2残基の相違をもつ)”, “エンドセリン-3 (ET-3: ET-1 とアミノ酸6残基の相違をもつ)”と命名された (図1)。化学合成された ET-2 及び ET-3 は、ET-1 と同様に in vitro において強い血管収縮活性をしめし、in vivo においては強かつ持続性の血圧上昇を示した。ただし、その効力には違いがあり、ET-2>ET-1>ET-3 となった¹⁵⁾。

以上のように、哺乳動物において“エンドセリン・ファミリー (ETs)” というべき3種類の類縁のペプチドが存在し、それぞれ異なる生理的機能を営んでいる可能性がある。しかしながら現在、

内皮細胞においては mRNA のレベルでも、ペプチドのレベルでも ET-1 のみが発現し、ET-2、ET-3 は発現していないことが確認されており、ETs がそれぞれどのような組織でどのような機能を果たしているのかということは今後の研究課題として残されている。

3. ET-1 前駆体の構造

クローニングされたブタ ET-1 cDNA の全配列の決定によって、203アミノ酸残基からなる ET-1 前駆体の一次構造が明らかにされた¹¹⁾ (図2)。N末端の約20残基はシグナルペプチドに相当する。

ET-1 は、図2に示すように、プロセシングにより、39残基の big ET-1 を経て生成されると考えられる。ET-1 のプロセシング部位のアミノ酸配列は極めて特徴的である。N末端のプロセシング部位には一般のペプチドにみられるような、dibasic な配列を持つが、C末端側のプロセシング部位には塩基性アミノ酸が見られない。つまり、big ET-1 から ET-1 に変換される過程においては dibasic pair を持たない部位 (Trp²¹ と Val²²の間) で切断が行われることになる。このような例はレニンによるアンギオテンシノーゲンの切断部位 (Leu-Val) などにきわめて例外的に認められる

のみである。しかも、big ET-1 は ET-1 にくらべ100分の1以下の効力 (ブタ冠動脈収縮活性) しか持たない。このことは、big ET-1 から ET-1 への変換が ET-1 の活性化にとって本質的なものであり、従って、活性の調節という点で重大な意味を持ちうることを示している。ブタ大動脈内皮細胞培養上清の分析によれば、上清中には微量の big ET-1[1-39] の他に ET-1[1-21] と big ET-1[22-39] がほぼ等量含まれている。このことは big ET-1 から ET-1 への変換が endoproteolytic な反応によって引き起こされていることを示している。この変換を行うキモトリプシン様の活性を持つ酵素 “ET 変換酵素 : ET-converting enzyme” は、あたかもアンギオテンシン変換酵素がレニン-アンギオテンシン系にとって重要な意義を持つように、ET-1 の機能発現及び調節に本質的な役割をしていると考えられる。なお、ET-2、ET-3 も ET-1 と同様に “bigform” から変換されると推定される¹⁵⁾。

4. ET-1 の薬理活性

ET-1 は、血管内皮細胞由来の血管収縮ペプチドとして単離・同定されたわけだが、以下に述べるように様々な薬理活性を有し、生体内においても様々な組織において発現し、多彩な生理的機能を有する可能性を持つことが明らかになってきている。実際に [I-125]ET-1 はラットにおいて心・血管系だけではなく、腸管、肺、腎、副腎 (特に髄質)、脳などに特異的な結合部位を持つことが明らかにされている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。

a) 血管平滑筋の収縮

ET-1 は in vitro において血管平滑筋標本に対し強力かつ持続性の収縮活性をしめす¹¹⁾。ET-1 による血管収縮反応は、その立ち上がりが遅く、極めて持続的で洗い流しにくい。また現在までに知られている他のどの血管収縮物質よりも低濃度で、ヒトを含めてほぼ全ての哺乳類の、ほとんど全ての種類の血管を強力に収縮させる。この様に非常に普遍的な収縮作用は他に類を見ない。

図3 a にブタ冠動脈の螺旋標本に対する ET-1 及び他の血管収縮性物質の収縮作用を示す。縦軸は K⁺ による最大拘縮を100%として各収縮反応 (張力) を示したものである。ET-1 は 10⁻¹¹ M から 10⁻⁸ M の範囲で濃度依存性に収縮を示し、

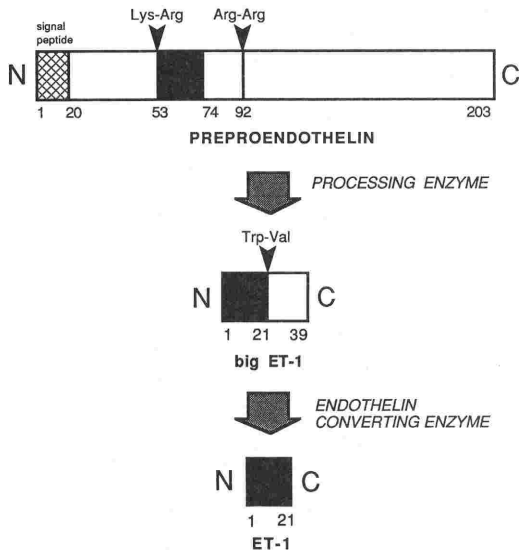


図2 ET-1 前駆体のプロセシング。Lys-Arg および Arg-Arg の切断は一般的なプロセシング酵素によって行われる。Trp-Val の切断にエンドセリン変換酵素の関与が想定される。

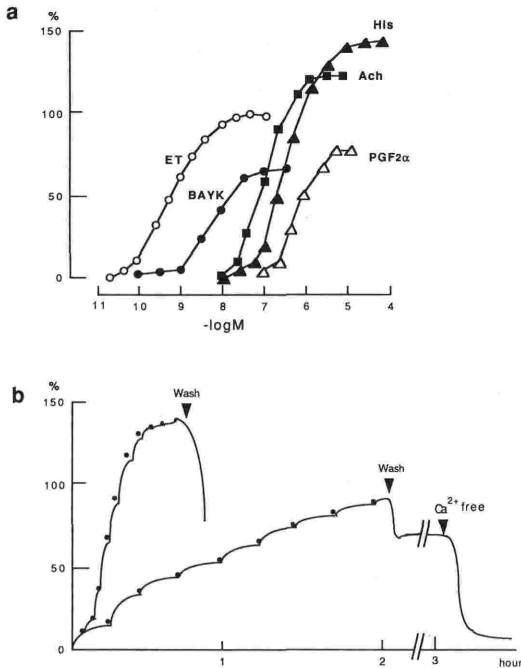


図3 a) プタ冠動脈螺旋標本に対する ET-1 および他の血管収縮性物質の収縮作用。
 b) プタ冠動脈における ET-1 の収縮様式をアセチルコリン (Ach) のそれと比較する。ET-1 による収縮はきわめて持続的であり、洗い流されにくい。しかし、外液を Ca^{2+} に置換すると収縮は低下する。

その EC_{50} は 5.2×10^{-10} M である。他の物質の EC_{50} は BAYK8644: 4.9×10^{-9} M, Ach 9.7×10^{-8} M, ヒスタミン: 3.1×10^{-7} M, プロスタグランジン $\text{F2}\alpha$: 6.8×10^{-7} M であるから、血管収縮における ET-1 の効力がいかに強力であるか理解できるであろう。

ET-1 の収縮活性は、 α 遮断薬、 β 遮断薬、 H_1 遮断薬、 5HT_1 遮断薬、ムスカリン様作用遮断薬といった既知の受容体遮断薬によって何等の影響も受けず、サイクロオキシゲナーゼ阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤の影響も受けなかった。また、血管内皮細胞の有無によっても影響を受けなかった¹¹⁾。つまり ET-1 は血管平滑筋に直接作用していると考えられる。

b) 血圧上昇作用

0.1–3 nmol/kg の ET-1 を動物にボーラス静注すると、一過性 (0.5–2 分) に血圧が低下し、その後持続的な強い血圧上昇がもたらされる¹¹⁾。この反応は、麻酔したラット、自律神経を遮断し

たラットでも同様に認められる。一過性の降圧をもたらずメカニズムの詳細は不明であるが、ET-1 が内皮細胞に働き、EDRF の放出を促進する¹⁹⁾ ことが関与しているのかも知れない。また、ラットをインドメサシンで前処置しておく、ET-1 の昇圧活性は増強するが、そのメカニズムの一部はプロスタサイクリンの生成阻害が関与するものと思われる。

一過性の降圧に続いてみられる、立ち上がりが遅く、きわめて持続性の血圧上昇は、全ての血管床の強い収縮を伴っている。この持続性は ET-1 の昇圧活性の著しい特徴であり、2 nmol/kg の 1 回静注後正常血圧にもどるまでに 2–3 時を要する。

c) 血管平滑筋以外の平滑筋に対する収縮作用

ET-1 は腸管、気管、気管支、子宮など血管平滑筋以外の平滑筋をも収縮させる^{19)–21)}。たとえば 10^{-11} – 10^{-8} M の ET-1 は、容量依存性にモルモット及びヒトの気管支平滑筋を強力かつ持続的に収縮させる²¹⁾。またこの作用はニカルジピンによって一部抑制される。

d) 心筋に対する陽性変力作用と陽性変時作用

ET-1 は、モルモットの心房標本に対し、陽性変力作用²²⁾ および陽性変時作用を示す²³⁾ ことが報告されている。

e) 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の分泌促進作用

ET-1 は、心房細胞に働き、ANP の分泌を促進する²⁴⁾。この作用は TPA (tetradecanoyl phorbol ester) によって増強され、ニカルジピンによって抑制される。

f) 腎に対する作用 (血管外作用)

ET-1 によるレニン放出の抑制²⁵⁾、集合尿管におけるウワバイン感受性 Na^+/K^+ ATPase の抑制²⁶⁾ が報告されている。

g) 増殖因子としての作用

ET-1 による血管平滑筋、メサンギウム細胞、線維芽細胞に対する増殖促進活性が報告されている^{27), 28)}。

h) 中枢神経系に対する作用

ET-1 は脊髄後角のニューロンにおいて substance P の放出を促進する²⁹⁾。また、ET-1 をラット側脳室内に投与すると交感神経系の緊張の上昇を伴った血圧上昇がもたらされる。

ごく最近、ブタ脊髄・脳ホモジネートから、ET-1 および少量の ET-3 が単離・同定された(新見 et al. 投稿中)。また、ET-1 の結合部位は中枢神経系において広く見いだされている。これらの事実は、ETs がニューロペプチドとして、neurotransmitter, あるいは neuroregulator の役割を果たしている可能性を提示する。

i) 副腎細胞における内分泌作用

交感神経末端³⁰⁾・副腎髄質³¹⁾においてカテコラミン分泌に影響を与える。また副腎皮質球状層のアルドステロン分泌を促進する³²⁾。

5. ET-1 の作用機序

ET-1 による血管収縮反応はその立ち上がりが遅く、きわめて持続的で洗い流されにくい(図3b)。この時間的経過は、ACh (ムスカリン様作用)に代表される IP₃ を介した細胞内 Ca²⁺ の動員により収縮をひきおこす物質によるものとは全く異なっている様に見える。また ET-1 による収縮反応は外液 Ca²⁺ に強く依存しており、またこの反応は低濃度の Ca²⁺ 拮抗薬により効率よく抑制される。このことは、ET-1 の作用が平滑筋のジヒドロピリジン (DHP) 感受性の電位依存性 Ca²⁺ チャネルの活性化を介していることを示唆する³³⁾。実際に ET-1 は単離ブタ冠動脈平滑筋細胞において DHP 感受性 Ca²⁺ チャネルを介する Ca²⁺ influx を著明に上昇させる³⁴⁾。ET-1 は前述の通り、多彩な機能を有するが、この電位依存性 Ca²⁺ チャネルを介するメカニズムによって、多くのシステムにおける作用が一応説明可能である。事実、ET-1 の持つ多彩な活性の多くはニカルジピン等のカルシウム拮抗薬によって効率よく抑制される。

最近 ET-1 のレセプターがニワトリヒナの心筋細胞膜より可溶化された³⁵⁾。しかし ¹²⁵I-ET-1 の結合部位は、DHP の誘導体である ³H-PN200-110 の結合部位とは区別された。また、¹²⁵I-ET-1 の結合部位は DHP 感受性 Ca²⁺ チャネルを認識するモノクローナル抗体によって認識されない。この事実は、ET-1 レセプターは、Ca²⁺ チャネルと密接に関係しているにしても、DHP 感受性 Ca²⁺ チャネルそのものではないことを示している。ET-1 レセプターと Ca²⁺ チャネルがどのように couple しているかは、今後の

重要な研究課題のひとつである。また最近、ET-1 レセプターに少なくとも2つのサブタイプが存在し、一方は ET-1, ET-2 に、もう一方は ET-3 により親和性が高いことが証明された³⁶⁾。

一方、ET-1 は血管平滑筋細胞^{37), 38)}、線維芽細胞²⁸⁾において、おそらくは IAP 非感受性G蛋白質を介してフォスホリパーゼ C (PL-C) を活性化する。この事実は、ET-1 が、(1)DHP 感受性、電位依存性 Ca²⁺ チャネルの活性化による細胞外 Ca²⁺ の流入促進、(2)PL-C の活性化に基づく PI (phosphoinositide) 代謝回転の促進を介した細胞内 Ca²⁺ の動員、という2つの系を介して標的細胞の [Ca²⁺]_i を上昇させるということを示している。

さらに、血管平滑筋細胞においてプロテインキナーゼC阻害剤 H-7 は、ET-1 による血管収縮反応を低下させるため³⁹⁾、プロテインキナーゼCも ET-1 による血管収縮作用になんらかの役割を果たしていると考えられる。プロテインキナーゼCの活性化は、また、ET-1 の増殖因子としての機能にも密接に関係している²⁸⁾。

以上の関連を模式的に図4に示す。

6. ET-1 の構造-活性相関

ET-1 は、分子内に2対のジスルフィド結合 (Cys¹-Cys¹⁵, Cys³-Cys¹¹) を持ち、それらによって分子内ループが形成されている。これらのジスルフィド結合、あるいはループ構造を切断すると、ET-1 の血管収縮における効力は著明に低下する⁴⁰⁾。例えば、4つのジステイン残基の還元、アルキル化は、ET-1 の効力を100分の1以下に低下させる。とくに Cys¹-Cys¹⁵ の結合は重要であり、Cys¹, Cys¹⁵ を Ala に置換すると、効力は100分の1以下に低下する。(これに対し、Cys³ および Cys¹¹ の Ala による置換は効力を10-20分の1に低下させる。)

また、ET-1 のC末端の Trp²¹ を取り去ると、効力は1000分の1以下に激減する。さらにC末端のアミノ酸残基を順次取り除くことにより、その効力はさらに低下していく⁴⁰⁾。逆に big ET-1[1-31] および big ET-1[1-25] は、その効力において ET-1[1-21] の100~140分の1及び50分の1であった^{41), 42)}。

以上の観察により、分子内ループを形成するジ

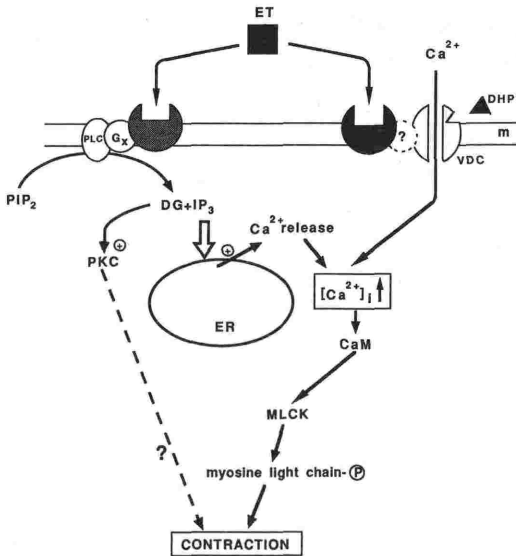


図4 ET(s)による血管平滑筋の収縮機構を模式的に示す。

PLC:ホスホリパーゼC, Gx:Gタンパク質, VDC:L型膜電位依存性カルシウムチャネル, DHP:ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬, ER:小胞体, m:細胞膜, MLCK:ミオシン軽鎖キナーゼ, CaM:カルモジュリン

スルフィド結合, C末端の Trp²¹, および21残基というペプチドの長さが ET-1 の生理活性発現(レセプターとの親和性)に重要に関与していることがわかる。

7. ET-1 の分泌調節

前述のように prepro ET-1 はシグナルペプチドを持ち(図2), 通常分泌ペプチドと同様に, 粗面小胞体からゴルジ装置へ輸送され, exocytosis によって分泌されると考えられる。しかし血管内皮細胞は電顕上, ほとんど分泌顆粒を持っていない。このことは, ET-1 が(他のペプチドのように)分泌顆粒に貯蔵され, 刺激に応じて放出されるものではなく, 一たん合成された ET-1 は constitutive に分泌されることを示唆する。おそらく ET-1 は mRNA 転写のレベルにおいて, その分泌がコントロールされていると考えられる。実際, ET-1 の mRNA は, 様々な化学的ならびに物理的的刺激によって誘導される。一例をあげればトロンビン¹¹⁾, transforming growth factor β (TGF- β)⁴³⁾, アンジオテンシン-2⁴⁴⁾, アル

ギニンバソプレッシン⁴⁴⁾などの化学的刺激および血管内皮へのズリ応力などの機械的刺激である。これらの化学的刺激は(TGF- β をのぞき)PI代謝回転促進系を介して血管内皮細胞内のCa²⁺濃度を上昇させる。また, 血管内皮細胞へのズリ応力も, 細胞内へのCa²⁺流入促進及び細胞内Ca²⁺ストアの動員を介して血管内皮細胞内のCa²⁺濃度を上昇させる。つまり, ET-1のmRNA誘導には, 内皮細胞内のCa²⁺濃度およびプロテインキナーゼCの活性化が重要に関与していると考えられる。実際にCa²⁺イオノフォアやphorbol ester^{44), 45)}は, 血管内皮細胞に働き, ET-1 mRNAのレベルを上昇させる。また, ET-1 mRNAの細胞内における寿命はきわめて短く, 転写阻害剤であるアクチノマイシンDを用いた実験によると, 半減期は約15分に過ぎない⁴⁵⁾。(同じ血管内皮細胞における β -アクチンmRNAの半減期は10~20時間である。)ヒト, ブタのET-1 mRNAは, ともに3'側の非翻訳部位にいくつかの“AUUUA”配列を持っているが, この配列は, サイトカイン, 増殖因子, あるいは, proto-oncogeneのmRNAにしばしば見いだされる。これらの物質のmRNAの寿命は, 共通して短く, この“AUUUA”配列がmRNAの選択的な分解に関与していると考えられる。

8. まとめ: ETsの生理的・病理的役割はなにか?

以上のように ETs は, 心・血管系のみではなく, 様々な組織において薬理活性を持っている。このことは, ETs が循環動態の制御をはじめ, 他の多くのシステムにおいても生理的な役割を果たしている可能性を提示する。

しかしながら, 現在のところ血管収縮反応を含め, 生理的反応および病理的状态として, ETs が関与するという明確な証拠がつかまれているものはない。

しかし, エンドセリンファミリーが持つ特徴的な性質は, 例えば, 血流の局所的な制御並びに全身的制御(特に長いタイムスケールでの調節), あるいは創傷の治癒過程や炎症部位における関与を想起させるし, 本体性高血圧, 異型狭心症, くも膜下出血後の脳血管攣縮, 急性腎不全, Raynaud 症状など様々な病態への関連を連想さ

せる。とくにクモ膜下出血では、イヌのモデルにおいて、mRNA 合成阻害剤であるアクチノマイシンDが delayed onset vasospasm を完全に抑制するという結果が得られており⁴⁶⁾、その作用機序に ET-1 mRNA の合成抑制が関与しているかも知れない。

生理的にも、局所的な血流動態のコントロールはもとより、ANP, レニン, カテコラミン, アルドステロン等の分泌制御を通じて全身的な調節機構とも密接に関連し、ET-1 自身も全身的な循環動態の制御にかかわっている可能性があるろう。

近い将来、様々な生理的・病理的状态に、ETs が果たす役割が具体的に把握されることを期待したい。

文 献

- 1) Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smoothmuscle by acetyl cholin. *Nature*, **288**:373, 1980.
- 2) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S.: Nitric oxide release for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**:524-526, 1987.
- 3) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. & Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize Nitric oxide from L-arginin. *Nature*, **333**:664-666, 1988.
- 4) Demay, J. G. & Vanhoutte, P. M.: Heterogenous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ. Res.*, **51**: 439-447, 1982.
- 5) Rubani, G. M. & Katusic, Z. S.: Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J. physiol.*, **364**:45-56.
- 6) Vanhoutte, P. M. & Katusic, Z. S.: Endotheliumderived contracting factor: Endothelin and/or superoxide anion?, *Trends Pharmacol. Sci.* **9**:229-230, 1988.
- 7) Shirahase, H., Usui, H., Kurahashi, K., et al.: Possible role of endothelial thromboxane A₂ in the resting tone and contracting responses to acetylcholine in canine cerebral arteries. *J. cardio. Pharmacol.* **10**:517-522, 1987.
- 8) Gillespie, M. N., Owasoyo, J. O., McMurtry, I. F., et al.: Sustained coronary vasoconstriction provided by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Thr.* **236**:339-343, 1986.
- 9) Hickey, K. A., Rubani, G. M., Paul, R. J., et al.: Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by vascular endothelial cells., *Am. J. Physiol.* **248**:C550-556, 1985.
- 10) O'Brien, R. F., Robbins, R. J. & McMurtry, I. F.: Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *Am. J. Physiol.* **132**:

- 263-270, 1987.
- 11) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., et al.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**:411, 1988.
- 12) Takasaki, C., Yanagisawa, M., Kimura, S. et al.: Similarity of endothelin to snake venom toxin. *Nature*, **335**:303, 1988.
- 13) Kloog, Y., Ambar, I., Sokolovsky, M., et al.: Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, **242**:268-270, 1988.
- 14) Gu, X. H., Casley, D. J., and Nayler, W. G.: Sarafotoxine S6b displaces specifically bound [¹²⁵I]-endothelin. *Eur. J. Pharmacol.*, **162**, 1989.
- 15) Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., et al.: The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:2863-2867, 1989.
- 16) Jones, C. R., Hiley, C. R., Pelton, J. T., et al.: Autoradiographic visualization of the binding sites for [¹²⁵I]endothelin. *Neurosci. Lett.*, **97**, 276-279, 1989.
- 17) Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., et al.: Autoradiographic distribution of binding sites for [¹²⁵I]-endothelin in rat tissues. *Am. J. Physiol.*, **265**, 4:R858-R866, 1989.
- 18) Stash, J. P., Steinke, W., Kazda, S., et al.: Autoradiographic localization of [¹²⁵I]-Endothelin in rat tissues. *Arzneim. Forsh.* **39**:59-61, 1989.
- 19) de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., et al.: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:9797-9800, 1988.
- 20) Kozuka, M., Ito, T., Hirose, S., et al.: Endohelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, **159**: 317-323, 1989.
- 21) Uchida, Y., Ninomiya, H., Saotome, M. et al.: Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, a potent bronchoconstrictor. *Eur. J. Pharmacol.* **154**: 227-228, 1988.
- 22) Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., et al.: Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.*, **255**:H970-H973, 1988.
- 23) Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., et al.: Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* **413**:108-110, 1988.
- 24) Fukuda, Y., Hirata, Y., Yoshimi, H., et al.: Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**:162-172, 1988.

- 25) Rakugi, H., Nakamaru, M., Saito, H., et al.: Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**:1244-1247, 1988.
- 26) Zeidel, M. L., Kone, B., Brady, H., et al.: *J. Vasc. Med. Biol.* **1**, 126-126 (abst.)
- 27) Komura, I., Yoshizumi, M., Kurihara, H.: Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **238**:249-252, 1988.
- 28) Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., et al.: A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turn over in Swiss 3T3 fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, in press, 1989.
- 29) Yoshizawa, T., Kimura, S., Kanazawa, I., et al.: Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurons: Possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. *Neurosci. Lett.* in press, 1989.
- 30) Wiklund, N. P., Ohlen, A., and Cederqvist, B.: Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in the guinea-pig femoral artery. *Acta. Physiol. Scand.* **134**, 311-312, 1989.
- 31) Boarder, M. R. and Mariott, D. B.: Stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13(suppl. 5)**: S223-224, 1989.
- 32) Cozza, E. N., Gomez-Sanchez, C. E., et al.: Endothelin binding to cultured calf adrenal zone glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.* in press, 1989.
- 33) Kasuya, Y., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., et al.: Mechanism of contraction to endothelin in the isolated porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.*, in press.
- 34) Goto, K., Kasuya, Y., Matsuki, N., et al.: Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, in press, 1989.
- 35) Myazaki, H., Kondoh, M., Watanabe, H., et al.: Affinity labelling of endothelin receptor and Characterization of solubilized endothelin-endothelin receptor complex. *J. Biol. Chem.*, in press, 1989.
- 36) Watanabe, H., Miyazaki, H., Kondoh, M., et al.: Two distinct types of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press, 1989.
- 37) Resnik, T. J., Scott-Burden, T., and Buhler, F. R.: Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **157**:1360-1368, 1988.
- 38) Rubany, G. M., Patterson, K., and Pang, D. C.: Endothelin induces phosphatidyl inositol (PI) hydrolysis and calcium uptake in canine coronary artery. *FASEB J.* **3**, A235-A235, 1989.
- 39) Sugiura, M., Inagami, T., Hare, G. M. T., et al.: Endothelin action: Inhibition by a protein kinase C inhibitor and involvement of phosphoinositols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**:186-192, 1989.
- 40) Kimura, S., Kasuya, Y., Sawamura, K., et al.: Structure-activity relationship of endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**: 1182-1186, 1989.
- 41) Kashiwabara, T., et al.: Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity in vitro but a potent pressor effect in vivo. *FEBS Lett.*, **247**:73-76, 1989.
- 42) Kimura, S., Kasuya, Y., Sawamura, T., et al.: Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: Structure-activity relationships of big endothelin-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13(suppl. 5)**:S5-S7, 1989.
- 43) Kurihara, H., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 1989.
- 44) Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., et al.: Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 1:93-100, 1989.
- 45) Yanagisawa, M., Inoue, A., Takuwa, Y., et al.: The human preproendothelin-1 gene: possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13(suppl. 5)**:S13-S17, 1989.
- 46) Shigeno, T.: personal communication.