

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価

所属 国立小児医療研究センター

研究者 辻本 豪三

分担研究者

橋本 敬太郎	山梨医科大学・薬理学講座
高垣 和史	日本新薬株式会社・東部創薬研究所・分子生物学
生垣 一郎	旭化成工業株式会社・ライフサイエンス総合研究所・開発薬理研究所
赤羽 増夫	キッセイ薬品工業株式会社・中央研究所
伊藤 修司	大塚製薬株式会社・創薬研究部・徳島新薬研究所
中山 靖久	株式会社資生堂 ライフサイエンス研究所
山野 重幸	キリンビール株式会社・基盤技術研究所

遺伝子改変動物を用いた各G蛋白質共役型受容体の個体レベルでの機能評価の目的で、バゾプレッシン受容体や $\alpha 1$ アドレナリン受容体をモデル系として用い、ジーンターゲット法による遺伝子改変動物の作成およびトランスジェニックマウスの作製を行った。

1. 研究目的

近年、G蛋白質共役型受容体が多数クローニングされ、それぞれの受容体には従来の薬理特性からは予測できなかった新しいサブタイプが発見され、サブタイプ特異的薬物による機能評価が行われつつある。また更に、遺伝子改変動物を用い、各サブタイプ受容体の個体レベルでの機能評価が可能となり、現在受容体機能はこの新しい観点から考え直されようとしている。このような背景のもと、G蛋白質共役型受容体の代表であり、複数のサブタイプが存在することが知られてきているバゾプレッシン受容体や $\alpha 1$ アドレナリン受容体をモデル系として用い、遺伝子改変動物（ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス）による各受容体の個体レベルでの機能評価と新規開発薬物の個体レベルでの薬効評価を行う。

本課題では、各受容体のうち特に生理機能が明らかになっていない $\alpha 1D$ アドレナリン受容体、V1a,V1bバゾプレッシン受容体について、マウス未分化胚細胞を用いたジーンターゲット法およびトランスジェニック技術を用いて遺伝子改変マウスの作成を行い、この変異動物を解析し、受容体の生理機能、薬物の選択性を明らかにする。

2. 研究方法

I. ノックアウトマウスの作製

1-1. マウス $\alpha 1d$ -AR遺伝子のクローニング

ラット $\alpha 1d$ -ARcDNAをプローブにしてマウスゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。得られたクローンより制限酵素地図を作製した。

1-2. ターゲティングベクターの作製

ターゲティングベクターは α 1d-AR の第一エクソンの一部をネオマイシン耐性遺伝子 (Neo 遺伝子) に置き換え、さらにジフテリア毒素遺伝子 (DT) を negative selection マーカーとして用いた。

1-3. ES 細胞のスクリーニング

上記ターゲティングベクターを用いて ES 細胞に遺伝子導入を行い G418 にて薬剤耐性クローンのスクリーニング並びに PCR 法およびサザンブロット法にて組み換えたいのスクリーニングを行った。

1-4. キメラ、ヘテロ、ホモマウスの作製

正確に組み換えを起こしている ES 細胞をもちいて Blastocyte Injection をおこないキメラマウスの作製を行った。さらにキメラマウスを用いてヘテロ、ホモマウスの作製をおこなった。

II. マウスの解析

2-1. 遺伝子型の解析

生後 4 週目に Tail DNA の解析を PCR、サザンブロット法にて行った。

2-2. α 1 D -AR 遺伝子発現量の解析

2-2-1. RT-PCR

組織より RNA を抽出し、cDNA に変換後 PCR を行った。PCR 後、アガロースゲルにて電気エイドウを行い確認した。さらに、フィルターにプロテイングを行い、 α 1a-AR、 α 1b-AR、 α 1d-AR cDNA にてサザンブロット解析を行った。

2-2-2. TaqMan

脳組織より RNA を抽出し cDNA に変換後、PE バイオシステムの 7700、TaqMan システムを用いて α 1a-AR、 α 1b-AR、 α 1d-AR mRNA の発現量を定量した。

2-2-3. In situ ハイブリダイゼーション

α 1d-AR cDNA よりラジオアイソトープを用いて RNA プローブを作製し、組織切片を用いてハイブリダイゼーションを行った。

2-3. α 1-AR 受容体蛋白の薬理的解析

[¹²⁵I- HEAT] による α 1 受容体結合実験

α 1 アドレナリン受容体各サブタイプを発現する CHO 細胞およびマウス組織を用いた α 1 受容体結合実験は、細胞および組織より細胞膜を調整しそれを用いて行った。細胞膜は、培養細胞およびミンチした組織を氷冷した緩衝液 A (250mM サッカロース、5mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、pH7.4) にてホモジナイズした。これを 1000x g にて 4°C 10 分間遠心し細胞核を取り除いた後、35000xg にて 4°C 20 分間遠心し、ペレットを 50% グリセロールを含む緩衝液 B (50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、10mM MEGTA、pH7.4) にホモジナイズして、使用時まで -80°C にて保存した。細胞膜の蛋白濃度は BSA を標準品として BCA 蛋白アッセイキットを用いて測定した。[¹²⁵I- HEAT] を用いたラジオリガンド受容体結合実験は、0.2ml の細胞膜標本に対して、[¹²⁵I- HEAT] を含む緩衝液 B を最終 0.25ml になるように加え、25°C 60 分間拮抗薬の存在下または非存在下でインキュベーションを行った。反応は氷冷した緩衝液 B を大量に加えて停止させ、Brandel cell harvester (Model- 30) を用いてガラス繊維フィルター (Whatmann GF/C) に吸着させた。フィルターを回収して吸着した標識リガンドの放射線活性を測定した。測定は 1 点につき 2 本行った。[¹²⁵I- HEAT] は 0.5nM の濃度を使用した。非特異的結合は α 受容体拮抗薬であるフェントラミン 10⁻⁹M により定量し、特異的結合は全結合量から非特異的結合量を引いて計算した。実験結果は、非線形最小二乗法に基づく LIGAND プログラム (BIOSOFT) を用いてコンピューターにより解析した。

競合的結合実験には、拮抗剤としてプラゾシン、KMD 3213、BMY7378 を用いて行った。

2-4. 大動脈収縮反応

1) 大動脈標本の作製

マウスをPentobarbital sodium (50mg/kg, i.p.) で麻酔し、心臓を摘出した後、胸部大動脈を摘出した。Krebs - Henseleit緩衝液の中で摘出した血管に寸着している脂肪および結合組織を除去した。大動脈を0.8～1.0mmの長さに切断してリング状にし、これを開いて切片標本とした。これらの標本を95%O₂ + 5%CO₂混合ガス通気下37℃に保温した10ml Krebs - Henseleit緩衝液を含むマグナス管内に懸垂固定した。血管の等尺性張力変化はFDピックアップ (TB - 612T、日本光電工株式会社) を介してひずみアンプ (AP - 621G、日本光電工株式会社) で検出し、マルチペンレコーダー (理化電気) に記録した。血管標本に0.5gの静止張力を負荷し、各標本を約1時間安定化 (その間、約15分毎にKrebs - Henseleit緩衝液を交換) させた後、薬物投与を開始した。予試験より、40mMKClによる収縮反応を指標に至適静止張力 (1.1-1.0g) を調べたところ、ddy系マウス大動脈標本では1.5gで最大反応が得られたため、以後の実験ではこの条件を用いた。

2) 大動脈標本の等尺性張力変化の測定

3MKCl 125 μ Lを反応容器内に添加し低KCl最終濃度40mM)、標本を10分間収縮させ、その後緩衝液を4～5回交換して標本を洗浄した。これを2度行った後、次にノルエピネフリン (NE、0.1 μ M最終濃度) を反応容器内に、添加し標本を10分間収縮させた。洗浄後、再度NE 0.1 μ Mを反応容器内に添加し収縮させた。この時のNE収縮が安定したところで、内皮細胞の有無を確認するためにアセチルコリン (Ach、10 μ M) を加え、弛緩反応を調べた。以上の血管反応生から、血管標本の良し悪しを確認し、その後の実験に供した。

(1)NEによる収縮反応に及ぼすBunazosinの影響 (予試験として、ddy系マウスを用いて行った)。Bunazosin 0.1、1、10 nMを添加し10分間放置後、NE 0.1-1 μ Mを累積投与し、各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。

(2)NEによる収縮反応に及ぼすBMY7378の影響

BMY 0.01、0.1、1.0 nMを添加し10分間放置後、NE 0.1-1.0 μ Mを累積投与し、濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。(ddy系マウスを用いた実験ではbuffer中にtimololは加えなかった)。

(3)Phenylephrine (Phe)による収縮反応

Phe 1nM-100 μ Mを累積投与し、各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。

(4)Serotonin (5-HT)による収縮反応

5-HT 1nM-3 μ Mを累積投与し、各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。また、Ca²⁺濃度を1/10 (0.25mM) に調整した緩衝液下において、同様に5-HTの累積投与による収縮反応を記録した。

(5)AngiotensinIIによる収縮反応

AngiotensinII 1nM-1 μ Mを累積投与し、各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。

(6)KClによる収縮反応

KCl 10-40mMを含むKrebs - Henseleit栄養液(KClの増加分はNaCl濃度を減ずる)で20min毎に置換し、KCl各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。このとき、KClの濃度上昇に伴う緩衝液中の浸透圧の上昇による収縮反応への影響を無くすために、KCl+NaClのモル濃度を一定にすることで、緩衝液中の浸透圧を一定に維持した。

(7)CaCl₂による収縮反応

-Ca - 1mM EDTA緩衝液 (10分×2)、-Ca - KCl (10分×2) で標本を安定化させた後、CaCl₂ 0.1mM - 30 mMを累積投与し、各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。

(8)Vasopressin(Vaso)による収縮反応

Vaso 1.0nM-1.0 μ Mを累積投与し、各濃度に対する収縮反応の最大値を記録した。

各収縮反応の数値は発生張力の絶対値 (mg) で表した。また各々の最大反応から、収縮率を算出した。

3) データ処理・解析方法

用量 - 反応曲線の描き方

各累積投与時における最高反応濃度による収縮を最大反応（100%）として、薬物の各濃度段階での収縮高を百分率で求める。横軸に薬物濃度の対数値を取り、縦軸に各濃度に対する収縮率（%）をプロットした。他の薬物共存下の濃度 - 反応曲線は、これらの対照（薬物非共存下）の最大反応を100%として、それぞれの濃度における反応率を求めた。

2-5. 体重増加

生後4週目（28日目）に自動秤量を用いて体重を測定した。

2-6. 非負荷時心拍・血圧

Tail cuff法にて心拍・血圧を測定した。

2-7. 薬物刺激に対する昇圧反応

2-7-1. 末梢性

血圧測定

α 1D+/+ 及び -/- マウスの基礎血圧は覚醒下 tail-cuff method により測定した。薬物による昇圧反応を観察するため、マウスを sodium pentobarbital (40mg/kg, 腹腔内投与) で麻酔した。また、実験中必要に応じて少量の追加麻酔を行った。電気式パネルヒーターを用いてマウスの直腸温を36~37°Cに保持した。なお、予備実験で我々は本実験条件でのマウスの血中生化学ガスを測定している。pCO₂, pO₂ 及び pH の値はそれぞれ 104.7 ± 2.6 mmHg, 39.4 ± 1.8 mmHg, 7.34 ± 0.01 (n=8-12) であり、いずれも生理学的範囲内であった。

動脈圧は圧トランスデューサーに接続したポリエチレンカテーテル (PE-10) を右総頸動脈に挿入する事で測定した。平均血圧及び心拍数は前述の圧トランスデューサーで測定される収縮期血圧及び拡張期血圧より算出した。これらのパラメーターはカニューレ挿入後15分間安定化を行ってから測定し、記録した。薬物は大腿静脈に挿入したカニューレから投与した。

α 1D-/- マウスの norepinephrine や phenylephrine に対する昇圧反応を観察するため、これらの薬物を bolus 投与した。norepinephrine 及び phenylephrine は生理食塩水に溶解し、段階的に投与量を増やしながら15~20分間隔で投与した。angiotensin I と Arg-vasopressin も同様に100ng/kg を bolus 投与した。

norepinephrine による昇圧反応に対する α 1-antagonist の効果を分析するために、bunazosin hydrochloride (10 μ g/kg) または BMY-7378 (100 μ g/kg) を norepinephrine (3 μ l/kg/min) 持続投与 (10分間) の1分前にマイクロシリンジポンプを用いて投与した。

2-7-2. 中枢性

末梢と同様に中枢でもカテコールアミン性神経は、血圧調節に関与していることはよく知られている。そこで本実験では、非観式血圧測定法 (tail-cuff) で conscious の血圧・心拍数を測定した。また、血圧調節における中枢 α 1d-AR の関与を検討するために、ウレタン麻酔下で、フェニレフリン脳室内投与による血圧の変動を測定した。

1) 非観式血圧測定による血圧および心拍数の測定

血圧 (収縮期血圧) および心拍数は非観式血圧測定装置 (MK-1100; 室町機械) を用いて測定した。実験に使用するマウスは、少なくとも5日間ハンドリングを行ない、血圧および心拍数の測定時間は、すべて14時から16時までとした。

2) ウレタン麻酔下マウスにおけるフェニレフリン脳室投与による血圧の測定

マウスをウレタン (urethane; 1.5mg/kg, i.p.) で麻酔し、頸部を正中線に沿って約1.0cm切開して右頸動脈を剥離し、ポリエチレンチューブ (PE-10) を挿入固定した。血圧の測定は、右頸動脈に装着した PE-10 を圧トランスデューサーに接続し、ポリグラフで増幅し記録した。体温は約37°Cに保持した。脳室内投与は、注射芯 (27G) を用いて行なった。

III. $\alpha 1d$ トランスジェニックマウス作製

マウス $\alpha 1D$ アドレナリン受容体遺伝子をベーターアクチンプロモーター下に強制過剰発現させる発現プラスミド作成しマウス受精卵への遺伝子導入を行った。ファウンダーの解析はサザンブロット法およびPCR法を用いてトランスジーン陽性のマウスのスクリーニングを行った。陽性のマウスはさらに交配を行いホモマウスの作製を行った。

IV. V1a ノックアウトマウス作製

マウス $\alpha 1D$ アドレナリン受容体遺伝子と同様に通常のジーンターゲティング法を用いて作製した。

V. V1b ノックアウトマウス作製

マウス $\alpha 1D$ アドレナリン受容体遺伝子と同様に通常のジーンターゲティング法を用いて作製した。

VI. V1a トランスジェニックマウス作製

マウス V1a 受容体遺伝子をベーターアクチンプロモーター下に強制過剰発現させる発現プラスミド作成しマウス受精卵への遺伝子導入を行った。

VII. V1b トランスジェニックマウス作製

マウス V1b 受容体遺伝子をベーターアクチンプロモーター下に強制過剰発現させる発現プラスミド作成しマウス受精卵への遺伝子導入を行った。

3. 研究成果

I. $\alpha 1D$ 受容体ノックアウトマウスの作製

1-1. マウス $\alpha 1d$ -AR 遺伝子のクローニング

$\alpha 1D$ 受容体の遺伝子は2つのエクソンからなり他の $\alpha 1$ 受容体サブタイプの $\alpha 1A$ や $\alpha 1B$ と類似する構造を持っていた。

1-2. ターゲティングベクターの作製

Gene targeting は $\alpha 1D$ 受容体の第一エクソンの一部を Neo 遺伝子に置き換えたベクターを作製し、Gene targeting を行った。相同組み換えにより生じる mutant allele の遺伝子構造は第一エクソンの一部が Neo に置き換わることになる。

1-3. ES 細胞のスクリーニング

288 個の ES 細胞のスクリーニングの結果、正確に組み換えを起こした3つのクローンが正確に組み換えを起こしていた。これらのクローンを用いて blastocyte injection を行った。

1-4. キメラ、ヘテロ、ホモマウスの作製

blastocyte injection によりキメラマウスの作製、ヘテロ、ホモの作製をおこなった。

II. マウスの解析

2-1. 遺伝子型の解析

ヘテロ同士を交配によりえられたマウスの Genotyping の結果、 $+/+$ 、 $+/-$ 、 $-/-$ の出現頻度は 30、43、26 % で、この結果から $\alpha 1d$ 受容体ノックアウトマウスは正常に生まれ成育することが明らかになった。

2-2. $\alpha 1d$ -AR 遺伝子発現量の解析

2-2-1. RT-PCR

RT-PCR でそれぞれのサブタイプの発現量を解析してみたが、 $\alpha 1d$ -/- マウスでは、 $\alpha 1a$ -、 $\alpha 1b$ -AR の発現量は変化なく $\alpha 1d$ の発現は見られなかった。

2-2-2. TaqMan

同様に定量的に発現量を見るため脳の脳 RNA にて TaqMan probe を用いて解析した結果、 $\alpha 1a$ -、 α

Ib-AR の発現量とも +/+、 +/- と -/- のマウスでは差を認めなかった。

2-2-3. In situ

中枢神経系における α 1d-AR の発現を In situ ハイブリダイゼーション法にて解析したところ、 α 1d-AR は、大脳皮質・海馬・扁桃・視床、脊髄灰白質に多く発現していることが明らかになった。

2-3. α 1-AR 受容体蛋白の薬理的解析

125I HEAT をもちいた解析では α 1 受容体全体の数、つまり α 1a、 α 1b、 α 1d-AR の合計の受容体の数を表す Bmax は α 1d+/+ の whole brain で 101.2 に対し α 1d-/- では、92.2 と低下し、さらに α 1d-AR の発現量が多い大脳皮質ではその差が α 1d+/+ で 247、 α 1d-/- で 153 と著明に低下していた。おそらくこの差は、組織での α 1d-AR の受容体としての機能が消失しているためと考えられる。

α 1d-AR に対して特異性の高い BMY7378 を用いた competition assay では α 1d-/- のマウスでは α 1d+/+ にみられた high affinity site が消失した。Prazosin や α 1a 受容体に特異性の高い KMD3231 では α 1d+/+ と α 1d-/- の差はみられなかった。

2-4. 大動脈収縮反応

1) ddv 系マウスでの α 1 受容体を介する収縮反応

NE による収縮反応に及ぼす α 1-AR 遮断薬 Bunazosin および BMY7378 の影響

NE の収縮反応に及ぼす Bum および BMY の影響を図に示す。NE の累積投与により濃度依存性の収縮反応が惹起され、この用量反応曲線は、Bum、BMY それぞれの存在下で、アンタゴニストの濃度に比例して高用量側へシフトし、同時に最大反応もわずかに低下した。

2) α 1d+/+、 α 1d-/- マウスにおける収縮反応

(1) いずれのマウスにおいても、NE の累積投与により濃度依存的な収縮反応が惹起された。 α 1d+/+ マウスの収縮反応は、ddy 系マウスでの NE 収縮反応と比べてほとんど違いはなく、また β 遮断薬 (timolol) の有無による違いもほとんど見出されなかった。

α 1d-AR+/+ マウスから得られた反応曲線と比較して、 α 1d+/+ マウスから得られた NE 収縮の用量反応曲線は、発生張力の絶対値で表した場合、最大反応のわずかな低下が見られたが、収縮率では全く違いがなかった。一方、 α 1d-/- マウスにおける NE 収縮は、 α 1d+/+ あるいは α 1d+/+ マウスと比べ、その反応生ば著しく低下していた。NE 収縮の典型的な chart および用量反応曲線からも明らかであるように、 α 1d-/- マウスにおいては低用量 NE では収縮反応が惹起されず、 α 1-AR 遮断薬存在下での収縮反応のように、NE による用量反応曲線は高用量側へシフトした。NE による最大収縮反応もわずかに低下していた。用量反応曲線から算出した EC50 では、 α 1d+/+ および α 1d+/+ マウスでは同程度の値を示したがこれらと比べて α 1d-/- マウスでは約 50 倍高い値であった。

(2) NE による収縮反応に及ぼす BMY7378 の影響

α 1d+/+ および α 1d+/+ マウスにおいては、 α 1d-AR 遮断薬である BMY 存在下では NE 累積投与により惹起される濃度依存的な収縮反応は、BMY の濃度に比例して高用量側へシフトした。1 あるいは 10nM BMY 存在下では最大収縮反応のわずかな低下が認められたが、これは比較的反応性のよい標本で BMY 高用量の影響を検討したためである。BMY に対する pA2 値は、 α 1d+/+ マウスで 8.08、 α 1d-/- マウスで 8.62 であった。

一方、 α 1d-/- マウスでは pA2 (BMY7378 の理論値 8.0) と同程度の BMY 存在下ではその影響がほとんど認められなかった (BMY の存在下での用量反応曲線は control、NE 単独とほとんど変らなかった)。

BMY 高用量 (10⁻⁷M) でのみ、わずかに NE 用量反応曲線の右方向へのシフトが認められた。Schild plot 法では pA2 値は算出できなかったため、van Rossum の簡便法で pA2 値を算出した。

(3) Phenylephrine による収縮反応

Phe は α 1-AD に対する選択性では NE より高いが、Phe による収縮反応は NE よりも 10 倍程度高用

量から惹起された。Pheの累積投与により惹起される濃度依存性の収縮反応は、 α Id+/+と比較して α Id+/- マウスではわずかな低下がみられた。一方、 α Id-/- マウスにおけるPheの収縮反応は、chart上からも、 α Id-/- マウスの方が明らかに高用量で収縮反応を示すことから推測できるように、 α Id-/- マウスではPheの用量反応曲線は、 α Id+/+および α Id+/- マウスに比べて明らかに高用量側へシフトし最大反応もやや低下した。算出したEC50は、 α Id+/+ マウスに比べて α Id+/- マウスでは2倍高い値を示したに過ぎなかったが、 α Id-/- マウスでは約20倍高い値を示した。

(4) Serotonin (5-HT) による収縮反応

5-HTの累積投与により濃度依存的な収縮反応が惹起された。発生張力の用量反応曲線において、 α Id+/+、 α Id+/- および α Id-/- マウスの最大反応はほぼ一致していた。しかしながら、 α Id+/+ マウスに比べ α Id-/- マウスの用量反応曲線はわずかに低用量側へシフトし、EC50においても α Id+/+ および α Id+/- に比べて α Id-/- マウスでわずかに低い値を示したものの有意な差は得られなかった。

(5) AngiotensinII(AngII)および Vasopressin(Vaso)による収縮反応

AngII (AT1受容体)およびVaso (V1受容体)はともにGqタンパクを介して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる働きを持つので、ある程度の血管収縮反応が惹起されると予想されたが、今回の測定条件下(例えば初期張力0.5g設定)では収縮は認められなかった。

(6) 標本の安定化過程でのKCl収縮およびNE収縮反応

血管収縮反応を検討するため、標本の収縮反応を安定化させる目的で行った2回のKCl(40mM)収縮および2回のNE(10⁻⁷M)による収縮反応において、ddy系マウスを用いた場合、あるいは α Id+/+、 α Id+/- マウスでは、収縮回数を重ねる毎に収縮反応は亢進し、またNEによる最大収縮反応はKCl収縮より必ず上回っていた。一方 α Id-/- マウスにおいては、最初のKClによる収縮反応が α Id+/+マウスの反応に比べ大きくなる傾向があり、NEに対する反応性の方がKCl収縮と比べて、ほぼ同程度かもしくは若干低下していた。特にNE収縮ではプラトー相が低下し、安定しない標本が多かった。

このように α Id-/- マウスの収縮反応の様相は、他の収縮反応とは異なっていた。特に α Id-/- マウスではKCl収縮に対する反応性の亢進が認められたことに着目し、さらに α Id-/- マウス血管における反応性の亢進、あるいは刺激因子に対する組織標本の感受性亢進について検討した。

(7) KClによる段階的脱分極刺激による収縮反応

α Id+/+および α Id-/- マウス間では各濃度に対する反応の割合(各濃度に対する収縮率%)には全く変化は見られなかったが、各濃度に対する発生張力(mg)においては α Id+/+ マウスにくらべ α Id-/- マウスでわずかに収縮反応の亢進が見られた。

(8) CaCl₂による収縮反応

栄養液中のカルシウムイオンを予め除いた汰態で、さらに高濃度KClにより脱分極刺激を与えると、電位依存性のカルシウムチャネルが開口状態となる。この後に外液中のカルシウムイオンを与えると、加えられたCa²⁺に依存して収縮反応が惹起される。どのCaCl₂濃度においても α Id+/+と α Id-/- マウス間での相違は全く見られなかった。最大収縮反応、および収縮率をプロットした用量反応曲線においても、80mMKClによる脱分極下でのCaCl₂収縮反応では α Id+/+ マウスおよび α Id-/- マウス間での差は認められなかった。

15mMあるいは20mMKClのような脱分極刺激の程度が低い条件下では、 α Id+/+ マウスに比べ α Id-/- マウスでは比較的生理的条件に近い外液CaCl₂に対する発生張力の有意な亢進が見られた。発生張力の亢進は、15mMと20mMKCl間では同程度であった。

(9) 30mM CaCl₂暴露後の5-HTによる収縮反応

(8)で用いた標本を用いて、0.25mMあるいは2.5mM CaCl₂存在下での5-HT収縮を検討した。30mM CaCl₂暴露後の標本であるため、最大発生張力は(4)の場合よりも低下していた。 α Id-/- では、通

常のカルシウム濃度での5-HT収縮反応の低下が小さかった。

2-5. 体重増加・その他

生後4週目における体重測定の結果、体重増加にも $\alpha 1d+/+$ と $\alpha 1d-/-$ の間に有意さは見られなかった。作製した $\alpha 1d$ 受容体ノックアウトマウスは、生殖能力やその他も外見上異常は認めなかった。

2-6. 非負荷時心拍・血圧

2-7. 薬物刺激に対する昇圧反応

2-7-1. 末梢性

NEに対する末梢性の昇圧反応は、 $\alpha 1d-/-$ では $\alpha 1d+/+$ に比べて昇圧反応は有意に低下していた。

2-7-2. 中枢性

非観式血圧測定法 (tail-cuff) でconsciousの状態におけるの血圧、心拍数を測定した。収縮期血圧ならびに心拍数を1日おきに3度(初めて測定した日をDay1としている)、経時的に測定した。Day1、Day3、Day5において、 $\alpha 1d$ 受容体欠損マウスとそのコントロール($\alpha 1d+/+$)において差は見られなかった。ウレタン麻酔下でも、 $\alpha 1d$ 受容体欠損マウスとそのコントロール($\alpha 1d+/+$)において、定常状態の血圧はかわらなかった。しかし、フェニレフリン脳室内投与約5分後に生じる持続的昇圧反応は $\alpha 1d$ 受容体欠損マウスは対照に比べて低かった。

III. $\alpha 1d$ トランスジェニックマウス作製

マウス $\alpha 1D$ アドレナリン受容体遺伝子を強発現しているトランスジェニックマウスの作製を行った。Binding studyにより $\alpha 1$ アドレナリン受容体の細胞膜レベルでの過剰発現が確認された。

IV. V1aノックアウトマウス作製

マウス $\alpha 1D$ アドレナリン受容体遺伝子と同様に通常のジーンターゲティング法を用いて作製した。現在、キメラ・ヘテロマウスの作製まで行った。

V. V1bノックアウトマウス作製

マウス $\alpha 1D$ アドレナリン受容体遺伝子と同様に通常のジーンターゲティング法を用いて作製した。現在、キメラ・ヘテロ・ホモマウスの作製まで行った。

VI. V1aトランスジェニックマウス作製

マウスV1a受容体遺伝子をベクターアクチンプロモーター下に強制過剰発現させる発現プラスミド作成しマウス受精卵への遺伝子導入を行った。

VII. V1bトランスジェニックマウス作製

マウスV1b受容体遺伝子をベクターアクチンプロモーター下に強制過剰発現させる発現プラスミド作成しマウス受精卵への遺伝子導入を行った。

4. 考察

$\alpha 1$ -ARはカテコラミンによる血管の収縮それによる血圧維持・上昇に関わる受容体であるが、どのサブタイプが最も重要な役割を演じているのかは明らかではない。本研究では、 $\alpha 1d$ -AR $-/-$ マウスの大動脈標本を用いて、血管作動物質に対する収縮反応を測定し、この受容体サブタイプの機能的役割について検討した。

ddy系マウスでの $\alpha 1$ -ARを介する収縮反応

ddy系マウスの大動脈標本において、NEによって惹起される濃度依存性の血管収縮反応は、すべての α 1-ARに選択的なアンタゴニストであるBunazosinおよび α 1d-AR選択的アンタゴニストであるBMY7378によって濃度依存的に抑制された。これはいずれもアンタゴニスト共存下で、用量反応曲線が高用量側へシフトしたことから示され、実際にマウス大動脈の血管収縮反応に α 1d-ARが関与していることを確認された。

アゴニストの用量反応曲線は、競合的拮抗薬共存下では高用量側へ平行移動され、非競合拮抗薬の共存下では反応曲線の最大反応が抑制する。Bun、BMY両薬物はNE収縮に対して競合的拮抗作用を示すとされている。最大張力でプロットした場合、Bun存在下では最大収縮反応がわずかに低下したことから、すべての α 1-ARに選択的なアンタゴニストであるBunはマウス大動脈のNE収縮に対して非競合拮抗作用を示す可能性が示唆される。

さらのSchildプロットにおいて得られた直線の傾きはBMYで0.88、Bunで0.59であった。Schildプロットの関係式では、

$$\log KB = \log [B] - \log ([A_i] / [A_o] - 1)$$

の一次式が成立するので、競合的拮抗薬では理論上直線の傾きは1となる。したがって、BMYではSchildプロットにより得られた直線の傾きが0.88とほぼ1に近似していたことから、BMYはマウス大動脈の収縮反応に対して競合的拮抗薬として作用すると確認できた。一方、Bunについては、Schildプロットにより得られる直線の傾きが0.59であったことから、競合的拮抗薬として作用していないと見なされる。通常、ラットをはじめとするげっ歯類の大動脈では、 α 1d-ARが優位であることが知られている。もしも α 1b-ARや α 1a-ARが余剰受容体として存在しているならば、それらサブタイプの関与によって、すべての α 1-ARに選択的なアンタゴニストであるBunは非競合的拮抗作用でないにもかかわらず、一見、非競合的拮抗作用で見られるような最大反応の低下を示すかも知れない。

α 1d-AR^{-/-}マウスにおける大動脈収縮反応

初めに、 α 1d-ARの機能的役割を確認するために、 α 1d^{+/+}、 α 1d^{+/-}、 α 1d^{-/-}マウスの大動脈標本における α 受容体作動薬の反応を調べた。血管平滑筋の α 1受容体に結合して血管収縮を引き起こすNE、および α 1-AR選択的アゴニストPhenylephrineの累積投与によって惹起される収縮反応の用量反応曲線では、^{+/+}と^{+/-}マウスの反応はほぼ同一であったが、^{-/-}マウスではそれら薬物の用量反応曲線は明らかに高用量側へシフトしていた。また得られたEC50値では、^{+/+}と^{+/-}マウス間ではほとんど差がなかったが、^{-/-}マウスでは、NE、Pheそれぞれ約50、20倍そのEC50直が大きかった。これらの事実は、 α 1d-AR欠損によって明らかに α 1-ARを介する血管収縮反応が低下していることを示している。また α 1b-AR欠損マウスの収縮反応低下の程度と比較すると、 α 1d-AR欠損マウスの方がその影響が大きく現れていることが認められる。従って α 1-ARを介する血管収縮反応において、 α 1-ARサブタイプの中でも特に α 1d-ARが主要な役割を果たしていると考えられる。

しかし α 1d-ARの欠損した^{-/-}マウスにおいて感受性は著しく低下していたものの高用量では収縮反応が認められたことから、血管収縮においては α 1d-ARが優位な役割を担っているにもかかわらず、それは独占的なものではなく、他の受容体サブタイプの関与もあることが認められる。そこで、次にこの収縮反応が選択的 α 1d-ARアンタゴニストによってどのように影響されるかを検討した。

ddy系マウスで得られた結果と同様に、NEによって惹起される濃度依存性の血管収縮反応は、^{+/+}マウスおよび^{+/-}マウスにおいてはBMYによって用量依存的に抑制された。それぞれのSchildプロットから算出されたpA2値は8.08 (^{+/+}) および8.61 (^{+/-}) であり、ddy系マウスから得られた値(8.67)とほぼ一致した。しかしながら、^{-/-}マウスではBMYによる濃度依存的な抑制効果がほとんど認められず、Schild plot法ではpA2値を算出できなかった。そこでvan Rossum法からpA2値を算出(7.62)

したが、他の標本から得られた値とは明らかに異なっていた。

BMY7378は α 1d-AR高選択性アンタゴニストであるが、同時に5-HT_{1A}のアゴニストとしても作用する。BMYは、 α 1a-AR ($k_i = 800\text{nM}$)あるいは α 1b-AR ($k_i = 600\text{nM}$)と比べて、約100倍以上 α 1d-AR ($k_i = 2\text{nM}$)に対して高親和性であり、 α 1d-ARを発現している膜組織に結合することが知られている。NEによる血管平滑筋の収縮反応に対して特異的な拮抗作用を示すため、 α 1d-AR特有の関与については、BMYを用いて評価することができる。

したがって、 α 1d-ARの欠損した-/-マウスにおいては、NEおよびPheによる収縮反応が明らかに減弱したこと、またBMYによる阻害が認められなかったことから、今回使用した α 1d-ARノックアウトマウスは確かに α 1d-ARを欠損していることが証明された。さらに、マウス大動脈における α 1-ARを介する収縮反応は、その大部分が α 1d-ARに起因することが実証された。

一方 α 1d-AR +/-マウス (ヘテロ) では、理論的に大動脈標本の α 1d-ARは+/+マウスの半数であることになるが、その収縮反応性、およびBMYによる拮抗様式では殆ど違いがなかった。このことは、 α 1d-ARには余剰受容体があり、全体数では減少したとしても、残りの受容体で十分に機能を代償できることを示している。

α 1d-AR-/-マウスにおける5-HTおよびKClによる収縮反応の亢進

5-HTは5-HT₂受容体を介してGqタンパクに結合して血管収縮反応を引き起こす。5-HTの累積投与によって惹起される収縮反応の用量反応曲線 (縦軸は収縮率%)、およびEC₅₀直では、+/+マウスと +/-マウス間では差が見られなかった。興味あることには、これらと比べて、-/-マウスでは5-HTによる用量反応曲線の低用量側への逆のシフト、およびEC₅₀値の低下が認められた。最大収縮反応では3者間に違いはなかった。5-HTは介在する受容本は異なるが、受容体より下流の情報伝達系では α 1d-ARと同じpathway (反応経路) で血管収縮反応を引き起こすことから、 α 1d-/-マウスでは α 1d-ARの欠損による代償機構として5-HTに対する感受性が亢進している可能性が考えられる。さらに受容体作動性血管収縮物質として、AngiotensinIIおよびVasopressinを用いてその反応性を検討した。AngiotensinIIは血管平滑筋のAT₁受容体に直接作用して血管収縮作用 (皮膚、腎臓の血管で特に著明であるが、骨格筋、脳、心臓、副腎では弱い) を現すことが知られている。また、Vasopressinは血管平滑筋のV₁受容体に結合して血管平滑筋収縮、血圧上昇を起こすことが知られている。しかしながら、今回の実験条件ではAngiotensinIIおよびVasopressinによるマウス大動脈での収縮反応は、評価対象となるような血管収縮反応とはならなかった。これは今回の実験条件に原因があると考えられる。AngiotensinIIおよびVasopressinによる血管収縮作用の駆動力がNEのような α 1受容体刺激薬によるものと比較して弱いとすれば、今回の実験で用いた初期張力 (0.5g) が大きい可能性が示唆される。初期張力を低下させるなど実験条件を変えてさらに検討する必要がある。

血管反応性の確認、標本の安定化のために行ったKCl (40mM) およびNE (10⁻⁷M) による収縮反応において、 α 1d-/-マウスでは1回目および2回目のKClによる血管収縮反応が、 α 1d+/+ および +/-マウスと比べて亢進するような傾向が認められた。用量反応曲線からも明らかなように、 α 1d-/-マウスではNE (10⁻⁷M) によって惹起される収縮反応は+/+ や +/-マウスと比べて低下しているため、KCl_{max}/NE_{max} では、他のマウスの結果と比べて明らかに異なった様相を示した。

そこでさらに、安定化した後の標本を用いて、KCl累積置換による収縮反応の比較検討を行ったが、感受性の亢進はさほど認められなかった。この理由のひとつには、標本の状態が影響していると考えられる。初期KClによる収縮反応は、最初の物理的刺激直後の反応であるに対して、KCl累積投与による反応は、既に複数回薬物を作用させた後の標本に対して行われたので標本の疲労を考慮する必要がある。したがって、 α 1d-/-マウスで生じているKClに対する感受性亢進は、標本の筋疲労あるいはin vitroでの反応性の安定化によって消失するメカニズムが関与していると考えられる。

次に予めKClで脱分極させた標本を用いて、CaCl₂に対する感受性について検討した。80mMKCl脱分極下では、電立依存性カルシウムチャネルはほぼ全体が開口状態にあると考えられる。この時に添加したCa²⁺によって惹起される収縮反応では α 1d^{-/-}マウスの反応性亢進は認められなかったが、KCl15mMあるいは20mM程度の弱い脱分極刺激時では、^{-/-}マウスでのCaCl₂に対する収縮反応性の亢進が認められた。このような α 1d^{-/-}マウスで認められた収縮反応に対する感受性亢進のメカニズムは明らかとは出来ないが、一脱分極刺激に伴う電位依存性カルシウムチャネルの開口時間の延長、開口確率の上昇などが関与している可能性がある。また収縮タンパク自体のカルシウム感受性の増大、あるいは血管弛緩機構の減弱も関与する可能性がある。いずれにしても、先天性な α 1d-ARの欠損によって、正常な血管トーンスの維持が障害されるため、このような代償機構が生体のホメオスタシス維持のために作動していると考えられる。

α 1d-ARと血圧

α 1d-AR mRNAは、ribonuclease protection法を用いて調べたすべての血管において検出されたが、その受容体の平滑筋収縮への寄与は血管系ごとに異なり、 α 1d-AR mRNAが発現している動脈では、必ずしも α 1d-ARが動脈の収縮調整に関与しているわけではない。実際 α 1d-ARは大動脈および腸骨動脈での血管収縮を担う主要な受容体であるが、 α 1d-AR mRNAは尾動脈、腸管抵抗性血管、腎動脈においても検出されるものの、これらの血管収縮に対する α 1d-ARの役割はさほど重要ではないことが報告されている。そこで、もしも大動脈で認められたような血管の感受性亢進が、実際の血圧維持に関与している末梢の抵抗血管においても認められるならば、高血圧発症の機序を考える上で実に興味深い α 1d-ARの役割が推察される。即ち、 α 1d-ARの機能的な欠損を代償するために、他の受容体を介する血管収縮系、のみならず電位依存性カルシウムチャネルを介する血管収縮系までもが感受性を亢進させるのであれば、本質的に α 1d-ARは正常血圧維持の維持に極めて重要な役割を演じていると考えられる。

中枢生昇圧反応

受容体欠損マウスとそのコントロール(α 1d^{+/+})において、定常状態の収縮期血圧および心拍数の差は認められなかった。中枢の α 1d受容体の関与を検討するために、麻酔下マウスでフェニレフリン脳室内投与による中枢性の血圧上昇を調べた。フェニレフリンによる中枢性昇圧反応は、 α 1d受容体欠損マウスの方が低かった。この結果の考察は現時点では難しいが、一つの考えとして、中枢の α 1d受容体を介して、おそらくあるホルモンの遊離を引き起こし、血圧が上昇したとも思われる。事実、Brooksら(1)は、ラットでNA(ノルアドレナリン)脳室内投与による昇圧反応は、節遮断薬では影響されないが、vasopressin antagonistにより有意に抑制されると報告している。いずれにしても、脳内の α 1d受容体分布を検討することが一つのヒントとなる。

5. 結論

マウス α 1dアドレナリン受容体のノックアウトマウスの作製および解析を行った。

本研究から、血管の α 1-ARの機能的意義について、以下のような新たな知見が得られた。

1. 大動脈標本でのNE収縮に寄与する受容体サブタイプは、 α 1d-ARが最も優位である。
 2. α 1d^{-/-}マウスでは、5-HTあるいはKClのような α 1-AR作動薬以外の血管収縮生物質に対する感受性が亢進している可能性がある。
 3. 血管平滑筋の α 1d-ARは生体の循環機能維持に重要な役割を演じている。
- また、マウスバゾプレッシンV1a, V1b受容体のノックアウトマウスの作製を行った。

6 . 研究発表

[原著論文 (欧文)]

1) Moriyama N, Kurooka Y, Nasu K, Akiyama K, Takeuchi T, Nishimatsu H, Murata S, Murayama T, Tsujimoto G, Kawabe K.

Distribution of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtype mRNA and identification of subtype responsible for renovascular contraction in human renal artery.

Life Sciences. 66: 915-926, 2000.

2) Kikuchi S, Tanoue A, Endo F, Wakasugi S, Matsuo N, Tsujimoto G.

A novel nonsense mutation of the PEPD gene in a Japanese patient with prolidase deficiency.

J. Human Genetics 45: 102-104, 2000.

3) Shinoura H, Take H, Hirasawa A, Inoue K, Ohno Y, Hashimoto K, Tsujimoto G.

Key amino acids of vasopressin V1a receptor responsible for the species difference in the affinity of OPC-21268.

FEBS Letters 466: 255-258, 2000.

4) Nakayama Y, Takano Y, Shimohigashi Y, Tanabe S, Fujita T, Kamiya H, Tsujimoto G.

Pharmacological characterization of a novel AVP4-9 binding site in rat hippocampus.

Brain Research 858: 416-423, 2000.

5) Irie T, Oshida T, Hasegawa H, Matsuoka Y, Li T, Oya Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Kambara H.

Automated DNA fragment collection by capillary array gel electrophoresis in search of differentially expressed genes.

Electrophoresis 21: 367-374, 2000.

6) Homma N, Hirasawa A, Shibata K, Hashimoto K, Tsujimoto G.

Both $\alpha 1A$ - and $\alpha 1B$ -adrenergic receptor subtypes couple to the transient outward current (I_{TO}) in rat ventricular myocytes.

Br. J. Pharmacol. 129: 1113-1120, 2000.

7) Nakamura S, Yamamura Y, Itoh S, Hirano T, Tsujimae K, Aoyama M, Kondo K, Ogawa H, Shinohara T, Kan K, Tanada Y, Teramoto S, Sumida T, Nakayama S, Sekiguchi K, Tsujimoto G, Mori T, Tominaga M.

Characterization of a novel nonpeptide vasopressin V2-agonist, OPC-51803, in cells transfected human vasopressin receptor subtypes.

Br. J. Pharmacol. 129: 1700-1706, 2000.

8) Onishi S, Iikura Y, Tsujimoto G, et al.

Survey of the current state of pediatric drug use in Japan (1994-6).

Pediatrics International 42: 109-113, 2000.

9) Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo R, Saido T, Funakoshi A, Miyasaka K, Ohta S, Tsujimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N.

Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA).

J. Epidemiol. 10(1 Suppl): S-46-S-55, 2000.

10) Shimoyama Y, Tsujimoto G, Kitajima M, Natori M.

Identification of three human type II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type II classic cadherins.

Biochem.J. 349: 159-167, 2000.

- 11) Goda N, Tanoue A, Kikuchi S, Tsujimoto G
Cloning and characterization of the promoter of murine cytohesin-1 gene.
Biochim Biophys Acta 1493: 195-199, 2000.
- 12) Takada T, Iida K, Akasaka K, Yasue H, Torii R, Tsujimoto G, Taira M, Kimura H.
Evaluation of heterologous insulator function to chromosomal position effect using mouse blastocyst and fetus.
Mol. Reprod. Dev. 57: 232-237, 2000.
- 13) Koshimizu T, Goor F.V., Tomic M, Wong A.O., Tanoue A, Tsujimoto G, Stojkovic S.S.
Characterization of calcium signaling by purinergic receptor-channels expressed in excitable cells.
Mol Pharmacol. 58: 936-945, 2000.
- 14) Homma Y, Hamada K, Nakayama Y, Tsujimoto G, Kawabe K.
Effects of castration on contraction and alpha(1)-adrenoceptor expression
in rat prostate.
*Br J Pharmacol.*131:1454-60, 2000
- 15) Takei Y, Swietlik M, Tanoue A, Tsujimoto G, Kouzarides T, Laskey R.
MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3.
EMBO Reports. 2: 119-123, 2001.
- 16) Sugimoto Y, Fujisawa R, Tanimura R, Lattion A.L, Cottechia S, Tsujimoto G, Nagao T, Kurose H.
Differential contribution of key amino acids of beta1-adrenergic receptor responsible for beta1-selectivity to
high affinity binding and receptor activation.
Mol. Pharmacol.(in press).
- 17) Homma N, Tsujimoto G, and Hashimoto K.
Electrophysiologic effects of an antiarrhythmic agent, bidisomide, on sodium current in isolated rat ventricular
myocytes: Comparison with mexiletine and disopyramide.
Jpn.J. Pharmacol.(in press).
- 18) Yamauchi J, Tsujimoto G, Kaziro Y, Itoh H.
Parallel regulation of mitogen-activated protein kinase (MKK)3 and MKK6 in Gq-signaling cascade.
J. Biol. Chem. (in press).
- 19) Chalothorn D, McCune D.F, Edelmann S.F, Benovic J.L, Tsujimoto G, Piascik M.T.
Differences in the cellular localization and agonist mediated internalizaion properties of the alpha1-adrenoceptor
subtypes.
Mol. Pharmacol. (in press).
- 20) Yamauchi J, Hirasawa A, Miyamoto Y, Tsumaya K, Shinoura H, Kaziro Y, Itoh H, and Tsujimoto G.
Dependence on c-Src and Rho Family Small GTPases in a Pathway Coupling the alpha 1B-Adrenergic Receptor/Galphaq to Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 4
J. Biol. Chem. (in press).
- 21) Yamauchi J, Itoh H, Shinoura H, Miyamoto Y, Hirasawa A, Kaziro Y, Tsujimoto G.
Involvement of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in α 1B-adrenergic receptor
/G α q-induced inhibition of cell proliferation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press).

7. 知的所有権の取得状況：一件

特許出願「増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬物のスクリーニング方法」

平成13年3月26日出願 特願2001-088018

発明者：高垣和史。勝間進（日本新薬株式会社）辻本豪三（国立小児病院）

特許出願人：日本新薬株式会社、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社