

## Effects of Inorganic Polyphosphate on the Proteolytic and DNA-binding Activities of Lon in *Escherichia coli*\*

Received for publication, April 28, 2004, and in revised form, June 1, 2004  
Published, JBC Papers in Press, June 8, 2004, DOI 10.1074/jbc.M404725200

Kazutaka Nomura<sup>‡</sup>, Junichi Kato<sup>‡</sup>, Noboru Takiguchi<sup>‡</sup>, Hisao Ohtake<sup>‡§</sup>, and Akio Kuroda<sup>‡¶</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Molecular Biotechnology, Hiroshima University, Hiroshima 739-8530, Japan, the <sup>§</sup>Department of Biotechnology, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan, and <sup>¶</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

Lon belongs to a unique group of proteases that bind to DNA and is involved in the regulation of several important cellular functions, including adaptation to nutritional downshift. Previously, we revealed that inorganic polyphosphate (polyP) increases in *Escherichia coli* in response to amino acid starvation and that it stimulates the degradation of free ribosomal proteins by Lon. In this work, we examined the effects of polyP on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon. An order-of-addition experiment suggested that polyP first binds to Lon, which stimulates Lon-mediated degradation of ribosomal proteins. A polyP-binding assay using Lon deletion mutants showed that the polyP-binding site of Lon is localized in the ATPase domain. Because the same ATPase domain also contains the DNA-binding site, polyP can compete with DNA for binding to Lon. In fact, an equimolar amount of polyP almost completely inhibited DNA-Lon complex formation, suggesting that Lon binds to polyP with a higher affinity than it binds to DNA. Collectively, our results showed that polyP may control the cellular activity of Lon not only as a protease but also as a DNA-binding protein.

Inorganic polyphosphate (polyP)<sup>1</sup> is a linear polymer of many hundreds of orthophosphate residues linked together by ATP-like high energy phosphoanhydride bonds. This polymer naturally occurs in microbes, fungi, plants, and animals (1). In *Escherichia coli*, the level of polyP is very low in the exponential phase, but it increases up to 1000-fold in response to amino acid starvation and during the onset of the stationary phase (2, 3).

We demonstrated previously that polyP forms a complex with the ATP-dependent Lon protease, an enzyme that degrades intracellular proteins during nutritional downshift (4). We further showed that most of the proteins degraded by the polyP-Lon were free ribosomal proteins. Thus, it appears that polyP helps mediate adaptation to nutritional downshift by directing the degradation of ribosomal proteins. PolyP also binds to ribosomal proteins, suggesting that its interaction with the substrate may be important for the stimulation of degradation (4). However, whether polyP first binds to Lon or to the ribosomal proteins has not been established.

\* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Molecular Biotechnology, Hiroshima University, Hiroshima 739-8530, Japan. Tel.: 81-82-424-7758; Fax: 81-82-424-7047; E-mail: akuroda@hiroshima-u.ac.jp.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: polyP, inorganic polyphosphate; MBP, maltose-binding protein.

Lon is a highly conserved enzyme present in Archaea and eubacteria as well as in the mitochondria of eukaryotes. The Lon monomer includes an N terminus of unknown function, a central ATPase containing a typical ATP-binding motif, and a C-terminal proteolytic domain with a catalytically active residue at Ser-679 (5–8). The N-terminal region also contains a "basic-acid-basic" region (9). A "sensor and substrate discrimination" domain has been identified between the ATPase and protease domains (10). Purified sensor and substrate discrimination domain binds to known Lon substrates (10), suggesting that it plays a role in substrate recognition. Although *E. coli* Lon is thought to be a homo-tetramer or -octamer, recent structural analysis of the proteolytic domain of Lon revealed that it assembles into hexameric rings (11).

Lon contributes to the regulation of several important cellular functions, including radiation resistance, cell division, filamentation, capsular polysaccharide production, lysogeny of certain bacteriophages (reviewed in Refs. 12–14), and adaptation to nutritional downshift (4). *E. coli* Lon is known to bind non-specifically to DNA (15). However, human Lon binds specifically to a single-stranded GT-rich DNA sequence of human mitochondrial DNA (16). In addition, Fu *et al.* (17) showed that the *E. coli* Lon binds to a TG-rich site (pets) of the human immunodeficiency virus type2 enhancer. Whether *E. coli* Lon has a specific binding site on the *E. coli* chromosome is unclear.

It has been suggested that the basic-acid-basic domain is involved in DNA binding (5). Another report speculated that the protease domain is involved in DNA binding, because the amino acid sequence of this domain is similar to that of the DNA-binding protein LexA (18). In both cases, the DNA-binding sites of Lon were predicted from its amino acid sequence. Here, our experimental data suggested that both the polyP- and DNA-binding sites of Lon are localized in the ATPase domain. This explains why polyP competes with DNA for binding to Lon. Finally, based on these findings, we discuss the regulatory effects of polyP on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Protein Purification**—Lon protease fused with maltose-binding protein (MBP-Lon) was expressed in *E. coli* (pMal-Lon) and purified using amylose resin as described by Sonezaki *et al.* (19). MBP-Lon was further purified by Hi Trap Q anion exchange chromatography (Amersham Biosciences). MBP-Lon was eluted from the Hi Trap Q column with a linear gradient of 0–1 M NaCl in buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, and 20% glycerol). Lon was purified after the cleavage of proteolytic removal of MBP as described previously (19). The proteolytically inactive mutant, Lon-S679A, was also expressed as a fusion with MBP (a gift from Dr. S. Sonezaki (Toto Ltd., Kitakyushu, Japan)). MBP-SulA was purified as described previously (20).

Ribosomal proteins were purified from isolated ribosomes as follows. Ribosomes were isolated from *E. coli* MG1655 by ultracentrifugation (21). Ribosomal proteins were extracted by incubating the purified

TABLE I  
DNA sequence of primers

Primer	DNA sequence
F1	ATGAATCCTGAGCGTCTGA
F136	AGCCAGTTCGAAGGCTACAT
F181	CAGTCTGTTCTGGAGATGTC
F272	GAAGCAGAGTTGCAGAAGCT
F320	GATACCGACCATTATGGTCT
F472	TCCAACCTCCATGAACATTCCG
F618	GTCCCGGGTAAAGGCAACTG
R302	ACGGAATTCTCACGGCACCTGTACCATCCA
R437	AAGGAATTCTCAGGCCGATCGCCACGCAT
R616	ACCGAATTCTCATGCCGTTTCAATGGTCTAG
R713	ACGGAATTCTCATACCTGACCCAGCAGAGTGA
R775	CTGGAATTCTCAGCGTTTCAATTTGCAGCGA
R784	ACGGAATTCTCACTATTTTGCAGTCAACCT

ribosomes for 20 h at 4 °C with 4.5 M LiCl and 6 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (22). After precipitating the ribosomal RNAs by centrifugation (5000  $\times$  g, 5 min), the supernatant containing ribosomal proteins was dialyzed against buffer B (50 mM ammonium acetate, pH 5.6, 10% glycerol, and 0.15 M NaCl). The supernatant was applied to a carboxymethyl cation exchange column (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA), and ribosomal proteins were eluted with a linear gradient of 150–750 mM NaCl in buffer B over 15-column volumes. Some ribosomal proteins were further purified by gel filtration chromatography with Superdex 75 (Amersham Biosciences) in buffer A containing 150 mM NaCl.

**Degradation of Ribosomal Proteins by Lon**—Ribosomal proteins (5  $\mu$ g) and Lon (1.5  $\mu$ g) were incubated in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 4 mM ATP, and 5 mM  $Mg^{2+}$  in the presence and absence of 1.4  $\mu$ M polyP<sub>700</sub> as a polymer at 37 °C and then separated by 12.5% SDS-PAGE. PolyP<sub>700</sub> was synthesized by polyP kinase with ATP as a substrate as described previously (4). After electrophoresis, ribosomal proteins were stained with SYPRO Orange (Molecular Probes, Eugene, OR) and then visualized with a Typhoon image analyzer (Amersham Biosciences).

**Construction of Deletion Mutants of Lon**—To construct deletion mutants of Lon fused to MBP, a DNA fragment corresponding to Lon 1–713 was amplified using primers F1 and R713 and pMal-Lon (S679A) as the template. The amplified DNA fragment was digested with EcoRI and then inserted into XmnI and EcoRI-digested pMal-c-2x (New England Biolabs, Ontario, Canada). Lon 1–302, Lon 136–784, Lon 272–784, Lon 320–784, Lon 181–302, Lon 272–437, Lon 320–437, Lon 472–616, and Lon 618–775 were constructed with using primers F1 and R302, F136 and R784, F272 and R784, F320 and R784, F181 and R302, F272 and R437, F320 and R437, F472 and R616, and F618 and R775, respectively. DNA sequences of these primers are shown in Table I.

**PolyP Blotting**—Deletion mutants of Lon fused to MBP were expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$  on 2 $\times$  YT medium (16 g of tryptone, 10 g of yeast extract, and 5 g of NaCl/liter) (23) with 0.5 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside. Cells were collected by centrifugation and suspended in SDS sample buffer (23). After boiling for 5 min, samples were separated by 12.5% SDS-PAGE. Separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were washed twice with an incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , and 0.1% Triton X-100) and incubated for 12 h at 37 °C in the same buffer containing 1% bovine serum albumin. PolyP<sub>700</sub> (10.3 pmol) labeled with <sup>32</sup>P (4) was added, and the mixture was incubated for 2 h at 37 °C. The membranes were washed twice with the incubation buffer and then exposed to a film (Bas-IP, Fujifilm, Kanagawa, Japan). The exposed film was analyzed using the Typhoon image analyzer (Amersham Biosciences).

**PolyP- and DNA-binding Assays**—Deletion mutants of Lon fused with MBP were purified using amylose resin. Purified proteolytically inactive MBP-Lon (S679A) or its deletion mutants (35 pmol) and [<sup>32</sup>P]polyP (1 pmol) were mixed for 5 min at room temperature in 50  $\mu$ l of 25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM  $MgCl_2$ , and 1 mM ATP. The mixture was applied to a nitrocellulose filter (0.45  $\mu$ m), and the free [<sup>32</sup>P]polyP was washed off under a vacuum with a solution of 25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM  $MgCl_2$ , and 100 mM NaCl (4). The radioactivity remaining on the filter, corresponding to the amount of polyP-protein complex, was measured by scintillation counting. For the DNA-binding experiment, a DNA fragment (722 bp) coding *leuC* (514–1189 bp from the translational initiation site) was amplified using CAGGTCGACTCTAGAG-GATC and CAGTGAATTCGAGCTCGGTA as primers and pUC-*leuC* as a template, and then labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (23). The DNA-binding activity of Lon was assessed as described above except using <sup>32</sup>P-labeled

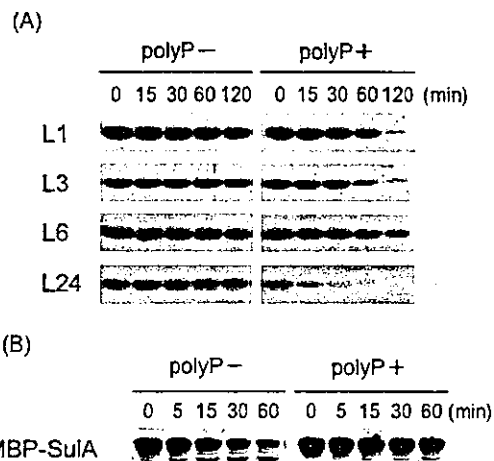


FIG. 1. Degradation of ribosomal and MBP-SulA proteins by Lon in the presence of polyP. A, purified ribosomal protein (5  $\mu$ g) was incubated with Lon (1.5  $\mu$ g) in the presence (*polyP*+) and absence (*polyP*-) of polyP<sub>700</sub> (1.4  $\mu$ M as a polymer) at 37 °C for the indicated amount of time. B, MBP-SulA (5  $\mu$ g) was incubated with Lon (1.5  $\mu$ g) in the presence and absence of polyP<sub>700</sub> (1.4  $\mu$ M as a polymer). For both experiments, reaction mixtures were subjected to 12.5% SDS-PAGE, and the gel was stained as described under "Experimental Procedures."

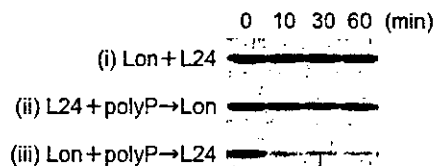


FIG. 2. Effect of order of addition on degradation of L24 by Lon. Ribosomal protein L24 (1.2  $\mu$ g), Lon (0.6  $\mu$ g), and polyP (0.7  $\mu$ M as a polymer) were mixed together in different orders, (i), Lon protease and L24 were mixed without polyP; (ii), L24 and polyP were mixed and incubated for 5 min at 37 °C after which Lon was added to the mixture; (iii), Lon and polyP were mixed, incubated for 5 min at 37 °C, and after which L24 was added to the mixture.

DNA instead of polyP. The radioactivity remaining on the filter was measured by scintillation counting.

**Sequencing of DNA Extracted from DNA-Lon Complex**—Proteolytically inactive Lon fused with MBP was expressed in *E. coli* harboring pMal-Lon(S679A). After the *E. coli* cells were disrupted, a lysate containing MBP-Lon-DNA complexes was applied to the immobilized amylose column. The column was washed with five volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, and 0.25% Tween 20 and then washed with five volumes of the same buffer containing 200 mM NaCl. After free DNA was completely eluted from the column, MBP-Lon was eluted with the same buffer containing 10 mM maltose. The fraction containing MBP-Lon was extracted twice with the same volume of phenol-chloroform, after which DNA was precipitated with ethanol. The DNA was dissolved with water, inserted into the SmaI site of pUC119, and then used to transform *E. coli*. Inserted DNAs obtained from 21 individual recombinants were sequenced (23).

**Gel-shift Assay**—*LeuC* DNA (0.5 pmol) and Lon (S679A) (1  $\mu$ g) were incubated for 5 min at room temperature in the presence or absence of polyP. The reactions were then mixed with loading dye and separated by 1% agarose gel electrophoresis (23). After staining with ethidium bromide, DNA was visualized under UV light. Double-stranded *leuC* DNA (GATCCAGCTATACTTGGTCAGGGCGAATTCTAACTA) (17) was synthesized and used as a competitor.

## RESULTS

**PolyP Affects the Substrate Specificity of Lon**—In the presence of polyP, Lon degrades most LiCl-extracted ribosomal proteins (4). We purified several ribosomal proteins of the large subunit (L1, L3, L6, L9, L13, L15, L17, L18, and L24) and subjected them to Lon-mediated degradation in the presence or absence of polyP. Lon degraded L1, L3, L6, and L24 in the presence but not in the absence of polyP (Fig. 1A). PolyP also stimulated the degradation of purified L9, L13, and L17 but not

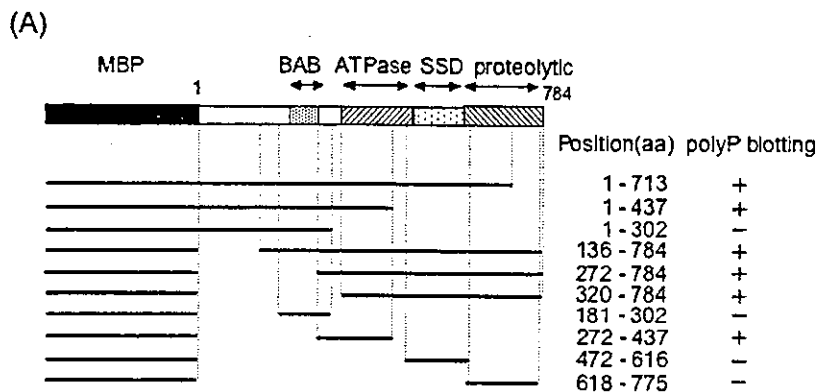
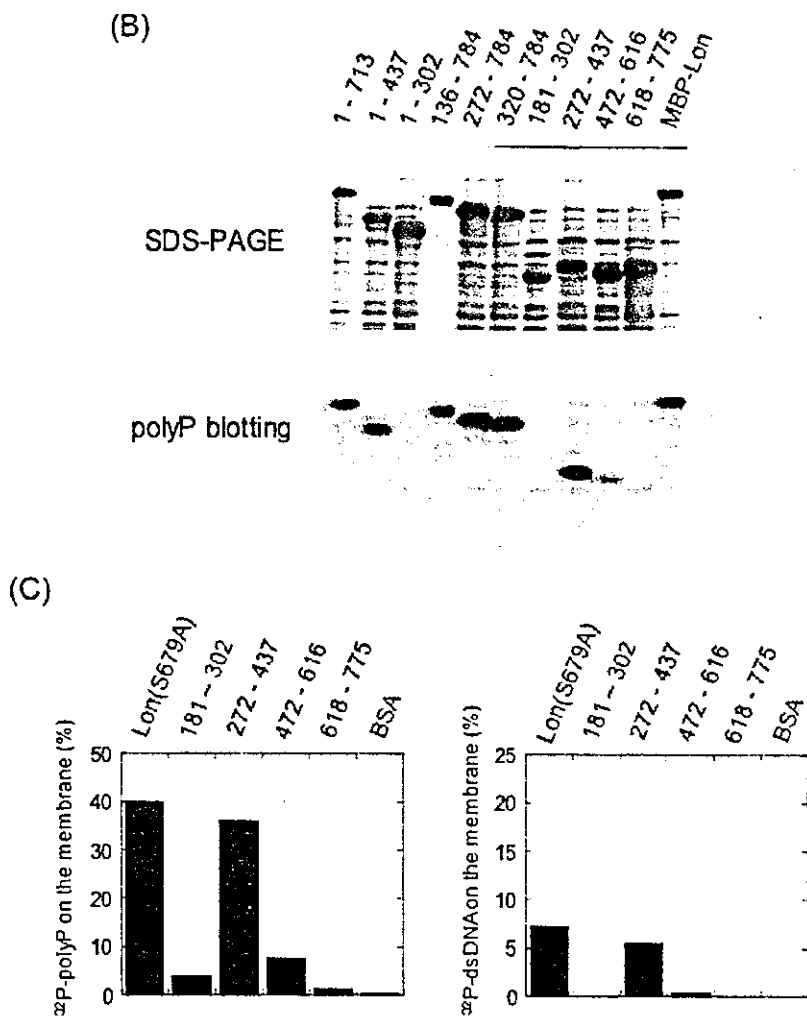


FIG. 3. PolyP- and DNA-binding sites of Lon. A, primary structure of the MBP-Lon shown with proposed domains. Structures of deletion mutants are shown with the number of amino acids (aa) of Lon fused to MBP. Results of the polyP blotting are indicated to the right. BAB, basic-acid-basic; SSD, sensor and substrate discrimination. B, total protein from *E. coli* expressing the MBP-Lon derivatives were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. The polyP blotting to the MBP-Lon derivatives was performed using  $^{32}\text{P}$ -labeled polyP as a probe. C, polyP- and DNA-binding assays of the purified MBP-Lon derivatives. The radioactivity remaining on the nitrocellulose filter, corresponding to the amount of polyP- (left) or DNA-protein (right) complex, is plotted. Proteolytically inactive Lon (S679A) was used to avoid proteolysis. BSA, bovine serum albumin.



L15 and L18 (data not shown). Lon is known to be responsible for the rapid turnover of regulatory proteins, including Sula, a cell division inhibitor produced in response to DNA damage. Therefore MBP-Sula was subjected to degradation by Lon in the presence and absence of polyP. In contrast to the ribosomal proteins tested, the degradation of the MBP-Sula protein was slightly inhibited in the presence of  $1.4 \mu\text{M}$  polyP (Fig. 1B). Therefore, our results showed that polyP does not always stimulate Lon-mediated protein degradation and that polyP affects the substrate specificity of Lon.

**PolyP-Lon Complex Formation Is Important for the Stimulation of Ribosomal Protein Degradation**—Most ribosomal proteins bind to polyP and are degraded by Lon in the presence of polyP (4). The MBP-Sula protein does not bind to polyP, indicating that polyP binding is necessary for the polyP stimulation

of Lon-mediated proteolysis. However, not all polyP-binding proteins are degraded by Lon in the presence of polyP. For example, polyP kinase, L15, and L18 can bind to polyP, but they are not degraded by Lon in the presence of polyP. Therefore, it is likely that polyP binding is necessary but not sufficient for the polyP stimulation of Lon-mediated proteolysis.

Lon also binds polyP (4). Does polyP first bind to Lon and then the polyP-Lon complex degrades the ribosomal proteins? Alternatively, does polyP bind to ribosomal proteins and then Lon recognizes the polyP-ribosomal protein complex for degradation? In the latter case, polyP may function as a molecular tag, much like ubiquitin in eukaryotic cells (reviewed in Refs. 24-26), to identify ribosomal proteins for degradation by proteases. To answer these questions, we examined the effect of the order of addition on L24 cleavage (Fig. 2). We found that

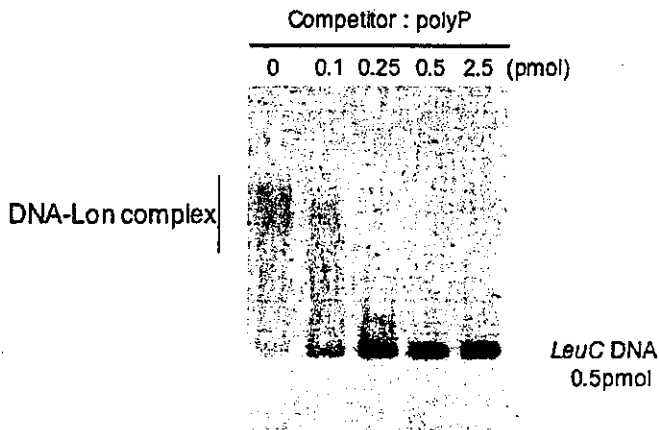


FIG. 4. Gel-shift assay for DNA-Lon complex. *LeuC* DNA (0.5 pmol) and Lon (1  $\mu$ g) were incubated for 5 min at room temperature in the presence of the indicated amounts of polyP. The mixtures were then mixed with loading dye and separated by 1% agarose gel electrophoresis. After staining with ethidium bromide, DNA was visualized under UV light.

Lon efficiently degraded L24 when Lon and polyP were mixed together prior to the addition of L24, whereas there was little degradation of L24 when L24 was first mixed with polyP before the addition of Lon (Fig. 2). This indicated that polyP-Lon complex formation is important for the stimulation of protein degradation and that polyP does not act as a tag for Lon-mediated degradation.

**PolyP- and DNA-binding Sites of Lon Are Localized within the ATPase Domain**—Lon consists of basic-acid-basic, ATPase, sensor and substrate discrimination, and proteolytic domains (Fig. 3A). To determine the polyP-binding site of Lon, we generated proteins containing deletion mutants of Lon fused to the C terminus of MBP. These proteins were expressed and transferred to a nitrocellulose membrane (Fig. 3B). PolyP blotting was performed using [ $^{32}$ P]polyP (Fig. 3B). The results of this experiment showed that the polyP-binding site is localized on Lon between amino acids 272 and 437. Because Lon 320–784 also bound to polyP, the polyP-binding site is presumably restricted to the region between amino acids 320 and 437. Therefore, polyP binding appears to be mediated by the ATPase domain.

We examined this further using purified Lon deletion mutants. The fusion proteins were purified by amylose chromatography and then used in a polyP-binding assay (Fig. 3C). We found that the binding activity of the purified Lon 272–437 was almost same as that of intact Lon. This supports the idea that the polyP-binding site is localized in the ATPase domain of Lon.

Although Lon was originally identified as a DNA-binding protein (5, 15), the location of the DNA-binding site has not been determined. We therefore performed a DNA-binding assay using the purified Lon deletion mutants. We used  $^{32}$ P-labeled *E. coli leuC* DNA as a probe because, as shown below, a *leuC* DNA fragment was co-purified with MBP-Lon. Fig. 3C shows that the DNA-binding site also appears to be localized in the ATPase domain of Lon.

**Lon Binds to polyP More Strongly than to DNA**—Because the ATPase domain contains both polyP- and DNA-binding sites, polyP may compete with DNA for the binding to Lon. To examine this possibility, we determined the effect of polyP on the DNA-Lon complex using a gel-shift assay (Fig. 4). DNA (*leuC*) formed a complex with Lon, but in the presence of an equimolar amount of polyP, formation of the DNA-Lon complex was almost completely inhibited. This suggested that polyP binds to Lon more strongly than to DNA. To further confirm that the DNA-Lon complex is inhibited in the presence of polyP, we

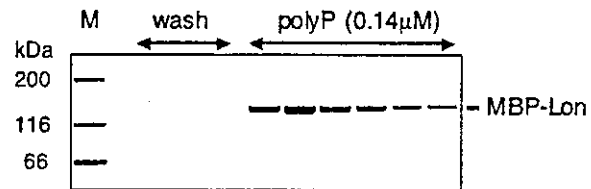


FIG. 5. Elution of Lon from DNA-immobilized column with polyP. MBP-Lon (50  $\mu$ g) was applied to a DNA-cellulose (Amersham Biosciences) column equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 50 mM NaCl. After washing with two volumes of the same buffer, MBP-Lon was eluted from the column with the buffer containing 0.14  $\mu$ M polyP as a polymer. Each fraction was separated by SDS-PAGE, and MBP-Lon was visualized by silver staining. M, molecular marker.

TABLE II  
DNA fragments co-purified with MBP-Lon

Gene	Position <sup>a</sup>
<i>b0899</i>	893 to 1363
<i>b2324</i>	-45 to 964
<i>b2973</i>	2200 to 2806
<i>cynS</i>	204 to 700
<i>ftsJ</i>	-84 to 546
<i>leuC</i>	514 to 1189
<i>lon</i>	845 to 1616
<i>lpdX</i>	686 to 1071
<i>malE</i>	313 to 932
<i>rhsE</i>	1006 to 1864
<i>rplM</i>	162 to 664
<i>secD</i>	-67 to 673
<i>yacK</i>	118 to 675
<i>yafA</i>	703 to 1417
<i>ybbC</i>	31 to 413
<i>yecA</i>	72 to 605
<i>yecS</i>	393 to 1072
<i>yejB</i>	-23 to 512
<i>yfhK</i>	430 to 1033
<i>ygcU</i>	375 to 861
<i>ymfE</i>	15 to 498

<sup>a</sup> Nucleotide number from the start site of translation is indicated.

examined the effect of polyP on MBP-Lon binding to a DNA-cellulose column. MBP-Lon was not eluted from the column by a buffer alone, but was eluted when the buffer contained polyP (Fig. 5). This result suggested that polyP can bind to Lon at the same site as DNA (Fig. 5).

During the course of the studies using amylose chromatography, we observed that purified MBP-Lon contains bound DNA. This bound DNA was lost when the MBP-Lon was further purified using an anion-exchange column. Interestingly, when the *E. coli* cells were subjected to nutritional downshift, which increases polyP level as much as 1000-fold (2, 3), we found a significant amount of polyP associated with the amylose resin-purified MBP-Lon (data not shown). Together, our results showed that although Lon can form a complex with DNA *in vitro* and *in vivo*, Lon forms a complex with polyP when it is present.

**Lon Binds Nonspecifically to *E. coli* Chromosomal DNA**—Although Fu *et al.* (17) showed that the *E. coli* Lon binds to a TG-rich sites of the human immunodeficiency virus type2 enhancer, it is unclear whether Lon binds to specific sites on the *E. coli* genome. To examine this in greater detail, we cloned and sequenced the DNA fragments that were co-purified with the amylose resin-purified Lon. Twenty-one DNA clones were randomly selected for analysis. Their DNA sequences corresponded to 382–1009-bp fragments containing *b0899*, *b2324*, *ftsJ*, *leuC*, *lon*, *lpdX*, *malE*, *rhsE*, *secD*, *yacK*, *yafA*, *ybbC*, *yecA*, *yejB*, *yfhK*, *ygcU*, and 496–679-bp fragments containing the intercistronic regions between *b2973* and *b2972*, *cynS* and *cynX*, *rplM* and *rpsI*, and *yecS* and *yecC* (Table II). There was no significant similarity among the sequences of

these DNA fragments. Thus, in agreement with Charette *et al.* (15), it appears that Lon binds nonspecifically to *E. coli* chromosomal DNA.

We also examined the relative affinities of *leuC* and the pets DNA. We used synthesized 36-bp TG-rich pets DNA as a competitor in the *LeuC* DNA-binding experiment. The *leuC* DNA-Lon complex was still observed in the presence of a 100-fold molar excess of the pets DNA (data not shown), suggesting that the pets DNA has lower affinity toward Lon than the *LeuC* DNA.

#### DISCUSSION

*PolyP Regulates the Proteolytic Activity of Lon by Forming a polyP-Lon Complex*—Regulatory proteolysis is generally quite specific, and the features of proteins that target them for degradation are well known in eukaryotic cells. Specifically, conjugation of proteins with ubiquitin (ubiquitination) targets them to the proteasome and is essential for the degradation of many proteins in eukaryotic cells (24–26). In bacteria, the SsrA-mediated tagging and degradation system provides a unique mechanism for the destruction of abnormal proteins produced by inappropriate translation termination (27). Therefore, we suspected that polyP acts as a tag to direct Lon-mediated protein degradation. However, our current order of addition experiments suggested that polyP first binds to Lon rather than to the targeted ribosomal proteins, suggesting that polyP does not function as a tag for Lon-mediated degradation.

We recently found that based on gel chromatography, the polyP-Lon complex is very large (>2000 kDa).<sup>2</sup> Furthermore, dynamic light scattering measurements indicated a molecular mass of ~8750 kDa (data not shown). Because one molecule polyP binds to approximately four molecules of Lon (4), it might be considered that the polyP-Lon complex is a multiple of the Lon hexamer. Additional studies must be performed to more precisely determine the structure of the polyP-Lon complex.

*PolyP Affects the DNA-binding Activity of Lon*—Analysis of polyP and DNA binding by Lon mutants indicated that the polyP- and DNA-binding sites of Lon are localized in the ATPase domain. Also, polyP bound to Lon more strongly than DNA, which allows polyP to displace the Lon-associated DNA *in vitro* as well as *in vivo*. The ATPase domain is thought to be involved in the important chaperon activity (10), and DNA has been reported to stimulate the ATPase activity of Lon (15). However, we have shown previously that polyP slightly inhibits the ATPase activity of Lon in the absence of substrates (4). It is a bit puzzling that both of the polyP-Lon and DNA-Lon complexes show ATPase activities if polyP and DNA persistently cover the ATPase domain. It might be possible that polyP and DNA binding to the ATPase domain are dynamic rather than static.

*Regulatory Effects of polyP on the Proteolytic and DNA-binding Activities of Lon*—Goff and Goldberg (28) reported that overproduction of Lon causes the proteolysis of normal proteins in cells and is lethal to the host cells. We also observed that *E. coli* growth stopped immediately when Lon was overproduced (data not shown). Excess Lon is unfavorable to cells under normal conditions. Sonezaki *et al.* (29) speculated that Lon is normally localized in the multiprotein-DNA complex (nucleoid), which might restrict its ability to access and degrade proteins under normal conditions. They also showed that MBP-Lon was dissociated from DNA in the presence of denatured

but not native bovine serum albumin and that treatment of MBP-Lon at 47 °C reduced its DNA-binding ability but does not affect its protease activity. These findings suggested that exposure to heat shock causes a release of Lon from DNA allowing it to degrade denatured proteins. Similarly our data suggested that when the levels of polyP increase in response to nutritional downshift, the polyP-Lon complex is released from DNA whereupon it can access and degrade free ribosomal proteins.

It is also possible that Lon binds to DNA at a site adjacent to a regulatory protein-binding site, thus leading to enhanced degradation of the regulatory protein. In agreement with this model, some early studies have suggested that Lon controls the level of mRNA transcription from the *E. coli gal* operon (30). In this case, polyP may modulate the function of Lon in transcriptional regulation. However, like Charette *et al.* (15), we suspected that *E. coli* Lon is a DNA-binding protein with low specificity. Further investigations are required to clarify the role of Lon in transcriptional regulation.

It remains unclear whether the main role of the DNA-binding ability of Lon is to prevent it from accessing and degrading substrate proteins or to mediate enhanced degradation of regulatory proteins. In any event, the drastic change in intracellular polyP levels that occurs during nutritional downshift can affect the DNA-binding ability of Lon and its regulation of cellular functions.

#### REFERENCES

- Kornberg, A. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 491–496
- Rao, N. N., and Kornberg, A. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1394–1400
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., and Kornberg, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21240–21243
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kornberg, A. (2001) *Science* **293**, 705–708
- Chin, D. T., Goff, S. A., Webster, T., Smith, T., and Goldberg, A. L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11718–11728
- Maurizi, M. R. (1992) *Experientia (Basel)* **48**, 178–201
- Yoshida, M., and Amano, T. (1995) *FEBS Lett.* **359**, 1–5
- Amerik, A. Yu., Antonov, V. K., Gorbalenya, A. E., Kotova, S. A., Rotanova, T. V., and Shimbarevich, E. V. (1991) *FEBS Lett.* **287**, 211–214
- Ebel, W., Skinner, M. M., Dierksen, K. P., Scott, J. M., and Trempy, J. E. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 2236–2243
- Smith, C. K., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6678–6682
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropen, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A., and Gustchina, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 8140–8148
- Goldberg, A. L., Moerschell, R. P., Chung, C. H., and Maurizi, M. R. (1994) *Methods Enzymol.* **244**, 350–375
- Goldberg, A. L. (1992) *Eur. J. Biochem.* **203**, 9–23
- Gottesman, S. (1989) *Annu. Rev. Genet.* **23**, 163–198
- Charette, M. F., Henderson, G. W., Doane, L. L., and Markovitz, A. (1984) *J. Bacteriol.* **158**, 195–201
- Fu, G. K., and Markovitz, D. M. (1998) *Biochemistry* **37**, 1905–1909
- Fu, G. K., Smith, M. J., and Markovitz, D. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 534–538
- Rotanova, T. V. (2002) *Vopr. Med. Khim.* **48**, 541–552
- Sonezaki, S., Kondo, A., Oba, T., Ishii, Y., Kato, Y., and Nakayama, H. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 313–318
- Sonezaki, S., Ishii, Y., Okita, K., Sugino, T., Kondo, A., and Kato, Y. (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 304–309
- Wickstrom, E., and Laing, L. G. (1988) *Methods Enzymol.* **164**, 238–258
- Cachia, C., Flamion, P. J., and Schreiber, J. P. (1991) *J. Chromatogr.* **539**, 343–353
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998) *Cell* **92**, 367–380
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801–847
- Karza, A. W., Roche, E. D., and Sauer, R. T. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 449–455
- Goff, S. A., and Goldberg, A. L. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 4508–4515
- Sonezaki, S., Okita, K., Oba, T., Ishii, Y., Kondo, A., and Kato, Y. (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 484–488
- Hua, S. S., and Markovitz, A. (1975) *J. Bacteriol.* **122**, 510–517

<sup>2</sup> K. Nomura, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda, unpublished observation.

## 運動時の呼吸化学調節フィードバックシステムの定量評価

—運動時換気決定機構解明への解析的アプローチ—

宮本忠吉 高木 洋 稲垣正司 川田 徹  
柳谷雄介 杉町 勝 砂川賢二

## 運動時の呼吸化学調節フィードバックシステムの定量評価

### — 運動時換気決定機構解明への解析的アプローチ —

宮本忠吉\* 高木 洋\* 稲垣正司\* 川田 徹\*  
柳谷雄介\* 杉町 勝\* 砂川賢二\*

#### § 背景および目的

呼吸の化学調節系は圧反射系と同様に生体の重要な負帰還系である。生体は血中の二酸化炭素濃度などを感知し分時換気量を変化させ、それによって血中二酸化炭素濃度(もしくはpH)を安定化させる。運動時には化学反射系のフィードバック調節によって代謝レベル(二酸化炭素産生量)に応じた換気反応の亢進が生じる<sup>1)</sup>。その結果、運動中のPaCO<sub>2</sub>は安静値からほとんど変化しないことが知られている。Kao<sup>2)</sup>らは麻酔下での犬の交差灌流実験を用いた研究で、運動時には末梢からの入力と中枢からのドライブの両方が換気亢進に影響を及ぼしていることを明らかにした。しかし、実際の運動中の化学調節系の定量的評価法は確立されておらず、その主要なメカニズムに関しては依然未解明な部分も多い。このため、心不全などの疾患において運動時呼吸異常と病態との関連が重要視されているが、その臨床的意義付けは十分にできていないのが現状である。

そこで我々は、呼吸化学調節フィードバックシステムの機能特性やそのシステムの換気量決定機構をヒトで定量的かつ統合的に評価するための方法論を開発した<sup>3)</sup>。本研究は、その評価法を用いて呼吸化学調節系の運動時換気決定機構の詳細を定量的に明らかにすることを目的とした。

#### § 対象および方法

対象：非肥満、非喫煙の健常男性9名(平均年齢24.8±5.4歳)で、平均体重および身長はそれぞれ69.4±7.4kg, 172.3±4.8cmであった。対象者にはあらかじめ実験内容の説明を行い、実験参加の意志を確

認し同意書に署名を求めた。また、テストの実施前24時間は激しい運動を避けること、日常の食事を続け高塩分食はさけること、各テスト実施の4時間前は食事、カフェイン、アルコールなどの摂取を行わないことなどを指示した。

測定方法：呼吸の化学調節系を① Central Controller(制御部)と② Peripheral Plant(被制御部)の二つのサブシステムに分離して各々の特性を定量化し、平衡線図解析法(図2)を用いて安静時と運動時(換気性作業閾値以下でかつ動作点における $\dot{V}O_2$ が約0.8L/分となるような負荷量)でそれぞれ比較検討した。

① Central controller 特性の定量評価：12分間一定濃度のCO<sub>2</sub>を一方向弁を用いて吸入させ(0, 3.5, 5.0, 6.0% CO<sub>2</sub>, 80% O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>バランス)定常状態における $\dot{V}E$ および呼気終末CO<sub>2</sub>分圧(PetCO<sub>2</sub>)の測定を行い、PetCO<sub>2</sub>→ $\dot{V}E$ 関係を $\dot{V}E=S \cdot (\text{PetCO}_2 - B)$ の式を用いて直線近似しその特性を定量的に評価した。

② Peripheral plant 特性の定量評価：12分間の一定の分時換気(低換気または過換気)をVisual feedback法<sup>3)</sup>を用いて意識的に行わせ、 $\dot{V}E \rightarrow \text{PetCO}_2$ 関係を双曲線近似( $\text{PetCO}_2 = A/\dot{V}E + C$ )することで定量的に記述した。

①②の交点は呼吸化学調節系の動作点と呼ばれ、通常我々が安静時や運動時に測定評価している $\dot{V}E$ やPetCO<sub>2</sub>値はこの点を指している。

#### § 結果および考察

運動によって呼吸化学調節フィードバックシステムを構成するCentral controllerおよびPeripheral plantの両サブシステムの特性は共に変化した。運動によるCentral controller特性の変化

運動時のCentral controller特性のスロープS値は安静値よりも有意に増加し(p<0.05)、X軸切片B値

\*国立循環器病センター研究所循環動態機能部  
(〒565-8565 吹田市藤白台5-7-1)

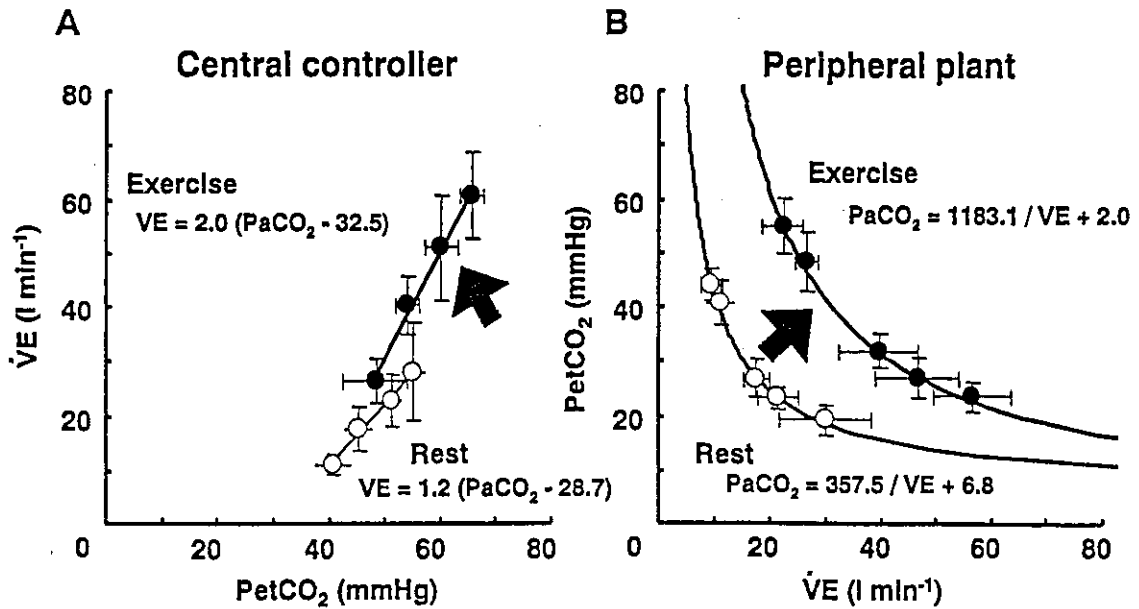


図 1 Characteristics of central controller (A) and peripheral plant (B) derived from pooled data from all subjects at rest and during exercise

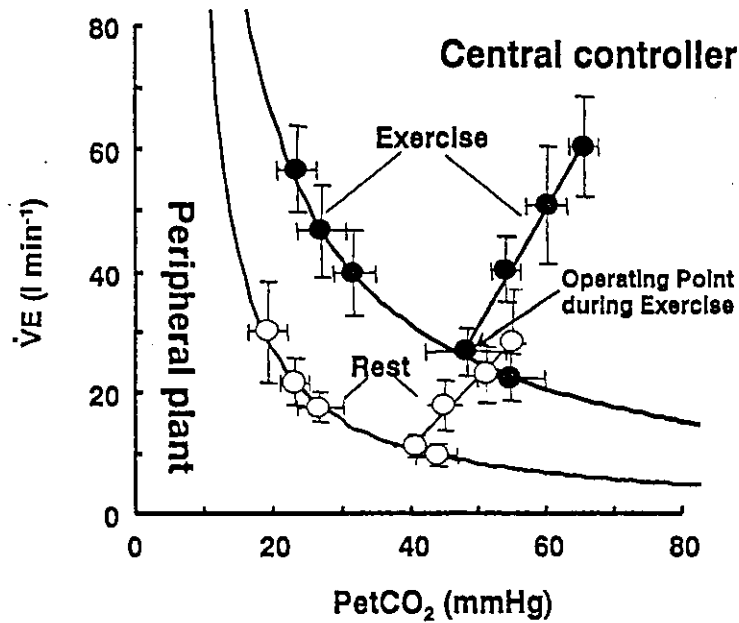


図 2 Integrated characterization of the chemoreflex system controlling ventilation, using an equilibrium diagram at rest and during exercise

は運動により有意な変化は認められなかった(図1-A)。これは運動によってCentral controllerのゲインの増加、すなわち中枢化学受容器や延髄呼吸中枢領域におけるCO<sub>2</sub>化学感受性が増していることを意味しており、Poon and Greene<sup>4)</sup>の報告と一致するものであった。しかし、他の先行研究では、運動によってCO<sub>2</sub>

化学感受性は変化しない、逆に低下するなどの報告もあり、研究者間で必ずしも一致した結果が得られていない。これには方法論の差異<sup>4)</sup>が一部関係していると考えられるが、むしろCentral controllerの特性が種々の条件下で容易に変化し得る性質を有していることに起因していると思われる。今後、運動時換気亢進



のメカニズムの検討にあたっては、同一の運動負荷条件下で Central controller の特性に影響を及ぼす中枢および末梢性の要因やそれらの相互作用に関する解析を進める必要があると考えられる。

#### 運動による Peripheral plant 特性の変化

Peripheral plant 定量特性、すなわち双曲線関係で近似した  $\dot{V}E \rightarrow \text{PetCO}_2$  関係の A 値は運動によって有意 ( $p < 0.01$ ) に増加し、逆に Y 軸漸近線である C 値は有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した (図 1-B)。Peripheral plant の特性は概念的には代謝双曲線式 ( $\text{PaCO}_2 = 863 \times \dot{V}\text{CO}_2 / (\dot{V}E \times (1 - \text{VD}/\text{VT}))$ ) を用いて説明することができる<sup>116)</sup>。すなわち、式が示すように  $\dot{V}E$  の変化によって最終的に決定される  $\text{PaCO}_2$  値は、 $\text{CO}_2$  産生量と死腔換気率の両パラメータによって決定される。したがって、その機能特性は主に全身での、特に運動時では活動筋における代謝機能と、肺でのガス交換機能の両者を反映する指標となり得る。したがって、本研究において観察された Peripheral plant 特性の運動による右上方シフト (A 値の増加) は、運動時に産生される  $\text{CO}_2$  産生量の変化を主に反映していると考えられる。一方、その漸近線のシフト (C 値の減少) は、換気亢進時における血中  $\text{CO}_2$  排泄効率の向上を示しており、これは、運動時の有効肺胞換気の増加 (VD/VT の減少) や、呼吸筋自体の仕事量減少に伴う  $\text{CO}_2$  産生量の減少などが関係していると考えられる。

平衡線図解析の結果、運動によって、両サブシステムの交点で決定される動作点の  $\dot{V}E$  値は、 $\text{PetCO}_2$  の増加を伴って有意 ( $p < 0.01$ ) に増加することがわかる (図 2)。

#### § 結論

運動時換気亢進は呼吸化学調節系の Central controller と Peripheral plant の両者の特性の質的な変化によって生じる。今後、運動時の換気決定機構や心

不全患者に見られる換気異常の機序解明には、本定量評価法を用いた解析的アプローチが有用であることが示唆された。

#### § 文献

- 1) Wasserman K, Whipp BJ and Casaburi R : In : Handbook of Physiology, The Respiratory System. Control of Breathing. Bethesda MD, Am Physiol Soc, 1986, 595-620
- 2) Kao FF : An experimental study of the pathways involved in exercise hyperpnea employing cross-circulation techniques. In : Regulation of Human Respiration, Ed by Cunningham DJC and Lyoyd BB, Blackwell, Oxford, 1963, 461-502
- 3) Miyamoto T, Inagaki M, Takaki H, et al : Integrated characterization of chemoreflex system controlling ventilation in human using an equilibrium diagram. *Eur J Appl Physiol*/submitted 2003
- 4) Poon CS and Greene JG : Control of exercise hyperpnea during hypercapnia in humans. *J Appl Physiol* 1985 ; 59 : 792-797
- 5) Berkenboshh A, Bovill JG, Dahan A, et al : The ventilatory  $\text{CO}_2$  sensitivities from Read's re-breathing method and the steady-state method are not equal in man. *J Physiol* 1989 ; 411 : 367-377
- 6) Cunningham DJC, Robbins PA and Wolff CB : In : Handbook of Physiology, Integration of respiratory responses to changes in alveolar partial pressures of  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  and in arterial pH. Bethesda MD, Am Physiol Soc, 1986, 476-528

特集

# 神経インターフェイス技法を用いた 心不全治療と術中血圧制御

佐藤 隆幸\*

## はじめに

循環器疾患では、心不全や圧反射失調のように制御機構の機能破綻が病態の悪化や予後を規定する因子になることが多い。そこで、積極的に循環制御機構の機能再建や最適化を図るための新しい治療戦略として、神経インターフェイス技法を用いたバイオニック療法が提唱されている<sup>1)</sup>。

本研究では迷走神経の電気刺激による心不全治療<sup>2)</sup>および脊髄交感神経刺激による術中自動血圧制御に関する我々の研究成果について紹介する。

## 迷走神経刺激による慢性心不全治療

慢性心不全においては、呼吸性心拍変動の低下や心拍数増加が予後不良因子として知られている

が、これらはいずれも心臓迷走神経活動の低下を反映したものである<sup>3-7)</sup>。そこで、「迷走神経を電気刺激する (Vagal Nerve Electrical Stimulation, VES) 神経インターフェイス療法」が生命予後を改善するか否かを心不全モデル動物を用いて実験的に検証した。左冠状動脈起始部の結紮により、左室の40~50%が梗塞におちいった慢性心不全ラットの右迷走神経に刺激電極を固定し、植え込み型電気刺激装置と接続した。刺激強度は、心拍数が10~20%低下する程度にした。VES療法は6週間のうち切り、血行動態・心臓リモデリングに与える影響と140日間の長期生存率を観察した。

## A. 心機能およびリモデリングに与える影響

図1は、治療終了時の血行動態の比較を示している。平均動脈圧は、梗塞後心不全群は、健常群

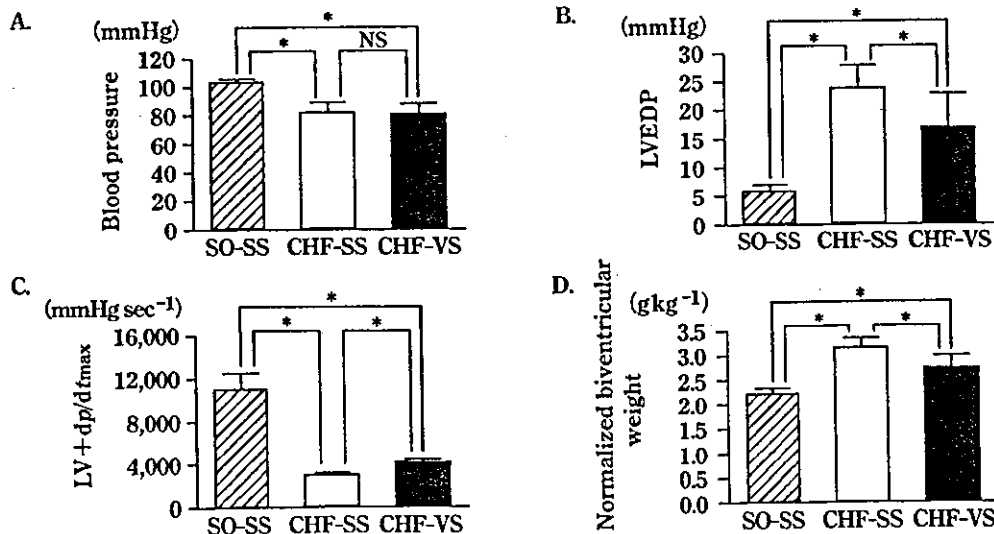


図1 迷走神経刺激の血行動態および両心室重量に与える影響

健常群 (SO-SS, n=9), 梗塞後心不全における非刺激群 (CHF-SS, n=13) および梗塞後心不全における刺激群 (CHF-VS, n=11)。値は、平均±標準偏差で示している。\*, 有意差あり (p < 0.05)。

\*高知大学医学部循環制御学教室

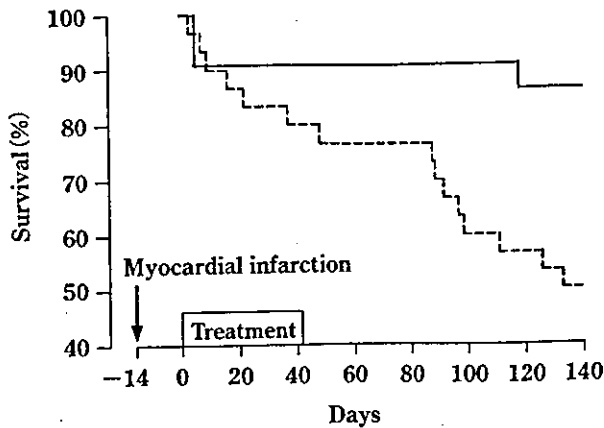


図2 迷走神経刺激の慢性心不全ラットの生存率に与える影響  
 実線は刺激群 (n=22), 破線は非刺激群 (n=30) を示す。迷走神経刺激により, 生存率は有意に改善した (p=0.008)。

に比べ, 有意に低かった。梗塞後心不全群は, 健常群に比べ, 左室拡張末期圧の有意な上昇と左室圧一次微分最大値の有意な低下を示したが, 迷走神経刺激療法により, 左室拡張末期圧の有意な減少と左室圧一次微分最大値の有意な上昇が認められた。両心室重量が, 梗塞後心不全群では有意な増加を示したが, 迷走神経刺激療法により有意に減少した。以上の結果は, 6週間の迷走神経刺激療法によってポンプ機能が改善し心室リモデリングが予防されたことを示唆する。なお, 梗塞後心不全における刺激群と非刺激群とも梗塞サイズに差はなかった。

**B. 長期生存率および液性因子に与える影響**

迷走神経刺激療法の生存率に与える影響をKaplan-Meier法により解析した。140日の観察期間における生存率曲線を図2に示す。刺激群22例のうち死亡は3例, 非刺激群30例のうち死亡は15例であった (p=0.008, Fisherの直接法)。このように, 迷走神経刺激療法は相対的死亡リスクを73%も減少させた。この効果は, アンジオテンシン変換酵素阻害薬によるものよりもさらに良好な成績であった<sup>8)</sup>。

迷走神経刺激療法は, 両心室重量, 血漿ノルエピネフリンおよび脳性ナトリウム利尿ペプチドを有意に減少させた。なお, これらの指標はいずれも臨床試験で明らかにされている予後規定因子で, 高値ほど予後不良とされているものである。

以上より, VES療法が心機能の改善とリモデリ

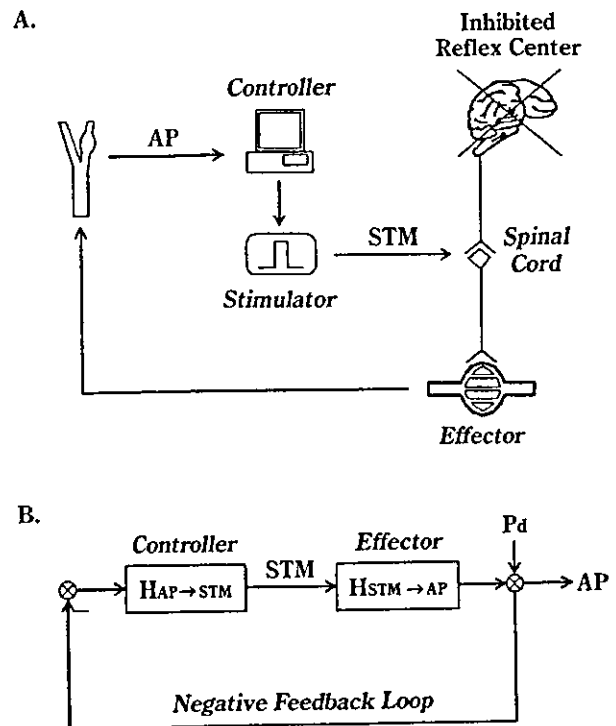


図3 バイオンニック圧反射装置  
 バイオンニック圧反射装置の概要(A)とブロック線図(B)。

ングを予防し, さらに, 長期予後を著明に改善することが明らかになった<sup>2)</sup>。今後は, 迷走神経電気刺激が予後改善効果を発揮するメカニズムの解明が待たれる。

**脊髄交感神経刺激による術中血圧の自動制御**

動脈圧受容器反射は短期血圧調節にきわめて重要な役割を果たしているが<sup>9)</sup>, 多くの麻酔薬がこの機能を抑制するため<sup>10,11)</sup>, 少量の出血などでも予期せぬ血圧低下を来すことがある<sup>12,13)</sup>。そこで, 図3のように, 圧センサー→コンピュータ→電気刺激装置→硬膜外カテーテル電極を用いたバイオンニック圧反射装置 (Bionic Baroreflex System, BBS) を用いて, 血圧の自動制御を試みた。

**A. 動作原理の開発戦略**

サーボコントロールの原理を応用してBBSを試作した。サーボコントローラの動作原理としては, いわゆる, 比例・積分補償型のネガティブフィードバックを採用した<sup>14)</sup>。被制御変数である瞬時血圧  $AP(f)$  の標的 blood pressure  $AP_t(f)$  からの偏差, すなわち, 制御誤差  $E(f)$  は,  $E(f) = AP_t(f) - AP(f)$  とあらわされる。  $E(f)$  から脊髄交感神経刺激  $STM(f)$  までの伝達関数  $H_1(f)$  は, 比例補償係数  $K_p$  と積分補償係数  $K_i$  およびラプラス演算子  $s=2\pi f j$  を用いると

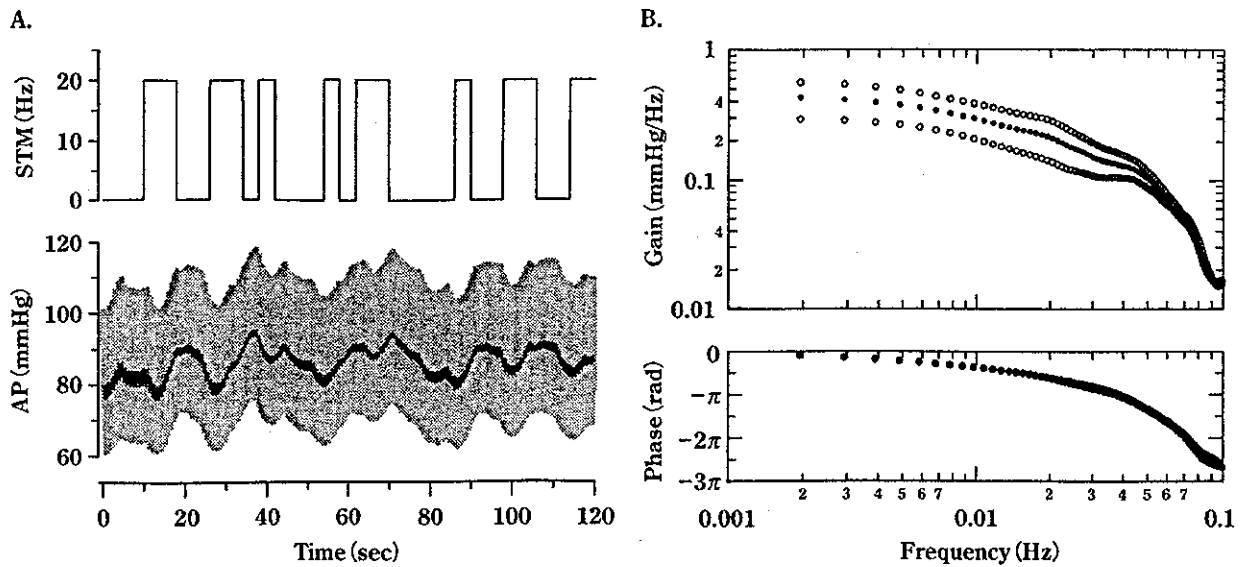


図4 脊髄交感神経の不規則刺激の例と伝達関数

不規則刺激(STM)に対する動脈圧(AP)の応答は緩徐である。伝達関数により刺激に対する動脈圧応答が定量的に推定可能になる。

次のようにあらわされる。

$$H_1(f) = K_p + \frac{K_i}{s}$$

また、脊髄交感神経刺激に対する血圧の応答特性を示す伝達関数を  $H_2(f)$  とすると、被制御変数は次のようにあらわされる。

$$AP(f) = \frac{H_1(f)H_2(f)}{1+H_1(f)H_2(f)} AP_i(f) + \frac{1}{1+H_1(f)H_2(f)} AP_d(f)$$

ここで、 $AP_d(f)$  は、サーボコントロールシステムに加わる外乱である。上の式から明らかのように、外乱の影響は、 $1/(1+H_1(f)H_2(f))$  に抑制されることがわかる。

したがって、外乱に抗して血圧安定化を図るためには、 $H_1(f)$  の最適設計が必要である。そこで、まず、計測可能な  $H_2(f)$  を次項のような方法で求め、次いで、数値シミュレーションにより  $H_1(f)$  の係数  $K_p$  および  $K_i$  を設計した。

### B. サーボコントローラ的设计

頸椎手術症例で、術中に脊髄誘発電位検査を施行予定の患者を対象にした。吸入麻酔薬による全身麻酔の導入後、経皮的に硬膜外カテーテル電極を挿入し、第9ないし第12胸椎レベルに電極を留置した。次いで刺激パルズのパラメータをパルス幅0.1ミリ秒、刺激頻度20Hzに設定した。刺激強度は、この刺激パルスにより平均動脈圧がおおむね10mmHgだけ上昇する電流値に調整した。筋弛

緩薬投与下で、電気刺激装置に白色雑音様の不規則なトリガー信号を入力しながら、動脈圧の変動を15分間記録した。刺激パルスの頻度は、0か20Hzかのいずれかになるように8秒間隔毎に不規則に切り替えた。不規則刺激中の血圧応答の例を図4Aに、また推定された伝達関数  $H_2(f)$  を図4Bに示す。ついで、20例で求めた平均的  $H_2(f)$  を用いて、ステップ状の血圧低下(-20mmHg)に対する血圧サーボシステムの振る舞いを比例補償係数  $K_p=0, 1, 2$ 、積分補償係数  $K_i=0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2$  の組み合わせでシミュレーションした。 $K_p=1, K_i=0.1$  に決定した。

### C. BBSの有効性の検証

膝の人工関節置換術時の下肢止血帯解除に伴う血圧低下を外乱と見なし、BBSの有効性を検証した。その結果、図5に示すように、BBSを用いることにより、迅速で安全な自動血圧管理が可能であることが明らかになった。

### まとめ

神経インターフェイス技法に基づいたバイオニック療法が、慢性心不全に対する画期的な治療戦略となりうること、および、バイオニック圧反射装置により術中血圧を自動管理しうることを示唆する臨床研究結果を得ることができた。

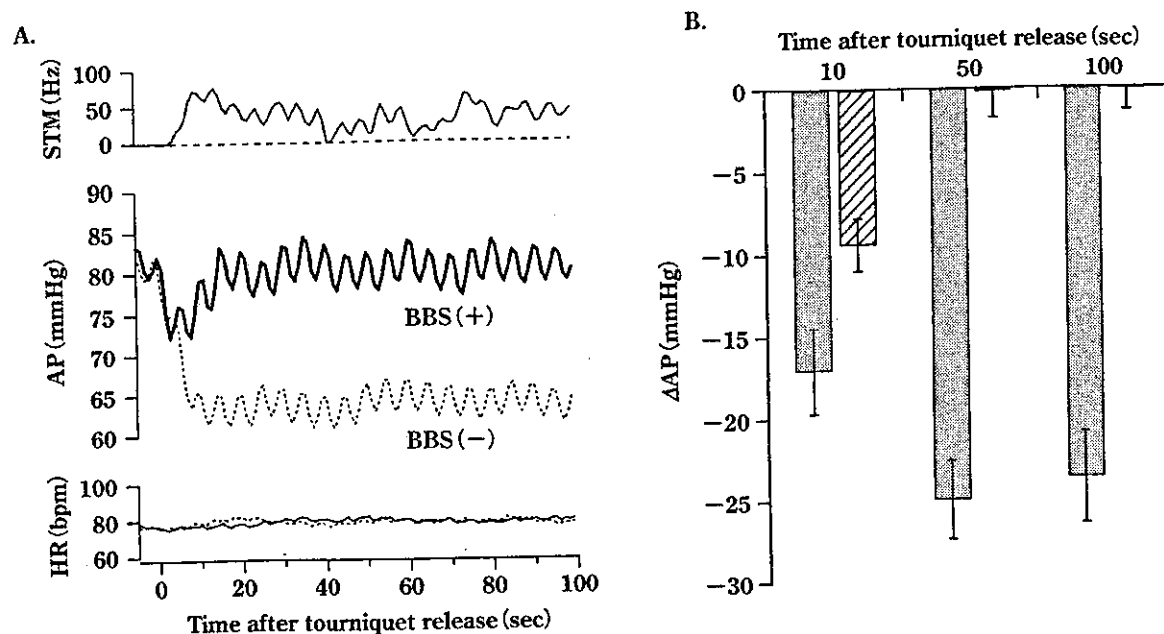


図5 バイオニック圧反射装置を用いた術中血圧制御  
タニケット解除によって生ずる低血圧がバイオニック装置により防止された。

## 文 献

- 1) Sato T, Kawada T, Sugimachi M, et al: Bionic technology revitalizes native baroreflex function in rats with baroreflex failure. *Circulation* 2002; 106: 730-4.
- 2) Li M, Zheng C, Sato T, et al: Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 2004; 109: 120-4.
- 3) Pfeffer MA: Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med* 1995; 46: 455-66.
- 4) Cerati D, Schwartz PJ: Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death. *Circ Res* 1991; 69: 1389-401.
- 5) Schwartz PJ, La Rovere MT, Vanoli E: Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 1992; 85(suppl. 1): I 77-91.
- 6) La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, et al: Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351: 478-84.
- 7) Lechat P, Hulot JS, Escolano S, et al: Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II trial. *Circulation* 2001; 103: 1428-33.
- 8) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, et al: Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72: 406-12.
- 9) Sato T, Kawada T, Inagaki M, et al: New analytic framework for understanding sympathetic baroreflex control of arterial pressure. *Am J Physiol* 1999; 276: H2251-61.
- 10) Tanaka M, Nishikawa T: Arterial baroreflex function in humans anaesthetized with sevoflurane. *Br J Anaesth* 1999; 82: 350-4.
- 11) Keyl C, Schneider A, Hobbhahn J, et al: Sinusoidal neck suction for evaluation of baroreflex sensitivity during desflurane and sevoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 2002; 95: 1629-36.
- 12) Tarkkila PJ, Kaukinen S: Complications during spinal anesthesia: a prospective study. *Reg Anesth* 1991; 16: 101-6.
- 13) Kahn RL, Marino V, Urquhart B, et al: Hemodynamic changes associated with tourniquet use under epidural anesthesia for total knee arthroplasty. *Reg Anesth* 1992; 17: 228-32.
- 14) Kawada T, Sunagawa K, Takaki H, et al: Development of a servo-controller of heart rate using a treadmill. *Jpn Circ J* 1999; 63: 945-50.

## 特集

# バイオニックラットからの提言 ：迷走神経の電気刺激療法

佐藤 隆幸\*

## はじめに

心不全の病態の解明や治療薬の開発が精力的に行われ、生命予後や生活の質の改善が図られつつある。しかしながら、重症心不全の場合には、現在でも、心移植以外には劇的な効果を期待できる治療法は存在しない。

最新の病態に関する研究により、心不全の重要な予後規定因子として、循環調節機構の破綻が上げられている。当初は、心機能低下の代償機転として適応的にはたっていた交感神経系の活性化と副交感神経系の活動低下やレニン・アンジオテンシン系の活性化がしだいに心臓リモデリングを進展・悪化させ、一種の悪循環を形成し、最終的には調節破綻に陥ると考えられるようになってきた<sup>1-3)</sup>。さらに、ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction)<sup>4)</sup> や CIBIS II (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II)<sup>5)</sup> といった大規模臨床試験により、心臓迷走神経活動の低下や心拍数の増加が予後不良因子であることが確認されるにいたった。

以上のようないわば観察研究から得られた知見をより直接的に検証し、新しい治療法を開発する第一歩として、迷走神経の電気刺激療法が心不全の病態や予後にどのような影響を与えるかを動物実験で検討した。

## 遠隔操作可能な埋込型迷走神経刺激システム

上記のような研究を行うためには、自由行動ラットの迷走神経を任意の刺激パターンで電気刺激するための埋込型装置が必要である。そこで、無

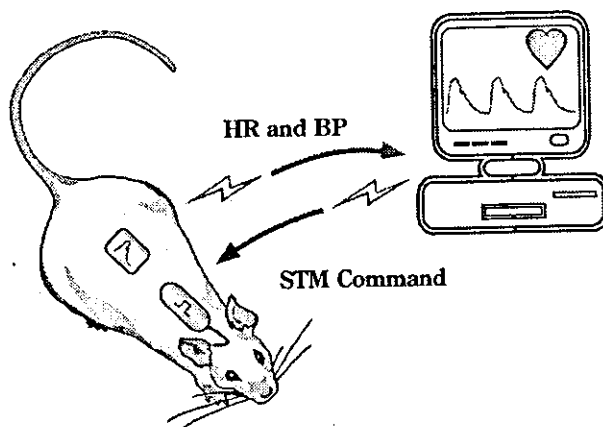


図1 遠隔操作可能な埋込型迷走神経刺激システムの概要

体内に埋め込まれた電気刺激装置は、コンピュータからの指令信号(STM Command)によって遠隔操作される。また、埋め込まれた送信器からは心拍数(HR)と血圧(BP)の情報が送られ、刺激強度の決定に用いられる。

線遠隔操作が可能な小型電気刺激装置および制御システムを構築した。図1に示すように、体内に埋め込まれた送信器から血圧信号が送られ、受信器を介してコンピュータに入力される。コンピュータは血圧信号をストレージするとともに、血圧波形から瞬時心拍を計算し、目標となる心拍数になるように刺激強度を操作する指令信号を電気刺激装置に送るようになっている。

## 方 法

ハロセン麻酔下でラット左冠状動脈起始部を結紮し、左室の約50%を梗塞にし、実験的心不全モデルとした。心筋梗塞導入術24時間以内の死亡率は約60%であった。

術後7日目に再度麻酔下で刺激用ワイヤ電極を右頸部迷走神経に、刺激装置と送信器を腹部に埋

\*高知大学医学部循環制御学教室

め込んだ。7日間の回復期間において、下記の実験プロトコルを開始した。

#### プロトコル1：血行動態およびリモデリングに与える影響

梗塞後心不全ラットを無作為に刺激群と非刺激群に割り付け、刺激群では電気刺激時に心拍数が20ないし30拍/分程度減少するような刺激強度を設定し、毎分10秒間の電気刺激を繰り返した。なお、予備実験により、この刺激強度では、摂食・飲水行動に異常が見られないこと、痛み刺激とならないことを確認している。6週間の治療終了時に、ハロセン麻酔下で血行動態の測定および組織学的検討を行った。

#### プロトコル2：長期生存率および液性因子に与える影響

プロトコル1と同様の治療を行った後、刺激を停止し、治療開始から140日間の生存率曲線を観察した。観察期間終了時まで生存していた例については採血し、血漿ノルエピネフリンおよび脳性ナトリウム利尿ペプチドを測定した。なお、小型電気刺激装置の駆動電源の電池寿命の限界から、その連続使用が制限されるため、治療期間を6週間に設定した。

## 結 果

### A. 心機能およびリモデリングに与える影響

図2に電気刺激の心拍数に与える影響を示している。データは非刺激時の心拍数の24時間平均を一週毎に平均した値である。治療開始時には、梗塞後心不全群では、健常群に比べ心拍数の有意な増加がみられた。しかし、迷走神経刺激療法により、一週後から有意な心拍数の低下がみられ、6週後には、刺激群の心拍数は健常群のものと有意な差がみられなくなった。治療終了時の血行動態の測定結果は、図3に示されている。平均動脈圧は、梗塞後心不全群は、健常群に比べ、有意に低かった。梗塞後心不全群は、健常群に比べ、左室拡張末期圧の有意な上昇と左室圧一次微分最大値の有意な低下を示したが、迷走神経刺激療法により、左室拡張末期圧の有意な減少と左室圧一次微分最大値の有意な上昇が認められた。両心室重量が、梗塞後心不全群では有意な増加を示したが、迷走神経刺激療法により有意に減少した。以上の結果は、6週間の迷走神経刺激療法によってポンプ機能が改善し心室リモデリングが予防されたことを示唆する。なお、梗塞後心不全における刺激群と非刺激群とも梗塞サイズに差はなかった。

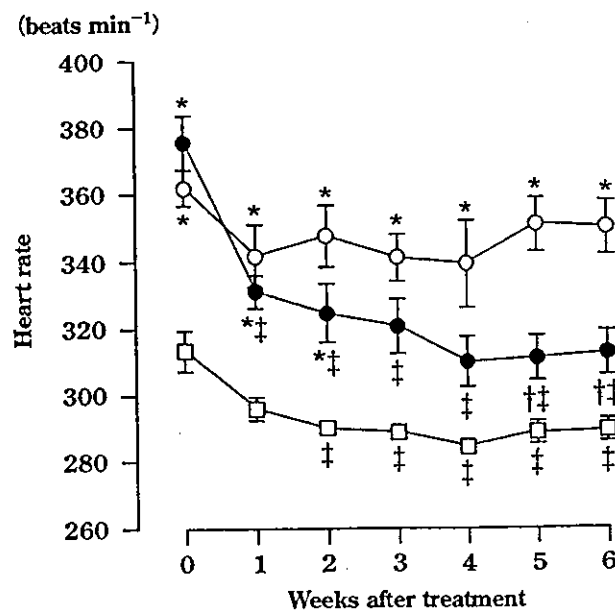


図2 迷走神経刺激の心拍数に与える影響

迷走神経刺激開始に伴う心拍数の変化を示している。健常群(□, n=9), 梗塞後心不全における非刺激群(○, n=13), 梗塞後心不全における刺激群(●, n=11)。値は、平均±標準誤差で示している。\*, 健常群との有意差あり(P<0.05); †, 非刺激群との有意差あり(P<0.05); ‡, 各群における刺激前の値からの有意差あり(P<0.05)。

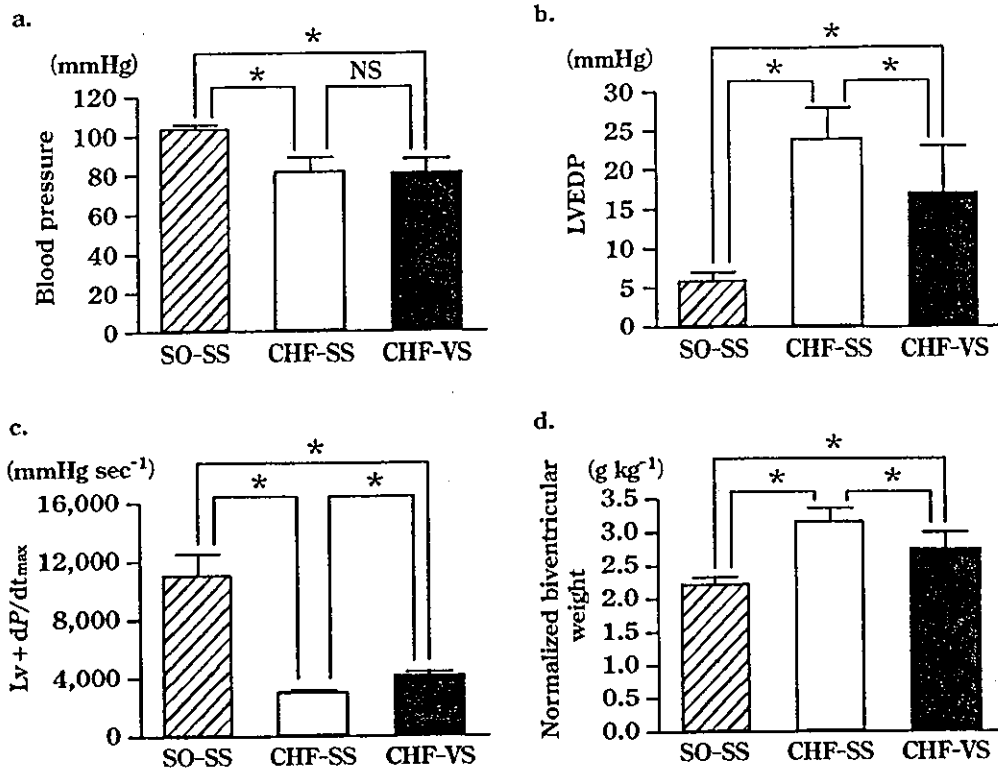


図3 迷走神経刺激の血行動態および両心室重量に与える影響

健常群(SO-SS, n=9), 梗塞後心不全における非刺激群(CHF-SS, n=13)および梗塞後心不全における刺激群(CHF-VS, n=11). 値は, 平均±標準偏差で示している. \*, 有意差あり (P<0.05).

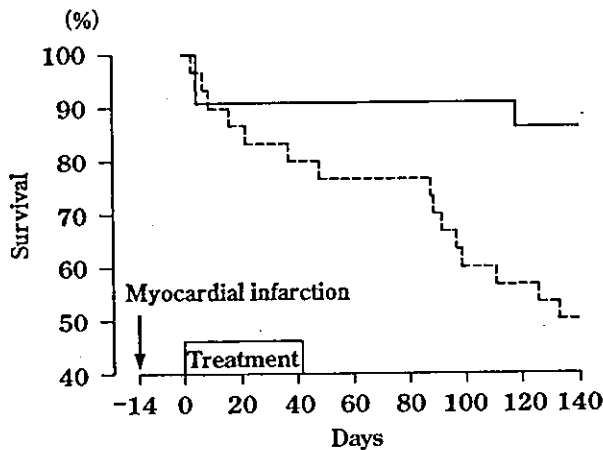


図4 迷走神経刺激の慢性心不全ラットの生存率に与える影響  
実線は刺激群(n=22), 破線は非刺激群(n=30)を示す.

**B. 長期生存率および液性因子に与える影響**

迷走神経刺激療法の生存率に与える影響を Kaplan-Meier 法により解析した. 140 日の観察期間における生存率曲線を 図4 に示す. 刺激群 22 例のうち死亡は 3 例, 非刺激群 30 例のうち死亡は 15 例であった (P=0.008, Fisher の直接法). このように, 迷走神経刺激療法は相対的死亡リスクを 73% も減少させた.

迷走神経刺激療法は, 両心室重量, 血漿ノルエピネフリンおよび脳性ナトリウム利尿ペプチドを有意に減少させた. なお, これらの指標はいずれも臨床試験で明らかにされている予後規定因子で, 高値ほど予後不良とされているものである.

**考 察**

心筋梗塞後の重症慢性心不全の生命予後は極めて不良で, 2 年生存率は約 50% である. 心臓移植以外には有効な治療法がなく, 新しい治療戦略の開発が待たれている. そこで, 本研究では, 近年の大規模臨床試験により示されている「循環調節系の悪循環に起因する心臓迷走神経活動の低下や心拍数の上昇が重要な予後不良因子である」という点に着目し<sup>3-5)</sup>, 迷走神経の電気刺激を用いて, 心拍数を減少させた場合にその長期予後が改善するかどうかを梗塞後心不全モデルを用いた動物実験により検証した.

今回得られた結果は, 迷走神経の電気刺激療法が, 梗塞後心臓リモデリングを予防し心機能の改善をもたらすこと, さらに, 長期生存率を劇的に改善させることを示唆している. 迷走神経の電気



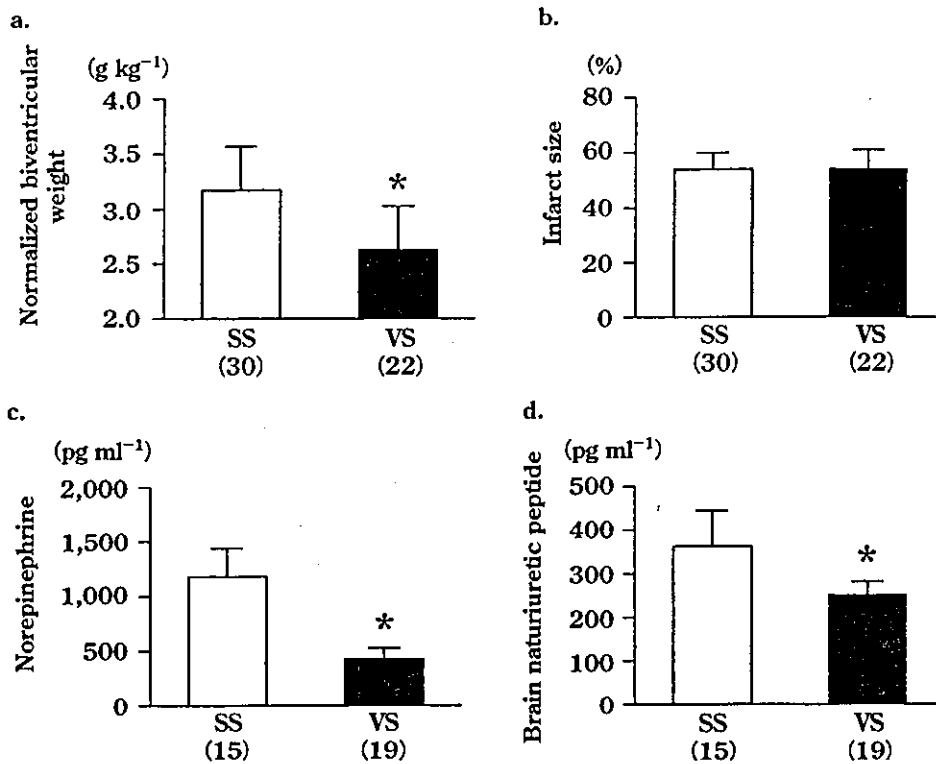


図5 迷走神経刺激の長期効果：両心室重量および液性因子に与える影響  
非刺激群(SS)と刺激群(VS)の比較。かっこ内は例数を示す。値は、平均±標準偏差で示している。  
\*, 有意差あり ( $P < 0.05$ )。

刺激がこのような治療効果を発揮する機序として、迷走神経電気刺激の遠心性効果と求心性効果が想定される。

遠心性効果としては、心臓に対する交感神経の作用を減弱させる accentuated antagonism<sup>6)</sup>、心拍数低下による心臓のエネルギー効率の改善<sup>7)</sup>、血管内皮からの一酸化窒素遊離を介する冠循環の改善などが考えられる<sup>8)</sup>。その他にも最近、迷走神経刺激により肝網内系における腫瘍壊死因子の産生が抑制されることが報告されているが<sup>9)</sup>、心不全におけるいわゆる悪液質(cardiac cachexia)がこのような作用によって予防された可能性もある<sup>10)</sup>。一方、求心性効果としては、心肺受容器反射のように中枢を介した交感神経の抑制によって減負荷がもたらされる可能性がある<sup>11)</sup>。

今回の研究成果で最も重要なのは、迷走神経刺激による予後改善効果が顕著である点である。アンジオテンシン変換酵素阻害薬カプトプリルが梗塞後心不全の生命予後を改善することを示した Pfeffer ら<sup>12)</sup>の成績は、用いられたモデルや治療開始時期が全く同じであることから、良い比較となる。彼らの成績でも、非治療群の平均的生存期間

はほぼ 140 日で我々の結果と同じであった。カプトプリル投与群では、140 日間の生存率が 60% で非治療群に比べわずかの改善にとどまっているのに対し、今回の成績では治療群における生存率が 86% であり、その効果はカプトプリルに比べ大きなものになっている。

これまでに我々は、生体制御系とインターフェイスしたり、生体制御系を機能的に置換して機能再建したり、あるいは治療する戦略をバイオニック医療と名付け、さまざまな具体的手法を示してきた<sup>13,14)</sup>。例えば、心不全における循環調節破綻を中枢神経系に介入して是正し、その結果、心臓リモデリングを予防し心機能を温存できる可能性を報告している<sup>15)</sup>。今回用いた手法も同じような治療戦略に則ったものであるが、治療に用いた個々の要素的技術や装置はすでに臨床的に用いられているものである。例えば、埋込型の迷走神経刺激電極は難治性癲癇の治療に用いられている<sup>16)</sup>。また埋込型電気刺激装置は、心臓ペースメーカをはじめ数多くの治療機器として使用されている。今後は、より大規模で長期の試験を動物実験で繰り返し、安全性および有効性を検証し、有用性が

確認された場合には、万全の体制を組み、臨床試験へと展開したいと考えている。

### ま と め

迷走神経の電気刺激は、梗塞後心臓リモデリングの予防と心機能の改善効果を有し、さらに、長期生存率を劇的に改善した。この新しい治療戦略「バイオニック医療」の今後の展開が期待される。

### 文 献

- 1) Pfeffer MA: Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med* 1995; 46: 455-66.
- 2) Cerati D, Schwartz PJ: Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death. *Circ Res* 1991; 69: 1389-401.
- 3) Schwartz PJ, La Rovere MT, Vanoli E: Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 1992; 85(suppl I): I 77-91.
- 4) La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, et al: Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351: 478-84.
- 5) Lechat P, Hulot JS, Escolano S, et al: Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II trial. *Circulation* 2001; 103: 1428-33.
- 6) Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, et al: Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* 1991; 68: 1471-81.
- 7) Burkhoff D, Sagawa K: Ventricular efficiency predicted by an analytical model. *Am J Physiol* 1986; 250: R1021-7.
- 8) Zhao G, Shen W, Xu X, et al: Selective impairment of vagally mediated, nitric oxide-dependent coronary vasodilation in conscious dogs after pacing-induced heart failure. *Circulation* 1995; 91: 2655-63.
- 9) Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, et al: Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- $\kappa$ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 2003; 107: 1189-94.
- 10) Mann DL: Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002; 8(suppl): S379-86.
- 11) Mark AL: Sensitization of cardiac vagal afferent reflexes at the sensory receptor level: an overview. *Fed Proc* 1987; 46: 36-40.
- 12) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, et al: Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72: 406-12.
- 13) Sato T, Kawada T, Sugimachi M, et al: Bionic technology revitalizes native baroreflex function in rats with baroreflex failure. *Circulation* 2002; 106: 730-4.
- 14) Li M, Zheng C, Sato T, et al: Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 2004; 109: 120-4.
- 15) Sato T, Yoshimura R, Kawada T, et al: The brain is a possible target for an angiotensin-converting enzyme inhibitor in the treatment of chronic heart failure. *J Card Fail* 1998; 4: 139-44.
- 16) Reid SA: Surgical technique for implantation of the neurocybernetic prosthesis. *Epilepsia* 1990; 31(suppl 2): S38-9.

## UWB 多元接続システムにおけるシステム間干渉低減のための 送信波形成形に関する検討

### A Pulse Design for UWB-CDMA System to Reduce Inter-System Interference

原田 浩樹\*  
Hiroki HARADA

池本 健太郎\*  
Kentaro IKEMOTO

河野 隆二\*  
Ryuji KOHNO

**Abstract**— As a communication system of new indoor short distance radio-communications Wireless Personal Area Network (WPAN) by which the Ultra Wideband (UWB) system is examined towards standardization. In such examination, UWB system use limited bandwidth and transmitted power in order to avoid a interference with other systems. The possibility of realization of the direction of systems, such as a Multiband type which uses a subcarrier, is higher than the system which does not use a subcarrier like the Impulse Radio (IR) system considered conventionally. In this research, we exploit notches of the "Modulated and Modified Hermite Pulses" to reduce an interference with the 5.2GHz-band WLAN system. In order to apply notches of the pulses of all orders, we propose a new design of a set of the "Modulated and Modified Hermite Pulse". Furthermore, about the characteristic and the performance of the waveform, it evaluates using a computer simulation, and excelling in the BER characteristic as compared with a Multiband-FHSS system is shown.

**Keywords**— Ultra Wideband, Modulated and Modified Hermite Pulse, Inter-System Interference Reduction

#### 1 はじめに

近年、より高速な通信が要求されている近距離無線通信の分野において超広帯域通信である Ultra Wideband (UWB) 無線通信方式が注目を集めている [1]. 2002 年 2 月米国で FCC から UWB の民間利用への認可が下りたことで盛んに研究が行われるようになったが、UWB システムは既存の無線通信システムと周波数帯を共用するため最大送信電力が非常に低く規制される。FCC の送信電力制限スペクトルマスクを満たしながらも送信電力をかせぐ目的で、UWB を用いた近距離無線ネットワーク Wireless Personal Area Network (WPAN) システムの研究は 3.1GHz から 10.6GHz の帯域を主に使用する方式が主流となってきている。

UWB-WPAN システムの研究において、マルチパスフェージングや他局間干渉など様々な干渉が考えられているが、中でも 5.2GHz 帯の WLAN システム (IEEE802.11a) との相互干渉の問題は解決すべき重要な課題である。従来は WPAN の使用帯域をいくつか分割し、5.2GHz 帯の使用を避けるような方式 (Dual-band, Multi-band など) が検討されている。

本稿では、IR 型 UWB 通信において使用が検討されていた修正エルミートパルス (Modified Hermite Pulse: MHP) [2] を搬送波によって変調した変調修正エルミートパルス (Modulated and Modified Hermite Pulse: MMHP) を用いた UWB 無線通信方式について検討する。この MMHP 波形には、次数の数だけ周波数特性にノッチを持つという特徴がある [3]. このノッチを 5.2GHz 帯に向けてることにより UWB-WPAN システムと WLAN システムとの相互の占有帯域の重複を少なくし、干渉を低減することを考える。本研究では、使用する全ての次数の MMHP 波形のノッチが 5GHz 帯に向くような波形成形法を提案する。また室内近距離無線通信において非常に問題となるマルチパスフェージング [4] への対策として自己相関特性の優れた波形を用いることは有効である。提案波形群はそれぞれが超広帯域を占有する波形であるため、自己相関特性において Dual-band や Multi-band 方式の波形より優れている。さらにマルチユーザ環境に対応する為、送信する MMHP 波形の次数をユーザ毎に異なるものを用いることにより、他局間干渉の低減も可能となる。

ここでは第 2 章で変調修正エルミートパルスについて述べ、第 3 章で提案方式である変調修正エルミートパルスを用いた UWB システムについて説明する。第 4 章では、従来検討されている、搬送波を用いて高周波数帯を広く占有する時間周波数ホッピング型のマルチバンド UWB 方式 (Multiband TH-FH-UWB) と本稿の提案方式を計算機シミュレーションにより比較した結果を示す。最後に第 5 章で結論と今後の課題について述べる。

#### 2 変調修正エルミートパルス

本章では、変調修正エルミートパルス (Modulated and Modified Hermite Pulse, MMHP) の生成法と波形の特性について説明する。

##### 2.1 変調修正エルミートパルス

[2] で示された修正エルミート多項式に、周波数  $f_c$  の cos 波を乗算すると次式 (1) のようになる。

$$\begin{aligned} mh_n(t) &= h_n(t) \cos(2\pi f_c t) \\ &= (-1)^n e^{\frac{t^2}{4}} \frac{d^n}{dt^n} (e^{-\frac{t^2}{2}}) \cos(2\pi f_c t) \quad (1) \end{aligned}$$

\*〒 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79 番 5 号横浜国立大学大学院工学府 Graduate School of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama-shi 240-8501 Japan. E-mail: hhiroki@kohnolab.dnj.ynu.ac.jp

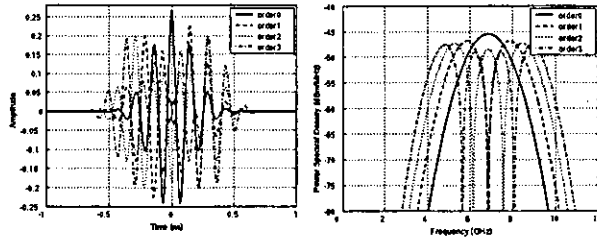


図 1: 変調修正エルミートパルスの時間応答 (次数 0,1,2,3) 図 2: 変調修正エルミートパルスの周波数応答 (次数 0,1,2,3)

この式から  $f_c$  は 6.85GHz として 2ns のパルス幅の MMHP を生成し、図 1, 2 にそれぞれ時間応答, 周波数応答を示す。

この変調修正エルミートパルスには以下に挙げるような特徴がある。

- 次数の異なる MMHP 波形同士は、時間的にちょうど重なっているとき直交である。
- MMHP 波形は、次数と同じ数だけ周波数特性にノッチを持つ。

## 2.2 パルス時間幅と使用可能次数の上限

変調修正エルミートパルス生成の際、式 (1) を以下のように変形する。

$$mh_n(t) = N_n(-1)^n e^{\frac{(t_p)^2}{4}} \frac{d^n}{dt^n} \left( e^{-\frac{(t_p)^2}{2}} \right) \cos(2\pi f_c t) \quad (2)$$

ここで  $N_n$  は正規化パラメータである。  $f_c$  は 6.85GHz とし、  $t_p$  を変えることによりパルスの時間幅を制御する。  $t_p$  の値を大きくする、すなわちパルス幅を広げると、波形の占有帯域は狭くなり、高次の波形でもスペクトルマスクの範囲内に収めることができる。 [3] より、  $t_p = 2.2$  の時、使用可能最高次数は 8 である。

## 3 提案システム

本章では、本稿の提案システムである MMHP を用いた UWB 伝送システムについて説明する。

### 3.1 5GHz 帯 WLAN との干渉除去のための波形整形

前節より、MMHP 波形は周波数特性に次数と同じ数だけのノッチを持つことがわかる。ここでノッチの位置を修正し、5.2GHz 帯 WLAN システムとの干渉を低減するための波形整形法を提案する。

前節の式 (2) を以下のように修正する。

$$mh_n(t) = N_n(-1)^n e^{\frac{(t_p)^2}{4}} \frac{d^n}{dt^n} \left( e^{-\frac{(t_p)^2}{2}} \right) \cos(2\pi(f_c + \Delta f_n)t)$$

ここで  $\Delta f_n$  は次数毎に異なる中心周波数修正値である。この値を次数毎に変え、全ての次数で 5.2GHz 帯にノッチが向くようにすることでシステム間の干渉を低減

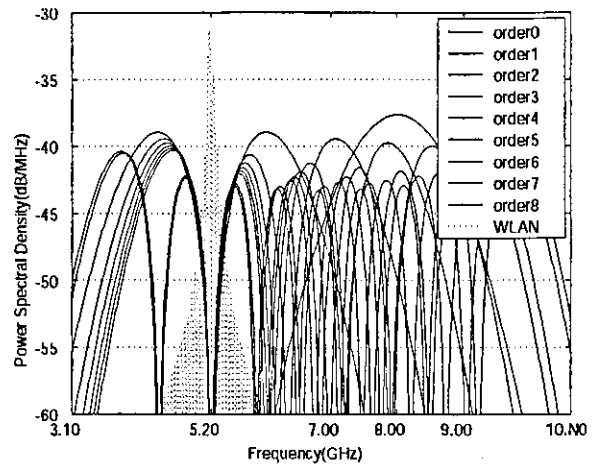


図 3: 中心周波数を修正し、5.2GHz 帯にノッチを向けた MMHP の PSD 特性

表 1: 5.2GHz 帯にノッチを向ける為の、次数毎の中心周波数修正値

使用最高次数	中心周波数修正値 (GHz)
0	1.15
1	-1.65
2	-1.08
3	-0.66
4	-0.31
5	-0.01
6	0.26
7	-0.29
8	-0.04

する (図 3)。  $\Delta f_n$  を決める際、5.2GHz 帯に向けるノッチは元々 5GHz 帯に最も近い位置のノッチとした。次数毎の中心周波数修正値を表 1 に示す。中心周波数  $f_c$  は 6.85GHz とし、またパルス幅パラメータ  $t_p$  は 2.2 とすることで、次数は 0 から 8 次までを用いることとした。

例として、次数 0,1,2,3 の場合の提案波形の時間応答, 周波数応答を図 4, 5 に示す。また、波形の自己相関, 相互相関特性を図 6, 7 に示す。

### 3.2 送信信号とデータ変調

提案方式では、ユーザがそれぞれに持つ固有の波形ホッピング用の多値 PN 系列に合わせ送信する MMHP の次数を決定し、またユーザ固有の TH 系列に合わせたタイミングで決定した次数の MMHP を送信する。 [3] では、この送信方法を用いることで他局間干渉および符号間干渉が低減されることが示されている。従って 1 番目のユーザの送信信号  $s_{nr}^{(1)}(t^{(1)})$  は次式で表される。