

柑橘由来成分:ノビレチンの
Sphingosylphosphorylcholine (SPC)によって
引き起こされる
血管平滑筋異常収縮に対する抑制作用

氏名 宮成 健司

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 分子細胞生理学分野

令和3年1月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	4
4. 方法	4
4.1 試薬類	
4.2 血管平滑筋条片の作成	
4.3 血管平滑筋条片を用いた張力測定	
4.4 血管平滑筋条片を用いた張力-細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 同時測定	
4.5 血管平滑筋条片を用いたウエスタンブロット分析	
4.6 統計処理	
5. 結果	7
5.1 SPC による異常収縮に対するノビレチン、ケルセチン、ナリンゲニンの効果	
5.2 SPC、40 mM K^+ 溶液刺激下でのノビレチンの張力および $[Ca^{2+}]_i$ への影響	
5.3 ノビレチンの SPC 刺激による MLC リン酸化レベルへの影響	
6. 考察	9
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	10
10. 図	13

1. 要旨

スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) / Rho キナーゼ (ROK) 経路を介した Ca^{2+} 非依存性血管収縮は、血管攣縮などの異常な血管過収縮の一因である。血管攣縮を予防するため食品由来成分を中心に探索した結果、柑橘由来成分の一種であるノビレチンを見出した。ノビレチンは SPC によって引き起こされた血管異常収縮を強力に抑制し、40 mM K^+ 溶液によって引き起こされる Ca^{2+} 依存性血管収縮に対しては、微弱な抑制効果を示した。さらに、細胞質 Ca^{2+} 濃度と張力の同時測定では、ノビレチンは細胞質 Ca^{2+} 濃度に影響を与えることなく SPC によって引き起こされた血管異常収縮を阻害し、40 mM K^+ 溶液によって引き起こされる Ca^{2+} 依存性血管収縮に対してはわずかな影響を及ぼした。以前の我々の報告では、SPC 刺激によって ROK が活性化すること、活性化した ROK が細胞質から細胞膜へ移動すること、そしてミオシンホスファターゼ標的サブユニット 1 (MYPT1) とミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化レベルを上昇させることを明らかにし、ROK の活性化が血管攣縮に重要な役割を果たすことを示した。ノビレチンは、SPC 刺激によってもたらされる MYPT1 および MLC のリン酸化レベルの上昇を有意に著しく抑制した。これらの結果は、ノビレチンが血管攣縮につながる異常な血管収縮の新規治療薬の候補として有望であることを示唆している。

2. 研究の背景

突然発症する血管攣縮は、突然死の一因である。その本態は ROK による血管平滑筋の Ca^{2+} 非依存性の異常収縮であるが、我々は ROK 上流の病的シグナル分子として SPC を同定した。実際に脳血管攣縮患者の髄液中 SPC 濃度は、対照群に比べ 20~30 倍にも増加しており、さらにイヌ髄腔内に投与された SPC は重篤な脳血管攣縮を引き起こした¹⁻³⁾。この血管攣縮は ROK 阻害剤である Y27632 で完全に抑制されたことから、血管攣縮における SPC / ROK 経路の重要性が示唆された^{4,5)}。また、SPC によって引き起こされる血管異常収縮の程度は、ヒト血清総コレステロール値および LDL コレステロール値と相関を示し、さらに HDL コレステロール値とは逆相関を示すことが確認されている⁶⁾。

我々は血圧維持を担う血管の Ca^{2+} 依存性収縮を抑制せずに、SPCによる異常収縮のみを抑制する特効薬を探索し、魚油の成分であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を見出した。EPA は *in vitro* において生理学的な Ca^{2+} 依存性血管収縮に影響を与えることなく、SPC による血管異常収縮のみを選択的に阻害し、*in vivo* において脳血管攣縮を予防することを発見した^{2,4)}。しかしながら、EPA の原材料となる魚油は海洋汚染等の環境の影響を受け易く、供給が不安定である。そこで我々は環境と供給が安定している植物に着目し、食品である植物由来成分を中心に探索を試みたところ、柑橘由来成分であるノビレチンに SPC によって引き起こされる血管異常収縮に対する抑制効果を見出した。これらの報告は、ノビレチンが血管攣縮の特効薬として利用可能というだけでなく、日常的に摂取可能な予防薬としての可能性を示唆している。

3. 目的

本研究の目的は、食品である植物由来成分を中心に SPC による血管異常収縮に対する抑制作用を持つ成分の探索を行い、見出された柑橘由来成分：ノビレチンの血管への作用を実験的に検証するとともに、ケルセチン、ナリンゲニンとの作用の比較検討を行い、作用メカニズムの解明を試みた。

4. 方法

4.1 試薬類

SPC はバイオモル (米国)、ブラジキニン (BK) はペプチド研究所 (大阪、日本)、ノビレチンとケルセチンは和光純薬 (大阪、日本)、ナリンゲニンはシグマアルドリッチ (米国) から購入した。ノビレチン、ケルセチンおよびナリンゲニンはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。DMSO は和光純薬から購入した。Indo1-AM は同仁化学研究所 (熊本、日本) から入手し、他のすべての試薬は片山化学 (大阪、日本) から購入した。また、使用した抗体を以下に示す：抗リン酸化 MYPT1 (Thr 850) (アップステート、米国)、抗 MYPT1 (サンタクルズバ

イオテクノロジー、米国)、抗リン酸化ミオシン軽鎖 2 (Ser19) モノクローナル抗体 (セルシグナリング、米国)、抗ミオシン軽鎖 (20 kDa) モノクローナル抗体 (シグマアルドリッチ、米国)。

4.2 血管平滑筋条片の作成

ブタの冠状動脈 (左前下行枝の近位部分の起点から 20~30 mm) は、公共の食肉処理場 (北九州市食肉検査管理センター) から入手した。組織標本をあらかじめ混合ガス (95% O₂、5% CO₂) を通気した氷冷 Krebs 溶液 (123.0 mM NaCl、4.7 mM KCl、15.5 mM NaHCO₃、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgCl₂、1.25 mM CaCl₂、11.5 mM D-グルコース) で動脈内の血液を洗い流し、研究室に持ち帰った。その後、血管周辺の脂肪組織を取り除いた後、外膜を取り除き、Krebs 溶液中にて 4°C で保存した。動脈をあらかじめ混合ガスで通気した Krebs 溶液中にて、血管を長軸方向に切り開き、剃刀を用いて血管平滑筋条片 1.0 mm × 4.0 mm を作製した。内皮は血管を長軸方向に切り開いた時点で、綿棒を用い血管内腔を軽く一方向に擦り、除去した。内皮の除去はブラジキニン (BK) による弛緩反応の消失により確認した。

4.3 血管平滑筋条片を用いた張力測定

張力測定実験については過去の論文で記述した方法に従って行った^{1,4,7)}。血管平滑筋条片は Krebs 溶液で満たされたオーガンバスチャンバーにワイヤーを用いて垂直に取り付けた。等尺性収縮力の測定にはトランスデューサー (TB-612T、日本光電、日本) を使用した。血管平滑筋条片はオーガンバスチャンバー中の Krebs 溶液に浸るよう調整し、Krebs 溶液は常に混合ガスでバブリングした。マグナス管外は恒温槽にて 37°C に保った水を循環させた。また、交換用の試験液についても、37°C で保温し混合ガスを通気したものを用いた。血管平滑筋条片を 118 mM K⁺ 溶液 (10.9 mM NaCl、116.8 mM KCl、15.5 mM NaHCO₃、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgCl₂、1.25 mM CaCl₂、11.5 mM D-glucose) を用いて一定時間毎に脱分極収縮を引き起こし、収縮の安定性と大きさを指標に静止張力を

最適化した。静止張力を最適化した後、40 mM K⁺溶液（88.9 mM NaCl、38.8 mM KCl、15.5 mM NaHCO₃、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgCl₂、1.25 mM CaCl₂、11.5 mM D-glucose）を加え、その収縮が定常状態に達した後、BKを最終濃度 1 μM になるように加えて内皮の有無を確認した。その後、30 μM SPC または 40 mM K⁺溶液によって誘発された収縮の最大および定常状態下で、ノビレチン、ナリンゲニン、ケルセチン（最終濃度は実験に準ずる）を添加し血管への影響を観察した。抑制率はノビレチン、ナリンゲニン、ケルセチン添加前の定常状態下での張力を 100%として算出した。

4.4 血管平滑筋条片を用いた張力-細胞質 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 同時測定

血管平滑筋条片を Ca²⁺濃度測定試薬 Indo1-AM (10 μM) と Krebs 溶液（混合ガスでバブリングし pH を 7.4 に調整したもの）に 37°C で 3~4 時間浸透させた^{8,9)}。反応後の血管平滑筋条片を顕微 2 波長分光蛍光測定装置（CAM-230、日本分光）を用いて張力と [Ca²⁺]_i を測定した。330 nm (F330) の励起光照射による 510 nm の蛍光強度を測定する事により、[Ca²⁺]_i の測定を行った^{1,4,5,8,9)}。血管平滑筋条片を 118 mM K⁺溶液を用いて一定時間毎に脱分極収縮を引き起こし、収縮の安定性と大きさを指標に静止張力を最適化し、Krebs 溶液でもとの定常状態まで弛緩した後に、30 μM SPC または 40 mM K⁺溶液を投与によって誘発された収縮の最大および定常状態下で 10 μM ノビレチンを添加し張力と [Ca²⁺]_i を測定した。

4.5 血管平滑筋条片を用いたウエスタンブロット分析

MLC (p-MLC)、MYPT1 (p-MYPT1) でのリン酸化レベルを計測するため、血管平滑筋条片を用いて以下のように調整した。血管平滑筋条片を用いて予めノビレチン (10 μM、37°C で 30 分) を Krebs 溶液中で反応させた。次に血管平滑筋条片をノビレチンの非存在下 (コントロール) または存在下で SPC (30 μM、37°C で 15 分) 刺激を行った。次に血管平滑筋条片を 5% トリクロロ酢酸 (TCA) にすばやく浸し、冷やした 10 mM DL-ジチオスレイトール (DTT) / アセトンで 2

回洗浄して TCA を除去した。血管平滑筋条片は液体窒素を使用して凍結し、SK-Mill Freeze-Crush Apparatus (ダイアグノシン、米国) で粉碎した。100 μ L の RIPA バッファー (和光純薬) とプロテアーゼ阻害剤のロイペプチン (シグマアルドリッチ) およびアプロチニン (シグマアルドリッチ) を添加して、凍結した血管平滑筋条片からタンパク質を抽出した。ライセートを遠心分離した後、上清を回収し、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ローディングバッファーを添加して 95°C で 5 分間煮沸し、ウエスタンブロット分析を行った。血管平滑筋条片サンプルを電気泳動により 9~13% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、Amersham Hybond-P PVDF メンブレン (ジーイーヘルスケアライフサイエンス) に転写した。PVDF メンブレンは予め 5% 無脂肪乳を加えた 0.05% Tween-20 トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) を用いて室温で 1 時間ブロッキングし使用した。メンブレンを p-MYPT1 (1: 800 希釈)、MYPT1 (1: 1000 希釈)、p-MLC (1: 1000 希釈)、MLC (1: 1000 希釈) に特異的な一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートし、その後、洗浄し、HRP 標識二次抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。免疫反応性バンドは化学発光基質キット (サーモフィッシャーサイエンティフィック、米国) を使用して検出した。

4.6 統計処理

本実験における統計量は、平均 \pm 標準誤差 (SE) として示した。統計分析は unpaired Student's t-test、複数のサンプルについては最小有意差検定によって実施した。なお、5% 未満の危険率を有意水準とした。

5. 結果

5.1 SPC による血管異常収縮に対するノビレチン、ケルセチン、ナリンゲニンの効果

EPA に代わるものとして食品のうち植物由来成分を中心に探索を行い 40 mM K^+ 溶液によって引き起こされる Ca^{2+} 依存性血管収縮には影響を与えず、SPC に

よる血管異常収縮のみを抑制する物質の探索を試みた。食品成分を中心に探索を行ったところ、柑橘由来成分の一種であるノビレチンに強い血管異常収縮抑制効果があることが確認できた。我々はさらにフラボノイドファミリーに属するケルセチン（フラボノールグループ）、ナリンゲニン（フラバノングループ）（図 1A）を用いて SPC による血管異常収縮および 40 mM K⁺溶液によって引き起こされる Ca²⁺依存性血管収縮に対する影響を検討した。結果としてノビレチンは 10 μM で SPC による血管異常収縮を強力に抑制し（89.3 ± 3.9%、n=3）、40 mM K⁺溶液による Ca²⁺依存性血管収縮に対しては微弱な抑制効果を示した（14.3 ± 1.9%、n=3）（図 1B、2A）。対照的にケルセチン、ナリンゲニンはそれぞれ 10 μM の最終濃度において SPC による血管異常収縮、40 mM K⁺溶液による Ca²⁺依存性血管収縮に対してほとんど抑制効果を示さなかった（図 1B）。ノビレチン（1、5、10、15、20、40 μM）は SPC による血管異常収縮と 40 mM K⁺溶液による Ca²⁺依存性血管収縮に対して双方を用量依存的に阻害したが、検討した濃度の中で最終濃度 10 μM においては Ca²⁺依存性血管収縮に対して抑制効果が小さく、一方で血管異常収縮を強く阻害し、最適な濃度を示した（図 2A、B）。これらの結果はノビレチンが Ca²⁺依存性血管収縮にほとんど影響を与えず、SPC による血管攣縮を治癒する可能性があることを示した。

5.2 SPC、40 mM K⁺溶液刺激下でのノビレチンの張力および細胞質 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) への影響

ノビレチンの [Ca²⁺]_i への影響を確認するため、血管収縮および [Ca²⁺]_i の同時測定を実施した。ノビレチンは SPC 依存性の血管異常収縮を抑制したが、[Ca²⁺]_i に影響しなかった（図 2C）。一方で 40 mM K⁺溶液刺激による Ca²⁺依存性血管収縮に対しては微弱な影響を示した（図 2D）。

5.3 ノビレチンの SPC 刺激による MLC リン酸化レベルへの影響

異常収縮の経路として SPC / ROK 経路が確認されていることから、ウエスタンブロッティングを行い、MYPT1 と MLC のリン酸化レベルを測定することにより、

ROK の活性化を評価した。血管平滑筋条片に対して SPC 刺激を行ったところコントロールと比較して p-MYPT1 (Thr853) と p-MLC20 (Ser19) の両方を有意に増加させた。一方でノビレチンは SPC 刺激によって引き起こされる MYPT1 および MLC のリン酸化レベルを有意に抑制した (図 3A)。

6. 考察

本研究では SPC が引き起こす血管異常収縮に対する効果が確認できている EPA の代替として Ca^{2+} 依存性収縮に対して影響がなく、血管異常収縮のみを抑制する効果をもつ食品由来成分を見出すことを目的とし、探索を行った。その結果、柑橘由来成分の一種であるノビレチンを発見した。ノビレチン (10 μ M) は SPC による血管異常収縮を抑制し、40 mM K^+ 溶液が引き起こす Ca^{2+} 依存性血管収縮に対してはほとんど影響を示さなかった。これまで EPA の類似構造物質を検討してきたが、EPA に匹敵するような血管異常収縮抑制作用を示すものは確認できていなかった。今回、EPA の代替としてノビレチンを見出したが、それぞれの構造は全く異なっているため、この結果を予測することはできなかった。フラボノイドの構造に関連する報告では、ケルセチンは構造上強い抗酸化活性を示すことが明らかとなっているが、SPC による血管異常収縮に対する抑制効果はほとんど確認できなかったことから、抗酸化活性が SPC による血管異常収縮への抑制作用にそれほど重要ではないと示唆された¹⁰⁾。ノビレチン、ケルセチン、ナリンゲニン間の構造のわずかな違いにより SPC による血管異常収縮に対する抑制効果が有意に異なる (図 1A、B)。そこから推測すると残基もしくは基本骨格が SPC による血管異常収縮に対する抑制効果に重要な役割を果たしていると考えられる。ノビレチンはポリメキシフラボンに分類され、シークワサー (平実檸檬): *Shiikuwasha* / *Citrus depressa* などの柑橘類の外皮のフラベド組織に多く含まれており、抗腫瘍作用、抗炎症性、抗糖尿病、抗認知症、抗動脈硬化作用など様々知られている¹¹⁻¹⁵⁾。また、他の報告ではノビレチンとその代謝物の血漿濃度は 25 μ M となることから、本研究で血管異常収縮抑制効果が観察された 10 μ M という濃度は *in vivo* において実現可能性が高い¹⁶⁾。ノビレチンは日常的に摂取

可能な食品に含まれることから、病気になる前、即ち血管攣縮に対する予防法としても活用できる可能性がある。また、後投与試験の結果から病気になった後、即ち治療薬としても有用であると考えられる（図 2A、B）。

SPC の血管異常収縮では ROK によるミオシンホスファターゼ（MLCP）の不活性化が深く関わっている。SPC 刺激によって活性化された ROK は MLCP のサブユニットである MYPT1 をリン酸化し、MLCP は不活性化され、それにより MLC のリン酸化レベルが上昇し収縮を引き起こすことが知られている^{4,7)}。ウエスタンブロットの分析では、ノビレチンは血管平滑筋条片を用いた分析において SPC 刺激による MLC、MYPT1 のリン酸化レベルの上昇を有意に抑制した。従ってノビレチンは、SPC によって誘発される ROK 活性化を阻害することで血管異常収縮を抑制していると考えられた。

ノビレチンは日常的に摂取可能な食品にも含まれることから、医師の診断を仰ぐ必要はなく、毎日食べることで血管攣縮の予防薬としても役立つ可能性が示唆される。

7. 結語

柑橘類に含まれる食品成分ノビレチンは SPC による血管の異常収縮に対して強力な抑制効果を持つ一方、40 mM K⁺溶液による Ca²⁺依存性血管収縮にはわずかな抑制効果にとどまることを明らかにした。作用メカニズムについては今後のさらなる検証が必要であるが、ノビレチンが血管攣縮に対する予防薬だけでなく特効薬としても利用できる可能性が高い。

8. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導下さいました、分子細胞生理学講座の小林 誠教授、岸 博子 准教授、張 影 講師、森田 知佳 助教の皆様に深く感謝申し上げます。そして、いつもご支援頂いた同教室の大学院生 呂 博超さんに厚く御礼申し上げます。また、ブタ冠状動脈サンプルを譲渡頂きました北九州市食肉検査管理センターの皆様にも心から感謝致します。

9. 参考文献

- [1] Todoroki-Ikeda N、Mizukami Y、Mogami K、Kusuda T. et al. Sphingosylphosphorylcholine induces Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction: possible involvement of rho-kinase. *FEBS Lett* 2000; 482: 85-90.
- [2] Shirao S、Fujisawa H、Kudo A、Kurokawa T. et al. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: possible involvement of a sphingosylphosphorylcholine-rho-kinase pathway. *Cerebrovasc Dis* 2008; 26: 30-37.
- [3] Kurokawa T、Yumiya Y、Fujisawa H、Shirao S. et al. Elevated concentrations of sphingosylphosphorylcholine in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage: a possible role as a spasmogen. *J Clin Neurosci* 2009; 16: 1064-1068.
- [4] Nakao F、Kobayashi S、Mogami K、Mizukami Y. et al. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca^{2+} -sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circ Res* 2002; 91: 953-960.
- [5] Shirao S、Kashiwagi S、Sato M、Miwa S. et al. Sphingosylphosphorylcholine Is a Novel Messenger for Rho-Kinase-Mediated Ca^{2+} Sensitization in the Bovine Cerebral Artery: Unimportant Role for Protein Kinase C. *Circ Res* 2002; 91: 112-119.
- [6] Morikage N、Kishi H、Sato M、Guo F. et al. Cholesterol primes vascular smooth muscle to induce Ca^{2+} -sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway: possible role for membrane raft. *Circ Res* 2006; 99: 299-306.
- [7] Zhang Y、Zhang M、Lyu B、Kishi H. et al. Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation.

Scientific Reports 2017; volume 7 Article: 36368.

[8] Hisaoka T, Yano M, Ohkusa T, Suetsugu M. et al. Enhancement of Rho/Rho-kinase system in regulation of vascular smooth muscle contraction in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovascular Research* 2001; 49: 319–329.

[9] Austin C, Wray S. The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Journal of Physiology* 1995; 488.2: 281–291.

[10] Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 84: 206–239.

[11] Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T. et al. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2006; 70. (1): 178–192.

[12] Goh J, Tan L-T, Goh J-K, Chan K-G. et al. Nobiletin and Derivatives: Functional Compounds from Citrus Fruit Peel for Colon Cancer Chemoprevention. *Cancers* 2019; Volume 11 Article: 867.

[13] Nakajima A, Ohizumi Y. Potential Benefits of Nobiletin, A Citrus Flavonoid, against Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *J. Mol. Sci.* 2019; Volume 20 Article: 3380.

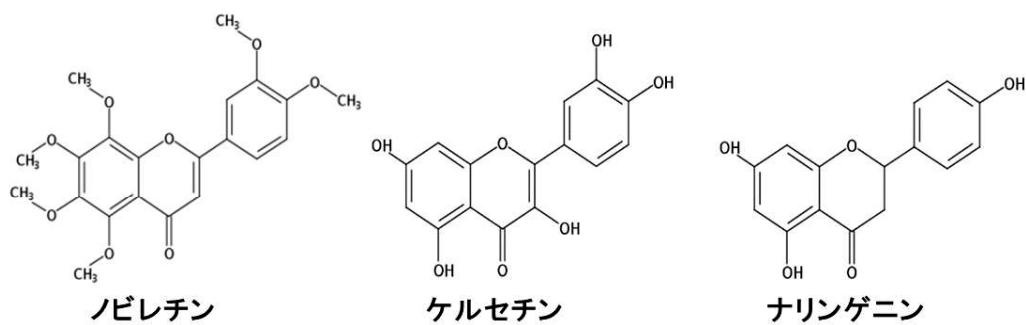
[14] Huang H, Li L, Shi W, Liu H. et al. The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016; Volume 2016 Article: 291879614.

[15] Mulvihill E-E, Burke A-C, Huff M-W. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.* 2016; 36: 275–299.

[16] Wang M, Zheng J, Zhong Z, Song M. et al. Tissue distribution of nobiletin and its metabolites in mice after oral administration of nobiletin. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013; Volume 27 Issue S1: 125.3–125.3.

図 1

A



B

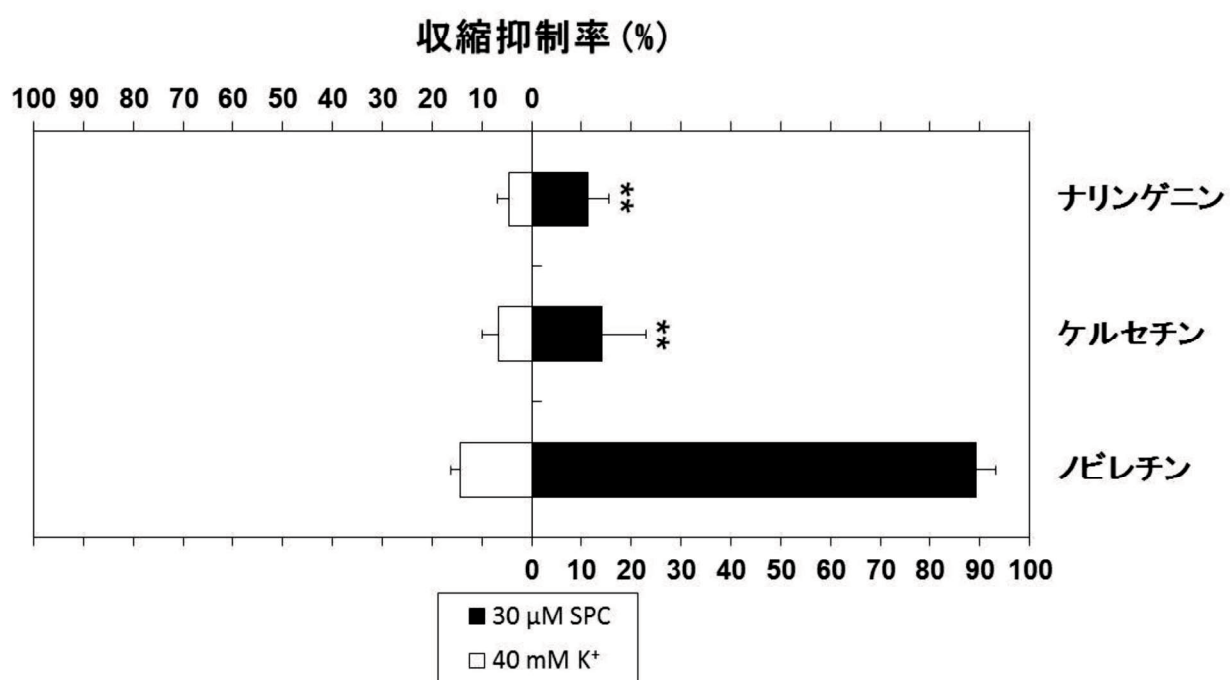
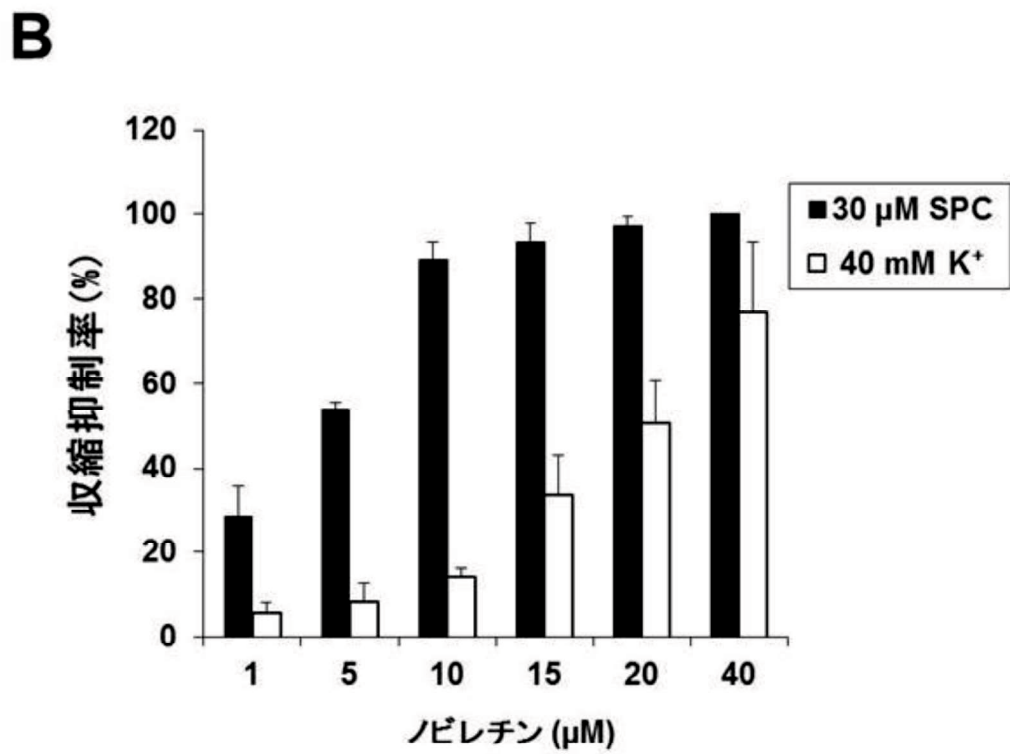
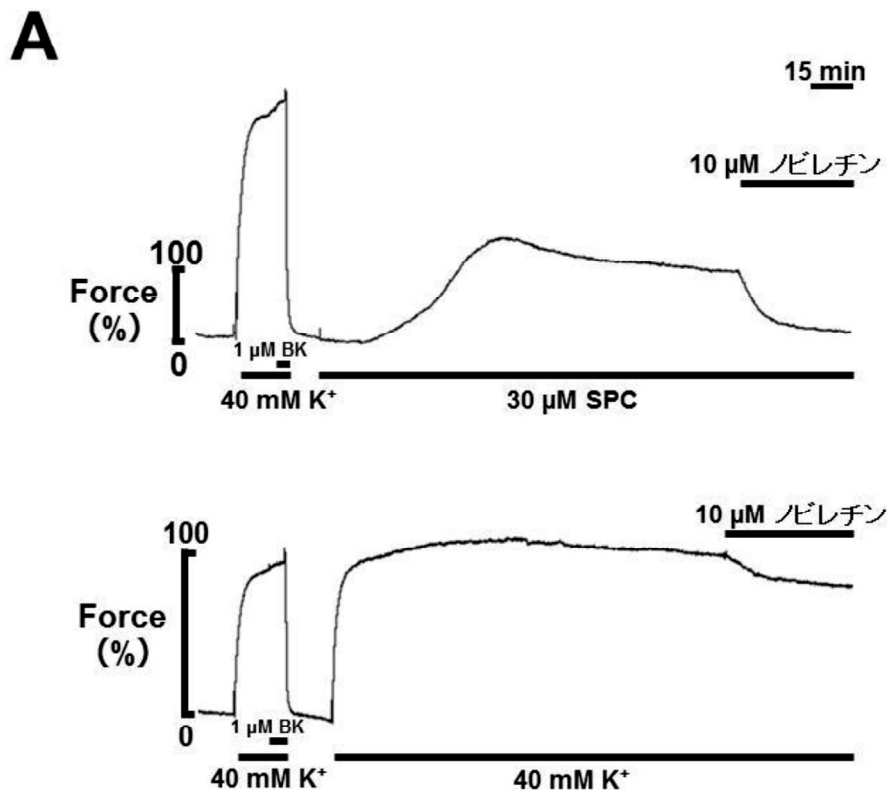


図 1 血管平滑筋条片においてノビレチンはケルセチン、ナリンゲニンと比較して SPC による血管異常収縮を強力に抑制し、40 mM K⁺溶液による Ca²⁺依存性血管収縮にわずかな影響を与えた。(A) ノビレチン (フラボングループ)、ケルセチン (フラボノールグループ)、ナリンゲニン (フラバノングループ)、それぞれの化学構造を示す。(B) 血管平滑筋条片における SPC (30 μM) による異常収縮もしくは 40 mM K⁺溶液による Ca²⁺依存性収縮に対するノビレチン (10 μM)、ケルセチン (10 μM)、ナリンゲニン (10 μM) の収縮抑制率を示す (n=3)。データは平均 ± 標準誤差にて表示した。抑制率はノビレチン、ナリンゲニン、ケルセチン添加前の定常状態下での張力を 100%として算出した。***P* < 0.01 vs ノビレチン。SPC: スフィンゴシルホスホリルコリン、BK: ブラジキニン、40 mM K⁺: 40 mM K⁺溶液

図 2



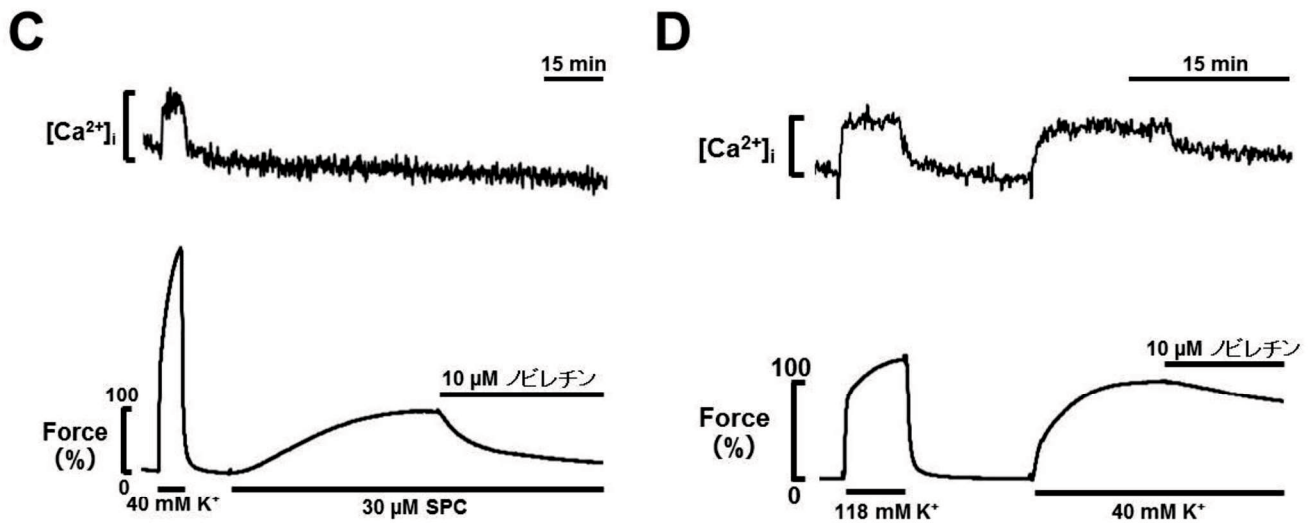


図2 血管平滑筋条片においてノビレチン (10 μM) はSPCによる血管異常収縮を特異的に抑制した。(A) ノビレチン (10 μM) の代表的な張力測定トレースを示す。(B) 血管平滑筋条片におけるSPCによる異常収縮および40 mM K^+ 溶液による Ca^{2+} 依存性収縮でのノビレチンの濃度依存性収縮抑制率を示した ($n=3$)。データは平均 \pm 標準誤差にて表示した。(C、D) Indo1-AM で処理した血管平滑筋条片を用いた $[Ca^{2+}]_i$ と張力の同時測定の代表的な張力測定トレースを示す。SPC または 40 mM K^+ 溶液刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の変化および張力に対するノビレチンの影響を観察した。

図 3

A

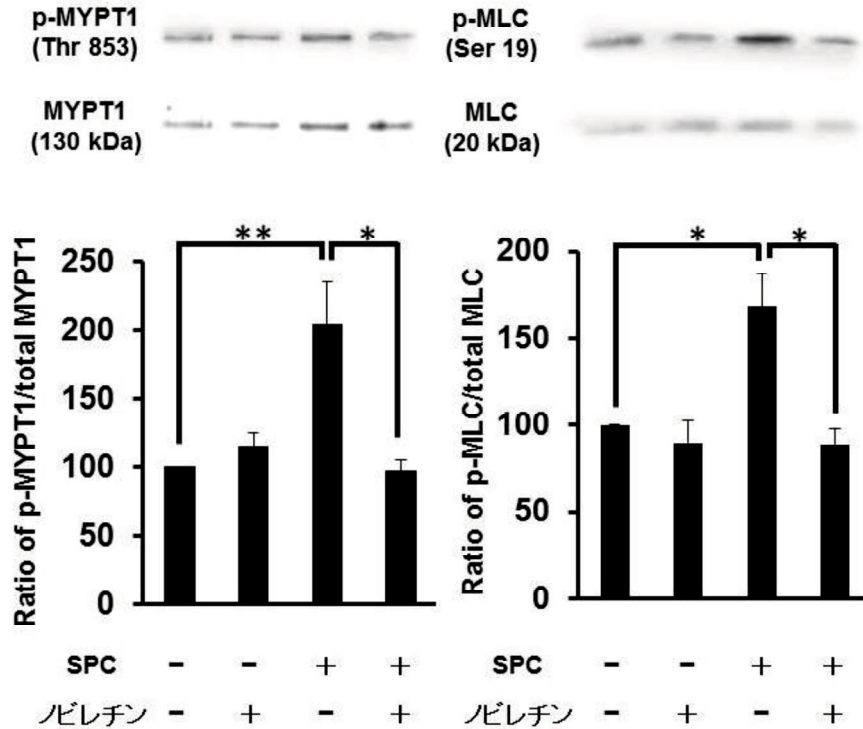


図 3 ノビレチンは血管平滑筋条片において SPC が誘導する ROK の活性化および MLC のリン酸化を抑制した。(A) ノビレチンの血管平滑筋条片における SPC 刺激による ROK の活性化および MLC のリン酸化レベルに対するウエスタンブロット解析結果を示す。血管平滑筋条片をノビレチン (10 μ M、30 分) またはコントロール (DMSO、30 分) でプレインキュベートし、SPC 存在下あるいは非存在下で処置し (30 μ M、15 分)、比較定量化した (n=3)。データは平均 \pm 標準誤差にて表示した。* P < 0.05、** P < 0.01、p-MLC: ミオシン軽鎖のリン酸化、p-MYPT1: ミオシンリン酸化標的サブユニット 1 のリン酸化