

東医大誌 53(2): 183~189, 1995

## ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) の 細胞質カルシウムイオンと形態 に対するオカダ酸の作用

<sup>1</sup>東京医科大学内科学教室第三講座, <sup>2</sup>生理学教室第一講座 (指導: 伊藤久雄主任教授)

小川恵美子<sup>1</sup> 荒川 敬<sup>1</sup> 能登谷洋子<sup>1</sup>  
橋口美津子<sup>2</sup> 橋口利雄<sup>2</sup>

### Effects of Okadaic Acid on Cytosolic Ca<sup>2+</sup> and Shape of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Emiko OGAWA<sup>1</sup>, Takashi ARAKAWA<sup>1</sup>, Yoko NOTOYA<sup>1</sup>,  
Mitsuko HASHIGUCHI<sup>2</sup> and Toshio HASHIGUCHI<sup>2</sup>

Department of Internal Medicine<sup>1</sup> and Department of Physiology<sup>2</sup> Tokyo Medical College  
(Director: Prof. Hisao Ito)

Okadaic acid (OA) is a potent marine toxin which selectively antagonizes type I & II protein phosphatases. We have found that OA altered histamine-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> response of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). OA completely abolished histamine-induced changes. In addition, the resting cytosolic Ca<sup>2+</sup> level was significantly decreased from 120 nM to 54 nM by 1 μM OA. Interestingly, OA induced a drastic change in configuration of HUVEC. Both of the effects of OA were time-dependent. We have speculated that OA abolished histamine H<sub>1</sub> sensitivity by a pathway involving protein kinase C, while refilling of Ca<sup>2+</sup> remains intact. The effect of OA on HUVEC configuration may be the result of contraction induced by myosin light chain kinase (MLCK), since MLCK is a known target of OA in smooth muscle. The implications of the experiment are discussed.

### 緒 言

荒川ら<sup>1</sup>は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、Fura 2 法により血管内皮細胞の細胞質カルシウム動態に対するヒスタミンの作用を観察し、H<sub>1</sub> 受容体を介する三相性の細胞質カルシウム変化、即ち細胞内 Ca 貯蔵部位よりの Ca 放出 (第 1 相)、細胞外よりの Ca 流入 (第 2 相)、そしてヒスタミン除

去後のアンダーシュート (第 3 相) を起こすことを報告した。さらに、第 1 相のピーク応答に脱感作が起こることも見出した。この脱感作とヒスタミン応答の第 3 相は、ヒスタミン除去後も数分から数十分持続する現象であることから、荒川らは H<sub>1</sub> 受容体活性化に引き続いて起こるプロテインカイネース C (PKC) 活性化が関与している可能性を考えた。

HUVEC においては、H<sub>1</sub> 受容体の活性化により、

(1994 年 12 月 17 日受付, 1994 年 12 月 27 日受理)

**Key words:** ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC), 蛍光カルシウム指示薬 (Fura 2), 細胞質遊離カルシウムイオン (Cytosolic Ca<sup>2+</sup>), オカダ酸 (Okadaic acid)

イノシトールリン酸代謝が惹起され、イノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) によるカルシウム放出とジアシルグリセロール (DG) 産生に続いて、PKC の活性化が起こることがすでに報告されている<sup>2)</sup>。PKC はカルシウムイオンの流入および H<sub>1</sub> 受容体の脱感作に関与するという報告<sup>3,4)</sup>があり、HUVEC においてもその役割の解明は重要である。オカダ酸は、細胞内信号伝達に関与する蛋白脱リン酸化酵素、特に 1 型および 2A 型フォスファターゼを特異的に阻害する作用を持ち、細胞膜を透過することから、細胞において脱リン酸化阻害の効果を検討できる長所があり、各種組織において、蛋白質のリン酸化、脱リン酸化の役割を解明する目的で用いられている<sup>5,6)</sup>。

本研究は PKC が H<sub>1</sub> 受容体の脱感作とカルシウムイオンの流入の調節に関与している可能性を解明する目的で、HUVEC に対するオカダ酸の作用を検討した。

材料と方法

HUVEC の培養法そして細胞質カルシウムのモニター法については既に荒川<sup>7)</sup>が報告した。細胞質カルシウム濃度の相対的变化は、二波長の励起光、340 nm と 380 nm、による蛍光強度の比 (F340/F380) として表した。静止時細胞質カルシウム濃度は、無処理および 0.5 μM または 1.0 μM オカダ酸を添加した Krebs 液で 1 時間インキュベートした後、Krebs 液で洗浄し、Ca-free/2 mM EGTA, 1.8 μM イオノマイシンを含む Krebs 液 (細胞質カルシウム最小値)、Krebs 液 (細胞質カルシウム最大値)、Ca-free/2 mM EGTA 2 mM Mn<sup>2+</sup> を含む Krebs 液 (バックグラウンド蛍光) の順で灌流し、それぞれの条件での蛍光強度から細胞質カルシウム濃度の絶対値を求めた<sup>8)</sup>。

オカダ酸の作用は、培養槽内での 1 時間のインキュベーションまたは灌流液への添加により検討した。またヒスタミン刺激は、10 μM ヒスタミンにより、ATP 刺激は、1 mM ATP により行い、10 秒、60 秒、180 秒の刺激時間について検討した。HUVEC の形態変化は、オカダ酸 0.5 μM および 1.0 μM で 15 分間インキュベートした後、位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK-2 TRP-2) で観察し、写真撮影した。

細胞質カルシウム濃度については、ANOVA post-hoc Tukey test (Systat version 4, Systat

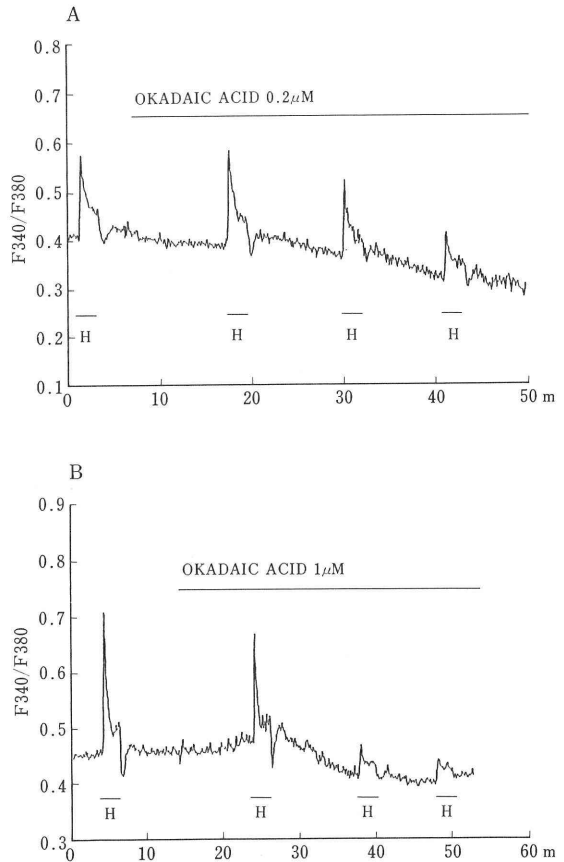


図 1 オカダ酸 0.2 μM (A) および 1.0 μM (B) 灌流による、ヒスタミン刺激 (H) に対する蛍光強度比の変化について

Co., I11 inois) により有意差検定を行った。

オカダ酸およびヒスタミンは和光純薬工業 (株)、イオノマイシンは CALBIOCHEM, ATP は SIGMA 社製を用いた。

結 果

1. ヒスタミン応答に対するオカダ酸の作用

HUVEC においては、既に荒川<sup>7)</sup>が報告したように、10 μM ヒスタミン刺激 (持続時間 180 秒) に応答し、三相性の F340/F380 変化が誘起される (図 1 A, B)。オカダ酸で灌流した場合、灌流後すぐにヒスタミン応答の変化は起こらなかった。0.2 μM オカダ酸投与の例 (図 1 A) では、灌流開始後 10 分間はヒスタミン刺激による F340/F380 の増加は殆ど変化を受けず、約 20 分後から抑制が明らかとなり、

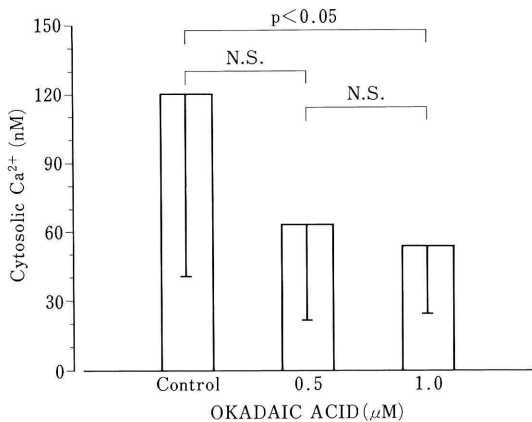


図 2 オカダ酸前処理(0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M) による内皮細胞の静止時細胞質カルシウム濃度の変化。オカダ酸 1.0  $\mu$ M 前処理による静止時細胞質カルシウムの減少は、危険率 0.05% で有意であった。

また灌流時間に応じて抑制が進行していく事が観察された。オカダ酸の濃度を 1  $\mu$ M とした例 (図 1 B) ではヒスタミンによる F340/F380 応答は、0.2  $\mu$ M の場合よりも速やかに抑制された。

このように、ヒスタミン刺激による F340/F380 増加に対するオカダ酸の抑制作用は、作用時間依存的であった。抑制発現までの潜時が長いことが大きな特徴であり、1  $\mu$ M オカダ酸を用いた場合では、約 15 分を要した (n=5)。またこのオカダ酸の抑制作用は持続的であり Krebs 液で 20 分以上洗い流した後も回復しなかった (n=3)。

## 2. 静止時細胞質カルシウムに対するオカダ酸の作用

オカダ酸は、ヒスタミン刺激時の F340/F380 変化のみならず、非刺激時の F340/F380 (静止時 F340/F380) を減少させた。静止時 F340/F380 の減少作用も、作用時間依存性であり、ヒスタミン応答の減弱と同程度の潜時を示した (図 2)。

HUVEC の静止時細胞質カルシウム濃度は  $120 \pm 80$  nM (n=14) であった。一方、0.5  $\mu$ M オカダ酸前処理により  $63 \pm 42$  nM (n=8)、また 1.0  $\mu$ M は  $54 \pm 30$  nM (n=6) と変化した。なお 1.0  $\mu$ M オカダ酸の静止時細胞質カルシウム濃度の低下は対照に比し、危険率 5% 未満で有意であった (図 2)。

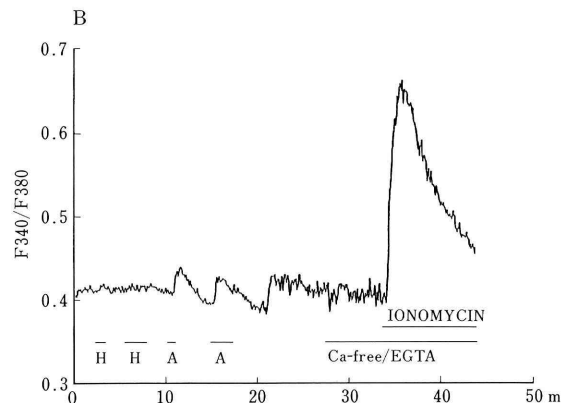
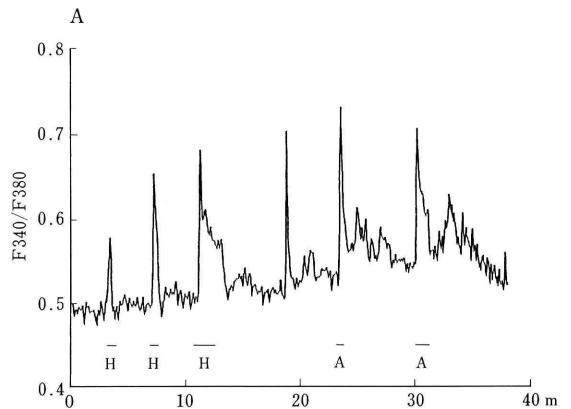


図 3 内皮細胞のヒスタミン (H) あるいは ATP (A) 刺激による Fura 2 蛍光強度比 (F340/F380) の変化 (A) と、オカダ酸 1  $\mu$ M、1 時間前処理 (B) の効果。

## 3. オカダ酸前処理によるアゴニスト依存性カルシウム応答の変化

オカダ酸の直接の作用点は、細胞表面の受容体ではなく、細胞内のホスファターゼである事から、オカダ酸のヒスタミン応答抑制は特異的な作用ではなく、細胞内の Ca 貯蔵部位からの Ca 放出を起こすアゴニストとは無関係に抑制することも考えられる。そこで強い Ca 放出作用を持つ ATP に対するオカダ酸の作用を検討した。

図 3A は対照としたオカダ酸無処理の HUVEC monolayer におけるヒスタミン応答と ATP 応答の 1 例である。ヒスタミン 10  $\mu$ M (H) あるいは ATP 1 mM (A) により、灌流時間が短い場合には一過性の F340/F380 増加、灌流時間が長い場合にはそれに続くプラトー状の F340/F380 増加が見られた。

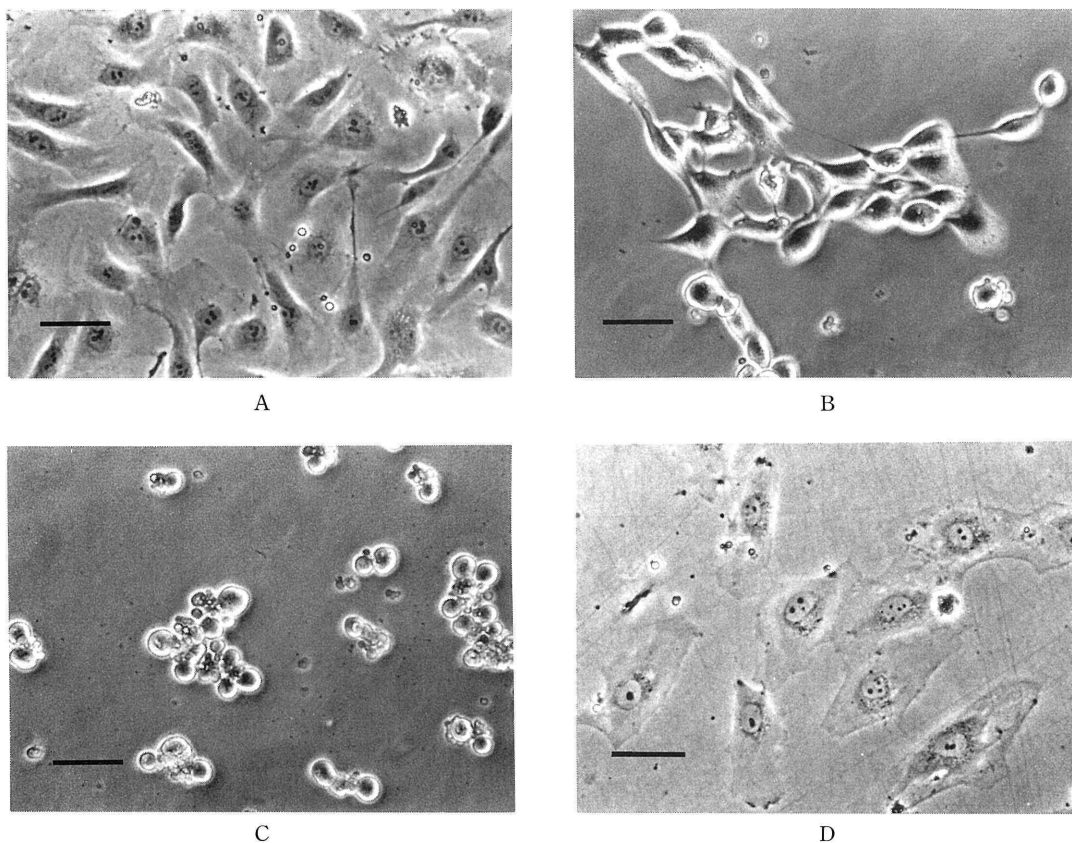


図4 オカダ酸による血管内皮細胞の変化。無処理 (A) 及びオカダ酸  $0.5 \mu\text{M}$  (B) または  $1.0 \mu\text{M}$  (C) で15分間インキュベート後、そしてオカダ酸  $1.0 \mu\text{M}$  で15分間インキュベートした後 Krebs 液にて24時間洗浄後 (D) の位相差顕微鏡像を示す。図中■は  $50 \mu\text{m}$  に相当する。

図3Bは  $1.0 \mu\text{M}$  オカダ酸で1時間前処理した例で、ヒスタミン刺激による F340/F380 の変化は完全に消失していた。一方、ATP による応答も強い抑制を受けたが、ヒスタミン応答とは少し異なり、弱い F340/F380 の増加と洗浄後に F340/F380 の減少が見られた。ヒスタミンのみならず、ATP 応答に対してもオカダ酸前処理は強い抑制作用を示したことから、細胞内の Ca 貯蔵部位が枯渇した可能性がある。この可能性を検討するため、Ca-free/2 mM EGTA 液中でイオノマイシンの作用を調べた。

オカダ酸前処理標本では、灌流液を 2 mM EGTA を含む Ca-free/2 mM EGTA 液 (Ca-free/EGTA) に変えても、F340/F380 の変化は見られなかったが、イオノマイシン ( $1.8 \mu\text{M}$ ) を投与すると、一過性に急激な細胞質カルシウム増加が起こった (図3B)。この例のように、イオノマイシンは細胞外 Ca

を除去した場合でも、HUVEC monolayer に F340/F380 の増加を起こした ( $n=3$ )。

#### 4. HUVEC の形態に対するオカダ酸の作用

$0.5 \mu\text{M}$  (図4B) あるいは  $1.0 \mu\text{M}$  オカダ酸 (図4C) で15分間処理した後の HUVEC 形態変化を示した。細胞の形態は、対照 (図4A) の典型的な一層敷石状配列に比して、オカダ酸添加により紡錘状から徐々に球状に変化した。この形態変化は可逆的でありオカダ酸を洗浄することにより、数時間から数十時間後には紡錘状の形態に復帰した (図4D)。また、トリパンブルー染色により、オカダ酸処理後の生細胞数の検討を行ったが、95% 以上の viability を認め、HUVEC のオカダ酸処理による形態変化は細胞の死に起因するものではなかった。

## 考 察

オカダ酸はクロイツ海綿 (*Halichondria okadai*) から分離された生理活性物質で、強力なプロテイン (セリン/スレオニン) ホスファターゼ (PrPase) 活性阻害作用を持っている。特に 1 型そして 2A 型の PrPase を特異的に阻害し<sup>9)10)</sup>、細胞膜を透過することから、細胞の機能調節における細胞内情報伝達系の研究に使用されている<sup>9)</sup>。我々は、HUVEC をオカダ酸で処理することにより、HUVEC における蛋白質磷酸化の役割を検討した。

### 1. ヒスタミン応答に対するオカダ酸の作用

HUVEC においては、ヒスタミンによる細胞質カルシウムの変化は  $\text{H}_1$  受容体の活性化によるものであり、第 1 相は細胞内貯蔵カルシウムの放出により、第 2 相は細胞外からのカルシウム流入によるとしている<sup>11)12)</sup>。これらの、ヒスタミン刺激に対する細胞質カルシウムの状態は、オカダ酸で灌流開始後、15 分以降に抑制され、作用時間依存的であった。また  $1 \mu\text{M}$  オカダ酸で前処理することにより、ヒスタミン応答は完全に消失した (図 3)。ヒスタミン刺激による細胞質カルシウムの増加は、二つの独立したメカニズム、貯蔵部位からの細胞内カルシウムの放出と細胞外からの持続的カルシウム流入の結果により生じる。前者には  $\text{IP}_3$  の関与そして後者にはアゴニスト作動性  $\text{Ca}$  チャネルがそれぞれ関与していることから、オカダ酸はこの二つの異なるメカニズムを共に抑制する作用を持っていることとなる。

$\text{Ca-free}/2 \text{ mM EGTA}$  液中では、イオノマイシンにより一過性の細胞質カルシウムの上昇が見られた (図 3B)。この時、細胞外のカルシウムイオンを EGTA により除去してあるので、この細胞質カルシウム増加は、イオノマイシンが細胞内カルシウム貯蔵部位の膜に作用し、カルシウム透過性を高めた結果起こったと解釈できる<sup>12)</sup>。従って、細胞内貯蔵部位のカルシウムは枯渇したわけではないことから、細胞内貯蔵部位へのカルシウムの再負荷機構は働いていると考えられる。オカダ酸前処理標本において、ヒスタミンあるいは ATP による一過性の細胞質カルシウム増加が起こらないのは、アゴニスト-受容体結合を含めカルシウム放出に至る情報伝達機構の過程で、PrPase がオカダ酸により阻害されたため、機能蛋白質が見かけ上磷酸化を受けたことによる現象と推定される。

### 2. 静止時細胞質カルシウムに対するオカダ酸の作用

HUVEC の静止時の細胞質カルシウム濃度はすでに報告<sup>13)14)</sup>があり、 $117 \pm 5 \text{ nM}$  あるいは  $112 \pm 8 \text{ nM}$  とされている。我々の実験結果、 $120 \pm 80 \text{ nM}$  ( $n=14$ )、はこれらの報告と極めて良く一致した。

$1 \mu\text{M}$  オカダ酸前処理により、静止時の細胞質カルシウム濃度は対照に比し有意に低下した ( $p < 0.05$ )。オカダ酸前処理により細胞質カルシウムの静止レベルが減少した標本では、 $\text{Ca-free}/2 \text{ mM EGTA}$  液灌流により、さらに細胞外のカルシウムを除いても、それ以上の細胞質カルシウム濃度低下はおこらなかった。このことは、オカダ酸前処理標本では、細胞外からのカルシウム流入が停止していることを示す。ヒスタミン刺激時のみならず静止時においてもカルシウム流入が停止していること、そして細胞内カルシウム貯蔵部位への負荷が intact であることにより、持続的な細胞質カルシウム濃度減少がおきたと結論できる。

興味深いことに、オカダ酸のヒスタミン応答に対する作用、F340/F380 増加の抑制と静止時細胞質カルシウム減少は、灌流開始後 15 分以降に出現し、Krebs 液で洗浄しても短時間では回復が認められない点で共通していた。オカダ酸による蛋白質の磷酸化は、投与後 15 分で最大になるという報告<sup>15)</sup>を考慮すると、オカダ酸により誘導された蛋白質の磷酸化が関与しているものと考えられる。HUVEC においてオカダ酸による蛋白質の磷酸化の詳細は不明であるが、ヒスタミン刺激による、二つの異なったカルシウム応答さらには ATP によるカルシウム応答を共に抑制したことから (図 3)、細胞膜表面の受容体やカルシウムチャネルの過度の磷酸化により、受容体の脱感作やチャネルの閉鎖を起こした可能性がある。ヒスタミン  $\text{H}_1$  受容体は PKC による磷酸化により、機能調節を受けている<sup>3)4)</sup>。PKC は蛋白質 (セリン/スレオニン) カイネースであることから、その基質の脱磷酸化には PrPase 2A が関与する可能性が高く<sup>9)</sup>、オカダ酸により見かけ上、PKC 活性が増加したと解釈出来る。

### 3. HUVEC の形態に対するオカダ酸の作用

オカダ酸は、HUVEC の紡錘型の形態を球形化させた。この変化はトリパンプルーの取り込みを伴わないことから、細胞の死による変化ではない。現在までに、内皮細胞の形態に対するオカダ酸の効果に

ついで報告はない。しかし、炎症を惹起する物質の多くが、内皮細胞の形態変化を引き起こすことにより血管壁の透過性を調節している<sup>16)</sup>こと、透過性変化には細胞質カルシウム、cyclic nucleotidesそしてPKCが関与する<sup>17)</sup>こと、さらにカルシウム拮抗薬の一部が球形化を防ぐ<sup>18)</sup>ことなどの報告を考慮すると、オカダ酸によるHUVECの球形化のメカニズムは興味深い。

オカダ酸による細胞の球形化には、細胞骨格あるいは容積調節系<sup>19)</sup>の関与が考えられ、いずれの場合にもカルシウム依存性の重合・脱重合あるいは燐酸化の関与を考慮する必要がある。

細胞骨格を構成する繊維成分として、微小管、アクチンフィラメント及び中間径フィラメントがあるが、これらの重合状態や集合形態は、細胞質カルシウムを含め様々な因子により調節をうけている。ヒスタミン刺激時には、細胞質カルシウムの増加、F-アクチンの減少そしてアルブミン透過性の増加が起こる事<sup>7)</sup>が報告されている。またCaイオノフォアにより細胞質カルシウムを直接増加させた時、アルブミン透過性が増大する<sup>17)</sup>ことから、細胞質カルシウムの増加は内皮細胞の形態変化をもたらす、透過性を増すと考えられている。しかしオカダ酸によりHUVEC球形化が起こった状態では、細胞質カルシウムは正常の約1/2に低下していたことから、Ca<sup>2+</sup>依存性の重合による形態変化と考えることはできない。

興味深いことに、腸管の平滑筋スキンドファイバー標本においては、0.1 μM以上のオカダ酸によりカルシウム不在下で収縮が起こり、わずかなカルシウムがあれば増強される<sup>20)</sup>。すなわちオカダ酸はカルシウム非依存性に収縮を引き起こす働きがある。このメカニズムは、ニワトリ砂嚢天然アクトミオシン標本で詳細に検討された結果、オカダ酸の平滑筋での収縮作用点は、Ca<sup>2+</sup>カルモジュリンに非依存性に活性化され、カルシウムにより活性がさらに増加するようなミオシン軽鎖リン酸化酵素であろうと推測されている<sup>21)</sup>。

HUVECにおいて、オカダ酸がミオシン軽鎖の燐酸化を起こすか否かは明らかではないが、内皮細胞の収縮蛋白、アクチンとミオシンが平滑筋と極めてよく似ていること<sup>7)</sup>、さらにウシ肺動脈由来内皮細胞の形態変化にミオシン軽鎖の燐酸化が伴うことが知られている<sup>22)</sup>のでHUVECにおいてもオカダ酸

投与により、カルシウム非依存性にミオシン軽鎖の燐酸化が生じ、アクチンとの相互作用で細胞の球形化が生じた可能性が考えられる。もしミオシン軽鎖の燐酸化が細胞の機能と形態を変化させたとすれば、炎症や動脈硬化の発症における各種炎症誘起物質の役割を考えるうえで興味深い。

## 結 論

HUVECにオカダ酸を投与し、細胞質カルシウムと形態の変化を観察し以下の結果を得た。

1. オカダ酸は、HUVECにおけるヒスタミンによる細胞質カルシウムの上昇を、時間依存的に抑制した。
2. 1.0 μM オカダ酸は、静止時細胞質カルシウムを対照に比し有意に低下した。
3. オカダ酸は、HUVECの形態を球形に変化させた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました東京医科大学内科第三講座、伊藤久雄教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究にあたり御鞭撻を頂いた第一生理学教室、登坂恒夫教授に深謝致します。また、御協力頂きました教室員各位に感謝申し上げます。

## References

- 1) 荒川 敬, 橋口美津子, 橋口利雄: ヒト臍帯静脈由来内皮細胞におけるヒスタミン誘起細胞質Ca<sup>2+</sup>変化の性質. 東医大誌 (投稿中) (1994)
- 2) Resink, TJ et al: Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells. Association with thromboxane and prostacyclin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 438~446, 1987.
- 3) Brock, TA & Capasso, EA: Thrombin and histamine activate phospholipase C in human endothelial cells via a phorbol ester-sensitive pathway. *J. Cell Physiol.*, **136**: 54~62, 1988.
- 4) Carter TD, Hallman TJ & Pearson JD: Protein kinase C activation alters the sensitivity of agonist-stimulated endothelial-cell prostacyclin production of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Biochem. J.*, **262**: 431~437, 1989.
- 5) Alexander DR: The role of phosphatases in signal transduction. *New Biologist* **2**(12): 1049~

- 1062, 1990.
- 6) Schonthal A: Okadaic acid—a valuable new tool for the study of signal transduction and cell cycle regulation? *New Biologist Jan*; 4(1): 16~21, 1992.
  - 7) Rotrosen D and Gallin J I: Histamine Type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.*, **130**: 2379~2387, 1986.
  - 8) Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY: A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440~3450, 1985.
  - 9) Bialojan C and Takai A: Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.*, **256**: 283~290, 1988.
  - 10) Cohen P: The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev Biochem.*, **58**: 453~508, 1989.
  - 11) Jacob R., et al: Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature*, **335**: 40~45, 1988.
  - 12) Yoshida S & Plant S: Mechanism of release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores in response to ionomycin in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. *Journal of Physiology*, **458**: 307~318, 1992.
  - 13) Wickham NW, et al: Measurement of intracellular calcium concentration in intact monolayers of human endothelial cells. *J. Lab. Clin. Med.*, **112** (2): 157~167, 1988.
  - 14) Ryan US, et al: Influence of vasoactive agents on cytoplasmic free calcium in vasocul endothelial cells. *J. Appl. Physiol.*, **65**(5): 2221~2227, 1988.
  - 15) Guy G.R., et al., Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1. *J. Biol. Chem.*, **267**: 1846~1852, 1992.
  - 16) Northover AM: The effects of TMB-8 on the shape changes of vascular endothelial cells resulting from exposure to various inflammatory agents. *Agents & Actions*, **26**(3-4): 367~371, 1989.
  - 17) Yamada Y, et al: Roles of calcium, cyclic nucleotides, and protein kinase C in regulation of endothelial permeability. *Arteriosclerosis*, **10**: 410~420, 1990.
  - 18) Northover AM: Inhibition by calcium antagonists of shape changes induced *in vitro* by pro-inflammatory mediators in venous endothelial cells. *Agents & Actions*, **36**(3-4): 237~242, 1992.
  - 19) McCarty N.A. and O'Neil R.G.: Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiological Review*, **72**(3): 1037~1061, 1992.
  - 20) Ozaki H, : Direct activation by okadaic acid of the contractile elements in the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **355**: 356~358, 1987.
  - 21) Ozaki H, et al: Calcium-independent phosphorylation of smooth muscle myosin light chain by okadaic acid isolated from black sponge (*Halichondria-okadai*). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **243**: 1167~1173, 1987.
  - 22) Wysolmerski RB, Lagunoff D, : Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Jan*; **87**(1): 16~20, 1990.
- (別刷請求先: 〒160 新宿区西新宿 6-7-1  
東京医科大学内科学第3講座 小川恵美子)