

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20390303

研究課題名（和文） 動脈管酸素感受機構におけるシグナル伝達のプロテオミクス

研究課題名（英文） Proteomic analysis of constriction mechanisms in response to oxygen in the ductus arteriosus

研究代表者

中西 敏雄（NAKANISHI TOSHIO）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：90120013

研究成果の概要（和文）：酸素感受性膜電位依存性 K チャネル 1.5（Kv1.5）と直接又は間接的に相互作用するタンパク質として、Kvb1.2, α actinin-2, SAP97, valosin containing protein, クラスリン, HSP60, ATP 合成酵素 F1 α , β サブユニット, α -アクチニン, プロヒビチン-1, -2 が検出された。これらは、Kv1.5 の細胞内輸送や制御に関わると推定される。動脈管や肺動脈の収縮制御に重要な Ca^{2+} を貯蔵する筋小胞体の主要構成成分の発現は、胎仔の発達に伴い大きく変動し、血管ごとに違いが大きいことから、動脈管では特異的な筋小胞体が構成されていると推定される。

研究成果の概要（英文）：Direct or indirect interaction of oxygen-sensing voltage-gated potassium channel 1.5 (Kv1.5) with Kvb1.2, α actinin-2, SAP97, valosin containing protein, clathrin, HSP60, ATP synthase F1 α/β subunits, α -actinin, prohibitin-1/-2 was detected. These proteins might have roles in the cellular transportation and regulation of Kv1.5. Gene expression related to the storage of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum (SR) in ductus arteriosus (DA) and pulmonary artery (PA) varied depending on the vessels and fetal developmental stages. The SR activity in the DA might be specific depending on the developmental stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2012 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：タンパク質, シグナル伝達, 動脈管, 酸素感受性, プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

動脈管は胎生期の低酸素状態で開き、生後酸素に反応して収縮する。一方、肺動脈は胎生期低酸素状態で収縮しており、生後血中酸素分圧が上昇すると拡張する。動脈管と肺動脈の酸素に対する反応の違いの機序は不明である。周産期の動脈管の収縮・拡張の機構を

調べることは、胎児循環生理の根本問題であるにもかかわらず、国内外での研究は少ない。動脈管の酸素感受機構が明らかになれば、胎児、新生児の動脈管に関わる疾患に対する新しい治療法につながる。

動脈管平滑筋細胞膜電位は主にカリウムイオン(K)チャネルによって調節されている。K

チャンネルが開き、脱分極すればカルシウムイオン (Ca) チャンネルが開き、Ca²⁺の流入が増え細胞内の Ca²⁺濃度が上昇し、平滑筋細胞は収縮する。また細胞膜α受容体からイノシトール3 燐酸を含むシグナル伝達系の活性化により、小胞体から Ca²⁺が放出され、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇する。また、血管平滑筋の収縮は、細胞内 Ca²⁺濃度増加とは別に、筋原線維の Ca²⁺に対する感受性の増加によっても制御される。

(1) K チャンネル: K チャンネルには多くのファミリーがあるが、膜電位依存性Kチャンネル(Kv)ファミリーには酸素感受性を示すメンバー (Kv1.2、1.5、2.1/9.3、3.1b、4.2、4.3) が報告されている。我々はブタ胎仔、新生仔の動脈管、肺動脈ではKv1.5及びそのアクセサリサブユニットのKvβ1.2が顕著に発現していることを報告した。新生仔の肺動脈ではKvβ1.2の発現が低下、Kv1.5の発現が増大し、動脈管ではKvβ1.2の発現が増大していた。Kvβ1.2はKv1.5電流を抑制することから、新生仔動脈管ではKvβ1.2によってKv1.5電流が抑制され、肺動脈では抑制が少ない状態であることが推定された。動脈管ではKvの抑制に伴いCaチャンネルが開き、細胞内へCa²⁺が流入することから血管が収縮し、一方肺動脈では逆に拡張すると推定された (Hayama, Nakanishi. Ped. Res., 2006)。

Kチャンネルは、PDZドメインをもつ骨格タンパク質の一つであるInaDによって会合して一つのチャネロソームを形成する。Kv1.5もPDZ結合ドメインをもつ。Kv1.5はMAGUK (membrane associated guanylate kinase) タンパク質であるSAP97 (PDZドメインをもつ) と結合しさらにSAP97はCaveolin-3と結合する。動脈管と肺動脈におけるチャネロソームについての研究はまだない。

(2) Caチャンネル: 細胞膜に発現する電位依存性L型Caチャンネル(Cav1.2)は細胞膜のG蛋白によって開閉が制御されているが、動脈管におけるCaチャンネルの酸素感受性はまだ研究されていない。

(3) 小胞体: 平滑筋細胞では、細胞膜から流入するCa²⁺が小胞体に存在するリアノジン受容体を刺激しCa²⁺が放出される。またイノシトール3リン酸が筋小胞体よりのCa²⁺放出をうながすことにより、細胞内Ca²⁺濃度が上昇して平滑筋収縮が起こる。小胞体にはリアノジン受容体、Ca²⁺-ATPase、カルセクエストレイン、ホスホランパンなどのCa²⁺結合タンパク質が存在し、Ca²⁺と結合して小胞体からのCa²⁺放出やCa²⁺取り込みを制御している。動脈管細胞では酸素で小胞体からのCa²⁺放出が増加する。肺動脈では逆に、低酸素で小胞体からのCa²⁺放出が増加する。この違いの機序は不明である。

(4) 筋原線維のCa²⁺感受性: 血管平滑筋の収縮は、細胞内Ca²⁺濃度増加とは別に、筋原線

維のCa²⁺に対する感受性増加によっても制御されている。即ち、GTP結合蛋白(GTP-Rho AやGTP-Rho B)はRhoキナーゼを活性化し、Rhoキナーゼの活性化はミオシン軽鎖ホスファターゼをリン酸化し、結果的にその活性を落とすことで、ミオシン軽鎖はリン酸化され、Ca²⁺に対する感受性が上がり、収縮が促される (Kajimoto, Nakanishi et al. Circulation 2006)。動脈管ミオシンは酸素によりCa²⁺に対する感受性が増加し、肺動脈では逆に低下する。その違いの機序は不明であり、Rho、Rhoキナーゼに関するシグナル伝達系の酸素による修飾について解明が待たれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動脈管が酸素を感受して収縮する機構のシグナル伝達系を解明することである。本研究では、動脈管における1) Kチャンネル、2) 小胞体、3) 筋原線維のCa感受性、を制御するシグナル伝達系の構成タンパク質群を、プロテオミクス手法などを用いて肺動脈などと比較する。

3. 研究の方法

(1) 抗体の調製: グルタチオン-S-トランスフェラーゼや10xヒスチジンタグを含む融合タンパク質を大腸菌に発現し、アフィニティ精製した。精製したタンパク質をアジュバントと混和し、ウサギなどに投与した。複数回投与後、抗血清又は血漿を得た。一部の抗血清は、抗原ペプチドを結合させたアフィニティカラムにより、抗体を精製した。

(2) 複合体の抽出・分離:

① 細胞試料: 対象遺伝子のタンパク質コード領域を哺乳類細胞発現ベクターに挿入したもの (Kv1.5の場合は、HAタグを付加したブタKv1.5をpIRESに挿入) をHEK293細胞に導入し、安定発現する細胞株を樹立した。又、pIRES-A-FLAG-Kvb1.2を一過性導入も実施した。HEK293細胞は、10% FBS-DMEMで継代培養し、分析用細胞はトリプシンを使わずに回収、PBSで複数回洗浄後、-80°Cで保存した。

② 組織試料: ブタ又は日本白色家兔 (胎仔、新生仔、母獣) の心臓、肺、大血管 (動脈管、肺動脈、大動脈) を、安楽死後可及的速やかに採取し、実体顕微鏡下氷冷生理食塩液中で血液成分などをできる限り除去し、急速凍結後、-80°Cに保存した。動脈管、肺動脈の一部は、窒素 (95% N₂-5% CO₂) 又は酸素 (95% O₂-5% CO₂) 飽和 Krebs-Henseleit 緩衝液中37°Cで培養し、液体窒素急速凍結後-80°Cで保存した。

③ 抽出液: 界面活性剤の1% トライトン X-100、又は0.5% n-ドデシル-β-マルトシド + 0.25% digitonin (又は界面活性剤を含まない) 50 mM BisTris, 50 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerol, 0.001% Ponceau S, pH 7.2 緩衝液。プロテアーゼ阻害剤 1x コンプリート (ロシユ) と脱リ

ン酸化阻害剤を含む。

④ 抽出法：細胞試料：氷冷した界面活性化剤を含む抽出液を試料重量のおよそ 20 倍量を添加、vortex を用いて再懸濁し、氷上で 15 分間インキュベートし、遠心分離により上清（タンパク質抽出液）を得た。組織試料：液体窒素冷却下、乳鉢を用いてパウダー化し、上記抽出液を試料重量のおよそ 20 倍量（2 段階抽出の場合は、1）界面活性化剤を含まない抽出液をおよそ 10 倍量、その後 2）界面活性化剤を含む抽出液をおよそ 5 倍量）と混和、氷上でインキュベート後、遠心分離により上清（タンパク質抽出液）を得た。

この後、免疫沈降法によるタンパク質複合体の抽出を実施、又は複合体を含むタンパク質抽出液を分子量分画により濃縮して、そのまま Blue-native ポリアクリルアミド電気泳動（BN-PAGE）引き続き二次元目として SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）による分離を実施した。

⑤ 免疫沈降：血液成分の混入があるタンパク質抽出液には、プロテイン G 抗体を添加し、約 1 時間インキュベートして IgG 成分を除去（プレクリーン）した。

方法 A：Kv1.5（HA タグ）などを発現させた HEK293 細胞抽出液に、タグ抗体結合アガロースを添加し、タグペプチドとの交換反応により、複合体を温和な条件で溶離した。

方法 B：抗体とビオチンを共有結合し、Monocromeric avidin を結合したアガロースビーズとインキュベートすることにより免疫沈降を行った。ビオチンを過剰量加えることにより、抗体と結合したタンパク質複合体を溶離した。

方法 C：タンパク質抽出液に目的タンパク質に対する抗体を添加し、1 時間インキュベートした。続いて、プロテイン G 結合磁性ビーズ（Dynabeads Protein G, Invitrogen）を添加し、約 1 時間インキュベートして、抽出液を用いて洗浄後、結合タンパク質を SDS サンプル緩衝液により溶出した。

⑥ BN-PAGE：コンプレックス構造を維持したままのタンパク質をゲル電気泳動法により大きさに従って分離する方法であり、巨大サイズ（およそ 10 mega Da）のタンパク質複合体も分離可能である。BN-PAGE を一次元目に用い、二次元目に SDS アクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE）を用いて二次元電気泳動法を採用した。

(3) リアルタイム PCR による血管の収縮弛緩に関する遺伝子の発現変動解析：採取した組織試料から RNeasy mini (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、DNaseI 処理後、逆転写反応により cDNA 試料を調製した。これらの cDNA を測定試料として、リアルタイム PCR 法によりターゲット遺伝子の発現 (mRNA) の定量を行った。ターゲット遺伝子の一部を含む

プラスミドをスタンダードとして段階希釈し標準曲線を作製して絶対定量を行った。内部標準としてリボソーマル 18S を用いた。一部については、 $\Delta \Delta Ct$ 法により、標準試料に対する相対値を求めた。

(4) 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE)：組織試料から、8M ウレア、4%CHAPS、10mM Tris, pH 8.0, 1x コンプリートを含む可溶化用緩衝液によりタンパク質を抽出可溶化した。比較するタンパク質試料をそれぞれ Cy3, Cy5 (GE ヘルスケア) 又は IC-3-OSu, IC-5-OSu (同仁化学研究所) で標識し、適宜非標識の抽出タンパク質試料を加え、一括して同一ゲル上で等電点/SDS 二次元電気泳動を行った。

(5) 質量分析用試料の調製と測定

電気泳動法により分離されたタンパク質スポットを切り出し、洗浄、ジチオスレイトールによる還元処理、ヨードアセトアミドによるアルキル化処理後、ゲル内トリプシン消化し、ZipTip (ミリポア) を用いて脱塩し濃縮して、測定用試料とした。マトリックスには、 α -cyano-4-hydroxycinamic acid を用い、ターゲットには、MTP AnchorChip 600/484 を用いた。Autoflex II MALDI-TOF/TOF-MS (ブルカー・ダルトニクス) により質量分析を行った。検索ソフト (MASCOT) を用いたペプチドフィンガープリンティング法及び MS/MS の結果に基づいてタンパク質を同定した。

4. 研究成果

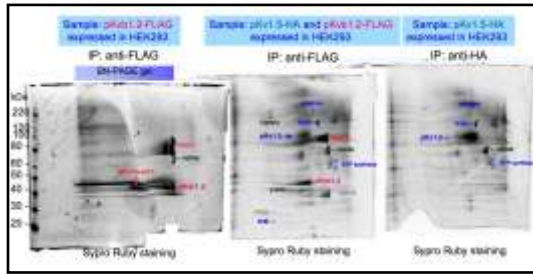
(1) 膜電位依存性 K チャネル 1.5 (Kv1.5)

免疫沈降 (方法 A) により HEK293 細胞における Kv1.5 複合体について検討した。BN-PAGE により分離された複合体は、Kv1.5 はおよそ 630 kDa、Kv β 1.2 はおよそ 530 kDa、Kv1.5/Kv β 1.2 はおよそ 800 kDa を示した。Kv1.5 が糖鎖付加される可能性を考慮しても、Kv 複合体が 8 量体を形成、又は本複合体に結合するタンパク質の存在が示唆された。

Kv1.5 はスフィンゴ脂質とコレステロールに富む脂質ラフトに会合していることが知られている。HEK293 に発現させた Kv1.5 もコレステロールに富む低比重画分に分画されることを確認した。脂質ラフトでは他の膜に比べて密に脂質が会合しており、シグナル伝達に関わる蛋白質分子が会合しているとされる。Kv1.5 複合体の抽出にはコレステロールを可溶化する digitonin を添加した。BN-SDS 二次元電気泳動により抽出タンパク質を分離し、MALDI-TOF/MS により各蛋白質を推定し、抗体を用いて確認した。下図に結果の総括を示した。

Kv1.5 と相互作用する可能性のあるタンパク質として、既に報告のある Kv β 1.2, α actinin-2, SAP97 が検出された。未報告のものでは、valosin containing protein (VCP),

クラスリン、HSP60、ATP 合成酵素 F1 α , β サブユニット, α -アクチニン, プロヒビチン-1 と-2 が検出された。VCP は、ATP-binding



protein ファミリーのメンバーであり、小胞輸送に関わる AAA ATPase のメンバーである。クラスリンや Hsc70 と結合し、膜への融合やユビキチン依存の蛋白質の分解に関係する。活性酸素種によりその活性が損なわれ、平滑筋における発現は比較的高い。クラスリンは、エンドサイトーシスのピットを形成することがよく知られている。脂質ラフトの細胞内へのエンドサイトーシスにも加わっており、脂質ラフトに会合している Kv1.5 と直接又は間接的に相互作用する可能性がある。ATP 合成酵素 F1 はミトコンドリア内膜に局在するとされる。VCP と ATP 合成酵素 F1 は、Walker 型シャペロン ATPase スーパーファミリーに属し、さらに同じ Second region of homology (SRH) 配列をもつ AAA ATPase に分類される。プロヒビチンは、核内やミトコンドリアの内膜に主に局在し、B cell では細胞膜に局在する。血管に高発現し、活性酸素種の産生を抑え、血管形成に関与する。プロヒビチンは、コレステロール親和性があり、UV 照射後に脂質ラフトに集まり、アポトーシスを阻害する。プロヒビチンドメインとも呼ばれる stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C (SPFH) ドメインを持つタンパク質群は細胞膜や細胞内小器官の膜につながれており、エンドサイトーシスやイオンチャネルの制御に関わるとされる。なお、プロヒビチン-1 と-2 はヘテロオリゴマーを形成するため、どちらも検出された。

免疫沈降 (方法 B 及び C) により、心血管における Kv1.5 複合体について検討した。ブタ大動脈、肺動脈 (成獣・新生仔) 及び右心室試料から、Kv1.5 と SAP97 を検出することができた。方法 B は C に比べて回収できるタンパク質量が極めて少なく、複合体の検出のためには試料量を相当必要とすることが明らかとなった。次に 1% digitonin を加えた抽出液により、ブタ新生仔右心室試料から複合体を含むタンパク質を抽出し分子量分画 (100 kDa) により濃縮して、BN-SDS 二次元電気泳動により分離したところ、およそ 900, 700, 600 kDa に Kv1.5 が含まれる複合体が存在することがわかった。二次元目の泳動により、ブタ Kv1.5 が、みかけ上 50~60kDa に 3 つの

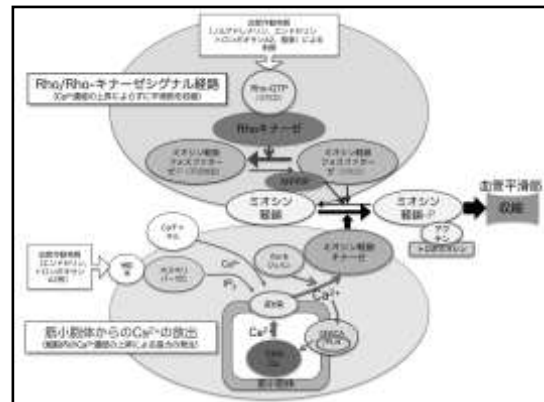
分子量として検出された。

以上の結果から、細胞試料から Kv1.5 の細胞内輸送や制御に関わるタンパク質との相互作用を検出することができた。心血管試料からも複合体の存在が示されたので、今後質量分析法による検出感度を高め、複合体の組成を明らかにしていきたい。

(2) 血管収縮制御に関わる遺伝子の発現 (Rho パスウェイ、筋小胞体、Cav1.2、筋原線維)

動脈管は生後数時間で自然に閉鎖するが、未熟児の場合は閉鎖せず開存したままのことがある。動脈管の酸素感受性は成熟胎仔・新生仔で良好である。動脈管や肺動脈の収縮制御に関わる遺伝子の発現を妊娠 30 日 (満期)、妊娠 27 日 (早期)、妊娠 21 日 (超早期) の家兎胎仔および新生仔 (生後 2 日) について、リアルタイム PCR を用いて発現遺伝子の変動解析を行った。

血管平滑筋の収縮に関わる Rho パスウェイと筋小胞体のカルシウムイオン (Ca^{2+}) の貯蔵・放出機構を下図に示した



① Rho/Rho キナーゼパスウェイ (Ca^{2+} 濃度非依存型の収縮制御)

a. RhoA と RhoB : RhoA は幼若から成熟の胎仔の動脈管 (DA)、肺動脈 (PA)、大動脈 (Ao) においてほぼ一定量発現していた。RhoB は RhoA の 2~3 倍発現が高かった。DA は、PA や Ao と比べてやや高い発現を示した。胎仔の発達に伴う発現変動は、RhoA、RhoB とも 2 倍程度以内であった。

b. Rho キナーゼ 1 と 2 : Rho キナーゼ 1 は、PA と Ao では胎仔が成熟するにつれて発現量が増え、成獣で胎仔より高い発現を示した。Rho キナーゼ 2 の発現量は、Rho キナーゼ 1 の 1/1000 倍程度であった。Rho キナーゼ 2 は、DA では胎仔が成熟するにつれて発現量が増えたが、PA と Ao では胎仔期の発現変動は少なく、成獣で胎仔より高い発現を示した。

c. ミオシンフォスファターゼ-Rho 相互作用タンパク質 : DA で胎仔の発達に伴った発現量の減少が見られたが、PA と Ao では発現変動は少なく、成獣と比べても大差なかった。

まとめ : 胎児の肺動脈・動脈管・大動脈の Rho/Rho キナーゼ経路を構成する Rho, Rho キ

ナーゼ、ミオシンフォスファターゼ-Rho 相互作用タンパク質の発現量は成獣のものと同等のレベルであった。

②筋小胞体 (Ca²⁺濃度依存型の収縮制御)

a. リアノジン受容体 1 と 2: 細胞膜から流入した Ca²⁺が筋小胞体のリアノジン受容体を刺激し、筋小胞体から細胞質へCa²⁺を放出する。DA、PA、Ao におけるリアノジン受容体 1 の発現量は低く、胎仔の発達に伴う増減も見られなかった。DA、PA、Ao におけるリアノジン受容体 2 の発現量は、リアノジン受容体 1 に比べて高く、胎仔の発達に伴って 3 血管とも増加を示した。これらの結果から、リアノジン受容体 2 に対してマウス抗体を調製した。

b. カルセクエストリン 1 と 2: 筋小胞体内で Ca²⁺を貯蔵するカルセクエストリンの発現量は、心筋型カルセクエストリン 2 が骨格筋型カルセクエストリン 1 より、全般に高かった。未熟および新生仔の DA では、カルセクエストリン 1 の発現量が同時期の PA や Ao に比べて高かった。

c. ホスホランバンは、Ca²⁺を筋小胞体に取り込む ATP アーゼ (SERCA) 活性を調節する。DA における発現はわずかであったが、新生仔でやや増加を示した。PA と Ao では胎仔の発達に伴って顕著に増加し、成獣で高発現した。まとめ: 筋小胞体を構成するリアノジン受容体、カルセクエストリン、ホスホランバンの胎仔の発達に伴う発現量の変動は大きく、成獣の発現量に比べて少ないものが多く、血管による違いもまた大きかった。胎仔の肺動脈、動脈管、大動脈の筋小胞体は、成獣のものに比べて未熟であり、胎仔の発達段階や血管ごとに異なる成分をもつ筋小胞体が構成されている可能性がある。

③ Cav1.2

胎仔の成熟に従いわずかに低下するが、DA で PA や Ao より常に 2 倍以上高い発現を示した。成獣の PA、Ao で最も高く、新生仔 DA の 2 倍程度を示した。

④ 収縮タンパク質とそのリン酸化に寄与するタンパク質

a. カルモジュリン 2: DA、PA、Ao では胎仔の発達に伴って減少傾向を示し、PA や Ao では成獣で最も高い発現を示した。カルモジュリン 2 の発現量は、Rho パスウェイや筋小胞体の遺伝子群に比べて大変高かった。

b. ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の発現量は、カルモジュリン 2 のおよそ 50 分の 1 であったが、その発現パターンは、カルモジュリン 2 のそれと近しており、DA、PA、Ao で胎仔の発達に伴って減少する傾向を示した。

c. 平滑筋アクチンの発現は、DA では妊娠 27 日齢をピークに増減し、生後 2 日の新生仔で極めて少なくなった。PA では胎仔の発達に伴い減少する傾向を示したが、Ao では増加する傾向を示し、成獣の Ao で最も高い発現を示

した。
d. 平滑筋ミオシン重鎖: 胎仔 DA ではほぼ一定、かつ PA や Ao よりやや高めであったが、生後 2 日の新生仔で急激に低下した。PA における発現は、胎仔の発達に伴い減少する傾向を示し、Ao では増加する傾向を示したが、成獣の PA と Ao で最も高い発現を示した。

まとめ: 胎児の肺動脈・動脈管・大動脈及び臍帯動脈の収縮性タンパク質の発現量の変動は大きく、血管による違いも大きかった。

(3) 未熟及び成熟家兔胎仔の肺動脈、動脈管タンパク質の蛍光標識二次元電気泳動法による分析

動脈管の成熟に従って発現が増える 2 つのタンパク質を同定した。EF ハンドドメインを持つ Ca 結合タンパク質の reticulocalbin 3、筋収縮タンパク質のトロポミオシン 2 であった。いずれも高浸潤性の癌細胞に高発現することから、動脈管の平滑筋細胞の遊走能に関与している可能性が考えられた。

(4) 酸素感受性蛋白質の発現変動解析

蛍光標識二次元電気泳動法を用いて、高酸素低酸素条件でインキュベートした肺動脈と動脈管における蛋白質の発現変動解析を行った。結果から、高酸素条件の両血管でアセチル化トロポミオシンが増える可能性が示された。トロポミオシンがアセチル化するとアクチンに結合しやすくなることから、筋収縮に影響すると推定された。

活性酸素である過酸化水素を除去するペルオキシレドキシシンファミリーのペルオキシレドキシシン 4 が高酸素条件の動脈管で増加したことから、本条件の動脈管では過酸化水素の除去が活発であると推定された。ペルオキシレドキシシン 4 は、Nf-κB の活性化を抑制する。Nf-κB は酸化ストレスにより活性化され、COX-2 や iNOS を誘導する。ペルオキシレドキシシン 4 が Nf-κB の活性化を抑えるならば、血管拡張が抑えられ、動脈管の収縮の維持や閉鎖に寄与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘, 胎児血管の収縮制御に関する遺伝子の機能解析 - 胎仔動脈管に高発現するタンパク質群の検討 -, (財)日本心臓血圧研究振興会(平成二十三年度研究業績集), 26, in press, 2012, 査読無
- ② 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘, 胎生期の動脈管を始めとした心血管におけるタンパク質発現の解析, (財)日本心臓血圧研究振興会(平成二十二年度研究業績集), 25, 17-21, 2011, 査読無
- ③ 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘, 肺動脈と動脈管における蛍光標識二次元電気泳動法を用いた酸素感受性蛋白質の発現

変動解析, (財)日本心臓血圧研究振興会 (平成二十一年度研究業績集), 24, 13-17, 2010, 査読無

- ④ Toyoshima K, Momma K, Nakanishi T., In vivo dilatation of the ductus arteriosus induced by furosemide in the rat. *Pediatric Research*, 67, 173-176, 2010, 査読有
- ⑤ Sun F, Hayama E, Katsube Y, Matsuoka R, Nakanishi T., The role of the large-conductance voltage-dependent and calcium-activated potassium (BK(Ca)) channels in the regulation of rat ductus arteriosus tone. *Heart & Vessels*, 25, 556-564, 2010, 査読有
- ⑥ 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘, 動脈管の酸素感受性の機序に関する基礎的研究 - 膜電位依存性カリウムチャンネル複合体 -, (財)日本心臓血圧研究振興会 (平成二十年研究業績集), 23, 15-19, 2009, 査読無
- ⑦ Katsuaki Toyoshima, Kazuo Momma, Toshio Nakanishi, Fetal reversed constrictive effect of indomethacin and postnatal delayed closure of the ductus arteriosus following administration of transplacental magnesium sulfate in rats, *Neonatology*, 96, 125-131, 2009, 査読有
- ⑧ Kazuo Momma, Katsuaki Toyoshima, Sun Fan, Toshio Nakanishi, In vivo dilatation of the ductus arteriosus by Rho kinase inhibition in the rat, *Neonatology*, 95, 324-331, 2009, 査読有
- ⑨ Kazuo Momma, Katsuaki Toyoshima, Kiyomi Ito, Kiyoshi Sugiyama, Shinichiro Imamura, Fang Sun, Toshio Nakanishi, Delayed neonatal closure of the ductus arteriosus following early in utero exposure to indomethacin in the rat. *Neonatology*, 96, 69-79, 2009, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① 羽山恵美子, 勝部康弘, 中西敏雄, 小川俊一, 動脈管・肺動脈の発達に伴う $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 mRNA の発現変動, 第48回日本小児循環器学会, 2012. 7. 5, 京都
- ② 勝部康弘, 羽山恵美子, 中西敏雄, 小川俊一, HEK293細胞に発現させたNa-Ca交換輸送体(SLC8A1)の電流測定, 第48回日本小児循環器学会, 2012. 7. 5, 京都
- ③ 羽山恵美子, 中西敏雄, 胎仔発達に伴う肺動脈/動脈管の発現タンパク質の変化, 第18回日本小児肺循環研究会, 2012. 2. 4, 東京

⑩ Emiko Hayama, Toshio Nakanishi, Developmental Difference in Maturation of Sarcoplasmic Reticulum in the Large Blood Vessels Influences Their Contractility, American Heart Association Scientific Session, 2011.11.7, USA

- ④ 羽山恵美子, 勝部康弘, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル1.5の遺伝子多型における機能変化の検討, 第47回日本小児循環器学会, 2011. 7. 7, 福岡
- ⑤ 羽山恵美子, 中西敏雄, 肺動脈・動脈管の発達に伴う収縮制御に関する遺伝子群の発現変動, 第16回日本小児肺循環研究会, 2011. 2. 5, 東京
- ⑥ 羽山恵美子, 中西敏雄, 蛍光標識二次元電気泳動法を用いた肺動脈・動脈管酸素感受性蛋白質の検討, 第46回日本小児循環器学会, 2010. 7. 8, 東京
- ⑦ 羽山恵美子, 中西敏雄, 蛍光標識二次元電気泳動法を用いた肺動脈・動脈管酸素感受性蛋白質の検索, 第16回日本小児肺循環研究会, 2010. 2. 6, 東京
- ⑧ 羽山恵美子, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル1.5のglycosylationに関する検討, 第82回日本生化学会大会合同大会, 2009. 10. 12-14, 神戸
- ⑨ 羽山恵美子, 中西敏雄, ブタ新生仔大血管膜電位依存性カリウムチャンネル複合体の分離, 第45回日本小児循環器学会, 2009. 7. 15-17, 神戸
- ⑩ 勝部康弘, 孫芳, 羽山恵美子, 中西敏雄, 小川俊一, 家兔血管平滑筋における酸素感受性蛋白質 - iTRAQ2D-LC-MS/MS法による解析 -, 第45回日本小児循環器学会, 2009. 7. 15-17, 神戸
- ⑪ 孫芳, 羽山恵美子, 中西敏雄, 先天性心疾患の拡張した大動脈ではTGF-betaが発現している, 第45回日本小児循環器学会, 2009. 7. 15-17, 神戸
- ⑫ 羽山恵美子, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル複合体の分離, 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会, 2008. 12. 9, 神戸
- ⑬ 羽山恵美子, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル複合体の酸化還元状態による変化, 第44回日本小児循環器学会, 2008. 7. 2, 郡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 敏雄 (NAKANISHI TOSHIO)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90120013