

食塩感受性高血圧症におけるミオシンホスファターゼレギュレーター機能解析

堀 正敏¹, 局 博一², 角田 茂¹

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, ² 東京大学名誉教授

概要 CPI-17 は、主に平滑筋に発現している内因性ミオシンホスファターゼ (PP1 PPase) 阻害タンパク質である。CPI-17 はプロテインキナーゼ C (PKC) や Rho kinase の基質となり、38 番目のスレオニン残基 (T38) がリン酸化されることで活性化し、PP1 PPase と結合して直接 PP1 PPase 活性を抑制する。CPI-17 による PP1 PPase の阻害は、結果としてミオシンのリン酸化を増加させることから、血管平滑筋の収縮を増強させる。従って、CPI-17 は、生理学的、あるいは高血圧や血管攣縮などの疾患時の血圧調節に重要な役割を担っていると考えられてきた。しかし、CPI-17 の KO マウスや機能的不活性型ミュータントノックインマウスなどの作出がこれまで世界的に成功していなかったことから、CPI-17 の血圧調節における役割については不明であった。

本研究では、ゲノム編集技術を用いて CPI-17 欠損マウス (CPI-KO) と 38 番目のスレオニンをアラニンに置換した恒常的不活性型の [T38A]CPI-17 (CPI-TA) を作製し、これらのミュータントマウスを用いて、正常血圧ならびに食塩負荷誘発高血圧における CPI-17 の機能について明らかにすることを目的とした。

In vitro の血管収縮測定実験成績より、CPI-KO ならびに CPI-TA が確かに CPI-17 の機能を欠失していることを確認した。すなわち、両マウスの大動脈ではホルボールエステルである PDBu による収縮増強作用が消失していた。また、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリンによる収縮も、両ミュータントマウスでは有意に野生型マウスの大動脈における収縮に比べて小さく、ミオシンリン酸化量の減少も伴っていた。テレメリーシステムによる血圧測定実験より、両ミュータントマウスの正常血圧は野生型マウスの正常血圧よりも有意に低く、この低血圧を補うために心拍数が有意に増加していた。さらに、食塩負荷誘発高血圧においても、両ミュータントマウスの食塩負荷によって増加する血圧は野生型マウスに比べて緩徐であり、食塩負荷による血圧上昇においても CPI-17 が関与していることが示された。

以上の成績から、CPI-17 は T38 のリン酸化制御により活性化され、正常血圧維持や食塩負荷誘発の高血圧発症に関与していることが明らかになった。

1. 研究目的

血管平滑筋細胞の収縮・弛緩はミオシンのリン酸化量によって調節されている。このミオシンのリン酸化量は、 Ca^{2+} / カルモジュリン (CaM) / ミシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 複合体によるミオシンのリン酸化反応と、ミオシンホスファターゼ (PP1 PPase) によるミオシンの脱リン酸化反応のバランスで制御されている (Fig. 1)。

さらに PP1 PPase の活性は、CPI-17 系と Rho kinase 系という 2 つの PP1 PPase レギュレーター経路により制御される。CPI-17 は 17kD の内因性の PP1 PPase 阻害タンパク質で

あり、Rho kinase は GTP-RhoA により活性化されるセリン / スレオニン-リン酸化酵素である (Fig. 1)。CPI-17 はプロテインキナーゼ C (PKC) や Rho kinase の基質となり 38 番目のスレオニン残基 (T38) がリン酸化されることで活性化し、PP1 PPase と結合して直接 PP1 PPase 活性を抑制する。一方、Rho kinase は PP1 PPase の調節サブユニットである MYPT1 の 853 番目のスレオニン残基をリン酸化することで、間接的に PP1 PPase 活性を抑制する^(2, 4)。この 2 つの PP1 PPase レギュレーター経路 (PP1 PPase 活性の抑制調節経路) により、血管平滑筋の収縮は同じ Ca/CaM/MLCK

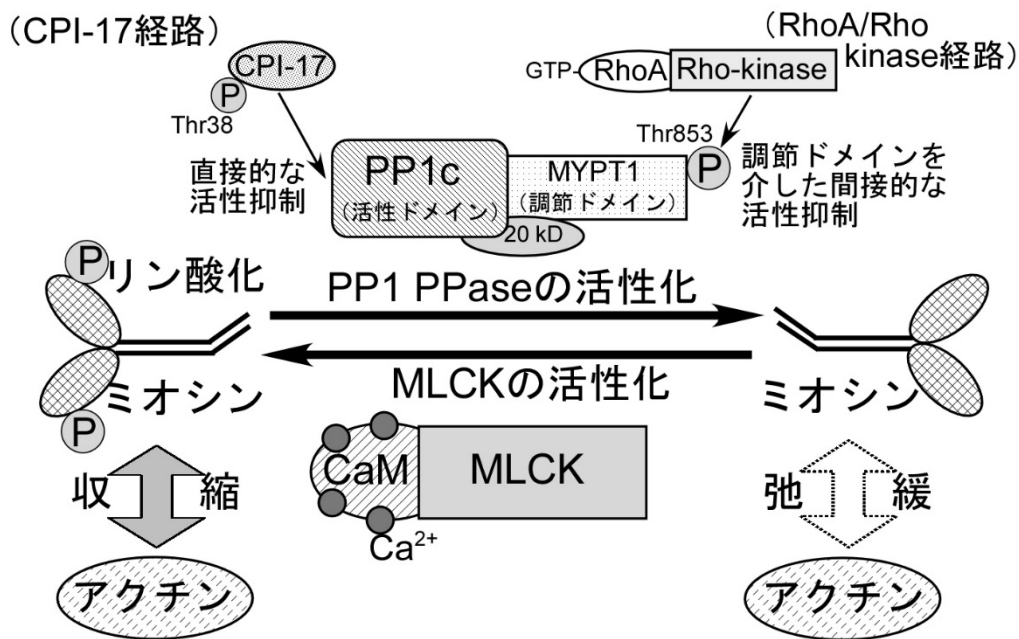


Fig. 1: Contractile machinery in smooth muscle cells.

Smooth muscle contraction is regulated by myosin phosphorylation. Phosphorylated myosin can react with actin to generate force development. Myosin phosphorylation level is regulated by balance of activities between MLCK and PP1 PPase. PP1 PPase activity is negatively regulated by 2 signaling pathways. One is PKC/CPI-17 signaling, the other is RhoA/rho-kinase signaling.

活性においても、より強い収縮を発生する「 Ca^{2+} sensitization」を引き起こし、この現象が高血圧や脳血管れん縮などの血管病態発症に重要と考えられている。しかし、この二つの PP1 PPase レギュレーター経路が血圧調節に実際にどの程度関与しているのか、さらには、食塩負荷誘発高血圧症の病態発現に関与するか否かは全く不明である。その原因は、ES 細胞を用いた CPI-17 のノックアウト(KO)マウスの作出が、CPI-17 が発見されて以来 30 年以上もの間世界で成功していなかったことに起因する。

そのような背景のもと、我々は CPI-17 の KO マウス(以下、CPI KO)に加えて、CPI-17 の活性制御リン酸化部位 (T38)を他の塩基に置換することで、恒常的にリン酸化を受けない不活性型と恒常的にリン酸化状態にある活性型のフェノタイプの出現を期待し、[T38A] CPI-17(以下、CPI-TA)と [T38E] CPI-17(以下、CPI-TE)の、2 種類の CPI-17 ノックインマウスを、ゲノム編集技術により作出した。

本研究では、上記 3 種の CPI-17 ミュータントマウスと野生型マウスを用いて、まず、CPI-17 の機能欠損と恒常的不活性型と恒常的活性型の機能変異の有無について検証し、その結果を踏まえて CPI-17 ミュータントマウスにおけるテレメリーシステムによる無拘束下全身血圧測定を行い、健常個体ならびに食塩負荷誘発高血圧における PP1 PPase レギュレーターの 1 つである CPI-17 の生理学的、ならびに病態生理学的機能について解明することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験動物

C57BL/6J マウス(以下、WT), CPI-KO, CPI-TA, ならびに CPI-TE は、東京大学食の安全研究センター動物飼育管理室にて明暗 12 時間周期、室温 23 度および一定湿度維持など、準 SPF 環境下にて飼育し、実験には血圧測定開始時の週齢が 9-10 週齢の♂マウス(体重 20-24 g)を用いた。

2. 2 食塩負荷誘発高血圧マウスの作出

送信プローブの頸動脈設置手術施行後1週間より食塩負荷をマウスに実施した。食塩負荷誘発高血圧マウスの作出は、Titze らの方法に従って作製した。NaCl 濃度 8% のマウスの MF 飼料を自由給餌し、同時に生理食塩水をマウスに自由飲水させた⁽⁴⁾。

2. 3 摘出血管を用いた収縮測定

各マウスを過剰のペントバルビタール投与により安楽死させ、放血させた後に大動脈を摘出した。内皮細胞を、ピンセットを用いて丁寧に剥離した後、幅およそ 2 mm の血管リング標本を作製し、イーザーマグヌス装置を用いて等張性に血管収縮反応を測定した。

2. 4 ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは常法に従って行った。

ミオシンのリン酸化ならびに CPI-17 のリン酸化は既報に従って測定した^(5, 10)。

2. 5 形態学的解析

常法に従って大動脈の薄層切片を作製し、ヘマトキシ-エオジン染色 (HE 染色) を施し、血管壁の厚さの定量解析を行った。また、CPI-17 抗体を用いた免疫組織化学染色を施し、CPI-17 の発現を確認した。

2. 6 テレメトリーシステムによる無拘束下血圧変動測定

イソフルランによる麻酔下において、簡易手術により右頸動脈に圧感知カテーテルを内蔵した超小型送信器を装着し、5 日飼育して術後の侵襲を消失させた後、テレメトリーシステムにより全身血圧の日内変動を経時的に計測した。超小型送信器は、圧感知カテーテルの他、内部にアンプ増幅器、送信回路ならびにバッテリーを内蔵し、外装部は生体適合性の高いコーティング加工により密封されている。システムは、送信器から送られた信号を受け取る受信機、複数の受信機を接続してデータを集約する Data Exchange Matrix 装置 (MX2)、大気圧校正装置 (APR-1)、データ取得・解析システム装置 (PONEMAH) から構成される。パラメーターとして平均血圧 (mean blood pressure; MBP)、収縮期血圧 (systolic blood pressure; SBP)、拡張期血圧 (diastolic blood pressure; DBP)、ならびに Heart rate (HR) を 72 時間測定した。食塩負荷誘発マウスにおいては、高濃度食塩負荷開始後 1-3 週間までの期間、1 週間ごとに 48 時間連続で日内変動血圧をテレメトリーシステムにて測定した。

2. 7 テールカフ法によるマウス平均血圧測定

マウスを専用の筒状の保温器に入れ無拘束下での平均血圧を、容積振動法を利用したテールカフ法により測定した⁽⁹⁾。間接法による平均血圧は Softron 社 (東京) の BP-98A 血圧測定システムを使用し、マウス尾の容積脈波を光電的に検出しその最大振幅点で決定した。

3. 研究結果

3. 1 各種 CPI-17 ミュータントマウスのフェノタイプ解析～ホルボールエステルの収縮反応性による解析～

CPI-KO, CPI-TA および CPI-TE における体重増加曲線は、WT と比較して有意な差は認められず、ホモ固体においても十分繁殖能力を維持していた。次に、大動脈標本を用いてウェスタンブロット解析により CPI-17 のタンパク質発現について解析した。結果、CPI-KO の大動脈では CPI-17 のタンパク質発現は認められなかった。一方、CPI-TA と CPI-TE の大動脈においては、ミュータント CPI-17 のタンパク質発現が認められた。免疫組織化学染色にて大動脈における CPI-17 の発現を検証した結果、ウェスタンブロット解析の結果同様、CPI-KO の大動脈においてのみ CPI-17 の発現は検出できなかった。

これまでの報告から、ニワトリでは先天性に CPI-17 遺伝子が欠失していることが明らかにされており、血管を用いた機能解析から PKC 活性化薬であるホルボールエステルによる収縮は、CPI-17 のリン酸化を介して生じていることが証明されている⁽⁸⁾。そこで、ホルボールエステル誘導体である PDBu の血管収縮反応を検討することで、CPI-17 の機能的欠失の有無について解析した。栄養液中の 70 mM の NaCl を KCl に置換して作製した高濃度カリウム液は、平滑筋細胞膜を直接脱分極させ、結果、電位依存性 Ca²⁺チャネルを介した筋直接刺激による持続的な収縮を引き起こす⁽⁶⁾。WT の大動脈において、高濃度カリウムによる収縮が最大に達した後 PDBu を投与すると高濃度カリウムによる収縮は 2 倍程度増強された。一方、PDBu は単独では収縮を生じなかった。CPI-KO の大動脈標本において、この PDBu による収縮増強作用は完全に消失していた。PKC は CPI-17 の T38 をリン酸化することから、T38A 点変異 CPI-17 をノックインした CPI-TA では CPI のリン酸化の生じない恒常的不活性型のフェノタイプが期待できる。他方、T38E 点変異 CPI-17 をノックインした CPI-TE は恒

常的活性型のフェノタイプが期待できる。そこで、CPI-TA と CPI-TE からそれぞれ大動脈標本を作製し、PDBu による収縮反応性について検討した。結果、いずれも PDBu 刺激による高濃度カリウム収縮の増強作用は認められず、逆に高濃度カリウム収縮をほぼ完全に抑制した。従って、両ノックインマウスともに恒常的不活性型のフェノタイプを示すことが明らかになった。そこで、以降は CPI-KO と CPI-TA についてさらに解析を進めることにした。

3. 2 高濃度カリウムならびに $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬の収縮反応性の解析

2. 2. 1 高濃度カリウムによる収縮反応

高濃度カリウムによる収縮は、G タンパク質を介した情報伝達経路によらない筋直接刺激による収縮である。そこで、WT, CPI-KO ならびに CPI-TE の大動脈標本における、高濃度カリウムによる収縮反応について比較した。結果、いずれの収縮反応も有意な差は認められなかった。さらに、高濃度カリウム刺激後 10 分におけるミオシンのリン酸化について測定したところ、いずれの大動脈においてのミオシンのリン酸化量に有意な差は認められなかった。

3. 2. 2 $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬の収縮反応

血圧の調節において交感神経による制御は重要であり、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激は血圧上昇を引き起こす。そこで、 $\alpha 1$ アドレナリン作動薬であるフェニレフリン (PE; 1 μ M) の収縮反応について検討した。WT の大動脈標本において、PE はゆっくりとした持続性の収縮を発生し、その最大収縮は高濃度カリウムの収縮のおよそ 150%であった。一方、CPI-KO ならびに CPI-TA の大動脈において、PE による収縮は WT のそれに比べて有意に小さかった(高濃度カリウム収縮のおよそ 120%から 130%)。また、PE 刺激後 10 分後の MLC のリン酸化量について測定したところ、WT における MLC のリン酸化量に比べて CPI-KO ならびに CPI-TA における MLC のリン酸化量は有意に少なかった。また、CPI-KO と CPI-TA 間での差は認められなかった。

3. 3 健常個体における無拘束下血圧変動に対する CPI-17 の影響

以上の解析結果より、WT, CPI-KO ならびに CPI-TA を用いて、正常血圧変動に対する CPI-17 の役割の有無についてテレメトリーシステムを用いて解析した。WT の MBP は明期(休息期)と暗期(活動期)に合致して日内変

動していた。24 時間通しての MBP の平均値は WT で 108.7 mmHg, CPI-KO で 102.5 mmHg, CPI-TA で 100.3 mmHg であり、有意に CPI-KO と CPI-TA で低かった。しかし、WT と CPI-KO ならびに CPI-TA 間で MBP の日内変動リズムには相違はなかった。また、この時の SBP と DBP についても同様の違いが認められた。これに対して、HR は WT で 561 beat per min (BPM), CPI-KO で 586 BPM, CPI-TA で 573 BPM の値をそれぞれ示し、CPI-KO と CPI-TA の HR は WT に比べて有意に増加していた (Fig. 2)。さらに、無拘束無麻酔に加えて外科的処置なしで尾動脈の MBP を測定するテールカフ法を実施した。結果、WT, CPI-KO, および CPI-TA の MBP はそれぞれ、112.4 mmHg, 98.7 mmHg, および 95.3 mmHg であり、テレメトリーシステムでの結果同様 CPI-KO と CPI-TA においては有意に MBP の低下が認められた。

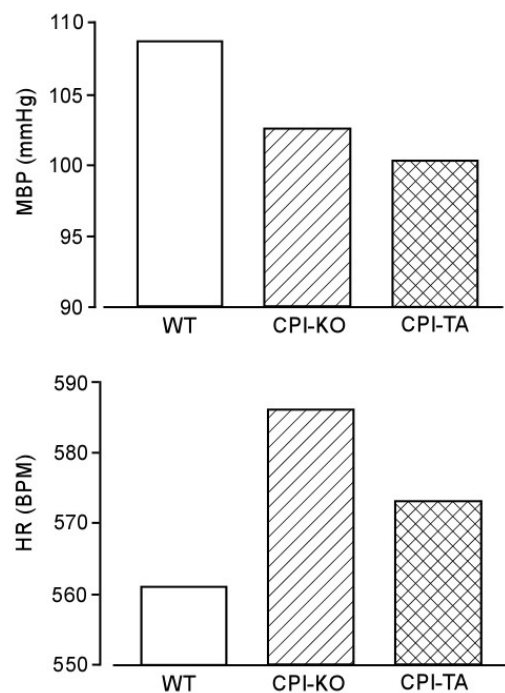


Fig. 2: Change in mean blood pressure and heart rate in wild type, CPI-17 knock-out and [T38A] CPI-17 knock-in mice

Upper or lower figure showed results of mean blood pressure (MBP) or heart rate (HR), respectively. WT; wild type mice, CPI-KO; CPI-17 knock-out mice, CPI-TA; [T38A] CPI-17 knock-in mice. Each column showed mean value of 5-7 experiments.

3. 4 食塩負荷誘発高血圧マウスにおける CPI-17 の影響

次に食塩負荷誘発高血圧マウスにおける MPB 変動に対する CPI-17 の影響についてテレメリーシステムを用いて検討した。WT における食塩負荷 1 週間後の 24 時間の MBP の平均値は食塩負荷前の 105.1 mmHg から 114.4 mmHg に増加し(例数 4-5 例), その後 3 週間にわたって高血圧を維持した(2 週目; 113.8 mmHg, 3 週目; 114.0 mmHg)。一方, CPI-KO では食塩負荷 1 週目~3 週目に渡って WT にくらべて低血圧を維持したが, 食塩負荷によって有意に血圧増加が認められた(0 週目; 96.5 mmHg, 1 週目; 101.6 mmHg, 2 週目; 102.0 mmHg, 3 週目; 106.3 mmHg,)。CPI-TA においても同様の成績を得た(0 週目; 100.7 mmHg, 1 週目; 106.3 mmHg, 2 週目; 103.3 mmHg, 3 週目; 102.9 mmHg) (Fig. 3)。

4. 考 察

本研究では, 世界で初めてミオシンホスファターゼの内因性抑制タンパク質である CPI-17 のノックアウトマウス (CPI-KO) と CPI-17 の 38 番目のスレオニン残基 (T38) をアラニンに置換した (T38A) リン酸化修飾を受けない恒常的不活性化 CPI-17 ノックインマウス (CPI-TA) の作製に成功した。しかし, 恒常的なリン酸化修飾を模倣するグルタミン酸置換 (T38E) については, 恒常的活性化のフェノ

タイプを示さなかった。タンパク質の部分結晶解析研究から, T38E のミュータント CPI-17 は T38 をリン酸化修飾した CPI-17 の結晶構造とは異なる立体構造を示す成績が得られていることから⁽¹¹⁾, CPI-TA も恒常的活性化のフェノタイプを示さなかったと考えられた。

CPI-17 は主に血管平滑筋細胞などの平滑筋細胞に特異的に発現している内因性ホスファターゼ阻害タンパク質である⁽⁴⁾。摘出血管を用いた解析結果から, WT より摘出した大動脈において得られる PDBu による収縮は, CPI-KO や CPI-TA より摘出した大動脈では完全に消失していた。ニワトリでは先天性に CPI-17 をコードする遺伝子が欠失しており, CPI-17 のタンパク質発現が全身の平滑筋臓器で認められない⁽⁸⁾。ニワトリの大動脈標本においても PDBu は全く収縮を生じないことが報告されている。以上のことから, CPI-KO ならびに CPI-TA は CPI-17 の機能を確かに欠失していることが示唆された。CPI-17 のリン酸化部位については, T38 以外にもこれまで幾つかの報告がある⁽¹⁻³⁾。しかし, 本研究において CPI-TA (T38A の変異 CPI-17) と CPI-KO (CPI-17 欠失) の間で, PDBu や PE の収縮反応性や正常血圧, さらには食塩負荷誘発高血圧症における血圧変動に有意な差はみとめられなかった。従って, 生体内における CPI-17 のリン酸化制御において, T38 のリン酸化が最も重要であることが示された。

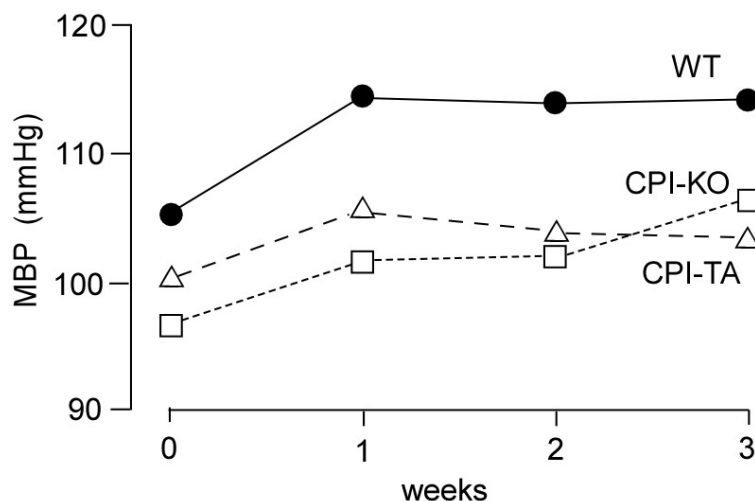


Fig. 3: Change in mean blood pressure in high salt diet induced hypertension model of wild type, CPI-17 knock-out and [T38A]CPI-17 knock-in mice

WT; wild type mice, CPI-KO; CPI-17 knock-out mice, CPI-TA; [T38A]CPI-17 knock-in mice. Each column showed mean value of 5-7 experiments.

摘出大動脈を用いた解析結果において、PE による収縮は CPI-KO や CPI-TA いずれにおいても WT に比べて有意に小さかったが、その差は予想に比して大きな差ではなかった。しかし、MLC のリン酸化量の測定結果においても、WT の大動脈にくらべて CPI-KO と CPI-TA の大動脈の PE 刺激による MLC のリン酸化は有意に少なかったことから、確かに両 CPI ミュータントマウスでは PE の収縮能は低下していると考えられた。今回は大動脈での収縮能を測定したが、CPI-17 経路の収縮能への関与は腸間膜動脈などの細動脈になるほど大きくなることが報告されている^{7,14)}。従って、CPI-KO ならびに CPI-TA における小動脈での PE 収縮には、WT との間でより大きな差が得られるものと考えられた。

テレメトリーシステムならびにテールカフ法による MBP 測定において、CPI-KO ならびに CPI-TA においては有意に MBP の低下が認められた。さらに、HR が顕著に両 CPI-17 ミュータントマウスにおいて増加していた。さらに、CPI-KO と CPI-TA との MBP には有意な差は認められなかった。これらの成績から、① PKC/CPI-17 経路は生体において正常な血圧維持に必須のシグナル経路であること、② T38 のリン酸化による CPI-17 の活性制御が生理学的な血圧維持に重要であること、③ PKC/CPI-17 経路の欠損による血圧低下を代償するために HR が顕著の増加している可能性が高いこと、が示唆された。すなわち、血圧維持の為の HR の代替的な増加がなければ、PKC/CPI-17 経路の欠失によりさらに正常血圧の低下が生じることが予測された。

本研究では食塩負荷1週間～3週間における血圧変動に対する CPI-17 の影響を CPI-KO ならびに CPI-TA を用いて解析した。食塩負荷は血中の塩濃度を上昇させ、生体は血中塩濃度上昇に対して体液増加をもたらす結果として血圧が上昇するが、通常はホメオスタシスが働き血圧は正常に維持される。しかし、食塩感受性高血圧症では、塩分摂取過多によるこの血圧上昇によってナトリウムの再吸収を促すアルドステロンが低下するにもかかわらず、依然としてその鉱質コルチコイド受容体が活性化され続け、遠位尿細管の ENaC (Epithelial sodium channel) などのナトリウムチャネルの発現が亢進し、ナトリウムの再吸収が促進されて高血圧症をもたらす¹²⁾。本研究では血中アルドステロン濃度の解析や ENaC の発現変動などの解析を行

っておらず、本研究の高濃度食塩負荷による高血圧が食塩感受性高血圧症モデルとなるか不明であるが、食塩負荷により 3 週間以上にわたって高血圧を維持した。CPI-KO や CPI-TA においては3週間にわたって継続して WT に比べて顕著な血圧低下が認められた。また、CPI-KO と CPI-TA の間には有意な差は認められなかった。これらのことから、食塩負荷誘発高血圧マウスの血圧上昇においても、PKC/CPI-17 経路は血圧上昇に関与していることが示唆された。また、このときに CPI-17 の T38 のリン酸化が重要な活性化制御を担っていることが示された。WT における食塩負荷前と食塩負荷後の血圧上昇率と CPI-KO や CPI-TA における同じ血圧上昇率を比較すると、CPI-KO や CPI-TA ではその上昇率が緩やかな傾向を示していたことから、PKC/CPI-17 経路は健常時の血圧維持を担うだけでなく、食塩負荷による血圧上昇機構自体にも何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

以上を要するに、PKC/CPI-17 経路は正常な血圧維持や食塩負荷誘発性の高血圧発症において、生理・病態生理学的役割を担っていることがはじめて明らかにされた。また、CPI-17 の生体内での活性制御は少なくとも血圧調節においては T38 のリン酸化が重要であることが示された。

5. 今後の課題

CPI-17 はホスファターゼの阻害因子であることから、CPI-KO では抑制因子の欠失であるため、ホスファターゼ活性亢進となり、結果としてリン酸化制御を受ける情報伝達系を抑制する。一方、CPI-17 の恒常的活性化ミュータントを作製することは、逆にホスファターゼ活性を恒常的に抑制することとなり、結果としてリン酸化制御を受ける情報伝達系を恒常的に活性化させることが期待できる。すなわち、様々な疾患の発現における CPI-17 の機能を検証する際、CPI-17 の恒常的活性化ミュータントノックインマウスは、今回我々が作製に成功した CPI-KO や CPI-TA に比べて極めて有用である可能性が高い。従って、今後恒常的活性化タイプの CPI-17 ミュータントのアミノ酸変異の同定とそのノックインマウスの作製をめざしたい。

本研究において食塩負荷誘発高血圧の血圧上昇に CPI-17 のシグナルの関与が示唆されたが、食塩負荷による血管平滑筋細胞のミオシンリン酸化量の変動や、

CPI-17 のリン酸化量の変動など、血管平滑筋細胞内シグナル変動の情報が十分得られていない。今後、これらの細胞内シグナル変動パラメーターについて CPI-KO や CPI-TA の影響を解析することで、より詳細な食塩性負荷誘発高血圧症における CPI-17 の病態生理学的役割の解明できると期待される。

最後に、今後の大きな課題としてあげられることとして、RhoA/Rho-kinase 経路の正常血圧ならびに食塩負荷誘発高血圧における生理学的、ならびに病態生理学的役割の解明が必要であろう。その一つの手法として、WT と CPI-KO マウスを用いて Rho-kinase 阻害薬の作用を比較検討することである程度 PKC/CPI 経路と RhoA/Rho-kinase 経路の関与の程度を明らかにできる可能性が考えられた。

6. 文献

1. Dubois T, Howell S, Zemlickova E, Learmonth M, Cronshaw A, and Aitken A. Novel in vitro and in vivo phosphorylation sites on protein phosphatase 1 inhibitor CPI-17. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 186-192, 2003.
2. Eto M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem* 284: 35273-35277, 2009.
3. Eto M, Kirkbride JA, Chugh R, Karikari NK, and Kim JI. Nuclear localization of CPI-17, a protein phosphatase-1 inhibitor protein, affects histone H3 phosphorylation and corresponds to proliferation of cancer and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 137-142, 2013.
4. Eto M and Kitazawa T. Diversity and plasticity in signaling pathways that regulate smooth muscle responsiveness: Paradigms and paradoxes for the myosin phosphatase, the master regulator of smooth muscle contraction. *J Smooth Muscle Res* 53: 1-19, 2017.
5. Eto M, Wong L, Yazawa M, and Brautigan DL. Inhibition of myosin/moesin phosphatase by expression of the phosphoinhibitor protein CPI-17 alters microfilament organization and retards cell spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 46: 222-234, 2000.
6. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, and Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 49: 157-230, 1997.
7. Kitazawa T and Kitazawa K. Size-dependent heterogeneity of contractile Ca²⁺ sensitization in rat arterial smooth muscle. *J Physiol* 590: 5401-5423, 2012.
8. Kitazawa T, Polzin AN, and Eto M. CPI-17-deficient smooth muscle of chicken. *J Physiol* 557: 515-528, 2004.
9. Kuwahara M, Sugano S, Yayou K, Tsubone H, and Kobayashi H. Evaluation of a new tail-cuff method for blood pressure measurements in rats with special reference to the effects of ambient temperature. *Jikken Dobutsu* 40: 331-336, 1991.
10. Ohama T, Hori M, Sato K, Ozaki H, and Karaki H. Chronic treatment with interleukin-1beta attenuates contractions by decreasing the activities of CPI-17 and MYPT-1 in intestinal smooth muscle. *J Biol Chem* 278: 48794-48804, 2003.
11. Ohki S, Eto M, Shimizu M, Takada R, Brautigan DL, and Kainosho M. Distinctive solution conformation of phosphatase inhibitor CPI-17 substituted with aspartate at the phosphorylation-site threonine residue. *J Mol Biol* 326: 1539-1547, 2003.
12. Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, Muraoka K, Ishizawa K, Yoshida S, Kawarazaki W, Takeuchi M, Ayuzawa N, Miyoshi J, Takai Y, Ishikawa A, Shimosawa T, Ando K, Nagase M, and Fujita T. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J Clin Invest* 121: 3233-3243, 2011.
13. Titze J and Luft FC. Speculations on salt and the genesis of arterial hypertension. *Kidney Int* 91: 1324-1335, 2017.
14. Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL, and

Kitazawa T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca²⁺ sensitivity of protein

kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 535: 553-564, 2001.

Functional Analysis Myosin Phosphatase Regulator in High Salt Diet-Mediated Hypertension

Masatoshi Hori, Hirokazu Tsubone, Shigeru Kakuta

Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Vascular smooth muscle contraction is regulated by balance between MLC kinase (MLCK) and myosin light chain phosphatase (MLCP) activities. MLCP activity is negatively regulated by rhoA/rho-kinase signaling and PKC/CPI-17 signaling (CPI-17; a protein kinase C potentiated phosphorylation-dependent inhibitory protein of MLCP). These negative regulatory pathways are thought to modulate blood pressure in physiological and/or pathophysiological condition, such as hypertension and cerebrovascular spasm. We here generated CPI-17-deficient mouse (CPI-KO) and mutant CPI knock in mice in which phosphorylatable T38 was replaced with unphosphorylatable alanine (CPI-TA) by using CRSPR/Cas9 system, then investigated the effect of CPI-17 on vascular contractility and mean blood pressure (MBP).

In wild type mice (WT) aorta, phorbol ester (PDBu) potentiated high K^+ -induced contraction although PDBu alone did not induce contraction. In contrast, in aorta isolated from CPI-KO and CPI-TA, the PDBu-mediated potentiation of high K^+ -induced contraction was completely abolished, indicating that CPI-17 is functionally knocked out in both CPI-17 mutant mice. Phenylephrine-induced contractions in aorta of CPI-KO and CPI-TA were also smaller than that of WT in accordance with decrease in MLC-phosphorylation. In radio-telemetry system, MBP in CPI-KO and CPI-TA were significantly decreased than that in WT. In contrast, heart rates (HR) in CPI-KO and CPI-TA were increased rather than that in WT. This may be compensative action to maintain blood pressure. In high salt diet- induce hypertension model of WT, MBP was significantly increased within 1 week later after starting high salt diet then maintained the high level MBP over 3 weeks. In contrast in CPI-KO and CPI-TA, increment of MBP induced by high salt diet was significantly lower and maintained lower level over 3 weeks.

In conclusion, we, for the first time, succeeded to generate CPI-17 deficient mice and phospho-inactive mutant CPI-17 knock-in mice. We established that PKC/CPI-17 signaling pathway is important to regulate MBP not only in physiological condition but also in pathophysiological condition of high salt diet-induced hypertension.