

Thesis

新規ダントロレン誘導体を用いた Ca^{2+} 放出機構に関する解析

埼玉医科大学薬理学教室

(指導: 丸山 敏教授)

木原 康隆

リアノジン受容体 (RyR) を介する筋小胞体 (SR) からの Ca^{2+} 放出は骨格筋の生理的収縮において興奮を収縮につなげる必須の過程である。RyR から Ca^{2+} 放出を起こす機構には Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) がよく知られているが、骨格筋の生理的収縮においては CICR 機構ではなく、RyR が CICR とは異なる開口様式 (モード) で機能する生理的 Ca^{2+} 放出 (PCR) 機構が働いていると考えられている。すなわち、細胞膜上の電位変化を横行小管 (T 管) 膜に存在するジヒドロピリジン受容体 (DHPR) が検知し、その信号を RyR に何らかの方法で伝えることで Ca^{2+} 放出が起きる。しかし PCR の分子的な機序の詳細はまだ不明のままである。CICR を抑制することなく PCR を特異的に抑制する薬物があれば PCR の分子的機構の解明に有用と思われる。悪性高熱の治療薬で知られるダントロレン (Dan) は室温でも高温でも PCR を抑制するが、CICR に対しては高温では抑制を示すけれども室温では抑制しないか、しても極めて弱いと言われる。すなわち、Dan は PCR と CICR を少なくとも室温においてはある程度区別している可能性が高い。

今回、Dan よりもっと明白に PCR と CICR を区別する薬物を見つける目的で、数種の新しく合成された Dan 誘導体の影響を検討した。これらの薬物について骨格筋無傷線維の単収縮 (PCR) 抑制作作用とサポニン処理スキンド・ファイバーでの CICR 抑制作作用を調べた。また PCR に類似した特徴を有すると思われる clofibric acid (Clof) による Ca^{2+} 放出に対してこれらの薬物の影響も検討した。その結果、Dan 誘導体の中には Dan よりも PCR と CICR をより明瞭に区別するものがあることがわかった。

なお、これらの実験の結果、Clof によって活性化された RyR- Ca^{2+} 放出チャネルの開口様式と PCR の開口様式が類似していることを裏付ける結果が得られた。

序論

骨格筋の主機能は収縮である。この収縮は、骨格筋細胞の細胞膜上に生じた電気的変化がトリガーとなって、細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位である筋小胞体 (Sarcoplasmic reticulum, SR) から Ca^{2+} が放出されることにより発生する。細胞膜上に生じた電気的変化を検知するのは横行小管 (T-tubule, T 管) 系に存在するジヒドロピリジン受容体 dehydropyridine receptor (DHPR) であり、SR からの Ca^{2+} 放出はリアノジン受容体 (RyR : Ca^{2+} 放出チャネル) を通じて起きることが分かっている^{1,2)}。

RyR は植物アルカロイドである リアノジンの Ca^{2+} 放出チャネルに対する特異的結合を利用して、単離、精製され³⁻⁵⁾、その一次構造も明らかにされた SR 膜上

医学博士 甲第 850 号 平成 15 年 3 月 28 日 (埼玉医科大学)

に存在するタンパク質である⁶⁾。この単離されたチャネル蛋白を人工膜に埋め込むと、 Ca^{2+} チャネルとしての機能が認められ^{3, 4, 7, 8)}、その性質はスキンド・ファイバー⁹⁾や、分離筋小胞体¹⁰⁻¹²⁾で詳しく調べられた Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出 (CICR) 機構の性質とほぼ一致した。またリアノジンはチャネルが開口した時にのみ RyR に結合し作用を発揮するが、その作用を発揮させる条件も CICR の活性化条件に一致した¹³⁾。つまり、リアノジン結合蛋白質 (RyR) と、CICR 機構を担う蛋白質とは同一のものであると考えられる。一方、リアノジン受容体の電顕的形態^{4, 5, 14)}は、SR の生理的 Ca^{2+} 放出 (physiological Ca^{2+} release, PCR) チャネルと考えられてきた小胞体・T 管接合部に存在する “foot 構造”¹⁵⁾ と極めてよく類似していることから、PCR を行なうチャネル蛋白質と RyR、すなわち CICR を行なうチャネル蛋白とは同一のものであると考えられてきた。

CICR 機構は、SR からの Ca^{2+} 放出機構として詳しく研究されてきた機構である。しかし、種々の実験結果から興奮収縮連関における PCR 機構としては機能していないことが分かっている⁹⁾。このことは先に述べた PCR チャネルと CICR チャネルが同一分子であることと一見矛盾するように見える。しかし、RyR のノックアウト・マウスでは骨格筋を刺激して興奮させても収縮は起こらないので、RyR が骨格筋の PCR チャネルとして機能していることは確実である¹⁶⁾。また RyR を欠如した細胞では CICR 機構も完全に消失することも明らかにされた¹⁷⁾。したがって現在では、同一の RyR 分子が、SR の周囲の Ca^{2+} 濃度変化と、T 管の膜電位センサーから伝えられる情報という異なる刺激に対して、異なる二種類のモードで開口する性質を持つと解釈されている^{18, 19)}。

ところで骨格筋細胞の興奮収縮連関 (Excitation-Contraction coupling, E-C coupling)において、最も重要なかつ未だ不明な点は、T 管に波及した電位変化を膜電位センサーである DHPR が感知した後に、その情報がどのように SR の Ca^{2+} 放出機構すなわち RyR に伝達されて PCR を起こすかという問題である。DHPR が直接 SR の Ca^{2+} 放出チャネルに相互作用を及ぼして情報を伝達するのか、DHPR と Ca^{2+} 放出チャネルとの間に未知の蛋白が介在し、それを介して Ca^{2+} 放出を調節するのかもまだ明らかでない。この問題の解決には先に述べた CICR モードと PCR モードという性質を異にする 2 種の開口モードそれぞれが RyR- Ca^{2+} 放出チャネル分子のどのような分子形態に基づくものかを明らかにすることが重要であると思われる。これまでのところ、CICR 機構については生理学的あるいは生化学的標本を用いて様々な解析がなされている。一方、PCR 機構については、細胞膜と細胞内小胞体膜という二つの生体膜間での情報伝達であり、その特徴的な構造が保存されていること、すなわち無傷筋線維であることがその解析には必須であり、そのためもあって PCR モードでの RyR の開口性質については情報が少ない。無傷筋線維において RyR の二つの開口様式のうち PCR のみを特異的に修飾する薬物がもし存在すれば、その薬物の作用メカニズムの解析を通して PCR の分子レベルでの活性化機構の解明は大きく前進するかもしれない。しかし現在のところそのような薬物は知られていない。そこで、われわれは RyR の二つの開口様式のうち PCR のみを特異的に修飾するリガンドの開発を計画した。

ダントロレン (Dan) は骨格筋の興奮収縮連関、すなわち PCR の阻害剤として見出された筋弛緩薬である^{20, 21)}。また、この Dan は悪性高熱症 (malignant hyperthermia, MH) 発症時の特効的治療薬としても知られている。MH は人と豚において特定の素因を有する個体が吸入麻酔薬を適用された場合に骨格筋の

RyR を介した Ca^{2+} 放出が異常に亢進するために発症する疾病である²²⁻²⁴⁾。この Ca^{2+} 放出の亢進は RyR がもつ CICR 機構が異常に亢進しているために引き起こされることが明らかにされた^{25, 26)}。先にも述べたように Dan は PCR に対して抑制作用を有する。しかし、Dan は CICR を強く抑制するという作用をも有し、この CICR への抑制作用の方が MH 発症時に有効な治療効果を発揮する理由であると考えられている。しかし、Dan の Ca^{2+} 放出への作用にはさらに興味深い事実も知られている。それは、PCR が温度に関わらず Dan によって強く抑制されるのに対して、CICR への抑制作用は通常の体温に近い条件下、すなわち 37°C 程度の温度下においてのみ見られるものであり、室温のような比較的低い温度ではその作用はほとんど見られないことである²⁷⁻²⁹⁾。これらの事実は Dan が高温下では、RyR の CICR と PCR の両方の開口メカニズムを認識し、低温下では PCR のそれのみを強く認識している可能性を示唆している。しかし、Dan は実験条件によっては、室温においても CICR 抑制作用を示すこともあるといわれるので、Dan の適当な誘導体をいろいろ調べれば、二つの開口様式をもっと明確に区別して認識するものがあるのではないかと考え、岐阜大学工学部（現岐阜大学医学部）の鈴木研究室と共同して、種々の Dan の誘導体を作成した。そしてこれら誘導体の PCR および CICR への影響を解析した。その結果、二つの開口様式のうち PCR のみに対して特異的に修飾する Dan 誘導体を見出した。

方 法

実験材料

5-9 週令の雄の ICR マウスを 50-80 mg/kg のペントバルビタールナトリウムで麻酔(i.p.)後、断頭し、その骨格筋を実験に用いた。

Dan と Dan 誘導体の Ca^{2+} 放出への作用は骨格筋を電気刺激したときに発生する単収縮(twitch contraction)への影響を指標として観察した。この単収縮の変化は直接 Ca^{2+} 放出を観察しているわけではないが、最も簡単に興奮収縮連関過程における Ca^{2+} 放出、すなわち PCR の変化を推察できる実験方法である。

さらに、筋細胞を界面活性剤のサポニンで処理することにより細胞膜の透過性を増加させたスキンド・ファイバー標本の SR からの Ca^{2+} 放出に対する Dan 誘導体の影響も解析した。スキンド・ファイバーは、機械的あるいは化学的な処置を標本に施すことにより拡散障壁としての細胞膜機能を除去した標本であり、細胞内小器官の機能解析を可能とする手法である。つまり、細胞や組織を破壊して得られる生化学標本と無傷細胞や組織を用いる生理標本のちょうど中間に位置づけされる標本である。サポニンは今回用いた程度

の濃度及び処理時間で、細胞膜には孔（直径~20 nm）をあけるが、筋小胞体には孔を開けないことが分かっている³⁰⁾。したがって SR の機能を保持したまま迅速かつ自由に細胞内の SR 周囲の溶液環境を変化させることができることから各 Dan 誘導体の CICRへの影響を測定することができる。また、池本ら³¹⁾によって報告された Clofibrate acid(Clof)による Ca^{2+} 放出 (Clof-induced Ca^{2+} release) に対する各 Dan 誘導体の効果もこのスキンド・ファイバー標本を用いて解析した。

無傷骨格筋線維 (Intact fiber) の単収縮の測定

長趾伸筋(Extensor digitorum longus muscles, EDL)の四頭の一つを注意して切り出し、生理的食塩水 (PSS: NaCl, 150; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; HEPES, 5; glucose 5.6[単位 mM]; pH 7.4) に浸した。一対の刺激用電極 (白金線) を装備した実験槽の電極間に標本を移し、筋束の一端を絹糸を介して張力トランスデューサー(AE801, Akers, Norway または UL-10GR, NMB, Japan) に接続し、もう一方を実験槽に固定した。筋標本を神経筋遮断薬である D-ツボクラリン (25 μM) と dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.2%) を含む PSS に浸し、0.2 Hz の頻度で電気刺激 (20V, 0.5 ms) を標本に対して与えた。単収縮の収縮高が一定になった後、細胞外溶液を DMSO に溶解した Dan または Dan 誘導体を含む PSS に変更した。薬物を含む PSS 中で標本を 15-30 分間処置した後の単収縮高を薬物処理前の収縮高と比較した。D-ツボクラリンは全実験経過をとおして存在させた。実験温度は 21-23°C で行った。統計的有意性は Dunnett's test を用いて判断した (図 2a)。

カフェイン拘縮に対する Dan と Dan 誘導体の影響

無傷筋線維での CICR 機構に対する Dan および Dan 誘導体の影響を調べるために CICR を強く促進するカフェインを適用し、それにより生じる拘縮 (カフェイン拘縮) の変化を指標として Dan あるいは Dan 誘導体の作用を解析した。この実験では以下のようにマウスの横隔膜筋標本を使用した。

横隔膜中心から約 1.5-2 mm 幅の扇状の筋束を筋線維の走行に沿って切り出し、線維末端は肋骨まで含んで取り出した。EDL を用いた実験と同様に PSS 中で単収縮高が一定になるまで安定させた。その後電気刺激を止めて、素早く細胞外溶液を [K]・[Cl] 積を一定に保ったメタンスルホン酸高 K 溶液 (HKMs: KMs, 103.7; KCl, 0.7; NaMs, 50; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; HEPES, 5; glucose, 5.6[単位 mM]; pH 7.4) に全液交換を行い膜電位センサーを完全に不活性化させた。その後 HKMs に溶解したカフェイン (32 mM) を全液交換で標本に作用させカフェイン拘縮を引き起こした。一定時間拘縮を観察した後 HKMs で洗浄した。カフェイン拘縮は 15 分の間隔で同一標本で合計 2 回行い、その間は

HKMs の中で標本の回復を待った。初回のカフェイン拘縮の張力を 100% とし、薬物不存在下(コントロール)および 20 μM Dan または 50 μM Dan 誘導体存在下での 2 回目のカフェイン拘縮の張力の変化を比べた。実験はすべて 0.2% の DMSO 存在下で、22°C と 37°C で行った。コントロールとの統計的有意差は、t-test を用いて判断した。

スキンド・ファイバーにおける Ca^{2+} 放出の測定方法および実験プロトコール

EDL を弛緩液 (ATP, 4.76; メタンスルホン酸 Mg [MgMs₂], 5.54; メタンスルホン酸 K[KMs], 108.6; NaN₃, 20; piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid) [PIPS], 20; EGTA, 1[単位 mM]; pH 7.0) の中で、45 分間、サポニン (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) で処理しスキンド・ファイバーを作成した。弛緩液でサポニンを洗浄後、3 または 4 本の筋線維束を弛緩液の中で注意して切り出し、その両端を絹糸で直径 100 μm のステンレス・ワイヤーに固定した。微小な標本から放出される Ca^{2+} を効率よく測定するために、スキンド・ファイバーを固定したステンレス・ワイヤーを内径 400 mm, 長さ 32 mm のガラス・キャピラリー (ドラモント) の中央付近に挿入し、蛍光装置 (CAM-200, 日本分光工業) に付属した顕微鏡 (BHS-RFK, オリンパス) のステージに固定した。

SR からの Ca^{2+} 放出を正確に測定するためには次のような問題を考慮しなければならない。(1) ATP が SR 周囲に存在している場合、放出された Ca^{2+} は SR 膜上の Ca ポンプを介して速やかに再取り込まれる。(2) Ca^{2+} 放出の結果、SR 周囲の Ca^{2+} 濃度が上がると、それが CICR 機構を介して二次的に Ca^{2+} 放出を促進するので、どれだけが最初の Ca^{2+} 放出刺激の結果であり、どれだけが二次的な Ca^{2+} 放出によるものか、分からぬ。これを避けるために高濃度の Ca^{2+} 緩衝剤を用いると、 Ca^{2+} 蛍光指示薬等による直接的な遊離 Ca^{2+} 濃度の変化は測定不可能である。以上の二点の問題があるので、単純な方法では正確な Ca^{2+} 放出の変化を測定することは出来ない。そこで以下の三つのステップより構成されたプロトコールを用い、 Ca^{2+} 放出に対する薬物の影響を解析した³²⁾。

ステップ 1: SR に Ca^{2+} を取り込ませる。

後述するステップ 3 を経て、筋小胞体中の Ca^{2+} をあらかじめ全て放出させてから実験を始める。最初に筋小胞体に存在する Ca^{2+} ポンプ (Ca-ATPase) を利用して一定量の Ca^{2+} を取り込ませる。今回の実験ではこの取り込みを pCa 6.7, 4.0 mM MgATP²⁻, 1.5 mM Mg²⁺ の条件で 60 秒間行い、その後 ATP を除いて SR の Ca^{2+} ポンプを停止させ、 Ca^{2+} の再取り込みが起きないようにした。このステップ 1 以外はすべて ATP を含まない溶液を用いた。

ステップ 2:Ca²⁺放出刺激により Ca²⁺を放出させる。

ステップ 1に引き続いて、Ca²⁺緩衝剤である EGTA (10 mM) を用いて種々の遊離 Ca²⁺濃度に調製されたテスト溶液をさまざまな時間 (4-270 s) 適用する。実験によっては Mg²⁺濃度も変化させた。また、必要に応じて Clof やカフェイン、AMP といった Ca²⁺放出を引き起こす薬物をこのテスト溶液に混ぜた。さらに今回の実験の目的である Dan および Dan 誘導体もこの溶液に加えた。無傷筋線維用いた実験と同様に DMSO を用いて Dan, GIF-0082 および GIF-0185 については 0.1-25 mM を、その他の誘導体については 25 mM の濃度の原液を作成し、test 溶液中に DMSO の濃度が 0.2% または 0.4% (図 4a のみ) になるように調整した。したがって Dan, および Dan 誘導体を含まないテスト test 溶液も DMSO の濃度がそれと同じになるように調整した。

ステップ 3:SR 中に残った Ca²⁺の量を測定する。

最後に充分な濃度のカフェインおよび AMP を含んだアッセイ溶液を与えることで SR 内に残った Ca²⁺を全て放出させた。この時蛍光 Ca²⁺指示薬である fura-2 (35 μM)³³⁾ を加えておき、放出された Ca²⁺量を測定した。このアッセイ時には、EGTA を加えず、fura-2 に Ca²⁺を結合させるようにした。

このようなテスト処理 (ステップ 2) を含むプロトコールの前後に、テスト処理を行わずアッセイを行うコントロール (対照実験) をおく。この対照実験に比べてテストを行った後に残存する Ca²⁺が減った分を、テスト処理中に放出された Ca²⁺量として算出することが出来る。このプロトコールを用いた場合、Ca²⁺放出を引き起こす時 (ステップ 2) には ATP が存在しないし、また高濃度の EGTA が存在しているため Ca²⁺が放出されても遊離 Ca²⁺濃度はほとんど変化しないので、前述した二点の問題点を除外した正確な Ca²⁺放出の性質が解析可能である。

このプロトコールにおいて单一の条件でテスト処理の時間を変えた場合、SR 内の Ca²⁺残存量はテスト処理の時間に応じて減少し、その時間経過は単一の指數関数で近似できることが分かっている³⁴⁾。そこで一定の処理時間によって得られた減少 Ca²⁺量を用いて指數関数の速度定数を求め、Dan あるいはその誘導体の Ca²⁺放出への影響を解析した。スキンド・ファイバーを用いた実験はすべて 21-23°C で行った。統計的有意差は paired t-test を用いて判断した。

Dan の誘導体の合成

合成はすべて岐阜大学工学部の鈴木研究室で行われた。

Dan (図 1a) の誘導体、GIF-0082 (図 1b) および GIF-0163 (図 1e) は、それぞれ Dan と (3-azido-5-iodo)

benzyl bromide または benzyl bromide とのカップリング反応により合成した³⁵⁾。Dan のニトロ基をヨード基に変換した類縁体である GIF-0146 (図 1c) は、4-iodoaniline を出発原料に用いて Snyder ら³⁶⁾による従来法に従い合成した。Dan のニトロ基をメトキシ基に変換した類縁体である GIF-0185 (図 1c) は、まず、4-iodoanisole と 5-(tri-n-butylstannyl)-2-furaldehyde³⁷⁾ との Stille 反応³⁸⁾ を行い、つづいて、1-aminohydantoin³⁹⁾ との縮合反応を行うことにより合成した。

GIF-0149-R (図 1d) は、5-(4-nitrophenyl)-2-furaldehyde とラセミ体の 1-amino-5-(6-methoxycarbonylhexyl) hydantoin⁴⁰⁾ との縮合反応により合成した。新規合成 GIF 化合物はいずれも再結晶を行うことにより精製し、¹H- および ¹³C-NMR (nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴スペクトル), 赤外吸収スペクトル, 紫外吸収スペクトルの各種スペクトル測定、および元素分析測定を行うことによりその構造決定および純度検定 (純度 > 99%) を行った。

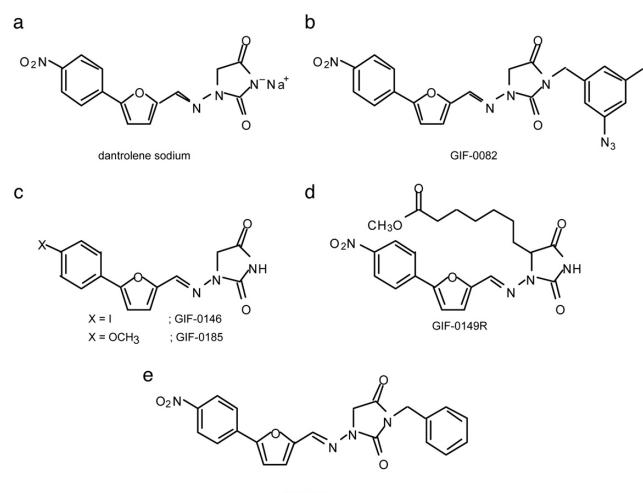


図 1. 本研究に使用したダントロレンおよびその誘導体の化学構造式。a) ダントロレン。b) GIF-0082: ダントロレンの N-(3-アジド-5-ヨード) ベンジル化誘導体。光反応性のアジド基を含有し、放射性 ¹²⁵I の導入を考慮して設計した。c) GIF-0146 と GIF-0185: ダントロレンのフェニル基上の置換基を電子求引性のニトロ基から電子供与性のヨードおよびメトキシ基に変えた誘導体。d) GIF-0149-R: ダントロレンのヒダントイン環部分にアルキル側鎖を導入した誘導体。e) GIF-0163: N- ベンジルダントロレン。GIF-0082 の構造を単純化 (アジド基とヨード基を除去) したダントロレン誘導体。本図は、Nature Publishing Group の許可を得て、以下の共著論文より複製した。Ikemoto T, et al. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br J Pharmacol 2001;134: 729-36.

他の化合物

Dan は、山之内製薬(株)より寄贈されたもの、または、ナカライトスク(株)より購入したものを使用した。D-ツボクラリンクロライドは、ナカライトスク(株)より購入した。 Na_2ATP はベーリングガーマンハイム(FRG)、サポニンは ICN Pharmaceuticals Inc. (USA)、Fura-2 と Mag-Fura-2 は Molecular Probes, Inc. (USA)、AMP および 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid (clofibrate acid, Clof) は Sigma Chemical Co. (USA) から購入した。

結果

無傷筋線維における Ca^{2+} 放出とスキンド・ファイバーにおける CICR に対する Dan と Dan 誘導体の効果

図 2a に示すように GIF-0082 は骨格筋の無傷筋線維において、Dan(●)よりもその作用は弱いものの、用量依存性に单収縮を抑制した($0.2\text{--}50 \mu\text{M}$, □)。一方、GIF-0185 は Dan と同程度に单収縮張力を抑制した(▽)。Dan は SR の Ca^{2+} ポンプの活性やスキンド・ファイバーにおける収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性には影響しないことが明らかにされている²⁹⁾。データは示していないが、GIF-0082 および GIF-0185 も Dan と同様にそれらに対して影響はなかった。つまり図 2a の結果は、この 2 つの Dan 誘導体が Dan と同様に無傷筋線維の生理的 Ca^{2+} 放出 (PCR) を抑制することを示している。

図 2b は骨格筋スキンド・ファイバーにおける Dan(○), GIF-0082(■), および GIF-0185(▼)の CICR に対する効果を示している。図からもわかるように SR からの Ca^{2+} 放出速度は Ca^{2+} 濃度が $10 \mu\text{M}$ 以上では差はないが、それ以下の Ca^{2+} 濃度下では Dan によって有意に減少している(△ vs ○)。高濃度 Dan ($20\text{--}50 \mu\text{M}$) は pCa 6.0 での条件下で、約 50% 程度 Ca^{2+} 放出速度を減少させた(図 4a, ○)。一方、GIF-0082 と GIF-0185 ($50 \mu\text{M}$) は、すべての Ca^{2+} 濃度において Ca^{2+} 放出速度に変化を与えたなかった。(図 2b, △ vs ■, ▼)。これらの結果は、今回新規に合成した誘導体 GIF-0082 および GIF-0185 が少なくとも室温下においては PCR のみを抑制し、Dan より特異的に CICR と PCR を区別して認識することを示すものである。

スキンド・ファイバーにおける Clof による Ca^{2+} 放出への Dan と GIF-0082 の影響

池本ら³¹⁾はスキンド・ファイバーで、Clof が RyR- Ca^{2+} チャンネルを活性化するが、その開口様式が、CICR の開口様式とは大きく異なり、PCR の開口様式に類似した特徴を有していることを報告した。図 2a の結果は GIF-0082 および GIF-0185 が PCR を強く抑制することを示しているので、Clof による Ca^{2+} 放出に対しても強い抑制作用を発揮することが予想される。

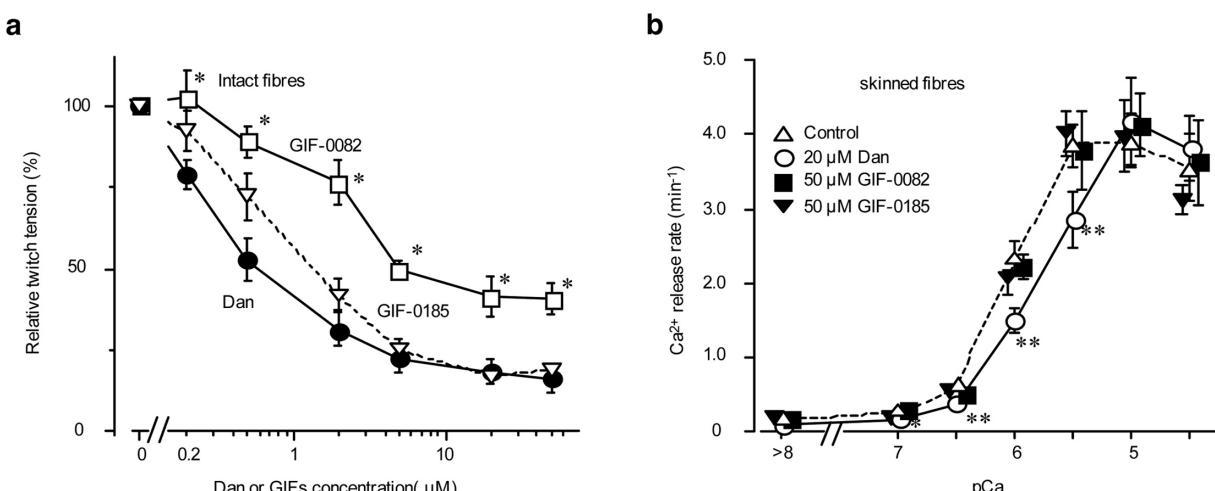


図 2. Dan, GIF-0082 および GIF-0185 の Ca^{2+} 放出に対する効果。 (a) 無傷骨格筋線維において、 $0.2\text{--}50 \mu\text{M}$ の Dan, GIF-0082 および GIF-0185 の薬物処置後の单収縮の大きさを薬物処置前の大きさと比較した (mean \pm s.e.mean, n=9 [Dan], n=3–6 [GIF-0082, GIF-0185]). *p<0.05 (Dunnett's test). (b) サポニン処理により得られたスキンド・ファイバーを用いて SR からの Ca^{2+} 放出速度を測定した。 Mg^{2+} および adenine nucleotide 非存在下 pCa $>8\text{--}4.5$ での各薬物の影響を比較した。△は Dan および Dan 誘導体を投与しない時の Ca^{2+} 放出速度を示す(コントロール, n=11–16)。各 Ca^{2+} 濃度における GIF-0082, GIF-0185 の結果は水平にずらして表記している (mean \pm s.e.mean)。*p<0.05, **p<0.01 (vs コントロール)。シンボルよりも小さなエラー・バーは省略した。本図は、Nature Publishing Group の許可を得て、以下の共著論文より複製した。Ikemoto T, et al. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br J Pharmacol 2001;134: 729–36.

Clorf は SR 周囲の Ca^{2+} 濃度が充分低いときに PCR と類似の特徴を持って RyR を活性化させると報告されている³¹⁾。そこで $\text{pCa} > 8$ の条件下での Clorf による Ca^{2+} 放出に対する Gif-0082 の影響を調べた。その結果、図 3a に示すように Gif-0082 (50 μM) は予想どおり有意の抑制作用を示した。一方、CICR 機構を活性化させるカフェインによる Ca^{2+} 放出に対しては図 2b の結果に一致して Ca^{2+} 放出速度に影響を示さなかった(図 3b)。Dan は PCR および CICR の両方を抑制するが、やはり Clorf およびカフェインによる Ca^{2+} 放出を抑制した(図 3b)。図 3a あるいは図 3b の Dan あるいはその誘導体の効果は、すべて同一標本で比較した結果を集めたものである。そこで Gif-0082 や Dan の存在下での Ca^{2+} 放出速度をこれらの薬物が存在しない時の Ca^{2+} 放出速度を 1 として表わした結果を図 3c に示す。Clorf の濃度が高まれば高まるほど、Gif-0082 の抑制の程度が強くなっているように見える。なお、AMP はカフェインとはメカニズムは異なるもののやはり CICR の活性化薬である。図 3b では AMP によって促進された Ca^{2+} 放出は、Dan によってあまり抑制されないように見えるが、図 3c の形で比較してみるとやはり Dan によって Ca^{2+} 放出速度が減少傾向にあることが分かる。

Gif-0082 と同様に PCR 特異的抑制作用を有する Gif-0185 の Clorf による Ca^{2+} 放出に対する作用は後述する。

Dan の Ca^{2+} 放出抑制への Gif-0082 と Gif-0185 の効果

SR からの生理的 Ca^{2+} 放出は CICR メカニズムを介して起こっているものではないと考えられている^{9, 41)}ので、Gif-0082 や Gif-0185 が CICR を全く抑制しないにもかかわらず PCR を抑制することに論理的矛盾はない。しかし、Dan 誘導体が CICR を抑制しないのは、スキンド・ファイバーで実験したからで、スキンド・ファイバーでは Dan 誘導体の作用を仲介する分子が消失しているのではないか、という議論はあり得るであろう。それに対しては、スキンド・ファイバーにおいても Clorf による Ca^{2+} 放出はこれらの Dan 誘導体により強く影響をうけているので、その可能性は低いと考えられるが、さらに次に示す実験結果によってその可能性は完全に否定される。

スキンド・ファイバーにおいて、Dan は用量依存性(2-50 μM , 図 4a, ○)に CICR を抑制する。Gif-0185 は、図 2b に示すように CICR に対して抑制効果を持たないものの、Dan の低濃度(2-20 μM)下では、Gif-0185 を共存させると Dan の抑制効果が完全に消失した(図 4a, ▼)。このことからスキンド・ファイバーにおいても Gif-0185 は、Dan の CICR メカニズムに対する作用点を認識していることがわ

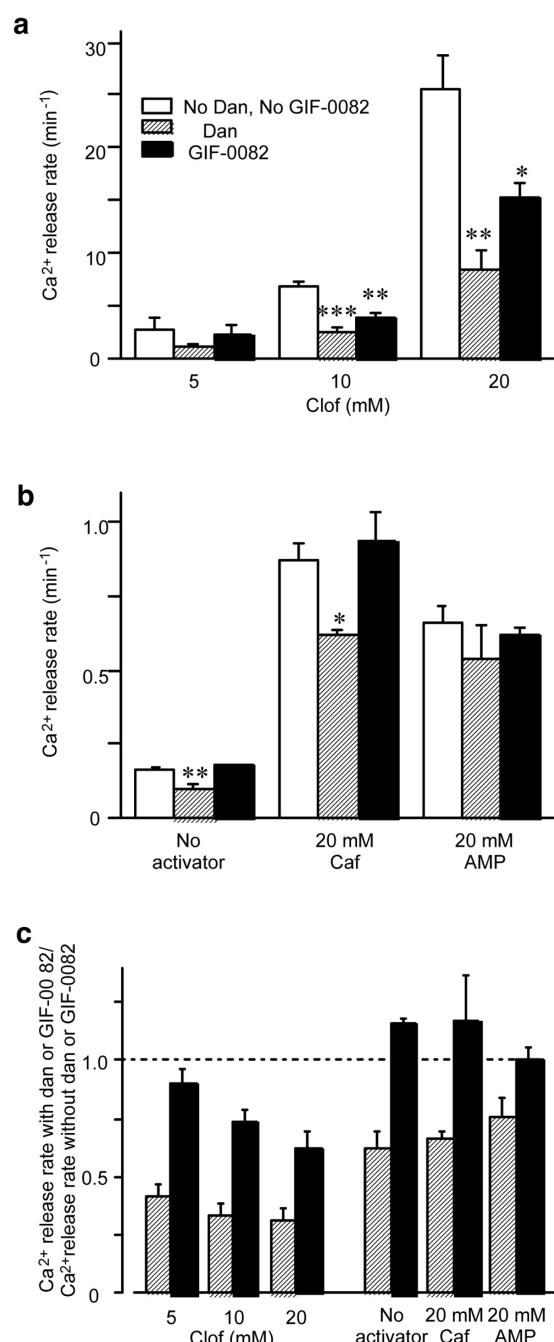


図 3. スキンド・ファイバーにおける Clorf (a) およびカフェインと AMP (b) による Ca^{2+} 放出に対する Dan と Gif-0082 の効果。20 μM Dan と 50 μM Gif-0082 は Mg^{2+} , Ca^{2+} -free (10 mM EGTA 存在下) で、(a) 5-20 mM Clorf (n=3-6), または (b) CICR 活性化薬 (カフェイン, [Caf]; AMP; n=5-7) による Ca^{2+} 放出に対する 20 μM Dan と 50 μM Gif-0082 の作用を調べた (mean \pm s.e.mean)。a と b で縦軸 (Ca^{2+} 放出速度) の目盛りには大きな違いが見られることに注意。* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (c) a, b でのコントロール値を 1.0 として Dan あるいは Gif-0082 存在下の相対値を示した。本図は、Nature Publishing Group の許可を得て、以下の共著論文より複製した。Ikemoto T, et al. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br J Pharmacol 2001;134: 729-36.

かる。一方、GIF-0082 はそれ自身 CICR に対して影響を示さないが、GIF-0185 とは異なって、Dan による CICR の抑制も GIF-0082 によって影響を受けなかつた(図 4a, □)。

他方、Clof による Ca^{2+} 放出に対しても、GIF-0082 または GIF-0185 と Dan を同時に適用した場合の効果を検討した。図 4b に示すように Dan 誘導体は Clof による Ca^{2+} 放出を抑制した。また、低濃度の Dan (2 または 5 μM) も Clof による Ca^{2+} 放出を抑制した(図 4b)。そこで GIF-0082(25 μM) または GIF-0185 (5 μM) と Dan を同時に投与すると Ca^{2+} 放出の抑制は相加的に増強した(図 4b)。

Ca^{2+} 放出に対する他の Dan 誘導体の効果

GIF-0082 や GIF-0185 以外の Dan 誘導体についても検討した。試行した多数の誘導体の中で、GIF-0146 と GIF-0149-R は無傷筋線維の単収縮を抑制したが、GIF-0163 はほとんど無効であった(図 5a)。単収縮に対する Dan および Dan 誘導体の抑制効果の強さを順に示すと、Dan(20 μM)=GIF-0185 (50 μM)>GIF-0082(50 μM)>GIF-0146(50 μM) \geq GIF-0149-R(50 μM)>GIF-0163 (50 μM) (図 2a, 5a) となった。一方スキンド・ファイバーにおいて、これら誘導体のどれもが pCa 6 で Ca^{2+} 放出速度に変化を与える CICR に対する作用を示さなかつたが、その中で GIF-0163 だけはむしろ CICR を促進する傾向を示

した(図 5b)。

これら誘導体のスキンド・ファイバーでの Clof による Ca^{2+} 放出に対する効果も調べた。この実験では無傷筋線維の収縮に対する効果と比較するため、テスト処理、すなわち Clof による Ca^{2+} 放出を引き起こすときの溶液環境を 0.5 mM Mg^{2+} , 10 mM AMP, pCa 7 という筋細胞の静止状態での細胞内環境に近い条件にして各誘導体の作用を解析した。その結果、図 6a のように単収縮に対して抑制効果を示す誘導体の全てが Clof (20 mM) による Ca^{2+} 放出を減弱させた(図 6a)。しかし、これらの誘導体はカフェイン (20 mM) による Ca^{2+} 放出に対しては有意な抑制を示さなかつた(図 6b)。

さらにこれらの実験結果をもとに、Dan とその誘導体によるスキンド・ファイバーでの Clof による Ca^{2+} 放出とカフェインによる Ca^{2+} 放出に対する抑制の程度と無傷筋線維での単収縮に対する抑制率とを比較したところ、単収縮の抑制の割合と Clof による Ca^{2+} 放出の抑制の割合が、良く相関する(図 6c, ●)ことが判明した。しかし、単収縮の抑制率とカフェインによる Ca^{2+} 放出の抑制率に有意な相関関係は見られない(図 6c, ○)。

以上、われわれは少なくとも室温において CICR に対しては全く抑制効果を示さず特異的に生理的 Ca^{2+} 放出および Clof による Ca^{2+} 放出を抑制するいくつかの Dan 誘導体を見出した。

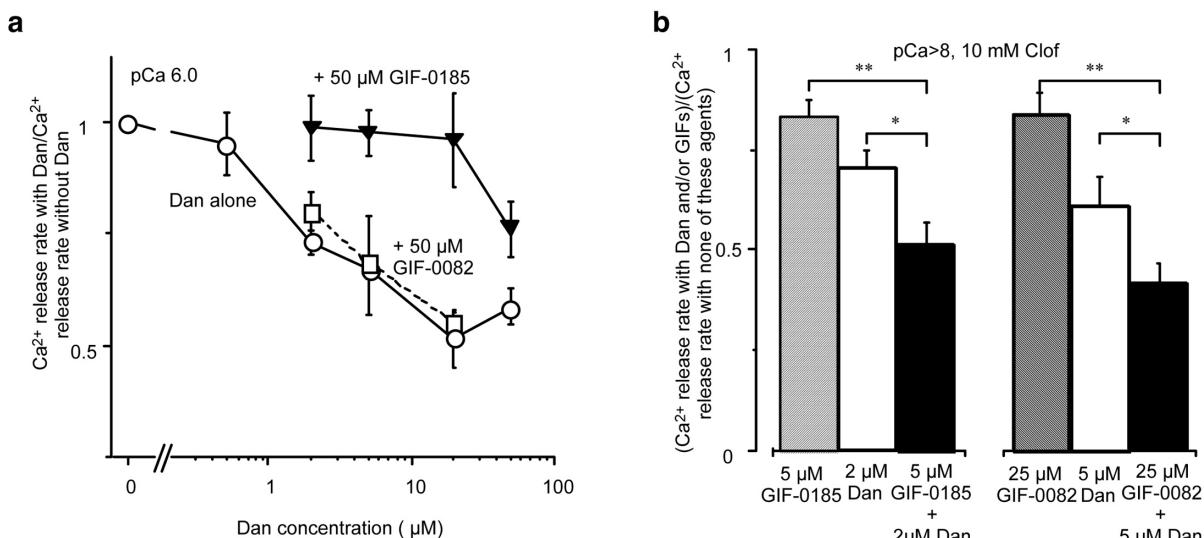


図 4. Ca^{2+} 放出に対する Gif-0082 と Gif-0185 の効果。 (a) スキンド・ファイバーを用いて、 Mg^{2+} -free, pCa6.0 の条件下で Dan (0–50 μM) 存在下の Ca^{2+} 放出速度を同一標本のコントロール値 (Dan を処理する前の Ca^{2+} 放出速度) を 1 とする相対値で示した (Dan alone, mean \pm s.e.mean, n=3–6)。同様の条件で 50 μM Gif-0082 (n=3) または Gif-0185 (n=5) を Dan と共存させた。 (b) 10 mM Clof の Ca^{2+} 放出速度への Dan (2 or 5 μM), Gif-0185 (5 μM), および Gif-0082 (25 μM , n=4) 単独の影響、及び Dan, Gif-0185 と Dan, Gif-0082 共存時の効果。 Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free (10 mM EGTA 存在下) の条件下。同一標本でのコントロール値を 1 として、相対値で示した。 * p<0.05, ** p<0.01。本図は、Nature Publishing Group の許可を得て、以下の共著論文より複製した。 Ikemoto T, et al. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br J Pharmacol 2001;134: 729–36。

無傷筋線維におけるカフェイン拘縮に対する Dan 誘導体と Dan の影響

今回新規に合成した Dan 誘導体の骨格筋 Ca^{2+} 放出機構への作用をより明確にするために、無傷骨格筋線維において CICR 機構への作用を検討した。図 7a は室温 (22°C) 下における Dan ($20 \mu\text{M}$), GIF-0082 ($50 \mu\text{M}$) および GIF-0185 ($50 \mu\text{M}$) 存在下のカフェイン拘縮を同一標本の薬物適用前のカフェイン拘縮と比較したものである。カフェインはこれまでにも記したように CICR 機構の Ca^{2+} 感受性を増加させることによって SR から Ca^{2+} 放出を引き起こす結果収縮を惹起する。図に示すように、カフェイン拘縮を繰り返すと 2 度目の収縮は大きくなる傾向にあり、Dan および Dan 誘導体存在下ではその傾向がないのでカフェイン拘縮は僅かに抑制されたように見える。しかし、薬物存在下においても 1 度目の薬物非存在下の拘縮とほぼ同程度 ($\approx 100\%$) の反応が得られているので、室温下で真に抑制作用があるか否かについての最終的な結論を下すにはさらなる検討が必要である。いず

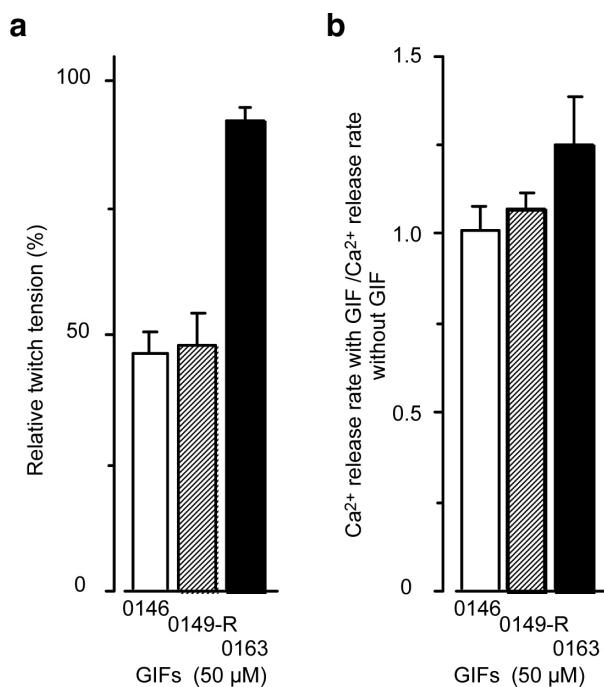


図 5. Ca^{2+} 放出に対する他の Dan 誘導体の効果 (a) 無傷筋線維で、GIF-0146, GIF-0149-R, GIF-0163 処置後の単収縮の大きさを処置前 (100%) と比較した。 (b) スキンド・ファイバーを用いて $\text{pCa} 6.0, \text{Mg}^{2+}$ -free の条件で各 Dan 誘導体存在下の Ca^{2+} 放出速度と非存在下での Ca^{2+} 放出速度との比を示した。 (mean \pm s.e.mean, a; n=3-4, b; n=3) 本図は、Nature Publishing Group の許可を得て、以下の共著論文より複製した。 Ikemoto T, et al. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br J Pharmacol 2001;134: 729-36.

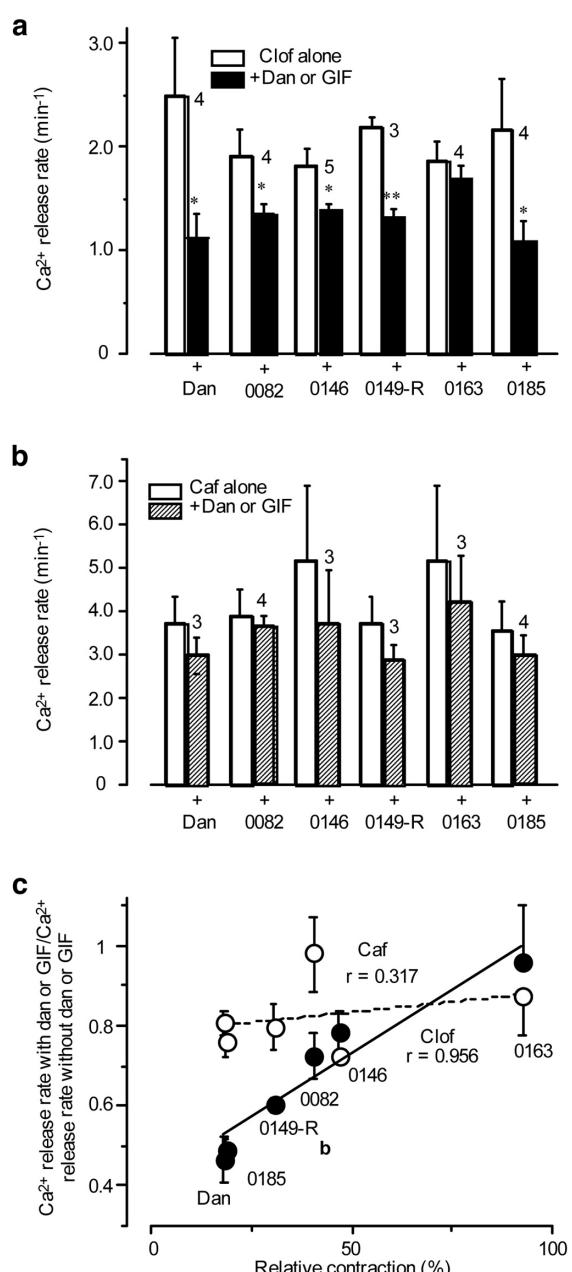


図 6. Dan 誘導体の Ca^{2+} 放出速度に対する効果と単収縮に対する効果の関係。スキンド・ファイバーを用いて、 $\text{pCa} 7.0, 0.5 \text{ mM Mg}^{2+}, 10 \text{ mM AMP}$ の存在下で (a) 20 mM Clof または (b) 20 mM Caf を適用した時の Ca^{2+} 放出速度に対する Dan ($20 \mu\text{M}$) または Dan 誘導体 ($50 \mu\text{M}$) の効果を示す (mean \pm s.e.mean, a; n=3-5, b; n=3-4) * p < 0.05, ** p < 0.01. (c) スキンド・ファイバーにおける Dan ($20 \mu\text{M}$) あるいは Dan 誘導体 ($50 \mu\text{M}$) 存在下のカフェイン (○) または Clof (●) による Ca^{2+} 放出速度のコントロールに対する相対値を、無傷骨格筋線維のこれらの薬物処理後の相対的単収縮の平均値に対してプロットした。直線は最小二乗法で求めた。相関係数はそれぞれ 0.317 と 0.956 であった。本図は、Nature Publishing Group の許可を得て、以下の共著論文より複製した。 Ikemoto T, et al. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br J Pharmacol 2001;134: 729-36.

れにしても、室温下では、抑制はあったとしても強いものではない。一方、Dan の CICR に対する抑制作用は高温下 ($\approx 37^\circ\text{C}$) で顕著に現れることが報告されている²⁷⁻²⁹⁾ので、次に 37°C でのカフェイン拘縮に対する影響を検討した。図 7b に示すように Dan は以前の報告に一致して著明にカフェイン拘縮を抑制した。また Dan 程ではないものの GIFT-0185 も室温での実験結果と大きく異なりやはり明確な抑制作用を発揮した。一方、GIFT-0082 はコントロールと有意差がなく、カフェイン拘縮をわずかに減弱させる傾向を示したのみであった。

考 察

本論文では、骨格筋の SR からの二種類の Ca^{2+} 放出機構、すなわち PCR (今回は単収縮の変化を指標) および CICR 機構に対する Dan および数種類の新規 Dan 誘導体の作用を解析した。その結果、CICR をまったく抑制しないにもかかわらず単収縮すなわち PCR を抑制する数種の Dan 誘導体を見出した (図 2 および 4)。つまり PCR と CICR を Dan よりも明確に区別して認識する薬物を見出した。

この Dan 誘導体は無傷骨格筋の単収縮を指標にして解析した場合だけではなく、スキンド・ファイバーを用いた Clof による Ca^{2+} 放出をも抑制していることから SR の Ca^{2+} 放出機構に作用していることは明らかである (図 3, 4 および 6)。また、PCR の抑制の程度は Clof による Ca^{2+} 放出に対する抑制率と極めて強い相関関係を示すことを明らかにした (図 6c)。池本ら³¹⁾ はスキンド・ファイバーで、Clof が RyR- Ca^{2+} チャンネルを活性化する開口様式が、PCR の開口様式に類似した特徴を有していると報告しているが、本論文の結果はそれをさらに裏付ける結果を与えたと言える。

過去の Dan の効果に関する報告と今回の結果の相違について

先に述べたように、Dan は室温下のような比較的温度の低い条件下ではほとんど CICR 機構に対して抑制を示さないと報告されていた²⁹⁾。しかし、本論文ではマウス骨格筋スキンド・ファイバーの CICR 機構は Dan ($20 \mu\text{M}$) によって明らかに抑制されている。今回結果には示さなかったが、Dan の抑制効果は Mg^{2+} 非存在下でのみ観察され、 Mg^{2+} の共存下においては減弱し、 0.5 mM 程度の Mg^{2+} が存在するとほぼ完全にその抑制作用は消失した。過去の報告も多くは Mg^{2+} (0.5 mM) 存在下での実験結果であり^{27, 29)}、その条件での Dan の作用に関しては本論文と一致している。しかし、太田ら²⁹⁾ は、 Mg^{2+} 非存在下でさえもモルモット骨格筋の CICR はやはり室温下 (20°C) では Dan ($50 \mu\text{M}$) で抑制されないと報告している。現時点ではこの報告と本論文の結果との違いを説明することは出来ないが、ひとつの可能性として、種差、すなわち今回用いた標本はマウスからのものであり、以前の報告はモルモットのものであることが原因であるかもしれない。

Ca^{2+} 放出機構の解明に関する Dan およびその誘導体の有用性

細胞内貯蔵 Ca^{2+} の放出機構は骨格筋以外の細胞系でも生理的に重要であると考えられている。近年、Dan は細胞内貯蔵庫からの Ca^{2+} 放出抑制薬としてさまざまな細胞系の実験に利用されている⁴²⁻⁴⁵⁾。しかしながら、本論文で用いた骨格筋においてさえ Dan が直接 RyR に結合することにより Ca^{2+} 放出を抑制するのか、それとも他の物質 (蛋白質) を介して二次的に Ca^{2+} 放出を抑制するのか、といった基本的な問題をはじめとして、その作用メカニズムは未解明である⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

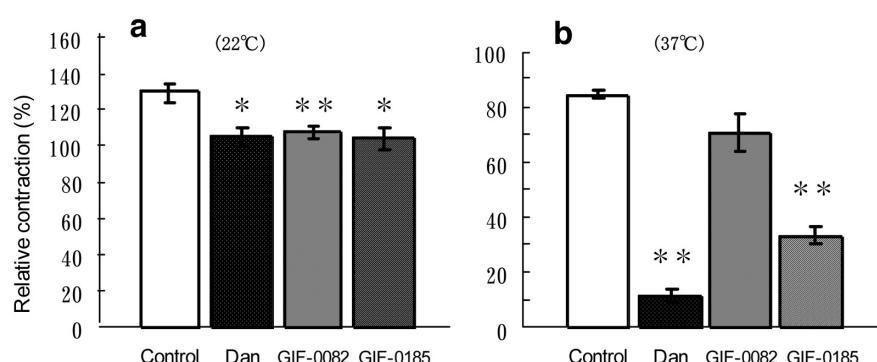


図 7. 無傷骨格筋線維のカフェイン拘縮に対する Dan および Dan 誘導体の影響。 (a) 22°Cあるいは(b) 37°Cの温度で HKMs にて膜電位センサーを不活性化した横隔膜標本に対してカフェイン (32 mM) による拘縮を起こした (100%)。その後カフェインは HKMs で洗浄し、直ちに Dan ($20 \mu\text{M}$), GIFT-0082 ($50 \mu\text{M}$) あるいは GIFT-0185 ($50 \mu\text{M}$) を 15 分間それぞれ適用した。その後、再びカフェイン (Dan あるいは Dan 誘導体を含む) を同様に適用し、それにより引き起こされた拘縮の初回の拘縮に対する相対値を示した (mean \pm s.e.mean, n=6). * p < 0.05, ** p < 0.01. (vs コントロール).

つまり、骨格筋細胞に限らず一般に細胞内貯蔵庫からの Ca^{2+} 放出の生理的役割を解明するためには、Dan の分子レベルでの作用メカニズムを解決することが重要であると思われる。

本論文においていくつかの新規合成 Dan 誘導体は、室温下 ($21\text{-}23^\circ\text{C}$) において CICR には無影響でありながらも PCR (単収縮) を抑制した。この条件下で CICR に無影響であることは無傷骨格筋標本のカフェイン拘縮に影響を与えないか、抑制したとしても非常に弱いものである事実 (図 7a) からもスキンド・ファイバーというやや特殊性の高い標本でのみ見られる現象ではないことが分かる。また GIF-0185 は、CICR 抑制作用は示さないものの、Dan の CICR への作用に対して拮抗的に影響する (図 2b および 4a) ので、CICR 抑制に関係する作用点は明らかにスキンド・ファイバーで保存されていて、GIF-0185 はそれを認識している。

GIF-0185 は室温下ではスキンド・ファイバーの結果 (図 2a) に一致してカフェイン拘縮すなわち CICR をほとんど抑制しない (図 7a) のに対して 37°C では明確な抑制効果を発揮した (図 7b)。以上のことから、GIF-0185 は Dan と同じ作用部位に働くが、Dan に比べて CICR 抑制作用が室温においても 37°C においてもずっと弱いものであると考えられる。

これに対して GIF-0082 は 37°C においてもカフェイン拘縮に対する抑制は認められなかった (図 7b)。さらに室温下では単収縮 (図 2a) および Clof による Ca^{2+} 放出 (図 3a および図 4b) を強く抑制するが Dan の CICR 抑制作用については GIF-0185 とは異なって無影響 (図 4a) であることを考えると、この GIF-0082 は Dan や GIF-0185 よりももっと特異的に PCR のみを抑制する誘導体であると考えられる。この GIF-0082 は、その構造中にヨウ素を含みかつアジド基を持つことにより光親和性標識に応用可能な構造を有している。つまり今回行った生理的標本 (無傷骨格筋線維) やスキンド・ファイバーを用いた機能的な実験だけではなく分離筋小胞体や精製 RyR 等を材料とした光親和性結合実験に応用可能である。この GIF-0082 を PCR メカニズム解明のための分子プローブとして用いて、これまで未解明のまま残ってきた細胞内貯蔵 Ca^{2+} 放出機構解明のためより詳細な情報が集められるものと期待される。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導、ご校閲を賜りました埼玉医科大学薬理学教室丸山敬教授と元埼玉医科大学薬理学教室教授、現埼玉医科大学遠藤實副学長に謝意を表します。また、直接に本研究、論文執筆のご指導を賜りました埼玉医科大学薬理学教室助手池本隆昭先生に心より感謝いたします。

また、共同研究者としてご指導たまわりました、岐阜大学工学部(現岐阜大学大学院医学研究科)鈴木正昭教授、同研究科助手細谷孝充先生、同研究科の青山博史氏、平松俊行氏にも厚く御礼申し上げます。

また、最後までご協力や励ましの言葉を頂戴しました埼玉医科大学薬理学教室中原なほみ女史をはじめ、埼玉医科大学薬理学教室の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

- Chandler WK, Rakowski RF, Schneider MF. A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J Physiol* 1976;254:245-83.
- Melzer W, Schneider MF, Simon BJ, Szucs G. Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle. *J Physiol* 1986;373:481-511.
- Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Cambell KP. Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* 1987;262:16636-43.
- Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G. Purification and reconstitution of calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988;331:315-9.
- Saito A, Inui M, Radermacher M, Frank J, Fleischer S. Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1988;107(1):211-9.
- Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989;339:439-45.
- Hymel L, Inui M, Fleischer S, Schindler H. Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms Ca^{2+} -activated oligomeric Ca^{2+} channels in planar bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:441-5.
- Smith JS, Imagawa T, Ma J, Fill M, Campbell KP, Coronado R. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 1988;92:1-26.
- Endo, M. Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. *Curr Top Membr Transp* 1985;25:181-230.
- Meissner G. Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1984;259:2365-74.

- 11)Meissner G. Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 1986;25:244-51.
- 12)Smith JS, Coronado R, Meissner G. Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: activation by Ca^{2+} and ATP and modulation by Mg^{2+} . *J Gen Physiol* 1986;88:573-88.
- 13)Oyamada H, Iino M, Endo M. Effects of ryanodine on the properties of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibres of the frog. *J Physiol* 1993;470:335-48.
- 14)Inui M, Saito A, Fleischer S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem* 1987;262:15637-42.
- 15)Franzini-Armstrong C. Studies of the triad: I. structure of the junction in frog twitch fibers. *J Cell Biol* 1970;47:488-99.
- 16)Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, et al. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine receptor gene. *Nature* 1994;369:556-9.
- 17)Ikemoto T, Komazaki S, Takeshima H, Nishi M, Noda T, Iino M, et al. Functional and morphological features of skeletal muscle from mutant mice lacking both type 1 and type 3 ryanodine receptors. *J Physiol* 1997;501:305-12.
- 18)Endo M. The calcium-induced calcium release mechanism in skeletal muscle and its modification by drugs. In: Simmons RM, editor. *Muscle Contraction*. London: Cambridge University Press; 1992. p. 67-82.
- 19)Endo M, Ikemoto T. Regulation of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. In: Endo M, Kurachi Y, Mishina M, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology, Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors*. Vol 147. Heidelberg: Springer-Verlag; 2000. p. 581-601.
- 20)Ellis KO, Bryant SH. Excitation-contraction uncoupling in skeletal muscle by dantrolene sodium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972;274:107-9.
- 21)Ellis KO, Carpenter JF. Studies on the mechanism of action of dantrolene sodium. A skeletal muscle relaxant. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972;275:83-94.
- 22)Harrison GG. Control of the malignant hyperpyrexic syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br J Anesth* 1975;47:62-5.
- 23)Kolb ME, Horne ML, Martz R. Dantrolene in human malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1982;56:254-62.
- 24)McLennan DH, Phillips MS. Malignant hyperthermia. *Science* 1992;256:789-94.
- 25)Endo M, Yagi S, Ishizuka T, Horiuti K, Koga Y, Amaha K. Changes in the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of muscle from patient with malignant hyperthermia. *Biomed Res* 1983;4:83-92.
- 26>Ohta T, Endo M, Nakano T, Morohoshi Y, Wanikawa K, Ohga A. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in malignant hyperthermia-susceptible pig skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989;256(2 Pt 1):C358-67.
- 27>Ohta T, Endo M. Inhibition of calcium-induced calcium release by dantrolene at mammalian body temperature. *Proc Jpn Acad* 1986;62:329-32.
- 28>Kobayashi T, Endo M. Temperature-dependent inhibition of caffeine contracture of mammalian skeletal muscle by dantrolene. *Proc Jpn Acad* 1988;64:76-9.
- 29>Ohta T, Ito S, Ohga A. Inhibitory action of dantrolene on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 1990;78:11-9.
- 30>Endo M, Iino M. Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR functions by saponin treatment. *J Muscle Res Cell Motil* 1980;1:89-100.
- 31)Ikemoto T, Endo M. Properties of Ca^{2+} release induced by clofibric acid from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. *Br J Pharmacol* 2001;134:719-28.
- 32)Endo M, Iino M. Measurement of Ca^{2+} release in skinned fibers from skeletal muscle. *Methods Enzymol* 1988;157:12-26.
- 33)Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-50.
- 34)Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 1989;94:363-83.
- 35)Hosoya T, Aoyama H, Ikemoto T, Hiramatsu T, Kihara Y, Endo M, et al. $[^{125}\text{I}]$ -N-[3-Azido-5-iodo]benzyl)dantrolene and $[^{125}\text{I}]$ -N-{[3-iodo-5-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)]benzyl}dantrolene: Photoaffinity probes specific for the physiological

- Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:3263-5.
- 36) Snyder HR Jr, Davis CS, Bickerton RK, Halliday RP. 1-[(5-Arylfurylidene)amino]hydantoin. A new class of muscle relaxants. *J Med Chem* 1967;10:807-10.
- 37) Denat F, Gaspard-Iloughmane H, Dubac J. An easy one-pot synthesis of group 14 C-metallated 2 (or 3)-furan-and thiophenecarbaldehydes. *Synthesis* 1992;1992:954-6.
- 38) Stille JK. The palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organotin reagents with organic electrophiles. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1986;25:508-24.
- 39) Traube W, Hoffa E. Ueber die Hydrazinoessigsäure. II. *Chem Ber* 1898;31:162-9.
- 40) Barraclough P, Brockwell M, Caldwell AG, Demaine DA, Harris CJ, King WR, et al. Synthesis and inhibitory activity on platelet aggregation of 13'-aza and other ω -chain modified BW245C analogs. *Arch Pharm* 1994;327:307-17.
- 41) Schneider MF. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* 1994;56:463-84.
- 42) Hui CS. Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle. *J Physiol* 1983;337:509-29.
- 43) Shoshan-Barmatz V, Pressley TA, Higham S, Kraus-Friedmann N. Characterization of high-affinity ryanodine-binding sites of rat liver endoplasmic reticulum. Differences between liver and skeletal muscle. *Biochem*. 1991;276:41-6.
- 44) Partridge LD, Valenzuela CF. Ca²⁺ store-dependent potentiation of Ca²⁺-activated non-selective cation channels in rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol* 1999;521:617-27.
- 45) Seutin V, Mkahli F, Massotte L, Dresse A. Calcium release from internal stores is required for the generation of spontaneous hyperpolarizations in dopaminergic neurons of neonatal rats. *J Neurophysiol* 2000;83:192-7.
- 46) Parness J, Palnitkar SS. Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995;270:18465-72.
- 47) Palnitkar SS, Mickelson JR, Louis CF, Parness J. Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle. *Biochem J* 1997;326:847-52.
- 48) Fruen BR, Mickelson JR, Louis CF. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *J Biol Chem* 1997;272:26965-71.