

칼슘이온 감작이 포함된 Transgelin의 혈관 평활근 수축성 조절

제현곤 · 제현동*·#

CHA 의과대학고 강남차병원 소아청소년과, *대구가톨릭대학교 약학대학 약물학 교실
(Received April 23, 2009; Revised May 2, 2009; Accepted May 4, 2009)

Transgelin is Required for Agonist-induced Ca^{2+} -Sensitization in Vascular Contractility: Evidence from an Antisense Approach

Hyun Gon Je and Hyun Dong Je*·#

Department of pediatrics, CHA Gangnam Medical Center, CHA University, Seoul 135-081, Korea

*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract — The present study was undertaken to determine whether transgelin participates in the regulation of vascular smooth muscle contraction and, if so, to investigate the mechanism. By PCR homology cloning, the cDNA sequence of ferret transgelin was determined and phosphorothioate antisense and random oligonucleotides were synthesized and introduced into strips of ferret aorta by a chemical loading procedure. Treatment of ferret aorta with transgelin antisense oligonucleotides resulted in a significant decrease in protein levels of transgelin to sham- or random sequence-loaded muscles, but no change in the protein levels of actin. Contraction in response to a phorbol ester was significantly decreased in antisense-treated muscles compared to sham- or random sequence-loaded controls. Neither basal intrinsic tone nor the contraction in response to phenylephrine was significantly affected by the antisense treatment. The data indicate that transgelin plays a significant role in the regulation of contraction and suggest that in a tonically active smooth muscle transgelin may function as a signalling protein to facilitate PKC or ERK-dependent signalling rather than thick filament regulation including Ca^{2+} or calmodulin dependent regulation of myosin light chain kinase.

Keywords □ phenylephrine, phorbol ester, PKC, vasoconstriction, vasorelaxation

특정 유전자 transgelin는 수축성 평활근 세포의 세포골격성 악틴 섬유에 결합된 평활근 세포 계열에 국한된 22 kDa의 단백질이다. 이러한 특정 유전자의 생리적 기능을 연구하기 위하여 우리는 ferret 대동맥의 평활근 세포에서 transgelin의 양을 급성으로 저하시키기 위해 antisense를 이용한 인위적인 돌연변이를 시도하였다. 그런데 얻어진 결과로 판단할 때 transgelin이 평활근 수축 조절에서 중요한 역할을 수행할 것으로 생각된다. Transgelin은 출생 후 발생동안 내장 및 혈관 평활근에만 충분히 발현되는 세포골격성 단백질이며 SM22 α ,^{1,2)} transgelin,^{3,4)} WS3-10,⁵⁾ p27⁶⁾ 등으로 다양하게 명명되고 있다. 또한 transgelin은 가는 섬유의 평활근 세포 제한성 근원섬유 조절 단백질인 calponin,^{7,8)} 꼬마선충 체벽 근육단백 Unc-87,⁹⁾ 초파리 근육 단백질 Mp20,¹⁰⁾ 신경제한성

단백 NP25¹¹⁾ 등과 비교할 때 일부 아미노산 서열이 동일하다. 비록 transgelin이 평활근 세포에 풍부히 발현되고 세포골격 장치에 국소화된다고 알려졌지만 그 기능에 대해서 여전히 알려진 바가 적다.

효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 칼슘과 칼모듈린에 의한 마이오신의 조절성 경사슬의 인산화를 포함하는 고전적인 평활근의 생화학적 경로에 주로 의존한다. 이들 경로의 존재는 분리된 혈관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광 측정과 전기영동적 평가로 직접적으로 확인되었다. 혈관 평활근 수축의 개시가 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의존적 증가에 의해 전적으로 조절된다고 생각되었지만¹²⁾ 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.¹³⁻¹⁵⁾ 마이오신 경사슬 인산화는 악틴과 마이오신의 상호작용과 평활근 수축을 촉진한다. 그런데 마이오신 경사슬 인산화나 수축의 정도는 세포내 칼슘이온농도와 언제나

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3615 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) hyundong@cu.ac.kr

평행하지는 않다. 효능약 자극에 의한 마이오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높고, 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹⁶⁾ 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제 또는 기는 미세섬유성 조절 등이 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.¹⁷⁻²¹⁾

혈관 평활근 수축이 칼슘의존성 및 비의존성으로 조절되므로 가역적 막투과성 증가라는 간편한 돌연변이 유도를 통한 transgelin 발현 억제가 혈관 평활근 수축성을 조절하는지를 조사하였다.²²⁾ 따라서 이번 연구의 목적은 antisense 삽입 방법을 이용하여 transgelin의 단백 발현을 급성으로 억제하여 transgelin이 칼슘이온감각과 관련된 혈관 평활근 수축성 조절에 참여하는지를 연구하고 또한 antisense를 이용한 간편한 돌연변이 유발의 유용성을 확인하는 것이다.

실험방법

재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Potassium chloride(Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium bicarbonate(Sigma), phenylephrine hydrochloride(Sigma), D-(+)-glucose(Sigma), dithiothreitol(Fisher), trichloroacetic acid(Fisher), ECL(Pierce), DPBA(ICN Biomedicals), 페릿(Marshall 농장). 또한 Transgelin, 생쥐 IgM 또는 토끼 IgG에 대한 일차 또는 이차 항체는 Cell Signaling Technology 또는 Upstate에서 구입되었다. 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs 용액이나 생리식염수에 첨가되었다.

Antisense 제조, 삽입 및 조직 배양

페릿 대동맥 transgelin의 전체 RNA에 대해 RT-PCR이 수행되었고 일부에 대한 antisense 5f-GCC CAT CTG CAG CCC GAT GAC-3f 및 sense 5f-GTC ATC GGG CTG CAG ATG GGC-3f sequences가 Millipore Expedite nucleic acid synthesis system으로 제조되어 30% ammonium hydroxide와 Poly-Pak cartridge(Glen Research, Sterling, VA, USA)로 분리 및 정제되었다. 그 다음 대동맥 조각들이 4가지 종류의 용액에 2°C로 30~120분씩 담겨 있게 되었다. 즉 용액 I: EGTA 10 mM, Na₂ATP 5 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 2 mM, Tes 20 mM, 용액 II: EGTA 0.1 mM, Na₂ATP 5 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 2 mM, Tes 20 mM, antisense oligodeoxynucleotide 25 μM, 용

액 III: EGTA 0.1 mM, Na₂ATP 5 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM, Tes 20 mM, 용액 IV: NaCl 120 mM, KCl 5.8 mM, dextrose 11 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgCl₂ 10 mM, NaH₂PO₄ 1.4 mM(pH 7.0). 이렇게 삽입 및 조직 배양을 4일 반복하면서 총 5일간 혈관 수축성을 관찰하였다.

대동맥 적출

본 실험은 US National Institute of Health(NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다. 중부 절개로 흉곽이 열렸고 수술도구로 심장과 주변 부위를 노출시켰다. 심장과 폐는 분리되지 않았고 대동맥 적출을 위한 충분한 공간을 확보하기 위해 좌측으로 밀어서 생리식염수로 적셔진 천으로 덮었다. 대동맥은 간 근처에서 심장부근까지 적출되었고 즉시 차가운 Krebs 용액에 담겨졌다. 대동맥내 혈액과 각종 결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌다.

기계적 활성 측정

동맥의 고리 조각은 2개의 금속 갈고리로 수조내 현수되었다. 아래쪽 갈고리는 수조바닥에 고정되었고 위쪽 갈고리는 등장력 변환기에 연결되었다. 등장력 변환기의 신호는 physiograph에 표시되었고 수조내 용액은 37°C에서 95% O₂와 5% CO₂로 포화되었다. Krebs 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 118.4; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.18; NaHCO₃, 25; KH₂PO₄, 1.2; glucose, 11.7. 용액의 최종 pH는 7.4~7.5로 유지되었다. 1시간의 평형기간동안 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절되었다. 평형기간 후 대동맥 고리는 50 mM KCl로 자극되었고 근육이 충분히 수축할 경우 실험이 시작되었다. 용량-반응 곡선을 얻기 위해 혈관 수축제들이 수조내로 투여되었다. 결과는 50 mM KCl에 의한 대조수축의 %로 표시되었다.

Western blot 분석 analysis

동맥 조직이 5일째에 신속히 냉각되어 20 mM Mops, 4% SDS, 10% glycerol, 10 mM DTT, 20 mM β-glycerophosphate, 5.5 μM leupeptin, 5.5 μM pepstatin, 20 KIU aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 100 μM ZnCl₂, 20 μM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride(AEBSF) 및 5 mM EGTA 등이 포함된 완충액에서 균질화되었다. 샘플을 전기영동 후 PVDF 막에 옮기고 항체를 부착시켜 발광시키고 밴드를 확인하였다.

통계 분석

모든 실험결과들은 평균 ± 표준오차로 나타내었고 통계 처리는 Student's t-test를 실시하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

```

CGGGCCCCGGCCCCGGCGCCACTCGGCCCGCAGGCCCGCCAGAAAGTGTATCGCGGCAACCGGCCAACGCACCCACAG      80
CCACCACTGCCCTAGGGAATGGCCAACAGGGGACCTGCCTACGGCCTGAGCCGGGAGGTGCAGCAGAAGATCGAGAAGCA      160
      M A N R G P A Y G L S R E V Q Q K I E K Q
GTACGATCGGGACCTGGAACAGATCCTGGTCCAGTGGATCACTACCCAGTGCCTGCAAGGACGTGGGCCGGCCCGCCAGCCTG      240
      Y D A D L E Q I L V Q W I T T Q C R K D V G R P Q P
GGCGTGAGAACTTCAGAACTGGCTTAAGGATGGCACGGGTGCTGTGTGAGCTCATCAATGGGCTGTACCCCGAGGGACAG      320
      G R E N F Q N W L K D G T V L C E L I N G L Y P E G Q
GCCCCGTGAAGAAGATCCAGGCCTCCACCATGGCCTTCAAGCAGATGGAGCAGATCTCCAGTTCCTGCAGGCGGCCGA      400
      A P V K K I Q A S T M A F K Q M E Q I S Q F L Q A A E
GGCGTACGGCATCAACACCACTGACATCTTCCAGACCGTGGACCTCTGGGAAGGAAAGAATATGGCCTGTGTGCAGCGGA      480
      R Y G I N T T D I F Q T V D L W E G K N M A C V Q R
CGCTGATGAACCTGGGCGGGCTGGCCGTAGCCCGGGACGATGGGCTGTTCTCTGGGGATCCCAACTGGTTTCCCAAGAAG      560
      T L M N L G G L A V A R D D G L F S G D P N W F P K K
TCCAAGGAGAACCCTCGAACTTCTCGGACAACCACTGCAGGAGGGCAAGAATGTCATCGGGCTGCAGATGGGCACCAA      640
      S K E N P R N F S D N Q L Q E G K N V I G L Q M G T N
CCGCGGGGCGTCCCAGGCCGCATGACTGGCTACGGGATGCCGCGCCAGATCCTCTGACCCCGCCCGCCAGCCCGTGCCCA      720
      R G A S Q A G M T G Y G M P R Q I L
TGGATGGTTAATATATATATATATATTTTTAGCAGTGACATTCCCCGAGAGCCCTGGGACTCTCAGACTCCCTTGGCCAG      800
      GGTGGGGGGCCCGGCTGCCTCCTCTGGGGTGCCCGGTGGCAGGCCCGCCCGCCCGTGTACTAATACATTCCCTTCTT
CAAACCCACAAAACCTGGACCAACTGGCCTCCTTCTCTGGGACCAAAAGTGGGGGCGCTCGCCGCTGCAGGCCCAT      960
      AGCTCTTCTTTCCCTTTGGCTTCTTTCCGCTCTGAGCTCTGCCCTCAATCTGTTCTCGGCTGGGGTCCGAGACCCT
GCCTTCTGGCCTTCTCTCGCCTCGCCCTTAGCCGGGCTGCAGGGACTTCATTATAGGGAGAGGCCCTGGGGCGGTGGC      1120
      CACCGGCCCGGCTGGGCTGCCGTCACACACAGGAGCGGTCTACCCCTGGCGGCGCCTTCTCTCCAGCTTCCCTT
CTCCGTTCCCTGTGTGTGGCTACGGGTTGGGGTGGAGGGACAGGACTGCGACCATGGGCTGGGGCTCGAAGAACCTGA      1280
      GTTGTGATTTCAATAAATATCTTCTTGTCTTTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

Fig. 1 – Nucleotide and deduced amino acid sequence of ferret transgelin as determined with a full-length cDNA clone isolated from a ferret aorta cDNA library. Amino acid residues are given in one-letter code above the respective codons. The numbers on the right represent the nucleotide position. Antisense oligonucleotide used in the study is from the region underlined.

실험결과

페릿 transgelin에 대한 부분 복제

페릿 대동맥 transgelin의 전체 RNA에 대해 RT-PCR이 수행되었고 일부에 대한 antisense 5fi-GCC CAT CTG CAG CCC GAT GAC-3fi 및 sense 5fi-GTC ATC GGG CTG CAG ATG GGC-3fi sequences가 제조되었다(Fig. 1). 전체 RNA는 TRIzol reagent(Gibco BRL)와 cDNA synthesis kit(Clontech)로 페릿 대동맥에서 확인되었다. 따라서 염기 서열 및 관련 아미노산 서열이 제시되고 있다(Fig. 1).

Transgelin의 단백 발현 수준에 대한 antisense의 효과

용액 I, II, III, IV에서 antisense 삽입 및 조직 배양을 4일 반복하면서 총 5일간 혈관 수축성이 관찰된 내피가 제거된 페릿 대동맥에서 일부 유전자에 대한 antisense는 transgelin의 단백 발현을 유의하게 감소시켰지만(Fig. 2) actin에 대해서는 억제효과가 없었다. 따라서 가역적 막투과성 증가라는 방법으로 효과를 나타내는 antisense 부착은 본 실험에서 유용하다고 판단되었다.

혈관 평활근 수축 조절에 대한 antisense의 효과

4일간 배양 후 5일째 antisense는 phenylephrine에 의한 수축에 대해 약간의 억제 효과가 관찰되었으나 유의성은 없었다(Fig. 3). 게다가 기저 장력이나 탈분극에 의한 수축에 대한 억제 효과도 없었다(data not shown). 그러나 5일째 2 mM EGTA로 칼슘

의 효과가 제거된 즉 가는 미세섬유성 조절이 주된 기전인 일종의 phorbol ester인 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate 20-acetate DPBA에 의한 수축에 대해 유의성 있는 이완 효과가 관찰되었

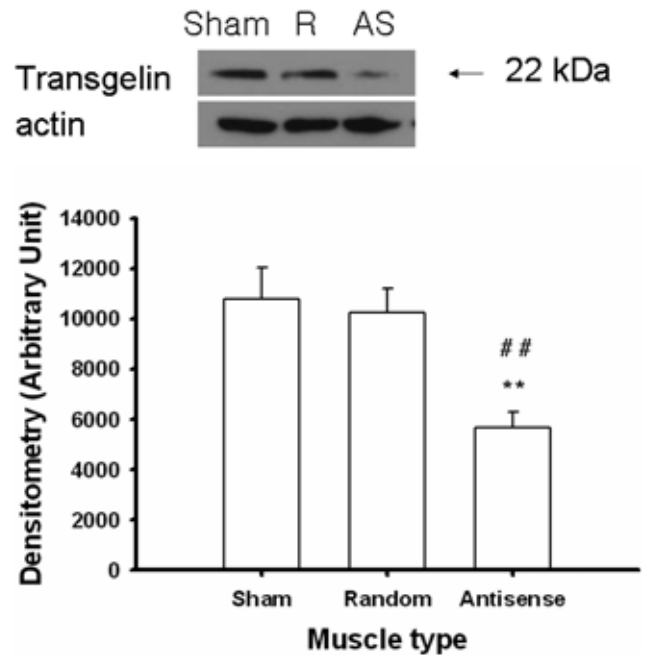


Fig. 2 – Effect of antisense to transgelin on the level of transgelin or actin. Data are expressed as means of 5-7 experiments with vertical bars showing SEM. ** $P < 0.01$, ### $P < 0.01$ versus sham or random respectively.

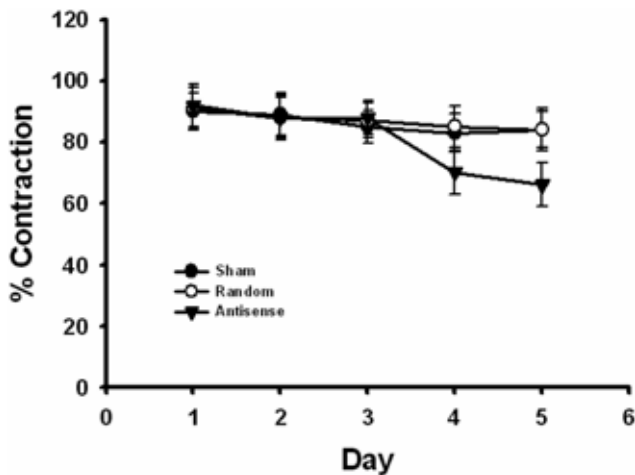


Fig. 3 – Phenylephrine-induced contraction in antisense-loaded aorta in the absence of endothelium compared to sham- or random sequence-loaded aorta during the organ culture of 5 days. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl on the same day. Data are expressed as means of 5~7 experiments with vertical bars showing SEM.

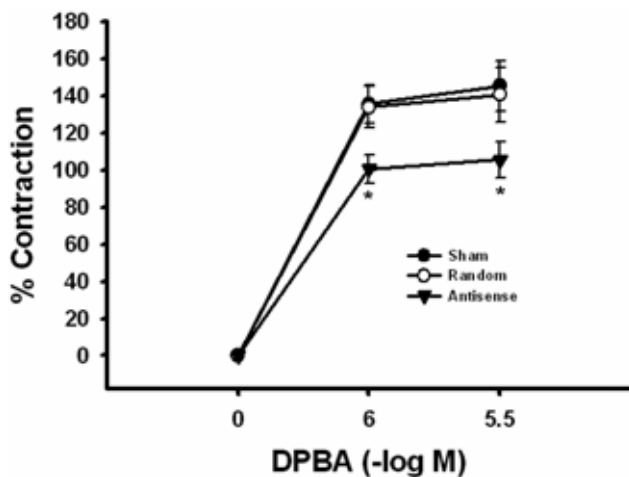


Fig. 4 – Ca^{2+} -independent phorbol ester-induced contraction on day 5 in antisense-loaded aorta in the absence of endothelium compared to sham- or random sequence-loaded aorta. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl on day 1. To make a Ca^{2+} -free solution, 3 mM EGTA was pretreated. Data are expressed as means of 5~7 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$ versus sham-loaded aorta.

다(Fig. 4).

고찰

효능약 자극에 의한 마이오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높고,

이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹⁶⁾ 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제와 얇은 섬유성 조절 등이 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.^{17,21)} 그런데 phenylephrine은 주로 칼슘에 의존성인 굵은 미세섬유성 조절을 통해 수축을 유도한다고 보고되었고 phorbol ester는 주로 칼슘에 비의존성인 가는 미세섬유성 조절을 통해 수축을 유도한다고 알려져 있다.

Phorbol ester인 DPBA는 마이오신 경사슬 인산화 증가 없이 혈관을 수축시킨다고 보고되었고 따라서 PKC, ERK, caldesmon 등의 활성화와 관련된 칼슘-비의존성인 가는 미세섬유성 조절을 포함한다고 생각된다. 반면에 phenylephrine의 경우 2 mM EGTA 처치 후 수축이 약 1/3 이하로 감소되는 것을 관찰해볼 때(data not shown) 주로 MLCK 또는 MLCP 등이 관련된 칼슘-의존성인 굵은 미세섬유성 조절을 포함하는 것으로 생각된다. 그런데 페릿 대동맥에서 antisense 삽입은 transgelin의 단백 발현을 유의하게 감소시켰다(Fig. 2). 또한 내피에서 유래되는 혈관 확장성 물질의 간섭 효과를 차단하기 위해 내피가 제거된 페릿 대동맥에서 antisense는 phenylephrine에 의한 수축에 대해 억제 효과가 없었고 따라서 내인성 transgelin이 칼슘 의존성 기전에 대해 조절 효과가 없다고 생각되었다(Fig. 3). 그런데 phorbol ester에 의한 수축에 대해 이완 효과가 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 내인성 transgelin이 소위 칼슘이온 감각을 유도하여 혈관 수축성을 조절한다고 생각되며 관련 기전으로는 마이오신 탈인산화효소의 억제 보다는 칼슘 비의존성 기전을 조절한다고 판단된다.

본 실험에서는 특정 종 페릿 transgelin의 기능을 조사하기 위해 해당 transgelin 일부에 대한 antisense 삽입 및 조직 배양을 수행하여 transgelin 유전자 단백 발현을 급성으로 억제하였고 저하된 transgelin은 특이적으로 혈관 수축성을 조절하였다. 보상기전이 발동될 수 있는 유전적으로 해당 단백 발현이 완전히 결여된 유전자 변형 동물에 비해 antisense 삽입 방법은 일부 유전자의 기능이 남아 있고 또한 보상적인 타유전자의 발현 증가 없이 순수하게 해당 유전자의 기능을 비교할 수 있는 장점이 있다.

결론

본 실험에서는 페릿 transgelin의 기능을 조사하기 위해 transgelin 일부에 대한 antisense 삽입 및 조직 배양을 수행하여 유전자 단백 발현을 급성으로 일부 억제하였고 저하된 transgelin은 PKC 또는 ERK 등의 활성화와 관련된 칼슘-비의존성인 가는 미세섬유성 조절이 포함된 특이적 방법으로 칼슘이온 감각을 유도하여 혈관 수축성을 조절하였다.

참고문헌

- 1) Lees-Miller, J. P., Heeley, D. H. and Smillie, L. B. : An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles. Purification from bovine aorta. *Biochem. J.* **244**, 705 (1987).
- 2) Shanahan, C. M., Weissberg, P. L. and Metcalfe, J. C. : Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **73**, 193 (1993).
- 3) Lawson, D., Harrison, M. and Shapland, C. : Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil. Cytoskel.* **38**, 250 (1997).
- 4) Bregant, E., Renzone, G., Lonigro, R., Passon, N., Di Loreto, C., Pandolfi, M., Scaloni, A., Tell, G. and Damante, G. : Down-regulation of SM22/transgelin gene expression during H9c2 cells differentiation. *Moll. Cell. Biochem.* 2009 Feb 18. [Epub ahead of print].
- 5) Thweatt, R., Lumpkin, C. K. and Goldstein, S. : A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1 (1992).
- 6) Almendral, J. M., Santaren, J. F., Perera, J., Zerial, M. and Bravo, R. : Expression, cloning and cDNA sequence of a fibroblast serum-regulated gene encoding a putative actin-associated protein (p27). *Exp. Cell. Res.* **181**, 518 (1989).
- 7) Samaha, F. F., Ip, H. S., Morrissey, E. E., Seltzer, J., Tang, Z., Solway, J. and Parmacek, M. S. : Developmental pattern of expression and genomic organization of the calponin-h1 gene; a contractile smooth muscle cell marker. *J. Biol. Chem.* **271**, 395 (1996).
- 8) Takahashi, K. and Nadal-Ginard, B. : Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J. Biol. Chem.* **266**, 13284 (1991).
- 9) Goetinck, S. and Waterston, R. H. : The *Caenorhabditis elegans* muscle-affecting gene *unc-87* encodes a novel thin filament associated protein. *J. Cell Biol.* **127**, 79 (1994).
- 10) Ayme-Southgate, A., Lasko, P., French, C. and Pardue, M. L. : Characterization of the gene for mp20: a *Drosophila* muscle protein that is not found in asynchronous oscillatory flight muscle. *J. Cell Biol.* **108**, 521 (1989).
- 11) Ren, W., Ng, G. Y. K., Wang, R.-X., Wu, P. H., O'Dowd, B. F., George, S., Osmond, D. H. and Liew, C. : The identification of NP25: a novel protein that is differentially expressed by neuronal subpopulations. *Mol. Brain Res.* **22**, 173 (1994).
- 12) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 13) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
- 14) Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. and Narumiya, S. : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994 (1997).
- 15) Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. and Takuwa, Y. : Ca^{2+} -dependent activation of Rho and Rho-kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* **93**, 548 (2003).
- 16) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 17) Kitazawa, T., Masuo, M. and Somlyo, A. P. : Protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9307 (1991).
- 18) Gohla, A., Schultz, G. and Offermanns, S. : Roles for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.* **87**, 221 (2000).
- 19) Leung, T., Manser, E., Tan, L. and Lim, L. : A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29051 (1995).
- 20) Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. : Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* **15**, 2208 (1996).
- 21) Wier, W. G. and Morgan, K. G. : 1-Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**, 91 (2003).
- 22) Kim, I., Je H. D., Gallant, C., Zhan, Q., Ripper, D. V., Badwey, J. A., Singer, H. A. and Morgan, K. G. : Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta. *J. Physiol.* **526**, 367 (2000).