

琉球大学学術リポジトリ

[総説]Dihydrobiopterin による内皮型一酸化窒素合成酵素機能障害

メタデータ	<p>言語:</p> <p>出版者: 琉球医学会</p> <p>公開日: 2015-04-24</p> <p>キーワード (Ja):</p> <p>キーワード (En):</p> <p>作成者: 野口, 克彦, 濱館, 直史, 松崎, 俊博, 坂梨, まゆ子, 仲宗根, 淳子, 内田, 太郎, 新垣, 久美子, 久保田, 陽秋, 石内, 勝吾, 益崎, 裕章, 須加原, 一博, 大屋, 祐輔, 坂梨, 又郎, 筒井, 正人, Noguchi, Katsuhiko, Hamadate, Naobumi / 浜館, 直史 / 濱館, 直史 / 浜館, 直史, Matsuzaki, Toshihiro / 松崎, 俊博, Sakanashi, Mayuko, Nakasone, Junko, Uchida, Taro, Arakaki, Kumiko, Kubota, Haruaki, Ishiuchi, Shogo, Masuzaki, Hiroaki, Sugahara, Kazuhiro, Ohya, Yusuke, Sakanashi, Matao, Tsutsui, Masato</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002017764

Dihydrobiopterin による内皮型一酸化窒素合成酵素機能障害

野口 克彦¹⁾, 濱舘 直史¹⁾, 松崎 俊博¹⁾, 坂梨 まゆ子¹⁾, 仲宗根 淳子¹⁾,
内田 太郎¹⁾, 新垣 久美子²⁾, 久保田 陽秋³⁾, 石内 勝吾⁴⁾, 益崎 裕章⁵⁾,
須加原 一博³⁾, 大屋 祐輔²⁾, 坂梨 又郎¹⁾, 筒井 正人¹⁾

¹⁾琉球大学大学院医学研究科薬理学, ²⁾循環器・腎臓・神経内科学,
³⁾麻酔科学, ⁴⁾脳神経外科学, ⁵⁾内分泌代謝・血液・膠原病内科学

(2013年2月26日受付, 2013年4月9日受理)

Impairment by dihydrobiopterin of endothelial nitric oxide function in vivo

Katsuhiko Noguchi¹⁾, Naobumi Hamadate¹⁾, Toshihiro Matsuzaki¹⁾,
Mayuko Sakanashi¹⁾, Junko Nakasone¹⁾, Taro Uchida¹⁾,
Kumiko Arakaki²⁾, Haruaki Kubota³⁾, Shogo Ishiuchi⁴⁾,
Hiroaki Masuzaki⁵⁾, Kazuhiro Sugahara³⁾, Yusuke Ohya²⁾,
Matao Sakanashi¹⁾ and Masato Tsutsui¹⁾

*Departments of ¹⁾Pharmacology, ³⁾Anesthesiology, and ⁴⁾Neurosurgery,
and ⁵⁾Second and ²⁾Third Departments of Internal Medicine, Graduate
School of Medicine, University of the Ryukyus*

ABSTRACT

Dihydrobiopterin (BH2), an oxidized form of tetrahydrobiopterin (BH4) which is an essential cofactor of nitric oxide synthase, has been reported to be elevated in association with oxidative stress-related cardiovascular disorders such as hypertension and diabetes. However, the role of BH2 in the regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity in vivo remains unknown. Thus, we aimed to clarify whether increasing intracellular BH2 levels causes eNOS dysfunction in rats. The BH2 precursor sepiapterin (SEP) was intravenously given after administration of the specific dihydrofolate reductase inhibitor methotrexate (MTX) to block intracellular conversion of BH2 to BH4. MTX/SEP treatment markedly augmented aortic BH2 levels by 8.7-fold but did not affect aortic BH4 levels compared with control (saline) treatment. MTX alone did not significantly alter BH4 or BH2 levels. MTX/SEP, but not MTX alone, impaired vasodilator responses induced by acetylcholine (ACh), an endothelium-dependent vasodilator, and also attenuated ACh-induced relaxations of isolated aortas, indicating impairment of endothelial function. Importantly, MTX/SEP treatment significantly enhanced NOS inhibitor-sensitive superoxide production, suggesting the involvement of eNOS uncoupling. MTX/SEP treatment modified the eNOS phosphorylation state into a reduced eNOS activity. The present data indicate that BH2, even in the absence of BH4 deficiency, causes impairment of eNOS function in vivo, and suggest a novel role of BH2 in endothelial dysfunction. *Ryukyu Med. J.*, 32(1,2)7~12, 2013

Key words: tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin, endothelial function, acetylcholine, nitric oxide synthase

諸言

一酸化窒素 (NO) は、内皮由来血管弛緩因子としてだけでなく、生体の恒常性維持や病態で大変重要な役割をもつことが知られているシグナル分子である。内因性 NO を産生する NO 合成酵素は、基質である L-arginine を、中間体である N-hydroxy-L-arginine を経て、酸化することによって citrulline とともに NO を生成する。

内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の構造と機能を示した模式図 (Fig. 1) にあるとおり、NO 合成酵素は、reductase domain と oxygenase domain からなるホモダイマーを形成しており、reductase domain からの電子を oxygenase domain のヘムに運ぶことによって L-arginine を活性化し、NO を生成する。この NO 合成酵素の本来の機能である NO 生成には、cofactor である tetrahydrobiopterin (BH4) の存在が必須である。ところが、高脂血症・糖尿病・喫煙などの酸化ストレスを伴う心血管疾患や生活習慣では、BH4 が減少していることが報告されている¹⁾。そのような状態 (BH4 不足の状態) では、eNOS は L-arginine を酸化することができず、本来生成すべき NO の代わりに活性酸素であるスーパーオキシドを産生してしまう²⁾。つまりこのような状況下では NO 合成酵素は、スーパーオキシド産生酵素として機能することになる。これを eNOS の uncoupling と呼び、これら病態における血管内皮機能障害の重要な機序のひとつとされている (Fig. 1)。すなわち、BH4 の不足は eNOS uncoupling を引き起こすと考えられている。

NO 合成酵素の必須 cofactor である BH4 は、プテリジン骨格内の 5, 6, 7, 8 位の 4 箇所が水素化された構造を持っているが、BH4 が酸化されるとプテリジン骨格の 5, 6 位の水素が取れ、7,8-dihydrobiopterin (BH2) となる (Fig. 2)。糖尿病・高血圧症などの心血管疾患では、BH4 の酸化型である dihydrobiopterin (BH2)

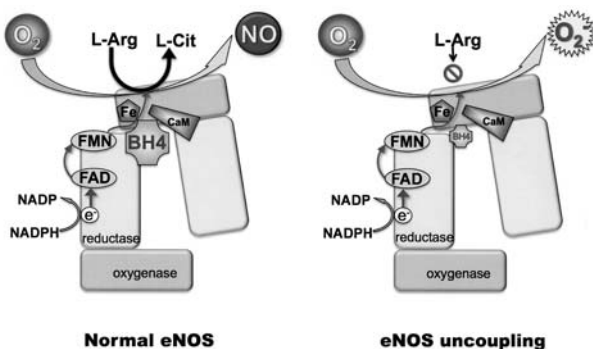


Fig. 1 Structure and function of normal endothelial nitric oxide synthase (eNOS; left panel) and uncoupled eNOS (right panel)

が増加することが観察されている^{3,4)}。しかし、これまで生体位における BH2 の役割についてはほとんど調べられていない。

そこで、私たちは、BH2 自体の作用について明らかにするため、BH4 生合成経路 (Fig. 3) の salvage 経路にあって BH2 の前駆物質である sepiapterin と、細胞内で BH2 から BH4 への変換を行う dihydrofolate reductase (DHFR) の選択的阻害薬 methotrexate (MTX) を併用した。これにより、生体内 BH2 レベルを増加させ、このときの内皮機能への影響を調べ、さらに今回はその機序についての検討の結果を併せて紹介する。

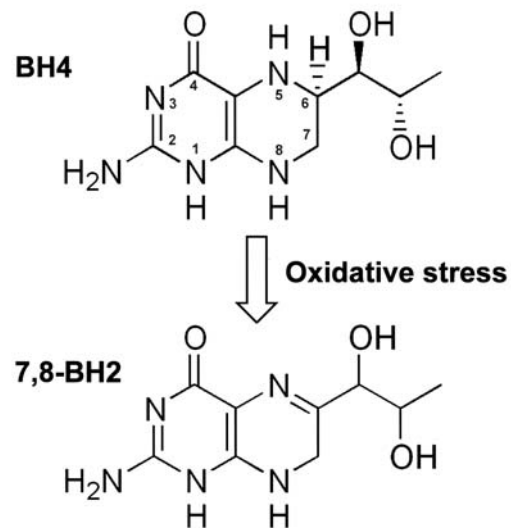


Fig. 2 Chemical structures of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) and 7,8-dihydrobiopterin (BH2)

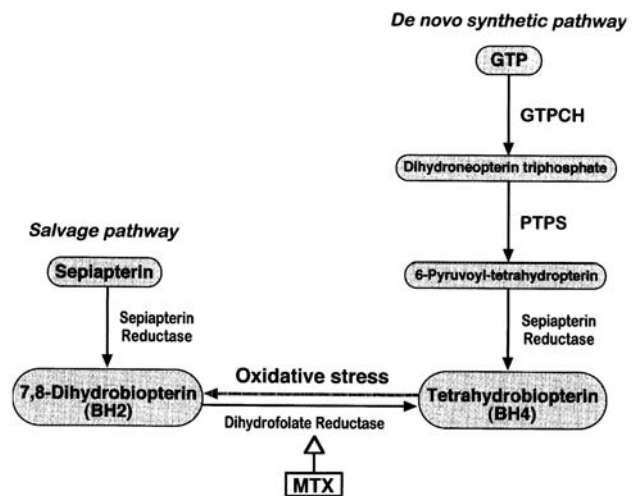


Fig. 3 Biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin (BH4) GTPCH, GTP cyclohydrolase I; PTPS, 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase; MTX, methotrexate

方 法

実験には、体重350-520gの雄性 Wistar 系ラットを使用した。MTX (5 mg/kg i.p.), またはその溶媒である PBS (pH7.4) 5 ml/kg は, sepiapterin (0.3 mg/kg i.v.) の4時間前に投与し, sepiapterin 投与後の影響を調べた。溶媒のみを投与した Control 群, MTX のみを投与した MTX 単独群, MTX と sepiapterin をともに投与した併用群の3群で検討した。なお, 本研究の動物実験計画は, 琉球大学動物実験委員会の承認を得ており, 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に準じて実施された。

[BH4測定] 摘出した胸部大動脈の組織中 BH4含量を, Fukushima & Nixon (1980)⁵⁾の方法に準じ HPLC を用いて測定した。BH4量は, 酸性条件下でのヨウ素酸化反応による biopterin 量 (total biopterin = BH4 + BH2 + biopterin) とアルカリ条件下でのヨウ素酸化反応による biopterin 量 (BH2 + biopterin) との差から算出した。なお, 生体中の biopterin 量は, 無視できるほど微量であることからアルカリ条件下での値を BH2量とした⁶⁾。

[血行動態の測定] ラットをペントバルビタール麻酔後, 大動脈圧 (BP) を頸動脈に挿入したカテーテルを介して圧トランスデューサにより, 大腿動脈血流量 (FVB) を超音波血流計によりそれぞれ測定した。大腿部血管抵抗は次式により算出した: (FVR = mean BP/ FVB)。Sepiapterin 投与後30分以降に, 内皮依存性血管拡張薬である acetylcholine (ACh) と内皮非依存性血管拡張薬 (NO 放出薬) である sodium nitroprusside の静注による降圧反応と末梢血管抵抗の反応を調べた。

[摘出大動脈実験] エーテル麻酔下に摘出した大動脈からリング標本作製し, Krebs-Henseleit 液 (37 °C, 95% O₂+5% CO₂) 中に懸垂した後, 等尺性張力変化を記録した。Phenylephrine (10⁻⁶ M) による拘縮に対する ACh (10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ M), あるいは sodium nitroprusside (10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁵ M) の弛緩反応を調べた。

[スーパーオキシド産生の測定] 胸部大動脈リング標本を 5 μM lucigenin を含んだ Krebs-HEPES 液中におき, 誘発された化学発光を, luminometer (MiniLumat LB9506) により測定した。

[ウエスタンブロッティング] 液体窒素で凍結した胸部大動脈をガラスホモジナイザーでホモジナイズし, 遠心後上清 (50 μg protein) を分析に使用した。一次抗体は, 次のものを使用した。eNOS (BD Transduction Laboratories), phosphorylated eNOS at Ser¹¹⁷ (BD Transduction Laboratories), phosphorylated eNOS at Thr⁴⁹⁵ (BD Transduction Laboratories), および β -actin (Amersham-GE Healthcare)。

[統計] 用量反応データは, 反復測定分散分析で行い, 多群間の比較は一元配置分散分析と Dunnett の post-

hoc test で行った。対応のない2群の比較は, unpaired Student's *t*-test で行った。統計学的有意さの水準は, $P < 0.05$ とした。すべてのデータは, 平均値 \pm SE で示した。

結 果

大動脈中の BH4, BH2の含量を HPLC 法で測定し各群で比較したところ (Fig. 4), MTX-sepiapterin 併用群では, BH4含量の変化を伴わずに, BH2の含量は, 対照群の8.7倍の著明な増加を示した ($P < 0.01$)。しかし, BH4含量には, 各群間で有意の差は認められなかった。BH4/BH2比は, MTX-sepiapterin 併用群で著明に低下し ($P < 0.01$), MTX 単独群でも有意の減少が認められた ($P < 0.01$)。

各群のベースラインの血圧は, MTX-sepiapterin 併用群でのみ, 対照群に比べ軽度ながら有意の血圧上昇が認められた。また, 血圧は, BH2含量が増加すればするほど上昇することを示していたが, BH4含量と血圧との間には, 有意の相関はみられなかった。

内皮依存性血管拡張薬の ACh による降圧反応と血管拡張反応は, MTX 単独群では有意の影響はみられなかったが, MTX-sepiapterin 併用群では, 有意の減弱 ($P < 0.05$) が認められ, 内皮機能障害を生じていることを示した (Fig. 5)。一方, 内皮非依存性血管拡張薬の nitroprusside による反応にはどちらの群にも有意の影響はみられなかったことから, NO による血管拡張能自体には差がないと考えられた。さらに, 摘出大動脈標本を用いた検討でも, in vivo での結果と同様に, 併用群で ACh による血管弛緩反応に有意の選択的減弱 ($P < 0.05$) がみられたが, nitroprusside による血管弛緩反応には有意の影響はみられなかった (Fig. 6)。これらの結果から, 血管内 BH2の増加は, 内皮機能障害を引き起こすことが示唆された。

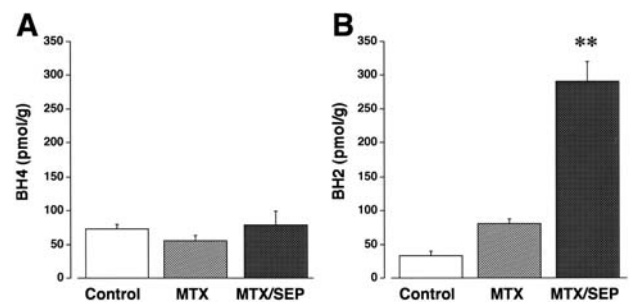


Fig. 4 Tetrahydrobiopterin (BH4; A) and dihydrobiopterin (BH2; B) in the aorta in control, methotrexate (MTX) alone and MTX/SEP groups

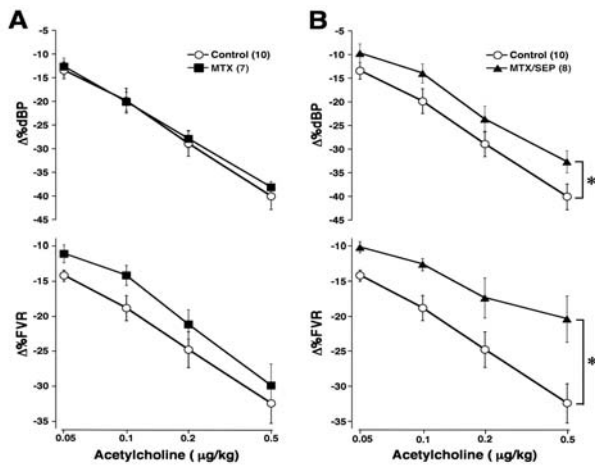


Fig. 5 Responses of diastolic aortic pressure (dBP) and femoral vascular resistance (FVR) to i.v. acetylcholine in control, methotrexate (MTX) alone (A) and MTX/SEP (B) groups

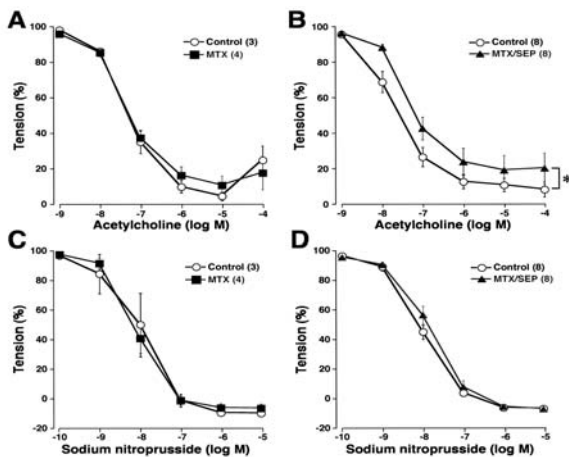


Fig. 6 Vasorelaxation to acetylcholine (A and B) and sodium nitroprusside (C and D) in phenylephrine-precontracted aortic segments isolated from rats in control, methotrexate (MTX) alone and MTX/SEP groups

MTX-sepiapterin 併用群でみられた ACh による摘出大動脈標本での血管弛緩反応の減弱は、スーパーオキシド消去剤の superoxide dismutase 処置により有意に改善され ($P < 0.05$), MTX-sepiapterin 処置による内皮機能障害にスーパーオキシドが関与することが示唆された。そこで、大動脈内スーパーオキシド産生量を化学発光法で測定したところ、併用群では、コントロール群に比べ有意のスーパーオキシド産生亢進が認められた ($P < 0.05$)。このスーパーオキシド産生は、NO 合成酵素阻害薬の L-NAME で抑制されたことから、eNOS 由来であること、すなわち MTX-sepiapterin 併用群の eNOS は uncoupling 状態であることが示唆された。

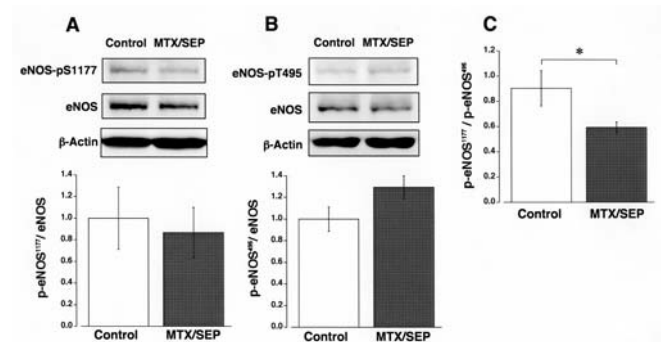


Fig. 7 Western blots of eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ (A) and at Thr⁴⁹⁵ (B), and ratios of eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ to that at Thr⁴⁹⁵ (C) in aortic segments isolated from control or MTX/SEP rats

つぎに、BH2の増加がどのようにして eNOS の uncoupling を引き起こすのかを調べるため、eNOS の活性調節に影響するリン酸化状態をウエスタンブロッティング法で検討した (Fig. 7). eNOS の活性亢進を引き起こす eNOS のリン酸化部位である Ser1177 のリン酸化は、併用群で抑制傾向がみられ、逆に eNOS 活性を抑制するリン酸化部位の Thr495 のリン酸化は増加傾向がみられ、これらの比 ($p\text{-eNOS}^{1177}/p\text{-eNOS}^{495}$) は併用群で対照群に比べ有意の減少を示した ($P < 0.05$)。このことから、BH2による eNOS の活性障害の機序として、リン酸化状態の変化が関与する可能性が示唆された。

考 察

今回の研究で私達は、eNOS の必須 cofactor である BH4 生合成の salvage 経路 (Fig. 3) において細胞内で BH2 を経て BH4 を生成する sepiapterin、および dihydrofolate reductase (DHFR) の選択的阻害薬 methotrexate (MTX) を併用することによって、細胞内 BH4 の変化を伴わずに BH2 のみを増加させることに成功した。その結果、短期間の細胞内 BH2 増加それ自体で BH4 レベルと無関係に、おそらく eNOS の uncoupling を介して内皮機能不全が引き起こされることを *in vivo* で見出した。従来、eNOS uncoupling は、BH4 が不足したときに生じると考えられてきた。しかし、今回私たちは、BH2 の増加が起こると、BH4 の不足がなくても、eNOS uncoupling が起こる可能性のあることを示した。このことは、eNOS uncoupling の、すなわち eNOS 活性調節の、新たな機序を示唆するものである。

本研究と同様に、これまでの酸化ストレスが関与するとされている種々の病態モデル、例えば高フラクトース食負荷による2型糖尿病モデルラット³⁾、自然発症肥満2

型糖尿病モデルである db/db マウス⁷⁾, Dahl 食塩感受性高血圧ラット⁸⁾, ヒツジの肺高血圧モデル⁹⁾, 肥満2型糖尿病モデルラットである Zucker Diabetic Fatty ラット¹⁰⁾で, 血管内 BH2 含量の増加とスーパーオキシド産生亢進が報告されている. 従来, これら病態でみられた血管内皮細胞機能障害の機序として, BH4 の相対的不足, すなわち BH4/BH2 比の減少による eNOS uncoupling のためと説明されてきた. しかし, 著者らの以前の研究^{11,12)}で, eNOS 機能障害と BH4/BH2 比の減少とは必ずしも関連せず, むしろ血管内 BH2 含量の増加と関連することを示した. また, 今回の実験でも, MTX 単独群で BH4/BH2 比の明らかな減少にも関わらず eNOS 機能には全く影響がみられなかった. このことは, これら病態でも血管内皮細胞機能不全の原因に BH2 の増加自体が関与する可能性を示唆するものである.

著者らは, 今回の研究で, 内因性の BH2 を増加させるために DHFR の選択的阻害薬 MTX を使用して BH4 生合成経路の salvage 経路を抑制したが, DHFR 活性や発現量の減少がアンジオテンシン負荷¹³⁾や心臓の虚血再灌流時¹⁴⁾に起こることが報告されている. このような状況に, BH2 を増加させるような酸化ストレスが加われば, 今回の実験と同様な状態が起こりうることを示唆している. 最近, salvage 経路, とくに DHFR の活性が eNOS 機能障害の決定因子として重要であることがいくつかの *in vitro* の実験で指摘されている^{13,15,16)}. 本研究では, MTX 単独群では, BH4 含量と内皮機能に影響がみられなかったことから, 少なくとも今回用いた投与量の MTX を投与された健常ラットでは, eNOS 機能調節における salvage 経路の役割は大きくないと思われた. しかし, 糖尿病や高血圧, 動脈硬化などの病態では, DHFR の寄与が増大することが予想される. 今後, MTX 活性の阻害や BH2 の増加による短期的な影響だけでなく, これら病態の動物モデルを用いて長期間にわたる影響を明らかにすることが必要かもしれない.

今回の検討で, 血管内 BH2 含量の増加は eNOS のリン酸化状態に有意の影響を与えることが明らかとなった. 同様に, 細胞内 BH2 含量の増加が eNOS の Ser116 の脱リン酸化を引き起こし, eNOS による NO 産生抑制と活性酸素生成を生じるという観察が, 培養血管内皮細胞で報告されている¹⁶⁾. しかし, どのような分子機構で BH2 が eNOS リン酸化に影響するのかについては不明である. したがって, eNOS リン酸化に影響することが知られている分子種 (ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/Akt, プロテインキナーゼ C, プロテインキナーゼ A, AMP 活性化キナーゼ, カルモジュリンキナーゼなど) の発現状態について今後調べることが必要と思われる. さらに, eNOS 活性調節の分子機序は, 転写調節と転写後調節に分けられるが, 転写後調節に関わる要素だけでも, eNOS の細胞内局在, 細胞内 Ca²⁺-calmodulin 結合, S-ニトロシル化, caveolin-1・dyna-

min・分子シャペロンであるヒートショックプロテイン Hsp90・G たんぱく質共役受容体等の eNOS associated protein などがリン酸化以外にも知られており多岐にわたる. BH2 の eNOS 活性調節における詳細な役割を明らかにするためには, これら要素に対する検討も今後の課題と考えられる.

結 語

本研究の結果から, BH2 の血管内含量の増加は, それ自体で, *in vivo* における eNOS 機能障害を引き起こすこと. そして, その機序として, おそらく eNOS の uncoupling の関与が示唆された¹⁷⁾.

謝 辞

本研究は, JSPS 科研費 24590324 の助成を受けたものである.

文 献

- 1) Förstermann U. and Münzel T.: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 113: 1708-1714, 2006.
- 2) Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P. and Pritchard K.A., Jr.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 9220-9225, 1998.
- 3) Shinozaki K., Kashiwagi A., Nishio Y., Okamura T., Yoshida Y., Masada M., Toda N. and Kikkawa R.: Abnormal bipterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*. 48: 2437-2445, 1999.
- 4) Landmesser U., Dikalov S., Price S.R., McCann L., Fukai T., Holland S.M., Mitch W.E. and Harrison D.G.: Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 111: 1201-1209, 2003.
- 5) Fukushima T. and Nixon J.C.: Analysis of reduced forms of bipterin in biological tissues and fluids. *Anal. Biochem*. 102: 176-188, 1980.
- 6) Sawabe K., Wakasugi K.O. and Hasegawa H.: Tetrahydrobiopterin uptake in supplemental administration: elevation of tissue

- tetrahydrobiopterin in mice following uptake of the exogenously oxidized product 7,8-dihydrobiopterin and subsequent reduction by an anti-folate-sensitive process. *J Pharmacol Sci.* 96: 124-133, 2004.
- 7) Pannirselvam M., Simon V., Verma S., Anderson T. and Triggle C.R.: Chronic oral supplementation with sepiapterin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in small mesenteric arteries from diabetic (db/db) mice. *Br J Pharmacol.* 140: 701-706, 2003.
 - 8) Taylor N.E., Maier K.G., Roman R.J. and Cowley A.W., Jr.: NO synthase uncoupling in the kidney of Dahl S rats: role of dihydrobiopterin. *Hypertension.* 48: 1066-1071, 2006.
 - 9) Grobe A.C., Wells S.M., Benavidez E., Oishi P., Azakie A., Fineman J.R. and Black S.M.: Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290: L1069-L1077, 2006.
 - 10) Crabtree M.J., Smith C.L., Lam G., Goligorsky M.S. and Gross S.S.: Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294: H1530-H1540, 2008.
 - 11) Hamadate N., Noguchi K., Sakanashi M., Matsuzaki T., Nakasone J. and Sakanashi M.: Effect of decreased levels of intrinsic tetrahydrobiopterin on endothelial function in anesthetized rats. *J. Pharmacol. Sci.* 107: 49-56, 2008.
 - 12) Noguchi K., Hamadate N., Matsuzaki T., Sakanashi M., Nakasone J., Sakanashi M., Tsutsui M. and Sakanashi M.: Improvement of impaired endothelial function by tetrahydrobiopterin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 631: 28-35, 2010.
 - 13) Chalupsky K. and Cai H.: Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 9056-9061, 2005.
 - 14) Dumitrescu C., Biondi R., Xia Y., Cardounel A.J., Druhan L.J., Ambrosio G. and Zweier J.L.: Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 15081-15086, 2007.
 - 15) Crabtree M.J., Tatham A.L., Hale A.B., Alp N.J. and Channon K.M.: Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *J Biol Chem.* 284: 28128-28136, 2009.
 - 16) Sugiyama T., Levy B.D. and Michel T.: Tetrahydrobiopterin recycling, a key determinant of endothelial nitric oxide synthase-dependent signaling pathways in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 284: 12691-12700, 2009.
 - 17) Noguchi K., Hamadate N., Matsuzaki T., Sakanashi M., Nakasone J., Uchida T., Arakaki K., Kubota H., Ishiuchi S., Masuzaki H., Sugahara K., Ohya Y., Sakanashi M. and Tsutsui M.: Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301: H721-H729, 2011.