

授与番号	甲第 1789 号
------	-----------

論文内容の要旨

平滑筋収縮制御タンパク質 h-caldesmon に注目した消化管運動機能調節の解析

(朝倉謙輔, 真柳平, 木村眞吾, 菅井有, 松本主之, 祖父江憲治)

(岩手医学雑誌 71 巻 1 号 平成 31 年 4 月掲載予定)

I. 研究目的

蠕動運動による内容物の指向性移動や逆流防止など正常な消化管機能には平滑筋の収縮制御が不可欠である。平滑筋においては caldesmon (CaD) タンパク質が収縮制御の中心的役割を担っている。CaD には広汎な組織に発現する低分子型 (l-CaD) および分化した平滑筋特異的に発現する高分子型 (h-CaD) の二つのアイソフォームが存在する。h-CaD および l-CaD の生化学的特性はほぼ同一であることから、分化型平滑筋で特異的に h-CaD が高発現する生理的意義は長きにわたって未解明であった。そこで我々は h-CaD を発現せず、全身性に l-CaD のみを発現する h-CaD 特異的ノックアウト (h-CaD-KO) マウスを作成し、個体レベルでの解析を可能にした。

逆流性食道炎、機能性ディスペプシア、過敏性腸症候群、偽性腸閉塞等の機能性消化管疾患の病態には平滑筋の機能異常の関与が示唆される。収縮能を有する分化型平滑筋に特異的に発現する h-CaD の機能に注目した研究はこれら疾患の理解へとつながり得る。

II. 研究対象ならび方法

マウスゲノム中の CaD 遺伝子 (*Caldl*) を組換えることで h-CaD アイソフォームに必要なエクソンを欠失させ、l-CaD のみを発現する h-CaD 特異的ノックアウト (h-CaD-KO) マウスを作成した。RT-PCR 法およびウエスタン解析によって h-CaD-KO マウスの大腸組織において mRNA およびタンパク質レベルで h-CaD の発現消失を確認した。

実験には 8~12 週齢雄生の C57BL/6J 系統野生型 (WT) マウスおよび h-CaD-KO マウスを使用した。WT マウスおよび h-CaD-KO マウスの消化管の肉眼的所見, 食物の消化管通過時間, 大腸組織の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色, ウエスタン解析による主要な平滑筋収縮関連タンパク質の発現量, Magnus 法による大腸平滑筋収縮力に関して比較検討した。

III. 研究結果

1. h-CaD-KO マウスと WT マウスの肉眼的所見の比較では、食道、胃、小腸、大腸に関して構造的な明らかな違いはなかったが、h-CaD-KO マウスの大腸内腔に WT より多くの内容物の滞留を認めた。
2. 消化管の内容物通過時間は h-CaD-KO マウスは WT と比較して食物の消化管通過時間の有意な延長を認めた。
3. 大腸の組織学的観察では粘膜筋板や固有筋層など平滑筋に富む組織について、h-CaD を欠失することによる顕著な異常は認めなかった。
4. 大腸組織における α -SMA, SM22, calponin など平滑筋の収縮装置関連タンパク質の発現に関して h-CaD-KO マウスと WT マウスの間に有意な違いは認められなかった。
5. 大腸組織を用いた筋収縮実験において、h-CaD の欠失は高濃度 K^+ やカルバコール刺激によって誘起される平滑筋の収縮力の低下が認められた。

IV. 結 語

h-CaD-KO マウスでは野生型マウスと比較して食物の消化管通過時間の有意な延長および内容物の滞留を認め、消化管運動機能の低下が示唆された。消化管の組織学的観察および主要な平滑筋収縮関連タンパク質の発現量に変化は認められなかったが、一方で大腸組織を用いた筋収縮実験では h-CaD 欠失によって有意な収縮力の減弱が認められた。これらの結果から、平滑筋における h-CaD 欠失は l-CaD による置換では機能補償されず、消化管平滑筋の収縮制御において h-CaD は独自かつ不可欠の機能を持つことが示唆された。今後、機能的消化管疾患など平滑筋による運動性変化が関わる消化管疾患の病態との関連を見据えた研究を展開したいと考える。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 中壽 克己 (生理学講座：統合生理学分野)

副査 教授 菅井 有 (病理診断学講座)

副査 教授 平 英一 (薬理学講座：情報伝達医学分野)

正常な消化管機能には平滑筋の収縮制御が不可欠である。平滑筋の収縮制御に caldesmon(CaD)は中心的役割を担っている。CaD には低分子型(l-CaD)と高分子型(h-CaD)の2つのアイソフォームが存在する。h-CaD は分化型平滑筋に特異的に発現するが、その意義については解明されていない。本研究論文は、アクチン-ミオシン収縮装置の制御因子である h-CaD を欠失させ、l-CaDのみを発現させたh-CaD 特異的欠失(h-CaD-KO)マウスを作成して、消化管の構造と機能を解析することから平滑筋収縮制御におけるh-CaD の役割を検証したものである。h-CaD-KO 群を野生型マウス群と比較すると、大腸の組織形態と CaD を除く平滑筋関連タンパク質の発現レベルに差はなかったが、食物の消化管通過時間は延長した。大腸を用いた筋収縮実験では、平滑筋収縮力が有意に減弱した。以上の成績は、h-CaD が消化管平滑筋機能の制御においてl-CaD では補償できない重要な役割を担うことを示唆するものである。

本論文は、消化管平滑筋の機能異常に起因すると考えられている消化器疾患群の病態解明においてブレイクスルーをもたらす可能性を有しており、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

h-CaD の機能発現に関する質問に対しては、大腸平滑筋を用いた追加実験において① Rho/ROCK 経路の cofilin, MLC, MYPT1 のリン酸化レベルが低下していたこと、②h-CaD が ROCK に直接結合することを確認した等の回答を得た。このように、本論文の内容に加えて h-CaD と ROCK の相互作用を介する平滑筋収縮制御について試問を行い、適切な解答を得ることができた。よって学位に値する学識を有すると考える。なお、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) Sobue K, Hayashi K and Nishida W: Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem* **190**, 105-118, 1999.
- 2) Mayanagi T and Sobue K: Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh Migr* **5**, 150-159, 2011.