

## 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<sup>1)</sup>, 真柳 平<sup>2)</sup>, 木村眞吾<sup>3)</sup>,  
菅井 有<sup>4)</sup>, 松本主之<sup>1)</sup>, 祖父江憲治<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 内科学講座消化器内科消化管分野

<sup>2)</sup> 岩手医科大学, 医歯薬総合研究所, 神経科学研究部門

<sup>3)</sup> 岩手医科大学医学部, 生理学講座統合生理学分野

<sup>4)</sup> 岩手医科大学医学部, 病理診断学講座

(Received on December 3, 2018 & Accepted on December 27, 2018)

### 要旨

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高発現するが、その意義については解明されていない。そこで我々は h-CaD を欠失させ、l-CaD のみ発現する h-CaD 特異的欠失 (h-CaD-KO) マウスを作成し解析

した。h-CaD-KO と野生型マウスを比較すると、大腸の組織形態と CaD 以外の平滑筋関連タンパク質の発現に差異は認めなかったが、食物の消化管通過時間の延長を示し、蠕動運動の減弱が示唆された。そこで大腸を用いた筋収縮実験を行い、平滑筋収縮力の有意な減弱を見出した。これらの結果から消化管平滑筋の収縮制御において h-CaD は l-CaD では代替されない特異的機能を持つことが示唆された。

**Key words :** caldesmon (CaD), smooth muscle, h-Cad-KO mice, gastrointestinal motility

### I. 緒 言

平滑筋は内臓および血管の自律的な収縮を担っており、内容物の移送・排出等が関わる様々な臓器の生理機能に深く関わっている。中でも消化管平滑筋は協調的な収縮と弛緩による蠕動運動により、内容物の移送、混和、貯蔵や逆流防止などの多彩な機能を遂行している。平滑筋の収縮は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化が引き金になっており、 $Ca^{2+}$  依存的なアクチン-ミオシン収縮制御においてカルモジュリン (CaM) が重要な役割を果たしている。平滑筋および非

筋細胞における CaM/caldesmon (CaD) は骨格筋および心筋におけるトロポニンに相当し、低  $Ca^{2+}$  では CaD はアクチン-ミオシン相互作用を阻害する。収縮刺激を受けた細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇により  $Ca^{2+}$  と結合した CaM は CaD に結合してアクチン-ミオシン結合阻害を解除することにより、平滑筋の収縮が引き起こされる<sup>1,2)</sup>。CaD には平滑筋細胞特異的に発現する高分子型の h-CaD と広範な組織に発現する低分子型の l-CaD のアイソフォームが存在する。h-CaD は分化状態の平滑筋細胞のみ発現し、未分化および脱分化状態では h-CaD は発現せず、l-CaD のみが存在するため、CaD のアイソフォームの変化は平滑筋細胞の分化・脱分化形

Corresponding author: Kensuke Asakura  
asaken@iwate-med.ac.jp

質を反映する優れた指標である<sup>3,4)</sup>。高い特異性から h-CaD 発現は分化した平滑筋において特別な機能を担っていることが示唆されるものの、これまでの *in vitro* での解析では h-CaD と l-CaD の分子特性には際立った差異は認められず<sup>5)</sup>、分化型平滑筋特異的な h-CaD 発現は平滑筋の機能においてどのような意義を持っているのかは、CaD の発見から 30 年以上を経てなお未だ解明されていない。

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器疾患の病態には神経性の要因に加えて平滑筋収縮の機能異常の関与が示唆されている<sup>6,7)</sup>。収縮能を発揮する分化型平滑筋特異的に発現する h-CaD の機能に着目した研究はこれらの疾患の理解へとつながることが期待される。我々はマウスゲノム中の CaD 遺伝子 (*Cald1*) を組換え、h-CaD アイソフォームのみを発現不能にした h-CaD 特異的ノックアウト (h-CaD-KO) マウスの作成に成功した。h-CaD-KO マウスでは平滑筋で本来高発現している h-CaD が消失し、l-CaD のみが発現される。このマウスを用いてその表現型を解析することにより平滑筋機能制御における h-CaD の役割を解明することが可能であると考えられる。

## II. 研究材料および方法

### 1. h-CaD 特異的ノックアウトマウスの作成

マウスゲノム中の CaD 遺伝子 (*Cald1*) 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-KO マウスを作成した。具体的には、マウス *Cald1* 遺伝子の h-CaD 特異的な配列を含むエクソン 3 に対して、l-CaD のエクソン 3 以降の配列を含む cDNA で置換する遺伝子組み換え用ベクターを設計した。エクソン 3 以降の l-CaD cDNA 配列の両端には loxP 配列を配置し、必要に応じて cre 組み換え酵素発現系統マウスとの交配によって欠失させることを可能

とした。遺伝子組み換えベクターはエレクトロポレーション法によって ES 細胞 (C57BL/6 由来) に導入し、ベクター内のネオマイシン耐性カセット (NeoR) による薬剤耐性によって陽性細胞をクローニングした。陽性 ES 細胞は Balb/c 系統マウス由来の胚盤胞へとマイクロインジェクションした後に ICR 系統マウスの仮親に移植した。得られたキメラマウスを C57BL/6 系統マウスと交配して、生まれた F1 ヘテロマウスを選別し、生殖系列に組み換えが生じた個体を確立した。マウスの遺伝子型は、尾先端部の組織片より DNA を抽出し、PCR 法によって決定した。野生型 *Cald1* アレルの検出には CaD-WT プライマーセット (F: 5'-GGCAGGTCAGCGCAGAAGAG-3', R: 5'-GTGCTCAGCCACTCTTCTCTGC-3', 増幅長 354bp)、h-CaD 欠失アレルの検出には NeoR プライマーセット (F: 5'-AGATGGATTGCACGCAGGTTC-3', R: 5'-GGTCGAATGGGCAGGTAGCC-3', 増幅長 392 bp) を使用した。得られた h-CaD-KO マウスは C57BL/6 系統の野生型 (WT) マウスと 8 世代の戻し交配を実施し、実験に用いた。h-CaD-KO マウスの作成に関しては大阪大学医学動物実験委員会の承認を受けて実施し、大阪大学動物実験施設より岩手医科大学動物研究センターへと移送した。

### 2. 動物実験

実験には、8~12 週齢の C57BL/6J 系統 WT マウス (日本 SCL) および h-CaD-KO マウスの雄個体を使用した。マウスは岩手医科大学動物研究センターにて明暗サイクル (7:00 点灯, 19:00 消灯) で飼育し、水及び標準飼料は自由に摂取させた。マウスからの組織採取に際してはイソフルランによる深麻酔下で速やかに安楽死させた後に行った。本研究で行った動物実験は、岩手医科大学動物実験規定に基づいた実験計画書を動物実験委員会の承認の上で実施した。

### 3. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

WT マウスおよび h-CaD-KO マウスの大腸を摘出し、組織片を RNA later (Thermo Fisher Scientific) で保存した。保存した組織片より TRIzol plus (Thermo Fisher Scientific) を用いて全 RNA を抽出し、SuperScript VILO cDNA master mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写して cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、h-CaD 特異的プライマー (F: 5' -GGCAAGAGTCGAAGCAGAAC-3', R: 5' -GCCTCAGCCACTCTTCTCTGC-3', 増幅長 162 bp), CaD 共通プライマー (F: 5' -CACTCCTAAAGGCTCGTCTCTC-3', R: 5' -ATCCGATGCTGCTGGCTTC-3', 増幅長 190 bp) によって半定量的に CaD mRNA の発現量を検出した。内部標準として *Gapdh* 遺伝子 (F: 5' -CGTGCCGCTGGAGAAAC-3', R: 5' -TGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3', 増幅長 136 bp) を用いて標準化した。

### 4. 消化管の肉眼的所見

WT マウスおよび h-CaD-KO マウスの食道、胃、小腸と大腸を摘出し肉眼的所見を両群で比較した。

### 5. 消化管の通過時間

着色料 (Fast Green FCF, SIGMA) で緑に着色した粉末状の標準飼料 (MF: オリエンタル酵母) を WT マウスおよび h-CaD-KO マウスに経口摂取させ、着色された便が排出されるまでの時間を測定した。

### 6. 大腸の組織学的評価

WT マウスおよび h-CaD-KO マウスの大腸を摘出し、4%パラホルムアルデヒド-PBS 溶液を用いて固定した。パラフィン包埋の後、4  $\mu$ m の薄切スライド標本を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色して観察を行った。

### 7. ウェスタンブロット解析

大腸組織は生理食塩水で洗浄の後、SDS サンプルバッファー [125 mM Tris-HCl, pH 6.8,

2% SDS, 10% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.01% ブロモフェノールブルー, 1% プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai), 1% ホスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai)] を用いて組織を破碎・溶解した。SDS サンプルはポリアクリルアミドゲル (7.5~15%) を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。5% スキムミルクを含む TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween20) で 30 分間のブロッキング後、抗体反応を行った。一次抗体は標的タンパク質に対する特異抗体、抗  $\alpha$ -Smooth Muscle actin 抗体 (1A4; Sigma), 抗 calponin 抗体 (hCP; Sigma), 抗 SM22 抗体 (ab10135-100; Abcam), 抗  $\beta$ -actin 抗体 (AC15; Sigma), 抗 caldesmon 抗体 (D5C8D; Cell Signaling Technologies) を CanGet Signal Immunoenhancer solution (TOYOBO) で希釈して反応させ、次いで二次抗体として一次抗体に対応した HRP 標識した抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ抗体 (GE healthcare), 抗ヤギ抗体 (R & D Systems) を反応させた。PVDF 膜は洗浄した後、Clarity ECL 溶液 (BioRad) による化学発光をバイオメディカル X 線フィルムを用いて検出した。 $\beta$ -アクチンの発現量を標準化に用いた。

### 8. 大腸平滑筋収縮実験

摘出腸管の運動の観察は Magnus 法にて行った<sup>8)</sup>。WT マウスおよび h-CaD-KO マウスから速やかに大腸を摘出し、これを 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 4°C に平衡化しておいた modified Tyrode 液 (NaCl 117 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2.5 mM, Glucose 11.5 mM, pH 7.4) に入れて平衡化した。実体顕微鏡下で大腸組織に付着している脂肪組織、血管、結合組織等を取り除いた後、大腸を 5 mm の長さに切断し、大腸内腔の滞留した内容物を除去し、リング状標本を作製した。この標本の一端を容量 1.5 ml のチャンバー

の底部に糸つきフックで固定した。さらにもう一端を同じく糸つきフックを用いて張力測定用の transducer (UL10; Minebea, Nagano) のプローブ部に懸垂した。この標本を 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気した pH 7.4, 37°C の modified Tyrode 液で灌流した。平滑筋標本の張力の粘性による成分を除去するために筋に 0.5 g の制止張力を加え, これを resting tension として収縮誘発物質を投与した場合に発生する張力変化を transducer にて測定した。収縮誘発物質として 90 mM KCl (高濃度 K<sup>+</sup>), 10 μM カルバコール (Sigma) を用いた。収縮誘発物質を投与して発生した収縮応答を記録して収縮効果を評価した。

### 9. 統計学的解析

それぞれの実験は独立の実験として 3 回以上の試行を実施した。

食物通過時間および筋収縮実験の定量的解析については, 平均値および標準誤差を求め, 平均 ± 標準誤差, マウスの個体数を N, 標本数を n として表示した。

実験結果の統計処理には両側分布の Student's t-test を用い,  $p < 0.05$  を有意差ありと見なした。

## III. 結 果

### 1. h-CaD 特異的ノックアウトマウスの作成

平滑筋における h-CaD の生理的機能を解析するために h-CaD を特異的に欠失させたマウスを作成した。h-CaD および l-CaD はいずれも *Cald1* 遺伝子から発現するが, 選択的スプライシングによってエクソン 3b を含むことによって h-CaD 特異的な配列を含む高分子量型アイソフォーム h-CaD が合成される (図 1A)。CaD は細胞分裂にも関与するため, これまでに完全な遺伝子欠失に成功した報告はない。そのため, 我々は h-CaD 発現に必要なエクソン 3b を含むエクソン 3 領域に対して, エクソン 3b を含まない l-CaD の cDNA で置換するとい

う方法を取った (図 1B)。これによりエクソン 3b は欠失し, 常に低分子量型の l-CaD のみが発現する。さらに置換に使用した l-CaD cDNA の両端には loxP 配列を挿入してあり, cre 組み換え酵素を発現するマウス系統と交配することによって条件的に完全な CaD 欠失マウスが作成できる組み換えマウスの作成に成功した。マウスの遺伝子型は h-CaD に特異的なエクソン 3b 領域に対する PCR プライマー (CaD-WT) および組み換えに使用した遺伝子配列に含まれるネオマイシン耐性遺伝子カセット領域に含まれる PCR プライマー (NeoR) を用いて確認した (図 1B)。ホモ接合体の h-CaD-KO マウスではエクソン 3b 領域を欠失していることが確認された (図 1C)。さらに大腸組織より RNA を抽出し, RT-PCR によって mRNA レベルで CaD の発現を確認した。その結果, h-CaD-KO マウスにおいて転写レベルで h-CaD の発現が消失していることが確認された (図 1D)。それに対して 2 種の CaD mRNA に共通の 3' 末端部分に対するプライマーで検出すると, 発現レベルの低下 (33.95 ± 2.91% 減) は認められたものの h-CaD-KO マウスにおいても l-CaD の発現が認められた。得られた h-CaD-KO マウスを用いて, 本来 h-CaD が高発現している消化管平滑筋において h-CaD 欠失がどのような影響を与えるのかに注目して解析を進めた。

### 2. 消化管の肉眼的所見

まず最初に, 肉眼的観察によって消化管の構造的な差異や機能異常に伴う所見の有無に着目し, h-CaD-KO マウスと WT マウスの両者を比較した。

食道, 胃, 小腸, 大腸に関して構造的な肉眼的所見に明らかな違いはなかった。しかし, いずれの個体についても, h-CaD-KO マウスの小腸と大腸内腔には WT マウスと比較して多くの内容物の滞留を認めた (図 2)。内容物の滞留は特に大腸, 直腸など下部消化管で顕著に認められた。

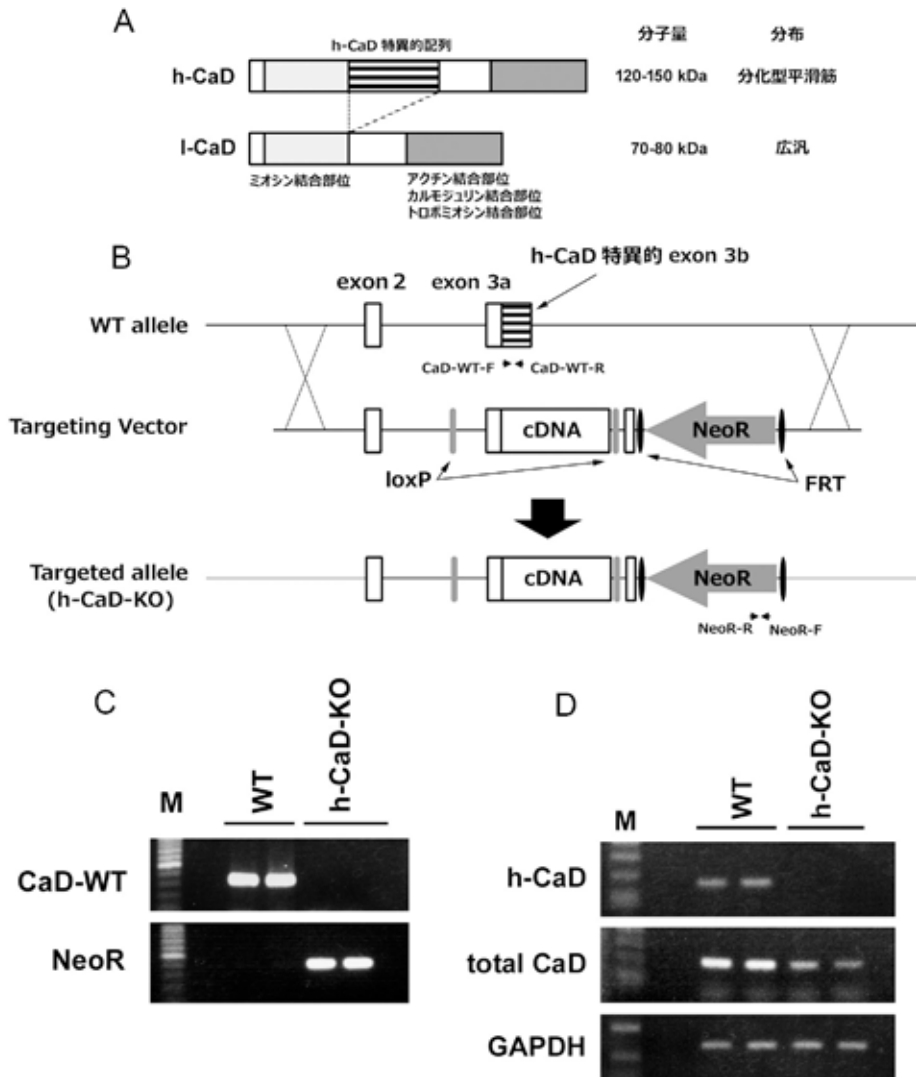


図1. h-CaD 特異的欠失マウスの作成

WT および h-CaD-KO マウスの遺伝子型特定のための PCR 結果, および大腸由来 cDNA を用いた RT-PCR の結果を示す (ホモ接合体, 各 2 個体).

- h-CaD および l-CaD の特徴および模式図
- マウス Cald1 遺伝子エクソン 2, 3 付近の模式図および遺伝子組み換えマウス作成のストラテジー
- マウス尾由来のゲノム DNA を用いた PCR 結果  
B に示した CaD-WT および NeoR プライマーセットを用いた PCR 結果を示す.
- マウス大腸由来の cDNA を用いた RT-PCR 結果  
h-CaD に特異的なプライマーセットおよび CaD 共通配列に対するプライマーセットを用いた RT-PCR の結果を示す.

### 3. 食物の消化管通過時間

h-CaD-KO マウスの消化管内腔に多くの内容物の滞留を認めたことから, h-CaD 欠失によって消化管に何らかの機能異常が引き起こされ, 食物の消化管通過時間が変化している可能性が示唆された. これを確認するために WT マウ

スと h-CaD-KO マウスに着色した粉末飼料を経口摂取させ, 排出までの時間を計測することで消化管通過に要する時間を比較した. その結果, WT マウスにおける消化管通過時間は  $177 \pm 10.3$  分 (平均  $\pm$  標準誤差,  $N = 8$ ) であるのに対して h-CaD-KO マウスでは  $219.5 \pm 12.2$  分

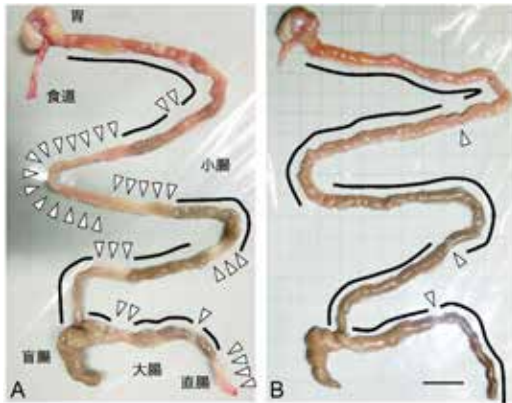


図2. 消化管の肉眼的所見

WT マウスと h-CaD-KO マウスの食道, 胃, 小腸および大腸の肉眼的所見を比較した.

- A. WT マウス消化管の肉眼的所見  
 B. h-CaD-KO マウス消化管の肉眼的所見  
 黒線 (-) で消化管内腔に内容物の滞留が認められる領域, 白矢頭 (▽) で内容物を含まない部位を示す.

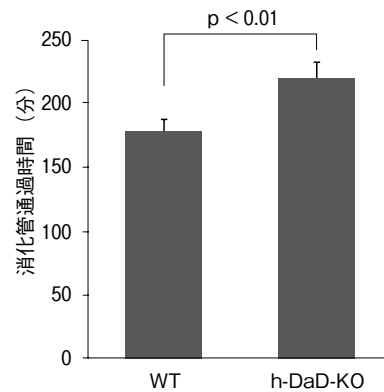


図3. 食物の消化管通過時間

WT マウスと h-CaD-KO マウスにおいて, 経口摂取した食物が排便されるまでにかかる時間を消化管通過時間として測定した. (WT: N = 8; h-CaD-KO: N = 8).

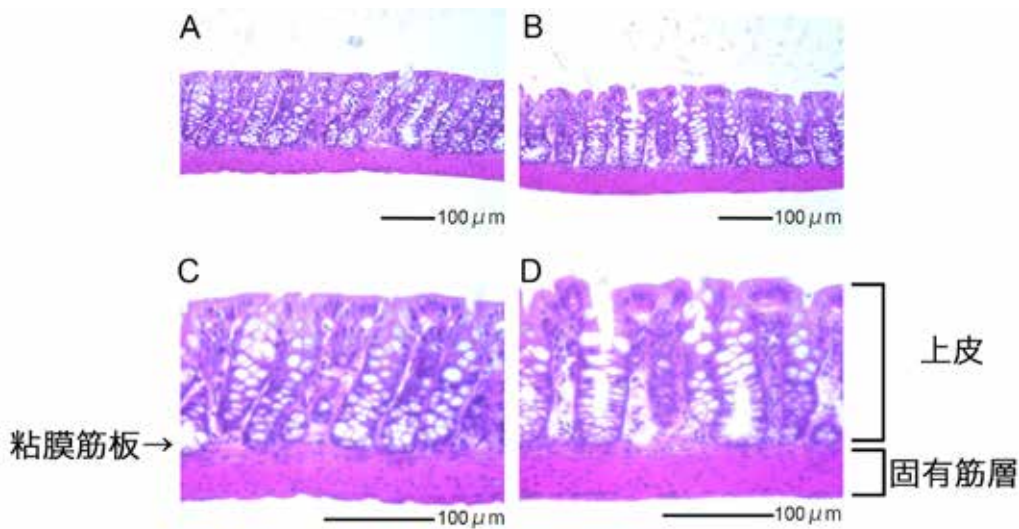


図4. 大腸の組織学的所見

WT および h-CaD-KO マウス由来の大腸について HE 染色により組織像を観察した.

- A. WT マウス大腸縦断面の HE 染色像 (× 200)  
 B. h-CaD-KO マウス大腸縦断面の HE 染色像 (× 200)  
 C. WT マウス大腸縦断面の HE 染色像 (× 400)  
 D. h-CaD-KO マウス大腸縦断面の HE 染色像 (× 400)

(N = 8) であり, 有意な消化管通過時間の延長を認めた ( $p < 0.01$ , 図3).

#### 4. 大腸の組織学的所見

h-CaD は分化型平滑筋に特異的に高発現するため, h-CaD 欠失の影響は平滑筋を中心に出現

することが予想される. h-CaD-KO マウスに認められる食物の消化管通過時間の遷延と消化管内腔の内容物の滞留は, 平滑筋収縮が担う消化管運動の異常によることが示唆される. 特に大腸における内容物の滞留が顕著であったことか

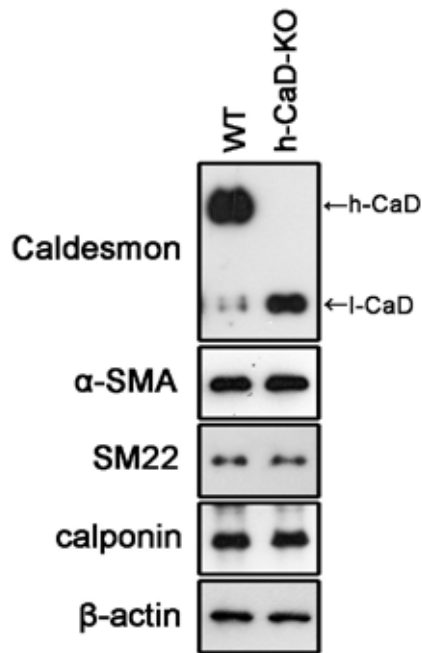


図5. 大腸組織における平滑筋関連タンパク質の発現変化

WT および h-CaD-KO マウスの大腸組織から SDS サンプルを調製し、ウエスタンブロット法により解析した。

ら、大腸組織を用いて消化管平滑筋について観察を行った。WT マウスおよび h-CaD-KO マウスから採取した大腸組織の切片を HE 染色により組織学的に比較した。大腸における平滑筋に富む組織として粘膜筋板および固有筋層について精査したが、平滑筋の厚さや筋繊維の配向など組織学的所見について、h-CaD 欠失による明らかな異常は認められなかった (図4)。

#### 5. 大腸組織における平滑筋関連タンパク質の発現変化

次に筋収縮に関わる平滑筋関連タンパク質の発現についてウエスタンブロット解析によって比較した。WT マウスの大腸においては h-CaD が高レベルで発現し、l-CaD の発現は弱い (図5)。それに対して h-CaD-KO マウスの大腸では h-CaD の発現が完全に消失し、l-CaD に置き換わっていることがタンパク質レベルでも確認された (図5)。

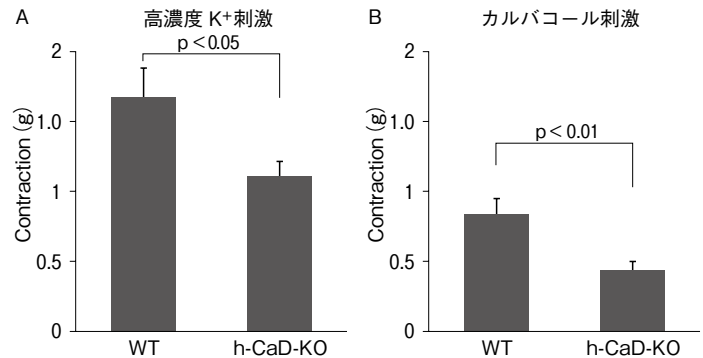


図6. 大腸組織の平滑筋収縮力

WT マウスと h-CaD-KO マウスの大腸組織を用いて平滑筋収縮力を測定し、最大値を比較した。(WT: N = 5, n = 11; h-CaD-KO: N = 5, n = 9).

- A. 90 mM  $K^+$  刺激に対する WT および h-CaD-KO マウス由来大腸の平滑筋収縮力の比較 (最大収縮値)。  
 B. 10  $\mu$ M カルバコール刺激に対する WT および h-CaD-KO マウス由来大腸の平滑筋収縮力の比較 (最大収縮値)。

平滑筋に対する分子マーカーとして扱われる平滑筋収縮関連タンパク質として平滑筋型  $\alpha$ -アクチン ( $\alpha$ -SMA), SM22 (transgelin), calponin の発現について WT マウスと h-CaD-KO で比較した。大腸組織においていずれの平滑筋関連タンパク質についても発現レベルに大きな差は認められなかった (図5)。

#### 6. 大腸組織の平滑筋収縮力

CaD は平滑筋に高発現し、 $Ca^{2+}$  依存的な収縮制御において中心的役割を担う分子である。大腸組織における平滑筋収縮力について解析を実施した。WT マウスあるいは h-CaD-KO マウスの大腸から作製したリング状標本を normal Tyrode 液で灌流したチャンバー内に固定して、0.5 g の resting tension をかけた条件下で実験を行った。基線が安定してから標本に脱分極性の刺激を与える高濃度  $K^+$  (90 mM  $K^+$ ) 溶液を5分間投与すると、投与後30秒で最大収縮に達する早い収縮応答が発生した。この応答は高濃度  $K^+$  投与後、normal Tyrode 液で wash

outすると10分程度でresting tensionに戻った。高濃度 $K^+$ 投与によるWTマウスにおける最大収縮値は $1.68 \pm 0.2$  g ( $N = 5, n = 11$ )であるのに対し、h-CaD-KOマウスでは $1.10 \pm 0.11$  g ( $N = 5, n = 9$ )であり有意に低い値を示した ( $p < 0.05$ , 図6A)。高濃度 $K^+$ 投与終了後にnormal Tyrode液で15分灌流し基線が安定した後に、アセチルコリン受容体作動薬であるカルバコール ( $10 \mu M$ ) を投与すると、投与後1分程度で最大収縮に達する応答を認めた。カルバコール投与によるWTマウスにおける最大収縮値は $0.84 \pm 0.11$  g ( $N = 5, n = 11$ )であるのに対してh-CaD-KOマウスにおいては $0.44 \pm 0.05$  g ( $N = 5, n = 9$ )であり有意に低かった ( $p < 0.01$ , 図6B)。大腸における平滑筋組織において構造的にも平滑筋関連タンパク質の発現量についてもh-CaD-KOマウスとWTマウスとの間には大きな差異は認められなかったが、h-CaD欠失は平滑筋の収縮能の低下という機能的な異常を引き起こすことが示された。

#### IV. 考 察

CaDは平滑筋における収縮制御の中心的な役割を担うことが知られているが、その際に主に機能するのは分化型平滑筋で強く発現する高分子型アイソフォームh-CaDである。一方で上皮や間葉系など広汎な種類の細胞にも発現が認められるが、その際に発現しているのは低分子型のl-CaDである。平滑筋細胞においても脱分化すると速やかにh-CaDの発現が減少し、l-CaDが発現するようになる<sup>3, 4)</sup>。このようにh-CaDが厳密に分化型平滑筋に局限して発現することから、平滑筋の機能に特別な役割を持つことが示唆されていた。しかし、生化学的な解析においては分子量の違いの他にh-CaDとl-CaDの明確な機能的差異は見出されず<sup>5)</sup>、これまでは個体レベルの解析が容易ではなかったため未だh-CaDの生理的役割について十分な

解明がなされていなかった。

今回我々はh-CaD発現に必要なエクソンをl-CaD型のcDNAで置換するという独創的な手法によって、本来h-CaDが発現する組織においてもh-CaDの代わりにl-CaDのみが発現するマウス系統の確立に成功した。既にWangらのグループがh-CaDに必要なエクソン3bに終始コドンを導入する古典的な手法によってh-CaDが発現しないマウス系統を報告しているが、h-CaD型として転写された分はタンパク質として翻訳されないためにCaD全体の発現量としては著しく減少してしまう<sup>9, 10)</sup>。そのためh-CaDとl-CaDの機能的差異だけではなくCaD発現低下の影響が複合的に生じてしまう結果となっている。それに対して我々の作成したマウス系統では、本来h-CaDとして転写された分はl-CaDに置換して発現される工夫が為されているため、若干の発現量の減少は認められたもののh-CaDとl-CaDというアイソフォームの機能的差異に注目した解析に用いるために優れている (図1D, 図5)。

本研究では平滑筋に富み、内容物の移送、貯蔵、攪拌、逆流防止など秩序だった運動制御が不可欠な消化管に注目した。h-CaD-KOマウスは肉眼的、組織学的にはWTマウスと明らかな構造的差異を持たなかったが (図2, 4)、小腸と大腸を中心に内容物の滞留を認め、食物の消化管通過時間の延長が認められた (図2, 3)。その原因として、大腸組織で認められたh-CaDを欠失した平滑筋収縮能の低下の関与が考えられた (図6)。h-CaD-KOマウス由来の大腸組織では高濃度 $K^+$ 刺激およびカルバコール刺激によるリガンド誘起に対する平滑筋収縮力が減弱していることが示された。つまり、h-CaD-KOマウスで見られた平滑筋機能異常から、h-CaDにはl-CaDによる置換では補償されない特異的な機能を持つことを強く示唆した。また、本研究では主に大腸を用いて解析を進めたが、h-CaD-KOマウスでは小腸にも内容物の滞留を



認めたことから、h-CaD 欠失は大腸と同様に小腸などの他の消化管領域における平滑筋収縮にも影響を与えて消化管通過時間の延長を引き起こしていることが示唆された。つまり l-CaD では代替できない h-CaD による平滑筋収縮制御は、消化管の運動能制御に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

固有筋層及び粘膜筋板といった大腸における平滑筋組織の厚さおよび構造には明らかな違いがなく、平滑筋収縮装置およびその制御に関わるタンパク質の発現量にも大きな違いが認められなかったことから、平滑筋量の減少や平滑筋収縮関連タンパク質の発現低下によるものである可能性は低いと考えられる (図 4, 5)。すなわち h-CaD 欠失による筋収縮力低下は器質的な変化でなくアクチン-ミオシン依存的な収縮活性制御の機能的変化により生じている可能性が示唆される。

平滑筋の収縮制御にはアクチン側制御と、ミオシン軽鎖のリン酸化を介したミオシン側制御がある。CaD はアクチン線維に結合し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  と結合しない状態ではアクチン-ミオシン相互作用を妨げて収縮力の発生を阻害するアクチン側制御因子として機能する。収縮刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴い  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存的に CaD によるアクチン-ミオシン相互作用の阻害が解除され平滑筋は収縮する。一方でミオシン側制御は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  によるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の活性化により、ミオシン軽鎖がリン酸化され、ミオシン ATPase 活性が上昇して平滑筋収縮が促進される<sup>11)</sup>。

h-CaD と l-CaD の構造的差異は中央部に挿入される電荷を持つアミノ酸に富んだドメインの有無のみである<sup>12)</sup>。最低限の要素により構成された *in vitro* の再構成実験においては h-CaD および l-CaD の間で  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存性のミオシン ATPase 阻害効果に差異を認めない<sup>5)</sup>。しかし、*in vivo* の平滑筋収縮装置は主要なアクチン、ミオシンに加えてアクチン側、ミオシン側

収縮制御に関わる様々なタンパク質から構成されている。CaD は主要なアクチン側収縮制御因子であると同時にミオシン結合能も併せ持つ (図 1A)。平滑筋細胞内では、中央部の挿入配列を持つ h-CaD だけが相互作用できる収縮制御タンパク質が存在し、その相互作用を介して本来の分化型平滑筋が持つ収縮制御機能を発揮している可能性がある。今後、h-CaD 特異的に相互作用する因子の探索など更なる解析によって明らかにしていく必要がある。

消化管蠕動運動による内容物は指向性移動や逆流防止など消化管の正常な機能には精巧な平滑筋の収縮制御が重要である。逆流性食道炎、機能性ディスペプシア、過敏性腸症候群や偽性腸閉塞では検査で明らかな異常所見を認めないこともあり、神経性の要因に加えて平滑筋の機能異常の関与が示唆される消化器疾患である<sup>6,7)</sup>。今回、h-CaD-KO マウスの解析から、h-CaD 欠失は器質的な異常を伴わない平滑筋収縮能の変化が消化管運動性の障害を引き起こすことを示し、h-CaD は平滑筋収縮制御に必須の機能を有することが示唆された。CaD のアイソフォームの変化は平滑筋細胞の分化状態を反映する優れた指標であり、具体例として動脈硬化の進行に伴い脱分化した血管中平滑筋層では h-CaD の発現低下と l-CaD への変化が認められる<sup>13)</sup>。消化管平滑筋組織において何らかの要因で h-CaD から l-CaD への発現変化が生じた場合には h-CaD-KO マウスに認められたような消化管運動障害が生じる可能性が考えられる。機能性消化器疾患は明確な器質的变化を認めないため、その原因が十分に明らかにされていない。今後さらに病理検体の利用など臨床病態に基づいた解析を進める必要があるが、本研究のような平滑筋の機能異常に注目した解析は原因未解明の機能性消化器疾患の病態解明につながる可能性を持ち、h-CaD-KO マウスが機能性消化器疾患の解析モデルとして有用となり得る。逆流性食道炎、機能性ディスペプシア、過敏性

腸症候群や偽性腸閉塞等の消化管平滑筋の機能異常が病態に関わる消化器疾患の病態の理解と効果的な治療法の確立につながることを期待される。

稿を終えるにあたり、本研究の組織学的解析について技術的支援をいただいた岩手医科大学医学部、病理診断学講座のスタッフの皆様、ならびに本研究に用いた実験動物の飼育・実験補助についてご協力いただいた岩手医科大学動物研究センタースタッフの皆様にご礼申し上げます。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

### References

- 1) **Sobue K, Muramoto Y, Fujita M, et al.:** Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 5652-5655, 1981.
- 2) **Sobue K and Seller JR:** Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. *J Biol Chem* **266**, 12115-12118, 1991.
- 3) **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.
- 4) **Mayanagi T and Sobue K:** Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh Migr* **5**, 150-159, 2011.
- 5) **Marston FA and Redwood CS:** The molecular anatomy of caldesmon. *Biochem J* **279**, 1-16, 1991.
- 6) **Tugtepe H, Tugay M, Bozkurt S, et al.:** Esophageal smooth muscle reactivity is impaired in chronic reflux esophagitis by both receptor and nonreceptor-mediated mechanisms. *J Pediatr Surg* **42**, 641-646, 2007.
- 7) **Curró D:** The modulation of potassium channels in the smooth muscle as a therapeutic strategy for disorders of the gastrointestinal tract. *Adv Protein Chem Struct Biol* **104**, 263-305, 2016.
- 8) **Ono H, Nakamura A, Matsumoto, et al.:** Circular muscle contraction in the mice rectum plays a key role in morphine-induced constipation. *Neurogastroenterol Motility* **26**, 1396-407, 2014.
- 9) **Guo H and Wang CL:** Specific disruption of smooth muscle caldesmon expression in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 1132-1137, 2005.
- 10) **Guo H, Huang R, Senba S, et al.:** Ablation of smooth muscle caldesmon affects the relaxation kinetics of arterial muscle. *Pflugers Arch* **465**, 283-294, 2013.
- 11) **Walsh MP:** Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* **135**, 21-41, 1994.
- 12) **Hayashi K, Yano H, Hashida T, et al.:** Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 12122-12126, 1992.
- 13) **Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG et al.:** Modulation of human aorta smooth muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9542-9546, 1998.

## Analysis of h-Caldesmon in regulation of gastrointestinal motility

Kensuke ASAKURA<sup>1)</sup>, Taira MAYANAGI<sup>2)</sup>, Shingo KIMURA<sup>3)</sup>,  
Tamotsu SUGAI<sup>4)</sup>, Takayuki MATSUMOTO<sup>1)</sup> and Kenji SOBUE<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine,  
School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

<sup>2)</sup> Department of Neuroscience, Institute for Biomedical Sciences,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

<sup>3)</sup> Department of Physiology, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

<sup>4)</sup> Division of Molecular Diagnostic Pathology, Department of Pathology,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

*(Received on December 3, 2018 & Accepted on December 27, 2018)*

---

### Abstract

Smooth muscle contraction is critically involved in gastrointestinal motility. In smooth muscle cells, caldesmon (CaD) crucially regulates the Ca<sup>2+</sup>-dependent actomyosin contraction. The two isoforms of CaD have been identified: high molecular weight CaD (h-CaD) and low molecular weight CaD (l-CaD). Although l-CaD is widely expressed in non-muscle cells, h-CaD is specifically expressed in differentiated smooth muscle cells. In spite of decades of extensive studies, the specific function of h-CaD in smooth muscle cells in vivo remains unclear.

Here, we established and analyzed h-CaD specific

knockout (h-CaD-KO) mice. Gastrointestinal transit time was significantly prolonged in h-CaD-KO mice and stagnated contents were observed in the colorectum. Furthermore, smooth muscle-dependent contraction was impaired in the colonic tissue of h-CaD-KO mice. Our results demonstrate that defects in the h-CaD-deficient smooth muscle resulted in intestinal motility dysfunction. The present study may improve our understanding of pathophysiology of functional gastrointestinal disorders with dysregulated smooth muscle-dependent motility, and help define a novel therapeutic approach.

---