

講座

# 平滑筋細胞における収縮の $Ca^{2+}$ 制御と分化

祖父江 憲治\*

筋収縮・ホルモン分泌・神経伝達物質放出・細胞分裂・貧食などの細胞機能発現は、細胞内における一過性のカルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) の増加をシグナルとしている。各種細胞現象のうちで、横紋筋（骨格筋・心筋）の収縮に関していち早く  $Ca^{2+}$  の重要性が見い出され、その  $Ca^{2+}$  依存性制御機構が解明された。いっぽう平滑筋では、横紋筋で明らかになったようなトロポニンCをはじめとするトロポニン複合体が検出されず、従って横紋筋の制御機構についてはトロポニン複合体を介さない新たな検討が必要となった。本稿では、平滑筋収縮の  $Ca^{2+}$  制御機構、及びその研究から発展した細胞生物学的成果について述べる。

## I. 横紋筋収縮の $Ca^{2+}$ 制御機構

本稿の目的である平滑筋収縮の  $Ca^{2+}$  制御機構を理解していただく為に、はじめに横紋筋収縮の  $Ca^{2+}$  制御機構について概説する。横紋筋の格子状構造は Huxley による電顕写真であまねく有名になった。この格子状構造を模式化したのが図1 Aである。Z帯により区切られた1つの格子状ユニットは、太いフィラメント（ミオシンの束）と細いフィラメント（アクチンを中心とするマイクロフィラメント）により構成されている。Huxley は収縮により格子状の各ユニットが短縮することを観察し、横紋筋収縮はこの太いフィラメントと細いフィラメントの滑りによるものであるとの説を提唱した<sup>1)</sup>。アクチン-ミオシン相互作用が、“滑り説”だけで説明出来るか否かの是非は現在も依然論争中であるが、両者の相互作用を形態学的に初めて捉えたことの意味は大きい。

いずれにしても、アクチンフィラメントとミオシン相互作用は、各格子状ユニットの間を縦走す

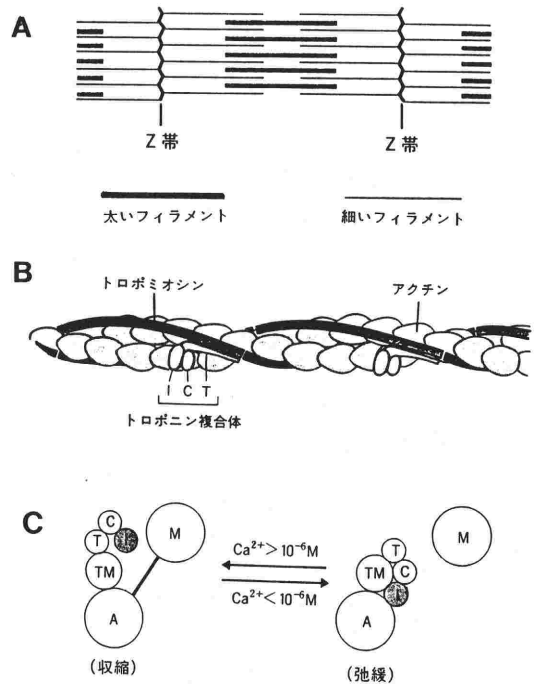


図1 横紋筋の  $Ca^{2+}$  依存性収縮制御機構

A; 横紋筋の構成。太いフィラメントとZ線に固定された細いフィラメントが整然と格子状に配列されており、光学顕微鏡では横紋として観察される。

B; 細いフィラメント上でのアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の配列。

C; 収縮の  $Ca^{2+}$  制御。  $Ca^{2+}$  が低濃度 ( $<10^{-6}$  M) では、トロポニンIはアクチンフィラメントに結合して、アクチン-ミオシン相互作用を阻害する（弛緩）、  $Ca^{2+}$  濃度が増加し ( $>10^{-6}$  M) トロポニンCに  $Ca^{2+}$  が結合すると、トロポニンIはアクチンフィラメントより遊離し、この阻害が解除される（収縮）。

A: アクチン, M: ミオシン, TM: トロポミオシン, T, C, I: トロポニン T, C, I

\*大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター・高次神経医学部門・神経生化学

るT管（筋小胞体）という  $\text{Ca}^{2+}$  プールからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が引き金になっている。この  $\text{Ca}^{2+}$  は、細いフィラメント上に存在する制御因子に作用して、アクチン-ミオシン相互作用を惹起する。そこで、細いフィラメントについてももう少し詳しく述べる。

細いフィラメントの主要構成成分は、アクチン・トロポミオシンとトロポニン (T·C·I) 複合体である (図1B)。トロポニン複合体は江橋により発見され、これによって横紋筋アクチン-ミオシン系  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構は解明された<sup>2)</sup>。トロポミオシンとトロポニン複合体は、二重螺旋を描いて配列するアクチンフィラメント上に結合している。量比は、アクチン7分子にトロポミオシン・トロポニン複合体各1分子の割合である。トロポニンCはトロポニン複合体中の  $\text{Ca}^{2+}$  受容蛋白質で、細いフィラメント上の  $\text{Ca}^{2+}$  の作用点となっている。トロポニンCの  $\text{Ca}^{2+}$  との結合定数は  $10^{-6}$  M であり、前述のT管より筋細胞質内に流入する  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  M の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度とよく一致する。これは横紋筋に限ったわけではなく、後に述べる平滑筋をはじめ筋肉以外の一般細胞（以後、非筋細胞と呼ぶ）において、細胞の活性化を来す  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は全て  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  M である。おもしろいことに、カルモデュリンをはじめとした  $\text{Ca}^{2+}$  受容蛋白質の  $\text{Ca}^{2+}$  との結合定数もやはり  $10^{-6}$  M 辺りであり、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルによる細胞活性化の一般的メカニズムとなっている。 $\text{Ca}^{2+}$  と結合した  $\text{Ca}^{2+}$  受容蛋白質は、立体構造上著明な変化を来す。トロポニンCの場合も例外ではない。細いフィラメントにおいては、アクチン・トロポミオシン上にトロポニン T·C·I 複合体が

ループを描いて配列しており、トロポニンTがトロポミオシンと結合し、さらにトロポニンIとアクチンが結合している。トロポニンIとアクチンの結合によりアクチン-ミオシン相互作用は阻害され、その結果横紋筋は弛緩する。いっぽう、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入によりトロポニンCは  $\text{Ca}^{2+}$  と結合してその立体構造変化を来す。さらにその影響はトロポニンIとアクチン間の結合にまで及び、トロポニンIとアクチン間の解離が起こる。つまり、トロポニンIによるアクチン-ミオシン間相互作用の抑制が解除（脱抑制）され、横紋筋は収縮するようになる (図1C)。これが横紋筋収縮の  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構である<sup>3)</sup>。

但し、細いフィラメントと太いフィラメントが相互作用するのみでは張力は発生せず、いずれか いっぽうのフィラメントが固定されている必要がある。横紋筋では細いフィラメントがZ帯に固定されており、このZ帯と細いフィラメントを繋ぐ蛋白質（架橋蛋白質）が $\alpha$ -アクチニンである。

## II. 横紋筋と平滑筋・非筋細胞収縮系の違い

平滑筋・非筋細胞においても収縮の基本はアクチン-ミオシン相互作用であり、 $\text{Ca}^{2+}$  により調節されることは明らかである。しかしながら、以下に述べるいくつかの点で違いが見出される。

i) アクチン/ミオシン量比が、横紋筋と平滑筋・非筋細胞で著しく異なる。表1に、横紋筋・平滑筋から非筋細胞に至るアクチン/ミオシンの含有量と量比をまとめた。横紋筋では全蛋白質に占めるアクチンとミオシン量は実に40%以上に達し、量比も7と高い。各組織あるいは細胞を比較していくと、アクチン含有量は横紋筋・平滑筋を

表1 種々の組織におけるアクチンとミオシン含有量の比較

組 織	細胞蛋白質に占める割合 (%)		アクチン/ ミオシン (モル比)
	アクチン	ミオシン	
骨格筋 (ウサギ)	23	38	7
平滑筋 (ウシ頸動脈)	25	8	34
血小板 (ヒト)	10	1	109
粘 菌	7	0.5	157
脳 (ニワトリ胎児)	10	0.05~0.5	233~2333

除いて比較的一定であるが、アクチン/ミオシン量比は横紋筋→平滑筋→非筋細胞の順に漸減する。これは、アクチンが単にアクチン-ミオシン相互作用のためだけでなく、細胞構築をはじめとした広汎な細胞運動性に関与していることによる。逆に、収縮性構成員としてのアクチンの割合は、非筋細胞に移行するにつれ減少していくとも言える。ii) 平滑筋・非筋細胞では、横紋筋のような太いフィラメントと細いフィラメントによる格子状構造は見い出されない。平滑筋において細いフィラメントの終着点は、dense body である(図2)。非筋細胞においては、ミオシンがアクチンの三次元的 meshwork の間を架橋するようにして相互作用するのみで、アクチン-ミオシン系による特異的構造物は観察されない。iii) すでにアクチン/ミオシン量比について述べたが、ミオシン自体の性質も相当に異っているようで、平滑筋・非筋細胞のミオシン軽鎖の違い並びにミオシン ATPase 活性は横紋筋のそれと比較して約1/10程度と低い。iv) 横紋筋の細いフィラメントすなわちアクチン側の  $Ca^{2+}$  制御を担うトロポニン複合体は、これまでの手法では平滑筋・非筋細胞において検出されない。v) トロポミオシンの性質が、横紋筋→平滑筋→非筋細胞となるに従って順次異なる。

以上の様な点に留意しつつ、平滑筋・非筋細胞におけるアクチン-ミオシン系の  $Ca^{2+}$  制御について述べる。

### Ⅲ. 平滑筋収縮の $Ca^{2+}$ 制御機構

トロポニンCに代わるもう1つの細胞内  $Ca^{2+}$  受容蛋白質が、カルモデュリンである。横紋筋の

みに存在するトロポニンCとは異なり、カルモデュリンは原生動物から植物・動物に至るまで普遍的に分布している。平滑筋にも  $10\sim 20\mu M$  の豊富なカルモデュリンが存在する。

#### 1. ミオシン側制御

1970年代後半から、平滑筋の  $Ca^{2+}$  依存性収縮制御機構として、ミオシンリン酸化説が提唱されるようになった<sup>4)</sup>。その後多くの研究者により、ミオシンリン酸化機構の存在は平滑筋のみならず非筋細胞においても確認されている<sup>5,6)</sup>。これは図3に示すように、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇→ $Ca^{2+}$ ・カルモデュリン複合体形成→カルモデュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の活性化→ミオシン軽鎖のリン酸化→収縮というものである。逆に弛緩は、 $Ca^{2+}$  濃度低下→ホスファターゼによるミオシン軽鎖の脱リン酸化→弛緩という機作である。すなわち、ミオシン軽鎖のリン酸化によりミオシンが活性化され、その脱リン酸化はミオシンを不活性化することがミオシン側制御の根拠となっている。

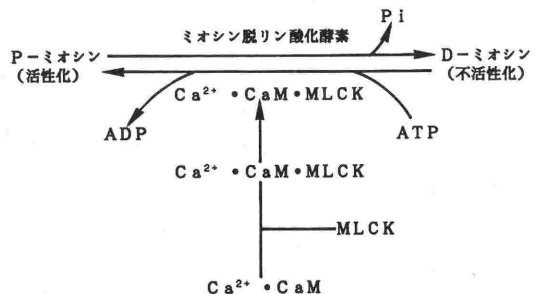


図3 ミオシン側制御 (ミオシンリン酸化説) MLCK, ミオシン軽鎖キナーゼ, P-ミオシン, リン酸化ミオシン; D-ミオシン, 非リン酸化ミオシン; CaM, カルモデュリン

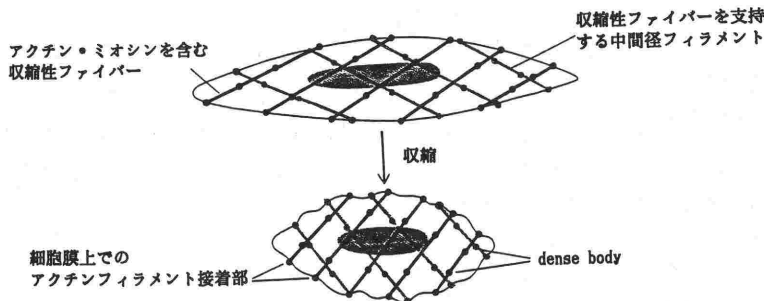


図2 平滑筋細胞収縮における dense body の役割 細胞質内の dense body と細胞膜のアクチンフィラメント接着部が、平滑筋細胞における収縮性要員の接点となり、収縮時の張力発生に寄与している。

## 2. ミオシン二重リン酸化

後に述べるように、平滑筋には多量のミオシン軽鎖キナーゼが存在する ( $3 \mu\text{M}$ )。平滑筋のカルモデュリン結合蛋白質としては、アクチン側制御因子であるカルデスモンに次いで多い。この酵素がミオシン軽鎖1モルに1モルのリン酸化を行うとして単純にその必要量を計算すると、平滑筋中のミオシン軽鎖キナーゼの存在量はその必要量の約20倍に達する。そこでわれわれは、通常のみオシンリン酸化量の10-20倍に相当するミオシン軽鎖キナーゼを添加して、尿素ゲル電気泳動法によりミオシン軽鎖の易動度を検討した。すると、これまで観察されていたリン酸化ミオシン軽鎖(1モルの軽鎖が1モルリン酸化されたもの)よりも、さらに易動度の速い位置に軽鎖が移動することを見出した(図4)<sup>7)</sup>。この新たに移動した軽鎖は、脱リン酸化酵素によって本来のリン酸化あるいは非リン酸化軽鎖の位置まで易動度が回復する。併せて、 $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて速い易動度を示した軽鎖へのリン酸化量を測定したところ、軽鎖1モルに2モルのリン酸が取り込まれていた。1モル目のリン酸化は Ser 残基、2モル目は Thr 残基であること、またミオシン軽鎖の二重リン酸化により、ミオシン ATPase 活性は著明に増大することが判明した<sup>8)</sup>。同様の結果は、ほぼ時期を同じくして Ikebe & Hartshorne によっても報告され

た<sup>9)</sup>。

このミオシン二重リン酸化は試験管内の単なる artifact なのか、それとも平滑筋の何らかの機能と関わっているのであろうか。最近、血管条片の収縮性とリン酸化の対応から、収縮力の増大時にミオシン二重リン酸化が検出されることが示された<sup>10)</sup>。これらのことから、本来は1モルリン酸化で収縮・弛緩制御が行われている平滑筋が、ある種の状態(例えば血管攣縮)においてのみ二重リン酸化が起こるのではないかと考えられる。この問題は病態とも関わる重要な点であり、今後詳細な検討が必要である。

## 3. アクチン側制御

ミオシン側制御は広く受け入れられて現在に至っているが、これだけでは説明できない矛盾点もある。ミオシン側制御が全盛の頃、アクチン側においても  $\text{Ca}^{2+}$  制御系の存在することが指摘された<sup>11-13)</sup>。アクチン側制御とは、 $\text{Ca}^{2+}$  の作用点が横紋筋の場合と同様に、アクチン側に存在するというものである。江橋らはライオトニン説を提唱したが<sup>11)</sup>、Marston や Hartshorne らはアクチン側制御因子の同定に至らなかった<sup>12,13)</sup>。

当時われわれは、各種組織・細胞に  $5\sim 35 \mu\text{M}$  存在するカルモデュリンの標的を探索していた。その結果、平滑筋に2種類のカルモデュリン結合蛋白質(分子量 135 kDa と 150 kDa)が存在することを見出した。135 kDa 蛋白質はミオシン軽鎖キナーゼであり<sup>14)</sup>、150 kDa 蛋白質は酵素活性を持たない未知の蛋白質であると考えた。われわれは、この新しいカルモデュリン結合蛋白質をカルデスモン(caldesmon)と名付けた(calmodulin+desmos...結合を意味するギリシャ語)<sup>15)</sup>。表2にニワトリ砂囊平滑筋中のカルモデュリン・カルデスモン・ミオシン軽鎖キナーゼ含有量をまとめた。カルデスモンとミオシン軽鎖キナーゼは、平滑筋カルモデュリンの各々71%と13%に相当する量存在する。すなわち、この両者で実に84%のカルモデュリン量を説明するに足るだけ存在することになり、平滑筋におけるカルモデュリンの主要標的はこの2つの蛋白質であると考えても過言ではない。

カルデスモンは、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存してカルモデュリンとアクチンフィラメント間で結合性の変換を示すという特性を持っている<sup>15)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度

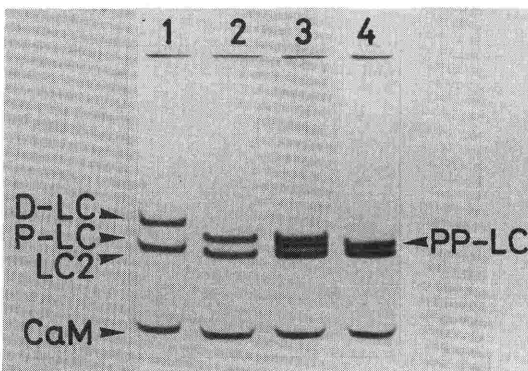


図4 砂囊平滑筋ミオシン軽鎖のリン酸化(尿素ゲル電気泳動像)

20 K ミオシン軽鎖(D-LP, 非リン酸化ミオシン軽鎖; P-LP, 1モルリン酸化ミオシン軽鎖; PP-LP, 二重リン酸化ミオシン軽鎖) 17 K ミオシン軽鎖(LC2), カルモデュリン(CaM)。1, 0; 2, 5; 3, 50; 4, 200  $\mu\text{g}$  ミオシン軽鎖キナーゼ/ml を添加。ミオシン軽鎖キナーゼ添加量の増加により、新たな PP-LC が出現する。

表2 ニワトリ砂囊平滑筋のカルモデュリンとカルモデュリン結合蛋白質

蛋白質	分子量 (kDa)	含有濃度 ( $\mu M$ )	カルモデュリンへの結合当量 ( $\mu M$ )
カルモデュリン	17	24	— (100%)
カルデスモン	~150	16	16 (67%)
ミオシン軽鎖キナーゼ	135	3	3 (13%)

が  $10^{-6} M$  以下の時、カルモデュリンは不活性型でカルデスモンとは相互作用せず、従ってカルデスモンはアクチンフィラメントと結合した状態にある。ところが  $Ca^{2+}$  濃度が  $10^{-6} M$  以上に増加すると、 $Ca^{2+}$  はカルモデュリンと結合して活性型カルモデュリンとなり、このカルモデュリンとカルデスモンが複合体を形成しアクチンフィラメントから遊離する。われわれは、この結合様式の変換をフリップ・フロップ結合 (flip-flop binding) と名づけた<sup>15,16</sup>。その後われわれは、 $Ca^{2+}$  濃度に依存してカルモデュリンと細胞骨格 (アクチンフィラメントあるいはチューブリン) 間でフリップ・フロップ結合により細胞骨格機能制御を行う一連の蛋白質を見出したが<sup>17</sup>、カルデスモンはその最初の例となったものである。

次に、ニワトリ砂囊平滑筋より調整した脱感作アクトミオシンを用いて、アクチン-ミオシン系に対するカルデスモンの作用を検討した。ミオシンリン酸化に必要最小量の  $Ca^{2+}$ ・カルモデュリン・ミオシン軽鎖キナーゼとトロポミオシン存在下で活性化されるアクチン-ミオシン相互作用をカルデスモンは抑制し、逆にカルモデュリンの添加によってこの抑制作用が解除されることが判明した<sup>18</sup>。ついで、リン酸化ミオシンをはじめ全て精製した収縮系要素より成る完全再構成系を用いて、カルデスモンの作用機作を解析を行った<sup>19</sup>。これらの結果から、カルデスモンを介するアクチン-ミオシン間制御機作を、図5Aの如きフリップ・フロップ制御によるものと考えている<sup>20</sup>。 $Ca^{2+}$  が低濃度 ( $10^{-6} M <$ ) の時は、カルデスモンはアクチンフィラメント・トロポミオシン系に結合し、アクチン-ミオシン間相互作用を抑制する。いっぽう  $Ca^{2+}$  濃度の増加により ( $>10^{-6} M$ )、活性型カルモデュリン・カルデスモン複合体が形成され、この複合体はアクチンフィラメント・トロポミオシン系から遊離する。この結果、カルデスモンによるアクチン-ミオシン間抑制作用

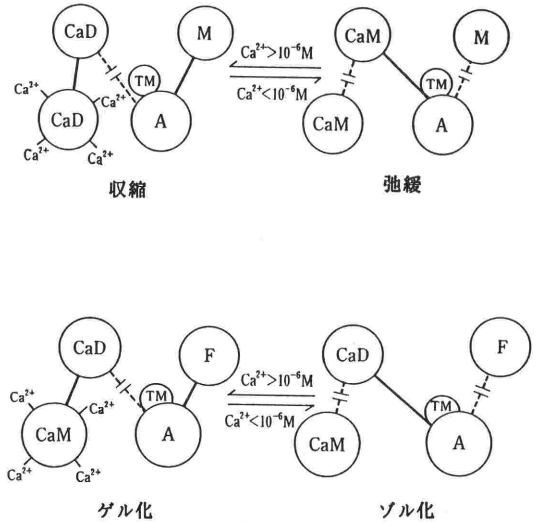


図5 カルデスモンによるフリップ・フロップ制御  
A. 平滑筋アクチン-ミオシン系の  $Ca^{2+}$  制御 (アクチン側制御) -フリップ・フロップ制御  
B. アクチン-フィラミン間のカルデスモンによるフリップ・フロップ制御

が解除され、アクチン-ミオシン相互作用が起こるのである。この系でアクチンとミオシンが相互作用する為には、前述のミオシン側の活性化 (ミオシンリン酸化) が必要である。従って、平滑筋アクチン-ミオシン系の  $Ca^{2+}$  による制御は、アクチン-とミオシンの両側制御 (dual regulation) により成り立っていると考えられる。

平滑筋収縮において、アクチン-とミオシンの両側制御がいかなる役割分担をしているのだろうか。ミオシン側制御は恐らくアクチン-ミオシン相互作用の程度、すなわち平滑筋全体としては張力の発生を規定しているであろうし、カルデスモンを介するアクチン側制御はアクチン-ミオシン相互作用のまさにスイッチ on-off 的役割を果していると考えられる。カルデスモンの収縮系への関与については、Szpacenko らは、ニワトリ砂囊平滑筋の skinned fiber を用いた収縮系でカルデスモンの抑制効果を確認している<sup>21</sup>。

Marston らも、彼らの調整した細いフィラメントに存在するアクチン側制御因子がカルデスモンであることを同定した<sup>22)</sup>。

カルデスモンのアクチン-ミオシン系への関与を明らかにしはじめた頃、われわれは同時にアクチン-フィラミン系へのカルデスモンの影響についても検討を開始した。カルデスモンはアクチン-フィラミン系に対しても、 $\text{Ca}^{2+}$ ・カルモデュリン依存性の制御を行っている<sup>23)</sup>。さらにカルデスモンの効果が、トロポミオシン存在下で飛躍的に促進されることを見出した<sup>24)</sup>。この分子機作は、アクチン-ミオシン系の場合と同様、フリップ・フロップ型制御により説明可能である(図5B)。それでは、なぜ同じ蛋白質が同じ作用機作により異なる蛋白質間の相互作用を制御しているのだろうか。先にも述べたように、アクチンとミオシンが相互作用して張力を発生する為には、アクチンを含む細いフィラメントの一端は固定されている必要がある。横紋筋では、細いフィラメントはZ帯に支えられている。先程述べたように、平滑筋・非筋細胞ではこのZ帯に相当するものが平滑筋でわずかに dense body として観察されるのみで、非筋細胞に至っては全くそれらしき構造は見い出されない。横紋筋と平滑筋・非筋細胞収縮機構の基本的違いは、横紋筋がZ帯を基盤とした二次元的収縮であるのに対して、後者は三次元的収縮ということである。平滑筋・非筋細胞でアクチンフィラメント間を架橋することにより細いフィラメントの支えを行っているのが支点蛋白質であり、この蛋白質がまさに三次元的収縮の要となるものである。これまでいくつかの蛋白質がその候補として挙げられてきたが、この中で最も可能性のある蛋白質の1つがフィラミンという訳である。

われわれは図5BとCで得られたカルデスモンによるアクチン-ミオシン間及びアクチン-フィラミン間の各制御系を組み合わせた三次元収縮モデルの作製を試みた<sup>25)</sup>。図6Aにこの収縮モデルを用いた実験結果の一部を紹介する。三次元収縮モデルにはアクチン・トロポミオシン・ミオシンそれにミオシンリン酸化に必要最小量のミオシン軽鎖キナーゼとカルモデュリンに加えてフィラミンの存在が必須である。このモデルによれば(図6B)、フィラミンによりアクチンフィラメント

間の架橋が生じ、ついにはアクチンフィラメントがゲル化する。同時に、アクチンフィラメント間に存在するミオシンがアクチンフィラメントと相互作用する結果、ゲルの収縮を来すと考えられる。次に、この三次元収縮モデルを用いてカルデスモンの影響を検討した。予想された通り、 $\text{Ca}^{2+}$  とカルモデュリン存在下でカルデスモンはアクチン-フィラミン系に対する抑制効果を発揮し得ず、逆にフィラミンによるアクチンフィラメント架橋を起し、アクチンゲルが形成される。同時に、アクチン-ミオシン相互作用によりゲルの収縮を来す。いっぽう低 $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $<10^{-6}$  M) では、カルデスモンはアクチン-フィラミン系とアクチン-ミオシン系に対して、それぞれゲル化抑制(ゾル化)と収縮抑制(弛緩)作用を示す。従って、三次元収縮モデルにおける収縮・弛緩-ゾル化・弛緩相関 (gelation·contraction-solation·relaxation coupling) とも言える<sup>20)</sup>。

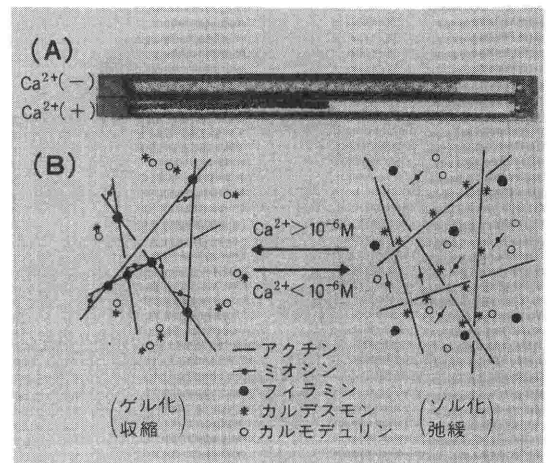


図6 三次元収縮モデル

(A) 蛋白質溶液に微細な炭素粉を加えガラス毛細管内に吸い上げ一端を封じる。黒い炭素粉により収縮が可視化される。収縮にはアクチン・トロポミオシン・ミオシン・リン酸化ミオシンに加えてフィラミンが必須である。

(B) ゲル化-収縮-ゾル化-弛緩連関。右：低 $\text{Ca}^{2+}$  濃度では、カルデスモンはアクチン-フィラミン系およびアクチン-ミオシン系に作用して、ゲル化抑制(ゾル化)および収縮抑制(弛緩)を示す。左：高濃度ではカルデスモンによるアクチン-フィラミン系の抑制が解除され、アクチンゲルが形成されると同時に、アクチン-ミオシン間相互作用によりゲルが収縮する。



#### IV. 非筋細胞アクチン-ミオシン系の $Ca^{2+}$ 制御機構

平滑筋同様、非筋細胞においてもカルモデュリン・ミオシン軽鎖キナーゼの存在はすでに証明されている。また、非筋細胞の各種ミオシンがミオシン軽鎖キナーゼにより  $Ca^{2+}$ ・カルモデュリン依存性にリン酸化されることも明かである。従って、非筋細胞でミオシン側制御の存在はほぼ確立されたと言える。

カルデスモンによるアクチン側制御はどうか。われわれは、カルデスモン抗体を用いたイムノブロット法により、カルデスモン分布の検討とその定量化を行った(表3)<sup>26-28</sup>。これによれば、平滑筋では SDS ゲル電気泳動上分子量 ~150 kDa のカルデスモンが特異的かつ高濃度存在し、非筋細胞では分子量 77 kDa の低分子カルデスモンが見い出された。非筋実質細胞では低分子カルデスモンが圧倒的優位である。そこで高分子 (high Mr) 型を *h*-カルデスモン、低分子 (low Mr) 型を *l*-カルデスモンと名づけた<sup>20, 28</sup>。

精製した *l*-カルデスモンは、アクチン・カルモデュリン結合能・非筋アクチンミオシン系への抑制効果などを検討の結果、*h*-カルデスモンと機能的に全く差異がなかった<sup>27</sup>。従って、*l*-カルデスモンも *h*-カルデスモン同様、非筋細胞における広汎なアクチン側制御因子であることが確立した<sup>20</sup>。

また *l*-カルデスモンの細胞内分布では、培養細胞中のアクチンフィラメントの束であるストレスファイバーと細胞運動性の高い細胞辺縁部に局在していることが明らかになった<sup>26</sup>。Bretscher と Lynch はカルデスモン抗体を用いた細胞内局在の検討から、*l*-カルデスモンがストレスファイバーに沿って周期的斑点状に分布することを見出した<sup>29</sup>。この局在は、ストレスファイバー上でのトロポミオシンのそれに類似しており、前に述べたカルデスモンがトロポミオシン機能を調節しているという生化学的知見を支持するものであった。免疫組織化学的手法により、*l*-カルデスモンは骨格筋・心筋を除く全ての組織でその存在が確認されている<sup>30</sup>。殊に、細胞運動性に富むオルガネラとしてよく知られている小腸絨毛刷子縁にその存在が著明であった<sup>31</sup>。細胞運動性については、細胞膜流動性を伴うリンパ球細胞膜レセプターのキャップ現象がよく知られている。この系でリンパ球における *l*-カルデスモンは、トロポミオシン、アクチンとともにリガンド (コンカナバリン A) により誘起されたレセプター凝集塊と一致してその直下に集積した<sup>32</sup>。このように、*l*-カルデスモンは非筋細胞の細胞運動性と関連して分布しており、アクチン・トロポミオシンとの局在が一致している。

表3 カルデスモンの組織・細胞分布

組織・細胞	<i>h</i> -カルデスモン ( $\mu$ M)	<i>l</i> -カルデスモン ( $\mu$ M)
ニワトリ 砂嚢	18.4	<0.06
ウシ 大動脈	6.0	<0.06
副腎髄質	0.04	0.82
副腎皮質	0.05	0.68
下垂体前葉	0.03	0.44
下垂体後葉	0.03	0.64
ラット 脾臓	0.05	0.43
脳	<0.01	0.25
肝臓	0.03	0.78
腎臓	0.03	0.66
培養細胞 BALB/c 3T3	<0.01	0.62
NRK	<0.01	0.35
BHK	<0.01	0.53
MDCK	<0.01	0.40
CHO-K1	<0.01	0.48

V. 平滑筋分化・脱分化の生物学

in vivo で、平滑筋は未分化細胞（幹細胞, germ cell）から平滑筋細胞へと一方通行的に分化する。ところが、初代培養系の平滑筋細胞では、分化型から脱分化型へと形質転換を示す。これまでに、分化及び脱（あるいは末）分化型平滑筋細胞の生物学的特性についてはあまり多くの解析がなされていない。

ここでは平滑筋分化・脱分化に伴うカルデスモンの発現変換を中心に述べる。平滑筋で特異的に検出される*h*-カルデスモンとは、いかなる時期に発現するのか。われわれはこの問題を、ニワトリ砂嚢平滑筋の発育過程、ラット大動脈平滑筋初代培養系及び BC<sub>3</sub>H1 細胞を用いて、平滑筋細胞の分化、脱分化という立場から検討した<sup>28)</sup>。ニワトリ砂嚢平滑筋発育過程でみると、孵卵7日目までカルデスモンは*l*-型のみが発現している。しかし孵卵10日目を過ぎると、*h*-カルデスモンが検出されるようになり、その後発育に伴って*h*-カルデス

モンは急激に増加する。この発現パターンは、ミオシンやトロポミオシンのそれとよく一致している。*h*-カルデスモンとは反対に、*l*-カルデスモンの発現は砂嚢平滑筋の発育に伴ってむしろ漸減する。この両カルデスモン発現の推移は、孵卵7-10日目の砂嚢がまさに幹細胞から平滑筋細胞に分化し、徐々に平滑筋組織に発育する過程と符合している（図7）。次に、大動脈平滑筋初代培養系では培養に伴い細胞は収縮型から増殖型へと脱分化するが、これに一致して*l*-カルデスモンの発現増加と*h*-カルデスモンの発現抑制が認められた（図8）。逆に、平滑筋細胞分化モデルである BC<sub>3</sub>H1 細胞を増殖型から分化型に変換すると、それまで発現していなかった*h*-カルデスモンが発現するようになる。mRNA レベルは上記蛋白質レベルと一致することから、平滑筋細胞の分化・脱分化に伴う両カルデスモンの発現は、mRNA 以前のレベルで制御されているものと考えられる。表4で示したように収縮性構成員のいくつかは確かに分化・脱分化で変化を示すが、その中でも特徴的变化として捉えられるのがカルデスモンの発現変換である。従って、今後カルデスモンの発現変換は、平滑筋細胞の分化・脱分化という平滑筋における形質転換の絶好の指標になるものと期待さ

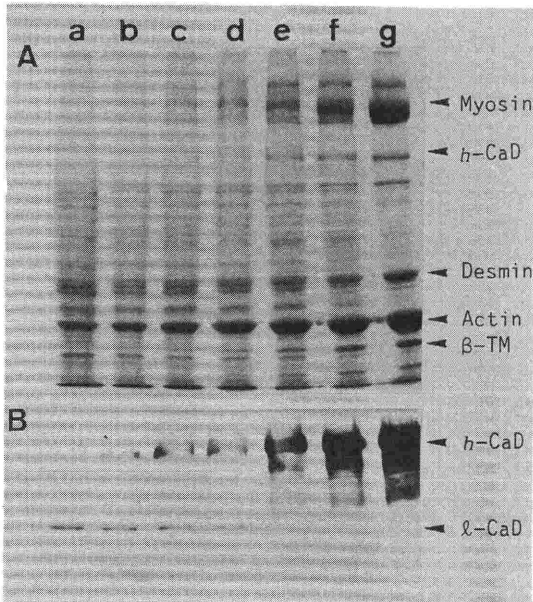


図7 ニワトリ砂嚢平滑筋の分化過程に伴う収縮性構成員の発現変化

A: ニワトリ砂嚢平滑筋の各発育段階での蛋白パターン (SDS-ゲルをクマシー染色)。

B: Aを*h*-カルデスモン抗体でイムノプロットした像。

a-e: 孵卵7, 10, 13, 16, 19日目, f: 孵化3日後, g: 成鶏。

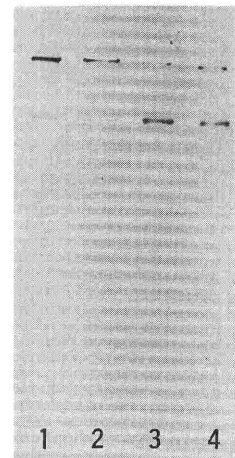


図8 ラット大動脈平滑筋初代培養系の脱分化に伴う*h*-と*l*-カルデスモン発現変化

培養各日数における*h*-と*l*-カルデスモンの発現変化 (*h*-カルデスモン抗体を用いたイムノプロット法による)。

1, 培養1日目; 2, 2日目; 3, 5日目; 4, 7日目。



表4 平滑筋分化・脱分化に伴う変化

	脱(未)分化細胞	分化細胞(平滑筋)
アセチルコリン受容体	少	多
収縮脳(アンギオテンシンIIに対する反応性)	—	+
ミオシン・トロポミオシン	少	多
カルデスモン(蛋白質及びmRAレベル)	l-カルデスモン	h-カルデスモン

れる。

最近われわれは、*h*-と*l*-カルデスモン発現制御を解析する目的で、両カルデスモンの一次構造を決定したので以下に紹介する。*h*-カルデスモンは771個のアミノ酸残基より成る分子量89 kDaの蛋白質であり<sup>33,34)</sup>、*l*-カルデスモンは517個のアミノ酸から構成される70 kDa蛋白質であった<sup>35)</sup>。両者の基本的相違点は図9に示すように、*h*-カルデスモン中央部のドメインが*l*-カルデスモンには欠損していることである。本稿の初めの項で*h*-カルデスモンはSDSゲル電気泳動上150 kDaであると述べたが、確かに*h*-カルデスモンcDNAによってコードされた89 kDa蛋白質は、SDSゲル電気泳動上の分子量は~150 kDaを示す。これは、*l*-カルデスモンで欠損している中央部ドメインがグルタミン酸の豊富な15個のアミノ酸配列の繰り返し構造によるためSDSゲル電気泳動上の易動度が遅く、本来の分子量の倍近くの分子量として算定されたのである。*h*-と*l*-カルデスモンともに、カルデスモンとしての必須の機能(カルモデュリン-、アクチン-、トロポミオシン-結合能)はともにCドメインにある<sup>36)</sup>。一次構造決定の現時点では、両カルデスモンは少なくともスプライシングにより両者が出来たと考えられる。次の問題は、この両カルデスモン発現制御であるが、これについては今後genomicのレベルまで掘り下げる必要がある。

## VI. おわりに

研究の歴史からは横紋筋の収縮制御機構が先に解明されたために、平滑筋の収縮制御機構が特異であると考えがちであった。しかし、平滑筋や非筋細胞のアクチン-ミオシン系制御機構の方がより普遍的であり、横紋筋のそれはむしろ合目的的に分子進化・特殊化したものではないかと考えられる。骨格筋・心筋は迅速に収縮弛緩を繰り返すために、進化の過程においてリン酸化-脱リン酸

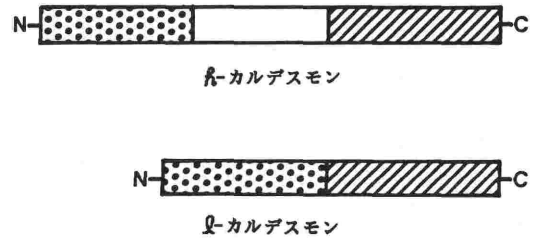


図9 *h*-と*l*-カルデスモンの一次構造上のドメインマップ

C末端35 kDa部がカルモデュリン・アクチン・トロポミオシン結合ドメイン。*h*-カルデスモン中央部の繰り返し構造(□)が欠損している。N末端の機能は現在不明。C末端とN末端のアミノ酸配列は、N末端の一部を除き全て一致する。

化の酵素反応を省略し、さらにフリップ・フロップ制御のような抑制性因子の完全な結合-解離よりもより効率的なアクチンフィラメント上でのトロポニン複合体によるスイッチング機構を獲得したものと考えられる。この過程で、カルモデュリンの特殊化といえる $Ca^{2+}$ 結合蛋白質=トロポニンC、カルデスモンに対応するアクチン調節蛋白質=トロポニンI・Tが生じたのかも知れない。

このような観点で平滑筋と横紋筋を対比すると、同じ筋組織でありながら $Ca^{2+}$ 制御系という機能面とその制御因子の分子面との両面にわたる進化過程をたどることが出来る。

## 文 献

- 1) Huxley, H. E.: Science 164:1356-1366 (1969).
- 2) Ebashi, S., Ebashi, F., and Kodama, A.: J. Biochem. 62:137-138 (1967).
- 3) Ohtsuki, I., Maruyama, K., and Ebashi, S.: Adv. Prot. Chem. 38:1-67 (1986).
- 4) Sobieszek, A. and Small, J. V.: J. Mol. Biol. 102:75-92 (1976).
- 5) Adelstein, R. S. and Eisenberg, E.: Annu. Rev. Biochem. 49:921-956 (1980).
- 6) Hartshorne, D. J. and Siemankowski, R. F.: Annu. Rev. Physiol. 43:519-530 (1981).
- 7) Tanaka, T., Yamazaki, K., and Sobue, K.: J.

- Biochem. 97:1823-1826 (1985).
- 8) Tanaka, T., Sobue, K., Owada, M. K., and Hakura, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131:987-993 (1985).
  - 9) Ikebe, M. and Hartshorne, D. J.: *J. Biol. Chem.* 260:10027-10031 (1985).
  - 10) Haeberle, J. R., Sutton, T. A., and Trockman, B. A.: *J. Biol. Chem.* 263:4424-4429 (1988).
  - 11) Mikawa, T., Toyo-oka, T., Nonomura, Y., and Ebashi, S.: *J. Biochem.* 81:273-275 (1977).
  - 12) Marston, S. B., Trevett, R. M., and Walters, M.: *Biochem. J.* 185:355-365 (1980).
  - 13) Peschini, A., Mrwa, U., and Hartshorne, D. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98:800-805 (1981).
  - 14) Sobue, K., Morimoto, K., Kanda, K., Fukunaga, K., Miyamoto, E., and Kakiuchi, S.: *Biochem. Int.* 5:503-510 (1982).
  - 15) Sobue, K., Muramoto, Y., Fujita, M., and Kakiuchi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5652-5655 (1981).
  - 16) Kakiuchi, S. and Sobue, K.: *Trends in Biochem. Sci.* 8:59-62 (1983).
  - 17) Sobue, K., Tanaka, T., Kanda, K., and Ashino, N.: *The Role of Calcium in Biological Systems* (Anghileri, L. J. ed.) CRC Press, Inc. pp. 21-35 (1987).
  - 18) Sobue, K., Morimoto, K., Inui, M., Kanda, K., and Kakiuchi, S.: *Biomed. Res.* 3:188-196 (1982).
  - 19) Sobue, K., Takahashi, K., and Wakabayashi, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132:645-651 (1985).
  - 20) Sobue, K., Kanda, K., Tanaka, T., and Ueki, N.: *J. Cell. Biochem.* 37:317-325 (1988).
  - 21) Szpacenko, A., Wagner, J., Dabrowska, R., and Ru'egg, J. C.: *FEBS Lett.* 192:9-12 (1985).
  - 22) Marston, S. B. and Lehman, W.: *Biochem. J.* 231:517-522 (1985).
  - 23) Sobue, K., Morimoto, K., Kanda, K., Maruyama, K., and Kakiuchi, S.: *FEBS Lett.* 138:289-292 (1982).
  - 24) Nomura, M., Yoshikawa, K., Tanaka, T., Sobue, K., and Maruyama, K.: *Eur. J. Biochem.* 163:467-471 (1987).
  - 25) Nomura, M. and Sobue, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146:936-943 (1987).
  - 26) Owada, M. K., Hakura, A., Iida, K., Yahara, I., Sobue, K., and Kakiuchi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3133-3137 (1984).
  - 27) Sobue, K., Tanaka, T., Kanda, K., Ashino, N., and Kakiuchi, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5025-5029 (1985).
  - 28) Ueki, N., Sobue, K., Kanda, K., Hada, T., and Higashino, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9049-9053 (1987).
  - 29) Bretscher, A. and Lynch, W.: *J. Cell Biol.* 100:1656-1663 (1985).
  - 30) Fujita, H., Ishimura, K., Ban, T., Kurosumi, M., Sobue, K., and Kakiuchi, S.: *Cell Tissue Res.* 237:375-377 (1984).
  - 31) Ishimura, K., Fujita, H., Ban, T., Matsuda, H., Sobue, K., and Kakiuchi, S.: *Cell Tissue Res.* 235:207-209 (1984).
  - 32) Mizushima, Y., Kanda, K., Hamaoka, T., Fujiwara, H., and Sobue, K.: *Biomed. Res.* 8:73-78 (1987).
  - 33) Hayashi, K., Yamada, S., Kanda, K., Kimizuka, F., Kato, I., and Sobue, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:38-45 (1989).
  - 34) Hayashi, K., Kanda, K., Kimizuka, F., Kato, I., and Sobue, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:503-511 (1989).
  - 35) Hayashi, K., Kanda, K., Kimizuka, F., Kato, I., and Sobue, K.: *submitted*.
  - 36) Yazawa, M., Yagi, K., and Sobue, K.: *J. Biochem.* 102:1065-1073 (1987).