

様式3

平成 29 年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

平成 30 年 2 月 26 日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関 : 東京大学 _____

部局・職名 : 先端科学技術研究センター・

助教

氏名 : 榊原伊織 _____

1. 研究課題

アンドロゲンによる筋増強機構の解明

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 榊原伊織	東京大学 先端科学技術研 究センター	助教	Androgen receptor 欠損マウスの解析
研究分担者 今井祐記 澤崎達也 高橋宏隆	愛媛大学プロテオ サイエンスセンター	教授 教授 講師	Mylk4 ノックダウンマウスの作製 MYLK4 の基質の探索 MYLK4 の基質の探索

3. 研究成果

別紙のとおり

<研究課題名>

アンドロゲンによる筋増強機構の解明

<研究者所属・職・氏名>

東京大学・助教・榊原伊織

<研究目的>

現代、すでに高齢社会になっており、増加する高齢者のロコモティブシンドロームは社会の関心事である。ロコモティブシンドロームの原因の一つとして、骨格筋の機能低下（サルコペニア）があり、骨格筋の維持が重要である。アンドロゲンは骨格筋の増強作用があるが、そのメカニズムが不明であるため、メカニズムを解明することができれば、創薬の標的となる可能性がある。本研究の目的は、アンドロゲンによる筋増強のメカニズムを解明することである。

<研究内容>

すでに今井教授が所有する骨格筋特異的アンドロゲン受容体欠損マウスを用いた解析から、アンドロゲン受容体依存的に Mylk4 が誘導され、Mylk4 が TNNI2 のリン酸化を行う可能性が示唆されている。MYLK4 には MYLK2 という別の遺伝子にコードされるアイソフォームが存在し、MYLK2 の基質は MYLPF であることがわかっている。そのため、MYLK4 と MYLPF の相互作用についても検討したい。本共同研究では、(1) 澤崎達也教授、および、高橋宏隆講師が所有するコムギ無細胞タンパク合成技術を用いて、MYLK4、MYLPF、および、TNNI2 タンパク質を合成し、*in vitro* でのリン酸化アッセイ、および、(2) 今井祐記教授と共同で Mylk4 による筋増強作用の生理学的評価を行う。

<研究成果>

- (1) MYLK4 は kinase ドメインがあり、Mylk4 の機能を解明するためには、MYLK4 の基質を同定する必要がある。そこで、小麦無細胞タンパク質合成系を用いて、MYLK4、及び、MYLK4 の基質候補である TNNI2、または、MYLPF のタンパク質を合成し、そのタンパク質—タンパク質相互作用を Alpha-screening により解析した。その結果、Alpha-screening では MYLK4 と TNNI2 の間に非常に弱い相互作用がある可能性が示された(図 1)。一方、

MYLRF はどの相互作用は検出されなかった(図 2)。これらのことから MYLK4 の基質としては TNNI2 である可能性が高いことが示唆された。

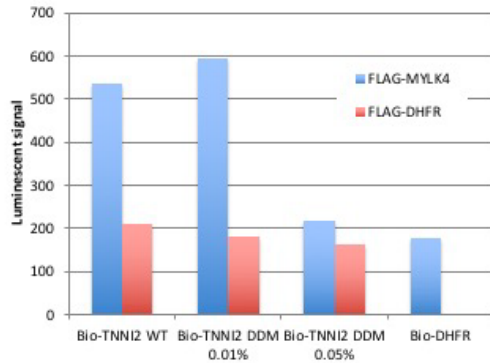


図 1 Alpha-screening による MYLK4 と TNNI2 の相互作用の検出

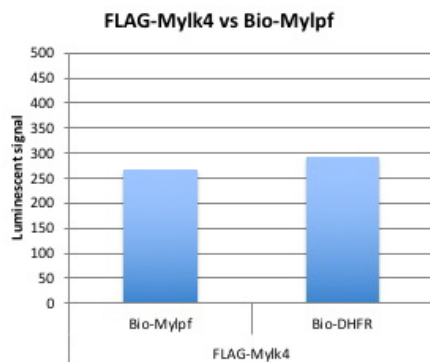


図 2 Alpha-screening による MYLK4 と MYLRF の相互作用の検出

(2) 骨格筋における Mylk4 の生理機能を解析するために、オスの野生型マウスの前脛骨筋に Mylk4 に対する siRNA を導入した。前脛骨筋の徐膜筋繊維を単離し、カルシウムに応答して生じる収縮力を計測した(図 3)。しかしながら、対照群と Mylk4 ノックダウン群で、cCa50 及び、最大収縮力共に、変化は見られなかった。

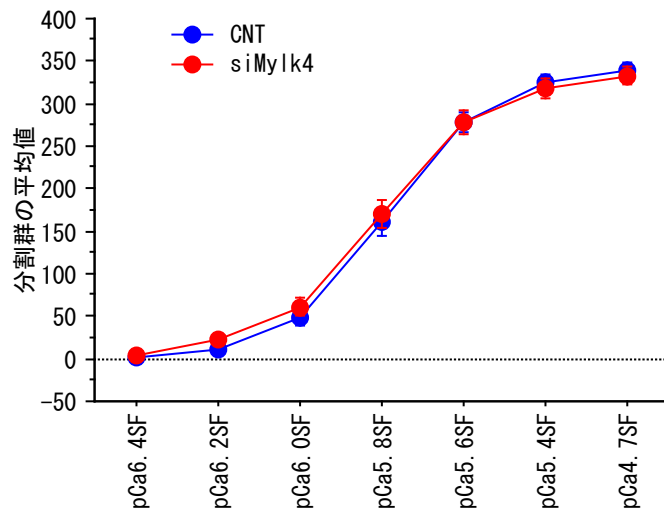


図3 Force-pCa curve

<成果発表>

2017年12月 第40回分子生物学会、口頭発表

2017年12月 第40回分子生物学会、ポスター発表

<今後の課題>

Alpha-screening では MYLK4 と TNNI2 の弱い相互作用が検出されたが、これはタンパク質のリン酸化反応は非常に早い反応であるため、複合体の形成される時間が短かく、Alpha-screening の値が小さく出て結果ではないかと考えられる。そこで、引き続き、小麦無細胞タンパク質合成系で合成したタンパク質を用いて in vitro kinase assay を行い、TNNI2、及び、MYLPF が MYLK4 によりリン酸化されるかどうか検討を行う。

今回の siRNA を用いた実験では、すべての筋繊維で siRNA が導入されるわけではなく、単離し、計測に使用した筋繊維で siRNA が作用していたかどうか確認が取れなかったため、今回の実験のみで Mylk4 の生理機能を説明するのは非常に困難である。そこで、CRISPR/CAS9 を用いて、Mylk4 の欠損マウスを作製する予定である。すでに、Mylk4 遺伝子に変異を導入することに成功したが、まだ Mylk4 欠損遺伝子のホモ欠損マウスが得られていない。今後は、マウスの交配を進め、Mylk4 欠損遺伝子のホモ欠損マウスを得た上で、骨格筋の生理学的評価を行う。

昨年までに行なった RNA-seq の結果を解析したところ、糖代謝、及び、アミノ酸代謝に関

わる遺伝子の変動が見られたため、遺伝子の発現変動を代謝マップに投影した(図4)。アミノ酸の取り込みが促進し、アミノ酸の異化が抑制されることが示唆されたため、実際の代謝産物の定量を行うため、メタボローム解析を行いたい。

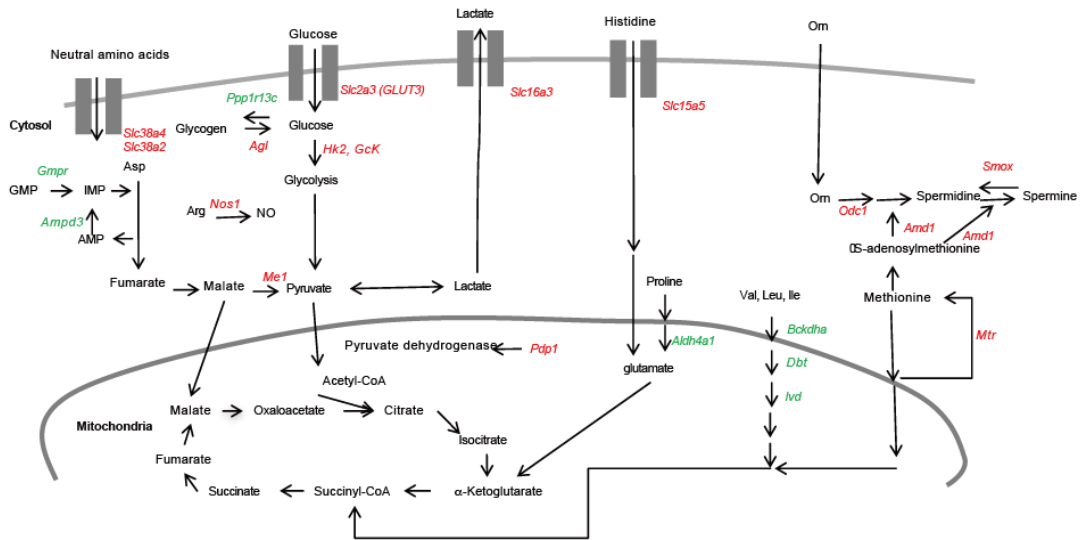


図4 Androgen receptorにより制御される代謝マップ