

様式3

平成30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31年2月5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 ノックアウトマウスの作製 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 が筋力を制御する可能性が示唆されている。本年度は、(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すでに合成した MYLK4、および、標的タンパク質の *in vitro* でのリン酸化アッセイ、および、(2) Mylk4 欠損マウスの筋力の評価を行う。

#### <研究成果>

- (1) Mylk4 の骨格筋における生理機能の解析を行うために、CRISPR/Cas9 法を用いて、Mylk4 欠損マウスの作製を行った。guideRNA を exon3、および、exon6 に作製し、ゲノム編集を行ったところ(図 1A, B)、exon3 を標的とした guideRNA を用いた受精卵からは 8 塩基を欠失した Mylk4 K0 マウス(図 1C)、exon6 を標的とした guideRNA を用いた受精卵からは 11 塩基を欠失した Mylk4 K0 マウス(図 1D)が得られた。どちらの Mylk4 変異体も欠失によりフレームシフトを起こすため、Mylk4 が K0 されたマウスとなることが示唆された。

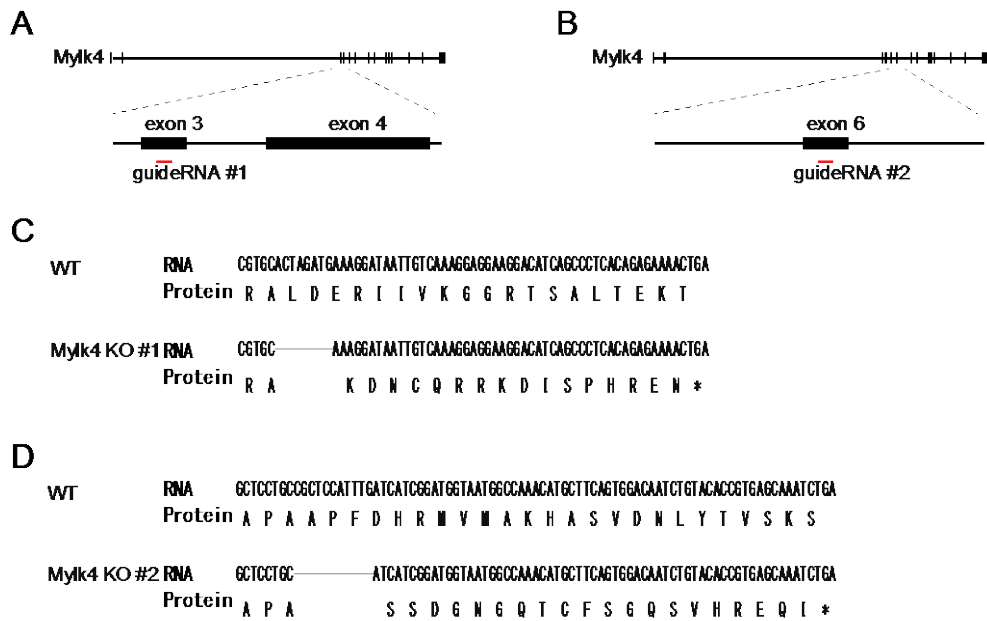


図1 Mylk4 欠損マウスの作製。A. Mylk4 KO マウス#1 作製の模式図。B. Mylk4 KO マウス#2 作製の模式図。C. Mylk4 KO マウス#1 のゲノム配列。D. Mylk4 KO マウス#2 のゲノム配列。

(2) 骨格筋における Mylk4 の生理機能を解析するために、Mylk4 KO マウス#1 の握力を測定したが、オス、メス共に、Mylk4 KO マウスと野生型マウスの間に握力の差は見られなかった。

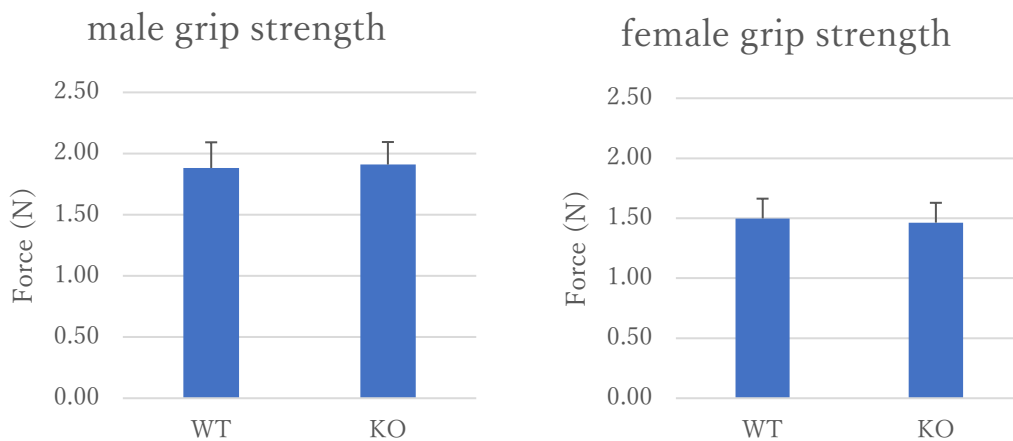


図2 Mylk4 KO マウスの握力

12 週齢 Mylk4 KO マウス#1 の握力。オス (WT N=9, KO N=8)、メス 12 週齢 (WT N=6, KO N=9)。

(3) 骨格筋における MYLK4 のリン酸化標的を同定するために、Mylk4 KO マウスの骨格筋タンパク質からリン酸化タンパク質の濃縮を行ったところ、180kDa 付近のバンドが Mylk4 KO マウスでは減少することが明らかとなった。このタンパク質を同定するために、このバンドをマスマスペクトロメトリーを用いて解析した。その結果、このバンドは Myomesin-1 であることが明らかとなった。

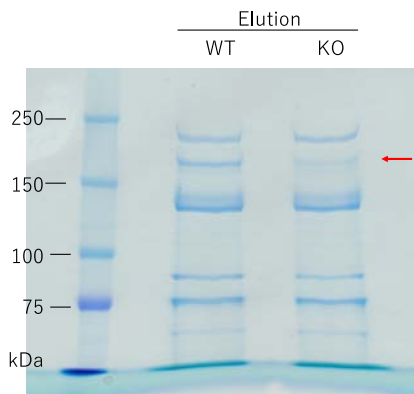


図3 リン酸化プロテオミクス解析

8 週齢 Mylk4 KO マウスの大腿四頭筋のタンパク質リン酸化タンパク質を濃縮したのち、6% ポリアクリルアミドゲルに泳動後、クマシーブルー染色によりタンパク質の染色を行った。赤矢印で示されたバンドが Mylk4KO マウスでは減少した。

#### (4) Myomesin-1 の小麦胚細胞タンパク質合成

Myomesin-1 と MYLK4 の *in vitro* リン酸化実験を行うために、コムギ胚細胞系を用いて Myomesin-1 タンパク質の合成を行った。N 末にビオチンタグをつけた Myomesin-1 と C 末にビオチンタグをつけた Myomesin-1 を合成したところ、C 末にビオチンタグをつけた Myomesin-1 の方が遥かに合成量が多いことが明らかとなった。また、合成した Myomesin-1 タンパク質は遠心後の上清から検出されたため、合成後、十分可溶化されていることも示された。このことから、C 末にビオチンタグをつけた Myomesin-1 タンパク質を用いて、*in vitro* リン酸化実験を行うことが可能となった。

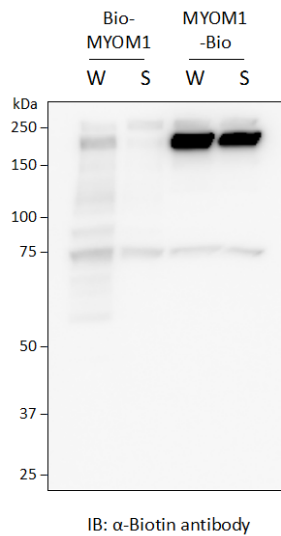


図4 Myomesin-1 タンパク質の合成

小麦無細胞タンパク質合成系を用いて、Myomesin-1 タンパク質の合成を行い、anti-biotin 抗体を用いて検出した。W, whole protein. S, supernatant。

<成果発表>

2018年10月、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究 性スペクトラムー連続する表現型としての雌雄第2回領域会議、アンドロゲンによる骨格筋制御

2018年11月、第6回若手による骨格筋細胞研究会、アンドロゲンによる筋制御メカニズム

<今後の課題>

Mylk4 KO マウスの骨格筋では Myomesin-1 のリン酸化が変化することが示された。Myomesin-1 は Titin と複合体を形成し、サルコメア構造の M-band を形成するタンパク質であるため、サルコメア構造に関与することが示唆される。一方、握力検査から Mylk4 KO マウスの握力が変化しないことが示された。骨格筋の収縮には、能動的筋収縮と受動的筋収縮があり、握力検査の結果から、能動的筋収縮には Mylk4 が関与していないことが示唆された。今回用いた握力検査では受動的筋収縮を測定することができないため、今後は Mylk4 KO マウスの受動的筋収縮を測定する必要がある。

MYLK4 の標的として、Myomesin-1 が候補として挙げたが、MYLK4 が直接 Myomesin-1 をリン酸化するかどうかは明らかでない。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 MYLK4、および、Myomesin-1 タンパク質を用いて in vitro kinase assay を行う必要がある。