

様式3

令和元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

令和2年2月18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解析 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 に作製し、ゲノム編集を行ったところ（図 1A）、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 KO マウス（図 1B）が得られ、欠失によりフレームシフトを起こすため、Mylk4 が KO されたマウスとなることが示唆された。

続いて、Mylk4 KO マウスの骨格筋の詳細な解析を行うため、Mylk4 KO マウスの skinned fiber を用いた筋収縮力測定を行なった。Mylk4 KO マウスの骨格筋は能動的な筋収縮力には変化がないが、筋繊維を受動的に引き延ばすのに必要な力が小さくなっており、

筋繊維の頑強さが減弱することが示された(図1C)。

Mylk 遺伝子には4つのアイソフォームが存在し、それらのうち、骨格筋には Mylk2 と Mylk4 が発現する。Mylk2 については、すでに Mylk2 の欠損マウスが作製されており、Mylk2 欠損マウスは拘縮後の筋力増強が減弱することが報告されている。Mylk4 も拘縮後の筋力増強に関与するかどうか解析したところ、Mylk4KO マウスは拘縮後の筋力増強を変化させないことが明らかとなった(図1D)。このことから、Mylk2 と Mylk4 は骨格筋においてそれぞれ別の機能を果たすことが明らかとなった。

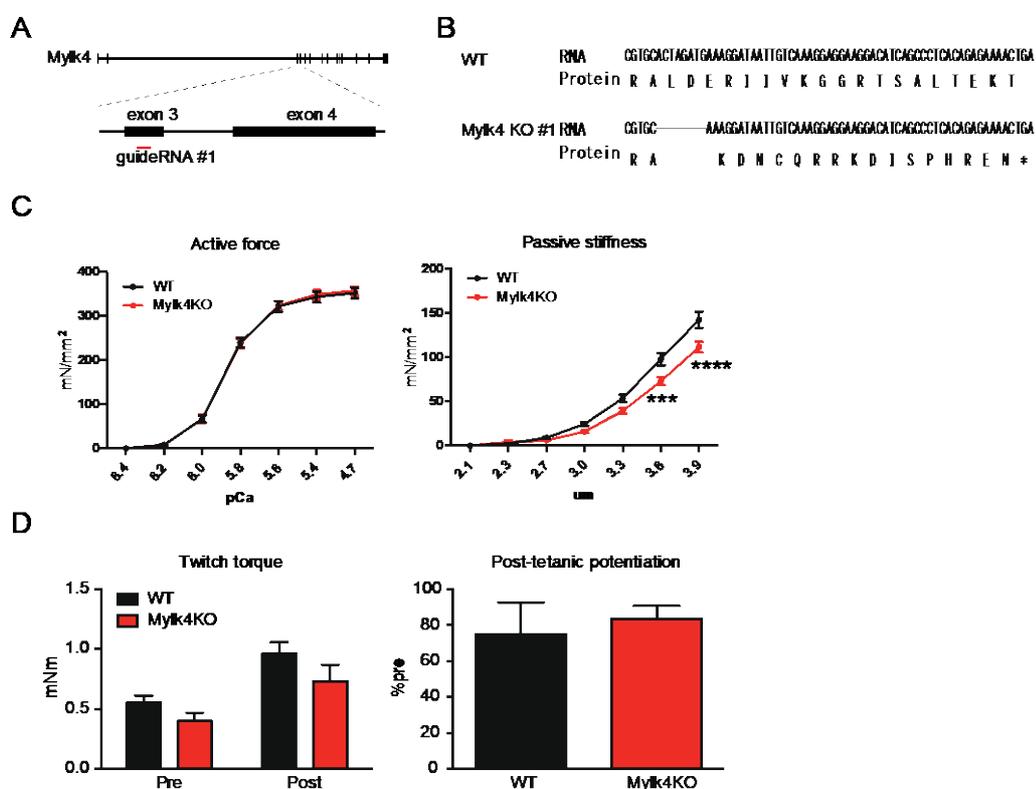


図1 Mylk4 欠損マウスは受動的頑強さが低下する。A. Mylk4 KO マウス#1 作製の模式図。B. Mylk4 KO マウス#1 のゲノム配列。C. skinned fiber を用いた筋収縮力。(WT N=9, KO N=8)D. Mylk4 KO マウス#1 の単収縮のトルク (左) と拘縮後の収縮力増強 (右)。

(2) 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結果、このバンドは Myomesin-1 であることが

明らかとなり、Myomesin-1がMYLK4の標的である可能性が示唆された。Myomesin-1がMYLK4により直接リン酸化されるかどうか検討するために、コムギ無細胞系を用いて Myomesin-1タンパク質と MYLK4 タンパク質の合成を行い、in vitro リン酸化実験を行った。autoradiographyの結果から、Myomesin-1は全体的に弱くリン酸化されたバンドが認められるが、negative controlとして用いた DHFRでも、同じ位置にバンドが検出され、野生型のMYLK4タンパク質によるMyomesin-1タンパク質への特異的なリン酸化付加は認められなかった(図2)。

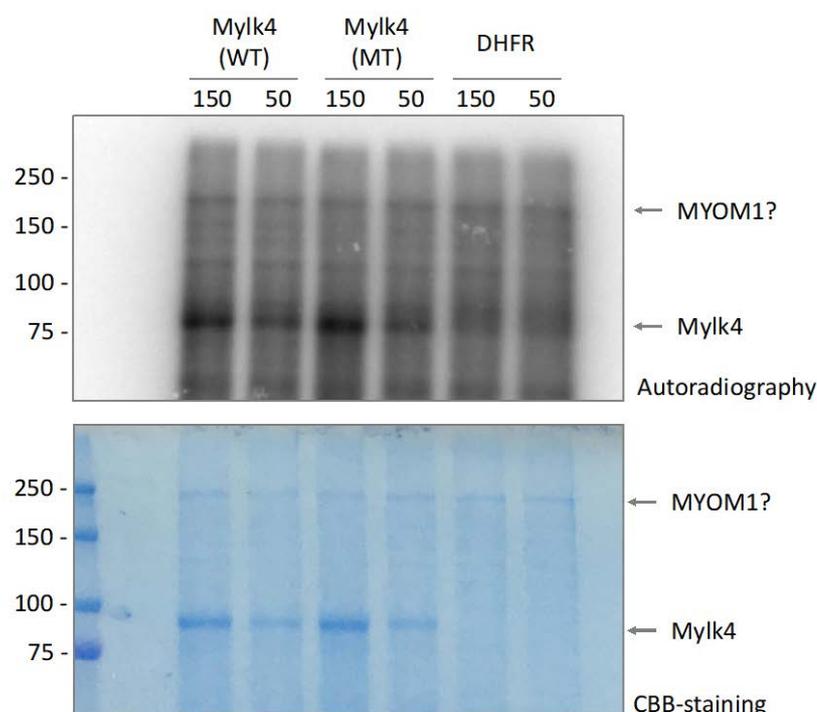


図2 in vitro kinase assay

コムギ無細胞合成系を用いて、野生型 MYLK4 タンパク質、および、変異型 MYLK4 タンパク質、Myomesins-1 タンパク質を合成し、in vitro kinase assay を行なった。

<成果発表>

2019年9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3回領域会議、アンドロゲンによる骨格筋制御

2019年9月、第74回日本体力医学会大会、アンドロゲンによる骨格筋制御機構メカニ

ズム

2019年11月、第47回日本関節病学会、アンドロゲンによる筋力増強作用の分子メカニズム

〈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し、骨格筋の頑強さに関与することが示唆される。一方、Mylk4 KO マウスの骨格筋の頑強さが変化することが示された。これらのことから、MYLK4 が Myomesin-1 のリン酸化を介して、骨格筋の頑強さを制御することは一貫した結果が得られた。しかしながら、小麦胚細胞タンパク質合成系を用いた *in vitro* でのリン酸化アッセイでは、MYLK4 が Myomesin-1 をリン酸化するという結果は得られなかった。Myomesin-1 は MYLK4 の直接の標的ではないという可能性も考えられるが、MYLK4 が活性を持つために他のタンパク質と複合体を形成する必要がある、もしくは、MYLK4 に何らかのシグナルが必要であるという可能性もあるため、今回の結果を以って、Myomesin-1 が MYLK4 の標的であるかどうか結論付けることができなかった。今後は *in vivo* での Myomesin-1 のリン酸化の解析などから、MYLK4 が Myomesin-1 をリン酸化するときの条件についても検討を行う必要がある。