

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22805

研究課題名（和文）新規合成タンパク質局在化の可視化による筋原線維形成の観察

研究課題名（英文）Observation of myofibril formation by visualizing the localization of a newly synthesized protein

研究代表者

小笠原 理紀 (Ogasawara, Riki)

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：10634602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：新規に合成されたタンパク質の局在化はタンパク質がその機能を発揮するために重要である。本研究では、Puromycinの新規合成ペプチドへの結合を利用したアプローチにより筋線維内における新規合成タンパク質の局在を可視化できる可能性を示した。また、新生ミオシンの局在が可視化できたことから、筋原線維形成動態を可視化できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規に合成されたタンパク質の局在化はタンパク質がその機能を発揮するために重要である。収縮タンパク質であるミオシンは筋原線維構造において機能を発揮することから、新生ミオシンの筋原線維構造への追加を可視化することは骨格筋量や機能の調節メカニズムの解明において重要であると考えられる。本研究では新生ミオシンの局在を可視化することに成功した。今後、新生ミオシンがリボソームにおいて合成される過程から筋原線維構造に追加される過程や定量手法等を詳細に検討することで、骨格筋量・機能の調節メカニズムや真に骨格筋量・機能の改善に効果的な手法の検討が可能となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated the possibility of visualizing the localization of newly synthesized proteins in skeletal muscle fiber using an approach based on the binding of Puromycin to newly synthesized peptides.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：Puromycin Proximity Ligation Assay タンパク質合成 新生タンパク質 ミオシン イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

これまで骨格筋量調節に関する研究は、その原則に則った筋タンパク質の合成と分解のバランスに注目したアプローチが主に行われてきた。しかし、筋タンパク質の合成と分解のバランスだけでは運動による筋肥大や加齢に伴う筋萎縮(サルコペニア)などといった身近な骨格筋量の変化を説明できていない。

新規合成タンパク質は局在化されることにより機能を発揮することができる。骨格筋が太く強くなるためには既存の筋原線維へ新規に収縮フィラメントが追加(筋原線維形成)される必要があるが、近年筋原線維形成に関わるタンパク質が運動や加齢によって変化することが報告されている。このことは、幅広く骨格筋リモデリングを反映する筋タンパク質合成の段階だけではなく、その後の筋原線維形成を観察することも骨格筋量・機能調節の解明において重要なことを示唆する。しかし、その観察手法は十分には確立されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では新規合成タンパク質の局在化観察手法を確立し、これまで測定することができなかった新規合成タンパク質の筋原線維形成動態の可視化を試みる。

### 3. 研究の方法

Puromycin の新規合成ペプチドへの結合を利用した以下のアプローチを試みた。

#### 【実験1】

抗原抗体反応による観察：Puromycinはすでに抗原抗体反応を用いて筋線維レベルでの観察に用いられていた(Goodman et al. FASEB J 2011, Takagi et al. J Appl Physiol 2018)。本研究では筋原線維レベルでの観察を試みた。SDラットを対象とし、解剖の15分前にpuromycinを眼窩静脈叢に投与した。

#### 【実験2】

Proximity ligation assay (PLA) による観察：PLAでは2つの抗体の距離が近い場合に2つの抗体に結合したオリゴヌクレオチドが環状構造をとるようになっている。そこにDNAポリメラーゼを加えることで環状構造が増幅される。その際に蛍光標識されたプローブがハイブリダイズすることで通常の抗原抗体反応と比較し~1000倍増強したシグナルが得られる(Söderberg et al. Nat Methods 2006)。単一のタンパク質の検出の際には異なるエピトープに結合する抗体を用いることでPLAを適用できる。本研究ではpuromycinとミオシンを観察することで新生ミオシンの局在を検討した。

### 4. 研究成果

#### 【実験1】

前脛骨筋の縦断面を対象とし、蛍光顕微鏡を用いて免疫染色によって puromycin を可視化したところ、横紋構造のような縞模様が観察された(図1)。明視野で観察した筋線維画像と重ねると、主に明部(筋原線維の暗帯に該当)もしくは沿って puromycin の縞模様が観察された。

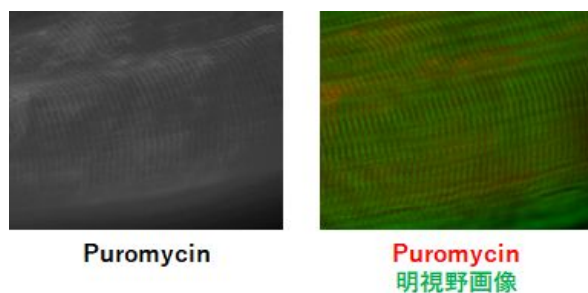


図1 新生タンパク質の可視化

#### 【実験2】

実験 1 と同様，前脛骨筋の縦断面を対象とし，PLA 法を用いて puromycin が結合しているミオシン（新規に合成されたミオシン）の局在を検討したところ，スポット状に点在している様子が観察された（図 2）．明視野で観察した筋線維画像と重ねると，主に明帯で観察された．

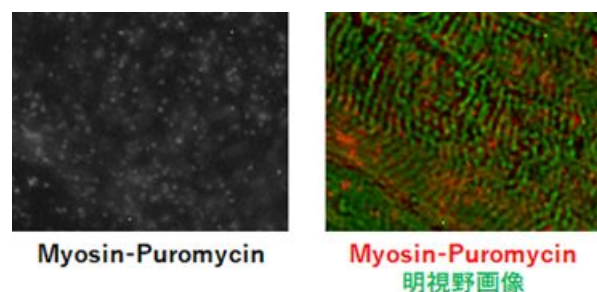


図 2 新生ミオシン（Puromycin 結合 Myosin）の可視化

以上の結果から，新生タンパク質やミオシンは筋原線維構造上のミオシン存在部位にて確認できたものの，多くは明帯に存在していると考えられた．より空間解像度の高い共焦点顕微鏡を用いて puromycin の局在について検討したところ，ミオシンではなく，明帯においてリボソームタンパク質と共局在している傾向が強く観察された．したがって，局在化した新生タンパク質というよりは主に翻訳中や翻訳終了直後のまだリボソーム周辺に存在する新生タンパク質を検出していた可能性がある．ウェスタンブロットングにて新生ミオシンを検出すると全長鎖のミオシンが検出されることから，puromycin によって翻訳伸長が途中で阻害されたのではなく，多くは全長まで翻訳が進行していたと考えられる．今後は puromycin の投与量や時間などをさらに検討し，より新生タンパク質の局在化が観察できる条件について検討していく必要がある．

一方，共焦点顕微鏡を用いた単一筋線維レベルでの観察では，puromycin の細胞内局在を検討することができた（Ato and Ogasawara. J Exp Biol 2021）．また，筋収縮による筋タンパク質合成の亢進も検出することができた．以上から，puromycin の投与条件や定量手法についてはさらなる検討が必要であるものの，Puromycin によって標識された新生タンパク質を免疫染色後に共焦点顕微鏡など比較的空間分解能の高い手法で観察することで新規合成タンパク質の局在化を可視化できると考えられる．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ato S, Ogasawara R	4. 巻 224
2. 論文標題 The relationship between myonuclear number and protein synthesis in individual rat skeletal muscle fibres	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 jeb242496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.242496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿藤聡、小笠原理紀
2. 発表標題 ラット単離骨格筋線維における新規合成タンパク質局在の可視化
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿藤聡、小笠原理紀
2. 発表標題 骨格筋線維の核数とタンパク質合成の関係性と筋収縮による修飾
3. 学会等名 第25回日本体力医学会東海学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田悠暉, 阿藤聡, 小笠原理紀
2. 発表標題 筋収縮により新規に合成されるタンパク質の組成にmTORC1が与える影響.
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ  
<http://muscle.web.nitech.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	阿藤 聡  (Ato Satoru)  (20825731)	名古屋工業大学・工学研究科・特別研究員    (13903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------