

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19740

研究課題名(和文)筋線維タイプの決定機構の解明を目指した萌芽的研究

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism underlying myofiber-type determination

研究代表者

深田 宗一郎(FUKADA, So-ichiro)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：20432445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、申請者の樹立シラットモノクローナル抗体 3A11-3 の抗原同定による筋線維タイプの決定機構解明を目的とした。3A11-3抗体が認識する抗原はおそらく新生仔筋組織の細胞膜に局在する150-160kDaの膜タンパク質であると考えられた。しかし、3A11-3抗体はIgMであり、IgGのように抗原に強く結合するものではないため、樹脂をスケールアップしてPull-downすることでは効率的に抗原を回収できずLC-MS/MSによる抗原同定にはいたらなかった。今後は銀染色によって検出できた電気泳動バンドからのタンパク質抽出の効率を上げ、LC-MS/MSでの同定を引き続き行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの筋線維タイプの決定している因子は、筋原繊維を構成するミオシンやミトコンドリアタンパクなど、その殆ど全てが細胞内タンパクである。そのため、細胞表面タンパク質が、筋線維タイプにより異なる成果は、細胞外のシグナルを介して筋線維タイプが決定される可能性を示しており、学術的には非常に新規性の高い成果である。さらに、本抗原は、筋線維タイプが決定されると、その発現が低下することから、筋線維タイプの維持ではなく、その決定に関与している可能性が高い。今回は抗原の同定には至らなかったが、その同定により様々な病態で変化する筋線維タイプの変動機能回目につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The antigen recognized by the 3A11-3 antibody is probably a 150-160 kDa membrane protein localized in the cell membrane of neonatal muscle tissue. 3A11-3 antibody is IgM and does not bind to the antigen as strongly as IgG. Therefore, it is thought that the antigen could not be efficiently recovered and identified by LC-MS/MS. As mentioned above, IgM is thought to have a weak binding force, so it is possible that the antigen is dissociated by washing the resin during pull-down. In the future, we will improve the efficiency of protein extraction from the electrophoresis bands detected by silver staining and continue to identify the proteins by LC-MS/MS.

研究分野：筋生理学

キーワード：筋線維 遅筋 速筋 モノクローナル抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の構成細胞である筋線維は代謝経路や収縮装置(筋原繊維)を構成するミオシン重鎖により、速筋タイプと遅筋タイプに分類されている。速筋タイプは、疲労度は高いが瞬発力発揮にすぐれている(短距離ランナー型)。一方、遅筋タイプは、瞬発力発揮には不向きだが耐疲労性を有している(マラソンランナー型)。速筋・遅筋の比率は全部位の骨格筋で同一ではなく、遅筋が多いヒラメ筋(Soleus muscle)や速筋が多い長趾伸筋(EDL muscle)など、部位によってその比率は異なる。また、様々な筋疾患特異的に遅筋が速筋に変化したり(slow-to-fast)逆に速筋が遅筋に変化したりする(fast-to-slow)。加齢に伴う筋萎縮であるサルコペニアは、現在非常に注目を集めている研究分野であり、サルコペニアでは速筋に有意な筋萎縮と速筋の遅筋化が見られる。速筋、遅筋を運命付ける機構を明らかにできれば、遅筋化を促進・制御することで、加齢による筋萎縮に耐性の筋線維構築に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者は、遅筋タイプの筋線維特異的に認識するモノクローナル抗体 3A11-3 を樹立している。これまでの遅筋特異的な抗体との相違点として

- 1) 成体での遅筋線維(Soleus)よりも、新生仔時期(Neonatal Hind limb)の遅筋線維で 3A11-3 の反応性は強い結果。
- 2) フローサイトメーターによるスクリーニングで樹立したことから、細胞表面抗原を認識する。があげられる。さらに、肝臓、胃、小腸、精巣等の成体組織には 3A11-3 は反応性を示さない。そのため 3A11-3 抗体が認識する抗原を決定し、その分子の機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) モノクローナル抗体(3A11-3)の精製

3A11-3 ハイブリドーマを腹腔投与すること得られた 3A11-3 抗体含有腹水の硫酸沈殿産物から 3A11-3 抗体の精製を行った。3A11-3 の抗体アイソタイプは IgM であることが同定されていたため、HiTrap IgM Purification HP Column (Cytiva 社)を用いて精製を行った。PBS に 3A11-3 抗体含有腹水の硫酸沈殿産物を溶解し、Binding buffer (20 mM リン酸ナトリウム, 0.5 M 硫酸カリウム, pH 7.5)で透析することで、硫酸および腹水由来のイオン化合物を除去したのち、HiTrap IgM Purification HP Column に 3A11-3 抗体を結合させた。結合後、同 Binding buffer でカラムを洗浄後、Elution buffer (20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.5)で 3A11-3 抗体を溶出させた。3A11-3 抗体の精製収量は約 40 mg であった。

2) 3A11-3 抗体固定化セファロース樹脂(3A11-3 セファロース)の作成

HiTrap IgM Purification HP Column で精製した 3A11-3 抗体を HiTrap NHS-activated セファロース樹脂(Cytiva 社)にカップリングすることで 3A11-3 抗体固定化セファロース樹脂を作成した。2.0 ml の 3A11-3 抗体(3.5 mg/ml)を、Coupling buffer (0.2 M 炭酸水素ナトリウム, 0.5 M NaCl, pH 8.3)で十分に透析した。HiTrap NHS-activated セファロース樹脂を 1 mM HCl で洗浄後、Coupling buffer で平衡化し、3A11-3 抗体を樹脂と 4 で一晩混合することで、3A11-3 抗体を樹脂に固定化した。0.5 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0 でセファロースの未反応 NHS 基をブロッキングし、0.1 M 酢酸ナトリウム, 0.5 M NaCl, pH 4.0 で洗浄した。このブロッキングと洗浄を 3 回繰り返した後、PBS で平衡化した。

3) 新生仔筋組織のタンパク質抽出と 3A11-3 抗体固定化セファロース樹脂による pull-down

3A11-3 抗体を使った細胞の免疫染色では細胞膜も染色されていることから、3A11-3 抗体が認識する抗原は細胞質タンパク質以外に膜タンパク質であることも考えられる。膜タンパク質は細胞膜に埋もれた膜貫通領域と細胞内外領域の可溶性領域が存在するが、3A11-3 抗体が抗原の立体構造を形成した状態を認識する場合は、その抗原となる膜タンパク質の立体構造が壊れると抗体が認識されない懸念がある。したがって新生仔筋組織(+)のタンパク質抽出では細胞質タンパク質だけでなく膜タンパク質も可溶化した状態に調製することが必要であると考えられる。イオン性界面活性剤である SDS 等のイオン性界面活性剤は膜タンパク質を変性させるため、膜タンパク質の立体構造解析のための精製で用いられる非イオン性界面活性剤(DDM, Tween20, コール酸ナトリウム)を用いることとした。新生仔筋組織を液体窒素で凍結し乳鉢ですりつぶし、最終濃度 1.0 %の非イオン性界面活性剤を含む PBS を加え、新生仔筋組織からの抽出液を回収した。比較対象として肝細胞抽出液も回収した。回収したそれぞれの抽出液と 3A11-3 抗体固定化セファロース樹脂(20 μ l 体積)を混合し pull-down を行った。Pull-down 時の溶出はグリシンバ

ッファーを用いて溶出し SDS-PAGE 電気泳動を行い銀染色法によるバンドの検出を行った。

4 . 研究成果

非イオン性界面活性剤 DDM を用いて抽出した新生仔筋組織において 150-160kDa 付近に強いバンドを確認し、3A11-3 抗体の抗原である可能性が示された。これらの実験を足がかりに LC-MS/MS で 3A11-3 抗体の抗原同定のための試料調製を行った。LC-MS/MS で効率的に抗原を同定するために微量の電気泳動バンドを銀染色法ではなく、CBB 染色によっても電気泳動バンドを確認できるほどの抗原の回収を目指した。

3A11-3 抗体固定化セファロース樹脂を 200 μ l にスケールアップ、新生仔筋組織抽出液からの Pull-down を行い、SDS-PAGE を行い CBB 染色を行った。その結果、CBB 染色では全くバンドを確認することができなかった。3A11-3 抗体の調製、3A11-3 抗体固定化セファロース樹脂の作成、新生仔筋組織からのタンパク質抽出をやり直し、同様の実験を行ったが、CBB 染色で確認できるほどの抗原量は回収できなかった。一方で、銀染色法により検出されたバンドを切り出し、LC-MS/MS を実施したが優位なシグナルは検出できず抗原タンパク質を同定することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang L, Noguchi YT, Nakayama H, Kaji T, Tsujikawa K, Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Okada Y, Doi T, Watanabe S, Braun T, Fujio Y, Fukada SI.	4. 巻 19
2. 論文標題 The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 2154-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.10.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda S, Kaneshige A, Kaji T, Noguchi YT, Takemoto Y, Zhang L, Tsujikawa K, Kokubo H, Uezumi A, Maehara K, Harada A, Ohkawa Y, Fukada SI.	4. 巻 8
2. 論文標題 Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 pii: e48284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.48284.	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 該当する

1. 著者名 Gordish-Dressman H, Willmann R, Dalle Pазze L, Kreibich A, van Putten M, Heydemann A, Bogdanik L, Lutz C, Davies K, Demonbreun AR, Duan D, Elsey D, Fukada SI, et al	4. 巻 5
2. 論文標題 A Project to Improve How We Advance Duchenne Muscular Dystrophy Therapies to the Clinic	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuromuscular Disease	6. 最初と最後の頁 407-417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JND-180324.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 So-ichiro Fukada
2. 発表標題 Regulation of muscle stem cell in overloaded muscle
3. 学会等名 France-Hong Kong meeting-Hong Kong, China（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深田宗一朗
2. 発表標題 筋トレと幹細胞
3. 学会等名 愛媛大学医学部 PROSセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	竹下 浩平 (TAKESHITA Kohei) (80346808)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・ 研究員 (82401)	

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
---------	---------