

課題番号 36

加齢原理の解明を目的とした新規モノクローナル抗体の作製

〔1〕組織

代表者：常陸 圭介

(藤田医科大学・医科学研究センター・
難病治療学研究部門)

対応者：白川 龍太郎

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

久保 純 (大阪大学大学院・薬学研究科)

研究費：物件費 55,240 円,
旅費 144,760 円

〔2〕研究経過

超高齢社会の現在において、健康長寿の観点からサルコペニアの研究及び予防法の開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、加齢研究に有用なモノクローナル抗体の作製を目的として研究を行った。

研究代表者の常陸は長期間の運動によって発現が増加する遺伝子を見出している。この遺伝子を欠損させたマウスでは、ミオシンの分子機能を減弱化させ筋力、筋量が低下することが分かっている。このような特徴は加齢における筋力・筋量低下とこの遺伝子が深く関わっている可能性を示唆している。

しかしながら、この遺伝子がコードするタンパク質を認識するよい抗体は現在までのところ、入手できておらず、ウェスタンブロットによるタンパク質発現の解析や免疫組織染色による骨格筋細胞内でのこのタンパク質の局在や動態の解析を困難にしている。そこで共同研究では、ラット腸骨リンパ節法を用いて、この遺伝子を認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。

共同研究活動としては、主にメールを用いて研究打合せを日常的に行ってきた。また Zoom を利用した打合せも行った。実際に手を動かす部分の研究については、分担者の久保が加齢研を訪問し、対応教員である白川龍太郎講師の指導をうけながら実験を行った。分担者による加齢研の訪問は 10 回以上に及んだが、その一部の旅費 (4 回) については、本共同利用・共同研究費から支出を行った。

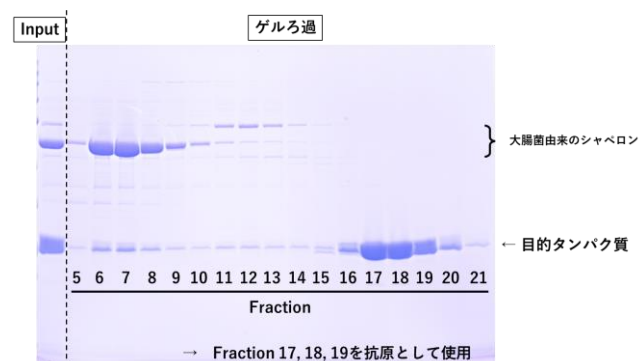
〔3〕成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

モノクローナル抗体を取得するために、ラット腸骨リンパ節法を行った。そのために、まず免疫に用いる抗原タンパク質を大腸菌を用いて作製した。

pGEX プラスミドベクターにこの遺伝子のタンパク質コーディング領域をクローニングした。その後、タンパク質発現用の大腸菌株である BL-21(DE3) に形質転換し、0.1mM IPTG、20℃、16 時間にて発現誘導を行った。発現を誘導した大腸菌は集菌後、ソニケーションにより破碎し、超遠心によって不溶化タンパク質を除いた。ここに、GST ビーズを加え、4℃にて 3 時間インキュベーションすることで目的タンパク質を回収した。ビーズを洗浄後、還元型グルタチオンを加えて溶出した。アミコンウルトラを用いて濃縮後、PD-10 カラムを用いて脱塩を行った。目的タンパク質から GST タグを除去するために、PreScission Protease を用いて GST タグを切断後、GST ビーズを用いて不要な GST タグを除去した。得られたサンプルを SDS-PAGE/CBB 染色により確認したところ、大腸菌由来のシャペロンタンパク質の混入が認められたため、さらにゲルろ過による精製を行った。結果、高純度な抗原タンパク質を得ることに成功した。ゲルろ過後の各フラクションのサンプルを SDS-PAGE/CBB 染色で解析した結果を以下に示す。



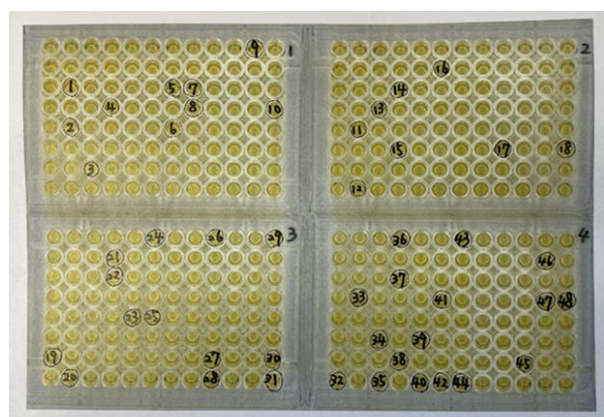
次に、作製した抗原タンパク質を用いてラットに免疫を行った。免疫後、2 週間でラットを安楽死させ、解剖し、肥大した腸骨リンパ節を単離した。こ

これから単離したリンパ球とミエローマをポリエチレングリコール（PEG）を用いて融合させ、ハイブリドーマを作製した。以下、免疫したラットから単離した腸骨リンパ節を示す。



単離した腸骨リンパ節

得られたハイブリドーマは 96 ウェルプレートに播種し、培養を行った。1 週間後に培地交換を行った後、さらに 5 日間培養を続け、ELISA でスクリーニングを行った。得られたクローンからシグナルが高い 48 クローンを選抜した。以下、ELISA の結果を示す。



今回バックグラウンドが高めに出てしまったが、シグナルの高い48クローンを回収した

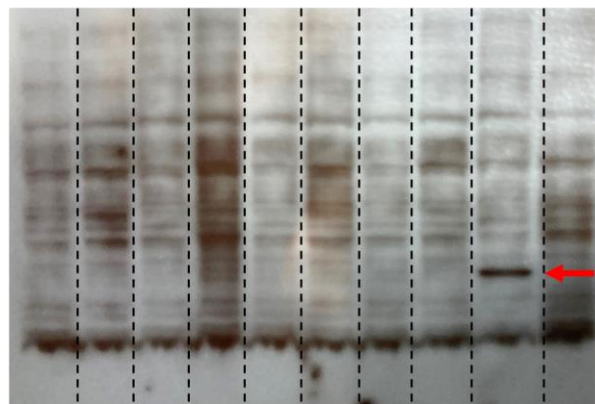
単離した 48 クローンを拡大培養し、培養上清を回収するとともに、凍結保存を行った。得られたモノクローナル抗体はウエスタンブロッティングのように変性したタンパク質でも認識するもの、非変性のタンパク質のみを認識するものが考えられる。

まずウエスタンブロットに使用できる抗体が存在するかどうかを確認するために、C2C12 筋管（分化誘導 5 日目、薬剤処理あり）から回収したタンパク質サンプルを SDS-PAGE により電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。得られたメンブレンを短冊状に切り、それぞれの短冊を異なるハイブリドーマの培養上清でインキュベーションを行った。抗ラット IgG-HRP を二次抗体として反応させ、検出を行ったところ、少なくとも 1 個の培養上清（クローン

34) においては、目的タンパク質のサイズ付近にバンドが確認できた。以下、ウエスタンの結果を示す。

Clone:

4 10 11 15 16 19 27 28 34 35



各クローンの培養上清を用いて行ったウエスタンブロッティングの結果。赤矢印でしめしたバンドは目的のタンパク質のサイズに相当するバンドであった

（３－２）波及効果と発展性など

今回、ウエスタンブロットに使用できる可能性のあるモノクローナル抗体が得られた。また、まだ確認はできていないものの、免疫組織染色で使用する抗体も含まれていることが期待される。本共同研究によって得られたモノクローナル抗体を用いることで、骨格筋の加齢における遺伝子の機能を詳細に解析できるようになる可能性がある。

また腸骨リンパ節法を用いることで、比較的短期間でモノクローナル抗体が取得できるため、骨格筋の加齢にかかわる、その他の遺伝子についてもモノクローナル抗体を容易に作製することが可能となった。

今回、加齢研共同利用・共同研究において得られたリソース、テクニックを用いることで骨格筋の加齢のメカニズムの解明が期待される。

〔４〕成果資料

該当なし