

研究題目

転写因子 Pax3/Pax7 を介した骨格筋幹細胞の機能維持・調節機構の解明

研究組織

研究代表者：林 晋一郎（国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

成体の骨格筋中の組織幹細胞である筋衛星細胞は転写因子 Pax7 を発現し、Pax7 を欠損したマウスは筋再生不全および筋衛星細胞の消失が起こることから、Pax7 は筋衛星細胞の機能維持に必須であると考えられている (Cell 102, 777-786, 2000)。一方、Pax7 のパラログである Pax3 は筋発生時に重要であり、Pax3 を欠失したマウス胚では体節の形成不全や四肢の骨格筋の欠失が起こる。また、Pax3 と Pax7 のダブルノックアウトマウス胚では体幹の骨格筋が消失し、Pax3/Pax7 は MyoD や Myf5 といった筋分化制御因子上流制御因子であることが示されている (Nature 435, 948-953, 2005)。このように発生期における筋形成時および成体骨格筋中の筋幹細胞の機能維持における Pax3/Pax7 の重要性は明らかであるが、Pax3 および Pax7 の *in vivo* における転写活性調節機構に関する転写共役因子や標的因子については不明な点が多い。そこで、本研究では新たにエピトープタグを付加したノックインマウスを作製し、筋発生過程における Pax7 の相互作用タンパク質をプロテオーム解析により明らかにすることを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

国立精神・神経医療研究センターにおいて、新たに Pax7 にエピトープタグを付加したノッ

クインマウスを CRISPR-Cas9 技術により作製した。野生型およびタグノックインマウスの 12.5 日齢胚から体幹および四肢を採取し、タグ抗体を用いた免疫沈降-質量分析法により網羅的に解析した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

免疫沈降-質量分析法によって 1700 種類以上のタンパク質を同定した。野生型と比較してタグノックインマウス胚で多く検出されたタンパク質のリストを基に機能エンリッチメント解析を行った結果、細胞周期関連因子やストレス応答因子、ユビキチン関連因子などが変動していることが明らかとなった。一方でこれまで Pax7 の共役因子として報告された MLL1 (Nat. Cell Biol. 10, 77-84, 2008) や Carm1 (Cell Stem Cell 11, 333-345, 2012)などは検出されなかった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまで報告された Pax7 の共役因子はどれも *in vitro* の実験系により報告されたものであり、本研究のように *in vivo* における Pax7 の相互作用タンパク質を網羅的に解析したものはない。本研究の進展に伴い、骨格筋の発生過程における筋幹細胞の増殖・分化制御機構の全容が明らかになることが期待される。さらに本研究の成果は筋疾患を対象とした再生医療など

への応用も期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

林 晋一郎, 井上由紀子, 井上高良, 野口悟, 西野一三. ゲノム編集によるエピトープタグノックインマウスの作製と筋幹細胞研究への応用 令和元年度 「筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発」(29-4) 西野班班会議

国立精神・神経医療研究センター, 東京都

令和元年 11 月 25 日-26 日

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究では Pax7 と相互作用すると思われるタンパク質を多く検出したものの、これまで Pax7 と相互作用すると報告された MLL1 や Carm1 といったタンパク質は検出されなかった。これらは筋細胞株に Pax7 を過剰発現させることで見出されたものであり、今回用いた筋発生時の筋幹細胞とは異なるため検出されなかったことが要因として考えられる。一方で、これらのタンパク質との結合が弱く実験の過程で乖離してしまった可能性も否定できない。そこで現在、マウス胚を採取後すぐに固定処理を行い、結合の弱い複合体を架橋して安定化させたうえで免疫沈降を行う計画を立てている。これにより今回検出できなかった共役因子も検出可能となると考えられる。また、本研究の成果と合わせ、ChIP-seq 解析を行うことにより、Pax7 による筋発生制御機構の理解が深化することが期待される。