

## 研究題目 骨格筋幹細胞の未分化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

骨格筋は再生能力の非常に高い組織として知られている。骨格筋再生過程では、骨格筋中の組織幹細胞である筋サテライト細胞がその中心的な役割を担う。筋サテライト細胞は転写因子 Pax7 を発現し、Pax7 を欠失したマウスは筋サテライト細胞の消失および筋再生不全が起こることから、Pax7 は筋サテライト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; PNAS 110, 16474-16479, 2013, Cell Stem Cell 13:590-601, 2013)。一方、Pax7 のパラログである Pax3 は主として筋発生時の筋前駆細胞で発現する。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り、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することから、Pax3/Pax7 は MyoD や Myf5 といった筋分化制御因子の上流制御因子であることが示されている (Nature 435, 948-953, 2005)。成体においては一部の筋サテライト細胞のみ Pax3 を発現しており、近年、我々のグループはフランスの Dr. Relaix のグループと共同で成体の Pax3 陽性の筋サテライト細胞が環境ストレスに対して耐性を持っているという新たなメカニズムを報告した (Cell Stem Cell 24:958-973, 2019)。しかしながら、Pax3/Pax7 の発現・制御機構や標的因子については未だ十分に理解されておらず、Pax3/Pax7 の *in vivo* における転写活性調節機構に参与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 Pax3/Pax7 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これら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

これまでの研究において、我々は Pax7 にエピトープタグを付加したノックインマウス (Pax7-HA) 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 Pax7 と結合するタンパク質を網羅的に解析した結果、812 種類のタンパク質を同定した。その中で、Pax7-HA ノックイン胎児で抗 HA 抗体によって野生型と比較して 2 倍以上の差が見られる 324 種を見出した。しかしながら免疫沈降-ウェスタンブロット法による解析では Pax7 の結合を確認できない分子も多くあり、特異性に関する課題も見られた。そこで本研究では、Pax7-HA マウスより筋サテライト細胞をセルソーターにより単離・培養し、免疫沈降-質量分析法により筋衛星細胞における Pax7 複合体構成因子の同定を試みた。さらに我々は、CRISPR-Cas9 によって PA タグを Pax3 の N 末に 2 つ付加したノックインマウスの作製し、マウス胚を用いた解析によって PA タグの発現を確認した。本研究では、このマウスの表現型を解析し、Pax7 と同様に Pax3 の共役因子の同定を目的とした。

### 【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果  
培養筋サテライト細胞を用いた免疫沈降-質量分析法により、Pax7-HA 筋サテライト細胞で野生型マウス由来サテライト細胞と比較して 2 倍

以上有意に検出されたタンパク質を 267 種同定した。Gene Ontology 解析の結果、翻訳に関わる因子が多く見出された。一方、E12.5 胚を用いた結果と同様に、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) および Carm1 (Cell Stem Cell 11, 333-345, 2012) は検出されなかった。

次に、Pax3-PA マウス胚 (E10.5) を免疫蛍光染色により解析した。ヘテロマウス胚 (Pax3-PA/+) では PA タグは検出されなかったが、ホモ胚 (Pax3-PA/PA) において Pax3 と PA の共局在を確認した。しかしながら、その後の解析から Pax3-PA ホモマウスは胎生致死であることが明らかとなった。Pax3 のターゲットである Myod1 の発現および体節の筋発生を Whole mount in situ hybridization によって解析した結果、Myod1 の発現量は大きく変化しないものの、前肢への筋前駆細胞の移動不全や、体節の発生異常が見られ、Pax3 の N 末端へのノックインにより Pax3 の DNA 結合能、あるいは転写活性に影響があるものと考えられた。

[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 Pax3/Pax7 の共役因子は全て *in vitro* の強制発現系により見出されたものであり、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

1. Hayashi S, Inoue Y, Kosako H, Inoue T, Noguchi S, Nishino I: Generation and characterization of a Pax7-HA knock-in mouse line. 26th International Congress of the World Muscle Society, Prague (Online), 9.23, 2021(9.20-9.24)
2. 林晋一郎: Pax7-HA タグノックインマウスを用いた筋幹細胞の未分化性維持機構の解明. 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究セ

ンター 精神・神経疾患研究開発費「筋レポジトリーの拡充とそれを活用した筋ジストロフィー関連疾患の病態解明と診断・治療法開発」(主任研究者: 西野一三) 令和 3 年度班会議 (Online), 11.29, 2021.

[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

本研究で新たに Pax7 と相互作用すると考えられるタンパク質を数多く同定した。これらは過去に報告のないものであり、現在免疫沈降-ウェスタンブロット法により詳細な解析を進めている。本研究の成果と合わせ、ChIP-seq 解析を行うことにより、Pax7 による骨格筋幹細胞の未分化維持機構の理解が深まることが期待される。Pax3-PA マウスについては今回の研究では実験に使用可能なノックインマウスを得ることはできなかった。今後エピトープタグの挿入を C 末にするなどの工夫が必要であると考えられる。