

研究題目

骨格筋幹細胞の新規分化調節機構の解明

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

骨格筋は非常に再生能力の高い組織として知られているが、筋再生過程においてその中心的な役割を担うのが筋サテライト細胞と呼ばれる幹細胞である。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)。一方、Pax7 のパラログである Pax3 は筋発生時の筋前駆細胞で主に発現し、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。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、Pax3 陽性の筋サテライト細胞は環境ストレスに対して抵抗性を有することが示されている (Cell Stem Cell 24:958-973, 2019)。さらに、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の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 Pax7 と結合するタンパク質を網羅的に解析した。

【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-質量分析法により、Pax7-タグノックインマウス胚で野生型マウス胚と比較して 2 倍以上有意に検出されたタンパク質を 324 種同定した。その中には、クロマチンリモデリング因子やヒストン蛋白、メチル化酵素に加え、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含まれていた。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) Shinichiro Hayashi, Yukiko U. Inoue, Hidetaka Kosako, Takayoshi Inoue, Satoru Noguchi, Ichizo Nishino. Generation and characterization of Pax7-HA knock-in mice. 25th International Congress of the World Muscle Society (Web)
10.1, 2020 (9.30-10.2)
- 2) 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出と筋幹細胞研究への応用「疾患モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」令和2年度研究班会議 (Web), 国立精神・神経医療研究センター, 東京都 12.1, 2020
(12.1-12.2)

[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 と相互作用すると考えら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つたことが要因として考えられる。現在、本研究課題で検出したタンパク質を免疫沈降-ウェスタンブロット法および免疫組織化学的染色法により解析中である。本研究の成果と合わせ、ChIP-seq 解析を行うことにより、Pax7 による筋

分化制御機構の理解が深まることが期待される。