

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450391

研究課題名(和文)肉用家畜応用を視野に入れたバイオマーカー探索とモデル動物解析法の樹立

研究課題名(英文)Improving meat production by fundamental research on myogenic differentiation

研究代表者

中村 真子(Nakamura, Mako)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80452746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、筋芽細胞形成に神経ガイダンス因子セマフォリン3A (Sema3A)が重要な役割を行うことを報告している。そこで、Sema3Aと筋肉発生に必須の遺伝子Paired box 7 (Pax7)との関係に着目し解析を進めた。その結果Sema3Aのシグナルが筋細胞マーカーであるPax7およびMyf5を調節して筋芽細胞の活性化制御を行っており、これらの因子の発現抑制の結果筋細胞分化が抑制されることを明らかとした。この結果に加えて、核膜タンパク質であるEmerinの発現量もSema3Aの調節を受けており、筋細胞分化と核膜タンパク質との相互作用をも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Muscle regeneration is initiated by activation of muscle stem cells, known as satellite cells, which are adjacent to the basal lamina around the proximal region of each myofiber. We previously showed that Semaphorin 3A (Sema3A) expression was induced when quiescent muscle became activated satellite cells (ASCs). However, how Sema3A regulates genes in the early phase of ASCs remains unclear. In this study, we investigated whether Sema3A signaling can regulate the early phase of ASCs. We showed that expression of the myogenic proliferation regulatory factors Pax7 and Myf5 was decreased in myoblasts transfected with Sema3A siRNA. Emerin was also regulated by Sema3A in ASCs.

研究分野：筋細胞学

キーワード：筋細胞分化 食肉科学 畜産物

## 1. 研究開始当初の背景

近年、畜産物である牛乳や食肉、卵等の環境に配慮した品種改良や効率性の追求は喫緊の課題である。食肉研究においても、多くの研究者が肉質改良のため、筋肉の発生・分化時に何が起きているかバイオマーカーを用いて明らかにしようと様々な取り組みが行われている。本研究課題では食肉産生の技術改善を最終目的として、培養細胞を用いた検証 (*in vitro*) を行い、将来的に個体モデルでの検証を行うことを視野に入れ解析を進める。

## 2. 研究の目的

これまでに、筋芽細胞形成に神経ガイダンス因子セマフォリン3A (Sema3A) が重要な役割を行うことを報告している。そこで、筋肉発生に必須の遺伝子 Paired box 7 (Pax7) との関係に着目し解析を進めた。Pax7 は筋肉発生時及び成体の筋損傷からの修復時に発現することが知られている。本研究では筋肉細胞の分化時に Sema3A シグナルが与える影響を Pax7 と連携して機能する遺伝子の発現時期、場所、メカニズムを解明することを目的とした。本研究においては筋芽細胞へ Sema3A 及び Pax7 の RNAi を外来的に導入し、Pax7 発現に与える影響について解析を行なった。

## 3. 研究の方法

### 筋芽細胞への siRNA 導入法による Sema3A シグナルが Pax7 に与える影響の解析

活性化筋芽細胞を用いて実験を行なった。まず、Sema3A のノックダウン実験を行い、筋細胞マーカー発現に与える影響を RT-qPCR 法およびウェスタンブロッティング法を用いて RNA、タンパク質レベルで解析を行った。さらに細胞の活性化有無を BrdU 法にて明らかにした。タンパク質の発現局在を蛍光免疫染色法にて解析した。

### Sema3A シグナル阻害が細胞分化に与える影響の解析

上記 1) で解析した細胞が分化能力を維持しているのか検証するため、分化誘導培地に置き換え 3 日間培養を行い、マーカー遺伝子の発現パターンや局在の解析を行った。

### 筋芽細胞内における Sema3A 強制発現が Pax7 に与える影響の解析

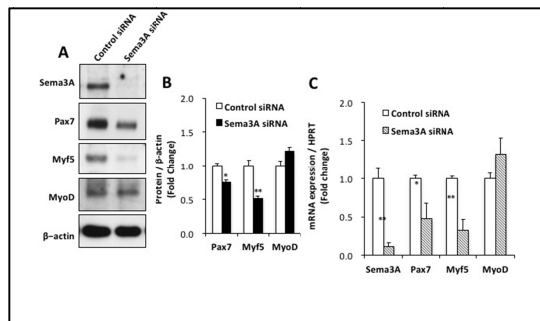
上記 1)、2) では Sema3A シグナルを阻害した際の影響について解析した。今度は逆に過剰にシグナルを活性化した

場合に Pax7 を始めとする筋マーカーに与える影響を明らかにするため、強制発現ベクターを筋芽細胞内に導入した。回収した細胞から筋マーカーのタンパク質および mRNA の発現量の変動を明らかにした。

## 4. 研究成果

### 活性化筋芽細胞内における Sema3A の発現阻害は Pax7, Myf5 の発現量を低下させる。

活性化筋芽細胞において Sema3A を阻害すると Pax7, Myf5 の発現量をタンパク質レベルおよび mRNA レベルで低下させることを明らかにした。一方で MyoD 発現には変化を与えなかった (下図)。これまでに、Myf5 は Pax7 の下流に位置し、発現制御を受けていることが広く知られている。このことから、両マーカーが発現抑制を受けていることは Sema3A のシグナルがこれらの下流因子を調節して筋芽細胞の活性化制御を行っている可能性を示唆している。



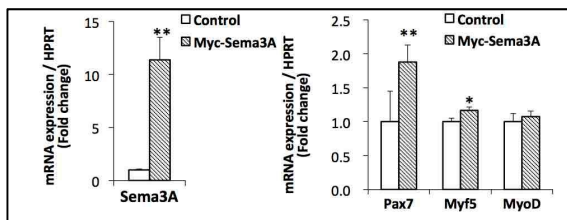
### 筋芽細胞内における Sema3A の発現阻害は分化初期における MyoD 発現を低下させる。

上記 1) の細胞の分化能の有無を明らかにするために、分化培地に置換し筋分化を誘導したところ MyoD の発現を低下させた。また筋管を形成する細胞の割合も優位に減少させた。さらに、分化培地で培養内においても単核細胞のままでありさらに Pax7, MyoD 発現が抑制された細胞が確認された。

### 活性化筋芽細胞内における Sema3A の強制発現は Pax7, Myf5 の発現を活性化させる。

これまでの解析結果を踏まえ、今度は Sema3A シグナルを過剰にした場合の影響を解析するため、Sema3A 強制発現ベクターを筋芽細胞内に導入したところ、Pax7, Myf5 発現が活性化された (下図)。

さらにBrdU解析により活性化筋芽細胞が増加しており、Sema3A シグナルが細胞増殖に関わっていることを明らかとした。



Sema3A は Emerin の発現調節を行なっている。

筋ジストロフィーの原因遺伝子としても知られる Emerin は核膜に存在し、筋細胞分化機構に関わることが報告されている。本研究では、Sema3A の発現抑制した場合、Emerin の発現量が増加していること、逆に Sema3A を強制発現ベクターで発現増加した際には Emerin の発現量が抑制されていることを見出した。この結果から Sema3A シグナルも Emerin のタンパク質発現量を調節していることを明らかとした。Emerin に関しては、今後も解析を進めるべく実験を継続しており、Emerin の発現量と筋細胞分化の関わりや、分化阻害にともなう筋芽細胞の核の大きさの変化と Emerin の関与、また Emerin が細胞の形質に及ぼす影響などの研究を継続している。さらに個体のモデルを用いた *in vivo* 解析につなげていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Shoko Sawano, Yusuke Komiya, Riho Ichitsubo, Yasuyuki Ohkawa, Mako Nakamura, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Wataru Mizunoya, A One-Step Immunostaining Method to Visualize Rodent Muscle Fiber Type within a Single Specimen, *PLoS ONE*, 11(11), e0166080, 査読有, 2016.11. DOI:10.1371/journal.pone.0166080

Mulan Qahar, Yuko Takuma, Wataru Mizunoya, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Mako Nakamura, Semaphorin 3A promotes activation of Pax7, Myf5, and MyoD through inhibition of emerin expression in activated satellite cells, *FEBS open bio*, 査読有, 2016.03. DOI:10.1002/2211-5463.12050

Mai-Khoi Q. Do, Naomi Shimizu, Takahiro Suzuki, Hideaki Ohtsubo, Wataru Mizunoya, Mako Nakamura, Shoko Sawano, Mitsuhiro Furuse, Yoshihide Ikeuchi, Judy E. Anderson, Ryuichi Tatsumi, Transmembrane proteoglycans syndecan-2, 4, receptor candidates for the impact of HGF and FGF2 on semaphorin 3A expression in early-differentiated myoblasts, *Physiological Reports*, 3(9), e12553, 査読有, 2015.09. DOI:10.14814/phy2.12553

[学会発表](計 41 件)

Mulan Qahar, Wataru Mizunoya, Ryuichi Tatsumi, Mako Nakamura, Role for semaphorin 3A in regulation of myogenic stem cells proliferation, The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, 2016.08.23, Kyushu Sangyo University (福岡県・福岡市)

木蘭, 水野谷 航, 辰巳 隆一, 池内 義秀, 中村 真子, Sema3A は emerin 発現を阻害することで筋特異的因子 Pax7 および Myf5 発現を増加させ、筋芽細胞の増殖能を上昇させる, Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease, 2016.06.09, California (United States of America)

木蘭, 水野谷 航, 辰巳 隆一, 池内 義秀, 中村 真子, Sema3A は emerin 発現を阻害することで筋特異的因子 Pax7 および Myf5 発現を増加させ、筋芽細胞の増殖能を上昇させる, 第 121 回日本畜産学会大会, 2016.03.29, 日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

詫間 裕子, 木蘭, 水野谷 航, 辰巳 隆一, 池内 義秀, 中村 真子, Pax7 が筋細胞および脂肪細胞の分化に与える影響, 第 121 回日本畜産学会大会, 2016.03.28, 日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

木蘭, 尾島 孝一, 大川 恭行, 中村 真子, 水野谷 航, 辰巳 隆一, 池内 義秀, 骨格筋における Sema3A の機能解析, 第 3 回 若手による骨格筋細胞研究会, 2015.11.24, 九州大学病院キャンパス(福岡県・福岡市)

[その他]  
ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/se>

arch/details/K003166/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 真子 (NAKAMURA MAKO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：8 0 4 5 2 7 4 6