

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 6 年 4 月 15 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 徳島文理大学 薬学部 病態分子薬理学
職 名 特別研究員
研究代表者 吉開 会美

下記のとおり令和5年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号:23003)

1. 共同研究課題名	骨格筋の形成と再生における亜鉛トランスポーターZIP13 の役割解明 -筋サテライト細胞に着目した研究-			
2. 共同研究目的	本研究は、骨格筋における亜鉛シグナルの役割と筋疾患との関連の解明を目指し、骨格筋の恒常性における亜鉛シグナルの意義を究明するものである。本研究では、筋形成および筋再生の中心的な役割を担う筋幹細胞(筋サテライト細胞とも呼ばれる)に着目し、独自に開発した ZIP13 の発現を GFP で可視化する <i>Zip13</i> -GFP ノックイン(KI)マウスと、群馬大学が保有する <i>Zip13</i> -遺伝子欠損(KO)マウスを用いて、ZIP13 が制御する筋サテライト細胞の骨格筋形成や再生に関わるメカニズムを解析した。			
3. 共同研究期間	令和5年4月1日 ~ 令和6年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 吉開 会美	徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室	特別研究員	筋サテライト細胞の解析	
(分担研究者) 深田 俊幸	徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室	教授	研究の統括	
原 貴史	徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室	准教授	骨格筋の機能解析	
大橋 拓人	徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室	大学院生	動物実験	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御	氏 名	藤谷与士夫

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

1) ZIP13 陽性筋サテライト細胞の系譜解析

筋サテライト細胞は骨格筋の筋繊維に付随する未分化な *Pax7* 陽性細胞として存在し、筋損傷などの刺激を受けると、MRF(muscle-specific regulatory factors)と呼ばれる bHLH 型転写因子群を順次活性化させ、筋繊維へと分化する。申請者らは、EGFP-IRES-CreERT2 遺伝子カセットを *Zip13* プロモーター下流にノックイン(KI)した *Zip13*-GFP-KI マウスを作成し、当該マウスの *Pax7* 陽性の未分化な筋サテライト細胞において、ZIP13 が発現することを明らかにした。しかし、ZIP13 の亜鉛シグナルが筋サテライト細胞にどのような役割を演じているのか、その実態と分子機序は未解明である。そこで、筋サテライト細胞から筋繊維まで骨格筋形成過程における *Zip13*-GFP/*Tomato*-KI マウスを作成した。本マウスにタモキシフェンを投与し、GFP および *Tomato* 発現細胞を経時的に分取し、骨格筋の初期分化過程における ZIP13 発現細胞の役割と系譜を解明する。

2) 筋サテライト細胞における亜鉛シグナルの作用点の同定

Zip13-KO マウスから筋サテライト細胞を分取し、RNA シーケンス法で ZIP13 の失調の影響をうける筋形成遺伝子群を同定する。さらに Zn^{2+} conditional proteomics 法(亜鉛と相互作用している細胞内タンパク質を特異的に蛍光標識させるラベル化試薬を用いたプロテオミクス解析)を適用して、ZIP13 によって輸送される亜鉛の標的分子を探索する。上記の解析で提示された ZIP13 関連分子について遺伝子オンロジー解析を実施し、骨格筋形成に関わる ZIP13 の亜鉛シグナル伝達経路を構成する分子群を同定する。

3) 骨格筋の再生における ZIP13 の役割解明

骨格筋の再生における ZIP13 の個体レベルの役割を精査するために、筋損傷モデルを実施する。具体的には WT と *Zip13*-KO マウスの腓腹筋に塩化バリウムを投与し、筋組織の回復期間を設け、凍結切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施し、筋損傷およびその回復を形態学的に観察する。*Zip13*-KO マウスにおける筋損傷部位の HE 染色データを画像解析することによって、データを精査する。これらの結果を基にして、上記 1) で作成した *Zip13*-GFP/*Tomato*-KI マウスの筋サテライト細胞を、塩化バリウム筋肉注射による筋損傷モデルに適用し、FACS 解析、および幹細胞マーカー *CD34* や転写因子 *Pax7*、筋分化のマスターレギュレーターである MRF、*MyoD* などを定量 PCR 法によって遺伝子発現量を解析することによって、ZIP13 が筋再生においてどのように関わるのかを検討する。

7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

1) ZIP13 陽性筋サテライト細胞の系譜解析

これまでの生体調節研究所との共同研究において、*Zip13*-KO マウスは野生型と比較して筋力低下を示すこと、また骨格筋を採取して筋分化関連遺伝子の発現を検討したところ、*Zip13*-KO マウスにおける *Pax7* 遺伝子、*MyoD* 遺伝子の発現量は、野生型と比較して低下していることが確認された。そこで、筋の発生や再生過程において筋サテライト細胞から分化する筋芽細胞について、*Zip13* を shRNA によりノックダウンしたマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を作成し分化能を評価したところ、コントロールと比較して筋管細胞への分化能が顕著に低下していたことから、サテライト細胞以降の筋分化過程において ZIP13 は重要な役割を果たしていることが示された。

2) 筋サテライト細胞における亜鉛シグナルの作用点の同定

筋サテライト細胞における ZIP13 の発現について詳細に解析するために、筋サテライト細胞の休止期及び活性期に着目して、ZIP13 の発現様式を、片側のアレルのみに GFP 遺伝子配列を有する GFP ヘテロノックインマウスを用いて FACS により解析した。興味深いことに、GFP の発現は、活性期 (Integrin $\alpha 7$ 陽性及び *CD34* 陰性) と比較して、休止期 (Integrin $\alpha 7$ 陽性及び *CD34* 陽性) のサテライト細胞で高いことが確認された。さらに、GFP ホモノックインマウス(両側のアレルに GFP 遺伝子が挿入されているため ZIP13 遺伝子はノックアウトされている)を同様に解析したところ、GFP の発現は野生型マウスと同程度まで低下していることが確認された。従って、筋サテライト細胞における ZIP13 の亜鉛シグナルが、ZIP13 自体の発現制御に関係していることが示唆された。

3) 骨格筋の再生における ZIP13 の役割解明

上述の検討により、筋サテライト細胞の活性期および休止期における ZIP13 の発現様式を確認したこと

から、次に筋再生過程に ZIP13 がどのように関わっているかを、塩化バリウムを筋注し筋障害を引き起こす *in vivo* 病態モデルを *Zip13*-KO マウスに適用して検討した。塩化バリウム投与後の *Zip13*-KO マウスにおける筋損傷の程度を筋組織の HE 染色で評価したところ、野生型と比較して同程度での筋損傷を確認した。一方で、回復過程においては、塩化バリウム投与後 10 日においても顆粒球の浸潤が確認されたことから、野生型と比較して *Zip13*-KO マウスでは回復が遅延していることが示唆された。

以上のことから、ZIP13 は筋サテライト細胞および筋繊維に発現し、骨格筋の分化や維持さらにその回復過程に重要な役割を有していることが示唆された。特に、ZIP13 の発現様式がサテライト細胞の性状において異なることは、ZIP13 がサテライト細胞の役割を制御する重要な分子であるものと考えられる。

本共同研究においては逐次意見交換の場を設け、筋サテライト細胞のみで ZIP13 遺伝子がノックアウトされる *Pax7*-Cre マウスの使用や、筋力測定等の具体的な評価項目について助言をいただき、効率的な計画の遂行と、発展的に研究の方向性を定めることができたことは、大きな成果であると考え。一方で、当初の研究計画のサテライト細胞の網羅的な遺伝子解析については計画を見直し、サテライト細胞の活性期と休止期それぞれについて網羅的に遺伝子を解析することが有用であると考え。従って、今後は筋サテライト細胞の性状を制御する ZIP13 の亜鉛シグナルに焦点を当てて、発展的に研究を展開する予定である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

M Shoji, T Ohashi, S Nagase, H Yuri, K Ichihashi, T Takagishi, Y Nagata, Y Nomura, A Fukunaka, S Kenjou, H Miyake, T Hara, E Yoshigai, Y Fujitani, H Sakurai, HGD Santos, T Fukada, T Kuzuhara. *Scientific Reports*. 14. 8052. 2024.doi: 10.1038/s41598-024-56912-7. in press.
Possible involvement of zinc transporter ZIP13 in myogenic differentiation.

② この共同研究に基づくとの記載のある論文

該当なし

③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

第 144 回日本薬学会年会(横浜) 口頭発表 2024 年 3 月 30 日
中山雄太、原貴史、野口綾香、中井靖乃、吉開会美、大橋拓人、Mitchell D. Knutson、深田俊幸
金属トランスポーターZIP14 を介する亜鉛シグナルに関する研究.

第 144 回日本薬学会年会(横浜) 口頭発表 2024 年 3 月 30 日
橋本匡生、吉開会美、都築秀尚、大橋拓人、原貴史、深田俊幸
筋サテライト細胞に発現する亜鉛トランスポーターZIP13 の意義に関する研究.

第 144 回日本薬学会年会(横浜) 口頭発表 2024 年 3 月 30 日
外山莉聖、原貴史、東志織、吉開会美、大橋拓人、深田俊幸
亜鉛トランスポーターZIP13 のゴルジ体ストレス応答制御における役割.

③ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

オンラインミーティング -ZIP13 web meeting- (群馬大学共同研究会議)
実施日: 令和 5 年 8 月 4 日:
本研究の進捗と研究方針に関する議論と情報交換を行なった。