

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 15日現在

機関番号：17102
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2010～2011
課題番号：22880025
研究課題名（和文） 脱アミノ化酵素 APOBEC2 による筋分化時の DNA 脱メチル化機構の解明
研究課題名（英文） The mechanisms of DNA demethylation by APOBEC2 deaminase during myogenic differentiation
研究代表者
佐藤 祐介（SATO YUSUKE）
九州大学・農学研究院・特任助教
研究者番号：50589520

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、骨格筋の肥大・成長メカニズムを理解するため「筋分化メカニズムの解明」を目的とし、研究を行った。特に、筋芽細胞から筋管への分化が脱アミノ化酵素 APOBEC2 を介した DNA 脱メチル化により制御されていると仮説を立て研究を行った。研究の結果、APOBEC2 を欠損すると、筋分化が促進されることが判明した。即ち、APOBEC2 は筋分化を負に制御していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present research was to understand the mechanisms of skeletal muscle growth and hypertrophy. We hypothesized that the myogenic differentiation was regulated by DNA demethylation via deamination by APOBEC2 enzyme. As a result, we found that lack of APOBEC2 promoted the myogenic differentiation. APOBEC2 might negatively regulate muscle differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,180,000	354,000	1,534,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,280,000	684,000	2,964,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：骨格筋、APOBEC2、筋分化、筋再生、DNA 脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

近年、地球規模での人口増加が加速しており、世界レベルの食料不足が深刻な問題となる

ことは間違いない。食料の中でも特に優れたタンパク質源である畜肉（または人工食肉）の安定供給は極めて重要な課題である。本研究課題では、骨格筋の肥大・成長メカニズムを理解し、操作可能にするための基盤となる「筋分化メカニズムの解明」を目的とした。骨格筋を形成する筋細胞（筋線維）は、単核の筋芽細胞（筋衛星細胞）が多核を有する筋管に融合（筋分化）することで、筋収縮やエネルギー代謝などの筋特異的な遺伝子の発現パターンを獲得する。この発現パターンの変化は、DNA の脱メチル化による、遺伝情報のリプログラミングにより支配されている。筋分化時の DNA 脱メチル化に関してはほとんどが謎であったが、近年、APOBEC ファミリー（AID, APOBEC2）によるメチル化シトシンの脱アミノ化が DNA 脱メチル化に関与することをゼブラフィッシュの胚細胞を用いて実証した。しかし、高等動物である哺乳類では DNA メチル化がより高度に制御されている可能性があるため、同様の機構で DNA 脱メチル化が起こっているのかは不明である。研究代表者はこれまでの研究から、APOBEC2 がマウスの筋分化初期に発現誘導されることを見出しており、APOBEC2 が DNA 脱メチル化に関与する可能性は高いと予想した。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの研究から、① APOBEC2 欠損が筋疾患様の表現型を示すこと、② APOBEC2 がマウスの筋分化初期に発現誘導されることを明らかにしている (Sato et al, J. Biol. Chem., 2010)。近年、ゼブラフィッシュを用いた研究からも同様の報告がされており、研究代表者の結果を支持するものであった (Etard et al, J. Cell Biol., 2010)。これらの報告から、APOBEC2 は正常な筋形成に必要な分子であると考えられる。そこで、本研究では、「APOBEC2 を介した筋分化制御の解明」を目的とした。

3. 研究の方法

野生型および APOBEC2 欠損型マウスの筋分化能の比較

(*in vitro*) 野生型および APOBEC2 欠損型マウスの下腿筋から筋衛星細胞を、コラゲナーゼ、トリプシンを用いて単離し、播種した。全細胞中の筋芽細胞数を確認するため、MyoD 抗体による免疫染色を行った。両細胞間で筋芽細胞の割合が同程度になるように播種した。筋芽細胞が 80% コンフルエントに達し

たら、低血清培地にて分化誘導し、筋管への分化能をウェスタンブロット、細胞免疫染色、リアルタイム RT-PCR にて時系列的に比較した。

(*in vivo*) 野生型および APOBEC2 欠損型マウスの下腿筋に 10 μ M カーディオトキシンを 500 μ L 注入し、筋損傷させた。その後、筋損傷からの回復過程を比較するため、12 日後まで時系列で凍結切片を作成し、HE 染色にて観察した。

4. 研究成果

APOBEC2 欠損が筋分化に及ぼす影響

(*in vitro*) 野生型および APOBEC2 欠損型の両マウスで筋芽細胞数が同程度になるよう調節し、筋管への分化能を比較した。その結果、APOBEC2 欠損型の方が野生型の筋芽細胞よりも多くの筋管を形成していた。ウェスタンブロットおよびリアルタイム RT-PCR にて筋分化マーカー (myogenin, MyHC) の発現量を調べたが、APOBEC2 欠損型の方が野生型より高い値を示した。細胞免疫染色の結果も、APOBEC2 欠損型の方が野生型より多くの MyHC 抗体陽性の筋管が観察された。APOBEC2 欠損型では野生型に比べ、特に分化誘導後の早い段階で myogenin の発現が強くなり、筋管が早く形成されていた。

(*in vivo*) 次に、カーディオトキシンによる筋損傷の回復具合を時系列的に HE 染色にて観察した。その結果、APOBEC2 欠損型の方で野生型よりも早い段階で中心核を有する再生筋が観察された。この結果は、APOBEC2 欠損が生体でも分化を促進したことを示唆している。APOBEC2 欠損型マウスでは、常に再生筋が存在しており、野生型に比べ、再生能が高くなっている可能性が考えられた。そこで、リアルタイム RT-PCR により MyoD, myogenin, eMyHC の発現を調べたが、野生型と APOBEC2 欠損型で差は見られなかった。また、APOBEC2 欠損により AID や APOBEC1 等の他のファミリー分子の代償的な発現誘導はなかった。以上の結果から、APOBEC2 欠損は筋分化を促進することが示唆された。

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 1 件)

① Do MK Q, Sato Y, Shimizu N, Suzuki T, Shono JI, Mizunoya W, Nakamura M, Ikeuchi

Y, Anderson JE, and Tatsumi R.
Growth Factor Regulation of Neural
Chemorepellent Sema3A Expression in
Satellite Cell Cultures
*American Journal of Physiology-Cell
Physiology*, 301, C1270-C1279, (2011) 査
読有

〔学会発表〕(計12件)

国際学会

① Sato Y, Probst HC, Mizunoya W, Tatsumi R, Rada C, Neuberger MS, and Ikeuchi Y. Skeletal Muscle Fiber-Type Change, Diminished Body Mass and Myopathy in APOBEC2 KO Mouse.

2010 FASEB Summer Research Conference on “Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells” Carefree Resort, Carefree, AZ, US (July 18-23, 2010)

② Do MQ, Shimizu N, Sato Y, Suzuki T, Tatsumi R, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Anderson JE and Allen RE.

Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: Temporal coordination of HGF/FGF-2/TGF- β may regulate neural chemorepellent Sema3A expression.

2010 FASEB Summer Research Conference on “Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells” Carefree Resort, Carefree, AZ, US (July 18-23, 2010)

③ Tatsumi R, Do MQ, Shimizu N, Sankoda Y, Anderson JE, Sato Y, Suzuki T, Mizunoya W, Ikeuchi Y, and Allen RE.

Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF and FGF2 up-regulate neural chemorepellent Sema3A expression.

on Theme 3: Tissue Mechanics, Track 3.6 Muscle Mechanics and Motor Control, the 6th World Congress on Biomechanics 2010, in conjunction with the 14th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME) 2010 and the 5th Asian Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech) 2010.

Suntec Convention and Exhibition Center, Singapore (August 1-6, 2010)

国内学会

④ 鈴木貴弘, 尾嶋孝一, 佐藤祐介, 中村真子, 水野谷航, 辰巳隆一, 池内義秀
semaphorin 3A は筋幹細胞の初期分化を制御する

日本畜産学会第115回大会(2012年3月27日~30日)名古屋大学 東山キャンパス

⑤小宮佑介, 水野谷航, 後藤剛, 高橋信之, 河田照雄, 中村真子, 佐藤祐介, 辰巳隆一, 池内義秀

n-3系不飽和脂肪酸による骨格筋線維タイプの変換

日本畜産学会第115回大会(2012年3月27日~30日)名古屋大学 東山キャンパス

⑥ 佐藤祐介, 大坪秀明, 水野谷航, 辰巳隆一, 池内義秀

筋特異的脱アミノ化酵素APOBEC2の筋細胞内局在

第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

⑦ ド・マイコイ, 清水直美, 佐藤祐介, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀

TGF- β 2, 3は衛星細胞のSema3A発現調節に関与する

第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

⑧ 鈴木貴弘, 尾嶋孝一, 佐藤祐介, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀

筋幹細胞が分泌するsemaphorin 3Aの生理機能

第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

⑨ 原美菜子, 田畑久仁子, 真鍋宣隆, 佐藤祐介, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 西村正太郎, 田畑正志, 池内義秀

筋衛星細胞の活性化における物理刺激受容機構の解明

第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

⑩ 真鍋宣隆, 原美菜子, 佐藤祐介, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀

伸展刺激強度の違いが筋衛星細胞の活性化に及ぼす影響第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

⑪ 生野淳一, 坂口昇平, 佐藤祐介, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀

活性化マクロファージは骨格筋再生に関与する

第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

⑫ 下村健太, 水野谷航, 中村真子, 佐藤祐介, 辰巳隆一, 池内義秀

大豆イソフラボン摂取がラットの骨格筋線維型に及ぼす影響

第114回日本畜産学会大会(2011.8月26日-27日、北里大学十和田キャンパス)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bbs1.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/chikusan/>

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/anj/item/sato.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 祐介 (SATO YUSUKE)

九州大学・農学研究院・特任助教

研究者番号：**50589520**