

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05040

研究課題名(和文) Apobec2による褐色脂肪の制御と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Regulation of energy metabolism in brown adipose tissue by Apobec2

研究代表者

佐藤 祐介 (Sato, Yusuke)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：50589520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織は脂肪酸や糖のエネルギーを消費することで、恒温動物の体温維持に寄与している。本研究では、AID/Apobecファミリーの1つであるApobec2が褐色脂肪におけるエネルギー代謝を制御する可能性について精査した。Apobec2を欠損すると褐色脂肪組織における脂質代謝が亢進することがわかった。Apobec2欠損による脂質代謝亢進が、高脂肪食摂取による脂肪への脂肪蓄積や代謝異常を抑制することがわかった。更に、細胞のエネルギー代謝解析の結果から、Apobec2はミトコンドリアの呼吸を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトや一部の家畜などの恒温動物では、摂取エネルギーの大部分が体温維持に消費されている。近年、ヒトや家畜を含めた多くの哺乳類が、機能的褐色脂肪を有することがわかったが、その制御機構は未解明の部分が多い。本研究から、Apobec2が褐色脂肪組織や筋細胞におけるエネルギー代謝を制御する可能性が示唆された。褐色脂肪組織におけるエネルギー消費を制御できれば、畜肉の生産性の向上や肥満に起因する生活習慣病などの予防への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The brown adipose tissue is a specialized organ that produce heat by burning fat and sugar in mammals. In this study, we investigated whether Apobec2 regulates energy metabolism in brown adipose tissue. Apobec2^{-/-} mice showed reduced white adipose tissue and smaller lipid droplets in brown adipose tissue compared with WT littermates. Furthermore, Apobec2^{-/-} mice showed increased energy expenditure and lipid metabolism with altered mitochondrial morphology, mitochondrial depolarization and marker protein expression. This might be due to the higher activation of BAT thermogenesis under cold exposure compared with WT littermates. In addition, Apobec2 deficiency ameliorated high fat diet-induced lipid accumulation in liver and metabolic disorder. Our findings indicate the possibility of energy metabolism regulation by Apobec2 in brown adipose tissue.

研究分野：動物生産科学

キーワード：エネルギー代謝 褐色脂肪 骨格筋 脂質 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトや家畜の体内には大きく分けて 2 種類の脂肪細胞、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞が存在する。白色脂肪は主に皮下や内臓に分布しており、余剰なエネルギーを脂肪として脂肪滴に蓄積している。一方で、褐色脂肪はヒトにおいては背中や鎖骨周りに分布しており、脂肪や糖を燃焼し体温維持に貢献している。これは、褐色脂肪細胞に多数存在するミトコンドリアの脱共役タンパク質 UCP1 が、プロトン駆動力を熱に変換していることに起因する。ヒトでは新生児期しか褐色脂肪細胞を持たないと考えられていたが、近年、成人も機能的褐色脂肪を有することが明らかになった。そのため、研究開始当初までに、褐色脂肪の制御に関する研究は盛んに行われてきた。発生段階では、褐色脂肪細胞は筋細胞と同じ系統の *myf5* 発現細胞から派生することがわかっている。転写因子である PRDM16 は *myf5* 陽性筋細胞を褐色脂肪細胞へと運命付ける重要な因子であるが、分化の詳細なメカニズムは依然不明であった。また、褐色脂肪細胞は全身のエネルギー代謝の恒常性維持に寄与することがわかったが、熱産生制御に關与する未同定の因子が存在すると考えられる。

AID/Apobec 脱アミノ化酵素ファミリーの 1 つである Apobec2 は脊椎動物の骨格筋および心筋でのみ特異的に発現すると考えられていた。研究代表者のこれまでの研究から、Apobec2 を欠損したマウスでは体重の減少や筋疾患、ミトコンドリアや運動機能の低下が確認されている。Apobec2 の分子機能がミトコンドリアに関連するものと予想したが、その詳細については突き止めていなかった。研究代表者の予備研究から、Apobec2 が褐色脂肪組織でもタンパク質レベルで発現していることを偶然見出した。本研究では、褐色脂肪細胞における Apobec2 の生理的意義、特にエネルギー代謝との関係について検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、褐色脂肪組織における Apobec2 の生理的意義を検証することである。Apobec2 遺伝子欠損マウスを用いて、生体レベルで脂肪組織の表現型、エネルギー代謝、熱産生、高脂肪食給餌に対する影響を調べた。また、培養細胞に対するエネルギー代謝解析から、Apobec2 が直接的にエネルギー代謝を制御する可能性について調べた。

3. 研究の方法

実験 1: Apobec2 欠損が褐色脂肪細胞の分化に与える影響の解析

4 週齢の雄性マウス (野生型および Apobec2 欠損型) から単離した褐色脂肪組織を酵素処理し、間質血管細胞群を得た。これらの細胞をインスリン、IBMX、デキサメタゾン等を含む脂肪分化誘導培地で 8 日間培養し、褐色脂肪細胞へ分化させた。脂肪分化の程度を評価するため、形態観察 (オイルレッド O による脂肪滴の染色) と qPCR 法によるマーカー遺伝子 (脂肪分化、筋分化など) の発現解析を行った。

実験 2: Apobec2 欠損がマウスの脂肪組織およびエネルギー代謝に与える影響の解析

15~20 週齢の雄性野生型および Apobec2 欠損型マウスから、褐色脂肪組織、内臓脂肪、皮下脂肪を採取し、重量を測定した。褐色脂肪組織については、qPCR 法を用いたマーカー遺伝子 (脂肪分化、脂質代謝など) の発現解析およびパラフィン切片に対する HE 染色と透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。また、両マウスの摂食量、自発行動量、呼吸代謝解析を行った。

実験 3: Apobec2 欠損が高脂肪食を給餌されたマウスに与える影響の解析

7 週齢の雄性野生型および Apobec2 欠損型マウスに対し、高脂肪食 (60%) を 20 週間程度給餌し、肥満を誘導した。給餌期間終了後に経口糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。また、体重、脂肪組織、骨格筋、肝臓等の重量を測定した。血液成分分析により代謝異常に関連するマーカー因子を測定した。肝臓の形態を観察するため、パラフィン切片および凍結切片を作製し、HE 染色および BODIPY 染色を行なった。

実験 4: Apobec2 ノックダウンまたは過剰発現が培養細胞のエネルギー代謝に与える影響の解析

マウス筋芽細胞 C2C12 または肝細胞 AML12 に対し、siRNA または発現ベクターを用いることで Apobec2 のノックダウンまたは過剰発現を行った。ノックダウンまたは過剰発現の効率については、ウェスタンブロットおよび qPCR 法にて確認した。細胞のエネルギー代謝の測定は、細胞外フラックスアナライザーを用いて行った。特に、ミトストレストキットを用いて、酸素消費量 (ミトコンドリアの呼吸の指標) を調べた。

4. 研究成果

実験 1

脂肪分化と Apobec2 の関係を調べるため、以下の実験を行なった。野生型および Apobec2 欠損型マウスの肩甲骨下の褐色脂肪組織から単離した間質血管細胞群を脂肪分化培地で培養すると、両細胞群とも脂肪滴を有する褐色脂肪細胞に分化した。オイルレッド O 染色にて脂肪滴の形態 (大きさ、数) を観察したが、両細胞とも正常な脂肪滴を有しており、顕著な相違は確認されなかった。また、qPCR 法にて *Adipoq*, *Pparg1a*, *Prdm16*, *Myog* などのマーカー遺伝子の発現量を定量したが、両細胞間で有意な差は確認できなかった。これらの結果から、Apobec2 は褐色脂

肪細胞の分化には必須ではないことが示唆された。

実験 2

Apobec2 欠損マウスは新生児期から野生型に比べて体重が軽い。これまでの研究から、Apobec2 欠損により骨格筋重量が減少することがわかっていたが、本研究では脂肪組織の重量を測定した。その結果、Apobec2 欠損マウスでは、白色脂肪である精巣上体脂肪と鼠蹊部皮下脂肪の重量が野生型と比べて有意に減少していた。一方で、褐色脂肪組織の重量は両群間で変化は確認されなかった。また、両マウスの摂食量と自発運動量についても変化は確認できなかったことから、Apobec2 欠損マウスでみられた白色脂肪重量の減少は、いずれかの組織における脂質代謝亢進によるものと予想した。褐色脂肪組織の形態観察を行うと、Apobec2 欠損マウスでは野生型よりも小さな脂肪滴を有することが確認された。これは透過型電子顕微鏡による超微細構造の観察においても同様であった。次に、呼吸ガス測定装置を用いて、通常食給餌下で呼吸代謝解析を行なった結果、Apobec2 欠損マウスの呼吸交換費は野生型よりも低い値を示した (0.8 以下)。更に、呼吸代謝解析から算出されたエネルギー消費量、脂肪酸化量は暗期において有意に野生型と比べて高い値を示した。一方、Apobec2 欠損マウスの炭水化物酸化量は野生型と比べて有意に低下していたことから、このマウスでは脂質代謝が亢進していると考えた。qPCR の結果からは、両マウス間でマーカー遺伝子 (脂肪分化、脂質代謝など) の発現量に変化は確認されなかった。

実験 3

Apobec2 欠損による脂質代謝亢進が、食事性肥満や代謝異常を抑制できるか調べるため、長期間の高脂肪食給餌試験を行なった。高脂肪食給餌後の体重についても、Apobec2 欠損マウスの方が野生型よりも低い値を示した。経口糖負荷試験およびインスリン負荷試験の結果から、Apobec2 欠損マウスでは高脂肪食による耐糖能およびインスリン抵抗性が一部改善されたことがわかった。組織重量については、Apobec2 欠損マウスの骨格筋重量は通常食給餌下と同様に野生型よりも有意に低い値を示した。褐色脂肪組織、精巣上体脂肪、鼠蹊部皮下脂肪の重量については両群間で有意な差は認められなかったが、Apobec2 欠損マウスの肝臓重量は野生型よりも有意に低い値を示した。HE 染色および BODIPY 染色により肝臓の形態観察を行うと、Apobec2 欠損マウスでは野生型に比べて、小さな脂肪滴を有していることがわかった。血液成分分析の結果から、Apobec2 欠損マウスでは総ケトン体の値が有意に高く、肝臓における脂質代謝が亢進している可能性が示唆された。また、肝機能の異常に関連する乳酸脱水素酵素、コリンエステラーゼ、LDL-コレステロールの値は、Apobec2 欠損マウスにおいて野生型よりも有意に低い値を示した。これらの結果から、Apobec2 欠損による脂質代謝亢進が高脂肪食給餌による肥満や代謝異常を抑制する可能性が示唆された。

実験 4

Apobec2 欠損により誘導される代謝亢進を細胞レベルで確認するため、細胞外フラックスアナライザーを用いたエネルギー代謝解析を行った。マウスより単離した初代培養筋芽細胞および褐色脂肪組織由来の間質血管細胞群を用いてエネルギー代謝解析を行ったが、初代培養細胞の分化の程度が異なるため、正確な測定が困難であることがわかった (Apobec2 欠損マウス由来の筋芽細胞は野生型由来の筋芽細胞よりも分化が早いことがわかっている)。そのため、代替法として、細胞株に対する siRNA を用いたノックダウンおよび過剰発現を用いて Apobec2 とエネルギー代謝の関係を調べた。エネルギー代謝解析 (ミトストレステスト) の結果、マウス筋芽細胞 C2C12 に対する siRNA を用いた Apobec2 ノックダウンにより、ミトコンドリアの呼吸の指標である酸素消費量の最大値が有意に増加した。また、Apobec2 発現ベクターを用いて Apobec2 を C2C12 に過剰発現させると、酸素消費量が有意に低下した。これらの結果から、Apobec2 は筋芽細胞においてミトコンドリアの呼吸を制御している可能性が示唆された。一方、マウス肝細胞 AML12 に対して Apobec2 過剰発現を行っても酸素消費量は変化しなかったことから、Apobec2 によるミトコンドリア機能の制御は、細胞特異性があると考えられた。

総括

本研究から、Apobec2 が褐色脂肪組織や筋細胞においてエネルギー代謝を制御する可能性が示唆された。今後は、Apobec2 がどのようにミトコンドリアの呼吸を制御しているのか、その分子メカニズムを解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohtsubo Hideaki, Sato Yusuke, Matsuyoshi Yuji, Suzuki Takahiro, Mizunoya Wataru, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Ikeuchi Yoshihide	4. 巻 17
2. 論文標題 Fluorescence microscopy data on expression of Paired Box Transcription Factor 7 in skeletal muscle of APOBEC2 knockout mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 1348 ~ 1351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.dib.2018.02.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoriko, Sato Yusuke, Obeng Kodwo Amuzuah, Yoshizawa Fumiaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Acute oral administration of L-leucine upregulates slow-fiber? and mitochondria-related genes in skeletal muscle of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 36 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.nutres.2018.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Shin-ichi, Kondo Shinji, Sato Yusuke, Yoshizawa Fumiaki, Yagasaki Kazumi	4. 巻 71
2. 論文標題 Anti-hyperuricemic effect of isorhamnetin in cultured hepatocytes and model mice: structure?activity relationships of methylquercetins as inhibitors of uric acid production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s10616-018-0275-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoriko, Sato Yusuke, Suzuki Reiko, Obeng Kodwo, Yoshizawa Fumiaki	4. 巻 364
2. 論文標題 Leucyl-tRNA synthetase is required for the myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, but not for hypertrophy or metabolic alteration of myotubes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 184 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtsubo Hideaki, Sato Yusuke, Suzuki Takahiro, Mizunoya Wataru, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Ikeuchi Yoshihide	4. 巻 12
2. 論文標題 Data supporting possible implication of APOBEC2 in self-renewal functions of myogenic stem satellite cells: Toward understanding the negative regulation of myoblast differentiation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 269 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.dib.2017.03.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohtsubo Hideaki, Sato Yusuke, Suzuki Takahiro, Mizunoya Wataru, Nakamura Mako, Tatsumi Ryuichi, Ikeuchi Yoshihide	4. 巻 85
2. 論文標題 APOBEC2 negatively regulates myoblast differentiation in muscle regeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The International Journal of Biochemistry & Cell Biology	6. 最初と最後の頁 91 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.biocel.2017.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Reiko Suzuki, Yoriko Sato, Kodwo Amuzuah Obeng, Daisuke Suzuki, Yusuke Komiya, Shin-ichi Adachi, Fumiaki Yoshizawa, Yusuke Sato	4. 巻 77
2. 論文標題 Energy metabolism profile of the effects of amino acid treatment on skeletal muscle cells: Leucine inhibits glycolysis of myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 110794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.nut.2020.110794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoko Sawano, Kento Baba, Yuka Sonoda, Jun-ichiro Wakamatsu, Shozo Tomonaga, Mitsuhiro Furuse, Yusuke Sato, Ryuichi Tatsumi, Yoshihide Ikeuchi, Wataru Mizunoya	4. 巻 -
2. 論文標題 Beef extract supplementation promotes myoblast proliferation and myotube growth in C2C12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s00394-020-02205-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naomi Watanabe, Yusuke Komiya, Yusuke Sato, Yusuke Watanabe, Takahiro Suzuki, Keizo Arihara	4. 巻 525
2. 論文標題 Oleic acid up-regulates myosin heavy chain (MyHC) 1 expression and increases mitochondrial mass and maximum respiration in C2C12 myoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 406-411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木 玲子、佐藤 祐介、佐藤 より子、吉澤 史昭
2. 発表標題 アミノ酸による筋細胞の代謝変化とその作用機序の探索
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 竜司、佐藤 祐介、鈴木 玲子、二瓶 直浩、吉澤 史昭
2. 発表標題 Apobec2 欠損による脂質代謝変化の解析
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Suzuki, Yusuke Sato, Kodwo Amuzuah Obenga, Fumiaki Yoshizawa
2. 発表標題 Analysis of the effects of amino acids on energy metabolism of cultured cells and its mechanism
3. 学会等名 FASEB SRC "Nutrient Sensing and Metabolic Signaling" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuji Hayashi, Yusuke Sato, Naohiro Nihei, Yoriko Sato, Shozo Tomonaga, Fumiaki Yoshizawa
2. 発表標題 Enhanced lipid metabolism by Apobec2 deficiency ameliorates high fat diet-induced metabolic defects.
3. 学会等名 FASEB SRC “Nutrient Sensing and Metabolic Signaling” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 祐介、川島 恵介、佐藤 より子、赤岩 将門、福井 えみ子、松本 浩道、吉澤 史昭
2. 発表標題 マトリセルラータンパク質Tinagl1による筋細胞制御の可能性の検討
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 祐介、鈴木 玲子、佐藤 より子、吉澤 史昭
2. 発表標題 アミノ酸添加による筋細胞のエネルギー代謝変化ならびにその作用機序の探索
3. 学会等名 第124回日本畜産学会大会(東京大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見 有希、佐藤 祐介、吉澤 史昭
2. 発表標題 アルギニンの筋タンパク質合成促進作用の C2C12 細胞を用いた評価
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第 11 回学術大会(京都府立大学)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 より子、佐藤 祐介、吉澤 史昭
2. 発表標題 Leucyl-tRNA synthetase による筋細胞の分化・肥大の制御
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第 11 回学術大会（京都府立大学）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 二瓶直浩, 佐藤祐介, 鈴木玲子, 友永省三, 吉澤史昭
2. 発表標題 Apobec2欠損における褐色脂肪組織のエネルギー代謝変化
3. 学会等名 日本畜産学会第 1 2 3 回大会（信州大学）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 祐介, 川島 恵介, 赤岩 将門, 福井 えみ子, 吉澤 史昭, 松本 浩道
2. 発表標題 骨格筋における Tinagl1 の発現と役割
3. 学会等名 日本畜産学会第 1 2 3 回大会（信州大学）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤祐介, 佐藤より子, 林竜司, 吉澤史昭
2. 発表標題 Apobec2による筋細胞の分化・エネルギー代謝制御の可能性の検討
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会(岩手大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤祐介
2. 発表標題 アミノ酸による筋線維型・代謝の制御
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会シンポジウム「動物の運動における代謝-遺伝」日本動物遺伝育種学会第20回大会(宇都宮大学)(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----