

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06035

研究課題名(和文)細胞選択的ノックアウトマウスで明らかになるエネルギー代謝分子USP2の役割

研究課題名(英文)Evaluation of physiological roles of USP2 in energy metabolism by using cell-specific knockout models

研究代表者

北村 浩 (Kitamura, Hiroshi)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：80312403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のユビキチン鎖を分解する酵素であるUSP2のエネルギー代謝における役割を調べた。骨格筋選択的USP2欠損マウスはインスリンの反応性が変化した。一方マクロファージ選択的USP2ノックアウトマウスはGM-CSFの分泌を促すことで、凍結融解後の精子の運動性の維持に関わった。一方、視床下部腹内側核のUSP2は腹内側核のミトコンドリア機能を維持することで交感神経系の過剰な活性化を抑え、結果的に平常時の血糖値を高めることを見出した。以上から、USP2は、発現細胞、発現細胞の近傍の細胞、間脳視床下部を介した全身臓器でのエネルギー代謝を制御するエネルギー代謝の鍵分子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞や個体のエネルギーの産生や消費を調節する新たな酵素を見出したという内容である。私たちが注目したUSP2は、1千万人以上の患者のいる2型糖尿病の主要な原因となるインスリン感受性を変化させる分子であること、また糖尿病の素因となる正常時の血糖値の上昇を抑える分子であること、さらには不妊治療や希少動物の保護、成績優良家畜の育種などに使用される凍結精子の活動を高める分子であることを個体レベルで明らかにした。USP2は酵素であることから活性の人為的調節が可能であり、エネルギー代謝に関連した種々の疾患の克服のための創薬標的となることを示唆する成果である。

研究成果の概要(英文)：Roles of ubiquitin-specific protease (USP) 2 on energy metabolism was investigated using in vivo models. Myocyte-selective Usp2 knockout mice represented changes in insulin sensitivity after a high-fat fed obesity model compared with wild type mice. Myeloid-selective Usp2 knockout mice exhibited impairment of sperm motility via mitochondrial dysfunction. The defects in sperm motility of Usp2 knockout mice was account for aberrant production of GM-CSF by testicular macrophages. On the other hand, USP2 in ventromedial hypothalamic neurons mitigates accumulation of reactive oxygen and phosphorylation of AMPK. Consequently, hypothalamic USP2 maintains normal blood glucose level through maintenance of sympathetic activation. Collectively, USP2 seems to be a key regulatory molecule for energy metabolism at plural hierarchies

研究分野：実験動物学

キーワード：ユビキチン マクロファージ 精巣 視床下部 神経 エネルギー代謝 骨格筋 インスリン感受性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ユビキチン選択的プロテアーゼ 2 (ubiquitin-specific protease 2, USP2) とは? : タンパク質ユビキチン化はタンパク質に一つないし複数のユビキチンタンパク質が付加する反応で、付加を触媒するユビキチンリガーゼと分解を触媒する脱ユビキチン化酵素のバランスで調節される。脱ユビキチン化酵素には複数のグループがあるが USP はその中でも最大のファミリーを形成する。USP2 は USP ファミリーの中で 2 番目に同定された酵素であり、細胞周期の調節や (*Mol Cell*, 36, 469-476, 2009) 細胞死の制御 (*J Biol Chem*, 284, 495-504, 2009) など細胞の基本機能の調節に関わることが知られる。

(2) USP2 によるエネルギー代謝制御: 研究代表者は元々マクロファージ分化時に発現やスプライシングパターンが変わる分子の一つとして USP2 を見出した。これまでの検討で、マクロファージに発現する USP2 は脂肪組織の慢性炎症に関わる分子の産生を抑えることで (*FASEB J* 27, 4940-4953, 2013) 肥満時のインスリン感受性の低下を抑えることを見出した (*Biochem Biophys Res Commun* 9, 322-329, 2017)。つまり、USP2 が新たな抗糖尿分子であることを明らかにした。一方、USP2 は視床下部での遺伝子発現を低血糖時に低下させるほか (*Diabetes* 54, 952-958, 2005) 肝臓での糖代謝の制御や (*Diabetes* 61, 1025-1035, 2012) 腫瘍細胞の脂肪酸合成酵素の遺伝子発現を調節するなど (*Cancer Cell* 5, 253-261, 2004) 細胞・臓器横断的にエネルギー代謝制御に関わる分子である可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究は、種々の USP2 の遺伝子組換えマウスや USP2 の選択的な阻害剤を駆使することで、エネルギー代謝の鍵分子として想定される USP2 の役割を明確にすることである。

(1) 主要なエネルギー代謝臓器の糖代謝における USP2 の役割の解明: 骨格筋や肝臓、脂肪組織はグルコース代謝において貯蔵・消費臓器であると共に種々のメディエーターの分泌を介した制御臓器でもある。これら臓器の中でも特に骨格筋における USP2 の役割を中心に明らかにする。即ち、肥満・糖尿病誘発モデルにおける骨格筋の USP2 の役割を調べると共に、エネルギー代謝が盛んな筋再生時における USP2 の役割も明らかにする。

(2) 間脳視床下部における USP2 の役割の解明: エネルギー代謝の制御中枢である視床下部ニューロンにおける USP2 の生理学的な役割を明らかにする。

(3) 血糖変化に反応する細胞における USP2 の役割の解明: 血糖値の変化は細胞レベルでストレスになるので、*cFos* や *Arc* など最初期遺伝子を誘導すると言われる。「血糖値に反応するシステムの中の USP2 の役割」という着眼から、低血糖に応答し活性化する細胞の USP2 の役割を個体レベルで明らかにする。

(4) USP2 によるエネルギー代謝制御分子機構の解明: USP2 は種々の臓器において横断的にエネルギー代謝を調節する鍵分子と想定されるが、その作用機序は各々異なる。しかしながら、臓器横断的な効果を鑑みると、共通の分子標的があると想定される。そこでエネルギー調節に関わる際の USP2 による普遍的な分子調節機構を探索する。

(5) 精巣マクロファージにおける USP2 の役割の解明: マクロファージでの USP2 の発現部位を検索していた時に精巣マクロファージで一定の発現が認められた。そこで、精巣マクロファージのエネルギー代謝に与える役割を明らかにすることも本研究の目的に加えた。

(6) プロポリスによる抗糖尿病作用における USP2 の役割: この課題も当初計画になかった内容であるが、脂肪組織のマクロファージの機能を USP2 が調節し、糖尿病の発症を調節することを明らかにしたので (*Adipocyte* 2, 227-236, 2013) 脂肪組織マクロファージに働き糖尿病の発症を抑えるブラジル産グリーンプロポリスの作用機序に USP2 が関わるかを調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨格筋における USP2 の役割

骨格筋で USP2 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成した。これらマウスと野生型マウスに 60% kcal の高脂肪餌を長期に給餌し、臓器重量や血液生化学検査やインスリン抵抗性、耐糖能を測定した。また *Usp2* 欠損マウスの前脛骨筋に塩化バリウムで筋損傷を生じた後に、組織像を観察すると共に筋重量や握力を観察した。一方、培養筋芽細胞株 C2C12 の *Usp2* 遺伝子をゲノム編集で破壊、または USP2 の選択的阻害剤 (ML364) を添加後、筋芽細胞の増殖や ATP 蓄積量に対する USP2 の役割を調べた。ATP 蓄積量が USP2 の有無の影響を受けたので、ミトコンドリアの膜電位をフローサイトで、分離ミトコンドリアのミトコンドリア複合体の活性を比色反応で、さらに酸素消費量を ESR で測定した。更に、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の蓄積を活性酸素の蛍光プローブを用いて評価した。また USP2 の欠損細胞で発現が変動する活性酸素制御分子をマイクロアレイ法で探索した。

#### (2) 視床下部における USP2 の役割

視床下部の USP2 を発現する神経核や細胞種を組織学的に解析した。腹内側核で顕著な発現が認

められたので、当初の計画では腹内側核に USP2 を発現するアデノ随伴ウイルスを投与することを予定していたが、ML364 が市場から入手可能になったので、バイオセーフティーの点からも ML364 の腹内側核投与実験に切り替えた。ML364 投与後、血糖値やその他の血液生化学的使用、血糖制御に関わるホルモンの血中レベル、摂餌量を測定した。さらに肝臓でグリコーゲンの分解に関わるグリコーゲンホスホリラーゼの活性を測定した。また、ML364 投与後の視床下部における活性酸素種の蓄積や、AMPK のリン酸化を評価した。一方、培養神経細胞である SH-SY5Y 細胞に ML364 を加えることで ROS の蓄積やその原因となるミトコンドリア機能の解析（複合体の活性や細胞内 ATP 量）を進めた。一連の検討から、腹内側核の USP2 が ROS や AMPK を介して血糖値の制御を行うことが想定されたが、そのことを確認するために ROS の産生阻害剤であるトロロックスや、AMPK の阻害剤であるコンパウンド C の効果も調べた。

#### ( 3 ) 血糖変化で活性化する細胞での *Usp2* 欠損の効果の評価

タモキシフェン投与後、*cFos* プロモーターや *Arc* プロモーター制御下で Cre を発現するドライバーマウスと R26GRR マウスを交配し、*cFos* 或いは *Arc* 活性化細胞で赤色蛍光を発するマウスを作成した。さらに *cFos-Cre* マウスと *Usp2<sup>fl/fl</sup>* マウスを交配し、タモキシフェン投与後、*cFos* 発現細胞で *Usp2* 遺伝子を欠損するマウスの作成を試みた。これらを低血糖処置し、脳での遺伝子発現を組織学及び生化学的に調べた。

#### ( 4 ) マクロファージの USP2 による精子のエネルギー代謝調節

*LyzM* プロモーター制御下でマクロファージにおいて Cre を発現するマウスと R26GRR マウスを交配させ、マクロファージを可視化し、*Usp2* mRNA との局在を比較した。次に *LyzM-Cre* マウスと *Usp2<sup>fl/fl</sup>* マウスを交配して得られたマクロファージ選択的 *Usp2* 欠損マウス(*msUsp2KO* マウス)の表現型を解析した。精巣マクロファージの亜集団の組成は表面マーカーを基にフローサイトメトリーで調べた。精巣を構成する主要な細胞の数や局在を免疫組織化学的に調べると共に、精巣・血液のテストステロン濃度や、精巣でのレチノイン酸合成酵素の発現量を調べた。さらに精巣上体から分離した精子や凍結融解精子の運動性を SMAS で解析すると共に、精子のミトコンドリア膜電位や ATP 含有量からミトコンドリア活性を調べた。また CTC 解析や細胞内カルシウムイオン濃度、細胞内 pH の変化から精子のキャパシテーションを評価し、体外受精法により受精能を評価した。一方、マクロファージの USP2 の欠損により精巣で発現が変動するサイトカインを網羅的 qRT-PCR で調べ、見出された GM-CSF については組織学的手法（免疫組織化学・定量的蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）及び分離細胞を材料に主要な発現細胞を同定した。一方、GM-CSF の受容体である CSF2R の発現細胞を免疫組織化学的手法で調べた。GM-CSF の凍結精子への影響を調べるために、予め組換え GM-CSF タンパク質で刺激した *msUsp2KO* マウスおよび野生型マウスの精子を凍結融解し、精子の機能を調べた。

#### ( 5 ) ブラジル産プロポリスの脂肪組織マクロファージに対する効果

*ob/ob* マウスや高脂肪給餌肥満マウスにプロポリスエタノール抽出液を投与し、脂肪組織マクロファージの亜集団をフローサイトメトリー解析した。また腹腔内マクロファージにプロポリスエタノール抽出液を加えたときの USP2 を含む複数の糖尿病抑制分子の遺伝子発現やサイトカインの産生パターンを調べた。骨髄由来免疫抑制細胞（myeloid-derived immune suppressor cell, MDSC）が誘導されたことから、本研究の主題には直接関わらないが、プロポリス主要含有成分の中で MDSC の誘導を惹起する成分を探索した。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) 骨格筋の USP2 の役割 ( *Physiol Rep* 7 e14193, 2019 他 )

骨格筋選択に *Usp2* 遺伝子を欠損したマウスに高脂肪餌を長期間給餌した際、摂餌量や体重増加量血液中の脂質レベルは、野生型マウスと比べ、大きな差が認められなかった。しかしながら空腹時血糖値に僅かな増加傾向がみられ、インスリン応答性や耐糖能に悪化傾向が認められた。反応性に個体差が認められたため、さらなる解析にはモデルの再検討が必要と考えた。

*Usp2* 遺伝子を破壊した C2C12 細胞は細胞内 ATP 量が減少し、細胞増殖能が低下した。この時、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体の酵素活性自体は影響がなかったが、ミトコンドリアの膜電位の低下がみられ、酸素消費量が低下した。即ち、USP2 は筋芽細胞の酸化的リン酸化の維持に関わることが示唆された。この時、ミトコンドリアでは ROS の蓄積がみられた。これら結果に一致して、ML364 処置後も ROS の蓄積とミトコンドリア機能不全がみられた。一方、*Usp2* 遺伝子を破壊した細胞では ROS を制御する複数の分子の遺伝子発現が変化した。

*Usp2KO* マウスの前脛骨筋に塩化バリウムを投与し筋損傷を惹起させ、経時的に組織像や筋重量、握力を測定したが、野生型マウスとの間で有意な差は認められなかった。4 - ( 1 ) の筋芽細胞の培養細胞系でみられた USP2 のエネルギー代謝維持における役割が個体レベルでは確認できなかったため、個体では何らかの分子が代償的に働くことが想定された。

#### ( 2 ) 視床下部の USP2 の役割 ( *J Neurosci*, in press 他 )

*Usp2* mRNA は脳実質全体で発現し、特に海馬の CA1 領域や歯状回、小脳の顆粒細胞層など神経細胞の細胞体が密に分布する領域で顕著だった。視床下部についても腹内側核や背内側核、弓

状核、室傍核、外側野といった糖代謝制御を行う神経核に発現が見られ、2重染色解析の結果、*Usp2* mRNA の主たる発現細胞は神経細胞であることが判明した。次に ML364 を視床下部腹内側核に投与すると血糖値の有意な増加が認められた。腹内側核以外に ML364 を投与しても血糖値の有意な増加は認められなかったことから、特に腹内側核の USP2 が平常時に血糖値が高まることを防ぐことが明らかになった。一方、腹内側核に ML364 を投与すると、インスリンや副腎皮質ホルモンの中濃度は変わらなかったが、ノルエピネフリン濃度は上昇した。更にこのとき、肝臓のグリコーゲンホスホリラーゼの活性が上昇したので、ML364 腹内側核投与後の血糖値の上昇は、交感神経の活性化とそれに依る肝臓でのグリコーゲン分解が関わることを示唆された。事実、ML364 投与前後の血糖値、血中ノルエピネフリン濃度、肝臓ホスホリラーゼ活性の間にはそれぞれ正の相関が認められた。

次に視床下部神経での分子イベントについて調べた。腹内側核による交感神経の過活性化には AMPK が関わるということが知られているので、ML364 腹内側核投与後、視床下部の AMPK のリン酸化を評価したところ、2 倍程度リン酸化が進むことが明らかになった。SH-SY5Y 細胞に対しても ML364 処置は AMPK のリン酸化を進めた。AMPK のリン酸化は細胞内の ATP 濃度が減少したときにみられるが、予想通り、ML364 処置した SH-SY5Y 細胞では細胞内 ATP 量が 6 割程度減少した。この時、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (I, II, IV) の活性が有意に低下し、ミトコンドリア内膜腔とマトリクス間のプロトン勾配が軽減したこと、 $F_0F_1$ ATPase の活性が低下したことなどから、ML364 はミトコンドリアの酸化リン酸化を抑えることで、細胞内 ATP を減少させ、結果的に AMPK のリン酸化を抑えることが明らかになった。ML364 が USP2 の阻害剤であることを考えると、USP2 はミトコンドリアの呼吸鎖の機能を維持することで不用意な AMPK の活性化を抑える可能性が示唆された。

次に AMPK のリン酸化の変化が視床下部の USP2 による血糖調節に実際に関与するかを検討した。AMPK の選択的阻害剤であるコンパウンド C を予め腹内側核に投与すると、ML364 による血中のノルエピネフリンの増加や肝ホスホリラーゼ活性の上昇、血糖値の増加が抑えられた。以上のことから、USP2 は AMPK の活性化を抑えることで血糖値の上昇にブレーキをかけることが明らかになった。

4 - (1) - の骨格筋の検討で、USP2 の阻害が ROS の蓄積を惹起することを見出した。そこで USP2 阻害による神経細胞のミトコンドリア機能不全が ROS の蓄積に依るのかを更に検討した。SH-SY5Y 細胞に ROS 産生阻害剤であるトロロックスを処置すると、活性酸素の減少に合わせてミトコンドリア機能が回復し、細胞内 ATP 量が回復した。視床下部腹内側核の *in situ* 薄切標本も ML364 の処置により ROS の蓄積が認められた。またトロロックスを予め腹内側核に投与することで、ML364 投与後の腹内側核の ROS の蓄積の軽減に併せて、視床下部の AMPK のリン酸化や血中ノルエピネフリン量の増加が軽減し、肝ホスホリラーゼ活性の増加が軽減した。これら結果に一致して、トロロックスの前処置は ML364 腹内側核投与後の血糖値の上昇を完全に消失させた。つまり USP2 は腹内側核の酸化ストレスレベルを制御し、血糖調節につなげていることが分かった。このことは、酸化ストレスが筋・脳共通に USP2 が制御する現象であることも示す。

研究者は当初、神経選択的 *Usp2* 欠損マウスの視床下部に USP2 を強制発現する組換えアデノ随伴ウイルスを投与するという遺伝学的なアプローチも計画したが、選択的阻害剤投与で十分なメカニズム解析ができたことから、選択的阻害剤を用いた検討に焦点を絞った。最終的に、視床下部腹内側核の USP2 は ROS の蓄積によるミトコンドリア機能不全を発端とする AMPK - 交感神経 - 肝ホスホリラーゼ軸の不要な活性化を抑えることで、平常時の血糖値の上昇を妨げていることを明らかにした (図 1)。

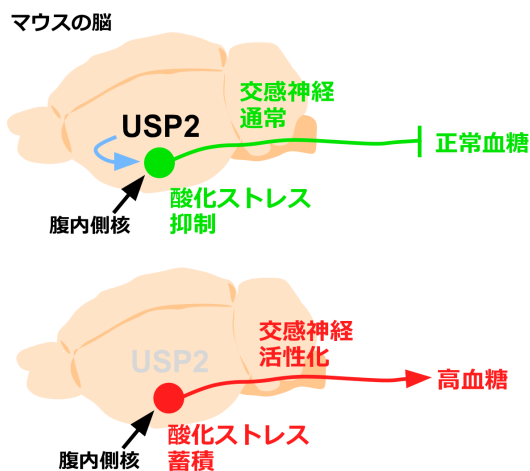


図 1 腹内側核でのUSP2の役割

### (3) 血糖変化で活性化する細胞での *Usp2* 遺伝子欠損の効果の評価

*cFos-Cre* マウス及び *Arc-Cre* マウスと R26GRR マウスを交配させ、*cFos* 或いは *Arc* が誘導される細胞で *Cre* が活性化するマウスの作成を試みた。得られたマウスにタモキシフェンを投与し、絶食及びインスリン投与によって低血糖を誘導したが、活性化細胞を赤色蛍光で標識するために最適なタモキシフェンの投与量と投与のタイミングを見出せなかった。同様に、*cFos-Cre* マウスと *Usp2<sup>fl/fl</sup>* マウスを交配し得られたマウスについても、低血糖条件下で視床下部で *Usp2* mRNA の発現が欠落するタモキシフェンの投与条件を確立できなかった。3R の Reduction の観点からこの検討は断念した。

(4) マクロファージの USP2 による精子のエネルギー代謝調節 (*Cell Mol Life Sci* 78, 2929-2948, 2021 他)

精巣では後期精子細胞が特に USP2 を高いレベルで発現するが、間質及び精細管周囲のマクロファージでも USP2 の発現が認められた。

msUsp2KO マウスは、正常に繁殖し、野生型マウスと比べて精巣の大きさも変わらなかった。また、M1/M2 マクロファージ比や精細管周囲/間質マクロファージの比率に変化は見られず、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、精母細胞、精子細胞、精子の形態や生存性、数にも差が無かった。また、精巣及び血中のテストステロン量や、精巣のレチノイン酸合成酵素遺伝子 (*Aldh1, Rdh10*) の遺伝子発現も影響を受けなかった。精巣上体尾部から採取した精子の運動性は減少傾向がみられたが、キャパシテーションを起こした精子の割合は野生型マウスと変わらなかった。以上の結果から、精巣マクロファージの USP2 は精巣や精子の形成には必要不可欠ではないことが判明した。

msUsp2KO マウスの精子の運動性に減少傾向がみられたことから、より精子にストレスのかかる環境では差が明確になることを想定した。そこで凍結融解処置後の精子について調べた。野生型マウスの精子と比べ、msUsp2KO マウスの精子は生存性には差が無かったが、直線運動性、曲線運動性、キャパシテーションが低下した。また、細胞内のグルコース量や乳酸量は変わらなかったが、ミトコンドリアの膜電位が低下し、ATP 量が減少した。さらに活性化精子で見られる細胞内カルシウム濃度や pH の上昇がみられなかった。これら活性化の低下に一致して、msUsp2KO マウスの精子の体外受精能は有意に低下した。以上のことから精巣マクロファージの USP2 は凍結融解後の精子の活動維持に関わることが示された。凍結精子は実験動物分野では系統の維持や育種に、医学領域では不妊治療に用いられ、獣医・畜産領域でも育種や希少動物の保存と広く利用される材料なので、その活性を調節する酵素を新たに見出した意義ある成果と考える。

精巣マクロファージが精子系列の細胞に働く際に関わる液性因子を探索したところ、GM-CSF の遺伝子発現が、マクロファージの USP2 の欠損により、精巣で半減することが分かった。免疫組織化学的解析により、精巣による主要な GM-CSF 発現細胞は間質のマクロファージであり、分離精巣マクロファージでも GM-CSF が細胞内で検出された。一方、定量的蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション解析により、精巣マクロファージの *Csf2* mRNA (GM-CSF をコードする) はマクロファージの USP2 欠損により 3 割程度減少した。GM-CSF の受容体である CSF2R の発現部位を調べたところ、精巣では間質マクロファージに加え、後期精子細胞や精子で認められた。GM-CSF は血液・精巣関門を通過することを考え併せると (*Biol Reprod* 57, 822-826, 1997) 精巣マクロファージの産生する GM-CSF が後期精子細胞や精子に働く可能性が考えられる。

次に GM-CSF が凍結精子の運動性や活性化に与える影響について調べた。予め組換え GM-CSF で処置すると、msUsp2KO マウスの凍結精子でみられた機能不全のうち、ミトコンドリアの機能障害と精子内 ATP 量の減少が改善し、これに依存した直線運動が回復した。一方で、CTC 染色や細胞内カルシウムイオンレベルや pH の上昇、非対称運動で現されるキャパシテーションの回復は認められず、体外受精能も不全状態のままであった。以上のことから、精巣マクロファージの USP2 による凍結精子の活動の中で、GM-CSF はミトコンドリアに依拠した機能の維持に関わるが、キャパシテーションなどについては未だ同定されていない他の機構によることが明らかになった (図 2)。

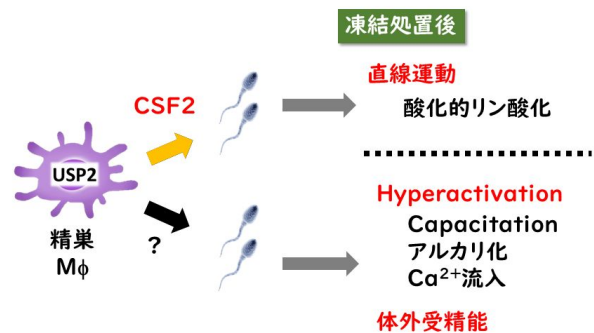


図2 精巣マクロファージのUSP2の役割

(5) ブラジル産プロポリスの脂肪組織マクロファージに対する効果 (*BMC Complement Altern Med* 18, 138, 2018 他)

プロポリスエタノール抽出液を投与した *ob/ob* マウスや高脂肪餌誘導肥満マウスの腸間膜脂肪組織において、総マクロファージの減少にあわせて、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSC の増加が認められた。この MDSC の増加は肥満していないマウスの生殖器周囲脂肪組織や腹腔内マクロファージでも見られたことから、プロポリスが糖尿病の治療のみならず予防にも使用できることが示唆された。プロポリスエタノール抽出による MDSC の誘導はマクロファージ亜集団の中でも特に M1 様マクロファージで顕著だった。プロポリスによって誘導された MDSC は IL-10 など免疫抑制サイトカインの発現が高レベルであったが、USP2 の発現は増加しなかった。

腹腔内マクロファージにプロポリスエタノール抽出液に含まれる主要な 12 成分を添加し、MDSC への分化を調べたところ、ケンフェロールとピノセンプリンが誘導活性を示した。特にケンフェロールはマウスに 2 カ月間投与した時にも生殖器脂肪組織で MDSC を誘導したことから、プロポリス中の主要な MDSC 誘導成分であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hashimoto Mayuko, Kimura Shunsuke, Kanno Chihiro, Yanagawa Yojiro, Watanabe Takafumi, Okabe Jun, Takahashi Eiki, Nagano Masashi, Kitamura Hiroshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Macrophage ubiquitin-specific protease 2 contributes to motility, hyperactivation, capacitation, and in vitro fertilization activity of mouse sperm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 2929 ~ 2948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-020-03683-9	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 該当する
1. 著者名 Kitamura Hiroshi, Hashimoto Mayuko	4. 巻 22
2. 論文標題 USP2-Related Cellular Signaling and Consequent Pathophysiological Outcomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031209	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 Watahiki Asami, Shimizu Kouhei, Hoshikawa Seira, Chiba Mitsuki, Kitamura Hiroshi, Egusa Hiroshi, Fukumoto Satoshi, Inuzuka Hiroyuki	4. 巻 524
2. 論文標題 Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 477 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.119	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 Hashimoto Mayuko, Saito Natsuko, Ohta Haru, Yamamoto Kumiko, Tashiro Asuka, Nakazawa Kosuke, Inanami Osamu, Kitamura Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Inhibition of ubiquitin specific protease 2 causes accumulation of reactive oxygen species, mitochondria dysfunction, and intracellular ATP decrement in C2C12 myoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14193	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 Hiroshi Kitamura	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of Propolis Extract and Propolis-Derived Compounds on Obesity and Diabetes: Knowledge from Cellular and Animal Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4394 ~ 4394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24234394	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 ISHINO Takeshi, KURITA Hirofumi, KIRISAWA Rikio, SHIMAMOTO Yoshinori, NUMANO Rika, KITAMURA Hiroshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Introduction of a plasmid and a protein into bovine and swine cells by water-in-oil droplet electroporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 14 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0475	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 Watahiki Asami, Shimizu Kouhei, Hoshikawa Seira, Chiba Mitsuki, Kitamura Hiroshi, Egusa Hiroshi, Fukumoto Satoshi, Inuzuka Hiroyuki	4. 巻 524
2. 論文標題 Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 477 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.119	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 Kenta Kikuchi, Mayumi Iida, Naoki Ikeda, Shigetaka Moriyama, Michito Hamada, Satoru Takahashi, Hiroshi Kitamura, Takashi Watanabe, Yoshinori Hasegawa, Koji Hase, Takeshi Fukuhara, Hideyo Sato, Eri H. Kobayashi, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto, Masato Tanaka, Kenichi Asano	4. 巻 201
2. 論文標題 Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 635-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800040	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 Hiroshi Kitamura, Natsuko Saito, Junpei Fujimoto, Ken-ichi Nakashima, and Daisuke Fujikura	4. 巻 18
2. 論文標題 Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice in vivo and in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12906-018-2198-5	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 Takeshi Ishino, Mayuko Hashimoto, Misato Amagasa, Natsuko Saito, Osamu Dochi, Rikio Kirisawa, Hiroshi Kitamura	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of protocol for preparation of gene-edited bovine ear-derived fibroblasts for somatic cell nuclear transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 95-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.39.95.	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 Shimamoto Yoshinori, Nio-Kobayashi Junko, Watarai Hiroshi, Nagano Masashi, Saito Natsuko, Takahashi Eiki, Higuchi Hidetoshi, Kobayashi Atsushi, Kimura Takashi, Kitamura Hiroshi	4. 巻 198
2. 論文標題 Generation and validation of novel anti-bovine CD163 monoclonal antibodies ABM-1A9 and ABM-2D6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 6~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2018.02.004	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 FUJIMOTO Masaki, KITAMURA Hiroshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Application of the colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for genotyping $\text{Cre}^{-/-}$ driver mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 507~510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0658	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 0件）

1. 発表者名 橋本菜由子、木村俊介、菅野智裕、柳川洋二郎、渡邊敬文、岡部潤、高橋英機、永野昌志、北村 浩
2. 発表標題 精巣マクロファージのコピキチン特異的プロテアーゼ2が精子機能に与える影響
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本菜由子、太田葉瑠、齊藤菜津子、山本久美子、稲波修、北村 浩
2. 発表標題 コピキチン特異的プロテアーゼ2による筋芽細胞のミトコンドリアの機能維持と活性酸素の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田葉瑠、橋本菜由子、齊藤奈津子、山本久美子、中澤康裕、稲波修、北村 浩
2. 発表標題 筋芽細胞におけるUSP2によるミトコンドリア機能制御
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石野武志、栗田弘史、北村 浩
2. 発表標題 Droplet-EP法による家畜細胞へのプラスミド・組前タンパク質の導入
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本茉由子、今野幸太郎、渡辺雅彦、北村 浩
2. 発表標題 新たなエネルギー代謝制御酵素USP2の視床下部での発現と機能
3. 学会等名 第24回グリアクラブ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本茉由子、Lee Ming Liang、木村俊介、戸田知得、高橋英機、北村 浩
2. 発表標題 視床下部ユビキチン特異的プロテアーゼ2の発現と血糖調節に対する役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天笠美聡、菅野智裕、木村俊介、柳川洋二郎、岩永敏彦、高橋英機、永野昌志、北村 浩
2. 発表標題 マクロファージに選択的なUsp2ノックアウトマウスの精巣機能の評価
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本茉由子、李 明亮、木村俊介、戸田知得、高橋英機、北村 浩
2. 発表標題 視床下部ユビキチン特異的プロテアーゼ2の血糖値に対するフィードバック制御
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天笠美聡、菅野智裕、木村俊介、柳川洋二郎、岩永敏彦、高橋英機、永野昌志、北村 浩
2. 発表標題 マクロファージ選択的ユビキチン特異的プロテアーゼ2欠損マウスの精巣機能の評価
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本菜由子、Lee Ming Liang、木村俊介、戸田知得、高橋英機、北村 浩
2. 発表標題 ユビキチン特異的プロテアーゼ2の視床下部における発現と血糖調節における役割
3. 学会等名 第32回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村 浩、橋本菜由子、木村俊介、渡邊敬文、高橋英機、永野昌志
2. 発表標題 精巣マクロファージに発現するUSP2による精子運動機能の制御
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本菜由子、木村俊介、菅野智裕、柳川洋二郎、渡邊敬文、高橋英機、永野昌志、北村 浩
2. 発表標題 マクロファージのユビキチンプロテアーゼ2が凍結精子の機能に与える役割
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

酪農学園大学の北村浩教授らが活発な凍結精子を得るのに必要な酵素を発見  
<https://www.u-presscenter.jp/article/post-44651.html>  
<https://www.facebook.com/RakunoGakuVetPhysiol/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------