

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06359

研究課題名(和文) 骨格筋の分化とエネルギー代謝を制御する機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of skeletal muscle energy metabolism and differentiation.

研究代表者

佐藤 祐介 (Sato, Yusuke)

東海大学・農学部・特任准教授

研究者番号：50589520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は単核の筋芽細胞が分化・融合した多核の筋線維の集合体であり、生体最大のエネルギー代謝器官である。本研究では、脱アミノ化酵素Apobec2が筋細胞の「分化」および「エネルギー代謝」を制御する機構について検証した。C2C12筋芽細胞に対するApobec2の強制発現は、筋芽細胞から筋管への分化を顕著に抑制した。また、siRNAによるApobec2ノックダウンは、筋細胞におけるミトコンドリアの呼吸を亢進した。以上から、Apobec2が筋細胞において分化とエネルギー代謝の両方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

筋細胞の分化・代謝の制御機構を理解することができれば、骨格筋量の維持・増加あるいは性質をコントロールできるようになる。本研究により、筋細胞の代謝・分化の制御機構の一旦が明らかになった。研究成果は、サルコペニアの予防やスポーツ科学に貢献するだけでなく、昨今注目が集まる培養肉の開発に資すると考える。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscles are composed of multinucleated myofibers that differentiate and fuse from mononuclear myoblasts and are the largest energy metabolizing organs in the body. In this study, the mechanism by which muscle cell differentiation and energy metabolism are controlled by the deaminase enzyme Apobec2 was investigated. Forced expression of Apobec2 in C2C12 myoblasts significantly suppressed the differentiation of myoblasts into myotubes. In addition, knockdown of Apobec2 by siRNA increased mitochondrial respiration in C2C12 myoblasts. These results suggest that Apobec2 may regulate both differentiation and energy metabolism in skeletal muscle cells.

研究分野：代謝学、畜産物利用学

キーワード：骨格筋 エネルギー代謝 分化 ミトコンドリア Apobec2

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は発生段階で単核の筋芽細胞が分化・融合した多核の筋線維の集合体である。筋細胞の分化・融合の制御は、筋形成調節因子 (MRF : Myogenic Regulatory Family) ファミリー (Myod, Myog など) や Mef2 が筋特異的遺伝子の発現を協調的に調節することで成立する。これら因子の単一または複数の欠損は、発生段階における筋形成を著しく抑制する。また、TGF- $\beta$ ファミリーの1つである Mstn (ミオスタチン) や mTOR セリン・スレオニンキナーゼは筋細胞のシグナル伝達を介して、分化・融合・タンパク質合成を制御することで骨格筋量を調節している。

近年、筋細胞の「分化」を制御すると考えられていた遺伝子が、実際には「エネルギー代謝」をも制御することがわかってきた。これまで筋細胞の分化とエネルギー代謝を制御する因子が多数報告されている。一方で、近年、それら両方を制御するものが報告されている。単一の遺伝子が筋細胞のステージごと (筋芽細胞、筋管) に、異なる機能 (分化、エネルギー代謝) を有する生理的意義は不明である。

Apobec2 は筋細胞特異的に発現する AID/APOBEC ファミリーの1つである。これらファミリー分子はその脱アミノ化酵素活性により、DNA/RNA を編集することで多様な生理機能を発揮する (Salter, *Trends Biochem. Sci.*, 2015)。一方、Apobec2 の脱アミノ化酵素活性は疑問視されており、全く異なる機能を有すると予想されている (Powell, *J. Biol. Chem.*, 2014)。

これまでの研究から、Apobec2 遺伝子のノックアウト (またはノックダウン) が筋細胞の分化やエネルギー代謝を負に制御する可能性を見出している。本研究では、Apobec2 が未知の分子機構により、筋細胞の分化とエネルギー代謝の両方を制御する新規メカニズムを明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Apobec2 が筋細胞の分化とエネルギー代謝の両方を制御するメカニズムの検証を行い、その生理的意義を明らかにすることである。具体的には、Apobec2 の強制発現が培養筋細胞およびマウス骨格筋の分化またはエネルギー代謝制御に与える影響を調べる。また、Apobec2 の結合分子の同定から、その分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 培養筋細胞に対する Apobec2 の強制発現が分化およびエネルギー代謝へ与える影響の解析について：準備研究から、Apobec2 発現ベクター (プラスミドおよびアデノ随伴ウイルス : AAV6-Flag-Apobec2) を作製した。筋芽細胞株 C2C12 に Apobec2 を強制発現させた後、低血清培地にて筋管に分化誘導した。Apobec2 は筋分化時の DNA 脱メチル化に関係すると考えられているため (Carrió, *BMC Biol.*, 2016)、メチル化特異的 PCR にて筋分化を制御する Myog, Myod 遺伝子などのメチル化レベルを定量した。同時に、各種分化のマーカーの発現量について、ウェスタンブロットおよび qRT-PCR にて定量した。また、筋管については細胞外フラックスアナライザーを用いたミトストレストテストにより、エネルギー代謝 (ミトコンドリアの呼吸) を評価した。ミトコンドリア呼吸鎖の発現量をウェスタンブロットにて定量した。

(2) マウス骨格筋に対する Apobec2 強制発現が分化およびエネルギー代謝へ与える影響の解析について：AAV6-Flag-Apobec2-GFP をマウスの後肢筋に対し筋内注射し、Apobec2 強制発現を行うため、予備実験として、筋芽細胞株 C2C12 に導入した。GFP 陽性細胞をカウントし、導入効率を検証した。

(3) Apobec2 の分子機能の探索：結合分子の同定など：準備研究から、筋管に対して Flag-Apobec2 を用いて免疫沈降し、共沈タンパク質を確認する。得られたバンドを質量分析により同定し、Apobec2 との結合が確認できたものについては、siRNA を用いたノックダウン等により分化またはエネルギー代謝制御との関係を調べる。

## 4. 研究成果

(1) Apobec2 は筋分化前ではほとんど発現しておらず、分化に伴い、その発現量が増加する。Apobec2 欠損マウスから単離した筋芽細胞 (Apobec2<sup>-/-</sup>) では、初期の筋分化が促進されることがわかっている (Ohtsubo, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2017)。Apobec2 と筋分化の関係を詳細に調べるため、C2C12 筋芽細胞に対し Apobec2 発現プラスミドを導入した。His-tag に対するウェスタンブロットにて、分化前の筋芽細胞に Apobec2 が発現できたことを確認した。細胞の形態観察および qRT-PCR によるマーカー遺伝子の発現量の定量から、Apobec2 の強制発現は筋芽細胞から筋管への分化を顕著に抑制することが明らかになった。Apobec2 は筋分化時の DNA 脱メチル化を

制御すると予想されているため、メチル化特異的 PCR にて筋分化制御に関わる *Myog*, *Myod1*, *Myf5* のメチル化レベルを調べたが、*Apobec2* 強制発現は影響を与えなかった。次に、*Apobec2* とエネルギー代謝の関係を調べるため、siRNA を用いた *Apobec2* ノックダウンと細胞外フラックスアナライザーを用いたミトストレステストを実施した。siRNA 導入により、筋細胞における *Apobec2* 発現量はタンパク質レベルで 50%程度減少した。一方で、ミトコンドリア呼吸鎖複合体のタンパク質発現量に変化は認められなかった。ミトストレステストの結果、コントロールと比べて *Apobec2* ノックダウン細胞では、ミトコンドリアの呼吸が亢進していた。以上から、*Apobec2* が筋細胞において分化とエネルギー代謝の両方を制御することが示唆された。

(2) (1) で確認された現象を生体で検証するため、マウス骨格筋への *Apobec2* 強制発現を計画した。アデノ随伴ウイルスベクター (AAV6-Flag-*Apobec2*-GFP) の導入効率を筋芽細胞株 C2C12 により確認した。C2C12 を低血清培地により筋管に分化させた後、アデノ随伴ウイルスベクターをトランスフェクションしたが、GFP 陽性筋管はほとんど確認されなかった。筋管に対するアデノ随伴ウイルスベクターの導入効率が低いため、分化誘導前の筋芽細胞および HEK293 に対してもトランスフェクションした。その結果、HEK293 では一部 GFP 陽性細胞が観察されたが、C2C12 筋芽細胞においてはほとんど観察されなかった。また、ウェスタンブロットにてタンパク質発現を確認したが、Flag-*Apobec2* の発現は確認されなかった。その後、異なる血清型で新たにウイルスベクターを構築したが、筋芽細胞への導入効率は改善されなかった。

(3) ゼブラフィッシュ網膜やグリア細胞を用いた研究から、*Apobec2* の結合分子 (Ubc9, Topors, Pou6f2) が報告された。しかし、これらは哺乳類の筋細胞ではほとんど発現しておらず、*Apobec2* と協調的に機能するとは考えにくい。これまでに、筋芽細胞における *Apobec2* 強制発現および免疫沈降から、複数の結合分子を回収した。今後、得られたバンドのタンパク質の同定を実施したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Fukaya Misato, Sato Yoriko, Kondo Shinji, Adachi Shin-ichi, Yoshizawa Fumiaki, Sato Yusuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Quercetin enhances fatty acid -oxidation by inducing lipophagy in AML12 hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e07324 ~ e07324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e07324	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 Nomura Ryo, Tsuzuki Sho, Kojima Takaaki, Nagasawa Mao, Sato Yusuke, Uefune Masayoshi, Baba Yasunori, Hayashi Toshiya, Nakano Hideo, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Administration of Aspergillus oryzae suppresses DSS-induced colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry: Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 100063 ~ 100063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fochms.2021.100063	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 Suzuki Reiko, Sato Yoriko, Fukaya Misato, Suzuki Daisuke, Yoshizawa Fumiaki, Sato Yusuke	4. 巻 82
2. 論文標題 Energy metabolism profile of the effects of amino acid treatment on hepatocytes: Phenylalanine and phenylpyruvate inhibit glycolysis of hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111042 ~ 111042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2020.111042	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 Koike Shinichiro, Kabuyama Yukihiro, Obeng Kodwo Amuzuah, Sugahara Kunio, Sato Yusuke, Yoshizawa Fumiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 An Increase in Liver Polyamine Concentration Contributes to the Tryptophan-Induced Acute Stimulation of Rat Hepatic Protein Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2665 ~ 2665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12092665	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, Kawashima Keisuke, Fukui Emiko, Matsumoto Hiromichi, Yoshizawa Fumiaki, Sato Yusuke	4. 巻 1869
2. 論文標題 Functional analysis reveals that Tinagl1 is required for normal muscle development in mice through the activation of ERK signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119294 ~ 119294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2022.119294	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 OBENG Kodwo Amuzuah, MOCHIZUKI Shinji, KOIKE Shinichiro, TOYOSHIMA Yuka, SATO Yusuke, YOSHIZAWA Fumiaki	4. 巻 68
2. 論文標題 Analysis of the Stimulative Effect of Tryptophan on Hepatic Protein Synthesis in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 312 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.68.312	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

#### 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
---------	---------