

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850218

研究課題名(和文) APOBEC2 によるオートファジー制御と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Regulation of autophagy by APOBEC2 and its physiological roles in skeletal muscle

研究代表者

佐藤 祐介 (SATO, YUSUKE)

宇都宮大学・農学部・助教

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)：骨格筋におけるオートファジーの破綻は、筋疾患や筋量の減少を引き起こす。本研究では、筋特異的脱アミノ化酵素APOBEC2欠損マウスの骨格筋で観察されたオートファジーについて追求した。複数のオートファジーのマーカー分子の発現パターンおよび組織学的検討から、APOBEC2欠損マウスの骨格筋ではオートファジー(あるいはミトファジー)が亢進していることがわかった。また、メタボローム解析の結果、APOBEC2欠損筋ではミトコンドリアの代謝産物の一部に変化がみられた。即ち、APOBEC2欠損マウス骨格筋で観察されたオートファジーは、ミトコンドリアの代謝異常に起因すると考えた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is essential for maintaining muscle mass. Dysregulation of autophagy is known to cause myopathy and atrophy. In the present study, we investigated whether APOBEC2, a muscle specific AID/APOBEC deaminase family, deficiency promotes autophagy/mitophagy in skeletal muscle. We found that autophagy/mitophagy up-regulation and metabolic dysregulation in APOBEC2 deficient muscle. Further studies should be done to elucidate the regulatory mechanisms of APOBEC2 mediated autophagy and its molecular function in skeletal muscle.

研究分野：農学

キーワード：骨格筋 APOBEC2 オートファジー ミトコンドリア 代謝

1. 研究開始当初の背景

骨格筋量は、筋線維（筋細胞）の大きさに依存しており、その大きさは主に筋タンパク質の合成と分解により調節されている。骨格筋量の操作が可能になれば、ヒトでは老齢性筋萎縮の予防、スポーツ科学、医療への応用が可能であり、家畜では畜肉の増産が期待できる。これまで、研究代表者は筋特異的脱アミノ化酵素 APOBEC2 の欠損が筋疾患や骨格筋重量の減少を引き起こすことを明らかにしている。しかし、APOBEC2 の基質分子や生理機能の詳細については不明のままである。研究代表者は電顕および組織学的解析から、APOBEC2 を欠損した筋細胞ではオートファジーの異常が起こっている可能性を見出した。近年、骨格筋でオートファジーが正常に機能しなければ、筋疾患や骨格筋重量が減少することが明らかになっていることから (Masiero, *Cell Metabol.*, 2009)、APOBEC2 欠損マウスの骨格筋で見られた筋疾患および骨格筋重量の減少は、オートファジーの異常が原因である可能性が極めて高いと考えた。そこで、本研究では、APOBEC2 欠損筋で観察されたオートファジーの異常について追求し、その制御機構および生体における生理的意義の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、APOBEC2 欠損マウスで見られたオートファジーの異常について精査し、その制御機構および生体における生理的意義について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には野生型および APOBEC2 欠損マウス (Mikl, *Mol. Cell. Biol.*, 2005) の後肢筋（ヒラメ筋、長肢伸筋、前脛骨筋等）これらのマウスから単離・培養した筋管を使用した。オートファジーの評価のため、各種マーカー分子の定量（ウェスタンブロット法および qRT-PCR 法）および免疫染色法を行った。また、筋組織中の代謝物を定量するため、メタボローム解析を行った。

4. 研究成果

APOBEC2 欠損筋を電顕解析すると、オートファゴソームや異常なミトコンドリアが多数観察される。そこでまず、オートファジーおよびミトファジー（ミトコンドリアのオートファジー）に関連するマーカー分子の発現量を定量した。野生型に比べ APOBEC2 欠損筋では、オートファゴソーム形成に関与

する LC3B / , poly-Ub, PINK1, Parkin の発現量が増加しており、分解の指標である p62 が減少していたことから、オートファジー（あるいはミトファジー）が亢進していると判断した。遺伝子発現についても、Map1lc3b, Gabarapl1, Pink1, Park2 の発現量が APOBEC2 欠損筋において有意に増加していた。また、免疫組織染色（LC3B, poly-Ub, Tom20 など）の結果からも、APOBEC2 欠損筋ではオートファジーの亢進が確認された。そこで次に、オートファジーの主要な制御経路である mTOR シグナルのリン酸化について、ヒラメ筋、長肢伸筋および筋管を用いてウェスタンブロットにて検討したが、野生型と APOBEC2 欠損筋で有意な差は見られなかった。また、APOBEC2 欠損筋では異常なミトコンドリアが多数観察されたことから、ミトコンドリアコピー数を定量したが、野生型と有意差は見られなかった。近年、一部の代謝中間体が細胞内のオートファジーを制御することが報告された (Duran, *Mol. Cell.*, 2012)。そこで次に、両マウスの前脛骨筋についてメタボローム解析を行った。その結果、APOBEC2 欠損筋では TCA 回路の一部の代謝中間体が増加していた。このことから、APOBEC2 欠損筋で見られたオートファジーの亢進は、ミトコンドリア代謝異常に起因する可能性が考えられる。これらの詳細なメカニズムについては、今後も研究を進めていきたい。既に、他の AID/APOBEC ファミリーは脱アミノ化酵素として DNA/RNA に作用し、多様な生理機能を発揮することが明らかになっているが、APOBEC2 の基質や生理機能は不明な点が多い。本研究では、APOBEC2 欠損による筋疾患および骨格筋量の減少が、オートファジーや代謝異常により引き起こされた可能性を示しており、APOBEC2 の生理機能の一部を明らかにした。

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9件)

Mizunoya W., Tashima A., Sato Y.,

Tatsumi R., Ikeuchi Y.

The growth-promoting activity of egg white proteins in the C2C12 myoblast cell line. *Animal science journal* 86 194-199.

(2015) doi: 10.1111/asj.12257 (査読あり)

Sakaguchi S., Shono J., Suzuki T., Sawano

S., Anderson JE., Do MK., Ohtsubo H., Mizunoya W., Sato Y., Nakamura M., Furuse M., Yamada K., Ikeuchi Y., Tatsumi R.

Implication of anti-inflammatory macrophages in regenerative moto-neuritogenesis: promotion of myoblast migration and neural chemorepellent semaphorin 3A expression in injured muscle.

The international journal of biochemistry & cell biology 54 272-285 (2014) doi:

10.1016/j.biocel.2014.05.032. (査読あり)

Mizunoya W., Iwamoto Y., Sato Y., Tatsumi R., Ikeuchi Y.

Cold exposure increases slow-type myosin heavy chain 1 (MyHC1) composition of soleus muscle in rats. Animal science journal 85 293-304. (2014) doi:

10.1111/asj.12143. (査読あり)

Mizunoya W., Iwamoto Y., Shirouchi B., Sato M., Komiya Y., Razin FR., Tatsumi R., Sato Y., Nakamura M., Ikeuchi Y.

Dietary fat influences the expression of contractile and metabolic genes in rat skeletal muscle. Plos One 11 8 e80152 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0080152. (査読あり)

Mizunoya W., Sawano S, Iwamoto Y., Sato Y., Tatsumi R., Ikeuchi Y.

Effect of 48-h Food Deprivation on the Expressions of Myosin Heavy-Chain Isoforms and Fiber Type-Related Factors in Rats. Journal of nutritional science and vitaminology 59 289-298 (2013) (査読あり)

Shono JI., Sakaguchi S., Suzuki T., Do MK., Mizunoya W., Nakamura M., Sato Y., Furuse M., Yamada K., Ikeuchi Y., Tatsumi R.

Preliminary time-course study of antiinflammatory macrophage infiltration in crush-injured skeletal muscle. Animal science journal 84 744-750 (2013) doi: 10.1111/asj.12105 (査読あり)

Mizunoya W., Ohnuki K., Baba K., Miyahara H., Shimizu N., Tabata K., Kino T., Sato Y., Tatsumi R., Ikeuchi Y.

Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice.

SpringerPlus 2 165 (2013) doi:

10.1186/2193-1801-2-165 (査読あり)

Shimasaki Y., Tsuyama M., Tasmin R., Qiu X., Shimizu M., Sato Y., Yamasaki Y., Kato-Unoki Y., Nukata A., Nakashima T., Ichinose H., Wariishi H., Honjo T., Oshima Y.

Thiobencarb Herbicide Reduces Growth, Photosynthetic Activity, and Amount of Rieske Iron-Sulfur Protein in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. Journal of biochemical and molecular toxicology 27 437-444 (2013) doi: 10.1002/jbt.21505

(査読あり)

佐藤祐介

骨格筋における APOBEC2 の機能に関する研究 招待講演 栄養生理研究会報 57 15-20 (2013) (査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

佐藤より子, 佐藤祐介, 菅原邦生, 吉澤史昭

日本畜産学会 第119回大会(宇都宮大学) 2015年3月28-29日 アミノ酸による筋線維型変換機構の解明
佐藤より子, 佐藤祐介, 菅原邦生, 吉澤史昭

日本アミノ酸学会 第8回学術集会(東京農業大学) 2014年11月8-9日
ロイシン経口投与がラット骨格筋の遅筋遺伝子の発現に及ぼす影響

Fujita Y., Sato Y., Ohtubo H., Mizunoya W., Tatsumi R., Ikeuchi Y., Yohizawa F., Sugahara K.

16th Asian-Australasian Animal Production Conference (インドネシア) 2014年11月10-14日 APOBEC2

Deficiency Causes Increased Autophagy and Abnormal Mitochondria in Skeletal Muscle

Ohtubo H., Sato Y., Suzuki T., Mizunoya W., Nakamura M., Tatsumi R., Ikeuchi Y. FASEB SRC on “Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells” (アメリカ) 2014年7月22日 APOBEC2 deficiency up-regulates myoblast differentiation.

大坪秀明, 佐藤祐介, 鈴木貴弘, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀
日本畜産学会大会 第118回大会(畜産草地研究所) 2014年3月27日
脱アミノ化酵素 APOBEC2 の欠損が筋再生に及ぼす影響

藤田優平, 佐藤祐介, 大坪秀明, 水野谷航, 辰巳隆一, 池内義秀, 吉澤史

昭, 菅原邦生

日本畜産学会大会 第118回大会(つくば) 2014年3月27 APOBEC2欠損マウスの骨格筋で観察されるオートファジーについて

大坪秀明, 佐藤祐介, 鈴木貴弘, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀
日本畜産学会大会 第117回大会(新潟大学) 2013年9月9 脱アミノ化酵素 APOBEC2 の欠損が筋細胞の分化に及ぼす影響

佐藤祐介

招待講演 平成25年家畜栄養生理研究会 春季学術集会(日本獣医生命科学大学) 骨格筋における APOBEC2 の機能に関する研究 2013年5月18日

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/muscle>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐藤 祐介 (SATO YUSUKE)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号: 50589520