九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

The role of cytidine deaminase APOBEC2 expression in myogenic regeneration and mitophagy

大坪, 秀明

https://hdl.handle.net/2324/1931959

出版情報：九州大学, 2017, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏　　名　：大坪 秀明

論文題名　：The role of cytidine deaminase APOBEC2 expression in myogenic regeneration and mitophagy
（筋再生とマイトファジーにおけるシチジン脱アミノ化酵素 APOBEC2 発現の役割）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

近年、急激な人口増加により世界レベルでの食糧不足が危惧されている。この問題を解決するためには、様々な栄養資源の安定供給策を講じる必要がある。動物性タンパク質資源に関しては、肉用家畜・家禽一個体あたりの筋肉量の増大および培養筋細胞を用いた人口食肉の開発と実用化が挙げられる。これらを実現するには骨格筋の形成機構（筋肥大・再生機構）を解明することが必要であり、これを制御している因子の同定と機能の解明が急務である。骨格筋の肥大・再生は、筋細胞（筋線維）の細胞膜と基底膜の間隙に存在する筋幹細胞（衛星細胞）に大きく依存している。即ち、衛星細胞が増殖・分化し互いに融合および既存の筋線維に融合することで筋形成に寄与することが知られている。これまでの研究により、分化初期の衛星細胞ではシチジン脱アミノ化酵素 AID/APOBEC ファミリーの一つである APBOEC2 の発現が大きく上昇すること、APOBEC2 欠損マウスは筋疾患様の表現型を示すことを明らかにしたことから、APOBEC2 は正常な筋形成に寄与すると考えられた（Sato *et al.* 2009, 2010）。この作業仮説を実証するため本研究では、APOBEC2 欠損マウスを用いて、(1) 衛星細胞の分化および自己複製に与える影響、(2) ミトコンドリアの機能およびマイトファジー（ミトコンドリア特異的なオートファジー）に与える影響を明らかにすることを目的とした。得られた知見の概略は以下の通りである。

(1) APOBEC2 欠損が衛星細胞の分化・自己複製に与える影響（第2，3章）

先ず、野生型および APOBEC2 欠損マウスから単離した衛星細胞を培養し、細胞分化能を比較した。APOBEC2 欠損により衛星細胞の分化・融合が促進され、幼若な筋線維である筋管の形成が有意に促進された。これに符合して、筋細胞分化マーカーである myosin 重鎖（MyHC）と myogenin の発現が増加していることを確認した。また、RNAi 法により、野生型マウス衛星細胞の APOBEC2 発現を分化誘導時に抑制すると、先と同様に myogenin 発現が増加したことから、上記の APOBEC2 欠損衛星細胞培養系における筋管形成の促進は分化期での APOBEC2 の機能を反映することが明らかになった。続いて、cardiotoxin 注入による *in vivo* 筋損傷モデルを用いて、野生型および APOBEC2 欠損マウスの筋再生能を比較した。APOBEC2 欠損マウスでは、中心核を特徴とする再生筋線維がより早期に形成されることを H&E 染色および抗 developmental MyHC 抗体を用いた蛍光免疫組織染色により観察した。myogenin の発現も有意に増加していたことから（筋細胞分化の促進）、APOBEC2 欠損により再生筋線維の形成が促進されることが明らかとなった。APOBEC2 欠損型マウスの筋線維径は野生型マウスに比べて有意に小さいなどの筋疾患様の表現型を示したことから考えて、APOBEC2 は筋分化を抑制的に制御することにより正常な筋線維形成に寄与していると考察した（第2章）。

このことをさらに追究するため、APOBEC2 欠損が衛星細胞の自己複製能（セルフリニューアル）に及ぼす影響を調べた。APOBEC2 欠損マウスから単離した筋線維では分化期の衛星細胞（Pax7 陰性/MyoD 陽性細胞）の割合が増加しており、一方、自己複製した Pax7 陽性/MyoD 陰性細胞の割合が減少していた。この実験結果は、APOBEC2 欠損マウスの筋組織において Pax7 陽性の衛星細胞数が野生型と比べ有意に少ないことと符合した。従って、APOBEC2 欠損により衛星細胞の自己複製が抑制されていることが明らかとなり、APOBEC2 は筋分化（増殖した衛星細胞が分化し筋線維となる）と自己複製（休止化して筋幹細胞プールになる）のバランスを保つことで正常な筋形成に寄与していると結論した（第3章）。

(2) APOBEC2 欠損がマイトファジー機能に与える影響（第4章）

筋分化時に既存のミトコンドリアが分解され、ATP 合成能力のより高いミトコンドリアに置換される“mitochondrial networks remodeling”が起こる。このプロセスはマイトファジーにより制御されており、また、マイトファジーによるミトコンドリア分解が筋分化のスイッチとなることも報告されている。このことから、APOBEC2 はマイトファジーに関与しているのではないかと推測した。透過型電子顕微鏡による筋組織観察から、APOBEC2 欠損マウスには異常な構造のミトコンドリアが多数存在することを見出した。また、ミトコンドリア生合成に関わる PGC1α と PPARδ の発現が有意に減少しており、citric acid や cis-aconitic acid 等の TCA 回路代謝物にも異常が見られたことから、APOBEC2 欠損筋のミトコンドリアは機能的に異常をきたしていることがわかった。また、オートファゴソーム形成の指標である LC3 の異常な蓄積も観察され、この蓄積がミトコンドリアマーカーである Tom20 と共局在していた。さらに、マイトファジー関連遺伝子の発現が APOBEC2 欠損により有意に増加していた。以上のことから、APOBEC2 欠損によりミトコンドリアの機能不全が生じると共にマイトファジーが異常亢進すると考えられた。

以上、本研究により、APOBEC2 は筋幹細胞の分化と自己複製のバランスを保つことで正常な筋線維形成に寄与すると共に、筋細胞分化に密接に関与するマイトファジー（エネルギー代謝系のリモデリング）を調節しており、以て、正常な骨格筋形成に寄与する重要な因子であることが明らかとなった。