

## 131. 運動によるダイレクトな遺伝子発現制御の解明

佐藤 祐介

Key words : 骨格筋, APOBEC2, 脱メチル化, 筋特性

\*宇都宮大学 農学部 動物生産学講座  
栄養制御学研究室

### 緒言

近年、肥満に起因する生活習慣病や高齢者の増加に伴うサルコペニア人口の増加、更には2つを合併したサルコペニア肥満が大きな社会問題となっている。これらの疾患の予防・治療のターゲット器官である骨格筋の基礎的知見を得ることは大変重要である。また、骨格筋の研究は、健康科学のみならず、運動科学や食肉生産など多方面への応用が期待できる。近年、運動が神経伝達物質や成長因子等を介さず、骨格筋のDNA脱メチル化をダイレクトに惹起することで筋特性に関与する遺伝子発現を制御することが報告され大変注目を集めた<sup>1)</sup>。即ち、筋細胞でも何らかの分子によりDNA脱メチル化による遺伝子発現が起こっていると考えられる。DNA脱メチル化の機構については、AID/APOBECファミリーに関する複数の報告があるが、詳細は明らかではない。APOBEC2は筋特異的なAID/APOBECファミリーの1つであり、その欠損は筋疾患や筋線維型の変化を引き起こす<sup>2)</sup>。APOBEC2の分子機能は不明であるが、正常な筋形成、発生、再生に必須であることが報告されている<sup>3,5)</sup>。そこで、本研究では、APOBEC2が筋細胞のDNA脱メチル化を制御する可能性について検討することにした。

### 方法

雄性15週齢のC57Bl/6マウスの片脚の坐骨神経を切除し、APOBEC2抗体にて免疫染色を行い、その局在について正常筋と比較した。また、野生型およびAPOBEC2欠損型マウスのヒラメ筋に対し、次世代シーケンサーを用いたRRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) 法により、ゲノムワイドにDNAメチル化パターンを解析した。更に、一部の遺伝子発現についてqRT-PCR法にて発現量の定量を行った。また、APOBEC2が筋分化に及ぼす影響についても検討した。

### 結果および考察

C57Bl/6マウスの前脛骨筋の横断切片に対する免疫染色では、APOBEC2タンパク質の反応は細胞質および筋核内で見られたが、坐骨神経の切除により完全に消失した(図1)。縦断切片では、APOBEC2タンパク質はZ線上に局在することが確認されたことから(図2)、APOBEC2は運動刺激により細胞質から核内へ移行していると考えられる。現在、APOBEC2の細胞内局在の変化について確認を行っている。一方、RRBS法によりゲノムワイドにDNAメチル化解析を行ったが、野生型とAPOBEC2欠損型マウスのヒラメ筋で大きな変化は見られなかった。プロモーター領域のメチル化レベルに変化がみられた一部の遺伝子について、qRT-PCRにより発現量の定量を行ったが、有意な差はみられなかった。

\*現所属：宇都宮大学 農学部 生物資源科学科

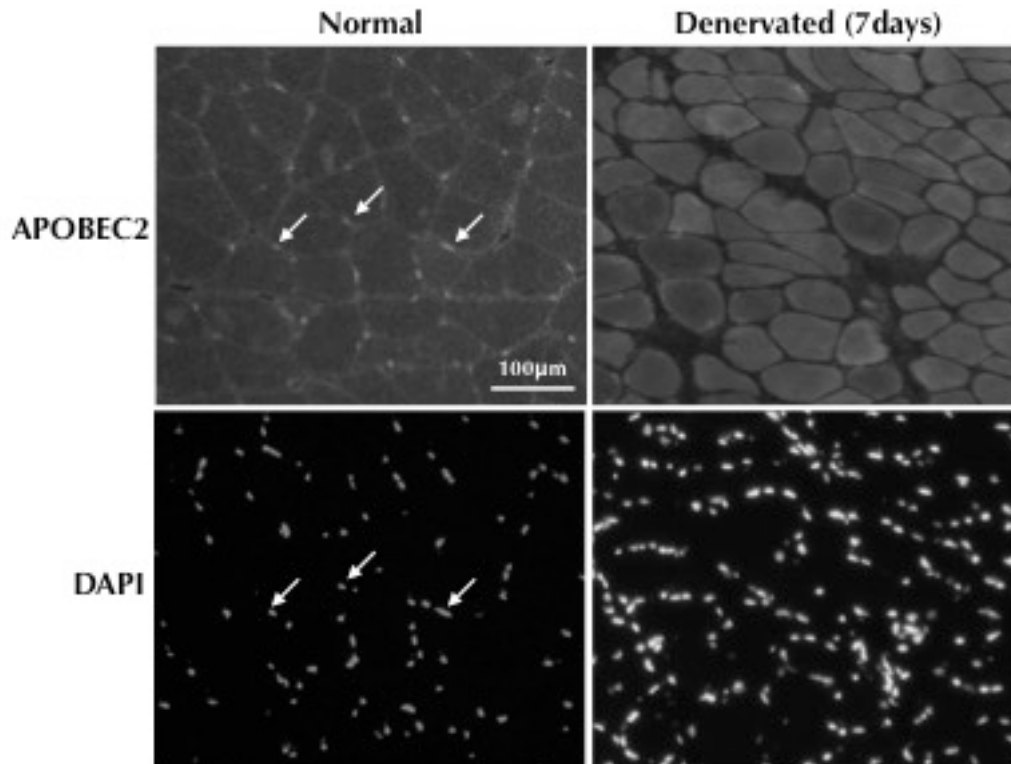


図1. APOBEC2 の骨格筋における局在の変化.

正常な前脛骨筋では、APOBEC2 の反応は細胞質および筋核内で見られたが（左）、坐骨神経の切除により完全に消失した（右）。

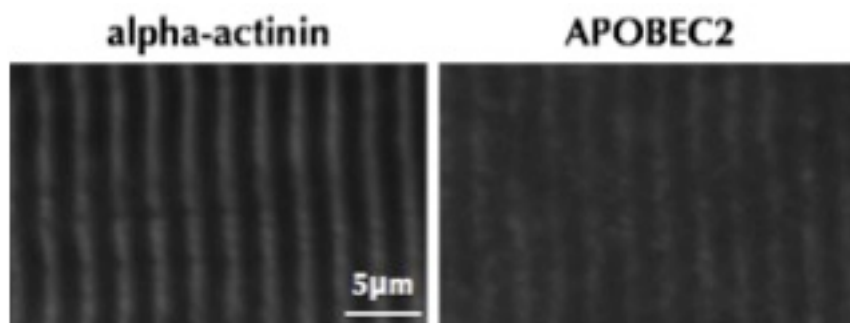


図2. APOBEC2 の骨格筋における局在（縦断切片）.

縦断切片上では、APOBEC2 はサルコメア Z 線に局在している。

*APOBEC2* 欠損が基底状態の DNA メチル化レベルに影響しなかったことから、当初予定していた運動刺激後のメチル化解析ではなく、筋分化について検討することにした。筋細胞は筋芽細胞から分化する際、DNA のメチル化レベルが大きく変化することが知られている。*APOBEC2* が DNA 脱メチル化に影響するか確認する前に、まず、筋分化へ及ぼす影響について検討することにした。野生型と *APOBEC2* 欠損型マウスの後肢から初代筋芽細胞を採取し、筋管へ分化させた結果、*APOBEC2* 欠損マウスでも正常なサルコメア構造を有する筋管を形成した。また、*APOBEC2* 欠損マウスの腓腹筋へカーディオトキシンを注入し、筋損傷からの回復過程を HE 染色にて観察したが、正常な筋再生を示した。*APOBEC2* 欠損マウスでは産仔の体重が減少しており、成獣でも体重の減少や軽度の筋萎縮が見られる<sup>2)</sup>。以上

から, *APOBEC2* は筋細胞の分化・発生時の DNA 脱メチル化には直接影響しないと考えられる。一方, *APOBEC2* の過発現が一部の遺伝子の塩基変化を起こすこと, それに伴い肝癌・肺癌が発生することが報告されており<sup>5)</sup>, *APOBEC2* が生体において塩基置換を行っている可能性も否定できない。現在, *APOBEC2* の分子機能の解明に向けて, そのターゲット分子の特定を検討している。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は, 九州大学農学研究畜産化学研究室の池内義秀教授, 辰巳隆一准教授, 水野谷航助教, 大坪秀明, 宇都宮大学農学部栄養制御学研究室の菅原邦生教授, 吉澤史昭教授である。最後に, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Barrès, R., Yan, J., Egan, B., Treebak, J. T., Rasmussen, M., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., O'Gorman, D. J. & Zierath, J. R. : Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metabol.*, **15** : 405-411, 2012.
- 2) Sato, Y., Probst, H. C., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Neuberger, M. S. & Rada, C. : Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber type, diminished body mass, and myopathy. *J. Biol. Chem.*, **285** : 7111-7118, 2010.
- 3) Etard, C., Roostalu, U. & Strähle, U. : Lack of Apobec2-related proteins causes a dystrophic muscle phenotype in zebrafish embryos. *J. Cell Biol.*, **189** : 527-539, 2010.
- 4) Vonica, A., Rosa, A., Arduini, B. L. & Brivanlou, A. H. : APOBEC2, a selective inhibitor of TGF  $\beta$  signaling, regulates left-right axis specification during early embryogenesis. *Dev. Biol.*, **350** : 13-23, 2011.
- 5) Powell, C., Elsaiedi, F. & Goldman, D. : Injury-dependent Müller glia and ganglion cell reprogramming during tissue regeneration requires Apobec2a and Apobec2b. *J. Neurosci.*, **32** : 1096-1109, 2012.
- 6) Okuyama, S., Marusawa, H., Matsumoto, T., Ueda, Y., Matsumoto, Y., Endo, Y., Takai, A. & Chiba, T. : Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int. J. Cancer.*, **130** : 1294-1301, 2012.