

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21238

研究課題名(和文) SIRT7によるユビキチンシステム制御機構の解明およびSIRT7活性測定系の構築

研究課題名(英文) The molecular mechanism of CUL4B E3 ubiquitin ligase complex by SIRT7

研究代表者

KARIM MD・FAZLUL (Karim, Md. Fazlul)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：10746316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SIRT7はNAD依存性の脱アセチル化酵素である。SIRT7はDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体に結合し、TR4の分解を阻害することで肝臓内脂質蓄積量を制御するが、そのメカニズムは不明である(Cell Metabolism 2014)。本研究の結果、SIRT7はユビキチン複合体のDDB1に結合し、DDB1を脱アセチル化することが判明した。SIRT7はDDB1の脱アセチル化を介してユビキチン複合体の活性を制御していると考えられた。今後はSIRT7により脱アセチル化されるリシン残基を同定し、アセチル化状態の変化が複合体の活性に及ぼす影響について検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：SIRT7 is an NAD dependent deacetylase. We found that SIRT7 increases the hepatic lipid accumulation by inhibiting the degradation of TR4, a nuclear receptor that plays a critical role in lipid homeostasis, via the DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ubiquitin ligase complex. In the present study, we identified that SIRT7 interacts with in vitro translated DDB1. Interaction of SIRT7 and DDB1 was also detected in cultured 293T cells by the co-immunoprecipitation assay. Furthermore, SIRT7 reduced acetylation of DDB1. These results suggest that SIRT7 regulates DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ubiquitin ligase complex via DDB1 deacetylation. Further studies are necessary to the functional consequence of DDB1 deacetylation in the DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ubiquitin ligase complex.

研究分野：生化学

キーワード：サーチュイン SIRT7 ユビキチンリガーゼ複合体 DDB1

1. 研究開始当初の背景

サーチュインファミリーは、NAD 依存性脱アセチル化酵素群の一つであり、哺乳類では7種類(SIRT1~SIRT7)が知られている。これらサーチュインの中でSIRT7については、酵素活性が不明であったことなどから、近年まで研究の進展が比較的遅れていた。しかし最近、SIRT7がヒストンH3 (Baber MF. Nature 2012)やポリメラーゼI結合因子のPAF53 (Chen S. Mol. Cell 2013)、ミトコンドリアの機能を調節する転写因子GABPβ1 (Ryo D. Cell Metabolism 2014)を脱アセチル化することが報告され注目を浴びているが、その他のSIRT7標的分子については不明である。

申請者らは、SIRT7の遺伝子欠損(*Sirt7*KO)マウスでは、高脂肪食で引き起こされる肝臓の脂肪蓄積、肥満や糖尿病が野生型マウスに比べて顕著に軽減することを発見した。そのメカニズムとして、脂肪酸の取り込みやトリグリセリドの蓄積に重要な役割を果たす核内受容体TR4のタンパク質ターンオーバーが肝臓のSIRT7によって制御されること、さらにSIRT7がDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体に結合し、TR4の分解を阻害することを発見した(Yoshizawa T., Karim MF. Cell Metabolism 2014) (図1)。

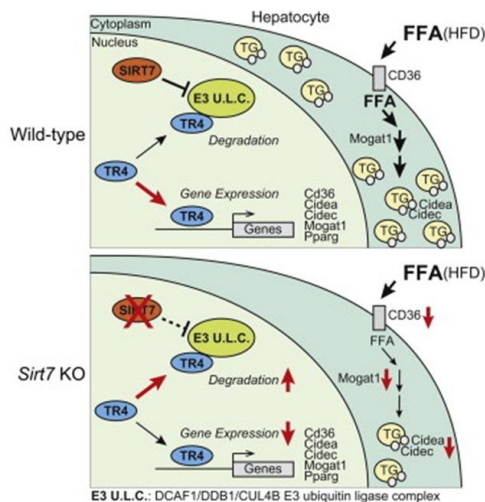


図1. SIRT7はDCAF1/DDB1/Cul4B E3ユビキチンリガーゼ複合体を抑制し、核内受容体TR4の発現量を制御する。

これら研究の結果、SIRT7が代謝異常症治療の創薬ターゲットとして大きな可能性を持つことが考えられるが、SIRT7によるDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体の制御機構については不明である。

2. 研究の目的

申請者らはSIRT7がDCAF1/DDB1/CUL4B

E3ユビキチンリガーゼ複合体に結合し、TR4の分解を阻害することを発見したが、現在のところ、その詳細な分子機構は不明である。したがってSIRT7が直接結合し、脱アセチル化する因子の同定や、脱アセチル化された標的因子の機能変化を解析することが必要である。

本研究では、SIRT7がDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体を制御する分子メカニズムの解明を第一の目的とする。また、SIRT7の活性を制御する化合物を検索するためのSIRT7の標的分子特異的なアセチル化ペプチドを用いたSIRT7活性測定系の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) SIRT7によるユビキチンリガーゼ複合体制御機構の解明

In vitro transcription/translationシステムを用いてDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子であるDCAF1、DDB1、Cul4Bタンパク質を合成した後、大腸菌で発現させたHalo-SIRT7によるプルダウンを行い、Halo-SIRT7に結合するタンパク質の検討を行った。

SIRT7およびで同定した分子の発現ベクターを293T細胞に遺伝子導入し、免疫沈降法により両者の結合について検討を行った。

リシン特異的なアセチル化抗体を用いたウエスタンブロット法により、SIRT7および機能喪失型SIRT7変異体がで同定した分子の脱アセチル化活性を有するか検討を行った。

(2) アセチル化ペプチドを用いたSIRT7活性測定系の開発

大腸菌(KRX)および293T細胞を用いてSIRT7(Halo-SIRT7-FLAG)を発現させた。HaloタグビーズにSIRT7を結合させた後、TEVプロテアーゼで切断を行った。TEVプロテアーゼはHisタグで除去することでリコンビナントSIRT7のみを回収した。SIRT7の標的であることが判明しているヒストンH3の18番目のリシンを含むアセチル化ペプチドを合成し、リコンビナントSIRT7による脱アセチル化活性について質量分析法により検討を行った。

4. 研究成果

(1) SIRT7によるユビキチンリガーゼ複合体制御機構の解明

In vitro translationシステムにより合成したDCAF1、DDB1、Cul4Bタンパク質とSIRT7の結合についてプルダウンアッセイにより検討した。その結果、SIRT7はDCAF1およびCul4Bに結合しないが、DDB1に結合することが判明した(図2)。

そこで293T細胞にSIRT7発現ベクターとDDB1発現ベクターを共発現させ、免疫沈降

法により細胞内におけるSIRT7とDDB1の結合について検討を行った。その結果、細胞内におけるSIRT7とDDB1の結合が確認された。



図2. SIRT7はDDB1と結合する。

SIRT7はNAD依存性の脱アセチル化酵素である。実際にDDB1が細胞内でアセチル化されているか、また、SIRT7がDDB1に結合することでDDB1を脱アセチル化するか否かについて検討を行った。アセチル化リシン特異的抗体を用いたウエスタンブロット法による検討の結果、293T細胞内においてDDB1はアセチル化されていること、SIRT7はDDB1を脱アセチル化することが明らかになった。H188Y-SIRT7はNAD結合性の欠如した機能低下型変異体である。H188Y変異体はDDB1を脱アセチル化することができなかった。これらの結果から、SIRT7の酵素活性がDDB1の脱アセチル化に必要であることが明らかになった(図3)。

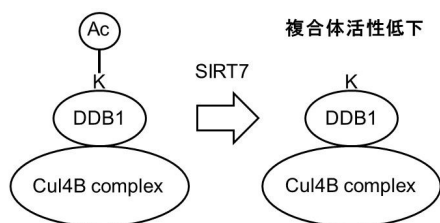


図3. SIRT7はDDB1を脱アセチル化する。DDB1の脱アセチル化がCul4B複合体の活性を低下させ、肝における脂質蓄積を制御すると考えられる。

DDB1のアセチル化・脱アセチル化はDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体の活性とどのように関係しているのでしょうか。アセチル化状態がタンパク質の安定性を制御していることが報告されている。しかしDDB1の発現量については野生型および*Sirt7*KOマウスで差を認めなかったことから、DDB1アセチル化はタンパク質安定化以外のメカニズムでDCAF1/DDB1/CUL4B E3ユビキチンリガーゼ複合体の活性を制御しているものと考えられた。今後、SIRT7により脱アセチル化されるリシン残基をアルギニン残基に変異させた変異体DDB1を作製し、*in vitro*におけるユビキチン活性を検討することで、詳細な分子メカニズムの解明を行う予定である。

(2) アセチル化ペプチドを用いたSIRT7活性測定系の開発

大腸菌(KRX)でHalo-SIRT7-FLAGタンパク質を発現させ、Haloレジンに結合後、TEV

プロテアーゼで切断を行った。残存するTEVプロテアーゼはHisタグ結合レジンで除去した後、SDS-PAGE電気泳動を行ったところ図4に示すようにCBB染色でSIRT7タンパク質がシングルバンドで認められた。

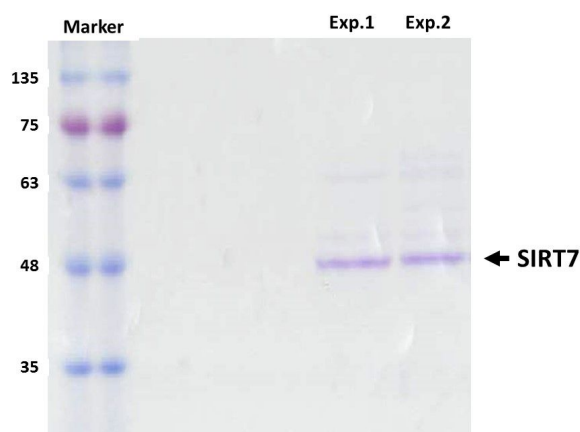


図4. 大腸菌を用いたリコンビナントSIRT7の作製

大腸菌で作製したリコンビナントSIRT7とH3K18アセチル化ペプチドを用いてNAD存在下で*in vitro* deacetylationアッセイを行ったが、SIRT7による脱アセチル化反応は確認できなかった。

次に293T細胞にHalo-SIRT7-FLAG発現ベクターを遺伝子導入し、Halo-SIRT7-FLAGの発現について検討を行ったが、精製に十分な量のタンパク質発現が得られなかった。

大腸菌で活性のあるSIRT7タンパク質が得られなかったことからSIRT7の活性には糖鎖修飾など何らかのmodificationが必要である可能性が考えられた。今後はバキュロウイルスを用いてリコンビナントSIRT7を作製し、活性の有無について検討を行う予定である。

<引用文献>

- (1) Barber, M.F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y. et al. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature* **487**, 114-118.
- (2) Chen, S., Seiler, J., Santiago-Reichert, M. et al. (2013). Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Mol Cell*. **52**, 303-313.
- (3) Yoshizawa, T., Karim, M.F., Sato, Y. et al. (2014). SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab*. **19**, 712-721.

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 1 件)

- (1) Sato Y, Tsuyama T, Sato C, Karim MF, Yoshizawa T, Inoue M, Yamagata K. (2017) Hypoxia reduces HNF4 α /MODY1 protein expression in pancreatic β -cells by activating AMP-activated protein kinase. **J Biol. Chem.** (in press), doi: 10.1074/jbc.M116.767574.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部 病態生化学分野

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/biochem2/biochem2.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

カリム モハメド・ファズルル

(KARIM MD, Fazlul)

熊本大学大学院・生命科学研究部・助教
研究者番号：10746316

(2)研究分担者 なし

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

研究者番号：

(4)研究協力者 なし