

令和元年5月27日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05328

研究課題名(和文) SIRT7による多面的代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of the multifaceted metabolic roles of SIRT7

研究代表者

山縣 和也 (Yamagata, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70324770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は高脂肪食負荷Sirt7ノックアウト(KO)マウスでは脂肪肝が軽減することを見出したが、脂肪肝が改善する分子メカニズムは不明である。TR4は肝において脂質蓄積促進作用を有する核内受容体型転写因子である。本研究の結果、SIRT7はCul4/DDB1/DCAF1-E3ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子であるDDB1を脱アセチル化することでユビキチンリガーゼ活性を抑制し、TR4発現量を増加させることが判明した。Sirt7 KOマウスではDDB1のアセチル化が亢進することでTR4発現が低下し、肝脂質蓄積が低下すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール非依存性に肝臓に脂肪蓄積をきたすNAFLD患者は我が国に1000万人程度存在していると推定されているが、その一部は脂肪肝から肝硬変、さらに肝癌と進行するため、その対策は重要な医学的課題である。我々は脱アセチル化酵素であるSIRT7のノックアウトマウスが脂肪肝を抑制することを見出しているが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究の結果、SIRT7の抑制が脂肪肝を軽減する詳細な分子機構が明らかになり、SIRT7を標的とした治療薬開発の基盤が確立された。

研究成果の概要(英文)：Sirtuin 7 (SIRT7) is an NAD⁺-dependent deacetylase. Recently, we found that Sirt7 knockout mice are resistant to high-fat diet-induced fatty liver, but the mechanism is not identified. Here, we demonstrate that SIRT7 binds directly to DDB1, a component of CUL4B/DDB1/DCAF1 E3 ubiquitin ligase complex and deacetylates DDB1. SIRT7-mediated deacetylation of K1121 of DDB1 attenuates the activity of the CUL4B/DDB1/DCAF1 E3 ubiquitin ligase complex by reducing binding between DDB1 and DCAF1, leading to the increased expression of TR4 and hepatic lipid accumulation.

研究分野：代謝学

キーワード：サーチュイン SIRT7 脂肪肝 脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サーチュインは代謝や老化の制御に関与する脱アセチル化酵素であり、哺乳類では SIRT1 から SIRT7 の 7 種類が存在する。申請者は高脂肪食負荷 Sirt7 ノックアウト (KO) マウスでは脂肪肝、肥満、糖尿病が軽減することを見出し、SIRT7 が多面的な代謝制御作用を有していることを明らかにした (Cell Metabolism 2014)。しかしながら Sirt7 KO マウスで脂肪肝や肥満・糖尿病が軽減する詳細な分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

TR4 は肝において脂質蓄積促進作用を有する核内受容体型転写因子である。SIRT7 は Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体活性を抑制することで、TR4 の分解を抑制し、その発現レベルを増加させる。Sirt7 KO マウス肝では Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体活性が上昇しているため、TR4 の発現が低下しているために脂肪肝発症に対して抵抗性を示す。しかし SIRT7 が Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体活性を抑制するメカニズムは不明である。褐色脂肪組織 (BAT) は熱産生を行うことでエネルギー代謝を亢進させる働きを有する。Sirt7 KO マウスでは BAT における熱産生遺伝子の発現が上昇しているが、その理由についても不明である。SIRT1 は脂肪細胞分化・機能のマスターレギュレーターである PPAR γ を脱アセチル化することで白色脂肪細胞を制御することが報告されているが、SIRT7 による PPAR γ の制御は不明である。本研究では肝臓や脂肪細胞における SIRT7 の代謝作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝における SIRT7 作用機構の検討

Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子と SIRT7 の結合について検討を行う。SIRT7 が結合する分子については、SIRT7 による脱アセチル化の有無を検討し、アセチル化状態がユビキチンリガーゼ複合体の活性に及ぼす影響について検討を行う。

(2) BAT における SIRT7 作用機構の検討

Adiponectin-Cre トランスジェニックマウスを用いた脂肪細胞特異的 Sirt7 KO マウスを作製し、BAT における SIRT7 の欠失が熱産生・エネルギー消費の亢進に関与するか検討を行う。

(3) 白色脂肪組織 (WAT) における SIRT7 作用機構の検討

SIRT7 と PPAR γ の結合について検討を行い、両者の結合が確認できた場合には SIRT7 による PPAR γ の脱アセチル化作用などについて検討を行う。

4. 研究成果

(1) 肝における SIRT7 作用機構の検討

Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子と SIRT7 の結合について検討を行った結果、SIRT7 は DDB1 に選択的に結合することが判明した。DDB1 は 3 つの BP ドメイン (BPA、BPB、BPC) と CTD ヘリカルドメインから構成される。SIRT7 と DDB1 の結合部位について各種の欠失変異体を作製し検討したところ、SIRT7 は DDB1 の BPC-CTD ドメインに結合することが明らかになった。アセチル化酵素である PCAF によりリシン残基のアセチル化がおきることが報告されており、1121 番目のリシン残基がその標的アミノ酸であると考えられる。同リシン残基は SIRT7 の結合部位に位置していることから、1121 番目のリシンが SIRT7 の標的である可能性が考えられた。293T 細胞に野生型 DDB1 と 1121 番目のリシンをアルギニンに置換した変異体 DDB1 (K1121R-DDB1) を発現し、DDB1 のアセチル化について検討したところ、K1121R-DDB1 のアセチル化は野生型に比して減弱しており、また野生型で認められた SIRT7 による脱アセチル化が認められなかった。以上の結果から、SIRT7 は DDB1 に結合し、1121 番目のリシン残基を脱アセチル化することが判明した。

Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体において DDB1 は DCAF1 と結合する。そこで DDB1 の 1121 番目のリシンアセチル化が DCAF1 との結合に及ぼす影響について検討を行った。293T 細胞に野生型もしくは K1121R 変異体 DDB1 と DCAF1 を発現させ、両者の結合について免疫沈降法で検討を行った。その結果、K1121R-DDB1 と DCAF1 の結合は野生型に比して減弱していることが判明した。また Hepa1-6 細胞に野生型および K1121R-DDB1 を発現させたところ、K1121R-DDB1 の発現により TR4 の発現が増加しており、その下流の標的遺伝子である Cd36 や Cidea、Cidec の発現上昇が認められた。以上の結果から、SIRT7 は DDB1 の 1121 番目のリシンの脱アセチル化により Cul4/DDB1/DCAF1-E3 ユビキチンリガーゼ複合体の活性を抑制することが明らかになった。

(2) BAT における SIRT7 作用機構の検討

Adiponectin-Cre トランスジェニックマウスと SIRT7 flox マウスを交配させることで脂肪細胞特異的 Sirt7 KO マウスを作製することに成功した。同マウスにおいても全身性 Sirt7 KO マウス同様に体温の上昇、酸素消費の亢進が認められ、BAT における SIRT7 が熱産生やエネルギー消費を制御していることが明らかになった。

(3) 白色脂肪組織 (WAT) における SIRT7 作用機構の検討

293T 細胞に SIRT7 と PPAR γ を共発現させ、免疫沈降法により両者の結合について検討したところ、SIRT7 は PPAR γ に結合することが判明した。ルシフェラーゼアッセイにより Sirt7 欠損細胞における PPAR γ 活性について検討したところ、PPAR γ 活性の減弱が認められた。以上の結果から SIRT7 は PPAR γ を脱アセチル化することでその転写活性を増強する作用を有すると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Jono H, Su Y, Obayashi K, Tanaka Y, Ishiguro A, Nishimura H, Shinriki S, Ueda M, Ikeda K, Yamagata K, Ichihara K, Ando Y; Scientific Committee for the Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry: Sources of variation of transthyretin in healthy subjects in East and Southeast Asia: Clinical and experimental evidence for the effect of alcohol on transthyretin metabolism. Clin Chim Acta. 458: 5-11, 2016
2. Nomiyama H, Osada N, Takahashi I, Terao K, Yamagata K, Yoshie O: Translational repression of a splice variant of cynomolgus macaque CKCL1L by its C-terminal sequence. Journal of Interferon and Cytokine Research 37: 129-138, 2017
3. Sato Y, Tsuyama T, Sato C, Karim MF, Yoshizawa T, Inoue M, Yamagata K: Hypoxia reduces HNF4 α /MODY1 protein expression in pancreatic β -cells by activating AMP-activated protein kinase. J Biol. Chem. 292: 8716-8728, 2017
4. Karim MF, Yoshizawa T, Sobuz SU, Sato Y, Yamagata K: SIRT7-dependent deacetylation of DDB1 regulates the expression of nuclear receptor TR4. Biochem Biophys Res Commun. 490: 423-428, 2017
5. Yamagata K, Yoshizawa T: Transcriptional regulation of metabolism by SIRT1 and SIRT7. Int. Rev. Cel. Mol. Bio. 335: 143-166, 2018
6. Tanoue H, Morinaga J, Yoshizawa T, Yugami M, Itoh H, Nakamura T, Uehara Y, Masuda T, Odagiri H, Sugizaki T, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Terada K, Ochi H, Takeda S, Yamagata K, Fukuda T, Mizuta H, Oike Y: Angiopoietin-like protein 2 promotes chondrogenic differentiation during bone growth as a cartilage matrix factor. Osteoarthritis Cartilage 26: 108-117, 2018
7. Islam MS, Wei FY, Ohta K, Shigematsu N, Fukuda T, Tomizawa K, Yoshizawa T, Yamagata K: Sirtuin 7 is involved in the consolidation of fear memory in mice. Biochem Biophys Res Commun. 495: 261-266, 2018
8. Zhao J, Tian Z, Kadomatsu T, Xie P, Miyata K, Sugizaki T, Endo M, Zhu S, Fan H, Horiguchi H, Morinaga J, Terada K, Yoshizawa T, Yamagata K, Oike Y: Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice. J Biol Chem 293: 1596-1609, 2018
9. Korogi W, Yoshizawa T, Karim MF, Tanoue H, Yugami M, Sobuz SU, Hinoi E, Sato Y, Oike Y, Mizuta H, Yamagata K: SIRT7 is an important regulator of cartilage homeostasis and osteoarthritis

development. *Biochem Biophys Res Commun.* 496: 891-897, 2018

10. Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Morita Y, Ishi N, Fukuda K, Murakami S, Nishida S, Kawasaki S, Motoshima H, Furukawa N, Komohara Y, Fujiwara Y, Yamagata K, Takeya M, Araki E: Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation and suppresses atherosclerosis and insulin resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 : 994-1006, 2018.

11. Miyasato Y, Yoshizawa T, Sato Y, Nakagawa T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Kuwabara T, Adachi M, Lanni A, Braun T, Komohara Y, Mukoyama M, Yamagata K: Sirtuin 7 deficiency ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury through regulation of the inflammatory responses. *Sci Rep* 8: 5927, 2018

12. Fukuda M, Yoshizawa T, Karim MF, Sobuz SU, Korogi W, Kobayashi D, Okanishi H, Tasaki M, Sawa T, Sato Y, Chirifu M, Masuda T, Nakayama T, Tanoue H, Nakashima K, Kobashigawa Y, Morioka H, Bober E, Ohtsuki S, Yamagata Y, Ando Y, Oike Y, Araki N, Takeda S, Mizuta H, Yamagata K: SIRT7 has a critical role in bone formation by regulating lysine acylation of SP7/Osterix. *Nat. Commun.* 9: 2833, 2018

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 第 90 回日本内分泌学会学術総会 赤水尚史 (京都) 2017.4.20-22
脱アシル化酵素 SIRT7 による Osterix の転写活性化は骨形成に重要である
吉澤達也、福田雅俊、竹田秀、山縣和也

2. 第 90 回日本内分泌学会学術総会 赤水尚史 (京都) 2017.4.20-22
SIRT7 によるエネルギー代謝制御
山縣和也、吉澤達也

3. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会 田中良哉(福岡)2017.7.27-29
核内脱アシル化酵素 SIRT7 は軟骨細胞分化を制御し、変形性膝関節症の発症に関与する
興梠 航、吉澤達也、山縣和也

4. 日本生化学会九州支部例会 森下和広 (宮崎) 2017.5.13-14
膵 細胞低酸素による HNF4 α 蛋白低下メカニズムの解明
佐藤叔史、津山友徳、佐藤ちなみ、Md. Fazlul Karim、吉澤達也、井上正宏、山縣和也

5. 第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 楽木宏美 (大阪) 2017.12.8-12.10
急性尿細管障害における SIRT7 の機能解明
宮里腎和、吉澤達也、中川輝政、柿添 豊、栗原孝成、安達政隆、向山政志、山縣和也

6. 脳心血管抗加齢研究会 2017 佐田政隆 (大阪) 2017.12.16-12.17
シンポジウム 6 「サーチュインとアンチエイジング」
SIRT7 とアンチエイジング
山縣和也、吉澤達也

7. 第 91 回日本生化学会大会 菊池章(京都) 2018.9.24-26

シンポジウム：低酸素生物学：ミトコンドリア呼吸、代謝、遺伝子発現、細胞分化・組織再生から臨床応用へ（オーガナイザー：南嶋洋司、山縣和也）
低酸素応答因子 HIF-1/AMPK による膵 細胞障害の分子機構
佐藤叔史、山縣和也

8. 第 41 回日本分子生物学会 石野史敏（横浜）2018.11.28-30

Bhlhe40-Mafa 経路を介した低酸素ストレスによるインスリン分泌抑制
津山友徳、佐藤叔史、吉澤達也、松岡孝昭、山縣和也

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉澤達也

ローマ字氏名：Yoshizawa Tatsuya

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 40313530

研究分担者氏名：佐藤叔史

ローマ字氏名：Sato Yoshifumi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：助教

研究者番号(8桁): 90622598

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 澤 智裕

ローマ字氏名: Sawa Tomohiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。