

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04107

研究課題名（和文）中鎖脂肪酸修飾タンパク質による新たな運動器恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanism in musculoskeletal homeostasis by middle-chain fatty acylated proteins.

研究代表者

吉澤 達也 (Yoshizawa, Tatsuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・准教授

研究者番号：40313530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：各代謝臓器の機能調節における中鎖脂肪酸修飾タンパク質の重要性を分子レベルで明らかにする事を目的とし、脱中鎖脂肪酸アシル化活性が判明したSIRT7（サーチュインの一つ）を足がかりに解析した。その結果、SIRT7が、白色脂肪組織の脂肪酸合成、褐色脂肪組織の熱産生とエネルギー代謝、寿命、骨格筋の再生、を制御していることを発見した。また、世界初のリジンデカノイル化修飾を受けるタンパク質群を発見した。現在、脱アセチル化と脱中鎖脂肪酸アシル化を分けるSIRT7点変異体マウスを解析しており、これにより個体レベルでの中鎖脂肪酸修飾タンパク質の重要性が明らかにされると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リジン残基が中鎖脂肪酸アシル化されるタンパク質自体は僅かしか報告されておらず、世界初の中鎖脂肪酸修飾タンパク質の発見などは多くの生命現象に関わる研究であり、非常に大きな意義と新規性・独自性の高い研究といえる。我々の研究成果は、運動器疾患や内分泌代謝異常症において、リジン中鎖脂肪酸アシル化修飾の調節が新規の薬剤開発の標的になる可能性を世界に先駆けて示すことができる。

研究成果の概要（英文）：We aim to elucidate the importance of middle-chain fatty acylated proteins in the regulatory mechanism of metabolic homeostasis. As a results, we revealed that SIRT7, which is the member of sirtuins (SIRT1-7 in mammals) regulating a wide variety of biological process, can catalyze lysine-middle-chain fatty acylation strongly, and found novel lysine-decanoylated proteins. Furthermore, we discovered that SIRT7 can regulate lipogenesis in white adipose tissue, thermogenesis and energy metabolism in brown adipose tissue, aging, and skeletal muscle regeneration.

研究分野：代謝

キーワード：運動器 骨 骨格筋 アシル化 サーチュイン

1. 研究開始当初の背景

脂質によるタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質の局在・安定化・活性などを制御し、シグナル伝達経路に深く関わっている。したがって、脂質修飾の変容と疾患との関連を理解することは重要である。サーチュイン（哺乳類では7種類：SIRT1-7）はNAD⁺依存性脱アセチル化酵素として働き、様々な代謝・炎症・老化・がんなど広範な生命現象の調節因子として重要な役割を担っている。近年では、アセチル基のみならずスクシニル基、さらには中鎖脂肪酸由来のアシル基など様々なアシル基を取り除く酵素活性が新発見されており、サーチュインはリジン残基の脱アシル化酵素という新たな概念の酵素群として認識されるようになってきた。

しかし、アセチル化以外のタンパク質リジンアシル化修飾の研究はまだ歴史が浅く、異なったアシル化修飾の役割やそれぞれのアシル化修飾の調節機構など、解決しなくてはならない課題が山積みである。特に、中鎖脂肪酸由来のアシル化修飾に関しては、脂肪酸アシル化されるタンパク質自体の報告が極めて少なく、環境（加齢や生活習慣）の変化による脂肪酸アシル化修飾調節の破綻と疾患の関連についてはほとんど明らかにされていない。

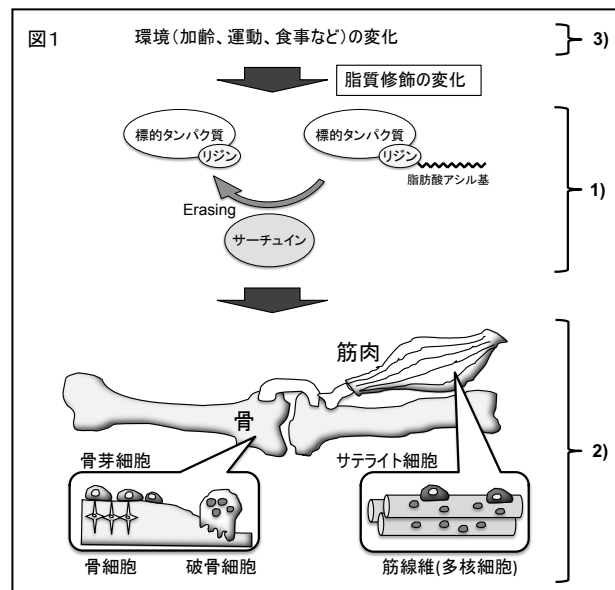
リジンアシル化修飾は、アシル基転移酵素による“Writing”とサーチュインによる“Erasing”によって厳密に制御されている。現在のところリジン残基に中鎖脂肪酸アシル基を転移する酵素は発見されていないため、我々は主にサーチュインを足がかりに研究を展開しており、核内に存在するSIRT7が、糖・脂質・エネルギー代謝、心筋の創傷治癒、認知機能、骨代謝、炎症の制御に重要な役割を果たしていることを解明してきた。さらに、現在SIRT7の酵素活性は弱い脱アセチル・スクシニル化しか報告されていないが、ついに我々は、SIRT7が中鎖脂肪酸由来のアシル基を取り除く活性が非常に強いことを発見した（未発表）。

2. 研究の目的

我々は様々な組織・疾患を対象とした研究を行っているが、研究開始当初の考えでは運動器について焦点を絞ることとした。

骨や筋肉は、体を支持する役割に加え、ホルモンを分泌してリン代謝・糖/脂質代謝・生殖能・認知機能などを調節する内分泌器官であることが近年明らかとなってきた。したがって、運動器の疾患は寝たきりのリスクのみならず全身の恒常性維持に影響を及ぼすため、骨や筋肉の量と質を保つことは、老化・生活習慣病関連疾患の予防や治療を考える上で重要である。

本研究では、SIRT7を足がかりに、運動器における中鎖脂肪酸アシル化修飾タンパク質の重要性を分子レベルで明らかにする事を目的とし、次の課題について解析する（図1）。



課題1) 中鎖脂肪酸アシル化修飾タンパク質の同定とその役割の解明:

我々が発見したSIRT7新規酵素活性の標的であるデカノイル基に着目し、リジンデカノイル化修飾タンパク質の網羅的取得を目指す。また、中鎖脂肪酸由来アシル化修飾タンパク質の重要性についても研究を進める。

課題2) 運動器におけるSIRT7の役割とその分子機構の解明:

各種組織特異的*Sirt7* KOマウスを用いて、SIRT7の運動器における役割とその分子機構を解明する。

課題3) 脂肪酸アシル化修飾の環境による変化について:

加齢、運動、食事がどのように脂肪酸アシル化修飾に影響を及ぼすのかを解析する。

研究途中からは、課題2)において運動器以外の組織・疾患にも対象を広げ、脂肪組織や寿命におけるSIRT7の役割も解析した。

3. 研究の方法

① 中鎖脂肪酸アシル化修飾タンパク質の同定：デカノイル化リジン残基特異的抗体を用いた免疫沈降法と質量分析により、リジンデカノイル化修飾を受ける新規タンパク質の取得を行う。さらに、これら個々のタンパク質を用いてアシル化修飾の解析を行う。

② 中鎖脂肪酸アシル化修飾タンパク質の役割の解明：SIRT7の脱アセチル化活性と脱デカノイル化活性を分離できる点変異体を作成する。そして、*Sirt7* KO培養細胞にこの変異体を導入し、デカノイル化修飾の重要性を細胞レベルで証明する。さらに、個体レベルでの証明のため、CRISPR-Cas9システムを用いて、この変異を持つマウス個体の作成を行う。

③ SIRT7による骨の恒常性維持機構の解析：最近我々は、*Sirt7* KOマウス由来の骨髄間葉系幹細胞では骨芽細胞への分化が阻害されると同時に、脂肪細胞への分化が促進されることを発見した(未発表)。そこで以下の方法により、間葉系幹細胞におけるSIRT7の役割とその分子機構を解析する。

A. 形態学的解析：Prx1-Creマウスを用いた間葉系幹細胞特異的*Sirt7* KOマウスを作成し、 μ CT解析と骨形態計測を行う。また、免疫組織学的解析により骨髄脂肪化の評価をする。

B. 培養細胞を用いた解析：間葉系幹細胞可視化(CXCL12-GFP)マウスを利用し、WTと*Sirt7* KOマウス由来の骨髄間葉系幹細胞をFACSにて採取し、幹細胞の自己複製能や分化能について解析する。

C. 分子機構の解析：*Sirt7* KO間葉系幹細胞における遺伝子発現変化をRNA-seqにより網羅的に解析する。また我々は、間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を抑制する転写因子FoxC1がSIRT7と結合することを見出しており(未発表)、今後は、1)細胞内におけるアセチル化状態の解析、2)SIRT7による脱アセチル化部位の同定、3)脱アセチル化状態を模倣するKR(リジンからアルギニン)点変異体を用いた機能解析、を行う。

④ SIRT7による骨格筋の恒常性維持機構の解析：最近我々は、*Sirt7* KOマウスでは骨格筋損傷後の筋再生が低下していることを見出した(未発表)。そこで以下の方法により、サテライト細胞におけるSIRT7の役割とその分子機構を解析する。

A. 形態学的解析：Pax7-CreERマウスを用いたサテライト細胞特異的*Sirt7* KOマウスの骨格筋を損傷後、炎症期・修復期・リモデリング期を追って骨格筋をサンプリングし、筋再生程度や繊維化・脂肪化の評価、免疫細胞の動態を組織学的に解析する。

B. 培養細胞を用いた解析：WTと*Sirt7* KOマウス由来の初代培養サテライト細胞や単一筋繊維上培養サテライト細胞を用いて、細胞の増殖・分化能について解析する。

C. 分子機構の解析：*Sirt7* KOサテライト細胞における遺伝子発現変化をRNA-seqにより解析する。また、SIRT7アフィニティーカラムとプロテオミクスにより、サテライト細胞内のSIRT7標的タンパク質を網羅的に取得する。候補因子の機能解析は③-Cに順ずる。

⑤ SIRT7による白色脂肪組織の恒常性維持機構の解析：我々は、*Sirt7* KOマウスでは高脂肪食負荷による肥満が軽減することを報告している。そこで以下の方法により、白色脂肪細胞におけるSIRT7の役割とその分子機構をPPAR γ に着目して解析する。

1) SIRT7とPPAR γ の結合、2) SIRT7によるPPAR γ の脱アセチル化部位の同定、3) 脱アセチル化状態を模倣するKR(リジンからアルギニン)およびアセチル化状態を模倣するKQ(リジンからグルタミン酸)点変異体を用いた機能解析。

⑥ SIRT7による褐色脂肪組織(BAT)の恒常性維持機構の解析：我々は、高脂肪食負荷時の*Sirt7* KOマウスでは熱産生が増加することを報告している。そこで以下の方法により、褐色脂肪細胞におけるSIRT7の役割とその分子機構を解析する。

A. エネルギー代謝の解析：Ucp1-Creマウスを用いたBAT特異的*Sirt7* KOマウスのエネルギー消費量を代謝ケージで測定する。

B. 培養細胞を用いた解析：フラックスアナライザーを用いて、WTと*Sirt7* KOマウス由来初代培養褐色脂肪細胞のエネルギー代謝について解析する。

C. 分子機構の解析：BAT特異的*Sirt7* KOマウスのBATにおける遺伝子とたんぱく質の発現変化

を解析する。また、SIRT7アフィニティーカラムとプロテオミクスにより、BATにおけるSIRT7標的タンパク質を網羅的に取得する。候補因子の機能解析は③-Cに順ずる。

⑦ 寿命におけるSIRT7の役割の解析：*Sirt7* KOマウスを用いて寿命解析を行う。また、各種代謝実験や各臓器における遺伝子発現の解析を行う。

⑧ 脂肪酸アシル化修飾の環境による変化について：加齢や栄養素がどのように脂肪酸アシル化修飾に影響を及ぼすのかを解析する。

4. 研究成果

① これまでに報告がなかったリジンデカノイル化修飾を受ける新規タンパク質の取得を行った。さらに、これら個々のタンパク質を用いてアシル化修飾の解析を行った。

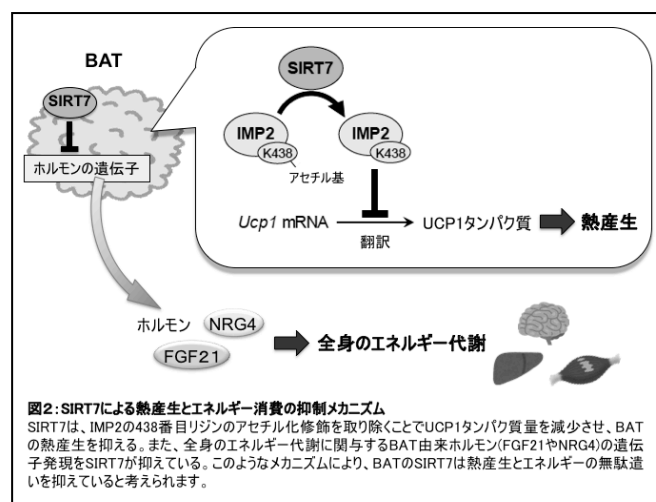
② SIRT7の脱アセチル化活性と脱中鎖脂肪酸アシル化活性を分離できる点変異体を開発し、CRISPR-Cas9システムを用いてこの変異を持つマウス個体の作成を行い、代謝実験や骨の形態計測を行った。この*Sirt7*点変異マウスも体温が高く、エネルギー消費が上昇していた。一方、高脂肪食負荷実験では、この*Sirt7*点変異マウスと野生型マウスの間で肥満の度合いは変わらず、*Sirt7* KOマウスの結果と差異が生じた。現在は骨組織の解析を行っている。

③ 間葉系幹細胞可視化マウスを利用し、若齢野生型マウス、若齢*Sirt7* KOマウス、老齢野生型マウス由来の骨髄間葉系幹細胞をFACSにて採取し、RNA-Seqにより網羅的遺伝子発現解析を行っている。また、間葉系幹細胞特異的*Sirt7* KOマウスを大量に繁殖させ、現在は骨組織の解析を行っている。SIRT7によるFoxC1の脱アシル化を解析したが、アセチル化、プロピオニル化、スクシニル化ではないアシル化調節の可能性が示唆された。

④ サテライト細胞特異的*Sirt7* KOマウスでは、骨格筋損傷後の筋再生が損なわれていることを見出した。その機構として、修復時に集積するマクロファージによるIL-1 β シグナル経路を介したサテライト細胞の増殖促進効果が、*Sirt7* KOでは低下していることを明らかにした。さらにそのメカニズムとして、SIRT7がIKK β を脱アセチル化することで、FoxO3aの核外輸送を促進し、p27遺伝子発現を抑えることを発見した。

⑤ SIRT7が、転写因子PPAR γ の382番目リジンのアセチル化修飾を取り除くことで、転写活性化能を増加させることを発見した。さらに、382番目リジンのアセチル化修飾は、PPAR γ の全機能ではなく、脂肪酸合成など一部の遺伝子セットにのみ影響を与えることが明らかになった。この研究成果は、J. Diabetes Investig. 2021に掲載され、メタボリックシンドロームの新規治療薬開発につながると期待される。

⑥ *Sirt7* KOマウス、脂肪組織特異的*Sirt7* KOマウス、BAT特異的*Sirt7* KOマウスでは、対照群に比べて体温とエネルギー消費量が高いことを見出した。BAT特異的*Sirt7* KOマウスと対照マウスのBATを用いてUCP1の発現を解析したところ、両者でmRNAの発現に差はないものの、タンパク質の量がBAT特異的*Sirt7* KOマウスで増加していた。さらに、初代培養褐色脂肪細胞においても、UCP1タンパク質の量が*Sirt7* KO細胞で増加していた。褐色脂肪細胞内でSIRT7に結合する因子を網羅的にスク



リーニングしたところ、*Ucp1* mRNAの翻訳を抑えるRNA結合因子IMP2が見つかった。野生型褐色脂肪細胞でIMP2を欠損させると、基礎呼吸・最大呼吸・脱共役呼吸において有意に酸素消費量が上昇したが、酸素消費量が高い*Sirt7* KO褐色脂肪細胞ではIMP2欠損によってさらに上昇することはなかった。つまり、SIRT7は褐色脂肪細胞のエネルギー消費を（少なくとも一部は）IMP2を介して抑えていることが分かった。さらに、*Ucp1* mRNAの翻訳抑制に対するIMP2の活性化のためには、SIRT7がIMP2タンパク質の438番目のリジン残基におけるアセチル化修飾を取り除くことが重要であることが明らかとなった。

以上の結果から、SIRT7は、IMP2のアセチル化修飾を取り除くことでUCP1タンパク質量を減少させ、BATの熱産生を抑えるという新たなメカニズムを解明することができた。また、SIRT7が全身のエネルギー代謝に関与するBATのホルモン産生を抑えていることも見出ししており、BATのSIRT7は熱産生とエネルギーの無駄遣いを抑えている重要な酵素であると考えられた(図2)。この研究成果は、Nat. Commun. 2022に掲載された。

⑦ オスの*Sirt7* KOマウスは寿命が伸びることが明らかとなった。この老齢オス*Sirt7* KOマウスは、インスリン感受性が高く、耐糖能も良く、血中FGF21濃度も高いことが明らかとなった。この研究成果は、Cells 2022に掲載された。

⑧ 中鎖脂肪酸アシル化修飾タンパク質は老化により増加すること、絶食により細胞内の局在が変わることが明らかとなった。また、培養細胞に中鎖脂肪酸を添加すると、中鎖脂肪酸アシル化修飾タンパク質が増加するどころか、反対に激減することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akter Fatema, Tsuyama Tomonori, Yoshizawa Tatsuya, Sobuz Shihab U., Yamagata Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 SIRT7 regulates lipogenesis in adipocytes through deacetylation of PPAR 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1765 ~ 1774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizumoto Tomoya, Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Ito Takaaki, Tsuyama Tomonori, Satoh Akiko, Araki Satoshi, Tsujita Kenichi, Tamura Masaru, Oike Yuichi, Yamagata Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 SIRT7 Deficiency Protects against Aging-Associated Glucose Intolerance and Extends Lifespan in Male Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3609 ~ 3609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11223609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Sobuz Shihab U., Mizumoto Tomoya, Tsuyama Tomonori, Karim Md. Fazlul, Miyata Keishi, Tasaki Masayoshi, Yamazaki Masaya, Kariba Yuichi, Araki Norie, Araki Eiichi, Kajimura Shingo, Oike Yuichi, Braun Thomas, Bober Eva, Auwerx Johan, Yamagata Kazuya	4. 巻 13
2. 論文標題 SIRT7 suppresses energy expenditure and thermogenesis by regulating brown adipose tissue functions in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35219-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tatsuya Yoshizawa
2. 発表標題 The diverse functions of NAD-dependent lysine deacylase SIRT7.
3. 学会等名 KSBMB (Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology) International Conference 2021 (Symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小野 悠介 (Ono Yusuke) (60601119)	熊本大学・発生医学研究所・教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	マックスプランク研究所			
スイス	スイス連邦工科大学ローザンヌ校			
米国	Harvard Medical School	Howard Hughes Medical Institute		