

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590074

研究課題名(和文) 脱アセチル化酵素 SIRT7 による癌細胞の低酸素・低グルコース適応応答反応の制御

研究課題名(英文) Regulation of adaptive responses to hypoxia and glucose deprivation by NAD-dependent deacetylase SIRT7

研究代表者

中川 宏治 (NAKAGAWA, KOJI)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80360949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NAD依存性脱アセチル化酵素であり癌化の促進因子であるSIRT7が、がん細胞の低酸素・低グルコース適応応答に関連した遺伝子発現調節において、どのような役割を果たしているかを明らかにするために解析を行った。その結果、SIRT7は、低酸素応答性転写因子HIF-1と相互作用し、HIF-1依存的な遺伝子発現を促進することを見出した。さらに、SIRT7は、HIF-1の正の制御因子でありがん遺伝子産物であるユビキチンリガーゼMDM2とも直接的に結合し、MDM2タンパク質の安定性を増大させることを発見した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the physical and functional interactions between SIRT7 (sirtuin-7) deacetylase and HIF-1(hypoxia inducible factor-1). It was found that SIRT7 physically associates with HIF-1 and enhances the expression of HIF-1-target genes. Moreover, we also found that SIRT7 directly associates with E3-ubiquitin ligase MDM2 (murine double minute 2), which is known to enhance the transcriptional activity of HIF-1, and increases the protein stability of MDM2.

研究分野：分子生物学・生物系薬学

キーワード：低酸素応答 低グルコース応答 SIRT7 脱アセチル化酵素 HIF-1 MDM2

1. 研究開始当初の背景

固形癌の内部では血管からの隔離により血液の供給不足が起こり、癌細胞は低酸素状態に陥る。低酸素環境下の癌細胞では、転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)が活性化され、様々な標的遺伝子の発現を介して、血管新生・アポトーシス耐性・運動浸潤性の上昇など低酸素への適応応答反応を示す (Majmundar AJ. et al.: *Mol Cell*, 2010)。この適応応答反応が転移や抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性を付与し、癌細胞を悪性化させる原因となっており (Bertout, JA.: *Nature Rev Cancer*, 2008)、その機序の解明と解除する方法の開発は、癌治療の成績を向上させる上で重要である。

しかしながら、in vivo における実際の腫瘍環境においては、血流供給不足により、癌細胞は低酸素状態であるだけでなく、同時に低グルコース状態にも曝されている (Gatenby RA, Gillies RJ: *Nature Rev Cancer*, 2004)。我々は、これまで、膵臓癌細胞を低酸素+低グルコース状態に暴露すると、血管新生因子 VEGF などの HIF-1 の標的遺伝子の一部の発現が、低酸素状態のみに暴露した場合と比較して、著しく上昇することを発見した (Natsuizaka et al: *Exp Cell Res*, 2007)。この結果から、低グルコース状態は癌細胞の低酸素適応応答反応を増強させることが考えられたが、その分子機構については不明であった。その後、我々は、DNA マイクロアレイ解析により膵臓癌細胞において低酸素+低グルコース環境下で発現上昇する遺伝子として、SIRT7 を同定した。SIRT7 は、Sirtuin ファミリーに属する NAD⁺依存性脱アセチル化酵素であり、核小体に局在し、低グルコース下における NAD⁺/NADH 比の上昇により活性化される。研究開始当初の時点において、SIRT7 ノックアウトマウスでは、心筋症や炎症性心肥大が起こり野生型マウスと比較して短命となること (Vakhrusheva et al.:

Circ Res, 2008) のほか、種々の癌細胞で SIRT7 遺伝子の発現が亢進していることや、SIRT7 はヒストン H3K18 の脱アセチル化を介して癌細胞の増殖を促進すること (Barber et al.: *Nature*, 2012) が報告されており、癌の進展に対して促進的な役割を担っていることが考えられた。これらの知見と、我々が独自に見出した低酸素+低グルコース環境下で SIRT7 遺伝子の発現が上昇するという発見から、癌の悪性化をもたらす低酸素・低グルコース適応応答の制御に SIRT7 が関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、低酸素・低グルコース適応応答における SIRT7 を介した遺伝子発現制御のメカニズムを分子生物学的に解析することにより、SIRT7 の癌細胞悪性化における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SIRT7 と HIF-1 の相互作用の解析

SIRT7 と低酸素応答の中心的な制御因子である転写因子 HIF-1 との物理的および機能的相互作用について以下解析を行った。

293 細胞に、FLAG-tag を付加した HIF-1 α と S-tag を付加した SIRT7 を transfection し、免疫沈降および western blot 解析により HIF-1 α と SIRT7 の物理的相互作用を解析した。

293 細胞に、HIF-1 α に応答する hypoxia response element (HRE) を有するレポーター遺伝子 pHRE-SV-Luc を、HIF-1 および SIRT7 の発現ベクターと共に transfection し、HIF-1 α 依存的な転写活性に対する SIRT7 の効果をルシフェラーゼアッセイにより解析した。

293 細胞に、SIRT7 に対する siRNA を導入し、低酸素下 (1%O₂, 16 時間) で培養した後、RNA を抽出した。HIF-1 標的遺伝子の発現を qRT-PCR 法により解析した。

(2) SIRT7 と MDM2 の相互作用の解析

癌遺伝子産物である MDM2 (murine double minute 2) は、RING finger 型ユビキチンリガーゼであり、癌抑制遺伝子産物 p53 の分解を促進することが広く知られているが、p53 非依存的な機能として、HIF-1 α と結合し、HIF-1 を介した遺伝子発現を正に制御していることが報告されている (Nieminen et al.: *J Cell Physiol*, 2005 および LaRusch et al.: *Cancer Res*, 2007)。SIRT7 による HIF-1 依存的な遺伝子発現の促進に MDM2 が介在している可能性が考えられたため、SIRT7 と MDM2 の物理的および機能的相互作用について以下解析を行った。

293 細胞に、FLAG-tag を付加した MDM2 と S-tag を付加した SIRT ファミリータンパク質 (SIRT1,2,6,7) を transfection し、免疫沈降および western blot 解析により MDM2 と SIRT7 の物理的相互作用を解析した。

大腸菌を用いて GST-MDM2 および SIRT7 の組換えタンパク質を発現させ、精製した後、両者の直接的相互作用を GST pull down アッセイにより解析した。

293 細胞に、FLAG-MDM2 と GFP-SIRT7 を transfection し、免疫蛍光染色法により両者の細胞内局在を解析した。

293 細胞、A549 細胞および H1299 細胞に、SIRT7 の siRNA を導入し、SIRT7 を knockdown した場合の MDM2 タンパク質の発現への影響を Western blot 解析により検討した。

293 細胞に、FLAG-MDM2 をと S-SIRT7 を transfection し、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを用いたチェイスアッセイを行い、MDM2 の安定性に対する SIRT7 共発現の効果を Western blot 解析により検討した。

(3) SIRT7 新規結合タンパク質の探索

SIRT7 による遺伝子発現制御機構をさらに

解析する目的で、yeast two-hybrid 法により、SIRT7 新規結合タンパク質の探索を行った。さらに単離した遺伝子のうち、CHMP5 について、動物細胞内における SIRT7 との結合性の検討を行った。

4. 研究成果

(1) SIRT7 と HIF-1 の相互作用の解析

293 細胞における免疫沈降および western blot 解析の結果から、HIF-1 α と SIRT7 に共沈降が観察され、両者は細胞内において複合体を形成しうることが判明した。

293 細胞におけるルシフェラーゼアッセイの結果から、SIRT7 の共発現は、HIF-1 α 依存的な転写活性を用量依存的に増強させた。

293 細胞における qRT-PCR 解析の結果から、SIRT7 mRNA の knockdown は、低酸素下において、Adrenomedullin など一部の HIF-1 標的遺伝子の発現を低下させた。

これらの結果から、SIRT7 は、HIF-1 を介した遺伝子発現の促進因子であることが示唆された。しかし、一方、本研究の実施中に Semenza らのグループにより、SIRT7 は HIF-1 のタンパク質発現量を低下させ、HIF 依存的な遺伝子発現を負に制御していることが報告された (Hubbi et al.: *J Bio Chem*, 2013)。この報告は、我々の得た実験結果とは逆に SIRT7 は、HIF の負の制御因子であることを主張しているが、我々の解析からは、この論文で示されているような結果は得られていない。実験条件や、用いている細胞株の条件の差異などが影響している可能性も考えられることから、今後さらなる解析が必要であると考えられる。

(2) SIRT7 と MDM2 の相互作用の解析

293 細胞を用いた免疫沈降実験から、MDM2 は、細胞内において SIRT1,2,6,7 のうち、SIRT7 とのみ特異的に複合体を形成することが判明した。また、MDM2 と SIRT7 の複合体形成は、高グルコース (2000 mg/L)

培養下に比較して、低グルコース(500 mg/L) 培養下で増強していることが判明した。

精製した組換えタンパク質による GST pull down アッセイの結果から、MDM2 と SIRT7 は直接的に結合していることが分かった。

293 細胞を用いた免疫蛍光解析から、MDM2 と SIRT7 は、それぞれ核に局在し、また、その一部は核小体において共局在が観察された。

293 細胞、A549 細胞および H1299 細胞において、Western blot 解析の結果から、SIRT7 siRNA の導入は、Scramble siRNA を導入した場合と比較して、MDM2 タンパク質の発現量を減少させた。また、293 細胞および A549 細胞において、p53 タンパク質の発現の増加が観察された。

チェイスアッセイの結果から、SIRT7 の共発現は、MDM2 タンパク質の安定性を増加させた。また、MDM2 の安定性は、高グルコース (2000 mg/L) 培養下に比較して、低グルコース (500 mg/L) 培養下で増加していることが判明した。

これらの結果から、SIRT7 は、細胞核内において MDM2 と直接的に結合することで、MDM2 の安定化させることが明らかとなった (現在、投稿準備中) 。MDM2 は、癌抑制遺伝子産物 p53 の負の制御因子であり、また低酸素応答性転写因子 HIF-1 の正の制御因子であることが知られている。これらの報告と本研究の結果から、SIRT7 は、MDM2 の安定化を介して、p53 依存的な癌抑制経路を負に制御し、さらに HIF-1 依存的な低酸素・低グルコース応答反応を正に制御することで、発癌や癌細胞の悪性化を促進することが予想される。今後、発癌や癌細胞の悪性化における SIRT7 の役割を細胞生物学的・腫瘍学的に明らかにする必要があると考えられる。

(3) SIRT7 新規結合タンパク質の探索

ヒト平均化 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、複数の SIRT7 結合タンパク質の候補を同定した。そのうち、メンブレントラフィックの制御に関与することが報告されている CHMP5 (charged multivesicular body protein) については、293T 細胞を用いた免疫沈降実験から、動物細胞内において SIRT7 と結合することが確認された。今後、細胞機能制御における SIRT7-CHMP5 相互作用の生物学的意義を明らかにしていきたい。

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 7 件)

1. Katayama K, Nakagawa K, Takeda H, Matsuda A, Ichikawa S Total synthesis of sandramycin and its analogues via a multicomponent assemblage. *Org. Lett.* **2014**, 16, 428-431. 査読有り
2. Chiba T, Hosono H, Nakagawa K, Asaka M, Takeda H, Matsuda A, Ichikawa S Total Synthesis of Syringolin A and Improvement of Its Biological Activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 4836-4839. 査読有り
3. Katayama K, Okamura T, Sunadome T, Nakagawa K, Takeda H, Shiro M, Matsuda A, Ichikawa S Synthesis and biological evaluation of quinaldopeptin. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 2580-2590. 査読有り
4. Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H Hypoxia-inducible Factors Activate CD133 Promoter through ETS Family Transcription Factors. *PLoS ONE* **2013**, 8: e66255. 査読有り
5. Goudarzi H., Iizasa H, Furuhashi M, Nakazawa S, Nakane R, Liang S, Hida Y, Yanagihara K, Kubo T, Nakagawa K,

- Kobayashi M, Irimura T, Hamada JI
Enhancement of in vitro cell motility and
invasiveness of human malignant pleural
mesothelioma cells through the
HIF-1 α -MUC1 pathway. *Cancer Lett.* **2013**,
39, 82-92. 査読有り
6. Nakagawa K, Uehata Y, Natsuizaka M,
Kohara T, Darmanin S, Asaka M, Takeda
H, Kobayashi M The nuclear protein Artemis
promotes AMPK activation by stabilizing the
LKB1-AMPK complex *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. **2012**, 427, 790-795. 査読
有り
7. Sasajima H, Nakagawa K, Kashiwayanagi M,
Yokosawa H Polyubiquitination of the B-Cell
Translocation Gene 1 and 2 Proteins Is
Promoted by the SCF Ubiquitin Ligase
Complex Containing betaTrCP. *Biol. Pharm.*
Bull. **2012**, 35, 1539-1545. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 大西俊介、中川宏治、坂本直哉、小林正伸
HIF による Ets 結合部位を介した CD133 プ
ロモーター活性の制御 第 71 回日本癌学会
学術総会、2012. 9. 20 札幌市教育文化会館
(北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 中川宏治、武田宏司 医学用語解説 脱ア
セチル化酵素 SIRT7 *G.I. Research* 2014, 22,
69-71

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/byoutai/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 宏治 (NAKAGAWA KOJI)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：80360949

(2)研究分担者

小林 正伸 (KOBAYASHI MASANOBU)

北海道医療大学・看護福祉学部・教授

研究者番号：80241321