

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：24659086
研究課題名(和文)SIRT1活性化による催奇形性抑制効果の検証

研究課題名(英文)Effects of SIRT1 activation on Teratogenesis

研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA, Yasukazu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50390810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の胚発生の過程で、体節と呼ばれる胸骨や腰骨など等間隔で並ぶ脊椎骨の元になる組織の形成過程(体節形成)があり、非常に頑健な機構により体節形成が行われていることが知られている。この過程で中心的な役割を果たしているタンパク質のひとつにHes7がある。われわれは未分節中胚葉(体節になる領域)特異的SIRT1ノックアウトマウスを作製・解析することで、Hes7の遺伝子発現およびタンパク質の安定性にSIRT1と呼ばれる脱アセチル化酵素が関与していること示唆する知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Somite formation giving rise to the backbone occurs with an accurate periodicity during embryogenesis in vertebrates. It has been known that Hes7 is the one of the core clock genes for somitogenesis. We investigated whether SIRT1, a NAD⁺ dependent deacetylase, is concerned in somitogenesis by generating presomitic mesoderm-specific SIRT1 knockout mice. Our study has suggested that SIRT1 regulates Hes7 gene expression and Hes7 protein stability.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖一般(含組織学・発生学)

キーワード：先天異常学・奇形学

1. 研究開始当初の背景

NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 は、その機能異常が糖尿病、脂質異常症などの代謝性疾患を引き起こすこと、逆に、レスベラトロールなどの SIRT1 活性化低分子化合物が糖尿病や肥満を抑制することが明らかになり、長寿遺伝子として注目を浴びている。これまでわれわれは、NAD⁺代謝/SIRT1 活性と概日時計が相互制御していることを発見した。

体節とは、胸骨や腰骨など等間隔で並ぶ脊椎骨の元になる組織であり、非常に頑健な機構により体節形成が行われていることが知られている。興味深いことに、以前より SIRT1 は、体節形成で中心的な役割を果たしている Hes7 タンパク質と複合体を形成することが知られている。われわれもこれらの複合体形成を確認していたが、生理的意義は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SIRT1 と Hes7 の複合体形成が Hes7 の機能にどのような影響を与えるのか、また、遺伝子改変マウスによる SIRT1 活性変化が催奇形性物質バルプロ酸による催奇形性に対して抑制効果を示すかを検証する。

3. 研究の方法

体節形成が行われる未分節中胚葉での SIRT1 活性と催奇形性への影響を明らかにするために、1) 遺伝子工学的に未分節中胚葉特異的に SIRT1 活性を上昇、もしくは減少させたマウスの作成、2) 遺伝子改変マウスの催奇形性物質、本研究ではバルプロ酸を使用、に対する影響を骨染色など形態学的手法による観察と分子生物学的手法による体節形成遺伝子発現パターンの観察による検証、3) 培養細胞を用いた SIRT1 による Hes7 機能への関与の生化学的解析、を行った。

4. 研究成果

体節形成が行われる未分節中胚葉 (PSM) 特異的に SIRT1 を欠損するコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成するために、酵素活性部位を含む exon4 を lox 配列で挟んだ SIRT1^{flox/flox} マウスと未分節中胚葉特異的に Cre を発現することが報告されている Hes7-Cre マウスをそれぞれ米国 The Jackson Laboratory と理研バイオリソースセンターより購入した。これらのマウスを掛け合わせることによって PSM 特異的 SIRT1 cKO マウスを得た。まず、PSM 特異的 SIRT1 cKO 新生仔マウスを用いて骨染色を行い、脊椎骨の等間隔パターンの異常の有無を検証した。その結果、cKO マウスで脊椎骨の等間隔パターンをはじめとする骨形成異常を見出すことはできなかった (図 1 A, B)。この結果は、骨の正確な等間隔パ

ーンの元となっている体節形成に異常がないことを示唆している。

つぎに、催奇形性物質であるバルプロ酸 (VPA) を妊娠 9 日目の母マウスの腹腔内へ投与し、催奇形性の程度を観察した。その結果、SIRT1 cKO 新生仔マウスでは、同腹仔野性型新生仔マウスに比べ、奇形の程度が穏やかな傾向が見られた (図 1 C, D)。これらの結果より、外的環境ストレスが無い条件では、SIRT1 が欠損していても体節形成には影響しないが、外的環境ストレス下では、SIRT1 活性を抑制することで脊椎骨の乱れを減弱させることができる可能性が示唆された。

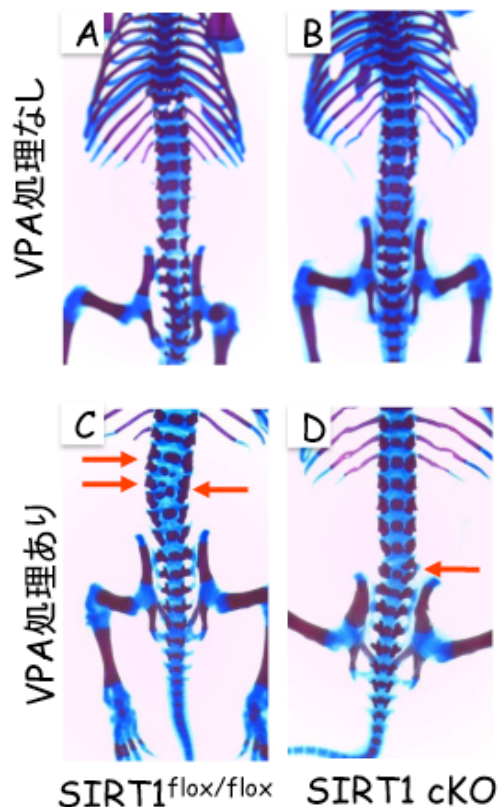


図1. SIRT1 cKOマウスの骨染色

VPA 未処理の野生型マウス (A; SIRT1^{flox/flox}) と cKO マウス (B; SIRT1 cKO)、および VPA 処理後の野生型マウス (C; SIRT1^{flox/flox}) と cKO マウス (D; SIRT1 cKO) の骨染色写真。脊椎骨の癒合箇所を矢印で示す。

SIRT1 cKO マウスで VPA 刺激による骨形成異常の減弱が見られたことより、つぎに、PSM での Hes7 mRNA の発現パターンを in situ ハイブリダイゼーション法により検出した。その結果、cKO 新生仔マウスの脊椎骨に異常がなかったことから示唆された通り、Hes7 mRNA は SIRT1 を欠損した状況でも振動することが確認できた。しかし、その発現量は野性型マウスに比べて上昇し

ている傾向が見られた (図2)。今後、定量的 PCR により、正確に cKO マウスで *Hes7* mRNA 量が上昇しているかを検証する必要がある。また、他の体節時計遺伝子の発現量についても検証し、SIRT1 による *Hes7* をはじめとする体節時計遺伝子の発現制御機構を明らかにしたい。

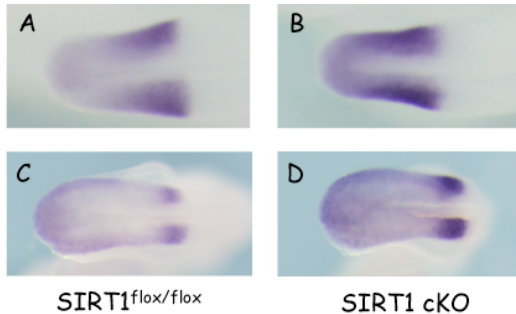


図2. SIRT1 cKO マウスでの *Hes7* mRNA の発現量

野生型マウス (A, C; SIRT1^{flox/flox}) および cKO マウス (B, D; SIRT1^{cKO}) PSM での *Hes7* mRNA 発現パターン。野生型、cKO マウスともに *Hes7* mRNA の発現パターンがサンプルによって異なるため、振動していることが分かる。

また、PSM 特異的 SIRT1 高発現マウスも複数ライン作成したが、外来性 SIRT1 の発現を検出することはできなかった。再度マウスの作成を試み、PSM cKO マウスの結果と比較することで SIRT1 の PSM での機能を解明したい。

一方で、*Hes7* タンパク質の機能に対する SIRT1 の関与を検証するために、培養細胞を用いて以下の実験を行った。まず、*Hes7* タンパク質の安定性に SIRT1 が関与するかを検証した。*Hes7* タンパク質は、非常に不安定で半減期が 20 分程度であることが既に報告されている。われわれも中胚葉系幹細胞由来の培養細胞である C3H 10T1/2 細胞を用いて *Hes7* タンパク質の安定性を検証した結果、半減期が約 20 分であることが確認できた (図 3 上段)。*Hes7* タンパク質の安定性に SIRT1 が関与するかを検証するために、C3H 10T1/2 細胞を SIRT1 活性化剤であるレスベラトロール (Resveratrol) もしくは、活性阻害剤であるニコチンアミド (Nicotinamide) で処理し、*Hes7* タンパク質の安定性を調べた。その結果、*Hes7* タンパク質は、レスベラトロール処理で不安定になり (図 3 中段)、ニコチンアミド処理により安定化した (図 3 下段)。上記薬理学的手法に加え、遺伝学的手法、すなわち、*Hes7* タンパク質と野生型 SIRT1、もしくは不活性型 SIRT1 を C3H 10T1/2 細胞に共発現させ、*Hes7* タンパク質の安定性を調べたところ、薬理学的検証と同様に、不活性型 SIRT1 と

共発現させた *Hes7* タンパク質は *Hes7* タンパク質を単独発現させた時よりも安定化することを確認した。以上の結果は、SIRT1 脱アセチル化活性により *Hes7* タンパク質の安定性が制御されていることを示している。しかしわれわれの質量分析法を用いた解析結果からは、*Hes7* タンパク質がアセチル化されていないことが明らかになった。

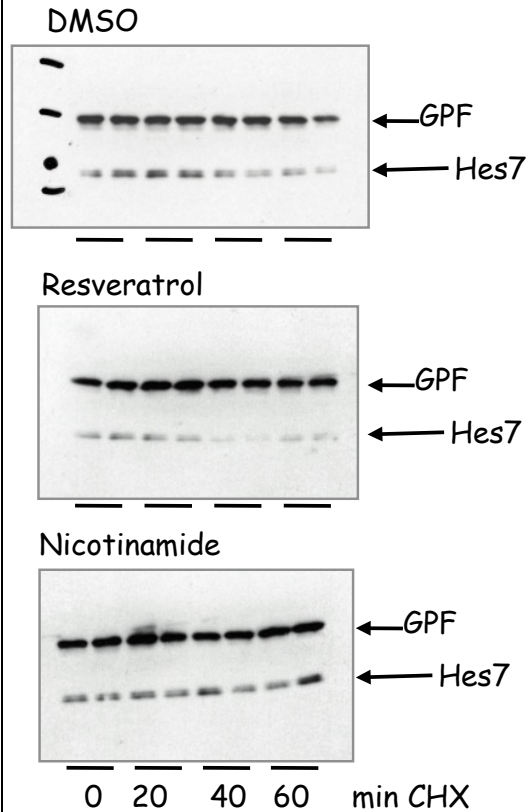


図3. SIRT1による*Hes7*タンパク質の安定性変化

C3H 10T1/2 細胞に myc-*Hes7* および myc-GFP (transfection control) を発現させ、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) 処理後、各時間での *Hes7* タンパク質量を myc 抗体により検出した。上段; コントロール処理、中段; SIRT1 活性化剤処理、下段; SIRT1 活性阻害剤処理

また、*Hes7* タンパク質の転写抑制因子としての機能に SIRT1 が関与しているかをルシフェラーゼアッセイにより検証したが、*Hes7* の転写抑制能に SIRT1 が関与するという結果は得られなかった。

今後の展望として、SIRT1 cKO で明らかになった *Hes7* mRNA の増加と培養細胞で明らかになった SIRT1 活性化阻害による *Hes7* タンパク質の安定化の分子機構、さらに VPA による脊椎骨の奇形に対して SIRT1 がどのような分子機構により関与している

のかを明らかにしたい。

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 1 件)

Nitanda Y, Matsui T, Matta T, Higami A, Kohno K, Nakahata Y, Bessho Y.
3'-UTR-dependent regulation of mRNA turnover is critical for differential distribution patterns of cyclic gene mRNAs. FEBS J. 2014 Jan;281(1):146-56. 査読あり
doi: 10.1111/febs.12582.

〔学会発表〕(計 1 件)

二反田康秀、松井貴輝、松田達郎、樋上絢、中畑泰和、別所康全
3'UTR依存的なmRNAの分解制御は発現振動遺伝子の発現領域の違いを生み出す
日本分子生物学会 2012年12月14日 福岡市

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA, Yasukazu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号 : 50390810

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :