

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650011

研究課題名(和文) 内因性代謝物質による脱アセチル化酵素サーチュイン活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the inhibitory mechanism of a lysine deacetylase Siruin by endogenous metabolites

研究代表者

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：40391859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗老化遺伝子として注目されているサーチュインはNAD依存的な脱アセチル化酵素を有し、細胞内のNAD/NADH比によってその酵素活性が制御されていることが知られているが、生理的な内因性阻害物質の存在は不明である。我々は脂肪酸代謝物であるアシルドーパミンが内因性のSIRT2阻害物質であることを明らかにした。種々のアシルドーパミンはSIRT2の酵素活性をin vitroおよびin vivoで阻害することを示した。加えて、SIRT2とアシルドーパミン複合体のX線結晶構造を解くことに成功し、アシルドーパミンによるSIRT2阻害の分子機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Sirtuins possess NAD-dependent deacetylase activity and is involved in diverse biological processes including aging. The enzymatic activity of sirtuins is known to be regulated by cellular NAD/NADH ratio. However, endogenous inhibitors for sirtuins have not been identified yet. Here, we identified N-acyldopamines as endogenous SIRT2 inhibitors. We found that a number of N-acyldopamine species including N-palmitoyldopamine inhibit both in vitro and in vivo SIRT2 activity. In addition, X-ray crystallographic analysis of the SIRT2 N-palmitoyldopamine complex revealed the molecular mechanism by which N-acyldopamines inhibit the SIRT2 activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：Sirtuin 代謝物質 アセチル化

1. 研究開始当初の背景

バクテリアからヒトまで保存されているリジン脱アセチル化酵素サーチュインは、栄養や環境刺激に対する様々な生物学的応答を制御するだけでなく、老化・寿命の重要な制御因子として機能することが知られている。また、その破綻は、糖尿病などの代謝疾患や発癌に關与する。サーチュインがリジン脱アセチル化酵素として機能するためには酸化還元反応の補酵素である NAD を必要とすることから、細胞のエネルギー状態 (NAD/NADH 比) に応答してサーチュインの活性が制御されている。しかし、内因性の阻害物質の存在にはついては全く不明であった。

ヒトにおいてサーチュインは7種類のサブタイプ (SIRT1-7) が存在しており、その中でも SIRT2 は主に細胞質に局在し、微小管の脱アセチル化酵素として機能する一方、DNA 複製、ゲノムの安定化等に関わるサーチュインであることが知られている。我々は、独自に同定した阻害剤とサーチュインの共結晶構造解析情報から、脂肪酸類がサーチュイン阻害活性を有する可能性を見出した。実際、脂肪酸代謝物の中から SIRT2 阻害物質を探索したところ、神経伝達物質であるドーパミンとパルミチン酸のアמידである *N*-Palmitoyl dopamine にサーチュインの一つである SIRT2 に対して阻害活性が存在することを見出した。

2. 研究の目的

N-Palmitoyl dopamine およびその類縁物質が SIRT2 の生理的な内因性阻害物質として機能することを明らかにすることを目的とした。加えて、*N*-Palmitoyl dopamine およびその類縁物質による SIRT2 阻害機構を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *N*-Palmitoyl dopamine 類似物質の SIRT2 阻害活性の検討。市販可能なアシルドーパミンについて、クマリンペプチドを用いた蛍光法、あるいは LabChip テクノロジーを用いたモビリティシフトアッセイを用いて、in vitro SIRT2 阻害活性を検討した。加えて、他のサーチュインアイソフォームである SIRT1 および SIRT3 の酵素活性についても同様の手法で検討した。

(2) *N*-Palmitoyl dopamine と SIRT2 の共結晶構造解析。大腸菌から結晶構造解析グレードの SIRT2 タンパク質を精製し、共結晶得るための条件を検討した。解析に資する共結晶が得られた場合、SPRING-8 あるいは高エネルギー加速器研究機構の放射光施設を利用して共結晶構造解析を行った。

(3) 細胞レベルでの *N*-Palmitoyl dopamine の SIRT2 阻害活性の検討。我々は SIRT2 の生理的基質としてアクチン結合タンパク質であるコータクチンを見出した。そこで、アセチル化されたコータクチンを特異的に認識

する抗体を用いたウエスタンブロット法により、コータクチンのアセチル化レベルを指標にして PLADA の細胞内 SIRT2 阻害活性を評価した。

4. 研究成果

アシルドーパミンはドーパミンと脂肪酸のアמידであり、脂肪酸の数だけアシルドーパミンの種類が存在する可能性がある。そこで *N*-Palmitoyl dopamine に加えて、市販されている4種類のアシルドーパミン (*N*-Lauroyl dopamine, *N*-Arachidonoyl dopamine, *N*-Stearoyl dopamine, *N*-Oleoyl dopamine) (図1) について、SIRT2 に対する in vitro 阻害活性を検討した。その結果、*N*-Stearoyl dopamine 以外のアシルドーパミンに SIRT2 阻害活性が存在することが分かり、SIRT2 阻害活性を有するアシルドーパミンの種類を同定した。さらに、脂肪酸部分の長さ、不飽和度は、SIRT2 の阻害活性に影響を与えることが示唆された。また、SIRT2 阻害活性を有するアシルドーパミンについては、SIRT1 および SIRT3 の阻害活性についても検討した。その結果、調べた全てのアシルドーパミンは SIRT1 および SIRT3 の脱アセチル化酵素活性には影響を与えないことが分かり、アシルドーパミンは選択的に SIRT2 の酵素活性を阻害していることを示した。

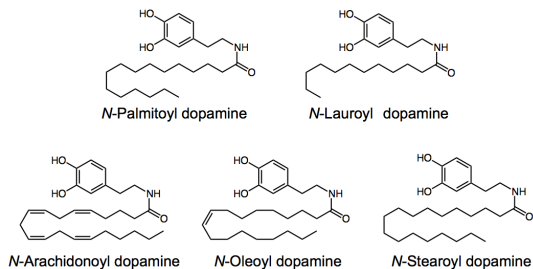


図1. アシルドーパミンの構造

アシルドーパミンによる SIRT2 阻害活性の分子機構を明らかにするために、SIRT2 と *N*-Palmitoyl dopamine 複合体の X 線共結晶構造解析を実施し、複合体構造を明らかにした。SIRT2 を含むサーチュインの構造は、NAD が結合する large ドメインと亜鉛が結合している small ドメインから成り、基質であるアセチル化リジンペプチドは、large ドメインと small ドメインの狭間の部位に結合することが知られている。X 線共結晶構造解析の結果、SIRT2 の基質結合ポケットの奥に存在する疎水的な空間に *N*-Palmitoyl dopamine の脂肪酸部分が入り込んでいることが分かった。SIRT2 のアポ体と *N*-Palmitoyl dopamine との複合体の構造を比較したところ、*N*-Palmitoyl dopamine との SIRT2 複合体に存在する基質結合ポケットの奥の疎水的な空間は、アポ体には存在しないことが分かった。そこで、アポ体と複合体の構造を重ね合わせたところ、large ドメインの構造に変化はな

いが、small ドメインの構造が異なることが分かった。これらの結果から、*N*-Palmitoyl dopamine は SIRT2 の small ドメインの構造変換を引き起こすことにより、基質結合ポケットの奥に疎水的な空間を創りだし、そこに *N*-Palmitoyl dopamine の脂肪酸部分が相互作用することにより SIRT2 の活性を阻害するユニークな阻害メカニズムを有することが示唆された。

加えて我々は、*N*-Lauroyl dopamine と SIRT2 複合体の X 線共結晶構造を解くことに成功した。*N*-Palmitoyl dopamine と同様に、*N*-Lauroyl dopamine もアポ体には存在しない、基質結合ポケットの奥の疎水的な空間に *N*-Lauroyl dopamine の脂肪酸の部分が結合していることが分かった。これらの結果から、アシルドーパミンは共通の阻害メカニズムで SIRT2 の酵素活性を阻害していることが示唆された。

SIRT2 はミリスチル酸などのリジン残基の長鎖アシル化を脱アシル化する活性を有しているが、我々はミリスチル化リジン含有ペプチドと SIRT2 の複合体構造を X 線共結晶構造解析により初めて明らかにした (Feldman JL Biochemistry 54, 3037-3050, 2015) (図 2)。アシルドーパミン複合体とミリスチル化リジン含有ペプチド複合体の構造を比較検討したところ、*N*-Palmitoyl dopamine の脂肪酸部分とミリスチル化リジンペプチドのアシル基の部分は、同じ疎水的空間に位置していることが分かった。これらの結果から、アシルドーパミンは生理的な基質であるアシル化リジンを模倣・拮抗することにより、SIRT2 の活性を阻害することが示唆された。

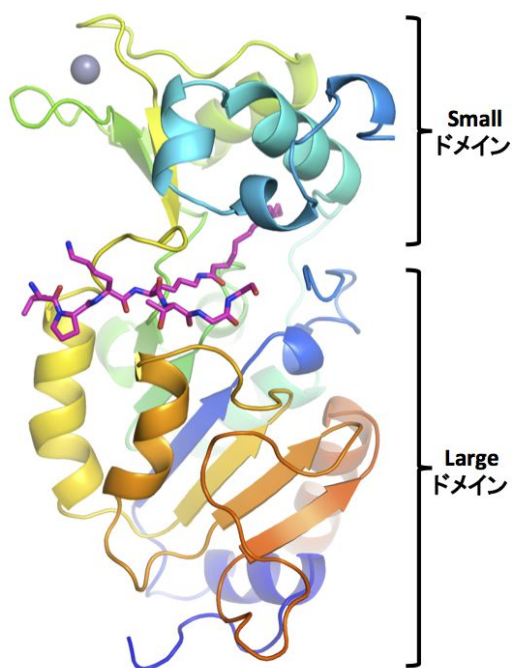


図 2. SIRT2 とミリスチル化リジン含有ペプチド複合体の X 線共結晶の構造

我々はがん細胞の浸潤、転移に重要なアクチン結合タンパク質コータクチンが SIRT2 の生理的基質であることを見出し、SIRT2 はコータクチンを脱アセチル化することにより、がん細胞の運動性を亢進することを見出した (Ito A et al. Sci. Signal 8, ra120, 2015)。そこで、アセチル化コータクチンレベルを指標にして、アシルドーパミンが細胞内の SIRT2 の酵素活性を阻害できるかどうか検討した。その結果、*in vitro* で SIRT2 阻害活性を有するアシルドーパミンはコータクチンのアセチル化を濃度依存的に増加させた一方、*in vitro* で SIRT2 を阻害できない *N*-Stearoyl dopamine はコータクチンのアセチル化レベルには影響しなかった。以上の結果から、アシルドーパミンは細胞内で SIRT2 の阻害物質として機能出来ることが示された。

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 3 件)

1. Matsumoto Y, Ito A, Uesugi M, Kittaka A. Efficient N-Acyldopamine Synthesis. Chem. Pharm. Bull. In press 査読有

2. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S, Natsume T, Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M, Yoshida M. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. Sci. Signal. 8, ra120 (2015) 査読有

3. Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Kudo N, Thelen JN, Ito A, Yoshida M, Denu JM. Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD(+) Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. Biochemistry 54, 3037-3050 (2015) 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. Akihiro Ito, Norio Kudo, Akiko Nakata, Satoko Maeda, Minoru Yoshida, "Novel functions of lipid metabolites as endogenous SIRT2 inhibitors" 8th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, January 19, 2016, Pacific Hotel Okinawa, Naha, Okinawa

2. 伊藤昭博、吉田稔、「NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT2 による細胞運動制御機構とその内因性阻害物質」、第 2 回北陸エビジェネティクス研究会、2015 年 11 月 11 日、富山大学、富山市、富山県

〔図書〕(計1件)

1. 伊藤昭博、八代田陽子、吉田稔、「NAD+関連タンパク質」、生体の化学 [増大特集]細胞シグナル操作方法、66、454-455、2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)
国立研究開発法人理化学研究所・
吉田化学遺伝学研究室・専任研究員
研究者番号：40391859

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

本 賢一 (Moto, Kenichi)
国立研究開発法人理化学研究所・
小林脂質生物学研究室・専任研究員
研究者番号：9033335

工藤 紀雄 (Kudo, Norio)
国立研究開発法人理化学研究所・
環境資源科学研究センター・研究員
研究者番号：80632421