

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22639

研究課題名(和文)新規アシル化翻訳後修飾による代謝制御の分子機構解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of metabolic regulation through protein acylations

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：PPAR₂は脂質代謝のマスターレギュレーターである。サーチュインの一つであるSIRT7がPPAR₂のアセチル化・アシル化など翻訳後修飾を制御し、PPAR₂の機能を制御しているかについては不明である。我々は、SIRT7がPPAR₂の382番目のリシン残基を脱アセチル化することを見出した。382番目のリシンアセチル化修飾が転写因子機能に及ぼす影響について検討したところ、脱アセチル化PPAR₂ではSrebp1c、Acaca、Fasn、Scd1など脂質合成に働く遺伝子群の発現が増強していた。SIRT7はPPAR₂を脱アセチル化することで脂質合成に関わる遺伝子の発現を制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPAR₂の合成リガンドは糖尿病の治療薬として広く臨床で使用されているが、近年、PPAR₂の翻訳後修飾を制御する新たなタイプのPPAR₂モジュレーターの開発が進んでいる。今回の我々の研究結果はPPAR₂382番目のアセチル化修飾が脂質代謝の制御に重要であることを意味しており、今後、同部位のアセチル化修飾変容薬が新たな脂質代謝・代謝異常症の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR₂) is a transcription factor crucial for regulating adipogenesis and glucose/lipid metabolism. Sirtuin 7 (SIRT7), a nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase, also controls metabolism. However, it is not known whether SIRT7 regulates the function of PPAR₂ by its deacetylation. We demonstrated that SIRT7 binds to PPAR₂ and deacetylates PPAR₂ at K382. C3H10T1/2-derived adipocytes expressing PPAR₂K382Q (a mimic of acetylated K) accumulated much less fat than adipocytes expressing wild-type PPAR₂ or PPAR₂K382R (a mimic of nonacetylated K). Global gene expression analysis of adipocytes expressing PPAR₂K382Q revealed that K382Q caused the dysregulation of a set of genes involved in lipogenesis, including Srebp1c, Acaca, Fasn, and Scd1. Our findings indicate that SIRT7-dependent PPAR₂ deacetylation at K382 controls lipogenesis in adipocytes.

研究分野：代謝学

キーワード：PPAR₂ 脂肪細胞 サーチュイン SIRT7

1. 研究開始当初の背景

PPAR γ は脂肪細胞の分化や機能を制御するマスター転写因子であり、糖脂質代謝を制御する。PPAR γ には PPAR γ 1と PPAR γ 2の2種類のアイソフォームが存在するが、脂肪細胞においては PPAR γ 2が選択的に発現している。糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体は PPAR γ 2の合成リガンドであり、PPAR γ 2を活性化することでインスリン抵抗性・耐糖能を改善する。PPAR γ 2はリン酸化やアセチル化など翻訳後修飾を受けており、PPAR γ 2の転写活性が翻訳後修飾により制御されることが判明し、「翻訳後修飾」を標的とした新しいクラスの PPAR γ 2活性化薬の開発が進んでいる (Nature Medicine 2013)。近年、タンパク質のリシン残基に対するプロピオニル、サクシニルなどアシル化(R-CO-)修飾が新たな翻訳後修飾として注目を浴びている (Nat Rev Mol Cell Biol 2017)。しかし PPAR γ 2がアセチル化以外のアシル化修飾を受けているか否かは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は PPAR γ 2のアセチル化・アシル化修飾の有無、脱アセチル化・アシル化酵素である SIRT7 が PPAR γ 2の翻訳後修飾やその活性に及ぼす影響について検討を行うものである。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ 2翻訳後修飾に関する検討

HEK293T細胞に HA タグ付きの PPAR γ 2発現ベクター (pcDNA3.1-3xHA-PPAR γ 2) を遺伝子導入後、HA タグに対する抗体を用いて免疫沈降を行う。アセチル化リシン、サクシニル化リシン特異的抗体を用いてウエスタンブロット解析を行う。

(2) SIRT7 による PPAR γ 2翻訳後修飾制御についての検討

HEK293T細胞に pcDNA3-3xHA-PPAR γ 2と pcDNA3.1-FLAG-SIRT7 を共発現し、SIRT7 が PPAR γ 2のアセチル化・アシル化に及ぼす影響についてウエスタンブロットを用いて検討した。抗 PPAR γ 抗体を用いて野生型および SIRT7 ノックアウト (KO) マウスの白色脂肪組織ライセートの免疫沈降を行い、SIRT7 の欠損が内因性の PPAR γ 2のアセチル化・アシル化修飾に及ぼす影響について検討を行う。

(3) SIRT7 と結合する PPAR γ 2の領域の探索

PPAR γ 2 の欠失変異体 (GAL4DBD-PPAR γ 2 (1-200), GAL4DBD-PPAR γ 2 (201-350), GAL4DBD-PPAR γ 2 (351-439), GAL4DBD-PPAR γ 2 (440-506) を作製後、Halo-SIRT7 を用いたプルダウン実験を行い、SIRT7 と結合する PPAR γ 2の領域を同定する。同定された領域内のリシン残基をアルギニンに変異した KR 変異体を作製する。

(4) SIRT7 の標的リシン残基の同定

HEK293 細胞に SIRT7 と各種 KR 変異体を遺伝子導入し、アセチル化・アシル化の変化について検討することで、SIRT7 の標的部位の同定を行う。

(5) SIRT7 による PPAR γ 2 の翻訳後修飾変化が脂肪細胞機能に及ぼす影響の検討

レトロウイルスを用いて C3H10T1/2 細胞に野生型 PPAR γ 2、K382R-PPAR γ 2 (脱アセチル化・アシル化ミミック)、K382Q-PPAR γ 2 (アセチル化・アシル化ミミック) を発現後、脂肪細胞に分化させ、PPAR γ 2 の翻訳後修飾変化が脂肪細胞機能に及ぼす影響について検討する。

(6) アセチル化・アシル化が遺伝子発現に及ぼす影響の検討

K382R-PPAR γ 2 および K382Q-PPAR γ 2 発現脂肪細胞における遺伝子発現について RNA-seq 解析を行い検討する。

4. 研究成果

(1) SIRT7 が PPAR γ 2翻訳後修飾に及ぼす影響

HEK293T 細胞内で PPAR γ 2 のアセチル化が確認できた。一方、PPAR γ 2 のサクシニル (アシル化) 修飾は認められなかった。SIRT7 の共発現により PPAR γ 2 の脱アセチル化が認められた。以上の結果から、PPAR γ 2 は SIRT7 により脱アセチル化される標的分子であることが判明した。

SIRT7 と結合する PPAR γ 2の領域について検討を行ったところ、PPAR γ 2 (351-439)の領域が SIRT7 と結合することが判明した。同領域には6個のリシン残基 (K364, K382, K386, K395, K401, K432) が存在していたことから、これらの KR 変異体を作製し、SIRT7 の脱アセチル化作用について検討した。HEK293T細胞に PPAR γ 2と K382R 変異体 PPAR γ 2を発現させ、PPAR γ 2のアセチル化について検討したところ、K382R-PPAR γ 2ではアセチル化が減少しており、SIRT7 を共発現させたところ、野生型 PPAR γ 2で認められた SIRT7 による脱アセチル化が K382R 変異体 PPAR γ 2では認められなかった。このことから K382 が SIRT7 の標的リシン残基であると考えられた。

(2) K382 アセチル化が PPAR γ 2活性に及ぼす影響の検討

C3H10T1/2 細胞に野生型 PPAR γ 2、K382R-PPAR γ 2、K382Q-PPAR γ 2 を発現後、脂肪細胞に分化させたところ、K382Q-PPAR γ 2 発現脂肪細胞では細胞内脂質の蓄積が大きく低下していた。K382R-PPAR γ 2 発現脂肪細胞と K382Q-PPAR γ 2 発現脂肪細胞を用いて、RNA-seq 解析を実施したところ、K382Q-PPAR γ 2 発現脂肪細胞では Acaca (アセチル CoA カルボキシラーゼ)、Fasn

(脂肪酸合成酵素) Scd1 (ステアロイル CoA デサチュラーゼ) SREBP1c など脂肪合成に関わる遺伝子群の発現が著明に低下していた。

以上の結果から、SIRT7 は PPAR γ 2の382番目のリシン残基を脱アセチル化することで脂肪合成に関連する遺伝子の発現を促進する作用を有していることが判明した (図1)。

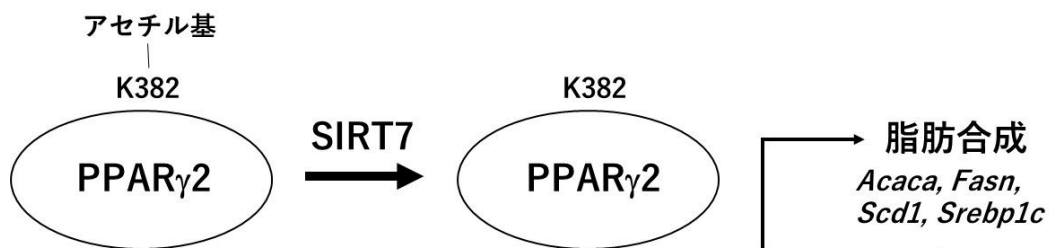


図1. SIRT7はPPAR γ 2の382番目のリシン残基を脱アセチル化し、脂肪合成に関連する遺伝子群の発現を亢進させる (Fatema et al. JDI (in press))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sobuz SU, Sato Y, Yoshizawa T, Karim MF, Ono K, Sawa T, Miyamoto Y, Oka Y, Yamagata K | 4. 巻 1866 |
| 2. 論文標題 SIRT7 regulates the nuclear export of NF-kB p65 by deacetylating Ran. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 SIRT7 regulates the nuclear export of NF-kB p65 by deacetylating Ran. | 6. 最初と最後の頁 1355-1367 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.05.001. | 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 Yamamura S, Izumiya Y, Araki S, Nakamura T, Kimura Y, Hanatani S, Yamada T, Ishida T, Yamamoto M, Onoue Y, Arima Y, Yamamoto E, Sunagawa Y, Yoshizawa T, Nakagata N, Bober E, Braun T, Sakamoto K, Kaikita K, Morimoto T, Yamagata K, Tsujita K | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 Cardiomyocyte Sirt (Sirt7)7 ameliorates stress-induced cardiac hypertrophy by interacting with and deacetylating GATA4. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Hypertension | 6. 最初と最後の頁 98-108 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13357. | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kariba Y, Yoshizawa T, Sato Y, Tsuyama T, Araki E, Yamagata K | 4. 巻 530 |
| 2. 論文標題 Brown adipocyte-derived miR-132-3p suppress hepatic Srebf1 expression and thereby attenuate expression of lipogenic genes. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 500-507 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.090. | 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 Sato Y, Rahman MM, Haneda M, Tsuyama T, Mizumoto T, Yoshizawa T, Kitamura T, Gonzalez FJ, Yamamura K, Yamagata K | 4. 巻 1866 |
| 2. 論文標題 HNF1a controls glucagon secretion in pancreatic a-cells through modulation of SGLT1. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BBA; Mol Basis Dis | 6. 最初と最後の頁 165898 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadis.2020.165898. | 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 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Morita Y, Senokuchi T, Yamada S, Wada T, Furusho T, Matsumura T, Ishii N, Murakami-Nishida S, Nisida S, Motoshima H, Komohara Y, Yamagata K, Araki E | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Impact of tissue macrophage proliferation on peripheral and systemic insulin resistance in obese mice with diabetes. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care | 6. 最初と最後の頁 e001578 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2020-001578. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Arima Y, Nakagawa Y, Yamagata K, Tsujita K et al. | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature Metabolism | 6. 最初と最後の頁 196-210 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-021-00342-6. | 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 Kimura Y, Izumiya Y, Araki S, Yamamura S, Hanatani S, Onoue Y, Ishida T, Arima Y, Nakamura T, Yamamoto E, Senokuchi T, Yoshizawa T, Sata M, Kim-Mitsuyama S, Nakagata N, Bober E, Braun T, Kaikita K, Yamagata K, Tsujita K | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Sirt7 deficiency attenuates neointimal formation following vascular injury by modulating vascular smooth muscle cells proliferation. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Circulation Journal | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0936. | 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9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤叔史、津山友徳、吉澤達也、松岡孝昭、山縣和也 |
| 2. 発表標題 低酸素誘導性BHLHE40による 細胞機能低下機序の解明 |
| 3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuya Yamagata |
| 2. 発表標題 Regulation of aging-related diseases by sirtuin 7 (SIRT7) |
| 3. 学会等名 France-Japan Symposium. Implications of senescence in age related disorders: Towards healthy aging. (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤叔史、Sobuz Shihab U., 吉澤達也、Fazlul Karim、小野勝彦、澤智裕、宮本洋一、岡正啓、山縣和也 |
| 2. 発表標題 脱アセチル化酵素SIRT7によるNF-kB p65の核外輸送制御メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 津山友徳、佐藤叔史、吉澤達也、松岡孝昭、山縣和也 |
| 2. 発表標題 低酸素ストレスはBhlhe40-Mafa経路を介してインスリン分泌不全を誘導する |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 山縣和也 |
| 2. 発表標題 老化関連疾患の克服による健康寿命の延伸 |
| 3. 学会等名 第70回日本体質医学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤叔史、Md Mostafizur Rahman、羽根田昌樹、水本智也、津山友徳、吉澤達也、北村忠弘、Frank J Gonzalez、山村研一、山縣和也 |
| 2. 発表標題 HNF-1 による膵 細胞機能制御メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 山縣和也 |
| 2. 発表標題 膵 細胞と低酸素ストレス |
| 3. 学会等名 第58回日本糖尿病学会九州地方会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuya Yamagata |
| 2. 発表標題 Regulation of Metabolism by nuclear factors |
| 3. 学会等名 The Quadruple symposium-2021（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuya Yamagata |
| 2. 発表標題 HNF1a controls both insulin and glucagon secretion in pancreatic islets |
| 3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the Japan Diabetes Society |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部病態生化学講座
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/biochem2/biochem2.html>

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 | 吉澤 達也 (Yoshizawa Tatsuya) (40313530) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (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 |
|---------|---------|
|---------|---------|