

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010-2012

課題番号：22590245

研究課題名（和文） 神経細胞分化における SIRT1 の働き

（英文） Functional roles of SIRT1 in the differentiation of neural cells

研究代表者

堀尾 嘉幸 (HORIO YOSHIYUKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30181530

研究成果の概要（和文）：

酵母長寿遺伝子 Sir2 ホモログ SIRT1 が Notch の機能を助ける p300 を脱アセチル化して、ユビキチン化による p300 分解を促進する機能を見出した。また、SIRT1 は PC12 神経細胞の neurite の形成を促すこと、神経堤由来の細胞の melanoma B16F1 細胞を用いて SIRT1 が lamellipodia 形成と移動に必要で、神経細胞移動にも SIRT1 が関与する可能性を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We found that SIRT1, an homologue of yeast longevity gene Sir2, bound and deacetylated p300, a co-activator for Notch-intracellular domain, resulting in the ubiquitination and degradation of p300. We found that SIRT1 promoted neurite formation and extension of PC12 pheochromocytoma cells. We also found that SIRT1 was necessary for lamellipodium formation and migration of B16F1 melanoma cells. Because melanoma cells are derived from neural crest cells, similar mechanism may regulate neural cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：サーチイン、長寿遺伝子、細胞移動、

1. 研究開始当初の背景

SIRT1 は酵母で寿命をのばす長寿遺伝子 Sir2 の哺乳類ホモログとして有名であるが、神経系に発現しており、その機能として神経幹細胞が神経細胞へ分化する際のスイッチ

として働くことを見出した。しかし、そのメカニズムは完全には解明しておらず、また、分化した神経細胞にも SIRT1 が存在することは他の機能が SIRT1 に存在することを示唆している。

2. 研究の目的

SIRT1の神経系での生理的、病態的機能とそのメカニズムを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p300 についての研究

1-1) 培養細胞を用いた研究

培養細胞に SIRT1 活性化剤や阻害剤を作用させて、また SIRT1-siRNA, dominant-negative SIRT1, SIRT1、p300 やアセチル化酵素 PCAF を発現させて p300 の発現量やアセチル化を調べた。また、p300 のアセチル化 lysine を arginine に変化させた p300 で検討した。

1-2) *in vivo* マウスにおいて p300 発現量を SIRT1 ノックアウトマウス等で調べた。

(2) PC12 細胞を用いた検討

PC12 細胞の NGF による neurite 伸長の SIRT1 の及ぼす効果について siRNA, 活性調節剤、クローンの過剰発現等により調べた。

(3) B16F1 細胞等の細胞移動における SIRT1 の作用をレンチウイルス shRNA を使ったノックダウン、マウスへの移植実験、FRET 法による PI(3, 4, 5)P3 量の変化、細胞形態の変化等で調べた。

4. 研究成果

(1) 転写 co-activator の p300 はアセチル化、脱アセチル化でその蛋白質発現量がコントロールされており、SIRT1 が p300 を脱アセチル化すると p300 のユビキチン化が促進され、p300 の発現量が減少した。逆に SIRT1 を阻害したりノックダウンすると p300 の発現量が増加した。

(2) p300 の Lys-1020 と Lys-1024 がアセチル化を受け、このアセチル化を SIRT1 が脱アセチル化すると p300 のユビキチン化が進み分解が促進された。

(3) p300 は p300 自身もしくは PCAF によりアセチル化され、アセチル化は p300 の蛋白質量を増加させた。

(4) SIRT1 コンディショナルノックアウトマウスで SIRT1 をノックアウトすると細胞の p300 の発現量は増加していた。

(5) SIRT1 活性化剤のレスベラトロールは *in vitro*, *in vivo* ともに p300 の蛋白質発現量を減少させた。

(6) 筋ジストロフィー症マウスでは心筋の p300 量が増加して、線維化の進行が見られたが、レスベラトロールをマウスに継続的に経口投与しておく、骨格筋、心筋ともに線維化が抑制され、レスベラトロールの治療効果が観察された。レスベラトロールは線維化を促進する TGF- β の量を変化させないことから、TGF- β の下流で働く p300 の SIRT1 による量的調節機構が関与するものと考えられた。

(7) p300 は Notch の下流で働くことから、SIRT1 による Notch シグナルの抑制機構にも p300 のユビキチン化と分解のメカニズムが深く関与することが考えられた。

(8) SIRT1 活性化作用を持つレスベラトロールは線維化抑制剤としての可能性も持つことを明らかとした。線維化は各種慢性疾患の病態で状態を悪化させる大きな原因であり、レスベラトロール等の SIRT1 活性化剤の各種病態治療への応用が考えられた。

(9) PC12 細胞での neurite 伸長に SIRT1 が関与し、活性促進では neurite の長さが有意に伸延し、逆に SIRT1 阻害によって neurite の伸長は抑制された。しかし 1 つの細胞から得る neurite の数には SIRT1 活性は影響しないことがわかった。

(10) B16F1 細胞等では細胞の移動に SIRT1 が必要であり、SIRT1 活性をノックダウンもしくは阻害剤で阻害すると細胞移動が著しく抑制され、逆に SIRT1 活性化をおこなうと細胞移動が促進された。

(11) 他のサーチュインである SIRT2~7 はノックダウンしても B16f1 細胞の細胞移動に影響しなかった。また、p53 はこの細胞での細胞移動に関与しなかった。

(12) SIRT1 は細胞が移動する際に移動方向に作る lamellipodia の形成に関与することを発見した。SIRT1 阻害は lamellipodia 形成を阻害することによって細胞移動を抑制することが考えられた。

(13) 活性型 Rac による細胞移動が SIRT1 阻害により阻害されることから、Rac の上流にある

phosphatidylinositol (3, 4, 5) trisphosphate (PIP3) の関与について、FRET 法で、成長因子誘導性の膜直下の PIP3 増加を検討したところ、SIRT1 の阻害により PIP3 の増加や維持が阻害されることを見出した。

(14) B16F1 細胞を皮下移植したマウスは SIRT1 阻害により有意に転移が抑制され寿命が有意に延長した。

(15) SIRT1 をレンチウイルスでノックダウンした B16F1 細胞では元の細胞に比べて転移が著しく抑制されていた。

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 13 件)

1) Kuno A, Hori YS, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Resveratrol improves cardiomyopathy in dystrophin-deficient mice through SIRT1 Protein-mediated modulation of p300 Protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 5963-5972, 2013. (査読有)

2) Srisuttee R, Koh SS, Malilas W, Moon J, Cho IR, Jhun BH, Horio Y, Chung YH. SIRT1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells expressing hepatitis B virus X protein to oxidative stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **429**, 45-50, 2013. (査読有)

有)

- 3) Hosoda R, Kuno A, Hori YS, Ohtani K, Wakamiya N, Oohori A, Hamada H, Horio Y. Differential cell-protective function of two resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) glucosides against oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344**, 124-132, 2013. (査読有)
- 4) Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol.* **107**, 273-275, 2012. (査読有)
- 5) Cho IR, Koh SS, Malilas W, Srisuttee R, Moon J, Choi YW, Horio Y, Oh S, Chung YH. SIRT1 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells expressing pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel oncogene, by suppression of β -catenin. *Biochem Biophys Res Commun.* **423**, 270-275, 2012. (査読有)
- 6) Srisuttee R, Koh SS, Kim SJ, Malilas W, Boonying W, Cho IR, Jhun BH, Ito M, Horio Y, Seto E, Oh S, Chung YH. Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates β -catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase. *Oncol Rep.* **28**, 276-282, 2012. (査読有)
- 7) 堀尾嘉幸、久野篤史:「レスベラトロールの筋肉・神経疾患への応用」、*Anti-aging Medicine (アンチ・エイジング医学)* Vol 8 p906-912., 2012 (査読無)
- 8) Horio Y. Diabetes: Insulin signal meets SIRT1 at AKT. *Nat Rev Endocrinol.* **8**, 131-132, 2011. (査読有)
- 9) Hori SY, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K and Horio Y. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 784-794, 2011 (査読有)
- 10) Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clin Sci.* **121**, 191-203, 2011 (査読有)
- 11) Mariño G, Morselli E, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, Cabrera S, Bénit P, Rustin P, Criollo A, Kepp O, Galluzzi L, Shen S, Malik SA, Maiuri MC, Horio Y, López-Otín C, Andersen JS, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G. Longevity-relevant regulation of autophagy at the level of the acetylproteome. *Autophagy* **7**, 647-649, 2011. (査読有)
- 12) Morselli E, Mariño G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, Cabrera S,

Bénit P, Rustin P, Criollo A, Kepp O, Galluzzi L, Shen S, Malik SA, Maiuri MC, Horio Y, López-Otín C, Andersen JS, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J. Cell Biol.* **192**, 615-629, 2011. (査読有)

13) Sugino T, Maruyama M, Tanno M, Kuno A, Houkin K, Horio Y. Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *FEBS Lett.* **584**, 2821-2826, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 7 件国際学会および国内学会シンポジウム)

1) Kuno A & Horio Y. SIRT1 inhibits cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of p300. Keystone Symposia "Aging and Diseases of Aging" October 22-27, 2012. Tokyo.

2) Kunimoto R, Jimbow K, Tanimura A, Sato M, Hisahara S, Sugino T, Hirobe T, Yamashita T, Horio Y: SIRT1 drives melanoma cell migration by modulating phosphatidylinositol trisphosphate at the leading edge. Keystone Symposia "Aging and Diseases of Aging" October 22-27, 2012. Tokyo

3) Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Horio Y FOXO transcription factors play a crucial role in the anti-cell death effects of SIRT1 under oxidative stress. Keystone Symposia "Aging and Diseases of Aging" October 22-27, 2012. Tokyo.

4) Horio Y, Hayashi T. A neuroprotective effect of protein deacetylase SIRT3 against oxidative stress. Neuroscience 2012, September 18-21, 2012, Nagoya.

5) Horio Y. Function of SIRT1 in health and Disease. International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka. August 24-26, 2012

6) Hori YS, Hayashi T, Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Resveratrol ameliorates muscle pathogenesis in mdx mouse, a model for *Duchenne* muscular dystrophy. neuroscience Meeting. November 12-16, 2011, Washington DC.

7) Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Resveratrol ameliorates dystrophic muscle pathogenesis in mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. Gordon Research Conference Muscle Myogenesis: New Horizons for Myogenesis August 28 - September 2, 2011 WaterVille Valley, USA.

[図書] (計 2 件)

濱田博喜、堀尾嘉幸:「トランスレスベラトロ

ールの機能性解明」機能性食品・素材と運動療法（大澤俊彦 他 監修），pp66-73, シーエムシー出版 2012

久野篤史、堀尾嘉幸：「レスベラトロールによる筋ジストロフィー治療の試み」

レスベラトロールの基礎と応用（坪田一男 監修），pp203-210, シーエムシー出版 2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：レスベラトロールを含む剤、及び組成物
発明者：濱田博喜、堀尾嘉幸、清水芳雄
権利者：備前化成株式会社
種類：特許
番号：特願 2011-111971
出願年月日：平成 23 年 5 月 19 日
国内外の別：国内

名称：筋ジストロフィーを処置するための組成物
発明者：堀尾嘉幸、久野篤史、堀佑輔
権利者：札幌医科大学
種類：特許
番号：2010-205453
出願年月日：平成 22 年 9 月 14 日
国内外の別：国内

○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

<http://web.sapmed.ac.jp/pharmacology/>
札幌医科大学薬理学講座ホームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀尾 嘉幸 (HORIO YOSHIYUKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：30181530

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

林 貴士 (HAYASHI TAKASHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：90457698

久野 篤史 (KUNO ATSUSHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：30468079

國本 梨沙 (KUNIMOTO RISA)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20468094