

令和元年6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K11014

研究課題名(和文) リジン脱アシル化酵素SIRT7による骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of bone metabolism by lysine deacylase SIRT7.

研究代表者

吉澤 達也 (Yoshizawa, Tatsuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：40313530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、老化・様々な代謝・がんの調節因子として重要な役割を担っているサーチュイン(哺乳類ではSIRT1-7)の一つであるSIRT7が骨形成に重要な役割を果たすことを発見すると共に、骨形成に必須の遺伝子調節因子Osterixの働きを活性化する新しいメカニズムを解明することに成功した。また、骨組織におけるSIRT7は加齢により減少することが判明した。本研究の研究成果から、SIRT7によるOsterixの調節機構が骨形成低下に伴う骨粗鬆症の新たな治療薬開発のための標的となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症では骨吸収を抑える薬剤に比べて骨形成を促進させる薬剤は限られており、骨を再生させる治療薬の開発が望まれている。我々の研究結果によると、老化した場合などSIRT7が十分に働かない状況では、Osterixの働きが低いために骨を作ることが損なわれ、骨形成低下に伴う骨粗鬆症が引き起こされると考えられた。今後、SIRT7-Osterixの調節経路が骨形成低下に伴う骨粗鬆症の新たな治療薬開発のための標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We discovered that the SIRT7, which is the member of Sirtuins (SIRT1-7 in mammals) regulating a wide variety of biological process, is important for bone formation, and have succeeded in finding a new mechanism which activates functions of Osterix transcription factor essential for bone formation. Furthermore, we found that SIRT7 in bone decreased with age. It is expected that the “SIRT7-regulated Osterix activating pathway” will be a new therapeutic drug target to treat decreased osteogenesis and osteoporosis.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨組織 骨粗鬆症 サーチュイン SIRT7 老化 ロコモティブシンドローム アシル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は体を支持する役割に加え、ホルモンを分泌し、リン代謝、エネルギー代謝、雄の生殖能、脳の発達などを調節する内分泌器官である。したがって、骨組織における疾患は骨折や寝たきりのリスクのみならず、全身の代謝疾患に影響を及ぼす可能性が高く、骨の量と質を保つことは、老化・生活習慣病関連疾患の予防や治療を考える上で極めて重要である。

サーチュイン(哺乳類では SIRT1-7)は元来 NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素として研究されてきたが、現在ではヒストンのみならず転写因子や酵素などを制御し、様々な代謝・がん・老化の調節因子として重要な役割を担っており、老化・生活習慣病関連疾患の治療標的として研究・開発されている。また、最近の研究では、アセチル基のみならずマロニル基、スクシニル基、中鎖鎖脂肪酸由来のアシル基など様々なアシル基を取り除く酵素活性が新発見されており、サーチュインはリジン残基の脱アシル化酵素という新たな概念の酵素群として認識されるようになってきた。しかしながら、脱アシル化酵素としてのサーチュインの骨組織における役割やその分子機構については未だにあまり解明が進んでいない。

2. 研究の目的

最近我々は、*Sirt7* KO マウスでは、高脂肪食で引き起こされる肥満、脂肪肝、糖尿病が野生型マウスに比べて軽減することを発見した(*Cell Metabolism* 2014)。この研究により、SIRT7 が代謝異常症治療の創薬ターゲットとして大きな可能性を持つことが判明した。

そこで次に、SIRT7 の骨代謝に対する役割を解析する目的で、*Sirt7* KO マウス大腿骨を μ CT で解析したところ、雌雄ともに海綿骨、皮質骨において著しい骨量の低下が認められた。さらに、雌マウスの腰椎を用いた骨形態計測を行ったところ、*Sirt7* KO マウスでは、骨量の低下、骨形成速度の低下、骨芽細胞の減少、破骨細胞の増加が認められた。骨形成が低下していたため、*Sirt7* KO マウス初代骨芽細胞を用いて骨芽細胞分化実験を行った結果、SIRT7 が無いと骨芽細胞の分化が著しく損なわれることが明らかとなった。さらに、SIRT7 が骨芽細胞分化に必須の転写因子 Osterix (OSX) に結合すること、ルシフェラーゼアッセイでは *Sirt7* KO マウス初代骨芽細胞における OSX の転写活性化能が 8 割も減少していることを見出した。以上の結果から、骨芽細胞における SIRT7 は、OSX の転写活性化能を正に調節し、骨芽細胞分化を正常に制御することにより、骨組織の恒常性を維持する重要な核内因子であることが明らかとなった(図 1)。

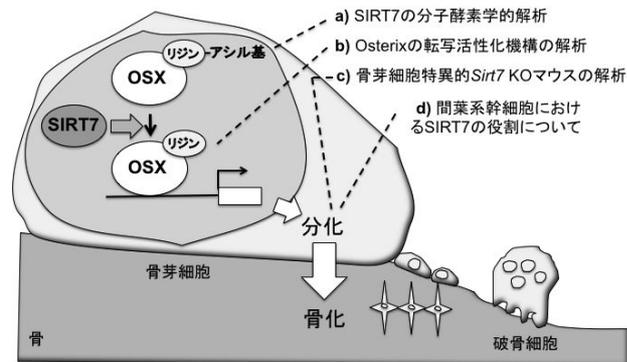


図 1: 我々が明らかにした SIRT7 による骨代謝制御機構の模式図と今後の解明目標

そこで本研究課題では、新たな骨代謝制御因子としての SIRT7 の分子機構の解明を目的とし、以下の点について解析を進める(図 1)。

- SIRT7 の分子酵素学的解析を進める。
- OSX のリジンアシル化修飾の調節による転写活性化機構の解析を進める。
- 骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスの解析を進める。
- 間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化における SIRT7 の役割についても解析を進める。

3. 研究の方法

(a) SIRT7 の分子酵素学的解析

現在のところ、SIRT7 の酵素活性は弱い脱アセチル化と脱スクシニル化しか発見されており、真の酵素活性は依然不明であるため、SIRT7 の新規脱アシル化酵素活性の発見を試みる。リジンアシル化ペプチドとリコンビナントサーチュインを用いて *in vitro* 酵素反応を行い、質量分析法にて脱アシル化されたペプチドを検出することにより、脱アシル化反応が行われたかを判定することが出来る。そこで、各種アシル基(アセチル基、プロピオニル基、ブチル基、クロトニル基、マロニル基、スクシニル基、ヘキサノイル基、オクタノイル基、デカノイル基、ドデカノイル基、ミリストイル基、パルミトイル基)を、ヒストン H3 の 18 番目のリジン残基に導入したペプチドを合成し、リコンビナント SIRT7 を用いて検討する。

b) OSX のリジンアシル化修飾の調節による転写活性化機構の解析

これまでの解析により、SIRT7 は OSX の C 末端側 DNA 結合ドメインに結合することがわかっていて、そこで、このドメインに存在する 10 個のリジン残基をそれぞれアルギニンに置換した点変異体を作成し、転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにより解析する。

また、内在性や過剰発現させた OSX を用いて、質量分析とウェスタンブロットによりリジンアシル化の状態を解析する。

c) 骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスの解析

骨芽細胞における SIRT7 の役割を個体レベルで確かにするため、タイプ I コラーゲンプロモーター-Cre マウスを用いた骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスを作成し、 μ CT および骨形態計測により静的動的パラメーターの解析を行う。

d) 間葉系幹細胞における SIRT7 の役割について

Sirt7 KO マウス (P3) の頭頂骨由来間葉系細胞を用いた骨芽細胞分化実験の際、SIRT7 が無いと脂肪細胞への分化が著しく増加することが判明した (未発表)。そこで、*Sirt7* KO マウス由来の骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞と脂肪細胞への分化のスイッチングについて解析する。分子機構の解明として、間葉系幹細胞内の SIRT7 の標的タンパク質をアフィニティークラムにより網羅的に取得後、候補因子の SIRT7 による脱アシル化反応の解析を行っていく。

4. 研究成果

骨形態計測の結果、骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスにおいても骨形成が低下していたが、破骨細胞数に変化はなかったことから、SIRT7 は骨芽細胞の分化に重要な核内因子であることが明らかとなった。興味深いことに、大腿骨における *Sirt1* の発現は加齢で変化しないが、*Sirt7* の発現は老齢 (2 年) マウスで顕著に低下していた。

Sirt7 KO マウス初代骨芽細胞では OSX の転写活性化能が 8 割も減少していること、OSX が SIRT7 の酵素活性部位に結合すること、さらに *Sirt7* ノックダウン (KD) MC3T3-E1 細胞において減少した OSX の転写活性化能が野生型 SIRT7 の過剰発現で回復されるが、酵素活性のない点変異 SIRT7 (H188Y) では改善されないことから、SIRT7 の酵素活性が OSX の転写活性化能に重要であることが明らかとなった。

OSX は N 末端側に転写活性化ドメインが、C 末端側に zinc-finger ドメインがあり、過去の報告では C 末端側の欠失により N 末端側の転写活性化が引き起こされることが示されている。SIRT7 は C 末端側に結合することが判明したので、C 末端側に存在する 10 個のリジン残基 (K) をそれぞれアルギニン (R) に置換した点変異体を用いて転写活性を調べたところ、368 番目リジンの翻訳後修飾が自身の転写活性を低下させることが明らかとなった。OSX (K368R) の転写活性は *Sirt7* の KD により低下しないこと (図 2) また、*Sirt7* KD MC3T3-E1 細胞で激減した石灰化は OSX (K368R) の過剰発現により回復することから (図 3)、SIRT7 は OSX の C 末端側にある 368 番目リジンのアシル化修飾を取り除くことで OSX の N 末端側の転写活性化能を増加させることが明らかとなった。

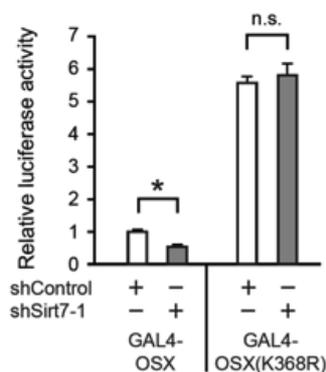


図 2 : OSX(K368R) を用いたルシフェラーゼアッセイ

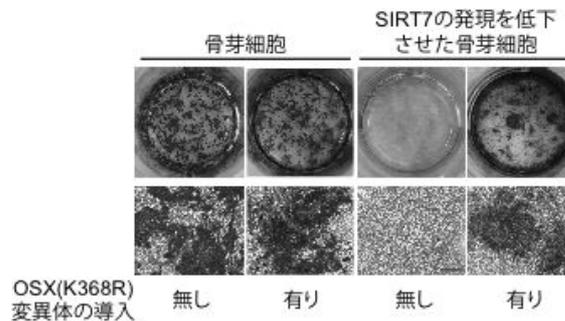


図 3 : SIRT7 が骨芽細胞の分化および石灰化能に及ぼす影響

次に、SIRT7 が OSX のどの様なアシル基を取り除くのかを検討した。野生型と *Sirt7* KO マウスの初代培養骨芽細胞や頭蓋骨から内在性 OSX を免疫沈降してアセチル化状態を調べたが、変化は認められなかった。しかし我々は、*Sirt7* KO マウスでは OSX のプロピオニル化が亢進していることを突き止めた。実際に、過剰発現した SIRT7 が OSX を脱プロピオニル化するが、SIRT7 (H188Y) ではしないことを証明した。詳細な質量分析と点変異体を用いたウェスタン

プロットの結果、プロピオニル化していた主なリジンは N 末端側にある 41 と 45 番目であることが判明した。残念ながら、SIRT7 の標的である 368 番目リジンの修飾は、その部分を含むペプチド自体が複数回の質量分析でも検出できなかったため、明らかにすることはできなかった。しかし、OSX (K368R) では OSX のプロピオニル化が激減すること、また、SIRT7 は OSX (K368R) のプロピオニル化をさらに減少させることができないことから、SIRT7 は OSX の 368 番目リジンの何かしらのアシル化修飾を取り除くことで OSX の N 末端側の脱プロピオニル化を促進させることが明らかとなった。さらに、高プロピオニル化状態の OSX タンパク質を直接細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行なった結果、低プロピオニル化 OSX に比べて転写活性が低いことが明らかとなった。最後に、SIRT1 が OSX の N 末端側に結合して脱プロピオニル化すること、また、SIRT7 と SIRT1 が協調的に働いて OSX の脱プロピオニル化および転写の活性化を行うことが明らかとなった (図 4)。

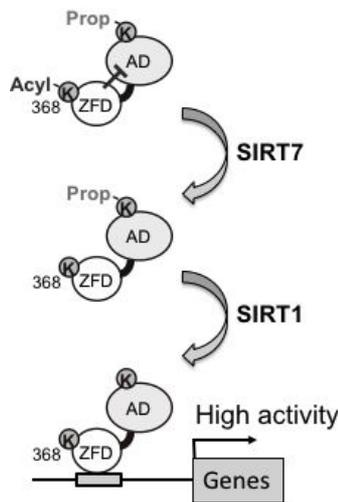


図 4 : SIRT7 と SIRT1 による OSX 転写活性化機構のモデル

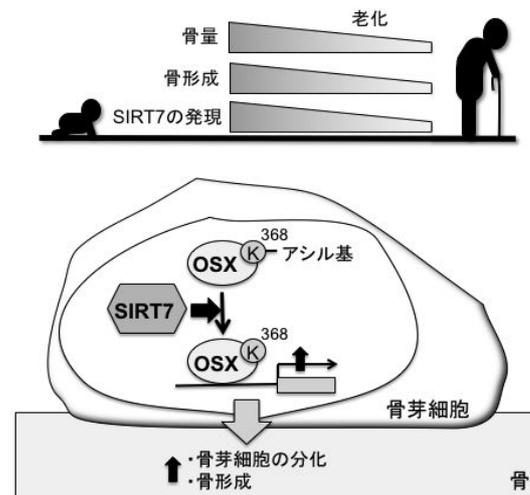


図 5 : SIRT7 による骨形成制御のメカニズム

以上の結果から、骨芽細胞における SIRT7 は、OSX の脱プロピオニル化を促進することで転写活性化能を正に調節し、骨芽細胞分化を正常に維持する重要な核内因子であることが明らかとなった。老化した場合など SIRT7 が十分に働かない状況では、Osterix の転写活性が低いために骨芽細胞が骨を作ることが損なわれ、骨形成低下に伴う骨粗鬆症が引き起こされると考えられた (図 5)。この結果は、本研究課題の目的である「新たな骨代謝制御因子としての SIRT7 の分子機構の解明」を果たし、以下の論文に掲載された。さらに、我々は骨芽細胞特異的 Sirt7 KO マウスを解析中に、骨組織における SIRT7 が糖代謝や腫瘍の発生に関与している可能性を新発見した (未発表)。また、上記 a) の解析において、我々はいよいよ SIRT7 の真の酵素活性を発見した (未発表)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Fukuda, M.*, **Yoshizawa, T.*#**, Karim, MF.*, Sobuz, SU., Korogi, W., Kobayasi, D., Okanishi, H., Tasaki, M., Ono, K., Sawa, T., Sato, Y., Chirifu, M., Masuda, T., Nakamura, T., Tanoue, H., Nakashima, K., Kobashigawa, Y., Morioka, H., Bober, E., Ohtsuki, S., Yamagata, Y., Ando, Y., Oike, Y., Araki, N., Takeda, S., Mizuta, H., Yamagata, K.:

SIRT7 has a critical role in bone formation by regulating lysine acylation of SP7/Osterix.

Nat. Commun. 9: 2833, 2018. (*共同第一著者 #責任著者)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 吉澤達也、山縣和也：脱アシル化酵素 SIRT7 によるエネルギー代謝制御

第 72 回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム(2018)

2) 吉澤達也、山縣和也：サーチュインによる骨代謝制御

日本薬学会第 138 年会 シンポジウム(2018)

3) 吉澤達也、山縣和也：SIRT7 による多様な代謝制御

ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会 合同大会) ワークシ

ヨ ッ プ (2017)

〔 図 書 〕 (計 0 件)

〔 産 業 財 産 権 〕

出 願 状 況 (計 0 件)

取 得 状 況 (計 0 件)

〔 その他 〕

ホ ー ム ペ ー ジ 等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/biochem2/biochem2.html>

6 . 研 究 組 織

(1) 研 究 分 担 者

研 究 分 担 者 氏 名 :

ロ ー マ 字 氏 名 :

所 属 研 究 機 関 名 :

部 局 名 :

職 名 :

研 究 者 番 号 (8 桁) :

(2) 研 究 協 力 者

研 究 協 力 者 氏 名 :

ロ ー マ 字 氏 名 :

科 研 費 に よ る 研 究 は、 研 究 者 の 自 覚 と 責 任 に お い て 実 施 す る も の で す。 そ の た め、 研 究 の 実 施 や 研 究 成 果 の 公 表 等 に つ い て は、 国 の 要 請 等 に 基 づ く も の で は な く、 そ の 研 究 成 果 に 関 す る 見 解 や 責 任 は、 研 究 者 個 人 に 帰 属 さ れ ま す。