

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03711

研究課題名（和文）SIRT7の多面的代謝作用の解明およびその制御法の開発

研究課題名（英文）Identification of the metabolic roles of SIRT7 and the development of its regulation.

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：サーチュイン（SIRT1-SIRT7）は様々な生物活性を示すが、SIRT7の働きについては不明な点が多い。本研究の結果、SIRT7は転写因子PPAR α を脱アセチル化することで脂肪細胞内の脂肪合成を促進する作用を有すること（脂質代謝制御作用）、また、SIRT7は低分子量GTPase結合タンパク質であるRanを脱アセチル化することで転写因子NF- κ Bの核内量を増加させ、炎症反応促進的に作用すること（炎症反応制御作用）が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や炎症反応を制御する新たな方法の開発は、現在社会における重要な医学的課題である。本研究の結果、SIRT7の阻害が肥満や炎症反応を減弱させることが判明した。SIRT7阻害剤の開発が、種々の疾患の治療法開発につながる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Sirtuins (SIRT1-SIRT7 in mammals) are NAD-dependent lysine deacetylase/deacylase that regulate diverse biological processes. However, the biological function of SIRT7 is largely unknown. In the present study, we identified that SIRT7 controls lipogenesis in adipocytes through the deacetylation of transcription factor PPAR α . We also identified that SIRT7 regulates the nuclear accumulation of NF- κ B by deacetylating Ran, a small GTPase Ras related nuclear antigen. These results indicate that SIRT7 plays important roles in lipid metabolism and inflammation.

研究分野：代謝学

キーワード：サーチュイン SIRT7 脂肪細胞 炎症

1. 研究開始当初の背景

サーチュインは NAD 依存性の脱アセチル・アシル化酵素である。哺乳類においては SIRT1-7 の 7 種類が存在するが、SIRT7 の働きについては不明な点が多い。申請者は、生体内における SIRT7 の役割について研究をすすめており、(1) SIRT7 は Cul4B E3 ユビキチン複合体の構成成分である DDB1 を脱アセチル化することでユビキチン・プロテアソーム複合体の活性を抑制しており、SIRT7 ノックアウト (KO) マウスの肝臓では、脂肪蓄積促進的に働く転写因子 TR4 の発現が低下するため脂肪肝発症が抑制されること (肝脂質代謝制御作用) (Cell Metabolism 2014) (2) SIRT7 は転写因子 Osterix を脱アシル化することで骨代謝を制御しており、SIRT7 KO マウス骨組織では、骨量が低下すること (骨代謝制御作用) (Nat. Commun 2018) (3) SIRT7 KO マウスの腎臓や心臓では炎症のマスターレギュレーターである転写因子 NFκB の核内発現量が低下するため、炎症性サイトカインの発現が低下すること (炎症制御作用) (Circulation 2015, Sci Rep 2018) などを明らかにしたが、その他の臓器における SIRT7 の働きは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 白色脂肪組織 (WAT) および褐色脂肪組織 (BAT) における SIRT7 の働きとその分子メカニズムの解明、(2) SIRT7 による炎症制御の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪組織における SIRT7 の役割とその分子メカニズムの解明

脂肪細胞における SIRT7 標的タンパク質の同定: SIRT7 と PPAR γ の結合についてプルダウン法および免疫沈降法で検討を行った。GAL4-DNA binding domain (GAL4-DBD) と PPAR γ の融合タンパク質を作製し、SIRT7 との結合領域について検討を行った。結合領域に含まれるリシン残基をアルギニンに変異した PPAR γ を作製し、SIRT7 による脱アセチル化を受けるアミノ酸について検討を行った。

変異体 PPAR γ の機能解析: C3H10T1/2 細胞にレトロウイルスを用いて WT-PPAR γ 、K382R-PPAR γ 、K382Q-PPAR γ を発現後、脂肪細胞に分化させた。RNA-seq により脂肪細胞発現遺伝子について検討した。

変異体 PPAR γ 転写活性の検討: HEK293T 細胞に pBIND-PPAR γ LBD (WT, K382R, K382Q) と pG5luc を遺伝子導入した後、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性について検討した。

脂肪細胞特異的 SIRT7 ノックアウト (KO) マウスの解析: SIRT7 flox/flox マウスと adiponectin-Cre トランスジェニックマウスを交配し、脂肪細胞特異的 SIRT7 KO マウス (Adipo SIRT7 KO マウス) を作製した。Adipo SIRT7 KO マウスの体温および BAT における UCP1 の発現について検討を行った。

(2) SIRT7 による炎症反応制御機構の解明

SIRT7 による Ran の脱アセチル化部位の同定: SIRT7 と Ran の結合についてプルダウン法および免疫沈降法で検討を行った。GAL4-DBD と Ran の融合タンパク質を作製し、SIRT7 が結合する領域について検討を行った。結合領域に含まれるリシン残基をアルギニンに変異した Ran を作製し、SIRT7 による脱アセチル化を受けるアミノ酸の検討を行った。

SIRT7 欠損が NFκB-p65 の細胞内局在に及ぼす影響の検討: 野生型 (WT) および SIRT7 KO マウスから fibroblast を単離し、LPS 刺激後、p65 の細胞内局在について western blot 解析および免疫染色法で検討した。

Ran 変異体が p65 細胞内局在に及ぼす影響の検討: WT および SIRT7 KO マウスから fibroblast を単離し、GFP-p65、pmCherry-WT-Ran、pmCherry-K37R-Ran および pmCherry-K37Q-Ran を遺伝子導入した。LPS 刺激後、GFP-p65 の細胞内局在について検討を行った。

SIRT7 が NFκB-p65-CRM1-Ran 複合体形成に及ぼす影響の検討: HEK293T 細胞に HA-WT-Ran、HA-K37R-Ran、HA-K37Q-Ran 遺伝子と FLAG-CRM1 遺伝子を導入し、Ran 変異体が CRM1 や p65 との結合に及ぼす影響について免疫沈降法で検討を行った。

4. 研究成果

(1) WAT における SIRT7 の役割とその分子メカニズムの解明

PPAR γ は脂肪細胞の分化や機能に必須の転写因子である。プルダウンアッセイと免疫沈降法による検討の結果、SIRT7 は PPAR γ と結合し、PPAR γ を脱アセチル化することが明らかになった。種々の PPAR γ deletion 変異体を用いた検討の結果、SIRT7 は PPAR γ (351-440) の領域に結

合することが判明した。同領域には K364, K382, K386, K395, K401, K432 の 6 種類のリシン残基が存在したため、K364R, K382R, K386R, K395R, K401R, K432R 変異体を作製し、SIRT7 による脱アセチル化について検討した。その結果、K382R-PPAR γ は SIRT7 によりアセチル化の低下が認められず、K382 が SIRT7 により脱アセチル化されるリシン残基であることが判明した。

K382 の脱アセチル化が PPAR γ 機能に及ぼす影響について検討するため、C3H10T1/2 脂肪細胞にレトロウイルスベクターを用いて K382R-PPAR γ および K382Q-PPAR γ を発現させたところ、K382Q-PPAR γ 発現脂肪細胞では、脂肪酸合成に重要な *Fasn*, *Acaca*, *Scd1*, *Srebp1c* などの遺伝子発現が低下すると共に細胞内の脂肪蓄積量が減少することが判明した。これら結果から、SIRT7 は PPAR γ を脱アセチル化することで脂肪合成に係わる遺伝子の発現を上昇させ、脂肪細胞内の脂質蓄積量を増加させる作用をもつことが明らかになった (図 1)。

PPAR γ -LBD (K382Q)のルシフェラーゼ活性は PPAR γ -LBD (K382R)に比して低下しており、K382 の脱アセチル化は PPAR γ の転写活性を増加させることで、脂肪合成に関わる遺伝子の発現上昇を引き起こすことが明らかになった (Akter F. J Diabetes Investig 2021)。

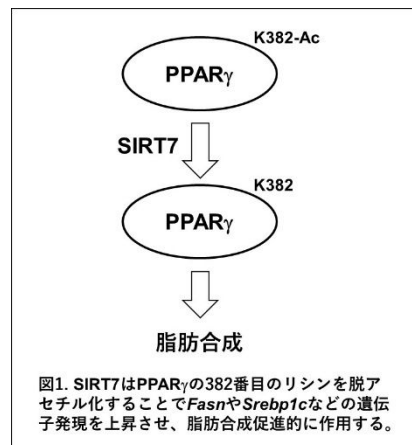


図1. SIRT7はPPAR γ の382番目のリシンを脱アセチル化することで*Fasn*や*Srebp1c*などの遺伝子発現を上昇させ、脂肪合成促進的に作用する。

(2) BATにおけるSIRT7の役割とその分子メカニズムの解明

Adiponectin-Cre トランスジェニックマウスを用いて、脂肪細胞特異的 SIRT7 KO マウスを作製した。同マウスは体温がコントロールに比して高く、エネルギー代謝が亢進していることが判明した。UCP1 は BAT における熱産生を制御する脱共役タンパク質である。脂肪細胞特異的 SIRT7 KO マウスでは、UCP1 の遺伝子発現はコントロールと比して同程度であったが、UCP1 タンパク質の発現が著明に増加しており、SIRT7 は UCP1 の発現を翻訳レベルで制御していることが明らかになった (投稿論文リバイス中)。

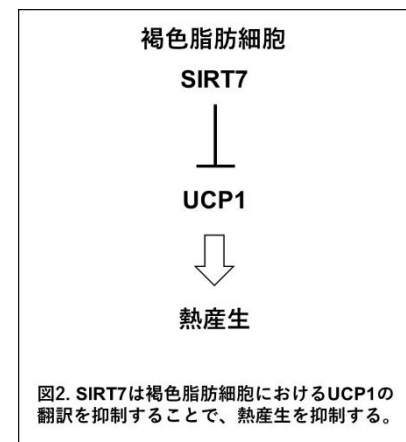


図2. SIRT7は褐色脂肪細胞におけるUCP1の翻訳を抑制することで、熱産生を抑制する。

(3) SIRT7による炎症反応制御機構の解明

転写因子 NF κ B は炎症反応のマスターレギュレーターである。通常 NF κ B p65 は I κ B α と結合し細胞質に存在しているが、細胞に炎症刺激が入ると I κ B α がリン酸化され分解することで p65 が細胞質から核に移動する。核内における p65 は *Tnfa* や *Nfkb1a* (I κ B α をコードする) の遺伝子発現を増加させるが、I κ B α と p65 が結合すると、両分子は核外輸送分子である Ran および CRM1 と複合体を形成することで核から細胞質に輸送され、NF κ B による炎症反応が終了することが知られている。

SIRT7 KO マウスの腎臓や心臓では、炎症刺激に対するサイトカインの産生が低下しており、NF κ B-p65 の核内発現量が低下しているが、その分子機構は不明であった。最近、低分子量 GTPase である Ran が SIRT7 と結合することが報告された (Lee N. Proteomics 2014)。そこで SIRT7 が Ran と結合し、Ran を脱アセチル化することで p65 の細胞内局在を制御している可能性について検討した。

プルダウンアッセイと免疫沈降法により SIRT7 と Ran の結合が確認され、SIRT7 が Ran を脱アセチル化することが明らかになった。種々の Ran deletion 変異体を用いた検討の結果、SIRT7 は Ran (1-69)に結合することが判明した。同領域には K37 および K60 の 2 種類のリシン残基が存在したため、K37R, K60R,変異体を作製し、SIRT7 による脱アセチル化の有無について検討した。HEK293T 細胞に WT-Ran, K37R-Ran K60R-Ran を遺伝子導入したところ、WT と K60R 変異体では Ran のアセチル化レベルに変化がなく、K37R 変異体では Ran のアセチル化レベルの低下が認められた。また SIRT7 の発現により K37R-Ran のアセチル化レベルの低下は認められず、K37 が SIRT7 により脱アセチル化される標的残基であることが判明した。

WT および SIRT7 KO マウスから fibroblast を単離し、LPS 刺激後、p65 の細胞内局在について western blot 解析で検討したところ、p65 の細胞質から核内への移行については両細胞で差を認めなかった。一方、LPS 刺激後、培養液から LPS を除去し、p65 の細胞質への移行について検討したところ、SIRT7 KO fibroblast では p65 の細胞質以降が亢進していることが判明した。

次に WT および SIRT7 KO fibroblast に GFP-p65 および pmCherry-WT-Ran、pmCherry-K37R-Ran、pmCherry-K37Q-Ran を遺伝子導入し、LPS 刺激後、GFP-p65 の細胞内局在について検討を行った。その結果、WT fibroblast に K37Q-Ran を発現させた場合、p65 の核外移行が促進すること、SIRT7 KO fibroblast に K37R-Ran を発現させた場合、p65 の核内蓄積が増加することが判明した。これら結果から、SIRT7 が Ran を脱アセチル化した場合、p65 の核内蓄積が増加すること、Ran の K37 がアセチル化している場合には、p65 の核外移行が亢進することが明らかになった。

Ran のアセチル化が p65 の細胞内局在を制御する分子メカニズムを解明するため、Ran 変異体と CRM1 の結合について免疫沈降法で検討した。その結果、K37Q-Ran と CRM1 の結合は K37R-Ran に比して強いことが判明した。Ran-CRM1 複合体は、I κ B α および p65 と結合し、p65 を核外輸送する。K37Q-Ran は K37R-Ran と比べ、p65 との結合が強いことも明らかになった。以上の結果から、K37Q-Ran(アセチル化 Ran を模倣)は CRM1-I κ B α -p65 と強く結合することで p65 の核外輸送を促進すると考えられた(図3)。

以上の研究結果から、SIRT7 は炎症反応や脂肪細胞における脂質代謝を制御するという新たな役割を有することが判明した。

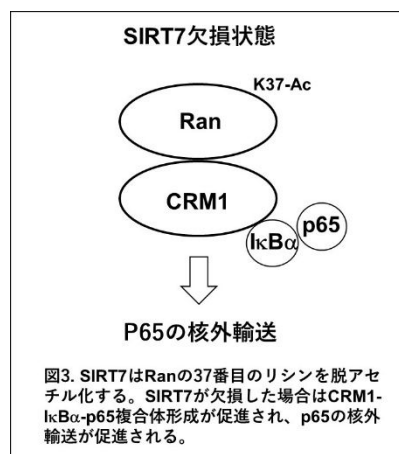


図3. SIRT7はRanの37番目のリシンを脱アセチル化する。SIRT7が欠損した場合はCRM1-I κ B α -p65複合体形成が促進され、p65の核外輸送が促進される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

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 b-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, Takeo T 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 Akter F, Tsuyama T, Yoshizawa T, Sobuz SU, Yamagata K	4. 巻 10
2. 論文標題 SIRT7 regulates lipogenesis in adipocytes through deacetylation of PPARγ2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Invest	6. 最初と最後の頁 1765-1774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13567	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 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 NFκB p65 by deacetylating Ran.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BBA - Mol Cell Res	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) 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 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 85
2. 論文標題 Sirt7 Deficiency Attenuates Neointimal Formation Following Vascular Injury by Modulating Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 2232-2240
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 該当する

1. 著者名 Daikuzono H, Yamazaki M, Sato Y, Takahashi T, Yamagata K	4. 巻 578
2. 論文標題 Development of a DELFIA method to detect oncofetal antigen ROR1-positive exosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 170-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.054.	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 5件 / うち国際学会 2件)

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 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 SIRT7による加齢関連疾患の発症制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学大学院生命科学研究部病態生化学講座 https://www.kumamoto-medbiochem.com/</p>

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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐藤 叔史 (Sato Yosifumi) (90622598)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (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			
ドイツ	Max-Planck-Institute			