

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790637

研究課題名（和文） 視床下部におけるSIRT1のエネルギー代謝制御機構の解明

研究課題名（英文） Investigation into the role of hypothalamic SIRT1 in regulating energy metabolism.

研究代表者

佐々木 努 (SASAKI TSUTOMU)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：50466687

研究成果の概要（和文）： NAD<sup>+</sup>依存性のタンパク脱アセチル化酵素であるSirt1は、インスリン感受性・代謝を制御することが報告されていたが、中枢性代謝制御への役割は未解明だった。そこで、Sirt1が視床下部で食欲を調節するか検討した。その結果、Sirt1は視床下部で摂食行動を制御する部位に発現しており、食事性の調節を受けることが分かった。また、視床下部内側基底部でのSirt1の強制発現が食欲を亢進させる神経ペプチドAgRPの発現を抑制し、食欲と体重増加を抑制することが分かった。

研究成果の概要（英文）： Sirt1 links the energy availability status with cellular metabolism in peripheral organs. Insulin and leptin signaling regulate food intake in the arcuate nucleus of the hypothalamus. Sirt1 has been reported to improve insulin sensitivity *in vitro*, but the role of hypothalamic Sirt1 in regulating feeding has not been addressed. We found that hypothalamic Sirt1 protein level and stability is regulated by food intake. Forced expression of wild-type Sirt1 in the mediobasal hypothalamus suppressed hyperphagia and weight gain by suppressing the expression of the orexigenic neuropeptide AgRP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内分泌・代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：SIRT1、視床下部、食欲

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの中枢性機構は未解明な点が多いが、最近、インスリンおよびレプチンシグナルの FoxO1 と Stat3 を

介した摂食行動調節メカニズムが解明された。近年、メタボリズム制御と老化・寿命制御の結びつきが指摘されており、カロリー制限により実験動物でエネルギー代謝の改善

を伴う寿命延長が見られることは注目に値する。この効果は下等動物の SIRT1 ホモログ Sir2 依存性である。FoxO1 を基質とする SIRT1 は、肝・膵・骨格筋・脂肪に作用してエネルギー代謝を調節することが知られているが、中枢神経系におけるエネルギー代謝制御への役割は未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、SIRT1 の視床下部におけるエネルギー代謝制御への役割を解明することを目的とする。具体的には、Sirt1 および FoxO1 アデノウイルスの視床下部の特定核への投与、および視床下部における FoxO1 遺伝子改変マウスを用いることによって、Sirt1-FoxO1 の機能的関係が与えるエネルギー代謝制御への影響を調べる。FoxO1 と Sirt1 を視床下部特異的に操作することで中枢性エネルギー代謝制御機構における Sirt1 と FoxO1 の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

[1] 組織蛍光免疫染色を用いた、視床下部 Pomc, Agrp ニューロンにおける Sirt1 発現確認。

[2] ウェスタンブロット法と定量性 RT-PCR 法による視床下部 SIRT1 の食事性変化の検討。

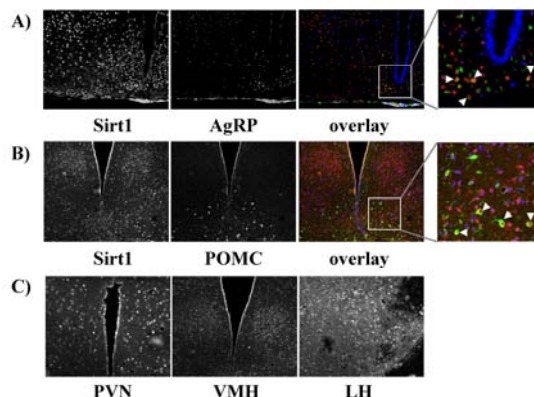
[3] 視床下部培養細胞 N41 および視床下部サンプルによる、免疫沈降法およびウェスタンブロット法による視床下部 SIRT1 タンパク制御メカニズムの検討。

[4] 視床下部内側基底部分へのアデノウイルスのマイクロインジェクション法による視床下部 Sirt1 の摂食行動への影響の解析

[5] 定量性 RT-PCR 法およびデュアルルシフェラーゼアッセイ法による、Sirt1 による *Agrp*, *Pomc* プロモーター活性制御メカニズムの解析

## 4. 研究成果

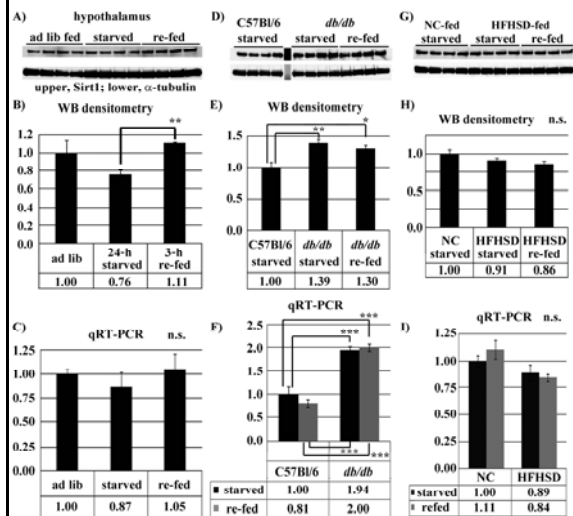
[1] 食欲調節に關与する視床下部神経核



Pomc, Agrp ニューロンを含む) に Sirt1 は発現している。

組織蛍光免疫染色を用いた、視床下部 Pomc, Agrp ニューロンにおける Sirt1 発現確認を行ったところ、食欲制御に重要な視床下部神経核 (弓状核の AgRP 陽性神経細胞 (A) および POMC 陽性神経細胞 (B)、そして室傍核 (PVN)、腹内側核 (VMH)、視床下部外側野 (LH) (C)) で Sirt1 が発現していることを確認した。

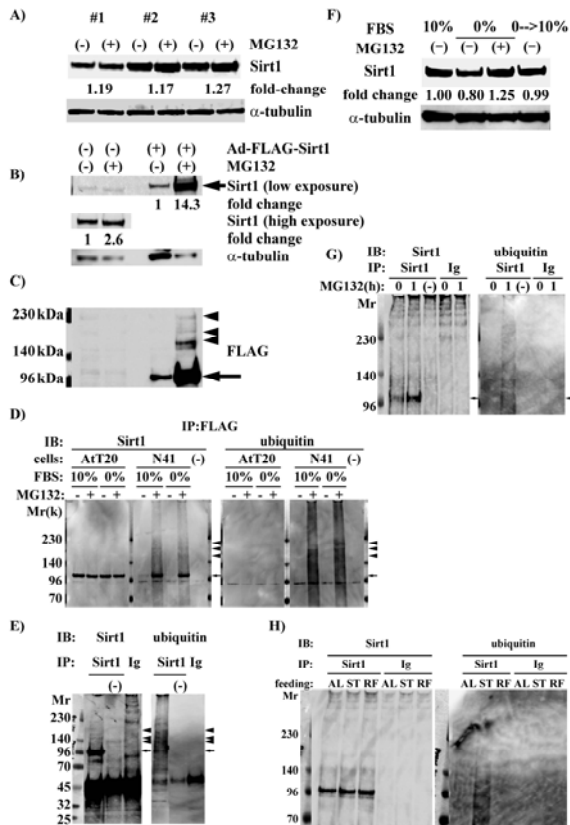
[2] 視床下部 SIRT1 は摂食により増加するが、この機構は食事性肥満および肥満モデルマウス *db/db* では破たんしている。



任意摂食 (ad lib fed)、24 時間絶食 (starved)、および絶食後の 3 時間再摂食 (re-fed) マウスの視床下部サンプルで Sirt1 発現レベルを検討した。その結果、視床下部 Sirt1 はタンパクレベルで摂食により増えることが判明した (A-C)。このような制御機構は肥満モデルマウス *db/db* (D-F) や食事性肥満マウス (G-I) では破たんしていることが分かった。

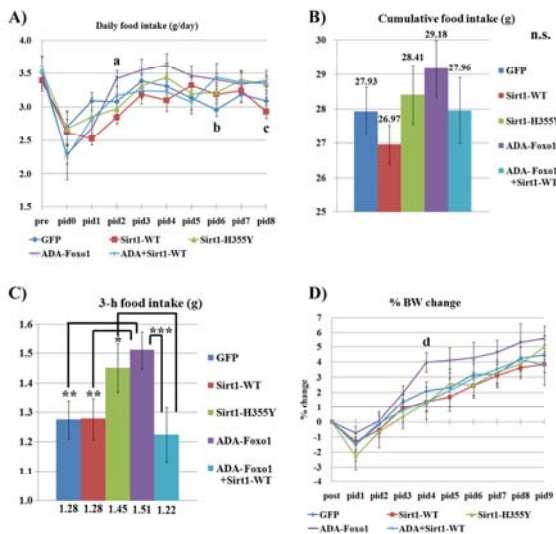
[3] 視床下部 Sirt1 タンパクはプロテアソームおよびユビキチン化による制御を受ける。

視床下部 Sirt1 がタンパクレベルで食事性の制御を受けることが分かったため、その制御メカニズムを検討するために、まず視床下部培養細胞 N41 を用いて実験を行った。その結果、Sirt1 は N41 細胞においてプロテアソームおよびユビキチン化による制御を受けていることが分かった (A-F)。また、プロテアソーム阻害薬 MG132 の髄中実験にて、視床下部 Sirt1 タンパクも食事性にユビキチン化を受けることを解明した (G, H)。



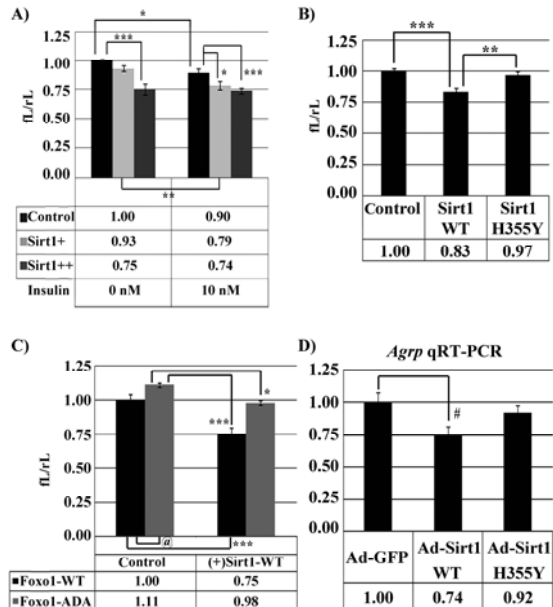
[4] 視床下部内側基底部における Sirt1 強制発現は、核内滞留型 Foxo1 によって惹起される過食および肥満を改善する。

視床下部 Sirt1 タンパクの食事性制御機構を解明した後、視床下部内側基底部へのアデノウイルスのマイクロインジェクション法を用いて視床下部 Sirt1 の摂食行動への影響を検討した。その結果、視床下部 Sirt1 の過剰発現により絶食後の再摂食量および体重増加が抑制されることが分かった。

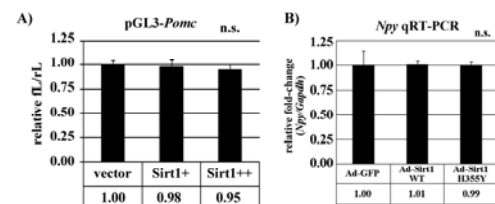


[5] Sirt1 は摂食促進性神経ペプチド AgRP の発現を抑制する。

視床下部 Sirt1 の強制発現による摂食抑制効果の分子メカニズムを検討するために、定量性 RT-PCR 法およびデュアルルシフェラーゼアッセイ法による、Sirt1 による *AgRP*, *Pomc* プロモーター活性制御メカニズムの解析をおこなった。その結果、Sirt1 は AgRP 発現を抑制することが分かった (A-D)。



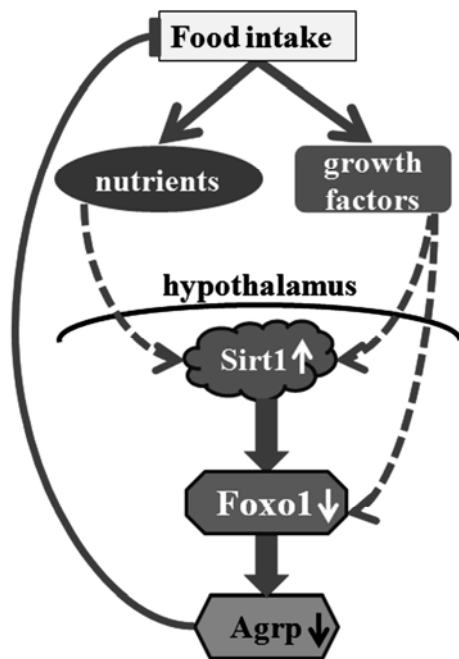
なお、Sirt1 は他の摂食促進性神経ペプチドである *Npy* の発現や摂食抑制性神経ペプチドの前駆産物である POMC の発現には影響を与えなかった (A-B)。



### [考察]

本研究課題では、視床下部 Sirt1 が食事性にタンパクレベルでの制御を受けること、および Sirt1 が摂食促進性の神経ペプチドの発現を抑え、その結果摂食を抑制する方向に働くことを解明した。

これらの結果から、以下のようなモデルが提唱できると考える。すなわち、摂食に伴い栄養素もしくは末梢の栄養状態を反映するホルモンが視床下部弓状核の AgRP 神経細胞に作用し、Sirt1 タンパクの増加・安定がおこり、その結果として AgRP 発現が抑制され摂食をやめるというフィードバック機構が存在すると考えられる。



## 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1件)

① 佐々木努、金恵珍、小林雅樹、北村ゆかり、橋本(横田)博美、志内哲也、箕越靖彦、北村忠弘、Induction of Hypothalamic Sirt1 Leads to Cessation of Feeding via AgRP、Endocrinology、査読有り、in press (2010)。

〔学会発表〕(計3件)

① 佐々木努、Induction of Hypothalamic Sirt1 Leads to Cessation of Feeding via AgRP、第14回国際内分泌学会、2010.3.30、京都国際会館(京都府)

② 佐々木努、Sirt1の視床下部における摂食行動・エネルギー代謝制御機構の解明、第30回日本肥満学会、2009.10.9、アクトシティ浜松(静岡県)

③ 佐々木努、Sirt1の視床下部における摂食行動・エネルギー代謝制御機構の解明、第82回日本内分泌学会、2009.4.23、前橋商工会議所(群馬県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 努 (SASAKI TSUTOMU)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：50466687