

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791026
研究課題名（和文） ミトコンドリアSIRT5タンパクの機能と肝臓・骨格筋における代謝機能連関
研究課題名（英文） Function of mitochondrial SIRT5 protein and metabolic interaction between liver and skeletal muscle
研究代表者 中村 靖彦 (NAKAMURA YASUHIKO) 京都大学 医学研究科 助教 研究者番号：10375256

研究成果の概要（和文）：

寿命関連タンパクであるミトコンドリア SIRT5 の基質タンパクとして二次元電気泳動により同定された urate oxidase (UOX) の活性調節機構を、SIRT5 を全身に過剰発現を行うトランスジェニックマウスを用い明らかにした。その結果、UOX と SIRT5 が直接相互作用することにより UOX が SIRT5 によって脱アセチル化され、活性が上昇することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We identified urate oxidase (UOX) as a target of SIRT5 by using two-dimensional electrophoresis. Acetylation levels of UOX in liver of SIRT5 Tg mice were approximately half of those in wild-type mice, and UOX activity was significantly increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：ミトコンドリア、細胞、老化、肝臓、マウス、サーチュイン、核酸代謝

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類においてカロリー制限により寿命が延長することが 1930 年代より知られていたが、昨年になり霊長類においてもカロリー制限が、耐糖能障害、悪性新生物、心血管障害、脳委縮症など加齢に伴う疾患の発症リスクを低下させ、これらの疾患による死亡率を低下させるという報告がなされた。カロリー制限による寿命延長の哺乳類におけるメカニズムは未だ不明であるが、その一つとして酵母において寿命調節に重要とされる NAD 依存性のヒストン脱アセチル化酵素“SIR2”の哺乳類ホモログである SIRT ファミリーに注目が集まっている。SIRT ファミリーは SIR2 同様、NAD 依存性のタンパク脱アセチル化酵素活性を持ち、摂取エネルギーの低下を NAD/NADH 比の上昇として感知することで、代謝センサーと

して働く一方、SIR2 のホモログであることから、寿命を調節する機能を有することも考えられ、栄養と寿命とを結びつける分子として重要な役割を果たすことが期待されている。

SIRT ファミリーは SIRT1 から SIRT7 の 7 種類からなり、SIRT3、SIRT4、SIRT5 はミトコンドリアに局在する。ミトコンドリアはクエン酸回路、β酸化や酸化的リン酸化といったエネルギー生合成に関わる重要な代謝が行われる細胞内小器官であることから、ミトコンドリア SIRT が代謝調節機能を有していることが期待される。申請者はこれまでに SIRT3、SIRT4、SIRT5 がそれぞれ内膜、マトリックス、膜間スペースに存在することを明らかにした。さらに SIRT3 は SIRT5 共存化で存在が核に移ることを発見し、SIRT3 がミトコンドリアのみならず核においても機能し

うることを見出した。また、これらミトコンドリア SIRT のうち、SIRT3 は Acetyl-CoA synthetase 2 や isocitrate dehydrogenase 2 を脱アセチル化し活性を調節することが、SIRT4 は膵 β 細胞において glutamate dehydrogenase 活性を抑制し、インスリン分泌を低下させることが既に報告されている。

その一方、SIRT5 はこれまで標的となるタンパクが同定されておらず、その機能は長い期間不明であった。これに対し申請者らは全身に SIRT5 を過剰に発現するトランスジェニックマウス (SIRT5 Tg マウス) を作製し、その解析を通じて SIRT5 が肝臓において尿素回路の重要な酵素である carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) を脱アセチル化し、活性化することを明らかにした。尿素回路は絶食時に、主として筋肉のタンパクより供給されるアミノ酸をエネルギー源として用いた際に、生じるアンモニアの解毒を行う回路である。申請者らは SIRT5 Tg マウスの肝細胞において尿素合成も亢進することを明らかにした。このことから、SIRT5 は絶食時に CPS1 の脱アセチル化と活性化を通してアンモニア解毒に寄与することが解明された。これらのことから SIRT5 は肝臓において絶食時の生体の恒常性維持に関わると考えられた。

2. 研究の目的

更なる SIRT5 の機能を明らかにするために、野生型マウスと SIRT5 Tg マウスの肝臓からミトコンドリアタンパクを抽出し、2次元電気泳動法を用いた解析を行うことにより、SIRT5 の新規基質タンパクとして、プリンヌクレオチド代謝系に属する urate oxidase (UOX) を同定した。このことは SIRT5 が生体においてアンモニア解毒以外にプリンヌクレオチド代謝に関与することを示唆している。肝臓において UOX が SIRT5 の基質タンパクであることを確認し、絶食時における SIRT5 による UOX 活性の調節機構および個体レベルにおける機能の解明を目的とした。

また骨格筋において、肝臓と同様、絶食時に SIRT5 の発現量が上昇していることを申請者は明らかにしている。すでに SIRT5 の基質として明らかになっている CPS1 は絶食時に崩壊した筋肉から放出されたアミノ酸の代謝、UOX はプリンヌクレオチドの代謝に関与することが推測でき、肝臓と骨格筋の間に SIRT5 を介した強い機能連関があることが推測できる。これらのことから、骨格筋における SIRT5 の基質となるタンパクを同定し、その機能を解析することによって、肝臓・骨格筋間の機能連関を明らかにすることも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

UOX が SIRT5 の基質タンパクであることを

すでに同定している。UOX はこれまでにミトコンドリアとペルオキシソームに局在することが報告されていることから密度勾配遠心によりミトコンドリアとペルオキシソームを分離することにより、UOX の明確な細胞内局在を明らかにする。また、本研究では SIRT5 による UOX の脱アセチル化に依存した UOX 活性の変化、栄養状態に依存した調節機構の解明を行う。また、骨格筋において、肝臓と同様に絶食時に SIRT5 の発現量が上昇することを明らかにしている。肝臓における SIRT5 の基質である CPS1、UOX は共に絶食時に骨格筋から放出されたアミノ酸、プリンヌクレオチドの代謝にかかわることが推測できる。これらのことから絶食時に骨格筋からアミノ酸やプリンヌクレオチドを放出する機構に SIRT5 が関わっていることが十分に想像できる。以上のことから、骨格筋においても SIRT5 の基質となるタンパクを同定し、その機能を以下に示すような研究を行うことにより解明することで肝臓・骨格筋間の機能連関を明らかにする。

具体的には以下の通り研究を行う

(1) UOX のアセチル化、脱アセチル化が肝ミトコンドリアにおいて調節されていることや、野生型マウスにおいて摂食エネルギー量依存的な UOX の脱アセチル化の変化を明らかにする。その上で、UOX のアセチル化に依存した酵素活性の変化と、免疫沈降法による SIRT5 と UOX の直接的な相互作用を明らかにする。

(2) 上記の研究で得られた結果に従い、マウス肝初代培養細胞を用い、培地中のブドウ糖制限時と非制限時を比較し、培地中への尿酸と活性酸素種の放出量の変化を明らかにする。次に、培地中のプリンヌクレオチド量を変化させることによる培地中への尿酸、活性酸素種の放出量の変化を測定する。また、SIRT5 Tg マウスと野生型マウス個体から摘出した肝臓にプリンヌクレオチド溶液を灌流することにより合成された尿酸量と活性酸素種を測定する。

(3) SIRT5 Tg マウスと野生型マウスの骨格筋からミトコンドリアタンパクを抽出し、等電点電気泳動と SDS 電気泳動を組み合わせた 2次元電気泳動により分離を行う。この後、SIRT5 が脱アセチル化酵素であることから抗アセチル化リジン抗体を用いたウエスタンブロットにより、脱アセチル化が亢進したタンパクを検出し、MALDI-TOF-MS を用い同定する。

(4) 骨格筋において同定した SIRT5 基質タンパクのアセチル化依存的な活性の変化を解明すると共に、骨格筋初代培養細胞を用い in vitro でエネルギー状態に応じた SIRT5 基質タンパクの役割を解析する。

4. 研究成果

UOX の細胞内局在がミトコンドリアとするものと、ペルオキシソームとするものの2つの報告がこれまでになされていることから、UOX の細胞内局在を明確にすることをまず行った。マウス肝臓粗ミトコンドリア画分を密度勾配遠心により、ミトコンドリアとペルオキシソームを分離した結果、UOX はミトコンドリアとペルオキシソーム双方に存在することが明らかとなった。次に野生型マウスと SIRT5 過剰発現トランスジェニックマウス (SIRT5 Tg マウス) を用い、UOX のアセチル化レベルを調べたところ、SIRT5 Tg マウスにおいて野生型に比べ有意に低下していることが確認された。また UOX の活性の変化を調べたところ、SIRT5 Tg マウスにおいて活性化されていることが明らかとなった。さらに肝臓ミトコンドリアタンパクを用い、SIRT5 の免疫沈降を行ったところ、UOX が SIRT5 と共に沈降し、UOX と SIRT5 は直接相互作用していることが明らかとなった。

次に SIRT5 の基質タンパクがどこでアセチル化されているのかはこれまでに明らかになっていないことから、UOX を用い、アセチル化される細胞内部位の特定を行った。in vitro で合成した UOX をミトコンドリアまたはサイトゾルと共にインキュベートしたところ、UOX はミトコンドリアと共にインキュベートした時のみアセチル化された。このことから、SIRT5 基質タンパクのアセチル化酵素がミトコンドリアに存在することが推測され、また栄養状態に依存したアセチル化-脱アセチル化のサイクルにより活性を調節する機構が存在することが示唆された。

これらのことから、SIRT5 は UOX を直接脱アセチル化することで活性化させることが解明された。以上の結果より、UOX はプリンヌクレオチド由来の尿酸をアラントインに異化する酵素であることから、絶食時において筋肉中に存在する核酸の分解過程で生じた尿酸を肝臓において速やかに異化し、水溶性の高いアラントインにすることで、排泄を促進する働きを持つことが推測される。

一方、骨格筋における SIRT5 の基質はいまだ同定に至っておらず、今後における研究の課題として残っている。

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4件)

Yasuhiko Nakamura, Masahito Ogura, Kasane Ogura, Daisuke Tanaka, Nobuya Inagaki. SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. FEBS Lett. 586(23):4076-4081, 2012

査読有

DOI:10.1016/j.febslet.2012.10.009

[学会発表] (計2件)

1. 中村 靖彦、小倉 雅仁、小倉 かさね、田中 大祐、稲垣 暢也 マウス肝ミトコンドリアにおける Sirt5 による urate oxidase の脱アセチル化と活性化 第55回日本糖尿病学会(2012年5月、横浜)
2. Yasuhiko Nakamura, Masahito Ogura, Kasane Ogura, Daisuke Tanaka, Nobuya Inagaki SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in mouse liver mitochondria. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the study of Diabetes (November 2012, Kyoto)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 靖彦 (NAKAMURA YASUHIKO)

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号：10375256

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし