

65. サーチュイン (SIRT7) による代謝制御機構の解明

山縣 和也

熊本大学 大学院生命科学研究部 病態生化学分野

Key words : サーチュイン, SIRT7, DDB1, BAT

緒言

サーチュインは NAD 依存性脱アセチル化酵素であり、翻訳後修飾の制御を介して代謝、ストレス応答、老化、発がんなど種々の生命現象に深く関与することが報告されている。哺乳類では7種類のサーチュイン (SIRT1-SIRT7) の存在が知られているが、SIRT7 の働きについては長らく不明であった。近年、SIRT7 がヒストン H3 の 18 番目のリシン選択的な脱アセチル化活性を有しており、がんの発育促進を制御していることが判明した¹⁾。しかし SIRT7 の代謝作用については全く不明であった。我々は SIRT7 のノックアウト (KO) マウスを用いて SIRT7 の代謝作用について検討を行った。その結果、*Sirt7* KO マウスにおいては、高脂肪食により惹起される脂肪肝・肥満・糖尿病などの代謝異常がコントロールに比して軽度であることが判明し、SIRT7 が糖脂質代謝の制御に重要であることが明らかになった²⁾。

SIRT7 による代謝制御メカニズムの検討をすすめる過程で、Cul4B E3 ユビキチン複合体は肝臓脂肪蓄積制御に重要な核内受容体である TR4 の発現量を制御していること、SIRT7 が Cul4B E3 ユビキチン複合体の働きを抑制することを我々は見出した²⁾。*Sirt7* KO マウスにおいては Cul4B E3 ユビキチン複合体の働きが増強しているため TR4 の発現量が低下しており、その標的遺伝子である Cd36 などの遺伝子発現低下が認められる²⁾。しかし SIRT7 が Cul4B E3 ユビキチン複合体の働きを抑制する分子メカニズムは不明である。

また高脂肪食負荷 *SIRT7* KO マウスにおいてはコントロールマウスに比して体温が高く、褐色脂肪組織 (BAT) における脂肪燃焼が増加することでエネルギー代謝が亢進し、肥満になりにくく、耐糖能も良好であった²⁾。しかし SIRT7 による体温制御機構の分子メカニズムは全く不明である。

本研究では SIRT7 による Cul4B E3 ユビキチン複合体制御機構および体温制御機構の解明を行った。

方法

1. SIRT7 による Cul4B E3 ユビキチン複合体制御分子機構の解明

1) SIRT7 結合タンパク質の検索

Cul4B E3 ユビキチン複合体の構成分子である Cul4B、DDB1、DCAF1 のリコンビナントタンパク質を *in vitro* transcription/translation system を用いて合成した。大腸菌を用いて作製した Halo-SIRT7 と Cul4B、DDB1、DCAF1 リコンビナントタンパク質を用いたプルダウン法により SIRT7 とリコンビナントタンパク質の結合について検討を行った。

2) SIRT7 による DDB1 アセチル化の検討

HEK293T 細胞に HA-DDB1 または FLAG-SIRT7 と HA-DDB1 を共発現させ、HA で免疫沈降後、抗アセチル化リシン特異的抗体を用いた western blot を行うことで DDB1 のアセチル化について検討を行った。

2. SIRT7 による BAT 活性制御機構の検討

1) 普通食飼育下における *Sirt7* KO マウスの熱産生

普通食を投与した *Sirt7* KO マウスの体温、エネルギー代謝、BAT における遺伝子発現、タンパク発現について検討を行った。

2) 脂肪細胞特異的 *Sirt7* KO マウスの作製と表現型解析

Adiponectin-Cre Tg マウスと *Sirt7* flox マウスを交配し、脂肪細胞特異的 *Sirt7* KO マウスを作製した。同マウスの体温、BAT における遺伝子発現について検討を行った。

結 果

1. SIRT7 結合タンパク質の検索

SIRT7 と *in vitro* で合成した Cul4B、DDB1、DCAF1 の結合についてプルダウン法により検討を行った。その結果、SIRT7 は DDB1 に結合するが、Cul4B や DCAF1 とは結合しないことが判明した (図 1)。

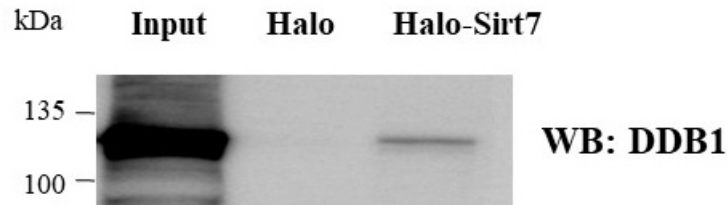


図 1. SIRT7 と Cul4B 複合体分子の結合
SIRT7 は DDB1 と結合する。

SIRT7 は DDB1 を介して Cul4B E3 ユビキチン複合体の活性を制御している可能性が考えられた。

2. SIRT7 による DDB1 脱アセチル化の検討

次に SIRT7 が DDB1 を脱アセチル化する可能性について western blot 法による検討を行った。その結果、HEK293T 細胞内において DDB1 はアセチル化されていること、SIRT7 により DDB1 が脱アセチル化されることが判明した (図 2) [3\)](#)。

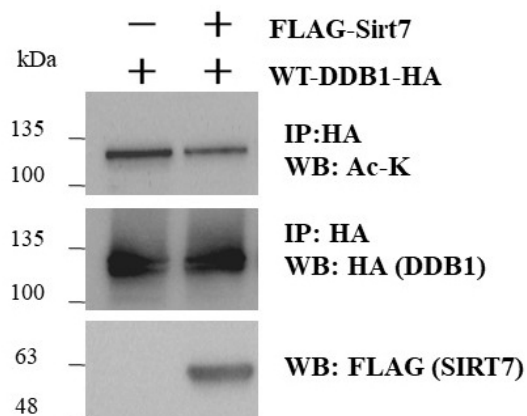


図 2. SIRT7 による DDB1 脱アセチル化
HEK293 細胞内で SIRT7 は DDB1 を脱アセチル化する。

3. 普通食飼育下における *Sirt7* KO マウスの熱産生・エネルギー代謝

高脂肪食負荷 *Sirt7* KO マウスでは熱産生が亢進し、体重の増加が軽度である。普通食負荷 *Sirt7* KO マウスにおいてもコントロールマウスに比して体温の上昇が認められた。酸素消費および二酸化炭素の排出も増加しており、*Sirt7* KO マウスではエネルギー消費が亢進していることが明らかになった。

4. 普通食飼育下における *Sirt7* KO マウスの BAT における遺伝子・タンパク質発現

Ucp1 および *Dio2* は BAT の熱産生を制御する遺伝子である。*Sirt7* KO マウスの BAT における *Ucp1* および *Dio2* の遺伝子発現はコントロールマウスに比して増加しており、これらの遺伝子発現が体温の上昇に関連していることが考えられた。TR4 は肝臓における脂質の取り込みや蓄積を制御する核内受容体型転写因子であり、*Sirt7* KO マウスの肝臓における TR4 のタンパク発現レベルは低下している²⁾。BAT における TR4 の発現レベルについて western blot 法にて検討したが、KO とコントロールマウスで明らかな差を認められなかった (図 3)。



図 3. *Sirt7* KO マウスの BAT における TR4 の発現

肝臓とは異なり、*Sirt7* KO マウス BAT における TR4 発現量はコントロールと同程度である。

5. 脂肪細胞特異的 *Sirt7* KO マウスの検討

BAT は交感神経による強い制御を受けており、SIRT7 は脳においても発現が認められる。神経系における SIRT7 の欠損が交感神経系を活性化させ、BAT 活性を上昇させている可能性について検討するため、脂肪細胞特異的な *Sirt7* KO マウスを作製し、その表現型について検討した。その結果、脂肪細胞特異的 *Sirt7* KO マウスにおいても体温の上昇、*Ucp1* の発現上昇など全身性の KO マウスと同様の結果が得られた。この結果から BAT における SIRT7 が *Ucp1* や *Dio2* の遺伝子発現を制御しているものと考えられた。

考 察

1. SIRT7 による Cul4B E3 ユビキチン複合体制御分子機構の解明

本研究により SIRT7 は Cul4B E3 ユビキチン複合体の構成分子である DDB1 (DNA damage-binding protein 1) に結合し、DDB1 の脱アセチル化を促進することが新たに判明した。SIRT7 は Cul4B E3 ユビキチン複合体の活性を低下させることから、DDB1 の脱アセチル化が同複合体の活性低下に関与していることが想定される (図 4)。

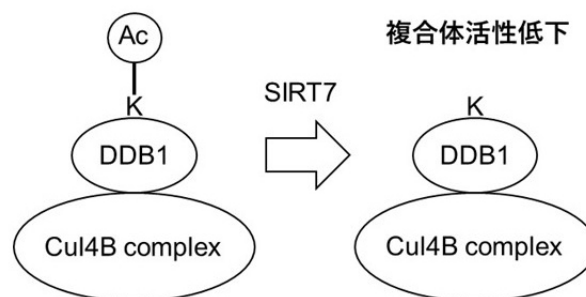


図 4. SIRT7 による Cul4B E3 ユビキチン複合体の制御

SIRT7 は DDB1 を脱アセチル化することで Cul4B E3 ユビキチン複合体を制御する。

DDB1は1140アミノ酸からなり、三つの seven-bladed beta-propeller (BP) ドメイン (BPA、BPB、BPC) を有する。DDB1はDDB2などのWD40リピートをもつDCAFタンパク質と結合することで基質のユビキチン化に関与する⁴⁾。DDB1はアセチル基転移酵素であるPCAFによりアセチル化されることが報告されており⁵⁾、本研究によりPCAFによりアセチル化されたリシン残基がSIRT7により脱アセチル化されることが判明した。今後、リシン残基のアセチル化がDDB1の機能に及ぼす影響についてさらに検討を行う予定である。

2. SIRT7によるBAT活性制御機構の検討

BATの活性は交感神経による強い制御を受ける。*Sirt7* KOマウスで認められる熱産生増加が神経系に発現しているSIRT7によるものか、BAT自身のSIRT7によるものか明らかにするため、adiponectin-Cre Tgマウスを用いた脂肪細胞特異的*Sirt7* KOマウスの作製を行った。脂肪細胞特異的な*Sirt7* KOマウスにおいても熱産生関連遺伝子の発現増加や体温の上昇が認められたことから、BAT内のSIRT7が重要であることが明らかになった。BATにおける熱産生には転写因子PPAR γ やPrdm16などが関与していることが報告されている⁶⁾。今後は、これらの分子とSIRT7の関連について検討を行い、SIRT7によるBATの制御機構の解明を目指す。

本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, Li W, Chua KF. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*. 2012 Jul 5;487(7405):114-8. doi: 10.1038/nature11043. PubMed PMID: 22722849; PubMed Central PMCID: PMC3412143.
- 2) Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab*. 2014 Apr 1;19(4):712-21. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.006. PubMed PMID: 24703702.
- 3) Karim MF, Yoshizawa T, Sobuz SU, Sato Y, Yamagata K. Sirtuin 7-dependent deacetylation of DDB1 regulates the expression of nuclear receptor TR4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Aug 19;490(2):423-428. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.057. Epub 2017 Jun 14. PubMed PMID: 28623141.
- 4) Lee J, Zhou P. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol Cell*. 2007 Jun 22;26(6):775-80. Review. PubMed PMID: 17588513.
- 5) Li T, Du Y, Wang L, Huang L, Li W, Lu M, Zhang X, Zhu WG. Characterization and prediction of lysine (K)-acetyl-transferase specific acetylation sites. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Jan;11(1):M111.011080. doi: 10.1074/mcp.M111.011080. Epub 2011 Sep 30. PubMed PMID: 21964354; PubMed Central PMCID: PMC3270103.
- 6) Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Aug;17(8):480-95. doi: 10.1038/nrm.2016.62. Epub 2016 Jun 2. Review. PubMed PMID: 27251423; PubMed Central PMCID: PMC4956538.