

【総説】

SIRT7 の多様な代謝機能

吉澤 達也、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

要約

サーチュイン（哺乳類では SIRT1-7）は NAD 依存性脱アシル化酵素として働き、代謝・がん・老化などに関与する重要な因子である。我々は、*Sirt7* ノックアウト（KO）マウスでは、高脂肪食で誘導される肥満、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。肝臓では、SIRT7 がユビキチンリガーゼ複合体に結合することで TR4（脂質代謝に重要な核内受容体）タンパク質の分解を抑制し、その結果として TR4 標的遺伝子の活性化を介して脂肪酸取り込みとトリグリセリド合成 / 貯蔵を増加させることを証明した。さらに我々は、*Sirt7* KO マウスは体温が高く、褐色脂肪組織において熱産生遺伝子群の発現が上昇していることを見出しており、褐色脂肪組織におけるエネルギー代謝においても SIRT7 が重要であると考えられた。この研究により、SIRT7 が糖脂質エネルギー代謝調節に重要な役割を果たしていることが示された。

キーワード：サーチュイン、肥満、脂肪肝、糖尿病、エネルギー代謝

1. はじめに

近年、糖尿病・肥満・高血圧といった生活習慣病が世界中で急増しており、その成因解明と治療法の開発は非常に重要な課題である。サーチュイン（哺乳類では 7 種類（SIRT1 ~ SIRT7）は、がん、老化、様々な代謝を調節しており、代謝異常症などの創薬ターゲットとして注目されている [1, 2]。サーチュインは、標的タンパク質のリジン残基のアセチル基を NAD 依存的に取り除く脱アセチル化酵素である。最近の研究では、アセチル基のみならずマロニル基、サクシニル基、長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 [3-5]。

このような背景の中、SIRT7 は最も研究が遅れていた因子であったが、ここ 3 ~ 4 年で非常に重要な研究成果が立て続けに報告され始めた。2012 年、SIRT7 の酵素活性とその標的タンパクが初めて報告された [6]。この研究で、SIRT7 はヒストン H3 における 18 番目のリジンのアセチル基を特異的に脱アセチル化すること、さらにこの特異的な脱アセチル化は、がん細胞の基本的特

性と腫瘍形成性の維持のために重要であることが明らかとなった。SIRT7 は rDNA 転写の調節に関わることが分かっていたが、その分子機構については長らく不明であった。しかし 2013 年に、RNA ポリメラーゼ I サブユニットの PAF53 が SIRT7 によって脱アセチル化されることが発表された [7]。マウス個体で証明されている生理機能は、心筋細胞でのストレス応答と細胞死の制御（KO マウスは拡張型心筋症）のみであり [8]、代謝における SIRT7 の機能については全く不明であった。そこで我々は、SIRT7 の代謝における役割と分子機能の解明を試み、2014 年に SIRT7 が肝臓の脂質代謝調節に重要な役割を果たしていることを報告した [9]。本稿では、この報告を中心に SIRT7 の糖脂質エネルギー代謝調節機能について概説する。

2. 肝臓の脂質代謝を調節する SIRT7

1) *Sirt7* KO マウスでは、高脂肪食で誘導される脂肪肝が軽減される

SIRT1,3,6 の KO マウスでは脂肪肝を発症することが報告されているため [10-12]、我々はまず *Sirt7* KO マウスを用いて肝臓の脂質代謝について検討した。その結果、*Sirt1,3,6* KO マウスとは著しく対照的に、*Sirt7* KO マウスでは高脂肪食によって肝臓へ蓄積される脂肪滴が顕著に減少していた（図 1 A）。この組織学的解析結果に一致して、高脂肪食を与えた *Sirt7* KO マウスの肝臓トリグリセリド量は、野生型マウスに比べて優位に低下していた（図 1 B）。一方、通常食を与えた場合には、

連絡先：吉澤達也 〒 860-8556

熊本県熊本市本荘 1-1-1

TEL : 096-373-5070

E-mail : yoshizaw@kumamoto-u.ac.jp

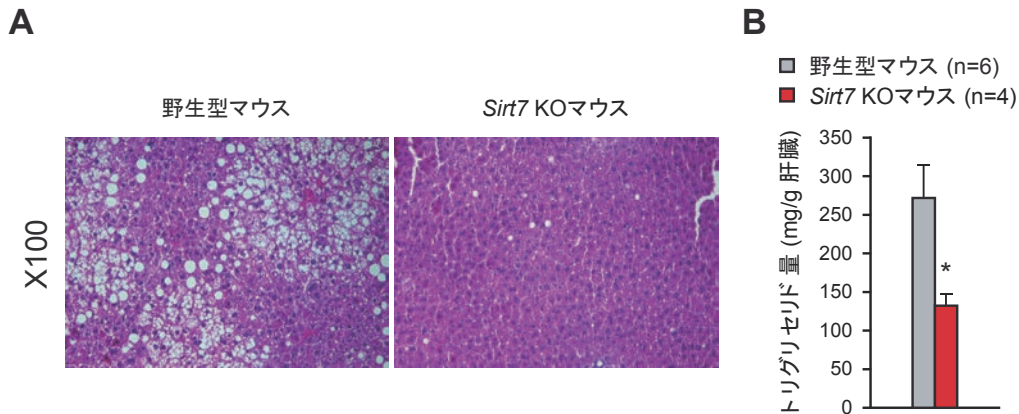


図1：Sirt7 KO マウスでは高脂肪食で引き起こされる脂肪肝が軽減。22 週間高脂肪食を与えた野生型マウスと Sirt7 KO マウスの肝臓を用いて、脂肪の蓄積程度を解析した。(A) 典型的な肝臓の組織切片像。(B) 肝臓中のトリグリセリド量。
データは平均値±標準誤差で示されている。* p<0.05

顕著な差は見られなかった。そこで次に、高脂肪食を与えた Sirt7 KO マウスの肝臓を用いて、脂質代謝に関する遺伝子群の発現を調べた。Sirt7 KO マウスでは、脂肪酸の取り込みに関わる遺伝子 *Cd36*、トリグリセリドの合成に関わる遺伝子 *Mogat1*、貯蔵に重要な遺伝子 *Cidea*、*Cidec* の発現が顕著に減少していた。脂肪酸合成に関する遺伝子群や β 酸化に関わる遺伝子群の幾つかも減少していた。

SIRT7 による肝臓の脂質代謝への作用が、肝臓で発現する SIRT7 の直接作用によるのかを明らかにするため、我々は肝臓特異的 Sirt7 KO マウスを作製し解析したところ、肝臓特異的 Sirt7 KO マウスにおいても、高脂肪食による肝臓へのトリグリセリド蓄積はコントロールマウスに比べて低下していた。そこで次に、培養細胞系にて SIRT7 による肝細胞の脂質代謝への作用を解析した。通常食を与えた Sirt7 KO マウスから得られた初代肝細胞では、*Cd36*、*Mogat1*、*Cidea* などの遺伝子発現は低下していたが、脂肪酸合成に関する遺伝子群は変化がなかった。肝細胞株 AML-12 で Sirt7 を siRNA によりノックダウン (KD) した場合にも同様の現象が見られた。つまり、肝臓の SIRT7 は、主に脂肪酸の取り込みとトリグリセリドの合成/貯蔵を調節していることが明らかとなった。このことに一致して、AML-12 を用いた脂肪酸の取り込み実験では、脂肪酸の短時間での取り込みと脂肪滴の蓄積が、Sirt7 の KD により顕著に減少した。過剰の脂肪酸を添加しない場合にはコントロールとの間に差が認められないことは、KO マウスの結果とよく相関しており、肝臓の SIRT7 が脂肪酸の取り込みを強く制御していることが裏付けられた。

2) 肝臓の SIRT7 は TR4 のタンパク質の制御により脂質代謝を調節する

我々は、Sirt7 KO マウスの表現型と遺伝子発現パターンが、脂質代謝に重要な役割を果たす核内受容体 TR4 の KO マウス [13] に非常に似ていることを発見した。

そこで、通常食を与えた Sirt7 KO マウスの肝臓を用いて TR4 タンパク質の量を調べたところ、野生型マウスに比べて減少していることが明らかとなった。また、Sirt7 KD AML-12 細胞の場合にも同様の現象が見られた。さらに、Sirt7 KD AML-12 細胞に SIRT7 を強制発現させると、減少していた TR4 タンパク質量が回復した。この時、酵素活性のない SIRT7 変異体を用いると、その回復効果は消えることから、SIRT7 の TR4 タンパク質量制御には酵素活性が必要であることが示唆された。

SIRT7 の脂質代謝調節作用において、実際に TR4 タンパク質量の制御が重要であるか否かを調べるため、TR4 を強制発現するアデノウイルスを Sirt7 KO マウスに感染させた。その結果、高脂肪食摂取時に軽減していた脂肪肝が野生型と同程度にまで戻ることを証明した。さらに、Sirt7 KD AML-12 細胞に TR4 を強制発現するアデノウイルスを感染させる実験においても、同様の結果が得られた。これらの結果は、肝臓の SIRT7 が TR4 のタンパク質量の制御を介して脂質代謝を調節することを示すものである。

3) SIRT7 は DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ユビキチンリガーゼ複合体に結合し、TR4 のタンパク質分解を抑制している

Sirt7 KO マウス肝臓の TR4 mRNA の発現量は野生型マウスと比べて差がなかったことから、TR4 タンパク質の安定性について解析した。パルスチェイス解析により、TR4 タンパク質は Sirt7 KD AML-12 細胞においてより早く分解していくことを発見した。さらに、TR4 タンパク質は細胞内でユビキチン化されること、そのユビキチン化の程度は SIRT7 の強制発現により低下することを明らかにした。

TR4 のユビキチン化を行う因子群の取得のため、プルダウン法と質量分析法を用いて網羅的に TR4 結合タンパク質を取得した。その結果、DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ユビキチンリガーゼ複合体 [14,15] の構成タンパク

質である DDB1 と DCAF1 が検出された。免疫沈降法により、DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ユビキチンリガーゼ複合体は TR4 と結合することが示された。さらに、*Sirt7* を KD しておいた Hepal-6 肝癌細胞において、CUL4B の発現を siRNA によって抑制させると、コントロール siRNA に比べて TR4 タンパク質の発現量が増加することを明らかにした。これらの結果から、肝細胞において、DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ユビキチンリガーゼ複合体は TR4 に結合し、そのユビキチン化と分解を促進することが強く示唆された。さらに我々は、SIRT7 が DCAF1、DDB1、CUL4B それぞれと複合体を形成することも明らかにした。

次に SIRT7 が DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ユビキチンリガーゼ複合体依存的な TR4 の分解を制御するかどうかについて解析した。Hepal-6 細胞において、*Sirt7* を KD すると TR4 タンパク質量は減少するが、同時に CUL4B を KD すると TR 4 タンパク質量は減少しなかった。また、*Sirt7* KD AML-12 細胞に SIRT7 を強制発現させると TR4 タンパク質量が増加するが、同時に CUL4B を KD しておくとも TR 4 タンパク質量は増加しなかった。これらの結果は、SIRT7 が DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ユビキチンリガーゼ複合体に結合し、それにより TR4 のユビキチン化と分解を阻害することを示している。

この研究により、SIRT7 はユビキチン-プロテアソーム経路の制御を介して、肝臓の脂質代謝を調節することが明らかにされた。図 2 に示す通り、肝細胞では SIRT7 は DCAF1/DDB1/CUL4B E3 ユビキチンリガーゼ複合体に結合し、それにより TR4 のユビキチン化と分解を阻害している。分解を逃れた TR4 は *Cd36* などの脂質代謝関連遺伝子群の発現を上げる。結果的に脂肪酸を取り込み貯蔵する経路が働き、過剰の脂肪を摂取した場合には、肝臓に脂肪が蓄積していくこととなる (図 3 上)。一方、SIRT7 が無い場合には、TR4 は分解の方

向に傾き、脂肪酸を取り込み貯蔵する経路が低下しているため、過剰の脂肪を摂取した場合でも肝臓に脂肪が貯まりにくくなるのである (図 3 下)。

4) 老化した *Sirt7* KO マウスの肝臓ではミトコンドリアの異常により微小脂肪滴が現れる

我々の論文が発表された後しばらくして、Dr.Auwerx のグループが、老化した *Sirt7* KO マウスの肝臓ではミトコンドリアの異常により微小脂肪滴が現れることを報告した [16]。このメカニズムとして、SIRT7 がミトコンドリアの機能に重要な GABP β 1 を脱アセチル化し、GABP α /GABP β ヘテロダイマーの転写活性を増加させることが示されている。この表現型は、一見すると「*Sirt7* KO マウスでは高脂肪食で誘導される脂肪肝が軽減される」という我々の結果に反すると考えられるが、彼らを用いているマウスが通常食を与えた老齢 (42-55 週齢) マウスのみであり、若いマウスについては一切言及されていないことに注意が必要である。

SIRT7 によるミトコンドリアの機能調節は老化した時期にのみ必要なのか、それとも SIRT7 欠損によるミトコンドリアの異常は若い時期から起こっているが、長い時間をかけて脂肪滴の蓄積という表現型が現れるのか、今後の詳細な解析が待たれる。

3. 肥満と糖尿病に関する SIRT7

我々は、脂肪肝の軽減以外に、*Sirt7* KO マウスでは高脂肪食で誘導される肥満と糖尿病が軽減されることを発見した [9]。具体的には、高脂肪食を 12 週間与えた *Sirt7* KO マウスは、野生型マウスに比べて、精巣上体脂肪 (内臓脂肪) の重量比率 (% 体重) が 3 割以上も減少していた。また、耐糖能試験では、ブドウ糖負荷後 30 分の血糖値が 2 割程低い値だった。一方、高脂肪食を与えた肝臓特異的 *Sirt7* KO マウスとコントロールマウスの間では、体重、脂肪重量、耐糖能に顕著な差が認

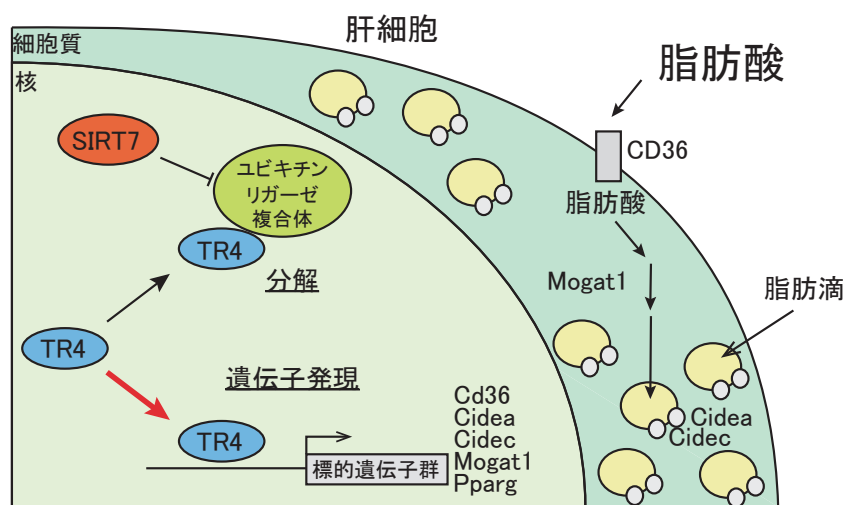


図 2 : SIRT7 がユビキチン-プロテアソーム経路の制御を介して肝臓の脂質代謝を調節するモデル図。本文参照。

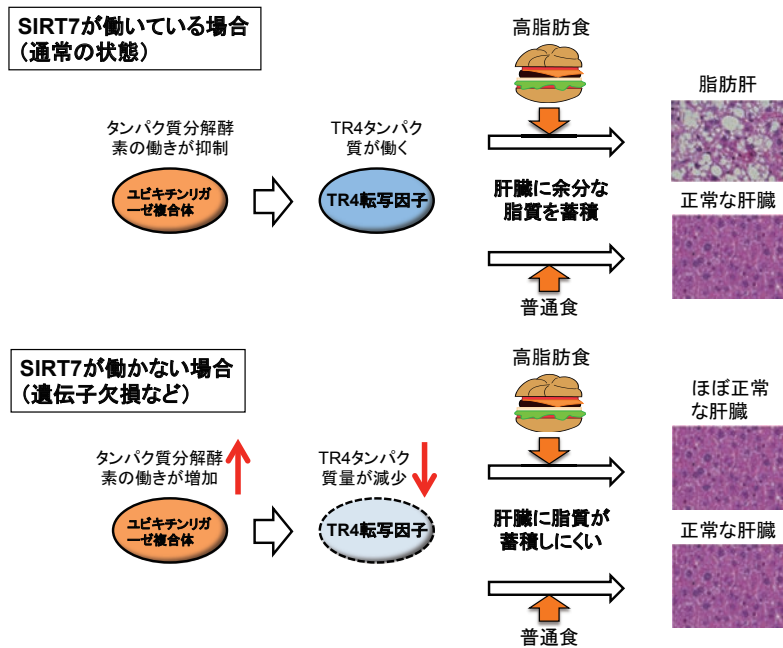


図3：SIRT7の有無で肝臓への脂質蓄積が変化する機構

められなかった。この結果は、肝臓以外のSIRT7が脂肪重量、耐糖能に重要な役割を果たしていることを示している。

CD36は脂肪組織においても脂肪酸の取り込みに関与していることが分かっている。また、脂肪細胞でのCidea KDは脂肪分解を促進させる。現在のところ高脂肪食負荷Sirt7 KOマウスの肥満軽減作用の正確な機構は明確ではないが、少なくともSirt7 KOマウスの脂肪組織でCd36とCideaの遺伝子発現が減少していることはその一端を担っていると考えられる。

高脂肪食を与えたSirt7 KOマウスは、自発運動活性と食餌摂取量において野生型マウスとの間に差が認められない。したがって、脂肪が体に蓄積しにくいSirt7 KOマウスでは、余分な脂質が何処かで消費されている可能性が示唆された。そこで、呼吸ガス分析によるエネルギー代謝測定を行ったところ、Sirt7 KOマウスでは呼吸交換率(RER)が優位に低いことが明らかとなった。つまり、Sirt7 KOマウスでは脂質を燃焼する傾向が比較的強いことが分かった。

4. 褐色脂肪組織における熱産生を調節するSIRT7

エネルギー代謝測定の際、高脂肪食を与えたSirt7 KOマウスは体温が高いことも判明した[9]。骨格筋においてSirt7の発現は非常に低いことが報告されていることから、褐色脂肪組織において熱産生に関わる遺伝子群の発現を調べたところ、Sirt7 KOマウスではUcp1や

Dio2の遺伝子発現が著しく増加していた[9]。これらの発見は、SIRT7が体全体のエネルギー代謝を制御する際には、少なくとも一部は、褐色脂肪組織の機能調節を介している可能性を示唆している。最近我々は、通常食を与えたSirt7 KOマウスにおいても体温が高く、褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子群の発現が高く、酸素消費量が増加している事を明らかにしており(未発表)、今後のSIRT7による熱・エネルギー代謝調節メカニズムの解明が期待される。

5. おわりに

我々のSIRT7による代謝調節の研究により、SIRT7が脂質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。SIRT7の阻害剤が開発されれば、脂肪肝と肥満を軽減し、余剰脂質の燃焼を褐色脂肪組織において増強させる効果が予想される(図4)。また、これら肥満と脂肪肝の軽減を介した糖尿病の改善も予想されることから、脂質代謝異常を伴うメタボリックシンドローム全般の画期的治療薬となりうると思われる。そのためにも、未だ十分な解明がされていないリジン脱アシル酵素としてのSIRT7のさらなる分子解剖が必須であり、我々はこの困難な課題を一つ一つ解明し、将来の代謝異常症の予防や治療に貢献できることを目指している。

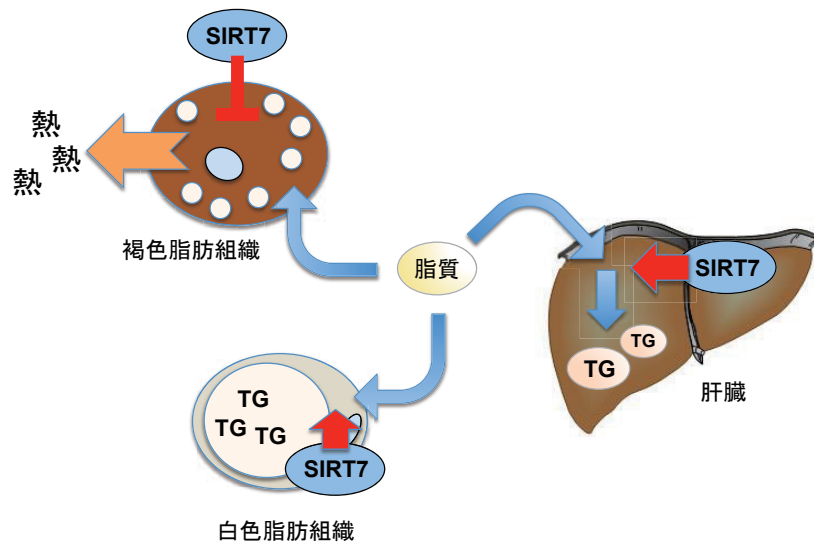


図4：SIRT7は肝臓、褐色脂肪組織、白色脂肪組織に働きかけ、脂質代謝を制御

参考文献

- [1] Guarente L. Sirtuins, aging, and medicine. *New England Journal of Medicine* 364:2235-2244, 2011.
- [2] Houtkooper RH, Pirinen E, and Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13:225-238, 2012.
- [3] Du J, Zhou Y, Su X, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* 334:806-809, 2011.
- [4] Jiang H, Khan S, Wang Y, et al. SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* 496:110-113, 2013.
- [5] Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, et al. Sirtuin 4 is a lipamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*. 159:1615-1625, 2014.
- [6] Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature* 487:114-118, 2012.
- [7] Chen S, Seiler J, Santiago-Reichert M, et al. Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Molecular Cell*. 52:303-313, 2013.
- [8] Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circulation research*. 102:703-710, 2008.
- [9] Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, et al. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metabolism* 19:712-721, 2014.
- [10] Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metabolism* 9:327-338, 2009.
- [11] Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, et al. SIRT3 regulates fatty acid oxidation via reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464:121-125, 2010.
- [12] Kim HS, Xiao C, Wang RH, et al. Hepatic specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metabolism* 12:224-236, 2010.
- [13] Kang HS, Okamoto K, Kim YS, et al. Nuclear orphan receptor TAK1/TR4-deficient mice are protected against obesity-linked inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Diabetes* 60:177-188, 2011.
- [14] Lee J, and Zhou P. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Molecular Cell* 26:775-780, 2007.
- [15] Higa LA, and Zhang H. Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Division* 2:1-9, 2007.
- [16] Ryu D, Jo YS, Lo Sasso G, et al. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABP β 1 controls mitochondrial function. *Cell Metabolism* 20:856-869, 2014.

Diverse metabolic functions of SIRT7

Tatsuya Yoshizawa, Kazuya Yamagata

Department of Medical Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

Abstract

Sirtuins (SIRT1-7 in mammals) are NAD-dependent lysine deacylases that regulate a wide variety of biological processes, such as metabolism, tumorigenesis, and aging. We recently demonstrated that *Sirt7* knockout mice are resistant to high-fat diet-induced fatty liver, obesity, and diabetes. Hepatic SIRT7 positively regulates the protein level of nuclear receptor TR4 involving in lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway, and its target genes related to fatty acid uptake, triglyceride synthesis/storage. Furthermore, we found that *Sirt7* knockout mice have high body temperature, and expressions of the genes involving in thermogenesis were significantly increased in brown adipose tissue of *Sirt7* KO mice. These results indicated that SIRT7 plays an important role in the regulation of glucose/lipid/energy metabolism.

Keywords : Sirtuins, obesity, fatty liver, diabetes, energy metabolism