

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	小 倉 雅 仁
論文題目	Overexpresion of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1		
（論文内容の要旨） カロリー制限による寿命の延長は酵母から哺乳類にまで認められるが、酵母ではそのメカニズムにSIR2遺伝子が重要な役割を果たす。SIR2蛋白はNAD依存性脱アセチル化酵素で、哺乳類には7種類のSIR2ホモログ(SIRT1-SIRT7)が存在する。SIRT1はSIR2と最もアミノ酸相同性が高く、核に局在する。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酸化や電子伝達系が行われる細胞内小器官であることから、これらのSIRTはエネルギー代謝の調節に寄与していることが予想される。SIRT3がacetyl-CoA synthetase 2やisocitrate dehydrogenase 2を脱アセチル化し活性化すること、SIRT4が膵β細胞においてglutamate dehydrogenaseをADPリボシル化し、その活性を制御してインスリン分泌を低下させることはすでに報告されているが、SIRT5についての報告はin vitroでNAD依存性脱アセチル化酵素活性を有することのみであった。SIRT5の生理機能の解析を試みるため、野生型のマウスで栄養状態によるSIRT5 mRNA発現量の変化を半定量的RT-PCRにて評価した。絶食により肝臓でSIRT5のmRNA発現量が増加し、再摂食によって減少したが、心臓や腎臓では同様の変化は認められなかった。このことから、SIRT5は肝臓で作用することが示唆された。次にSIRT5のC末端にFLAGタグを付与した融合タンパク（SIRT5-FLAG）を全臓器で過剰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、コピー数の異なる2系統のトランスジェニックマウスを樹立した。また特異的抗マウスSIRT5抗体の作製を行い、得られた抗体によるウェスタンブロッティングから両系統のマウスで、内在性のSIRT5タンパクと比較して過剰量のSIRT5-FLAGタンパクが発現していることが確認された。次にSIRT5の基質の同定を試みた。栄養状態によるSIRT5 mRNA発現量の変化からSIRT5は肝臓で作用することが示唆されたため、野生型とSIRT5 Tgマウスの肝臓よりミトコンドリア蛋白を採取して二次元電気泳動法により分離した。得られたゲルをSYPRO Rubyによって全タンパクを染色し解析したところ、野生型とSIRT5 Tgマウスで出現の異なるスポットを認めた。MALDI-TOF-MSにてその蛋白を解析し、このタンパクが尿素回路の酵素である carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1)であると同定した。このことからCPS1がSIRT5の基質であることが示唆された。SIRT5 Tgマウスの肝臓ではCPS1が野生型マウスに比べ脱アセチル化され、また活性も高かった。尿素回路は絶食時に蛋白の異化によって生じるアンモニアの解毒に重要であるが、SIRT5 Tgマウスから単離した肝細胞での尿素合成は野生型マウスよりも亢進していた。最近L.Guarenteらによって報告されたSIRT5ノックアウトマウス(SIRT5 KOマウス)の肝臓においてはCPS1のアセチル化は亢進し、その活性は低下している。48時間絶食したSIRT5 KOマウスは高アンモニア血症を呈する。今回SIRT5 Tg マウスを用いて得られた結果は、SIRT5 KOマウスにおける報告と相補的であり、SIRT5がCPS1の脱アセチル化を介して絶食時のアンモニアの解毒に寄与することが確認された。			

（論文審査の結果の要旨） カロリー制限による寿命の延長は酵母から哺乳類にまで認められ、酵母ではその現象にSIR2遺伝子が必須である。SIR2蛋白はNAD依存性脱アセチル化酵素で、哺乳類には7種類のホモログ(SIRT1-SIRT7)が存在する。SIRT5はミトコンドリアに局在し、NAD依存性の脱アセチル化酵素活性を有することが知られているが、その機能は不明であったことから、SIRT5の生理機能を明らかにすることを目的とした。 野生型マウスでSIRT5 mRNA発現量は絶食により肝臓で増加した。そこでSIRT5を全身に過剰発現するSIRT5トランスジェニック(Tg)マウスを作製し、SIRT5の基質を同定する目的で、野生型とSIRT5 Tgマウスの肝臓からミトコンドリア蛋白を採取し、二次元電気泳動を行った。野生型とSIRT5 Tgマウスで出現位置の異なる蛋白をMALDI-TOF-MSで解析したところ、尿素回路の酵素であるカルバモイルリン酸合成酵素 1 (CPS1)であった。野生型に比べSIRT5 Tgマウスの肝臓でCPS1は脱アセチル化され、活性が高く、SIRT5 Tgマウスの肝細胞で、尿素合成は亢進していた。これらのことから、SIRT5はCPS1の脱アセチル化と活性化により絶食時のアンモニアの解毒に寄与する可能性が示唆された。 以上の研究は栄養状態の変化による代謝調節機構の解明に貢献し代謝栄養学の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成22年5月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			