

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21037

研究課題名(和文)トリプトファン-ナイアシン代謝を介した老化調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms of aging regulation via tryptophan-niacin metabolism

研究代表者

松田 寛子(Matsuda, Hiroko)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号：80709733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本申請期間では、アミノ酸の一種である L-Trp からビタミンB群の一種であるナイアシン(NA)を生成するトリプトファン-ナイアシン(Trp-NAD)代謝の老化機構との関連性、および野菜や果物中に含まれる植物栄養素(ファイトケミカル)の影響の解明をした。
in vitro の検討により、老化調節機構に関わるホルモンや因子であるインスリンやmTORは、Trp-NAD代謝の主要酵素ACMSDの遺伝子発現には直接的な影響を与えないことがわかった。一方では、長寿遺伝子SIRT1とACMSDとは、体内での遺伝子発現挙動に類似した点があった。また、クルクミンを用いた検討においても同様の結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補酵素として我々の生命維持に貢献するナイアシン(NA)は、生体内でのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)へ変換し長寿遺伝子SIRT1の活性化を介して、老化や癌などの老年疾患の予防効果をもつ。申請者は、NAD生成量を減少させるトリプトファン-ナイアシン(Trp-NAD)代謝の主要酵素ACMSD活性は、老化に関わるmTORシグナルの因子により直接的な影響を受けないことを示した。Trp-NAD代謝に関しては、未解明な点が多く、本研究成果により一部解明された。
今後、本研究を発展させることにより、Trp-NAD代謝を介した新たな老化調節機構が存在することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：During this research period, tryptophan-niacin (Trp-NAD) metabolism that produces niacin (NA), a kind of vitamin B group, from L-Trp, a kind of amino acid, is related to aging mechanism and affected by phyto-chemicals contained vegetables and fruits were clarified.
In the results of in vitro, it was found that insulin and mTOR, which are hormones and regulation factors involved in the aging regulation mechanism, do not directly affect the gene expression of ACMSD, which is a major enzyme of Trp-NAD metabolism, On the other hands, the longevity genes SIRT1 and ACMSD were similar to the gene expression behavior in vivo. Similar results were obtained in the study using curcumin.

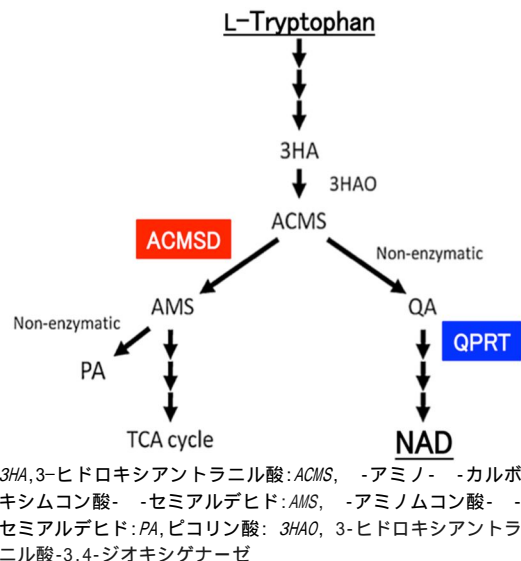
研究分野：食品栄養学

キーワード：トリプトファン ナイアシン ファイトケミカル インスリンシグナル mTOR 老化 ACMSD 食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

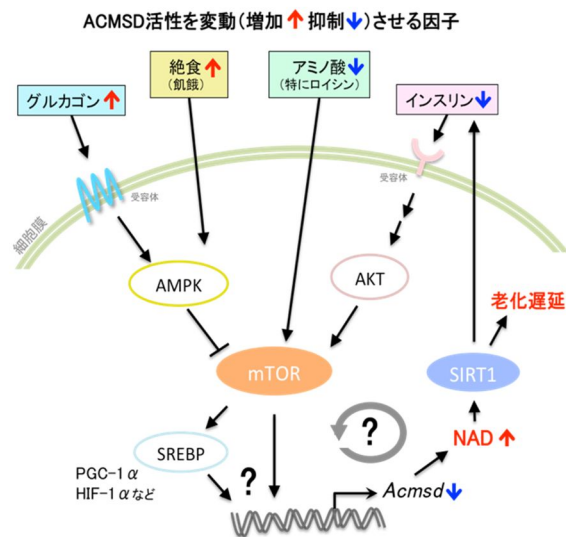
(1) ナイアシン(NA)は、ニコチン酸とニコチンアミドの総称であり、ビタミンB群に分類される。NAの主な摂取源は食品とされているが、肝臓や腎臓中のトリプトファン-ナイアシン(Trp-NAD)代謝経路[右図]を介して、L-Trpからも合成が可能である[1]。日本人が一般的な食事をしている場合、Trp由来のNA供給は、NA必要量を賄う上で重要であると報告されている[2]。また、Trp欠乏はNA欠乏時と同様に皮膚病であるペラグラが発症するため、NA栄養維持においてTrp-NAD代謝を無視することはできない[3]。また、本代謝は、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症を誘導する強い神経毒性を持ったキノリン酸(QA)の生成にも大きく関わっている[4]。これらの代謝経路において、ACMS 脱炭酸酵素(ACMSD)とキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPRT)は、TrpからのNAD転換率に影響を与える主要酵素と言われている。しかし、生体内でQAやNADが生合成されるにも拘らず、Trp-NAD代謝と老化との関連性や、ACMSDとQPRTの発現調節機構に関する知見は乏しい。したがって、これらを明らかにし、Trp-NAD代謝を介した新たな老化制御機構を提唱することは、社会的に大きな波及効果のある緊急性の高い研究テーマである。



(2) 申請者は、食品由来成分によるNAD生成量の変動や、NAD転換率と酵素活性に負の相関をもつACMSDのmRNA(*Acmsd*)発現調節機構に着目し検討してきた[5,6,他投稿準備中]。その結果、葉野菜中に含まれるフィトケミカルなどにNAD量増加および肝臓のACMSD活性抑制作用が確認された。さらに、ACMSDは脂質・糖代謝の主要因子であるステロール調節配列結合蛋白(SREBP)によってmRNA発現の抑制を受け、酵素活性が減少する可能性を見出した。これまで、江頭祐嘉合博士(研究協力者)などの報告により、肝臓中のACMSD活性は、インスリン(INS)、グルカゴン、アミノ酸(特にロイシン)、絶食などで、変動することが知られてる[7-9]。このことから申請者は、*Acmsd*発現は、INSおよびアミノ酸に応じた哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)シグナルの影響を受けると考えた[下図]。mTORシグナルは、寿命や抗癌との関連が深いことで知られている[10]。また、Trp-NAD代謝により増加したNADがSIRT1を活性化することで、INS分泌促進やあらゆる代謝を調節し、再びACMSD活性の抑制を介してNAD生合成を亢進する、代謝制御ループがあると推定した[11,12]。そのため、副作用を持たない食品成分の摂取によるTrp-NAD代謝制御は、老化抑制や遅延に繋がる可能性が高いという結論に至った。

2. 研究の目的

補酵素として我々の生命維持に貢献するナイアシン(NA)は、生体内でのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)へ変換し長寿遺伝子SIRT1の活性化を介して、老化や癌などの老年疾患の予防効果をもつ。申請者は、NAD生合成量を減少させるトリプトファン-ナイアシン(Trp-NAD)代謝の主要酵素、ACMS 脱炭酸酵素(ACMSD)活性が、フィトケミカルなどの食品成分や老化に関わるmTORシグナルの因子により抑制される可能性を発見した。そこで本研究では、以下の2点を研究目的とした。



- (1) mTORシグナルやサーチュイン1(SIRT1)を介したTrp-NAD代謝による新たな老化調節機構が存在することを示す[右図]。
- (2) Trp-NAD代謝を介して、老化の抑制および遅延効果を有する食品成分を探索する

3. 研究の方法

(1) 肝実質細胞におけるmTORシグナルと*Acmsd*発現との相互作用の解析

コラゲナーゼ灌流法を用いて、マウスから初代肝実質細胞を単離する。そこへ、インスリンまたはデキサメタゾン(それぞれINS, dexをする)を添加し24時間培養後の*Acmsd*発現を測定した。同時に、mTORの上流因子であるAKTやAMPKさらにはmTORについて

immunoblotting 解析を行った。その後、AICAR やラパマイシンの共添加による mTOR 活性阻害時の *Acmsd* 発現の回復を解析した。

(2) マウスが肝臓中 ACMSD 発現変動およびその調節機構へ与える影響の解析

上記の方法と同様に、マウスから初代肝実質細胞を単離した後、培地中最終濃度が $1\ \mu\text{M}$ および $5\ \mu\text{M}$ となるようクルクミンを添加した。その後、24 時間培養し、上記(1)と同様に解析した。

ICR 雄マウス 6 週齢(日本エスエルシー)を一般飼育用試料(CE-2: 日本クレア)で 3 日間予備飼育し、環境順化させた。予備飼育後、各個体の体重を測定し、平均初体重が等しい 3 群(コントロール食群、0.05%クルクミン食群、0.15%クルクミン食群)に群分けした($n=6$)。各群には表 1 の組成で調製した試料を与え、7 日間本飼育した。なお、本実験では ACMSD タンパクおよび ACMSD mRNA の発現量の変動を測定するため、これらの発現のベースラインを上昇させる高タンパク質食を与えた。さらに、必須脂肪酸を含む食餌が肝臓中の ACMSD 発現を減少させるという報告に基づき、すべての群の食餌は脂肪を含有しないものとした[13]。動物実験は「国立大学法人東京海洋大学動物実験等取扱規則」に則って実施した。本飼育終了後、3 種混合麻酔下でマウスの肝臓および腎臓を摘出するとともに

心臓から採血することで血漿を得た。その後、両組織について ACMSD の酵素活性を測定し、肝臓のみ RNA およびタンパク質発現を解析した。さらに、血漿中のクエン酸濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 肝実質細胞における mTOR シグナルと *Acmsd* 発現との相互作用の解析

既往の研究において、I 型糖尿病モデルラットでは肝中 ACMSD 活性が高く、INS を投与することでその活性が抑制されることが報告されている。しかし、肝実質細胞を用いた本検討では、INS 添加において、INS シグナルが亢進しているにも拘らず(pAKT 発現が上昇した)ACMSD タンパク質発現に変化はなかった。この結果から、INS は *in vivo* において間接的に肝臓の ACMSD 活性を制御している可能性が考えられた。一方、dex 添加では、ラットを用いた既往の報告と一致し ACMSD タンパク質発現の上昇が確認され、mTOR シグナルと ACMSD 発現との関連性が確認された。しかし、AICAR とラパマシンを用いて、mTOR シグナル直接的な関連性を検討したところ、ACMSD 発現には mTOR は関与していない可能性が示唆された。また、ACMSD は AKT のリン酸化を亢進するインスリンの添加では発現が変動せず、AMPK のリン酸化抑制では発現が亢進した。これらの因子の変動は、クルクミン添加時でも同様の結果となった。

(2) クルクミンが肝臓中 ACMSD 発現変動およびその調節機構へ与える影響の解析

クルクミンを摂取したマウスにおいて、肝臓中 ACMSD タンパク質発現は上昇するとともに、Trp-NAD 経路の代謝産物であるクエン酸の血中濃度が増加していた。これまでの ACMSD に関する研究では、Trp-NAD 経路の代謝産物として NAD のみに着目することが多く、ACMSD 発現増加によるエネルギー代謝の亢進を一部を確認することはなかった。エネルギー代謝と長寿遺伝子である SIRT1 mRNA には相関関係がある可能性が報告されている。そのため、ACMSD 発現は mTOR と関連がないと予想されたことから、SIRT1 のヒストン脱アセチル化レベルではなく、SIRT1 mRNA 発現と ACMSD との相関を検討することによって、仮説とは異なった機構による ACMSD と SIRT1 との関連性を明らかにしようと試みた。その結果、ACMSD と SIRT1 mRNA 発現には正の相関があり、同様の制御因子が関与している可能性が予想された。

< 引用文献 >

1. Su-Ju L, Leonard G, Nicotinamide Adenine Dinucleotide, a Metabolic Regulator of Transcription, Longevity and Disease, *Curr Opin Cell Biol*, 15(2), 2003, 241-246.
2. 福渡 努, ナイアシン栄養におけるトリプトファン経路の重要性, *日本栄養・食糧学会誌*, 63(4), 2010, 135-141.
3. Peter B, Katrina L B, Charles B, NAD⁺ Metabolism in Health and Disease, *Trends Biochem Sci*, 32(1), 2007, 12-19.
4. Gilles J G, Lily W, Bruce J B, Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex, *J Neuroinflammation*.2, 2005, 16.
5. Hiroko M, Ryo-ta G, Shizuka H, Yukari E, Effect of Dietary Phytol on the Expression of α -Amino-carboxymuconate- β -semialdehyde Decarboxylase, a Key Enzyme of Tryptophan-niacin Metabolism, in Rats, *Biosci Biotech Biochem*, 77(7), 2013, 1416-1419.
6. Hiroko M, Mayumi S, Mako Y, Manami K, Shizuka H, Yukari Egashira, Regulation of rat hepatic α -amino-carboxymuconate- β -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in the tryptophan-NAD pathway, by dietary cholesterol and sterol regulatory element-binding protein-2, *Eur J Nutr*, 53, 2014, 469-477.

7. Atsushi T, Yukari E, Shin-Ichi F, Katsumi S, Hiroo S, Expression of Rat Hepatic 2-Amino-3-Carboxymuconate-6-Semialdehyde Decarboxylase Is Affected by a High Protein Diet and by Streptozotocin-Induced Diabetes, *J Nutr*, 132(6), 2002, 1153-1159.
8. 江頭 祐嘉合, 真田 宏夫, 脂質とトリプトファン代謝, *日本栄養・食糧学会誌*, 55(6), 2002, 357-360.
9. 柴田克己, アミノ酸インバランスとナイアシン欠乏との関係, *ビタミン*, 68(10), 1994, 616-618.
10. Roberto Z, Alejo E, David M S, mTOR: From Growth Signal Integration to Cancer, Diabetes and Ageing, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 2011, 21-35.
11. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al., Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic Cells, *PLoS Biol*, 4(2), 2006, e31.
12. Angeliki C, Leonard G, Sirtuins Mediate Mammalian Metabolic Responses to Nutrient Availability, *Nat Rev Endocrinol*, 8(5), 2012, 287-296.
13. Shibata K, Matsuo H. Effect of dietary tryptophan levels on the urinary excretion of nicotinamide and its metabolites in rats fed a niacin-free diet or a constant total protein level. *J Nutr*, 120(10), 1990, 1191-1197.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋彩夏、松田寛子、坂田菜摘、松本奈々、江頭祐嘉合
2. 発表標題 クルクミンがTrp-NAD経路における
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋彩夏、松田寛子、坂田菜摘、松本奈々、江頭祐嘉合
2. 発表標題 クルクミンがトリプトファン-ナイアシン代謝の鍵酵素の活性変動に与える影響
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	江頭 祐嘉合 (Egashira Yukari)		