

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05922

研究課題名（和文）NAD合成系酵素の発現制御機構の解明と食品因子による肥満関連疾患の予防への応用

研究課題名（英文）Investigation of the regulatory mechanism of NAMPT expression by food factors

研究代表者

三谷 壘一（Mitani, Takakazu）

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：40773304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、NAD合成経路の律速酵素NAMPTの発現制御機構を解析し、大豆イソフラボンの一種であるゲニステインが細胞膜タンパク質であるPHB1に結合することでNAMPTの発現を転写レベルで増加することを明らかにした。肥満や老化によって脂肪組織のNAMPTの発現量は低下し、これがNAD合成量の減少と耐糖能の低下に繋がるとされている。ゲニステインを摂取することで、脂肪組織のNAMPTレベルが増加し、肥満に起因する耐糖能の低下も回復することが示された。以上の結果から、NAMPTの発現量が食品成分で制御可能であり、NAMPTの発現量を制御することで2型糖尿病の予防に資することが証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のNAD量の低下を改善することは肥満や加齢性疾患の標的とされている。現在NAD量の増加方法としてNAD前駆体の投与、NAMPTの酵素活性を向上する医薬品の開発が行われている。本研究の特色は、これらとは異なる、第3の方法としてNAMPTの発現量の制御に着目した点にある。動物実験の結果から、大豆イソフラボンがNAMPTの発現量とNAD量の制御することが可能であることを明らかにし、食品成分が疾患予防に有用である基礎データを得たことは学術的にも社会的にも意義が大きい。今後、NAMPTの発現制御が加齢性疾患に対しても予防効果があるのかを検証し、ゲニステインの実用化を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we declared that genistein, a soy isoflavone, increases the expression level of NAMPT by binding to a plasma membrane protein, prohibitin 1. Obesity and aging decrease NAMPT expression in adipose tissue, leading to decreased NAD synthesis and impaired glucose tolerance. Genistein intake was shown to increase the amount of NAMPT in adipose tissue and furthermore restore obesity-induced glucose intolerance. These results prove that the expression of NAMPT can be controlled by food components and that controlling the expression of NAMPT contributes to the prevention of type 2 diabetes.

研究分野：食品科学

キーワード：肥満 2型糖尿病 大豆イソフラボン NAD NAMPT 標的タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病や高血圧症、動脈硬化症などの様々な肥満関連疾患の原因である。それらの疾患は生活の質の低下に直結することから、日常的な予防が重要とされており、その方策を提案するためには、肥満関連疾患の発症機序の解明が不可欠となる。脂肪細胞は、中性脂肪を溜め込むだけでなく、種々の生理活性物質を分泌する分泌細胞でもある。高脂肪食負荷やDNA障害の蓄積による脂肪細胞の老化(細胞老化)が進むと炎症性アディポカインの分泌が増加し、これが2型糖尿病などの肥満関連疾患のリスクを上昇させると考えられる。脂肪細胞の細胞老化と関わりが深いのがビタミンB3から合成されるNADの減少である。高脂肪食の摂取が、NAD合成経路の律速酵素 nicotinamide phosphoribosyl-transferase (NAMPT)の発現を抑制し、これがNAD合成量の低下と細胞老化を引き起こすことが報告されている。従って、NAMPTは、細胞老化を介して肥満関連疾患を制御し得る鍵因子と考えられるが、NAMPTの発現制御機構には未解明な部分が多く残っている。そこで、脂肪組織におけるNAMPTの発現制御機構を解明し、それを食品因子によって制御することで、脂肪組織の細胞老化を抑制できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

食品因子による脂肪細胞の抗老化と抗肥満関連疾患戦略を進めるためには、NAMPTの発現制御機構を分子レベルで解明することが重要である。そこで本研究では、脂肪細胞におけるNAMPTの発現は、どのように制御されているのか? NAMPTの発現増加がNAD量の増加を介して肥満関連疾患を予防できるのか?という問いを解明すること目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) NAMPTの発現制御解析

脂肪細胞におけるNAMPTの発現制御メカニズムを明らかにするために、3T3-L1細胞を脂肪細胞へと分化させ、経時的に細胞を回収し、*Nampt*の発現増加と転写因子の発現増加パターンを比較した。*Nampt*の発現以前に増加する転写因子をsiRNAでノックダウンすることで*Nampt*の発現が抑制されるのかを確認した。

### (2) 食品成分によるNAMPTの発現制御機構の解析

これまでの実験でNAMPTの発現量は植物由来のポリフェノールによって制御されることを見出している。最も誘導率が高い食品成分であったゲニステイン(大豆イソフラボン)に着目し、NAMPTの発現制御機構をゲニステインの標的タンパク質の観点から解析した。

### (3) ゲニステイン投与試験

ゲニステインを摂取したマウス個体の脂肪組織でNAMPTの発現量が増加し、肥満に起因する耐糖能の低下が改善されるのかを試験した。また、ゲニステインによる効能がNAMPTの発現増加に起因するのかを検証するために、NAMPTのヘテロノックアウトマウスを用いて検証した。

## 4. 研究成果

(1) *Nampt*の発現を制御する転写因子の同定: 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に

伴って *Nampt* の発現量が増加することから、脂肪細胞分化に関わる転写因子が NAMPT の発現制御に関与することが示唆された。中でも脂肪細胞への分化の初期に関与する C/EBP $\beta$  を siRNA でノックダウンすることで *Nampt* の発現が著しく低下することを見出した。さらに C/EBP $\beta$  には 3 種類のスプライシングバリエーションが存在し、脂肪細胞の分化の寄与がほとんど無いバリエーション (LIP) も *Nampt* の転写を促すことが示された。つまり、C/EBP $\beta$  による *Nampt* の発現制御は脂肪細胞分化の制御とは異なる作用メカニズムであることが示唆された。

(2) 食品因子による NAMPT の発現制御の解析: 3T3-L1 細胞にゲニステインを添加すると C/EBP $\beta$  のタンパク質の安定性が向上し、*Nampt* の発現量が増加することを見出した。さらに、ゲニステインの標的タンパク質の探索を行った結果、細胞膜タンパク質 PHB1 と結合することを同定した。ゲニステインは PHB1 の SPFH ドメインに結合することで PHB1 のタンパク質安定性の向上に寄与し、細胞内シグナル伝達経路の一種である ERK の活性化をした。ERK は C/EBP $\beta$  の T188 のリン酸化を促すことで C/EBP $\beta$  タンパク質安定性の向上に寄与することを明らかとした。

(3) ゲニステイン投与試験: ゲニステイン摂取によって脂肪組織の NAMPT の発現量が増加するのかを検証し、さらに高脂肪食による耐糖能の低下に対する効果を検討した。高脂肪食にゲニステインを 0.2% 混餌した飼料を 3 ヶ月間自由摂取したマウスでは、高脂肪食のみを摂取したマウスと比較して皮下脂肪組織および内臓脂肪組織の NAMPT のタンパク質量、NAD 含有量が顕著に増加した。また、耐糖能を経口糖負荷試験で検証した結果、ゲニステインの摂取により食後血糖値の上昇が抑制された。その一方、NAMPT のヘテロノックアウトマウスでは、ゲニステイン摂取による、脂肪組織の NAMPT のタンパク質量、NAD 含有量の増加は示されず、ゲニステイン摂取による血糖値の上昇抑制効果も示されなかった。以上の結果から、NAMPT による NAD 量の維持は、血糖値の正常維持に寄与しており、ゲニステインによる血糖値の上昇抑制効果は NAMPT の発現増加に起因していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda T, Watanabe S, Mitani T.	4. 巻 86
2. 論文標題 Genistein regulates adipogenesis by blocking the function of adenine nucleotide translocase-2 in the mitochondria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 260-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab203.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka E, Mitani T, Nakashima M, Yonemoto E, Fujii H, Ashida H.	4. 巻 100
2. 論文標題 Theobromine enhances the conversion of white adipocytes into beige adipocytes in a PPAR activation-dependent manner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2021.108898.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mitani T, Watanabe S, Wada K, Fujii H, Nakamura S, Katayama S	4. 巻 522
2. 論文標題 Intracellular cAMP contents regulate NAMPT expression via induction of C/EBP in adipocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 770-775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 NAKASHIMA Momona, MITANI Takakazu	4. 巻 68
2. 論文標題 25-Hydroxyvitamin D Increases Insulin-Stimulated Glucose Uptake by Enhancing Adipocyte Differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 420 ~ 428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.68.420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三谷壘一、池田貴弘、渡邊駿
2. 発表標題 ゲニステインの新規標的分子を介した脂質生成制御メカニズム
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中嶋桃菜、三谷壘一
2. 発表標題 脂肪細胞の分化に及ぼすビタミンD受容体と11 $\beta$ -HSD1の関係性について
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第190回例会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 三谷壘一
2. 発表標題 カカオ苦味成分であるテオブロミンの脂肪細胞の褐色化誘導効果
3. 学会等名 第26回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 三谷壘一、渡邊駿、春山莉輝、富岡郁夫
2. 発表標題 ゲニステインは膜タンパク質との結合を介して抗肥満効果を発揮する
3. 学会等名 JSoFF2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 三谷壘一、渡邊駿、春山莉輝、梅澤公二、富岡郁夫
2. 発表標題 NAD合成酵素の発現を介したゲニステインの抗肥満効果の解析
3. 学会等名 第79回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 米本英都、田中瑛美、中嶋桃菜、三谷壘一
2. 発表標題 テオプロミン摂取による白色脂肪細胞のベージュ化誘導に関する分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第79回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 三谷壘一、中嶋桃菜
2. 発表標題 25-ヒドロキシビタミンDによる脂肪細胞の分化制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 渡邊 駿、三谷 壘一、片山 茂、中村 宗一郎
2. 発表標題 ゲニステインによるNAD+合成関連酵素NAMPTの発現制御メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（福岡）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三谷 壘一、和田 憲次郎、渡邊 駿
2. 発表標題 NAMPTは細胞内NAD+量を増加することで脂肪細胞への分化を制御する
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部大会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 貴弘、渡邊 駿、三谷 壘一
2. 発表標題 ゲニステインによる脂質形成抑制に関わる標的タンパク質の同定とその機能の解明
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部大会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 春山 莉輝、梅澤 公二、渡邊 駿、三谷 壘一
2. 発表標題 GenisteinがPHB1を介して細胞内NAD+量を増加するメカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会第187回中部支部例会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 貴弘、渡邊 駿、三谷 壘一
2. 発表標題 ANT2が脂肪細胞の脂質形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会第187回中部支部例会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三谷 壘一、池田 貴弘、渡邊 駿
2. 発表標題 ゲニステインはミトコンドリア標的分子を介して脂質蓄積を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会（仙台）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学 学術情報オンラインシステムSOAR <a href="http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.ypcCPUkh.html">http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.ypcCPUkh.html</a>
---

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------