

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689019

研究課題名(和文) 脱アセチル化酵素サーチュインによる新規代謝産物O-アセチルADPリボースの機能

研究課題名(英文) The role of novel metabolite, O-acetyl-ADP-Ribose

研究代表者

中川 崇 (NAKAGAWA, TAKASHI)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：40610374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化関連分子Sirtuinによる新規代謝産物O-acetyl-ADP-Riboseの生理活性の解明を目指し研究を行った。まず、O-acetyl-ADP-Riboseを組織内、細胞内において定量する測定系をLC-MSを用いて構築した。次に、分解酵素として報告されている、Nudt5に着目し、それらの発現を低下させた細胞を構築し、細胞内代謝がどの様に変化するかメタボロミクスを用いて検討したところ、様々なNAD関連代謝物に変化が見られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated the physiological role of novel metabolite, O-acetyl-ADP-Ribose (OAcADPR). First, the system to measure the OAcADPR was established by using LC/MS. Next, I focused on the enzyme, Nudt5, which catabolized the OAcADPR. I generated the Nudt5- knocked down cell and examined the intracellular metabolism in these cells, and found that various NAD-related metabolites were altered in these cells.

研究分野：代謝学

キーワード：代謝 メタボローム NAD

1. 研究開始当初の背景

O-acetyl-ADP-Ribose (OAADPR) は、老化関連分子である Sirtuin による、NAD 依存性脱アセチル化反応の副産物であり、今までに同定されていなかった新規代謝産物である。Sirtuin は老化や、生活習慣病、神経変性疾患、がんなどの様々な老化関連疾患に関与していることが知られている。これら Sirtuin の作用の多くは、基質の脱アセチル化を介して働いているが、最近のいくつかの研究結果より、OAADPR 自身が生理的活性を持つ事が報告されている。そのことから、Sirtuin の一部の機能は、OAADPR を介していることが推測されるが、詳細は明らかでない。酵母では OAADPR を代謝する、YSA1 という蛋白質が同定されており、ミトコンドリアに局在していると考えられている。一方、哺乳類では Nudt5、Nudt9 などの Nudix hydrolase が *in vitro* にて OAADPR を AMP に代謝できることがわかっている。そこで、OAADPR 合成酵素でもある Sirtuin や、OAADPR 代謝酵素である Nudt5、Nudt9 などの機能解析を通して、OAADPR 代謝系の分子基盤を確立するとともに、OAADPR の生理・病理的役割について、特に老化、老化関連疾患との関連を解明し、OAADPR 代謝系をターゲットとした、将来的な治療法開発に結びつけていく。

2. 研究の目的

本研究課題では、老化関連分子であるサーチュインの O-アセチル ADP リボース(OAADPR) 合成酵素としての役割に注目し、OAADPR の生理活性を解明するとともに、OAADPR 代謝と老化関連疾患とのつながりについて、網羅的メタボロミクスや遺伝子改変マウスを用いて、分子レベルから個体レベルまで包括的に解析することを目標とする。

3. 研究の方法

OAADPR を組織内、細胞内において定量する測定系を FT-MS、LC-MS/MS を用いて構築した。また、OAADPR の代謝酵素としての候補である Nudt5、Nudt9 について細胞内局在など、分子特性について解析を行った。さらに、Nudt5、Nudt9 のノックダウン細胞株、過剰発現細胞株を使って、OAADPR 代謝経路の改変が、細胞内のグローバルな代謝に影響を与えるか、質量分析によるメタボロミクスで検討した。また *in vivo* での OAADPR 代謝の役割を明らかにするため、Nudt5、Nudt9 のノックアウトマウスを作成し、解析することを目的とした。

4. 研究成果

老化関連分子 Sirtuin による新規代謝産物 O-acetyl-ADP-Ribose (OAADPR) の生理活性の解明を目指し研究を行った。まず、OAADPR を組織内、細胞内において定量する測定系を FT-MS、LC-MS/MS を用いて構築した。OAADPR は市販されていないことから、NAD より合成した。アセチル基の部位については既報の通

り、2' と 3' のものが 50% ずつの割合でこんごうしたものであった。また、クロマトグラム上も 2 峰性のピークとなり、それぞれ 2' -OAADPR、3' -OAADPR 由来のものと考えられた。そこで、これら測定系を用いて各種培養細胞、マウス組織中の OAADPR レベルを測定したところ、検出は可能であったものの、極めて低いレベルであった。OAADPR は Nudix hydrolase である Nudt5 によって、さらに分解され AMP へと代謝されていく。Nudt5 については、現在までにこうした酵素学的な研究については、よく行われているが、あまり細胞生物学的な研究は行われて来ていなかった。そこで、Nudt5 についての基礎的な機能解析を、培養細胞を用いて行った。まず、Nudt5 のウサギポリクローナル抗体を作成し、評価を行った。293T 細胞において Nudt5-Flag を過剰発現したところ、明瞭なバンドを検出できた。また、各種培養細胞株においても endogenous の Nudt5 を同様のサイズにて検出できた。このことから、我々が作製した Nudt5 抗体は、過剰発現した Nudt5 のみならず、endogenous の Nudt5 を検出できることが解った。そこで、Nudt5 の各種組織での発現パターンを調べるため、各種組織の whole tissue lysate を用いて WB を行ったところ、Nudt5 はユビキタスに発現し、特に白色脂肪細胞に比較すると、褐色脂肪細胞ではその発現が強いことが解った。次に、Nudt5 細胞内でどの様に機能しているのかが明らかにするために、まず Nudt5 の細胞内局在について検討した。Hela 細胞を用いて、Nudt5-Flag を過剰発現し、その細胞内局在について調べた。Flag M2 抗体を用いた蛍光免疫染色において、Nudt5 は diffuse な細胞質パターンを示した。また、Hela 細胞を用いて、細胞質分画、オルガネラ分画のフラクションを行い、endogenous Nudt5 についての WB を行ったところ、Nudt5 は細胞質分画に存在することが解った。以上から、Nudt5 は細胞質に局在していることが解った。次に、Nudt5 の代謝に与える影響を検討するため、Nudt5 の発現を低下させた細胞を shRNA を用いて構築した。ウエスタンブロッティングにて Nudt5 の発現を確認したところ、Nudt5 はほぼ検出できなかった。そこで、この Nudt5 ノックダウン株を用い、細胞内代謝がどの様に変化するかメタボロミクスを用いて検討した。すると、予想に反し、OAADPR に著明な変化は認められなかったが、様々な NAD 関連代謝物に変化が見られた。また Nudt5、Nudt9 のノックアウトマウスについては、十分な解析が行えておらず、それらについては今後の課題となった、

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Takikawa A, Usui I, Fujisaka S, Ikutani

- M, Senda S, Hattori S, Tsuneyama K, Koshimizu Y, Inoue R, Tanaka-Hayashi A, Nakagawa T, Nagai Y, Takatsu K, Sasaoka T, Mori H, Tobe K. Deletion of SIRT1 in myeloid cells impairs glucose metabolism with enhancing inflammatory response to adipose tissue hypoxia. *Diabetology Int.* 7(1): 59-68. (2016)
2. Yamamoto M, Hikosaka K, Mahmood A, Tobe K, Shojaku H, Nakagawa T*. Nmnat3 is not essential for the maintenance of mitochondrial NAD level in vivo. *PLOS ONE* 11(1): e0147037. (2016) (*Corresponding author)
 3. Yoon MJ, Yoshida M, Johnson S, Takikawa A, Usui I, Tobe K, Nakagawa T, Yoshino J, Imai SI. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD+ and Function in Mice. *Cell Metab.* 21(1): 1-12. (2015)
 4. Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno H, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T*. Deficiency of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 3 (Nmnat3) Causes Hemolytic Anemia by Altering the Glycolytic Flow in Mature Erythrocytes. *J Biol Chem.* 289(21): 14796-14811. (2014) (*Corresponding author)
 5. Nakagawa T*, Guarente L, SnapShot: Sirtuins, NAD and Aging. *Cell Metab.* 20(1): 192. (2014) (*Co-Corresponding author)
 6. Sasaki T, Kikuchi O, Shimpuku M, Susanti VY, Yokota-Hashimoto H, Taguchi R, Shibusawa N, Sato T, Tang L, Amano K, Kitazumi T, Kuroko M, Fujita Y, Maruyama J, Lee YS, Kobayashi M, Nakagawa T, Minokoshi Y, Harada A, Yamada M, Kitamura T. Hypothalamic SIRT1 prevents age-associated weight gain by improving leptin sensitivity in mice. *Diabetologia.* 57(4): 819-831. (2014)
 7. 中川崇: NAD とその関連代謝物による生活習慣病の制御、医学のあゆみ 250(9) : 831-832. (2014)
 8. 中川崇: HDAC/Sirtuin 阻害薬・活性化剤と疾患治療、遺伝子医学 MOOK 別冊「細胞死研究の今-疾患との関わり、創薬に向け
- てのアプローチ」 92-95. (2013)
9. 中川崇: ミトコンドリアを介した老化・寿命制御機構、Clinical Neuroscience 30(9): 1054-7. (2012)
- 〔学会発表〕(計 31 件)
1. 中川崇: メタボロミクスを用いた NAD 代謝の疾患生物学, 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会・ワークショップ「NAD と FAD の分子生物学: 水溶性ビタミンの多面的理解に向けて»; 2015 Dec 1-4; 神戸. (招待講演)
 2. 山本雅司, 中川崇, 猪原秀典: Nmnat3 はミトコンドリアの NAD 合成にとって必須ではない, 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会; 2015 Dec 1-4; 神戸.
 3. Mehmood A, Gulshan M, Yamamoto M, Okabe K, Yaku K, Nakagawa T: Nmnat3 overexpression protected against High fat diet- and age- induced obesity and glucose intolerance. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会; 2015 Dec 1-4; 神戸.
 4. Gulshan M, Mehmood A, Yamamoto M, Okabe K, Yaku K, Nakagawa T: Establishing the positive role of Nmnat3 in protecting against malarial infection in mice model. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会; 2015 Dec 1-4; 神戸.
 5. 岡部圭介, 薄井勲, 戸邊一之, 中川崇: Nampt を介した NAD 合成は 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化に伴う代謝リモデリングを制御する, 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会; 2015 Dec 1-4; 神戸.
 6. 夜久圭介, 中川崇: NAD の細胞膜輸送動態の同定, 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会; 2015 Dec 1-4; 神戸.
 7. Nakagawa T: Elucidating physiological and pathological roles of NAD synthesis enzyme, Nmnat3. International Society for Tryptophan Research Conference (ISTRY2015). 2015 Sep 16-18; Grand Rapids, USA. (Invited lecture)
 8. Nakagawa T, Gulshan M: NAD Synthesis Enzyme, Nmnat3 Protects against High Fat Diet- and Age-Induced Obesity in Mice. *FASEB Science Research*

conferences: NAD+ Metabolism and Signaling, 2015 Aug 9-14; Timmendorfer Strand, Germany.

9. Nakagawa T, Mehmood A: Deficiency of Nmnat3 in mice causes hemolytic anemia and increases the susceptibility to malaria infection. Gordon Conference: Red Cells. 2015 Jun 28-Jul 3; Holderness, USA.
10. Nakagawa T, Gulshan M: NAD Synthesis Enzyme, Nmnat3 Protects against High Fat Diet- and Age-Induced Obesity in Mice. Keystone symposia Conference: Obesity and the Metabolic Syndrome: Mitochondria and Energy Expenditure. 2015 Mar 22-27; Whistler, Canada.
11. 中川崇、彦坂圭介 : NAD 合成酵素 Nmnat3 の欠損は溶血性貧血を引き起こす、第 36 回日本トリプトファン研究会学術集会; 2014 年 10 月 17-18 日; 旭川
12. 中川崇、彦坂圭介 : NAD 合成酵素 Nmnat3 の赤血球での役割 . 日本生化学会北陸支部第 32 回大会; 2014 年 5 月 24 日; 富山
13. 彦坂圭介、中川崇 : NAD 合成酵素 Nmnat3 欠損マウスは溶血性貧血を呈する、第 36 回日本分子生物学; 2013 年 12 月 3-6 日; 神戸
14. 彦坂圭介、中川崇 : NAD 合成酵素 Nmnat3 欠損マウスのメタボローム解析 . 第 8 回メタボロームシンポジウム; 2013 年 10 月 3-4 日; 福岡
15. Nakagawa T, Hikosaka K. Physiological Function of NAD Synthesis Enzyme, Nmnat3. Cold Spring Harbor Asia Meeting, Molecular Basis of Aging; 2013 年 9 月 9 日-13 日; Suzhou, China.
16. 彦坂圭介、中川崇 : Nmnat3 欠損マウスの解析 . 第 12 回日本ミトコンドリア学会、2012 年 12 月 14-16 日、つくば .
17. 中川崇、彦坂圭介 : ミトコンドリア NAD 合成酵素 Nmnat3 と代謝性疾患との関連 . 第 12 回日本ミトコンドリア学会、2012 年 12 月 14-16 日、つくば .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中川 崇 (Takashi Nakagawa)
富山大学・先端ライフサイエンス拠点・
特命助教
研究者番号 : 40610374