

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11808

研究課題名(和文) NAD+の構造変化に伴う糖代謝の変化と疾患マーカーとしての有用性評価

研究課題名(英文) Structural modification of NAD+ by peroxynitrite attenuates cellular metabolism and is involved in metabolic diseases

研究代表者

江口 裕伸 (Eguchi, Hironobu)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60351798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題において、ペルオキシ亜硝酸イオン(ONOO-)によりNAD+がニトロ化され、機能が低下することを見出し、さらにニトロ化部位を同定した。NAD+のニトロ化は酵素の活性低下、ピルビン酸濃度の低下、ミトコンドリア複合体Iの発現量の減少を引き起こし、代謝を低下させることが示唆された。さらにNMNはサイトカインの作用にも影響することが認められた。これらの結果から、NAD+はニトロ化により機能が低下し、細胞機能を低下させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAD+は多くの酵素に必要な因子であり、タンパク質機能やエネルギー代謝に関与している。NAD+は糖尿病やがんの治療、老化防止にも有効であり、代謝性疾患での標的因子として注目されている。本課題ではNAD+不足やNAD+機能低下を引き起こす原因として、酸化傷害によるNAD+の構造変化を同定し、細胞代謝低下を引き起こすことを明らかにした。NAD+のニトロ化による機能低下は新規の知見であり、病態との関与をさらに解析することで新たな治療薬や検査の開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was found that the function of NAD+ was reduced by peroxynitrite-mediated nitration. The nitration site of NAD+ was identified by MS/MS analysis. Nitration of NAD+ decreased the enzymatic activity, pyruvate concentration and expression of mitochondrial complex I. In addition, it was found that NMN affects the cytokines activity. These results suggest that nitration reduces NAD+ functions and attenuates cellular functions.

研究分野：レドックス代謝

キーワード：NAD+ ニトロ化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病では細胞内へのグルコース取り込み低下により ATP 産生が低下する。この状態では解糖系での NADH 産生がエネルギー源として重要になるが、そのためには NAD⁺が絶えず供給される必要があり、NAD⁺不足は細胞死を引き起こし、病態悪化の原因となる。実際に、2 型糖尿病や肥満では NAD⁺量の低下が認められることから、NAD⁺は生活習慣病に關与する分子として注目されている。

(2) 糖尿病や肥満では一酸化窒素 (NO) も増加することも知られており、細胞死や病態に深く関わっていることが多数報告されている。NO による生体分子への影響はタンパク質や脂質のニトロ化/酸化修飾であり、それらの活性などにも大きく影響することが報告されている。

(3) NAD⁺は酸化還元反応に關与する分子であり、細胞内での多くの代謝に必須の働きを持つ。NAD⁺は活性酸素の影響を受けることが知られているが、NO が NAD⁺におよぼす直接的な影響はほとんど明らかになっていない。

(4) 申請者は、NO の代謝物である ONOO⁻により NAD⁺が酸化、ニトロ化、脱ニコチンアミド化修飾されることを初めて見出し、これらの修飾による代謝と細胞機能の低下について解析してきた。その中で、ONOO⁻による NAD⁺の構造変化は多くの代謝を低下させる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本課題では、NAD⁺と NMN の構造変化が引き起こす糖代謝機能の低下や、多くの代謝酵素と同様に NAD⁺やその類似体を基質とするサーチュインや糖代謝関連酵素を介した生活習慣病やがんへの影響を解析することで生活習慣病への關与を詳細に明らかにし、新しいバイオマーカーとして NAD⁺の構造変化から細胞機能を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ONOO⁻による NAD⁺の構造変化の解析

ONOO⁻で処理した NAD⁺を HPLC および質量分析 (MS/MS) により解析した。HPLC 用のカラムは ZIC-HILIC (ミリポア、150x4.6 mm) を使用し、アセトニトリル-酢酸アンモニウム溶液で分離し、245/340nm にて構造変化物を検出した。

質量分析による解析では、カラムに Intrada Organic Acid、150x2 mm を使用した。解析には TripleTOF6600 (SCINEX 社) を用いた。

(2) ニトロ化 NAD⁺による糖代謝への影響

NAD⁺は ONOO⁻溶液 (Dojindo) により 1 時間室温にて処理をした。このニトロ化 NAD⁺を用いて、HepG2 細胞の GAPDH 活性を測定した。ONOO⁻処理をしていない NAD⁺を用いた GAPDH 活性と比較し、酵素活性への影響を評価した。

ニトロ化処理をしたニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) を HepG2 細胞に反応させ、細胞中のピルビン酸濃度の変化を定量して解析した。

(3) ONOO⁻による NAD⁺のサーチュイン活性への影響の解析

NAD⁺は ONOO⁻溶液 (Dojindo) により 1 時間室温にて処理をした。このニトロ化 NAD⁺を用いて、リコンビナント SIRT1 の活性を系広報にて解析した。ONOO⁻処理をしていない NAD⁺を用いた SIRT1 活性と比較し、酵素活性への影響を評価した。

(4) ONOO⁻による NMN のミトコンドリア機能への影響の解析

ニトロ化処理したニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) を HepG2 細胞に反応させ、細胞中の TFAM の変化を特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにて解析した。

ニトロ化処理したニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) を HepG2 細胞に反応させ、ミトコンドリア電子伝達系の複合体の変化を特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにて解析した。

(5) サイトカイン活性への影響

KG-1 細胞に IL-18 で刺激を行い、24 時間後に上清中の IFN γ の量を定量した。同時に NMN またはニトロ化処理をした NMN を加え、IFN γ の量に変化があるか解析した。

4. 研究成果

(1) ONOO⁻によるNAD⁺の構造変化の解析

ONOO⁻溶液を用いてPBSに溶解したNAD⁺を処理し、HPLCにて反応物を解析した。その結果、NAD⁺は修飾または分解を受け、複数の反応物が生成されることが認められた。その中で6.7分のリテンションタイムのピークはNAD⁺であり、4.7分のリテンションタイムのピークはNADHであることが、標品のリテンションタイムから推察された。しかし、その他の複数のピークに関しては構造が未知であったため、分取し、質量分析にて解析を試みた。しかし、これらのピークを明確に分離する条件が決定できず、さらにそれぞれのピークの濃度が非常に薄かったため、分取による構造解析は断念することとなった。(図1.2)

図1 NAD⁺のHPLCチャート

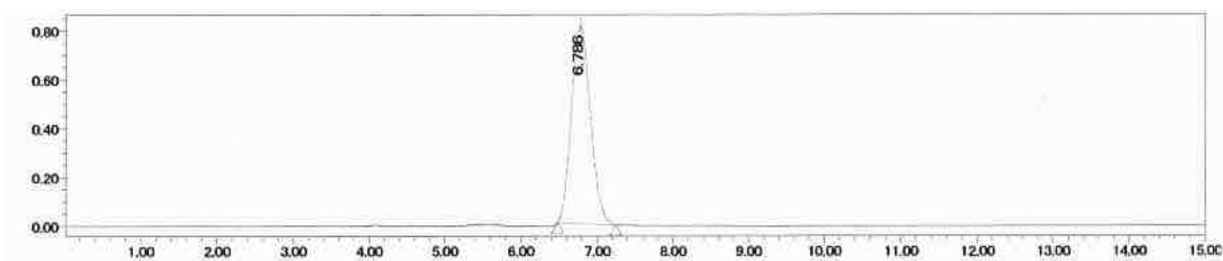
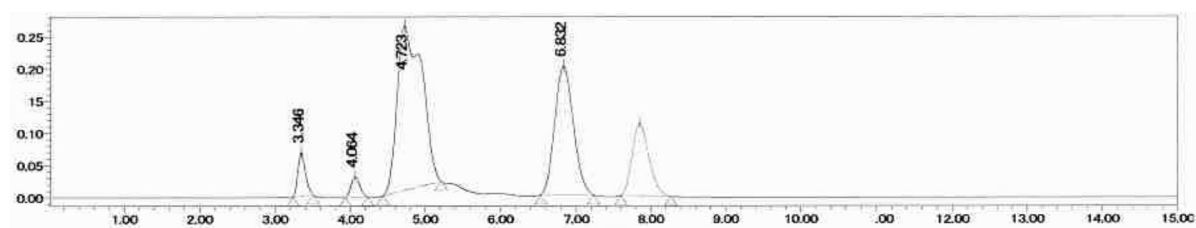
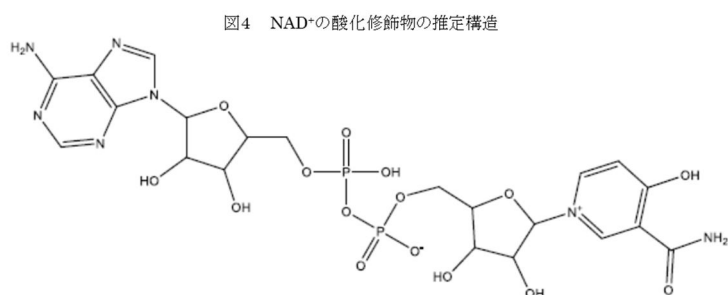
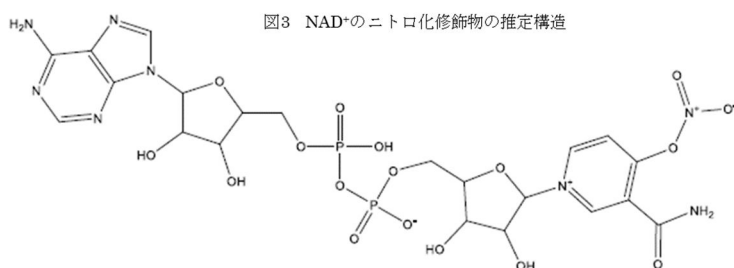


図2 ONOO⁻処理を行ったNAD⁺のHPLCチャート



そこでMS/MSによる構造解析を行った。NAD⁺はHPLC解析と同様にONOO⁻にて処理し、反応液をMS/MSにより解析した。その結果、分子量からいくつかの分解物およびニトロ化修飾物、酸化修飾物の構造が認められた。これまでの予備解析の結果やニトロ化の報告例から、NAD⁺の塩基部分にニトロ基が付加されると予想していたが、解析の結果、ニトロ基の付加はニコチン酸アミド部分で生じており、この部分はNAD⁺が酸化還元反応を触媒する部分であった(図3)。このニトロ基が修飾されたNAD⁺は生成量が少なく、おそらく不安定なため別の構造に変化することが考えられた。そこで他の修飾物をMS/MSにて解析したところ、ニトロ基修飾が生じていた部分が水酸基になっている構造が認められた。この構造はニトロ基付加体と比べ多く検出されたことより、NAD⁺はニトロ化されたものの、比較的安定な酸化型に変化している可能性が考えられた(図4)。また、これら以外にも分解物と考えられる複数の構造変異体が検出され、ニコチンアミド部分が欠落したものも認められた。このように、これらのONOO⁻による影響は、すべてニコチンアミド部分に生じることが認められた。



(2) ONOO⁻によるNAD⁺の糖代謝への影響の解析

GAPDH 活性への影響

NAD⁺は細胞内において多くの酵素反応の補酵素として利用されている。

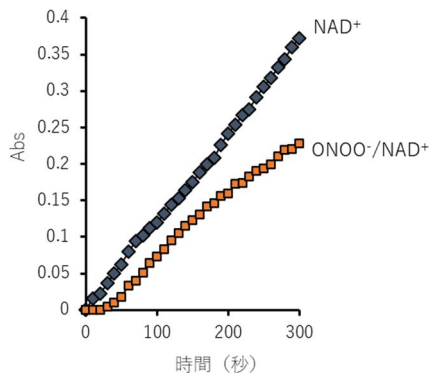


図5 ニトロ化処理したNAD⁺ではGAPDH活性が低下する。

NAD⁺の細胞への補充が糖尿病の予防や糖代謝に有用であることが報告されたことから、ニトロ化による糖代謝への影響を解析した。グルコースは細胞内で解糖経路により代謝されるが、解糖経路の中でNAD⁺はGAPDHによりNADHに変換される。そこでニトロ化NAD⁺によりGAPDHの活性に変化があるかを検討するため、NAD⁺をONOO⁻で処理したのちに、GAPDH活性の測定に用いた。その結果、ニトロ化処理によりGAPDHの活性が低下していることが認められた(図5)。また、解糖経路においてNAD⁺を利用する乳酸脱水素酵素においても同様に活性が低下することを認めている。

細胞内ピルビン酸濃度への影響

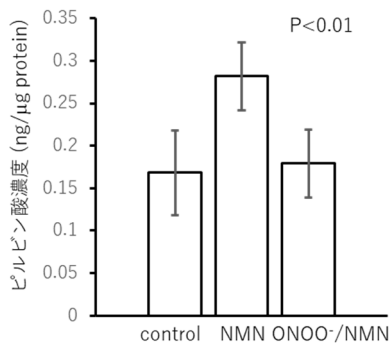


図6 ニトロ化NMNによる細胞内ピルビン酸濃度の減少

GAPDH活性が低下していたことより、解糖系全体において代謝不全を生じていることが示唆された。そこで細胞内ピルビン酸濃度を測定したところ、ニトロ化NMNで処理するとコントロールと比べ優位にピルビン酸濃度の低下が認められた(図6)。これらの結果から、ニトロ化はNAD⁺の機能を阻害して解糖経路の代謝を低下させることが示唆され、NOが多く産生される糖尿病などにおいては病態悪化に繋がるものと考えられた。このようなニトロ化によるNAD⁺の機能低下は、図3と4で示したようにニコチンアミド部分の変化によるものと考えられる。

(3) ONOO⁻によるNAD⁺のサーチュイン活性への影響の解析

NAD⁺は酸化還元反応に関わる酵素反応だけでなく、サーチュインの基質としても重要な役割を担っている。転写制御に関わるヒストン脱アセチル化酵素であるサーチュインはその活性にNAD⁺を必須としており、マウスの寿命を延ばし、糖・脂質代謝を高めることから細胞保護効果のある酵素として注目されている。

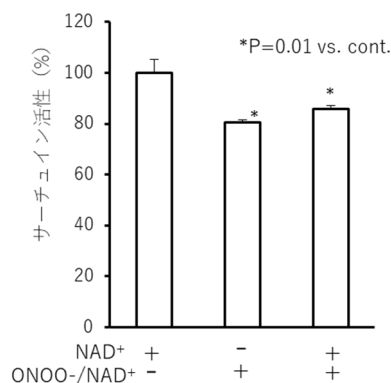


図7 ニトロ化処理したNAD⁺ではサーチュイン活性が低下する。

サーチュインの作用部位においてもニコチンアミド部分は重要であるため、ニトロ化修飾を受けたNAD⁺ではどのような影響があるかを検討した。NAD⁺をONOO⁻で処理したのちに、SIRT1活性の測定に用いた。その結果、ニトロ化処理によりサーチュインの活性が低下していることが認められた(図7)。この結果から、ニトロ化はNADPH同様、NAD⁺の機能を阻害してサーチュインによる代謝を低下させることが示唆された。このように、ONOO⁻によるNAD⁺の修飾はニコチンアミド部分に生じているため、NAD⁺を利用する大部分の反応系が影響を受け、活性や機能が低下すると考えられた。

(4) ONOO⁻によるNMNのミトコンドリア機能への影響の解析

ニトロ化処理をしたNMNによるTFAMの発現量の変化

TFAMは転写因子として働き、ミトコンドリアの維持に必須の働きを担っている。TFAMは高発現したマウスでは心不全や老化などに対して保護的作用を示すことから、病態で生じると考えられるNAD⁺のニトロ化修飾がTFAMにどのような影響を及ぼすかを検討した。ウエスタンブロッティングによりTFAMの発現量を解析した結果、ニト

口化 NMN は TFAM の発現に影響しなかった。このことからニトロ化 NAD⁺は代謝に影響を及ぼすものであり、遺伝子発現には関与していないものと考えられた。

ニトロ化処理をした NMN によるミトコンドリア複合体の変化

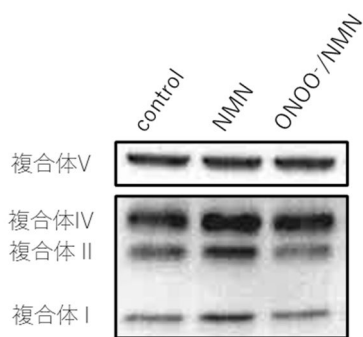


図8 ニトロ化NMNによるミトコンドリア複合体の発現抑制

ミトコンドリアではクエン酸回路で生じた NADH により電子伝達が行われ、エネルギーとして ATP が産生される。これまでの結果より NAD⁺がニトロ化により機能不全となることが示唆されたため、ミトコンドリア複合体にどのような影響を及ぼすかウエスタンブロッティングにて解析した。その結果、NMN の投与では複合体 I、II および IV の発現量が増加することが認められたが、ニトロ化処理によりその発現増強作用は抑制されていた(図8)。この結果から、ニトロ化された NMN は細胞内に取り込まれないか、取り込まれても代謝に利用できないものと考えられた。細胞に内への取り込みについては、化学合成したニトロ化 NMN を用いて引き続き解析を行っている。

(5) サイトカイン活性への影響

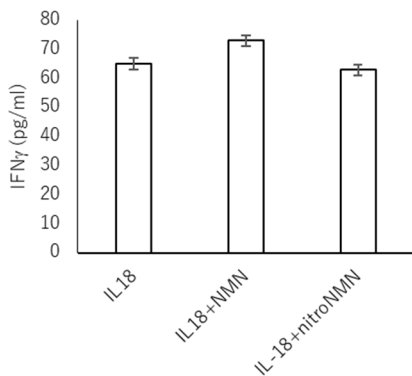


図9 NMNによるサイトカイン産生の増強作用

NAD⁺は細胞保護作用や代謝促進作用があることは報告されているが、炎症状態においてはどのような役割を担っているか明らかになっていない。これまでに IL-18 がニトロ化により活性低下し、サイトカイン分泌が低下することを見出ししてきた。そこで NMN の投与により IL-18 の IFN_γ 分泌機能が変化するかを検討したところ、NMN によりわずかではあるが IFN_γ 産生が増加した(図9)。また、この作用はニトロ化処理により抑制された。この結果から、NAD⁺は炎症時において細胞応答性を向上させる働きがあり、感染時などに防衛的に作用することが示唆された。しかし、感染時に多く産生される NO によって NMN は不活性化し、細胞応答性を低下させることも示唆された。

(6) まとめ

NAD⁺は細胞内において酸化還元反応など多くの代謝に関わり、細胞の保護や老化の抑制作用、糖尿病などの改善など多くの利点が報告されている。しかし一方で、酸化還元を受ける特徴から活性酸素や活性窒素による影響も受けると考えられるが、これまでその報告はほとんどない。本課題では NO 代謝物の一つである ONOO⁻ による影響を解析し、その構造変化を明らかにできた。ONOO⁻ による修飾は、今回検出できたものはすべてニコチンアミド部分に生じており、NAD⁺が関与する大部分の反応に影響を及ぼすことが示唆された。実際、GAPDH やサーチュインの酵素活性低下や生成物であるピルビン酸濃度の減少が認められ、ニトロ化は反応系に大きく影響するファクターであることが明らかとなった。さらにサイトカインの活性にも影響を及ぼすことが認められ、これらは学会にて報告してきた。このように NAD⁺のニトロ化が代謝に大きく影響することが認められ、今後は化学標識した NMN または NAD⁺を用いて細胞内及び生体内検出を解析し、病態とのかかわりを明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口裕伸
2. 発表標題 SIN-1およびペルオキシ亜硝酸イオンによるインターロイキン18の発現変化と機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江口裕伸
2. 発表標題 ニトロ化によるIL-18のIFN 誘導活性変化と糖代謝経路への影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口裕伸
2. 発表標題 ニトロ化によるIL-18の機能変化と糖尿病への関与の検討
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO) (30508958)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	吉原 大作 (YOSHIHARA DAISAKU) (00567266)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究分担者	井原 秀之 (IHARA HIDEYUKI) (50452834)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	
研究分担者	鈴木 敬一郎 (SUZUKI KEIICHIRO) (70221322)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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