

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21051

研究課題名(和文) NAD前駆体のトランスポーターの同定

研究課題名(英文) Elucidation of transportation mechanism of NAD precursors

研究代表者

夜久 圭介 (Yaku, Keisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・研究員

研究者番号：70761865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生活習慣病の予防・治療効果を期待されているNAD前駆体の輸送動態とその後の代謝動態について明らかにすることを目的とした。そこで、NAD代謝物の一斉測定系をLC-MSを用いて構築した。この測定系を用いてNAD代謝を鳥瞰したところ、NADの前駆体のひとつであるNRの代謝機構に、これまで知られていた経路とは異なる機構が存在することが明らかになった。

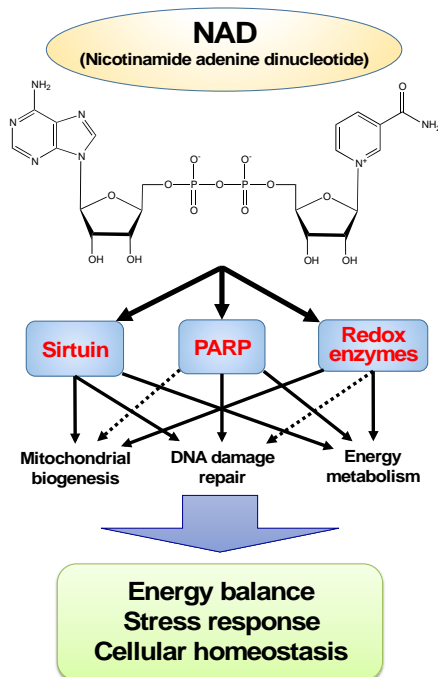
研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to elucidate the transportation mechanism of NAD precursors which are expected to have beneficial effects on lifestyle diseases. To measure NAD metabolites all at once, we developed NAD metabolomics by combining HPLC and mass spectrometry. By using the methods, we found that NR, which is one of the major NAD precursors, was metabolized via novel pathway distinct from classical route.

研究分野：代謝

キーワード：NAD 代謝 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) は細胞内の酸化還元反応に関わる補酵素であり、解糖系や TCA 回路といったエネルギー産生系をはじめ、様々な代謝反応において重要な役割を果たしている。また、DNA 修復に関わる Poly ADP ribose polymerase (PARP) やタンパク質の脱アセチル化を触媒する Sirtuin は NAD を基質として消費することから、NAD は老化や生活習慣病と深く関わっている。そのため、NAD はこうした疾患の治療ターゲットとして考えられており、実際に NAD の中間代謝物である Nicotinamide mononucleotide (NMN) や Nicotinamide riboside (NR) の投与は、肥満や 2 型糖尿病、神経変性疾患などに対する治療・予防効果を持つことがマウスなど動物を用いた研究を中心に数多く報告されている。また、ヒトにおいても NMN や NR を用いた臨床研究が始まっており、NAD 前駆体による介入試験が注目を浴びている。しかし、これら NAD 前駆体の細胞への取り込みや、その後の代謝動態についての詳細については、現在でも不明な部分が多い。一般に、生体膜の極性化合物の通過は細胞膜に存在するトランスポーターによって為される。*E. coli* では NMN や NR に対するトランスポーターとして PnuC が同定されている。また、*S. cerevisiae* では NR トランスポーターとして Nrt1 が、さらにミトコンドリアにおける NAD トランスポーターとして Ndt1p と Ndt2p が同定されている。しかしながら、これらはヒトを含めた哺乳類においてはホモログが存在せず、依然として哺乳類の生体膜における NAD 前駆体の輸送機構については不明な部分が多い。そこで本研究では、哺乳類における NAD 前駆体の輸送動態、ならびに NAD 前駆体の代謝経路の解明を目指し、研究を行った。



2. 研究の目的

本研究では、NAD の前駆体、特に NMN と NR について、その輸送動態ならびに代謝経路の解明を目指した。また培養細胞、マウスを用いて、これら NAD 前駆体代謝の生理的意義について包括的に解析し、NAD 前駆体を用いた介入試験における重要な知見を得ることを目標とした。

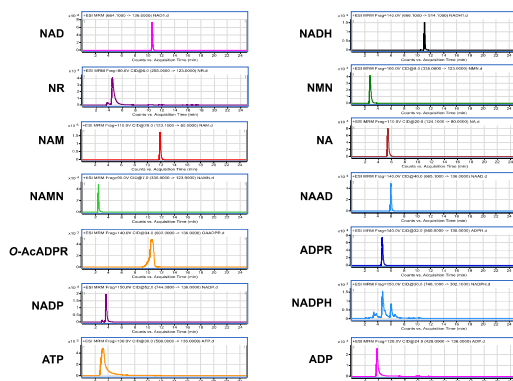
3. 研究の方法

NAD 代謝を詳細に検討するためには、NAD だけでなく、NAD 前駆体や様々な NAD 関連代謝物を同時にかつ正確に定量する必要がある。そこで、これら代謝物を一斉に測定する測定系である NAD メタボロミクスを、HPLC と質量分析計を組み合わせて構築した。NAD 前駆体の動態について基礎的な知見を得るため、構築した NAD メタボロミクスを用いて、培養細胞への NAD 前駆体投与時の NAD 代謝動態を詳細に解析した。また、NAD 前駆体の候補トランスポーターについて、siRNA でノックダウンし、NAD 前駆体の取り込みに影響があるか検討した。さらに、マウスに NAD 前駆体を投与することで、個体レベルでの NAD 前駆体投与時の NAD 代謝を解析し、NAD 前駆体代謝の生理的意義について解析した。

4. 研究成果

NAD 関連代謝物の正確な定量を可能にするため、これら代謝物を一斉に測定する系である NAD メタボロミクスを、トリプル四重極質量分析計を用いて構築した(下図参照)。

トリプル四重極質量分析計による NAD メタボロミクス



NMN に関しては候補となるトランスポーターが存在しないが、NR の細胞への取り込みは Equilibrative nucleoside transporter (ENT) family の阻害剤である dipyridamole によって阻害されることが間接的に示されている。そこで、dipyridamole が実際に NR の細胞輸送を阻害していることを確認するため、培養細胞に NR と dipyridamole を添加し、先に構築した NAD メタボロミクスを用いて細胞への NR 取り込みを直接的に測定したところ、dipyridamole の添加によって培養細胞の NR 取り込みは著明に阻害されるこ

とが解った。これらの結果は、NR の取り込みは ENT family を媒介していることを示唆するものであった。そこで、細胞膜に存在する主要な ENT family である ENT1 と ENT2 の siRNA を用いてノックダウンし、NR の取り込みを検討したが、それぞれ単独の ENT のノックダウンでは NR の取り込みは阻害されなかった。この結果は ENT1 と ENT2 はお互いに相補的に働いている可能性を示唆していた。一方、NMN は細胞内に輸送される際、膜酵素である CD73 によって NR に変換され、NR として取り込まれることが報告されている。そこで、siRNA によって CD73 をノックダウンし、NMN の輸送動態を調べたところ、細胞外での NMN から NR への変換は NMN の輸送に必須ではないこと、すなわち NMN は NMN として細胞内に取り込まれる機構が存在することが明らかになった。また、細胞内で NR を NMN に変換する酵素である Nrk1 を siRNA によってノックダウンし、NR の動態を確認したところ、非常に興味深いことに NR は既知の代謝経路とは異なる新規の経路をたどって NAD に変換されることが見いだされた。さらに、マウスの静脈に NR を投与し、各組織における NAD メタボロームを測定した結果、特に肝臓と腎臓においてこの新規代謝経路が活発であることが示唆された。NR は NAD 代謝をターゲットとした介入試験において最も注目されている前駆体の一つであるため、本研究で得られた成果を発展させることは NAD による抗生活習慣病、抗老化戦略に重要であると考えられた。その一方で、NMN と NR のトランスポーターの同定にはまだ至っておらず、今後の重要な課題であると考えられた。

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 7 件)

1. Yaku K, Okabe K, Nakagawa T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity. **Ageing Research Reviews**. (DOI: 10.1016/j.arr.2018.05.006) (2018) (in press)
2. Gulshan M*, Yaku K*, Okabe K*, Mahmood A, Sasaki T, Yamamoto M, Hikosaka K, Usui I, Kitamura T, Tobe K, Nakagawa T*. Overexpression of Nmnat3 efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance. **Ageing Cell**. (DOI:10.1111/ace.12798) (2018) (in press) (*equally contributed)
3. Yaku K, Okabe K, Nakagawa T. Simultaneous measurement of NAD metabolome in aged mice tissue using

liquid chromatography tandem-mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**. 32(6): e4205. (2018)

4. Yaku K, Matsui-Yuasa I, Kojima-Yuasa A. 1'-Acetoxychavicol Acetate Increases Proteasome Activity by Activating cAMP-PKA Signaling. **Planta Med**. 84(3):153-159. (2018)
5. Talukdar G, Inoue R, Yoshida T, Ishimoto T, Yaku K, Nakagawa T, Mori H. Novel role of serine racemase in anti-apoptosis and metabolism. **Biochim Biophys Acta**. 1861(1): 3378–3387. (2017)
6. Kojima-Yuasa A, Yamamoto T, Yaku K, Hirota S, Takenaka S, Kawabe K, Matsui-Yuasa I. 1'-Acetoxychavicol acetate ameliorates age-related spatial memory deterioration by increasing serum ketone body production as a complementary energy source for neuronal cells. **Chem Biol Interact**. 257:101-109. (2016)
7. 夜久圭介, 中川崇: NAD 代謝による老化制御機構、基礎老化研究 41(1): 23-27. (2017)

[学会発表](計 6 件)

1. 夜久圭介, 中川崇: マラリア感染時の免疫応答における NAD の役割、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6-9 日; 神戸
2. 中川崇, 夜久圭介: NAD 前駆体投与による NAD 合成経路の解析、第 38 回日本トリプトファン研究会学術集会、2017 年 12 月 2-3 日; 名古屋
3. 夜久圭介, 中川崇: Nmnat3 過剰発現マウスにおける新規 NAD アナログの検出、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年 5 月 19-21 日; 宜野湾
4. 夜久圭介, 中川崇: 質量分析計を用いた新規 NAD アナログの解析、第 37 回日本トリプトファン研究会学術集会、2017 年 12 月 2-3 日; 名古屋
5. 夜久圭介, 中川崇: NAD 前駆体輸送機構の解明、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日; 仙台
6. 夜久圭介, 中川崇: NAD の細胞膜輸送動態の同定、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015 年 12 月 1-4 日; 神戸

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/metabolism/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夜久 圭介 (Keisuke, Yaku)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)

病態代謝解析学講座・研究員

研究者番号: 70761865