

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11072

研究課題名(和文) NAD+代謝のトランスオミクス解析

研究課題名(英文) Transomic analysis of NAD+ metabolism

研究代表者

原 伸正 (Hara, Nobumasa)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：20284028

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)：長寿に関わるとされるサーチュインの酵素活性に必須のNAD+の細胞内濃度([NAD+])の制御機序解明は重要な研究課題である。様々な哺乳動物株化培養細胞および初代培養細胞において、[NAD+]は細胞の種類が異なっても比較的一定に保たれること、NAD+合成の律速酵素活性の高低に関わらずNAD+合成速度および[NAD+]は狭い範囲に保たれること、合成速度と分解速度はつり合うことを明らかにした。さらにこの律速酵素の発現を増加させても、NAD+合成速度は比例して増加せず、さらに分解速度も同程度に増加すること、結果として[NAD+]は顕著に増加しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性疾患がさまざまな臓器のNAD+レベルの減少と関連し、NAD+レベルを増加させ、長寿に関わるとされるNAD+依存性脱アセチル化酵素サーチュイン(SIRT)を活性化することがこれら疾患の予防および治療に有益であると考えられている。そのため細胞内NAD+濃度([NAD+])制御の機序解明は重要である。本研究のNAD+合成と分解の緊密な連関のメカニズムの解明は、[NAD+]を増加させSIRTを活性化すること、従って加齢性疾患の予防および治療につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that cellular NAD+ concentrations ([NAD+]), the rates of the synthesis and breakdown of NAD+ are maintained within a narrow range in various mammalian cells including primary cultured cardiomyocytes under the resting conditions. We have also found that [NAD+] moderately increases upon induction of the rate-limiting enzyme in NAD+ synthesis. The moderate increase in cellular [NAD+] likely results from suppressed increase in NAD+ synthesis and the balanced increase in its breakdown. Many studies suggest that cellular NAD+ levels fall during aging and in age-related diseases such as metabolic syndrome, neurodegeneration, and cancer, and that raising the NAD+ levels back to normal healthy levels promotes healthy aging and delays the age-related diseases. Future elucidation of the molecular basis of the tight link between the NAD+ synthesis and its breakdown should provide an important cue toward the NAD+-boosting strategy to prevent and treat the age-related diseases.

研究分野：生化学

キーワード：NAD+ サーチュイン Nampt

1. 研究開始当初の背景

(1) 年齢が高くなるほど認知症、ガン、動脈硬化、糖尿病などの病気を持つ人が多くなる。これら加齢性疾患が老化とともに起こる臓器の NAD⁺ レベルの減少と関連があり、NAD⁺ レベルを増加させることがその予防と治療に有益であると考えられている。NAD⁺ は長寿に関わるとされる NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素サーチュイン (SIRT) を活性化するからである。

(2) 各臓器の NAD⁺ レベルの報告は数多くあるがその値は含量であって絶対濃度ではない。SIRT を活性化するために必要な NAD⁺ 濃度 (NAD⁺ に対する Km 値) は既知であるが、NAD⁺ 含量のデータでは細胞内での SIRT の活性を推測することができない。

(3) 哺乳動物細胞において NAD⁺ 合成はニコチンアミド (Nam) から律速酵素である Nam ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Nampt) の触媒により開始され、主としてポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ-1 (PARP-1) により Nam へと分解される。NAD⁺ レベルはその合成と分解のつり合いで決まるので、NAD⁺ レベルの変動を理解するためには、NAD⁺ 合成速度と分解速度を NAD⁺ レベルと同時に定量しなければならない。しかし現在そのような方法がないため、NAD⁺ レベルの変動が合成の変化によるのか、分解の変化なのか、その両者なのか、明らかにすることができない。

(4) 加齢とともに NAD⁺ 合成・分解に関与する酵素の発現や活性が変化するとされるが、これが NAD⁺ 合成・分解速度にどれだけ影響を与え、どれだけ NAD⁺ レベルを変動させるかについての定量的なデータは全く存在しない。

2. 研究の目的

哺乳動物細胞において (1) NAD⁺ 合成・分解酵素活性の変動が NAD⁺ 合成・分解速度および NAD⁺ 濃度にどう反映されているか、(2) 合成速度の変化が分解速度に影響を与えるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 哺乳動物由来株化培養細胞 (Fao、HepG2、HeLa、HEK293、HEK293T、Caco-2) および非がん細胞 (C2C12、H9c2) およびラット心筋初代培養細胞を用意する。

(2) 4 個の重水素 (D) で標識された Nam (d4-Nam と記し、図 1 左に示す) を上記哺乳動物細胞に投与すると、Nam 部分に 3 個の D を有する NAD⁺ (d3-NAD⁺ と記し図 1 右に示す) が産生される。d3-NAD⁺ の産生とともにラベル前に

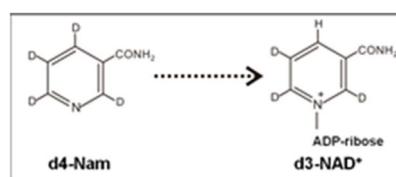


図1

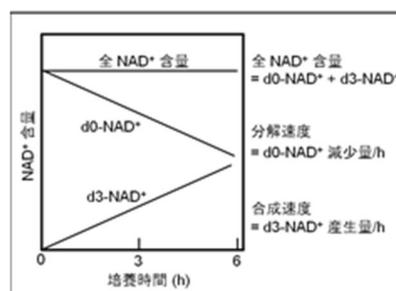


図2

存在していた NAD⁺ (d0-NAD⁺ と記す) が減少する。LS/MS/MS 法で測定した d3-NAD⁺ の産生速度と d0-NAD⁺ 減少速度からそれぞれ NAD⁺ 合成速度 (R_S) と分解速度 (R_B) を、d3-NAD⁺ と d0-NAD⁺ の合計から全 NAD⁺ 量を計算する (図 2)。用いる細胞は大きさが顕著に異なる。データを異なる細胞間で比較するため、自動セルカウンターを用いて測定した細胞の体積により、上記測定値を基準化する。すなわち細胞の NAD⁺ 含量ではなく NAD⁺ 濃度を提示する。

(3) Nampt 酵素活性の測定は細胞抽出液を放射性 Nam とインキュベートすることで行う。

(4) 誘導発現系により Nampt の細胞内酵素量を段階的に増加させ、全 Nampt 酵素活性、NAD⁺ 合成・分解速度、細胞内 NAD⁺ 濃度の関連を調べる。

4. 研究成果

(1) 定常状態の細胞内 NAD⁺ 濃度は狭い範囲に維持されている。

Fao、HepG2、HeLa、HEK293、HEK293T、Caco-2 の細胞内 NAD⁺ 濃度 ($[NAD^+]$) は細胞種によらず 400-700 μ M と比較的狭い範囲に維持されていた (図 3D)。

非がん細胞 (C2C12、H9c2) およびラット心筋初代培養細胞においても同様に 400-500 μ M と比較的狭い範囲に維持されていた (図 3D)。

(2) 定常状態の NAD⁺ 合成速度 (R_S) と分解速度 (R_B) は細胞種が異なっても大きく変わらず、狭い範囲に維持されていた (図 3B、C)。

(3) R_S は細胞の全 Nampt 酵素活性 (Nampt activity) よりはるかに小さい

HeLa 細胞において、NAD⁺ 合成速度 (R_S) は 33 μ M/h であり Nampt 酵素活性の 180 μ M/h よりはるかに低い (図 3A、B)。

調べた細胞のなかで最も大きい NAD⁺ 合成速度 (R_S) (62 μ M/h) をもつ Fao 細胞でも Nampt 酵素活性 74 μ M/h より低い合成速度であった (図 3A、B)。

図 3 の NAD⁺ 合成速度 (R_S) と Nampt 酵素活性を再プロットすると、細胞内全 Nampt 酵素活性が大きくても NAD⁺ 合成速度は大きくなく、NAD⁺ 合成速度が細胞内全 Nampt 酵素活性と直接比例しないことが明らかとなっ

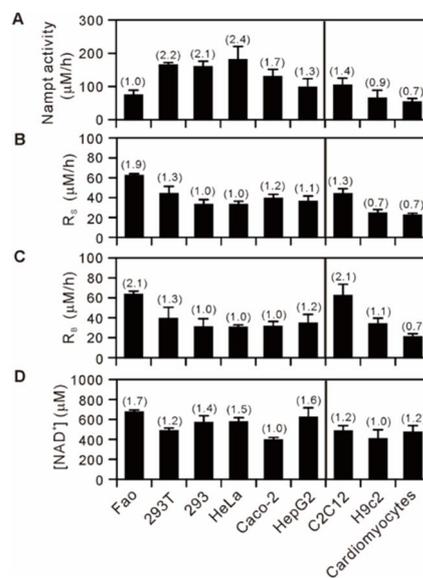


図3: NAD⁺ レベル、NAD⁺ 合成速度 (R_S)、NAD⁺ 分解速度 (R_B)、全 Nampt 活性の絶対値

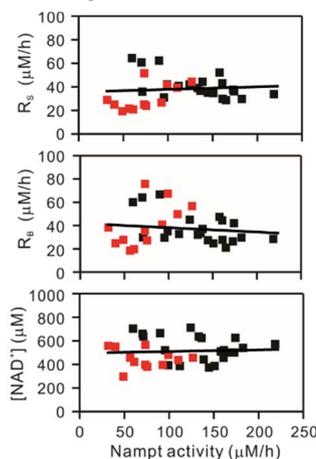


図4: 全 Nampt 活性、NAD⁺ 合成速度 (R_S)、NAD⁺ 分解速度 (R_B)、NAD⁺ レベルの関係、この図と図5の赤シンボルは非がん細胞の値

た(図4A)。これらの結果は細胞内で Nampt が抑制されていることを示している。

(4) NAD⁺ 分解速度は合成速度に依存する

図4B、Cに示すようにNAD⁺ 合成速度 (R_S) と分解速度 (R_B) は調べたすべての細胞において類似の値を示した。図5でこれらを再プロットしたところ両者は良い直線関係を示した。このことはNAD⁺ 合成と分解が緊密に関連していることを示している。

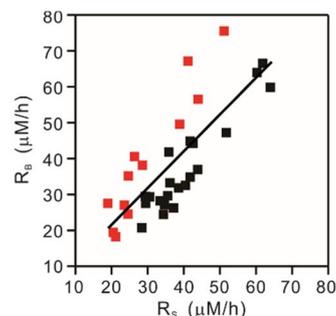


図5: NAD⁺ 合成速度 (R_S) と NAD⁺ 分解速度 (R_B) の関係

(5) Nampt の酵素量を増加させても細胞内 NAD⁺ 濃度は比例して増加しない

誘導発現系を用いて、HeLa 細胞内の Nampt 酵素量を強制的に増加させると(図6A) 細胞内の全 Nampt 酵素活性が6倍以上増加した(図6B)。

しかし細胞内 NAD⁺ 濃度と NAD⁺ 合成速度 (R_S) の増加は50%以下であった(図6C、D)。

このNAD⁺ 合成速度 (R_S) のわずかな増加にともなって分解速度 (R_B) も増加した。以上のことから Nampt の酵素量を増加させても細胞内 NAD⁺ 濃度は比例して増加せず、Nampt が細胞内で抑制されていること、さらに NAD⁺ 分解が活性化されることが示唆された。

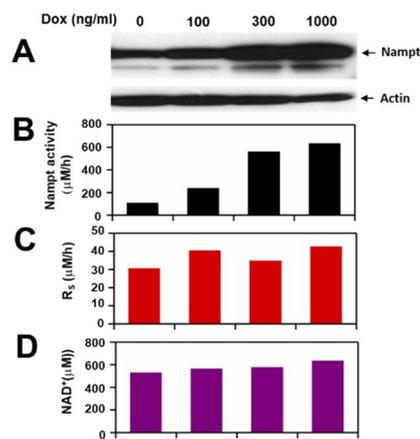


図6: Nampt量を増加させた細胞における全Nampt活性、NAD⁺ 合成速度 (R_S)、NAD⁺ 分解速度 (R_B)、NAD⁺ レベルの関係

(6) 定常状態における NAD⁺ 分解に関与する酵素の同定

NAD⁺ 分解酵素の候補と報告されている PARP-1 および PARP-2 の NAD⁺ 分解への関与を PARP-1、PARP-2 遺伝子ノックアウト細胞を作成し検討したが、これらの関与は否定された。NAD⁺ 分解に関与する酵素はいまだ同定されていない。

(7) 本研究では、NAD⁺ 合成・分解速度と NAD⁺ 濃度を同時に定量する最初の方法を用いて、NAD⁺ 合成酵素活性、NAD⁺ 合成・分解速度、NAD⁺ 濃度を定量的に関連づけた。さらに NAD⁺ 含量ではなく NAD⁺ 濃度を定量した。

様々な哺乳動物株化培養細胞および初代培養細胞において、NAD⁺ 濃度は細胞の種類が異なっても比較的一定に保たれること、NAD⁺ 合成の律速酵素 Nampt の活性の高低に関わらず NAD⁺ 合成速度および NAD⁺ 濃度は狭い範囲に保たれること、NAD⁺ 合成速度と分解速度はつり合うことを明らかにした。さらに Nampt の酵素量を強制的に増加させても、NAD⁺ 合成速度は比例して増加せず、さらに分解速度も同程度に増加すること、結果として NAD⁺ 濃度

は顕著に増加しないことを明らかにした。

本研究の NAD⁺ 合成と分解の緊密な連関のメカニズムの解明は、生理学的な NAD⁺ 濃度変動の機序の解明に寄与するとともに、NAD⁺ 濃度の恒常性の破綻が関与するとされる加齢性疾患の発症機序の解明や、これら疾患への効果的な予防的・治療的アプローチの開発につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara Nobumasa, Osago Harumi, Hiyoshi Mineyoshi, Kobayashi-Miura Mikiko, Tsuchiya Mikako	4. 巻 14
2. 論文標題 Quantitative analysis of the effects of nicotinamide phosphoribosyltransferase induction on the rates of NAD+ synthesis and breakdown in mammalian cells using stable isotope-labeling combined with mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0214000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nobumasa Hara, Takeshi Nakamura, Harumi Osago, Mineyoshi Hiyoshi, Mikiko Kobayashi-Miura, Mikako Tsuchiya
2. 発表標題 Global acetylation levels of histone H4 lysine 16 and H3 lysine 9 may not represent cellular SIRT1 activity
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 伸正、長子 晴美、日吉 峰麗、三浦 美樹子、土屋 美加子
2. 発表標題 NAD+分解におけるSARM1の関与について
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 原 伸正、長子 晴美、日吉 峰麗、三浦 美樹子、土屋 美加子
2. 発表標題 哺乳動物初代培養細胞におけるNAD+代謝の解析
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 原 伸正, 長子 晴美, 日吉 峰麗, 三浦 美樹子, 土屋 美加子
2. 発表標題 NAD+代謝におけるSIRT1の関与について
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------