

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11696

研究課題名(和文) 定常状態下の細胞でNAD+を分解している酵素の同定とNAD+濃度調節機構の解明

研究課題名(英文) Identification of NAD⁺-degrading enzymes for the breakdown of NAD⁺ under the resting conditions

研究代表者

原 伸正 (Hara, Nobumasa)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：20284028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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⁺の細胞内濃度の制御機構の解明は重要な研究課題である。本研究では、NAD⁺分解酵素の候補の発現を増減させた細胞を作成し、NAD⁺分解速度を測定することで、特定のNAD⁺分解酵素を除去あるいは増加させると、補償的に他のNAD⁺分解酵素活性が誘導あるいは抑制され、結果としてこれら修飾細胞においてNAD⁺分解活性が大きく変わらないように制御されていることを示唆する結果を得、NAD⁺濃度調節の機構の一端を明らかにした。

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⁺レベルの低下と関連があり、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⁺])調節の制御機構の解明は重要である。本研究はNAD⁺分解酵素による[NAD⁺]調節機構の一端を明らかにした。このことは[NAD⁺]を増加させSIRTを活性化すること、すなわち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)：NAD⁺ is continuously degraded and synthesized under resting conditions in mammalian cells. We deleted or overexpressed the known NAD⁺-degrading enzymes including PARP1 and CD38 and found that these modifications do not induce obvious changes in the rate of cellular NAD⁺ breakdown. No observed changes in the rate are, at least in part, the result of the compensatory regulation of cellular NAD⁺ breakdown. Thus, the total cellular NAD⁺-degrading activity may be kept constant against changes in the expression of NAD⁺-degrading enzymes. 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. Further elucidation of the molecular mechanism underlying the compensatory regulation of cellular NAD⁺ breakdown should provide an important clue toward an NAD⁺ boosting strategy.

研究分野：生化学

キーワード：NAD⁺代謝 ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ CD38 サーチュイン 老化

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⁺ レベルはその合成と分解のつり合いで決まるので、どのようにして NAD⁺ レベルが変動するか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ぬ。これまでそのような研究方法がないため、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ず、NAD⁺ 濃度調節の機序解明は遅れていた。

(3) 哺乳動物細胞における NAD⁺ 分解は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ 1 (PARP1)、PARP2、SIRT1、SARM1、CD38 により仲介されると報告されているが、これら候補酵素の関与に対する確実な証拠はない。例えば、定常状態で常に起こっている NAD⁺ の分解は PARP1 が専ら担っていると考えられてきた。PARP1 ノックアウトにより細胞内 NAD⁺ レベルが増加するからである。しかし、この細胞において NAD⁺ 分解速度が野生型細胞と比べて減少したとの報告はないため、PARP1 の NAD⁺ 分解への関与は確定していない。すなわち NAD⁺ 合成に対し、NAD⁺ 分解についての確実なデータは極めて少ない。

2. 研究の目的

哺乳動物細胞において、候補とされる上記 NAD⁺ 分解酵素の発現を増減させ、NAD⁺ 合成・分解速度、NAD⁺ 濃度を測定することで、定常状態の NAD⁺ 濃度を制御している NAD⁺ 分解酵素を同定し、NAD⁺ 濃度調節の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PARP1、PARP2、SIRT1、SARM1、CD38の発現量を強制的に変動させた哺乳動物由来株化培養細胞 (HeLa、HEK293T) を樹立し、これら細胞の NAD⁺ 合成・分解速度、NAD⁺ 濃度を測定する。

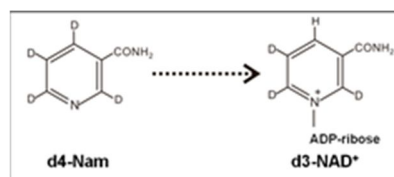


図1

(2) これら NAD⁺ 分解酵素の発現の増減に対応して NAD⁺ 分解速度を変動させ、NAD⁺ 濃度を变化させる酵素を同定する。

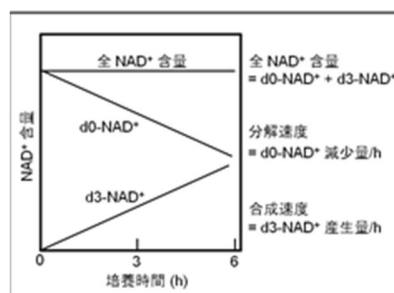


図2

(3) 4個の重水素 (D) で標識されたニコチンアミド (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⁺ 合成速度と分解速度を、d3-

NAD⁺ と d0-NAD⁺ の合計から全 NAD⁺ 量を計算する (図 2)。分解速度は培養液中に放出された Nam から得た。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、測定した細胞の体積により、上記測定値を基準化、絶対値を得る。

4. 研究成果

(1) PARP1 を除去しても細胞の NAD⁺ 分解速度は低下しない。

遺伝子編集により PARP1、PARP2、両者を消失させた細胞 (それぞれ 1KO、2KO、DKO と表示) を作製した (図 3A)。

PARP1 を除去した細胞 (1KO) では以前の報告に一致して過酸化水素 (H₂O₂) 投与による細胞内 NAD⁺ 濃度の低下が起こらず PARP1 欠損が確認された (図 3B)。

PARP1 欠損細胞 (1KO) では過去の報告に一致して細胞内 NAD⁺ 濃度は増加したが、驚くべきことに測定した NAD⁺ 分解速度は低下しなかった (図 3C)。

PARP2 欠損細胞 (2KO) においても NAD⁺ 分解速度は低下しなかった (図 3C)。

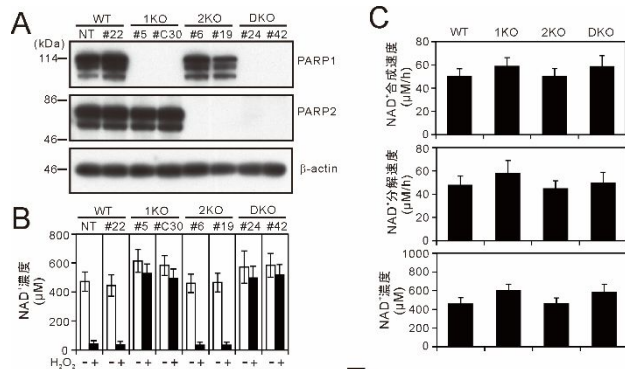


図 3

(2) CD38 の発現増加は細胞の NAD⁺ 分解速度を増加させない。

野生型の細胞 (WT) は CD38 を発現していない (図 4A)。野生型細胞においてすでに定常状態で NAD⁺ は分解されている (図 4C) ことから、定常状態での NAD⁺ 分解に CD38 は関与していない。

CD38 を強制的に過剰発現させた細胞 (CD38 OE) を作製した (図 4A)。この細胞では過去の報告に一致して細胞外に投与した NAD⁺ を分解することから (図 4B)、CD38 の発現が確認された。

CD38 過剰発現細胞 (CD38 OE) では過去の報告に一致して細胞内 NAD⁺ 濃度は低下したが、驚くべきことに測定した NAD⁺ 分解速度は増加しなかった (図 4C)。

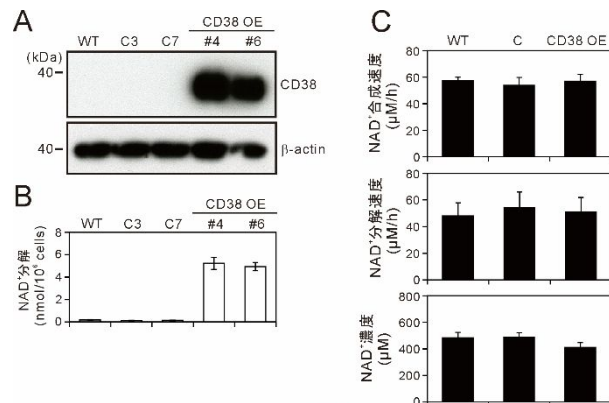


図 4

(3) 遺伝子編集により SIRT1 を除去しても細胞の NAD⁺ 分解速度は低下しなかった (データは示さず)。

(4) 遺伝子編集により SARM1 を除去しても細胞の NAD⁺ 分解速度は低下せず、一方 SARM1 の発現を誘導しても NAD⁺ 分解速度は増加しなかった (データは示さず)。

(5) PARP1 を欠損させると他の異なる NAD⁺ 分解酵素が誘導される。

野生型細胞 (WT) では PARP1 阻害剤存在下で NAD⁺ 分解速度が低下した (図 5)。一方 PARP1 欠損細胞 (PARP1 KO) ではこの阻害剤の効果は認められなかった (図 5)。PARP1 が定常状態の NAD⁺ 分解に関与することが明らかとなった。

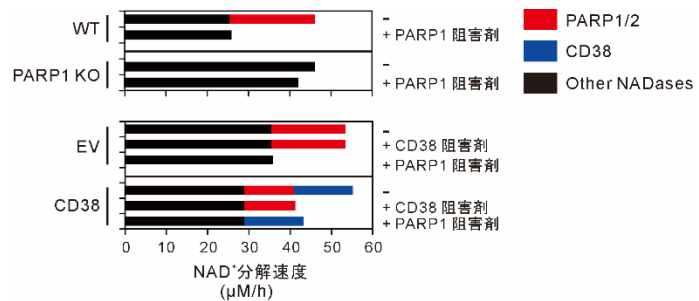


図5

PARP1 阻害剤存在下で NAD⁺ 分解速度を両細胞で比較したところ、PARP1 欠損細胞 (PARP1 KO) では PARP1 が存在しないにもかかわらず野生型細胞より大きい NAD⁺ 分解速度を示した (図 5)。このことは PARP1 を欠損させると PARP1 以外の NAD⁺ 分解酵素活性が誘導されることを示している。

(6) CD38 を発現させると内在性の NAD⁺ 分解酵素活性が抑制される。

CD38 阻害剤投与により、対照細胞 (EV) ではなく、CD38 発現細胞 (CD38) においてのみ NAD⁺ 分解速度が低下した (図 5)。CD38 が発現しているならば、この酵素が定常状態の NAD⁺ 分解に関与することが明らかとなった。

CD38 阻害剤存在下で NAD⁺ 分解速度を両細胞で比較したところ、対照細胞 (EV) における分解速度が CD38 発現細胞の速度に比較して大きかった (図 5)。この結果は CD38 を発現させると内在性の NAD⁺ 分解酵素活性が抑制されることを示している。

PARP1 阻害剤の NAD⁺ 分解速度に対する抑制効果は、対照細胞 (EV) に比べ CD38 発現細胞 (CD38) において小さかった (図 5)。このことは CD38 を発現させると内在性の NAD⁺ 分解酵素すなわち PARP1 活性が抑制されていることを示している。

(7) PARP1 および CD38 (もし発現していれば) が定常状態の細胞の NAD⁺ 分解に関与することが明らかとなった。しかし、PARP1 を恒常的に欠損させる、あるいは CD38 を強制的に発現させると、それぞれ補償的に他の分解酵素活性が誘導あるいは抑制され、結果としてこれら修飾細胞において NAD⁺ 分解速度が大きく変わらないように制御されていることを示唆する結果を得た。

(8) 加齢性疾患がさまざまな臓器の NAD⁺ レベルの低下と関連があり、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 SIRT1 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。本研究は NAD⁺ 分解酵素に関わる細胞内 NAD⁺ 濃度調節機序の一端を明らかにした。このことは細胞内 NAD⁺ 濃度を増加させ SIRT1 を活性化すること、すなわち加齢性疾患の予防および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2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nobumasa Hara, Harumi Osago, Mineyoshi Hiyoshi, and Mikiko Kobayashi-Miura	4. 巻 -
2. 論文標題 The rate of NAD ⁺ breakdown is maintained constant against deletion or overexpression of NAD ⁺ -degrading enzymes in mammalian cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Takeshi Nakamura, Nobumasa Hara, Harumi Osago, Mineyoshi Hiyoshi, Mikiko Kobayashi-Miura, Mikako Tsuchiya	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of NAD ⁺ Synthesis Levels on Sirtuin 1 Deacetylase Activity in Mammalian Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Shimane J. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 59-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nobumasa Hara, Harumi Osago, Mineyoshi Hiyoshi, Mikiko Kobayashi-Miura
2. 発表標題 Involvement of CD38 in NAD ⁺ turnover in mammalian cells
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

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

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