

NAD 代謝関連酵素の老化・老化関連疾患での役割

富山大学 先端ライフサイエンス拠点

中川 崇

1. はじめに

NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) はミトコンドリアにおける、酸化リン酸化や、TCA回路、 β 酸化など、様々な代謝酵素反応に関与する補酵素である。近年では、老化関連分子であるSirtuinの介する脱アセチル化反応にNADが必要であることが明らかとなり、老化と代謝を結びつける、栄養状態のセンサーとしての役割も注目を浴びるようになってきた。しかしながら、こういった重要性にも関わらず、ミトコンドリアでのNAD合成経路や輸送システムについては、未だ不明な部分が数多く残っている。またNADの関与する、個々の酵素反応自体は、非常に良く研究されているが、代謝システム全体で見た際のNAD合成系の役割、つまりはミトコンドリアNAD合成系が、どのような制御を受けて、どのような生理的・病理的条件下で働いているかなどの情報はほとんど解っていない。本研究では、このような「古くて新しい」NADのミトコンドリアでの代謝システムに注目し、古典的な酵素学に加え、遺伝子改変動物に、メタボロミクス解析といった、新しい技術を結びつけ、今までとは違った側面から見た、ミトコンドリアでのエネルギー代謝制御機構の解明を目指していく。

2. 方法

1) Nmnat3過剰発現マウスの高脂肪食誘導性肥満における役割

ミトコンドリアにおいて、NAD合成の鍵を握ると考えられている酵素、Nmnat3 (Nicotinamide adenylidtransferase 3)を、全身で過剰発現するマウス(Nmnat3 Tgマウス)を6週齢から、60%高脂肪食を与える群と、コントロール餌(20%脂肪)を当てる群とに分け、体重変化を調べた。

2) マウス組織を使ったメタボロミクス解析

Nmnat3 Tgマウスとコントロールの野生型マウスより、肝臓、心臓など各臓器を摘出し、過塩素酸にて除タンパクを行い、代謝産物を抽出した。メタボロミクス解析にはThermo Scientific社のOrbitrap LTQを用いた。測定はFT-MSによるFull Scanにて行い、イオン化はESI法を用いた。ESIの条件は、ネガティブイオンモードで、キャピラリー温度375°C、イオンスプレー電圧4500Vにて行った。また、HPLCの分離条件は、Waters社のAtlantis T3カラムを用い、移動相には5mMギ酸アンモニウム、メタノールを使用した。抽出サンプルは、測定の直前にギ酸アンモニウムにて中和し、0.45 μ mフィルターにて濾過した後、オートインジェクターを用いて20 μ l注入した。測定後のデータ解析は、メタボロミクス差分解析ソフトSIEVEを用いて行い、アライメント、スペクトル抽出、代謝物同定を行った。

3. 結果

1) Nmnat3過剰発現マウスの高脂肪食誘導性肥満における役割

Nmnat3 Tgマウスで、Nmnat3が過剰発現されているか、マウス肝臓ミトコンドリアを単離し、ウエスタンブロッティングにてNmnat3の発現を確認した。すると、図1に示されるように、Nmnat3が、ミトコンドリアレベルで過剰発現されていることを確認した。そこで、老化関連疾患のうち、生活習慣病、特に肥満に着目し、これらNmnat3 Tgマウスが肥満において、Nmnat3の過剰発現が何らかの影響を及ぼすか検討を行った。Nmnat3 Tgマウスと野生型マウスでは、通常餌投与時では特に、体重に大きな違いはなかった(図2)。そこで、6週齢から60%高脂肪食餌をNmnat3 Tgマウスと野生

型マウスの両群に与えたところ、野生型マウスでは時間経過とともに著名な体重増加が見られたが、Nmnat3 Tgマウスでは、野生型マウスと比較し、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示した。

図1

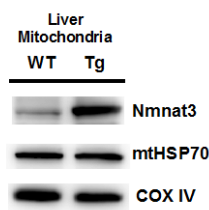
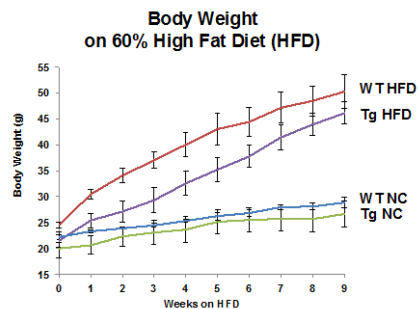


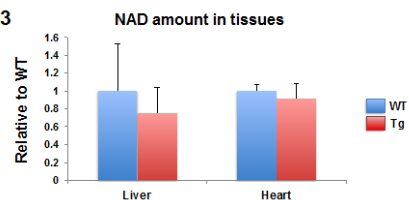
図2



2) Nmnat3過剰発現マウスでのメタボロミクス解析

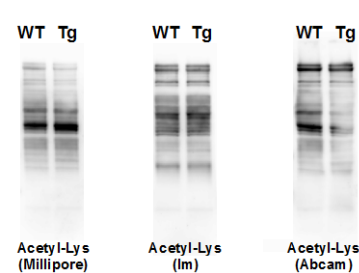
Nmnat3 Tgマウスでは、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示したことから、その分子メカニズムを探るべく質量分析計を用いた、代謝物の測定を行った。まず、Nmnat3の過剰発現が、NADの増加をもたらし、NADを介した代謝経路の改変を来しているか検討を行った。そこで、各組織におけるNAD量を測定したところ予想に反し、NAD量に変化はなかった

図3



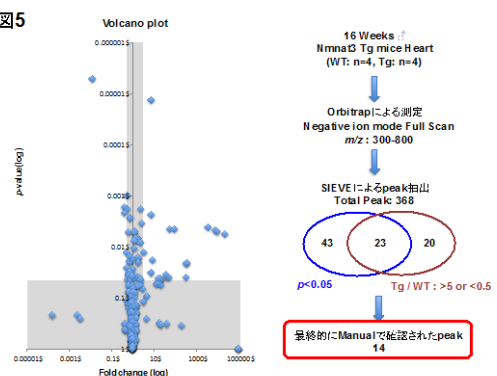
(図3)。さらに、ミトコンドリアNADが脱アセチル化酵素 Sirtuinを介して、ミトコンドリアタンパク質の脱アセチル化を引き起こしているかを調べるため、肝臓よりミトコンドリアを単離し、抗アセチルリジン抗体を用いたウエスタンブロッティングで評価した。しかしながら、こちらに関しても、野生型とNmnat3 Tgマウスとの間で、ミトコンドリアタンパク質のアセチル化状態については特に変化が見られなかった(図4)。そこで、Nmnat3 Tgマウスにおける代謝経路の変化を明らかにするため、フーリエ変換型質量分析計 (Thermo社Orbitrap) を用いた、ノンターゲットな網羅

図4



的メタボロミクスを行った。野生型とNmnat3 Tgマウス心臓より、それぞれ代謝物を抽出し、ネガティブイオンモードで測定を行った。得られたデータセットをSIEVEにて解析と行ったところ、合計368個のマスピークを得ることができた。さらに、それらを縦軸がp-value、横軸がNmnat3 Tgと野生型マウスのRatioをLog2スケールで取ったVolcano plotにて表したところ、図5のようなグラフが得られた。そこで、p-value <

図5



0.05かつ、Nmnat3 Tg / WT Ratio >5もしくは<0.5で、データ抽出を行ったところ、合計23個の代謝物が得られた。さらにマニュアルで同位体などを除くことで、最終的に14個のNmnat3 Tgマウスにて変動する代謝物を得ることができた。これらの14個の代謝物に対し、精密質量を用いて、Chem Spiderによる同定を試みたが、精密質量の情報のみでの代謝物同定は困難であった。今後さらにMS/MS情報を集めるなどして、これら代謝物の同定を進めていきたい。

4. 考察

ミトコンドリアNAD合成系の老化・老化関連疾患での役割を明らかにするため、ミトコンドリアNAD合成の鍵を握る酵素Nmnat3に着目し、特に本研究では、老化関連疾患のうち、肥満との関連を調べた。Nmnat3を過剰発現したマウスは、高脂脂肪食誘導性肥満に対し抵抗性を示した。そのメカニズムを明らかにするため、Nmnat3 Tgマウス各組織でのNAD量を質量分析計を用いて精密定量したが、予想に反しNAD量に変化はなく、またミトコンドリアタンパク質のアセチル化にも影響はなかった。しかしながら、FT-MSによる網羅的メタボロミクス解析では、Nmnat3 Tgマウスにおいて有意に変動する代謝産物14個を見つけることができた。現在これらの代謝産物の同定をMS/MS解析により行っており、これらをさらに詳細に解析することで、Nmnat3を過剰発現したマウスが示す、高脂脂肪食誘導性肥満に対する抵抗性のメカニズムを明らかにできると考えている。また、これらデータはNmnat3が、高脂脂肪食による肥満に対して良い治療標的であることを示しており、Nmnat3を活性化する薬剤を開発することは、肥満治療に対する新たな治療戦略となりうると考えられる。

5. 参考文献

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)