

Nmnat3 を介した NAD の合成経路と老化制御における役割

中川 崇

1. はじめに

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide : NAD) は 100 年以上前にエタノール発酵を媒介する補酵素として発見された¹⁾。NAD は、酸化型である NAD⁺ と還元型である NADH の間で電子のやり取りをすることで、発酵だけでなくさまざまな酸化還元反応を媒介している。特に、ミトコンドリアにおけるクエン酸回路や呼吸鎖などのエネルギー代謝経路において NAD は補酵素として非常に重要な役割を果たしている²⁾。実際、哺乳類細胞のミトコンドリアには、細胞内の 30~70% の NAD が存在しており、NAD が働く場、貯蔵庫として重要である³⁾。ミトコンドリアは太古の昔に原核生物が真核生物に寄生したものがその起源であると考えられているが、ミトコンドリアを獲得した細胞は酸素呼吸を行うことで非常に効率のよい ATP 産生が可能となった。一方で、呼吸鎖においては、不完全な電子の流れによるリークが活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) を作り出し、これら ROS が細胞への酸化ストレスや DNA 損傷を引き起こし、細胞を機能不全へと導く。このため、ミトコンドリアの機能不全は老化の重要な原因と考えられ、フリーラジカル老化仮説として現在でも広く受け入れられている⁴⁾。一方で、NAD⁺ は補酵素としてだけでなく、ポリ ADP リボシル化酵素 (poly ADP-ribose polymerase : PARP) や class III 脱アセチル化酵素サーチュインの基質としても働く。PARP は自己 ADP リボシル化を介して DNA 損傷修復過程を開始する。また、サーチュインはヒストンやさまざまなタンパク質の脱アセチル化を介して遺伝子発現や細胞ストレス応答などを制御している⁵⁾。興味深いことに、サーチュインは下等生物から高等生物までさまざまな生物種で

老化・寿命制御をしていることが報告され、老化・寿命遺伝子として注目を浴びている⁶⁾。そのため、ミトコンドリア NAD の制御は抗老化を考える上で重要な位置を占めている。本稿では、著者らが明らかにしたミトコンドリアにおける NAD 代謝経路の詳細と老化における役割について、最新の文献を交えながら解説する。

2. ミトコンドリアにおける NAD の生合成経路

NAD は細胞膜透過性がなく、ヒトを含めた哺乳類ではトランスポーターも存在しないことから、栄養素として直接的な吸収・取り込みはできない。そのため、食餌性のトリプトファンやナイアシン (ニコチン酸とニコチンアミドの総称) を材料とした生合成が生体内で行われている⁷⁾。哺乳類における NAD の生合成経路には、①トリプトファンを出発物質とした *de novo* 経路 [別名キヌレニン (kynurenine) 経路]、②ニコチン酸を利用する Preiss-Handler 経路、③ニコチンアミド (nicotinamide : NAM) を利用するサルベージ経路の三つがある (図 1)。特に哺乳類では、PARP やサーチュインによる NAD⁺ の消費に伴い産生される NAM が再利用されるサルベージ経路が NAD レベルの維持に非常に重要である。この経路では、NAM phosphoribosyltransferase (Nampt) によって NAM からニコチンアミドモノヌクレオチド (nicotinamide mononucleotide : NMN) へと変換され、さらに NMN adenylyltransferase (Nmnat) によって NMN と ATP から NAD⁺ が合成される。*de novo* 経路では、トリプトファンから六つの反応によりキノリン酸 (quinolinate : QA) が合成され、quinolinate phosphoribosyltransferase (Qprt) によりニコチン酸モノヌクレオチド (nicotinic acid mononucleotide : NAMN) へと変換される。また、Preiss-Handler 経路では、nicotinic acid phosphoribosyltransferase (Naprt) がニコチン酸 (NA) から NAMN を合成する。そして NAMN はサルベージ経路と共通の酵素である Nmnat により、ニコチン酸アデニンジヌクレオチド (nicotinic acid adenine dinucleotide : NAAD) に変換され、最終的には NAD synthetase (NADS) によりアミド化され NAD⁺ が産生される⁸⁾。

このように、NAD は三つの経路で合成されていることは古くから知られているが、実際にどの臓器がどの経路を主に使っているのはよくわかっていない。さらに、細

富山大学学術研究部医学系分子医科薬理学講座 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

Metabolism of mitochondrial NAD and its role in aging process
Takashi Nakagawa (Department of Molecular and Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama, Toyama 930-0194, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920572

© 2020 公益社団法人日本生化学会

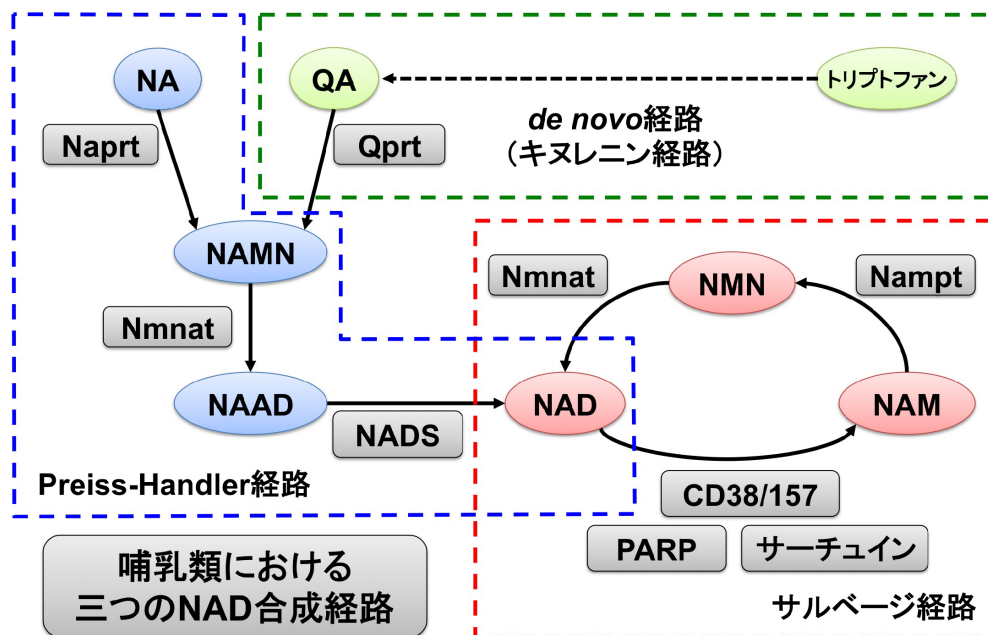


図1 哺乳類におけるNAD合成経路

トリプトファンを出発物質とした*de novo*経路（別名キヌレニン経路）、ニコチン酸を利用するPreiss-Handler経路、ニコチンアミド（NAM）を利用するサルベージ経路の三つが存在する。NmnatはNMN、NAMNのどちらも基質とし、ATPのアデニンヌクレオチドを結合させNADもしくはNAADを合成する。

胞内には核、細胞質、ミトコンドリアなどNADが多く局在する細胞内コンパートメントがあるが、それらにおけるNADの合成・維持がどの経路に依存しているかは現在も議論が続いているところである。特に、ミトコンドリア内膜は細胞膜と同様NADの透過性がなく、トランスポーターも見つかっていない。また、各NAD合成経路で律速酵素となる、NamptやQprt、Naprtはすべて細胞質に局在し、脱アミド型のNAADをアミド型のNADに変換するNADSもやはり細胞質に局在していると考えられている。一方で、すべてのNAD合成経路で働くNmnatには別々の遺伝子でコードされる三つのアイソザイム（Nmnat1～3）が存在する。クローニングされた当時、それらは細胞内での局在が異なっており、Nmnat1は核に、Nmnat2はゴルジ体に、Nmnat3はミトコンドリアに局在することが報告された⁹⁾。そのため、ミトコンドリアでのNAD合成は、細胞質で作られたNMNがミトコンドリアに輸送されて、Nmnat3によりNADへと変換されるのではないかと予想された。しかしながら、初期の研究成果はNmnat3を培養細胞で過剰発現して得られた結果であることから、個体レベルでの生理的な状況におけるNmnat3のNAD合成への役割は不明なままであった。

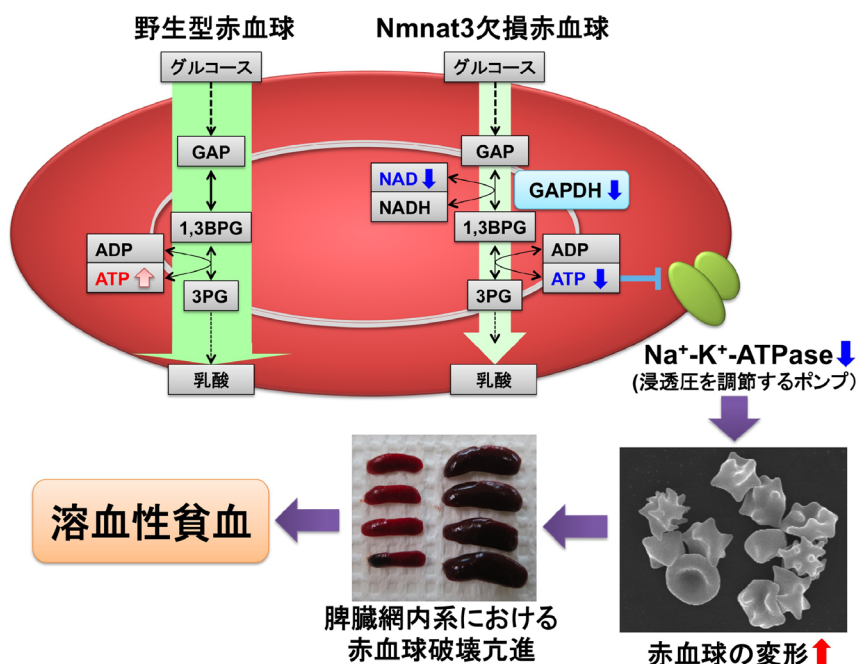
3. Nmnat3のミトコンドリアNAD合成への寄与

我々は、実際の生体内におけるミトコンドリアNAD合

成・維持機構を明らかにするため、Nmnat3の欠損マウスを用いて解析を行った。Nmnat3特異的なモノクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロッティングで確認したところ、Nmnat3は比較的ユビキタスにマウス組織に存在していた。しかしながら、細胞内の局在はミトコンドリアではなく、主に細胞質にあることが示唆された¹⁰⁾。もしNmnat3が本当にミトコンドリアNAD合成に必須であるならば、Nmnat3欠損マウスは重篤な異常が出現することが考えられたが、予想に反してNmnat3ホモ欠損マウスは正常に出生し、見かけ上は明らかな異常を呈さなかった。そこで、生体内NAD代謝を精密に解析するため、我々の研究室で開発したNADメタボロミクスを用いて、各組織におけるNAD⁺およびNAD関連代謝物の測定を行った。すると、測定した肝臓、骨格筋、腎臓、心臓などすべての臓器において、Nmnat3欠損マウスのNAD⁺レベルは対照となる野生型マウスと比較して差がみられなかった¹¹⁾。また、肝臓、心臓についてはミトコンドリアを単離し、NAD⁺レベルを比較したが特に低下はみられなかった。以上より、少なくともNmnat3はミトコンドリアNADの合成・維持には必須ではないことが明らかとなった。

Nmnat3欠損マウスは見かけ上明らかな異常はなく、成長にも影響がみられなかったが、解剖を行うと著明な脾腫を呈していることがわかった。組織を調べるとヘモグロビンの沈着がみられ、血液検査では赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの低下がみられた。一方で、白血球や

Nmnat3の欠損は溶血性貧血を引き起こす



Nmnat3の活性化は抗老化作用を示す

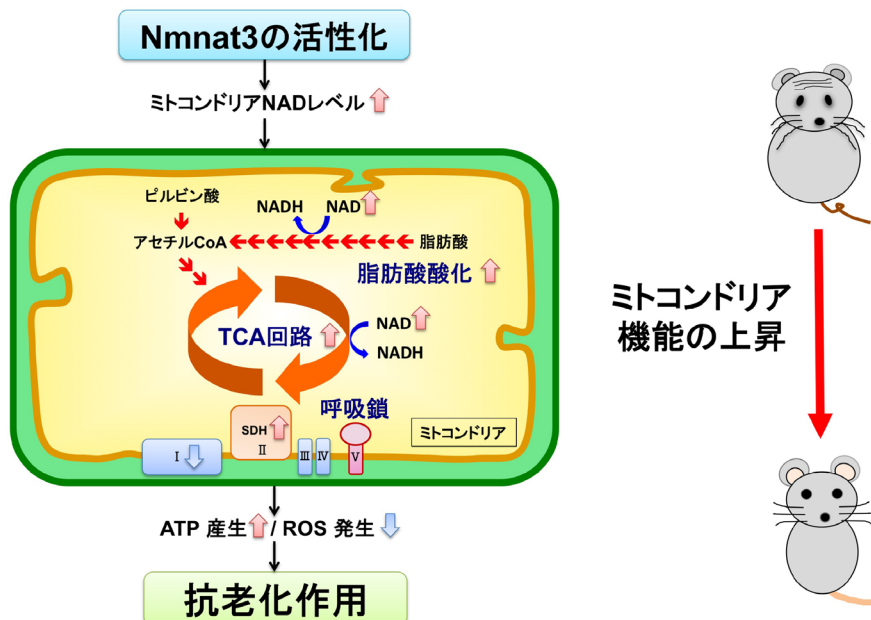


図2 Nmnat3欠損マウス、過剰発現マウスの解析

(上段) 成熟赤血球では、Nmnat3の欠損によりNADレベルが著明に低下し、解糖系酵素GAPDHの阻害によりATPレベルが減少する。そのため、浸透圧調節を担うNa⁺/K⁺チャネルの機能低下を引き起こし、正常な形態維持ができなくなる。結果として、脾臓での赤血球破壊が亢進することで、溶血性貧血が引き起こされる。GAP: グリセルアルデヒド3-リン酸, 1,3-BPG: 1,3-ビスホスホグリセリン酸, 3PG: 3-ホスホグリセリン酸。(下段) Nmnat3の過剰発現は骨格筋でのミトコンドリアNAD⁺レベルを上昇させ、加齢によるミトコンドリア機能の低下が抑制されている。その結果、加齢によるATPレベルの減少、ROS産生の上昇が抑えられ、耐糖能の維持など抗老化作用を発揮していると考えられる。

血小板数には異常がなく、網状赤血球の数が著明に増加していることから、造血機能異常はなく、脾臓での赤血球の破壊が亢進している溶血性貧血であることが考えられた。実際にNmna3は、ミトコンドリアや核など細胞小器官がすべて消失している成熟赤血球の細胞質で非常に強く発現していた。通常、マウス赤血球の寿命は60日程度であるが、Nmna3欠損赤血球では10日程度で、その形態も変形した異常赤血球がほとんどであった。そこで、NADメタボロミクスを行うと、Nmna3欠損赤血球ではNAD⁺レベルの著明な低下がみられた。成熟赤血球はミトコンドリアを持たないことから、そのATP産生は解糖系に依存している。次に我々は、解糖系の代謝物をメタボロミクスを用いて解析したところ、NAD⁺依存性酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : GAPDH) が阻害されることで解糖系が途中で止まり、ATP産生が低下していることがわかった。以上より、Nmna3は成熟赤血球のNAD⁺合成ならびにATP産生に必須であり、その欠損はATP依存性Na⁺/K⁺チャネルの機能低下を引き起こし、正常な形態維持ができなくなっていることが考えられた。その結果、脾臓での赤血球破壊が亢進することで、溶血性貧血を引き起こしていることが明らかとなった(図2上段)。このように、当初ミトコンドリアNAD⁺の合成に関与していると考えられたNmna3だが、実際はミトコンドリアの存在しない成熟赤血球のNAD合成に必須であるという予想外の結果が明らかとなった。

4. Nmna3と老化との関係

我々のNmna3欠損マウスの解析からは、Nmna3はミトコンドリアNAD合成には必須でないことが明らかとなった。一方で、培養細胞でNmna3を過剰発現すると、ミトコンドリアNADレベルが上昇することも事実であり、ミトコンドリアNADレベルを増加させる手段としてのNmna3活性化は、NAD⁺レベルの上昇を介した抗老化に利用できる可能性が示唆された。そこで、マウスの個体レベルでNmna3を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて、Nmna3の抗老化作用について検討を行った¹²⁾。Nmna3過剰発現マウスの各組織ではNAD⁺レベルが野生型マウスと比較し約2~3倍程度上昇していた。また、ミトコンドリア分画でもNAD⁺レベルが上昇しており、Nmna3の過剰発現によりミトコンドリアNAD代謝を活性化できることがわかった。我々は以前、骨格筋において加齢に伴ってNAD⁺レベルが減少することを見だしていたが¹³⁾、Nmna3過剰発現マウスでは、18か月齢の老齢マウスでもNAD⁺レベルの低下がみられず、野生型マウスと比較し、著明なNAD⁺レベルの増加を呈していた。ま

た、C57BL/6バックグラウンドの野生型マウスでは加齢に伴い耐糖能異常を示すことが知られているがNmna3過剰発現マウスでは、耐糖能はほぼ正常に保たれていた。また、高脂肪を与えた際も、Nmna3過剰発現マウスでは肥満や耐糖能異常が著明に改善されていることがわかった。野生型マウスでは加齢によりNAD⁺レベルが減少し、結果としてTCA回路の代謝物、特にコハク酸のレベルが減少していた。その結果、呼吸鎖複合体IIの活性が減少し、ATP産生が落ちる一方で、ROSの産生が上昇していた。しかしながら、Nmna3過剰発現マウスではミトコンドリアNAD⁺レベルが加齢によっても低下せず、結果として加齢によるATPレベルの減少、ROS産生の上昇が抑えられ、ミトコンドリア機能が保たれており、これが抗老化の表現型につながっていると考えられた(図2下段)。

5. Nmna3のNAD合成以外の役割

Nmna3過剰発現マウスを解析している途中、Nmna3過剰発現マウスではNAD⁺だけでなくNADのアナログであるニコチンアミドグアニンジヌクレオチド (nicotinamide guanine dinucleotide : NGD) やニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド (nicotinamide hypoxanthine dinucleotide : NHD) レベルも上昇していることを我々は見いだした¹²⁾。NGD、NHDはNADのアデニン部分がそれぞれグアニン、ヒポキサンチンに置き換わった代謝物である。通常Nmna3はNMNとATPからNAD⁺を合成するが、ATPの代わりにGTP、ITPを使うとそれぞれNGD⁺、NHD⁺が合成できることが*in vitro*の実験からわかった。Nmna3過剰発現マウスでは、さまざまな組織においてNAD⁺だけでなくNGD⁺、NHD⁺レベルが著明に増加していた。また、Nmna3欠損マウスを使った解析からは、赤血球でNGD⁺やNHD⁺は検出限界以下となり、その他の組織でもNGD⁺やNHD⁺は有意に低下していた¹⁴⁾。このことから、Nmna3は生体内におけるNGD⁺、NHD⁺合成酵素であることが明らかとなった。しかしながら、内因性のNGD⁺、NHD⁺濃度はNAD⁺と比較すると非常に低く、さらにどのような機能を持っているのかはわかっておらず、今後の研究が望まれる。

6. おわりに

本稿では、ミトコンドリアNAD⁺の生合成経路とその老化における役割について、我々の研究を中心に概説した。NADが発見され100年以上経ち、その合成経路もほとんど解明されたかに思われていたが、現時点でもミトコンドリアNADの合成・維持機構は不明なままである。ミトコンドリア内膜にNAD⁺輸送体が存在しないことから、

NADはミトコンドリア内部で合成されていると長年考えられてきたが、その実態は不明であり、NAD⁺を合成する酵素活性も報告されては否定されるといったことを繰り返してきた。さらに近年、NADはミトコンドリア外で合成され輸送されているのではないかとする研究結果が報告された¹⁵⁾。しかしながら、この研究でも直接的な輸送体は同定されておらず、状況証拠から導かれた結論であり、ミトコンドリアNAD合成の実態はやはり不明のままである。近年、その抗老化作用から再び脚光を浴びているNAD代謝であるが、抗老化戦略を考えたとき、ミトコンドリアNADの合成経路の解明は非常に大きな問題であり、この100年来の謎が我々を含めた研究者たちの努力により解明されることが期待される。

文 献

- 1) Harden, A. & Young, W.J. (1906) The alcoholic ferment of yeast-juice. *Proc. R. Soc. Lond., B*, **77**, 405–420.
- 2) Sauve, A.A. (2008) NAD⁺ and vitamin B3: From metabolism to therapies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **324**, 883–893.
- 3) Tischler, M.E., Friedrichs, D., Coll, K., & Williamson, J.R. (1977) Pyridine nucleotide distributions and enzyme mass action ratios in hepatocytes from fed and starved rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **184**, 222–236.
- 4) Harman, D. (2003) The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.*, **5**, 557–561.
- 5) Yaku, K., Okabe, K., & Nakagawa, T. (2018) NAD metabolism: Implications in aging and longevity. *Ageing Res. Rev.*, **47**, 1–17.
- 6) Nakagawa, T. & Guarente, L. (2011) Sirtuins at a glance. *J. Cell Sci.*, **124**, 833–838.
- 7) Shibata, K. (2018) Organ co-relationship in tryptophan metabolism and factors that govern the biosynthesis of nicotinamide from tryptophan. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **64**, 90–98.
- 8) Hikosaka, K., Yaku, K., Okabe, K., & Nakagawa, T. (2019) Implications of NAD metabolism in pathophysiology and therapeutics for neurodegenerative diseases. *Nutr. Neurosci.*, 1–13.
- 9) Nikiforov, A., Dolle, C., Niere, M., & Ziegler, M. (2011) Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: From entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J. Biol. Chem.*, **286**, 21767–21778.
- 10) Hikosaka, K., Ikutani, M., Shito, M., Kazuma, K., Gulshan, M., Nagai, Y., Takatsu, K., Konno, K., Tobe, K., Kanno, H., et al. (2014) Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **289**, 14796–14811.
- 11) Yamamoto, M., Hikosaka, K., Mahmood, A., Tobe, K., Shojaku, H., Inohara, H., & Nakagawa, T. (2016) Nmnat3 is dispensable in mitochondrial NAD level maintenance in vivo. *PLoS One*, **11**, e0147037.
- 12) Gulshan, M., Yaku, K., Okabe, K., Mahmood, A., Sasaki, T., Yamamoto, M., Hikosaka, K., Usui, I., Kitamura, T., Tobe, K., et al. (2018) Overexpression of Nmnat3 efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance. *Ageing Cell*, **17**, 12798.
- 13) Yaku, K., Okabe, K., & Nakagawa, T. (2018) Simultaneous measurement of NAD metabolome in aged mice tissue using liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC/MS/MS). *Biomed. Chromatogr.*, **32**, e4205.
- 14) Yaku, K., Okabe, K., Gulshan, M., Takatsu, K., Okamoto, H., & Nakagawa, T. (2019) Metabolism and biochemical properties of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) analogs, nicotinamide guanine dinucleotide (NGD) and nicotinamide hypoxanthine dinucleotide (NHD). *Sci. Rep.*, **9**, 13102.
- 15) Davila, A., Liu, L., Chellappa, K., Redpath, P., Nakamaru-Ogiso, E., Paoletta, L.M., Zhang, Z., Migaud, M.E., Rabinowitz, J.D., & Baur, J.A. (2018) Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria. *eLife*, **7**, e33246.

著者寸描

●中川 崇 (なかがわ たかし)



富山大学学術研究部医学系分子医科薬理学講座教授。博士 (医学)。

■略歴 1999年大阪大学医学部卒業、2005年同大学院医学系研究科修了。米国留学後、11年富山大学先端ライフサイエンス拠点特任助教、16年富山大学医学部准教授を経て19年より現職。

■研究テーマと抱負 質量分析計によるメタボロミクスを用いて代謝・老化研究を行っている。エネルギー代謝は生命にとって根源的な活動であり、基礎的な研究のみならず将来的なヒトへの応用を目指して研究を進めていきたい。

■ウェブサイト <http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/>

■趣味 旅行、ランニング。