

【総説】

NAD代謝による老化制御機構

夜久 圭介、中川 崇

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

要約

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) は生体内で酸化還元反応を媒介する補酵素として重要であるとともに、脱アセチル化や ADP-リボシル化といったタンパク質の翻訳後修飾にも関わっており、エネルギー代謝にとどまらず、分化・増殖といった様々な細胞内機能の調節を行っている。特に老化関連分子として重要な Sirtuin は NAD 依存性の脱アセチル化酵素であり、NAD 代謝 - Sirtuin 経路を介した老化制御機構が注目を浴びている。また、加齢とともにさまざまな組織において NAD 量は減少することが知られており、Sirtuin だけでなく、生体内の様々な代謝機構を介した加齢性変化や疾患への関与が報告されている。本稿では基本的な NAD 代謝の概略、測定法について説明するとともに、老化や様々な老化関連疾患との関わりについても、最近の知見を交えて概説していく。

キーワード：NAD、Sirtuin、PARP、metabolisms

1. NAD の生合成経路

NAD は栄養素として、直接的な吸収・取り込みはできないことから、生体内で生合成が行われ、その恒常性が維持されている。哺乳類における NAD の生合成経路には、トリプトファンを出発物質とした、de novo 経路、ニコチンアミド (NAM: Nicotinamide) を再利用する salvage 経路の二つがある [1]。salvage 経路では、生体内の NAM の再利用だけでなく、食餌性に取り入れられたビタミンであるナイアシンとして、NAM だけでなく、ニコチン酸 (NA: Nicotinic acid)、ニコチンアミドリボース (NR: Nicotinamide riboside) なども NAD 合成に利用される (図 1)。

1) de novo 経路

トリプトファンは、8つの酵素反応により、キノリン酸 (QA: Quinolinic acid) を経て NAD へと変換される。キノリン酸は quinolinate phosphoribosyltransferase (QaPRT) によって NA mononucleotide (NAMN) に変換され、さらに Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (Nmnat) と NAD synthase (NADS)

によって Nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD) を経て NAD が合成される。トリプトファンから NAD への変換効率については、60 mg のトリプトファンが 1 mg のナイアシンに相当すると見積もられており、一見 NAD 合成への寄与率は低いように見える。しかし、NA-free の食事を与えた QaPRT のノックアウトマウスでは脳や肝臓、腎臓、脾臓、腸など様々な組織で NAD 量が減少することから、組織や栄養状態によってその依存度が異なると考えられている [2]。また、QaPRT の活性は老化によって低下し、その結果蓄積する Quinolinic acid は神経毒性を有することが知られており、老化に伴う神経変性疾患との関わりが示唆されている [3]。

2) Salvage 経路

Salvage 経路はビタミンであるナイアシンのニコチンアミド環を利用して NAD を合成する経路で、NAM、NA、NR から始まる経路がある。NAM は食餌由来のナイアシンの吸収形態としてだけでなく、NAD 消費酵素であるサーチュインや PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) の反応産物でもある。この経路の開始反応は NAM から Nicotinamide mononucleotide (NMN) への変換であり、Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) によって媒介され、続いて Nmnat が NMN と ATP から NAD を合成する [1]。この経路の律速段階は Nampt による NMN の合成反応であり、Nampt 阻害剤である FK866 を作用させると細胞内の NAD 量は

連絡先：中川 崇 〒 939-0194

富山市杉谷 2630

TEL : 076-415-8849

FAX : 076-415-8849

E-mail : nakagawa@med.u-toyama.ac.jp

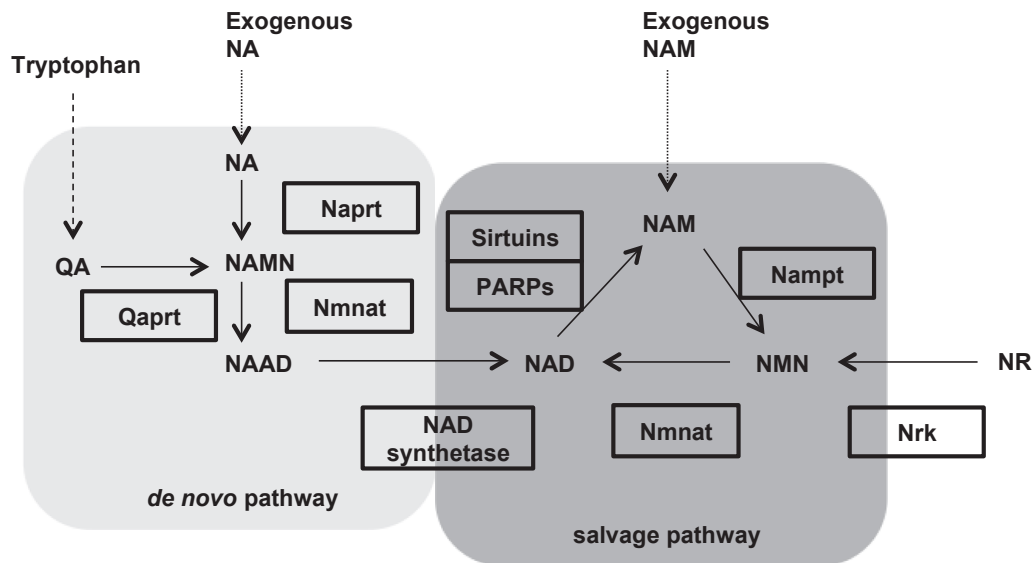


図1 NAD代謝経路 (de novo 合成経路と salvage 経路)

著しく減少する。また、Nampt のノックダウンや過剰発現によって培養細胞中の NAD 量が大きく変化することから、生体内で利用可能な NAD の量は Nampt の機能に大きく依存すると考えられている。また、Nmnat は salvage 経路における NAD 合成の最終反応を触媒する酵素であり、ヒトを含めた哺乳類では Nmnat1-3 の 3 つのアイソザイムが知られている。それらは、組織や細胞内のコンパートメントによって発現特異性が異なっており、Nmnat1 は核に、Nmnat2 は細胞質とゴルジに、Nmnat3 はミトコンドリアと細胞質に局在する。そのため、それぞれの細胞内コンパートメントでの NAD 合成に、Nmnat のアイソザイムの違いが重要だと考えられているが、その詳細はよくわかっていない [4]。

一方で、NR は牛乳中に見出された NAD 前駆体であり、牛乳中では NAM に次ぐ高濃度で存在している [5]。細胞内では NR は NR kinase (Nrk) によって NMN に変換され、上記の NAD 合成経路に合流する。Nrk はヒトでは Nrk1 と Nrk2 の二つのアイソザイムがある。Nrk1 は全身のあらゆる組織にユビキタスに発現が認められるが、Nrk2 は骨格筋や心臓に特異的に発現している。また、NR は直接的に細胞内に取り込むことが可能なため、NAD 合成の前駆体として重要だと考えられるが、実際にどの程度、食餌性の NR が NAD 合成に寄与しているかは現在のところ不明である。

2. NAD 代謝研究のための NAD 測定法

1) 酵素サイクリング法

NAD は、還元型である NADH の最大吸光波長が 340nm であることが知られており、古くから吸光度計を用いた測定方法が用いられてきた。また、酵素サイクリング法と呼ばれる、二つの酵素反応を組み合わせた方法を用いることで、生体の微量な NAD、NADH を増幅して測定することができる。さらに、NAD は酸性

溶液中で安定であり、NADH は塩基性溶液中で安定であるという特徴を利用し、酸抽出、アルカリ抽出を行うことで、NAD、NADH を区別して測定が行われてきた [6]。酵素サイクリング法は、アルデヒド脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素の反応を共役させて、マレイン酸を産生させる。このマレイン酸産生量は元の NAD もしくは NADH 量に比例することから、次に指示反応として過剰量の NAD、グルタミン酸とともに、トランスグルタミナーゼ (GOT) を添加し、NADH を生成させる。最終的には、この NADH 量を吸光度もしくは蛍光で測定することで、元の試料内の NAD、NADH を定量することができる。

2) 質量分析法

酵素サイクリング法は簡便であり、比較的感度も良い。しかしながら、NAD、NADH 以外の関連代謝物を測定することは不可能であり、抽出法も酸、アルカリと 2 種類必要である。また、酵素サイクリング法は間接的な測定法であるため、測定サンプルがアッセイに使用する酵素へ干渉する可能性があるなど、不確定要素も多い。そこで、直接的な測定法で、高感度かつ特異性の高い方法として質量分析法が利用されている。質量分析法では生体サンプルのような夾雑物を多く含んだ試料を用いて、まず HPLC による分離を行い、次に質量分析計を用いてそれぞれの代謝物を検出する。筆者らの研究室ではトリプル四重極質量分析計を用いて、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法による NAD メタボロームを行っているが、この方法では、四重極と呼ばれる、印加された電圧によって透過するイオンの質量を自由に設定することができる質量フィルターを用い、目的の質量を持ったイオンを選択的に検出する [7]。具体的には、一つ目の質量フィルターによって目的イオンのみ透過させ、さらに次の部屋で衝突ガスによって化学結合の弱い部分で

イオンを開裂させることで、フラグメントイオンを生成させる。最終的に、これらフラグメントイオンを二つ目の質量フィルターで検出することによって、選択的な検出が可能となる。この方法は、非常に高精度かつ高感度であり、同時に複数のMRMを組むことで、NAD関連代謝物だけでなく、解糖系代謝物やアミノ酸など様々な代謝物も同時に測定可能である。一方で、質量分析計は非常に高価であり、その利用には習熟が必要などのデメリットもあるが、本法の応用範囲は広く、非常に有用な測定法だと考えられる。

3. NAD代謝と加齢

生体内で利用可能なNAD量はその合成と分解のバランスによって調節されていると考えられている。補酵素としてのNADはNAD/NADH間の水素原子のやりとりをおこなっているだけで、その総量は安定的であるように考えられていたが、実際にはNAD代謝は非常にダイナミックであり、その合成・分解は細胞内において恒常的に行われている。特にDNA 1本鎖損傷の修復酵素であるPARPは、生理的条件下でも大量に発生するDNA 1本鎖損傷に対応し、NADを使った自己ポリADPリボシル化を介して大量のNADを消費していることが知られている。例えば、1つの細胞内においては、1日で約25万箇所のDNA 1本鎖損傷が発生することから、生体内でのNAD消費速度は速く、その半減期は非常に短いと考えられている [8]。一般に加齢に伴い、NAD量が減少することが知られているが、この機構にはNAD分解系の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。細胞内では、加齢とともに活性酸素の産生量が増加するが、これらは二次的なゲノムDNA損傷も増加させると考えられている。この時、PARPによるNADの消費に対して供給（NAD合成）が追いつかなくなると、NADプールの減少が起こると考えられている。実際に肝臓や心臓、腎臓、肺では加齢に伴ってPARP-1活性が増加することが報告されており、NAD量の変化と相関を示す [9]。また、PARP1ノックアウトマウスでは、NAD消費が抑えられるため、NAD濃度が増加し、抗老化分子SIRT1の活性が引き起こされることが解っている [10]。しかしながら、DNA損傷に対する修復は抗老化という面からは非常に重要であり、PARP阻害は、DNA損傷を引き起こす諸刃の剣でもあり、単純にPARP活性を阻害してNAD濃度を上昇させることが良いのかは、組織によって異なると考えられる。そのため、その生理的意義についてはさらなる検討が必要である。

NAD分解酵素であるCD38はエクトエンザイムとして細胞外のヌクレオチドの変換に関わっているが、核やミトコンドリアといった細胞内の膜にも存在が認められている。CD38の活性は肝臓や筋肉、脂肪組織などで加齢に伴って上昇する一方で、CD38をノックアウトすることによって加齢に伴うNAD量の減少が抑制されることが最近報告された [11]。CD38のノックアウトによって増加したNADは、ミトコンドリア内のSIRT3を活

性化し、ミトコンドリアタンパク質のアセチル化を減少させる。ミトコンドリアのアセチル化はその多くがミトコンドリア内の反応を抑制するため、ミトコンドリア内のNAD量を維持することは加齢によるミトコンドリア機能の低下を抑制するひとつの重要な戦略と言える。

4. NAD代謝と老化関連疾患

1) 神経変性疾患

NADの神経保護作用についてはWlds mutantに関する研究で盛んに明らかにされてきた。Wallerian degenerationは軸索が細胞体から切り離された後にフラグメント化される過程である。この軸索変性はアルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経変性疾患の進展に寄与しており、Wallerian degenerationを遅らせることによって疾患の症状が改善されると考えられている。Wlds mutantはUbiquitin assembly factor (Ube4b/Uf2a)のN末端側70アミノ酸残基とNmnat1の全配列をコードする変異体であり、この変異を持つマウスにおいて軸索変性の過程が遅延する。Wlds変異のNmnat1活性を欠損させるとその保護作用が損なわれるため、Nmnat1活性はこの変異において重要な役割を果たしていると考えられる [12]。また、Nmnat1はLeber congenital amaurosis (LCA)の原因遺伝子として報告されている [13]。LCA発症においてNAD代謝がどの様に寄与しているのか、そのメカニズムは不明であるが、最近網膜光受容体特異的Nampt欠損マウスが作成され、網膜変成による視覚障害を示すことが解ったことから、NAD代謝が、網膜機能維持に重要であることが示唆される [14]。

2) がん

多くのがん細胞においては、ワールブルグ効果と呼ばれる、有酸素下での嫌氣的解糖の亢進が知られている。解糖系の亢進にはNAD量の増加が不可欠であり、実際に多くのがん種においてNamptの過剰発現が確認されている。一方で、ミトコンドリア内のクエン酸回路や脂肪酸酸化においても、補酵素としてNADが利用されるが、Namptの特異的阻害剤である、FK866でがん細胞を処理したところ、細胞内のNAD濃度の著明な低下が見られ、解糖系は顕著に阻害を受けるものの、クエン酸回路はあまり影響を受けないことが報告されている [15]。このことは細胞質にある解糖系と、ミトコンドリア内にある他の代謝経路とではNAD代謝の阻害の影響が異なることを示している。NADは生体にとって非常に重要な補酵素であり、その阻害は正常細胞にも影響を及ぼす可能性があるが、上述の結果はNAD代謝が、比較的がん細胞の方で重要で、その阻害はがん治療のターゲットなり得ることを示している。

3) 代謝性疾患

NAD合成経路を介した、細胞内NAD濃度の上昇が、Sirtuinの活性化に重要であることから、NAD前駆体投与により、直接的に細胞内NAD濃度を上昇

させ、Sirtuin 活性化を介した、様々な代謝制御が試みられている。例えば、Nampt により産生される NMN (Nicotinamide mononucleotide) は、マウス個体に投与することで、加齢や高脂肪食により誘導された耐糖能異常を改善することが報告されている [16]。また、NR (Nicotinamide Riboside) の食餌性投与は、NMN 同様、NAD の濃度上昇を来し、SIRT1 だけでなく、ミトコンドリアに局在する SIRT3 も活性化し、ミトコンドリア機能の上昇や、脂肪酸酸化を亢進させることで、最終的に高脂肪食により誘導された耐糖能異常や肥満を改善する [17]。また、NR は線虫個体への投与により、SIRT1-FOXO を介したシグナル経路により、個体レベルでの寿命延長効果があることが明らかとなっている [18]。一方で、Nampt の脂肪細胞特異的欠損マウスでは、インスリン抵抗性の悪化が見られ、骨格筋特異的欠損マウスでは、進行性の筋変成が見られる。これらの結果は、NAD 代謝が、組織の恒常性維持に重要であることを示している [19,20]。

おわりに

他の先進国と比較しても類を見ない超高齢社会に突入したわが国では、高齢者の健康寿命の維持が喫緊の課題である。多くの研究により、加齢に伴う NAD 量の減衰が、様々な老化症状、関連疾患を引き起こすが解ってきたが、こうした細胞内 NAD 量の低下は、NAD 前駆体投与により防止することができる。さらには加齢に伴う機能低下に対しても有効であるという知見が、動物実験を中心に積み重ねられてきており、今後は実際のヒトでの治験なども計画されている。その一方で、NAD の合成に関わる代謝機構には、細胞内局在の問題や、NAD 前駆体の細胞内取り込み機構など、未知の部分も多く、今後の大きな課題であり、これらを解決していくことで、NAD 代謝を標的とした抗老化戦略が、より発展することが期待される。

1. Chiarugi A, Dolle C, Felici R and Ziegler M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 12, 741-752, 2012.
2. Terakata M, Fukuwatari T, Sano M, *et al.* Establishment of true niacin deficiency in quinolinic acid phosphoribosyltransferase knockout mice. *J Nutr.* 142: 2148-2153, 2012.
3. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, *et al.* Changes in kynurenine pathway metabolism in the brain, liver and kidney of aged female Wistar rats. *FEBS J.* 278: 4425-34, 2011.
4. Berger F1, Lau C, Dahlmann M, *et al.* Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem.* 280: 36334-41, 2005.
5. Trammell SA, Yu L, Redpath P, *et al.* Nicotinamide Riboside Is a Major NAD+ Precursor Vitamin in Cow Milk. *J Nutr.* 146: 957-963, 2016.
6. Lowry OH. Amplification by enzymatic cycling. *Mol Cell Biochem.* 32(3):135-46, 1980
7. Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, *et al.* Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J Biol. Chem.* 289: 14796-14811, 2014.
8. Rechsteiner M, Hillyard D, Olivera BM. Turnover at nicotinamide adenine dinucleotide in cultures of human cells. *J Cell Physiol.* 88: 207-17, 1976
9. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, *et al.* Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One* 6: e19194, 2011.
10. Bai P, Cantó C, Oudart H, *et al.* PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab.*13(4):461-8, 2011.
11. Camacho-Pereira J, Tarragó MG, Chini CC, *et al.* CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab.* 23: 1127-1139, 2016.
12. Avery MA, Sheehan AE, Kerr KS, *et al.* Wld S requires Nmnat1 enzymatic activity and N16-VCP interactions to suppress Wallerian degeneration. *J Cell Biol.* 184: 501-513, 2009.
13. Chiang PW, Wang J, Chen Y, *et al.* Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 44(9):972-4, 2012
14. Lin JB, Kubota S, Ban N, *et al.* NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis Is Essential for Vision In Mice. *Cell Rep.* 17(1):69-85, 2016
15. Tan B, Young DA, Lu ZH, *et al.* Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an enzyme essential for NAD+ biosynthesis, in human cancer cells: metabolic basis and potential clinical implications. *J Biol Chem.* 288(5):3500-11, 2013
16. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, *et al.* Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14: 528-36, 2011.
17. Trammell SA, Schmidt MS, Weidemann BJ, *et al.* Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat Commun.* 7: 12948, 2016.
18. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, *et al.* The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial

- UPR and FOXO Signaling. *Cell*. 154(2):430-41, 2013
19. Stromsdorfer KL, Yamaguchi S, Yoon MJ, *et al*. NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis in Adipocytes Regulates Adipose Tissue Function and Multi-organ Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Rep*. 16(7):1851-60, 2016
20. Frederick DW, Loro E, Liu L, *et al*. Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle. *Cell Metab*. 24(2):269-82, 2016

Regulatory role of NAD metabolism in aging

Keisuke Yaku and Takashi Nakagawa

Department of metabolism and nutrition, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

Abstract

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) is an important co-enzyme mediating various metabolic enzymes through redox reactions. NAD also serves as a substrate for poly(ADP-ribose)polymerases (PARPs) and sirtuins for poly(ADP-ribosylation) and deacetylation, respectively, and regulates various cellular functions such as differentiation and proliferation. Recently, many studies suggested the implication of NAD metabolism in aging and aging-related diseases. Especially, NAD metabolism controls the activity of sirtuins, which are famous anti-aging molecule. In this review, we describe the overview of NAD metabolism and discuss the recent literatures about NAD metabolism and aging.

Keywords : NAD, Sirtuin, PARP, metabolism