

遺伝子に対応するもので、ニコチン受容体を制御したNOSの発現にも関わっており、従ってNMDA型のグルタミン酸受容体活性を調節すると考えられる。また、Stefanssonらは変異型のneuregulin 1を持つマウスは野生型に比べNMDA型受容体の機能が低下しており、精神分裂病に似た行動をとること、その異常行動は抗精神病薬のclozapineの投与で幾分回復することを報告している⁴⁾。このneuregulin 1はヒトでは第8番目の染色体の8p21上にある。

以上から分裂病の発症原因は低活性型のNMDA型グルタミン酸受容体によるシグナル伝達の阻害によるものであるが、pLG72とDAAOの役割はpLG72がDAAOと結合するとDAAO活性が上昇してNMDA型グルタミン酸受容体のactivatorであるD-serineが消費されるため受容体の活性型への変換が阻止されると考えられる。このpLG72とDAAOのSNPs体との相互作用とD-アミノ酸化酵素活性への効果の解析によって分子レベルでのタンパク質間の相互作用機構の解明も遠い先のことではなく、その研究成果の医療への応用などに拍車がかかってくると思われる。

(徳島大・分子酵素研究センター・頼田和子)

文 献

- 1) Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, *et al.* (2002) Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13675-13680
- 2) Mothet J-P, Parent AT, Wolosker H, *et al.* (2000) D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4926-4931
- 3) Straub RE, Jing Y, MacLean CJ, *et al.* (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**, 337-348
- 4) Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, *et al.* (2002) Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**, 877-892

ニコチンアミド代謝が寿命を支配する

「腹八分に医者いらず」ということわざがある。摂取エネルギー制限により老化が抑制され、寿命が延びることは、ラットやマウスで繰り返し証明されているし、酵母、線虫、クモなどでも認められている¹⁾。したがって、摂取エネルギーの制限が老化を抑制し、寿命を延ばすことは動物にとって共通的に認められる現象のようである。では、どれだけエネルギー摂取を制限しなくてはいけないかという、動物実験では自由摂取群の1/2~2/3に制限する必要がある。酵母では通常の2%グルコース培地で培養したものに対して、0.5%培地で培養するとその寿命が1.25倍にもなる²⁾。かなりきびしいエネルギー制限のように思える。2003年に、エネルギー制限により得られる寿命の延長に、ニコチンアミドの代謝が重要な役割を果たしているという論文²⁾がでたので紹介する。

その前に、なぜ「ニコチンアミドの代謝が寿命とかわかっている」という研究ができたのか、そのいきさつを紹介する。「転写が活発に行われている遺伝子領域では、ヒストンのアセチル化が亢進している」という現象は、古くから知られていたそうである。しかしながら、これは単なる副産物的な結果にすぎないとされ、ヒストンのアセチル化と転写活性の調節との関係に興味を持つ研究者は少なかったようである。ところが、1996年に転写のコアクチベーターとして同定されていた分子であるCBP/p300に、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性が報告され³⁾、また同年ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)として精製されていたタンパク質が、出芽酵母の転写抑制因子RPD3のホモログであることが明らかにされた⁴⁾ことなどから、「ヒストンのアセチル化・脱アセチル化反応」と「転写の活性化・抑

制」という二つの現象がつながってきた。さらに 1997 年、DNA 結合性の転写因子 p53 が CBP/p300 によってアセチル化されるという報告⁵⁾がきっかけとなり、タンパク質のアセチル化・脱アセチル化の問題は、転写修飾の花形となってきた。

さてそのような中で、2000 年酵母で転写のサイレンシングに関与していることが 1995 年に報告されていた Sir2 (Silent information regulator 2) に⁶⁾、NAD⁺ 依存性のヒストン脱アセチル化酵素活性があることが報告された⁷⁾。この酵素は以下に示すように、NAD⁺ とアセチル化されたヒストン(この状態では活性クロマチン構造をとっている)を基質として、脱アセチル化されたヒストン、ニコチンアミドおよび *O*-アセチル ADP リボースを産生する (NAD⁺ + アセチル化ヒストン → ニコチンアミド + *O*-アセチル ADP リボース + 脱アセチル化ヒストン)。ヒストンが脱アセチル化されるとサイレンシング、すなわち不活性クロマチン構造となる。その結果老化が抑制され、寿命がのびるという仮説である。たとえば、Sir2 を 1 コピー余分に持つ酵母は野生型の酵母 (21~23 回分裂) よりも 1.4 倍の寿命を持つのに対し、Sir2 を欠く変異体の寿命は野生型の 1/2 にまで短縮する⁸⁾。つまり、Sir2 遺伝子の産物である Sir2 タンパク質は、酵母の老化・寿命の制御に必須であることが明らかとなった。この Sir2 の機能は、酵母におけるエネルギー制限による寿命延長効果にも必須であることが明らかにされている⁹⁾。すなわち、酵母をグルコース制限培地 (0.5 % グルコース) で培養すると、非制限培地 (2 % グルコース) と比較して寿命が 1.25 倍程度延長されるが、Sir2 を欠損させた変異株では延長されない¹⁰⁾。さらに、Sir2

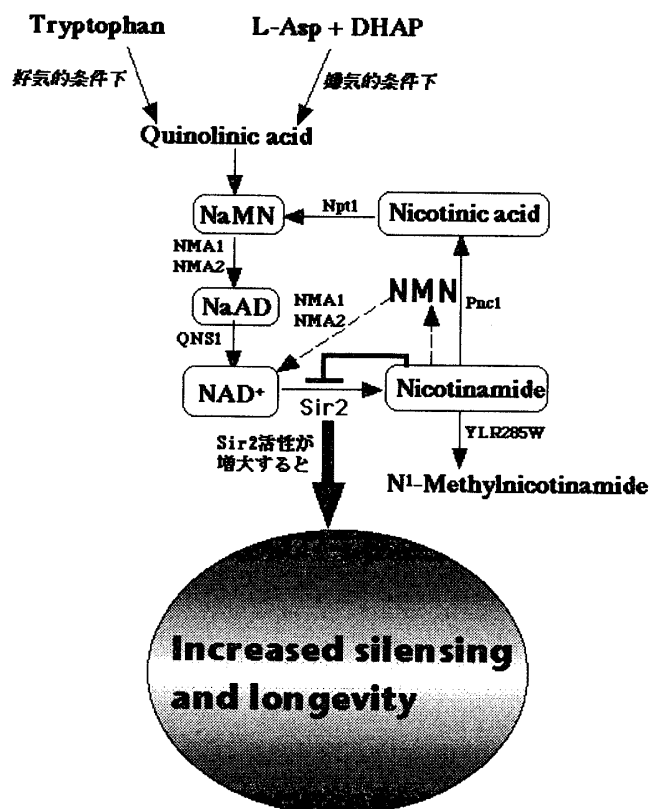


図 1. NAD⁺ 代謝 (出芽酵母)

Sir2 (NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素の一つ) は NAD⁺ 代謝からみれば、NAD⁺ 分解酵素の一つである。Sir2 の欠損は酵母の NAD⁺ 含量に影響を及ぼさないことから、NAD⁺ 分解酵素としての役割は重要ではない。しかし、Sir2 活性が増大すると、活性型クロマチンを不活性型クロマチンに変換し、転写が抑制(サイレンシング)され、寿命が延びる。なお、点線の矢印で示したニコチンアミド→NMN(ニコチンアミドモノヌクレオチド)→NAD⁺ の経路は哺乳類では主要な NAD⁺ 合成経路であるが、出芽酵母で存在するか否かは不明である。DHAP=Dihydroxyacetonephosphate. 文献 2 の Fig. 1 を参考にして改変。

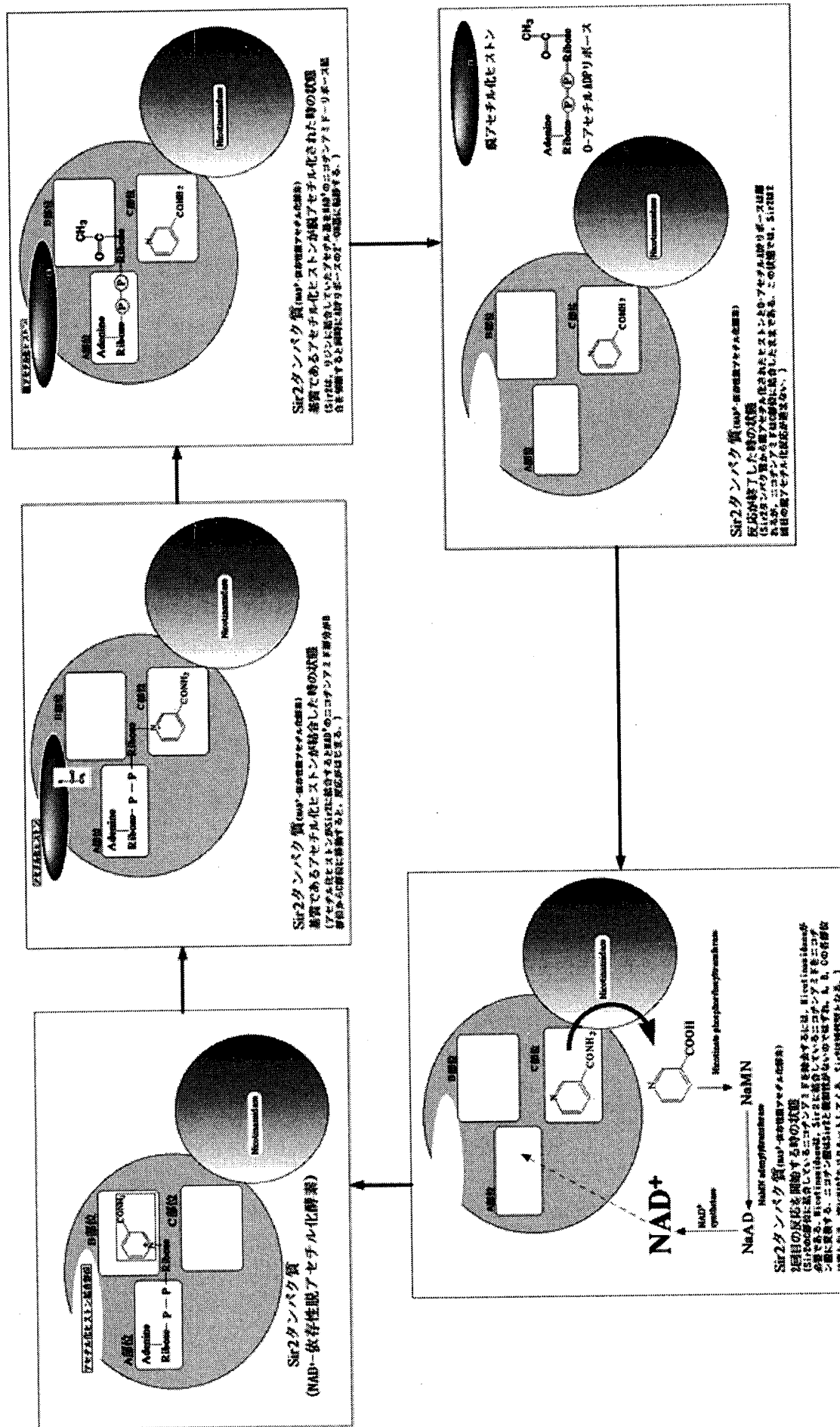


図2. Sir2, ニコチンアミダーゼ, NAD⁺およびニコチンアミドの関係図。
 文献15のFig.7を参考にして改変。

のホモログである *sir-2.1* の高発現が線虫の *Caenorhabditis elegans* の寿命を延ばすこと¹¹⁾, ヒトにおいて *Sir2* に最も近いホモログである *SIRT1* が, p53 の脱アセチル化を介してアポトーシスを阻害することが報告された¹²⁾¹³⁾. これらの報告は, *Sir2* とそのホモログが生物界に広く保存された寿命に関わる因子であることを示唆している. したがって, ヒトにおいてもエネルギー制限による老化の抑制と寿命の延長の可能性がでてきた.

ここで, *Sir2* が核内に存在することおよび *Sir2* が NAD^+ の存在下でアセチル化ヒストンを脱アセチル化することを思い出していただきたい. NAD^+ は NADH に還元されるのではなく, ニコチンアミドと *O*-アセチル ADP リボースに分解されてしまう. この *Sir2* の脱アセチル化反応は, 生成物のニコチンアミドにより強く阻害される¹⁴⁾. 以上の結果から, 野生型酵母においてエネルギー制限下で *Sir2* 活性が上昇する機構として次の三つの可能性が考えられる. ① *Sir2* タンパク質レベルが上昇する, ② *Sir2* による脱アセチル化反応の基質 NAD^+ の供給が高まり, *Sir2* 活性が上昇する, ③ 脱アセチル化反応によって阻害物質であるニコチンアミドが迅速に代謝され, *Sir2* 活性が上昇する. このうち①の可能性については, エネルギー制限下でも *Sir2* レベルが変化しないことが判明している¹⁵⁾ ので, 除外される. そのような背景からハーバード大学医学部の Sinclair らの研究グループは, 出芽酵母を用いて *Sir2* と NAD^+ 代謝との関連を研究し始め, 以下に示すことを明らかにした [文献 15, 14, 2]. 以降の文章の理解の手助けとして, 図 1 と図 2 を添付した. なお出芽酵母においては, 3 種類(接合型遺伝子, テロメア, rDNA)のサイレンシング遺伝子座(転写抑制遺伝子座)が同定されている.

文献 15: ① Nicotinate phosphoribosyltransferase をコードする *NPT1* を高発現させた酵母では, 寿命が通常の酵母よりも 1.6 倍も延びた. しかしながら, NAD^+ 濃度と NAD^+/NADH 比は変化していなかった. ② NAD^+ 生合成にかかわる酵素をコードする遺伝子である *PNC1* (nicotinamidase), *NMA1* (nicotinic acid mononucleotide and nicotinamide mononucleotide adenyltransferase), あるいは *NMA2* (nicotinic acid mononucleotide and nicotinamide mononucleotide adenyltransferase) を導入すると, rDNA (rRNA 遺伝子) の安定化が増し, すなわち rRNA の合成量が低下が起こった. また, テロメア領域のサイレンシング(転写抑制)が高まった. しかし, *QNS1* (NAD^+ synthetase) の導入はサイレンシングに影響を与えなかった. ③ *Sir2* 欠損酵母菌における NAD^+ 量は通常の酵母と変動がなかった(このことは, *Sir2* は NAD^+ の主要な分解酵素ではないことを意味している.). ④ エネルギー制限によって, nicotinate phosphoribosyltransferase 量は増大せず, 局在も変動しなかった. これらの結果から彼らは, *Sir2* 活性は, salvage NAD^+ 生合成経路(ニコチンアミド→ニコチン酸→ニコチン酸モノヌクレオチド→ニコチン酸アデニンジヌクレオチド→ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+))から流入する NAD^+ レベル, あるいは NAD^+ に由来する物質によって調節されている可能性を示唆した. つまり, NAD^+ そのものの量は寿命とは関係ないらしい.

文献 14: ① *Sir2* の反応産物の一つであるニコチンアミドは, 酵母のサイレンシングを強く阻害した. ② ニコチンアミドは, *Sir2* タンパク質の生成を抑制していなかった. ③ ニコチンアミドは野生型酵母の rDNA の組み換え頻度を高めたが, 元々 rDNA の組み換え頻度の高い *Sir2* 欠損酵母では影響を及ぼすことはなかった. ④ 野性型の酵母を 5 mM ニコチンアミド含有培地で培養すると, 寿命が非含有培地の寿命の約半分にまで低下した. この低下した寿命は, *Sir2* 欠損酵母と同じであった. ⑤ *Sir2* 欠損酵母をニコチンアミド過剰含有培地で培養しても, 寿命の低下は認められなかった. ⑥ ニコチンアミドは, *in vitro* で *Sir2* と *SIRT1* (ヒトの *Sir2* ホモログ) の非拮抗阻害剤であることを証明した. IC_{50} は 50 μM 程度であった.

文献 2: ① 野生型の酵母 0.5 % グルコース培地で培養すると寿命が延びるが, この延長は nicotinamidase をコードする遺伝子 *PNC1* を欠損させると消失した. ② 野生型の酵母を 37°C で生育させると(熱ショック処理), 通常の培養温度の 30°C と比べて寿命が延びるが, この延長も nicotinamidase を

コードする遺伝子 *PNC1* を欠損させると消失した。③野生株に5倍量の *PNC1* を導入した酵母の寿命は、約2倍も延長した。④ *Pnc1* レベルは、培地中のグルコース濃度が低下するに従って増大した。⑤ *cdc25-10* アレル(エネルギー制限の模倣を引き起こす)の導入は、*Pnc1* レベルの上昇を引き起こした。⑥アミノ酸制限、塩ストレス、熱ストレス、ソルビトール添加はすべて、*Pnc1* レベルの上昇を引き起こした。⑦実際に *nicotinamidase* 活性も、*Pnc1* タンパク質レベルに応じて認められた。⑧ニコチン酸の添加は、*rDNA* のサイレンシングを増大させなかった。⑨ *de novo* NAD^+ 生合成経路を欠損させた酵母 (*bnab6Δ*; *quinolinate phosphoribosyltransferase* を欠く酵母)をさらに *pnc1Δ*(*nicotinamidase* の遺伝子欠損株)にしても通常の培地では生育した。このことは、*Pnc1* すなわち *nicotinamidase* が NAD^+ 生合成において決定的な役割を果たしていないことを意味している。⑩ *npt1Δ*(*nicotinate phosphoribosyltransferase* の遺伝子欠損株)はサイレンシング欠陥株であるが、*PNC1* を導入すると若干欠陥が回復する。ちなみに、*npt1Δ*(*nicotinate phosphoribosyltransferase* の遺伝子欠損株)の細胞内 NAD^+ レベルは野生株の1/2程度である。そこで、培地に *de novo* 生合成経路の中間体であるキノリン酸を添加して NAD^+ レベルを正常にすると、*npt1Δ*, $3 \times PNC1$ 株の *rDNA* のサイレンシング(すなわち *rRNA* の転写抑制)を野生株のレベルまで回復させた。⑪ヒトの *NNMT*(*nicotinamide methyltransferase* をコードする遺伝子)を酵母に導入すると、*rDNA* のサイレンシングが上昇した。また、酵母の *NNMT* 遺伝子と推定される *YLR285W* の導入もサイレンシングを上昇させた。⑫ *YLR285W* の導入は酵母の寿命を延ばしたが、グルコース飢餓培地で培養しても、さらに寿命は延びなかった。しかしながら、*YLR285W* 欠損株は野生株と同じようにグルコース飢餓により寿命が延びることから、*YLR285W* は *PNC1* と異なり、本当の寿命調節因子ではない。

以上の結果から、エネルギー制限や適度なストレスによる寿命の延長は、*PNC1* の発現を高めることを介して起こることが明らかとなった。つまり、*Sir2* の NAD^+ 依存性脱アセチル化酵素活性により生ずる反応産物の一つであるニコチンアミドをニコチン酸としてすばやく除去することが、生物の寿命を支配している可能性がでてきた。ニコチンアミドを *N*-メチルニコチンアミドに変換する酵素 *nicotinamide methyltransferase* 活性の増大も寿命を延ばす。

ビタミン剤には、主にニコチンアミドが使用されている。ニコチン酸には血管壁を拡張させ、皮膚を発赤させる副作用が100 mg/回の摂取で起こる危険性があるためである。しかし、細胞内に遊離のニコチンアミドが蓄積すると老化の抑制が阻害され、寿命が短縮される危険性がでてきた。ニコチンアミドの代謝を加齢という時間軸を入れた研究が必要となってきた。

(滋賀県大 人間文化 柴田 克己, 福渡 努, 佐々木隆造)

文 献

- 1) Arking R (2000) 老化のバイオロジー (鍋島陽一, 北徹, 石川冬木 監訳) メディカル・サイエンス・インターナショナル
- 2) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**, 181-185
- 3) Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959
- 4) Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411
- 5) Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **87**, 953-959
- 6) Brachman CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD (1995) The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* **9**, 2888-2902

- 7) Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L (2000) transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800
- 8) Kaerberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* **13**, 2570-2580
- 9) Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126-2128
- 10) Lin S-J, Kaerberlein M, Andalls AA, Sturtz LA, Defossez P-A, Culotta VC, Flink GR, Guarente L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418**, 344-348
- 11) Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230
- 12) Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137-148
- 13) Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai S, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA (2001) hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149-159
- 14) Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen H, Latorre-Esteves M, Sinclair DA (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **277**, 45099-45107
- 15) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Cohen H, Lin SS, Manchester JK, Gordon JI, Sinclair DA (2002) Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ level. *J Biol Chem* **277**, 18881-18890

種を越えて存在しているビタミンK依存カルボキシラーゼ

最近、ビタミンK(K), 特にK₂の一つであるメナキノン-4の新しい作用(細胞分化誘導, アポトーシス誘導, 肝癌再発阻害など)が注目を集めている。一方, Kのよく知られた(古典的ともいうべき)機能として, いくつかのタンパク質の翻訳後修飾を行なう際の補酵素としての役割がある。これはK依存カルボキシラーゼ(GGCX)によって, 血液凝固因子や骨タンパク質などのK依存性タンパク質中のグルタミン酸残基が, γ -カルボキシルグルタミン酸(Gla)に変換されるものである。Gla残基はカルシウムイオンを配し, Gla残基を含むドメイン(Glaドメイン)の高次構造の安定化に寄与している。GGCXは, ほ乳類では血液凝固因子の産生場である肝臓や骨を中心として, 胎盤, 脳, 腎臓, 心臓など多くの組織で発現している。また, ショウジョウバエ¹⁾²⁾, イモ貝(巻き貝の一種)³⁾⁻⁵⁾といった無脊椎動物からも, GGCXをコードするcDNAがクローニングされ, 実際にGla化反応を触媒できることが示されている。これらの下等生物にまでGGCXが存在することから, グルタミン酸残基のカルボキシル化は種を越えて重要な意義を持つものと推察されるが, 生理的役割については不明な点が多く残っている。

クローニングされているヒト⁶⁾, ショウジョウバエ, イモ貝(*Conus textile*)のcDNAから推定されるGGCXは, それぞれ758, 670, 811アミノ酸残基である(Fig. 1)。3種のGGCXともに似たhydropathy index profileを示し, 五つの膜貫通領域の存在が推定されている(TM1~TM5)。ほ乳類GGCXは小胞体膜上に存在し, そのN末端は細胞質側にあり糖鎖修飾を受け, C末端側は小胞体の内腔側に存在すると考えられている⁶⁾。GGCXは, 翻訳直後の基質前駆体のGlaドメインの上流配列(プロペプチド領域, γ -グルタミルカルボキシラーゼ認識配列を含む)と結合し, 還元型KとO₂, CO₂存在下でグルタミン酸残基を修飾する。プロペプチド領域は, Glaドメインよりも酵素による基質認識に重要であり, K依存血液凝固因子, オステオカルシン, マトリックスGlaタンパク質, GAS6, PRGPIなどのプロペプチド領域には, コンセンサス配列が存在する。GGCXの相同性を検索すると, N末端, C末端ではホモロジーが見られないが, 中心部分は相同性が高い。特に相同性が高い領域は, 5番目の膜貫通領域