



## ミトコンドリアにおける NADP (H) 供給とその調節に関する分子生化学的研究

群馬大学生体調節研究所 大橋 一 登

### はじめに

NAD<sup>+</sup>は様々な反応に用いられる主要かつ始原的な補酵素と考えられている。その合成原料であるナイアシン(ビタミンB3)は、原始生命の原材料が存在するとされる小惑星リュウグウからも発見されている。NAD<sup>+</sup>及びその還元型のNADH(両者をまとめてNAD(H)と表記する)とこれらのリン酸化型であるNADP<sup>+</sup>及びNADPH(NADP(H)と表記する)は現在までに知られている全ての生物種で用いられる補酵素であり、多くの酵素反応に必要とされる。NAD(H)は主に異化反応に、NADP(H)は主に同化反応に用いられる。NAD(H)とNADP(H)の量的変動は様々な代謝系に影響を及ぼすため、NAD(H)のリン酸化によってNADP(H)を生成するNADキナーゼ(NADK)やNADHキナーゼ(NADHK)は、代謝調節において重要である。一方、ミトコンドリアは、共生微生物が起源とされるオルガネラであり、TCA回路や電子伝達系が局在することから、細胞の「エネルギー工場」と考えられてきた。しかし、近年ではそれだけに留まらず、代謝制御の中核としての役割が示されつつある。このような背景の下、著者らはミトコンドリアのNADP(H)供給機構に関する研究に取り組んだ。以下にその概要を示す。

### 1. ヒトのミトコンドリア局在性NADキナーゼC5orf33の発見とその生理的重要性

ミトコンドリアのNADP(H)は、脂質やアミノ酸の生合成や活性酸素種(ROS)の除去など様々な代謝に深く関わっている。ヒトのミトコンドリアのNAD<sup>+</sup>は、細胞質から供給される。しかし、NADP(H)の供給源は不明であり、その解明が望まれていた。著者らは、一般的なNADKとは分子系統樹上で全く別の枝を形成するが、NADK特有のモチーフ構造を有するヒト由来機能未知タンパク質C5orf33を見出した。そこで、C5orf33の組み換えタンパク質を精製し、その機能を解析した(図1)。その結果、C5orf33はATPに加えて原始的なエネルギー担体であるポリリン酸もリン酸供与体として利用することを明らかにした。さらに、C5orf33の $k_{cat}$ は0.15(1/sec)であり、ヒト細胞質NADK<sup>1)</sup>の $k_{cat}$ の61(1/sec)と比べて約1/400と非常に弱いNADK活性しか有していないことを見出した。しかし、C5orf33のNAD<sup>+</sup>に対する $K_m$ は0.02mMであり、ヒト細胞質NADKのNAD<sup>+</sup>に対する $K_m$ の1.07mMと比較して極めて低いことが分かった。生理的なNAD<sup>+</sup>濃度(ミトコンドリア:約0.25mM, 細胞質:約0.39mM)では、C5orf33は約3.9U/ $\mu$ molの比活性を示し、ヒト細胞質NADKの約12.1U/ $\mu$ molに比して、1/3程度の遜色ない活性であることを明らかにした。また、ヒト培養細胞系でC5orf33のミトコンドリア局在性やROS除去機能を明確にし、C5orf33はヒトのミトコンドリア局在性NADKであり(図1)、ヒトのミトコンドリアのNADP<sup>+</sup>供給源であると結論した<sup>2)</sup>。なお、C5orf33

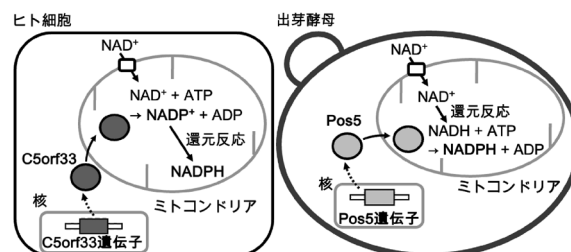


図1. ヒトのミトコンドリア局在性NADK(C5orf33)と出芽酵母のミトコンドリア局在NADHK(Pos5)

の立体構造やアミノ酸・脂質の生合成における必要性などが報告されている。特に医学分野ではC5orf33の生理学的機能と疾患との関連が明らかにされつつあり、より詳細な理解が重要な段階に達している。

### 2. 出芽酵母ミトコンドリア局在性NADHKによる基質(NADHとNAD<sup>+</sup>)識別の構造要因

真核生物である出芽酵母では、ミトコンドリア局在NADHKであるPos5(図1)が、ミトコンドリアのNADP(H)供給源であることが明らかにされている。Pos5は一般的なNADKと一次構造上で高い相同性を示すにも関わらず、NADHに対する高い親和性と高いNADHK活性を有するが、その生理的な意義は不明である。NADHK活性の原因となる構造要因の特定は、生物種におけるNADHKの分布を明らかにし、NADHKの生理的意義の理解に役立つ。そこで、X線結晶構造解析によりPos5とNADHの複合体(Pos5-NADH)の立体構造をNADHKとして初めて決定した。Pos5-NADHとNADKの立体構造を比較すると、NADHと相互作用するアミノ酸残基の多くはNADKでも保存されていた。しかし、Pos5のアルギニン(Arg)-293に相当するアミノ酸残基はNADKでは保存されておらず、ヒスチジン(His)残基に相当した。基質結合部位の表面電荷を計算すると、Pos5は正電荷を、NADKは負電荷を帯びていた。ArgとHisの $pK_a$ はそれぞれ12と6であり、Pos5のArg-293がPos5のNADH結合部位の正電荷に寄与していると考えられた。実際、Pos5のArg-293をHis残基へと置換すると、NADHK活性の低下とNADK活性の上昇が確認され、NAD<sup>+</sup>に対する $K_m$ は低下した。そのため、Pos5はNADH結合部位の正電荷(Arg-293が寄与)により、正に荷電したNAD<sup>+</sup>との親和性を低くし、NADHとNAD<sup>+</sup>の識別を可能にしていると考えられた(図2)。以上より、Arg-293はPos5の基質(NAD<sup>+</sup>とNADH)識別、並びに高いNADHK活性の構造要因であることが明らかになった<sup>3)</sup>。なお、Pos5のArg-293に相当するアミノ酸残基は、分子系統樹とアライメント解析で一部の真菌類由来タンパク質に保存され、これらはNADHKと推測されるに至った。それゆえ、NADHK活性は、これらの真菌類

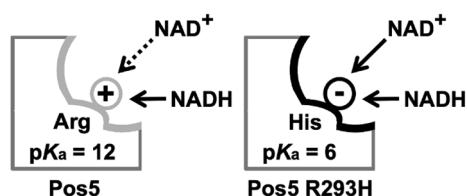


図2. 出芽酵母ミトコンドリア局在NADHKによる基質 (NADH と NAD<sup>+</sup>) 識別の構造要因

の NADP(H) 供給を特徴付ける可能性がある。以上より、出芽酵母のミトコンドリアにおける特徴的な NADP(H) 供給の仕組みを主に NADHK の構造生物学的側面から明らかにし、その仕組みが一部の真菌類に普遍的である可能性を示した。

### 3. ミトコンドリアの NADP(H) 供給に必要な NAD<sup>+</sup> 合成系への研究展開

ミトコンドリアの NADP(H) 供給は、利用可能な NAD<sup>+</sup> 量に依存する。NAD<sup>+</sup> はトリプトファン (Trp) からの *de novo* 経路 (図3A), またはニコチン酸などの NAD<sup>+</sup> 前駆体からの salvage 経路で供給される。Trp からキノリン酸 (QA) を合成するキヌレニン (KYN) 経路は、NAD<sup>+</sup> の供給に重要である。出芽酵母で KYN 経路の研究を進め、Trp の代謝で生じるキヌレン酸 (KA) や NAD<sup>+</sup> 前駆体の QA が細胞外に放出されることを見出した<sup>4,5)</sup>。さらに、過剰な Trp 存在下では、KYN から KA を合成する kynurenine aminotransferase (KAT; Aro8 と Aro9) の発現上昇と KA の増加が顕著に認められた。これらの結果から、*de novo* 経路での NAD<sup>+</sup> 供給には一部の Trp のみが必要とされ、余剰な Trp は KA へと代謝されて細胞外に放出されると考えられた。即ち、KYN 経路は NAD<sup>+</sup> 合成経路であると同時に、不要な Trp の分解経路であることを示した。特に、KAT は Trp 分解に極めて重要で、機能不明であった KA は排出物と考えられた。なお、KA は高等動物の尿中に多く含まれることも知られており、この事実は KA が排出物であることを支持している。また、本研究で得られた知見から、細胞内での Trp 蓄積の有害性が示唆された。そこで、過剰な Trp への耐性に必要な遺伝子を調べ、細胞表層ストレス応答に関わる Cell Wall Integrity (CWI) 経路の MAP キナーゼカスケードが Trp への耐性に必要であることを示した。実際、過剰な Trp によって、CWI 経路の MAP キナーゼである Slt2 のリン酸化が抑制されていたことなどから、Trp の蓄積が CWI 経路の活性化による細胞表層ストレスへの応答を妨げることが示唆された (図3B)<sup>6)</sup>。このように、高濃度 Trp の細胞毒性と KYN 経路の解析により、NAD<sup>+</sup> の *de novo* 合成の多面的制御機構の存在が示された。また、細胞内 NAD<sup>+</sup> レベルの維持には、オートファジーが必要と考えられている。著者らはオートファジーに必須の Atg8 タンパク質の脂質化反応機構<sup>7)</sup> や膜タンパク質である Atg2 の立体構造と機能の解析<sup>8)</sup> にも取り組んだ。NAD<sup>+</sup> 供給系にはまだ明らかになっていない制御機構があると考えている。多角的な研究の発展によって、NAD<sup>+</sup> 供給系の全体像の解明が期待される。

おわりに

本研究により、ミトコンドリアの NADP(H) 供給にかかる様々な調節機構の存在が示された。ミトコンドリアの NADP(H) は様々な代謝活動に必要とされ、特に生活習慣病や寿命との関連も深い。そのため、ミトコンドリアの NADP(H) 供給を調節する分子機構の理解が重要であると考えている。今後は応用も見据えながら、新しい知見を積み重ねていきたい。

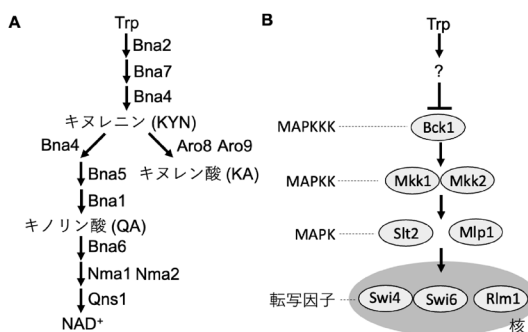


図3. 出芽酵母における NAD<sup>+</sup> 合成系の多面的制御  
A) Trp からの NAD<sup>+</sup> 合成経路。B) Trp 蓄積による CWI 経路の MAP キナーゼカスケードの抑制。

### (引用文献)

- 1) K. Ohashi, S. Kawai, M. Koshimizu, K. Murata. *Mol. Cell. Biochem.*, 355(1-2), 57-64 (2011)
- 2) K. Ohashi, S. Kawai, K. Murata. *Nat. Commun.*, 3, 1248 (2012)
- 3) T. Ando, K. Ohashi, A. Ochiai, B. Mikami, S. Kawai, K. Murata. *J. Biol. Chem.*, 286(34), 29984-29992 (2011)
- 4) K. Ohashi, R. Chaleckis, M. Takaine, C. E. Wheelock, S. Yoshida. *Sci. Rep.*, 7(1), 12180 (2017)
- 5) K. Ohashi, S. Kawai, K. Murata. *Eukaryot. Cell*, 12(5), 648-653 (2013)
- 6) K. Ohashi, R. Chaleckis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85(10), 2131-2136 (2021)
- 7) K. Ohashi, T. Otomo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463(3), 447-452 (2015)
- 8) S. Chowdhury, C. Otomo, A. Leitner, K. Ohashi, R. Aebersold, G. C. Lander, T. Otomo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 16, 115(42), E9792-E9801 (2018)

謝辞 本研究は、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野、The Scripps Research Institute Department of Integrative Structural and Computational Biology、および群馬大学生体調節研究所において行われました。大学・大学院時代の指導教員で、本研究の端緒となる課題を与えていただき、その研究を通じて研究活動の基礎をご教授いただいた京都大学名誉教授の村田幸作先生には、今に至るまでご指導ご鞭撻を頂いております。心より深く感謝申し上げます。また、様々なご支援と厳しくも温かいご助言をいただいた京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野教授の橋本渉先生に心より感謝申し上げます。研究の基礎となる技術や考え方を一から手ほどきいただき、本研究に多くのご助言と惜しみないご支援をくださった石川県立大学生物資源工学研究所教授の河井重幸先生に深く感謝申し上げます。アメリカでの研究留学において、研究の厳しさやそれまでとは全く違う価値観を経験させていただき、研究活動を支えていただきました San Diego Biomedical Research Institute の大友崇紀先生に深く感謝申し上げます。独立して研究を開始するにあたって、多面的なご支援をいただき、本研究にも的確かつ厳しいご指摘と温かい励ましをいただきました早稲田大学国際教養学部教授の吉田知史先生に心より感謝申し上げます。また、自由な研究環境を与えてくださった群馬大学生体調節研究所の先生方、本研究にご指導・ご助力を賜りました先生方、共同研究者の皆様にも深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・伏信進矢先生 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻酵素学研究室) に深く御礼申し上げます。