

老化・寿命の制御における NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の機能に関する研究

林田 諭

福岡大学薬学部生化学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Study on the roles of NAD⁺-dependent deacetylase, SIRT1, in aging and longevity

Satoru Hayashida

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Calorie restriction (CR) extends lifespans in a wide variety of species. CR induces an increase in the NAD⁺/NADH ratio in cells and results in activation of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase that is thought to be a metabolic master switch linked to the modulation of lifespans. CR also affects the expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). The three subtypes, PPAR α , PPAR γ , and PPAR β/δ , are expressed in multiple organs. It has been suggested that PPARs mediate the effects of CR and that PPARs and CR activate the same signaling pathways to prolong lifespan. CR enhances the expressions of PPARs and SIRT1. However, it is not known whether or how an increase in NAD⁺ in the salvage pathway under CR can directly enhance the expressions of PPARs and SIRT1. In this study, we investigated how the NAD⁺ metabolic system is involved in controlling the expression of SIRT1 and PPARs under CR, by using CR mice and C2C12 myotubes. The NAD⁺ levels increased with increasing expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) in the NAD⁺ salvage pathway in skeletal muscle of mice under exercise. Treatment of C2C12 myotubes with AICAR, a NAD⁺ salvage pathway activator, showed that the mRNA expression of SIRT1 and PPAR β can be enhanced but that of PPAR α is not. The cell experiments using PPAR β agonist suggested that PPAR β is a key molecule located upstream from SIRT1, and has a role in regulating SIRT1 gene expression in skeletal muscle of mouse under CR and Exercise.

Keywords : SIRT1; PPAR β ; Calorie restriction; NAD⁺

【緒言】

現在、日本では社会全体の高齢化や老人医療費の負担増加などが深刻な社会問題となっている。もし多くの高齢者が肉体的・精神的に健康で、生産的的老後 (Productive Aging) をおくることが可能になれば、高齢化が加速する日本において、社会的に大きな変革をもたらすと考えられる。高齢者は複数の慢性的な疾病を有していることが多く、これらの一つ一つに対して予防や治療を施していくと、患者の肉体的、精神的、そして経済的負担は増大してしまう。ほとんどの高齢者の慢性的な疾患における重要なリスクファクターは老化であるため、老化・寿命研究がこれらの慢性疾患の予防につながる成果を生む可能性は大きい。そのような状況の中、生活の質の低下を招く主要な老化関連疾患を対象として、その予防と治療を目指した研究が数多くなされている。一方、エネルギーの摂取/消費バランスの破綻や生体内での

酸化ストレスの亢進といったメタボリックシンドロームのリスクファクターは、老化と密接な関係を有している。この老化と代謝をつなぐ重要な制御因子となる可能性があるのが、寿命関連因子である。そのため、寿命関連因子を中心とした生体の情報伝達シグナルの解析がメタボリックシンドロームの成因を解明するうえで、重要な鍵を握っていると考えられる。したがって、寿命関連因子に焦点を当てた研究から得られる成果や情報に基づいた創薬は、メタボリックシンドロームの新たな予防や治療法の開発につながるのではないかと推察できる。

1930年代、カロリー制限に老化遅延・寿命延長効果があることが明らかとなって以来¹、カロリー制限が老化関連疾患に有効であるとする報告が相次いでなされている^{2,3}。近年、酵母を用いた研究から Sir2 タンパク質が老化・寿命の制御に関わる重要な因子であるとの報告がなされた⁴。その後の研究で哺乳類における Sir2 ホモログとして SIRT1~7 が同定され、Sirtuin ファミリーを形成していることが明らかとなった⁵⁻⁷。これらのうち、酵母 Sir2 と最も相同性の高いタンパク質が SIRT1 である。カロリー制限がもたらす老化遅延・寿命延長効果の中心的分子と考えられる SIRT1 を含めた Sirtuin ファミリーに関する数多くの研究成果が報告されているため⁸⁻¹⁰、これらをターゲットとした薬剤の開発が期待されている。また、カロリー制限にはメタボリックドミノ進展抑制効果があることも報告されているため¹¹、SIRT1 は老化と代謝をつなぐ重要な制御因子となりうるものと考えられる。

一方、さまざまな生体応答において NAD⁺ が重要な役割を果たしていることはよく知られているが^{12,13}、この NAD⁺ 依存的に働く脱アセチル化酵素が寿命関連因子の一つである SIRT1 である¹⁴。SIRT1 は、ヒストンの脱アセチル化により遺伝子のサイレンシング、いわゆるエピジェネティックな遺伝子制御に関与している一方で、ヒストン以外の様々なタンパク質を直接脱アセチル化し、その活性や機能を制御・統括しているとされている。SIRT1 により脱アセチル化を受ける主な因子としては、ヒストンのようなヌクレオソーム構成タンパク質や、NF- κ B, PGC-1 α , p53, FOXO などの転写因子が挙げられるが、LKB1 などのリン酸化酵素が SIRT1 のターゲットとなる例も報告されている¹⁵⁻¹⁹。

このように、NAD⁺代謝系によって制御されている SIRT1 が老化と代謝をつなぐ因子として注目され、そのターゲットとなる転写因子も数多く報告されているが、SIRT1 の発現制御に関する分子メカニズムには不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、カロリー制限による SIRT1 の発現制御機構を解明し、老化関連疾患の予防・治療薬の開発に端緒を開くべく実験を行った。

1. 生体のエネルギー代謝に及ぼすカロリー制限の影響

カロリー制限や SIRT1 の活性化剤であるレスベラトロールが肥満の改善に効果があるとの報告がなされている。そこで、生体に及ぼすカロリー制限の影響について、エネルギー代謝に焦点を当てて検討を行った。本研究ではマウスを用い、普通食を自由摂食させた対照 (ND) 群、平日隔日給餌法によるカロリー制限 (CR) 群、高脂肪食負荷による肥満モデル (HF) 群、高脂肪食負荷後に普通食に切り替えた (HF/ND) 群および高脂肪食負荷後にカロリー制限に切り替えた (HF/CR) 群について比較検討を行った。

マウスの体重変動に及ぼす食餌の影響について検討を行った結果、ND 群と比較し、CR 群では明らかに体重増加が抑制されていた。一方、HF 群では有意な体重増加が認められたが、途中から普通食や隔日給餌に切り替えた HF/ND 群と HF/CR 群では、HF 群に比べ、どちらも脂肪肝の改善と体重の有意な減少が認められた。これらの群では体重の減少に伴い、HF/ND 群では肝臓および腎臓周辺の、HF/CR 群では肝臓や腎臓周辺に加え睾丸周辺の脂肪組織量にも明らかな減少が認められた。HF 群で高い値を示していた血中のトリグリセリドおよびコレステロール濃度も、カロリー制限により改善された。また、血糖値と血中インスリン濃度は、ND 群に比べ HF 群ではどちらも高い値を示した。グルコース負荷試験の結果

も考慮すると、HF群ではインスリン抵抗性が増大しているものと推察された。HF/NDおよびHF/CR群では、HF群で高かった血糖値とインスリン濃度の低下が認められたことから、摂取カロリーの低下によってインスリン抵抗性が改善され、糖の利用が亢進しているものと考えられた。

前記方法で飼育したマウスの自発運動量について測定を行った。その結果、カロリー制限（CR群）によりND群に比べ、有意な自発運動量の亢進が起こること、さらに、肥満（HF群）で減少した自発運動量がカロリー制限を行う（HF/CR群）ことで亢進することも明らかとなった（Fig.1）。この運動量の亢進は、マウスの活動期である暗期においてのみ観察された。これらの結果は、カロリー制限による運動量の亢進が、体内の脂質および糖の利用を充める一因となっている可能性が高いことを示唆している。

酸化ストレスの亢進も肥満や老化と関連しているとされていることから、各群マウスの酸化ストレスの指標である血中ヒドロペルオキシド量を測定し、酸化ストレス度について検討を行った。HF群で上昇した酸化ストレスは、HF/ND群およびHF/CR群では有意に減少していたことから、カロリー制限を行うと体内の酸化ストレスが改善されることが示唆された。また、前項で示したように、カロリー制限によりマウスの自発運動量の亢進が観察されたことから、骨格筋におけるROS（活性酸素）産生量について測定を行った。その結果、HF群で上昇したROS産生量が、HF/ND群およびHF/CR群では減少することが確認された。

骨格筋におけるSIRT1のタンパク量について検討を行ったところ、カロリー制限により骨格筋でのSIRT1のタンパク質レベルの上昇が認められた。NAD⁺濃度もカロリー制限により上昇していた。

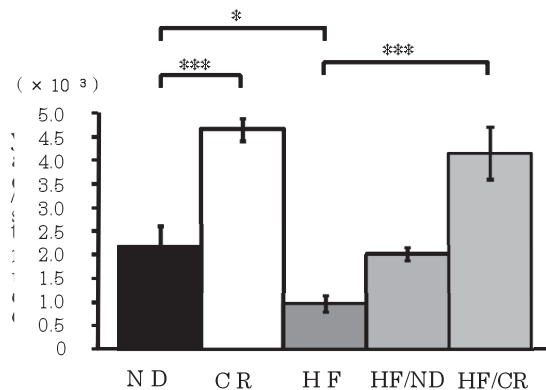


Fig. 1 Calorie restriction increases spontaneous motor activity. Each value represents the mean \pm S.E. of three mice. *P<0.05, ***P<0.005.

2. 生体のエネルギー代謝に及ぼす運動の影響

エネルギー代謝はエネルギーの摂取と消費のバランスによって制御を受けているが、前節で示したように、エネルギーの摂取量を変えると、消費系である運動量に変化が認められた。前節に示したような結果が、摂取カロリーの制限による効果なのか、あるいは運動量の亢進による効果なのかを明らかにするために、マウスを用いて体重、組織重量、血中ヒドロペルオキシド量および骨格筋におけるSIRT1発現とNAD⁺濃度に及ぼす強制運動の影響について検討した。これまでの実験と同じ条件で飼育した対照（ND）群およびカロリー制限（CR）群に加え、自由摂食下で強制運動を行った（Ex）群、カロリー制限下で強制運動を行った（CR+Ex）群について比較検討を加えた。

CR群ではND群に比べ体重の増加が抑制されていたが、CR群とCR+Ex群間に大差はなく、運動だけでは有意な体重変化は起こらないことが判った。また、肝臓および脂肪組織の重量は、カロリー制限によ

て低下したが、ND群とEx群ならびにCR群とCR+Ex群間には有意な差がなかった。血中のトリグリセリドおよびコレステロール濃度についても測定したが、運動負荷による大きな変化は認められなかった。しかし、血糖値およびインスリン濃度は、カロリー制限や運動負荷によって、それぞれ低下および上昇していた。これらの結果は、本実験条件でのカロリー制限や運動が、脂質よりも糖代謝の方により大きな影響を及ぼしていることを示唆している。

運動により酸化ストレスが影響を受けるのではないかと推測されるため、血中ヒドロペルオキシド量を測定したが、各群間でその量に有意な変化は認められず、強制運動は酸化ストレスに大きな影響を及ぼさないことが判った。

前節で示したように、カロリー制限によって自発運動量が増加し、骨格筋におけるSIRT1タンパク量や細胞内NAD⁺濃度が上昇していたことから、強制的な運動がこれらの事項に影響を及ぼす可能性があるのではないかと考え、これらの点について検討を行った。その結果、運動負荷によって明らかなSIRT1タンパク質量 (Fig.2) および細胞内NAD⁺濃度の上昇が認められた。しかし、カロリー制限と強制運動を併せて負荷すると、それぞれの単独負荷群に比べて、SIRT1タンパク量および細胞内NAD⁺濃度の低下が認められた。このことは、過重な負荷が生体にとって必ずしも好ましいことではないことを暗示している。いずれにせよ、以上の結果から、骨格筋におけるSIRT1のタンパク発現および細胞内NAD⁺濃度は、カロリー制限だけでなく、運動によっても大きな影響を受けることがわかった。

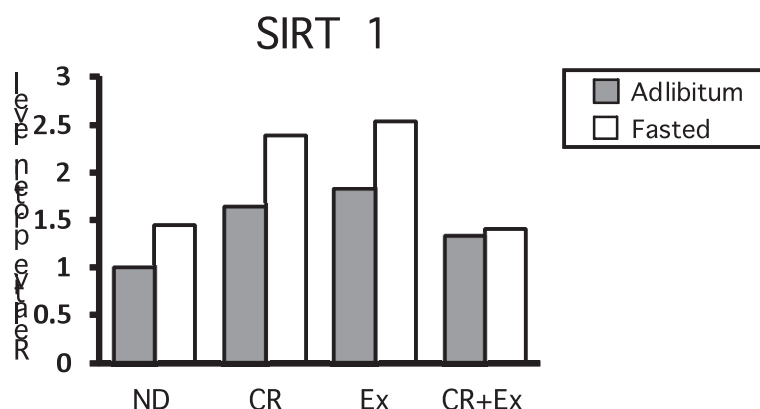


Fig.2 Effect of carolie restriction and exercise on the protein expressions of SIRT 1 .

3. SIRT1およびその他の代謝制御因子の発現に及ぼすNAD⁺の影響

カロリー制限や運動によってSIRT1の発現が上昇するが、そのメカニズムは明らかになっていない。カロリー制限や運動によって骨格筋における細胞内NAD⁺濃度の上昇が、SIRT1のNAD⁺依存的な酵素活性を活性化することは知られているものの、SIRT1の発現に及ぼすNAD⁺の効果については報告されていない。著者は、培養肝細胞を用いた研究からNAD⁺がSIRT1の発現を正に制御していることを見出している。本研究では、マウス筋芽細胞株C2C12を筋管細胞に分化させた後にNAD⁺を添加して、SIRT1の発現がどのような影響を受けるのか検討した。

骨格筋において、AMP kinaseが活性化されると、NAD⁺合成酵素であるNAMPTの発現誘導を介してNAD⁺合成が亢進することが報告されている。AMP kinaseはセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内エネルギーレベルの低下 (AMP/ATP比の上昇) によって活性化される代謝センサーである。そこで、AMPK kinaseの活性化剤であるAICARがSIRT1の発現にどのような影響を及ぼすのか検討を行った。

その結果、AICAR処理によって有意なSIRT1の発現誘導が認められた (Fig.3A)。上述のようにAICARによって細胞内NAD⁺濃度が上昇していることが考えられることから、NAD⁺はSIRT1の活性だけでなく、その発現も制御している可能性も推察された。そこで、NAD⁺自体の影響を調べるため実験を行った結果、NAD⁺はSIRT1の発現を有意に上昇させることが明らかとなった (Fig.3B)。このように、AICARの作用により増加した細胞内NAD⁺は、SIRT1の酵素活性のみならず、その発現の上昇にも寄与していることが示唆された。

また、著者は、肝臓でのSIRT1発現の制御に、NAD⁺によって制御を受けるPPAR α が関与することをすでに報告している²⁰。PPARのサブタイプの中で、肝臓ではPPAR α の発現が最も多いが、骨格筋においてはPPAR β が最も多く発現しており、筋肉組織における脂肪酸燃焼などのエネルギー消費を制御する因子と考えられている。さらに、PPAR β は、運動やカロリー制限によって制御を受けていることが報告されていることから、SIRT1との間に何らかの関連性があると考えられる。そこで、PPAR β の発現についても前項と同一条件で検討を行った。その結果、SIRT1と同様に、AICAR処理によってPPAR β 発現の誘導が認められ (Fig.3A)、NAD⁺の添加によっても発現が有意に上昇した (Fig.3B)。しかしながら、PPAR α の発現には、AICAR処理で有意な変化が認められなかった。したがって、骨格筋においては、PPAR α ではなくPPAR β がNAD⁺による制御を受けていることが明らかとなり、NAD⁺代謝系が影響を受けるカロリー制限や運動条件下における代謝変動には、PPAR β が重要な役割を果たしている可能性が高いことが示唆された。

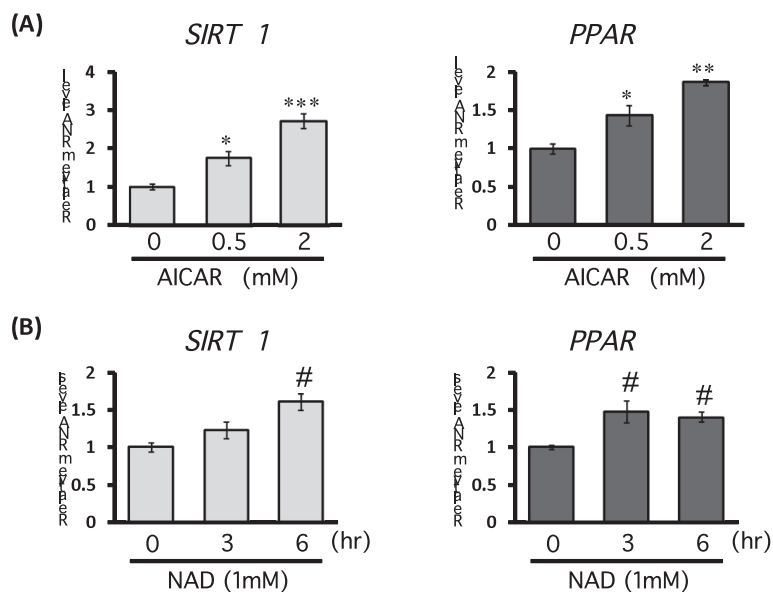


Fig.3 Effect of AICAR (A), and exogenously added NAD⁺ (B) on the mRNA expressions of SIRT1 and PPAR β in C2C12 myotubes. Each value represents the mean \pm S.E. of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.005, compared to the control (0 mM). # P <0.05, compared to the control (0 hr).

肝臓におけるSIRT1の発現はPPAR α によって制御されているが、これまでにSIRT1の発現制御に対するPPAR β の関与についての報告はない。著者は、SIRT1のプロモーター領域にPPAR-responsive element (PPRE)と推定される配列を見出し、PPAR β のアゴニストであるGW501516処理によってSIRT1の発現が有意に上昇することも明らかにしている。したがって、SIRT1の発現は、プロモーター領域のPPRE

を介して PPAR β によって制御されている可能性が高いと考えられた。このように、SIRT1 は酵素活性のみならず、その発現自体が NAD⁺ によって制御されていることが明らかとなった。さらに、NAD⁺ 合成を制御している AMP kinase や NAD⁺ によって、PPAR β も制御されており、その下流には SIRT1 遺伝子が位置することが示唆された。

【総括】

本研究では、老化関連疾患に深い関わりを持つと考えられるカロリー制限と運動について重要な寿命関連因子の一つである SIRT1 を中心に分子レベルでの解析を試みた。その結果は、骨格筋における SIRT1 の発現が、カロリー制限だけでなく運動によっても影響を受けることを示した。さらに、そのメカニズムとして、これまで SIRT1 の酵素活性の上昇に必要なとされていた NAD⁺ が SIRT1 の発現自体も正に制御すること、また、PPAR β が SIRT1 発現を制御している可能性が高いことも明示することができた。

現在、SIRT1 および NAD⁺ 合成系の研究から、“NAD World” と言われる老化・寿命制御と代謝制御を結びつける新しい概念が提唱されている。この“NAD World”の必須の構成因子は、代謝制御のペースメーカーとして機能する NAD⁺ 合成系と各組織でメディエーターとして働く SIRT1 であるとされているが、本研究結果は、PPAR β がこの“NAD World”と骨格筋における代謝制御をつなぐ重要な因子となり得ることを示唆している。

これまでの研究で、老化関連疾患の予防や治療において、NAD⁺ 合成系や SIRT1 が創薬標的になりうる可能性が示唆されているが、本研究によって得られた成果から、PPAR β がこれらの疾患に対する新たな創薬標的となりうることを期待できる。

【謝辞】

終わりに臨み、本研究の機会を与えられ、終始懇切な御指導並びに御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部生化学教室の添田泰司教授に謹んで感謝の意を表します。本研究に際し、数多くの貴重な御提言と御指導を賜りました同学部生化学教室の占野廣司教授ならびに本田伸一郎准教授に深甚なる謝意を表します。折に触れ、研究上の示唆を与えて下さった同学部生化学教室の藏元佑嘉子助教、小迫知弘助教ならびに元流梨恵助教に深く感謝致します。本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野の田中嘉孝教授に深く感謝致します。最後に、本研究に尊い命を提供して頂きました実験動物諸霊に感謝いたします。

【参考文献】

1. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 1935;10:63-79.
2. Wang J, Ho L, Qin W, Rocher AB, Seror I, Humala N, Maniar K, Dolios G, Wang R, Hof PR, Pasinetti GM. Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2005;19:659-61.
3. Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, Grondin R, Roth GS, Mattison J, Lane MA, Carson RE, Cohen RM, et al. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:18171-6.
4. Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*.

- Nature 2001;410:227-30.
5. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 2007;21:1745-55.
 6. Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med* 2007;39:335-45.
 7. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007;404:1-13.
 8. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlon EJ, Lin SJ, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006;4:0210-0220.
 9. Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol Cell Biol* 2007;27:4698-707.
 10. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 2007;282:33583-92.
 11. Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:868-74.
 12. Ying W. NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci* 2006;11:3129-48.
 13. Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 2007;32:12-9.
 14. Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000;403:795-800.
 15. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 alpha and SIRT1. *Nature* 2005;434:113-8.
 16. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2008;283:27628-35.
 17. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2 alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001;107:137-48.
 18. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;303:2011-5.
 19. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004;23:2369-80.
 20. Hayashida SA, A. Kuramoto, Y. Kozako, T. Honda, S. Shimeno, H. Soeda, S. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Mol Cell Biochem* 2010;339:285-292.