

## トピックス

## ウリジン 5'-三リン酸によるチアミンピロリン生成とピルビン酸の酸化促進

### Uridine 5'-triphosphate supports cellular thiamine pyrophosphate production and pyruvate oxidation

ヌクレオチドは核酸の構成単位としてだけでなく多くの機能を備えている。プリンヌクレオチドでは、アデノシンが補酵素 (coenzyme A, NADH, FADH<sub>2</sub> 等) を構成したり細胞内シグナル分子 (cAMP) になっており、ATP と GTP は高エネルギーリン酸化合物として多くの代謝反応を促進している。一方、ピリミジンヌクレオチドでは、UDP-グルコースや UDP-ガラクトースは糖鎖付加反応の基質になり、CDP-コリンや CDP-エタノールアミンはグリセロリン脂質生合成に関与している<sup>1)2)</sup>。しかし、ATP や ADP などのプリンヌクレオチドが解糖系や TCA 回路のようなエネルギー代謝に関与しているのに対して、ピリミジンヌクレオチドの中心炭素代謝経路 (central carbon metabolism) への直接的な作用については報告がなかった。今回、米国の Sahu らのグループ<sup>3)</sup>が、UTP がチアミンピロホスホキナーゼ (thiamin pyrophosphokinase, TPK) の基質として優先的に利用されており、その結果、チアミンピロリン酸 (thiamin pyrophosphate, TPP) 生成、ピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 活性、TCA 回路、脂質生合成 (lipogenesis) と脂肪細胞分化 (adipocyte differentiation) 等が促進されることを明らかにしたので紹介したい。

まず、ピリミジンヌクレオチドが細胞内代謝にどのように影響しているのか検討するため、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞にピリミジン *de novo* 経路 (図 1) のジヒドロオロト酸脱水素酵素 (dihydroorotate dehydrogenase, DHODH) 阻害剤であるブレキナル (brequinar, BRQ) を添加して代謝産物プロファイリングを分析した。その結果、ピリミジン関連物質 (ヌクレオシド、ヌクレオチド、糖ヌクレオチド等) の減少に続いて、クエン酸濃度の減少とピルビン酸濃度の増加が観察された。しかし、ATP の濃度は減少しなかった。一方、プリンヌクレオチド合成やチミジル酸合成に関与するジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメトトレキサートはクエン酸やピルビン酸の濃度に影響を与えなかったが、ATP の濃度は減少

した。そこで、DHODH の阻害に依存しない細胞内ピリミジン欠乏状態を構築するため、CRISPR-Cas9 系を用いて、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞と HeLa 細胞に、それぞれカルバモイルリン酸合成酵素 2、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ、およびジヒドロオロターゼ (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydroorotase) の頭文字から CAD と呼ばれる三機能酵素 (図 1) とオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (orotate phosphoribosyl transferase) とオロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素 (orotidine 5'-phosphate decarboxylase) の 2 つの活性部位を持つ UMP 合成酵素 (UMP synthase, UMPS, 図 1) を欠損させた  $\Delta$ CAD,  $\Delta$ UMPS 細胞を作製した。CAD と UMPS は共にピリミジン *de novo* 経路の酵素であるので、培養時にウリジンを添加しないと細胞内ピリミジン欠乏状態となって細胞の増殖能力が低下する。 $\Delta$ UMPS HEK293 細胞をピリミジン欠乏状態にすると、やはりクエン酸濃度の減少とピルビン酸濃度の増加が観察された。この状態での解糖や TCA 回路の状況を検討するため、6 つの炭素全てを安定同位体 <sup>13</sup>C で標識した [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] グルコースと 3 つの炭素全てを同様に標識した [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] ピルビン酸によるトレーサー実験を行ったところ、「クエン酸/ピルビン酸」比が減少し、TCA 回路の中間体である  $\alpha$ -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸の生成が低下していた。一方、フルクトース 1,6-ビスリン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸・グリセルアルデヒド 3-リン酸、乳酸などの解糖系中間体には有為な変化は認められなかった。HEK293 細胞に BRQ や UMPS 阻害剤であるピラゾフルリン (pyrazofurin, PRZ) を添加しても、さらに  $\Delta$ CAD HEK293 細胞においても、同様にピルビン酸の異化と TCA 回路の活性が低下していた。対照的に、プリン *de novo* 経路の酵素ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ (phosphoribosylglycinamide formyltransferase, GART) を欠損させた  $\Delta$ GART HEK293 細胞では、ジヒドロキシアセトンリン酸・グリセルアルデヒド 3-リン酸、ピルビン酸、

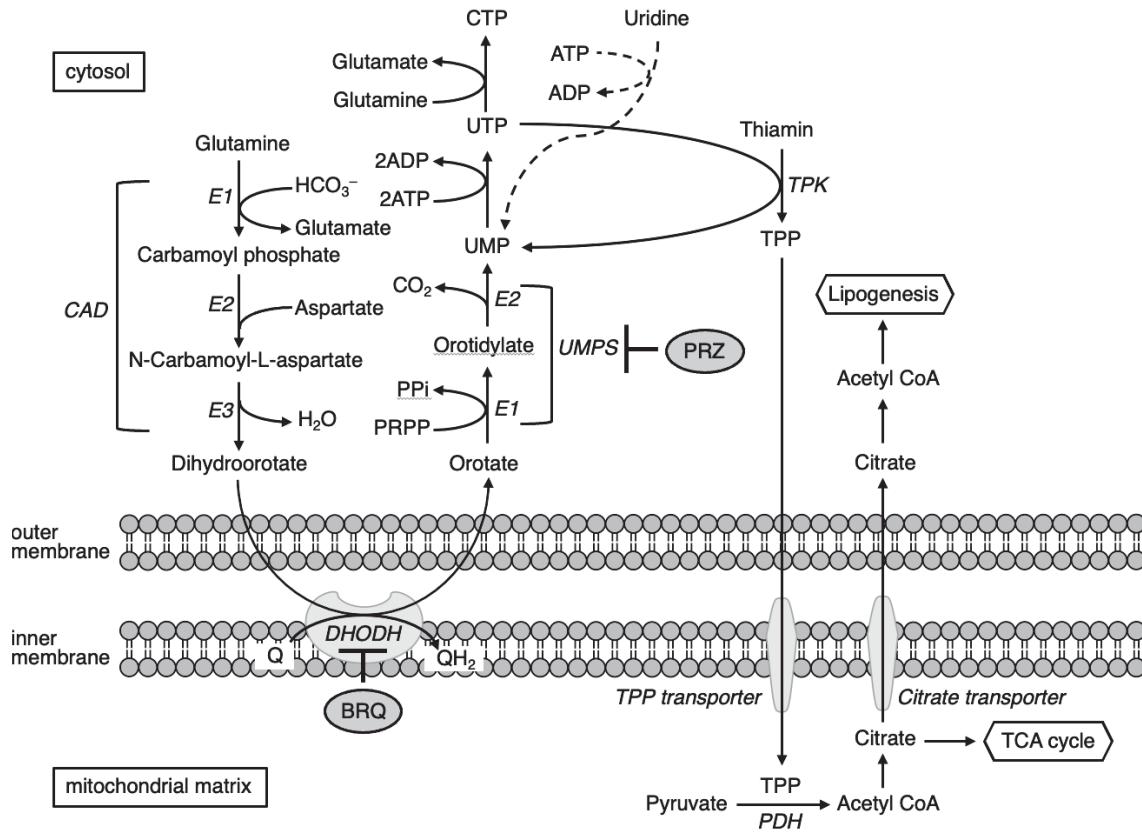


図1 ピリミジンヌクレオチドの生合成経路と中心炭素代謝経路への関与

グルタミンから UMP までの実線はピリミジンの *de novo* 経路を示し、破線はサルベージ経路を示す。イタリック体は酵素を表す。CAD は E1 (carbamoyl-phosphatase 2), E2 (aspartate transcarbamoylase), E3 (dihydroorotase) の活性部位を有する三機能酵素であり、UMPS は E1 (orotate phosphoribosyl transferase) と E2 (orotidine 5'-phosphate decarboxylase) の活性部位を有する二機能酵素である。DHODH (dihydroorotate dehydrogenase) はミトコンドリア内膜に存在する酵素で、ユビキノン (Q) が電子受容体となる。その他の略語は本文を参照されたい。

乳酸の生成と共に ATP の濃度も低下していた。このピリミジンの存在量によるピルビン酸異化への影響は、出芽酵母のウラシル要求性株 ( $\Delta URA3$ ) やマウス個体を用いた実験でも確認されており、種を超えた一般的な現象であることが示唆された。

ピルビン酸はミトコンドリアの PDH 複合体による酸化脱炭酸反応によってアセチル CoA に変換される (図1)。そこで、 $[1-^{14}C]$  ピルビン酸からの  $[^{14}C]$  二酸化炭素放出を定量して PDH 活性を評価したところ、 $\Delta CAD$  及び  $\Delta UMP5$  HEK293 細胞で PDH 活性の低下が確認されたことから、細胞内ピリミジン欠乏によるピルビン酸濃度の上昇は PDH 活性の低下による事が示唆された。なお、この結果は PDH 複合体を構成する PDHA1 (E1 $\alpha$ サブユニット), PDHB (E1 $\beta$ ), DLAT (E2), DLD (E3) 等の量的な変化によるものではない事がウェスタンブロット法で確認されている。また、

PDHA1 は PDH キナーゼによってリン酸化を受けると不活性化するが、PDHA1 のリン酸化状態にも変化は認められなかった。では何故、ピリミジン欠乏によって PDH 活性が低下するのであろうか。Sahu らは、 $\Delta CAD$  HeLa 細胞をピリミジン欠乏状態にしたとき、ピルビン酸、チアミン、メチオニン、チロシン、グルコースの代謝が影響を受けることをノンターゲットメタボロミクス解析において観察した。このうち、チアミンは補酵素 TPP として、PDH E1 のピルビン酸脱炭酸活性に必要である。そこで、BRQ 処理 HeLa 細胞、PRZ 処理 HEK293 細胞、 $\Delta UMP5$  HeLa 細胞での TPP 濃度を定量したところ、何れの細胞においても著しく低下していた。また、BRQ と PRZ を投与されたマウスの肝臓において、TPP と UTP の減少が認められたが、ATP は変化していなかった。さらに、 $\Delta UMP5$  HEK293 細胞と  $\Delta GART$  HEK293 細胞で  $[^{13}C_4]$  チアミンのトレーサー

実験を行うと、ATP 濃度が減少した  $\Delta GART$  HEK293 細胞では TPP の生成は影響を受けなかったのに対して、UTP 濃度が減少した  $\Delta UMPS$  HEK293 細胞では TPP 生成の低下が観察された。これらの結果より、TPK 活性は細胞内プリンではなくピリミジン濃度に影響を受けており、ピリミジン欠乏によって TPP 濃度が減少するため PDH 活性が低下することが示唆された。なお、PDH だけでなく、トランスケトラーゼ、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素、分枝鎖ケト酸脱水素酵素等の TPP 依存性酵素活性もピリミジン欠乏によって低下することが確認されており、ピリミジンが細胞内 TPP 濃度と中心炭素代謝経路に関与していることが示唆された。

TPK によるチアミンリン酸化反応のリン酸基供与体は ATP であると一般的に知られている。しかし、ヒトの精製酵素 (hTPK) を用いた *in vitro* の実験では、ATP 以外のヌクレオチドもリン酸基供与体になり得る事が報告されている<sup>4)</sup>。筆者らも、4 種類のヌクレオチド (ATP, CTP, GTP, UTP) のなかで UTP を用いた時に最も活性が高く、その比活性は ATP の 2 倍であることを観察している<sup>5)</sup>。そこで、Sahu らは、ジギトニンで透過処理したピリミジン欠乏状態の  $\Delta UMPS$  HEK293 細胞に上記 4 種類のヌクレオチドを添加したところ、UTP のみが TPP 濃度と「クエン酸/ピルビン酸」比を回復させた。また、UTP は TCA 回路の中間体である  $\alpha$ -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸等の生成も回復させており、UTP は TPP の生成とピルビン酸の酸化に必要であることが示唆された。この透過性細胞に直接 TPP を添加すると、部分的にはあるが「クエン酸/ピルビン酸」比が回復したことから、ピリミジン欠乏による TPP 濃度低下がピルビン酸の酸化を抑制したことが明らかとなった。精製 hTPK の酵素学的解析においても、UTP は ATP よりも 10 倍以上親和性が高く ( $K_{m-UTP} = 0.33$  mM;  $K_{m-ATP} = 5$  mM), 触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は約 10 倍であった。酵素-UTP 複合体のドッキングシミュレーションでは、高度に保存されたアミノ酸残基で構成される UTP 結合部位が推定された。そのうち 2 つのアミノ酸残基 (Asp100, Phe101) をそれぞれアラニン残基へ置換した変異型酵素 D100A と F101A を作製して TPK 活性を測定したところ、D100A 酵素は ATP と UTP の何れがリン酸基供与体の場合でも活性が消滅したが、F101A 酵素は UTP の場合にのみ活性が著しく低下した。この結果より、Phe101 が特異的に UTP との結合に関与していることが示唆された。なお、Asp100 はピロリン酸基の転移に関与していることが以前より示唆されている<sup>5)6)</sup>。

これまでの結果から、細胞内 UTP 濃度が TPP 生成とピルビン酸異化反応の下流にあるクエン酸生成に影響を与えることが明らかとなった。クエン酸は、ミトコンドリアで TCA 回路によって代謝されるか、細胞質に移動してアセチル CoA に変換されて脂肪酸合成の材料となる (図 1)。そこで、ピリミジン欠乏が脂質合成に与える影響を検討するため、HeLa 細胞、HEK293 細胞、マウス繊維芽細胞における [<sup>14</sup>C] グルコース、[<sup>14</sup>C] ピルビン酸、[<sup>14</sup>C] 酢酸から脂質への炭素原子の取り込みを定量した。脂肪酸合成酵素阻害剤や PDH 阻害剤を添加したときと同じように、細胞に BRQ を添加するとグルコースとピルビン酸からの脂質合成が抑えられた。ピリミジン欠乏状態の  $\Delta UMPS$  HEK293 細胞においてもピルビン酸からの脂質合成が減少したが、酢酸からの生合成は影響を受けなかった。また、透過処理したピリミジン欠乏状態の  $\Delta UMPS$  HEK293 細胞に UTP を添加すると脂質合成が回復した。次に、マウスより抽出した脂肪前駆細胞の白色脂肪細胞への分化に及ぼすピリミジン欠乏の影響を検討したところ、BRQ が脂肪細胞への分化を抑制した。この BRQ による抗分化作用はウリジンや酢酸の添加によって部分的ではあるが減弱された。また、マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞の UMPS, TPK, PDHA1 をそれぞれ欠損させた細胞は脂肪細胞への分化が低下し、 $\Delta UMPS$  3T3-L1 細胞については培地へウリジンや酢酸を添加すると分化が回復した。以上の結果より、ピリミジンヌクレオチドである UTP が細胞内 TPP 生成とピルビン酸の酸化を維持することにより、脂質合成と脂肪細胞への分化のためのクエン酸の利用を可能にしていることが示唆された。

今回の研究の結果、ピリミジンヌクレオチドの UTP が中心炭素代謝経路に密接に関与していることが明らかとなった。UTP は TPK 反応の優先的なリン酸基供与体として細胞内 TPP 濃度を維持し、その結果ピルビン酸の酸化的脱炭酸反応を活性化させて TCA 回路や脂肪酸合成の基質を提供しており、脂質合成と脂肪細胞への分化にも影響を与えている (図 1)。つまり、ピルビン酸の酸化と脂質合成の維持のためのビタミン B<sub>1</sub> の効率的な利用には UTP が必要という事になる。TPK は、ATP や GTP ではなく、UTP がリン酸基供与体として重要であるリン酸化酵素であることが示された。TPK における UTP のように、*in vitro* の実験でリン酸基供与体になる事が観察されながら、*in vivo* における重要性が検討されていない例が他にもあるかも知れない。また、透過処理したピリミジン欠乏状態の  $\Delta UMPS$  HEK293 細胞に UTP を添加したところ TPP 濃

度と「クエン酸／ピルビン酸」比が回復されたのに対して、直接 TPP を添加しても「クエン酸／ピルビン酸」比の回復は部分的であったことから、TPP の生成を介しない UTP によるピルビン酸の酸化制御機構が存在する可能性があり、今後の研究に期待したい。

**Key words:** pyrimidine, UTP, thiamin pyrophosphokinase, thiamin pyrophosphate, pyruvate oxidation

School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,  
Mukogawa Women's University  
Kazuto Nosaka  
武庫川女子大学薬学部  
野坂 和人

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2024.8.26 受付)

## 文 献

- 1) Lane AN, Fan TW (2015) Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res* **43**, 2466–2485
- 2) Villa E, Ali ES, Sahu U, Ben-Sahra I (2019) Cancer cells tune the signaling pathways to empower *de novo* synthesis of nucleotides. *Cancers* **11**, 688
- 3) Sahu U, Villa E, Reczek CR, Zhao Z, O'Hara BP, Torno MD, Mishra R, Shannon WD, Asara JM, Gao P, Shilatifard A, Chandel NS, Ben-Sahra I (2024) Pyrimidines maintain mitochondrial pyruvate oxidation to support *de novo* lipogenesis. *Science* **383**, 1484–1492
- 4) Voskoboyev AI, Ostrovsky YM (1982) Thiamin pyrophosphokinase: Structure, properties, and role in thiamin metabolism. *Ann NY Acad Sci* **378**, 161–176
- 5) Onozuka M, Nosaka K (2003) Steady-state kinetics and mutational studies of recombinant human thiamin pyrophosphokinase. *J Nutr Sci Vitaminol* **49**, 156–162
- 6) Baker L-J, Dorocke JA, Harris RA, Timm DE (2001) The crystal structure of yeast thiamin pyrophosphokinase. *Structure* **9**, 539–546