

平成23年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1

4

6

0

3

2. 研究機関名

奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名

若手研究(A)

4. 補助事業期間

平成23年度～平成25年度

5. 課題番号

2

3

6

8

9

0

1

3

6. 研究課題

概日NAD+代謝制御の破綻による老化関連疾患発症メカニズムの解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
50390810	ナカハタ ヤスカズ	バイオサイエンス研究科	助教
	中畑 泰和		

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

概日時計と老化/老化関連疾患の関連性が近年示唆されているが、遺伝子/分子レベルでの理解は不明のままである。本研究では、概日NAD+変動の生理的意義を細胞・臓器・個体という異なった階層で解析し、概日時計崩壊による老化関連疾患発症機構の要因が概日NAD+変動破綻によることを解明することを目指している。

本年はNAD+変動の生理的意義を解明するため、Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) 法により細胞内NAD+を可視化するためのFRETプローブの開発を試みた。FRETプローブとして、中央にヒトSIRT1由来NAD+結合ポケット、N端にYFP、C端にCFPを持つ1分子FRETを採用した。作成したFRETプローブを培養細胞に導入したのち、細胞内NAD+量を減少させることが知られている薬剤で培養細胞を処理し、FRET現象の有無を蛍光分光光度計で評価した。その結果、薬剤処理によりFRET現象を起こしていることを示すプローブを複数種類見出した。

次に大腸菌より精製したFRETプローブ精製標品を用いて、試験管内でNAD+および類似代謝物に対するFRETプローブの特異性の検証を行ったが、NAD+濃度によらずFRETスペクトルに変化が見られなかった。この結果は、立体構造異常のあるFRETプローブを精製したためNAD+に反応しなかった可能性が考えられた。今後はFRETプローブの精製条件検討・精製を行い、FRETプローブのNAD+特異性を検証したのち、細胞内NAD+量を可視化するFRETプローブを完成させる。

一方、恒常的NAD+量増加トランスジェニックマウスを複数ライン樹立したので、このマウスを用いて概日NAD+変動破綻が老化関連疾患発症の要因であるかを検証する。

10. キーワード

(1) 概日時計	(2)	(3)	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分) (3) やや遅れている。

(理由)

NAD⁺FRETプローブ開発は以下の理由で難航している。

- 1) NAD⁺量に依存してFRETを起こすプローブの作成に時間がかかった。FRET効率の高いプローブを構築するまでに、異なる部分欠損NAD⁺結合ポケットを持つFRETプローブを10種類作成する必要があった。
- 2) 機能を保持した状態のFRETプローブ精製標品の単離に時間がかかっている。大腸菌より精製標品を単離するための条件を検討した結果、FRETプローブを高純度を得ることに成功したが、この精製標品に高濃度NAD⁺を添加してもFRETスペクトルに変化が見られなかった。この理由を立体構造が保持できていないためであると考え、さらに種々の精製条件を検討し、精製を試みているが現在に至るまでNAD⁺濃度依存的にFRETを起こす精製標品を得ることはできていない。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

大腸菌からのFRETプローブ精製の方法を検討し、NAD⁺結合能を有するFRETプローブ精製を行い、細胞内NAD⁺量を可視化するFRETプローブを完成させる。まずは、NAD⁺ FRETプローブを培養細胞に発現させ、概日NAD⁺変動の時空間変化を細胞内オルガネラレベルで観察し、ライブイメージングから細胞内NAD⁺の概日変動の意義を明らかにする。さらにNAD⁺ FRETプローブを発現するトランスジェニックマウスの作成に取り組む。

また今年度作成したTgマウスの細胞、臓器をもちいて、細胞内概日NAD⁺変動と老化関連疾患発症メカニズム、特に肥満との関連性を分子レベルで明らかにする。具体的には、1)細胞レベルでの解析：インスリン分泌能、グルコース取り込み能や関連遺伝子発現をTgマウス由来初代細胞で検証する。2)臓器レベルでの解析：糖・脂質代謝関連遺伝子発現などを高脂肪食もしくは普通食給餌 Tgマウス由来各臓器で検証する。3)個体レベルでの解析：高脂肪食もしくは普通食給餌Tgマウスを用いて、体重増加比較およびグルコース依存性インスリン分泌、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験などを行う。

13.研究発表(平成23年度の研究成果)

[雑誌論文] 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

著 者 名	論 文 標 題				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

[学会発表] 計(0)件 うち招待講演 計(0)件

発 表 者 名	発 表 標 題	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所

[図書] 計(0)件

著 者 名	出 版 社		
書 名			発行年
			総ページ数

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

[出願] 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

[取得] 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考