

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2010
課題番号：19780095
研究課題名（和文）ニコチン酸、ニコチンアミドの細胞内への取込み機構ならびに細胞内における動態の解明
研究課題名（英文） Investigation of uptake mechanisms of nicotinic acid and nicotinamide in a cell and intracellular dynamics of two compounds
研究代表者
緒方 進（OGATA SHIN）
三重大学・大学院生物資源学研究科・助教
研究者番号：19780095

研究代表者の専門分野：分子ビタミン学
科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学
キーワード：ニコチン酸、ニコチンアミド、ビタミン、NAD、動物培養細胞

1. 研究計画の概要

申請者は、かねてよりニコチン酸、ニコチンアミドの新規生理作用並びに薬理作用の検索を目的として、様々な研究テーマを設定し検討を行ってきたが、その過程を経て、ある種の仮説を設定するに至った。すなわち、NADを基質とする生化学反応は、共通して、その前駆体であるニコチンアミドを生じ、それによるフィードバック阻害を受ける点である。ニコチン酸にはそのような作用はない。そこで種々の生命現象における、ニコチンアミドによる制御因子としての新たな役割の設定である。これまでの検討において、先に述べたように、ニコチンアミドによる様々な作用濃度は mM オーダーと比較的高濃度である。ここで新たな疑問が生じてきた。確かにニコチンアミドは水溶性ビタミンであるため、脂質二分子膜を透過しにくいと予想されるが、申請者の個人的な考えとしては、ビタミンの1つであるニコチンアミドが、非選択的に取り込まれるとは考えにくい。何らかの機構を介して選択的に取り込まれ、細胞内で様々な機能を発揮している事が考えられる。そこで、申請者の過去の検討で得られた知見のひとつである、ヒト白血病細胞に対するニコチン酸、ニコチンアミドの分化誘導効果を実験系として選択し、本研究課題において、まず明らかにしていく目的としては、その取り込みを仲介すると想定される結合因子の同定が挙げられる。

2. 研究の進捗状況

水溶性ビタミンである、ニコチン酸、ニコチンアミドに対する結合因子を同定することを目的として、動物培養細胞より調製した無細胞抽出液と、ニコチン酸およびニコチンアミドをリガンドとして化学反応によりカップリングした磁気アフィニティビーズとを一定時間混和した後、結合因子を回収した。その後、電気泳動法により分子量ごとに分離後、各リガンドに対して特定に検出される、すなわち特異的に結合する因子と予想されるバンドの検索を行った。

また特異抗体を用いての免疫染色法により、動物培養細胞内における、これらビタミンおよび関連因子の細胞内局在の解析を蛍光顕微鏡により行った。

3. 現在までの達成度

やや遅れている。

（理由）

特に、アフィニティビーズによる結合因子の解析に関して研究の進行がやや遅れている。現状では目的因子同定に到達しているとは言いがたい。その理由としては、ニコチン酸およびニコチンアミドが、それぞれ分子量120程度という非常に低分子化合物であるために、タンパク質性因子などに比べると構造的特徴が乏しいと予想され、特異的に結合する因子に加え、非特異的に結合する因子も多数回収されてくるなどにより目的因子の特定を困難にしていると考えられる。また磁気アフィニティビーズに選択的な配向性をもってカップリングすることが困難であると点についてもひとつの原因として予想される。

4. 今後の研究の推進方策

広義の意味で、ニコチン酸、ニコチンアミドと結合するという因子の同定という目的に加え、ひいては、ニコチン酸、ニコチンアミドの細胞内取り込み機構に関わる因子の同定、その解明にもつながる事を目的し、これまでの研究成果を踏まえて、以下の検討事項を今後計画之中である。すなわち、従来検討を行ってきた方法に改良を加え、標識ニコチン酸、ニコチンアミドをリガンドとして用い、無種細胞抽出液（主にヒト白血病由来細胞株HL-60を計画している）と一定時間混合後、磁気アフィニティビーズを用いて結合因子を回収するアプローチ、さらに、細胞をニコチン酸、ニコチンアミドと一定時間処理することで、ニコチン酸、ニコチンアミドと、それら結合因子を *in vivo* において標識し、同様に磁気アフィニティビーズを用いて回収するアプローチに関しても試みる。その後、回収した結合因子を電気泳動法により分離した後、昨年度に本学生命科学研究支援センターに導入された、MALDA-TOF-MS型質量分析計による解析を行う事とする。今回計画之中の2つのアプローチにより得られた解析の結果を比較検討することで、より特異的結合因子の同定が可能となることが期待される。

5. 代表的な研究成果

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- 1) Keiko Iwata, Shin Ogata, and Hiroshi Taguchi. Novel events in mitochondria: Increase of poly(ADP-ribosyl)ation in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line during differentiation by nicotinamide. *Process Biochemistry*, 45, 54-59, (2010)（査読有り）
- 2) 緒方 進・井田 智恵利・田口 寛. ニコチン酸、ニコチンアミドおよびイソニコチン酸のヒト白血病細胞に対する分化誘導. 三重大学大学院生物資源学研究科紀要, 37, 53-58 (2010)（査読有り）

〔学会発表〕（計2件）

- 1) 緒方 進, 白井貴博, 井田智恵利, 奥村克純, 田口 寛. ニコチンアミドによるアポトーシスにおける形態変化抑制機構の解

析. 日本ビタミン学会第61回大会(平成21年5月30日～5月31日, 京都府亀岡市)

- 2) 井田智恵利, 緒方 進, 奥村克純, 田口 寛. ニコチン酸関連化合物によるヒト白血病細胞K562の分化誘導における作用機構の検討. 日本ビタミン学会第61回大会(平成21年5月30日～5月31日, 京都府亀岡市)

〔図書〕（計1件）

緒方 進その他（共著）ビタミンの総合事典（朝倉書店）印刷中