

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14881

研究課題名(和文) NAD関連代謝物の包括的評価を目指したcADPRの高感度定量系の構築

研究課題名(英文) Construction of highly sensitive quantitative system of cADPR for comprehensive evaluation of NAD-related metabolites

研究代表者

松本 洋太郎 (Matsumoto, Yotaro)

東北大学・薬学研究科・講師

研究者番号：90420041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)主要代謝物であるサイクリックADPリボース(cADPR)は、オキシトシン放出、インスリン分泌や、炎症反応、さらには幹細胞の自己複製など、様々な生命現象との関わりが指摘されている重要なメッセンジャー分子である。本研究は、これまでのメタボローム研究において極微量であるために定量できていなかった細胞内cADPRに焦点を当て、LC/MSを用いたcADPRの高感度精密定量法の構築を行った。内部標準物質としてcADPRの安定同位体を合成し、cADPRの定量系を構築した。既報より1,000倍以上感度が上昇し、細胞内cADPRを定量するに十分な感度を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cADPRは、これまでのメタボローム研究において極微量であるために定量できていなかったが、本研究課題によって、既報より1,000倍以上感度が上昇した。細胞内cADPRを定量するに十分な感度を達成し、cADPR研究に新たな評価系を提案することができた。

本系はNADを同時に定量可能であり、NADメタボロミクスや種々の疾患機序、および薬の詳細な作用機序解明に応用できる可能性がある。今後は本cADPR定量法をベースとしたNAD関連代謝物質の一斉定量法に展開する予定である。

研究成果の概要(英文)：Cyclic ADP ribose (cADPR) is the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) major metabolite. cADPR is an important messenger molecule that has been pointed out to be involved in various life phenomena. For example, oxytocin release, insulin secretion, inflammatory response, and even stem cell self-renewal. In this study, we focused on intracellular cADPR, which could not be quantified due to the extremely small amount in the previous metabolome studies, and constructed a highly sensitive and accurate quantification method for cADPR using LC / MS. A stable isotope of cADPR was synthesized as an internal standard and a quantitative system of cADPR was constructed. Sensitivity was increased 1,000 times more than previously reported, and sufficient sensitivity was achieved to quantify intracellular cADPR.

研究分野：分析化学

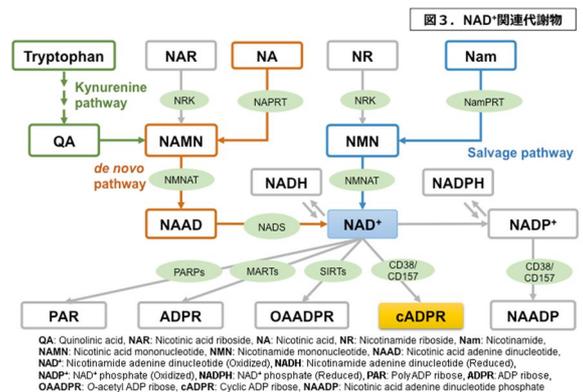
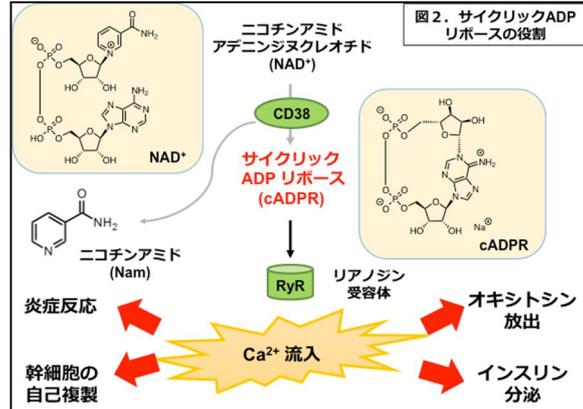
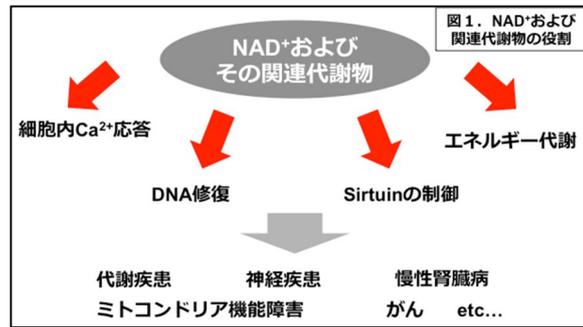
キーワード：サイクリックADPリボース ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 安定同位体 定量系 ターゲット
メタボロミクス 重水素化 有機合成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)はミトコンドリアにおけるエネルギー代謝を司るほか、老化制御因子 Sirtuin を活性化する化合物として注目されている (図1) また NAD 関連代謝物の多くはシグナル伝達分子としての機能を有しており、中でもサイクリック ADP リボース (cADPR) は細胞内 Ca^{2+} を動員して種々の細胞応答に寄与する重要な化合物である (図2)。NAD 関連代謝物は生命現象に対する多様な側面を持っており、NAD 代謝物群の量的プロファイルが細胞状態を鋭敏に反映し、かつ複数の疾患とのかかわりを持つことが明らかにされつつある。したがって、NAD 関連代謝物の量的変動を捉えることは老化関連疾患の病態解明および NAD 代謝を標的とした新規薬剤の詳細な機序解明に貢献することが期待される (図3)。一般に NAD 関連代謝物の定量手法としては、その優れた汎用性・選択性の点から液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) あるいは液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) が用いられる。しかし、細胞内における cADPR は約 10-100 ng/10⁸ cells と極微量であるため (Da Silva CP 1998) LC-MS や LC-MS/MS による分析においては細胞内 cADPR の定量に至っておらず (Cordell RL 2008) cADPR に関する詳細な機序解析に応用できていない。そのため、酵素サイクリングアッセイを用いた cADPR のみを定量する方法に限定されているのが現状である (Graeff R 2002)。



2. 研究の目的

そこで申請者は、cADPR 安定同位体を合成し内部標準物質として用いることで、未だ達成できていない LC-MS を用いた細胞内 cADPR 高感度定量系を構築することを目指した。

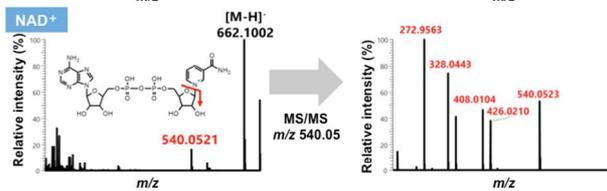
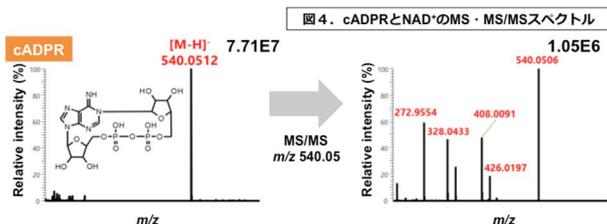
3. 研究の方法

cADPR の LC 分離条件および MS 検出条件の最適化を行う。一方、内部標準物質として cADPR の安定同位体を有機合成する。得られた安定同位体を用いて cADPR の定量系を構築する。

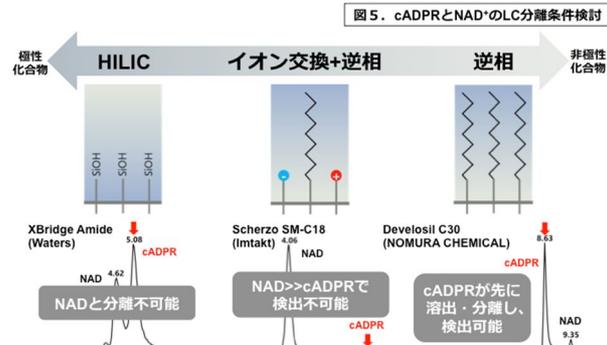
4. 研究成果

cADPR と NAD の分離と検出に関する当初の問題点として、MS 側では同一のプロダクトイオンやフラグメントイオンが検出されてしまい MS のみでは区別が困難であること (図4) ②カラムによっては先に溶出する NAD の相対濃度が極めて大きいために NAD のテーリングに埋もれ、定量が困難であること (図5) が挙げられたが、分析カラムの選定とイオンモニタリングの方法の検討によって解決することができ、既報より 1,000 倍以上感度が上昇し、細胞内 cADPR を定量するに十分な感度を達成した。

NAD+関連代謝物の一斉定量 = NAD+メタボロミクスは種々の疾患機序、および薬の作用機序解明に貢献する



cADPR の安定同位体合成は、既知の cADPR の合成法 (Graham SM 2004, Liu W 2009) を



参考に進めた。出発原料である Nicotinamide、Adenine、Methyl D-ribofuranoside を佐治木らの方法(Esaki H 2005、Esaki H 2006、Sawama Y 2012)で重水素を導入した。これら合成素子を グリコシル化、リン酸化することで NR→Adenosine、NMN→5'-AMP とそれぞれ変換した。これらを Michelson 法(Bailey VC 1997)でリン酸部位のカップリングを行い NAD とし、ADP-リボシルサイクラーゼで酵素的に閉環することで cADPR 安定同位体の合成を達成した。

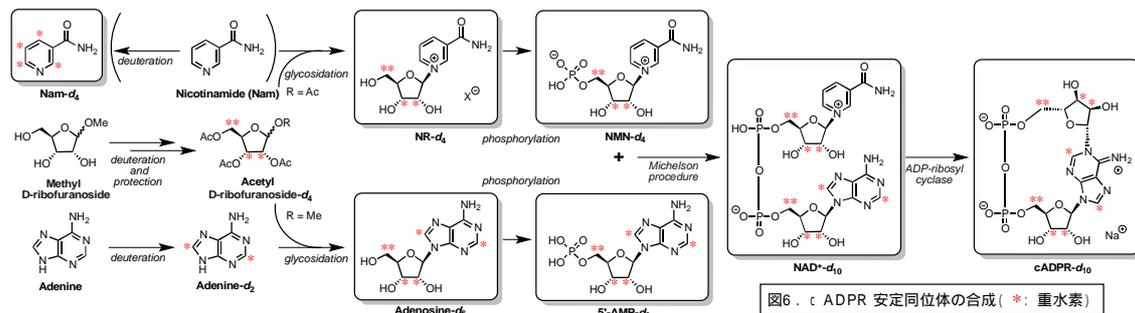


図6 . c ADPR 安定同位体の合成 (* : 重水素)

次に、得られた安定同位体と最適化した LC 分離条件および MS 検出条件を用いて、cADPR の検量線を作成し、分析バリデーションを行った。生体マトリックスによるイオン化抑制の影響を受けない安定同位体を内部標準物質に用いることで、高精度定量系を構築することができた。

細胞内における cADPR は極めて微量であり、LC-MS や LC-MS/MS による NAD 関連代謝物の分析においては cADPR の定量に至っておらず、cADPR に関連する詳細な機序解析に応用できていない。また、cADPR の安定同位体を用いた定量系の例は無い。NAD 関連代謝物の量的変動を捉える研究において、感度・選択性の高い cADPR 定量法が求められている。したがって、本研究課題で構築した cADPR の安定同位体を利用した高感度精密定量系は、新たな cADPR 分析手法を提供し、詳細な機序解明研究のための画期的なツールとなりえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----