

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22657035  
 研究課題名（和文） 細胞内代謝ネットワークを理解するための細胞内 NAD<sup>+</sup>可視化技術開発  
 研究課題名（英文） Develop an intracellular NAD<sup>+</sup> live-imaging technology  
 研究代表者  
 中畑 泰和（NAKAHATA YASUKAZU）  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイサイエンス研究科・助教  
 研究者番号：50390810

研究成果の概要（和文）：従来の NAD<sup>+</sup>分析法では、細胞を破壊して組織抽出液中の NAD<sup>+</sup>を測定するため、個々の細胞が持つ NAD<sup>+</sup>の時空間情報が失われてしまう。そこで本研究では、FRET 法により細胞内 NAD<sup>+</sup>を可視化するための FRET プローブ開発を行った。その結果、開発した FRET プローブは細胞内 NAD<sup>+</sup>量を感じ、FRET が起こっていることを示唆するデータを得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：It is impossible to measure the intracellular NAD<sup>+</sup> level with spatiotemporal information, because conventional methods for NAD<sup>+</sup> measurement use cell lysates. In this study, we sought to develop a NAD<sup>+</sup> FRET probe to monitor intracellular NAD<sup>+</sup> in a living cell. As results, we succeeded to mke the NAD<sup>+</sup> FRET probe that might monitor intracellular NAD<sup>+</sup>.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生体エネルギー変換、ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含め地球上に存在するほとんどの生物は 24 時間の明暗周期にあわせて生活を営んでおり、それらは恒暗条件下でも約 24 時間周期で生活を営むことができる。これは生物個体自体が約 24 時間の周期を刻む時計“概日時計”を持っているからである。また近年、概日時計は癌、うつ病、肥満などの代謝性疾患や老化との関連を示唆する報告が急増している。われわれはこれまでの概日時計研究により、老化や代謝に関わる制御因子

として注目されている nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 が概日時計を調節していること、さらに SIRT1 の活性に必須である細胞内 NAD<sup>+</sup>の合成が概日時計により制御されていること、すなわち細胞内 NAD<sup>+</sup>量に概日周期があることを発見した。われわれの一連の発見は『概日時計』『老化』『代謝』という重要な生命現象を“統一的に結び付ける新規概念”を提示した。

(2) われわれ自身の研究成果を深化させ、概日時計が老化進行/老化関連疾患発症に関連しているのか、さらに関連しているのであれば、その分子メカニズムの解明を NAD<sup>+</sup>/SIRT1 に注目して解き明かそうと考えた。

(3) NAD<sup>+</sup>を中心とした代謝ネットワークの観点から概日時計と老化進行/老化関連疾患を理解するためには、細胞内 NAD<sup>+</sup>の時空間分布を知ることは非常に重要であると考えた。しかし、従来の NAD<sup>+</sup>分析法では、細胞を破壊して組織抽出液中の NAD<sup>+</sup>を測定するため、個々の細胞の持つ NAD<sup>+</sup>の時空間情報が失われてしまう。すなわち、細胞間・細胞内 NAD<sup>+</sup>分布・変動を観察するためには、NAD<sup>+</sup>の1細胞内での時間的・空間的な分布・変動を測定する技術開発が必要と着想するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 生きたまま単一細胞レベルで経時的に NAD<sup>+</sup>測定が可能になれば、従来の NAD<sup>+</sup>測定技術では検出が困難である非常に小さな組織（脳内の一部の領域、脾・細胞など）での NAD<sup>+</sup>の時空間動態を知ることができると考えた。また、われわれが見出した NAD<sup>+</sup>の概日変動を生きた細胞で観察できれば、核、ミトコンドリアなどの細胞内小器官レベルでの概日 NAD<sup>+</sup>動態を観察することも可能になり、それぞれの小器官での NAD<sup>+</sup>動態と概日時計の関連性を明らかにするための有用な情報を得ることができると考えた。さらに汎用例として、細胞死(アポトーシス)や細胞分裂など種々の細胞機能と時空間的細胞内 NAD<sup>+</sup>量変化の関連性を明らかにできると考え、NAD<sup>+</sup>FRET プロープの作成を試みた。

(2) 具体的には、NAD<sup>+</sup>の単一細胞内での時間的・空間的な分布・変動を生きた細胞で測定するため、細胞内 NAD<sup>+</sup>を感知する Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) 蛍光プローブを構築し、細胞・生体レベルで生きた細胞のままリアルタイムに NAD<sup>+</sup>動態を可視化することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) リアルタイムで生きた細胞内 NAD<sup>+</sup>濃度の可視化するために、FRET を用いることを試みた。蛍光プローブは、CFP (cyan fluorescent protein) と YFP (yellow fluorescent protein) をリンカーで繋いだ1分子 FRET を採用した。リンカー部分に用いるモチーフとして、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の NAD<sup>+</sup>結合ドメインを採用した(図 1)。

(2) FRET プロープが NAD<sup>+</sup>を感知しているかは、細胞内 NAD<sup>+</sup>濃度を減少させることが知られて

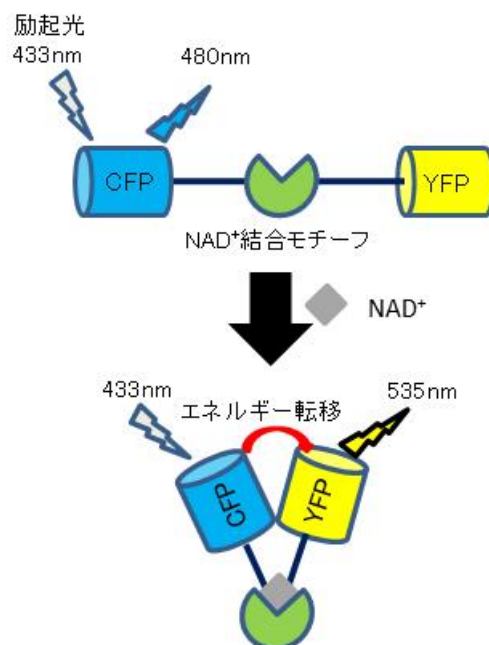


図1 NAD<sup>+</sup>FRETプロープ

いる過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 処理と細胞内 NAD<sup>+</sup>再利用経路の律速酵素である NAMPT 酵素活性を阻害する薬剤 FK866 でそれぞれ細胞を処理し、FRET の有無を蛍光分光光度計にて調べた。

## 4. 研究成果

(1) FRET ベクターのリンカー部分にヒト SIRT1 由来全長 NAD<sup>+</sup>結合ドメインを組み込んだ。この FRET ベクターを培養細胞 (HEK293T 細胞) に一過的に発現させた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理細胞群と非処理細胞群からそれぞれ細胞抽出液を回収し、蛍光分光光度計にて FRET の有無を検証した。しかし結果は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の有無に依らず同じスペクトルであった。

(2) 次に、10 種類のヒト SIRT1 部分欠損 NAD<sup>+</sup>結合ドメイン持つ FRET ベクターを作製し、上記と同様の実験を行った。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により異なるスペクトルを示す FRET プロープを3種類見出した。それらプロープは、NAD<sup>+</sup>濃度が低い状態 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理) で CFP の蛍光 (480nm ; CFP) が減少し、YFP の蛍光 (535nm ; YFP) が上昇した。これは 433nm の波長で励起された CFP のエネルギーが近傍に移行してきた YFP に転移したことを意味する。すなわち、私が作成したプロープは図 1 のように NAD<sup>+</sup>量依存的に YFP と CFP が隣接するような構造変化が起こっていると考えられる。これら3種類のプロープに対して同様の実験を繰り返し、最も H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の有無で FRET 効率が大きいプロープ#10 を見出した(図 2)。これ以降の実験では、プロープ#10 を用いた。

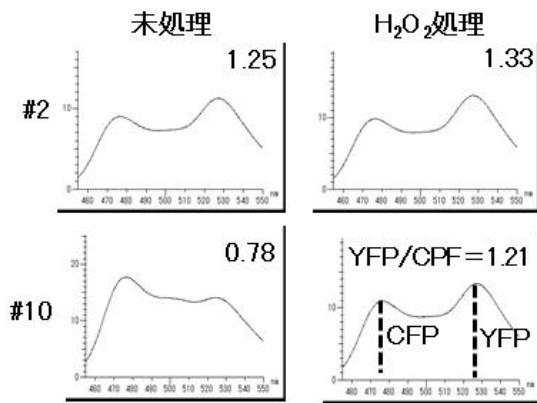


図2 FRETプローブスクリーニングの結果

(3) さらに、 $H_2O_2$  処理による FRET 変化が細胞内  $NAD^+$  の減少に起因するものであるかを確かめるため、細胞内  $NAD^+$  再利用経路の律速酵素 NAMPT の酵素活性阻害剤であり、細胞内  $NAD^+$  量を減少させることが知られている薬剤 FK866 を用いて同様の実験を行った。その結果、 $H_2O_2$  処理した時と同様に FK866 処理により YFP/CFP が大きくなった(図 3)。これらの結果は、プローブ#10 は細胞内  $NAD^+$  量を検出するプローブであることを示唆している。

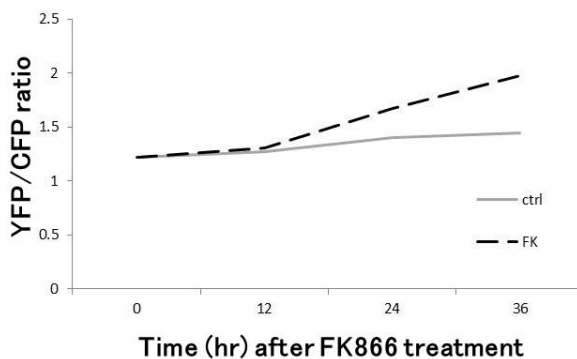


図3 FK866処理によるFRETの変化

(4) 細胞を用いた実験により、FRET プローブ #10 が  $NAD^+$  量を検知している可能性が考えられたため、つぎに FRET プローブ#10 精製蛋白質標品を用いて、実際にプローブ#10 が  $NAD^+$  量依存的に FRET を引き起こしているのか、さらに、FRET プローブの結合標的分子の特異性の評価を試みた。まず、蛋白質標品を得るために FRET プローブ#10 を大腸菌に発現させ精製を行った。その結果、非常に高純度な FRET プローブ#10 を精製することに成功した。これを用いて FRET のスペクトルを調べたところ、 $NAD^+$  添加なしの条件にもかかわらず、YFP/CFP 比率が高かった。さらに、 $NAD^+$  添加を行っても、FRET スペクトルに変化は見られなかった。これらの結果は、FRET プローブ精製標品は精製段階ですでに  $NAD^+$  と結合してい

ることを示唆している。

(5) 現在までに、ヒト SIRT1  $NAD^+$  結合ドメインの一部をリンカーとした一分子 FRET 法を用いて、細胞内  $NAD^+$  量の変化を観察できると思われるプローブ#10 を見出した。今後は、蛋白質標品を用いた試験管内での  $NAD^+$  および類似代謝物 ( $NADH$ 、ニコチンアミドなど) に対する FRET プローブの特異性を検証し、 $NAD^+$  特異的プローブを完成させる。

(6)  $NAD^+$  FRET プローブが完成すれば、まず培養細胞レベルで  $NAD^+$  動態を観察する。また、生体レベルで観察するために遺伝子工学的手法によりトランスジェニック動物 (マウス、ゼブラフィッシュ) を樹立する。トランスジェニックゼブラフィッシュは、ゼブラフィッシュの特徴を生かし、胚発生時期の時間的・空間的  $NAD^+$  動態を観察し、胚発生における  $NAD^+$  動態の重要性を明らかにしていきたい。トランスジェニックマウスは、成獣脳、肝臓など組織での細胞内  $NAD^+$  の時間的・空間的变化を詳細に観察し、細胞内  $NAD^+$  の 24 時間周期の時空間情報が加齢あるいは高脂肪食など特殊な食餌によりどのように変化するかを明らかにしたい。

(7) すなわち、発生・分化においても重要な役割を担っていることが明らかになりつつある  $NAD^+$  のライブイメージ観察が可能になれば、現代医学において重要な問題である老化や代謝異常、さらには、基礎生物学的に興味深い現象である発生・分化における  $NAD^+$  の振る舞いを時間的・空間的に解析できるため、形態学および生化学・分子生物学的手法などからでは得ることのできない情報を得ることができると期待している。

##### 5. 主な発表論文等

(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 1 件)

- ① 中畑泰和,  $NAD^+$ /SIRT1 が結ぶ体内時計と老化・代謝, 心臓, Vol.43 No.2 : 140-144, 2011, 査読なし

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 中畑泰和, CLOCK-SIRT1 による概日時計制御, 第 87 回日本生理学会大会, 2010. 5. 19, 岩手
- ② 中畑泰和,  $NAD^+$ 代謝による概日時計制御機構, 第 17 回日本時間生物学学術大会, 2010. 11. 20, 東京

〔その他〕  
ホームページ  
<http://bsw3.naist.jp/bessho/>

賞罰

- ① 第9回(2011年度)日本時間生物学会学術  
奨励
  
- ② 平成 23 年度科学技術分野の文部科学大  
臣表彰「若手研究者賞」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 泰和 (NAKAHATA YASUKAZU)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教  
研究者番号：50390810