



Title	Nmnat3 Is Dispensable in Mitochondrial NAD Level Maintenance In Vivo
Author(s)	山本, 雅司
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61525
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	山本 雅司
論文題名 Title	Nmnat3 Is Dispensable in Mitochondrial NAD Level Maintenance <i>In Vivo</i> (Nmnat3は生体内においてミトコンドリアのNAD維持に必須ではない)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>NADはTCA回路・β酸化・酸化リン酸化などでの酸化還元反応の補酵素としての役割や、DNA修復のためのポリADPリボシレーション・サーチュインによる脱アセチル化において重要な代謝物である。NADの合成に関してNmnat (Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase) はNAD合成経路上の酵素で、律速酵素であるNamp1 (Nicotinamide phosphoribosyltransferase) と共に重要な酵素と考えられている。哺乳類においてNmnatには3つのアイソザイム1, 2, 3が存在するとされており、それぞれが核、ゴルジ体、ミトコンドリアに局在していると考えられている。また、現在のところミトコンドリアにNADのトランスポーターは知られておらず、Nmnat3がミトコンドリアNADを維持していると考えられている。先行研究において、Nmnat3ノックアウトマウスでは赤血球でのNAD、ATPレベルが減少し、それにより赤血球が短命となり最終的に脾腫を起こすこと、またこれまでミトコンドリアに局在していると考えられていたNmnat3が赤血球の細胞質分画に強く発現し、赤血球のNAD合成を調整していることを報告している。しかし成熟した赤血球はミトコンドリアをもたずこれらの結果はNmnat3がミトコンドリアに局在するという考えに矛盾している。そこで本研究では、Nmnat3はミトコンドリアNADにとって本当に必須の酵素であるのかをNmnat3ノックアウトマウスを用いて調べた。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>WTマウスの各組織におけるNmnat3のタンパクレベルでの発現については肝臓・骨格筋・心臓・腎臓に強く発現を認めた。これにより本研究では肝臓・骨格筋・心臓を用いて解析を進めた。各組織におけるNADレベルを野生型とNmnat3ノックアウトマウス間で比較したところ、既報通り赤血球においてはノックアウトで有意に低い結果となり、肝臓・骨格筋・心臓においては有意な差を認めなかった。また、肝臓・骨格筋からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアのNADレベルについて比較したところ、野生型とNmnat3ノックアウトマウスの間に有意な差を認めなかった。Nmnat3欠損の解糖系・TCA回路への影響、酸化還元状態への影響を知るために経路上の代謝物およびNAD・NADHとGSSG・GSHのレベルを野生型とNmnat3ノックアウトマウスで比較したが、いずれにおいても有意な差を認めず、それぞれへの影響はないものと考えられた。Nmnat3欠損の加齢による影響について組織のNADレベルと組織像を野生型とNmnat3ノックアウトマウスで比較したが、肝臓・骨格筋においてはNADレベル、組織像ともに差を認めず、先の研究通り差を認めたのは赤血球のNADレベルと脾臓の大きさのみであった。Nmnatの酵素活性について組織全体、ミトコンドリアのそれぞれについて調べた。組織全体においては野生型とNmnat3ノックアウトマウスの間に差は認めなかったが、ミトコンドリアにおいては差を認めた。この結果からNmnat3がやはり部分的にはミトコンドリアのnmnat活性に寄与していると考えられる。しかしミトコンドリアでの差が全体にはあまり反映されていない結果をふまえるとNmnat活性においてはミトコンドリアが全体に占める割合が小さいのではないかと推測された。そこでNmnat酵素活性の組織全体におけるミトコンドリアの割合を調べたところやはり非常に小さいことがわかった。また、骨格筋の細胞質・ミトコンドリア分画においてNmnat3のタンパク発現をWestern Blottingにより調べたところNmnat3は細胞質に強く発現していることがわかった。以上のことから、Nmnat3はミトコンドリアに存在するものの、タンパクの発現・Nmnat活性は非常に小さく、細胞全体の30-70%と言われるミトコンドリアNADを維持するためにはNmnatに依存しないNAD合成機構、もしくは外部からのNAD取り込み機構があるのではないかと考えられる。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>Nmnat3ノックアウトは組織全体・ミトコンドリアの双方で赤血球以外のNAD合成に影響しなかった。またミトコンドリアのNmnat活性は全体において非常に小さく、Nmnat3はミトコンドリアに存在はするものの、そのNADの維持に必須ではなくミトコンドリアにはNAD維持のために他の合成酵素の存在やNADトランスポーターの存在の可能性があると考えられる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		山本 雅司	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	猪俣 勇典
	副 査	大阪大学教授	下村 康一
	副 査	大阪大学教授	金田 安史
論文審査の結果の要旨			
<p>NADは酸化還元反応やDNA修復などに関わる重要な代謝物であり、NmnatはNamptとともにNAD合成酵素として知られている。Nmnatには3つのアイソザイムNmnat1, 2, 3が存在し、それぞれが核、細胞質、ミトコンドリアに局在するとされているが、それらの生体内での役割に関しては未だ不明な部分が多い。</p> <p>そこで我々はNmnat3ノックアウトマウスを作成し、生体内におけるNmnat3の役割を調べた。Nmnat3のノックアウトは赤血球を除く各組織においてNAD合成に影響せず、また各組織から抽出したミトコンドリアにおいてもそのNAD合成に影響しなかった。ミトコンドリアにおいてはNmnat活性に影響が見られたが、ミトコンドリアにおけるNmnat活性は組織全体のNmnat活性と比べると非常に小さく、つまりNmnat3はミトコンドリアに存在はするものの、そのNADの維持に必須ではなくミトコンドリアにはNAD維持のために他の合成酵素の存在やNADトランスポーターの存在の可能性があると考えられた。</p> <p>本研究はミトコンドリアのNAD合成はNmnat3が担っているという定説に異議を唱えるものであり、今後のミトコンドリア研究にとって重要な研究と考えられることから博士の学位授与に値する。</p>			