助成番号 140737	５－２

研 究 成 果 報 告 書

（国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿）

研究テーマ（和文） AB	ヒトのミトコンドリア NADP(H)濃度の決定要因 NAD キナーゼの修飾によるその活性制御の仕組み				
研究テーマ（欧文） AZ	Mechanism underlying the regulation of activity of human mitochondrial NAD kinase, the determinant for NADP(H) concentration in mitochondria				
研究代表者	カタカナ CC	姓）カワイ	名）シゲユキ	研究期間 B	2014 ～ 2016 年
	漢字 CB	河井	重幸	報告年度 YR	2016 年
	ローマ字 CZ	Kawai	Shigeyuki	研究機関名	京都大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	京都大学 農学研究科 食品生物科学専攻 生物機能変換学分野・助教				

概要 EA （600 字～800 字程度にまとめて下さい。）

NADP$^+$は、NAD キナーゼ（NADK)が触媒する NAD$^+$のリン酸化反応により合成される。ヒトのミトコンドリア局在型 NADK(NADK2)は、リン酸化修飾やアセチル化修飾で活性が制御される可能性があるが、その詳細は不明である。

本研究では、FLAG タグを導入した *NADK2* でトランスフェクトしたヒト HEK293 細胞を、低グルコース環境や酸化ストレス存在下で培養し、NADK2 の *in vivo* でのリン酸化を Phos-Tag 解析で検出することを試みた。しかし、市販の PKA による *in vito* でのリン酸化は Phos-Tag 解析により検出されたものの、*in vivo* でのリン酸化は検出することが出来なかった。また、NADK2 と相互作用する Sirtuin を特定するために、FLAG タグを導入した *SIRT3*、*SIRT4*、*SIRT5* の各々でトランスフェクトした HEK293 細胞と抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行ったが、目的のタンパク質は検出されなかった。他方、模倣リン酸化（リン酸化部位の候補である各 Thr または Ser 残基を Asp または Glu 残基に置換した）NADK2 組換え精製酵素（NADK2 T183D、S188D、S289D、S289E、S294D、T357D、および S376D）を調製し、それらの *in vitro* における NADK 活性の低下を観察した（同 S345D、S363D、および S367D の活性は変動しなかった）。特に、NADK2 S188D の活性は完全に消失した。NADK2 Ser-188 のリン酸化は、複数のフォスフォプロテオミクス解析で検出されており、Ser-188 は NADK2 のホモログ間に特有な Motif 2 に存在するため、NADK2 の Ser-188 のリン酸化が NADK2 活性を負に制御する上で特に重要であると考えられた。

キーワード FA	NAD キナーゼ	ミトコンドリア	リン酸化修飾	活性制御

（以下は記入しないで下さい。）

助成財団ｺｰﾄﾞ TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい。）									
雑誌	論文標題GB	Significance of Ser-188 in human mitochondrial NAD kinase as determined by phosphomimetic and phosphoresistant amino-acid substitutions.							
	著者名 GA	Yutaka Kawabata, Kousaku Murata, Shigeyuki Kawai	雑誌名 GC	Biochem. Biophys. Res. Commun.					
	ページ GF	691～695	発行年 GE	2	0	1	5	巻号 GD	468
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
図書	著者名 HA								
	書名 HC								
	出版者 HB		発行年 HD					総ﾍﾟｰｼﾞ HE	
図書	著者名 HA								
	書名 HC								
	出版者 HB		発行年 HD					総ﾍﾟｰｼﾞ HE	

欧文概要　ＥＺ

NADP$^+$ is synthesized through the phosphorylation of NAD$^+$ catalyzed by NAD kinase (NADK). Human mitochondrial NADK (NADK2) is probably regulated through phosphorylation or acetylation, although little is known about the regulation of NADK2.

In this study, it was initially attempted to detect phosphorylation of NADK2 *in vivo*. The human HEK293 cells were transfected with FLAG-tagged *NADK2* and the resultant cells were grown in several conditions including a low-glucose medium or under oxidative stress. The Phos-Tag system was used to detect phosphorylation; however phosphorylation was not detected, although *in vitro* phosphorylation of NADK2 by authentic PKA was detected with the Phos-Tag system. In order to find the Sirtuin that interacts with NADK2, the HEK293 cells were transfected with *SIRT3*, *SIRT4*, and *SIRT5*, all of which were tagged with FLAG. Although immunoprecipitation was conducted using α-FLAG and the lysates of the resultant cells, the interacting protein was not detected. Finally, the purified recombinant NADK2, in which the putative phosphorylation site (Thr or Ser) was substituted with Asp or Glu, was prepared and the activity of the enzyme was measured. Activity of each of NADK2 T183D, S188D, S289D, S289E, S294D, T357D, and S376D was found down-regulated, although that of each of NADK2 S345D, S363D, and S367D was normal. Especially, the activity was completely inhibited by substituting Ser-188 with an Asp. Moreover, Ser-188 was found highly conserved in the primary structures of NADK2 homologs in higher animals. Ser-188 has been frequently detected in human and mouse phosphoproteomics studies. Collectively, Ser-188 was strongly suggested as the important phosphorylation site that downregulates NADK2.