



CobB and SIRT6 are NAD-dependent NAANs hydrolases

Yun Wei

School of Life Sciences, Fudan University



【背景简介】

SIRT家族是一类进化上保守的NAD依赖性的去乙酰化酶，包括SIRT1-SIRT7。近年来研究已经证实了SIRT家族蛋白与细胞代谢、衰老、凋亡和增殖分化都有着密切的关系。

2005年之后，逐渐发现了SIRT家族越来越多的新的催化活性，目前已经发现SIRT家族蛋白可以去琥珀酰化、丙二酰化、长链脂酰等超过10种翻译后修饰的能力。而赵老师实验室正在投稿的一篇文章中发现了SIRT家族超过10种新的去翻译后修饰的能力。这些翻译后修饰有一个共同的特点——都是以酰胺键形式修饰在蛋白质赖氨酸的侧链氨基上的。

代谢物NAANs是一类功能广泛的代谢物，目前在哺乳动物中已经报道的NAANs超过了70种。其结构为氨基酸或者某些神经递质通过酰胺键与长链脂肪酸相连。研究发现NAANs在G蛋白偶联受体、转运蛋白、离子通道的功能上起着重要的作用。

本课题猜想，SIRT家族具有酰胺键水解酶的活性，从而水解代谢物NAANs，影响神经系统、血管系统和免疫系统的发育。该课题猜想如果得到证实，我们将发现去乙酰化酶SIRT家族的一个不同于去翻译后修饰的全新的催化活性，同时也为代谢物NAANs失调所导致的神经、血管和免疫系统方面的疾病提供了一个药物治疗的靶点。

【展望与计划】

1、建立利用液相色谱-质谱联用仪（LC-MS）检测代谢物NAANs的方法（已有文献报道说可以用LCMS方法检测NAANs）。

2、用脂肪酸检测试剂盒检测在不同底物浓度下，NAANs水解的产物脂肪酸随时间的变化，从而计算出，SIRT3水解NAANs的动力学参数。

3、利用过表达纯化出来的SIRT家族所有蛋白（SIRT1-7），用脂肪酸检测试剂盒或者GC-MS的方法检测SIRT家族中除了SIRT3之外，还有哪些SIRT可以水解NAANs。

4、在细胞水平上，用NAANs处理细胞，同时SIRT3过表达之后，用脂肪酸检测试剂盒检测SIRT3过表达之后，细胞内脂肪酸水平的变化，以及用LC-MS方法检测细胞内NAANs水平的变化。进一步证明在细胞内SIRT3可以水解NAANs。

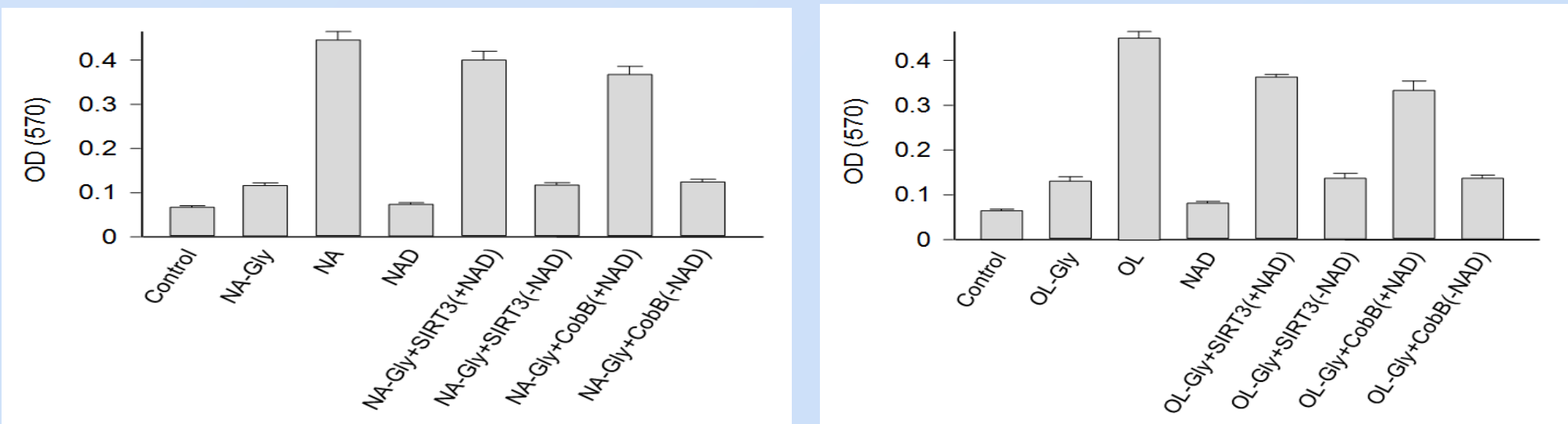
5、在老鼠水平上，挑选SIRT3敲除的以及野生型的老鼠（已有），用LC-MS方法老鼠的各个脑组织（因为文献报道说，在脑组织中NAANs含量高，并且有重要的作用）中NAANs水平的变化。

【核心发现】

一、体外验证SIRT3具有水解代谢物NAANs的能力

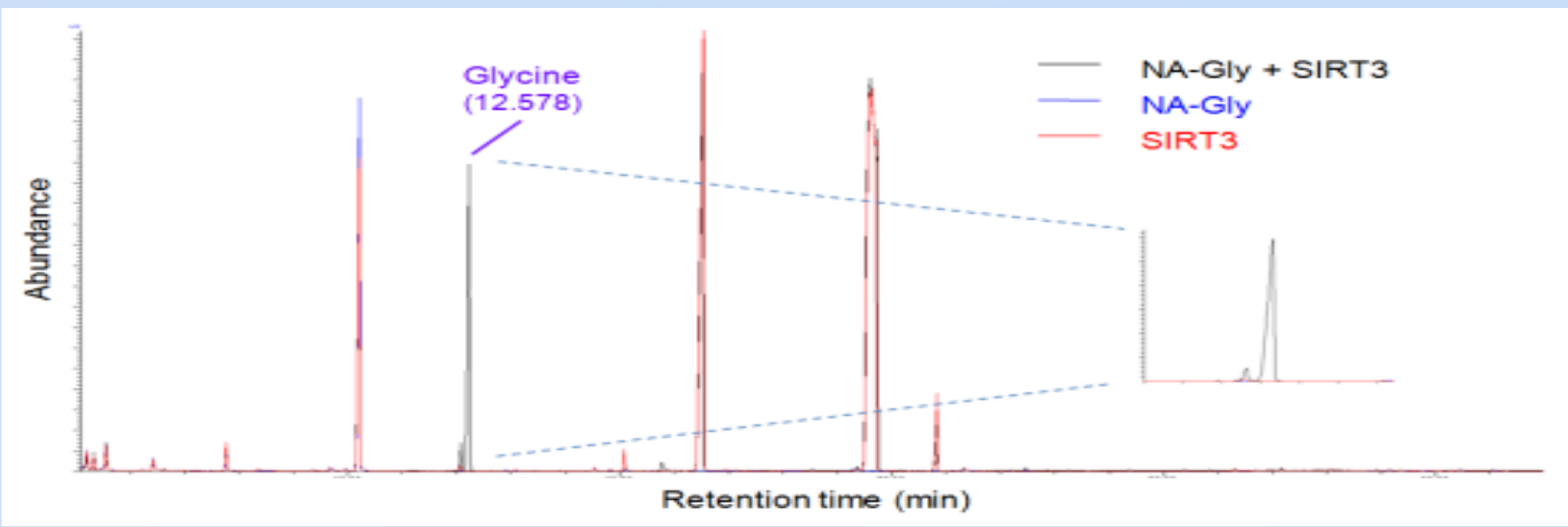
1、脂肪酸检测试剂盒验证SIRT3体外水解NAANs的能力

将SIRT3跟NA-Gly（花生四烯酸-甘氨酸）或OL-Gly（油酸-甘氨酸）放在一起孵育，反应4h之后，用脂肪酸检测试剂盒检测NA（花生四烯酸）或者是OL（油酸）的水平，证明了SIRT3在体外具有水解NAANs的能力。



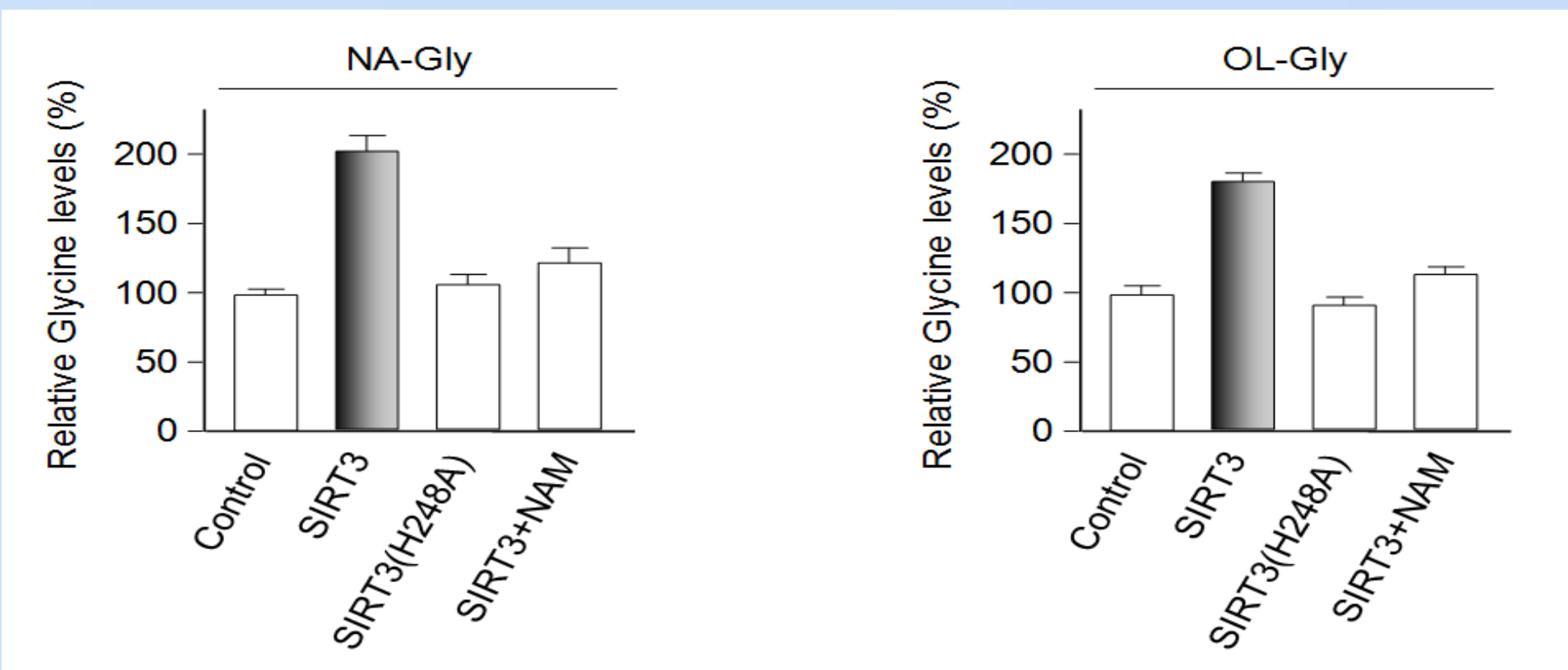
2、用GC-MS 验证SIRT3体外水解NAANs的能力

将CobB及SIRT3跟NA-Gly（花生四烯酸-甘氨酸）放在一起孵育，反应4h之后，用甲醇（甲醇最终体积占总体积的80%）终止反应，经过GC-MS处理过程之后，送去复旦大学枫林校区明道楼8楼打GC-MS。

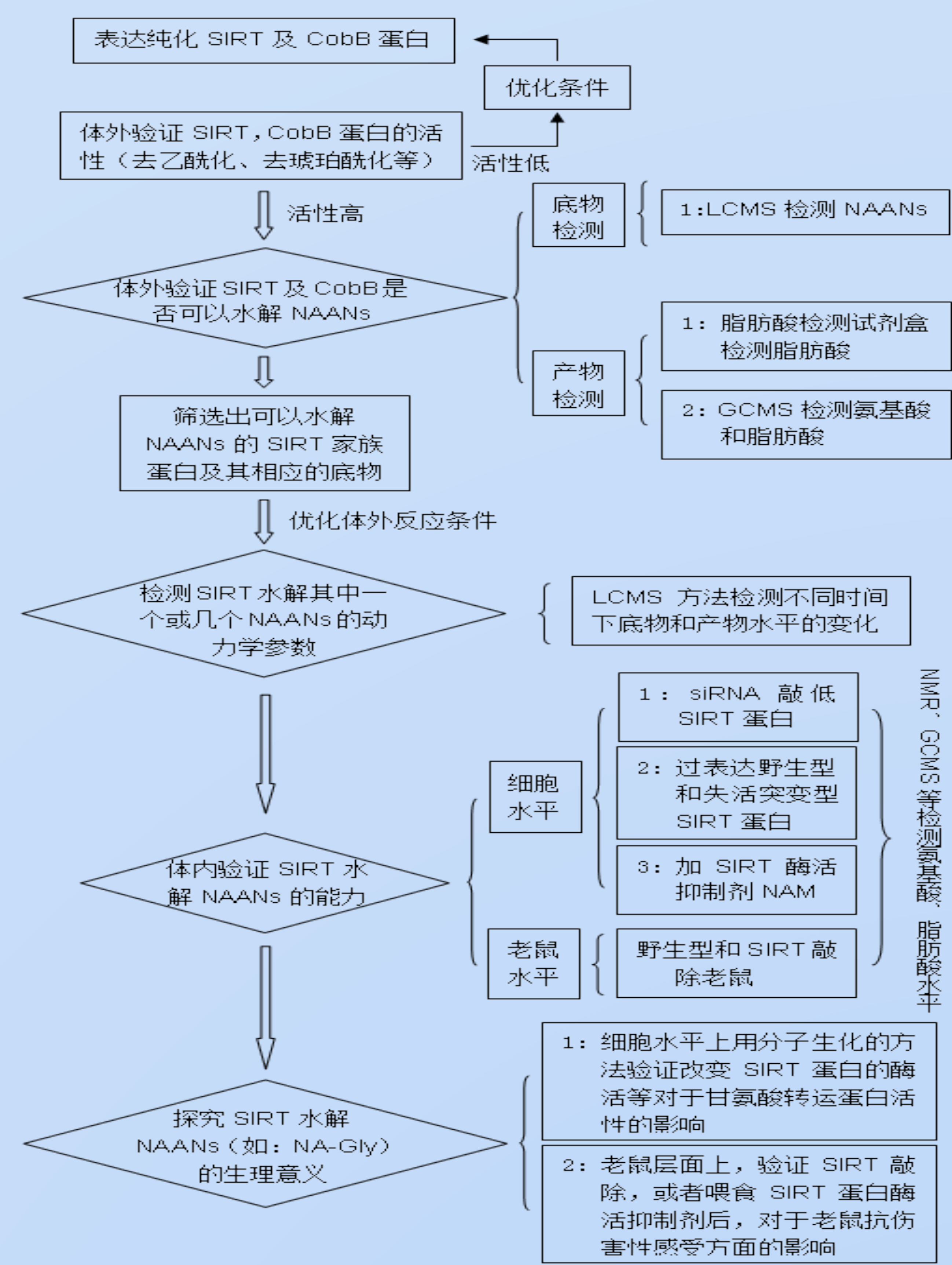


二、体内验证SIRT3具有水解代谢物NAANs的能力

用NA-Gly来处理HEK293T并且过表达SIRT3的野生型或酶活失活突变型（H248A），并且用SIRT家族的酶活抑制剂NAM处理细胞（已有文献报道说NA-Gly处理HEK293T是可以进入到细胞内的）。然后用 GC-MS检测细胞内甘氨酸水平的变化，证明SIRT3在细胞内也具有水解NAANs的活性。



【技术路线图】



【参考文献】

[1] E. Michishita, et al., Mol. Biol. Cell 16, 4623-4625. (2005)
[2] M. C. Haigis, et al., Cell 126, 941-944. (2006)
[3] Zhao.S, et al., Science 327, 1000-1004. (2010)
[4] Du.J, et al., Science 334, 806-809. (2011)
[5] Matthew F.B., et al., Nature 487, 114-118. (2012)
[6] Jiang.H, et al., Nature 496, 110-113. (2013)
[7] Mathias RA, et al., Cell 159, 1615-1625. (2014)
[8] K.A.Anderson, et al., Cell 156, 159-160. (2014)
[9] Ahern GP, et al., J Biol Chem 278, 30429-30434. (2003)
[10] Mark.C, et al., British Journal of pharmacology 538, 1476-1479. (2010)
[11] S.Jordt, et al., Cell 108, 421-430. (2002).
[12] Cravatt BF, et al., Nature 384, 83-87. (2006).
[13]Guo J, et al., J Neurophysiol 100, 1147-1151. (2008)