

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590097

研究課題名(和文)精子幹細胞におけるポリ(ADP-リボース)代謝の役割

研究課題名(英文)Essential role of poly(ADP-ribosylation) in maintenance of spermatogonial stem cells

研究代表者

竹橋 正則 (TAKEHASHI, MASANORI)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：10378862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞の長期培養系は、GS細胞と呼ばれている。GS細胞は2年間培養し続けても、増殖速度、形態、核型、DNAメチル化パターン、精子形成能が維持された安定な細胞である。これまでの研究から、GS細胞のポリ(ADP-リボシル)化反応を阻害することによって、細胞増殖が抑制され、細胞死が誘導されることを明らかにした。今回の研究から、ポリ(ADP-リボシル)化反応を阻害することによって、p53の下流で働く複数の遺伝子の発現が変化することがわかった。また、この阻害によってp53のリン酸化が促進された。これらの結果は、GS細胞におけるp53の活性化にポリ(ADP-リボシル)化が関与していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Spermatogonial stem cells (SSCs) can proliferate in vitro in the presence of glial cell line-derived neurotrophic factor, a self-renewal factor for SSCs. These cultured SSCs are called germline stem (GS) cells. In previous study, we examined the effect of PARP inhibitor, inhibition of poly(ADP-ribosylation), on GS cells. Inhibition of poly(ADP-ribosylation) suppressed cell proliferation of GS cells, and induced cell death. In order to identify the causative genes that is involved in the pathway leading to the suppression of cell proliferation, the gene expression and protein phosphorylation analyses were carried out. Some genes in p53 signaling pathway were up-regulated after addition of PARP inhibitors. We then investigated activation of p53 by detection of its phosphorylation site. The phosphorylation was increased after addition of PARP inhibitors. These results suggest that poly(ADP-ribosylation) regulates activity of p53 and thus p53 signaling pathway in GS cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：精子幹細胞 ポリ(ADP-リボース) 多能性幹細胞 発生・分化 再生医療

1. 研究開始当初の背景

生後の精巣に存在する精子幹細胞は、生後組織にある他の幹細胞と比べて、遺伝情報を次世代に受け継ぐことができるという点が特徴である。2003年にはマウスでその培養系 (Germline stem cells: GS 細胞) が確立され、その後の我々の研究から、2年間の長期培養によっても増殖速度、形態、核型、DNAメチル化パターン、精子形成能が維持された非常に安定な細胞であることを明らかにした。以上のような遺伝情報を次世代に受け継ぐという性質とこれまでの実験結果から、GS細胞には厳密なゲノム安定化機構が備わっていることが示唆されている。

この精子幹細胞のゲノム安定化に関わる分子メカニズムを明らかにするため、DNA修復、染色体の安定性などとの関連が知られているタンパク質翻訳後修飾、ポリ(ADP-リボシル)化反応に着目し、精子幹細胞における役割について研究を進めてきた。これまでの研究から、ポリ(ADP-リボシル)化反応を触媒する酵素、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP) 活性を、酵素阻害剤を用い、GS細胞および神経幹細胞に作用させ阻害することで、これらの幹細胞の増殖が抑制され、細胞死が誘導されることを明らかにした。

2. 研究の目的

精子幹細胞および神経幹細胞の培養系を用いて、幹細胞の増殖や細胞死の制御に、ポリ(ADP-リボース)代謝がそのように関与しているかについて、その詳細な分子メカニズムを解明することが目的である。今回の研究ではとくに、細胞死について着目した。

3. 研究の方法

(1) GS細胞の樹立

生後1~2日目のDBA/2マウスの精巣を採取し、コラゲナーゼとトリプシンによる2段階の酵素処理によって分離した細胞を、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) の存在下で培養し、約2ヶ月後、安定に増殖するGS細胞を得た。

(2) 神経幹細胞の樹立

比較実験として、組織幹細胞の1つ、神経幹細胞の培養系を用いた。胎児 (胎生14~15日) ICRマウスの脳からNeurosphere法により神経幹細胞を分離・培養した。

(3) ポリ(ADP-リボシル)化反応の制御

ポリ(ADP-リボシル)化反応を触媒する酵素、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP) 活性を、酵素阻害剤の1つ、PJ34を用いて阻害した。

また、PARPに対するshRNA発現レンチウイルスを作成し、GS細胞または神経幹細胞に感染させ、PARP遺伝子の発現を抑制した。

(4) 細胞増殖および細胞死の解析

形態的变化の観察、細胞数の変化、細胞死判定などの解析を行った。

(5) 遺伝子およびタンパク質の発現解析

RT-PCR法、ウエスタンブロット法および免疫染色法を用いて解析した。とくにDNAメチル基転移酵素 (Dnmt)、細胞死に関わるp53に関わる遺伝子や、そのリン酸化について着目した。

(6) DNAメチル化パターンの解析

GS細胞は父方インプリンティング遺伝子が完全にメチル化され、一方、母方インプリンティング遺伝子が非メチル化状態に維持されている。父方インプリンティング遺伝子として、*H19*、*Meg3*、*Igf2r*、*Peg10*のDNAメチル化パターンを解析した。また、未分化制御に重要な遺伝子 *Pou5f1* の発現調節領域のメチル化パターンも解析した。メチル化解析には、COBRA法 (combined bisulfite restriction analysis) を用いた。

(7) 幹細胞の増殖に関わるポリ(ADP-リボシル)化タンパク質の同定

ポリ(ADP-リボース)親和性レジンを用いたプルダウンアッセイやポリ(ADP-リボース)抗体を用いた免疫沈降法によって、幹細胞の増殖に関わるポリ(ADP-リボシル)化タンパク質について解析した。

(8) p53発現抑制およびp53欠損GS細胞および神経幹細胞の樹立

p53に対するshRNA発現レンチウイルスを作成し、GS細胞または神経幹細胞に感染させ、p53遺伝子の発現を抑制した。

また、入手したp53ノックアウトマウスを、ヘテロ欠損どうしを掛け合わせ、新生児または妊娠マウスの胎児から、(1)または(2)と同様の方法で、ホモ欠損のp53ノックアウトマウス由来のGS細胞および神経幹細胞を分離・培養した。

4. 研究成果

(1) PARP活性阻害による遺伝子発現の変化

精子幹細胞の培養系、GS細胞にPARP阻害剤を添加すると、細胞増殖が抑制され、細胞死が誘導されることから、細胞周期や細胞死に関わる遺伝子について着目し、RT-PCR法によって遺伝子発現の変化を解析した。その結果、PARP阻害剤によってポリ(ADP-リボシル)

化反応を阻害した GS 細胞では、p21 などの p53 の下流で働く複数の遺伝子の発現に変化があることがわかった。このことから、ポリ(ADP-リボシル)化の阻害によって、p53 が活性化されたと考えられた。また、ポリ(ADP-リボシル)化の阻害によってアポトーシスが誘導されていることを、PARP の断片化や TUNEL 法によって確認した。

(2) shRNA 発現レンチウイルスによる PARP 遺伝子発現抑制による影響

PARP 遺伝子の発現抑制によって、酵素阻害剤を作用させたときと同様の遺伝子発現変化や、細胞変化が見られた。このことは、GS 細胞の増殖に与える変化が、用いた PARP 阻害剤の副作用によるものではなく、ポリ(ADP-リボシル)化が関与していることを示唆した。

また、酵素阻害剤による変化と同様に、DNA メチル基転移酵素のうちの数種で、その発現が抑制されていた。その際、DNA メチル化パターンに明らかな変化が生じるかどうかについて COBRA 法によって解析したが、今後さらに詳細な検証が必要である。

(3) PARP 阻害による p53 の活性化

PARP 阻害剤によるポリ(ADP-リボシル)化阻害が p53 自体にどのように影響しているかを調べるため、種々のリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法によって解析した。その結果、ポリ(ADP-リボシル)化阻害によって、GS 細胞や神経幹細胞において p53 のリン酸化が上昇していることがわかった。

(4) p53 の活性化に関わるポリ(ADP-リボシル)化タンパク質の同定

ポリ(ADP-リボース)親和性レジンによるブルダウンアッセイの結果から、p53 のリン酸化酵素がポリ(ADP-リボシル)化されている可能性が示唆された。GS 細胞や神経幹細胞においては通常、このポリ(ADP-リボシル)化が p53 のリン酸化を抑制していると考えられた。

(5) p53 発現抑制 GS 細胞および神経幹細胞における PARP 阻害剤の影響

shRNA 発現レンチウイルスを用いて p53 の発現を抑制した GS 細胞および神経幹細胞に PARP 阻害剤を作用された場合、増殖能の低下や細胞死が軽減された。p53 ホモ欠損させた細胞においても、同様に軽減された。このことは、ポリ(ADP-リボシル)化の抑制による細胞変化に p53 が関与することを、さらに示唆した。

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 3 件)

Takehashi M, Tada M, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Kazuki Y, Oshimura M, Tada T, Shinohara T. Hybridization of testis-derived stem cells with somatic cells and embryonic stem cells in mice. *Biol Reprod.* 86,178(1-9) (2012) (査読有)

Kurokawa S, Takehashi M, Tanaka H, Mihara H, Kurihara T, Tanaka S, Hill K, Burk R, Esaki N. Mammalian selenocysteine lyase is involved in selenoprotein biosynthesis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 57, 298-305 (2011) (査読有)

Banasik M, Stedeford T, Strosznajder RP, Takehashi M, Tanaka S, Ueda K. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 attenuates the toxicity of carbon tetrachloride. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 26, 883-889 (2011) (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

奥田明子, 他. PARP-1 による神経幹細胞の増殖制御. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日(熊本)

中嶋瀬里奈, 他. 多能性幹細胞の初期化能の解析. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日(熊本)

小野友久, 他. ポリ(ADP-リボシル)化の制御が精子幹細胞に与える影響. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日(熊本)

奥田明子, 他. PARP-1 阻害剤による p21 を介した細胞周期制御. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日(横浜)

前田藍佳, 他. PARP-1 阻害剤が神経幹細胞の細胞周期に与える影響について. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕 出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹橋 正則 (TAKEHASHI, Masanori)
大阪大谷大学・薬学部・准教授
研究者番号：10378862

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし