

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06903

研究課題名(和文)細胞膜修復に関わるADP-リボシル化修飾酵素の探索およびその細胞内機序の解明

研究課題名(英文) Intracellular mechanism for membran repair mediated by ADP-ribosylation

研究代表者

間下 雅士 (Mashimo, Masato)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：30738886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜の破綻は、様々な病態時に生じ細胞死に直結する。従って、細胞膜修復機構は、生体の恒常性維持に重要な役割を持つ。ADP-リボシル化修飾反応は、ポリADP-リボースポリメラーゼ(PARP)などのADP-リボシル化修飾酵素がNAD⁺のADP-リボシル基を標的タンパク質に付加する反応である。本研究により、細胞膜に損傷を与えるとPARPファミリーの初期メンバーであるPARP1が活性化し損傷領域でポリADP-リボシル化修飾が促進した。PARP阻害薬やshRNAによるPARP1の発現抑制は、細胞膜修復を抑制した。これらの結果から、PARP1が細胞膜損傷後の細胞膜修復に寄与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、本研究をさらに進めることで臨床応用に発展させていきたいと考えている。現在、器質的ダメージや虚血再灌流障害など細胞膜損傷に伴う病態に対する直接的な治療法は無い。たとえば、虚血性心疾患の治療薬として心臓の負荷の軽減や心機能を改善する効果を狙った対症的治療薬が用いられているが、細胞膜損傷に伴う心筋細胞死に対する直接的な治療薬はない。したがって、本研究は、ADP-リボシル化修飾酵素の未解明の部分明らかにするという学術的意義に加え、細胞膜損傷によって惹起される疾患、たとえば心不全による心筋細胞死などに対する臨床応用に向けた理論的基盤を提供できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Plasma membrane breaks occurs during various pathological conditions, which is directly linked to cell death. Hence, the membrane repair mechanism plays an important role in maintaining homeostasis for the living body. ADP-ribosylation is a post-translational modification of proteins in which ADP-ribose units are sequentially transferred from NAD⁺ to acceptor proteins by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). In this study, we found that PARP1, a founding member of PARP family, was activated in response to membrane breaks and catalyzed poly(ADP-ribosyl)ation. Suppression of PARP1 expression by shRNAs or pretreatment with PARP inhibitors inhibited membrane repairs as well as poly(ADP-ribosyl)ation in the damaged area. These results indicate that PARP1 contributes to membrane repair.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞膜修復 ADP-リボシル化修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の破綻は、様々な病態時に生じ細胞死に直結する。従って、細胞膜修復機構は、生体の恒常性維持に重要な役割を持つ。ADP-リボシル化修飾反応は、ADP-リボース トランスフェラーゼ (ART) やポリ ADP-リボースポリメラーゼ (PARP) などの ADP-リボシル化修飾酵素が NAD^+ の ADP-リボシル基を標的タンパク質に付加する反応である。ADP-リボシル化修飾反応を受けた標的タンパク質はその活性および局在が変化し、生理機能が発揮される。ADP-リボシル化修飾反応には一つの ADP-リボースが付加するモノ ADP-リボシル化修飾反応と複数の ADP-リボース (poly(ADP-ribose); PAR) が付加するポリ ADP-リボシル化修飾反応に分類される。ART1 は標的タンパク質のアルギニン残基に一つの ADP-リボースを付加するモノ ADP-リボシル化転移酵素であり、筋肉細胞に特異的に発現する。MG53 は筋肉細胞に特異的に発現し、細胞膜損傷部位に小胞を輸送することで修復を促進する。ART1 は MG53 をモノ ADP-リボシル化修飾し、細胞膜修復を促進することが明らかとなっている。一方、非筋肉細胞において細胞膜修復機構に ADP-リボシル化反応の関与は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、非筋肉細胞である HeLa 細胞および HEK293T 細胞において、ADP-リボシル化修飾反応の細胞膜修復機構への関与を検討した。申請者は、タンパク質の ADP-リボシル化修飾が虚血再灌流障害による細胞膜の損傷により生じ、心筋 (筋肉) 細胞では細胞膜の修復を抑制し、非筋肉細胞では細胞膜の修復を促進することを明らかにしている。しかしながら、ADP-リボシル化修飾酵素は数多く存在し細胞膜修復に関与する酵素の特定には至っていない。そこで、本研究は、非筋肉細胞において細胞膜修復に必要な ADP-リボシル化修飾酵素および標的タンパク質を探索しその細胞内機序の解明を行う。本研究は、細胞膜損傷を伴う病態に対する新たな創薬ターゲットの理論的基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

・試薬

PJ34 は Enzo Life Sciences、streptolysin-0 (SLO) は Sigma-Aldrich、propidium iodide (PI) は Nacalai tesque、Biotinylated- NAD^+ は Trevigen、NeutrAvidin Protein, DyLight633、Lipofectamin 3000 は Thermo Fisher Scientific で購入した。

・細胞培養

HEK293T および HeLa 細胞は、10% FBS、100 units/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含む DMEM で 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。HeLa 細胞に PARP1 shRNA (Origene) を Lipofectamin 3000 を用いて発現させ、puromycin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による薬剤選択により PARP1 shRNA を恒常的に発現させた細胞を樹立した。

・Scratch assay

6-well plate に培養した HeLa 細胞 (3.0×10^5 cells/mL) に PJ34 (10 μM)、XAV-939 (5 μM) を投与し、30 分間反応させてから 200 μL ピペットチップを用いて縦に 1~2 本スクラッチし、スクラッチ直後と 24 時間後の創傷部の傷の幅の測定を行い、傷の幅の経時的変化をグラフ化した。

・Flow cytometry

PJ34 を添加し、10 分後 SLO を氷上で添加した。5 分後 37°C で 5 分間待ち、 4°C で PI を添加した。1200 x g、2 分で遠心し、PBS で 2 回洗浄後、Flow cytometry で検出した。

・共焦点顕微鏡

HEK 細胞 (1.0×10^5 cells) に biotinylated- NAD^+ を 5 分間添加し、その後 SLO を 5 分間添加し

た。PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒド (10 分) で固定し、PBS で洗浄後 blocking one (Nacalai tesque) を添加し、30 分後に取り除いた。NeutrAvidin Protein、DyLight633 を添加した。2 時間後 PBS で洗浄し、DAPI を添加し 10 分後に PBS で洗浄し、共焦点顕微鏡で観察した。

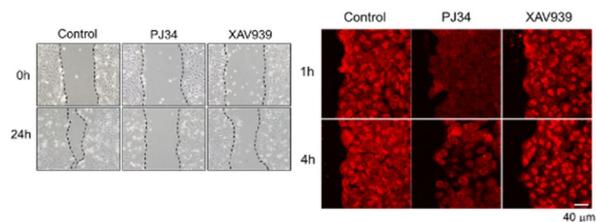
・統計解析

データは平均 ± S.E.M として示す。統計解析は SigmaPlot (Systat Software Inc.) を用いて行った。Dunnett 検定および Tukey 検定を用いた一元検体分散分析 (ANOVA) を用いて群の差を評価した。P < 0.05 の場合を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

PARP1 は scratch wound assay による細胞膜損傷によって PAR の産生を促進し、細胞膜修復や細胞遊走を促進する

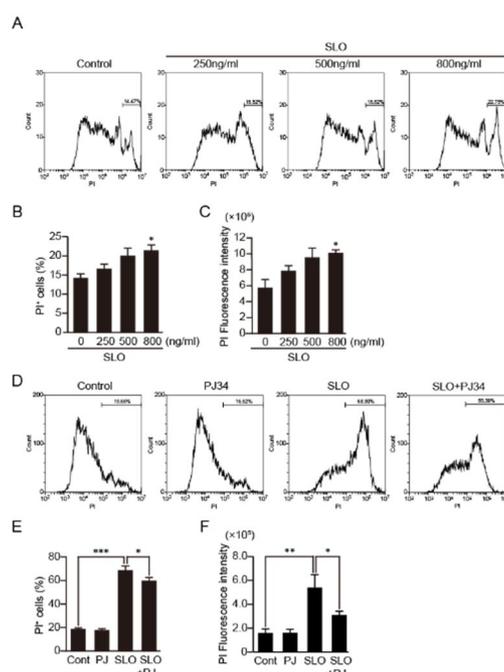
ポリ ADP-リボシル化修飾反応が細胞膜創傷の修復に関わっているか検討するために、Scratch assay を行った。培養した HeLa 細胞にチップで傷をつけ、創傷部の修復の様子を顕微鏡で観察して創傷部の傷の幅を測定したところ、Scratch 直後と比較する



と 24 時間後では Control 群に比べて PJ34 (非選択的 PARP 阻害剤)、XAV-939 (PARP5 選択的阻害剤) 投与群では創傷部の傷の幅の減少具合が小さく、傷の修復が遅くなった (左図)。加えて、PARP1 を恒常的に抑制した細胞においても修復が抑制された。PARP 阻害剤 (PJ34、XAV-939) 非存在下もしくは存在下、Scratch assay 1、4 時間後、PAR の産生を免疫染色で観察した (右図)。PJ34 は核および細胞質における PAR の発現を有意に抑制した。また、阻害剤と 4 時間反応させると PJ34 および XAV-939 は核および細胞質における PAR の発現を有意に抑制した (右図)。以上の結果から、PARP を阻害することで傷の修復が抑制されている、すなわち、PARP によって傷の修復が促進されていることが明らかとなった。加えて、PARP1 shRNA を安定的に発現した細胞でも細胞膜修復が抑制された。したがって、これらの結果から、PARP1 が創傷治癒に関与する事が示唆された。

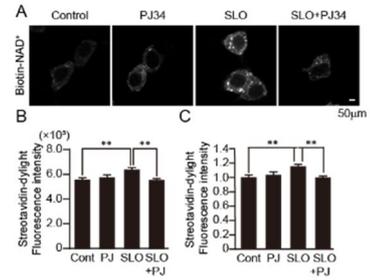
PARP1 は、SLO による細胞膜傷害を促進する

細胞膜に損傷を与えるため SLO を投与し PI の蛍光光度を flow cytometry により測定した。SLO は細胞膜に孔を形成することで傷害を与え、PI は細胞膜を損傷した細胞に入り DNA にインターカレーションすることで蛍光を発する。PI の取り込みは、SLO 濃度依存的に増加し、800 ng/ml で最も増加した (A-C)。HEK293T 細胞において細胞膜修復に ADP-リボシル化酵素 PARP が関与するかを検討した。PARP 阻害剤 PJ34 は、SLO による PI の取り込みを抑制した (D-F)。これらの結果より、SLO が引き起こした細胞膜傷害は、PARP により促進することが示唆された。**SLO が細胞膜障害を引き起こすと ADP-リボシル化修飾反応 が起こる**



HEK293T 細胞において細胞膜傷害後に ADP-リボシル化反応が起こっているかを検証するために、

biotin-NAD⁺を用いた。SLOによりbiotin-NAD⁺の蛍光強度が細胞内で増加し、PJ34によって抑制された (A-C)。この結果より、SLOが細胞膜傷害を与えるとPARPによるADP-リボシル化反応が行われることが示唆された。



以上の結果より、PARP1が細胞膜損傷時の修復に関与していることを明らかにした。今後、本研究をさらに進めることで臨床

応用に発展させていきたいと考えている。現在、器質的ダメージや虚血再灌流障害など細胞膜損傷に伴う病態に対する直接的な治療法は無い。たとえば、虚血性心疾患の治療薬として心臓の負荷の軽減や心機能を改善する効果を狙った対症的治療薬が用いられているが、細胞膜損傷に伴う心筋細胞死に対する直接的な治療薬はない。したがって、本研究は、ADP-リボシル化修飾酵素の未解明の部分をつまらかにするという学術的意義に加え、細胞膜損傷によって惹起される疾患、たとえば心不全による心筋細胞死などに対する臨床応用に向けた理論的基盤を提供できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mashimo Masato, Bu Xiangning, Aoyama Kazumasa, Kato Jiro, Ishiwata-Endo Hiroko, Stevens Linda A., Kasamatsu Atsushi, Wolfe Lynne A., Toro Camilo, Adams David, Markello Thomas, Gahl William A., Moss Joel	4. 巻 4
2. 論文標題 PARP1 inhibition alleviates injury in ARH3-deficient mice and human cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.124519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mashimo Masato, Moss Joel	4. 巻 1
2. 論文標題 ADP-Ribosyl-Acceptor Hydrolase Activities Catalyzed by the ARH Family of Proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 187~204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8588-3_12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mashimo Masato, Onishi Mayu, Uno Arina, Tanimichi Akari, Nobeyama Akari, Mori Mana, Yamada Sayaka, Negi Shigeru, Bu Xiangning, Kato Jiro, Moss Joel, Sanada Noriko, Kizu Ryoichi, Fujii Takeshi	4. 巻 296
2. 論文標題 The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100046~100046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青山 和正、間下 雅士、Bu Xiangning、加藤 治郎、石渡-遠藤 広子、Stevens Linda A、笠松厚志、Wolfe Lynne A、Toro Camilo、Adams David、Markello Thomas、Gahl William A、Moss Joel
2. 発表標題 PARP1 inhibitors alleviate injury in ARH3-deficient mice and human cells
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Mashimo, Xiangning Bu, Kazumasa Aoyama, Jiro Kato, Hiroko Ishiwata-Endo, Linda A. Stevens, Atsushi Kasamatsu, Lynne A. Wolfe, Camilo Toro, David Adams, Thomas Markello, William A. Gahl, Joel Moss
2. 発表標題 Patients with a gene encoding a truncated ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 exhibit a progressive neurodegenerative phenotype
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 愛花、藤野 裕道、川村 暢幸、和田 戈虹、和田 洋、藤井 健志、間下 雅士
2. 発表標題 PARP1 依存的EGFR のエンドサイトーシス促進機構の解明
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 両角茜音1、延山明理1、根木 滋1、川村暢幸1、和田戈 虹1、和田 洋2、藤井健志1、間下雅士
2. 発表標題 PARP1 依存的初期エンドソームタンパク質の解離メカニズムの解明
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Mashimo, Xiangning Bu, Kazumasa Aoyama, Jiro Kato, Hiroko Ishiwata-Endo, Linda A. Stevens, Atsushi Kasamatsu, Lynne A. Wolfe, Camilo Toro, David Adams, Thomas Markello, William A. Gahl, Joel Moss
2. 発表標題 Truncated dysfunctional ARH3 mutant exhibits PARP1-dependent progressive neurodegeneration phenotype in humans
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 延山 明理, 木山 悠, 川村 暢幸, 和田 戈虹, 和田 洋, 藤井 健志, 間下 雅士
2. 発表標題 ポリ ADP- リボシル化修飾反応によるエンドサイトーシスの制御機構の解明
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井 満里奈, 間下 雅士, 藤井 健志
2. 発表標題 Daudi細胞におけるムスカリン受容体はインターロイキン6産生や抗体クラススイッチを制御する
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 愛花, 藤野 裕道, 川村 暢幸, 和田 戈虹, 和田 洋, 藤井 健志, 間下 雅士
2. 発表標題 PARP1 依存的 EGFR のエンドサイトーシス促進機構の解明
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 両角 茜音, 根木 滋, 川村 暢幸, 和田 戈虹, 和田 洋, 藤井 健志, 間下 雅士
2. 発表標題 PARP1によるエンドサイトーシス抑制メカニズムと生理的意義の解明
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 未来華、森愛美、藤野裕道、藤井健志、間下雅士
2. 発表標題 PARP14による大腸がんの増殖に関するEP4受容体発現調節機構の解明
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関