

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18871

研究課題名(和文) 神経細胞死を惹起するPARの細胞内局在を制御する機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of intracellular localization of PAR in neuronal cell death

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Parthanatosは、PARP1依存的な細胞死であり、DNA傷害によって活性化したPARP1が、PARを産生することから始まる。本研究は、PARが核から細胞質に移行する機序を明らかにすることを目的とする。

PARP1は、PARを産生後カスパーゼ3によって89-kDaおよび24-kDaの断片に分解された。89-kDa PARP1断片は、自己修飾部位にPARを保持したまま、核から細胞質に移行した。PARP1の断片化を抑制することで、PARの細胞質への移行およびParthanatosが抑制された。これらの結果からPARPの断片化が、PARの核から細胞質への移行に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Parthanatos is a programmed cell death resulting from a PARP1-dependent manner. Upon sensing DNA damage, activated PARP1 generates PAR polymers, which acts signaling molecules to transduce nuclear information to the cytoplasm and mitochondria. After translocating to the cytoplasm, PAR polymers bind apoptosis-inducing factor (AIF) via their PAR-binding motif. AIF is cleaved and released from mitochondrial membrane. After translocating to the nucleus, AIF induces DNA fragmentation. In the pathway, PAR translocation to the cytoplasm appears a critical step, but its mechanism is unknown.

We found that PARP1 was cleaved by caspase 3, generating 89-kDa and 24-kDa PARP1 fragments. 89-kDa PARP1 fragment was automodified by PAR and translocated to the cytoplasm with attaching PAR polymers. In the cytoplasm, the automodified 89-kDa PARP1 fragment was associate with AIF. Thus, PARP1 fragmentation is an important step to carry PAR from the nucleus to the cytoplasm to induce parthanatos.

研究分野：分子生物学

キーワード：Parthanatos DNA damage cell death PARP1 caspase apoptosis

1. 研究開始当初の背景

Poly(ADP-ribose) (PAR) は、200 個ほどの ADP-ribose が分岐鎖構造を形成したポリマーであり、ネクローシスやアポトーシスとは異なる細胞死 parthanatos を惹起する。Parthanatos は、心不全、パーキンソン病や脳虚血再灌流障害時におこる細胞死に関与し、その詳細な細胞内メカニズムは parthanatos によって惹起される病態の解明および新たな創薬ターゲットの開発に貢献することが期待される。

Parthanatos は、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 1 が DNA 損傷により活性化し、核で PAR を産生することから始まる。その後、PAR は細胞質に移行し、ミトコンドリア外膜の apoptosis-inducing factor (AIF) を切り離す。細胞質に遊離した AIF は、核に移行し DNA を断片化する。加えて、PAR は解糖系の hexokinase1 と結合し、その活性を阻害することによって ATP の枯渇を引き起こす。

DNA 損傷時、PARP1 によって産生された PAR の大部分は、PARP1 自身に結合しており、parthanatos の誘導には PAR の核から細胞質への移行が必要であるが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、PAR が核から細胞質を経てミトコンドリアへ移行する機序に着目し、核外へ移行した PAR の検出、PAR の移行を制御する因子の特定という課題に挑戦した。

(1) 核外へ移行した PAR を検出する

本項目では、DNA 障害により PARP1 により産生した PAR の核から細胞質への移行を免疫染色法にて調べた。

(2) PAR の移行を制御する因子を特定する。

PAR の移行を制御する因子を探索し、PAR との結合を生化学的手法を用いて調べた。核に存在する PAR 結合タンパクが PAR の核外への移行を調節すると仮定している。本項目では、PAR の移行を制御する PAR 結合タンパクを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

Hela 細胞は、10% FBS、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

・細胞生存率測定

Hela 細胞 (1.5 × 10⁴ cells) を 96-well plate に 37°C、5% CO₂ 条件下 24 時間培養し、staurosporine (100-800 nM) で刺激した。細胞生存率は、cell count reagent SF を用いて測定した。試薬を 37°C、1 時間の条件で反応させ、その吸光度 (450 nm) を spectra max M5 を用いて測定した。

・ウエスタンブロット

Hela 細胞 (5 × 10⁵ cells) を 6-well plate に

37°C、5% CO₂ の条件下 24 時間培養した。Staurosporine (300 nM) で刺激後、2% SDS を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) で細胞を溶解した。タンパク量を調整し 4-12% bis-tris SDS-PAGE で電気泳動後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンは、blocking one で 37°C、1 時間ブロッキングした後に 1 次抗体を 4°C、1 晩反応させた。0.1% Tween 20 を含む TBS で洗浄後、2 次抗体 (anti-rabbit もしくは anti-mouse antibody HRP conjugate) を室温、1 時間反応させた。SuperSignal West で反応させた後、Fuji film Las-3000 mini で化学発光を検出した。

・免疫染色

Hela 細胞 (3 × 10⁴ cells) を 4% パラホルムアルデヒド (4°C、20 分) で固定し、10% FBS、1% BSA、0.5% Triton X-100 を含む PBS で透過及びブロッキング処理を行った。1 次抗体を 4°C、1 晩で反応させ、PBS で洗浄後 2 次抗体 (Alexa 488-conjugated anti-rabbit もしくは Alexa 555-conjugated anti-mouse antibody (1:500)) を室温、1 時間反応させた。核は、300 nM DAPI で染色した。

・GST 結合マクロドメインによる pull-down assay

細胞質画分にグルタチオン sepharose beads に結合した GST-マクロドメインを 20 µl 加え、4°C、1 晩で反応させた。遠心分離 (20,000 × g、5 分) し、その上清および沈殿物を回収した。PAR 結合タンパクは GST-マクロドメインと結合するので、遠心後の上清を PAR と結合していないタンパク質、沈殿物を PAR と結合したタンパク質とした。

・免疫沈降

Hela 細胞に 0.05% NP-40 を含む 10 mM HEPES (pH 7.9) を添加しダウンス型ホモジナイザー (60 回ストローク) で破砕した。細胞溶解液を 1,000 × g、5 分間遠心分離した。上清を回収後、さらに遠心分離 (1,000 × g、5 分) しその上清を細胞質およびミトコンドリア画分とした。タンパク量を調製 (500 mg/ml) し、抗体 (anti-AIF antibody (1:100) もしくは anti-hexokinase1 antibody (1:100)) と 4°C、1 時間反応させた Dynabeads Protein G (invitrogen) に加え、室温で 20 分反応させ、免疫沈降を行った。

4. 研究成果

Staurosporine による caspase 依存的アポトーシスによる細胞死の下流に PARP 依存的な細胞死を部分的に含む。

Protein kinase 阻害剤 staurosporine によって惹起されるアポトーシスにおいて parthanatos が関わっているかを検討するために細胞生存率を測定した。Hela 細胞を staurosporine で 8 時間刺激すると、濃度依存的な細胞死がみられた (図 1)。Staurosporine 添加 30 分前に PARP 阻害薬 PJ34 もしくは caspase 阻害薬 zVAD-fmk を投与すると、細胞死は部分的もしくは完全に抑制され、PJ34 および

zVAD-fmk を併用すると PJ34 の効果はみられなかった (図 1)。加えて、staurosporine で 6 時間刺激すると核の縮小がみられ、PJ34 または zVAD-fmk は、核の縮小を抑制された。Staurosporine による PAR の産生が、PARP1 依存性であるかを検証するために、PARP1 に選択的な shRNA (PARP1 shRNA) を恒常的に発現する Hela 細胞を作製した。この細胞は、コントロール shRNA が発現する細胞に比べ、PARP1 の発現が 90%減少した。PARP1 shRNA 発現細胞では、staurosporine 投与による細胞死が、コントロール shRNA 発現細胞に比べ、顕著に抑制された (図 1)。これらの結果から、staurosporine による細胞死の大部分は caspase 依存性アポトーシスによるものであるが、その下流に PARP1 依存性細胞死も部分的に含むことが示唆された。

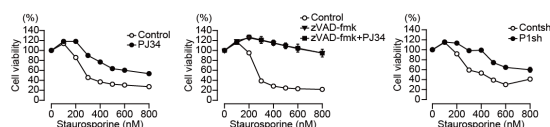


図 1 Staurosporine による細胞死

Staurosporine は、PAR の産生および核から細胞質への移行を引き起こす。Parthanatos は、PARP1 が DNA 損傷により活性化し、核で PAR を産生することから始まる。PAR は staurosporine 投与 1 時間で産生し、4 時間でピークとなった。Staurosporine 添加 30 分前に zVAD-fmk または PJ34 を投与したところ、PAR の産生が抑制された。免疫染色を行い、PAR の細胞内局在を観察したところ、staurosporine 投与により 1 時間以降から核において産生された PAR は時間経過とともに細胞質へ移行した (図 2)。PARP1 shRNA 発現細胞では、staurosporine による PAR の核における産生及び細胞質への移行が抑制された。これらの結果から、staurosporine は、PARP1 を活性化し、PAR の核における産生および細胞質への移行を惹起することが示唆された。

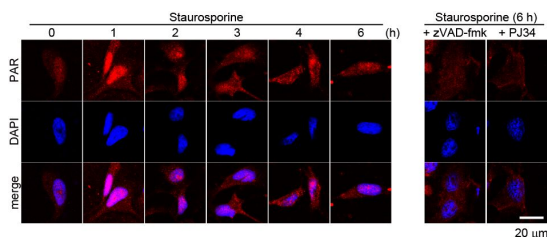


図 2 Staurosporine 刺激後の PAR の局在

Staurosporine は、AIF のミトコンドリアから核への移行を引き起こす。Parthanatos では、ミトコンドリアに存在する AIF が PAR によって切り離され、核へ移行することによって DNA を断片化し、細胞死を引き起こす。AIF の局在を検討するために、免疫染色を行った。Staurosporine 投与前、AIF はミトコンドリアに局在した。Staurosporine 刺激後では、AIF の核への移行が観察された。

Staurosporine 添加 30 分前に zVAD-fmk または PJ34 を投与したところ、AIF の核への移行が抑制された。加えて、PARP1 shRNA 発現細胞では、staurosporine による AIF の核移行は抑制された。これらの結果から、staurosporine によって部分的に起こる PARP1 依存性細胞死は parthanatos であることが示唆された。

Staurosporine は、caspase3 の活性化を介した PARP1 の断片化を引き起こす。アポトーシス誘導因子である caspase3 は、断片化により活性化する。PARP1 は、caspase3 の基質となり、断片化されることにより 89 kDa と 24 kDa の断片を生成する。Staurosporine 投与 1 時間以後から、caspase3 の断片化がみられ、それに伴い PARP1 の断片化が観察された (図 3)。Staurosporine 添加 30 分前に zVAD-fmk または PJ34 を投与したところ、zVAD-fmk では caspase3 および PARP1 の断片化が抑制されたが、PJ34 では抑制されなかった (図 3)。これらの結果から、staurosporine による parthanatos では、caspase3 の活性化にともない PARP1 が断片化されることが示唆された。



図 3 Staurosporine による caspase3 および PARP1 の断片化

断片化された PARP1 は、細胞質に移行する。PARP1 は、110 kDa の核タンパク質であり、3 つの特徴的なドメインを持つ。N 末端には DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain: DBD)、C 末端には活性化部位 (Catalytic domain)、これらのドメインに挟まれた中央部に PAR の自己修飾ドメイン (Automodification domain) を持つ。加えて、DBD の C 末端側に核局在化部位 (NLS)、automodification domain の N 末端側に caspase 切断部位を持つ。PARP1 は caspase によって caspase 切断部位で分解される。24-kDa の PARP1 フラグメントは DBD および NLS を持ち、89-kDa の PARP1 フラグメントは automodification domain および catalytic domain を持つ。PARP1 断片化が PARP1 の細胞内局在に影響を及ぼすかを検討するために細胞分画を行った。PARP1 の C 末端を認識する抗体を用いると、staurosporine 刺激後、89-kDa の PARP1 フラグメントのみが細胞質画分でみられた。Staurosporine 添加 30 分前に zVAD-fmk または PJ34 を投与し、細胞質画分を観察したところ、zVAD-fmk では断片化した 89-kDa の PARP1 フラグメントの細胞質への移行が抑制されたが、PJ34 では抑制されなかった。加えて、PARP1 の N 末端および C 末端に mCherry および GFP を結合させた mCherry-PARP1 および PARP1-GFP を Hela 細胞に発現させた。

Staurosporine 刺激 6 時間後、mCherry-PARP1 は、核に局在し、PARP1-GFP は細胞質に局在した (図 4)。これらの結果から、PARP1 は caspase3 によって断片化され、断片化した 89-kDa の PARP1 フラグメントが細胞質へ移行し、24-kDa の PARP1 フラグメントは、核に保持されることが示唆された。

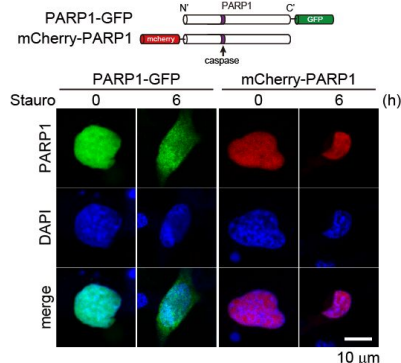


図 4 Staurosporine 刺激後の PARP1-GFP および mCherry-PARP1 の局在

細胞質へ移行した 89-kDa PARP1 フラグメントは PAR と結合している。細胞質へ移行した 89-kDa の PARP1 フラグメントは、automodification domain を持つ。このフラグメントが、PAR と結合し細胞質に移行するかを検討するために、glutathione-s-transferase (GST) 結合マクロドメインによる pull-down assay を行った。マクロドメインは、PAR と結合する特性をもち、GST マクロドメインを用いた pull-down assay は、PAR と結合するタンパクを検出する。Staurosporine 刺激 6 時間後、細胞分画法により細胞質を分離し、GST マクロドメインと反応させた。89-kDa の PARP1 は、GST マクロドメインと結合したことから細胞質に移行した 89-kDa の PARP1 フラグメントは、PAR と結合していることが明らかとなった。これらの結果から、staurosporine によって活性化した PARP1 は、PAR を産生し caspase3 によって断片化されることで PAR を保持したまま細胞質へ移行することが示唆された。

断片化した PARP1 は PAR を介して AIF および hexokinase1 と結合する。PARP1 の断片化とともに細胞質へ移行した PAR が、parthanatos を誘導する AIF および hexokinase と結合するかを検討するために免疫沈降法を行った。Staurosporine 投与後、断片化した 89-kDa の PARP1 フラグメントは、細胞質およびミトコンドリア画分において、AIF または hexokinase1 と結合した (図 5)。Staurosporine 添加 30 分前に PJ34 を投与したところ、89-kDa の PARP1 フラグメントは、AIF または hexokinase1 と結合しなかった (図 5)。これらの結果から、89-kDa の PARP1 フラグメントは PAR を介して AIF または hexokinase1 と結合することが示唆された。

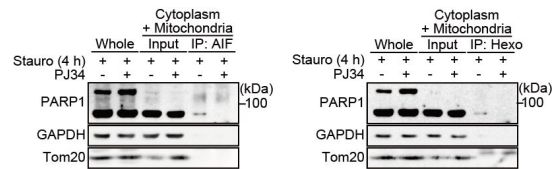


図 5 PAR を介した 89-kDa PARP1 フラグメントと AIF および hexokinase との結合

以上の結果をまとめると、PARP1 が PAR を産生、保持したまま caspase3 により断片化されることで PARP1 は、PAR の核から細胞質への移行のキャリアとなっていることを明らかにした (図 6)。

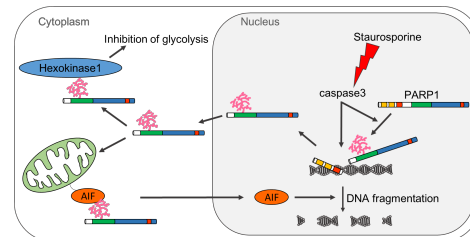


図 6 Parthanatos の細胞内メカニズム

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)

Mashimo M, Moss J. Functional Role of ADP-Ribosyl-Acceptor Hydrolase 3 in poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Response to Oxidative Stress. *Curr Protein Pept Sci*. 査読有. 2016 17(7):633-640.

Mashimo M, Yurie Y, Kawashima K, Fujii T. CRAC channels are required for [Ca(2+)]i oscillations and c-fos gene expression after muscarinic acetylcholine receptor activation in leukemic T cells. *Life Sci*. 査読有. 2016 161:45-50.

DOI: 10.1016/j.lfs.2016.07.014. Epub 2016 Jul 26.

Mashimo M, Iwasaki Y, Inoue S, Saito S, Kawashima K, Fujii T. Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca2+, IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci*. 査読有. 2017 172:13-18. doi: 10.1016/j.lfs.2016.12.015.

〔学会発表〕(計 4 件)

大西真由、宇野愛莉奈、藤井健志、間下雅士 PARP1 の細胞質への局在変化は、PARP1 依存的な細胞死 parthanatos を惹起する 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 2016/10 大阪薬科大学 (大阪府、高槻市)

大西真由、宇野愛莉奈、藤井健志、間下雅士 細胞死を惹起する poly(ADP-ribose) の核外への移行の時空間的解析 第 65 回 日本薬学会近畿支部

総会・大会 2015年10月17日 大阪大谷
大学 (大阪府、富田林市)
間下雅士、加藤治郎、Joel Moss
ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3
regulates poly(ADP-ribose) degradation
and cell death during oxidative stress
間下雅士、加藤治郎、Joel Moss
ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 は、酸
化ストレスによる poly(ADP-ribose)
polymerase 1 依存的な細胞死
parthanatos を抑制する BMB2015
2015年12月1日~4日 神戸ポートアイ
ランド (兵庫県、神戸市)

〔その他〕

同志社女子大学 研究者データベース

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/3633/3633_Research.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

間下 雅士 (Masato Mashimo)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：30738886