

令和元年6月22日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08257

研究課題名(和文) 精巣由来の幹細胞特有に働くポリ(ADP-リボシル)化タンパクの同定

研究課題名(英文) Identification of novel poly(ADP-ribosyl)ated proteins in 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷時などにPARPが活性化し、ポリ(ADP-リボシル)化(PAR化)が亢進することが知られている。我々は、マウス精子幹細胞や神経幹細胞ではPARPが高発現し、通常の培養条件下で、PAR化が亢進状態であることを明らかにした。本研究では、この組織幹細胞特有に働く、PAR化タンパク質の解析を試みたが、明確に特有の働きを証明する新規のタンパク質の同定には至らなかった。一方、組織幹細胞におけるPAR化亢進のメカニズムについて解析し、PARP1の組織幹細胞における転写調節領域を同定した。また、組織幹細胞におけるPAR化が、細胞周期関連タンパク質の発現を制御することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子幹細胞や神経幹細胞では、通常の培養状態で体細胞に比べPARPが高発現し、常にNAD<sup>+</sup>を過剰に消費してポリ(ADP-リボシル)化(PAR化)が亢進状態である。このことから、体細胞にはない、これら幹細胞特有のPAR化の重要な働きがあることが予想される。本研究によって、組織幹細胞におけるPARP1の発現制御機構と、組織幹細胞においてPAR化が細胞周期関連タンパク質の発現を制御することを明らかにした。最近、PARP1阻害剤が抗がん剤として臨床応用されていることから、PAR化の多彩な役割を解明することによる学術的及び社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) has plays multiple roles in the cellular responses to DNA damage and the regulation of several nuclear events. Mouse spermatogonial stem cells (SSCs) and neural stem/progenitor cells (NSPCs) express higher levels of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) than mouse embryonic fibroblasts (MEFs). However, the molecular mechanisms involved in the regulation of PARP1 expression in tissue stem cells remain to be elucidated. In the present study, to identify the transcription factor involved in PARP1 transcription in mouse NSPCs, we performed a luciferase reporter assay and found two transcriptional regulatory elements upstream of the mammalian conserved promoter region.

研究分野：生物系薬学

キーワード：精子幹細胞 ポリ(ADP-リボシル)化 神経幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリ(ADP-リボシル)化が遺伝子発現調節・ゲノム安定性・癌化などに重要な役割を果たしていることに注目し、マウス精子幹細胞における PAR 化の役割を解析した申請者らの研究(平成 20~22 年度, 23~25 年度 基盤研究(C))により、定常状態で体細胞に比べ GS 細胞(マウス精子幹細胞の長期培養系)や神経幹細胞ではポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP:ポリ(ADP-リボシル)化を触媒する酵素)の発現量が高くポリ(ADP-リボシル)化が亢進状態であることがわかり(発表論文)、細胞内のポリ(ADP-リボシル)化の抑制が、p53 の転写活性化や DNA メチル化酵素の発現低下を及ぼし、GS 細胞の増殖抑制および細胞死を導いていることがわかった。この現象は体細胞では見られなかった。

このことは、GS 細胞の増殖維持にポリ(ADP-リボシル)化が重要な役割を担っていると考えられる。また、iPS 細胞の樹立に PARP が必修であるという複数の報告がなされている。このことから、PARP 自身もしくは PARP によってポリ(ADP-リボシル)化を受けた蛋白質が細胞のリプログラミングにおいて重要な役割を担っていると考えられる。

ただし、精子幹細胞や神経幹細胞においてポリ(ADP-リボシル)化の標的となっているタンパク質についての詳細は明らかにされていない。さらに、これら幹細胞において PARP が高発現する転写制御機構についても知られていない。最近、PARP 阻害剤が抗がん剤として臨床応用されていることから、このような幹細胞における PARP の転写制御機構やポリ(ADP-リボシル)化の多彩な役割を解明することは、抗がん剤としての効果やその副作用においても、重要な知見を与える。

### 2. 研究の目的

(1) 体細胞と比較して GS 細胞で特異的に働く新規ポリ(ADP-リボシル)化タンパク質を同定し、その役割を解明する。とくに、本来は単能性の GS 細胞が試験管内において稀に多能性精子幹細胞(mGS 細胞)に変化するというユニークな性質をもつことから、この GS 細胞の多能性獲得や mGS 細胞の多能性維持にポリ(ADP-リボシル)化がどのように関与するかを明らかにする。

(2) 組織幹細胞において PARP が高発現する転写制御機構を明らかにする。ポリ(ADP-リボシル)化触媒を中心的に担う PARP1 のプロモーター領域において、組織幹細胞において PARP の高発現を制御する、転写因子の結合部位を同定する。

(3) 組織幹細胞において、ポリ(ADP-リボシル)化が細胞周期の進行にどのように関与しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) GS 細胞及び mGS 細胞で特異的に働く新規ポリ(ADP-リボシル)化タンパク質の同定

マウス胎児線維芽細胞、GS 細胞、mGS 細胞からそれぞれ抽出したタンパク質から、ポリ(ADP-リボース)に対する抗体を用いた免疫沈降法およびポリ(ADP-リボース)親和性レジンを用いてポリ(ADP-リボシル)化タンパク質を単離し、質量分析や二次元電気泳動によって幹細胞特異的に働くポリ(ADP-リボシル)化タンパク質を同定することを試みた。

(2) 組織幹細胞における PARP1 遺伝子発現調節領域の同定

PARP1 遺伝子発現調節領域の各種変異体を導入したレポーター遺伝子発現ベクターを構築し、種々の幹細胞を用いてレポーターアッセイを行った。これによって組織幹細胞における PARP1 遺伝子発現に関わる転写調節領域を同定し、その調節に関わる転写因子候補をデータベースから絞りこんだ。

(3) ポリ(ADP-リボシル)化抑制が組織幹細胞の細胞周期に与える影響

PARP 阻害剤を組織幹細胞と体細胞に作用させた際、細胞周期関連タンパク質の発現に対する影響の違いをリアルタイム PCR によって解析した。その違いをもとに、各種薬剤によって細胞周期を同調させ細胞の FACS 解析によって、細胞周期のどの段階の進行に影響するかを解析した。

### 4. 研究成果

(1) それぞれの幹細胞の培養条件、タンパク質抽出のタイミング、ポリ(ADP-リボシル)化タンパク質の単離条件、単離後のタンパク質の解析条件などを検討し、幹細胞特異的に働くポリ(ADP-リボシル)化タンパク質の同定を試みた。しかし、明確に GS 細胞や mGS 細胞で特異的に働きを証明できた新規ポリ(ADP-リボシル)化タンパク質の同定には至らなかった。今後さらに、

条件を絞り込み解析を進める。

(2) マウス PARP1 プロモーター領域の各種変異体を作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて解析した結果、哺乳類で高度に保存された PARP1 プロモーター領域中の 2 箇所の部分が PARP1 発現に重要であることがわかった。そのうち一方は、これまで体細胞で PARP1 発現に関わる転写因子として報告されていた SP1 の結合部位であった。もう一方は、組織特異的に発現する転写因子の結合部位であると予想された。(発表論文)

(3) PARP 阻害剤をマウス胎児線維芽細胞 (MEF) とマウス神経幹細胞に作用させると、神経幹細胞ではサイクリン B1 及び B2 の発現が抑制された。MEF ではその抑制が見られなかった。PARP 阻害剤によるサイクリン B1 の発現抑制は、サイクリン B1 プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイによって証明できた。この PARP 阻害剤がサイクリン B 発現を抑制するメカニズムとして、ポリ(ADP-リボシル)化抑制によってサイクリン B の転写調節因子 (FoxM1、B-MTB) の発現が抑制されることが起因となっていると考えられた。さらに、サイクリン B は G2/M 期から G1 期の進行に重要な働きを担っていることが知られていることから、ノコダゾールによって細胞周期を同調された細胞を用いて FACS 解析を行った。その結果、PARP 阻害剤によるポリ(ADP-リボシル)化抑制が、神経幹細胞の G2/M 期から G1 期への進行を遅らせることを明らかにした。(発表論文)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kurokawa S, Okuda A, Kondo Y, Tanaka S, Takehashi M: Identification of transcriptional regulatory elements of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene in neural stem/progenitor cells. *Int J Anal Bio-Sci*, 7(1):6-13 (2019) (査読有)  
<http://plaza.umin.ac.jp/~e-jabs/2019-1.html>

Kurokawa S, Okuda A, Nishizawa Y, Furukawa K, Sumihiro A, Nakaji Y, Tanaka S, Takehashi M: Suppression of cell cycle progression by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 in neural stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 510(1):59-64 (2019) (査読有)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.025.

Okuda A, Kurokawa S, Takehashi M, Maeda A, Fukuda K, Kubo Y, Nogusa H, Takatani-Nakase T, Okuda S, Ueda K, Tanaka S: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors activate the p53 signaling pathway in neural stem/progenitor cells. *BMC Neurosci*, 18(1):14 (2017) (査読有)  
doi: 10.1186/s12868-016-0333-0.

〔学会発表〕(計 1 件)

黒川優, 奥田明子, 竹橋正則, 田中静吾: ポリ(ADP-リボース)合成酵素阻害剤 PJ34 の神経幹細胞の細胞周期抑制作用について. 第 41 回日本分子生物学会年会(横浜, 2018 年 11 月 28-30 日, 2018 年度)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.osaka-ohtani.ac.jp/department/teacher/pharmacy/takeham.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 黒川 優

ローマ字氏名：KUROKAWA SUGURU

所属研究機関名：大阪大谷大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70759761

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。