

機関番号：34204

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590291

研究課題名（和文） 未知のポリ ADP-リボシル化タンパク質の同定、修飾部位決定と生物学的意義の解明

研究課題名（英文） Identification of novel acceptor proteins for polyADP-ribosylation, determination of the site of modification and clarification of biological function

研究代表者

三輪 正直（MIWA MASANAO）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：20012750

研究成果の概要（和文）

ポリ ADP-リボシル化は、細胞増殖、細胞死など様々な細胞内機能に関与している翻訳後修飾である。その機能解明により神経難病などの機構解明に役立てることを目的として、モデル生物のショウジョウバエを用いて生体におけるポリ ADP-リボシル化タンパク質の単離同定を試みている。その結果 9 - 14 個の候補タンパク質が 2 次元電気泳動法にて見出された。現在これらのタンパク質を質量分析装置にて同定を行っている。

研究成果の概要（英文）:

PolyADP-ribosylation is a posttranslational modification that is involved in various cellular events including cell growth and cell death. We are trying to clarify the function of polyADP-ribosylation using *Drosophila* as an animal model for future application to analyze the mechanism of neurological diseases. We found 9-14 new acceptor proteins of polyADP-ribosylation using 2-D gel electrophoresis and now trying to identify those new proteins by mass spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：翻訳後修飾、ポリ ADP-リボシル化、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローン抗体、神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷修復や細胞死、細胞周期、転写制御、分化などの生命現象は、時に非常に迅速に調節制御される必要がある。迅速でかつ、可逆的な反応として知られ

ているのが、翻訳後修飾であり、実際様々な翻訳後修飾が数多くの細胞内機能に関与している。

翻訳後修飾の中でも最も大きな分子

を目的タンパク質に付加し得るポリADP-リボシル化は、DNA修復や細胞死、細胞増殖、転写、分化など様々な細胞内機能に關与しているとされている。我々は細胞内器官の要の一つである中心体にとって、ポリADP-リボシル化は中心体機能を正常に維持するために非常に重要であることを報告して来た (Kanai et al. 2003, Mol. Cell. Biol.)。また、がん抑制遺伝子のp53タンパク質への *in vitro* 反応におけるポリADP-リボシル化部位を同定し、p53の核外輸送をポリADP-リボシル化が阻害することを見出している (Kanai et al. 2007, Nature Cell Biol.)。

しかし、ポリADP-リボシル化の分子レベルにおける機能を解明する上では、*in vivo* においてポリADP-リボシル化を受ける目的タンパク質 (受容タンパク質) の解明が必須であるが、ポリADP-リボース分解酵素のノックアウト・ショウジョウバエにおける解析からポリADP-リボシル化が *in vivo* で非常に速やかな代謝回転を行っていること (Hanai et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、 NAD^+ が細胞膜を透過しないこと、ポリADP-リボシル化の修飾を行うポリADP-リボース残基の鎖長の多様性のため、培養細胞系での2, 3のタンパク質を除き *in vivo* における多くの目的タンパク質の同定は今なお困難を極めている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞培養系のみでなく、*in vivo* の組織におけるポリADP-リボシ

ル化タンパク質を生化学的に同定し、ポリADP-リボシル化の生理的及び病態における役割を明らかにしたいと考えている。その方法としては、我々がポリADP-リボシル化の分解酵素 (PARG) ノックアウト動物として始めて作出したショウジョウバエ個体に蓄積するポリADP-リボシル化タンパク質を材料として、精製には、我々が以前に作成したポリADP-リボースに対するモノクローン抗体 (10H) (Kawamitsu et al. 1984 Biochemistry 23:3771-3777) を精製しアフィニティーカラムにより分離精製を行い、質量分析によりそのタンパク質の同定と修飾部位の決定を行い、究極的にはポリADP-リボシル化の生理的、病態的な意義を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 各組織からの未知のポリADP-リボシル化タンパク質の抽出法の確立

In vivo の組織からのポリADP-リボシル化タンパク質の抽出法を確立することを行う。ポリADP-リボース分解酵素 (PARG) の欠損変異個体であるショウジョウバエより、ポリADP-リボース抗体と反応する物質を抽出する際には、ヒト腎臓細胞株 (293T) 細胞からとは異なり、少なくとも0.5%SDSを含む抽出液を用いなければ十分な抽出効果が得られないことがわかったが、SDSはポリADP-リボシル化タンパク質の単離において少なからぬ障害となっており、SDSを除くことを含めて単離法の改善を試みる。

(2) ポリADP-リボシル化タンパク質の単離方法の確立

ポリADP-リボシル化タンパク質の単離の方法としては、原理的には、我々は、以前に作成したポリADP-リボースに対するモノクローン抗体(10H)を大量精製して固相化したアフィニティーカラムによりポリADP-リボースに対する抗体の特異的な結合能を用いて単離することを考えた。10H抗体の大量調製を行って調べた予備的な知見に依れば、このような方法で抽出液をカラムに通しても何故か、カラムへはごく少量しか結合しなかった。このため、ポリADP-リボシル化タンパク質のポリADP-リボース部分が何らかの物質との非共有結合により抗体との結合が阻害されている可能性が考えられた。この結合は、恐らくSDS存在下で遊離すると仮定して、PARGノックアウトショウジョウバエ個体から、直接SDS存在下で加熱抽出することを試みたところ、抽出物の約半分のポリADP-リボシル化物質がカラムに吸着することが明らかとなり、ポリADP-リボシル化タンパク質の一部は分離できることがわかった。そこで、より効率的な方法でポリADP-リボシル化タンパク質をカラムに吸着させる条件を確立し精製へと進みたい。

(3) ポリADP-リボシル化タンパク質の同定法の確立

(2)の方法により、精製した画分を直接、質量分析にかけることが可能かどうかを試みる。もしも負電荷が多くてイオ

ン化が難しい場合には、ポリADP-リボース分解酵素(PARG)または、蛇毒フォスフォヂエステラーゼをカラムに固相化させて、これによりポリADP-リボース部分を、切断することにより質量分析にかけることを試みる。

(4) ポリADP-リボシル化タンパク質の生理的役割と疾患における役割の解析

(1)-(3)の結果、ショウジョウバエ個体からのポリADP-リボシル化タンパク質が同定された際には、ヒト培養細胞系においての相同タンパク質の挙動を解析し、ポリADP-リボシル化の役割の分子レベルでの解析を進める。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエからのポリADP-リボシル化タンパク質の抽出法の確立

ポリADP-リボース分解酵素(PARG)の欠損変異個体であるショウジョウバエより、ポリADP-リボース抗体と反応する物質を抽出する条件として、6種類の抽出条件で調べたところ、Denaturation buffer2(0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 70 mM 2-mercaptoethanol)を加えた後、5分間の煮沸を行なう方法が最も抽出効果が良かった。SDSの濃度を0.1%に下げた場合は抽出効果は低下した。このことから、ショウジョウバエの変異体の脳に蓄積する天然のポリADP-リボシル化タンパク質の抽出は、293T細胞からの場合とは大きく異なり、改めて条件検討の必要があった。種々検討の結果、7 M Urea, 0.5%SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 70 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM NaFの条件で大幅な改善がみられた。

(2) ポリADP-リボシル化タンパク質の

単離方法の確立

精製 10H 抗体を CNBr-activated Sepharose に結合させてポリ ADP-リボース抗体カラムを作製した。1,500 匹の変異体から上記の方法により得た、ショウジョウバエの抽出液を 10H 抗体カラムに通して吸着させる試みを行なった。吸着画分には、ポリアクリルアミドゲルにてタンパク質のバンドが検出されるが、10H 抗体のコントロールとして正常マウス IgG をカラムに固相化させた場合でも似たようなタンパク質が吸着することがわかり、非特異的なタンパク質が多いことがわかった。そこで、ポリ ADP-リボシル化タンパク質は、グルタミン酸残基でエステル結合をしているとの報告があるので、アルカリ処理によりポリ(ADP-リボース)を脱離させることにより、新しく現れるタンパク質のバンドに注目することが考えられた。また、タンパク質の分離には、2次元電気泳動を用いることにした。3,000 匹のショウジョウバエ変異体より上記の方法で抽出した画分を 10H 抗体カラムを用いて精製を行った。この画分を 2 つに分け、片方はそのまま、また片方は、1 M NaOH で氷上で 15 分間処理を行った。それぞれを 2次元電気泳動により分離したところアルカリ処理により移動度が変化した 9 個 14 個の新しいスポットを同定することができた。

(3) ポリ ADP-リボシル化タンパク質の同定法の確立

(2) で述べた方法で分離したタンパク質のスポットを切り出し、質量分析装置にかけたが、シグナルが得られなかった。これは、質

量分析装置の感度の問題もあるが、基本的にはショウジョウバエの使用量がまだ不足していると考えられた。そのため、さらに多くのショウジョウバエ変異体を用いて精製を行えば、アクセプタータンパク質の同定が可能であるとの確実な見通しが得られた。

(4) ポリ ADP-リボシル化タンパク質の生理的役割と疾患における役割の解析

未だショウジョウバエ由来の *in vivo* のアクセプタータンパク質の同定は成功していないが、時間の問題と考えている。そのため、*In vivo* におけるポリ ADP-リボシル化の役割を調べるために必要になると考えられる技術として、ポリ(ADP-リボース)を測定する ELISA 法を開発した。補足抗体として前述の 10H 抗体を用い、ポリ(ADP-リボース)をウサギに免疫して作成したポリクローナル抗体を 1 次抗体として用いたもので現在の感度は、1 ng であり、更に高感度の測定が可能ないように改善していく予定である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nodono, H., Hamada, A., Kuroda, Y., Hasegawa, M., Kondo, C., Che, F. S., Hanai, S. and Miwa, M. Approaches to separate and identify polyADP-ribosylated proteins using PARG knockout *Drosophila*. In: *Methods in Molecular Biology on Poly(ADP-ribose)*, A. Tulin ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 査読有、2011、in press.

Sakamaki, J.I., Daitoku, H., Yoshimochi, K., Miwa, M., Fukamizu, A. Regulation of FOXO1-mediated transcription and cell

proliferation by PARP-1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 2009, 382(3):497-502.

〔学会発表〕(計27件)

森田 寛之他、タンパク質のポリ ADP-リボシル化部位の同定、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日 10日、神戸ポートアイランド

江口 貴之他、ポリ ADP-リボース定量法の確立、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日 10日、神戸ポートアイランド

芝崎 僚他、ポリ ADP-リボシル化を受ける未知タンパク質の検出、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日 10日、神戸ポートアイランド

Hiroto Nodono 他、Identification of polyADP-ribosylated acceptor proteins in poly(ADP-ribose) glycohydrolase knockout *Drosophila melanogaster*、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日 10日、神戸ポートアイランド

Masatoshi Mushiake 他、Effect of inhibition of polyADP-ribosylation on centrosome amplification and chromosome numbers、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日 10日、神戸ポートアイランド

高橋 淳他、ポリ ADP-リボシル化阻害剤 3-aminobenzamide による細胞周期進行の遅延、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日 24日、Osaka International Convention Center, RIHGA Royal Hotel Osaka

Nodono H 他、Separation and identification of poly(ADP-ribosyl)ated

acceptor proteins in PARP-knockout *Drosophila melanogaster* that shows neuronal cell death, PARP 2010 (18th International Conference on ADP-ribose metabolism

2010.8.18-8.21, Zurich, Switzerland

田中 秀明他、オリゴ及びポリ ADP-リボシル化タンパク質の単離と同定、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日 12日、パシフィコ横浜

浜田 彰子他、ポリ(ADP-リボース)分解酵素{PARG}ノックアウトショウジョウバエにおける蓄積ポリ ADP-リボシル化タンパク質の単離と同定、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日 12日、パシフィコ横浜

貴田 亨他、ポリ ADP-リボースの ELISA 法による定量の検討、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日 12日、パシフィコ横浜

田中 浩司他、レトロウイルス感染におけるポリ ADP-リボシル化酵素 (PARP) の関与について、第82回日本生化学会大会、2009年10月21日 24日、神戸国際会議場

三輪 正直他、DNA 損傷で誘導される中心体増幅の新しいシグナル経路、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日 3日、パシフィコ横浜

虫明 正敏他、ポリ ADP-リボシル化の阻害が中心体数と染色体数へ及ぼす影響、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日 3日、パシフィコ横浜

Masanao Miwa 他、Effect of inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerases on centrosome amplification and chromosome number abnormality, 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research, Mar 11-13, 2009, DamYang Resort, Korea

貴田 亨他、アポトーシス誘導におけるポリ ADP-リボシル化反応の役割、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大

会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

幸得友美他、293T細胞におけるポリADP-リボシル化タンパク質の同定、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

黒田泰仁、他、PARGノックアウトショウジョウバエにおけるポリADP-リボース蓄積の発生に与える影響、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

山田 真生、他、DNA損傷による中心体増幅を起こす経路の特定、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

山田 夢衣他、ヒトデ初期発生過程におけるポリADP-リボシル化の役割、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

森田 寛之他、PARPのポリADP-リボシル化を受ける修飾部位の特定、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

⑳ 虫明正敏他、ポリ-ADPリボシル化の阻害と中心体、染色体との関係、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

㉑ 野殿弘人他、ポリ(ADP-リボース)分解酵素(PARG)ノックアウトショウジョウバエにおける蓄積ポリADPリボシル化タンパク質の単離、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

㉒ 坂巻 純一他、PARP-1による転写因子FOXO1の制御機構の解析、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポート

アイランド

24 田中浩司他、レトロウイルス感染におけるポリADP-リボシル化酵素(PARP)の関与について、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日 12日、神戸ポートアイランド

25 Masataka Tsuda 他、Without DNA damage, inhibition of polyADP-ribosylation causes centrosome amplification, 第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日 30日、名古屋国際会議場

26 Masanao Miwa 他、Inhibition of poly(ADP-ribosylation) induces chromosomal aneuploidy through abnormal centrosome amplification、PARP2008: 17th International Symposium on poly(ADP-ribosylation)、May 28-31, 2008, Tucson, Arizona, USA

27 Masataka Tsuda 他、Isolation of polyADP-ribosylated proteins with affinity chromatography using antibody against poly(ADP-ribose)、PARP2008: 17th International Symposium on poly(ADP-ribosylation)、May 28-31, 2008, Tucson, Arizona, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 正直 (MIWA MASANAO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：20012750