

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590350

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 acceptor proteins and their modification sites of polyADP-ribosylation and 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ポリADP-リボシル化の生物学的な意義は、DNA修復以外にはまだ不明な点が多い。特にin vivoにおけるポリADP-リボシル化のアクセプター蛋白質の同定から機能を調べることにした。この目的にポリ(ADP-リボース)の分解酵素のノックアウト・ショウジョウバエを用いた。この変異体は、温度条件により羽化できるが神経変性症状を示し神経疾患のモデルともいえる。ポリ(ADP-リボース)抗体のアフィニティーカラム、アルカリ処理、2次元電気泳動法と質量分析を組み合わせ、ポリADP-リボシル化のアクセプター蛋白質候補を検索し、alcohol dehydrogenaseを含む複数の蛋白質を同定した。

研究成果の概要(英文)：One of the biological functions of polyADP-ribosylation has been known to be involved in DNA base excision repair. However the other functions are still not known yet. To clarify the functions through identifying the in vivo acceptor proteins of polyADP-ribosylation that is mostly unknown, we used *Drosophila melanogaster* mutant that had deleted poly(ADP-ribose) degradation enzyme gene, (poly(ADP-ribose) glycohydrolase gene). This mutant *Drosophila* could eclose under elevated temperature and shows neurological disease. Thus this might serve as a model for human neurological diseases. Using affinity column of immobilized antibody against poly(ADP-ribose), alkaline treatment, 2D gel electrophoresis and mass spectrometry, we identified alcohol dehydrogenase and several other proteins as candidates of polyADP-ribosylation in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：翻訳後修飾 ポリADP-リボシル化 ショウジョウバエ変異体 アクセプタータンパク質

1. 研究開始当初の背景

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、転写など様々な細胞内機能に関与していると示唆されている。また近年、相同組み換えに必要な *BRCA2* の機能欠失乳がん細胞では、特別な抗がん剤を使用せずに、ポリ ADP-リボシル化の阻害剤単剤で細胞死が誘導されることが外国の研究者により報告され、ポリ ADP-リボシル化の分子機能は抗がん作用との関連も推定されてきた。

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、生体内におけるポリ ADP-リボシル化タンパク質とその修飾部位の決定が必須と考えられる。しかし *in vivo* においてポリ ADP-リボシル化を受けているタンパク質(アクセプタータンパク質、被修飾タンパク質)の同定は、今なお、下記の理由により困難を極めてい

その原因の第一として、放射性同位元素標識のリン酸は容易に細胞内に取り込まれ、目的とするアクセプタータンパク質の抗体があれば、それによって標識されたリン酸化タンパク質を同定することが可能であるのに反して、ポリ ADP-リボース合成の基質である NAD^+ は、細胞膜非透過性という難点を抱えていてこのような同定法が使用できない。さらに修飾残基のポリ ADP-リボースは、2 以上 300 あるいはそれ以上の多様な鎖長を持つため、修飾を受けたタンパク質の分子量は様々となり分子量を指標にした検出や精製が困難であることによる。

しかしながら、我々は、ショウジョウバエの系において、ポリ(ADP-リボース)の分解酵素(PARG)のノックアウト変異体を作成することに成功しているため、この変異体の中には *in vivo* においてポリ ADP-リボシル化されたタンパク質が生体内に蓄積している可能性がある。そこでこの変異体を多量に集めてタンパク質を抽出し、ポリ(ADP-リボース)に対する抗体を用いて精製し、ポリ(ADP-リボース)とアクセプタータンパク質の結合がエステル結合であることが多いことが、*in vitro* の知見により知られているので、これを加水分解することにより、目的タンパク質の同定が可能であると考えた。

2. 研究の目的

DNA 損傷修復、転写制御、細胞増殖と細胞死、分化などに関与するとされるポリ ADP-リボシル化の生理的役割は、生体内におけるアクセプタータンパク質の同定が必須であるにもかかわらず、基質 NAD^+ の細胞膜非透過性、迅速な代謝やポリ(ADP-リボース)の鎖長が種々あるため就職を受けたタンパク質の分子量が一定しないなどのため未だになされていない。我々の樹立したポリ(ADP-リボース)分解酵素の欠失変異体のショウジョウ

バエに蓄積するポリ ADP-リボシル化タンパク質を、ポリ(ADP-リボース)に対する特異抗体を固定したアフィニティーカラムにより分析可能な量まで大量に精製し、アルカリ処理によりポリ(ADP-リボース)とアクセプタータンパク質の結合をきることにより、2次元電気泳動により新たに出現するタンパク質のスポットを切り出して質量分析装置により同定する。またその修飾部位を同定する。修飾部位に変異を入れたタンパク質を発現させ、細胞さらに個体における機能変化を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) PARG 欠失ショウジョウバエ変異体を大量に集め、タンパク質を抽出し、予め調整したポリ(ADP-リボース)に対するモノクローン抗体(10H)アフィニティーカラムのカラムに吸着した画分を集め、これをポリ ADP-リボシル化タンパク質粗画分とする。この画分をアルカリ処理(1 N NaOH, 15 min, 4) 処理によりポリ(ADP-リボース)とタンパク質とのエステル結合を加水分解する。
- (2) 2次元電気泳動後のゲルを銀染色によるタンパク質染色する。アルカリ処理なしとアルカリ処理ありの2種類のサンプルを比較し、アルカリ処理により新たに出現したスポットを見出し、質量分析装置によりアクセプタータンパク質を同定する。
- (3) 同定されたタンパク質を大腸菌で発現させ、*in vitro* でもポリ ADP-リボシル化反応を行ってポリ ADP-リボシル化が起きるかどうかを確認する。
- (4) 哺乳動物細胞の相同タンパク質の抗体を得て、哺乳動物細胞内でもポリ ADP-リボシル化を受けているかを調べる。
- (5) 代表的なアクセプタータンパク質について修飾部位を同定する。修飾部位のアミノ酸に変異を入れたタンパク質を発現させて細胞機能に与える影響を調べる。

4. 研究成果

- (1) ショウジョウバエのポリ ADP-リボシル化の分解酵素遺伝子欠失変異体 30,000 匹を用いて、ポリ(ADP-リボース)抗体のアフィニティーカラムを用いて精製した。
- (2) アフィニティーカラムからの溶出液を、2次元電気泳動法にて分離し、アルカリ処理後に新たに現れたタンパク質のスポットを質量分析計により解析した。その結果、ポリ ADP-リボシル化のアクセプタータンパク質候補として、アルコール脱水素酵素(ADH)の他、A キナーゼ・アンカータンパク質 200 アイソフォーム

D, グリコーゲンフォスホリラーゼ、グリセロリン酸化酵素 1、エノラーゼ、脂体タンパク質 1、トロポニン T、アクチン-87E、リンゴ酸脱水素酵素を同定できた。

- (3) 量的に多く認められたタンパク質として同定されてきたショウジョウバエの ADH について調べた。大腸菌内でリコンビナントタンパク質として発現させたショウジョウバエの ADH を精製した。関西医科大学の田中 正和博士との共同研究により放射性 NAD⁺を用いて試験管内でヒトポリ (ADP-リボ-ス) 合成酵素 1 (hPARP1) を用いて試験管内でポリ ADP-リボシル化反応を行った結果、現在の条件ではポリ ADP-リボシル化が検出できないという結果を得た。これは、用いた酵素がヒト由来の PARP1 であったことによる可能性と、生体内においては、各種の補助タンパク質が必要であるなどと *in vitro* における反応条件とは異なるためであるかもしれないとの可能性があり、検証を行う必要がある。
- (4) 関西医科大学の田中 正和博士との放射性同位元素の NAD⁺を用いた共同研究を行った。その結果、ヒト ADH に対して、ヒト PARP1 を用いた試験管内でのポリ ADP-リボシル化反応では、短いポリ (ADP-リボ-ス) を結合した ADH のバンドが検出された。
- (5) 予想以上のポリ ADP-リボシル化タンパク質候補が同定されたので、まずは、そのポリ ADP-リボシル化が神経細胞死に結びつくかどうかについて調べることが優先されると考えている。その後、ポリ ADP-リボシル化部位の同定を行う必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Poltronieri, P., Miwa, M., PARP proteins, NAD, epigenetics, and antioxidative response in abiotic stress. In: Applied plant genomics and biotechnology, Eds. Palmiro Poltronieri and Yiguo Hong (Invited article), Woodhead Publishing, Elsevier, Cambridge, UK. In press.
- (2) Shitara, Y., Tonohara, Y., Goto, T., Yamada, Y., Miki, T., Makino, H., Miwa, M., Komiya, T.: Mitochondrial P5, a member of protein disulphide isomerase family, suppresses oxidative stress-induced cell death. J Biochem. 査読有、2012 Jul; 152(1):73-85. doi:10.1093/jb/mvs034.
- (3) Tsuda, M., Tanaka, M., Mushiake, M.,

Takahashi, J., Tanaka, K., Watase, J., Fujisawa, J.-I., Miwa, M.: A novel pathway of centrosome amplification that does not require DNA lesions. Cancer Sci. 査読有、2012 Feb; 103(2):191-196. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02152.x. Epub 2011 Dec 15.

- (4) Sugihara, E., Shimizu, T., Kojima, K., Onishi, N., Kai, K., Ishizawa, J., Nagata, K., Hashimoto, N., Honda, H., Kanno, M., Miwa, M., Okada, S., Andreeff, M., Saya, H.: Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. Oncogene. 査読有、2012 Jun; 31(23):2849-2861. 2011 Oct 10. doi:10.1038/onc.2011.462. [Epub ahead of print]
- (5) Nodono, H., Hamada, A., Kuroda, Y., Kamemura, K., Hasegawa, M., Komiya, T., Kondo, C., Che, F. S., Hanai, S. and Miwa, M.: Approaches to separate and identify polyADP-ribosylated proteins using PARG knockout *Drosophila*. Methods Mol Biol. 査読有、2011; 780:377-390. doi:10.1007/978-1-61779-270-0_22.

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) Tanaka, M., Ida, C., Takahashi, J., Eguchi, T., Ohta, N., Yamashita, S., Tsukada, M., Mushiake, M., Fujii, T., Ikegami, S., Nishi, Y., Fujisawa, J., Miwa, M. Regulation of *in vivo* level of polyADP-ribosylation, cell growth and centrosome amplification. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on The PARP Family & Friends: Gene regulation & beyond, April 9-12, 2014, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) 井田 智恵利、緒方 進、塚田 匡輝、田中 正和、三輪 正直、ヒト白血病細胞 K562 の細胞分化誘導過程における細胞内 NAD 量およびポリ (ADP-リボ-ス) 量の変動、P2-0477 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日 6 日、神戸国際展示場
- (3) 香山 賢一、江口 貴之、森田 寛之、亀村 和生、西 義介、三輪 正直、白井 剛、組み替え human poly(ADP-ribose) polymerase 1 の精製と予備的構造解析第 51 回日本生物物理

学会年会 2013 年 10 月 28 日 30 日、国立京都国際会館

- (4) Tsukada, M., Eguchi, T., Yamashita, S., Takahashi, J., Tanaka, M., Fujii, T., Ikegami, S., Miwa, M. Detection of DNA strand Breaks with ELISA for poly(ADP-ribose) PARP2013 19th International Conference on ADP-ribosylation September 6-9, 2013, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Quebec-Pavillon CHUL, Quebec city, Canada
- (5) Tanaka, M., Takahashi, J., Eguchi, T., Tsukada, M., Mushiake, M., Fujisawa, J-I., Miwa, M. Effect of inhibition of polyADP-ribosylation on cell proliferation in CHO-K1 cells, (Short talk #22) PARP2013 19th International Conference on ADP-ribosylation September 6-9, 2013, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Quebec-Pavillon CHUL, Quebec city, Canada
- (6) 山下 幸子、江口 貴之、藤井 貴弘、亀村 和生、小宮 徹、蔡 晃植、田中 正和、藤澤 順一、西 義介、三輪 正直、ポリ ADP-リボ-ス分解酵素 (PARG) ノックアウトシヨジヨウバエから同定された alcohol dehydrogenase (ADH) のポリ ADP-リボシル化の検証、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- (7) 香山 賢一、江口 貴之、森田 寛之、亀村 和生、西 義介、三輪 正直、白井 剛、組み替え human poly(ADP-ribose) polymerase 1 の精製とその立体構造解析、第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- (8) 江口 貴之、高橋 淳、貴田 亨、藤井 貴弘、池上 晋、三輪 正直、生理的条件下における DNA 損傷の程度を測るためのポリ (ADP-リボ-ス) 量の測定第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- (9) 太田 成美、江口 貴之、高橋 淳、田中 正和、藤井 貴弘、池上 晋、三輪 正直、種々の条件下におけるヒト細胞のポリ (ADP-リボ-ス) 量の変化、2P-0399(2ST5-058) 第 3 5 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- (10) 江口 貴之、三輪 正直他、ELISA 法を用いた細胞内ポリ (ADP-リボ-ス) の定量、第 3 1 回分子病理学会 (恵那シンポジウム) 2012 年 07 月 21 日-22 日、恵那峡グランドホテル
- (11) 山下 幸子、三輪 正直他、ポリ (ADP-リボ-ス) 分解酵素 (PARG) ノックアウトシヨジヨウバエに蓄積するタンパク質のポリ ADP-リボシル化の検証、第 31 回分子病理学会 (恵那シンポジウム) 2012 年 07 月 21 日-22 日、恵那峡グランドホテル
- (12) 三輪 正直、田中正和 DNA 損傷を必要としない新しい中心体増幅経路、第 3 回中心体研究会、2011 年 12 月 17 日 (東京理科大学、東京)
- (13) Koyama, K., Eguchi, T., Morita, H., Sakai, T., Kamemura, K., Nishi, Y., Miwa, M. Preparation of quantities of recombinant human poly(ADP-ribose) polymerase 1 for structural analysis, 2P-0310 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 16 日、パシフィコ横浜
- (14) 寺田 佳優、虫明 正敏、高橋 淳、藤井 貴弘、田中 正和、三輪 正直、ポリ ADP-リボシル化の阻害と中心体増幅の関係、3P-0487 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日 16 日、パシフィコ横浜
- (15) Eguchi, T., Takahashi, J., Kida, T., Fujii, T., Ikegami, S., Miwa, M. Change of the amount of poly(ADP-ribose) in cells under physiological Condition and DNA damage, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日 16 日、パシフィコ横浜
- (16) Takahashi, J., Mushiake, M., Tsuda, M., Tanaka, M., Miwa, M. Effect of inhibition of polyADP-ribosylation on cell proliferation, 4P-0430 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 16 日、パシフィコ横浜
- (17) Yamashita, S., Eguchi, T., Nodono, H., Hamada, A., Kuroda, Y., Kamemura, K., Komiya, T., Hanai, S., Miwa, M. Verification of an acceptor protein for polyADP-ribosylation from poly(ADP-ribose) glycohydrolase-knockout *Drosophila melanogaster*, 第 34 回日本分子生物学会

年会, 2011年12月13日 16日、パシ
フィコ横浜

(18) 三輪 正直、虫明 正敏、高橋 淳、江
口 貴之、家村 顕白、大杉 美穂、藤
沢 順一、田中 正和、Effect of
inhibition of polyADP-ribosylation on
centrosome and chromosome (English
Oral Sessions) E1-3 Oct. 3 (Mon.),
第70回日本癌学会学術総会、2011年10
月3日 5日、名古屋会議センター

(19) 三輪 正直、野殿 弘人、浜田 彰子、黒
田 泰仁、亀村 和生、長谷川 慎、小
宮 徹、近藤 真千子、藤井 貴弘、蔡
晃植、花井 修二、ポリ(ADP-リボース)
分解酵素遺伝子欠失変異による神経細
胞死を呈するショウジョウバエのポリ
ADP-リボシル化タンパク質の同定法に
ついて、シンポジウム 1S4a-5、第84回
日本生化学会大会、2011年9月21日-24
日、国立京都国際会館

(20) 坂巻 純一、大徳 浩照、吉用 賢治、
三輪 正直、深水 昭吉、
Poly(ADP-ribose) polymerase-1 による
転写因子 FOXO1 の機能調節と細胞増殖の
制御、シンポジウム 1S4a-6、第84回日
本生化学会大会、2011年9月21日-24
日、国立京都国際会館

(21) 設楽 優、後藤 貴宏、三輪 正直、
小宮 徹、ミトコンドリア局在型 P5 安定
発現細胞における H2O2 誘導性細胞死と
エネルギー代謝、第84回日本生化学会
大会、2011年9月21日-24日、国立京
都国際会館

(22) Miwa, M., Eguchi, T., Nodono, H.,
Hamada, A., Yamashita, S., Fujii, T.,
Kamemura, K., Komiya, T., Hasegawa, M.,
Che, F-S., Ikegami, S. General method
to quantify poly(ADP-ribose) and to
isolate polyADP-ribosylated proteins
in vivo、FASEB Summer Research
Conference: NAD Metabolism &
Signaling, September 4-9, 2011 Lucca,
Italy

(23) 田中正和、津田雅貴、高橋淳、塚田匡輝、
虫明正敏、山田真生、藤澤順一、三輪正
直、DNA 損傷を起こさない化合物による
中心体増幅経路の存在、第58回日本生
化学会近畿支部例会、2011年5月21日、
関西医科大学、大阪

(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

(2) 研究分担者
()
研究者番号:

(3) 連携研究者
()
研究者番号: