

## 論文

ポリ ADP-リボシル化修飾反応に関わるタンパク質の細胞周期過程における  
発現および細胞内局在パターンの解析

<sup>1</sup>間下 雅士    <sup>2</sup>田中 萌乃  
<sup>3</sup>齋藤 瑞穂    <sup>4</sup>藤井 健志

<sup>1</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特任助教

<sup>2</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・2019年度卒業

<sup>3</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・2020年度卒業

<sup>4</sup>同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授

**Analysis of expression and subcellular localization patterns of  
proteins involved in poly(ADP-ribosylation)  
modification during the cell cycle**

<sup>1</sup>MASHIMO Masato    <sup>2</sup>TANAKA Moeno  
<sup>3</sup>SAITO Mizuho    <sup>4</sup>FUJII Takeshi

<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Assistant professor

<sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2019

<sup>3</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2020

<sup>4</sup>Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor

## 【要旨】

ポリ ADP-リボシル化修飾反応は、タンパク質の翻訳後修飾反応のひとつであり、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) が産生する poly(ADP-ribose) (PAR) が標的タンパク質に共有もしくは非共有的に結合する。修飾を受けたタンパク質は、活性および局在が変化し、生理的役割が変化する。PARP1は、核に局在し、ヒストンをはじめとする核タンパク質をポリ ADP-リボシル化修飾する。一方、poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) は、標的タンパク質上に形成された PAR を加水分解することで、ポリ ADP-リボシル化修飾反応を終結する。PARP1および PARG によって形成されるポリ ADP-リボシル化修飾反応のサイクルは、DNA の修復や染色体の安定性に重要な働きを持つ。しかしながら、細胞分裂期におけるこれらのタンパク質の発現および細胞内局在については明らかになっていない。そこで、本研究では、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞における PARP1および PARG、PAR の細胞周期による細胞内局在および発現量の変化について検討した。

HeLa 細胞において PARP1および PARG は細胞分裂期に核から細胞質へ移行するとともに発現量が減少した。それに伴い、核における PAR の発現が減少した。加えて、細胞分裂期における PARP1および PARG の減少は、転写が抑制されたことが起因となることを明らかにした。以上の結果より、細胞分裂期において PARP1の発現および核での局在を減少させることで、核におけるポリ ADP-リボシル化修飾反応を抑制し染色体を不安定化させ細胞分裂を促進していることが示唆された。

### Abstract

Poly(ADP-ribosyl)ation modification is a post-translational modification of proteins in which poly(ADP-ribose) (PAR) produced by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) binds covalently or non-covalently to target proteins. The modified protein changes its activity and localization, which exerts its physiological function. PARP1 localizes to the nucleus and modifies nuclear proteins such as histones by poly(ADP-ribosyl)ation. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) terminates the poly(ADP-ribosyl)ation modification reaction by hydrolyzing PAR formed on the target protein. The poly(ADP-ribosyl)ation-modification cycle formed by PARP1 and PARG is important for DNA repair and chromosome stability. However, the expression and subcellular localization of these proteins during mitosis are not well understood. In this study, we investigated the subcellular localization and expression of PARP1, PARG and PAR in human cervical carcinoma cell line, HeLa cells, during the cell cycle.

In HeLa cells, the expression levels of PARP1 and PARG decreased with the translocation from the nucleus to the cytoplasm during cell division. Accordingly, the expression of PAR in the nucleus was reduced. The decrease in PARP1 and PARG during mitosis was attributed to repressed transcription. These results indicate that decreasing PARP1 expression and localization in the nucleus during mitosis leads to the suppression of poly(ADP-ribosyl)ation modification reactions in the nucleus, which decreases chromosome stability and promotes cell division.

## 1. 緒言

ADP-リボシル化修飾反応は、タンパク質の可逆的な翻訳後修飾のひとつであり、NAD<sup>+</sup>のADP-ribose基が標的タンパク質のアミノ酸残基に付加することでタンパク質の活性および局在を調節する<sup>1-3)</sup>。この修飾は、一個のADP-リボースが付加するモノADP-リボシル化修飾と複数のADP-リボースが付加するポリADP-リボシル化修飾に分類される。

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP1)は、核内でクロマチンに結合するタンパク質で、酵母を除くほとんどの真核生物に存在する<sup>4)</sup>。PARP1の触媒ドメインとの配列の類似性に基づいて、18種類のPARP酵素が同定されている<sup>1,4)</sup>。この18種類のPARPファミリーの中で、PARP1、PARP2、PARP3、PARP4、Tankyrase1 (PARP5A)、Tankyrase2 (PARP5B)は、ポリADP-リボシル化修飾反応を触媒し、PARP10、PARP12、PARP14、PARP15、PARP16はモノADP-リボシル化修飾反応を触媒する。PARP9とPARP13は、NAD<sup>+</sup>結合残基がないため、酵素的には不活性である。他のPARPアイソフォームはモノ

ADP-リボシル転移酵素であると予測されている。

PARP1は、酸化ストレス、アルキル化剤や電離放射線などによってDNA損傷が誘発される条件下で、細胞の生存に重要な役割を果たしている<sup>1,2)</sup>。PARP1の基礎活性は、DNAの一本鎖および二本鎖切断に反応して500倍に増加する。これは、PARP1のジンクフィンガーDNA結合ドメインを介してDNA切断部位に結合し、核内タンパク質のグルタミン酸、アスパラギン酸、リジン残基へのポリADP-リボシル化修飾反応を開始するためである。PARP1欠損細胞で得られた結果によると、PARの生成の90%以上は、PARP1の活性によるものであると推定されている。DNA傷害時、PARP1によるポリADP-リボシル化修飾反応は、DNA修復機構複合体を形成するXRCC1やDNAリガーゼIII、DNA依存性プロテインキナーゼのKu70サブユニットなどの相互作用を促進することでこれらのタンパク質をDNA損傷部位に集積させる<sup>5)</sup>。その結果、DNAの修復が行われる。また、PARP1は、ヒストンをポリADP-リボシル化修飾しクロマチンの構造を変化させることで転写調節を行う。

PARP1によるポリADP-リボシル化修飾反応はいくつ

かの重要な生物学的プロセスに関与しているため、空間的にも時間的にも制御する必要がある。実際、ポリ ADP-リボシル化修飾反応は、poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)や terminal ADP-ribose protein glycohydrolase 1 (TARG1)、ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 (ARH3) など、複数の ADP-リボシル化加水分解酵素によって制御されている<sup>6-9)</sup>。PARG は、PAR 鎖の O-グリコシド結合の加水分解を触媒することにより、ポリ ADP-リボシル化修飾反応の終結を担う主要な酵素である。PARG 遺伝子を欠損すると核内に PAR が過剰に蓄積され、それに伴って細胞死が誘導されるため、胚の致死が生じる<sup>10)</sup>。PARG は、PARG 遺伝子の選択的スプライシングにより、核に局在するアイソフォーム (111kDa)、細胞質に局在する 3 つのアイソフォーム (102kDa, 99kDa, 60kDa)、ミトコンドリアに局在するアイソフォーム (55kDa) など分子量や活性、細胞内局在が異なる複数の PARG アイソフォームを生じる<sup>11)</sup>。

PARP1 および PARG によって形成されるポリ ADP-リボシル化修飾反応のサイクルは、DNA の修復や染色体の安定性に重要な働きを持つ。しかしながら、細胞分裂期におけるこれらのタンパク質の発現および細胞内局在については明らかになっていない。そこで、本研究では、子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞における PARP1 および PARG の細胞周期による細胞内局在および発現量の変化について検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 試薬

Mouse monoclonal anti-PARP1 antibody (C-2-10)、mouse monoclonal anti-PAR antibody (10H) は Enzo Life Sciences、rabbit polyclonal anti-PARG antibody は Cell Signaling Technology、mouse monoclonal anti-PARG antibody (D8B10) は Merck Milipore、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse は Thermo Scientific で購入した。

### 2.2. 細胞培養

HeLa 細胞は、10% FBS、100units/ml ペニシリン、100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞周期を同期するために、無血清培地で 24 時間培養し、再び 10% FBS を含む DMEM

で培養した。

### 2.3. ウェスタンブロット

HeLa 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) を 6-well plate に 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下 24 時間培養後、2% SDS を含む 50mM 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 (Thermo fisher scientific) 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 (Nacalai tesque) で 37°C、1 時間ブロッキングした後に 1 次抗体を 4°C、一晩反応させた。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、Las-3000 mini (Fuji film) で化学発光を検出した。

### 2.4. 免疫染色

HeLa 細胞 ( $3 \times 10^5$  cells) を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) (4°C、20分) で固定し、10% FBS、1% BSA、0.5% Triton X-100 を含む PBS で透過およびブロッキング処理を行った。1 次抗体を 4°C、一晩反応させ、PBS で洗浄後 2 次抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse (1:500)) を室温、1 時間反応させた。核は、600nM DAPI で染色した。画像は、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 700 Meta; Carl Zeiss) で取得した。

### 2.5. Real-time PCR

RNA はセパゾール RNA II Super (Takara Bio) で抽出後、S1000サーマルサイクラー (Bio-rad) で Prime Script RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。SYBR Premix Ex Taq II、およびプライマーを用いて Thermal Cycler Dice (Takara Bio) で PCR 産物を解析した。

### 2.6. Flow cytometry

細胞を PBS で洗浄し、4% PFA で固定した。続いて propidium iodide (PI) (50mg/ml) を 4°C、30 分間添加した。その後、RNase (0.25mg/mL) を 37°C、30 分間添加した。40 $\mu$ m ナイロンメッシュに細胞を通した後、フローサイトメトリー (Cytoflex, Beckman Coulter) で測定した。

## 2.7. 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。

## 3. 結果

### 3.1. ポリ ADP-リボシル化修飾反応に関わるタンパク質の抗体の特異性について

細胞分裂期におけるポリ ADP-リボシル化修飾反応の主要なタンパク質 (PARP1 および PARG) の細胞内局在および発現を免疫染色法で検出した。まず、使用する抗体の特異性をウェスタンブロット法によって確かめた (Fig. 1)。HeLa 細胞において抗 PARP1 抗体は、110kDa 付近に PARP1 に相当する単一バンドを検出した。PARG は、細胞内局在および分子量の異なる複数のアイソフォームが存在するため、2種類の抗体を使用した。抗 PARG 抗体 # 1 は、核に局在するアイソフォーム (111kDa) を検出した。抗 PARG 抗体 # 2 は、核のアイソフォームに加え、細胞質に局在する 3つのアイソフォーム (102kDa や 99kDa、60kDa)、ミトコンドリアに局在する 2つのアイソフォーム (55kDa) を検出した。これらの結果から、使用する抗体は目的タンパク質を特異的に検出することが示唆された。PARG の複数のアイソフォームは、単一遺伝子のスプライシングによって合成される。抗 PARG 抗体 # 2 の結

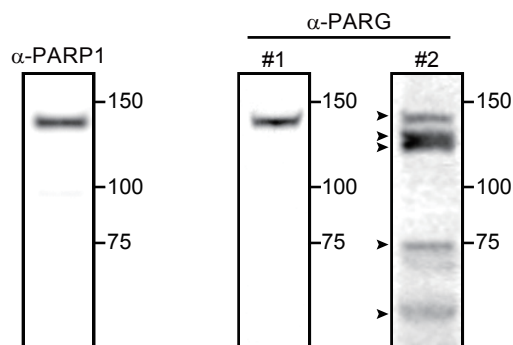


Fig. 1 抗 PARP1 および抗 PARG 抗体の特異性の検討

HeLa 細胞に発現する PARP1 および PARG アイソフォームをウェスタンブロットによって検出した。抗 PARP1 抗体は、110kDa PARP1 を認識した。抗 PARG 抗体 # 1 は、核に局在する 111kDa アイソフォームのみを認識し、抗 PARG 抗体 # 2 は、核のアイソフォームに加え、細胞質に局在する 102kDa や 99kDa、60kDa アイソフォーム、ミトコンドリアに局在する 55kDa アイソフォームを検出した。

果から、細胞質に局在する 102kDa や 99kDa アイソフォームが主に生合成されることが示唆された。

### 3.2. 細胞周期における PARP1 の細胞内局在および発現パターンの変化について

PARP1 は、間期において核に局在した (Fig. 2 A)。細胞分裂期を迎えると、PARP1 は、細胞分裂中の prophase から anaphase にかけて細胞質にも局在するようになり telophase で再び核内に局在するようになった。加えて、PARP1 は、細胞分裂期において発現が顕著に減少し、anaphase で最も減少した。一方、PARP1 は、細胞分裂期に細胞質に局在変化した PARP1 の発現に変化はなかった。

PAR の 90% は、PARP1 によって合成される。つづいて、細胞周期における PAR の局在および発現を確認した (Fig. 2 A)。PAR は間期において核および細胞質に様に分布していた。細胞分裂期において PAR は、核内の発現が減少した。PAR の核内の発現は、metaphase で最も減少し、anaphase から再び増加した。一方、細胞質における PAR の発現は細胞分裂期に変化がなかった。以上の結果から、PARP1 は、細胞分裂期において核において発現が減少するとともに細胞質に移行し、それに伴い核における PAR の発現が減少することが明らかとなった。

### 3.3. 細胞周期における PARG の細胞内局在および発現パターンの変化について

抗 PARG 抗体 # 1 を用いて核に局在する 111kDa PARG の細胞内局在および発現量を調べた (Fig. 2 B)。111kDa PARG は、間期において核に局在した。111kDa PARG は、細胞分裂期において細胞質にも局在するようになった。加えて、111kDa PARG は、間期に比べ分裂期において発現が減少し、metaphase で最も発現量が低下した。また、細胞質において 111kDa PARG は、anaphase から発現が増加し telophase で再び核内に局在した。

抗 PARG 抗体 # 2 を用いて核および細胞質に局在している PARG の発現を調べた (Fig. 2 B)。PARG は、間期において細胞質よりも核に局在していた。抗 PARG 抗体 # 1 の結果と同様に、細胞分裂期に入った細胞では、核における PARG の発現が減少した。一方、細胞質に局在する PARG の発現は変化しなかった。これらの結果から、核に局在する PARG は、細胞分裂期において発現が減少するとともに細胞質に移行するが、細胞質に局在する PARG の発現に変化はないことが示唆された。

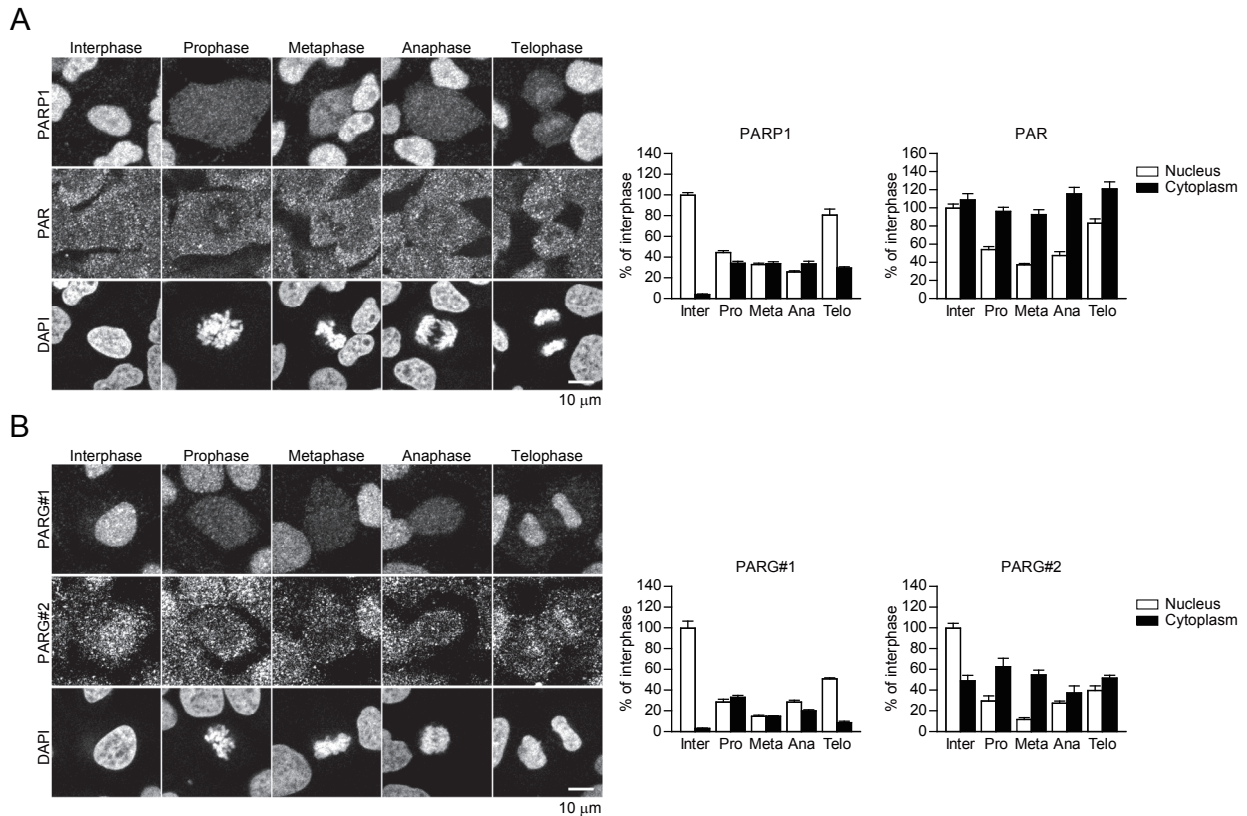


Fig. 2 細胞周期におけるポリ ADP-リボシル化修飾反応にかかわるタンパク質の細胞内局在および発現

- (A) 細胞周期における PARP1 および PAR の細胞内局在に抗 PARP1 および抗 PAR 抗体を用いて免疫染色を行った。DAPI で染色体を染色することで細胞分裂期を特定した。右のグラフは、細胞周期における核および細胞質の PARP1 および PAR の発現量を示す。PARP1 および PAR の間期における核内の発現量を 1 として変化量を示す。means  $\pm$  S.E.M. (n = 7)
- (B) 細胞周期における PARG の細胞内局在に抗 PARG # 1 抗体および抗 PARG # 2 抗体を用いて免疫染色を行った。DAPI で染色体を染色することで細胞分裂期を特定した。右のグラフは、細胞周期における核および細胞質の PARG の発現量を示す。PARG の間期における核内の発現量を 1 として変化量を示す。means  $\pm$  S.E.M. (n = 7)

### 3.4. 細胞周期におけるポリ ADP-リボシル化修飾反応に関わるタンパク質の転写レベルの変化について

これまでの結果から、ポリ ADP-リボシル化修飾反応に関わる PARP1 および PARG の発現は、細胞分裂期に合わせて減少することが明らかとなったが、これが転写の抑制によることを調べた。HeLa 細胞を無血清培地で 24 時間培養することで細胞周期を間期に停止させた (Fig. 3 A)。その後、血清培地で培養することで細胞周期を開始させた。Propidium iodide (PI) で DNA 量を測定することで、細胞周期のどのフェーズに細胞が多く存在するかを調べた。血清培地に置換直後、多くの細胞が、間期に存在していたが、培養時間が増加することで染色体数が増加し、細胞増殖が促進することが示唆された。20 時間後、HeLa 細胞の約 50% が細胞分裂期に入ることが明らかとなった。間期に存在する細胞に比べ細胞分裂期に入る細胞が多くなる 12 時

間および 20 時間後、PARP1 および PARG の mRNA レベルが減少した (Fig. 3 B)。これらの結果からポリ ADP-リボシル化修飾反応に関わるタンパク質の発現は細胞分裂期に抑制されることが示唆された。

## 4. 考察

ポリ ADP-リボシル化修飾反応に関わる PARP1 および PARG の発現は、細胞分裂期に合わせて転写レベルで抑制されることが明らかとなった。今後、これらの遺伝子発現がどのような因子によって制御されているかを検討する予定である。また、核に局在する PARP1 や PARG は、細胞分裂期に細胞質に移行することが明らかとなった。細胞分裂期において核膜は崩壊および消失する。これが PARP1 や PARG が細胞質に移行する主たる要因だと考えられる。しかしながら、PARP1 や PARG は、核移行シグ

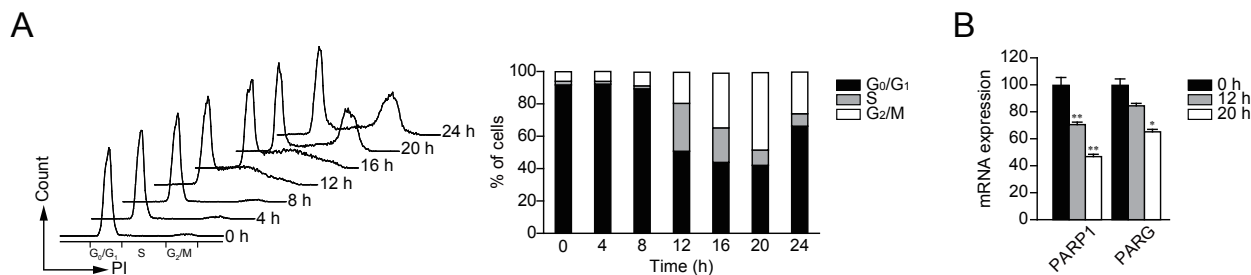


Fig. 3 細胞周期における PARP1 および PARG の転写レベルの変化

- (A) 細胞周期解析無血清培地によって細胞周期を同期後、FBS を加えることで細胞周期を開始した。PI にて染色体を染色し、フローサイトメトリで細胞周期を解析した。(n=7)
- (B) 細胞周期における PARP1 および PARG の転写レベルの測定細胞同期直後 (0 時間)、細胞周期開始後 (12 および 20 時間)、細胞を回収し PARP1 および PARG の mRNA を real-time PCR で測定した。GAPDH をローディングコントロールとした。means  $\pm$  S.E.M. (n=3) \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. 0h (one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test)

ナルおよび核局在シグナル両方を持つ<sup>1,11,12)</sup>。また、これらのタンパク質の多くは、染色体と結合していることから<sup>2,11)</sup>、核と細胞質間の移行には能動的な機構が存在していることが想定される。この後、PARP1 および PARG の核と細胞質間の移行の分子メカニズムに着目した研究を行っていく予定である。

細胞分裂期にあわせて核における PARP1 の局在が減少するとともに細胞質に移行することで核における PAR のレベルが減少することを明らかにした。PARP1 による核タンパク質のポリ ADP-リボシル化修飾反応は、DNA 修復、転写および染色体安定性に寄与する。これまでの結果をまとめると、PARP1 の発現および核での局在を減少させることで、染色体の安定性を低下させ、細胞分裂を促進させている可能性が考えられる。

## 5. 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (21K06539) の助成を受けたものである。著者らについて、何ら開示すべき利益相反はない。

## 6. References

- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG: Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal*, 342 (Pt 2), 249-268 (1999).
- Gupte R, Liu Z, Kraus WL: PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev*, 31, 101-126 (2017).
- 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*, 17, 633-640 (2016).
- Ame JC, Spelshauer C, de Murcia G: The PARP superfamily. *Bioessays*, 26, 882-893 (2004).
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G: Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 517-528 (2006).
- Mashimo M, Kato J, Moss J: Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases. *DNA repair*, 23, 88-94 (2014).
- Verheugd P, Butepage M, Eckerl L, Luscher B: Players in ADP-ribosylation: Readers and Erasers. *Curr Protein Pept Sci*, 17, 654-667 (2016).
- Mashimo M, Kato J, Moss J: ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly(ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 18964-18969 (2013).
- Sharifi R, Morra R, Appel CD, Tallis M, Chioza B, Jankevicius G, Simpson MA, Matic I, Ozkan E, Golia B, Schellenberg MJ, Weston R, Williams JG, Rossi MN, Galehdari H, Krahn J, Wan A, Trembath RC, Crosby AH, Ahel D, Hay R, Ladurner AG, Timinszky G, Williams RS, Ahel I: Deficiency of terminal ADP-ribose protein

- 
- glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *EMBO J*, **32**, 1225-1237 (2013).
- 10) Koh DW, Lawler AM, Poitras MF, Sasaki M, Wattler S, Nehls MC, Stoger T, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM: Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17699-17704 (2004).
- 11) Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Coyle DL, Jacobson EL, Jacobson MK: Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res*, **297**, 521-532 (2004).
- 12) Meyer RG, Meyer-Ficca ML, Jacobson EL, Jacobson MK: Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) gene and the common promoter sequence it shares with inner mitochondrial membrane translocase 23 (TIM23). *Gene*, **314**, 181-190 (2003).

