

博士論文

全長 human poly(ADP-ribose) polymerase 1
の電子顕微鏡単粒子解析

2019年3月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

氏 名 香山 賢一

目次

要約	-----	3
緒言	-----	4
材料と方法	-----	8
結果	-----	18
考察	-----	29
謝辞	-----	32
参考文献	-----	33

要約

ポリ ADP-リボシル化反応は DNA の塩基除去修復をはじめとしたゲノム安定性や転写調節など様々な生理的機能に関与するタンパク質翻訳後修飾であり、細胞内では主に poly(ADP-ribose) ポリメラーゼ (PARP)ファミリーによって触媒される。近年 PARP 阻害剤は単剤で、*BRCA* がん抑制遺伝子変異をもつ乳がん、卵巣がんに効果を発揮する抗がん剤として期待されている。しかし、ヒトの主要な PARP である h-PARP1 の全体構造は未解明であり、この解明は h-PARP1 特異的な抗がん剤の開発に重要である。我々は大腸菌発現系を用いて、h-PARP1 の大量発現と精製を行い、電子顕微鏡単粒子解析によって全長構造の解析を行った。その結果、h-PARP1 が二量体を形成している事を示唆するリング状のサブユニットが2つ2回対称で結合した3次元再構成像が確認された。h-PARP1 が二量体を形成することは実験的に示唆されていたが、本研究により初めて構造生物学的な根拠が得られた。

キーワード

ポリ ADP-リボシル化反応、PARP1、電子顕微鏡単粒子解析、構造解析、EMAN2、二量体

緒言

ポリ ADP-リボシル化反応はゲノム安定性や転写調節を含む様々な生理的機能に関与するタンパク質の翻訳後修飾である[1]。ポリ ADP-リボシル化反応は、 NAD^+ を基質としてニコチンアミドを遊離するとともに、ADP-ribose 残基をタンパク質に共有結合させ、引き続いて ADP-ribose 残基同士を重合させ直鎖状のポリマーを合成させるとともに、分岐構造も生ずる酵素反応である (Fig. 1) [2,3]。

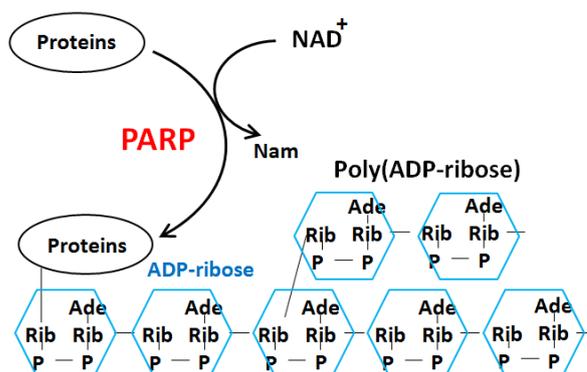


Fig. 1. PARP によるポリ ADP-リボシル化反応

PARP は翻訳後修飾の一つであるポリ ADP-リボシル化反応を触媒する。この反応は標的タンパク質に NAD^+ を基質として ADP-ribose の付加を行う。また PARP は ADP-ribose の重合により、直鎖または分岐構造を持った Poly ADP-ribose 鎖を形成する反応も行う。

細胞内でポリ ADP-リボシル化は主に poly(ADP-ribose) ポリメラーゼ (PARP)ファミリーに属する酵素によって触媒される。例えばヒトゲノムには 17 種の PARP ファミリーの遺伝子が存在する[4]。ポリ ADP-リボシル化の機能としては、塩基除去修復、DNA 複製、転写、クロマチン構造、姉妹染色分体交換、中心体数制御、テロメア制御、細胞シグナル伝達、細胞増殖、発がん、神経変性、免疫防御、虚血再還流傷害、細胞死など多岐にわたっている [5, 6]。PARP ファミリーの一つ human PARP1 (h-PARP1)は、細胞内でも最も多くまた良く研究された分子であり、DNA の塩基除去修復の開始過程に深く関わっていることが知られている[7]。

h-PARP1 は DNA 上のニックを認識し、ニックの部分に結合して高度に活性化され[8-10]、h-PARP1 を含む種々のアクセプタータンパク質にポリ ADP-リボシル化を行う[11]。この翻訳後修飾で作られたポリ (ADP-リボース)[poly(ADP-ribose)] に DNA 修復因子である XRCC1、DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼがリクルートされ、塩基除去修復等の DNA 修復が開始される (Fig. 2) [12, 13]。

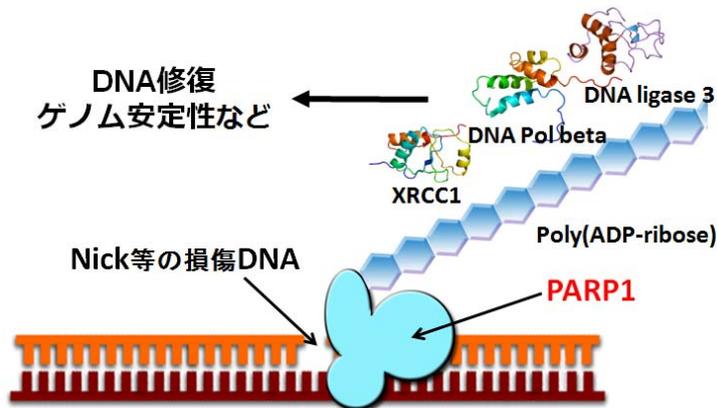


Fig. 2. ポリ ADP-リボシル化による DNA 修復

ポリ ADP-リボシル化反応は、DNA 修復に関与している。PARP1 は DNA1 本鎖切断である nicked dsDNA 等の損傷 DNA を認識し、結合して活性化され、PARP1 自身をアクセプターとして poly(ADP-ribose)を合成する。この poly(ADP-ribose)鎖に DNA ポリメラーゼ beta、DNA リガーゼ 3、XRCC1 等の DNA 修復因子がリクルートされることによって、DNA 修復をはじめとしたゲノム安定性に関わる様々な細胞機能が発現することが示されている。

この反応を阻害する PARP 阻害剤は近年、単剤で BRCA がん抑制遺伝子変異をもつ乳がん、卵巣がんなどに効果を発揮する抗がん剤として期待されている (Fig. 3) [14]。この現象は合成致死と呼ばれ、PARP1 阻害剤単剤でがん治療ができるために最近注目され、その PARP 阻害剤の一つであるオラパリブ (リムパーザ) は、再発卵巣がん治療薬として欧米各国及び日本で承認されている。しかし、オラパリブに耐性のがん細胞も見つかってきており、構造創薬による効果的な抗がん剤の開発が期待されている。そのためには、PARP1 の立体構造の解明が必要である。

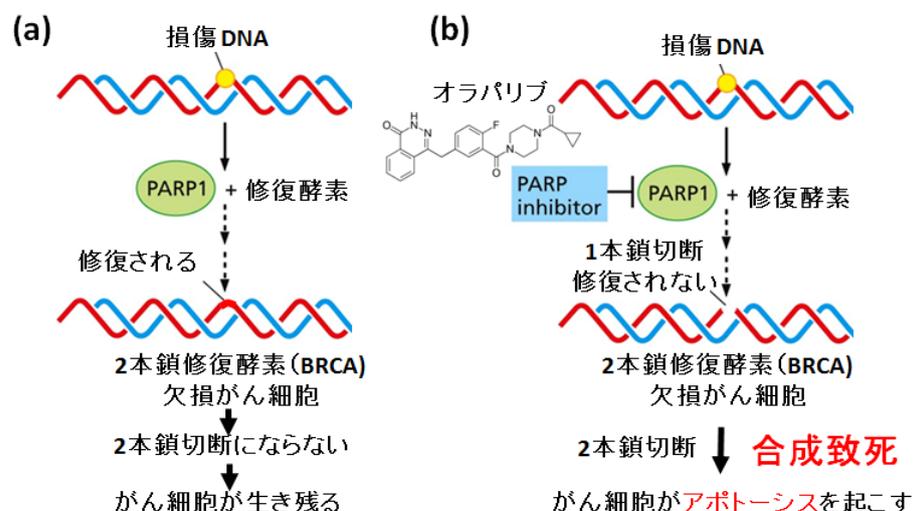


Fig. 3. PARP 阻害剤による合成致死メカニズム

PARP1 は、がんの創薬ターゲットとして注目されている。BRCA がん抑制遺伝子に変異をもつ乳がんや卵巣がんの細胞では、DNA 複製時に BRCA による DNA2 本鎖切断修復が行われない。しかし PARP1 が損傷 DNA の修復を行うことで、がん細胞が生き残り増殖する。一方、最近承認されたオラパリブなどの PARP1 阻害剤により、この PARP1 による 1 本鎖切断の修復機能を阻害すると、DNA 複製時に生じる DNA2 本鎖切断が修復できないため、がん細胞はアポトーシスを起こし死ぬことになる [15, 16]。

h-PARP1 はアミノ末端から、それぞれ zinc finger モチーフを持つ 3 つの DNA binding ドメイン [18, 19]、自己修飾部位やタンパク質間相互作用に重要な BRCT(BRCA1 C-terminal)モチーフを持つ BRCT ドメイン (自己修飾ドメインとも呼ばれる)、機能制御ドメインの WGR ドメイン、酵素活性を持つ PARP ドメイン [19] の 6 つのドメインから構成されている (Fig. 4)。これらのドメインの機能によって、h-PARP1 は単独で ADP-ribose 残基の標的タンパク質 (h-PARP1 自身も含む) への付加、ADP-ribose 残基の重合、分岐構造の合成を行うことができる。

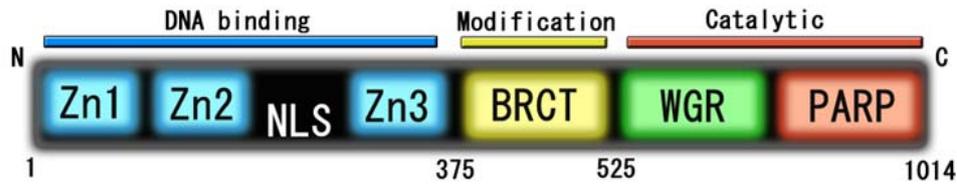


Fig. 4. h-PARP1 のドメイン

h-PARP1 は 1014 アミノ酸残基からなるタンパク質で、アミノ末端から 3 つの zinc finger 型の DNA binding ドメイン、BRCT ドメイン、WGR ドメイン、PARP ドメインの 6 つのドメインから構成されている。

近年、h-PARP1 と double strand DNA (dsDNA) の複合体の結晶構造解析が報告されたが(PDB IDs 4OQA, 4OQB, 4OPX, 4DQY)、この結晶構造では BRCT ドメイン及び DNA binding ドメインの zinc finger 2 が欠失しており、全体構造は未解明である [20]。さらに、全長 h-PARP1 (amino acid 1-1014) は nicked dsDNA 存在下で酵素活性が大きく上昇することが報告されているが、酵素の濃度と活性の相関の生化学的解析から、その際 h-PARP1 が二量体を形成すると推定されている [21, 22]。また、h-PARP1 の DNA binding ドメイン (amino acid 1-234) のみを用いた蛍光異方性 (fluorescence anisotropy) 測定からも h-PARP1 が 5' recessed DNA 存在下で二量体を形成することが予測されている [23]。また、DNA が存在しない場合でも PARP1 の濃度が高くなると二量体を形成するとの報告もある [24]。

一方、上記の一部のドメインを欠失した h-PARP1 (Zn1 ドメイン + Zn3 ドメイン + WGR ドメイン + PARP ドメイン)の結晶構造では、単量体で DNA に結合している [15]。さらに Small-angle X-ray scattering による研究で、h-PARP1 の DNA binding ドメイン + BRCT ドメイン (amino acid 1-486) は単量体として存在するとの報告もある [25]。

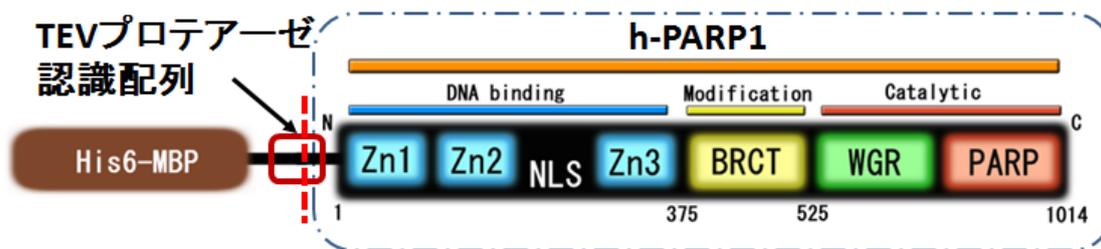
このように、全長の h-PARP1 が単量体として存在するのか二量体として存在するのか相反する報告がなされている。さらに、nicked dsDNA の存在下での全長 h-PARP1 の 4 次構造についての構造学的報告は全く無い。そのため h-PARP1 の全体構造を解明することは、酵素の構造と機能の関係を理解し、より効果的な抗がん剤の開発につながるものとして重要である。そのため、本研究では全長 h-PARP1 を用いて電子顕微鏡単粒子解析を行った。

材料と方法

h-PARP1 の 2 つのコンストラクトを用いての発現

本研究では、2 つの発現ベクターを用いた。一つは、h-PARP1 の大腸菌での発現が確認されている発現ベクターで、N 末端に (His6)-(マルトース結合タンパク質)-(TEV 配列) を結合した h-PARP1 を組み込んだもの (“1C-h-PARP1”)であり、Dr. Michael Raney (The Institute of Cancer Research, London, UK) より供与していただいた (Fig. 5a)。もう一つは、h-PARP1 の N 末端にユビキチンを付加したもの (“ユビキチン付加 h-PARP1”) で、国立がん研究センターの益谷 美都子博士より供与していただいた h-PARP1 cDNA に、長浜バイオ大学西 義介教授研究室でユビキチン遺伝子を結合し pET-41a(+)ベクターに組み込んだものである (Fig. 5b)。

(a)



(b)

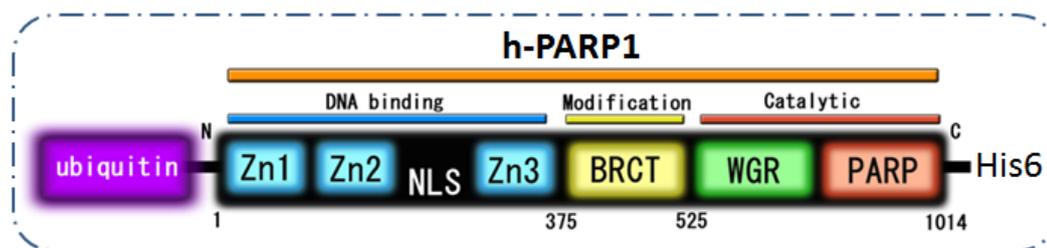


Fig. 5. h-PARP1 の発現系

今回用いた発現系の図。(a) 1C-h-PARP1。N 末端に his タグとマルトース結合タンパク質が付加されているが、これらの N 末端部分を TEV プロテアーゼ分解により切除し、全長 h-PARP-1 を得ることができる発現系。(b) ユビキチン付加 h-PARP1。全長 h-PARP1 cDNA の N 末端にユビキチン遺伝子を結合した発現系。

1C-h-PARP1 の形質転換と発現

アガロース L03 (TAKARA) を 1.5 g、NaCl を 1 g、Hipolypton を 1 g、Yeast Extract

を 0.5 g を純水に加え全量を 100 ml としてオートクレーブして溶解した。溶解後アガロースが固まらないうちに、カナマイシンが 50 $\mu\text{l/ml}$ とクロラムフェニコールが 25 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えディッシュに流し、カナマイシン+クロラムフェニコールプレートを作成した。Rosetta (DE3) pLysS 大腸菌の competent cells 20 μl に 1C-PARP1 プラスミド DNA 1 μl を加え氷上で 30 分静置し、その後 42°C で 30 秒熱ショックを行い、氷上で 2 分間以上静置した。SOC 培地(Novagen)を 300 μl 加え 37°C で一時間培養後、培養液 40 μl に LB 培地 80 μl を加え 120 μl としこれをカナマイシン+クロラムフェニコールプレートにプレーティングし 37°C で一晩培養を行った。

プレート上に生じたコロニーを回収し、LB 液体培地 (40 $\mu\text{l/ml}$ カナマイシン、25 $\mu\text{l/ml}$ クロラムフェニコールを含む)100 ml を 300 ml 三角フラスコに加えた培養液に植菌し 37°C で一晩培養を行った。この培養液 2.5 ml を 250 ml の TB 培地 (40 $\mu\text{l/ml}$ カナマイシン、25 $\mu\text{l/ml}$ クロラムフェニコール) に加え 2 L の羽根付き三角フラスコ中で 37°C にて振とう培養した。OD₆₀₀ が 1.0 以上になった時点で、ZnSO₄ を終濃度 0.1 mM になるように加え、OD₆₀₀ が 2.0 以上になるまで 37°C にて振とう培養した。その後、培養液を 4°C で一時間冷却した後、IPTG を終濃度 0.5 mM になるように加えて 18°C で一晩培養を行い、4,830 x g (6,000 rpm)、10 分間の遠心にて集めた菌体ペレットを、-80°C にて精製開始まで保存した。なお、用いた上清は、オートクレーブ後、含まれている ZnSO₄ は、NaOH を加えて pH を 10 程度として Zn(OH)₂ として沈澱させた[26]。その沈澱は、濾過により集めて可燃物として廃棄し、上清は、30 倍以上に希釈して下水に廃棄した。

1C-h-PARP1 の精製

1C-h-PARP1 菌体ペレット 2 g につき 4 ml の割合で Lysis 緩衝液を加え懸濁した。リゾチームを終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え懸濁し超音波処理により溶菌を行った。超音波処理は、氷水で容器を冷却しながら TAITEC 社の ULTRA5 ソニケーターで Output Control 4 とし、5 秒間 on、5 秒間 off のサイクルを 110 回行った。溶菌液を 10,000 × g で 90 分遠心し上清を 0.45 μm シリンジフィルターで濾過した。

容積 5 ml の His Trap HP カラム (Nickel カラム) (GE ヘルスケア) によるアフィニティー精製を行うため、まずペリスタポンプを用い流速 4 ml/min で溶菌液上清を添加後、洗浄液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 1 mM DTT] にて洗浄後、AKTAexplorer 10s (GE Healthcare) を用いてイミダゾールの直線濃度勾配 (イミダゾール濃度 10 mM ~ 250 mM の濃度勾配) をかけて流速 0.8 ml/min で溶出を行った。His Trap HP カラムから約 100 mM のイミダゾール濃度で溶出された画分に、N 末端の His-tag 配列を持った maltose binding protein を切り離すために、TEV プロテアーゼ (Abcam) 約 500 units を加え、透析液 [50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 250 mM NaCl, 0.5 mM DTT] 1 L を用いて 4°C、一晩透析しながら TEV 認識配列の切断を行った(Fig. 5a)。

透析後の画分を再度 His Trap HP カラムに添加し、20 ml の洗浄液 [50 mM Tris-HCl

(pH 7.5), 250 mM NaCl, 0.5 mM DTT] による「素通り画分」と 10 ml のイミダゾールを含む押出液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM イミダゾール, 250 mM NaCl, 0.5 mM DTT]による「押出画分」とで全長 PARP1 を溶出した。h-PARP1 は DNA に結合することから DNA と同様に負荷電を持った多糖類である heparin と結合することが考えられる。そこで Heparin-Sepharose カラムによるアフィニティー精製を以下に述べる手順で行った。

上記の「素通り画分」と「押出画分」を集めて、ペリスタポンプの流速を 3 ml/min とし、容積 5 ml の Hi Trap Heparin HP カラム (GE ヘルスケア) に吸着させた後に、洗浄液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 0.5 mM DTT] による洗浄を行った。その後、AKTAexplorer 10s を用いて流速 0.8 ml/min で NaCl の直線濃度勾配 (250 mM ~ 1 M の濃度勾配) により精製を行った。精製された画分をさらに約 10 倍 Amicon (分子量 10,000 以上を保持する) フィルターにて濃縮し、10 μ M (h-PARP1 タンパク質濃度 : 約 1 mg/ml) として電子顕微鏡サンプルとした。

ユビキチン付加 h-PARP1 の形質転換と発現

2 \times YT 培地を、ミリ Q 水 800 ml に塩化ナトリウム 10 g (ナカライテスク株式会社)、乾燥酵母エキス 20 g (ナカライテスク株式会社)、トリプトン 32 g (ナカライテスク株式会社) を溶解し、ミリ Q 水にて 2,000 ml にメスアップした後、オートクレーブで滅菌処理して作成した。無菌操作下において滅菌済み 2 \times YT 培地 30 ml に 25 mg/ml のカナマイシン (ナカライテスク株式会社)、34 mg/ml のクロラムフェニコール (ナカライテスク株式会社) をそれぞれ 30 μ l ずつ加えた (カナマイシン終濃度 25 μ g/ml、クロラムフェニコール終濃度 34 μ g/ml)。これにユビキチン付加 h-PARP1 遺伝子を導入したリコンビナントベクター pET-41a(+) で形質転換した大腸菌 (BL21 株、Rosetta 2、Novagen) 菌体を少量加え、振盪器にて 14 時間 37 $^{\circ}$ C で前培養を行った。

2 \times YT 培地 400 ml を 1,000 ml 三角フラスコに加え、これを 4 本作製しオートクレーブで滅菌処理した。無菌操作にて 25 mg/ml のカナマイシン、34 mg/ml のクロラムフェニコールをそれぞれ 400 μ l (カナマイシン終濃度 25 μ g/ml、クロラムフェニコール終濃度 34 μ g/ml)、前培養液を 5 ml 加え振盪器にて 37 $^{\circ}$ C で培養した。一時間ごとに分光光度計で吸光度 (OD₆₀₀ 値) を測定し OD₆₀₀ 値が 0.6 以上になるまで培養した。OD₆₀₀ 値が 0.6 以上になった後、発現確認のために各フラスコから 1.5 ml ずつ培養液を回収し、-80 $^{\circ}$ C で保存した (以下、"未発現サンプル" と呼ぶ)。この後、1 M イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG、ナカライテスク株式会社) を 400 μ l ずつ各フラスコに加え (IPTG 終濃度 1 mM)、振盪器にて 3 時間 37 $^{\circ}$ C で培養した。発現確認のために各フラスコから 1.5 ml ずつ培養液を回収し、-80 $^{\circ}$ C で保存した ("発現サンプル" と呼ぶ)。残った培養液を 50 ml 遠沈管 4 本に 40 ml ずつ分注し、16,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心し上清を除いた。同様の操作を繰り返し遠沈管 4 本の沈殿画分にすべての菌体を集めた。その後、各遠沈管に 1 \times phosphate buffered saline (PBS(-)) を全量が約 8 ml 程度になるように加え懸濁した後、一本の遠沈管にまとめ

全量約 32 ml として、-80°Cで保存した（”精製用発現サンプルストック”と呼ぶ）。

ユビキチン付加 h-PARP1 の精製

-80°Cにて保存した”精製用発現サンプルストック”を 37°Cウォーターバスで解凍した。10,000×g、4°Cで 5 分間遠心し上清を取り除き BugBuster（東京化成工業株式会社）7.5 ml を加え、20 分間室温でローテートした。16,000×g、4°Cで 20 分間遠心し溶菌した上清を 15 ml ファルコンチューブに回収した。

精製第一段階として、容積 5 ml の Hi Trap Heparin HP カラムを Heparin-Sepharose 用平衡化緩衝液（50 mM Tris-HCl、1 mM DTT、pH 8.0）に 200 mM NaCl を加えた溶液 25 ml で洗浄した後に、Heparin-Sepharose 用平衡化緩衝液を 25 ml 通し平衡化した。その後、上記の BugBuster 処理サンプルを 7.5 ml 通した。その後ポンプを用いて、Heparin-Sepharose 用平衡化緩衝液と 2 M の NaCl を添加した Heparin-Sepharose 用溶出緩衝液を用いて流速 0.24 ml/min の NaCl の直線濃度勾配で溶出を行った [27]。

精製第二段階として、PARP 阻害剤である 3-アミノベンズアミド (3-AB) 結合カラムによるアフィティー精製を行うため、カラムを以下の手順で作成した。ECH Sepharose 4B (GE Healthcare) 5 ml を、ミリ Q 水を塩酸（ナカライテスク株式会社）で pH4.5 に調整した溶液 100 ml で懸濁、洗浄した。続けて、0.5 M NaCl 100 ml で洗浄した。3-AB（東京化成工業）0.1 g を 1 ml のメタノールに溶解し、洗浄した ECH Sepharose 4B に全量加えた。N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボイミド塩酸塩 (Sigma-Aldrich) 0.2 g を MilliQ 水 1 ml に溶かし、ECH Sepharose 4B に加えた。塩酸を用いて ECH Sepharose 4B 懸濁液の pH を 4.5 に調整し、ミリ Q 水を用いて 10 ml にメスアップした。この ECH Sepharose 4B を 4°Cで 1 時間ローテートを行った後、水酸化ナトリウム（ナカライテスク株式会社）を用いて pH を 4.5 に調整し、さらに 4°Cで一晩ローテートを行った。翌日、ECH Sepharose 4B を 0.1 M 酢酸緩衝液(0.1 M 酢酸ナトリウム三水和物（和光純薬工業）、0.5 M NaCl 、 pH4.0) 100 ml で第 1 回洗浄、0.1 M Tris 緩衝液(0.1 M Tris、0.5 M 塩化ナトリウム、pH8.0) 100 ml で第 2 回洗浄、ミリ Q 水で第 3 回洗浄した後、4°Cで遮光保存した。

上記の 3-AB カラムを用いて、以下の手順で第 2 段階精製を行った。3-AB カラム用平衡化緩衝液{100 mM Tris-HCl、14 mM 2-メルカプトエタノール（ナカライテスク株式会社）、0.5 mM エチレンジアミン四酢酸（ナカライテスク株式会社）、0.5 mM フッ化フェニルメチルスルホン（ナカライテスク株式会社）、pH7.5} に 100 mM NaCl を加えた溶液 13 ml でカラムを洗浄した後、3-AB カラム 2.5 ml に 3-AB カラム用平衡化緩衝液を 13 ml 通し平衡化した。Heparin-Sepharose カラムから溶出された h-PARP1 を含むサンプルを 3-AB カラム用平衡化緩衝液で 2 倍に希釈し、3-AB カラムにアプライした。3-AB カラム用平衡化緩衝液と 3-AB カラム用溶出緩衝液 {3-AB カラム用平衡化緩衝液、400 mM NaCl 、 2 mM 3-メトキシベンズアミド(和光純薬工業)} との濃度勾配により流速 0.24 ml/min でペリスタ

ポンプによる溶出を行った[28]。

精製第三段階の1つとして、3-AB カラムクロマトグラフィーによって精製したサンプルを、3-AB カラム用平衡化緩衝液で平衡化した FPLC 用ゲル濾過カラム (Superdex 200、GE Healthcare) に載せ、AKTAexplorer 10s (GE Healthcare) を用いて同じ 3-AB カラム用平衡化緩衝液によるゲル濾過を行った。各溶出サンプルはフラクションコレクターを用いて 15 ml ファルコンチューブに回収した。各行程においての流速はすべて 0.25 ml/min で行った。

同じく精製第三段階の1つとして、ストレプトアビジンカラムによる DNA 複合体のアイソティープ精製も検討した。まずストレプトアビジンカラム担体 100 ml を 1.5 ml マイクロチューブに取り、2,000×g、1 分間遠心し、上清を除いた。ストレプトアビジン用洗浄緩衝液 (100 mM potassium phosphate、150 mM NaCl、pH 7.2) 500 µl をマイクロチューブに加え、緩やかに攪拌してから 2,000×g、1 分間遠心し、上清を除いた。ストレプトアビジン用平衡化緩衝液 (100 mM potassium phosphate、150 mM NaCl、400 mM ammonium sulfate、pH 7.2) 200 µl をマイクロチューブに加え緩やかに攪拌した。

3-AB 溶出サンプルに nicked dsDNA 又は dsDNA サンプルをそれぞれ 1.8 µM、3.6 µM、9 µM) の DNA 濃度に調製した溶液 100 µl に 3×ストレプトアビジン用平衡化緩衝液 (300 mM potassium phosphate、450 mM NaCl、1.2 M ammonium sulfate、pH 7.2) を 50 µl 加え全量 150 µl のサンプルとした。ストレプトアビジンカラムを入れたマイクロチューブの上清を除き、そこに上記のサンプルを加え緩やかに攪拌した。後述の様に、これらの nicked dsDNA 又は dsDNA サンプルは PCR による調整の際、フォワードプライマーにビオチンを結合させている。

その後、2,000×g、1 分間遠心し、上清を除いた (素通り画分)。ストレプトアビジン用洗浄緩衝液 500 µl をチューブに加え緩やかに攪拌した。2,000×g、1 分間遠心し、上清を除いた (洗浄画分 1)。同様の操作をもう一度行った (洗浄画分 2)。ストレプトアビジンカラム用溶出緩衝液 (100 mM potassium phosphate、150 mM NaCl、2 mM D-biotin、pH 7.2) を 100 µl をチューブに加え緩やかに攪拌した。2,000×g、1 分間遠心し、上清を溶出画分として回収した (溶出画分 1)。同様の作業をもう一度行った (溶出画分 2)。

Lowry 法によるタンパク質量の測定

精製の各段階におけるタンパク質の発現および濃度は Lowry 法により確認を行った[29]。1×PBS(-) 1,250 µl と Lowry 法用 6×サンプル緩衝液 250 µl を混合し、Lowry 法用 1×サンプル緩衝液 1,500 µl を作製した。BSA 10 mg を Lowry 法用 1×サンプル緩衝液 100 µl に溶解し 100 mg/ml BSA 溶液を作製し Lowry 法用 1×サンプル緩衝液を用いて 1, 0.5, 0.1 mg/ml BSA 基準溶液を作製した。試薬 A (BIO-RAD) 1,470 µl と試薬 S (BIO-RAD) 30 µl との混合液を 1,500 µl 調製し、この混合液を 1.5 ml マイクロチューブにそれぞれ 50 µl ずつ分注し、コントロールとして 1 本に Lowry 法用 1×サンプル緩衝液を、検量線作成用と

して 0.1 mg/ml BSA、0.5 mg/ml BSA、1 mg/ml BSA、10 mg/ml BSA をそれぞれ 3 本ずつ、サンプル測定用としてサンプル溶液を各 2 本用意した。これらの溶液 5 μ l に対して試薬 B (BIO-RAD) 400 μ l を各マイクロチューブに加え、遮光で 15 分間静置後、分光光度計で 750 nm における吸光度を元に検量線を作製し各測定サンプルの濃度を計算した。

Image J による CBB 染色 SDS ポリアクリルアミドゲル結果の純度計算

h-PARP1 の純度を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、CBB 染色を行ったゲルを用いて Image J により各バンドの色の濃さから計算を行った。まず Image J の四角選択ツールで純度計測を行う一番始めのレーンを選択した。その後 Analyze \rightarrow Gels \rightarrow Select First lane コマンドにより第一レーンの選択を決定した。第一レーンの選択を行った四角選択枠を次に計測を行うレーンに移動し Analyze \rightarrow Gels \rightarrow Select Next lane コマンドにより次のレーンの決定をした。更に計測するレーンについては同様の操作を繰り返した。Analyze \rightarrow Gels \rightarrow Plot Lanes コマンドにより各レーンのプロファイルプロットを作成した。対象となるピークについて直線選択ツールを使ってまずベースラインを引き、この作業で対象のピークが閉じられなかった場合は縦方向のドロップラインを引くことで必要となる目的の領域を閉じた。各ピークに対してサイズの測定を行い、パーセント表示にて各ピークの割合の測定結果から純度を算出した。

ユビキチン付加 h-PARP1 の活性測定

ユビキチン付加 h-PARP1 の自己ポリ ADP-リボシル化(自己修飾)活性の測定のために、3-AB カラムからの h-PARP1 溶出液 1 μ l に、基質として 100 mM NAD⁺ 5 μ l、コファクターとして 100 mM MgCl₂ 5 μ l、ポリ ADP-リボシル化の誘導のための 125 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA 1 μ l、および 3-AB カラム用平衡化緩衝液 48 μ l を混合し、30 分常温で静置した [30]。このサンプルについて、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った後、一次抗体として抗 poly(ADP-ribose)抗体 (10H) [31]を用いてウエスタンブロッティングによる活性測定を行った。

リガンド dsDNA 及び nicked dsDNA の作成

h-PARP1 のリガンドとして、105 bp の nicked dsDNA サンプルを作成した (Fig. 6)。pET-41a(+) 上で nick restriction enzyme である *Nb.Bts* I の認識配列(GCAGTG)を中央部に持つ全長 105bp を増幅する様に設計したビオチン標識フォワードプライマー(5'-biotin-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3') および リバースプライマー (5'-GATCCCGGTGCCTAATGAGTG-3') を、*Pfu* Turbo ポリメラーゼを加え 95°C で 2 分反応させた後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分間反応させる操作を 30 サイクル行った後、72°C で 10 分間反応させた。増幅された dsDNA を Wizard SV Gel and PCR

Clean-UP System (Promega)を用いて精製し、制限酵素 (*Nb.Bts* I、New England Biolabs) で反応 (37°C、4 時間) させ 105 bp の nicked dsDNA を調製した。調製した nicked dsDNA は Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System(Promega)を用いて精製した。

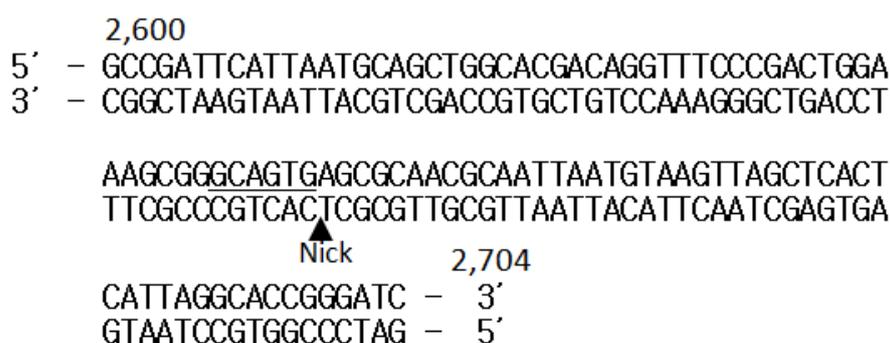


Fig. 6. Nicked-dsDNA サンプル

設計した dsDNA の配列及び nick の位置 (矢印で示す)。 *Nb.Bts* I nicking endonuclease の認識配列を下線で示す。

ユビキチン付加 h-PARP1 と DNA 結合のネイティブ PAGE による確認

h-PARP1 への DNA の結合の確認を行うため、ネイティブ PAGE によるゲルシフトアッセイを行った。ゲル板の組み立てを行い、コームを差し込んだ位置から 1 cm 下のところに印をつけた(二枚)。分離ゲル作成用の遠沈管に MilliQ 水 8.64 ml、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 4.50 ml、30% アクリルアミド溶液 4.50 ml を加えた。さらに 10% APS 180 μ l、TEMED 20 μ l を加え、ゲル板に記した印の所まで流し込み、上から 1 ml の MilliQ 水を加えた。濃縮ゲル作成用の遠沈管に MilliQ 水 4.30 ml、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.80 ml、30% アクリルアミド溶液 0.96 ml、10%APS 72 μ l、TEMED 20 μ l を加えた。これをゲル板の MilliQ 水を取り除いてからゲル板に流し込み、コームを差し込んだ後静置し、ゲル固化後ガasketを外した。泳動槽の陽極側に 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8)を加え、ゲルを泳動槽にセットした後、陰極側に 0.068 M グリシン-0.053 M Tris-HCl (pH 8.9)を加えた。

泳動サンプルとしての 3-AB カラム溶出サンプルに、4×loading 緩衝液 (40 %グリセロール、0.4 % BPB、0.2 M Tris-HCl、pH 6.8) 2.5 μ l を混合して全量が 10 μ l になった時点の濃度がそれぞれ、125 μ M h-PARP1、125 μ M h-PARP1 + 9 μ M nicked dsDNA、125 μ M h-PARP1 +18 μ M nicked dsDNA、125 μ M h-PARP1 + 45 μ M nicked dsDNA とした。マーカーとして h-PARP1 とほぼ同じ分子量である β -D-ガラクトシダーゼを用いた。各サンプルをアプライ後、ゲル 1 枚につき 10 mA で泳動を行った。

ユビキチン付加 h-PARP1 結晶化条件の探索

精製したユビキチン付加 h-PARP1 精製サンプルについて京都大学 iCeMS コンプレックス 2 森川研究チームの津中 康央、森川 耿右両博士の協力の下、mosquito®を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法による h-PARP1 の結晶化条件の探索を行った。96 穴結晶化プレートのウェルにリザーバー溶液を 40 μ l ずつ加え、サンプルストリップに h-PARP1 精製サンプル溶液を 4 μ l ずつアプライした後、mosquito によりサンプル溶液 200 nl、リザーバー溶液 200 nl の合計 400 nl のドロップを各ウェルに作成した。リザーバー溶液としてスクリーニングキット classic I、classic II、JCSG+を用いて合計 $96 \times 3 = 288$ 条件のドロップを作成した。結晶化プレートは 18°C のインキュベータに静置し、後日実体顕微鏡で結晶を観察した。

h-PARP1 の電子顕微鏡単粒子解析

h-PARP1 のネガティブ染色法による電子顕微鏡単粒子解析を行った。Heparin カラムによる精製 1C-h-PARP1 (タンパク質濃度 1.2 mg/ml) に、dsDNA または nicked dsDNA を加え、5 μ M h-PARP1、0.25 μ M DNA となるように調整した (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 125 mM NaCl, 0.5 mM DTT)。3-AB カラムで精製したユビキチン付加 h-PARP1 (タンパク質濃度 2.5 mg/ml) には、nicked dsDNA または、nicked dsDNA を最終濃度 12.5 μ g/ml となるように添加したのち、3-AB カラム用平衡化バッファーで 100 倍希釈を行い、5 μ M h-PARP1、0.18 μ M DNA に調製した。

イオンスパッタ装置にて親水化したカーボン膜張グリッドにこれらの溶液 3 μ l を乗せ、3 drop の 2 % 酢酸ウラニル溶液を混合し、自然乾燥させた (Fig. 7a)。このカーボン膜張グリッドを用いて、九州大学 生体防御医学研究所 附属生体多階層システム研究センターの電子顕微鏡 (JEM1010、JEOL(日本電子)) を用いて、加速電圧 100kV、ピクセルサイズ 5.1 $\text{\AA}/\text{pixel}$ で測定した (Fig. 7b)。倍率はタバコモザイクウイルスを用いて calibration した。電子線損傷を抑えるために minimum dose system (MDS) を使用した。

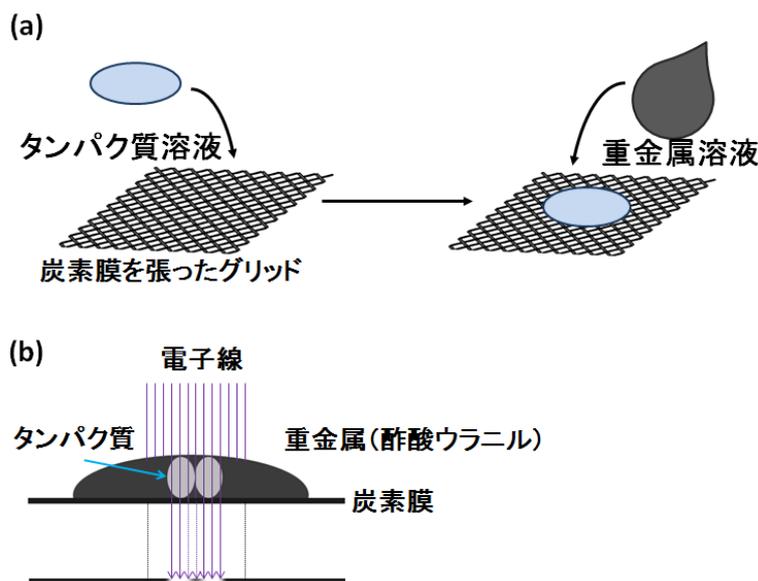


Fig. 7. ネガティブ染色法

ネガティブ染色法。(a)炭素膜を張ったグリッドにタンパク質溶液を滴下し固定し、固定したタンパク質の上から重金属溶液を加え染色する。(b)この試料に電子線を照射することによって得られる二次元像で、タンパク質の部分は重金属層が薄いために電子線が通り白抜けに、重金属の部分は電子線が通らず黒く染まって観察される。

粒子像 (box サイズ 64 x 64 ピクセル) のピックアップ、クラス平均化、common-line method による 3次元再構成マップの合成は EMAN2 を用いて行った [32]。分解能の評価は Fourier shell correlation (FSC) 法で行った。

h-PARP1 分子モデルは、h-PARP1 ドメインの結晶構造を UCSF Chimera を用いて手動で 3次元再構成マップにフィティングすることで構築した (Fig. 8)。全長 h-PARP1 モデルの構築のために用いた結晶構造は、PDB コード 4DQY (A~C 鎖、Zn 1 ドメイン、Zn 3 ドメイン、WGR ドメイン、PARP ドメイン)、2L31 (A 鎖、Zn 2 ドメイン)、2COK (A 鎖、BRCT ドメイン)である。

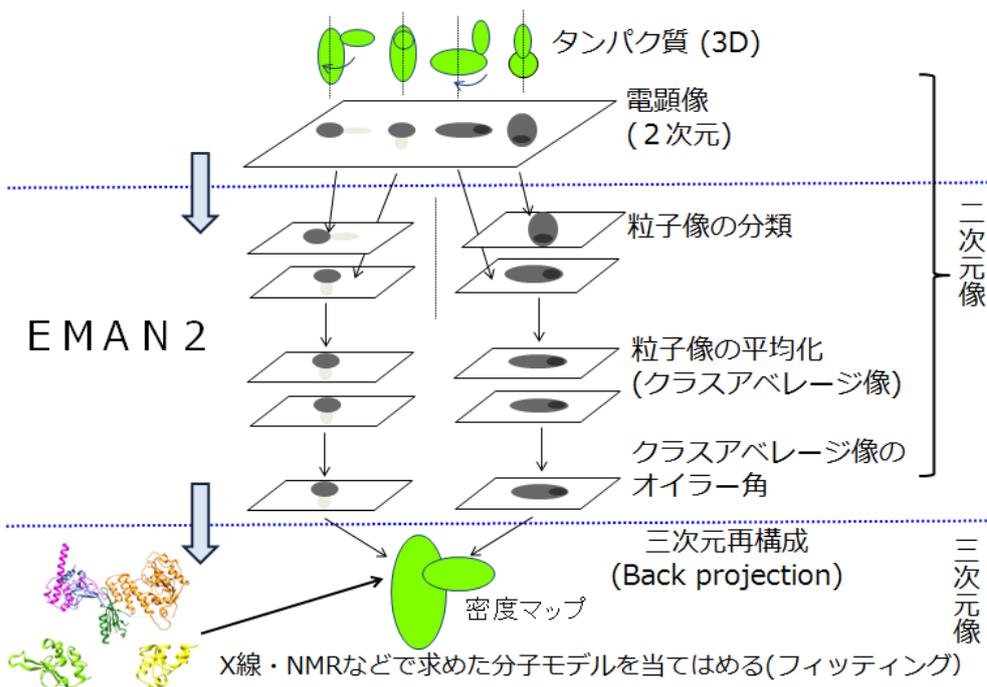


Fig. 8. 電子顕微鏡単粒子解析の原理

電子顕微鏡単粒子解析。まず目的のタンパク質を膜に固定する。そこへ電子線を照射することで二次元の電顕像を撮影する。この電顕像には通常、多数のタンパク質分子の粒子像が写っており、これらから個々のタンパク質粒子像を取り出し、類似性に基づいて粒子像をクラス分類する。同じクラスに属する粒子像は、分子を同じ角度から見ている像と推定されるので、クラス内の粒子像を平均化し、クラスアベレージ像を作成する。それぞれのクラスアベレージ像について、分子をどの角度から見ているかを規定するオイラー角を決定する。オイラー角を元にクラスアベレージ像を逆射影 **Back projection** することで三次元の密度マップを作成する。この過程を三次元再構成という。通常、三次元再構成により作成された密度マップは低分解能で、そのまま分子の構造モデルを推定することは困難なので、X線結晶解析やNMRなどの方法で求めた分子モデルを、密度マップの形状に一致するようにあてはめることで、分子モデルを作成する。この過程をフィッティングと呼ぶ。

結果

1C-h-PARP1 の発現と精製

Dr. Raner らによるプロトコールに従って、His Trap HP カラム (Nickel カラム) での精製、TEV プロテアーゼ処理、2 回目の His Trap HP カラムでの精製を経て、Hi Trap Heparin HP カラムでの NaCl 濃度勾配による精製の結果、NaCl の濃度が約 600 mM 付近に単一のピークとして h-PARP1 が溶出されたことが、7.5% SDS-PAGE で確認された (Fig. 9)。なお精製された全長の 1 C-h-PARP1 は、精製度は 90%以上と推定された。

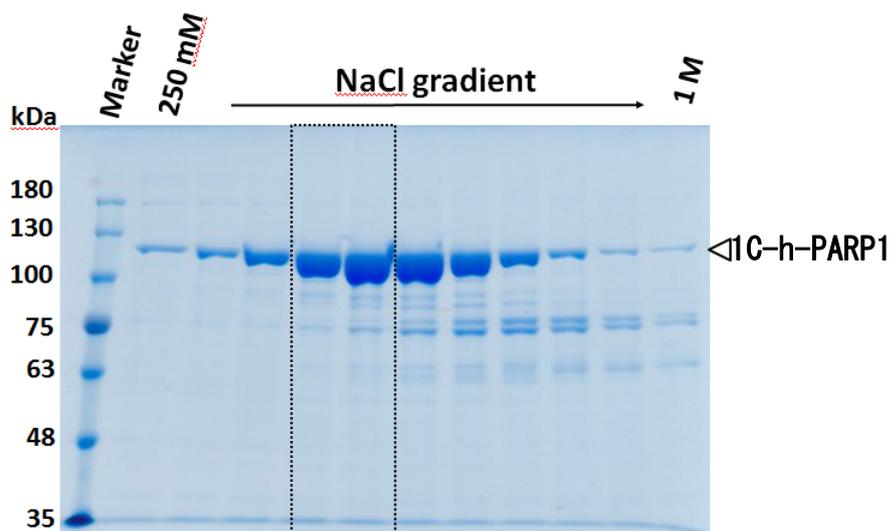


Fig. 9. 1C-h-PARP1 の Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーによる結果

全長 h-PARP1 の Hi Trap Heparin HP による溶出後、各溶出フラクションの 2% (v/v) を 7.5% SDS-PAGE で分離後 CBB 染色を行った図。この内点線の枠で囲ったフラクションを 10 倍濃縮を行い構造解析用サンプルとして用いた。

ユビキチン付加 h-PARP1 の発現確認

pET-41a⁽⁺⁾ h-PARP1 ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 株による”発現サンプル”と”未発現サンプル”を、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色と、抗 h-PARP1 抗体 (C 末端を検出できる F2 抗体) を用いたウエスタンブロッティングで h-PARP1 の発現確認を行った。”未発現サンプル”ではバンドが見られなかったが、”発現サンプル”では CBB 染色で、h-PARP1 の予想サイズである 120 kDa の付近にバンドが確認できた (Fig. 10a)。また、ウエスタンブロッティングにおいても同サイズの位置に”発現サンプル”でのみ h-PARP1 に相当するバンドが確認できた (Fig. 10b)。

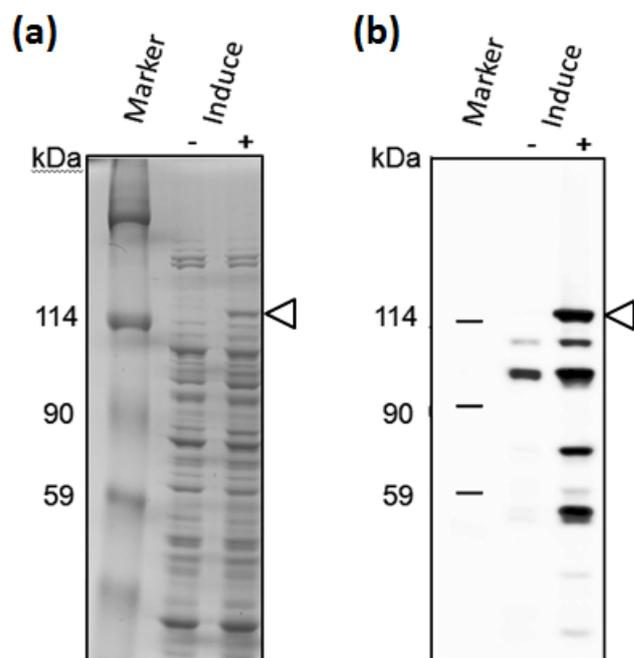


Fig. 10. ユビキチン付加 h-PARP1 発現結果

(a) CBB 染色および (b) ウェスタンブロッティングによる発現の確認。h-PARP1 の推定分子量位置を矢頭で示した。

ユビキチン付加 h-PARP1 の精製結果

1 段階目の精製として Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーをおこない、各サンプルを SDS-PAGE を行ったのち、CBB 染色と、抗 h-PARP1 抗体(F2 抗体)を用いたウェスタンブロッティングで確認を行った。

CBB 染色で溶出画分 4 に h-PARP1 が確認できた (Fig. 11a、Elution 4)。また、ウェスタンブロッティングでも同サイズの位置にバンドが確認できた (Fig. 11b、Elution 4)。また、この Heparin-Sepharose カラムから NaCl の塩濃度勾配で溶出すると、約 600 mM ~ 625 mM NaCl の濃度付近で h-PARP1 が多く溶出することが確認できた (Fig. 11c)。

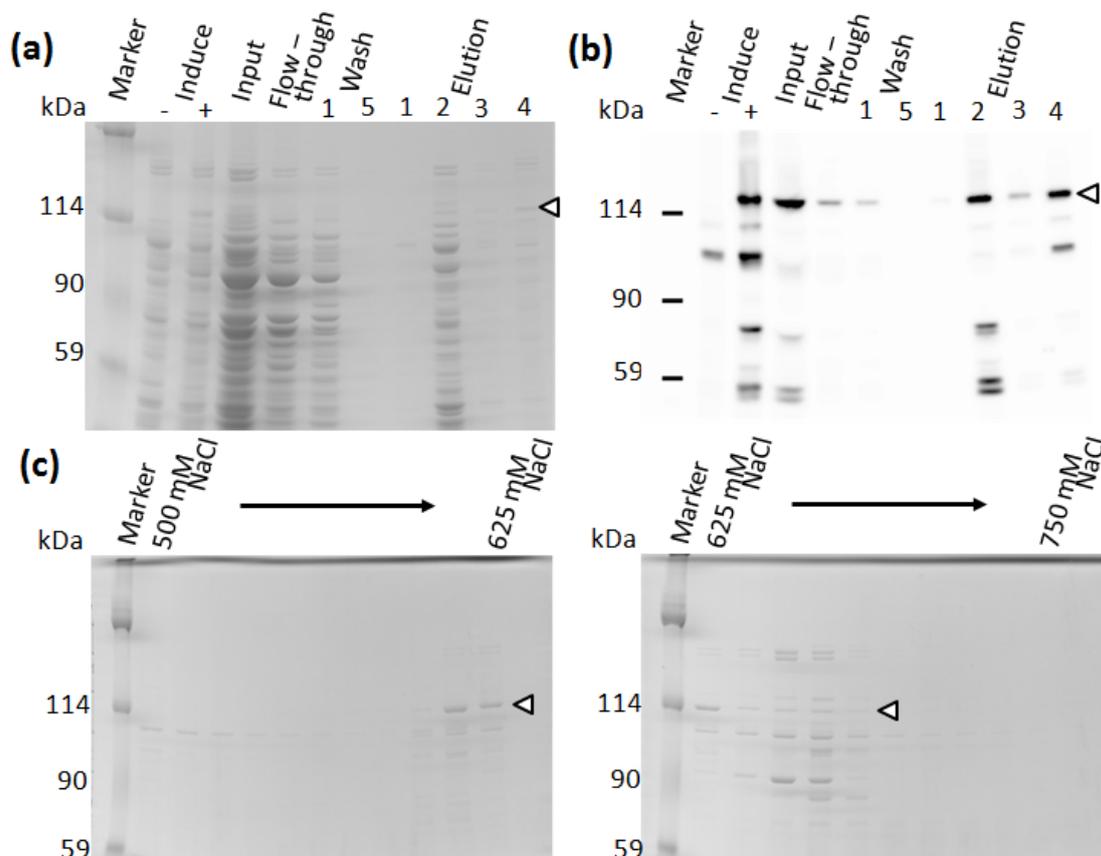


Fig. 11. ユビキチン付加 h-PARP1 の Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーによる精製

(a) CBB 染色の結果。各レーンには h-PARP1 発現条件として Induce- が IPTG 未添加のサンプル、Induce + が IPTG 添加後 3 時間経過時のサンプルである。Input は BugBuster 溶菌処理による未精製添加サンプル、Flow-through は素通り画分、Wash はカラム洗浄画分を示す。Elution 1, 2 は 500 mM NaCl で、Elution 3, 4 が 1 M NaCl でいずれも濃度勾配をかけずに溶出したサンプルを示す。(b) 同ゲルを抗 h-PARP1 抗体 (F2 抗体) を用いてウエスタンブロッティングした結果。(c) 同 Induce + のサンプルを NaCl 濃度勾配で溶出した画分のうち、NaCl 濃度 500 mM~750 mM の画分の SDS-PAGE の結果。それぞれの画分の 0.2% (v/v) を泳動した。Marker はいずれもプレステインドタンパク質マーカを用いている。ユビキチン付加 h-PARP1 の溶出位置を矢頭で示した。

Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーで精製を行ったサンプルに対し、2 段階目の精製として 3-AB カラムクロマトグラフィーをおこない、各溶出画分を SDS-PAGE を行ったのち、CBB 染色と、抗 h-PARP1 抗体 (Purified Mouse Anti-PARP、BD Transduction Laboratories) を用いたウエスタンブロッティングで精製度の確認を行った。

CBB 染色で、溶出画分 1 に h-PARP1 が確認できた (Fig. 12a, Elution 1)。また、ウエ

スタンブロットティングでも同サイズの位置にバンドが確認できた (Fig. 12b、Elution 1)。また、同じく 3-AB カラムから 3-メトキシベンズアミドの濃度勾配での溶出を行うと 3-メトキシベンズアミド濃度が約 0.55 mM~0.91 mM の付近で h-PARP1 の溶出が確認できた (Fig. 12c)。この時点での h-PARP1 の純度は Image J を用いて各バンドの色の濃さから計算したところ、3-AB カラム溶出サンプル内のタンパク質における全長 h-PARP1 含有量は 24%(w/w)となった。

なお、第三段階の精製としてのゲル濾過、ストレプトアビジンカラムによる DNA 複合体のアフィニティー精製を試みたがさらなる精製度は認められなかったため、3-AB カラムクロマトグラフィーにより精製した標品を用いて電子顕微鏡単粒子解析などを進めた。

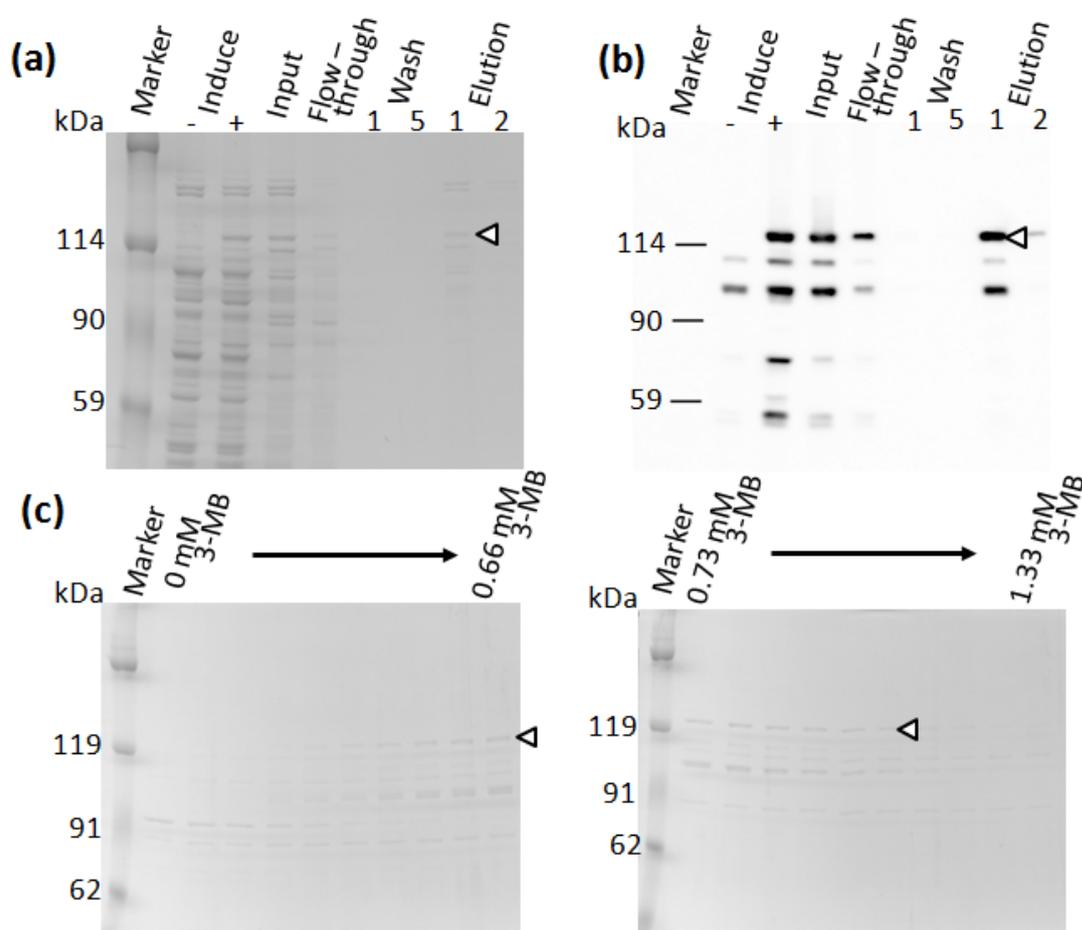


Fig. 12. ユビキチン付加 h-PARP1 の 3-AB カラムクロマトグラフィーによる精製

(a) CBB 染色の結果。各レーンは h-PARP1 発現条件として Induce- が IPTG 未添加のサンプル、Induce + が IPTG 添加後 3 時間経過時のサンプルである。Input は BugBuster 溶菌処理による未精製添加サンプル、Flow-through は素通り画分、Wash はカラム洗浄画分を示す。Elution 1、2 共に 0.5 mM 3-メトキシベンズアミドで濃度勾配をかけずに溶出したサンプルを示す。(b) 同ゲルを抗 h-PARP1 抗体 (F2 抗体) を用いてウエスタンブロッ

ティングした結果。(c) 同 Induce + のサンプルをそれぞれ 3-メトキシベンズアミドの濃度勾配で溶出した画分のうち、3-メトキシベンズアミド濃度 0 mM~1.33 mM 画分の SDS-PAGE の結果。それぞれの画分の 0.2% (v/v) を泳動した。Marker はいずれもプレステインドタンパク質マーカールを用いている。ユビキチン付加 h-PARP1 の溶出位置を矢頭で示した。

ユビキチン付加 h-PARP1 の発現と酵素活性測定

h-PARP1 が正常な構造を維持しているか確認するために、酵素活性測定を行った。h-PARP1 は nicked dsDNA 存在下で活性化され、NAD⁺ を基質として自己ポリ ADP-リボシル化により、BRCT ドメインに poly(ADP-ribose) を付加する。h-PARP1 に nicked dsDNA と基質を加え 30 分反応させた反応液を SDS-PAGE で分離し、抗 poly(ADP-ribose) 抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認を行った。その結果 h-PARP1 が NAD⁺ を基質として ADP-ribose の重合度合いの異なった poly(ADP-ribose) が h-PARP1 に結合したためスメア状となるバンドとして確認できた。この結果から、精製 h-PARP1 サンプルには酵素活性があることが確認された (Fig. 13)。

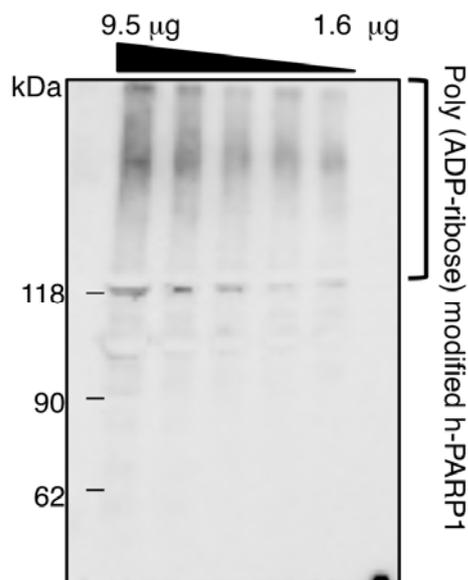


Fig. 13. ユビキチン付加 h-PARP1 の活性測定

抗 PAR 抗体を用いた h-PARP1 の自己修飾反応生成物の Western blot による活性測定。タンパク質量は、レーンの左から順に 9.5 μ g、6.3 μ g、3.2 μ g、2.1 μ g、1.6 μ g である。SDS-PAGE の結果、自己修飾された h-PARP1 と予想される 118 kDa より大きなサイズのスメア状となるバンドの位置を右側に示した。

h-PARP1 の電子顕微鏡単粒子解析

Hi Trap Heparin HP カラムで精製した 1C-h-PARP1 を用いて、電子顕微鏡単粒子解析を 2 回試みた。1 回目は、Hi Trap Heparin HP カラム による精製画分の h-PARP1 を 37 μM まで濃縮して、dsDNA を添加せずに h-PARP1 のみを電子顕微鏡にて観察したところ、大きな塊が多く認められ、EMAN2 を用いて 1,000 程度の画像をピックアップしたが、明瞭な電頭像は得られなかった。2 回目は、h-PARP1 (終濃度 5 μM) に dsDNA (終濃度 2.5 μM) または、nicked dsDNA (終濃度 2.5 μM) を加えて観測した結果、nicked dsDNA を加えた場合にかろうじてタンパク質らしき像が観察されたが、分子の形状ははっきりせず、この写真からのデータ処理は不可能であった (Fig. 14)。

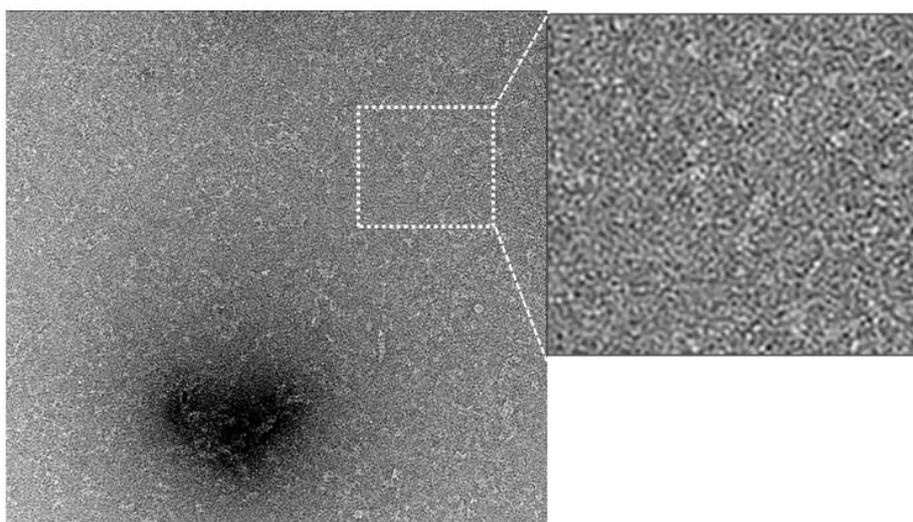


Fig. 14. 1C-h-PARP1 精製サンプルの電子顕微鏡像

1C-h-PARP1 と nicked dsDNA 混合サンプルの電子顕微鏡解像。タンパク質粒子像は認められたが、粒子像の大きさが不均一であった。さらに、類似した粒子像が認められなかった。この事から電子顕微鏡単粒子解析に適さない試料であると判断された。

この原因を調べる為に、10 μM の 1C-h-PARP1 に等しい容量の純水を加えた場合 (h-PARP1 終濃度 5 μM) では、沈殿はみられないものの、10 μM h-PARP1 に等しい容量の 5 μM dsDNA 溶液を加えた場合 (h-PARP1 終濃度 2.5 μM) や、10 μM h-PARP1 に等しい容量の 10 μM nicked dsDNA 溶液を加えた場合 (h-PARP1 終濃度 2.5 μM)。それぞれの溶液の最終組成は 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 0.25 mM DTT) で、室温 10 分間で肉眼により淡い沈澱が認められた。さらに、4 $^{\circ}\text{C}$ 、16,000 x g 2 時間の遠心により h-PARP1 が沈澱画分に回収されることが確認された (Fig. 15)。

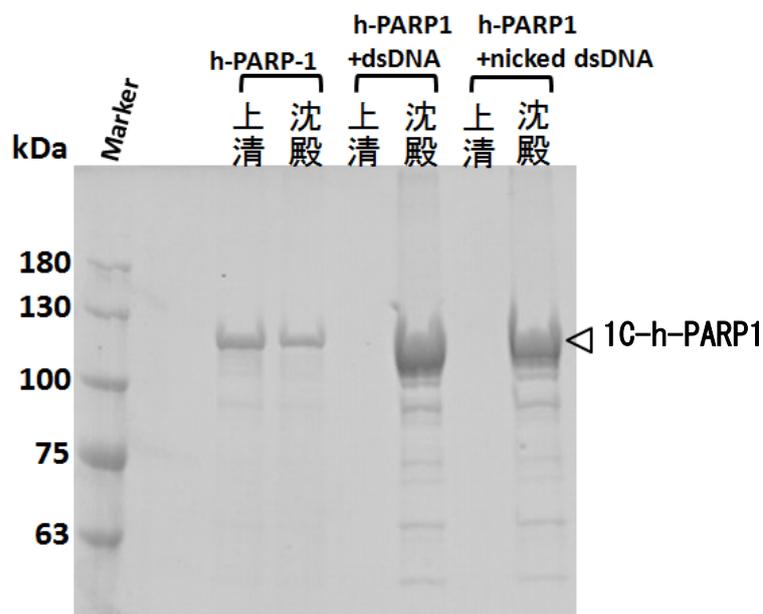


Fig. 15. 1C-h-PARP1 の沈殿確認

全長 h-PARP1 (終濃度 5 μM) 及び、全長 h-PARP1 (終濃度 5 μM) に dsDNA (終濃度 2.5 μM)、nicked dsDNA (終濃度 2.5 μM) を加えた試料について、遠心後の上清画分の 20%と沈殿画分の 100%を、それぞれを 7.5% SDS-PAGE で分離後 CBB 染色を行った。dsDNA、nicked dsDNA を加えた場合、上清画分では全長 h-PARP-1 と思われるバンドが確認出来ず、沈殿画分において確認された。

以上の結果を踏まえ、1C-h-PARP1 のサンプルは、現状では電子顕微鏡の解析には適さないものであると判断された。そのため、以降はユビキチン付加 h-PARP1 について、X 線結晶解析および電子顕微鏡単粒子解析による立体構造解析を行った。

ユビキチン付加 h-PARP1 のサンプルを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法による結晶化条件の予備的探索を行ったが、結晶成長は確認できなかった。

そこで 3-AB カラムにより精製したユビキチン付加 h-PARP1 に dsDNA または nicked dsDNA をそれぞれ加えたものをネガティブ染色し電子顕微鏡で観察した (Fig. 16)。h-PARP1 の精製度が十分でないことを反映して、電顕像は十分な単分散性を示さなかったが、いずれの試料もおいても、h-PARP1 が二量体を形成している事を示唆するリング状の像が 2 つ結合した像が確認できた (Fig.16)。Nicked dsDNA サンプルと dsDNA サンプルで観察される粒子像に有意な差が認められなかったため、粒子数を得るために、以降は両サンプルの像をまとめて解析に用いた。

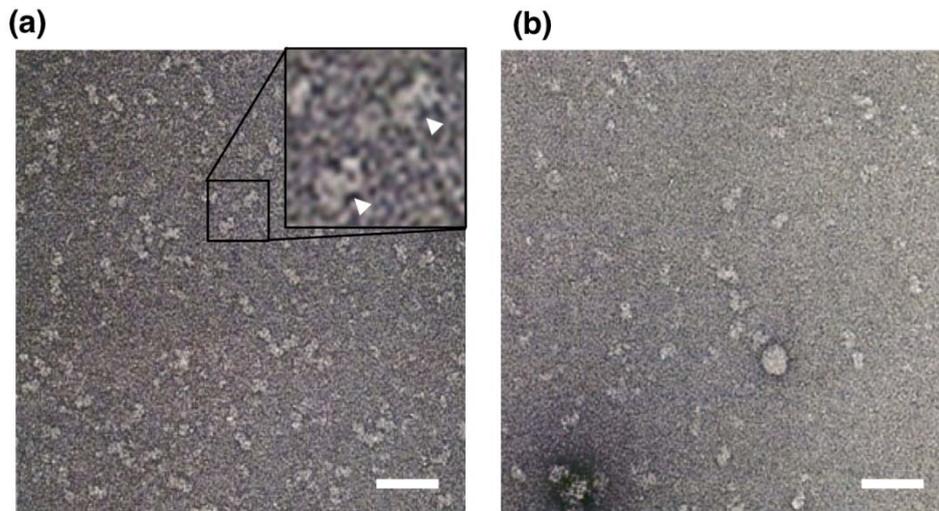


Fig. 16. h-PARP1 の電子顕微鏡写真

(a) Nicked dsDNA を加えた h-PARP1 サンプルのネガティブ染色像。インセットは、予測された二量体 h-PARP1 粒子の拡大図を示す (矢頭)。(b) dsDNA を加えた h-PARP1 サンプルのネガティブ染色像。Scale bar は 50 nm を示す。

64 枚の電子顕微鏡像から EMAN2 を用いて、4791 個の粒子像を手動で選択し、それらの粒子像をクラスター分類し、31 個のクラス平均化像を作成した(Fig. 17)。得られたクラス平均化像の多くは 2 回対称性を示した。

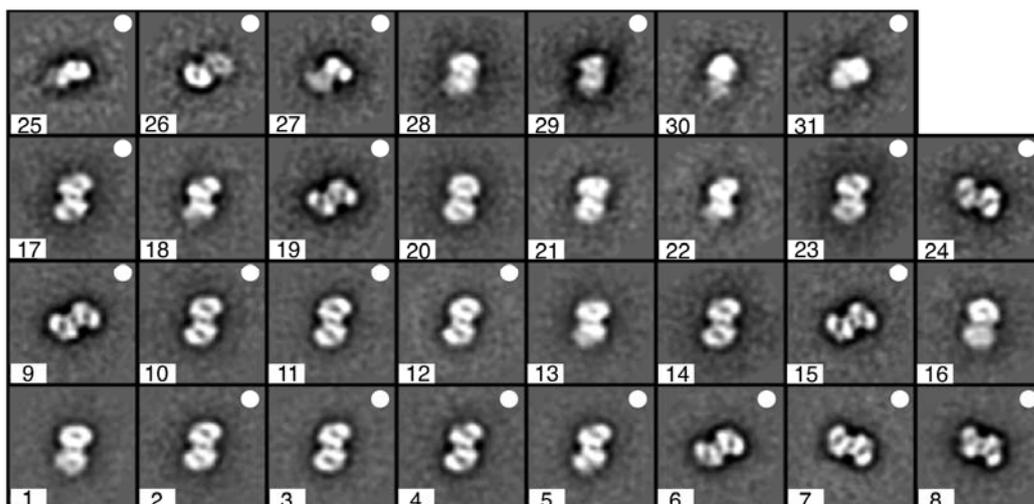


Fig. 17. h-PARP1 のクラス平均化像

h-PARP1 粒子のクラス平均化像。白い点で示されたクラスは初期モデル構築に用いた。

これらのクラス平均化像から 21 個を選択し、初期モデル(密度マップ)を作成した。初期モデルから全粒子像を用いた 3 次元再構成像を作成した。初回の 3 次元再構成は h-PARP1 の対称性を仮定せず(C1)に行った。その結果得られた 3 次元再構成像には明確な 2 回対象軸が認められたので、2 回目の 3 次元再構成では、2 回対称(C2)を仮定して精密化を行った (Fig. 18)。

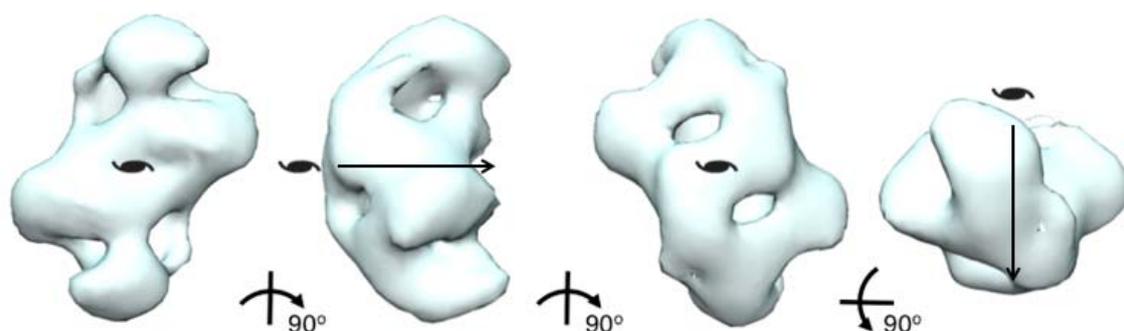


Fig. 18. h-PARP1 密度マップの三次元構成

h-PARP1 二量体の密度マップの (a) 正面図、(b) 側面図、(c) 背面図 (d) 上面図を示す。

分解能は、粒子像を二群にわけて独立に密度マップを再計算し、これら 2 つの独立した密度マップのフーリエ関数係数 (Fourier shell correlation : FSC) の相関係数が一定値を下回る波数で定義される。今回は相関係数 0.5 を閾値として用いて分解能は 28 Å と評価された (Fig. 19a)。また、粒子像のオイラー角の分布は、概ね全域に分布が認められることから、密度マップに深刻なバイアスがかかっていないと結論された (Fig. 19b)。

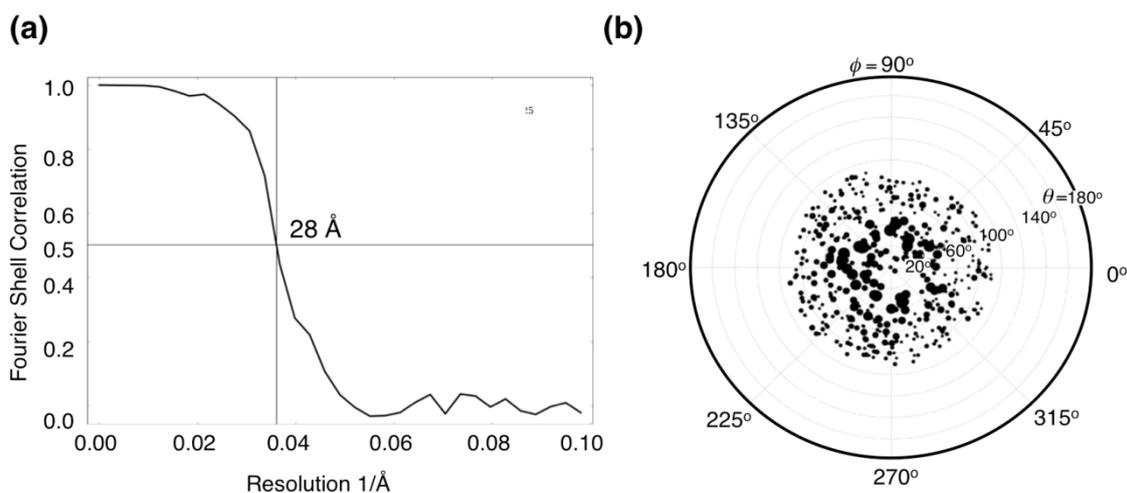


Fig. 19. h-PARP1 の FSC とオイラー角分布

(a) 標準偶数/奇数試験から、Fourier shell correlation (垂直軸)を波数(水平軸)に対してプロットした。(b) 粒子視野角のオイラー角分布。ドットの大きさが観測されたオイラー角の頻度に比例する。

結果として、中央部に大きめのドメインが配置し、そこからいくつかの小ドメインが対称に配置した3次元再構成像が得られた(Fig. 20)。h-PARP1の部分構造であるDNA結合ドメインが nicked dsDNA と結合する際に二量体を形成することを示唆する報告があるが[33]、これまでにh-PARP1の個々のドメインまたは、複数のドメインを欠失させた部分構造の結晶構造解析の結果[20]は単量体を示唆するものであった。今回の結果は、全長のh-PARP1が二量体を形成することを示した最初の構造生物学的な知見である。

h-PARP1の分子モデルのフィッティング

本研究で得られた全長h-PARP1の3次元再構成像は二量体構造を示したが、低分解能であり、信頼性のある原子モデルの構築は困難であった。そこで、現時点ではもっとも全長構造に近いBRCTドメイン及びDNA bindingドメイン中のzinc finger 2ドメインを欠失したh-PARP1の結晶構造[20]が、本研究で得られた密度マップにフィッティング可能か試みた。この結晶構造ではh-PARP1は4DQY A~C鎖に分割されているが、結果としてA~C鎖の相対配置を保ったままでのフィッティングは困難であった。このことから、少なくとも二量体形成時にはドメインの再配置が起こることが予想された。

このフィッティングの過程で、最大のドメインであるPARPドメイン(amino acid 662-1014、353アミノ酸残基からなる)が、密度マップ中央部分で二量体間の界面付近に位置し、サブユニット間で相互作用する場合に、比較的良好なフィッティングが得られた(Fig. 19)。

そこで、PARPドメインが密度マップ中央で相互作用しているモデル(Fig. 19)を出発点として、その他のドメインを手動で3次元再構成像にフィッティングし、さらに、発表された結晶構造[20]では欠けている部分については、別に単独で決定されたBRCTドメイン(PDB 2COK)及びzinc finger 2ドメイン(PDB 2L31)の立体構造を用いて密度マップの空いている領域に、ドメイン間のペプチドの連続性を考慮しながら当てはめることができた(Fig. 20)。

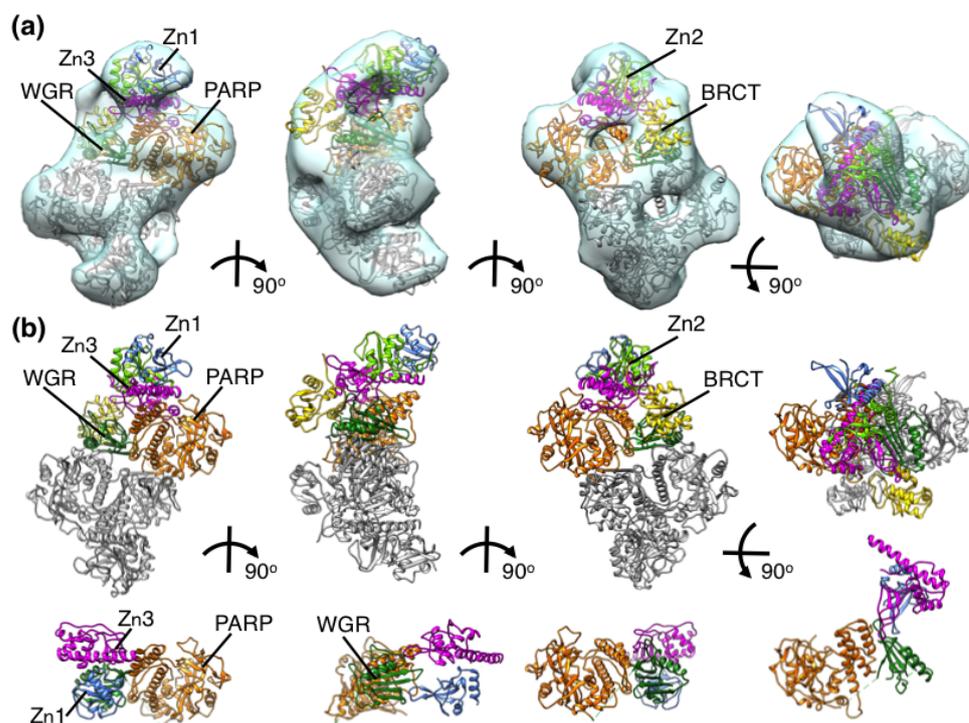


Fig. 20. h-PARP1 密度マップへのフィッティングモデル

(a) h-PARP1 二量体の密度マップに Zn1 (青)、Zn2 (黄緑)、Zn3、(紫)、BRCT (黄色)、WGR (緑)、PARP (橙) ドメインの結晶 / NMR structure をフィッティングしたモデル。(b) 密度マップを除いた同じモデル。なお最下段には、PARP ドメインの二量体モデルの上サブユニットとの比較のために、従来報告されている PARP1 結晶構造 (PDB 4DQY) [20] を PARP ドメインを電子顕微鏡モデルに重ね合わせて示した。ドメインの色は二量体モデルと同じである。

考察

本研究により全長 h-PARP1 の二量体構造の解析に初めて成功した。予測された二量体構造では、ポリ ADP-リボシル化反応の活性に関わる PARP ドメイン、WGR ドメイン、BRCT ドメインがサブユニット間インターフェースを形成することが示された。二量体形成にはこれら 3 つのドメインが必要と考えられるが、これまでこれら 3 つのドメインをすべて備えた試料による構造解析の報告例はない。このことから、今回初めて二量体の構造解析に成功した理由が説明できる。また、予測された二量体構造では、Zn1 ドメイン、Zn2 ドメインなどの DNA 結合ドメインは複合体の周辺部位に位置しており、DNA と相互作用が可能であると予想される。しかし、密度マップからは nicked dsDNA の結合は観測されなかった。このことから、本研究で解明された二量体構造 (Fig. 21a) は、ポリ ADP-リボシル化活性を持った構造に移行する前の休止状態である レスティング (resting) 構造と推定される。あるいは、DNA 結合ドメインが周辺部位に露出していることから、DNA 上で損傷部位を検索できる スキャンニング (scanning) 構造の可能性も考えられる (Fig. 21b)。

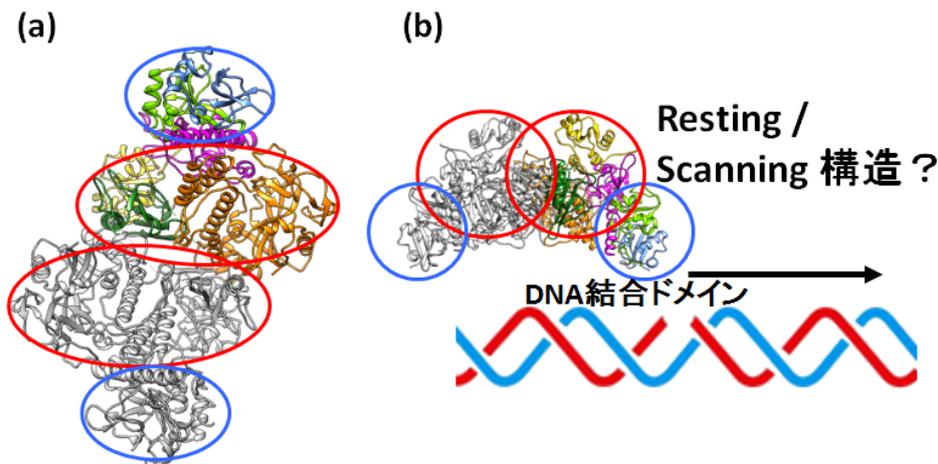


Fig. 21. h-PARP1 構造の予測モデル

一方、全長 1C-h-PARP1 発現系を用いた精製 1C-h-PARP1 の電子顕微鏡解析を試みた。しかし、活性化に必要である nicked dsDNA や dsDNA 存在下で h-PARP1 が著しい沈殿を形成したため、構造解析は成功しなかった。この理由として、ごく最近 NMR 測定や AFM 測定により提唱された PARP1 の複雑な構造変化モデルが関与しているのではないかと考えられた [34, 35]。このモデルでは、DNA 結合ドメインで損傷 DNA を認識した PARP1 は、その他のドメインが順次構造変化を起こして段階的に集合することで、活性構造を形成すると提唱されている。このモデルによると、本研究で推定された二量体構造は、損傷 DNA 上でいったん二量体を解離して、活性構造に移行する必要がある。本研究の試料は、

構造解析に用いるために非常に高濃度で調整されているため、この解離と構造変化の過程で変性シアクリゲーションを起こした可能性が考えられる(Fig. 22)。このことから、試料の調整法のさらなる工夫が必要であると考えられる。

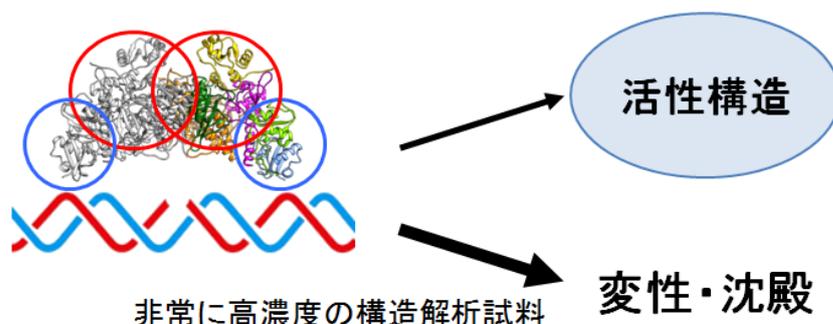


Fig. 22. 1C-h-PARP1 沈殿の推察モデル

また、本研究では N 末端にユビキチンを付加した h-PARP1 の電子顕微鏡単粒子解析を行った。この二量体構造で nicked dsDNA の結合が観測されなかった理由として、試料にユビキチンが付加されていることによる影響が疑われる。ユビキチンは N 末端の DNA 結合ドメイン付近にあることから、nicked dsDNA との結合を阻害した可能性が考えられる。ただし、電子顕微鏡解析に用いた試料は、nicked dsDNA 存在下で活性を示したため、DNA 結合能が全く失われているとは考えられなかった。一つの可能性として、スキヤンニングにより損傷 DNA を発見した PARP1 はレスティング/スキヤンニング構造と活性構造との平衡状態にあり、ユビキチン付加は、この平衡をレスティング/スキヤンニング構造に大きく傾けるのではないかと考えた。もう一つの可能性として、電子顕微鏡解析に用いた試料にはポリ ADP-リボシル化の基質である NAD⁺が添加されていないことによる影響が推定される。構造解析試料では分子の均一性を維持するため、基質を与えないことで、自己ポリ ADP-リボシル化反応を抑制している。もし活性構造の安定化に、基質である NAD⁺および自己ポリ ADP-リボシル化が必要であれば、活性測定では活性が確認され、構造解析では nicked dsDNA の結合が観測されなかった理由が説明できると考えられる (Fig. 23)。

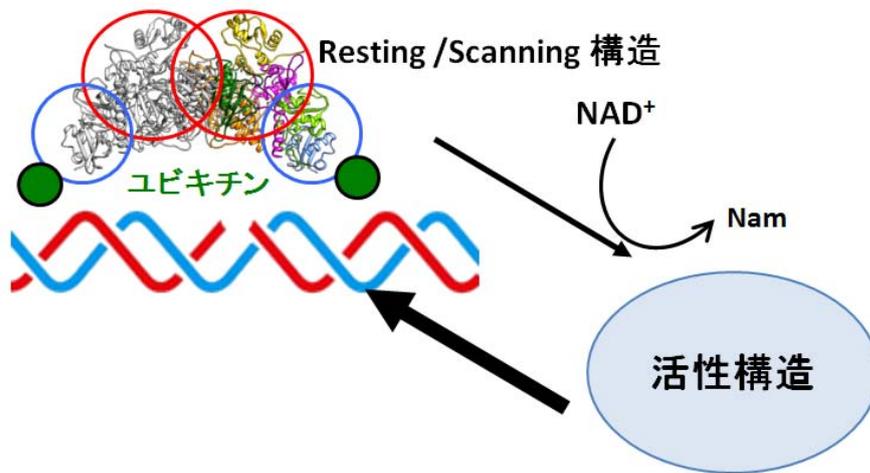


Fig. 23. ユビキチン付加 h-PARP1 構造の推察モデル
Nam: ニコチン酸アミド。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御指導いただきました長浜バイオ大学構造生物学研究室の白井剛教授、中江 摂助手、長浜バイオ大学の三輪 正直教授、旧蛋白質工学研究室の西 義介教授、さらに、h-PARP1 の発現ベクターを提供して下さった国立がん研究所センターの益谷 美都子博士、組み替え h-PARP1 獲得の為に助言いただきました長浜バイオ大学バイオサイエンス研究科の亀村 和生博士、1C-PARP1 plasmid を提供して下さった The Institute of Cancer Research, London, UK の Dr. Michael Ranes、電子顕微鏡単粒子解析においてご協力をいただきました九州大学の真柳 浩太博士に深謝いたします。また、長浜バイオ大学旧分子細胞生物学研究室のメンバーの方々にも御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012, 13:411-424.
- [2] Sugimura T. Poly(adenosine diphosphate ribose). *Prog Nucleic Acid Mol Biol.* 1973, 13: 127-151.
- [3] Miwa M, Ishihara M, Takishima S, Takasuka N, Maeda M, Yamaizumi Z, Sugimura T, Yokoyama S, Miyazawa T. The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 leads to 2) ribose-ribose linkage. *J Biol Chem.* 1981, 256: 2916-2921.
- [4] Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004, 26: 882-893.
- [5] Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006, 7: 517-528.
- [6] Miwa M, Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci.* 2007, 98: 1528-1535.
- [7] Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature.* 1980, 283: 593-596.
- [8] Benjamin RC, Gill DM. Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *J Biol Chem.* 1980, 255: 10502-10508.
- [9] Ménissier-de Murcia J, Molinete M, Gradwohl G, Simonin F, de Murcia G. Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA. *J Mol Biol.* 1989, 210: 229-233.
- [10] Le Cam E, Fack F, Ménissier-de Murcia J, Cognet JA, Barbin A, Sarantoglou V, Révet B, Delain E, de Murcia G. Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. *J Mol Biol.* 1994, 235: 1062-1071.
- [11] Althaus FR, Richter C. ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance. *Mol Biol Biochem Biophys.* 1987, 37: 1-237.
- [12] Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 1998, 18: 3563-3571.
- [13] Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Smulson ME. Purification and

- characterization of poly(ADP-ribosyl)ated DNA replication/repair complexes. *Methods Mol Biol.* 2011, 780: 165-190.
- [14] Kraus WL. PARPs and ADPrubosylation:50 years ... and counting. *Mol Cell.* 2015, 58: 902-910.
- [15] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005, 434: 913-917. Erratum in: *Nature.* 2007, 447: 346.
- [16] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005, 434: 917-921.
- [17] Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J Biol Chem.* 2011, 286: 10690-10701.
- [18] Langelier MF, Ruhl DD, Planck JL, Kraus WL, Pascal JM. The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *J Biol Chem.* 2010, 285: 18877-18887.
- [19] Iwashita A, Hattori K, Yamamoto H, Ishida J, Kido Y, Kamijo K, Murano K, Miyake H, Kinoshita T, Warizaya M, Ohkubo M, Matsuoka N, Mutoh S. Discovery of quinazolinone and quinoxaline derivatives as potent and selective poly(ADP-ribose) polymerase-1/2 inhibitors. *FEBS Lett.* 2005, 579: 1389-1393.
- [20] Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science.* 2012, 336: 728-732.
- [21] Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R. Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *J Biol Chem.* 1993, 268: 22575-22580.
- [22] Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R. The 40 kDa carboxy-terminal domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 forms catalytically competent homo- and heterodimers in the absence of DNA. *J Mol Biol.* 2004, 336: 105-114.
- [23] Pion E, Bombarda E, Stiegler P, Ullmann GM, Mély Y, de Murcia G, Gérard D. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dimerizes at a 5' recessed DNA end in vitro: a fluorescence study. *Biochemistry.* 2003, 42: 12409-12417.
- [24] Bauer PI, Buki KG, Hakam A, Kun E. Macromolecular association of

- ADP-ribosyltransferase and its correlation with enzymic activity. *Biochem J.* 1990, 270: 17-26.
- [25] Lilyestrom W, van der Woerd MJ, Clark N, Luger K. Structural and biophysical studies of human PARP-1 in complex with damaged DNA. *J Mol Biol.* 2010, 395: 983-994.
- [26] 石橋融子、鳥羽峰樹、田中義人、熊谷博史、松尾 宏「凝集剤による低濃度溶存態亜鉛処理の基礎的実験」福岡県保健環境研究所年報. 2010, 第 37 号: 64-66.
- [27] Amé JC, Kalisch T, Dantzer F, Schreiber V. Purification of Recombinant Poly(ADP-Ribose) Polymerases. *Methods Mol Biol.* 2011, 780: 135-152.
- [28] Burtscher HJ, Auer B, Klocker H, Schweiger M, Hirsch-Kauffmann. Isolation of ADP-ribosyltransferase by affinity chromatography. *Anal Biochem.* 1986, 152: 285-290.
- [29] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193: 265-275.
- [30] Yoshihara K, Hashida T, Yoshihara H, Tanaka Y, Ohgushi H. Enzyme-bound early product of purified poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977, 78: 1281-1288.
- [31] Kawamitsu H, Hoshino H, Okada H, Miwa M, Momoi H, Sugimura T. Monoclonal antibodies to poly(adenosine diphosphate ribose) recognize different structures. *Biochemistry.* 1984, 23: 3771-3777.
- [32] Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol.* 1999, 128: 82-97.
- [33] Pion E, Ullmann GM, Amé JC, Gérard D, de Murcia G, Bombarda E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry.* 2005, 44: 14670-14681.
- [34] Eustermann S, Wu WF, Langelier MF, Yang JC, Easton LE, Riccio AA, Pascal JM, Neuhaus D. Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1. *Mol Cell.* 2015, 60: 742-754.
- [35] Liu L, Kong M, Gassman NR, Freudenthal BD, Prasad R, Zhen S, Watkins SC, Wilson SH, Van Houten B. PARP1 changes from three-dimensional DNA damage searching to one-dimensional diffusion after auto-PARylation or in the presence of APE1. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45: 12834-12847.