

氏名(本籍)	うちだまさひろ 内田真啓(埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2927号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Overexpression of <i>Drosophila</i> poly (ADP-ribose) polymerase disrupts tissue polarity and organization of cytoskeletal F-actin (ショウジョウバエポリ(ADP-リボース)合成酵素の過剰発現は組織極性と細胞骨格Fアクチンの形成の異常を誘導する)
主査	筑波大学教授 医学博士 高橋 智
副査	筑波大学助教授 理学博士 志賀 隆
副査	筑波大学講師 博士(理学) 小林 麻己人
副査	筑波大学講師 博士(理学) 三輪 佳宏

論文の内容の要旨

(目的)

ポリADPリボース合成酵素(PARP: poly (ADP-ribose) polymerase)は真核細胞においてNADを基質としてアクセプタータンパク質をポリADPリボシル化する酵素として同定された。PARPは、DNA切断端に結合すると活性化されることや、活性型Caspase-3により切断されるというような生化学的特徴を持つことから、DNA修復やアポトーシス、細胞周期等に関与する可能性が考えられてきた。しかしながら現在までのところ、それらの現象との関係はほとんど明らかにされていない。生体内における活性化のメカニズムやアクセプタータンパク質との相互作用等を含めた生物学的機能はまったく不明のままである。そこで本研究では、発生におけるPARPの生物学的機能の一端を解明することを目的として研究を行った。

(対象と方法)

ショウジョウバエの複眼は、整然と配列する800個の個眼からなり、それぞれの個眼は、8つの光受容神経細胞と、それを取り巻く非神経細胞からなる。非神経細胞は、光受容細胞の上に並びレンズを分泌する4つのコーン細胞、個眼の表層部に前後に配置する一次色素細胞、隣接する個眼と共有し光受容細胞を取り巻くように交互に配置する各々6つの二次、三次色素細胞からなっている。発生におけるショウジョウバエの複眼形成は非常に厳密に制御されており、個眼構成細胞の数・配列・極性は全ての個眼において一定になっている。従って複眼発生の際の細胞増殖・分化・細胞死および極性調節の異常は個眼の配列異常として特異的、かつ高感度に検出される。複眼特異的発現系GMR (Glass Multimer Reporter)は、成虫複眼発生における分化開始に伴って活性化される複眼特異的転写因子Glassの活性によって、形態形成溝より後部においてのみ複眼原器特異的に遺伝子の過剰発現を可能にする。そこで本研究では、GMR発現誘導システムを用いてPARPを過剰発現させ、複眼発生におけるPARP過剰発現の影響を解析することで、発生におけるPARPの機能解明を試みる。更に熱ショック誘導による全身発現系を用いて複眼および他の表皮組織におけるPARP過剰発現の影響を解析した。

(結果)

1. pGMRベクターにショウジョウバエPARP cDNAを挿入した発現ベクターを用いて、遺伝子導入体*GMR-PARP*を樹立したところ、全てにおいて個眼の配列異常による複眼の形成異常が確認された。組織学的解析により、成虫複眼における個眼の極性の異常が観察された。またこの表現型は、導入遺伝子数の増加に伴って増強した。
2. 個眼を構成する細胞の数に変化は見られず、さらにPARP過剰発現が細胞周期・細胞死に影響を及ぼさないことが明らかになった。
3. 蛹期中期の網膜における細胞骨格アクチン線維の重合が阻害されていることが明らかになった。
4. 全身にPARPを熱ショックにより誘導することの出来る遺伝子導入体を樹立したところ、複眼以外の組織においても細胞骨格形成異常、ならびに組織極性異常が誘導された。このことからPARP過剰発現が、細胞骨格形成に影響を及ぼしていることが確認された。
5. PARP過剰発現により表現型はFz (*Frizzled*), Dsh (*dishevelled*), RhoAなどの既知の組織極性遺伝子の変異体の表現型に酷似していた。それらの遺伝子の変異体・遺伝子導入体を用いて、遺伝学的解析を行ったところ、Fz, Dshとの遺伝的相互作用は確認されなかった。しかし、Rho GTPaseファミリーの一つであるRhoA過剰発現の影響が、PARP共発現により抑制されることが明らかになった。更に、他のRhoファミリー分子であるRacおよびCdc42との遺伝学的解析を行ったが、それらとPARPとの相互作用は確認出来なかった。

(考察)

*GMR-PARP*複眼原基において細胞死が若干増加していた。仮にPARP過剰発現の影響として直接的に細胞死が誘導されたならば、成虫複眼における細胞数の減少が観察されるはずである。しかしながら成虫複眼(蛹期網膜)における細胞数はwild-typeと変わりなかった。さらに、この細胞死が組織極性異常の原因になっている可能性も考えられたが、p35をPARPと共発現させ、細胞死を抑制しても、組織極性異常が回復しなかったことから、その可能性は否定された。以上のことから*GMR-PARP*に観られた細胞死の増加は、細胞形態・極性異常により二次的に誘導されたものである可能性が示唆された。

PARP過剰発現により細胞骨格Fアクチンの重合が阻害された。遺伝学的解析により、これはRhoAを介したシグナル伝達経路を阻害したためであることが強く示唆される。しかしながらPARPが他の細胞骨格制御遺伝子やアクチン分子そのものの転写に影響を与えた事は否定できない。更に、PARP過剰発現により合成されたポリADPリボースの分解産物として、ADPリボースが過剰に産生され、細胞質に蓄積したADPリボースがRhoAやアクチンのモノADPリボシル化に影響を及ぼした可能性も考えられる。ショウジョウバエ培養細胞や哺乳類細胞を用いて、PARP過剰発現の細胞骨格形成およびRhoA活性化への影響を解析することにより、そのメカニズムが明らかになると考えられる。

(結論)

本研究の結果から、発生においてPARPが、おそらくRhoAシグナル伝達経路との相互作用を介して、組織極性の決定や細胞骨格の構築に関与する可能性が示された。また、核と細胞質・細胞膜とを結びつけるシグナル伝達経路にPARPおよびRhoAが深く関与する可能性が考えられた。本研究における発見が、がん細胞の転移・浸潤に深く関与する細胞の運動性制御機構に関する研究に、新たな局面を与えると期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者提出の論文は、遺伝子欠損マウスの解析からも未だ明らかになっていない、ポリADPリボース合成酵素(PARP: poly (ADP-ribose) polymerase)の生体内における機能を、様々な遺伝子改変操作を用いることができる

ショウジョウバエの系を用いて、複眼特異的にPARPを過剰発現することによって、その機能を明らかにしようと試みたものである。実験全体の計画は、良く設計されており、解析の方法も的確であると考えられた。

一方で、本研究は、PARPの過剰発現実験による解析であり、観察された結果がPARP本来の機能によるものなのか、PARPの過剰発現による二次的な表現型なのかは、必ずしも明らかにできてはいない。例えば、PARPの過剰発現によりFアクチンの重合が阻害されたことも、著者らが考察しているように、PARPの過剰発現により合成されたポリADPリボースの分解産物として、ADPリボースが過剰に産生され、細胞質に蓄積したADPリボースがRhoAやアクチンのモノADPリボシル化に影響を及ぼした可能性も残されている。このような可能性を否定するためにも、PARP欠損のショウジョウバエラインを確立することが重要と考えられたが、論文審査会の質疑の中で明らかにされたように、PARP欠損ラインは、著者を含めた多くの研究者の努力にもかかわらず確立されておらず、また、PARP遺伝子領域を含む染色体の欠失変異体は致死となることから、PARP遺伝子はショウジョウバエの発生に不可欠の遺伝子であることが予想され、特別な方法を用いない限り、PARP欠損個体は得られないものと考えられた。

また、論文の考察について、質疑の中で明らかにされた内容をさらに追加することを求めたところ、内容を追加して再提出がなされ、質疑の内容が記述された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。