

氏名(本籍)	かな い まさ ゆき 金 居 正 幸 (栃木県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3515 号
学位授与年月日	平成 16 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	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Involvement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 and Poly(ADP-Ribosyl) ation in Regulation of Centrosome</b> (ポリ ADP リボース合成酵素 1 とポリ ADP リボシル化の中心体機能への関与)
主 査	筑波大学教授 薬学博士 永 田 恭 介
副 査	筑波大学教授 医学博士 加 藤 光 保
副 査	筑波大学教授 医学博士 高 橋 智
副 査	筑波大学教授 医学博士 山 田 信 博

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

多くのがん細胞は染色体異常を有している。この原因の1つとして考えられるのが、中心体の機能異常である。中心体は細胞周期 G1/S 期に複製し、細胞分裂期において染色体を正常に娘細胞に分配する機能を担っている。近年、中心体タンパク質の翻訳後修飾が中心体の機能発現に大きく関与していることが報告されている。タンパク質の翻訳後修飾酵素の1つであるポリ ADP リボース合成酵素 (PARP-1) は、標的タンパク質にポリ ADP リボースを付加・重合することで、そのタンパク質の機能を変化させることが報告されている。また、このポリ ADP リボシル化は PARG (ポリ ADP リボース分解酵素) によって可逆的かつ迅速に分解される。PARP-1 のノックアウトマウスでは染色体不安定性が顕著に見いだされ、PARP-1 と染色体安定性の関連が示唆されている。これらの知見をもとに、本研究では、PARP-1 が中心体の機能制御に関わり、よって染色体の安定性維持に関与している可能性について検討した。

### (対象と方法)

解析には、PARP-1 ノックアウトマウスと野生型マウスより調製したマウス胎児線維芽細胞を用いた。PARP-1 とポリ ADP リボシル化タンパク質の局在や中心体数を調べるために、抗 PARP-1 抗体と抗ポリ ADP リボース抗体および中心体のマーカータンパク質であるガンマチューブリンに対する抗体を用いて免疫染色を行った。中心体の生化学的な解析のために、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて中心体画分を得た。

### (結果)

著者はこれまでに、いくつかのがん細胞において、PARP-1 が核だけでなく、中心体にも局在することを明らかにしてきた。本研究では、最初にマウス胎児由来の線維芽細胞を用いて、PARP-1 によって合成されたポリ ADP リボースも中心体に局在していることを示した。細胞を PARP-1 の阻害剤である 3-aminobenzamide で処理すると、60%の細胞で中心体の複製異常が認められた。さらに、PARP-1 のノッ

クアウトマウスから樹立された胎児線維芽細胞においては、約30%の細胞で中心体数の異常が認められた。この現象は、ノックアウトマウスから調製した初代培養細胞においても確認された。このようなノックアウト細胞における中心体数の異常は、DNA合成阻害剤を用いた中心体複製アッセイにより、G1/S期における中心体複製の異常が原因となっている可能性を示した。生化学的な方法により、複数の中心体タンパク質がポリADPリボシル化を受けていることを明らかにした。中心体においてポリADPリボシル化を受けるタンパク質の1つとして、がん抑制遺伝子産物であるp53を同定した。一方、ノックアウトマウス由来細胞から分離した中心体画分ではポリADPリボシル化されたタンパク質が消失していることを見いだした。

#### (結論と考察)

本研究により、PARP-1が中心体関連機能の1つである染色体の安定性維持機構に関与していることが示された。

PARP-1によって合成されたポリADPリボースは、PARGによって速やかに分解される。本研究と関連した研究において、PARGが細胞周期間期においては核に、分裂期においては細胞質に移動すること、また中心体にも局在することを明らかにした。従って、タンパク質のポリADPリボシル化代謝に関わるPARP-1やPARGおよびポリADPリボシル化を受けているタンパク質の中心体局在と中心体数の維持機構の間には密接な関連があると考えられる。つまり、中心体にてPARP-1とPARGが競合して、標的タンパク質のポリADPリボース代謝を行うことにより、正常な中心体機能を制御していると考えられる。その一つの経路として、p53が関わる中心体機能の上流にPARP-1が位置することが示唆された。

中心体複製異常は、PARP-1の欠損または酵素活性の低下などで引き起こされるのみならず、がん抑制遺伝子産物p53やBRCA1あるいはがん遺伝子産物RasやMDM2などによっても引き起こされることが報告されている。本研究に関連して、神経芽細胞腫において悪性化因子として報告されているMYC-Nの過剰発現によりDNA損傷後に中心体複製異常が引き起こされることも見いだした。これらのがん関連タンパク質あるいはその発現や機能発現調節にかかわる因子のポリADPリボシル化が、緻密な中心体の複製を制御しているものと考えられる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、タンパク質のポリADPリボシル化反応に関わるPARP-1ノックアウト細胞を用いて、PARP-1自身が中心体に局在し、中心体に局在するタンパク質のポリADPリボシル化に関与していることを示すとともに、PARP-1が中心体の数と機能を維持する機構に関わっていることを明らかにしたものであり、細胞の分裂機構と細胞のがん化機構を理解するうえで価値ある研究と考えられる。

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。