

氏名(本籍)	花井修次(東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,148号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Genomic Organization of <i>Drosophila</i> Poly (ADP-ribose) Polymerase and Distribution of its mRNA during Development (ショウジョウバエ・ポリ(ADP-リボース)合成酵素遺伝子の構造と発生における発現の解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	坂内四郎
副査	筑波大学教授	博士(医学)	梶正幸
副査	筑波大学教授	獣医学博士	八神健一
副査	筑波大学助教授	理学博士	石井哲郎
副査	筑波大学講師	医学博士	高橋智

論文の内容の要旨

(目的)

ポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)は、DNAのニック及び切断端特異的に結合することで活性化され、NADを基質として様々な核タンパク質にADP-リボース残基を付加重合する翻訳後修飾反応を触媒する。主な標的はヒストン、DNAトポイソメラーゼ、PARP自身である。その為、PARPはDNA損傷後の修復、細胞周期、癌化や細胞死との関係が注目されてきた。近年、哺乳類PARPがアポトーシスにおいてカスパーゼによって限定分解を受けることが明らかにされたがその意義は明らかでない。

ショウジョウバエは遺伝的、発生学的に扱いやすい実験動物であり、多くの突然変異株が保存されており、また、P因子導入やγ線、化学物質による遺伝子破壊固体の作成が可能である。PARPの生理的役割を固体レベルで解析するためにショウジョウバエのPARP遺伝子(*D. PARP*)の構造解析と発生過程に於ける遺伝子発現を解析した。

(方法)

D. PARP cDNAを用いてショウジョウバエゲノムライブラリーをスクリーニングし、得られたコスミド・ファージクローンの制限酵素地図を作成した。これらクローンからエクソン、プロモーターを含む断片をサブクローン化し塩基配列を決定した。プロモーター領域についてGCGソフトウェアにより転写因子結合部位の検索を行うとともに胚よりポリAリッチRNAを精製し5'-RACE法で転写開始点を決定した。さらに第一エクソン上流1kbまたは2kbの断片をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ上流に挿入したベクターを構築し、ショウジョウバエ胚由来のKC細胞に導入して転写活性を測定した。

遺伝子のコピー数を知るため、D. PARP cDNAの全長又は部分長をプローブとしてゲノムサザンプロットを行った。また、唾腺染色体の*in situ* hybridizationによって遺伝子座を決定した。

PARP発現の変化を観察するため発生の各段階における全RNAのノーザンプロット法と胚発生及び卵形成の*in situ* hybridizationによってPARP mRNAの時間的空間的分布を観察した。

(結果)

ショウジョウバエPARPの翻訳領域は6つのエクソンに分れており、DNA結合ドメインはエクソン1から4

に、自己修飾ドメインはエクソン5に、触媒ドメインの大部分は第6エクソンにコードされていた。ゲノムサザンプロットの結果は制限酵素地図と一致した。エクソン2, 3特異的なプローブでは、単一のバンドを認めた。唾腺染色体の解析でPARP遺伝子は第3染色体動原体付近の81Fにマップされた。転写開始点は開始コドン上流76bpで、その上流にはTATAボックス、CCAATボックスを認めた。プロモーター領域1kbの断片と2kbの断片はKC細胞において同等の転写活性を示した。ノーザンプロット法により初期胚で最大の発現を示し、その後減少し産卵後8から12時間胚で再び上昇した。幼虫では発現を認めず、蛹と成虫で発現を認めた。*in situ* hybridizationでは初期胚では一様に強く染色されたが生殖細胞の起源である極細胞は染色されなかった。後期胚では斑点状の分布を示し、囲肛板が強く染った。形成中の卵胞では哺育細胞で発現し卵細胞に移行していた。

(考察)

ショウジョウバエPARP遺伝子は6つのエクソンから成る全長60kb以上のシグナルコピー遺伝子であった。ヒトPARP遺伝子は23のエクソンから成り全長43kbで一つの遺伝子と2つの偽遺伝子が存在する。通常Znフィンガーは単一のエクソンにコードされるが、PARPにおいてはヒト、ショウジョウバエともイントロンに分断されていた。プロモーター領域には典型的なTATAボックス、CCAATボックスがあり、哺乳類PARP遺伝子がこれらを持たずGCに富む領域を持つ点と異なる。ヒトPARPプロモーター転写活性は12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetateにより上昇したと報告されているがショウジョウバエKC細胞では活性上昇を認めなかった。PARP mRNAは初期胚で最も高いがこれは卵胞での結果に照らして母性由来に蓄積したものと考えられる。後期胚での斑点状のPARP発現細胞の分布はこの時期にアポトーシスを起こす神経細胞の分布に酷似していた。哺乳類細胞ではS期にPARP mRNAの増加が見られDNA合成への関与が示唆されているが、核・細胞分裂を伴わないDNA複製が行われるショウジョウバエ幼虫ではPARP発現を認めなかった。PARP発現が最大となる初期胚では迅速な核・細胞分裂が行われ、これらのPARPへの関与が示唆される。従来の哺乳類での研究でPARPはDNA修復に関与するとされてきたが、今回新たに発生における発現が観察された事は興味深い。本研究はショウジョウバエにおける突然変異固体作成・過剰発現等の基礎となり、さらには、生体内でPARPと機能的に相互作用する遺伝子産物の解明につながるものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)はその生理機能において依然として未知の部分の多い酵素である。本論文はその機能の探求に資することを目的として、ショウジョウバエのPARP遺伝子の構造を明らかにした。その結果、本酵素の固体発生における発現経過がはじめて明かになった。この遺伝子と哺乳類PARPの遺伝子を比較すると、多くの類似点と相違点がある。これらを詳しく解析していくことは、今後、PARPの機能の全容を解明するのに大きく寄与すると思われる。

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。