

氏名(本籍)	かわむとものり 河村智教(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2,135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	An Alternative Form of Poly(ADP-ribose) Polymerase in <i>Drosophila melanogaster</i> and its Ectopic Expression in Rat-1 Cells (オルターナティブ型ショウジョウバエポリ(ADP-リボース)合成酵素の, Rat-1細胞における異所性発現による機能解析)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 榊 正 幸
副査	筑波大学教授 医学博士 濱 口 秀 夫
副査	筑波大学講師 医学博士 高 濱 洋 介
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-リボシル)化反応は、真核生物におけるタンパク質の翻訳後修飾のひとつで、ポリ(ADP-リボース)合成酵素(以下PARPと略す)により触媒される。PARPは、DNAの損傷で生じたnickに特異的に結合することによって活性化されるが、PARPによる核内タンパク質の修飾の意義や、その他の生物学的な役割は、今なおよくわかっていない。

われわれは、PARPの生理的機能を検討する目的で、変異体の豊富なショウジョウバエから、全領域を含む完全型(PARP I)、及びalternative splicingにより、automodification domainに相当するexon5を欠失した欠失型(PARP II)cDNAを単離した。欠失型のPARP IIは*Drosophila*の胚発生段階で発現していることが、Northern blottingとRT-PCRにより確認されており、発生過程で、なんらかの機能を果たしているものと考えられる。

本研究では、PARP IIの生理機能を明らかにすることを目的に、PARP IIが存在しないRat-1細胞にPARP IIを異所性に発現させ、細胞機能の変化の有無を解析した。

### (対象と方法)

PARP I、PARP IIの機能を調べるために、MMTV-プロモーターを用いて、それぞれの発現ベクターを作製した。内在性のPARPの影響を除くため、この発現ベクターをラット繊維芽細胞由来Rat-1細胞にトランスフェクションし、細胞のクローニングを行った。これに、グルココルチコイドである、デキサメサゾンを追加してPARPに過剰発現させ、細胞増殖、及び細胞形態に与える影響を観察した。また、PARP発現後に起きた変化の発生機序を検討する目的で、フローサイトメトリーを用いて、

- 1) propidium iodide (PI) 及び、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスの有無の検討、
  - 2) TUNEL法によるエトポサイドに対する感受性の差の検討、
  - 3) 細胞周期の変化の有無の検討
- を行った。

## (結果)

デキサメサゾンによる誘導後、PARP II transformantにおいて細胞増殖の抑制、及び形態の変化が観測された。PARP I transformantでは、誘導前後で、細胞増殖や形態に有意な差は見られなかった。PARP II を誘導後、PI染色し、フローサイトメトリーで解析したところ、蛍光の強い細胞の割合がやや増加したが、TUNEL染色で陽性細胞は認められず、少なくともDNA fragmentationは観察されなかった。また、PARP II を含めた各transformantにおいて、PARP誘導前後の細胞周期に有意な変化はみられなかった。また、各transformant間で、エトポサイドに対する感受性に明らかな差異は認められなかった。

## (考察と結語)

PIは、アポトーシス細胞のみならず、ネクローシス細胞を含め、非特異的な障害の加わった細胞にも取り込まれるので、PARP II 誘導後の形態変化は、何らかの細胞膜（細胞骨格）の変化による可能性が考えられる。また、細胞増殖の抑制は、細胞死の増加や細胞周期の変化によるものではなく、細胞膜の変化による細胞分裂速度の遅延によるものと推測される。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

ポリ（ADP-リボシル）化反応は、真核生物におけるタンパク質の翻訳後修飾のひとつで、ポリ（ADP-リボース）合成酵素（以下PARPと略す）により触媒される。ショウジョウバエのPARPをコードするcDNAには、全蛋白翻訳領域を含む完全型cDNA (PARP I) と alternative splicingにより automodification domain に相当する exon5 を欠失した欠失型 (PARP II) cDNA がある。本研究はPARP I cDNA と PARP II cDNA を Rat-1 細胞に異所性に発現させ、細胞機能の変化の有無を検討する事によりPARP II の生理機能を明らかにしようとしたものである。

PARP II の異所性発現によって細胞増殖の抑制と形態の変化が観察されたが、PARP I の異所性発現では明らかな変化は無かった。PARP II の異所性発現による変化はアポトーシスの結果ではなく、細胞膜の変化による細胞分裂速度の遅延によるものと考えられた。形態変化に関しても細胞膜ないしは細胞骨格の変化による可能性が考えられたが、原因は明らかではなかった。

本研究はPARPの機能的な解析を進める為の1つの視点を与えたものと評価される。今後は、PARP II cDNA 導により実際に遺伝子産物の過剰発現が起こったか、その結果ポリ（ADP-リボシル）化が増加したか、細胞増殖の抑制や形態変化がどの様なメカニズムで起こったか等の検討が必要であると判断された。

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。