

氏名(本籍)	小 ^こ 山 ^{やま} 由 ^ゆ 美 ^み (埼玉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,147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	Poly (ADP-ribose) polymerase interacts with novel <i>Drosophila</i> ribosomal proteins, L22 and L23a, with unique histone-like amino-terminal extensions (ショウジョウバエ・ポリ(ADP-リボース)合成酵素はアミノ末端にヒストン類似の配列を持つ新規なりボソームタンパク質 L22, L23a と相互作用する)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	榊 正 幸
副査	筑波大学教授	理学博士	坂 内 四 郎
副査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年
副査	筑波大学客員教授 (理化学研究所)	医学博士	林 崎 良 英
副査	筑波大学助教授	理学博士	志 賀 隆

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

ポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)は、真核生物におけるタンパク質への翻訳後修飾の一つであるポリADPリボシル化反応を担う酵素として発見された。現在まで、この酵素が遺伝子の修復、複製、アポトーシスなどに関与しているという報告があるが、生物学的な意義は解っていない。我々は遺伝学的解析が容易なショウジョウバエを用いてPARPの意義を調べて来た。ショウジョウバエPARP cDNAは他の種と異なり2種類のcDNAが存在し、そのうちの1つはPARPの自己修飾領域(AM domain)に対応する遺伝子が欠損したものであった。ショウジョウバエPARPのこの領域にはロイシンジッパーモチーフがあり、他のタンパク質と相互作用している可能性が指摘された。そこで我々はこの自己修復領域と相互作用する因子を探索し、PARPの機能を解明しようと試みた。

(対照と方法)

ショウジョウバエPARPのAM domainをglutathione S-transferase (GST)との融合タンパク質として大腸菌内で発現し精製した。またAM domainのロイシンジッパーモチーフの2, 3番目のロイシンをプロリンに変えた変異体も同様に精製した。これらをタンパク質プローブとしてショウジョウバエλgt11 cDNAライブラリーより、Far-Western screening法を用いて、結合するタンパク質をコードするcDNAを単離した。単離された遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST及びFASTAプログラムを用いてホモロジーとモチーフの検索を行った。

(結果)

1) 遺伝子の単離

60万個のショウジョウバエλgt11 cDNAライブラリーより19個のクローンを単離した。これらのクローンはGST-AM (AM domainとGSTとの融合タンパク質)に結合性を示すが、GSTには結合性を示さない。単離したcDNAクローンはPARP-binding protein (PBP)と名付けた。cross-hybridizationによって、19個のクローンは6種類の独立のcDNAクローンからなることがわかった。今回の研究の対象としたPBP-3とPBP-12は19個のクローンの中でそれぞれ4個と2個の割合で得られた。

2) 遺伝子配列

PBP-3, PBP-12cDNAの遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列のコンピュータ解析の結果, PBP-3とPBP-12のcarboxyl末端は真核生物のリボソームタンパク質L23a, L22とそれぞれ60%以上のホモロジーを持つことがわかった。またPBP-3は各種の真核生物のリボソームタンパク質L23に共通してみられるrRNA結合共通配列をcarboxyl末端にコードしていた。PBP-3, PBP-12は共に, ショウジョウバエ以外のリボソームタンパク質L23aやL22のcDNAよりも約2倍長く, amino末端にhistone H1に類似したアラニン, リシン, プロリンの豊富な配列を余分に持つ新規なリボソームタンパク質であることがわかった。

3) ノーザンブロット解析

PBP-3, PBP-12のmRNAはショウジョウバエの胚および培養細胞株のS2細胞の両方において, 1.1kbと1.2kbの単一なバンドとして確認された。

4) ロイシンジッパーモチーフ変異体タンパク質の結合実験

PBP-3, PBP-12のアミノ酸配列にはロイシンジッパーモチーフは見られなかった。PARPのロイシンジッパーモチーフ変異体GST-AMタンパク質を用いてFar-western blottingを行った結果, 結合能はGST-AMタンパク質と変わらなかった。

(考察と結語)

ホモロジーおよびモチーフ検索の結果, PBP-3, PBP-12はショウジョウバエリボソームタンパク質L23aとL22であることが強く示唆された。またBDGP/HHMIショウジョウバエESTプロジェクトにより登録されている遺伝子の20クローン以上が, PBP-3, PBP-12 cDNAの配列と一致することから, このcDNAはクローニングの際に生じたアーチファクトでは無いことが証明された。

最近, 電子顕微鏡によりPARPはHeLa細胞内では核小体に濃縮され, RNA合成阻害剤を加えると核質内に拡散していくとの報告がある。核小体はリボソーム合成の場であり, リボソームタンパク質が豊富に存在する。今回の実験で, 単離されたL22およびL23aがPARPと相互作用するという結果はこの報告に矛盾しない。

今回ショウジョウバエPARPに存在するロイシンジッパーモチーフは, L22およびL23aのPARPとの相互作用には機能していないことが分かった。最近, 塩基除去修復タンパク質であるXRCC1がPARPのAM domainとそれぞれBRCT (BRCA1 C terminus) モチーフを介して結合することが報告された。このモチーフはタンパク質間相互作用を示唆するもので, DNA修復やDNA損傷応答性細胞周期チェックポイントに関連するタンパク質に広くみられる。よってL22およびL23aのPARPとの相互作用はAM domainのBRCTモチーフを介して結合している可能性がある。

ショウジョウバエのリボソームタンパク質L22とL23saは, 他の生物種で対応するL22とL23aに比べてリシンが豊富にあるヒストン様配列をamino末端に持っているが, この意義については不明である。ヒストンH4はヌクレオソームを構成する際にリシン残基にアセチル化を受けることが分かっている。またヒストンH1, H2B, H4はポリADP-リボシル化を受けることも報告されている。このことから, ショウジョウバエL23aとL22はamino末端のヒストン様配列を介してDNAと結合し, ポリADP-リボシル化やアセチル化を受けることにより核小体の機能調節を行っているかもしれない。

審査の結果の要旨

本研究は, ショウジョウバエ・ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) の自己修飾領域と相互作用する因子を同定したものである。今回解析したPBP-3とPBP-12は, そのカルボキシル末端で真核生物のリボソームタンパク質L23a, L22とそれぞれ60%以上の相同性を持ち, アミノ末端にはヒストンH1に類似したアラニン, リシン, プロリンの豊富な配列を持つ新規なリボソームタンパク質であった。この結合はPARPに存在するロイシンジッパー

モチーフではなく、BRCT (BRCA1 C terminus) モチーフを介している可能性が示唆された。

本研究は PARP の機能解析を進める為の指針を与えたものと評価される。今後は PARP と PBP-3 と PBP-12 の結合の意義を解明、PARP の機能的な解析が待たれる。

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。