

[別 紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目: Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (*Parg*)欠損マウス ES 細胞株の

DNA 損傷に対する感受性亢進

指導教官: 高戸毅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名: 藤原久子

要旨

Poly ADP-ribosyl 化反応とは、poly(ADP-ribose) polymerase (*Parp-1*)によって細胞内の NAD を基質としてポリ(ADP-リボース)を生成し、DNA 修復応答、クロマチン構造の維持などに関与している生体反応である。ポリ(ADP-リボース)は、poly(ADP-ribose) glycohydrolase (*Parg*)によって分解されるが、未だに *Parg* の有用な阻害剤がないために、*Parg* の機能については未だに不明な点が多い。

本研究では、poly(ADP-ribose) glycohydrolase (*Parg*)遺伝子欠損マウス胚性幹(ES)細胞株を樹立し、それを用いて *Parg* の DNA 損傷に対する応答能について調べた。

マウス ES 細胞 J1 の *Parg* 遺伝子のエクソン 1 を両アレル共に破壊し、*Parg*⁺ ES 細胞及び *Parg*⁻ ES 細胞を作製した。まず、片方のアレルの *Parg* エクソン 1 内の *Nar I* 切断部位にネオマイシン耐性遺伝子カセットを挿入してエクソン 1 を破壊した *Parg*^{+/+} ES 細胞株を単離した。

更に、*Parg*^{+/+} ES 細胞株のもう片方の *Parg* エクソン 1 内の *Nar I* 切断部位にピューロマイシン耐性遺伝子カセットを挿入して両アレルとも破壊した *Parg*⁻ ES 細胞株を樹立した。このようにして得られた *Parg*^{+/+} 及び *Parg*⁻ ES 細胞株について性状解析を行い、さらに DNA 損傷に対する応答を調べ、*Parg* 遺伝子がどのような働きをしているのかを調べた。

まず *Parg*^{+/+} ES 細胞株および *Parg*⁻ ES 細胞株の増殖能を調べた。その結果、増殖速度及び飽和密度は各細胞間で有意差はなく、*Parg* の欠損は細胞増殖に影響を

及ぼさないことが分かった。

ノーザンブロット法により、*Parg* 遺伝子の mRNA の発現を調べたところ、*Parg*^{-/-} ES 細胞株では *Parg*^{+/+} ES 細胞株と比較して約 6 分の 1 に低下していた。また、RT-PCR を行ったところ、*Parg*^{-/-} ES 細胞株で、targeting を行ったエクソン 1 内の *Nar* I 切断部位より下流部分のみから転写されている truncated 型 *Parg* mRNA が残存していた。

細胞の粗抽出液を調製し、*Parg* 活性を計測したところ、野生株と比較して *Parg*^{-/-} ES 細胞株では ADP-ribose 産生量は約 50% に低下しており、*Parg*^{-/-} ES 細胞株では、未消化の長鎖ポリ ADP-リボースが認められた。残存する *Parg* 活性は、*Parg* 遺伝子由来の truncated mRNA に由来する可能性と、他の *Parg* ファミリー分子による可能性がある。

Poly(ADP-ribose) は *Parg* により ADP-ribose へ、phosphodiesterase により phosphoribosyl AMP および AMP に分解される。*Parg*^{-/-} ES 細胞株においても *Parg*^{+/+} ES 細胞株と同様に、phosphoribosyl-AMP の産生は全く認められなかったことから、細胞内での poly(ADP-ribose) の分解は、phosphodiesterase ではなく *Parg* が担うことが示唆された。

ES 細胞のタンパク質の polyADP-ribosyl 化を抗(polyADP-ribose) に対するウェスタンブロット法により検討したところ、無処理状態では、*Parg*^{+/+} 及び *Parg*^{-/-} ES 細胞株の間で差異は認められなかったが、アルキル化剤 methylmethanesulfonate を添加して 1 時間後、*Parg*^{-/-} ES 細胞において顕著な poly(ADP-ribosyl) 化の上昇が認められた。

更に、得られた *Parg*^{+/+}、*Parg*^{+/-} 及び *Parg*^{-/-} ES 細胞株を用いて、アルキル化剤である methylmethanesulfonate、過酸化水素及び γ 線照射による DNA 損傷後の生存率をコロニー形成能で測定した。その結果、過酸化水素に対しては *Parg*^{-/-} ES 細胞株は野生株と同様の致死感受性を示したが、methylmethanesulfonate 及び γ 線照射に対しては、*Parg*^{+/-} ES 細胞株では *Parg*^{+/+} ES 細胞株と比較して、約 1.5-2.0 倍致死感受性が亢進していることが分かった。

次に、*Parg* の欠損による MMS 処理後の致死感受性の亢進の原因を検討した。MMS 処理後、*Parg*^{+/+} 及び *Parg*^{-/-} ES 細胞共に、約 24 時間後から G2/M 期停止と DNA の断片化を伴うアポトーシスが起り、約 48 時間後から PI 染色性という特徴を示すネクロトーシスが主に観察され、*Parg* の genotype による差異は認められなかった。しかし、前述のように、MMS 処理 1 時間後、タンパク質の polyADP-ribosyl 化が顕著に亢進していた。また、細胞内 NAD レベルを HPLC を用いて定量したところ、*Parg*^{-/-} ES 細胞株では無処理状態で細胞内 NAD レベルが *Parg*^{+/+} ES 細胞株の約 4 倍に上昇していた。

また、MMS 処理後 5 時間後では、*Parg*^{+/+}ES 細胞株では無処理状態と変わらなかったのに対して、*Parg*^{-/-}ES 細胞株では、無処理状態の約 19%、MMS 処理 5 時間後の *Parg*^{+/+}ES 細胞株の NAD レベルの約 38%と低下していた。細胞内 NAD レベルの低下が、*Parg*^{-/-}ES 細胞の MMS に対する致死感受性と関連することが示唆される。

以上のように、*Parg*^{-/-}ES 細胞では、*Parg*^{+/+}ES 細胞と比較して、アルキル化剤処理後に poly(ADP-ribose) polymerase (Parp)によって形成されたポリ(ADP-リボース)の分解が遅く、また細胞内 NAD レベルが低下していた。

よって、*Parg*もまた Parp-1と同様に DNA 損傷からの回復に関与していることが強く示唆された。*Parg* は、ポリ(ADP-リボース)を分解して細胞内 NAD レベルを回復することによって、DNA 修復後の細胞の生存に関与していることが示唆された。