

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 藤原 久子

PolyADP-ribosyl 化反応とは、poly(ADP-ribose) polymerase (Parp)によって細胞内の NAD を基質としてタンパク質をポリ(ADP-リボース)鎖で修飾する反応であり、DNA 修復応答、クロマチン構造の維持などに関与する生体反応である。ポリ(ADP-リボース)は、poly(ADP-ribose) glycohydrolase (Parg)によって分解されるが、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 遺伝子(*Parg*)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 損傷応答能における役割について検討した。

まずマウス 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 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 細胞株数株を樹立した。更に、*Parg*^{+/−} ES 細胞株のもう片方の *Parg* エクソン 1 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 2 株樹立した。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* 遺伝子の関与について検討した。

Parg^{−/−} ES 細胞株は、次のような性状を示した。

1. 細胞の増殖能については野生型 ES 細胞株と差異はなかった。

2. *Parg* mRNA の発現レベルは約 6 分の 1 に低下しており、残存する *Parg* mRNA は全てエクソン1欠失型であった。
3. Poly(ADP-ribose)分解活性は、ADP-ribose の産生量を指標として約 50%に低下していた。
4. MMS 処理後、細胞内ポリ ADP-リボシル化タンパク質の蓄積が認められた。
5. MMS および γ 線に対する感受性は亢進した。
6. MMS 処理後、アポトーシスによる DNA の断片化が野生株よりも早く約 5 時間後から起きることがわかった。
7. MMS 処理後、12 時間後から経時的に DNA 量の減少したアポトーシスをおこした細胞の割合が増加していた。
8. 細胞内 NAD レベルは、約3倍に亢進しており、また MMS 処理1時間後、無処理状態の約 1/7 に急減し、変動しやすくなっていた。

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。そして、*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 修復後の細胞死の抑制に関与していることが示唆された。

本研究は、未だに報告のない *Parg*⁺ 及び *Parg*⁻ ES 細胞株を樹立し、その性状解析を行っており、その意義は高く学位審査に十分値する論文である。ただ、申請者が当初提出していた学位請求論文においては、*Parg*⁻ ES 細胞における *Parg* 遺伝子の発現レベル、*Parg* 活性レベル、アルキル化剤に対する感受性の亢進の結果の raw data および基準となる計算式について記載がなかったこと、本研究において ES 細胞を使用した意義についての言及がなかったため、これらの事項を補足した後、審査員の全員一致で最終試験に合格と判定した。