

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	山下 幸子
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2018年（平成30年）3月17日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	ポリ ADP リボシル化は細胞生理レベルにおいての新たな研究対象となるか？
審査委員 主査	教授 西 義介
副査	教授 山本 博章
副査	教授 水上 民夫
副査	教授 三輪 正直

論文内容要旨

ポリ ADP リボシル化とは翻訳後修飾の一つであり、DNA 修復、細胞死などに関与しています。ポリ ADP リボシル化 (PAR 化) はポリ ADP リボース合成酵素 (PARP) がニコチンアデノシンヌクレオチド (NAD⁺) を基質にして標的タンパク質にポリ ADP リボース (PAR) を付加重合していく反応であり、この PAR はポリ ADP リボース分解酵素 (PARG) により速やかに分解されます。

PARP 阻害剤や PARP/PARG などの遺伝子欠損技術によるポリ ADP リボシル化の研究は多いにも関わらず、生体内における PAR 量の定量的評価研究は少ない。さらに、適切な動物モデルはポリ ADP リボシル化の生理的な機能を明らかにする上で重要であります。そのため、私は3つの側面から生理的なポリ ADP リボシル化の機能について調べました。

第1章は HeLa 細胞におけるポリ ADP リボシル化と細胞周期の関わりについての研究、第2章は生理的温度条件における培養細胞の PAR 量の定量的評価研究、第3章は PARG-KO ショウジョウバエから同定されたアルコール脱水素酵素 (ADH1) のポリ ADP リボシル化検証。

第1章:私たちが開発したポリ ADP リボース定量のための ELISA 法を用いて S 期の前期において PAR 量がピークを示すことを明らかにしました。この時の PARP1 と PARG のタンパク質レベルに変化はありませんでした。興味深いことに、PAR 量のピークは DNA 合成のピークよりも早く認められました。さらに、PARP 阻害剤は細胞毒性を示さない条件で細胞増殖を低下させ、細胞周期、特に G1 から S 期への進行を遅らせていました。このことから、S 期の前期における PAR 量は G1 から S 期への進行に重要であることが明らかになりました。

第2章:ポリ ADP リボシル化に与える培養温度の影響は良く分かっていません。温和な温度である 40.5°C で 12 時間培養すると、有意に PAR 量が上昇し、 \cdot H2AX のシグナルが誘導され、PARP 阻害剤は \cdot H2AX のシグナルをさらに増強しました。以上の結果から、HeLa 細胞において 40.5°C は DNA の切断を起こすことが明らかになり、 \cdot H2AX と PAR 量は DNA の切断マーカーになりうることを示唆されました。

第3章:PARG 欠損ショウジョウバエが神経変性を起こし、早期に致死に至ることが報告されています。先行研究において、PARG 欠損ショウジョウバエから幾つかのポリ ADP リボシル化候補タンパク質を同定されました。その内の主な候補タンパク質である、アルコール脱水素酵素 (ADH1) に着目し、試験管内における ADH1 の ADP リボシル化検証を行いました。結果、ヒトの ADH1 はアスパラギン酸又はグルタミン酸に ADP リボシル化されることを示唆しました。また、HepG2 細胞において、PARP 阻害剤が ADH1 の活性を高めたことから、ADP リボシル化が ADH1 の活性を低下させていることが示唆されました。

論文審査結果要旨

本研究は、翻訳後修飾の 1 つである細胞内のポリ ADP-リボシル (PAR) 化を正確かつ高感度に評価する系を樹立¹⁾して、生理的な条件下、中でも細胞周期との関係、体温の高熱 (40.5°C) 時の状態との関係での PAR 量の定量評価を行い、以下の知見を得た。PAR は DNA 損傷に伴い、上昇するが、生理的な状況下での PAR 量は低いために、定量は困難であった。今回、細胞周期における PAR 量を測定したところ、early S 期において最高値を示すことを見出した。PAR 化阻害剤 3AB の添加が S 期遅延を誘起することも見出した。DNA 複製初期に PAR 化が関

与していること、この PAR 化を抑制すると、細胞周期遅延が起こることを示唆しており、新知見として、興味深い結果と判断できる。また、高熱(40.5°C)条件に細胞をおくと、細胞増殖の有意な低下に伴い、PAR 量の増加を引き起こす。この原因は DNA 鎖切断によるものであることを、(γ H2AX の染色により)間接的ではあるが、見出し、がんの温熱療法に対して、基礎医学的な新知見を与えた²⁾。なお PAR 分解酵素の KO・*Drosophila* では、Alcohol dehydrogenase (ADH) が PAR 化を受ける標的タンパク質の一つであり、重篤な神経症状を示すとの先行研究に新たな知見を加え、人の細胞においても、ADH の PAR 化により、*in vivo* で ADH の活性が低下することを見出した。論文の構成と内容、質疑応答を総合的に鑑み、バイオサイエンスにおける十分な知識と判断力を備えていると確認できた。以上のことから、博士としての資格は十分であると判断した。¹⁾Ida, C., Yamashita, S., Tsukada, M., Sato, T., Eguchi, T., Tanaka, M., Ogata, S., Fujii, T., Nishi, Y. Ikegami, S., Moss, J. and Miwa, M., An enzyme-linked immunosorbent assay-based system for determining the physiological level of poly(ADP-ribose) in culture, *Anal. Biochem.*, 494, 76-81, 2016. 2) Yamashita, S., Tanaka, M., Sato, T., Ida, C., Ohta, N., Hamada, T., Uetsuki, T., Nishi, Y., Moss, J. and Miwa, M., Effect of mild temperature shift on poly(ADP-ribose) and γ H2AX levels in cultured cells, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 476, 594-599, 2016.