

「脳を守る」

平成10年度採択研究代表者

中別府 雄作

(九州大学生体防御医学研究所 教授)

「活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構」

1. 研究実施の概要

我々は、ヒトの脳・神経系における活性酸素による細胞障害に対する防御系として、(1)酸化ヌクレオシド三リン酸を特異的に一リン酸に分解・排除する酵素(MTH1)やDNA中の酸化塩基を修復する修復酵素(OGG1, MYH)などDNAの酸化に起因する障害を抑制するシステムと、(2)これらの酵素や細胞増殖・分化・細胞死に関わる遺伝子の発現を酸化ストレスに応答して制御するシステム(Jun/Fos転写制御系)に注目し、その全体像の解明を目指して本研究を進めている。

ヒトMTH1遺伝子多型について解析を進め、スプライシングの変化を引き起こす一塩基多型が新たなMTH1タンパク質の合成をもたらすこと、さらに新たなMTH1タンパク質がミトコンドリア移行シグナルを持つことを明らかにした。

2つの修復酵素(OGG1, MYH)がヒト細胞の核とミトコンドリアに局在することを示し、さらにその細胞内局在がそれぞれのmRNAの択一的スプライシングで制御される事を明らかにした。ヒトOGG1とMYHタンパク質はミトコンドリア内膜に弱く結合した状態で存在しており、ミトコンドリア内膜に結合しているミトコンドリアDNAの修復を効率良く行う修復装置の存在が示唆される。

ヒト脳および脊髄組織における酸化塩基の蓄積とOGG1およびMTH1の発現を解析し、ヒトの脳・神経細胞の障害にDNAの酸化損傷の蓄積、あるいはその修復系の異常が関与する可能性が強く示唆される結果を得た。

脳出血や脳梗塞時に見られる脳・神経細胞の活性酸素によるストレス応答に関わるFosBと FosBタンパク質の発現と細胞の運命をラット培養細胞系で検討し、FosBと FosBが細胞増殖、細胞分化、そして細胞死を制御する能力を持つことを明らかにした。

2. 研究実施内容

(1) 活性酸素によるDNA損傷とその防御機構に関する研究

DNAの酸化損傷の中でもプリン塩基(アデニンとグアニン)の酸化体、8-オキソグアニン(8-oxoG)と2-ヒドロキシアデニン(2-OH-A)による脳・神経細胞の障害とその防御機構の解明を目的として、酸化プリンヌクレオチドの

DNAへの取込みを抑制する酵素とDNA中に取り込まれた酸化プリンあるいはDNAの直接酸化によって生じた酸化プリンの除去修復に関わる3つの遺伝子(MTH1, OGG1, MYH)とその産物の解析を進め、以下に述べる成果を挙げた(表1)。

表1 . プリン塩基の酸化に起因するDNA障害を抑制するヒトの酵素群

酵素	2-OH-A/アデニン DNAグリコシラーゼ		8- オキソグアニン DNAグリコシラーゼ	酸化プリンヌクレオシド 三リン酸分解酵素
機能	 AOG ↓ AO+? G 	 A GO ↓ A+? GO 	 C GO ↓ C ?+GO 	8-oxo-dGTP 2-OH-dATP ↓ 8-oxo-dGMP+PPi 2-OH-dAMP+PPi
遺伝子	MYH		OGG1	MTH1
細胞内局在	核 ミトコンドリア		核 ミトコンドリア	細胞質(核) ミトコンドリア
発現組織	胸腺 > 大脳、精巣、 腎臓、脾臓、卵巣		大脳 > 胸腺、精巣、 腎臓、脾臓、卵巣	胸腺、精巣、腎臓、 脾臓、卵巣 > 大脳
疾患での発現	(解析予定)		ALS()、脳出血()	PD()、ALS()
KO マウス	生存(自然腫瘍)		生存(自然腫瘍)	生存(自然腫瘍)

a . MTH1タンパク質の機能および細胞内分布とその制御機構

MTH1タンパク質の基質特異性を解析した結果、8-oxo-dGTP以外に8-oxo-GTP, 8-oxo-dATP, 2-ヒドロキシ(2-OH)-dATPを効率良く分解することを見出した。MTH1は、酸化ピリミジンヌクレオシド三リン酸には作用しないことから、酸化プリンヌクレオシド三リン酸を特異的に分解する活性を持つと結論した。酸化プリンヌクレオシド三リン酸の中では2-OH-dATPが最も低いKm値を示し、2-OH-dATPが細胞にとって特に有害である事が示唆される。

ヒト細胞におけるMTH1遺伝子の発現を解析し、MTH1遺伝子は択一的スプライシングにより7種類のmRNAを産生し、3種類のポリペプチド(MTH1b, c, d)をコードすることを明らかにした。この3種類ポリペプチドの中ではMTH1dが発現量が最も多く、細胞質とミトコンドリアに局在する。ヒト細胞のミトコンドリア内では、MTH1dタンパク質はマトリックスに可溶性のタンパク質として存在する。

日本人集団には、MTH1 遺伝子のエクソン 2 に択一的スプライシングの変化をもたらす遺伝子多型 (GT/GC) が存在し、GC多型を持つ個体では、アミノ末端に 18 個のアミノ酸が付加された第 4 のMTH1タンパク質 (MTH1a) が合成される。この 18 個のアミノ酸の意義を明らかにする目的で、GFPタンパク質のアミノ末端にMTH1aのアミノ末端の 18 個のアミノ酸を融合させヒト細胞で発現させたところ、融合タンパク質はミトコンドリアへ移行した。すなわち、MTH1 タンパク質のミトコンドリア移行は遺伝子多型によって変化することが明らかになった。

b . OGG1タンパク質の機能および細胞内分布とその制御機構

Jurkat細胞核抽出液よりDNA中に存在する8-oxoGの中でシトシンと対合した8-oxoGのみを遊離塩基として切り出す8-oxoG DNA グリコシラーゼ活性を精製した。OGG1 遺伝子産物に対する抗体を用いた実験より、この8-oxoG DNA グリコシラーゼがOGG1遺伝子産物であることを明らかにした。

OGG1遺伝子は択一的スプライシングにより 7 種類の以上のmRNAを産生し、その中の少なくとも 2 つがそれぞれ核型OGG1タンパク質 (OGG1-1a) 、ミトコンドリア型OGG1タンパク質 (OGG1-2a) をコードする。OGG1- 1aとOGG1- 2aともにそのアミノ末端にミトコンドリア移行シグナルを持つが、前者においてはカルボキシル末端に存在する核移行シグナルがドミナントに作用して核に移行、局在する。OGG1- 2aは、そのアミノ末端のミトコンドリア移行シグナルとユニークなカルボキシル末端に存在する疎水性に富む領域に依存してミトコンドリアに移行し、プロセスされた後内膜に弱く結合して存在する。

c . MYHタンパク質の機能および細胞内分布とその制御機構

Jurkat細胞の核抽出液にDNA中に誤って取り込まれた2-OH-Aを除去する2-OH-A DNAグリコシラーゼ活性を見出し、その部分精製を行った。2-OH-A DNAグリコシラーゼ活性を含む部分精製分画には8-oxoGに誤って対合したアデニンを除去するアデニンDNAグリコシラーゼが検出され、このアデニンDNAグリコシラーゼをコードすると予想されていたヒトMYH遺伝子産物が2-OH-A DNAグリコシラーゼ活性を持つ可能性が示唆された。組換えMYH タンパク質に対して作製したMYH抗体を用い、部分精製分画中にヒトMYHタンパク質が存在することを確認した。また、組換えMYHタンパク質が 2 つの基質 (2-OH-Aとアデニン) を除去する活性を持つこと確認し、MYHタンパク質が2-OH-A/アデニンDNAグリコシラーゼ活性を持つと結論した。

ヒト細胞には核とミトコンドリアにMYHタンパク質が存在するが、それぞれの分子量は異なっており、複数のMYHタンパク質の存在が示唆された。ミトコンドリアのMYHタンパク質はその内膜に弱く結合した状態で存在する。

MYH遺伝子の転写産物の解析から択一的スプライシングにより10種類のmRNAが産生され、少なくともそのうちの2つが核型とミトコンドリア型酵素をコードすることが示唆された。

d. 遺伝子欠損マウスの作成と解析

MTH1, OGG1, MYH遺伝子欠損マウスを樹立し、複数系統の純系マウスへ戻し交配を進めている。MTH1遺伝子欠損マウスにおいては、近交系C57BL/6Jへの戻し交配がF10まで終了した。

修復遺伝子欠損マウスを用いて脳の老化における障害を観察するには、遺伝子欠損マウスが長期生存可能かどうかを実験を計画する上で重要なファクターである。修復遺伝子欠損マウスにおいては発癌による早期死亡が予想されるため、3つの遺伝子欠損マウスの自然老化中の病変について解析した。これまでの解析から、3つの遺伝子の単独欠損マウスは生後1年半近くで自然発癌頻度が上昇するものの、生存率においては野生型と差がなく、老化による脳へのDNA損傷の蓄積の程度を解析するのに十分な長期観察に耐え得ることが確認できた。

(2) 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその障害防御におけるMTH1とOGG1の役割解明に関する研究

a. 脳・神経変性疾患におけるDNAの酸化損傷の関与

活性酸素による細胞障害の関与が示唆されているパーキンソン病 (PD), アルツハイマー病 (AD), 脳出血 (SAH), 孤発性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者とコントロール群の剖検組織を用いて、8-oxoGの蓄積の程度を酵素抗体法で検出し解析した。

PD患者の中脳黒質緻密層においてニューロメラニン陽性神経細胞の細胞質に顕著な8-oxoGの蓄積を認めた。コントロール群ではほとんど8-oxoGの蓄積は見られなかった。また、神経細胞以外の周囲組織においても8-oxoGの蓄積がPD患者のみに認められた。一方、活性酸素障害の関与がないと思われる多系統萎縮症 (MSA) の黒質変性部位においては、8-oxoGの蓄積はまったく観察されなかった。また、AD患者においてはコントロールと比較して8-oxoG蓄積の著しい上昇は認めなかった。

脊髄組織においては、SAHとALS患者の脊髄前角細胞の細胞質に顕著な8-oxoGの蓄積を認めた。ケースによってはミトコンドリアに一致したシグナルを認め、特にミトコンドリアに8-oxoGが蓄積している可能性が示唆された。

以上の結果から、PD, SAH, ALSにおける活性酸素障害の1つとしてグアニンの酸化が存在することが明らかになった。これらの疾患においては、8-oxoGが主に細胞質 (恐らくミトコンドリア) に蓄積していることから、神経

細胞の変性過程にミトコンドリアDNAの酸化傷害が関与する可能性が強く示唆された。

b . MTH1と OGG1タンパク質のヒト脳および脊髄組織での発現

MTH1と OGG1タンパク質のヒト脳および脊髄組織での発現をコントロール群の剖検組織を用いてウエスタンブロッティングと免疫染色により解析した。OGG1タンパク質についてはミトコンドリア型OGG 1 タンパク質特異的な抗体のみが組織染色において強いシグナルを与えた。OGG1の発現は脳組織全般で主に神経細胞の胞体に認められたが、前頭葉や海馬に比較して後頭葉の神経細胞で強い発現が認められた。MTH 1 タンパク質は、脳組織全般に神経細胞の胞体にびまん性に弱く発現していた。

脊髄組織においては、前角神経細胞の胞体にOGG 1 の強い発現が認められ、MTH1も低いながらも検出可能なレベルで発現していた。

c . 脳・神経変性疾患におけるOGG 1 とMTH 1 タンパク質の発現の変動

PD患者において、8-oxoGの蓄積が見られる黒質緻密層の神経細胞と周囲のグリア組織に顕著なMTH 1 タンパク質の発現誘導が認められた。MTH 1 の発現はコントロール、MSA患者の標本では検出レベル以下であった。PD患者においてニューロメラニン陽性神経細胞に誘導されたMTH1タンパク質は、その細胞質とミトコンドリアに局在していた。

脊髄前角細胞において8-oxoGが顕著に蓄積していたALSにおいては、ミトコンドリア型OGG 1 タンパク質の発現が著しく低下する一方でMTH 1 の発現亢進が細胞質に見られ、核内にも顆粒状のMTH1染色が観察された。ミトコンドリア機能を示すチトクロームオキシダーゼの活性染色からOGG 1 の発現低下はミトコンドリアの消失によるものではないことを確認した。一方、脊髄前角細胞において同様に8-oxoGの蓄積が見られたSAHの場合には、OGG 1 とMTH 1 の両者の発現上昇が観察された。

以上の結果は、活性酸素によるDNAの酸化傷害の関与が示唆される脳・神経変性疾患においてMTH1やOGG1の発現誘導が認められることから、これらのタンパク質が脳・神経細胞の生存に寄与している可能性が示唆される。また、孤発性ALSにおいては、ミトコンドリア型OGG 1 タンパク質の発現低下が脊髄前角細胞の変性の一要因である可能性が示唆された。

(3) fosB遺伝子の脳・神経系における生理的役割に関する研究

脳・神経細胞の活性酸素による障害として脳出血や脳梗塞が挙げられる。我々は、このような脳・神経細胞障害のモデルとして脳の虚血再灌流障害を取りあげ、その神経細胞死に関わる遺伝子について解析を進めている。ラットの脳虚血再灌流障害時に前初期遺伝子群の発現を調べたところ、遅延型細胞死を起こす海

馬CA1領域の神経細胞においてfosB遺伝子産物のFosBと FosBタンパク質の発現が灌流後細胞死に先立ってゆっくりと誘導される事を見出した。細胞死に抵抗性のあるCA3および歯状回では灌流後早期よりFosBと FosBタンパク質の発現の亢進が観察された。FosBと FosBタンパク質の発現の違いが虚血再灌流障害時の神経細胞死に対する感受性を規定している可能性が示唆される。fosB遺伝子は、スプライシングの違いにより2つのタンパク質、FosBと FosBをコードする。 FosBは転写活性化ドメインを含むFosBのカルボキシル末端領域（101アミノ酸残基）を欠く最も小さいFosファミリー - タンパク質（237アミノ酸残基）で、FosBあるいはc-FosとJunによる転写活性化を抑制する。

我々は以下に述べる培養細胞を用いた解析からfosB遺伝子が細胞増殖、分化、細胞死を制御することを明らかにした。このような細胞レベルで明らかにされたfosB遺伝子の機能が、個体レベルでは脳・神経細胞の増殖、分化細胞死および神経機能制御に関わると考えられる（図1）。

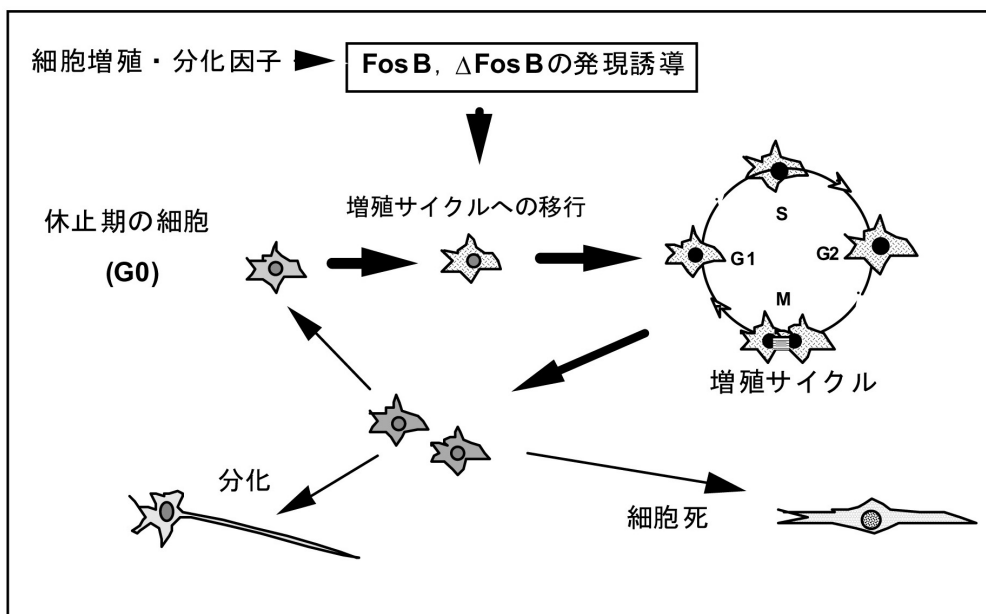


図1 FosB, FosBによる細胞増殖・分化・細胞死の制御

a. 細胞増殖と細胞死におけるFosBと FosBの役割

エストロゲンレセプターと FosBの融合タンパク質 (ER- FosB) を発現するRat-1A細胞は、血清飢餓下にエストロゲンで刺激することにより、増殖サイクルへ移行し、完全に細胞分裂を一回終了する。一方、ER-FosBは、ゆっくりとした細胞増殖を誘導する。この2つの系を用いて次の結果を得た。ER-FosB発現細胞は、ER- FosBの発現に伴い同調して細胞周期への移行が見ら

れ、その際CDK2, CDC2 mRNAレベルがG1期からS期への移行期に一過性に増加した。その後、細胞分裂が一回完全に終了し、細胞は次のG1期に入る。この段階でまたCDK2およびCDC2 mRNAレベルの増加が観察された。さらに、p53 mRNAレベルもG2/M期から増加し始め、次のG1期でも減少せずに蓄積的に増加することが明らかになった。このER- FosB発現細胞では2回目のG1期で細胞周期が停止した後、12時間後から細胞死が観察された。この細胞死に伴ないゲノムDNA断片化が確認され、かつカスパーズ阻害剤で細胞死が阻害されることから、FosBが遅延型アポトーシスを引き起こすことが明らかになった。ER-FosBの発現は細胞死を誘発することはなく、数日のタイムコースでゆっくりとトランスフォーメーションを引き起こす。この過程ではCDK2, CDC2, p53ともに顕著な発現の変化は見られない。

b. 細胞分化におけるFosBと FosBの役割

FosBあるいは FosBの発現により分化を引き起こす細胞株をスクリーニングし、Rat3Y1細胞株が、FosBと FosBいずれの単独発現でも増殖を停止し、紡錘状に両極に伸張した形態をとることを見出した。この形態変化した細胞は長期間生存することから、FosBと FosBが細胞分化に伴う形態変化を誘導したと考えられる。形態変化に伴う遺伝子発現の変化を二次元電気泳動法によるタンパク質の発現の変化として解析を行い、複数のタンパク質の発現が増減することを見出し、現在それぞれのアミノ酸配列の解析を行っている。

c. fosB遺伝子改変マウスの作製

FosBと FosBの個体レベルでの生理機能を解明するには、それぞれのタンパク質の発現を欠損する実験動物が有用である。このような考えに基づき、現在fosB遺伝子完全欠損ES細胞、FosBタンパク質欠損ES細胞、FosBタンパク質欠損ES細胞の樹立を進めており、今後はこれらから遺伝子改変マウス個体を樹立し、神経機能の制御におけるfosB遺伝子の役割を解明することを目指している。

d. Jun/Fos転写因子の活性化にかかわるシグナル伝達系の解析

FosBと FosBは、機能複合体としてJunタンパク質とダイマーを形成して作用する。この複合体の機能はJunタンパク質のリン酸化によって制御されるが、我々はこのJunタンパク質のリン酸化酵素(JNK)の活性を制御するタンパク質(JSAP1)を発見した。JNKには3つのメンバーの存在が知られており、中でも脳・神経組織特異的に発現するJNK3の遺伝子欠損マウスが脳組織の虚血再灌流障害に抵抗性を示すことから、この活性の制御機構が活性酸素による脳・神経細胞障害に深くかかわることが示唆される。我々は、この考えに基づき現在JSAP1の遺伝子破壊を進めている。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., and Nakabeppu, Y. (1999). Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Biol. Cell.* 10,(5), 1637-1652.

Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., and Kasai, H. (1999). The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.* 274 (26), 18201-18205.

Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., and Yamamoto, K. (1999). JSAP1, a novel JNK-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, (11) 7539-7548.

Oda, H., Taketomi, A., Maruyama, I., Itoh, R., Nishioka, K., Yakushiji, H., Suzuki, T., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y., (1999). Multi-forms of Human MTH1 Polypeptides Produced by Alternative Translation Initiation and Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acid Res.* 27, (22), 4335-4343.

Fujii, Y., Shimokawa, H., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. (1999). Functional significance of the conserved residues for the 23 residue module among MTH1 and MutT family proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 (53), 38251-38259.

Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y. and Mizuno, Y. (1999). Increased 8-oxo-dGTPase in the Mitochondria of Substantia Nigral Neurons in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.*, 46(6), 920-924.

Kalinichev, M., Rosenblatt, J. S., Nakabeppu, Y., and Morrell, J. (2000). Induction of c-Fos- and FosB-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations differentially involved in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats. *Journal of Comparative Neurology*, 416 (1), 45-78.

Ohyagi, Y., Yamada, T., Nishioka, K., Clarke, N. J., Tomlinson, A. J., Naylor, S., Nakabeppu, Y., Kira, J. Younkin S. G. (2000). Selective increase in cellular A[?]42 is related to apoptosis but not necrosis. *NeuroReport*, 11 (1), 167-171.

Kawate, H., Itoh, R., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Ide, F., Ishikawa, T., Noda, T., Nawata, H., Sekiguchi, M. (2000). A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis*, 21 (2), 301-305.

Inoue, R., Abe, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Mori, T., and Suzuki, T. (2000). Characterization of Human Polymorphic DNA Repair Methyltransferase.

Pharmacogenetics, 10, 59-66.

Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T, and Nakabeppu, Y. (2000). Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multi-forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 28(6), 1355-1364

Morifuji, M., Taniguchi, S., Sakai H., Nakabeppu, Y., and Ohishi, M. (2000). Differential Expression of Cytokeratin in Newly Established Human Tongue Cancer Cell Lines of Defined Metastatic Ability with Orthotopic Implantation. *Am. J. Pathol.*, 156 (4), 1317-1326.