

「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

個体発生において神経前駆細胞は胎生期から出生直後にかけて分裂増殖するが、神経細胞に分化し神経回路網を構築すると分裂能を失う。神経細胞はその個体の生涯を通して生存し機能する必要があるが、分裂能を欠くため加齢に伴う障害により変性脱落しても他の神経細胞の増殖によって補われることはない。そのため、神経回路網を保持する機構が幾重にも用意されていると考えられる。

神経伝達物質の放出など神経細胞の機能を保持するために必要な大量のエネルギーのほとんどは、ミトコンドリアでの酸素呼吸により供給されている。ところが、酸素呼吸では反応性の高い活性酸素が常時発生するため、神経細胞はその活動を維持する上で活性酸素による酸化障害の危機に常に曝されている。

我々は、これまで「DNAの酸化障害とその防御機構」について研究を進め、生物は酸化されたDNAを修復する機構とそのヌクレオチド前駆体の酸化体を分解、排除する機構を備え、活性酸素による酸化障害の危機に対抗していることを明らかにした。神経細胞の核DNAは複製されないことから、その生存と機能保持には核ゲノム情報の維持が必須であり、さらに神経細胞の機能保持にはミトコンドリアDNAの維持も重要である。我々は、「DNAの酸化障害」が神経細胞の寿命を決定する主な要因の1つであると考えている。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳では酸化塩基「8-オキシグアニン」の蓄積が明らかにされており、「DNAの酸化障害に対する防御機構」の異常がこのような神経変性疾患の危険因子となっている可能性が高い。本研究では上記の作業仮説に基づき、脳の老化障害と神経変性疾患の発症がDNAの酸化障害に起因する可能性を、その防御機構を失った遺伝子改変マウスを用いて実験的に検証することを目指している。

組織を構築する細胞が修復不能な障害を受けると新たな細胞増殖によって機能細胞が補給され、組織の構造と機能が維持される。げっ歯類や新世界ザルでは、成獣の大脳海馬の歯状回においてDNA複製を伴った神経細胞の供給が観察されている。神経細胞の新たな供給は、最近ヒト大脳でも観察されている。我々は、転写因子FosBが細胞のDNA複製を活性化する機能を持ち、げっ歯類の海馬歯状回で発現

することを見い出している。この発見に基づき、障害を受けた脳での神経前駆細胞の複製と分化の活性化に注目し、FosB の生理機能の解明を目指す。本研究で取り組む2つのプロジェクトは、新たな視点から「脳の保護と機能回復」に関する研究の展開を推進するものと位置付けている。

## 2. 研究実施内容

### (1) 活性酸素による脳・神経細胞の障害と神経変性疾患の発症機序の解明

本研究においては、脳・神経細胞の維持における DNA の酸化傷害の修復系の役割を明らかにし、その分子機構を解明することを目指している。DNA の酸化傷害の中でも複製、転写時に誤まった塩基対の形成をひき起こすため突然変異と異常タンパク質の生成の原因となる 8 - オキソグアニンに注目し、その DNA への取込みの抑制や修復に関わる次の3つの遺伝子に焦点を絞り、以下に述べる研究を進めた (表1)。

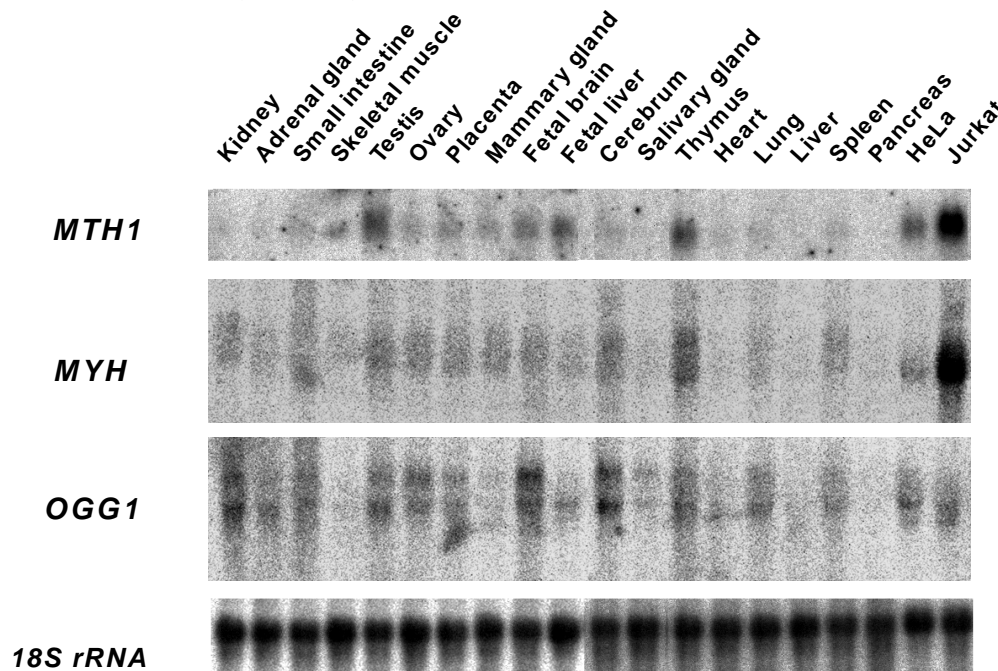
表1. 活性酸素による核酸の酸化に対する生体防御機構

酵素名	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	8-oxo-dGTP 分解酵素
酵素 活性	<p>A 8-oxoG ↓ A + □ 8-oxoG</p>	<p>C 8-oxoG ↓ C □ + 8-oxoG</p>	<p>8-oxo-dGTP 8-oxo-GTP ↓ 8-oxo-dGMP + PPi 8-oxo-GMP + PPi</p>
大腸菌	<i>mutY</i>	<i>mutM</i>	<i>mutT</i>
ヒト 脳組織での発現	<i>MYH</i> 比較的高い	<i>OGG1</i> 最も高い	<i>MTH1</i> 胎児脳で高い
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

a . 脳・神経細胞における各遺伝子の発現と分布の解析

ヒト各種臓器における発現をノーザンプロットと RT-PCR により解析し、*OGG1* および *MYH* が成人および胎児の脳で高い発現レベルを示すことを明らかにした。また、*MTH1* も低いレベルながら胎児脳での発現が確認された ( 図 1 ) 。

図 1 . *MTH1* , *MYH* , *OGG1* 遺伝子のヒト臓器における発現



b . 各遺伝子産物の機能および細胞内分布とその制御機構

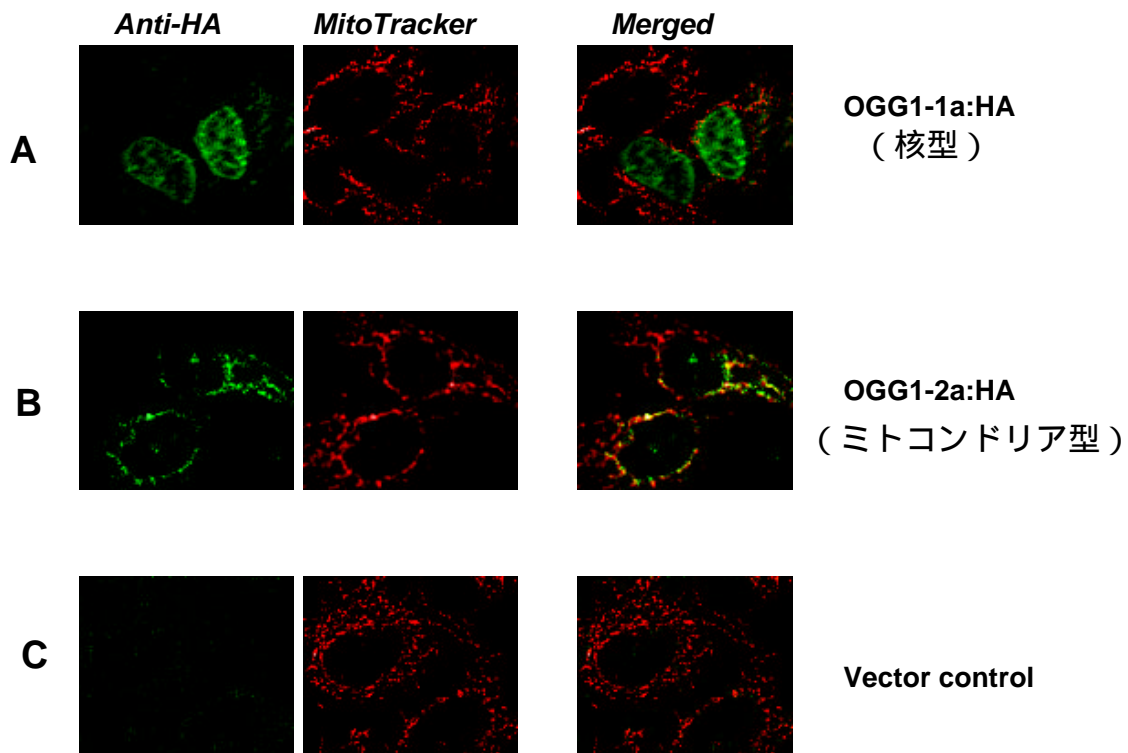
ヒト細胞における *MTH1* 遺伝子の発現を解析し、*MTH1* 遺伝子は択一的スプライシングにより 7 つの mRNA を産生し、少なくとも 3 つのポリペプチドをコードすることを明らかにした。この 3 つの *MTH1* ポリペプチドの 1 つは、細胞質とミトコンドリアに局在する。さらに、*MTH1* タンパク質の基質特異性を解析した結果、8-oxodGTP 以外に 8-oxoGTP、8-oxo-dATP、2-hydroxy-dATP を効率良く分解することを見出した。中でも 2-hydroxy-dATP が最も低い  $K_m$  値を示し、8-oxoG 以外の塩基やヌクレオチドの酸化体も生物にとって有害である可能性が示唆された。

*OGG1* 遺伝子は択一的スプライシングにより 7 つの以上の mRNA を産生し、その中の少なくとも 2 つがそれぞれ核型 *OGG1* タンパク質とミトコンドリア型 *OGG1* タンパク質をコードすることを明らかにした ( 図 2 ) 。ミトコンドリア内では、*MTH1* 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し、一方 *OGG1* 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する。

*MYH* 遺伝子産物については、cDNA をもとに特異的な抗体を作製し、ヒト細胞

で発現する MYH タンパク質の検出に成功した。この MYH も核とミトコンドリアに存在するようである。

図2 . OGG1蛋白質は核とミトコンドリアに局在する



c . 3つの遺伝子の欠損マウスの作成と解析

*MTH1*、*OGG1*、*MYH* 遺伝子の単独欠損マウスを樹立した。現在、それぞれの変異マウスの遺伝的背景を均一にするために、バッククロスを進め、さらに二重遺伝子欠損、三重遺伝子欠損マウスの樹立を試みている。

d . 脳・神経細胞の生存に於ける *MTH1* 遺伝子産物の役割の解明

*MTH1* タンパク質に対する特異的抗体を用いた免疫染色法およびウエスタンブロットによりパーキンソン病患者の中脳黒質のドーパミンニューロンに *MTH1* タンパク質が特異的に発現していることを見出した。コントロールの患者の中脳黒質のドーパミンニューロンには全く発現は見い出せなかった。パーキンソン病患者の中脳黒質のドーパミンニューロンでは 8-oxoG も高度に蓄積しており、酸化ストレスとパーキンソン病の関連が強く示唆され、*MTH1* タンパク質の発現誘導が、ドーパミンニューロンの生存維持に寄与している可能性が示唆された。

(2) FosBによる神経前駆細胞の複製の活性化と神経分化の制御

*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 (図4)。

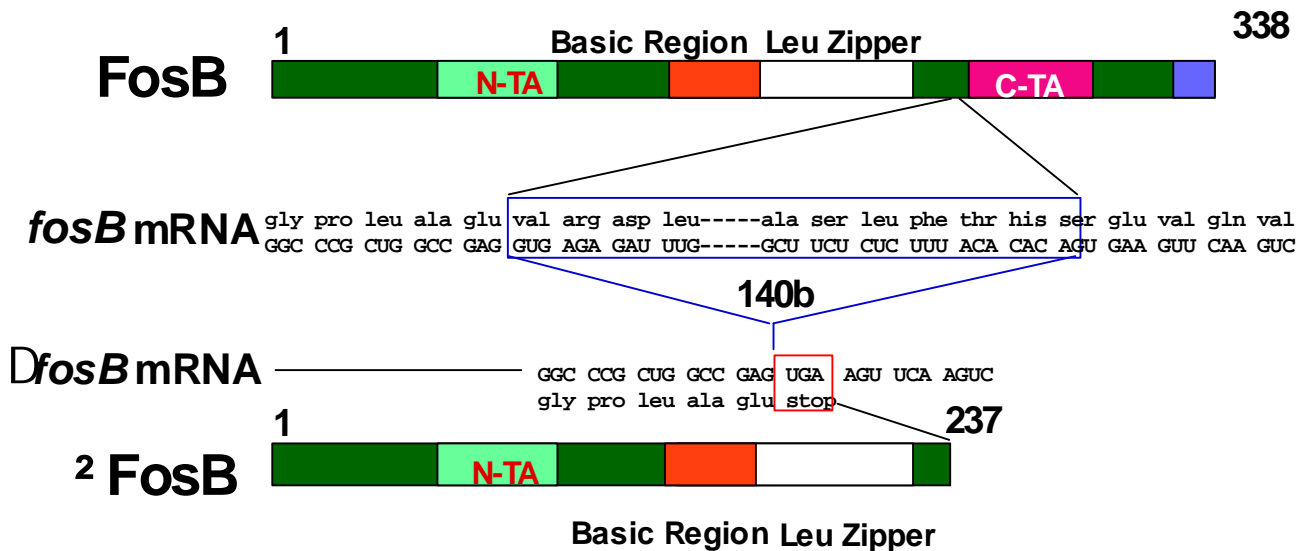


図4。FosB と FosB タンパク質

*fosB* 遺伝子は脳組織の中で神経前駆細胞が存在する海馬歯状回での発現が顕著であり、さらに種々の神経刺激や脳虚血でその発現が大きく変動する。我々は以下に述べる培養細胞を用いた解析から *fosB* 遺伝子が増殖、分化、細胞死を制御することを明らかにしつつある。最終的には、個体レベルで *fosB* 遺伝子の脳・神経機能の制御における役割を解明することを目指している。

a. 細胞増殖と細胞死における FosB と FosB の役割

FosB、 FosB とともに構成的に発現させると Rat1A 細胞をトランスフォームする。また、 FosB を休止期の Rat1A 細胞で発現させると、細胞は同調的に増殖サイクルへ移行し、少なくとも1回の DNA 複製、核分裂そして細胞分裂を進行させる。この過程では、サイクリン E と CDK2 の mRNA が安定化されることをすでに明らかにしている。

平成10年度はこの研究をさらに進め、 FosB が細胞増殖を促進的に制御するだけでなく、2回目の G1 期以降に遅延型の細胞死を誘発することを明らかにした。この細胞死は、CDK2、CDC2、そして p53 タンパク質発現のいずれかによって制御されている可能性が示唆されたので、現在その細胞死のメカニズムの解析を進めている。

## 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ひ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、形態的に変化することを見出した。この形態的に変化した細胞は長期間生存することから細胞分化に伴う形態変化を FosB と FosB が誘導したと考えられる。現在、その分化形質を特定中である。

## c . *fosB* 遺伝子の脳・神経系での発現と機能

我々は、FosB と FosB タンパク質特異的な抗体を用いた神経組織の免疫染色とイムノプロットングより 6-ヒドロキシドーパミン投与ラットの線条体 - 黒質ニューロンの中で D2 ドーパミンレセプターを持つニューロンに Fos ファミリータンパク質の中で FosB タンパク質のみが選択的に長期発現することを報告している。一方、このパーキンソン病モデルラットは、D1 アゴニストの投与により線条体ニューロンの中の D1 ドーパミンレセプターを発現するニューロンを興奮させると運動機能の異常（旋回運動）を引き起こす。この時最初に L-ドーパあるいはアポモルフィンなどの D1 と D2 の両レセプターに作用するアゴニストを投与しておくとその効果が増強され、この現象はプライミングと呼ばれる。

平成 10 年度は、このプライミング時にも *fosB* 遺伝子の発現が線条体ニューロンで特異的に増強されることを明らかにし、その機能的な重要性を解析した。このプライミングの過程では、c-Jun や c-Fos、Zif268 など他の転写因子の発現も増強するので、*fosB* 遺伝子発現の意義を明らかにする目的で *fosB* mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドをラットの線条体に注入し、その発現を抑制した。*fosB* mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドを注入したラット線条体では、*fosB* 遺伝子のみが発現が一過性に抑制されたが、c-Jun や c-Fos、Zif268 など他の転写因子の発現は変化しなかった。このラットにおいては、プライミングによる運動機能の異常（旋回運動）の亢進が有意に抑制されていた。この結果は、初めて *fosB* 遺伝子が神経機能の制御に重要な役割を持つことを個体レベルで示唆したものである。

## d . *fosB* 遺伝子機能の個体レベルでの解析

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 ES 細胞から遺伝子改変マウス個体を樹立し、脳・神経細胞の機能制御における *fosB* 遺伝子の役割を解明することを目指している。

## ( 3 ) 共同研究者の研究成果

### a . A グループ

種々のヒト脳神経変性疾患患者の脳標本の採取とライブラリー化を進めた。

b . Bグループ

ヒトプレセニンとヒトタウタンパク質の野性型および変異型遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの樹立を進めた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Crocker, S.J., Morelli, M., Nakabeppu, Y., and Robertson, G.S. 1998. D1-Receptor-related priming is attenuated by antisense-mediated 'knockdown' of *fosB* expression. *Mol. Brain Res.* 53, 69-77.

Hazell, A.S., McGahan, L., Tetzlaff, W., Bedard, A. M., Robertson, G.S., Nakabeppu, Y., and Hakim, A. M. 1998. Immediate-Early Gene Expression in the Brain of the Thiamine Deficient Rat. *J. Molec. Neurosci.* 10, 1-15.

McGahan, L., Hakim, A. M., Nakabeppu, Y., and Robertson, G. S. 1998. Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. *Mol. Brain Res.* 56, 146-161

Ohtsubo, T., Matsuda, O., Iba, K., Terashima, I., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. 1998. Molecular cloning of *AtMMH*, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene and analysis of functional domains of its product. *Mol. Gen. Genet.* 259, 577-590.

Hayakawa, H., Hofer, A., Thelander, L., Kitajima, S., Cai Y., Oshiro, S., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., Kuwano, M. and Sekiguchi, M. 1999. Metabolic Fate of Oxidized Guanine Ribonucleotides in Mammalian Cells. *Biochemistry.* 38 (12), 3610-3614.

Nakabeppu, Y. 1998.

Defense Mechanisms against Oxidative Damages of Nucleic Acids in Mitochondria: Implication in Neuronal Cell Death. *J. J. Clin. Chem.* 27 (4), 210-222.

中別府雄作. 1998.

活性酸素による DNA の損傷とその防御機構 神経細胞死へのかかわり

別冊 医学のあゆみ 神経細胞死制御 (三須良實, 赤池昭紀編集), pp.127-133, 医歯薬出版 (株), 東京.