

「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。

これまでヒト脳・神経細胞において核酸の酸化損傷の防御に関わる遺伝子として、*MTH1*、*OGG1*、*MYH*、*APE2*を同定し、それぞれ核とミトコンドリアに局在して機能する事を明らかにした。さらに、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症等のヒト脳神経変性疾患において8-oxoGを始めとする核酸の酸化損傷の蓄積とこれら防御遺伝子の発現の変動を見だし、これらの脳神経変性疾患の発症に核酸の酸化損傷とその防御機構の異常が関与する可能性を示した。今後は、脳・神経変性疾患発症モデルマウスにおける活性酸素障害の解析を進め、最終的に防御遺伝子欠損マウスとの交配実験により活性酸素による脳・神経細胞の障害と神経変性疾患の発症機序の解明を進める計画である。

前初期遺伝子*fosB* 遺伝子は択一的スプライシングによりFosBと $\Delta$ FosBの2つの前初期転写因子をコードする。前脳虚血再還流後のラット海馬CA1領域においては、 $\Delta$ FosBがその遅発性神経細胞死に先立って発現するが、他の海馬領域ではFosB、 $\Delta$ FosBともに早期に発現する。我々は、胚由来線維芽細胞株 (Rat3Y1, Rat1a) でFosBおよび $\Delta$ FosBを人為的に発現させることにより、(1)  $\Delta$ FosBがRat3Y1細胞に一回の細胞分裂とその後の形態変化を伴う細胞分化、さらに神経軸索伸長・再生因子Galactin-1の発現誘導を引き起こすこと、(2)  $\Delta$ FosBがRat1a細胞に一回の細胞分裂とp53依存性遅発性アポトーシスを誘発することを明らかにした。また、Fos蛋白質とヘテロダイマーを形成して転写調節に関わるJun蛋白質のリン酸化酵素、JNKのシグナル伝達系を制御するJSAP1がES細胞の神経分化系に重要な役割を持つことを明らかにした。これらの結果から、神経前駆細胞の分化成熟および遅発性神経細胞

死の誘発にΔFosBとJSAP1が重要な役割を持つ可能性が示唆されたので、今後は培養神経細胞及び実験動物レベルでΔFosBおよびJSAP1による神経前駆細胞の複製の活性化と神経分化の制御機構の解明を進める予定である。

## 2. 研究実施内容

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

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4つの遺伝子(MTH1, OGG1, MYH, APE2)とその産物の解析を進め、以下に述べる成果をあげた(表1)。

表1. 核酸の酸化に起因するDNA傷害を抑制する酵素群

酵素	2-OH-A/Adenine DNA グリコシラーゼ	8-oxoG DNA グリコシラーゼ	脱塩基部位特異的 エンドヌクレアーゼ	酸化プリンヌクレオチド 三リン酸分解酵素
機能				
遺伝子	human: <i>hMYH</i>	human: <i>hOGG1</i>	human: <i>hAPE2</i>	human: <i>hMTH1</i>
細胞内 局在	Nucleus Mitochondria	Nucleus Mitochondria	Nucleus Mitochondria	Nucleus/Cytoplasm Mitochondria
発現 組織	Thymus > Brain, Testis, Kidney, Spleen, Ovary	Brain > Thymus, Testis, Kidney, Spleen, Ovary	Kidney, Brain	Thymus, Testis, Kidney, Spleen, Ovary > Brain
疾患で の発現	ND	SAH( ), ALS( ) AD( ): NFT(+)	ND	PD( ), ALS( ) AD( CA3 ), Tumor( )
KO mice	(-/-): 生存 ( Lung Cancer )	(-/-): 生存 ( Lung Cancer )	(-): 生存	(-/-): 生存 ( Lung Cancer ) ( Liver Cancer ) ( Stomach Cancer )

SAH: クモ膜下出血, ALS: 筋萎縮性側索硬化症, AD: アルツハイマー病, PD: パーキンソン病, ND: 未解析  
GO: 8-oxoguanine, AO: 2-hydroxyadenine, □: 脱塩基部位,

### - 1) 新規AP エンドヌクレアーゼ (APE2) のクローニングと解析

MYHやOGG1により損傷塩基が除去された後に生じる脱塩基部位は、脱塩基部位特異的エンドヌクレアーゼ (AP エンドヌクレアーゼ) が作用して一本鎖が切断された後、DNAポリメラーゼやリガーゼによる修復合成が行われ、塩基除去修復反応が完了する。OGG1とMYHは核に加えてミトコンドリアで機能することから、ミトコンドリアで機能するAPエンドヌクレアーゼが必須である。しかし、これまで核型のAPエンドヌクレアーゼ (APE1) の存在は明らかにされていたが、ミトコンドリア型の酵素については不明であった。我々はヒトゲノムデータベースからミトコンドリア移行シグナル (MTS) を持つAPエ

ンドヌクレアーゼをコードすると予想されるゲノム領域を特定し、その配列から予想されるcDNAクローンを単離することにより、新たなAPエンドヌクレアーゼ (APE2) を同定した。我々は、APE2蛋白質のMTS-GFP融合蛋白質がミトコンドリアに移行すること、さらに免疫電顕法によりAPE2蛋白質がヒト細胞のミトコンドリアの内膜近傍に局在する事を明らかにした。

APE2のカルボキシ末端にPCNA結合配列と相同なアミノ酸配列が見いだされたので、そのPCNAとの会合の可能性を免疫沈降法および*in vitro* Pull-down法により解析したところ、APE2はそのカルボキシ末端のPCNA結合配列を介してPCNAと細胞内で結合することが明らかになった。さらに、複製にカップルした塩基除去修復反応で修復される塩基損傷を誘発すると、細胞核内でPCNAとAPE2の共存フォーカスが顕著に増加し、APE2が複製にカップルした塩基除去修復に関与することが示唆された (Nucleic Acids Res. 29, 印刷中)。

#### - 2 ) マウスAPE2遺伝子のクローニングと遺伝子欠損ES細胞及びマウスの樹立

ヒトAPE2 cDNAをプローブとしてマウスAPE2 cDNAおよび遺伝子をクローニングした。マウスAPE2遺伝子はヒト同様X染色体上に位置し、5-アミノレブリン酸合成酵素をコードするALAS2遺伝子の下流に逆方向に存在する。マウスAPE2遺伝子は16.5Kbのサイズで、6つのexonからなる(論文準備中)。intron5の一部とexon6の一部をネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換する標的遺伝子組換えベクターを作製し、このベクターをES細胞に導入後相同組換えを起こした10クローンを樹立した。2クローンのAPE2遺伝子欠損ES細胞から遺伝子欠損マウスを樹立し、現在長期観察ともどし交配を進めている。

#### - 3 ) ヒトMTH1蛋白質の基質認識機構の解析

ヒトMTH1 (hMTH1) は大腸菌ホモログMutTと異なり、8-oxo-dGTPに加えてdATPの酸化体 (2-OH-dATP/8-oxo-dATP) とATPの酸化体 (2-OH-ATP/8-oxo-ATP) をより効率良く分解する (Nucleic Acids Res., 28, 3240-3249, 29, 449-454)。hMTH1による酸化ヌクレオチド認識の分子機構を明らかにする目的で、まずhMTH1の基質認識に関わる可能性のある2つの領域としてhMTH1の活性中心であるphosphohydrolase moduleとMutTに存在しないMTH1のC末端の25アミノ酸付加配列に注目して解析した。しかしながら、この2つの領域はそれぞれ活性中心として、あるいは蛋白質の構造の安定化に必須であるものの、基質認識には関与しないことが明らかになった。次に、hMTH1蛋白質と8-oxo-dGDPあるいは2-OH-dADPの複合体のNMR解析をおこなったところ、3つのアミノ酸残基 (Phe27, Trp117, Asp119) に同程度の化学シフト変化が観察され、8-oxo-dGDPと2-OH-dADPがこれら3つのアミノ酸残基に同様に相互作用するこ

とが示唆された。そこで、これらの3つの残基についてそれぞれにアミノ酸置換変異体を作成しその基質特異性の変化を詳細に解析した。その結果、Trp117が2つの酸化ヌクレオチドの認識に必須であること、Phe27が2-OH-dATPより8-oxo-dGTPの認識により重要であること、さらにAsp119が2-OH-dATPの認識に不可欠であることが明らかになった（論文準備中）。

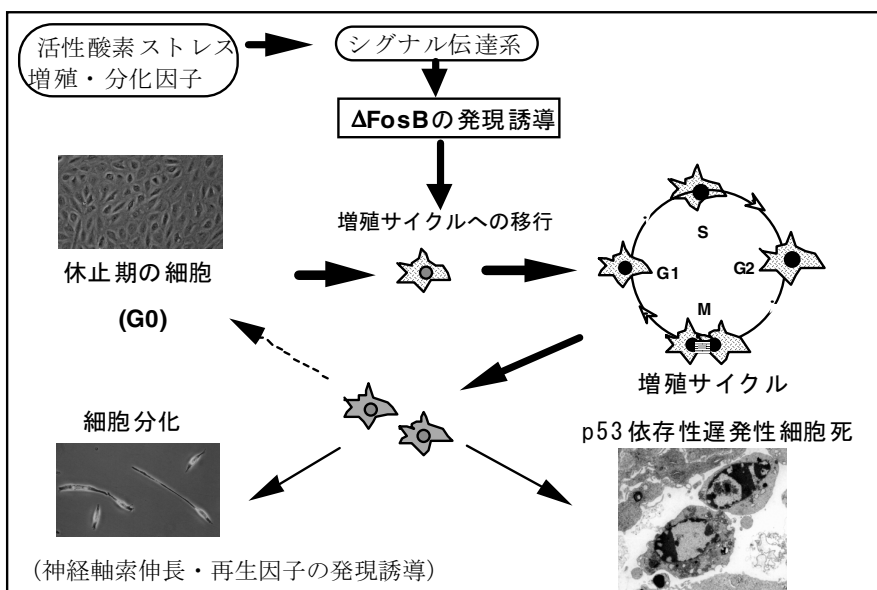
- 4 ) Alzheimer病における hOGG1 および hMTH1 の免疫組織化学的検討

hMTH1とミトコンドリア型OGG1(hOGG1-2a)の発現をAlzheimer病(AD)について免疫組織化学的に検討した。hMTH1とhOGG1-2a(ミトコンドリア型)は正常脳で主に神経細胞に認められ、hMTH1は海馬(特に苔状線維系)に、hOGG1-2aは大脳新皮質に強く発現する傾向がみられた。ADにおいてhMTH1はCA3で、hOGG1-2aは前頭葉で染色性が低下し、酸化損傷に対する防御機構が減退していると考えられた。hOGG1-2aは神経原線維変化の見られる部位にも一致して発現しており、その形成にミトコンドリアの機能障害や活性酸素ストレスが関与する可能性が示唆された（論文投稿中）。

- 5 ) 脳腫瘍における8-oxo-dGおよびhMTH1 の免疫組織化学的検討

種々の脳腫瘍における8-oxo-dGの蓄積とhMTH1の発現を免疫組織化学的に解析したところ、グリオーマなどにおいて悪性度が高いほど8-oxo-dGの蓄積が亢進し、かつhMTH1が高発現していることが明らかになり、脳腫瘍において活性酸素ストレスが亢進している可能性が示唆された。以上の結果は、脳腫瘍の悪性化に何らかの酸化ストレスが関与し、さらにhMTH1の発現レベルが脳腫瘍の悪性度の指標として有効である事を意味する（Neuro-oncol., 3, 73-81）。

図1 . ΔFosBによる細胞運命の制御



### ΔFosBによる神経前駆細胞の複製の活性化と神経分化の制御

海馬の神経細胞は虚血再還流障害に対し異なる感受性を示す。歯状回やCA3の神経細胞は虚血後ほとんど脱落しないが、CA1の神経細胞は遅発性の細胞死に陥る。前初期遺伝子*fosB*の発現は、虚血再還流直後に歯状回やCA3で顕著に増加する。一方、CA1では細胞死の直前にその発現が増加する。我々はこれらの結果から*fosB*が神経細胞の運命の決定に関わると仮定し、2つのラット胚由来培養細胞株で*fosB*遺伝子産物の機能解析を進めた(図1)。また、ラット大脳での*fosB*遺伝子発現の詳細な解析を行い、*fosB*遺伝子の脳内発現パターンの解明を進めている(Neuroscience, 98, 535-547; Synapse, 39, 122-132; Exp. Neurol., 168, 392-401; Mol. Brain Res. 印刷中)。

#### - 1) ΔFosB発現によるRat3Y1細胞の分化の制御機構の解析

ΔFosBを強制発現させたRat3Y1細胞は1回細胞分裂した後増殖を停止し、細胞内アクチンの重合低下を伴った頻繁な形態変化と運動性の亢進を示した。FosB発現細胞でも同様の現象が観察されたが、その程度はΔFosB発現細胞より軽度であった。2次元電気泳動法によりΔFosB誘導後に顕著に発現が変化した蛋白質を複数同定し、それぞれの配列を解析したところ、このうち2つの蛋白質が神経軸索伸長因子あるいは軸索再生因子として機能するGalectin-1とその新規イソフォームであることが明らかになった(論文準備中)。

#### - 2) ΔFosB発現によるRat1a細胞の遅発性細胞死制御機構の解析

FosBを強制発現させたRat1a細胞では1回のDNA複製・核分裂・細胞分裂が同調して進行する。しかし、72時間後にはほとんどの細胞が死滅した。このような細胞死はFosB発現細胞では全く観察されなかった。ΔFosBの発現誘導48時間後には電子顕微鏡観察でアポトーシス小体が確認され、さらに核の凝縮と核DNAの断片化が観察された。以上より、ΔFosBはRat1A細胞に遅発性のアポトーシスを誘発すると結論された。ΔFosBに依存した細胞増殖はCdk2、Cdc2特異的な阻害剤で抑制されたが細胞死は抑制されなかったことより、FosBによるアポトーシスは細胞増殖に依存しない経路であることが明らかになった。さらにΔFosBによるアポトーシスは、Caspase-3及びCaspase-9の阻害剤の添加により阻害されたが、Caspase-8の阻害剤では阻害されなかった。ΔFosBによるアポトーシスはp53のantisense oligonucleotideにより抑制されたことから、p53依存性の経路であると結論された(論文準備中)。

#### - 3) JSAP1による神経分化の制御機構の解析

ΔFosBは機能複合体としてJunとヘテロダイマーを形成して作用するが、この複合体の機能はJunのリン酸化によって制御される。我々は、Junリン酸化酵素(JNK)のスキヤフォールド蛋白質として同定したJSAP1の生理的機能を明

らかにする目的で *JSAP1* 遺伝子および cDNA を単離しその構造を決定した (Gene, 255, 229-234)。さらに、*JSAP1* 遺伝子欠損 ES 細胞株を樹立し、得られたキメラマウスから *JSAP1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの樹立を進めたが、これまでのところ 2 系統の ES 細胞から得られた複数のキメラマウスからは、*JSAP1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスは得られていない。*JSAP1* はヘテロ欠損でも胚性致死となる可能性が示唆された。そこで、ヘテロの *JSAP1* 遺伝子欠損細胞株を高濃度の G418 存在下で選択し、ホモの *JSAP1* 遺伝子欠損細胞株を樹立した。これら細胞株の *in vitro* 分化系における表現形質の解析から、*JSAP1* は ES 細胞からの神経細胞の分化過程に重要であることを示す結果を得た。現在、*JSAP1* 欠損細胞の詳細な解析を進めている。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Miyako, K., Takamatsu, C., Umeda, S., Tajiri, T., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Hamasaki, N., Takeshige, K. and Kang, D. (2000) Accumulation of Adenine DNA Glycosylase-sensitive Sites in Human Mitochondrial DNA. J. Biol. Chem., 275 (16), 12326-12330.

Schwartz, W.J., Carpino, JR, A., De La Iglesia, H.O., Baler, R., Klein, D.C., Nakabeppu, Y. and Aronin, N. (2000) Differential regulation of fos family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. Neuroscience, 98 (3), 535-547.

Takama, F., Kanuma, T., Wang, D., Nishida, J., Nakabeppu, Y., Wake, N. and Mizunuma, H. (2000) Mutation analysis of the hMTH1 gene in sporadic human ovarian cancer. Int. J. Oncol., 17(3) : 467-471.

Shimokawa, H., Fujii, Y., Furuichi, M., Sekiguchi, M. and Nakabeppu, Y. (2000) Functional significance of conserved residues in the phosphohydrolase module of *E. coli* MutT protein. Nucleic Acid Res., 28 (17), 3240-3249.

Ito, M., Akechi, M., Hirose, R., Ichimura, M., Takamatsu, N., Xu, P., Nakabeppu, Y., Tadayoshi, S., Yamamoto, K. and Yoshioka, K. (2000) Isoforms of JSAP 1 scaffold protein generated through alternative splicing. Gene, 255, 229-234.

Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y. and Kasai, H. (2001) The human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. Nucleic Acids Res., 29 (2), 449-454

Liang, R., Igarashi, H., Tsuzuki, T., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Kasprzak, K.S. and Shiao, Y-H. (2001) Presence of potential nickel-responsive element(s) in the mouse *MTH1* promoter. Ann. Clin. Lab. Sci., 31, (1) 91-98.

Rodriguez, J.J., Garcia, D.R., Nakabeppu, Y. and Pickel, V.M. (2001) FosB in rat

striatum : normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol administration. *Synapse*, 39 (2), 122-132.

Iida, T., Furuta, A., Kawashima, M., Nishida, J., Nakabeppu, Y. and Iwaki, T. (2001) . Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-oncol.*, 3 (2), 73-81.

Rodriguez, J.J., Garcia, D.R., Nakabeppu, Y. and Pickel. V. M. (2001) Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration. *Exp. Neurol.*, 168(2) : 392-401.

Nakabeppu, Y. Molecular Genetics and Structural Biology of Human MutT Homolog, MTH1. (2001) . *Mut. Res.* 477( 1 - 2 ) 59-70

Nakabeppu, Y. Regulation of Intracellular Localization of Human MTH1, OGG1 and MYH Proteins for Repair of Oxidative DNA Damage. (2001) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 68, 75-94.