

「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

個体発生過程において神経幹細胞から生じた神経前駆細胞は胎生期から出生直後にかけて分裂増殖し、膨大な数の神経細胞を供給する。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する運命にある。そのため成体においても神経前駆細胞からの新たな神経細胞の供給など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。神経興奮と神経伝導など神経細胞の基本的な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。

本研究では、ミトコンドリアで発生する活性酸素による核やミトコンドリアゲノムの損傷は神経細胞死を引き起こし脳の老化や神経変性疾患の原因の1つとなると考え、また損傷を受けた脳組織の機能回復には新たな神経細胞供給が不可欠と考え、以下の2つのアプローチで「脳を守るメカニズム」の解明を進めている。

① 活性酸素によるゲノム損傷の分子実体とその防御機構を明らかにする

これまでに、8-オキシグアニン(8-oxoG)と2-ヒドロキシアデニン(2-OH-A)をはじめとする酸化損傷に対してヒト細胞が複数の防御機構を核とミトコンドリアに独立に備えていることを明らかにした。さらに、これらの防御遺伝子の発現異常を伴って、核酸の酸化損傷がパーキンソン病、アルツハイマー病、そして筋萎縮性側索硬化症の患者の変性組織に蓄積していること明らかにした。核酸の酸化およびその防御遺伝子の発現異常とこれらの神経変性疾患の発症の因果関係を解明するために、それぞれの遺伝子欠損マウスおよび変性疾患のマウスモデルを確立した。今後、防御遺伝子の欠損による「神経変性の促進と抑制」に注目した解析を進める計画である。

② 活性酸素ストレス下における神経前駆細胞活性化のメカニズムを探る

脳の虚血再還流障害時に発現誘導される AP-1 (Jun/Fos) 複合体のサブユニットである Δ FosB が、神経軸索伸長・再生促進因子 (Galectin-1) の発現と細胞運命 (増殖・分化・死) を制御することを明らかにし、虚血再還流障害を受けたラット海馬歯状回において、Galectin-1 の発現を伴った DNA 複製の誘導を見出した。現在、この系における Δ FosB と Galectin-1 の役割

の解明を進めている。一方、神経細胞で特異的に発現する新しい AP-1 の活性化因子 JSAP1 を同定し、遺伝子破壊実験から JSAP1 が初期胚段階での神経前駆細胞の形成に関与し、個体発生に必須であることを明らかにした。Galectin-1 の発現は、JSAP1 の下流で制御されることも明らかにした。

2. 研究実施内容

① 活性酸素によるゲノム損傷の分子実体とその防御機構の解明

(1) 酸化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素、MTH1 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。我々は、MTH1 タンパクがどのような分子メカニズムで 8-oxo-dGTP と 2-OH-dATP の 2 種の酸化ヌクレオチドを認識するかを MTH1 タンパク質に本来存在するトリプトファン残基の蛍光分析により検討した。その結果、タンパクの蛍光強度は酸化ヌクレオチド結合に伴いほぼ半減した。従って、MTH1 タンパク質分子あたり 4 個のトリプトファン残基の少なくとも 1 つがヌクレオチド結合部位あるいはその近傍にあることが示唆された。8-oxo-dGTP による蛍光変化は 2-OH-dATP によるそれに類似しておりこれらのヌクレオチドが MTH1 タンパク質に同様の結合をすることが示された。酸化されていない通常のヌクレオチドの結合によっても蛍光は減少したが、減少の程度が小さく結合モードが異なることが示された。酸化されたヌクレオチドの結合は酸化されていないヌクレオチドの結合と比べタンパク質とより多くの接点を持ちそのことによりより強い結合することが示された。またこの分析からヌクレオチド結合部位近傍にあるトリプトファン残基の近傍に負の電荷をもったアミノ酸残基があることが示唆された。NMR により決定した MTH1 の立体構造において 117 番目のトリプトファン残基が負の電荷をもつアミノ酸残基の近傍に存在する事から、このトリプトファン残基をアラニンに変換したところ、変異タンパクでは活性が完全に消失し、さらに上述の蛍光も消失したことから 117 番目のトリプトファン残基がヌクレオチド結合にかかわることが明らかになった。

(2) DNA 中の 8-oxoG の除去修復酵素、OGG1 の解析

OGG1 は、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持つ酵素である。OGG1 タンパク質はシステインに富むタンパク質であるが、その活性は一酸化窒素 (NO) に曝された細胞で顕著に失活することを見出した。失活した OGG1 の修飾アミノ酸の解析から一部のシステイン残基のニトロ化が確認された。炎症時などに酸化ストレスの亢進した細胞内では、OGG1 はシステイン残基の酸化やニトロ化により失活する可能性が高く、このことが炎症時の細胞障害の増悪に関与している可能性が示唆される。

ogg1 遺伝子欠損マウス (F2) の長期観察において、肺がんの自然発症の上昇を認め、さらに *mth1* 遺伝子欠損マウスとの交配により、*ogg1/mth1* 二重遺伝子欠損マウスにおいてこれらの肺がんの頻度が有意に低下することを見出している。この結果は、DNA 中の酸化塩基の蓄積とヌクレオチドプール中の酸化ヌクレオチドの蓄積がもたらす細胞障害の質が異なることを示唆する。*ogg1* 遺伝子欠損マウスについては、C57BL/6 への戻し交配を 10 世代まで終了した。

OGG1ノックアウト(KO)および野生型(WT)マウス胚から分離した胚由来線維芽細胞を用いて、酸化ストレス負荷後の8-oxoGの変化を同方法で比較解析した。その結果、標本の前処理の組み合わせにより細胞内での8-oxoGの存在様式を明らかにした。WTではRNase処理標本での核およびミトコンドリアに検出された蛍光シグナルはともにH₂O₂負荷後2時間以内に急速に減少した。一方 OGG1KOでは、核内シグナルは負荷後2時間以内にコントロールのレベルまで低下するが、ミトコンドリアにおいては2時間たってもコントロールのレベルに低下することはなかった。以上から、核ゲノムの8-oxoGの修復にはOGG1以外の修復経路の存在が示唆される。

(3) DNA 中の 2-OH-A の除去修復酵素、MYH の解析

ゲノムDNA中の8-オキソグアニン(8-oxoG)は、複製の際にアデニンと誤って対合するために突然変異の原因となる。MYH蛋白質は、8-oxoGに対合したアデニンを除去修復する活性を有する。今回我々は、MYH欠損ES細胞において自然突然変異率が3倍程度上昇し、8-oxoGに対合したアデニンの複製後修復が欠損していることを明らかにした。MYHはDNA複製後にPCNAに依存して8-oxoGに誤対合したアデニンを効率良く修復する。マウスMYHを大量に発現、精製することに成功した、マウスMYHは8-oxoGに対合したアデニンに加えて、誤ってDNA中に取り込まれた2-OH-Aも効率良く修復することを明らかにした。*myh*遺伝子欠損マウス(F2世代)の長期観察において肺がんの自然発症頻度の上昇を認めている。C57BL/6への戻し交配を12世代まで終了した。

(4) 新たな塩基除去修復酵素 APE2 の解析

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*遺伝子は細胞増殖の活性化に伴って発現が誘導され、APE2蛋白質はPCNAと安定な複合体を形成する。

ape2 遺伝子欠損マウスは、成長の過程を通して野生型より低体重であり何らかの細胞機能異常が考えられる。現在詳細な解析を進めるとともに、戻し交配を8世代まで終了している。

(5) 核酸の酸化損傷の定量的検出系の確立

核酸の酸化損傷は突然変異、発がん、細胞死そして老化を考える上で非常に重要な要因である。これまで、核酸の酸化損傷の中ではグアニンの酸化体である8-オキソグアニンに関して多くの研究が報告されている。しかしながら、8-オキソグアニン以外の酸化塩基の検出法はまだ確立されておらず、8-オキソグアニンについてもその細胞内での局在や動態については詳しい解析がなされていないのが現状である。

我々は、LC-MS/MS装置を用いてDNA中に存在する8-オキソグアニンと2-ヒドロキシアデニンを始めとする複数の酸化塩基の定量的検出を確立し、虚血再還流障害を受けた臓器(腎臓、脳)での酸化塩基の蓄積を明らかにした。現在、ヌクレオチドレベルとRNA中の酸化塩基の検出法の確立を進めている。

次に、レーザー走査蛍光顕微鏡を用いた蛍光抗体染色法により8-オキソグアニンの細胞内動態の解析法を樹立した。この解析法により、酸化ストレスを受けた細胞内における8-オキソグアニン

ンの蓄積とその後の急速な修復過程を核やミトコンドリア、さらに DNA と RNA を区別して可視化することが可能となった。現在、マウス個体レベルでの解析を進めている。

(6) 活性酸素障害モデル動物の作製

MTH1、OGG1、MYH、APE2 の欠損および過剰発現が活性酸素ストレスによる脳・神経変性に対する感受性に及ぼす影響を解析する目的で、以下の疾患モデル動物を準備している。

i. パーキンソン病モデル

a) ロテノン投与によるパーキンソン病モデルマウス:ミトコンドリアの電子伝達系複合体 I の特異的阻害剤であるロテノンのマウスへの持続投与(4 週間)により、10~20%程度の割合で線条体 TH 染色性の低下と運動機能失調症状が誘発されることを見いだした。現在黒質ドパミン神経における核酸の酸化とその防御遺伝子の発現に注目して詳細な解析を進めている。

b) MPTP 投与によるパーキンソン病モデルマウス:

神経毒 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の腹腔内投与により、黒質緻密層においてミトコンドリア機能障害を伴ったドパミン神経細胞の脱落が誘発される。現在、このモデルにおいて核酸の酸化とその防御遺伝子の発現の変動に注目して解析している。

今後、これら2つのパーキンソン病モデルを用いて、MTH1 および OGG1 欠損マウスと野生型マウスとの比較解析を進め、それぞれの遺伝子の機能と黒質ドパミン神経変性の関与を明らかにする計画である。

ii. 筋萎縮性側索硬化症モデル

変異 SOD1トランスジェニックマウス(米国 Jackson Lab より購入):現在 C57BL/6 に戻し交配を進めている。8 ヶ月齢前後で運動機能異常が認められた複数のマウスについて、脊髄前角細胞の脱落と大腿筋の萎縮を確認した。現在、このモデルにおいて核酸の酸化とその防御遺伝子の発現の変動に注目して解析を進めるとともに、OGG1、MTH1、MYH 欠損マウスへの交配を進めており、来年度から解析が可能となる予定である。

iii. 変異 Tau トランスジェニックマウス

ヒト型 R406W 変異 Tau を前頭部の神経細胞特異的に過剰発現したマウス (Tg マウス)を組織病理学的及び行動学的に解析した。組織病理学的には、約 18 ヶ月齢の Tg マウスにおいて、タウタンパク質の蓄積をとまなう変性神経細胞を海馬を中心とした領域に認めた。これらの変性細胞はヒト型変異タウに加え野生型のマウスタウも蓄積しており、それらのタウは染色上、高度にリン酸化されていた。また、同時に細胞骨格系の異常も認められた。行動学的には他のヒト型タウを発現したマウスの多くに認められる神経原性の運動障害は全く認められなかったが、海馬及び扁桃体依存性と考えられる恐怖記憶の低下が認められた。現在 OGG1 ノックアウトマウスとの交配を行っている。

② 活性酸素ストレス下における神経前駆細胞活性化のメカニズムの解明

海馬の神経細胞はその領域によって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。*fosB* 遺伝子は、選択的スプライシングにより Jun と協調して転写を活性化する FosB 蛋白質と、Jun の転写活性化をドミナントに抑制する ΔFosB 蛋白質をコードすることから、この2つの *fosB* 遺伝子産物が神経細胞の運命の決定に異なる役割を持つと仮定し、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、ΔFosB 蛋白質が細胞増殖・細胞分化・細胞死を制御する機能を持つことを見出した。また、この2つの細胞株では、多機能レクチンとして知られる Galectin-1 の発現が ΔFosB により誘導されることを明らかにしている。

(1) ガレクチン-1 は ΔFosB 依存的に発現誘導される。

fosB 遺伝子の択一的スプライシング産物である ΔFosB 蛋白質の脳神経系における蓄積的発現は、コカインや脳虚血などのストレス応答時に重要な役割を持つことが示唆されつつある。我々は FosB と ΔFosB の機能の違いを明らかにするため、*fosB* 遺伝子完全欠損 ES 細胞とスプライシングサイトに変異をノックインすることで FosB あるいは ΔFosB の一方のみを発現する ES 細胞を樹立した。これらの細胞において、ΔFosB の標的として報告されている Cdk5 の発現は変化しなかったが、嗅球における神経軸索伸長のガイダンス等に関わる Galectin-1 の発現が ΔFosB 依存的に誘導されることが明らかになった。

(2) 前脳虚血による神経前駆細胞の活性化

ラット両頸動脈結紮による前脳虚血・再灌流後の海馬における BrdU 取り込みによる DNA 複製細胞を検出したところ、コントロール群ではほとんど見られなかった DNA 複製細胞が海馬歯状回において多数観察された。さらに、Galectin-1 の発現を免疫染色法で検討したところ、DNA 複製の観察された歯状回の神経細胞層の周辺領域で顕著な発現亢進を認めた。また、神経細胞死の見られる CA1 領域でも発現亢進が認められた。これらの領域は、*fosB* 遺伝子の発現が虚血再灌流後に亢進する領域と一致しており、培養細胞系で観察された ΔFosB の機能との関連性について、現在解析を進めている。

(3) JNK カスケードスキャフォールド蛋白質 JSAP1 の機能解析

JSAP1 は MAPキナーゼカスケード、特に JNK 経路の活性化を空間的に制御するスキャフォールド蛋白質として機能する。我々は、この JSAP1 の生理的機能を明らかにする目的で、*jsap1* 遺伝子欠損 ES 細胞株を樹立した。*In vitro* で ES 細胞から分化した神経細胞では、JSAP1 は主に軸索の成長円錐に局在する。野生型およびホモの JSAP1 欠損神経細胞の軸索の長さを測定したところ、欠損株において軸索伸長が有意に抑制され、かつ synaptophysin の局在が変化することを見出した。さらに、嗅球における神経軸索伸長のガイダンス等に関わる Galectin-1 の発現が JSAP1 に依存している可能性が示唆された。

3. 研究実施体制

中別府グループ

- ① 研究分担グループ長名:中別府 雄作(九州大学・生体防御医学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - 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
 - 2) Δ 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

岩城グループ

- ① 研究分担グループ長名:岩城 徹(九州大学大学院・医学研究院、教授)
- ② 研究項目
 - 1) ヒト脳神経変性疾患の病理解析
 - 2) 実験動物の病理解析の指導

高島グループ

- ① 研究分担グループ長名:高島 明彦
(理化学研究所・脳科学総合研究センター、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - 1) アルツハイマー病の動物モデル作成とその解析

光本グループ

- ① 研究分担グループ長名:光本 泰秀
(大塚製薬株式会社・医薬第二研究所、グループリーダー)
- ② 研究項目
 - 1) MPTP 投与パーキンソン病モデル動物の作成とその解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Kasprzak, K. S., Y. Nakabeppu, T. Kakuma, Y. Sakai, K. Tsuruya, M. Sekiguchi, J. M. Ward, B. A. Diwan, K. Nagashima, and B. H. Kasprzak. 2001. Intracellular distribution of the antimutagenic enzyme MTH1 in the liver, kidney and testis of F344 rats and its modulation by cadmium. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53:325-335.
- Jaiswal, M., N. F. LaRusso, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, and G. J. Gores. 2001. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res.* 61:6388-6393.
- Furuta, A., T. Iida, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2001. Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 12:2895-2899.
- Tsuzuki, T., A. Egashira, H. Igarashi, T. Iwakuma, Y. Nakatsuru, Y. Tominaga, H. Kawate, K. Nakao, K. Nakamura, F. Ide, S. Kura, Y. Nakabeppu, M. Katsuki, T. Ishikawa, and M. Sekiguchi. 2001. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding

- 8-oxo-dGTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98:11456-11461.
- Nakabeppu, Y., Y. Tominaga, D. Tsuchimoto, Y. Ide, S. Hirano, Y. Sakai, K. Sakumi, and M. Furuichi. 2001. Mechanisms Protecting Genomic Integrity from Damage Caused by Reactive Oxygen Species: Implications for Carcinogenesis and Neurodegeneration. *Environ. Mutagen. Res.* 23:197-209.
 - Kikuchi, H., A. Furuta, K. Nishioka, S. O. Suzuki, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2002. Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 103:408-414.
 - Fujikawa, K., H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, T. Suzuki, M. Masuda, H. Ohshima, and H. Kasai. 2002. 8-Chloro-dGTP, a hypochlorous acid-modified nucleotide, is hydrolyzed by hMTH1, the human MutT homolog. *FEBS Lett.* 512:149-151.
 - Hayashi, H., Y. Tominaga, S. Hirano, A. E. McKenna, Y. Nakabeppu, and Y. Matsumoto. 2002. Replication-Associated Repair of Adenine:8-Oxoguanine Mispairs by MYH. *Curr. Biol.* 12:335-339.
 - Iida, T., A. Furuta, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2002. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol.* 103:20-25.
 - Sakai, Y., M. Furuichi, M. Takahashi, M. Mishima, S. Iwai, M. Shirakawa, and Y. Nakabeppu. 2002. A molecular basis for the selective recognition of 2-hydroxy-dATP and 8-oxo-dGTP by human MTH1. *J. Biol. Chem.* 277:8579-8587.
 - Kato, K., S. Horiuchi, A. Takahashi, Y. Ueoka, T. Arima, T. Matsuda, H. Kato, J. Nishida, Y. Nakabeppu, and N. Wake. 2002. Contribution of estrogen receptor alpha to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation and its implication for escape from senescence by modulating the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* 277:11217-11224.
 - Nishioka, T., K. Sakumi, T. Miura, K. Tahara, H. Horie, T. Kadoya, and Y. Nakabeppu. 2002. fosB gene products trigger cell proliferation and morphological alteration with an increased expression of a novel processed form of galectin-1 in the rat 3Y1 embryo cell line. *J. Biochem.* 131:653-661.

(2) 特許出願

なし