

「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が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 活性酸素による脳・神経細胞の障害と神経変性疾患の発症機序の解明
- ② 神経前駆細胞の複製の活性化と神経分化の制御

### 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

#### ①-1) MTH1による酸化ストレス障害の抑制

MTH1は、酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解活性を有することから、複製や転写の際にゲノムDNAやRNAに酸化プリンヌクレオチドが取り込まれる結果引き起こされる突然変異や翻訳エラーを回避することで遺伝情報の維持に重要な役割を持つと考えられている。我々は、*Mth1*欠損マウス由来胎児線維芽細胞 (*Mth1*<sup>-/-</sup> MEF) にヒトMTH1 (hMTH1) 蛋白質を強制発現させた細胞株を樹立し、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 負荷後の細胞の機能障害や細胞死に注目して解析した。*Mth1*欠損細胞はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対して高い感受性を示し、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) およびカスパーゼ非依存性の細胞死に陥るが、この細胞死はhMTH1

の発現により効率よく抑制された。HPLC-MS/MSおよび蛍光免疫染色による解析から $H_2O_2$ に曝された*Mth1*欠損細胞の核およびミトコンドリアDNAに8-oxodGが継続的に蓄積することが明らかになった。hMTH1を発現させることにより、 $H_2O_2$ 負荷8時間後以降の核およびミトコンドリアゲノムDNA中における8-oxodGのレベルが有意に低下した。 $H_2O_2$ 負荷後の*Mth1*欠損細胞においては、電子顕微鏡観察により電子密度の高い異常な構造体の出現を伴うミトコンドリアの形態変化が高頻度に見出された。このようなミトコンドリアの形態変化がhMTH1の発現によりほぼ完全に抑制されたことから、hMTH1が酸化ストレスによるミトコンドリア障害を効率よく抑制している事が明らかになった。8-oxo-dGTP分解活性を選択的に喪失したhMTH1 (W117Y) あるいは2-ヒドロキシ(OH)-dATP分解活性を選択的に喪失したhMTH1 (D119A) 変異蛋白質の発現によって、いずれも野生型のhMTH1の発現時に比較すると低いレベルではあるが、 $H_2O_2$ による細胞死が有意に抑制された。以上の結果は、hMTH1が酸化プリンヌクレオチドを分解することで酸化ストレスによる細胞の機能障害や細胞死から細胞を保護する機能を有し、その保護効果の一部はミトコンドリア機能障害の抑制に起因することを示唆する。さらに、hMTH1は8-oxo-dGTPとそれ以外の2-OH-dATP等に起因する細胞障害を抑制することが明らかになった。

我々は、*Ogg1*遺伝子欠損マウスには野生型に比べて高頻度に肺腫瘍が発生することを報告し、さらに*Ogg1/Mth1*二重遺伝子欠損マウスでは肺腫瘍の自然発生頻度が野生型と同じレベルまで抑制されることを明らかにしている。hMTH1が酸化プリンヌクレオチドを分解することで酸化ストレスによる細胞の機能障害や細胞死から細胞を保護する機能を有する事から、*Ogg1/Mth1*二重遺伝子欠損マウスでは*Mth1*欠損により酸化ストレスに起因する細胞死が促進される結果として癌の発症が抑制されている可能性が高い。

以上の研究成果から、MTH1を高発現している脳腫瘍細胞などの酸化ストレス抵抗性はMTH1の阻害剤により効率良く抑制できると予想され、他の抗癌剤との併用によりその抗癌剤の用量の軽減や、放射線療法時の照射線量の軽減、さらにこれらの療法に抵抗性の癌の化学療法及び放射線療法に応用できるものと期待される。しかしながら、このような阻害剤を簡便且つ確実にスクリーニングできる系は未だ見出されていない。特に、MTH1は試験管内では酸化プリンヌクレオシド三リン酸により効率よく阻害されるが、酸化プリンヌクレオシド三リン酸は細胞膜を透過できないために薬剤としては使用できない。すなわち、MTH1を阻害する薬剤をスクリーニングする際に無細胞スクリーニング系を用いると、細胞膜透過性を有しない薬剤が得られるという問題がある。本研究の結果は、*Mth1*欠損線維芽細胞にhMTH1を強制発現させた細胞を用いて酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素(MTH1)を阻害する薬剤のスクリーニングが可能となることを示しており、MTH1阻害剤のスクリーニング系として特許を出願した。

#### ①-2) OGG1による酸化ストレス障害の抑制

これまでに我々は、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-oxoGの細胞内動態について詳細な解析を行い、細胞内での8-oxoGの存在様式と局在を明らかにした。NIH3T3細胞の核およびミトコンドリアDNA中の8-oxoGに由来する免疫蛍光シグナルは、過

酸化水素負荷直後に急激に増加し、30分から1時間で負荷前のレベルまで低下することを確認した。これらのことより、酸化ストレスを受けた細胞内では、核およびミトコンドリアに8-oxoGを急速に除去するメカニズムが存在することが示された。今回さらに、DNA鎖中のシトシンに対合する8-oxoGを除去するグリコシラーゼである*Ogg1*遺伝子ホモ欠損マウス胎児由来線維芽細胞 (*Ogg1*<sup>-/-</sup> MEF) を用いて同様の実験を行った。野生型のMEFではNIH3T3細胞と同様の結果が得られたが、*Ogg1*<sup>-/-</sup> MEFの核内8-oxoGシグナルは、野生型MEFより遅いものの負荷後2時間以内に負荷前のレベルまで低下した。しかし、ミトコンドリアにおいては2時間たっても*Ogg1*<sup>-/-</sup> MEFでは負荷前のレベルまで低下することはなかった。

以上の結果は、核においてはOGG1とOGG1以外の8-oxoGを修復するメカニズムが機能していることを示唆しており、さらにミトコンドリアでは8-oxoGの修復にOGG1が必須である事を示している。

#### ①-3) MUTYHによる修復反応の試験管内再構成系の開発

DNA中の8-oxoGに誤って取り込まれたアデニンは、次の複製を経てG→T transversionを引き起こす。アデニンDNAグリコシラーゼ活性を有するMUTYHは、A:8-oxoG対合からアデニンを除去することにより修復反応を開始する。我々は、MUTYHによりアデニンが除去されて生じる修復中間体(脱塩基部位:8-oxoG)が8-oxoG DNAグリコシラーゼ(OGG1)とAPEX1の基質となる事を精製APEX1とOGG1を用いた*in vitro*修復反応系で見出した。この実験事実からMUTYHによる塩基除去修復反応中間体からDNAの二本鎖切断が生じることが示唆される。DNAの二本鎖切断は複製阻害や細胞死の原因となることから、細胞は何らかのメカニズムで二本鎖切断の発生を抑制し、A:8-oxoG対合をC:8-oxoG、そしてC:G対合へ修復すると考えられる。我々は、野生型およびMUTYH欠損マウスの胸腺細胞から調製した全細胞抽出液および精製蛋白質を用いた実験系で、MUTYH自身がA:8-oxoG対合からアデニンを除去後も基質DNAから解離せず、MUTYHにより生じた8-oxoG対側の脱塩基部位をAPEX1による切断から保護する事を見出した。現在、MUTYHによる二本鎖切断の抑制の*in vitro*再構成系を用いた詳細な解析を進めている。

#### ①-4) マウスMUTYHの解析

DNA中に存在するグアニンの酸化体、8-oxoGに対して取り込まれたアデニンはアデニンDNAグリコシラーゼにより除去される。我々は、ヒトMUTYH(hMUTYH)蛋白質がアデニンDNAグリコシラーゼと2-OH-アデニンDNAグリコシラーゼ活性をもち、核とミトコンドリアに局在することを報告した。核型およびミトコンドリア型hMUTYH蛋白質は異なるエクソン1をもつmRNAにコードされ、異なるアミノ末端の配列を有している。我々は、マウスの*Mutyh*遺伝子のゲノム構造と転写産物の解析から、マウス*Mutyh*遺伝子は17個のエクソンからなり、エクソン2と6の択一的スプライシングにより3種類のmRNA(type a, b, c)をコードすることを明らかにした。マウスのほとんどの臓器において3つの*Mutyh* mRNAの発現が確認された。いずれの臓器においてもtype b mRNAのレベルが最も高いものであった。type cについては脳、心臓、腎臓で相対的に高い発現を認めた。type aとtype bの翻訳領域は同一で、分子量57.7 kDaの蛋白質(mMUTYHa)をコードすることが予測された。一

方, type cの場合は翻訳領域が異なり, 分子量50.2 kDaの蛋白質(mMUTYH $\beta$ )をコードすることが予側された。type b およびtype c mRNAの *in vitro* translation反応産物中には, 抗hMUTYH抗体と反応する54kDaと45kDaの蛋白質がそれぞれ検出された。MUTYHを欠損したマウスES細胞では8-oxoGに対合したアデニンの複製後塩基除去修復能が欠損し, その結果自然突然変異率が上昇することを明らかにした。また, このMUTYH蛋白質による複製後修復は, MUTYHのPCNAへの結合に依存することが明らかになった。

最近, 劣性の遺伝性大腸腺腫症患者でMUTYH遺伝子の変異が見出され, 腫瘍のAPC遺伝子に高頻度でG:C→T:A変異が検出される事が報告された。我々は, *Mutyh*遺伝子欠損マウスを樹立し, 自然発癌について野生型マウスと比較して解析した。*Mutyh*遺伝子欠損マウスでは自然発癌頻度が有意に上昇しており, 特に小腸における腺癌の発生が顕著であった。小腸における自然突然変異を解析した結果, *Mutyh*遺伝子欠損マウスではG:C→T:A変異の有意な上昇が認められた。以上の結果から, MUTYHは哺乳動物においてG:C→T:A変異を抑制し, その結果として消化管系の自然発癌を抑制すると結論され, ヒトMUTYH遺伝子の劣性変異が遺伝性大腸腺腫症の直接の原因である事を裏付ける。*Mutyh*遺伝子欠損マウスは, MUTYH遺伝子の劣性変異に起因する遺伝性大腸腺腫症のモデル動物として有用である。

#### ①-5) マウスモデルを用いたパーキンソン病発症機構の解析

野生型及び防御遺伝子欠損マウスにMPTP又はロテノン投与し, 中脳黒質と線条体の神経細胞の核及びミトコンドリアにおける核酸の酸化損傷の蓄積と神経細胞障害に注目して病理および生化学的な解析を行い, 以下の成果を得た。

浸透圧ポンプによるRotenoneの全身持続投与で, 投与1週間後から個体の死亡が観察され, 投与後4週間の生存率は65%であった。生存したマウスの大部分に, 投与後1週間目に顕著な自発運動の低下を認めた。Rotenone投与1週間後の自発運動の低下に対してL-DOPAを投与したが, 自発運動の低下の回復はみられず, 自発運動の低下の原因としてドパミン系以外の関与が考えられた。

Rotenone投与後4週間目で自発運動の低下を示し, さらにRotarod scoreの低値を認めるマウスでは, 線条体におけるTH染色性の低下と黒質緻密部でのドパミンニューロンの減少を認めた。また, 線条体においては $\Delta$ FosBの発現増加が認められ, 線条体におけるドパミン枯渇が示唆された。LC-MS/MSにより脳組織DNA中の8-oxodGを定量したところ, Rotenone投与後4週間目において小脳以外の脳組織で8-oxodGの蓄積量が増加しており, ロテノン投与により, 広範囲の脳組織で酸化ストレスが増加している事が示唆された。

ヒトや猿において薬物性パーキンソン病を引き起こす神経毒, MPTPによるマウスの黒質ドパミン神経の変性を解析する目的で, 野生型と*Mth1*<sup>-/-</sup>マウスに腹腔内注射により1日1回, 30mg MPTP/kgを5日間連続で投与した。最終投与から1週間後には, いずれのマウスとも線条体および黒質においてTH染色性の低下を認めたが, ロテノン投与と異なり顕著な行動の異常は認められなかった。現在, これらのマウスについて詳細な解析を進めている。

#### ①-6) パーキンソン病におけるミトコンドリア機能異常

パーキンソン病 (PD) の発症にはミトコンドリア機能低下が関与している。ミトコンドリアは酸素消費の主な細胞内小器官であり、エネルギー産生の際として重要な機能を有している。神経細胞は分裂終了細胞であり、一般に分裂はしないとされている。従って核ゲノムは複製しないと考えられている。一方、ミトコンドリアゲノム (mtDNA) は神経細胞においても絶えず複製を繰り返すことから、活性酸素により直接の酸化損傷を受けたり複製の際に酸化ヌクレオチドを取り込むことで、突然変異が生じる可能性が高い。我々は酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素、MTH1の発現について検討し、PDで発現が増加していることを確認した。更にOGG1, MUTYHの発現についてもPD 4例、また進行性核上性麻痺 (PSP), 皮質基底核変性症 (CBD) について各2例づつOGG1の発現について検討した。結果としてはPDでは進行例を除く3例についてOGG1, MUTYHの発現亢進が認められた。PSP, CBDについては病変部位の比較的軽度な部位に一致して発現を認めた。PDの重症例の残存細胞では染色を認めないことから、これら修復酵素はまず防御的に発現が増加し、更に進行すると発現が低下することが予想される。事実、正常対照でも88歳の高齢者の剖検脳では発現が増加していた。PSP, CBDでも最も病変部位の強いところでは発現が低下し、中等度の病変を持つ部位では発現が増加していたことも上記仮説を支持するものと考えられる。AD, ALSでこれら酵素が低下していた事実は、PDと比してこれらの疾患の進行が速いことを示しているのかもしれない。

#### ①-7) ヒト変異*SOD1*遺伝子トランスジェニックマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症発症機構の解析

C57BL/6J系統へのもどし交配が進んだヒト変異*SOD1*遺伝子 (G93A) トランスジェニックマウス (*SOD1*<sup>tg/+</sup>) とC57BL/6J系統へ戻し交配の進んだ*Ogg1*<sup>+/-</sup>遺伝子欠損マウス (F12) を交配し、*SOD1*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>+/-</sup>マウス系統を樹立した。現在、*SOD1*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>+/-</sup>マウスの交配により*SOD1*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>+/+</sup>, *SOD1*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>-/-</sup>, *+/+*/*Ogg1*<sup>+/+</sup>, *+/+*/*Ogg1*<sup>-/-</sup>マウスの生産を準備している。

#### ①-8) ヒト変異*TAU*遺伝子トランスジェニックマウスにおける脳神経変性機構の解析

C57BL/6J系統へのもどし交配が進んだヒト変異*TAU*遺伝子 (V337W) トランスジェニックマウス (*TAU*<sup>tg/+</sup>) とC57BL/6J系統へ戻し交配の進んだ*Ogg1*<sup>+/-</sup>遺伝子欠損マウス (F12) を交配し、*TAU*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>+/-</sup>マウス系統を樹立した。*TAU*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>+/-</sup>マウスの交配により*TAU*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>+/+</sup>, *TAU*<sup>tg/+</sup>/*Ogg1*<sup>-/-</sup>, *+/+*/*Ogg1*<sup>+/+</sup>, *+/+*/*Ogg1*<sup>-/-</sup>マウスがそれぞれ13, 14, 5, 9匹ずつ得られた。現在、海馬神経の変性に注目して解析中である。

#### ①-9) グリア細胞におけるhOGG1およびhMTH1の発現解析

酸化ストレス関連酵素であるミトコンドリア移行型hOGG1 (hOGG1-2a) およびhMTH1の発現変化を正常および病的状態におけるグリア細胞の反応様式に注目して検討した。方法は免疫組織化学染色を用い、脳梗塞や転移性脳腫瘍にみられる反応性グリアについて検討した。その結果、反応性アストロサイトではhOGG1-2aやhMTH1の発現亢進がみられ、強発現した細胞ではhOGG1-2aの細胞体のみならず核にも蓄積がみられた。反応性アストロサイトにおけるhMTH1の発現はhOGG1-2aと比べると程度は低かった。オリゴデンドロサイトにも

hOGG1-2aとhMTH1の発現がみられたが、この発現パターンに関して種々の脳病変による特徴的な変化は認められなかった。

#### ①-10) *Mth1*欠損マウスにおけるプリオンの感染実験

プリオン病における神経細胞死の機序は不明であり、異常アミロイド蛋白質の蓄積に伴うミクログリアの活性化や酸化ストレスの関与が疑われている。そこで*Mth1*のノックアウトマウスにプリオン病原因子を接種して発症までの潜伏期や臨床像を調べた。福岡1株NZWマウス脳乳剤(1%を100  $\mu$ l)をこれらのマウス腹腔内に接種した。結果は、野生型:潜伏期間371日, *Mth1*<sup>+/+</sup>:潜伏期間349日, *Mth1*<sup>-/-</sup>:潜伏期間342日であった。腹腔内接種では、2週間から4週間程度の潜伏期間のばらつきがでるため、MTH1の発現と潜伏期間との相関をこのデータからは結論するのは困難であった。

#### ①-11) 神経原線維変化の形成への酸化傷害の関与の検討

神経原線維変化の形成への酸化傷害の関与を検討するために、進行性核上性麻痺におけるミトコンドリア移行型hOGG1(hOGG1-2a)の発現を免疫組織化学染色法にて検討した結果、Alzheimer病と同様、神経原線維変化にhOGG1-2aの蓄積をみとめた。

#### ①-12) 虚血再灌流障害における細胞DNAの8-オキシグアニン蓄積とOGG1発現変動

脳、心、腎などの種々の臓器における虚血後の再灌流は、虚血再灌流(I/R)の過程で生成される活性酸素種(ROS)により臓器障害を惹起する。我々は、虚血再灌流障害におけるゲノムDNAの酸化損傷と防御遺伝子の関わりを解明する目的で、ラット腎の虚血再灌流障害モデルの解析を進めた。

ラット腎の虚血再灌流(I/R)障害では、主に髄外髄質(OM)の尿細管が障害されるが、近位尿細管にネクローシス、遠位尿細管にアポトーシスを認める。この障害は、2週間のうちにほとんど消失する。我々は、I/R障害をうけたラット腎において、酸化DNA損傷の一つである8-oxodGの蓄積量を測定し、8-oxodG DNAグリコシラーゼをコードするOGG1遺伝子の発現について検討した。HPLC-MS/MSでは、I/R後1時間で、腎皮質およびOMから抽出した核DNAに、8-oxodGの増加を認めた。また、免疫組織染色でも、皮質およびOMともに、尿細管の核に8-oxodGの蓄積を認めた。皮髄境界とOMの尿細管では細胞質に核より遅れて8-oxodGが蓄積しはじめ、特に遠位尿細管より近位尿細管での蓄積が顕著であった。免疫組織染色における細胞質の染色は、ミトコンドリアDNAへの8-oxodGの蓄積と考えられ、その蓄積は、I/R後6時間で最も著明で、OMの近位尿細管壊死に先行していた。リボヌクレアーゼプロテクションアッセイでは、OGG1 mRNAは正常腎で高発現しており、I/R後3時間でOMの発現は減少し、1~7日後には皮質およびOMともに発現は回復し、さらに増加していた。*In situ*ハイブリダイゼーションでは、正常腎でOGG1 mRNAは皮質よりOMの尿細管で高発現していたが、その発現はI/R後3時間には著しく減少した。以上のように、核DNAではなくミトコンドリアDNAにおける8-oxodGの蓄積が、OGG1の発現変動を伴った尿細管壊死に関与していると考えられる。

#### ①-13) APEX2欠損マウスの解析

4週齢のApex2遺伝子欠損マウスの体重の平均値は同腹野生型マウスの平均値の約83%で

あった。更に8腹由来の*Apex2*遺伝子欠損マウス10匹と野生型マウス11匹について3週齢以降、約3ヶ月齢までの体重変化を調べたところ一貫して*Apex2*遺伝子欠損マウスの発育遅延を認めた。新生児マウスの体重を測定したところ、*Apex2*遺伝子欠損マウスの体重は同腹の野生型マウスの平均値に対して84%と低い値を示し、胎生期において既に発育遅延が発症していることが示された。4週齢のマウスについて各臓器重量を測定したところ、*Apex2*遺伝子欠損マウスにおいては脾臓、精巣、腎臓、心臓、肺、肝臓、脳の各臓器重量が体重の低下と同程度に低下しており、全身性の発育遅延が明らかになった。

#### ①-14) 大腸菌Endonuclease VIII (NEI) 類似タンパク質NEIL3をコードするヒトおよびマウス遺伝子のゲノム構造と発現解析

APEX2のユニークなC末端領域にはヒトトポイソメラーゼ3 (TOP3) のC末端に相同性を示す領域やPCNA binding motifが存在する。このAPEX2のC末端領域アミノ酸配列に相同性を有するタンパク質をデータベース上で検索し、Hypothetical human protein (Acc. no. NP\_060718) を見いだした。このポリペプチドのN末端領域は酸化ピリミジンDNA glycosylaseである大腸菌Endonuclease VIII (Nei) と相同性を有する。最近NEIと相同性を有する2つのタンパク質 (NEIL1, 2) が報告されていることから、我々は今回同定したタンパク質をNEI like protein 3 (NEIL3) と命名した。ヒトNEIL3 cDNAの配列に相同性を示すマウスEST (Acc. nos. BG917224 and BF607936) の配列を元にPCRプライマーを設計し、マウスcDNA libraryを鋳型としたPCRによりマウスNEIL3をコードするcDNAをクローニングした。ヒトNEIL3とマウス*Neil3*遺伝子は各々4番、8番染色体に位置し、10個のエキソンからなる。ヒトおよびマウスNEIL3 cDNAは各々605と606アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、そのアミノ酸配列はヒトとマウス間で74%一致した。NEIL3のN末端側の配列はヒトNEIL1, NEIL2, 大腸菌MutM, Neiに対して約20%の同一性を示し、特に活性中心とされるN末端付近の配列、DNA結合に関わるとされるH2THドメイン、Zn finger motifなどが保存されている。しかしMutM/Nei family のDNA glycosylase活性の活性中心と考えられているN末端ProlineはNEIL3ではValineに置換されていた。NEIL3のC末端領域の配列にはAPEX2とTOP3に相同性を示す領域が保存されているが、APEX2に存在するPCNA binding motifは存在しなかった。

#### ①-15) イノシン酸三リン酸分解酵素 (ITPase) をコードするヒトおよびマウス遺伝子のゲノム構造と発現解析

ヌクレオチドの酸化障害として酸化的脱アミノ化反応が知られている。アデニン、グアニンそしてシトシンのアミノ基はROSによりケト基に分解され、それぞれヒポキサンチン、キサンチン、ウラシルへ変換される。このような脱アミノ化がdATP, dGTP, dCTPなどのヌクレオチドで生じると複製の際にDNA中に取り込まれ、突然変異の原因となる。またATP, GTP, CTPなどのリボヌクレオチドの場合、RNA合成の誤りやシグナル伝達に異常を来すと予想される。我々は、このような脱アミノ化ヌクレオチドを細胞内から分解排除する酵素としてヒトおよびマウスよりITPaseをコードするcDNAおよびゲノム遺伝子をクローニングし、その構造を決定した。また、リコンビナント蛋白質を発現、精製しその基質特異性な

どの生化学的な解析からマウス，ヒトITPaseともにITPとdITPを効率良く分解する事が確認された。また，遺伝子破壊マウス樹立のためにマウスのゲノム解析を進める過程で，マウスにはイントロン/エクソン構造を持つ *Itpa* 遺伝子の他に，イントロンを持たない processed type の遺伝子が3つ以上存在し，その内の1つは完全なコーディング領域を維持している事から，processed gene の1つと考えられた。現在，ES細胞での遺伝子破壊と processed gene の発現解析を進めている。

## ② 神経前駆細胞の複製の活性化と神経分化の制御

### ②-1) *fosB* 遺伝子によるガレクチン-1 の発現制御

ガレクチン-1はガレクチンファミリーに属する134アミノ酸からなる蛋白質であり，分子内に1つの糖結合部位を有している。その機能は，細胞間接着，T細胞アポトーシスの誘導，細胞増殖の制御，骨芽細胞や筋細胞の分化，pre-mRNAのスプライシング，嗅球における olfactory sensory neuron の軸索投射，末梢神経における軸索伸長などに関連しており非常に多様であることが報告されている。しかしながら，これまでその発現の制御機構についての解析はほとんど手つかずであった。我々は，これまでに転写因子群AP-1 family の構成サブユニットのひとつである  $\Delta$ FosB および FosB が，転写制御以外の経路でガレクチン-1 の発現を拮抗的に調節することを見い出している。 $\Delta$ FosB と FosB は，種々のストレス下で急速に発現誘導されることが知られているが，その下流で機能する標的分子はこれまで不明であった。また， $\Delta$ FosB と FosB は *fosB* 遺伝子から択一的スプライシングによって生じるバリエーションであり，その転写制御機能は互いに拮抗的に作用することが知られている。 $\Delta$ FosB と FosB の機能の違いを明らかにする目的で，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 を発現できないES細胞， $\Delta$ FosB を発現できないES細胞，そのどちらも発現できないES細胞株を樹立し，さらに発現ベクターの導入による  $\Delta$ FosB の過剰発現ES細胞株を作製した。これらの細胞株でガレクチン-1 の発現誘導を比較解析したところ，ガレクチン-1 の発現は mRNA レベルではほとんど変化がなく，蛋白質レベルで  $\Delta$ FosB の発現量と正の相関性を示し，一方 FosB の発現量とは負の相関性を示した。さらに，FosB と  $\Delta$ FosB を共に欠損する細胞においてもガレクチン-1 の発現量は増加した。以上から， $\Delta$ FosB と FosB が主としてガレクチン-1 蛋白質の合成及び分解を調節をすることでガレクチン-1 の発現量を制御する可能性が示唆された。現在，cDNA Microarray による遺伝子発現の網羅的な解析を行い，FosB または  $\Delta$ FosB 標的遺伝子の探索を進めている

### ②-2) *fosB* 遺伝子機能の解析

$\Delta$ FosB のみを発現するマウスと *fosB* 遺伝子完全欠損マウスが樹立できたので，これらのマウスを用いて個体レベルで FosB と  $\Delta$ FosB の脳神経系における機能を解析する目的で，C57BL/6J にもどし交配を進めている。また，FosB および  $\Delta$ FosB を発現するアデノウイルスベクターを構築し，現在 Rat1A 細胞への感染実験でこれまで ER-FosB および ER- $\Delta$ FosB で観察された細胞運命の制御機能を確認している。また，ラット脳への感染実験により，海馬 CA1 神経細胞死と神経前駆細胞の増殖分化への影響に注目して解析を進めている。



### ②-3) ガレクチン-1の機能解析

我々は、AP-1転写因子に属する $\Delta$ FosB蛋白質によって発現制御される蛋白質のひとつとしてガレクチン-1および、そのN末端6アミノ酸が欠損した新規アイソフォームを同定し、それぞれガレクチン-1 $\alpha$ 、ガレクチン-1 $\beta$ と命名した。これら2つのガレクチン-1アイソフォームの機能解析を行うためにリコンビナント蛋白質の大量発現系を構築し、組み換えガレクチン-1 $\alpha$ 、 $\beta$ タンパク質を大量生産、精製し、その生化学的な比較解析を行った。アミノ末端の6アミノ酸を欠くガレクチン-1 $\beta$ は、糖結合能を有するものの大部分がモノマーで存在する。一方、ガレクチン-1 $\alpha$ は、還元状態ではホモダイマーで存在し糖結合能を保持しているが、酸化されると糖結合能を失う事が明らかになった。血球凝集試験からガレクチン-1 $\alpha$ がガレクチン-1 $\beta$ の8倍の血球凝集能を有することが明らかになった。我々は、虚血やカニン酸刺激により海馬CA1やCA3領域に $\Delta$ FosBが発現誘導されることを明らかにし、 $\Delta$ FosBが中枢神経系における細胞の増殖・分化や細胞死などの細胞運命の決定に重要な役割を果たしている可能性を示唆するデータを得ている。虚血時には海馬でガレクチン-1の発現も大きく変化することから、中枢神経系における細胞運命の決定に注目してガレクチン-1 $\alpha$ および $\beta$ の機能解析を進めている。現在、組み換えガレクチン-1 $\alpha$ 、 $\beta$ によるDRG神経再生活性について比較解析を進めている。

### ②-4) ガレクチン-1の組織再生への関与の検討

我々は、組織再生モデルとしてシスプラチン投与による腎障害後の尿細管再生を取り上げ、ガレクチン-1の組織再生への関与を検討した。Sprague-Dawleyラット（雄、7～8週齢）にシスプラチン（8mg/kg）を静脈内投与することにより腎臓のouter medullaを中心に尿細管間質障害を認めた。主に近位尿細管のnecrosisが顕著であった。障害は3日目より明らかとなり、5日目をもっとも顕著であった。7日目には、尿細管腔の拡張、尿細管上皮の扁平化がみられ、14日目には正常近くにまで改善していた。腎機能について、BUNおよびcreatinineは3日目より上昇し始め、5日目にもっとも高値であったが、その後速やかに改善し、10日目には正常レベル近くにまで低下した。ガレクチン-1の免疫組織染色では、正常腎でガレクチン-1は血管の平滑筋細胞、および間質の細胞で発現を認めるのみであったが、シスプラチン投与後7日目には、障害が顕著であるouter medullaの尿細管周囲の間質にガレクチン-1発現細胞が増加していた。現在、培養腎臓細胞を用いて、ガレクチン-1の投与実験を行っている。

### ②-5) JSAP1による神経分化の制御機構の解析

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。ヘテロの*Jsap1*欠損ES細胞をマウスに移植すると、キメラマウスは生まれたが、このキメラマウスと野生型マウスとの交配からはヘテロの*Jsap1*欠損マウスが得られなかった。このことから、JSAP1はヘテロ欠損でも生殖細胞系列の形成あるいは個体の発生に異常をもたらす可能性が示唆された。

JNK経路で機能するJNKにはJNK1, 2, 3の3種類があるが、JNK3は、JSAP1同様に脳で特異的

に高い発現を示すことが分かっている。我々は、これまでにJSAP1がJNK3と特に強く結合し、その活性化を制御していることを報告した。我々は脳の早期発生におけるJSAP1の機能を解析するために、ホモのJSAP1欠損ES細胞株を樹立し、*in vitro*神経分化を試みた。この系で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と思われるNeuriteの先端、さらにNeuriteがシナプスを結成している部位に局在することを認めた。野生型およびホモの*Jsap1*欠損神経細胞のNeuriteの長さを測定したところ、欠損株においてその伸長が有意に抑制されていた。また、シナプスのマーカーであるsynaptophysinの局在が変化することも見出した。さらに、JNK経路の下流で機能するJNK及びc-Junの発現もJSAP1に依存していることが示唆された。これらの結果から、我々は、JSAP1はJNK経路を介して個体の初期発生、特に脳の初期発生に関与していると考えている。

#### ②-6) 転写伸長因子Elongin Aを欠損するマウスES細胞の樹立と解析

Elonginは、アデノウイルス主要後期プロモーターからの転写を促進するタンパク質として同定され、その後、転写の伸長に作用してPo1 IIによるmRNAの合成速度を増加させることが明らかとなった。ElonginはA, B, Cの3つのサブユニットからなる3量体である。哺乳動物のElongin Aは約770個のアミノ酸からなり、C末端部分が転写活性に必要であるが、この領域にはElongin B, Cとの結合に必要な配列も存在する。精製されたElongin Aタンパク質は、*in vitro*転写系において鋳型DNAに転写伸長阻害配列や構造が存在する場合単独で軽度の転写伸長活性を有し、Elongin BとCがその正の調節性サブユニットとして機能することが示されている。

我々は、高等真核生物における遺伝子発現時の鋳型DNA上に生じた酸化損傷等の存在が転写伸長に及ぼす影響と転写伸長におけるElongin Aの生理的機能を明らかにする目的で、マウスES細胞を用いて、Elongin Aの遺伝子座をホモに欠損する細胞株の樹立を試みた。Elongin Aの転写活性化必須部位を含むエクソン8, 9, 10およびこの周辺のイントロンをネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換したターゲティングベクターをES細胞に導入し、ヘテロ欠損株を単離した。さらに高濃度のG418存在下で培養することにより、ホモ欠損株を樹立した。Elongin Aホモ欠損ES細胞では、細胞の肥大化と染色体の倍数性の変化が観察され、細胞周期のコントロールに何らかの異常が生じていることが示唆された。また、cDNA Microarrayを用いた遺伝子発現の変化を解析したところ、一部の遺伝子群の発現が減少あるいは増加していることが判明した。

### 3. 研究実施体制

#### 中別府グループ

- ① 研究分担グループ長：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：「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」および「神経前駆細胞の複製の活性化と神経分化の制御」の解析

#### 岩城グループ

- ① 研究分担グループ長：岩城徹（九州大学大学院医学研究院、教授）

② 研究項目：実験動物の神経病理学的解析の指導

ヒト神経変性疾患における活性酸素障害の関与の解明

高島グループ

① 研究分担グループ長：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：ヒト変異型タウ遺伝子トランスジェニックマウスの供給

光本グループ

① 研究分担グループ長：光本泰秀（大塚製薬株式会社医薬第二研究所、チームリーダー）

② 研究項目：MPTP 投与パーキンソン病モデル動物の作成とその解析の指導

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Sakumi, K., Y. Tominaga, M. Furuichi, P. Xu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu, Ogg1 Knockout-associated Lung Tumorigenesis and Its Suppression by Mth1 Gene Disruption, *Cancer Res*, 63(5), 902-905, 2003.
- Matsukura, S., H. Soejima, T. Nakagawachi, H. Yakushiji, A. Ogawa, M. Fukuhara, K. Miyazaki, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, and T. Mukai, CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection, *Br J Cancer*, 88(4), 521-529, 2003.
- Tsuruya, K., M. Furuichi, Y. Tominaga, M. Shinozaki, M. Tokumoto, T. Yoshimitsu, K. Fukuda, H. Kanai, H. Hirakata, M. Iida, and Y. Nakabeppu, Accumulation of 8-oxoguanine in the cellular DNA and the alteration of the OGG1 expression during ischemia-reperfusion injury in the rat kidney, *DNA Repair*, 2(2), 211-229, 2003.
- Ide, Y., D. Tsuchimoto, Y. Tominaga, Y. Iwamoto, and Y. Nakabeppu, Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene( small star, filled ), *Genomics*, 81(1), 47-57, 2003.
- Arima, H., Y. Kiyohara, Y. Tanizaki, Y. Nakabeppu, M. Kubo, I. Kato, K. Sueishi, M. Tsuneyoshi, M. Fujishima, and M. Iida, Detection of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism from paraffin-embedded tissues: the Hisayama study, *Circ J*, 66(11), 1034-1036, 2002.
- Zhang, D., L. Zhang, D.W. Lou, Y. Nakabeppu, J. Zhang, and M. Xu, The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression, *J Neurochem*, 82(6), 1453-1464, 2002.
- Yamazaki, K., L. Guo, K. Sugahara, C. Zhang, H. Enzan, Y. Nakabeppu, S. Kitajima, and T. Aso, Identification and biochemical characterization of a

novel transcription elongation factor elongin A3, *J. Biol. Chem.*, 277(29), 26444-26451, 2002.

- Nunoshiba, T., T. Watanabe, Y. Nakabeppu, and K. Yamamotoa, Mutagenic target for hydroxyl radicals generated in *Escherichia coli* mutant deficient in Mn- and Fe-superoxide dismutases and Fur, a repressor for iron-uptake systems., *DNA Repair*, 1(5), 411-418, 2002.
- Takahashi, M., F. Maraboeuf, Y. Sakai, H. Yakushiji, M. Mishima, M. Shirakawa, S. Iwai, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu, Role of tryptophan residues in the recognition of mutagenic oxidized nucleotides by human antimutator MTH1 protein, *J. Mol. Biol.*, 319(1), 129-139, 2002.
- Kohya, N., K. Miyazaki, S. Matsukura, H. Yakushiji, Y. Kitajima, K. Kitahara, M. Fukuhara, Y. Nakabeppu, and M. Sekiguchi, Deficient Expression of O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Combined With Mismatch-Repair Proteins hMLH1 and hMSH2 Is Related to Poor Prognosis in Human Biliary Tract Carcinoma, *Ann. Surg. Oncol.*, 9(4), 371-379, 2002.
- 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.
- 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

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）