

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460490

研究課題名(和文) 8-オキソグアニンが引き起こすドパミン神経変性の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of degeneration of dopaminergic neurons caused by 8-oxoguanine

研究代表者

盛子敬 (Sheng, Zijing)

九州大学・生体防御医学研究所・特別研究員

研究者番号：90467895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ドパミン神経変性におけるMTH1、OGG1、MUTYHの関与を解析した。ドパミン神経毒のMPTPを投与したOgg1/Mth1-DKOマウスは、野生型と比較して多動、運動亢進、握力低下を呈した。ヒトMTH1を高発現するhMTH1トランスジェニックマウスは、運動亢進に対して顕著な抵抗を示した。MPTP投与により野生型およびOgg1-KOマウスは運動亢進を示したが、Ogg1/Mutyh-DKOマウスでは観察されなかった。以上の結果は、MTH1とOGG1は黒質線条体系のドパミン神経細胞を保護し、一方MUTYHによる塩基除去修復過程はドパミン神経細胞の変性の引き金となる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated roles of MTH1, OGG1, and MUTYH in the molecular pathological mechanisms by which oxidative stress induces degeneration of dopaminergic neurons. Ogg1/Mth1-DKO mice administered MPTP, a dopaminergic neurotoxin, which is known to cause Parkinsonism, displayed hyperactivity, namely hyperkinesia, in open field test compared to wild-type mice. The Ogg1/Mth1-DKO mice also showed a more pronounced reduction in grip strength compared to the wild-type mice. Furthermore, it was revealed that human MTH1 transgenic mice overexpressing hMTH1 showed remarkable resistance to the hyperkinesia induced by MPTP. Ogg1-KO mice as well as wild-type mice exhibited hyperkinesia after MPTP administration, however Ogg1/Mutyh-DKO mice showed no hyperkinesia induced by MPTP. These data suggest that MTH1 and OGG1 may protect nigrostriatal dopaminergic neurons, while base excision repair initiated by MUTYH may trigger degeneration of the dopaminergic neurons.

研究分野：脳神経

キーワード：8-oxoG パーキンソン病 MTH1 OGG1 MUTYH

1. 研究開始当初の背景

活性酸素に曝された細胞では、DNA 中のグアニンや遊離ヌクレオチドのdGTP が最も酸化されやすく、8-オキシグアニン (8-oxoG) を生じる。我々は、8-oxoG を核酸の酸化損傷マーカーとして捉え、そのゲノム (核とミトコンドリアDNA を指す) 蓄積を防御する酵素群として、8-oxo-dGTPを8-oxo-dGMP に分解するMTH1, DNA 中の8-oxoG を除去修復するOGG1, そして複製の際にDNA中の8-oxoG に誤って対合したアデニンを除去修復するMUTYH を同定し、その生化学的解析と細胞、個体レベルでの機能解析を進めてきた。研究代表者は、代表的な酸化塩基である8-oxoGのゲノム蓄積を抑制する遺伝子 (*Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh*) を欠損するノックアウト (KO) マウスを用いて、ミトコンドリア毒である3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) 投与により誘発されるハンチントン病モデルにおける運動機能障害および線条体変性の発生メカニズムに注目して解析を行い、3-NPによる線条体変性はMTH1とOGG1によって抑制されることを明らかにした。一方、3-NP による線条体変性は修復酵素MUTYHによる塩基除去修復過程 に依存することが明らかになった。この研究の過程で、8-oxoG はマウスの線条体において中型有棘神経細胞とミクログリアで独立した2つの細胞死の経路を独立に活性化することを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、パーキンソン病 (PD) の発症機構を明らかにする目的で、「酸化ストレスがドパミン神経変性を引き起こす分子機序」を8-oxoG蓄積とMTH1, OGG1, MUTYHに注目し、以下のアプローチで解明する。神経毒MPTP (1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン) 投与PDモデルを用いて、8-oxoGの蓄積を抑制するMTH1とOGG1の欠損、さらにMTH1の過剰発現の効果を解析する。*Mutyh*遺伝子ノックアウト (*Mutyh*-KO)

マウスにMPTPを投与して、MUTYHによって開始されるDNA修復反応がドパミン神経変性の引き金となるかどうかを検討する。

MPTP投与PDモデルにおけるドパミン神経変性をカルパイン阻害剤あるいはPARP阻害剤が抑制するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

使用するマウス：野生型 (C57BL/6J),

*Mth1/Ogg1*二重遺伝子ノックアウト

(*Mth1/Ogg1*-DKO) マウス, hMTH1-Tg マウス,

Ogg1-KO マウス, *Ogg1/Mutyh*-DKO

マウス (12ヶ月齢, 雄, 雌)。神経毒MPTP

投与PD モデルを作成する。MPTPは、5日間

腹腔内注射する。初日30mg/kg, 2-5日目

20mg/kgを1日1回腹腔内注射する。行動観

察：MPTP投与1週間後, 2週間後, 3週間後,

4週間後に、オープンフィールドで無動や寡動

の指標となる運動の測定、握力試験 (grip

strength) で運動バランス, 筋力を測定する。

組織病理解析：8-oxoG, TH (チロシン水酸化酵素), ミクログリア (F4/80), アストロサイト (GFAP) の免疫染色で酸化ストレス, ドパミン神経変性の程度とグリオシスの程度を比較解析する。

4. 研究成果

まず、野生型 (C57BL/6J), *Mth1/Ogg1*-DKO

マウス, hMTH1-Tg マウス (12ヶ月齢, 雄)

について、MPTP を投与しないコントロール

群と MPTP 投与群について行動解析を行った。

薬物性 PD を誘発する MPTP を投与した

OGG1/MTH1 二重欠損マウスは、野生型マウスと

比較して、オープンフィールドで多動、運動亢進を

呈する事を明らかにした。握力試験において、

Mth1/Ogg1-DKO マウスは野生型マウスと比較して、

MPTP に暴露した後より顕著な握力低下を示した。

また、hMTH1-Tg マウスは、MPTP による運動亢進

に対して顕著な抵抗性を示すことが明らかになり、

MTH1 と OGG1 は黒質ドパミン神経細胞を保護する

可能性が示唆された。

さらに、野生型 (C57BL/6J), *Ogg1*-KO,

Ogg1/Mutyh-DKO マウス (12 ヶ月齢, 雄) について, MPTP を投与しないコントロール群と MPTP 投与群について行動解析を行った。MPTP 投与1週間後, 2週間後, 3週間後, 4週間後に, オープンフィールドで運動量を測定したところ, MPTP 投与により野生型および *Ogg1*-KO マウスは運動亢進を示したが, *Ogg1/Mutyh*-DKO マウスは運動亢進を示さず, MPTP に抵抗性である可能性が示唆された。握力試験では, はっきりとした差は認められなかった。MUTYH によって開始される DNA 修復反応が黒質ドパミン神経細胞変性の引き金となる可能性が示唆された。

行動解析後のマウスの剖検脳を回収し, 核とミトコンドリア DNA における 8-oxoG の蓄積, ドパミン神経変性の脱落, グリオースに注目して病理解析を行い, 神経変性経路の活性化について検討した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Nona Abolhassani, Julio Leon, Zijing Sheng, Sugako Oka, Hideomi Hamasaki, Toru Iwaki, Yusaku Nakabeppu, Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain, *Mech Ageing Dev*, 161, 95-104, 2017.
2. Julio Leon, Kunihiko Sakumi, Erika Castillo, Zijing Sheng, Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu, 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neuritogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions, *Sci Rep*, 6, 22086, 2016

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 岡 素雅子, 盛 子敬, フリオ レオン, 土本 大介, 作見 邦彦, 中別府 雄作, アルツハイマー病進展における核あるいはミトコンドリア DNA 中に蓄積した 8-oxoguanine の役割, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.12.01, 横浜.
2. 中別府 雄作, 岡 素雅子, 盛 子敬, 大野みずき, 土本 大介, 作見 邦彦, 活性酸素による DNA 損傷が引起こすさまざまな生命現象: 突然変異から神経変性まで, 第 17 回日本進化学会年大会, 2015.08.22, 東京.
3. Zijing Sheng, Yusaku Nakabeppu, Cranial irradiation causes hippocampal degeneration through accumulation of 8-oxoguanine in mitochondrial DNA in neurons, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015.07.30, Kobe.
4. Yusaku Nakabeppu, Sugako Oka, Zijing Sheng, Kunihiko Sakumi, MUTYH-dependent programmed cell death triggered by 8-oxoguanine and its implication in tumor suppression and neurodegeneration, 15th International Congress of Radiation Research: ICRR2015, 2015.05.27, 京都.
5. 岡 素雅子, 盛 子敬, 作見 邦彦, 中別府 雄作, ほ乳動物ゲノムにおける 8-オキソグアニンの修復プロセッシングと細胞運命, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014.11.26, 横浜.
6. Yusaku Nakabeppu, Mizuki Ohno, Sugako Oka, Zijing Sheng, Kunihiko Sakumi, Control mechanisms of genetic diversity and programmed cell death induced by 8-oxoguanine in mammals, 9th 3 R (Replication, Repair, recombination) symposium, 2014.11.18, 御殿場.
7. Yusaku Nakabeppu, Sugako Oka, Zijing

Sheng, Kunihiko Sakumi,
MUTYH-dependent programmed cell death
induced by 8-oxoguanine accumulated in
cellular DNAs and its implication in
tumorigenesis and neurodegeneration, 5th
US-Japan DNA Repair Meeting,
2014.10.29, 鳴門.

8. 岡 素雅子, 盛 子敬, 中別府 雄作,
MUTYH によって開始される塩基除去修復
に依存した2つの独立したプログラム細胞
死の経路, 日本遺伝学会 第 86 回大会,
2014.09.17, 長浜.

9. Zijing Sheng, Yusaku Nakabeppu,
Mechanism by which 8-oxoguanine causes
dopaminergic neurodegeneration in aged
mice, 第 37 回日本神経科学大会, 2014.09.11,
横浜.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/nfg/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

盛 子敬 (Zijing Sheng)

九州大学・生体防御医学研究所・

特別研究員

研究者番号：90467895

(2)連携研究者

中別府 雄作 (Yusaku Nakabeppu)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350