

厚生省厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
基礎老化

ヒト個体における老化機構の分子疫学的解明
（H10－長寿－031）

平成11年度研究報告書

2000.3.

主任研究者：山木戸 道郎
（広島大学医学部 教授）

ヒト個体における老化機構の分子疫学的解明

山木戸 道郎 (広島大学 医学部 第二内科学講座 教授)

長期に亘り疾患及び寿命の追跡調査を行っている原爆被爆者集団のデータおよび臨床背景が参照可能であった症例の解析では、ヒト体細胞のテロメア長短縮は細胞老化の指標となるが、定常時の末梢血単核球のテロメラーゼ活性レベルは、その規定因子も個体寿命との関連性も明らかでなかった。ヒト癌細胞のテロメア長・テロメラーゼ活性は癌細胞の増殖能とも関連性を示し、細胞周期にある細胞のテロメラーゼ活性レベルが、細胞の寿命を規定していることが示唆された。また、原爆被爆者集団の解析では、血液細胞、特に幹細胞に生じた異常を反映している体細胞突然変異頻度の増加が癌の発生頻度と関連していることを示唆する結果が得られた。ウェルナー症と診断された患者の繊維芽細胞より樹立した不死化細胞株は、培養早期に核型が不安定性を示し、p53を欠失し不死化したと考えられた。DNAの損傷の蓄積の機構として、単独では変異原性を示さない化合物が、結合により新規化合物を形成し、DNA付加体を形成することが明らかとなった。変異原性を誘発することも示めされた。修復機能と老化に関しては、ヒトMTH1蛋白質は3種類の酸化損傷ヌクレオチドを分解し、ヒトのパーキンソン病やノックアウトマウスの結果より、MTH1が老化に伴う酸化ヌクレオチドによる細胞障害を抑制的に制御していることが強く示唆され、MTH1蛋白質の変異や老化の抑制に関する役割が、今まで予想されていた以上に重要である可能性が明らかとなった。

[研究組織]

- 山木戸道郎 (広島大学医学部第二内科学教授)
- 葛西 宏 (産業医科大学産業生態科学研究所職業性腫瘍学教授)
- 中別府雄作 (九州大学生体防御医学研究所生化学部門教授)
- 二階堂 修 (金沢大学薬学部分子細胞薬学教授)
- 平井裕子 (放射線影響研究所放射線生物学部主任研究員)
- 若林敬二 (国立がんセンター研究所がん予防研究部部長)

A. 研究目的

本研究は、ヒト個体の老化及び寿命を遺伝子異常の蓄積による生理的老化という観点で捉え、これまでに提唱されてきたが直接的証拠の得られていない老化の仮説のうち、1.老化は体細胞遺伝子の突然変異の蓄積により生じる、2.遺伝子異常の蓄積の要因の一つは、遺伝子修復機能の低下であるとの2つの仮説の検証を行うことにより、内的、外的要因により生じる遺伝子損傷に対する修復機能の低下及び遺伝子異常の蓄積とヒト個体の老化及び寿命との関係を解析することを目的とする。個体の老化に関しては、長期に亘る大規模集団での疫学調査が必要と考えられるが、我々は既に、疾患及び寿命の追跡調査を長期に亘り行っている原

爆被爆者集団の蓄積されたデータを有している。

本年度は、昨年度に続き、原爆被爆者集団の対象者や臨床背景が参照可能であった症例について、テロメア長、テロメラーゼ活性や体細胞突然変異頻度 (Mf) と臨床背景、予後や寿命との関連を解析した。癌細胞における細胞老化とテロメア長・テロメラーゼ活性の関係も検討した。遺伝子損傷の生成、蓄積に関しては、新しい機序の解析を行った。無限増殖能を得たウェルナー患者由来細胞については、その原因について検討した。遺伝子修復機能の低下と老化の関係については、酸化ヌクレオチドの分解酵素の酵素活性、局在、脳・神経疾患での関与およびノックアウトマウスでの、ヒトの老化で生じる疾患や寿命について調べた。

B. 研究方法

1. 原爆被爆者及び疾患背景が参照可能であった症例について、末梢血リンパ球におけるテロメア長、テロメラーゼ活性と臨床背景や寿命との関係について比較検討した。肺癌組織を対象に癌遺伝子・癌抑制遺伝子などの異常とテロメア長・テロメラーゼ活性レベル、予後との関係を検討した。
2. 原爆被爆者の末梢血好中球における Fcγレセプター III (FcγRIII) 遺伝子突然変異体頻度 (Mf) と癌発生率及び寿命について解析した。
3. 酸化的損傷ヌクレオチドと分解酵素 (MTH1) をインキュベートし、分解されるか否かを観察した。
4. ノルハルマンは、S9 mix 存在下、アニリンと共存させることにより新規変異原物質アミノフェニルノルハルマン (APNH) を生成し、DNA と

付加体を形成する。APNH 生成に關与する S9 mix 中の酵素および APNH の DNA への付加体形成について検討した。

5. 無限増殖能を得たウェルナー症候群患者の細胞について、原因遺伝子 (WRN) の突然変異部位、mRNA 及び蛋白質の発現量、p53 蛋白質の発現量について調べた。
6. 酸化ヌクレオチドを分解する酵素ヒト MTH1 蛋白質の基質特異性、遺伝子多型により発現した MTH1 蛋白質の細胞内局在、老化に伴ない発症が増加する脳、神経変性疾患における核酸の酸化による障害の関与および MTH1 を欠損したマウスの自然老化による病的変化の解析を行った。

倫理面への配慮: いずれの施設においても倫理委員会が設置されており、その基準を遵守して研究が進められている。この研究班で使用するヒト生体試料は総て同意書を得ており、個人が特定されることのない様に、サンプル番号、性別、年齢、疾患についてデータベースを作成して管理した。総ての動物実験は各施設の動物委員会の飼育実験管理規則を遵守して行っている。中別府が行っている動物実験は九州大学医学部動物実験委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

山木戸は、原爆被爆者及び疾患背景が参照可能であった症例 287 例について、リンパ球におけるテロメア長、テロメラーゼ活性と背景要因を解析したが、統計学的に有意な要因は認めなかった。更に、死亡データを加えた予後の検討においても、統計学的有意差は認めなかった。

肺癌組織におけるテロメラーゼ高活性と背景諸

因子との間に統計学的に有意な関連が認められた因子は、小細胞癌（対非小細胞癌）、Aneuploidy、%S phase、6ヶ月未満の早期死亡（非小細胞癌）、テロメア長変化例（短縮／延長）、予後であった。一方、関連が認められなかった因子は、年齢、腫瘍径、病理病期、分化度、癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常であった。

平井は、原爆被爆者584名について、末梢血好中球における Fcy RIII Mf と癌発生率との関係を調べた。Fcy RIII Mfの上昇に伴ない発癌リスクは統計的に有意に上昇した。死亡時年齢とMfは統計的有意差は認めなかった。癌の既往症のあるヒトについて、死亡群と生存群に分けて各群のMfを比較したが、有意な結果は得られなかった。Mfが平均の10倍以上高い対象者の変異細胞では、Fcy RIII mRNAが欠損していた。

葛西は、活性酸素によるDNA損傷の蓄積を防御するシステムを解明するために、活性酸素により生ずる酸化的損傷ヌクレオチドの分解について8-OH-d GTP を分解する酵素として知られているヒトMTH1 蛋白質が、2-OH-dATPや8-OH-dATPも分解することを示した。しかも、2-OH-dATPは8-OH-dGTPより効率良く分解することが判明した。

若林は、環境中幅広く存在するノルハルマンはS 9 mixの存在下でアニリンと共存させると新規変異原物質 APNH が生成することを明らかにした。この化合物はS9 mix 中のCytochromeP-450 の働きにより形成され、DNA付加体を形成する。APNH-DNA 付加体はdeoxyguanosineとの付加体であることが明らかとなった。

二階堂は、遺伝的早老症を特徴とするウェルナー一患者由来細胞（WS細胞）24株のうち不死化した

細胞について、何故WS細胞が不死化したのか、その原因について検討した。ウェルナーの原因遺伝子WRNの変異は同定できなかった。しかも、WRN遺伝子mRNAの発現量の低下及びWRN蛋白質量の明らかな低下や欠損も認めなかった。p53蛋白質については、発現量の低下が認められた。染色体数は継代初期は46本であったが、32代では50本に移動し異数化が観察され、造腫瘍性を示した。

中別府は、酸化損傷ヌクレオチドの分解酵素の一つであるMTH1が、酸化型プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素活性を持ち、スプライシングに変化をもたらす遺伝的多型により翻訳される4種のMTH1蛋白質のうち1つはミトコンドリア移行シグナルが付加されていたことを明らかとした。老化とともに増加する疾患の一つであるパーキンソン病患者の中脳黒質では、8-oxoGが蓄積し、MTH1の発現が亢進していることを発見した。また、MTH1遺伝子欠損マウスに生じた病変、特に腫瘍に関して解析を行い、野生型、欠損型いずれのマウスとも、肺、肝臓、胃の腫瘍や過形成などの増殖病変を認めたと、欠損マウスの方が、発生頻度が上昇しており、上記3種以外の臓器（子宮や皮膚）にも病変を認めた。この結果は、雌雄ともに有意にMTH1遺伝子欠損マウスで増殖性病変の自然発生が増加していることを示している。

D. 考察

当研究班は、ヒト個体の老化及び寿命は遺伝子異常の蓄積による生理的老化を基盤とするとの仮説を元に、その機構を解明することを目的としている。

本年度の結果は、長期に亘り、疾患および寿命の

追跡調査を行っている原爆被爆者集団および臨床背景が参照可能であった症例より、臨床背景や寿命と定常時の末梢血リンパ球のテロメア長、テロメラーゼ活性の関連を解析したが、明らかな関連性は認められなかった。昨年度の研究で、リンパ球においては、その刺激時のテロメラーゼ活性増強能の差がテロメア短縮修復能の差をもたらし、メモリーT細胞・活性化リンパ球の分裂寿命・増殖能を規定している可能性を示した。本年度の肺癌の研究結果も、その仮説を支持するものであった。すなわち、癌細胞においても、遺伝子変異の蓄積・細胞周期の促進に伴う細胞分裂回数増加によりテロメア短縮ひいてはテロメラーゼ活性化に至ると考えられ、細胞老化を免れ分裂寿命を延長するには、テロメラーゼ活性化によるテロメア反復配列の修復が不可欠であることが示唆された。

老化に伴う疾患の一つである癌の罹患リスクが赤血球だけではなく、好中球のMfとも相関することが明らかとなった。特に、骨髄幹細胞に生じた変異の蓄積が老化に伴う疾患発生に強く関与していることが示唆された。これらの遺伝子は、発癌に直接関係した遺伝子ではないが、個体の癌関連遺伝子の突然変異を間接的に反映していることを示唆した。血液細胞のMfの疫学的調査におけるバラツキの要因としてクローナルな増殖が考えられるが、骨髄幹細胞由来細胞においても同様なことが考えられる結果であった。今後癌以外の老年疾患や寿命とMfの関係について、長期にフォローアップすることが必要であると考えられる。

ウェルナー症候群患者より樹立した細胞株の中に無限増殖する細胞株が得られた。この細胞のWRN遺伝子に異常は認められなかったため、細胞供与者はウェルナー症ではないと判定された。この

細胞の培養初期に染色体不安定性が発現することにより、一部の細胞に p53 の欠失が生じ、それらの細胞が増殖上の優位を獲得して集団中に大勢を占め、ついには造腫瘍性を獲得するに至ったと結論した。しかし、何故、培養初期に染色体不安定性が生じたかは不明である。ウェルナー由来とされながら、不死化した細胞株を複数樹立しているため、これらについても検討が必要である。

ノルハルマンのアニリン共存下における変異原性の発現は、新規変異原物質である APNH の生成によることが既に明らかである。APNH の生成に関与する酵素は、S9 mix 中の Cytochrome P-450 であることが今回明らかとなった。しかし、P-450 のどの分子種が結合に関与しているのかについては判っていない。また、APNH の DNA 付加体は、APNH と deoxyguanosine との付加体であることが明らかとなった。

活性酸素により生じる酸化的DNA損傷の蓄積の原因として、生じた酸化的損傷デオキシヌクレオチドの分解に関して調べ、酸化的損傷ヌクレオチドの分解にMTH1蛋白質が重要な働きをしていること、特に、8-OH-dGTP以外に2-OH-dATPを効率よく分解することが明らかとなった。これまでにヌクレオチドプールに2-OH-dATPの存在が報告されていないが、今回の結果は、2-OH-dATPがヒトの細胞中に生じるが、効率良く分解される可能性が示唆された。この作用は哺乳動物に限定された機能である可能性が高い。ヒトの肺癌や肝細胞癌におけるp53遺伝子の変異には8-oxoGの関与が示唆されているが、胃癌では8-oxoGの関与は非常に少ない。それゆえ、MTH1欠損マウスでの胃癌の増加の原因は、2-OH-dATPに由来する変異が関与している可能性が考えられる。

パーキンソン病患者の中脳黒質で8-oxo Gが蓄積し、MTH1の発現も著しく亢進していることを世界で初めて明らかにした。8-oxoGはミトコンドリアに蓄積していると考えられ、エネルギーをミトコンドリアの呼吸に依存している神経細胞では、ヌクレオチドの酸化がミトコンドリア機能障害の原因となっている可能性が示唆される。これらの結果は、遺伝子異常の蓄積が老化にともなう疾患の原因となり、その蓄積が修復酵素の機能低下により生じるという仮説を間接的に支持している。

E. 結論

1. 正常細胞、癌細胞共に、細胞の寿命は、細胞周期にある細胞のテロメラーゼ活性レベルが規定している。
2. ヒト個体の老化が遺伝子異常の蓄積により生じるという仮説は、癌発生率と体細胞突然変異頻度が相関することにより強く支持された。特に、血液幹細胞に生じた異常を反映している体細胞突然変異に統計的に有意な相関が示された。
3. DNA に付加体を形成する遺伝子異常の蓄積の新しい機構が証明された。正常細胞の培養で得られた不死化細胞株は、培養早期にp53が欠失した細胞が増殖上の優位を獲得したことにより得られた。
4. 遺伝子異常の蓄積が遺伝子修復能の低下に基づくという仮説は、修復酵素の基質特異性が明らかとなり、ノックアウトマウスにおいて加齢と共に癌の発生頻度が有意に高くなり、パーキンソン病の解析より、中脳に酸化ヌクレオチドが蓄積し、修復酵素活性の発現が亢進していたことから、支持された。

「老化とゲノム反復配列」 ーヒト体細胞の老化とテロメア長・テロメラーゼ活性ー

山木戸道郎（広島大学医学部 教授）

ヒト体細胞のテロメア長短縮は細胞老化の指標となるが、定常時の末梢血単核球のテロメラーゼ活性レベルは、その規定因子も個体寿命との関連性も明らかではなかった。一方、ヒト癌細胞のテロメア長・テロメラーゼ活性は癌細胞の増殖能とも関連性を示し、細胞周期にある細胞のテロメラーゼ活性レベルが、細胞の寿命を規定しているのかもしれない。

キーワード：テロメラーゼ、テロメア長、単核球、癌細胞、加齢、寿命

A. 研究目的

マウス正常細胞は、p53やRbを不活化しヒト癌遺伝子を導入することで容易に癌細胞に変換できるが、ヒトの正常細胞は、この操作では不死化癌細胞は得られない。ヒト正常細胞が不死化癌細胞となるには、さらにテロメラーゼの活性化を必要とする、ということが本年度Weinbergらにより明らかにされた¹⁾。すなわち、もともとテロメア長が非常に長いマウスと異なり、ヒト細胞は、テロメラーゼ活性によるテロメア伸長なしには、癌細胞に変換され増殖するのに必要なだけの細胞分裂をする前に老化して死滅してしまうのである。この機序はturn overの早い正常細胞が分裂を続けるためにもあてはまることが予想されるため²⁾、様々な臨床背景を持つ個体の末梢血単核球の相対的テロメラーゼ活性レベル・テロメア長とその臨床背景・予後との関係を検討してきたが、本年度に得られた新たな寿命データも加えて再検討した。

また、ヒト癌においては、肺癌では他の多

くの固形癌と同様、過半数のテロメア長は正常肺組織と有意な変化を認めず3割のみ短縮または延長しており、約8割の肺癌組織検体でテロメラーゼ活性が検出されるがその活性レベルはさまざまであることを報告してきた³⁾。そこで、ヒト癌細胞における細胞老化とテロメア長・テロメラーゼ活性の関係を明らかにするため、外科的に切除された肺癌組織を対象に、種々の癌遺伝子・癌抑制遺伝子などの異常とテロメア長・テロメラーゼ活性レベル、予後との関係を検討した。

B. 研究方式

1. 定常時末梢血単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性と臨床背景の検討

対象は、放射線影響研究所放射線生物学部および臨床研究部の協力のもと、広島原爆被爆者および広島大学医学部附属病院受診患者、ボランティアで、疾患背景が参照可能であり同意が得られた287例とした。

1) 末梢血単核球テロメラーゼ活性の測定

ヘパリン採血された末梢血から単核球を分離し、 10^6 個の単核球をCHAPSを含むlysis buffer 100 μ lで溶解し蛋白を抽出した²⁾。残った核ペレットは、DNA抽出用に保存した。TRAP-ezeキット (ONCOR) を用いて、 α -³²P-dCTP内部標識によるPCRでTRAPアッセイを行い、12.5% PAGEで泳動した。ゲルはイメージングプレートに露光し、BAS2000を用いて、各サンプル毎にテロメラーゼに特異的な6塩基ラダーおよび内部標準バンド (36 bp) のシグナル強度を計測した。ラダーシグナル/内部標準シグナルの比を標準テンプレート (TSR8) のそれと比較し、各サンプルの相対的テロメラーゼ活性レベルとした⁴⁾。

2) 末梢血単核球テロメア長の測定

テロメラーゼを抽出した残りの 10^6 個末梢血単核球核ペレットからDNA抽出キット (WAKO) を用いてDNAを抽出し、制限酵素 *Hinf* I で消化後、0.8%アガロースゲルで泳動。0.25N HClで15分間処理し、DNAを断片化した後、アルカリ処理を行った。サザンプロット法によりアガロースゲル中のDNAを6 x SSC (1x = 0.15 M NaCl - 0.015 M citrate) でニトロセルロースフィルターにトランスファーさせ、80°Cのオーブンで乾燥させた。T4 キナーゼにより [γ -³²P] ATPラベルした (TTAGGG)₄ オリゴDNAをプローブとして、ニトロセルロースフィルターを50°Cで16時間ハイブリダイスした後、4xSSC、0.1% SDS液で55°C 15分間ずつ4回洗浄し、イメージングプレートに2-3時間露光させた。それぞれのレーンにおけるスメアのピークをBAS2000によって決定し、ピーク的位置をその組織における平均のテロメア長として、その長さを計算した⁵⁾。

3) 臨床背景とテロメラーゼ活性・テロメア長の関係についての統計解析は、正規分布もしくはそれに近い因子についてはANOVA・対応なし

のT検定を用い、それ以外の因子についてはKruskal-Wallisの順位検定で検討した。

2、肺癌における予後・生物学的特性とテロメア長・テロメラーゼ活性の検討

1) 組織のテロメラーゼ活性の測定

外科的に切除された97例の肺癌組織および非癌部組織について、前述の如くテロメア長、テロメラーゼ活性を測定した。組織のテロメラーゼ抽出には、新鮮材料または-80°C以下で保存された50-100 μ gの組織を1.5 mlマイクロチューブに入れ、200 μ l 冷却Lysisバッファーを加え、適合するペレットミキサーを木工用ドリルで約500 rpm回転させホモジナイズした。蛋白量はBCA アッセイにより562 nmの可視光線波長で吸光度を測定して定量し、1反応あたり6 μ gの蛋白質を含む抽出液を用いた場合を標準法としてラダーが検出される例をテロメラーゼ活性の陽性とし、100倍希釈の0.06 μ gの蛋白質を含む抽出液を用いても陽性の場合を高活性、希釈によりラダーが検出されなくなる例を低活性と判定した。

2) 肺癌組織のDNA解析

組織のDNA抽出は、ポッターホモジナイザーを用いて細胞を分離し、Proteinase KおよびSDSを加えた後、フェノール・クロロホルムで精製し、エタノール沈殿を行った。テロメア長測定は、末梢血単核球と同様に行った。

癌抑制遺伝子p53の塩基置換はPCR-DGGE法で、p53, Rb, FHIT, 3p14, 1p34の欠損をPCR-RFLP法およびマイクロサテライトマーカを用いて検索した。癌遺伝子c-myc, L-myc, N-mycの増幅をサザンプロット法で、K-ras コドン12, 13の変異をPCR-RFLP法で検索した。

3) 統計解析

これらの結果を、テロメラーゼ活性の有無お

よびテロメラーゼ高活性とそれ以外の群に分けて χ^2 検定により検定し、 $P < 0.05$ を有意とした。また、術後の生存期間との関連をカプラン-マイヤー法で検討した。

C. 研究結果

1. 定常時末梢血単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性と臨床背景の検討

単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性レベルと背景因子の検討では、本年度死亡例も加えた予後の検討においても、統計学的に有意な関連性は認められなかった。

2. 肺癌における予後・生物学的特性とテロメア長・テロメラーゼ活性の検討

肺癌組織におけるテロメラーゼ高活性と背景諸因子との間に統計学的に有意な関連が認められた因子は、小細胞癌（対非小細胞癌）、Rb遺伝子領域アリル欠失、Aneuploidy、%S期細胞高値、6ヶ月未満の早期死亡（非小細胞癌）、テロメア長変化例（短縮/延長）、予後不良（非小細胞癌）、であった。傾向を示す因子は、L-myc遺伝子領域アリル欠失、p53遺伝子領域アリル欠失、異常FHITmRNA発現量、複数遺伝子変異（> 5 hits）であった。一方、関連が認められなかった因子は、年齢、腫瘍径、病理病期、分化度、FHIT遺伝子領域アリル欠失、c-myc増幅、p53変異、1p34-pter LOH、L-myc Sアリル、K-ras変異、であった。

カプラン-マイヤー法により予後と有意に相関した因子は、上記のうち、テロメラーゼ高活性とRB LOHであった。

D. 考察

染色体末端のテロメア反復配列の長さの短縮は、細胞老化ひいては個体老化をもたらすが、

昨年度の研究で、リンパ球においては、その刺激時のテロメラーゼ活性増強能の差がテロメア短縮修復能の差をもたらし、メモリーT細胞・活性化リンパ球の分裂寿命・増殖能を規定している可能性を示した。本年度の研究結果も、その仮説を支持するもので、正常体細胞であっても、癌細胞であっても、細胞周期にある細胞では、増殖とともにテロメラーゼ活性が強く増強される細胞においてその増殖能が強く保たれることが示唆された。すなわち、癌細胞においても、遺伝子変異の蓄積・細胞周期の促進にともなう細胞分裂回数の増加によりテロメア短縮ひいてはテロメラーゼ活性化に至ると考えられ、正常細胞同様、細胞老化を免れ分裂寿命を延長するには、テロメラーゼ活性化によるテロメア反復配列の修復が不可欠であることが示唆された。

E. 結論

細胞周期にある細胞の増殖に伴い増強されたテロメラーゼ活性レベルが、正常体細胞であれ、癌細胞であれ、その細胞の増殖能・細胞老化を規定することが予想された。

F. 参考文献

- 1) Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., et al.: Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468, 1999.
- 2) Hiyama K., Hirai Y., Kyoizumi S., et al.: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells, *J Immunol* 155: 3711-3715, 1995.
- 3) Hiyama K., Hiyama E., Yamakido

M., et al.: Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers, *J Natl Cancer Inst* 87: 895-902, 1995.

- 4) Hiyama K., Ishioka S., Shay J.W., et al.: Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune-associated lung diseases. *Int J Mol Med* 1: 545-549, 1998.
- 5) Shirotani Y., Hiyama K., Ishioka S. et al.: Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer, *Lung Cancer* 11: 29-41, 1994.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamagawa K., Taooka Y., Maeda A., Hiyama K., Ishioka S., Yamakido M. Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, in press.
- 2) Maeda H., Konishi F., Hiyama K., Ishioka S., Yamakido M. A family with cases of adult onset still's disease and psoriatic arthritis. *Intern Med* 39:77-9, 2000.
- 3) Murakami I., Hiyama K., Ishioka S., Yamakido M., Kasagi F., Yokosaki Y. p53 Gene mutations are associated with shortened survival in patients with advanced non-small cell lung cancer: an analysis of medically managed patients. *Clin Cancer Res* 6:526-

30, 2000.

- 4) Yoshikawa M., Hiyama K., Ishioka S., Maeda H., Maeda A., Yamakido M. Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in Japanese. *Int J Mol Med* 5:49-53, 2000.
- 5) Haruta Y., Hiyama K., Ishioka S., Hozawa S., Maeda H., Yamakido M. Activation of telomerase is induced by a natural antigen in allergen-specific memory T lymphocytes in bronchial asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 259:617-23, 1999.
- 6) Ishioka S., Hiyama K., Sato H., Yamanishi Y., McLeod H.L., Kumagai K., Maeda H., Yamakido M. Thiopurine methyltransferase genotype and the toxicity of azathioprine in Japanese. *Intern Med* 38:944-7, 1999.
- 7) Ishioka S., Maeda A., Hiyama K., Jougasaki Y., Yamakido M. Two asymptomatic cases with sarcoidosis demonstrated sequential evolution from radiographic stage I to III within five years. *Hiroshima J Med Sci* 48:101-3, 1999.
- 8) Ishioka S., Nishisaka T., Maeda A., Hiyama K., Yamakido M. A case of group II non-specific interstitial pneumonia developed during corticosteroid therapy after acute respiratory distress syndrome.

- Respirology 4:283-5, 1999.
- 9) Ishioka S., Wiwien H.W., Hiyama K., Maeda A., Yamakido M. New monoclonal antibodies against the epithelioid cells in sarcoid granulomas. *Exp Lung Res* 25:663-70, 1999.
- 10) Ishioka S., Yamanishi Y., Hiyama K., Maeda A., Maeda H., Yamakido M. Sarcoidosis associated with connective tissue diseases: report of 3 cases. *Intern Med* 38:984-7, 1999.
- 11) Konishi F., Maeda H., Yamanishi Y., Hiyama K., Ishioka S., Yamakido M. Transcriptionally targeted in vivo gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing adenocarcinoma. *Hiroshima J Med Sci* 48:79-89, 1999.
- 12) Maeda A., Ishioka S., Taooka Y., Hiyama K., Yamakido M. Expression of transforming growth factor-beta1 and tumour necrosis factor-alpha in bronchoalveolar lavage cells in murine pulmonary fibrosis after intraperitoneal administration of bleomycin. *Respirology* 4:359-63, 1999.
- 13) Oshima M., Maeda A., Ishioka S., Hiyama K., Yamakido M. Expression of C-C chemokines in bronchoalveolar lavage cells from patients with granulomatous lung diseases. *Lung* 177:229-40, 1999.
- 14) Sato H., Hiyama K., Ishioka S., Maeda H., Yamakido M. Alternative splicing, but not allelic loss, of the FHIT gene increases with development of lung cancer. *Int J Oncol* 15:81-8, 1999.
- 15) Yamanishi Y., Hiyama K., Ishioka S., Maeda H., Yamanaka T., Kurose Y., Yamakido M. Telomerase activity in the synovial tissues of chronic inflammatory and non-inflammatory rheumatic diseases. *Int J Mol Med* 4:513-7, 1999.
- 16) Yamanishi Y., Maeda H., Konishi F., Hiyama K., Yamana S., Ishioka S., Yamakido M. Dermatomyositis associated with rapidly progressive fatal interstitial pneumonitis and pneumomediastinum. *Scand J Rheumatol* 28:58-61, 1999.
- 17) 山木戸道郎編. がんとテロメア・テロメラーゼ. 日本医学館, 東京, 1999.
- 18) 檜山桂子, 檜山英三, 石岡伸一, 山木戸道郎. 肺癌における染色体テロメアとテロメラーゼ. *臨床医* 25:1550-1553, 1999.
- 19) 檜山桂子, 檜山英三, 石岡伸一, 山木戸道郎. テロメラーゼの測定. *Lab. Clin. Pract.* 16:148-155, 1999.
2. 学会発表
- 1) Yoshikawa M, Hiyama K, Maeda H, Ishioka S, Yamakido M, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M.

- Association between polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene and respiratory diseases in Japanese. 1999 International Conference of American Thoracic Society (ATS), San Diego, California, USA, 1999.
- 2) Tamagawa K, Taooka Y, Maeda A, Maeda H, Hiyama K., Ishioka S., Yamakido M. Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 1999 International Conference of American Thoracic Society (ATS), San Diego, California, USA, 1999.
- 3) 檜山桂子, 石岡伸一, 前田晃宏, 磯部威, 村上功, 山木戸道郎. シンポジウム「呼吸器疾患に対する気管支鏡の役割」腫瘍性および非腫瘍性呼吸器疾患における気管支鏡検体の分子生物学的解析, 第22回日本気管支学会総会, 1999年5月, 福岡.
- 4) 石岡伸一, 好川基大, 檜山桂子, 山木戸道郎. シンポジウム「COPDにおける遺伝的感受性—mEPHX遺伝子多型の関与の可能性—」, 第1回東京COPDシンポジウム, 1999年7月, 東京.
- 5) 檜山桂子, 石岡伸一, 山木戸道郎. ワークショップ「肺癌における分子生物学の進展とその臨床応用」肺癌のテロメラーゼ診断, 第58回日本癌学会, 1999年9月, 広島.

分担課題：老化と活性酸素；DNA 損傷の蓄積およびその修復活性の変動

葛西 宏（産業医科大学・産業生態科学研究所・職業性腫瘍学教授）

老化のプロセスと関連していると思われる、活性酸素による DNA 損傷の蓄積を抑制するメカニズムを解明するために、活性酸素によって生ずる酸化的損傷ヌクレオチドの酵素的分解に着目して研究を進めた。その結果、ヒト MTH1 蛋白質は dGTP から生ずる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸に加えて、dATP から生成する 2-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸と 8-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸を加水分解することが明らかになった。

キーワード：活性酸素、DNA 損傷、ヌクレオチドプール、変異誘発、MTH1 蛋白質

A. 研究目的

活性酸素（酸素ラジカル）による DNA 損傷の蓄積は、老化のプロセスと深く関連していると思われる。DNA に損傷が蓄積する過程には、DNA 中の塩基部や糖部が直接的に攻撃を受けるルートと、DNA 前駆体の集合体であるヌクレオチドプール中に生じた、酸化的損傷ヌクレオチドが DNA ポリメラーゼによって DNA 中に取り込まれるルートがあると考えられている。我々は、一昨年度、昨年度の研究で、ヌクレオチドプール中に生成すると思われる酸化的損傷ヌクレオチド（2-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸、8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸、

5-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸、5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸）が DNA 鎖に取り込まれることにより、DNA 損傷が蓄積し、変異を誘発することを明らかにした^{1,2)}。今年度は、酸化的損傷ヌクレオチドの生成に起因する DNA 損傷の蓄積を防御するシステムである、損傷ヌクレオチド分解酵素による分解についての研究を行った。

B. 研究方法

1. 酸化的損傷デオキシヌクレオシド三リン酸である、2-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸（2-OH-dATP）、8-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン

酸 (8-OH-dATP)、8,5'-シクロデオキシアデノシン 5'-三リン酸 (cyclo-dATP)、8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸 (8-OH-dGTP)、5-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸 (5-OH-dCTP) 及び 5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸 (5-CHO-dUTP) を調製し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて高純度に精製した。

2. 8-OH-dGTP を分解する酵素として知られている、ヒト MTH1 蛋白質及び大腸菌 MutT 蛋白質を精製した。

3. 酸化損傷ヌクレオチドとヒト MTH1 蛋白質または大腸菌 MutT 蛋白質をインキュベートし、反応液をイオン交換 HPLC で分析し、分解されるか否かを観察した。さらに、分解の酵素学的パラメーターを算出した。

C. 研究結果

1. 6 種類の酸化損傷デオキシヌクレオチド、2-OH-dATP、8-OH-dATP、cyclo-dATP、8-OH-dGTP、5-OH-dCTP 及び 5-CHO-dUTP とヒト MTH1 蛋白質をインキュベートし、反応液をイオン交換 HPLC で分析したところ、2-OH-dATP、8-OH-dATP、8-OH-dGTP の一リン酸体への加水分解が観察された。一方、cyclo-

dATP、5-OH-dCTP、5-CHO-dUTP の分解は検出されなかった。また、大腸菌 MutT 蛋白質を用いて同様の実験を行ったところ、8-OH-dGTP 以外の酸化損傷ヌクレオチドの分解は観察されなかった。

2. 2-OH-dATP、8-OH-dATP、8-OH-dGTP の MTH1 蛋白質による分解反応の酵素学的パラメーターを算出したところ、8-OH-dATP の分解反応は親和性、最大反応速度ともに 8-OH-dGTP の場合と同程度であり、8-OH-dATP は 8-OH-dGTP と同程度に分解されることが明らかになった。一方、2-OH-dATP の分解反応を調べたところ、最大反応速度は 8-OH-dGTP の場合と同程度であるが、親和性が約 2 倍であるために、2-OH-dATP は 8-OH-dGTP よりも効率良く分解されることが判明した。

D. 考察

活性酸素によって生ずる酸化 DNA 損傷の蓄積が、老化のプロセスに関連していることが推測されている。一昨年度、昨年度の研究により、酸化損傷ヌクレオチドである、2-OH-dATP、8-OH-dGTP、5-OH-dCTP、5-CHO-dUTP が細胞内 DNA に取り込まれて DNA 損傷が蓄積し、変異を誘発することを我々は明らかにした^{1,2)}。

今年度の研究はこの結果に基づき、酸化的損傷デオキシヌクレオチドの分解に関して研究を行い、興味深い点が幾つか明らかになった。

第一点目は、ヒト MTH1 蛋白質が、2-OH-dATP、8-OH-dATP、8-OH-dGTP の 3 種類の酸化的損傷ヌクレオチドを加水分解することが明らかになったことである。MTH1 蛋白質は、8-OH-dGTP 分解酵素として知られており³⁾、大腸菌のミューテーター遺伝子産物である MutT 蛋白質⁴⁾の機能的ホモログであることから、変異の抑制に重要であると推測されていた。今年度の研究により、MTH1 蛋白質が(少なくとも)3種類の酸化的損傷ヌクレオチドを分解することが明らかになったので、MTH1 蛋白質の変異や老化の抑制に関する役割は、今まで想像されていた以上に重要である可能性が明らかになった。

第二点目は、ヒト MTH1 蛋白質は 2-OH-dATP を最も効率良く分解した点である。我々はこれまでに、2-OH-dATP が dATP から細胞内の酸化反応により生成する可能性について、試験管内の酸化反応を用いて示した^{5,6)}。他の研究グループにより、DNA 中に 2-ヒドロキシアデニンが存在することが示されている^{7,8)}が、ヌクレオチドプールに 2-OH-dATP が存在する証拠は

現在まで報告されていなかった。2-OH-dATP が MTH1 蛋白質により最も効率良く分解されたという今年度の結果は、2-OH-dATP がヒトの細胞中に生ずる可能性を強く示唆するものである。

E. 結論

活性酸素による DNA 損傷の蓄積が、老化の一つの原因であるという観点に立ち、今年度は、酸化的損傷ヌクレオチドの生成による DNA 損傷の蓄積を抑制する蛋白質について研究を進めた。その結果、ヒトの MTH1 蛋白質は、これまで知られていた 8-OH-dGTP 分解酵素としてだけでなく、2種類の酸化された dATP である 2-OH-dATP と 8-OH-dATP の分解酵素として作用することが明らかになった。したがって、酸化的損傷ヌクレオチドの生成と MTH1 蛋白質の活性に変動が老化過程に重要な役割を担っている可能性が明らかになった。

F. 引用文献

- 1) Inoue, M., Kamiya, H., Fujikawa, K., Ootsuyama, Y., Murata-Kamiya, N., Osaki, T., Yasumoto, K., and Kasai, H. (1998). Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli*

- by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. *J. Biol. Chem.*, *273*, 11069-11074.
- 2) Fujikawa, K., Kamiya, H., and Kasai, H. (1998). The mutations induced by oxidatively damaged nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, *26*, 4582-4587.
 - 3) Sakumi, K., Furuichi, M., Tsuzuki, T., Kakuma, T., Kawabata, S., Maki, H., and Sekiguchi, M. (1993). *J. Biol. Chem.*, *268*, 23524-23530.
 - 4) Maki, H. and Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, *355*, 273-275.
 - 5) Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Muraoka, M., Kaji, H. and Kasai, H. (1997). Comparison of oxidation products from DNA components by g-irradiation and Fenton-type reactions. *J. Radiat. Res.*, *38*, 121-131.
 - 6) Kamiya, H. and Kasai, H. (1995). Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, *270*, 19446-19450.
 - 7) Jaruga, P. and Dizdaroglu, M. (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.*, *24*, 1389-1394.
 - 8) Abalea, V., Cillard, J., Dubos, M.P., Anger, J.P., Cillard, P., and Morel, I. (1998). Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis*, *19*, 1053-1059.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Nomoto, M., Yamaguchi, R., Kawamura, M., Kohno, K. and Kasai, H. Analysis of 8-hydroxyguanine in rat kidney genomic DNA after administration of renal carcinogen, ferricnitriloacetate. *Carcinogenesis*, *20*, 837-841 (1999)
 - 2) Yamaguchi, R., Hirano, T., Ootsuyama, Y., Asami, S., Tsurudome, Y., Fukada, S., Yamato, H., Tsuda, T., Tanaka, I. and Kasai, H. Increased 8-hydroxyguanine in DNA and its repair activity in hamster and rat lung after intratracheal instillation of crocidolite asbestos. *Jpn. J. Cancer Res.*, *90*, 505-509 (1999)

- 3) Murata-Kamiya, N., Kaji, H., Kasai, H. Deficient nucleotide excision repair increases base-pair substitutions but decreases TGGC frameshifts induced by methylglyoxal in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, 442, 19-28 (1999)
- 4) Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y. and Kasai, H. The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.*, 274, 18201-18205 (1999)
- 5) Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamato, H., Tanaka, I., Sagai, M., Hirano, H., Nagata, N., Itoh, H. and Kasai, H. Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and *OGG1* mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, 20, 1573-1576 (1999)
- 6) Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Karino, N., Ueno, Y., Kaji, H., Matsuda, A. and Kasai, H. Formation of 5-formyl-2'-deoxycytidine from 5-methyl 2'-deoxycytidine in duplex DNA by fenton-type reactions and γ -irradiation. *Nucleic acid Res.* 27, 4385-4390 (1999)
- 7) Kamiya, H. and Kasai, H. Preparation of 8-hydroxy-dGTP and 2-hydroxy-dATP by a phosphate transfer reaction by nucleoside-diphosphate kinase. *Nucleosides & Nucleotides*, 18, 307-310, (1999)
2. 学会発表
- 8) 鶴留洋輔, 葛西 宏他, ディーゼル排気微粒子 (DEP) 気管内注入によるラット肺組織中 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) 値とその修復酵素活性の経時的変化に関する検討, 第 99 回日本外科学会総会, (1999)
- 9) 金興男, 葛西 宏他, クロシドライト曝露による肺胞上皮細胞 (A549) の 8-ヒドロキシグアニン生成及びその修復酵素活性, 第 72 回日本産業衛生学会, (1999)
- 10) 紙谷尚子, 葛西 宏他, γ 線照射及び Fenton 反応による 5-methyl-dC からの 5-formyl-dC の生成, 第 42 回日本放射線影響学会, (1999)
- 11) 紙谷尚子, 葛西 宏他, 5-methyl-dC の酸化による 5-formyl-dC の生成, 第 58 回日本癌学会総会, (1999)
- 12) 平野雄, 葛西 宏他, アゾ色素 3'-Me-DAB のマウス肝発癌メカニズムにおける 8-ヒドロキシグアニンの関与, 第 58 回日本癌学会総会,

- (1999)
- 1 3) 藤川勝義, 葛西 宏他, 2-hydroxy-dATP, 8-hydroxy-dATP のヒト MTH1 蛋白質による分解
 - 1 4) 葛西 宏他, ライフスタイルと尿中 8-OH-dG, 第 58 回日本癌学会総会, (1999)
 - 1 5) 紙谷浩之, 葛西 宏, 酸化的損傷ヌクレオチドによって誘発される変異の防御システム, 第 58 回日本癌学会総会, (1999)
 - 1 6) 野本実, 葛西 宏他, Nth 1・Tsc 2・Pkd 1 遺伝子群における 8-ヒドロキシグアニンのゲノム塩基配列レベルでの解析, 第 58 回日本癌学会総会, (1999)
 - 1 7) 鶴留洋輔, 葛西 宏他, 加齢によるヒト大腸粘膜組織における 8-ヒドロキシグアニン(8-OH-Gua)の上昇, 第 58 回日本癌学会総会, (1999)
 - 1 8) 井上政昭, 葛西 宏他, 酸化的 DNA 損傷と肺癌－間質性肺炎と肺線維症における肺癌発生のメカニズムの解析－, 第 17 回産業医科大学学会総会, (1999)
 - 1 9) 紙谷尚子, 葛西 宏他, 哺乳動物細胞におけるメチルグリオキサー
 - ルの変異誘発能, 第 22 回日本分子生物学会年会, (1999)
 - 2 0) 紙谷浩之, 葛西 宏他, 大腸菌 DNA ポリメラーゼによる 2-hydroxy-dATP の取り込みの解析, 第 22 回日本分子生物学会年会, (1999)
 - 2 1) 藤川勝義, 葛西 宏他, ヒト MTH1 による 2-OH-dATP の分解, 第 22 回日本分子生物学会年会, (1999)
 - 2 2) 葛西 宏他, 活性酸素による DNA 損傷, 変異誘発およびその防御, 第 22 回日本分子生物学会年会, (1999)
 - 2 3) 平野雄, 葛西 宏他, 肝発癌物質 3'-Me-DAB 投与マウス肝臓 DNA 中に生じる酸化的 DNA 損傷 8-ヒドロキシグアニンとその修復酵素活性の測定, 日本環境変異原学会第 28 回大会, (1999)

老化と酸化ヌクレオチドの浄化機構に関する研究

分担研究者 中別府雄作 九州大学生体防御医学研究所

研究要旨

リコンビナントMTH1蛋白質の生化学的解析から、MTH1蛋白質が8-oxo-dGTP以外のdATPの酸化体(2-OH-dATP, 8-oxo-dATP)も効率良く分解する活性を持つことを明らかにし、この酵素が酸化型プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素活性を持つと結論した。MTH1 mRNAのスプライシングと翻訳開始の変化をもたらすエクソン2の遺伝的多型(GTとGC)の解析から、GT多型をもつMTH1遺伝子は3つのMTH1蛋白質(MTH1b, MTH1c, MTH1d)を合成し、GC多型をもつMTH1遺伝子は4つのMTH1蛋白質(MTH1a, MTH1b, MTH1c, MTH1d)を合成すること、そしてMTH1aがミトコンドリア移行シグナルを持つことを証明した。さらに、①MTH1遺伝子欠損マウスにおいて老化に伴う自然発がん頻度が上昇していること、②ヒトのパーキンソン病の中脳黒質で8-oxoGが蓄積し、MTH1の発現が亢進していることから、MTH1は老化に伴う酸化ヌクレオチドによる細胞障害を抑制的に制御している事が強く示唆される。

A. 研究目的

ヒトMTH1蛋白質は、ヌクレオチドプール中のdGTPが活性酸素により酸化されて生じる8-oxo-dGTPを8-oxo-dGMPに分解することでDNA複製の際に誤って取り込まれるのを防ぎ、A:T⇄C:Gトランスマージョン型の突然変異を抑制する役割を持つと考えられる。このようなヌクレオチドの酸化によるゲノム障害は老化とともに蓄積することから、老化の原因の1つとして考えられている。

我々は、哺乳動物やヒトの老化における活性酸素によるゲノム障害の実体を明らかにするべく、酸化ヌクレオチドプールの浄化に関わるヒトMTH1遺伝子の発現制御とその産物の機能解析を進めている(1-4)。すでに、MTH1遺伝子が転写、スプライシング、翻訳の各ステップで複雑な制御を受けることを明らかにしている。さらに、ヒト集団にスプライシングと翻訳開始の変化をもたらす遺伝的多型(GT/GC)とアミノ酸の変化をもたらす遺伝的多型(Val83/Met83)を見出した。その分布の解析から、この2つの遺伝的多型間に連鎖不平衡が存在することを明らかにした(4)。Met83MTH1蛋白質は、その構造、活性ともに熱に不安定であった(3)。また、MTH1遺伝子欠損マウスにおいて老化に伴う胃、肝臓、肺における自然発がんの発症頻度の上昇を観察しており、MTH1の機能欠損が発がんリスクとなる可能性が示唆される。

本年度は、①ヒトMTH1蛋白質が、8-oxo-dGTP以外の酸化型ヌクレオチドを分解できるかどうかを検討し、さらに②MTH1遺伝子多型のMTH1蛋白質の細胞内局在に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究を進めた。③また、老化に伴い発症が増加する脳・神経変性疾患における核酸の酸化による障害の関与を明らかにするために剖検脳でのMTH1の発現、8-

oxoGの蓄積の検索を計画した。④一昨年以來、観察を行っているMTH1遺伝子欠損マウスの自然飼育下での老化に伴う病的変化の解析の完了を目指した。

B. 研究方法

①MTH1蛋白質の基質特異性の解析：大腸菌でMTH1d(Val83)と大腸菌MutT蛋白質を過剰発現させ、これをカラムクロマトグラフィにより、純化精製した。精製蛋白質を用い、種々の酸化ヌクレオチドの分解をHPLC法により解析した。なお、この研究は産業医科大学の葛西教授のグループとの共同研究で行った。今回、調べた酸化ヌクレオチドは以下のものである。8-oxo-dGTP, 8-oxo-dATP, 2-OH-dATP, 5-OH-dCTP, 5-formyl-dUTP。

②MTH1遺伝子多型のMTH1蛋白質の細胞内局在に及ぼす影響の解析：MTH1遺伝子にコードされる4つのMTH1蛋白質(MTH1a, MTH1b, MTH1c, MTH1d)のアミノ末端のアミノ酸配列をコードするcDNAとGFP遺伝子を融合させて、GFP蛋白質のアミノ末端にそれぞれのアミノ末端が付加された融合蛋白質の発現系を構築した。陽性コントロールとして、チトクローム酸化酵素のサブユニットVIIIのミトコンドリア移行シグナルをGFPのアミノ末端に付加したものを作製して用いた。それぞれのGFP蛋白質をHeLa細胞で発現させ、生細胞内のGFP蛋白質の局在を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で解析した。

③脳・神経変性疾患における核酸の酸化による障害の関与の検討：パーキンソン病、癌、その他の疾患で死亡した患者の剖検脳の組織切片を用いて、8-oxoGの蓄積とMTH1蛋白質の発現を免疫組織化学的手法で解析した。

④MTH1遺伝子欠損マウスの自然老化における病的

変化：遺伝子標的組換えにより作製したMTH1遺伝子欠損マウス (MTH1^{-/-}: ♂42, ♀51) と野生型マウス (MTH1^{+/+}: ♂46, ♀44) をSPF自然飼育条件下で1年半飼育したのちに、病理解剖により全身の病変を観察した。

倫理面への配慮：全ての剖検サンプルは、病因解明の目的で解析する事を説明の上、家族の承諾を得て採取した。全ての動物実験は九州大学医学部動物実験委員会の承認を受けて行った。

C. 研究成果

(1) MTH1蛋白質は、酸化型プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素活性を持つ。

MTH1の大腸菌ホモログであるMutTタンパクは8-OH-dGTPのみを特異的に分解したが、MTH1タンパクは、2OH-dATP>8-OH-dGTP=8-OH-dATPの順の効率で3種のヌクレオチドを分解した。酸化型ピリミジンヌクレオシド三リン酸には、全く作用しなかった。また、MutTとMTH1ともに8-oxo-GTPを分解したが、MTH1の場合8-oxo-GTPの分解速度は8-oxo-dGTPの50分の1であった。

以上の結果より我々は、MTH1蛋白質は酸化型プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素活性 (Oxidized Purine Nucleoside Triphosphatase) を持つと結論した。

(2) MTH1遺伝子エクソン2のGC多型は、ミトコンドリア移行シグナルをMTH1蛋白質に付加する。

MTH1遺伝子エクソン2の多型は択一的スプライシングを変化させ、さらに上流の開始コドンから4番目のMTH1蛋白質 (MTH1a) の翻訳を可能にする。この上流の翻訳領域にコードされるリーダー・ペプチドは、MitoProt II プログラムによる解析からミトコンドリア移行シグナルとして機能する可能性が示唆された。今回、MTH1aを含む4つのhMTH1蛋白質の細胞内局在をGFP融合蛋白質発現系を用いて解析したところ、MTH1aのアミノ末端の18アミノ酸からなる配列が、HeLa細胞内でミトコンドリア移行シグナルとして機能することが明らかになった。その他の3つ (MTH1b, MTH1c, MTH1d) についてはほとんど細胞内に全体に存在し、特異的な局在は見られなかった。なお、通常は、MTH1dが10%程度ミトコンドリアに局在する(2)。

(3) パーキンソン病患者の中脳黒質では8-oxoGが蓄積し、MTH1の発現が亢進している。

パーキンソン病患者の中脳黒質では、コントロール群に比してニューロメラニン陽性細胞 (ドーパミン神経細胞) 数が激減しているが、まだ生存しているドーパミン神経細胞に抗8-oxoG抗体で強い免疫染色シグナルが観察される。このシグナルは細胞質に強く認められ、核では顕著ではない。パーキンソン病と同じよ

うに黒質線条体神経細胞の脱落を伴うMultiple system atrophy (MSA: オリーブ・橋・小脳萎縮症とも呼ばれる) の患者においては、明らかにニューロメラニン陽性のドーパミン神経細胞が黒質で減少しているにも関わらず、8-oxoGの蓄積を示すシグナルはコントロール群と同じレベルであった。パーキンソン病患者の中脳黒質の場合、神経細胞以外のグリア細胞等においても免疫染色シグナルの増強が見られ、黒質全般に8-oxoGのレベルが上昇していることを示している。さらに、パーキンソン病患者やMSA患者の中脳黒質の切片をMTH1抗体を用いて免疫染色を行い、このような神経変性に伴うMTH1蛋白質の発現の変化を検討した。その結果は、上で述べた8-oxoGの蓄積と平行して見られる著しいMTH1の発現亢進であった。すなわち、MSAやコントロール患者群では、ほとんどMTH1の発現は見られず、パーキンソン病患者のサンプルでのみ顕著なMTH1の発現が生存しているドーパミン神経細胞の細胞質と周囲のグリア組織に認められた。ウェスタンブロッティングによる細胞分画の解析から、18-kDaのMTH1dポリペプチドが細胞質とミトコンドリアの両方で顕著に増加している事が明らかになった。

(4) MTH1遺伝子欠損マウスでは老化における腫瘍の自然発生頻度が上昇する。

通常のSPF飼育条件下で1年半を経過した時点のマウス個体 (MTH1^{-/-}: ♂42, ♀51とMTH1^{+/+}: ♂46, ♀44) について剖検を行い腫瘍を中心に解析を行ったところ、野生型、MTH1遺伝子欠損マウスともにも肺、肝臓、胃に腫瘍 (アデノーマ、カルシノーマ) や過形成などの増殖性病変を認めた。野生型の雄ではこれら3つの臓器の病変が28.3%の個体で観察されたが、MTH1遺伝子欠損マウスでは57.1%に上昇していた。一方、野生型の雌では4.5%の個体に何らかの増殖性病変を認め、MTH1遺伝子欠損マウスでは25.5%の個体に同様の病変を認めた。特にMTH1遺伝子欠損マウスの雌の場合、上記3つ以外の臓器 (子宮や皮膚) にも病変を認めた。この結果は、雌雄ともに有為にMTH1遺伝子欠損マウスで増殖性病変の自然発生が増加していることを示す。

D. 考察

本年度の研究から、8-oxo-dGTPaseとして解析を進めていたMTH1蛋白質は、dATPの酸化体の1つである2-OH-dATPを最も効率良く分解することが明らかになった。この事実は、2-OH-dATPが生物にとって非常に有害であることを意味する。大腸菌のMutT蛋白質は2-OH-dATPを全く分解しないこと、さらに酵母等にはMutT/MTH1ホモログが存在しないことから、このようなMTH1の酵素活性は哺乳動物に限定された機能である可能性が高い。2-OH-dATPは大腸菌