



戦略的創造研究推進事業  
研究領域「脳を守る」

研究課題

「活性酸素による脳・神経細胞の障害とその  
防御機構」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

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

## 1. 研究実施の概要

### 基本構想

個体発生において神経前駆細胞は胎生期から出生直後にかけて分裂増殖するが、神経細胞に分化し神経回路網を構築すると分裂能を失う。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。そのため成人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。神経伝達物質の放出など神経細胞の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。

我々は、これまで「DNAの酸化障害とその防御機構」について研究を進め、大腸菌から哺乳動物まで生物は酸化されたDNAを修復する機構とその前駆体ヌクレオチドの酸化体を分解、排除する機構を備え、活性酸素による酸化障害の危機に対抗していることを明らかにしてきた。神経細胞の核ゲノムDNAはもはや複製されないが、その生存と機能保持には核ゲノム情報の維持と正確な転写が必須であり、さらに神経細胞の機能保持にはエネルギー供給の観点からミトコンドリアゲノムDNAの維持も重要と考えられる。我々は、「DNAの酸化障害」が神経細胞の寿命を決定する主な要因の1つであると考えているが、アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳では酸化塩基「8-オキシグアニン」の蓄積が明らかにされており、「DNAの酸化障害に対する防御機構」の異常がこのような神経変性疾患の危険因子となっている可能性が高い。

本研究では上記の作業仮説に基づき、(1) 脳の老化や神経変性の原因と考えられる酸化障害としてゲノムDNAとヌクレオチドの酸化障害に注目し、その防御機構の解明を分子レベルから個体レベルまで展開し、さらに防御系の欠損がもたらす病態を細胞レベルから個体レベルまで解析した。

組織を構築する細胞が修復不能な障害を受けると新たな細胞増殖によって機能細胞が補給され、組織の構造と機能が維持される。げっ歯類や霊長類の成獣、さらに最近では成人の大海馬の歯状回においてもDNA複製を伴った神経細胞の供給が観察されている。我々は、酸化ストレス下での遺伝子発現制御に関わる転写因子AP-1の構成サブユニットの1つである $\Delta$ FosBが細胞のDNA複製を活性化する機能を持ち、げっ歯類の海馬歯状回で発現することを見い出している。この発見に基づき、(2) 活性酸素による遺伝子発現制御に関わるシグナル伝達系としてJNK-JSAP1に、転写因子としてAP-1の $\Delta$ FosBに注目してその生理機能を追及した。

## 研究の実施と成果の概要

### 1. 核酸の酸化損傷とその防御機構に関する研究

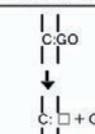
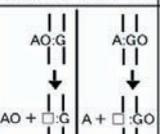
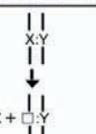
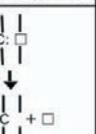
#### (1) 核およびミトコンドリアゲノムDNA中の酸化損傷の修復機構の解明

DNAの酸化損傷としてグアニンの酸化体(8-オキシグアニン[8-oxoG])とアデニンの酸化体(2-ヒドロキシアデニン[2-OH-A])に注目し、核ゲノムDNAおよびミトコンドリアゲノムDNAに蓄積したそれぞれの酸化塩基の修復に関わる酵素を同定しその作用機序を解明するとともに、それぞれの遺伝子をヒトおよびマウスやラットからクローニング

した。個々の遺伝子及び遺伝子産物の構造を決定するとともに遺伝子欠損マウスを樹立し、解析した。表1にその研究成果の概要をまとめて示す。

ミトコンドリア型OGG1は、ヒト脳での神経細胞で発現が最も高く、Menadione等による細胞死を効率良く抑制する。

表1. 哺乳動物細胞のゲノムDNA中の酸化塩基の修復酵素とその異常の関与が疑われる疾患

酵素	8-oxoG DNA グリコシラーゼ	2-OH-A/アデニン DNA グリコシラーゼ	新規 DNA グリコシラーゼ	新規AP エンドヌクレアーゼ
機能				
ヒト遺伝子	<i>OGG1</i>	<i>MUTYH</i>	<i>NEIL3</i>	<i>APEX2</i>
細胞内局在	核 ミトコンドリア	核 ミトコンドリア	核 (ミトコンドリア?)	核 ミトコンドリア
発現部位	脳 > 胸腺, 精巣, 腎臓, 脾臓, 卵巣	胸腺 > 脳, 精巣, 腎臓, 脾臓, 卵巣	胸腺, 脾臓	胸腺, 腎臓 > 肝臓, 脾, 脳
関連疾患	PD, AD, ALS, SAH 肺がん, 腎がん	PD, 脳低酸素症 大腸腺がん	未解析	未解析
欠損マウス	肺がん	小腸腺がん	解析中	成長遅延 免疫系の不全

GO: 8-オキシグアニン (8-oxoG), AO: 2-ヒドロキシアデニン (2-OH-A), □: 脱塩基部位, X, Y: 不明の塩基, PD: パーキンソン病, AD: アルツハイマー病, ALS: 筋萎縮性側索硬化症, SAH: くも膜下出血

#### (2) 異常ヌクレオチドの浄化機構の解明

DNAおよびRNAの前駆体ヌクレオチドの酸化体の中でプリンヌクレオチド三リン酸の酸化体と脱アミノ化体をヌクレオチド一リン酸へ分解することでヌクレオチドプールを浄化し、ゲノムDNAおよびRNAへの取込みや蓄積を抑制する酵素を同定し、その作用機序を解明した。それぞれの遺伝子をクローニングし、遺伝子及び遺伝子産物の構造を決定するとともに遺伝子欠損マウスを樹立し、解析した。表2にその研究成果の概要をまとめて示す。MTH1は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等の酸化ストレスによる細胞死を効率良く抑制する。

表2. 哺乳動物細胞において異常ヌクレオチドを排除する酵素とその異常の関与が疑われる疾患

酵素	酸化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素	脱アミノ化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素
機能	2-OH-dATP / 2-OH-ATP 8-oxo-dATP (8-oxo-ATP) 8-oxo-dGTP (8-oxo-GTP) 8-Cl-dGTP ↓ dNMP/NMP + PPi	dITP / ITP dXTP/XTP ↓ dNMP/NMP + PPi
遺伝子	<i>MTH1</i>	<i>ITPA</i>
細胞内局在	核, 細胞質 ミトコンドリア	細胞質 (核, ミトコンドリア?)
発現部位	胸腺, 精巣, 腎臓, 脾臓, 卵巣, 脳	精巣, 腎臓, 脳 胸腺, 肝臓, 小腸, 脾
関連疾患	PD, AD, ALS, 脳腫瘍, 胃がん, 腫瘍全般	統合失調症, 腫瘍全般
欠損マウス	肝細胞がん	解析中

PD: パーキンソン病, AD: アルツハイマー病, ALS: 筋萎縮性側索硬化症

## 2. 活性酸素による遺伝子発現制御に関わるシグナル伝達系と転写因子に関する研究

### (1) JNK-JSAP1シグナル伝達系による脳の初期発生の制御

我々は、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タンパク質として新規タンパク質JSAP1を発見し、JSAP1がJNK経路を介して個体の初期発生、特に脳の初期発生に必須である事を明らかにした。JSAP1は神経細胞では、主に軸索の成長円錐と思われる神経突起の先端、さらに神経突起がシナプスを形成している部位に局在するがJSAP1欠損神経細胞では神経突起の伸長が有意に抑制され、軸索輸送の低下を認めた。さらに、JNK経路の下流で機能するJNK及びc-Junの発現そのものがJSAP1に依存していることを明らかにした。

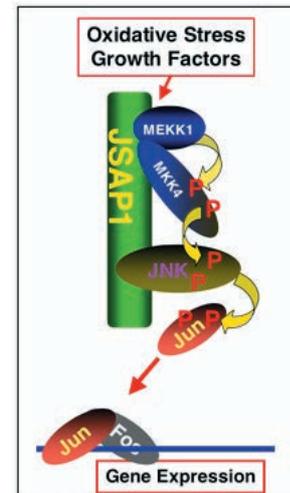


図1. JSAP1による遺伝子発現の制御

### (2) $\Delta$ FosBによる細胞運命の制御機構の解明

海馬の神経細胞はその領域によって虚血再灌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、虚血再灌流直後に歯状回や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 タンパク質と、Jun の転写活性化をドミナントに抑制する  $\Delta$ FosB タンパク質をコードすることから、培養細胞を用いて *fosB* 遺伝子産物の機能解析を進め、 $\Delta$ FosB タンパク質が細胞増殖・細胞分化・細胞死を制御する機能を持つことを明らかにした。さらに、この  $\Delta$ FosB の下流で発現が誘導されるタンパク質として、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 $\alpha$  とその新規アイソフォーム Galectin-1 $\beta$  を同定した。Galectin-1 $\beta$  は Galectin-1 $\alpha$  と同等に脊髄後根神経節の切断端からの軸索再生を促進するが、細胞死を誘導しない事から神経再生を促進する治療薬として有望である。虚血再灌流後のラット大脑海馬歯状回では、*fosB* 遺伝子と Galectin-1 の高発現に伴って神経前駆細胞の活性化が観察され、 $\Delta$ FosB-Galectin-1 は中枢神経系でも、神経再生に関わると期待される。

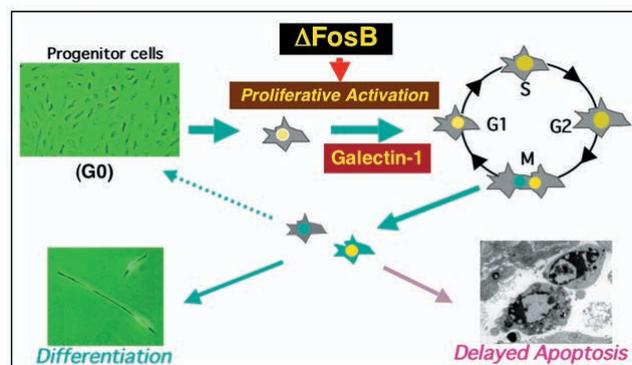


図2.  $\Delta$ FosB-Galectin-1による細胞運命の制御

## 2. 研究構想

### 当初に立案した研究計画の概要

個体発生において神経前駆細胞は胎生期から出生直後にかけて分裂増殖するが、神経細胞に分化し神経回路網を構築すると分裂能を失う。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しても他の神経細胞の増殖によって補われることはない。そのため、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。

神経伝達物質の放出など神経細胞の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。

我々は、これまで「DNAの酸化障害とその防御機構」について研究を進め、生物は酸化されたDNAを修復する機構とその前駆体ヌクレオチドの酸化体を分解、排除する機構を備え、活性酸素による酸化障害の危機に対抗していることを明らかにした。神経細胞の核DNAは複製されないが、その生存と機能保持には核ゲノム情報の維持が必須であり、さらに神経細胞の機能保持にはミトコンドリアDNAの維持も重要である。我々は、「DNAの酸化障害」が神経細胞の寿命を決定する主な要因の1つであると考えている。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳では酸化塩基「8-オキシグアニン」の蓄積が明らかにされており、「DNAの酸化障害に対する防御機構」の異常がこのような神経変性疾患の危険因子となっている可能性が高い。

本研究では上記の作業仮説に基づき、(1)「DNAの酸化障害に対する防御機構」の全貌を解明するとともに、脳の老化障害と神経変性疾患の発症がDNAの酸化障害に起因する可能性を実験的に検証するために、酸化塩基の修復や酸化ヌクレオチドの浄化機構を完全に欠損する動物モデルを作製し、脳の老化障害と神経細胞死の促進や神経変性疾患の発症を検証する事を計画した。

組織を構築する細胞が修復不能な障害を受けると新たな細胞増殖によって機能細胞が補給され、組織の構造と機能が維持される。げっ歯類や新世界ザルでは、成獣の大海馬の歯状回においてDNA複製を伴った神経細胞の供給が観察されている。我々は、転写因子 $\Delta$ FosBが細胞のDNA複製を活性化する機能を持ち、げっ歯類の海馬歯状回で発現することを見い出している。この発見に基づき、(2)障害を受けた脳での神経前駆細胞の複製と分化の活性化に注目し、 $\Delta$ FosBの生理機能を解明するために、*fosB*遺伝子欠損マウス、さらに $\Delta$ FosBあるいはFosBタンパク質のみを発現する遺伝子改変マウスを用い、それぞれの神経前駆細胞のDNA複製と

分化に及ぼす影響を個体レベルと培養細胞レベルで解析する事を計画した。

本研究で取り組む上記2つのプロジェクトは、新たな視点から(3)「脳の保護と機能回復」に関する研究の展開を推進するものと位置付け、(1)(2)の研究成果に基づき、活性酸素による障害から「脳を守る」方法の基礎理論を構築し、遺伝子改変マウスやその脳・神経細胞を用いてその実効性を検証することを目指した。

### 新展開から生まれた研究目標

(1) ヒトおよびマウスのDNAの酸化障害に対する防御遺伝子(*MTH1*, *OGG1*, *MUTYH*)の発現レベルの解析から、ヒト脳におけるこれら防御遺伝子の発現レベルがマウス脳における発現レベルの数十倍から百倍に達する事が明らかになった。当初、これらの遺伝子欠損マウスを用い、マウス個体レベルでDNAの酸化障害に対する防御機構の欠損がもたらす病態を脳の老化障害と神経細胞死の促進や神経変性疾患の発症に注目して解析する事を計画していたが、マウスでは2年の寿命の間には、脳における有意な病態は観察されなかった。このような経緯から、我々はそれぞれの遺伝子欠損マウスから細胞株を樹立し、この遺伝子欠損細胞にヒト防御遺伝子を導入してその遺伝子産物の機能解析を進めた。また、マウス個体レベルでヒト防御遺伝子の発現亢進の効果を解析する目的でトランスジェニックマウスの樹立を目指した。

(2) 研究発足後に新たな防御遺伝子として、*APEX2*, *NEIL3*, *ITPA*を同定し、クローニングしたので、これらの遺伝子についても生化学、細胞、個体レベルでの解析を進めた。

(3) 脳におけるJun/Fosの活性酸素ストレス下での発現制御に関わる分子としてJNKシグナル伝達系の足場タンパク質として機能することが期待される新規分子、*JSAP1*を同定した。*JSAP1*の発現が脳で選択的に高い事から、*JSAP1*の脳における生理機能を明らかにする目的で*Jsap1*遺伝子をクローニングし、*Jsap1*遺伝子破壊実験を進めた。

(4) 損傷を受けたゲノムDNAのRNAポリメラーゼによる転写伸長反応を促進することが想定されるElongin Aの遺伝子をクローニングできたので、その遺伝子破壊による機能解析を進めた。

(5)  $\Delta$ FosBの下流で発現が制御される分子としてGalectin-1とその新規アイソフォームGalectin-1 $\beta$ を同定した。Galectin-1は、嗅球の神経軸索伸長や脊髄後根神経節の切断端からの軸索再生を促進する活性を持つことから、組換えGalectin-1 $\beta$ タンパク質の発現と精製を進め、その機能解析を行った。

## 各サブグループが担った役割分担

### (1) 中別府グループ

ヒトおよびマウスのDNAの酸化障害に対する防御遺伝子 (*MTH1*, *OGG1*, *MUTYH*, *APEX2*, *NEIL3*, *ITPA*) と転写関連遺伝子 (*JSAP1*, *fosB*, *Elongin A*) の産物とその標的のGalectin-1について、以下の項目でその生化学および分子生物学的な解析と遺伝子改変マウスの作製と解析を担当し、「核酸の酸化損傷とその防御機構に関する研究」および「活性酸素による遺伝子発現制御に関わるシグナル伝達系と転写因子に関する研究」を進めた。

#### I. 核酸の酸化損傷とその防御機構に関する研究

- A. 核およびミトコンドリアゲノムDNA中の酸化損傷の修復機構の解明
- B. 異常ヌクレオチドの浄化機構の解明
- C. 核酸の酸化損傷の定量的検出と細胞内動態に関する研究
- D. 活性酸素障害モデル動物の作製と解析

#### II. 活性酸素による遺伝子発現制御に関わるシグナル伝達系と転写因子に関する研究

- A. JNK-JSAP1シグナル伝達系と初期発生
- B.  $\Delta$ FosBによる細胞運命の制御機構の解明
- C. Galectin-1に関する研究
- D. 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

### (2) 岩城グループ

*MTH1*, *OGG1*, *MUTYH*, *APEX2*がヒト脳神経変性疾患の発症に関与する可能性を患者の病理組織の解析から展開し、さらに中別府グループの実験動物の病理解析の指導を担当した。

### (3) 高島グループ

マウスにおける神経変性疾患モデルを樹立する目的で、アルツハイマー病の発症に関わるヒト変異タウ遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作製・樹立し、その解析を担当した。さらに、*OGG1*遺伝子欠損マウスとの交配を進め、得られたマウスを中別府グループに提供した。

### (4) 光本グループ

MPTP 投与によるパーキンソン病モデルマウスの樹立と表現形解析法の樹立を担当した。中別府グループのパーキンソン病モデル解析の指導を担当した。

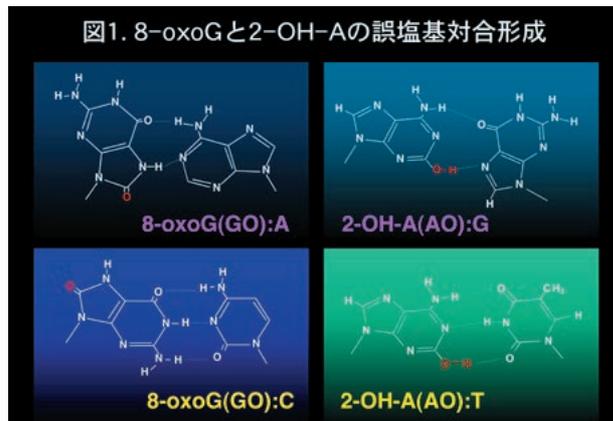
### 3. 研究成果

#### 3. 1 中別府グループ

##### (1) 研究内容及び成果

##### I. 核酸の酸化損傷とその防御機構に関する研究

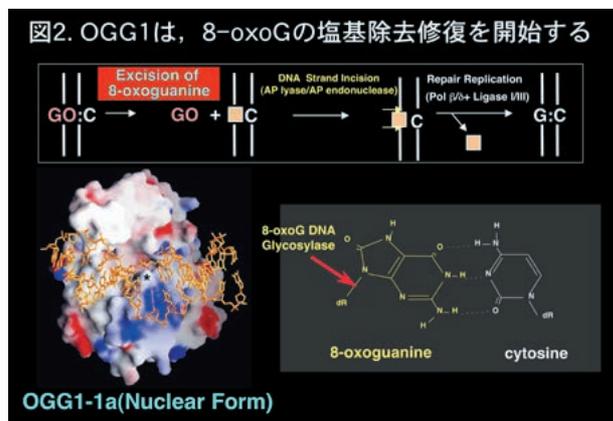
DNAやヌクレオチドなどの核酸がヒドロキシラジカルなど反応性の高い活性酸素に曝されると、50種類を越える損傷塩基の生成や糖の化学修飾、そしてDNA鎖切断などの反応が起こる。本研究では、定量的かつ生化学的アプローチを主体とするために、化学合成が可能な8-オキソグアニン (8-oxoG) と2-ヒドロキシアデニン (2-OH-A) に注目して、その修復酵素とヌクレオチド分解酵素に注目して研究を進めた。8-oxoGはDNAの直接酸化とヌクレオチドの酸化の両方で生じるが、2-OH-Aは主にヌクレオチドの酸化で生じる。図1に示すようにこの2つの酸化塩基は、8-oxoG:A, 2-OH-A:Gなど誤った塩基対合を形成するために突然変異の原因となる事が大腸菌の研究で明らかにされている。



##### A. 核およびミトコンドリアゲノムDNA中の酸化損傷の修復機構の解明

##### a. DNA中の8-oxoGの除去修復酵素，OGG1に関する研究

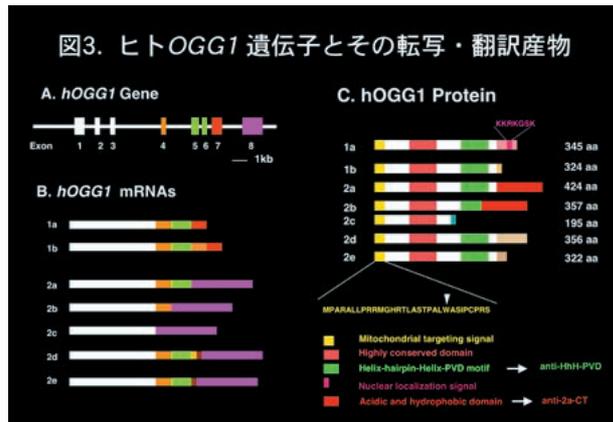
DNA中の8-oxoGの修復は、8-oxoG DNA グリコシラーゼによる8-oxoGの除去で修復反応が開始される。この酵素には2種類のプロトタイプが存在しており、ひとつは大腸菌のMutMタンパク質であり、もうひとつは酵母のOgg1タンパク質である。我々は、DNA中に存在する8-oxoGの中でシトシンと対合した8-oxoGのみを遊離塩基として切り出す8-oxoG DNA グリコシラーゼ活性をJurkat細胞核抽出液に見出し、精製酵素を用いて、この8-oxoG DNA グリコシラーゼがヒトOGG1遺伝子産物であることを明らかにした。OGG1タンパク質は、シトシンと対合しているDNA中の8-oxoGを遊離の塩基として切り出すDNAグリコシラーゼ活性と、その



結果生じた脱塩基部位 (apurinic/apyrimidinic [AP] site) でDNA鎖を切断するAPリナーゼ活性を合わせ持つDNA修復酵素である (図2)。OGGI遺伝子はヒト3番染色体 (3p26.2) のVHL遺伝子の近傍に位置する。

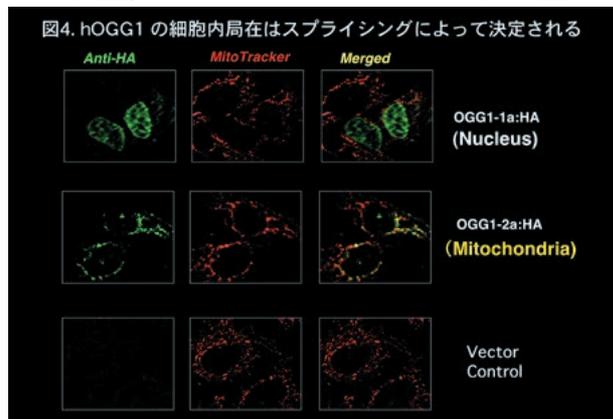
ヒトOGGI遺伝子の転写産物は、その最後のエクソンの選択により2種類に大別される。エクソン7まで持つ、Type 1 (1aおよび1b) とエクソン8を有するType 2 (2a, 2b, 2c, 2dおよび2e) である。種々のヒト臓器におけるhOGGI mRNAの発現をNorthern blotおよびRT-PCRで解析したところ、ほとんどの臓器で7つ以上のOGGI mRNAの発現が確認されたが、いずれの臓器でもType 1aおよびType 2a mRNAが主転写産物であった。各mRNAはそれぞれ異なるポリペプチド

(hOGGI-1aから2eまで) をコードすることが期待され、全てのタンパク質においてミトコンドリア移行シグナル (MTS) と推測される配列を含むN末端側190アミノ酸残基は共通であるが、それぞれがユニークなC末端領域を持つと予想された (図3)。



我々は、ヒト細胞で発現するhOGGIタンパク質を同定するために、hOGGIタンパク質を認識する2種類の抗体、(1) 酵母のOgg1タンパク質にも保存されているヘリックス-ヘアピン-ヘリックスモチーフを認識する抗体 (anti-HhH-PVD) と (2) hOGGI-2aおよび2bに共通のユニークなC末端領域を認識する抗体 (anti-2a-CT) を作製した。anti-HhH-PVDはJurkat細胞の核抽出液から部分精製した8-oxoG DNA グリコシラーゼ活性分画に一致して精製される36-kDaのポリペプチドと反応したが、anti-2a-CTはこのポリペプチドp36には反応しなかった。一方、anti-2a-CTはJurkat細胞およびHeLa細胞より分離したミトコンドリア分画の40-kDaのポリペプチドと反応した。以上より、hOGGI-1aが核型、hOGGI-2aがミトコンドリア型として存在する事を初めて証明した。ミトコンドリア型のhOGGIはヒトの脳や脊髄などの神経細胞で特に発現が高い。

HeLa細胞における組み換えタンパク質の発現実験から、hOGGI-1a (36-kDa) は核へ、一方、hOGGI-2a (43-kDa) は特異的にミトコンドリ



アへ輸送されて40-kDaにプロセスされることが明らかになった（図4）。

またミトコンドリアに存在するhOGG1-2aは、内膜に接して局在することが電子顕微鏡で示された（図29参照）。欠失変異タンパク質の発現実験から、hOGG1タンパク質のミトコンドリアへの移行はN末端のMTS様の配列のみでは不十分であり、hOGG1-2aのユニークなC末端領域が必要であることが明らかになった。一方OGG1-1aは、そのC末端の核移行シグナル（NLS）に依存して核に局在する。以上より、ヒト細胞においては8-oxoG DNA グリコシラーゼ（hOGG1タンパク質）が核内とミトコンドリア内膜に局在しており、それらの発現はmRNAの択一的スプライシングにより制御されていることを明らかにした。

hOGG1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hOGG1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、hOGG1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。また、NOやペルオキシナイトライトによる神経細胞死においてhOGG1の機能喪失が関与することを示唆する。

我々は、OGG1の生物学的機能解析を目的として、マウス*Ogg1*遺伝子をクローニングし、そのゲノム構造を決定した。マウス*Ogg1*遺伝子は6番染色体（48.0cM）に存在する。ヒトとマウスの核型（hOGG1-1a）を比較すると両者とも345アミノ酸からなりその85%は同一である。どちらもDNAグリコシラーゼファミリーに特徴的なヘリックス-ヘアピン-ヘリックスモチーフをもち、シトシンと対合しているDNA中の8-oxoGを切り出すDNAグリコシラーゼ活性と、その結果生じた脱塩基部位でDNA鎖を切断するAPリナーゼ活性を合わせ持つDNA修復酵素である。これまでのところ、ヒトと異なり、ミトコンドリア移行型（hOGG1-2a）に相当するスプライシングバリエーションは見つかっていない。

現在までに我々のグループを含めて、世界中で少なくとも3種類の*Ogg1*遺伝子の欠損マウスが作製、報告されている。*Ogg1*遺伝子は7つのエクソンからなるが、我々の研究室では開始コドンを含むエクソン1から3までを、西村らの研究室ではエクソン2の一部と3を、またBarnesらの研究室ではヘリックス-ヘアピン-ヘリックスモチーフを含むエクソン4から7をそれぞれ欠失させた遺伝子欠損マウスを作製した。いずれのマウスも8-oxoG DNAグリコシラーゼ活性を失っていることが確認されている。これらのOGG1欠損マウスは形態、成長、生殖に関して野生型マウスと顕著な差は観察されなかった。

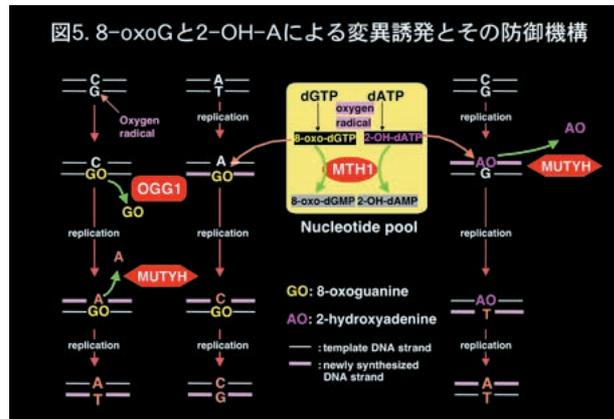
8-oxoG DNAグリコシラーゼの基質である8-oxoGはsyn型をとりやすいため2

本鎖DNA中でシトシンだけでなくアデニンとも対合することができる(図1, 5)。このためDNA複製の過程でG:C→T:Aトランスバージョン突然変異をひきおこす原因となる。同様にヌクレオチドプールに存在する8-oxo-dGTPはDNA複製の際にアデニンと対合できるため、A:T→C:G トランスバージョン突然変異の原因となる。

8-oxoGがDNA中に生じる経路は、①DNA合成時にアデニン(あるいはシトシン)に対して8-oxo-dGTPが取り込まれる場合と、②DNA中のグアニンが直接酸化される場合の2つに大別できる。①の経路に対しては、8-oxo-dGTPase(MTH1遺伝子産物)が8-oxo-dGTPを8-oxo-dGMPに特異的に分解することによって(図5, 22参照)、

また①, ②の経路でDNA中に生じてしまった8-oxoGに対しては8-oxoG DNAグリコシラーゼ(OGG1遺伝子産物)が働き、DNAからこれを排除することでDNA中の8-oxoGの量を低く抑えていると考えられている。

OGG1欠損マウスではそのDNA中に8-oxoGが蓄積し、さらに細胞の突然変異頻度が上昇していることが期待

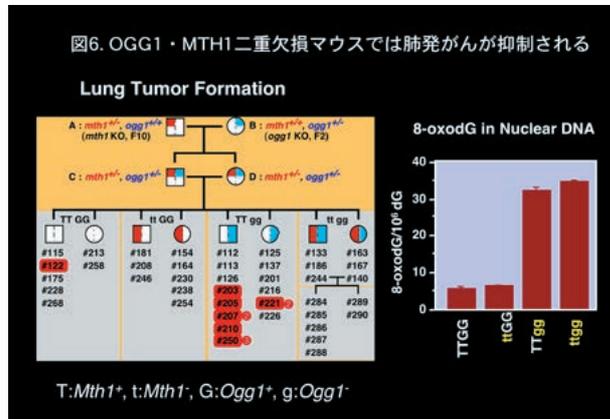


できる。実際に西村らの研究室とBarnesらの研究室でDNA中に8-oxoGが蓄積していること、細胞の突然変異頻度が上昇していることが確認された。また、核のDNAだけでなくミトコンドリアのDNAにも8-oxoGの蓄積がみられることも見いだしている。我々は8-oxoGの蓄積が発がんに関与しているのではないかと考え、OGG1欠損マウスの長期自然観察を行い腫瘍の発生頻度を野生型マウスと比較した。その結果、OGG1欠損マウスでは肺の腫瘍発生頻度が上昇していることを見いだした。ここで見いだされた肺腫瘍はアデノーマ/アデノカルシノーマであった。メチルニトロソウレア等の発がん物質の腹腔内投与で発生する肺腫瘍は肺葉の表面に生じるが、OGG1欠損マウスに生じた腫瘍は肺葉の内部に生じていた。これまでのところOGG1欠損マウスで腫瘍の発生を確認できたのは当研究室だけであるが、これは自然発生する腫瘍を検出するためには1年半前後の観察期間を必要とするためだと考えられる。

DNA中の8-oxoGの量はMTH1とOGG1の両方の働きで低く抑えられている。両者の役割を評価するため、*Mth1*, *Ogg1*のそれぞれ単独、および二重の遺伝子欠損マウスを作製し、LC-MS/MSを用いて生後580日目のマウスの肝臓のDNAに含まれる8-oxoGの含量を測定したところ、それぞれ $10^6$ のグアニンあたり、野生型マウスで5.4個、MTH1欠損マウスで6.0個、OGG1欠損マウスで32.1個、MTH1・OGG1二重欠損

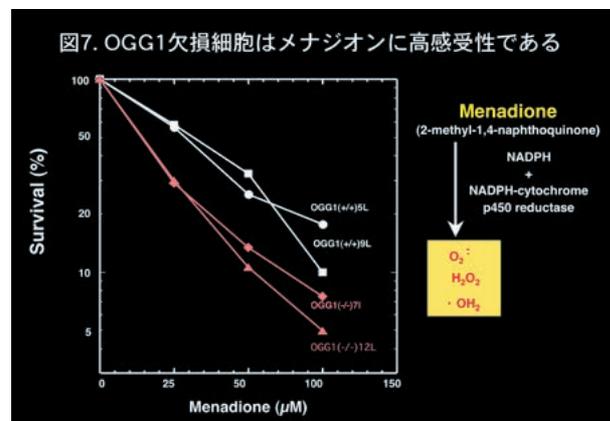
マウスでは34.3個という値が得られた。この結果からOGG1欠損マウスでは野生型マウスと比べて約6倍の8-oxoGが蓄積していること、DNA中の8-oxoGの量は主に8-oxoG DNAグリコシラーゼによって低く抑えられていることが明らかになった。

我々は、MTH1・OGG1二重欠損マウスではより多くの腫瘍が発生すると予想していたが、8-oxoGの蓄積がOGG1欠損マウスと同等以上だったにもかかわらず、予想に反してOGG1欠損マウスに発生した肺のアデノーマ/アデノカルシノーマはMTH1・OGG1二重欠損マウスでは観察されなかった(図6)。



この結果はMTH1タンパク質の欠損がOGG1欠損マウスで観察される肺のアデノーマ/アデノカルシノーマの発生を抑制していることを意味する。以上の結果は、核やミトコンドリアゲノムDNAへの過剰な酸化塩基の蓄積が細胞死を誘発する可能性を示唆する。

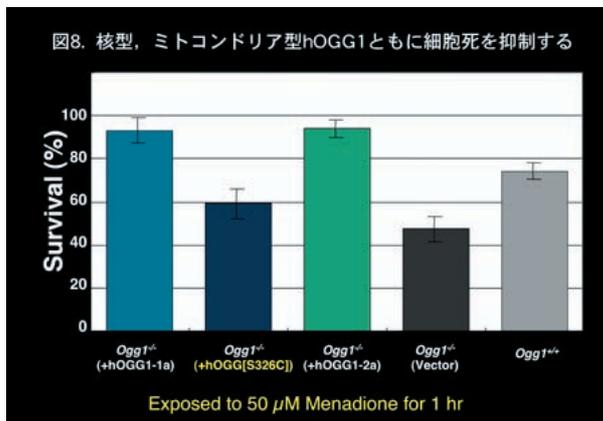
そこで、我々は野生型マウスおよびOGG1欠損マウスより胎児繊維芽細胞を分離するとともに、OGG1欠損細胞にヒトの核型OGG1タンパク質 (hOGG1-1a) とミトコンドリア型OGG1タンパク質 (hOGG1-2a) を発現するプラスミドを導入し、安定発現株を樹立した。酸化ストレスによる細胞障害に対する抵抗性をMenadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) 負荷24時間後の細胞生存率で比較したところOGG1欠損細胞は野生株と比較して高いMenadione感受性を示した。さらにhOGG1-1aとhOGG1-2a発現株ではOGG1欠損細胞株と比較し有意に高い生存率を回復していた。この二つの細胞では、それぞれ核ゲノムとミトコンドリアゲノムでの修復機能が確認されている。すなわち、核とミトコンドリアのゲノムDNAいずれにおいても、8-oxoGが高度に蓄積すると細胞死を引き起こす事が結論される。この結果は、hOGG1が酸化ストレスによる細胞死を抑制する事を初めて証明するものである(図7, 8)。



ヒト集団中に多型頻度20%で存在するアミノ酸置換型hOGG1-1a(S326C)を

OGG1欠損細胞株に発現させたところ、OGG1欠損細胞株とhOGG1-1a発現株の中間程度のMenadione感受性を示した。このhOGG1-1a(S326C)多型は発がんや神経変性の危険因子として見なされており、

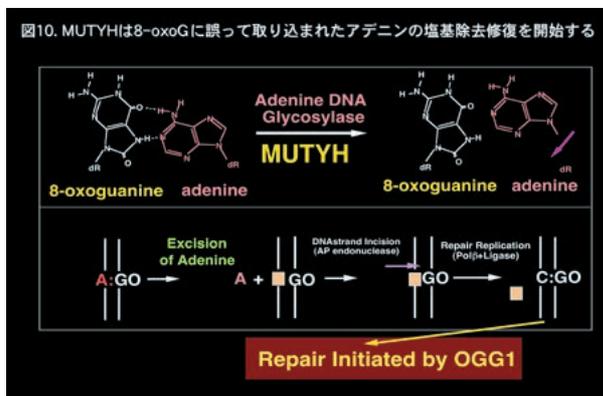
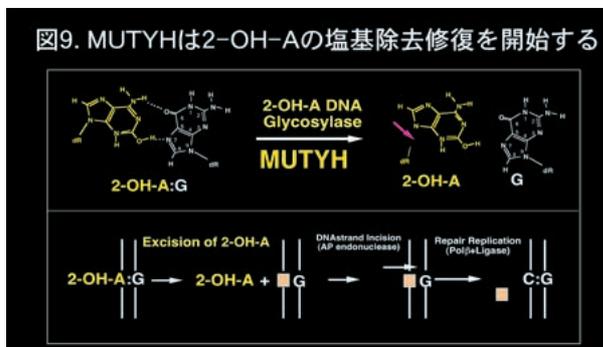
我々の結果はhOGG1-1a(S326C)が部分的な機能喪失をもたらす事を示している。OGG1の活性はそのシステイン残基の酸化やニトロ化により失活する事から、hOGG1-1a(S326C)はこのような酸化ストレスに対する抵抗性が低下している可能性が高い(図8)。



b. DNA中のアデニン/2-OH-Aの除去修復酵素, MUTYHに関する研究

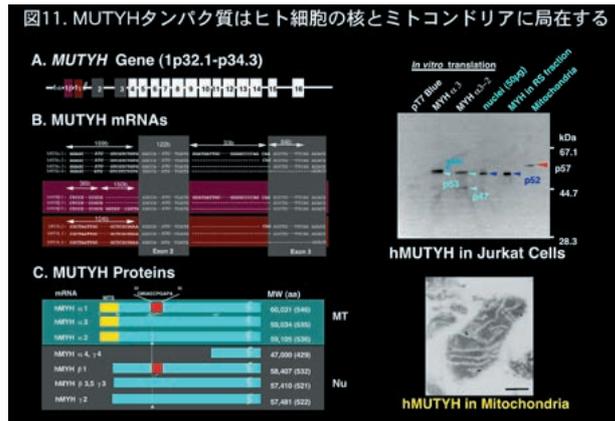
Jurkat細胞の核から調製した抽出液を用いて、二本鎖DNA中に存在する2-ヒドロキシアデニン(2-OH-A)を特異的に除去する2-OH-A DNAグリコシラーゼ活性を検出し、そのタンパク質を部分的に精製した。2-OH-A DNAグリコシラーゼ活性を含む部分精製分画には8-oxoGに誤って対合したアデニンを除去するアデニンDNAグリコシラーゼの活性も検出された。

このアデニンDNAグリコシラーゼはヒトMUTYH遺伝子産物にコードされるが、本遺伝子産物が2-OH-A DNAグリコシラーゼ活性を合わせ持つと考えられた。組換えhMUTYHタンパク質に対して作製したMUTYH抗体を用い、部分精製分画中に確かにhMUTYHタンパク質が存在することを確認した。また、組換えhMUTYHタンパク質が2つの基質(2-OH-Aとアデニン)を除去する活性を持つこと確認できたので、hMUTYHタンパク質が2-OH-A/アデニンDNAグリコシラーゼ活性を持つと結論した(図9, 10)。



我々は、ヒト細胞のミトコンドリアゲノムにhMUTYHで修復可能なDNA損傷が存在

することを報告し、さらにヒト細胞には核とミトコンドリアにhMUTYHタンパク質が存在することを明らかにした。ミトコンドリアのhMUTYHタンパク質はその内膜に弱く結合した状態で存在する。*MUTYH*遺伝子の転写産物の解析から択一的スプライシングにより10種類のmRNA



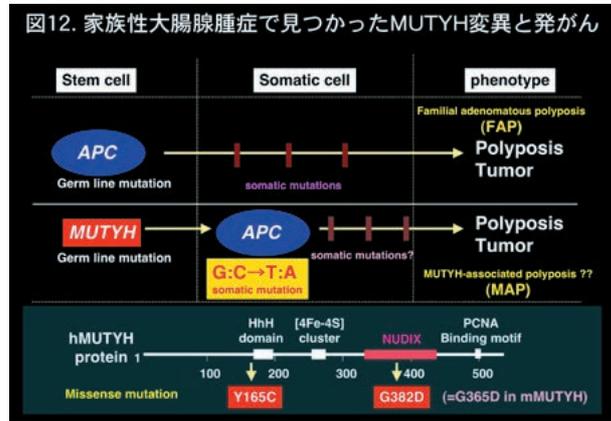
が産生され、少なくともそのうちの2つが核型とミトコンドリア型酵素をコードすることを明らかにした(図11)。ヒト組織の中で大脳における*MUTYH* mRNAの発現レベルは中程度であったが、脳特異的に発現する*MUTYH*のスプライシングバリエーションが存在する事が明らかになった。この*MUTYH*のスプライシングバリエーションは、脳の虚血再灌流障害時に発現が増強される可能性がラットで報告されており興味深い。

次に、我々はマウス*MutYh*遺伝子をクローニングし、そのゲノム構造と転写産物の解析を行った。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。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が、特に小腸で高い発現が見られた。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のタンパク質(mMUTYHα)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のタンパク質(mMUTYHβ)をコードすることが予測された。type bおよびtype c mRNAの*in vitro*翻訳反応産物中には、抗hMUTYH抗体と反応するmMUTYHα (54kDa) と mMUTYHβ (45kDa) のタンパク質がそれぞれ検出され、マウス胚性幹(ES)細胞や臓器においてもこれら2つのMUTYHタンパク質の発現が確認された。2つのMUTYHタンパク質は核とミトコンドリアの両方に局在して存在する事も確認された。

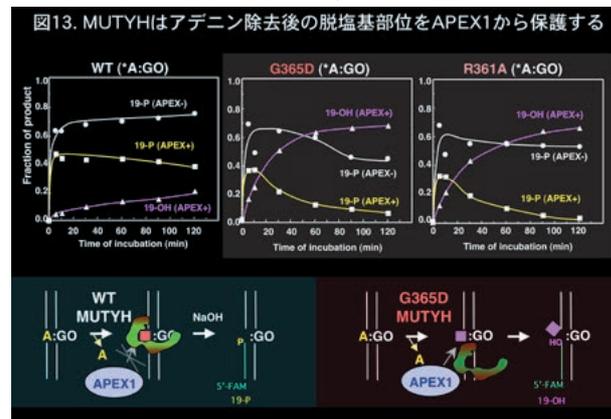
*MUTYH*の機能解析を目的として、*MutYh*遺伝子を完全に欠損したマウスES細胞を樹立し、まずmMUTYHタンパク質の発現とアデニンDNAグリコシラーゼ活性を解析した。野生型ES細胞で検出された54kDaと45kDaのタンパク質は*MutYh*欠損細胞では完全に消失し、8-oxoGに對合したアデニンの塩基除去修復能も完全に欠損していた。さらに、*MutYh*欠損ES細胞では自然突然変異率が2倍から3倍上昇していた。このような自然突然変異率の上昇は、野生型*MutYh* cDNA (type b) の発現ベクタ

一の導入により完全に抑制された。一方、MUTYH欠損マウスでは生後18ヶ月後の剖検において小腸におけるアデノーマ、アデノカルシノーマ、さらにリンポーマの発生の頻度が野生型マウスの数倍に上昇した。また、脾臓、肝臓、肺における腫瘍発生も増加傾向であった。

2002年、APC遺伝子に生殖細胞系列の変異が見つからないヨーロッパの家族性大腸腺腫症患者においてMUTYH遺伝子の変異の存在が報告され、このような患者ではポリープやがん化した組織のAPC遺伝子にG:C→T:A変異が生じており、hMUTYHの機能欠損がその原因として注目を集めている(図12)。



我々は、hMUTYHと90%以上の相同性を持つマウスMUTYHをチオレドキシン(TRX)融合タンパク質として安定に発現精製することに成功し、この組換えタンパク質を用いた*in vitro*修復反応系を再構成した。DNA中の8-oxoGに誤って取り込まれたアデニン、次の複製を経てG:C→T:Aトランバージョン変異を引き起こす(図5参照)。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(図10)。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APエンドヌクレアーゼ(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による塩基除去後の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(A:GO)をC:8-oxoG(C:GO)、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タンパク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(図13)。MUTYH

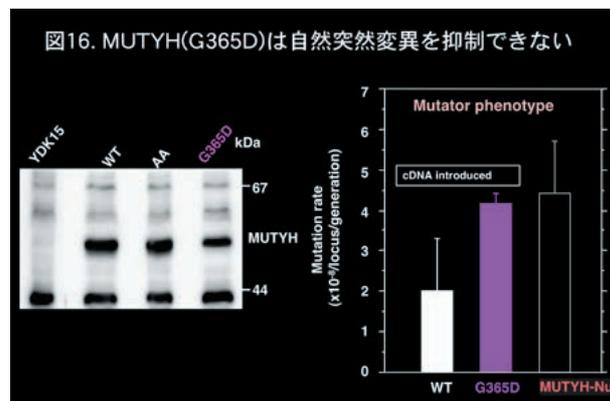
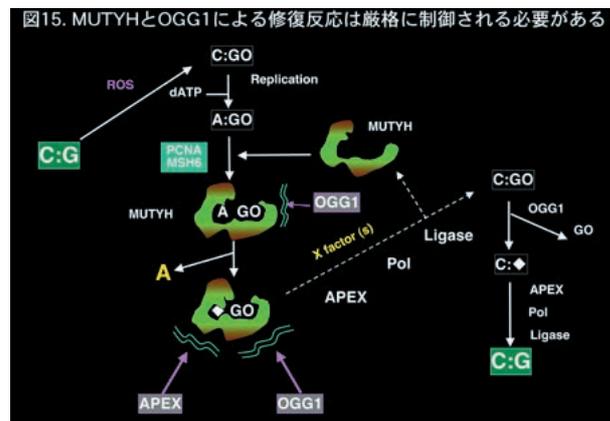
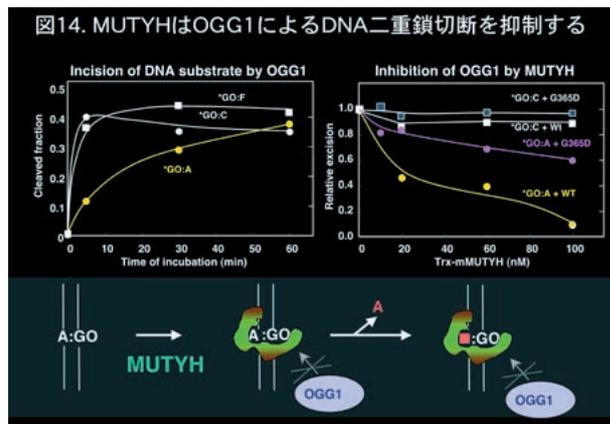


は、A:8-oxoG対合と脱塩基部位対側の8-oxoGに対してOGG1が作用し、8-oxoGを除去する反応も阻害する。この反応は、OGG1がAPリナーゼ活性を持つために修復過程で二重鎖切断が生じるのを防ぐ上で重要な機能である（図14）。

ヒト家族性大腸腺腫症患者で見つかった変異hMUTYH(G382D)に相当するマウス変異型mMUTYH(G365D)は（図12）、野生型と比較した場合8-oxoGに対合したアデニンを切り出すグリコシラーゼ活性には大きな差は無いものの、その結果生じた脱塩基部位をAPEX1のAPエンドヌクレアーゼ活性から保護する活性を失っていることが明らかになった（図13）。この保護活性の喪失は基質DNAへの結合能と相関し、A:8-oxoG対合を持つDNAに対

する見かけの解離定数が変異型では野生型の数倍に上昇していた。また、脱塩基部位の対側の8-oxoGに対しても、mMUTYH(G365D)は野生型に比べてOGG1のグリコシラーゼ活性からの保護活性が低下していることが分かり、mMUTYH(G365D)がA:8-oxoG対合に作用した場合、二重鎖切断が起きる可能性が示唆された。また、このmMUTYH(G365D)は、A:8-oxoG対合からOGG1が8-oxoGを除去する事を阻害できない事から、hMUTYH(G382D)変異をホモに持つヒトでは、修復されるべきアデニンが残ってしまい、その結果G:C→T:A変異を促進する可能性も示唆された（図14、15）。

我々は、変異型hMUTYH(G382D)をホモに持つ患者でAPC遺伝子にG:C→T:A変異が生じるメカニズムをさらに解明するべく、mMUTYH(G365D)と野生型mMUTYHの発現ベクターをMUTYH欠損細胞に導入して、突然変異抑制活性を検討した。その結果、野生型mMUTYHはMUTYH欠損細胞で上昇している自然突然変異を完全に抑制したが、mMUTYH(G365D)は全く突然変



異の発生を抑制できなかった。すなわち、hMUTYH(G382D)は自然突然変異を抑制する機能を完全に失っている事が示唆された(図16)。

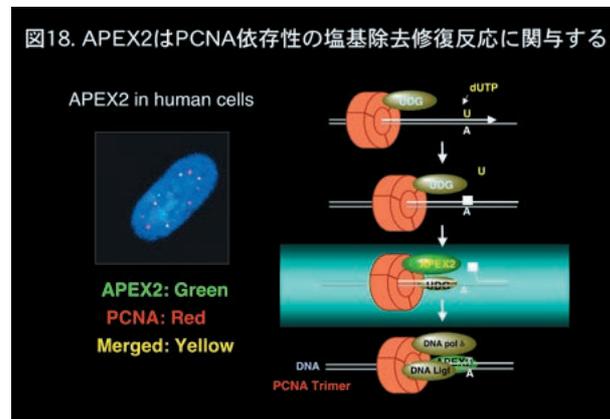
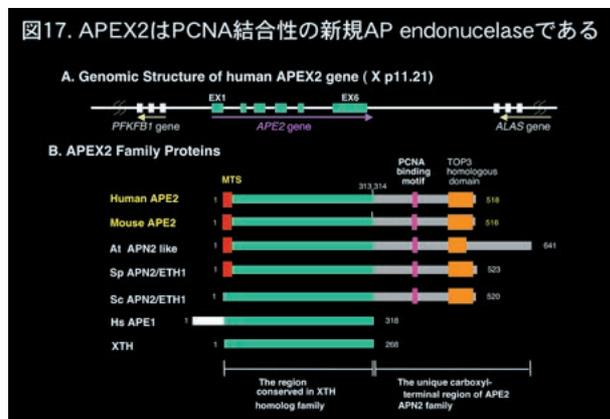
我々の結果は、MUTYHが哺乳動物においてG:C→T:A変異を抑制し、その結果として消化管系の自然発癌を抑制することを示しており、ヒトMUTYH遺伝子の劣性変異が遺伝性大腸腺腫症の直接の原因である事を裏付けるものである。また、Mutyh遺伝子欠損マウスがヒトMUTYH遺伝子の劣性変異に起因する遺伝性大腸腺腫症のモデル動物として有用である事が示唆された。

### c. 新たなAPエンドヌクレアーゼ, APEX2に関する研究

MUTYH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(図2, 9, 10)。OGG1とMUTYH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(APEX1)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(APEX2)を同定した。ヒトAPEX2遺伝子は、腎臓や脳での発現が高い。我々は、APEX2タンパク質のMTSを結合したGFP融合タンパク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APEX2タンパク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(図17, 29)。

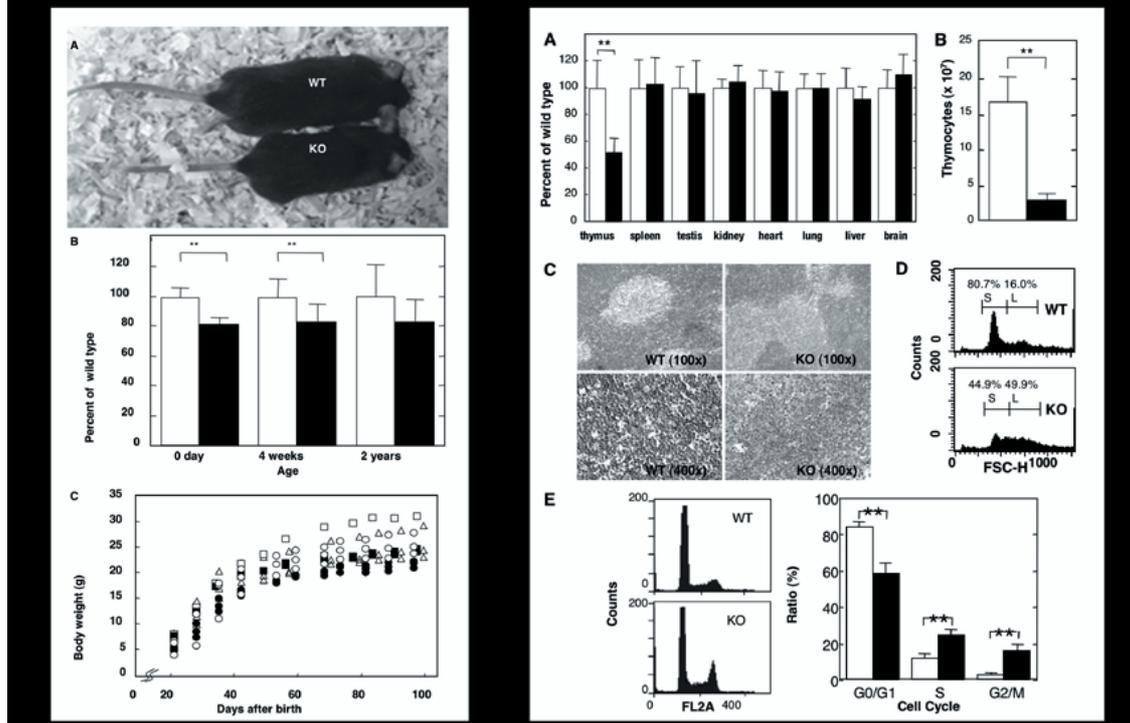
APEX2のC末端にPCNA結合配列と相同なアミノ酸配列が見いだされたので、PCNAとの会合の可能性を免疫沈降法および*in vitro* Pull-down



法により解析したところ、APEX2はそのC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系で修復される塩基損傷を誘発すると、細胞核内でPCNAとAPEX2の共存フォーカスが顕著に増加し、APEX2が複製にカップルした塩基除去修復反応に関与することが明らかになった（図18）。

ヒトAPEX2 cDNAをプローブとしてマウスAPEX2 cDNAおよび遺伝子をクローニングした。マウス*Apex2*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*Apex2*遺伝子は16.5Kbのサイズで、6つのエクソンからなる。マウス*Apex2*遺伝子は細胞増殖の活性化に伴って発現が誘導される。マウスAPEX2タンパク質もPCNAと安定な複合体を形成する。このAPEX2の細胞および個体における役割を調べるため、我々はマウス*Apex2*遺伝子のイントロン5の3'側からエクソン6の5'側にかけての領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを構築し、これを用いて*Apex2*遺伝子を標的破壊したマウスES細胞株を作成した。更に、定法に従いAPEX2

図19. APEX2欠損は全身性の成長不全と免疫系の発達不全を引き起こす



欠損マウスを樹立した（図19）。

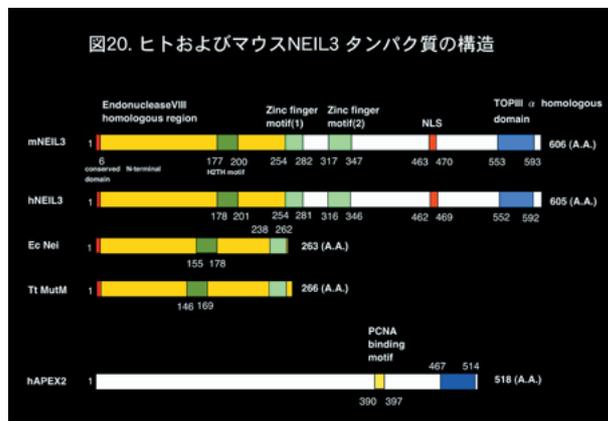
*Apex2*遺伝子はX染色体上に位置するため、変異*Apex2*遺伝子は伴性遺伝の法則に従って遺伝した。ヘテロ変異メスマウスと野生型オスマウスの掛け合わせにより生まれてくるAPEX2欠損マウスの出生率は同腹兄弟の野生型オスマウスの出生率と同じであり、APEX2欠損はマウスの発生時に致命的な影響を及ぼすことはない

考えられる。しかしAPEX2欠損マウスは同腹野生型マウスと比較して体重が約80%と軽く、発育の遅延を認めた。各主要臓器の重量測定の結果、胸腺重量が体重補正後も約50%と減少していた。また胸腺細胞数は約20%まで減少していた。末梢血中の血液細胞密度を解析した結果、赤血球、白血球の減少を認め、白血球中の分画では顆粒球/単球、T細胞、B細胞の各々で有意な減少を認めた。胸腺細胞の単離核のDNA含量解析より、S期進行の遅滞とG2/M期の細胞の蓄積が観察された。

末梢リンパ球として脾臓細胞を用い、LPSまたはConA刺激による細胞増殖誘導を行ったところ、APEX2欠損マウスにおいて増殖率の低下を認め、DNA含量解析によりS期進行の遅滞とG2/M期細胞の蓄積を同様に観察した。これらの結果よりAPEX2欠損マウスではDNA中に損傷部位が修復されずに取り残されることによりDNA複製に異常をきたし、S期およびG2/M期チェックポイント機構が働いているために全身性の成長遅延と造血不全にいたっているものと考えられた。

#### d. 新たなDNAグリコシラーゼ候補, NEIL3に関する研究

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結合配列が存在する。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グリコシラーゼである大腸菌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ライブラリーを鋳型とした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Nei13遺伝子は各々4番, 8番染色体に位置し、10個のエクソンからなる。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%の相同性を示し、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

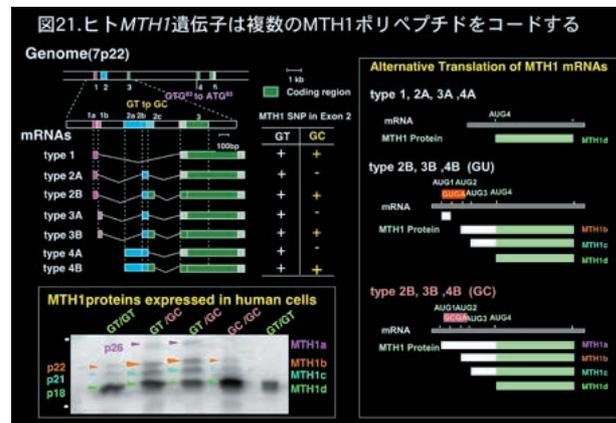


れるH2THドメイン，Znフィンガーモチーフなどが保存されている。MutMのグリコシラーゼ活性中心であるN末端プロリンはNEIL3ではバリンに置換されていた。NEIL3のC末端領域の配列にはAPEX2とTOP3に相同性を示す領域が保存されているが，APEX2に存在するPCNA結合配列は存在しなかった（図20）。現在，遺伝子欠損マウスを樹立し，その解析を進めている。

## B. 異常ヌクレオチドの浄化機構の解明

### a. 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素，MTH1に関する研究

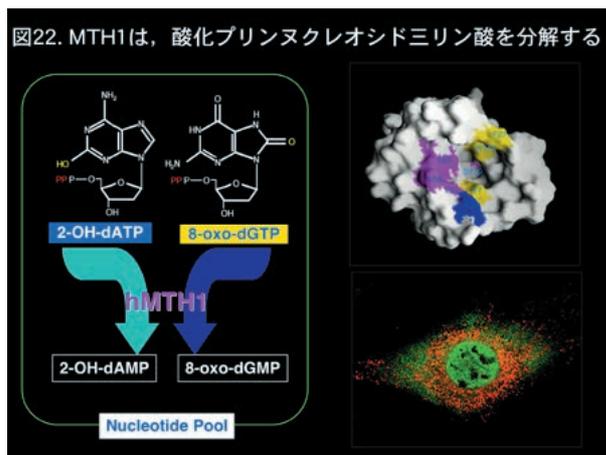
ヒト*MTH1*遺伝子は，ヒト染色体の7p22に位置し，択一的なスプライシングおよび翻訳開始により，7つの異なる*MTH1* mRNAと3種類のMTH1ポリペプチド（MTH1b, c, d）をコードする。この3種類ポリペプチドの中ではMTH1dの発現量が最も多く，細胞質とミトコンドリアに局在する。ヒト細胞のミトコンドリア内では，MTH1dタンパク質はマトリックスに可溶性のタンパク質として存在する（図21，29）。



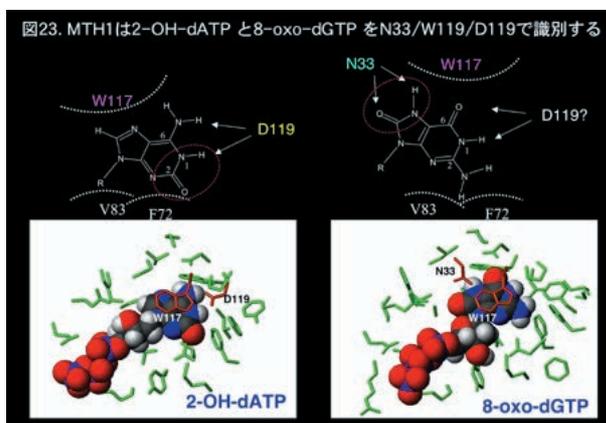
日本人集団には，*MTH1* 遺伝子のエクソン2に択一的スプライシングの変化をもたらす遺伝子多型（GT/GC）が存在し，GC多型を持つ個体では，アミノ末端に18個のアミノ酸が付加された第4のMTH1タンパク質（MTH1a）が合成される。この18個のアミノ酸の意義を明らかにする目的で，GFPタンパク質のアミノ末端にMTH1aのアミノ末端の18個のアミノ酸を融合させヒト細胞で発現させたところ，融合タンパク質はミトコンドリアへ移行した。すなわち，MTH1タンパク質のミトコンドリア移行は遺伝子多型によって変化することが明らかになった。

この多型は，老化に伴う疾患（発がん，パーキンソン病など）の発症の危険因子となる可能性が示唆されているもう1つのアミノ酸置換を伴うMTH1多型と連鎖しており，MTH1タンパク質のミトコンドリアでの機能の重要性を示唆するものである。*MTH1*遺伝子の構造と発現制御機構の解析から，*MTH1*遺伝子は活性酸素を産生するニッケル等への暴露で誘導され，その細胞内局在も組織やストレスにより大きく変動することが明らかになった。

当初, 8-oxo-dGTP特異的分解酵素として報告したMTH1の基質特異性を新たな酸化ヌクレオチドを含めて再検討し, dATP, ATP, dGTP, GTPの酸化体を分解する活性を持つことを明らかにし, 酸化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素と改名した(図22)。これらの酸化ヌクレオチドの中で, MTH1は2-ヒドロキシ-dATP (2-OH-dATP) と2-OH-ATPを最も効率良く分解する。



我々はこれらヌクレオチドの中で8-oxo-dGTPと2-OH-dATPに注目し, MTH1タンパクがどのような分子メカニズムでこれら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。MTH1タンパク質の蛍光強度は酸化ヌクレオチド結合に伴いほぼ半減することより, MTH1タンパク質1分子あたり4個存在する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位置することが示唆された。8-oxo-dGTPと2-OH-dATPによる蛍光の減衰パターンがほぼ同じであることから, これらの2つのヌクレオチドはMTH1タンパク質に同様のモードで結合することが示唆された。酸化されていない通常のヌクレオチド (dGTPおよびdATP) の結合によっても蛍光は減衰したが, 減衰の程度が小さいことから結合モードが異なることが示唆された。8-oxo-dGTPと2-OH-dATPは正常なヌクレオチドに比べ, タンパク質とより多くの接点を持つことで強く結合すると考えられる。またこの解析からヌクレオチド結合部位に位置す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存在す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 (W117) が負の電荷をもつアミノ酸残基の近傍に位置する事から, このトリプトファン残基をアラニンに置換したところ, 変異タンパク質 (W117A) 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必須であることが明らかになった(図23)。

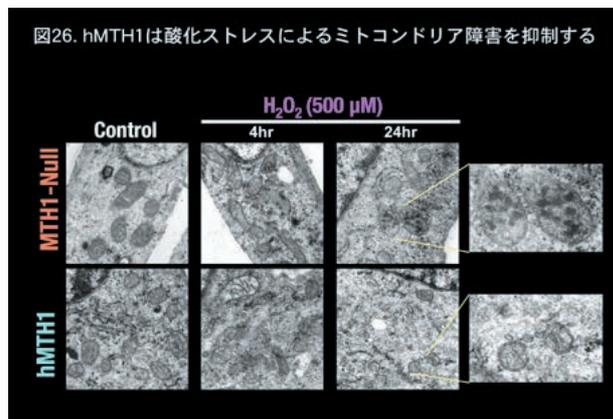
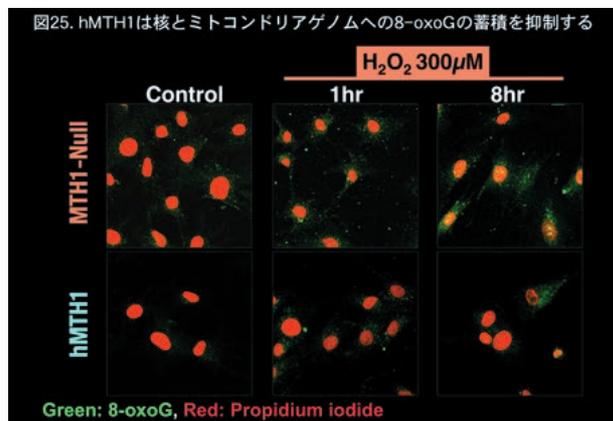
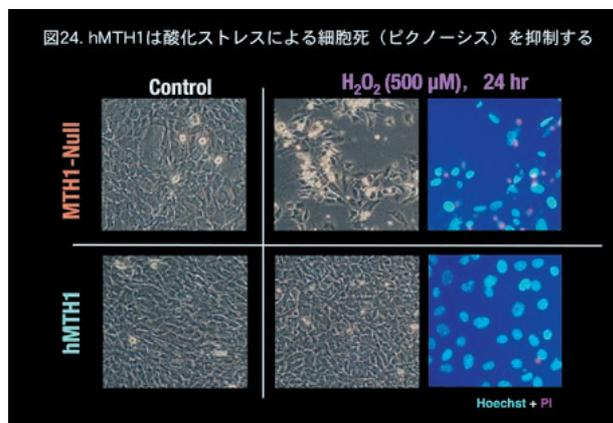


我々は, *MTH1*の生物学的重要性を明らかにする目的で, マウス*Mth1*遺伝子をク

ローニングし、MTH1欠損マウスを樹立した。このマウスの18ヶ月齢での剖検から、MTH1欠損が肝がんの自然発生を数倍上昇させるをことを明らかにした。肺や胃でも発がんの頻度が増加する傾向が観察されており、OGG1, MUTYH欠損マウスとの結果を合わせて考えると、それぞれの遺伝子が特異的な臓器の発現抑制に重要である事が示唆される。中でも、肺における発がんはOGG1欠損で最も有意に上昇するが、MUTYH, MTH1欠損でも上昇傾向が見られる事からこれら3つの酵素が相乗的に作用している可能性が示唆される。

OGG1とMTH1の二重欠損マウスにおいて、肺がんの発生が全く観察されなかった事から、我々はMTH1が酸化ストレス下で誘発される細胞死を抑制する可能性を検討した。*Mth1*欠損マウス由来胎児線維芽細胞 (*Mth1*<sup>-/-</sup>MEF) にヒトMTH1 (hMTH1d) タンパク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・ポリメラーゼ及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 (図24)。

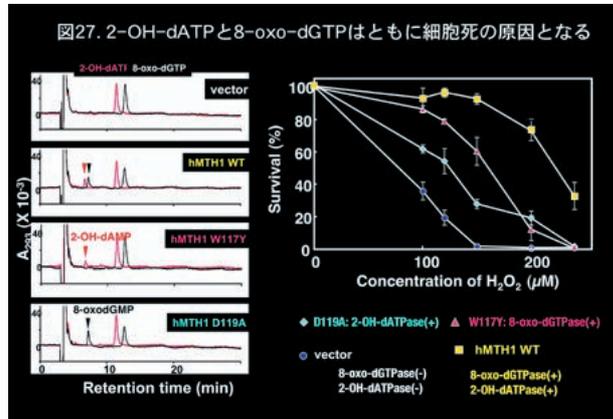
HPLC-MS/MSおよび蛍光免疫染色法による解析からH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に曝された*Mth1*欠損細胞の核およびミトコンドリアDNAに8-oxoGが継続的に蓄積することが明らかになった。hMTH1を発現させることにより、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷8時間後以降の核およびミトコンドリアゲノムDNA中における8-oxoGのレベルは有意に低下した (図25)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷後の*Mth1*欠損細胞においては、電子顕微鏡観察により電子密度の高い異常な構造体の出現を伴うミトコンドリアの形態変化が高



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は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（図26）。

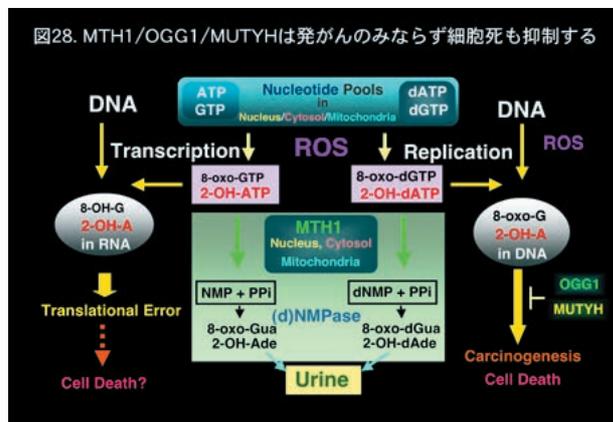
8-oxo-dGTP分解活性を選択的に喪失したhMTH1 (W117Y) あるいは2-ヒドロキシ(OH)-dATP分解活性を選択的に喪失したhMTH1 (D119A) 変異タンパク質の発現によって、いずれも野生型のhMTH1の発現時に比較すると低いレベルではあるが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による細胞死が有意に抑制された（図27）。

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

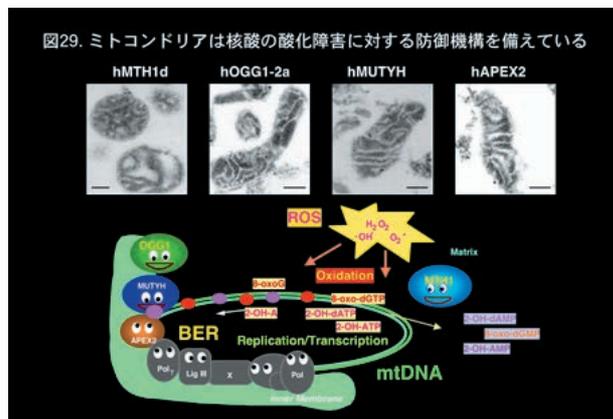


酸化ストレスによる細胞の機能障害や細胞死から細胞を保護する機能を有し、その保護効果の一部はミトコンドリア機能障害の抑制に起因することを示唆する。この結果から、8-oxo-dGTP以外の酸化ヌクレオチドが細胞障害に関わっていることが示され、さらにhMTH1がその抑制に寄与していることも初めて明らかになった。

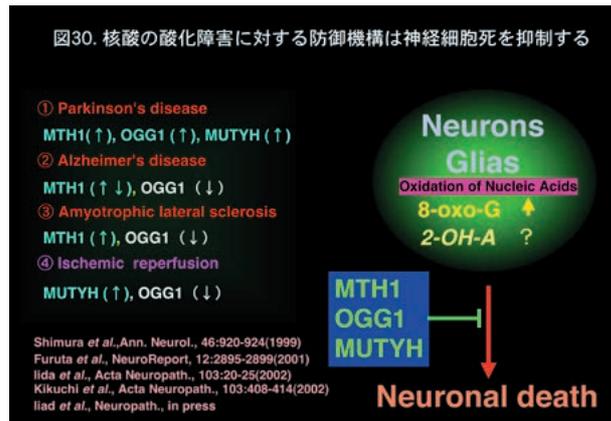
我々は、パーキンソン病患者の黒質ドパミン神経細胞の細胞質（おそらくミトコンドリア）に8-オキソグアニンが蓄積し、さらにMTH1やOGG1, MUTYHが高発現していることを報告している。このような、酸化損傷の蓄積や防御遺伝子群の発現誘導はコントロール患者や多系統萎縮症の患者の黒質では観察されないことから、パーキンソン病患者のドパミン神経細胞では種々のヌクレオチドやDNAの酸化が亢進し、その有害な影響を排除する目的でこれらの発現が誘導されている可能性が示唆される（図28, 29）。



脳腫瘍における8-oxoGの蓄積とMTH1の発現の解析から、悪性度の高いグリオーマにおいて核ゲノムへの8-oxoGの蓄積が亢進し、さらに通



常の脳組織では検出できないMTH1が高レベルに発現している事を見出した。MTH1が酸化ストレスにより誘発される細胞死を効率良く抑制できる事から、がん細胞やパーキンソン病の中脳黒質ドパミン神経細胞では酸化ストレスによる細胞障害をMTH1を高発現することで、最も有害なミトコンドリアゲノムDNAへの



の8-oxoGの蓄積を抑制し、細胞の生存を維持している事が示唆された。また、岩城グループの研究成果から、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症等の患者の病変部においても8-oxoGの蓄積とこれらの防御遺伝子の発現の増減が著しい事が明らかになった。我々の結果は、MTH1やOGG1, MUTYHが酸化ストレスから細胞を守る役割を持つ事を示しており、このような神経細胞の生存維持にも重要と考えられる(図30)。

#### b. 脱アミノ化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素，ITPAの解析

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活性酸素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活性を持つと期待されるヒトおよびマウスのイノシン三リン酸分解酵素 (ITPA) 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、リコンビナントタンパク質を発現、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ITPA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。

統合失調症の患者では、ITPAの発現が減少している事が報告されており、ITPAは神経機能の維持に重要である事が示唆されている。現在、遺伝子欠損マウスを

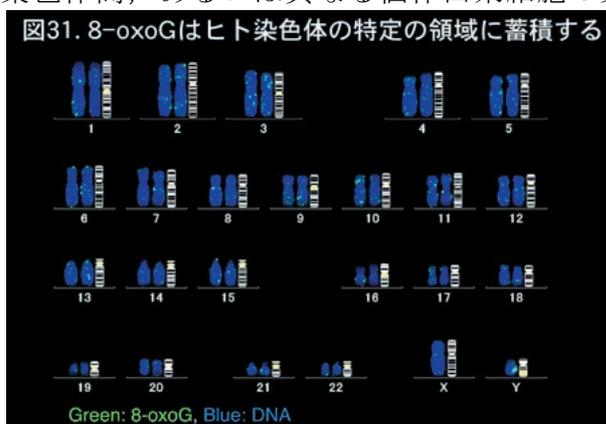
樹立し、その解析を進めている。

### C. 核酸の酸化損傷の定量的検出と細胞内動態に関する研究

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-oxoGに関して多くの研究が報告されている。しかしながら，8-oxoG以外の酸化塩基の検出法はまだ確立されておらず，8-oxoG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-oxoGと2-OH-Aを始めとする複数の酸化塩基の定量的検出を確立し，虚血再灌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。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-oxoGの細胞内動態の解析法を樹立した。この2つの解析法により，酸化ストレスを受けた細胞内における8-oxoG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。

ヒトの末梢血リンパ球よりM期の染色体標本を用いて8-oxoGの局在パターンを解析したところ，間期核では約200個のスポット状の抗8-oxoG抗体に由来する蛍光シグナルが検出されたが，染色体上では特定のバンドに対応して両姉妹染色分体上の同一領域にほぼ等しい輝度でスポット状の蛍光シグナルが検出された。これらの蛍光シグナルは標本を事前にRNaseとDNaseで処理することで消失し，RNase H処理には影響されず，8-oxoG DNAグリコシラーゼであるMutM処理によりほとんど消失した。以上より，蛍光シグナルは染色体上の8-oxoGを検出していることが確認された。これらのシグナルは相同染色体間，あるいは異なる個体由来細胞の染色体間でもほぼ同様の領域に検出された。XX核型での両X染色体においてもシグナルパターンは同様であった。以上の結果は8-oxoGがヒトゲノム中に不均一に存在すること，DNA配列依存的にある特定の領域に恒常的に存在することを示唆している（図31）。



さらに興味深いことに，シグナルを染色体バンドにマッピングすることで得られた位置情報はEnsembl Genome BrowserのHuman Map View ([www.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens))で公開されている一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs)

の染色体レベルでの分布と酷似していた。SNPs頻度が多い領域は塩基置換が起こりやすく、淘汰の影響を受けなかった領域と考えることができる。ヒトゲノム上でSNPsの頻度に大きな偏りがあることの原因や特徴的DNA配列などは明らかにされていないが、我々の結果はゲノム中には8-oxoGが高頻度に存在する領域があり、このような偏りが遺伝子多型などのゲノム配列の多様性を生み出す原動力になっていることを示唆するものである。

#### D. 活性酸素障害モデル動物の作製と解析

MTH1, OGG1, MUTYH, APEX2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樹立し、解析した。

##### a. パーキンソン病モデル

(1) 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浸透圧ポンプによる全身持続投与で、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。ロテノン投与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。

ロテノン投与後4週間目のマウスで自発運動の低下が認められ、さらにRotarod scoreの低値を認めるマウスでは、線条体におけるチロシン水酸化酵素 (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-oxoGを定量したところ、ロテノン投与後4週間目において小脳以外の脳組織で8-oxoG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。

(2) 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) 30mg/kgの1日1回、腹腔内連続投与(5日間)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。このモデルにおいては黒質緻密層と線条体におけるTH染色性の低下は顕著であるが、運動機能失調症状はほとんど観察されなかった。8-oxoGの蓄積を免疫染色法で検討したところ、ドパミン神経脱落が見

られる黒質緻密層のTH陽性細胞の核に有意に8-oxoGの蓄積が増加する事が観察され、MPTP投与によるドパミン神経細胞死に伴いゲノムDNAへの酸化損傷の蓄積が増加する事が初めて確認された。MTH1の発現を *In situ* hybridizationで観察したところ、黒質緻密層での発現が比較的高いレベルである事が確認された。MTH1欠損マウスにMPTPを同等に投与したところ、黒質緻密層と線条体におけるTH染色性の低下は野生型と同程度であった。8-oxoGの蓄積については、LC-MS/MSの解析から脳幹／中脳領域において野生型マウスより8-oxoGのレベルが高い傾向が見られた。

#### b. 筋萎縮性側索硬化症

ヒト変異 *SOD1* 遺伝子 (G93A) トランスジェニックマウス (米国Jackson Labより購入) と *OGG1*, MTH1欠損マウスへの交配により得られるマウスの生存率を解析したが、*OGG1*およびMTH1欠損による生存率の低下は観察されなかった。

#### c. アルツハイマー病

高島グループが樹立したヒト変異タウ遺伝子 (V337W) トランスジェニックマウスと *OGG1*欠損マウスの交配により得られるマウスを1年から1年半飼育中であるが、高島らが報告している高架式十字迷路による行動解析により野生型マウスとトランスジェニックマウスの差が観察されるに到っていないため、現在継続して観察を続けている。

#### d. 虚血再灌流障害

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-oxoG 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-oxoG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-oxoG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-oxoG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

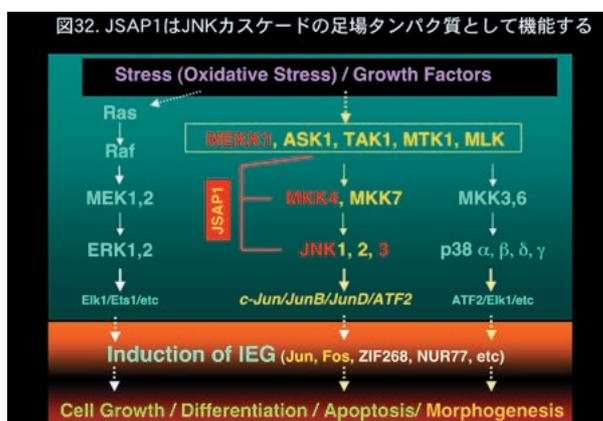
染色は、ミトコンドリアDNAへの8-oxoGの蓄積と考えられ、その蓄積は、I/R後6時間で最も著明で、OMの近位尿細管壊死に先行していた。リボヌクレアーゼプロテクションアッセイでは、*OGG1* mRNAは正常腎で高発現しており、I/R後3時間でOMの発現は減少し、1～7日後には皮質およびOMともに発現は回復し、さらに増加していた。*In situ* hybridizationでは、正常腎で*OGG1* mRNAは皮質よりOMの尿細管で高発現していたが、その発現はI/R後3時間には著しく減少した。以上のように、核DNAではなくミトコンドリアDNAにおける8-oxoGの蓄積が、*OGG1*の発現変動を伴った尿細管壊死に関与していると考えられる。

## II. 活性酸素による遺伝子発現制御に関わるシグナル伝達系と転写因子に関する研究

### A. JNK-JSAP1シグナル伝達系と初期発生

FosBや $\Delta$ FosB等のFosファミリータンパク質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。また、Junタンパク質は、ホモダイマーとしても転写活性化能を持ち、細胞機能の制御に重要な役割を持つ。

我々は、Junリン酸化酵素（JNK）のスキヤフォールドタンパク質として新規タンパク質JSAP1を同定した（図32）。JSAP1の生理的機能を明らかにする目的でマウス*Jsap1*遺伝子およびcDNAを単離しその構造を決定した。



#### a. JSAP1による初期発生の制御

*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。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すら得られておらず、*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*Jsap1*遺伝子欠損ES細胞株を高濃度のG418存在下で選択し、ホモ*Jsap1*遺伝子欠損ES細胞株を樹立した。これらES細胞株の*in vitro*初期発生系を確立し解析を進めた。

ES細胞は、*in vitro*培養系で胚様体の形成を経て内胚葉、中胚葉、外胚葉へと分化し、さらに培養条件を変える事で神経細胞や心筋細胞に分化する。JSAP1欠損ES細胞は未分化な状態で野生型よりも増殖速度が20%以上増加していたが、JSAP1欠損ES細胞では細胞増殖を促進する

ELK1の発現レベルが増加し、増殖を抑制的にコントロールするATF2の発現レベルが低下していた。JSAP1-JNKのシグナル伝達系の下流でELK1およびATF2の発現が制御されているようである（図33）。

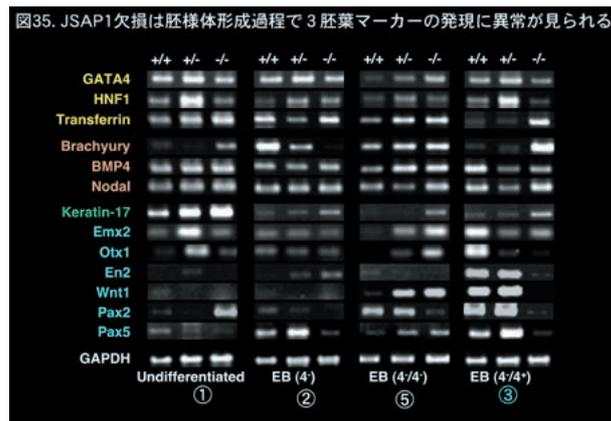
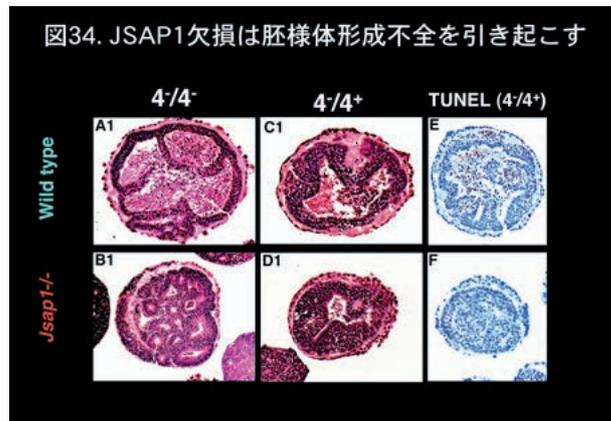
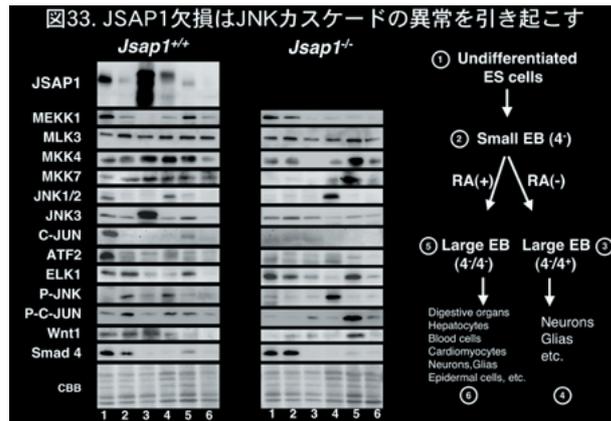
ES細胞の浮遊培養により胚様体が形成されるが、JSAP1欠損ES細胞から形成される胚様体は、モルフォ

ーゲンであるレチノイン酸の存在／非存在に関わらず、野生型より25%程度小さく、3胚葉の分化に異常が認められた。特に、 $\beta$ -tubulin IIIとWnt1の発現を伴う神経外胚葉が過剰分化している事が明らかになった（図34）。

JSAP1が欠損すると、中胚葉のマーカーであるBrachyuryの発現が初期胚様体で全く誘導されず、レチノイン酸処理で初めて発現すべき神経外胚葉マーカーがレチノイン酸非存在下に成長した後期の胚様体で高レベルで発現する（図35）。

この結果を反映して、JSAP1欠損胚様体からは、レチノイン酸未処理

に関わらず神経細胞が野生株よりも高頻度に分化した。通常、レチノイン酸非存在下で見られる心筋の分化は全く見られなかった。野生型のJSAP1cDNAをJSAP1欠損ES細胞に導入する事により、Brachyuryの発現と心筋分化がともに復帰する事から、JSAP1はBrachyuryの発現制御を介して中胚葉分化の決定に関わる事が示され



た。マウス胎仔の心臓および成獣の心臓でもJSAP1の発現は高く，分化以外の機能を持つ事が強く示唆される。

#### b. JSAP1による脳の初期発生と神経機能の制御

神経発生を考えた場合，JSAP1欠損ES胚様体から神経細胞が自然分化することから，JSAP1は神経前駆細胞の増殖と分化を抑制的に制御すると考えられる。しかしながら，レチノイン酸存在下では，野生型胚様体はJSAP1の発現誘導とアポトーシスを伴って神経外胚葉を形成するが，JSAP1欠損胚様体ではアポトーシスの誘導が見られず，神経外胚葉の形成不全が見られた（図36）。

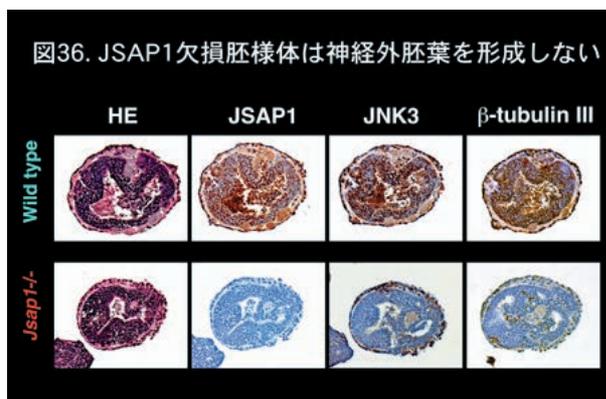


図36. JSAP1欠損胚様体は神経外胚葉を形成しない

レチノイン酸存在下で形成されたJSAP1欠損胚様体からの神経突起の伸長は、野生株の60%レベル以下までの低下していた。以上の結果は，JSAP1が神経細胞の分化と成熟を促進的に制御するシグナル伝達系に関わる事を示している（図37）。

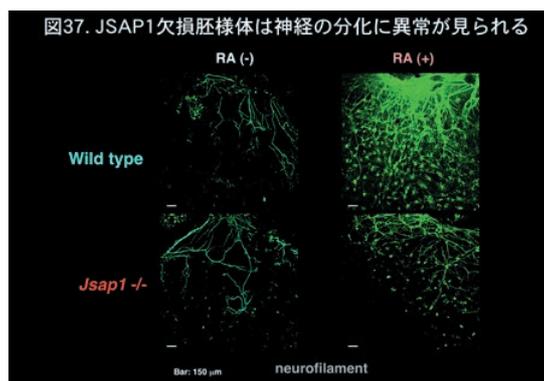


図37. JSAP1欠損胚様体は神経の分化に異常が見られる

レチノイン酸処理で誘導されるJSAP1はJNK3と会合しており，その下流のシグナル伝達系への制御によりアポトーシスと神経外胚葉の分化を制御すると考えられる。さらに，我々はレチノイン酸処理した胚様体から分化した神経の解析から，JSAP1は主に軸索の成長円錐と思われるNeuriteの先端，特に神経突起がシナプスを形成している部位に局在することを認めた（図38）。JSAP1欠損神経細胞では，シナプトフィジン抗体で検出されるシナプス小胞が細胞体に蓄積しており，軸索輸送に異常が見られる（図39）。

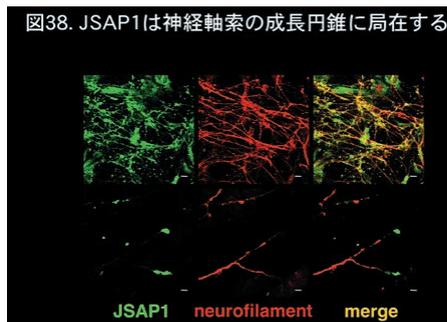


図38. JSAP1は神経軸索の成長円錐に局在する

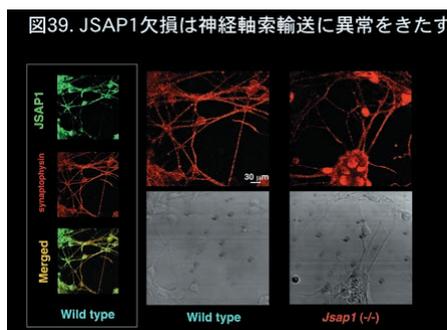
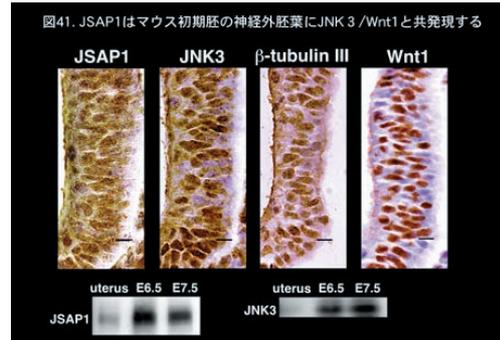
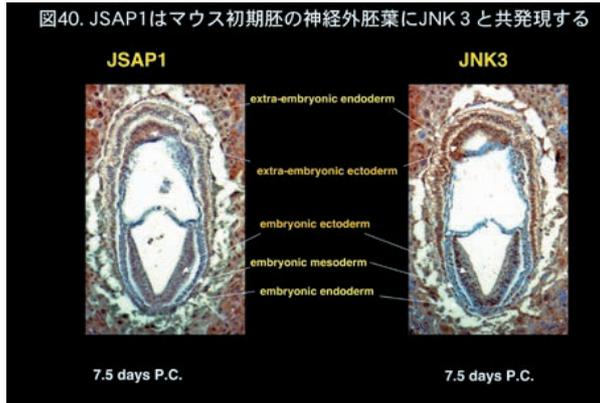
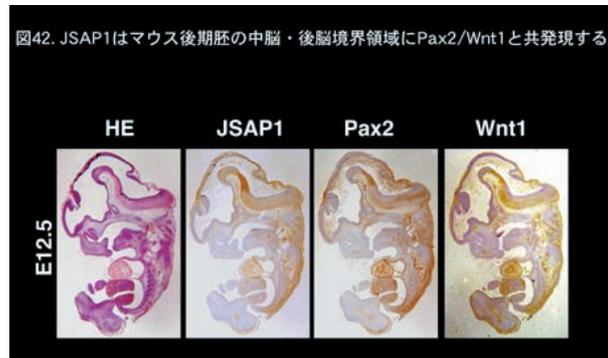


図39. JSAP1欠損は神経軸索輸送に異常をきたす

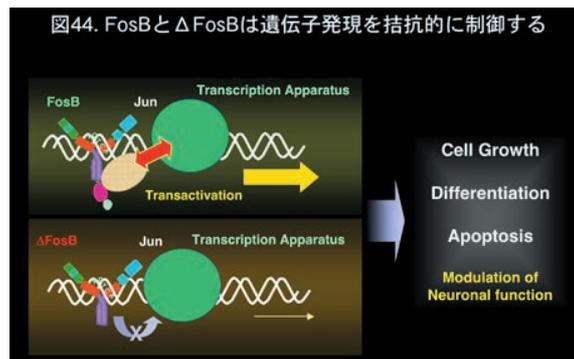
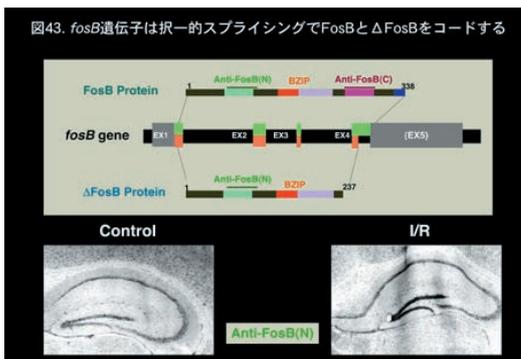


マウスの7.5日齢の初期胚の神経外胚葉では、JSAP1/JNK3/Wnt1の共発現が認められ(図40, 41), さらに12.5日齢のマウス胎仔では中脳/後脳境界領域でPax2とJSAP1が共発現している(図42)。以上の実験データから、我々はJSAP1は神経外胚葉の形成段階から脳の初期発生に必須であると考えている。



### B. ΔFosBによる細胞運命の制御機構の解明

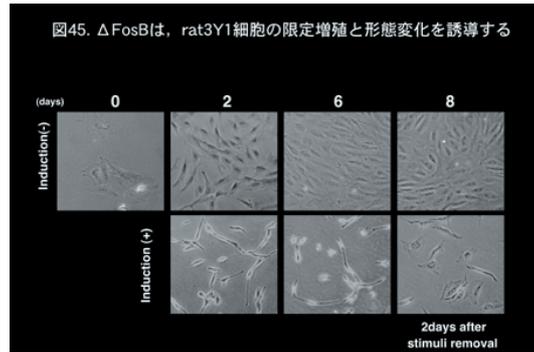
海馬の神経細胞はその領域によって虚血再灌流障害に対し異なる感受性を示す。歯状回やCA3の神経細胞は虚血後ほとんど脱落しないが、CA1の神経細胞は遅発性の細胞死に陥る。前初期遺伝子 *fosB* の発現は、虚血再灌流直後に歯状回やCA3で顕著に増加する(図43)。一方、CA1では細胞死の直前にその発現が増加する。*fosB* 遺伝子は、選択的スプライシングによりJunと協調して転写を活性化するFosBタンパク質と、Junの転写活性化をドミナントに抑制するΔFosBタンパク質をコードすることから、この2つの *fosB* 遺伝子産物が神経細胞の運命の決定に異なる役割を



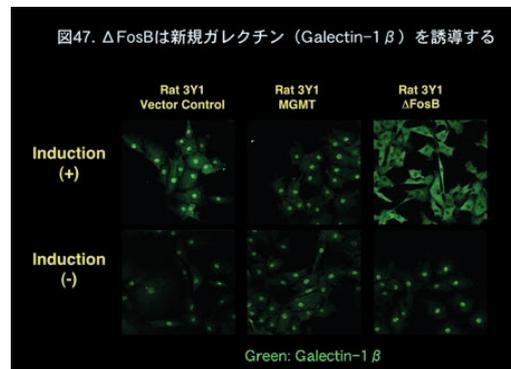
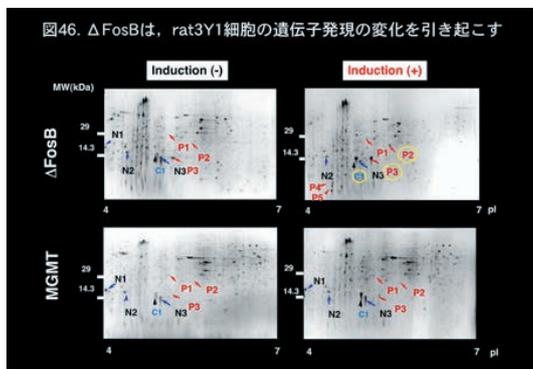
持つと仮定し（図44），2つのラット胚由来培養細胞株で *fosB* 遺伝子産物の機能解析を進め， $\Delta$ FosBタンパク質が細胞増殖・細胞分化・細胞死を制御する機能を持つことを見出した。また， $\Delta$ FosBの下流で発現が制御される分子として神経軸索伸長因子あるいは軸索再生因子として機能するGalectin-1を同定した。

a.  $\Delta$ FosB発現によるRat3Y1細胞の分化の制御機構の解析

$\Delta$ FosB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（図45）。FosB発現細胞でも同様の現象が観察されたが，その程度は $\Delta$ FosB発現細胞より軽度であった。2次元電気泳動法

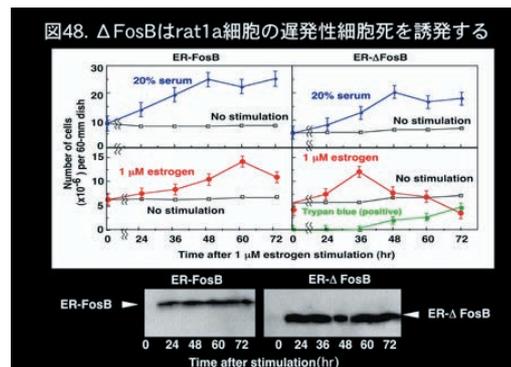


により $\Delta$ FosB誘導後に顕著に発現が変化したタンパク質を複数同定したところ，このうち2つのタンパク質が神経軸索伸長因子あるいは軸索再生因子として機能するGalectin-1とそのアミノ末端の7アミノ酸がプロセスされた新規アイソフォームであることが明らかになった（図46，47）。この新規アイソフォームをGalectin-1 $\beta$ ，従来の分子をGalectin-1 $\alpha$ と命名した。



b.  $\Delta$ FosB発現によるRat1a細胞の遅発性細胞死制御機構の解析

$\Delta$ 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（図48）。 $\Delta$ FosB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（図49）。よって、 $\Delta$ FosB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。

$\Delta$ FosBに依存した細胞増殖はサイクリン依存性キナーゼ1の特異的な阻害剤であるbutyrolactone Iで完全に抑制されたが、細胞死は全く抑制されなかった。

すなわち、 $\Delta$ 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。一方、細胞増殖そのものはGalectin-1のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびラクトースで抑制され、Galectin-1のレクチン活性に依存するものであった（図50）。

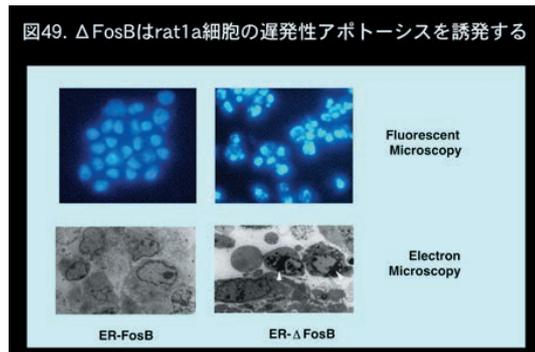


図49.  $\Delta$ FosBはrat1a細胞の遅発性アポトーシスを誘発する

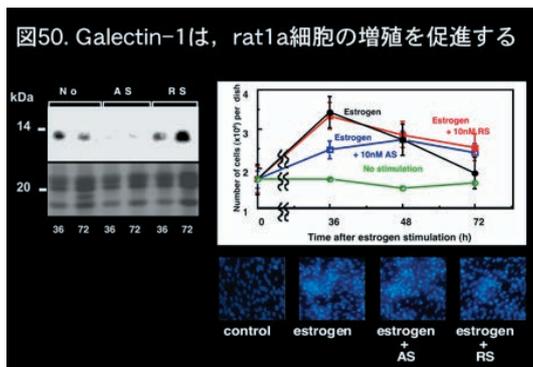


図50. Galectin-1は、rat1a細胞の増殖を促進する

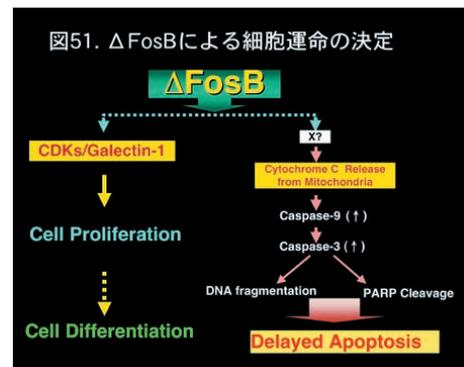


図51.  $\Delta$ FosBによる細胞運命の決定

$\Delta$ FosBによるアポトーシスは、チトクロームの細胞質への放出を伴い、Caspase-3及びCaspase-9の阻害剤の添加により阻害されたので、ミトコンドリアを介した経路で制御されることが示唆された（図51）。

### c. 前脳虚血による神経前駆細胞の活性化

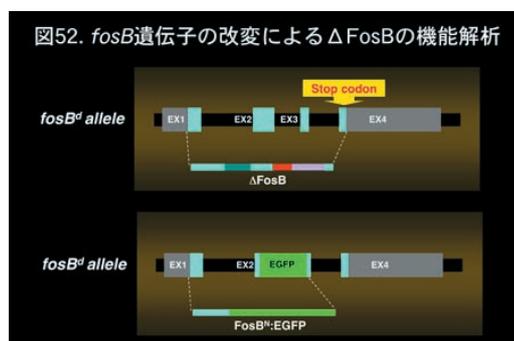
ラット両頸動脈結紮による前脳虚血・再灌流後の海馬におけるBrdU取り込みによるDNA複製細胞を検出したところ、コントロール群ではほとんど見られなかったDNA複製細胞が海馬歯状回において多数観察された。さらに、Galectin-1の発現を免疫染色法で検討したところ、DNA複製の観察された歯状回の神経細胞層の周辺領域で顕著な発現亢進を認めた。また、神経細胞死の見られるCA1領域でも発現亢進が認められた。これらの領域は、*fosB*遺伝子の発現が虚血再灌流後に亢進する領域と一致しており、培養細胞系で観察された $\Delta$ FosBの機能との関連性について、現在解析を進めている。

#### d. $\Delta$ FosBによるGalectin-1の発現制御

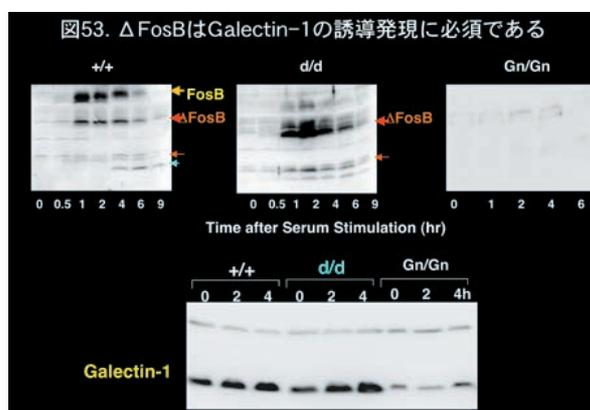
Galectin-1はGalectinファミリーに属する134アミノ酸からなるタンパク質であり、分子内に1つの糖結合部位を有している。その機能は、細胞間接着、T細胞アポトーシスの誘導、細胞増殖の制御、骨芽細胞や筋細胞の分化、pre-mRNAのスプライシング、嗅球におけるolfactory sensory neuronの軸索投射、末梢神経における軸索伸長などに関連しており非常に多様であることが報告されている。しかしながら、これまでその発現の制御機構についての解析はほとんど手つかずであった。我々は、転写因子群AP-1 familyの構成サブユニットのひとつである $\Delta$ FosBおよびFosBが、転写制御以外の経路でGalectin-1の発現を拮抗的に調節することを見出した。 $\Delta$ 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(図43, 44)。

$\Delta$ FosBとFosBの機能の違いを明らかにする目的で、FosBをコードするmRNAが

$\Delta$ FosBのみをコードするようにストップコドンをもつ2つ連続して導入した*fosB<sup>d</sup>*遺伝子座をホモに持つES細胞株、 $\Delta$ FosBとFosBのどちらも発現できない*fosB<sup>d</sup>*遺伝子座をホモに持つ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(図52)。



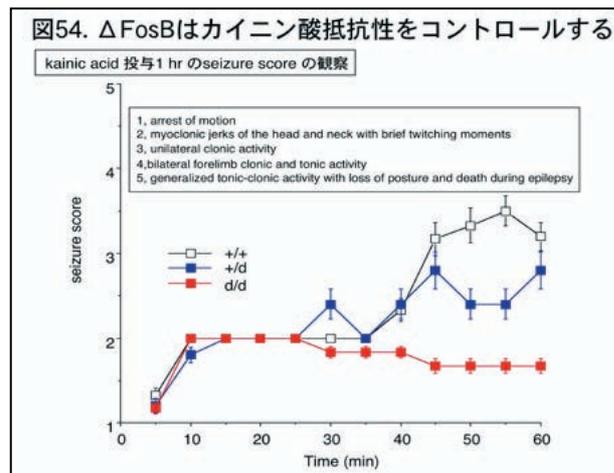
これらの細胞株でGalectin-1の発現誘導を比較解析したところ、Galectin-1の発現はmRNAレベルではほとんど変化がなく、タンパク質レベルで $\Delta$ FosBの発現量と正の相関性を示した。以上から、 $\Delta$ FosBが主としてGalectin-1タンパク質の合成、または分解を調節をすることでGalectin-1の発現量を制御する可能性が示唆された(図53)。



e.  $\Delta$ FosBによる脳機能の制御

*fosB*遺伝子を完全に欠損する *fosB*<sup>-/-</sup>マウス,  $\Delta$ FosBのみ発現するように  $\Delta$ FosBコーディング領域の直後にストップコドンをもつ2個導入した改変 *fosB*<sup>d/d</sup>遺伝子をヘテロ (*fosB*<sup>+/-</sup>), ホモ (*fosB*<sup>d/d</sup>) に持つマウスを樹立した。野生型マウス (雌, 8週令) に20 mg/kgから25 mg/kgのカイニン酸を腹腔内投与することにより, ほとんどのマウスに1時間程度継続するSeizure score 3~5の痙攣発作を誘発する条件を確立した。野生型マウスに痙攣発作を誘発する用量のカイニン酸を投与すると1週間内に海馬CA3領域の神経細胞がアポトーシスにより脱落する事をニッスル染色, TUNELアッセイにより確認した。また, このときCA3領域の神経細胞に8-oxoGが特異的に蓄積しており, 酸化ストレスが亢進している事が確認された。この条件でカイニン酸を投与されたマウスの海馬から核抽出液を調整し, Western blottingによりFosB,  $\Delta$ FosBが発現誘導される事を確認した。カイニン酸投与後2時間ですでに最大レベルのFosBが発現しており, 以後24時間後まで $\Delta$ FosBが発現がドミナントになる事が明らかになった。

野生型マウス, ヘテロ (*fosB*<sup>+/-</sup>), ホモ (*fosB*<sup>d/d</sup>) マウスへのカイニン酸投与後に誘発される痙攣発作をSeizure scoreに基づき比較したところ, 野生型マウスでは1時間以内に全身性の強直を伴う痙攣発作がほとんどのマウスに観察されたが, ヘテロ (*fosB*<sup>+/-</sup>), ホモ (*fosB*<sup>d/d</sup>) マウスの順に発作が軽減した (図54)。



ヘテロ (*fosB*<sup>+/-</sup>) マウスの海馬では, カイニン酸投与前から $\Delta$ FosBが発現がわずかながら検出され, カイニン酸処理2時間ではFosBと $\Delta$ FosBともに誘導されたが,  $\Delta$ FosBの発現レベルが数倍高かった。ホモ (*fosB*<sup>d/d</sup>) マウスの海馬では, カイニン酸投与前の $\Delta$ FosBの発現レベルがより高く, カイニン酸投与後には $\Delta$ FosBのみが野生型の10倍以上に及ぶレベルまで誘導され, かつその発現は長期間安定であった。カイニン酸レセプターのGluR6/7の抗体を用いたウエスタンブロッティングでは, 3つのマウス系統で発現の違いを見出せなかった。

*fosB*遺伝子完全欠損マウスや*c-fos*遺伝子欠損マウスでは, 野生型マウスよりもカイニン酸による痙攣発作に感受性が増す事が報告されている事から,  $\Delta$ FosBの高発現によりカイニン酸による痙攣発作に抵抗性を獲得すると考えられる。

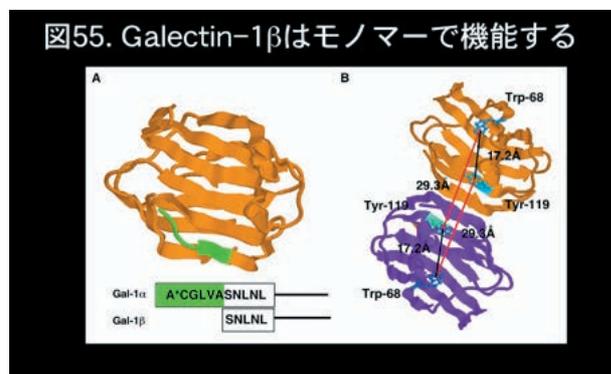
$\Delta$ FosBの発現がカイニン酸により誘導される事から、 $\Delta$ FosBが何らかの形で二次的な神経の興奮性を抑制的に制御している可能性が示唆された。

### C. Galectin-1に関する研究

#### a. Galectin-1の機能解析

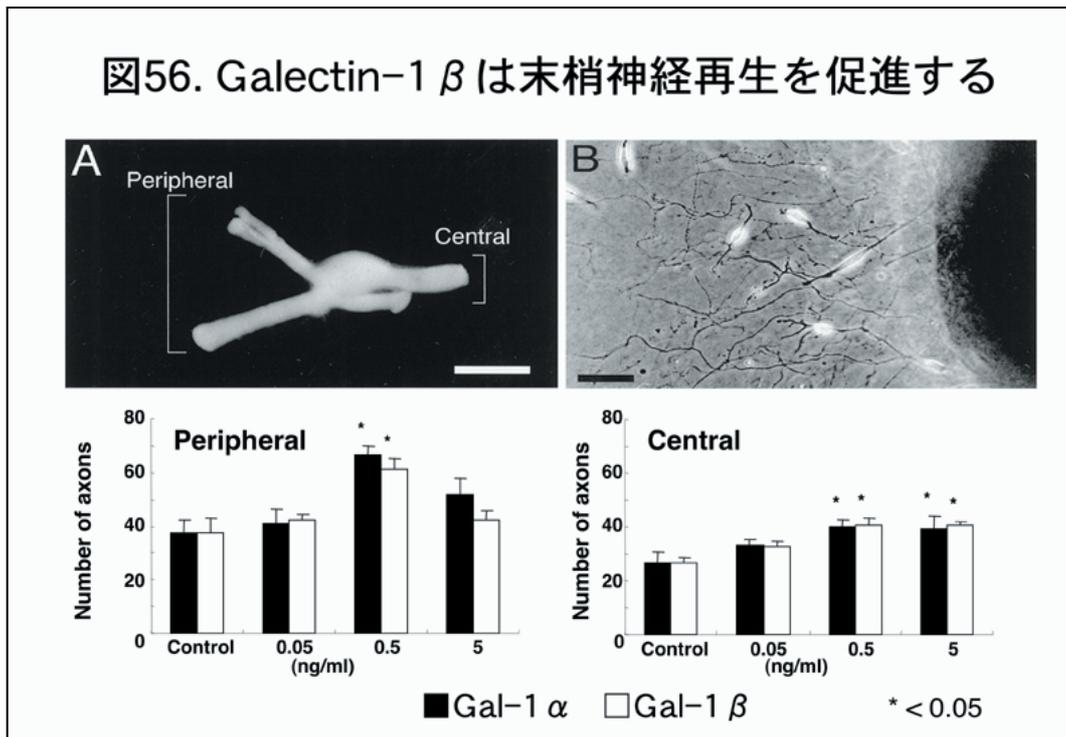
従来報告されていたGalectin-1(Galectin-1 $\alpha$ )は、分子量14.5kDaのタンパク質で、分子内に糖結合ドメインを1つ有し、濃度依存性にホモダイマーを形成することが報告されている。また、細胞間もしくは細胞-細胞外基質との接着や細胞周期の停止や細胞死を引き起こすなど細胞運命決定に関わったり、Rasシグナル伝達の調節やスプライシング機構への関与など、幅広い生物学的な役割を担っていることが報告されている。さらに最近では、酸化型のGalectin-1 $\alpha$ が、末梢神経切断端からの神経軸索の伸長を促進する活性を有することが報告され注目を集めている。

我々は、新規に見出したGalectin-1 $\beta$ の生物学的な役割を明らかにする目的で研究を進めているが、まずGalectin-1 $\alpha$ 、およびGalectin-1 $\beta$ の生化学的な特徴の違いを解析するためにマウスリコンビナントタンパク質の発現・精製を行った。いずれのリコンビナントタンパク質もラクトースを用いたアフィニティー精製が可能であり、精製リコンビナントmGalectin-1 $\alpha$  (rmGal-1 $\alpha$ ) およびリコンビナントmGalectin-1 $\beta$  (rmGal-1 $\beta$ ) のSDS-PAGE上の分子量は、それぞれ14.5kDaおよび14.3kDaであった。rmGal-1 $\alpha$ 、 $\beta$ のCDスペクトルおよび蛍光スペクトル解析より、rmGal-1 $\beta$ が2次構造レベルでrmGal-1 $\alpha$ と類似した構造を維持していることが確認できたが、rmGal-1 $\beta$ は糖結合能および二量体形成能いずれにおいてもrmGal-1 $\alpha$ よりも低下していた。また、従来濃度依存性にモノマー/ダイマー平衡を取ると報告されていたrmGal- $\alpha$ についてモノマー/ダイマー平衡を制御するファクターを検討した結果、濃度ではなく酸化/還元によりモノマー/ダイマー平衡が決定される事を明らかにした。還元型でダイマーとなったrmGal-1 $\alpha$ は酸化されて初めてモノマーとなるが、rmGal-1 $\beta$ は酸化還元に関わらずモノマーとして存在する(図55)。



次に、我々は、以上の生化学的な性質が生物学的な活性に与える影響を検証す

るために、Jurkat細胞のviabilityを低下させる活性、および障害末梢神経からの軸索再生活性に関してrmGal-1  $\alpha$ ,  $\beta$ の影響を調べた。その結果、rmGal-1 $\beta$ はJurkat細胞のviabilityを低下させる活性がrmGal-1  $\alpha$ に比較して非常に低いにもかかわらず、脊髄後根神経節の切断端からの軸索再生活性に関しては、rmGal-1  $\alpha$ とほぼ同程度を有していることが分かった（図56）。rmGal-1  $\beta$ は、神経再生因子としてはrmGal-1  $\alpha$ より細胞毒性が低く、安全な神経再生因子として応用が期待される。



#### b. Galectin-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、Galectin-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（8 mg/kg）を静脈内投与することにより腎臓の髓外髓質を中心に尿細管間質障害を認めた。主に近位尿細管のネクロシスが顕著であった。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回復していた。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。Galectin-1の免疫組織染色では、正常腎でGalectin-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、障害が顕著である髓外髓質の尿細管周囲の間質にGalectin-1発現細胞が増加していた。培養腎臓細胞へ酸化型リコンビナン

トhGalectin-1 $\alpha$  (rhGal-1 $\alpha$ /ox) を投与したところ、細胞増殖が20%程度活性化された。以上から、Galectin-1は、障害を受けた組織の再生を促進する機能を持つ可能性が示唆される。

#### D. 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、転写の伸長相に作用してPol 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た。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

### I. 活性酸素によるゲノム損傷の分子実体とその防御機構

活性酸素によるゲノム損傷に関する研究は、従来から老化と発がんの観点から国内外を問わず、活発な研究が進められている。我々が取り組んでいる *MTH1*, *OGG1*, *MUTYH*, *APEX2*, *NEIL3*, *ITPA* 遺伝子の中で *OGG1* については、日本で我々を含めて2つのグループ、米国、英国でそれぞれ1つのグループがノックアウトマウスを樹立し、発がんに注目した研究を進めている。*MUTYH* については、我々以外に米国のグループがノックアウトマウスの樹立を進めているが、まだ報告はない。*MTH1*, *APEX2*, *NEIL3*, *ITPA* については、その基礎研究からノックアウトマウスの樹立まで我々が世界の研究をリードしている。我々の研究対象は、「脳・神経細胞における核酸の酸化損傷」であるが、国外において「脳・神経細胞における核酸の酸化損傷およびその防御機構」に注目して研究を進めているグループはまだ数少なく、この研究分野そのものがまだ確立されていないのが現状である。国内では、我々以外には大阪大学の故畠中教授のグループがヌクレオチド除去修復遺伝子欠損の遺伝病である色素性乾皮症における小脳変性を中心に研究を進めているだけであったが、最近国内の2つのグループ（鳥取大学、大阪大学）から、アルツハイマー病に関して、我々のグループに共同研究の申し込みが有り、国内においてもこの分野の研究の重要性が認識されつつある。また、最近になってアルツハイマー病やパーキンソン病等における8-オキシグアニンの蓄積が複数の米国のグループからも報告され、我々の観察が確認されつつある。

今後は、「核酸の酸化損傷と神経変性の因果関係」を明らかにすることが重要な課題であり、我々の研究課題はまさにこれを目指すものである。

### II. 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

成人における神経前駆細胞の存在は、今日では広く国際的に認知された事実である。現在の研究の動向は、神経変性疾患患者への移植を目指した神経前駆細胞の分離と *in vitro* 培養系の確立が主要なものであり、国内においても複数の研究グループが世界をリードする研究を展開している。

我々は、損傷を受けた脳組織の機能回復を目的として、損傷部位の周囲組織に存在する神経前駆細胞の増殖・分化を活性化することにより新たな神経細胞供給の可能性を追求している。このような立場から神経前駆細胞の研究を進めているグループは、我々以外にはこれまでのところ国内外とも存在しないようである。

我々は、すでに虚血再灌流障害を受けたラット脳の海馬歯状回において  $\Delta$ FosB と神経軸索伸長・再生因子 (Galectin-1) の誘導とともに顕著なDNA複製の誘導を

見出しており，このような神経細胞あるいはその前駆体細胞における複製活性化の新たなメカニズムを解明することにより，損傷を受けた脳組織における新たな神経細胞供給の可能性を追求できると考えている。

JSAP1に関しては，国内国外ともに，線虫やショウジョウバエを用いた研究からストレス応答のシグナル伝達と軸索輸送の調節における役割が明らかにされつつある。しかし，神経前駆細胞の増殖・分化に注目した研究はまだ報告がない。線虫やショウジョウバエと異なりJSAP1の完全欠損マウスは樹立できないことから，JSAP1の個体レベルで機能解析は不可能な状況である。このような状況で，我々はES細胞からの初期発生系を確立して研究を進め，JSAP1が初期胚の段階で神経細胞の分化を抑制することを明らかにした。この研究は，神経前駆細胞の増殖・分化の新たな制御機構の存在を示したものと位置付けている。

### 3. 2 岩城グループ

#### (1) 研究内容及び成果

脳・神経細胞における酸化障害とその防御機構の解明を目指して、主要な酸化DNA損傷である8-オキソグアニン (8-oxoG) や2-ヒドロキシアデニン (2-OH-A) の修復に関わるヒトhOGG1 (8-oxoG DNAグリコシラーゼ)と酸化ヌクレオチドを分解するhMTH1 (酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素) の神経変性疾患を中心とした様々な脳神経疾患における発現と機能解析を進めることを目的として研究を行った。

#### I. 正常脳およびアルツハイマー病患者脳

アルツハイマー病における酸化傷害の関与を研究する目的で、まずhMTH1について正常脳9症例の海馬における発現パターンを免疫組織化学染色法で調べた。その結果、海馬CA3の透明層stratum lucidumにhMTH1が豊富に分布していることを発見した。この部位は歯状回の顆粒ニューロンの軸索であるmossy fiberのシナプス終末が集積している場所であり、その神経伝達物質としてグルタミン酸が働いている。生理的な状態では酸化ヌクレオシドによる障害から海馬を保護する役割をhMTH1が担っているものと考えられる (図57)。

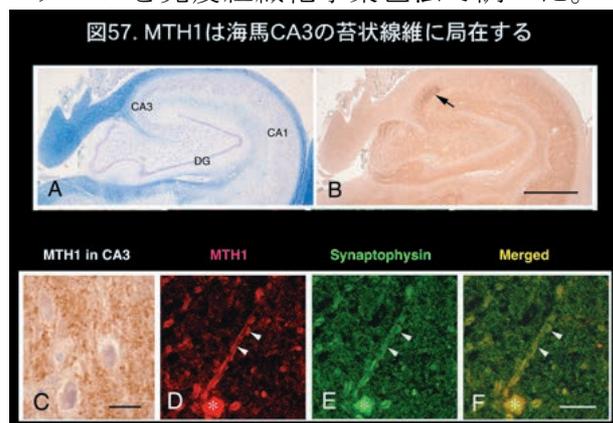


図57. MTH1は海馬CA3の苔状線維に局在する

アルツハイマー病 (8例) ではこの海馬CA3の透明層におけるhMTH1の発現が統計学的にも有意に減少していた。一方、嗅内皮質ではhMTH1の発現が亢進しており、老人斑や白質のオリゴデンドロサイトや反応性アストロサイトにもhMTH1の発現がみられた。このことからhMTH1の発現を調べることによって、アルツハイマー病で酸化ストレスが生じていることの間接的な証拠を得ることができると同時に、アルツハイマー病ではhMTH1の発現制御が部位によって異なることを

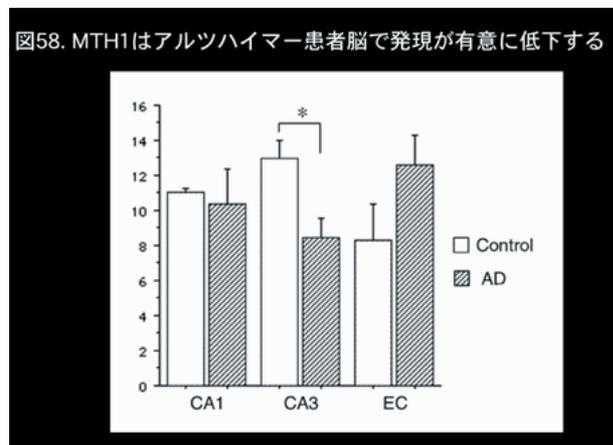
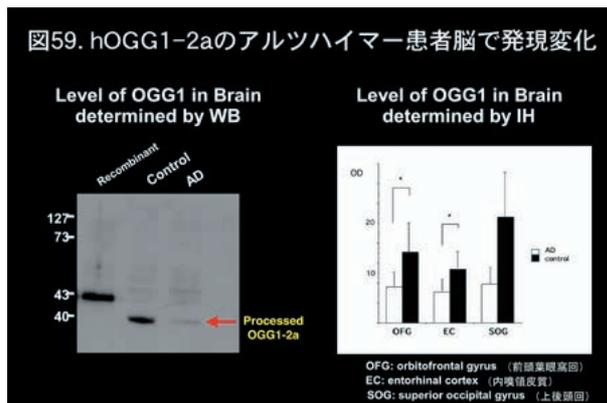


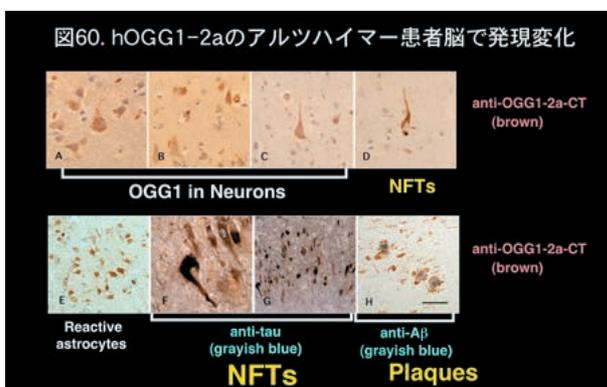
図58. MTH1はアルツハイマー患者脳で発現が有意に低下する

明らかにした (図 5 8)。

次にhOGG1特に、そのミトコンドリア移行型hOGG1 (hOGG1-2a) について特異抗体を用いた免疫組織化学的研究を行った。hOGG1-2aは主に神経細胞の胞体に分布しており、その発現強度は脳の部位によって異なっていた。アルツハイマー病では前頭葉底面の眼窩回と嗅内皮質の神経細胞で発現が低下していた (図 5 9)。



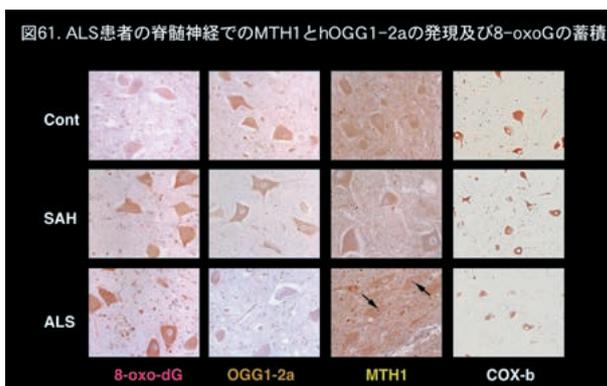
さらにアルツハイマー病では神経原線維変化や変性神経突起および反応性アストロサイトにhOGG1-2aの集積がみられた。このことからミトコンドリアDNAにおける酸化損傷を修復する酵素がアルツハイマー病では適切に機能していないと考えられ、ミトコンドリアDNAにおける酸化損傷がアルツハイマー病の病態形成に関与していることが示唆された (図 6 0)。



他の変性疾患にみられる神経原線維変化の形成にも酸化傷害が関与している可能性を検証するために、進行性核上性麻痺におけるhOGG1-2aの発現を免疫組織化学染色法にて検討した。その結果、アルツハイマー病と同様、神経原線維変化にhOGG1-2aの蓄積が選択的に生じていることをみとめた(未発表)。

## II. 筋萎縮性側索硬化症およびくも膜下出血

酸化ストレスは筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の重要な病因の1つである。孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 7例、くも膜下出血 (SAH) 4例および正常対照4例の脊髄運動ニューロンに関して、8-oxoGならびにその修復酵素であるミトコンドリア移行型hOGG1 (hOGG1-2a) お



よびhMTH1の発現を免疫組織化学的に検討した。ALSおよびSAH症例では、8-oxoGの強い染色性が見られた。hOGG1-2aは、SAHではミトコンドリア様に強く発現したが、ALSではその染色性が低下していた。またALSでは、運動ニューロンの核内にhMTH1の集積を認めた(図6 1)。ALSではDNA酸化傷害に対するミトコンドリアの機能異常が生じていることが示唆された。

### III. prion病

prion病における神経細胞死の機序は不明であり、異常アミロイドタンパク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*遺伝子欠損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。マウスは中別府研から供給を受けた。結果は*Mth1*<sup>+/+</sup>: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(未発表)。

### IV. 脳腫瘍

脳腫瘍50症例について8-oxoGの蓄積ならびにhMTH1の発現を検討した。その結果、全症例の腫瘍細胞の核に8-oxoGの蓄積がみられ、hMTH1の発現もほとんどの症例の腫瘍細胞の核と細胞質に認められた。さらにこれらの所見はグリオーマにより悪性度の高い症例で顕著であり、酸化ストレスがグリオーマの悪性転化に関与していることが示唆された。

### V. グリア細胞

以上の研究が神経細胞を主な研究対象としてきたので、グリア細胞における酸化ストレスに対するこれらの酵素の発現誘導を検討した。酸化ストレス関連酵素であるhOGG1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が細胞質のみならず核にも蓄積していた。反応性アストロサイトにおけるhMTH1の発現はhOGG1-2aと比べると程度は軽かった。*in vitro*の酸化ストレスの実験としてグリオーマ細胞にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を投与するとhMTH1の急速な発現亢進が観察されたが、hOGG1-2aはむしろ構成的な発現パターンを示し、急速な発現変化はみられなかつ

た。アストロサイトーシスは組織障害に対するアストロサイトの連続的な形態変化であり、この過程でアストロサイトは酸化障害から神経細胞を保護する能力を高めるために様々な抗酸化機構を亢進する。反応性アストロサイトにおけるこれらの酵素タンパクの発現亢進は酸化ストレスによる核酸損傷に対する適応能力も有していることを示している。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明らかな変化はみとめられなかった。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

活性酸素による細胞の機能異常は修復不能なレベルではアポトーシスという形で短時間のうちに細胞死を生じるため、長い経過を示す神経変性疾患における酸化損傷の影響を評価することは容易ではない。これまでの我々の研究によってhOGG1やhMTH1等の核酸の酸化損傷に関わる修復酵素を指標にして、その影響を検討することが可能であることを示してきた。ヒト剖検材料によって得られたこれらの知見を遺伝子改変マウスで検証する試みが、中別府グループで進行している。

### 3. 3 高島グループ

#### (1) 研究内容及び成果

アルツハイマー病は、脳血管性痴呆と並ぶ代表的な老人性痴呆疾患の1つである。この病気は、進行に伴って記憶認知障害を引き起こし、末期には高度の痴呆状態となる。当研究グループでは、痴呆症の原因となっている神経変性、すなわち神経細胞死や神経原線維変化の成因を明らかにする目的で、変異タウ遺伝子を用いて動物モデルの作製を行った。FTDP17変異のうち、アミノ酸V337M変異を持つヒトタウcDNAを用いてトランスジェニックマウスを作製し解析した。このcDNAをPDGFプロモーターの下流につなぎ、5-10コピー遺伝子導入したトランスジェニックマウスを3ライン確立した。タンパク質の発現量は内在性タウに対して1/10程度であった。発現部位は海馬および大脳皮質のいくつかの領域の神経細胞に限局されていた。これらの神経細胞は、リン酸化タウ抗体、ユビキチン抗体に陽性に染色され、神経原線維変化の1つの目安であるPHF-epitopeを有していることが明らかになった。さらに、ガリアス銀染色では、これらの神経細胞が特異的に染色され、これらの神経細胞ではタウタンパクが凝集していることが示された。一方、神経原線維変化は、タウタンパクが $\beta$ -シート構造をとった繊維状となっていることを示すため、Congo red染色を行い偏光顕微鏡で観察したところ、4ヶ月齢では複屈折性は見いだされなかったが、10ヶ月令では複屈折性を持つ神経細胞が海馬大脳皮質に多数観察されるようになった。FTDP17変異を持たないタウのトランスジェニックマウスでは、これらの所見は見いだせなかった。すなわち、FTDP17変異特異的に加齢によって神経原線維変化を示すマウスを作製することに成功した。この神経原線維は、電顕で観察すると直径約15nmのstraight filamentと呼ばれる構造をした繊維であることが判明した。行動学的検討を行ったところ、高架式十字迷路を用いた実験で神経原線維が生じる10ヶ月令で野生型マウスと比べて有意な異常を示した。このことは、神経原線維変化形成が神経機構に何らかの異常を示した結果であると推測された。

このマウスをOGG1ヘテロ欠損マウスと交配し、中別府グループに供給した。

#### (2) 研究成果の今後期待される効果

変異型タウトランスジェニックマウスで見られる神経原線維変化が酸化ストレスを亢進するのか、また神経変性にどのように関わるのかなどの問題の解明に役に立つモデル動物として多方面からのアプローチが期待される。

### 3. 4 光本グループ

#### (1) 研究内容及び成果

パーキンソン病は黒質線条体系ドパミン作動性神経細胞の変性を主病変とする進行性の神経変性疾患である。その病因は不明であるがパーキンソン病と同様の神経症状をヒトで引き起こす神経毒、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の活性代謝物である1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)の作用点から、ミトコンドリア機能障害とそれに引き続く酸化ストレスが本疾患のドパミン神経細胞死に深く関わっていると考えられている。本研究ではMPTPドパミン神経毒性において神経細胞の変性に先立って起こるミトコンドリア機能異常をMPP<sup>+</sup>注入ラット線条体で検証した。またMPTP処置マウスモデルにおいて、ドパミン神経変性に伴う行動異常の検出系を確立した。

#### I. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)によるラット線条体のミトコンドリア機能障害

MPP<sup>+</sup> (10-80 nmol/Striatum)注入18時間後のシナプトソームにおけるミトコンドリア酸化還元活性と膜電位は、Alamar BlueとJC-1蛍光色素を用いた検討より、MPP<sup>+</sup>の注入量に依存して減少した。その時、抗チロシン水酸化酵素抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、MPP<sup>+</sup>は、線条体チロシン水酸化酵素タンパク量に対してほとんど影響を与えず、MPP<sup>+</sup>処置7日後のチロシン水酸化酵素タンパク量は減少することを確認した。また、40 nmol MPP<sup>+</sup>によるミトコンドリア酸化還元活性、膜電位およびチロシン水酸化酵素タンパク量の低下は、選択的ドパミン取り込み阻害剤GBR-12909の投与によりほぼ完全に抑制された。これらのことから、同用量のMPP<sup>+</sup>によるミトコンドリア機能障害はドパミン作動性神経終末に起因するものと考えられ、ミトコンドリア酸化還元活性の低下とおそらくそれに引き続いて起こるミトコンドリア内膜の脱分極が、線条体ドパミン作動性神経終末の変性に先立って誘導されることが示唆された。

#### II. 尾懸垂試験を用いたMPTP誘発パーキンソン病モデルマウスの行動評価

C57BL/6雄性マウスにMPTP処置 (20 mg/kg, i. p. x 4) 3日後において、コントロール群に比べ、MPTPマウスの自発運動量に変化は見られなかったが、尾懸垂試験では有意な無動時間の延長を認めた。また、線条体におけるドパミン及びセロトニン含量は有意な低下していた。これらの行動学的、神経化学的变化は、塩酸セレギリン (2.5 mg/kg, i. p.) を前処置することにより完全に抑制された。以上

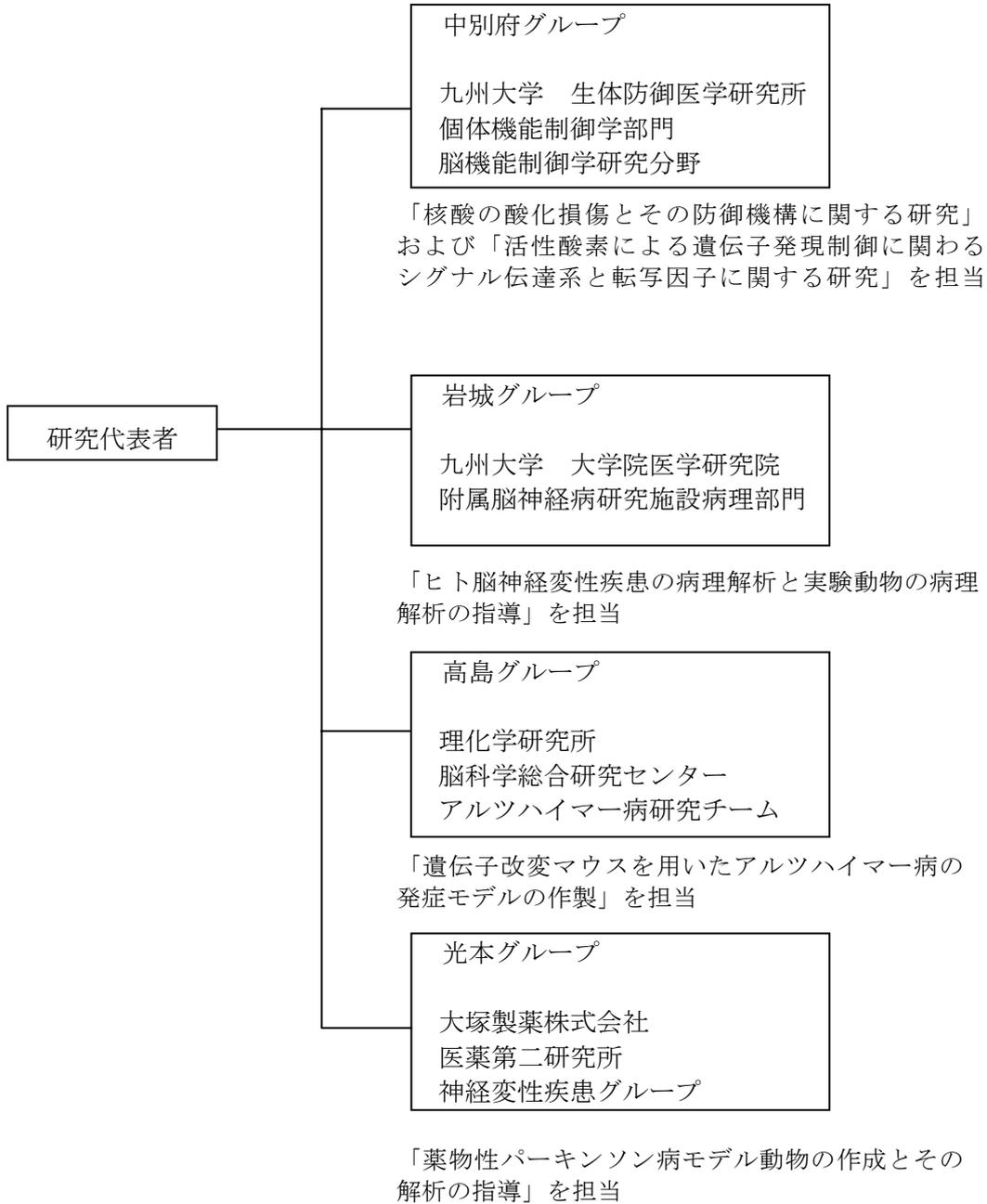
の結果から、尾懸垂試験においてMPTPマウスで観察された無動時間延長は、モノアミン含量低下によるものであり、同試験系がMPTPマウスの新規な行動評価系になり得る可能性が示唆された。

(2)研究成果の今後期待される効果

尾懸垂試験を用いたパーキンソン病モデルマウスの行動評価系が、OGG1やMTH1などの防御遺伝子欠損マウスのMPTP感受性の評価系として有用である事が期待される。

#### 4. 研究実施体制

##### (1) 体制



## (2)メンバー表

## 研究グループ名：中別府グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
中別府 雄作	九大・生医研	教授	総括	H10.12～H15.11	
古市 正人	九大・生医研	助手	DNA 損傷の生化学	H10.12～H15.11	
作見 邦彦	九大・生医研	助手	疾患モデル作成・解析	H10.12～H15.11	
富永 洋平	九大・生医研	助手	DNA 修復の生化学	H10.12～H.14.8	
山口 浩雄	九大・生医研	研究生	疾患モデル解析	H12.4～H15.11	
松山 朱美	九大・生医研	技術補助員	マウスの飼育補助	H10.12～H15.11	
許 萍	事業団	研究員	JSAP1 機能解析	H10.12～H15.11	
土本 大介	事業団	研究員	修復欠損マウスの解析	H10.12～H15.11	
大野 みずき	事業団	技術員	DNA 損傷の細胞生物学	H12.4～H15.11	
常岡 倫子	事業団	事務員	事務担当	H10.12～H15.3	
青木 奈緒	事業団	技術員	マウスの維持管理	H11.4～H12.9	
足立 尚美	事業団	研究補助員	DNA 損傷の定量解析	H11.4～H15.11	
北村 節子	事業団	研究補助員	病理解析の補助	H13.4～H15.11	
相浦 圭伊子	事業団	事務員	事務担当	H14.7～H15.11	
西岡 憲一	九大・大学院	大学院生	DNA 修復の生化学	H10.12～H11.3	
西岡 智子	九大・大学院	大学院生	FosB/ $\Delta$ FosB 機能解析	H10.12～H12.3	
今磯 泰幸	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H10.12～H11.7	
大西 克典	九大・生医研	研究生	fosB 欠損マウス解析	H10.12～H15.11	
井手 康人	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H10.12～H15.3	
酒井 康成	九大・大学院	大学院生	DNA 修復の生化学	H10.12～H14.3	
田原 一樹	九大・大学院	大学院生	FosB/ $\Delta$ FosB 機能解析	H10.12～H14.3	
平野 世紀	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H10.12～H15.3	
一戸 晶元	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H11.4～H15.11	
吉村 大輔	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H12.4～H15.11	
三浦 智史	九大・大学院	大学院生	ガレクチン-1 機能解析	H12.4～H15.11	
久留島 秀朗	九大・大学院	大学院生	虚血モデルの解析	H12.4～H15.11	
山崎 勝久	九大・生医研	研究学生	転写遺伝子解析	H12.4～H14.7	
Mehrdad Behmanesh	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H12.10～H15.11	
鳥巢 久美子	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H13.4～H15.11	
大西 陽子	九大・大学院	大学院生	Jun/ATF の機能解析	H13.4～H15.11	
岡 素雅子	九大・大学院	大学院生	修復遺伝子の解析	H13.9～H15.11	
梶谷 康介	九大・大学院	大学院生	神経興奮毒性の解析	H14.4～H15.11	
牛島 泰宏	九大・大学院	大学院生	修復酵素の機能解析	H14.4～H15.11	

太田 詠子	九大・大学院	大学院生	神経保護分子の解析	H15. 4～H15. 11	
段 由規彦	九大・大学院	大学院生	疾患モデル解析	H15. 4～H15. 11	
市川 淳二	九大・大学院	大学院生	疾患モデル解析	H15. 4～H15. 11	
善岡 克次	金沢大学	教授	JSAP1 の機能解析指導	H13. 4～H15. 11	

**研究グループ名：岩城グループ**

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
岩城 徹	九大・大学院	教授	神経病理学的解析の指導	H10. 12～H15. 11	
堂浦 克美	九大・大学院	助手	神経病理学的解析の指導	H10. 12～H15. 8	
鈴木 諭	九大・大学院	助手	神経病理学的解析の指導	H10. 12～H15. 11	
菊池 仁志	九大・大学院	大学院生	DNA 修復の病理	H10. 12～H12. 3	
畑中 一恵	九大・医	技官	病理標本作製	H10. 12～H12. 3	
別府 一美	九大・医	事務補佐	研究室事務	H10. 12～H12. 3	
古田 晶子	九大・大学院	助手	神経変性疾患と酸化ストレス	H10. 12～H15. 3	
飯田 崇	九大・大学院	大学院生	神経変性疾患と酸化ストレス	H12. 4～H15. 3	
脇坂 義信	九大・大学院	大学院生	低酸素性虚血性脳症と酸化ストレス	H13. 4～H15. 3	

**研究グループ名：高島グループ**

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
高島 明彦	理化学研究所	チームリーダー	Tg マウス作成と供給	H10. 12～H15. 11	
村山 洋	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H10. 12～H15. 3	
孫 小燕	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H10. 12～H15. 3	
村山美由紀	理化学研究所	テクニカルスタッフ	Tg マウス作成と解析	H10. 12～H15. 3	
菊池 尚美	理化学研究所	テクニカルスタッフ	Tg マウス作成と解析	H10. 12～H15. 3	
楯林 義孝	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H13. 4～H15. 3	
種村健太郎	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H13. 4～H15. 3	
宮坂 知宏	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H13. 4～H15. 3	
崔 得華	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H13. 4～H15. 3	
中尾 忍	理化学研究所	テクニカルスタッフ	Tg マウス作成と解析	H13. 4～H15. 3	
朴 正美	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H14. 4～H15. 3	
溝呂木達也	理化学研究所	研究員	Tg マウス作成と解析	H14. 4～H15. 3	

研究グループ名：光本グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
菊地幹雄	大塚製薬(株)	グループリーダー	総括	H10.12～H11.3	
光本泰秀	大塚製薬(株)	グループリーダー	ミトコンドリア毒素と 神経細胞傷害の解析	H10.12～H15.11	
中井正三	大塚製薬(株)	研究員	MPTP マウス/ラットモ デルの作成・解析	H13.4～H15.11	
森 厚詞	大塚製薬(株)	研究員	MPTP マウス/ラットモ デルの作成・解析	H13.4～H15.11	

## 5. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成10年 12月22日	岩城グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	7名	ヒト脳神経変性疾患患者の脳標本の解析の打ち合わせ
平成11年 3月19日	高島グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	6名	トランスジェニックマウス作製についての打ち合わせ
平成11年 9月28日	岩城グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	7名	ヒト脳・脊髄組織標の解析についての打ち合わせ
平成11年 10月5日	岩城グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	2名	ヒト脳・脊髄組織標の解析についての打ち合わせ
平成11年 10月7日	高島グループとの打ち合わせ	理化学研究所脳総合科学研究センター	4名	トランスジェニックマウス作製についての打ち合わせ
平成11年 12月24日	岩城グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	4名	ヒト脳・脊髄組織標の解析についての打ち合わせ
平成11年 12月9日	高島グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	6名	トランスジェニックマウスの戻し交配についての打ち合わせ
平成12年 3月25日	岩城グループとの打ち合わせ	九州大学生体防御医学研究所	2名	ヒト脳・脊髄組織標の解析についての打ち合わせ
平成12年 1月28日	高島グループとの打ち合わせ	理化学研究所脳総合科学研究センター	2名	トランスジェニックマウスの解析について打ち合わせ
平成12年 7月17～18日	プログレスレポート及び研究方針の検討	九州大学医学部附属図書館会議室	25名	各研究員および大学院生の研究進捗状況の説明(各30分)と討論
平成12年 9月6～7日	MPTPによるパーキンソン病モデルの作成指導	九州大学生体防御医学研究所	25名	光本泰秀博士(大塚製薬株式会社)による研究発表と討論および研究指導

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成12年 11月20 ～21日	研究報告会	九州大学医学部附属図書館会議室	7名	各研究員および大学院生の研究進捗状況の説明(各30分)と討論
平成13年4 月9日～10 日	研究報告会	九州大学コラボステーション	22名	研究進捗状況の報告と今後の方針を議論
平成13年8 月6日～8 日	研究報告会	九州大学コラボステーション	22名	研究進捗状況の報告と今後の方針を議論
平成13年 10月8日	研究打ち合わせ	金沢大学がん研究所	2名	JSAP1 研究について現状報告と今後の方針を議論
平成13年 11月26日 ～28日	研究報告会	九州大学コラボステーション	23名	研究進捗状況の報告と今後の方針を議論
平成13年 12月12日	研究打ち合わせ	横浜国際会議場	2名	JSAP1 研究について現状報告と今後の方針を議論
平成14年3 月2日	研究打ち合わせ	九州大学コラボステーション	5名	JSAP1 研究について現状報告と今後の方針を議論
平成14年4 月14～16日	研究報告会	九州大学コラボステーション	20名	過去4ヶ月の進捗状況の報告と今後の進め方を検討
平成14年6 月19日	学術セミナー	九州大学生体防御医学研究所	50名	真木寿治博士による「染色体異常と細胞死」に関するセミナー
平成14年6 月24日	学術セミナー	九州大学コラボステーション	50名	赤池孝章博士による「炎症病態におけるニトロ化とニトロ化ストレス」に関するセミナー
平成14年8 月5～6日	研究報告会	九州大学コラボステーション	20名	過去4ヶ月の進捗状況の報告と今後の進め方を検討
平成14年9 月3日	学術セミナー	九州大学生体防御医学研究所	50名	高橋正行博士による「MTH1の蛍光分析法」に関するセミナー

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成14年 11月8～ 9日	チーム内打ち合わせ	九州大学生 体防御医学 研究所	3名	善岡博士との JSAP1 に関する研究打合せ
平成14年 11月26 日	学術セミナー	九州大学コ ラボステー ション	40名	Serge Boiteux 博士による「活性酸素による DNA 損傷修復機構」についてのセミナー
平成14年 12月2日 ～3日	研究報告会	九州大学コ ラボステー ション	20名	過去4ヶ月の進捗状況の報告と今後の進め方を検討
平成15年 4月15～ 16日	研究報告会	九州大学コ ラボステー ション	20名	過去4ヶ月の進捗状況の報告と今後の進め方を検討
平成15年 7月28日 ～29日	研究報告会	九州大学コ ラボステー ション	20名	過去4ヶ月の進捗状況の報告と今後の進め方を検討
平成15年 11月17～ 18日	研究打ち合わせ	横浜 国際会議場	2名	過去4ヶ月の進捗状況の報告と今後の進め方を検討

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属, 役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Dr. Bruce Demple (Harvard School of Public Health, USA, Professor)	学術セミナー	福岡	平成13年 10月29日 ～31日
Dr. Jean Cadet (CEA, France, Director)	LC-MS/MS解析法に ついての検討	福岡	平成13年 10月30日 ～11月1日
Dr. Masayuki Takahashi (Nantes Univ., France, Professor)	共同研究	福岡	平成14年 11月23日 ～27日

6. 主な研究成果物, 発表等

(1) 論文発表 (国内 2件, 海外 63件)

1. Crocker, S. J., M. Morelli, N. Wigle, Y. Nakabeppu, and G. S. Robertson. 1998. D1-Receptor-related priming is attenuated by antisense-mediated 'knockdown' of *fosB* expression. *Mol. Brain. Res.* 53:69-77.
2. Hazell, A. S., L. McGahan, W. Tetzlaff, A. M. Bedard, G. S. Robertson, Y. Nakabeppu, and A. M. Hakim. 1998. Immediate-early gene expression in the brain of the thiamine-deficient rat. *J. Mol. Neurosci.* 10:1-15.
3. McGahan, L., A. M. Hakim, Y. Nakabeppu, and G. S. Robertson. 1998. Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. *Mol. Brain. Res.* 56:146-61.
4. Ohtsubo, T., O. Matsuda, K. Iba, I. Terashima, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 1998. Molecular cloning of *AtMMH*, an Arabidopsis thaliana ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene, and analysis of functional domains of its product. *Mol. Gen. Genet.* 259:577-90.
5. Hayakawa, H., A. Hofer, L. Thelander, S. Kitajima, Y. Cai, S. Oshiro, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, M. Kuwano, and M. Sekiguchi. 1999. Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells. *Biochemistry* 38:3610-4.
6. Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi, and Y. Nakabeppu. 1999. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Biol. Cell.* 10:1637-52.
7. Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Fujii, Y. Nakabeppu, and H. Kasai. 1999. The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.* 274:18201-5.
8. Ito, M., K. Yoshioka, M. Akechi, S. Yamashita, N. Takamatsu, K. Sugiyama, M. Hibi, Y. Nakabeppu, T. Shiba, and K. I. Yamamoto. 1999. JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19:7539-48.
9. Oda, H., A. Taketomi, R. Maruyama, R. Itoh, K. Nishioka, H. Yakushiji, T. Suzuki, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 1999. Multi-forms of human MTH1 polypeptides produced by alternative translation initiation and single nucleotide polymorphism. *Nucleic Acids Res.* 27:4335-43.
10. Shimura-Miura, H., N. Hattori, D. Kang, K. Miyako, Y. Nakabeppu, and Y. Mizuno. 1999. Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46:920-4.
11. Fujii, Y., H. Shimokawa, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 1999. Functional significance of the conserved residues for the 23-residue module among MTH1 and MutT family proteins. *J. Biol. Chem.* 274:38251-9.
12. Kalinichev, M., J. S. Rosenblatt, Y. Nakabeppu, and J. I. Morrell. 2000. Induction of c-fos-like and fosB-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations involved differentially in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 416:45-78.

13. Ohyagi, Y., T. Yamada, K. Nishioka, N. J. Clarke, A. J. Tomlinson, S. Naylor, Y. Nakabeppu, J. Kira, and S. G. Younkin. 2000. Selective increase in cellular A $\beta$  42 is related to apoptosis but not necrosis. *Neuroreport* 11:167-71.
14. Inoue, R., M. Abe, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, T. Mori, and T. Suzuki. 2000. Characterization of human polymorphic DNA repair methyltransferase. *Pharmacogenetics* 10:59-66.
15. Kawate, H., R. Itoh, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki, F. Ide, T. Ishikawa, T. Noda, H. Nawata, and M. Sekiguchi. 2000. A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis* 21:301-5.
16. Ohtsubo, T., K. Nishioka, Y. Imaiso, S. Iwai, H. Shimokawa, H. Oda, T. Fujiwara, and Y. Nakabeppu. 2000. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 28:1355-64.
17. Morifuji, M., S. Taniguchi, H. Sakai, Y. Nakabeppu, and M. Ohishi. 2000. Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability. *Am. J. Pathol.* 156:1317-26.
18. Miyako, K., C. Takamatsu, S. Umeda, T. Tajiri, M. Furuichi, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, N. Hamasaki, K. Takeshige, and D. Kang. 2000. Accumulation of adenine DNA glycosylase-sensitive sites in human mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 275:12326-30.
19. Schwartz, W. J., A. Carpino, Jr., H. O. de la Iglesia, R. Baler, D. C. Klein, Y. Nakabeppu, and N. Aronin. 2000. Differential regulation of *fos* family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 98:535-47.
20. Shimokawa, H., Y. Fujii, M. Furuichi, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 2000. Functional significance of conserved residues in the phosphohydrolase module of *Escherichia coli* MutT protein. *Nucleic Acids Res.* 28:3240-9.
21. Takama, F., T. Kanuma, D. Wang, J. I. Nishida, Y. Nakabeppu, N. Wake, and H. Mizunuma. 2000. Mutation analysis of the *hMTH1* gene in sporadic human ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* 17:467-71.
22. Ito, M., M. Akechi, R. Hirose, M. Ichimura, N. Takamatsu, P. Xu, Y. Nakabeppu, S. Tadayoshi, K. Yamamoto, and K. Yoshioka. 2000. Isoforms of JSAP1 scaffold protein generated through alternative splicing. *Gene* 255:229-34.
23. 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.
24. Nakabeppu, Y. 2001. Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 68:75-94.
25. Liang, R., H. Igarashi, T. Tsuzuki, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, K. S. Kasprzak, and Y. H. Shiao. 2001. Presence of potential nickel-responsive element(s) in the mouse MTH1 promoter. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31:91-8.
26. Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, and H. Kasai. 2001. Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. *Nucleic Acids Res.* 29:449-54.
27. Rodriguez, J. J., D. R. Garcia, Y. Nakabeppu, and V. M. Pickel. 2001. FosB in rat striatum: normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol

- administration. *Synapse* 39:122-32.
28. Iida, T., A. Furuta, M. Kawashima, J. Nishida, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2001. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-oncol.* 3:73-81.
  29. Rodriguez, J. J., D. R. Garcia, Y. Nakabeppu, and V. M. Pickel. 2001. Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration. *Exp. Neurol.* 168:392-401.
  30. Tsuchimoto, D., Y. Sakai, K. Sakumi, K. Nishioka, M. Sasaki, T. Fujiwara, and Y. Nakabeppu. 2001. Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res.* 29:2349-60.
  31. 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.* 53:325-336.
  32. 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.* 61:6388-93.
  33. 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.
  34. 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.* 98:11456-61.
  35. Matsukura, S., K. Miyazaki, H. Yakushiji, A. Ogawa, K. Harimaya, Y. Nakabeppu, and M. Sekiguchi. 2001. Expression and prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hepatocellular, gastric, and breast cancers. *Ann. Surg. Oncol.* 8:807-16.
  36. Nakabeppu, Y. 2001. Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutat. Res.* 477:59-70.
  37. 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.* 103:20-5.
  38. 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.
  39. 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. *Current Biol.* 12:335-9.
  40. 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.
  41. Kato, K., S. Horiuchi, A. Takahashi, Y. Ueoka, T. Arima, T. Matsuda, H. Kato, J. Nishida Ji, 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.

42. 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.* 103:408-14.
43. 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.
44. Kohya, N., K. Miyazaki, S. Matsukura, H. Yakushiji, Y. Kitajima, K. Kitahara, M. Fukuhara, Y. Nakabeppu, and M. Sekiguchi. 2002. 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.* 9:371-379.
45. Takahashi, M., F. Maraboeuf, Y. Sakai, H. Yakushiji, M. Mishima, M. Shirakawa, S. Iwai, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 2002. Role of tryptophan residues in the recognition of mutagenic oxidized nucleotides by human antimutator MTH1 protein. *J. Mol. Biol.* 319:129-139.
46. Nunoshiro, T., T. Watanabe, Y. Nakabeppu, and K. Yamamoto. 2002. 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* 1:411-418.
47. Yamazaki, K., L. Guo, K. Sugahara, C. Zhang, H. Enzan, Y. Nakabeppu, S. Kitajima, and T. Aso. 2002. Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor elongin A3. *J. Biol. Chem.* 277:26444-26451.
48. Zhang, D., L. Zhang, D. W. Lou, Y. Nakabeppu, J. Zhang, and M. Xu. 2002. The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. *J. Neurochem.* 82:1453-64.
49. Arima, H., Y. Kiyohara, Y. Tanizaki, Y. Nakabeppu, M. Kubo, I. Kato, K. Sueishi, M. Tsuneyoshi, M. Fujishima, and M. Iida. 2002. Detection of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism from paraffin-embedded tissues: the Hisayama study. *Circ. J.* 66:1034-6.
50. Ide, Y., D. Tsuchimoto, Y. Tominaga, Y. Iwamoto, and Y. Nakabeppu. 2003. 63. Characterization of the genomic structure and expression of the mouse *Apex2* gene. *Genomics* 81:47-57.
52. Tsuruya, K., M. Furuichi, Y. Tominaga, M. Shinozaki, M. Tokumoto, T. Yoshimitsu, K. Fukuda, H. Kanai, H. Hirakata, M. Iida, and Y. Nakabeppu. 2003. 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* 2:211-229.
53. Matsukura, S., H. Soejima, T. Nakagawachi, H. Yakushiji, A. Ogawa, M. Fukuhara, K. Miyazaki, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, and T. Mukai. 2003. CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection. *Br. J. Cancer* 88:521-529.
54. Sakumi, K., Y. Tominaga, M. Furuichi, P. Xu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 2003. *Ogg1* Knockout-associated Lung Tumorigenesis and Its Suppression by *Mth1* Gene Disruption. *Cancer Res.* 63:902-5.
55. Yamazaki, K., T. Aso, Y. Ohnishi, M. Ohno, K. Tamura, T. Shuin, S. Kitajima, and Y. Nakabeppu. 2003. Mammalian elongin A is not essential for cell viability but required for proper cell-cycle progression with limited alteration of gene expression. *J. Biol. Chem.* 278:13585-13589.

56. Tahara, K., D. Tsuchimoto, Y. Tominaga, S. Asoh, S. Ohta, M. Kitagawa, H. Horie, T. Kadoya, and Y. Nakabeppu. 2003.  $\Delta$ FosB but not FosB Induces Delayed Apoptosis Independent of Cell Proliferation in the Rat1a Embryo Cell Line. *Cell Death Diff.* 10:496-507.
57. Yoshimura, D., K. Sakumi, M. Ohno, Y. Sakai, M. Furuichi, S. Iwai, and Y. Nakabeppu. 2003. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1 suppresses cell death caused by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278:37965-37973.
58. Hirano, S., Y. Tominaga, A. Ichinoe, Y. Ushijima, D. Tsuchimoto, Y. Honda-Ohnishi, T. Ohtsubo, K. Sakumi, and Y. Nakabeppu. 2003. Mutator phenotype of MUTYH-null mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 278:38121-38124.
59. Xu, P., K. Yoshioka, D. Yoshimura, Y. Tominaga, T. Nishioka, M. Ito, and Y. Nakabeppu. 2003. In vitro development of mouse embryonic stem cells lacking JSAP1 scaffold protein revealed its requirement during early embryonic neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 48422-48433.
60. Nakagawachi, T., H. Soejima, Z. Wei, T. Urano, S. Matsukura, K. Higashimoto, Y. Satoh, Y. Kitajima, H. Harada, K. Furukawa, H. Matsuzaki, M. Emi, K. Miyazaki, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, and T. Mukai. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene expression in human cancer. *Oncogene* 22:8835-8844.
61. Yuan, Q., K. Matsumoto, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. A comparative immunohistochemistry of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neuropathol.* 23: 203-209.
62. Russo, M. T., M. F. Blasi, F. Chiera, P. Fortini, P. Degan, P. Macpherson, M. Furuichi, Y. Nakabeppu, P. Karran, G. Aquilina, and M. Bignami. 2004. The oxidized Deoxynucleotide Triphosphate Pool is a Significant Contributor to Genetic Instability in Mismatch Repair-Deficient Cells. *Mol. Cell Biol.* 24: 465-474.
63. Nakabeppu, Y., H. Maki, and M. Sekiguchi. DNA Replication and Transcription, p. in press. *In* R. A. Meyers (ed.), 2004. *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*. VCH Publishers Inc, New York. (in press)
64. Nakabeppu, Y., D. Tsuchimoto, A. Ichinoe, M. Ohno, Y. Ide, S. Hirano, D. Yoshimura, Y. Tominaga, M. Furuichi, and K. Sakumi. Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids Caused by Reactive Oxygen Species: from Mitochondria to Nuclei. *Ann. NY Acad. Sci.* (in press).
65. Ichinoe, A., M. Behmanesh, Y. Tominaga, Y. Ushijima, S. Hirano, Y. Sakai, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, N. Wake, Y. Nakabeppu. 2004. Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts. *Nucleic Acids Res.* (in press) .

(2) 口頭発表

①招待, 口頭講演 (国内 5 2 件, 海外 1 3 件)

②ポスター発表 (国内 6 9 件, 海外 1 4 件)

1. 土本大介, 中別府雄作. (1998, 12/16-12/19): ミトコンドリア型 AP endonuclease 候補の cDNA クローニング. 第 2 1 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (横浜).
2. 西岡憲一, 小田尚伸, 大坪俊夫, 康東天, 藤原俊幸, 中別府雄作. (1998, 12/16-12/19): ミトコンドリア型ヒト OGG1 タンパク質は内膜に結合して存在する. 第 2 1 回日本分子生物学会年会 (横浜).
3. 富永洋平, 作見邦彦, 續輝久, 築山忠維, 中別府雄作. (1998, 12/16-12/19): *OGG1* 遺伝子欠損マウスの樹立と解析. 第 2 1 回日本分子生物学会年会 (横浜).
4. 伊東理世子, 河手久弥, 作見邦彦, 續輝久, 野田哲生, 中鶴陽子, 石川隆俊, 中別府雄作, 関口睦夫. (1998, 12/16-12/19): 2つの DNA 修復系を欠損したマウスにおけるアルキル化剤による致死効果と発癌. 第 2 1 回日本分子生物学会年会 (横浜).
5. 下川英俊, 藤井喜充, 古市正人, 関口睦夫, 中別府雄作. (1998, 12/16-12/19): Site-directed mutagenesis による大腸菌 MutT タンパク質の機能ドメインの解析. 第 2 1 回日本分子生物学会年会 (横浜).
6. 藤川勝義, 紙谷浩之, 藤井喜充, 薬師寺浩之, 中別府雄作, 葛西宏. (1998, 12/16-12/19): 各種酸化損傷ヌクレオチドに対する大腸菌 MutT タンパク質の基質特異性. 第 2 1 回日本分子生物学会年会, (横浜).
7. Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., and Nakabeppu, Y. (1999, 2/7-2/12): Regulation of expression and intracellular localization of the 8-oxoguanine DNA glycosylases (OGG1 proteins) in human cells. Gordon Research Conference on Mammalian DNA repair (Ventura, California, USA).
8. Nakabeppu, Y. (1999, 2/20-2/21): Molecular mechanisms protecting genomic integrity from damages caused by reactive oxygen species. The 8th Hot Spring Harbor Symposium (Fukuoka).
9. Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., and Nakabeppu, Y. (1999, 2/22-2/25): Regulation of expression and intracellular localization of the 8-oxoguanine DNA glycosylases (OGG1 proteins) in human cells, Workshop on "DNA Repair, Recombination and Mutagenesis '99" (Osaka).
10. 下川英俊, 藤井喜充, 古市正人, 関口睦夫, 中別府雄作. (1999, 2/22-2/25): 大腸菌 MutT タンパク質の機能ドメインの site-directed mutagenesis による解析. Workshop on "DNA Repair, Recombination and Mutagenesis '99" (Osaka).
11. 中野博明, 片平祐子, 島原秀登, 小林祐次, 藤井敏, 真田正幸, 中別府雄作, 関口睦夫, 山縣ゆり子. (1999, 2/22-2/25): 3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ (AlkA) の機能発現に関する立体構造基盤. Workshop on "DNA Repair, Recombination and Mutagenesis '99" (Osaka).
12. 中別府雄作. (1999, 4/3): 活性酸素によるゲノム傷害とその防御機構. 第 2 5 回日本医学会総会 (シンポジウム) (東京).
13. Yusaku Nakabeppu. (1999, 9/22): Molecular Genetics and Structural Biology of Human MutT Homolog, MTH1. The First Fujihara International Seminar (Tokyo).
14. 藤川勝義, 紙谷浩之, 薬師寺浩之, 藤井喜充, 中別府雄作, 葛西宏. (1999, 9/29-10/1): 2-hydroxy-dATP, 8-hydroxy-dATP のヒト MTH1 タンパク質による分解. 第 5 8 回日本癌学会総会 (広島).

15. 伊東理世子, 河手久弥, 作見邦彦, 中別府雄作, 續輝久, 中鶴陽子, 石川隆俊, 野田哲生, 関口睦夫. (1999, 9/29-10/1) : アルキル化発癌におけるミスマッチ修復の役割. 第58回日本癌学会総会 (広島).
16. 大坪俊夫, 西岡憲一, 今磯泰幸, 富永洋平, 岩井成憲, 下川英俊, 中別府雄作. (1999, 10/9) : DNA 中の 2-ハイドロキシアデニンを除去するヒト修復酵素, 第72回日本生化学会大会 (シンポジウム) (横浜).
17. Toshio Ohtsubo, Kenichi Nishioka, Yasuyuki Imaiso, Shigenori Iwai, Hisanobu Oda, Toshiyuki Fujiwara, and Yusaku Nakabeppu. (1999, 11/17) : Human MYH protein possesses a novel repair activity for 2-hydroxyadenine in DNA. The 2nd 3R (Replication, Recombination, Repair) Symposium (Miki).
18. 富永洋平, 平野世紀, 一戸晶元, 大坪俊夫, 中別府雄作. (1999, 12/7) : アデニン DNA グリコシラーゼをコードする哺乳動物 *MYH* 遺伝子の発現とその制御. 第22回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (福岡).
19. 中別府雄作, 西岡憲一, 大坪俊夫, 土本大介, 富永洋平, 作見邦彦, 古市正人, 康東天, 岩井成憲, 藤原俊幸. (1999, 12/10) : ミトコンドリアにおける核酸の酸化とその修復機構. 第22回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (福岡).
20. 酒井康成, 小田尚伸, 古市正人, 中別府雄作. (1999, 12/10) : ヒト MTH1 タンパク質の細胞内局在とその制御. 第22回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (福岡).
21. 伊藤紀幸, 三島正規, 池上貴久, 山懸ゆり子, 中別府雄作, 白川昌宏. (1999, 12/7-12/10) : NMR による human MTH1 タンパク質の立体構造解析. 22回日本分子生物学会年会 (福岡).
22. 葛西宏, 紙谷浩之, 平野雄, 中別府雄作. (1999, 12/7-12/10) : 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 (ワークショップ) (福岡).
23. 作見邦彦, 富永洋平, 古市正人, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. (1999, 12/7-12/10) : *MTH1*, *OGG1* ダブルノックアウトマウスの作製とその解析. 第22回日本分子生物学会 (福岡).
24. 藤川勝義, 紙谷浩之, 薬師寺浩之, 藤井喜充, 中別府雄作, 葛西宏. (1999, 12/7-12/10) : 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 (福岡).
25. 西岡智子, 作見邦彦, 中別府雄作. (1999, 12/7-12/10) :  $\Delta$ FosB による細胞分化の誘導. 第22回日本分子生物学会年会 (福岡).
26. 田原一樹, 富永洋平, 中別府雄作. (1999, 12/7-12/10) :  $\Delta$ FosB による遅延型アポトーシスの誘導. 第22回日本分子生物学会年会 (福岡).
27. 末松佐知子, 中別府雄作, 渡邊武. (1999, 12/7-12/10) : B 細胞の抗原受容体を介するシグナル伝達と *fosB* 遺伝子の発現. 第22回日本分子生物学会年会 (福岡).
28. Yusaku Nakabeppu (2000, 2/27-3/2) : Structural Analysis of Human MTH1 revealed that Biological Significance of an Oxidized Form of Adenine, 2-Hydroxyadenine, Gordon Research Conference on Mutagenesis and Carcinogenesis (Ventura, California, USA).
29. Y. Nakabeppu, T. Nishioka and K. Sakumi (2000, 3/3-3/5) : FosB and  $\Delta$ FosB encoded by alternatively spliced *fosB* mRNAs initiate cell differentiation, 10th Annual Winternational Symposium on GENES AND DEVELOPMENT (Canadian Society of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology) (Banff, Alberta, CANADA).
30. Yusaku Nakabeppu (2000, 3/10-13) : Regulation of Intracellular Localization of Human MTH1, OGG1 and MYH Proteins for Repair of Oxidative DNA Damages, DNA Base Excision Repair Workshop, 2000 (Galveston, TX, USA).
31. 酒井康成, 小田尚伸, 古市正人, 中別府雄作. (2000, 4/15) : 遺伝子多型にともなうヒト MTH1 タンパク質の細胞内局在の変化, 第一回日本がん分子疫学研究会 (東京).
32. 作見邦彦. (2000, 6/15) : アルキル化抗癌剤に対する感受性を制御する遺伝子 *MGMT*, 第4

回がん分子標的治療研究会総会, 第 13 回日本臨床腫瘍研究会 (名古屋).

33. 中別府雄作. (2000, 7/10): 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構: DNA の損傷と修復の関わり, 新適塾第 41 回「千里神経懇話会」(大阪).
34. 中別府雄作. (2000, 9/13): 核酸の自然酸化に起因する生体の障害とその防御機構, ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis 2000」(仙台).
35. 中別府雄作. (2000, 9/28): 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構, 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・大阪大学タンパク質研究所合同セミナー「ポストゲノム時代の脳科学」(岡崎).
36. 中別府雄作. (2000, 10/12): 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構, 第 73 回日本生化学会大会 (シンポジウム) (横浜).
37. 服部信孝, 志村秀樹, 佐藤栄人, 町田裕, 康東天, 中別府雄作, 田中雅嗣, 水野美邦. (2000, 10/12): パーキンソン病とミトコンドリア機能異常, 第 73 回日本生化学会大会 (シンポジウム) (横浜).
38. 中別府雄作. (2000, 10/19): 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構: DNA の損傷と修復の関わり, 第 43 回日本神経化学会大会 (シンポジウム) (金沢).
39. 田原一樹, 北川雅敏, 富永洋平, 中別府雄作. (2000, 12/13):  $\Delta$ FosB による遅延型アポトーシスの誘導, 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
40. 中別府雄作. (2000, 12/14): ヒト神経組織における酸化的 DNA 損傷とミトコンドリア DNA 修復酵素の発現. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
41. 許萍, 善岡克次, 富永洋平, 児矢野聡, 伊藤道彦, 西岡智子, 木下徳彦, 中別府雄作. (2000, 12/14): JNK カスケードスキャフォールドタンパク質 JSAP1 欠損 ES 細胞株の樹立と解析. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
42. 藤川勝義, 紙谷浩之, 薬師寺浩之, 中別府雄作, 葛西宏. (2000, 12/14): ヒト MTH1 による酸化リボヌクレオチド, 2-ヒドロキシ-ATP の特異的分解. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
43. 大西克典, 作見 邦彦, 富永洋平, 中別府雄作. (2000, 12/15): 標的遺伝子組換えによるマウス *fosB* 遺伝子の択一的スプライシングの制御. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
44. 井手康人, 富永洋平, 土本大介, 酒井康成, 今磯泰幸, 中別府雄作. (2000, 12/16): マウス新規 AP endonuclease 候補遺伝子 *APE2* のクローニングと遺伝子欠損 ES 細胞株の樹立. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
45. 山口浩雄, 富永洋平, 作見邦彦, 古市正人, 許萍, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. (2000, 12/16): マウス中脳ドパミンニューロンにおける酸化障害と DNA 修復酵素の発現. 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
46. 酒井康成, 古市正人, 岩井成憲, 中別府雄作. (2000, 12/16): ヒト MTH1 タンパク質のカルボキシル末端領域の機能解析, 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
47. 松倉史朗, 副島英伸, 中川内哲治, 薬師寺浩之, 小川明臣, 宮崎耕治, 中別府雄作, 関口睦夫, 向井常博. (2000, 12/16): *MGMT* と *hMLH1* プロモーター領域の DNA メチル化の検討, 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
48. 大野みずき, 古市正人, 作見邦彦, 富永洋平, 許萍, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. (2000, 12/16): マウス脳海馬における酸化障害と DNA 修復酵素の発現, 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
49. 平野世紀, 富永洋平, 中別府雄作. (2000, 12/16): マウス *MYH* 遺伝子ホモ欠損 ES 細胞株の樹立とその解析, 第 23 回日本分子生物学会年会 (神戸).
50. Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T. and Nakabeppu, Y. (2001/1/21-1/26): Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei

and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair (Ventura, California, USA).

51. 中別府雄作. (2001, 4/27-28): 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構, CREST 「脳を知る・守る」合同シンポジウム 21 (京都).
52. 作見邦彦, 西岡智子, 中別府雄作. (2001, 4/27-28): *fosB* 遺伝子による細胞運命の制御と分子メカニズムの解析 (I). CREST 「脳を知る・守る」合同シンポジウム 21 (京都).
53. 田原一樹, 富永洋平, 中別府雄作. (2001, 4/27-28): *fosB* 遺伝子による細胞運命の制御と分子メカニズムの解析 (II). CREST 「脳を知る・守る」合同シンポジウム 21 (京都).
54. 酒井康成, 古市正人, 岩井成憲, 中別府雄作. (2001, 4/27-28): 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の基質認識機構の解析. CREST 「脳を知る・守る」合同シンポジウム 21 (京都).
55. 飯田崇, 古田晶子, 岩城徹, 中別府雄作. (2001, 4/27-28): Alzheimer 病における hOGG1 および hMTH1 の免疫組織化学的検討. CREST 「脳を知る・守る」合同シンポジウム 21 (京都).
56. 中別府雄作. (2001, 5/26): 核酸の酸化障害とその防御機構: 発がんや神経変性への関わり. 平成 13 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム (東京).
57. 中別府雄作. (2001, 6/2): 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の分子細胞生物学. 第 1 回日本タンパク質学会年会 [シンポジウム] (大阪).
58. Masaki MISHIMA, Noriyuki ITO, Takahisa Ikegami, Yuriko Yamagata, Mutsuo Sekiguchi, Yusaku Nakabeppu and Masahiro Shirakawa (2001, 8/20): Tertiary structure of human MTH1 and its interaction with oxidative-damaged DNA precursors, XIX International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (Florence, Italy).
59. Teijiro Aso, Katsuhisa Yamazaki, Kazunori Sugahara, Deshun Ma, Yusaku Nakabeppu and Shigetaka Kitajima (2001, 8/30): Functional Characterization Of Transcription Elongation Factor Elongin And The Vhl Tumor Suppressor Protein, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (New York, USA).
60. 作見邦彦, 許萍, 富永洋平, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. (2001, 9/26): *OGG1* 遺伝子欠損マウスで観察された肺の自然発癌. 第 60 回日本癌学会総会 (横浜).
61. 藤川 勝義, 薬師寺 浩之, 中別府 雄作, 鈴木利典, 増田光治, 大島 寛史, 葛西 宏 (2001, 9/26): ヒト MTH1 タンパク質による 8-クロロ-dGTP の特異的分解. 第 60 回日本癌学会総会 (横浜).
62. 中川内哲治, 副島英伸, 佐藤勇司, 松倉史郎, 北島吉彦, 原田晴仁, 中別府 雄作, 関口睦夫, 宮崎耕治, 江見充, 向井常博. (2001, 9/27): プロモーター領域のメチル化による O6-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) の転写制御. 第 60 回日本癌学会総会 (横浜).
63. 北島吉彦, 田中雅之, 中別府 雄作, 関口睦夫, 宮崎耕治. (2001, 9/27): 胃癌進展過程における DNA 修復酵素の発現低下の解析. 第 60 回日本癌学会総会 (横浜).
64. 中別府雄作. (2001, 9/27): *fosB* 遺伝子による細胞運命と Galectin-1 の発現制御, 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (シンポジウム) (京都).
65. 山崎勝久, 菅原和宣, 張純, 中別府雄作, 北嶋繁孝, 麻生悌二郎. (2001, 9/27): VHL 癌抑制タンパクと相互作用する転写因子エロンガンの機能. 日本人類遺伝学会第 46 回大会 (埼玉).
66. 中別府雄作. (2001, 10/7): 活性酸素種による核酸の酸化障害とその防御機構. 第 6

回金沢ニューロサイエンス・シンポジウム（金沢）.

67. 中別府雄作, 土本大介. (2001, 10/25) : ミトコンドリアにおける DNA 酸化障害の防御機構. 第 74 回日本生化学会大会 (シンポジウム) (京都).
68. Yusaku Nakabeppu (2001, 10/28) : Oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species, and protective mechanisms against the damage, The 8th International Conference on Environmental Mutagens, Satellite meeting (Nara).
69. Hiroyuki Kamiya, Hiroyuki Yakushiji, Yusaku Nakabeppu and Hideyoshi Harashima (2001, 10/27) : The human MTH1 protein does not act on damaged dGTPs formed by nitric oxide, The 8th International Conference on Environmental Mutagens, Satellite meeting (Nara).
70. Yasunari Sakai, Masato Furuichi, Masayuki Takahashi, Masaki Mishima, Shigenori Iwai, Masahiro Shirakawa, and Yusaku Nakabeppu (2001, 11/6) : A Molecular Basis for the Selective Recognition of 2-Hydroxy-dATP and 8-Oxo-dGTP by MTH1 Which Is Known to Suppress Spontaneous Carcinogenesis, The 3rd International 3R Symposium (Miki).
71. Masayuki Takahashi, Yasunari Sakai, Hiroyuki Yakushiji, Mutsuo Sekiguchi, Shigenori Iwai, and Yusaku Nakabeppu (2001, 11/6) : Role of tryptophan residues in the recognition of mutagenic oxidized nucleotides by human antimutator MTH1 protein, The 3rd International 3R Symposium (Miki).
72. Masaki Mishima, Noriyuki Itoh, Yasunari Sakai, Hiroyuki Kamiya, Yusaku Nakabeppu, Masahiro Shiorakawa. (2001, 11/6) : Structural studies of the human MTH1, The 3rd International 3R Symposium (Miki).
73. 三島正規, 伊藤紀幸, 酒井康成, 紙谷浩之, 中別府雄作, 白川昌宏. (2001, 11/14) : ヒト遺伝子修復酵素 hMTH1 の構造決定とその加水分解の研究. 第 40 回 NMR 討論会 (京都).
74. 平野世紀, 富永洋平, 本田陽子, 中別府雄作. (2001, 12/9) : MYH タンパク質はマウス ES 細胞における自然突然変異の生起を抑制する. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
75. 酒井康成, 古市正人, 高橋正行, 三島正規, 岩井成憲, 白川昌宏, 中別府雄作. (2001, 12/11) : 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 hMTH1 の機能解析 : 2-OH-dATP および 8-oxo-dGTP 識別の分子機構. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
76. 三島正規, 伊藤紀幸, 酒井康成, 紙谷浩之, 中別府雄作, 白川昌宏. (2001, 12/11) : ヒト MTH1 の立体構造とその加水分解反応の解析. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
77. 大野みずき, 中別府雄作. (2001, 12/11) : 酸化ストレスを受けた細胞における 8-オキソグアニンの動態, 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
78. Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu (2001, 12/11) : Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
79. 鶴屋和彦, 古市正人, 富永洋平, 篠崎倫哉, 徳本正憲, 吉光隆博, 福田恭一, 金井英俊, 平方秀樹, 中別府雄作. (2001, 12/11) : ラット虚血腎臓での 8-オキソグアニンの蓄積と修復酵素 OGG1 の発現変化. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
80. Akimasa Ichinoe, Yohei Tominaga, Seiki Hirano, Yusaku Nakabeppu (2001, 12/11) : Characterization of Two Forms of Mouse MYH Proteins Encoded by Alternatively Spliced Transcripts. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
81. 山崎勝久, 北嶋繁孝, 麻生梯二郎, 富永洋平, 中別府雄作. (2001, 12/11) : 転写伸長因子 Elongin A はマウス ES 細胞の生存には必須ではない. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
82. 井手康人, 富永洋平, 土本大介, 中別府雄作. (2001, 12/16) : マウス APE2 の発現と PCNA との相互作用. 第 24 回分子生物学会年会 (横浜).
83. 酒井康成, 小田尚伸, 古市正人, 中別府雄作 (2002, 1/31) : 遺伝子多型にともなうヒト

- MTH1 タンパク質の細胞内局在の変化. 第1回日本ミトコンドリア研究会年会 (東京).
84. 深江治郎, 久保紳一郎, 高梨雅史, 服部信孝, 水野美邦, 西岡憲一, 大坪俊夫, 作見邦彦, 富永洋平, 古市正人, 中別府雄作. (2002, 1/31): パーキンソン病における酸化防御酵素 OGG1, MYH の検討. 第1回日本ミトコンドリア研究会年会 (東京).
  85. 大野みずき, 富永洋平, 作見邦彦, 中別府雄作. (2002, 2/1): 酸化ストレス負荷後の 8-オキシグアニンの動態と OGG1 の関与, 第1回日本ミトコンドリア研究会年会 (東京).
  86. 中別府雄作. (2002, 1/27): 活性酸素による核酸の酸化障害とその防御機構: 発がんや神経変性への関わり. 第12回日本病態生理学大会 (シンポジウム) (松山).
  87. 中別府雄作. (2002, 2/2): 活性酸素障害による脳の老化とその防御機構. 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所公開シンポジウム 2002 (名古屋).
  88. 中別府雄作, 富永洋平, 酒井康成, 平野世紀, 井手康人, 土本大介, 作見邦彦, 古市正人. (2002, 4/12): 核酸の酸化障害とその防御機構: 発がんや神経変性への関わり. レドックスシンポジウム 2002 (レドックス生命科学第170委員会) (箱根).
  89. 中別府雄作. (2002, 4/18): 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構: DNA 損傷と修復の関わり. 日本麻酔科学第49回学術集会 (ランチョンセミナー) (福岡)
  90. 布柴達男, 石田力也, 佐々木三智, 中別府雄作, 山本和生. (2002, 9/18): 出芽酵母における大腸菌 MutT 機能的ホモログの分離・同定. 日本放射線影響学会第45回大会 (仙台).
  91. 作見邦彦, 古市正人, 許萍, 富永洋平, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. (2002/10/1): OGG1 遺伝子欠損と肺の自然発癌. 第61回日本癌学会総会 (東京).
  92. 坂本勝美, 富永洋平, 江頭明典, 蔵忍, 中津可道, 作見邦彦, 八尾隆史, 恒吉正澄, 増田康治, 中別府雄作, 續輝久. (2002, 10/1): MYH 遺伝子欠損マウスにおける自然発癌の解析. 第61回日本癌学会総会 (東京).
  93. 古市正人, 岩井成憲, 中別府雄作. (2002, 10/1): ゲノム DNA 中の 2-OH-dA は 8-oxo-dG と同様に老化にともない増加するのか? 日本遺伝学会第74回大会 (福岡)
  94. 井手康人, 土本大介, 富永洋平, 中別府雄作. (2002, 10/1): マウス Apex2 遺伝子のゲノム構造解析とその産物の発現解析. 日本遺伝学会第74回大会 (福岡).
  95. 平野世紀, 富永洋平, 本田陽子, 三浦智史, 松本吉博, 中別府雄作. (2002, 10/1): MUTYH タンパク質によるアデニン:8-オキシグアニン誤塩基対の複製後修復. 日本遺伝学会第74回大会 (福岡).
  96. 一戸晶元, 富永洋平, 平野世紀, 中別府雄作. (2002, 10/1): 択一的スプライシングにより翻訳される2種類のマウス MYH タンパク質の解析. 日本遺伝学会第74回大会 (福岡).
  97. 作見邦彦, 古市正人, 土本大介, 富永洋平, 平野世紀, 井手康人, 吉村大輔, 三浦智史, 酒井康成, 中別府雄作. (2002, 10/3): 哺乳動物における活性酸素による核酸の酸化障害とその修復・防御機構. 日本遺伝学会第74回大会 (ワークショップ) (福岡).
  98. 布柴達男, 石田力也, 佐々木三智, 中別府雄作, 山本和生. (2002, 10/3): 出芽酵母における大腸菌 MutT 機能的ホモログの分離・同定. 日本遺伝学会第74回大会 (福岡).
  99. 山口浩雄, 大野みずき, 鶴屋和彦, 古市正人, 作見邦彦, 富永洋平, 平方秀樹, 中別府雄作. (2002, 10/16): 活性酸素による細胞の機能障害と核酸の酸化損傷. 第75回生化学学会大会 (シンポジウム) (京都).
  100. 服部信孝, 深江治郎, 高梨雅史, 水野美邦, 西岡憲一, 作見邦彦, 大坪俊夫, 富永洋平, 中別府雄作. (2002/10/16): パーキンソン病におけるミトコンドリア機能異常. 第75回日本生化学会大会 (シンポジウム) (京都).
  101. Kazuhiko Tsuruya, Masatomo Taniguchi, Kohsuke Masutani, Makoto Hirakawa, Masanori Tokumoto, Kyoichi Fukuda, Hidetoshi Kanai, Hideki Hirakata, Hidenori Horie, Toshihiko Kadoya, Mitsuo Iida, Yusaku Nakabeppu (2002, 11/1): Possible involvement

- of galectin-1 (Gal-1) in renal tubular regeneration of cisplatin-induced acute renal failure (ARF), 35th Annual Meeting & Scientific Exposition, The American Society of Nephrology (Philadelphia, PA, USA).
102. Y. Ohnishi, K. Sakumi, T. Miura, K. Yamazaki, Y. Ohnishi, Y. Tominaga, H. Horie, T. Kadoya, Y. Nakabeppu (2002, 11/2): Expression of A Multi-Functional Lectin, Galectin-1 Is Dependent on FosB, 32nd Annual meeting, Society for Neuroscience (Orlando, Florida, USA).
  103. 布柴達男, 石田力也, 佐々木三智, 中別府雄作, 山本和生. (2002, 11/27): 酵母の大腸菌 MutT 機能的ホモログの分離・同定. 第 31 回日本環境変異原学会大会 (東京) .
  104. 富永洋平, 土本大介, 平野世紀, 一戸晶元, 作見邦彦, 三島正規, 白川昌宏, 中別府雄作. (2002, 12/11): MUTYH は, DNA 中の 8-oxoG に対して取り込まれた adenine の除去修復反応中間体を OGG1 と APEX1 による二本鎖切断から保護する. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  105. Mehrdad Behmanesh, Masato Furuichi, Kumiko Torisu, Yasunari Sakai, Yohei Tominaga, Kunihiko Sakumi, and Yusaku Nakabeppu (2002, 12/11): Molecular cloning and characterization of mammalian inosine triphosphate pyrophosphatase genes. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  106. 一戸晶元, 富永洋平, 平野世紀, 中別府雄作. (2002, 12/11): 複数の転写産物をコードするマウス Mutyh 遺伝子のゲノム構造とその翻訳産物の解析. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  107. 吉村大輔, 古市正人, 酒井康成, 大野みずき, 中別府雄作. (2002, 12/11): 酸化プリンスクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の生物学的意義の検討: 酸化ストレスによる細胞機能障害, 細胞死を抑制する機能について. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  108. 許萍, 善岡克次, 吉村大輔, 富永洋平, 中別府雄作. (2002, 12/11): JNK カスケードシグナル伝達タンパク質 JSAP1 は, 脳の初期発生に重要である. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  109. 山口浩雄, 古市正人, 大野みずき, 作見邦彦, 中別府雄作. (2002, 12/11): MPTP, ロテノン投与マウスにおける核酸の酸化損傷と神経機能障害の解析. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  110. 紙谷浩之, Laurence Dugu, 薬師寺浩之, Sylvie Pochet, 中別府雄作, 原島秀吉. (2002, 12/11): ヒト MTH1 タンパク質の基質認識--合成ヌクレオチドアナログを用いたアプローチ. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  111. 山内一己, 坂本勝美, 中津可道, 富永洋平, 中別府雄作, 真木寿治, 續輝久. (2002, 12/11): Mutyh 遺伝子欠損マウスにおける自然発がんと自然突然変異の解析, 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  112. 善岡克次, 許萍, 中別府雄作, 佐藤慎二, 西田純, 伊藤道彦, 柴忠義. (2002, 12/11): 哺乳動物のストレス応答 MAP キナーゼ経路における足場タンパク質の機能解析. 第 25 回日本分子生物学会年会 (シンポジウム) (横浜) .
  113. 大西克典, 作見邦彦, 三浦智史, 山崎勝久, 大西 (本田) 陽子, 富永洋平, 堀江秀典, 門屋利彦, 中別府雄作. (2002, 12/11):  $\Delta$ FosB と FosB による Galectin-1 の発現制御. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  114. 大野みずき, 古市正人, 作見邦彦, 富永洋平, 中別府雄作. (2002, 12/11): OGG1 欠損マウス胎児線維芽細胞における 8-oxoG の修復と細胞内動態. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
  115. 中川内哲治, 副島英伸, 佐藤勇司, 松倉史朗, 北島吉彦, 原田晴仁, 中別府雄作, 関口睦夫, 宮崎耕治, 江見充, 向井常博. (2002, 12/11): プロモーター領域のメチル化による O6-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) の転写制御. 第 25 回日本分子

生物学会年会（横浜）。

116. 山崎勝久, 麻生悌二郎, 北嶋繁孝, 中別府雄作. (2002, 12/11): 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. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
117. 布柴達男, 石田力也, 佐々木三智, 中別府雄作, 山本和生. (2002, 12/12): 出芽酵母における大腸菌 MutT 機能的ホモログの分離・同定. 第 25 回日本分子生物学会年会 [ワークショップ] (横浜) .
118. 中別府雄作, 土本大介, 大野みずき, 山口浩雄, 平野世紀, 一戸昌元, 吉村大輔, 鶴屋和彦, 平方秀樹, 富永洋平, 作見邦彦, 古市正人. (2002, 12/13): ミトコンドリアにおける核酸の酸化損傷とその防御機構. 第 25 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) (横浜) .
119. 古市正人, 岩井成憲, 中別府雄作. (2002, 12/13): ゲノム DNA 中の 2-OH-dA 測定の試み: 臓器や老化にともない変化するのか? 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
120. 土本大介, 鳥巢 (中原) 久美子, 中別府雄作. (2002, 12/13): 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. 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) .
121. 吉村大輔, 古市正人, 酒井康成, 大野みずき, 中別府雄作. (2002, 12/19): 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の生物学的意義の検討: 酸化ストレスによる細胞機能障害, 細胞死を抑制する機能について. 第 2 回日本ミトコンドリア研究会 (横浜) .
122. 三浦智史, 作見邦彦, 久留島秀朗, 梶谷康介, 西岡智子, 大西克典, 堀江秀典, 門屋利彦, 中別府雄作. (2003, 1/24): リコンビナントガレクチン-1  $\alpha$ , ガレクチン-1  $\beta$  の発現精製とその機能解析. CREST 「脳を守る」終了シンポジウム (横浜) .
123. 許萍, 善岡克次, 吉村大輔, 富永洋平, 中別府雄作. (2003, 1/24): JNK カスケードスキャフォールドタンパク質 JSAP1 は, 脳の初期発生に重要である. CREST 「脳を守る」終了シンポジウム (横浜) .
124. 吉村大輔, 古市正人, 酒井康成, 大野みずき, 中別府雄作. (2003, 1/24): 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の生物学的意義の検討: 酸化ストレスによる細胞機能障害, 細胞死を抑制する機能について. CREST 「脳を守る」終了シンポジウム (横浜) .
125. Behmanesh M., Furuichi M., Torisu K., Sakai Y., Tominaga Y., Sakumi K., Nakabeppu Y. (2003, 1/24): Molecular cloning and characterization of mammalian inosine triphosphate pyrophosphatase genes, CREST 「脳を守る」終了シンポジウム (横浜) .
126. 中別府雄作, 土本大介, 大野みずき, 山口浩雄, 平野世紀, 一戸昌元, 吉村大輔, 鶴屋和彦, 平方秀樹, 富永洋平, 作見邦彦, 古市正人. (2003, 1/31): 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の生物学的意義の検討: 酸化ストレスによる細胞機能障害, 細胞死を抑制する機能について. 日本学術振興会レドックス生命科学第 170 委員会, 第 8 回研究会 (池田) .
127. Yoshimura T., Oka S., Ohno M., Yamaguchi H., Tsuchimoto D., Ide Y., Tominaga Y., Furuichi M., Sakumi K., Nakabeppu Y. (2003, 2/5): Mechanisms Protecting Genomic Integrity from Damage Caused by Reactive Oxygen Species: Implications for Carcinogenesis and Neurodegeneration, The First Scientific Meeting of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (Seoul).
128. 古市正人, 吉村大輔, 酒井康成, 大野みずき, 中別府雄作. (2003, 2/25): 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の生物学的意義の検討: 酸化ストレスによる細胞機能障害, 細胞死を抑制する機能について. ワークショップ DNA Repair, Recombination and Mutagenesis (兵庫, 淡路夢舞台) .
129. 作見邦彦, 古市正人, 許萍, 富永洋平, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. (2003, 2/25): OGG1 遺伝子欠損と肺の自然発癌. ワークショップ DNA Repair, Recombination and Mutagenesis (兵庫, 淡路夢舞台) .

130. 中別府雄作. (2003, 4/4) : 活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構. 第26回日本医学会総会 (シンポジウム) (福岡) .
131. 中別府雄作 (2003, 5/22) : 活性酸素による生体障害とその防御機構- 核酸の酸化からのアプローチ. 第45回日本小児神経学会 (シンポジウム) (福岡) .
132. Tsuruya K, Taniguchi M, Masutani K, Hirakawa M, Tokumoto M, Fukuda K, Kanai H, Hirakata H, Horie H, Kadoya T, Iida M, Nakabeppu Y. (2003, 5/23) : Possible involvement of galectin-1 (Gal-1) in renal tubular regeneration of cisplatin-induced acute renal failure (ARF). 第46回日本腎臓学会学術総会 (東京) .
133. Yusaku Nakabeppu, Daisuke Tsuchimoto, Akimasa Ichinoe, Mizuki Ohno, Hiroo Yamaguchi, Yasuhito Ide, Seiki Hirano, Daisuke Yoshimura, Yohei Tominaga, Masato Furuichi and Kunihiro Sakumi (2003, 5/27) : Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids Caused by Reactive Oxygen Species: Implication for Carcinogenesis and Neurodegeneration, The 20th International Kumamoto Medical BioScience Symposium [Redox Biosignaling and Stress Responses] (Kumamoto) .
134. 中別府雄作. (2003, 6/20) : 活性酸素によるゲノム障害とその防御機構- 発がんと神経変性の分子病態- . 第26回日本基礎老化学会 (シンポジウム) (名古屋) .
135. Yusaku Nakabeppu, Yoshinori Ohnishi, Tomofumi Miura, Hideaki Kurushima, Ping Xu, Kosuke Kajitani, Hidenori Horie, Toshihiko Kadoya, and Kunihiro Sakumi (2003, 7/25) : Regulation of galectin-1 expression by *fosB* gene products. 第26回日本神経科学会 (シンポジウム) (名古屋) .
136. 中別府雄作. (2003, 8/2) : 哺乳動物ゲノムにおける酸化損傷とその防御機構の生物学的意義. 日本進化学会第5回大会 (シンポジウム) (福岡) .
137. Yusaku Nakabeppu, Daisuke Tsuchimoto, Yohei Tominaga, Masato Furuichi and Kunihiro Sakumi (2003, 8/21) : Oxidation of Nucleic Acids and Carcinogenesis, The Second International Symposium on Redox Life Science (Niseko).
138. Kenji Tamura, Katsuhisa Yamazaki, Kazunori Sugahara, Keikichi Miyata, Yulan Jin, Limei Guo, Hideaki Enzan, Saburo Onishi, Yusaku Nakabeppu, Shigetaka Kitajima, Taro Shuin, and Teiji Aso (2003, 8/27-8/31) : Functional characterization of transcription elongation factor elongin a and identification of a novel exonuclease family member as its interacting partner, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (New York, USA).
139. Seiki Hirano, Yohei Tominaga, Akimasa Ichinoe, Yasuhiro Ushijima, Daisuke Tsuchimoto, Yoko Honda-Ohnishi, Toshio Ohtsubo, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu (2003, 9/24) : A germ-line mutation MUTYH(G382D) found in patients with autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis and mutator phenotype. 日本遺伝学会第75回大会 (仙台) .
140. 續輝久, 山内一己, 坂本勝美, 江頭明典, 藏忍, 中津可道, 富永洋平, 作見邦彦, 中別府雄作, 真木寿治, 八尾隆史, 恒吉正澄. (2003, 9/26) : *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける自然発癌と自然突然変異の解析. 第62回日本癌学会総会 (名古屋) .
141. 作見邦彦, 吉村大輔, 古市正人, 酒井康成, 大野みずき, 岩井成憲, 中別府雄作. (2003, 9/27) : MTH1 は酸化ストレスによる細胞死を抑制する. 第62回日本癌学会総会 (名古屋) .
142. 山内一己, 坂本勝美, 中津可道, 平野世紀, 富永洋平, 愿山郁, 中別府雄作, 真木寿治, 續輝久. (2003, 10/6-10/8) : *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける自然突然変異の解析. 第46回日本放射線影響学会 (京都) .
143. Yusaku Nakabeppu, Daisuke Tsuchimoto, Daisuke Yoshimura, Akimasa Ichinoe, Mizuki Ohno, Sugako Oka, Yasuhito Ide, Seiki Hirano, Yohei Tominaga, Masato Furuichi and Kunihiro Sakumi (2003, 10/17) : Biological Significance of the Defense Mechanisms

against Oxidative Damage in Nucleic Acids: from Mutagenesis to Cell Death. 第76回日本生化学会大会 (シンポジウム) (横浜) .

144. Daisuke Tsuchimoto, Yasuhiro Ushijima, Yohei Tominaga, Seiki Hirano, Akimasa Ichinoe, Kunihiko Sakumi, and Yusaku Nakabeppu (2003, 10/18) : Repair mechanism of misincorporated adenine opposite 8-oxoG by mammalian MutY homolog, MUTYH: its relevance to mutagenesis and carcinogenesis. 第76回日本生化学会大会 (シンポジウム) (横浜) .
145. Yusaku Nakabeppu, Daisuke Tsuchimoto, Akimasa Ichinoe, Mizuki Ohno, Hiroo Yamaguchi, Yasuhito Ide, Seiki Hirano, Daisuke Yoshimura, Yohei Tominaga, Masato Furuichi and Kunihiko Sakumi (2003, 11/7): Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids Caused by Reactive Oxygen Species: Implication for Carcinogenesis and Neurodegeneration, Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research, Asia "Free Radicals in Health and Disease" (Seoul).
146. Daisuke Tsuchimoto, Yasuhito Ide, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe and Yusaku Nakabeppu (2003, 11/12) : Establishment and characterization of APEX2 null mice, The 4th International 3R Symposium (Awaji-Yumebutai, Hyogo).
147. Y. Nakatsu, K. Yamauchi, K. Sakamoto, Y. Tominaga, K. Yoshiyama, A. Egashira, S. Kura, K. Sakumi, H. Maki, Y. Nakabeppu & T. Tsuzuki (2003, 11/12) : Spontaneous tumorigenesis and mutagenesis in mice with a targeted disruption of the *Mutyh* gene, The 4th International 3R Symposium (Awaji-Yumebutai, Hyogo).
148. Yusaku Nakabeppu, Daisuke Tsuchimoto, Akimasa Ichinoe, Mizuki Ohno, Hiroo Yamaguchi, Yasuhito Ide, Seiki Hirano, Daisuke Yoshimura, Yohei Tominaga, Masato Furuichi and Kunihiko Sakumi (2003, 11/12) : Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids: Implication for Carcinogenesis and Neurodegeneration, The 4th International 3R Symposium (Awaji-Yumebutai, Hyogo).

(3)特許出願（国内 2件，海外 0件）

①国内

1) 発明の名称：酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素阻害剤のスクリーニング方法

①発明者 中別府雄作，古市正人，作見邦彦

②出願日 平成14年11月20日

③発明の内容の概略

酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素（MTH1）を阻害する薬剤を簡便且つ確実にスクリーニングすることのできる新しいアッセイ系を提供する。MTH1欠損ノックアウトマウス胎仔の線維芽細胞にヒトMTH1を強制発現させた細胞に被験物質を添加し，過酸化水素の存在下に細胞を培養して，その細胞死が認められたときに当該被験物質をMTH1阻害剤として選択するスクリーニング方法。無細胞スクリーニング系におけるような細胞膜透過性を有しない薬剤を選別するという問題も回避される。

2) 発明の名称：老化促進および免疫不全症のモデル動物

①発明者 中別府雄作，土本大介，作見邦彦

②出願日 平成15年4月22日

③発明の内容の概略

広く老化促進や免疫不全症などの病態のモデルとして有用な遺伝子変異動物を提供する。APエンドヌクレアーゼであるAPEX2酵素をコードする遺伝子が欠損している非ヒト哺乳動物，特にマウス。自然DNA損傷に起因する発育遅延を呈し，且つ，損傷に因る障害に感受性が高く免疫担当の細胞の減少が顕著であるので，老化促進や免疫不全などに関与する多くの病態のモデルとして有用である。

## 7. 結び

私は平成9年8月に教授に就任しましたが、その1年後にCRESTのサポートを受ける事ができ、研究室を立ち上げる上で大変助かりました。当初、研究設備がほとんどなかった研究室に、CRESTの支援で第一線級の研究設備を導入する事が可能となり、今日まで研究を進める事ができた事を感謝申し上げます。

5年前に提案した研究構想は、当時世界的にほとんど研究対象となっていなかった「脳におけるDNA損傷と修復」の問題に正面から取り組む事を宣言したものでした。我々の研究チームがいろいろなヒトの脳神経変性疾患でDNAの酸化と修復酵素の発現の変化が見られる事を報告するにつれて、米国やヨーロッパの研究グループがこの分野に少しずつ参入する様になってきました。この5年間では、脳の老化において核酸の酸化損傷がどのような意義を持つのか、最終的な回答を出すには到りませんでした。この問題がヒト脳の老化を考える上で重要な問題である事を明確にする事はできたと考えています。今後、よりヒト疾患に近い動物モデルを作出する事でこの問題を解決できると考え、現在取り組んでいます。

また、5年前は、ちょうど神経幹細胞の存在がクローズアップされた時期でした。我々は、脳が何らかの障害を受けた際にその再生機転として $\Delta$ FosBが誘導され、神経前駆細胞を活性化し、神経分化成熟を引き起こす事で、中枢神経系の再生に関わるという仮説を証明する事を目指して来ましたが、 $\Delta$ FosBの上流のJSAP1そして下流のGalectin-1という分子を介して、少なくとも $\Delta$ FosBが神経分化や再生に関与する事を示す事ができました。今後は、この仮説を直接証明するべく努力する所存です。5年間のご支援に心から感謝申し上げます。

