

【総説】

ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine に起因する病態とその防御機構

－発がんから神経変性まで－

中別府 雄作

九州大学 生体防御医学研究所

要約

8-oxoguanine は代表的な酸化塩基であるが、これまで自然突然変異の主要な原因として研究が進められてきた。細胞ゲノムへの 8-oxoguanine の蓄積はヌクレオチドプールに生じた 8-oxo-dGTP を分解する MTH1 (MutT homolog-1) と DNA 中の cytosine に対合した 8-oxoguanine を切り出す OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase)、鋳型 DNA 中の 8-oxoguanine に挿入された adenine を切り出す MUTYH (MutY homolog) の 3 つの酵素によって低いレベルに保たれている。MTH1、OGG1、MUTYH 欠損マウスの解析から、8-oxoguanine の核ゲノムとミトコンドリアゲノムへの蓄積は MUTYH によって開始される塩基除去修復反応に依存して、2 つの独立した細胞死の経路を活性化することが明らかになった。MUTYH に依存した細胞死はがん抑制機構の 1 つとして機能するだけでなく、ミトコンドリア機能障害による神経細胞死とミクログリオーシスを介して神経変性疾患の発症に関与する。

キーワード：MTH1, OGG1, MUTYH, Cancer, Neurodegeneration

1. はじめに

生物にとって、その遺伝情報を担うゲノム DNA を細胞から細胞へ、親から子へと正確に伝え維持することは最も基本的な生物学的機能であるが、ゲノム DNA やその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素によって酸化される危険に常に曝されている [1]。活性酸素に曝された DNA やヌクレオチドは様々な酸化的化学修飾を受けるが、このような酸化損傷は修復、除去されないとゲノムに蓄積する。その結果、突然変異を引き起こすことで細胞のがん化の原因となり [2]、あるいは細胞死を引き起こすことで多くの変性疾患などの原因となり [3]、老化を促進することが明らかにされつつある。本稿では、DNA の構成塩基の中で最も酸化されやすい guanine の酸化体である 8-oxoguanine のゲノム蓄積を制御する 3 つの酵素

(MTH1, OGG1, MUTYH) の研究から明らかになった 8-oxoguanine による発がんや神経変性について、我々のグループの研究成果を中心に概説する。

2. 8-oxoguanine の生成とゲノム蓄積の経路

DNA を構成する 4 つの塩基の中で guanine が最も酸化されやすいことが知られているが、DNA や遊離の 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP) が水酸基ラジカル (OH•) や一重項酸素 (1O_2) にさらされるとその guanine 塩基の 8 位の炭素に酸素原子が付加され、8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoguanine) が生成される [1, 4]。

8-hydroxy-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine) は 8 位の炭素に水酸基 (OH) が付加された状態である。8-oxoguanine と 8-hydroxyguanine は平衡状態にある互変異性体 (tautomer) であるが、中性の水溶液中ではほとんど 8-oxoguanine の形で存在する [5] (図 1 A)。DNA 中の guanine よりヌクレオチドプール中の dGTP の方が 10 倍近く酸化されやすく 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) が生成される [6] (図 2)。DNA polymerase は鋳型 DNA 中の cytosine と adenine に対して 8-oxo-dGTP を挿入することから、DNA 中の 8-oxoguanine は、ヌクレオチドプールの dGTP の酸化と DNA 中の guanine の直接酸化に由

連絡先：中別府雄作 〒 812-8582

福岡市東区馬出 3-1-1

TEL：092-642-6800

FAX：092-642-6791

E-mail：yusaku@bioreg.kyushu-u.ac.jp

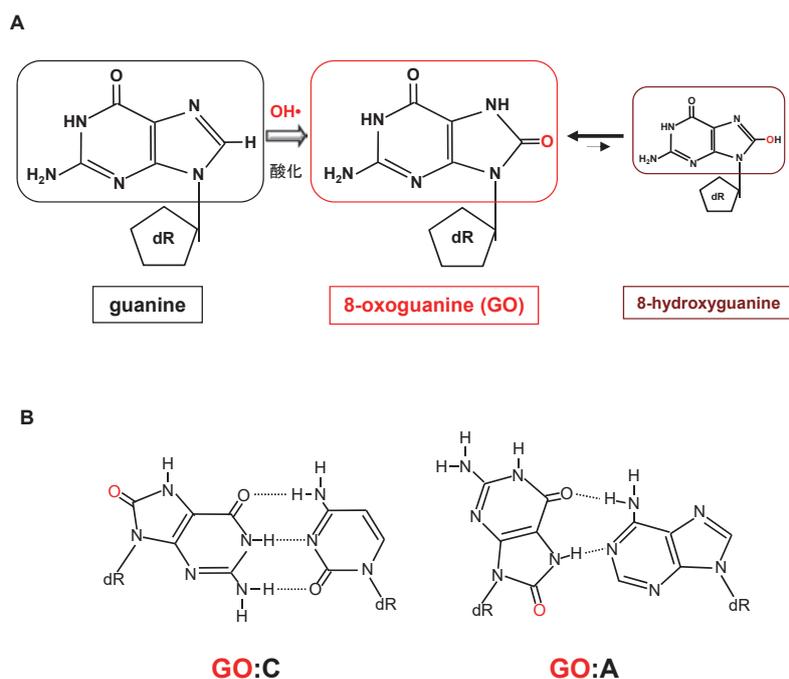


図1 8-oxoguanine の生成と塩基対合の特性

- A. 核酸塩基の中で guanine が最も酸化されやすく、水酸基ラジカルなどにさらされると 8 位の炭素に酸素が付加され 8-oxoguanine (GO) を生じる。8 位に水酸基が付加された 8-hydroxyguanine は 8-oxoguanine の互変異性体であるが、細胞内の環境ではほとんどが 8-oxoguanine として存在する。dR: デオキシリボース。
- B. DNA 中の guanine は通常 *syn/anti* 配置の平衡状態にあるが、8-oxoguanine の場合この平衡が *syn* 配置に偏っており、cytosine に加えて adenine と同程度に安定な塩基対 (GO:A) を形成する。

来する。

DNA 中の 8-oxoguanine はデオキシリボースに対して *anti* 配置と *syn* 配置の両方をとることから、二本鎖 DNA 中では cytosine に加えて adenine とともに安定な塩基対を形成する (図 1 B)。このような状態で DNA 複製が進行すると guanine から thymine へ、あるいは adenine から cytosine への transversion 型の塩基置換変異が誘発される [1] (図 2)。

3. 8-oxoguanine のゲノム蓄積を防ぐ仕組み

哺乳動物では、酸化プリンスクレオシド三リン酸分解酵素 (MTH1、NUDT1 と呼ばれる) により 8-oxo-dGTP が 8-oxo-dGMP と pyrophosphate に加水分解される [7] (図 2)。MTH1 は細胞内では細胞質に最も多く分布し、ミトコンドリアと核にも局在している [8, 9]。MTH1 以外にも 8-oxo-dGTP 分解活性を持つ酵素が複数報告されている [1]。DNA polymerase は 8-oxo-dGMP を基質として利用できないために、MTH1 により 8-oxo-dGTP が分解されると DNA への 8-oxo-dGTP の取り込みが抑制される。

DNA 中の cytosine と対合している 8-oxoguanine は、8-oxoguanine DNA グリコシラーゼ (OGG1) により切り出され、塩基除去修復反応により最終的に guanine に置換される (図 2)。OGG1 は、DNA グリコシラーゼ活性に加えて、脱塩基部位 (apurinic/aprimidinic site: AP

site) で DNA 主鎖の切断を引き起こす AP lyase 活性を持つ。OGG1 には、その mRNA の選択的スプライシングにより核型とミトコンドリア型が存在する [9, 10]。

鋳型鎖 DNA 中の 8-oxoguanine に対して誤って取り込まれた新生鎖 DNA 中の adenine は adenine DNA グリコシラーゼ (MUTYH) により切り出される [11, 12] (図 2)。MUTYH が adenine を除去した後は塩基除去修復反応で鋳型鎖の 8-oxoguanine に対して cytosine か adenine が挿入される。cytosine が挿入された場合には、次に OGG1 が作用して 8-oxoguanine は最終的に guanine に置換される。しかし、adenine が再度挿入されると MUTYH による塩基除去修復反応が繰り返される [13] (図 3 A)。MUTYH にも、その mRNA の選択的スプライシングにより核型とミトコンドリア型が存在する [9, 14]。核型の MUTYH は PCNA (proliferating cell nuclear antigen) などの複製装置と複合体を形成することから、複製時に鋳型 DNA 中の 8-oxoguanine に対して新生鎖に取り込まれた adenine を特異的に認識して塩基除去修復を開始すると考えられている [13, 15]。

4. MTH1、OGG1、MUTYH の欠損は突然変異と発がんを促進する

MTH1 を欠損したマウス個体では核ゲノムへの 8-oxoguanine の蓄積が野生型に比べて 10% 程度上昇し、さらに adenine から cytosine への transversion の自然発

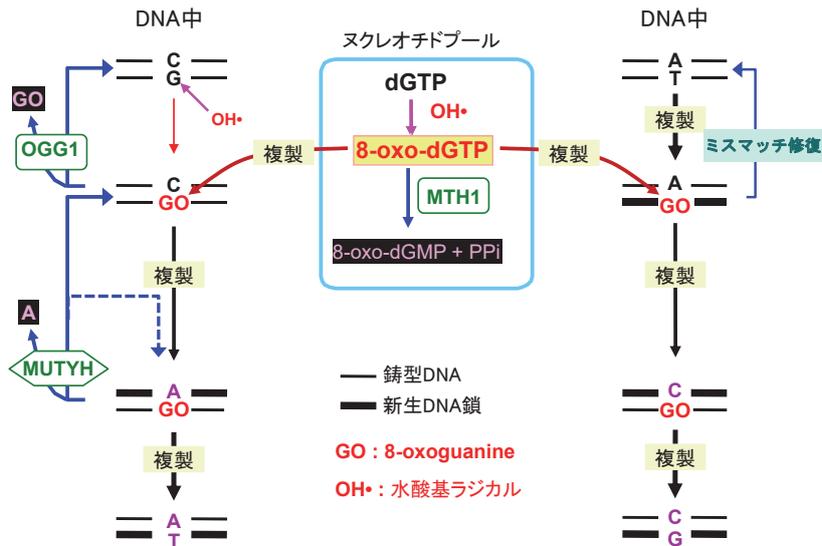


図2 8-oxoguanine の生成とそのゲノム DNA への蓄積を防ぐ仕組み

8-oxoguanine は、2つの経路を介して哺乳動物細胞のゲノム中に蓄積する。1つはヌクレオチドプール中の dGTP が活性酸素で酸化されて生じた 8-oxo-dGTP が DNA ポリメラーゼにより DNA 中に取り込まれる経路である。もう1つは、活性酸素により DNA 中の guanine 残基が直接酸化されて 8-oxoguanine が生成される経路である。ヌクレオチドプール中の 8-oxo-dGTP の分解と DNA 中に蓄積した 8-oxoguanine の修復経路を示す（詳細は本文参照）。

生頻度が野生型の約3倍に上昇していた。このような自然突然変異の上昇に伴い、MTH1 欠損マウスでは生後1年半で肝腫瘍の自然発生が19.4%に認められ、野生型マウス（6.7%）に比べて顕著に増加していた。特に雄マウスでの肝細胞がんの発症頻度は高く（38%）野生型マウスの3倍に達していた [16, 17]。

一方、OGG1 欠損マウスでは 8-oxoguanine の核ゲノムへの蓄積が野生型マウスの数倍に増加するとともに、guanine から thymine への transversion の自然発生頻度が数倍上昇する [18, 19]。さらに、生後1年半の野生型マウスの11%に発症が認められた肺腫瘍（腺腫/腺がん）の自然発生頻度が OGG1 欠損マウスでは52%に上昇していた。OGG1 欠損マウスで見られる肺がんは、OGG1/MTH1 二重欠損マウスでは全く認められなかった。非常に興味深いことに、OGG1/MTH1 二重欠損マウスの臓器では核ゲノムに野生型の数倍以上の 8-oxoguanine が蓄積していた [18]。次節で述べるように、MTH1/OGG1 二重欠損マウスでは、MUTYH の働きで 8-oxoguanine を蓄積した細胞が発がんに至る前に排除されている可能性が示唆される。

MUTYH 単独欠損マウスでは、生後1年半で野生型マウスにはほとんど見られない消化管の腺がんやリンパ腫の自然発生が数倍以上に増加する。また、KBrO₃ の飲水投与（16週間）により野生型マウスや MTH1、OGG1 単独欠損マウスの数十倍近い頻度で消化管腫瘍の発生を認め、3つの遺伝子の中で MUTYH による発がん抑制が最も強力であることが示唆された [20]。ヒトの家族性大腸ポリポーシスの原因の1つとして MUTYH の劣性変異が同定されており、MUTYH-associated polyposis (MAP) と呼ばれている [21]。MAP

患者の大腸腫瘍においては、家族性大腸腺腫症の主要な原因遺伝子の1つである APC 遺伝子において guanine から thymine への変異頻度が高いことが明らかにされている [13]。MUTYH 欠損マウスにおいても、消化管腫瘍で Apc 遺伝子や β-カテニン遺伝子に guanine から thymine への transversion が高頻度で同定されており、MUTYH はこのような自然突然変異を抑制することで、発がんを抑えていると考えられる [22]。

OGG1 と MUTYH の二重欠損マウスでは、肺腫瘍とリンパ腫が野生型マウスの数倍に増加し、さらに野生型マウスでは通常見られない卵巣・子宮の腫瘍と消化管の腫瘍も発生することが報告された。これらの結果は、OGG1/MUTYH 二重欠損マウスにおいて、guanine から thymine への transversion が野生型の40倍以上に上昇することと一致しており、OGG1 と MUTYH がゲノム中に生じた 8-oxoguanine に起因する自然突然変異を協調的に抑制することを示している [23]。

我々は、Mth1、Ogg1、Mutyh の3つの遺伝子をすべて欠損した MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスを樹立し、自然突然変異と発がんに注目して解析を進めてきた。MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスは、生後50日頃から死亡する個体が認められ、500日では生存率は10%近くまで低下した。野生型マウスや3つの遺伝子のヘテロ欠損マウスは生後500日でもその生存率は100%であった。MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスでは、肉眼で35%以上のマウスに肝臓、腎臓、肺、卵巣、乳腺、リンパ組織などの腫瘍に加えて、ハーダー腺腫瘍、毛包上皮腫など多様な腫瘍を含めてさまざまな腫瘍が認められた [24]。

MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスは、in bred

で交配、維持している間に出生数減少し、離乳期を過ぎて生存するマウスが8世代目には数パーセントとなり、系統としての維持が困難であった。さらに、MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウス系統では子孫に水頭症や特殊ながんの発生、毛色の変化など遺伝性の表現形質の変化が観察された。MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスの精巣や卵巣から抽出した DNA には野生型マウスの数倍高いレベルの 8-oxoguanine の蓄積が認められ、生殖細胞系列の突然変異頻度が上昇している可能性が示唆された。そこで、生殖細胞突然変異が最も蓄積していると考えられる 8 世代目の 3 匹のマウスを選択し、その DNA のエクソン領域 40.9 Mb を次世代シーケンサーを用いて解析したところ、このマウスの系統では 1 世代当たりの生殖細胞突然変異発生率が野生型マウス (5.4×10^9 変異 / 塩基 / 世代) と比較して約 3.7 倍 (2×10^7 変異 / 塩基 / 世代) 上昇していた。同定された変異の 99% は 8-oxoguanine に起因する guanine から thymine への transversion で、その頻度は野生型マウスの 450 倍以上に増加していた [24, 25]。同定された guanine から thymine への transversion の約 60% は遺伝子の機能に影響を与えるものであった [24]。

鋳型 DNA の adenine に対して挿入された 8-oxoguanine はミスマッチ修復で除去されることから、MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスでも adenine から cytosine への transversion 変異は増加しないと考えられる [13, 26] (図 2)。

5. 8-oxoguanine は MUTYH に依存して細胞死を引き起こす

MTH1/OGG1 二重欠損マウスは MTH1/OGG1/MUTYH 三重欠損マウスに比べると、ゲノム DNA に 8-oxoguanine が野生型の数倍蓄積しているにもかかわらずその寿命も発がん頻度も野生型レベルである [18, 24]。MTH1/OGG1 二重欠損マウスでは、MUTYH の働きで 8-oxoguanine を蓄積した細胞が発がんに至る前に排除されている可能性が示唆される。我々は OGG1 欠損マウス細胞株を用いた解析により、OGG1 欠損細胞が酸化ストレスに対して高い感受性を示すことを見出した [27]。ヒト細胞には、選択的スプライシングによって生じた核型とミトコンドリア型の OGG1 タンパク質が存在する。我々は OGG1 欠損細胞株に核型とミトコンドリア型ヒト OGG1 (hOGG1) の cDNA 発現ベクターを導入し、2 種類の hOGG1 の一方、あるいは両方を発現する細胞株を樹立した。核型とミトコンドリア型の hOGG1 の両者を発現する細胞は酸化ストレスを負荷してもいずれのゲノム DNA にも 8-oxoguanine を蓄積することはなく、酸化ストレスに対して最も強い抵抗性を示した。核型 hOGG1 を発現する細胞は酸化ストレス負荷後にミトコンドリアゲノムに選択的に 8-oxoguanine を蓄積し、ミトコンドリアの変性を伴って細胞死に陥る。ミトコンドリア型 hOGG1 を発現する細胞は、酸化ストレス負荷後に核ゲノムに選択的に 8-oxoguanine を蓄積し、細胞死に陥る。いずれの場合も MUTYH の

ノックダウンによって細胞死は顕著に抑制されることから、MUTYH に依存した細胞死の経路の存在が明らかになった [27]。

ゲノム DNA 中に 8-oxoguanine が高度に蓄積したまま DNA 複製が進行すると鋳型 DNA 中の 8-oxoguanine に対して adenine が高頻度に取り込まれる。8-oxoguanine に対合した adenine は MUTYH によって切り出されるが、鋳型 DNA には依然として 8-oxoguanine が存在するために塩基除去修復過程で比較的高頻度に adenine が再度挿入される。その結果、MUTYH による adenine の除去修復が継続的に起こるために、特に新生 DNA 鎖に一本鎖の切断が蓄積する (図 3 A)。

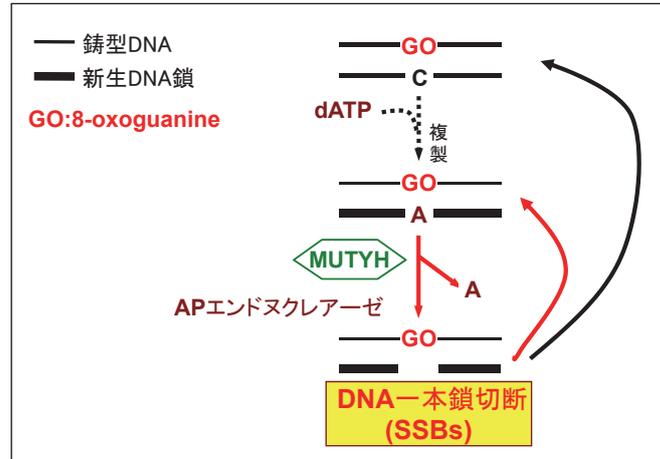
核ゲノムに 8-oxoguanine が蓄積した場合、新生 DNA 鎖の過剰切断によりポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) が活性化される。その結果、ADP-リボース・ポリマー (PAR) の蓄積によりミトコンドリアに局在している Apoptosis-inducing factor (AIF) がプロセッシングが引き起こされ、AIF が核へ移行してカスパーゼ非依存性のアポトーシスを引き起こす (図 3 B 上)。一方、ミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が蓄積した場合、その過剰切断からミトコンドリアゲノム DNA の枯渇を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。その結果、ATP の枯渇によりミトコンドリア膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアからの Ca^{2+} イオンの流出に伴って細胞質のタンパク質分解酵素カルパインが活性化されてリゾソームの崩壊による細胞死が誘導される (図 3 B 下)。この 2 つのプログラム細胞死の経路は、8-oxoguanine を蓄積し変異を起こしやすい細胞を排除する方向に作用することから、発がん抑制機構として重要と考えられる [13, 26]。

6. 8-oxoguanine と神経変性

老化と活性酸素ストレスが神経変性疾患の主要な原因として注目されているが、どのような分子機序で神経細胞脱落が引き起こされるか、その詳細は未だ明らかになっていない。パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病など多くの神経変性疾患では、神経細胞に脂質やタンパク質の酸化体に加えて 8-oxoguanine が多量に蓄積することが報告されており、神経変性が酸化ストレスをとともなうことを示す根拠として注目されている。また、我々は、パーキンソン病とアルツハイマー病患者の剖検脳の解析から、MTH1、OGG1、MUTYH タンパク質の発現が変化していることを報告しているが [28-32]、OGG1 遺伝子については、アルツハイマー病患者特異的な変異も報告され、8-oxoguanine の蓄積が神経変性に関わることが強く示唆されている [33, 34]。

我々は、MUTYH に依存した 2 つのプログラム細胞死が個体レベルで神経変性の過程に関わる可能性を検討するために、ミトコンドリア神経毒 3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) の投与によって引き起こされるハンチントン病モデルを用いて、MTH1、OGG1、MUTYH の欠損の影響を解析した [35]。3-NP はミトコンドリア呼吸鎖 (複合体 II) のコハク酸脱水素酵素活性を不可逆的に

A



B

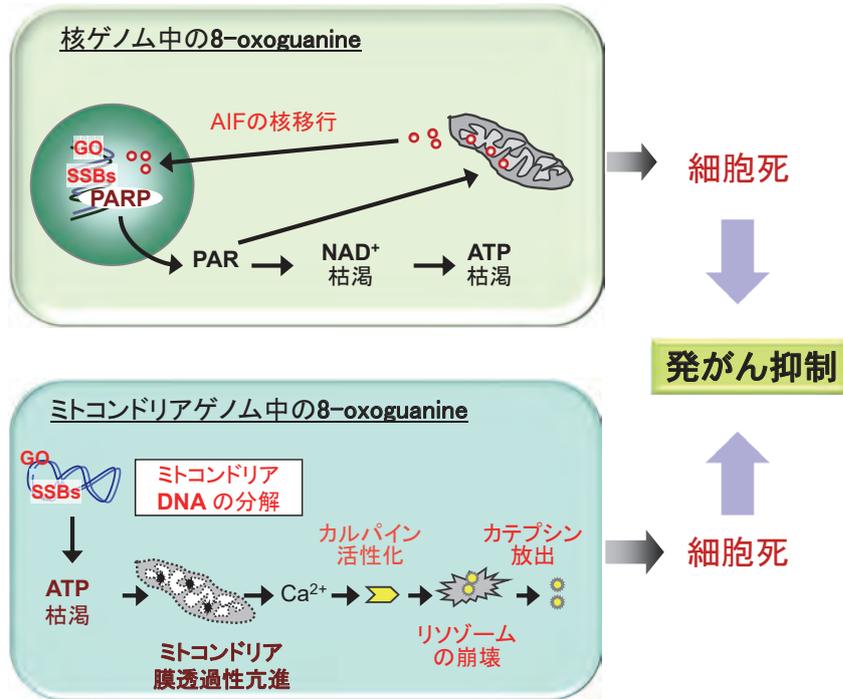


図3 MUTYHによるプログラム細胞死の誘発機構

A. 鋳型 DNA 中に 8-oxoguanine (GO) が存在すると次の複製の際に比較的高頻度で adenine が挿入される。この adenine は MUTYH で切り出され、その後の塩基除去修復過程では cytosine が挿入される場合と adenine が再挿入される場合とに分かれる。cytosine が挿入された場合には、図 2 に示すように OGG1 により 8-oxoguanine が除去修復される。しかし、adenine が再挿入されると、MUTYH による adenine の除去修復が継続的に起こるために、新生 DNA 鎖に一本鎖の切断 (SSBs) が蓄積する。

B. 核ゲノムに 8-oxoguanine (GO) が高度に蓄積し、新生鎖 DNA の過剰切断 (SSBs) が生じるとポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) が活性化され、ADP-リボース・ポリマー (PAR) の蓄積によりミトコンドリアに局在している Apoptosis-inducing factor (AIF) のプロセッシングが誘発される。プロセッシングを受けた AIF は、核移行してカスベース非依存性のアポトーシスを引き起こす (上図)。一方、ミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が高度に蓄積し、ミトコンドリアゲノム DNA の過剰切断 (SSBs) が生じるとミトコンドリアゲノム DNA の分解・枯渇を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。その結果、ATP の枯渇によりミトコンドリア膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアからの Ca²⁺ イオンの流出に伴って細胞質のタンパク質分解酵素カルパインが活性化される。最終的に、リソゾームが崩壊し、タンパク質分解酵素カテプシンの放出されるため細胞成分が分解され、細胞死が誘導される (下図)。このような MUTYH による細胞死は発がん抑制に寄与すると考えられる。

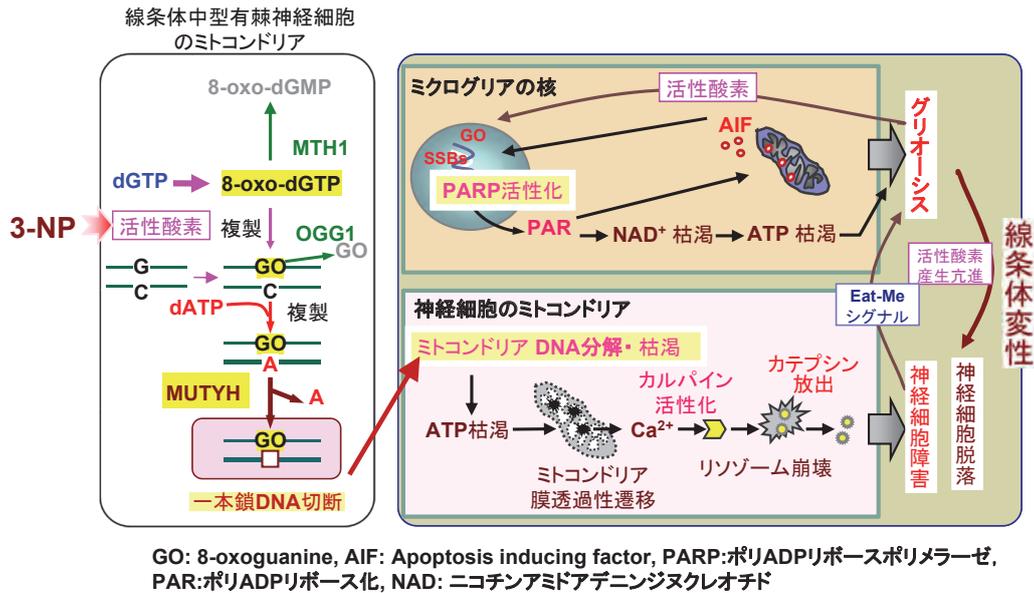


図4 3-ニトロプロピオン酸による線条体変性の分子機序

3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) をマウスに全身投与すると線条体の神経細胞に選択的に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体 II を特異的に阻害し、活性酸素の生成を誘発する。その結果、ヌクレオチドプールの dGTP が酸化され、8-oxo-dGTP が生じる。神経細胞ではミトコンドリアゲノムのみが複製しているために、ミトコンドリアゲノムに選択的に 8-oxoguanine が蓄積する。MUTYH により 8-oxoguanine に対して取り込まれた adenine が除去されると修復過程でミトコンドリアゲノム DNA が分解され、神経細胞の機能不全や細胞死が誘導される。このような障害を受けた神経細胞はミクログリアを活性化する。その結果、ミクログリア自身が産生する活性酸素によりミクログリアの核ゲノムに 8-oxoguanine の蓄積を引き起こす。ミクログリアの核ゲノムに蓄積した 8-oxoguanine は MUTYH に依存してミクログリオシスを増悪させ、神経変性を加速する。(詳細は本文参照)

阻害することでミトコンドリアにおける活性酸素の生成を亢進させるため、さまざまな機能分子の酸化を引き起こし、細胞機能障害を誘発する (図4左)。ヒトやサル、マウスが 3-NP を摂取すると、特に 3-NP に脆弱な線条体の中型有棘神経細胞死が誘発され、ハンチントン病様の運動機能障害を呈することが知られている。

MTH1、OGG1 あるいは MUTYH の単独欠損マウスと OGG1/MTH1 二重欠損マウス、そして野生型マウスに 3-NP を投与したところ、OGG1/MTH1 二重欠損マウス、OGG1 欠損マウス、MTH1 欠損マウスの順に野生型マウスよりも重篤な運動機能障害を呈し、線条体に高度な 8-oxoguanine の蓄積を伴う神経細胞脱落を呈することが明らかになった。興味深いことに、MUTYH 欠損マウスは野生型マウスと同程度かそれ以上の 3-NP 抵抗性を示した。OGG1/MTH1 二重欠損マウスや OGG1 欠損マウスで見られる線条体変性の早期には、3-NP による 8-oxoguanine の高度な蓄積は主に中型有棘神経細胞のミトコンドリアゲノムに認められ、ミトコンドリア機能障害を介してカルパイン活性化を伴う神経細胞の障害が観察された。一方、線条体変性の後期には神経細胞脱落部に増生したミクログリアの核ゲノムに顕著な 8-oxoguanine の蓄積が認められ、PARP の活性化と AIF の核移行が認められた。3-NP による線条体神経細胞脱落、ミクログリオシス、そして運動機能障害は、いずれもカルパイン阻害剤、あるいは PARP 阻害剤の

投与により有意に軽減することが確認された [35]。

OGG1 単独欠損マウスと OGG1/MTH1 二重欠損マウスの 3-NP 投与に対する応答を比較したところ、OGG1/MTH1 二重欠損マウスにおいては運動機能障害が顕著に軽減し、線条体における神経細胞脱落およびミクログリオシスもほとんど認められなかった。OGG1 欠損マウスの線条体の中型有棘神経細胞のミトコンドリア DNA とミクログリアの核ゲノムに認められた一本鎖 DNA 切断の蓄積も OGG1/MTH1 二重欠損マウスにおいては全く認められなかった [35]。

我々は、線条体組織に蓄積する 8-oxoguanine の起源を明らかにするために、ヒト MTH1 (hMTH1) を高発現するトランスジェニックマウスを樹立し、3-NP による線条体変性の程度を野生型マウスと比較した [36]。その結果、hMTH1 の高発現により線条体における 8-oxoguanine の蓄積と線条体変性が顕著に抑制され、3-NP の神経毒性に対して顕著な抵抗性を獲得することが確認された。OGG1/MTH1 二重欠損マウスが最も 3-NP の神経毒性に対して感受性が高いことをあわせて考えると、ヌクレオチドプール中の dGTP の酸化で生じた 8-oxo-dGTP が神経細胞のミトコンドリアゲノムやミクログリアの核ゲノム中に蓄積した 8-oxoguanine の起源であると結論される (図4左)。

細胞分裂しない神経細胞では核ゲノムは複製されないが、ミトコンドリアは神経細胞の機能維持に不可欠なエ

エネルギーを供給するためにそのゲノム DNA を常に複製し、新しいミトコンドリアをシナプス等に供給している。ヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP が DNA 中に取り込まれるには DNA 複製が不可欠である。3-NP を投与した OGG1/MTH1 二重欠損マウスの神経細胞では複製するミトコンドリアゲノムのみならず 8-oxoguanine が高度に蓄積し、さらにその後の複製に際して DNA 中に存在する 8-guanine に対して取り込まれた adenine を MUTYH が除去することで開始される塩基除去修復の中間産物である一本鎖 DNA 切断の生成が過剰となり、ミトコンドリアゲノム DNA が分解枯渇したと考えられる。その結果、ミトコンドリア膜電位が維持されなくなり、細胞質に放出された Ca^{2+} イオンによって活性化されたカルパインに依存した神経細胞の機能障害が誘導されると考えられる [37] (図 4 右下)。

最近我々は、MTH1/OGG1 二重欠損マウスの脳から大脳皮質の神経細胞を取り出し、抗酸化剤の存在下、非存在下で培養し、神経細胞の神経突起の生成やミトコンドリア機能に注目して解析した。その結果、MTH1/OGG1 二重欠損神経細胞は抗酸化剤のない条件で培養すると、ミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine を多量に蓄積し、ミトコンドリア機能障害に陥り、さらに神経突起の生成が顕著に低下することを見出した。すなわち、神経細胞のミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が蓄積すると、ミトコンドリア機能が障害されるためミトコンドリアは神経突起の生成とその維持に不可欠なエネルギーを供給できなくなるために、神経突起が維持されずに変性が進むことが確認された [38]。

一方、神経細胞の変性は、それ自身が脳内の免疫担当細胞であるミクログリアの活性化と増殖を誘発する。活性化ミクログリアは NADPH oxidase (NOX) 等により、その周囲に活性酸素を発生させるため、ミクログリアのヌクレオチドプールにも 8-oxo-dGTP が蓄積する。ミクログリアは分裂増殖に際して核ゲノムを複製することから、ヌクレオチドプールからその核ゲノム中に 8-oxoguanine が取り込まれて蓄積する。核ゲノム中に多量に蓄積した 8-oxoguanine もその後の複製に際して adenine と対合し、MUTYH による塩基除去修復の標的となる。その結果、核ゲノムの新生鎖に一本鎖 DNA 切断が蓄積するために PARP が活性化され、その下流でミトコンドリアに局在する AIF が切断され核に移行してミクログリアの活性化を促進すると考えられる。このような状況では、ミクログリオシスの増悪とともに活性酸素の生成が顕著に増強されるために、神経細胞はさらにダメージを受ける。また、活性化ミクログリアによる神経細胞の貪食作用によっても線条体の変性が著しく亢進されると考えられる [35, 37] (図 4B 右上)。

最近、フリードリヒ運動失調症において、MUTYH と PARP に依存したミクログリアの活性化が小脳と脊髄の神経変性、そして運動失調症の発症に関与することが報告され、我々が見出した MUTYH に依存したミクログリアの活性化機構が普遍的なものであることが報告された [39]。

7. おわりに

パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病など多くの老年性の神経変性疾患患者脳では、神経細胞のミトコンドリアゲノムに 8-oxoguanine が普遍的に蓄積しミクログリオシスを伴うことから、これらの神経変性疾患に共通の分子機序として図 4 に示した 2 つの経路が関与している可能性が強く示唆される。これらの経路に関わる分子は、認知症を始めとする神経変性疾患の治療薬開発に向けた新たな分子標的として有用と期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究は、九州大学 生体防御医学研究所 脳機能制御学分野でおこなわれたものです。研究を推進していただいたメンバーの皆様に感謝いたします。

引用文献

1. Nakabeppu Y, Behmanesh M, Yamaguchi H, *et al.* Prevention of the Mutagenicity and cytotoxicity of Oxidized Purine Nucleotides. In *Oxidative Damage to Nucleic Acids*, ed. M Evans, M Cooke, pp. 40-53. Landes Bioscience, Springer Science+Business Media, Austin, TE, USA and New York, NY, USA: 2007.
2. Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, *et al.* Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* 387: 373-379, 2006.
3. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, *et al.* Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 85: 919-934, 2007.
4. Kasai H, Nishimura S Hydroxylation of Deoxyguanosine at the C-8 Position by Ascorbic-Acid and Other Reducing Agents. *Nucleic Acids Res* 12: 2137-2145, 1984.
5. Jang YH, Goddard WA, Noyes KT, *et al.* First Principles Calculations of the Tautomers and pKa-Values of 8-Oxoguanine: Implications for Mutagenicity and Repair. *Chem Res Toxicol* 15: 1023-1035, 2002.
6. Kamiya H, Kasai H Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation. *J Biol Chem* 270: 19446-19450, 1995.
7. Nakabeppu Y Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutat Res* 477: 59-70, 2001.
8. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A, *et al.* Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids

- Caused by Reactive Oxygen Species: From Mitochondria to Nuclei. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 101-111, 2004.
9. Nakabeppu Y 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, 2001.
 10. Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, *et al.* 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: 1637-1652, 1999.
 11. Tominaga Y, Ushijima Y, Tsuchimoto D, *et al.* MUTYH prevents OGG1 or APEX1 from inappropriately processing its substrate or reaction product with its C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 32: 3198-3211, 2004.
 12. Ushijima Y, Tominaga Y, Miura T, *et al.* A functional analysis of the DNA glycosylase activity of mouse MUTYH protein excising 2-hydroxyadenine opposite guanine in DNA. *Nucleic Acids Res* 33: 672-682, 2005.
 13. Oka S, Nakabeppu Y DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci* 102: 677-682, 2011.
 14. Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, *et al.* 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: 1355-1364, 2000.
 15. Hayashi H, Tominaga Y, Hirano S, *et al.* Replication-associated repair of adenine:8-oxoguanine mismatches by MYH. *Curr Biol* 12: 335-339, 2002.
 16. Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the *MTH1* gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11456-11461, 2001.
 17. Tsuzuki T, Nakatsu Y, Nakabeppu Y Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Sci* 98: 465-470, 2007.
 18. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, *et al.* *Ogg1* knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by *Mth1* gene disruption. *Cancer Res* 63: 902-905, 2003.
 19. Isogawa A Functional cooperation of *Ogg1* and *Mutyh* in preventing G: C->T: a transversions in mice. *Fukuoka Igaku Zasshi* 95: 17-30, 2004.
 20. Sakamoto K, Tominaga Y, Yamauchi K, *et al.* MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 67: 6599-6604, 2007.
 21. Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Ushijima Y, *et al.* Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clin Genet* 73: 545-553, 2008.
 22. Isoda T, Nakatsu Y, Yamauchi K, *et al.* Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* 10: 940-947, 2014.
 23. Xie Y, Yang H, Cunanan C, *et al.* Deficiencies in mouse *Myh* and *Ogg1* result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64: 3096-3102, 2004.
 24. Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, *et al.* 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep* 4: 4689, 2014.
 25. Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, *et al.* Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genome Res* 25: 1125-1134, 2015.
 26. Nakabeppu Y Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 15: 12543-12557, 2014.
 27. Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D, *et al.* Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27: 421-432, 2008.
 28. Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, *et al.* Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46: 920-924, 1999.
 29. Furuta A, Iida T, Nakabeppu Y, *et al.* Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12: 2895-2899, 2001.
 30. Iida T, Furuta A, Nishioka K, *et al.* Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica* 103: 20-25, 2002.
 31. Fukae J, Takanashi M, Kubo S, *et al.* Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 109: 256-262, 2005.
 32. Arai T, Fukae J, Hatano T, *et al.* Up-regulation of hMUTYH, a DNA repair enzyme, in the mitochondria of substantia nigra in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 112: 139-145, 2006.
 33. Mao G, Pan X, Zhu BB, *et al.* Identification and

- characterization of *OGG1* mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35: 2759-2766, 2007.
34. Jacob KD, Noren Hooten N, Tadokoro T, *et al.* Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human *OGG1* alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage. *Free Radic Biol Med* 63: 115-125, 2013.
 35. Sheng Z, Oka S, Tsuchimoto D, *et al.* 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J Clin Invest* 122: 4344-4361, 2012.
 36. De Luca G, Russo MT, Degan P, *et al.* A role for oxidized DNA precursors in Huntington's disease-like striatal neurodegeneration. *PLoS Genet* 4: e1000266, 2008.
 37. Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, *et al.* Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev*, in press, 2016 (DOI: 10.1016/j.mad.2016.05.005)
 38. Leon J, Sakumi K, Castillo E, *et al.* 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neurogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci Rep* 6: 22086, 2016.
 39. Shen Y, McMackin MZ, Shan Y, *et al.* Frataxin Deficiency Promotes Excess Microglial DNA Damage and Inflammation that Is Rescued by PJ34. *PLoS One* 11: e0151026, 2016.

Pathophysiology caused by 8-oxoguanine accumulated in genomes and protective mechanisms: from carcinogenesis to neurodegeneration

Yusaku Nakabeppu

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

Abstract

8-oxoguanine, the most common oxidized base, has been characterized as a major cause of spontaneous mutagenesis. Levels of 8-oxoguanine in cellular genomes are maintained very low by coordinated actions of MTH1 (MutT-homolog-1) hydrolyzing 8-oxo-dGTP formed in nucleotide pool, OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) excising 8-oxoguanine opposite cytosine in DNA, and MUTYH (MutY homolog) excising adenine inserted opposite 8-oxoguanine in template DNA. Studies with mutant mice lacking MTH1, OGG1 or MUTYH, revealed that accumulation of 8-oxoguanine in either nuclear or mitochondrial genome triggers two distinct cell death programs dependent on MUTYH-initiated base excision repair. MUTYH-dependent cell death contributes to not only suppression of carcinogenesis, but also is involved in neurodegeneration through neuronal death due to mitochondrial dysfunction and microgliosis.

Keywords : MTH1, OGG1, MUTYH, Cancer, Neurodegeneration