



Title	中枢神経系での酸化ストレス制御におけるALKBH8の役割
Author(s)	本田, 弘平
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98673
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (本田 弘平)	
論文題名	中枢神経系での酸化ストレス制御におけるALKBH8の役割
論文内容の要旨	
<p>mRNA、tRNA、rRNAなどのRNAはエピトランスクリプトームと呼ばれる転写後の様々な修飾を受けその機能が制御されている。RNAの修飾はwriterおよびeraserと呼ばれるタンパク質によってそれぞれ付加および除去される。また付加された修飾はreaderと呼ばれるタンパク質により認識されることでスプライシング過程におけるエクソンの認識や翻訳効率の向上など多様な機能発揮に関与する。tRNAにおいては翻訳の際に正確な立体構造を構築することや翻訳制御因子との相互作用にとってその修飾が重要な役割を担う。tRNA配列の中で34番目に位置するウリジン(U34)はアンチドン認識配列の第一塩基に該当し、ゆらぎ塩基対(wobble base pairing)を形成する。このU34は様々な種類の修飾を受けることでコドン認識を介したDNA情報の読み取りに寄与している。RNA修飾は様々な生体機能や疾患との関連が報告されており、その制御メカニズムを解明することは生体機能の更なる理解や疾患に対する治療開発にとって重要である。</p> <p>RNA修飾機能を持ったAlkB homolog (ALKBH) ファミリーの一つとして同定されたALKBH8は、ファミリーに共通している2-oxoglutarate (2-OG)/Fe(II)依存的オキシゲナーゼドメイン (2-OGドメイン) に加えALKBHファミリーのなかで唯一メチルトランスフェラーゼドメイン(MTドメイン)も有している。ALKBH8はtRNA U34における5-carboxymethyl-uridine (cm5U)修飾を基質とし、メチルトランスフェラーゼ活性により5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm5U)修飾を、さらにヒドロキシル化活性により (S)-5-methoxycarbonylhydroxymethyluridine ((S)-mchm5U)修飾を生成する。tRNA U34におけるcm5Uとmchm5U修飾はセレノシスティンに対するtRNA (tRNA^{Sec}) に見られ、セレノプロテイン合成に必須である。また、ヒト由来細胞においてALKBH8の欠損はcm5Uの蓄積とmcm5Uの減少を引き起こし、DNA合成阻害剤に対し脆弱性を示す。このような <i>in vitro</i>での知見がある一方で、<i>in vivo</i>における生物学的な機能は充分に分かっていない。当研究室ではALKBH8の機能解析を行うため <i>Alkbh8</i>^{-/-}マウスを作製している。これまでに <i>Alkbh8</i>^{-/-}マウスを用いた新奇物体認識試験、ロータロッド試験、および強制水泳試験において <i>Alkbh8</i>^{+/+}に比して行動異常が見出されている。このような個体レベルでの表現型に変化が認められているが、ALKBH8がどのようなメカニズムを介して表現型に影響を与えていているかについては分かっていない。そこで、本研究では病理学的解析および分子生物学的解析によりALKBH8の役割を検討した。</p> <p>本研究では上記の行動異常におけるALKBH8のメカニズムを明らかにすることを目的としているが、その原因がどの組織で起きているか不明である。そこで、ALKBH8が重要な役割を担っている組織の同定を行った。 <i>Alkbh8</i>^{-/-}マウスにおけるウリジン修飾の解析において、ALKBH8の基質となるcm5Uの蓄積は全組織で認められたにもかかわらず、メチル化修飾体であるmcm5Uの低下は脾臓や肝臓にくらべ脳組織（大脳、小脳、海馬、線条体）ではその程度が低かった。このことは脳においてmcm5U修飾が何らかの代償的な機能により補完されており、mcm5Uおよびその下流の修飾が脳において重要であることを示唆している可能性があると考えた。また、行動異常が認められた新奇物体認識試験からは認知機能の低下が起きていること、ロータロッド試験および強制水泳試験からは諦めや行動制御が効かないなど過剰な刺激あるいは抑制系の抑制が起きていることが考えられた。これらはそれぞれ異なる機能を評価する試験であるが、総じて中枢神経系の機能における異常を示唆するものと考えた。これらの結果より本研究ではALKBH8が脳機能に関与していると仮説を立てその検証を行った。まずはALKBH8が脳に発現していることを確認した。 <i>Alkbh8</i> mRNAは発現の程度に差はあるものの脳を含む多様な組織でユビキタスに発現が認められた。また、大脳、海馬、小脳においてタンパク質レベルでも発現していることを確認し、 <i>Alkbh8</i>^{-/-}マウスではその発現が消失していることを確認した。さらにヒト神経芽細胞腫細胞株SH-SY5Yを神経細胞へ分化誘導したときにALKBH8タンパク質発現の増加が認められた。これらの結果から、ALKBH8は脳組織、そして神経細胞において発現しており、 <i>Alkbh8</i>^{-/-}マウスで認められた脳でのtRNA修飾変化や行動異常は脳局所におけるALKBH8の機能が関与していると考えられた。</p> <p>次に <i>Alkbh8</i>の欠損が脳に与えている影響を検討した。 <i>Alkbh8</i>^{-/-}マウスの脳重量を肝臓、脾臓、腎臓重量と比較した結果、脳以外の組織では <i>Alkbh8</i>^{+/+}、 <i>Alkbh8</i>^{-/-}によらず組織重量と体重の相関が認められたが、脳においては体重に</p>	

依存せず *Alkbh8* ^{-/-}マウスにおいて一定の脳重量低下が認められた。また、脳の病理解析では、*Alkbh8* ^{-/-}マウスの海馬CA1領域に隣接した纖維束部分において *Alkbh8* ^{+/+}に比べeosin染色の有意な淡明化が認められた。海馬CA1領域は脳のなかで虚血や低酸素ストレスに対し感受性が高い領域として知られている。また虚血による神経変性の指標として pyknotic neuron と呼ばれる収縮した濃い染色像を示す神経細胞が観察されることが知られているが、*Alkbh8* ^{-/-}マウスの側頭葉第三層以下の領域において pyknotic neuron の増加が認められた。これらの変化から *Alkbh8* ^{-/-}マウスの大脳あるいは海馬が低酸素ストレスに対し脆弱となり神経細胞がダメージを負っている可能性が考えられた。低酸素ストレスとの関連は不明であるが、髄液の循環障害に起因すると考えられる側脳室の拡大、側脳室上衣細胞層でのグリア細胞残遺およびVirchow-Robin腔の拡大がより *Alkbh8* ^{-/-}マウスにおいて観察された。

病理所見から *Alkbh8* ^{-/-}マウスでは脳において構造異常が起きていることが明らかとなった。そこで、*Alkbh8* ^{-/-}マウスの脳ではどのような分子メカニズムの変化が起きているか検討を行った。ALKBH8はtRNA修飾を介したタンパク質翻訳の制御に関与していることから、*Alkbh8* ^{-/-}マウスの大脳、小脳、海馬を対象にプロテオミクス解析を実施した。大脳および海馬ではミトコンドリア機能に関するontologyに含まれるタンパク質群が *Alkbh8* ^{-/-}マウスで亢進しており、特徴的なタンパク質群として NADH:ubiquinone oxidoreductase supernumerary subunits (NDUF) や Mitochondrial ribosomal proteins (MRP) に属するタンパク質が多く検出された。また、Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) や Gamma-glutamyltransferase 7 (GGT7) といった酸化ストレス応答に関わるタンパク質が *Alkbh8* ^{-/-}マウスで低下していた。ALKBH8の関与が報告されている Glutathione peroxidase 1 (GPX1) や GPX3 を含む17種類のセレノプロテインも検出されたが、いずれも顕著な発現変化は認められなかった。このことから脳においてはこれまでの報告とは異なるタンパク質制御により酸化ストレス応答に関与している可能性が考えられた。酸化ストレスへの応答はタンパク質だけでなく低分子代謝物も関与しているため、大脳皮質と海馬を対象にメタボロミクス解析も実施した。その結果、*Alkbh8* ^{-/-}マウスの大脳においてメチオニン、ベタイン、システイン、システイングルタチオンジスルフィドの低下が認められた。これらの代謝物は酸化ストレスに対する防御機構として知られるメチオニンサイクルおよびグルタチオン合成経路に含まれる代謝物であることから、タンパク質に加え代謝物の観点からも酸化ストレス応答の脆弱性が示唆された。

病理解析においてはCA1領域近傍の淡明化や pyknotic neuron も認められたことから、*Alkbh8* ^{-/-}マウス脳における異常が神経細胞において起きている可能性がある。そこでマウス胎仔脳から神経細胞を単離培養し、*Alkbh8*欠損の影響を検討した。単離した神経細胞（グリア細胞を含む）の細胞数、樹状突起長および神経突起長において *Alkbh8* ^{+/+} と *Alkbh8* ^{-/-} の間で違いは認められなかった。しかし、ミトコンドリアの膜電位を MT1 試薬により可視化した結果、細胞当たりの MT1 強度が *Alkbh8* ^{+/+} に比べ *Alkbh8* ^{-/-} 由来細胞において顕著に低下していた。さらに MT1 強度は complex I 阻害薬である rotenone の添加により低下したが、*Alkbh8* ^{+/+} に比べ *Alkbh8* ^{-/-} でより顕著な低下が認められた。これらの結果から *Alkbh8* ^{-/-} 由来神経細胞あるいはグリア細胞においてミトコンドリア機能が低下していることが示唆された。

ここまで得られた *Alkbh8* ^{-/-} マウスにおける結果がヒトにおいて起こり得るか検証することは将来的な病態理解や治療応用を考えるうえで重要である。そこでヒトへの外挿性を検討するため、近年ヒトにおいて知的障害の原因として報告された変異型 ALKBH8 (c. 1651CtoT (p. Arg551*) あるいは c. 1785delC (p. Trp596Glyfs*19)) の酵素活性機能を *in vitro* での酵素反応系により評価した。まずメチルトランスフェラーゼドメインによる c-m5U から mcm5U への修飾（メチルトランスフェラーゼ活性）を評価した結果、野生型 ALKBH8 に対し変異型 ALKBH8 では活性が減弱していた。一方で、メチル化された mcm5U に対する (S)-mchm5U への修飾（2-OG ドメインによるヒドロキシル活性）を評価した結果、野生型および変異型 ALKBH8 いずれも同等の活性を示した。このことからヒトで見出された変異型 ALKBH8 は変異が入っている MT ドメインの機能を欠損しているが、2-OG ドメインの機能は保持していることが明らかになった。ただし、生体内の反応においてはメチル化により生成される mcm5U がヒドロキシル化反応の基質となるため、MT ドメインのみの機能欠損で (S)-mchm5U を含む修飾の低下に充分であり、ヒトにおける変異型 ALKBH8 も *Alkbh8* ^{-/-} マウスと同様の機能阻害が起きていることが明らかとなった。

本研究では、ALKBH8 が正常な脳の形成に重要であり、その機能が欠損すると酸化ストレス応答が不十分となり大脳皮質および海馬において虚血性変化と類似のダメージを受けることを明らかにした。また ALKBH8 は神経細胞のミトコンドリア機能維持にも必要であり、その制御メカニズムは NNT や GGT7 といった酸化ストレス応答因子を介したものである可能性を見出した。これら分子メカニズムは、これまで知られているセレノシステインを介したものとは異なるものであった。また、ヒトにおいて知的障害との関連が見出された変異型 ALKBH8 は MT ドメイン機能を欠損しており、*Alkbh8* ^{-/-} マウスと同様の RNA 修飾変化を引き起こすことも見出した。このことから本研究で得られた ALKBH8 の機能に関する知見がヒトへ外挿できる可能性がある。今後、*Alkbh8* ^{-/-} マウスにおける更なる表現型解析や分子メカニズム解析を行うことで、ヒトにおける神経疾患の理解や治療法への応用などが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (本田 弘平)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 辻川 和丈
	副査 教授 中川 晋作
	副査 教授 橋本 均

論文審査の結果の要旨

DNAやタンパク質とともに、RNAにもメチル化等の多様な修飾が施されていることが明らかとなってきた。このRNAの後天的修飾による遺伝子の発現制御はエピトランスクリプトミクスと呼ばれている。エピトランスクリプトミクス制御は、修飾付加酵素と修飾除去酵素により担われており、さらに修飾されたRNAに認識タンパク質が結合することによりRNAに対する多様な調節機能が発現する。一方、これら修飾付加酵素、修飾除去酵素や認識タンパク質の発現異状や変異は種々の疾患の発症や悪性化に繋がることも明らかにされつつあり、注目されている。

本研究では、RNA修飾除去酵素であるAlkB homolog (ALKBH) ファミリー分子の1つであるALKBH8に着目して、中枢神経系での機能と疾患発症との関連性の解析研究が進められた。ALKBH8はALKBHファミリー分子に共通した2-oxoglutarate, Fe(II)-oxygenase domainとともに、他のALKBHファミリー分子には認められないRNA recognition motifやmethyltransferase domainを有する。ALKBH8はmethyltransferase domainを介してtRNAの5-carboxymethyluridineを5-methoxycarboxymethyluridineに、さらに2-oxoglutarate, Fe(II)-oxygenase domainを介して(S)-5-methoxycarboxyhydroxymethyluridineに変換する酵素活性を発現する。またこれらdomainを完全欠失する*Alkbh8*ノックアウトマウスは、認知機能の低下等の表現型が認められている。そこで本博士論文では病理学的解析および分子生物学的解析によりその表現型発現の分子メカニズムの解析と考察が行われた。その結果、病理解析から野生型マウスに比べ*Alkbh8*ノックアウトマウスの脳は低酸素や酸化ストレスによると思われる病理組織学的異常が大脳および海馬に起きていることを認めた。また*Alkbh8*ノックアウトマウスの脳では酸化ストレス関連因子の発現が変動していることを突き止めた、さらに神経細胞およびグリア細胞におけるミトコンドリア機能阻害が起きていることも見出した。

一方、近年ヒトにおいて知的障害と変異型ALKBH8との関連性が報告された。そこでこの変異型ALKBH8のリコンビナントタンパク質を作製して酵素活性を検証したところmethyltransferase domainの活性が減弱していることを認めた。さらにこの変異*Alkbh8*ノックインマウスは、*Alkbh8*ノックアウトマウスと同様の表現型が起きていることを明らかにした。この変異*Alkbh8*ノックインマウスに関してはさらなる詳細な表現型解析が必要ではあるが、ヒトの表現型をマウスにおいて再現できていることは非常に重要な意義を有するものと考える。

以上、本研究では中枢神経系におけるALKBH8機能が見出され、さらにヒトにおけるALKBH8と脳機能や神経疾患の理解へつながる成果が見いだされたことより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。