



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

博士学位論文

中枢神経系での酸化ストレス制御における ALKBH8 の役割

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻

細胞生理学分野 博士後期課程 3 年

本田 弘平

目次

略語.....	3
緒言.....	5
本論.....	11
第一章.....	11
第一節 実験材料および方法.....	11
第二節 脳における <i>Alkbh8</i> の発現.....	12
第二章.....	15
第一節 実験材料および方法.....	15
第二節 <i>Alkbh8</i> マウスの脳における病理解析.....	15
第三章.....	20
第一節 実験材料および方法.....	20
第二節 <i>Alkbh8</i> マウスの脳における分子メカニズム解析.....	23
第三節 変異型 ALKBH8 の酵素活性評価.....	33
総括.....	37
謝辞.....	41
本研究遂行における寄与.....	42
参考文献.....	43

略語

2-OG	2-oxoglutarate
ALKBH	AlkB homologs
atRA	All trans-retinoic acid
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CA1	Cornu ammonis 1
CBB	Coomassie brilliant blue
CE-FTMS	Capillary electrophoresis-Fourier transform mass spectrometry
cm5U	5-carboxymethyluridine
ELP	Elongator acetyltransferase complex subunit
FBS	Fetal bovine serum
FTO	Fat mass and obesity-associated protein
GGT	Gamma-glutamyltransferase
GPX	Glutathione peroxidases
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HE	Hematoxylin and eosin
m6A	N6-methyladenosine
MAP2	Microtubule-associated protein 2
mcm5s2U	5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine
mcm5U	5-methoxycarbonylmethyluridine
mcm5Um	5-methoxycarbonylmethyl-2'-O-methyluridine
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
METTL3	Methyltransferase 3, N ⁶ -adenosine-methyltransferase complex catalytic subunit
mRNA	Messenger RNA
MRP	Mitochondrial ribosomal proteins
nchm5U	5-carbamoylhydroxymethyluridine
ncm5U	5-carbamoylmethyluridine
ncm5Um	5-carbamoylmethyl-2'-O-methyluridine
NDUF	NADH:ubiquinone oxidoreductase supernumerary subunits
NES	Normalized enrichment score
NNT	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NSUN	NOP2/Sun RNA methyltransferase
pNF	phospho-neurofilament
ROS	Reactive oxygen species
RRM	RNA recognition motif

rRNA	Ribosomal RNA
(S)-mchm5U	(S)-5-methoxycarbonylhydroxymethyluridine
TRMT1	tRNA methyltransferase 1
tRNA	Transfer RNA
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1
VR	Virchow-Robin
WTAP	WT1 associated protein
YTHDF2	YTH N ⁶ -methyladenosine RNA binding protein F2

緒言

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を発揮する[1], [2]。tRNA の修飾は翻訳の際に正確な立体構造の構築や翻訳制御因子との相互作用にとって重要な役割を担う。tRNA 配列の中で 34 番目に位置するウリジン(U34)はアンチコ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[3], [4]。ALKBH は9種のタンパク質からなるファミリーを形成しており (ALKBH1~8 および FTO)、Fe(II)と 2-OG 依存的な脱メチル化活性を有した“eraser”としての機能が知られている。各 ALKBH タンパク質は様々な対象を基質としており、ALKBH1, 3, 5, 7, 8そして FTO は RNA を[5]–[10]、ALKBH1, 2そして 3 は DNA を[11], [12]、ALKBH1 と 4 はタンパク質[13], [14]を修飾することが報告されている。

RNA 修飾は様々な生体機能や疾患との関連が報告されている。胎仔発生の過程においては METTL3 や YTHDF2 による m6A 修飾や認識が必須である[15]。m6A 修飾はがんとの関連も見出されており、writer である METTL3, WTAP、eraser である ALKBH5, FTO、reader である YTHDF1/2/3 などの関与が報告されている[16]。また FTO の遺伝子多型は糖尿病と関連することが報告されている[17], [18]。そして当研究室からの報告を含め、エピトランスクリプトーム制御因子をターゲットにした抗がん剤への応用の可能性も報告されている[19]–[22]。エピトランスクリプトームの神経系における役割も研究されており、m6A 修飾が海馬での記憶に寄与していることが明らかとなっている[23], [24]。また神経疾患との関連として、ELP2 遺伝子多型の発達遅延、知的障害、自閉症への関与、NSUN6 遺伝子多型と知的障害および認知との関連、TRMT1 と発達遅延および知的障害との関連などが見出されている[25]–[27]。ALKBH ファミリーのなかでは ALKBH1 が神経細胞の軸索形成や海馬依存的な学習機能に関与していることが報告されている[28], [29]。

ALKBH8 は9つある ALKBH ファミリーの一つとして同定された。ALKBH ファミリーは共通して 2-OG/Fe(II)依存的オキシゲナーゼドメイン(2-OG ドメイン)を有しているが、ALKBH8 は 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[30]。ALKBH8 は tRNA U34 における 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 mcm5U 修飾を、さらにヒドロキシル化活性により (S)-mchm5U 修飾を生成する[7]。tRNA U34 における mcm5U と mchm5U 修飾はセレノシステインに対する tRNA (tRNA^{Sec})に見られ、セレノプロテイン合成に必須である[31], [32]。これらの修飾を介し ALKBH8 は GPX1, GPX3, GPX6 や TXNRD1 な

どのセレノプロテインの発現を制御し細胞の生存に寄与している[33]。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[34]。また *Alkbh8* を欠損した MEFs 細胞においてはミトコンドリアの増大と酸素消費の増加を伴う細胞老化が引き起こされる[35]。さらに *Alkbh8* 欠損 MEFs 細胞では hydrogen peroxide (H₂O₂) や rotenone 暴露による活性酸素種 (ROS) に対する感受性が増大している[33]。このような *in vitro* での細胞レベルの知見がある一方で、*Alkbh8* 欠損マウスを用いた研究では環境ストレスに対し脆弱となる報告があるものの[36]、通常飼育下では正常に生育することが報告されており[37]、*in vivo* 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、C57BL/6N マウスに対しエクソン 3 および 4 を欠損させ、12 世代以上バッククロスすることで *Alkbh8*^{-/-} マウスを作製している (Fig. 1)。エクソン 3, 4 は RRM を含む領域で、欠損により frameshift が起こり、残る 2-OG ドメインと MT ドメインを含む全領域のタンパク質合成が阻害される。

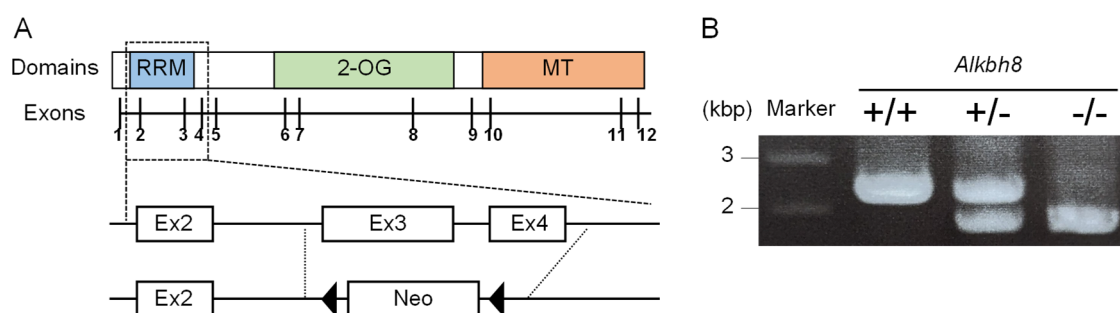
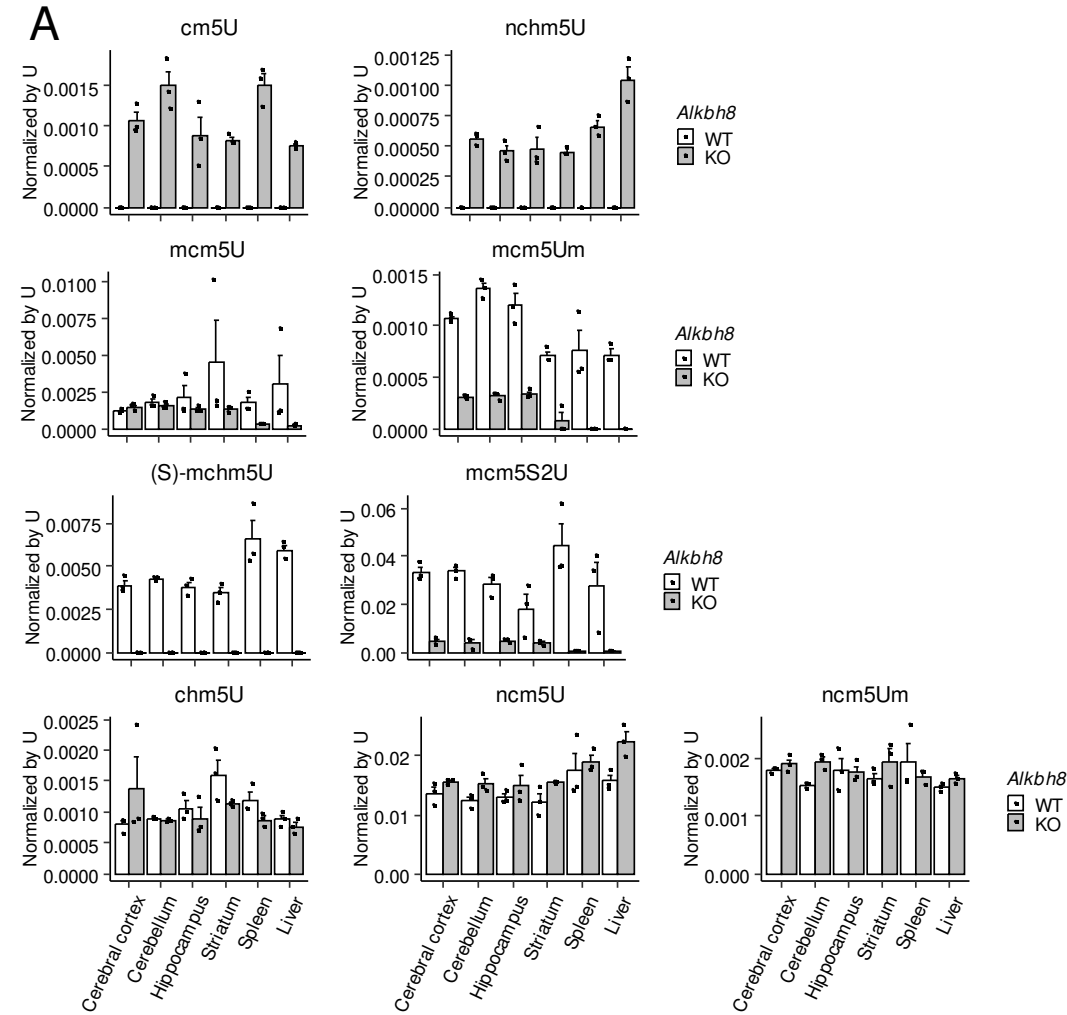


Fig.1 *Alkbh8* 欠損デザインとジェノタイピング

(A) *Alkbh8* exon 3 および 4 を欠損させるためのコンストラクトデザイン。RRM: RNA recognition motif, 2-OG: 2-OG/Fe(II) oxygenase domain, MT: methyltransferase domain (B) exon 3 および 4 を含む DNA 領域を対象とした PCR 解析により野生型 (+/+), heterozygous (+/-) および homozygous deletion (-/-) を確認した。

作製した *Alkbh8*^{-/-} マウスにおける ALKBH8 の機能欠損は、先行研究において tRNA を多く含む small RNA 画分を用いた質量分析計による RNA 修飾解析[38]で確認された (Fig. 2A, B)。まず、評価した大脳皮質、小脳、海馬、線条体、脾臓、肝臓の全臓器において ALKBH8 の基質となる cm5U が蓄積されていた。一方で、cm5U が ALKBH8 によりメチル化された結果生じる mcm5U、さらに mcm5U が ALKBH8 によりヒドロキシル化されることにより生じる (S)-mchm5U は低下していた。また mcm5U からさらにメチル基が付与された mcm5Um や硫黄原子への置換が入った mcm5s2U の量も低下していた。これらの結果は、*Alkbh8*^{-/-} マウスでは ALKBH8 の機能が欠損しており、直接的な修飾(mcm5U、(S)-mchm5U)だけでなくその下流 (mcm5Um、mcm5s2U) の修飾も含め阻害されていることを示している。ALKBH8 によるメチル化以外の修飾としてウリジンからカルバモイル化を

受ける一連の修飾体も検出された。ncm5U と ncm5Um の量に変化はなかったが、nchm5U は増加していた。これはメチル化修飾体の低下に対する代償的な反応によるもの、あるいはメチル化されるウリジンが低下したことによるカルバモイル化の相対的な増加の可能性が考えられる。



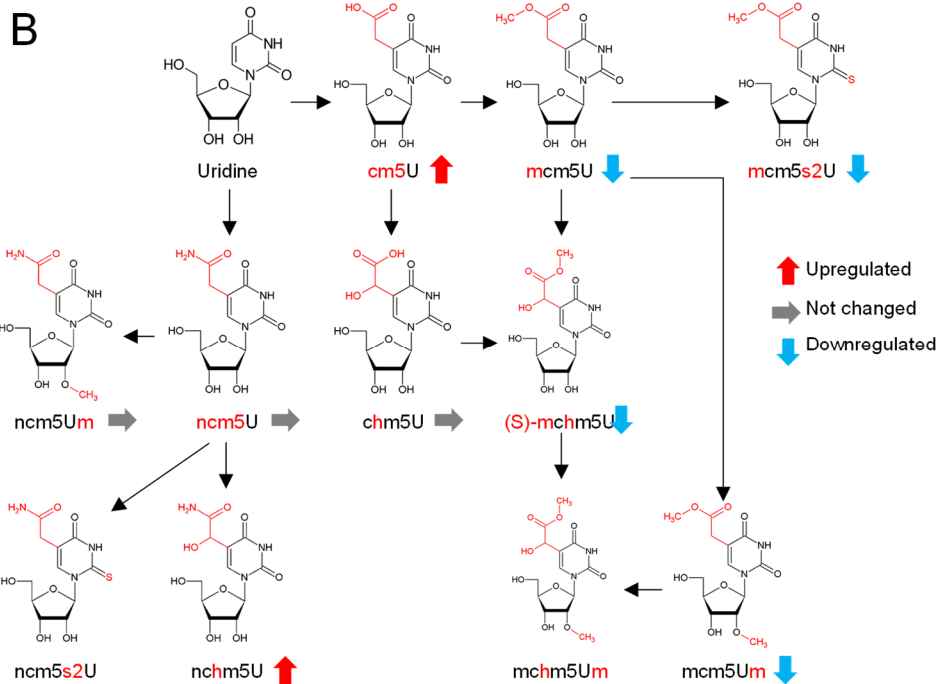


Fig. 2 *Alkbh8*^{-/-}マウスにおけるウリジン修飾変化

(A) tRNA を含む small RNA 画分を各組織から抽出し、ヌクレオシド分解を行った後、UHPLC-UniSpray/ESI-MS/MS により修飾体を分析した (n=3, mean + SEM)。WT: *Alkbh8*^{+/+}, KO: *Alkbh8*^{-/-}。(B) *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて認められたウリジン修飾の変化をパスウェイとして図示した。修飾の流れは Modomics database の知見をもとに作成した[39]。

上記の検討や *Alkbh8*^{-/-}マウスの飼育管理を行っている過程において偶然に、*Alkbh8*^{-/-}マウスが *Alkbh8*^{+/+}に比べ動きが俊敏であるなど異なる行動をとることが見出された。また、これまでに雄性 *Alkbh8*^{-/-}マウスを用いた各種行動試験が実施され、以下の3つの行動試験（新奇物体認識試験、ロータロッド試験、強制水泳試験）において *Alkbh8*^{+/+}との違いが見出されている。新奇物体認識試験は短期記憶の評価に用いられる試験である[40]。この試験では特定の物体が置かれた空間でトレーニングセッションを行い、その後新しい物体とトレーニングセッションで使われた物体が置かれた空間でマウスを自由に探索させる。マウスの習性として新たに置かれた物体に対する探索時間が長くなることが知られており、本試験でも *Alkbh8*^{+/+}マウスは新奇物体への探索時間が延長した。一方で *Alkbh8*^{-/-}マウスでは新奇物体探索時間の有意な延長は認められなかった。個々のマウスにおける総探索時間に対する新奇物体と既知物体の探索時間の差の割合で示される Discrimination index は認識記憶の感度指標として用いられるが、本試験では統計的有意差はなかったものの *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて低下する傾向が認められた (Fig. 3A)。ロータロッド試験は運動協調性を評価する試験であり、薬物の暴露や神経障害による影響を受けることが知られている[41]。加速する回転棒にマウスをのせ、落下するまでの時間を計測した。*Alkbh8*^{+/+}に比べ *Alkbh8*

$\text{Alkbh8}^{-/-}$ マウスでは落下までの時間が有意に延長した (Fig. 3B)。強制水泳試験はマウスを水に浮かべた後にほとんど動かなくなるまでの時間と動かない無動時間を評価する[42]。無動時間は抗うつ剤の有効性評価に使用される指標である。また動かなくなるまでの時間は抗うつ剤と覚せい剤など薬剤により変化に違いがあることが知られている[43]。 $\text{Alkbh8}^{-/-}$ マウスを用いた試験では無動時間に変化はなかったが、動かなくなるまでの時間が $\text{Alkbh8}^{+/+}$ に比べ有意に増加した (Fig. 3C)。ALKBH ファミリーのひとつである Alkbh1 欠損マウスでは恐怖条件付け学習試験およびモーリスの水迷路試験においてそれぞれ文脈記憶および空間記憶の低下が報告されている[29]。しかし当研究室では $\text{Alkbh8}^{-/-}$ マウスを用いた恐怖条件付け学習試験において $\text{Alkbh8}^{+/+}$ マウスとの差は見出されていない (Fig. 3D)。

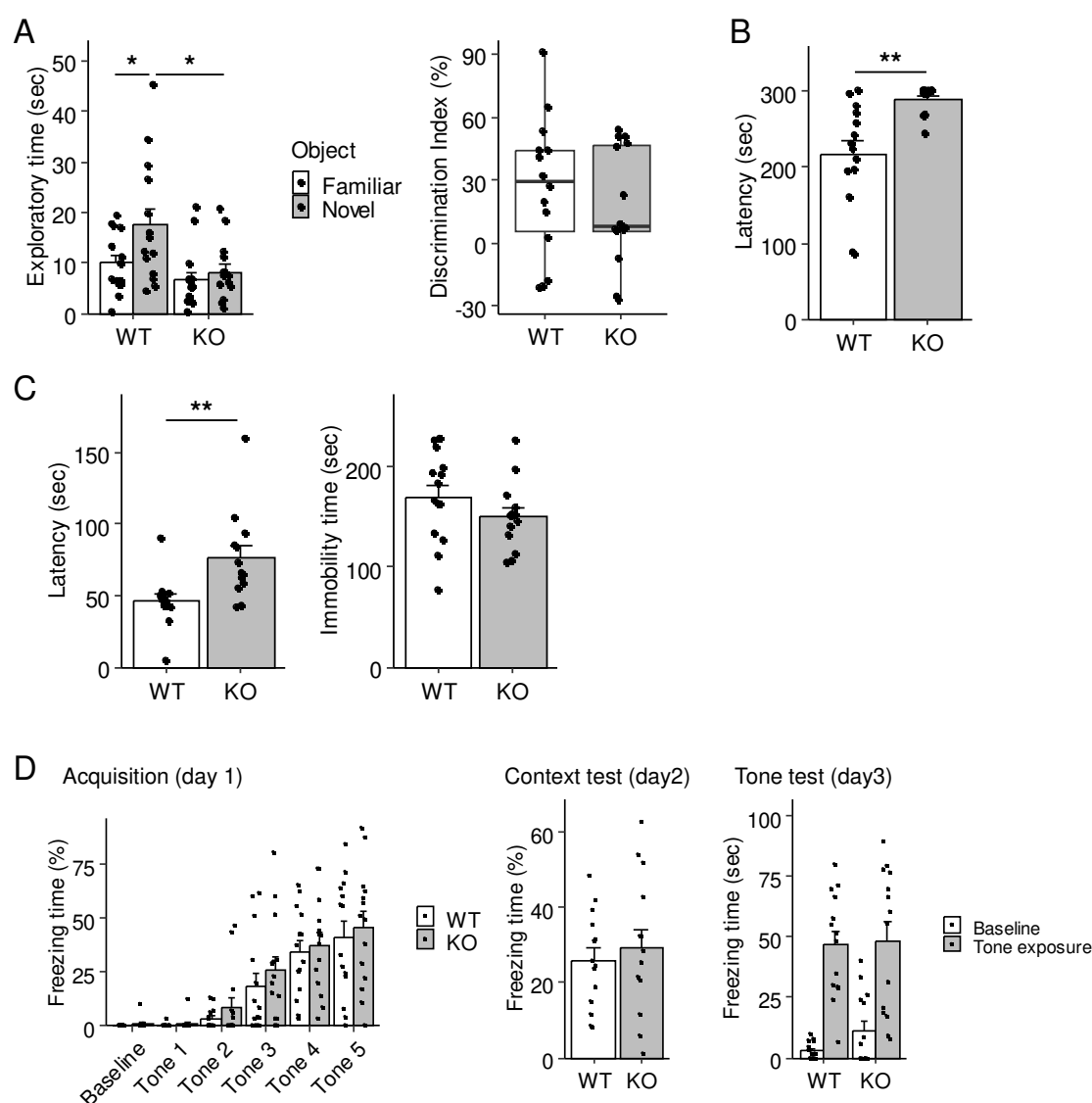


Fig. 3 $\text{Alkbh8}^{-/-}$ マウスを用いた行動試験

(A)新奇物体認識試験。2つの物体のある空間でトレーニングセッションを行った後、一つを新しい物体に置き換えてマウスを自由に探索させた。新しい物体の探索時間(T_n)とトレ

ニングセッションからの物体の探索時間(Tf)を計測した。Discrimination index (DI)は $DI = (Tn - Tf) / (Tn + Tf)$ として計算した (n=14, male, 14-17 weeks of age, 左グラフ: mean + SEM, 右グラフ: box-and-whisker plot, *p<0.05, Two-way ANOVA and Tukey-Kramer's post-hoc test)。(B)ロータロッド試験。コンスタントなスピードの回転(16 rpm)で 2 日間のトレーニングセッションを行い、テストセッションでは 0 から 35 rpm まで徐々にスピードを上げながら落下までの時間を計測した (n=14(WT) and n=13(KO), male, 18-23 weeks of age, mean + SEM, **p<0.01, Student's t test)。(C) 強制水泳試験。マウスを水が入ったガラスシリンダーの中に入れ 6 分間泳がせた。泳ぎをやめ無動になるまでの時間と、無動になっている時間を計測した (n=14(WT) and n=13(KO), male, 12-16 weeks of age, mean + SEM, **p<0.01, Student t test)。(D) 恐怖条件付け学習試験。1 日目に音と電気刺激による条件付けを行った。2 日目に条件付け時と同じ装置にマウスを入れ、電気刺激および音刺激のない条件でマウスのすくみ時間を測定した。3 日目においては、条件付け時と異なる環境のチャンバーにマウスを入れ、音刺激によるマウスのすくみ時間を測定した (n=14, male, 13-18 weeks of age, mean + SEM)。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。

以上のような個体レベルでのフェノタイプ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フェノタイプ変化に影響を与えているについては全く分かっていない。そこで、本研究では病理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。その結果、病理解析から野生型マウス (*Alkbh8*^{+/+} マウス) に比べ *Alkbh8*^{-/-}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脳および海馬に起きていることを見出し、ALKBH8 機能が必要な組織であることを明らかにした。そして分子メカニズム解析から *Alkbh8*^{-/-}マウスでは酸化ストレス関連因子が変動していることを見出し、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障害が起きていることも見出した。これらの結果より、脳においてはこれまで報告のあるセレノプロテインとは異なるタンパク質の制御を通じてストレス応答に関わっている可能性を明らかにした。また、近年ヒトで知的障害との関連が報告された変異型 ALKBH8 はメチルトランスフェラーゼドメインの活性が減弱しており、*Alkbh8*^{-/-}マウスと同様のウリジン修飾障害が起きることを明らかにした。これらの結果から、本研究で見出した ALKBH8 のメカニズムがヒトにおける脳機能や神経疾患の理解へつながることが期待された。

本論

第一章

第一節 実験材料および方法

Quantitative PCR analysis

野生型マウスを頸椎脱臼による安楽殺後、各臓器を摘出し-80°Cで凍結保存した。マウス組織からの total RNA は miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, cat# 217004)を用いて抽出した。脳各領域の total RNA は Mouse C57 brain region total RNA panel (Zyagen)を用いた。Total RNA から PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio, cat# RR037A)を用いて cDNA を合成した。*Alkbh8*と β -*actin* (*Actb*)の発現は以下の primer と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix reagent (TOYOBO, cat# QPS-101)を用いた qPCR により定量した。

Alkbh8 forward: 5'-TCC TGT CAG AAG TGG GTC TTG TG-3'

Alkbh8 reverse: 5'- GAG ACG GGC AAG TTC TTG GAG-3'

Actb forward: 5'-ACC CAG GCA TTG CTG ACA GG-3'

Actb reverse: 5'- GAG TAC TTG CGC TCA GGA GG-3'

*Alkbh8*の発現値は *Actb*の発現値で補正した。

SH-SY5Y 分化誘導

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞株は EMEM と Ham's F12 を 1:1 で混合した培地に 10% となるよう FBS を添加した培地で培養した (EMEM: 富士フィルム和光純薬, cat# 055-08975、Ham's F12: 富士フィルム和光純薬, cat# 087-08335)。分化誘導は以下の手順で実施した。終濃度 10 μ M となるよう atRA (富士フィルム和光純薬, cat# 186-01114)を添加した培養培地でプレートへ播種した。播種 3 日目に 10 μ M atRA を含む新鮮な培地で培地交換を行った。播種 5 日目に FBS を含まない EMEM:F12 (1:1)培地で細胞を洗浄し、終濃度 10 ng/mL となるよう BDNF を添加した FBS-free EMEM/F12(1:1)培地を添加し、さらに 3 日間培養した。

ウェスタンブロット解析

19~20 週齢オスの *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスを頸椎脱臼による安楽殺後、大脳、海馬、小脳を摘出し-80°Cで凍結保存した。凍結サンプルはプロテアーゼ阻害カクテル (ナカライ, cat#04080-11) を含む N-PER Reagent (ThermoFisher Scientific, cat# 87792)に入れ、バイオマッシャーII (株式会社ニッピ, cat#320-103) を用いてホモジナイズした。遠心 (15,000 rpm at 4°C, 15 min) 後に上清を回収し、DC プロテインアッセイ (BioRad, cat# 5000111JA)を用いてタンパク質濃度を定量した。サンプル間の濃度を合わせた後、2x sample buffer を加え 37°Cで 60 min インキュベートした。

SH-SY5Y については播種前と、誘導 3 日目、5 日目、8 日目の細胞を、プロテアーゼ阻害カクテルを含む N-PER Reagent で溶解した。遠心 (15,000 rpm at 4°C, 15 min) 後に上清を回収し、DC プロテインアッセイを用いてタンパク質濃度を定量した。サンプル間の濃度を合わせた後、2x sample buffer を加え 37°C で 60 min インキュベートした。

熱変性させたサンプルを 7.5% SDS-polyacrylamide gel で泳動し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck Millipore, cat#IPVH00010) へ転写した。転写後の PVDF 膜は 5% スキムミルク (森永乳業) で 30 min ブロッキングを行い、抗 ALKBH8 抗体 (Sigma Aldrich, cat# HPA038725) あるいは抗 β -actin 抗体 (富士フイルム和光純薬, cat# 010-27841) とともに 4°C, over night でインキュベートした。さらに horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technologies, cat# 7074) あるいは (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technologies, cat# 7076) と室温、1 時間インキュベートした。発光は Amersham ECL Prime 試薬 (Cytiva, cat# rpn2232) を用い、Amersham Imager 680 (GE Healthcare) で検出した。

第二節 脳における *Alkbh8* の発現

本研究では緒言に示した行動異常における 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、本章ではまず ALKBH8 が重要な役割を担っている可能性のある組織の同定を行った。

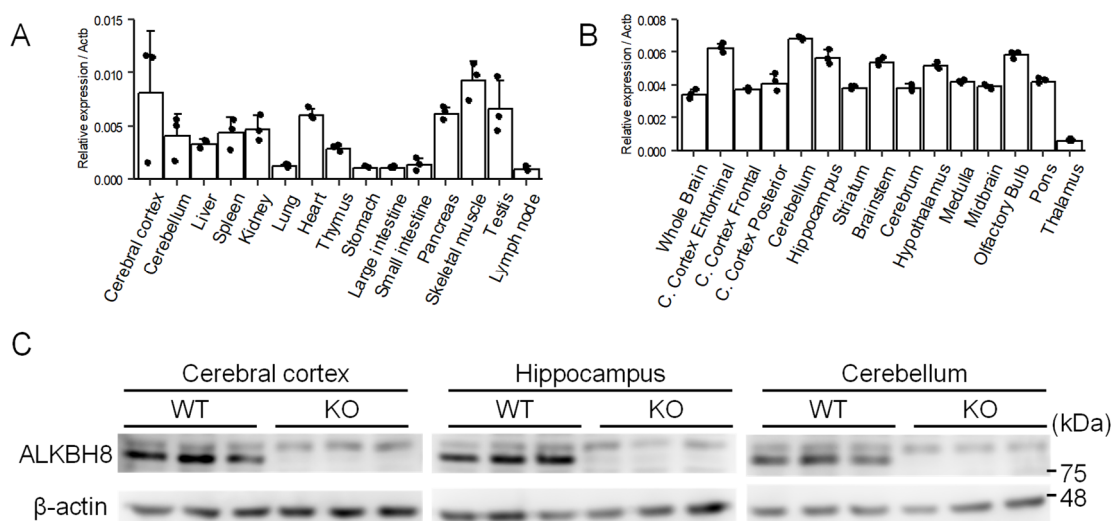
Fig. 2 に示した *Alkbh8*^{-/-} マウスにおけるウリジン修飾の解析において、ALKBH8 の基質となる cm5U の蓄積は全組織で認められたにもかかわらず、メチル化修飾体である mcm5U 低下は脾臓や肝臓にくらべ脳での低下の程度は低かった (*Alkbh8*^{+/-} に対する *Alkbh8*^{-/-} マウスでの相対的発現量は脳、小脳、海馬、線条体、脾臓、肝臓でそれぞれ、1.2、0.86、0.64、0.29、0.18、0.069 倍であった)。このことは脳において mcm5U 修飾が何らかの代償的な機能により補完されており、mcm5U およびその下流の修飾が脳にお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、Fig. 3 に示した行動試験において新奇物体認識試験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においては諦めや行動制御がきかないなど正常以上の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る。これらはそれぞれ異なる機能を評価する試験ではあるが、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、ALKBH8 が脳において発現しているか RNA およびタンパク質レベルで確認した。脳、小脳、その他全身組織における *Alkbh8* mRNA の発現レベルを qPCR により測定した (Fig. 4A)。発現の程度に差はあるものの脳を含むすべての組織でユビキタスに発現が認められた。さらに脳において詳細な領域別の *Alkbh8* mRNA の発現レベルを qPCR により測定した結果、脳内においてもユビキタスな発現が認められた (Fig. 4B)。また、*Alkbh8*^{+/-}

および *Alkbh8*^{-/-}マウス的大脑、海馬、小脳における ALKBH8 タンパク質発現をウェスタンブロット解析により評価した結果、*Alkbh8*^{+/+}ではいずれの組織でも発現しており、*Alkbh8*^{-/-}マウスでは発現が消失していることを確認できた (Fig. 4C)。

次に神経細胞における ALKBH8 発現を評価するため、神経細胞モデルとして知られている分化誘導を行った SH-SY5Y 細胞株を用いた検討を行った。SH-SY5Y 細胞株はヒト神経芽細胞腫由来の株化細胞で、atRA とそれに続く BDNF による分化誘導で神経突起が伸長した神経細胞様のフェノタイプを示す[44]。このモデルを用い、分化誘導前から分化誘導後にかけて経時的な ALKBH8 発現をウェスタンブロットにより解析した。分化誘導前に比べ、分化誘導後には神経突起形成のマーカーとなる neurofilament タンパク質の発現が増加した。同様に ALKBH8 の発現も分化誘導とともに増加した (Fig. 4D,E)。

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、*Alkbh8*^{-/-}マウスで認められた脳での RNA 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。



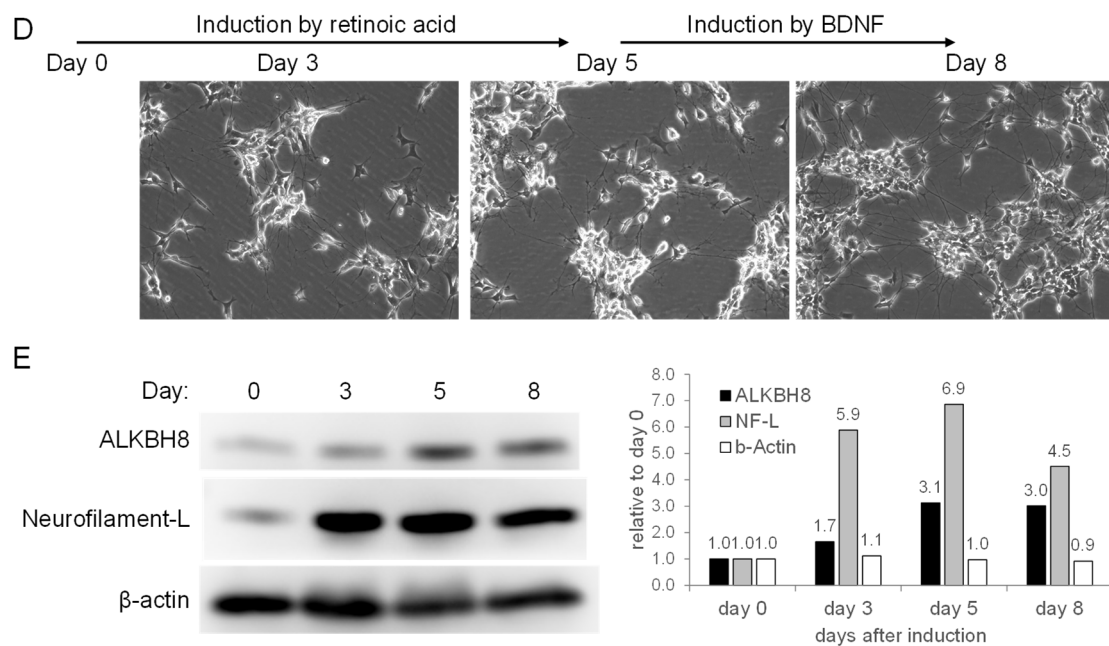


Fig. 4 各組織における ALKBH8 の発現

マウスの全身組織(A)および脳領域(B)における *Alkbh8* mRNA 発現を qPCR により測定した。発現値は *Actb* 遺伝子発現量で補正した ($n=3$, mean + SD)。(C) *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウス的大脑、海馬、小脳における ALKBH8 タンパク質発現をウェスタンブロットにより検出した。コントロールとして β -actin タンパク質の発現を用いた。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(D) SH-SY5Y 細胞を atRA と BDNF で分化誘導した。写真は各時間における細胞像を示す。(E) SH-SY5Y 細胞の分化誘導後経時的な ALKBH8、Neurofilament-L、 β -actin の発現をウェスタンブロットにより検出した。グラフはウェスタンブロットの各バンドを定量し、Day 0 でノーマライズした値を示した。

第二章

第一節 実験材料および方法

組織の摘出と重量測定

12 週齢オスの *Alkbh8*^{+/+} および *Alkbh8*^{-/-} マウスをイソフルランで麻酔し、腹部を切開した。横隔膜を切開し心臓を露出させた後、血液を流出させるため右心房の一部をカットした。まず約 10 mL の生理食塩水（大塚製薬）を 26G 注射針を用いて左心室から還流し脱血させた。脱血後、約 10 mL の 4%パラホルムアルデヒド/PBS(-)を 26G 注射針を用いて左心室から還流させた。

灌流固定後に脳、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し重量を測定した。腎臓は左右 2 個の合計値を使用した。重量測定後、脳は 4%パラホルムアルデヒド中で 4°C、24 時間固定した。固定後、PBS(-)で洗浄し、70%エタノールを加え病理解析まで 4°Cで保存した。

脳の病理解析

4%パラホルムアルデヒドで固定した脳サンプルは、株式会社アプライドメディカルリサーチにおいて組織切片の作製と HE 染色による病理解析を行った。全脳のうち右脳は矢状断で、左脳は冠状断で組織切片が作製した。HE 染色されたサンプルはデジタルデータとして取り込まれ、OlyVIA (Olympus Life Science)を用いて所見が認められた部位の病理像を切り出した。

海馬 CA1 領域に隣接した繊維束部分における eosin 染色強度は ImageJ Fiji[45]を用いて定量化を行った。対象となる領域の eosin 染色強度を変化のなかった近傍の eosin 染色強度で補正することで定量化した。染色強度が低い、つまり淡明化を起こしているほど定量化値は高値を示す。側脳室のサイズは Image J Fiji により側脳室部分を自動で検出することにより、その面積を測定した。

第二節 *Alkbh8*^{-/-}マウスの脳における病理解析

第一章での検討において ALKBH8 は脳、そして神経細胞に発現しており、脳局所において tRNA 修飾を制御し *Alkbh8*^{-/-}マウスの行動に影響を与えている可能性を考えた。そこで *Alkbh8* の欠損が脳に与えている影響を検討した。まず *Alkbh8*^{-/-}マウスの脳重量を評価した。*Alkbh8*^{-/-}マウスは雌雄とも *Alkbh8*^{+/+}に比べ低体重を示した (Fig. 5A)。脳、肝臓、脾臓、腎臓の組織重量は脳においてのみ有意に低下していた (Fig. 5B)。体重との相関をとると、脳以外の組織では *Alkbh8*^{+/+}、*Alkbh8*^{-/-}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 (Fig. 5C)。このことから脳では低体重とは独立して、形成異常が起きていると考えられた。

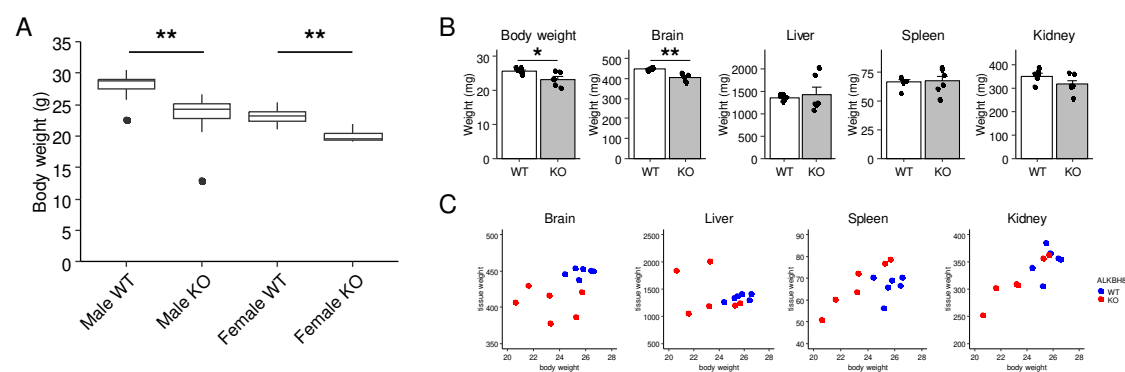
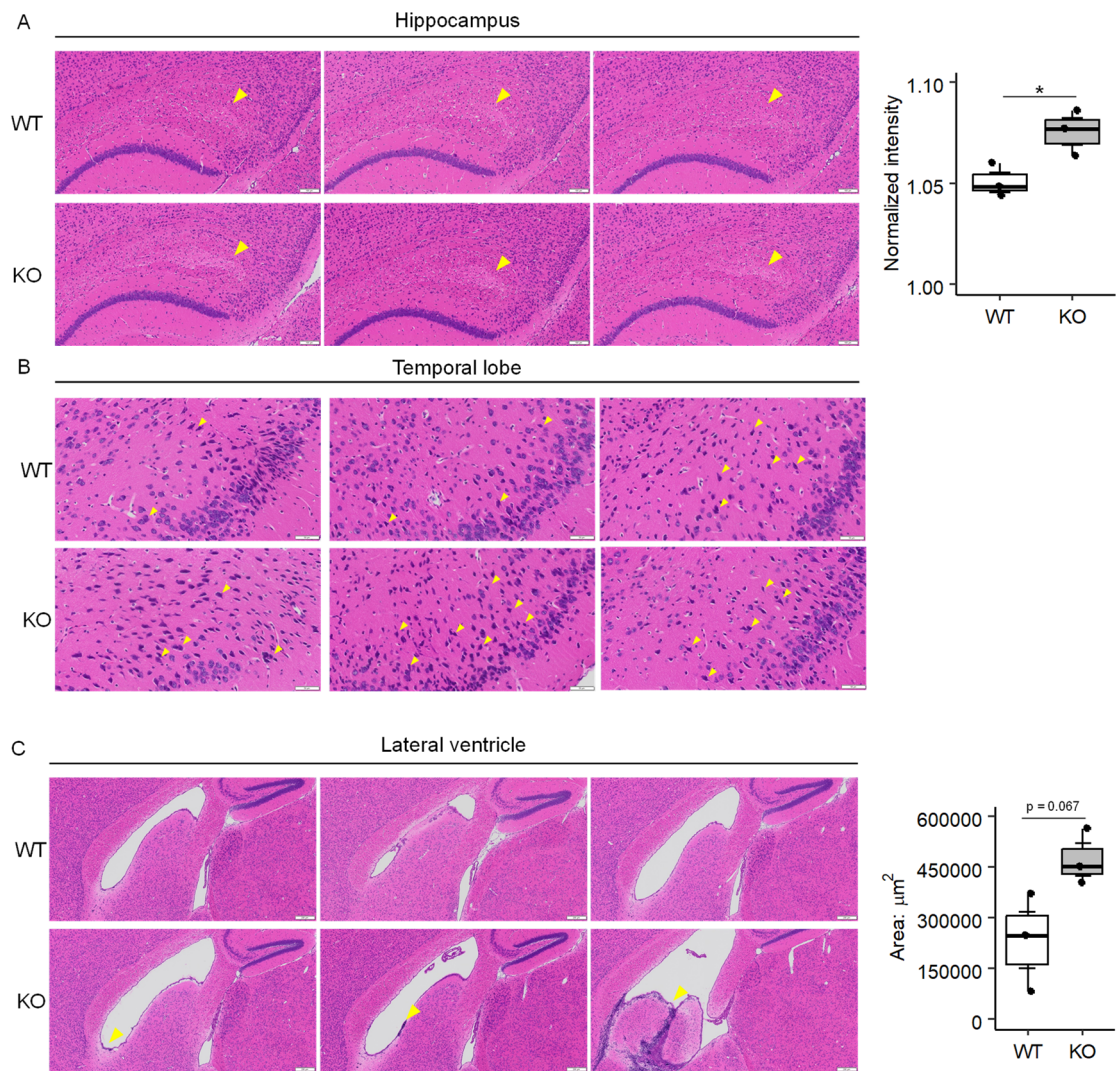


Fig. 5 *Alkbh8*^{-/-}マウスにおける脳重量

(A) *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスの体重を測定した。第1四分位数から第3四分位数の範囲に対し1.5倍以上離れた値は外れ値として個別の値をプロットした(n=6~16, 15 weeks of age, **p < 0.01, Student's t-test)。 (B, C) *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスを灌流固定し、各組織を摘出した。摘出した臓器の重量(weight (mg))と各個体の体重で補正した値(% of body weight)を示す (n=3, male, 12 weeks of age, mean + SEM, *p < 0.05, Student's t-test)。 WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。

次に12週齢オスマウスの脳を用いた病理解析を行った。パラホルムアルデヒド固定した脳を用い、右脳を矢状断で、左脳を冠状断で組織切片を作成しHE染色を行った。まず矢状断において *Alkbh8*^{-/-}マウスの海馬CA1領域に隣接した繊維束部分において *Alkbh8*^{+/+}に比べeosin染色の有意な淡明化が認められた (Fig. 6A)。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 [46]。 *Alkbh8*^{-/-}マウスのCA1領域においては *Alkbh8*^{+/+}に比べ明確な pyknotic neuron の差は認められなかったが、側頭葉の第三層以下の領域において pyknotic neuron の増加が認められた (Fig. 6B)。これらの変化から *Alkbh8*^{-/-}マウス的大脑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。

さらに *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて統計的有意差はないものの側脳室の拡大が観察された。また側脳室上衣細胞層においてグリア細胞の残遺が認められた (Fig. 6C)。側脳室の拡大は髄液の循環障害により引き起こされることが知られている。また、個体により部位が異なっていたが *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいてVR腔の拡大がより顕著に観察された。 *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスにおける所見を Table 1 にまとめ、severe と判定された所見像を Fig. 6D に示す。このVR腔拡大も髄液流通障害の結果起きていると考えられる [47]。酸化ストレスとの関連は不明であるが、 *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて正常な脳機能が阻害されていることを示唆する所見である。



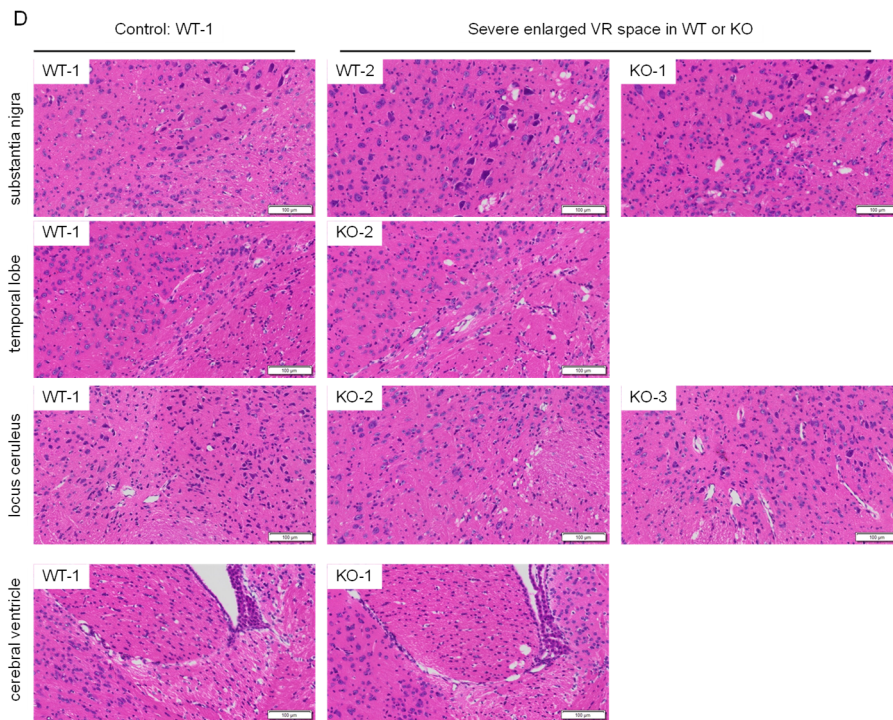


Fig. 6 *Alkbh8*^{-/-}マウスの脳病理解析

Alkbh8^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスを灌流固定し脳を提出した。右脳を矢状断で、左脳を冠状断で組織切片を作製し HE 染色を行った WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(n=3)。(A) 海馬 CA1 に隣接する領域での淡明化を矢印で示す。淡明化の定量値を個々の値を含む box-plot で示した。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(n=3, *p<0.05, Student's t-test) (B) 側頭葉領域で見られた pyknotic neuron を矢印で示す。(C) *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスそれぞれの側脳室と、上衣細胞層に見られたグリア細胞の依存を矢印で示す。側脳室の面積を個々の値を含む box-plot で示した。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(n=3, Student's t-test) (D) severe な VR 腔拡大所見 (HE 染色が白く抜けた領域) を示す。個体ごとに部位が異なるため *Alkbh8*^{+/+}を含む個体ごと (WT-2, KO-1,2,3) の組織像と WT-1 個体の該当箇所を比較対象として示した。Mild な所見を含む全所見は Table 1 としてまとめた。

Table 1 VR 腔の拡大所見

Region	WT-1	WT-2	WT-3	KO-1	KO-2	KO-3
Locus ceruleus	-	-	-	-	++	++
Substantia nigra	-	++	+	++	-	-
Cerebellum	-	-	+	-	-	-
Cerebral ventricle	-	-	-	++	-	+
Thalamus	-	+	+	-	-	+
Temporal lobe	-	-	-	+	++	+

-: not observed, +: mild, ++: severe

WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}

第三章

第一節 実験材料および方法

プロテオミクス分析

20 週齢オスの *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスから、第一章第一節に記載したウェスタンブロット解析と同じ方法で脳、小脳、海馬をホモジナイズし、タンパク質濃度を定量した。この lysate から EasyPep Mini MS Sample Prep Kit (Thermo scientific, cat# A40006)を用い手順書に従ってタンパク質を酵素的にペプチドへと消化した。得られたペプチドは 0.1%ギ酸に溶解し質量分析へ供した。

脳組織から得られたペプチドは Orbitrap Eclipse Tribrid mass spectrometer に連結した Easy-nLC 1200 System (Thermo Fisher Scientific)を用いた LC-MS により分析を行った。サンプルは C18 guard-desalting column (Thermo Fisher Scientific, Acclaim PepMap 100, 75 μ m x 2 cm, nanoViper, C18, 5 μ m, 100Å)でトラップし、12 cm 長の C18 column (Nikkyo Technos, C18, 3 μ m, 75 μ m x 12 cm)で分離した。溶出したペプチドは Data independent acquisition (DIA) method で解析した。Raw data ファイルは library-free mode with DIA-NN (version 1.8.1)で処理した。

プロテオミクスデータ解析

得られたタンパク質発現データは Perseus computational platform を用いて解析した[48]。発現が検出された 7,830 のタンパク質のうちすべてのサンプルで検出された 6,991 タンパク質を発現変動解析の対象とした。発現値は log2 スケールに変換後、quantile normalization を行った。主成分分析はノーマライズされたデータを用いて行った。Fold-change 解析は発現変動の閾値を 1.5 倍以上あるいは 1.5 倍以下、p 値の閾値を 0.05 未満として行った。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)解析は UC San Diego と Broad Institute により開発された software を使用し[49], [50]、enrichment 解析は M5 ontology 中の GO Biological Process ontology を対象とした。

メタボロミクス解析

12 週齢オスの *Alkbh8*^{+/+}および *Alkbh8*^{-/-}マウスから大脳皮質および海馬を摘出し、重量の測定後-80°Cで凍結保存した。組織からのメタボライト抽出、CE-FTMS による分析、発現値の主成分分析は Human Metabolome Technologies で実施された。発現値は質量分析によるピーク値を組織重量で補正したものを用いた。Fold-change 解析は発現変動の閾値を 1.2 倍以上あるいは 1.2 倍以下、p 値の閾値を 0.05 未満として行った。

初代神経細胞培養

Alkbh8^{+/+}あるいは *Alkbh8*^{-/-}マウスそれぞれの雌雄を交配し、胎生 17.5 日 (E17.5) の時

点で *Alkbh8*^{+/+}あるいは *Alkbh8*^{-/-}それぞれの母体から胎仔を摘出した。胎仔から脳を摘出後、小脳を切り離した。残る大脳皮質および海馬を含む組織から Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotech, cat# 130 094 802)を用い手順書に従って細胞を単離した。単離された細胞は 0.1 mg/mL となるよう H₂O に溶解したポリ L リシン臭化水素酸塩 M.W. 30,000 ~70,000 (富士フィルム和光純薬, cat#16 4 16961)で一晩コーティングしたプレートに播種した。培養には B 27 Supplement (ThermoFisher, cat# 17504044)と GlutaMAX Supplement (ThermoFisher, cat# 35050061)を含む Neurobasal Medium (ThermoFisher, cat# 21103049)を用いた。播種 3 日目にグリア細胞の増殖を抑制するため Ara-C (シトシン-1-β-D(+)-アラビノフラノシド, 富士フィルム和光純薬, cat# 030-11951)を終濃度 5 μM となるよう添加した。さらに播種 5 日目に、Rotenone (富士フィルム和光純薬, cat# 599 10811)を終濃度 10 nM となるよう添加した。

ミトコンドリア膜電位評価

初代神経細胞培養 7 日目にミトコンドリア膜電位を MT-1 ミトコンドリア膜電位検出キット (Dojindo, cat# 343-09781) を用いて可視化した。MT-1 試薬を 1/1000 濃度で加えた培地で細胞を 30 min インキュベートし、PBS(-)で洗浄した後 4%パラホルムアルデヒドで 15 min 固定した。PBS(-)で洗浄後、DAPI を含む封入剤 DAPI Fluoromount G (SouthernBiotech, cat#0100 20)を用いてカバーガラスで封入した。

樹状突起および軸索の免疫染色

初代神経細胞培養 7 日目に細胞を PBS(-)で洗浄し、0.3% TritonX 100 を含む PBS(-)で 20 min インキュベートし膜透過性を亢進させた。さらに PBS(-)で洗浄後、AE-1475 EzBlock Chemi (ATTO, cat# 2332615)で 30 min ブロッキングを行った。樹状突起と軸索の認識抗体としてそれぞれ抗 MAP2 抗体(Millipore, cat#5622)および抗 pNF 抗体 (BioLegend, cat#801601) を 4°C, over night でインキュベートした。さらに各抗体に対する 2 次抗体として AlexaFluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen, cat# A11034)と AlexaFluor 568 anti-mouse IgG (Invitrogen, cat# A11031)を用い室温、30 min インキュベートした。PBS(-)で洗浄後、DAPI Fluoromount G を用いてカバーガラスで封入した。

蛍光染色イメージの定量

MT1 および神経突起染色を行ったサンプルは BZ-X800 fluorescence microscope (Keyence)をもちいて蛍光染色イメージを取得した。MT1 染色サンプルにおいては視野あたりの MT1 染色積算輝度を DAPI の面積で割ることで、視野あたりかつ細胞あたりのミトコンドリア膜電位活性値とした。樹状突起および軸索の解析では、MAP2 染色領域あるいは pNF 染色部位のうち突起状になっている部分の面積を神経突起とし、DAPI 面積で割ることで視野あたりかつ細胞あたりの神経突起長とした。各サンプルあたり固定の 15 視野を

定量し、蛍光物質の沈殿などあきらかなエラー視野を除外した視野を比較解析に用いた。

ALKBH8 リコンビナントタンパク質の CBB 染色およびウェスタンブロット解析

野生型ならびに変異型 ALKBH8 (c.1651CtoT (p.Arg551*), c.1785delC (p.Trp596Glyfs*19)) リコンビナントタンパク質は Sysmex Corporation においてカイコ発現系を用いて作製した。リコンビナントタンパク質は FLAG ペプチドに対する抗 FLAG 抗体を用いて精製した。リコンビナントタンパク質へ 2x sample buffer を加え 95°C で 5 min インキュベートし、ウェスタンブロットおよび CBB 染色に供した。ALKBH8 のウェスタンブロット解析は第一章第一節に記載した方法を用いた。CBB 染色は SDS-PAGE 後に CBB 染色液 (methanol 250 mL, 酢酸 50 mL, MilliQ 200 mL + CBB) で室温、30 min の染色後、脱色液 (methanol 25 mL, 酢酸 37.5 mL, MilliQ 438 mL) で室温、over night の脱色を行った。

ALKBH8 リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 酵素反応

野生型および変異型 ALKBH8 リコンビナントタンパク質を *Alkbh8* ノーマウス腎臓から抽出した small RNA とともにインキュベーションバッファー (50 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 25 mM CH₃COONH₄, 0.5 mM MgCl₂, 25 μM S-adenosylmethionine, 2 mM ascorbic acid, 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine, 0.04% Nonidet-P40 substitute) 中で 37°C、24 時間インキュベートした。ヒドロキシル化反応まで行う場合は上記に 400 μM 2-OG (富士フィルム和光純薬, cat# 117-00081) と 40 μM FeSO₄ (富士フィルム和光純薬, cat# 098-01085) を加えた条件で反応させた。ヒドロキシル化反応のみを評価する系では、まず ALKBH8 と small RNA をインキュベーションバッファー中で 37°C、3 時間インキュベートし、続く 95°C、10 min のインキュベーションにより ALKBH8 タンパク質を失活させた。続けて変異型 ALKBH8 リコンビナントタンパク質と 400 μM 2-OG、40 μM FeSO₄ を追加し 37°C、24 時間インキュベートした。反応後、終濃度がそれぞれ 0.3 M CH₃COONa (Nippon Gene, cat# 316-90081)、0.2 mg/mL glycogen (ThermoScientific, cat# R0551)、70% エタノールとなるよう各試薬を添加し、遠心 (15,000 rpm, 4°C, 20 min) 後に上清を除去し濃縮乾固した。ペレットを再度 30 μL Ultrapure water に溶解した。

反応後の small RNA はヌクレオシド分解し、質量分析により修飾を分析した。まず small RNA の 1/100 volume の 2'-deoxyguanosine 15N5 (dG15N5, Cambridge isotope laboratories) を internal standard として加えた。dG15N5 を含む small RNA 35 μL に対し 0.1 U/μL Nuclease P1 (富士フィルム和光純薬, cat# 145-08221) と 0.1M 酢酸アンモニウム (pH5.3) を 1:1 で混和した溶液を 10 μL 添加し、45°C で 2 時間インキュベートした。次に 0.01 U/μL bacterial alkaline phosphatase (TaKaRa, cat# 2120A) を 5 μL 添加し 37°C で 2 時間インキュベートした。反応後、DNase/RNase free water 60 μL と 20 μL クロロホルムを加え、ボルテックスにより混和した。遠心 (5,000g, 室温, 5 min) 後、上清のみ回収し濃縮乾

固した。Small RNA が $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ となるよう DNase/RNase free water で再溶解した。サンプルは Xevo TQ-XS triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corp.) と連結した Waters ACQUITY UPLC system (Waters Corp.) を用いて UHPLC-UniSpray/ESI-MS/MS により測定した。測定後、TargetLynx ソフトを用いて、標品とサンプルのクロマトグラムを比較し、各ヌクレオシドに由来するピークの同定やピーク面積を決定した後、内部標準法により各ヌクレオシドを定量した。尚、アデノシン、ウリジン、シトシン、グアノシンについては 100 倍希釈液の測定データを採用し、これら以外の修飾ヌクレオシドについては原液の測定データを採用した。1 つのサンプルにつき 2 回の測定を行い、定量値の平均をとった後、各サンプルにおけるウリジンの濃度で修飾ヌクレオシドの濃度を割ることで、各修飾ヌクレオシドの濃度をノーマライズした。

第二節 *Alkbh8*^{-/-}マウスの脳における分子メカニズム解析

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。そこで次に、*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、海馬を対象に変動タンパク質を同定するためプロテオミクス解析を実施した (Fig. 7)。まずタンパク質変動の全体像を確認するため主成分分析を行った。最も寄与の大きい Component 1 により大脳・海馬と小脳が分離され、Component 2 により大脳、海馬、小脳すべてが分離された。これらの結果から、本試験で得られたタンパク質発現変動データは組織の特徴を反映していることが示された。Component 1 および 2 では *Alkbh8*^{+/+} と *Alkbh8*^{-/-} の違いは顕著ではなかったが、Component 3 により各組織の *Alkbh8*^{+/+} と *Alkbh8*^{-/-} が明確に分離された。

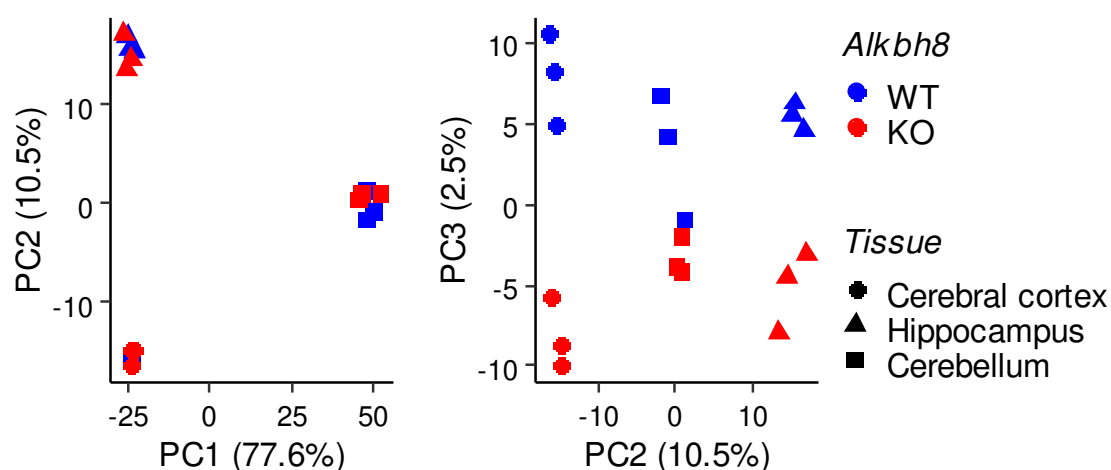


Fig. 7 主成分分析によるプロテオミクスデータの分析

Alkbh8^{+/+} および *Alkbh8*^{-/-} マウスの大脳皮質、海馬、小脳から調整したペプチドを用いて質

量分析によるプロテオミクス解析を行った。主成分分析の結果を component1 と 2 (左パネル) および component2 と 3 (右パネル) の比較でプロットした。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-} (n=3)。

主成分分析の結果から *Alkbh8*^{+/+} と *Alkbh8*^{-/-} 間でタンパク質発現の変化はそれほど大きくない可能性が考えられた。そこで、変動タンパク質の検出には変動の閾値を設定する Fold-change analysis と、変動量が小さくともパスウェイとして複数の因子が変動しているものを有意ととらえる GSEA の 2 種類の手段で解析を行った。GSEA 解析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*^{-/-} マウス的大脑と海馬で亢進していた。また、免疫応答に関与しているパスウェイに含まれるタンパク質群が大脑、海馬、小脳すべてで発現亢進していた (Fig. 8A)。ミトコンドリア機能に関する ontology の中で特徴的なタンパク質群としてNDUFやMRPに属するタンパク質が多く検出された (Fig. 8B)。発現変動の幅としては 1.1~1.6 倍程度であった。

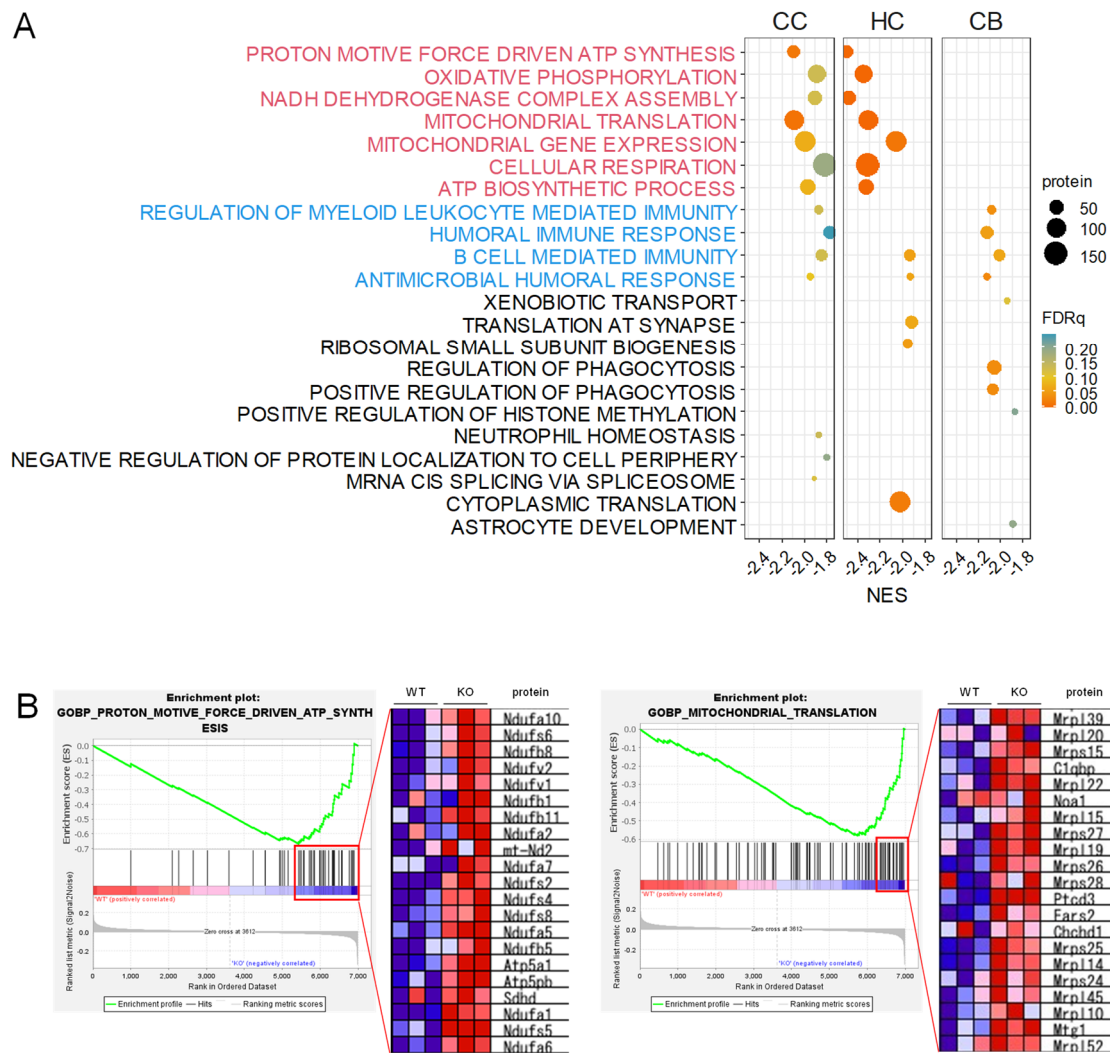


Fig. 8 *Alkbh8*^{-/-}マウス脳プロテオミクスデータの GSEA 解析

(A) GO Biological Process ontology (M5 ontology)を対象にした GSEA により enrichment 解析を行った。X 軸に NES を、Y 軸に ontology をプロットし、FDR q-value をヒートマップで示した。赤字と青字はそれぞれミトコンドリア関連 ontology と免疫応答関連 ontology を示す。

(B) ミトコンドリア関連 ontology の一例として complex I 構成因子およびリボソームタンパク質を多く含む ontology の enrichment plot を示す。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。

Fold-change analysis では変動閾値を 1.5 倍、p-value の閾値を 0.05 とし結果を volcano plot で示した (Fig. 9A)。主成分分析から推察された通り、変動タンパク質の数はそれほど多くなかった。しかし興味深いことにこれまでの得られた知見と関連するものとして NNT や 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 (Fig. 9B)。

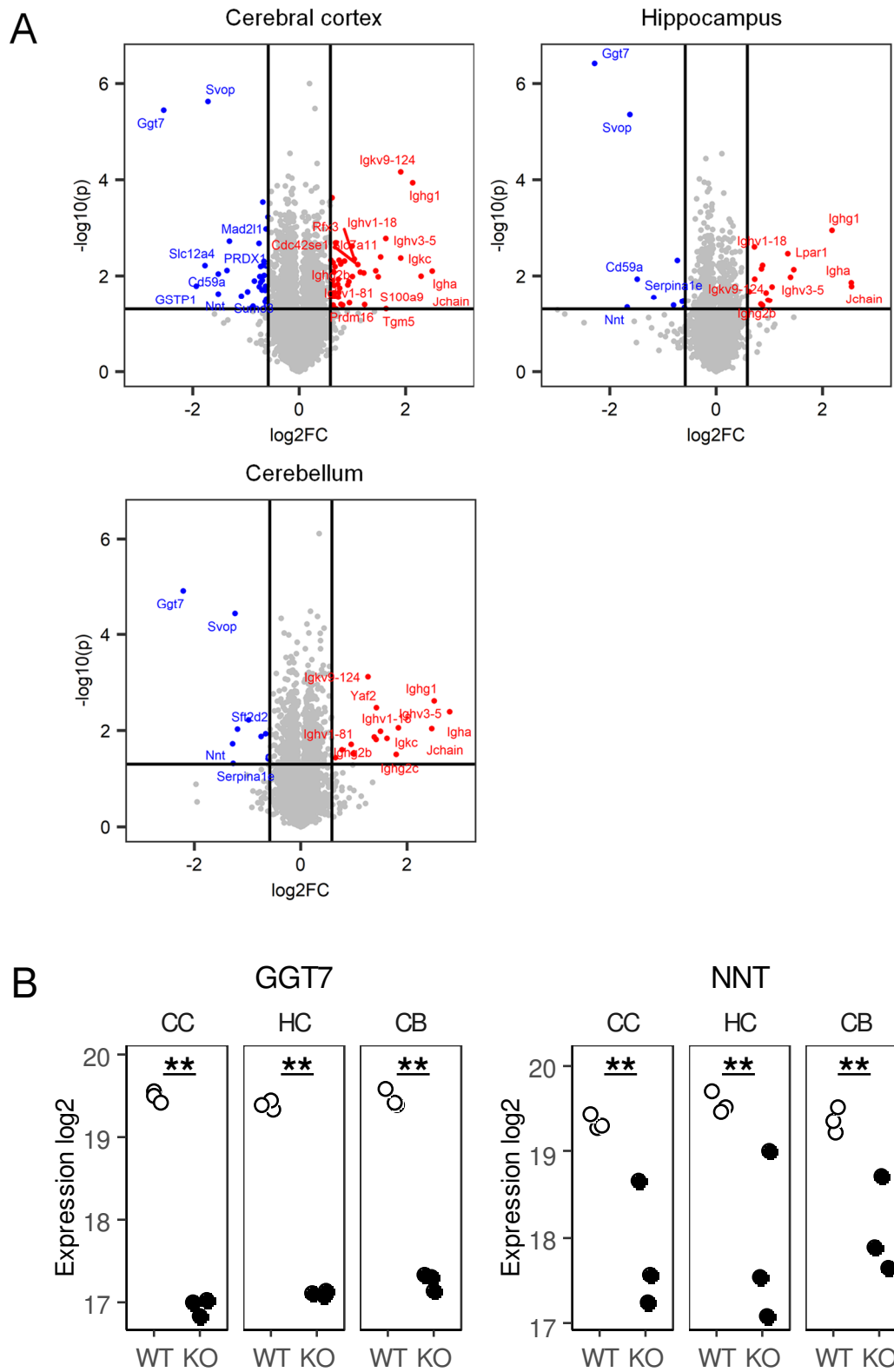


Fig. 9 *Alkbh8*^{-/-}マウス脳プロテオミクスデータの Fold-change analysis

(A) プロテオミクス解析による変動タンパク質を volcano plot で示した。発現変動の閾値は

1.5 倍以上あるいは 1.5 倍以下、p 値の閾値は 0.05 未満とした。(B) GGT7 および NNT のタンパク質発現を log2 scale で示した。CC: cerebral cortex、HC: hippocampus、CB: cerebellum。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(n=3, **p<0.01, Student's t-test)。

ALKBH8 はセレノプロテイン合成を制御することで酸化ストレス応答に関与することが知られている [33]。本試験のプロテオミクス解析では ALKBH8 の関与が報告されている GPX1 や GPX3[33], [37]を含む 17 種類のセレノプロテインが検出されたが、いずれも顕著な変化は認められなかった (Table 2)。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。

Table 2 *Alkbh8*^{-/-}マウスにおけるセレノプロテイン発現

Protein	cerebral cortex		hippocampus		cerebellum	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Gpx1	20.5+/-0.04	20.4+/-0.04	20.1+/-0.10	19.9+/-0.01	20.7+/-0.07	20.7+/-0.04
Gpx3	15.9+/-0.25	15.6+/-0.04	15.4+/-0.36	15.3+/-0.33	15.9+/-0.08	16.2+/-0.47
Gpx4	22.0+/-0.03	22.0+/-0.03	22.0+/-0.03	21.9+/-0.09	22.4+/-0.01	22.4+/-0.06
Gpx7	15.6+/-0.16	15.4+/-0.11	16.2+/-0.11	16.0+/-0.13	16.1+/-0.06	16.1+/-0.03
Txnrd1	20.7+/-0.02	20.7+/-0.04	20.8+/-0.07	20.7+/-0.04	20.9+/-0.02	21.0+/-0.02
Txnrd2	19.0+/-0.02	19.1+/-0.03	19.0+/-0.09	19.0+/-0.06	19.3+/-0.07	19.2+/-0.01
Txnrd3	20.5+/-0.09	20.4+/-0.12	20.4+/-0.04	20.4+/-0.12	20.5+/-0.13	20.7+/-0.06
Selenof	16.5+/-0.10	16.6+/-0.02	16.4+/-0.19	16.3+/-0.03	17.0+/-0.07	17.0+/-0.08
Selenoh	15.0+/-0.15	15.0+/-0.24	15.2+/-0.09	14.9+/-0.09	17.2+/-0.16	17.2+/-0.05
Selenoi	15.9+/-0.11	15.2+/-0.14	16.1+/-0.20	16.0+/-0.12	15.4+/-0.75	16.0+/-0.15
Selenok	16.2+/-0.05	16.1+/-0.04	16.1+/-0.12	16.1+/-0.05	16.5+/-0.04	16.7+/-0.09
Selenom	18.4+/-0.01	18.4+/-0.03	18.5+/-0.09	18.5+/-0.07	20.7+/-0.08	20.7+/-0.04
Selenoo	19.1+/-0.03	19.2+/-0.05	19.1+/-0.06	19.2+/-0.05	19.7+/-0.03	19.8+/-0.02
Selenop	13.8+/-0.19	13.4+/-0.11	14.3+/-0.26	13.7+/-0.32	14.6+/-0.18	14.4+/-0.12
Selenos	16.3+/-0.21	16.0+/-0.07	16.5+/-0.04	16.4+/-0.02	18.0+/-0.04	17.8+/-0.05
Selenot	18.6+/-0.09	18.4+/-0.06	18.7+/-0.04	18.6+/-0.19	19.3+/-0.08	19.3+/-0.03
Selenow	15.2+/-0.31	15.0+/-0.29	16.4+/-0.42	16.1+/-0.38	15.9+/-0.60	15.4+/-0.31

WT: *Alkbh8*^{+/+}, KO: *Alkbh8*^{-/-}

また *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて有意な変化を示したタンパク質として ELP1、ELP2 および ELP3 の増加が見出された (Fig. 10)。ELP1, 2, 3 タンパク質は複合体をつくり tRNA へ結合し、ウリジンに対し ALKBH8 の基質となる cm5U 修飾を促進する [51]。第一章第三節において、脳における mcm5U 低下が脾臓や肝臓にくらべ低かったことから、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いる可能性を考察した。プロテオミクス解析で見出されたこれら ELP1, 2, 3 の発現亢進も代償性機能亢進を示唆する変化のひとつであると考えられる。

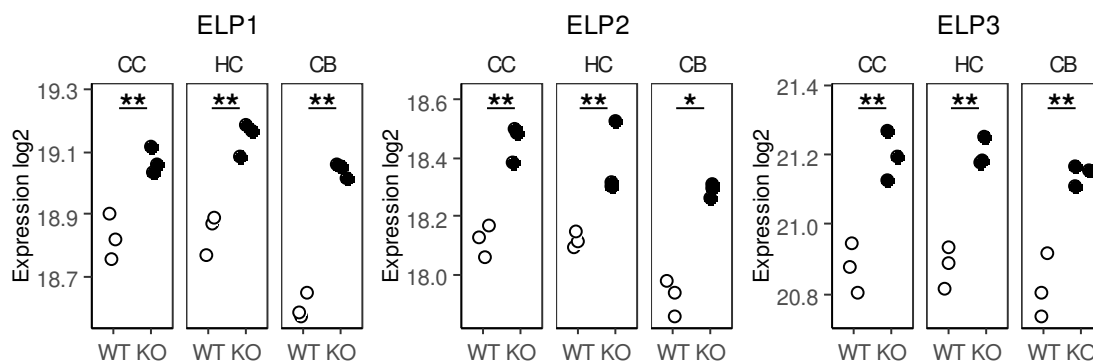


Fig. 10 *Alkbh8*^{-/-}マウス脳における ELP1, ELP2, ELP3 タンパク質の発現亢進
ELP1, 2, 3 のタンパク質発現を log2 scale で示した。CC: cerebral cortex、HC: hippocampus、CB: cerebellum。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(n=3, * p< 0.05 and **p<0.01, Student's t-test)。

病理解析に加えタンパク質変化からも *Alkbh8*^{-/-}マウス脳において酸化ストレス応答への脆弱性が示唆された。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。そこで *Alkbh8*^{-/-}マウス的大脑皮質と海馬を対象にメタボロミクス解析を実施した。主成分分析において *Alkbh8*^{-/-}マウス大脑皮質の 1 サンプルにおいて明らかな outlier が存在した (Fig. 11A)。このサンプルは他のサンプルと比べ発現値が全代謝物にわたり顕著な高値を示した。メタボロミクス解析においては厳密なサンプル重量補正以外にサンプル間のノーマライズを行う手段がなく、この outlier サンプルは重量補正エラーによるものと考えられたため、比較解析の対象からは除外した。残りのサンプルにおいてはプロテオミクス解析と同様に大脑皮質と海馬が大きく分離されたが、*Alkbh8*^{+/+}と *Alkbh8*^{-/-}は明確に分離せずプロテオミクス解析以上に変動因子が少なかった。その中でも *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて変動を示した代謝物としてメチオニン、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大脑皮質において認められた (Fig. 11B)。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。

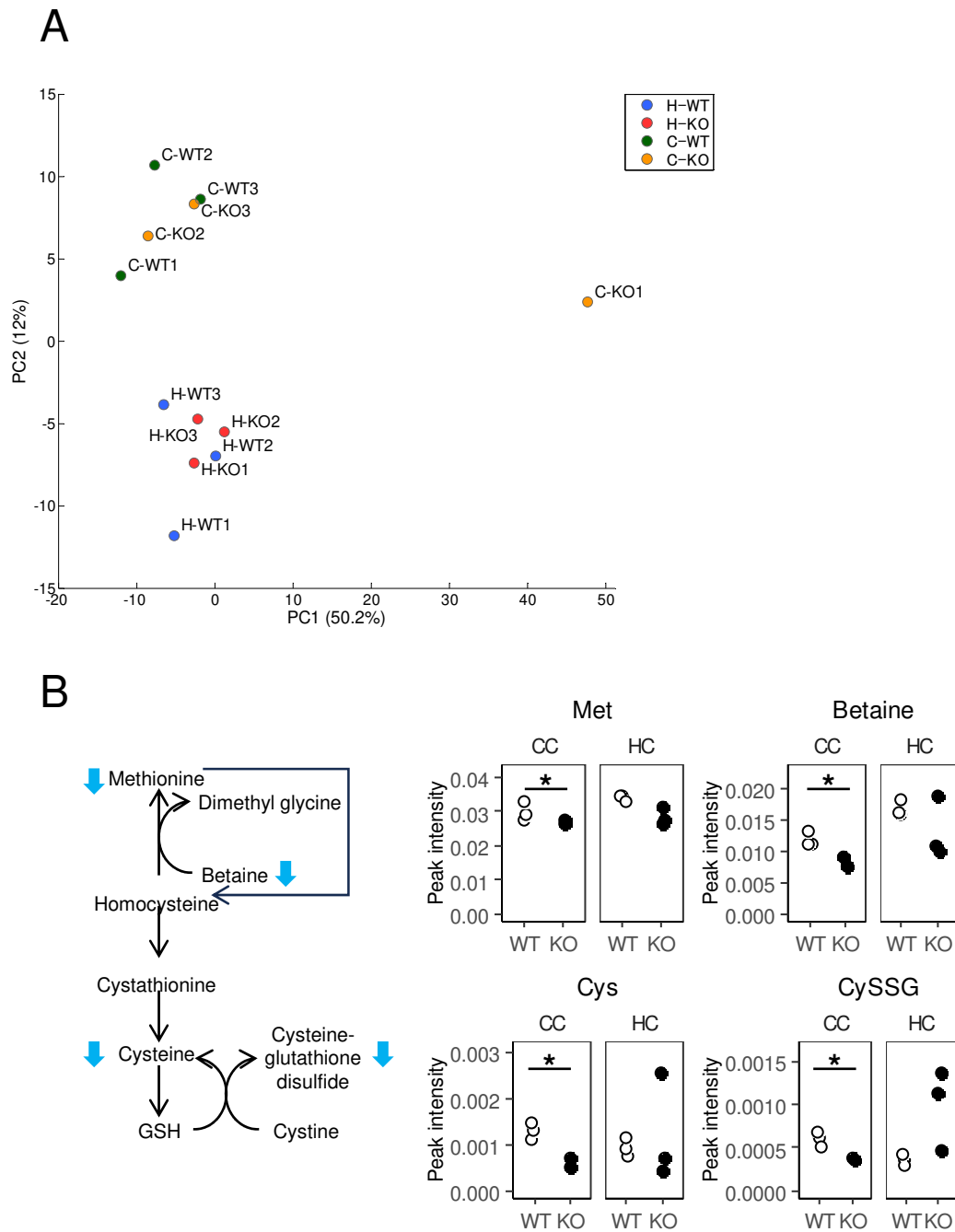
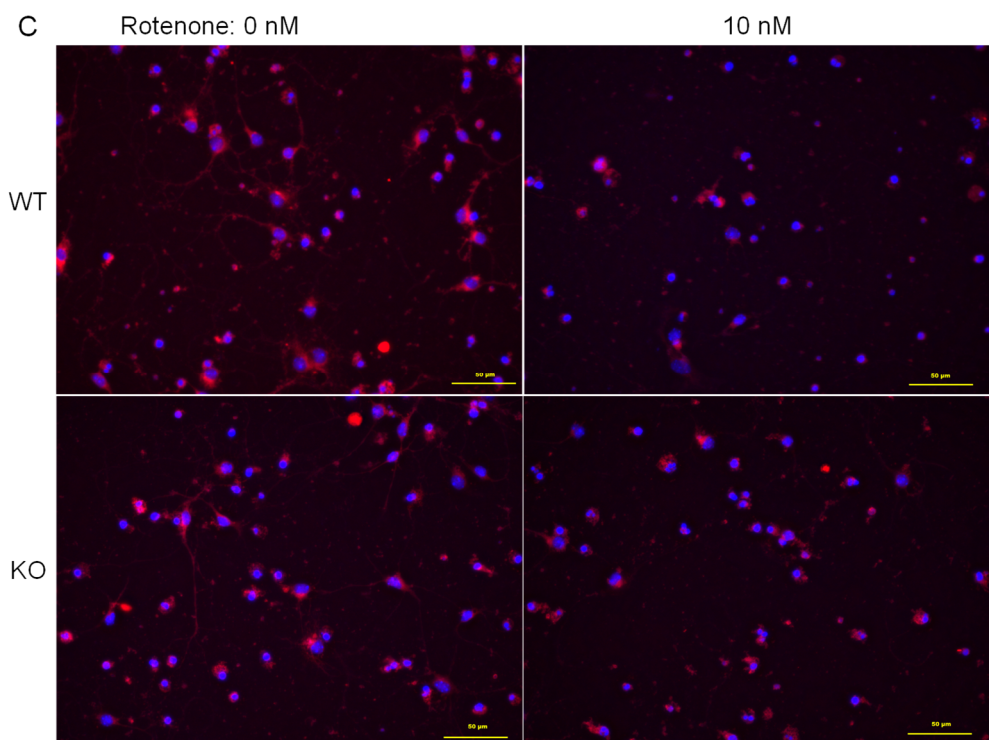
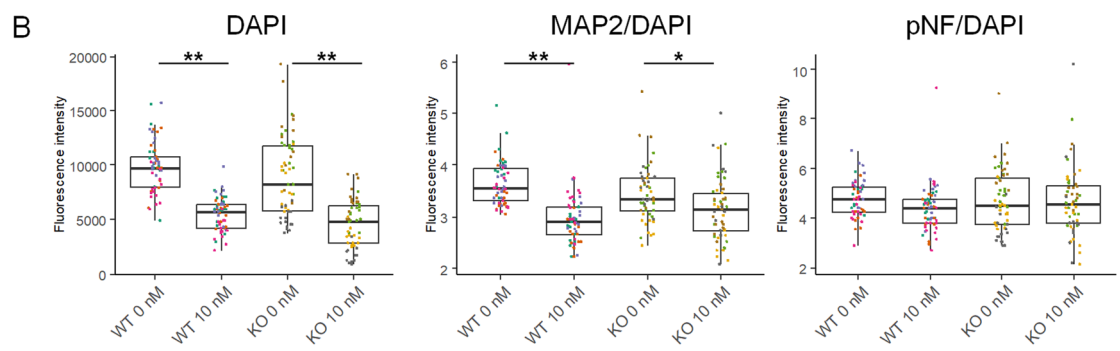
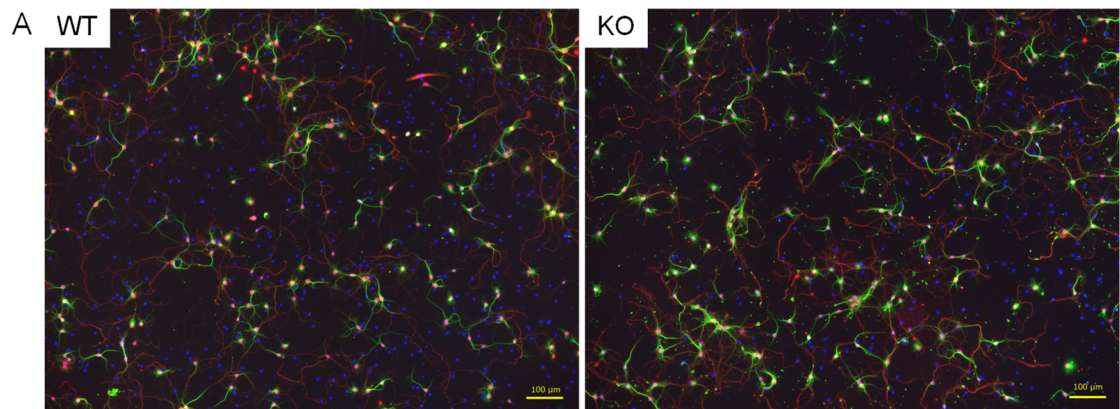


Fig. 11 *Alkbh8*^{-/-}マウス脳におけるメタボロミクス解析

(A) CE-FTMS によるメタボロミクス解析を行い、組織重量でノーマライズした発現値をもとに主成分分析を行った。H-WT: *Alkbh8*^{+/+} hippocampus, H-KO: *Alkbh8*^{-/-} hippocampus, C-WT: *Alkbh8*^{+/+} cerebral cortex, C-KO: *Alkbh8*^{-/-} cerebral cortex. (B) メチオニンサイクル・グルタチオン(GSH)合成経路と methionine (Met), betaine、cysteine (Cys)、cysteine-glutathione disulfide (CySSG)の発現値を示す。WT: *Alkbh8*^{+/+}、KO: *Alkbh8*^{-/-}。(C-KO は n=2、その他は n=3、*p<0.05, Student's t-test)。

病理解析において CA1 領域近傍の淡明化や pyknotic neuron が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 E17.5 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。胎仔脳の酵素処理により細胞を分離し、培養プレート上で 7 日間培養することにより神経細胞の神経突起伸長を促した。途中、培養開始 3 日目に Ara-C (シタラビン) を添加することでグリア細胞の増殖を抑制した。神経細胞は樹状突起マーカーである MAP2 と軸索マーカーである pNF を染色することで神経突起長を計測した。また細胞数を計測するため核を DAPI により染色した。DAPI 染色が観察された細胞には MAP2 および pNF が染色される細胞といずれも染色されない細胞があり、後者はグリア細胞が残存しているものと考えられた (Fig. 12A)。7 日間培養後、*Alkbh8*^{+/+}と *Alkbh8*^{-/-}の間で DAPI を指標とした細胞数に違いはなかった。また、細胞当たりの樹状突起長 (MAP2/DAPI) および神経突起長 (pNF/DAPI) においても違いは認められなかった (Fig. 12B, 0 nM rotenone 条件のグラフ)。

次に酸化ストレスに関する ALKBH8 の機能としてミトコンドリア機能の評価を行った。神経細胞培養 5 日目に complex I の阻害剤である rotenone を添加しさらに 2 日間培養 (合計 7 日間培養) 後に細胞数と神経細胞の突起長を計測した (Fig. 12B)。*Alkbh8*^{+/+}、*Alkbh8*^{-/-}由来神経細胞ともに rotenone の添加により細胞数 (DAPI 染色細胞) の低下が認められた。また、細胞当たりの樹状突起長 (MAP2/DAPI) が rotenone により低下していた。いずれも *Alkbh8*^{+/+}と *Alkbh8*^{-/-}の間の差は認められなかった。細胞当たりの軸索長 (pNF/DAPI) についてはいずれの条件でも変化は認められなかった。次にミトコンドリアの膜電位を MT1 試薬により可視化した。本試験系では神経細胞特異的な染色は技術的に困難であるが、高倍率の顕微鏡像から神経様細胞およびその他の形状を示す細胞 (グリア細胞) のいずれも MT1 強度が変化していることを確認した (Fig. 12C)。まず、細胞当たりの MT1 強度 (MT1/DAPI) は *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 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 (Fig. 12D)。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。



D

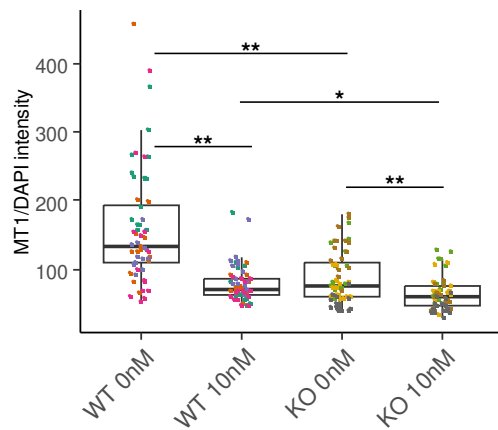


Fig. 12 *Alkbh8*^{-/-}マウス由来初代神経細胞の機能解析

(A) E17.5 胎仔脳から酵素処理により神経細胞およびグリア細胞を分離し培養した。培養 7 日目の核、樹状突起、軸索をそれぞれ DAPI、抗 MAP2 抗体、抗 pNF 抗体で染色した。blue: DAPI, green: MAP2, red: pNF。 (B) *Alkbh8*^{+/+}、*Alkbh8*^{-/-}それぞれ n=4 で実施し、個体ごとに 15 視野で各蛍光シグナルを測定した。グラフには各視野の値をプロットし、色は各個体を示す。 (C) ミトコンドリア膜電位を MT-1 試薬で可視化し、核を DAPI で染色した。代表的な染色像として高倍率画像を示す。 (D) 視野を広くカバーする低倍率画像を用いて細胞当たりの MT-1 シグナル強度(MT1/DAPI)を定量した。(n=4, 個体ごとに 15 視野計測, 色は各個体を示す)。WT: *Alkbh8*^{+/+}, KO: *Alkbh8*^{-/-}。

第三節 変異型 ALKBH8 の酵素活性評価

第二節までの検討によりマウスにおいては ALKBH8 が低酸素ストレス応答を介した脳機能への関与を見出したが、これらの結果がヒトにおいても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。そこで本節ではヒトへの外挿性を検討した。近年、ヒトにおいて知的障害の原因として ALKBH8 の変異が複数報告された [52]–[55]。これらの変異はいずれも MT ドメイン周辺に局在している。ALKBH8 変異をもつ個人の血中 RNA の解析から cm5U の蓄積と mcm5U、mchm5U、mcm5Um の低下が認められているが、直接的な ALKBH8 の機能欠損は評価されていない。そこで、ヒトにおいて報告された c.1651CtoT (p.Arg551*) あるいは c.1785delC (p.Trp596Glyfs*19) の変異をもつ ALKBH8 リコンビナントタンパク質を用いて酵素活性機能を *in vitro* での酵素反応系により評価した。まず野生型および変異型ともに ALKBH8 タンパク質が純度高く合成および精製されているか確認するため、CBB 染色とウェスタンブロット解析を行った。ここで用いた ALKBH8 抗体は 2-OG ドメインに含まれる配列を認識する抗体のため、タンパク質を変性させた泳動条件においては MT ドメインに変異を持つ ALKBH8 タンパク質も認識し得る。野生型および各変異型いずれも想定される分子量 (WT: 77.9 kDa, c.1651CtoT: 65.1

kDa、c1785delC: 71.9 kDa) 付近にバンドが検出されリコンビナント ALKBH8 の合成と精製が確認できた (Fig. 13)。

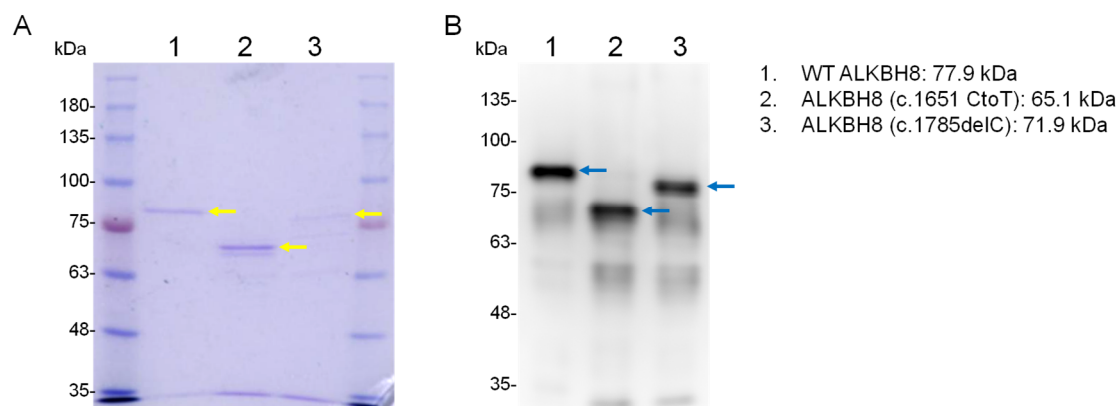


Fig. 13 ウェスタンブロットによるリコンビナント変異型 ALKBH8 タンパク質の確認
野生型 (WT) および変異型 ALKBH8 (B551* and Q596Gfs) のリコンビナントタンパク質を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色(A)および抗 ALKBH8 抗体によるウェスタンブロット(B)を行った。

リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* での酵素評価には ALKBH8 が基質とする cm5U 修飾を多く含む tRNA が必要なため、*Alkbh8*^{-/-}マウス由来の small RNA 画分 (tRNA を多く含む) を基質として使用した。この基質には cm5U が多く含まれ mcm5U と (S)-mchm5U はほとんど検出されないことを確認した (Fig. 14A, 第 1 カラム)。ALKBH8 によるメチル化およびヒドロキシル化のうち、ヒドロキシル化反応にはコファクターとして 2-OG と Fe(II)を必要とする。基質 RNA と各リコンビナントタンパク質を 2-OG/Fe(II)非存在下で反応させると、野生型 ALKBH8 では cm5U のほとんどが mcm5U へと変換され、2-OG/Fe(II)存在下ではヒドロキシル化された (S)-mchm5U 修飾まで反応が進んだ。一方で変異型 ALKBH8 では 2-OG/Fe(II)非存在下で 1/2 程度しか mcm5U へ変換されず、2-OG/Fe(II)存在下での (S)-mchm5U 修飾も野生型に比べ明らかに低下していた (Fig. 14A)。このことから、変異型 ALKBH8 は酵素活性が減弱していることが明らかになった。しかし、この条件での (S)-mchm5U 修飾の低下はもともになる mcm5U 修飾が低下していることも起因していると考えられるため、2-OG ドメインの機能欠損が起きているかは分からない。そこで、野生型 ALKBH8 と基質 RNA を 2-OG/Fe(II)非存在化で反応させ、熱処理により失活させることで mcm5U が増えた基質 RNA をつくり、この mcm5U 含有基質を対象に野生型および変異型 ALKBH8 タンパク質を反応させることでヒドロキシル化活性のみを評価した。その結果、野生型と変異型ともに同程度の (S)-mchm5U 修飾が認められた (Fig. 14B)。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る。

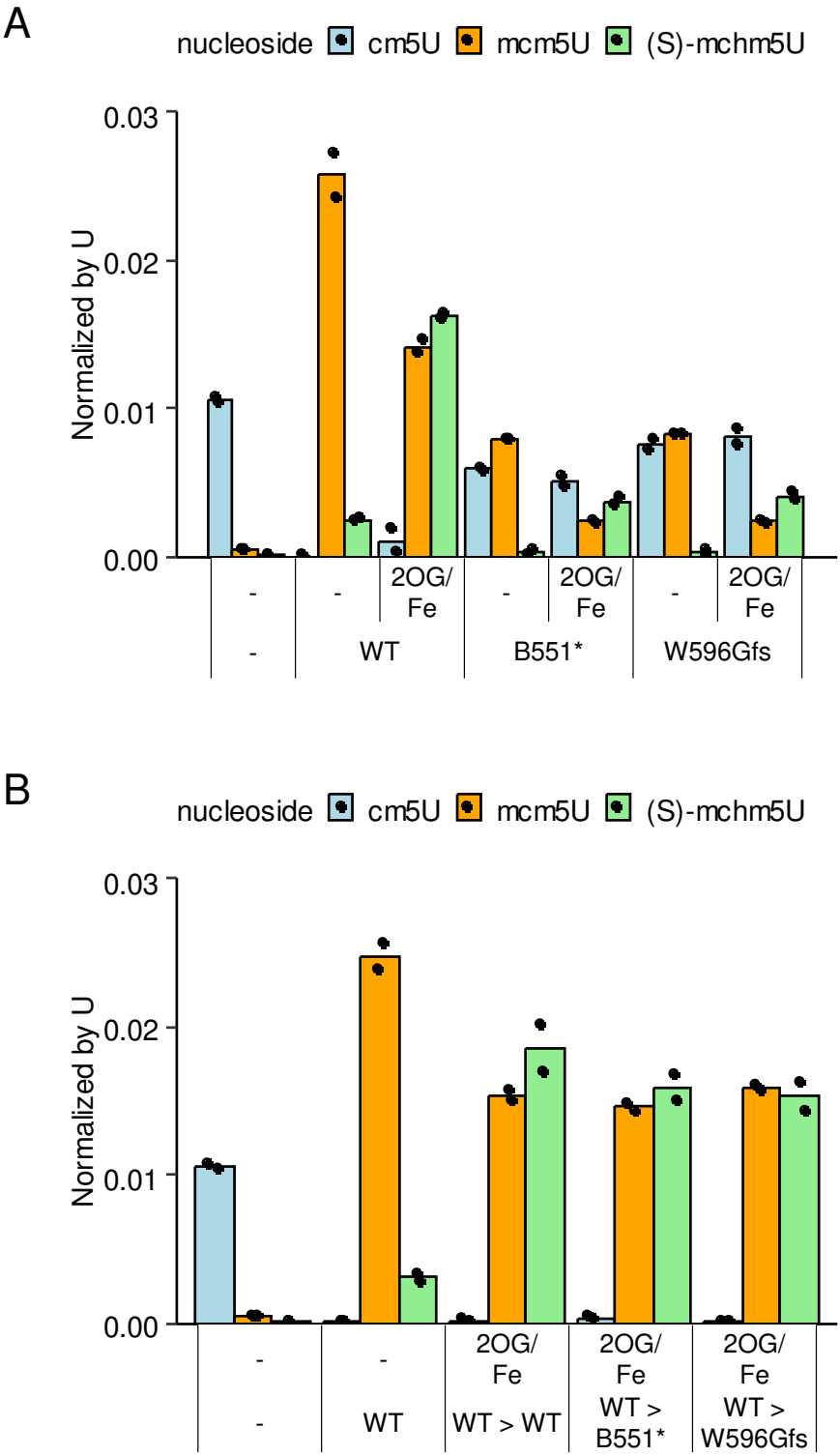


Fig. 14 変異型 ALKBH8 に対するメチル化およびヒドロキシル化活性測定

野生型 (WT) および変異型 ALKBH8 (B551* and Q596Gfs) リコンビナントタンパク質の酵素活性を測定した。基質として *Alkbh8*^{-/-}マウス由来の small RNA を用いた。(A) 2-OG と Fe(II) の非存在下あるいは存在下で酵素反応を行った (n=2)。(B) 第一反応として野生型 ALKBH8 と small RNA を反応させ、ヒドロキシル化反応の基質となる mcm5U を蓄積させ、熱による ALKBH8 失活後、第二反応として野生型あるいは変異型 ALKBH8 を用いた反応を行い 2-OG ドメインの機能を評価した(n=2)。反応後の RNA 修飾は UHPLC-UniSpray/ESI-MS/MS により分析した。

総括

ALKBH8 は tRNA の U34 部位を修飾する酵素でありセレノプロテインを含むタンパク質の翻訳制御を行うことが知られている。また ALKBH8 は過酸化水素、ミトコンドリア complex I 阻害剤、DNA 合成阻害剤、解糖系阻害剤あるいは環境汚染物質などによる外的ストレスに対する防御反応を担うことも報告されている[33]–[36]。しかし、生体における生物学的機能に関する報告は限定的である。ALKBH8 の機能解析のため当研究室では *Alkbh8*^{-/-}マウスを作製した。この *Alkbh8*^{-/-}マウスの臓器では ALKBH8 が修飾する mcm5U やその下流の修飾である (S)-mcm5U、mcm5Um の低下が認められたが、脳においては他の臓器ほど mcm5U の低下が認められなかった。tRNA の mcm5U と mcm5Um はセレノプロテイン合成に必要であるが、mcm5U は housekeeping セレノプロテインの合成に、mcm5Um はストレス応答に対するセレノプロテイン合成に必要であることが報告されている[56]。*Alkbh8*^{-/-}マウスの脳では生存のために必要な最低限の修飾が代償的に補完されている可能性が考えられた。実際に、プロテオミクス解析において検出されたセレノプロテインの発現は *Alkbh8*^{+/+}と *Alkbh8*^{-/-}マウスで差がなかった。ALKBH8 以外に cm5U のメチル化を担うタンパク質は明らかになっていないが、プロテオミクス解析では ELP1,2 および 3 の発現が亢進していることが見出された。ELP1,2,3 は複合体として tRNA へ結合し、ウリジンに対する cm5U 修飾を促進する[51]。この結果もフィードバック等による代償的反応を示唆するものと考えられる。

当研究室では *Alkbh8*^{-/-}マウスの行動試験において、新奇物体認識試験における新奇物体探索時間の短縮、ロータロッド試験における落下までの時間延長、強制水泳試験における無働までの時間延長を見出している。これらの試験はそれぞれ、短期記憶、運動協調性、抗うつ薬の有効性を評価するために実施される。より詳細な行動試験の実施が必要であるが、これら試験の共通性と脳における RNA 修飾変化から、本研究では *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて中枢神経系に異常が生じているとの仮説を立てた。このことは以下のような RNA 修飾酵素が神経疾患へ関与しているという報告からも推察される。NSUN2 および NSUN6 の機能欠損型変異は常染色体劣性遺伝の知的障害の原因因子として同定されている[26], [57]。ELP2 の変異は知的障害や自閉症スペクトラム症において見出されている[25], [58]。さらに ALKBH ファミリーのひとつである *Alkbh1* ノックアウトマウスでは学習機能障害が報告されているが[29]、異常が認められた恐怖条件付け学習試験は当研究室の *Alkbh8*^{-/-}マウスでは異常が認められていない。これらの違いから、ALKBH ファミリーや他のエピトランスクリプトームに関わる因子が中枢神経系で協調的に働いている可能性がある一方、個々に特化した役割も担っていると考えられる。

Alkbh8^{-/-}マウスが中枢神経系に異常を有するという仮説に基づき、本研究では脳の病理解析を行った。*Alkbh8*^{-/-}マウスの脳は *Alkbh8*^{+/+}に比べ重量が低下していた。しかし *Alkbh8*^{-/-}マウスは体重も低いことから脳重量低下だけで病的な変化であると断定できない。しかし

ながら、本マウスでは定性的な病的変化も観察された。海馬 CA1 領域は虚血に対して脆弱であることが知られている[46]。虚血は神経細胞死を誘導し、その結果 pyknotic neuron が観察される。本研究では *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて CA1 領域に隣接する繊維束領域の eosin 染色淡明化と側頭葉における pyknotic neuron の増加を認めた。これらの変化は報告されている虚血モデルにおける変化と比べると軽微なものであった[59]。しかし、行動試験での観察も重度の異常ではなかったことを考えると妥当な変化と考えられる。病理解析では側脳室の拡大も観察された。これは水頭症で見られる所見であり、脳脊髄液の循環異常によるものである[60]。側脳室拡大に加え観察された VR 腔の拡大も脳脊髄液循環障害の結果生じたものであると考えられる。虚血性変化との関連は不明であるが、脳脊髄液循環障害もまた神経細胞障害の一因となっている可能性がある。

病理解析による虚血性変化はプロテオミクスおよびメタボロミクス解析の結果からも裏付けられた。プロテオミクス解析では *Alkbh8*^{-/-}マウスにおける NNT と GGT7 の低下が見出された。NNT はミトコンドリアタンパク質で NADH 代謝を介した過酸化物の解毒に関与している因子であり、脳のミトコンドリアにおいても重要であることが報告されている[61], [62]。GGT7 はグルタチオン代謝に関与する γ -Glutamyltransferase の一因である。GGT7 の機能は十分解明されていないが、GGT1 とのアミノ酸配列の類似性から同様の活性が予測されている[63]。また、GGT7 の発現は他の臓器に比べ脳で高発現している[64]。さらに、神経膠芽腫においては増殖を抑制することから正常な脳機能において必要な因子であることが報告されている[65]。一方、GSEA 解析では *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて complex I やミトコンドリアリボソームタンパク質の構成因子などを含むミトコンドリア機能に関する ontology に含まれる複数のタンパク質の増加が認められた。その変化量は小さいものであったが、本研究で得られたグルタチオン合成に関連するアミノ酸類の低下や *Alkbh8*^{-/-}マウス由来神経細胞のミトコンドリア膜電位低下の結果と合わせて考察すると、GSEA 解析で見出された変化はミトコンドリアの機能亢進というよりは、むしろ酸化ストレス応答機能の低下に伴うフィードバックが起きていることを示していると考えられる。

ALKBH8 による tRNA 修飾を介して翻訳制御されているタンパク質としてセレノプロテインが報告されている。しかしその他のタンパク質を含む制御範囲の全容は解明されていない。本研究のプロテオミクス解析では、これまでに ALKBH8 による制御が報告されているセレノプロテインを含む複数のセレノプロテインが検出されたが、*Alkbh8*^{-/-}マウス脳における発現変化は認められなかった。一方で ELP1,2,3、NNT、GGT7 など *Alkbh8*^{-/-}マウスにおいて変動するタンパク質が見出されたが、これらが ALKBH8 に直接制御されているかは不明であり、ALKBH8 による制御機構のさらなる研究が必要である。

当研究室で作出した *Alkbh8*^{-/-}マウスでは低体重、低脳重量、脳における酸化ストレスに関連した病的変化とタンパク質および代謝物変化が認められた。しかし、これらの表現型は過去の報告と必ずしも一致していない。Songe-Mølle らは *Alkbh8*^{-/-}マウスを用いて tRNA の U34 修飾変化を見出しているが、表現型の顕著な変化は認められなかったと報告してい

る[37]。Leonardi らも通常飼育下では *Alkbh8*^{-/-}マウスは正常に出生し成長すると報告している。しかし、通常飼育下でも酸化ストレスのマーカーは増加しており、マウスがナフタレンの暴露を受けたときには肺へのダメージを受けやすくなっていることを見出している[33], [36]。この違いにはいくつかの理由が考えられる。ひとつは *Alkbh8* 遺伝子欠損のデザインの違いがある。Songe-Mølle らと Leonardi らはそれぞれエクソン 9 と 7 を欠損させている。これらは 2-OG ドメインと下流の MT ドメインの欠損につながるが、RRM は欠損していない。彼らのマウスで RRM ドメインだけが発現しているか不明であり、発現していたとしても RRM ドメインだけで何らかの機能があるという報告は無い。しかし、現時点では残存している RRM ドメインが正常な脳機能に影響している可能性を排除できない。別の可能性としては、観察されるフェノタイプの変化が小さいことがある。当研究室の *Alkbh8*^{-/-}マウスで観察された行動異常や病理解析の変化は重度なものではなく、詳細な解析を行わなければ気づかない変化である。Songe-Mølle らも神経系における機能やフェノタイプに関するマイナーな変化を評価することへの興味について言及している。また、Leonardi らはナフタレン暴露時においてのみ肺での変化を見出していることから、何らかの刺激や他の要因が加わらなければ顕著な変化が見出されない可能性もある。また当研究室で作製したマウスは C57BL/6 に 1 2 世代以上バッククロスしたものであり、遺伝的背景が本表現型の検出に繋がった可能性も考えられる。

ヒトにおいて見出された変異型 ALKBH8 は MT ドメインの機能を欠損しており、この機能欠損はメチル化修飾 mcm5U の阻害だけでなく、その下流のヒドロキシル化修飾の(S)-mchm5U の低下を引き起こすのにも十分であった。*Alkbh8*^{-/-}マウスの脳では mcm5U の低下は一定量残存していたが、(S)-mchm5U は他の組織と同程度に低下していた。このことから本研究で観察された脳の異常に関しては(S)-mchm5U やその下流の修飾が重要である可能性が考えられる。最近、当研究室では ALKBH4 が mcm5U から(R)-mchm5U への修飾を制御し、タンパク質翻訳効率に寄与していることを明らかにした[66]。脳における ALKBH4 の役割は現時点で不明であるが、ALKBH8 による tRNA 修飾制御だけでなく網羅的に tRNA 制御因子の影響を検討することで、より正確で詳細な脳機能における役割が明らかになることが期待される。

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同様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。

謝辞

本研究を学位論文として纏めるにあたり終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野教授 辻川 和丈先生に心より謝意を表します。

本研究において種々のご指導、ご協力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科助教 長谷 拓明先生、並びに特任准教授 上田 裕子先生、特任講師 神宮司 健太郎先生に心より感謝致します。

動物試験並びに中枢神経系試験の遂行にあたり、種々のご指導、ご協力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野教授 橋本 均先生、准教授 早田 敦子先生、助教 勢力 薫先生、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授 中川 晋作先生、陳 露 博士、山口 拓海 修士、広島大学大学院医系科学研究科教授 吾郷 由希夫先生、大阪大学微生物病研究所教授 伊川 正人先生、西岡 佐紀 特任技術職員に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多岐に亘る様々なご協力を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科 仲井 愛 修士、北恵 郁緒里 特任研究員、平出 祥啓 特任研究員、池見 唯 特任研究員、井熊 香 研究員、に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり日々の研究活動の中で、ご協力並びに様々なディスカッションで支えて頂きました、高橋 光 博士、内藤 拓也 博士、谷川 清香 修士、そして秘書の西村 恭子さん、岩渕 彩さん、三宅 葉子さんをはじめとする大阪大学薬学研究科細胞生理学分野の皆様、心より感謝致します。

本研究遂行における寄与

本研究の遂行にあたり、申請者は次に示す検討において実験を実施し、解析結果を得た。即ち、第一章, 脳および新駅細胞における ALKBH8 の発現解析 (Fig. 4)、第二章, 脳における病理解析 (Fig. 5, 6, Table 1)、第三章, ALKBH 8 の分子メカニズム解析 (Fig. 7-12, Table 2)および ALKBH8 の酵素活性に関する検討 (Fig. 14)を実施した。なお、一部の実験について、北恵 郁緒里特任研究員 (Fig. 4A/B, Fig. 15)、平出 祥啓特任研究員 (Fig. 15)の協力を得た。

参考文献

- [1] A. Wagner and M. Schosserer, “The epitranscriptome in ageing and stress resistance: A systematic review.,” *Ageing Res Rev*, vol. 81, p. 101700, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.arr.2022.101700.
- [2] R. Esteve-Puig, A. Bueno-Costa, and M. Esteller, “Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer.,” *Cancer Lett*, vol. 474, no. January, pp. 127–137, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.021.
- [3] T. Suzuki, “The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance.,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 22, no. 6, pp. 375–392, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00342-0.
- [4] L. Endres, P. C. Dedon, and T. J. Begley, “Codon-biased translation can be regulated by wobble-base tRNA modification systems during cellular stress responses.,” *RNA Biol*, vol. 12, no. 6, pp. 603–14, Jan. 2015, doi: 10.1080/15476286.2015.1031947.
- [5] L.-S. Zhang *et al.*, “ALKBH7-mediated demethylation regulates mitochondrial polycistronic RNA processing.,” *Nat Cell Biol*, vol. 23, no. 7, pp. 684–691, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41556-021-00709-7.
- [6] C.-J. Ma, J.-H. Ding, T.-T. Ye, B.-F. Yuan, and Y.-Q. Feng, “AlkB Homologue 1 Demethylates N3-Methylcytidine in mRNA of Mammals.,” *ACS Chem Biol*, vol. 14, no. 7, pp. 1418–1425, Jul. 2019, doi: 10.1021/acscchembio.8b01001.
- [7] E. van den Born *et al.*, “ALKBH8-mediated formation of a novel diastereomeric pair of wobble nucleosides in mammalian tRNA.,” *Nat Commun*, vol. 2, no. 1, p. 172, Feb. 2011, doi: 10.1038/ncomms1173.
- [8] Y. Ueda *et al.*, “AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells.,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 42271, Feb. 2017, doi: 10.1038/srep42271.
- [9] G. Jia *et al.*, “N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO,” *Nat Chem Biol*, vol. 7, no. 12, pp. 885–887, 2011, doi: 10.1038/NCHEMBIO.687.
- [10] G. Zheng *et al.*, “ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility,” *Mol Cell*, vol. 49, no. 1, pp. 18–29, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.10.015.
- [11] K. Bian *et al.*, “DNA repair enzymes ALKBH2, ALKBH3, and AlkB oxidize 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in vitro.,” *Nucleic Acids Res*, vol. 47, no. 11, pp. 5522–5529, Jun. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz395.

- [12] M. P. Westbye *et al.*, “Human AlkB homolog 1 is a mitochondrial protein that demethylates 3-methylcytosine in DNA and RNA.,” *J Biol Chem*, vol. 283, no. 36, pp. 25046–56, Sep. 2008, doi: 10.1074/jbc.M803776200.
- [13] R. Ougland *et al.*, “ALKBH1 is a histone H2A dioxygenase involved in neural differentiation.,” *Stem Cells*, vol. 30, no. 12, pp. 2672–82, Dec. 2012, doi: 10.1002/stem.1228.
- [14] M.-M. Li *et al.*, “ALKBH4-dependent demethylation of actin regulates actomyosin dynamics.,” *Nat Commun*, vol. 4, p. 1832, 2013, doi: 10.1038/ncomms2863.
- [15] M. Frye, B. T. Harada, M. Behm, and C. He, “RNA modifications modulate gene expression during development.,” *Science*, vol. 361, no. 6409, pp. 1346–1349, Sep. 2018, doi: 10.1126/science.aau1646.
- [16] X.-Y. Chen, J. Zhang, and J.-S. Zhu, “The role of m6A RNA methylation in human cancer.,” *Mol Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 103, May 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1033-z.
- [17] T. M. Frayling *et al.*, “A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity.,” *Science*, vol. 316, no. 5826, pp. 889–94, May 2007, doi: 10.1126/science.1141634.
- [18] A. Scuteri *et al.*, “Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits.,” *PLoS Genet*, vol. 3, no. 7, p. e115, Jul. 2007, doi: 10.1371/journal.pgen.0030115.
- [19] M. Ueda *et al.*, “Novel Metabolically Stable PCA-1 / ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells In Vivo,” *Anticancer Res*, vol. 38, pp. 211–218, 2018, doi: 10.21873/anticancer.12210.
- [20] H. Takahashi *et al.*, “Discovery of two novel ALKBH5 selective inhibitors that exhibit uncompetitive or competitive type and suppress the growth activity of glioblastoma multiforme.,” *Chem Biol Drug Des*, Apr. 2022, doi: 10.1111/cbdd.14051.
- [21] S. Huff, S. K. Tiwari, G. M. Gonzalez, Y. Wang, and T. M. Rana, “m 6 A-RNA Demethylase FTO Inhibitors Impair Self-Renewal in Glioblastoma Stem Cells,” *ACS Chem Biol*, 2021, doi: 10.1021/acscchembio.0c00841.
- [22] E. Yankova *et al.*, “Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia.,” *Nature*, vol. 593, no. 7860, pp. 597–601, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03536-w.
- [23] A. Pupak *et al.*, “Altered m6A RNA methylation contributes to hippocampal memory deficits in Huntington’s disease mice.,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 79, no. 8, p. 416, Jul. 2022, doi: 10.1007/s00018-022-04444-6.
- [24] H. Shi *et al.*, “m6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through

- YTHDF1.,” *Nature*, vol. 563, no. 7730, pp. 249–253, Nov. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0666-1.
- [25] M. Kojic *et al.*, “Elp2 mutations perturb the epitranscriptome and lead to a complex neurodevelopmental phenotype.,” *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, p. 2678, May 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22888-5.
- [26] F. Mattioli *et al.*, “Biallelic variants in NSUN6 cause an autosomal recessive neurodevelopmental disorder.,” *Genet Med*, vol. 25, no. 9, p. 100900, May 2023, doi: 10.1016/j.gim.2023.100900.
- [27] K. Zhang, J. M. Lentini, C. T. Prevost, M. O. Hashem, F. S. Alkuraya, and D. Fu, “An intellectual disability-associated missense variant in TRMT1 impairs tRNA modification and reconstitution of enzymatic activity.,” *Hum Mutat*, vol. 41, no. 3, pp. 600–607, Mar. 2020, doi: 10.1002/humu.23976.
- [28] Q. Li *et al.*, “N6-methyladenine DNA Demethylase ALKBH1 Regulates Mammalian Axon Regeneration.,” *Neurosci Bull*, vol. 37, no. 6, pp. 809–814, Jun. 2021, doi: 10.1007/s12264-021-00671-2.
- [29] L. Kawarada, M. Fukaya, R. Saito, H. Kassai, H. Sakagami, and A. Aiba, “Telencephalon-specific Alkbh1 conditional knockout mice display hippocampal atrophy and impaired learning.,” *FEBS Lett*, vol. 595, no. 12, pp. 1671–1680, Jun. 2021, doi: 10.1002/1873-3468.14098.
- [30] K. Tsujikawa *et al.*, “Expression and sub-cellular localization of human ABH family molecules.,” *J Cell Mol Med*, vol. 11, no. 5, pp. 1105–16, 2007, doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00094.x.
- [31] B. J. Lee, P. J. Worland, J. N. Davis, T. C. Stadtman, and D. L. Hatfield, “Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA.,” *J Biol Chem*, vol. 264, no. 17, pp. 9724–7, Jun. 1989, Accessed: Aug. 15, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2498338>
- [32] C. Sturchler, A. Lescure, G. Keith, P. Carbon, and A. Krol, “Base modification pattern at the wobble position of Xenopus selenocysteine tRNA(Sec).,” *Nucleic Acids Res*, vol. 22, no. 8, pp. 1354–8, Apr. 1994, doi: 10.1093/nar/22.8.1354.
- [33] L. Endres *et al.*, “Alkbh8 Regulates Selenocysteine-Protein Expression to Protect against Reactive Oxygen Species Damage.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0131335, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131335.
- [34] D. Fu *et al.*, “Human AlkB homolog ABH8 Is a tRNA methyltransferase required for wobble uridine modification and DNA damage survival.,” *Mol Cell Biol*, vol. 30, no. 10, pp. 2449–59, May 2010, doi: 10.1128/MCB.01604-09.
- [35] M. Y. Lee, A. Leonardi, T. J. Begley, and J. A. Melendez, “Loss of epitranscriptomic

- control of selenocysteine utilization engages senescence and mitochondrial reprogramming☆.,” *Redox Biol*, vol. 28, p. 101375, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.redox.2019.101375.
- [36] A. Leonardi *et al.*, “The epitranscriptomic writer ALKBH8 drives tolerance and protects mouse lungs from the environmental pollutant naphthalene.,” *Epigenetics*, vol. 15, no. 10, pp. 1121–1138, Oct. 2020, doi: 10.1080/15592294.2020.1750213.
- [37] L. Songe-Møller *et al.*, “Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding.,” *Mol Cell Biol*, vol. 30, no. 7, pp. 1814–27, Apr. 2010, doi: 10.1128/MCB.01602-09.
- [38] T. Kogaki *et al.*, “Development of a highly sensitive method for the quantitative analysis of modified nucleosides using UHPLC-UniSpray-MS/MS.,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 197, p. 113943, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jpba.2021.113943.
- [39] P. Boccaletto *et al.*, “MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update.,” *Nucleic Acids Res*, vol. 50, no. D1, pp. D231–D235, Jan. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1083.
- [40] A. Ennaceur and J. Delacour, “A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data.,” *Behavioural brain research*, vol. 31, no. 1, pp. 47–59, Nov. 1988, doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x.
- [41] J. Caston, N. Jones, and T. Stelz, “Role of preoperative and postoperative sensorimotor training on restoration of the equilibrium behavior in adult mice following cerebellectomy.,” *Neurobiol Learn Mem*, vol. 64, no. 3, pp. 195–202, Nov. 1995, doi: 10.1006/nlme.1995.0002.
- [42] R. D. Porsolt, M. Le Pichon, and M. Jalfre, “Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.,” *Nature*, vol. 266, no. 5604, pp. 730–2, Apr. 1977, doi: 10.1038/266730a0.
- [43] V. Castagné, R. D. Porsolt, and P. Moser, “Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse.,” *Eur J Pharmacol*, vol. 616, no. 1–3, pp. 128–33, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.018.
- [44] M. Ambjørn *et al.*, “A Loss-of-Function Screen for Phosphatases that Regulate Neurite Outgrowth Identifies PTPN12 as a Negative Regulator of TrkB Tyrosine Phosphorylation,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065371.
- [45] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nature Methods* 2012 9:7, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, Jun. 2012, doi:

10.1038/nmeth.2089.

- [46] T. Kirino and K. Sano, "Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia.," *Acta Neuropathol*, vol. 62, no. 3, pp. 201–8, Sep. 1984, doi: 10.1007/BF00691853.
- [47] M. Ishikawa, S. Yamada, and K. Yamamoto, "Three-dimensional observation of Virchow-Robin spaces in the basal ganglia and white matter and their relevance to idiopathic normal pressure hydrocephalus," *Fluids Barriers CNS*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, Jun. 2015, doi: 10.1186/S12987-015-0010-1/FIGURES/9.
- [48] S. Tyanova *et al.*, "The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data.," *Nat Methods*, vol. 13, no. 9, pp. 731–40, Sep. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3901.
- [49] V. K. Mootha *et al.*, "PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.," *Nat Genet*, vol. 34, no. 3, pp. 267–73, Jul. 2003, doi: 10.1038/ng1180.
- [50] A. Subramanian *et al.*, "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 102, no. 43, pp. 15545–50, Oct. 2005, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- [51] H. Hawer, A. Hammermeister, K. E. Ravichandran, S. Glatt, R. Schaffrath, and R. Klassen, "Roles of Elongator Dependent tRNA Modification Pathways in Neurodegeneration and Cancer.," *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.3390/genes10010019.
- [52] D. Monies, C. B. Vågbø, M. Al-Owain, S. Alhomaidi, and F. S. Alkuraya, "Recessive Truncating Mutations in ALKBH8 Cause Intellectual Disability and Severe Impairment of Wobble Uridine Modification.," *Am J Hum Genet*, vol. 104, no. 6, pp. 1202–1209, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.ajhg.2019.03.026.
- [53] S. Maddirevula *et al.*, "Insight into ALKBH8-related intellectual developmental disability based on the first pathogenic missense variant.," *Hum Genet*, vol. 141, no. 2, pp. 209–215, Feb. 2022, doi: 10.1007/s00439-021-02391-z.
- [54] A. K. Saad *et al.*, "Neurodevelopmental disorder in an Egyptian family with a biallelic ALKBH8 variant.," *Am J Med Genet A*, vol. 185, no. 4, pp. 1288–1293, Apr. 2021, doi: 10.1002/ajmg.a.62100.
- [55] A. Waqas *et al.*, "Case Report: Biallelic Variant in the tRNA Methyltransferase Domain of the AlkB Homolog 8 Causes Syndromic Intellectual Disability.," *Front Genet*, vol. 13, p. 878274, Apr. 2022, doi: 10.3389/fgene.2022.878274.
- [56] A. Leonardi, S. Evke, M. Lee, J. A. Melendez, and T. J. Begley, "Epitranscriptomic systems regulate the translation of reactive oxygen species detoxifying and disease

- linked selenoproteins.,” *Free Radic Biol Med*, vol. 143, pp. 573–593, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.030.
- [57] L. Abbasi-Moheb *et al.*, “Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability.,” *Am J Hum Genet*, vol. 90, no. 5, pp. 847–55, May 2012, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.021.
- [58] J. S. Cohen *et al.*, “ELP2 is a novel gene implicated in neurodevelopmental disabilities.,” *Am J Med Genet A*, vol. 167, no. 6, pp. 1391–5, Jun. 2015, doi: 10.1002/ajmg.a.36935.
- [59] T. Olsson, T. Wieloch, and M.-L. Smith, “Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade.,” *Brain Res*, vol. 982, no. 2, pp. 260–9, Aug. 2003, doi: 10.1016/s0006-8993(03)03014-2.
- [60] M. Dahme, U. Bartsch, R. Martini, B. Anliker, M. Schachner, and N. Mantei, “Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system,” *Nat Genet*, vol. 17, no. 3, pp. 346–349, Nov. 1997, doi: 10.1038/ng1197-346.
- [61] J. Rydström, “Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease.,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1757, no. 5–6, pp. 721–6, May 2006, doi: 10.1016/j.bbabo.2006.03.010.
- [62] P. Lopert and M. Patel, “Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) links the substrate requirement in brain mitochondria for hydrogen peroxide removal to the thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system.,” *J Biol Chem*, vol. 289, no. 22, pp. 15611–20, May 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.533653.
- [63] K. Takemura, P. G. Board, and F. Koga, “A Systematic Review of Serum γ -Glutamyltransferase as a Prognostic Biomarker in Patients with Genitourinary Cancer.,” *Antioxidants (Basel)*, vol. 10, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/antiox10040549.
- [64] L. Fagerberg *et al.*, “Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics.,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 13, no. 2, pp. 397–406, Feb. 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
- [65] T. T. Bui *et al.*, “ γ -Glutamyl transferase 7 is a novel regulator of glioblastoma growth.,” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 225, Apr. 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1232-y.
- [66] T. Kogaki *et al.*, “ALKBH4 is a novel enzyme that promotes translation through modified uridine regulation.,” *J Biol Chem*, vol. 299, no. 9, p. 105093, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.jbc.2023.105093.