



Brain expression of apurinic/aprimidinic endonuclease(ape/ref-1) multifunctional dna repair enzyme gene in the mouse with special reference to the suprachiasmatic nucleus

木村, 英仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2884

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002884>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 134 】

氏 名 ・(本 籍) 木村 英仁 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1529号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Brain expression of apurinic/apyrimidinic
endonuclease (APE/Ref-1) multifunctional DNA
repair enzyme gene in the mouse with special reference
to the suprachiasmatic nucleus
(DNA修復酵素アプリニック／アピリミジニックエンド
ヌクレアーゼ (APE／Ref-1) 遺伝子のマウス脳、特に視交叉上核での発現)

審 査 委 員

主 査 教 授 甲村 英二

教 授 岡村 均

教 授 尾原 秀史

【はじめに】

DNA 修復酵素アプリニック／アピリミジニックエンドヌクレアーゼ (APE/Ref-1) はアルカリ化物質、X 線、フリーラジカルなどによって損傷を受けた DNA に生じた apurinic/apyrimidinic (AP) 部位を除去する事で DNA 修復に関する酵素の一つであるが、また別の働きとして種々の転写因子の酸化還元を制御し、これらの活性を調節する事が知られている。これまでの報告より、APE/Ref-1 は脳を含む全ての組織に発現しており、そして脳においては海馬、小脳半球、視交叉上核を含む視床下部核などにその発現が報告されている。海馬、小脳半球において APE/Ref-1 はそれぞれの部位で錐体細胞、プルキンエ細胞が受ける興奮性アミノ酸の酸化的障害から細胞を保護する役割を担っているとされる。

視交叉上核はこれまでの報告より、哺乳類の唯一無二の概日リズム（サーカディアンリズム）発振部位として知られており、そこでは時計遺伝子が転写／翻訳を繰り返し、発現と消失を繰り返す発振ループにより概日リズムが生み出され、さらにはそのループからの出力信号により数々の生物時計に関する遺伝子の発現リズムが形成されている。そこでわれわれはまず視交叉上核での発現が知られている APE/Ref-1 が、生物時計によって制御され、その発現に概日リズムがあるかどうかを調べるべく、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて mRNA レベルで検討した。

さらに、視交叉上核は網膜視床下部路より外界からの光刺激を取り込んで、その生物時計を外界の明暗サイクルに同調させている事が知られている。同経路は興奮性グルタミン酸を神経伝達物質としており、海馬や小脳で見られる様に、APE/Ref-1 はこれによる酸化的障害から細胞を保護している可能性も考えられる。また、光刺激は視交叉上核において c-fos や jun-B などの遺伝子を速やかに発現させる事が知られており、APE/Ref-1 は Fos-Jun のヘテロダイマーや Jun-Jun のホモダイマーの酸化還元を調節する事で、これらの DNA への結合を制御している。よって、光刺激による APE/Ref-1 の発現の変化を見る事は、DNA 修復能の観点からも、酸化還元調節の観点からも、興味深い事であり、今回、in situ ハイブリダイゼーション法にて mRNA レベル、免疫組織学的手法にて蛋白レベルで検討した。

また今回、これまで検討されてこなかった APE/Ref-1 mRNA の脳内での詳細な分布を RI 標識やジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを用いて in situ ハイブリダイゼーション法にて検討した。

【材料および方法】

実験動物は成熟オス Balb/c マウスを用いた。これらは購入日より少なくとも 2 週間以上 12 時間ごとの規則正しい明暗条件下 LD サイクルで飼育されたのち、光照射の始まる時間を ZT0 と定め、以後 4 時間ごとに ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20 の 6 点で、各時点それぞれでマウスを 5 匹灌流固定した。また、恒常暗の条件での発現を調べるべく、同様に飼育されていたマウスを灌流 2 日前に恒常暗の条件下に移し、ZT 条件マウスの灌流と同時刻に、CT 条件マウスとして、やはり各時点 5 匹ずつ 6 点で灌流固定して組織化学的検索に用いた。

また、短時間の光刺激による遺伝子発現の変化を調べるため、CT16 においてマウスに 30 分間、蛍光灯にて 600 ルクスの照射を行い、mRNA 発現の検討では照射開始から 60 分と 120 分で、蛋白レベルの検討では照射開始から 120 分と 480 分で、それぞれ 3 匹ずつ灌流固定した。

組織化学的な検索は、クリオスタットで作成した凍結切片を用い、APE/Ref-1 の cRNA プローブをアイソトープ標識やジゴキシゲニン標識の in situ ハイブリダイゼーション法を行った。また、免疫組織学的な検討では、ウサギ抗 APE/Ref-1 ポリクローナル抗体を用いて、同様に切片を作成し、APE/Ref-1 蛋白の発現を検討した。

【結果及び考察】

APE/Ref-1 mRNA は全脳に分布したが、特に以下の部位で著明であった。まず歯状回の顆粒細胞、海馬の錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、顆粒細胞であるが、これらはそれぞれ興奮性グルタミン酸を神経伝達物質とする神経線維の入力を受け、これによる DNA への酸化的障害にさらされる部位であり、APE/Ref-1 はこれらより DNA を保護している事が示唆されている。またその他の部位としては、モノアミン系物質を含む神経核に高レベルの発現が認められた。それはドーパミン神経細胞のある弓状核、黒質、腹側被蓋野、ノルアドレナリン神経細胞のある青斑核や孤束核、セロトニン神経細胞のある縫線核などである。モノアミン代謝産物の細胞障害は良く知られているが、これらの細胞中の APE/Ref-1 の発現もそれぞれの DNA を保護する役割を担っている可能性がある。

APE/Ref-1 mRNA は視交叉上核に強く発現していた。定量的解析の結果、恒常暗条件下で飼われたマウスでも、明暗 12 時間ずつの条件下で飼われた

マウスでも、その発現量に概日リズムは確認されなかった。ジゴキシゲニン標識プローブを用いた視交叉上核内における組織学的検討では、APE/Ref-1 mRNA は視交叉上核の吻側端から尾側端まで中等度から高度の発現が見られ、背内側核ではより強く発現している事が確認された。光刺激による発現変動に関する実験では、APE/Ref-1 mRNA は変動せず、常に強い発現が見られた。免疫学的手法を用いた APE/Ref-1 酵素の視交叉上核での発現に関する検討でも、APE/Ref-1 は視交叉上核で恒常的に発現され、光刺激を与えてもその発現は変化しなかった。

視交叉上核は哺乳類において体内での概日リズムを作り出す部位であるが、この部位の代謝活性はリズムがあり、グルコース利用は昼に高く夜に低くなる事が分かっている。また代表的な時計遺伝子である mPer1 や mPer2 は視交叉上核で生物時計を発振する中心的遺伝子である。今回 APE/Ref-1 mRNA は視交叉上核で恒常的に強い発現を見たが、その発現に概日リズムは認められなかった。しかし注目すべきことは、この神経核の中でも時計遺伝子の発振が強く認められる背内側部に APE/Ref-1 の強い発現が確認されたことである。この背内側核に多く認められるという所見は、視交叉上核内での芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 AADC を含む神経細胞の分布と似ている。視交叉上核での AADC を含む神経細胞は、これ以外のアミン合成酵素を持たず、古典的なカテコールアミン細胞ではない。しかし、細胞外から L-dopa を取り込んでドーパミンを産生しているとされており、上述の様にドーパミン含神経細胞、ノルアドレナリン含神経細胞において APE/Ref-1 が強く発現している事からも考えると、視交叉上核での APE/Ref-1 の強い発現は、これらの部位でのアミンの存在に関係しているのかもしれない。

時計遺伝子の一つである clock 遺伝子は、ポジティブ因子としてサーカディアンリズム形成に重要な役割を持つ。この蛋白に含まれる bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM) ドメインはその他の bHLH/PAS 蛋白である BMAL1 とダイマーを形成し mPer1 遺伝子のプロモーター領域の E-box に結合し転写活性を高めると考えられている。近年別の bHLH/PAS 蛋白である hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) もマウス視交叉上核での発現が確認され、BMAL1, Clock とともに、bHLH/PAS 蛋白同士でリズムの形成に関っている事が示唆されている。APE/Ref-1 は HIF1 α の酸化還元状態を調節する事で、その活性を調節しているとの報告もみられ、またさらに BMAL1 の活性も酸化還元状態でコントロールされる事も分かっている。今回の実験で視交叉上

核での APE/Ref-1 の発現が概日リズムを示さず、恒常的に強く発現される事が確認されたが、この酵素が種々の時計遺伝子の酸化還元を調節する可能性は、今後検討すべき課題である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1530号	氏名	木村 英仁
論文題目	Brain expression of apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/Ref-1) multifunctional DNA repair enzyme gene in the mouse with special reference to the suprachiasmatic nucleus DNA 修復酵素アプリニック/アピリミジニックエンドヌクレアーゼ(APE/Ref-1) 遺伝子のマウス脳、特に視交叉上核での発現		
審査委員	主 査 甲村 英二 副 査 岡田 均 副 査 後原 孝史		
審査終了日	平成 15 年 4 月 15 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

DNA 損傷に対する修復機構は細胞機能維持のために必須のものである。DNA 修復酵素アプリニック/アピリミジニックエンドヌクレアーゼ (APE/Ref-1) はアルカリ化物質、X 線、フリーラジカルなどによって損傷を受けた DNA に生じた apurinic/aprimidinic (AP) 部位を除去する事で DNA 修復に関する酵素である。さらに APE/Ref-1 は別の働きとして種々の転写因子の酸化還元を制御し、これらの活性を調節する事が知られている。APE/Ref-1 は脳を含む全ての組織に発現しているが、マウス脳内での詳細な分布は検討されていない。さて、哺乳類の唯一無二の概日リズム（サーカディアンリズム）発振部位である視交叉上核にはグルタミン酸を介する入力繊維が豊富である。また、光刺激は視交叉上核 において c-fos や jun-B などの遺伝子を速やかに発現させ、その遺伝子産物の DNA への結合は酸化還元状態の調節により制御され引き続く遺伝子転写を調節している。そこで、今回 APE/Ref-1 の脳内分布を検討し、ことに視交叉上核における発現分布とその概日リズム、光刺激による発現変化を検討した。 成熟オス Balb/c マウスを用い、RI 標識やジゴキシンゲニン標識 cRNA プロープによる in situ ハイブリダイゼーション法で検討した。APE/Ref-1 mRNA は全脳に分布したが、特に以下の部位で著明であった。まず歯状回の顆粒細胞、海馬の錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、顆粒細胞であるが、これらはそれぞれ興奮性グルタミン酸を神経伝達物質とする神経線維の入力を受け、これによる DNA への酸化的障害にさらされる部位であり、APE/Ref-1 はこれらより DNA を保護している事が示唆されている。またその他の部位としては、モノアミン系物質を含む神経核に高レベルの発現が認められた。それはドーパミン神経細胞のある弓状核、黒質、腹側被蓋野、ノルアドレナリン神経細胞のある青斑核や孤束核、セロトニン神経細胞のある縫線核などである。モノアミン代謝産物の細胞障害は良く知られているが、これらの細胞中の APE/Ref-1 の発現もそれぞれの DNA を保護する役割を担っている可能性がある。 視交叉上核では、APE/Ref-1 mRNA は強く発現していた。定量的解析の結果、

恒常暗条件下で飼われたマウスでも、明暗 12 時間ずつの条件下で飼われたマウスでも、その発現量に概日リズムは確認されなかった。ジゴキシゲニン標識プローブを用いた視交叉上核内における組織学的検討では、APE/Ref-1 mRNA は視交叉上核の吻側端から尾側端まで中等度から高度の発現が見られ、背内側核ではより強く発現している事が確認された。光刺激による発現変動に関する実験では、APE/Ref-1 mRNA は変動せず、常に強い発現が見られた。免疫学的手法を用いた APE/Ref-1 酵素の視交叉上核での発現に関する検討でも、APE/Ref-1 は視交叉上核で恒常的に発現され、光刺激を与えてもその発現は変化しなかった。この酵素が種々の時計遺伝子の酸化還元を調節する可能性は、今後検討すべき課題と考えられた。

本研究は、DNA 修復酵素 APE/Ref-1 について、そのマウス脳内における発現分布を研究したものであるが、従来行われなかった脳内での詳細な発現部位の同定と、視交叉上核内での局在分布とその概日リズム、光刺激による発現変化の有無などについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。