

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 18 年度博士課程 入学

氏 名 李 知恩

指導教員名 小野 憲一郎

論文題目

虚血環境における神経細胞のミトコンドリア DNA 変異に関する研究

神経細胞はエネルギー要求度が非常に高く、そのエネルギー源としてグルコースのみが利用されている。また、肝臓や骨格筋細胞など他の組織とは異なりエネルギー保存能力に欠けることから、神経細胞が要求する要求量のグルコースを常時持続的に供給することが必要となる。また神経細胞は酸素への依存度が高く、中枢神経系疾患における神経細胞傷害では、虚血に代表される項目である酸素やグルコース供給の障害に基づいた発症機序や病態が注目され、検討されている。一方、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は環状 DNA で、生体のエネルギー産生系である酸化的リン酸化、ATP 合成の電子伝達系サブユニットなどをコードしている。近年、ミトコンドリア DNA の転写や複製領域 D-ループ (D-loop) の変異がアルツハイマー病など様々な疾患で認められ、動物でも加齢に伴った変異が報告されている。また、この D-loop の変異はミトコンドリア機能の低下をもたらし、神経細胞の生存ならびにその機能維持には mtDNA を intact に保持することが必要と考えられている。また、これまで mtDNA には核 DNA とは異なり修復機構がないと考えられていたが、少なくとも塩基除去修復系は備わっていることが明らかとなっている。一方、ミトコンドリアは細胞内における最大のラジカル産生源で、

mtDNA は核 DNA に比較して傷害を受けやすく、アポトーシス経路の活性化による神経細胞死に関連すると考えられている。再生能に乏しい神経細胞の細胞死については、虚血・再還流による早期の細胞死の発現機序、すなわち細胞外のグルタミン酸過剰、細胞膜の過酸化、Ca²⁺ インフラックスなどが明らかになっているが、遅延性の細胞死についてはいまだ明らかでない。

そこで本研究では mtDNA D-loop に着目し、虚血環境下における神経細胞の mtDNA の変異について、ラット海馬由来株化細胞 (HV16-4) を用いて、第一章では虚血環境下に暴露した際の mtDNA の変異について、第二章では塩基除去修復系の鍵となる DNA ポリメラーゼ γ の過酸化について、第三章ではグルタミン酸刺激による HV16-4 細胞の反応を Ca²⁺ インフラックスを蛍光色素を用いる方法で、膜電位の変化をパッチクランプ法により検討した。

第一章 虚血環境下における HV16-4 細胞の mtDNA の変異

虚血条件下で培養した HV16-4 細胞 mtDNA について検討した。すなわち、HV16-4 細胞を 2 度サブクローニングして細胞の性質を均一化した後、虚血条件 (2% O₂、10% CO₂、88% N₂) 下で 7 日および 14 日間培養した。なお対照として通常の培養条件 (5% CO₂、95% air) 下で培養した HV16-4 細胞を用いた。また培養条件を変更する前の HV16-4 細胞も検討した。

まず、これらの細胞から mtDNA Extraction CT Kit を用いて mtDNA を抽出した後、NCBI Entrez Nucleotide AC000022 に登録されたラット mtDNA に基づいて作成したプローブを用いて PCR 法で増幅した。培養条件変更前の HV16-4 細胞、通常の培養条件下ならびに虚血条件下で 7 日間ならびに 14 日間培養した HV16-4 細胞から得られた PCR 産物は、いずれも約 1000 kb に単一のバンドとして観察された。得られた PCR 産物を常法に従いクローニングし、その塩基配列を、NCBI Entrez Nucleotide AC000022 に登録されたラット mtDNA の塩基配列と比較検討した。培養条件変更前の HV16-4 細胞 (30 クローン) では 30 クローン中 3 クローン (10.0%) に一塩基置換が認められた。通常培養条件下 7 日目の細胞 (72 クローン: 同一条件で 3 回実施、各 24 クローン) では 72 クローン中 7 クローン (9.7%) (1 回目 2 クローン、2 回目 2 クローン、3 回目 3 クローン) に一塩基置換が、培養 14 日目の細胞 (84 クローン: 同一条件で 3 回実施、1 回目と 2 回目は 30 クローン、3 回目 24 クローン) では 84 クローン中 6 クローン (7.1%) (1 回目 2 クローン、2 回目 1 クローン、3 回目 3 クローン) に一塩基置換が認められた。一方、虚血条件下で培養した 7 日目の HV16-4 細胞 (78 クローン: 同一条件で 3 回実施、1 回目 30 クローン、2 回目と 3 回目は 24 クローン) では 78 クローン中 37 クローン

(47.4%) (1回目 15 クローン、2回目 12 クローン、3回目 10 クローン) に一塩基置換と一塩基欠失が、培養 14 日目の細胞 (84 クローン: 同一条件で 3 回実施、1回目 24 クローン、2回目と 3 回目は 30 クローン) では 84 クローン中 41 クローン (48.8%) (1回目 15 クローン、2回目 11 クローン、3回目 15 クローン) に一塩基置換と一塩基欠失が認められた。以上の結果から、HV16-4 細胞は虚血条件下の培養で、mtDNA D-loop に高頻度に一塩基置換あるいは一塩基欠失の起こることが明らかとなった。

第二章 虚血環境下における HV16-4 細胞の DNA ポリメラーゼ γ の酸化

mtDNA 修復能を低下させる、mtDNA 修復機構の鍵である DNA ポリメラーゼ γ の酸化について検討した。また、活性酸素のトラップ剤である 5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を最終濃度 11.04 μ M 添加時の DNA ポリメラーゼ γ の酸化についても検討した。DNA ポリメラーゼ γ の酸化は、通常条件下、虚血条件下ならびに虚血条件下 DMPO 添加で培養した HV16-4 細胞からミトコンドリアを Qproteome™ Mitochondria Isolation Kit を用いて分離し、SDS で外・内膜を破壊した後、抗ヒト DNA ポリメラーゼ γ 抗体ならびに OxyBlot™ protein oxidation detection Kit を用いたウエスタンブロット法で解析した。また、免疫沈降による解析も加えた。

まず通常条件下、虚血条件下ならびに虚血条件下 DMPO 添加で 3 日間培養した HV16-4 細胞のミトコンドリアタンパク質を OxyBlot で検討したところ、通常条件下で培養した HV16-4 細胞に比較して多くのミトコンドリアタンパク質が酸化されていた。また、虚血条件下 DMPO 添加で培養した細胞では、酸化されたミトコンドリアタンパク質の濃度が有意に減少した。また、培養 7 日目、14 日目の細胞でも同様の傾向が認められたが、14 日目の虚血条件下 DMPO 添加で培養した細胞の酸化されたミトコンドリアタンパク質の濃度は DMPO 不添加 (虚血条件下) で培養したものと差は認められなかった。

DNA ポリメラーゼ γ の酸化は、通常条件下、虚血条件下ならびに虚血条件下 DMPO 添加で培養した HV16-4 細胞のミトコンドリアタンパク質を抗ヒト DNA ポリメラーゼ γ 抗体で免疫沈降し、OxyBlot で検討した。虚血条件下で 7 日間培養した HV16-4 細胞では酸化された DNA ポリメラーゼ γ のバンドは DMPO 添加により有意に低下した。また、14 日間培養した細胞でも同様の結果が認められたが、その濃度に有意差は認められなかった。以上の結果から、HV16-4 細胞は虚血条件下で mtDNA D-loop に容易に変異が入り、その原因の一つは mtDNA 修復機構の鍵となる DNA ポリメラーゼ γ の活性酸素による酸化によって生じた mtDNA 修復能の低下によることが明らかとなった。

第三章 虚血環境下における HV16-4 細胞のグルタミン酸刺激に対する反応

グルタミン酸刺激による HV16-4 細胞の反応を Ca^{2+} インフラックスについては蛍光色素 (Fluo-3) を用いる方法で、膜電位の変化についてはパッチクランプ法により検討した。

1) Ca^{2+} インフラックス

まず Ca^{2+} イオノフォア (A23187) で刺激した場合の Ca^{2+} インフラックスを検討した。通常条件下で 7 日間培養した HV16-4 細胞では A23187 ($10 \mu\text{M}$) 投与後 10 sec で細胞内 Ca^{2+} が増加し始め、30 sec で頂値 (蛍光強度:前値の 180 %) となり以後 300 sec まで持続した。一方、虚血条件下で培養した HV16-4 細胞では投与後 10 sec で頂値 (前値の 140 %) を示し、80 sec 後にはほぼ前値に復した。その蛍光強度はいずれの時点においても通常培養と比較して有意な低値であった。グルタミン酸刺激 ($500 \mu\text{M}$) では、通常条件下で 7 日間培養した HV16-4 細胞では、投与後 40 min から細胞内 Ca^{2+} が増加する傾向を示し、虚血条件下で培養した HV16-4 細胞でも同様であった。またその蛍光強度に差は認められなかった。

2) 活動電位

グルタミン酸刺激 ($10 \mu\text{M}$) による活動電位 (細胞あたりの膜電位の変化) を、通常条件下ならびに虚血条件下で培養した HV16-4 細胞についてパッチクランプ法で検討した。通常条件下で 7 日間培養した HV16-4 細胞ではグルタミン酸投与後約 200 ms で陰性電流約 20 pA が観察され、投与後 2000 ms まで持続した。一方、虚血条件下で培養した HV16-4 細胞では陰性電流の発現しないものが多く、認められるものでも約 9 pA と有意な低値であった。以上の結果から、虚血条件下で培養した HV16-4 細胞では、 Ca^{2+} イオノフォアによる Ca^{2+} インフラックスが低下しており、またグルタミン酸刺激による活動電位が低下していることが明らかとなった。

これらの結果から、ラット海馬由来神経細胞 (HV16-4 細胞) は虚血条件下で、ミトコンドリア DNA 修復機構の鍵となる DNA ポリメラーゼ γ の酸化によって生じた修復能の低下により、ミトコンドリア DNA D-loop に高頻度に一塩基置換あるいは一塩基欠失が起こっていることが明らかとなった。また、虚血条件下の細胞の機能は低下しており、その原因の一つにはミトコンドリア DNA の変異が関与していると考えられ、神経細胞の遅延性細胞死に関連するものと推測された。