

機関番号：37114

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570168

研究課題名(和文) RNAの酸化損傷の抑制と酸化RNA排除機構

研究課題名(英文) RNA damages and RNA quality control (英訳)

研究代表者 早川 浩 (HAYAKAWA HIROSHI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70150422

研究成果の概要(和文)：

- ① 酸化RNA排除機構の解明の為、酸化RNAに特異的に結合するタンパクをヒト細胞抽出液から網羅的に検索するシステムを開発した
- ② 上記のシステムを用い、HeLa細胞抽出液から4つの酸化RNA結合タンパクを同定した。その中でも特にHNRNPD (Auf1) タンパク質は拮抗阻害試験により、酸化RNAにより選択的に結合することが明らかとなった。
- ③ これら4つのタンパクをsiRNAによりノックダウンする実験をおこなったところ、HNRNPD (Auf1) に加え、HNRNPCタンパクのノックダウンが過酸化水素水やメナディオンの酸化ストレスにたいし細胞の抵抗性を低下させることが明らかとなり、この2つのタンパク質が酸化ストレス感受性に関与していることが結論できた。
- ④ また、HNRNPDタンパクは細胞を酸化ストレス下に晒すと、細胞内での含量が急速に低下することが明らかとなった。一方HNRNPCタンパクについては変動がなかった。
- ⑤ さらにダブルノックダウンの実験では、酸化ストレス感受性の低下はシングルノックダウンの時とかわらず、2つのタンパクは同じ経路に働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

We searched for proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA from human HeLa cell extracts, and the candidate proteins were identified using mass spectrometry. Among the identified candidates, splicing isoform 1 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (HNRNPD) and splicing isoform C1 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 (HNRNPC) exhibited strong abilities to bind to oxidized RNA. The amount of HNRNPD protein rapidly decreased when cells were exposed to hydrogen peroxide, an agent that enhances oxidative stress. Moreover, the suppression of HNRNPD expression by siRNA caused cells to exhibit an increased sensitivity to hydrogen peroxide. The application of siRNA against HNRNPC also caused an increase in sensitivity to hydrogen peroxide. Since no additive effect was observed with a combined addition of siRNAs for HNRNPD and HNRNPC, we concluded that the two proteins may function in the same mechanism for the accurate gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：RNA

### 1. 研究開始当初の背景

生体内で生じる活性酸素はRNAやその前駆体であるヌクレオチドを酸化し、異常タンパクの生成を引き起こすことが知られているが、その抑制メカニズムについては殆ど知られていない。

RNAの酸化により生じる酸化型塩基の中で最も量が多く、かつ生物学的重要性があるのはグアニンの酸化型である

8oxoguanine (8oxoG) と考えられている。

8oxoGはシトシンのみならず、アデニンとも塩基対合をとれるため、間違った翻訳を引き起こし異常なタンパクを合成する。

大腸菌では MutT タンパクが酸化型 GTP, (8oxoGTP) を 8oxoGMP とリン酸に加水分解することで、8oxoG の RNA への取り込みを抑制し、その結果異常なタンパクの合成を抑制していることを我々は先に報告した。さらにヒトを含む哺乳動物細胞においても同様な酵素は広く存在し、普遍的な生体防御機構と考えられる。

酸化型の前駆体の排除には MutT やそのホモログが働いていると考えられるが、これは既に酸化したRNAには働かない。酸化したRNAには別の機構が存在するとの仮定をたてて酸化RNAに結合するタンパクを大腸菌で検索したところ Pnp タンパクが同定された。これを欠損する変異株は酸化ストレスを引き起こすパラコートに対する感受性が野生株に比べ異なっていたことから、このタンパクも何らかの仕組みで酸化RNAの排除に機能しているものと思われる。同様なタンパクはヒト細胞にも存在している。

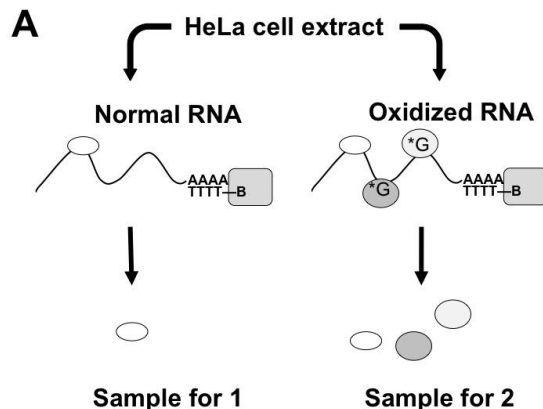
以上のような研究の過程で哺乳動物細胞には大腸菌に比べ多くのタンパクが酸化RNAの排除機構に働いている可能性が出てきたので、あらためて今回網羅的に検索する必要性を感じこの研究を進めた。

### 2. 研究の目的

酸化RNAに結合する活性を手がかりに酸化RNAの排除に関わる因子の同定を行う。本研究ではさらに、それらのタンパクの分子レベルでの作用機構や細胞レベルでの働きを明らかにし、さらにそれらの遺伝子に欠損をもつモデル動物を作成して、発がんや老化、神経細胞変性におけるそれらの分子の役割を明らかにすることを目標とする。

### 3. 研究の方法

酸化RNA特異的接合タンパクのヒト細胞からの網羅的検索

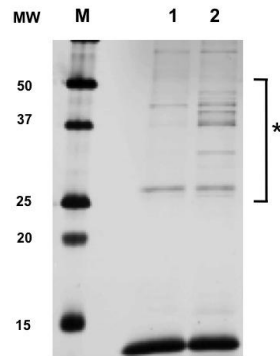


A 網羅的検索法

- ①酸化RNAと正常RNAに結合するタンパクを網羅的に同定し、半定量的質量分析により、選択的に酸化RNAに結合すると思われるタンパクの候補を選択する。
- ②候補タンパクの酸化RNA結合活性を確認する。
- ③このタンパクの発現を siRNA などでノックダウンし、酸化ストレス感受性に効果があるかどうかを調べる。

4. 研究成果  
酸化RNA結合タンパクの同定

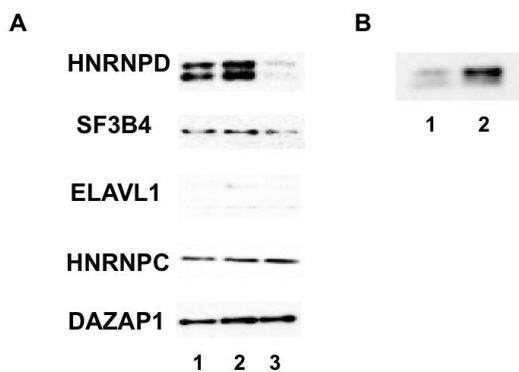
**B**



Bにそれぞれの結合タンパクを電気泳動で解析したパターンを示す。1；正常のRNAに結合するタンパクの電気泳動像。2；酸化RNAに結合するタンパクの電気泳動像。

]\*の部分を持ち出し質量分析にかけ、400個のタンパクを同定し、その中から5個の候補タンパクを絞り込んだ。

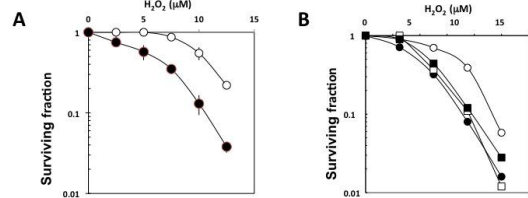
その中で4つのタンパクは実際に酸化RNA結合活性有する。さらにその中で1個のタンパク、HNRNPD (Auf1) は酸化RNAより選択的に結合することが明らかとなった。(下図参照)



A 1；酸化RNA結合活性をWBで確認、2；過剰量の正常RNAで競合実験をおこなった時の結合活性、3；過剰量の酸化RNAで競合実験をおこなった時の結合活性

B 1；正常RNAへの結合活性、2；酸化RNAへの結合活性

酸化RNA結合能をもつ4つのタンパクのうち、HNRNPDとHNRNPCタンパクはノックダウンにより細胞内のタンパクの発現を抑制すると過酸化水素水による酸化ストレスに対し抵抗性になることが明らかとなった。

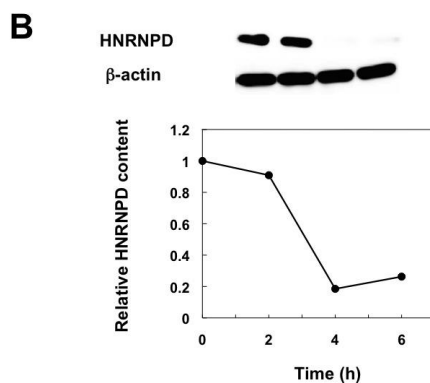


A HNRNPDノックダウン細胞の過酸化水素水に対する感受性試験、

B HNRNPCのsiRNAでノックダウンした細胞および、HNRNPDとHNRNPCの両siRNAでダブルノックダウンした細胞の過酸化水素水に対する感受性試験。

ダブルノックダウンでは感受性に相乗あるいは、相加的増加が認められない

なお、HNRNPD (Auf1) タンパクは細胞を酸化ストレス下に晒すと細胞内でのタンパク含量が急速に低下する。



B 細胞を過酸化水素で処理し細胞内のHNRNPDタンパクをコントロールとして使用下β-アクトチンとの相対量で示した。HNRNPDタンパクは処理後4時間で急速に量が低下する。

以上の様な結果から、

- ① この2つのタンパク質が酸化ストレス感受性に関与していること。
- ② 2つのタンパクは同じ経路に働いているが、その挙動はやや異なることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Hiroshi Hayakawa, Aya Fujikane Riyoko Ito,  
Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama and  
Mutsuo Sekiguchi. Human Proteins that  
Specifically Bind to  
8-Oxoguanine-containing RNA and their  
Responses to Oxidative Stress.  
Biochemical and Biophysical Research  
Communications 2010. 403, 220-224

〔学会発表〕(計1件)

Hiroshi Hayakawa, Aya Fujikane Riyoko Ito,  
Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama and  
Mutsuo Sekiguchi. Human Proteins that  
Specifically Bind to  
8-Oxoguanine-containing RNA and their  
Responses to Oxidative Stress.  
第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学学会合同大会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川 浩 (HAYAKAWA HIROSHI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：70150422

### (2) 研究分担者

伊東 理世子 (ITOU RIYOKO)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：10140865

### (3) 連携研究者 なし