

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32705

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06495

研究課題名（和文）RNAの酸化損傷が誘導するアポトーシス開始機構

研究課題名（英文）Initiation mechanisms of apoptosis for elimination of oxidatively damaged RNA

研究代表者

石井 健士（Ishii, Takashi）

鎌倉女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：70516731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスは、生体分子の酸化を通して、生体の恒常性喪失を誘導する。その結果として、ヒトの老化や神経変性疾患などが発症すると考えられている。我々の研究では、酸化を受けたRNAの排除に関わる因子の探索を行なった。酸化損傷RNAは遺伝情報の伝達に異常を引き起こすため、細胞の恒常性破綻の原因となる。研究の成果から、PCBP1とPCBP2の2つのタンパク質が酸化損傷RNAを生じた細胞をアポトーシスにより排除する機構に働くことが明らかになった。また、これを裏付ける証拠として、神経変性疾患を発症した患者の脳神経細胞ではPCBP2の発現量が低下することが明らかになっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化損傷塩基8-oxoGが生じると遺伝情報の正確な伝達が行われなくなる。その結果、DNAの変異による遺伝子疾患（がん等）や、RNAの変異による異常タンパク質合成が引き金となる老化や神経変性疾患（アルツハイマー病や認知症等）が誘導される。この危機を回避するために、生物は様々な機構を使って8-oxoGを排除している。その1つとして、我々はPCBP1とPCBP2による酸化損傷RNA排除機構の存在を明らかにした。この機構は、重度の酸化損傷を受けたRNAを持つ細胞をアポトーシスにより排除することで生体の恒常性維持に働くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress induces loss of homeostasis through the oxidation of various types of biomolecules. As a result, aging and neurodegenerative diseases are thought to occur. In our study, we searched for factors involved in elimination of oxidized RNA. Oxidatively damaged RNA causes abnormalities in the transduction of genetic information, which causes disruption of cell homeostasis. Research results revealed that two proteins, PCBP1 and PCBP2, act in the mechanism of apoptotic elimination of cells that have produced oxidatively damaged RNA. In addition, as evidence to support this, it has been revealed that the expression level of PCBP2 is downregulated in brain neurons of patients who develop neurodegenerative diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：酸化ストレス 酸化損傷 8-oxoG RNA アポトーシス 老化 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

これまでの我々の研究から、酸化損傷を受けた RNA に結合するタンパク質として AUF1 と PCBP1 の 2 つが存在することが明らかになっていた。

AUF1 は、AU-rich な配列に結合するタンパク質として知られていたが、酸化 RNA とも結合する能力があることを我々が明らかにしていた。また、AUF1 ノックアウト細胞を用いた解析から、AUF1 が酸化損傷 RNA の分解による排除に働くことも明らかにしていた。しかし、AUF1 が酸化損傷 RNA 分解を認識した後の詳しい分解経路は明らかになっていなかった。

PCBP1 は、ポリ C 配列に結合するタンパク質として知られていたが、人工的に合成した酸化損傷塩基 8-オキソグアニン (8-oxoG) を含んだオリゴ RNA 鎖を用いた結合実験により、酸化 RNA 結合因子として我々が同定した。PCBP1 は AUF1 に比べて、より重度に酸化された RNA のみを特異的に認識する性質を持つことを明らかにした。さらに、ゲノム編集技術を用いて作成した PCBP1 ノックアウト株を用いた解析から、PCBP1 が酸化ストレスにより誘導されるアポトーシスを促進する役割を持つことも明らかにしていた。しかし、PCBP1 が酸化損傷 RNA を認識して結合した後の詳しいアポトーシス誘導経路は明らかになっていなかった。また、PCBP1 と協働や競合する因子の存在も明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

生物の多くはエネルギー産生に酸素を利用している。酸素の利用に伴い、細胞内に酸化ストレスが生じると活性酸素種 (ROS) が生成される。ROS は非常に反応性が高く、様々な生体分子を酸化する。特に、遺伝情報の発現に関わる mRNA は酸化を受け易いことが知られている。mRNA の酸化は異常タンパク質の合成を誘導し、細胞の恒常性を喪失させて、老化や神経変性疾患を含む様々な疾患の原因になると考えられている。この危機を回避するために、細胞は酸化損傷 RNA を排除するための生体防御機構を有していると考えられる。

その機構を明らかにするために、酸化損傷を受けた RNA を特異的に認識して、結合するタンパク質を探索した。その結果、ヒトのタンパク質 PCBP1 を同定している。PCBP1 は、グアニンの酸化体 8-オキソグアニン (8-oxoG) を持つ重度に酸化された RNA に結合する能力を持っており、この酸化 RNA-PCBP1 複合体は細胞をアポトーシスに導く最初のシグナルになると考えられる。この機構が酸化ストレスにより異常タンパク質の蓄積を起こした細胞を排除する役割を果たすことから、PCBP1 は老化や神経変性疾患の抑制において重要な機能を担っていると考えられる。しかし、PCBP1 による細胞死誘導機構の詳しい分子経路は明らかになっていない。

本研究では、細胞死誘導における PCBP1 の機能を明らかにするため、次の 2 つの問題に焦点を絞って研究を行う。PCBP1 が酸化損傷 RNA を認識後、どのようにして下流に細胞死シグナルを伝達しているのか、PCBP1 と構造上の相同性が高いファミリータンパク質がアポトーシス誘導において同様の機能を果たすかを明らかにする。これらの研究成果を手掛かりに、老化や神経変性疾患発症における PCBP1 の機能解

明を目指す。

3．研究の方法

新規の酸化損傷 RNA 結合因子を分離するために、人工的に酸化損傷塩基 8-oxoG を組み込んだオリゴ RNA を用いて、ヒト培養細胞の抽出液中から酸化 RNA 結合タンパク質を分離同定した。同時に、我々の解析から酸化 RNA と結合することが明らかとなった PCBP1 のファミリータンパク質についても、酸化 RNA との結合性の有無を調べた。同定した因子については、ゲノム編集技術を用いてノックアウト株を作成し、その因子が果たす細胞内での機能を解析した。

さらに、生体内での役割について明らかにするために、神経変性疾患患者の脳神経細胞を用いた病理組織学的な解析も行なった。

4．研究成果

新規の酸化損傷 RNA 結合因子として PCBP2 を同定した。同時に、5 種類存在する PCBP ファミリータンパク質の中で、PCBP1 と PCBP2 のみが酸化損傷 RNA を特異的に認識し、結合することを明らかにした。さらに、ゲノム編集技術を利用して樹立した PCBP2 ノックアウト細胞の解析から、PCBP2 が酸化ストレスによって誘導される細胞死を抑制する機能を持つことを明らかにした。

さらに、神経変性疾患患者由来の脳神経細胞を用いた解析から、異常の生じた細胞では PCBP2 の蓄積が観察されることも明らかにした。このことは、PCBP2 が酸化ストレスによって引き起こされる神経変性疾患に深く関与していることを示していると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sekiguchi Takeshi, Ishii Takashi, Kamada Yoshiaki, Funakoshi Minoru, Kobayashi Hideki, Furuno Nobuaki	4. 巻 598
2. 論文標題 Involvement of Gtr1p in the oxidative stress response in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii Takashi, Igawa Tatsuhiro, Hayakawa Hiroshi, Fujita Tsugumi, Sekiguchi Mutsuo, Nakabeppu Yusaku	4. 巻 295
2. 論文標題 PCBP1 and PCBP2 both bind heavily oxidized RNA but cause opposing outcomes, suppressing or increasing apoptosis under oxidative conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12247 ~ 12261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sekiguchi Takeshi, Ishii Takashi, Kobayashi Hideki, Furuno Nobuaki	4. 巻 547
2. 論文標題 WDR35 is involved in subcellular localization of acetylated tubulin in 293T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura Motoi, Honda Hiroyuki, Sasagasako Naokazu, Mori Shinichiro, Hamasaki Hideomi, Suzuki Satoshi O, Ishii Takashi, Ninomiya Toshiharu, Kira Jun-Ichi, Iwaki Toru	4. 巻 80
2. 論文標題 PCBP2 Is Downregulated in Degenerating Neurons and Rarely Observed in TDP-43-Positive Inclusions in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 220 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 健士
2. 発表標題 RNAの酸化損傷に対する生体防御機構
3. 学会等名 福岡歯科大学学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村 基
2. 発表標題 PCBP2 is down regulated in degenerating neurons and rarely observed in skein-like inclusions in ALS
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------