

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590464

研究課題名(和文) RNAスプライシングによる酸化ストレスシグナル制御の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of oxidative stress regulation by RNA splicing

研究代表者

竹腰 進 (TAKEKOSHI, Susumu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70216878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：PKC SVを高発現させた神経細胞では、スーパーオキシド、過酸化水素、過酸化DAGなどの種々の酸化ストレス刺激による細胞傷害に対して抵抗性となることが判明した。また、酸化ストレス負荷によって過酸化DAGが増加した脳・肝臓などの組織中においてPKC SVの発現が著明に増加していることが明らかとなった。これらの結果から、酸化ストレスにより誘導されるPKC SVは細胞傷害抑制分子であることが明らかとなり、生体中にはRNAスプライシングを制御することにより酸化ストレス傷害を防御するメカニズムが存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol (DAG) is a physiological activator of protein kinase C (PKC). We reported that oxidized diacylglycerol (DAG-OOH) had a remarkably stronger PKC-activating action than un-oxidized DAG. DAG-OOH also induces neuronal cell injury through the over-activation of PKC delta molecule. On the other hand, PKC delta splicing variant (PKCSV) could prevent DAG-OOH-induced neuronal cell injury. In this study, the action of PKCSV to prevent oxidative stress-induced neuronal cell injury was analyzed and the expression of PKCSV under various oxidative stress arising was observed. In consequence, PKCSV over-expressing neuronal cells resistance to cell injury evoked by superoxide radical, hydrogen peroxide and DAG-OOH. Furthermore the expression of PKCSV significantly increased in oxidative stress models. These results suggested that PKCSV has a protective action against oxidative stress-induced cell injury and the cell defense mechanism through the RNA splicing may exist.

研究分野：分子病理学

キーワード：酸化ストレス RNAスプライシング シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Diacylglycerol (DAG) は protein kinase C (PKC) の活性化作用を有する脂溶性情報伝達物質であり、PKC の活性化を介して様々な生体反応に関与している。我々は酸化ストレスにより DAG が過酸化された際に生じる過酸化 DAG が native DAG の約 3 倍の PKC 活性化作用を持つ強力な活性化物質であることを証明し、機能性脂質 (DAG) の過酸化による PKC 過剰活性化と蛋白質リン酸化反応の異常亢進による病変発生の可能性を示唆した。生体内には活性化剤に対する感受性や局在部位などが異なる 11 種の PKC アイソザイムが存在する。我々は、過酸化 DAG がこれら既存の PKC アイソザイムの中でも分子種を特異的に強く活性化するというユニークな特性を明らかにした。更に、PKC 分子種を高発現させたラット胎児大脳皮質初代培養神経細胞に過酸化 DAG を作用させると MAPK カスケードの過剰活性化とともに tau 蛋白の過リン酸化を生じ細胞変性・細胞死に至ることが判明した。過酸化 DAG による神経細胞傷害の機序を追求する過程で、我々は PKC (シグナル伝達促進性) と同様に過酸化 DAG に強い結合性を有するがシグナル伝達特性の全く異なる新しい PKC 分子 (PKC SV: シグナル伝達抑制性) が存在することを見だし、本研究を着想するに至った。PKC SV は、PKC 分子の制御領域 (活性化物質の結合部位) のみからなる alternative splicing variant として報告されている分子と同一のものであることが判明しており、過酸化 DAG に強く結合するが蛋白質リン酸化活性を持たないことから過酸化 DAG による情報伝達異常亢進を抑制 (dominant negative 効果) している分子であることが強く示唆される。一方、ごく最近、筋萎縮性側索硬化症 (ALS: 酸化ストレスが発症原因の一つとして考えられている疾患) の病変部位に生じる ubiquitin 陽性封入体の形成に関わる分子とされる peripherin の 3 つの alternative splicing variant の発現の ratio が過酸化水素刺激により変動し、これが ubiquitin 封入体形成に重要な役割を果たすことが報告され (Brain Res. 2011: 1422: 57-65)、酸化ストレスによるスプライソソームの機能 (RNA スプライシング) 調節と病変発生の関連性が浮かび上がってきている。

2. 研究の目的

本研究課題では、脂溶性情報伝達経路の中核に位置するジアシルグリセロール (DAG) の過酸化とそのプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化作用の変質 (過剰亢進) により誘導される病変に対し「特異的に応答する RNA スプライシング反応」の分子機構を厳密に検証し、酸化ストレス防御システムとしてのシグナル伝達制御の役割を追求する。異なるシグナル伝達特性を有する PKC 分子種が発現している実際の in vivo 組織中におい

て、過酸化 DAG により誘導される病変の解析をシグナル亢進 (PKC) およびシグナル抑制 (PKC SV) の正負の役割を有するシグナル伝達分子を中心に検証することはきわめて重要であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究の目的「過酸化 DAG による PKC 活性化作用の過剰亢進により誘導される病変に対し、特異的に応答する RNA スプライシング反応の分子機構を in vivo 脳組織内において厳密に検証し、酸化ストレス制御システムとしてのシグナル伝達制御の役割を追求する」を達成するための下記の検討を行った。

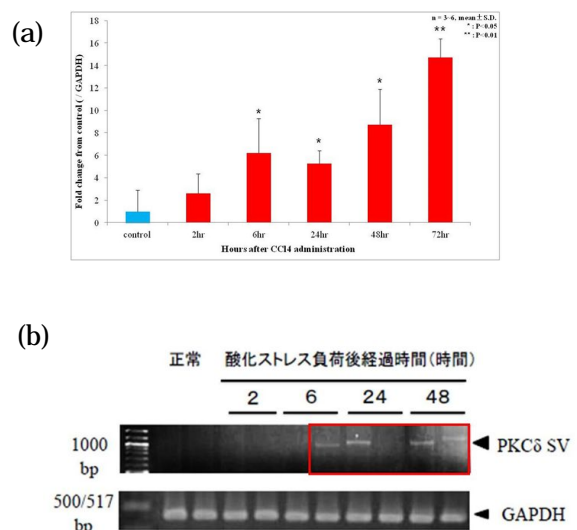
(1) 種々の酸化ストレス負荷動物モデルにおける PKC SV の mRNA および蛋白分子レベルでの詳細な発現解析を行う。

(2) 過酸化 DAG による PKC 過剰活性化を介して誘導される神経細胞傷害と PKC SV による細胞傷害抑制作用の検討を行う。

4. 研究成果

RT-PCR 法および新に開発した PKC SV mRNA の real-time RT-PCR 法による測定系を用い、四塩化炭素短期投与および脳虚血再灌流により酸化ストレスを負荷したモデル動物組織における PKC SV 発現解析を行った。その結果、酸化ストレス傷害をきたした組織では PKC SV mRNA が著明に増加していることが判明した (図 1、2)。このことから種々の酸化ストレスモデル動物の組織において PKC 分子の alternative splicing が亢進していることが明らかとなった。

図 1 四塩化炭素投与による肝組織内における PKC SV 発現促進: (a) RT-PCR 法による解析結果、(b) real-time PCR 法による解析結果



スーパーオキシドラジカルを発生させる薬剤である menadione により酸化ストレスを負荷した神経細胞 (PC12 細胞) では過酸化 DAG の増加とともに PKC 過剰活性化 MAPK カ

スケード活性化 tau 過剰リン酸化を経て細胞傷害が誘導された。この神経細胞傷害は、PKC SV を過剰発現させることにより有意に抑制された(図3)。また、PKC SV を高発現させた神経細胞では、過酸化 DAG、過酸化水素による神経細胞傷害作用に対しても抵抗性となることが判った。

図2 脳虚血再灌流部位における PKC SV の発現：(a)RT-PCR 法による解析結果、(b)real-time PCR 法による解析結果

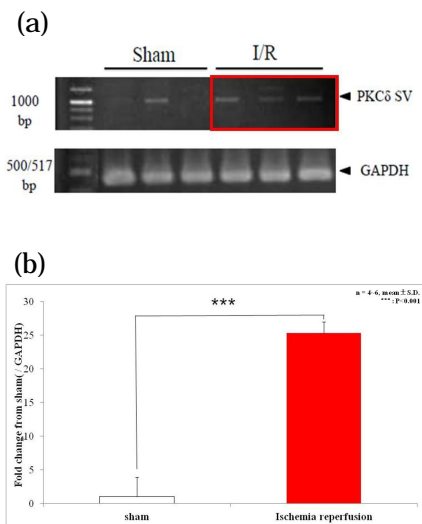
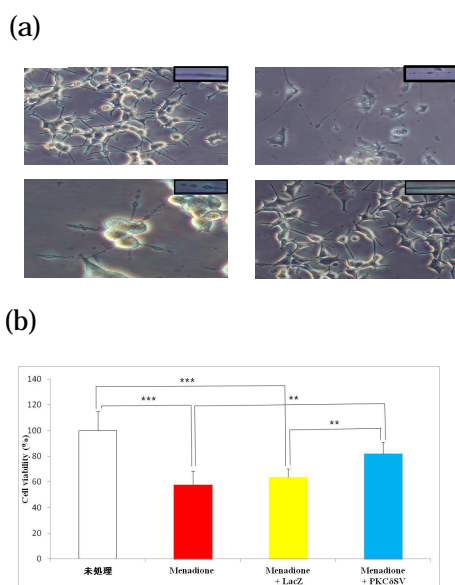


図3 PKC SV 発現誘導による酸化ストレス誘導性神経細胞傷害の抑制：(a)menadione 投与による PC12 細胞の形態変化、(b)PKC SV 発現誘導による細胞傷害抑制



一方、短期および長期間四塩化炭素を投与したマウス肝組織における細胞傷害の分子機構を詳細に解析した結果、「PKC およびの過剰活性化 NF-kappa B 活性化 TGF- 産

生促進」を介して肝組織傷害が亢進していることが明らかとなった。また、長期間四塩化炭素を投与したマウス肝組織では、過酸化 DAG が線維化促進物質となっている可能性が示唆された。過酸化 DAG が四塩化炭素投与ラット肝組織中において著明に増加していることが判明した。この結果により酸化ストレス負荷により過酸化 DAG が増加することが in vivo 動物モデルにおいて初めて証明された (Toriumi K, Takekoshi S, et al, Laboratory Investigation. 2013 93:218-29, Takekoshi S, et al., Acta Histochemica Cytochemica 2014 Aug 29;47(4):155-64)。また、四塩化炭素投与により atypical PKC (aPKC) の活性化を介して細胞極性の異常が引き起こされていることも明らかとなった (Horikoshi Y, Takekoshi S, et al, American Journal of Pathology. 2015 85 (4) : 958-968)。現在のところ酸化ストレスにより aPKC の活性化が誘導される分子機構は不明であるが、aPKC の活性化物質である phosphatidyl serine の酸化物が関与している可能性が強く示唆された。

PKC SV タンパク質の発現解析系を確立すべく、PKC SV に特異的なアミノ酸配列をもつペプチドを用いて特異抗体の作成を試みた。PKC 遺伝子から Alternative splicing により産生される PKC SV は、PKC の wild type とは異なるアミノ酸配列を有する。この PKC SV 特異的アミノ酸配列部の中から遺伝子データベースを参考に他の分子との相同性を持たない2つの配列を選択し、ペプチドを合成した。このペプチドに KLH をコンジュゲーションしたものをを用いてウサギに免疫し抗体作成を行った。作成した抗体と PKC の C 末側および N 末側を認識する市販を用いて、酸化ストレスモデル動物組織(四塩化炭素投与マウス肝臓、虚血再灌流ラット脳)を用いて蛋白質の発現解析を施行した。その結果、酸化ストレスモデル動物の組織中では PKC SV が蛋白レベルで発現が亢進していることが判明した。

以上の結果から、酸化ストレスによって誘導される PKC SV は酸化ストレス防御分子であることが判明した。また、生体中には RNA スプライシングを制御することにより酸化ストレス傷害を防御する機構が存在することが示された。

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17件)

1) Horikoshi Y, Kitatani K, Toriumi K, Fukunishi N, Itoh Y, Nakamura N, Ohno S, Matura T, Takekoshi S. Aberrant Activation of Atypical Protein Kinase C in Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Stress Provokes a Disturbance of Cell

Polarity and Sealing of Bile Canalicular Lumen. *American Journal of Pathology*. 査読有 2015 85 (4) : 958-968

2) Takekoshi S, Nagata H, Kitatani K. Stimulation of melanogenesis by nordihydroguaiaretic acid in human melanoma cells. *Acta Histochemica Cytochemica* 査読有 2014 47 (5): 203-210

4) Takekoshi S, Kitatani K, Yamamoto Y. Roles of oxidized diacylglycerol for carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mouse. *Acta Histochemica Cytochemica* 査読有 2014 47 (5): 185-194

3) Ota T, Takekoshi S, Takagi T, Kitatani K, Toriumi K, Kojima T, Kato M, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A. Notch signaling may be involved in the abnormal differentiation of epidermal keratinocytes in psoriasis. *Acta Histochemica Cytochemica* 査読有 2014 47 (4): 175-183,

5) Takekoshi S, Nagata H, Kitatani K. Flavonoids enhance melanogenesis in human melanoma cells. *Tokai J Exp Med*. 査読有 2014 Sep 20;39(3):116-21.

6) Takekoshi S, Yasui Y, Inomoto C, Kitatani K, Nakamura N, Osamura Y. A histopathological study of multi-hormone producing proliferative lesions in estrogen-induced rat pituitary prolactinoma. *Acta Histochemica Cytochemica* 査読有 2014 Aug 29;47(4):155-64.

7) Kawaguchi AT1, Okamoto Y, Kise Y, Takekoshi S, Murayama C, Makuuchi H. Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Gastric Wound Healing in the Rat. *Artif Organs*. 査読有 2014 Jun 12. doi: 10.1111/aor.12339. [Epub ahead of print]

8) Goto Y1, Kametani Y, Kikugawa A, Tsuda B, Miyazawa M, Kajiwara H, Terao Y, Takekoshi S, Nakamura N, Takeda S, Mikami M. Defect of tropomyosin-related kinase B isotype expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Biosci Trends*. 査読有 2014 Apr;8(2):93-100.

9) Kawabata K, Kobayashi M, Kusaka-Kikushima A, Akasaka E, Mabuchi T, Fukui T, Sugiyama Y, Takekoshi S, Miyasaka M, Ozawa A, Sakai S. A new objective

histological scale for studying human photoaged skin. *Skin Res Technol*. 査読有 2014 ; 20:155-163

10) Imamura N, Horikoshi Y, Matsuzaki T, Toriumi K, Kitatani K, Ogura G, Masuda R, Nakamura N, Takekoshi S, Iwazaki M. Localization of aPKC Lambda/Iota and Its Interacting Protein, Lgl2, Is Significantly Associated with Lung Adenocarcinoma Progression. *Tokai J Exp Clin Med*. 査読有 2013 Dec 20;38(4):146-58.

11) Takekoshi S, Matsuzaki K, Kitatani K. Quercetin stimulates melanogenesis in hair follicle melanocyte of the mouse. *Tokai J Exp Clin Med*. 査読有 2013 Dec 20;38(4):129-34.

12) Kikuchi T, Tokunaka M, Kikuti YY, Carreras J, Ogura G, Takekoshi S, Kojima M, Ando K, Hashimoto Y, Abe M, Takata K, Yoshino T, Muto A, Igarashi K, Nakamura N. Over-expression of BACH2 is related to ongoing somatic hypermutation of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Pathol Int*. 査読有 2013 Jul;63(7):339-44

13) Toriumi K, Horikoshi Y, Yoshiyuki Osamura R, Yamamoto Y, Nakamura N, Takekoshi S. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF- B pathway. *Lab Invest*. 査読有 2013 93:218-29

14) Masuda S, Kadowaki T, Kumaki N, Tang X, Tokuda Y, Yoshimura S, Takekoshi S, Osamura RY. Analysis of gene alterations of mitochondrial DNA D-loop regions to determine breast cancer clonality. *Br J Cancer*. 査読有 2012 Dec 4;107(12):2016-23

15) Sugiyama T, Miyazawa M, Mikami M, Goto Y, Nishijima Y, Ikeda M, Hirasawa T, Muramatsu T, Takekoshi S, Iwamori M. Enhanced expression of sulfatide, a sulfated glycolipid, in well-differentiated endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 査読有 2012 :22:1192-7

16) Deepak Chhabra, Koji Oda, Palepu Jagannath1, Hirotohi Utsunomiya, Susumu Takekoshi, Yuji Nimura. Chronic Heavy Metal Exposure and Gallbladder Cancer Risk in India, a Comparative Study with Japan. *Asian Pac J Cancer Prev*. 査読有

2012:13:187-90

17) Tsuyoshi Fukui, Akira T. Kawaguchi, Susumu Takekoshi, Muneo Miyasaka, Rica Tanaka. Liposome-Encapsulated Hemoglobin Accelerates Skin Wound Healing in Mice. Artificial Organs 査読有 36:161-169:2012

〔学会発表〕(計2件)

1)竹腰進、ジアシルグリセロールの過酸化によるシグナル伝達異常と肝組織傷害の分子機構、第102回日本病理学会、2013年6月8日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

2) 竹腰進、血管攣縮病態における脂溶性情報伝達物質の役割 STROKE2013(第38回日本脳卒中学会総会、第42回日本脳卒中外科学会、第29回スパスム・シンポジウム合同学会) 教育講演、2013年3月21日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区高輪)

〔図書〕(計1件)

1)竹腰進、北谷佳那恵
Immunoblotting法の基礎と応用
組織細胞化学 2013(日本組織細胞化学会編)日本組織細胞化学会、東京、2013:101-111

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹腰進(TAKEKOSHI, Susumu)
東海大学・医学部・教授
研究者番号:70216878

(2)研究分担者

(3)連携研究者

中村直哉(NAKAMURA Naoya)
東海大学・医学部・教授
研究者番号:50227922

瀧澤俊也(TAKIZAWA Shunya)
東海大学・医学部・教授
研究者番号:70197234

堀越洋輔(HORIKOSHI Yosuke)
東海大学・医学部・研究員
研究者番号:60448678