

令和元年5月23日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07260

研究課題名(和文)酸化損傷mRNAによる遺伝子発現異常を抑制する機構の解明

研究課題名(英文) Research for mechanisms of control in gene expression under oxidative stress

研究代表者

石井 健士 (Ishii, Takashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：70516731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは遺伝子情報の正常な発現を妨げることで、様々な疾患を引き起こす。特に、遺伝情報伝達物質mRNAの酸化損傷は神経変性疾患や老化を引き起こすことが知られている。このような危機に対応するために、細胞はmRNAの酸化損傷に应答する防御機構を有していると考えられる。我々は、そのような分子機構を明らかにするために酸化RNAに結合する因子の分離、同定を行った。その結果、細胞死を引き起こすことで酸化損傷を受けたmRNAを排除する機構に関わる因子PCBP1タンパク質が存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスは生命が逃れることのできないストレスであり、神経変性疾患や老化などの多くの疾患の原因となる。これらの疾患の発症は年齢と相関があり、老年病とも呼ばれている。わが国では超高齢化社会を迎え、老化関連疾患を抱える人口が爆発的に増加している。よって、酸化ストレスが一因となる老年病に対処する手立ての解明が、多くの国民に求められている。

本研究を通して、細胞が酸化ストレスを回避するための防御機構が明らかになった。本研究により得られた成果は、神経変性疾患や老化を防ぐための手立ての解明につながるかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress causes defect in gene expression, and eventually leads various diseases. Especially, mRNA oxidation induces neurodegenerative disease and aging through the abnormal protein synthesis.

To avoid these crises, cells have to possess defense mechanisms for oxidative damage in mRNA. Then, we sought to isolate and identify factors which participate metabolism for oxidized RNA. As a result, we identified PCBP1 protein as an oxidized RNA-binding factor. PCBP1 participates induction of apoptosis under oxidative stress. This result indicates that cell possesses defense mechanism for RNA oxidation via apoptosis induction.

研究分野：分子生物学

キーワード：酸化ストレス RNA 8-オキソグアニン アポトーシス PCBP1 神経変性疾患 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、酸化ストレス下における遺伝子発現の異常を防ぐ防御機構については、DNA の酸化損傷についての解析が主であった。その結果として多くの成果が得られ、DNA の損傷が修復される機構や細胞死が誘導される機構が明らかになっている。

それに対して、RNA の酸化損傷に反応する機構については分子レベルでの研究がほとんど行われていなかった。そのため、酸化損傷を受けた RNA がどのように代謝されるかは明らかになっていなかった。しかし、mRNA の酸化損傷が異常タンパク質の合成を通して細胞に悪影響を与えることから、細胞が mRNA の酸化損傷に対して何らかの防御機構を持っていると考えられていた。

2. 研究の目的

我々は、未だ明らかでない mRNA の酸化損傷に反応する機構の分子レベルでの解明を目的として研究を行った。特に、酸化された RNA に結合するタンパク質の同定と、その機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸化 RNA 結合因子の同定

酸化 RNA に結合する因子を分離するために、酸化損傷塩基 8-オキシグアニンを導入したオリゴ RNA を人工的に合成した。合成したオリゴ RNA と、ヒト培養細胞 HeLa 細胞から調製した細胞抽出液を用いて、酸化 RNA に結合する因子を精製した。精製したタンパク質を SDS-PAGE によって展開し、金染色により検出した。検出されたバンドについて、酸化 RNA からのサンプルに特異的なものをマスペクトル解析により同定した。

(2) PCBP1 ノックアウト細胞株の樹立

上の実験で同定された酸化 RNA 結合タンパク質 PCBP1 の機能を解析するために、CRISPR/Cas9 system を用いてヒト培養細胞 HeLa 株から PCBP1 ノックアウト株を樹立した。

(3) 酸化ストレス下における PCBP1 タンパク質の機能解析

RNA に酸化損傷が生じた際に、それに結合する PCBP1 タンパク質がどのような役割を果たすかを調べた。そのために、PCBP1 ノックアウト細胞を過酸化水素で処理することで酸化ストレスを与え、それに対する細胞の反応について調べた。特に、酸化ストレス下で誘導される細胞死に着目して解析を行うために、PARP-1 タンパク質の切断を指標に実験を行った。

(4) 変異型 PCBP1 タンパク質を用いた解析

PCBP1 タンパク質の酸化 RNA への結合能と、酸化ストレス下におけるアポトーシス誘導能の関係を調べるために、PCBP1 の RNA 結合ドメインに結合能を喪失させる変異を導入した変異型 PCBP1 タンパク質を調製した。また、この変異型 PCBP1 タンパク質を安定発現する細胞株を樹立し、結合能と細胞死誘導能の関係を調べた。

4. 研究成果

(1) 酸化 RNA 結合因子の同定

酸化 RNA プローブを用いた精製において、酸化 RNA との共沈物において特異的に出現するバンドを確認した。そこで、このバンドを切り出し、質量分析による解析を行った結果、酸化 RNA 結合タンパク質として PCBP1 タンパク質を同定した。これまで、PCBP1 タンパク質が酸化を受けた RNA に特異的に結合することは知られておらず、全く新規の発見であった。

(2) PCBP1 ノックアウト細胞株の樹立

ヒト培養細胞 HeLa 株より樹立した PCBP1 ノックアウト株は生育可能であった。しかし、野生型株に比べ生育が遅れが観察された。

(3) 酸化ストレス下における PCBP1 タンパク質の機能解析

野生型の HeLa 細胞に酸化ストレスを与えると細胞死の誘導が観察される。これに対して、PCBP1 ノックアウト細胞ではその誘導が抑制される結果を得た。このことは、PCBP1 タンパク質が酸化ストレス下で誘導されるアポトーシスに関与していることを示していると考えられ

る。

(4) 変異型 PCBP1 タンパク質を用いた解析

RNA 結合ドメインに変異を導入した変異型 PCBP1 タンパク質では、酸化損傷 RNA との結合能が失われる結果を得た。このことは、PCBP1 タンパク質が既知の RNA 結合ドメインを通して酸化損傷 RNA に結合することを示している。また、酸化損傷 RNA に結合できない変異型 PCBP1 タンパク質を安定発現している細胞株では、PCBP1 タンパク質発現の回復によるアポトーシス誘導能の回復が観察されなかった。このことは、PCBP1 タンパク質が酸化損傷 RNA を認識、結合することでアポトーシス誘導を行うことを示唆していると考えられる。

以上の結果から、PCBP1 タンパク質が酸化損傷 RNA に結合することで細胞死が誘導され、酸化損傷 RNA を持った細胞が細胞ごと処理される機構が存在する可能性が示された (図 1)。

酸化損傷RNAからの新規のアポトーシス経路

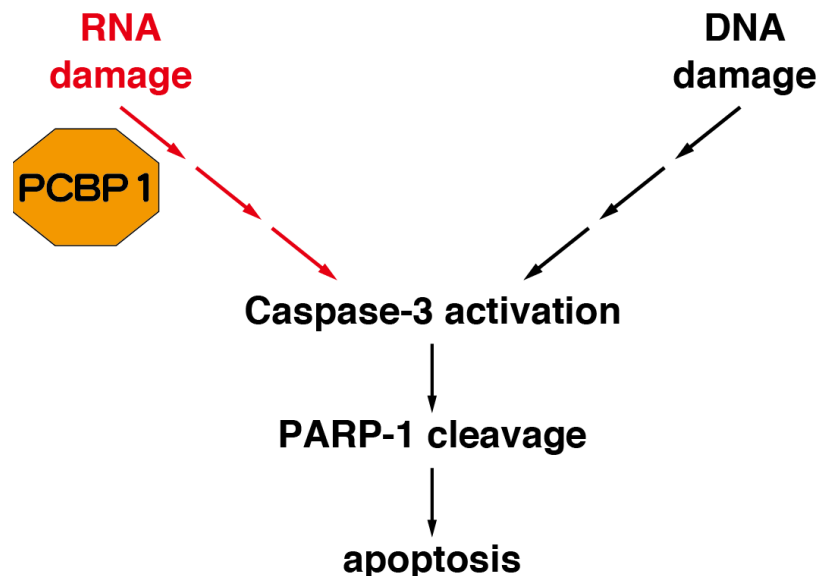


図1 RNA の酸化損傷により引き起こされる細胞死経路

RNA が酸化損傷を受けると PCBP1 タンパク質がそれを認識し結合する。その結果として、アポトーシスが誘導され、アポトーシス関連因子である Caspase-3 の活性化や PARP-1 の切断が引き起こされる。この機構により、細胞は酸化損傷を受けた RNA が生体に悪影響を及ぼすのを防いでいると考えられる。また、DNA の損傷からのアポトーシス誘導も一部同じ経路を用いて行われると予想される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Ishii, T., Hayakawa, H., Igawa, T., Sekiguchi, T. and Sekiguchi, M., Specific binding of PCBP1 to heavily oxidized RNA to induce cell death, Proc Natl Acad Sci USA, 査読有、Vol.26、 2018、 pp. 6715-6720
doi/10.1073/pnas.1806912115

〔学会発表〕(計 9件)

石井健士、早川浩、関口猛、関口睦夫：酸化損傷 mRNA の代謝に関わる新規因子の探索、日本分子生物学会第39回年会、横浜、平成28年12月

関口猛、石井健士、早川浩、古野伸明、小林英紀、関口睦夫：毒性物質の排出における出芽酵母 Gtr1 タンパク質の働き、日本分子生物学会第39回年会、横浜、平成28年12月

高原教代、末永尚弘、石井健士、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の PIP ボックスの役割 細胞での解析、日本分子生物学会第39回年会、横浜、平成28年12月

林晃世、高原教代、末永尚弘、石井健士、高橋達郎、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の PIP ボックスの役割 試験管内解析、日本分子生物学会第39回年会、横浜、平成28年12月

石井健士、井川達弘、関口猛、早川浩、関口睦夫：酸化損傷を受けた RNA 鎖に結合する新規因子の同定、日本分子生物学会第40回年会、神戸、平成29年12月

林晃世、石井健士、末永尚弘、高原教代、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 は PCNA と直接結合して機能する、日本分子生物学会第40回年会、神戸、平成29年12月

石井健士、早川浩、関口睦夫：PCBP1 タンパク質は酸化損傷 RNA 結合因子として機能する、日本遺伝学会第90回大会、奈良、平成30年9月

Takashi Ishii, Hiroshi Hayakawa, Tatsuhiro Igawa and Mutsuo Sekiguchi : Heavily oxidized RNA induces apoptosis, he Beijing Symposium on Genetic Stability and Accurate Gene Expression under Oxidative Stress、北京、平成30年11月

石井健士、早川浩、井川達弘、関口猛、関口睦夫：PCBP1 タンパク質は重度の酸化損傷を受けた RNA を認識して細胞死を誘導する、日本分子生物学会第41回年会、横浜、平成30年11月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：早川 浩

ローマ字氏名：(HAYAKAWA, hiroshi)

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 70150422

研究分担者氏名：関口 猛

ローマ字氏名：(SEKIGUCHI, takeshi)

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 60187846

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。