

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22370003

研究課題名(和文)酸化ストレスによる老化を抑える遺伝子系

研究課題名(英文)Genetic system for functioning to prevent aging

研究代表者

関口 睦夫 (Sekiguchi, Mutsuo)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00037342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸素は生物の生存に必須であるが、酸素の利用に伴って細胞内で生じる活性酸素はDNAやRNAを傷つけその結果突然変異や発現異常さらに発がんや老化をひき起こす。それを抑えるために生体は様々な機構を備えているが、本研究では(1)酸化された核酸前駆体ヌクレオチドを分解して排除する機構と(2)酸化塩基をもつRNAを認識して分解する機構についてそこで主要な役割を果たす遺伝子を同定しその産物タンパク質について構造や活性を調べた。その結果、ヒトの細胞は基質レベルとRNAレベルの2つの段階で働く機構を持っており、これによってタンパク質の恒常性を維持し酸素ストレス下で生体の機能を維持していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In aerobically growing cells, in which reactive oxygen species are produced, the guanine base of RNA is oxidized to 8-oxo-7,8-dihydroguanine, which induces alterations in gene expression. Human cells contain three types of enzymes, MTH1, MTH2 and MTH3, that degrade 8-oxoguanine-containing nucleotides. In addition, the human Auf1 protein, also called HNRNPD, binds specifically to RNA containing this oxidized base and may be involved in cellular processes associated with the problems caused by RNA oxidation. Auf-deficient cells were constructed from human HeLa and Nalm-6 lines using two different targeting procedures. Both types of Auf1-deficient cells are viable, but exhibit growth retardation. The level of oxidized messenger RNA was considerably higher in Auf1-deficient cells. Auf1 may play a role in the elimination of oxidized RNA, which is required for the maintenance of proper gene expression under oxidative stress.

研究分野：生物学

キーワード：RNA 前駆体ヌクレオチド 老化 発現異常 酸化ストレス 分解酵素 RNA結合タンパク質 8-オキソグアニン

## 1. 研究開始当初の背景

生命活動を支えるエネルギー生産の過程で活性酸素が生じるが、その大部分はスーパーオキシドジスムターゼやグルタチオンパーオキシダーゼ、カタラーゼなどの働きで消去される。しかし一部は残って核酸やタンパク質を酸化し、それが突然変異やがんをひき起こし、さらに老化を促進すると考えられる。生物はそれに対抗する機構をもつと考えられるが、その分子的な実体は明確ではなかった。私たちのグループは野生型より 1000 倍高い自然突然変異率をもつ大腸菌のミュータント (*mutT*) では細胞内で生じる酸化型グアニン (8-オキシグアニン) を含むヌクレオチドを排除する能力を欠くことを明らかにし、この問題の解明に突破口を開いた [Maki & Sekiguchi, *Nature*, **355**, 273 (1992)]。この発見を契機として私たちは、同様な機能をもつ酵素がヒトを含む哺乳動物の細胞にも存在すること [Sakumi, Sekiguchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 23524 (1993)]、酸化された RNA 合成前駆体の排除にも同様な酵素が作用して遺伝子発現の異常を抑えていることを示した [Taddei, Sekiguchi *et al.*, *Science*, **278**, 128 (1997)]。

このように本研究は私たち自身が長年にわたって研究し、独自の成果を積み上げてきたものである。研究の基本方針として、私たちはまず解析の容易な大腸菌モデル系で基本的な機構を明らかにし、その上に立ってより複雑な哺乳動物の細胞で働いている機構を明らかにしたいと考えている。そのため大腸菌 MutT に対応する酵素を哺乳動物で同定し、その遺伝子を欠く細胞株を樹立して分子的な機構の解析を進める。

この研究を進めることによってヒトを含む哺乳動物における遺伝子の安定性とその発現を支える分子機構を明らかにすることができると考えられる。ここで得られた知見はがんや脳神経疾患の治療や老化の抑制のための方策を確立する上で有用と期待できる。

## 2. 研究の目的

生物の遺伝情報は DNA に含まれているので、DNA が傷をうけると突然変異が生じ、ヒトではがんや様々な病気がひき起こされる。それを防ぐために生物は DNA に生じた傷を認識して修復する機構をもっており、その過程で働く種々の酵素系が明らかにされている。本計画の研究代表者、分担者は長年にわたって DNA 修復の研究に従事し、新しい修復酵素の発見やその機能の同定を通じて、DNA 修復の機構の解明に貢献してきた。

その研究の過程で私たちは、DNA 修復とは別に働くこれまで知られていなかったいくつかの機構が遺伝情報の維持と発現において重要な役割を果たしていることを見出した。これらの機構は特に活性酸素による遺伝子の発現異常や突然変異の生起を抑えるのに大きな働きをしており、自然発がんや老化の抑制の点から重要と考えられる。私たちが見出した次の2つの機構に焦点を絞って研究を行う。

### (1) 正確な DNA 複製とタンパク合成のための酸化ヌクレオチド排除機構：

活性酸素によってさまざまな核酸塩基が酸化されるが、遺伝情報の維持と発現からみて重要なのは 8-オキシグアニンの生成である。DNA と RNA の前駆体ヌクレオチド中に 8-オキシグアニンが生じるとそれは DNA や RNA 中にとり込まれ突然変異や発現異常を起こすことになる。それを防ぐために働いている酵素系を同定し、対応する遺伝子を欠損する細胞株を作成してその生物学的意義を明確にする。

### (2) 遺伝子発現における RNA レベルの精度維持機構：

DNA 中の塩基が酸化された場合は除去修復などの機構で修復されるが、RNA が酸化された場合はどうなるのか、わかっていない。私たちは酸化 RNA と特異的に結合するタンパク質を見出し、これが RNA レベルの精度維持に働いている可能性を示した。酸化 RNA と結合する

タンパク質の働きを明らかにし、これらのタンパク質の遺伝子を欠損する細胞株を作成して、その生物学的意義を探る。

下の図は老化抑制における2つの機構の位置づけを示したものである。

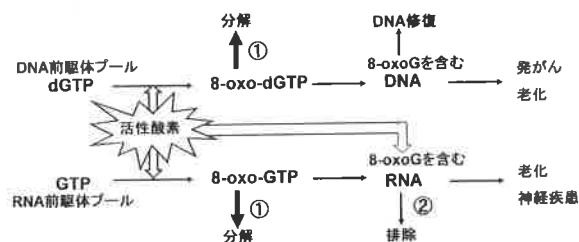


図 1.

### 3. 研究の方法

生体内の複雑な反応を解明し、その生物学的意義を明確にするには関与するタンパク質の生成と反応機構を生化学的手法を用いて解析すると共に、遺伝子を欠損する細胞株を作成して遺伝学的、分子生物学的に調べることが必要である。私達はこの2つの手法を融合して研究を進め、新しい局面を開くことができた。

### 4. 研究成果

#### (1) 正確な DNA 複製とタンパク合成のための酸化ヌクレオチドの排除機構

大腸菌の MutT タンパク質は、酸化されたグアニンを含む DNA 合成前駆体 (8-oxo-dGTP と 8-oxo-dGDP) と RNA 合成前駆体 (8-oxo-GTP と 8-oxo-GDP) をそれぞれ 8-oxo-dGMP と 8-oxo-GMP に分解する活性を持っており、それによって DNA 複製と遺伝子発現の精度維持に働いている。同様な活性をもつタンパク質をヒトの細胞抽出液を用いて調べたところ、前に同定した MTH1、MTH2 に加え、今回新たに MTH3 を見出した。これら3つのタンパク質を均一なレベルまで精製し、その基質特異性を調べたところ次のような活性が明らかになった。

MTH1 は酸化されたグアニンを含むリボ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸を一リン酸に分解する活性を持ち、MTH3 は酸化されたグアニンを含むリボ、デオキシリボヌクレオシド二リン酸を一リン酸に分解する活性を持っている。

MTH2 は大腸菌の MutT と同じく酸化グアニンを含むヌクレオシド三リン酸と二リン酸を共に一リン酸に分解する活性を持っている。これらの活性を図示すると次のようになる (リボヌクレオチドについてのみ示す)。

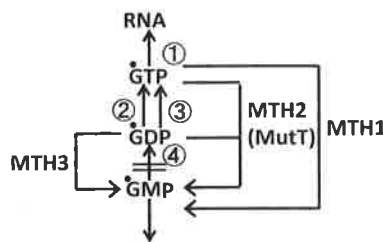


図 2. 酸化されたグアニンを含むヌクレオチドの RNA への転入を防ぐヒトの細胞の機構 ①RNA ポリメラーゼ、②ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、③アデノシン二リン酸キナーゼ、④グアニル酸キナーゼ。( ) 内の MutT は大腸菌の酵素を示す。

ここで重要なのは GMP をリン酸化して GDP にするグアニル酸キナーゼが、酸化された GMP (8-oxoGMP) には全く作用しないことである。これによって MTH1 などの酵素によってつくられた 8-oxoGMP が再利用されるのを防いでいる。

このようにヒトの細胞には酸化グアニンを含むヌクレオチドに働く3種の酵素 (MTH1、MTH2、MTH3) があり、これらが共同して働くことによって酸化されたグアニンが DNA や RNA にとり込まれるのを防いでいると考えられる。ヒトにはさらに NUDT5 という酵素があり、これは主として ADP-リボースなどの分解に働くがアルカリ性 pH の条件では酸化グアニンを含むヌクレオシド二リン酸を一リン酸に分解する活性も持っている。これらの酵素が実際に細胞内で突然変異や発現異常の抑制に働いているかどうか明らかにするには、それぞれの遺伝子を欠損した細胞株、さらに2種以上の酵素の遺伝子を欠く細胞株を作成して調べる必要がある。最近開発された CRISPRE 法は高効率で目的の遺伝子を欠損した細胞をつくるのに有効であるので、今後このような方法を用いて研究を展開することが望まれる。

#### (2) 遺伝子発現における RNA レベルの精度維持機構

酸化された塩基をとり込んだり、さらに RNA そのものが酸化されて酸化塩基が生じた場合、細胞はそのような RNA をみつけて排除する必要がある。さもなければそのようなメッセンジャーRNA を鋳型としてつくられたタンパク質にはアミノ酸置換などが起こり、結果的に細胞機能の変化をきたす可能性がある。メッセンジャーRNA の分子数は比較的多いので、多くの場合そのような異常は顕在化しないと考えられるが、生じたタンパク質が分解されにくかったり、不溶化したりすると長い年月の間に個体の生物学的機能に異常が生じる可能性がある。アルツハイマー病などの患者の脳組織には異常なアミロイドβタンパク質の蓄積がみられるが、それはこのような機構によって生じるのではないかと考えられている。

酸化RNAを排除するには、まず多数の正常RNAの中から酸化塩基をもつRNAを認識する必要がある。私達はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって酸化されたRNAに特異的に結合するタンパク質をヒトのHeLa細胞の抽出液から検索し、マス解析の結果Auf1を同定した。このタンパク質は元来RNA結合能を持つタンパク質として同定されたものでHNRNPDともよばれていた。特定のグアニンを8-オキシグアニンに変えたRNAオリゴマーを用いて調べたところ、Auf1は確かに8-オキシグアニンを認識してRNAに結合することがわかった。Auf1には発現過程で37K、40K、42K、45Kの4種の異なるアイソマーを生じるが、いずれも8-オキシグアニンを含むRNAに結合する。相同組み換え法とTALEN法を用いて4種のアイソマーの全てを欠く細胞株を作出したところ、ふつうの細胞培養の条件下で増殖するが、その増殖速度は野生株より有意に減少することがわかった。これらの細胞株についてメッセンジャーRNAの寿命を測定したところ、いずれのAuf1欠損細胞株でもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下でメッセンジャーRNAの半減期が野生株より低いこと

がわかった。比較的半減期の長い4種のメッセンジャーRNAについて調べたところ、いずれの場合にもこの現象は確認することができたので、Auf1は8-オキシグアニンをもつRNAの分解に関わっている可能性が高い。

RNA中の8-オキシグアニンの認識とRNAの結合には、ヒト細胞抽出液中のAuf1以外のタンパク質が必要であることが、Auf1欠損株の抽出液を用いた結合実験から示唆されている。今後この結合に関与するタンパク質を同定し、さらにその下流に存在すると考えられるRNA分解を行う因子を同定することが必要である。これによって酸化RNAを排除する細胞の機構の全容を明らかにすることができると考えられる。さらにその上にたって、この機構の生物学的意義を明らかにすることが期待される。

## 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19件)

- ① T. Ishii, H. Hayakawa, T. Sekiguchi, N. Adachi, M. Sekiguchi. Role of Auf1 in elimination of oxidatively damaged RNA in human cells. *Free Radical Biol. Med.* 79, 109-116, 2015
- ② H. Inokuchi, R. Ito, T. Sekiguchi, M. Sekiguchi. Search for proteins required for accurate gene expression under oxidative stress. Roles of guanylate kinase and RNA polymerase. *J. Biol Chem.* 208, 32952-32962, 2013
- ③ B. Nie, W. Gan, F. Shi, G.-X. Chen, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. *Oxidative Med. Cell. Longevity*, 2013, ID 303181
- ④ T. Sekiguchi, R. Ito, H. Hayakawa, M. Sekiguchi. Elimination and utilization of oxidized guanine nucleotides in the synthesis of RNA and its precursors. *J. Biol. Chem.* 288, 8128-8135, 2013
- ⑤ S. Sano, R. Sakagami, M. Sekiguchi,

M. Hidaka. Stabilization of MAPO1 by specifically binding with folliculin and AMP-activated protein kinase in O<sup>6</sup>-methylguanine-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 810-815, 2013

⑥ R. Fujikane, M. Sanada, M. Sekiguchi, M. Hidaka. The identification of a novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine. *PLoS ONE* 7, e44817, 2012

⑦ M. Sekiguchi. My path toward DNA repair. *DNA Repair* 11, 606-615, 2012

⑧ F. Shi, W. Gan, B. Nie, Y. Takagi, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Greater nucleic acids oxidation in the temporal lobe than the frontal lobe in SAMP8. *NeuroReport* 23, 508-512, 2012

⑨ F. Shi, B. Nie, W. Gan, X.-Y. Zhou, Y. Takagi, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. *Free Radic. Res.* 46, 1093-1098, 2012

⑩ Y. Takagi, D. Setoyama, R. Ito, K. Kamiya, Y. Yamagata, M. Sekiguchi. Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: Comparison with MTH1 and MTH2. *J. Biol. Chem.* 287, 21541-21549, 2012

⑪ L.-Q. Zhang, D.-P. Dai, W. Gan, Y. Takagi, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Lowered Nudix type 5 (NUDT5) expression leads to cell cycle retardation in HeLa cells. *Mol. Cell. Biochem.* 363, 377-384, 2012

⑫ W. Gan, B. Nie, F. Shi, X.-M. Xu, Y. Takagi, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: Urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1700-1707, 2012

⑬ T.-H. Lim, R. Fujikane, S. Sano, R. Sakagami, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M.

Sekiguchi, M. Hidaka. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylation mismatch in DNA. *DNA Repair* 11, 256-266, 2012

⑭ X.-N. Song, L.-Q. Zhang, D.-G. Liu, J. Lin, D.-P. Dai, A.-L. Hei, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Oxidative damage to RNA and expression patterns of MTH1 in the hippocampi of senescence-accelerated SAMP8 mice and Alzheimer's disease patients. *Neurochem. Res.* 36, 1558-1565, 2011

⑮ T. Arimori, H. Tamaoki, H. Kamiya, S. Ikemizu, Y. Takagi, T. Ishibashi, H. Harashima, M. Sekiguchi, Y. Yamagata. Diverse substrate and hydrolysis mechanisms of human NUDT5. *Nucl. Acids Res.* 39, 8972-8983, 2011

⑯ R. Ito, M. Sekiguchi, D. Setoyama, Y. Nakatsu, Y. Yamagata, H. Hayakawa. Cleavage of oxidized guanine nucleotide and ADP sugar by human NUDT5 protein. *J. Biochem.* 149, 731-738, 2011

⑰ D. Setoyama, R. Ito, Y. Takagi, M. Sekiguchi. Molecular actions of *Escherichia coli* MutT for control of spontaneous mutagenesis. *Mutation Res.* 707, 9-14, 2011

⑱ T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano, T. Tsuzuki, T. Doi, K. Kobayashi, S. Fujii, M. Sekiguchi, Y. Yamagata. Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.* 285, 444-452, 2010

⑲ H. Hayakawa, A. Fujikane, R. Ito, M. Matsumoto, K.I. Nakayama, M. Sekiguchi. Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403, 220-224, 2010

[学会発表] (計 19 件)

① 藤兼亮輔、関口睦夫、日高真純。ミスマッチ修復タンパク質依存のアポトーシス誘導における HMGA2 の機能。第 37 回日本分子生物学会年会、2014

- ② M. Sekiguchi. Introduction to gene expression under oxidative stress. 第 86 回日本生化学会大会、2013
- ③ J.-P. Cai, D.-P. Dai, H. Hayakawa, M. Sekiguchi. Translational errors caused by ROS. 第 86 回日本生化学会大会、2013
- ④ 井口八郎、伊東理世子、関口猛、関口睦夫。酸素ストレス下の遺伝子発現機構。日本遺伝学会第 85 回大会、2013
- ⑤ 日高真純、佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫。アポトーシス誘導過程の MAPO1 の安定化は FLCN と AMPK により制御される。日本遺伝学会第 85 回大会、2013
- ⑥ 伊東理世子、井口八郎、関口猛、関口睦夫。大腸菌における 8-オキソグアニンを含むヌクレオチドの排除機構。日本遺伝学会第 85 回大会、2013
- ⑦ 佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫、日高真純。アポトーシス誘導過程における MAPO1 タンパク質の安定化。第 35 回日本分子生物学会年会、2012
- ⑧ 日高真純、佐野しおり、藤兼亮輔、林徳豪、坂上竜資、中津可道、関口睦夫。発がんを抑制するアポトーシスの誘導機構。第 35 回日本分子生物学会年会、2012
- ⑨ R. Fujikane, M. Sanada, M. Sekiguchi, M. Hidaka. The identification of a novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis by O<sup>6</sup>-methylguanine. The 8th 3R Symposium, 2012
- ⑩ 日高真純、林徳豪、藤兼亮輔、佐野しおり、坂上竜資、中津可道、関口睦夫。MAPO1 と FLCN による AMPK の活性化はアポトーシスを誘導する。第 84 回大会日本遺伝学会、2012
- ⑪ M. Sekiguchi. Molecular mechanisms for accurate gene expression under oxidative stress. US-Japan DNA Repair Meeting (招待講演)、2012
- ⑫ 伊東理世子、高木康光、瀬戸山大樹、早川浩、関口睦夫。酸化ストレスによる RNA の異常を防ぐ酵素系。日本遺伝学会第 84 回大会、2012
- ⑬ 関口猛、早川浩、関口睦夫。HeLa 細胞に導入したグアニンヌクレオチドの運命。日本遺伝学会第 84 回大会、2012
- ⑭ M. Hidaka, S. Sano, R. Fujikane, T.H. Lim, R. Sakagami, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi. Molecular mechanisms of the induction of apoptosis to suppress mutation and cancer. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012
- ⑮ M. Hidaka, R. Fujikane, S. Sano, R. Sakagami, M. Sekiguchi. MAPO1/FLCN/AMPK protein complex is involved in apoptosis induced by DNA damage. Birt-Hogg-Dube Syndrome 3rd international Symposium, 2011
- ⑯ R. Fujikane, M. Sanada, M. Sekiguchi, M. Hidaka. A novel gene, C10 is related to induction of apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011
- ⑰ 佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫、日高真純。アポトーシス誘導過程での MAPO1 の活性化機構。第 34 回日本分子生物学会年会、2011
- ⑱ 日高真純、高木康光、林徳豪、中津可道、関口睦夫。哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死。日本遺伝学会第 83 回大会、2010
- ⑲ M. Hidaka, M. Sekiguchi. Genome integrity presented by induction of apoptosis from DNA damage. The 57th NIBB Conference on Dynamic Genome, 2010

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

関口 睦夫 (SEKIGUCHI, Mutsuo)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号：00037342

### (2)研究分担者

高木 康光 (TAKAGI, Yasumitsu)  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：20212003

伊東 理世子 (ITO, Riyoko)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師  
研究者番号：10140865