

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657006

研究課題名(和文) 損傷をうけたRNAを排除する分子および細胞レベルの新規の機構

研究課題名(英文) Novel mechanisms for eliminating oxidatively damaged RNA

研究代表者

関口 睦夫 (Sekiguchi, Mutsuo)

福岡歯科大学・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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：酸化RNAを排除するシステムについて研究を進めた。酸化グアニンに特異的に結合するタンパク質AUF1を同定し、その生物学的役割を明らかにするためその遺伝子を欠損する細胞株の樹立を行った。AUF1-/-細胞では正常細胞に比しH₂O₂により安定であることがわかった。これは細胞には酸化障害をうけたRNAを認識してそれを分解排除する機構があることを示している。それに加え、酸化損傷をうけたRNAをシグナルとしてそのような細胞をアポトーシスによって排除する機構の存在を示唆する結果も得た。

研究成果の概要(英文)： Reactive oxygen species are produced as side products of oxygen utilization and can lead to the oxidation of nucleic acids and their precursor nucleotides. Among the various oxidized bases, 8-oxo-7,8-dihydroguanine seems to be the most critical during the transfer of genetic information because it can pair with both cytosine and adenine. During the de novo synthesis of guanine nucleotides, guanylate kinase hardly acts on an oxidized form of GMP (8-oxo-GMP) formed by the oxidation of GMP or by the cleavage of 8-oxo-GDP and 8-oxo-GTP by MutT protein. The 8-oxo-GTP produced in this way and by the oxidation of GTP can be used for RNA synthesis. This misincorporation is prevented by MutT protein, which has the potential to cleave 8-oxo-GTP as well as 8-oxo-GDP to 8-oxo-GMP. When (14)C-labeled 8-oxo-GTP was applied to CaCl₂-permeabilized cells of a mutT(-) mutant strain, it could be incorporated into RNA at 4% of the rate for GTP.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：RNA 酸化 遺伝子発現 タンパク質 発現異常 酸化グアニン 酵素 ストレス

様式 C - 19

1. 研究開始当初の背景

放射線や化学物質などの環境ストレスは生物の DNA を傷つけ、それによって突然変異やがんがひき起こされる。それを防ぐために DNA 修復とアポトーシスの機構が働いているが、これらの機構の詳細とその生物学的意義については、これまで私達を含め多くの研究者によって研究され、その全容が明かにされつつある。この研究の過程で私達は RNA に傷ができた時どうなるか考えた。RNA は DNA を鋳型として多数のコピーがつくられるので、たとえ一部の RNA 分子が傷つけられても生体の機能は損なわれないというのが一般的な考えであった。しかし傷害をもつメッセンジャー RNA からは異常なタンパク質がつくられるので、それを抑える機能をもつことは生物にとって必須であると私達は考えた。

細胞の代謝の過程で生じる活性酸素は種々の生体成分を酸化するが、中でも核酸やその前駆体ヌクレオチドの酸化は重大である。酸化されたグアニン(8-オキシグアニン)を含むヌクレオチドは RNA にとりこまれ、発現異常をひき起こす。大腸菌の MutT タンパク質は酸化ヌクレオチド、すなわち 8-オキシグアニンを含むヌクレオチド三リン酸(8-oxoGTP)を分解する活性をもっており、それによって異常なタンパク質がつくられるのを防いでいる(Maki, Sekiguchi (1992) *Nature* **355**, 273; Sekiguchi *et al.* (1997) *Science* **278**, 128)。私達はさらに同様な活性をもつタンパク質(MTH1)がヒトやマウスの細胞に存在し、それが酸素ストレスによる発現異常を抑える能力をもつことを示した(Mo, Sekiguchi *et al.* (1992) *PNAS* **89**, 11021; Ishibashi, Sekiguchi *et al.* (2005) *Nucl. Acids Res.* **33**, 3779)。

この研究の過程で私達は、生物はこのような基質レベルの機構に加えて RNA レベルと細胞レベルで働く新規の機構をもっていることを示す結果を得た。これらのシステムはこれまで知られていなかった新規のものであり、その実体を明らかにし、その生物学的意義を明確にしたい。

2. 研究の目的

DNA の損傷とその回避の機構についてはこ

れまでよく研究されてきたが、RNA が傷ついた場合どうなるか、生物はそれを防ぐための機構をもっているか明らかでなかった。私達のこれまでの研究の結果、損傷を受けた RNA 合成の前駆体ヌクレオチドを分解することによって形質発現の異常を抑えるシステムを生物はもっていることを明らかにした。それに加えて生物は、RNA レベルと細胞レベルで働く新規の機構をもつと考えられる。それらの過程で働くタンパク質を同定し、その遺伝子を欠損させたりその発現を抑えた時に生体や細胞はどのようなレスポンスをするか調べ、その生物学的意義を明確にしたい。

3. 研究の方法

生物は8-オキシグアニンを含む RNA 合成前駆体を分解する酵素系をもっているが、RNA 自体が酸化された時には、酸化された RNA を選択的に分解し、さらに酸化 RNA をもつ細胞をアポトーシスによって排除する必要がある。基質レベルの機構については、私達のこれまでの研究でその分子的機構の概要を明らかにすることができたので、ここではその実体がほとんど明らかにされていない RNA レベルと細胞レベルの機構に焦点を絞って研究を行う。これらの過程を *in vitro* で行う実験系を構築し、それに関わるタンパク質因子を同定する。その上で遺伝子を分離し、遺伝子欠損、あるいは遺伝子発現を抑えた時の生物学的効果を見る。

4. 研究成果

(1) 生物の遺伝情報は DNA によって保持されているので、DNA の損傷は突然変異をひき起こし、それががんや遺伝病の原因となることから、それを防ぐ生体の機構についてこれまで多くの研究が行われてきた。それに対し RNA は DNA から情報をうけとるので、たとえ損傷を受けても生体に大きな影響は生じないとこれまで考えられてきた。しかし RNA の損傷は形質発現の異常をきたし、その結果老化や神経活動の低下をきたすことが明らかとなり、それを防ぐために生体はどのような機構をもつか大きな問題となってきた。私達はそのような機構の実体を分子レベルで明らかにしたいと考え研究を進めてきた。これまでの研究から、細胞は基質ヌクレオチド、RNA、細胞という少なくとも3つの段階で働く機構をもつと考えられるので、それぞれについて究を進めた。

(2) RNA 合成の基質となるヌクレオチドが酸化損傷を受けた時にそれを分解して、RNA へ損傷基質が入らないようにするシステムについては、これまでの研究でほぼその全容を明らかにすることができた。本研究ではその過程に関わる遺伝子とその産物タンパク質の機能について総括し、その全体像を明らかにすることができた。図 1 はその結果をまとめて示したものである。

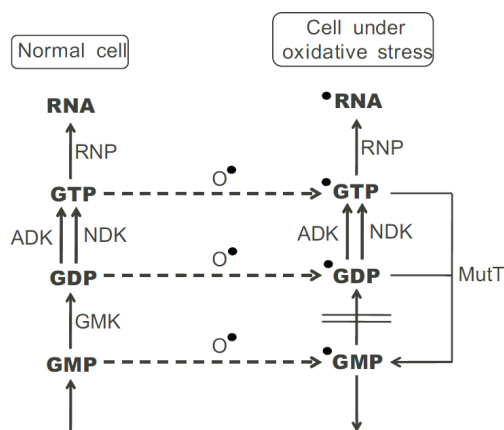


図 1. 酸化されたグアニンを含むヌクレオチドの RNA への転入を防ぐ細胞の機構

正常細胞では、GMP はグアニル酸キナーゼ (GMK) によってリン酸化されて GDP となる。GDP はさらに GTP に変化するが、この反応はヌクレオシドリン酸キナーゼ (NDK) とアデノシンリン酸キナーゼ (ADK) のいずれによっても行われる。このようにしてつくられた GTP は ATP、CTP、UTP と共に RNA ポリメラーゼ (RNP) によって RNA へと合成される。活性酸素分子種 (O^{\bullet}) は生理条件下で細胞内に生じ、それがグアニンを酸化して、8-オキソグアニンを含む各種のリボヌクレオチドが生じる。8-オキソグアニンを含むヌクレオシド三リン酸 ($^{\bullet}$ GTP) は RNP によって利用され得るので、それを排除するために MutT タンパク質が働いている。MutT タンパク質は $^{\bullet}$ GTP と $^{\bullet}$ GDP を共に $^{\bullet}$ GMP に効率よく分解する。生じた $^{\bullet}$ GMP の再利用を抑えているのが GMK の高い特異性である。GMK は GMP と dGMP をリン酸化して GDP と dGDP をつくる重要な酵素であるが、GMK は酸化された GMP と dGMP にはほとんど作用しない。このように MutT タンパク質とグアニル酸キナーゼの働きによって、酸化されたグアニンが RNA に入るのを防いでいることが明確となった。

(3) 上記の機構によって酸化されたグアニンが RNA 中へ入るのが防がれたとしても、RNA それ自身が酸化される可能性がある。主として一本鎖構造の RNA は、二本鎖 DNA よりもはるかにその塩基が酸化され易いことも示されている。そのような酸化グアニンを含む

RNA は異常なタンパク質をつくり、形質発現に異常をきたすと考えられる。我々はそれをアンバー変異をもつ β -ガラクトシダーゼ遺伝子を用いて示すことができた。これを防ぐには、酸化グアニンを含む RNA を選択的に分解して除去することが必要であるが、そのような機構の存在を示す実験結果を我々は最近得ることができた。ここで主要な役割を果たすのは AUF1 タンパク質で、これは HNRNPD と呼ばれ RNA 結合性をもつことが知られていた。我々は酸化 RNA に強い結合性をもつタンパク質を質量分析によって同定した結果、このタンパク質が 8-オキソグアニンを含む RNA にとりわけ強い結合能をもつことを明らかにすることができた。遺伝子ターゲティングによってヒトの HeLa 細胞からこのタンパク質を欠く細胞株を分離することができたので、この細胞では酸化 RNA の分解活性がおちているかどうか調べた。これまでの結果、AUF1^{-/-}細胞は実際にこの能力が低いことがわかったので、その分子機構を解く手がかりが得られた。

(4) 細胞の DNA に傷ができるとアポトーシスが誘導され、そのような細胞を排除する仕組みをヒトを含む哺乳動物の細胞は持っている。RNA に傷ができた時にも同様な機構が働くかどうかはこれまで知られていなかったもので、それについても研究を進めた。予備的な研究結果ではあるが、in vivo と in vitro の系で、AUF1^{-/-}細胞は H_2O_2 処理後のアポトーシスシグナルの出現が野生型細胞に比べ低下していることがわかった。AUF1 は酸化 RNA に特異的に結合する性質を持っているので、この結果は酸化グアニンをもつ RNA からアポトーシス誘起のシグナルが出ている可能性を示唆している。しかし酸化 DNA によるアポトーシスの誘導に AUF1 が関与する可能性も否定できない。この問題はさらに詳しく解析する必要がある。

(5) RNA の酸化による発現異常を抑えるには基質レベル、RNA レベル、細胞レベルの 3 段階で働く機構が考えられるが、本研究によってそのいずれの機構も存在する可能性が高くなった。基質レベルの機構についてはその詳細を明らかにすることができたが、RNA レベルと細胞レベルの機構についてはさらに解析が必要である。遺伝学と生化学の手法を駆使して今後さらに解明を進めたい。

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 8 件)

Hachiro Inokuchi, Riyoko Ito, Takeshi Sekiguchi, Mutsuo Sekiguchi. Search for proteins required for accurate gene

expression under oxidative stress: Roles of guanylate kinase and RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 288, 32952-32962, 2013

Ben Nie, Wei Gan, Fei Shi, Guo-Xin Hu, Lian-Guo Chen, Hiroshi Hayakawa, Mutsuo Sekiguchi, Jian-Ping Cai. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 1-9, 2013

Takeshi Sekiguchi, Riyoko Ito, Hiroshi Hayakawa, Mutsuo Sekiguchi. Elimination and utilization of oxidized guanine nucleotides in the synthesis of RNA and its precursors. I. *Biol. Chem.* 288, 8128-8135, 2013

Shiori Sano, Ryuji Sakagami, Mutsuo Sekiguchi, Masumi Hidaka. Stabilization of MAPO1 by specific binding with follicular and AMP-activated protein kinase in O⁶-methylguanine-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 810-815, 2012

Ryosuke Fujikane, Masayuki, Sanada, Mutsuo Sekiguchi, Masumi Hidaka. The identification of novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O⁶-methylguanine. *PLoS ONE* 7, e44817, 2012

Yasumitsu Takagi, Daiki Setoyama, Riyoko, Ito, Hiroshi Hayakawa, Hiroyuki Kamiya, Yuriko Yamagata, Mutsuo Sekiguchi. Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphate: Comparison with MTH1 and MTH2. *J. Biol. Chem.* 287, 21541-21549, 2012

Wei Gan, Ben Nie, Fei Shi, Xin-Min Xu, Chan Qian, Yasumitsu Takagi, Hiroshi Hayakawa, Mutsuo Sekiguchi, Jian-Ping 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-oxoguanine as a novel biomarker of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 1700-1707, 2012

Mutsuo Sekiguchi. My Path toward DNA repair. *DNA Repair* 11, 606-615, 2012

[学会発表](計8件)

M. Sekiguchi. Introduction to gene expression under oxidative stress. 第86回日本生化学会大会、2013

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

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

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。の日本遺伝学会第85回大会、2013

M. Sekiguchi. Molecular mechanisms for accurate gene expression under oxidative stress. US - Japan DNA Repair Meeting (招待講演) 2012

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

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

M. Hidaka, S. Sano, R. Fujikane, T.H. Lim, R. Sakagami, Y. Nakatsu, T. Tsuchi, 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

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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

関口 猛 (SEKIGUCHI, Takeshi)
九州大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 60187846