

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340040

研究課題名(和文) RNAの酸化シグナルによる細胞死誘導機構

研究課題名(英文) Cell death mechanism by RNA oxidative signal transduction

研究代表者

関口 猛 (Sekiguchi, Takeshi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60187846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳は他の組織に比べて酸素を多く消費するため、その過程で多くの活性酸素種(ROS)が多く作られ、アルツハイマー病などの病因になることが示唆されていた。本研究ではRNAの酸化損傷とそれを回避する機構について調べた。

酸化RNAに結合するヒトAuf1タンパク質がアポトーシスの誘導に働いているか調べた。Auf1タンパク質が、酸化RNAの分解に働いていることが分かった。Auf1タンパク質がないとアポトーシスが抑えられていることが明らかになった。さらに、酵母を用いてROSの排出にGtr1遺伝子が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：As oxygen is consumed in brain, reactive oxygen species are generated and are predicted to be a cause of alzheimer disease. In this research, we studied oxidation of RNA and removal of the oxidative RNA.

Human Auf1 protein, a oxidative RNA specific binding protein, was examined whether it had roles in the induction of apoptosis. It was found that Auf1 protein played a role in oxidative RNA degradation. In cells lacking Auf1 protein, apoptosis was repressed. In yeast, Gtr1 protein was found to be involved in excretion of ROS.

研究分野：分子生物学

キーワード：酸化ストレス RNA 酸化 8-オキソグアニン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA が放射線や活性酸素分子種 (Reactive oxygen species, ROS) により酸化を受け突然変異やガン化が引き起こされる。これは、塩基のグアニンが ROS のひとつであるヒドロキシラジカルにより酸化されて酸化グアニン (8-oxoGuanine) になり、アデニンとも対合できるようになるためである。それを防ぐために DNA 修復経路が働き、過度に DNA が損傷した時には細胞死 (アポトーシス) が誘導される。これら遺伝子レベルの酸化損傷に関する知見は多く報告されていた。

(2) RNA の酸化が生体にどのような影響を及ぼすかに関する知見はあまり得られていなかった。DNA が核にありあまり酸化を受けないのに対して RNA は細胞質にあり酸化を受けやすい環境にある。そのため、RNA は DNA より 20 倍以上酸化を受けることがわかってきた。RNA でもグアニンが酸化グアニンとなり、tRNA のアンチコドンが誤って対合し誤ったアミノ酸をタンパク質の中に入れてしまう。RNA が酸化を受けた時に生物がどのように対応しているかについて、われわれの研究グループの早川らは、RNA が酸化を受けて異常なタンパク質が合成されることを報告していた (Taddei, 1997 Science)。

2. 研究の目的

(1) 脳は他の組織に比べて酸素を多く消費するため、その過程で多くの活性酸素種 (ROS) が多く作られ、アルツハイマー病などの病因になることが示唆されていた。DNA の酸化損傷とそれを回避する機構についてはよく研究されていたため、本研究では RNA の酸化損傷とそれを回避する機構について研究することを目的とした。

(2) 大腸菌や酵母を用いて酸化 RNA が細胞にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。さらに、哺乳動物細胞で、酸化 RNA の除去と細胞死を誘導する過程に関わる遺伝子やタンパク質を明らかにする。それらの知見にたつて、老化モデルマウスの脳をでの働きを明らかにし脳疾患を治療するための基盤にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、まず大腸菌を用いて酸化されたりボヌクレオチドによる影響を詳細に解析する。C¹⁴-グアノシンを用いてモニターした。さらに、酵母を用いて、酸化ストレスに関与していることが分かっていた Gtr1 遺伝子について分子生物学的手法で調べた。

(2) 酸化 RNA に結合することが分かっている Auf1 の欠失しているヒト HeLa 細胞を用いて酸化ストレスとアポトーシスの関係について調べた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌を用いて、酸化ヌクレオチドが mutT 欠失株で蓄積するか調べた。

mutT 欠失株はヒドロキシラジカルにより GTP が酸化された 8-oxoGTP やを分解する活性がある。そこで、mutT 欠失株に C¹⁴-guanosine を導入し ROS を過剰産生させる薬剤であるメナジオン処理し 8-oxoGTP がヌクレオチドプールに蓄積するか HPLC を用いて調べたが、蓄積されていなかった。このことから、8-oxoGTP は RNA に導入され酸化 RNA となったか、細胞外に排出された可能性が示唆された。また、メナジオン処理すると GDP の産生が減少することがわかったが、これは GMK から GDP を作る GMK を阻害したため起こったことではないことがわかった。

(2) HeLa 細胞に酸化ヌクレオチドを導入し、アポトーシスを誘導するか調べた。低張液処理して HeLa 細胞に 8-oxoGTP を導入して、酸化 RNA を多く作らせてアポトーシスが誘導されるか調べたが、アポトーシスは誘導されなかった。

(3) 酵母を用いて、ROS の排出に Gtr1 遺伝子が関与しているか調べた。

Gtr1 遺伝子を欠失すると活性酸素に感受性になることから酸化ヌクレオチドの分解や排出に関与していることが示唆されていた。そこで、Gtr1 欠失株に ABC トランスポーター タンパク質 Sng2 を導入し活性酸素感受性を調べたところ、活性酸素耐性となった。このことから、Gtr1 が ROS の排出に関与していることが示された。

(4) 酵母をもちいて、ROS に対する抵抗性に Gtr1 がどのように働いているか調べた。

この研究で、Gtr1 が機能するためには Gtr2 と相互作用することが必要であることがわかった (図 1)。これら 2 つの相互作用に重要なアミノ酸 (ロイシン 207 番) を同定した。

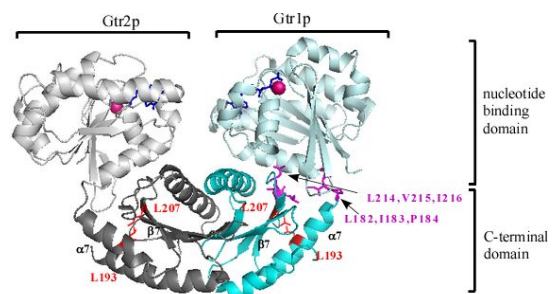
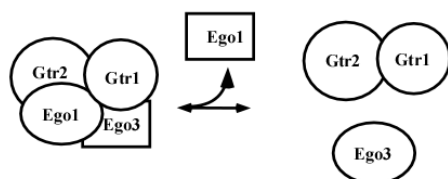


図 1

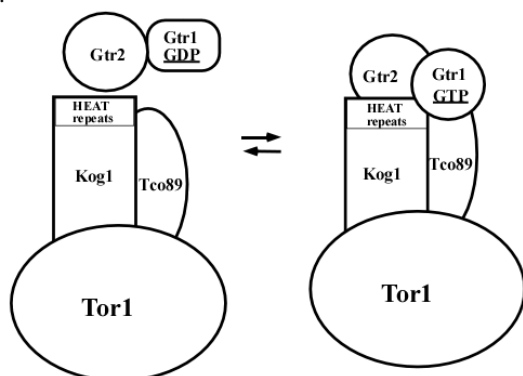
また、Gtr1 がオートファジーの制御因子である TORC1 のタンパク質のうち、Kog1 と Tco89 と直接相互作用していることを見出した。また、Gtr1 と Ego 複合体の相互作用に、Ego1 が必須であり、Ego1 と Gtr1/Gtr2 との結合がないと Ego3 が結合できないことを示した(図 2A)。さらに、Gtr1 と TORC1 複合体との相互作用には Gtr1 のグアニンヌクレオチドのうち、GTP 結合型が重要であり GDP 結合型では相互作用できないことを明らかにした(図 2B)。また、Gtr2 は TORC1 複合体との結合にヌクレオチド特異性はなかった。

図 2

A.



B.



さらに、酵母で塩に対する抵抗性にユビキチン鎖を持つタンパク質の輸送に働く Dsk2 タンパク質が関わっていることを示した(論文 2)

(5)酸化 RNA に結合するヒト Auf1 タンパク質がアポトーシスの誘導に働いているか調べた。

早川らにより酸化 RNA に結合することが示されていた Auf1 タンパク質が RNA の代謝とアポトーシスへの影響を調べたところ、酸化 RNA の分解に働いていることが分かった。また、Auf1 タンパク質がないと HeLa 細胞株特異的に、アポトーシスが抑えられていること明らかになった(未発表データ)。このことは、まだ、未知な因子が酸化 RNA によるアポトーシス誘導に関わっていることを示唆している。

さらに、アポトーシスに関する新規の遺伝子を同定した。尿中にでてくる酸化グアノシンは酸化 DNA の修復によって出てきたわけではないことを示した。

< 引用文献 >

F. Taddei, H. Hayakawa, M.-F. Bouton, A.-M. Cirinesi, I. Matic, M. Sekiguchi, M. Radman. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science*.1997; 278:128-130.

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 5件)

1. Evans, M.D., Mistry, V., Singh, R., Gackowski, D., Rózański, R., Simek-Gorecka, A., Phillips, D.H., Mulleanders, L., Pines, A., Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sekiguchi, M., Tsuzuki, T., Bignami, M., Oliński, R., Cooke, M.S. (2016) Nucleotide excision repair of oxidized genomic DNA is not a source of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanosine. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 358-391. 査読有 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.018

2. Fujikane, R., Komori, K., Sekiguchi, M., Hidaka, M. (2016) Function of high-mobility group A proteins in the DNA damage signaling for induction of apoptosis. *Sci. Rep.* **6**, 31714. 査読有 DOI: 10.1038/srep31714

3. Ishii, T., Hayakawa, H., Sekiguchi, T., Adachi, N., Sekiguchi, M. Role of Auf1 in elimination of oxidatively damaged messenger RNA in human cells. 2015 *Free Radical Biology and Medicine*, 79, 109-116, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.018

4. Ishii, T., Funakoshi, M., Kobayashi, H. and Sekiguchi, T. 2014. Yeast Irc22 is a novel Dsk2p-interacting protein that is involved in salt tolerance. *Cells*. **3**, 180-198. 10.3390/cells302018010 DOI: 10.3390/cells3020180

5. Sekiguchi, T., Kamada, Y., Furuno, N., Funakoshi, M and Kobayashi, H. 2014. Amino acid residues required for Gtr1p-Gtr2p complex formation and its interaction with the Ego1p-Ego3p complex and TORC1 components in yeast. *Genes Cells*.**19**, 449-463. DOI: 10.1111/gtc.12145

[学会発表](計 15件)

1. Mutsuo Sekiguchi. Molecular tactics to escape from the threat of oxidation

RNA damage. Tomas Lindahl Conference on DNA Repair. Jun. 17, 2015, Oslo, Norway

2. 関口睦夫、伊東理世子、関口猛、早川浩、井口八郎. 変異原性ヌクレオチドはどこへ行くのか? 日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 9 月 24 日、仙台

3. 伊東理世子、橋口一成、関口睦夫. 活性酸素による突然変異の生起とその抑制. 第 38 回日本分子生物学会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸

4. 橋口一成、石井健士、早川浩、関口睦夫. 遺伝子破壊細胞株を用いたヒト Nudix ファミリータンパク質の機能解析. 第 38 回日本分子生物学会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸

5. 藤兼亮輔、関口睦夫、日高真純. O6 メチルグアニンにより引き起こされるミスマッチ修復依存のアポトーシス誘導に関わる新規因子の同定. 第 38 回日本分子生物学会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸

6. 武石幸容、藤兼亮輔、関口睦夫、日高真純. ミスマッチ修復に依存したアポトーシス誘導に関わるクロマチン動態の解析. 第 38 回日本分子生物学会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸

7. Hayakawa, H., Ishii, T., Sekiguchi, M. (2017) Human proteins that recognize oxidative RNA damage. Gordon Research Conf. Oxidative Stress and Disease (Lucca, Italy).

8. 石井健士、早川浩、関口猛、関口睦夫(2016) 酸化損傷 mRNA の代謝に関わる新規因子の探索. 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜).

9. 橋口一成、梅津桂子、関口睦夫 (2016) ヒト Nudix ファミリータンパク質によるゲノム安定化維持機構の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜).

10. 武石幸容、藤兼亮輔、高橋達郎、関口睦夫、日高真純 (2016) ミスマッチ修復依存のアポトーシス誘導に関わるクロマチンリモデラーの機能. 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜).

11. 関口猛、石井健士、早川浩、古野伸明、小林英紀、関口睦夫 (2016) 毒性物質の排出における出芽酵母 Gtr1 タンパク質の働き. 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜).

12. Fujikane, R., Komori, K., Sekiguchi, M., Hidaka, M. (2016) Function of high-mobility group A proteins in DNA damage signaling for the induction of apoptosis triggered by O6-methylguanine. The 10th 3R Symposium, Matsue, Japan.

13. 藤兼亮輔、関口睦夫、日高真純 (2016) アルキル化剤によって引き起こされるアポトーシスに関わる新規因子の同定と解析. 第 23 回日本歯科医学会総会 (福岡).

14. 武石幸容、藤兼亮輔、関口睦夫、日高真純 (2016) アポトーシス誘導過程に起こるクロマチン構造変化の解析. 第 23 回日本歯科医学会総会 (福岡).

15. Fujikane, R., Takeishi, Y., Sekiguchi, M., Hidaka M. (2016) A novel function of HMGA family proteins in the induction of apoptosis triggered by O6-methylguanine in DNA. 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜).

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
関口 猛 (SEKIGUCHI TAKESHI)
九州大学医学研究院 助教
研究者番号：60187846

(2) 研究分担者

早川 浩 (HAYAKAWA HIROSHI)
福岡歯科大学歯学部 教授
研究者番号：70150422

石井 健士 (ISHII TAKASHI)
福岡歯科大学歯学部 講師
研究者番号：70516731

伊東理世子 (ITOH RIYOKO)
福岡歯科大学歯学部 講師
研究者番号：10140865

関口睦夫 (SEKIGUCHI MUTSUO)
福岡歯科大学歯学部 教授
研究者番号：00037342

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()