

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510061

研究課題名（和文）

DNA修復因子の新機能-XPDを含む新規複合体のゲノム損傷応答における役割

研究課題名（英文）

Novel functions of DNA repair factors: The roles of new XPD complex in the DNA damage responses

研究代表者

関 峰秋 (SEKI MINEAKI)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：40304167

研究成果の概要（和文）：

本研究では、XPDを含む新規複合体のゲノム損傷応答における役割を明らかにし、DNA修復機構に異常をもつ遺伝病の分子レベルでの理解を目的とした。その結果、解析過程において、これとは一部コンポーネントが重複するものの、異なる複合体(CIA複合体)を発見し、このCIA複合体が細胞質内において鉄硫黄クラスターをターゲットタンパク質に付加する反応の中心的役割を担うことを明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

To understand the mechanisms of genetics disorders caused by compromised nucleotide excision repair system, we started to analyze the roles of novel complex containing XPD in the response to DNA damage. In the course of study, we found another complex functioning in the cytosolic iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly pathway. This complex has central roles in the Fe-S cluster assembly in cytosol. Moreover, we also revealed the roles of each component in the complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線科学物質影響学

キーワード：修復、損傷、応答

1. 研究開始当初の背景

XPD遺伝子は、紫外線により皮膚がんを高頻度に発症する遺伝病、色素性乾皮症（以下XPと略）の原因遺伝子の1つとして知られて

いる。また同時に他の異なる2つの遺伝病の原因遺伝子としても知られている。コケイン症候群（以下CSと略）とトリコチオジストロフィー（以下TTDと略）である。意外なことにこれらの遺伝病は臨床症状がXPと大き

く異なる。CSの特徴は身体発育不全、神経発達障害や早期老化であり、TTDの特徴は早期老化と毛髪異常である。

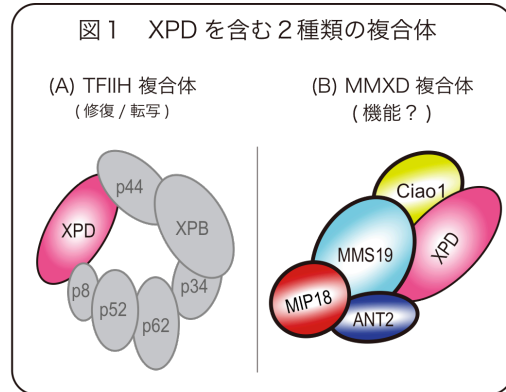
XPDタンパク質は、紫外線により生じるDNA損傷を除去、修復するヌクレオチド修復系で機能する。これはXPの紫外線による高発がんを見事に説明する。また、XPDタンパク質は基本転写因子TFIIHのサブユニットの1つであり、転写開始に機能する。しかしながら、ヌクレオチド除去修復機構の欠損と基本転写の異常のみで先の3種類の遺伝病の発生機構のすべてを説明することは難しい。むしろ細胞内におけるこれらXPDタンパク質の基本機能が明らかにされた現段階で、ようやくより高次の研究課題にとりかかれるようになったといえる。

XPD遺伝子における変異と発症症状の関連は既に詳細な解析がなされており、XPD遺伝子上における変異位置のマッピングが行われている。その結果、興味深いことが明らかになった。XPDタンパク質においては、変異の発生位置と種類により、それぞれ異なる遺伝病が誘発される。ではなぜXPDタンパク質でこのような現象が起きるのか？アミノ酸変異1カ所により、XPDタンパク質の何が変わったのか？

当研究室においては、これまでに以下の仮説を立てて研究を行ってきた。「XPDタンパク質は未知のタンパク質群と結合することにより、これまで知られていない機能を有しているのではないかと？そして、変異によるXPDタンパク質の構造変化が、タンパク質-タンパク質間インタラクションに影響を与え、各種遺伝病の発症につながるのではないかと？」

この仮説に基づき、当研究室の他の研究者によりXPD結合タンパク質のスクリーニングが試みられた。ヒト細胞抽出液からXPDを免疫沈降し、XPDと共沈降したタンパク質群がマスペクトラム解析により同定された。先に述べたようにXPDは転写因子TFIIHのサブユニットであることが知られているが、この解析では、興味深いことにTFIIHには含まれない複数のタンパク質群が同時に検出された(MMS19, MIP18, CIAO1, ANT2)。これらの多くはTFIIHや転写開始反応とは無関係と思われるものである。唯一、MMS19のみでXPDとのインタラクションが知られている。次に確認のため、逆にMMS19抗体を用いて、ヒト細胞抽出液から免疫沈降実験によりMMS19と共沈降するタンパク質群の同定が行われた。その結果、先の新規タンパク質群とXPDは共沈降したが、XPD以外のTFIIHのサブユニットは沈降産物中に検出されなかった。この結

果は、生体内において新規タンパク質群とXPDがTFIIHとは異なる複合体を形成している可能性を示す。また、RNAiによりMMS19遺伝子、及びMIP18遺伝子の発現量を低下させると、他のタンパク質群の不安定化が観察された。この結果は、これらのタンパク質群が



強固な複合体を形成することを示唆する。最終的に、ゲル濾過実験、組み換えタンパク質によるプルダウンアッセイ等により、これら5つのタンパク質がヒト細胞中において強固な複合体を形成しているとの結論に到達した。この複合体は、これまで知られているTFIIHとは異なる新規の複合体であり、発見者らによりMMXD複合体(図1)と命名された。

2. 研究の目的

本研究においては、このXPDを含む新規複合体の機能、特にDNA損傷応答機構における役割を明らかにする。併せて、複合体コンポーネントの機能を個別解析し、コンポーネント間の相互作用等も明らかにする。既に述べたがXPDは臨床症状の大きく異なる3種類の疾患の原因となる。本解析を通じてXPDの新機能を発見し、3種類の症状が異なる疾患(XP, CS, TTD)との関連性を明らかにすることにより疾患発症の基盤研究とする。

3. 研究の方法

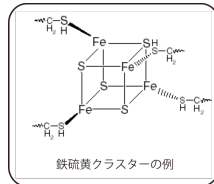
この複合体の機能は全くの未知であるが、サブユニットの1つであるMMS19に関しては、酵母での研究報告がある。出芽酵母 *mms19* 遺伝子欠損株は複数のDNA損傷薬剤に対し感受性を示す。またそれ以外にも転写異常、テロメア異常、胞子形成異常、メチオニン要求性といった様々な異常を示す。そこで本研究においてはヒト細胞においてMMS19遺伝子をノックダウンすることにより、MMXD複合体のDNA損傷における機能解析を進める。そこで

得られた知見を基にこの新規複合体が欠損した場合のヒト細胞の表現型から、その機能を考察する。併せて、XPD 変異に起因する遺伝病との相関関係を検証する。

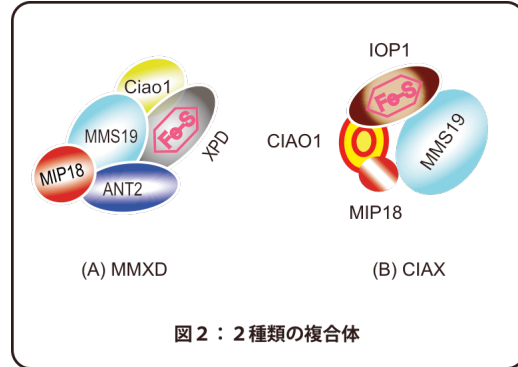
4. 研究成果

今回の解析においては、複合体の構成因子の1つであるヒト MMS19 の機能解析を最初に行った。これは先に述べた通り、出芽酵母においてそのオルソログである Mms19 タンパク質に関しある程度の知見が得られていたことによる。MMS19 遺伝子を shRNA によりノックダウンした HeLa 細胞は、放射線をはじめ種々の DNA 障害性薬剤に対し感受性を示した。MMS19 ノックダウン細胞は DNA 傷害性薬剤の中でも、特に、クロスリンク薬剤に高感受性を示した。これは研究遂行上の大きな手がかかりとなる。なぜならば、XPD と同じファミリーに属する FANCD1、RTEL1 をノックダウンした場合にも、いずれの場合も細胞がクロスリンク薬剤に高感受性を示すからである。また同じく XPD ファミリーのメンバーである DDX11 を機能欠損した場合、欠損細胞が MMS19 ノックダウン細胞同様、分裂異常を示すことが知られている (Warsaw Breakage Syndrome) 以上から、MMS19 ノックダウンは XPD のみならず、XPD ファミリーヘリ

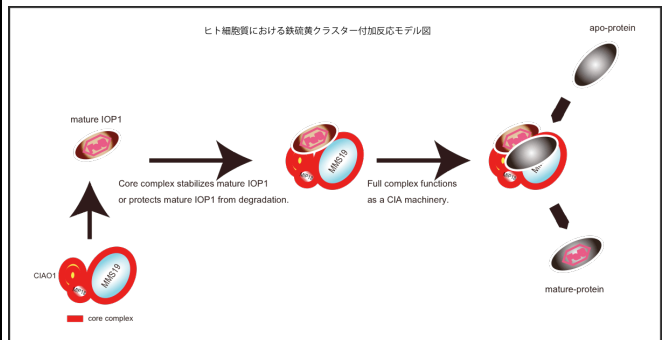
ケース全般の機能欠損を引き起こす可能性が考えられた。XPD ファミリーヘリケース群の特徴としては鉄硫黄クラスターとよばれる補欠分氏族を含有することが知られている。鉄硫黄クラスターは鉄補欠分子族であり、細菌からヒトまで広く保存されている。その機能は、電子伝達系で機能するタンパク質群の電子伝達反応や酵素の活性中心、レドックス制御、タンパク質の構造補強等多岐にわたる。仮に MMS19 の機能欠損により、鉄硫黄クラスターの生合成や運搬が機能なくなると仮定すると出芽酵母やヒトの MMS19 欠損細胞で観察される多様な表現型が説明可能である。そこで MMS19 が鉄硫黄クラスターの生合成もしくは、ターゲットタンパク質への鉄硫黄クラスターの付加反応において機能するのではないかと考え、MMS19 ノックダウン細胞における鉄硫黄クラスター付加活性を検証した。その結果、予想通り MMS19 ノックダウン細胞では、野生型 HeLa 細胞と比較して、顕著な鉄硫黄クラスター付加活性の低下が観察された。さらに、MMS19 が XPD ファミリーヘリケース群以外の多くの鉄硫黄タンパ



ク質と結合すること、これらの鉄硫黄タンパク質が MMS19 ノックダウン細胞においては不安定化していることを見いだした。これらの事から MMS19 が鉄硫黄クラスターの付加経路に機能すると確信し、解析を進めた。最終的に MMS19 が MIP18 以外に、鉄硫黄クラスター



付加反応関連因子である CIAO1、及び IOP1 と強固な複合体を形成することを明らかにした。そして、この MMS19 複合体が鉄硫黄クラスターの細胞質内でのターゲットタンパク質への付加反応 (CIA pathway) において中心的な機能を担う、CIA (Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly) 複合体の本体であることを発見するに至った。更に、この MMS19 複合体に関し、詳細な解析をすすめ、MMS19 がターゲットタンパク質と結合すること、CIAO1 が IOP1 と結合すること、MIP18 が CIAO1 と MMS19 をつなぐ役割をもつこと等、各コンポーネントの機能、コンポーネント間の相互作用等を明らかにし、MMS19 複合体が中



心となって行われる細胞質における鉄硫黄クラスター付加反応の新モデルを提唱した。

本研究は鉄硫黄クラスター研究において重要な発見であり、同様の発見が欧米の他グループによりサイエンス誌に先に発表されてしまったため、研究発表は他の雑誌 (Journal of Biological Chemistry) になったが、大変有意義な研究成果を挙げたものと考えている。

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1件)

Mineaki Seki, Yukiko Takeda, Kazuhiro Iwai and Kiyoji Tanaka: IOP1 protein is an external component of human cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) machinery and functions in MMS19 protein-dependent CIA pathway.

Journal of Biological Chemistry, in press
査読有

DOI: 10.1074/jbc.M112.416602

[学会発表] (計3件)

[国際学会口頭発表]

①発表者: 田中 亀代次

発表標題: MMS19 is a cytosolic Fe-S assembly factor required for genome integrity.

学会名: The 8th 3R Symposium

発表年月日: 2012年11月25日-2012年11月28日

発表場所: 淡路夢舞台国際会議場

[国際学会ポスター発表]

②発表者: 関 峰秋

発表標題: MMS19 functions in the cytosolic biogenesis of iron-sulfur proteins required for the maintenance of genomic integrity.

学会名: The 8th 3R Symposium

発表年月日: 2012年11月25日-2012年11月28日

発表場所: 淡路夢舞台国際会議場

[国内学会ポスター発表]

③発表者: 関 峰秋

発表標題: The roles of human MMS19 in cross-link repair and FeS assembly.

学会名: 日本環境変異原学会 第40回大会

発表年月日: 2011年11月21日-2012年11月22日

発表場所: 学術総合センター(東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/genera1/lab/12/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 峰秋 (SEKI MINEAKI)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 40304167

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし