

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340022

研究課題名(和文) DNA修復における鉄の役割と遺伝病への関与：新規複合体CIAXの機能解析

研究課題名(英文) Iron metabolism and DNA repair, genetic diseases: the roles of CIAX complex

研究代表者

関 峰秋 (Seki, Mineaki)

新潟薬科大学・健康・自立総合研究機構・准教授

研究者番号：40304167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復関連遺伝病の発症と鉄硫黄クラスターの関連性を明らかにするため、紫外線高感受性症候群の責任タンパク質UVSSAを解析した。UVSSAタンパク質は鉄硫黄クラスターが結合する可能性が高い配列を有する。この領域を含む各種変異型UVSSAを作成後解析し、一部の変異型UVSSAが高い紫外線感受性を示すことを明らかにした。併せて、各種がん細胞におけるCIAX複合体各コンポーネントの発現量解析を行った。CIAX複合体コンポーネントは血球系がん細胞において発現量の増加が観察された。特にマクロファージ様分化能を有するがん細胞において発現量の増加が顕著であった。CIAX発現量の低下は貪食能に影響しない。

研究成果の概要(英文)：To know the roles of iron-sulfur (FeS) cluster in DNA repair related genetic disease, we focused on the putative FeS cluster binding motif in UVSSA protein. We generated multiple mutants and found some of the mutants show sensitivity to UV. The expression levels of CIAX components in cancer cell lines were also examined. CIAX complex is up-regulated in blood cancer cell lines. In particular, CIAX complex is highly expressed in macrophage-like cells such as THP-1 and U937. The reduction of CIAX expression level does not affect phagocytosis.

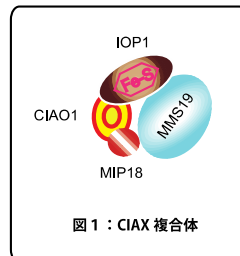
研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 鉄硫黄クラスター

1. 研究開始当初の背景

DNA 修復機構は、放射線や発がん物質等により傷つけられた DNA を修復し、がん等の疾病を防ぐ。これまで DNA 修復機構の研究は、その分子機構自体と、細胞周期の制御といった関連因子の研究が盛んになされてきた。近年、DNA 修復機構のマスターコントローラーとも言われる p53 の機能が、細胞内の栄養状態やエネルギー生産、糖代謝等に影響されること、そして逆に、p53 の機能がこれらに影響を与えることが判明した (Vousden et al. 2009)。これは、DNA 修復機構を他の細胞機能との関連において、統合的に理解する重要性を如実に示す。このような状況下、長らく機能不明であった DNA 修復因子 MMS19 が鉄関連因子であることが、申請者らと欧米のグループにより、相次いで報告された (Seki et al., 2013, JBC, Gari et al., 2012, Science, Stehling et al., 2012, Science)。MMS19 タンパク質は、出芽酵母変異株が、放射線や紫外線に高い感受性を示すことから DNA 修復関連因子と考えられていた。その一方で、胞子形成の異常や細胞分裂異常といった DNA 修復とは関連の低い多種多様な表現型を示す。申請者を含む研究グループは、紫外線により皮膚がんを高い頻度で発症する遺伝病「色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum、以下 XP と略)」を研究している。XP の原因遺伝子の 1 つである XPD と結合するタンパク質をスクリーニングする過程において、MMS19 が XPD と結合することが明らかになった。我々はヒト

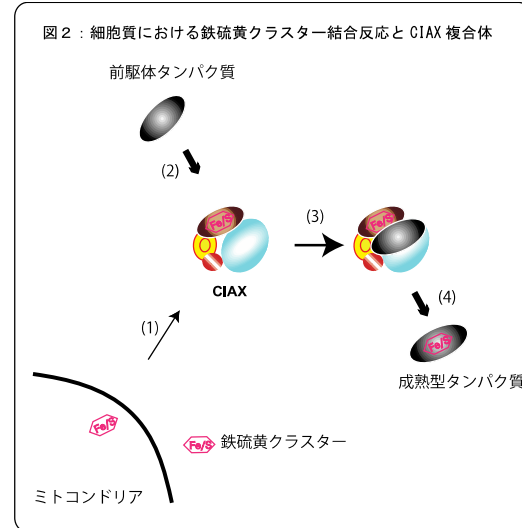
MMS19 の機能を明らかにするため MMS19 と結合するタンパク質群を探索し、MMS19 が、MIP18、CIAO1、IOP1 と強固な複合体を形成することを見いだした (図 1)。



我々はこれを CIAX (Cytosolic Iron-sulfur Cluster Assembly Complex) 複合体と命名した。MMS19 は、CIAX コンポーネント以外に FANCD1 (ファンコニー貧血の原因遺伝子) や DNA ポリメラーゼ等の DNA 関連タンパク質とも結合する。これらのタンパク質は共通して分子内に鉄硫黄クラスターを有する。ヒト細胞において MMS19 をノックダウンすると、鉄硫黄クラスターを標的タンパク質に付加する活性が低下する。このことから申請者らは、MMS19 が CIAO1、IOP1、MIP18 と複合体を形成し細胞質において鉄硫黄クラスター (ミトコンドリアで合成) を、標的タンパク質に付加する経路において機能することを報告した (図 2、基盤 C: 2009-2011, Seki et al., JBC 2013)。しかし、この経路における CIAX 複合体の機能の詳細や、DNA 修復ネットワークと

の関連、遺伝病における疾患発症との関連性等に関しては未解明な部分が多い。

2. 研究の目的



本研究課題においては、CIAX 複合体を中心とした鉄硫黄クラスター付加経路の解明とその異常が DNA 修復、発がん、遺伝病の発症に及ぼす影響を明らかにする。本研究は生体の鉄利用と DNA 修復をリンクさせた融合研究であり、この融合領域研究において先駆的なものであると同時に医学への貢献が期待される。鉄をターゲットとした抗がん剤としては、鉄過剰症治療薬のデフェロキサミン (DFO) の抗がん作用が知られている。DFO はキレート剤のため、すべての遊離鉄を取り込む。これに対し、CIAX 複合体を標的とした薬剤は、鉄硫黄クラスター付加経路を特異的に阻害する可能性が高い。本研究により CIAX 複合体の機能解析が進み、CIAX 複合体を標的としたより標的の特異性の高い抗がん剤の開発が期待される。また MMS19 ノックダウン細胞は放射線やクロスリンク薬剤に対し高い感受性を示す。このことから CIAX が新たな抗がん剤レスポンスマーカーとして利用される可能性が考えられる。

3. 研究の方法

本研究課題においては、以下の研究を行う。
(1) 鉄硫黄クラスター付加活性の異常と DNA 修復関連遺伝病発症との関連性。

鉄硫黄クラスターを含有する DNA 修復関連タンパク質群の中には遺伝病の責任遺伝子であるものが多く存在する。本研究課題においては、遺伝病発症と鉄硫黄クラスター付加経路異常の関係性を明らかにする。

(2) CIAX 複合体の「鉄硫黄クラスター付加経路」における機能の解明

申請者の最終目標は、鉄硫黄クラスター付加経路の全体像を明らかにすることである。

この中で本研究課題においては図2の(1)~(4)に示した反応経路における CIAX 複合体各コンポーネントの役割を明らかにする。

(3) DNA 修復ネットワークと CIAX 複合体との機能関連

ヒト *MMS19* ノックダウン細胞は抗がん剤をはじめ多くの DNA 障害剤に対し高い感受性を示す。DNA 修復ネットワークと CIAX 複合体との機能関連を明らかにし、将来的な抗がん剤の開発や、抗がん剤レスポンスマーカー、がんマーカー探索への基盤とする。

4. 研究成果

(1) 鉄硫黄クラスター付加活性の異常と DNA 修復関連遺伝病発症との関連性

鉄硫黄クラスターをもつ遺伝病責任タンパク質としてはFANCDJ、XPD、DDX11等の存在が知られている。今回我々は近年発見された紫外線高感受性症候群の責任因子であるUVSSAタンパク質に注目した。UVSSA変異細胞は紫外線に高感受性を示し、同じくDNA修復関連の遺伝病であるコケイン症候群の責任因子CSA、CSBと結合することが知られている。本研究においてはUVSSAタンパク質が鉄硫黄クラスターが結合する可能性が高いと思われる配列を有することに着目した。そこで、この領域を中心にUVSSAタンパク質の機能解析をおこなった。各種の変異型UVSSAタンパク質を作成し、紫外線感受性、CSAその他タンパク質との相互作用を解析する一連の実験を行った。その結果、一部の変異型UVSSAが高い紫外線感受性を示すことが明らかになった。併せて、CSAの変異型タンパク質を各種作成し、UVSSAとの結合を解析した。

(2) CIAX複合体の「鉄硫黄クラスター付加経路」における機能の解明

細胞質における鉄硫黄クラスター付加経路の初反応であるミトコンドリアからの鉄硫黄クラスター受取り反応を顕微鏡観察実験により解析した。次にIOP1の解析を行った。これまでの様々な状況証拠から鉄硫黄クラスターの受取りタンパク質はIOP1であると考えられる。先に申請者らは、IOP1が他のCIAXと一部挙動が異なることを発見した(Seki et al. JBC 2013)。このことからIOP1は鉄硫黄クラスター受取りの前後において、CIAX複合体以外の別のタンパク質と相互作用する可能性が考えられる。この解析のために実験系の構築を行った。これに加えCIAX 複合体各コンポーネントの機能解析を行う目的で、クリスパーシステムによるCIAXコンポーネントの遺伝子破

壊実験を行った。今後の研究課題としてこれらの更なる詳細な解析が残った。

(3) DNA修復ネットワークとCIAX複合体との機能関連

CIAX複合体発現量と抗がん剤感受性の関連性を検証した。CIAX複合体の発現量を低下させると細胞が各種抗がん剤に感受性を示すことを申請者を含む研究グループは以前に明らかにした(Seki et al., 2013,)。この点に着目し、固形がん細胞にCIAX複合体を過剰発現させた場合の効果を検証した。過剰発現の場合には抗がん剤に対する感受性には大きな変化は観察されなかった。次に各種がん細胞における*MMS19*、並びにCIAXコンポーネントの発現量解析を行った。その結果、血球系のがん細胞において発現量の顕著な増加が観察された。興味深いことにこれら血液がん細胞の中には複数のマクロファージ様分化能を有するものが含まれていた。更に、CIAX複合体関連因子に関しても同様に各種がん細胞における発現量を確認した。その結果、一部のCIAX複合体関連因子において、血液がん細胞の中でも特に、マクロファージ様分化能を有するがん細胞(THP1、U937)において顕著な発現量の増加

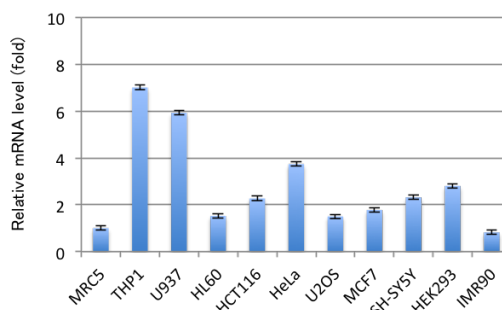


図3: 各種がん細胞におけるCIAX複合体関連因子の発現量

が観察された(図3)。そこで、CIAX複合体の発現量変化が自然免疫に及ぼす影響を解析した。その結果、CIAX複合体の発現量低下はマクロファージの貪食能には大きな影響を与えないことが明らかになった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 峰秋 (Mineaki Seki)
新潟薬科大学 健康・自立総合研究機構
准教授

研究者番号：40304167

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし