

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15082

研究課題名(和文) 分裂期チェックポイント異常による早老症発症におけるテロメア不安定性の関与

研究課題名(英文) Telomere function in premature ageing phenotypes of BubR1 deficiency

研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA, SHINYA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：90274133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期チェックポイント因子BubR1の低下したマウスは早老症を発症する。しかしながらそのメカニズムは不明のままである。本研究では、ヒトBubR1欠損症のモデルマウスを作製して、早老症におけるテロメア不安定性の関与を明らかにすることを目的とする。1833delTホモ接合体マウスの作製過程で、12塩基が欠失したマウスを取得した(608-611 LAST)。1833delTホモ接合体マウスは胎生致死であった一方、1833delTと608-611 LASTのコンパウンドヘテロ接合体マウスは誕生した。しかし5ヶ月の時点では早老症の症状は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Germline mutations that reduce BubR1 induce premature ageing phenotypes in mice. However, the molecular mechanism underlying the premature ageing phenotypes remain incompletely understood. The aim of this study is to study whether ageing phenotypes are associated with instability of telomeres. We generated the human mutation (1833delT) knock-in mice. During this process, we obtained a mouse carrying a 12-bp deletion (608-611 LAST) in exon 15 of BubR1. No homozygous mice for 1833delT were generated, suggesting that complete BubR1 deficiency causes the embryonic lethality. On the other hand, compound heterozygotes for 1833delT and the 12-bp deletion were generated according to the Mendelian inheritance. However, accelerated aging was not observed in these mice before the age of 5 months.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：細胞老化 モデル生物

1. 研究開始当初の背景

分裂期チェックポイント因子 BubR1 の発現が低下した BubR1^{H/H} マウスは急速な早老症を発症することが報告された。興味深いことに、BubR1^{H/H} マウスは、p53 と p21、p16^{INK4a} の老化マーカーが軒並み発現上昇していたが、p16^{INK4a} を高発現した細胞をマウス個体から人工的に除去したところ、早老症の症状が消失した。この結果は世界中から注目を集めた。しかしながら、分裂期チェックポイント異常が老化を誘導する分子メカニズムは不明のままである。最近、BubR1 がテロメアに集積することが示された。こうした知見から申請者らは、BubR1 低下による早老症はテロメア短縮が関与する可能性を考えた。

2. 研究の目的

分裂期チェックポイント因子 BubR1 の発現が低下したマウスは急速に早老症を発症する。しかしながら、BubR1 低下による老化誘導のメカニズムは不明のままである。最近、ショウジョウバエやヒト培養細胞を用いた研究から、BubR1 のテロメア末端への局在が示された。本申請研究では、BubR1 変異マウスとヒト BubR1 欠損症細胞を樹立して、BubR1 低下による早老症におけるテロメア不安定性の関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

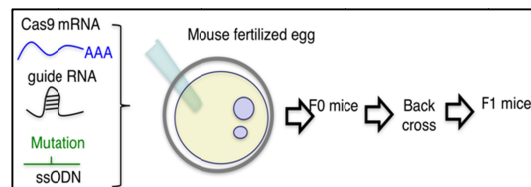
日本人 PCS(MVA)症候群で高頻度に検出される 1833delIT を導入したモデルマウスを作製する。最近、人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集法が遺伝子改変マウスの作製に利用されている。この方法は、従来法と異なって、マウス受精卵の前核に一本鎖オリゴヌクレオチドと人工ヌクレアーゼを微小注入して里親に移植するだけで、高頻度に標的遺伝子を改変することが可能である。申請者らは、ヒト培養細胞で人工ヌクレアーゼを用いた一塩基置換法を開発して、PCS(MVA)症候群の原因変異を同定することに成功しており、ゲノム編集法はすでに教室のルーチンワーク技術として定着している。したがって、直ちにこの手法をマウス作製に応用することが可能である。最近、寿命遺伝子 SIRT2 を BubR1^{H/H} マウスで

過剰発現させると、BubR1 タンパク質が増加してマウスの寿命が延長することが示された。BubR1 が細胞および個体老化を防ぐ活性については、断片的であるが確実に報告数が増えているが、BubR1 による老化抑制の作用機序は解決すべき重要課題として残されている。

4. 研究成果

日本人 PCS(MVA)症候群患者で高頻度に検出する 1833delIT (F611fsX625) に相当するマウスの BubR1 遺伝子変異をデザインした (F611fsP659X)。この F611fsP659X 変異を搭載した一本鎖オリゴヌクレオチド ssODN-1 と、この変異とともに PAM 配列にストップコドンを導入する一本鎖オリゴヌクレオチド ssODN-2 を作製した。それぞれの一本鎖オリゴヌクレオチドを、Cas9 mRNA およびガイド RNA とともにマウス受精卵に微小注入した。

ssODN-1 を 172 個の受精卵に注入したとこ

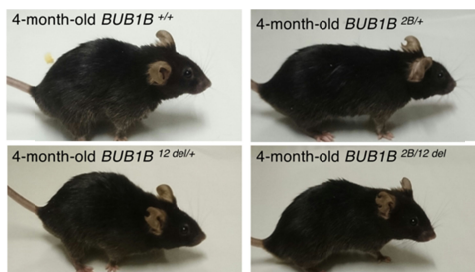


ろ、155 個が 2 細胞期に入った。そのうち 150 個を偽妊娠マウス 5 匹の子宮内に移植したところ、雄 31 匹と雌 22 匹が誕生した。シーケンス法によりノックイン変異の導入を確認した。ssODN-2 も同様に、ノックイン変異の導入が確認された。この過程で、BubR1 遺伝子のエクソン 15 に偶然に 12 塩基欠失を持つマウスが得られた (608-611 LAST)。得られた 3 系統のマウスはいずれも Germline transmission が確認された。

1833delIT のヘテロ接合体同士を掛けあわせたが、ホモ接合体は生まれてこなかった。この結果から BubR1 が生存に必須であることが示唆された。一方、1833delIT と 608-611 LAST のコンパウンドヘテロ接合体マウスはメンデル則にしたがって生まれてきた。しかし、このマウスを 4 ヶ月観察したが、今のところ早老症の症状は見られていない。さらに長期観察する必要があると考えられた。

PCS(MVA)症候群患者由来の皮膚線維芽細

胞を樹立した。この細胞で寿命遺伝子 SIRT2 を高発現させると、BubR1 タンパク質が増加して染色体が安定化することを見出した。今後、ヒト BubR1 欠損細胞にテロメア不安定性を誘導して、老化が促進されることを確認していきたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Shimada K, Yanagisawa R, Kubota N, Hidaka E, Sakashita K, Ishii E, Matsuura S, Ogiso Y. Wilms tumor accompanied by premature chromatid separation. *Pediatr Blood Cancer* 査読有 64, e26255, 2017
2. Takemoto A, Miyamoto T, Simono F, Kurogi N, Kurabayashi MS, Awazu A, Suzuki KT, Yamamoto T, Sakamoto N. Cilia play a role in breaking left-right symmetry of the sea urchin embryo. *Genes Cells* 査読有 21, 568-578, 2016
3. Sasaki T, Hanisch FG, Deutzmann R, Sakai LY, Sakuma T, Miyamoto T, Yamamoto T, Hannappel E, Chu ML, Lanig H, von der Mark K. Functional consequence of fibulin-4 missense mutations associated with vascular and skeletal abnormalities and cutis laxa. *Matrix Biol* 査読有 56, 132-149, 2016
4. Matsuura S, Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro H, Miyamoto T. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. *Ann ICRP* 査読有 45, 290-296, 2016
5. Miyamoto T, Matsuura S. Ciliopathy in

PCS (MVA) syndrome. *Oncotarget* 査読有 6, 24582-24583, 2015

〔学会発表〕(計24件)

1. Ekaterina Royba, et al; Evaluation of individual differences of radiosensitivity using genome editing. The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. (Hiroshima) February 21-22, 2017
2. Ekaterina Royba, et al; Genome editing technique as a useful tool for analysing individual differences of radiosensitivity. The 6th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (Hiroshima) February 11-12, 2017
3. 福満啓博 他 分裂期キナーゼ PLK1 による真性小頭症原因遺伝子産物 WDR62 のリン酸化を介した細胞分裂軸制御機構 第39回日本分子生物学会年会(横浜) 2016年11月30~12月2日
4. 宮本達雄 他 ゲノム編集技術を用いた放射線発がんリスクの個人差を規定する遺伝素因としての ATMヘテロ遺伝子変異の同定 第39回日本分子生物学会年会(横浜) 2016年11月30~12月2日
5. Kosuke Hosoba, et al; Generation of PCS(MVA) syndrome-mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9 system and ssODN mediated genome editing technology 第39回日本分子生物学会年会(横浜) 2016年11月30~12月2日
6. 宮本達雄 他 ATMヘテロ遺伝子変異は放射線感受性個人差に寄与する 第59回日本放射線影響学会(広島) 2016年10月26~28日
7. 柳原啓見 他 ゲノム編集法を用いた NBS1 SNP 導入細胞の作製と放射線感受性の評価 第59回日本放射線影響学

- 会 (広島) 2016 年 10 月 26~28 日
8. 福満啓博 他 遺伝性小頭症の原因遺伝子 WDR62 による細胞分裂軸制御機構 第 59 回日本放射線影響学会(広島)2016 年 10 月 26~28 日
 9. Shinya Matsuura, et al; *ATM* heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity in human populations. ASHG2016 (Vancouver) October 18-22, 2016
 10. Kosuke Hosoba, et al; Generation of PCS (MVA) syndrome mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology. ASHG2016 (Vancouver)カナダ October 18-22, 2016
 11. Tatsuo Miyamoto, et al; A combined approach of exome sequencing and genome editing identified *WDR62/MCPH2* mutations in patients with primary microcephaly. ASHG2016 (Vancouver)カナダ October 18-22, 2016
 12. Tatsuo Miyamoto, et al; Effect of *ATM* heterozygous mutations on individual differences of radiosensitivity in human populations 第 75 回日本癌学会 学術総会 (横浜) 2016 年 10 月 6~8 日
 13. Shinya Matsuura, et al; Molecular basis of human BUBR1 deficiency, a central protein of the spindle assembly checkpoint 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2016 年 10 月 6~8 日
 14. 宮本達雄 他 CRISPR/Cas9 システムと ssODN を用いた遺伝性小頭症モデル細胞の樹立 第 1 回日本ゲノム編集学会(広島) 2016 年 9 月 6~7 日
 15. Shinya Matsuura; Current research of low dose radiation effects in Hiroshima. GAP related meeting between Hiroshima University and the University of Texas DM Anderson Cancer Center (Hiroshima) July 22-23, 2016
 16. Yoshinori Masatsuna, et al; *WDR62/MCPH2* mutations identified in patients with primary microcephaly by a combined approach of exome sequencing and genome editing technology. ICHG2016 (Kyoto) April 3-7, 2016
 17. Silvia Natsuko Akutsu, et al. Insufficiency of BubR1 gene increases structure-chromosomal instability post ionizing radiation. The 5th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (広島) 2016 年 2 月 13~14 日
 18. Ekaterina Royba, et al. Application of genome editing technology into radiation biology for understanding individual difference of radiosensitivity. The 5th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (広島) 2016 年 2 月 13~14 日
 19. 政綱宜規 他 真性小頭症で同定された *WDR62/MCPH2* 遺伝子変異による細胞分裂軸制御不全 第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2015 年 12 月 1~3 日
 20. Shinya Matsuura, et al. Analysis of individual difference of radiosensitivity using genome-editing technique. The 3rd International Symposium on the System of Radiological Protection(ICRP 2015) (Korea) 2015 年 10 月 20~22 日
 21. Ekaterina Royba, et al. Custom-made system for estimation of individual difference of radiosensitivity 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015 年 10 月 8~10 日
 22. 宮本達雄 他 真性小頭症で同定された *WDR62/MCPH2* 遺伝子変異とゲノム編集技術を利用した疾患モデル細胞の作製 第 60 回日本人類遺伝学会 (東京) 2015 年 10 月 15~17 日
 23. Tatsuo Miyamoto, et al. Inducible

Cas9/CRISPR system as a tool to study DNA damage response. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015) (京都) 2015年5月25~29日

24. Hiromi Yanagihara, et al. Generation of SNP-knock-in cells using CRISPR/Cas9 system for elucidation of the effect on radiation sensitivity. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015)(京都) 2015年5月25~29日

〔図書〕(計16件)

1. 宮本達雄: 医学分野でのゲノム編集の利用 "ゲノム編集入門 山本卓 編" 裳華房 2016, pp184-203
2. 松浦伸也: Nijmegen染色体不安定症候群. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 2016, 36, 197-199
3. 松浦伸也: Fanconi貧血. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp42-43
4. 松浦伸也: Roberts症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp44-45
5. 松浦伸也: Bloom症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp46-47
6. 松浦伸也: PCS症候群/MVA症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp48-49
7. 松浦伸也: Rothmund-Thomson症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp51-52
8. 松浦伸也: 毛細血管拡張性運動失調症. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp53-54
9. 松浦伸也: Hutchinson-Gilford症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp58-59
10. 松浦伸也: Cockayne症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp62-63
11. 松浦伸也: Werner症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp64-65
12. 松浦伸也: Neu-Laxova症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp128-129

13. 松浦伸也: COFS症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp214-215

14. 松浦伸也: 正常者の身長・体重・成長曲線. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp470-473

15. 松浦伸也: 正常者の頭囲・眼間距離. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp474-474

16. 松浦伸也: 中手骨・指節骨の長さ. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp475-475

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号: 90274133

(2) 研究分担者

宮本 達雄 (MIYAMOTO TATSUO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師
研究者番号: 40542627

柳原 啓見 (YANAGIHARA HIROMI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 50719497