

平成22年 5 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013040

研究課題名（和文） 高発がん性遺伝病の原因遺伝子 NBS1 の機能解析

研究課題名（英文） FUNCTIONAL ANALYSIS OF CANCER-SUSCEPTIBLE GENE, NBS1

研究代表者 小松 賢志 (KOMATSU KENSHI)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：80124577

研究成果の概要（和文）：NBS1 がヒト細胞の相同組換え修復に重要な機能を有している。その機能は同じく放射線感受性疾患の ATM や BRCA1 遺伝子とは異なり、相同組換え修復の早い段階に機能することが示された。また、NBS1 が TOPBP1 と結合して ATR 活性化により、紫外線や制がん剤シスプラチンによる損傷の修復にも機能していることが初めて明らかにされた。さらに、NBS1 が中心体維持にも関与しており、その欠損によりゲノム不安定性を誘導する新規の経路が本研究で示された。

研究成果の概要（英文）：We showed here that NBS1 is involved in human homologous recombination. Contrast to other underlying genes of radiation sensitive genetic syndrome, such as ATM and BRCA1, NBS1 functions in early step of homologous recombination. In addition, we revealed that NBS1 binds to TOPBP1, which is an important factor for activation of ATR, and disruption of NBS1 leads to enhanced sensitivity to UV and anti-tumor drug, cis-platin. Furthermore, we showed that NBS1 has critical role in genome stability through maintaining centrosomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,400,000	0	16,400,000
2006年度	16,400,000	0	16,400,000
2007年度	16,400,000	0	16,400,000
2008年度	16,400,000	0	16,400,000
2009年度	16,400,000	0	16,400,000
総計	82,000,000	0	82,000,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA二重鎖切断・NBS1, BRCA1, 中心体・相同組換え・シスプラチン増感

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景

DNA二重鎖切断は複製ストレスや電離放射線照射などにより誘発される重篤なDNA損傷である。発がん因子としてDNA二重鎖切断が重要であることは、広島・長崎の原爆

放射線に被爆した生存者に種々の癌が多発した事から明らかである。高発がん性の劣性遺伝病ナイミーヘン症候群は若年患者の40%に、DNA二重鎖切断を伴う免疫組換えが起こるリンパ球特異的に、

腫瘍の発生が見られる事から DNA 二重鎖切断に起因する発がん過程を解析する優れた研究材料である。我々は、疾患の原因遺伝子 NBS1 のクローニングに成功。

(Matsuura S. et al., Nature Genet., 1998), また、NBS1 が相同組換えに重要な遺伝子であることを発見した (Tauchi, H. et al., Nature, 2002)。

2. 研究の目的

ナイミーヘン症候群細胞は放射線高感受性として知られている。その一方、がん遺伝子の活性化などにより誘導される複製ストレスに対して、ATM キナーゼ/Chk2/p53 経路による増殖制御およびアポトーシス誘導が発癌のバリアーとして機能していることが、他の研究者によりヒト膀胱癌、乳癌、肺癌、大腸癌で示された (Bartkova et al., Nature, 2005) ATM の活性化には NBS1 蛋白が必要であることから、上記の報告は複製ストレスに起因する発癌の抑制にも NBS1 が機能している事を示唆している。そこで本研究では放射線誘導の DNA 二重鎖切断に加えて、シスプラチンなどの薬剤を用いて複製ストレスに対する NBS1 の修復とチェックポイント制御による細胞防御機構を明らかにする事を目的とする。また、発癌に加えて DNA 修復の抑制による制癌の可能性についても検討する。

3. 研究の方法

NBS 細胞として当教室で患者の皮膚繊維芽細胞を SV40 により樹立した GM7166SV 細胞を用いた。しかし、この細胞を含めて、現在までに報告されている NBS 患者細胞では、NBS1 蛋白の C 末側が一部発現している hypomorphic 変異であることが知られている。このため、NBS1 遺伝子のエキソン 3-5 に LacZ と PGKneo 遺伝子を導入した NBS1 ノックアウトマウス細胞も実験に用いた。相同組換え能の測定には、GFP 遺伝子 2 個がタンデムに配列した DR-GFP レポーター遺伝子を予め 1 コピー導入した細胞を用いた。この細胞に制限酵素 I-SceI 発現プラスミドをエレクトロポレーション法で導入して、レポーター遺伝子内に発生する二重鎖切断が相同組換えにより再結合した時に発現する GFP 蛋白ポジティブ細胞を FACS により相同組換え能の定量解析を行った。一方、DNA 鎖間クロスリンク (ICL) の修復能はビオチン標識のソラーレンを用いた (図 2)。エレクトロポレーションにより細胞内に導入したソラーレンに紫外線 UVA を照射して DNA に生じた ICL を、細胞抽出のゲノム DNA をメンブレンフィルターにドットプロット後、ソラーレンに

結合したビオチンをペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いて定量測定した。紫外線照射により誘導されるシクロブタン型チミジン 2 量体ならびに 6-4 光産物のヌクレオチド除去修復能はそれぞれの損傷の特異抗体 TDM-2 および 64M-2 を用いた ELISA 法により定量測定した。

4. 研究成果

(1) DNA 二重鎖切断の修復チェックポイント
我々は既にニワトリ DT40 細胞の NBS1 欠損が相同組換えを顕著に低下する事を報告した (Nature, 2002)。DT40 細胞自体が相同組換え能が異常に昂進している細胞として知られているので、患者細胞での相同組換え能ならびにその機能ドメインを種々の NBS1 変異体を用いて解析した。その結果、ヒト NBS1 も相同組換えに関与していること、その機能には NBS1 の N 末側のヒストン結合領域と C 末側の MRE11 が重要である事が示された (図 1)。しかし、驚いた事に、C 末側の最末端の ATM 結合領域が欠損しても相同組換えの低下は見られなかった。そこで、ATM の欠損した A-T 患者細胞を用いて同様の解析をしたが結果は同じであった。更にこの事を確認するために、ATM 阻害剤の KU-55933 を用いて解析した。KU-55933 の添加により、非相同末端再結合の低下が見られたが、相同組換え能はほとんど影響を受けなかった。これに対して、放射線照射後の DNA 合成は NBS と A-T の両細胞ともに停止せずにいわゆる放射線抵抗性 DNA 合成を示した。この事から、チェックポイントに関しては ATM と NBS1 は同じ経路で機能する。しかし、NBS1 は相同組換え修復に必須であるが、ATM はほとんど関与せず、修復能において両蛋白機能の乖離が明らかになった。

(2) 紫外線損傷の複製後修復
相同組換えは多くの修復に関与しており、大腸菌の相同組換え欠損株は紫外線高感受性を示す。そこで、NBS1 ノックアウトマウス細胞を用いて紫外線感受性を検討した結果、予想通り高い感受性を示した。NBS 患者細胞では紫外線感受性が確認出来なかったため、患者細胞に見られる NBS1 蛋白の C 末側のわずかな発現が紫外線感受性をマスクしていたと思われる。続いて、ELISA 法を用いてヌクレオチド除去修復能を測定したが、NBS1 ノックアウトマウス細胞はシクロブタン型チミジン 2 量体ならびに 6、4 光産物のいずれにも正常の修復能を示した。紫外線損傷の未修復は複製フォークの停止を誘導する。このとき、複製後修復として相同組換えと RAD6/RAD18 による PCNA のモノユビキチン化が DNA ポリメラー

ゼ Pol η をリクルートして開始する Translesional DNA synthesis が誘導される事が知られている。しかし、相同組み換え能の低下した細胞、例えば、BRCA1-/-細胞、では紫外線高感受性は顕著でない。このため、紫外線感受性の原因を更に詳細に調べるために、NBS1 細胞の紫外線照射後の PCNA のモノユビキチン化を検討中である。

(3) DNA 鎖間クロスリンクの修復

ほ乳類細胞の DNA 鎖間クロスリンクの修復機構は未だに明らかになっていない。大腸菌や酵母ではヌクレオチド除去修復により修復されるが、ほ乳類細胞では相同組み換えが関与している事が示唆されている。そこで、NBS 細胞での同損傷に対する修復能を検討した。しかし、DNA 鎖間クロスリンクの修復を測定する幾つかのアッセイ系が報告されているが、既存の方法では DNA 鎖間クロスリンク剤への感受性と修復能の低下が一致しておらず測定法に問題がある。たとえばコメットアッセイ法では、DNA 鎖間クロスリンク剤感受性のファンコニー細胞の修復能の異常が検出出来ない。逆に、DNA 鎖間クロスリンクしたプラスミドを細胞に導入してその修復能をみる HCR 法では、DNA 鎖間クロスリンク剤に感受性を示さない色素性乾皮症細胞で修復能の低下を示す。このため、我々はビオチン標識のソラーレン (PPB) でゲノム DNA に導入した DNA 鎖間クロスリンクを直接測定する新規の PPB ドットプロット法を開発した。この方法では、ファンコニー細胞および色素性乾皮症細胞で DNA 鎖間クロスリンク剤に対する感受性と修復能に良い相関関係が確認された。このアッセイ法により、NBS 細胞の修復能を検討した結果、顕著な DNA 鎖間クロスリンクの除去機能の低下が見られた。また、これと一致して NBS 細胞のシスプラチン高感受性が確認された。

(4) TOPBP1、WRN および BRCA1 との結合 NBS1 は C 末側に ATM および MRE11 との結合領域、そして N 末側にリン酸化蛋白との結合領域を有する (図 1)。我々は抗体を用いた免疫共沈により、TOPBP1 (酵母 CUT5 のヒトホモログ) と WRN (ワーナー症候群の蛋白) が NBS1 と結合する事を示した。特に TOPBP1 は ATR (ATM and RAD5 related kinase) の活性化蛋白である事が他の研究者によって示されているので、複製フォーク停止における損傷応答に重要である。NBS1 と TOPBP1 の結合は紫外線線量依存性で、TOPBP1 の損傷部位へのリクルートに NBS1 が必要である。この事から、NBS1 は DNA 二重鎖切断に対しては ATM を損傷部位にリクルート、そして、複製フォークの停止に対しては TOPBP1 をリクルートしてチェックポイントを制御している可能性が示された。

(5) 中心体維持における役割

NBS1 欠損細胞が DNA 損傷だけでなく中心体数の異常を誘発することを示した。すなわち、NBS1 修復系が中心体の安定化により正常な細胞分裂を維持していることが明らかになった。NBS1 細胞では、中心体を構成する γ チューブリンのユビキチン化が低下していることから、NBS1 の中心体維持には BRCA1 との結合が重要であり、BRCA1 のユビキチン化活性を制御する事が初めて示された。

(6) まとめ

我々がナイミーヘン症候群の原因遺伝子として 1998 年にクローニングした NBS1 は、DNA 二重鎖切断の修復とチェックポイントの蛋白として研究されて来た。従来、類似疾患 A-T の蛋白 ATM との違いは知られていなかった。しかし、本研究では NBS1 の欠損により相同組み換えが顕著に低下するのに対して、ATM は相同組み換えにほとんど関与しない事が示された。これは、NBS1 と複合体を形成する MRE11/RAD50 が大腸菌の修復蛋白 SbcC/D のパラログ、そして ATM が酵母のチェックポイント蛋白 TEL1 由来するそれぞれの蛋白の起源とも一致する。NBS1 の本源的な機能は、実験材料に使用される NBS 患者細胞が NBS1 蛋白を一部発現している事によりマスクされていた可能性がある。そこで、NBS1 ノックアウトマウス細胞を用いた結果、電離放射線だけでなく DNA 鎖間クロスリンク剤ならびに紫外線にも高感受性である事が示された。また、NBS1 は DNA 鎖間クロスリンク剤の修復や紫外線損傷の複製後修復に関わっている事が示唆された。これらの損傷修復は複製フォーク停止および複製ストレスにより誘導されるので ATR の関与が疑われる。本研究で示された NBS1 が ATR 活性化蛋白 TOPBP1 と結合する事実は、上記の NBS 細胞の紫外線や DNA 鎖間クロスリンク剤感受性も良く説明できる。複製ストレスによるゲノム不安定化は発癌の要因と思われるので、発癌抑制における NBS1 機能の重要性があらためて示された。また、DNA 鎖間クロスリンクを誘発するシスプラチンは抗がん剤として臨床に用いられているので、NBS1 蛋白の修飾による DNA 鎖間クロスリンク修復の抑制による抗がん剤の増感効果の可能性が示された。一方、発がんの初期段階と見なされるゲノム不安定性は、チェックポイントや DNA 修復、複製ストレスに起因すると思われる。我々は本研究で、細胞核外に存在する中心体の維持に DNA 修復蛋白 NBS1 が関与しており、その異常が染色体の aneuploidy を通じてゲノム不安定性を誘導する新規の経路を初めて示した。

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 22 件)

1. Kobayashi J, Kato A, Ota Y, Ohba R, Komatsu K. Bisbenzamidine derivative, Pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Mol. Cancer*, 査読有, 9:34, 2010.

2. Tauchi H, Waku H, Matsumoto E, Yara S, Okumura S, Iwata Y, Komatsu K, Furusawa Y, Eguchi-Kasai K, Tachibana A. Two major factors involved in the reverse dose-rate effect for somatic mutation induction are the cell cycle position and LET value. *J Radiat Res* 査読有, 50, 441-8, 2009.

3. Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Bruma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, 380, 752-757, 2009.

4. Sakurai, Y. Komatsu K, Agematsu, K. Matsuoka, M. DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 査読有, 2009, 6:114

5. Shimada M, Komatsu K. Emerging connection between centrosome and DNA repair machinery. *J Radiat Res* 査読有, 50:295-301, 2009.

6. Shimada M, Sagae R, Kobayashi J, Habu T, Komatsu K. Inactivation of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to excess centrosome duplication via the ATR/BRCA1 pathway. *Cancer Research*, 査読有, 69:1768-75, 2009

7. Antoccia A, Sakamoto S, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K. NBS1 prevents chromatid-type aberrations through ATM-dependent interactions with SMC1. *Radiat Res*. 査読有, 170:345-352, 2008.

8. Uehara Y, Ikehata H, Komura J, Ito A, Ogata M, Itoh T, Hirayama R, Furusawa Y, Ando K, Paunesku T, Woloschak GE, Komatsu K, Matsuura S, Ikura T, Kamiya K, Ono T. Absence of Ku70 gene obliterates

X-ray-induced lacZ mutagenesis of small deletions in mouse tissues. *Radiat Res*. 査読有, 170:216-223, 2008.

9. Takai K, Sakamoto S, Sakai T, Yasunaga J, Komatsu K, Matsuoka M. Potential Link between Alternative Splicing of the NBS1 Gene and the DNA Damage/Environmental Stress. *Radiat Res*.

査読有, 170:33-40, 2008

10. Iijima K, Muranaka C, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K, Matsuura S, Kubota N, Tauchi H. NBS1 regulates a novel apoptotic pathway through Bax activation. *DNA Repair*, 査読有, 7:1705-16, 2008.

11. Tsuchida K., Komatsu K. Impaired removal of DNA interstrand cross-link in Nijmegen breakage syndrome and Fanconi anemia, but not in BRCA-defective group. *Cancer Sci*. 査読有, 99:2238-43, 2008.

12. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H. Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res*, 査読有, 49, 93-103, 2008.

13. S. Sakamoto, K. Iijima, D. Mochizuki, K. Nakamura, K. Teshigawara, J. Kobayashi, S. Matsuura, H. Tauchi, K. Komatsu. Homologous recombination repair is regulated by domains at the C-terminus of NBS1 and is independent of ATM. *Oncogene*, 26:6002-9, 2007 査読有,

14. H. Nakamura, Y. Yasui, N. Saito, A. Tachibana, K. Komatsu, Ishizaki. DNA Repair Defect in AT Cells and their Hypersensitivity to Low-Dose-Rate Radiation. *Radiation research*. 査読有, 165, 277-282, 2006

15. A. Antoccia, J. Kobayashi, H. Tauchi, S. Matsuura, K. Komatsu. Nijmegen Breakage Syndrome and Functions of the Responsible Protein, NBS1. *Genome Dyn.*

査読有, 1, 191-205 2006

16. M. Kobayashi, H. Ono, K. Mihara, H. Tauchi, K. Komatsu, H. Shimizu, K. Uchida, K. Yamamoto. ATM Activation by a Sulfhydryl-Reactive Inflammatory Cyclopentenone Prostaglandin. *Genes Cells*, 査読有, 11(7) 779-789 2006

17. M. Someya, K. Sakata, H. Tauchi, Y. Matsumoto, A. Nakamura, K. Komatsu, M. Hareyama. Association of Ionizing Radiation-Induced Foci of NBS1 with Chromosomal Instability and Breast Cancer Susceptibility. *Radiation Research*. 査読有, 166, 575-582 2006

18. S. Matsuura, Y. Matsumoto, K. Morishima, H. Izumi, H. Matsumoto, E. Ito, K. Tsutsui, J. Kobayashi, H. Tauchi, Y. Kajiwara, S. Hama, K. Kurisu, H. Tahara, M. Oshimura, K. Komatsu, Tatsuhiro Ikeuchi, Tadashi Kajii. Monoallelic BUB1B Mutations and Defective Mitotic-Spindle Checkpoint in Seven Families With Premature Chromatid Separation (PCS) Syndrome. *Amer J Med Genet.*, 査読有, 140(4):358-67, 2006

19. Li Lan, Satoshi Nakajima, Kenshi Komatsu, Andre Nussenzweig, Akira Shimamoto, Junko Oshima and Akira Yasui, Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells, *J Cell Sci.*, 査読有, 118:4153-4162, 2005

20. Yamamoto K, Hirano S, Ishiai M, Morishima K, Kitao H, Kimura M, Namikoshi K, Matsushita N, Arakawa H, Buerstedde JM, Komatsu K, Thompson LH and Takata M. Fanconi Anemia protein FANCD2 promotes immunoglobulin gene conversion and DNA repair through a mechanism related to homologous recombination. *Mol. Cell Biol.*, 査読有, 25:34-43, 2005

21. Cheng W, Kobbe G, Opresko P L, Arthur L M, Komatsu K, Sidman M M, Carney J P, Bohr V A. Werner syndrome protein associates with gamma H2AX in a manner that depends upon NBS1, *FEBS Letters*, 査読有, 28:579(6): 1350-1356, 2005.

22. Chen L, Morio T, Minegishi Y, Nakada S, Nagasawa M, Komatsu K, Chessa L, Villa A, Lecis D, Delia D, Mizutani S.

Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage, *Cancer Science*, 査読有, 96:134-141, 2005.

[学会発表] (計 75 件)

1. K. Komatsu, UV sensitivities of cells from Nijmegen breakage syndrome and the underlying gene, The 3rd Japan-US DNA Repair Meeting, Sendai, 2007 May.

2. K. Komatsu, NBS1 foci formation and divergent roles in response to DNA damage-eliciting agents, The 2006 International Workshop on Ataxia-telangiectasia, Canada Banff, 2006, September.

3. K. Komatsu, Human NBS1 functions in the repair of I-SceI-induced DSBs via homologous recombination and independently of ATM, The 2005 International Workshop on Ataxia-telangiectasia, Italy Milan, 2005, June.

[図書] (計 2 件)

1. Komatsu K, Shimada M, Tsuchida K, Nakamura K, Yanagihara Hi, Kobayashi. Multiple roles of NBS1 for genotoxic and non-genotoxic stresses. *Radiation Health Risk Science*. 183-192 pp, Springer, 2009

2. K. Komatsu, A. Antoccia, S. Sakamoto, J. Kobayashi, S. Matsuura, H. Tauchi. Human NBS1 and MRE11 associate for regulation of checkpoints and for homologous recombination repair. *International Congress Series 1299*, 158-163, ELSEVIER, Amsterdam, 2007.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：DNA 鎖間架橋の測定方法および
DNA 鎖間架橋の修復速度の測定方法
発明者：榎田謙、小松賢志
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特願
番号：2005-207121
出願年月日：2005年7月15日
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：DNA 鎖間架橋の測定方法および
DNA 鎖間架橋の修復速度の測定方法
発明者：榎田謙、小松賢志
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特願
番号：2005-207121
取得年月日：2007年2月2日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/Genome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 賢志 (KOMATSU KENSHI)

京都大学・放射線生物研究センター・教授
研究者番号：80124577

(2) 研究分担者

小林 純也 (KOBAYASHI JUNYA)

京都大学・放射線生物研究センター・助教
研究者番号：30301302

