

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 20 年度 ~ 平成 22 年度

課題番号：20591220

研究課題名(和文) 小脳変性を来す先天性遺伝子修復異常症の病態、治療法に関する研究

研究課題名(英文)

The analysis of congenital DNA-repair abnormality with cerebellar degeneration

研究代表者

折居 建治 (ORII KENJI)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30332688

研究成果の概要(和文)：

本研究では、ATM、Mre11、NBS1 からのシグナルが胎生期の脳形成に重要でありかつ患者における小脳変性にも重要であることが明らかになったことから ATM、Mre11、NBS1 の共通のターゲットとなる蛋白質を検索しそれらの蛋白質から脳形成や小脳変性を来す重要な蛋白質を同定することを目的としている。また、1 本鎖 DNA 切断修復遺伝子異常が遺伝性脊髄小脳変性症の原因であることが明らかにされ、これらの蛋白質との相互関係を検討し神経細胞死の共通の機序を明らかにすることを目的としている。これらの解析で病態の解明をすすめ早期診断法の開発、治療法の確立を目指している。今年度の研究実績は以下のとおりである。ATM のシグナルを種々の蛋白質に伝えている Mre11-NBS1-Rad50 複合体に結合する候補蛋白質に関して、これらの蛋白質それぞれについて生理機能および蛋白相互作用について検討をおこない、1 年間に以下のことを明らかにした。

1) 候補蛋白質の生理機能を解析 強制発現系を利用し deletion mutant を発現させると細胞内における局在がどのように変化するか、また会合蛋白質との細胞内での結合の変化、アポトーシス刺激に対する反応の変化等について検討した。主にミスマッチ修復に関する蛋白と NBS1 との相互作用について 検討をおこなった。また siRNA を利用した発現抑制による細胞の生理機能の変化についても検討をおこなった。

2) 候補蛋白質と Mre11-NBS1-Rad50 蛋白質複合体との結合部位とその立体構造 ミスマッチ修復に関わる蛋白質と NBS1 との結合部位について、その立体構造について検討し、deletion mutant から得られた情報と、細胞内局在および機能に及ぼす領域について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：

The signal transduction from complex of ATM, Mre11, and NBS1 are important for brain development during embryonic period. We searched the common target of protein complex of Rad50, Mre11 and NBS1. We tried to find the important proteins for brain development and cerebellar degeneration. We found several proteins which interact with Mre11-NBS1-Rad50 complex. We studied those protein function in the cells using overexpressing system, siRNA system and so on. We also found the binding sites which were important for interacting with the Mre11-NBS1-Rad50 complex. We used those data for protein structure analysis to understand about protein functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科

キーワード：小児神経学・小脳変性症

1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性運動失調症 (AT) は、進行性小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全、性成熟障害、悪性腫瘍の高率の合併、放射線感受性、染色体異常を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。染色体の不安定性を示すことから染色体断裂症候群に分類されている。病因遺伝子は ATM 遺伝子であることが明らかにされ、ATM 蛋白質が細胞周期チェックポイント、アポトーシス、テロメアの維持、そして DNA 修復等に関与する重要な蛋白質であることがわかってきている。遺伝子欠損モデルマウスも作成され生体内における機能解析が進んでいるが、マウスモデルには小脳性失調がみられず、ATM 蛋白質と小脳性失調との関連は、いまだ明らかにされていない。染色体断裂症候群に分類され毛細血管拡張性運動失調症様の症状を示す亜型の存在が知られており、Nijmegen breakage syndrome (NBS) と AT-like disorder (ATLD) とそれぞれ呼ばれていたが、最近病因遺伝子が同定され、それぞれ NBS1 遺伝子と Mre11 遺伝子に異常があることが明らかにされた。Mre11 蛋白質は、NBS1 蛋白質、Rad50 蛋白質と複合体を形成し転写エラーや活性酸素などによる DNA 二本鎖切断を修復するための ATM からのシグナルを伝える重要な蛋白質であることが最近明らかにされた。AT と ATLD は、小脳性失調を来すことが共通しているが、NBS は小脳性失調

を来さないことが知られている。しかし最近の報告では、NBS1 欠損マウスでは、小脳欠損と小脳性運動失調を認めることがわかっている (Frappart Nat Med 2005)。これは患者にみられる遺伝子変異が hypomorphic mutation であるためと考えられる。これらのことから ATM、Mre11、NBS1 の経路が小脳性運動失調を来す上で重要であることが示唆される。DNA 複製や放射線、薬物による DNA 二本鎖切断が起こった後の DNA 修復に ATM からのシグナルが重要であることが知られているが、胎児期に大脳が形成される際にこれらの DNA 二本鎖切断修復機構が重要な役割を果たしていることを我々はノックアウトマウスを使用して明らかにした (第一筆者 PNAS 2006)。

2. 研究の目的

ATM、Mre11、NBS1 からのシグナルが胎生期の脳形成に重要でありかつ患者における出生後の小脳変性にも重要であることが明らかになったことから、我々は、ATM、Mre11、NBS1 の共通のターゲットとなる蛋白質を検索しそれらの蛋白質の中から脳形成や小脳変性を来す上で重要な蛋白質を同定することを研究目的としている。これらの蛋白質の相互関係を明らかにすることで、病態の解明および早期診断法の開発、治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

ATM のシグナルを種々の蛋白質に伝えているのを助けている Mre11-NBS1-Rad50 複合体に結合する蛋白質を検索するために酵母ツーハイブリッド法を利用し候補蛋白質を15個同定した。これらの15個の蛋白質それぞれについて発現ベクターを作製し哺乳類細胞内において強制発現させ Mre11-NBS1-Rad50 複合体との結合を免疫沈降法を利用して調べており以下のことを明らかにする。

1) 候補蛋白質の生理機能を解析する

哺乳類細胞における候補遺伝子の生理的機能を解析するために、強制発現系を利用して細胞周期チェックポイント、細胞増殖能、放射線感受性、アポトーシス刺激に対する反応等について検討する。候補蛋白質の発現様式を検討し、神経組織特異的な発現の有無や発達期特異的な発現の有無等について検討する。

2) 候補蛋白質と Mre11-NBS1-Rad50 蛋白質複合体との結合部位を決定する

候補蛋白質との結合部位、結合時期等を検討する。結合部位に遺伝子変異を加えた変異蛋白質を作製し、ドミナントネガティブに作用する変異蛋白質作成の可能性について検討する。候補蛋白質と Mre11-NBS1-Rad50 蛋白質複合体に作用する蛋白質の有無について検討する。ATM と Mre11-NBS1-Rad50 蛋白質複合体からのシグナル伝達経路をさらに詳細に検討し、小脳性運動失調に直接的に関わる蛋白質の有無について検討する。

本研究では、毛細血管拡張性運動失調症にお

いて小脳性失調をきたす神経変性機構を解明することを研究の目的としている。同様の小脳性失調を来す AT-like-disorder の原因蛋白質 Mre11 が、転写エラーや活性酸素などによる DNA 二本鎖切断を修復するための ATM からのシグナルを伝える上で大切な役割を果たしている。ATM と Mre11 に共通する伝達系が小脳性失調を来す上で重要であり、そのターゲット遺伝子を検索し機能を同定することにより小脳性失調の原因を世界に先駆けて特定することを目的とする。さらにこの遺伝子の特定により分子遺伝学的な早期診断法および治療法を確立することを目的とする。

4. 研究成果

本研究では、ATM、Mre11、NBS1 からのシグナルが胎生期の脳形成に重要でありかつ患者における小脳変性にも重要であることが明らかになったことから ATM、Mre11、NBS1 の共通のターゲットとなる蛋白質を検索しこれらの蛋白質から脳形成や小脳変性を来す重要な蛋白質を同定することを目的としている。また、1本鎖DNA切断修復遺伝子異常が遺伝性脊髄小脳変性症の原因であることが明らかにされ、これらの蛋白質との相互関係を検討し神経細胞死の共通の機序を明らかにすることを目的としている。これらの解析で病態の解明をすすめる早期診断法の開発、治療法の確立を目指している。今年度の研究実績は以下のとおりである。ATM のシグナルを種々の蛋白質に伝えている Mre11-NBS1-Rad50 複合体に結合する候補蛋白質に関して、これらの蛋白質それぞれについて生理機能および蛋白相互作用について検討をおこない、1年間に以下のことを明らかにした。

1) 候補蛋白質の生理機能を解析 強制発

現系を利用し deletion mutant を発現させると細胞内における局在がどのように変化するか、また会合蛋白質との細胞内での結合の変化、アポトーシス刺激に対する反応の変化等について検討した。主にミスマッチ修復に関する蛋白と NBS1 との相互作用について検討をおこなった。また siRNA を利用した発現抑制による細胞の生理機能の変化についても検討をおこなった。

2) 候補蛋白質と Mre11-NBS1-Rad50 蛋白質複合体との結合部位とその立体構造ミスマッチ修復に関わる蛋白質と NBS1 との結合部位について、その立体構造について検討し、deletion mutant から得られた情報と、細胞内局在および機能に及ぼす領域について検討を行った。

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 4 件)

1 Hirotomo Saito, Mitsuhiro Kato, Ippei Okada, Kenji E. Orii, Tsukasa Higuchi, Hideki Hoshino, Masaya Kubota, Hiroshi Arai, Tstsuzo Tagawa, Shigeru Kimura, Akira Sudo, Sahoko Miyama, Yuichi Takami, Toshihide Watanabe, Akira Nishimura, Kiyomi Nishimura, Noriko Miyake, Takahito Wada, Hitoshi Osaka, Naomi Kondo, Kiyoshi Hayasaka, Naomichi Matsumoto
STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia* Vol.51, 1528-1168, 2010

2 Zenichiro Kato, Masahiro Morimoto, Kenji E. Orii, Tomomi Kato, Naomi Kondo
Developmental changes of radiological findings in Fukuyama-type congenital

muscular dystrophy. *Pediatric Radiology*.
Vol 40 suppl,S127-129, 2010

3 Pierre-Olivier Frappart, Youngsoo Lee, Helen R Russell, Nader Chalhoub, Yong-Dong Wang, Kenji E. Orii Jingfeng Zhao, Naomi Kondo, Suzanne J. Baker, Peter J. McKinnon
Recurrent genomic alterations characterize medulloblastoma arising from DNA double-strand break repair deficiency. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* Vol 106, 1880-1885, 2009

4 Hidenori Ohnishi, Hidehiko Tochio, Zenichiro Kato, Kenji E. Orii, Ailian Li, Takeshi Kimura Hidekazu Hiroaki, Naomi Kondo, Masahiro Shirakawa
Structural basis for the multiple interactions of the Myd88 TIR domain in TLR4 signaling
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA Vol 106 10260-10265, 2009

[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

折居 建治 (ORII KENJI)
岐阜大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30332638

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：