

## 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24年 4月27日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651018

研究課題名（和文）エピジェネティックスの視点から見たATRシグナル欠損症の病態解明

研究課題名（英文）Epigenetic dysregulation in disorder with defective ATR signaling

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

研究成果の概要（和文）：

転写はDNA損傷後に抑制される。このメカニズムとして、Chk1のクロマチンからの遊離とそれに伴うヒストンH3のリン酸化レベルの低下の関与が報告された。本研究で私たちは、ATRの先天性欠損症は、定常状態でヒストンH3のリン酸化レベルが正常細胞に比べて約50%低下していることを明らかにした。これらの結果から、ATR欠損症はエピジェネティックス制御の異常症である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

DNA damage induces transcriptional repression. It was been shown that Chk1 dissociation from chromatin and its concomitant reduced H3-T11 phosphorylation is responsible for the transcriptional repression. In this study, we found that cells from a patient with ATR deficiency have 50% level of H3-T11 phosphorylation even before irradiation. Our data suggested that ATR deficiency might be a disorder with epigenetic dysregulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

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：エピジェネティックス、染色体、ATR、ヒストン、クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム染色体は、遺伝情報だけでは規定できないエピジェネティックな制御を受けている。近年の目覚ましい研究進展により、ヒストンのリン酸化やアセチル化など多様な翻訳後修飾の実体が明らかになり、エピジェネティックスによるゲノム制御が解明されつつある。さらに翻訳後修飾の一部がDN

A修復に重要な役割を果たすことが明らかにされ注目を集めている。

## 2. 研究の目的

最近、ATRの主要なエフェクター分子であるChk1がヒストンH3のThr11をリン酸化してクロマチンを制御することが報告された。また、DNA損傷時

にはChk1がリン酸化されてクロマチンから遊離することで、ヒストンH3が脱リン酸化される。この研究成果から、ATRシグナル経路に異常を持つヒト遺伝病は、転写がグローバルに抑制されており、その結果として重篤症状を呈している可能性が示唆された。本研究は、この仮説を分子生物学的に検証することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) Chk1のリン酸化・細胞内局在の検討

ATR-セッケル症候群細胞に紫外線を照射して、Chk1のリン酸化をウェスタンブロット法で解析する。さらに、Chk1がDNA損傷後にクロマチンから遊離するかどうかをタンパク質の核分画抽出を行って検討する。Chk1の中心体局在を、免疫染色法と中心体分画のウェスタンブロット法で解析する。

#### (2) ヒストンH3のT11リン酸化とK9アセチル化の解析

ATR-セッケル症候群細胞に紫外線を照射あるいは非照射でタンパク質を抽出して、ヒストンH3のT11リン酸化とK9アセチル化抗体を用いてウェスタンブロット法を行う。さらに、正常細胞にChk1を過剰発現させて同様な解析を実施する。

### 4. 研究成果

ATRシグナル欠損症の細胞が、ハイドロキシウレア処理または紫外線を照射しても、Chk1のリン酸化とヒストンH3の脱リン酸化が起こらないことを確認した。次に、定常状態（DNA非損傷時）で、ATRシグナル欠損症のヒストンH3リン酸化レベルを正常細胞と比較検討したところ、ATRセッケル症候群は正常細胞に比べてヒストンH3の脱リン酸化が約50%に低下していることを見出した。さらに、PCNTセッケル症候群は、正常とATRセッケル症候群の中間の応答性を示した。以上の結果から、ATRシグナル欠損症はグローバルな遺伝子発現低下を共通病態とする「クロマチン病」の可能性が高いと考えられた。

### 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6件)

1. Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, Boravina A, Ciruna B, Shimizu A, Kajii T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, Matsuura S. Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes impaired

ciliogenesis in vertebrates. *Hum Mol Genet* 査読有 20, 2058-2070 (2011).

2. Miyamoto T, Furuse M, Furutani-Seiki M. In vivo imaging of tight junctions using Claudin-EGFP transgenic medaka. *Methods Mol. Biol* 査読無 762, 171-178 (2011)
3. Matsumoto Y, Miyamoto T, Sakamoto H, Izumi H, Nakazawa Y, Ogi T, Tahara H, Oku S, Hiramoto A, Shiiki T, Fujisawa Y, Ohashi H, Sakemi Y, Matsuura S. Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. *DNA Repair (Amst)* 査読有 10, 314-321 (2011).
4. Yanagihara H, Kobayashi J, Tateishi S, Kato A, Matsuura S, Tauchi H, Yamada K, Takezawa J, Sugawara K, Masutani C, Hanaoka F, Weemaes CM, Mori T, Zou L, Komatsu K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol  $\eta$ -dependent translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 査読有 43: 788-789 (2011)
5. Kobayashi J, Okui M, Asaithamby A, Burma S, Chen BP, Tanimoto K, Matsuura S, Komatsu K, Chen DJ. WRN participates in translesion synthesis pathway through interaction with NBS1. *Mech Ageing Dev* 査読有 131, 436-444 (2010).
6. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 査読有 465, 223-226 (2010).

[学会発表] (計25件)

1. 落合 博、宮本 達雄、細羽 康介、山本 卓、松浦 伸也：ヒト遺伝性疾患の病因変異と考えられる遺伝子間領域に存在する一塩基多型 (SNP) のZFNを利用した機能解析 第1回ゲノム編集研究会 広島 2012年2月28-29日
2. 佐久間 哲史、細井 紗弥佳、落合 博、宮本

- 達雄、松浦 伸也、坂本 尚昭、野地 澄晴、山本 卓：TALEN の効率的作製法および評価法の確立と改良型ヌクレアーゼの開発 第1回ゲノム編集研究会 広島 2012年2月28-29日
3. Miyamoto T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, Matsuura S: Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes a ciliopathy with chromosomal instability. International symposium 50<sup>th</sup> anniversary of RIRBM, Hiroshima University 広島 2012年2月20-21日
  4. Kobayashi J, Fujimoto H, Matsuura S: Role of Histone modification in radiation-induced cellular response following low dose-rate irradiation. International symposium 50<sup>th</sup> anniversary of RIRBM, Hiroshima University 広島 2012年2月20-21日
  5. Tauchi H, Ohara M, Abe H, Matsuura S, Komatsu K: Functional link between Nbs1 and Ku70 protein in cellular response to DNA damage induced by ionizing radiation. International symposium 50<sup>th</sup> anniversary of RIRBM, Hiroshima University 広島 2012年2月20-21日
  6. Sakuma T, Hosoi S, Ochiai H, Miyamoto T, Matsuura S, Sakamoto N, Yamamoto T: Targeted genome editing using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). International symposium 50<sup>th</sup> anniversary of RIRBM, Hiroshima University 広島 2012年2月20-21日
  7. Ochiai H, Jujita K, Nishikawa M, Suzuki K, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Sakamoto N, Shibata T, Yamamoto T: Zinc-finger nuclease-mediated targeted transgene integration enables quantitative imaging of endogenous gene expression in living sea urchin embryo. 第34回日本分子生物学会年会 神戸 2011年12月13-16日
  8. Miyamoto T, Porazinski S, Huijia W, Shimizu A, Kajii T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, Matsuura S: BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, plays a role of ciliogenesis in G0 phase. 第34回日本分子生物学会年会 神戸 2011年12月13-16日
  9. 宮本 達雄、古谷一清木 誠、松浦 伸也：
    10. 宮本 達雄、PORAZINSKI Sean、WANG Huijia、清水厚志、梶井 正、菊池 章、古谷一清木 誠、松浦 伸也：分裂期チェックポイント分子 BUBR1 は脊椎動物における繊毛形成を制御する 第54回日本放射線影響学会 神戸 2011年11月17-19日
    11. 宮本 達雄、菊池 章、古谷一清木 誠、松浦 伸也：紡錘体チェックポイント分子 BUBR1 は G0 期において繊毛形成を制御する 第70回日本癌学会学術総会 名古屋 2011年10月3-5日
    12. 松浦 伸也：産業医活動における放射能の知識 平成23年度第2回日医認定産業医研修会 広島 2011年9月15日
    13. 松浦 伸也：DNA修復障害・染色体不安定に起因するヒト遺伝病 第146回染色体研究会 東京 2011年6月11日
    14. 落合 博、佐久間 哲史、宮本 達雄、野地 澄晴、松浦 伸也、山本 卓：TALEヌクレアーゼ作製法の確立 自然科学研究機構・基礎生物学研究所共同利用共同研究・研究会「遺伝子機能解析の最先端 岡崎 2011年7月11-12日
    15. 宮本 達雄、松浦 伸也：分裂期チェックポイント分子 BUBR1 欠損による高発がん性と繊毛病 第52回原子爆弾後障害研究会 広島 2011年6月5日
    16. Miyamoto T, Matsumoto Y, Sakamoto H, Nakazawa Y, Ogi T, Matsuura S: Molecular pathogenesis of a novel MRE11A mutation in two patients with Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. The First RIRBM International Symposium 広島 2011年3月3-4日
    17. 宮本 達雄、松浦 伸也：紡錘体チェックポイント欠損症における細胞分裂軸異常の解析 第33回日本分子生物学会年会 神戸 2010年12月7-10日
    18. 宮本 達雄、松本 祥幸、坂本 裕美、松浦 伸也：Mre11 遺伝子変異を原因とする重度小頭症の分子病理 日本人類遺伝学会第55回大会 埼玉 2010年10月27-30日

19. 丸山 博文、森野 豊之、伊東 秀文、和泉 唯信、鎌田 正紀、松浦 伸也、阿部 康二、青木 正志、萩原 弘一、川上 秀史：筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子 Optineurin の同定 日本人類遺伝学会第 55 回大会 埼玉 2010 年 10 月 27-30 日
20. 音部 玲子、加瀬 佳寿江、家護谷 五月、兵頭 麻希、大原 正裕、村上 茂、横山 恭之、檜山 桂子、丸山 博文、檜山 英三、松浦 伸也、小林 正夫：地域と連携した HBOC 遺伝子検査の導入に向けた活動報告 日本人類遺伝学会第 55 回大会 埼玉 2010 年 10 月 27-30 日
21. 宮本 達雄、松本 祥幸、坂本 裕美、松浦 伸也：Mre11 遺伝子変異を原因とする重度小頭症における ATM 依存性アポトーシスの亢進 日本放射線影響学会第 53 回大会 京都 2010 年 10 月 20-22 日
22. Matsuura S: Gene and function in microcephaly. Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop "A New Era of Genetic Diseases" Cairo, Egypt October 3-4, 2010
23. Matsuura S: Mosaic Variegated Aneuploidy (Premature Chromatid Separation) Syndrome. Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop "A New Era of Genetic Diseases" Cairo, Egypt October 3-4, 2010
24. 宮本 達雄、松本 祥幸、坂本 裕美、泉 秀樹、松浦 伸也：ナイミーヘン症候群に類似した 2 症例で同定した MRE11A 遺伝子変異とその機能解析 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日
25. 山口 隆司、和田 真実、宮本 達雄、山崎 裕自、田村 淳、月田 承一郎、月田 早智子：ノックアウトマウス解析による細胞間隙におけるイオン透過性に関するクロロゲン 23 の役割 第 62 回日本細胞生物学会大会 大阪 2010 年 5 月 19-21 日

## 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：9 0 2 7 4 1 3 3

### (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・助教  
研究者番号：4 0 4 5 2 6 2 7