

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 4月20日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23651045

研究課題名（和文） 放射線とNBS1変異による小頭症発症の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of radiation/NBS1-associated microcephaly

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）：放射線 1Sv の被ばくによる、小頭症を伴う精神遅滞の発症は放射線発がんと比較して10倍近くの高い放射線リスクである。1Gy および 2Gy 照射によりマウス胎仔の脳 basal 側神経幹細胞にアポトーシスが見られ、同時に、顕著な小頭症が発症した。また、神経幹細胞を供給する apical 側にもアポトーシスがおこり、中心体が局在する構造が破壊された。中心体の維持能力を消失したナイミーヘン症候群患者で見られる小頭症と同様の機構で、放射線小頭症が起こっていると思われる。

研究成果の概要（英文）：The incidence of radiation microcephaly is 10-fold higher than that of radiation carcinogenesis. We showed her that radiation induces the apoptosis in basal neuro-progenitor cells, and develops radiation microcephaly. Simultaneously, apoptosis was observed in apical neuro-progenitor cells, which produce basal neuro-progenitor cells by cell proliferation through attachment of centrosomes to apical layers. These evidences suggest that proliferation is critical to develop radiation apososis, because defect in maintaining centrosomes induces the microcephaly in a patient with Nijmege breakage syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

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：感受性

1. 研究開始当初の背景

(1) 広島での原爆投下時に体内被ばくした子供 1613 人の調査により、爆心地から半径 1.5km 圏内の胎内被ばく児は半径 3.5km 圏外の対照群に比較して頭囲が有意に小さく精神遅滞を伴う原爆小頭症が報告された (Otake M. et al., Br. J Radiol., 1984)。国連科学委員会報告 (1988 年) による放射線障害の推定では、小頭症を伴う精神遅滞の発症は 1Sv あたり 40-50% であり、放射線発がんの 5%/Sv に比較して 10 倍近くの高い放射線リスクである。放射線小頭症の発症は妊娠 8 週から 15 週での体内被曝被ばくが原因である。この時期は胎児の器官形成期にあ

ることが原因とされている。しかし、神経細胞は放射線低感受性の組織として知られており (青山喬、放射線基礎医学、1996)、また胎児期の NBS1 ノックアウトマウスの観測は、放射線致死の原因となるアポトーシスが起こらなくとも小頭症が発症する事を示した (Shull ER, et al., Genes Dev. 2009)。放射線感受性に代わって、中心体とそれを制御する蛋白 (例えば NBS1) の異常が、神経幹細胞の不均衡分裂を介して神経の分化を阻害し、その結果として神経発生が抑制され大脳の発達が遅れる可能性が指摘される。このモデルは中心体局在の蛋白の欠損が小頭症を発症する多くの報告と良く一致している。が、

その分子機構については解明されていない。

(2) 我々は、患者の放射線感受性と小頭症を特徴とするナイミーヘン症候群の原因遺伝子 **NBS1** を同定して放射線損傷の修復に於ける役割を明らかにした (Matsuura S. et al., *Nature Genet.*1998; Tauchi H. et al., *Nature* 2002)。しかし、**NBS1** は DNA の存在しない中心体にも局在して、中心体の複製・安定化に必須であること (Shimada M. et al., *Cancer Res.* 2008) ,また放射線による中心体異常に防護的に機能していることを明らかにした (Shimada M. et al., *Cancer Sci.* 2010)。近年 **NBS1** と同様に、中心体に局在する蛋白、**MCPH1**, **ASPM**, **ATR**, **PCNT** などの蛋白の失活が小頭症を発症する事から中心体異常と小頭症の因果関係が示唆されている。

(3) ヒトの進化ならびに文明の起源は脳のサイズと相関する事が知られている。このため、脳のサイズを規定する蛋白の研究は生物研究者を長い間魅了してきた。近年ではこれらの蛋白のほとんどが中心体に局在することが報告され、大脳サイズならびに神経発生における中心体の役割の解明が注目されている。また、ヒト幹細胞は均等分裂を繰り返して幹細胞数を増やすが、分化発生では不均等分裂が起こる。本研究の神経細胞分化の解析は幹細胞不均等分裂における中心体の関与に重要な知見を与えると期待される。さらに、電離放射線以外の変異原物質、例えば **N-ニトロソ-N-メチル尿素**、なども小頭症を誘発する事が知られている。本研究により小頭症発症機構が解明されるならば、環境変異原の小頭症発症リスクを神経細胞の中心体異常を指標として予測可能になると期待される。

2. 研究の目的

広島・長崎の原子爆弾投下で子宮内被ばくを受けた場合に、精神遅滞を伴う小頭症が高頻度に発生することが知られている。近年の研究から、染色体の均等分割に必須の中心体が中枢神経の発生・分化と小頭症発症に関与する事が示唆されている。我々は、放射線感受性と小頭症発症を特徴とするナイミーヘン症候群の蛋白 **NBS1** が中心体に局在する事、また **NBS1** に変異のある患者細胞では中心体の安定維持に異常を呈することを報告した。そこで本研究は、中心体とその制御に関わる **NBS1** 蛋白による小頭症発症と、放射線誘発小頭症における中心神経の発生・分化における中心体の機能を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

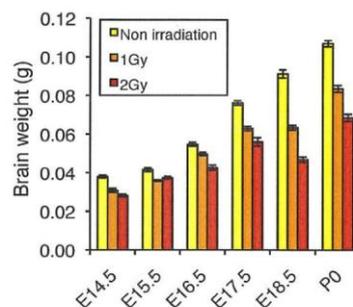
(1) マウス小頭症：妊娠 13 日目のマウス

に γ 線 1Gy および 1Gy を照射し、出産後のマウス胎仔脳を取り出し、非照射マウス胎仔能重量との比較から小頭症を判定した。また、1、4、12、24 時間後と時間経過依存的にマウス胎仔脳を取り出し、4%PFA で固定後、カスパー 3 蛋白およびリン酸化 H2AX 抗体を用いて放射線アポトーシスを測定した。マウス大脳 Basal 側および apical 側の神経幹細胞の分布を検討するために、SOX2 蛋白、Z01 蛋白および γ チューブリン中心体蛋白抗体を用いた組織染色を行った。放射線照射後の Basal 側および apical 側の神経幹細胞の細胞分裂は PH3 と Tuj1 抗体の二重染色により測定した。

(2) 放射線と中心体：ガンマ線 (ガンマセル) をヒト U2OS 細胞、マウス NIH3T3 細胞に照射後、コロニー法により生存率を求めた。また、照射後の細胞をスライドガラス状でメタノール固定して、 γ チューブリン抗体およびセントリン蛋白抗体を用いて中心体数を定量した。

4. 研究成果

(1) 放射線小頭症：広島・長崎の原爆による小頭症は妊娠 9-15 週で高頻度に発生することが知られている。そこで、13 週齢のマウス胎児に 1Gy および 2Gy のガンマ線照射をして、出産後のマウス胎仔の脳重量を測定した。非照射に比較して、それぞれ 78%、64%に脳重量が低下した (下図)。これは放射線照射



(2) マウス大脳の放射線アポトーシス：放射線小頭症が大脳の細胞死に原因するか確認するためにアポトーシスを測定した。カスパー 3 抗体を用いて放射線 1Gy 照射後 1、4、12、24 時間の脳組織を免疫染色した結果、4 時間後から 12 時間後にアポトーシスが顕著に増加、しかし 24 時間後には非照射のレベルまで低下した。これに対して、2Gy 照射では 24 時間でもアポトーシス細胞が存在しており、また Tuj1 抗体を用いたニューロンの組織染色では、組織構造が破壊されていることが示された。

続いて、DNA 損傷とアポトーシスの両方を

測定できるリン酸化 H2AX 抗体を用いた免疫染色を行った。照射後 15 分、および 1 時間後に DNA 二重鎖切断を表すリン酸化 H2AX のドット状のフォーカスが見られるが、4 時間後にはこれらが消失して細胞核全体が染まるアポトーシスが起った。また、アポトーシスは apical 側と basal 側の両方で誘導された。

(3) 放射線照射と大脳 apical 構造：放射線照射により、apical 構造の影響を、細胞間ジャンクション蛋白 Zo1 抗体ならびに apical 側に局在する中心体の γ チューブリン抗体を用いて検討した。その結果、1Gy 照射では apical が一時的に破壊されるが、24 時間後には回復した。これに対して、2Gy 照射では 24 時間後でも回復が見られなかった。

(4) 放射線照射後の大脳細胞分裂：神経幹細胞の分裂は apical 表面の底部で起こることが知られている。そこで、ヒストン H3 リン酸化抗体を用いて分裂細胞を組織染色した結果、照射後の一時的に低下した分裂細胞は、4 時間後には回復した。興味深いことには、分裂細胞は apical 側と basal 側の両方で観察された。

(5) 照射後の神経幹細胞数：apical 側および basal 側で観測された分裂細胞の由来を確認するために免疫染色した結果、驚いたことに apical 側に由来していた。

(6) 放射線による中心体異常：apical 側には中心体が局在しており、正常な細胞では中心体が 1-2 個に維持されている。3 個以上の中心体数では多極分裂により染色体数の異常が発生する。そこで、放射線照射により中心体が影響を受けるか検討した。ガンマ線照射により細胞内の中心体数の増加が明らかとなった。例えば、1Gy 照射では 3 個以上の中心体数を持つ細胞が約 8% に達した。

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 7 件)

- ① Yanagihara H, Kobayashi J, Tateishi S, Kato A, Matsuura S, Tauchi H, Yamada K, Takezawa J, Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F, Weemaes CM, Mori T, Zou L, Komatsu K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol η -dependent translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 43: 788-797, 2011. 査読有

DOI:10.1016/j.molcel.2011.07.026

- ② Shimada M, Kato A, Habu T, Komatsu K. Genistein, isoflavonoids in soybeans, prevents the formation of excess radiation-induced centrosomes via p21 up-regulation. *Mutat Res.* 716:27-32, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.mrfmmm.2011.07.017

[学会発表] (計 17 件)

- ① Junya Kobayashi, Kyosuke Nakamura, Hiromi Yanagihara, Akihiro Kato, Kenshi Komatsu. Novel Role of NBS1 in Ubiquitination-Mediated Response through RNF20. 14th International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW2012), New Delhi (India), February 11, 2012 (招待講演)
- ② Kenshi Komatsu, Kyosuke Nakamura, Akihiro Kato, Junya Kobayashi, Hiromi Yanagihara, Douglas V.N.P. Oliveira, Mikio Shimada, Satoshi Tashiro, Shinya Matsuura, Toshio Mori, Hiroshi Tauchi, The roles of NBS1 in responses to radiation- and UV-induced DNA damage, The Sugahara Memorial International Symposium, Kyoto, January 25, 2012 (招待講演)
- ③ 小林純也、藤本浩子、林幾江、小松賢志. Nucleolin participates in MDC1-related DNA damage response. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
- ④ Kenshi Komatsu, Kyosuke Nakamura, Akihiro Kato, Junya Kobayashi, Hiromi Yanagihara, Shuichi Sakamoto, Douglas V.N.P. Oliveira, Mikio Shimada, Satoshi Tashiro, Hiroshi Tauchi, H2B Ubiquitination-mediated chromatin remodeling in response to double-stranded DNA breaks in vertebrates 日本分子生物学会、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 15 日 (招待講演)
- ⑤ Kenshi Komatsu, Kyosuke Nakamura, Akihiro Kato, Junya Kobayashi. CONTROL OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION BY RNF20-DEPENDENT H2B UBIQUITINATION, 27th RBC-NIRS International Symposium, Kyoto, Dec 9, 2011 (招待講演)
- ⑥ 小松賢志, NBS1 を中心とした放射線損傷応答の最近の進歩、第 2 回国際放射線

- 神経生物学会、群馬大学、2011年12月3日（招待講演）
- ⑦ 小林純也、奥井理予、Martin Lavin、小松賢志：酸化ストレスによる ATM の活性制御、日本放射線影響学会第 54 回大会、2011 年 11 月 19 日、神戸
- ⑧ 加藤晃弘、小松賢志。MRN 複合体と RAD51 の相互作用 日本放射線影響学会第 54 回大会、11 月 18 日、神戸
- ⑨ 高居邦友、宮澤浩人、小林純也、竹崎達也、秀拓一郎、平山亮一、近藤亨、小松賢志：「グリオーマ幹細胞の DNA 修復能」日本放射線影響学会第 54 回大会、2011 年 11 月 18 日、神戸
- ⑩ Oliveira DV, Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Ikura T, Komatsu K. Facilitates Chromatin Transcription complex, FACT, on DNA repair 第 54 回日本放射線影響学会、2011 年 11 月 18 日、神戸
- ⑪ Akihiro Kato and Kenshi Komatsu. Physical and functional interaction between MRN complex and RAD51. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋
- ⑫ 小林純也、奥井理予、小松賢志：AT 様疾患における酸化ストレスの増加は ATM 依存性 DNA 損傷応答に異常を引き起こす。第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋
- ⑬ Douglas Oliveira, Ikura T, Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Komatsu K; FACT-dependent recruitment of RNF20 during DNA damage repair. EMBO Workshop, Chromosome Structure, Damage & Repair, September 26, 2011, Cape Sounio, Greece.
- ⑭ Junya Kobayashi, Hiroko Fujimoto, Kenshi Komatsu: Nucleolin participates in MDC1-related DNA damage response. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw , Poland , August 30, 2011
- ⑮ Akihiro Kato and Kenshi Komatsu. The link between MRN complex and RAD51. 14th International Congress of Radiation Research Warsaw , Poland , August 30, 2011
- ⑯ Mikio Shimada, J.N.Pulvers, F.Matsuzaki, K. Komatsu. Ionizing radiation induced-microcephaly depends on dissociation of apical

structure during embryonic development of the mouse cerebral cortex. 14th International Congress of Radiation Research Warsaw , Poland , August 29, 2011

- ⑰ 小松賢志. DNA 二重鎖切断におけるクロマチン・リモデリング因子とその制御機構、環境エピゲノミクス研究会第 5 回定例会、大阪府立大学、2011 年 5 月 14 日（招待講演）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 小松賢志. DNA 修復とゲノム不安定性、pp151-160、“がん生物学イラストレイテッド”、渋谷正史、湯浅保仁編集、羊土社、2011.

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都大学放射線生物研究センター・教授

小松 賢志 (KOMATSU KENSHI)

研究者番号：80124577