

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710068

研究課題名(和文) DNA損傷修復異常による遺伝性小頭症発症の分子機構

研究課題名(英文) Molecular pathology of hereditary microcephaly by the dysfunction of DNA repair

研究代表者

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：40452627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：放射線の子宮内被曝は精神遅滞を伴う重度小頭症を誘発することが知られている。しかし、小頭症発症の分子、細胞レベルでの発症機構は不明な点が多い。本研究では、遺伝性小頭症の原因遺伝子としてMRE11A遺伝子を同定して、ATM依存性アポトーシスの亢進が小頭症発症の一因になることを示した。また、セッケル症候群2家系2例が、中心体構成分子pericentrin遺伝子のヌルタイプ変異のコンパウンドヘテロ接合体であることを明らかにした。患者細胞はp53-p21経路が活性化されG1期停止した細胞集団が増加していることを示した。以上のことから、本研究により遺伝性小頭症発症の新たな遺伝的基盤が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Radiation exposure in utero induces severe microcephaly with mental retardation. However, less is known about the molecular and cellular pathology of microcephaly. This study revealed that mutations of the MRE11A gene causes hereditary microcephaly via the aberrant enhancement of ATM-dependent apoptosis. Moreover we demonstrated that the unrelated two patients with Seckel syndrome were compound-heterozygotes of null type mutations of pericentrin gene encoding a centrosome protein, and that G1 phase-arrested population in the patient cells increased by an aberrant activation of p53-p21 pathway. Taken together, these results shed light on the molecular basis of genetic microcephaly.

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：遺伝性小頭症 DNA損傷修復欠損症

## 1. 研究開始当初の背景

高等生物は多様な外的・内的要因によって生じる DNA 損傷を速やかに認識して、DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシスなどの DNA 損傷修復機構を駆使してゲノム上の遺伝情報を安定的に維持している。ヒト遺伝病には DNA 損傷修復機構が先天的に欠損して放射線高感受性を示すナイミーヘン症候群などの一連の遺伝性疾患が知られている。DNA 損傷修復欠損症は高発がん性や免疫不全など幅広い臨床症状を示すが、精神遅滞を伴う重度小頭症を発症する傾向が顕著である。したがって、新規の放射線感受性遺伝病を探索する上で遺伝性小頭症は有効な臨床的指標となり、遺伝性小頭症の原因遺伝子は DNA 損傷修復機構の中核を担う可能性が高いと考えられる。しかし、遺伝性小頭症の原因遺伝子とその生理的機能の多くは未だに不明であるため、新規小頭症原因遺伝子の同定および機能解析は今後の解決すべき重要課題として取り残されている状況である。

## 2. 研究の目的

近年の遺伝性小頭症の研究から DNA 損傷修復シグナルの根幹を担う ATR/ATM シグナル経路が神経発生を支える重要な分子機構であることが示唆されているため、原爆小頭症などの放射線の胎内被曝による小頭症発症機構を「DNA 損傷修復機構の破綻」として捉えることが可能になってきた。そこで、本研究では、遺伝小頭症の原因遺伝子の探索と細胞生物学的解析から原因遺伝子産物の DNA 損傷応答における機能を明らかにすることで、放射線誘発小頭症発症の分子機構の理解を進めることを研究目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA 損傷修復経路分子のウェスタンブロッティング法による原因遺伝子探索

DNA 損傷修復経路のうち ATR 経路 (ATR, Rad1, Rad9, Hus1, TopBP1, Chk1, Claspin, ATRIP, TopBP1, RPA1, Rad17)、ATM 経路 (ATM, NBS1, Mre11, Rad50, Rad51, Rad52, 53BP1, MDC1, Chk2) を構成する遺伝子群および既知の小頭症遺伝子群 (CENP-J, MCPH1, CEP164) が遺伝性小頭症の原因遺伝子として最有力候補と考えられる。これらの候補遺伝子のうち抗体入手が可能な分子についてウェスタンブロット法によるタンパク質発現を解析する。発現低下やバンドシフトなどを認めた場合、該当遺伝子の全エクソンおよびエクソン-イントロン接合部のシーケンシングを行い、変異部位を確定する。

### (2) エクソーム解析による原因遺伝子探索

遺伝性小頭症患者および両親について GeneChip Human Mapping 500K array (Affimetrix 社) を用いて、全ゲノム領域をカバーする高密度 SNP タイピングを行う。この

データをもとにホモ接合領域や染色体上の微小欠損などの異常を網羅的に検索する。次に、患者のゲノム DNA より全エクソンを回収して (SureSelect V2, Agilent 社または SeqCap EZ Human exome v3, Roche Nimblegen 社)、次世代シーケンサー (Genome Analyzer II または HiSeq2000, Illumina 社) を用いて塩基配列を決定する。小頭症の原因変異として、データベースに登録のない新規の variant のうち劣性遺伝様式で現れるものを探索する。

### (3) 患者細胞の DNA 修復能の解析

患者細胞に電離放射線、紫外線やヒドロキシ尿素などの DNA 損傷薬剤を処理して、主要な DNA 損傷修復タンパク質 ( $\gamma$ -H2AX, ATM, NBS1) の核内動態変化を経時的に蛍光免疫染色にて解析する。さらに、患者細胞の放射線感受性についてコロニー形成法にて評価する。次に、DNA 損傷後の G1 期チェックポイント、G2/M 期チェックポイントを免疫染色法とフローサイトメーター (FACS) で解析して、患者細胞の細胞周期制御の異常について評価する。また、活性型 Caspase3 抗体によるウェスタンブロット法および免疫染色により、患者細胞における DNA 損傷後のアポトーシス異常について検討する。

近年、多くの DNA 損傷修復タンパク質が中心体数を制御することが示されているため、中心体マーカー・ $\gamma$ -チューブリン抗体の免疫染色法によって患者細胞の中心体数の異常を解析する。

## 4. 研究成果

所属研究室の松浦伸也教授 (広島大学 原爆放射線医科学研究所) は全国の遺伝医学研究者と連携して日本人遺伝性小頭症の症例収集し患者細胞株の樹立を進めている。本研究終了時まで、15 家系 17 例の収集が行われた。本研究は松浦教授からこれらのサンプルの提供を受けて遂行された。

研究の方法 (1) により、2 家系 2 例の患者に DNA 二重鎖切断を認識する主要分子 MRE11 をコードする *MRE11A* 遺伝子にスプライシング異常を引き起こす変異を同定した。患者 2 例はいずれも *MRE11A* 遺伝子のコンパウンドヘテロ接合体であり、同一のスプライシング変異とそれぞれ異なるヌルタイプ変異を同定した。研究の方法 (3) により小頭症患者由来細胞の細胞機能の解析を行った。本患者 2 例の細胞は、放射線照射後の ATM 活性化とその下流で働く SMC1 と p53 のリン酸化、さらに Caspase-3 の活性化が亢進していた。これまでに *MRE11A* 遺伝子のミスセンスやナンセンス変異は毛細血管拡張性運動失調症様疾患 (ATLD) の原因であることが知られていたが、ATLD 細胞の放射線照射後の ATM 活性化とアポトーシス誘導は著しく低下していた。これらの結果から、本患者は神経発生過程で ATM 依存性アポトーシスが亢進したために、

DNA 損傷を受けた細胞が排除されてしまい、神経前駆細胞数の減少を来して小頭症を発症したと考えられた。一方、ATLD では、ATM 依存性アポトーシスの低下により、DNA 損傷をもつ機能低下した神経細胞が蓄積されてしまい、小頭症ではなく神経変性症を発症したと考えられた。

2家系2例は、既にセッケル症候群/MOPD-II の原因遺伝子として報告された中心体構成分子 *Pericentrin* 遺伝子のヌルタイプ変異のコンパウンド接合体であることを明らかにした。先行研究と同様に(Griffith *et al.*, *Nat genet* 2008)、患者細胞の放射線感受性は健常者細胞と同程度であったが、UV 照射後の分裂期指数の減少(G2/M チェックポイントの活性化)が有意に阻害されており、ATR 経路の障害が示唆された。また、細胞周期マーカーのウエスタンブロッティング解析と FACS 解析から、患者細胞および *Pericentrin* ノックダウン細胞では G1 期集団が有意に増加しており、p53-p21 経路が恒常的に活性化していることが示された。人為的に G1 期を長くしたマウス脳では神経細胞分化が早期に生じることが知られており(Iacopetti *et al.*, *PNAS* 1999)、本患者の神経発生過程では G1 期が長い神経幹細胞が自己増殖よりも神経細胞分化を優先的に行うことで、神経幹細胞の総数が低下して小頭症を発症する可能性が考えられた。

候補遺伝子の探索によって原因遺伝子を同定できなかった症例のうち、6家系8例について研究の方法(2)によりエクソーム解析を行った。両親と患者は4家系(同胞1例)、1家系同胞2例、1家系母親と患者の組み合わせでエクソーム解析を行った。小頭症の発症は劣性遺伝形式を示し極めて稀な疾患であるため、データベースに登録のない新規の variant のうち劣性遺伝様式で現れるものを探索した。ホモあるいはコンパウンドヘテロ接合を示すヌルタイプ変異およびホモ接合を示すミスセンス変異は検出されなかった。コンパウンドヘテロ接合を示すミスセンス変異として、1家系に核膜孔遺伝子、1家系に中心体キナーゼ遺伝子、1家系に細胞外マトリックス修飾酵素遺伝子を見出した。しかし、いずれもアミノ酸置換効果予測ではタンパク質機能に大きな影響を及ぼさないと推定された。残り3家系については条件を満たす variant の抽出には至らなかった。なお、MCPH1, ASPM, CDK5Rap2, STIL, WDR62, CEP152, CENP-J などの既知の小頭症遺伝子53遺伝子について解析したところ、1家系1症例に CENP-J 遺伝子のヌルタイプ変異がヘテロに検出されたが、もう一方のアリルには有望な変異は検出されなかった。エクソーム解析では有望な変異同定に至っていないので、各症例の全ゲノム配列決定を行い遺伝子外領域の変異探索が今後の課題として残された。

##### 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 9 件)

1. Ochiai H\*, Miyamoto T\*, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii K, Yamamoto T, Matsuura S. (\* Equal contribution) TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation of upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有 111 : 1461-1466, (2014), doi: 10.1073/pnas.1317008111.
2. Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S, Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep*, 査読有 3: 3379, (2013), doi: 10.1038/srep03379.
3. Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*, 査読有 18: 315-326, (2013), doi: 10.1111/gtc.12037.
4. Ochiai H, Sakamoto N, Nishikawa M, Suzuki K, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T, Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有 109 : 10915-10920, (2012), doi:10.1073/pnas.

- 1202768109.
5. 宮本達雄、細羽康介、落合博、松浦伸也。ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイント因子 BUBR1 の間期中心体における機能。 *長崎医学会雑誌*、査読なし 87 : 235-238, (2012), <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009523696>
  6. 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絨毛病。 *広島医学*、査読なし 65 : 308-310, (2012), <http://ci.nii.ac.jp/naid/40019319233>
  7. Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, Borovina 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*, 査読有り 20(10):2058-2070, (2011), doi:10.1093/hmg/ddr090.
  8. Matsumoto Y, Miyamoto T, Sakamoto H, Izumi H, Nakazawa Y, Ogi T, Tahara H, Oku S, Hiramoto A, Shiiki T, Fujisawa Y, Ohashi H, Matsuura S. Two unrelated patients with *MRE11A* mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. *DNA Repair (Amst)*, 査読有り 10(3):314-321, (2011), doi:10.1016/j.dnarep.2010.12.002.
  9. Miyamoto T, Furuse M, Furutani-Seiki M. (# Correspondence) *In Vivo* Imaging of Tight Junctions Using Claudin-EGFP transgenic Medaka. *Methods Mol Biol*, 査読有り 10(3):314-321, (2011), doi:10.1007/978-1-61779-185-7\_12.

[学会発表] (計 31 件)

1. Royba E, Akutsu SN, Miyamoto T,

- Matsuura S. Individual difference of radiosensitivity detected by cytokinesis-blocked micronucleus assay. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Phoenix Leader Education Program, 2014年2月15-16日, 広島
2. Miyamoto T, Ochiai H, Royba E, Matsuura S. Functional evaluation of single nucleotide polymorphisms linked to radiosensitivity using genome editing technology. The 4<sup>th</sup> International Symposium of RIRBM, Hiroshima University, 2014年2月13-14日, 広島
  3. 宮本達雄、細羽康介、落合博、佐久間哲史、山本卓、松浦伸也。 分裂期キネシン KIF2A を介した細胞増殖に共役した絨毛退縮機構。第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸
  4. Miyamoto T, Ochiai H, Kanai A, Hosoba K, Kume S, Sakuma T, Yamamoto T, Matsuura S. Identification of an extragenic mutation for PCS(MVA) syndrome and functional analysis using artificial nucleases. ASHG 63<sup>rd</sup> annual meeting, 22-26 Oct, 2013, Boston U. S. A.
  5. 宮本達雄、落合博、金井昭教、久米悟士、佐久間哲史、山本卓、松浦伸也。人工ヌクレアーゼを用いたヒト培養細胞での一塩基編集：放射線感受性 SNP の評価系構築への試み。日本放射線影響学会第56回大会, 2013年10月18-20日, 青森
  6. 松浦伸也、落合博、宮本達雄、金井昭教、細羽康介、久米悟士、佐久間哲史、野地澄晴、山本卓。Identification of an extragenic mutation for PCS(MVA) syndrome and functional analysis using artificial nucleases. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜
  7. 宮本達雄、細羽康介、落合博、佐久間哲史、山本卓、松浦伸也。The PLK1-KIF2A

- pathway in the context of growth signal dependent primary cilia disassembly. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜
8. 宮本達雄、落合博、久米悟士、佐久間哲史、山本卓、松浦伸也. ヒト培養細胞における一塩基編集技術: 放射線感受性 SNP の定量的評価系確立への試み. 第 38 回中国地区放射線影響研究会, 2013 年 7 月 26 日, 広島
  9. Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Sakuma T, Yamamoto T, Matsuura S. Ciliary disassembly by the enhanced PLK1-KIF2A pathway in a spindle assembly checkpoint-deficiency syndrome. The 25<sup>th</sup> CDB meeting, 2013 年 6 月 17-18 日, 神戸
  10. 宮本達雄、細羽康介、落合博、松浦伸也. 細胞増殖に連動した分裂期キネシン KIF2A による繊毛退縮機構. 第 54 回原子爆弾後障害研究会, 2013 年 6 月 2 日, 広島
  11. Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Yamamoto T, Matsuura S. Artificial nuclease-based targeted DSB introduction and its application. The 3<sup>th</sup> International Symposium of RIRBM, Hiroshima University, 2013 年 2 月 12-13 日, 広島
  12. Hosoba K, Miyamoto T, Ochiai H, Matsuura S. KIF2A phosphorylation by PLK1 regulates primary cilia disassembly. The 2nd International Symposium of Phoenix Leader Education Program, 2013 年 2 月 10-11 日, 広島
  13. 宮本達雄、細羽康介、落合博、松浦伸也. ヒト分裂期チェックポイント欠損症における繊毛形成異常. 2013 年 生体運動合同班会議, 2013 年 1 月 13-14 日, 東広島
  14. 宮本達雄、細羽康介、落合博、松浦伸也. 紡錘体形成チェックポイント欠損症における分裂期キナーゼ PLK1 による一次繊毛抑制機構. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡
  15. 落合博、宮本達雄、金井昭教、細羽康介、佐久間哲史、野地澄晴、山本卓、松浦伸也. 人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子間領域に存在する一塩基変異導入によるヒト疾患モデル細胞の樹立. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡
  16. 落合博、宮本達雄、細羽康介、佐久間哲史、山本卓、松浦伸也. 人工ヌクレアーゼを利用した一塩基置換の導入. 第 2 回ゲノム編集会, 2012 年 9 月 20 日, 岡崎
  17. 佐久間哲史、落合博、細井紗弥佳、宮本達雄、坂本尚昭、松浦伸也、山本卓. 人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集研究の現状. 第 2 回ゲノム編集会, 2012 年 9 月 20 日, 岡崎
  18. 落合博、宮本達雄、細羽康介、佐久間哲史、野地澄晴、山本卓、松浦伸也. 人工ヌクレアーゼ TALEN を利用した DSB 導入とその応用. 日本放射線影響学会 第 55 回大会, 2012 年 9 月 6-8 日, 仙台
  19. 宮本達雄、細羽康介、落合博、松浦伸也. 分裂期キネシンを標的とした単極性紡錘体形成の誘導法の探索. 日本放射線影響学会 第 55 回大会, 2012 年 9 月 6-8 日, 仙台
  20. 宮本達雄、細羽康介、落合博、松浦伸也. ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイント因子 BUBR1 の間期中心体における機能. 第 53 回原子爆弾後障害研究会, 2012 年 6 月 3 日, 長崎
  21. 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 回ゲノム編集会, 2012 年 2 月 28-29

- 日, 東広島
22. 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の効率的作成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回ゲノム編集会, 2012年2月28-29日, 東広島
23. 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, 2012年2月20-21日, 広島
24. Sakuma T, Hosoi S, Ochiai H, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S, Yamamoto T. Targeted genome editing using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). International Symposium 50<sup>th</sup> anniversary of RIRBM, Hiroshima University, 2012年2月20-21日, 広島
25. Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, 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, 2011年12月13-16日, 神戸
26. Ochiai H, Fujita 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 embryos. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, 神戸
27. 宮本達雄、Porazinski S、Wang H、清水厚志、梶井正、菊池章、古谷-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. 日本放射線影響学会第54回大会, 2011年11月17-19日, 神戸
28. 宮本達雄、古谷-清木誠、松浦伸也. 繊毛病としての染色分体早期解離 (PCS) 症候群. 第56回日本人類遺伝学会, 2011年11月9-12日, 千葉
29. 宮本達雄、菊池章、古谷-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, 2011年10月3-5日, 名古屋
30. 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」2011年7月11-12日, 岡崎
31. 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, 2011年6月5日, 広島
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/to-kushu/detail/234>  
[http://www.hiroshima-u.ac.jp/top/koho\\_press/press/h2301-12/p\\_m18fuk.html](http://www.hiroshima-u.ac.jp/top/koho_press/press/h2301-12/p_m18fuk.html)  
[http://www.hiroshima-u.ac.jp/top/koho\\_press/press/h2501-12/p\\_t2c07r.html](http://www.hiroshima-u.ac.jp/top/koho_press/press/h2501-12/p_t2c07r.html)
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
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: 40452627