

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19042

研究課題名（和文）網羅的転座染色体の解析によるPATRRの核内配置と転座染色体生成との関係

研究課題名（英文）Spatial proximity of PATRRs and their translocation frequencies

研究代表者

加藤 武馬 (KATO, TAKEMA)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：20387690

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：健常人精子由来のDNAを鋳型にして、Genome Walking法やハイブリダイゼーション用のオリゴを用いた方法により、未知のPATRRやPATRRを介した染色体転座の検出と同時に、PATRRを介した染色体転座を網羅的に検出する系の確立を目指した。しかし、これらの方法ではPATRRを介した染色体転座を高感度、かつ網羅的に検出するには至らなかった。また並行して、個々の細胞を解析する手法として、全ゲノム増幅と次世代シーケンサーによる染色体解析を組み合わせ、1細胞レベルでの網羅的な染色体解析の実験系を確立した。この実験法を確立したことにより、個々の精子の核型の解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of the PATRR-mediated translocation, I attempted to establish comprehensive PATRR-mediated translocations detection system using normal male sperm DNA as a template. Genome walking methods and hybridization capture for PATRR sequence enrichment system were used to identify unknown PATRRs and PATRR-mediated translocations. However these methods are limited to minimize nonspecific sequences. Therefore, I could not established the high sensitivity detection system of unknown PATRRs and translocations using these methods. Comprehensive PATRR and PATRR-mediated translocation detection system remains a future subject. I also attempted to establish single cell comprehensive chromosome analysis system using whole genome amplification and low coverage whole genome sequence by next generation sequencing. This system enable to analyze chromosome copy number alterations of individual germ cells. This result might lead to a chromosome copy number analysis in the future.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：PATRR 染色体転座

### 1. 研究開始当初の背景

パリンドローム配列などの繰り返し配列がゲノム不安定性を誘発することが知られており、t(11;22)(q23;q11)をはじめとして、パリンドローム配列を介した染色体転座が数多く報告されている。パリンドローム配列を介した染色体転座の両染色体の転座切断点には、Palindromic AT-rich repeats (PATRRs)と呼ばれる AT 含量の高い数百塩基対のパリンドローム配列が存在し、この繰り返し配列が染色体転座を誘発すると考えられている。t(11;22)(q23;q11)転座が高頻度に見つかるのは、高頻度に転座が *de novo* に発生することに起因する。実際に、健常男子由来の精子 DNA で、転座産物を特異的に増幅する PCR 法を用いて新生転座を高感度に検出することに成功している。さらに近年、t(11;22)以外の PATRR を介した染色体転座においても、同様の PCR 法を応用することで検出に成功している。PATRR を介した染色体転座のほとんどが 22 番染色体の PATRR を介しており、パートナー染色体の切断点にはサイズや配列は異なるが、同様の特徴を持つ類似の PATRR 配列が同定されており、PATRR の関与する染色体転座は PATRR 同士で特異的に切断・再結合する特殊な転座発生メカニズムにより発生していることが予想される。しかし PATRR を介した染色体転座は、ヒトゲノム中からどのように PATRR 配列を認識し、出会い、そして再結合し転座染色体を生成するのか、その発生機序は依然として不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、PATRR を介した染色体転座の発生機序に関して、30 億塩基対ものヒトゲノム中からどのように互いの PATRR 配列を認識し、出会い、そして再結合し転座染色体を生成するのか、PATRR 特異的な染色体転座の発生機序の全貌を解明するために、1. PATRR を介した染色体転座を網羅的に検出する。2. 各 PATRR の核内局在の距離を測定する。1, 2 の実験から転座発生時における各 PATRR 間の相対距離と転座発生頻度の相関関係を示し、転座発生時の染色体ダイナミクスを解明し、PATRR を介した染色体転座の発生機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、PATRR を介した染色体転座が、健常人の精子中に新生転座として数多く含まれており、転座特異 PCR によって高感度に検出できるという特徴を利用して、(1). ヒト精子ゲノム DNA を材料に、PATRR 特異的なプライマーと ambiguous なプライマーを組み合わせた PCR により、ゲノムウォーキング法を応用した網羅的に染色体転座を検出する方法を確立し、未知の PATRR や染色体転座の有無を明らかにする。

(2). PATRR を介した新生転座の発生が、精子細胞中における各 PATRR の核内相対距離に相関して発生しているのか、各 PATRR の核内局在の相対距離を Chromosome conformation capture 法や、網羅的に解析する Enrichment of Ligation Product 法で測定する。

(3). 1,2 の実験結果から、各 PATRR を介した染色体転座の発生頻度と核内相対距離の相関関係の有無を調べ、PATRR を介した染色体転座の発生機序を明らかにする。

### 4. 研究成果

健常人精子由来の DNA を鋳型にして、PATRR 特異的なプライマーと ambiguous なプライマーを組み合わせた PCR やハイブリダイゼーション用のオリゴを用いた方法により、PATRR を介した染色体転座を網羅的に検出する系の確立を目指した。しかしながら PCR 法では非特異的な産物が多数検出され、目的の新生転座を検出するに至らなかった。またハイブリダイゼーションによる濃縮法では、わずか 1 分子の新生転座を効率的にキャプチャーすることができず、ハイブリダイゼーションされた DNA には、非特異的な AT 含量の高い配列が濃縮されていた。したがって、これらの方法では PATRR を介した染色体転座を高感度、かつ網羅的に検出するには至らなかった。また並行して *de novo* の染色体異常を網羅的に検出するためには、1 細胞レベルでの染色体解析法の確立が必要であるため、複数の全ゲノム増幅法とアレイ CGH や次世代シーケンサーなどの染色体解析ツールを組み合わせ、1 細胞レベルでの染色体解析の実験系を確立した。この実験法を確立したことにより、個々の精子の核型の解析が可能となった。

### 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 8 件)

1: Miyazaki J, Nishizawa H, Kambayashi A, Ito M, Noda Y, Terasawa S, Kato T, Miyamura H, Shiogama K, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Increased levels of soluble corin in pre-eclampsia and fetal growth restriction. Placenta. 2016 Dec;48:20-25. 査読有

2: Akiyama T, Shibata T, Yoshinaga H, Kuhara T, Nakajima Y, Kato T, Maeda Y, Ohse M, Oka M, Kageyama M, Kobayashi K. A Japanese case of  $\beta$ -ureidopropionase deficiency with dysmorphic features. Brain Dev. 2017 Jan;39(1):58-61. 査読有

3: Inagaki H, Kato T, Tsutsumi M, Ouchi Y, Ohye T, Kurahashi H. Palindrome-Mediated Translocations in Humans: A New Mechanistic Model for Gross Chromosomal Rearrangements.

Front Genet. 2016 Jul 12;7:125. 査読無  
4: Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0141739.

5: Miyazaki J, Ito M, Nishizawa H, Kato T, Minami Y, Inagaki H, Ohye T, Miyata M, Boda H, Kiriyama Y, Kuroda M, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Intragenic duplication in the PKHD1 gene in autosomal recessive polycystic kidney disease. BMC Med Genet. 2015 Oct 26;16:98. 査読有

6: Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. PLoS One. 2015 Sep 30;10(9):e0139381. 査読有

7: Kurahashi H, Kato T, Miyazaki J, Nishizawa H, Nishio E, Furukawa H, Miyamura H, Ito M, Endo T, Ouchi Y, Inagaki H, Fujii T. Preimplantation genetic diagnosis/screening by comprehensive molecular testing. Reprod Med Biol, Review, 2015. 査読無

8: Tsuge I, Morishita M, Kato T, Tsutsumi M, Inagaki H, Mori Y, Yamasaki K, Inuo C, Ieda K, Ohye T, Hayakawa A, Kurahashi, H. Identification of novel FATP4 mutations in a Japanese patient with ichthyosis prematurity syndrome. Human Genome Variation, 2. 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1: Takema Kato, Yuya Ouchi, Hidehito Inagaki, Yoshio Makita, Seiji Mizuno, Hiroki Kurahashi. Mechanistic analysis and prediction of Interchromosomal Insertional Translocation. The American Society of Human Genetics Annual Meeting. 2016 年 10 月 19-22 日. Vancouver  
2: Takema Kato, Yuya Ouchi, Hidehito Inagaki, Yoshio Makita, Seiji Mizuno, Hiroki Kurahashi. Mechanisms of Interchromosomal Insertional Translocation. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016 年 4 月 3-7 日. 京都市、京都国際会館

3: 加藤武馬、大内雄矢、稲垣秀人、蒔田芳男、水野誠司、倉橋浩樹。染色体挿入の発生機序。BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)。2015 年 12 月 1-4 日。神戸ポートアイランド

4: 加藤武馬、大内雄矢、稲垣秀人、蒔田芳男、水野誠司、倉橋浩樹。染色体挿入の発生機序。日本人類遺伝学会 第 60 回大会。2015 年 10 月 14-17 日。京王プラザホテル

5: 加藤武馬、大内雄矢、稲垣秀人、倉橋浩樹。染色体挿入の発生機序。新学術ゲノム支援拡大班会議。2015 年 8 月 27-28 日。京都国際会館

6: 加藤武馬、Divya Mishra、稲垣秀人、池田真理子、森貞直哉、飯島一誠、城戸康宏、坂爪悟、古庄知己、涌井敬子、福嶋義光、倉橋浩樹。t(8;22)(q24.1;q11.2)の 2 家系。第 55 回日本先天異常学会学術集会・第 38 回日本小児遺伝学会学術集会。2015 年 7 月 25-27 日。パシフィコ横浜会議センター

7: Takema Kato, Hidehito Inagaki, Divya Mishra, Yuya Ouchi, Makiko Tsutsumi, Tamae Ohye, Hiroki Kurahashi. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24;q11) translocation. 第 11 回国際ゲノム会議。2015 年 5 月 20-22 日。一橋講堂

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 胎児成分の検出方法  
発明者: 倉橋浩樹、加藤武馬、大内雄矢、上林あす香、柴田沙季、野田佳照、西澤春紀、藤井多久磨  
権利者: 藤田保健衛生大学  
種類:  
番号: 2017-082459  
出願年月日: 2017 年 04 月 9 日  
国内外の別: 国内

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  
加藤 武馬 (KATO, Takema)  
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教  
研究者番号: 20387690

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )