

平成21年 4月21日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390097

研究課題名（和文） DNA 高次構造と染色体ダイナミクス

研究課題名（英文） DNA secondary structure drives chromosomal dynamics

研究代表者

倉橋 浩樹 (KURAHASHI HIROKI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：30243215

研究成果の概要：

t(11;22)転座は、現在知られている唯一の反復性の生殖細胞系列染色体転座である。転座保因者は無症状だが、無精子症、反復性流産、子の染色体不均衡による先天異常など、再生産に問題が生じる。本研究では、2つの転座切断点をそれぞれベクターに組み込み、細胞株に導入すると転座反応が起きる、という転座のモデル系を確立した。この転座反応は切断点の配列が特殊な立体構造をとったときのみ発生し、この DNA の立体構造の異常により DNA が不安定になることが、繰り返し起こる染色体転座の原因であることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000 |
| 2008年度 | 6,900,000 | 2,070,000 | 8,970,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：染色体転座、切断点、回文配列、パリンドローム、十字架型 DNA、非 B 型 DNA、染色体再構成、染色体構造異常

1. 研究開始当初の背景

ヒト染色体転座 t(11;22)(q23;q11)は、現在までに知られている中で、唯一の反復性非ロバートソン転座である。本研究代表者は t(11;22)転座の 11 番、22 番両染色体の切断点には palindromic AT rich repeat (PATRR) と呼ばれる AT 含量の多い回文配列が存在することを報告し、それが生理的な条件で「十字架型」DNA の立体構造をとるためゲノムが不安定になることが本染色体転座の原因であることを提唱している。また、代表者は、

転座特異的 PCR を用いた実験によって、ヒト精子においてのみ新生 t(11;22)が高頻度に存在することを報告した。

2. 研究の目的

(1) 本染色体転座がなぜ繰り返し発生するのか、(2) 本染色体転座がなぜ精子のみで発生するのか、の 2 つは、この分野で未解決の大きな命題である。本研究は、モデルシステムを用いて、この 2 つの命題の答えを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト細胞株を用いた t(11;22)転座のモデル系を構築した。11番、22番両染色体の切断点にある PATRR をそれぞれ別のプラスミドに組み込み、細胞内で転座様反応がおこると GFP レポーター遺伝子が発現するように設計した。そして、(1) 転座特異的 PCR、(2) GFP レポーター遺伝子の発現細胞の FACS 解析により転座反応をモニターした。

4. 研究成果

PATRR を持つ2つのプラスミドをヒト細胞株に同時に導入すると、ヒト t(11;22)転座と同様の切断点の性質を持つ組換え反応がおこることを、転座特異的 PCR と GFP レポーターの発現により証明した。これらのプラスミドの「十字架型」「非十字架型」の立体異性体を作成して種々の比率で混合した上で細胞に導入し転座様反応を定量すると、転座様反応が「十字架型」DNA の率と相関したことから、PATRR による転座が「十字架型」DNA を介していることを証明した。また、この細胞株のゲノムに存在する内因性の PATRR 同士は転座反応をおこさないことから、t(11;22)転座の精子特異性は「十字架型」DNA の存在に依存することがわかった。そして、siRNA の同時導入により、この転座様反応が Artemis ヌクレアーゼによるヘアピン先端の切断反応が必須であることを証明し、十字架型 DNA から転座反応に至る分子メカニズムを示した。

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 16 件)

- ①Kato, T., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Yamada, K., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2008). Two different forms of palindrome resolution in the human genome: deletion or translocation. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1184-1191. 査読有り
- ②Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Suzuki, M., Kato, T., Kogo, H., Sekiya, T., Kurahashi, H., Udagawa, Y. (2008). Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A2 in the serum of pre-eclamptic patients. *Mol. Hum. Reprod.*, 14, 595-602. 査読有り
- ③Kurahashi, H., Inagaki, H., Hosoba, E., Kato, T., Ohye, T., Kogo, H., Emanuel, B.S. (2007). Molecular cloning of a translocation hotspot in 22q11. *Genome Res.*, 17, 461-469. 査読有り
- ④Kano, H., Kurahashi, H., Toda, T. (2007). Genetically regulated epigenetic transcriptional activation of retrotransposon insertion confers

mouse dactylaplasia phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 19034-19039. 査読有り

- ⑤Kato, T., Yamada, K., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2007). Age has no effect on *de novo* constitutional t(11;22) translocation frequency in sperm. *Fertil. Steril.*, 88, 1446-1448. 査読有り
 - ⑥Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kato, T., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2007). Cruciform extrusion propensity of human translocation-mediating palindromic AT-rich repeats. *Nucleic Acids Res.*, 35, 1198-1208. 査読有り
 - ⑦Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., Marunouchi, T. (2007) CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol. Reprod.*, 76, 130-141. 査読有り
- 他、9件

[学会発表] (計 8 件)

- ①Kurahashi, H. (2008). Chromosomal instability mediated by non-B DNA: Cruciform conformation and not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. FASEB Summer Research Conferences. DNA Palindromes: Roles, consequences and implications of structurally ambivalent DNA. Saxtons River, USA, July, 6-11.
- ②Kurahashi, H., Bolor, H., Mori, T., Nishiyama, S., Inagaki, H., Kogo, H., Tsutsumi, M., Ohye, T. (2008). Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. 58th annual meeting of American Society of Human Genetics, Philadelphia, USA, November, 11-15.
- ③Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, H., Kato, T., Tong, M., Tsutsumi, M., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2008). Artemis cleaves cruciform-forming palindromic DNA leading to recurrent translocation in humans. 58th annual meeting of American Society of Human Genetics, Philadelphia, USA, November, 11-15.
- ④Kato, T., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Yamada, K., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2008). Possible post-meiotic origin of the constitutional t(11;22). European Human Genetics Conference, Barcelona, Spain, May 31-June 3.
- ⑤Kato, T., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Yamada, K., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2007). DNA secondary structure-forming propensity dictates translocation frequency. European Human Genetics Conference 2007, Nice, France, June, 16-19.
- ⑥Kato, T., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Tong, M., Emanuel, B.S., Kurahashi, H. (2007). Possible post-meiotic origin of the constitutional t(11;22). 57th Annual Meeting of American

Society of Human Genetics, San Diego, USA,
October, 23-28.
他、2件

〔その他〕

報道関連情報

中日新聞掲載 2008 年 12 月 25 日

NHK テレビ 2008 年 12 月 25 日

NHK ラジオ 2008 年 12 月 25 日

朝日新聞掲載 2009 年 1 月 9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 浩樹 (KURAHASHI HIROKI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：30243215

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし