

平成 21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590322

研究課題名 (和文) 22q11 欠失の断端に存在する non-B 型 DNA 構造

研究課題名 (英文) Non-B form DNA structure at the region of 22q11 deletion

研究代表者

大江 瑞恵 (OHYE TAMAE)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10247661

研究成果の概要:生命の遺伝情報を含んでいる染色体は、その数の変化や構造の変化によって、疾患の原因となることがある。染色体の中間部の微細な欠失により発症する疾患がいくつか知られているが、その発生機構は解明されていない。本研究では、22番染色体上に存在する特定の DNA 配列がその欠失を引き起こす原因となるかどうかを、モデル生物である酵母を用いて調べた。その結果、ある配列は染色体欠失を誘導することが明らかとなった。さらにこの欠失は、DNA 複製の過程で発生することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：染色体欠失 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

染色体異常を1コピーレベルで検出できるアレイ CGH の急速な普及に伴い、原因不明であった疾患のゲノム構造異常が近年次々と報告され、微細な染色体欠失が及ぼす表現型への影響が明らかにされつつある。そのうち、染色体の 22q11 の欠失によって発症する 22q11 欠失症候群は、最も頻度の高い染色体構造異常症のひとつである。以前に私達の所属する研究室では、欠失領域に長さ数百 kb の 22q11 特異的重複配列 (Low copy

repeat;LCR) が複数箇所あることを発見し、22q11 欠失の断端がこの重複配列内に存在することを明らかにした。そしてこの欠失は、これら重複配列間の不均衡交差やループアウトによって起こることを提唱した。すなわち、22q11 欠失の多くは減数分裂の相同組換え時の、LCR 間での不均衡交差に起因すると考えられた。しかし詳細なメカニズムは解っていなかった。このようなメカニズムで発生する疾患群「genomic disorder」には、Charcot-Marie-Tooth 病、Williams 症候群、

神経線維腫症(Neurofibromatosis 1;NF1)あるいはSotos症候群などの多くの疾患が含まれ、各方面からの研究が進められている。

一方、DNAの高次構造に起因する染色体の再構成という概念が近年注目され始めている。私達の研究室では、反復性の生殖細胞系列の染色体転座であるt(11;22)(q23;q11)の切断点のクローン化に成功し、その切断点に palindromic AT rich repeat (PATRR)と呼ばれるAT含量の高い回文配列が存在することを報告した。*in vitro*の実験では、回文配列DNAは、通常の二重らせんではない「十字架型構造」を形成しうる。そこで私達は、PATRRが細胞の核内のような生理的条件下でも「十字架型構造」を形成することで、ゲノムの不安定性、すなわち本染色体転座を誘発する、という仮説を提唱し、その研究を進めている。

2. 研究の目的

LCRを介した染色体欠失は、減数分裂の相同組換えのエラーで起こると考えられている。相同組換えは通常、プログラムされたランダムな二重鎖切断(DSB)からはじまる。しかし、私達は、LCR内の一部の配列が特殊な高次構造をとるためにDSBが高頻度に誘発されるのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、22q11欠失症候群の分子遺伝学的解析を行うことにより、この仮説を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 22q11のLCR内にある、27塩基の約40回の繰り返し配列(VNTR)、1.7kbのAT含量の高い繰り返し配列を複数個含む領域(AT-rich-repeat:ATRR)、およびGGT遺伝子の配列を候補配列とした。DNA配列がプラスミド内で高次構造を形成すると、超らせんが弛緩し、電気泳動の移動度が遅れる。そのことを利用して、候補配列の高次構造の形成度を検討した。

(2) 前述の候補配列を、2つのタンデムに並んだ相同配列の片側に挿入し、さらにその相同配列間に栄養マーカー遺伝子を配置した酵母モデルを作製した。そして選択培地により欠失頻度を測定した。

(3) 欠失発生のメカニズムを調べるために、*POL1*遺伝子のプロモーター部分を誘導型に改変した酵母モデルを作製した。

4. 研究成果

(1) 候補配列を導入したプラスミドDNAによる電気泳動では、VNTRやGGTを含んだプラスミドでは、通常予測されるサイズのバンドのみが検出され、シフトがみられなかった。一方、ATRRではバンドは通常より

も移動度が遅れるバンドも観察されたことから、高次構造を形成していることが示された。したがってこのATRRはゲノムの不安定性に関与しうることが推測された。

(2) 次に、候補配列と2つの相同配列をもつ酵母モデルを作製して、相同配列間の*in vivo*での欠失頻度を測定した。対照として、同様なLCR間での欠失でおこる疾患のNF1やSotos症候群で明らかにされている組換えのホットスポットの配列を用いた酵母モデルの頻度と比較した。その結果、これらの疾患のホットスポット配列に比べて、VNTR,GGTは欠失頻度に差がみられなかった。しかし、ATRRでは欠失頻度の増加が認められた。したがって、ATRR配列は酵母染色体上でも、相同配列間での欠失を誘発することが示された。

(3) さらに、欠失のメカニズムを調べるために、DNAポリメラーゼの遺伝子である*POL1*のプロモーター領域をガラクトースあるいは銅による誘導系にし、その発現量の制御をおこなって欠失頻度を測定した。GGT配列では*POL1*の発現量を低下させても欠失頻度は変化しなかったが、ATRRでは有意に増加した。

以上の3つの実験の結果より、22q11のLCR内に存在するATRRは、DNA複製が遅滞することで相同組換えを誘発し、染色体欠失を引き起こすことが示唆された。

non-B型DNAと呼ばれる特殊な高次構造DNAには、「Z-DNA」、「三重鎖DNA」、そして「十字架型DNA」などが知られている。しかし、高次構造を形成しうる配列に関して、染色体転座に関係していること以外に、染色体異常症に関与しているかどうか未解明であった。今回の研究成果は、染色体異常症の発生機構の解明に、高次構造DNAという新しい着眼点を与えるものとなる。

本研究の成果の一部は、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会で発表した。

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. Inagaki H. Ohye T. (他 7人、9番目) Chromosomal instability mediated by non-B DNA: cruciform conformation and DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. Genome Research 査読有 2009 19 191-198
2. Bolor H. Mori T. (他 16人、8番目と18番目) Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. The

- American Journal of Human Genetics 査読有 2008 84 14-20
3. Kato T. Inagaki H. (他 5 人 4 番目と 7 番目) Two different forms of palindrome resolution in the human genome: deletion or translocation. Human Molecular Genetics 査読有 2008 17 1184-1191
 4. 大江瑞恵 倉橋浩樹 染色体構造異常の発生メカニズム 藤田学園医学会誌 査読無 2007 31 89-97
 5. Kurahashi H. Inagaki H. (他 5 人 5 番目) Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. Genome Research 査読有 17 2007 461-469
 6. Kogo H. Inagaki H. (他 4 人 3 番目、5 番目) Cruciform extrusion propensity of human translocation-mediating palindromic AT-rich repeats. Nucleic Acids Research 査読有 2007 35 1198-1208
 7. Kato T. Yamada K. (他 5 人 5 番目、7 番目) Age has no effect on de novo constitutional t(11;22) translocation frequency in sperm. Fertility and Sterility 査読有 2007 88 1446-1448

[学会発表] (計 16 件)

1. 大江瑞恵 Parental origin of de novo t(11;22)(q23;q11). 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 12 日 神戸
2. 稲垣秀人 Artemis は十字架型のパリンδροーム構造を切断し染色体転座を誘発する. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 11 日 神戸
3. Tong M. Detection of cruciform DNA structure in human spermatogenic cells. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 11 日 神戸
4. 加藤武馬 パリンδροーム配列で起こるゲノム再編成のメカニズム. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 11 日 神戸
5. Bolor H SYCP3 遺伝子変異による習慣性流産. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 11 日 神戸
6. Inagaki H. Artemis cleaves cruciform-forming palindromic DNA leading to recurrent translocation in humans. 58th Annual meeting of The American Society of Human Genetics. 2008 November 13, Philadelphia, USA
7. 大江瑞恵 Parental origin of de novo t(11;22)(q23;q11). 日本人類遺伝学会第 53 大会 2008 年 9 月 30 日 横浜
8. 加藤武馬 Post-meiotic origin of the constitutional t(11;22). 日本人類遺伝学会第 53 大会 2008 年 9 月 30 日 横浜
9. Kato T. Possible post-meiotic origin of the constitutional t(11;22). 2008 Barcelona, Spain, June, 1
10. 大江瑞恵 2 本鎖 DNA 切断を誘発するヒトのパリンδροーム配列. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月 13 日 横浜
11. 稲垣秀人 Non-B 型 DNA によって起こる精子細胞特異的な染色体転座. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月 15 日、横浜
12. Tong M. The genotype of PATRR affects the t(11;22) translocation frequency. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月 13 日 横浜
13. 加藤武馬 Possible post-meiotic origin of the constitutional. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月 13 日 横浜
14. 稲垣秀人 DNA の非 B 型高次構造が引き起こす染色体転座. 第 39 回藤田学園医学会 2007 年 10 月 4 日 豊明
15. Kato T. Possible post-meiotic origin of the constitutional t(11;22). 57th Annual meeting of The American Society of Human Genetics 2007 San Diego, USA, October, 25.
16. 加藤武馬 染色体転座の発生頻度と年齢の影響. 日本人類遺伝学会第 52 大会 2007 年 9 月 30 日 東京
17. Kato T. DNA secondary structure-forming propensity dictates translocation frequency. European Human Genetics Conference. 2007 Nice, France, June, 16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大江 瑞恵 (OHYE TAMAE)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所
・助教
研究者番号: 10247661

(2) 研究分担者

倉橋 浩樹 (HIROKI KURAHASHI) (平成
19 年度)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所
・教授
研究者番号: 30243215

(3) 連携研究者

倉橋 浩樹 (HIROKI KURAHASHI) (平成
20 年度)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所
・教授
研究者番号：30243215