

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月24日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390101

研究課題名（和文） 父親に特異的に由来する染色体構造異常発生メカニズム

研究課題名（英文） Sperm-specific mechanism that induces the gross chromosomal rearrangements

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（和文）：

t(11;22)転座は、頻度の高い反復性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、産科的問題が生じる。研究代表者たちは、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。この実験系を利用して、転座反応が、2段階のDNA切断反応を介して進行すること、すなわち、（1）十字架型DNAの根本をホリデイ構造切断酵素であるGEN1が対角線の向きに切断し、（2）その結果としてできたヘアピン末端をARTEMISが開裂すること、そして両断端が非相同末端結合によって修復されることが、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。

研究成果の概要（英文）：

Gross chromosomal rearrangements (GCRs) are often generated by illegitimate repair between two DNA breakages at regions with nucleotide sequences that potentially adopt a non-B DNA structure. We previously established a plasmid-based model system that recapitulates palindrome-mediated recurrent translocations in humans, and demonstrated that cruciform DNA is required for the rearrangements. In this study, we show that two sequential reactions that cleave the cruciform structures induce the translocation: GEN1-mediated resolution that cleaves diagonally at the four-way junction of the cruciform, and Artemis-mediated opening of the subsequently formed hairpin ends. These two intrinsic pathways that normally fulfill vital functions independently, Holliday junction resolution in homologous recombination and coding joint formation in rearrangement of antigen-receptor genes, act upon the unusual DNA conformation in concert and lead to these recurrent GCRs in humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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δρο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の、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、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ている。

代表者は、最近の研究で、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、本転座のモデル系を構築した。また、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。

2. 研究の目的

本染色体転座がどのような経路で発生するのかを明らかにすることで、なぜ本染色体転座が精子のみで発生するのかを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト細胞株を用いた t(11;22)転座のモデル系を利用する。本実験系では 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、細胞に導入し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、(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。

本実験系において発生する転座産物の切断点と結合部位の塩基配列を詳細に検討することで、転座に至る経路を推測する。そして予想される経路に関わる種々の DNA 修復因子の siRNA によるノックダウンをおこない、転座反応の中間産物の増減をモニターすることで、転座産物の生成に至る酵素反応などの生物学的経路を同定する。

4. 研究成果

t(11;22)転座のモデル系に導入した PATRR は、前半部と後半部とを塩基多型によって区

別することが可能である。モデル系の転座産物では、前半部と後半部との入れ替わりが高頻度に見られた。これは、PATRR が十字架型 DNA の構造をとったあとに対角線方向に切断された結果できたヘテロ 2 本鎖がミスマッチ修復された、と予想される。実際、ミスマッチ修復因子をノックダウンするとこの入れ替わりはみられなくなる。非変性、変性条件下で泳動したサザンブロット法で中間産物を解析すると、第 1 段階の切断はやはり十字架型 DNA の対角線方向の切断であることが示された。十字架型 DNA は相同組換えの中間産物であるホリデイ構造と酷似し、ホリデイ構造切断酵素による切断が疑われるが、実際、ホリデイ構造切断酵素のひとつである GEN1 のノックダウンにより、転座様反応は阻害された。次に、この反応ではヘアピン末端型 DNA が生成されるが、転座反応が起こるためにはその末端部の開裂が必須である。この反応は、抗原受容体遺伝子の再構成時の coding joint 生成反応に酷似し、その反応にかかわる DNA 切断酵素 ARTEMIS がよい候補である。実際、ARTEMIS のノックダウンにより、転座様反応は阻害され、第 2 段階は ARTEMIS によるものであることが証明された。非相同末端結合に関わる LIG4 のノックダウンでも転座様反応は阻害され、ARTEMIS によるヘアピンの開裂によってできた DNA 断端は、最終的には、非相同末端結合によって再結合することが証明された。

以上により、転座に至る経路が解明されたが、これらはすべて体細胞に存在する DNA 修復経路である。にもかかわらず、精子にしか転座産物が同定されない理由は、最初の段階である、十字架型 DNA の生成が精子形成時にしかおこらないことが原因であると推測された。

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 36 件)

- ① Kato T, Inagaki H, Tong M, Kogo H, Ohye T, Yamada K, Tsutsumi M, Emanuel BS, Kurahashi H. DNA secondary structure is influenced by genetic variation and alters susceptibility to *de novo* translocation. Mol Cytogenet 4, 18, 2011. 査読有
- ② Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville M, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H. Paternal origin of the *de novo* constitutional t(11;22)(q23;q11). Eur J Hum Genet 18(7), 783-7, 2010. 査読有
- ③ Tong M, Kato T, Yamada K, Inagaki H,

Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Wang J, Emanuel BS, Kurahashi H. Polymorphisms of the 22q11.2 breakpoint region influence the frequency of *de novo* constitutional t(11;22)s in sperm. *Hum Mol Genet* 19(13), 2630-7, 2010. 査読有

④ Sheridan MB, Kato T, Haldeman-Englert C, Jalali GR, Milunsky JM, Zou Y, Klaes R, Gimelli S, Gemmill RM, Drabkin HA, Hacker AM, Brown J, Tomkins D, Shaikh TH, Kurahashi H, Zackai EH, Emanuel BS. A new palindrome-mediated recurrent translocation with 3:1 meiotic non-disjunction: the t(8;22)(q24.13; q11.21). *Am J Hum Genet* 87(2), 209-18, 2010. 査読有

⑤ Kurahashi H, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS. The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangement. *Clin Genet* 78(4), 299-309, 2010. 査読有

⑥ Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Bolor H, Taniguchi M, Shaikh TH, Emanuel BS, Kurahashi H. Chromosomal instability mediated by non-B DNA: Cruciform conformation and not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. *Genome Res* 19(2), 191-198, 2009. 査読有

⑦ Kurahashi H, Inagaki H, Kato T, Hosoba E, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Bolor H, Tong M, Emanuel BS. Impaired DNA replication prompts deletions within palindromic sequences, but does not induce translocations in human cells. *Hum Mol Genet* 18(18), 3397-3406, 2009. 査読有

⑧ Kurahashi H, Bolor H, Kato T, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T. Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet* 54(5), 253-260, 2009. 査読有
他、2 8 件

〔学会発表〕 (計 79 件)

① Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS, Kurahashi H. Mechanism of recurrent translocation t(11;22) initiated by cruciform conformation of palindromic sequences. The 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, October 11-15, 2011.

② Kato T, Sheridan MB, Hacker AM, Inagaki H, Glover TW, Plon SE, Drabkin HA, Gemmill RM, Kurahashi H, Emanuel BS. Identification of a novel palindrome mediated translocation associated with the t(3;8) of hereditary renal cancer. The 12th International

Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, October 11-15, 2011.

③ Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS, Kurahashi H. GEN1 resolves cruciform-forming palindromic DNA leading to a recurrent translocation in humans. *Kyestone Symposia: Functional consequences of structural variation in the genome*, Steamboat Springs, USA, January 8-13, 2011.

④ Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS, Kurahashi H. GEN1 resolves cruciform-forming palindromic DNA leading to a recurrent translocation in humans. The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting, Washington DC, USA, November 2-6, 2010.

⑤ Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS, Kurahashi H. GEN1 resolves cruciform-forming palindromic DNA leading to a recurrent translocation in humans. The 7th 3R Symposium, Toyama, Japan, October 26-30, 2010.

⑥ Kurahashi H. Palindrome-mediated chromosomal translocation in humans. *FASEB Summer Research Conferences. Biological Impact of Alternatively Structured DNA*. Steamboat Springs, Colorado, USA, July 5-10, 2010.

⑦ Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MVE, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H. Paternal origin of the *de novo* constitutional t(11;22) (q23;q11). *European Society of Human Genetics Conference 2010*. Gothenburg, Sweden June 12-15, 2010.

⑧ Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H. Parental origin of *de novo* t(11;22)(q23;q11). 59th annual meeting of American Society of Human Genetics, Hawaii, USA, October, 20-24, 2009.

⑨ Kurahashi H, Inagaki H, Kato T, Ohye T, Kogo H, Shaikh TH, Emanuel BS. Two successive cleavages in palindrome-mediated translocation. *Genome Instability and DNA Repair*. Genome Instability and DNA Repair. Taos, USA, March, 1-6, 2009.

他、7 0 件

〔図書〕 (計 1 件)

① Inagaki H, Kurahashi H. *Cruciform DNA*. *Encyclopedia of Genetics*, 2nd Edition, Elsevier in press.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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〕

○報道関連情報

平成23年2月2日 朝日新聞、毎日新聞、
中日新聞に研究成果に関する新聞記事

○ホームページ等

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所
<http://www.fujita-hu.ac.jp/ICMS/>
分子遺伝学研究部門
[\(http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/t\(11;22\) \(研究代表者が運営\)](http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/t(11;22))
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/11&22/>

6. 研究組織

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