

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659182

研究課題名(和文) 習慣流産をおこす G4 四重鎖 DNA 多型

研究課題名(英文) Recurrent pregnancy loss-associated promoter polymorphisms affect ANXA5 gene expression via G-quadruplex propensity

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)：私たちは以前の研究で、胎盤性抗凝固因子であるアネキシン A5 遺伝子のプロモーター領域にある遺伝子多型が習慣流産と関連し、女性が少数アリルを持つと流産のリスクが増加することを示した。このプロモーター領域の多型の位置にはグアニン 4 重鎖形成のコンセンサス配列がある。本研究では、プロモーター領域の多型がこのコンセンサスを変化させ、グアニン 4 重鎖の形成しやすさに影響し、その結果、少数アリルからのアネキシン A5 の発現量が低下することが胎盤における過凝固をひきおこし、流産のリスクが増加するという仮説を証明した。

研究成果の概要(英文)：Recent findings have highlighted the possibility that polymorphisms within the annexin A5 gene (ANXA5) promoter contribute to the etiology of various obstetric complications. However, the underlying mechanisms are unknown. In our present study, the transcriptional activity of the ANXA5 gene promoter was examined in the context of G-quadruplex formation. The M2 haplotype of the promoter polymorphisms that confers a high risk of onset for these disorders shows lower activity and less expression of ANXA5 mRNA. This gene promoter region has a motif that potentially forms a G-quadruplex structure, and the M2 allele possesses less potential than the major allele. The promoter activity determined by luciferase reporter analysis correlated with the in vitro G-quadruplex propensity estimated by circular dichroism. Treatment with a G-quadruplex ligand inhibited this promoter activity. Taken together, our data indicate that the M2 allele instigates G-quadruplex-mediated transcriptional regulation and consequently downregulates the placental anticoagulation factor annexin A5 levels, leading to obstetric disorders. Our data lend support to the developing paradigm that genomic variation affects gene expression levels via DNA secondary structures leading to the disease susceptibility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：習慣流産、アネキシン A5、グアニン 4 重鎖、プロモーター、多型、円旋光二色性

## 1. 研究開始当初の背景

習慣流産は多因子疾患であるが、胎盤における過凝固も要因のひとつである。私たちは以前の研究で、胎盤性抗凝固因子であるアネキシン A5 遺伝子 (ANXA5) のプロモーター

領域にある遺伝子多型が習慣流産と関連し、女性が少数アリルを持つと流産のリスクが増加することを示した。

## 2. 研究の目的

ANXA5 遺伝子のプロモーター領域の多型

の位置にはグアニン 4 重鎖形成のコンセンサス配列がある。近年、プロモーター領域のグアニン 4 重鎖構造の転写調節作用が注目されている。本研究では、プロモーター領域の多型がこのコンセンサスを変化させ、グアニン 4 重鎖の形成しやすさに影響し、その結果、少数アレルからの *ANXA5* 遺伝子の発現量が低下することが胎盤における過凝固をひきおこし、流産のリスクが増加するという仮説を証明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

胎盤での *ANXA5* 遺伝子の発現量を qRT-PCR、アレル特異的 qRT-PCR にて検討した。ルシフェラーゼアッセイを用いて、多型アレルのプロモーター活性を検討した。また、多型アレルのオリゴ DNA を合成し、円旋光二色性 (CD) によりグアニン 4 重鎖形成能を検討した。ルシフェラーゼアッセイや絨毛細胞株にグアニン 4 重鎖結合剤 TMPyP4 を加えることで発現への影響を検討した。

### 4. 研究成果

まず、胎盤での *ANXA5* 遺伝子の発現量を qRT-PCR にて検討したところ、少数アレルをヘテロで持つ胎盤は、多数アレルのホモの胎盤と比べて、発現量が有意に低かった。また、アレル特異的 qRT-PCR の解析系を確立し、ヘテロの胎盤内で比較したところ、少数アレル由来の産物の方が多数アレル由来の産物より発現量が低かった。次に、ルシフェラーゼシステムを用いてプロモーター活性を調べたところ、少数アレルの方が多数アレルよりもプロモーター活性が有意に弱かった。円旋光二色性 (CD) によりグアニン 4 重鎖形成能を検討したところ、多数アレルは生理的条件下でグアニン 4 重鎖を形成し、少数アレルは多数アレルよりもグアニン 4 重鎖形成能が低下していた。ルシフェラーゼシステムで、グアニン 4 重鎖形成を阻害するような変異を導入すると、少数アレルと同程度にルシフェラーゼ活性が低下した。グアニン 4 重鎖結合剤 TMPyP4 を加えるとルシフェラーゼ活性が低下し、絨毛細胞株で *ANXA5* 遺伝子の発現量が低下した。以上より、少数アレルはグアニン 4 重鎖形成能が低下することでプロモーター活性が低下し、*ANXA5* 遺伝子の発現量が低下し、胎盤内で過凝固になり、その結果、流産を起しやすくなる状態になっていることが示唆された。

### 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 24 件)

1. Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS, Kurahashi H. Two sequential cleavage reactions on cruciform DNA structures cause palindrome-mediated chromosomal translocations. *Nat Commun.* 4, 1592, 2013. doi: 10.1038/ncomms2595. (査読有)
2. Chen Y, Miyazaki J, Nishizawa H, Kurahashi H, Leach R, Wang K. MTA3 regulates CGB5 and Snail genes in trophoblast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Mar 17. doi:pii: S0006-291X(13)00412-9. 10.1016/j.bbrc.2013.02.102. (査読有)
3. Tsuge I, Ito K, Ohye T, Kando N, Kondo Y, Nakajima Y, Inuo C, Kurahashi H, Urisu A. Acute eosinophilic pneumonia occurring in a dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficient patient. *Pediatric Pulmonology*, in press. (査読有)
4. Kato T, Kurahashi H, Emanuel BS. Chromosomal translocations and palindromic AT-rich repeats. *Curr Opin Genet Dev* 22, 221-228, 2012. doi: 10.1016/j.gde.2012.02.004. (査読有)
5. Kogo H, Tsutsumi M, Ohye T, Inagaki H, Abe T, Kurahashi H. HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. *Genes Cells* 17, 439-454, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01600.x. (査読有)
6. Kogo H, Tsutsumi M, Ohye T, Inagaki H, Kiyonari H, Kurahashi H. HORMAD2 is essential for synapsis surveillance during meiotic prophase via the recruitment of ATR activity. *Genes Cells* 17, 897-912, 2012. doi: 10.1111/gtc.12005. (査読有)
7. Kurahashi H, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T. Failure of homologous synapsis and sex-specific reproduction problems. *Front Genet* 3, 112, 2012. doi: 10.3389/fgene.2012.00112. (査読有)
8. Kurahashi H, Tsutsumi M, Nishiyama S, Kogo H, Inagaki H, Ohye T. Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. *Congenit Anom (Kyoto)* 52, 8-15, 2012. doi: 10.1111/j.1741-4520.2011.00350.x. (査読有)
9. Kurahashi H, Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M. Mechanism of complex gross chromosomal rearrangements: A commentary on Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J Hum Genet* 57, 81-3, 2012. doi: 10.1038/jhg.2011.143. (査読有)
10. Tsutsumi M, Kowa-Sugiyama H, Bolor H, Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Yamada K, Taniguchi-Ikeda M, Toda T, Kurahashi H.

- Screening of genes involved in chromosome segregation during meiosis I: in vitro gene transfer to mouse fetal oocytes. *J Hum Genet* 57, 515-22, 2012. doi: 10.1038/jhg.2012.61. (査読有)
11. Inagaki A, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inuzuka H, Miyamura H, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia. *Placenta* 33, 919-26, 2012. doi: 10.1016/j.placenta.2012.08.003. (査読有)
  12. Kusaka M, Iwamatsu F, Kuroyanagi Y, Nakaya M, Ichino M, Marubashi S, Nagano H, Shiroki R, Kurahashi H, Hoshinaga K. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin during the early postoperative period predicts the recovery of graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *J Urol* 187, 2261-2267, 2012. doi: 10.1016/j.juro.2012.01.033. (査読有)
  13. Ahmed WA, Tsutsumi M, Nakata S, Mori T, Nishimura Y, Fujisawa T, Kato I, Nakashima M, Kurahashi H, Suzuki K. A Functional variation in the hypocretin neuropeptide precursor gene may be associated with obstructive sleep apnea syndrome in Japan. *Laryngoscope* 122, 925-929, 2012. doi: 10.1002/lary.23179. (査読有)
  14. Yoshihara D, Kugita M, Yamaguchi T, Aukema HM, Kurahashi H, Morita M, Hiki Y, Calvet JP, Wallace DP, Toyohara T, Abe T, Nagao S. Global gene expression profiling in PPAR- $\gamma$  agonist-treated kidneys in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. *PPAR Research* 695898, 2012. doi: 10.1155/2012/695898. (査読有)
  15. 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. doi: 10.1186/1755-8166-4-18. (査読有)
  16. Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S, Kaji R, Yokota T, Takeda S, Toda T. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478, 127-131, 2011. doi: 10.1038/nature10456. (査読有)
  17. Tsutsumi M, Kogo H, Kowa-Sugiyama H, Inagaki H, Ohye T, Kurahashi H. Characterization of a novel mouse gene encoding an SYCP3-like protein that re-localizes from the XY body to the nucleolus during prophase of male meiosis I. *Biol Reprod* 85, 165-171, 2011. doi: 10.1095/biolreprod.110.087270. (査読有)
  18. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Koishi K, Nakanishi I, Fujita T, Imayoshi Y, Markoff A, Yanagihara I, Udagawa Y, Kurahashi H. Polymorphism in annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 17, 447-452, 2011. doi: 10.1093/molehr/gar008. (査読有)
  19. Nishiyama S, Kishi T, Kato T, Suzuki M, Bolor H, Udagawa Y, Kurahashi H. A rare *synaptonemal complex protein 3* gene variant in unexplained female infertility. *Mol Hum Reprod* 17, 266-271, 2011. doi: 10.1093/molehr/gaq098. (査読有)
  20. Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 107, 2011. doi: 10.1186/1477-7827-9-107. (査読有)
  21. Nishizawa H, Suzuki M, Pryor-Koishi K, Sekiya T, Tada S, Kurahashi H, Udagawa Y. Impact of indoleamine 2,3-dioxygenase on the antioxidant system in the placentas of severely pre-eclamptic patients. *Syst Biol Reprod Med* 57, 174-178, 2011. doi: 10.3109/19396368.2011.587590. (査読有)
  22. Kugita M, Nishii K, Morita M, Yoshihara D, Kowa-Sugiyama H, Yamada K, Yamaguchi T, Wallace DP, Calvet JP, Kurahashi H, Nagao S. Global gene expression profiling in early-stage polycystic kidney disease in the Han:SPRD Cy rat identifies a role for RXR signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F177-88, 2011. doi: 10.1152/ajprenal.00470.2010. (査読有)
  23. Yoshihara D, Kurahashi H, Morita M, Kugita M, Hiki Y, Aukema HM, Yamaguchi T, Calvet JP, Wallace DP, Nagao S. PPAR- $\gamma$  agonist ameliorates kidney and liver disease in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F465-74, 2011. doi: 10.1152/ajprenal.00460.2010. (査読有)
  24. Ahmed WA, Mori T, Nishimura Y, Kitanaka T, Kato T, Bhardwaj KA, Kurahashi H, Suzuki K. Lack of Association between Orexin Receptor Genes Polymorphisms and Obstructive Sleep Apnea Syndrome in Japanese. *Sleep Biol Rhythms* 9, 73-77, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

1. Kurahashi H, Miyamura H, Nishizawa H, Ota

- S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Udagawa Y. Polymorphisms in the ANXA5 gene promoter in Japanese women with pre-eclampsia. European Society of Human Genetics Conference 2012. Nurnberg, Germany, June 23-26, 2012.
2. Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kurahashi H. Mechanism of recurrent translocation t(11;22) initiated by cruciform conformation of palindromes. FASEB SRC: "Dynamic DNA structures in biology". Saxtons River, USA, June 17-22, 2012.
  3. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kurahashi H, Udagawa Y. Polymorphisms in the ANXA5 gene promoter in Japanese women with preeclampsia. The XX FIGO World Congress, Rome, Italy, October 7-12, 2012.
  4. Taniguchi M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akmen HO, DiMauro S, Yokota T, Takeda S, Toda T Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. ASHG 2012, annual meeting, San Francisco, November 6-10, 2012.
  5. Inagaki H, Ota S, Nishizawa H, Miyamura H, Nakahira K, Suzuki M, Nishiyama S, Udagawa Y, Yanagihara I, Kurahashi H. Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via DNA secondary structures. ASHG 2012, annual meeting, San Francisco, November 6-10, 2012.
  6. 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. Keystone Symposia: Functional Consequences of Structural Variation in the Genome, Steamboat Springs, Colorado, USA, January 8-13, 2011.
  7. Kurahashi H, Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Koishi K, Nakanishi I, Fujita T, Imayoshi Y, Negi R, Markoff A, Yanagihara I, Udagawa, Y. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. European Society of Human Genetics Conference 2011. Amsterdam, Netherlands, May 28-31, 2011.
  8. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Koishi K, Nakanishi I, Fujita T, Imayoshi Y, Markoff A, Yanagihara I, Udagawa Y, Kurahashi H. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. 59th Annual Clinical Meeting, ACOG, April 30-May 4, 2011, Washington DC, USA.
  9. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Koishi K, Nakanishi I, Fujita T, Imayoshi Y, Markoff A, Yanagihara I, Udagawa Y, Kurahashi H. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. 27th Annual Meeting of ESHRE - Stockholm 2011, Stockholm, Sweden, July 3-6, 2011.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Emanuel BS, Kurahashi H. Identification of a recombination hotspot sequence at the breakpoint region of the 22q11 deletion using a yeast model. The 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, October 11-15, 2011.
  13. Kogo H, Tsutsumi M, Ohye T, Inagaki H, Kurahashi H. HORMAD1-deficiency causes azoospermia in males and pregnancy loss in females. The 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, October 11-15, 2011.
  14. Tsutsumi M, Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Kurahashi H. Mutation in the SYCP3 gene identified in a woman with recurrent pregnancy loss affect the synaptonemal complex conformation at meiotic prophase I. The 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, October 11-15, 2011.

〔図書〕（計 0 件）

〔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25年3月13日 朝日新聞、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\(11;22\)\)](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/11&22/>

## 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 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：