

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390085

研究課題名(和文)複製ストール依存性・非依存性染色体構造異常の発生機序

研究課題名(英文)DNA replication-dependent/independent mechanism of gross chromosomal rearrangement

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：すでに構築した細胞株を用いた転座発生アッセイシステムを利用して調べると、複製開始点を欠失したプラスミドでもt(11;22)転座発生が観察され、t(11;22)転座はDNA複製に非依存的で、FoSTeSの経路とは無関係であると判断された。一方で、非反復性の、非パリンδροームの構造異常に関しては、その切断点の解析により、1例の欠失と1例の重複では結合部位にマイクロホモロジーが同定され、FoSTeSの概念に合致するものであった。もう1例の欠失では、結合部位に複製のスリップ現象を同定し、FoSTeSで提唱されたDNA複製のエラーが関与している可能性を強く示唆する状況証拠が得られた。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism of palindrome-mediated t(11;22) translocation using plasmid-based assay. Even in the plasmid lacking the replication origin showed translocation when transfected into the human cell line, suggesting that the t(11;22) translocation mechanism is independent of the DNA replication-based mechanism such as FoSTeS. On the other hand, we also examined breakpoints of three non-palindrome gross chromosomal rearrangement. One interstitial deletion and one duplication showed microhomology at the junction, suggesting the rearrangement took place via FoSTeS. In the third deletion case, we identified 11-13 nucleotide sequence at the upstream breakpoint that was repeated four times at the deletion junction. The backward replication slippage or serial replication slippage is the predicted mechanism. These data suggests that the aberrant DNA replication is involved in the generation of a major subset of deletion/duplication.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：FoSTeS 染色体構造異常 DNA複製 切断点 複製のストール マイクロホモロジー パリンδροーム 十字架型DNA

1. 研究開始当初の背景

染色体の構造異常の発生メカニズムは、まだよくわかっていない。近年、DNA複製の停止、近傍の別の複製フォークヘマイクロホモロジーを介した侵入、引き続いておこる複製の再開、という一連の修復過程が構造異常の発生に関与するという仮説が提唱され、FoSTeSとよばれている。本研究では、ヒトで発生頻度の高い生殖細胞系列の転座 t(11;22) をモデルとして、ヒト染色体転座が FoSTeS によって発生しているのかどうかを検証するとともに、そうであれば FoSTeS のメカニズムの本態を詳細に解明し、そうでなければ FoSTeS 以外のどのようなメカニズムで発生しているのかを検討しようと考えた。

2. 研究の目的

染色体の構造異常(転座、欠失、重複など)の発生メカニズムは、よくわかっていない。反復性の構造異常は早くから研究が進んでおり、low-copy-repeat (LCR) もしくは segmental duplication (SD) と呼ばれている領域特異的な重複配列間の、非アリル間相同組換え (NAHR) が原因である。多くは第1減数分裂相同組換え時の不均衡交差として発生するとされている。研究代表者も 22q11 欠失症候群の染色体欠失が NAHR によって発生していることを示してきた。一方、非反復性構造異常に関しては、近年、Lupski らが新たに Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) という概念を提唱している。DNA複製の停止、近傍の別の複製フォークヘマイクロホモロジーを介した侵入、引き続いておこる複製の再開、という一連の修復過程が構造異常の発生に関与するという仮説である。このような構造異常では、(1) 新生転座や欠失 (NAHR 以外の) は父親由来の染色体におこっていることが多い、(2) 父親の年齢依存性に発生頻度が増加する、という事実があり、精子形成が生体内で最多の DNA 複製を経て行われることから、これらの事実は構造異常の発生に DNA 複製が関与しているという状況証拠となっているが、現時点で FoSTeS の関与を示す直接的な証拠はほとんどない。本研究では、これらに関して、転座発生のモデル系を用いて、直接的な証拠を得ようとするものである。

3. 研究の方法

染色体の構造異常の患者サンプルを用いて、マイクロアレイや次世代シーケンシングにより、その切断点と結合部位の情報を得た。

また、2つのプラスミドを用いた t(11;22) 転座発生モデル系を構築した。一方には、11番染色体側の転座切断点のパリンドローム配列 (PATRR11) と GFP 遺伝子の上流転写調節領域、もう一方には 22番染色体側の転座切断点のパリンドローム配列 (PATRR22) と GFP 遺伝子の翻訳領域を連結し、これら2つのプラスミドを HEK293 細胞に共導入し、転

座起これば GFP 遺伝子が発現し、蛍光強度で判定できる転座発生アッセイシステムを構築した。

4. 研究成果

すでに構築した細胞株を用いた転座発生アッセイシステムを利用して、反復性 t(11;22) 転座発生を調べると、2つのプラスミドを導入すると転座は発生し、このプラスミドにトポイソメラーゼ I を用いて十字架型の 2次構造をとらせなくすると転座発生が抑制された。これらのプラスミドは複製開始点を欠失しており細胞内で複製されないため、t(11;22) 転座は DNA 複製に非依存的で、2次構造依存的に発生すると考えられた。FoSTeS の経路とは無関係であると判断された。

この十字架型 DNA が誘発する転座発生パスウェイを解析した。siRNA を用いたスクリーニングにより、十字架型 DNA は 2段階で切断され、非相同末端結合で誤修復されることで転座が発生することがわかった。第1段階では十字架型 DNA は、GEN1 という相同組換えのあとでできるホリデー構造切断酵素によりななめ方向に切断される。できたヘアピン型の DNA 末端を、第2段階として、Artemis が、ヘアピンの先端を開裂する。そのあと、ligase IV が互い違いに修復する、というのが転座に至る全経路であることを示した(論文#16)。

また、t(8;22) 転座や t(3;8) 転座の切断点の解析を行い、同じくパリンドローム配列同士による染色体転座であることを示した(論文#3、#5)。

一方で、非反復性の、非パリンドロームの構造異常に関しては、その切断点の解析により、1例の欠失と1例の重複では結合部位にマイクロホモロジーが同定され、FoSTeS の概念に合致するものであった(論文#10、#17)。もう1例の欠失では、欠失の上流側の切断点にある 11-13 塩基の配列が4回繰り返した後、6塩基のマイクロホモロジーを介して下流側と結合していた。「backward replication slippage」もしくは「serial replication slippage」と呼ばれる複製のスリップ現象に合致し、FoSTeS で提唱された DNA 複製のエラーが関与している可能性を強く示唆する状況証拠が得られた(論文#4)。

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 33件)

1. Tsutsumi M, Fujiwara R, Nishizawa H, Ito M, Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Kato T, Fujii T, Kurahashi H. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. **PLoS One** 2014; 9(5): e96710.
2. Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T,

- Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. **Sci Rep** 2014; 4: 4559.
3. Mishra D, Kato T, Inagaki H, Kosho T, Wakui K, Kido Y, Sakazume S, Taniguchi-Ikeda M, Morisada N, Iijima K, Fukushima Y, Emanuel BS, Kurahashi H. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation. **Mol Cytogenet** 2014; 7: 55.
 4. Ohye T, Inagaki H, Ozaki M, Ikeda T, Kurahashi H. Signature of backward replication slippage at the copy number variation junction. **J Hum Genet** 2014; 59(5): 247-250.
 5. Kato T, Franconi CP, Sheridan MB, Hacker AM, Inagakai H, Glover TW, Arlt MF, Drabkin HA, Gemmill RM, Kurahashi H, Emanuel BS. Analysis of the t(3;8) of hereditary renal cell carcinoma: A palindrome mediated translocation. **Cancer Genet** 2014; 207(4): 133-140.
 6. Ohye T, Inagaki H, Kato T, Tsutsumi M, Kurahashi H. Prevalence of Emanuel syndrome: theoretical frequency and surveillance result. **Pediatr Int** 2014; 56(4): 462-466.
 7. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. **Clin Infect Dis** 2014; 59(4): 545-548.
 8. Fu XJ, Morisada N, Hashimoto F, Taniguchi-Ikeda M, Hashimura Y, Ohtsubo H, Ninchoji T, Kaito H, Nozu K, Takahashi E, Nakanishi K, Kurahashi H, Iijima K. A patient of Autosomal Recessive Alport syndrome due to Segmental Maternal Isodisomy. **Hum Genome Variation** 2014, 1, 14006.
 9. Tsuge I, Morishita M, Kato T, Tsutsumi M, Inagaki H, Mori Y, Yamawaki K, Inuo C, Ieda K, Ohye T, Hayakawa A, Kurahashi H. Novel FATP4 mutations responsible for ichthyosis prematurity syndrome in a Japanese patient. **Hum Genome Variation**, in press.
 10. 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 Pulmonol** 2014; 49(3): E52-55.
 11. Oikawa J, Tanaka J, Yoshikawa T, Morita Y, Hishiki H, Ishiwada N, Ohye T, Kurahashi H, Kohno Y. An immunocompetent child with chromosomally integrated human herpes virus 6B accidentally identified during the care of *Mycoplasma pneumoniae* infection. **J Infect Chemother** 2014; 20(1): 65-67.
 12. Kawai A, Kusaka M, Kitagawa F, Ishii J, Fukami N, Maruyama T, Sasaki H, Shiroki R, Kurahashi H, Hoshinaga K. Serum liver-type fatty acid-binding protein predicts recovery of graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. **Clin Transplant** 2014; 28(6): 749-754.
 13. Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. **Transplant Infect Dis**, in press.
 14. Hibi Y, Ohye T, Ogawa K, Shimizu Y, Shibata M, Kagawa C, Mizuno Y, Uchino S, Kosugi S, Kurahashi H, Iwase K. Pheochromocytoma as the first manifestation of MEN2A with RET mutation S891A: report of a case. **Surgery Today** 2014; 44(11): 2195-2200.
 15. Hibi Y, Ohye T, Ogawa K, Shimizu Y, Shibata M, Kagawa C, Mizuno Y, Kurahashi H, Iwase K. A MEN2A family with two asymptomatic carriers affected by unilateral renal agenesis. **Endocr J** 2014; 61(1): 19-23.
 16. 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** 2013; 4: 1592.
 17. Aleksic B, Kushima I, Ohye T, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Koide T, Iritani S, Kurahashi H, Iwata N, Ozaki N. Definition and refinement of the 7q36.3 duplication region associated with schizophrenia. **Sci Rep** 2013; 3: 2587.
 18. Ota S, Miyamura H, Nishizawa H, Inagaki H, Inagaki A, Inuzuka H, Suzuki M, Miyazaki J, Sekiya T, Udagawa Y, Kurahashi H. Contribution of fetal genotype of promoter polymorphisms in ANXA5 gene to the onset of pre-eclampsia. **Placenta** 2013; 34(12): 1202-1210.
 19. 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; 433 (4): 379-384.
 20. Inuzuka H, Nishizawa H, Inagaki A, Suzuki M, Ota S, Miyamura H, Miyazaki J,

- Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Decreased expression of apelin in placentas from severe pre-eclampsia patients. **Hypertens Pregnancy** 2013; 32(4): 410-421.
21. Kato T, Kurahashi H, *Emanuel BS. Chromosomal translocations and palindromic AT-rich repeats. **Curr Opin Genet Dev** 2012; 22 (3): 221-228.
 22. Kogo H, Tsutsumi M, Ohye T, Inagaki H, Abe T, Kurahashi H. HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. **Genes Cells** 2012; 17 (6): 439-454.
 23. 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** 2012; 17 (6): 897-912.
 24. Kurahashi H, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T. Failure of homologous synapsis and sex-specific reproduction problems. **Front Genet** 2012; 3: 112.
 25. 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)** 2012; 52 (1): 8-15.
 26. 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** 2012; 57 (2): 81-83.
 27. 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** 2012; 57 (8): 515-522.
 28. 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** 2012; 33 (11): 919-926.
 29. 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** 2012; 187 (6): 2261-2267.
 30. 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** 2012; 122 (4): 925-929.
 31. 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- γ agonist-treated kidneys in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. **PPAR Research** 2012; 695898.
- [学会発表](計 6 件)
1. Kurahashi H, Tsutsumi M, Fujiwara R, Nishizawa H, Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Kato T, Fujii T. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. Eshre 2014. Munich, Germany, June 29- July 2, 2014.
 2. Inagaki H, Ota S, Nishizawa H, Miyamura H, Nakahira K, Suzuki M, Tsutsumi M, Kato T, Nishiyama S, Udagawa Y, Yanagihara I, Kurahashi H. Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via G-quadruplex structure *in vivo*. FASEB SRC, Dynamic DNA Structures in Biology, Itasca, Illinois, July 20 - 25, 2014.
 3. Inagaki H, Ota S, Miyamura H, Tsutsumi M, Kato T, Nishizawa H, Yanagihara I, Kurahashi H. Detection of *in vivo* G-quadruplex structure of the ANXA5 promoter that contributes to the recurrent pregnancy loss. ASHG 2014, San Diego, CA, October 18-22, 2014.
 4. Ishihara N, Yokoi S, Yamamoto H, Natsume J, Tsutsumi M, Ohye T, Kato M, Saito S, Kurahashi H. Two cases of lissencephaly with marked hydrocephalus caused by TUBA1A mutation. ASHG 2014, San Diego, CA, October 18-22, 2014.
 5. Kato H, Okumoto T, Yoshimura Y, Taguchi Y, Sugimoto M, Inagaki H, Kurahashi H. EFNB1 mutation found in patients with craniofrontonasal syndrome in a Japanese family. The 10th Asian Pacific Craniofacial Association Conference, Adelaide, South Australia, October 3 - 5, 2014.
 6. Nishiyama S, Kato T, Kani C, Miyazaki J, Nishizawa H, Ochi M, Fujii T, Kurahashi H. Cytogenetic analysis of monopronucleated (1PN) zygotes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. International Society for Mild Approaches in Assisted Reproduction. Sydney, Australia, Sep 10-12. 2014.

〔図書〕(計 2 件)

1. Nisizawa H, Kurahashi H. Recurrent Pregnancy loss. **Clinical Genomics: Practical Applications in Adult Patient Care**, Michael Murray, Mark Babyatski, and Monica Giovanni, McGraw-Hill Professional, 2014.
2. Inagaki H, Kurahashi H. Cruciform DNA. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, 2nd Edition, Stanley Maloy and Kelly Hughes, Elsevier 2013.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
藤田保健衛生大学
<http://www.fujita-hu.ac.jp/>
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/>
疾患遺伝子網羅的解析センター
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~gtac/>
t(11;22)のページ
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/11&2/>

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：