

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33916
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25860256
研究課題名(和文)染色体脆弱部位FRA3Bとパリンドローム不安定性

研究課題名(英文)FRA3B and the Palindromic AT-rich repeat

研究代表者

加藤 武馬 (KATO, Takema)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：20387690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：t(3;8)(p14;q24)やt(8;22)(q24;q11)染色体転座の切断点を塩基レベルで解析し、これらがパリンドローム配列を介した染色体転座であることを明らかにした。また転座切断点に位置するパリンドローム配列の全長が明らかになったことにより、転座発生時の転座切断点はパリンドローム配列の中央部であり、小さな欠失を伴って、マイクロホモロジーを介して結合していることが明らかとなり、派生染色体の配列を比較すると、結合部の配列が完全に同一であることが分かった。この結果より、本来独立して発生するはずの2種類の派生染色体が、互いに協調しながら発生する新しいメカニズムを提唱した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified novel palindrome-mediated translocations with the t(3;8)(p14;q24) and t(8;22)(q24;q11). Detailed sequence analysis of both junction breakpoints have been resolved by next generation sequencing. To predict the mechanism of translocation generation, derivative sequences were aligned to entire palindrome sequences. The translocation junction is often accompanied by symmetric deletions at the center of both palindrome sequences. Rejoining occurs with minimal homology between the translocation partners. Remarkably, comparison of both derivative sequences shows identical breakpoint junctions between them, which likely represent products of two independent events on the basis of a classical model. Our data suggest the hypothesis that interactions between the two PATRRs prior to the translocation event might trigger illegitimate recombination resulting in the recurrent palindrome-mediated translocation.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：PATRR 染色体転座 パリンドローム

1. 研究開始当初の背景

パリンドローム配列が染色体の構造異常を誘発することが知られており、パリンドローム配列を介した染色体転座が $t(11;22)(q23;q11)$ をはじめとして数多く報告されている。両転座染色体上の切断点には、AT 含量の高い数百塩基対の Palindromic AT-Rich Repeats (PATRRs) と呼ばれる配列が存在しており、PATRR のゲノム不安定性が染色体転座を誘発していると考えられている。これまで PATRR を介した染色体転座は、全て 22 番染色体に位置する PATRR22 が関与しており、いくつかの染色体転座の切断点が詳細に解析され、パートナー染色体の切断点にはやはり類似の特徴を持つ PATRR 配列が同定されており、PATRR 同士で特異的に切断・再結合する特殊な転座発生メカニズムにより発生していることが予想される。PATRR はその配列の特性から PCR やクローニングの困難な配列であるため、データベースに全長の配列が登録されておらず、切断点の解析が困難であるため、ヒトゲノム中に PATRR がどれだけ存在しているか明らかにされていない。また PATRR を介した均衡型染色体転座保因者は無症状であることが多く、G バンドや FISH などの染色体検査で報告された既知の染色体転座に、PATRR を介した染色体転座が存在している可能性もあるため、未知の PATRR を介した染色体転座が存在している可能性を否定できない。

2. 研究の目的

本研究では、PATRR を介した染色体転座と思われる 2 例の染色体転座、 $t(3;8)(p14;q24)$ と、 $t(8;22)(q24;q11)$ について、転座切断点をと、切断点に存在する PATRR の全長を詳細に解析し、新規の PATRR と PATRR を介した染色体転座を明らかにする。さらに、明らかにされた PATRR の全長と派生染色体の配列を比較し、PATRR を介した染色体転座の転座発生のメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) $t(3;8)(p14;q24)$ 染色体転座では、派生染色体を単離したヒト・マウスの $der(3)t(3;8)$ ハイブリッド細胞を用いて、転座染色体の切断点を塩基レベルの解像度で同定を行う。 $t(8;22)(q24;q11)$ 染色体転座保因者から派生した Supernumerary $der(22)t(8;22)$ 症候群の患者の検体を用いて、SNP アレイや転座染色体を特異的に検出する PCR 方で明らかにする。以前に、転座特異的 PCR によって健常人精子に含まれている $t(11;22)$ 新生転座を検出する事に成功しており (図 1A)、転座特異的 PCR 法を応用して新しい PATRR が関与している染色体転座の検出を健常人精子で試みる。

(2) AT 含量が非常に高く、またパリンドローム構造を持つ PATRR を増幅可能な PCR 法を確

立する。ダイレクトシーケンス法では PATRR を解読することは困難のため、PATRR 領域を含む PCR 産物を次世代シーケンサーで deep sequence する。PATRR の全長は明らかにされていないため、 $t(3;8)(p14;q24)$ や $t(8;22)(q24;q11)$ の両転座染色体から予測した PATRR の全長をリファレンスにして、シーケンスデータをマッピングし、PATRR の全長を明らかにする。

(3) 解読した PATRR の全長と、転座産物の配列を比較解析し、転座を起こす PATRR の構造、転座切断点、転座発生時の塩基の欠失挿入の有無など、転座発生時における塩基レベルでのゲノム再構成から PATRR を介した染色体転座の発生メカニズムを予測する。

(4) 3 番染色体の転座切断点は染色体脆弱部位 FRA3B に位置しており、腎細胞癌患者でこの領域の欠失が見られる。染色体脆弱部位の不安定性は、特異的な DNA 構造が DNA 複製を阻害することで発生し、さらに AT 含量の高い配列が集まる領域は可塑性が強くゲノム再構成を誘発すると考えられている、染色体脆弱部位における染色体不安定性と PATRR を介した染色体転座の関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) $t(3;8)(p14;q24)$ と、 $t(8;22)(q24;q11)$ 染色体転座の派生染色体を詳細に解析し、 $t(8;22)(q24;q11)$ 転座における 22 番染色体の転座切断点が、PATRR22 に位置していること、8 番染色体の転座切断点は同様の特徴を持つ類似のパリンドローム配列中に位置していることから、 $t(8;22)(q24;q11)$ は新規の PATRR を介した染色体転座であることを明らかにした。さらに $t(3;8)(p14;q24)$ の 8 番染色体の転座切断点は PATRR8 内に位置し、3 番

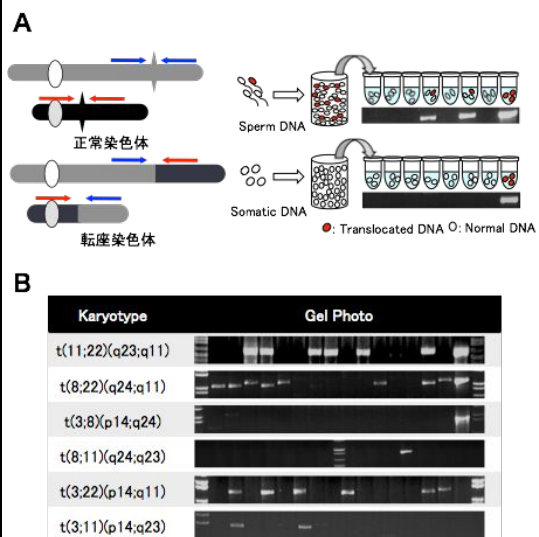


図1 転座産物特異的PCR

(A) それぞれのパリンドローム配列を挟んだ箇所にプライマーを設計し、各染色体で片側のプライマーを用いて、転座産物を特異的に検出するPCR。精子由来のゲノムDNAを鋳型にして数十本同じPCRを行った結果、転座産物が鋳型DNAに含まれていた場合、PCRの結果が陽性となった。*
(B) それぞれのPATRRの組み合わせで行った、転座産物特異的PCRの結果。

染色体の転座切断点にも PATRR 様の配列中に位置していることから、t(3;8)(p14;q24) 転座は、t(11;22)(q23;q11) や t(8;22)(q24;q11) と同様に繰り返し発生する PATRR を介した染色体転座であることを示した。PATRR22 を介さない染色体転座の存在は、PATRR を介した染色体転座はより普遍的なゲノム再構成によって発生していること示唆した。また、健康人精子 DNA を鋳型にした転座特異的 PCR を用いて、t(3;22)(p14;q11) や t(3;11)(p14;q23)、t(8;11)(q24;q23) と、これまで報告のない染色体転座を検出し、パリンδροーム配列同士を連結する染色体再構成が、一般的な転座発生のメカニズムであることを裏付けるとともに、ヒトゲノム中に散在するパリンδροーム配列を用いた、未知の PATRR を介した染色体転座の存在を示唆した (図 1B)。

(2) 8 番染色体に位置する PATRR 領域を含む配列を、ロングレンジの増幅が可能なポリメラーゼを用いて、1kb 程の PCR 産物に対して、5 分の伸長時間を設定した PCR で増幅した。PATRR 領域を含む PCR 産物を次世代シーケンサーで deep sequence し解読を試みた。(1) の実験で同定した転座染色体の配列を参照し、シーケンスリードをマッピングすることで解読に成功した。また複数検体を解読することで PATRR に多数のサイズ多型の存在 (図 2)、転座が発生した PATRR の構造が対称な構造を持つことを明らかにした。

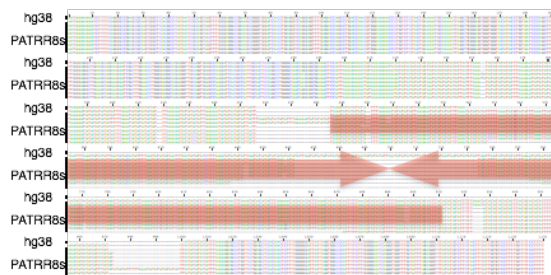


図2 次世代シーケンサーにより解読したPATRR6配列の全長

(3) 転座切断点に位置する PATRR 配列の全長が明らかになったことにより、転座発生時の転座切断点は PATRR 配列の中央部であり、小さな欠失を伴って、マイクロホモロジーを介して結合していることが明らかとなり (図 3A)、派生染色体の配列を比較すると、結合部の配列が完全に同一であることが分かった (図 3B)。この結果より、本来独立して発生するはずの 2 種類の派生染色体が、互いに協調しながら発生する新しいメカニズムを提唱した。

(4) Twist Flex program による *In silico* 解析で、転座切断点を含む FHIT 遺伝子のエクソン 3-7 領域の可塑性を算出し、PATRR3 と FRA3B 領域の欠失との関係を調べた。その結果、PATRR3 の位置は、FRA3B 領域の中で最も可塑性の強い領域に位置していることから、

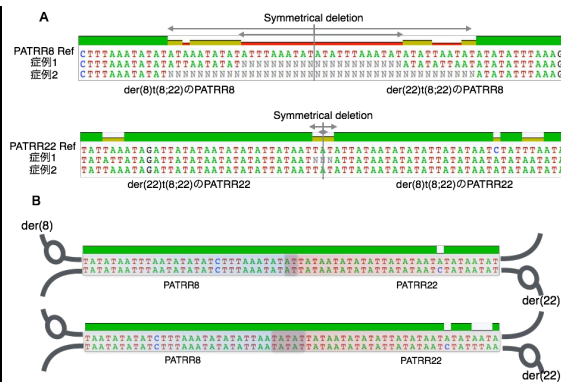


図3 t(8;22)(q24;q11)染色体転座のder(8)t(8;22)とder(22)t(8;22)派生染色体の配列比較

PATRR3 は転座のみならず、FRA3B 領域の欠失にも強く関与していると示唆された (図 4)。次に 2067 名の健康人検体のコピー数多型解析の結果、FRA3B 領域のコピー数異常はイントロン 5 付近に集中しており、PATRR3 を含むコピー数異常は見つからなかった (図 5A)。さらにヒト 3 番染色体のハイブリッド細胞を用いて、アフィディコリン (APH) によって DNA 合成を阻害し、FRA3B 領域の欠失を誘発し、その欠失と PATRR3 の関連性を解析した。その結果、APH によって誘導された FRA3B 領域の欠失は、PATRR3 とは離れた箇所でも発生していた (図 5B)。このことから PATRR3 配列の不安定性は、FRA3B 領域の反復性の欠失との関連性は低く、PATRR を介した染色体転座を誘発している事が分かり、これら t(3;8) 染色体転座と FRA3B 領域の欠失の 2 つのゲノム再構成は、異なるメカニズムで起きる事が示唆された。特に FRA3B 領域の欠失が複製を阻害する事で発生する事から、FRA3B 領域の欠失は複製を介したゲノム再構成で、一方で PATRR3 を介した染色体転座は複製依存とは異なるメカニズムで発生する事が示唆された。

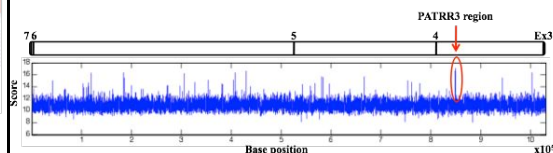


図4 PATRR3 PATRR3を含むFRA3B領域のDNAの可塑性の算出*
X軸: FHIT遺伝子のエクソン3から7までの領域。Y軸: DNA可塑性のスコア

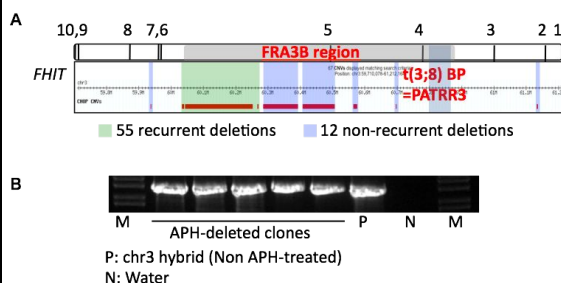


図5 FHIT遺伝子のコピー数多型*
(A) 2067名の健康人のFHIT遺伝子のコピー数多型。
(B) OHL73ヒトマウス体細胞ハイブリッドをAPHでFRA3B領域に欠失を誘発し、PATRR3領域のPCRを行い、これらの欠失がPATRR3領域を含んでいるか調べた。

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 5 件)

1. 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. *co-first author. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation. *Molecular cytogenetics*, 7, 1, 55, 2014. DOI: 10.1186/s13039-014-0055-x. 査読有
2. Ohye T, Inagaki H, Kato T, Tsutsumi M, Kurahashi H. Prevalence of Emanuel syndrome: theoretical frequency and surveillance result. *Pediatrics International* 56, 462-466. 2014. DOI: 10.1111/ped.12437. 査読有
3. 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* 9(5) 1-8. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0096710. 査読有
4. 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 Genetics* 207(4) 133-140 2014. DOI: 10.1016/j.cancergen.2014.03.004. 査読有
5. 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. *Nature communications*. 4, 1-10, 2014. DOI: 10.1038/ncomms2595. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 加藤武馬、Divya Mishra、稲垣秀人、大江瑞恵、堤真紀子、池田真理子、森貞直哉、飯島一誠、城戸康宏、坂爪悟、古庄知己、湧井敬子、福嶋義光、倉橋浩樹、Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日、横浜市、パシフィコ横浜
2. 加藤武馬、Divya Mishra、稲垣秀人、大江瑞恵、堤真紀子、池田真理子、森貞直哉、飯島一誠、城戸康宏、坂爪悟、古庄知己、湧井敬子、福嶋義光、倉橋浩樹、Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation、第 59 回日本人類遺伝学会、第 21 回日本遺伝子診療学会合同大会、2014 年 11 月 19 日、東京都、タワーホール船堀
3. 加藤武馬、稲垣秀人、大内雄矢、倉橋浩樹、ヒトゲノムに散財するパリンδροーム配列の同定、新学術「ゲノム支援」拡大班会議、

2013 年 8 月 20 日、神戸市、神戸ポートピアホテル

4. 加藤武馬、Divya Mishra、稲垣秀人、大江瑞恵、堤真紀子、池田真理子、森貞直哉、飯島一誠、城戸康宏、坂爪悟、古庄知己、湧井敬子、福嶋義光、倉橋浩樹、t(8;22)(q24.1;q11.2)の 2 家系、第 5 回東海小児遺伝カンファレンス、2014 年 2 月 14 日、名古屋市、名古屋市立大学
5. 加藤武馬、稲垣秀人、大江瑞恵、堤真紀子、倉橋浩樹、染色体転座と染色体間距離の因果関係、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸市、神戸ポートピアホテル
6. Takema Kato, Molly B. Sheridan, April M. Hacker, Hidehito Inagaki, Thomas Glover, Sharon Plon, Harry Drabkin, Robert Gemmill, Beverly S. Emanuel, Hiroki Kurahashi、FRA3B and the Palindromic AT-rich repeat、日本人類遺伝学会第 58 回大会、2013 年 11 月 21 日仙台市、江陽グランドホテル
7. 加藤武馬染色体脆弱部位 FRA3B とパリンδροーム配列、第 45 回藤田学園医学会、2013 年 10 月 3 日、豊明市、藤田保健衛生大学
8. 加藤武馬、稲垣秀人、倉橋浩樹、パリンδροーム配列を介した染色体転座の発生メカニズムの解明、新学術「ゲノム支援」拡大班会議、2013 年 8 月 28 日、神戸市、神戸ポートピアホテル

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 武馬 (KATO, Takema)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

研究者番号：20387690

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：