

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670171

研究課題名(和文)新しいエピゲノムとしてのDNAの2次構造による転写調節

研究課題名(英文)Transcriptional regulation via DNA secondary structure: novel epigenetic mechanism

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ANXA5遺伝子のプロモーターにある遺伝子多型によるハプロタイプが習慣流産と関連し、女性が高リスクのM2ハプロタイプを持つと流産のリスクが増加する。M2からのANXA5遺伝子の発現量は少なく、プロモーター活性は低い。ANXA5遺伝子のプロモーター領域の多型の位置にはG4形成のコンセンサス配列がある。野生型とM2のヘテロ接合体の胎盤由来のゲノムをバイサルファイト処理後、PCR産物を次世代シーケンサーで解析した。C>T変換パターンから、M2はG4の形成しやすさに影響し、その結果、ANXA5のプロモーター活性や発現量が低下し、胎盤内過凝固をひきおこし、流産のリスクが増加する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The polymorphisms in the ANXA5 promoter region are associated with recurrent pregnancy loss. The female carriers of M2 haplotype are at high risk of the pregnancy loss. The placenta from the M2 carrier has low level of ANXA5 transcript since the promoter activity of the M2 is low. We identified the consensus sequence for Guanine-quadruplex (G4) formation at this promoter region. We analyzed the potential secondary structure by bisulfite treatment followed by next generation sequencing. The pattern of C-to-T conversion indicated that the polymorphism affected the potential for G4. These data suggest that the low expression levels of ANXA5 via G4 formation induce hypercoagulation leading to high risk of pregnancy loss in M2 carriers.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：グアニン四重鎖 DNA二次構造 プロモーター アネキシン 多型 習慣流産

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複数の遺伝子多型により構成されるハプロタイプが習慣流産と関連し、女性が少数ハプロタイプ (高リスクアリル) を持つと流産のリスクが増加することを示した。M2 ハプロタイプからの ANXA5 遺伝子の発現量は野生型よりも有意に少なく、M2 ハプロタイプのプロモーター活性が低いこともルシフェラーゼアッセイシステムで、証明されている。

さらに、私たちは ANXA5 遺伝子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ことを発見した。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。私たちは、これまでの研究で、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、M2 ハプロタイプからの ANXA5 遺伝子の発現量が低下することを示した。この ANXA5 遺伝子の発現量の低下が M2 ハプロタイプでの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提唱している。

2. 研究の目的

グアニン 4 重鎖などの DNA の高次構造は、*in vitro* では種々の方法によりその存在が証明されているが、実際の細胞の中で高次構造を取り得るのかどうかは、いまだに議論のあるところである。本研究では、ANXA5 遺伝子プロモーター領域の多型の位置にあるグアニン 4 重鎖形成のコンセンサス配列が、実際に細胞内でグアニン 4 重鎖の高次構造を形成していることを証明することを目的とする。

3. 研究の方法

バイサルファイト法を利用する。胎盤からゲノム DNA を抽出する。バイサルファイト法による mC>T の変換は一本鎖状態の DNA に対する反応なので、一般にバイサルファイト法は熱変性させた DNA で行うが、本実験では抽出された DNA そのままで処理を行うと、すでに一本鎖状態になっている領域のみに mC>T の変換が生じる。グアニン 4 重鎖形成のコンセンサス配列を含むプロモーター領域の PCR 増幅産物を次世代シーケンサーで解析した。野生型と、M2 ハプロタイプのヘテロ接合体の胎盤を使用して行った。本研究は、藤田保健衛生大学・ヒトゲノム遺伝子研究倫理審査委員会の承認を得ている。

4. 研究成果

まず、次世代シーケンサーにて解析したシーケンスデータを、C>T 変換パターンにより上

鎖と下鎖に分離し、それらをクラスター解析でグループ化した。その結果、5-10%の分子において、1本鎖 DNA 形成を示す、およそ 30-100 bp の連続した領域での C>T 変換を有していた。これらは大きく 2 つの変換パターンを示した。1 つは G4 コンセンサス配列の相補鎖領域での集中した変換で、これは G4 構造が生体内で形成されていることを示している。もう 1 つはプロモーターから下流に伸びた変換パターンで、これは mRNA の転写開始と関連していると考えられた。これらのパターンが野生型と発現低下を示す M2 ハプロタイプとで若干異なっており、G4 構造形成が遺伝子発現を上昇させることを示唆した。同一アリルでの異なった変換パターンの存在は 1 本鎖 DNA 領域の時間的な変化を示していると考えられ、上記の処理方法と次世代シーケンス解析を組み合わせることで、生体内での DNA 構造の動的な変化を明らかにできると考えられた。

以上により M2 ハプロタイプをヘテロで持つ胎盤は、野生型のホモの胎盤と比べて、グアニン 4 重鎖形成能が変化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、流産を起こしやすい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 29 件)

1. Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, Kurahashi H. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. **J Virol Methods** 228, 74-8, 2016. (査読あり)
2. Markoff A, Kurahashi H, Grandone E, Bogdanova N. Annexin A5 haplotype M2 is not a risk factor for recurrent miscarriages in Northern Europe, is there sufficient evidence? **Reprod Biomed Online** 32(5), 469-73, 2016. (査読あり)
3. Nakagawa T, Taniguchi-Ikeda M, Murakami Y, Nakamura S, Motooka D, Emoto T, Satake W, Nishiyama M, Toyoshima D, Morisada N, Takada S, Tairaku S, Okamoto N, Morioka I, Kurahashi H, Toda T, Kinoshita T, Iijima K. A novel PIGN mutation and prenatal diagnosis of inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. **Am J Med Genet A** 170(1), 183-188, 2016. (査読あり)
4. Taniguchi-Ikeda M, Takeshima Y, Lee T, Nishiyama M, Awano H, Yagi M, Unzaki A, Nozu K, Nishio H, Matsuo M, Kurahashi H, Toda T, Morioka I, Iijima K. Next-generation sequencing discloses a

- nonsense mutation in the dystrophin gene from long preserved dried umbilical cord and low-level somatic mosaicism in the proband mother. **J Hum Genet**, 61(4), 351-355, 2016. (査読あり)
5. Boda H, Uchida H, Takaiso N, Ouchi Y, Fujita N, Kuno A, Hata T, Nagatani A, Funamoto Y, Miyata M, Yoshikawa T, Kurahashi H, Inagaki H. A PDE3A mutation in familial hypertension and brachydactyly syndrome. **J Hum Genet**, in press. (査読あり)
 6. Kurahashi H, Kato T, Miyazaki J, Nishizawa H, Nishio E, Furukawa H, Miyamura H, Ito M, Endo T, Ouchi Y, Inagaki H, Fujii T. Preimplantation genetic diagnosis/screening by comprehensive molecular testing. **Reprod Med Biol** 15(1), 13-19, 2015.(査読あり)
 7. Miyazaki J, Ito M, Nishizawa H, Kato T, Minami Y, Inagaki H, Ohye T, Miyata M, Boda H, Kiriyama Y, Kuroda M, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Intragenic duplication in the PHKD1 gene in autosomal recessive polycystic kidney disease. **BMC Med Genet** 16(1), 98, 2015. (査読あり)
 8. Yokoi S, Ishihara N, Miya F, Tsutsumi M, Yanagihara I, Fujita N, Yamamoto H, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kojima S, Saitoh S, Kurahashi H, Natsume J. TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like severe form of cortical dysgenesis. **Sci Rep** 5, 15165, 2015. (査読あり)
 9. Morine M, Kohmoto T, Masuda K, Inagaki H, Watanabe M, Naruto T, Kurahashi H, Maeda K, Imoto I. A unique TBX5 microdeletion with microinsertion detected in patient with Holt-Oram syndrome. **Am J Med Genet A** 167(12), 3192-3196, 2015. (査読あり)
 10. Nakamura Y, Kikugawa S, Seki S, Takahata M, Iwasaki N, Terai H, Matsubara M, Fujioka F, Inagaki H, Kobayashi T, Kimura T, Kurahashi H, Kato H. PCSK5 mutation in a patient with the VACTERL association. **BMC Res Notes** 8, 228, 2015. (査読あり)
 11. 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. **Human Genome Variation**, 2, 15003, 2015. (査読あり)
 12. Tairaku S, Taniguchi-Ikeda M, Okazaki Y, Noguchi Y, Nakamachi Y, Mori T, Kubokawa I, Hayakawa A, Shibata A, Emoto T, Kurahashi H, Toda T, Kawano S, Yamada H, Morioka I, Iijima K. Prenatal genetic testing for familial severe congenital protein C deficiency. **Human Genome Variation**, 2, 15017, 2015. (査読あり)
 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. **Transpl Infect Dis** 17(1), 160-1, 2015. (査読あり)
 14. Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, Kawashima N, Miyamura K, Yoshida N, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. **Transpl Infect Dis** 17(5), 728-31, 2015.(査読あり)
 15. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole genomic analysis of an unusual human G6P[14] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea in Thailand: evidence for bovine-to-human interspecies transmission and reassortment events. **PLoS One** 10(9), e0139381, 2015. (査読あり)
 16. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and characterization of unusual DS-1-like G1P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Thailand. **PLoS One** 10(11), e0141739, 2015. (査読あり)
 17. 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. (査読あり)
 18. 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.(査読あり)
 19. 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. (査読あり)

20. 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. (査読あり)
21. 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. (査読あり)
22. 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. (査読あり)
23. 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. (査読あり)
24. 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. (査読あり)
25. 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. (査読あり)
26. 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. (査読あり)
27. 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. (査読あり)
28. 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. (査読あり)
29. 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. (査読あり)
- [学会発表] (計 11 件)
1. Kurahashi H, Mishra D, Kato T, Inagaki H, Kosho T, Wakui K, Kido Y, Sakazume S, Taniiguchi-Ikeda M, Morisada N, Iijima K, Fukushima Y, Emanuel BS. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22) (q24.13;q11.21) translocation. European Human Genetics Conference 2015, Glasgow, UK, June 6-9, 2015.
 2. Inagaki H, Miyamura H, Tsutsumi M, Kato T, Nishizawa H, Kurahashi H. Massive parallel sequencing revealed the conformational dynamics of the non-B form DNA at the promoter. 65th annual meeting of American Society of Human Genetics. Baltimore, MA, USA, October 6-10, 2015.
 3. Inagaki H, Ota S, Nishizawa H, Miyamura H, Nakahira M, Suzuki M, Tsutsumi M, Kato T, Nishiyama S, Yanagihara I, Kurahashi H. Deep sequencing of sodium bisulfite-treated genomic DNA revealed in vivo G-quadruplex structure affecting the gene expression of ANXA5 that causes obstetric complications. The 11th International Workshop on Advanced Genomics, Tokyo, May 20-22, 2015.
 4. Kurahashi H, Kato T, Inagaki H, Mishra D, Ouchi Y, Tsutsumi M, Ohye T. Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans. International Symposium on Genome Science 2015, Tokyo, January 20-21, 2015.
 5. Kurahashi H. Age-related increase of aneuploidy in human oocytes. IFFS/JSRM International Meeting 2015, Yokohama, April 26-29, 2015.
 6. 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.
 7. 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Nishiyama S, Kato T, Kani C, Miyazaki J, Nishizawa H, Ochi M, Fujii T, Kurahashi H. Cytogenetic analysis of monopronucleated (IPN) 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 1 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.

〔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26年5月8日 NHK ニュース、朝日新聞、毎日新聞、日本経済新聞、中日新聞に研究成果に関する報道や記事

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/mgt\(11;22\)\)](http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/mgt(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：