

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501307

研究課題名(和文) ヒト均衡型相互転座を作り出す染色体切断端の近接機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of chromosome conformation and breakpoints of balanced translocations in human

研究代表者

稲垣 秀人 (INAGAKI, Hidehito)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：70308849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんや生殖細胞系列で見つかる染色体転座は、異なる染色体の切断端が再結合して形成される。しかしなぜ物理的に遠位にある染色体同士が再結合されるのか、不明な点が多い。本研究では、ヒト男性精子中に数万分の1で発生する均衡型相互転座の原因となるパリンドローム配列に着目し、その特殊なDNA配列が形成するDNA高次構造が核内でどのような相互作用を起こすかどうかを検討した。その結果、核内で内在の2つのDNA修復酵素によって切断されることが確認され、また別の特殊なDNA構造についても核内代謝に影響を及ぼすことを明らかにした。核内配置はその配列の特殊性からくる困難さにより今後の検討課題となった。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal translocations are mediated by illegitimate joining between distal parts of the different chromosomes. But the mechanism of proximity of these ends remains unknown which should have been repaired precisely. In this study, I used a palindromic sequence that induces frequent (1/20,000) de novo translocation in sperm from healthy men, and analyzed the interaction of these specific sequences that form DNA secondary structures in vivo. I found that the secondary structures were cleaved by two endogenous DNA repair enzymes, that the other DNA secondary structure also influences the chromosome metabolisms. Because of the difficulty of the DNA secondary structure, the chromosome conformation analysis remains a future subject.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：DNA secondary structure Translocation Chromosome conformation

1. 研究開始当初の背景

がん、あるいは生殖細胞系列で見つかる染色体転座は、ランダムな DNA 切断とその後に続く間違った再結合によって引き起こされると従来は考えられてきた。ところが近年、ランダムではなく、特定の部位で繰り返し起こる DNA 切断の例が報告されている。その部位では特殊な DNA 高次構造 (non-B 型 DNA)、すなわち三重鎖や十字架型構造が形成され、構造特異的な DNA 切断酵素によって切断を受けることが明らかにされた (Raghaven, Nature 2004; Bacolla, PNAS 2004; Inagaki, Genome Res 2009)。しかし、切断直後は元の DNA 末端同士が物理的に近接しており、細胞内の DNA 修復系によって通常は速やかに元通りに繋ぎ戻されるはずである。遙か彼方の染色体上の 2 カ所の切断端が互いにつながる確率は非常に低いと考えられる。

2. 研究の目的

ヒトの t(11;22)(q23;q11)は、繰り返し起こる生殖細胞系列の相互転座で、世界に 100 例以上の独立した家系が報告され、さらに、たいていの健常人の男性では de novo の転座が 1 万の精子中から 1 つという高確率で発見されている (Kurahashi, Nature Genet 2001; Kato, Science 2006)。この転座の頻度は、転座切断点に存在する数百塩基のパリンドローム配列 (Palindromic AT Rich Repeat, PATRR) の、長さ対称性に依存していることから、パリンドローム配列が DNA 高次構造を形成するによって、高頻度で切断が誘発されて発生すると考えられている。さらに、均衡型転座として観察されていることから、11,22 番染色体の切断端同士が相互に入れ替わって結合するような何らかの特殊な機構がはたらいっていることが推測された。

そこで本研究では、染色体転座の発生時に、将来の転座染色体となるペアの染色体を、切断前あるいは切断後にあらかじめ物理的に近接させるような機構が作用しているのではないかという仮説を立て、その機構を現象面と分子メカニズムの両方から解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) パリンドローム配列の関わる染色体転座の発生機構に関して、ヒトの培養細胞を用いたモデル系を用いて、その DNA 構造を認識するタンパク分子、あるいはその分子の起こす DNA 代謝についてさらに詳細を検討し

た。

(2) パリンドローム配列などの DNA 高次構造形成配列をもとに、これらの細胞内での動態を観察するため、蛍光を用いた検出系を立ち上げ、また高次構造を認識する細胞内分子の影響をロックダウンなどの手法で解析した。

(3) パリンドローム配列以外での高次構造について、プロモータ部位に存在する 4 重鎖 DNA を例に検討した。

4. 研究成果

(1) ヒトパリンドローム配列が引き起こす染色体転座に関わる因子の同定
先行研究において、ヒト培養細胞における転座モデル系を開発し、安定した転座発生モデルを利用することが可能となった。これを利用して、ヒト細胞において siRNA を導入して遺伝子ロックダウンをおこなう系の条件を確立し、DNA トランスフェクションと遺伝子ロックダウンを両立させながら、転座発生に関わる因子を同定した。その結果、細胞に内在の DNA 代謝酵素、GEN1 と Artemis の 2 つがこの転座モデル系のカギとなることが示唆された。

そこでまず、これらの酵素の DNA 切断機構を詳細に検討し、転座モデル系での DNA の切断端の配列と比較することにより、前述の候補タンパク質がの関与が正しいかどうかを検討した。切断はパリンドローム配列が作り出す十字架型構造 (ホリデイ構造に似た配列) の根元を切る特殊な酵素 GEN1 によって始まる。転座モデル系でわずかに残る切断残存物を PCR で増幅し、その切断位置をマッピングし詳細に観察したところ、この酵素の切断配列の選択が、既報の活性と一致していたことから、1 段階目は GEN1 による斜め切り (ホリデイ構造の resolution に相当する) であることが裏付けられた。

次に、その後のヘアピン構造を切り開く活性を有する Artemis の切断機構を同様に転座モデル系で検討した。この酵素の切断残存物は通常の方法では検出不可能であったため、切断後に再結合した配列を塩基レベルで検討した。パリンドローム配列のユニット間でわずかに異なる塩基を指標にし、結合から逆にたどりながら、切断時の配列を推測する方法で明らかにした。その結果、ヘアピン先端から 2 塩基程度内側に切れ目を入れることが判明した。このことは、先端 2 塩基が場

合によっては本来の向きと逆向きになって再結合することから導き出された。この活性は報告されている Artemis の酵素の活性そのものであり、2段階目での切断が Artemis によって引き起こされることが裏付けられた。

以上の結果をまとめ、先行実験の結果と合わせた成果を Nature Communications に報告し、新聞紙上にも掲載された。

(2) DNA 高次構造の細胞内での動態の観察

細胞内での観察を可能にするため、DNA に結合するタンパク質として LacO/LacI と tetO/tetR の系を用いた。結合配列ユニット (Operator) をパリンδροーム配列に並列に組み合わせ、同時に EGFP や DsRed (あるいは mCherry) を核移行シグナルおよびリガンド結合配列と組み合わせた遺伝子を挿入したベクターを用いて、細胞に導入し、細胞株の樹立を試みた。いくつかのラインについて、その配列を確認したところ、蛍光タンパクの発現は確認され、DNA への結合も検出されたものの、パリンδροーム配列の欠失したラインがほとんどであった。配列の不安定さがライン樹立を困難にした。

その頃、新たな遺伝子ノックダウン手法として急速に浸透してきた CRISPR/CAS9 を利用して、パリンδροーム配列の挿入をこの系を用いて実施を試みた。利点の1つはトランスジーンのコピー数制御が可能であり、もう1つは位置効果をそろえた複数のライン樹立ができるからである。この試みは、数多くのクローンの選抜が必要となり、現在も検討中の課題となっている。

なお同様の解析手法において、細胞内で DSB を発生させてその挙動を観察した結果が 2013 年に Science に掲載された¹。その結果はいわゆる contact-first と breakage-first の両方の性質を示すものであった。パリンδροームを介した転座は breakage-first では説明しにくいところが多く、今後の解析が待たれるが、ヒトで起こる転座のメカニズムを正確に解明するためには種による特異性を排除した、ヒト細胞におけるモデル系の確立とその解析手法の開発が必要ではないかと考えている。

(3) パリンδροーム以外の DNA 高次構造の検討

DNA 高次構造はパリンδροーム配列以外にも、G (グアニン) の集中しやすいプロモ-

ータ部位に存在するとされる 4 重鎖 DNA が知られる。先行研究にて ANXA5 遺伝子のプロモータに 4 重鎖 DNA を取りうるコンセンサス配列が見つかった。そこでこの構造が生体内で存在するかについて検討した。4 重鎖 DNA が形成されると、片側の DNA 鎖が余ることで 1 本鎖 DNA が形成される。この 1 本鎖を検出するために、Sodium Bisulfite 処理をおこなって塩基置換を起こさせ、その部位を mapping したところ、確かにコンセンサス配列部位での 1 本鎖の存在を確認した。この成果はまだプリミティブであるため、今後の裏付け実験を待ち、DNA 構造と代謝に関する新しい知見として報告する予定である。

<引用文献>

¹Roukos et al., Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. Science 341, p660 (2013).

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 13 件)

1) Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation. Mishra D, Kato T, Inagaki H, 他 10 名 . Mol Cytogenet. 2014 Aug 13;7:55. doi: 10.1186/s13039-014-0055-x. 査読有

2) Prevalence of Emanuel syndrome: theoretical frequency and surveillance result. Ohye T, Inagaki H, 他 3 名 . Pediatr Int. 2014 Aug;56(4):462-6. doi: 10.1111/ped.12437. 査読有

3) Signature of backward replication slippage at the copy number variation junction. Ohye T, Inagaki H, Ozaki M, Ikeda T, Kurahashi H. J Hum Genet. 2014 May;59(5):247-50. doi: 10.1038/jhg.2014.20. 査読有

4) Contribution of fetal ANXA5 gene promoter polymorphisms to the onset of pre-eclampsia. Ota S, Miyamura H, Nishizawa H, Inagaki H, 他 7 名. Placenta. 2013 Dec;34(12):1202-10. doi: 10.1016/j.placenta.2013.09.010. 査読有

5) Two sequential cleavage reactions on cruciform DNA structures cause palindrome-mediated chromosomal translocations. Inagaki H, 他 7 名. Nat

Commun. 2013;4:1592. doi:
10.1038/ncomms2595. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1) 稲垣秀人. DNA Quadruplex structure at promoter region analyzed by bisulfite method. 日本人類遺伝学会第 58 回大会. 2013 年 11 月 20-23 日. 江陽グランドホテル (宮城県仙台市)

2) Inagaki H. Detection of in vivo G-quadruplex structure of the ANXA5 promoter that contributes to the recurrent pregnancy loss. ASHG. Oct18-22, 2014. サンディエゴ (アメリカ).

3) Inagaki H. Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via G-quadruplex structure in vivo. FASEB SRC. Jul20-25, 2014. アイタスカ (アメリカ).

4) Inagaki H. DNA Quadruplex structure at promoter region analyzed by bisulfite method. 第 3 6 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3-6 日. ポートピアホテル (兵庫県神戸市).

5) 稲垣秀人. ゲノム中に存在する DNA 高次構造と疾患: 習慣流産の例. 2013 年 11 月 20-22 日. ホテルニュー水戸屋 (宮城県仙台市)

6) 稲垣秀人. t(11;22) 発生メカニズムにおける十字架型 DNA の袈裟切り仮説の決定的根拠. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012 年 10 月 24-27 日. 京王プラザホテル (東京都新宿区)

7) Inagaki H. Mechanism of recurrent translocation t(11;22) initiated by cruciform conformation of palindromes. FASEB SRC. Jun17-22, 2012. Saxtons River (アメリカ).

〔図書〕(計 2 件)

1) 稲垣秀人, 倉橋弘樹. 「ゲノム構造解析の変革」医歯薬出版. 医学のあゆみ. 250 巻 5 号 「遺伝子医療の現状とゲノム医療の近未来」 2014. pp331-335.

2) Inagaki H., Kurahashi H. “Cruciform DNA”. Academic Press. Brenner’s Encyclopedia of Genetics (2nd Ed.). 2013. pp241-243. ISBN: 978-0-08-096156-9

〔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

藤田保健衛生大学総合医科学研究所分子遺伝学研究部門

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 秀人 (INAGAKI, Hidehito)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師
研究者番号 : 70308849

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :