

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770141
 研究課題名 (和文) メダカ減数分裂細胞を用いたヒト染色体転座誘導機構の解明とその応用
 研究課題名 (英文) Analysis of chromosomal translocation in humans by using medaka germ cell and its application
 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・助教
 研究者番号：70308849

研究成果の概要 (和文)：染色体転座は、がんや不妊症など、さまざまな疾患の原因となる。ヒトで繰り返し起こる染色体転座を例に、その発生機構を明らかにする目的で、メダカの減数分裂細胞を用いた解析を試みた。また、ヒト細胞を使った転座モデル系を用いて、転座の発生に関わる因子の同定を試みた。その結果をふまえて、転座発生の新たなメカニズムを提唱した。この成果はまた、将来の遺伝子導入の新しい手法としても応用できると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Chromosomal translocations often cause a variety of diseases, such as cancers or infertility. To find mechanism of a frequently occurring translocation in humans as an example, I used medaka germ cells as a model. In addition, I made a translocation model system of a human cell line and made an attempt to find factors involving the translocation. As a result, I proposed a novel mechanism of the recurrent translocation. This result might lead to a new gene transfer technique in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体転座、DNAの高次構造

1. 研究開始当初の背景

染色体転座は、ゲノムの恒常性を維持する機構が破綻した結果起こる現象で、がんを始めとするさまざまな疾患の原因となる。ほとんどの染色体転座は DNA 鎖のランダムな場

所での切断に起因すると考えられている。一方、染色体のある領域に集中して切断箇所が見つかる例も存在する。生殖細胞系列の非ロバートソン型転座 t(11;22)は、保因者はほぼ健康であるが、配偶子形成過程での染色体不

分離に起因する、染色体数の異常な子供の出生によってはじめて見つかる、頻度の高い転座である。この保因者の切断点は約 100bp 以下の領域に集中し、その部位に AT 含量の高い特徴的なパリンδροーム（逆向き反復）配列が存在した(Palindromic AT-rich Repeat, PATRR)。筆者の研究グループでは、以前の研究成果から、この特徴的な配列が DNA の特殊な高次構造、すなわち十字架型構造を形成し、それが切断の原因となると考えた。

しかしながら、この転座発生機構には謎な部分が多い。この t(11;22)は健常人の精子でも数万分の 1 の頻度で検出されるほど頻度の高い転座である。しかしながら体細胞や培養細胞では検出限界以下で見つからない。以前の研究から、体細胞でも転座を引き起こす反応は起こりうるということがわかっており、環境としてはお膳立てができていられると思われる。すなわち、体細胞では DNA が十字架型構造を形成しないために検出されず、精子形成過程の段階でこの高次構造を形成することにより、精子特異的な転座が引き起こされるのではないかと考えられる。

ではなぜ体細胞ではなく精子で特異的に起こるのか？いくつかの可能性が考えられた。

- (a) 精巣は体温よりも低い温度が維持されている器官であること
哺乳類の体温よりも数度低い温度が維持されていることが、パリンδροームの高次構造を安定化させる働きをしている。PATRR は 37°C よりも 25°C の方が *in vitro* での十字架型構造を形成しやすい (Kurahashi et al., JBC 279:35377, 2004)。
- (b) 減数分裂細胞での相同組換え機構により、DNA の DSB を起こしやすい環境にある。
SPO11 などの組換え酵素の働きが強いため、特に減数分裂細胞で切られやすい。
- (c) 精子形成時のクロマチン構造の変化により、一時的に DNA にゆるみが生じる。
パリンδροーム配列が高次構造を形成するためには、負の超らせんが必要である。精子形成の最終段階にて、ヒストンが外され DNA の凝集が起こる。この時に DNA 構造に大規模な変化が生じ、十字架型構造形成の引き金になると考えられる。

2. 研究の目的

そこで、高次構造を伴う DNA 配列に起因する染色体転座の発生メカニズムを探るために、モデル動物としてメダカを用い、PATRR 配列が実際に十字架型構造を *in vivo* で形成するにはどのような条件が必要であ

るかを探ることが本研究の目的である。そして、その条件下で DNA 切断が頻繁に起こるのであれば、その部位に外来遺伝子を導入することが原理的には可能である。ヒトでは PATRR 配列の周辺には遺伝子が存在しないことから、ガン化などの危険の無い、遺伝子導入の新たな手法として実現させることも本研究の目標として掲げる。そのため、転座の一連の反応に関わる内部因子（すなわち DNA 切断酵素）を明らかにすることも平行して実施することとした。

ゲノムの不安定化が、生体内での DNA の高次構造形成に起因するという説は、古くは原核生物で示唆されて来た。しかし高等生物、とくにヒトの疾患と関連づけて提唱されて来たのは最近になってからである。それでも、実際に生体内で安定な DNA の二重らせんが変形し、果たして non-B 型の高次構造を取りうるのかどうか、未だ議論の分かれているところである。その上で、本研究をおこなうことで、生体内での non-B 高次構造の形成条件を明らかにし、その存在を証明することができれば、ゲノムの恒常性と変動のメカニズムについて重要な知見が得られると考えている。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックメダカの作製

転座モデルメダカを作製する目的で、ヒトの *de novo* 転座を誘発する配列 PATRR11、および PATRR22 を導入した。各ラインを掛け合わせることで、両者を有する個体を作製、選抜した。

(2) 転座頻度の計測

各個体より、転座を起こしていると想定された精巣およびコントロールとして肝臓を取り出し、DNA を常法で抽出した。PCR はヒトの t(11;22) 転座検出と同じ方法で実施した。

(3) 転座を引き起こす因子の解明

転座モデル動物を確立すると平行して、転座を引き起こすメカニズムを解明し、将来の遺伝子導入法として利用可能かどうかの検討をおこなった。材料は筆者が確立した実績のあるヒト培養細胞のモデル系を用いた。候補遺伝子をノックダウンし、転座頻度への影響を測定した。

4. 研究成果

(1) トランスジェニックメダカの作製

通常は遺伝子導入を行うにあたり、マーカーとなる遺伝子を用いて、導入の可否を簡便にスクリーニングする系を使用するのであ

るが、今回の転座においては、そのマーカーの遺伝子発現が DNA の高次構造形成に影響を与える等の何らかの負の要因となる可能性があった。ヒトの転座を引き起こす PATRR11 および PATRR22 はいずれも染色体上の遺伝子間あるいは繰返し配列の内部に位置しており、その領域を転写因子が通過することは無いと考えられた。

そのため、当初の計画を修正し、配列そのものだけを導入して近隣のマーカー遺伝子の影響を排除するように工夫をした。導入の可否は、トランスジーンそのものを検出する PCR にておこない、いくつかのラインを得ることができた。これらを組み合わせて作製した F2 世代から、二種類の PATRR を有する個体を選抜した。

(2) 転座頻度の計測

ヒト以外で実際に転座が起こるかどうかが、現時点では全くの未知数であったため、転座を計測する方法は従来のヒトで行っている PCR の系をそのまま用いて、他の障害となる要因を排除した上でおこなった。DNA の品質等は問題ないことを、別の領域に対する PCR にて検証した上で、転座の検出を試みた。しかしながら、複数のラインで繰返しおこなったにも関わらず、現時点では転座が検出できなかった。

検出できない理由について、いくつか挙げられた。

(a) 転座頻度の問題

用いた PATRR 配列は、ヒトに於いては転座頻度としておよそ 1/30000 という数値を得ているが、この頻度がトランスジェニック動物で維持されるかどうかは不明である

(b) 細胞数の問題

メダカ精巢より得られる DNA の量から、 2×10^5 個の細胞に相当する精子、あるいは精原細胞が得られていると考えられた。これは転座検出を試みるには若干少ない量である

(c) ヒトと異なる環境

メダカの飼育温度は 20-25°C であり、ヒトの精巢の温度よりはかなり低い。当初はこの温度が重要なファクターであると考えていたが、温度低下によって当初の想定とは逆に、転座が起きにくくなることが考えられた

以上の結果から、現時点では転座モデルを作製する目標には達することができていない。しかしながら、上記の問題をふまえて、転座頻度を上げるような構築を用いる等して工夫して行うことで、ヒトと同様な転座を起こすことが可能であると考えられ、今後の研究の道筋を作ることができたと考えている。

(3) 転座を引き起こす因子の解明

転座に関わる因子として、前述の十字架型構造形成のファクター以外にも、DNA 切断酵素、修復酵素など、細胞内因子に関わる。これらの同定を試みた。いくつかの DNA 構造特異的ヌクレアーゼや、DNA 修復酵素を選抜し、siRNA を用いた RNAi の手法でノックダウンし、その影響を転座モデル系の細胞内転座様反応の頻度の変化として計測した。

(a) 1 段目の切断

つい最近その実体が明らかにされた Holliday Junction resolvase である GEN1 が、PATRR を介した染色体転座に関与しているという知見を得ることができた。十字架型の DNA 構造は、その根元に相当する部位が、DNA 相同組換え中間体の Holliday 構造と相似形のため、この結果は確からしく思われた。事実、大腸菌で発現させたヒト GEN1 は、*in vitro* で PATRR の十字架型構造を斜めに切断 (resolution) することが確認された。

(b) 2 段目の切断

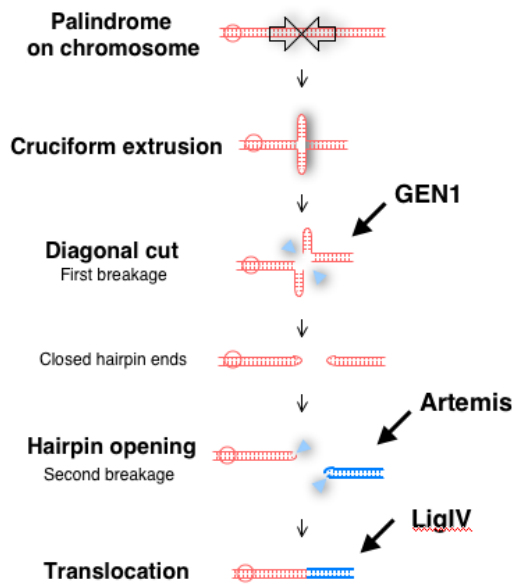
GEN1 によって切断された断端は閉じたヘアピン構造を有していると思われた。ヘアピン構造に特異的に働き、先端を切り開く Artemis 遺伝子のノックダウンを行った結果、転座頻度が減少することを確認した。これは V(D)J 組換えの中間体に働く Artemis の機能に極めて類似した反応であった。

(c) 切断端の融合

Artemis による切断で切り開かれた DNA 末端は、非相同末端結合で融合すると考えられた。DNA LigIV をノックダウンした結果、予想通り転座頻度が減少することが明らかとなった。

以上の結果から、PATRR の介する染色体転座の反応について、次のような反応で進む経路が考えられた。それぞれ DNA の高次構造に特異的なヌクレアーゼによって、1) まず GEN1 が十字架型構造を認識して斜めに切断し、2) その後出現した閉じたヘアピン末端を Artemis が切り開き、3) 最終的に出来上がった二重鎖切断末端が非相同末端結合によって融合されることで転座反応が完了する、という一連の経路およびその関与する因子がモデル系から確かめられた。このような染色体転座のメカニズムは今まで報告が無く、新しい知見である。これらの成果はアメリカ人類遺伝学会を始めとするいくつかの学会で報告し、また論文として発表予定である。

A model for PATRR-mediated translocation



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) Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H, Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22)(q23;q11), Eur J Hum Genet、査読有、in press、2010
- (2) Kurahashi H, Inagaki H, Kato T, Hosoba E, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Bolor H, Tong M, Emanuel BS、Impaired DNA replication prompts deletions within palindromic sequences, but does not induce translocations in human cells、Hum Mol Genet、査読有、Vol. 18、No. 18、2009、pp. 3397-3406
- (3) Kurahashi H, Bolor H, Kato T, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T、Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities、J Hum Genet、査読無、Vol. 54、No. 5、2009、pp. 253-260
- (4) Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Bolor H, Taniguchi M, Shaikh TH, Emanuel BS, Kurahashi H、Chromosomal instability mediated by non-B DNA: cruciform conformation and not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans、Genome Res、査読

有、Vol. 19、No. 2、2009、pp. 191-198

- (5) Kato T, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Yamada T, Emanuel BS, Kurahashi H、Two different forms of palindrome resolution in the human genome: deletion or translocation、Hum Mol Genet、査読有、Vol. 17、no. 8、2008、pp. 1184-1191

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 稲垣秀人、GEN1 resolves cruciform-forming palindromic DNA leading to recurrent translocation in human、第 32 回日本分子生物学会年会、2009-12-12、横浜市
- (2) 稲垣秀人、Non-B 型 DNA が引き起こすヒト染色体転座の発生機構、日本分子生物学会第 9 回春季シンポジウム、2009-5-11、宮崎市
- (3) 稲垣秀人、Artemis は十字架型のパリンドローム構造を切断し染色体転座を誘発する、第 31 回日本分子生物学会年会、2008-12-11、神戸市
- (4) Inagaki H.、Artemis cleaves cruciform-forming palindromic DNA leading to recurrent translocation in humans、58th Meeting of The American Society of Human Genetics、2008-11-13、Philadelphia
- (5) Inagaki H.、Artemis cleaves cruciform-forming palindromic DNA leading to recurrent translocation in humans、ASHG Ataxia-Telangiectasia/Genome Instability Satellite Meeting、2008-11-11、Philadelphia

[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〕
ホームページ等

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・
助教
研究者番号：70308849

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし