

氏名	DIVYA MISHRA
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1073号
学位授与の日付	平成27年3月12日
学位論文題名	Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22) (q24.13;q11.21) translocation 「繰り返す生殖細胞系列染色体転座t(8;22) (q24.13;q11.21)の切断点の解析」 Molecular Cytogenetics 7(55): 2014. 8
指導教授	倉橋浩樹
論文審査委員	主査 教授 前田 明 副査 教授 藤井 多久磨 教授 吉川 哲史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

生殖細胞系列染色体転座t(8;22) (q24.13;q11.21)は、転座保因者は健康であるが、過剰転座派生染色体による先天異常症候群の児の出生によって気付かれることが多い。AT含量の高いパリンドローム(回文配列)DNA (palindromic AT-rich repeat: PATRR)を介して繰り返り発生する染色体転座の一つである。22番染色体側の切断点は、最も頻度の高い生殖細胞系列染色体転座t(11;22) (q23;q11.21)の切断点と共通したPATRR配列(PATRR22)であることがわかっているが、一方、8番染色体側の切断点の詳細なことはわかっていない。その理由は、パリンドロームDNAの解析が技術的に困難であったことに起因する。

### 【目的】

本研究では、繰り返す染色体転座t(8;22)の発生メカニズムを解明するために、t(8;22)の8q24側の転座切断点を、詳細に検討した。パリンドロームDNAの解析の技術的困難を克服するために、次世代シーケンサーを利用して解析を行った。

### 【対象および方法】

t(8;22)を持つ2家系の家系構成員、並びに健常人に対し、研究内容を説明し同意の得られた後に、血液を採取した。8q24側のPATRR(PATRR8)は、健常人由来ゲノムDNAを用いて、PCR増幅後にアガロース電気泳動でおおまかに遺伝子型を判定し、それぞれのアリル由来PCR産物にタグメンテーション(Nextera XT、イルミナ社)を行った後、次世代シーケンサー(MiSeq、イルミナ社)で塩基配列を解析した。転座ジャンクションに関しては、t(8;22)転座家系構成員のゲノムDNAに対し、PATRR8とPATRR22に近接して設計したプライマーでPCRを行い、サンガー・シーケンス法によりPCR産物の塩基配列を得た。

### 【結果】

次世代シーケンサーでもパリンドローム配列の中央部はシーケンス効率が悪かったが、大量シーケンスすることで、PATRR8の全塩基配列が決定できた。得られたPATRR8のパリンドローム配列は98-423bpのサイズ多型を示し、対称型、非対称型を含めて8種類のアリルが同定された。PATRR22との相同性は35-50%程度であった。これらのPATRR8配列と、t(8;22)を持つ日本人2家系の転座ジャンクション配列を比較検討したところ、転座切断点はPATRR8、PATRR22内に位置していた。塩基レベルでは、家系ごとにわずかに異なっていたが、それぞれ対称型のPATRR多型アリルの中央付近に位置していた。転座発生時の再結合は、わずかな塩基数のマイクロホモロジーを介していた。特記すべきことに、従来からの概念では独立して発生していると思われる両転座派生染色体のジャンクション部の塩基配列が完全に一致していた。

### 【考察】

PATRR8が高度多型を示すこと、t(8;22)転座がPATRRの対称型アリルを発生母体としていること、切断点がPATRRの中央部であること、再結合がホモロジーを介さないこと、などの特徴はt(11;22)と共通しており、t(11;22)で提唱されている発生機序、すなわち、2つのPATRRがそれぞれ2次構造をとり、その中央部が切断され、誤修復されることで発生していると考えられる。また、両転座派生染色体のジャンクション部の塩基配列が完全に一致していたことは、2つの染色体に独立して発生した2カ所のDNA切断に対するDNA修復機構の結末としては説明できない現象で、未知の染色体再構成の分子経路を介して発生している可能性があり、今後の解明が待たれる。

### 【結語】

次世代シーケンサーで大量シーケンスすることで、ヒトゲノム・レファレンス配列のギャップであったPATRR8の全塩基配列が決定でき、その多型性アリルを同定した。日本人2家系のt(8;22)転座の解析から、t(8;22)転座はt(11;22)と同様のDNA 2次構造を介した機序で発生していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

パリンドローム領域は同一鎖内でアニールするため2次構造を形成しやすく、そのため、PCRによる増幅が困難、サンガーシーケンス反応が停止する、クローン化しても大腸菌内で欠失する、など様々な問題があり、従来の塩基配列解析法では解読不可能であった。

本研究では、次世代シーケンサーを用いて大量シーケンスをすることでこれらの難点を克服し、世界で初めて、PATRR8の全長を解読した。その結果を利用して、PATRR8の多型の解析と、t(8;22)転座のジャンクション配列の解析から、繰り返り起こるt(8;22)転座の発生メカニズムに関する新たな仮説を提唱したことは、この分野の進歩に大きく貢献すると考えられ、学位授与に値すると判断した。