

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710215

研究課題名（和文） 染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文） The chromosomal territory influencing the regulation of gene expression in neuronal cells.

研究代表者

堀家 慎一 (HORIKE SHINICHI)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：40448311

研究成果の概要（和文）：ヒト染色体工学技術を用いることで、神経細胞におけるヒト 15 番染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御機構の解明に取り組んだ。その結果、PWS-IC 領域は活発な遺伝子発現を呈する遺伝子領域をヒト 15 番染色体テリトリーの外にループアウトする機能を持つことを見いだした。これらの結果から、ヒト 15 番染色体上の遺伝子は、染色体の空間的配置によって高度に制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：I examined the chromosome territory of a human chromosome 15 in neuronal cells by using the chromosome engineering techniques. Finally, I found that active gene region of 15q11-q13 was looping out from the chromosome 15 territory. From my results, 15q11-q13 locus was highly coordinately regulated by PWS-IC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：自閉症、インプリンティング、PWS-IC、染色体ペアリング、核内配置

1. 研究開始当初の背景

自閉症は、社会環境と遺伝的背景が発症に関与していると考えられているが、その原因遺伝子、発症メカニズムは未だ明確にされていない。これまでに自閉症患者で数種の染色体異常やゲノムコピー数多型が報告されているが、最も頻回に認められるのは第 15 番染色体長腕領域（15q11-q13）の重複である。さらに興味深い事に、その重複は母親アレル特異的であり父親アレルの重複は臨床症状が異なることから、親由来特異的な発現を呈するゲノム刷り込み遺伝子の関与が推測さ

れる。しかしながら、自閉症の発症機序にゲノム刷り込みを含めたエピジェネティックな現象がどのように寄与しているかは長らく不明であった。こうした中、海外共同研究者である Dr. LaSalle (UC Davis) は世界で初めて 15q11-q13 領域における母方と父方アレルの染色体ペアリングを報告し、さらにその染色体ペアリングが自閉症などの神経発達障害の患者で異常をきたしていることを見出した。このように、15q11-q13 領域に関するいくつかのエピジェネティックな修飾因子が自閉症の発症に寄与していることが明らか

になりつつあるが、「なぜ母方アレルの重複で自閉症が発症するのか」という分子機構の解明にはさらなる研究の進展が必須である。

2. 研究の目的

申請者は、染色体の数的異常（アニュプロイディー）およびゲノムコピー数多型が核内における正常な「染色体の空間的配置（染色体テリトリー）」および相同染色体同士の相互作用に重大な影響を及ぼし、脳機能に重要な遺伝子発現に染色体ドメインレベルで異常をきたしている可能性を考えている。これまでの培養細胞レベルの研究で、申請者はヒト染色体移入法を用いてヒト 15 番染色体をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に移入することでヒト 15 番染色体のトリソミー細胞株を人工的に作製した。興味深いことに、作製した細胞株ではゲノムコピー数が増加したにもかかわらずヒト 15 番染色体上の GAB 受容体 β 3 サブユニット *GABRB3* 遺伝子やニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ サブユニット *CHRNA7* 遺伝子の発現量が著しく低下していた。従って、これらの遺伝子の発現には何らかの近接する cis および trans-effect が必須であり、トリソミーにより変化した各々の核内配置の異常が遺伝子発現異常を引き起こしたと考えた。そこで、15q11-q13 領域、約 10Mb にわたり各々の遺伝子座の核内配置を FISH で解析したところ、トリソミー細胞株において *GABRB3* 遺伝子座特異的な染色体のペアリング (trans-effect) の消失と PWS-IC (Imprinting Control Region) 相互作用 (cis-effect) の変化が観察された。このことは、ゲノムコピー数の増加に伴う染色体テリトリーの変化が正常な遺伝子発現に何らかの影響を与えていることを表していると考えられる。しかしながら、移入 15 番染色体がどのように核内における染色体のペアリングや PWS-IC 相互作用に影響を与えるか

については未だ明らかにされていない。さらに、それらの異常がなぜ脳機能に局限した表現型（神経発達障害）に繋がるかなど、染色体の数的異常がおよぼす組織特異的効果についても不明である。そこで、申請者はヒト 15 番染色体を保持するトランスクロモソミック (TC) マウスを作出し、自閉症で最も頻回に認められるコピー数多型を再現することで、細胞核内における染色体テリトリーとその表現型の関連を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

これまでに、ヒト染色体移入技術によってヒト 15 番染色体を 1 本保持する TC マウスを作出した。本 TC マウスの行動解析の結果、オープンフィールドにおける新奇オブジェクトに対する反応性とホームケージ活動量に有意な差を見だし、染色体の数的異常がもたらす脳機能障害のモデルとなると考えられた。そこで、この TC マウスを用いて、染色体の数的異常がなぜ脳機能に局限した表現型（神経発達障害）に繋がるかを解明するため、マウス内在性の遺伝子発現解析、染色体ペアリングや PWS-IC 相互作用などの染色体テリトリーの解析を行い、移入したヒト 15 番染色体がもたらす影響について明らかにする。さらに、その組織特異性や時期特異性を検討すると共に、染色体テリトリーを規定するエピジェネティック修飾（ヒストン修飾や DNA メチル化）の存在を ChIP 解析や Bisulfite Sequencing 法によって明らかにする。

4. 研究成果

15 番染色体重複の in vivo モデルとして、ヒト 15 番染色体を保持するトランスクロモソミックマウス (TC マウス) を作製し、染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御を解析した。ヒト 15 番染色体を保持する TC マウスにおいて遺伝子発現解析を行った結果、内在性のマウス 7q, *Snrpn-Gabrb3* 領域

における遺伝子発現には変化がないことが分かった。一方、ヒトの神経細胞で以前に見出した「染色体ペアリング」と呼ばれる現象がマウス 7q, Snrpn-Gabrb3 領域にも認められるか DNA-FISH 法で解析した結果, Gabrb3 領域にかかる 3 つの BAC プローブでは少なくとも神経細胞特異的な「染色体ペアリング」は観察されなかった。これらのことから、ヒトとマウスにおいて染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御に保存性がないことが示唆された。つまり、15 番染色体の重複によって引き起こされる遺伝子発現異常はヒト特異的であると考えられる。そこでヒト染色体工学技術を用いることで、神経細胞におけるヒト 15 番染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御機構の解明に取り組んだ。その結果、PWS-IC 領域は活発な遺伝子発現を呈する遺伝子領域をヒト 15 番染色体テリトリーの外にループアウトする機能を持つことを見いだした。これらの結果から、ヒト 15 番染色体上の遺伝子は、染色体の空間的配置によって高度に制御されていることが明らかとなった。

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 3 件)

- ① Nagai M., Meguro-Horike M., Horike S. “Epigenetic defects related to assisted reproductive technologies: Large offspring syndrome (LOS)” *DNA Methylation-Genomic Technologies and Impact*, 167-182, (2012) 査読なし, DOI: 10.5772/34102.
- ② Yasui D.H., Scoles H.A., Horike S., Meguro-Horike M., Dunaway K.W., Schroeder D.I., Lasalle J.M. (2011) “15q11.2-13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of

CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain.” *Human Molecular Genetics*, 20, 4311-4323. 査読あり, DOI: 10.1093/hmg/ddr357.

- ③ Meguro-Horike M., Yasui D.H., Powell W., Schroeder D.I., Oshimura M., Lasalle J.M., *Horike S. (2011) “Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome.” *Human Molecular Genetics*, 20, 3798-3810.
*Corresponding author 査読あり, DOI: 10.1093/hmg/ddr298.

[学会発表] (計 17 件)

- ① Horike S. “A noncoding imprinted RNA, MESTIT1 is essential for the repression in cis of KLF14” 62th Annual Meeting; The American Society of Human Genetics, Nov. 8, 2012, San Francisco, (USA)
- ② 堀家慎一「広汎性神経発達障害に関連する 15q11-q13 ゲノム刷り込み領域のアレル特異的クロマチンダイナミクスの解析」日本人類遺伝学会第 57 回大会, 京王プラザホテル, 2012 年 10 月 26 日 (東京都)
- ③ 堀家慎一「自閉症とエピジェネティクス」応用動物科学セミナー「エピジェネティクスの深淵」、東京大学 弥生講堂 一条ホール, 2012 年 7 月 20 日 (東京都)
- ④ 堀家慎一「PEG1/MEST 遺伝子領域のゲノム刷り込み制御機構の解明」第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会, 学術総合センター, 2012 年 5 月 14 日 (東京都)
- ⑤ 堀家慎一「高次遺伝子発現制御機構へのブレイクスルー」日本分子生物学会 第

- 12 回春季シンポジウム, 石和温泉 慶山, 2012 年 4 月 26 日 (山梨県)
- ⑥ Horike S., Yasui D.H., Powell W., LaSalle J.M., Meguro-Horike M. “A novel model of human 15q-duplication syndrome: Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription” Cell Symposia, Autism Spectrum Disorders: From Mechanisms to Therapies, November 10-11, 2011, Arlington, VA (USA)
- ⑦ 堀家 慎一 “Epigenetics of autism spectrum disorders” 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2011 年 10 月 27 日, (東京都)
- ⑧ Horike S., Yasui D.H., Powell W., Schroeder D. I., Oshimura M., LaSalle J. M., Meguro-Horike M. “Neuron specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome” The 32nd NAITO CONFERENCE ON Biological basis of mental functions and disorders, October 20-21, 2011, (山梨県)
- ⑨ Ohhira T., Abe S., Tanaka H., Notsu T., Horike S., Qi D.L., Fujisaki C., David G., Oshimura M., Kugoh H. “Evidence for a hTERT repressor gene on human chromosome 3p21.3 by using chromosome engineering” 12th International Congress of Human Genetics and The ASHG 61st Annual Meeting, October 14, 2011, Montreal, (CANADA)
- ⑩ Horike S., Yasui D.H., Powell W., Schroeder D. I., Oshimura M., LaSalle J.M., Meguro-Horike M. “Neuron specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome” 12th International Congress of Human Genetics and The ASHG 61st Annual Meeting, October 12, 2011, Montreal, (CANADA)
- ⑪ Yasui D.H., Scoles H.A., Horike S., Meguro-Horike M., Dunaway K.W., Schroeder D. I., LaSalle J.M. “15q11.2-13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain.” 12th International Congress of Human Genetics and The ASHG 61st Annual Meeting, October 12, 2011, Montreal, (CANADA)
- ⑫ Horike S. “Higher order inter-chromosomal association of maternal and paternal alleles of 15q11-q13” ICC on Genomic Imprinting and Beyond, September 21-23, 2011, Barcelona, (Spain)
- ⑬ Horike S., Yasui D.H., Oshimura M., LaSalle J.M., Meguro-Horike M. “Neuron specific impairment of inter-chromosomal pairing in MeCP2-depleted neuronal cells” June 26, 2011, 12th Annual Rett syndrome Symposium, Leesburg, VA, (USA)
- ⑭ 堀家 慎一 “ヒト 15q11-q13 領域におけるアレル特異的クロマチン脱凝集の解析” 日本分子生物学会 第 11 回春季シンポジウム, 2011 年 5 月 25 日, 金沢 (石川県)
- ⑮ Horike S., Powell W., LaSalle J.M.,

Oshimura M., Meguro-Horike M. “Role of PWS IC for paternal allele specific chromatin decondensation at 15q11-q13” 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011 年 5 月 20 日, (熊本県)

- ⑩ Meguro-Horike M., Yasui D.H., Powell W., Schroeder D.I., Oshimura M., LaSalle J.M., Horike S. “15q11-q13 homologous pairing and transcriptions are impaired in a novel neuronal model of 15q duplication syndrome” 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011 年 5 月 19 日, (熊本県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀家 慎一 (HORIKE SHINICHI)
金沢大学・学際科学実験センター・准教授
研究者番号：40448311

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし