

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710193

研究課題名（和文） 15q11-13 染色体ペアリングに着目した自閉症発症機構の解明

研究課題名（英文） Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome

研究代表者

堀家 慎一 (HORIKE SHINICHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任助教

研究者番号：40448311

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト染色体工学技術を用いて自閉症患者で最も頻回に認められる 15q11-q13 領域の母方アレル特異的重複を再現し、「なぜ過剰な母方 15q11-q13 領域が *UBE3A*, *ATP10C*, *GABA* レセプター遺伝子群の発現量を低下させるか」を染色体ペアリングや染色体の核内配置といった高次クロマチン構造の視点から検討した。その結果、母方 15q 重複モデル細胞株において *GABRB3* 遺伝子や *CHRNA7* 遺伝子の発現量の低下とともに、*GABRB3* 遺伝子近傍での特異的な相同染色体のペアリングが消失していた。

研究成果の概要（英文）：The most common recurrent cytogenetic abnormalities in autism spectrum disorders involve maternally derived duplications of the imprinted domain on chromosome 15q11-q13. Therefore characterizing the epigenetic chromatin organization of 15q11-q13 is important for understanding normal neuronal development. In this study, we focused on the homologous 15q11-q13 pairing in human neuronal cells. Our aim is to understand how the homologous pairing of 15q11-q13 is organized in the mammalian brain and associated with gene expression within the paired regions. In order to model 15q11-q13 maternal duplication in a neuronal cell line, a maternal copy of human chromosome 15 was transferred into the human SH-SY5Y neuronal cells by microcell fusion. As expected, homologous 15q11-q13 pairing was disrupted in human neuronal cells with an extra maternal copy of human chromosome 15. Interestingly, gene expression analysis of 15q11-q13 transcripts demonstrated significantly decreased expression of *SNRPN*, *GABRB3*, *CHRNA7* transcripts despite increased maternal dosage. These results suggested that gene expression can be altered in unexpected ways through epigenetic changes resulting from increased maternal 15q11-13 dosage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、染色体工学、エピジェネティクス、15q11-q13、インプリンティング

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症は、「言語発達の遅れ」「コミュニケーション能力の障害」「反復的で常同的な行動」を特徴とした広汎性神経発達障害である。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ヒト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 (Marshall, C.R. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 2008)。さらに、興味深い事に 15q11-q13 の重複は母親アレル特異的であり父親アレルの重複は自閉症を発症しないことから、親由来特異的な発現を呈するゲノム刷り込み遺伝子と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、大変興味深いことに研究協力者である 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減少していることを明らかにした (Thatcher, K.N. et al. *Hum. Mol. Genet.*, 2005)。染色体ペアリングは、相同染色体同士の相互作用であり、一見ランダムに配置されていると考えられている染色体の核内配置 (染色体テリトリー) と密接に関わっているとされ、近年大変注目されるエピジェネティック現象の一つである。これまでに、15q11-q13 領域に関して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、その発症機序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

本研究では、ヒト染色体工学技術を用いて自閉症患者で最も頻回に認められる 15q11-q13 領域の母方アレル特異的重複を再現し、「なぜ過剰な母方 15q11-q13 領域が *UBE3A*, *ATP10C*, *GABA* レセプター遺伝子群の発現量を低下させるか？」を染色体ペアリングや染色体の核内配置といった高次クロマチン構造の視点から検討する。

ダウン症や母方 15 番染色体の重複、18 番染色体トリソミー症候群、クラインフェルター症候群などのトリソミー症候群では、その過剰染色体が異なるにもかかわらず、自閉症や精神発達遅滞などの脳機能障害が認められ

る例が極めて高い。このことより我々は、以前より染色体の数的異常 (アネupロイディー) 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。しかしながら、核内における染色体テリトリーを決定する分子メカニズムや、染色体同士が互いにどのような領域および修飾因子を認識し、作用し合うのかなどを網羅的に解析する手法は確立されておらず、染色体テリトリーと各種疾患との関連もまた未だ明らかにされていない。本研究では、母方 15q 重複による自閉症をモデルとし、15q11-q13 のゲノムコピー数多型がどのように細胞核内で遺伝子発現に影響を与えるか明らかにする。そこで、母親由来のヒト 15 番染色体をヒト神経細胞株 SH-SY5Y に移入し、人工的に母方 15q 重複モデル細胞株を作製する。移入したヒト 15 番染色体の細胞核内での染色体配置と 15q11-q13 領域の遺伝子発現の関連を解析することで、15q11-q13 領域の母親由来の重複が自閉症の発症機序にどのように寄与しているか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 母方 15q 重複モデル細胞株の樹立

これまでに、ゲノム刷り込み現象を容易に解析するための資材として、染色体移入法を用い、親起源の明らかなヒト染色体 1 本を保持するマウス雑種細胞の作製を行ってきた。実際に、この雑種細胞を用い新規ヒト刷り込み遺伝子の単離に成功しており、ゲノム刷り込みの解析にきわめて有用な資材であることを証明した。本研究では、微小核細胞融合法により母方ヒト 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、過剰染色体が与える影響を染色体ペアリングや染色体の核内配置といった高次クロマチン構造という視点から解析する。

### (2) 母方 15q 重複モデル細胞株における遺伝子発現解析

15q11-q13 領域に位置する刷り込み遺伝子 (*MDN*, *SNRPN*, *UBE3A*) を含めた 10 遺伝子について、Real-time PCR 法により遺伝子発現量を定量する。コントロール遺伝子として、*GAPDH* および  $\beta$  アクチンを用いる。

### (3) 染色体ペアリング解析

15q11-q13 領域、約 10Mb の領域に位置する 15 個の BAC DNA をプローブとし、

DNA-FISH 解析を行う。プローブは、ニックトランスレーションキットにより、緑、または赤の蛍光色素でラベルする。SH-SY5Y 細胞は、PMA で分化誘導 72 時間後にスライド上で固定し、DNA-FISH 解析に用いる。1 スライド少なくとも 100 個以上の核を観察し、相同染色体間距離を測定する。その上で、2 点間距離が  $2\mu\text{m}$  以下の場合、「染色体ペアリング」と規定し、その割合を各々の遺伝子座で解析する。

(4) MeCP2, CTCF ノックダウン細胞の樹立

SH-SY5Y 細胞にダーマコン社の Accell siRNA を導入し、MeCP2 および CTCF のノックダウン細胞を樹立する。ノックダウンの効率は、ウエスタンブロットにより確認する。コントロールとして、GAPD のノックダウン細胞を樹立し、MeCP2 および CTCF が染色体ペアリングに与える影響について解析する。

#### 4. 研究成果

- (1) ヒト染色体移入技術を用いた実験系は、ゲノムコピー数多型が及ぼす染色体テリトリーの解析に比類をみない利点を持つ。本研究では、ヒト染色体移入法を用いて母方ヒト 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に成功した。染色体解析および PCR 解析により移入した染色体が安定的に SH-SY5Y 細胞に維持されていることを確認した。最終的に、計 20 の独立した細胞株を樹立し、以後の実験に 3 つの細胞株を選択し使用した。
- (2) 母方 15q 重複モデル細胞株における遺伝子発現解析を行ったところ、作製した細胞株ではゲノムコピー数が 1.5 倍に増加したにもかかわらずヒト 15 番染色体上の GAB 受容体  $\beta 3$  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。また、父片アレル特異的に発現する刷り込み遺伝子 *SNRPN*、*NDV* 遺伝子は、発現量の変化がないと期待されたが、*GABRB3*、*CHRNA7* 遺伝子同様に発現量の低下が認められた。さらに、母性発現遺伝子 *UBE3A* 遺伝子は、母方 15 番染色体移入により 2 倍量の発現増加が期待されたが、コントロール細胞株と比べ変化がなかった。このように、本研究によって 15q11-q13 領域の遺伝子発現がゲノムコピー数に非依存的に制御されていることが明らかとなった。
- (3) 15q11-q13 領域の相同染色体間距離を 15 の BAC DNA をプローブとし、PMA 処理で

分化誘導かけた SH-SY5Y 細胞株で解析した。その結果、*GABRB3* 遺伝子近傍で特異的な染色体のペアリングが観察された。

(約 55% の細胞核で相同染色体間距離が  $2\mu\text{m}$  以下であった。) さらに、これらの染色体ペアリングが神経細胞分化と共に誘導されることが明らかとなった。一方、母方 15q 重複モデル細胞株における染色体ペアリング解析を行ったところ、染色体ペアリングの消失が観察された。このことから、ゲノムコピー数多型が細胞核内における相同染色体の染色体ペアリングに影響を与えていることが明らかとなった。従って、15q11-q13 領域に位置する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、ゲノムコピー数多型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られた。また、興味深いことに本研究で明らかとした *GABRB3* 遺伝子近傍の染色体ペアリング領域にクロマチンタンパク質である MeCP2 や CTCF の結合部位を複数見出した。MeCP2 や CTCF は、近年高次クロマチン構造をループ状に束ねることで周囲の遺伝子発現をダイナミックに制御することでよく知られている。

- (4) MeCP2 および CTCF が染色体ペアリングに与える影響について解析するため、MeCP2 および CTCF ノックダウン細胞を樹立し、染色体ペアリング解析を行った。その結果、MeCP2 および CTCF ノックダウン細胞株で染色体ペアリングの著しい減少が観察された。このことより、クロマチンタンパク質である MeCP2 および CTCF が *GABRB3* 遺伝子近傍に結合し、相同染色体間の相互作用に寄与することで周囲の遺伝子発現を制御しているのではないかと考えられた。

本研究の学術的な特色、および独創的な点はヒト染色体移入技術を発展させ、人工的に染色体の数的異常およびゲノムコピー数多型を作り出し、その移入染色体の核内配置を、自閉症の発症機序の観点から解析した点である。近年、マイクロアレイ技術の進展により、自閉症や統合失調症を含めた脳発達障害の発症に、ゲノムコピー数多型が関与していることが明らかとなっている。しかしながら、ゲノムコピー数多型が如何に脳機能障害をもたらすかについては未だ明らかになっていない。古くから「染色体」という“ゲノムの基本構造体”が正しく細胞核内で配置されることが脳神経の発達に重要であると推察されてきたが、その「染色体の空間的配置 (染色体テリトリー) と脳神経の発達に関わる遺伝子発現制御機構」を研究するシステムティックな実

験系が未だ確立されていないこともあり、研究の進展が遅れてきた。本研究は、それらの研究に優れた系を提供し、染色体間相互作用研究のブレイクスルーになる可能性を秘めている。

#### 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1件)

- ① 東田陽博, 堀家慎一, 小泉恵太, 吉原亨  
「自閉症分子マーカー探索～自閉症の遺伝子・分子生物・実験動物学的研究」, 医学のあゆみ, 231 (2009), 1072-1078, 査読無

[学会発表] (計15件)

- ① Horike S., “MeCP2- and CTCF-mediated homologous 15q11-q13 pairing is essential for neuronal gene expressions.”, Keystone symposia, 2011. 3. 28, Grove Park Inn Resort & Spa, (USA)
- ② 堀家慎一, “Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons.”, 日本人類遺伝学会第55回大会, 2010年11月22日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)
- ③ Horike S., “Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons.”, Sweden-Japan Joint Colloquium, 2010. 9. 6, Karolinska Institutet (Sweden)
- ④ 堀家慎一, 「母方15番染色体重複細胞株における15q11-q13領域の遺伝子発現および染色体ペアリングの解析」, 第4回大会日本エピジェネティクス研究会, 2010年5月28日, 米子市文化ホール (鳥取県)
- ⑤ Horike S., “Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons.”, The 9th Annual International Meeting for Autism Research, 2010. 5. 20, Philadelphia Marriott (USA)
- ⑥ Horike S., “Epigenetics in Autism

Research”, International Conference on Social Brain: Autism and Neuroethics, 2010. 3. 25, 金沢大学十全講堂 (石川県)

- ⑦ 堀家慎一, “Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression within the paired region” 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑧ Horike S., “Characterization of regulatory sequences essential for homologous pairing of chromosome 15q11-q13.”, 59<sup>th</sup> Annual Meeting; The American Society of Human Genetics, 2009. 10. 21, Hawaii Convention Center (USA)
- ⑨ Horike S., “Characterization of regulatory sequences essential for homologous pairing of chromosome 15q11-q13.”, 18<sup>th</sup> Lake Shirakaba Conference, 2009. 6. 20, Tokai University European Center (Denmark)
- ⑩ 堀家慎一, 「ヒト染色体工学を用いた15q11-13の染色体ペアリングの解析」, 第3回大会日本エピジェネティクス研究会, 2009年5月22日, 学術総合センター (東京都)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀家 慎一 (HORIKE SHINICHI)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任助教

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