

令和 3 年 10 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19066

研究課題名(和文)インプリンティング遺伝子の発現可視化と不活化アレル再活性化因子の探索

研究課題名(英文)Expression and functional analysis of the imprinting genes located in 15q11-13

研究代表者

玉田 紘太(Tamada, Kota)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：10550957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト染色体15q11-13領域の重複が自閉症のリスクとなることが報告されていることから、その遺伝子発現様式および機能を解明することが重要である。本研究では本領域におけるインプリンティング遺伝子の発現制御機構、およびその機能を解明することを目的とした。発現制御機構の解明としてKI動物が作製できずに終わった。しかし、機能解析について父性由来発現遺伝子を全てスクリーニングしたところ、Ndn遺伝子により自閉症様の行動学的異常のみならず、大脳皮質の興奮/抑制の不均衡、シナプスの異常が引き起こされることを見出し、Ndn遺伝子が自閉症のリスクとなることを新たに見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト染色体15q11-13領域ではこれまでUbe3aという遺伝子のみが着目されてきた。しかし、近年になりUbe3aを含まない重複自閉症者が認められてきたことから、Ube3a以外の遺伝子も関与する可能性が挙げられてきた。しかし、その原因はこれまで明らかになっていない。本研究結果はNdnが新たな15q11-13領域中でのリスクとなり、自閉症発症分子メカニズム解明に向けた一歩となりうることを証明した成果となる。

研究成果の概要(英文)：The cytogenetic aberration of human chromosome 15q11-q13 causes neurodevelopmental disorders including autism, Prader-Willi (PWS) and Angelman syndrome (AS). Duplication of this region, called 15q11-13 duplication syndrome, is the most frequently found in cytogenetic abnormality in autism. Thus, precise expression of the genes in this region is critical for normal brain development. Previously, we modeled this chromosome duplication in mice and found paternally inherited duplication (patDp/+) causes abnormal social behaviors and serotonin imbalance. In this study, we identified Ndn genes is critical not only for autistic like behaviors but synaptic development or cortical excitatory/inhibitory balance.

研究分野：神経科学

キーワード：ゲノムインプリンティング 自閉症 遺伝子発現 Ndn

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精神疾患研究領域における最終的目標は、その病態を分子、細胞、神経回路レベルでの理解をもってして治療を可能にすることである。精神疾患の中でも自閉症スペクトラム障害はその多用な原因・症状から、最も未解明な部分の多い研究といえる。自閉症スペクトラム障害は近年、非常に注目されている神経発達障害であり、その罹患率は現在では1 / 59と非常に高いものとなっている(CDC, 2018)。自閉症は1.社会性の欠如・コミュニケーションの質的障害、2.常同・反復的行動、強い固執性により特徴付けられる。自閉症スペクトラム障害の一因として、これまでに様々な染色体領域が同定されてきている。その中でもヒト染色体15q11-13領域の重複という染色体異常は自閉症者の数パーセントにも上ると報告されている。ヒト染色体15q11-q13領域にマップされている遺伝子群は、マウス染色体7番B-C領域にほとんど保存されていることを利用し、我々研究チームは本領域の重複マウス(15q dup マウス)を作製することに成功した(Nakatani et al., 2009)。また、本領域はインプリンティング遺伝子、すなわち両親由来の染色体の中で、片側の染色体側からしか発現しない遺伝子がクラスターを形成している染色体領域であり、我々の作製した15q dup マウスも父性由来染色体、母性由来染色体が重複したかにより区別される。様々な行動解析の結果、父性染色体15q dup マウスは社会性の欠如、母胎分離時の超音波啼鳴反応数の異常、および逆転学習による固執性の上昇といった、自閉症様の行動学的異常を呈することが分かった。一方で、母性染色体15q dup マウスは明確な行動学的異常を示さなかった。そのため、我々は父性15q dup マウス(以降、15q dup マウス)の行動学的異常を説明すべく、種々の解析を行い、以下のことを明らかとした。自閉症スペクトラム障害の一部の子供で認められる脳内セロトニンの生後発達期における上昇が認められないこと知られている。これを15q dup マウスで調べたところ、脳全体でセロトニンが減少していることが明らかとなった(Tamada et al., 2010)。さらにその後の我々および共同研究の結果、15q dup マウスは小脳における長期可塑性の変化、幼少期の大脳皮質におけるシナプス動態異常(形成/除去率の上昇)、縫線核における神経活動の低下、大脳皮質における神経活動の興奮/抑制バランスの破綻等、脳組織/回路レベルでの様々な生物学的異常を見出してきた(Isshiki et al., 2014, Piochon et al., 2014, Nakai et al., 2017)。

ヒト15q11-q13重複者では母性由来染色体の重複者が多く認められることから、本領域の母性由来染色体発現遺伝子Ube3aのみが着目されてきた。しかし一方で近年、Ube3aを含まない重複者も認められてきており、本領域でのUbe3a以外の遺伝子が自閉症に關与する可能性がある。重要なことに、これらの自閉症者はNdn, Magel2, Mkrn3の3つの父性由来染色体発現遺伝子のみが重複したアリルをもつということが分かった(2014, Eur J Med Genet, 57, 5-14)。このことは我々の作製した15q dup マウスで父性由来染色体重複のときにのみ異常を呈したと繋がる可能性があることから、父性由来発現遺伝子にも自閉症の原因遺伝子があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

我々は15q11-q13領域における父性由来発現遺伝子に自閉症原因遺伝子があるのではないかと仮説を立てこれを実証することを目的とした。すなわち、15q dup マウスにおける原因遺伝子の発現様式およびその機能を明らかにすることで、本領域内の新たな自閉症責任遺伝子の同定、およびその発現様式を調べることで治療に向けた基盤的知見を得ることを目的とした。

本研究により得られる結果は、自閉症スペクトラム障害の発症メカニズムの解明に向けた基盤的知見になると期待される。

3. 研究の方法

(1) 15q11-q13原因遺伝子の同定

15q11-q13領域の父性由来染色体発現遺伝子には4つのタンパク質をコードする遺伝子(Snrpn, Ndn, Magel2, Mkrn3)、およびmiRNA、snRNA、lincRNAなどが多数存在する。そこで、まずSnrpnおよび種々のsnRNAが含まれる1.5 Mb領域について、in vivo chromosome engineering法により、その重複マウスを作製し(1.5 Mb patDp/+)。自閉症行動異常について評価した。また、その後、4つのタンパク質コード遺伝子については、それぞれのタンパク質を発現させるプラスミドベクターを構築し、子宮内電気穿孔法を用いて、それぞれのベクターと蛍光タンパク質(GFP)をマウスの胎児脳に導入し、産まれてきたマウスが3週齢になったときに、thinned skull法を用いて、2日間の間に増減したスパインの数を測定することで、各遺伝子のスパインに対する寄与を調べた。

(2) 原因遺伝子の機能解明

(1)の結果絞られた標的遺伝子が真に自閉症様の行動学的異常に寄与するかを調べるために、CRISPR/Cas9法を用いて、15q dup マウスから1コピーだけの標的遺伝子を除去した遺伝子改変マウスを作製した。このマウスを用いてオープンフィールド試験、社会的相互作用試験、超音波啼鳴試験、バーズ迷路を用いた逆転学習試験の4つの行動解析を行った。また、本マウスにおけるスパインの動態異常を調べるために、Thy1-EYFP マウスを掛けあわせた後、上述と同様のthinned skull法にてスパインの形成・除去率を調べた。更に大脳皮質における興奮性/

抑制性シナプスのマーカーである VGLUT、および VGAT に対する抗体を用いた immunohistochemistry を行い、その puncta 数を調べることで、大脳皮質内の興奮/抑制のバランスを調べた。

(3) 標的遺伝子発現様式の解明

Ndn 遺伝子の発現を生体内でモニタリングするためにはレポーターノックインマウスが必要となる。そこで、レポーターのドナーとしていくつかの長さの異なる homology arm、EGFP または mCherry 蛍光タンパクを有したプラスミドベクターを構築した。また、double strand DNA が single strand DNA のどちらが良いかは論文によって意見の分かれるところであったことから、両方とも試みた。調製したドナー DNA、ガイド RNA、および Cas9 タンパク質を受精卵に導入した。産まれてきた仔の tail からゲノム DNA を調製した後、PCR 法と Southern blot 法で標的領域へのドナーの挿入確認を試みた。

4 . 研究成果

(1) 15q11-q13 原因遺伝子の同定

胎生期の脳内に Mage12 と Ndn 遺伝子を導入したときに、生後の大脳皮質におけるスパインの形成率が有意に上昇した。また、Snrpn 遺伝子を導入した際には除去率の上昇が認められた。ただし、最終的なスパインの密度を調べると Snrpn はコントロールと比べて有意差がなく、Mage12 の強制発現の効果も統計的有意差はあったものの、差自体は大きくなかった。一方で、Ndn 遺伝子を導入した際にはスパインの密度に大きな上昇が認められた。この増加したスパインは形態学的解析から、filopodia のような未成熟スパインが多く含まれていた。このことから、Ndn は神経細胞におけるスパインの量と成熟度合いを調節する因子であることが分かった。

(2) 原因遺伝子の機能解明

元々の 15q dup マウスは不安度の上昇、社会的相互作用の欠如、逆転学習の異常などの行動学体異常があったが、15q dup-Ndn マウス(Ndn のゲノムコピー数のみが正常になったマウス)の行動解析を行ったところ、15q dup マウスと異なりこれらのほとんどの異常を示さなかった。また、15q dup-Ndn マウスでスパインの形成・除去率を調べたところ、予想外なことに形成率だけでなく、除去率の上昇も野生型マウスと同レベルまで抑えられていた。さらに VGLUT/VGAT 解析の結果、15q dup では抑制性シナプスマーカーである VGAT の puncta 数が顕著に減少していたが、15q dup-Ndn ではこの減少が認められなかった。これらのことから、Ndn は自閉症様の行動学体異常のみならず、自閉症で示唆されているシナプスの異常や大脳皮質の興奮/抑制の破綻に寄与する重要な遺伝子であるということが明らかとなった。

(3) 発現様式の解明

Ndn 遺伝子座位に EGFP/mCherry 蛍光タンパク質の挿入を十数回のマイクロインジェクション、試み、100 匹近いマウスが得られたが、ランダムにドナーが挿入されたマウスが数匹できたのみで、正しく挿入されたマウスを得ることができなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. **Kota Tamada**, Keita Fukumoto, Tsuyoshi Toya, Nobuhiro Nakai, Janak R Awasthi, Shinji Tanaka, Shigeo Okabe, François Spitz, Fumihito Saitow, Hidenori Suzuki, Toru Takumi
Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in a mouse model of paternal 15q duplications.
Nature Communications, 12, 4056, 2021 (査読有)

2. Toru Takumi, **Kota Tamada**, Fumiyuki Hatanaka, Nobuhiro Nakai, Patrick F. Bolton
Behavioral neuroscience of autism
Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 110, 60-76, 2020 (査読有)

3. Ryohei Furumai, **Kota Tamada**, Xiaoxi Liu, Toru Takumi
UBE3A regulates the transcription of IRF, an anti-viral immunity
Hum Mol Genet, 28, 1947-1958, 2019 (査読有)

4. Toru Takumi, **Kota Tamada**

CNV biology in neurodevelopmental disorders.
Current Opinion in Neurobiology, 48, 183-192, 2018 (査読有)

5. Keita Fukumoto*, **Kota Tamada***, Tsuyoshi Toya, Tasuku Nishino, Yuchio Yanagawa, Toru Takumi

Identification of genes regulating GABAergic interneuron maturation.

* equal contributed,

Neurosci Res, 134, 18-29, 2018 (査読有)

6. Moe Nakanishi, Jun Nomura, Xiao Ji, **Kota Tamada**, Takashi Arai, Eiki Takahashi, Maja Bucan M, Toru Takumi

Functional significance of rare neuroligin1 variants found in autism.

PLoS Genet, 13, e1006940, 2017 (査読有)

7. Nobuhiro Nakai*, Masatoshi Nagano*, Fumihito Saitow*, Yasuhito Watanabe*, Yoshinobu Kawamura, Akiko Kawamoto, **Kota Tamada**, Hiroshi Mizuma, Hirotaka Onoe, Yasuyoshi Watanabe, Hiromu Monai, Hajime Hirase, Jin Nakatani, Hirofumi Inagaki, Tomoyuki Kawada, Taisuke Miyazaki, Masahiko Watanabe, Yuka Sato, Shigeo Okabe, Kazuo Kitamura, Masanobu Kano, Kouichi Hashimoto, Hidenori Suzuki §, Toru Takumi §

Serotonin Rebalances Cortical Tuning and Behavior Linked to Autism Symptoms in 15q11-13 CNV Mice.

Sci. Adv., 3, e1603001, 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計 5件)

1. **Kota Tamada**, Keita Fukumoto, Tsuyoshi Toya, Nobuhiro Nakai, Janak Awasthi, Sandra Ruf, Francois Spitz, Toru Takumi

In vivo screening of maternally imprinted genes in human chromosome 15q11-q13

RIKEN Epigenetics in Wako, 2019

2. **玉田 紘太**, 福本 景太, 戸谷 豪志, 中井 信裕, Ruf Sandra, Spitz Francois, 内匠 透

自閉症責任領域 15q11-q13 モデルマウスにおける 原因遺伝子の探索

次世代脳 冬のシンポジウム, 2018

3. **玉田 紘太**, 福本 景太, 戸谷 豪志, Ruf Sandra, Spitz Francois, 内匠 透

自閉症責任領域 15q11-q13 モデルマウスにおける原因遺伝子の探索

ConBio, 6th Dec, 2017, Workshop, Kobe

4. **Kota Tamada**, Kunihiro Fukuda, Toru Takumi

Epigenetic transcriptional regulation of Necdin gene.

RIKEN Epigenetics in Tsukuba, 2017

5. **Kota Tamada**, Kunihiro Fukuda, Hiroko Okubo, Toru Takumi

Visualization of the parental Ndn expression by dual color targeting with CRISPR.

International Symposium for RIKEN Epigenetics Program, 2016

〔図書〕(計 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:

国内外の別:

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。