

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463120

研究課題名(和文) 哺乳期の呼吸と嚥下機能調節におけるエピジェネティック制御因子の関与

研究課題名(英文) Involvement of epigenetic regulatory factors in respiration and swallowing during the suckling period

研究代表者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA, Tetsuo)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00187527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Mecp2欠損による延髄呼吸中枢でのGad1遺伝子発現へのエピジェネティックな影響とバルプロ酸(VPA)投与の効果を実験マウスで検証した。Mecp2欠損マウスでは野生型マウスに比べ15日齢で呼吸中枢でのGad1 mRNAレベルが低かったが、VPAの7日間の投与により上昇した。VPAを投与したMecp2欠損マウスでは、延髄呼吸ニューロンのヒストン上のリジン残基H3K9およびH4K5について、生理食塩水群(コントロール)に比べアセチル化レベルの有意な上昇が認められた。以上のことから、VPAがヒストンアセチル化を介した延髄呼吸中枢でのGad1遺伝子発現の調節に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic effects of valproate (VPA) on Gad1 expression in the medullary ventral respiratory group (VRG) of neonatal Mecp2-deficient mice were examined. We found that the Gad1 mRNA level in the VRG of Mecp2-deficient mice was lower than that of wild-type mice while VPA treatment for 7 days increased Gad1 mRNA expression in the VRG of Mecp2-deficient mice on postnatal day 15. Acetylation levels of H3K9 and H4K5, the lysine residues of core histones, were increased with the VPA treatment in the Mecp2-deficient mice. These results suggest that the effects of VPA on Gad1 mRNA expression in the VRG of Mecp2-deficient mice are caused by the increase in the acetylation levels of core histones which may enhance Gad1 promoter activity.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Mecp2 Gad1 延髄呼吸中枢 ヒストンアセチル化 バルプロ酸 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 延髄には呼吸や嚥下に必須の中枢があり、抑制性神経伝達物質である GABA がそれらの機能調節に重要な役割を担っている。呼吸と嚥下は出生直後から生命維持に不可欠であるが、それらを制御する中枢の発達には不明の点が多い。

(2) 近年、GABA の産生に関わっているグルタミン酸脱炭酸酵素 1 (GAD1, 別名 GAD67) の遺伝子発現に、エピジェネティクスが大きく関与していることが示唆されている。Gad1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化はその一つであるが、メチル化レベルの変化と遺伝子発現の関係、あるいは呼吸機能調節との関係は未解明である。

2. 研究の目的

(1) 我々はこれまで、呼吸および嚥下に異常がみられる生後 15 日の Mecp2 ノックアウトマウス (Mecp2-/y) の延髄呼吸中枢について、Gad1 遺伝子のプロモーター領域にある CpG のメチル化レベルが上昇していることを確認している。本研究では、CpG のメチル化レベルについて、Mecp2-/y とその同腹仔の野生型マウス、および野生型母から生まれた仔マウスで違いがあるかどうか、またバルプロ酸 (VPA) の投与でそれらがどのような影響を受けるかについて検討することとした。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬である VPA の投与により、呼吸ニューロンでのコアヒストンのアセチル化が促進され、それによって mRNA 発現が上昇する可能性が考えられる。そこで VPA の腹腔内投与が延髄呼吸中枢での H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 のアセチル化に及ぼす影響を免疫組織学的方法で調べることとした。

3. 研究の方法

(1) Gad1 近位プロモーター上の CpG のメチル化レベルおよび Gad1 mRNA 量の測定

野生型マウスおよび Mecp2-/y について、生後 15 日で延髄腹側部から DNA を抽出し、バイサルファイトシークエンス法により、Gad1 プロモーター上の CpG についてメチル化率を算出した。23 箇所の CpG のメチル化レベルについてグループ単位で比較した。また延髄腹側部から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により Gad1 mRNA 量を測定した。また脳摘出前に全身型プレチスモグラフにより呼吸パターンを測定し、無呼吸頻度を調べた。

(2) DNA のメチル化・脱メチル化に関与している酵素のリアルタイム PCR による検討

DNA メチル化に関与している DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, および DNA 脱メチル化に関与している TET1, TET2, TET3, TDG の延髄呼吸中枢での発現について、リアルタイム PCR による mRNA 量の測定により評価した。また VPA 投与による影響も調べた。

(3) VPA 投与によるヒストンアセチル化レベルへの影響の検討

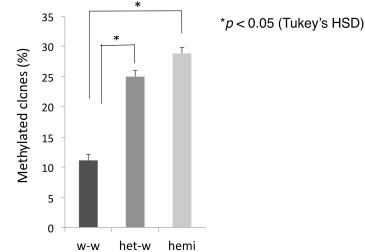
生後 2 週の Mecp2-/y ならびに野生型雄マウスに、生後 8 日から 7 日間、バルプロ酸あるいは生理食塩水の腹腔内投与を行った。生後 15 日に脳組織を摘出した。延髄の連続切片を作製後、アセチル化した H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 の各ヒストンに特異性のある抗体を使用し蛍光 2 重染色を行った。そのうち各アセチル化ヒストンの蛍光強度を ImagePro7.0 にて細胞単位で定量、比較した。

(4) Gad1 プロモーター領域でのメチル化 CpG 結合因子の動態

DNA 結合タンパクとクロスリンクした DNA 分画を Mecp2-/y の脳組織から抽出し、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、Gad1 プロモーター領域での MBD1 および MBD2 の結合レベルを調べた。

4. 研究成果

(1) 延髄腹側呼吸群における Gad1 近位プロモーター領域の CpG メチル化レベルを調べたところ、Mecp2-/y、Mecp2-/y と同腹 (同母) の野生型雄マウス (het-w)、および野生型の母マウスから生まれた野生型雄マウス (w-w) の比較では、Mecp2-/y (図では hemi) および het-w について、23 箇所の CpG 全体で比較した場合のメチル化レベルが w-w に比べ有意に高かった (図 1, $p < 0.05$)。一方、Mecp2-/y (hemi) と het-w には有意差がみられなかった。



Percent of clones in which at least one CpG in the Gad1 promoter was methylated.

図1 Cytosine methylation at 23 CpG sites in the Gad1 promoter

Mecp2-/y は w-w に比べ無呼吸回数が有意に多く、延髄呼吸中枢での Gad1 mRNA レベルが低かったが、VPA の投与により無呼吸回数が減少し、Gad1 mRNA レベルが上昇した (図 2)。

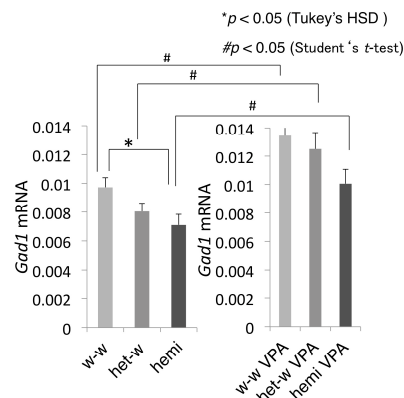


図2 GAD1 mRNA expression in the VRG of P15 mice

(2) 生後 2 週の *Mecp2*^{-/y} ならびに野生型雄マウスに、生後 8 日から 7 日間、バルプロ酸あるいは生理食塩水の腹腔内投与を行い、生後 15 日に延髄呼吸中枢の組織を摘出してリアルタイム PCR による mRNA 測定を行った。その結果、DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2, TET3, TDG のいずれについても発現量に関して *Mecp2*^{-/y} と野生型雄マウスで差がみられなかった。また、VPA 投与による影響も認められなかった。代表例として DNMT1 および TET1 の結果を図で示す (図 3 , 図 4) 。

図 3 DNMT1

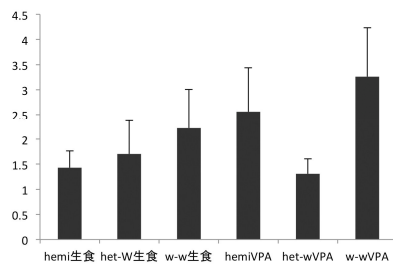
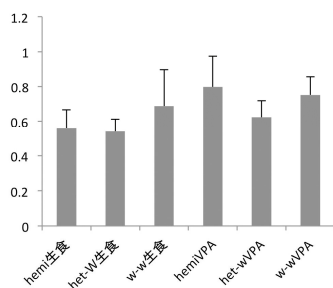


図 4 TET1



(3) 生後 15 日の *Mecp2*^{-/y} に VPA を 7 日間投与したところ、延髄呼吸ニューロンでのヒストン上のリジン残基 H3K9 および H4K5 について、VPA 投与群でコントロール (生理食塩水群) に比べアセチル化レベルの有意な上昇が認められた ($p < 0.01$) 。一方、H3K14 と H4K8 ではアセチル化レベルに変化が認められなかった。また野生型マウスでも同様に H3K9 および H4K5 にアセチル化レベルの上昇が認められた ($p < 0.05$) (図 5 ~ 8) 。

図 5

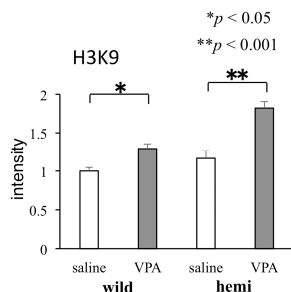


図 6

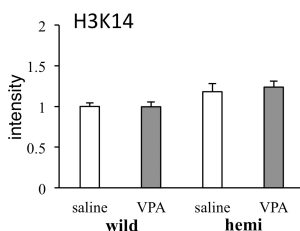


図 7

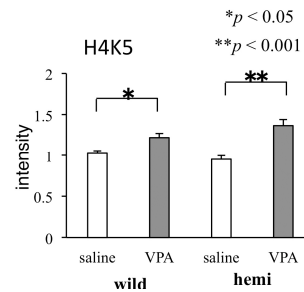
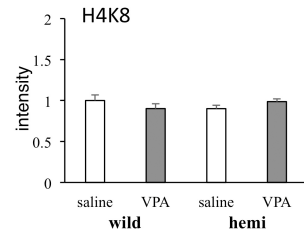


図 8

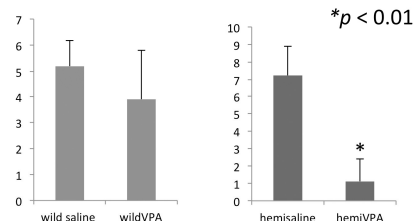


(4) VPA を投与した *Mecp2*^{-/y} および野生型マウスについて、*Gad1* プロモーター領域に結合している MBD1 ならびに MBD2 の量を ChIP 法により測定した。

MBD1, MBD2 はメチル化された CpG に結合して下流に位置する遺伝子の発現を抑制する働きがある。MBD1 について、*Mecp2*^{-/y} では VPA の投与後に結合量が有意に減少していたが、野生型マウスでは影響がみられなかった (図 9) 。なお生理食塩水を投与した *Mecp2*^{-/y} および野生型マウスでは MBD1 の結合に変化はみられなかった。

MBD2 については *Mecp2*^{-/y} と野生型雄マウスで差がみられず、また VPA の投与によっても結合量に変化はみられなかった。

図 9 MBD1



(5) MeCP2 の欠損と疼痛閾値の関係について、*Mecp2* 欠損雌マウス (*Mecp2*^{+/-}) を用いて検討した。起炎物質である Complete Freund's adjuvant (CFA) を舌に注入して疼痛閾値の変化を調べたところ、*Mecp2*^{+/-} では CFA による疼痛閾値の低下がみられないことが明らかになった。この研究成果の詳細は論文にて発表した (主な発表論文 (1)) 。

(6) 研究成果のまとめ

Mecp2^{-/y} では、延髄腹側呼吸中枢で、*Gad1* プロモーターの CpG 高メチル化ならびに *Gad1* mRNA 発現の低下が生じており、コアヒストン H3K9 および H4K5 の修飾がそれらに影響を与えている可能性が示された。また、*Mecp2*^{-/y} において VPA がヒストンアセチル化ならびに CpG メチル化を介した遺伝子発現の調節に影響を及ぼすことが示唆された。

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1件)

Suzuki A, Shinoda M, Honda K, Shirakawa I, Iwata K, Regulation of transient receptor potential vanilloid 1 expression in trigeminal ganglion neurons via methyl-CpG binding protein 2 signaling contributes tongue heat sensitivity and inflammatory hyperalgesia in mice. *Mol Pain*, 査読有, 12, 2016, 1-11
DOI:10.1177/1744806916633206

〔学会発表〕(計2件)

白川 哲夫, 石山 未紗, 岩佐 聡子, 伊藤 寿典, 木舩 崇, 武井 浩樹, 浅野 正岳, 伊藤 雅之, *Mecp2* 欠損マウス延髄呼吸中枢での *Gad1* mRNA 発現に対するバルプロ酸の効果, レット症候群国際シンポジウム 2017 in KOBE, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2017年3月18-19日
岩佐 聡子, 石山 未紗, 鈴木 安住, 伊藤 寿典, 木舩 崇, 白川 哲夫, *MeCP2* 欠損マウスを用いたレット症候群の呼吸異常の解明, 第32回 日本障害者歯科学会学術大会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2015年11月6-8日

〔図書〕(計1件)

白川 哲夫, 坂田 英明, 大阪大学出版会, レット症候群診療ガイドブック, 2015, 254(165-169)

〔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

白川 哲夫 (SHIRAKAWA, Tetsuo)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 00187527

(2) 研究分担者

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 10231896

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

武井 浩樹 (TAKEI, Hiroki)
石山 未紗 (ISHIYAMA, Misa)