

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591363
研究課題名（和文）発達障害モデルとして捉えるソトス症候群の神経行動学・生化学的研究
研究課題名（英文）The Molecular analysis of Sotos syndrome

研究代表者
黒滝 直弘（KURITAKI NAOHIRO）
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：20423634

研究成果の概要：

NSD1蛋白の精製とHMT活性の評価に関しては、NSD1コンストラクトを用いて細胞への導入はHek293では成功しHek293を用いて、HMT活性の評価に必要な十分量のNSD1蛋白を現在精製中である。モデルマウスの作成に関しては当該領域のヒトとマウスのゲノム構造を比較検討した結果、ヒトとマウスのゲノム構造の差異明らかになったが、モデルマウスの作成には成功していない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ソトス症候群 発達障害

1. 研究開始当初の背景

発達障害の臨床面と基礎研究両面での研究および原因解明は現代社会で急務である
本研究ではソトス症候群を発達障害の一つと捉え、生化学、神経心理学の観点から知見を得ることを背景としたものである。これらの知見は広く発達障害の臨床および基礎研究に応用できると考えた。

2. 研究の目的

- (1) 染色体欠失および重複モデルマウスを作成し、その表現型を明らかにし、発達障害のモデルマウスとしての妥当性を検討する。
- (2) NSD1のミスセンス変異がNSD1蛋白のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

1. 染色体欠失および重複モデルマウスの作成と表現型の評価

(1) モデルマウスの作成

ヒトにおける染色体欠失部位を正確に同定しそのメカニズムを決定し、マウスにおける当該領域のゲノム解析を行う。ヒトとマウスの相同部位が決定した後は

共同研究者 Dr Allan Bradley の作成した Mutagenic Insertion and Chromosome Engineering Resource (MICER) を用いてターゲティングベクターを作成しベクターが得られ次第、ES 細胞に導入しキメラマウスの作成へと進む予定であった。

(2) 形態の観察

ソトス症候群の特徴である顔面奇形の観察や、過成長の程度、中枢神経系の形態を評価する。もし、マウスが致死の胎生致死の場合には胎児期に応じた発生状況の評価する。

2. ミスセンス変異の NSD1 蛋白のヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMT) 活性に対する影響の解析

(1) NSD1 蛋白の精製

遺伝子全長を組み込んだ発現ベクターを有しているので、これを Site-Directed Mutagenesis System を用いて突然変異の導入を行う。ただし、コンストラクト自体が約 13 Kb と大きいので、PCR を用いた変異導入には困難も予想される。その際は遺伝子の一部をサブクローニングし直し、コンストラクトのサイズを落として対応する。

(2) (1) で作成したコンストラクトをヒト細胞株、HeLa, HepG2 に導入する。HepG は *NSD1* の内因性の発現がないため巨大なコンストラクトが機能するか否かの

確認に用いる。NSD1 抗体はすでに入手しており、HeLa 核抽出物を用いて免疫沈降法に使用可能であることを確認している。

(3) 免疫沈降により精製した正常及び変異を有する NSD1 蛋白に市販の HMT アッセイキットを用いて HMT 活性を測定する。

4. 研究成果

(1) ソトス症候群における典型例ではない、より染色体欠失例の染色体欠失メカニズムの解明

欠失典型例とは異なる 3 症例はいずれも典型例よりも小さなサイズの欠失であり、研究代表者が報告してきた low copy repeat を介する non allelic homologous recombination に基づくメカニズム (Kurotaki et al., 2005) とは異なるメカニズムであることを示した。この 3 症例においては、染色体切断点には Alu 配列が存在し付近のシーケンス解析によると、この Alu 配列下で non allelic homologous recombination が誘発されていることが判明した。(Mochizuki et al., 2008)

(2) ヒトとマウスのゲノム構造の比較

図 1 に示したようにヒトとマウスでは相応の共通したゲノム構造ではある。ヒトとマウスでは同定された相同遺伝子はほぼ等しくこの領域は異種間では比較的保存されていると考えられるが、テロメア側で不一致が見られる。ヒトで同定された相同性領域 (Low Copy Repeat) はマウスでは認められない。この結果、マウスで欠失させるべき領域の決定が困難であった。

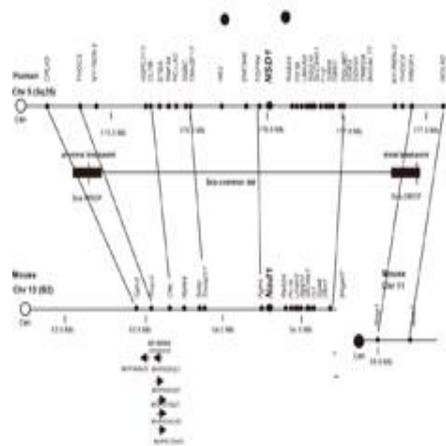


図 1

(3) NSD1 変異プラスミドの生成及び NSD1 蛋白の発現の確認

図 2 に示したのは作成したプラスミドを大腸菌に導入し抽出し、電気泳動法にてサイズを確認した結果である。NSD1 を発現ベクターに組み込んだプラスミドはそのサイズ故かあるいはそもそも NSD1 が細胞毒性を有するのかわか定かではないが、プラスミドの回収率が低く大腸菌の大量培養を必要とした。

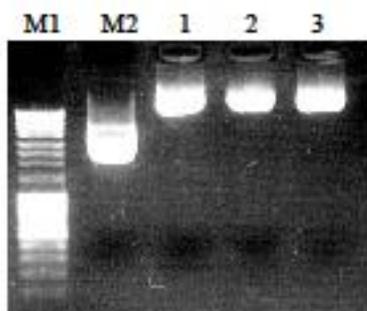


図 2

図 3 は Hek293 細胞株に対し、NSD1 プラスミド (変異型及び野生型) のトランスフェクションを行い、ウェスタンブロット法において予想されるサイズのバンドを確認した結果である。

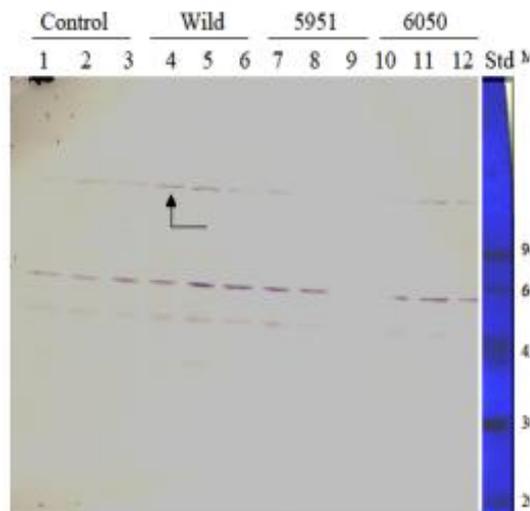


図 3

NSD1 遺伝子の点突然変異であるミスセンス変異がソトス症候群の原因であるから、変異型と野生型の NSD1 蛋白において、機能的活性すなわちヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を比較する予定であった。

しかしながら、NSD1 の内因性発現のない HepG2 細胞株ではトランスフェクションが成功していないため、野生型と変異型で比較すべき HMT 活性の測定には至っていない。

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 2 件)

Mochizuki J, Saito H, Mizuguchi T,

Nishimura A, Visser R

Kurotaki N, Miyake N, Unno N, Matsumoto

N. Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. Clinical Genetics (査読有) 74, (2008) 384-391

CNV-[英]copy number variation-

今村明, 菊池妙子, 黒滝直弘

臨床精神医学, 37(2) : 220-221, 2008.

〔学会発表〕(計 1件)

黒滝 直弘、小澤 寛樹 発達障害モデルとして捉えたソトス症候群の分子遺伝学的解析

第27回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 平成20年6月20日 神奈川県箱根川温泉 ザプリンス箱根

〔図書〕(計 1件)

小澤寛樹、黒滝直弘 第12章 双極性障害(2008)、気分障害、413-431

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

○取得状況(計 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒滝 直弘(KUROTAKI NAOHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20423634

(2)研究分担者

小澤 寛樹(OZAWA HIROKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50260766

吉浦 孝一郎(YOSHIURA KOICIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00304931

(3)連携研究者