

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：94316

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19295

研究課題名（和文）転写伸長の障害による自閉症の発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of autism through transcription elongation impairment

研究代表者

片山 雄太（Katayama, Yuta）

リージョナルフィッシュ株式会社（研究開発部）・研究開発部・主任研究員

研究者番号：70725085

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症患者で最も変異率の高い原因遺伝子の1つであるCHD8が転写伸長を制御する機能を持つことを検証した。CHD8を欠損させたマウス神経幹細胞において転写伸長反応を調べたところ、CHD8の欠損に伴って転写伸長活性が低下していた。さらに、CHD8タンパク質は転写伸長活性化因子と結合していることが明らかになり、転写伸長をCHD8が促進していることが示唆された。転写伸長活性の低下は特に長鎖遺伝子に強い影響を与えると考えられるが、自閉症関連遺伝子には長い遺伝子が多いことから、CHD8の遺伝子変異を原因とする自閉症の発症には転写伸長の障害が関わっていると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症は発症頻度が1%以上と高いうえに有効な治療法が確立されていないため、大きな医学的・社会的問題を生じている神経発達障害である。そこで発症原因の解明と治療法の開発が急務となっていることから、社会的にも研究成果に期待が大きい研究領域である。本研究では転写伸長反応の障害が自閉症の発症原因の1つであることを示唆する結果を得た。この発見は自閉症の病態メカニズムの理解を深め、新たに転写伸長反応を標的とする治療戦略の開発に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：CHD8, one of the most frequently mutated genes in autistic patients, was tested for its function in regulating transcription elongation. Transcription elongation responses were examined in mouse neural stem cells lacking CHD8, and transcription elongation activity was reduced with CHD8 loss. Furthermore, a comprehensive search for CHD8-binding proteins revealed that CHD8 proteins bind to transcription elongation activators, suggesting that CHD8 promotes transcription elongation. Since reduced transcription elongation activity is thought to have a particularly strong effect on long genes, and since many autism-related genes are long, it is speculated that impaired transcription elongation is involved in the development of autism caused by genetic mutations in CHD8.

研究分野：分子生物学

キーワード：自閉症 ASD CHD8 転写

1. 研究開始当初の背景

自閉症と自閉スペクトラム症(Autism Spectrum Disorder: ASD)は発症頻度が1%以上と高いうえに有効な治療法が確立されていないため、大きな医学的・社会的問題を生じている神経発達障害である。申請者は自閉症患者で有力な原因遺伝子候補として知られる CHD8 の遺伝子変異を再現したマウスを作製し、このマウスがヒトの自閉症を再現することを明らかにした。さらにオリゴデンドロサイトの障害が発症原因の1つであることを報告し、胎生期の細胞分化の障害が発症原因の1つであることを報告したが、そのメカニズムについてはほとんど不明であった。

これまでに転写伸長の障害が神経変性の要因になることがいくつかの自閉症関連遺伝子について報告されており発症メカニズムの1つと考えられていた。しかし CHD8 が転写伸長に関わる分子機能をもつことは報告がなく、CHD8 欠損による自閉症の発症に転写伸長が関わる可能性は検証されていなかった。

2. 研究の目的

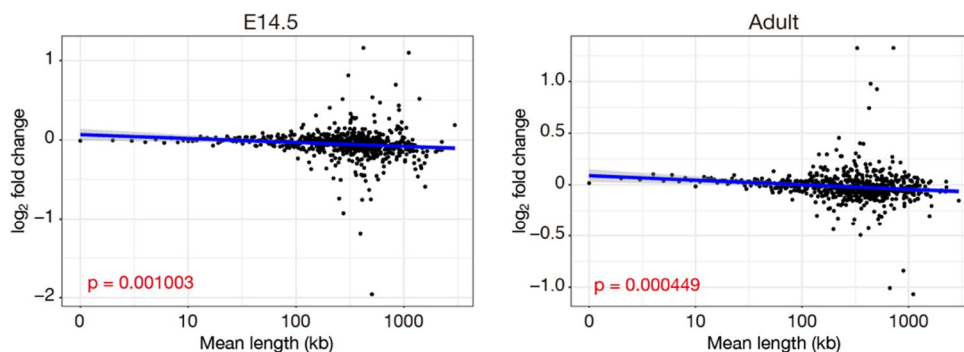
本研究では転写伸長の異常が自閉症の発症原因の1つであり、CHD8 の遺伝子変異による自閉症の発症にも転写伸長障害が関与していると仮説を立て、CHD8 の分子機能解析から仮説の検証を試みた。CHD8 欠損による自閉症の発症原因が転写伸長障害であることが明らかになれば、転写伸長を標的とした新たな治療戦略の開発が期待できる。

3. 研究の方法

CHD8 の遺伝子変異を保有するマウスの脳組織において転写伸長が障害されることを検証するため、特に転写伸長障害の影響を受けることが予想される長鎖遺伝子の発現量を同定した。次に CHD8 が転写伸長と関わることを確認するため、転写状態を測定することができる mNET-seq 法と POINT-seq 法を用いて CHD8 の欠損によって転写伸長に影響が出ること検証した。さらに CHD8 の結合タンパク質を免疫沈降法と質量分析を用いて網羅的に同定し、CHD8 の分子機能の同定を試みた。

4. 研究成果

まず CHD8 の遺伝子変異と転写伸長の関連を明らかにするため、CHD8 ヘテロ欠損マウスの脳サンプルを採取し mRNA-seq 解析を用いて遺伝子発現を調べた。この結果、転写伸長の障害によって特に影響を受けることが予想される長鎖遺伝子において CHD8 の遺伝子変異によって発現量が低下する傾向が胎児期(E14.5)と成体(Adult)において観察された(図1)。この結果から CHD8 は転写伸長を促進する活性をもち、CHD8 が欠損することによって転写伸長の障害が生じていると考えられる。



【図1】 CHD8 ヘテロ欠損マウスにおいて長鎖遺伝子の発現低下が観察された

次に CHD8 の分子機能を明らかにするため、タモキシフェン誘導性に CHD8 を欠損させることができる CreERT2/CHD8 マウスから神経幹細胞を樹立した。この細胞を用いて、RNA ポリメラーゼに結合している RNA 断片を検出することで細胞の転写状態を解析する手法である mNET-seq 法によって CHD8 欠損時の転写状態を調べた。しかし神経幹細胞では mNET-seq 法による結果が安定しなかったため、近年開発された手法である POINT-seq 法を採用して再度転写状態の解析をおこなった。この結果、CHD8 を欠損した神経幹細胞では転写伸長が障害されていることを示すデータが得られたことから、CHD8 は転写伸長を促進する機能を有していると考えられる。

さらに、CHD8 の結合分子を同定することで CHD8 が転写伸長を促進する分子メカニズムの解明を試みた。FLAG タグをノックインすることで FLAG タグと CHD8 の融合タンパク質を発現する細

胞を作製し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降することで CHD8 タンパク質複合体を濃縮し、質量分析計を用いて結合タンパク質を網羅的に同定した。この結果、CHD8 は転写伸長を促進することが知られているタンパク質複合体と結合していることを示すデータが得られた。CHD8 はクロマチンリモデリング因子でありヒストンスライディング活性を持つことから、転写時に転写伸長複合体と協調してクロマチン構造を緩めることで転写伸長を促進する機能を担っていると考えられる。

本研究の結果から CHD8 が転写伸長促進機能を持つことが明らかになり、CHD8 の遺伝子変異による自閉症の発症にも転写伸長の障害に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片山雄太
2. 発表標題 モデルマウスを用いたASD発症メカニズムの多階層的解析
3. 学会等名 第15回自閉症学研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------