

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300147

研究課題名(和文)クロマチンリモデリング分子ATR-X遺伝子改変マウスによる脳発達障害の分子病態解明

研究課題名(英文)Molecular pathological mechanisms of the brain development disorder using the chromatin-remodeling molecule ATRX gene knockout mouse

研究代表者

北島 勲 (Kitajima, Isao)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50214797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,300,000円、(間接経費) 3,390,000円

研究成果の概要(和文)：ATR-Xの脳発達障害との関連性は明らかにされていないため、ATR-Xエクソン2を欠失させたマウスを作成した。本マウスは脳におけるATR-X蛋白が約70%減少し、条件付恐怖記憶障害長期増強(LTP)減少、CaMKIIとGluRリン酸化減少、大脳皮質神経スパイン形状異常が認められた。CaMKII下流のPAK1/3、PAK2リン酸化亢進、PPI活性低下を明らかにした。ATR-Xコンディショナルノックアウトマウス作成を行った。エクソン6-9のターゲティングベクターを複製しFip-FRTシステムより相同組み換えにてES細胞を得てキメラマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：Mutation in a chromatin remodeling protein, ATRX causes alpha-thalassemia X-linked mental retardation syndrome. We generated ATRX mutant mice lacking exon2 (ATRXdE2 mice). In a contextual fear conditioning test, total freezing time was decreased in ATRXdE2 mice. ATRXdE2 mice showed significantly reduced long-term potentiation (LTP) in the hippocampal CA1 region evoked by high-frequency stimulation. ATRXdE2 mice exhibited abnormal dendritic spine formation in the medial prefrontal cortex. We confirmed that increased phosphorylation of CaMKII, PAKs and reduced activity of protein phosphatase 1. Next, we conditionally inactivated the homolog in mice, Atrx. Strategy for targeted deletion of exon 6. The PGK-neo selection cassette was inserted in intron 6 and the loxP target sites of the Cre recombinase were in intron 7. Cre-mediated ablation of full-length atrx protein in ES cells were established and then chimera ATRX loxP mice were developed.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経化学・融合基盤脳科学

キーワード：脳発達障害 エピジェネティクス クロマチンリモデリング ノックアウトマウス スパイン

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA メチル化等のエピジェネティクス異常と脳発達障害との関連が注目されている。重度精神遅滞、 α サセミア、骨格異常、心奇形、生殖器異常など多彩な臨床症状を呈する X-linked α -thalassemia/ mental retardation syndrome (ATR-X 症候群)は、世界で 182 家系 200 例、わが国で 40 家系 60 例が確認され、その原因遺伝子 ATRX が 1995 年に同定された。本患者リンパ球から DNA メチル化異常の存在が明らかにされた (Nature Genetics 24:368, 2000)が、ATR-X 遺伝子変異との詳細な関連は解明されていない。最近、ATR-X 蛋白が MeCP2 蛋白と相互作用することが報告され、ATR-X に関する研究が活発化してきており (PNAS 104:2709, 2007)、ATR-X エクソン 18 をノックアウトしたマウスが開発され、生後数日で死亡することが報告されている (J.Clin Invest 115:258,2005)。ATR-X 症候群の精神遅滞発症解明のためは、行動解析が可能な 10 週齢以上生存できる遺伝子改変マウスを新しく開発し、脳機能の発達異常を解析する必要がある。

2. 研究の目的

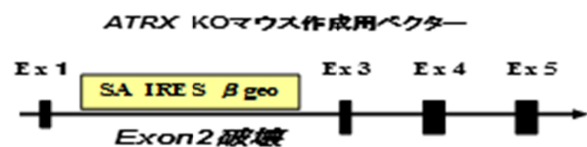
エピジェネティクスと精神発達障害の関連が注目されている。クロマチンリモデリング分子 ATRX 遺伝子変異による ATR-X 症候群は重度精神遅滞を発症するが、病因の詳細は解明されていない。申請者は、ATR-X エクソン 2 欠失による ATRX 低発現マウスを作成し、その海馬体機能障害を報告した。今回、本マウスの病態解析に加え、ヒストン H3 結合能を有する PHD-like ドメインをコードするエクソン 7 コンデシヨナルノックアウトマウスを開発し、クロマチンリモデリング変化と行動異常・電気生理学障害やスパイン形成との関連を解明する。本研究は、ATR-X を介するエピジェネティック変化と記憶学習分子である

CaMKII-GluR1 を繋ぐ精神遅滞関連因子やその分子群が同定できる意義を有する。

3. 研究の方法

(1) ATRX エクソン 2 変異マウスの作成と脳機能解析

ATR-X エクソン 2 変異 (R37X) で蛋白発現が約 30% 残存し、精神遅滞が軽症である家系 (Chudley-Lowry 症候群) に注目にした (Ann. Neurol.47:117, 2000)。そこで、本家系と同様のエクソン 2 変異を有するマウス (ATR-X E2) を作成した。



本マウスを用いて 生後 1 年間の成長を含むフェノタイプ解析、行動解析、記憶・学習能力解析 (モーリス水迷路試験、条件付恐怖記憶試験等)、脳病理組織解析、脳電気生理解析 (長期増強刺激 LTP) を実施した。

(2) ATR-X エクソン 2 ノックアウトマウスの社会行動解析: Beiderbeck ら (Eur J Neuroscience 26,3597, 2007) の開発した resident-intruder test を行う。ATR-X E2 マウスまたは正常マウスを 10 日間 1 匹独飼育する。次に C3H マウスを侵入させ、10 分間の行動をビデオ撮影し、親密行動数 (嗅ぐ行為、親密接触行等) と攻撃・嫌悪行数 (威嚇、逃避、咬む等) の定量的解析を行う

(3) 微細神経構造 (スパイン) 形態解析: lucifer yellow (LY) ラベリング法 (J. Comp. Neurol, 429:113,2001) を用いて、ATR-X E2 マウスと正常マウスの大脳、海馬体、扁桃体スライスに抗 LY 抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡でスパインを評価する。

(4) スパイン形態に関する分子病態解析: スパイン形成に関わるポストシナプス形成分子として重要な NMDA 受容体下流の

CaMKII 活性化シグナル分子 (Rac1-GEF, Tiam1, Kalirin-7, PAKs) 解析を行う。ATR^X E2 マウスにおけるこれら分子の発現とリン酸化、さらに AMPA 型受容体に結合する spinophilin/proteinphosphatase1 (PPI) の発現変化を免疫組織化学、免疫沈降法、ウエスタンブロットで検討する。

(5) Atr^xΔE2 マウスにおいて DNA マイクロアレイ解析

(6) ATRX エクソン 6 コンディショナルノックアウトマウス作成: マウス X 染色体ゲノムを含む BAC クローンより ATRX 遺伝子エクソン 6-9 を含むゲノム断片を切り出し、ターゲングベクターを作製することで、PHD ドメインの一部をコードするエクソン 7 欠損により ATRX 遺伝子の機能と発現を完全に抑制することが可能となる。エクソン 7 両端に loxP 配列挿入を行い、loxP 配列を両端にもつ GK-neo カセットをイントロン 6 に挿入し G418 で ES 細胞 (C57BL/6 由来) クローン薬剤選択後、サザンブロット法でスクリーニングを実施、ATR^X 遺伝子組み換え ES 細胞を樹立し、マウスに戻し、エクソン 7 Cre-lox 組み換えマウスを作製する。

4. 研究成果

(1) ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスの海馬障害

作成された ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスは

1 年以上生存し生殖能力有り。 ATRX 蛋白発現が約 70% 低下。

脳では、海馬体と大脳皮質における発現が著明に低下

モーリス水迷路試験は正常であったが条件付き恐怖記憶障害所見が得られた。

海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP) 低下の所見が得られた。

以上より、ATR^X エクソン 2 ノックアウトマウスは、イタリアで報告された軽症 ATR^X

症候群に一致した表現型を示すことが明らかになった。

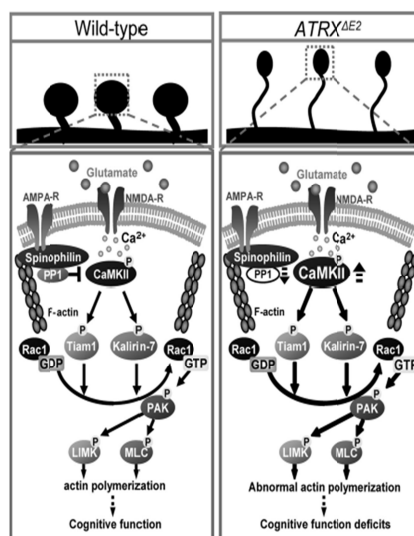
(2) ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスの社会行動障害 ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスは、他のマウスが侵入すると攻撃性が強く、社会協調性障害が認められた。

(3) ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスでは、中前脳皮質の神経微細構造を検討すると dendritic spine の形態異常、未熟なスパインの頸部が伸びている所見が確認された。しかし、海馬体 CA1 内神経では、異常な。所見は認められなかった。

(4) ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスでは、中前脳皮質において、カルモジュリン (CaMKII) 、蛋白発現量に差が認められなかったが、リン酸化の明らかな増加が認められた。

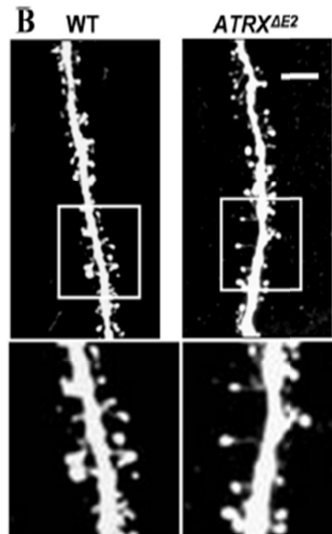
(5) ATRX エクソン 2 ノックアウトマウスのスパイン形態異常に関する分子解析 ノックアウトマウスでは、wild (対照) マウスに比べて、アクチン重合に関連し、CaMKII の下流に位置する Tiam1, Kalirin-7 のセリン・スレオニンリン酸化が亢進し、Rac1GDP から Rac1GTP への変換に伴う PAK1/3, PAK2 リン酸化が亢進することがウエスタンブロットで明らかになった。PAK のリン酸化亢進から LIMK, MLC リン酸化障害を経て、アクチン重合障害が生じた可能性が

考察された。



(6) *Atrx*^{ΔE2}

マウスのDNAマイクロアレイ解析スクリーニングの結果、インプリント遺伝子のひとつが脳特異的に上昇していることを見出した。この分子はプロ



モーター領域には ATRX タンパク質が特異的に結合するグアニン 4 重鎖 (G4) 構造が存在し、ルシフェラーゼアッセイの結果このインプリント遺伝子の発現は ATRX タンパク質によって直接的に調節されていることが明らかとなった。さらに、このインプリント遺伝子のプロモーター領域の CpG island が *Atrx*^{ΔE2} マウスにおいて有意に脱メチル化していた。また、培養神経細胞にこのインプリント遺伝子を過剰発現させることで、*Atrx*^{ΔE2} マウスで見られるような樹状突起スパイン形態異常が観察された。これらのことから、*Atrx*^{ΔE2} マウスで認められる脳内の樹状突起スパイン形態異常の一因として、このインプリント遺伝子の異常な発現上昇が関与することが明らかとなった。今後、ATR-X 症候群由来 iPS 細胞を用いてより詳細な病態解明を行う。

(7) ATRX エクソン 6 コンディショナルノックアウトマウス作成

Cre-loxP システムを用いた ATR-X コンディショナルノックアウトマウス作成を行った。マウス X 染色体ゲノムを含む BAC クローンより ATRX 遺伝子エクソン 6-9 を含むゲノム断片を切り出し、ターゲティングベクターを作製し、エクソン 7 両端に loxP 配列挿入を行った。loxP 配列を両端にもつ GK-neo カセットをイントロン 6 に挿入し G418 で ES 細胞

(C57BL/6 由来)クローン薬剤選択後、サザンプロット法でスクリーニングを行い、ATR-X 遺伝子組み換え ES 細胞を樹立し、ES 細胞をマウスに戻し EXON7Cre-lox 組み換えマウスを作製した。しかし、良いクローンが得られなかったため、ターゲティングベクターに改良を加えた。相同組み換え ES 細胞クローンのゲノム中から PGK-neo カセットを除去するため、Flp-FRT システムを用いた。200 個の ES 細胞クローンをサザンプロットにてスクリーニングし 2 個の相同組み換え細胞を得て、2 匹のキメラマウスを作成した。

【今後の展望】

ATR-X 症候群は多彩な臨床症状を呈するが、ほぼ 100% 症状が出現する精神遅滞と生命予後に関与する心・血管系病態の解析を行う。海馬体解析は CaMK-Cre マウス、扁桃体解析は Lhx7/8-CreRP マウスと PR-Cre マウス、神経系全体解析は Wnt1-Cre マウスと交配する。心機能解析用に Nkx2.5-Cre マウス、血管機能解析用に Tie2-Cre マウスと交配する。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 12 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Yabuki Y, Shioda N, Maeda T, Hiraide S, Togashi H, Fukunaga K. Aberrant CaMKII activity in the medial prefrontal cortex is associated with cognitive dysfunction in ADHD model rats. Brain Res. 2014; 1557:90-100.
査読：有
2. Tian Y, Yabuki Y, Moriguchi S, Fukunaga K, Mao PJ, Hong LJ, Lu YM, Wang R, Ahmed MM, Liao MH, Huang JY, Zhang RT, Zhou TY, Long S, Han F. Melatonin reverses the decreases in hippocampal protein

- serine/threonine kinases observed in an animal model of autism. *J Pineal Res.* 2014; 56(1): 1-11.
査読 : 有
3. Harada K, Mikuni S, Beppu H, Niimi H, Abe S, Hano N, Yamagata K, Kinjo M, Kitajima I : A rapid and high-throughput quantitation assay of the nuclear factor κ B activity using fluorescence correlation spectroscopy in the setting of clinical laboratories . *PLoS One.* 2013;8(10):e75579.
査読 : 有
4. Yabuki Y, Nakagawasai O, Moriguchi S, Shioda N, Onogi H, Tan-No K, Tadano T, Fukunaga K . Decreased CaMKII and PKC activities in specific brain regions are associated with cognitive impairment in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats . *Neuroscience.* 2013;234:103-115.
査読 : 有
5. Katsushima Y, Sato T, Yamada C, Ito M, Suzuki Y, Ogawa E, Sukegawa I, Sukegawa J, Fukunaga K, Yanagisawa T. Interaction of PICK1 with C-terminus of growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) modulates trafficking and signal transduction of human GHRHR. *J Pharmacol Sci.* 2013; 122(3): 193-204.
査読 : 有
6. Kiyonaka S1, Nakajima H, Takada Y, Hida Y, Yoshioka T, Hagiwara A, Kitajima I, Mori Y, Ohtsuka T : Physical and functional interaction of the active zone protein CAST/ERC2 and the β -subunit of the voltage-dependent Ca(2+) channel. *J Biochem.* 2012;152(2):149-159.
査読 : 有
7. Fukunaga K, Shioda N. Novel dopamine D2 receptor signaling through proteins interacting with the third cytoplasmic loop . *Mol Neurobiol.* 2012;45(1):144-52.
査読 : 有
8. Shioda N, Moriguchi S, Oya T, Ishii Y, Shen J, Matsushima T, Nishijo H, Sasahara M, Fukunaga K. Aberrant hippocampal spine morphology and impaired memory formation in neuronal platelet-derived growth factor β -receptor lacking mice . *Hippocampus.* 2012;22(6):1371-8. doi: 10.1002/hipo.20973.
査読 : 有
9. Shioda N, Fukunaga K. Abnormal dendritic spine morphology and its signal transduction mechanisms in mental retardation. *Seikagaku.* 2012; 83(12): 1113-1117.
査読 : 有
10. Hida Y1, Fukaya M, Hagiwara A, Deguchi-Tawarada M, Yoshioka T, Kitajima I, Inoue E, Watanabe M, Ohtsuka T. Prickle2 is localized in the postsynaptic density and interacts with PSD-95 and NMDA receptors in the brain. *J Biochem.* 2011;149(6):693-700.
査読 : 有
11. Shioda N1, Beppu H, Fukuda T, Li E, Kitajima I, Fukunaga K. Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain . *J Neurosci.*

2011;31(1):346-358.

査読：有

12. Nogami T1, Beppu H, Tokoro T, Moriguchi S, Shioda N, Fukunaga K, Ohtsuka T, Ishii Y, Sasahara M, Shimada Y, Nishijo H, Li E, Kitajima I:Reduced expression of the ATRX gene, a chromatin-remodeling factor, causes hippocampal dysfunction in mice. *Hippocampus*. 2011;21(6):678-687

査読：有

〔学会発表〕(計4件)

1. 塩田倫史、澤井優広、小野里美咲、山口航矢、福永浩司 ATR-X 症候群におけるシナプス病態分子機構 第87回日本薬理学会年会 仙台(2014.3.19-21)
2. Kitajima I, Hirano K, Tani M, Tanaka K:Novel haemostatic biomarkers in acute cardioembolic stroke, 2013 American Association for Clinical Chemistry Annaul Meeting, July 28-Augst1, Houston, TX,USA
3. Kitajima I, Harada K, Tomoda F, Kagitani S, Koike T, Inoue H: NF-kB activity in the peripheral blood lymphocytes correlates with metabolic syndrome-related biomarkers in patients with essential hypertension. 2011 American Society for Clinical Pathology Annual Meeting/WASPaLM XXVI Wordld Cobgress, October 19-23, 2011, Las Vegas, USA
4. Kitajima I, Beppu H, Nogami T, Shoda N, Fukunaga K: Reduced expression of the ATRX gene, A chromatin-remodeling factor, causes abnormal behaviors and learning impairment. XXth World Congress of Neurology, November 12-17, 2011,

Marrakesh, Morocco.

6. 研究組織

(1)研究代表者

北島 勲 (Kitajima Isao)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
研究者番号：50214797

(2)研究分担者

森 寿 (Mori Hisashi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
研究者番号：00239617

福永 浩司 (Fukunaga Kohji)
東北大学・薬学研究科(研究員)・教授
研究者番号：90136721