

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2012

課題番号：23681041

研究課題名（和文） マウス視覚野におけるMecp2とFoxg1の標的ゲノム領域探索

研究課題名（英文） Genomic targets of Mecp2 and Foxg1 in mouse visual cortex

研究代表者

ARNER ERIK (ARNER ERIK)

独立行政法人理化学研究所・LSA情報基盤施設・研究員

研究者番号：20571839

研究成果の概要（和文）

レット症候群のマウスモデルについてChIP配列決定を行い、野生型(WT)とMecp2欠損(KO)マウスの視覚野におけるMecp2とFoxg1の標的を特定。キャップによる遺伝子発現解析(CAGE)でKOの標的の発現レベルを評価した。WTとKOで発現の異なる遺伝子は主に発生後期に見られ、その多くは呼吸鎖等のミトコンドリア・プロセスに関連しており、レット症候群におけるミトコンドリアの関与を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In a mouse model of Rett Syndrome, ChIP-sequencing was used to identify targets of Mecp2 and Foxg1 in visual cortex of wild-type (WT) and Mecp2 knockout (KO) mice. Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) to assess the expression levels of these targets in Mecp2 null mice. Differentially expressed genes between WT and KO were mostly observed at a late stage of development, and were enriched for mitochondrial processes including the respiratory chain, suggesting a mitochondrial component to Rett Syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	8,000,000	2,400,000	10,400,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：Rett Syndrome, Mecp2, FoxG1, ChIP Sequencing, Transcriptome Analysis

1. 研究開始当初の背景

メチル化 CpG 結合タンパク質 2 (Mecp2)

遺伝子とフォークヘッドボックスタンパク質 G1 (Foxg1) 遺伝子の変異は、シナプス可

塑性の障害によって引き起こされる重篤な神経発達障害、レット症候群 (RTT) の発病機序に関与している。日本の女子における RTT の有病率は 15000 人に 1 人であり、現在、この障害の治療法はない。さらに *Mecp2* は自閉症、X 染色体性精神遅滞、アンジェルマン症候群などの疾患にも関与している。*Mecp2* と *Foxg1* は、標的遺伝子のクロマチン結合を介して転写を調節することが知られている。重要なことに、*Mecp2* には、クロマチンのサイレンシングと関連づけられるクロマチン凝縮を起こすメチル化 DNA と結合する配列モチーフが含まれている。一方、脳特異的転写制御因子である *Foxg1* は終脳パターンニングおよびニューロン新生に不可欠である。また、*Foxg1* と *Mecp2* は補助抑制因子を引きつけることで転写を抑制し、*Mecp2* は活性化補助因子と相互作用することも知られている。このように両タンパク質は標的遺伝子の発現レベルを調節することが分かっている。また、シナプス可塑性に関与する標的遺伝子の誤制御は RTT に見られる表現型を引き起こすと考えられている。

2. 研究の目的

本プロジェクトの主な目的は、*Mecp2* と *Foxg1* のそれぞれおよび共通のゲノム標的を特定し、発達可塑性臨界期の *Mecp2* 欠損マウスについて、これらの標的の発現レベルを評価することである。また、*Mecp2* と *Foxg1* が、活性化したプロモーターあるいは不活性化したプロモーターと結合するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

Mecp2 と *Foxg1* の標的を同定するため、野生

型および *Mecp2* 欠損マウスの視覚野にクロマチン免疫沈降 (ChIP) を実施し、配列決定を行った。クロマチンは、野生型マウスの視覚野から調製し、プールした。免疫沈降のための抗体は、*Mecp2*、*Foxg1*、RNA ポリメラーゼ II、5-メチルシトシンおよびネガティブコントロールとしてウサギ IgG の 5 つを使用。視覚野試料内で活発に転写している遺伝子および抑圧されている遺伝子の同定を可能にするため、RNA ポリメラーゼ II および 5-メチルシトシンの配列解析も行った。配列決定にはイルミナ HiSeq Version3、*Mecp2* と *Foxg1* の遺伝子標的の同定には標準 ChIP-seq ピークコーリング・パイプラインを使用。MeDIPS アルゴリズムを用いて MeDIP ライブラリを定量的に分析し、メチル化した領域を特定した。

また、ハーバード大学医学部の Michela Fagiolini 博士と共同で *Mecp2* 欠損マウスおよび野生型マウス由来の視覚野のトランスクリプトームの配列決定も行った。発生の 3 段階 (P15、P30、P60) で、野生型および *Mecp2* 欠損マウスの視覚野について CAGE 配列決定を実施。CAGE 法では、各プロモーター領域の発現量を定量的に測定することで、プロモーター領域を形成する可能性のある転写開始部位を同定できる。また、個々の遺伝子について、転写因子から異なる調節入力の影響を受けていると思われる複数のプロモーター領域を同定することもできる。

4. 研究成果

ChIP および MeDIP の配列解析は最終段階に入っている。CAGE データから、発生の 3 段階で異なる発現をするプロモーターを同定し、共同研究者の研究室で qPCR を用いた検証が行われている。この CAGE データに基

づき、いくつかの興味深い結果が観察された。プロモーター発現に関していえば、差異は主に発生の後期段階 (P60) で観察された。P15では、野生型 (WT) とノックアウト (KO) とで著しく発現量が異なるプロモーターが 3 個だけ検出された。P30 において WT と KO で発現量の異なるプロモーターは 53 個だった。一方、P60 では、WT と NO との間で著しく発現量が異なる (DE) プロモーターが合計 844 個確認された。この 844 個のプロモーターのうち KO において上方制御されていたのは約半数 (400 個) で、残り (444 個) は下方制御されていた。P60 における DE プロモーターに着目すると、過半数 (63%) は、既知のプロモーターの近傍に位置していた。別の 32% はアノテートした遺伝子 (5' -UTR と 3' -UTR、イントロンとエクソン) の遺伝子本体内にあり、対応する遺伝子の選択的転写開始部位を表している可能性がある。P60 における DE プロモーターの 5% は新規タンパク質コード RNA または非コード RNA を表している可能性のある遺伝子間領域に位置していた。

(一般にハウスキーピング遺伝子と関連付けられている) CpG 島とオーバーラップするプロモーターをさらに詳しく分析した結果、これらのプロモーターに対する *Mecp2* ノックアウトの影響は多くの場合一時的なものであり、P30 で強い影響が見られ、P60 では減少することがわかった。これにはよく知られている転写因子 NR4A1、JUNB、EGR2 も含まれている。

遺伝子オントロジー分析から、P30 で異なる発現をしたプロモーターの中には転写因子の活性、神経投射、概日リズムに関連するものが多いことが判明した。一方、P60 の DE

プロモーターには呼吸鎖を含むミトコンドリア・プロセスに関連したものが多く、レット症候群のモデルにおいて既に説明されているミトコンドリアの関与を示唆している。

STRING データベースに記載されているタンパク質間の既知の相互作用を用い、P30 と P60 で異なる発現をする遺伝子のプロモーターに関して、タンパク質間の相互作用 (PPI) ネットワークを比較した。この分析により、特に P60 において、DE プロモーターの顕著な相互関連性が明らかになった。これは、*Mecp2* ノックアウトは、発達後期に単一経路の障害だけでなく、すべての経路に障害をもたらすことを示唆している。

私たちは、CAGE データに対してモチーフ活性の応答解析 (MARA) を実施した。この方法は FANTOM4 プロジェクトにおいて開発されたものであり、発現している CAGE プロモーター内に存在する DNA 配列モチーフの頻度に基づき、さまざまな試料内で活性化している転写因子を特定する。MARA による解析の結果、特に P60 において、WT と KO の間で異なる活性を有することが予測されていたいくつかの転写因子を同定した。これらの転写因子には FOXP1、EGR 転写因子、IRF7 が含まれていた。

また、私たちは反復因子に着目して、さらに詳しく CAGE データを分析した。過去の研究から、特に脳内において、発生と反復因子の発現との関連が確認されており、DNA メチル化と転位因子の活性および発現にも強い関連性がある。私たちの調査では、発現している反復因子の数は 3 つの発達段階においてほぼ一定 (1000 個前後) だったにもかかわらず、P60 以外では WT と KO で異なる発

現をしているものは全くないか、あってもごくわずかだったが、P60では発現している反復因子の多く（～10%）が異なる発現をしていた。したがって、Mecp2のノックアウトは、タンパク質コード遺伝子だけでなく、転位因子の発現にも影響を及ぼすと思われる。発現しているこれらの反復因子に機能があるとするれば、その評価にはさらなる研究が必要だろう。

要約すると、いくつかの興味深い発見があり、これらは国内外のレット症候群研究の分野に影響を及ぼすものと予想される。

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ARNER ERIC

(ARNER ERIK)

独立行政法人理化学研究所・

LSA 情報基盤施設・研究員

研究者番号：20571839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

・ CARNINCI PIERO

(CARNINCI, PIERO)

独立行政法人理化学研究所

ゲノム機能研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10333296

・ FORREST ALISTAIR

(FORREST ALISTAIR)

独立行政法人理化学研究所・

LSA 情報基盤施設・施設長

研究者番号：40569084

・ SAXENA ALKA

(SAXENA ALKA)

独立行政法人理化学研究所・

ゲノム機能研究チーム・上級研究員

研究者番号：20618772

・ FAGIOLINI MICHELA

(FAGIOLINI MICHELA)

Children's Hospital Boston・

Assistant Professor of Neurology