

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510280

研究課題名(和文) ヒトBACを用いた自閉症スペクトラム患者共通遺伝的リスク因子の解析

研究課題名(英文) Enhancer trap analysis for Autism Spectrum Disorder associated locus by utilizing Human BAC transgenic mouse methodology

研究代表者

井上 由紀子 (Inoue, Yukiko)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第六部・流動研究員

研究者番号：30611777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：5番染色体のCDH10/CDH9遺伝子間領域に、自閉症スペクトラム(ASD)患者群で最も広く共有される一塩基多型(SNP)が存在し、そのゲノム領域からMoesin遺伝子に対するアンチセンスRNAが転写され、神経発達に関わるMoesin蛋白量に影響を与える可能性が報告されている。

本研究では、ヒトの塩基配列を持つ人工染色体を利用して、このASDリスクSNPを含む配列をマウスの染色体へ組込んだところ、その配列はASD患者で機能障害が見られる大脳皮質・線条体・小脳において、前述のアンチセンスRNAの転写を活性化することが明らかになった。この結果はASDの複雑な遺伝的背景の一端を解明した点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：A recent genome-wide association study indicated a significant association of ASD with the SNPs, rs4307059 and five others, located in a gene-poor region between CDH10 and CDH9 on chromosome 5p14.1. In addition, the transcription of a novel noncoding RNA antisense to Moesin mRNA from this ASD risk SNP region was reported.

In the present study, we applied bacterial artificial chromosome (BAC) based transgenic mouse methodology to analyze the enhancer activities of this risk SNP region. By using BACs containing the human genome sequences around the SNPs, we revealed that the region harbored the neocortical area, striatum and cerebellum specific enhancers for the aforementioned antisense RNA. Considering the actin filament linking ability of Moesin at axonal growth cones, balancing machinery of Moesin protein expression at distinct brain regions that relate to clinical conditions might well explain the common features of ASD.

研究分野：ゲノム医科学、神経発生生物学

キーワード：自閉症スペクトラム SNP ヒトBAC BACトランスジェニックマウス アンチセンスRNA Moesin

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム (ASD) の遺伝学的研究は過去 10 年間で急速に進み、全症例の 10-20% 程度を占める稀な遺伝子変異 (レアバリエーション) が多数同定されてきたが、それ以外の ASD 患者に共通して存在する遺伝的リスク因子 (コモンバリエーション) についての知見は現在も乏しい。ヒトゲノムでは約 300 塩基ごとに 1 ヶ所の割合で一塩基多型 (SNP) がみられ、この個人差が「病気にかかりやすさ」と連関すると考えられるが、ゲノム全体を網羅する数十万個の SNP を一挙に決定可能なアレイ技術の発達により、様々な疾患を対象として、患者群 vs 健常者群で頻度が異なる SNP の報告 (ゲノムワイド関連解析; GWAS) が近年相次いでいる。ヒトゲノムにおいてタンパク質をコードしている塩基配列は僅か 2% 程度に過ぎないことを考慮すると、GWAS によって見出される疾患関連 SNP の大半が gene desert と呼ばれる遺伝子非コード領域内に同定されるのは自然であるが、そのようなゲノム領域を解析する手段は少ないため、ほとんどがリスク因子としての理解を得られないまま放置されているのが現状である。

染色体 5p14.1 上の rs4307059 は、過去最大規模 (被験者およそ 1 万人) の GWAS によって初めて見出された ASD 患者に共通の SNP であり、シナプスに存在する細胞接着分子であるカドヘリン 10 とカドヘリン 9 の遺伝子間領域のほぼ中央に位置する (Wang K et al., *Nature* 459: 528-533, 2009)。rs4307059 と連鎖する 5 つの ASD 患者特有 SNP を含む連鎖不平衡ブロック内には、脊椎動物ゲノム間で進化的に高度に保存された配列 (lod=3480) が含まれるため、このゲノム領域がカドヘリン 10 あるいはカドヘリン 9 の遺伝子発現調節機能を有する可能性が示唆されていた (Wang K et al., *Nature* 2009)。またカドヘリン 10 は、発達期胎児脳において、眼窩前頭皮質 (ASD 患者で臨床的に機能障害が認められる脳領域のひとつ) で強く発現していることから、この遺伝子の発現変化が ASD 発症リスクに影響を与えることが推測されていた (Wang K et al., *Nature* 2009)。

以上のことから、カドヘリン 10 / カドヘリン 9 遺伝子間に存在する ASD 発症リスク

SNP を含むゲノム領域に着目し、その領域の遺伝子転写調節活性を明らかにすることは、これまで解析が手薄であったコモンバリエーションへの理解を深めることになり、ASD 遺伝的要因の複雑性を解きほぐす一助となることが期待された。

2. 研究の目的

染色体 5p14.1 に隣接するカドヘリン 10 / カドヘリン 9 遺伝子間には、「ASD 患者群で最も広く共有される 6 つの SNP」を含むゲノム領域が存在する。本研究では、この領域にカドヘリン 10 あるいはカドヘリン 9 遺伝子の発現調節機能が有るか否かを明らかにし、ASD 患者に共通する発症リスクの遺伝的メカニズムの一端を探ることを目的とする。

具体的には、該当ゲノム領域の中樞神経系における転写調節活性を、「ヒトゲノム配列を有する細菌人工染色体 (BAC)」を用いたトランスジェニックマウス作出技術を駆使して解析し、病因となりうる SNP の存在と遺伝子発現の変化を初めて関連付けることを目指す。

3. 研究の方法

細菌人工染色体 (BAC) に基づく先端ゲノム操作技術とトランスジェニックマウス作出技術を組み合わせ、報告者ら固有の遺伝子発現調節モジュール解析法を適用することにより、カドヘリン 10 / カドヘリン 9 遺伝子間に位置する ASD 患者特有 SNP を含むゲノム領域に遺伝子発現調節活性があるか否かを検証した。

特に本研究では、「ヒトゲノム配列を有する BAC」を用い、エンハンサートラップ機能を持つレポーター遺伝子カセットを BAC へ挿入後、BAC トランスジェニックマウスを作出、作出したマウスの脳組織におけるレポーター遺伝子発現を解析することにより、遺伝子非コード領域の転写調節活性を効率良く抽出した。

4. 研究成果

前述の6つのASDリスクSNPを全て含むヒトBAC(#1)に、大腸菌内でのトランスポゾン転移を利用して「最小プロモーター+LacZレポーター遺伝子」カセットを挿入し、受精卵へインジェクションすることによって、このBACを有するトランスジェニックマウスを作製しエンハンサートラップを試みたところ、発達期の脳皮質・線条体、および小脳において強いLacZレポーター遺伝子発現が観察され、ASD患者において臨床的に機能障害が認められる脳領域において作用するエンハンサーの存在が明らかになった。

次に、ヒトBAC(#1)と隣接し、かつ一部重複するが6つのSNPは含まない、新たなヒトBAC(#2)およびヒトBAC(#3)を用いて前述のエンハンサートラップ法を行った結果、これらのBACには脳におけるエンハンサー活性は全く無く、BAC(#1)のみに含まれるASDリスクSNPに対応するゲノム領域こそが、脳皮質・線条体・小脳における転写調節活性を担うことが明らかになった。

さらに、このヒトゲノム領域の塩基配列をチンパンジー、マカクサル、マウス、ラットと比較すると、霊長類では高度保存されているものの、げっ歯類での保存性は低く、ヒトBACにおいて検出された脳エンハンサー活性は霊長類特異的なものであることが予想されたので、ヒトBAC(#1)に相当するマウスBAC(#1')を用いたエンハンサートラップを新たに行った結果、中枢神経系における活性は無いことが明らかになり、ASDリスクSNP領域の脳における転写調節活性はやはり霊長類に特有のものである可能性が示唆された。

また、本研究期間中に、本研究対象ゲノム領域(6つのASDリスクSNPを含む領域)から新規アンチセンスRNA(Moesin pseudogene1 antisense)が転写されることが報告され、これがMoesin遺伝子から転写されるmRNAと結合して、シナプス形成に関与するMoesin蛋白量を変化させることによりASDの病因に寄与することが推測されているため(Kerin T et al., *Sci Transl Med* 2012)。本研究で作製したヒトBAC(#1)トランスジェニックマウス(レポーター遺伝子としてLacZを持つ)の脳皮質・線条体・小脳から抽出

したサンプルを用いて、アンチセンスRNAとLacZ RNAを定量したところ、両者には相関があり、本研究で見出した脳エンハンサー活性はアンチセンスRNAの転写を調節するものである可能性が高いことが明らかになった。

研究開始当初、本研究対象ゲノム領域は、直近の遺伝子であるカドヘリン10あるいはカドヘリン9の転写調節活性を持つのではないかと予測していた。とくにカドヘリン10は発達期胎児脳において、ASD関連脳部位のひとつである眼窩前頭皮質で発現していることに着目し、カドヘリン10遺伝子の直近5'側上流を含む新たなヒトBAC(#4)を用いてエンハンサートラップを行ったところ、脳発達早期において前頭皮質でLacZレポーター遺伝子発現が観察され、この脳部位に対するエンハンサーは遺伝子近傍に存在することが明らかになった。つまり、ASDリスクSNP領域にカドヘリン10発現を調節する遠位エンハンサーがある可能性は低いと考えられた。

以上の結果は、ASDの複雑な遺伝的背景の一端を解明した点で意義深く、現在はこれらを論文としてまとめ、投稿中である。

近年、さまざまな疾患リスクSNPの同定が進んでいるが、全ゲノム中で遺伝子をコードする配列はわずか2%程度であるため、同定されたSNPの大部分は、本研究対象のASDリスクSNPと同様に蛋白非コード領域内にあり、それらの機能解析法はこれまでほとんど開発されてこなかった。本研究により有用性を示した「ヒトBACを用いるエンハンサー活性検出法」は、ポストゲノムにおいて疾患リスクSNPの機能をスクリーニングする有益技術として非常に重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- 1) Terakawa YW, Inoue YU, Asami J, Hoshino M, Inoue T. (2013) A sharp cadherin-6 gene expression boundary in the developing mouse cortical plate demarcates the future functional areal border. *Cereb Cortex*. 10, 2293-2308, doi: 10.1093/cercor/bhs221. 査読有

2) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. (2014) Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nat Commun.* 5: 3337, doi: 10.1038/ncomms4337. 査読有

3) Yamada M, Seto Y, Taya S, Owa T, Inoue YU, Inoue T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. (2014) Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by *ptf1a* and *ato1* for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurosci.* 34(14) 4786-4800, doi:10.1523/JNEUROSCI.2722-13.2014. 査読有

4) Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T, Inoue K. (2015) Additive dominant effect of a SOX10 mutation underlies a complex phenotype of PCWH. *Neurobiol Dis*, in press, doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.013. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1) 江草早紀、井上由紀子、浅見淳子、星野幹雄、宗田孝之、井上高良 (2012) マウス大脳皮質聴覚野形成における Cadherin-6 発現の役割、Neuro2012 (第 35 回日本神経科学大会) 名古屋国際会議場

2) 井上由紀子、井上高良 (2013) 自閉症スペクトラム患者共通リスク SNPs を含むゲノム領域は発達期脳においてエンハンサー活性を有する、第 6 回神経発生討論会、理化学研究所和光キャンパス

3) 井上-上野由紀子、井上高良 (2013) A 5p14.1 gene-poor region encompassing Autism Spectrum Disorder associated SNPs has

enhancer activities in the developing brain, Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会) 国立京都国際会館

4) Inoue YU, Inoue T (2013) Brain enhancer activities at the gene-poor 5p14.1 Autism-associated locus, Neuroscience2013 (the 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience), San Diego Convention Center, CA, USA

5) 井上-上野由紀子、井上高良 (2014) Ultra-rapid generation of Pax6 mutant mice via CRISPR/Cas9-mediated genome engineering, Neuro2014 (第 37 回日本神経科学大会) パシフィコ横浜

6) 井上-上野由紀子、井上高良 (2014) CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による迅速な Pax6 遺伝子変異マウスの作製、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜

7) 江草早紀、井上由紀子、浅見淳子、星野幹雄、井上高良 (2015) カドヘリン発現による大脳皮質パレル IV 層ニューロン特異的な樹状突起の配向性と細胞体配置の制御、第 8 回神経発生討論会、九州大学医学部キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部第二研究室

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r6/index-lab2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 由紀子 (INOUE, Yukiko)

独立行政法人国立精神・神経医療研究セ

ンター 神経研究所 疾病研究第六部
流動研究員
研究者番号：30611777

- (2) 研究分担者 無し
- (3) 連携研究者 無し