

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430167

研究課題名(和文) 神経細胞特異的なクロマチンダイナミクスを司る分子の同定

研究課題名(英文) Identification of chromatin factor which is associated with neuron specific chromatin dynamics.

研究代表者

堀家 慎一 (Horike, Shin-ichi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：40448311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、細胞核内では転写マシナリーが活性化している領域と不活性化している領域とが存在し、遺伝子が適切な場所に配置されることで、発現が制御されることが明らかになっているが、実際にどのような分子が染色体ゲノムの核内配置や相互作用に関わり、遺伝子発現を制御しているのか、明らかにされていない。そこで、我々はブラダーウィリ症候群やアンジェルマン症候群の発症に寄与する15q11-q13領域に着目し、15q11-q13領域の遺伝子発現やクロマチンを制御する分子の同定を試みた。その結果、15q11-q13領域のクロマチン動態を司る分子として、メチル化CpG結合タンパク質の可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The PWS/AS imprinted gene cluster on human chromosome 15q11-q13 spans ~4Mb region that includes several protein-coding genes and the 450kb long UBE3A-ATS lncRNA. UBE3A-ATS is expressed from its unmethylated CpG island promoter contained in the defined ICR on the paternal chromosome. Despite the fact that PWS-IC is known to be necessary for the coordinately controlled gene expression of 15q11-q13 imprinted domain, the mechanism by which it act and how it influence to the several protein-coding genes over long distance, is unknown. In order to define the precise long-range gene regulation of 15q11-q13, we examined shRNA-based knockdown experiments by using the human/mouse hybrid cells which is containing a single human chromosome of identified parental origin. Our results support the idea that Methyl-CpG binding proteins such as MeCP2, Mbd1 have an essential role for long-range gene regulation of 15q11-q13.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス インプリンティング クロマチン DNA-FISH

### 1. 研究開始当初の背景

15q11-q13 領域はゲノム刷り込み遺伝子がクラスターを形成して存在している領域であり、その刷り込み遺伝子の発現異常によりプラダーウィリ症候群やアンジェルマン症候群を発症する。また、15q11-q13 領域の重複は自閉症患者や統合失調症患者で数多く報告されている。我々は、これまでに15q11-q13 領域における精神発達障害の発症機序の解明に取り組み、15q11-q13 領域の遺伝子発現制御には核内における遺伝子の配置が重要な意味を持っていることを見出してきた。近年、細胞核内では転写マシナリーが活性化している領域と不活性化している領域とが存在し、遺伝子が適切な場所に配置されることで、発現が制御されることが明らかになっているが、実際にどのような分子が染色体ゲノムの核内配置や相互作用に関わり、遺伝子発現を制御しているのか、明らかにされていない。これまでに、CTCF、コヒシン蛋白質がインスレーター活性を有し、クロマチンループ形成を介したローカルな染色体ドメインの構築に重要であることは知られているが、15q11-q13 領域におけるクロマチン動態を司る分子は、未だ明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

我々は15q11-q13 領域のゲノム刷り込み遺伝子クラスターの複雑な遺伝子発現制御をモデルに、15q11-q13 領域のクロマチン動態を司る分子の同定を試みる。これまでの研究から、細胞核内では転写マシナリーが活性化している領域と不活性化している領域とが存在し、遺伝子が適切な場所に配置されることで、発現が制御されることが明らかになっている。しかし、実際にどのような分子が染色体ゲノムの核内配置や相互作用に関わり、遺伝子発現を制御しているのか、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト shRNA 発現レトロウイルスライブラリーを使用し、我々がこれまでに明らかにしてきた「PWS-IC 領域とシス相互作用」と「染色体ペアリング」といったクロマチン動態を指標にスクリーニングを行うことで、15q11-q13 領域のクロマチン動態を司る分子の同定を試みる。

### 3. 研究の方法

神経細胞特異的なクロマチンダイナミクスを司る分子を同定するため、ヒト shRNA 発現ベクターをヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞にトランスフェクションし、DNA-FISH 解析により「PWS-IC 領域と CHRNA7 領域のシス相互作用」と「GABRB3 遺伝子座における染色体ペアリング」を指標にスクリーニングを行う。ヒト shRNA 発現ベクターライブラリーは、ゲノムネットワークプロジェクト「ヒト全遺伝子レトロウイルス型 siRNA ライブラリー構築」の成果に基づくライブラリーから「転写活性に重要な遺伝子」1,340 個を抽出し使用する。一次スクリーニングとして、10 個の

shRNA 発現ベクタープールをトランスフェクションさせ、DNA-FISH 解析により、クロマチン動態に変化のあるものを抽出する。その上で、二次スクリーニングを行い、15q11-q13 領域のクロマチンダイナミクスを司る分子を同定する。また、15q11-q13 領域の SNRPN~UBE3A 遺伝子領域は、父方アレル特異的なクロマチンの脱凝集を呈するが、未だその分子基盤は明らかにされていない。そこで、同様にマウス shRNA 発現ベクターをトランスフェクションさせた F12 細胞（親由来の明らかなヒト 15 番染色体を含む）において、SNRPN~UBE3A 領域をカバーする BAC Clone をプローブにし DNA-FISH 解析を行い、父方アレル特異的なクロマチン脱凝集に必須の因子を明らかにする。

### 4. 研究成果

我々はこれまでにヒト染色体工学技術を用いて PWS-IC を欠失させた改変母方 15 番染色体および改変父方 15 番染色体の構築に成功した。構築した PWS-IC 欠失染色体で、15q11-q13 領域の遺伝子発現を qRT-PCR 法で解析したところ、父方特異的な MAGEL2 遺伝子の発現低下が認められた。そこで、DNA-FISH 法により 15q11-q13 領域のクロマチン動態を詳細に解析することで、MAGEL2 遺伝子の発現低下を引き起こしたクロマチン動態を明らかにすることとした。その結果、父方アレル特異的なクロマチン脱凝集は PWS-IC を欠失したにも関わらずクロマチン脱凝集状態を維持していた。一方、PWS-IC 欠失母方染色体では異所的にクロマチン脱凝集が起こっていた。このことから、15q11-q13 領域のクロマチン動態を司る分子として、メチル化 CpG 結合タンパク質の可能性が強く示唆された。そこで、MeCP2 や MBD1 などのメチル化 CpG 結合タンパク質に対する shRNA 発現ベクターをトランスフェクションさせた F12 細胞（親由来の明らかなヒト 15 番染色体を含む）において、SNRPN~UBE3A 領域をカバーする BAC Clone をプローブにし DNA-FISH 解析を行い、父方アレル特異的なクロマチン脱凝集にメチル化 CpG 結合タンパク質が寄与するかについて検討した。さらに、15 番染色体テリトリーと MAGEL2 遺伝子座の相関関係について解析したところ、発現している MAGEL2 遺伝子座は 15 番染色体テリトリーの外側にループアウトし、発現していない MAGEL2 遺伝子座は 15 番染色体テリトリーの内側にあることが明らかとなった。このように、本研究では PWS-IC 欠失母方染色体において異所的にクロマチン脱凝集が生じたことから、MeCP2 などのメチル化 CpG を認識する分子が正常母方アレルにおけるコンパクトなクロマチン状態の維持に重要であることが示された。一方、父方 PWS-IC が 1Mb 離れた MAGEL2 遺伝子座の核内配置をコントロールしている事実は大変興味深く、今後 15q11-q13 領域のクロマチン状態の形成・維持に関わる因子を同定すると共に、MeCP2 を介した遺伝子

発現制御機構を明らかにする。さらに、レット症候群や自閉症といった発達障害の治療のターゲットとなる分子の同定を試みると共に、治療法の開発へ発展させる。

#### 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2件)

Munesue, T., Nakamura, H., Kikuchi, M., Miura, Y., Takeuchi, N., Anme, T., Nanba, E., Adachi, K., Tsubouchi, K., Sai, Y., Miyamoto, K., Horike, S., Yokoyama, S., Nakatani, H., Niida, Y., Kosaka, H., Minabe, Y., Higashida, H. "Oxytocin for male adolescents and adults with autism spectrum disorder and comorbid intellectual disabilities: A randomized pilot study" *Frontiers in Psychiatry*, 7:2. doi: 10.3389/fpsy.2016.00002. eCollection 2016. 査読有

Guo, L., Yamashita, H., Kou, I., Takimoto, A., Meguro-Horike, M., Horike, S., Adachi, T., Ikegawa, S., Hiraki, Y., Shukunami, C. (2016) "Increased expression of the ladybird homeobox 1 causes scoliosis in zebrafish" *Plos Genetics*, 12(1) e1005802. doi:10.1371/journal.pgen.1005802 査読有

#### [学会発表](計4件)

堀家慎一「エピジェネティクス制御と生命機能、畜産への応用」第31回東日本家畜受精卵移植技術研究会、石川県立音楽堂、金沢、2016年2月4~5日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「The imprinted ncRNA, UBE3A-ATS regulates the chromatin architecture of MAGEL2 and NDN locus over long distance」第38回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸、2015年12月1~4日

堀家慎一「SNORD116によるクロマチンダイナミクスを介したMAGEL2/NDN領域の発現制御機構の解明」第2回北陸エピジェネティクス研究会、富山大学、富山、2015年11月11~12日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「The imprinted ncRNA, UBE3A-ATS regulates the chromatin architecture of MAGEL2 and NDN locus over long distance」International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 淡路夢舞台国際会議場、淡路島、2015年8月23~26日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「Neuron specific impairment of inter-chromosomal

pairing and transcription in a novel model of human 15q duplication syndrome」International Symposium on Non-coding DNA and Chromosomal Integrity, 淡路夢舞台国際会議場、淡路島、2015年8月7~8日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「The imprinted ncRNA, UBE3A-ATS regulates the chromatin architecture of MAGEL2 and NDN locus over long distance」Gordon Research Conference, Epigenetics, Bentley University, Waltham, USA, 2015年8月2~7日

堀家慎一「SNORD116によるクロマチンダイナミクスを介したMAGEL2/NDN領域の発現制御機構の解明」第9回日本エピジェネティクス研究会、学術総合センター、東京、2015年5月25~26日

S.Horike, D.H. Yasui, W.Powell, J.M.LaSalle, M.Meguro-Horike "PWS-IC is essential for the higher order chromatin organization of 15q11-q13 and the location of a paternally expressed gene within a chromosome 15 territory." The 4D Nucleome 2014, Hiroshima, 2014年12月17~20日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「高次クロマチンダイナミクスを制御するPWS-ICの新たな役割」第32回染色体ワークショップ、第13回核ダイナミクス研究会、広島、2014年12月15~17日

Horike S.「MeCP2 is required for chromatin higher-order structure and dynamics at the imprinted 15q11-q13 locus.」Epigenomics of Common Diseases, Wellcome Trust Conference Centre, Churchill College, Cambridge, UK 2014年10月28~31日

目黒牧子, 赤木佐千代, 堀家慎一「CRISPR/Casシステムを用いたヒト染色体ドメインの大規模欠失によるクロマチンダイナミクスの解析」第4回ゲノム編集研究会、広島国際会議場、広島、2014年10月6~7日

堀家慎一【招待講演】「発達障害におけるエピジェネティクス研究」第57回日本神経化学学会大会・第36回日本生物学的精神医学会、奈良県文化会館、奈良、2014年9月29~10月1日

堀家慎一【招待講演】「核内ダイナミクスと遺伝子発現」名市大エピジェネティクス研究会、ホテル木曽路、南木曽、2014年9月4~5日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「高次クロマチンダイナミクスを介したPWS-ICによる遺伝子発現制御機構の解析」第8回日本エ

- ピジェネティクス研究会,伊藤国際学術センター,東京,2014年5月25~27日  
目黒牧子,堀家慎一「クロマチンダイナミクスを制御する PWS/AS インプリンティングセンターの新たな役割」第8回日本エピジェネティクス研究会,伊藤国際学術センター,東京,2014年5月25~27日  
堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子「高次クロマチンダイナミクスを制御する PWS-IC の新たな役割」日本生化学会北陸支部 第32回大会,富山,2014年5月24日  
堀家慎一, Yasui DH, Powell W, LaSalle JM, 目黒 - 堀家牧子 「PWS-IC is essential for the higher order chromatin organization of 15q11-q13 and the location of a paternally expressed gene within a chromosome 15 territory」高等研カンファレンス Chromatin Decoding, 国際高等研究所, 京都, 2014年5月12~15日  
堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, 目黒 - 堀家牧子 「Long non-coding RNA, UBE3A-ATS is essential for long-range gene regulation and chromosome territory in 15q11-q13 imprinted locus.」第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2013年12月3~6日  
堀家慎一, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒 - 堀家牧子 「15q11-q13 領域の遺伝子発現制御における染色体ダイナミクスの役割」第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会, ホテルおかだ, 箱根, 2013年11月25~27日  
堀家慎一, 岡田源作, 棟居俊夫, 東田陽博, 横山茂, 目黒 - 堀家牧子 「自閉症発症機序におけるエピゲノムの重要性 ~オキシトシンレセプタープロモーター領域の DNA メチル化解析~」日本人類遺伝学会 第58回大会, 江陽グランドホテル, 仙台, 2013年11月20~23日
- 21 Horike S. 「MeCP2 is required for chromatin higher-order structure and dynamics at the imprinted 15q11-q13 locus.」Epigenomics of Common Diseases, Wellcome Trust Conference Centre, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK 2013年11月7~10日
- 22 堀家慎一【招待講演】「神経疾患のジェネティクスとエピジェネティクス」日本心理学会 第77回大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2013年9月19~21日
- 23 堀家慎一 「MeCP2 is required for chromatin higher-order structure and dynamics at the imprinted 15q11-q13 locus.」酵母からのエピジェネティクス研究へのメッセージ, グランディア芳泉, あわら, 2013年9月2~4日
- 24 堀家慎一, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒 - 堀家牧子 「父性発現遺伝子 MAGEL2 の遺伝子発現制御における染色体ダイナミクスの役割」第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良県新公会堂, 奈良, 2013年5月30~31日
- 〔図書〕(計3件)  
目黒牧子, 堀家慎一 「インプリント lncRNA による染色体ドメインレベルの遺伝子発現制御」実験医学増刊号「ノンコーディング RNA テキストブック」, 第33巻, 第20号, 82-83. 2015年12月10日発行 査読なし  
Meguro-Horike, M., \*Horike, S. (2015) “MMCT-Mediated Chromosome engineering technique applicable to functional analysis of lncRNA and nuclear dynamics” *Methods Mol Biol.*, 1262; 277-289. \*Corresponding Author 査読なし  
目黒牧子, 堀家慎一 「発達障害の遺伝学から明らかとなる多彩なエピジェネティクスの役割」エピジェネティクスの産業応用, シーエムシー出版, 239-247, 2014年4月30日発行 査読なし
- 〔産業財産権〕  
 出願状況(計 0件)
- 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:
- 取得状況(計 0件)
- 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:
- 〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://chromosome.w3.kanazawa-u.ac.jp/horike/index.html>  
 6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 堀家 慎一 (HORIKE, Shin-ichi)  
 金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
 研究者番号: 40448311
- (2)研究分担者

目黒 牧子 (MEGURO, Makiko)  
金沢大学・学際科学実験センター・博士研究員  
研究者番号：20304222

(3) 連携研究者

中林 一彦 (NAKABAYASHI, Kazuhiko)  
国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長  
研究者番号：10415557