

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460409

研究課題名(和文) エピジェネティック因子MBD5による発達障害発症機序の解明

研究課題名(英文) the MBD5 gene cause the clinical features of neurodevelopmental disorder

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症などの発達障害と診断される児童の数は年々増加傾向にある。近年の発達障害患者の全ゲノム解析により、MBD5(メチル化CpG結合ドメインタンパク質5)が欠失あるいは重複している症例が数多く報告された。そこで、本研究では神経細胞におけるMBD5のターゲット遺伝子の同定を試みた。その結果、MBD5がmicroRNAやsnRNAなどのnon-coding RNAの発現制御に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The incidence of autism spectrum disorders (ASD) has increased dramatically over the past decade. However, for at least 70% of ASD cases, the underlying genetic cause remain unknown. Recent whole-genome microarray studies have revealed that deletion or duplication at 2q23.1 includes MBD5, a methyl-DNA binding protein that is a causative gene of ASD. In this study, we first targeted the MBD5 gene in the SH-SY5Y cells, using two pairs of ZFNs. Then we examined the microarray analysis in MBD5+/- cells. The results indicates that MBD5 may have a crucial role of non-coding RNA expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：発達障害 自閉症 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

発達障害とは、自閉症や学習障害、注意欠陥多動性障害など、脳機能の障害に起因する小児の疾患を指す。患者数は年々増加傾向にあり、現在、児童のおよそ10%は何らかの発達障害を有しているとされ、その対策は大きな社会問題となっている。発達障害の原因に、遺伝的要因が深く関与していることは様々な研究結果から疑いの余地はないが、その症状が複雑多岐に渡り個人差も大きいことから、これまでに原因遺伝子として同定されたのは、*MeCP2* (自閉症を主徴とする Rett 症候群の原因遺伝子) や *FMR1* (精神発達遅滞等を伴う脆弱X症候群の原因遺伝子) など、ごく少数に過ぎない。

MBD5 (Methyl-CpG Binding Domain protein 5) は、ヒト 2q23.1 に位置するが、近年の発達障害患者における全ゲノム解析により、MBD5 を含むゲノム領域の欠失または重複が数多く報告された。MBD5 と同様にメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) を有するタンパク質である *MeCP2* は自閉症を主徴とする Rett 症候群の原因遺伝子であり、MBD5 もまた脳の発達過程において何らかの重要な役割を担っていると示唆される。しかしながら、メチル化 CpG への結合能が明確に示されないため、メチル化 CpG に直接結合する以外の機能を有していると推測されるが、発達障害の発症機序における役割は全く分かっていない。

2. 研究の目的

発達障害患者の全ゲノム解析により、MBD5 遺伝子を含むゲノム領域が欠失または重複している例が数多く報告されており、MBD5 が脳の発達において何らかの重要な役割を担っていることは間違いないと思われる。しかしながら、MBD5 の脳での機能はもとより、メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質としていったい何をしているのか、全く分かっていない。2012 年に *Mbd5* ノックアウトマウスが作製されているが、MBD5 遺伝子領域の欠失患者の症状 (神経発達遅滞、てんかん、自閉症など) とは異なるため、MBD5 の脳での機能がマウスとヒトでは異なる可能性が示唆される。そこで、本研究では神経細胞における MBD5 のターゲット遺伝子の同定、さらに、その制御メカニズムを明らかにすることで、MBD5 の脳での機能を明確にすると共に、メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質を介したエピジェネティクスと発達障害との関連を解き明かす。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術の一つであるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用い、神経細胞様に分化誘導出来るヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞株で MBD5 のノックアウトを行う。発達障害患者において MBD5 の欠失はヘテロであることから、MBD5 をヘテロに持つ細胞株を樹立し、mRNA マイクロアレイ解析により MBD5 +/- で発現変化する遺伝子を同定する。

本研究では MBD5 の脳での機能を明らかにすることを主目的とするため、正常 SH-SY5Y 細胞と MBD5 +/- の SH-SY5Y 細胞を PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate) 処理により神経細胞に分化した時に発現変化のある遺伝子 (神経分化に関与する遺伝子) 同士を比較し、MBD5 +/- で分化誘導に際し発現に異常が生じた遺伝子を同定する。その上で、マイクロアレイ解析で得られた MBD5 ターゲット候補遺伝子について実際に発現に変化があるのか、定量 RT-PCR で再確認する。また、MBD5 の DNA 結合能を生化学的な実験や ChIP 解析により明らかにすることで、MBD5 の脳での機能やメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質としていったい何をしているのか明らかにする。

4. 研究成果

本研究では神経分化における MBD5 の役割を明らかにするため、ゲノム編集技術の一つであるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用い、神経細胞様に分化誘導出来るヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞株で MBD5 のノックアウトを行った。ZFN による DNA 切断、ミスマッチ修復による新規 5 塩基の挿入の結果、核移行シグナル (NLS) から C 末側を欠損した断片化 MBD5 をヘテロに持つ細胞株を樹立した。発達障害患者において MBD5 の欠失はヘテロであることから、本樹立細胞を発達障害患者のモデル細胞として、マイクロアレイ解析により MBD5 +/- で発現変化を呈する遺伝子の同定を試みた。その結果、とても興味深いことに、microRNA や snRNA などの non-coding RNA の占める割合が極めて高く、MBD5 がそれら non-coding RNA の発現制御に関わっている可能性が示唆された。最近、Rett 症候群の原因遺伝子であり、MBD5 と同様にメチル化 CpG 結合ドメインを有する *MeCP2* が microRNA の発現制御に関わっていること、また、選択的スプライシングの機構に関与していることなどが報告されており、メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質の新たな機能として注目されている。一方、今回 MBD5 +/- でおよそ 2 倍の発現上昇を認めた microRNA、MIR548A1 は 6p22.3 に位置するが、この領域は自閉症患者で欠失が多数報告されており、自閉症発症機序を考える上でも大変興味深い。また、発現量がおよそ半分にまで減少している MOG 遺伝子はナルコレプシーとカタレプシー家系の解析で変異が同定されている。発達障害の患者において、しばしば睡眠障害が認められることから、MBD5 を介した MOG 遺伝子の発現制御機構が発達障害の発症機序に関与していることが示唆される。このように本研究成果は、単に MBD5 を介した発達障害発症メカニズムの解明につながるだけでなく、近年増加傾向にある発達障害全般にわたる発症機序の一般則に結びつく極めて重要な研究であると考えている。そして、MBD5 のさらに詳細な作用機序の解明は、これまでの *MeCP2* の知見と併せ考えることで、発達障害の発症機序

における環境因子とエピジェネティック因子の相互作用の一端が見いだせるのではないかと期待される。

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 3件)

Dunaway, K., Islam, S., Coulson, J., Lopez, R., Ciernia, A.V., Chu, R., Yasui, D., Pessah, I., Lott, P., Mordaunt, C., Meguro-Horike, M., Horike, S., Korf, I., LaSalle, J.M. (2016) "Cumulative impact of large chromosomal duplications and polychlorinated biphenyl exposure on DNA methylation, chromatin, and expression of autism candidate gene" *Cell Reports*, 17(11):3035-3048. 査読あり

Murakami K., Nakamura Y., Felizola S.J., Morimoto R., Satoh F., Takanami K., Katanami H., Hirota S., Takeda Y., Meguro-Horike M., Horike S., Unno M., Sasano H. (2016) "Pancreatic solitary fibrous tumor causing ectopic adrenocorticotrophic hormone syndrome." *Mol Cell Endocrinol*, 436, 268-273. 査読あり

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

[学会発表](計 16件)

堀家慎一, 目黒牧子, 沼田紗弥, 本田俊哉, 岡田源作, 横山茂, 東田陽博「オキシトシンレセプター遺伝子の発現制御機構の解明」第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜市), 2016年11月30日~12月2日

堀家慎一, 目黒牧子, 沼田紗弥, 本田俊哉, 岡田源作, 横山茂, 東田陽博「オキシトシンレセプター遺伝子の発現制御機構の解明」日本遺伝学会第88回大会, 日本大学国際関係学部北口校舎(三島市), 2016年9月7~10日

堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, 目黒牧子 「The SNORD116 Host-Gene transcript is essential for the high order chromatin dynamics of the NDN & MAGEL2 genes locus over long distance」 RNA 2016, 国立京都国際会館(京都市), 2016年6月28日~7月

2日

目黒牧子, 堀家慎一「脱凝集クロマチンを介した long non-coding RNA, SNORD116HG による遺伝子発現制御メカニズムの解明」第10回日本エピジェネティクス研究会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府), 2016年5月19~20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(神戸市), 2015年12月1~4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(淡路市), 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(淡路市), 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, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子 「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(東京都), 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, 安芸グランドホテル(広島市), 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, 安芸グランドホテル(広島市), 2014 年 12 月 15~17 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(広島市), 2014 年 10 月 6~7 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(東京都), 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(東京都), 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, 富山大学杉谷キャンパス(富山県), 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(京都市), 2014 年 5 月 12~15 日

〔図書〕(計 4 件)

目黒牧子, 堀家慎一「lncRNA によるエピジェネティック制御の作用機序」DOJIN BIOSCIENCE SERIES 25 ノンコーディング RNA, 化学同人, 233-244, 2016 年 7 月 15 日発行 査読なし

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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

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

伊藤 雅之 (ITO, Masayuki)
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 疾病研究第二部・室長
研究者番号: 50243407

(4) 研究協力者

堀田 秋津 (HOTTA, Akitsu)