

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460483

研究課題名(和文) 自閉症高感受性遺伝子ニューロリギン4Xのエピジェネティックな発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of autism-susceptibility gene, NLGN4X.

研究代表者

飯尾 明生 (Iio, Akio)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・リサーチレジデント

研究者番号：80344349

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)：本研究はヒト自閉症高感受性遺伝子ニューロリギン4X(NLGN4X)について、自閉症での遺伝子発現の変化の有無、その発現の増減が自閉症発症の原因なのか結果なのか、その発現の増減を引き起こす非遺伝的背景は何なのか明らかにすることを目的としている。そこでNLGN4Xの発現制御機構について詳細に解析したところ、NLGN4Xの発現がプロモーターのCpGメチル化を介してMeCP2により調節されていること、ストレス依存的なmiR-23aによって翻訳抑制されていること、AS-NLGN4Xによって相補的に発現制御されていることが明らかとなり、エピジェネティックな発現制御を受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Some types of genetic mutation in NLGN4X, including point mutations and copy number variants, are considered responsible for rare autism spectrum disorders. However, it is unclear about the transcriptional and post-transcriptional regulation of NLGN4X expression. Thus, we focus on elucidating how the NLGN4X expression is epigenetically regulated in the neural cell. Firstly, we showed that NLGN4X promoters were silenced by CpG methylation in association with MeCP2. Next, we clarified that NLGN4X was down-regulated by exosomal miR-23a, which secreted by heat-stressed microglia. Finally, we identified a novel natural antisense transcript (AS-NLGN4X), which was partially complementary to NLGN4X exon 1s. Its expression pattern was similar with NLGN4X. Interestingly, forced expression of AS-NLGN4X down-regulated NLGN4X expression, and AS-NLGN4X knockdown up-regulated it. These results suggest that NLGN4X is transcriptionally and/or post-transcriptionally under control by non-coding RNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：NLGN4X CpG methylation MeCP2 miR-23a exosome lncRNA epigenetic iPSC

1. 研究開始当初の背景

自閉症は、3歳までの小児で発症して障害が生涯にわたる精神疾患で、患者家族への負担が大きく、米国では88人に1人の割合で子供に現れるなど、社会的に深刻な問題となっている。遺伝子要因が強く関与する脳の発達障害であるが、複数の関連遺伝子の変異の組み合わせにより危険度が増す一方で、遺伝子変異を有しないが、妊娠中のウイルス感染や、ストレス、薬物、アルコールの服用など、何らかの環境要因が原因で遺伝子の発現に異常が生じた結果、発症するケースも多い。この場合、後天的にゲノムのメチル化やクロマチンの修飾など、エピジェネティカルな制御を受けることで遺伝子の発現異常が起こることが明らかになってきている。我々は、自閉症高感受性遺伝子の一つ NLGN4X に着目し、そのモレキュラーネットワークの解明を通して、自閉症の病因、病態の解明を目指している。NLGN4X は神経のシナプス後膜に発現し、リガンド Neurexin と結合してシナプス形成に働く接着分子 Neuroligin の一種であり、自閉症患者で機能障害を有する変異や欠失が報告されている。(Human Genet 1999; Nature Genet 2003; Am J Hum Genet 2004; Hum Mol Genet 2004; Mol Psychiatry 2005; J Med Genet 2006; Eur J Hum Genet 2008; Genet Test Mol Biomarkers 2009; J Neurosci 2009) NLGN4 ノックアウトマウスでは、社会性の欠如など自閉症様症状を示すことがわかっているが (Proc Natl Acad Sci USA 2008; Behave Brain Res 2012)、マウス NLGN4 はヒト NLGN4X とは進化的にとっても異なった遺伝子であり (Proc Natl Acad Sci USA 2008)、脳における発現部位もヒトとは異なっていることから、ヒトの自閉症の病因、病態の解明には、**ヒトの NLGN4X を調べなければならぬ**と考えられる。また、自閉症患者で NLGN4X の発現が調べられた例はない。iPS 細胞から作成した神経細胞を用いた自閉症研究は、原因特定のティモシー症候群の例 (Nature Med 2011)、レット症候群の例 (Mol Psychiatry 2012) や、原因不明の例 (Neurosci Lett 2012) が報告されているが、シナプス形成まで解析されておらず NLGN4X の発現も調べられていない。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト自閉症高感受性遺伝子ニューロリギン 4X(NLGN4X)について、自閉症での遺伝子発現の変化の有無、その発現の増減が自閉症発症の原因なのか結果なのか、その発現の増減を引き起こす非遺伝的背景(エピジェネティクス、環境要因)は何なのか明らかにし、自閉症発症のメカニズムの解明や、発現を指標とした新規診断法及び発現調節を標的にした予防・治療法の確立を目的としている。具体的には(i)NLGN4X 発現制御機構の解析(ii)自閉症患者由来神経細胞を用

いた発現と表現型の解析(iii)発現調節活性を有する生理活性物質の探索と治療法の検討、を行う。

3. 研究の方法

(1) プロモーターのメチル化

神経細胞及び非神経細胞における NLGN4X promoter のメチル化について、bisulfite sequencing 法により調べた。

(2) メチル化プロモーターの解析

NLGN4X promoter vector をメチル化し、レポーターアッセイにより活性を調べた。

(3) MeCP2 タンパク質の ChIP 解析

抗 MeCP2 抗体を用いて NLGN4X プロモーター領域について ChIP 解析した。

(4) MeCP2 siRNA による発現解析

HeLa や Glioma を用いて MeCP2 siRNA によるノックダウンで NLGN4X の発現が変化するかどうか解析した。

(5) iPSC の分化誘導と NLGN4X 発現

ヒト iPSC から神経細胞への分化誘導を行い、NLGN4X の発現を解析した。

(6) miR-23a による NLGN4X 発現制御の解析

NLGN4X の 3'UTR を含むレポーターベクターを用いて miR-23a による発現制御を解析した。

(7) ミクログリア exosome の解析

熱ストレス後のミクログリア exosome 中の miR-23a の変化を解析した。

(8) exosome による NLGN4X 発現制御

レポーターアッセイにより exosome による発現制御を解析した。

(9) AS-NLGN4X の単離

PCR により AS-NLGN4X cDNA をクローニングした。

(10) AS-NLGN4X による NLGN4X の発現制御

AS-NLGN4X の強制発現及び siRNA によるノックダウンによる NLGN4X の発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) CGI shore / CGI promoter のメチル化

TGW 及び HeLa を用いて CGI shore 及び CGI promoter 近傍のメチル化を調べたところ、CGI shore (BMP1+2)、CGI (BMP3,4,5)ともに HeLa では高度にメチル化されていることがわかった(図1)。また、CGI shore, CGI promoter ベクターをメチル化し、レポーターアッセイすると、ほぼ完全に活性が抑制されることがわかった。

(2) MeCP2 による発現制御

プロモーター領域について抗 MeCP2 抗体を用いて ChIP を行なったところ、HeLa では ChIP2 を除き MeCP2 タンパク質がゲノム DNA に結合していることがわかった(図2)。HeLa, Glioma を用いて MeCP2 siRNA によるノックダウンを行うと、NLGN4X の CGI shore プロモーターのみが活性化して Exon 1A を含む mRNA の転写が増加した(図3)。

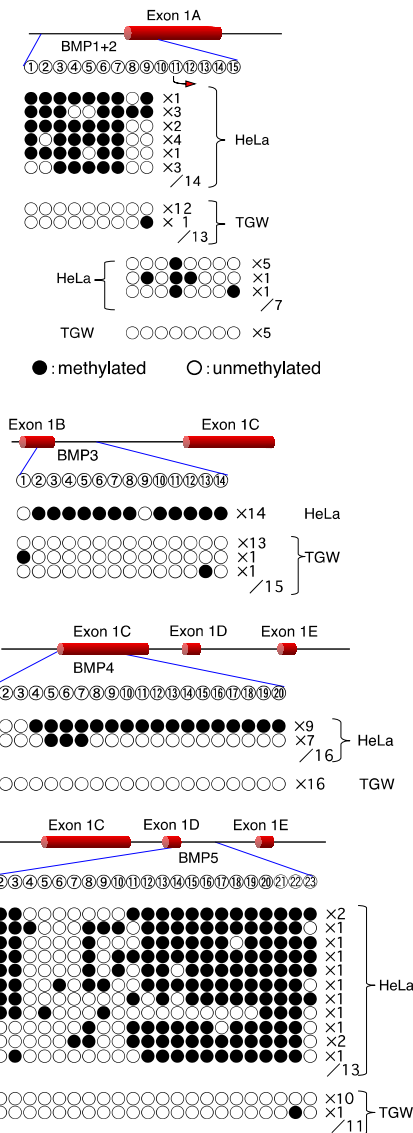


図1 プロモーターメチル化

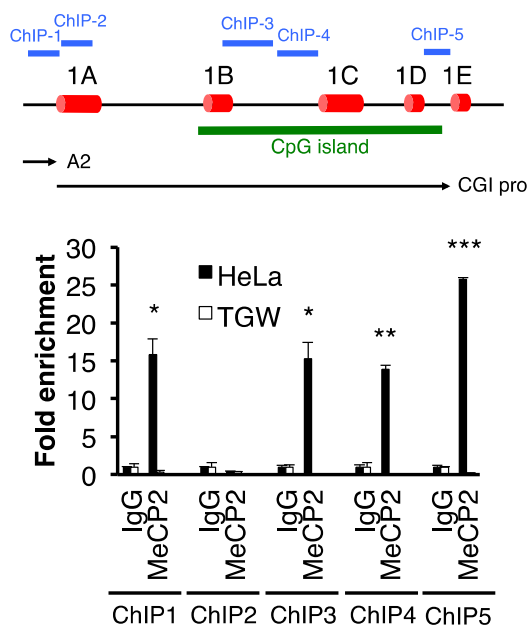


図2 MeCP2によるChIP解析

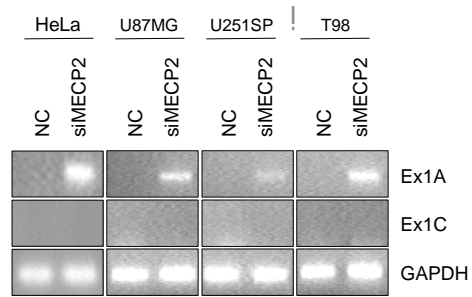


図3 MeCP2 ノックダウンによる Exon 1A の発現

(3) 神経分化と NLGN4X 発現制御

ヒト iPSC を用いて神経分化誘導を行い、NLGN4X の発現を解析したところ、未分化細胞では Exon1A が優位に発現しているのに対し、Exon1C は少なく、分化が進むと Exon1C の発現が増加することがわかった (図4)

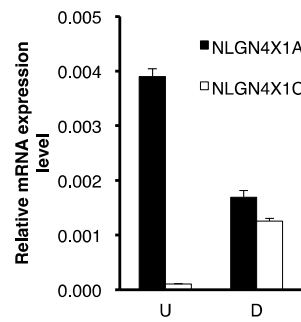


図4 iPSC の分化と NLGN4X 発現

(4) miR-23a による NLGN4X 発現制御

miR-23a 結合部位を含む NLGN4X 3'UTR をレポーターベクターに導入し、レポーターアッセイを行なったところ、miR-23a に依存して翻訳活性が低下することがわかった (図5)

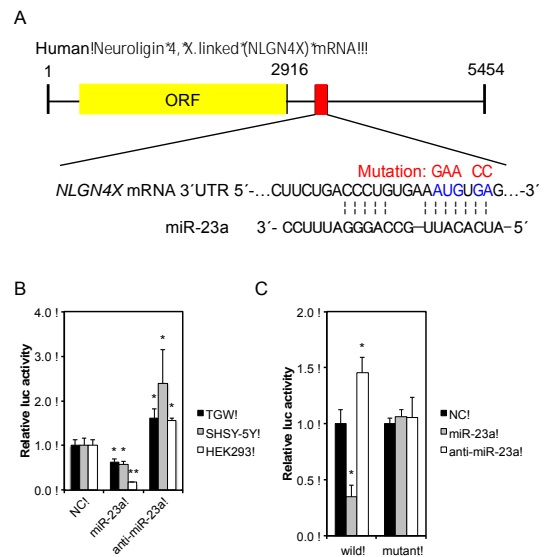


図5 miR-23a による翻訳制御

ミクログリアに熱ストレスを加えると exosome 中に miR-23a の分泌が増加することがわかった(図6)。また、この exosome を神経細胞に作用させると NLGN4X の発現が抑制されることがわかった。

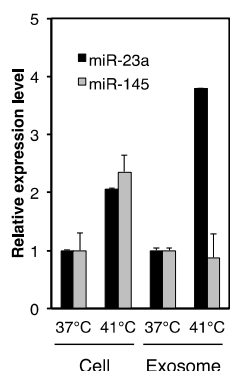


図6 ミクログリア exosome 中の熱ストレスによる miR-23a 変化

(5) AS-NLGN4X による発現制御

神経細胞より NLGN4X の Exon 1 からプロモーター領域をカバーする逆鎖 RNA である AS-NLGN4X を単離同定した。発現ベクターを用いた強制発現、及び siRNA によるノックダウンを行うと、AS-NLGN4X の増減と相補的に NLGN4X の発現が変化した(図7)。

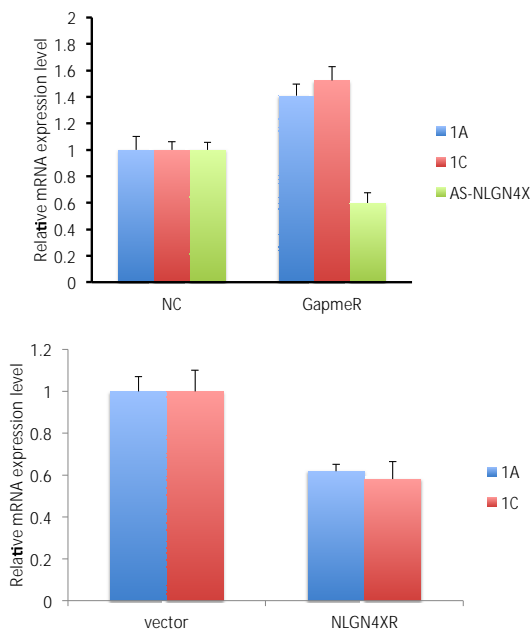


図7 AS-NLGN4X による NLGN4X 発現制御

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1件)

特集 統合失調症はどこへ行くのか (2) 統合失調症と発達障害の関連 椎野智子、宍戸恵美子、飯尾明生、尾崎紀夫 臨床精神医学 (査読無し) 45, 1169 -1175, 2016.

〔学会発表〕(計6件)

松木亨、飯尾明生、中山敦雄
神経極性制御に関わる Stk25-LKB1 シグナルが神経系の発達と機能に果たす役割
日本組織培養学会第89回大会. 2016年5月25日 豊中

松木亨、飯尾明生、中山敦雄
神経極性を制御する LKB1-Stk25 シグナルが自閉症発症機構に果たす役割の解明
第119回日本小児科学学会学術集会. 2016年5月14日 札幌

A. Iio, T. Matsuki, E. Aoki, A. Nakayama.
Multiple regulatory mechanisms of autism susceptibility gene, NLGN4X, expression by non-coding RNAs.

第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月3日 神戸

飯尾明生
ニューロリギン 4X のエピジェネティクスによる発現制御機構の解析(招待講演)
第二回 霊長類への展開に向けた幹細胞・発生・エピゲノム研究(京都大学霊長類研究所&中部幹細胞クラブ研究会) 2015年9月2日 犬山

中山敦雄、深田斉秀、飯尾明生、青木英子、正木茂夫
自閉症感受性遺伝子 NLGN4X の発現解析とその制御機構

第104回日本病理学会総会, 2015年5月2日 名古屋

A. Iio, T. Matsuki, E. Aoki, A. Nakayama.
The expression of autism-susceptibility gene NLGN4X is regulated by miR-23a.

第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/d-embryology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯尾 明生 (IIO, Akio)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・リサーチレジデント
研究者番号: 80344349

(2) 連携研究者

中山 敦雄 (NAKAYAMA, Atsuo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・部長
研究者番号: 50227964