

自閉症ヒト型モデルマウスのエピジェネティクス解析

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 統合バイオ研究室
内匠 透

1. はじめに

精神疾患の原因は多因子と考えられ、動物モデルとして単一遺伝子のノックアウトマウス解析からだけでは限界がある。我々は、染色体工学的手法を用いて、臨床例に基づくヒト染色体 15q11-13 重複モデルマウスを開発した。

染色体 15q11-13 重複は、自閉症の細胞遺伝的異常としてもっとも頻度が高いもので、本マウスは自閉症様行動を示した。本マウスは自閉症様表現型のみならずヒトと同じ生物学的 (染色体) 異常を有する構成的妥当性をも充たす自閉症ヒト型モデルマウスといえ、分子の研究から出てきたノックアウトマウスとは一線を画すユニークなモデルである。さらに、インプリンティングをうける重複領域内の snoRNA の解析から、重複マウスでのセロトニンシグナルの異常を見いだした。

本研究は、本マウスのアレル特異的に発現する異常行動の原因を明らかにするために、エピジェネティクスな観点を中心にした分子病態解明を行い、未だ客観的診断法及び有効な治療法がない発達障害をはじめとする精神疾患の基盤的研究を目的とする。

我々は、Cre-loxP 系に基づく最新のゲノム工学的手法を用いて、ヒト染色体異常型マウスを複製し、本モデルマウスが自閉症様行動を示すことを明らかにした²。本マウスは、ヒト症状に似た表現的妥当性だけでなく、ヒト生物学的 (染色体) 異常と同じ異常を有する構成的妥当性をも充たす自閉症ヒト型モデルマウスといえる。また、重複領域内の non-coding RNA である sno (small nucleolar) RNA の解析から、父親由来重複マウス (patDp/+) において、セロトニン受容体 2c (5-HT_{2c}R) を介するセロトニンシグナルの異常が確認され、本 patDp/+マウスにみられる異常行動の一つの原因と示唆された。本モデルマウスを用いてアレル特異的な表現型の表出のメカニズムを明らかにするために、エピジェネティクス解析を行う。

2. 方法 3. 結果 研究成果 4. 考察 まとめ

1) 重複領域上の遺伝子の転写開始領域における DNA メチル化状態の解析

PatDp/+マウス脳における詳細なメチル化状態は明らかになっていないため、バイサルファイトシークエンシングによる DNA メチル化状態の解析を試みた。重複領域上のゲノム刷り込み遺伝子である Snrpn の制御領域、Ube3a および Gabrb3 遺伝子の転写開始点近傍の CpG アイランドについ

て、大脳皮質、海馬、小脳および肝臓におけるメチル化状態の解析を行った。3 サンプルずつ解析を行い、各サンプル 10 クローン程度シーケンシングを行った。Snrpn はアレル特異的なメチル化状態を維持し、過去の報告通りコピー数に応じたメチル化状態が認められた。Ube3a, Gabrb3 は各組織非メチル化状態であり、PatDp/+と野生型に差は認められなかった。解析を行った組織においてゲノム刷り込み遺伝子のメチル化は部位ごとの差は小さく、コピー数変化によるメチル化のかく乱は非常に少ないと思われる。

2) ChIP-seq による小脳における H3K4me3 の解析

H3 サブユニットの 4 番目リジンのトリメチル化 (H3K4me3) は発生期より遺伝子発現活性化に関与し、脳の機能に関与する遺伝子や自閉症への関連が示唆されている。これまでに小脳におけるセロトニンの関与が示唆されたため、10 週齢マウスにおいて H3K4me3 に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、次世代シーケンサーにより解析を行った (ChIP-seq)。Refseq 上の転写開始領域周囲 1Kb および、その他の enrich された領域の周囲 2Kb について比較を行った。PatDp/+マウスにおいて染色体 7c 重複領域上の遺伝子の転写開始領域近傍の H3K4me3 修飾は 2 倍程度の明確な差が認められた。他の領域は明確な差が認められなかった。

3) ウェスタンブロッティングによるヒストン H3 修飾解析

PatDp/+マウスと野生型マウスにおけるヒストン修飾の違いを明らかにするため、ヒストン H3 修飾に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。遺伝子発現活性化に関与する H3K4me3 および H3 のアセチル化 (H3Ac)、遺伝子発現抑制に関与する H3 の 27 番目リジンのトリメチル化 (H3K27me3) を認識する抗体を用い、10 週齢マウスの小脳、中脳、橋/延髄および海馬について 4 サンプルずつを用いて解析を行った。PatDp/+マウスと野生型マウスに明確な差は認められなかった。

4) 軽微なストレス負荷後における免疫組織化学によるヒストン H3 修飾解析

オープンフィールド試験後のマウスにおけるヒストン修飾状態の解析を行った。10 週齢マウスを用いて 30 分間の試験を行った。過去の報告と同様に、PatDp/+においてオープンフィールド装置の中央付近に滞在する時間が優位に低く、新規環境下における不安度が高いことが示された。試験後のマウスを一定時間後にかん流固定を行い、海馬周辺 (bregma-1.22~-2.46) の 30um 厚の切片を作成し、H3K4me3、H3K27me3 および H3Ac に対する抗体で一次抗体処理を行い、DAB 染色にて検出を行った。1 サンプルにつき 2-3 枚程、各群 3 サンプルずつ染色を行い、染色像の相対濃度定量を行った。PatDp/+マウスの海馬 CA1 領域の顆粒細胞層において H3Ac が濃く染色され、有意差が認められた。これらのことから、自閉症様行動の表出とヒストン修飾の関連が示唆される。今後ヒストン脱アセチル化酵素およびアセチル化酵素活性の解析を行う。

5) MBII-52 ノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析

PatDp/+マウスの染色体重複領域内に存在する核小体内 RNA は自閉症様行動に重要な役割を担っていると考えられているがその機能は完全に解明されていない。snoRNA の一つである MBII-52 の

ノックダウンを行い、影響を受ける遺伝子を明らかにし、標的分子の同定を試みた。胎生16.5日齢の胎児マウス由来の海馬初代培養細胞にMBII-52に対する修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドをヌクレオフェクションにより導入し、効率的なMBII-52発現抑制が可能な実験系を確立した。アンチセンスオリゴ導入後48時間培養した細胞より抽出したtotal RNAよりmRNAを精製し、mRNA-seqを行った。ノックダウンおよびコントロール群各4サンプルを用いて行った。97遺伝子について変動がみられた。また、MBII-52はRNA editingへの関与が示唆されている。未知の標的の探索を試み、MBII-52と相補的な配列を持つ領域について塩基置換が認められる部位を検索し、18か所の候補を絞り込んだ。今後MBII-52過剰発現細胞における解析を視野に入れ、実験結果の評価、確認を行う。

5. 発表論文、参考文献

1. Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, Ise S, Ohta H, Inouse K, Tomonaga S, Watanabe Y, Chung YJ, Banerjee R, Iwamoto K, Kato T, Okaawa M, Yamauchi K, Tanda K, Takao K, Miyakawa T, Bradley A and Takumi T: Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* 137:1235-1246, 2009.