

眞貝 洋一

(独)理化学研究所基幹研究所・主任研究員

ヒストンリジンメチル化制御系に基づく脳機能の理解と治療戦略への展開

§1. 研究実施体制

(1)「眞貝」グループ

① 研究代表者:眞貝 洋一 (理化学研究所基幹研究所、主任研究員)

② 研究項目

1. ヒストンリジンメチル化制御は哺乳類の精神神経活動に如何に関与するか
 - 1.1 成体脳特異的KOマウスでの行動解析、神経学的解析とエピゲノム解析
 - 1.1.a 行動解析
 - 1.1.c トランスクリプトームおよびエピゲノム解析
 - 1.2 *Glp*欠損マウスの行動異常はH3K9脱メチル化酵素の抑制で回復可能か？
行動解析及びトランスクリプトーム及びエピゲノム解析
 - 1.3 *Glp*欠損マウスの行動異常は、生後に外来性のGLPの発現により改善可能か？
行動解析及びトランスクリプトーム及びエピゲノム解析
2. 先天奇形症候群患者・精神疾患患者におけるヒストンリジンメチル化調節因子遺伝子の変異解析
 - 2.1ヒストンリジンメチル化および脱メチル化酵素の遺伝子変異解析
生化学的解析および細胞生物学的解析

(2)「平澤」グループ

① 主たる共同研究者:平澤 孝枝 (山梨大学医学部、助教)

② 研究項目

1. ヒストンリジンメチル化制御は哺乳類の精神神経活動に如何に関与するか
 - 1.1 成体脳特異的KOマウスでの行動解析、神経学的解析とエピゲノム解析
 - 1.1.b 神経学的解析
 - 1.2 *Glp*欠損マウスの行動異常はH3K9脱メチル化酵素の抑制で回復可能か？

神経学的解析

1.3 *Glp*欠損マウスの行動異常は、生後に外来性のGLPの発現により改善可能か？

神経学的解析

(3)「吉川」グループ

①主たる共同研究者: 吉川 武男 (理化学研究所脳科学研究センター、シニアチームリーダー)

②研究項目

2. 先天奇形症候群患者・精神疾患患者におけるヒストンリジンメチル化調節因子遺伝子の変異解析

2.1 ヒストンリジンメチル化および脱メチル化酵素の遺伝学解析

2.2 ヒストンリジンメチル化および脱メチル化酵素のトランスクリプトーム解析

(4)「黒澤」グループ

①主たる共同研究者: 黒澤 健司 (神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター、遺伝科部長)

②研究項目

2. 先天奇形症候群患者・精神疾患患者におけるヒストンリジンメチル化調節因子遺伝子の変異解析

2.1 ヒストンリジンメチル化および脱メチル化酵素の遺伝学的解析

§ 2. 研究実施内容

研究のねらいとこれまでの研究の背景

エピゲノム制御の特徴の1つは、それ自身も遺伝的に規定されながら環境要因にも大きく影響を受けることにある。生物の表現型(とその変化)は遺伝と環境要因によって決まっているが、遺伝と環境の相互作用を統合的に理解するためにはエピゲノム制御系の理解が不可欠である。特に、生後の私たちの体を作っている大部分の細胞は終末分化を迎え、細胞周期から逸脱した(post-mitotic な)細胞として、長期にわたりその細胞形質を維持したまま存在し機能している。これらの細胞でのエピゲノム制御の可塑性が如何にあり、エピゲノム情報はどの程度塗り替えられるのかが明らかになれば、エピゲノム情報を任意に変える技術の将来性がより明確なものとなる。

この post-mitotic な細胞でのエピゲノム情報の可塑性に関わる重要な研究として、Rett 症候群の研究がある。Rett 症候群は、自閉症・てんかん・失調性歩行・特有の常同運動(てもみ動作)・知能や言語能力の低下などを特徴とするX連鎖優性遺伝病で、発生率は女兒1万人に1人(男性は胎生致死)、1999年に責任遺伝子が *MECP2* であることが判明した (Amir et al., *Nat Genet*

1999)。MeCP2 分子はメチル化された DNA(シトシン)に特異的に結合する。その後、*Mecp2* のヘテロ KO ♀ マウスが Rett 症候群の多くの特徴を示すこと・遅発性の発症を示すことから、*Mecp2* KO マウスは Rett 症候群のモデル動物として認知され、多くの研究がなされてきた。2007 年、*Mecp2* KO マウスを用いて、生後に、欠損している *Mecp2* の発現を回復させることで表現型の出現の阻止や症状の進行抑制あるいは改善がどのくらい可能かが検討された(Guy J et al., *Science* 2007)。その結果、*Mecp2* KO マウスの発症初期あるいは中期に、欠損しているアリーの *Mecp2* の発現を回復させると、症状が消失あるいは改善することが示された。つまり、DNA メチル化情報を読み取れないことで起きる Rett 症候群の病態は改善可能であることを示しており、解釈としては *Mecp2* の欠損で確立された異常なエピゲノム状態は post-mitotic な細胞でも充分可塑性があり、MeCP2 の発現回復により本来の正しい状態に戻れることを示唆している。

ヒストン H3K9 のメチル化修飾は、主に遺伝子の転写抑制のヒストンコードとして機能し、この修飾の不全は、胚発生だけでなく、生殖、神経、代謝、免疫系など様々な生命現象の機能の障害をもたらす。研究代表者がこれまで精力的に研究をしてきたヒストン H3K9 メチル化酵素である G9a (Ehmt2)/GLP (G9a like protein: Ehmt1)ヘテロ複合体も様々な生命現象に関与しているが、近年 *EHMT1* が先天奇形症候群である 9q34 サブテロメア欠失症候群の責任遺伝子(少なくともその1つ)であることが報告され、言語発達を中心とする発達障害における重要性が示唆されている(Kleefstra T et al., *Am J Hum Genet.* 2006)。さらに G9a/GLP 複合体の脳特異的欠損マウスあるいは *Glp* ヘテロ欠損(*Glp* Δ /+)マウスは行動や認知の異常といった 9q34 サブテロメア欠失症候群患者に見られる精神神経症状を示し、この疾患のモデルマウスとなっている(Schaefer A et al., *Neuron* 2009, Balesmans MC et al, *Behav Brain Res* 2010)。

そこで、本提案の研究のねらいの1つは、post-mitotic な神経細胞で H3K9 のメチル化マークの可塑性がどのくらいあるのかをゲノムワイドなエピゲノム解析により明らかにする。同時に、*Mecp2* KO マウスのように、*Glp* KO マウスの高次脳機能不全の表現型が生後遺伝学的にどの程度可逆性を示すことが可能であるかを検討する。それとは別に、別の H3K9 メチル化調節酵素の脳特異的欠損マウスを用いて、「ヒストンリジンメチル化制御が哺乳類の精神神経活動に如何に関与するか」の問題に挑戦し、並行して精神神経疾患および発達障害の患者のゲノム解析を行うことで「メチル化制御不全と精神神経疾患との関係」を明らかにする研究も行う。

研究の進捗状況

- *Glp* KO マウスの高次脳機能不全の表現型が生後遺伝学的にどの程度可逆性を示すことが可能であるかを検討するために、*Glp* Δ /+マウスがこの目的に使えるか(相補を受けるマウスとして適当か)を我々の手で検証した。
- H3K9 メチル化酵素 G9a/GLP 複合体のコア構成因子 G9a, GLP および Wiz の遺伝的変異が自閉症患者遺伝子中に存在するか、解析を開始した。
- 発達障害の患者遺伝子中にヒストンメチル化制御遺伝子の変異が存在するか、解析を開始した。

研究成果

- ・ *GlpΔ*/+マウスと *Glp*/+マウスの行動解析の比較(n=12)により、♂ *GlpΔ*/+マウスでは有意に活動能の低下、不安指標の上昇、新しい環境での探索傾向の低下が見られることが分かった。
- ・ 自閉症患者(316名)のゲノムサンプルのエクソンリシークエンスの結果、*EHMT1* に8箇所(このうち新規のものは5箇所)、*EHMT2* に4箇所(このうち新規のものは3箇所)、*WIZ* に3箇所(このうち新規のものは1箇所)の missense mutation が見つかった。上記新規なものについては、両親が揃っている家系についてはどちらの親から伝達されたか確かめた。
- ・ 原因不明精神遅滞・自閉症症例群において、病因としてヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング因子がどのように関与しているかを検討するために、これらの遺伝子を網羅的にシーケンス解析するパネルを設計し、データ解析のパイプラインを整備した。
- ・ 原因不明精神遅滞症例 700 例を解析し、1 例に CTCF を含む領域の微細欠失例を検出した。

今後の見通し等

我々の手でも *GlpΔ*/+マウスが行動異常を示すことを確認し、条件的発現誘導可能な *Glp*-TG マウスの解析も近日中に予定していることから、早ければ今年度末までには外来性の GLP が *Glp* KO マウスの行動異常の表現型をどの程度相補できるか検証できるだろう。自閉症患者にいくつかの missense mutation が同定されたので、この変異の生化学的検証を進める。また、変異については、家系内で表現型との共分離を調べる。さらに、精神遅滞患者で見出される変異に関しても生化学的検証を進め、変異のある患者由来の iPS 細胞化も検討する。