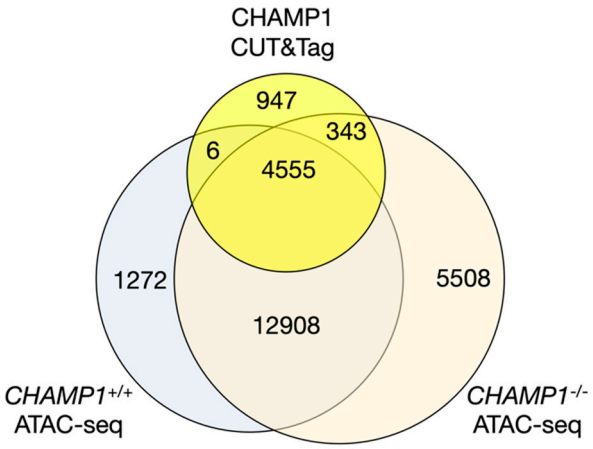
29　知的障害分子CHAMP1による遺伝子発現制御機構の解明	田中　耕三

【目的】本研究では、我々が同定した知的障害関連分子 CHAMP1（Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1）による遺伝子発現制御機構について明らかにし、*CHAMP1* 遺伝子の変異が知的障害を引き起こすしくみを解明することを目的とする。CHAMP1 は、細胞分裂期における染色体分配に関与する分子として同定され、その後 DNA2 本鎖切断の相同組換えによる修復や、細胞の生存など多彩な機能を果たしていることが明らかになってきているが、その変異がどのようにして知的障害を引き起こすのかについてはよくわかっていない。我々は CHAMP1 がエンハンサー・プロモーター領域に高頻度に局在することを見出しており、本研究では CHAMP1 が遺伝子発現制御に関与し、CHAMP1 の変異によってその制御が破綻することが知的障害を引き起こす可能性について検証する。

【方法】1. *CHAMP1* ノックアウトによる遺伝子発現の変化の検討 : *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳における遺伝子発現を RNA-seq により調べた。*CHAMP1* ホモノックアウトマウスは生後数日で死亡するため、成体脳についてはヘテロノックアウトマウスで解析を行った。発現が変動した遺伝子について、どのような機能を持った遺伝子が多いかを検討すると共に、CHAMP1 のゲノム上でのピークとの関連を調べた。2. *CHAMP1* ノックアウトによるクロマチン構造の変化の検討 : *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seq を行って調べ、どのような機能を持った遺伝子領域でクロマチン構造変化が見られるかを検討すると共に、クロマチン構造変化が見られた領域と CHAMP1 のピークおよび 1. の発現変動遺伝子との関連を検討した。

【結果】1. *CHAMP1* ノックアウトによる遺伝子発現の変化の検討 : RNA-seq の結果、*CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳では、神経伝達物質輸送・神経発達障害に関連する遺伝子の発現が低下していることがわかった。また *CHAMP1* ヘテロノックアウトマウスの成体脳でも同様の傾向が見られた。また *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳で発現が変動していた一部の遺伝子領域には、CUT&Tag 法で検出された CHAMP1、POGZ のピークが存在することがわかった。2. *CHAMP1* ノックアウトによるクロマチン構造の変化の検討 : *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seq を行って調べたところ、*CHAMP1* ノックアウトマウスで消失あるいは出現するピークは、シナプスや神経発達に関連する遺伝子領域上に多く存在していた。また、CUT&Tag 法で検出された CHAMP1 のピークの多くは ATAC-seq のピークと一致しており（図）、精神障害に関連する遺伝子領域に多く存在していることがわかった。

マウス胎児脳における CHAMP1 CUT&Tag のピークと *CHAMP1*$^{+/+}$、*CHAMP1*$^{-/-}$での ATAC-seq ピークの比較



29. 知的障害分子 CHAMP1 による遺伝子発現制御機構の解明

田中　耕三

東北大学 加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野

Key words：知的障害，CHAMP1，POGZ，遺伝子発現，クロマチン構造

緒　言

知的障害（Intellectual disability：ID）は、人口の 2〜3%で見られる発達障害である。臨床病態として、知的障害は自閉症スペクトラム障害（Autism spectrum disorder：ASD）や注意欠陥多動性障害（Attention deficit hyperactivity disorder：ADHD）とともに神経発達障害（Neurodevelopmental disorders：NDD）に含まれる。知的障害の原因として、栄養不良や感染症などの環境ストレス因子と遺伝子の突然変異があげられる。大規模な研究により、知的障害症例の半数で遺伝子変異が同定されているが、変異が見られる遺伝子は多岐にわたっている。このような多様な遺伝子がどのように知的障害を引き起こすのかについてはほとんどわかっておらず、効果的な治療法も見つかっていない。

CHAMP1 は知的障害患者で変異する遺伝子のひとつである［1］。最近の報告では、*CHAMP1* 変異に関連する障害には自閉症スペクトラム障害や注意欠陥多動性障害の表現型も含まれることが示された［2］。我々はこの遺伝子産物が有糸分裂時の紡錘体上の動原体-微小管結合の維持に関与していることを報告し、この分子を CAMP（Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein）と命名し、Human Gene Nomenclature Database（HGNC）に *CHAMP1* として登録した［3］。CHAMP1（CAMP）は脊椎動物で保存されており、ヒト CHAMP1 は両端の Zn フィンガードメインに挟まれた長い天然変性領域からなる 812 aa のタンパク質である（図 1）。中間領域にはいくつかの繰り返しモチーフがあり、特に有糸分裂期には CDK1（サイクリン依存性キナーゼ 1）によって多くのセリン残基がリン酸化される。CHAMP1 は、間期には核に局在し、有糸分裂期には染色体と紡錘体に局在する。マウスでは、CHAMP1 の発現は脳、胸腺、精巣、卵巣組織で検出される。知的障害患者では、*CHAMP1* に同定された変異のほとんどがナンセンス変異またはフレームシフト変異であり、その結果、さまざまな程度で C 末端領域を欠く変異タンパク質が形成される（図 1）。興味深いことに、CHAMP1 の結合因子である POGZ（pogo transposable element-derived protein with zinc finger domain）をコードする遺伝子も知的障害患者で変異が見られ、White-Sutton 症候群として知られる様々な表現型を示す［4］。知的障害で見られる *POGZ* 変異は、*CHAMP1* 変異と同様に、ナンセンス変異またはフレームシフト変異である。

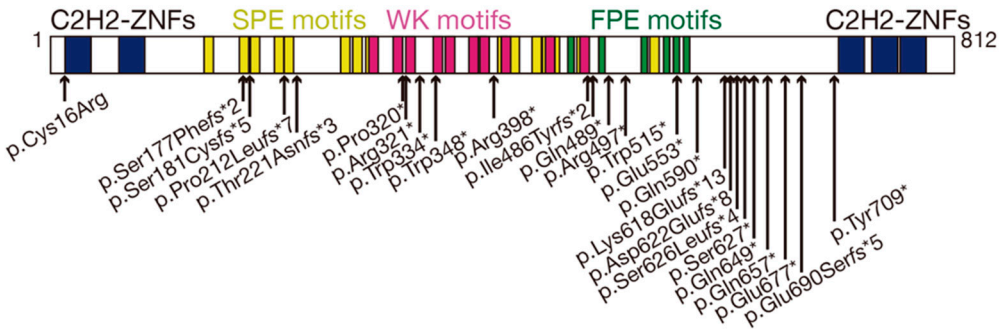


図 1. 知的障害で見られる CHAMP1 の変異

最近我々はCHAMP1の神経系での機能を探索するため、*CHAMP1*ノックアウトマウスを作製した[5]。その結果、*CHAMP1*ホモ欠損マウスは出生後すぐに死亡することがわかった。*CHAMP1*ノックアウトマウスの脳構造は肉眼的には正常であったが、*CHAMP1*ノックアウト神経幹細胞は神経分化の遅延を示した。行動テストでは、*CHAMP1*ヘテロノックアウトマウスは軽度の記憶障害、社会的相互作用の変化、うつ病様行動を示した。

我々の研究により、CHAMP1は染色体分配以外にも、DNA2本鎖切断の相同組換えによる修復や、細胞の生存など多彩な機能を果たしていることがわかったが［6, 7］、*CHAMP1*の変異がどのようにして知的障害を引き起こすのかについては、明らかではない。CHAMP1とPOGZは共にZnフィンガータンパク質であり、DNAに結合する可能性が考えられたことから、我々はこれらのゲノム上での分布をCUT&Tag法によって解析した。CHAMP1とPOGZは共にHP1（heterochromatin protein 1）と結合することから、これまでヘテロクロマチン領域に存在するのではないかと考えられていたが、検討の結果、むしろヒストンH3のK27のアセチル化修飾が集積するエンハンサーやプロモーター領域に多く局在することがわかった（図2A）。またCHAMP1とPOGZが複合体を形成することと一致して、両者のピークは高頻度に一致していた（図2B）。さらに興味深いことに、CHAMP1、POGZのピークが存在する遺伝子群には、染色体分配やDNA修復関連遺伝子、あるいはシナプス関連遺伝子や神経疾患に関連する遺伝子が有意に多く含まれていた（図2C）。

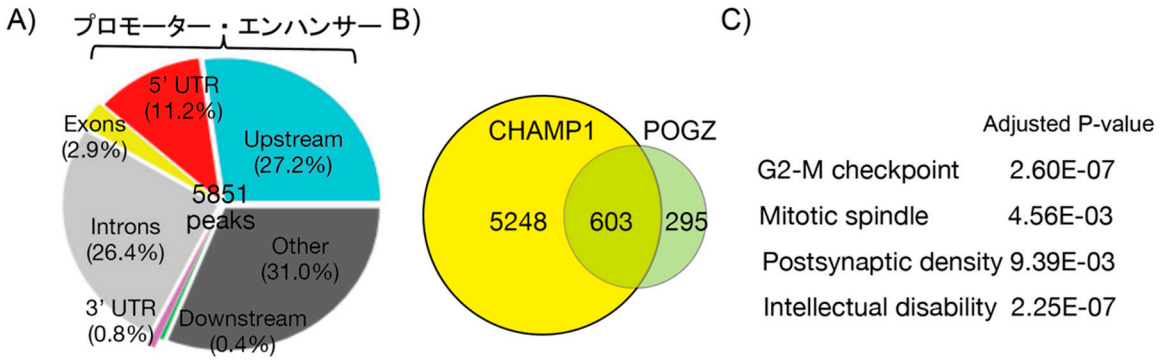


図2. CUT&Tag法によるCHAMP1のゲノム上の分布

A) CHAMP1のゲノム上での分布。

B) CHAMP1とPOGZのピークのオーバーラップ。

C) CHAMP1のピークが存在する遺伝子のエンリッチメント解析。

そこで本研究では、CHAMP1がこれらの遺伝子の発現を制御している可能性について検討を行った。RNA-seqの結果、*CHAMP1*ノックアウトマウスの胎児脳では、神経伝達物質輸送・神経発達障害に関連する遺伝子の発現が低下していることがわかった。また*CHAMP1*ヘテロノックアウトマウスの成体脳でも同様の傾向が見られた。また*CHAMP1*ノックアウトマウスの胎児脳で発現が変動していた一部の遺伝子領域には、CUT&Tag法で検出されたCHAMP1、POGZのピークが存在することがわかった。さらに*CHAMP1*ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seqを行って調べたところ、*CHAMP1*ノックアウトマウスで消失あるいは出現するピークは、シナプスや神経発達に関連する遺伝子領域上に多く存在していた。また、CUT&Tag法で検出されたCHAMP1のピークの多くはATAC-seqのピークと一致しており、精神障害に関連する遺伝子領域に多く存在していることがわかった。以上の結果から、CHAMP1がPOGZと共に神経発達関連遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域に局在してクロマチン構造を制御しており、CHAMP1、POGZの変異による遺伝子発現異常が知的障害をひきおこす可能性が示唆された。

方　法

1. *CHAMP1* ノックアウトによる遺伝子発現の変化の検討

CHAMP1 ノックアウトマウスの胎児脳における遺伝子発現を RNA-seq により調べた。*CHAMP1* ホモノックアウトマウスは生後数日で死亡するため、成体脳についてはヘテロノックアウトマウスで解析を行った。発現が変動した遺伝子について、どのような機能を持った遺伝子が多いかを検討すると共に、CHAMP1 のゲノム上でのピークとの関連を調べた。

2. *CHAMP1* ノックアウトによるクロマチン構造の変化の検討

CHAMP1 ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seq を行って調べ、どのような機能を持った遺伝子領域でクロマチン構造変化が見られるかを検討すると共に、クロマチン構造変化が見られた領域と CHAMP1 のピークおよび **1.** の発現変動遺伝子との関連を検討した。

結　果

1. *CHAMP1* ノックアウトによる遺伝子発現の変化の検討

RNA-seq の結果、*CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳では、神経伝達物質輸送・自閉症に関連する遺伝子の発現が低下していることがわかった（図 3，4）。また *CHAMP1* ヘテロノックアウトマウスの成体脳でも同様の傾向が見られた。また *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳で発現が変動していた一部の遺伝子領域には、CUT&Tag で検出された CHAMP1、POGZ のピークが存在することがわかった。

GO Biological Process (Down)	-log 10 (*P*-value)
Ion transport	4.303673
Cation transport	4.303673
Neurotransmitter transport	4.303673
Response to metal ion	4.303673
Regulation of transmembrane transport	4.303673
Regulation of ion transmembrane transport	4.303673
Regulation of ion transport	4.303673
Regulation of neurotransmitter transport	4.303673
Positive regulation of neurotransmitter transport	4.303673

図 3. *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳で発現が減少している遺伝子のエンリッチメント解析

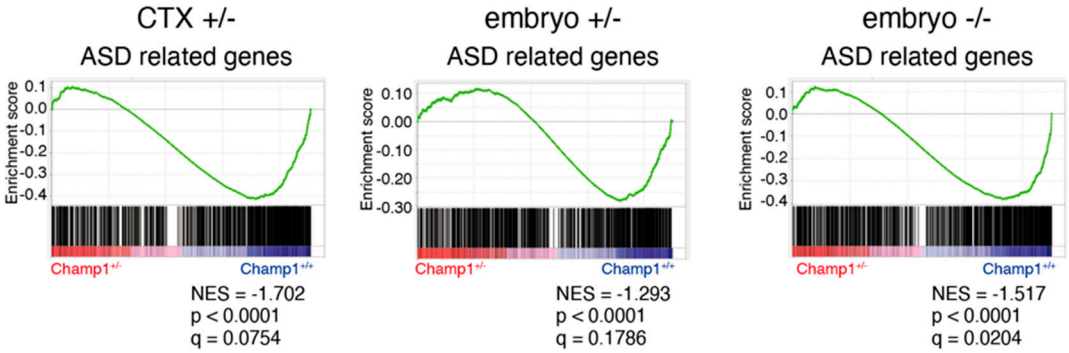


図 4. *CHAMP1* ノックアウトマウスの成体大脳皮質（CTX）、胎児脳（embryo）における自閉症関連遺伝子の GSEA 解析

2. *CHAMP1* ノックアウトによるクロマチン構造の変化の検討

CHAMP1 ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seq を行って調べたところ、*CHAMP1* ノックアウトマウスで消失あるいは出現するピークは、シナプスや神経発達に関連する遺伝子領域上に多く存在していた（図 5）。また、CUT&Tag で検出された CHAMP1 のピークの多くは ATAC-seq のピークと一致しており（図 6，7）、精神障害に関連する遺伝子領域に多く存在していることがわかった。

	CHAMP1$^{+/+}$ only (673 genes)			*CHAMP1*$^{-/-}$ only (3740 genes)		
Jensen COMPARTMENTS						
	Term	Overlap	Adjusted P-value	Term	Overlap	Adjusted P-value
	Synapse	52/737	5.54E-04	Synapse	210/737	5.83E-08
	Neuron part	76/1287	7.79E-04	Excitatory synapse	69/190	7.36E-06
	Synapse part	39/594	0.02228838	Cell leading edge	106/343	1.23E-05
	Plasma membrane region	53/913	0.02228838	Postsynaptic density	64/177	1.23E-05
	L-type voltage-gated calcium channel complex	13/110	0.02228838	Postsynaptic specialization	64/177	1.23E-05
DisGeNET						
	Term	Overlap	Adjusted P-value	Term	Overlap	Adjusted P-value
	Autistic Disorder	42/677	0.52109906	Body mass index	110/370	6.52E-04
	Sleep disturbances	11/101	0.86209134	Finding of body mass index	110/370	6.52E-04
	Smoking Behaviors	17/209	0.86209134	Autistic Disorder	179/677	8.65E-04
	Angelman Syndrome	Aug-60	0.86209134	Bipolar Disorder	210/837	0.00388331

図 5. *CHAMP1* ノックアウトマウスで消失または出現する ATAC-seq ピークが存在する遺伝子領域のエンリッチメント解析

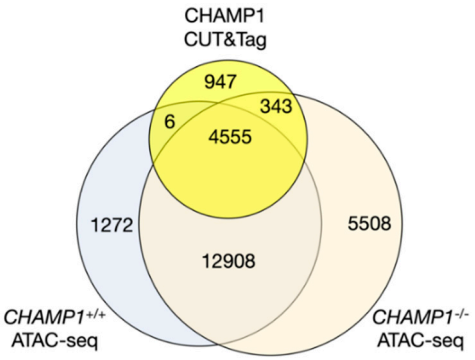


図 6. マウス胎児脳における CHAMP1 CUT&Tag のピークと *CHAMP1*$^{+/+}$、*CHAMP1*$^{-/-}$での ATAC-seq ピークの比較

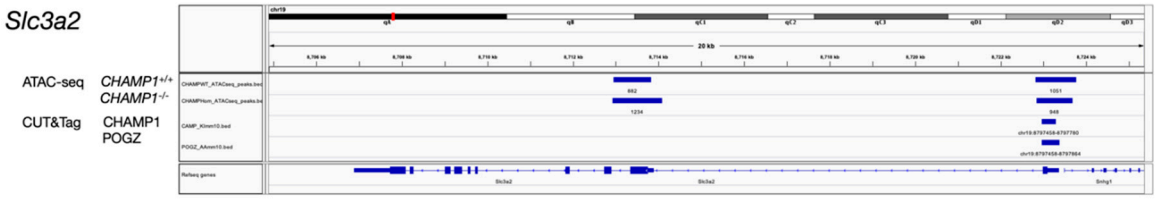


図 7. マウス胎児脳の *Slc3a2* 遺伝子座における CHAMP1 CUT&Tag のピークと ATAC-seq ピークの一致

考　察

本研究において、CHAMP1 が POGZ と共に神経発達関連遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域に局在してクロマチン構造を制御していることが示唆された。神経発達障害に関連する遺伝子は数多く同定されているが、その多くが転写調節に関連することが知られている。興味深いことに、最近 CHAMP1 の結合分子である POGZ についても、プロモーターやエンハンサー領域においてクロマチン構造を制御し、シナプス関連遺伝子の発現を制御することが報告されている［8］。今回の我々の結果は、CHAMP1 が POGZ と共にクロマチン構造を制御しており、これらの変異により生じるシナプス関連遺伝子の発現異常が知的障害の発症につながる可能性を支持している。今後さらに *CHAMP1* ノックアウトマウス胎児脳で POGZ やヒストン修飾の CUT&Tag 解析を行い、*CHAMP1* ノックアウトが POGZ のゲノム上での局在やヒストン修飾に及ぼす影響を解析する予定である。また *CHAMP1* ノックアウトマウス胎児脳のシングルセル RNA-seq 解析を行うことにより、*CHAMP1* ノックアウトが脳のどのような細胞に影響を及ぼすのかを明らかにする。さらに知的障害で見られる変異 CHAMP1 が、CHAMP1 のゲノム上での局在やクロマチン制御・遺伝子発現制御にどのような影響を与えるのかを解析することにより、*CHAMP1* の変異による知的障害発症機構が明らかになり、その治療法の開発へとつながることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学加齢医学研究所分子腫瘍学研究分野の家村顕自、永井正義、吉崎裕次郎、槇陽一朗、東北大学大学院情報科学研究科応用情報科学分野の木下賢吾、安澤隼人である。*CHAMP1* に変異を持つ知的障害者の情報を共有させていただいている家族団体 The CHAMP1 Research Foundation（https://champ1foundation.org/）に感謝する。

文　献

1） Isidor B, Küry S, Rosenfeld JA, Besnard T, Schmitt S, Joss S, Davies SJ, Lebel RR, Henderson A, Schaaf CP, Streff HE, Yang Y, Jain V, Chida N, Latypova X, Caignec CL, Cogné B, Mercier S, Vincent M, Colin E, Bonneau D, Denommé AS, Parent P, Gilbert-Dussardier B, Odent S, Toutain A, Piton A, Dina C, Donnart A, Lindenbaum P, Charpentier E, Redon R, Iemura K, Ikeda M, Tanaka K, Bézieau S. De Novo Truncating Mutations in the kinetochore-microtubules attachment gene *CHAMP1* Cause Syndromic Intellectual Disability. Hum Mutat. 2016 Apr;37(4):354-8. doi: 10.1002/humu.22952. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26751395

2） Levy T, Pichardo T, Silver H, Lerman B, Zweifach J, Halpern D, Siper PM, Kolevzon A, Buxbaum JD. Prospective phenotyping of CHAMP1 disorder indicates that coding mutations may not act through haploinsufficiency. Hum Genet. 2023 Sep;142(9):1385-1394. doi: 10.1007/s00439-023-02578-6. Epub 2023 Jul 16. PMID: 37454340

3） Itoh G, Kanno S, Uchida K, Chiba S, Sugino A, Watanabe K, Mizuno K, Yasui A, Hirota T, Tanaka, K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. EMBO J. 2011 Jan 5;30(1):130-44. DOI: 10.1038/emboj.2010.276. Equb 2010 Nov 9. PMID: 2106339030

4） Assia Batzir N, White J, Sutton VR. White-Sutton Syndrome. 2021 Sep 16. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 34529370

5) Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, Wanibuchi H, Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K. Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioral phenotype. Brain Commun. 2022 Aug 30;4(5):fcac220. DOI: 10.1093/braincomms/fcac220. eCollection 2022. PMID: 36106092

6) Fujita H, Ikeda M, Ui A, Ouchi Y, Mikami Y, Kanno SI, Yasui A, Tanaka K. Deficiency of *CHAMP1*, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioral phenotype. Brain Commun. 2022 Aug 30;4(5):fcac220. DOI: 10.1093/braincomms/fcac220. eCollection 2022. PMID: 36106092

7) Hino M, Iemura K, Ikeda M, Itoh G, Tanaka K. CHAMP1 (CAMP) plays a role in cell survival through regulating Mcl-1 expression. Cancer Sci. 2021 Sep;112(9):3711-3721. DOI: 10.1111/cas.15018. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34107118

8) Markenscoff-Papadimitriou E, Binyameen F, Whalen S, Price J, Lim K, Ypsilanti AR, Catta-Preta R, Pai EL, Mu X, Xu D, Pollard KS, Nord AS, State MW, Rubenstein JL. Autism risk gene POGZ promotes chromatin accessibility and expression of clustered synaptic genes. Cell Rep. 2021 Dec 7;37(10):110089. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110089. PMID: 34879283