

purified from a polychaete, *Perineresis sp.*, which is not commonly available.

So far, simultaneous HPLC determination of CR, GA, and CN in urine and blood has been reported using the reversed-phase and strong acidic cation-exchange modes, which require derivatization for fluorescence detection (Natelson 1984; Carducci et al. 2001).

Analytical methods using mass spectrometry (MS) have been described recently, including gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (Hunneman and Hanefeld 1997), liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) (Yasuda et al. 1997), liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Carling et al. 2008; Cognat et al. 2004), and flow injection analysis–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (FIA-ESI-MS/MS) (Carducci et al. 2006). Techniques using MS are highly reliable and should contribute to the diagnosis CCDS.

Here, we report a simple HPLC method using weak-acidic ion chromatography column with UV detection that does not require derivatization. Three components, CR, GA, and CN, needed for CCDS diagnosis eluted within 15 min with complete separation. Our new method allows the quantitation of these three compounds without the use of MS. This new method should contribute to patient screening, and allow early interventions for patients with CCDS.

Acknowledgments This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Science, and Sports of Japan.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ardon O, Amat di San Filippo C, Salomons GS, Longo N (2010) Creatine transporter deficiency in two half-brothers. *Am J Med Genet A* 152(8):1979–1983
- Arias A, Corbella M, Fons C, Sempere A, Garcia-Villoria J, Ormazabal A, Poo P, Pineda M, Vilaseca MA, Campistol J, Briones P, Pampols T, Salomons GS, Ribes A, Artuch R (2007) Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin Biochem* 40(16–17):1328–1331
- Betsalel OT, van de Kamp JM, Martinez-Munoz C, Rosenberg EH, de Brouwer AP, Pouwels PJ, van der Knaap MS, Mancini GM, Jakobs C, Hamel BC, Salomons GS (2008) Detection of low-level somatic and germline mosaicism by denaturing high-performance liquid chromatography in a EURO-MRX family with SLC6A8 deficiency. *Neurogenetics* 9(3):183–190
- Braissant O, Henry H, Beard E, Uldry J (2011) Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* 40(5):1315–1324
- Carducci C, Birarelli M, Santagata P, Leuzzi V, Antonozzi I (2001) Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of guanidinoacetic acid in dried blood spots: a tool for early diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 755(1–2):343–348
- Carducci C, Birarelli M, Leuzzi V, Battini R, Cioni G, Antonozzi I (2002) Guanidinoacetate and creatine plus creatinine assessment in physiologic fluids: an effective diagnostic tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies. *Clin Chem* 48(10):1772–1778
- Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, Artiola C, Giovannello T, Battini R, Antonozzi I (2006) Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis–electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 364(1–2):180–187
- Carling RS, Hogg SL, Wood TC, Calvin J (2008) Simultaneous determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine and plasma by un-derivatized liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 45(Pt 6):575–584
- Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE, Salomons GS (2006) X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* 119(6):604–610
- Cognat S, Cheillan D, Piraud M, Roos B, Jakobs C, Vianey-Saban C (2004) Determination of guanidinoacetate and creatine in urine and plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 50(8):1459–1461
- Fossati P, Prencipe L, Berti G (1983) Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 29(8):1494–1496
- Hunneman DH, Hanefeld F (1997) GC-MS determination of guanidinoacetate in urine and plasma. *J Inher Metab Dis* 20(3):450–452
- Husdan H, Rapoport A (1968) Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clin Chem* 14(3):222–238
- Item CB, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Muhl A, Alessandri MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Cioni G (2001) Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* 69(5):1127–1133
- Lion-Francois L, Cheillan D, Pitelet G, Acquaviva-Bourdain C, Bussy G, Cotton F, Guibaud L, Gerard D, Rivier C, Vianey-Saban C, Jakobs C, Salomons GS, des Portes V (2006) High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology* 67(9):1713–1714
- Longo N, Ardon O, Vanzo R, Schwartz E, Pasquali M (2011) Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. doi:10.1002/ajmg.c.30292
- Mercimek-Mahmutoglu S, Stoeckler-Ipsiroglu S, Adami A, Appleton R, Araujo HC, Duran M, Ensenuer R, Fernandez-Alvarez E, Garcia P, Grolik C, Item CB, Leuzzi V, Marquardt I, Muhl A, Saelke-Kellermann RA, Salomons GS, Schulze A, Surtees R, van der Knaap MS, Vasconcelos R, Verhoeven NM, Vilarinho L, Wilichowski E, Jakobs C (2006) GAMT deficiency: features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology* 67(3):480–484
- Natelson S (1984) Metabolic relationship between urea and guanidino compounds as studied by automated fluorimetry of guanidino compounds in urine. *Clin Chem* 30(2):252–258
- Newmeyer A, Cecil KM, Schapiro M, Clark JF, Degrauw TJ (2005) Incidence of brain creatine transporter deficiency in males with developmental delay referred for brain magnetic resonance imaging. *J Dev Behav Pediatr* 26(4):276–282

- Puusepp H, Kall K, Salomons GS, Talvik I, Mannamaa M, Rein R, Jakobs C, Ounap K (2009) The screening of SLC6A8 deficiency among Estonian families with X-linked mental retardation. *J Inher Metab Dis*. doi:10.1007/s10545-008-1063-y
- Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers HH, Fryns JP, deGrauw TJ, Jakobs C, Salomons GS (2004) High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75(1):97–105
- Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C (2001) X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 68(6):1497–1500
- Shirokane Y, Nakajima M, Mizusawa K (1991) A new enzymatic assay of urinary guanidinoacetic acid. *Clin Chim Acta* 202(3): 227–236
- Stockler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von Figura K (1996) Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet* 58(5): 914–922
- Walker JB (1979) Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 50:177–242
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80(3):1107–1213
- Yasuda M, Sugahara K, Zhang J, Ageta T, Nakayama K, Shuin T, Kodama H (1997) Simultaneous determination of creatinine, creatine, and guanidinoacetic acid in human serum and urine using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 253(2):231–235

ATR-X(X連鎖 α サラセミア・精神遅滞)症候群の 分子遺伝学

—エピジェネティクスの破綻により発症するクロマチン病
Molecular genetics of ATR-X syndrome



和田 敬仁

Takahito WADA

神奈川県立こども医療センター神経内科

◎ ATR-X 症候群は、その責任遺伝子 *ATRX* が X 染色体上に局在する X 連鎖精神遅滞症候群のひとつである。男性に発症し、重度の精神遅滞、HbH 病 (α サラセミア)、外性器異常、骨格異常、行動異常など多彩な症状を特徴とする。ATRX 蛋白は、メチル基転移酵素と共通の ADD ドメインと、クロマチンリモデリングドメインの 2 つの機能的に重要な部位をもち、その構造から SNF2 ファミリーに属するクロマチンリモデリング蛋白と考えられている。ATR-X 症候群は *ATRX* 遺伝子変異による ATRX 蛋白の機能低下がクロマチン構造が破綻を引き起こし、複数の遺伝子発現が異常をきたし発症すると考えられ、エピジェネティクスのメカニズム破綻により発症するクロマチン病と位置づけられる。ATRX 蛋白はヘテロクロマチンの維持とともに、染色体内あるいは染色体間の相互作用を調節し、細胞機能維持に重要かつ多様な機能を有していると考えられる。

Key word : ATR-X 症候群, α サラセミア, 精神遅滞, エピジェネティクス, クロマチンリモデリング

精神遅滞 (mental retardation : MR, 近年は intellectual disability : ID が用語として用いられている) は全人口の 1~3% と頻度が高い病態であり、男女比 1.3 : 1 である。MR/ID の原因は遺伝学的要因と環境的要因に分けられ、中等度から重度の MR/ID (IQ < 50) の 50% は遺伝的要因が関与し、軽度の MR/ID (50 < IQ < 70) は環境的要因が大きいと推定されている¹⁾。

X 連鎖精神遅滞 (XLMR) は X 染色体にその責任遺伝子が局在し、おもに男性が罹患するが、X 染色体の不活化の偏り (skewed X-inactivation) により女性も発症する可能性があることに注意が必要である。欧米においては脆弱 X 症候群 (FMR1) が XLMR 男性の約 20% の原因であるが、それ以外に 200 を超えると推定される XLMR の責任遺伝子は男性 MR 患者の 10~12% にかかわっていると見積もられている。全ゲノムの 4% にすぎない X 染色体上に MR/ID の責任遺伝子の 10% が局在

することから、X 染色体は常染色体に比べて知的機能にかかわる遺伝子の密度が約 2 倍程度高いと推測されている²⁾。

臨床的には、精神遅滞以外の臨床的特徴をもつ症候性 XLMR と、精神遅滞が唯一の症状である非特異的 XLMR に分類されるが、*ATRX* 遺伝子を含む複数の遺伝子が症候性 XLMR および非特異的 XLMR の責任遺伝子となっている。

XLMR の責任遺伝子はそのコードする蛋白の機能により、転写調節 (22%)、シグナル伝達 (19%)、細胞膜構成物 (15%)、代謝 (15%) などに分類される²⁾。精神遅滞の責任遺伝子としてエピジェネティクスを含む遺伝子発現調節にかかわる蛋白をコードする遺伝子群は重要な位置を占めている。エピジェネティクスの破綻により発症する疾患は、このメカニズムにより発現を調節されている複数の遺伝子が不適切な発現をするために多彩な症状を呈すると考えられ、とくに厳密な遺伝

子発現調節が要求されると想像される脳機能が影響を受けやすいため精神遅滞を伴いやすくと推定される。ヒトの疾患において生殖細胞系列でのエピジェネティクスの破綻は“精神遅滞”を中心とする多彩な症状を呈する症候群の原因となり、これらはクロマチン病と位置づけられている(「サイドメモ」参照)³⁾。

本稿ではクロマチンリモデリング蛋白をコードしている *ATRX* 遺伝子を責任遺伝子とし、エピジェネティクスの破綻がその発症のメカニズムと考えられている、精神遅滞と α サラセミアを特徴とする *ATR-X* 症候群(X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome, MIM# 301040)について概説する。

ATRX-X症候群¹⁾

1. 概念

1981年に、 α サラセミア(ヒトヘモグロビンにおける、 β グロビンに対する α グロビンの低下による量的不均衡)と精神遅滞の合併例(α -thalassemia and mental retardation: ATR)がはじめて報告されて以来、 α グロビン遺伝子が局在する16p13.3を含む領域の欠失を認める隣接遺伝子症候群と考えられる症例(ATR-16)と、欠失を認め

ない症例に区別された。前者は男性、女性とも罹患し、精神遅滞の程度もさまざまであるのに対し、後者は重度の精神遅滞を伴い、特徴的顔貌を呈し、臨床的に一様であり、患者が男性のみであることから、責任遺伝子がX染色体上にあることが予想され、*ATR-X*と名づけられ、1995年にイギリスのGibbonsにより責任遺伝子*ATRX*が同定された⁵⁾。現在までに世界で、日本人症例70名以上を含む90家系200症例以上が*ATR-X*と診断されている⁶⁻¹⁰⁾。

2. 臨床像

*ATR-X*は、その責任遺伝子*ATRX*をX染色体にもつX連鎖精神遅滞症候群のひとつである。典型的な*ATR-X*の臨床像は、男性の患者、重度の精神遅滞、 α サラセミアの存在、特徴的顔貌、外性器異常、骨格異常、行動異常といった多彩な症状を特徴とする¹⁰⁾。

歩行可能例は少なく、歩行可能例も10代後半で歩行を獲得することが多い。精神遅滞は重度であり、日常生活は全介助を要することがほとんどであり、有意語の言語獲得は難しいが、有意語を獲得した軽症例も報告されている。同程度の精神遅滞を呈する症候群の患者と比べると、*ATR-X*症候群の患者の多くは視線を合わそうとしない、常同行為を繰り返すといった自閉症的な行動を伴う頻度が高く、*ATRX*遺伝子の発達障害の責任遺伝子としての可能性を示している。外性器異常は、小精巣や停留精巣の軽症例から女性様外性器異常を呈する症例まで幅広い。

*ATR-X*の名前が示すとおり α サラセミアの存在は特徴的であるが、HbH封入体をもつ赤血球の割合は患者により1%未満から数十%と幅広く、また、患者の20%では検出されないため、HbH陰性は*ATR-X*症候群を否定するものではないことに注意が必要である。同じ変異をもつ患者間でも α サラセミアの程度のばらつきは大きく、その原因は不明であったが、最近その新しいメカニズムが明らかにされた(後述)。

3. *ATRX*遺伝子

*ATRX*遺伝子はXq13.3に局在し、300 kbに広がり、35エクソンからなる¹¹⁾。*ATRX*遺伝子は10.5 kbの転写産物をコードしているが、alterna-

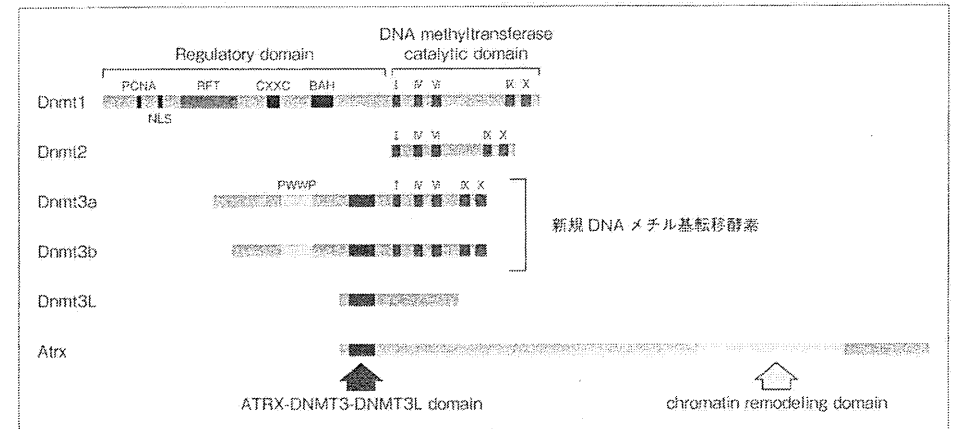


図1 *ATRX*蛋白と他のDNAメチル基転移酵素の構造
*ATRX*蛋白はDNAメチル基転移酵素活性をもたない。

tively splicedにより5'端が異なる、すくなくとも2つの蛋白(265 kDa, 280 kDa)が産生される。さらに、イントロンIIで終止している約7 kbの転写産物から*ATRXi*とよばれる蛋白が翻訳され、これはマウスとヒトの間で保存されている。

コードされる*ATRX*蛋白は機能上重要な領域が2つある(図1)。ひとつはN末端のシステインの豊富なADD(*ATRX-DNMT3b-DNMT3L*)ドメインとよばれる領域で、plant homeodomain (PHD)様 zinc fingerと、そのすぐ上流にC₂C₂モチーフからなる。このPHD fingerはクロマチンを介した転写制御にかかわる蛋白に同定され、50~80個のアミノ酸からなるzinc-fingerドメイン(Cys₄-His-Cys₉)をもつ。この部位はDNA結合蛋白に特徴的な構造をもたず、上流のC₂C₂ドメインを介してDNAに結合すると考えられている。この領域はヒトとマウスの間で、アミノ酸98個中1個が異なり、高度に保存されており、機能的にも重要と考えられる。実際、*ATR-X*患者の60%で、この領域に変異を認めている(図2)。

もうひとつは、中央部の7つのhelicase motifからなる。ヒトとマウスで高度(94%)に保存されている領域であり、*ATR-X*患者の40%はこの領域に変異をもつ。この構造により*ATRX*蛋白はクロマチンリモデリング蛋白のSNF2サブファミリーに分類されている。このグループに属する蛋

白は7つの高度に保存されたcolinear helicase motifs構造を特徴とし、転写制御(SNF2, MOT1, brahma), 細胞周期制御(NPS1), DNA修復(RAD16, RAD54, ERCC6), 細胞分裂時の染色体分離(lodestar)といった、さまざまな細胞機能にかかわる蛋白が属している。*ATRX*蛋白はこのなかでもとくにRAD54との相同性が高いが、*ATR-X*患者において臨床的に紫外線感受性や発癌性などを示す報告はなく、*ATRX*蛋白がDNA修復にかかわっていることを直接示唆するデータはない。ほかに、C末端には他のSNF-2様蛋白にも認める転写制御にかかわる領域(P-box)と、蛋白相互作用にかかわるグルタミンに富む領域(Q-box)をもつ。

4. *ATRX*蛋白とエピジェネティクス

*ATRX*蛋白は核蛋白であり、他の蛋白と複合体を形成している。そのひとつがヘテロクロマチン蛋白のHP1であり、*ATRX*蛋白のADDドメインの下流で結合し、セントロメア近傍のヘテロクロマチンに共局在している。HP1はヒストンH3-K9のメチル化酵素SUV39H1を含む多くの核蛋白と相互作用して、遺伝子発現抑制やクロマチン構造にかかわっている¹²⁾。

また、ヒト細胞において大部分の*ATRX*が核スペckル(nuclear speckle)に存在し、転写およびアポトーシスの制御因子であるDaxxを介してPML蛋白(promyelocytic leukemia body)と結合

サイドメモ クロマチン病

DNAのメチル化、ヒストンテールの修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化などによるヒストンコード)、クロマチン構造の変化(クロマチンリモデリング)はエピジェネティクスのメカニズムの中心となり、遺伝子発現促進・抑制にかかわっている。このメカニズムにかかわる遺伝子の生殖細胞系列における変異は精神遅滞を主症状とする症候群を発症し、クロマチン病とよばれる。遺伝子発現抑制を4つのステップに分けると疾患を理解しやすい。①DNAメチル化(ICF症候群)、②メチル化DNAの認識(Rett症候群)、③ヒストン修飾やクロマチンリモデリング(Rubinstein-Taybi症候群, Sotos症候群, Coffin-Lowry症候群, Kabuki make-up症候群, *ATR-X*症候群, CHARGE症候群, Cockayne症候群)、④遺伝子不活化パターンの確立(Angelman症候群, Prader-Willi症候群)。

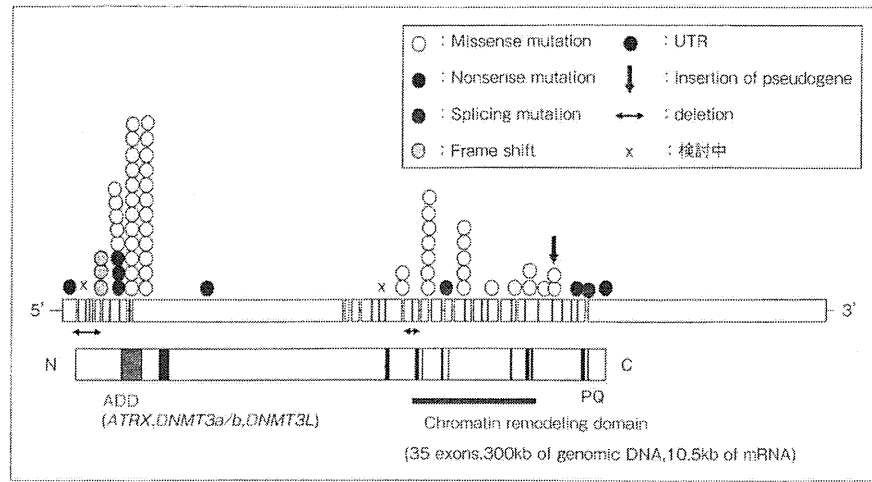


図2 日本人のATR-X症例67人に検出されたATR-X遺伝子変異
機能的に重要な2つのドメインに変異が集中している。

する¹³⁾。この分布は細胞周期における ATRX 蛋白のリン酸化状態に依存し、細胞分裂中期では核マトリックスに、細胞分裂中期ではセントロメアに関連する可能性が報告された¹⁴⁾。また、ヒト細胞の細胞分裂中期において、ATR-X 抗体が端着糸型染色体(acrocentric chromosomes: 13, 14, 15, 21, 22 染色体)の短腕に局在し、核オーガナイザー領域(nucleolar organizer regions)で rDNA に結合すると考えられる転写因子(upstream binding factor)と共存することが示された¹²⁾。

Gibbons ら¹⁵⁾による、ATR-X 遺伝子に変異をもつ ATR-X 患者の血液から抽出した DNA の解析により、DNA メチル化異常を示していることが示された。ひとつは rDNA 遺伝子の CpG rich な領域であり、正常では 20% 程度のメチル化を認めるが、ATR-X 患者では低メチル化状態であることが示された。また、Y 染色体特異的のリピートである DY22 では健常人で約 6% が非メチル化されているのに対して、ATR-X 患者ではほとんどメチル化している。サブテロメア領域のリピートである TelBam3.4 でもメチル化の違いを認めている。

ATR-X 蛋白は DNA メチル基転移酵素活性部位をもたないが、新規 DNA メチル基転移酵素であ

る DNMT3 ファミリーと共通の ADD ドメインをもつことから、ATR-X がヒストン脱アセチル化酵素と結合、あるいはシーケンス特異的な DNA 結合蛋白を介して、DNA メチル化装置を導入する可能性がある¹⁶⁾。

最近、2つのグループから、ATR-X 蛋白が H3K9me3 を認識する heterochromatin protein-1 (HP1) との結合とともに、その ADD ドメインを介してヒストン H3 の N 末端テールの非修飾 Lys4 (H3kme0) と、ジメチルあるいはトリメチル化された Lys9 (H3K9me2 or H3K9me3) を、従来の芳香族アミノ酸残基によるかご型の認識部位とは異なる認識ポケットにより同時に認識し結合することが示された^{17,18)}(図3)。この ATR-X 蛋白、HP1 のクロマチンへの導入により、三者の相互作用が隣接するヌクレオソームへ広がり、ヒストンコードが読み込まれる過程を明らかにした。ATR-X はヒストン異性体(histone variant)のひとつである H3.3 に特異的なヒストン・シャペロンである Daxx と結合するが、H3.3 と結合した Daxx がどのようにヘテロクロマチンに ATR-X 蛋白を介して取り込まれるのかは不明であったが、この研究はこれを解明する可能性がある。ATR-X 蛋白の ADD ドメインのヒストンコード読取り装置とし

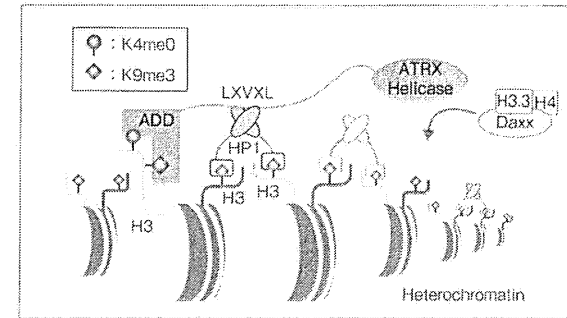


図3 ヘテロクロマチンにおける ATRX 蛋白、HP1 関係¹⁷⁾
ATR-X 蛋白の ADD ドメインによる H3K4me0 と H3K9me3 の認識と、H3K9me3 に結合した HP1 ダイマーによるヘテロクロマチンへの ATR-X 蛋白の導入を示している。ATR-X 蛋白は、Daxx-H3.3 のヘテロクロマチンへの導入にもかかわっている。

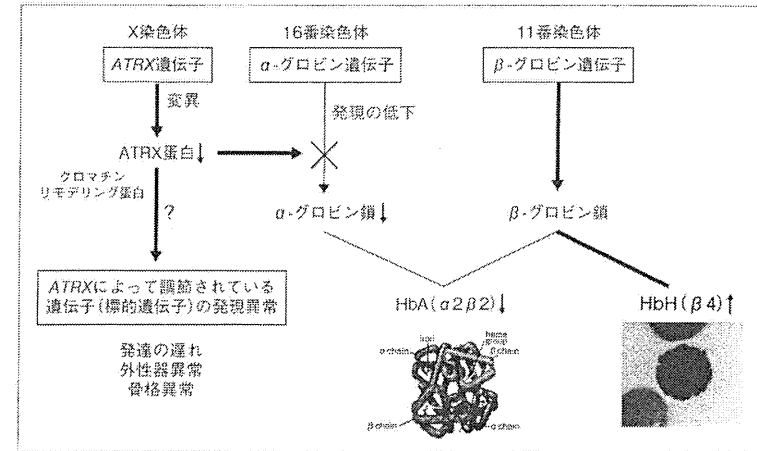


図4 ATR-X 症候群における病態の模式図
右下に、末梢血液の Brilliant Cresyl blue 染色によりゴルフボール様に染色された HbH 封入体をもつ赤血球を示す。

での役割が明らかにされたとともに、ヒストンコードが複数のエフェクターとクロマチンの相互作用により解釈されるメカニズムが示された。また、ATR-X 患者に認める ADD ドメインの変異により、ATR-X のヘテロクロマチンへの誘導が制限されることにより発症することが明らかにされた。

5. ATR-X 遺伝子変異と病態(図4)

現在までに同定された変異はほとんどがミスセ

ンス変異であり、機能的に重要な2つの領域、ADD ドメインと helicase ドメインに集中している⁹⁾。その機能喪失が病態にかかわり、その完全機能喪失は致死的と考えられている。現在のところ、遺伝子変異型と表現型の明らかな相関は認めないが、唯一、C 末端の欠失をもつ症例で重症の外性器異常を呈しており、この領域が泌尿器外性器の発達に特異的な役割を果たしている可能性を示し、ATR-X が性分化にかかわる遺伝子と

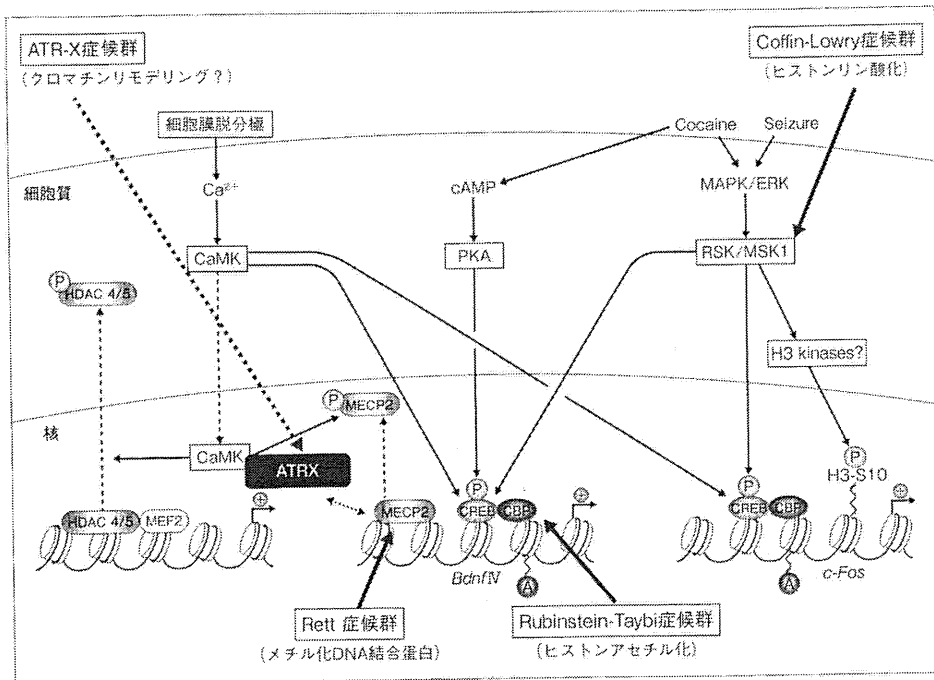


図5 細胞内情報伝達カスケードを介したクロマチン構造の制御²⁰⁾

Rett 症候群はメチル化した CpG に結合する蛋白 MECP2 をコードする *MECP2* 遺伝子、Rubinstein-Taybi 症候群はヒストン蛋白のアセチル化にかかわる蛋白 CBP をコードする *CBP* 遺伝子、Coffin-Lowry 症候群はヒストン蛋白のリン酸化にかかわる *RSK2* 遺伝子を責任遺伝子とする(「サイドメモ」参照)。

CREB(cAMP-response element binding protein)、CBP(CREB binding protein)、PKA(protein kinase A)、CaMKs(calcium/calmodulin-activated protein kinases)、RSK(ribosomal S6 kinase)、MSK1(mitogen- and stress-activated protein kinase)はそれぞれ、cAMP(cyclic AMP)、calcium-および mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated protein kinase(MAPK/ERK)にかかわる細胞内情報伝達カスケードにより活性化され、転写因子 CREB をリン酸化する。これがヒストンアセチル基転移酵素活性をもつ CBP と結合する。これにより近傍のヒストンがアセチル化され、遺伝子転写活性(たとえば *c-Fos*, *Bdnf*)を促進する。

しても注目される。

ATR-X 症候群はその多彩な症状からクロマチンリモデリングを介した複数の遺伝子の発現調節異常が病態として想定されているが、実際のところ ATRX 蛋白はクロマチンリモデリング活性がきわめて弱いことが示されており、遺伝子発現調節のメカニズムは不明な点が多い。

また、精神遅滞にかかわる標的遺伝子も不明であるが、最近、Rett 症候群の責任遺伝子 *MECP2* がコードしている *MECP2* が ATRX と結合し、その破壊が精神遅滞発症と関連する可能性が報告された¹⁹⁾。エビジェネティクスの破壊による精神遅

滞症候群が共通の症状をもつことから、神経細胞におけるシナプス活性による遺伝子発現の促進・抑制に影響を与えるクロマチンリモデリングと細胞内シグナル伝達系の関連には共通経路のあることが想定されている(図5)²⁰⁾。

6. ATR-Xモデルマウスを用いた解析

Kitajima らが軽症 ATR-X 症候群として発症した患者のエクソン2の変異(c. C109T;p. R37X)に着目し、エクソン2を欠失させたマウスを作成し、ATR-X 蛋白の脳機能障害におけるメカニズムを解析した。このマウスでは contextual fear memory(文脈恐怖条件付き記憶)が損なわれ、海

馬の CA1 領域で高頻度刺激による誘発される長期増強(long term potentiation: LTP)が有意に減少していることが示された。これは、ATR-X 蛋白の機能低下による、海馬におけるカルシウム-カルモデュリン依存性リン酸化酵素(α CaMK II)の自己リン酸化とイオンチャネル型グルタミン酸受容体のひとつである AMPA1(GluR1)のリン酸化の減少が原因であることが示された²¹⁾。また、同じモデルマウスの解析により内側前頭前皮質の樹状突起棘(dendritic spine)の形態異常と、同部位における CaMK II 活性の異常上昇を示し、ヒトの精神遅滞における Rac1-GEF/PAK 情報伝達系の異常と樹状突起棘の形態異常の関与が示唆された²²⁾。この酵素活性を調節する薬剤の治療法としての可能性が期待される。

7. 新しいメカニズム

前述したとおり、ATR-X 遺伝子変異が同じ患者どうしでも α サラセミアの程度に大きく幅があることが知られていたが、その原因は不明であった。最近、Gibbons らにより、同じ遺伝子変異のもとでの浸透率の差異を説明しうる新しいメカニズムが報告された(図6)²³⁾。ChIP シークエンスにより ATRX 蛋白のターゲットとして同定された、グロビン遺伝子の発現している primary human erythroid cell の 917 遺伝子、および mouse embryonic stem cell の 1305 遺伝子の解析により、ユークロマチンにおける ATRX 蛋白のターゲットは、G/C-rich で CpG ジヌクレオチドの含有率が高い VNTR(variable number tandem repeat)を含むシークエンスであることが示された。すなわち、正常の ATRX 蛋白はテロメアやユークロマチンの繰返し配列(tandem repeat: TR)に結合するが、異常 ATRX 蛋白は結合することができなくなり、この TR に関連する遺伝子群がその TR の長さに依存して発現異常をきたすというものである。この TR はグアニンに富んでおり(G-rich)、*in vivo* で G-quadruplex を含む non-B DNA structure とよばれる特別な構造(G4 structure)をとることが示された。ATR-X 蛋白はテロメアや G-rich TR におけるこの G4 structure を認識し、その構造を変換することにより下流の遺伝子発現を調節しているが、異常 ATRX 蛋白はこれを認

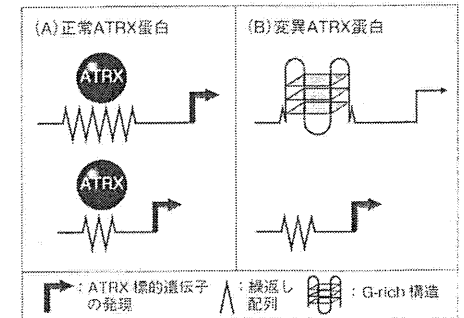


図6 ATRX蛋白のtandem repeatへの結合による遺伝子発現の制御²³⁾

正常では ATRX 蛋白は繰返し配列に結合し遺伝子発現を on にしているが(A)、変異 ATRX 蛋白では繰返し配列に結合できないため、G-quadruplex という構造をとり、繰返し配列の長さ依存性に遺伝子発現が抑制される(B)。

識できないため、下流の遺伝子発現が TR が伸張するほど強く影響を受けている可能性がある。これは ATRX 遺伝子変異によって影響を受ける α グロビン遺伝子を含む領域のゲノム構造が CpG island や G-rich TR の含有率が高い GC-rich サブテロメアに存在するのに対し、このようなゲノム構造をもたない β グロビンが影響を受けないことと関連しているかもしれない。さらに興味深いことに、ATR-X 蛋白が結合する TR にもっとも近い遺伝子の発現は ATRX 蛋白が存在しない場合にもっとも強く阻害されるが、その下流 10 kb に位置する遺伝子の発現も影響を受けていた。ATR-X は核内における細胞周期、DNA 転写、DNA 修復、DNA 組換え、DNA 複製などさまざまな現象にかかわっている可能性がでてきた。

おわりに

クロマチンリモデリング蛋白 ATRX をコードする ATRX 遺伝子を責任遺伝子とする ATR-X 症候群は、1990 年に疾患が発見され、1995 年に責任遺伝子が同定された。ATR-X 蛋白の機能についてほとんど不明であったが、2010 年に ATRX 蛋白と G4 structure との関連が明らかにされた。ATR-X 蛋白が以前想像されていたよりも、より基本的かつ多様な細胞機能にかかわっている可能

性が出てきた。本稿によりひとりでも多くの研究者の皆さんがこの疾患に興味をもっていただき、病態解明への糸口となれば幸いである。

文献

- 1) 和田敬仁：神経研究の進歩，50：793-808，2006.
- 2) Chiurazzi, P. et al.: *Eur. J. Hum. Genet.*, **16** : 422-434, 2008.
- 3) Higgs, D. R. et al.: *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **8** : 299-325, 2007.
- 4) Gibbons, R. J. and Wada, T.: *Inborn Errors of Development*(ed. by Epstein, C.J. et al.). Oxford Univ. Press, New York, 2008, pp.943-954.
- 5) Gibbons, R. J. et al.: *Cell*, **80** : 837-845, 1995.
- 6) Gibbons, R. J. et al.: *Hum. Mutat.*, **29** : 796-802, 2008.
- 7) Wada, T. et al.: *Am. J. Med. Genet.*, **94** : 242-248, 2000.
- 8) 和田敬仁・他：脳と発達，**30** : 283-289，1998.
- 9) Wada, T. et al.: *Am. J. Med. Genet. A*, **138** : 18-20, 2005.
- 10) Wada, T. and Gibbons, R. J.: *Genetics and Genomics of Neurobehavioral Disorders*(ed. by Fisch, G. S.), Humana Press, Totowa, 2003, pp.309-334.
- 11) Picketts, D. J. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, **5** : 1899-1907, 1996.
- 12) McDowell, T. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** : 13983-13988, 1999.
- 13) Xue, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 10635-10640, 2003.
- 14) Berube, N. G. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, **9** : 539-547, 2000.
- 15) Gibbons, R. J.: *Nat. Genet.*, **17** : 146-148, 1997.
- 16) Argentaro, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** : 11939-11944, 2007.
- 17) Eustermann, S. et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18** : 777-782, 2011.
- 18) Iwase, S. et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18** : 769-777, 2011.
- 19) Nan, X. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** : 2709-2714, 2007.
- 20) Tsankova, N. et al.: *Nat. Rev. Neurosci.*, **8** : 355-367, 2007.
- 21) Nagomi, T. et al.: *Hippocampus*, **21** : 678-687, 2011.
- 22) Shioda, N. et al.: *J. Neurosci.*, **31** : 346-358, 2011.
- 23) Law, M. J. et al.: *Cell*, **143** : 367-378, 2010.

* * *

