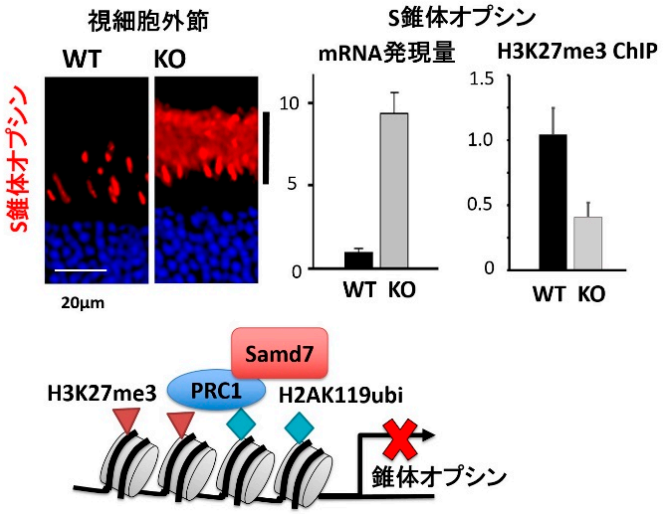
64　ヒストン修飾制御による網膜視細胞の分化機構の解明	古川　貴久

【目的】哺乳類の神経細胞の発生や分化におけるヒストン修飾の生理的意義やその制御メカニズムはまだ未解明な点が多い。網膜の発生・成熟段階や変性網膜ではヒストン修飾がダイナミックに変化することが知られており、遺伝子の異常のみならずエピジェネティックな制御もこれらの疾患の発症に大きな影響を与えていると考えられている。しかし、網膜の分化や成熟におけるエピジェネティック制御の明確な生理的意義や機能メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。我々は網膜視細胞におけるエピジェネティック制御を行う因子の同定とその機能メカニズムの解析を行い、網膜視細胞の発生と機能におけるエピジェネティック機構の生理的意義を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法】我々は、網膜視細胞の発生に重要なエピジェネティック因子を探索するスクリーニングを行った。このスクリーニングからヒストン K27 メチル化を制御するポリコームグループ PRC1 の構成因子 Phc2 の SAM ドメインと高いホモロジーを持つ機能未知タンパク質 Samd7 と Samd11 を見出した。*Samd7* と *Samd11* それぞれのノックアウト（KO）マウスを作製し、網膜における表現型の機能解析を行った。Samd7 と Samd11 の発現解析とともに、Samd7 の抗体を作製した。さらに KO マウスを用いて、網膜組織の免疫染色、網膜電図（ERG）、遺伝子発現のマイクロアレイ解析、蛋白質相互作用解析、ChIP 解析などを実施した。

【結果】*Samd7* と *Samd11* はともに網膜視細胞特異的な発現パターンを示した。我々は、*Samd7* の欠損マウスを作製し、*Samd7*欠損マウスでは青色錐体（S 錐体）オプシンが野生型に比べて 10 倍程度に過剰発現することや約 160 個の非桿体遺伝子が桿体視細胞に高発現をすることを見出した。我々は Samd7 によるエピジェネティックな発現制御機構を解析するために、クロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイを行ったところ S 錐体オプシンをはじめとした錐体遺伝子のプロモーター領域で H3K27me3 や H2AK119Ubi のヒストン修飾が大きく減少していることを見出した（図）。また、これらのヒストン修飾を制御するポリコーム複合体 1（PRC1）が Samd7 と細胞核内で共局在することが明らかとなった。これらの結果から、Samd7 は桿体視細胞において不必要な錐体遺伝子を PRC1 とともに抑制しており、*Samd7* 欠損マウスでは脱抑制により種々の錐体遺伝子が桿体視細胞で異常に高発現していることが明らかとなり、Samd7 が PRC1 複合体の細胞種特異的サブユニットとして桿体視細胞におけるヒストン修飾を制御し、オプシンなどの錐体視細胞特異的遺伝子の発現抑制を行っていることを発見した。さらに、*Samd11*KO マウスおよび *Samd7/11* のダブル KO マウスを作製し、これらのマウスの表現型解析を通じて、網膜視細胞の発生におけるエピジェネティック機構の機能的意義を明らかにする。

ヒストン修飾を通じた網膜視細胞のアイデンティティ制御



64. ヒストン修飾制御による網膜視細胞の分化機構の解明

古川　貴久

大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室

Key words：網膜，視細胞，分化，エピジェネティックス，ヒストン修飾

緒　言

脊椎動物の網膜は、後に間脳（前脳後部）になる脳領域が胎生期に膨出して形成される中枢神経系由来の組織である。構造が比較的単純であり、生体レベルでの実験操作が容易であるといったことから、網膜は中枢神経系発生研究の良いモデルとして知られている。特に、1 世紀以上論争となっていたニューロンとグリア細胞の起源について、いずれも共通前駆細胞由来であることは網膜において初めて見出された。網膜未分化前駆細胞は多分化能を有し、おおまかな分類として 5 種類の網膜神経細胞と、1 種類のグリア細胞を産生することが知られている。網膜の細胞はサブタイプも含めると 70 種類に及び、これらが正確に分化・成熟してアイデンティティーを獲得することは、正常な視覚機能に必須である［1］。

近年、各発生段階におけるゲノムワイドなエピゲノム変化の網羅的解析が進み、網膜細胞の多様性を確立する過程には、ダイナミックなヒストン修飾の変化やクロマチン構造の変遷を伴うことが解明されつつある［2，3］。このように網膜では、ダイナミックなヒストン修飾の変化を伴いながら、共通前駆細胞から多様な細胞サブタイプへ分化し成熟していくが、この変化を制御しているエピジェネティック因子の実体は何であろうか？また、これらのエピジェネティック制御因子は既存の転写因子群とどのような関係にあるのだろうか？この問いに答えるべく、本研究では、網膜の 80%を占める桿体視細胞に焦点をあて、ヒストン修飾とクロマチン構造の変化をエピジェネティックに制御する因子の同定と、これらの因子が制御する網膜発現ターゲット遺伝子の発現機構の解明を目的として実験を行った［4］。

方法および結果

1.　マウス *Samd7* と *Samd11* の発現解析

Samd7 の網膜における発現パターンを解析するために、発生期と成体期のマウス網膜を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*Samd7* は生後 1 日目（P1）の桿体視細胞の発生のピーク期から発現が認められ、P6 の視細胞で強く発現し、以降次第に発現が低下するが生後 4 週の網膜でも発現が維持されていた。次に、我々は抗 Samd7 抗体を作製し、P4 マウス網膜の免疫染色を行ったところ、Samd7 は桿体視細胞と錐体視細胞の両方で発現が観察された。一方、*Samd11* は、網膜視細胞において胎生後期から発現されることが明らかとなった。

2.　*Samd7*KO マウス網膜の組織学的解析

我々は、*Samd7*KO マウスを作製し、ホモ変異 KO マウスの網膜組織を解析した。P9 の *Samd7*KO 網膜において、桿体視細胞のマーカーであるロドプシンおよび水緑色錐体視細胞のマーカーである M 錐体オプシンの発現と局在は野生型（WT）コントロールと *Samd7*KO マウスで変化が認められなかった。一方、青色オプシンのマーカーである S 錐体オプシンは、WT では発現していない桿体視細胞で強い異所性の発現が観察された（図 1a）。視細胞は二次ニューロンである双極細胞と水平細胞とシナプス結合を形成する。視細胞のシナプス形成を Pikachurin や CtBP2 などのマーカー抗体を用いて観察したところ、WT と *Samd7*KO 網膜で変化はなく、*Samd7*KO 網膜においてもシナプス形成は正常であることが分かった。

3. *Samd7*KO マウス網膜の神経生理学的解析

Samd7 の網膜のおける神経生理学的機能を明らかにするために、我々は *Samd7* KO マウスの網膜電図（ERG：Electro Retinogram）解析を行った。暗順応条件下において桿体視細胞機能を検証したところ、*Samd7* KO マウスや野生型に比べて a 波および b 波の有意な低下が認められた。これは、*Samd7* KO マウスにおける視細胞の機能の低下を示す。次に、明条件下において錐体視細胞機能を検証したところ、野生型コントロールマウスと *Samd7* KO マウス間で有意な差は認められなかったことから、*Samd7*KO マウスにおいて錐体機能は正常であることが明らかとなった。

4. *Samd7*KO マウス網膜における遺伝子発現解析

我々は、*Samd7*KO 網膜の免疫染色において S 錐体オプシンの異常発現を観察したことから、P12 の野生型と *Samd7* KO 網膜のゲノムワイドな遺伝子発現解析を Agilent 社のマイクロアレイを用いて行った。野生型網膜に比べ、163 個の遺伝子が上昇し、251 個の遺伝子が有意に減少していることを見出した。発現上昇した遺伝子のうち 33 遺伝子は S 錐体遺伝子を含む錐体関連遺伝子で、23 個は桿体関連遺伝子であった。さらに、発現上昇した遺伝子のうち 163 遺伝子は、網膜以外に発現する遺伝子であった。

5. Samd7 とポリコーム抑制複合体 PRC1 との結合

Samd7 による遺伝子発現抑制メカニズムを明らかにするために、 酵母ツーハイブリッド法を用いて samd7 タンパク質と結合するタンパク質を探索した。その結果、Samd7 と結合するタンパク質として、Samd7、Samd11 とともに、PRC1 の主要コンポーネントの一つである Phc2 を同定した。Phc2 は SAM ドメインを有する。次に、Samd7 と Phc2 が結合することを、HEK293 細胞を用いた免疫沈降法によって確認した。さらに我々は、Samd7 と Phc2 が SAM ドメインを通じて多量体を形成することを FSEC（Fluorescence-detection size-exclusion chromatography）法によって検出した。

6. Samd7 と PRC1 によるトリメチル化 H3K27（H3K27me3）による非桿体遺伝子の抑制

我々は *Samd7* KO 網膜において発現上昇している遺伝子の H3K27me3 のレベルを解析した。以前 ChIP 解析されデータベースに登録されている桿体遺伝子と *Samd7*KO で発現上昇している遺伝子を比較した。我々は、*Samd7*KO で発現上昇している遺伝子のうち 58 遺伝子は、桿体視細胞で H3K27me3 されていることを見いだした。これらの遺伝子について、ChIP 解析を行い、H3K27me3 されていることを確認した。さらには、*Samd7* KO で発現上昇している遺伝子について、H2AK119ub 化を検証し、複数の遺伝子が桿体視細胞において H2AK119ub 化されていることを見いだした。

考　察

上記の結果から、網膜桿体視細胞において Samd7 がポリコーム抑制複合体 PRC1 の Phc2 と結合し、さらに桿体に発現する転写因子と相互作用することによって桿体における非桿体遺伝子の発現を抑制し、桿体視細胞の適切な分化と維持に不必要な遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。従来、神経細胞の分化によるアイデンティティ形成には複数の転写因子の組み合わせによる制御によるものと考えられてきた。本研究によって、神経細胞の終末分化によるアイデンティティ形成には転写因子による制御だけでなく、エピジェネティックな制御機構も重要である可能性が示された（図 2）。今後は、*Samd7* と *Samd11* のダブル KO マウス網膜の組織、遺伝子発現、ヒストン修飾を解析し、さらにはクロマチン高次構造への影響を明らかにしていく。

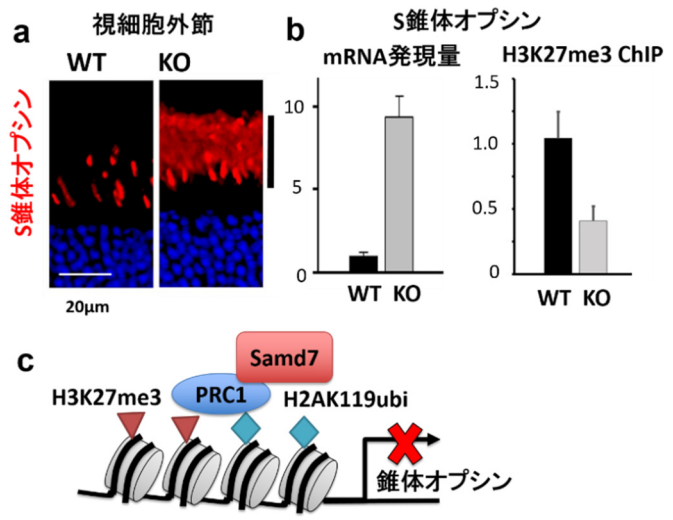


図 1. *Samd7*KO マウス網膜における S 錐体オプシンの異所性発現とヒストン修飾の制御

a) 野生型（WT）と *Samd7*KO（KO）マウスの網膜の S 錐体オプシン抗体を用いた免疫染色（赤）。細胞核を DAPI で染色している（青）。KO では桿体視細胞で異所性の S 錐体オプシンの発現が観察された。

b) WT と KO での S 錐体オプシン mRNA の quantitative RT-PCR 法による定量と ChIP 解析による H3K27me3 の定量。KO では S 錐体オプシン mRNA が著しく増加し（縦軸：WT を 1 とした比）、H3K27me3 が低下していた（縦軸：H3K27me3 抗体によってクロマチン免疫沈降された割合）。エラーバーは S.D.。mRNA および H3K27me3 ともに t 検定で WT と KO 間の差が有意であることを確認した。

c) 桿体視細胞において、Samd7 が PRC1 と複合体を作り、H3K27me3（茶三角）や H2AK119ubi（青四角）のヒストン修飾制御を介して錐体オプシンの発現を抑制しているモデル図。

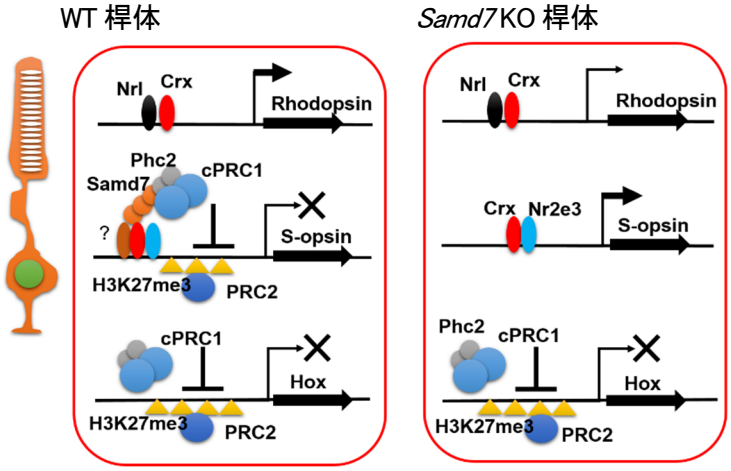


図 2. 網膜視細胞の終末分化を制御するエピジェネティック機構

左上野生型（WT）桿体視細胞においては転写因子 Nrl と Crx が協同して桿体オプシン（Rhodopsin）を転写活性化する。野生型では桿体で発現しない S 錐体オプシン遺伝子は、Crx および Nr2e3 転写因子に Samd7 が未同定の転写因子によってリクルートされ、Phc2-PRC1 複合体と結合して H3K27me3 を引き起こし、PRC2 抑制複合体とともに S 錐体オプシン遺伝子の発現を抑制する。Hox 遺伝子も PRC1、2 複合体の作用で H3K27me3 のヒストン修飾によって遺伝子発現が不活化されている。一方、*Samd7*KO では、*Samd7* の欠損により、Crx および Nr2e3 転写因子が S 錐体遺伝子を活性化し、異所性の S 錐体オプシンが発現する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学蛋白質研究所分子発生学研究室の大森義裕と久保竣である。

文　献

1） Cepko C. Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. Nat Rev Neurosci. 2014 Sep;15(9):615-27. Epub 2014 Aug 6. PMID: 25096185 DOI: 10.1038/ntn3767

2） Mo A, Luo C, Davis FP, Mukamel EA, Henry GL, Nery JR, Urich MA, Picard S, Lister R, Eddy SR, Beer MA, Ecker JR, Nathans J. Epigenomic landscapes of retinal rods and cones. Elife. 2016 Mar 7;5:e11613. PMID: 26949250 DOI: 10.7554/eLife.11613

3） Aldiri I, Xu B, Wang L, Chen X, Hiler D, Griffiths L, Valentine M, Shirinifard A, Thiagarajan S, Sablauer A, Barabas ME, Zhang J, Johnson D, Frase S, Zhou X, Easton J, Zhang J, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Dyer MA. The Dynamic Epigenetic Landscape of the Retina During Development, Reprogramming, and Tumorigenesis. Neuron. 2017 May 3;94(3):550-568.e10. PMID: 28472656 DOI: 10.1016/j.neuron.2017.04.022

4） Omori Y, Kubo S, Kon T, Furuhashi M, Narita H, Kominami T, Ueno A, Tsutsumi R, Chaya T, Yamamoto H, Suetake I, Ueno S, Koseki H, Nakagawa A, Furukawa T. Samd7 is a cell type-specific PRC1 component essential for establishing retinal rod photoreceptor identity. Proc Natil Acad Sci U S A. 2017 Sep 26;114(39):E8264-E8273. Epub 2017 Sep 12. PMID: 28900001 DOI: 10.1073/pnas.1707021114