

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：82404
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K16995
 研究課題名(和文) ヒト網膜変性原因遺伝子EYSのゼブラフィッシュモデル動物の作製と分子生理機能解析

研究課題名(英文) Generation of animal model and functional analysis of EYS, a retinitis pigmentosa-causing gene, in zebrafish

研究代表者
 瀧田 真平 (Takita, Shimpei)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部・流動研究員

研究者番号：90781261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトeyes shut homolog (EYS)遺伝子は日本人常染色体潜性網膜色素変性の約3割を占める主要原因であるが、現在治療法がない。本研究では、小型魚類の一種ゼブラフィッシュを用いて、相同遺伝子*eyes*のノックアウト個体(*eyes*^{-/-})を作製し、EYS蛋白質の分子生理機能を検討した。*eyes*^{-/-}眼球では視細胞変性が観察され、発現量が顕著に低下している遺伝子を複数同定した。また、2遺伝子性*eyes*^{+/-}; *lrp5*^{+/-}眼球では、レチノイドサイクルで重要な役割を担っているretinol binding protein 1 (*rbp1*)の発現量が顕著に低下していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトeyes shut homolog (EYS)遺伝子は、日本人常染色体潜性網膜色素変性の約3割を占める主要原因である。本研究によりゼブラフィッシュ*eyes*^{-/-}眼球で確かに視細胞変性が観察されたことから、ヒトでの遺伝子解析結果が裏付けられた。そして、ヒトとゼブラフィッシュとでEYSの転写産物を詳細に解析し主要な発現転写産物を明らかにすることで、遺伝子解析・治療、機能解析の基盤を整えた。また、これまで網膜色素上皮におけるall-trans retinolの取り込みは良く分かっていなかったが、2遺伝子性*eyes*^{+/-}; *lrp5*^{+/-}を解析することで、LRP5が関与する可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The human eyes shut homolog (EYS) gene is a major cause of retinitis pigmentosa, accounting for about 30% of all cases, in the Japanese population, however, there is currently no treatment. In this study, the grant recipient used zebrafish as an animal model by generating *eyes* knockout (*eyes*^{-/-}) and analyzing function of EYS protein. Photoreceptor degeneration was observed in the mutant and expression levels of several genes were remarkably reduced. In addition, in the digenic *eyes*^{+/-}; low-density lipoprotein (LDL)-related receptor-5 (*lrp5*)^{+/-} eye, expression level of retinol binding protein 1 (*rbp1*), the protein important for the retinoid cycle, was remarkably reduced.

研究分野：眼科学関連

キーワード：Zebrafish *eyes* *lrp5* *rbp1* *eyes*-related genes Functional analysis

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症(RP)は、脊椎動物の網膜に存在する2種類の視細胞、桿体・錐体のうち、特に桿体が退行変性していく網膜変性疾患である。ショウジョウバエの正常な眼の形成に必須な遺伝子として発見された *eyes shut (EYS)* は^{1,2}、2008年、そのヒト相同遺伝子 *eyes shut homolog (EYS)* が RP の原因遺伝子であることが初めて報告され^{3,4}、次いで2012年、日本人常染色体潜性(ar)RPの主要原因遺伝子であることが判明した^{5,6}。現在 arRP には根本的な治療法がないため、変異 EYS 蛋白質による発症機構の解明が、有効性の高い治療法確立に必須である。

EYS 遺伝子が最も一般的なモデル生物の齧歯類には存在しないこともあり、EYS 蛋白質の視細胞における機能や変異 EYS 蛋白質による RP 発症機構は良く分かっていない。これまで、直接的分化誘導によって RP 患者由来の皮膚線維芽細胞から作製した視細胞様細胞(ヒト変性視細胞モデル)^{7,8} を用いた国立障害者リハビリテーションセンター研究所・視覚機能障害研究室(以下、所属研究室)での解析により、EYS 遺伝子の異常な転写産物が視細胞変性を引き起こす可能性が見出されている。直接的分化誘導法は短期間(数日)で EYS 遺伝子を発現する視細胞様細胞を作製出来る点で優れているが、現状では視細胞の分化が不完全なため、動物モデルを用いた機能解析が必須である。

そのため、本研究は小型魚類の一種ゼブラフィッシュを用いて動物モデルを作製し、EYS 蛋白質の機能解析を行うこととした。*eyes* 遺伝子は齧歯類には存在していないが、多くの動物種では保存されている。ゼブラフィッシュにも *eyes* 遺伝子が存在しており、成魚眼球に発現している。加えてゼブラフィッシュにはモデル生物として次のような利点がある。(i) 全ゲノムが決定され、ヒトの相同遺伝子が71.4%と非常に多く存在する⁹。(ii) ヒトと網膜・眼の構造が類似しており¹⁰、ヒト網膜変性原因遺伝子の相同遺伝子の変異により、ヒト同様網膜変性になる事例が多数ある¹¹。EYS 蛋白質についてもドメイン構造を SMART⁴ によって予測したところ、EGF ドメインや Laminin G ドメインが存在し、それらの並び方も類似しているため、視細胞での機能も両種間で良く保存されていると予測される。(iii) 任意の標的遺伝子に対してノックアウト・ノックインが可能^{12,13}。(iv) 他の網膜変性原因遺伝子で、内在性蛋白質の発現を阻害し、そこにヒト相同蛋白質を強制発現させると表現型が回復する^{14,15}。(v) 化学変異原による突然変異体が大規模に提供されており¹⁶、相互作用相手など EYS 蛋白質に関係する蛋白質があった場合、ノックアウトゼブラフィッシュを得やすい。(vi) 大量飼育、繁殖が容易である。

以上を勘案すると、本研究により日本人の主要なタイプの arRP に対応した動物モデルを用いる研究方法が確立出来れば、arRP 研究のブレークスルーとなり、arRP の病態研究とそれに基づいた治療法の開発に大きく寄与すると期待される。

2. 研究の目的

EYS 蛋白質の分子生理機能と、変異 EYS 蛋白質による arRP 発症機構を解析する。

3. 研究の方法

EYS 転写産物解析

ヒト EYS 遺伝子は、5'側の領域の解析から、これまで網膜特異的に発現していると考えられてきた。一方、所属研究室では、2番目に頻度の高い変異箇所 M2 の解析過程において、3'側が皮膚線維芽細胞にも発現していることを見出していた。そこで、本研究では、ヒト視細胞と皮膚線維芽細胞に発現している EYS 転写産物を詳細に比較し、また、ヒトとゼブラフィッシュ視細胞に発現する EYS と *eyes* 転写産物を詳細に比較することで、視細胞に発現する EYS の特徴を明らかにすることにした。ヒトでは、視細胞として Y79 網膜芽腫細胞、皮膚線維芽細胞として HDF-a 細胞を用い、ゼブラフィッシュでは、視細胞の代替として眼球を用いた。そして、各サンプルについて RACE, CAGE, RNA-seq, RT-PCR によって発現している EYS ないし *eyes* 転写産物を詳細に検討した。

ゼブラフィッシュを用いた *eyes*^{-/-} および *eyes*^{+/-}; *lrp5*^{+/-} 動物モデルの作製と機能解析

ゲノム編集の1つである CRISPR/Cas9 システムを用いて、*eyes* ノックアウト(*eyes*^{-/-})ゼブラフィッシュを作製することにした。翻訳開始点直後の配列を標的として gRNA を設計し、Cas9 と複合体 (ctRNP) を形成させ、受精卵に微量注入した。そのうちの一部を用いて標的配列をゲノム PCR で増幅後、heteroduplex mobility assay により変異の導入を確認した。次に、残り(F₀世代)を成魚まで育て、野生型とかけ合わせて次の世代(F₁世代)を得て、変異が生殖系列移行により世代間で伝わることを確認した。その後変異体同士をかけ合わせ、*eyes*^{-/-}ゼブラフィッシュを作製した。

その間、*eyes* の C 末端側にナンセンス変異によりストップコドンが生じ、不完全な蛋白質が発現する変異体が Zebrafish International Resource Center (ZIRC) に存在することが分かっていたので、これを取り寄せた。そして、*eyes*^{-/-}眼球を用いて、視細胞変性の指標として視細胞層の厚さを野生型と比較し、また、網膜における細胞死を TUNEL 法により検討した。さらに microarray による網羅的遺伝子発現解析を行い、どのような遺伝子が

影響を受けているか、また、その因果関係を検討した。

次に、ヒトにおいて *EYS* と *low-density lipoprotein (LDL)-related receptor-5 (LRP5)* 遺伝子について、*EYS*^{+/-}; *LRP5*^{+/-} が RP を発症(すなわち両者が相互作用)する可能性を示す症例報告があったので¹⁷、ZIRC から、*lrp5* の N 末側にそれぞれナンセンス変異によりストップコドンが生じ、不完全な蛋白質が発現する変異体を取り寄せた。そして、これを *ey*s の C 末端側にストップコドン変異のある *ey*s^{+/-} ゼブラフィッシュとかけ合わせて *ey*s^{+/-}; *lrp5*^{+/-} ゼブラフィッシュを作製した。

次に、作製した *ey*s^{+/-}; *lrp5*^{+/-} 眼球を用いて、視細胞変性の指標として視細胞層の厚さを野生型と比較し、また、網膜における細胞死を TUNEL 法により検討した。そして microarray による網羅的遺伝子発現解析を行ってどのような遺伝子が影響を受けているか検討し、さらに、その因果関係を検討した。

ゼブラフィッシュ眼球における *prom1* 相同遺伝子と *ey*s との遺伝的相互作用の可能性の検討

ショウジョウバエにおいて、*ey*s が *prominin-1 (prom1)* とネガティブタイプの遺伝的相互作用をする可能性が示されていたため^{18,19}、ゼブラフィッシュ相同遺伝子 *prom1a* および *prom1b* が *ey*s と遺伝的相互作用をする可能性について検討することにした。*prom1a* については *ey*s と同様 CRISPR/Cas9 システムを用いて、*prom1b* については ZIRC から N 末側にストップコドン変異のある変異体を取り寄せ、これらをかけ合わせて *prom1a*^{-/-}; *prom1b*^{-/-} ゼブラフィッシュを作製した。

次に、*ey*s^{-/-} 眼球と *prom1a*^{-/-}; *prom1b*^{-/-} 眼球を用いて、*ey*s と *prom1a*, *prom1b* の発現量を野生型の眼球と比較した。

4. 研究成果

EYS 転写産物解析

転写開始点を示す TSS cluster が、ヒト Y79 細胞では exon 1, 2 付近に存在し、HDF-a 細胞では exon 37 上に存在した(図 1a, 1b)。また、ゼブラフィッシュ眼球では exon 1 上に存在した。これにより、*EYS* および *ey*s 遺伝子は前方の領域(5'側)が眼球に特異的である、という機能的示唆が得られた。また、ゼブラフィッシュ眼球では選択的スプライシングにより、N 末側の EGF ドメインのみからなるバリエーションが存在することが判明した。このことから、推定 *EYS* 蛋白質のドメイン構造とバリエーションがヒトとゼブラフィッシュとで良く保存されていることが明らかとなり、*EYS* 研究をゼブラフィッシュで行うことは有望であることが示唆された。また、*EYS* および *ey*s 遺伝子は選択的スプライシングを受けやすいことも判明した。得られた結果は論文としてまとめて、The FASEB Journal に発表した²⁰。

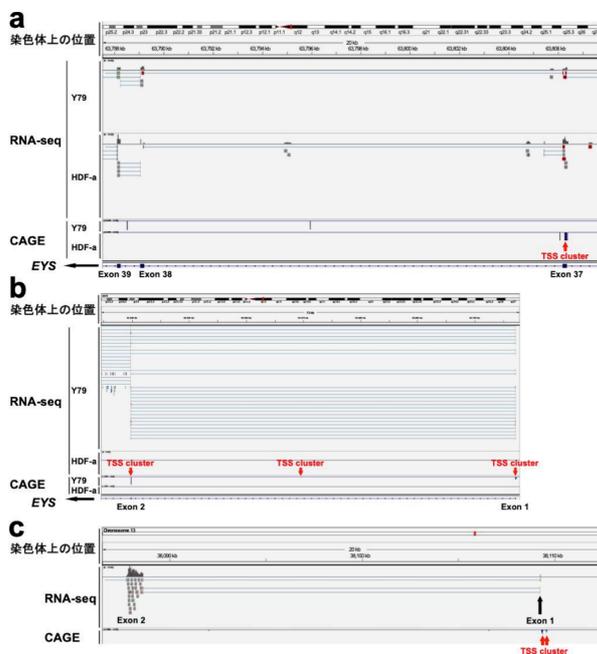


図 1. *EYS* (*ey*s) の転写開始点(TSS)の解析。CAGE や RNA-seq から、ヒト皮膚線維芽細胞では exon 37 に(a, 矢印)、Y79 細胞やゼブラフィッシュ眼球では主に exon 1 付近に TSS が存在した(b, c 矢印)。

*ey*s^{-/-} および *ey*s^{+/-}; *lrp5*^{+/-} ゼブラフィッシュの作製と機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて、N 末側を標的とする *ey*s^{-/-} ゼブラフィッシュの作製に成功した。また、C 末端側にストップコドン変異のある *ey*s^{+/-} ゼブラフィッシュ眼球で視細胞層の厚さを測定したところ、野生型に比べて約 75% に減少しており、網膜において細胞死が観察された。さらに、この系統を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、発現量が顕著に低下している遺伝子を複数同定した。

*ey*s^{+/-}; *lrp5*^{+/-} 眼球においても、視細胞層の厚さがマイルドではあるものの野生型に比べて約 90% に減少しており、細胞死が観察された。また、網羅的遺伝子発現解析から、ビジュアル(レチノイド)サイクルにおいて網膜色素上皮で *all-trans retinol* の輸送を行っている *retinol binding protein 1 (rbp1)* 遺伝子の発現量が顕著に低下していることを見出した(図 2)。

次にその因果関係を検討するため抗ゼブラフィッシュ RBP1, LRP5 抗体を作製し、成魚眼球を用いて両蛋白質の局在を検討した。その結果、両者が網膜色素上皮(RPE)細胞の

microvilli で共局在していることが判明した。そこで、両蛋白質が直接結合するかどうか、赤色蛍光蛋白質 mCherry との融合蛋白質として発現させた LRP5 の C 末端側の細胞内領域を beads に固定しておき、そこに緑色蛋白質 EGFP との融合蛋白質として発現・精製した全長 RBP1 を *in vitro* 下で加えることで結合を検討した。その結果、beads 上で mCherry に加えて EGFP のシグナルが観察され、RBP1 と LRP5 とが直接結合することが明らかになった。

さらに、*rbpl*^{-/-} 眼球において *eyes* および *lrp5* の発現量を qPCR により検証した。その結果、いずれの遺伝子についても顕著な発現量の変動は認められなかった。一方、*lrp5*^{-/-} 眼球で *rbpl* の発現量は約 10% と顕著に低下していた(図 2)。これにより、遺伝的に *rbpl* が *lrp5* の下流に存在することが明らかになった。

以上、*eyes*^{+/-}; *lrp5*^{+/-} ゼブラフィッシュを詳細に解析した結果、LRP5 蛋白質が RPE の microvilli で all-trans retinol の取り込みに関与する受容体であることが強く示唆された。

得られた結果は論文としてまとめて、2020 年 7 月現在投稿中である²¹。

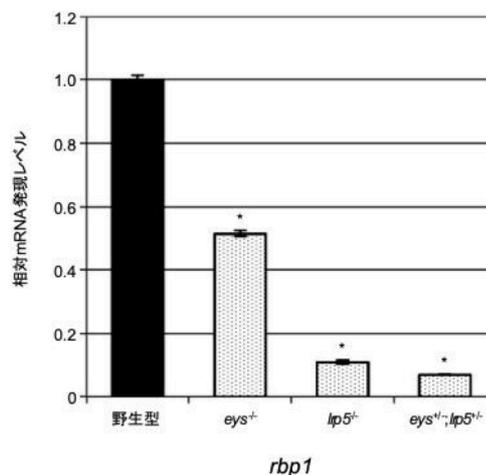


図 2. qPCR による *rbpl* の発現比較。*eyes*^{+/-}; *lrp5*^{+/-} では *rbpl* の発現量が顕著に低下していた。

prom1 相同遺伝子と eyes との遺伝的相互作用の可能性の検討

eyes^{-/-} 眼球において *prom1a*, *prom1b* の発現量は、野生型の眼球と変わらなかった。*prom1a*^{-/-}; *prom1b*^{-/-} 眼球において *eyes* の発現量は、野生型の眼球よりも少し上昇していたが、顕著に低下していることはなかった。以上により、ゼブラフィッシュ眼球において、*eyes* と *prom1a*, *prom1b* とがネガティブタイプの遺伝的相互作用をする可能性は低いことが示唆された²¹。異なる位置に変異の入った系統を用いるか、もしくは精製した視細胞を用いる必要がある可能性については、今後の検討課題と考えられる。一方で、より直接的には、両蛋白質の直接的結合を検討することが望ましいと考えられる。

引用文献

- Husain *et al.*, *Dev. Cell* 11: 483-493 (2006).
- Zelhof *et al.*, *Nature* 443: 696-699 (2006).
- Abd El-Aziz *et al.*, *Nat. Genet.* 40: 1285-1287 (2008).
- Collin *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 83: 594-603 (2008).
- Iwanami *et al.*, *IOVS* 53: 1033-1040 (2012).
- Hosono *et al.*, *PLoS One* 7: e31306 (2012).
- Seko *et al.*, *PLoS One* 7: e35611 (2012).
- Seko *et al.*, *Genes Cells* 19: 198-208 (2014).
- Howe *et al.*, *Nature* 496: 498-503 (2013).
- Chhetri *et al.*, *Eye* 28: 367-380 (2014).
- Gestri *et al.*, *Dev. Neurobiol.* 72: 302-327 (2012).
- Auer *et al.*, *Genome Res.* 24: 142-153 (2014).
- Hwang *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 31: 227-229 (2013).
- Khanna *et al.*, *Nat. Genet.* 41: 739-745 (2009).
- Murga-Zamalloa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 286: 28276-28286 (2011).
- Kettleborough *et al.*, *Nature* 496: 494-497 (2013).
- Gao *et al.*, *Int. J. Ophthalmol.* 10: 325-328 (2017).
- Nie *et al.*, *Dev. Biol.* 371: 312-320 (2012).
- Gurudev *et al.*, *Biol Open* 3: 332-341 (2014).
- Takita *et al.*, *FASEB J.* 33, 9422-9433 (2019).
- Takita and Seko, Under Review.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimpei Takita, Kiyoko Miyamoto-Matsui, Yuko Seko	4. 巻 33
2. 論文標題 Intra- and interspecies comparison of EYS transcripts highlights its characteristics in the eye	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 9422-9433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201900056RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Seko, Masaki Iwanami, Kiyoko Miyamoto-Matsui, Shimpei Takita, Noriyuki Aoi, Akihiro Umezawa, Seishi Kato	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 The manner of decay of genetically defective EYS gene transcripts in photoreceptor-directed fibroblasts derived from retinitis pigmentosa patients depends on the type of mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-018-1016-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shimpei Takita, Yuko Seko
2. 発表標題 Remarkable decrease of rbp1 expression as hallmark of zebrafish eye with digenic eys+/-; lrp5+/- retinitis pigmentosa-candidate mutations.
3. 学会等名 2019 ARVO Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧田真平、世古裕子
2. 発表標題 2遺伝子性eys+/-; lrp5+/-ゼブラフィッシュ眼球の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第11回 Retina Research Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimpei Takita, Yuko Seko
2. 発表標題 Global gene expression analysis of zebrafish eye with digenic eys+/-; lrp5+/- retinitis pigmentosa-candidate mutations.
3. 学会等名 XXIII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimpei Takita, Kiyoko Miyamoto-Matsui, Yuko Seko
2. 発表標題 Insights into EYS protein function(s) by deciphering the novel transcripts expressed in human dermal fibroblasts and zebrafish eye.
3. 学会等名 2018 ARVO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧田真平、宮本-松井潔子、世古裕子
2. 発表標題 種内および種間での転写産物比較により明らかになる眼球に発現するEYSの特徴
3. 学会等名 第39回比較眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧田真平、宮本-松井潔子、世古裕子
2. 発表標題 Intra- and interspecies comparison of EYS transcripts highlights its characteristics in the eye.
3. 学会等名 第21回日本進化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimpei Takita, Yuko Seko
2. 発表標題 rbp1 gene plays a role downstream of lrp5 gene in the zebrafish eye.
3. 学会等名 2020 ARVO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧田真平、宮本-松井潔子、世古裕子
2. 発表標題 ヒト・ゼブラフィッシュを用いた転写産物比較により明らかになった眼球におけるEYSの特徴
3. 学会等名 第12回 Retina Research Meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考