

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04695

研究課題名(和文) 網膜をモデル系としたヒストンメチル化による細胞系列特異的分化、維持機構の研究

研究課題名(英文) Roles of Histone methylation in retinal differentiation and maintenance

研究代表者

渡邊 すみ子 (Watanabe, Sumiko)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60240735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Ezh2ノックアウト網膜は視細胞のみならず、他の神経細胞、グリア細胞も前倒しになっており、脱メチル化の意義はむしろ網膜の発生タイミングの制御にあることが示唆された。H3K27アセチレーションとH3K27me3の拮抗作用は観察されなかったが、ヒストンH3の別の位置のリジンのメチル化修飾に関する酵素の網膜特異的ノックアウトマウスでは視細胞分化に異常があった。このメチル化の標的遺伝子座の一部はH3K27のメチル化を強く受ける遺伝子座で、H3K27のメチル化とこのメチル化の何らかの同期した作用という全く新しいメカニズムの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ezh2 knockout mice retinas showed delay of development of not only photoreceptors, but also other neurons and glias. Therefore, roles of histone H3K27 methylation was suggested to be regulation of timing of cells differentiation. We found histone H3 lysine other than K27 was also involved in retinal development. ChIP-seq showed that the gene loci, which are highly modified this methylation, was also methylated in histone H3K27, suggesting new mechanisms that co-operated regulation of transcription by these two methylations.

研究分野：発生生物学

キーワード：網膜 エピジェネティクス ヒストンメチル化 発生 マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜は 6 種類に大別される神経細胞とグリア細胞で構成され、発生過程の時間軸に従って、各細胞系列が逐次的に共通のプロジェニター細胞から分化をとげる。神経細胞は網膜の約 80%をしめる視細胞、数種類の介在神経細胞、脳へ投射する神経節細胞により構成される。加齢性黄斑変性、網膜色素変性症など有効な治療法のない失明にいたる疾患の多くは、視細胞変性が失明原因であるため、視細胞の再生の実現は急務であり、その分化や維持の分子機構の解明は重要な課題である。これまで視細胞を中心に転写因子のカスケードについて米国を中心に多数の仕事が報告された。細胞分化、細胞形質の維持は転写因子ネットワークに加え、ホストの「場」すなわちコンピタンスが重要であると考えられる。我々は、「場」による特定の細胞系列分化決定とその維持の分子機構にヒストンメチル化の役割を仮定し研究を進めてきた。

(2) 我々は中でも転写に抑制的に作用する H3K27me3 に注目し、メチル化酵素 Ezh2、脱メチル化酵素 Jmjd3 が発生期網膜にそれぞれ特異的なパターンで発現している事をみだし、この二つの酵素の、網膜特異的のノックアウトマウスの解析、網膜器官培養における sh-RNA による発現抑制、過剰発現の一連の実験を行い、H3K27me3 修飾の網膜細胞の増殖・分化への影響を検討した。その結果、H3K27me3 修飾が、網膜介在神経の一種である双極細胞の中の二つのサブタイプの成熟に必須である事を明らかにした。

(3) 一方で Ezh2 は発生初期の網膜全体に発現し、双極細胞分化関連の遺伝子座で H3K27 のメチル化を担うのに対し、脱メチル化酵素 Jmjd3 は介在神経の存在する中間顆粒層のみに生後マウスの網膜で発現していた。この Jmjd3 の網膜発生における時空的に特異的な発現により双極細胞分化に必須の転写因子、Bhlhb4, Vsx1 の遺伝子座における H3K27me3 の脱メチル化が特定の双極細胞系列前駆細胞で起こり、分化が誘導される事が明らかになった。

(4) この研究の過程で、発生期網膜で、介在神経分化にかかわる多くの遺伝子座で H3K27me3 修飾をつけているにもかかわらず、視細胞関連の遺伝子座はほとんど H3K27me3 修飾が観察されていない事を見いだした。このことから視細胞あるいは介在神経系列特異的なヒストンメチル化による細胞分化、あるいは維持の機構があることが予測された。

(5) そこで視細胞系列とその他の網膜細胞の遺伝子発現、H3K4me3, H3K27me3 修飾の発生過程の時間軸をおった変化の検討を行った。視細胞にコミットした前駆細胞から成熟視

細胞まで特異的に発現している Cd73 を用いて、様々な発生過程のマウス網膜を、視細胞系列とその他の細胞系列に分離・純化し、RNAseq, H3K4me3-, H3K27me3-ChIP-seq をおこなった。その結果、視細胞と他の細胞系列、視細胞関連遺伝子の領域と、他の細胞系列の分化にかかわる遺伝子の領域で H3K4me3, K27me3 パターンにユニークな次のような違いがあることを見いだした：

* H3K4me3 修飾は、視細胞特異的の遺伝子座において、視細胞特異的にはいつている。

* H3K27me3 修飾は、視細胞において介在神経・神経節細胞関連の多数の遺伝子座にはいつている。しかし視細胞以外の細胞系列では H3K27me3 レベルは低い。

* 視細胞関連の遺伝子座では、視細胞、その他の細胞を通じて H3K27me3 修飾は低レベルである。

(5) 以上の結果は、視細胞関連遺伝子の視細胞特異的の遺伝子発現に H3K4me3 がかわっている可能性を示唆し、さらに、視細胞では、他の細胞系列の分化にかかわる遺伝子発現を H3K27me3 修飾により抑制している事が示唆された。しかし視細胞関連遺伝子座には他系列の細胞において H3K27me3 がいつていないことから、この機構は視細胞の分化、維持に特異的なメカニズムであることを示唆していた。

2. 研究の目的

本研究提案ではこの仮説にもとづき、細胞系列特異的なヒストンメチル化による視細胞系列分化、その維持機構の分子メカニズムについて明らかにすることを目的とした。このため、以下の課題を設定し、解析を行った。(1) H3K4me3 が視細胞関連遺伝子座に特異的にはいる機構と視細胞関連遺伝子転写制御への役割。

(2) 介在神経・神経節細胞関連遺伝子座領域特異的に、視細胞系列で H3K27me3 がはいるメカニズムの解明。

(3) 視細胞発現遺伝子の loci において、細胞系列を問わず、H3K27me3 修飾がはいる機構の解明。

(4) 他の細胞系列の遺伝子の発現を抑制することが視細胞系列維持につながるメカニズムの検討。

3. 研究の方法

(1) H3K27 アセチレーションと H3K27me3 の拮抗作用を仮定し、網膜内での H3K27 のアセチレーションパターンを明らかにし、その H3K27me3 パターン形成への役割を検討する。(2) 網膜視細胞の発生軸における H3K4me3, H3K27 アセチレーション修飾に関連する酵素群の発現状態の時空的遷移について、視細胞・それ以外の細胞系列に純化した細胞を用いて我々が行った RNA-seq データを用いて検

討し、視細胞関連遺伝子座の H3K4me3, H3K27me3 パターンとの比較から、この修飾に関与する可能性のある酵素を推測する。

(3)これらの酵素について、sh-RNA および過剰発現プラスミドを作成し、単独、複数で網膜に発現させ、網膜分化、遺伝子発現、ヒストン修飾への影響を検討する。

(4)上記の実験により、網膜分化、維持にかかわりがあると予測される修飾酵素について会合分子を MS を用いて同定をこころみる。この分子について、shRNA、ノックアウトマウス、過剰発現により網膜分化、細胞系列維持をおもな指標に機能解析を行う。

(5)視細胞発生後期以降で Jmjd3 を過剰発現し視細胞が維持されるか、細胞死等がおこる場合その分子機構を検討する。

4. 研究成果

(1)H3K27 アセチレーションと H3K27me3 の拮抗作用の可能性を検討するため、網膜内での H3K27 のアセチレーションパターンを ChIP-qPCR により解析したが、H3K27me3 レベルを変化させた時に、アセチレーションのレベルが変化するという結果を得ることはできなかった。ChIP-qPCR であるため、限られた遺伝子座の解析ではあったが、H3K27 メチル化を受け、かつ網膜発生に重要であると思われる主要な遺伝子座については、両者の関連を見出すことはできなかったため仮説から外れた。

(2)細胞以外の細胞系列の遺伝子発現を視細胞においてヒストン H3K27 メチル化により抑制しておくことの網膜発生における意義をより詳しく検討した。Ezh2 ノックアウト網膜のフェノタイプについてタイムコースを詳しくとり検討を行った結果、網膜発生が視細胞のみならず、他の神経細胞、グリア細胞ともに前倒しになっていることが明らかになった。脱メチル化の意義はむしろ網膜の段階的なタイミングの制御にあることが示唆され次の研究へと発展する手がかりとなった。

(3) ヒストン H3K27 トリメチル化の脱メチル化の役割をより詳細に検討するため、Ezh2 のホモログである Ezh1 について検討した。Ezh1 の sh-RNA を通常マウスの網膜、あるいは Ezh2-CKO の網膜に発現させ、視細胞維持への影響、関連遺伝子座のメチル化への影響を検討したが、Ezh2 単独のノックアウトと比較してあまりフェノタイプの変化は観察されず、網膜発生においては Ezh2 が主要な役割を果たしていることが示唆された。一方、Ezh2 ノックアウト、Jmjd3 ノックアウトを行った網膜で、発生中どの遺伝子発現が脱抑制、抑制をうけているのか RNAseq により検討し、バイオインフォマティクス的手法により、標的となる遺伝子の絞り込みを行った。この時に、細胞系列特異的な遺伝子リスト、遺伝子機能

による遺伝子のグルーピングの情報を盛り込むことにより、特定の細胞系列、あるいは機能を持つ遺伝子への影響が観察され、一群の遺伝子のヒストンメチル化をどのように制御するのか、という分子基盤の研究としての発展が期待された。

(4)会合分子の解析は共沈実験を様々な方法で試みたが、MS 解析に至るような特異的なバンドが確認されず今後の課題として継続して検討することとなった。

(5)ヒストン H3K27 脱メチル化酵素 Jmjd3 過剰発現による検討：H3K27me3 脱メチル化酵素である Jmjd3 を視細胞で過剰発現させたときの影響を網膜エクスプランと培養で検討したが、Jmjd3 のノックアウトの時にフェノタイプが観察された双極細胞を含め発生時間、形態ともに顕著な影響は見出されなかった。

(6)研究の過程で、ヒストン H3 の別の位置のリジンのメチル化の網膜発生における役割について示唆するデータを得たためより深く検討を行った。この修飾に関与する酵素の網膜特異的ノックアウトマウスを作成し、このマウスが網膜発生中に視細胞分化に異常があることが明らかになった。メチル化の異常により遺伝子発現の異常が観察されるのかどうかについて、網膜特異的遺伝子について発現パターンを qPCR でコントロールと比較したところ、網膜発生に関わる複数の転写因子について発現パターン異常が観察された。同時に、これらの遺伝子の遺伝子座においてこのヒストンリジンのトリメチル、ダイメチルの修飾レベルの変動が観察されることが ChIP-qPCR で明らかになった。特に一部の遺伝子座は H3K27 のメチル化を強く受ける遺伝子座で、H3K27 のメチル化とこのメチル化の何らかの同期した作用という全く新しいメカニズムの可能性が示唆され、さらに発展させたプロジェクトを組んで検討を加えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Ueno, K., Iwagawa, T., Ochiai, G., Koso, H., Nakauchi, H., Nagasaki, M., Suzuki, Y., Watanabe, S. (2017) Analysis of Muller glia specific genes and their histone modifications using Hes1-promoter driven EGFP expressing mouse. *Sci Rep*, 7, 3578

Suzuki-Kerr, H., Baba, Y., Tshako, A., Koso, H., Dekker, J. D., Tucker, H. O., Kuribayashi, H., Watanabe, S. (2017) Forkhead box protein P1 is dispensable for retina but essential for lens development.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 158,
1916-1929

Kuribayashi, H., Tshako, A., Kikuchi, M.,
Yoshida, N., Koso, H., Watanabe, S. (2016)
Role of transcription factor Tgif2 in
photoreceptor differentiation in the
mouse retina. **Exp. Eye Res.** 152, 34-42

Ueno, K., Iwagawa, T., Kuribayashi, H.,
Baba, Y., Nakauchi, H, Murakami, A.,
Nagasaki, M., Suzuki, Y., Watanabe, S.
(2016) Transition of differential histone
H3 methylation in photoreceptors and other
retinal cells during retinal
differentiation, **Sci Rep**, 6, 29264

Watanabe, S., Murakami A. (2016)
Regulation of retinal development via the
epigenetic modification of histone H3. **Adv
Exp Med Biol.** 2016;854:635-641

〔学会発表〕(計 3件)

渡邊すみ子、視細胞変性の分子基盤の解明を
目指して、蛋白研セミナー「網膜感覚研究の
フロンティア」招待講演、千里ライフセンタ
ー、大阪、2018 Jan 19

渡邊すみ子「網膜の発生と維持に関わるヒス
トンメチル化の役割」招待講演、筑波大学
TBSA セミナー(つくばブレインサイエンス協
会、第237回つくばブレインサイエンス・
セミナー、2017 Oct 24

Watanabe, Sumiko, Retinal Cell lineage
specific modification of Histone H3 during
retinal development, symposium "Retinal
Neuroscience and Development" (RND),
International Society of Eye Research
(ISER),2016, June 1

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
渡邊 すみ子(WATANABE, Sumiko)
東京大学・医科学研究所・特任教授
研究者番号：60240735