

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03420

研究課題名(和文) 網膜の細胞分化におけるエピジェネティック因子による制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of epigenetic factors in retinal cell differentiation

研究代表者

大森 義裕 (Omori, Yoshihiro)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90469651

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)：私たちの眼球に入射した映像は、まず網膜の神経回路により受容、処理される。この網膜神経回路を構成するニューロンとグリアはサブタイプを含めると約70種類以上に及ぶ。また、網膜視細胞にはシナプスや繊毛が発達し、視覚情報の取得に重要な役割を果たしている。近年、網膜において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、クロマチン状態の変化を伴うことが解明されつつあるが、その制御因子やメカニズムの実体の解明は進んでいない。本課題では脊椎動物モデルを用いて網膜におけるエピジェネティック制御機構の解析を行い、中枢神経の発生と機能に重要なメカニズムの解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異体キنگョやゲノム編集による遺伝子改変ゼブラフィッシュや遺伝子改変マウスなどの脊椎動物モデルを用いて、網膜の細胞分化におけるエピジェネティック因子による制御機構の解析を行うことで、脊椎動物における網膜の発生と維持の分子メカニズムの解明に繋げることができる。これらの研究から得られた脊椎動物の網膜における生物学的な知見により発生や進化などの基礎生物学的な理解の蓄積に繋がる。これらの基礎生物学的な知識は、基礎医学の分野でも重要であり、眼科領域疾患の治療法や診断法の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Images that we observed using the eyes are first received and processed by neural circuits in the retina. There are more than 70 types of neurons and glia in the retinal neural circuit. In addition, retinal photoreceptor cells have well-developed synapses and cilia, which play an important role in the acquisition of visual information. Recently, a comprehensive analysis of epigenomic changes in the retina has revealed that the process of establishing retinal cell diversity is accompanied by changes in chromatin state, however the regulatory mechanisms have not been elucidated yet. We analyze the epigenetic control mechanisms in the retina using vertebrate models. We will elucidate the mechanisms important for the development and function of the central nervous system.

研究分野：基礎医学、発生生物学、ゲノム科学

キーワード：網膜 脊椎動物 ゲノム進化

## 1. 研究開始当初の背景

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。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を獲得することは、正常な視覚機能に必須である(Nature Reviews Neurosci 2014;15:615)。

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(eLife 2016;5:e11613, Neuron 2017;94:550)。一方で、その制御因子やメカニズムの実体の解明は進んでいない。

私たちは、これまでにマイクロアレイを用いた発現解析から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てきた(Omori et al., PLOS One 2011)。この解析からエピジェネティック制御と関係の深いBlimp1やMef2dが網膜視細胞の発生をコントロールすることを見出してきた(Kato, Omori et al., J Neurosci 2010; Omori et al., GTC 2015)。最近、このスクリーニングからヒストンH3K27メチル化を制御するポリコーン複合体1(PCR1)の構成因子PhcのSAMドメインと高いホモロジーを持ち視細胞特異的に発現する機能未知蛋白質Samd7を見出した。PCR1はヒストンH2AK119ユビキチン化やクロマチン凝集を制御したり、ヒストンH3K27メチル化を触媒するPCR2と連携することで生体のエピジェネティック制御の中心的な役割のひとつを担っている。私たちは、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することを見出した(Omori et al., PNAS 2017)。Samd7がPCR1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(Omori et al., PNAS 2017)。この発見により、SAMドメイン蛋白質の一群がPCR1を制御することでクロマチン構造を変化させる新たなモデルが提唱された。

## 2. 研究の目的

網膜は視覚を司る神経組織であるが、その1細胞レベルでの遺伝子発現の詳細やエピジェネティックな遺伝子制御による遺伝子発現変化のメカニズムは十分に明らかになっていない。また、網膜色素変性症は根本的な治療法が確立していない難病であり、その発症メカニズムや診断法、治療法の確立が望まれている。本研究では、マウスやゼブラフィッシュ、キンギョなどの脊椎動物モデルを用いて数十種類の神経細胞を含む複雑な神経組織である網膜におけるエピジェネティック因子による発生と維持・再生の制御メカニズムを解明することを目的とする。これらのメカニズムを解明することで、基礎生物学的な知見を得るだけでなく、網膜色素変性症を含む網膜関連疾患の発症メカニズムを解明するとともに眼科関連疾患を含む基礎医学的な知見の蓄積に貢献することが予想される。本研究から得られた知見により、眼科関連疾患の治療法や診断法の確立に貢献することが期待される。

### 3 . 研究の方法

網膜の解析には、通常の凍結組織切片の作製後、免疫蛍光染色法などを用いて組織の染色を行った。染色後の組織は、コンフォーカル顕微鏡などを用いて画像を取得する。一方、ゲノム編集には合成 gRNA を用いたインジェクション法を確立した。キンギョやゼブラフィッシュの受精卵にデザインした gRNA のインジェクションを行い、ゲノム編集が行われていることをサンガー法によるシーケンスで確認した。シングルセル解析には、網膜組織からプロテアーゼにより細胞の分散を行い、シングルセルの状態ライブラリの作製を行った。Illumina 社のショートリード DNA シーケンサーなどを用いて次世代 DNA シーケンサー解析を行い FASTQ ファイルを得た。RNA-seq ( RNA Sequencing ) 解析と ATAC-seq ( Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing ) 解析は 10xGenomics のシステムを用い Seurat のプラットフォームを使ってインフォマティクスの解析を行った。これらの NGS データは公共データベースに登録を行った。

### 4 . 研究成果

本研究では、まず、新規な脊椎動物モデルであるキンギョを用いて、次世代 DNA シーケンサーを用いたシングルセルレベルでの網膜における遺伝子発現解析とエピジェネティック解析を行う実験系の確立を行った。キンギョから網膜を単離し、状態のよいシングルセルを単離する手法の確立を行った。プロテアーゼ処理の条件を工夫することで、シングルセル解析に十分な細胞を精製することに成功した。この手法によって得られた細胞からシングルセル解析を行うためのライブラリを構築し、次世代シーケンサーを使ってパイロットシーケンスを行った。その結果、細胞集団のクラスターを複数確認し、本手法が有効であることが証明された。シングルセル解析と並行して野生型網膜と病変網膜組織を用いたバルク RNA-seq を行いトランスクリプトームの比較を行った ( Kon et al., Current Biology 2020 )。バルク RNA-seq の結果とシングルセル解析で行った結果を比較すると、予想通りシングルセル解析の結果がバルク RNAseq の結果の総和となっていることがわかり、手法の正確性が確認された。また、トランスクリプトーム情報にエピジェネティックな情報をリンクさせる目的でシングルセル ATAC-seq 解析を行った。また、これまでに得られたシングルセル RNA-seq のデータと、バルク RNA-seq のデータ、ATACs-eq のデータを統合して正常網膜における細胞の遺伝子発現とエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の wet 解析および dry 解析を実施した。シングルセル解析の手法を用いて解析を行う個体数を増やし網膜細胞のデータを取得し詳細な解析を行った。網膜変性を示す動物系統にも同手法を適用し、シングルセル解析を複数個体行った。一方、マウスを用いて網膜分化と維持に關与する転写因子の機能解析を行い、網膜細胞の分化と成熟に重要なメカニズムを明らかにした ( Kubo et al., Scientific Reports 2021, Yamamoto et al., Cell Reports 2020 )。また、網膜におけるシングルセル RNA-seq 解析の詳細な情報処理を 10x Genomics の Seurat のプラットフォームを用いて、脊椎動物モデルの野生型と変異型の網膜における細胞種を高精度で分離することに成功した。さらにエピジェネティックな理解を深めるために行ったシングルセル ATAC-seq 解析でもプロテアーゼによる網膜細胞の処理条件を工夫することで細胞種の同定に成功した。情報解析では、網膜におけるシングルセル ATAC-seq で得られたピークのシグナルの定量化を行い、シングルセル発現解析のデータと照合したところ、多くの細胞種で特異的な遺伝子の発現パターンと ATAC-seq のゲノム上のピークが強く関連することを示唆する結果を得ることができた。Seurat のパイプラインを用いてデータベース上に登録されている別のモデル生物の網膜におけるシングルセル解析の結果と比較し、今回発見した細胞種群との対比をおこなった。新たなサブタイプの細胞種が同定され、網膜の細胞種の多様性が明らかとなった。これらのデータを統合して網膜におけるシン

グルセルレベルでのトランスクリプトームのエピジェネティックな制御機構が明らかになった。これらのデータをまとめ、学会で発表を行った（2021 年度、日本分子生物学会大会、ワークショップ）。また、論文の作成を行い専門科学雑誌に投稿を行い現在査読中である。これらのデータから得られた情報をもとにさらなる情報解析をすすめている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kon Tetsuo, Pei Liyi, Ichikawa Ryota, Chen Chunyan, Wang Ping, Takemura Ikuyo, Ye Yingying, Yan Xiaojun, Guo Baoying, Li Weiye, Lauden Hagai Nsobi, Tabata Hiromasa, Pan Hao, Omori Yoshihiro, Ogura Atsushi, Jiang Lihua	4. 巻 11
2. 論文標題 Whole-genome resequencing of large yellow croaker ( <i>Larimichthys crocea</i> ) reveals the population structure and signatures of environmental adaptation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90645-1	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 該当する
1. 著者名 Jiang Lihua, Kon Tetsuo, Chen Chunyan, Ichikawa Ryota, Zheng Qiyuan, Pei Liyi, Takemura Ikuyo, Nsobi Lauden Hagai, Tabata Hiromasa, Pan Hao, Omori Yoshihiro, Ogura Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Whole-genome sequencing of endangered Zhoushan cattle suggests its origin and the association of MC1R with black coat colour	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96896-2	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Haruka, Kon Tetsuo, Omori Yoshihiro, Furukawa Takahisa	4. 巻 30
2. 論文標題 Functional and Evolutionary Diversification of Otx2 and Crx in Vertebrate Retinal Photoreceptor and Bipolar Cell Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 658 ~ 671.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.072	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 -
1. 著者名 Nakamura Kentaro, Noguchi Tatsuro, Takahara Mariko, Omori Yoshihiro, Furukawa Takahisa, Katoh Yohei, Nakayama Kazuhisa	4. 巻 295
2. 論文標題 Anterograde trafficking of ciliary MAP kinase like ICK/CILK1 by the intraflagellar transport machinery is required for intraciliary retrograde protein trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13363 ~ 13376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014142	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 -

1. 著者名 Kon Tetsuo, Omori Yoshihiro, Fukuta Kentaro, Wada Hironori, Watanabe Masakatsu, Chen Zelin, Iwasaki Miki, Mishina Tappei, Matsuzaki Shin-ichiro S., Yoshihara Daiki, Arakawa Jumpei, Kawakami Koichi, Toyoda Atsushi, Burgess Shawn M., Noguchi Hideki, Furukawa Takahisa	4. 巻 30
2. 論文標題 The Genetic Basis of Morphological Diversity in Domesticated Goldfish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2260 ~ 2274.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.04.034	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 該当する

1. 著者名 大森 義裕	4. 巻 71
2. 論文標題 連載講座 生命科学を拓く新しい実験動物モデル キンギョの多様な表現型と全ゲノム重複-疾患モデル動物としての展開	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 68 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201122	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kubo Shun, Yamamoto Haruka, Kajimura Naoko, Omori Yoshihiro, Maeda Yamato, Chaya Taro, Furukawa Takahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional analysis of Samd11, a retinal photoreceptor PRC1 component, in establishing rod photoreceptor identity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83781-1	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 -

1. 著者名 Chen Zelin, Omori Yoshihiro, Koren Sergey, Shirokiya Takuya, Kuroda Takuo, Miyamoto Atsushi, Wada Hironori, Fujiyama Asao, Toyoda Atsushi, Zhang Suiyuan, Wolfsberg Tyra G., Kawakami Koichi, Phillippy Adam M., Mullikin James C., Burgess Shawn M., NISC Comparative Sequencing Program	4. 巻 5
2. 論文標題 De novo assembly of the goldfish (Carassius auratus) genome and the evolution of genes after whole-genome duplication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav0547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aav0547	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 該当する

1. 著者名 Kozuka Takashi, Omori Yoshihiro, Watanabe Satoshi, Tarusawa Etsuko, Yamamoto Haruka, Chaya Taro, Furuhashi Mayu, Morita Makiko, Sato Tetsuya, Hirose Shinichi, Ohkawa Yasuyuki, Yoshimura Yumiko, Hikida Takatoshi, Furukawa Takahisa	4. 巻 9
2. 論文標題 miR-124 dosage regulates prefrontal cortex function by dopaminergic modulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38910-2	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 -

1. 著者名 Furukawa T, Ueno A, Omori Y	4. 巻 77
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying selective synapse formation of vertebrate retinal photoreceptor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci	6. 最初と最後の頁 1251-1266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-019-03324-w	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Tetsuo Kon, Yoshihiro Omori
2. 発表標題 Understanding of molecular mechanisms underlying on morphological diversity of goldfish (Carassius auratus) strains
3. 学会等名 日本分子生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuo Kon, Yoshihiro Omori
2. 発表標題 A data-scientific approach toward understanding of the goldfish genome and morphological diversity
3. 学会等名 International Symposium: Global Collaboration on Data beyond Disciplines (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森義裕、久保竣、今鉄男、成田宏隆、上野明希子、堤峻太郎、茶屋太郎、山本悠、中川敦史、古川貴久
2. 発表標題 組織特異的ポリコム抑制複合体1(PRC1)の構成要素Samd7は網膜桿体視細胞のアイデンティティの確立に重要である
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIHIRO OMORI, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Hironori Wada, Masakatsu Watanabe, Zelin Chen, Koichi Kawakami, Takahisa Furukawa, Hideki Noguchi, Shawn Burgess, Atsushi Toyoda
2. 発表標題 キンギョ品種の形態形成を制御するメカニズムの解析
3. 学会等名 第52回 日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIHIRO OMORI, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Zelin Chen, Hironori Wada, Masakatsu Watanabe, Hideki Noguchi, Asao Fujiyama, Atsushi Toyoda, Koichi Kawakami, Shawn Burgess, Takahisa Furukawa
2. 発表標題 キンギョの全ゲノム配列決定と品種に見られる多様な表現型を規定する遺伝子の探索
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Hironori Wada, Masakatsu Watanabe, Zelin Chen, Koichi Kawakami, Takahisa Furukawa, Atsushi Toyoda, Shawn Burgess, Hideki Noguchi
2. 発表標題 Goldfish genome resequencing and the phenotypic variations of domesticated strains
3. 学会等名 The 14th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Mari Nishino, Natsuki Noda, Atsushi Toyoda, Hideki Noguchi
2. 発表標題 キンギョ (Carassius auratus) とその近縁種、そして全ゲノム重複後の進化
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Atsushi Toyoda, Hideki Noguchi
2. 発表標題 Diversity of morphological phenotypes in domesticated goldfish strains and their whole genome analysis
3. 学会等名 The 2nd Asia Evo Conference 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森義裕
2. 発表標題 公開講演会「今!キンギョがおもしろい」
3. 学会等名 日本動物学会 中部支部 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Atsushi Toyoda, Hideki Noguchi
2. 発表標題 Mechanism of the eye size control using the Demekin strain of goldfish (Carassius auratus)
3. 学会等名 2021年 日本生化学会大 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoshihiro Omori	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Protocols	5. 総ページ数 17
3. 書名 zebrafish: The genetics and genome analysis of domesticated goldfish strains with a wide variety of phenotypes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

長浜バイオ大学大学院 大森研究室 <a href="https://yoshihiroomori.web.fc2.com/">https://yoshihiroomori.web.fc2.com/</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	NIH		