

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770136

研究課題名(和文) 核内受容体 COUP-TF の錐体オプシン発現制御におけるエピジェネティクス

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic regulation of cone opsin expression by COUP-TF nuclear receptors

研究代表者

佐藤 伸哉 (SATO SHINYA)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：80333558

研究成果の概要(和文)：我々のグループでは核内受容体 COUP-TFs (COUP-TFI と COUP-TFII)がマウス網膜錐体視細胞で発現するオプシン遺伝子の発現を制御し背腹軸に沿った空間的発現パターン形成に寄与する事を見いだしており、本研究ではその制御機構についてエピジェネティックな視点から明らかにしようと試みた。マウス網膜背側、腹側の青オプシン遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化状態、ヒト網膜芽腫細胞株で内在性の COUP-TFs の発現を抑制した時のヒト赤オプシン遺伝子プロモーター周辺領域における DNA メチル化状態およびヒストン修飾状態の変化を調べてみたが COUP-TFs の直接的な関与は見いだされなかった。しかし、TRbeta2 によるヒト赤オプシン (マウス緑オプシン) 遺伝子発現制御領域を同定し、さらに COUP-TFs が TRbeta2 によるオプシン遺伝子活性化に対してヒトとマウスで異なる作用を発揮する事を見いだした。また、クロマチンリモデリング因子の一つ Brg1 が青オプシン遺伝子の転写活性化に寄与し、その活性化に対して COUP-TFs は抑制的に働かう事が分かった。COUP-TFs はこれら因子と相互作用しオプシン遺伝子の発現を制御している事、また、動物種間で異なるオプシンの空間的発現パターンもこれら因子との相互作用を介して発揮される事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously we demonstrated that COUP-TF nuclear receptors contribute to the establishment of dorso-ventral expression pattern of cone opsins in mouse retina. In this study I'd like to clarify the mechanism of this regulation by focusing on epigenetic mechanism. I analyzed DNA methylation status of dorsal- and ventral-region of mouse retina, or DNA methylation and histone modification status in retinoblastoma cell line in which endogenous COUP-TFs were knocked down by shRNA. However, significant correlation between COUP-TFs expression and these epigenetic status has not been seen yet. On the other hand, I identified TRbeta2 regulating genomic region in human red opsin gene and found that COUP-TFs show the different effect on TRbeta2-mediated activation in this genomic region between human and mouse genome. Furthermore, I found that Brg1, a chromatin remodeling factor, activates blue opsin gene expression and COUP-TFs suppress this Brg1-mediated activation. These results suggest that COUP-TFs regulate cone opsin expression in retina through interaction of these factors, which establishes each animal specific cone opsin expression pattern.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：網膜、核内受容体、オプシン

1. 研究開始当初の背景

色覚情報を最初にとらえる網膜錐体オプシンは動物種ごとに特徴的な網膜内空間的発現パターンを示す。殊にマウス錐体オプシンは背腹軸に沿って特徴的な発現パターンを示す事から網膜における空間的発現パターン形成のモデルとして長年研究されている。しかし、そのメカニズムについてはほとんど解明されていなかった。我々は BMP シグナル、及びその下流遺伝子として同定した核内受容体 COUP-TFs (COUP-TFI and COUP-TFII)がマウス錐体オプシンの空間的発現パターン制御に関わる事を見いだしていた。また、ヒト赤オプシン遺伝子の発現がエピジェネティックな制御（特に DNA メチル化）を受けている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では COUP-TFs を中心に錐体オプシンの空間的発現パターン制御について、特にオプシン遺伝子におけるエピジェネティックな制御に焦点をあててその機構を明らかにしようと試みた。ヒトの培養細胞、マウス網膜を中心に研究を進めたが、この研究で得る事が期待される知見を他の動物種で検討する事によりメカニズムの普遍性、あるいは特異性を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) マウス青オプシンプロモーター周辺領域における DNA メチル化状態について、発現量の少ない背側とそれ以外の領域に胎生 13 日の網膜を分けて Bisulfite sequencing 法により解析を行った。また、成体網膜においては、背側、腹側の網膜より錐体視細胞を PNA positive/CD73 negative 分画としてソーティング回収し調べた。

(2) ヒトオプシン遺伝子、特に赤オプシン遺伝子のプロモーター周辺領域における DNA メチル化状態が COUP-TFs を過剰発現、ある

いはノックダウンさせた時に変化するか培養細胞を用いて Bisulfite sequencing 法により解析を行った。また、ヒストンの修飾状態についてもクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により解析した。

(3) 赤オプシン遺伝子の発現には COUP-TF だけではなく thyroid hormone receptor beta2 (TRbeta2) が寄与する事が既に知られていた。そこで COUP-TF、TRbeta2 がオプシン遺伝子のどの領域に作用するかを明らかにするために、赤オプシゲノムをクローニングし、レポータープラスミドの作製を試みた。様々な培養細胞を用いてレポーターアッセイを行い制御領域の同定と、COUP-TF と TRbeta2 の相互作用についても検討した。

(4) COUP-TFII のオプシン遺伝子への作用機序をさらに詳しく解析するために、COUP-TFII と相互作用する事が示唆されたクロマチンリモデリング因子 Brg1 のオプシン遺伝子への作用について、培養細胞を用いて検討した。

(5) マウスとはオプシンの空間的発現パターンが異なるマーマセット、ラット、ゼブラフィッシュなどについて COUP-TFs の発現との相関性を検討した。オプシン、COUP-TFs の発現は in situ hybridization あるいは組織免疫染色法により検出した。

4. 研究成果

(1) オプシン遺伝子の発現が DNA メチル化による制御を受けている可能性が他のグループから報告されていたため、マウスオプシン遺伝子のプロモーター周辺領域における DNA メチル化状態を Bisulfite sequence 法により調べる事にした。青オプシンは転写開始点より下流 200bp、上流 400 bp 内に 7 カ所の CpG サイトが存在した。胎生 13 日のマウス網膜については背側とそれ以外の領域に分

けて解析したが、両領域における DNA メチル化状態に大きな差は観察されなかった。また、成体網膜においては背側と腹側に分け、さらに PNA positive/ CD73 negative 画分として錐体細胞をソーティング回収し調べたが、背側、腹側で大きな差は見られなかった。COUP-TFI と COUP-TFII の発現は背腹軸で異なる発現を示し、マウス赤オプシンの発現を制御するが、DNA メチル化への影響は少ないと示唆された。

ヒト赤オプシン遺伝子のプロモーター周辺領域（転写開始点より上流 500 bp 内）には 2-3 カ所の CpG サイトが存在するが、マウス緑オプシン（ヒト赤オプシンの相同遺伝子）には存在せず、動物種間の発現制御に寄与する事が示唆された。ヒト網膜芽腫由来 Y79 細胞は錐体視細胞の様相を示す細胞株であり、内在性の COUP-TFII の発現を RNAi によりノックダウンすると赤オプシンの発現が上昇する事を見いだした。つまり、COUP-TFII は赤オプシン遺伝子の発現を抑制している事が明らかになった。そこで、このような状況下でヒト赤オプシンプロモーター周辺領域における DNA メチル化状態に変化が見られるのか調べてみたが、COUP-TFII のノックダウンにより脱メチル化される傾向が観察されたものの有為な差は得られていない。

また、Y79 細胞で内在性の COUP-TFs の発現を RNAi システムでノックダウンさせた時にヒストンの修飾状態に変化が見られるか ChIP アッセイにより検討してみたが、アセチル化ヒストン H3、ヒストン H3K4 メチル化において変化は観察されなかった。今後、他のヒストン修飾についても検討したいと考えている。

(2) ヒト赤オプシン遺伝子（マウス緑オプシン遺伝子）の発現は thyroid hormone により活性化され、その受容体として核内受容体 TRbeta2 が錐体視細胞で特異的に発現し寄与している事が分かっていたが、赤オプシン遺伝子内のどのゲノム領域が TRbeta2 により制御されているか、またどのような因子と相互作用しているかなどのメカニズムは全く不明であった。そこで、まず TRbeta2 および thyroid hormone による赤オプシン遺伝子の制御領域を明らかにするために転写開始点より上流約 21 kb、下流約 15 kb のゲノム DNA をクローニングしレポータープラスミドを作製し、培養細胞を用いて解析した。その結果、thyroid hormone 非依存的に TRbeta2 は転写開始点より上流 300 bp 内で赤オプシンプロモーターを活性化する事、thyroid hormone により exon-intron のある領域が反応し TRbeta2 と相乗的に転写活性化する事を見いだした。さらに、COUP-TFII は thyroid

hormone、TRbeta2 非存在下では転写活性化に影響を与えないが、TRbeta2、thyroid hormone による赤オプシン遺伝子転写活性化を抑制する事が分かった。従って、COUP-TFII は TRbeta2 に作用し赤オプシン遺伝子発現を抑制する事が示唆された。今後は、まず TRbeta2 及び thyroid hormone によるエピジェネティックな変化を検討し、COUP-TF によるそれらがどう影響するか解析したいと考えている。

ヒト赤オプシン遺伝子プロモーターのマウス相同領域（緑オプシン遺伝子）を同様にクローニングし TRbeta2、COUP-TFII の影響をレポーターアッセイにより調べてみたところ、転写開始点より上流 300 bp 内でヒト赤オプシン遺伝子同様に TRbeta2 による活性化が観察されたが、興味深い事に COUP-TFII により相乗的にその活性が上昇する事が分かった。この事は、マウス網膜に COUP-TFII を過剰発現させると緑オプシンの発現が上昇する事と相関する。つまり、TRbeta2 はヒト赤オプシン遺伝子、マウス緑オプシン遺伝子を活性化するが、COUP-TFII はヒトでは抑制的に、マウスでは活性化に寄与する事が示された。動物種間のゲノム配列の違いにより COUP-TFII の作用が異なる事が示され大変興味深いと思われる。DNA メチル化状態の違い（ヒトではこの領域に 2-3 カ所の CpG サイトが存在するが、マウスでは全く存在しない）により COUP-TFII の作用機構が変わるのではないかと仮説を立てて今後調べてみたいと考えている。

(3) 我々のグループは以前、COUP-TFII と相互作用するマウス網膜内の蛋白質をプロテオミクスによりスクリーニングしていた。相互作用する候補蛋白質の中にクロマチンリモデリング因子のひとつである Brg1 があった。そこで、まず Brg1 がオプシン遺伝子の発現に影響を与えているか、RNAi による loss of function、またオプシンプロモーターを要するレポータープラスミドを用いて解析したところ青オプシンプロモーターの転写活性化に寄与する事を見いだした。さらに、COUP-TFII は Brg1 による青オプシン遺伝子活性化に対して抑制的に働く事を見いだしている。従って、COUP-TFII は Brg1 と相互作用しクロマチンリモデリングに影響し青オプシン遺伝子発現を制御している事が示唆された。

(4) マウス網膜では COUP-TFI が腹側に、COUP-TFII が背側に発現するという特徴的な発現パターンを示しオプシンの背腹軸による発現を制御している事を見いだしていたが、他の動物種での COUP-TFs の発現はどうか調べてみた。ラット及びマーマモセットの胎児網膜では、マウス網膜同様に背側に

COUP-TFII、腹側にCOUP-TFIが強く発現していたが、免疫染色で詳しく観察してみると、弱いながらも腹側胎児網膜でもCOUP-TFIIの発現が観察された（マウス腹側網膜ではCOUP-TFIIの発現はアマクリン細胞を除き観察されない）。また、マーモセット成体網膜では錐体視細胞に強くCOUP-TFIIが発現し、さらに網膜中心部から辺縁部に掛けてその発現が強くなる発現傾向が観察された。ゼブラフィッシュではCOUP-TFI、COUP-TFIIともに背側網膜で強く発現している事が観察された。このようなCOUP-TFの空間的発現パターンの違いがマウスとは異なるオプシンの発現パターン形成に寄与しているのか今後明らかにしたいと考えている。特に、マーモセットはヒトに近い動物種という事、またヒトと同様に黄斑部を持つ事から黄斑部形成解析にも有用と考えられる。マーモセット網膜を用いて解析する手段を考えた場合に、やはり遺伝子のgain of functionあるいはloss of functionの手法が有用だと考えられた。そこで、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターをマーモセット網膜体外培養の系に導入してみたところ血清型により有用なAAVが見いだされた。AAVを用いてマーモセット網膜をモデル系として、哺乳類におけるオプシン遺伝子発現制御機構をin vivoで明らかにしていきたいと考えている。

当初の予想ではCOUP-TFsが直接オプシン遺伝子のDNAメチル化状態あるいはヒストン修飾状態を変化させると考えていたが、本研究によりCOUP-TFは赤、緑オプシン遺伝子に対してはTRbeta2に、青オプシン遺伝子に対してはBrg1に作用し転写に影響を及ぼしている事が示唆される結果を得た。TRbeta2及びBrg1ともにエピジェネティックな作用を持つ因子である事が示唆され、COUP-TFはこれら因子を介してエピジェネティックな作用を発揮すると考えられる。また、動物種間のゲノム配列の違いがCOUP-TFの作用の違いを発揮するという事は興味深くそのメカニズムについて今後明らかにしたいと考えている。

#### 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2件)

- ① Inoue M, Iida A, Satoh S, Kodama T, Watanabe S. COUP-TFI and -TFII nuclear receptors are expressed in amacrine cells and play roles in regulating the differentiation of retinal progenitor cells. *Experimental Eye Research*, 査読有り Vol. 90, No. 1, 2010, pp49-56.

- ② Satoh S, Tang K, Iida A, Inoue M, Kodama T, Tsai SY, Tsai MJ, Furuta Y, Watanabe S. The spatial patterning of mouse cone opsin expression is regulated by bone morphogenetic protein signaling through downstream effector COUP-TF nuclear receptors. *Journal of Neuroscience* 査読有り Vol. 29, No. 40, 2009, pp12401-12411.

[学会発表] (計1件)

佐藤伸哉 The spatial patterning of mouse cone opsin expression is regulated by BMP signaling through downstream effector COUP-TF nuclear receptors. 2009年11月9-12日 沖縄県恩納村 OIST シーサイドハウス

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホー ム ペ ー ジ :  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/moldev/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 伸哉 (SATOH SHINYA)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：80333558

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし