

「網膜視細胞の変性と生存の新たな分子メカニズムの解析」

大阪大学蛋白質研究所 古川貴久

○研究の背景と目的

脊椎動物の網膜発生において、5種類の主要なニューロンおよびミューラーグリア細胞は共通の前駆細胞から生み出される。このプロセスにおいて様々な転写制御因子が連動して働くことにより、ニューロンおよびグリア細胞が運命決定され、成熟し、維持されている。哺乳類では唯一の光受容機関である視細胞の発生および維持には、Otx2、Crx、Nr1 などの転写因子が重要な役割を果たすことが知られている。これらの転写因子欠損マウスの網膜を用いた大規模な遺伝子発現プロファイリング解析によって、網膜の複雑な転写制御ネットワークの一部が明らかとなっている。マウスでは、生後間もなく外節の発達およびシナプス形成を含む視細胞の成熟が開始される。視細胞は双極細胞および水平細胞の樹状突起末端とシナプス結合を形成する。視細胞の軸索末端ではリボンシナプスと呼ばれる特殊なシナプスが形成され、このシナプスによって光強度の段階的な変化に関する情報が双極細胞へと伝わる事が可能となっている。視細胞の頂端側においては、外節が視細胞前駆細胞に存在する一次繊毛から発達する。ヒトでは視細胞の変性や細胞死により網膜色素変性症、レーバー先天黒内障、錐体杆体変性症といった様々な網膜変性疾患が引き起こされる。視細胞の外節やシナプスは網膜関連疾患の発症との関係が深く、その形成メカニズムの解明は網膜関連疾患の発症原因の解明や診断法や治療法の確立のために重要である。

そこで我々は視細胞の発生および成熟に関わる遺伝子を特定するため、視細胞に優位に発現する遺伝子の探索を行った。Crx は視細胞前駆細胞に発現する転写因子であり、Crx を発現する視細胞前駆細胞を集めて遺伝子を解析することで視細胞に優位に発現する遺伝子を同定することが可能であると考えられる。以前我々は Crx のプロモーター下で EGFP を発現するトランスジェニックマウスを用いた研究が行われた。胎生期 17.5 日において EGFP 陽性の細胞を FACS で選別後、EGFP 陽性と EGFP 陰性の細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により比較した。この解析により視細胞前駆細胞で優位に発現する転写因子を 21 個見出した。なかでも MADS ファミリーに属する転写制御因子をコードする Mef2d が EGFP 陽性細胞において EGFP 陰性細胞の約 4 倍の発現レベルを示した。この結果から、Mef2d が錐体視細胞前駆細胞において高発現しており、視細胞の発生および生存に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本研究で我々は Mef2d に焦点を当て、Mef2d の視細胞における機能を解明することで視細胞成熟のメカニズムを明らかにすることを試みた。Mef2 転写因子ファミリーは N 末端に Mef2 ドメインおよび MADS ドメインをもつ蛋白質として定義されており、この 2 つのドメインによってゲノム上の特定の DNA 結合配列 (Mef2 調節エレメント、MRE) に結合し、コファクターと相互作用する。さらに C 末端の転写活性化ドメイン (転写活性化ドメイン、TAD) によって標的遺伝子の転写活性を制御する。Mef2 遺伝子ファミリーはもともと哺乳類およびショウジョウバエにおいて、筋肉の分化および成熟に関わる因子として報告された。脊椎動物においては、Mef2 転写因子ファミリーには異なる遺伝子座にコードされる 4 つのメンバー (Mef2a、Mef2b、Mef2c、Mef2d) が存在し、筋肉、心臓、骨、白血球、脳といった様々な組織において多様な機能を持つことが明らかとなっている。Mef2a 欠損マウスは生後間もなく致死となり、Mef2c 欠損マウスも胎生致死となるが、このことからこれらの因子が哺乳類の発生に不可欠な役割を担っていることが示唆される。一方、Mef2d 欠損マウスは生存可能であり、野生型マウスと比較して発生過程において明らかな異常は見られないが、心肥大に対して耐性があるという報告があ

る。しかし、Mef2d の網膜における役割は明らかにされていない。本研究では Mef2d 欠損マウスを作製して解析することにより、Mef2d の網膜発生における機能を明らかにすることを目的とした。

○研究方法・研究内容

1. Mef2d はマウス網膜において高発現する

Mef2d のマウス組織における発現を調べるために、成体マウスの組織から単離した全 RNA を用いてノザンブロット解析を行った。その結果、Mef2d が網膜において高発現していることが明らかとなった。次に、Mef2 ファミリー遺伝子の網膜の発生段階における発現を明らかにするために、各発生ステージの網膜組織の切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。Mef2d は胎生期 17.5 日および生後 3 日において網膜全層に渡って発現が見られた。特に胎生期 17.5 日において、Mef2d は将来視細胞層になる領域において強い発現が見られた。この時期には視細胞のうち錐体視細胞前駆細胞が分化することから、Mef2d は錐体視細胞前駆細胞に高発現していることが示唆される。また、生後 9 日および 21 日においても、Mef2d は外顆粒層、内顆粒層、神経節細胞層を含む網膜全層に渡って発現していた。

2. Mef2d は視細胞の生存および生理機能に不可欠である

網膜の発生過程における Mef2d の生体における役割について検討することを目的として、Mef2d 欠損マウスの作製を行った。Mef2d 欠損マウスの網膜における表現型を解析するため、まず網膜の凍結切片を作成しトルイジンブルー染色を行った。生後 21 日においては野生型マウスと Mef2d 欠損マウスの間で ONL の厚みに有意な差は確認されなかったが、生後 30 日から 6 か月にかけて Mef2d 欠損マウスの網膜において、ONL の厚みが減少し視細胞の変性が進行していることが確認された。この結果から、Mef2d はマウス視細胞の維持に不可欠であることが示唆される。

次に視細胞における Mef2d の生理的機能を調べるために、1 か月齢の Mef2d 欠損マウスおよび野生型マウスの網膜電図 (ERG) 測定を行った。暗順応下において、野生型マウスでは a 波が高刺激強度においてのみ観察された。また、b 波は弱刺激強度であっても観察された。一方で Mef2d 欠損マウスは、暗順応下において a 波、b 波共に著しい振幅の減弱を示した。これらの結果から、Mef2d は杆体視細胞の活性および杆体視細胞から ON 型双極細胞への光情報の伝達に不可欠な役割を果たしていることが示唆された。明順応下において、Mef2d 欠損マウスにおける a 波の振幅は高刺激強度において極めて減弱した。さらに b 波の振幅も、高刺激強度において著しい減弱を示した。これらの結果から、Mef2d が錐体視細胞の活性および錐体視細胞から ON 型双極細胞への光情報の伝達においても不可欠な役割を果たしていることが示唆された。

3. Mef2d は視細胞外節の成熟に不可欠である

トルイジンブルー染色および ERG における結果から、Mef2d 欠損マウスは視細胞の成熟過程に異常が生じていることが示唆された。そこでこの表現型をさらに詳しく解析するために、免疫組織染色法を用いた解析を行った。まず、生後 14 日および 30 日の野生型および欠損型の網膜を杆体視細胞のマーカーである Rom1 と Rhodopsin を用いて共染色した。その結果、すでに生後 14 日において Mef2d 欠損マウスの杆体視細胞の外節の厚みが野生型マウスと比較して減少していることが分かった。また同様に生後 14 日および 30 日の野生型および欠損型の網膜を錐体視細胞のマーカーである S-opsin と M-opsin、さらに外節および内節のマーカーである PNA によって 3 重染色したところ、

桿体視細胞の外節と同様に Mef2d 欠損マウスの錐体視細胞の外節の長さが野生型マウスと比較して短縮していることが分かった。これらの結果から、Mef2d は視細胞外節の成熟に不可欠であることが示された。

4. Mef2d は視細胞リボンシナプスの成熟に不可欠である

さらに、リボンシナプスの形成が Mef2d 欠損マウスにおいて阻害されているかどうかを調べるために、免疫組織染色法を用いた解析を行った。まず Mef2d 欠損マウスにおいて視細胞シナプス前部の成熟過程に異常が見られるかどうか調べるため、生後 14 日、21 日および 30 日の野生型および欠損型の網膜を視細胞シナプス前部末端に存在するシナプスリボンのマーカーである Ctbp2 により染色した。生後 14 日において、野生型マウスの網膜では馬蹄形をしたシナプスリボンが確認されたが、Mef2d 欠損型ではシナプスリボンの数自体が減少しており、さらにその多くが異常な形態を示していることが明らかとなった。

次に Mef2d 欠損マウスにおいて視細胞シナプス後部の成熟過程に異常が見られるかどうか調べるため、生後 14 日、21 日および 30 日の野生型および欠損型の網膜を視細胞のシナプス後部に位置する双極細胞の樹状突起末端のマーカーである mGluR6、Trpm1、Cacna1s により染色し、視細胞軸索末端と双極細胞樹状突起末端の間のシナプス間隙をピカチュリン抗体により染色した。Mef2d 欠損マウス網膜においては、双極細胞の樹状突起マーカーのシグナル強度は著しく低下していた。生後 21 日における野生型および欠損型の網膜において抗 Ctbp2 抗体により染色された視細胞シナプスリボンおよび抗 Cacna1s 抗体により染色された双極細胞樹状突起のシナプスの数をカウントしたところ Mef2d 欠損マウス網膜においてシナプスリボンおよびシナプスの数が著しく減少していることが明らかとなった。

さらに、Mef2d 欠損マウス網膜で見られた視細胞層における異所性のシナプスが視細胞と双極細胞および水平細胞との間に形成されているかどうかを調べるため、野生型および Mef2d 欠損マウスの網膜を抗 PKC- α 抗体(桿体双極細胞樹状突起マーカー)、抗 Znp-1 抗体(錐体双極細胞樹状突起マーカー)および抗 Calbindin 抗体(水平細胞樹状突起マーカー)により染色した。生後 14 日および 30 日における野生型マウスの網膜において、抗 Ctbp2 抗体により染色された視細胞シナプスリボンは抗 PKC- α 抗体で染色された双極細胞樹状突起末端の近傍に存在した。同様に、生後 21 日における野生型マウスの網膜において、リボンシナプスは抗 Calbindin 抗体で染色された水平細胞樹状突起末端に存在した。生後 14 日および 30 日における Mef2d 欠損マウス網膜において、視細胞層に見られる異所性のシナプスは桿体双極細胞および水平細胞の樹状突起末端に局在していた。以上の結果から、Mef2d は視細胞リボンシナプスの成熟に必須であることが明らかになった。

5. Mef2d による視細胞および双極細胞に発現する遺伝子の転写制御

Mef2d 欠損マウス網膜における異常が引き起こされる分子メカニズムを解明するため、表現型が見られ始めた生後 14 日における Mef2d 欠損マウスと野生型マウスの網膜における遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により比較した。この解析の結果、視細胞に発現する複数の遺伝子および双極細胞に発現する遺伝子の発現レベルが Mef2d 欠損マウスの網膜において顕著に低下していることが確認された。これらの結果から、網膜において Mef2d を欠損することにより複数の視細胞および双極細胞に発現する遺伝子の転写制御を行っていることが示された。

6. Mef2dは視細胞特異的転写因子Crxと協同して錐体アレスチンのプロモーターを活性化する

DNAマイクロアレイ解析の結果、錐体アレスチン(Arr3)の発現がMef2d欠損マウス網膜において著しく低下していることが明らかとなった。視細胞におけるMef2dの転写制御分子メカニズムを調べるため、錐体アレスチンプロモーターに着目した。錐体アレスチンプロモーターの活性がMef2dによって制御されているのではないかと考え、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。Mef2dからは組織特異的なスプライシングを経て、ユビキタスなスプライシングアイソフォームであるMef2d α 1および筋肉特異的なMef2d α 2が生成される。網膜においてどちらのアイソフォームが生成されるのかを明らかにするため、Mef2d α 1 およびMef2d α 2 に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い、網膜を含むマウスの7組織における両アイソフォームの発現を検出した。その結果、マウス網膜においてはMef2d α 1のみが発現していることが明らかとなった。そこでHEK293T細胞にMef2d α 1発現ベクターと共に、錐体アレスチンプロモーター配列下にルシフェラーゼレポーター遺伝子を結合したコンストラクトをトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、Mef2dにより錐体アレスチンプロモーターが強く活性化されることが明らかとなった。さらに、Mef2dおよびCrx発現ベクターを錐体アレスチンレポーターコンストラクトとともにHEK293T細胞にトランスフェクションしたところ、Mef2dとCrxによる錐体アレスチンプロモーターの相乗的な活性化が観察された。これらの結果から、視細胞においてMef2dとCrxが協同して錐体アレスチンのプロモーター活性を上昇させていることが示唆された。

○研究成果（研究から得た考察、残された課題、今後の課題を含む）

本研究は、マウス網膜において転写制御因子 Mef2d の機能を解析することにより、視細胞および双極細胞の成熟過程の分子基盤の新たな理解をもたらすものである。第一に、Mef2d は視細胞の生存に不可欠であり、Mef2d を欠損させるとヒト網膜色素変性症患者で観察されると類似した進行性の視細胞変性が引き起こされる。第二に、Mef2d は視細胞と双極細胞間の正常なシナプス形成に必須である。Mef2d 欠損マウス網膜においては視細胞と双極細胞間のシナプスマーカーが野生型マウスと比較して顕著に減少し、ERG における b 波の著しい低下が見られた。第三に、少なくとも一部の視細胞特異的プロモーターにおいて、Mef2d は視細胞および双極細胞に発現する遺伝子の転写を Crx と共同して制御する。以上のことから、Mef2d は視細胞の成熟および維持を制御する転写因子であり、網膜において他の転写因子とともに、あるいは単独で標的遺伝子の発現を制御すると考えられる。

○研究がもたらす効果及び波及効果

申請者と共同研究者の研究グループはこれまでも網膜発生の基礎研究のみならず、網膜色素変性症、先天性夜盲、小眼球症などの網膜疾患の原因遺伝子の同定に貢献してきた。Crx 遺伝子の変異が網膜色素変性症の原因であることや、TRPM1 遺伝子の変異が先天性停止性夜盲の原因になることを報告してきた。網膜色素変性症の原因遺伝子は既に 200 個程度同定されているが、まだ多数あると予測されており、MEF2D がその一つである可能性は高いと考えている。本研究を行うことによって網膜における視細胞変性を引き起こす新規なメカニズムが明らかとなり、網膜変性疾患の原因解明や治療法の確立へとつながることが期待される。