

審査の結果の要旨

氏名 福島 正哉

脊椎動物の網膜は、6つの神経細胞と1つのグリア細胞から構成されており、これらの細胞はすべて、発生過程において、厳密に制御された遺伝子発現によって、共通の網膜前駆細胞 (RPC) から分化する。遺伝子発現を制御する機構の一つとして、エピジェネティックな制御が注目されている。特にヒストンメチル化は、主にヒストンメチル化酵素や脱メチル化酵素の機能低下を通じて、網膜の発達に必要な役割を果たすことが明らかにされてきた。各種ヒストン修飾の中で、H3K36メチル化の網膜発生における役割についてはこれまで報告がなかった。H3K36メチル化に関わる遺伝子の中で、*Fbxl11*はH3K36me1/2の脱メチル化を触媒する酵素であり、非メチル化CpGアイランドに結合し近傍のH3K36を脱メチル化することが知られている。*Fbxl11*ノックアウトマウスは、細胞増殖の低下、アポトーシスの増加、神経管欠損、胚性致死を呈するが、網膜発生における*Fbxl11*の機能についてはこれまで明らかにされていなかった。そこで本研究は、H3K36脱メチル化酵素*Fbxl11*が網膜発生において果たす機能を明らかにすることを目的として遂行された。

まず網膜特異的*Fbxl11*ノックアウト (*Fbxl11*-CKO) マウスの網膜表現型の経時変化を免疫組織化学で評価した。その結果、(1) 生後早期におけるRPCの減少、(2) 胎生後期以降の桿体細胞および双極細胞の分化異常、(3) 胎生早期からのアポトーシスの亢進が見られた。続いて*Fbxl11*のノックアウトによる転写に対する影響を明らかにするために、qPCRおよびRNA-seqでmRNAの発現レベルを評価した。その結果、(1) 胎生後期以降の桿体細胞マーカー遺伝子の発現減少、(2) 出生7日時点における桿体細胞に加えて双極細胞のマーカー遺伝子の発現減少、(3) 出生7日時点におけるRNA splicingにおけるintron retentionの亢進が見られた。加えて、H3K36メチル化状態の変化を解析するために出生1日時点でH3K36me2/3に対してCUT&Tagを行い、視細胞や桿体細胞のマーカー遺伝子のプロモーター領域におけるH3K36メチル化状態の変化を見出した。

次に、*Fbxl11*-CKO網膜における表現型の細胞種特異性を明らかにするために、DNAメチル化状態の制御に着目した。先述の通り*Fbxl11*は非メチル化CpGアイランドを認識しDNAに結合する。網膜の発生過程では、CpGアイランドのメチル化パターンが視細胞と他の細胞種とで異なり、視細胞関連遺伝子のCpGアイランドはRPCから視細胞への分化の過程で脱メチル化される傾向にあることが知られている。DNA脱メチル化は、細胞分裂による受動的希釈とTET/TDG/BER経路による能動的脱メチル化の2つの経路を介して生じる。このうち能動的脱メチル化の経路は、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルの網膜や眼の発達に不可欠な役割を担うことが知られている。一方でマウスを含む哺乳類

の網膜発生において能動的脱メチル化が果たす機能は不明であった。本研究では網膜特異的 *Tet3* ノックアウト(*Tet3*-CKO)マウスの解析および器官外培養網膜での TET1/2 阻害による影響の解析を行うことで、網膜発生における能動的脱メチル化経路の機能および *Fbx11* との関連を明らかにすることを目指した。まず *Tet3*-CKO 網膜の発達を評価した結果、*Tet3* が OFF 型および桿体双極細胞の分化を制御することで視覚機能に寄与していることが明らかになった。また TET1/2 阻害剤である *Bobcat339* を加えた培地で摘出網膜を培養したところ、(1) 5hmC 量の減少、(2) ON 型双極細胞の減少が見られた。一方で *Tet3*-CKO および TET1/2 阻害のいずれにおいても、桿体視細胞の発生には明らかな影響はなく、アポトーシスの増加も見られなかった。

本研究は、マウス網膜発生において *Fbx11* が網膜前駆細胞の生存と桿体細胞・双極細胞の正常な発生に必須であることを明らかにした。代表的なヒストン修飾のうち H3K4/9/27 については網膜発生における重要性が明らかにされてきたが、本研究はこれまで網膜発生における知見がなかった H3K36 メチル化についても適切な制御が必要であることを示した点で新規性がある。今後他の H3K36 メチル基転移酵素や脱メチル化酵素のさらなる解析の意義も示唆するものと言える。また本研究は、*Fbx11* の表現型の細胞種特異性を説明しうる要素として、ヒストン修飾に並んで代表的なエピジェネティックな因子である DNA メチル化の制御に着目した。哺乳類の網膜発生における DNA メチル化状態の制御に関する研究はこれまで主に DNA メチル基転移酵素に注目して行われており、比較的最近に明らかになった能動的 DNA 脱メチル化の経路については知見がなかった。本研究は、*Tet* 遺伝子は双極細胞の分化・成熟に必要であること、*Tet3* および *Tet1/2* が影響を与える双極細胞のサブグループが異なることを明らかにした。このことは、哺乳類網膜においても能動的脱メチル化が正常な網膜発生に必要であること、そして魚類や両生類とは異なる機能を果たすことを示している。一方で、桿体細胞発生や細胞生存については *Tet3*-CKO および TET1/2 阻害による明らかな影響は見られなかった。このことは発生期網膜における *Fbx11* の機能は能動的脱メチル化非依存的に制御されることを示唆する。よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。