

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03204

研究課題名(和文) 単一細胞トランスクリプトームによる異なる神経サブタイプを生み出す分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms that give rise to different neural subtypes by single cell transcriptomics

研究代表者

堀江 健生 (Takeo, Horie)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10455925

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)：本研究は、シンプルなホヤ幼生の中樞神経系をモデルとして、単一細胞トランスクリプトーム解析などのゲノム生物学的な手法と発生生物学的な手法を組み合わせることにより、中枢神経系に存在する全てのニューロンについて、異なる神経サブタイプを生み出す分子機構を解明することを目的としている。我々は、単一細胞トランスクリプトーム解析のデータをもとにドーパミン神経、様々な種類のGABA神経、グルタミン酸作動性の表皮感覚神経細胞の分化機構について解明した。また、様々な動物における感覚神経細胞の分化機構の比較解析を行い、左右相称動物の間で保存された感覚神経細胞の分化機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シンプルな神経系を持つホヤを用いることで様々な神経細胞の分化機構を解明した。さらに、解明した分化機構をもとに様々な神経細胞を人為的に作り出すことにも成功している。今後、これらの研究成果をマウスやヒトなど高等脊椎動物でも検証することにより、iPS細胞やES細胞から人為的に任意の神経細胞の分化を誘導する技術の開発へとつなげたい。そして、損傷した神経回路の修復など医学方面への応用を視野に入れた研究へと発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We study the ascidian simple CNS as a model system to elucidate the molecular mechanisms that give rise to different neural subtypes for all neurons in the central nervous system by combining genomic and developmental biological methods, such as single-cell transcriptomics. Our goal is to elucidate the molecular mechanisms that give rise to different neuronal subtypes for all neurons in the CNS.

From the single-cell transcriptomics data, we have elucidated the differentiation mechanisms of dopaminergic neurons, various types of GABAergic neurons, and glutamatergic epidermal sensory neurons. We also performed a comparative analysis of the differentiation mechanisms of sensory neurons in multiple animals to elucidate the differentiation mechanisms of sensory neurons that are conserved between left and right homologous animals.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ホヤ 単一細胞トランスクリプトーム解析 神経細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

脳・神経系には多様なニューロンが存在している。個々のニューロンはそれぞれ特徴的な性質を備えており、脳の高次神経機能を担っている。そのため、各ニューロンの性質がどのような分子機構で決定されるのかを解明することは神経科学、発生生物学にとって根源的な研究課題である。しかしながら、哺乳類では脳を構成する細胞数の多さから、その全貌を解明することは困難である。申請者はこの問題を解明するために尾索動物ホヤをモデルとして、ゲノム生物学的な手法と発生生物学的な手法を組み合わせる研究を進めている。

ホヤの幼生はオタマジャクシ型の形態をしており、背側に神経管が位置するなど脊椎動物の脳神経系の基本設計を備えているが、その中枢神経系は約 350 個、ニューロンに限定すれば、わずか 177 個とごく少数の細胞から構成されている。ホヤの幼生は透明で、ニューロンを可視化したトランスジェニック系統を用いることにより、ニューロンを生きたまま観察することが可能である。また、胚操作や遺伝子導入、遺伝子の機能阻害が容易に行えるなど、ニューロンの分化や機能発現を研究する上ですぐれた特性を備えている。申請者はニューロンが利用する神経伝達物質や特定のニューロンで機能するタンパク質を指標にして、ニューロンを機能ごとに分類することに成功し、ホヤ幼生に存在するほぼ全てのニューロンを同定している(Horie *et al Nature* 2011; Horie *et al Zoolog Sci* 2010; Horie *et al Dev Growth Differ* 2009)。また、ニューロンのサブタイプ特異的な遺伝子の発現調節機構の解析により、各ニューロンの発生や分化に必須の転写因子を同定している(*Dev. Biol.* **352**, 202-214, 2011; *Dev. Growth Differ.* **49**, 657-667, 2007; *Genes*, **39**, 130-140, 2004)。しかしながら、依然として多くのニューロンの分化機構は不明である。これはサブタイプ特異的に発現する遺伝子の情報、特に転写因子の情報がほとんどないことが原因であった。

最近、申請者らは 10XGenomics 社のマイクロ流体型細胞分取装置を用いて、個体まるごとの単一細胞トランスクリプトーム解析を行うことにより、ホヤの個体を構成する全ての細胞の遺伝子発現プロファイルを作成することに成功した(Horie *et al 2018 Nature*)。続いて、遺伝子発現を操作した個体において単一細胞トランスクリプトーム解析を行い、ドーパミンニューロンの分化に必須の転写因子カクテルの同定に成功した(Horie *et al., Genes & Development* 2018)。さらに、中枢神経系を構成する細胞の遺伝子発現プロファイルを詳細に解析し、ホヤ幼生の中枢神経系の細胞は 12 種類のサブタイプに分類できることを明らかにした。この遺伝子発現プロファイルデータを活用することにより、特定のニューロンで特異的に発現する転写因子を一挙に同定することが可能となり、これまで不明であったニューロンのサブタイプを生み出す分子機構を解明するための基盤が完成した。

2. 研究の目的

上記の研究の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究課題では『単一細胞トランスクリプトームによる神経サブタイプ特異的に発現する転写因子の同定』、『神経サブタイプ特異的に発現する転写因子の機能解析』、『分化運命を変換した個体の単一細胞トランスクリプトーム解析』、『神経サブタイプ特異的な遺伝子の発現調節機構の解析』以上の 4 つの研究を通して、ホヤ幼生の中枢神経系全体においてニューロンの異なるサブタイプを生み出す分子機構を解明する。そして、ホヤにおける知見を他のモデル動物の知見と比較し、進化的に保存された普遍的なニューロンの分化機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、単一細胞トランスクリプトーム解析と実験発生生物学的な手法を組み合わせることにより、ホヤ幼生の中枢神経系に存在する全てのサブタイプ特異的なニューロンの分化機構を解明することを目指す。具体的には以下の 4 つの研究を行う。

単一細胞トランスクリプトームによる神経サブタイプ特異的に発現する転写因子の同定

単一細胞トランスクリプトームのデータをもとに各ニューロンで特異的に発現する転写因子を単離した。*in situ* ハイブリダイゼーションによって、同定した転写因子の発現を明らかにし、これらの転写因子が実際にサブタイプ特異的に発現していることを確認した。本実験により、各神経サブタイプの分化に関連すると予想される転写因子群をリストアップを行った。

神経サブタイプ特異的に発現する転写因子の機能解析

同定した転写因子の機能阻害実験を行い、各神経サブタイプの分化への影響を調べた。また、転写因子の過剰発現実験を行い、各ニューロンの分化に対する影響を調べた。

分化運命を変換した個体の単一細胞トランスクリプトーム解析

同定した転写因子が過剰発現された細胞一つ一つについて遺伝子発現プロファイルを調べた。本実験により、従来の研究では不可能であった、ニューロンの分化状態をゲノムワイドに、そして定量的に評価する

神経サブタイプ特異的な遺伝子の発現調節機構の解析

各神経サブタイプ特異的な遺伝子の発現調節領域をレポーター遺伝子に連結し、ホヤ胚に導入することで、レポーター遺伝子が神経サブタイプ特異的な遺伝子発現を示すことを確認した。そして、発現調節領域の欠失、置換実験を行うことにより、神経サブタイプ特異的な遺伝子の発現調節機構を明らかにした。

4. 研究成果

単一細胞トランスクリプトームによる神経サブタイプ特異的に発現する転写因子の同定

単一細胞トランスクリプトーム解析のデータをもとに各ニューロンで特異的に発現する転写因子の単離を行った。その結果、Eminence 細胞と名付けられた特定の GABA ニューロンにおいて Prop1 が発現していることを明らかにした。さらに、ドーパミンニューロンにおいて Ptf1a が、表皮感覚ニューロンにおいて POUIV が発現していることを明らかにした。

神経サブタイプ特異的に発現する転写因子の機能解析

Prop1 の機能を阻害したところ、Eminence 細胞の分化が阻害された。同様に Ptf1a の機能を阻害したところドーパミンニューロンの分化が完全に阻害された。POUIV の機能を阻害したところ表皮感覚ニューロンの分化が完全に阻害された。これらの結果から、Prop1 は Eminence 細胞の分化に、Ptf1a はドーパミンニューロンの分化に、POU IV は表皮感覚ニューロンの分化に必須の役割をすることが明らかとなった。

分化運命を変換した個体の単一細胞トランスクリプトーム解析

Prop1 を中枢神経系全体で過剰発現したところ、異所的な GABA ニューロンの分化が引き起こされた。現在、Prop1 を過剰発現した個体について単一細胞トランスクリプトーム解析を進めている。

Ptf1a を中枢神経系全体で過剰発現したところ、異所的なドーパミンニューロンの分化が引き起こされた。続いて、Ptf1a を中枢神経系全体で過剰発現した個体について単一細胞トランスクリプトーム解析を行ったところ、Ptf1a の過剰発現によってドーパミンニューロンに分化した細胞とドーパミンニューロンに分化出来なかった細胞が存在することが明らかとなった。これら 2 種類の細胞群の間で遺伝子発現プロファイルの比較を行ったところ、Ptf1a の過剰発現によりドーパミンニューロンに分化した細胞において転写因子 Meis が発現していることが明らかとなった。Ptf1a と Meis を中枢神経系全体で共発現したところ全ての中枢神経系の細胞がドーパミンニューロンへと運命を変換した。

POUIV を表皮全体で過剰発現させたところ、表皮全体にわたって異所的な表皮感覚ニューロンの分化が引き起こされた。POUIV を表皮全体で過剰発現させた個体について、単一細胞トランスクリプトーム解析を行ったところ、新たに 7 種類の細胞クラスターが作り出されること、これら 7 種類は特定の感覚ニューロンではなく、いくつかの感覚ニューロンのハイブリッドの性質を備えた細胞が作り出されていることが明らかとなった。

神経サブタイプ特異的な遺伝子の発現調節機構の解析

単一細胞トランスクリプトーム解析により、ドーパミンニューロンで特異的に発現する遺伝子の検索を行ったところ、ドーパミンの生合成・分泌に関連する「ドーパミン関連遺伝子」の他に「ホルモン・神経ペプチド関連遺伝子」が発現していることが明らかとなった。5 種類の「ドーパミン関連遺伝子」、10 種類の「ホルモン・神経ペプチド関連遺伝子」についてエンハンサー解析を行い、全ての遺伝子についてドーパミンニューロンでの発現に必要な最小エンハンサー 300bp を同定した。その結果、全ての遺伝子のドーパミン神経の最小エンハンサーにおいて、Meis, Ptf1a の結合配列が存在することが明らかとなった。これらの結果から、¹の実験で同定した Ptf1a, Meis は直接ドーパミンニューロン特異的な遺伝子群の発現を活性化することにより、ドーパミンニューロンの分化を制御していることが明らかとなった。

POUIV を表皮全体で過剰発現させた個体における単一細胞トランスクリプトーム解析の結果、POUIV の過剰発現によって転写因子 neurogenin の発現が上昇していることが明らかとなった。neurogenin は表皮感覚ニューロンのうち BTNs と名付けされた双極型の感覚ニューロンで発現することが知られている。neurogenin のエンハンサー解析を行い、neurogenin の BTNs における最小エンハンサー 250bp を同定した。この最小エンハンサーには POUIV の結合配列が 12 個存在していた。これら 12 個の POUIV 結合配列に変異を挿入したところ、BTNs におけるレポーター遺伝子の発現は完全に消失した。POUIV の機能を阻害した個体では、neurogenin の BTNs における発現は完全に消失した。これらの結果から、POUIV は neurogenin の発現を制御することで BTNs の分化に関わっていることが明らかとなった。この POUIV, neurogenin を介した感覚ニューロンの分化機構は線虫、ホヤ、アフリカツメガエルなど左右相称動物間で保存された普遍的なメカニズムであることも明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Krasovec Gabriel, Hozumi Akiko, Yoshida Tomoyuki, Obita Takayuki, Hamada Mayuko, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Horie Takeo, Mori Hisashi, Sasakura Yasunori	4. 巻 8
2. 論文標題 D-Serine controls epidermal vesicle release via NMDA receptor, allowing tissue migration during the metamorphosis of the chordate <i>Ciona</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabn3264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abn3264	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 Chacha Prakriti Paul, Horie Ryoko, Kusakabe Takehiro G., Sasakura Yasunori, Singh Mona, Horie Takeo, Levine Michael	4. 巻 119
2. 論文標題 Neuronal identities derived by misexpression of the POU IV sensory determinant in a protovertebrate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2118817119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2118817119	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 Akahoshi Taichi, Utsumi Madoka K., Oonuma Kouhei, Murakami Makoto, Horie Takeo, Kusakabe Takehiro G., Oka Kotaro, Hotta Kohji	4. 巻 7
2. 論文標題 A single motor neuron determines the rhythm of early motor behavior in <i>Ciona</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabl6053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abl6053	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 Oonuma Kouhei, Yamamoto Maho, Moritsugu Naho, Okawa Nanako, Mukai Megumi, Sotani Miku, Tsunemi Shuto, Sugimoto Haruka, Nakagome Eri, Hasegawa Yuichi, Shimai Kotaro, Horie Takeo, Kusakabe Takehiro G.	4. 巻 9
2. 論文標題 Evolution of Developmental Programs for the Midline Structures in Chordates: Insights From Gene Regulation in the Floor Plate and Hypochord Homologues of <i>Ciona</i> Embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 704367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.704367	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 Kawada Tsuyoshi, Shiraishi Akira, Matsubara Shin, Hozumi Akiko, Horie Takeo, Sasakura Yasunori, Satake Honoo	4. 巻 12
2. 論文標題 Vasopressin Promoter Transgenic and Vasopressin Gene-Edited Ascidian, <i>Ciona intestinalis</i> Type A (<i>Ciona robusta</i>): Innervation, Gene Expression Profiles, and Phenotypes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 688564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2021.668564	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 Zhao Di, Chen Siyu, Horie Takeo, Gao Yimeng, Bao Hongcun, Liu Xiao	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparison of differentiation gene batteries for migratory mechanosensory neurons across bilaterians	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolution & Development	6. 最初と最後の頁 438 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ede.12331	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 該当する

1. 著者名 Okawa Nanako, Shimai Kotaro, Ohnishi Kohei, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi, Horie Takeo, Kuhara Atsushi, Kusakabe Takehiro G.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cellular identity and Ca ²⁺ signaling activity of the non-reproductive GnRH system in the <i>Ciona intestinalis</i> type A (<i>Ciona robusta</i>) larva	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75344-7	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 Hozumi A, Matsunobu S, Mita K, Treen N, Sugihara T, Horie T, Sakuma T, Yamamoto T, Shiraishi A, Hamada M, Satoh N, Sakurai K, Satake H, Sasakura Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 GABA-Induced GnRH Release Triggers Chordate Metamorphosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1555-1561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.02.003.	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江良子、日下部岳広、笹倉靖徳、堀江健生
2. 発表標題 単一細胞トランスクリプトーム解析によるホヤ幼生の尾部に存在する双極型感覚神経細胞の分化機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一寸木明日香、堀江良子、笹倉靖徳、堀江健生
2. 発表標題 ホヤ幼生の重力を感知する神経回路の構造と機能
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江 健生
2. 発表標題 シングルセルトランスクリプトーム解析から切り込む視床下部相同器官の分化機構
3. 学会等名 第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江良子、日下部岳広、笹倉靖徳、堀江健生
2. 発表標題 単一細胞トランスクリプトーム解析によるホヤ幼生尾部の双極型感覚神経細胞の分化機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川達也、堀江良子、笹倉靖徳、堀江健生
2. 発表標題 カタユウレイボヤにおけるK6遺伝子の発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeo Horie
2. 発表標題 regulatory cocktail for dopaminergic neurons in ascidian identified by single cell transcriptomics
3. 学会等名 日本発生物学会オンライントライアルミーティング（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江 健生
2. 発表標題 単一細胞トランスクリプトームによるホヤ胚における神経細胞分化を制御する遺伝子カクテルの同定
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeo Horie
2. 発表標題 Regulatory cocktail for individual neurons identified by whole embryos single cell transcriptomics in ascidian embryos
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

堀江研究室 ホームページ
<https://cionaneuron.wixsite.com/labhomepage>

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	プリンストン大学			
中国	北京師範大学			