

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22436

研究課題名(和文) 2つの細胞系譜で独立に遺伝子操作を行い細胞自律的・非自律的效果を解析する技術開発

研究課題名(英文) Development of a genetic system analyzing the cell-autonomous and non-cell-autonomous effects of gene manipulation on the two independent cell lineages

研究代表者

栗崎 健 (Awasaki, Takeshi)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60359669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：完成した組織から、発生過程で異なる細胞系譜間同士がどのような関係にあったのかを知ることは容易ではない。細胞系譜間の関係とそれを制御する分子機構を明らかにするために、本研究ではキイロショウジョウバエを用いて、「2種類の細胞系譜で独立に遺伝子操作を行い細胞自律的・非自律的效果を同時に解析する技術」の開発を新規に行った。その結果、幼虫期のグリア前駆細胞に由来する成虫グリア細胞と、それ以外の細胞系譜に由来する成虫グリア細胞を同時に可視化する技術の開発に成功した。この技術は、細胞系譜間の関係を制御する分子機構の解明に役立つことが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエを用いた研究は多様な生命現象に関する遺伝子の機能を明らかにすることに優れており、ショウジョウバエでの研究成果を手がかりとして一般性の高い普遍的な遺伝子機能の解明につながった例は枚挙にいとまがない。今回ショウジョウバエをモデルとして、細胞系譜間の関係とそれを制御する分子機構を明らかにすることができる「新規の系」が確立できたことの学術的意義は高いと考える。細胞系譜の研究はがん研究ならびに幹細胞研究において必要不可欠な情報を提供できるため、社会的注目度の高い研究にも応用可能な研究知見をもたらす可能性も秘めているため、本研究成果は社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to understand the relationship between one cell lineage and another cell lineage during tissue development and differentiation. To elucidate the relationship among cell lineages and the molecular mechanisms that control them, in this study, using *Drosophila melanogaster*, we developed a new technology that enables to conduct of gene manipulation in two different cell lineages independently and analyzes its cell-autonomous and non-cell-autonomous effects simultaneously. As a result, we developed a technique to visualize two distinct populations of adult neuropil-glia cells derived from lineages of the adult neuropil-glia precursors and other cell lineages. This system is expected to help elucidate the molecular mechanisms that regulate relationships between cell lineages.

研究分野：Developmental neurobiology

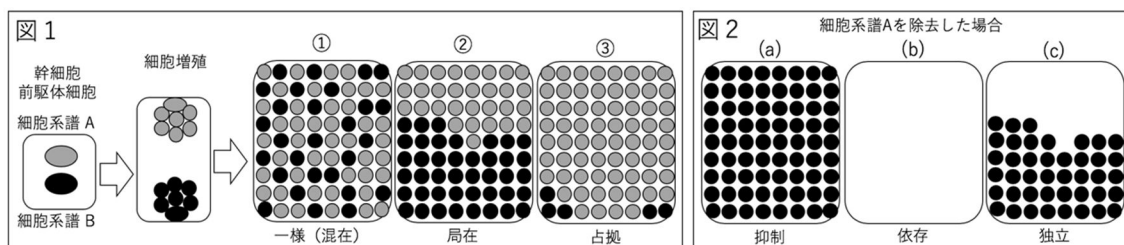
キーワード：Drosophila

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでの研究を通して、ショウジョウバエ成虫の脳に存在するニューロピルグリア組織は少なくとも2つの由来の異なる集団により形成されていることを発見した (Kato et al., 2020, Development)。1つは、幼虫脳において神経幹細胞から誕生した未分化グリアが増殖して作られる集団で、もう1つは、幼虫期に成熟した分化したグリア細胞がグリア前駆体細胞へと脱分化し、そこから作られる集団である。これらの2つの細胞系譜集団は、大きく分けるとそれぞれ成虫脳の上側と下側に局在している。興味深いことに、発生過程において、どちらか一方のグリア集団の細胞増殖を抑制すると、成虫脳では正常と変わらないグリア組織を完成される。すなわち、これらのグリア集団にはお互いを補完するという可塑的発生能力があると考えられる。こうした2つの細胞系譜に由来するグリア集団間にはどのような関係があるのか？その相互作用ならびにそれを制御する分子機構を明らかにするためには、これら2つの集団を独立にラベルし、独立に遺伝子機能や細胞機能を操作する必要がある。しかしながら、2つの細胞系譜を別々にラベルし、それぞれで独立に遺伝子操作するような技術は開発されていないため、現段階ではこの問題にアドレスすることができない。そこで、申請者らは、「2種類の細胞系譜で独立に遺伝子操作を行い細胞自律的・非自律的效果を同時に解析する技術」の開発を考え本研究に至った。

2. 研究の目的

各組織を構成する細胞は特定の幹細胞や前駆体細胞の子孫細胞として誕生する。しかし、分化した組織では、細胞系譜を示す目印となる遺伝子や分子は、ほとんど存在しない。そのため、完成した組織から、発生過程で異なる細胞系譜間同士がどのような関係にあったのかを知ることは容易ではない。2つの細胞系譜から一つの組織が作られる時、それぞれの細胞系譜に由来する細胞が 一様に混在する、それぞれが限局的に存在する、片方の集団が占拠する、など様々な分布が想定される (図1)。これらを可視化するとともに、片方の細胞系譜を取り除くなどの実験的操作を行うことで、この2つの細胞系譜間の関係を理解することができる。例えば、2つの細胞系譜が限局的に存在していた場合 (図1-) を考える。片方の細胞系譜を発生過程で除去したとき、他方が埋め合わせた場合 (図2-a) は、本来は侵入を抑制していたことがわかる。また、他方も消えた場合 (図2-b) は、依存的な関係があったことが、他方に影響がなかった場合 (図2-c) は、独立した関係にあったことがわかる。加えて、片方の細胞系譜で特異的に特定の遺伝子機能の操作を行い、その影響を調べることで、こうした関係を制御する分子機構について、はじめて理解することが可能となる。



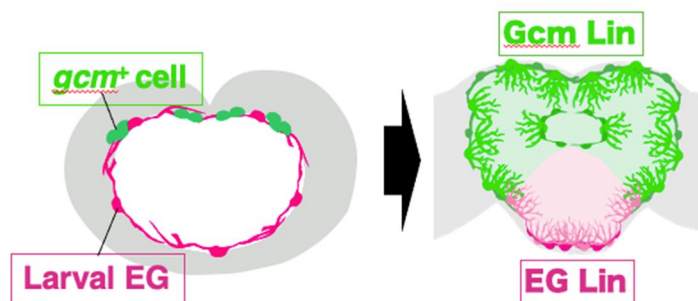
このような細胞系譜間の関係とそれを制御する分子機構を明らかにするために、本研究では「2種類の細胞系譜で独立に遺伝子操作を行い細胞自律的・非自律的效果を同時に解析する技術」を新規に開発する。この方法では、異なる細胞系譜に由来する2種類の細胞集団を、それぞれ GFP と RFP といった異なる蛍光マーカーにより、発生過程を通して恒久的にラベルする。これにより、2つの集団の分布を可視化できる。さらに、それぞれの細胞集団で独立に遺伝子操作を行う。これらにより、一つの細胞系譜集団で特定の遺伝子や細胞の機能を操作した時の細胞集団自律的な影響と他の細胞系譜への非自律的な影響を同時に解析することが可能となる。今回は、個体レベルの解析を迅速に行うことができるキロショウジョウバエを用いて本解析技術の開発を行う。

3. 研究の方法

申請者らが開発した細胞系譜インターセクション法 (Awasaki et al., 2014, Nat Neurosci) では、発生過程のある時期に親細胞で発現する遺伝子の発現を、ユビキタスエンハンサーの活性に転換することで、その子孫細胞を特異的かつ恒久的にラベルすることが可能である。本研究では、これに他の2つの技術を組み合わせ、「2種類の細胞系譜で独立に遺伝子操作を行い細胞自律的・

非自律的効果を同時に解析する技術」を確立する。

本研究では、こうした技術を確立するために、ショウジョウバエ成虫脳ニューロピルグリアに注目して解析を展開する。ショウジョウバエの成虫脳ニューロピルグリア(右図右側)は、幼虫期の脳に存在するグリア前駆体細胞:gcm positive cells (gcm+ cell)と幼虫被覆グリア:Larval ensheathing



glia(Larval EG)(右図左側)という2つの異なる細胞系譜より作られている(Kato et al 2020, Development).具体的には、この系において、(1)幼虫のgcm+ cellとLarval EGで独立のバイナリシステム(GAL4/UASとLexA/lexAop)を用い、(2)異なるリコンビナーゼ(FLPaseとKD:KDR recombinase)を薬剤により幼虫期に限定して発現(GeneSwitch(GS)システム)させて、(3)それぞれを独立のバイナリシステム(GAL4/UASとLexA/lexAop)を用いた細胞系譜インターセクション法で恒久化ラベルすることで、Gcm+細胞系譜とEG細胞系譜(右図右側)のそれぞれをの独立した遺伝子操作やラベルを可能にする。

4. 研究成果

(1)独立バイナリシステム(GAL4/UASとLexA/lexAop)による幼虫のgcm+ cell(aNGP:adult neuropil-glia cell precursors)とLarval EG(LEG)の操作: GAL4系統の遺伝子発現ライブラリーおよび論文で公表された遺伝子発現情報より、幼虫脳/CNSの発現を手がかりにして、aNGPとLEGで発現することが予想されるエンハンサーを探索して、それぞれ3つのエンハンサー配列を同定し、各3種のaNGP-GAL4、LEG-LexA系統を作出した。

それぞれ3種の系統について、その遺伝子発現誘導能について調べたところ、それぞれ1系統のみがaNGPならびにLEG特異的な遺伝子発現誘導が可能な系統であることがわかった。ただし、LEG-LexA系統については、3齢幼虫後期ではaNGPにおいても遺伝子発現を誘導してしまうことがわかった。このことは、これらのエンハンサーを使い(2)における、幼虫期限定的に遺伝子の発現誘導を行う場合、GAL4とLexAの活性化のステージを分ける必要があることを示した。

(2) 薬剤を用いたリコンビナーゼの限定的発現システムの適用:

1. 薬剤発現誘導システム: GeneSwitch(GS)システムのみを利用し、GAL4ならびにLexAとこれを融合させた、GAL4-GSとLexA-GSを用いて薬剤(RU486)で時期特異的にGAL4とLexAを活性化させる予定であったが、(1)の実験結果より、aNGPは3齢幼虫後期にLEGは3齢幼虫前期から中期において遺伝子発現を誘導する必要があることが示された。それゆえ、GSシステムに加えて、Destabilizing Domain(DD)システム(薬剤[TMP]存在下でのみDDドメインを持つ分子の分解が抑制されるシステム)を同時に利用するべく計画を変更した、aNGP-GAL4-GSとLEG-LexA-DD系統を作出した。

LEG-LexA-DDの動作点検を行ったところ、LEG-LexA-DDはlexAop-RFPといった蛍光マーカーの発現を薬剤依存的に誘導することが確認できた。しかしながら、薬剤誘導したLEG-LexA-DDによりlexA-KDを発現させたところ、ターゲット配列となるKDRTの組換えを誘導することができなかった。このことは、薬剤によるLexAの活性化では十分なりコンビナーゼの発現を誘導することができないことを示した。

(3) 2つのバイナリシステムを用いた細胞系譜インターセクション法による恒久化ラベル:

全細胞(Act in5C)、グリア細胞(repo)、アストロサイト様グリア(ALG)、被覆グリア(EG)の中でリコンビナーゼが発現する特定の細胞系譜に由来する集団をラベルするため、各細胞種特異的エンハンサーの下流にFRT-stop-FRT-GAL4(FOT-GAL4)およびKDRT-stop-KDRT-LexA(KOT-LexA)を持つコンストラクを作成し、以下の系統を作出した、Act in5C-FOT-GAL4、repo-FOT-GAL4、ALG-FOT-GAL4、EG-FOT-GAL4、Act in5C-KOT-LexA、repo-KOT-LexA、ALG-KOT-LexA、EG-KOT-LexA。それぞれワークするかどうかを確かめたところ、Act in5C-FOT-GAL4とAct in5C-KOT-LexAはうまく機能しないことがわかったが、他の系統はワークすることがわかった。

(4) 2種類の細胞系譜で独立に遺伝子操作を行い独立に可視化する技術:

上述の(1)~(3)を組み合わせることで、本目的が達せられる予定であったが、(2)が困難となり目的とした技術を完全な形で確立することはできなかった。その理由の一つがLEGのみで特異的に遺伝子操作することができなかったからである。LEGエンハンサーは成虫のEGのエンハンサーでもあるため、これを幼虫期に限定的に活性化できない場合、すべてのEGで遺伝子操作がなされてしまうからである。その結果、細胞系譜特異的な効果とそれ以外の効果を区別

することが困難となる。一方で、aNGP 特異的な細胞操作は可能であり、その細胞系譜に由来する、2種類のグリアサブタイプ(ALGとEG)を成虫で特異的にラベルすることができる。ゆえに、今回開発したツールにより、成虫のALGとEGのみに注目すれば、aNGPに由来する細胞系譜で遺伝子操作を行いその細胞自律的效果ならびに、それがaNGP細胞系譜以外の細胞群に及ぼす細胞非自律的效果の可視化が可能である。2種類の細胞系譜について解析することは叶わないものの、特定の細胞系譜とそれ以外については解析が可能であり、今回開発モデルとして用いたショウジョウバエ成虫脳のニューロピルグリアの解析においては有用な技術が確立できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Orihara-Ono M, Kato K, Awasaki T |
| 2. 発表標題 Identification of genes essential for differentiation of neuropil-glia in adult Drosophila brain. |
| 3. 学会等名 14th Japan Drosophila Research Conference |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 織原-小野 美奈子, 加藤 健太郎, 栗崎 健 |
| 2. 発表標題 ショウジョウバエ成虫脳(neuropil glia)の発生に関する因子の新規同定 |
| 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 織原-小野 美奈子, 加藤 健太郎, 三好 啓太, 齋藤 都暁, 栗崎 健 |
| 2. 発表標題 ショウジョウバエ成虫脳のニューロピルグリアの発生分化と機能に必要な遺伝子の同定 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|------------------------------------------------|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 加藤 健太郎 (Kentaro Kato) (30733068) | 杏林大学・医学部・講師 (32610) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|