

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23739

研究課題名（和文）新たな手法DamIDを用いた多様な神経細胞を作り分けるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding molecular mechanisms that regulate neuronal diversity using DamID technique

研究代表者

鈴木 匠（Suzuki, Takumi）

茨城大学・理工学研究科（理学野）・助教

研究者番号：30623764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経幹細胞から生み出された多様な神経が、正しい場所に移動し、最適な相手と結合することで正確な神経回路が構築される。神経幹細胞では、Temporal Factors(TFs)という転写因子群が特定の順序で発現することで、多様な神経を作り分けているが、TFsの下流でどのような遺伝子が制御され細胞運命を決定しているのかはわかっていない。そこで、TFsによって制御される遺伝子を探索したところ、TFsの一種であるSlpによってDanと呼ばれる遺伝子が制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったTFsのゲノムワイドなDNA結合パターン解析によって、TFsのひとつであるSlpの下流で働く遺伝子候補としてDanを同定した。これまで、それぞれのTFsの下流で機能する遺伝子は同定されていないため、Danの同定によって、神経幹細胞が多種多様な神経を生み出す分子機構の解明への糸口が得られた。ショウジョウバエの脳神経系は哺乳類の脳神経系と構造的・発生学的な特徴を共有するため、哺乳類大脳においても類似したメカニズムで神経の産生を制御している可能性が高い。このように、本研究で得られた成果は、動物界に共通した神経運命決定メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：A wide variety of neurons are produced from neural stem cells. The neurons migrate to the correct location and join with their optimal counterparts to establish precise neural circuits. In neural stem cells, a group of transcription factors called Temporal Factors (TFs) are expressed in a specific order to produce diverse neurons, but it is not known what is going on downstream of TFs to determine cell fates. Therefore, we searched for genes regulated by TFs, and found that a gene called Dan is regulated by Slp, one of TFs.

研究分野：発生生物学

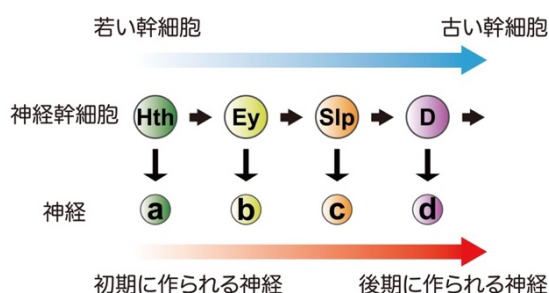
キーワード：DamID ショウジョウバエ 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脳の複雑な機能はどのようにして獲得されるのか、という疑問は神経科学の根源的な問題である。脳機能は発生過程において形成された神経回路によって実現されている。しかし、大脳皮質は莫大な種類の神経細胞を含み、神経の誕生から回路形成までを一貫して解析することが極めて困難であるため、どのようにして多種多様な神経細胞が作り分けられ、どのように神経回路に組み込まれていくのか？という点は未解明のままである。これらの問題の解決なしには、脳機能の獲得メカニズムの理解は成し得ない。

ハエ視覚中枢は、層・カラム構造といった哺乳類の脳と共通した構造を持ち、約100種・4万個の神経細胞から構成され解析可能な程度の複雑性を持つため脳神経系の解析モデルとして注目されている[Hasegawa et al., 2011]。さらにハエでは、分子遺伝学的技術が発展しており、他のモデル系では不可能な解析を効率良く行うことができる。我々は以前の研究で、ハエ視覚中枢では、Temporal Factor と呼ばれる一連の転写因子群が決められた順序で一過的に発現することによって、1つの神経幹細胞が数十種類に及ぶ多様なタイプの神経細胞を生み出していることを報告した[Suzuki et al., 2013; 2014; 2016a、図1]。しかし、このような幹細胞自身の内的な変化によって神経細胞の多様性が生み出されると考えられているが、Temporal Factor がどのようにして働き、細胞の運命を決定しているのかは全く分かっていない。

図1. TFs による神経の運命決



2. 研究の目的

我々は、以前の研究で、ハエ視覚中枢には前方に位置する幹細胞プール outer proliferation center (OPC)に加えて、後方に位置する glia precursor cells (GPC)においても神経細胞が産生されていることを報告した[Suzuki et al., 2016b]。OPC、GPC のいずれの領域でも、Temporal Factor が神経の運命決定に重要な役割を果たすことが知られている[Bertet et al., 2014]。両者の Temporal Factor はほぼ同一の遺伝子セット(転写因子 Ey, Slp, D は共通)であるにも関わらず、全く異なるタイプの神経細胞を産生している。つまり、同じ転写因子であっても OPC と GPC では働きが全く異なることが考えられる。この点に注目し、OPC と GPC において、同一の Temporal Factor がそれぞれどのように働き、異なるタイプの神経が生み出されるのかを解明するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、OPCとGPCで共通している Temporal Factor に注目し、それぞれの転写因子が制御している遺伝子を探索し、それぞれの Temporal Factor の下流で機能する遺伝子を同定する、という戦略を採用した。

新規のアプローチとして DamID 法を用いた。DamID 法では、5'-GATC-3'配列を認識する DNA アデニンメチルトランスフェラーゼ(Dam)を目的の DNA 結合タンパク質に融合させ、特定の細胞でこの融合タンパクの発現を誘導する。すると、Dam は目的のタンパク質が結合した領域の近傍にある 5'-GATC-3'配列を認識しメチル基を転移させるので、目的のタンパク質が結合した領域付近はメチル基によってマークされる。DNA のゲノムワイドなメチル化パターンを解析することにより、DNA 結合タンパク質の結合領域を特定できる [Southall et al., 2013]。OPC、GPC のそれぞれについて、同じ Temporal Factor の DNA 結合パターンをゲノムワイドに解析し、両者で DNA 結合パターンに違いが見られる領域に注目し、それぞれの

領域で特異的な Temporal Facrtor の標的遺伝子を探索した。

4. 研究成果

<TF-Dam 系統の樹立>

DamID による解析では、それぞれの TF の末端に Dam を挿入した融合タンパク質を発現する系統が必要である。そこで、はじめに OPC と GPC に共通する TFs である Ey, Slp, D について Dam 融合タンパク質の発現コンストラクトの作成を行った。Slp, D については発現ベクターの構築に成功し、マイクロインジェクション法によってこれらをショウジョウバエ胚に注入し、遺伝子組換え系統を樹立した。Ey-Dam については現在、発現コンストラクトを作成中である。

<OPC、GPC におけるトランスクリプトーム解析>

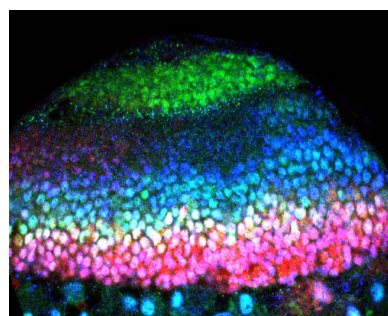
それぞれの TF の標的遺伝子を特定するためには、次の二段階の解析が必要となる。①それぞれの TF の DNA 結合パターンを調べ、結合が見られる領域に含まれる遺伝子が標的遺伝子の候補となる。②これらの標的候補が実際に、神経幹細胞で発現していることを確認する。

上述の TF-Dam 系統の作出にはマイクロインジェクション後に 2 カ月程度の時間を必要としたため、この期間に OPC、GPC において特異的にトランスクリプトーム解析を行い、この後の解析を円滑に進められる準備を整えることとした。細胞特異的なトランスクリプトーム解析には、シングルセル RNAseq が中心的な手法として広く用いられているが、OPC、GPC から神経幹細胞のみを選別し、大量に収集することは極めて困難であるため、ここでは DamID によるトランスクリプトーム解析を行った。RNA ポリメラーゼ II に Dam を融合させたタンパク質を用いれば、RNA ポリメラーゼ II の DNA 結合パターン、つまり転写が行われた領域を特定できる。OPC、GPC において特異的に遺伝子発現を誘導可能な系統はすでに同定済みのため、これらの系統を用いて、それぞれ特異的にトランスクリプトーム解析を行った。このようにして得た発現遺伝子リストには、神経幹細胞で特異的に発現している Deadpan や Miranda、TFs である Slp や D が含まれており、実験系が機能していることを確認した。

<OPC、GPC における Slp の標的遺伝子>

本研究で樹立した Slp-Dam 系統を用いて、OPC、GPC における Slp の標的遺伝子を探索した。これまでの研究から、それぞれの TF 間には相互関係が見られることがわかっており、Slp は次に神経幹細胞で発現する D の発現を誘導することがわかっている。このため、D の遺伝子座に注目したところ、Slp が高頻度に結合していることがわかった。このことから、Slp は直接的に D の調節領域に結合し、その発現を制御していることが示唆された。次に OPC において Slp が強く結合する領域を探索したところ、*distal antenna (dan)* とよばれる遺伝子の調節領域に高度に結合していることがわかった。先に行ったトランスクリプトーム解析でも、Danr は OPC の発現遺伝子リストに入っていた。さらに、実際に発現解析を行ったところ、Slp 発現時期の神経幹細胞での発現が確認された [図 2]。GPC では、このような結合パターンは見られなかったため、Dan は OPC で特定な Slp の標的である可能性が考えられた。

図 2. Dan の発現パターン



Dan/Slp/神経幹細胞

今後、今回同定した Dan の機能解析によって、TFs が生み出される神経の運命を決定する分子機構の解明に近づくことが期待される。

【引用文献】

Bertet C, Li X, Erclik T, Cavey M, Wells B, Desplan C. Temporal patterning of neuroblasts controls Notch-mediated cell survival through regulation of Hid or Reaper. *Cell*, 158, 1173-1186, 2014.

Hasegawa E, Kitada Y, Kaido M, Takayama R, Awasaki T, Tabata T, Sato M. Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the *Drosophila* visual center. *Development*, 138, 983-993, 2011.

Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH. Cell-type-specific profiling of gene expression and chromatin binding without cell isolation: assaying RNA Pol II occupancy in neural stem cells. *Dev Cell*, 15, 101-112, 2013.

Suzuki, T., Hasegawa, E., Nakai, Y., Kaido, M., Takayama, R., Sato, M. Formation of neuronal circuits by interactions between neuronal populations derived from different origins in the *Drosophila* visual center. *Cell Reports*, 15, pp499-509, 2016b.

Suzuki, T., Kaido, M., Takayama, R., Sato, M. A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. *Developmental Biology*, 380, pp12-24, 2013.

Suzuki, T. and Sato, M. Neurogenesis and neuronal circuit formation in the *Drosophila* visual center. *Development, Growth & Differentiation*, 56, pp491-498, 2014.

Suzuki, T., Takayama, R., Sato, M. *eyeless/Pax6* controls the production of glial cells in the visual center of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 406, pp343-353, 2016a.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato M., and Suzuki, T	4. 巻 16
2. 論文標題 Cutting edge technologies expose the temporal regulation of neurogenesis in the Drosophila nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fly	6. 最初と最後の頁 222-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336934.2022.2073158	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takumi Suzuki and Andrea H. Brand
2. 発表標題 Identifying genes that regulate neural stem cell quiescence
3. 学会等名 43回 日本分子生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akari Tanaka, Yuanchang Tsai, Naho Tsubota, Takumi Suzuki
2. 発表標題 Understanding molecular basis that produces neuronal diversity in different progenitor pools
3. 学会等名 44回 日本分子生物学会大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------