

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15099

研究課題名（和文）シングルセル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明

研究課題名（英文）Elucidation of differentiation mechanism of bipolar tail neurons in the ascidian larvae by single-cell transcriptomics

研究代表者

堀江 良子 (Horie, Ryoko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特別研究員 (PD)

研究者番号：90894907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ホヤの幼生の神経系はわずか231個（中枢神経系は177個、末梢神経系は54個）と少数の細胞から構成されている。そのため、神経系に存在する全ての神経細胞の分化機構を単一細胞レベルで解明することが可能である。本研究課題は、申請者らが行ってきた個体丸ごとの単一細胞トランスクリプトームデータを利用することにより、ホヤ幼生の神経系に存在する神経細胞のうち、尾部に存在する双極型感覚神経細胞の分化機構を解明することを目指して研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、わずか231個の神経細胞から構成されるホヤの神経系をモデルとして、神経細胞の分化機構、特に尾部に存在する双極型感覚神経細胞の分化機構を解明することに成功した。また、この研究成果をもとに双極型感覚神経細胞を人為的に作り出すことにも成功している。今後は、この研究成果をもとにヒトにおいて任意の神経細胞の分化を誘導する技術の開発につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：The nervous system of ascidian larvae consists of only 231 cells (177 in the central nervous system and 54 in the peripheral nervous system). Therefore, it is possible to elucidate the differentiation mechanisms of all neurons in the nervous system at the single-cell level. In this research project, the applicants aimed to elucidate the differentiation mechanism of bipolar sensory neurons in the caudal region among the neurons in the nervous system of ascidian larvae by using the single-cell transcriptome data of whole individuals that they have conducted.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞分化 単一細胞トランスクリプトーム 神経細胞 ホヤ

1. 研究開始当初の背景

尾索動物のホヤの幼生はオタマジャクシ型の形態をしており、脊椎動物と共通の体制を備えている。ホヤ幼生の神経系には、神経管から派生する中枢神経系と表皮感覚神経細胞により構成される末梢神経系が存在する。ホヤの幼生の神経系を構成する細胞数はわずか 231 個(中枢神経系は 177 個、末梢神経系は 54 個)と少数の細胞から構成されている。そのため、神経系に存在する全ての神経細胞の分化機構を単一細胞レベルで解明することが可能である。ホヤは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、神経細胞の分化機構を研究するうえで優れた特性を備えている。しかしながら、特定の神経サブタイプで特異的に発現する転写因子やシグナル分子の情報が不足していることから、各神経サブタイプの分化機構については不明な点が多く残されていた。

最近、申請者らは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.*, Nature 2018)。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、ドーパミン神経の分化に必須の転写因子の同定に成功した (Horie *et al.*, Genes & Development 2018)。さらに、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、ホヤ幼生の神経系の細胞は 24 種類のサブタイプに分類できることを明らかにした。この単一細胞トランスクリプトーム解析を基にした遺伝子発現プロファイルデータを活用することにより、特定の神経サブタイプ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神経細胞の分化機構を解明するための基盤が完成した。

本研究課題では、ホヤ幼生の神経系に存在する神経細胞のうち、尾部に存在する双極型感覚神経細胞 (Bipolar Tail Neurons 以下、BTNs と略す。) の分化機構を解明することを目指す。ホヤ幼生の神経系には、神経板境界由来の 4 種類の感覚神経細胞 (PSCs, aATENs, pATENs, BTNs) が存在している。このうち BTNs は脊椎動物の神経堤細胞由来の感覚神経細胞である後根神経節との相同性が示されており (Stolfi *et al.*, Nature 2015)、進化的にも興味深い細胞である。BTNs の分化機構については、申請者らのグループも含めていくつかの研究グループから転写因子 *Msx* や *Neurogenin* が BTNs の初期の運命決定に重要な役割をすることが報告されているが (Stolfi *et al.*, Nature 2015, Li *et al.*, PNAS 2017)、BTNs の最終分化運命決定機構については未だ不明な点が多く残されていた。

申請者は単一細胞トランスクリプトームのデータをもとに BTNs を含む最終分化した感覚神経細胞で特異的に発現する転写因子として *POUIV* を同定している。さらに、*POUIV* の過剰発現実験や機能阻害実験により *POUIV* が BTNs の分化に必須であるというデータを得ている。本研究では、これまでの研究成果をもとにゲノミクス手法と発生生物学的な手法を組み合わせた研究を展開し、BTNs の分化機構を解明することを目指して研究を行った。

2. 研究の目的

上記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、『*POUIV* 過剰発現胚における単一細胞トランスクリプトーム解析解析』、『*POUIV* 過剰発現胚において発現が上昇した転写因子の機能解析』、『*POUIV* 過剰発現胚において発現が上昇した遺伝子の転写調節領域の解析』

の 3 つの研究を通して、尾部に存在する双極型感覚神経細胞 (BTNs) の分化機構を解明することを目指した。

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、尾部に存在する感覚神経細胞 (BTNs) の分化機構を解明することを目指す。具体的には以下の 3 つの研究を行う。

POUIV 過剰発現胚における単一細胞トランスクリプトーム解析解析

申請者は、表皮細胞全体で *POUIV* を過剰発現させた胚において単一細胞トランスクリプトームを行うことにより、異所的に多数の神経細胞が分化すること、この異所的に分化してきた神経細胞は BTNs と似た遺伝子発現パターンを示すというデータを既に得ている。野生型の BTNs で特異的に発現し、かつ *POUIV* の過剰発現により異所的に分化した BTNs において発現が上昇した遺伝子の同定を行い、*POUIV* の下流において BTNs の分化や機能に関係すると予想される遺伝子群を同定する。特に細胞の分化に重要な役割を担う転写因子、神経細胞の機能に重要であるイオンチャンネルや神経伝達物質の受容体に着目して解析を行う。

POUIV 過剰発現胚において発現が上昇した転写因子の機能解析

ホヤではモルフォリノオリゴや TALEN、CRISPR 等のゲノム編集ツールを卵に顕微注入することにより、標的遺伝子の機能阻害を簡単に行うことができる。の実験で同定した転写因子の機能阻害実験を行い、BTNs の分化への影響を明らかにする本実験により、BTNs の分化において *POUIV* の下流で働く因子や *POUIV* と共役して働く転写因子を同定する。

POUIV 過剰発現胚において発現が上昇した遺伝子の転写調節領域の解析

単一細胞トランスクリプトーム解析の利点の1つが、数十個から百個程度の細胞種特異的なマーカー遺伝子を一挙に得ることが可能なことである。BTN_sで特異的に発現する遺伝子のうち、POUIVの過剰発現により発現が上昇した遺伝子について、遺伝子発現調節領域の解析を行い、POUIVによるBTN_sへの分化運命決定機構についてシス側からの解析を行う。BTN_sで特異的に発現する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BTN_s特異的な遺伝子発現を示すことを確認する。そして、発現調節領域の欠失、置換実験を行うことにより、BTN_s特異的な遺伝子発現調節機構を明らかにする。実験により、およびの実験で同定した転写因子が、POUIVと共役してBTN_s特異的な遺伝子の発現を誘導するかどうかを明らかにするとともに、BTN_s特異的な遺伝子の転写調節領域に存在する転写因子の結合配列から新たな遺伝子発現を誘導する転写因子の同定を試みる。

4. 研究成果

POUIV 過剰発現胚における単一細胞トランスクリプトーム解析

表皮細胞全体でPOUIVを過剰発現させた胚において、野生型のBTN_sで特異的に発現し、かつPOUIVの過剰発現により異所的に分化したBTN_sにおいて発現が上昇した遺伝子の検索を行った。その結果、BTN_sの分化において必須の働きがされている*Neurogenin*、*NK5*の発現が上昇することが出来らかとなった。また、イオンチャネル群としてはBTN_sのマーカーとして使用されている感受性イオンチャネル(*ASIC1b*)の発現が有意に上昇していることが確認できた。これらの結果から、従来、POUIVの上流で働くことが知られていた*Neurogenin*がPOUIVによって発現が制御されている可能性が示唆された。

POUIV 過剰発現胚において発現が上昇した転写因子の機能解析

の実験から、表皮細胞全体でPOUIVを過剰発現させた胚において発現が上昇する転写因子として*Neurogenin*を同定した。POUIVの機能を阻害するとBTN_sにおける*Neurogenin*の発現は消失した。一方で、*Neurogenin*の機能を阻害するとBTN_sにおけるPOUIVの発現が失われ、BTN_sは消失した。この結果から、両者がお互いを活性化するフィードバックループがBTN_sの分化において働いている可能性が示唆された。

POUIV 過剰発現胚において発現が上昇した遺伝子の転写調節領域の解析

の実験からPOUIVによって*Neurogenin*の発現が制御されている可能性が示唆された。これを検証するために*Neurogenin*のBTN_sに特異的な最小エンハンサーの同定を行った。段階的な欠失実験の結果、*Neurogenin*のBTN_sに特異的な最小エンハンサー-250bpを同定することに成功した。この*Neurogenin*のBTN_s特異的な最小エンハンサーにおいて、POUIVの結合サイトを検索したところ、わずか250bpの中に8個のPOUIV結合サイトが存在することが明らかとなった。この8個のPOUIV結合サイトに変異を導入したところ、レポーター遺伝子のBTN_sにおける発現は完全に消失した。これらの結果から、POUIVが*Neurogenin*の発現を直接制御していることが示された。

また、*Neurogenin*だけでなく、*NK5*、*ASIC1b*のエンハンサー解析を行い、BTN_s特異的な最小エンハンサーの同定に成功しており、それぞれの最小エンハンサーにPOUIV結合配列が存在することを確認した。

以上の研究およびこれまでの研究の結果から、BTN_sの分化には*Msx*→*Neurogenin*→POUIVの遺伝子ネットワークが働いていること、さらに*Neurogenin*とPOUIVには、両者がお互いを活性化するフィードバックループが存在しており、このフィードバックループがBTN_sの分化において必須の働きをしていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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 堀江良子、一寸木明日香、堀江健生	4. 巻 113
2. 論文標題 非コード領域による転写制御 遺伝子発現のタイミングをつくり出す新たなメカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1931 ~ 1936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 長谷川達也, 堀江良子, 笹倉靖徳, 堀江健生
2. 発表標題 カタコウレイボヤにおけるNK6遺伝子の転写調節領域の解析
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 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 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解析
3. 学会等名 日本動物学会 近畿支部 研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀江良子, 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 日本動物学会 近畿支部 研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asuka Chokki, Ryoko Horie, Yasunori Sasakura, and Takeo Horie
2. 発表標題 Gravitaxis neural circuit in the ascidian larva
3. 学会等名 11th International Tunicate Meeting
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

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