

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19249

研究課題名（和文）シングルセルゲノミクスとイメージングによる遺伝子発現のタイミング制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms controlling the timing of gene expression by single-cell genomics and live imaging

研究代表者

堀江 健生（Horie, Takeo）

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10455925

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現の制御には、エンハンサーによる遺伝子発現の活性化が重要な役割を担っている。エンハンサーによる遺伝子発現調節については、組織特異的な発現調節機構については解析が進んでいるが、遺伝子発現のタイミングをコントロールする仕組みについては不明な点が多い。本研究では、ホヤ胚をモデルとして、遺伝子発現のタイミングをコントロールする仕組みについて、ゲノミクス的手法と転写のライブイメージングの手法を用いて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

遺伝子発現の制御は、個体発生だけでなく、癌などの疾患とも関係しており、正確な遺伝発現制御機構を解明することは生物学的にも医学的にも重要な研究課題である。本研究では、コンパクトなゲノムを持つホヤを用いて遺伝子発現の時間的なタイミング制御機構に関する研究を行い、転写因子間の結合距離の違いが遺伝子発現のタイミングを制御することを明らかにすることに成功した。今後はヒトをはじめとした脊椎動物においても同じメカニズムが存在するかどうか検証する実験を行っていきたい。

研究成果の概要（英文）：Activation of gene expression by enhancers is essential in regulating gene expression. Although the tissue-specific regulation of gene expression by enhancers has been well analyzed, the mechanism that controls the timing of gene expression still needs to be determined. In this study, using the ascidian embryo as a model system, we aimed to elucidate the mechanisms that control the timing of gene expression using genomics and live imaging of transcription.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ホヤ 遺伝子発現 転写 エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

正確な遺伝子発現は、個体の正常な発生に必須であるだけでなく、その異常は癌などの疾患の原因とも関連しており、まさに生命現象の根幹を成すものである。したがって、正確な遺伝子発現をもたらす制御機構を解明することは生物学的にも医学的にも重要な研究課題である。遺伝子発現は様々な段階で制御されているが、転写段階における制御においては、エンハンサーによる遺伝子発現の活性化が重要である。エンハンサーは遺伝子をコードしない非コード DNA 領域で、自身に結合する転写因子からの入力をもとに、標的遺伝子の転写活性を時空間的に制御している。エンハンサーによる遺伝子発現調節については、組織特異的な遺伝子発現調節機構については解析が進んでいるが、遺伝子発現のタイミングをコントロールする仕組みについては不明な点が多い。これは、同じ組織で発現するが、発現のタイミングが異なる遺伝子のエンハンサーの情報不足しているため、それらの比較解析から遺伝子発現のタイミングに迫る研究が進んでいなかったことが原因の一つである。また、従来のエンハンサーの機能解析の手法は、発生の特定の時間のスナップショット的な解析が主な手法であり、継時的な解析が可能な実験手法がなかったことも大きな要因である。提案者らはこの問題について、ホヤを用いて解明を目指している。

ホヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に属している。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基本的な体制を備えているが、個体を構成する細胞は約 2600 個と非常に少数である。提案者らが行った個体丸ごとの単一細胞トランスクリプトーム解析 (Horie et al., Nature 2018) のデータから、ホヤの個体は約 100 種類の細胞種から構成されることが明らかとなっている。また、ホヤは遺伝子発現調節機構の研究に多くの利点を備えている。ホヤの遺伝子発現調節領域の長さの平均は約 4kb と脊椎動物と比較して非常に短い。また、胚への遺伝子導入法が確立されており、短時間で多くの DNA コンストラクトを導入することが可能である。このように個体を構成する細胞種が全て同定されており、遺伝子発現調節機構の解析のための実験技術が確立されているホヤは、各細胞種の分化過程における遺伝子発現調節機構を解析する上で優れたモデルになると考えられる。さらに、発生過程における単一細胞トランスクリプトームによる解析 (Cao et al., Nature 2019) から、同じ組織ながらも異なるタイミングで発現する遺伝子群のリストが完成しており、その情報をもとに組織特異的なエンハンサーを時間軸にそって大量に同定することが可能であることから、ホヤは遺伝子発現のタイミング制御機構を研究する上で最適な研究材料である。

最近、申請者らは単一細胞トランスクリプトーム解析の結果から、ホヤにおいてドーパミン神経で特異的に発現する遺伝子群を約 100 個同定することに成功した。それらのうち、『ドーパミン関連遺伝子』と『ホルモン・神経ペプチド関連遺伝子』の発現は、Ptf1a と Meis という同じ 2 つの転写因子によってコントロールされているにもかかわらず、発現のタイミングが異なることを明らかにした。さらに、発現の遅い『ドーパミン関連遺伝子』のエンハンサーでは、Meis と Ptf1a の結合配列間の距離は約 150bp 離れているが、発現の早い『ホルモン・神経ペプチド関連遺伝子』のエンハンサーでは、Meis と Ptf1a の結合配列間の距離が非常に近いことを突き止めた。

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、『同じ組織に発現するが、発現のタイミングが異なる遺伝子群のエンハンサー領域の解析』、『転写のライブイメージングによる遺伝子発現のタイミングの定量的解析』、『同定したタイミングを制御する遺伝子発現制御機構の一般化』以上 3 つ研究を通して、遺伝子発現のタイミングの違いを生み出す分子機構について、エンハンサーにおける転写因子の結合配列の距離の違いという観点から明らかにすることを旨とする。

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転写のライブイメージング解析を組み合わせることにより、遺伝子発現のタイミングの違いを生み出す分子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。

同じ組織に発現するが、発現のタイミングが異なる遺伝子群のエンハンサー領域の解析

ホヤのドーパミン神経において、『ドーパミン関連遺伝子』と『神経ペプチド関連遺伝子』の発現はどちらも Ptf1a, Meis という同じ 2 つの転写因子によって発現が制御されているにもかかわらず、発現のタイミングが異なることが明らかとなっている (Horie et al., Genes & Development, 2018)。申請者らは、30 個のドーパミン神経特異的な遺伝子のエンハンサー解析から、発現の遅い『ドーパミン関連遺伝子』のエンハンサーでは、Meis と Ptf1a の結合配列間の距離は約 150bp 離れているが、発現の早い『神経ペプチド関連遺伝子』のエンハンサーでは、Meis と Ptf1a の結合配列間の距離が隣り合っていることを突き止めた。発現の遅い『ドーパミン関連遺伝子』の最少エンハンサーにおいて、他の配列は変えずに Meis, Ptf1a 結合配列の位置を近づけ、発現の

早い『神経ペプチド関連遺伝子』と同じ構造にする、逆に『神経ペプチド関連遺伝子』の最少エンハンサーにおいて、Meis, Ptf1a 結合配列の位置を離し、『ドーパミン関連遺伝子』と同じ構造にする。また、それぞれの中間型の構造にする。これにより、2つの転写因子の結合配列間の距離の違いが、遺伝子発現のタイミングを制御する可能性について実験的に検証する。

転写のライブイメージングによる遺伝子発現のタイミングの定量的解析

上記で明らかにした遺伝子発現のタイミングが異なるエンハンサーについて、MS2/MCP-GFP システムを用いた転写のライブイメージングを行う。MS2/MCP-GFP システムは、コートタンパク質 (MCP) とそれを認識する MS2 RNA ステムループとの相互作用を認識することにより、RNA の転写をイメージングするシステムであり、ショウジョウバエでは個体レベルの遺伝子発現解析に使用されている。ライブイメージングにより発生段階を通して観察を行い、エンハンサーによって誘導された遺伝子発現のタイミングを正確に明らかにする。

同定したタイミングを制御する遺伝子発現制御機構の一般化

上記で明らかにした転写因子の結合配列間の距離の違いが、遺伝子発現のタイミングを制御するという機構について別の組織においても検討し、同定したメカニズムの一般化を行う。

4. 研究成果

同じ組織に発現するが、発現のタイミングが異なる遺伝子群のエンハンサー領域の解析

『ドーパミン関連遺伝子』の一つである TH (チロシン水酸化酵素)の最少エンハンサーについて実験を行い、Meis, Ptf1a 結合配列を近づけることにより、遺伝子発現のタイミングが本来より早くなることを明らかにした。さらに、TH 以外の『ドーパミン関連遺伝子』である AADC, GCH, VMAT, SERT についても同様の実験を行ったところ、Meis, Ptf1a 結合配列を近づけることにより、遺伝子発現のタイミングが本来より早くなることを明らかにした。

逆に『ホルモン・神経ペプチド関連遺伝子』であるナトリウム利尿ペプチド受容体の最少エンハンサーにおいて、Meis, Ptf1a の結合配列を離すことにより、遺伝子発現のタイミングが遅くなった。さらに2種類のナトリウム利尿ペプチド受容体、ソマトスタチン受容体について同様の実験を行ったところ、Meis, Ptf1a の結合配列を離すことにより、遺伝子発現のタイミングが遅くなった。

以上の結果から、ドーパミン神経においては Ptf1, Meis という2つの転写因子の結合配列間の距離の違いが遺伝子発現のタイミングの違いを制御していることが明らかとなった。

転写のライブイメージングによる遺伝子発現のタイミングの定量的解析

全て神経細胞において最も早く遺伝子発現が開始する ETR の遺伝子発現調節領域を用いて、MS2/MCP-GFP システムによる転写のライブイメージングシステムの構築を試みた。ETR の遺伝子発現調節領域の下流に 24XMS2 をつなげた DNA コンストラクトを作成し、ホヤ卵に導入した。MCP-GFP については種々の条件検討の結果、in vitro で mRNA を合成し、合成した mRNA をホヤ卵に導入した。その結果、ETR 遺伝子の転写が始まる原腸胚期から神経胚期にかけて ETR 遺伝子が発現する神経板において MCP-GFP 由来の輝点を確認することが出来た。以上の結果より、MS2/MCP-GFP システムによる転写のライブイメージングシステムをホヤ胚において確立することに成功した。今後は、『ドーパミン関連遺伝子』、『ホルモン・神経ペプチド関連遺伝子』について、発生段階を通して観察を行い、エンハンサーによって誘導された遺伝子発現のタイミングを正確に明らかにしていきたい。

同定したタイミングを制御する遺伝子発現制御機構の一般化

転写因子の結合配列間の距離の違いが、遺伝子発現のタイミングを制御するという機構について、メカニズムの一般化を行う。2つ以上の転写因子によって運命が決定されることが知られている、脊索と筋肉を対象に上記と同じ実験を行い、検証する。すでに申請者らは単一細胞トランスクリプトームデータをもとに、脊索と筋肉について遺伝子発現のタイミングが異なる遺伝子群を大量に同定している。また、これらの遺伝子群の組織特異的なエンハンサーを同定し、脊索については Brachury, Zic1 によって発現が制御されていること、筋肉細胞については Tbx6 と MyoD などの Myogenic factor により発現が制御されることを確認した。今後は、ドーパミン神経を対象に行った 1)、2) の実験を脊索と筋肉でも展開していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5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 668564
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 Sakamoto Aya, Hozumi Akiko, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Horie Takeo, Sasakura Yasunori	4. 巻 64
2. 論文標題 The channel PKD2 is involved in sensing the mechanical stimulus of adhesion for initiating metamorphosis in the chordate <i>Ciona</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 395 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12801	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 -

1. 著者名 Sasakura Yasunori, Horie Takeo	4. 巻 2637
2. 論文標題 Improved Genome Editing in the Ascidian <i>Ciona</i> with CRISPR/Cas9 and TALEN	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 375 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3016-7_28	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 -

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14件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件）

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 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 (国際学会)
4. 発表年 2022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 11th International Tunicate Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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を応用した神経細胞の分化を制御する転写因子カクテルの同定
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀江健生
2. 発表標題 シングルセル解析を応用したホヤ胚における神経細胞の分化を制御する転写因子カクテルの同定
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀江健生
2. 発表標題 ホヤにおける遺伝子発現調節メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第6回幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富山新、堀江健生
2. 発表標題 ホヤ胚における転写のライブイメージングの構築
3. 学会等名 第6回幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeo Horie
2. 発表標題 Regulatory cocktail for dopaminergic neurons in ascidians identified by single cell transcriptomics
3. 学会等名 Adaptive Circuit Census International Symposium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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			