

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657144

研究課題名(和文) 線虫個体における分化転換誘導

研究課題名(英文) Induced reprogramming of cell fate in *C. elegans*

研究代表者

高木 新 (Takagi, Shin)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90171420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞運命・分化の決定機構と安定性解明のために、線虫 *C. elegans* を材料にして、生体内での細胞運命・分化リプログラミング系の確立を試みた。神経細胞発生の完了した線虫幼虫に複数の転写因子群(hlh-14/Ascl1 + hlh-2/E2a, 又は hlh-3/Ascl1 + hlh-2/E2a) を異所発現させることで異所的に神経マーカー発現細胞を作出できることを発見した。一部の細胞は特定の神経細胞特性を示したが、リプログラム前の細胞の特性を併せ持った例もみられた。本実験系が完全なリプログラミングに必要な細胞内コンテキストを解き明かす糸口を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies show that ectopic expression of specific combinations of transcription factors can change identity of apparently differentiated cells. To reveal the underlying mechanisms of reprogramming we here take the worm *C. elegans*, in which the developmental fate of each cell appears to be determined strictly. In larval worms that have completed neurogenesis, forced expression of a mixture of transcription factors induced production of cells that ectopically express pan-neuronal markers. Many of them assumed neuron-like morphology and expressed a marker for differentiated sensory cells, suggesting they underwent complete reprogramming, while some assumed non-neuron-like morphology and co-expressed a marker of a non-neuronal cell type. Thus, we have successfully established an in vivo model for deciphering the cellular contexts necessary for cell reprogramming.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：分化運命 *C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

単一の細胞である受精卵から細胞が多様に運命づけられ分化する機構の解明は、多細胞生物の発生における根本的な研究課題のひとつである。分化の安定性・不可逆性は発生過程の重要な特徴である。しかし、再生時などには、細胞が獲得した分化形質を失い(脱分化)、異なる種類の細胞に分化する(分化転換)例も知られている(Okada (1980) *Curr Top Dev Biol* **16**:349)。近年、induced pluripotent stem (iPS) 細胞作成(Takahashi & Yamanaka, (2006) *Cell* **126**, 633)をはじめとして、脊椎動物細胞において比較的少数の因子の強制発現によって、分化の進んだ細胞の運命を人工的に操作して未分化な細胞に戻したり種類の異なる細胞へ運命を転換したりすることが可能となり、分化安定性の問題に実験的に迫ることができるようになった(Zhou et al., (2008) *Nature* **455**, 627)。例えば Vierbuchen らは哺乳類の繊維芽細胞に *Ascl1*、*Brn2/Pou3f2*、*Myt1l* という転写因子群を同時に発現させることによって、興奮性神経細胞が分化することを報告している((2010) *Nature* **463**, 1035)。

細胞の脱分化・分化転換を促す実験手法の進歩は医療など応用面で画期的であるだけでなく、分化研究の有力な方法論として基礎研究の面からも大いに評価されている。ただ、これまでの実験はほ乳類培養細胞を用いており、その知見がどこまで生体内に適用できるかどうかは不明な点も多い。たとえば培養系では、生体内で運命決定の安定性や分化維持を補償する本来の調節機構が脱落している可能性が考えられる。また、哺乳類で明らかにされた機構が他の動物にどこまで当てはまるのかという疑問も残る。これらの問題に答えるためにも、哺乳類以外の生物種における生体を利用した新たな実験系確立が有益であると、私は考え、材料として線虫 *C. elegans* を選択した。

C. elegans は僅か 1000 個足らずの体細胞から成る微小な動物であるが、筋、神経、表皮など、脊椎動物と共通する多様な組織とそれらを構成する複数の細胞種を持っている。特に、発生を通じて全ての体細胞が同定可能であり、細胞系譜にほとんど個体差が無いというユニークな特徴があることから、細胞運命・分化の変更を検出する上で大変有利な材料といえる。また、*C. elegans* 卵はいわゆるモザイク卵の代表であって非調節的な発生様式を示す。このような生物でも運命決定・分化の安定性維持に脊椎動物と同様の機構が働いているのかと言う観点からも、この動物で細胞運命・分化の安定性と操作可能性を調べることは興味深い。

2. 研究の目的

C. elegans を材料として細胞運命・分化の変更(以下リプログラミングと呼ぶ)現象を研究するために、まず、線虫個体に転写調節因子を強制発現させることで、特定の細胞を別の種類の細胞へとリプログラミングさせる実験系の確立を目指す。次に、リプログラム現象が確認できた系を用いて、生体内での、1)リプログラミングに必要な因子の特定、2)リプログラミングを施すことができる細胞の種類、3)リプログラミングの結果生じた細胞の特性、を解明する。これらの解析を通じて、リプログラミングの機構解明の糸口を得る。

上記の目的のために、神経細胞へのリプログラミングに着目し、1)前述の哺乳類培養細胞を興奮性神経細胞へと分化転換させる因子を選択し、その線虫ホモログの候補を全て発現させて、汎神経マーカーで異所的な神経細胞が形成されるか検証する。次に、この因子群から実際にリプログラミングに必要な因子(群)を特定する。2)リプログラミングで生じた異所的な神経細胞がどの細胞に由来するのかを調べるために、候補となる組織に特異的に発現するマーカーの存在

下でリプログラミング実験を行う。3) リプログラミング実験で形成された神経細胞の特性を、細胞形態および神経細胞サブセット特異的なマーカーを用いて調べる。

3. 研究の方法

哺乳類の培養繊維芽細胞を興奮性神経細胞へと転換させる因子 *Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*, と *Ascl1* と協調して働くことが知られている *Da/E2a* 因子の線虫ホモログ候補計 6 種類 (*Ascl1*: *hlh-14*, *hlh-6*, *hlh-3*), (*Brn2*: *unc-86*), (*Myt1l*: *ztf-11*), (*E2a*: *hlh-2*) のそれぞれの cDNA を熱誘導性タンパク質ヒートショックプロテインのプロモーター (*hsp*) 下流に繋いだプラスミドを作成し、これらを形質転換マーカーである *rol-6D* 遺伝子とともに野生型 *C. elegans* *N2* 系統に導入してトランスジーン *Ex[hsp::hlh-14, hsp::hlh-6, hsp::hlh-3, hsp::unc-86, hsp::ztf-11, hsp::hlh-2; rol-6D]* を作成した。このトランスジーンを 4 種類の汎神経特異的なマーカー (*H20::gfp*, *H20::mCherry*, *F25B3.3p::gfp*, *jkk-1p::HIS-24::mCherry*) 発現系統に、掛け合わせによって導入した。これらの系統の幼虫に対して全身的な熱ショック反応誘導を行い、トランスジーン中の各 cDNA の異所的発現を誘導し、神経細胞が形成されるかどうか検討した。熱ショック反応誘導は *C. elegans* での神経細胞発生が完了する 2 齢幼虫以降に行った。誘導後数時間から数日後に蛍光顕微鏡観察によって異所的に神経細胞が作出されたかどうかを検討した。

異所的に形成された神経細胞の由来を調べるために、組織特異的なマーカー系統 (*ELM::gfp* *Egg Laying Muscle specific promoter) を、また、異所的神経細胞の特性を調べるために感覚神経細胞特異的なマーカー (*osm-6p::gfp*) を利用した。

4. 研究成果

野生型の体側では神経細胞が本来片側 7

つずつしか存在しないが、6 種類の転写調節因子群の異所発現誘導を施した個体では、これらに加えて異所的に神経細胞マーカー *H20::gfp* を発現する細胞が観察された。(Fig 1-2) 異所的 *H20::gfp* 発現細胞は小さな粒状の細胞体から突起を延ばし、神経細胞特有の形態を有していた。*H20::gfp* 以外の複数の神経マーカー (*jkk-1p::HIS-24::mCherry*, (*F25B3.3p::gfp*) を用いた実験でも 6 種転写調節因子群の異所発現誘導によって異所的神経マーカー発現が認められ、それらが神経細胞特有の形態を有していたことから、異所的な神経細胞が形成されたと判断した。

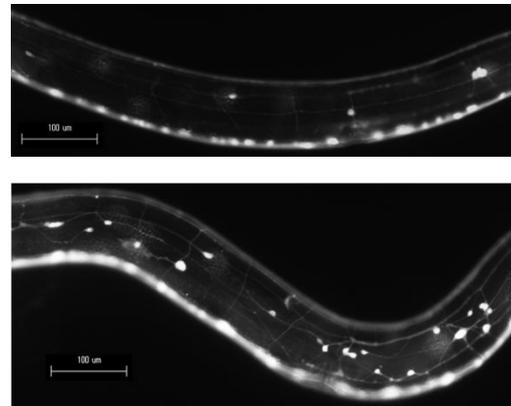


Fig 1 野生型 (上) と *Ex[hsp16.2p::hlh-14; hsp16.2p::hlh-6; hsp16.2p::hlh-3; hsp16.2p::unc-86; hsp16.2p::ztf-11; hsp16.2p::hlh-2; hsp16.2p::mCherry; rol-6d]* での転写因子発現誘導 (下) 個体の体側部における神経マーカー *Is[H20::gfp]* の発現。転写因子発現誘導により、異所的に神経マーカーの発現細胞が出現している。

次にこの異所的神経細胞の形成に必要な因子を特定する為に *Da* を含む各ホモログから一種類ずつ選出した 4 種類の因子を異所発現させたところ、同様に異所的な神経細胞の形成が確認された。これを更に絞り込んだ結果、*ascl1*, *Da* の 2 種類の線虫ホモログ因子 (*hlh-14+hlh-2*, 又は *hlh-3+hlh-2*) の組合せで異所的な神経細胞が形成されるが、*hlh-14*, *hlh-3*, *hlh-2* 各因子の単独発現では異所的神経細胞が出現しないことが明らか

になった。

異所的な神経細胞マーカー発現細胞には、上述の突起を持ち神経細胞に特徴的な小さな核を有し完全に神経細胞リプログラミングされたと考えられる細胞以外に、明らかな突起を持たず非神経的な形状の細胞や神経細胞にしては大きすぎる核を持つ細胞も観察された。後者は、リプログラミングが不完全で由来となる細胞の特性を残している細胞である可能性が考えられる。

そこで異所的な神経細胞マーカーを発現する神経様細胞では神経細胞の特性がどの程度確立されているのかを確認することにした。異所的に形成された神経細胞の中には体側の PDE 神経細胞とよく似た形態を示す細胞が認められたので、これらの細胞で *osm-6p::GFP* の発現を検討した。*osm-6p::GFP* マーカーは野生型線虫の体側では PDE 神経細胞のみが発現するが、転写調節因子群の異所発現誘導個体ではこのマーカー発現する異所的細胞が確認でき、(Fig 2)更にその中には PDE 神経細胞の特徴的な神経突起の伸長とよく似た突起伸長をしていた細胞も確認された。このことから、リプログラミングされた細胞の一部は PDE という特定の神経細胞に分化したと考えられる。

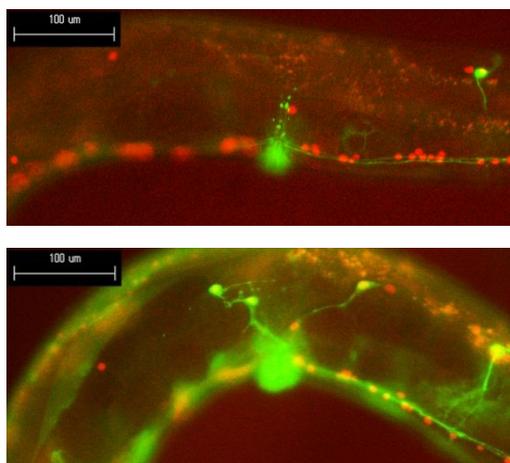


Fig 2: 野生型(上)と PDE 神経細胞(上図右緑色蛍光)に似た異所的神経細胞(下) *Is[osm-6p::gfp; jkk-1p::mCherry; ajm-1::gfp]; Ex[hsp16.2p::hlh-14; hsp16.2p::hlh-2; hsp16.2p::gfp; rol-6d]* 系統を用いた。

次に異所的な神経細胞がどの細胞に由来するのかを調べた。PDE 様の特性を示す異所的細胞は、その位置から体側表皮細胞である seam cell がリプログラミングされたと予想され、現在 seam cell マーカーを利用してこの可能性を検討中である。一方、陰門付近で観察される非神経細胞の形状を示す細胞は本来陰門筋の位置に存在するため、細胞陰門筋マーカーである *ELM::gfp* と汎神経マーカー *H20::mCherry* を掛け合わせて異所発現を行ったところ、陰門筋マーカーと汎神経マーカーを共に発現する細胞が観察された。陰門筋は神経細胞の発生系譜とは大きく隔たって形成されてくる細胞であり、この細胞が部分的にもリプログラミングしたということが事実なら非常に興味深い。

本研究によって転写因子の組み合わせ発現によって線虫個体内で神経細胞へのリプログラミングを引き起こすことができることが明らかになった。異所的に形成された細胞の位置から考えて、本実験条件でリプログラミングを行うことができる細胞は、限定された種類の細胞であると予想される。また、一不十分にリプログラミングされたと考えられる細胞も検出された。これらの細胞は、どのような細胞内コンテキストが完全なリプログラミングに必要なかを解き明かす糸口と成ることが期待される。以上の成果に関して現在、論文作成準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計1件)

Masaki Shimojou, Shin Takagi: Combinatorial expression of defined transcription factors induces ectopic neurons in *C. elegans* larvae. 2013/5/29 くにびきメッセ(松江) 日本発生生物学会第46回年会

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院理学研究科生命理学
専攻 M7 研究室

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~m7home/>

6．研究組織

(1)研究代表者

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

高木 新 (Shin Takagi)

研究者番号：90171420

(2)研究分担者

(3)連携研究者

該当無し