

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14535

研究課題名(和文)上皮形態形成を制御する細胞自他認識機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of self-other recognition mechanisms during epithelial morphogenesis

研究代表者

近藤 武史 (Kondo, Takefumi)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：60565084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮組織の形態形成は、個々の細胞が細胞運命に従って適切に形態を変化させることで生み出される力によって駆動される。いくつかの場合において異なる運命を持つ細胞同士が互いを認識し、自身の振る舞いを制御する。運命決定因子により規定されるトランスクリプトーム状態が、その自他認識に関わると考えられるが、詳細については不明な点が多い。その解明に向けた全ゲノムレベルでの情報基盤を構築するために、まずショウジョウバエ初期胚を対象とした1細胞RNA-seq手法を確立し、251細胞分の1細胞RNA-seqデータを取得した。そして、細胞ごとに発現状態が異なる様々な自他認識制御の候補因子群を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Cooperative action of each cell behavior regulated by cell-fate determinants is important to generate forces to drive epithelial morphogenesis. One of the important steps is that cells with different fates recognize each other and control their behavior. Although transcriptome status created by cell-fate determinants is supposed to regulate self-other recognition, it still remains unclear in details. To understand these mechanisms, we planned to establish quantitative genomic data of early Drosophila embryos at single cell resolution. We first established the protocol of single cell RNA-seq for Drosophila embryos and succeeded to get single-cell RNA-seq data of 251 cells. From this data, we identified some candidate genes that show ununiform expression among cells during dynamic epithelial morphogenesis controlled by self-other recognition.

研究分野：発生生物学

キーワード：上皮形態形成 1細胞RNA-seq ショウジョウバエ 胚発生

1. 研究開始当初の背景

上皮組織の形態形成運動は、個々の細胞が細胞運命に従って適切に形態を変化させることで生み出される力によって駆動される。分子発生物学の発展により、パターン形成機構や細胞運命決定機構については多くのことが明らかになった。また、近年のライブ観察技術の発展により組織内での個々の細胞動態が詳細に観察できるようになり、細胞がかたちを変形させる過程についても理解が進んできている。しかしながら、細胞がどのようにして力の発生と自身の形態変化を決定しているのかについてはあまり理解が進んでいない。

非筋細胞ミオシン II (以下ミオシン) による収縮力の発生は上皮形態形成における主要な駆動力として考えられている。上皮細胞では、ミオシンはアドヘレンスジャンクション(AJ)を裏打ちするように局在するが、形態形成の際にはミオシンは特定の AJ へ異方性を持って強く集積し、その収縮力により細胞の配置換え運動を誘導する。細胞がこの配置換えの方向を平行に揃えることで収斂伸長を引き起こすことはよく知られている (Zallen and Blankenship, *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008)。また、我々は円周状に極性をつくることで陥入運動を駆動することを明らかにしてきた (Nishimura et al, *Development* 2007, Kondo & Hayashi, *Nature* 2013)。しかし、この「ミオシン局在の異方性」を決定する機構はほとんど明らかになっていない。手がかりは、多くの場合において異なる運命を持つ細胞が接する「境界」にミオシンが集積することである (Zallen and Blankenship, *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008)。また、細胞運命は発現する転写因子の組み合わせパターンにより規定される。つまり、その下流で異なる遺伝子発現状態を確立し、それにより自他認識を行っていると考えられるが、どのような遺伝子群の発現差異が自他認識に関与するのかその詳細については不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では「細胞が

遺伝子発現の違いを基準とする未知の自他認識機構を介して、秩序だった上皮形態形成を制御する」という仮説を立てた。その検証のためには、1細胞ごとの詳細なトランスクリプトーム情報の取得が必要であった。そこで、配置換え運動を行うショウジョウバエ胚上皮細胞の遺伝子発現状態を1細胞レベルで空間情報とともに定量解析する手法を新たに確立し、上皮形態形成を制御する細胞自他認識機構を明らかにするための情報基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ初期胚では、転写因子をコードするペアルール遺伝子群が前後軸に沿ってストライプ状に発現する。ペアルール遺伝子は1細胞列ごとに異なる組み合わせで発現しており、細胞分化制御が1細胞列レベルで理解されている非常に希有な例である。さらに、ペアルール遺伝子群の1細胞列レベルでの発現組み合わせの違いが細胞の配置換え運動を誘導し、胚全体の伸長運動を引き起こすことも知られている (Zallen and Blankenship, *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008)。これらペアルール遺伝子による細胞運命制御の下流で機能する胚帯伸長制御因子を同定することを目指して、ショウジョウバエ初期胚からランダムに1細胞を採取し、cDNAライブラリを合成する手法を確立した。そして、この手法を用いて増幅した1細胞 cDNA を次世代シーケンサーにより解析することで1細胞トランスクリプトーム情報を取得した。続いて、遺伝子発現状態から各細胞の元の空間位置情報の推定し、配置換え運動を行う細胞集団を抽出し、それらの細胞間でばらついた発現プロファイルを示す遺伝子を同定した。このようにして抽出した遺伝子群を自他認識制御候補とし、細胞自他認識による上皮形態形成機構の解明に向けた情報基盤の構築を行った。

4. 研究成果

ショウジョウバエ初期胚を対象とした1細胞トランスクリプトームデータの取得のために、まずその実験手法の確立を行った。

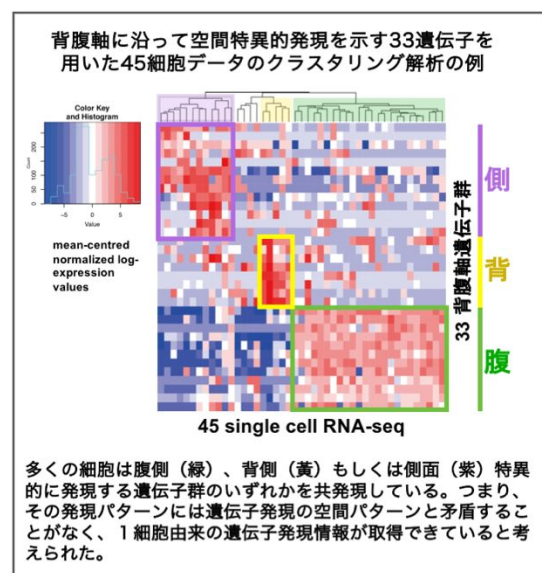
近年の1細胞RNA-seq技術の発展には目覚ましいものがあるが、本研究では特に検出感度（発現を検出できる遺伝子数とダイナミックレンジ）を重視してフリューダイン社のC1を用いて、1細胞RNA-seq解析を進めた。このC1システムでは1細胞単位に分離した生細胞をマイクロ流路に流し込んで1細胞ごとに補足し、1細胞からのcDNA増幅を行う。しかしながら通常のプロトコールでは、ショウジョウバエ胚由来の生細胞はマイクロ流路の中で、おそらく機械的なストレスによって細胞死を起こしてしまうことがわかった。また、胚から細胞を分離する過程においても、細胞が急に細胞死を起こしてしまうことがよく観察されたため、まずこれら問題を解決する必要が生じた。そこで、胚から細胞を分離する手法について様々な検討を行った。胚をホモジナイズする方法、使用する培地もしくはバッファーや添加物（トレハロースやBSA）、細胞分離酵素などについて様々な組み合わせの検討を進め、最終的に細胞死を起こすことなく安定して1細胞に単離する手法を確立した。しかしながら、C1マイクロ流路中での細胞死は抑えることができなかった。そこで、細胞分離後に分子架橋を伴わない方法で細胞を固定する過程を追加した。それにより安定して細胞分離からC1による1細胞cDNA増幅までを行う手法を確立することに成功した。この細胞固定は細胞を胚から単離してからC1にロードし、溶解するまでの間に遺伝子発現状態が変化してしまうことを抑えることができる点においても重要であると考えられる。実際に、胚から直接精製したRNAと固定後のバルク細胞から精製したRNAを用いたRNA-seq解析を行ったところ、両者には強い相関関係（ $R=0.98$ ）が認められた。つまり固定細胞は分離前の胚における遺伝子発現状態を保持していると考えられた。

次に、この新たに確立した手法を用いて251細胞分の1細胞RNA-seqデータを取得し、以下の解析によりそのデータクオリティを検討した。

(1) 固定後のバルク細胞から精製したRNAを用いたRNA-seqデータ（バルクデータ）と1

細胞データの総和の関係性について解析を行ったところ、両者には強い相関関係（ $R=0.93\sim 0.94$ ）が認められ、検出遺伝子数にも大きな差は認められなかった（RPKM >1 として、バルクデータ：8,250~8,257遺伝子、1細胞データ総和：8,119~8,566遺伝子）。一方で、個々の1細胞データでは平均4,556遺伝子の発現が検出された。また、計4回のC1によるcDNA増幅を行っている。そこでトリアルごとに1細胞データを総和しその関係性について解析を行ったところ、各トリアル間にも強い相関関係（ $R=0.96\sim 0.98$ ）が認められた。これらの結果から、確立した1細胞RNA-seq手法では安定して、バルク解析と同程度の検出感度をもつデータを取得できると考えられた。

(2) 前後軸および背腹軸に沿って空間特異的な発現をする遺伝子ランドマーク遺伝子の発現を基準として、各1細胞データが実際に1細胞を反映しているかについて検討した。その結果、その発現パターンは既知の遺伝子発現の空間パターンと矛盾することはなかった（下図にその一例を示す）。つまり、1細胞由来の遺伝子発現情報が取得できていると考えられ、またそれぞれの細胞について得られたトランスクリプトームデータから胚空間におけるおおよそ位置を推定できることが明らかになった。



続いて、251細胞データから既知の遺伝子発現空間パターンの情報を基準として、細胞

自他認識を介した配置換え運動を行う胚側面に位置する 86 細胞を抽出した。それらは外胚葉組織に相当するが、GO 解析を行ったところ関連 GO の割合が増加していた。さらにこれらの細胞間での highly variable gene (HVG) を解析したところ、転写制御因子に加えて多くの膜タンパク質をコードする遺伝子が集団内で不均一に発現することが明らかになった。この中にはこの研究を進める間に、不均一な発現パターンと自他認識に関与することが報告された toll ファミリー因子群に加え、軸索誘導に関わる因子も含まれていた。細胞間認識に関与する因子が複数同定されたことから、これらの複雑な相互作用の組み合わせパターンを介して近隣細胞が互いを認識しあい、形態形成を駆動している可能性が示唆された。

上皮細胞の配置換え運動は動物の形態形成において共通した現象であり、今後これら候補因子の解析を進めることにより、上皮形態形成における普遍的な制御機構の提唱につながることを期待される。また、この研究を進める間に、ショウジョウバエ初期胚の 1 細胞 RNA-seq 解析の結果が別の研究グループから報告された(Karaiskos et al., Science 2017)。この報告では Drop-seq という手法を用いている。しかしながら、我々の C1 を用いた手法ではより多くの遺伝子発現の検出できており、今後は我々が今回確立した高感度手法でさらなるデータ取得を進め、補完し合うことによりショウジョウバエ初期胚の 1 細胞レベルでのより高精度な遺伝子発現カタログの作製にもつながることが期待できる。さらに、ショウジョウバエ初期胚では多様な形態形成運動が観察されることから、ライブ観察により得られる 1 細胞レベルの動態情報、さらには情報科学分野とも融合させることで、自他認識機構の解明にとどまらず、発生現象を自己組織化システムとして理解していくための重要な情報基盤へと発展していくことも期待できる。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

近藤 武史

Genetic programs and mechanical feedback to shape three-dimensional epithelial architecture

第 19 回生命科学研究科シンポジウム

2017 年 7 月 7 日、京都

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 武史 (Kondo, Takefumi)

京都大学・大学院生命科学研究科・特定助教
研究者番号：60565084

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()