

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19398

研究課題名(和文)細胞の形状変化の履歴情報の記憶と呼び出し機構に関する研究

研究課題名(英文)History of cell shape changes and cell-fate determination in asymmetric division

研究代表者

赤沼 啓志 (Akanuma, Takashi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50450721

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)：本研究課題では、まずゼブラフィッシュを用いた遺伝子改変が簡便に行える方法を開発した。ゲノムに挿入する外来遺伝子配列を3kb程度のホモロジーアームで挟んだドナーDNAを、クロマチン構造を緩めるメチル基転移酵素阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と共に受精卵に注入するだけで、ゲノム上の標的部位に挿入することに成功した。この手法を用いて、V2介在神経前駆細胞(V2細胞)の挙動を従来よりも早い段階から長く追跡できる遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製した。現在、V2細胞の形状変化の履歴と非対称分裂による娘細胞の運命選択の関係を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集は、近年盛んに行われているが、ゼブラフィッシュでは効率の面で課題があった。これに対し本研究課題の成果であるCRISPR-Cas9システムを使わない遺伝子改変技術により、従来よりも簡便に遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製できるようになると思われる。そして、ゼブラフィッシュモデルの特長であるイメージング解析にとって有用なトランスジェニックラインが今まで以上に作られるようになり、発生学のみならず様々な分野で活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I first developed a simple and rapid method of homologous recombination-based gene targeting to generate genetically modified zebrafish in which fluorescent proteins are expressed in a cell type-specific manner. Injection of the donor DNA comprising fluorescent protein fragments and long (~3kb) homology arms together with chromatin modifier inhibitors into fertilized zebrafish eggs results in efficient targeting at the predetermined genomic location. Using my novel gene targeting method, I created transgenic zebrafish which expresses the membrane-bound GFP protein in V2 interneuron progenitors (V2 cells). Through the imaging analysis of this zebrafish, I succeeded in recording the V2 cell behaviors over a long time and identified characteristic features of V2 cell shape change. Now I am investigating the relationship between the cell shape change history and fate determination of daughter cells after the asymmetric V2 cell division.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ ライブイメージング 運命決定

## 1. 研究開始当初の背景

細胞には固有の形があり、均一な細胞間であっても、まったく同じ形のものには存在しない。このような非遺伝的な形の違いが、細胞の振る舞いにとって重要な要素であることが古くから知られている。例えば、分裂方向の決定(Hertwig, 1884)や細胞増殖(Folkman and Moscona, 1978)、細胞内情報伝達(Rangamani et al., 2013)などで、細胞の形との関係が明らかにされてきた。では、細胞は、どのように形という情報を記憶し、呼び出すのだろうか。この問題に関して、申請者は、ゼブラフィッシュ胚のV2 介在神経形成での非対称分裂をモデルとして研究を行ってきた。そして、分裂期直前のV2 前駆細胞の形の非対称性に従って、Delta リガンドが局在し、娘細胞の二者択一の運命選択が偏ることを明らかにした(図1; Akanuma et al., Nature Communication, 7:11963, 2016)。では、分裂期直前よりも以前の細胞形状は、娘細胞の運命選択に影響しないのだろうか。また一方、申請者はV2 前駆細胞の経時的な形の変化から、細胞分裂のタイミングを予測できることを示した(Kozawa and Akanuma et al., Scientific Reports, 6:32962, 2016)。これからのことから、形状変化が分裂の時期決定機構に関わっているのかは不明であるが、細胞は形状変化の履歴情報を積極的に活用し、その挙動を制御している可能性が考えられた。

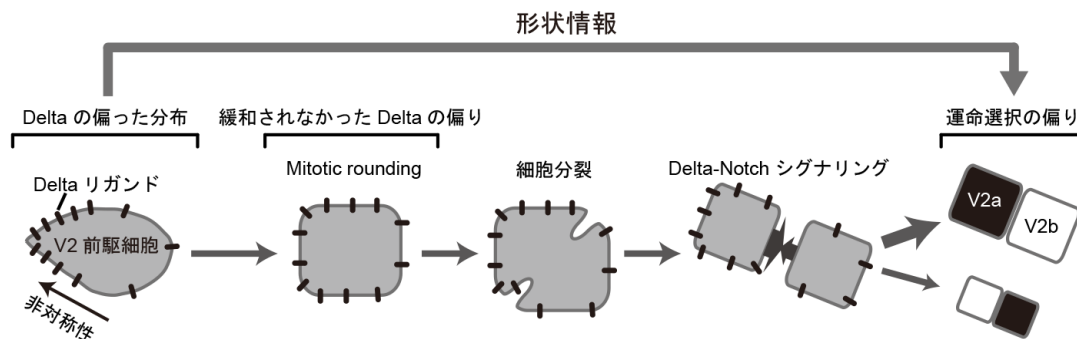


図1.形がもたらす運命選択の偏り。非対称な形により偏ったDelta リガンドは、mitotic rounding 期では細胞膜上を広がる。Delta の分布が一様になる前に分裂すると、尖っていた側の娘細胞にDelta が多く分配され、V2a(黒)へ分化する傾向が生まれる。

## 2. 研究の目的

均一な細胞集団内においても、細胞の形はばらつく。しかし、遺伝的に制御されていない偶発的な形の違いの意義は、これまでほとんど検証されていなかった。その一方で、近年、非遺伝的な細胞間の違いの重要性が注目されている(Altschuler and Wu, 2010)。また、細胞が形の情報を記憶し、細胞機能に反映していることが明らかになった(Rangamani et al., 2013; Akanuma et al., 2016)。では、刻一刻と変化する生体内の細胞の形は、細胞挙動に影響するのだろうか。この問題に取り組むため、本研究ではゼブラフィッシュ胚でのV2 介在神経前駆細胞の非対称分裂に注目した。そして、形の経時変化が、細胞内の分子機構に影響し、非対称分裂を制御する仕組みを明らかにすることを通して、非遺伝的で確率論的な細胞履歴が生体システムに果たす役割の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ゼブラフィッシュゲノムへのレポーター遺伝子導入効率の改善

近年 CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集が盛んに行われているが、ゼブラフィッシュゲノムへの遺伝子導入に関しては、マウスなどの他のモデル生物と比べると効率の面で問題であった。そこで、ドナーDNA のホモロジーアームの長さを変えたり、クロマチン構造を緩める薬剤を共注入するなどして導入効率の改善を試みた。標的遺伝子として発生期に体全体に散在

する免疫細胞で発現する *foxp3a* 遺伝子を用いた(図 2)。

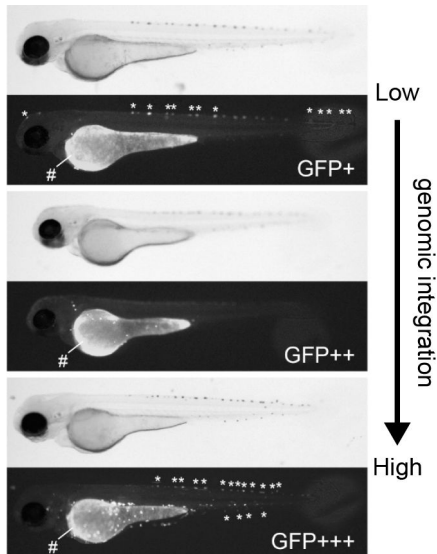


図 2. *foxp3a* 遺伝子座への外来遺伝子配列の導入。受精後二日目の胚。*foxp3a* 遺伝子座の終止コドンに P2A-eGFPCAAX 配列に置き換えたターゲティングベクターを作製した後、ホモロジーアームと導入遺伝子配列のみを PCR で増幅、精製しドナー DNA とした。このドナー DNA を受精卵に注入し、胚の体表に散在する GFP 陽性細胞の数でゲノムへの導入効率を算定した。導入効率の低い胚は、GFP 陽性細胞の数が 1~10 個(GFP+)、中程度では 10~50 個くらい(GFP++)、高い胚は 50 個以上(GFP+++ )とした。(\*)、(#)はそれぞれ色素細胞と卵黄での自家蛍光を表す。

## (2) V2 介在神経の前駆細胞(V2 細胞)の形状変化の解析

V2 細胞の形状変化を詳細に観察するため、V2 細胞特異的に細胞膜に局在する GFP を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製した。ゼブラフィッシュ受精卵にドナー DNA と DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-アザシチジン、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A を共注入し、*vsx1* 遺伝子プロモーター下で細胞膜局在型 GFPCAAX が発現するようにした。細胞挙動の観察には、ライトシート顕微鏡(Zeiss Lightsheet Z.1)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ゼブラフィッシュゲノムへのレポーター遺伝子導入効率の改善

導入効率を改善するために条件検討を行ったところ、合成 Cas9 mRNA を用いると、GFP 陽性胚の割合は高いがモザイク性は低く、一方、リコンビナント Cas9 タンパク質を用いると、合成 mRNA と比べて GFP 陽性胚の割合は下がるが、モザイク性は上がるのが分かった。また、クロマチン構造を緩める DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-アザシチジンとヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A をゼブラフィッシュ卵に共注入すると、CRISPR-Cas9 システムによるゲノムの切断効率、および蛍光タンパク質配列の導入効率が上昇することを見出した。さらに、ホモロジーアームを長くするとより効率が良くなるうえ、CRISPR-Cas9 システムに依存せずに、ある程度ゲノムへの導入が起こることを見出した(図 3)。そして、注入するドナ

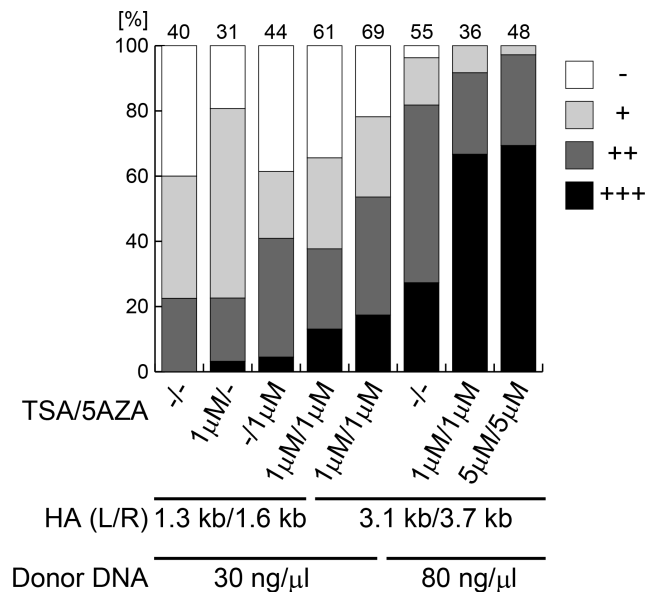


図 3. CRISPR-Cas9 システムを用いない外来配列のゲノムへの導入。長いホモロジーアーム(HA)を持つドナー DNA を受精卵に注入するだけである程度 GFP 陽性胚が得られた。さらに、トリコスタチン A (TSA)と 5-アザシチジン(5AZA)を共注入すると相乗的に導入効率の上昇が見られた。また、より長い HA のドナー DNA を高濃度で注入することにより、CRISPR-Cas9 システムを用いた場合と遜色なくゲノムへ GFP 配列が導入された。

ーDNA の量を多くすることにより、CRISPR-Cas9 システムを用いた場合と同じ程度の導入効率を達成した(図 3)。

## (2) V2 介在神経の前駆細胞(V2 細胞)の形状変化の解析

先行研究(Akanuma et al., Nature Communication, 7:11963, 2016; Kozawa and Akanuma et al., Scientific Reports, 6:32962, 2016)では、V2 細胞の形状観察に TgBAC(*vsx1:GFP*)ゼブラフィッシュを用いていたが、細胞間の蛍光強度のばらつきが大きく、効率良く V2 細胞の形成から分裂までを記録することが難しかった。そこで、上記の手法を用いて内在の *vsx1* 遺伝子座に直接 P2A-eGFPCAAX 配列を導入して V2 細胞の挙動を記録することを試みた。その結果、TgBAC(*vsx1:GFP*)ゼブラフィッシュでは、せいぜい分裂前一時間頃から V2 細胞の形状を記録できたのに対して、新たにライトシート顕微鏡を用いたということもあり、*vsx1-P2A-eGFPCAAX* 遺伝子改変ゼブラフィッシュでは二時間以上前から観察に十分な蛍光が得られ、詳細な形状変化を観察することができた(図 4)。現在得られた画像データから V2 細胞が非対称分裂した後の娘細胞の二者択一の運命選択と関係のある V2 細胞の特徴量の抽出を試みているが、まだ優位に相関のある特徴量の同定には至っていない。また、娘細胞の運命選択を担う Delta-Notch シグナリングの Delta リガンドの分布と V2 細胞の形状履歴との関係を探るため、内在の *deltaC* 遺伝子座の終止コドン を GFP 配列で置き換え、DeltaC-GFP 融合タンパク質を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製した。同時に、DeltaC リガンドの形に依存した細胞局在のメカニズムを探るため、DeltaC タンパク質の細胞内ドメインを DeltaA タンパク質の細胞内ドメインに置き換えた DeltaC-DeltaA-GFP 遺伝子改変ゼブラフィッシュも作製した。現在、これらの遺伝子改変ゼブラフィッシュについても、V2 細胞の形状履歴、および娘細胞の運命選択との関連を解析中である。

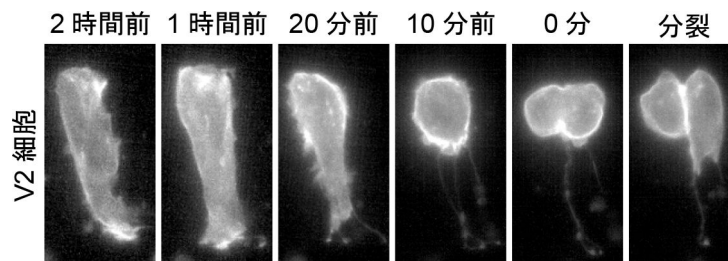


図 4. V2 介在神経前駆細胞(V2 細胞)の形状変化の履歴。*vsx1-P2A-eGFPCAAX* ドナーDNA を注入した遺伝子改変ゼブラフィッシュの受精後 18 時間胚。従来の遺伝子改変体と比べて早い時間帯から詳細な V2 細胞の形状を観察することができる。例えば、未成熟な V2 細胞ではひだ状の構造が見られるが、細胞が成熟し分裂が近づくにつれ、ひだ状の構造が消え、突起状の構造が明確に見えるようになる。特に mitotic rounding を始めると尖がった部分が引っ込んだ後に細長い突起が残り、分裂後も片側の娘細胞に受け継がれる。このような形状変化が、DeltaC リガンドの分布や娘細胞の運命選択とどのように関係するのかを、現在解析している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

査読有

- (1) Taisuke Kondo, Yuki Imura, Shunsuke Chikuma, Sana Hibino, Setsuko Omata-Mise, Makoto Ando, Takashi Akanuma, Mana Iizuka, Ryota Sakai, Rimpei Morita, Akihiko Yoshimura. “Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy” Cancer Science 109(7), 2130-2140 (2018)

〔学会発表〕(計 1件)

(1) Takashi Akanuma, Akihiko Yoshimura. “In vivo imaging of immune cells using transgenic zebrafish”

日本免疫学会学術集会(2018年)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。