

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16150

研究課題名(和文) 単一細胞レベルで解き明かす、左右非対称なホヤ幼生脳にある神経細胞の発生プログラム

研究課題名(英文) Studies on the developmental mechanisms of neurons in the left-right asymmetric brain of the Ciona larva with the single cell resolution

研究代表者

大沼 耕平 (Onuma, Kouhei)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：70774876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の細胞が300個しかないホヤ幼生は、神経系の発生メカニズムを、個々の細胞レベルで理解できるモデルである。近年、ホヤ幼生の脳の細胞系譜を調べた過程で、脳の左右非対称性が従来の報告よりも複雑であることを見出した。しかし、他の動物も含め、左右非対称な脳をつくる仕組みはよくわかっていない。そこで本研究では、ホヤ幼生の脳の細胞系譜を明らかにした上で、その遺伝子制御ネットワーク(GRN)の解明を目指した。2019-2021年度では、ホヤ幼生の脳にあるドーパミン産生細胞(DA細胞)や重力感知細胞、レンズ細胞の細胞系譜を完全に明らかにした。また、DA細胞と重力感知細胞のGRNの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ホヤ胚の卵膜除去による脳胞の構造や左右性の異常という技術的な問題を解決し、正常な脳にあるドーパミン産生細胞やレンズ細胞の、受精卵を起点とした細胞系譜を完全に明らかにした。また、この明らかにした細胞系譜の情報を基に、ドーパミン産生細胞の特異化や決定が生じる時期と、特異化に重要な因子を明らかにした。他の神経細胞についても、その細胞系譜と発生機序の一端を明らかにした。以上の成果により、ホヤと脊椎動物とで脳(特にドーパミン産生細胞)の発生機序を単一細胞レベルで比較するための土台を初めて築いた。今後、本研究の成果を基にした、単一細胞レベルでの神経回路形成の解析や機能解析への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The larva of the ascidian *Ciona intestinalis* type A (*Ciona robusta*), which has only 300 cells of the central nervous system, is a useful model for understanding the developmental mechanisms of the nervous system at the single-cell resolution. Recently, in the process of studying the cell lineage of the brain in the *Ciona* larva, I found that the left-right asymmetry of the brain is more complex than previously reported. However, the developmental mechanisms that develop the left-right asymmetric brain are poorly understood, including in other animals. In this study, I aimed to elucidate the cell lineage of the brain in the *Ciona* larva and the gene expression regulatory networks (GRNs) that regulate the development of the brain. During 2019-2021, I revealed the complete cell lineage of dopaminergic cells (DA cells), gravity-sensing cells, and lens cells in the brain of the *Ciona* larva. In addition, I revealed the partial GRNs of the DA cells and the gravity-sensing cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：ホヤ 脳 左右非対称 細胞系譜 遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脳の構造は左右非対称で、その機能も左右で異なる。この左右非対称な脳をつくる仕組みについては、哺乳類の海馬や魚類の松果体などで調べられているが、脳全体ではよくわかっていない。その主な理由は、脊椎動物の脳細胞の数が数百億個以上もあり、さらに脳構造が複雑であるからである。

ホヤ幼生は、この問題を解決するための優れたモデルである。ホヤは脊椎動物に最も近縁で、神経系の基本設計を脊椎動物と共有する。幼生の脳(脳胞)、運動神経節、神経索は、それぞれ脊椎動物の前中脳、後脳、脊髄に相同であるとされている。また、幼生の中枢神経系の細胞はわずか300個で、脊椎動物に比べて圧倒的に少ない。つまり、ホヤ幼生を使うことで、脊椎動物と共通する脳神経系の形成を、単一細胞レベルで明らかにできる。

ホヤ幼生の脳胞構造にも明確な左右非対称性があることが知られていたが、申請者は近年、従来の報告よりも複雑な左右性があることを見出した。しかし、左右非対称な脳胞を作り出す仕組みはわかっていない。その主な原因は、一般的なホヤ胚の操作に必須な卵膜除去が脳胞の左右性を乱すことにあった(Shimeld and Levine, *Dev. Dyn.* 235, 2006)。

この問題を打破すべく、申請者は近年、卵膜を除去せずに正常な脳胞の発生を実験的に調べる手法を開発した(Oonuma et al., *Dev. Biol.* 420, 2016)。申請者は現在、この手法を細胞標識に応用し、幼生の脳胞を構成する細胞が神経板のどの細胞に由来するかを明らかにしつつある。しかし、神経板が形成された時期(神経板期)から幼生期までの間、予定脳胞細胞がいつ何回分裂し、どう移動することで脳胞になるかはわかっていない。また、脳胞で働く遺伝子の発現パターンを調べた先行研究は卵膜除去胚を使っていたため、その正常な発現パターンはよくわかっておらず、左右非対称な脳胞の発生メカニズムは不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、ホヤ(カタコウレイボヤ *Ciona intestinalis* type A) 幼生というシンプルなモデルを用いて、左右非対称な脳を作る分子基盤を明らかにすることである。その第1歩として本計画では、まず、神経板期から幼生期までの脳胞の細胞系譜(分裂時期・回数や動態)を明らかにする。次に、脳胞系譜で発現するシグナル伝達の関連因子や転写因子の時空間的な発現パターンを明らかにする。そして、脳胞の神経細胞に焦点をしばって、その発生に必要な因子を同定し、その因子間の発現制御ネットワークを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳胞の細胞系譜解析

神経板期から幼生期までの間、脳胞系譜の細胞がいつ何回分裂し、どう移動して脳胞を構成するのかを明らかにするために、以下の方法で脳胞系譜の個々の細胞の追跡を試みた。

神経板にある脳胞系譜の細胞は16個ある。最初に、この16個の細胞を、光変換型蛍光タンパク質Kaedeにより個別に標識した。標識した胚が幼生になったら、免疫染色で各種神経細胞の分子マーカーを検出し、光変換後のKaede蛍光と免疫染色のシグナルが重なるかを調べることで、各種神経細胞が神経板のどの細胞に由来するかを調べた。なお、Kaedeの発現には、脳胞系譜で発現する遺伝子のプロモーターにKaedeをつないだDNAコンストラクトを用いた。また、Kaedeの光変換には、共焦点レーザー顕微鏡を利用した。

次に、10分毎に固定した卵膜付きの胚を用いて、脳胞系譜で働く遺伝子の発現と染色した細胞核を指標に、16個ある脳胞系譜の細胞を幼生期まで追跡した。遺伝子発現の検出には蛍光 whole-mount *in situ* hybridization (WISH) を、核染色にはDAPIを用いた。

### (2) 脳胞の各種神経細胞を生み出す遺伝子発現制御ネットワークの解明

最初に、Horieらによる単一細胞トランスクリプトーム解析のデータ(Horie et al., *Genes Dev.* 32, 2018)や文献、研究代表者が単離した遺伝子の発現パターンから、脳胞系譜で発現する、リガンドや受容体を含むシグナル伝達の関連因子や転写因子を網羅的に探索した。探索した遺伝子の発現パターンを、卵膜付きの胚を用いてWISHにより調べた。その結果と細胞系譜解析のデータを組み合わせ、脳胞にある各種神経細胞の系譜で発現する因子を特定した。次に、特定した因子のどれが各種神経細胞の発生に重要かを明らかにするために、それらの因子の機能を阻害または過剰発現させ、どの因子が各種神経細胞の分子マーカーの発現に影響を与えるかを蛍光WISHで調べた。そして、これらの因子間の発現制御ネットワークを明らかにするために、各因子の機能を阻害または過剰発現させ、他の因子の発現への影響を調べた。

なお、機能阻害にはアンチセンス・モルフォリノオリゴ(MO)を用いたノックダウンを、一方過剰発現には特異的なプロモーターを各因子の翻訳領域につないだDNAコンストラクトを利用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ドーパミン産生細胞の発生メカニズム

ホヤ幼生の脳胞の左腹側には、ドーパミン産生細胞 (DA 細胞) がある。この細胞は、脳胞の腔所に球状の突起を突出させたユニークな構造をもち、幼生の遊泳運動を制御している。また、ホヤ幼生の DA 細胞は、同様の構造や光受容能がある魚類間脳の血管嚢と相同であると考えられており、発生生物学的・進化生物学的に注目されている。近年、Horie ら (2018) により、ドーパミン生成に必要な遺伝子群 (DA 遺伝子群) の発現が転写因子 *Fer2/Ptf1a* と *Meis* によって直接制御されることが示唆された。また、研究代表者らは 2018 年度に、上記の細胞系譜解析により、DA 細胞が神経胚期に現れる a10.73 細胞のすべての子孫細胞であることを明らかにした。しかし、DA 遺伝子群や *Fer2*、*Meis* の発現開始時期は不明であり、DA 細胞の発生におけるコミットメントはよくわかっていない。また、*Fer2* や *Meis* の発現を制御する因子は不明であり、DA 細胞を生み出す遺伝子発現制御ネットワークはよくわかっていない。そこで、まず DA 遺伝子群や *Fer2*、*Meis* の発現パターンを WISH により調べたところ、*Fer2* と *Meis* は a10.73 細胞で、一方 DA 遺伝子群の一つ *Th* 遺伝子は a10.73 細胞の娘細胞で発現を開始していた。また、発生を追って発現パターンを調べたところ、*Fer2* は a10.73 細胞のすべての子孫細胞で特異的に発現し続けていた。次に、阻害剤や MO を用いた実験により、a10.73 細胞での *Fer2* の発現には MAPK 経路および転写因子 *Otx* がそれぞれ独立に必要であることがわかった。以上から、DA 細胞の発生において、特異化は a10.73 細胞で、決定はその娘細胞で生じることが示唆された。また MAPK 経路や *Otx* から DA 遺伝子群までの遺伝子発現調節ネットワークを示唆することができた。今後、MAPK 経路が DA 系譜の細胞で活性化される仕組みを調べ、DA 細胞の発生運命を決める分子基盤を明らかにする。なお、以上の成果を *Development* 誌にて報告した (Oonuma and Kusakabe, 2021)。

##### (2) ホヤ幼生の重力感知細胞の細胞系譜と発生メカニズム

ホヤ幼生は光と重力に応答し、そのうち重力の感知は脳胞内にある 2 個のアンテナ細胞と呼ばれる感覚細胞が担うとされている。アンテナ細胞については、形態などの特徴は知られているが、その発生はよくわかっていない。そこで、卵膜を除去せずに、アンテナ細胞の細胞系譜と発生メカニズムを調べた。光変換型蛍光タンパク質 *Kaede* を用いた細胞標識・追跡により、アンテナ細胞が神経板の右側にある a9.33 と呼ばれる 1 個の細胞に由来することがわかった。また、遺伝子発現を指標にして a9.33 を追跡したところ、この細胞が 2-4 回分裂することで 8 個の細胞が生まれ、そのうち 2 個の細胞 (a12.261 と a13.525) がアンテナ細胞になることがわかった。この過程で、2 個のアンテナ細胞がグルタミン酸作動性ニューロンであることを明らかにした。さらに、これらの細胞が光受容細胞と同じように発生過程で *Rx* を発現すること、そのノックダウンにより *Rx* がアンテナ細胞の発生に必要なこともわかった。以上から、アンテナ細胞の完全な細胞系譜とその発生メカニズムの一端を明らかにしただけでなく、光受容細胞とアンテナ細胞という、ホヤ幼生の感覚細胞では共通して *Rx* がそれらの発生を制御することを示唆した。今後、*Rx* を軸にして、それらの発生を制御する遺伝子発現制御ネットワークを明らかにし、どのような違いが 2 種類の感覚細胞を生み出すのかを追究する。

##### (3) レンズ細胞の細胞系譜

ホヤ幼生の脳胞にある眼点は 30 個の光受容細胞と 1 個の色素細胞、3 個のレンズ細胞から構成される。レンズ細胞は、集光により光を光受容細胞に送ることで幼生の光応答を制御している。レンズ細胞の役割や特徴的な細胞構造については報告があるが、その細胞系譜や発生メカニズムはよくわかっていない。また、レンズ細胞特異的な分子マーカーがなかったため、*Kaede* による細胞標識法を利用した細胞系譜解析は困難であった。そこで、Horie ら (2018) による単一細胞トランスクリプトーム解析データを利用し、まずレンズ細胞特異的に発現する遺伝子を探索した。その結果、グリコーゲン分岐酵素をコードする *Gbe1* 遺伝子を見出し、WISH や *Gbe* 抗体を用いた免疫染色により *Gbe1* がレンズ細胞で高い発現レベルを示すことを確認した。また、発生を追って *Gbe1* の発現パターンを調べたところ、レンズ細胞は神経板の右側 A9.16 細胞に由来すること、この細胞の子孫細胞のうち、3 個の細胞 (A14.509、A14.505、A14.501) がレンズ細胞であることを明らかにした。これまでの知見と本研究結果により、ホヤ幼生の眼点を構成するすべての細胞の細胞系譜が完全に明らかとなった。

##### (4) 脳胞の発生に関わるミトコンドリアダイナミクス

ホヤ幼生の脳胞にあるレンズ細胞では、特徴的なミトコンドリアの細胞内配置が知られている。そこで、レンズ細胞の発生メカニズムを明らかにする一環として、胚や幼生の細胞におけるミトコンドリアの局在や役割を調べた。ミトコンドリアを構成するタンパク質に対する抗体を用いて免疫蛍光染色をしたが、レンズ細胞系譜でのミトコンドリアの局在は不明瞭であった。しかし、脳胞にある 2 個の色素細胞で免疫染色の高いシグナルが得られたこと、また幼生の体幹部の中央ではそのシグナルが著しく低いことがわかり、幼生を構成する細胞の種類によってミト

コンドリアの量が異なることが示唆された。また、ミトコンドリアの働きを阻害する試薬をホヤ胚に処理したところ、ミトコンドリアの分裂阻害剤を処理した時のみに色素細胞の色素形成が阻害された。以上の結果から、ミトコンドリアの分裂が脳胞にある色素細胞の発生に重要であることが示唆された。今後、ミトコンドリアダイナミクスが色素細胞の発生にどう関わるかを調べるとともに、レンズ細胞の発生とミトコンドリアの関係およびそれらを制御する遺伝子制御ネットワークを解析する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taichi Akahoshi, Madoka K. Utsumi, Kouhei Onuma, Makoto Murakami, Takeo Horie, Takehiro G. Kusakabe, Kotaro Oka and Kohji Hotta	4. 巻 7
2. 論文標題 A single motor neuron determines the rhythm of early motor behavior in Ciona	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eab16053
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 Kouhei Onuma, Maho Yamamoto, Naho Moritsugu, Nanako Okawa, Megumi Mukai, Miku Sotani, Shuto Tsunemi, Haruka Sugimoto, Eri Nakagome, Yuichi Hasegawa, Kotaro Shimai, Takeo Horie and Takehiro G. Kusakabe	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 Ciona 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 Kouhei Onuma and Takehiro G. Kusakabe	4. 巻 148
2. 論文標題 The complete cell lineage and MAPK- and Otx-dependent specification of the dopaminergic cells in the Ciona brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev198754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.198754	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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 The complete cell lineage and MAPK- and Otx-dependent specification of the dopaminergic cells in the Ciona brain
3. 学会等名 第1回NBRPホヤ主催オンラインセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ幼生の脳にあるドーパミン産生細胞の発生メカニズムの解析
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 日下部岳広、佐藤由奈、関彩花、山本真帆、森継奈穂、大川奈菜子、曾谷実玖、圓尾綾菜、常深秀人、堀江健生、笹倉靖徳、大沼耕平
2. 発表標題 脊索動物の正中構造の発生プログラム進化とヘッジホッグシグナルの役割
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 曾谷実玖、大川奈菜子、堀江健生、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ幼生尾部神経索グリア細胞の多様性と機能
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日下部岳広、佐藤由奈、関彩花、山本真帆、森継奈穂、大川奈菜子、曾谷実玖、圓尾綾菜、常深秀人、堀江健生、笹倉靖徳、大沼耕平
2. 発表標題 脊索動物の正中構造の発生プログラム進化とヘッジホッグシグナルの役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼 耕平、日下部 岳広
2. 発表標題 ホヤ幼生の脳にあるグルタミン酸作動性ニューロンの細胞系譜と 発生メカニズムの解析
3. 学会等名 日本動物学会第91大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾谷 実玖、大川 奈菜子、山本 真帆、堀江 健生、大沼 耕平、日下部 岳広
2. 発表標題 ホヤ神経索特異的遺伝子群の同定と発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第91大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤星 太一、大沼 耕平、村上 誠、堀江 健生、日下部 岳広、岡 浩太郎、堀田 耕司
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> 振動する一対の運動ニューロンA10.64はホヤにおいて初期の自発的運動を制御する
3. 学会等名 日本動物学会第91大会2020 関連集会 第38回ホヤの生物学談話会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾谷実玖、山本真帆、中村瑞葉、大川奈菜子、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ神経索特異的遺伝子群の同定と発現調節機構の解析
3. 学会等名 第5会ホヤ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古結大樹、緒方翼、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 眼点レンズ細胞の細胞系譜と発生機構
3. 学会等名 第5会ホヤ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大沼 耕平、日下部 岳広
2. 発表標題 ホヤ幼生脳胞の完全な細胞系譜の解明と発生機構
3. 学会等名 第5会ホヤ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kouhei Oonuma and Takehiro G. Kusakabe
2. 発表標題 Left-right asymmetric development of cells in the larval brain of Ciona
3. 学会等名 10th International Tunicate Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ幼生の脳にあるドーパミン産生細胞の細胞系譜の完全解明
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山本真帆、森継奈穂、常深秀人、堀江健生、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ胚のフロアプレートと内胚葉索に共通な遺伝子発現調節機構の解析
3. 学会等名 2019年度 日本動物学会近畿支部 春季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuto Tsunami, Naho Moritsugu, Kouhei Oonuma, Mike Levine, Takeo Horie and Takehiro G. Kusakabe
2. 発表標題 Evolution of developmental programs for the midline structure in chordates: insights from gene regulation in the floor plate and hypo chord homologues of Ciona embryos
3. 学会等名 10th International Tunicate Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本真帆、森継奈穂、常深秀人、大川奈菜子、堀江健生、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ胚のフロアプレートと内胚葉索にみられる遺伝子発現調節機構の共通性
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本真帆、森継奈穂、常深秀人、大川奈菜子、堀江健生、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 脊索動物胚の中軸構造の発生を制御する遺伝子プログラムの進化:フロアプレートとハイポコードの遺伝子発現調節機構の共通性
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緒方翼、佐藤南美、大沼耕平、日下部岳広
2. 発表標題 ホヤ幼生眼点のレンズ特異的分子マーカーの同定とレンズ細胞の発生機構の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019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
---------	---------