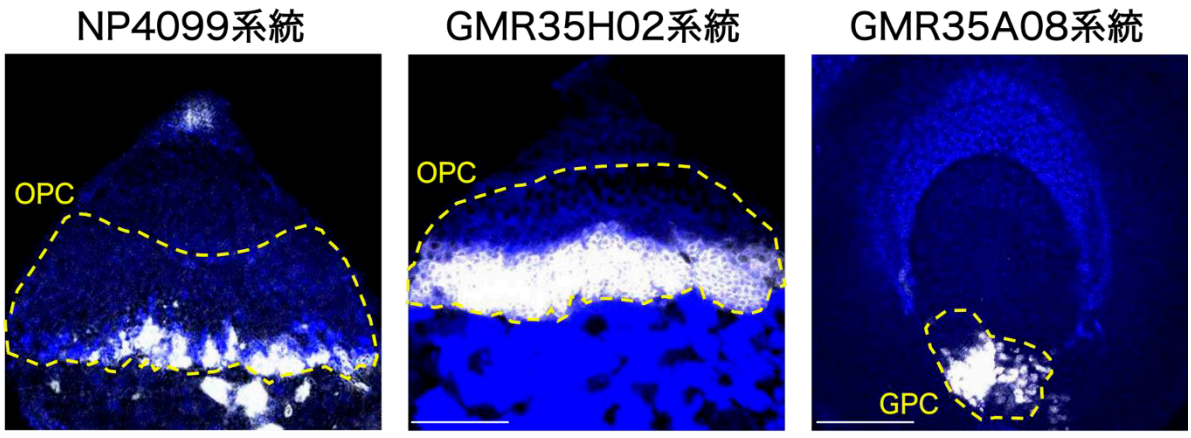
147　新規手法DamIDによる神経多様性創出機構の解明	鈴木　匠

【目的】神経幹細胞から生み出された多様な神経が、正しい場所に移動し、最適な相手と結合することで正確な神経回路が構築される。神経の産生に不具合が生じると顕著な脳機能障害が起こるため、神経産生の制御は神経回路形成に非常に重要である。神経幹細胞では、Temporal Factors（TFs）という転写因子群が特定の順序で発現することで、多様な神経を作り分けている。しかし、TFs の下流でどのような遺伝子が制御され細胞運命を決定しているのかについては、これまで適切な解析法がなかったため不明な点が極めて多く残されている。DNA アデニンメチル基転移酵素を利用して転写因子の DNA 結合パターンを解析できる新規手法 DamID を用いて TFs の標的遺伝子を同定し、神経の運命決定を直接制御する遺伝子を特定する。

【方法】本研究では、解析モデルとして、哺乳類の大脳皮質と多くの共通点を持つショウジョウバエの視覚中枢を用いた。ショウジョウバエの視覚中枢は、層・カラム構造といった哺乳類の大脳と共通した構造を持ち、解析可能な程度の複雑性を持つ。また、単一細胞レベルでの遺伝学的解析が可能であるため、脳神経発生の解析モデルとして優れている。まず、DamID 解析を行うために必要な TF-Dam 融合タンパク質の発現コンストラクトを作製した。次に、視覚中枢に存在する二つの幹細胞プールをそれぞれ特異的に操作できる系統の探索を行った。また、新規の TFs の探索と役割がわかっていない TF についての機能解析を行った。

【結果】公共のストックセンターから取り寄せた合計 137 種類の系統を用いて、幼虫期の脳におけるそれぞれの発現パターンを調べたところ、GMR35H02、GMR35A08 がそれぞれ、表層の幹細胞集団（OPC）、後方の幹細胞であるグリア前駆細胞（GPC）において特異的に発現していることがわかった。GMR35A08 については、GPC の 70%程度の範囲での発現が確認された。これによって、それぞれ OPC、GPC において特異的に DamID 解析を行うことが可能になった。また、発現スクリーニングによって、古い幹細胞で特異的に発現が見られる遺伝子、*ONB1*、*ONB2* を同定した。また、同時に行っていた NP 系統のスクリーニングによって、ONB2 の発現を再現する系統として NP4099 を同定した。この NP4099 系統を用いて、これまで役割がわかっていなかった TF である D の過剰発現を行ったところ、グリア細胞の過剰産生が見られた。

新規 TF の発現を再現する系統と、OPC、GPC を特異的に操作可能な系統の発現パターン



147. 新規手法 DamID による神経多様性創出機構の解明

鈴木　匠

茨城大学 理学部 生物科学領域

Key words：脳神経系，神経幹細胞，転写因子，ショウジョウバエ，DamID

緒　言

脳は、約 900 億の神経から構成される回路により、絶えず入力される様々な情報を正確に処理している。このような神経回路は、発生初期において生じる多種多様な神経の産生、成熟、移動、そして神経同士の結合、という一連の過程によって形成される。このうち神経の産生は最初に起こる現象であり、回路形成にとって最も基本的な要素である。これが破綻すると、異常な回路が形成され神経機能不全に陥ってしまう。実際、神経の過剰産生や産生不足が見られる自閉スペクトラム症やダウン症などでは、顕著な脳機能障害が起こっている［1〜2］。このように、正しく機能する神経回路の構築には多様な神経が必要な数だけ生み出されることが非常に重要であるが、その制御メカニズムは未解明のままである。前述した脳機能障害の治療ターゲットの探索のためにも、この制御メカニズムの解明が喫緊の課題である。

哺乳類の大脳皮質では、脳室帯で産生される興奮性神経と基底核原基から供給される抑制性神経が混在している。興奮性神経は放射方向に移動して特徴的な 6 層構造を作り上げるが、抑制性神経は脳表面の接線方向に移動して大脳皮質へ入り込み、興奮性神経と相互作用し正確な神経回路を構築する（図 1 左）。このように脳室帯と基底核原基では全く異なるタイプの神経細胞を生み出しているが、この違いをもたらすメカニズムは分かっていない。その大きな理由は、大脳皮質は 900 億もの莫大な数の神経を含んでおり、一つ一つの神経の誕生から成熟、回路形成までを一貫して解析することが極めて困難なためである。

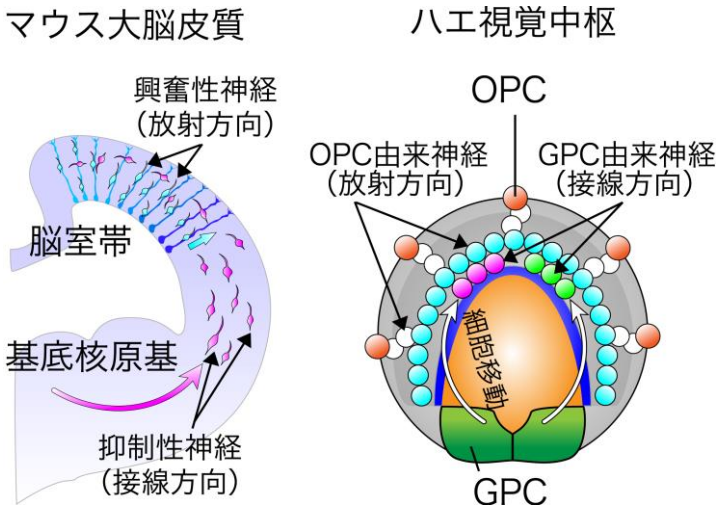


図 1. マウス大脳とショウジョウバエ 視覚中枢の比較
マウス大脳では背側の脳室帯、腹側の基底核原基において神経が生み出されている。基底核原基由来の神経は接線方向に移動して大脳皮質に供給されている。ハエ視覚中枢でも、同様にOPC、GPCという2つの神経供給源が存在している。GPCで生み出された神経は接線方向に移動することによって視覚中枢に供給される。

本研究では、哺乳類大脳皮質の解析モデルとして、より単純なモデルであるショウジョウバエの視覚中枢を用い「多種多様な神経を作り分ける分子機構」の解明に取り組む。ハエ視覚中枢は、層・カラム構造など哺乳類の脳と共通した構造を持ち、約 100 種／4 万個の神経から構成されているため解析可能な程度に複雑であると言える［3］。また、研究代表者自身による研究から、ハエ視覚中枢では、哺乳類大脳の脳室帯と基底核原基のように、2 つの独立した神経供給源が存在し異なるタイプの神経を供給している、という極めて重要な特徴が見出されている（図 1）［4〜6］。加えて、ハエでは分子遺伝学が発展しており、他のモデル系では不可能な解析を効率良く実施することが可能である。

従来、視覚中枢の全ての神経は表層の幹細胞集団（OPC）に由来すると考えられてきたが、研究代表者は、後方に位置するグリア前駆細胞（GPC）にも神経幹細胞の性質があり、神経を生み出すことを見出した（図 1 右）［4］。GPC から生み出された神経は、接線方向に移動して視覚中枢の深層部に供給される。研究代表者は、神経幹細胞において Temporal Factors（TFs）と呼ばれる一連の転写因子群が決められた順序で一過的に発現することによって、一つの神経幹細胞が数十種類に及ぶ多様なタイプの神経を生み出すことを発見した（図 2）［7，8］。このように、神経幹細胞自身の内的な変化によって多種多様な神経が生み出されると考えられるが、TFs が何を制御し、どのようにして生み出される細胞の運命を決定しているのか？という分子メカニズムは全く分かっていない。

OPC と GPC では、両者の TFs はほぼ同一の遺伝子セット（転写因子 Ey、Slp、D は共通）であるにも関わらず、全く異なるタイプの神経を生み出している［7，9］。つまり、同じ転写因子であっても OPC と GPC では全く異なる働きをしていることが考えられる。本研究ではこの点に注目し、OPC と GPC において、同一の TFs がそれぞれどのように働き、異なるタイプの神経が作り分けられるのかを解明することを目的とした。

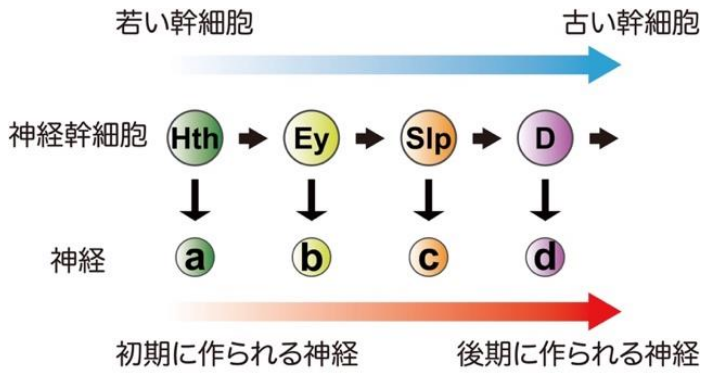


図 2. Temporal Factors による神経の運命決定
神経幹細胞において発現している転写因子が時間の経過とともに変化し、それに伴って生み出される神経のタイプも変化する。Hth が発現している時期には、神経幹細胞は a 神経が生み出すが、Ey の発現に切り替わると b 神経を生み出すようになる。

方　法

1. DamID 解析

TFs はすべて転写因子であるため、それぞれの機能を比較するには、各 TFs の DNA 結合パターンを調べる必要がある。従来のクロマチン免疫沈降法（ChIP）を用いる場合、脳から神経幹細胞のみを摘出し大量に収集する必要があり、それは技術的に極めて困難であった。このため、TFs の下流で機能する遺伝子の解析は永らく行われて来なかった。

本研究では、従来法の ChIP ではなく、新規に開発された DamID 法により TFs の DNA 結合パターンを解析することを選択した。DamID 法では、DNA アデニンメチル基転移酵素（Dam）を利用する。目的のタンパク質に Dam を融合させたものを任意の細胞で発現させ、DNA のアデニンメチル化パターンを解析して結合領域を特定する。アデニンメチル化は Dam 融合タンパク質を発現させた細胞でのみ生じるため、細胞の分離回収をせずに解析可能である［10］。このように、DamID 法は、これまで大きな障壁であった神経幹細胞の大量収集が必要なく本研究に非常に適している。

DamID による解析には、それぞれの TF の末端に Dam を融合したタンパク質を発現する系統を作出することが必要であり、本研究では TF-Dam 融合タンパク質の発現コンストラクトを作製した。すでに保有していた pUAS-LT3-Dam プラスミドに *ey*、*slp*、*D* の配列を組み込むことによって発現ベクターの構築を行った。ハエの脳から抽出した RNA を用いて cDNA を合成し、PCR 法によってそれぞれ *ey*、*slp*、*D* の配列を増幅した。Gibson assembly 法によって、これらの配列を pUAS-LT3-Dam ベクターに導入した。現在、Slp、D については発現ベクターの構築が完了しており遺伝子組換えショウジョウバエの作出に取り掛かっている。Ey については、この方法では目的の発現ベクターが得られなかったため、別の手法を用いて現在作製中である。

2. OPC、GPC をそれぞれ特異機に操作する系統の探索

それぞれ OPC、GPC において特異的に Dam 融合タンパク質を発現させる必要があるため、それぞれの領域で特異的に遺伝子操作をできるツールの探索を行った。日本国内の京都工芸繊維大学ストックセンターで維持されている NP 系統、米国のインディアナ大学で維持されている GMR 系統を多数取り寄せ、GFP 系統と交配することによってそれぞれの発現パターンを調べた。

3. 新規 TFs の探索

転写因子と GFP の融合タンパク質を発現する系統をインディアナ大学から取り寄せ、幹細胞において一過的に発現する遺伝子を探索した。これと同時に、転写因子の抗体を用いて発現スクリーニングを行った。

4. D の機能解析

これまで TF としての機能が確定していない D について、新規に同定した NP4099 系統を用いて過剰発現実験を行い、生み出される細胞への影響を検討した。

結果および考察

1. OPC、GPC をそれぞれ特異機に操作する系統の探索

京都工芸繊維大学から 55 種類の NP 系統、インディアナ大学から 82 種類の GMR 系統を取り寄せ、幼虫期の脳におけるそれぞれの発現パターンを調べた。その結果、OPC では、GMR35H02 系統が、GPC では GMR35A08 がそれぞれ特異的に発現していることがわかった（図 3）。GMR35A08 系統については、GPC の 70%程度の範囲での発現が確認された。これによって、それぞれ OPC、GPC において特異的に DamID 解析を行うことが可能になった。

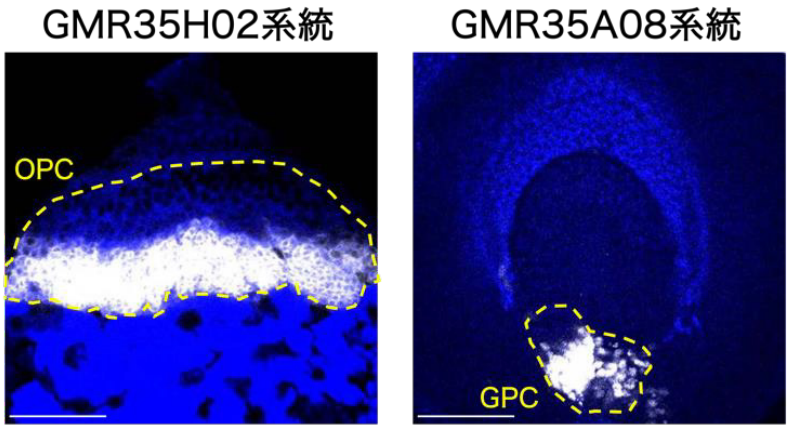


図 3. 幼虫期における各系統の発現パターン
GMR35H02 系統（左）では、OPC において中間から古い神経幹細胞で強い発現が見られた。脳においては、OPC 特異的であり、その他の脳領域では全く発現が見られなかった。GMR35A08（右）では、GPC の 7 割程度の細胞において発現が見られた。
白色：GFP（各系統の発現領域）、青色：神経細胞、スケールバー：50 μm。

2. 新規 TFs の探索

GFP 融合系統を用いたスクリーニングから、より古い幹細胞で特異的に発現が見られる遺伝子として *ONB1*、*ONB2* を同定した。いずれもホメオボックスドメインを有する進化的に保存された転写因子であり、新規の TF である可能性が高い。また、同時に行っていた NP 系統のスクリーニングによって、ONB2 の発現を再現する系統として NP4099 を同定した。NP4099 は、OPC、GPC のいずれにおいても、D や ONB2 が発現している古い幹細胞とその系譜で発現していることが確認された。

3. D の機能解析

これまでの研究から、Ey、Slp を異所的に発現させた場合、特定の種類の神経細胞の数が増減することがわかっていた。しかし、D の過剰発現実験では、明確な表現型が得られておらず機能が不明であった［7］。そこで、今回同定した NP4099 系統を用いて D の異所発現実験を行った。その結果、グリア細胞が大量に生み出されている様子が観察された。この結果から、D を発現している時期には、幹細胞では神経ではなくグリア細胞が生み出されていることが示唆された（図 4）。

今後は、現在作出中の TF-Dam 融合系統を用いて DamID 解析を行い、実際にそれぞれの TF の DNA 結合パターンを解析し、それぞれの下流遺伝子を同定する。特に、D については、特にグリア産生に関与する遺伝子に注目して研究を進めていく予定である。

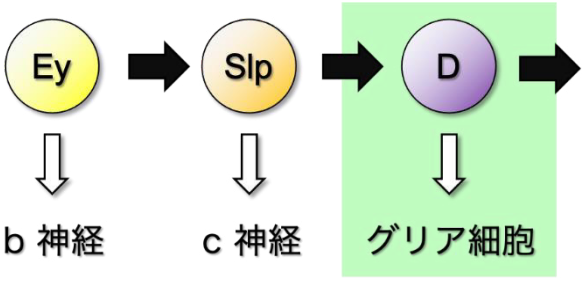


図 4. 各 TF による細胞の運命決定
Ey、Slp の発現時期にはそれぞれ、b、c 神経が生み出されるが、D の発現時期に切り替わると、神経産生からグリア産生へと切り替わる。

謝　辞

本研究は、現所属の茨城大学理学部生物科学領域、生理学・発生生物学研究室にて行った研究の成果です。本研究の遂行において中心的な役割を果たした当研究室の卒業研究生 2 名（蔡源章氏、坪田菜穂氏）に感謝いたします。本研究に助成を頂戴した公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝の意を表します。

文　献

1） Hazlett HC, Gu H, Munsell BC, Kim SH, Styner M, Wolff JJ, Elison JT, Swanson MR, Zhu H, Botteron KN, Collins DL, Constantino JN, Dager SR, Estes AM, Evans AC, Fonov VS, Gerig G, Kostopoulos P, McKinstry RC, Pandey J, Paterson S, Pruett JR, Schultz RT, Shaw DW, Zwaigenbaum L, Piven J; IBIS Network; Clinical Sites; Data Coordinating Center; Image Processing Core; Statistical Analysis. Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. Nature. 2017 Feb 15;542(7641):348-351. PMID: 28202961. DOI: 10.1038/nature21369.

2) Stagni F, Giacomini A, Emili M, Guidi S, Bartesaghi R. Neurogenesis impairment: An early developmental defect in Down syndrome. Free Radic Biol Med. 2018 Jan;114:15-32. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28756311. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.026.
3) Sanes JR, Zipursky SL. Design principles of insect and vertebrate visual systems. Neuron. 2010 Apr 15;66(1):15-36. PMID: 20399726. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.01.018.
4) Suzuki T, Hasegawa E, Nakai Y, Kaido M, Takayama R, Sato M. Formation of Neuronal Circuits by Interactions between Neuronal Populations Derived from Different Origins in the Drosophila Visual Center. Cell Rep. 2016 Apr 19;15(3):499-509. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27068458. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.056.
5) Suzuki T, Sato M. Inter-progenitor pool wiring: An evolutionarily conserved strategy that expands neural circuit diversity. Dev Biol. 2017 Nov 15;431(2):101-110. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28958816. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.09.029.
6) Suzuki T, Liu C, Kato S, Nishimura K, Takechi H, Yasugi T, Takayama R, Hakeda-Suzuki S, Suzuki T, Sato M. Netrin Signaling Defines the Regional Border in the Drosophila Visual Center. iScience. 2018 Oct 26;8:148-160. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30316037. DOI: 10.1016/j.isci.2018.09.021.
7) Suzuki T, Kaido M, Takayama R, Sato M. A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the Drosophila visual center. Dev Biol. 2013 Aug 1;380(1):12-24. Epub 2013 May 9. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.05.002.
8) Suzuki T, Takayama R, Sato M. eyeless/Pax6 controls the production of glial cells in the visual center of Drosophila melanogaster. Dev Biol. 2016 Jan 15;409(2):343-53. Epub 2015 Dec 6. PMID: 26670857. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.12.004.
9) Bertet C, Li X, Erclik T, Cavey M, Wells B, Desplan C. Temporal patterning of neuroblasts controls Notch-mediated cell survival through regulation of Hid or Reaper. Cell. 2014 Aug 28;158(5):1173-1186. PMID: 25171415. DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.045.
10) Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH. Cell-type-specific profiling of gene expression and chromatin binding without cell isolation: assaying RNA Pol II occupancy in neural stem cells. Dev Cell. 2013 Jul 15;26(1):101-12. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23792147. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.05.020.