

単一細胞トランスクリプトーム解析を
用いたカタユレイボヤにおける
感覚神経細胞の分化機構に関する
発生生物学的研究

2020年3月

堀江（新木）良子

兵庫県立大学生命理学研究科

発表論文リスト

I. 本学位論文の一部は以下の原著論文として、公表済みまたは公表予定

1. Ryoko Horie*, Alex Hazbun*, Kai Chen*, Chen Cao, Michael Levine & Takeo Horie * equal contribution
Shared evolutionary origin of vertebrate neural crest and cranial placodes
Nature, **560**(2018)228-232
2. Takeo Horie*, Ryoko Horie*, Kai Chen*, Chen Cao*, Masashi Nakagawa, Takehiro G. Kusakabe, Noriyuki Satoh, Yasunori Sasakura and Michael Levine *equal contribution
Regulatory cocktail for dopaminergic neurons in a protovertebrate identified by whole-embryo single-cell transcriptomics
Genes & Development, **32**(2018)1297-1302

II. 本学位論文に含まれない原著論文その他

1. Takeo Horie, Ryoko Shinki, Yosuke Ogura, Takehiro G. Kusakabe, Nori Satoh and Yasunori Sasakura
Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system
Nature, **469**(2011)525-528
2. Yongbin Li, Di Zhao, Takeo Horie, Geng Chen, Hongcun Bao, Siyu Chen, Weihong Liu, Ryoko Horie, Tao Liang, Biyu Dong, Qianqian Feng, Qinghua Tao and Xiao Liu
Conserved gene regulatory module specifies lateral neural borders across bilaterians
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **114**(2017) E6352-E6360

目次

総序	3
第一部 単一細胞トランスクリプトーム解析を用いた神経板境界領域から派生する感覚神経細胞の分化メカニズムの解析	8
序論	9
方法	12
結果	18
考察	24
第二部 単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたドーパミン神経細胞分化を制御する転写因子カクテルの同定	27
序論	28
方法	30
結果	33
考察	38
総括	40
引用文献	42
謝辞	54
図・表	55

総序

脳・神経系には多様な神経細胞が存在している。個々の神経細胞はそれぞれ特徴的な性質を備えており、脳の高次神経機能を担っている。脳・神経系を理解するためには、脳を構成する神経回路の全体像を明らかにするとともに、神経回路を構成する神経細胞の個々の機能やその発生、分化メカニズムを解明することが重要である。そのため、各神経細胞の性質がどのような分子機構で決定されるのかを解明することは神経科学、発生生物学にとって根源的な研究課題である。しかしながら、ヒトやマウスなど脊椎動物の脳・神経系は膨大な数の神経細胞から構成されており、神経回路全体を一つ一つの細胞レベルで解明することは困難である。私は脊椎動物の複雑な神経系を理解するためには、シンプルであるが、脊椎動物の神経系の基本設計を持つホヤの幼生の神経系が優れたモデルになると考え、研究を行ってきた。

ホヤは脊索動物門に属し、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であり（図 1 および図 2）、古くから発生学や進化生物学の研究対象として用いられてきた（Sato 2014）。また、胚発生過程が早く進行し、約 18 時間後に幼生となる（図 3）。胚への遺伝子導入が簡単であることから、遺伝子発現調節機構の研究にも用いられてきた（Kusakabe 2005）。

ホヤの幼生は体幹部と尾部からなるオタマジヤクシ型の形態をしている。体幹部の前方の背側には眼点、平衡器などの感覚器を含む中枢神経系が、頭部の腹側には成体の消化管を作る内胚葉が、頭部の後方の腹側には間充織が存在している。尾部の背側には神経索が通り、その腹側には脊索動物の特徴である脊索が、尾部の左右には筋肉が存在している。そして、幼生全体は一層の表皮細胞が取り囲んでいる（図 4）。このようなホヤのオタマジヤクシ型幼生は脊椎動物のボディプランの最も基本的な形態を示している（Sato 2014）。

ホヤ幼生の中枢神経系は、背側に位置する神経管から派生するなど、脊椎動物の脳神経系の基本構造を備えているにもかかわらず、わずか 350 個程度、神経細胞に限定すれば 177 個と非常に少数の細胞から構成されている（図 5）（Horie *et al.* 2009; Sasakura *et al.* 2012; Ryan *et al.* 2016）。このようにシンプルなホヤの幼生の中枢神経系は複雑な脊椎動物の脳神経系を理解するうえで良いモデル

となると考えられる。ホヤ幼生の中樞神経系は大きく分けて 4 つの部分に分けることができ、前方部から付着突起、脳胞、運動神経節、神経索に分かれる (図 5) (Horie *et al.* 2009)。付着突起は感覚受容と機械刺激受容の機能を有していることが示唆されている (Torrence and Cloney 1983)。幼生は付着突起により岩などに固着した後に変態をし、成体となるが、この際に付着突起で固着刺激を感じ変態が誘導されると考えられている。最近、マーカー遺伝子の発現を指標にして、付着突起を構成する細胞の詳細な記載が行われ、付着突起は Axial Columnar cells (我々は Palp Sensory Neurons, PSCs と名付けている。詳しくは本学位論文第一部参照)、Lateral Primary Sensory Neurons、Collocytes の 3 種類の細胞から構成されていることが報告された (Zeng *et al.* 2019)。脳胞には眼点、平衡器という 2 つの黒色色素を有した感覚器を含んでおり、眼点は光受容に、平衡器は重力感知に関連することが報告されている (Tsuda *et al.* 2003; Sakurai *et al.* 2004)。脳胞の腹側にはグループ III 光受容細胞と名付けられた眼点外光受容細胞とコロネット細胞と名付けられた感覚神経細胞が存在している (Horie *et al.* 2010; Ryan *et al.* 2016)。

コロネット細胞にはドーパミンの生合成、分泌に関わる分子が発現しており、ドーパミン神経細胞であることが報告されている (Moret *et al.* 2005a; Razy-Krajka *et al.* 2012)。運動神経節には 5 対 10 個のコリン作動性神経が存在しており、そのうち 2 対の細胞は尾部の筋肉を神経支配している運動神経であり、遊泳運動を制御していると考えられている (Horie *et al.* 2010; Stolfi and Levine 2011; Ryan *et al.* 2016, 2017)。その他の 3 つの細胞も介在神経として遊泳運動を制御していると予想されている (Ryan *et al.* 2016, 2017)。神経索は尾部に存在しており、背腹左右 4 個のグリア細胞の 1 種である上衣細胞から構成されている。左右の上衣細胞に沿って、運動神経節から伸びた 2 本の軸索が走行している (Ryan *et al.* 2016)。

ホヤには中樞神経系とは別に末梢神経系として表皮感覚神経細胞が存在している (Takamura 1998; Imai and Meinertzhagen 2007; Horie *et al.* 2008a; Ryan and Meinertzhagen 2019)。表皮感覚神経細胞には、付着突起に存在する Palp Sensory Cells (PSCs)、頭部の表皮前方に存在する Rostral Trunk Epidermal Neurons (RTENs)、体幹部の神経管の最も前方部に位置する入水口

原基の近傍に存在する anterior Apical Trunk Epidermal Neurons (aATENs)、体幹部の後方の表皮に存在する posterior Apical Trunk Epidermal Neurons (pATENs)、尾部の背側と腹側に存在する Caudal Epidermal Sensory Neurons (CESNs)、尾部の中央に位置する Bipolar Tail Neurons (BTNs)の少なくとも 6 種類の表皮感覚神経細胞が存在することが報告されている (Takamura 1998; Imai and Meinertzhagen 2007; Horie *et al.* 2008a; Ryan and Meinertzhagen 2019)。このうち、PSC, aATEN, pATEN, BTN は神経板境界領域から発生し、PSC と aATEN は脊椎動物のプラコードとの相同性が、BTNs は神経堤細胞との相同性が指摘されている (Wagner and Levine 2012; Wagner *et al.* 2014; Abitua *et al.* 2015; Stolfi *et al.* 2015)。

ホヤの神経系に関する研究は、電子顕微鏡によるコネクトーム解析 (Ryan *et al.* 2016, 2017; Ryan and Meinertzhagen 2019) や神経伝達物質を指標にして、個々の神経細胞の種類を、機能をもとに分類する研究などが行われてきた (Horie *et al.* 2008a, 2009, 2010)。最近、Ca²⁺蛍光指示タンパク質を用いた Ca²⁺イメージングや光遺伝学などの手法を利用することにより、個々の神経細胞の機能に関する研究は進んできたが (Hozumi *et al.* 2015)、神経細胞の分化機構に関する研究は一部の細胞を除きほとんど進んでいなかった。これは個々の神経細胞で発現する転写因子やシグナル分子の情報が不足しているためであると考えられる。私は個々の神経細胞の遺伝子情報を得るため、単一細胞トランスクリプトームを行い、従来の発生生物学的な手法と組み合わせた研究を行った。

単一細胞トランスクリプトームとは、個体もしくは組織の細胞をバラバラに解離し、それら一個一個の細胞に対して、すべての遺伝子転写産物の配列を網羅的に解析 (トランスクリプトーム解析) するという手法である (Satija *et al.* 2015; Tanay and Regev 2017)。動物の個体は様々な組織、細胞から構成されている。それぞれの細胞種の違いは、発現している遺伝子の違いを反映している。そのため、各細胞の遺伝子発現を 1 細胞レベルで解明することが出来れば、個々の細胞の機能や発生、分化機構に関して飛躍的に理解が深まると期待される。ホヤ幼生の全身を構成する細胞の数は約 2600 個 (中枢神経系が約 350 個、脊索細胞が 40 個、筋肉細胞が 38 個、表皮細胞が 800 個、間充織細胞が約 900 個、内胚葉細胞が 550 個) と非常に少数である (Sato 2014)。このように個体を構成する

細胞数が少数であり、さらに過去の発生生物学的な知見が積み重なっているホヤは、個々の細胞の遺伝子発現を全遺伝子レベルで解析し、発生現象を 1 細胞レベルで理解するために最適なモデル生物である考えられる。

本研究では、脳神経系の発生・分化機構の 1 細胞レベルでの理解を目指して、単一細胞トランスクリプトームを用いて、ホヤの幼生に存在する表皮感覚神経細胞とドーパミン神経細胞/コロネット細胞の分化メカニズムの解析を行った。また、これらの神経細胞の発生、分化機構をもとに、これらの神経細胞の進化的な起源に関する考察を行った。表皮感覚神経細胞は幼生の表皮に存在する末梢神経細胞で、付着刺激や接触刺激を受容すると考えられている。ドーパミン神経細胞/コロネット細胞は形態学的な特徴から脊椎動物の機械刺激受容器との相同性を指摘されている細胞である。

第一部では、「神経板境界領域から生じる感覚神経細胞の分化メカニズムの解析」を行った。脳と感覚器を備えた頭部構造は脊椎動物に特徴的な構造であり、神経板境界領域から生じるプラコード、神経堤細胞から派生することが知られている (Patthey *et al.* 2014; Schlosser *et al.* 2014; Schlosser 2015)。ホヤの幼生にもプラコード様の構造や神経堤細胞の祖先型を持つことが報告されていたが (Abitua *et al.* 2015; Stolfi *et al.* 2015)、それらがいつ、どのように獲得されたのかは不明であった。単一細胞トランスクリプトームと発生生物学的な実験を組み合わせた解析の結果、プラコード由来、神経堤細胞由来の感覚神経細胞はお互いに運命転換が可能な良く似た性質を備えていることを明らかにし、その結果をもとにプラコード・神経堤細胞が進化的な起源を共有するという新たなモデルを提唱した。

第二部では、「ドーパミン神経細胞分化を制御する遺伝子カクテルの同定」を行った。ドーパミン神経細胞は情動行動の制御や運動機能の調節など様々な役割を行うことが知られている。脊椎動物には数種類のドーパミン神経細胞が存在しており、中脳、視床下部、嗅球などに分布している。特に中脳の黒質領域のドーパミン神経細胞はパーキンソン病との関連が知られており、ドーパミン神経細胞の分化機構の研究は医学的にも生物学的にも非常に重要である。一方で、視床下部のドーパミン神経細胞の分化機構に関しては、不明な点が多く残されていた。今回、ホヤにおいて、ドーパミン細胞の分化メカニズムについ

て、単一細胞トランスクリプトーム解析のデータをもとに研究を行った。その結果、ホヤのドーパミン神経細胞の分化には *Ptf1a* と *Meis* という 2 つの転写因子が必須の役割をしていることを明らかにした。また、ホヤのドーパミン神経細胞にはホルモン・神経ペプチドの関連遺伝子が多数発現しており、ホヤのドーパミン神経細胞は脊椎動物の視床下部のドーパミン神経細胞と類似していることを明らかにした。マウス視床下部のドーパミン神経細胞の分化にも *Ptf1a* が重要な役割をすることが報告され (Fujiyama *et al.* 2018)、視床下部における *Ptf1a* によるドーパミン神経細胞の分化の制御機構は進化的に保存された分子機構であることが示唆された。

第一部

単一細胞トランスクリプトーム解析を用いた神経板境界領域から派生する感覚神経細胞の分化メカニズムの解析

序論

発達した脳および眼、鼻、耳などの感覚器を備えた頭部を持つことは、脊椎動物の大きな特徴の一つである(Gee 2018)。頭部では、脳が頭蓋骨で保護されている。頭部形成における重要なキーワードとして、プラコードと神経堤細胞があげられる(図 6) (Gans and Northcutt 1983; Baker and Bronner-Fraser 1997; Northcutt 2005; Schlosser 2008; Patthey *et al.* 2014)。プラコードからは眼、鼻、耳などの感覚器が、神経堤細胞からは末梢神経系や頭蓋組織、色素細胞など様々な細胞が生じることが知られている(図 6)(Schlosser 2015; Green *et al.* 2015)。これら、プラコードと神経堤細胞は脊椎動物に特異的な組織と考えられており、これらの組織が登場したことが、脊椎動物への進化の過程において重要なイベントであると考えられている(Gans and Northcutt 1983; Northcutt 2005)。発生過程の神経胚期において、神経板と表皮の前方の境界領域には頭部プラコードが、神経板と表皮の側方の境界領域には神経堤細胞が形成される(図 7) (Schlosser *et al.* 2014; Schlosser 2015)。プラコードと神経堤細胞は、脊椎動物に特有の組織であると考えられてきたが、最近、無脊椎動物ホヤにおいて、プラコードと神経堤細胞の起源的な性質を備えた細胞が存在することが報告された(図 8) (Manni *et al.* 2004; Abitua *et al.* 2012, 2015; Stolfi *et al.* 2015)。しかしながら、プラコードと神経堤細胞が進化の過程においてどのように獲得されたのか、例えばプラコードと神経堤細胞は進化の過程において別々に獲得されたのか、もしくは進化的な起源を共有しているのかなどは不明であった。

今回、細胞系譜追跡実験、遺伝子機能阻害、単一細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせることで、ホヤのプラコードと神経堤細胞の分化メカニズムに関する研究を行った。ホヤでは、神経板境界領域から 4 種類の表皮感覚神経細胞 (Imai and Meinertzhagen 2007; Horie *et al.* 2008a, 2009)が分化することが知られており、それぞれ前方から PSCs (Palp Sensory Cells)、aATEN (Anterior Apical Trunk Epidermal Neurons)、pATENs (Posterior Apical Trunk Epidermal Neurons)、BTN (Bipolar Tail Neurons) と名前が付けられている(図 8)。PSCs は付着突起に存在する感覚神経細胞で、先端がとがった円柱の特徴的な形態をしており (Wagner and Levine 2012; Wagner *et al.* 2014; Zeng *et al.* 2019)、マーカー遺伝子と

して β -crystallin や *Islet* を発現している (Shimeld *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2014)。aATEN は神経管の最も前方部である入水口原基の近傍に位置し、マーカー遺伝子として *GnRH* を発現する (Imai and Meinertzhagen 2007; Horie *et al.* 2008a; Abitua *et al.* 2015)。BTN は尾部の中央部に位置し、長い神経突起を前方と後方へと伸ばしており、マーカー遺伝子として *Acid Sensing Channel1b (Asic1b)* を発現する (Imai and Meinertzhagen 2007; Horie *et al.* 2008a; Coric *et al.* 2008; Wagner *et al.* 2014; Li *et al.* 2017)。pATEN は頭部の後方に位置しているが、マーカー遺伝子が単離されておらず、その詳細は不明である (Imai and Meinertzhagen 2007; Horie *et al.* 2008a)。

PSC と aATEN は神経板境界領域の前方部から分化してくることが知られており、プラコードとの相同性が報告されている (Wagner and Levine 2012; Wagner *et al.* 2014; Abitua *et al.* 2015)。特に aATEN は化学受容性細胞としての性質と、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を放出する神経内分泌性細胞としての性質の両方を備えていることが報告されている (Abitua *et al.* 2015)。一方、最も後方に位置する BTN は、マーカー遺伝子の発現や発生学的な起源から神経堤細胞に由来する後根神経節 (dorsal root ganglia) と性質が似ていることが報告されている (Stolfi *et al.* 2015)。しかしながら、各感覚神経細胞やその由来となる割球で発現している遺伝子や、その発生プログラムはいまだ不明な点が多く残されていた。

そこで、本研究では、プラコードもしくは神経堤細胞から派生する感覚神経細胞において、細胞系譜の解析、単一細胞トランスクリプトームによる、各感覚神経細胞およびその由来となる割球で特異的に発現している遺伝子の解析とその機能解析を行った。その結果、プラコード領域では転写因子 *Dmrt.a* が、神経堤細胞領域では *Msx.b* がお互いに排他的に発現し、プラコードと神経堤細胞の区画化を担っていることを明らかにした。さらにプラコード領域内では *Foxc* と *Six1/2* により区画化されていることを見出し、*Foxc* 発現領域からは PSC が *Six1/2* 発現領域からは aATEN が分化することを明らかにした。これらの結果から、転写因子によって区画化された領域から、異なる感覚神経が産み出されることを明らかにした。さらに、PSC 形成を制御する転写因子 *Foxc* を神経堤細胞領域に強制発現させたところ、BTN が PSC へと運命転換した。この現象を単一細胞トラン

スクリプトームで解析したところ、PSC に完全に運命転換した細胞群と、PSC と BTN の両方の遺伝子発現を持つ細胞群が確認された。つまり、プラコードと神経堤細胞は、一つの遺伝子の発現を変化させるだけで、運命転換が可能な良く似た性質を有していることが明らかとなった。以上の結果をもとに、プラコードと神経堤細胞は共通の進化的起源を有しているという新たなモデルを提唱する。

方法

カタユウレイボヤ成体の取得

カタユウレイボヤ成体は M-REP 社（カリフォルニア）、およびナショナルバイオリソースプロジェクトカタユウレイボヤ (<http://marinebio.nbrp.jp/>) より取得した。成体は循環型水槽に入れ、水温 18°C、恒明下で飼育した。数個体のカタユウレイボヤ成体の輸卵管から未受精卵を、輸精管から精子を取り出し、実験に使用した。

カタユウレイボヤのコリオン（卵殻）除去

チオグリコール酸ナトリウム(Sigma) 0.1g、プロテアーゼ(Streptomyces griseus 由来 Sigma) 0.01g を 10ml のガラスのスピッツ管に入れ、海水を約 5 ml、2N HCl 300ul を加えた。未受精卵を加えて、10ml にメスアップした。約 5 分ピペティングを行い、卵膜を除去した。実体顕微鏡下で卵膜除去を確認後、手回し遠心機で遠心し、卵殻除去液をピペットで除き、2 回海水で洗った後、実験に使用した。

マイクロインジェクション

カタユウレイボヤの未受精卵へのマイクロインジェクションは(Satou *et al.* 2001)の方法に従って行った。アンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) は Gene tools 社より購入した。本実験に使用した MO の配列を以下に示す。

Dmrt.a MO (5'-CTGTTTGCTATAATTTCTGTA ACTC-3')

Msxb MO (5'-ATTCGTTTACTGTCATTTTAAATTT-3')

Otx MO (5'-TACGACATGTTAGGAATTGAACCCG-3')

Msxb MO (5'-CATTGTCATTATAGAGAATCAAACC -3')

Control MO (5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3')

MO は 1 mg/ml テトラメチルローダミン-デキストラン(D1817, Invitrogen)を含む DEPC 水に溶解させた。インジェクション溶液の MO 濃度は 0.5mM、プラスミド DNA 濃度は 1-10 ng/μl である。すべての実験は最低でも 2 回以上、異なる個体からの卵を用いて繰り返した。MO の特異性と効果を検証するため、MO

の認識配列を付加した CFP コンストラクト (1 ng/μl) やレスキューコンストラクト (1 ng/μl)を同時にインジェクションした。

プラスミドコンストラクトの作成

Dmrt.a, *Msx*, *Six1/2*, *GnRH*, *CNGA*, *Foxc*, *Islet* 遺伝子それぞれのレポーターコンストラクトは以前に報告されたエンハンサー配列を用いて作成した (Aniello *et al.* 1999; Russo *et al.* 2004; Roure *et al.* 2014; Wagner *et al.* 2014; Abitua *et al.* 2015; Gainous *et al.* 2015; Wagner and Levine 2012)。 *Eya*, *Pax3/7* のエンハンサー領域は以下のプライマーを用いてPCRを行い単離した。

Eya エンハンサー領域に対するプライマーの配列

Fw: 5'-ATGCCTGCAGACTCAATTACCGAATTAATT-3'

Rv: 5'-GATCGGATCCATATTTCCATCACGAACTTT-3'。

Pax3/7 エンハンサー領域に対するプライマー

Fw: 5'-ATGCCTGCAGGTATGACTGTGTAAATCTGC-3'

Rv: 5'-GATCGGATCCGTTTGTGGGTTGTGTTTCAG-3'

下線は制限酵素サイトを示す。得られたPCR産物を pSPeCFPベクターの PstI/BamHIサイトに挿入し、エンハンサーの制御下でCFPを発現するレポーターコンストラクトを作成した。

pSPDmrt.a ΔMO target sequence CFP (図32) は、以下のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物をpSPeCFPベクターのSphI/BamHIサイトに挿入し作成した。

Fw: 5'-ATGCGCATGCTAGTAGGGTGGAGGAAGATG-3'

Rv: 5'-GATCGGATCCTTGGTTTAACTCTAAAGC-3'

pSPDmrt.aコンストラクトを作成するため、以下のプライマーを用いてPCRを行い、*Dmrt.a*のORF配列をpSPeCFPベクターのNotI/EcoRIサイトに挿入した。

Fw: 5'-ATGCGCGGCCGCATGGCAACCGACAGAGGA-5'

Rv: 5'-GATCGAATTCCTACTTGTCCTTGAGCATG-3'

pSPDmrt.aΔMO target sequence *Dmrt.a*コンストラクト (図32) を作成するため、*Dmrt.a*ΔMO target sequenceをpSPDmrt.aコンストラクトのSphI/BamHIサイトに挿入した。

pSPMsxb MO target sequence CFP (図33) を作成するため、CFPにインバースPCRを行い、*Msxb MO target sequence*(AAATTAAAAATGACAGTAAACGAAT)のタグを付加した。*Msxb*>*Msxb MO target sequence CFP*を作成するため、*Msxb* エンハンサー領域を、pSPMsxb MO target sequence CFPのXhoI/NotIサイトに挿入した。pSPMsxbコンストラクトを作成するため、*Msxb*のORF配列を以下のプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物をpSPeCFPベクターのNotI/EcoRI平滑化サイトに挿入した。

Fw: 5'-ATGCGCGGCCGCATGACAGTAAACGAATCC-3'

Rv: 5'-GCTTGATATCCTATCGACTCTCAGTTGGGT-3'

pSP *Msxb mutant*コンストラクト (図33) を作成するため、インバースPCRを用いて、*Msxb MO target* 配列 (ATGACAGTAAACGAAT) を (ATGACGGTGAATGAGT)に置換した。PCR産物をNotI/EcoRVで処理し、pSPeCFPのNotI/EcoRI平滑化サイトに挿入した。pSPMsxb *Msxb mut*を作成するため、*Msxb*エンハンサー領域をpSPMsxb mutのXhoI/NotIサイトに挿入した。

Foxc MO target sequence CFP (図34) を作成するため、インバースPCRを行い、CFPに*Foxc MO target sequence* (GGTTTGATTCTCTATAATGACAATG) のタグを付加した。pSP*Foxc*>*Foxc MO target sequence CFP*を作成するため、*Foxc*エンハンサー領域を、pSP*Foxc MO target sequence CFP*のXhoI/NotIサイトに挿入した。

pSP*Foxc*コンストラクト作成のため、*Foxc* のORF配列を以下のプライマーを用いてPCRを行い、pSPeCFPベクターのpSPeCFPのNotI/EcoRIサイトに挿入した。

Fw: 5'-ATGCGCGGCCGCTATGACAATGCAAATCCG-3'

Rv: 5'-GATCGAATTCTCAGTACTTAGTGTAATCGT-3'

pSP*Foxc Foxc*を作成するため、*Foxc*エンハンサー配列をpSP*Foxc*のXhoI/NotIサイトに挿入した。

pSP*Dmrt.a*>CFP、pSP*Six1/2*>CFP、pSP*Foxc*>CFPを作成するため、*CiDmrt.a*, *CiSix1/2*, *CiFoxc*のエンハンサー領域を以下のプライマーで単離した。

CiSix1/2 Fw: 5'-ATGCGCGGCCGCATGGCAGCCACCCTGGCG-3'

CiSix1/2 Rv: 5'-GATCGAATTCTTACGATCCCATTTCGACTG-3'

CiFoxc Fw: 5'-ATGCGCGGCCGCTATGACAATGCAAATCCG-3'

CiFoxc Rv: 5'-GATCGAATTCTCAGTACTTAGTGTAATCGT-3'

PCR産物をEcoRI/NotIで処理し、pSPeCFPのEcoRI/NotIサイトに挿入した。

Dmrt.a>Msxb, *Dmrt.a>Six1/2*コンストラクトを作成するため、*Dmrt.a*エンハンサー領域をpSPMsxbとpSPSix1/2のSphI/BamHIサイトに挿入した。

*Dmrt.a>Foxc*を作成するため、*Dmrt.a*エンハンサー領域を、pSPFoxcのSphI/NotIサイトに挿入した。*Pax3/7>Foxc*コンストラクトを作成するため、*Pax3/7*エンハンサー領域をpSPFoxcのXhoI/NotIサイトに挿入した。*Six1/2*の最小エンハンサー領域を以下のプライマーを用いて単離した。

Fw: 5'-TGCCTGCAGCGAAAACAATGGTTTATCCG - 3'

Rv: 5'-GATCGGATCCTACATGTACGCGCACTTTAA- 3'

このPCR産物をpSPFoxAa最小プロモーターおよび*Kaede*を含むレポーターコンストラクトのPstI/BamHIサイトに挿入した。

DiI および DiO に用いた細胞系譜追跡実験

16細胞期の a5.3, a5.4, b5.3 割球の DiI もしくは DiO ラベルは(Satou *et al.* 2004) および(Horie *et al.* 2011)に従って行った。DiI (Celltracker CM-DiI Dye, C7000), DiO(D-275, Molecular Probes)は大豆オイルに 5mg/ml で溶解させた。

単一細胞トランスクリプトーム解析

Pax3/7>Foxc(2.5ng/ul)をインジェクションした卵と、コントロールの卵をそれぞれ受精させ、後期尾芽胚(18°Cで受精後12時間)まで発生させた。それぞれの胚で、形が正常なもの約120個を5%BSA Ca²⁺-free 人工海水 (ASW: Ca²⁺-free ASW、10 mM KCl、40 mM MgCl₂、15 mM MgSO₄、435 mM NaCl、2.5 mM NaHCO₃、7 mM Tris base、13 mM Tris-HCl)でコートした1.5ml チューブに回収した。集めた胚を300ul 1% trypsin in Ca²⁺free ASW(5mM EGTA)で5分間、氷上でピペッティングし、細胞を完全にバラバラにした。0.5%BSAを含む氷冷したCa²⁺freeASW 500ul を加えて、反応を止めた。細胞を900G 5分4°Cで遠心し、細胞を集め0.5%BSAを含む氷冷したCa²⁺freeASW 50ulに溶解させた

10xGenomics 社のプロトコールに従い (Zheng *et al.* 2017)、cDNA を増幅させるため、リージェントキットを用い、10Xgenomics Chromium system にロードした。イルミナシーケンシングライブラリーは cDNA サンプルから Nextera DNA

library prep キットを用い、作成した。イルミナ HiSeq2500 Rapid flowcells (Illumina) を用いてイルミナ社のプロトコールに従い、ペアエンドシーケンス (26 + 125nucleotide reads) で、シーケンスを行った。シーケンスを行った生データは、イルミナ HiSeq コントロールソフトウェアを用い、フィルターを通過したもののみ、解析に使用した。

Pax3/7>Foxc 注入胚サンプルおよびコントロール胚サンプルをHiSeq 2500の Rapid ランモードで、両方のレーンに流した。Illumina RTA version 1.18.64.0. BCL filesを用いてベースコーリングを行い、bcl2fastq version 1.8.4 (Illumina)を用いて、FASTAQフォーマットに変換した。それぞれのレーンからFASTQファイルを統合し、barcode splitter version 0.18.2を用いて1ミスマッチまでのバーコードシーケンスを分離した。それぞれのサンプルで、遺伝子バーコードの行列を作るため、10X Cell Ranger version 2.0.1を用いて、FASTAQファイルのデフォルトセッティングでカウントパイプラインを行った。リファレンスシーケンスはGhost データベースにSV40のシーケンスを加えたものから獲得した。遺伝子のアノテーションもGhostデータベースにSV40シーケンスを加えたものから得た。

低品質のトランスクリプトームデータは以下の方法でフィルターをかけた。

(1) 200以下の遺伝子を発現している細胞を除く。(2) 500以下もしくは30000以上のランダムな塩基配列UMI (unique molecular identifiers) を持つものは除く。その後、次世代シーケンサーでcDNA配列に加えてUMI配列を決定し、同じUMI配列を持った同じcDNA配列は一つとして数えた。我々はさらにそれぞれの細胞のリードカウントをSeurat methods用いてノーマライズした。そして、ノーマライズされたリードカウントを今後の解析と可視化のため対数変換した。次元削除のため、各遺伝子の相対的な発現定量は、不必要なバリエーションを取り除くのに用いた。コントロールと実験操作を行った (*Pax3/7>Foxc*) サンプルで高く変化した遺伝子として、上位2000の高い標準偏差を持つ遺伝子が得られた。我々はさらに、共通の類似点に着目し、比較解析を容易にするため、相似点正準相関分析 (canonical correlation analysis) を用いて2つのサンプルをアラインさせた。アラインしたデータセットにおいて、10135細胞がキープされ、高く変異した遺伝子の主成分分析 (principal component analysis) スコア

を元にクラスター化した。基本的には、主成分分析が同定された後、細胞の距離行列をクラスターに分割するため、a graph-based clustering approachを用いた。細胞の距離は2次元に圧縮したt-SNEにより可視化した。異なるタイプの細胞間の差別的に発現した遺伝子は、DESeq2 software packageを用い以下の基準で行った。(1) FDR法 (false discovery rate) $P < 0.01$ 、(2)グループ間のabsolute $\log_2(\text{fold change})$ が1より大きいこと。

画像の取得

写真はZeiss AX 10落射蛍光顕微鏡を用いて撮影した。

シングルセルRNA-seqデータ

この論文で用いたシングルセルRNA-seqデータはNCBIのGene Expression Omnibus (GEO)において、アクセスナンバーGSE115331で取得可能である。

結果

1. 神経板境界領域における遺伝子発現の区画化のパターンはホヤと脊椎動物で保存されている。

ホヤ幼生では、神経板境界領域から 4 種類の感覚神経が生じることが知られている (Abitua *et al.* 2015; Stolfi *et al.* 2015)。前方から PSC (palp sensory cell)、aATEN (anterior apical trunk epidermal neuron)、pATEN (posterior apical trunk epidermal neuron)、BTN (bipolar tail neuron) と名付けられている (図 8)。このうち、前方からの PSC および aATEN は頭部プラコードの原始的な性質を持つことが報告されている (Manni *et al.* 2004; Abitua *et al.* 2015)。後方に位置する BTN は神経堤細胞に由来する後根神経節 (dorsal root ganglia) と性質が似ていることが報告されている (Stolfi *et al.* 2015)。しかしながら、各割球および各感覚神経細胞で発現している遺伝子や、その発生プログラムはいまだ不明な点が多く残されていた。そこで、各割球および各神経細胞で特異的に発現している遺伝子の同定を試みた。

まず、Dil を用いた細胞系譜追跡実験およびレポーター遺伝子の発現観察を行った。16 細胞期の a5.3、a5.4、b5.3 割球を Dil でレベルし、各割球の運命を幼生期に観察した (図 9)。その結果、a5.3 割球は PSCs を含む付着突起を構成する細胞に、a5.4 割球は頭部前方の aATEN を構成する細胞に、b5.3 割球は BTN が存在する尾部の表皮細胞を構成する細胞になることが明らかとなった (図 9A-D)。さらに、これまで知られている各割球の予定運命、マーカー遺伝子の発現解析などから、神経板境界領域から生じる感覚神経細胞の細胞系譜を詳細に解析したところ、PSCs は 110 細胞期の a8.20 および a8.18 割球から (Wagner and Levine 2012)、aATEN は a8.26 割球から (Abitua *et al.* 2015)、pATEN は b8.20 割球から (Pasini *et al.* 2006)、BTN は b8.18 割球から発生することが明らかとなった (Stolfi *et al.* 2015) (図 10)。

次に各感覚神経細胞の分化機構を明らかにすることを目的として、PSC の起源となる a8.18、a8.20 割球、aATEN の起源となる a8.26 割球、BTN の起源となる b8.18 割球で発現する転写因子の検索を行った。これまでに報告されている発生

制御因子の遺伝子発現パターンの解析(Imai *et al.* 2006)および 110 細胞期の各割球の単一細胞トランスクリプトーム解析の結果から、*Dmrt.a* が a8.18、a8.20、a8.26 割球、つまり将来のプラコードを形成する領域全般に渡って発現していることが明らかとなった(図 9A、E および図 10、図 11)。一方で、b8.18、b8.20 割球、つまり将来の神経堤細胞を形成する領域には *Msxb* が発現していることが明らかとなった(図 9D、F、図 10 および図 11A)。また、プラコード領域内の前方の PSC 領域では *Foxc* が、プラコード領域内の後方 aATEN 領域では *Six1/2* が発現していた(図 9H、図 10 および図 11B)。このように各感覚神経細胞が分化する領域はそれぞれ特異的な転写因子によって明確に区画化されていることが明らかとなった(図 10 および図 12)。神経板境界領域における *Dmrt.a*、*Foxc*、*Six1/2*、*Pax3/7*、*Msxb* 遺伝子の発現の区画化パターンをホヤと脊椎動物で比較したところ、非常によく保存されていた(図 12)。*Dmrt.a*、*Six1/2*、*Foxc* はプラコード領域で、*Msxb* は神経堤細胞領域で発現している(図 12)。また、これらの転写因子の前後軸に沿った発現パターンは、頭部プラコードに由来する感覚神経、および神経堤細胞に由来する感覚神経が生じる位置と対応していた。

2. 神経板境界領域において、各転写因子がお互いに制御しあうことで、各転写因子の、さらには、各感覚神経細胞の区画化が生み出される。

各転写因子の発現パターンが互いの発現パターンに影響するのかを解析した。モルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)を用いて、各転写因子の機能を阻害し、遺伝子発現の変化を観察した。*Dmrt.a* はプラコード領域全般に渡って発現していることから、*Foxc*、*Six1/2* の発現を制御していることが予想された。そこで、その可能性について検討した。*Foxc>CFP* レポーター遺伝子を未受精卵にマイクロインジェクションし、*Foxc>CFP* の発現を確認した。コントロールでは、付着突起に *Foxc>CFP* の発現が見られた(図 13)。*Dmrt.a* 機能阻害胚において、付着突起における *Foxc* の発現は完全に消失した(図 13)。このことから、*Dmrt.a* は *Foxc* の発現を活性化していると考えられる。次に、*Six1/2* の発現を解析した。コントロールでは、頭部前方に *Six1/2>CFP* の発現が見られる(図 14)が、*Dmrt.a* 機能阻害胚では *Six1/2>CFP* の発現は完全に消失した(図 14)。この結

果から、*Dmrt.a* は *Six1/2* の発現を活性化していると考えられる。*Six1/2* の co-factor である *Eya* についても、*Six1/2* と同様の結果が得られた (図 15)。これらの結果から、*Dmrt.a* はプラコード領域で発現する *Foxc*, *Six1/2*, *Eya* などのプラコード遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

続いて、*Foxc* と *Six1/2* の関係について解析した。*Six1/2* は頭部の前方に発現するが、*Foxc* MO 胚では、*Six1/2* の発現が、頭部前方だけではなく、PSC 領域に異所的にも見られるようになった (図 16)。さらに、*Dmrt.a* エンハンサー領域を用いて、*Six1/2* 発現領域を含むプラコード領域全体で *Foxc* を発現させると、*Six1/2* の発現が消失した (図 16)。これらの結果から、PSC 領域において、*Foxc* は *Six1/2* の発現を抑制していることが示唆された。以上の結果をまとめると、*Dmrt.a* はプラコード領域において、*Foxc* と *Six1/2* の発現を活性化することが明らかとなった。プラコード領域内において、PSC 領域には *Foxc* が、aATEN 領域には *Six1/2* が発現するが、*Foxc* は *Six1/2* の発現が PSC 領域で発現しないように抑制することで、PSC と aATEN の境界を形成することが示唆された (図 17)。

次に、神経堤細胞領域で発現する転写因子 *Msx*b について機能解析実験を行った。脊椎動物において、*Msx*b は神経堤細胞の分化に重要なだけでなく、神経堤細胞領域におけるプラコードの形成を阻害することが報告されている (Feledy *et al.* 1999; Schlosser 2006)。そこで、*Msx*b 機能阻害胚における *Six1/2* の発現の解析を行い、この可能性を検討した。コントロールでは、*Six1/2* は頭部前方に発現するが、*Msx*b MO 胚では、これまで発現していなかった頭部の後方領域に *Six1/2* の発現が異所的に広がった (図 18)。また、*Dmrt.a* エンハンサーを用いて *Msx*b をプラコード領域に発現させると、*Six1/2* の発現が完全に消失した (図 19)。これらの実験により、*Msx*b は神経堤細胞領域におけるプラコード遺伝子の発現を抑制することで、プラコードが神経板境界領域に形成されないようにしていることが示唆された (図 17)。さらに、*Six1/2* のエンハンサー領域を単離し、エンハンサー領域の欠失実験を行ったところ、*Six1/2* の最小エンハンサー 400 bp 内に *Msx*b の結合配列が多数存在していることが明らかとなった (図 20)。この結果から、*Msx*b が *Six1/2* のエンハンサーに直接結合して、発現を抑制している可能性が示唆された (図 20)。

3. 神経板境界領域前方のプラコード領域から生じる感覚神経細胞はお互いに運命転換が可能によく似た性質を備えている。

次に、各転写因子の機能を阻害したときの感覚神経細胞の分化への影響を調べた。まず、*Foxc*について解析を行った。コントロールでは、付着突起にPSCマーカーである、*βγ-Crystallin*の発現が見られるが、*Foxc*機能阻害胚では、付着突起の形成が阻害され、*βγ-Crystallin*の発現が消失した(図22)。この結果より、*Foxc*がPSC形成に重要であることが明らかとなった。次に、*Foxc*機能阻害胚におけるaATEN分化への影響を解析した。aATENはGnRHを発現しており、*GnRH>CFP*を用いて、aATENの分化を確認した(図23。*Foxc*機能阻害胚では、PSC領域においてGnRHの異所的な発現が見られるようになった(図23B)。つまり、PSCがaATENに運命転換したことが示唆された(図23C)。この結果より、*Foxc*はPSC遺伝子を活性化するとともに、aATEN遺伝子の発現を抑制することにより、PSCの分化を制御することが示唆された。また、PSCとaATENは互いに運命の転換が可能であったことから、神経板境界領域の前方、プラコード領域内は互いに似た発生プログラムを利用する可能性が示唆された。

4. 神経板境界領域のプラコード領域と神経堤細胞領域から生じる感覚神経細胞はお互いに運命転換が可能によく似た性質を備えている。

神経堤細胞から生じる感覚神経細胞であるBTNはプラコードから生じる感覚神経細胞に運命転換できるのだろうか？神経堤細胞から生じる感覚神経であるBTNをプラコードから生じる感覚神経細胞に運命転換できれば、これらは似た発生プログラムを利用していると考えられる。そこで、神経堤細胞に発現する*Pax3/7*のエンハンサー領域を用いて、*Foxc*を神経堤細胞領域に発現させた際の感覚神経細胞の分化について解析を行った(図24)。

コントロールでは、BTNマーカーである*Asic1b*の発現が尾部で観察された(図24A)。*Pax3/7*もしくは*Msxb*エンハンサー領域を用いて、神経板境界領域の後方に*Foxc*を異所的に発現させた胚(*Pax3/7>Foxc*インジェクション胚)

では、BTNにおいてPSCマーカーである $\beta\gamma$ -*Crystallin* の発現が観察された (図24B)。つまり、BTNがPSCsへと運命転換できていることが示唆された (図24C)。また、この際に、PSCマーカーのみを発現するもの、PSCとBTN両方のマーカーを発現するものが観察された (図24B)。

このBTNからPSCの運命転換の詳細を解析するため、単一細胞トランスクリプトームによる解析を試みた。ホヤの尾芽胚は1500個ほどの少数の細胞からなり、細胞系譜も詳細に解析されているため、胚丸ごとを用いた単一細胞トランスクリプトーム解析により遺伝子発現や細胞の由来を解析するのによいモデルとなる。*Pax3/7* エンハンサー領域を用いて、*Foxc* を細胞板境界領域後方に異所的に発現させた後期尾芽胚 (*Pax3/7>Foxc* をインジェクションした後期尾芽胚) 約120個をバラバラにし、10xGenomics社のChromiumを用いて単一細胞トランスクリプトーム解析を行った。約5000細胞のシーケンスデータが得られ、これはホヤ全細胞の約3倍に当たり、十分なデータが得られたと判断した。t-SNE(t-distributed stochastic neighbor embedding)プロット解析により、ホヤの後期尾芽胚は、脊索、内胚葉、尾部筋肉、内胚葉、表皮、中枢神経系等の約20種類の細胞クラスターに分けることができた (図25)。BTNは *Asic1b*、*synaphin* などのマーカー遺伝子の発現を、PSCは *islet*、*SP8*、*Foxg*、 $\beta\gamma$ -*crystallin* などのマーカー遺伝子の発現を指標に同定した (図26)。

完全にPSCに運命転換したBTNは、*Pax3/7>Foxc* の発現、BTNマーカー (*Asic1b*、*synaphin*) の発現の消失、PSCマーカー (*islet*、*foxg*、*SP8*) の発現獲得、野生型 PSCの95%信頼区間内にクラスタリングされたことにより定義した (図27)。一部運命転換したBTNは、*Pax3/7>Foxc* の発現、一部のPSCマーカーの獲得により定義した。一部運命転換したPSCsとBTNの両方の性質を備えたハイブリッド型の細胞はPSCの95%信頼区間外にマッピングされる傾向があった (図27)。*Pax3/7>Foxc* を発現させた細胞の遺伝子発現のヒートマップを図28に示す。この結果より、計41個の (*Pax3/7>Foxc* を発現した) BTN細胞が同定された。約半分の21個が運命転換せずBTNのままであった。残りの半分のうち10個が完全にPSCに運命転換し、14個がBTN、PSC遺伝子両方を発現するハイブリッド型であった (図28)。この結果は、レポーター遺伝子を用いた実験の観察結果と一致した。このように、BTNからPSCへの運命転換が可

能なことが明らかとなった。この実験結果により、神経板境界領域から生じる感覚神経細胞は、異なる感覚神経細胞であるにもかかわらず、互いに運命転換が可能な似た性質を有していることが示唆された。

考察

神経板境界領域における遺伝子発現ネットワーク。

本研究では、神経板境界領域における遺伝子ネットワークを明らかにした (図 12 および 17)。プラコード領域に *Dmrt.a* が、神経堤細胞領域において、*Msxb* が発現するなど、脊椎動物のものと類似していた (図 12)。ホヤにおいてはプラコードの前方が *Foxc* を発現する PSCs 領域となる、プラコードの後方が *Six1/2* を発現する aATEN 領域となる。このようにプラコード領域は細胞系譜と遺伝子発現が異なる 2 つの領域に明確に区画化されていた。図 20 に神経板境界領域が感覚神経に分化する際の、遺伝子ネットワークの仮説を示す。*Dmrt.a* が PSC 領域において *Foxc* の発現を、aATEN 領域において *Six1/2* の発現を活性化する。*Foxc* と *Six1/2* はお互いに発現を抑制しあうことにより、プラコードにおける PSC 領域、aATEN 領域の区画化が作られると考えられる (図 20)。*Dmrt.a* 以外に *Foxc*、*Six1/2*、*Eya* などのプラコード関連遺伝子の発現を制御する因子として *Otx* が同定されている (Imai *et al.* 2006) (図 21)。*Otx* の機能阻害胚では *Dmrt.a* の発現は変化しないことから (Imai *et al.* 2006)、*Dmrt.a*、*Otx* はそれぞれ独立にプラコード関連遺伝子の発現を制御していると考えられる (図 21)。

神経堤細胞領域では *Msxb* が発現している。本研究において、*Msxb* の機能阻害胚では、*Six1/2* などのプラコード関連遺伝子の発現が広がること (図 17)、プラコード領域において *Msxb* を強制発現させるとプラコード遺伝子の発現が完全に消失することが明らかとなった (図 18)。このことから、*Msxb* は神経堤細胞の領域においてプラコードが形成されないようにしていることが示唆された。これまでに私たちの研究グループは、*Msxb* が BTN の分化に必須の役割をしていることを報告してきた (Li *et al.* 2017)。これらの結果を合わせると、*Msxb* は神経堤細胞由来の感覚神経細胞の分化とプラコード形成の抑制の両方の機能を備えていることが明らかとなった。

PSC と aATEN、BTN は、互いに運命転換が可能なことから、神経板境界領域の異なる区画から生じるにもかかわらず、何らかの共通の発生プログラムを持つことが示唆される (図 29)。各区画において、尾芽胚期において、共通の

発生プログラムが、*Foxc*、*Six1/2*、*Msx*の下流で活性化され、感覚神経細胞の分化を引き起こすと考えられる（図 29）。Horie *et al.*, 2018 では、尾芽胚期の共通の発生プログラムの候補として、*PouIV*、*DCDC2*、*14-3-3c*を提示したが、その後の研究により *PouIV*が共通の発生プログラムであることを明らかとなった（論文投稿準備中）。*PouIV*はホメオドメイン型転写因子の一つで、様々な動物において感覚神経細胞の分化に重要なことが知られており、ホヤでも感覚神経細胞の分化に重要なことが報告されている(Candiani *et al.* 2005; Chen *et al.* 2011; Joyce Tang *et al.* 2013)。表皮細胞全体で *PouIV*を過剰発現させた個体では表皮感覚神経細胞が表皮全体で分化することが報告されている (Tang *et al.*, 2013)。私たちはこのように表皮全体で *PouIV*を発現させた個体において単一細胞トランスクリプトーム解析を行ったところ、PSC や BTN、あるいは両者の性質を備えたハイブリッド型の細胞が分化していることを明らかにしている（論文投稿準備中）。このことから、*PouIV* が各感覚神経細胞で働く共通の発生プログラムを駆動する鍵となる分子であると予想される。

プラコード領域内の PSC と aATEN は互いに運命転換が可能であった。さらに、神経堤細胞由来の BTN がプラコード由来の PSC に運命を転換できたことにより、ホヤでは、プラコードと神経堤細胞は脊椎動物の初期型の段階を今にとどめていると考えられる。

脊椎動物とホヤの遺伝子発現を比較することでよりプラコードらしく、より神経堤細胞に近づくための因子が明らかとなるかもしれない。また、進化の過程において、ホヤと脊椎動物の間にあるような生物（ヤツメウナギ、ヌタウナギなど）やその他の脊索動物（ナメクジウオ、ギボシムシ）も含め解析を行えば、新たな知見が得ることが出来ると期待される。

神経堤細胞・プラコードは様々な組織への分化能を有する特殊な細胞群である。その特徴の一つである分化能を解析するうえで、細胞一つ一つの遺伝子発現を解析できる単一細胞トランスクリプトーム解析は神経堤細胞・プラコードの解析にとって優れたツールとなることが期待される。神経堤細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析の論文が相次いで報告され（マウス (Soldatov *et al.* 2019)、ヤツメウナギ(Martik *et al.* 2019))、未知な点が多く残されていた神経堤細胞・プラコードの解析がさらに進むことが期待される。

脊椎動物のプラコードと神経堤細胞は共通の進化的起源を有している。

神経板境界領域の前方（プラコード領域）と後方（神経堤細胞領域）は、関連しているが異なった感覚神経細胞の発生プログラムを共有していることが示唆された。これまでにプラコードと神経堤細胞の進化について 2 つの仮説が考えられてきた（図 30）（Schlosser 2008）。第一の仮説は、「表皮と神経板の境界に感覚神経の生じる神経板の境界領域が最初に獲得され、これらの細胞が移動能を獲得、感覚神経細胞となる。その次に、それぞれ特異的な inducer か遺伝子調節ネットワークを獲得し、プラコードと神経堤細胞が進化した。」という説、第二の仮説は、「神経堤細胞とプラコードは別々に進化してきた。」という説である（Schlosser 2008）。本研究より、ホヤのプラコードと神経堤細胞は運命転換が可能な似た性質を有することが示された。この結果より、プラコードと神経堤細胞は別々に進化してきたのではなく、仮説 1 の、まず、神経板境界領域が獲得され、そこから、プラコードと神経堤細胞が生じたのではないかと考えられる（図 31）。つまり、脊椎動物のプラコードと神経堤細胞は共通の進化的起源を有していることが示唆される。我々は、神経板境界領域の区画化は脊椎動物より前に存在しており、ホヤと脊椎動物の共通祖先の神経板の境界領域は、頭部プラコードと神経堤細胞の共通の進化的な起源であるというモデルを提唱する。

第二部

単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたドーパミン神経細胞の分化を制御する転写因子カクテルの同定

序論

ドーパミン神経細胞は、脊椎動物において、喜びや快楽を介する報酬行動や恐怖や不安といった情動のコントロール、運動の調節など様々な役割をすることが知られている (Iversen and Iversen 2007)。脊椎動物の中枢神経系には数種類のドーパミン神経細胞があり、運動を司る中脳やニューロペプチド分泌をコントロールする視床下部などいくつかの領域に存在している (Flames and Hobert 2011; Grattan 2015)。特に中脳の黒質領域に存在するドーパミン神経細胞が減少するとパーキンソン病が引き起こされることが知られている (Flames and Hobert 2011; Kee *et al.* 2017; Kirkeby *et al.* 2017; Parmar 2018)。ドーパミン神経細胞の分化を調節する分子メカニズムの同定は、この神経細胞を理解するために大変重要であり、さらにパーキンソン病のようなドーパミン欠乏病に対する幹細胞治療において重要な知見となる (Doitsidou *et al.* 2013; Flames and Hobert 2009)。

これまでの研究で、線虫において、Ets 転写因子の一つである AST-1 がドーパミン神経細胞の分化に重要な決定因子であることが報告されている (Flames and Hobert 2009; Doitsidou *et al.* 2013)。このメカニズムは脊椎動物の嗅球ドーパミン神経細胞でも保存されていることが報告されている (Flames and Hobert 2009; Doitsidou *et al.* 2013)。しかしながら、脊椎動物には他のタイプのドーパミン神経細胞があり、さらなる研究が必要とされている。脊椎動物において、中脳のドーパミン神経細胞の分化に関する転写因子が報告されている。例えば、*Nurr*、*Lmx*、*Pitx3* は中脳黒質のドーパミン神経細胞の分化に関連していることが知られている (Flames and Hobert 2011) が、視床下部に関連するドーパミン神経細胞など他のタイプのドーパミン神経細胞については不明で、ドーパミン神経細胞の分化メカニズムの詳細について更なる研究が必要であった。

脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物カタユレイボヤ幼生の中枢神経系は 177 個と少数の神経で構成されており、シンプルながらも、背側に存在するなど、脊椎動物との相同性が知られている (Ryan *et al.* 2016)。ホヤ幼生は、一つのドーパミン神経細胞のクラスターであるコロネット細胞を有しており、ドーパミン/コロネット細胞群は脳胞の腹側、グループ III 光受容細胞群の近傍に存在

している（図 35、36）（Moret *et al.* 2005a; Horie *et al.* 2008b; Razy-Krajka *et al.* 2012; Ryan *et al.* 2016; Sharma *et al.* 2019）。この領域は視床下部との類似点が知られており（Moret *et al.* 2005a, 2005b; Razy-Krajka *et al.* 2012）、魚類の脳の深部の光受容器官との相同性が指摘されている（Nakane *et al.* 2013）。本研究では、ホヤにおいて単一細胞トランスクリプトーム解析や遺伝子機能阻害実験などの手法を用いて、ドーパミン神経細胞の分化決定因子の同定を試みた。その結果、*Ptf1a* と *Meis* がドーパミン神経細胞の分化に必須の役割をしていることが明らかとなった。また、*Ptf1a* と *Meis* の共発現により、中枢神経系の細胞を全てドーパミン神経細胞へと転換することに成功した。さらに、ホヤのドーパミン神経細胞に発現する遺伝子を解析したところ 13 種類のホルモン・神経ペプチドやその受容体が発現していることが分かった。これはホヤの持つホルモン・神経ペプチドの約 50% に相当していた。この結果から、ホヤのドーパミン神経細胞は脊椎動物の視床下部のドーパミン神経細胞に似ていることが明らかとなった。マウス視床下部のドーパミン神経細胞の分化にも *Ptf1a* が重要な役割をすることが報告され、視床下部における *Ptf1a* によるドーパミン神経細胞の分化の制御機構は進化的に保存された分子機構であることが示唆された。

方法

Ci-Ptf1a cDNA の単離

Ghostデータベース (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/cgi-bin/gb2/gbrowse/kh>) から、*Ci-Ptf1a* 遺伝子のcDNA配列の一部を得た。全長を得るため、GeneRacer キット (Invitrogen) を用い、以下のプライマーを用いて、5' RACEを行った：

primary PCR 5'-CACCACCCCTTCTTCGGTAAATTGGAAG-3'

nested PCR 5'-TCGGGAGGCTAGTACCTCACGAAGCAACG-3'

得られたcDNAをpGEM Tベクターにクローニングした。全長配列をDNAシーケンサー (Applied Biosystems) により決定した。

Whole-mount in situ hybridization

Ci-Ptf1a の全長ORFを含むcDNAクローンをテンプレートとし、DIG-RNAラベリングキット (Roche) を用いて、digoxigeninでラベルしたアンチセンスRNAプローブを作成した。Razy-Krajka *et al.* (2012)の方法に従い、実験を行った。

プラスミドコンストラクトの作成

Razy-Krajka *et al.* (2012)で使用した*TH*、*AADC*、*GCH*、*SERT*、*Ptf1a* エンハンサー配列を元にレポーター遺伝子コンストラクトを作成した。

pSPCiPTF1a ΔMO 標的配列を作成するため、*Ci-Ptf1a* 5'上流領域をPCRによって増幅した。得られたPCR産物をBamHIで切断し、BamHIで切断したpSPeCFPに挿入した。pSPCiGCYA2K、pSPCiGnRHXXK、pSPCiNtlBK、pSPCiPDE9aK、pSPPDEd、pSPLectinK、pSPSS23A3Kを作成するため、*Ci-GCYA2*、*Ci-GCYB*、*Ci-GnRHCi-NtlB*、*Ci-PDE9a*、*CiPDEd*、*Ci-Lectin*、*Ci-SS23A3* の5'上流領域をPCRで増幅した。プライマー配列は表2に示す。PCR産物をBamHI/NotIで切断し、pSPKaedeに挿入した。pMiCiTHKを作成するため、以下のプロモーター-Kaedeをベクター特異的な配列プライマーを用いて増幅した。

Fw: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAACTCGAGCAGCTGAAGCTTG-3'
Rv: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCAGATCTGATGGCCGCTTTGAC-3'
Gateway system(Invitrogen)を用いて、PCR産物をpMiDestFにサブクローン化し、pSPMiCiTHKを作成した。pSPCiPtf1aDNAを作成するため、表2に示したプライマーを用いて、*Ci-Ptf1a*を増幅させた。PCR産物をNotIで切断し、pSPeGFPのNotI/平滑化させたEcoRIサイトに挿入した。pSPCiMeiscDNAを作成するため、表Xに示したプライマーを用いて、*Ci-Meis* ORFを増幅した。PCR産物をBamHI/EcoRVで切断し、pSPeGFPのBamHI/平滑化させたEcoRIに挿入し、pSPCiMeiscDNAを作成した。pSPCibtubulinCiPtf1acDNAおよびpSPCiPtf1a Δ MO target sequence Ptf1acDNAを作成するため、*Ci- β 2tubulin*の5'上流領域と*Ci-Ptf1a* Δ MO target sequenceを、pSPCiPtf1acDNAのBamHIサイトに挿入した。pSPCib2tubulinCiMeiscDNAを作成するため、*Ci-b2tubulin*の5'上流領域を、pSPCiMeiscDNAのXho/BamHIサイトに挿入した。

トランスジェニック系統の作成

*TH>Kaede*トランスジェニック系統を作成するため、*in vitro*で合成したトランスポゼースmRNAとpMiCiTHKを共にエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションした動物は室内飼育系で飼育、維持した。トランスジェニック系統のスクリーニングは(Sasakura *et al.* 2007)に従って行った。

マイクロインジェクション

モルフォリノアンチセンスオリゴはGene tools社より購入した。*Ci-Ptf1a* MOの配列は5'-CGTTGATAACTCACAAACACATAGG-3'、*Ci-Meis* MOの配列は5'-GCGACATTTTTCTTTTCTTTCTTTG-3'である。これらのMOをDEPC水で2.5mMに希釈し、ストック溶液とした。MOは濃度0.25-1.0 mMで使用した。MOにプラスミドDNA(終濃度2.5-10 ng/ul), 2 mg/ml FastGreen、1 mg/ml テトラメチルローダミン-デキストラン (D1817, Invitrogen) を加え、実験に使用した。全ての実験は最低2回以上、異なる個体由来の卵を用いて行った。

単一細胞トランスクリプトーム解析

2.5 ng/ul *β2tubulin>Ptf1a* を顕微注入した卵、2.5 ng/ul *β2tubulin>Ptf1a* と 2.5 ng/ul *β2tubulin>Meis* を同時に顕微注入した卵、コントロールとして顕微注入を行っていない卵をそれぞれ、受精させ、中期尾芽胚（18°Cで受精後約 11 時間）もしくは後期尾芽胚（18°Cで受精後約 13.5 時間）まで発生させた。それぞれの胚約 120 個ずつ、形が正常なものを用いて、単一細胞トランスクリプトーム解析を行った。単一細胞トランスクリプトーム解析は前章の方法に従って行った。

画像の取得

幼生の写真は、Zeiss AxioPlan, Zeiss AX 10 epifluorescence microscope, Olympus FluoView FV10i confocal microscope を用いて撮影した。

シングルセルデータのアクセスナンバー

β2tubulin>Ptf1a インジェクション胚、*β2tubulin>Ptf1a* および *β2tubulin>Meis* 共インジェクション胚, コントロール胚単一細胞 RNA シークエンスデータは Gene Expression Omnibus(GEO)から取得可能である。アクセスナンバーは、GSE120035 である。

結果

中期尾芽胚（～1500個）を単一細胞に解離し、10x Genomics Chromium システムを用いてバーコードを付加、個々の細胞からRNAを抽出し、逆転写を行い、シーケンス解析を行った。5000個弱の細胞のシーケンスデータが得られ、全細胞を十分にカバーしていると判断した。この単一細胞トランスクリプトーム解析により、脊索、中胚葉、内胚葉、尾部筋肉、中枢神経系等の主要組織すべてを同定した（図25、37）。

ドーパミン生合成経路の分子（*TH*、*GCH*、*AADC*等）の発現(図38)を元にドーパミン神経細胞/コロネット細胞群を同定した。この細胞群は中枢神経系の細胞群とは離れた位置に独立のクラスターを形成した（図37）。ドーパミン神経細胞/コロネット細胞の単一細胞トランスクリプトームデータにより、多くの転写因子が見つかった。そのうちの 하나가、*Ptf1a*である。*Ptf1a*はベーシックヘリックスループヘリックス（bHLH）型の転写因子で脊椎動物の膵臓や小脳のGABA/グルタミン酸神経細胞の発生に関わっていることが知られている（Hoshino *et al.* 2005; Schulte 2014; Dullin *et al.* 2007; Nakhai *et al.* 2007）。*Ptf1a*はホヤ中期尾芽胚においてドーパミン/コロネット細胞に強く発現しており、他の神経細胞には発現が見られなかった（図35、39）（Razy-Krajka *et al.* 2012）。

ドーパミン神経細胞/コロネット細胞分化における*Ptf1a*の役割を同定するため、モルフォリノアンチセンスオリゴ（MO）を用いて、*Ptf1a*の機能阻害実験を行った。機能阻害胚は一見正常だが、脳胞腹側におけるドーパミン関連遺伝子の発現が完全に消失した（図40、41）。*Ptf1a* 機能阻害胚においてドーパミン神経細胞/コロネット細胞が消失した。一方で、光受容細胞のマーカであるアレスチンのグループIII光受容細胞における発現部位の広がりが観察された（図40）。つまり、*Ptf1a*機能阻害胚において、ドーパミン神経細胞/コロネット細胞が光受容細胞に転換した可能性が示唆された（図40）。これらの結果により、*Ptf1a* がホヤ中枢神経系のドーパミン神経細胞/コロネット細胞の発生に重要な役割をしていることが示された。

*Ptf1a*がドーパミン神経細胞/コロネット細胞の分化の「マスターコントロー

ル遺伝子」として働くのかを調べるために、*β2tubulin*のエンハンサー領域を用いて、中枢神経系や末梢神経系など神経系全体に*Ptf1a*を発現させた際の、ドーパミン神経細胞の分化を解析した。*β2tubulin>Ptf1a*をインジェクションした胚では、ドーパミン神経細胞マーカーである*TH>Kaede*の発現が脳胞や神経索の一部に発現が大きく広がった（図41C）。*Ptf1a*の異所的発現により中枢神経系の一部が（他の神経ではなく）ドーパミン/コロネット細胞に転換したことから、*Ptf1a*がドーパミン/コロネット細胞決定因子であると考えられる。しかしながら、すべての中枢神経系細胞がドーパミン神経細胞に分化していたわけではなく分化していない細胞も観察された（図41C）。

ドーパミン神経細胞への運命転換についてさらに調べるため、*β2tubulin* エンハンサーの制御下で、*Ptf1a*とCFPを共発現させた胚（*β2tubulin>CFP β2tubulin>Ptf1a*インジェクション胚）で単一細胞トランスクリプトーム解析を行った（図41C、D）。*Ptf1a*を神経系全体で過剰発現された個体では、内胚葉、尾部筋肉等ほとんどの組織では変化が見られなかった。これに対し、中枢神経系と末梢神経系において、*Ptf1a*の強い発現が見られた。そこで、*Ptf1a*発現細胞の遺伝子発現を比較し、クラスタリング解析を行った(Satija *et al.* 2015; Butler *et al.* 2018)。その結果、神経系全体で*Ptf1a*を発現させたことによって、新たに4つのクラスター（クラスター1から4）が形成されることが明らかとなった（図41C）。各クラスターを構成する細胞一つ一つの遺伝子発現を調べたところ、クラスター1はドーパミン神経細胞/コロネット細胞遺伝子をほぼ完全に発現していたため、ドーパミン神経細胞に完全に転換したクラスターであると判断した（図41E）。このクラスター1は図41Cにおいて運命転換していた脳胞後方と神経索の一部の細胞の可能性が高い。対照的に、クラスター2~4はドーパミン/コロネット細胞マーカー遺伝子の発現は低く、本来の脳胞前方や末梢神経系の遺伝子発現を維持していた（図41C、E）。このように*Ptf1a*を強制発現させた細胞において、ドーパミン神経細胞に分化した細胞クラスターと分化していない細胞クラスターが観察された。

神経系全体で*Ptf1a*を過剰発現した個体では、光受容細胞 (Horie *et al.* 2008b) と上衣細胞 (Horie *et al.* 2011) の分化が抑制されたが（図40F）、グルタミン酸、GABA/グリシン、コリン作動性神経に大きな変化は見られなかった

(図42)。 *Ptf1a*の過剰発現により、光受容細胞と上衣細胞はドーパミン神経細胞/コロネット細胞に運命転換したと考えられる。 *Ptf1a*はドーパミン神経細胞/コロネット細胞の分化において他の転写因子と働く可能性が考えられた。また、これらの転写因子は光受容細胞や上衣細胞に存在し、他の神経細胞には存在しないもしくは発現が低いのかもしれない。そこで、ドーパミン神経細胞に分化した細胞群（クラスター1）と分化していない細胞群（クラスター2、3、4）の遺伝子発現の比較を行ったところ、ドーパミン神経細胞に分化した細胞群にのみ転写因子 *Meis*が発現していることを突き止めた（図41E）。

Meis はホメオドメイン型の転写因子の一つで、 *Pax6* や *MyoD* などの他の転写因子の co-factor として働くことが報告されている (Moens and Selleri 2006; Agoston *et al.* 2014)。また、マウスの嗅球では *Pax6* の co-factor としてドーパミン神経細胞の分化に関与することが報告されている (Agoston *et al.* 2014)。さらに、 *Meis* はマウスの視床下部においてドーパミン神経細胞の分化に関連しているという報告もある (Hook *et al.* 2018)。ホヤでも、 *Meis* はドーパミン神経細胞で発現することが報告されている (Moret *et al.* 2005)。

*Meis*がドーパミン神経細胞の分化に重要か否かを確認するため、 *Meis*の機能解析実験を行った（図43）。 *Meis*はドーパミン神経細胞以外にも、筋肉など様々な組織に発現しているため、 *Meis* MOを未受精卵にインジェクションすると、発生異常になる。そこで、ドーパミン神経細胞の生じる細胞系譜を解析したところ、ドーパミン神経細胞は8細胞期のa細胞から生じることが分かった (Imai *et al.* 2006)。ドーパミン神経細胞のマーカーとして *TH>Kaede*を未受精卵にインジェクションし、受精させ、8細胞期においてa細胞2つに *Meis* MOもしくはコントロールMOのインジェクションを行った（図43A）。コントロールMOインジェクション胚では、 *TH>Kaede*の発現が観察され、ドーパミン神経細胞が分化していることが分かった（図43B）。一方で、 *Meis* MOインジェクション胚では、 *TH>Kaede*の発現が完全に失われ、ドーパミン神経細胞が消失していることが明らかとなった（図43C）。また、付着突起、色素細胞が失われており、 *Meis* はこれらの組織の発生・分化にも必要なことが明らかとなった（図43C）。この実験により、 *Meis* がドーパミン神経細胞の分化に必須であることが明らかとなった。

Meis がPtf1aとドーパミン神経細胞/コロネット細胞分化に協調的に働くのかを調べるために、神経系全体でMeisとPtf1aの共発現実験を行った(図44)。β2tubulin>Meisをインジェクションし、中枢神経系すべての細胞にMeisを発現させたところ、ドーパミン神経細胞マーカーであるGCYA2>Kaedeの発現に変化は見られなかった。つまり、Meis単独の過剰発現では、ドーパミン神経細胞の分化に変化は見られなかった(図44A)。β2tubulin>Ptf1aを発現させると、先ほども述べたように、ドーパミン神経細胞が異所的に分化した(図41C、図44B)。β2tubulin>Ptf1aとβ2tubulin>Meis 両方をインジェクションした胚では、GCYA2>Kaede の発現が中枢神経系全体で観察され、中枢神経系の全ての細胞がドーパミン神経細胞へと運命が転換していることが示唆された(図44C)。このことをより詳細に解析するために、β2tubulin>Ptf1aとβ2tubulin>Meis 両方をインジェクションした胚に対して単一細胞トランスクリプトームを行った(図44D,E、図45)。

中枢神経系全体でPtf1aとMeisを共発現させた個体では、2つのクラスターが形成された(図44D)。これらのクラスターを構成する細胞一つ一つの遺伝子発現を調べたところ、すべての細胞においてドーパミン神経細胞/コロネット細胞マーカー遺伝子が発現していた(図44E)。これらの結果から、Ptf1aとMeisの共発現により中枢神経系全体をドーパミン神経細胞へと転換することに成功したと考えることが出来る。Ptf1aとMeis の共発現によりドーパミン神経細胞へと運命転換した細胞では、アセチルコリン神経のマーカーであるVACHT/Chat やGABA神経のマーカーであるGADなどのマーカー遺伝子の発現を失っていた(図46)。中枢神経系の細胞はPtf1a、Meisの共発現によりドーパミン神経細胞へと運命が転換したが、これとは対照的に表皮の感覚神経は、ほとんど、もしくは全くドーパミン神経細胞に転換しなかった。

Ptf1a、Meisがドーパミン神経細胞/コロネット細胞特的な遺伝子の発現を直接制御しているかどうかを調べるために、ドーパミン関連遺伝子(TH、AADC、GCH) のエンハンサー領域の解析を行い、ドーパミン神経細胞/コロネット細胞における発現に必要な最小エンハンサーを同定した(図47、48)。これらドーパミン関連遺伝子の最小エンハンサーにはPtf1a 結合配列(E-box)とMeis 結合配列が存在していた。これらの結合配列を含む配列にレポーター

遺伝子をつなげたところ、ドーパミン神経細胞/コロネット細胞に特異的に発現した(図47、48)。THのエンハンサーにおいて、*Ptf1a*の結合配列であるE-boxおよび*Meis*結合配列に変異を導入したところ、ドーパミン神経細胞/コロネット細胞でのレポーター遺伝子の発現は消失した(図47-49)。これらの結果から、*Ptf1a*と*Meis*は、ドーパミン神経細胞で特異的に発現する遺伝子群の転写を直接活性化している可能性が示された。

単一細胞トランスクリプトームのデータをもとに、ホヤのドーパミン神経細胞/コロネット細胞に発現する遺伝子を解析したところ、*GnRH*、ガラニン、ニューロテンシン、オキシトシン、バソプレシンなど13種類のホルモン/神経ペプチド、およびその受容体が発現していることが明らかとなった(図38)。これらホルモン/神経ペプチド/受容体関連遺伝子のうち、ナトリウム利尿ペプチドの受容体である*GCYA*および*GCYB*のエンハンサー領域の解析を行った(図49)。その結果、*GCYA*および*GCYB*のドーパミン神経細胞/コロネット細胞特異的な最小エンハンサーは、*Ptf1a*結合配列であるE-box、*Meis*結合配列が近接して存在しており、ホルモン/神経ペプチド/受容体関連遺伝子の発現も*Ptf1a*と*Meis*により直接活性化されることが示唆された(図50)。以上の結果から、*Ptf1a*と*Meis*はドーパミン関連遺伝子、ホルモン/神経ペプチド/受容体遺伝子の発現を直接活性化することにより、ドーパミン神経細胞の最終分化を制御している可能性が示された。

考察

単一細胞トランスクリプトームは、遺伝子発現の細胞アトラス記載や細胞腫の分類の為にこれまで使われてきた(Karaiskos *et al.* 2017; Briggs *et al.* 2018; Farrell *et al.* 2018; Fincher *et al.* 2018; Plass *et al.* 2018; Wagner *et al.* 2018)。我々は、従来の実験的なマニピレーションと単一細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせることで、細胞を分化を制御する遺伝子ネットワーク同定の有力なツールになると考え、実験を行った。その結果、ホヤ幼生中枢神経系のドーパミン神経細胞/コロネット細胞の運命決定因子として*Ptf1a*を同定することに成功した。さらに、ドーパミン/コロネット細胞分化の際の*Ptf1a*の補因子として*Meis*を同定することに成功した。これらの結果は、単一細胞トランスクリプトームが細胞分化研究に非常に有効な手法であることを示している。

*Ptf1a*の機能阻害を行うとドーパミン神経細胞/コロネット細胞が消失し、異所的に発現させると大量のドーパミン神経細胞/コロネット細胞が出現した。光受容細胞と上衣細胞が最も運命転換しやすく、これらの細胞群の遺伝子発現を調べると*Meis*が強く発現していることがわかった。*β2tubulin*エンハンサーを用いて、*Ptf1a*と*Meis*を共発現させると中枢神経系の全ての細胞がドーパミン神経細胞/コロネット細胞に運命が転換した。*Meis*は中枢神経系、内胚葉、筋肉、表皮など幅広く発現しているが、中枢神経系では*Ptf1a*単独でドーパミン神経細胞/コロネット細胞に転換しやすい細胞群（光受容細胞や上衣細胞など）により発現していた。それでは、*Meis*を発現していない、もしくは発現量の低い細胞に対し、*Ptf1a*と*Meis*を共発現させた場合はどうなるのであろうか。例えば、筋肉、表皮などの組織の細胞に*Ptf1a*と*Meis*を共発現させた場合、ドーパミン神経細胞に分化するのだろうか？この実験で、ドーパミン神経細胞に分化できた細胞とできなかった細胞を比較することで、新たな知見が得られるかもしれない。

Meis MOを用いて、*Meis*の機能を阻害すると、ドーパミン神経細胞/コロネット細胞は消失する。さらに、眼点、付着突起も消失した。つまり、*Meis*はこれらの細胞の発生・分化に関わっている可能性が示唆された。脊椎動物の眼の発生において、*Meis*が*Pax6*と協調して働くことが報告されており、ホヤの

眼点形成においても、重要な働きをしているのかもしれない。*Meis* 機能阻害実験において、光受容細胞への影響は確認していないので、今後の課題としたい。

脊椎動物の脳内には中脳と視床下部の2つの領域にドーパミン神経細胞は分布している。中脳のドーパミン神経細胞は情動行動や運動制御に関連しており、その欠損はパーキンソン病の原因となることが知られている(Iversen and Iversen 2007; Flames and Hobert 2011; Kee *et al.* 2017; Kirkeby *et al.* 2017; Parmar 2018)。一方、視床下部のドーパミン神経細胞はホルモンや神経ペプチドの分泌を制御し、生殖活動やホメオスタシスの制御に関係している(Iversen and Iversen 2007)。では、ホヤのドーパミン神経細胞は中脳のドーパミン神経細胞と視床下部のドーパミン神経細胞のどちらに似ているのだろうか？単一細胞トランスクリプトームのデータから、ホヤのドーパミン神経細胞/コロネット細胞クラスターにおいて13種類のホルモン/神経ペプチドやその受容体の遺伝子が発現していることが明らかとなった。これはホヤに存在するホルモン/神経ペプチドの約50%がドーパミン神経/コロネット細胞で発現していることを示している。つまり、ホヤのコロネット細胞は脊椎動物の視床下部のドーパミン神経と、ペプチドホルモン分泌細胞の機能を併せ持つ可能性がある(図51)。おそらく、無脊椎動物のホヤの時点では、コロネット細胞はドーパミン神経細胞とペプチド神経細胞という複数の機能を有しており、脊椎動物に進化した際に、一つの機能を一つの細胞が担うようになった(Subfunctionalization)と考えられる(図51)。この詳細を明らかにするためには、半索動物や頭索動物などのドーパミン神経との比較解析が必要である。各動物の解析結果を比較することで、ドーパミン神経細胞の進化や分化に関する新たな知見を得られることが期待される。

最近、雌マウスの視床下部において、ドーパミン神経細胞の分化やKiss1ペプチド発現細胞の分化に*Ptf1a*が必須の役割をしていることが報告された(Fujiyama *et al.* 2018)。本研究により明らかとなった*Ptf1a*を介したドーパミン神経細胞の分化機構は、脊索動物間で保存された普遍的なドーパミン神経細胞の分化機構であることが示唆された。

総括

本研究「単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたカタユウレイボヤにおける感覚神経細胞の分化機構に関する発生生物学的研究」において、単一細胞トランスクリプトーム解析と従来の実験生物学的解析を組み合わせ、ホヤ幼生の感覚神経細胞の分化メカニズムの解析を行った。

第一部「単一細胞トランスクリプトーム解析を用いた神経板境界領域から派生する感覚神経細胞の分化メカニズムの解析」においては、頭部発生における重要な組織であるプラコードと神経堤細胞から生じる感覚神経細胞の分化メカニズムを解析した。まず、プラコードと神経堤細胞が生じる神経板境界領域における遺伝子発現解析を行った。神経板境界領域前方すなわち、プラコード領域全体では *Dmrt.a* が発現しており、領域内を *Foxc*、*Six1/2* が区画化していることを明らかにした。神経板境界領域後方、すなわち神経堤細胞領域内では *Msxb* が発現していた。この区画化のパターンは脊椎動物のものと類似していることを明らかにした。プラコード領域前方、*Foxc* が発現する領域からは PSC が、プラコード領域内後方、*Six1/2* が発現する領域からは aATEN が、神経板境界領域、*Msxb* が発現する領域からは BTN が発生し、これらの遺伝子発現ネットワークの区間区化により、異なる感覚神経細胞が生じることを明らかとした。PSC 形成を制御する転写因子 *Foxc* を神経堤細胞領域に強制発現させたところ、BTN が PSC に運命転換した。この現象を単一細胞トランスクリプトームにより解析したところ、PSC に完全に運命転換した細胞群と、PSC と BTN の両方の遺伝子発現を持つ細胞群が確認された。つまり、プラコードと神経堤細胞は運命転換が可能な良く似た性質を有していることが明らかとなった。以上の結果をもとに、プラコードと神経堤細胞は共通の進化的起源を有しているという新たなモデルを提唱した。

第二部「単一細胞トランスクリプトーム解析を用いたドーパミン神経細胞の分化を制御する転写因子カクテルの同定」では、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物ホヤにおいて、ドーパミン神経細胞の分化メカニズムについて、単一細胞トランスクリプトーム解析のデータもとに解析を行い、その結果、ホヤのドーパミン神経細胞の分化には *Ptf1a* と *Meis* という 2 つの転写因子が必須の役割をして

いることを明らかにした。また、ホヤのドーパミン神経細胞にはホルモン・神経ペプチドに関連遺伝子が多数存在しており、ホヤのドーパミン神経細胞は脊椎動物の視床下部のドーパミン神経細胞に対応する役割を持つ可能性があることを明らかにした。マウス視床下部のドーパミン神経細胞の分化にも *Ptf1a* が重要な役割をすることが報告され、視床下部における *Ptf1a* によるドーパミン神経細胞の分化の制御機構は進化的に保存された分子機構であると考えられる。

最近、様々な生物の単一細胞トランスクリプトーム解析により、各組織の詳細な細胞アトラスが作成されている。これらの遺伝子発現アトラスは細胞分化メカニズム解析のための有用なツールとなると考えられる。さらに、本研究のように、詳細な遺伝子発現アトラスをもとに、従来の実験的なマニピレーションと単一細胞トランスクリプトーム解析を繰り返すことで、より詳細な解析を進めることができると期待される。今後もこれらの手法を組み合わせた研究を展開し、ホヤ幼生に存在する177個全ての神経細胞の運命決定機構を1細胞レベルで明らかにしたい。

引用文献

- Abitua PB, Gainous TB, Kaczmarczyk AN, Winchell CJ, Hudson C, Kamata K, Nakagawa M, Tsuda M, Kusakabe TG, Levine M. 2015. The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature* **524**: 462–465
- Abitua PB, Wagner E, Navarrete IA, Levine M. 2012. Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature* **492**: 104–107.
- Agoston Z, Heine P, Brill MS, Grebbin BM, Hau AC, Kallenborn-Gerhardt W, Schramm J, Götz M, Schulte D. 2014. Meis2 is a Pax6 co-factor in neurogenesis and dopaminergic periglomerular fate specification in the adult olfactory bulb. *Development* **141**: 28–38.
- Aniello F, Locascio A, Villani MG, di Gregorio A, Fucci L, Branno M. 1999. Identification and developmental expression of Ci-msxb: A novel homologue of Drosophila msh gene in Ciona intestinalis. *Mechanisms of Development* **88**: 123-126.
- Baker CVH, Bronner-Fraser M. 1997. The origins of the neural crest. Part II: An evolutionary perspective.: 13–29.
- Briggs JA, Weinreb C, Wagner DE, Megason S, Peshkin L, Kirschner MW, Klein AM. 2018. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. *Science* **360**: eaar5780.
- Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. 2018. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature Biotechnology* **36**: 411–420.

- Candiani S, Pennati R, Oliveri D, Locascio A, Branno M, Castagnola P, Pestarino M, de Bernardi F. 2005. Ci-POU-IV expression identifies PNS neurons in embryos and larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development Genes and Evolution* **215**: 41–45.
- Chen JS, Pedro MS, Zeller RW. 2011. miR-124 function during *Ciona intestinalis* neuronal development includes extensive interaction with the Notch signaling pathway. *Development* **138**: 4943–4953.
- Coric T, Passamaneck YJ, Zhang P, di Gregorio A, Canessa CM. 2008. Simple chordates exhibit a proton-independent function of acid-sensing ion channels. *FASEB Journal* **22**: 1914–1923.
- Doitsidou M, Flames N, Topalidou I, Abe N, Felton T, Remesal L, Popovitchenko T, Mann R, Chalfie M, Hobert O. 2013. A combinatorial regulatory signature controls terminal differentiation of the dopaminergic nervous system in *C. elegans*. *Genes and Development* **27**: 1391–1405.
- Dullin JP, Locker M, Robach M, Henningfeld KA, Parain K, Afelik S, Pieler T, Perron M. 2007. Ptf1a triggers GABAergic neuronal cell fates in the retina. *BMC Developmental Biology* **7**: 1–14.
- Farrell JA, Wang Y, Riesenfeld SJ, Shekhar K, Regev A, Schier AF. 2018. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science* **360**: eaar3131.

- Feledy JA, Beanan MJ, Sandoval JJ, Goodrich JS, Lim JH, Matsuo-Takasaki M, Sato SM, Sargent TD. 1999. Inhibitory patterning of the anterior neural plate in *Xenopus* by homeodomain factors Dlx3 and Msx1. *Developmental Biology* **212**:455-464.
- Fincher CT, Wurtzel O, de Hoog T, Kravarik KM, Reddien PW. 2018. Cell type transcriptome atlas for the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Science* **360**: eaaq1736.
- Flames N, Hobert O. 2009. Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature* **458**: 885–889.
- Flames N, Hobert O. 2011. Transcriptional Control of the Terminal Fate of Monoaminergic Neurons. *Annual Review of Neuroscience* **34**: 153–184.
- Fujiyama T, Miyashita S, Tsuneoka Y, Kanemaru K, Kakizaki M, Kanno S, Ishikawa Y, Yamashita M, Owa T, Nagaoka M, *et al.* 2018. Forebrain Ptf1a Is Required for Sexual Differentiation of the Brain. *Cell Reports* **24**: 79–94.
- Gainous TB, Wagner E, Levine M. 2015. Diverse ETS transcription factors mediate FGF signaling in the *Ciona* anterior neural plate. *Developmental Biology* **399**:218-225.
- Gans C, Northcutt RG. 1983. Neural Crest and the Origin of Vertebrates: A New Head. *Science* **220**: 268–273.
- Grattan DR. 2015. The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology* **226**: T101–T122.

- Green SA, Simoes-Costa M, Bronner ME. 2015. Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature* **520**: 474–482.
- Horie T, Kusakabe T, Tsuda M. 2008a. Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *Journal of Comparative Neurology* **508**: 249–263.
- Horie T, Nakagawa M, Sasakura Y, Kusakabe TG. 2009. Cell type and function of neurons in the ascidian nervous system. *Development Growth and Differentiation* **51**: 207–220.
- Horie T, Nakagawa M, Sasakura Y, Kusakabe TG, Tsuda M. 2010. Simple Motor System of the Ascidian Larva: Neuronal Complex Comprising Putative Cholinergic and GABAergic/Glycinergic Neurons. *Zoological Science* **27**: 181–190.
- Horie T, Sakurai D, Ohtsuki H, Terakita A, Shichida Y, Usukura J, Kusakabe T, Tsuda M. 2008b. Pigmented and nonpigmented ocelli in the brain vesicle of the ascidian larva. *Journal of Comparative Neurology* **509**: 88–102.
- Horie T, Shinki R, Ogura Y, Kusakabe TG, Satoh N, Sasakura Y. 2011. Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. *Nature* **469**: 525–529.
- Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura Y v., Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, *et al.* 2005. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* **47**: 201–213.

- Hozumi A, Horie T, Sasakura Y. 2015. Neuronal map reveals the highly regionalized pattern of the juvenile central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Developmental Dynamics* **244**: 1375–1393.
- Imai JH, Meinertzhagen IA. 2007. Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: I. Central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* **501**: 316–334.
- Imai KS, Levine M, Satoh N, Satou Y. 2006. Regulatory blueprint for a chordate embryo. *Science* **312**: 1183–1187.
- Iversen SD, Iversen LL. 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences* **30**: 188–193.
- Joyce Tang W, Chen JS, Zeller RW. 2013. Transcriptional regulation of the peripheral nervous system in *Ciona intestinalis*. *Developmental Biology* **378**: 183–193.
- Karaiskos N, Wahle P, Alles J, Boltengagen A, Ayoub S, Kipar C, Kocks C, Rajewsky N, Zinzen RP. 2017. The *Drosophila* embryo at single-cell transcriptome resolution. *Science* **358**: 194–199.
- Kee N, Volakakis N, Kirkeby A, Dahl L, Storvall H, Nolbrant S, Lahti L, Björklund ÅK, Gillberg L, Joodmardi E, *et al.* 2017. Single-Cell Analysis Reveals a Close Relationship between Differentiating Dopamine and Subthalamic Nucleus Neuronal Lineages. *Cell Stem Cell* **20**:29-40.

- Kirkeby A, Nolbrant S, Tiklova K, Heuer A, Kee N, Cardoso T, Ottosson DR, Lelos MJ, Rifes P, Dunnett SB, *et al.* 2017. Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* **20**: 135–148.
- Kusakabe T. 2005. Decoding cis -Regulatory Systems in Ascidians. *Zoological Science* **22**: 129–146.
- Li Y, Zhao D, Horie T, Chen G, Bao H, Chen S, Liu W, Horie R, Liang T, Dong B, *et al.* 2017. Conserved gene regulatory module specifies lateral neural borders across bilaterians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: E6352–E6360.
- Manni L, Lane NJ, Joly JS, Gasparini F, Tiozzo S, Caicci F, Zaniolo G, Burighel P. 2004. Neurogenic and non-neurogenic placodes in ascidians. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **302**: 483–504.
- Martik ML, Gandhi S, Uy BR, Gillis JA, Green SA, Simoes-costa M, Bronner ME. 2019. Evolution of the new head by gradual acquisition of neural crest regulatory circuits. *Nature* **574**: 675–678.
- Moens CB, Selleri L. 2006. Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental Biology* **291**: 193–206.
- Moret F, Christiaen L, Deyts C, Blin M, Joly JS, Vernier P. 2005a. The dopamine-synthesizing cells in the swimming larva of the tunicate *Ciona intestinalis* are located only in the hypothalamus-related domain of the sensory vesicle. *European Journal of Neuroscience* **21**: 3043–3055.

- Moret F, Christiaen L, Deyts C, Blin M, Vernier P, Joly JS. 2005b. Regulatory gene expressions in the ascidian ventral sensory vesicle: Evolutionary relationships with the vertebrate hypothalamus. *Developmental Biology* **277**: 567–579.
- Nakane Y, Ikegami K, Iigo M, Ono H, Takeda K, Takahashi D, Uesaka M, Kimijima M, Hashimoto R, Arai N, Suga T, Kosuge K, Abe T, Maeda R, Senga T, Amiya N, Azuma T, Amano M, Abe H, Yamamoto N, Yoshimura T. 2013. The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length. *Nature Communications* **4**: 2108.
- Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F, Duncker GIW, Schmid RM. 2007. Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* **134**: 1151–1160.
- Northcutt GR. 2005. The new head hypothesis revisited. *Journal of Experimental Zoology* **304**: 274–297.
- Parmar M. 2018. Towards stem cell based therapies for Parkinson's disease. *Development* **145**: dev156117.
- Pasini A, Amiel A, Rothbacher U, Roure A, Lemaire P, Darras S. 2006. Formation of the ascidian epidermal sensory neurons: Insights into the origin of the chordate peripheral nervous system. *PLoS Biology* **4**: 1173–1186.

- Patthey C, Schlosser G, Shimeld SM. 2014. The evolutionary history of vertebrate cranial placodes - I: Cell type evolution. *Developmental Biology* **389**: 82–97.
- Plass M, Solana J, Alexander Wolf F, Ayoub S, Misios A, Glažar P, Obermayer B, Theis FJ, Kocks C, Rajewsky N. 2018. Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics. *Science* **360**: eaaq1723.
- Razy-Krajka F, Brown ER, Horie T, Callebert J, Sasakura Y, Joly JS, Kusakabe TG, Vernier P. 2012. Monoaminergic modulation of photoreception in ascidian: Evidence for a proto-hypothalamo-retinal territory. *BMC Biology* **10**: 45.
- Roure A, Lemaire P, Darras S. 2014. An Otx/Nodal Regulatory Signature for Posterior Neural Development in Ascidiarians. *PLoS Genetics* **10**: e1004548.
- Russo MT, Donizetti A, Locascio A, D’Aniello S, Amoroso A, Aniello F, Fucci L, Branno M. 2004. Regulatory elements controlling Ci-msxb tissue-specific expression during *Ciona intestinalis* embryonic development. *Developmental Biology* **267**: 517-528.
- Ryan K, Lu Z, Meinertzhagen IA. 2017. Circuit Homology between Decussating Pathways in the *Ciona* Larval CNS and the Vertebrate Startle-Response Pathway. *Current Biology* **27**: 721–728.
- Ryan K, Lu Z, Meinertzhagen IA. 2016. The CNS connectome of a tadpole larva of *Ciona intestinalis* (L.) highlights sidedness in the brain of a chordate sibling. *eLife* **5**: 1–34.

- Ryan K, Meinertzhagen IA. 2019. Neuronal identity: the neuron types of a simple chordate sibling, the tadpole larva of *Ciona intestinalis*. *Current Opinion in Neurobiology* **56**: 47–60.
- Sakurai D, Goda M, Kohmura Y, Horie T, Iwamoto H, Ohtsuki H, Tsuda M. 2004. The role of pigment cells in the brain of ascidian larva. *Journal of Comparative Neurology* **475**: 70–82.
- Sasakura Y, Mita K, Ogura Y, Horie T. 2012. Ascidiarians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Development Growth and Differentiation* **54**: 420–437.
- Sasakura Y, Oogai Y, Matsuoka T, Satoh N, Awazu S. 2007. Transposon mediated transgenesis in a marine invertebrate chordate: *Ciona intestinalis*. *Genome Biology* **8**: 1–11.
- Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. 2015. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology* **33**: 495–502.
- Satoh N. 2014. Developmental Genomics of Ascidiarians. *Wiley-Blackwell*
- Satou Y, Imai KS, Satoh N. 2001. Action of morpholinos in *Ciona* embryos. *Genesis* **30**: 103–106.
- Satou Y, Imai KS, Satoh N. 2004. The ascidian *Mesp* gene specifies heart precursor cells. *Development* **131**: 2533–2541.

- Schlosser G. 2008. Do vertebrate neural crest and cranial placodes have a common evolutionary origin? *BioEssays* **30**: 659–672.
- Schlosser G. 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Developmental Biology* **294**: 303-351.
- Schlosser G. 2015. Vertebrate cranial placodes as evolutionary innovations- The ancestor's tale. *Current Topics in Developmental Biology* **111**: 235-300.
- Schlosser G, Patthey C, Shimeld SM. 2014. The evolutionary history of vertebrate cranial placodes II: Evolution of ectodermal patterning. *Developmental Biology*.
- Schulte D. 2014. Meis: New friends of Pax. *Neurogenesis* **1**: e976014.
- Sharma S, Wang W, Stolfi A. 2019. Single-cell transcriptome profiling of the Ciona larval brain. *Developmental Biology* **448**: 226–236.
- Shimeld SM, Purkiss AG, Dirks RPH, Bateman OA, Slingsby C, Lubsen NH. 2005. Urochordate β -crystallin and the evolutionary origin of the vertebrate eye lens. *Current Biology* **15**: 1684-1689.
- Soldatov R, Kaucka M, Kastriti ME, Petersen J, Chontorotzea T, Englmaier L, Akkuratova N, Yang Y, Häring M, Dyachuk V, *et al.* 2019. Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science* **364**: eaas9536.

- Stolfi A, Levine M. 2011. Neuronal subtype specification in the spinal cord of a protovertebrate. *Development* **138**: 995–1004.
- Stolfi A, Ryan K, Meinertzhagen IA, Christiaen L. 2015. Migratory neuronal progenitors arise from the neural plate borders in tunicates. *Nature* **527**: 371–374.
- Takamura K. 1998. Nervous network in larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development Genes and Evolution* **208**: 1–8.
- Tanay A, Regev A. 2017. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism. *Nature* **541**: 331–338.
- Torrence SA, Cloney RA. 1983. Ascidian larval nervous system: Primary sensory neurons in adhesive papillae. *Zoomorphology* **102**: 111–123.
- Tsuda M, Sakurai D, Goda M. 2003. Direct evidence for the role of pigment cells in the brain of ascidian larvae by laser ablation. *Journal of Experimental Biology* **206**: 1409–1417.
- Wagner DE, Weinreb C, Collins ZM, Briggs JA, Megason SG, Klein AM. 2018. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science* **360**: 981–987.
- Wagner E, Levine M. 2012. FGF signaling establishes the anterior border of the *Ciona* neural tube. *Development* **139**: 2351–2359.
- Wagner E, Stolfi A, Choi YG, Levine M. 2014. Islet is a key determinant of ascidian palp morphogenesis. *Development* **141**: 3084–3092.

Zeng F, Wunderer J, Salvenmoser W, Hess MW, Ladurner P, Rothbacher U. 2019. Papillae revisited and the nature of the adhesive secreting colocytes. *Developmental Biology* **448**: 183–198.

Zheng GXY, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, Ziraldo SB, Wheeler TD, McDermott GP, Zhu J, *et al.* 2017. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nature Communications* **8**:14049.

謝辞

本研究を行うにあたり、様々な方に御協力、御助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

プリンストン大学・ルイスシグラー統合ゲノミクス研究所 Mike Levine 教授には 2015 年 9 月から 2019 年 3 月まで、Reserch Specialist II として雇用していただきました。本研究の大部分は Levine 教授の研究室で行いました。研究の進め方、論文の書き方など、研究者として Levine 教授からしか学べないことを教えていただきました。また、常に激励していただきました。深く感謝いたします。

筑波大学下田臨海実験センター 笹倉靖徳教授には、2007 年 12 月から 2011 年 5 月まで研究員・技術補佐員として雇用していただき、カタユウレイボヤの飼育、ホヤに関する基本的な実験、胚操作実験、顕微注入についてご指導いただきました。深く感謝いたします。

筑波大学・下田臨海実験センター 堀江健生助教には、2007 年から共同研究者として、また、指導者として多くのことをご指導いただきました。本研究の全ては、Levine 教授、笹倉教授の研究室において、堀江先生の指導のもとで行われました。共に多くの実験を行い、議論を行い、論文をまとめてきました。また、2019 年 5 月から現在まで、筑波大学下田臨海実験センター技術補佐員として雇用していただきました。深く感謝いたします。

兵庫県立大学 八田公平教授には、博士論文をまとめるにあたり、様々な助言をいただきました。違う生物を研究しておられる先生の御意見は、大変重要なものでした。お忙しい中、細かい御指導をいただきました。深く感謝いたします。

NBRP (ナショナルバイオリソースプロジェクト)「カタユウレイボヤ」には、野生型カタユウレイボヤおよびトランスジェニック系統の提供をしていただきました。深く感謝いたします。

研究生生活を支えてくれた家族に深く感謝いたします。娘の翔子の笑顔は研究生生活の支えでした。夫の堀江健生の協力が無ければ研究生生活を続けることはできませんでした。あらためて、お礼申し上げます。

图表

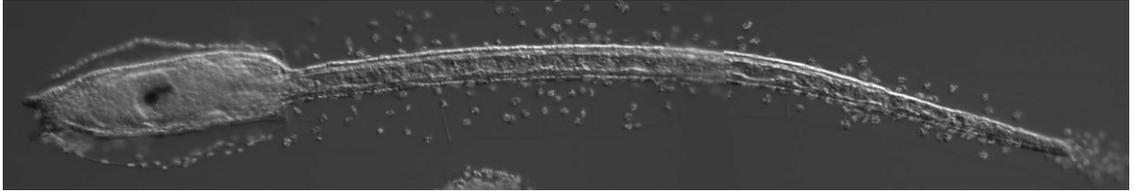
表 1. Gene ID (KH2012 model)

Gene Name	Gene ID
Ptf1a	KH2012:KH.L116.39
Meis	KH2012:KH.C10.174
TH	KH2012:KH.C2.252
AADC	KH2012:KH.L20.60
GCH	KH2012:KH.L10.1
SERT	KH2012:KH.C10.200
GnRHX	KH2012:KH.S1104.4
Neurotensin likeB	KH2012:KH.C2.201
Natriuretic peptide receptor A /GCYA2	KH2012:KH.C9.602
Natriuretic peptide receptor B /GCYB	KH2012:KH.C7.64
PDE9a	KH2012:KH.C3.666
PDEdelta	KH2012:KH.C12.604
Lectin	KH2012:KH.C2.572
SS23A3	KH2012:KH.C10.147
β 2tubulin	KH2012:KH.L116.85
Arrestin	KH2012:KH.C1.1125.
Ci-opsin1	KH2012:KH.L171.13
GAD	KH2012:KH.S761.6
VACHT/ChAT	KH2012:KH.C1.498

表 2. プライマー配列

Gene Name	Construct name	Primer	
Ptf1a	pSPCiPtf1a ΔMO target sequence C	Fw	gtggatccgatgctgggtgtatgaacg
		Rv	ggggatcctacttgcaatagagaagc
Natriuretic peptide receptorA/GCYA2	pSPCiGCYA2K	Fw	atgcggatccgtgcatggattacacattt
		Rv	gatcgcggccgcattgcggaatggattat
Natriuretic peptide receptorB/GCYB	pSPCiGCYBK	Fw	atgcggatccgtgctgtatgtccacaagttg
		Rv	gatcgcggccgccttacggaatctgtactt
GnRHx	pSPCiGnRHxK	Fw	atgcggatccctatcgtgccgtttcttgac
		Rv	gatcgcggccgccagggtaaaattaaattg
Neurotensin likeB	pSPCiNtlBK	Fw	atgcggatccatgcatacgcgcaggccgca
		Rv	gatcgcggccgcggtgaatgggtatttgcg
PDE9a	pSPCiPDE9aK	Fw	atgcggatccgaatgtatcgtgctttattc
		Rv	gatcgcggccgcgcgagttgcagcaacacg
PDEd	pSPPDEdK	Fw	atgcggatccttactcgcgggtgttttaca
		Rv	gatcgcggccgcaaaactcctgaaacacag
Lectin	pSPLectinK	Fw	atgcggatccccagcccgactgtgttttt
		Rv	gatcgcggccgcgactctgtacaagtaag
SS23A3	pSPSS23A3K	Fw	atgcggatccgtctagcccattttacacca
		Rv	gatcgcggccgcagagggttaaacgcta
Ptf1a	pSPCiPtf1acDNA	Fw	aagcggccgctatggaaagcataaataatg
		Rv	ctacaaaggattgggtacactg
Meis	pSMeiscDNA	Fw	atgcggatcccatgtcgcaacagcagtttg
		Rv	gcttgatatcctagcaagtatggccgagca

A



B



図1 (A) カタユウレイボヤ幼生 (B) カタユウレイボヤ成体

ホヤの幼生はオタマジャクシ型の形態をしており、遊泳運動を行う。

岩などに頭部先端の付着突起で付着し、変態し、運動能を持たない成体となる。

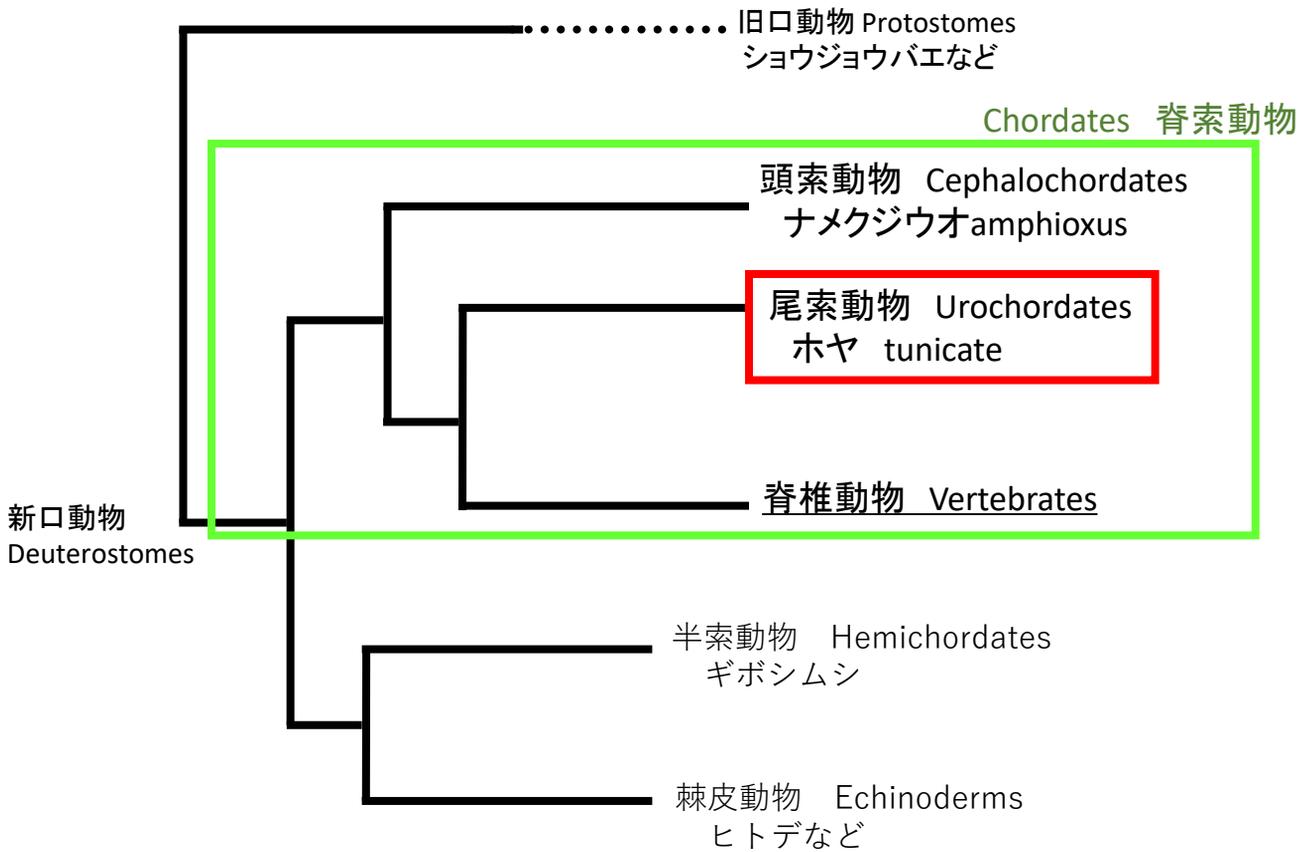


図2 系統樹におけるホヤの位置

ホヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に属する。

ホヤは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物である。



図3 ホヤの発生過程

約1時間に1回分裂を行う。

今回は、ほぼ全ての組織の分化が完了しているとされる中期尾芽胚を用いて実験を行った（図中の赤色）。

図は Hotta *et al.* 2007より改変。

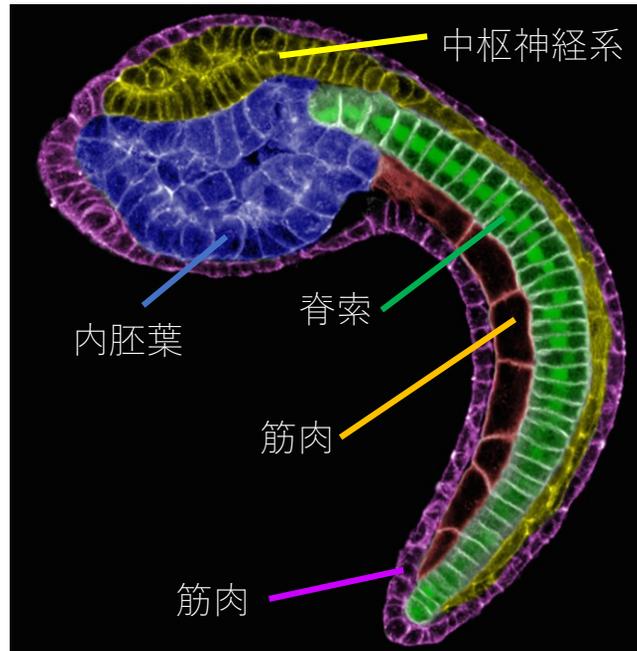


図4 ホヤ幼生は少数の細胞から構成されるが、脊椎動物の基本設計を有している。個体を構成する細胞数が非常に少数であるが、背側に中枢神経系を有するなど、脊椎動物の基本設計を備えている。図はVeeman and Reeves 2015より改変。

全細胞数: 2,600 個 (ヒト37兆個)

中枢神経系: 350個

脊索細胞: 40 個

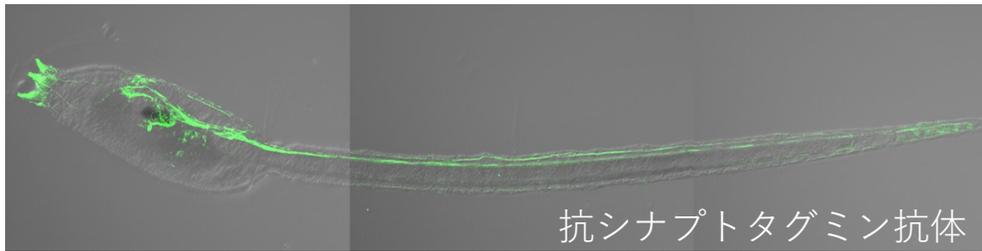
筋肉細胞: 38 個

表皮細胞: 800個

間充織細胞: 900個

内胚葉細胞: 550個

A



B

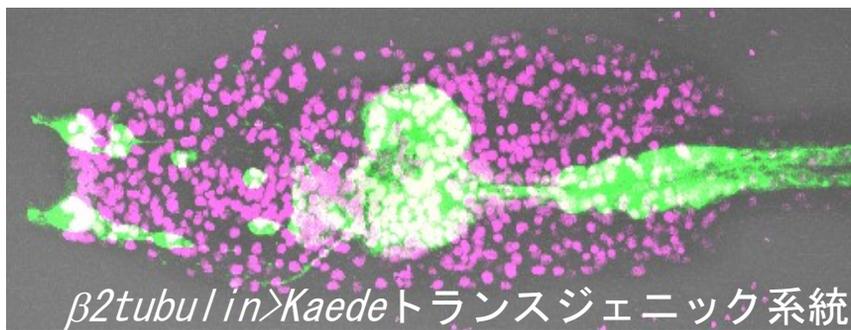


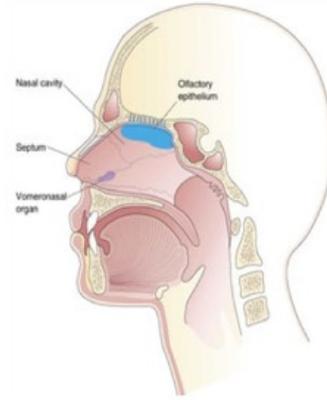
図5 ホヤの中枢神経系

(A) 抗シナプトタグミン抗体を用いて、ホヤの中枢神経系を染色したもの。

(B) 神経系の細胞を蛍光タンパク質で可視化したトランスジェニック系統 ($\beta 2tubulin > Kaede$ 系統)。マゼンダはDAPI染色で核を染色したもの。

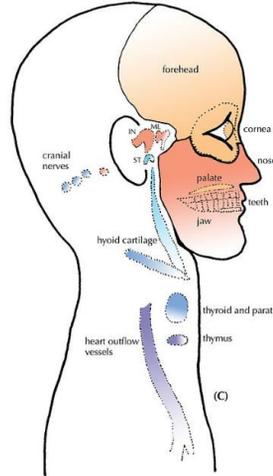
図はT. Horie *et.al.*, 2009およびT. Horie *et.al.*, 2011より改変。

プラコード



眼、鼻、耳の
感覚器など

神経堤細胞



顔面頭蓋の骨格筋・
骨・軟骨
末梢神経、
色素細胞
心臓の一部
ホルモン産生細胞な
ど

図6 プラコードと神経堤細胞から顔面の感覚神経が生じる。

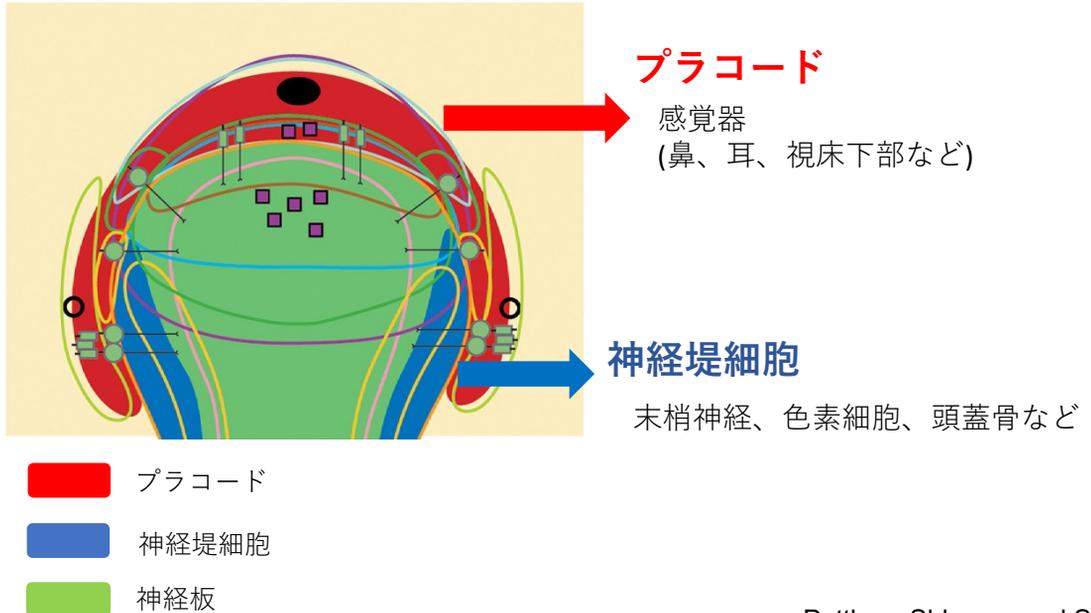
頭部とは頭部は頭蓋骨や中枢神経、感覚神経が集まることで形成される。

頭部の感覚神経はプラコードと神経堤細胞から生じる。

プラコードからは眼、鼻、耳などの感覚器が、神経堤細胞からは末梢神経系や頭蓋組織など様々な細胞が生じる。

これら、プラコードと神経堤細胞は脊椎動物に特異的な組織として考えられており、これらの組織が登場したことが、脊椎動物への進化の過程において重要なイベントであると考えられている。

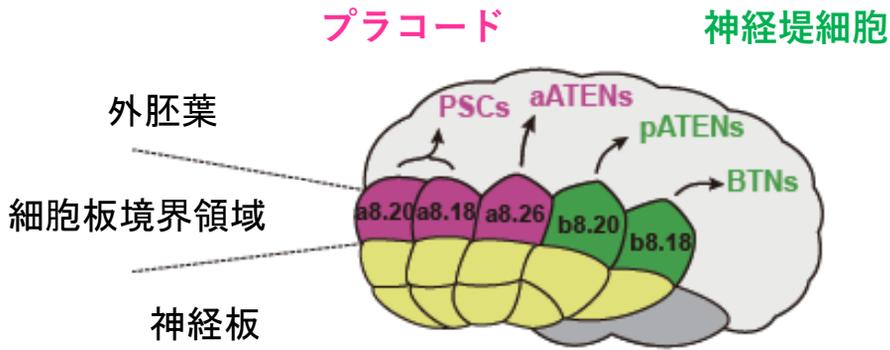
(Gans and Northcutt 1983 および Northcutt 2005より)



Patthey, Shlosser and Shimeld
Developmental Biology(2014)

図7 プラコードと神経堤細胞は神経板と表皮の境界領域から生じる。
この模式図はアフリカツメガエルの神経胚のもので、緑が神経板、赤がプラコード、青が神経堤細胞を示している。プラコードは神経板境界領域前方から、神経堤細胞は後方から生じる（図はPatthey *et. al.* 2014より改変）。

A 110細胞期



B 幼生

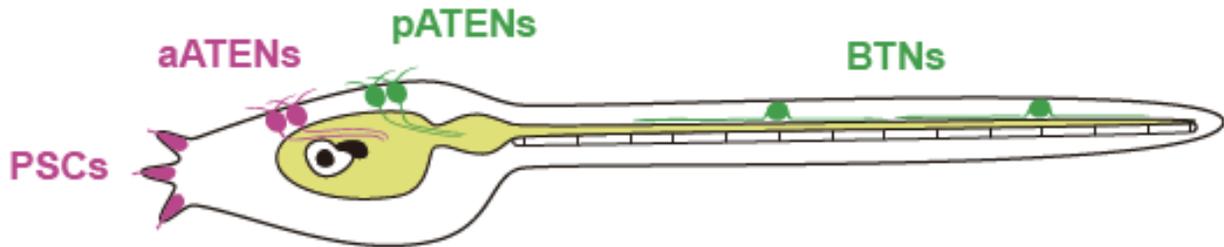


図8 ホヤ神経板境界領域と感覚神経の模式図

(A) ホヤの110細胞期における神経板境界領域の模式図

a8.20とa8.18細胞からPSCが、a8.26からaATENが生じる。b8.20からpATEN、b8.18からBTNが生じる。黄色は神経板。

(B) ホヤ幼生における各感覚神経の位置

マゼンダがプラコード由来の、緑が神経堤細胞由来の感覚神経を示す。

PSC: palp sensory cell

aATEN: anterior apical trunk epidermal neuron

pATEN: posterior apical trunk epidermal neuron

BTN: bipolar tail neuron

(Abitua *et. al.*,2012; Abitua *et. al.*,2015; Stolfi *et.al.* 2015より。)

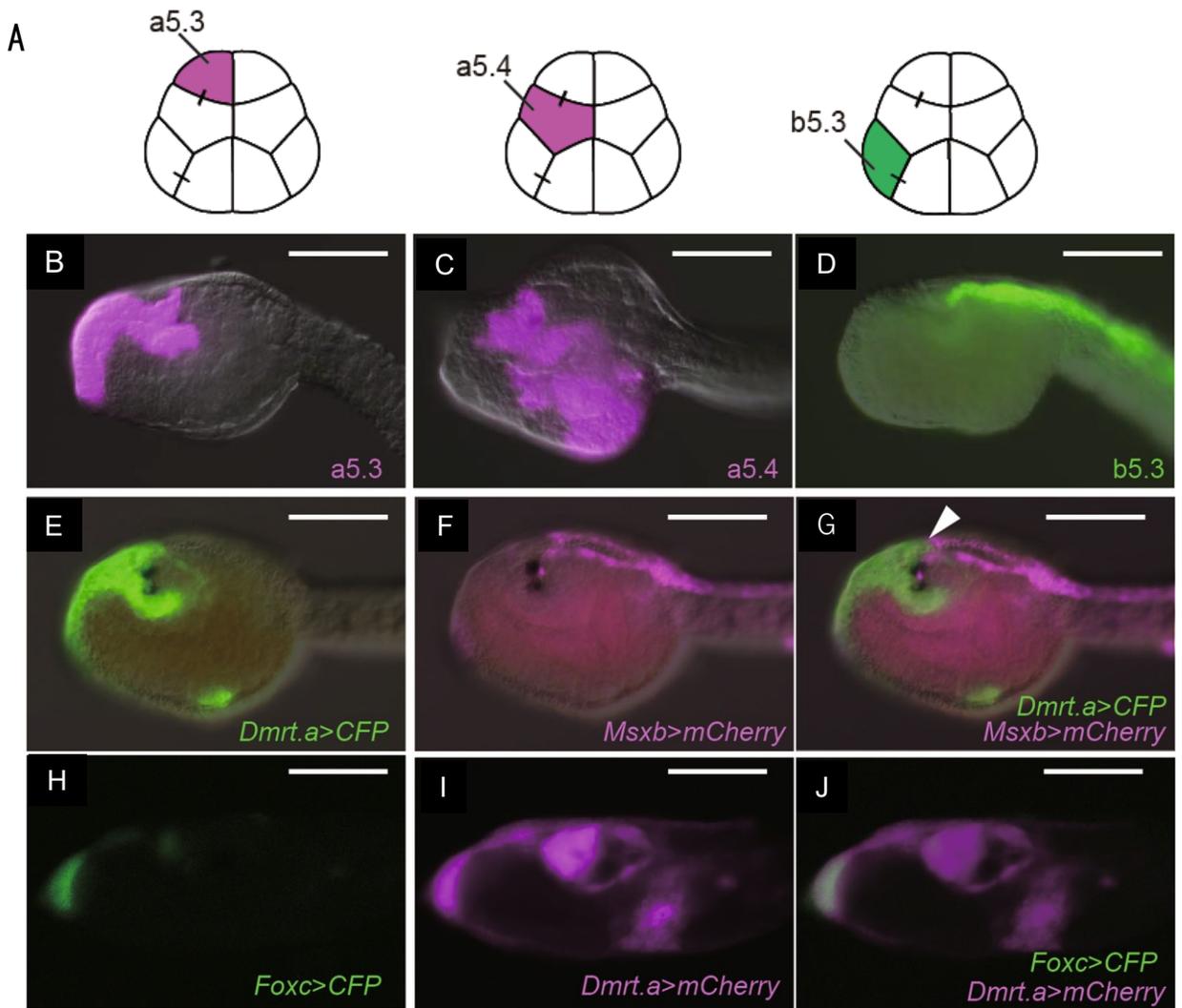


図9 DiIもしくはDiOを用いた細胞系譜の追跡

(A) 16細胞期において、DiI(マゼンダ)もしくはDiO(緑)で割球をラベルし、細胞系譜追跡実験を行った。

(B) a5.3、(C) a5.4、(D) b5.3細胞をそれぞれラベルした際の、尾芽胚期における位置。

(E-G)インジェクションした*Dmrt.a>CFP*もしくは*Msxb>mCherry*レポーター遺伝子の、尾芽胚期における発現

(E) *Dmrt.a>CFP*

(F) *Msxb>mCherry*

(G) *Dmrt.a>CFP*と*Msxb>mCherry*の重ね合わせ。*Dmrt.a*と*Msxb*の境界が見られる(白い矢じり)。

(H-J)インジェクションした*Foxc>CFP*もしくは*Dmrt.a>mCherry*レポーター遺伝子の、尾芽胚期における発現。

(H) *Foxc>CFP*

(I) *Dmrt.a>mCherry*

(J) *Foxc>CFP*と*Dmrt.a>mCherry*の重ね合わせ。

スケールバーは100 μ m。

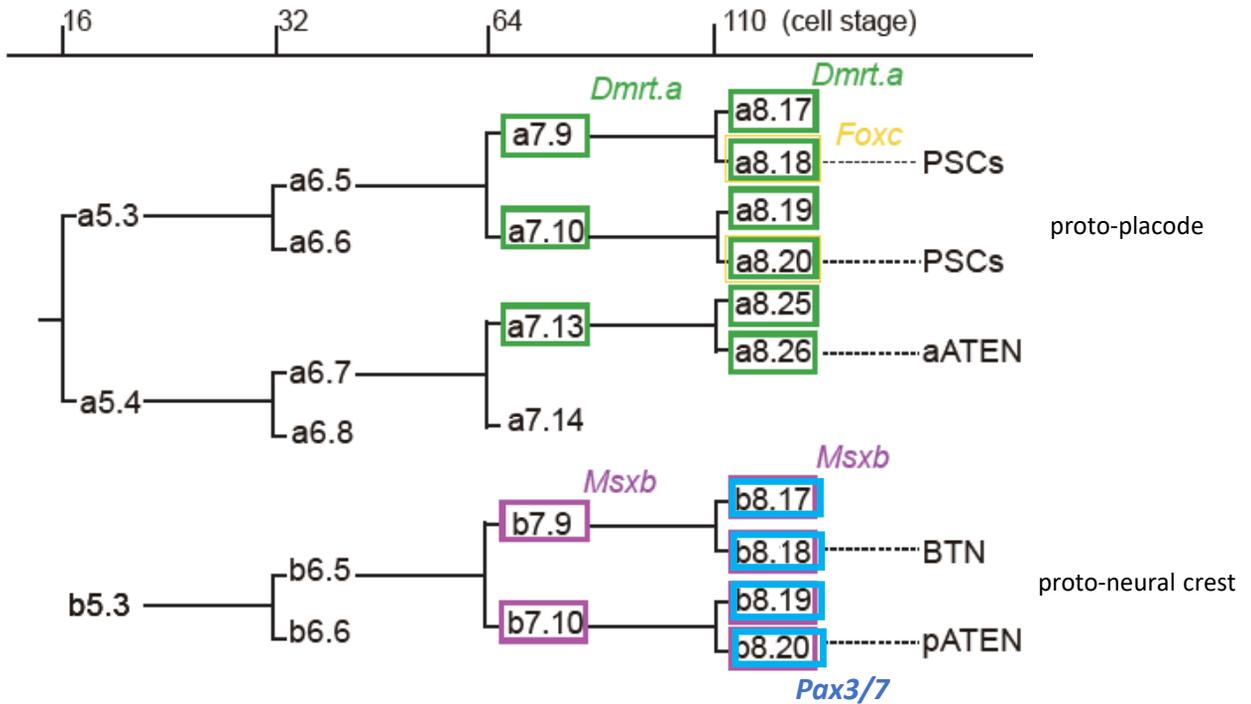


図10 カタユウレイボヤ感覚神経細胞の細胞系譜

16細胞期から110細胞期におけるa割球とb割球の細胞系譜。

*Dmrt.a*を発現する割球を緑色で、*Foxc*を発現する割球を黄色で、*Msxb*を発現する割球を紫色で、*Pax3/7*を発現する割球を水色で示した。

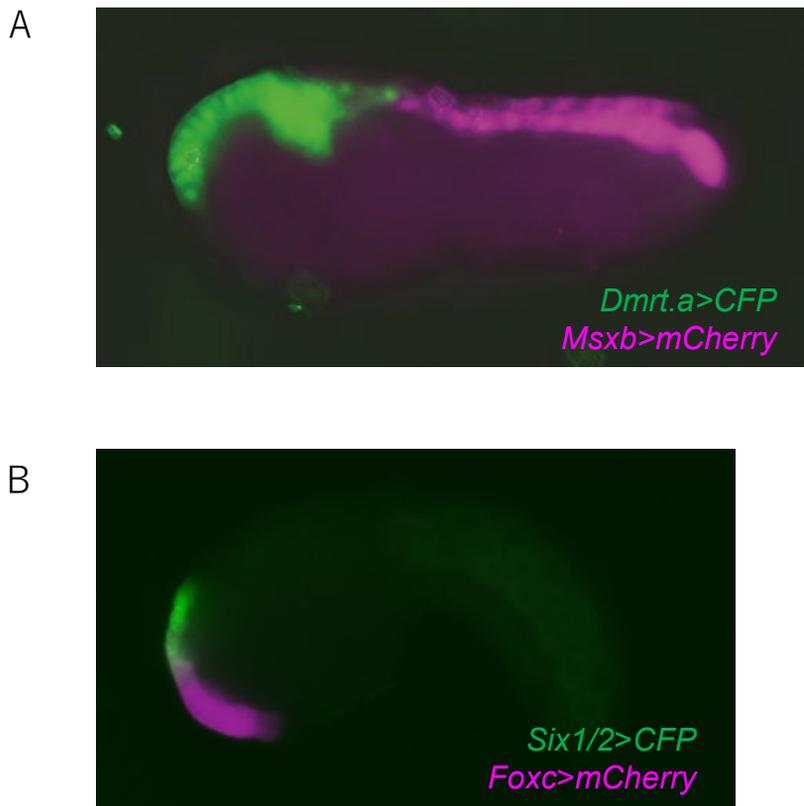
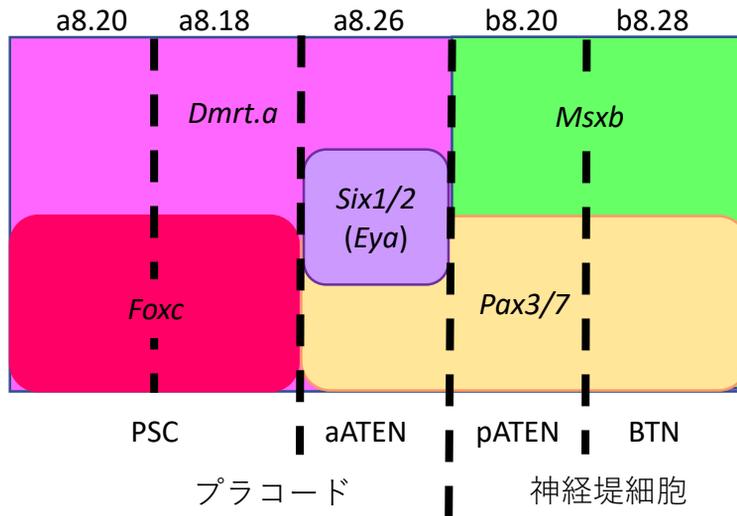


図11 初期尾芽胚期における転写因子の発現

- (A) *Dmrt.a>CFP*および*Msxb>mCherry*をインジェクションした胚
 プラコード領域では*Dmrt.a*の発現が、神経堤細胞領域では*Msxb*の発現が見られる。
- (B) *Six1/2>CFP*および*Foxc>mCherry*をインジェクションした胚
 プラコード領域内の前方のPSC領域では*Foxc*の、プラコードの後方aATEN領域では
*Six1/2*の発現が見られた。
- このように各感覚神経細胞が由来する領域はそれぞれ特異的な転写因子によってそれぞれ明確に区画化されていた。

A ホヤ



B 脊椎動物 (アフリカツメガエル)

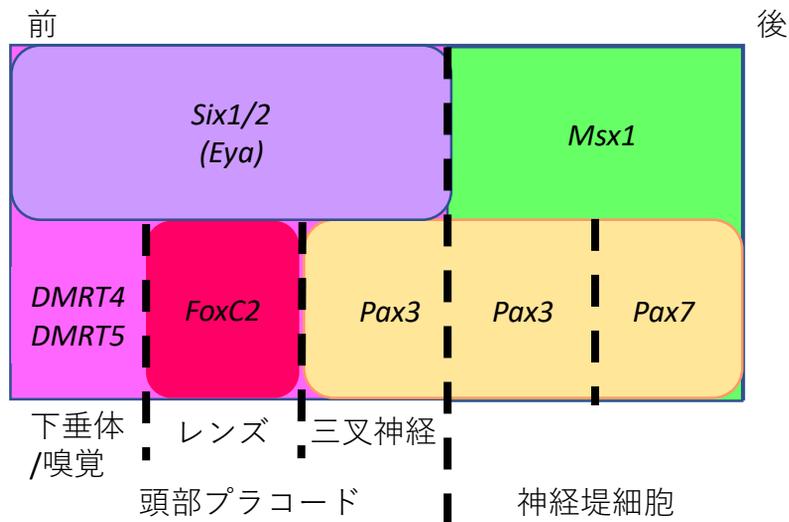


図12 転写因子による神経板境界領域の区画化のパターンの模式図

(A) ホヤ (B) 脊椎動物(アフリカツメガエル)

Dmrt、*Six1/2*、*Foxc*はプラコード領域で、*Msx*は神経堤細胞領域で発現するなどの類似性が見られた。

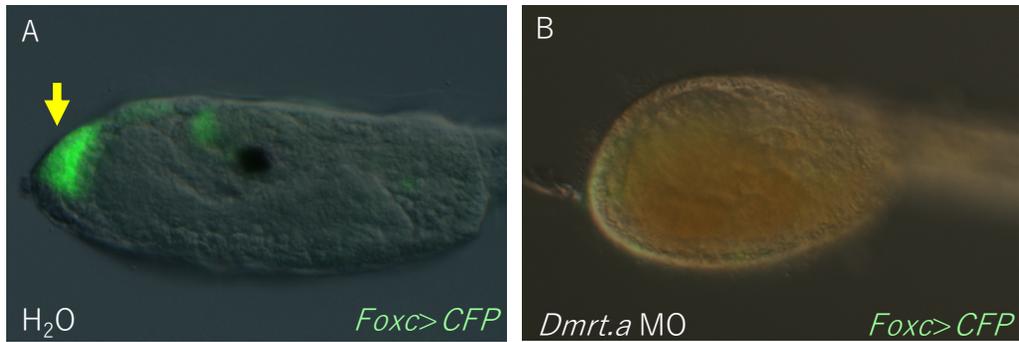


図13 *Dmrt.a*は*Foxc*の発現を制御している。

(A) コントロール ($H_2O + Foxc > CFP$ インジェクション胚)

(B) *Dmrt.a* MO + *Foxc > CFP* インジェクション胚

コントロールでは、PSCが形成される付着突起部分に*Foxc*の発現が見られる
(黄色の矢印)。

Dmrt.a MO胚では、*Foxc*の発現が完全に消失する。

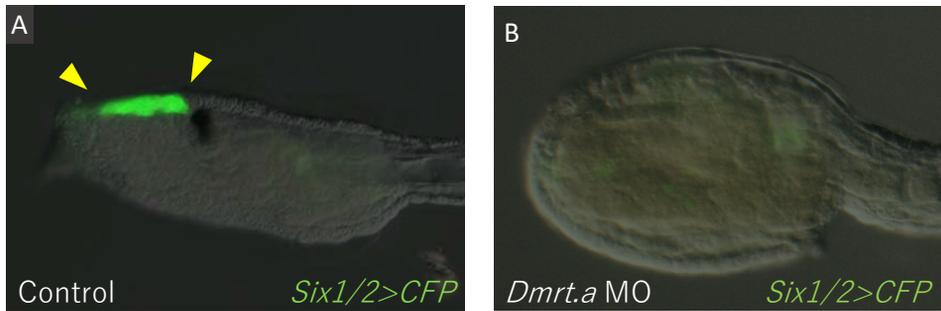


図14 *Dmrt.a*は*Six1/2*の発現を活性化している。

(A) コントロール

(B) *Dmrt MO* + *Six1/2>CFP*

コントロール胚では、頭部前方に*Six1/2*の発現が見られる。

*Dmrt MO*をインジェクションした胚では、*Six1/2*の発現が完全に消失した。

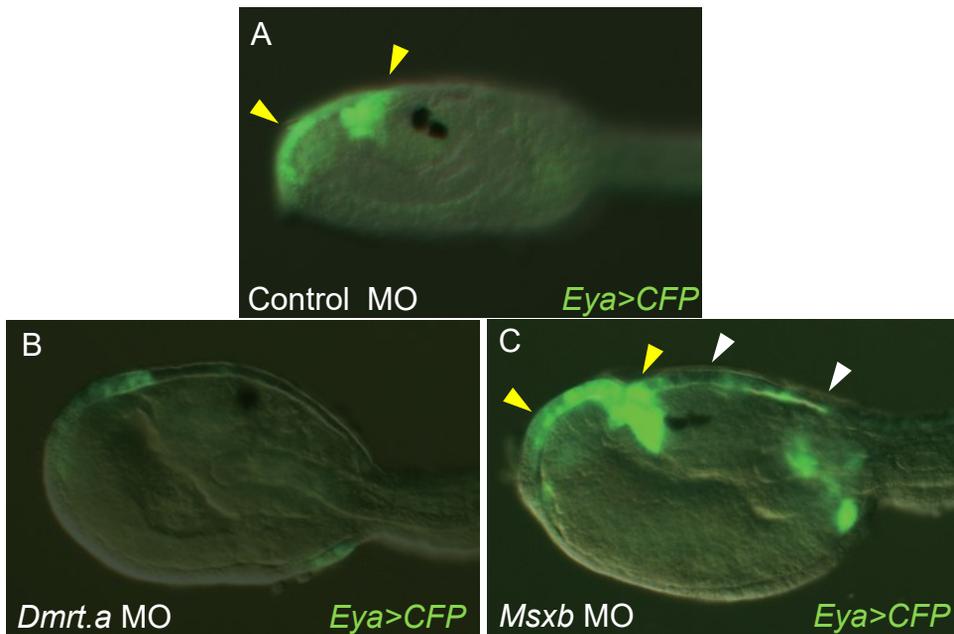


図15 *Dmrt.a* MO胚では、*Eya*の発現が抑制され、*Msxb* MO胚では、異所的に*Eya*の発現が広がった。

(A) Control MO + *Eya>CFP*インジェクション胚

黄色の矢じりで示したように、プラコード領域に*Eya>CFP*レポーター遺伝子の発現が見られる（36個体中36個体）。

(B) *Dmrt.a* MO + *Eya>CFP*インジェクション胚

Dmrt.a MO胚では*Eya>CFP*レポーター遺伝子の発現が消失した（88個体中88個体）。

(C) *Msxb* MO + *Eya>CFP*インジェクション胚

Msxb MO胚では、白い矢じりで示したように、*Eya>CFP*の発現が本来の発現場所の後方に広がった（48個体中39個体）。スケールバーは100 μm 。

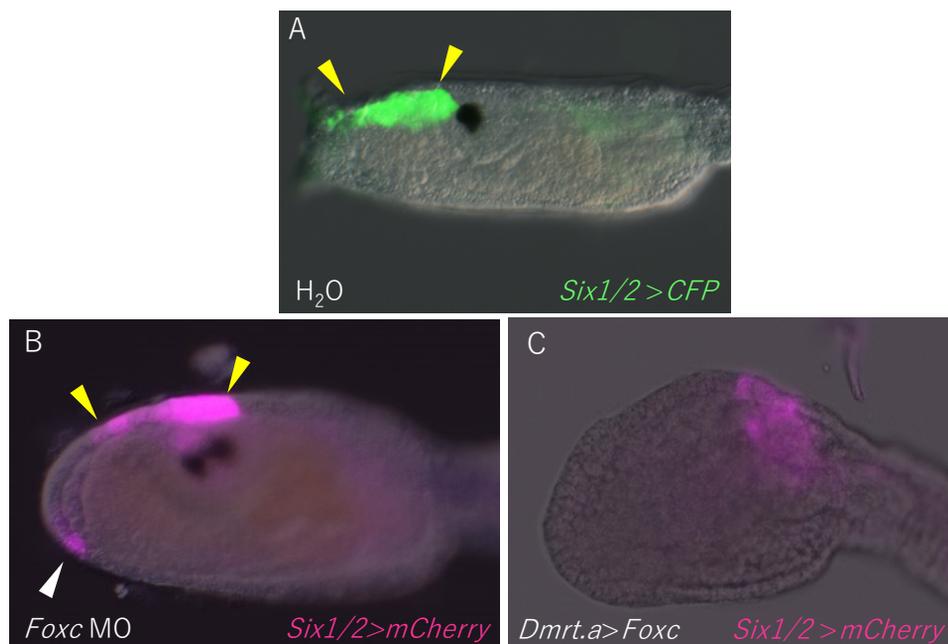


図16 *Foxc* はPSC予定領域における*Six1/2*の発現を抑制している。

(A) コントロール ($H_2O + Six1/2 > CFP$) 胚

コントロールでは、*Six1/2*は頭部の前方位置に発現する（黄色の矢印）。

(B) *Foxc* MO + *Six1/2 > mCherry* インジェクション胚

*Foxc*の機能を阻害すると、本来の発現に加え、*Six1/2*の発現がPSC領域に見られるようになった（白色の矢印）。

(C) *Dmrt.a > Foxc* + *Six1/2 > mCherry* インジェクション胚

*Six1/2*領域を含むプラコード領域全体で*Foxc*を発現させると、*Six1/2*の発現が消失した。

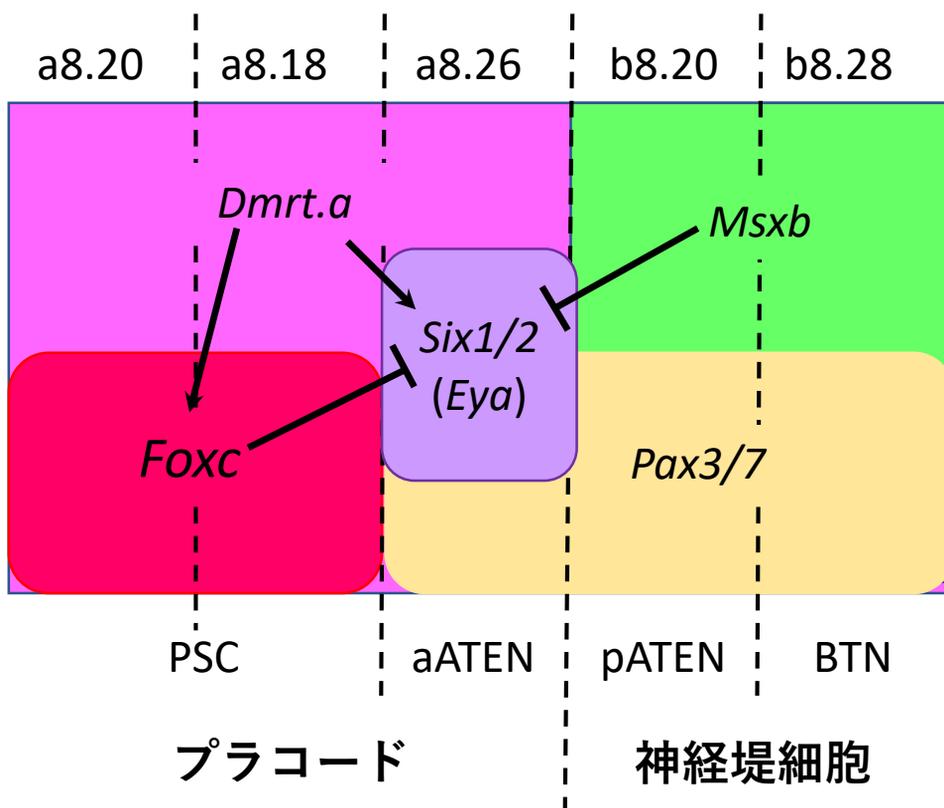


図17 ホヤ神経板境界領域における遺伝子ネットワーク

図12で示したように、プラコードが生じる前方領域では、*Dmrt.a*が、後方の神経堤細胞領域では*Msxb*が発現している。

プラコード領域において、*Dmrt.a*が、*Foxc*と*Six1/2*の発現を活性化している。神経堤細胞領域において、*Msxb*は、*Six1/2*の発現を抑制し、プラコードが神経堤細胞領域に形成されるのを阻害している。

さらに、プラコード領域内では、*Foxc*は、PSC領域での*Six1/2*の発現を抑制することで、プラコード内のPSCとaATENの区画化を制御している。

このように各転写因子が制御しあうことで、プラコード、神経堤細胞の区画化のパターンが形成されていた。

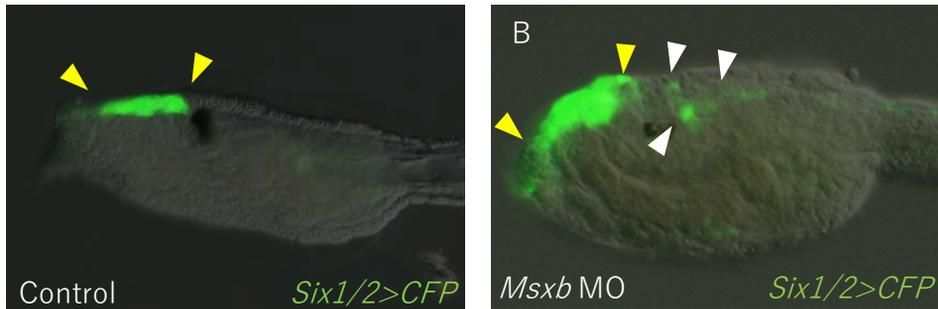


図18 *Msxb*は神経堤細胞領域の*Six1/2*の発現を抑制している。

(A) コントロール (control MO + *Six1/2*>*CFP*)

(B) *Msxb*機能阻害胚 (*Msxb* MO + *Six1/2*>*CFP*)

コントロールでは、*Six1/2*は頭部の前方位置に発現する（黄色の矢じり）。*Msxb* MO胚では、*Six1/2*の発現はプラコードより後方、神経堤細胞領域にまで広がった（白色矢じり）。スケールバーは100 μm 。

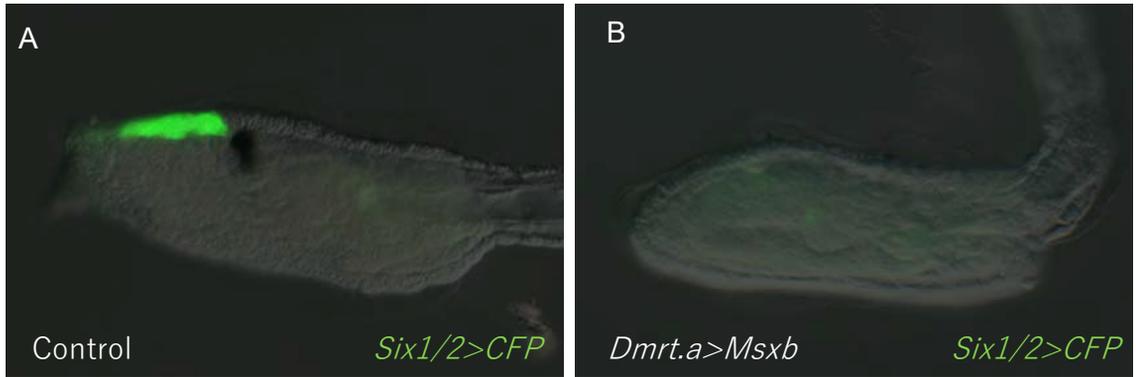
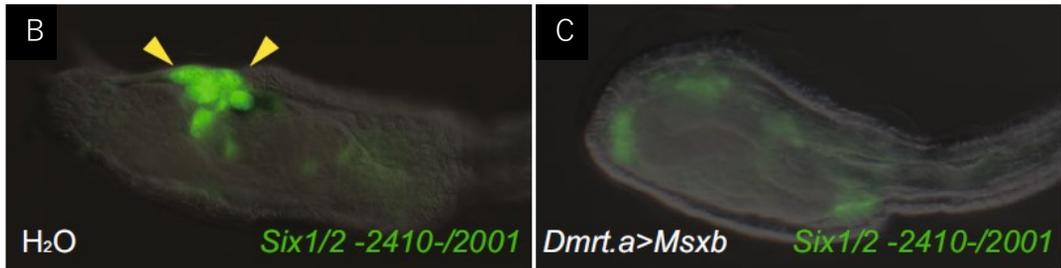
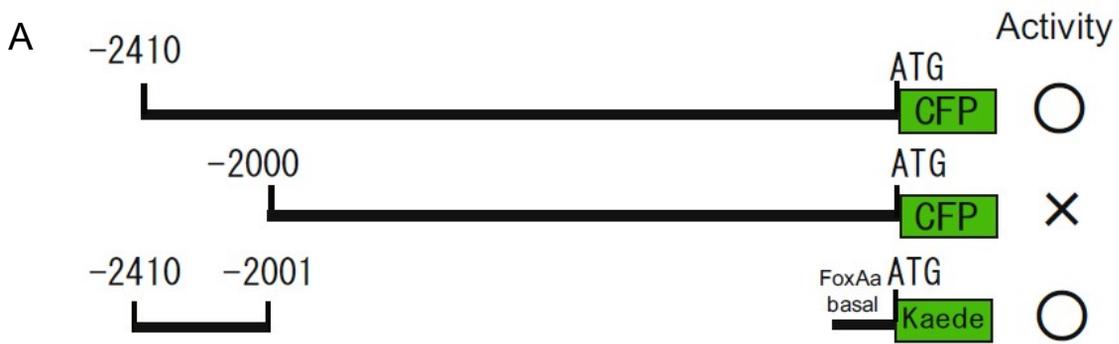


図19 プラコード領域に*Msxb*を発現させると、プラコード領域内における*Six1/2*の発現が抑制される。

- (A) コントロール (Control + *Six1/2*>*CFP* インジェクション胚) 、
(B) *Dmrt.a*エンハンサーを用いてプラコード領域に*Msxb*を発現させた個体
(*Dmrt.a*>*Msxb* + *Six1/2*>*CFP*インジェクション胚) では、*Six1/2*の発現が完全に消失した。



D

```

-2410 CGAAAACAATGGTTTATCCGAGGTAGTAGAGTAGATTTCTGAGCAACACA
      GAAAGTTTGTAAACAACAATGAAAGAATATTAACGCCTGAGATTATTGT
-2310 AATTGTAGTAATATAGCTTTCACATTTTCAAACGATCTGTCAACTGCTAA
      ACTGCCAATTAATATTAACGCATATTTGCATAGCAATTATTTACTAATTC
-2210 CGACACGCAAGGACCGATTTCCCAACTCTGTTTGATCAAAGGGAATCGCT
      TTGCTTGTTAATGCGATCATCAACGCTACAAATGTCAGCAATCGGATAT
-2110 TTTAAGCTCCGTATTAAGTCACGTGCTACGAGCGTGATGAAGTGGAACGA
      GTTGTTTACTTTTAAACTCACGTGGCGTTAATTGGTGGATTAAAGTGCG
-2010 CGTACATGTA
  
```

Msxb 結合サイト Otx 結合サイト

図20 *Msxb*は*Six1/2*の上流に直接結合して抑制する。

(A) *Six1/2* の5'上流発現調節領域の欠失実験。

-2410から-2001がプラコード領域における*Six1/2*の発現に重要である。

(B) $H_2O + Six1/2 -2410/-2001 > Kaede$ インジェクション胚。

*Six1/2*の発現が見られる (74/74個体)。

(C) $Dmrt.a > Msxb + Six1/2 -2410/-2001 > Kaede$

*Msxb*をプラコード領域に発現させると、*Six1/2*の発現が消失した。

(発現が消失した胚 37/37個体)

*Msxb*が*Six1/2*の5'上流-2410/-2001に結合し、*Six1/2*の発現を制御していることが示唆される。

(D) *Six1/2*の5'上流-2410から-2000の配列。

*Six1/2*の5'上流発現調節領域400bpの間には5個の*Msxb*結合領域が存在する。

マゼンダが予測*Msxb*結合サイト、緑が予測*Otx*結合サイト。

(Martha Bulyk's binding matrix 使用)

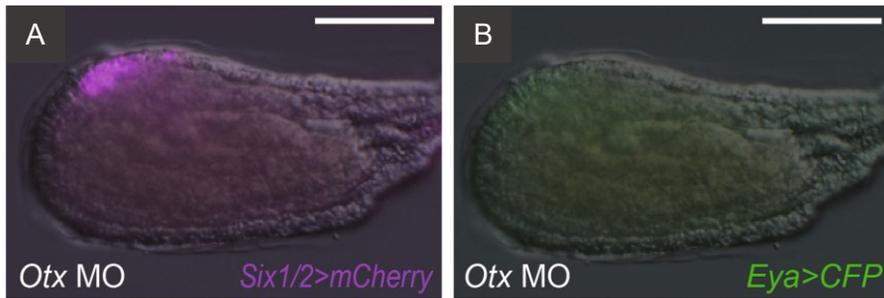


図21 Otxはプラコード関連遺伝子の発現を制御している。

(A) *Otx* MO + *Six1/2>mCherry*

*Six1/2>mCherry*の発現が減少もしくは見られなくなった
(32個体中32個体)。

(B) *Otx* MO + *Eya>CFP*

*Eya>CFP*の発現が完全に消失した (32個体中32個体)。
スケールバーは100 μm 。

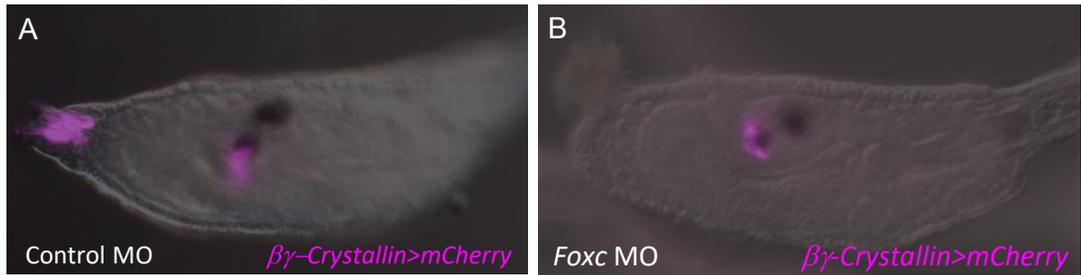


図22 *Foxc*は付着突起の形成に重要である。

(A) コントロール (Control MO + $\beta\gamma$ -Crystallin>mCherryインジェクション胚) 付着突起にPSCマーカーの $\beta\gamma$ -Crystallin>mCherryの発現が見られる。

(B) *Foxc* MO胚 (*Foxc* MO + $\beta\gamma$ -Crystallin>mCherryインジェクション胚) では、付着突起の形成が阻害され、 $\beta\gamma$ -Crystallin>mCherryの発現が消失した。

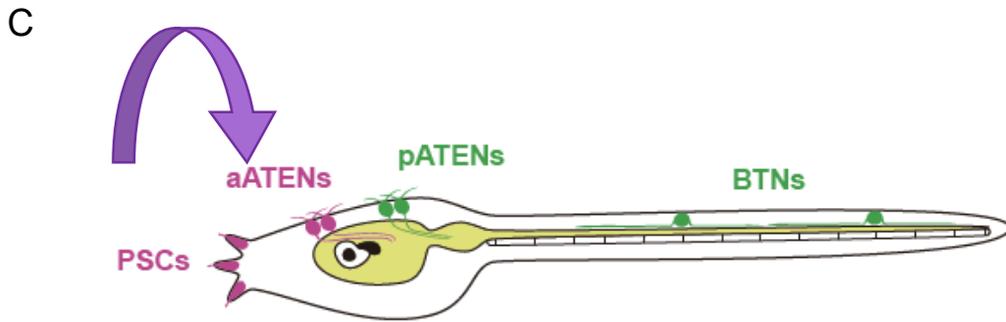
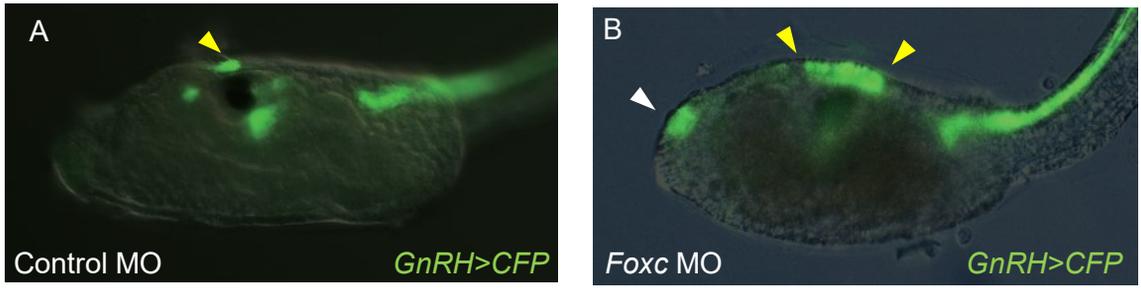


図23 *Foxc*はPSC形成に必要なだけでなく、予定PSC領域において、aATENの分化を抑制している。

(A) コントロールMO + *GnRH>CFP*

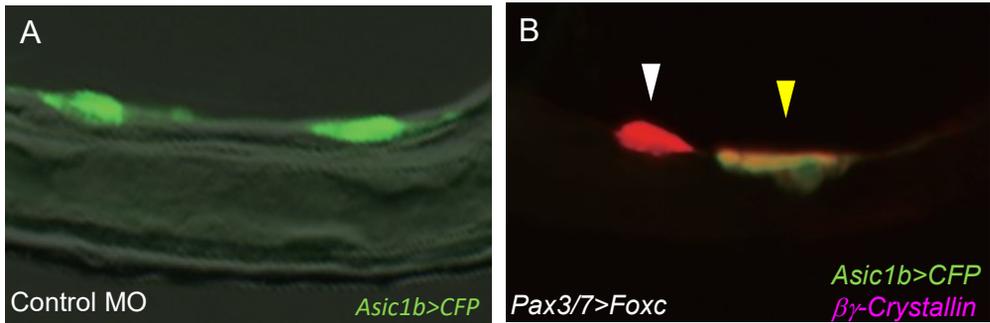
(B) *Foxc* MO + *GnRH>CFP*

コントロール胚では、*GnRH*を発現するaATENsが見られる（黄色の矢じり）。

Foxc MOをインジェクションした胚では、PSC領域で、*GnRH*の発現が見られるようになった（白い矢じり）。

つまり、PSCがaATENに運命転換したと考えられる。

(C) 模式図



C

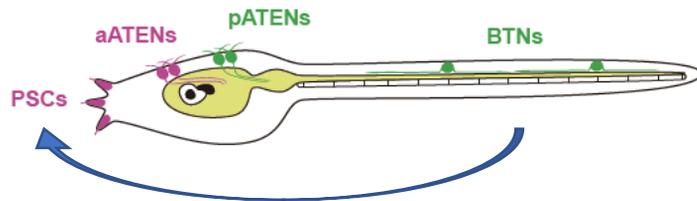


図24 神経堤細胞予定領域に*Foxc*遺伝子を発現させると、BTNがPSCに運命を転換した。

(A) コントロール MO+*Asic1b*>*CFP*

BTNのマーカである*Asic1b*の発現が見られる。

(B) *Pax3/7*>*Foxc* + *Asic1b*>*CFP* + $\beta\gamma$ -*Crystallin*>*mCherry*

*Pax3/7*エンハンサーを用いて、*Foxc*をBTNの前駆細胞で発現させたところ、

BTNにおいてPSCのマーカである $\beta\gamma$ -*Crystallin*の発現が見られた。

また、この際に、PSCマーカのみを発現するもの（白色の矢じり）、

PSCとBTN両方のマーカを発現するもの（黄色の矢じり）が観察された。

(C) 模式図

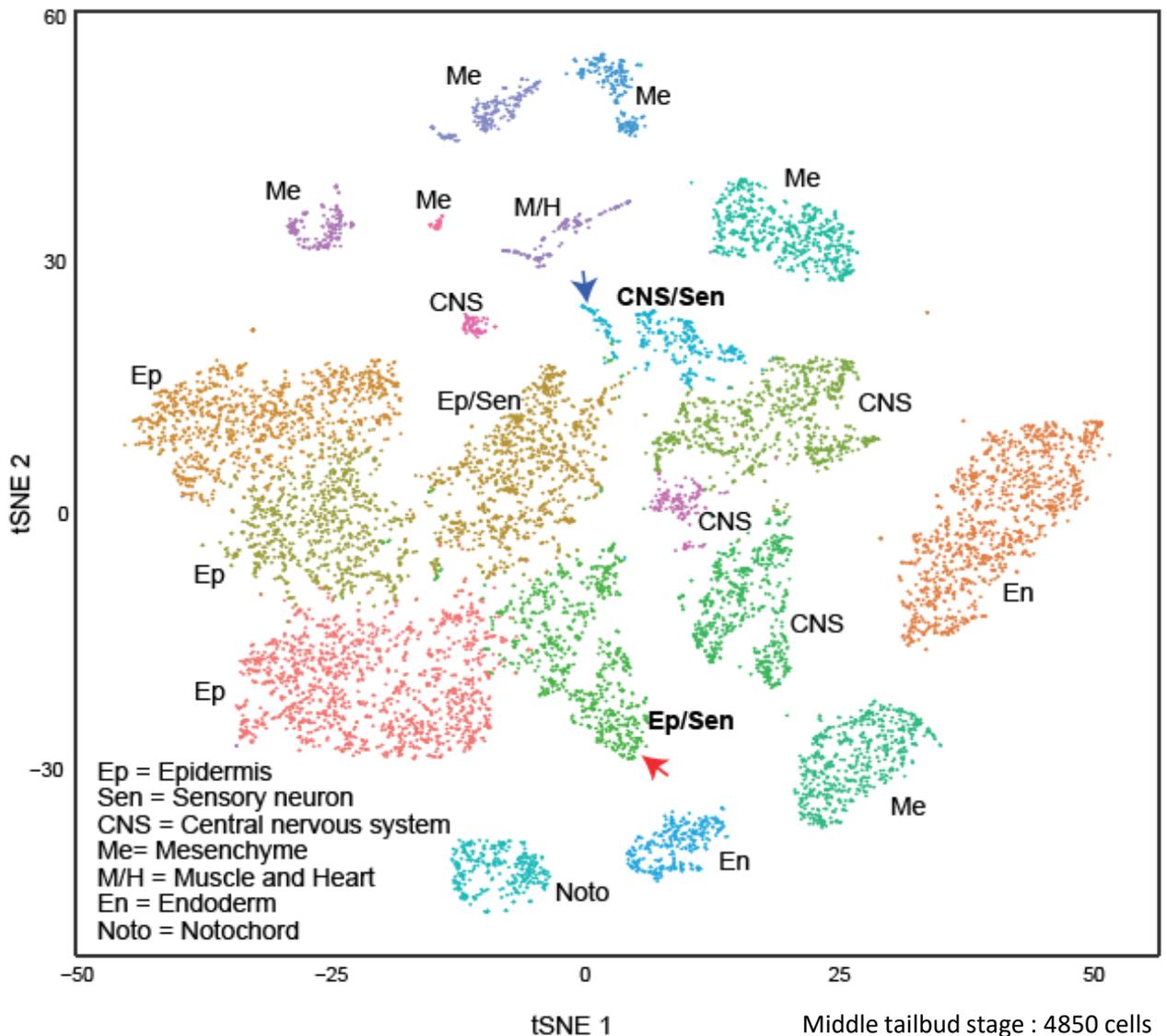


図25 ホヤ中期尾芽胚の単一細胞トランスクリプトームのtSNEプロット解析
 一つ一つの点が1細胞を示す。この解析データでは似た遺伝子発現を示すもの、
 つまり性質の似た細胞は同じクラスターに属する。
 例えば、M/Hと示されているクラスターは、筋肉アクチンを発現する筋肉細胞、
 Notoと示されているクラスターは、brachyuryを発現する脊索を示す。

EP: 表皮

Sen: 末梢感覚神経

CSN: 中枢神経系

Me: 間充織

M/H: 筋肉

En: 内胚葉

Noto: 脊索

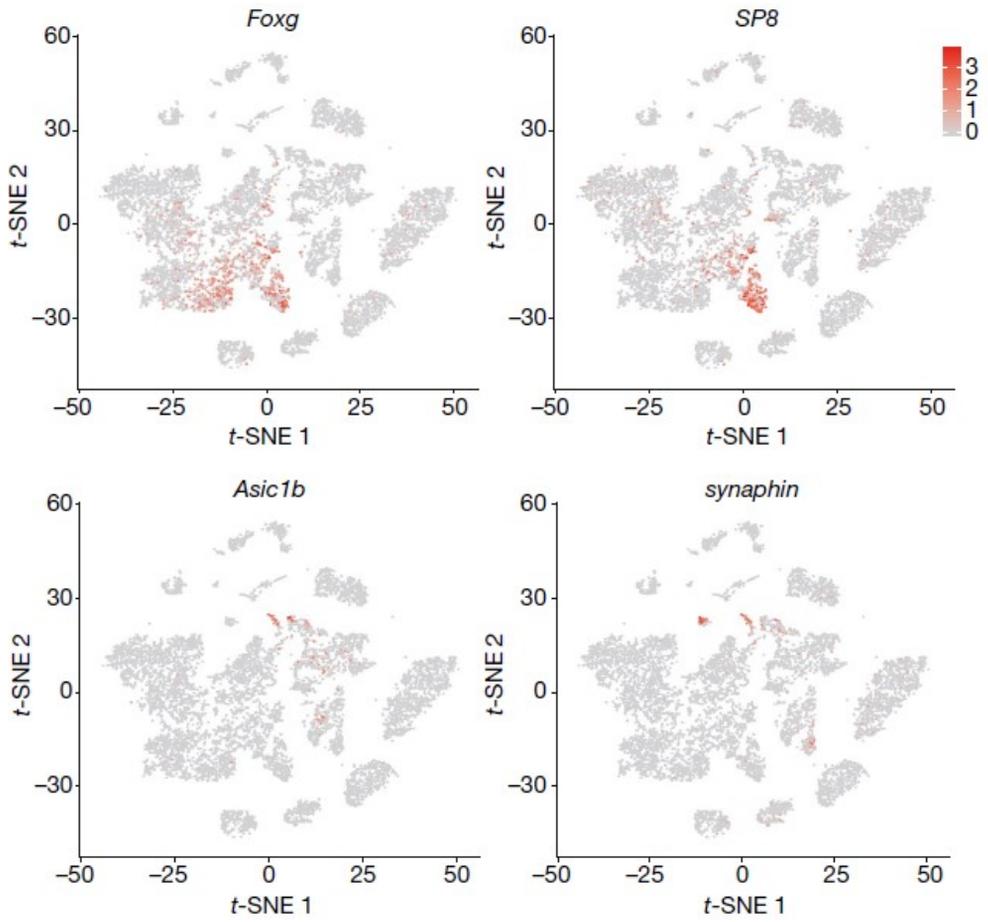


図26 PSCマーカー（上段。*Foxg* および *SP8*）の発現およびBTNマーカー（下段。*Asic1b* および *synaphin*）の発現

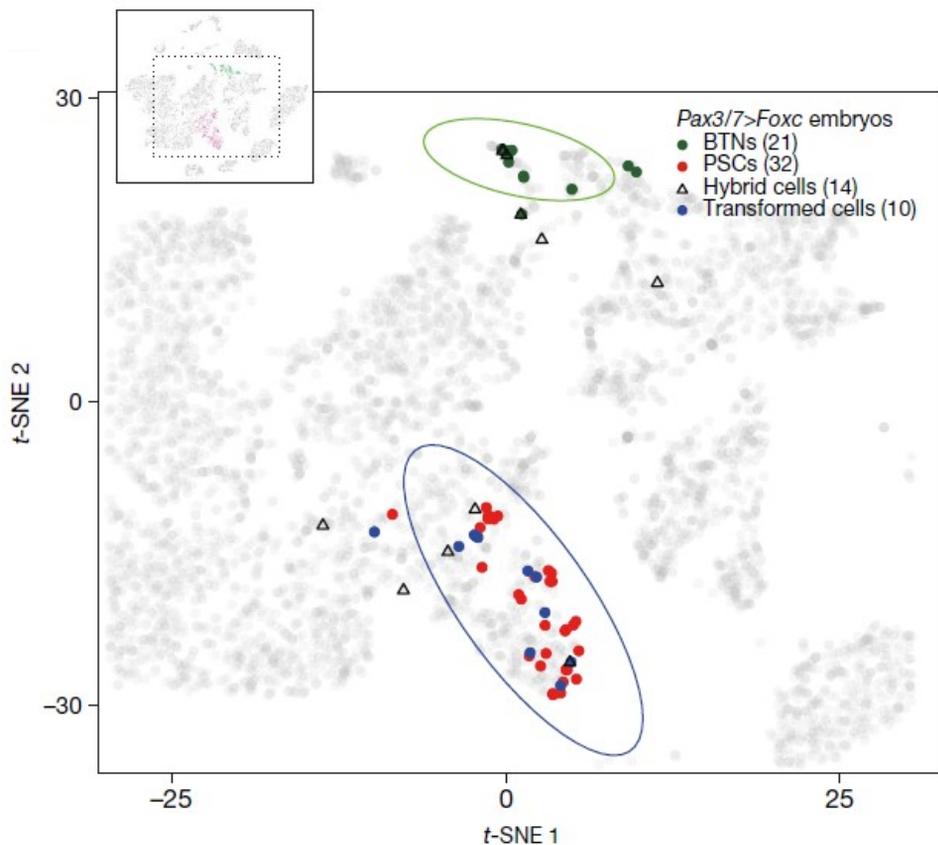


図27 *Pax3/7>Foxc*発現細胞の分布

BTNは21個（緑色の丸）、PSCは32個（赤色の丸）、PSCとBTNマーカー両方の発現を持つ細胞は14個（白色の三角）、BTNからPSCに完全に運命転換した細胞は10個（青色の丸）確認された。

なお、完全にPSCに運命転換したBTNは、*Pax3/7>Foxc* の発現、BTNマーカー (*Asic1b*, *synaphin*) の発現の消失、PSCマーカー (*islet*, *foxc*, *SP8*) の発現獲得、野生型PSCの95%信頼区間内にクラスタリングされたことにより定義した。一部運命転換したBTNは、*Pax3/7>Foxc* の発現、一部のPSCマーカーの獲得により定義した。

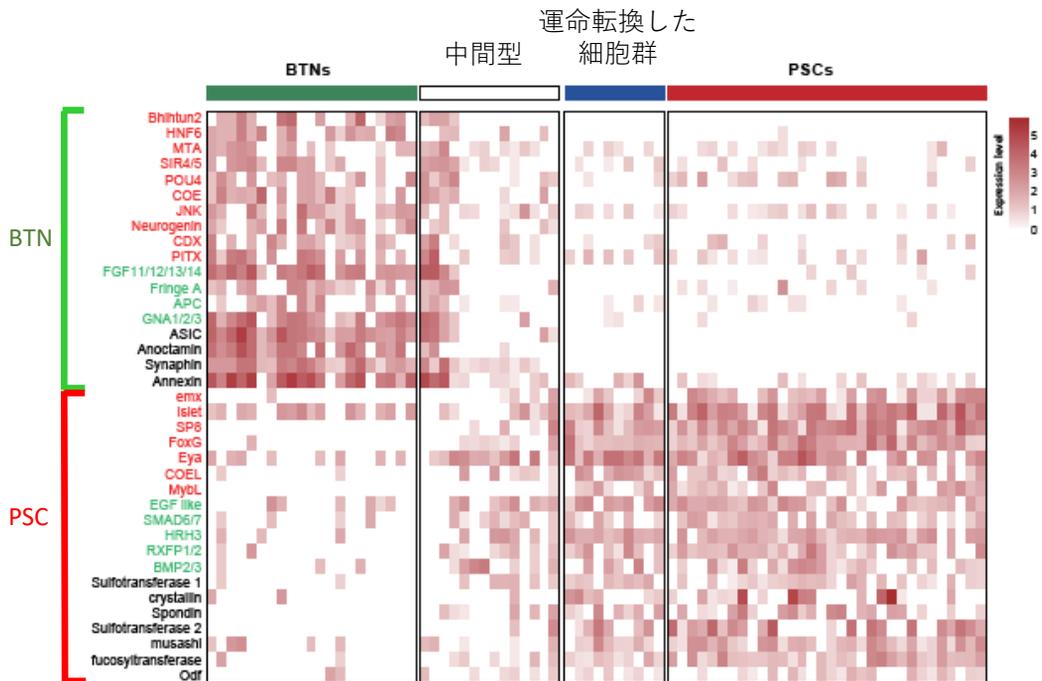


図28 *Pax3/7>Foxc*を発現させた細胞の遺伝子発現のヒートマップ

縦軸が一つ一つの細胞、横軸が各遺伝子を示している。

(赤:転写因子、緑:シグナル分子、黒:機能分子)

上段が、BTNで特異的に発現する遺伝子群、

下段が、PSCで特異的に発現する遺伝子群である。

なお、*Pax3/7>Foxc*を発現させた細胞はCFPでラベルしてあり、CFPを発現している細胞に対して、解析を行っている。

BTNからPSCへ完全に運命転換したクラスター（図中の青色）とBTNとPSCの両方の遺伝子発現を持つ中間型のクラスター（図中の白色）が確認された。

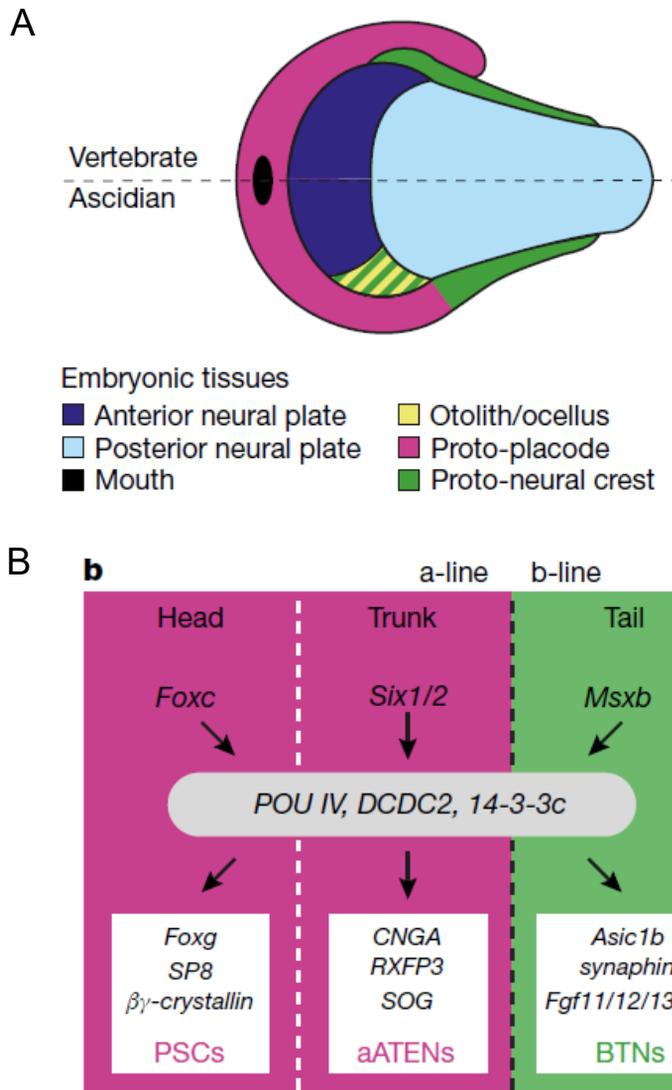


図29 ホヤの神経板境界領域の分画化

(A) 神経板と神経板境界領域の模式図

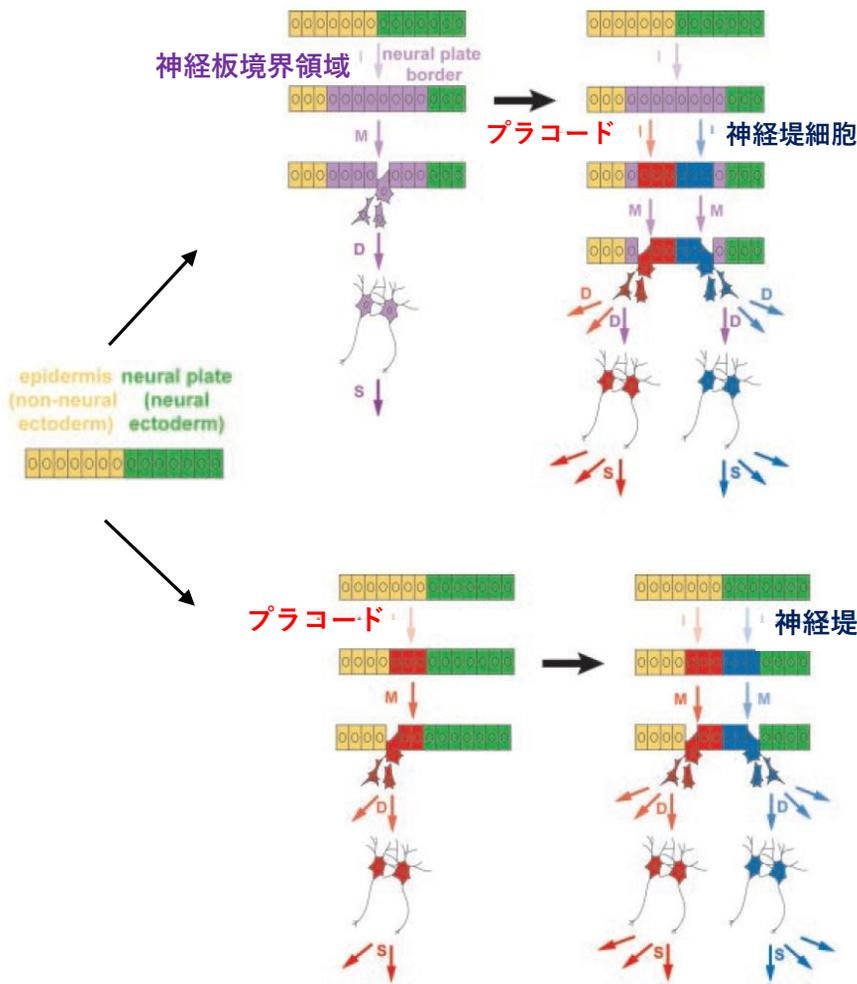
上半分が脊椎動物で、下半分がホヤ。ホヤと脊椎動物の共通祖先の神経板の境界領域は、原始的な頭部プラコードおよび原始的な神経堤細胞の共通の進化的な起源であるというモデルを提唱する。

(B) ホヤの神経板境界領域から感覚神経へ分化する際の遺伝子ネットワークの区画化の仮説

初期発生時に、プラコード領域（マゼンダ）において*Foxc*と*Six1/2*がhead-trunk境界を作る（白い破線）。

*Msxb*が神経堤細胞領域（緑色）を形成する。尾芽胚期に、各区画において、共通のプログラムが感覚神経の前駆細胞の分化を引き起こす。

CNGA, *RXFP3*, *SOG* はAbitua *et al.* 2015より。



仮説1

- 表皮と神経版の境界領域に特殊な細胞群が生じ、それらが感覚神経となる。
- 次の段階で、それぞれ特異的な遺伝子ネットワークを獲得し、プラコードと神経堤細胞が進化した。

仮説2

- 神経堤細胞とプラコードは別々に生じ、進化してきた。

Schlosser 2008 Bio Essay

図30 プラコードと神経堤細胞の進化における2つの仮説

プラコードと神経堤細胞の進化についてこれまでに2つの仮説が考えられてきた (図はSchlosser 2008 より)。

仮説1

表皮と神経版の境界に感覚ニューロンの生じる神経版の境界領域が最初に獲得され、感覚神経となる。

その次にそれぞれ特異的なinducerか遺伝子調節ネットワークを獲得し、プラコードと神経堤細胞が進化した。

仮説2

神経堤細胞とプラコードは別々に生じ、進化してきた。

ホヤと脊椎動物の共通起源

脊椎動物

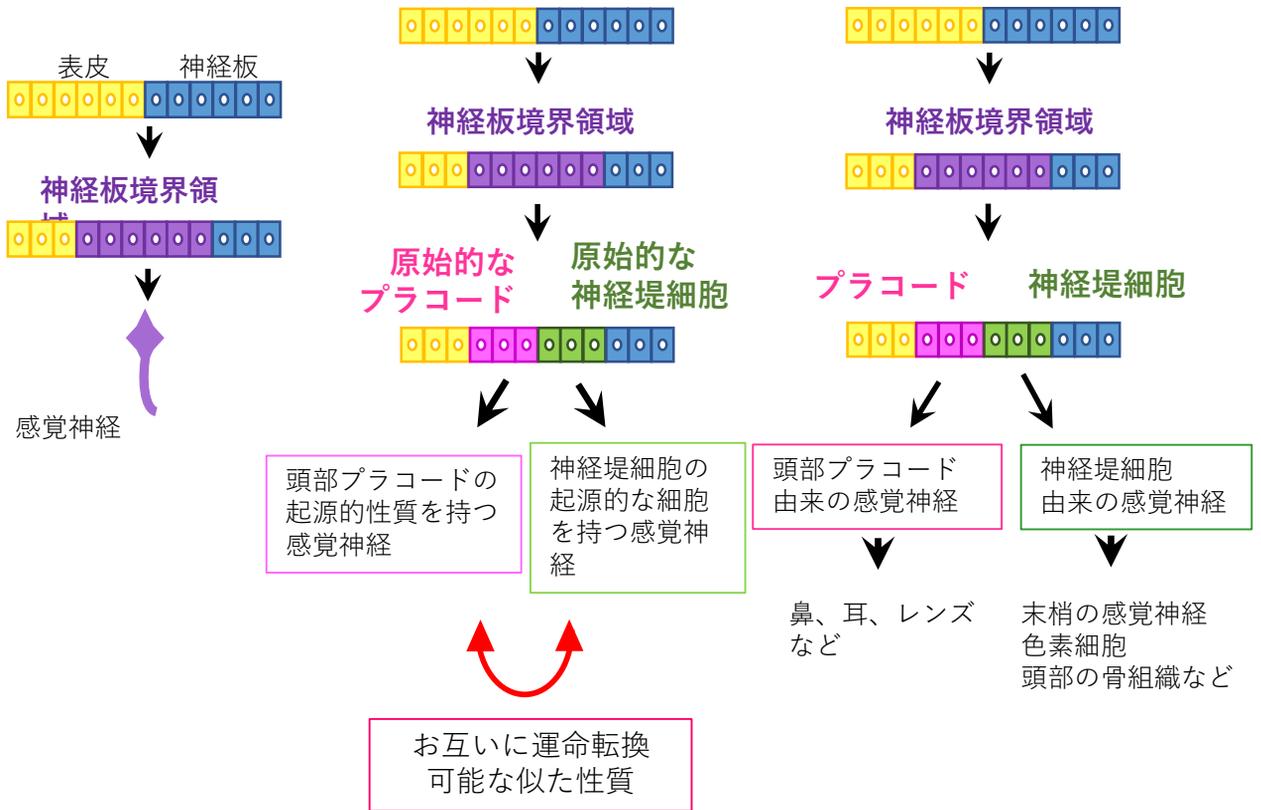


図31 プラコードと神経堤細胞は共通の進化的起源を有している。

本研究より、ホヤのプラコードと神経堤細胞は運命転換が可能な似た性質を有することが示された。この結果より、プラコードと神経堤細胞は、図30で示した仮説1のように、「まず、神経板境界領域が獲得され、そこから、プラコードと神経堤細胞が生じた。」と考えられる。

脊椎動物のプラコードと神経堤細胞は共通の進化的起源を有しているというモデルが考えられる。

A

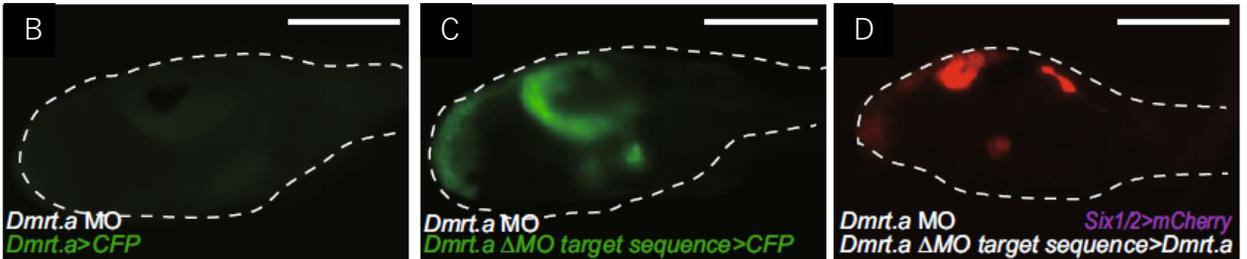
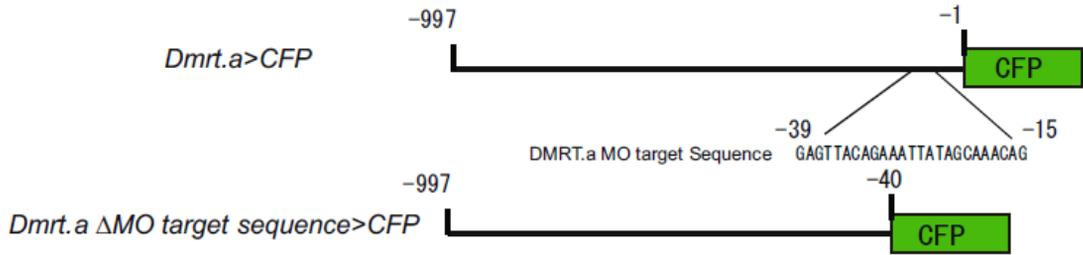


図32 *Dmrt.a* MOに対する特異性の確認

(A) 使用したコンストラクトと*Dmrt.a* MOの認識配列

上段は*Dmrt.a*>*CFP*の模式図。*Dmrt.a*の5'上流の-39から-15の位置 (*Dmrt.a* MO target Sequence) に対し、MOを作成した。

下段、MO認識配列を除いた*Dmrt.a*レポーター遺伝子 (*Dmrt.a* ΔMO target Sequence>*CFP*) の模式図。

(B) *Dmrt.a* MO + *Dmrt.a*>*CFP*インジェクション胚

Dmrt.a>*CFP*の発現は見られない (48/48)。

(C) *Dmrt.a* MO + *Dmrt.a* ΔMO target Sequence>*CFP*インジェクション胚。

MO認識配列を除いた*Dmrt.a*レポーター遺伝子では、*CFP*の発現が見られる (57/57)。

(D) *Dmrt.a* MOに対するレスキュー実験

Dmrt.a MOでは*Six1/2*の発現は消失するが (図14)、

Dmrt.a MOと共に*Dmrt.a* ΔMO target Sequence>*Dmrt.a*をインジェクションすると、*Six1/2*の発現がレスキューされる (107/108)。

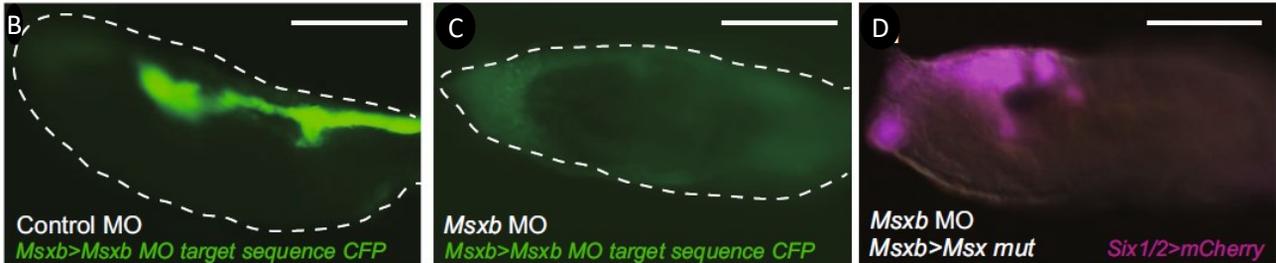
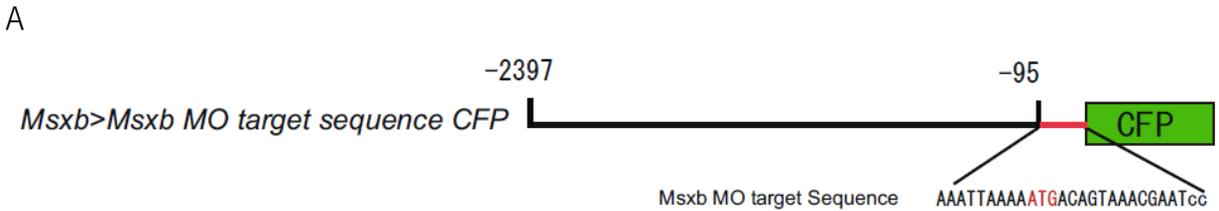


図33 *Msxb* MOに対する特異性の確認

(A) *Msxb*>*Msxb* MO target sequence CFPと*Msxb* MOの認識配列

MO認識配列中の赤で示したATGに対し、変異を導入し、*Msxb*>*Msxb* mut (MO-resistant *Msxb* cDNA)を作成した。

(B) Control MO + *Msxb*>*Msxb* MO target sequence CFP

CFPの発現が見られる (54個体中54個体)。

(C) *Msxb* MO + *Msxb*>*Msxb* MO target sequence CFP

全ての個体でCFPの発現は見られなかった (CFPの発現が見られなかった個体は44個体中44個体)

(D) *Msxb* MO + *Msxb*>*Msxb* mut+*Six1/2*>*mCherry*

Msxb MO + *Six1/2*>*mCherry*では、*Six1/2*>*mCherry*の発現が消失するが (図18)

Msxb>*Msxb* mutを共にインジェクションすると、*Six1/2*>*mCherry*の発現が回復した。

A

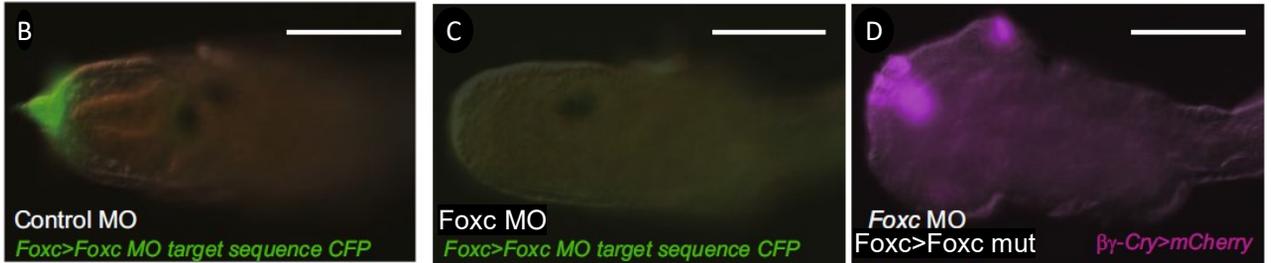


図34 *Foxc* MOに対する特異性の確認

(A) 使用した*Foxc*>*Foxc* MO target sequence CFPコンストラクトと*Foxc* MOの認識配列。MO認識配列中の赤で示したATGに対し、変異を導入し、*Foxc*>*Foxc* mut (MO-resistant *Foxc* cDNA)を作成した。

(B) Control MO + *Foxc*>*Foxc* MO target sequence CFP
CFPの発現が見られる (25個体中25個体)。

(C) *Foxc* MO + *Foxc*>*Foxc* MO target sequence CFP
全ての個体でCFPの発現は見られなかった (CFPの発現が見られなかった個体99個体中99個体)

(D) *Foxc* MO + *Foxc*>*Foxc* mut (MO-resistant *Foxc* cDNA) + β -Crystallin>mCherry
Foxc MO + β -Crystallin>mCherryでは、 β -Crystallin>mCherryの発現は消失するが (図22)、*Foxc*>*Foxc* mut を共にインジェクションすると β -Crystallin>mCherryの発現が回復する。

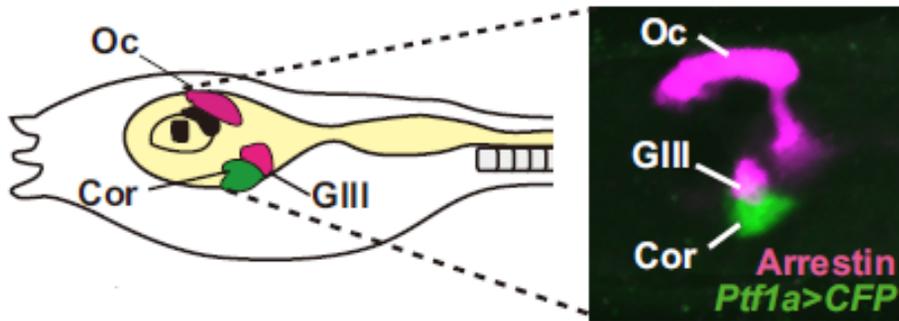


図35 ホヤのドーパミン神経細胞/コロネット細胞

ホヤ幼生の頭部におけるコロネット細胞の位置。

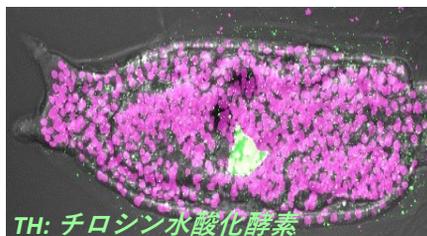
左が模式図、右は*Ptf1a>CFP*レポーター遺伝子でコロネット細胞を、抗アレスチン抗体を用いて光受容細胞を可視化している。

ホヤはドーパミンニューロンクラスターであるコロネット細胞を有しており、ドーパミン/コロネット細胞群は脳胞の腹側、第3光受容細胞群の近傍に存在している。

Oc: Ocellus 眼点 Ot:Otolith 平衡器 Cor:Coronet cells コロネット細胞

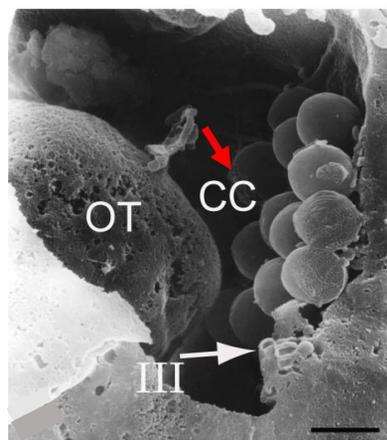
GIII:group III photoreceptor cells グループIII視細胞群

A



T.Horie et al. 2011

B



T.Horie et al. 2008

図36 ホヤのドーパミン神経細胞/コロネット細胞2

(A) *TH>Kaede* トランスジェニック系統

コロネット細胞にはTH（チロシン水酸化酵素）をはじめとするドーパミンの生合成・分泌に関わる遺伝子が特異的に発現しており、ドーパミン神経であることが報告されている（T. Horie *et al.* 2011）

(B) ホヤ幼生脳胞内部の走査型電顕写真

OT: Otolith 平衡器、 III: the group III photoreceptor 第III光受容細胞、 CC: コロネット細胞。スケールバーは2 μm 。

ドーパミン/コロネット細胞群（赤色の矢印）は脳胞の腹側、グループIII光受容細胞群（白色の矢印）の近傍に存在している(Horie *et al.* 2008)。

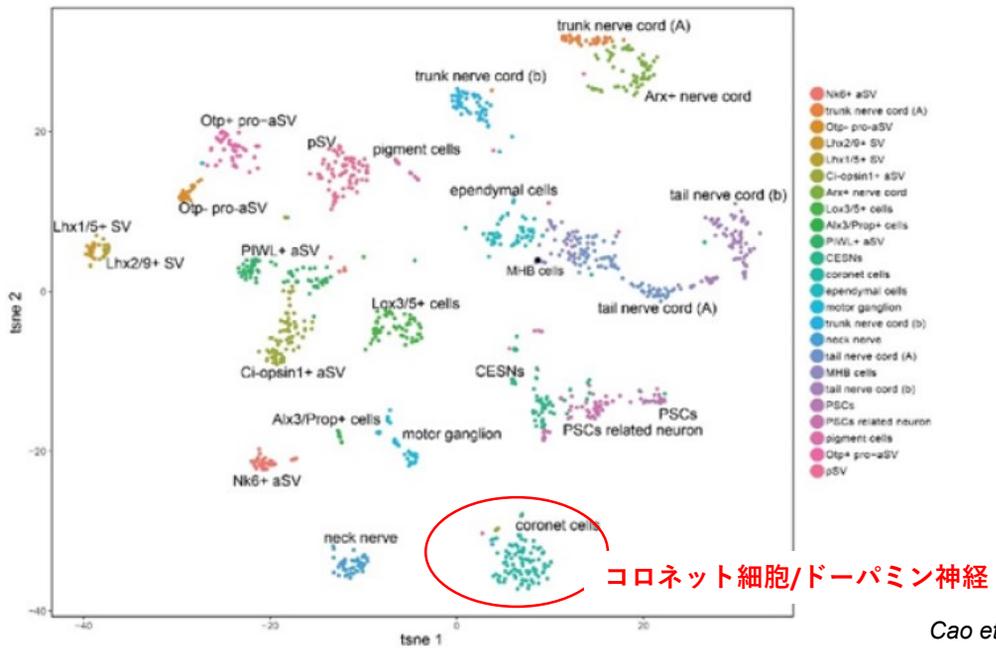
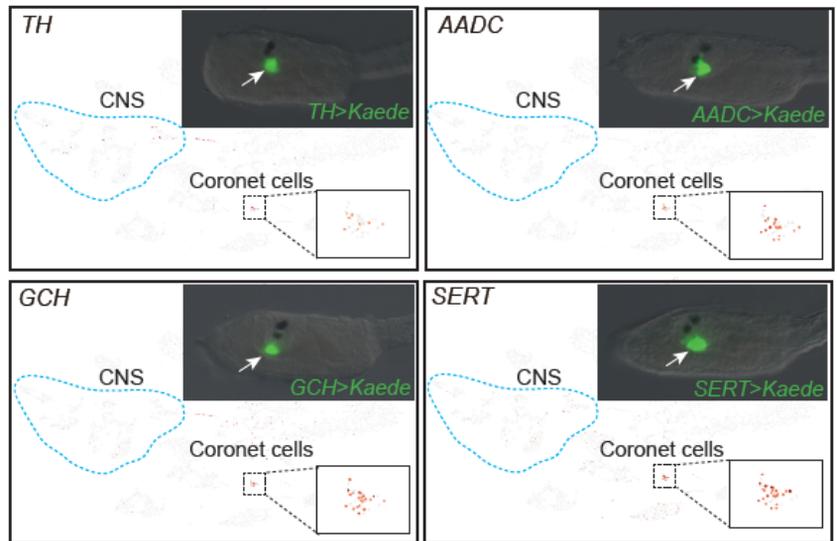
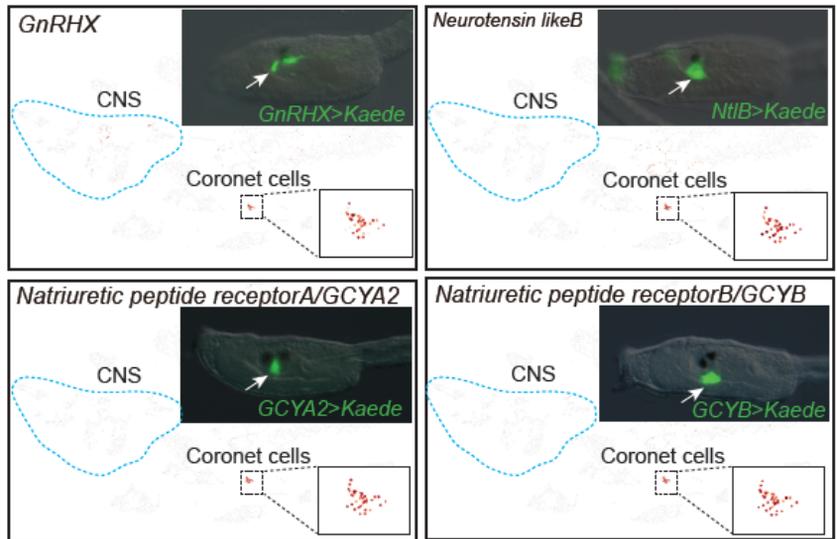


図37 ホヤの中枢神経系には、遺伝子発現の異なる20種類の細胞が存在する。ホヤの中枢神経系には、20種類の細胞が存在していた。赤で囲んだのが、コロネット細胞のクラスターである。

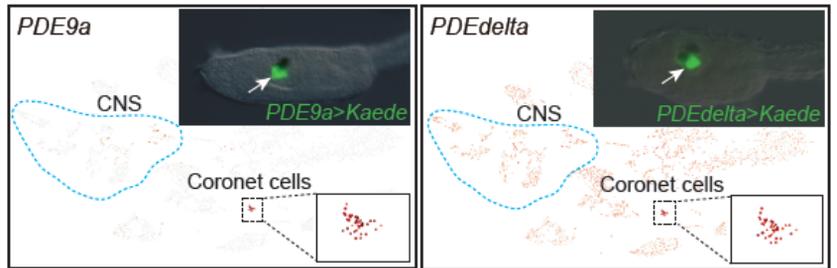
A ドーパミン
関連遺伝子



B ホルモン、
神経ペプチド、
神経ペプチド受容体



C cGMA関連遺伝子



D レクチンなど

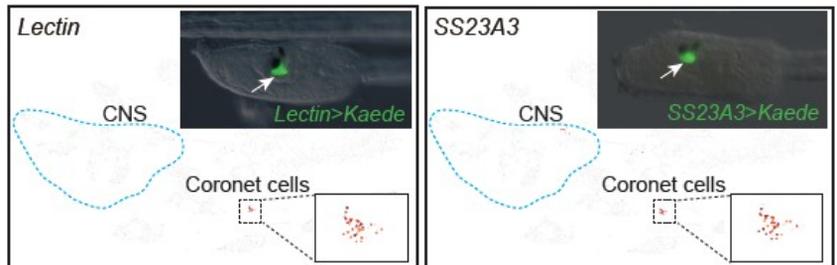


図38 ホヤのドーパミン神経におけるホルモン・神経ペプチドの発現解析

各遺伝子のtSNEプロット解析とホヤ幼生におけるレポーター遺伝子の発現解析の結果を示す。
(A)ドーパミン関連遺伝子、(B)ホルモン、神経ペプチド、神経ペプチド受容体、(C) cGMA関連
遺伝子、(D) レクチンなど。

tSNEプロットにおいて、赤い点が各遺伝子を発現している細胞を示す。

ホヤ幼生における各レポーター遺伝子の発現部位は矢印で示す。

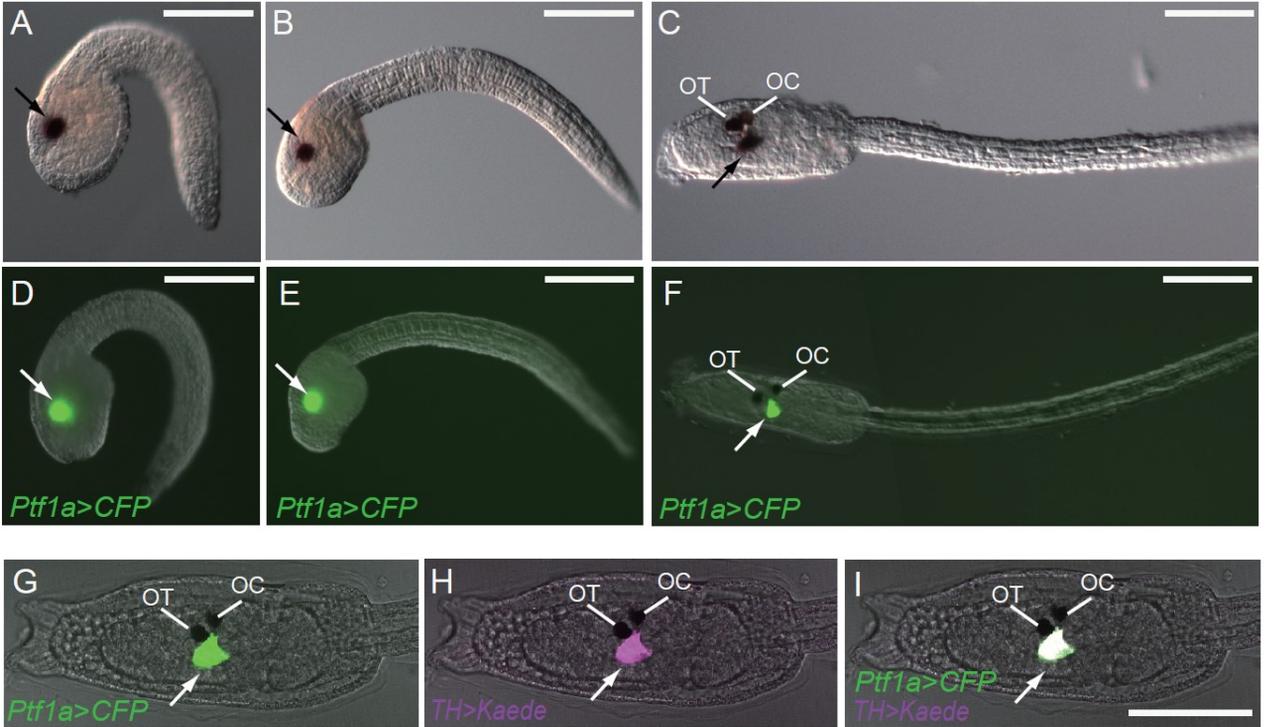


図39 *Ptf1a*はドーパミン神経/コロネット細胞で発現している。

(A-C) *Ptf1a*のin situ hybridization

脳胞の腹側に*Ptf1a* mRNAの局在が確認された（黒い色の矢印）。

(D-E) *Ptf1a*>*CFP*レポーター遺伝子の発現

Ptf1a>*CFP*レポーター遺伝子の発現が、mRNAと同様に脳胞の腹側で確認された（白色の矢印）。

(A) (D) は中期尾芽胚

(B) (E) は後期尾芽胚

(C) (F) オタマジヤクシ型幼生

OT: Otolith 平衡器、 OC: Ocellus 眼点。

(G-H) *Ptf1a*>*CFP*レポーター遺伝子をドーパミン神経細胞マーカーである*TH*>*Kaede*トランスジェニック系統で発現させたもの。

Ptf1a>*CFP*レポーター遺伝子はドーパミン神経/コロネット細胞で発現していた（白色の矢印）。スケールバーは100um。

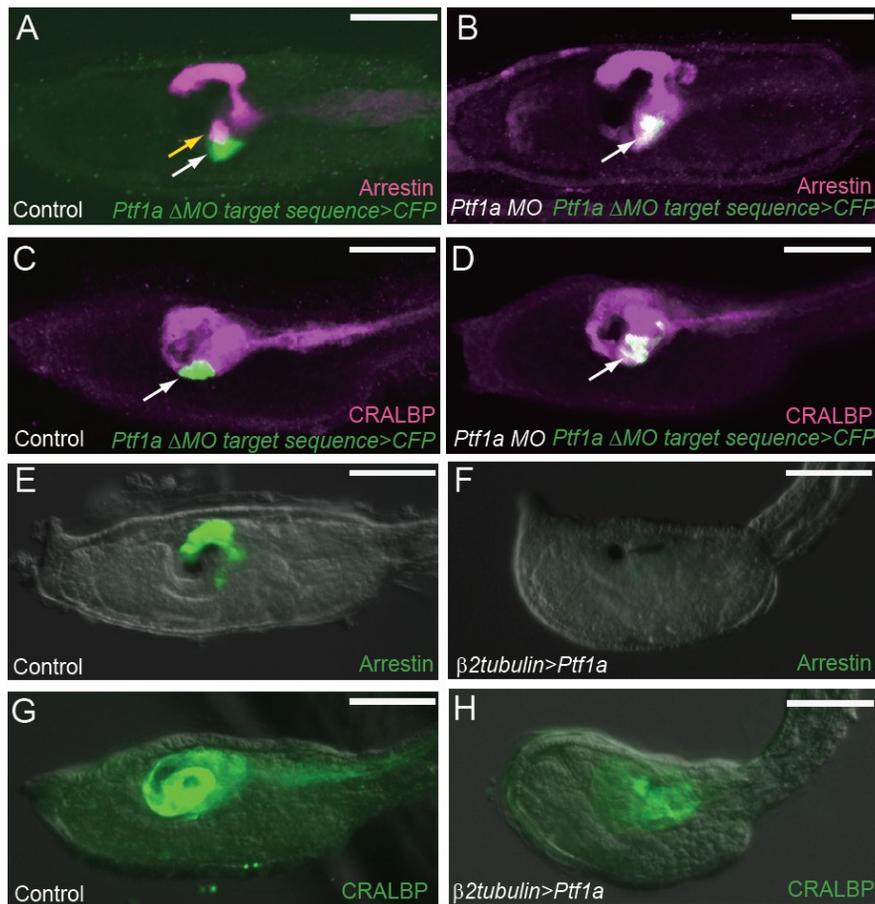


図40 *Ci-Ptfla*機能阻害により、ドーパミン神経/コロネット細胞は光受容細胞に転換する。*Ci-Ptfla*過剰発現により、光受容細胞は消失する。

(A, C) コントロール MO + *Ptfla* DMO target sequence > CFP インジェクション胚。

(B, D) *Ptfla* MO + *Ptfla* DMO target sequence > CFP インジェクション胚。

(A, B) 抗Arrestin抗体および抗GFP抗体で、(C, D)は抗CRALBP抗体および抗GFP抗体で染色したもの。白色の矢印は、CFP発現細胞。黄色の矢印は、グループIII光受容細胞群。

コントロール胚では、CFPの発現細胞はアレスチン発現細胞 (A) (5個体中5個体) もしくはCRALBP発現細胞 (B) (8個体中8個体) は重なり合わない。

Ptfla MO インジェクション胚では、CFPの発現細胞は (A) アレスチン発現細胞 (7個体中7個体) もしくは (B) CRALBP発現細胞 (8個体中8個体) とそれぞれ重なり合う。

(E, G) コントロール胚を抗アレスチン抗体 (E) で、抗CRALBP抗体 (G) で染色したもの。

(F, H) *Ptfla* 過剰発現させた胚を抗アレスチン抗体 (F) で、抗CRALBP抗体 (H) で染色したもの。

Ptfla 過剰発現させた胚ではアレスチン発現細胞は消失した (E, F) (32個体中32個体)。

Ptfla 過剰発現させた胚では、CRALBP発現細胞は大きく減少した (G, H) (25個体中25個体)。

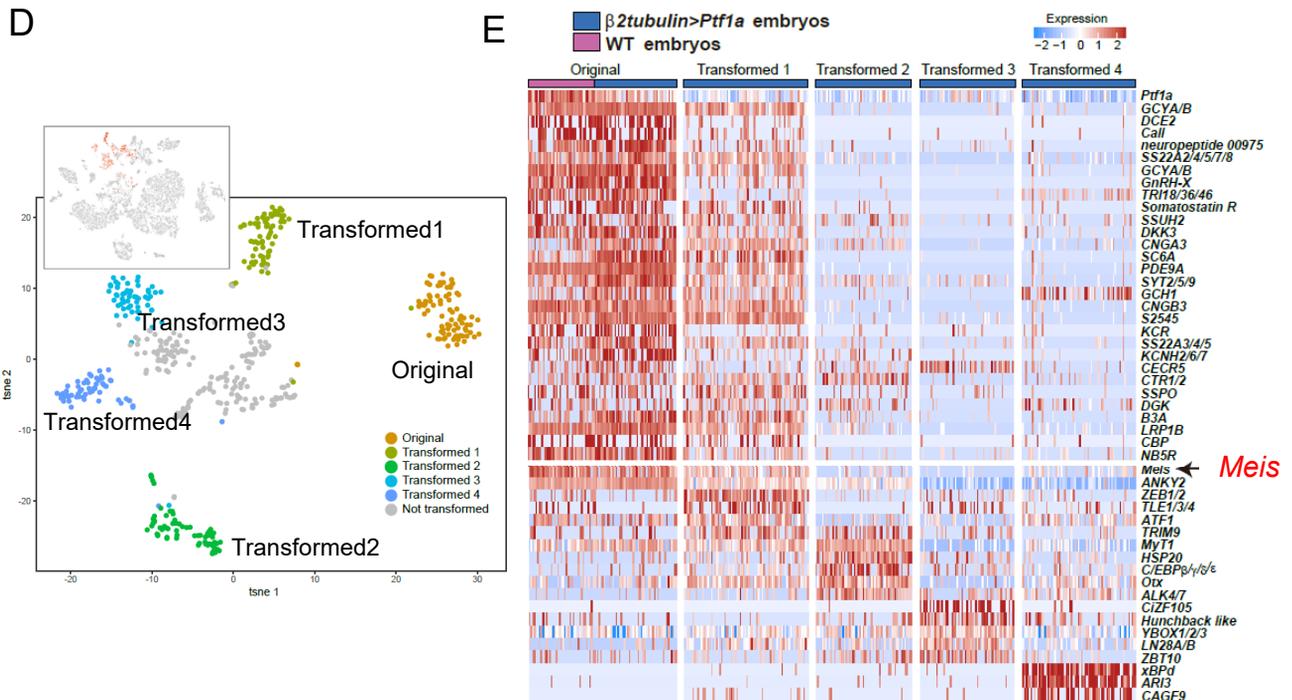


図41 *Ptf1a*はドーパミン神経細胞の分化に必須である。

(A) コントロール+*TH>Kaede*インジェクション胚

眼点後方に*TH>Kaede*の発現、すなわちドーパミン神経が見られる。

(B) *Ptf1a* MO+*TH>Kaede*インジェクション胚。

ドーパミン神経細胞が感染に失われた。

(C) *beta2-tubulin>Ptf1a+TH>Kaede*インジェクション胚。

*beta2-tubulin*エンハンサーを用いて、中枢神経系全体で*Ptf1a*を過剰発現したところ、ドーパミンニューロンは異所的に分化した。

(D) *beta2-tubulin>Ptf1a+TH>Kaede*胚の単一細胞トランスクリプトーム解析の結果を示したtSNEプロット。

*Ptf1a*の過剰発現により、新たに4つのクラスター (Transformed1-4) が生じた。

(E) Original およびTransformed1-4における遺伝子発現のヒートマップ。

このヒートマップにより、Transformed1がドーパミンニューロンに分化した細胞で、2、3、4はドーパミンニューロンへと分化できなかった細胞であることが分かった。さらに、ドーパミンニューロンに分化していない細胞では発現しておらず、分化した細胞でのみ発現する転写因子の検索を行い、転写因子*Meis*を同定した。

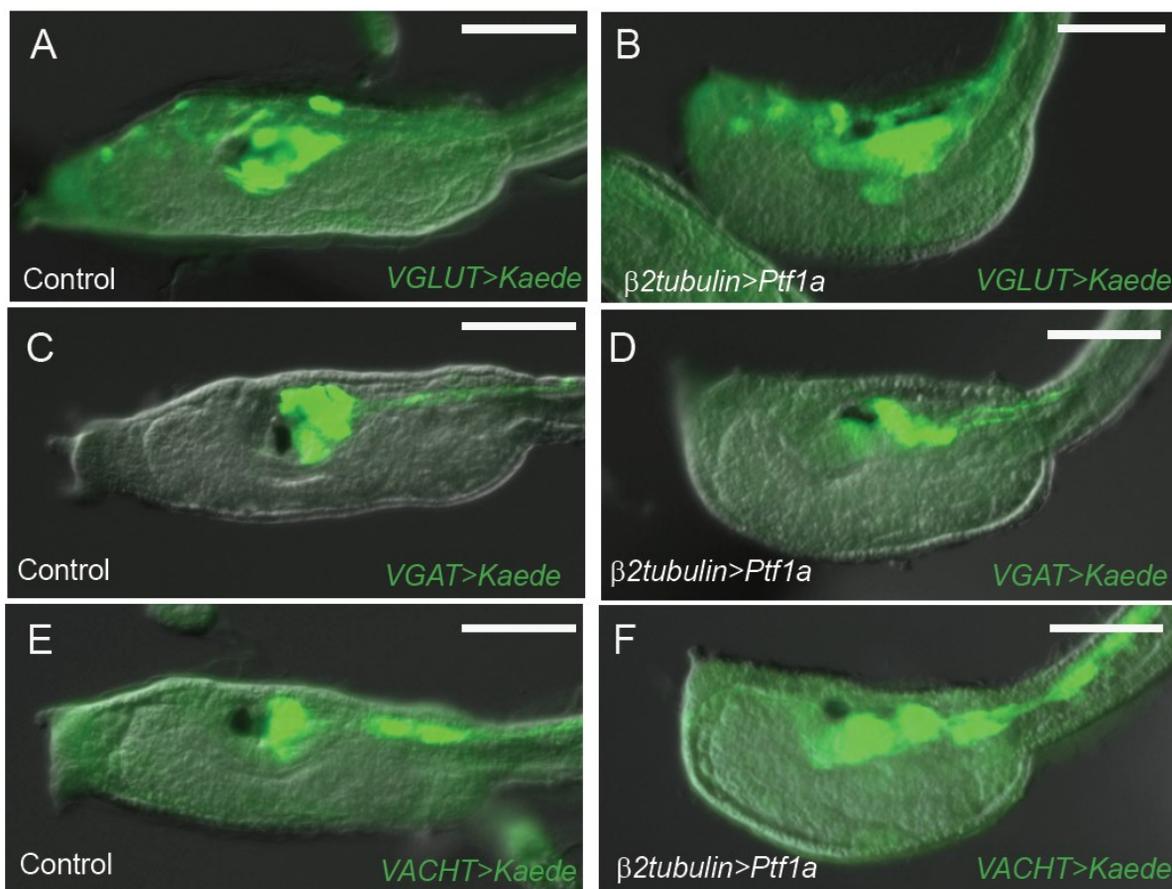


図42 *Ptf1a*過剰発現はドーパミン神経以外の他の神経の分化には影響しない。

(A, B) グルタミン酸作動性神経のトランスジェニック系統 (*VGLUT>Kaede*)

(A) コントロール (71 個体中71個体)。

(B) *Ptf1a*過剰発現胚 (79個体中79個体)。

(C, D) GABA/グリシン作動性神経のトランスジェニック系統 (*VGAT>Kaede*)

(C) コントロール (56個体中56個体)。

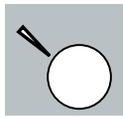
(D) *Ptf1a*過剰発現胚 (48個体中48個体)

(C, D) アセチルコリン作動性神経のトランスジェニック系統 (*VACHT>Kaede*)

(C) コントロール (74個体中74個体)。

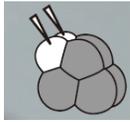
(D) *Ptf1a*過剰発現胚 (39個体中39個体)。

A



未受精卵にTH>Kaedeをインジェクション

↓ 受精



8細胞期にa割球2個に Meis or Control MOをインジェクション

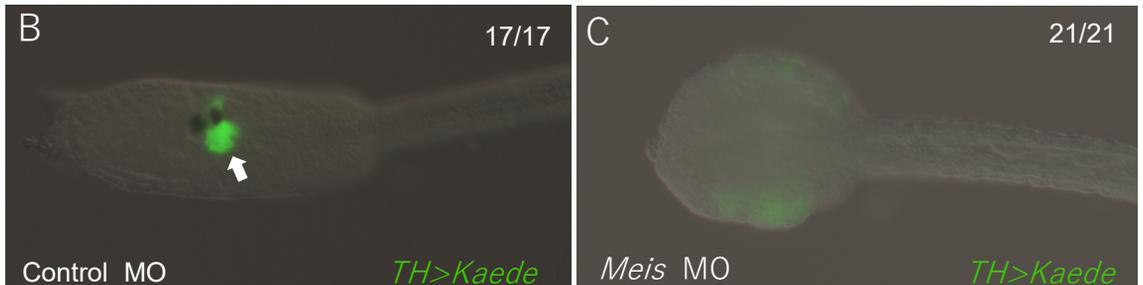


図43 *Meis* MO 注入胚では ドーパミン神経/コロネット細胞が消失する。

(A) *Meis* 機能阻害実験のストラテジー

*Meis*はドーパミン細胞以外にも、筋肉など様々な組織に発現しているので、未受精卵にMOを打つと発生異常となる。

そのため、未受精卵に、ドーパミン神経細胞のマーカースとして、*TH>Kaede*をインジェクションし、受精、発生させ、8細胞期において、ドーパミン神経細胞の生じる予定細胞である8細胞期のa細胞にコントロールMO もしくは*Meis* MOをインジェクションした。

(B) コントロールMOインジェクション胚。白い矢印は*Meis*発現細胞を示す。

(C) *Meis* MOインジェクション胚

コントロール胚では、ドーパミン神経細胞マーカースの*TH>Kaede*の発現が見られるが、*Meis* MO胚では、*TH>Kaede*の発現が消失した。

Meis MO胚では、ドーパミン神経以外にも、付着突起や色素細胞が消失している。

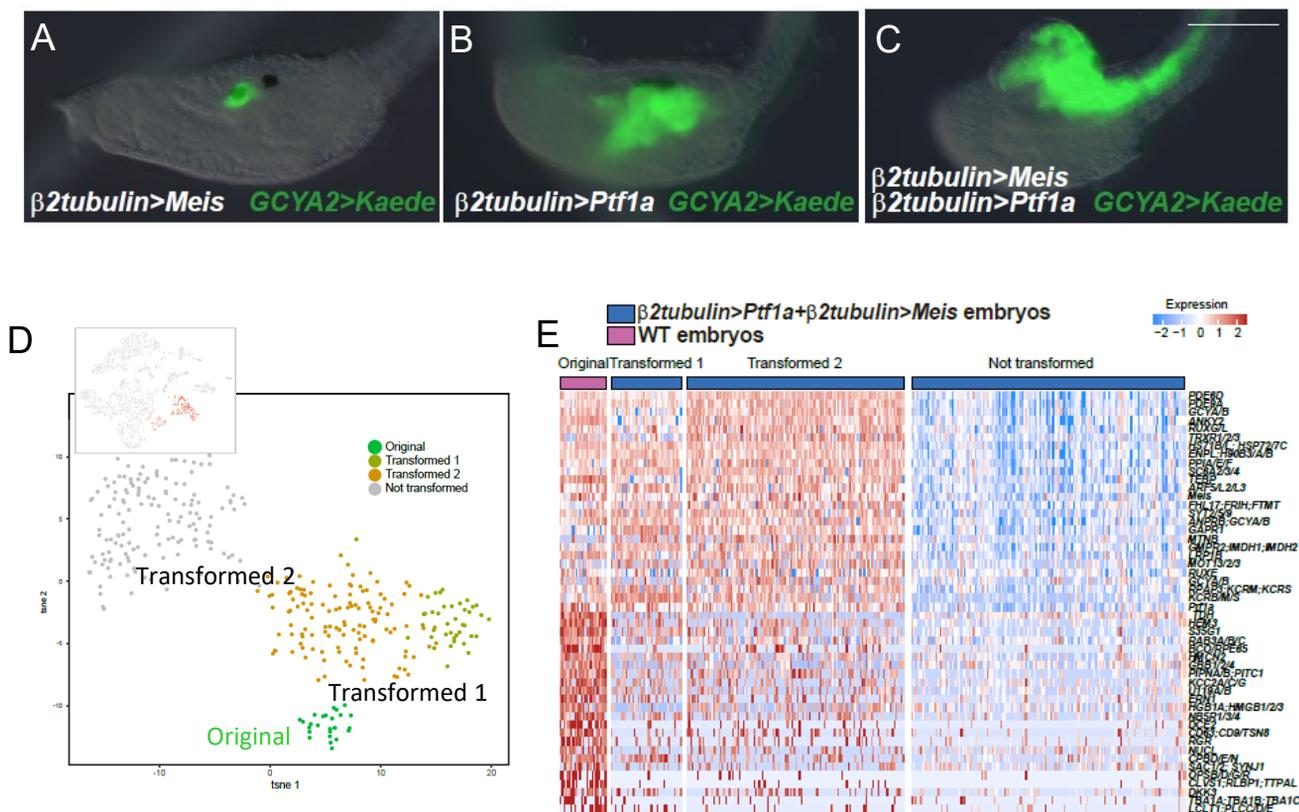


図44 *Ptf1a*, *Meis*カクテルはドーパミン神経細胞分化を強力に促進する。

(A) 中枢神経系で*Meis*を単独で過剰発現させた胚 ($\beta 2\text{-tubulin}>\text{Meis}+\text{GCYA2}>\text{Kaede}$)。

(B) 中枢神経系で*Ptf1a*を単独で発現させた胚 ($\beta 2\text{-tubulin}>\text{Ptf1a}+\text{GCYA2}>\text{Kaede}$)。

*Meis*単独では、ドーパミン神経の分化に変化はなく、

*Ptf1a*の過剰発現では、ドーパミン神経の分化が促進された。

(C) *Ptf1a*と*Meis*を共発現させた胚 ($\beta 2\text{-tubulin}>\text{Ptf1a}+\beta 2\text{-tubulin}>\text{Meis}+\text{GCYA2}>\text{Kaede}$)。

*Meis*と*Ptf1a*を共発現させると、中枢神経系の細胞がドーパミン神経へ分化が強力に促進された。

(D) $\beta 2\text{-tubulin}>\text{Ptf1a}+\beta 2\text{-tubulin}>\text{Meis}+\text{GCYA2}>\text{Kaede}$ 胚のtSNEプロット。

(E) $\beta 2\text{-tubulin}>\text{Ptf1a}+\beta 2\text{-tubulin}>\text{Meis}+\text{GCYA2}>\text{Kaede}$ 胚のヒートマップ。

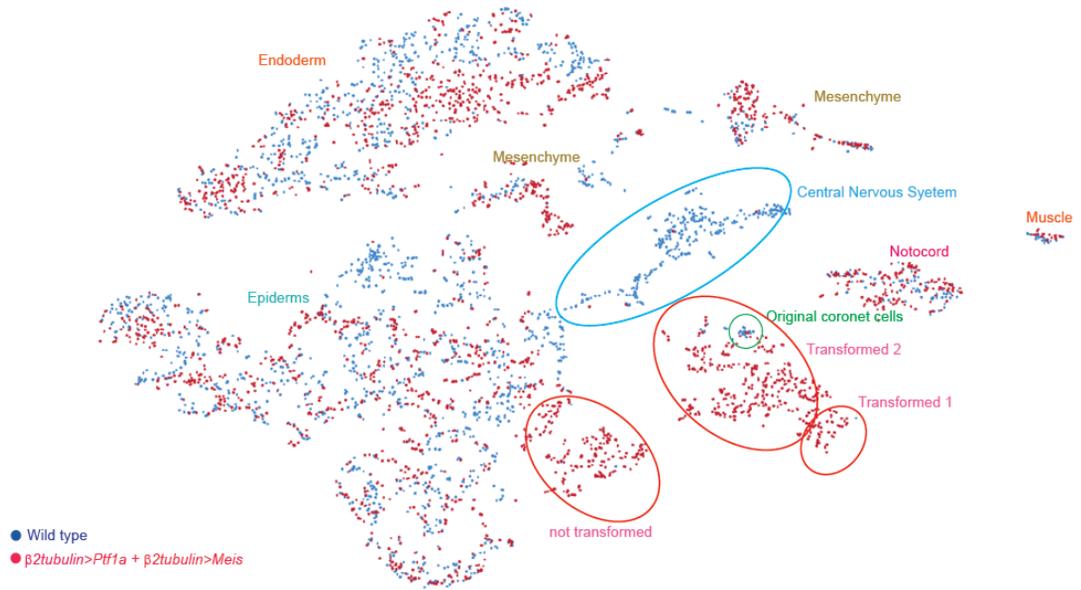


図45 *Ptf1a-Meis* 過剰発現した後期尾芽胚と野生型の後期尾芽胚のtSNEプロット。一つの点が一つの細胞を表す。青色の点が野生型、赤色の点が*Ptf1a-Meis* 過剰発現胚 (*b2tubulin>Ptf1a + b2tubulin>Meis* インジェクション胚) を表す。青色の丸が中枢神経系、緑色の丸がオリジナルのドーパミン神経/コロネット細胞、赤色の丸が*Ptf1a-Meis* 過剰発現により、転換した細胞群を示す。

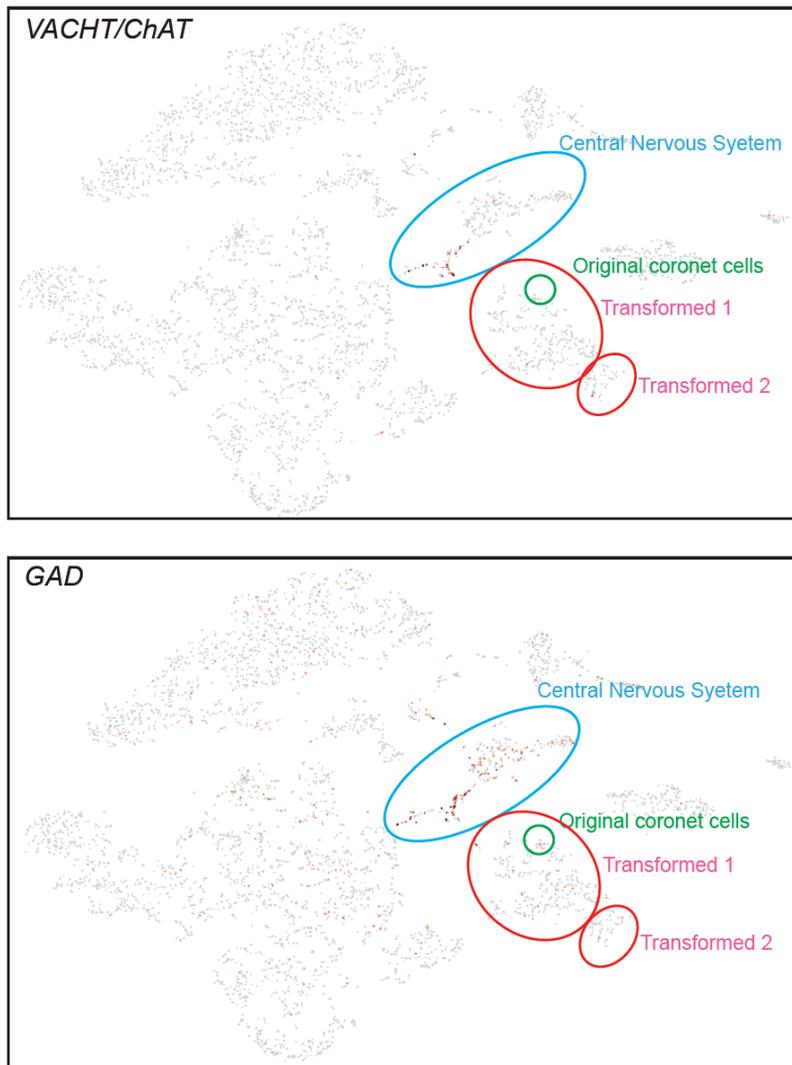


図46 *Ptfla-Meis*過剰発現胚と野生型胚のtSNEプロット。

*Ptfla-Meis*過剰発現により、各神経細胞は本来の遺伝子発現を失っていた。

(A) *VACHT/ChAT* (アセチルコリンニューロンマーカー) のtSNEプロット

(B) *GAD* (GABAニューロンマーカー) のtSNEプロット

青色の丸は野生型の中枢神経系。緑色の丸はオリジナルのドーパミン神経/コロナネット細胞。赤色の丸は*Ptfla-Meis*過剰発現により、形質転換した細胞群 (Transofromed1および2)。

*VACHT/ChAT*と*GAD*の発現が野生型の中枢神経系で確認されるが、*Ptfla-Meis*過剰発現胚のTransofromed1および2では、*VACHT/ChAT*と*GAD*の発現は失われていた。

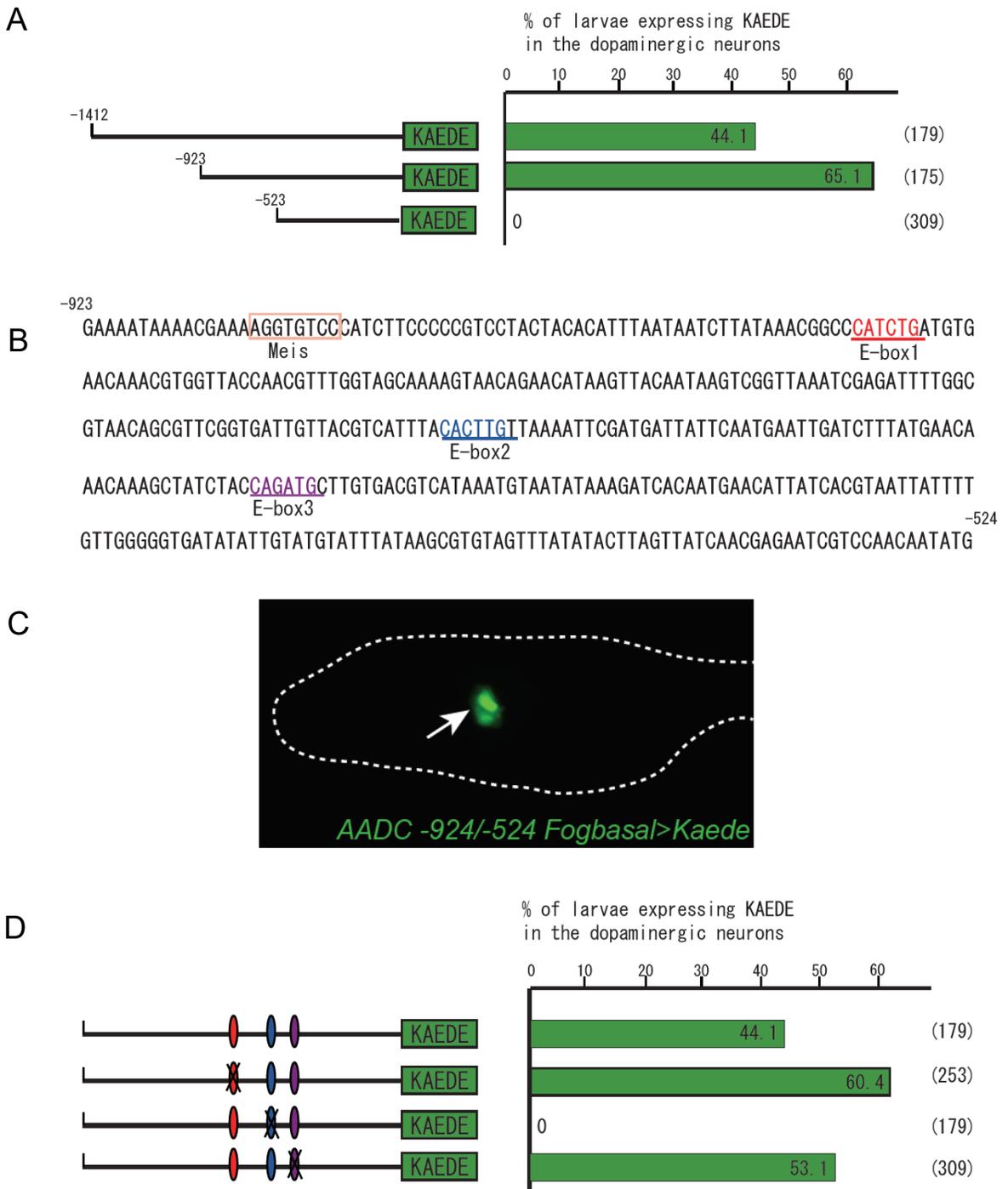
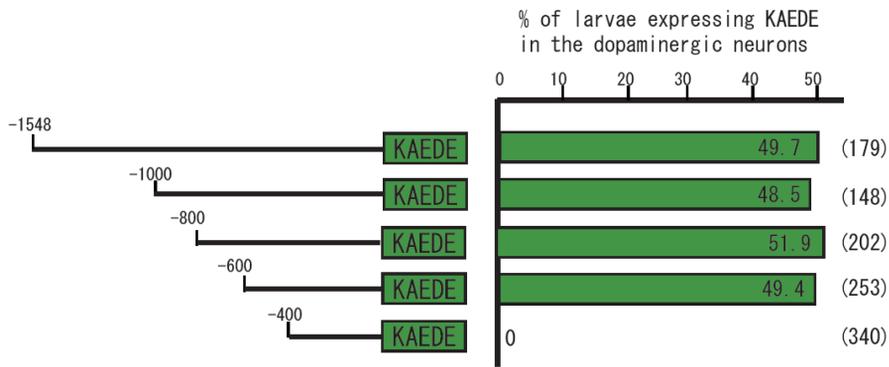


図47 ドーパミン神経/コロネット細胞の *Ci-AADC* の発現にはE-boxが必要である。
 (A) *Ci-AADC* の調節領域の欠損実験。 *Ci-AADC* の上流-923から-524bp が発現に重要な領域である。
 (B) *Ci-AADC* の上流-923から-524bp には、3つのE-box (E-box1, E-box2 および E-box3) と一つのMeis結合領域がある。(A)で示したように、*Ci-AADC* の発現には、この配列で充分である。
 (C) *AADC -924/-524 Fog basal > Kaede*インジェクション胚
 (D) E-boxの変異実験。この実験により、ドーパミン神経/コロネット細胞における *Ci-AADC* の発現にはE-boxが必要であることが分かった。

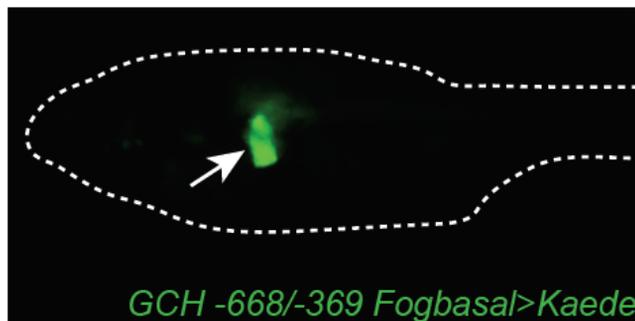
A



B

-668
 TGCAAGGGATGTATATTTATAGTAAATAACAGAAACTGCCAACTGGCGTTTATTTATTGT
 CAGTTGACACGACCATCAAACACTTTTGTATAATGCAGTTATAATTTGTAGCACTACGT
 Meis
 AATACGTACCGTGATTGCGTTGTTATTGCACAGCAGTAAGAGACAGCAGTGACGTAAAAT
 GAAACAAAACGCGTCACGCGCAGATG GTAGATGTACACCTGATATTGGAGAAATAGCGG
 E-box1 E-box2
 TAGTCAGTCCAGCAGTGCTTGTATAACACATGGGGTGACGTCTTGTTCATTAAATCTA
 E-box3
 -369

C



D

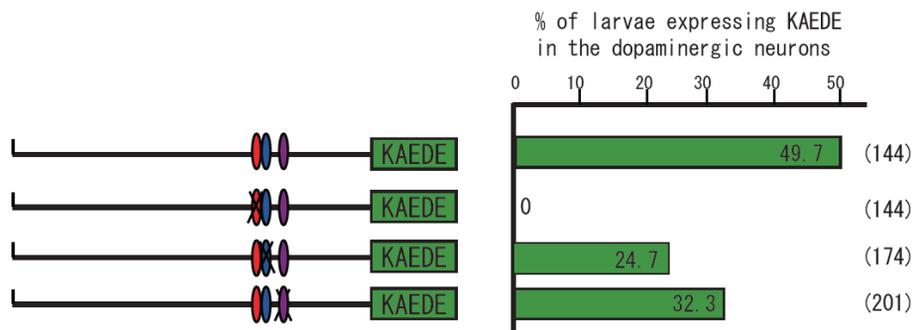


図48 ドーパミン神経/コロネット細胞における*Ci-GCH*の発現には一つのE-boxが必要である。

(A) *Ci-GCH*の調節領域の欠損実験。 *Ci-AADC*の上流-668から-369bpが発現に重要な領域である。

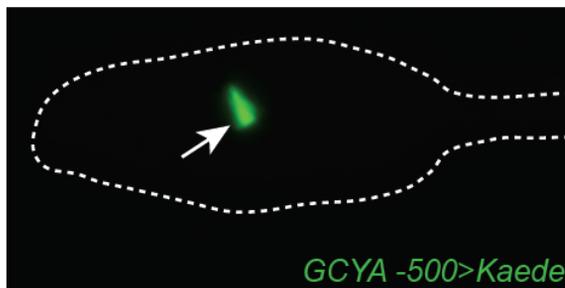
(B) *Ci-GCH*の上流-668から-369bpには、3つのE-box (E-box1, E-box2 および E-box3) と一つのMeis結合領域がある。(A)で示したように、*Ci-GCH*の発現には、この配列で充分である。

(C) *GCH -668/-369 Fogbasal>Kaede*インジェクション胚

(D) E-boxの変異実験。この実験により、ドーパミン神経/コロネット細胞における*Ci-AADC*の発現にはE-box1が必要であることが分かった。

A ナトリウム利尿ペプチド受容体A/GCYA2

⁻⁵⁰⁰
 GTACATAATATCCAACATTCTGAACGTTTTTAAACAATTAACAACGGTCTATAAGAGTC
 GTGAAGAGATACCGTTTTATATTTCTTTGAATGTTCTTTGTTTATCACCAATGGGACGA
 GAAAACGGAATGAACAGGTGTCCGTCTCCCCCACCCTACTATATATTAATACTACTCCA
 TACACCTCTTGCCAGTTTACGAATTACCAAATATGTTACTTTGCGGTTGTTTTTTGCAT
 CTTTCATTTTTTATGTATGACTGATAATTTGGTCAACCCATTAGTGGCCGCTGAATTGGT
 TCGCACAAGCGTCTGTGTTGACGTTTATTGCTGTTGCAAACAIGTGJTATATTGTTGGCT
 TGAGTTGAAATGCTTTGTCAATCGCAGGCGTCCAATAAACCGAATATCATTAAAAAGCCAA
 TATATAATAAGACCGGACCTGCCGGTTCATTTTTATTGTGCCAAAATATTTAGCCGCA
 ATATAATCCATTACCGCAAT⁻¹



B ナトリウム利尿ペプチド受容体A/GCYB

⁻⁵⁰⁰
 GGAAAAAGCTGGTTTATATAACATTTTTCGTTATGTCGATAACTTTATAC
 ACATACCGCTATATTGATTATAAATGGTTTGGTCTTTAATGGTCATTTGA
 TTAACAACATAATACATGTCAAATGCAGAGAAAATGCATTTGATTT
 GCGTTACGTTTGTAGTGTCTGCATATGACAAGCGCACACTGATAATAAA⁻³⁰¹
 E-box Meis

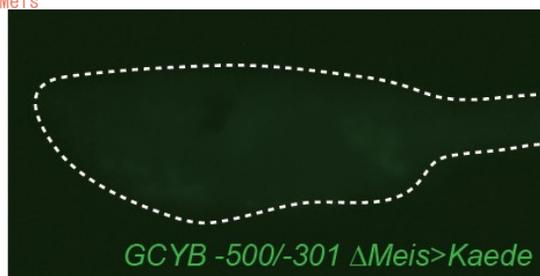
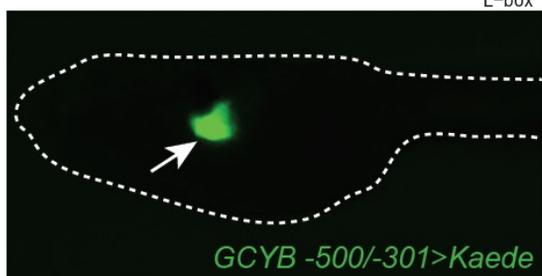


図49 ナトリウム利尿ペプチド受容体の最小エンハンサーには近接したE-boxとMeis結合サイトが存在する。

(A) ナトリウム利尿ペプチド受容体A/GCYA2の最小エンハンサー500bpには近接したE-boxとMeis結合サイトが存在する。写真はGCYA -500>Kaedeインジェクション胚。

(B) ナトリウム利尿ペプチド受容体A/GCYBの最小エンハンサー300bpには近接したE-boxとMeis結合サイトが存在する。

Meis結合サイトを欠損させると、ナトリウム利尿ペプチド受容体B/GCYBの発現が消失する（119個体中119個体）。

写真は左が、GCYB -500/-301>Kaedeインジェクション胚。

右が、GCYB -500/-301 ΔMeis>Kaedeインジェクション胚。

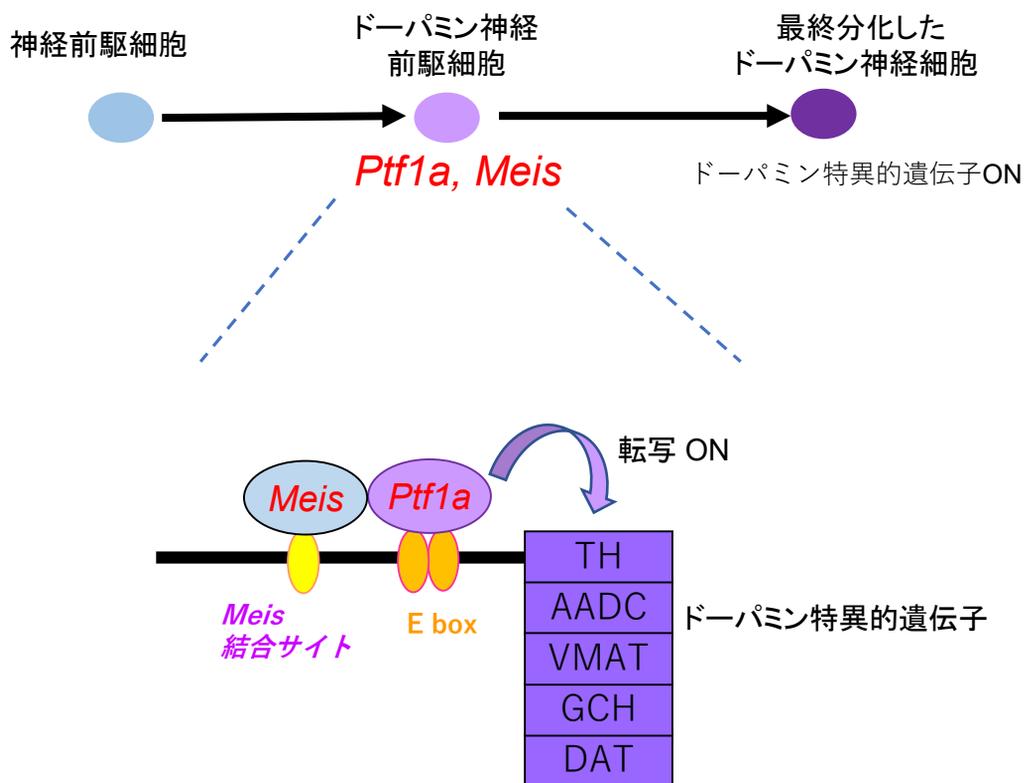


図50 *Ptf1a, Meis*カクテルによるドーパミン神経細胞分化誘導メカニズム

*Ptf1a*は脳内において一部の細胞で発現することから神経前駆細胞全てに発現しているのではなく、ドーパミン神経の前駆細胞で発現していると考えられる。

図47から49で示したように、ドーパミン特異的な遺伝子の発現調節領域の解析から *Ptf1a*と *Meis*はドーパミン神経特異的な遺伝子の発現を直接制御していると考えられる。ドーパミン神経前駆細胞に、*Ptf1a*と *Meis*がドーパミン神経特異的な遺伝子の転写をONにすることにより、成熟したドーパミン神経への最終分化を制御すると考えられる。

ホヤの脳の腹側

脊椎動物視床下部

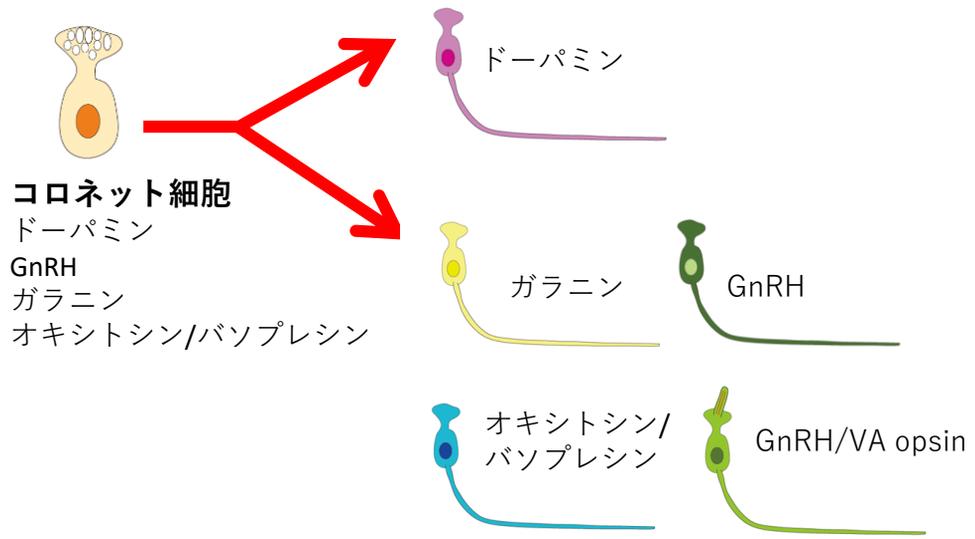


図51 視床下部の進化とsubfunctionalizationに関する考察

ホヤのコロネット細胞には、ドーパミンだけでなく、GnRHやガラニンなどの13種類のホルモン/神経ペプチドが発現していた。これはホヤに存在するホルモン/神経ペプチドの50%に相当する。

つまり、ホヤのコロネット細胞は脊椎動物の視床下部のドーパミン神経と、ペプチドホルモン分泌細胞の機能を併せ持つ可能性がある。おそらく、無脊椎動物のホヤの時点では、コロネット細胞はドーパミン神経細胞とペプチド神経細胞という複数の機能を有しており、脊椎動物に進化した際に、一つの機能を一つの細胞が担うようになった（Subfunctionalization 機能分担）と考えられる。

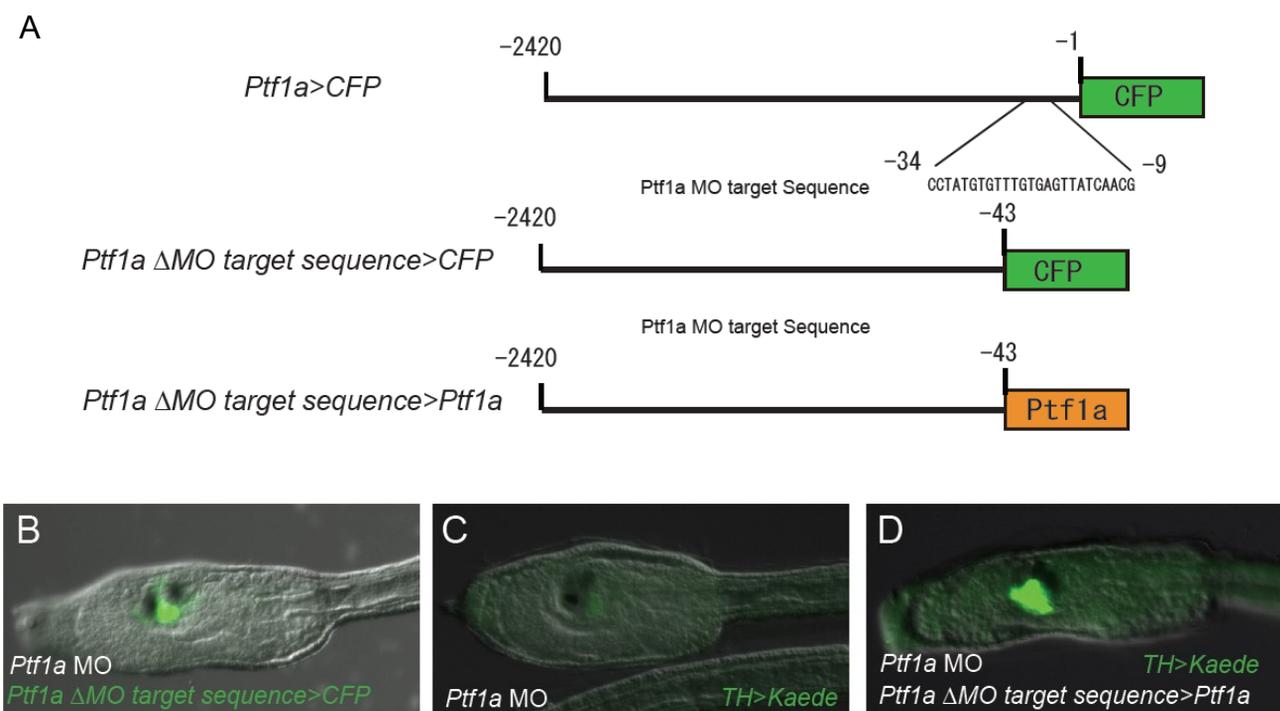


図52 *Ptf1a* MOの特異性の確認

(A) 使用したレポーター遺伝子コンストラクトと*Ptf1a* MOの認識配列

Ptf1a MO認識配列は開始コドンより5'上流の-34から-9に位置する。

(B) *Ptf1a* MO + *Ptf1a*ΔMO target sequence>CFPインジェクション胚

ドーパミン神経における発現が確認された (40個体中40個体)

(C) *Ptf1a* MOをインジェクションした野生型卵に、*TH*>*Kaede*トランスジェニック系統の精子を受精させた。

121個体中10個体でこの図51Cのように、*TH*>*Kaede*の弱い発現が見られた。

121個体中111個体で図41Bのように、*TH*>*Kaede*の発現が完全に消失した。

(D) *Ptf1a* MO + *Ptf1a*ΔMO target sequence>*Ptf1a* をインジェクションした野生型卵に

TH>*Kaede*トランスジェニック系統の精子を受精させた。

Ptf1a MOインジェクション胚では図41Bのように、*TH*>*Kaede*の発現が完全に消失するが、MO認識配列を除いた、レスキューコンストラクト*Ptf1a*ΔMO target sequence>*Ptf1a* を共にインジェクションすると、*TH*>*Kaede*の発現が回復する。96個体中49個体で*TH*>*Kaede*の発現回復が見られた。なお、*TH*>*Kaede*トランスジェニック系統はヘテロなので、*TH*>*Kaede*を発現するのは約50%である。