

論文の内容の要旨

論文題目

Single-cell analysis of phenotypic and molecular heterogeneity
in the developing lateral line system of zebrafish

(発生過程のゼブラフィッシュ側線神経細胞集団にみられる
表現型・遺伝子発現の多様性の単一細胞解析)

氏名 佐藤 朗

<序論>

神経系は形態・神経接続・応答性などの異なる多様な細胞によって構成されており、このような多様性が生じることは機能的な神経組織の形成に必須である。例えば、近接した神経細胞同士は非常に似た性質を持つが、それぞれ異なる細胞と接続しており、均一な集団ではない。しかし、細胞レベルの違いがどのように生じ、機能的な神経系の形成にどのように寄与しているかは、ほとんどわかっていない。その最大の原因として、一般的に神経系は膨大な数の細胞によって構成されていること、そしてそれらが非常に複雑な回路を形成していることが挙げられる。そこで本研究では、細胞数が少なく単純な構造を持つゼブラフィッシュ側線神経系に注目し、神経細胞集団内の多様性を定量的に解析した。

側線は水流を感知する器官で、群形成や捕食者の感知など様々な行動に重要な役割を果たす。ゼブラフィッシュ稚魚の側線は主に感丘（感覚受容器）と神経細胞で構成される。その発生過程では、まず受精 22 時間後に頭部において前駆組織が側線原基（感丘の前駆細胞集団）と神経細胞集団に分化する。その後、側線原基は後方へ移動を開始し、側線神経の軸索は原基と共に伸長する。移動途中で原基の一部は移動を停止し、感丘へと分化する。この過程を繰り返すことで、受精 48 時間後には 6~8 個の感丘とそこに接続する神経細胞を持った初期側線が形成される。本研究では、一見均一な神経細胞集団が軸索を伸長させ、初期側線の神経回路を形成する受精後 22~48 時間に注目し、(1) 単一神経細胞の表現型（軸

索伸長速度と形態) (2) 単一神経細胞の遺伝子発現量 (3) 初期側線の神経回路の3点を解析した。

<結果>

1. 初期側線形成過程における単一神経細胞の振る舞い

側線神経細胞をランダムに標識するため、蛍光タンパク質をコードした DNA コンストラクトを 1~2 細胞期に顕微注入し、モザイク胚を作製した。単一の側線神経細胞が標識された多数の個体を経時観察した結果、側線神経の伸長過程における振る舞いは細胞毎に大きく異なることがわかった。側線系では軸索の伸長に側線原基の移動が必須であることが知られているが、実際に側線原基と接触しながら伸長する細胞は全体の 3 分の 1 程度しか存在しておらず、残りの細胞は遅れて軸索を伸長させていた。次に、先行する神経細胞集団を Leader、後続の集団を Follower と分類し、その振る舞いを詳細に解析した。その結果、Leader の軸索伸長速度は Follower よりも有意に速いことがわかった (Leader: $80 \pm 7.6 \mu\text{m/h}$, Follower: $32 \pm 11 \mu\text{m/h}$)。さらに成長円錐の形態は Leader の方が有意に複雑であった。以上の結果から、側線神経の細胞集団内には軸索伸長過程で既に多様性が生じており、特に Leader, Follower という表現型の大きく異なる集団に分類できることが明らかになった。また、Leader の細胞体は受精後 32 時間胚において側線神経節の背側に多く存在することを、光変換型蛍光タンパク質 Kaede を発現する系統を用いた逆行性標識によって明らかにした。

2. 側線神経の細胞集団における遺伝子発現量の多様性

単一細胞の観察により明らかになった表現型の多様性、特に Leader, Follower という大きな違いは、遺伝子発現量の違いによって制御されている可能性が考えられる。側線神経節内の遺伝子発現の多様性を調べるため、ゼブラフィッシュ単一神経細胞の遺伝子発現解析法を確立した。この解析法では、まず側線神経で GFP を発現する系統を用いて目的の細胞を単離・回収する。そして単一細胞に含まれる mRNA を逆転写した後、量比を保ったまま増幅して cDNA ライブラリを作製し、そこに含まれる各遺伝子の cDNA 量を real-time PCR によって定量する。本研究では初めに、バッファーに加えた外部標準遺伝子を定量し、本解析法が高い再現性と定量性を示すことを確認した。

この方法を用いて 9 種の遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子 3 種: *ppia*, *rps18*, β -*actin*、側線神経のマーカー遺伝子 2 種: *egfp*, *stathmin 1b*、神経分化と神経細胞のマーカー遺伝子 4 種: *nestin*, *ngn1*, *neurod*, *elavl3*) の発現量を定量した結果、一部の遺伝子の発現量は側線神経節内で不均一であった。発現量の集団内分布 (ばらつき具合) は遺伝子毎に異なっており、特に β -*actin* と *neurod* において集団内分布の大きさが顕著であった。

続いて、表現型が顕著に違う Leader, Follower の 2 集団について遺伝子発現量を比較した。このために、モザイク胚作製による単一細胞標識と遺伝子発現解析を組み合わせを行った。上記の 9 種の遺伝子について Leader, Follower 間での発現量を比較した結果、Leader で *β-actin* と *neurod* の発現量が有意に高いことがわかった。*neurod* の発現パターンを蛍光 in situ hybridization 法で確認すると、神経節の背側で強く発現していた。この結果は、Leader が背側に多く存在するという上述の観察事実と一致する。加えて、Leader と Follower が形態的に分化する前（受精後 22 時間：側線原基の移動開始直前）にこれらの遺伝子の発現量を調べたところ、*neurod* 発現量のばらつきは分化前から大きかった。一方で *β-actin* 発現量のばらつきは分化に伴って有意に増加していた。以上の結果から、発生初期の側線神経節内において *neurod* 発現量の高い細胞が Leader へと分化し、低い細胞が Follower へと分化することが強く示唆された。この可能性を検証するため、単一の側線神経細胞で *neurod* を過剰発現させたモザイク胚を作製し、過剰発現細胞が Leader へと分化するかどうかを調べた。その結果、*neurod* 過剰発現細胞は Leader へと分化する傾向が強く見られ、先の仮説は支持された。

3. Leader, Follower が形成する初期側線の神経回路構造

最後に、遺伝子発現の多様性によって側線神経の小さな細胞集団に生じる Leader, Follower の 2 つの集団が側線系の発生と機能にどのように寄与するかを明らかにするため、神経回路の構造を解析した。側線系の神経回路は非常にシンプルであるが、トポグラフィックマップ（細胞体と接続先の位置的な相関）と呼ばれる多くの神経系に共通する機能的に重要な構造を持つことが発生後期（受精後 6 日胚）において知られていた。そこで本研究ではこのトポグラフィックな回路構造に注目し、初期側線の形成直後（受精後 2~3 日胚）において「(神経節における) 細胞体の位置」と「接続する感丘の位置」を調べた。まず逆行性標識によって回路構造を調べると、初期側線の形成直後にはすでに不完全ながらもトポグラフィックな構造が形成されていることがわかった。しかし、モザイク胚を用いて単一細胞レベルで調べたところ、Leader は細胞体の位置に関わらず後方の感丘に接続しており、トポグラフィックな構造は見られなかった。この接続傾向は、Leader 細胞の軸索が Follower の足場として機能している可能性を示唆している。一方で Follower 細胞においては、「細胞体の位置」と「接続する感丘の位置」との間に相関が見られ、トポグラフィックな構造が形成されていた。以上の結果は、トポグラフィックな回路構造は初期側線の形成過程で Follower 細胞によって形成されることを示している。

<結論>

本研究では、均一に見える細胞集団内に表現型の多様性が生じて機能的な神経系を形成する過程を、系全体にわたる単一細胞解析によって明らかにした。さらに、単一細胞における遺伝子発現の定量的な解析法を確立することで、表現型の多様化を引き起こす遺伝子発現量の多様性に関する知見も得ることができた。本研究で得られた結果より、私は以下のような側線神経系の形成メカニズムを提唱する（図 1）。軸索伸長を開始する前の側線神経節内には *neurod* 発現の量的なばらつきが生じており、発現量の高い細胞では軸索伸長が促進される（図 1A）。その結果、*neurod* 発現の高い細胞の軸索が側線原基と接触し、Leader として伸長する（図 1B, C）。Leader は側線原基と共に尾部まで伸長し、Follower の伸長のための足場として機能する。一方、*neurod* 発現の低かった細胞は Follower として、Leader 細胞の軸索上をゆっくりと伸長する（図 1C）。Follower は細胞体の位置に応じた標的感丘を何らかの方法で感知し接続することにより、トポグラフィックな回路構造を形成する（図 1D）。

今後の展望として、*neurod* 発現の多様性を生み出す要因（外部要因の変動か、あるいは内因的な遺伝子発現のゆらぎか）のライブイメージングによる解明が期待される。また、網羅的な発現解析により、神経細胞集団の多様性を生み出す *neurod* 以外の遺伝子、そして Follower がトポグラフィックな構造を作るメカニズムの一端が明らかになると考えられる。

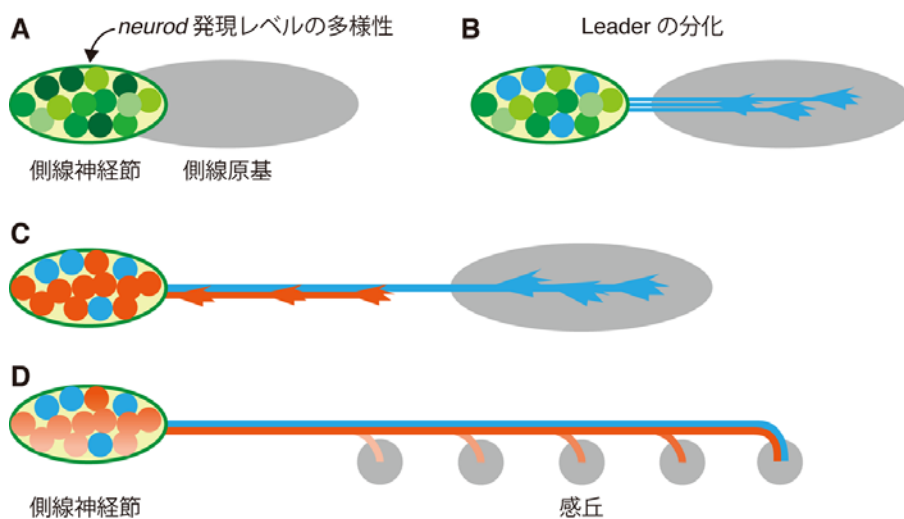


図 1. 側線神経回路の形成過程のモデル図

A: 初期の側線神経節内に *neurod* 発現量の多様性が生じる. **B:** *neurod* 発現量の高い細胞は Leader (水色) に分化し、側線原基と共に伸長する. **C:** 残りの神経細胞は Follower (オレンジ) として Leader の軸索上を伸長する. **D:** Leader は後方まで伸長を続け、Follower は細胞体の位置に応じて接続しトポグラフィックな構造を形成する.