

# ショウジョウバエ原腸胚における1細胞遺伝子発現アトラスを作成 —ゲノム情報による発生制御の解明に向けた基盤的リソース—

## 概要

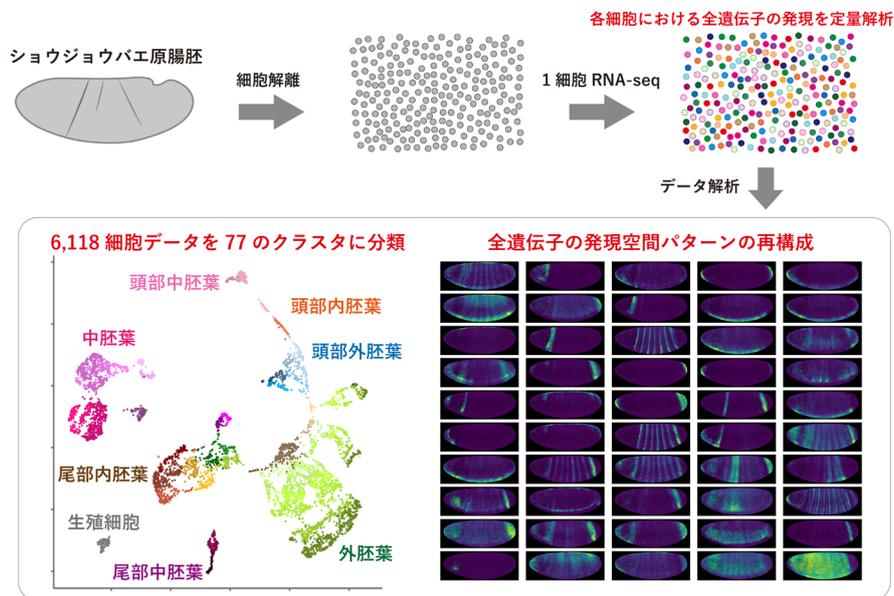
近藤武史 京都大学大学院生命科学研究科特定講師（研究当時、現：理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー）、坂口峻太 同研究科博士課程学生（学振特別研究員 DC1、現：同研究員）らの研究グループは、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）原腸胚を構成する各細胞における全遺伝子の発現を定量解析し、高解像度の空間情報を含む1細胞遺伝子発現アトラスを構築しました。

動物のゲノムには数万の遺伝子がコードされています。そして、この数万の遺伝子が複雑に絡み合いながら協調して働くことによって、複雑な発生現象が正確に進行すると考えられます。しかし、遺伝子が時空間的に協調して発生を制御する仕組み・ルールの理解には未だ至っていません。その理由の一つとして、発生中の胚における細胞単位での定量的な遺伝子発現情報が不足していることが挙げられます。

キイロショウジョウバエ原腸胚はまさに細胞分化とダイナミックな形態形成が進行している発生段階であり、本研究で構築した1細胞遺伝子発現アトラスは、ゲノム情報による発生制御の仕組みのさらなる理解へと貢献することが期待されます。

本成果は、現地時間7月10日午前11時に米国の国際学術誌「*Cell Reports*」に掲載されました。

## ショウジョウバエ原腸胚の1細胞遺伝子発現アトラスの作成



## 1. 背景

動物の体づくりは一つの受精卵から始まり、細胞分裂により数を増やしながらかその集合として個体を作り上げていきます。この胚発生の過程では、細胞が位置に応じて特定の細胞に分化し、決まった振る舞いを示すことが重要です。その背後には、それぞれの細胞が自分の位置を認識し、遺伝子発現をコントロールするというステップがあります。動物のゲノムには数万の遺伝子がコードされています。そして、この数万の遺伝子が複雑に絡み合いながら協調して働くことによって、複雑な発生現象が正確に進行すると考えられます。しかし、これまでの多くの研究により各遺伝子の個別の機能については理解が進んできましたが、遺伝子が時空間的にどのように協調して発生を制御しているのか、その仕組み・ルールには不明な点が未だ多く残されています。この問題にアプローチするためには、胚を構成する各細胞がどのような組み合わせで遺伝子を発現しているのかということ、全遺伝子のレベルで知る必要があります。すなわち、各細胞におけるトランスクリプトームを空間位置情報と合わせて明らかにすることが重要です。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*、以下ショウジョウバエ) は発生生物学の研究において重要な役割を果たしてきたモデル生物です。中でも、およそ 6,000 の細胞からなるショウジョウバエの原腸胚は三胚葉分化が始まるとともに、単純な構造から複雑な組織・器官を作り上げる形態形成を駆動するために各細胞が多様な振る舞いを示し始めるタイミングでもあるため、前述の問いを解くのに優れたモデルです。これまでにも、ショウジョウバエ原腸胚における細胞レベルのトランスクリプトームが調べられていましたが、その精度には改善すべき点が多く残されていました。

## 2. 研究手法・成果

まず 1 細胞 RNA-seq によってショウジョウバエ原腸胚の細胞レベルのトランスクリプトーム情報をより正確に取得するために、実験手法の検討を行いました。1 細胞 RNA-seq では胚を 1 細胞の単位に解離する必要があり、多くの場合、25°C もしくは 37°C で数分~数十分の酵素処理により細胞を解離しています。しかし、この酵素処理の過程では細胞内で RNA の転写および分解反応も進んでしまうため、元の遺伝子発現の状態が変わってしまう可能性があります。実際に、トリプシンによる細胞解離の遺伝子発現への影響を調べたところ、たった数分の処理にもかかわらず一部の遺伝子の発現が亢進してしまうことがわかりました。これらの遺伝子は発生制御の重要なシグナル伝達系である Notch シグナルの制御下にあるため、その発現の人為的な変化は後のデータ解析と解釈を困難にします。そこで、哺乳類の研究で実績のあった低温で作用する酵素を用いた細胞解離手法を適用したところ、ショウジョウバエ原腸胚においても解離処理による遺伝子発現変動を抑えつつ、細胞を解離できることがわかりました。

こうして解離した細胞を用いて 1 細胞 RNA-seq を行うことで、ショウジョウバエ原腸胚の全細胞数に相当する 6,118 細胞のトランスクリプトーム情報を取得しました。そして、詳細な クラスタリング解析 と各クラスタの アノテーション を行うことによって、トランスクリプトーム情報のみから 6,118 細胞を 77 のクラスタに割り当てることに成功しました。さらに、既知の遺伝子発現の空間情報と照らし合わせることで、全 77 クラスタが胚における特定の位置に対応しており、この 1 細胞 RNA-seq データがショウジョウバエ原腸胚のほぼ全ての空間領域を網羅していることも明らかになりました。また、このクラスタの中にはその分化状態が明確ではなく、二つの分化状態の中間的な状態にある細胞群が存在することが示唆され、さらなる解析により実際にそれらは隣接する二つの細胞種の境界部分に存在していることもわかりました。

動物の胚発生を制御する基本的な仕組みの一つとして モルフォゲン による制御があります。モルフォゲンの

濃度勾配によって胚・組織内に位置情報が形成され、それに応じて細胞はどういった細胞に分化するか、どういった振る舞いを示すか、を決めているとするモデルです。ショウジョウバエ原腸胚においても体の前後軸（頭尾軸）・背腹軸に沿った位置情報がモルフォゲンによって形成されます。モルフォゲン濃度勾配は連続的でアナログな位置情報ですが、それを読み取った細胞は離散的なパターンとして特定の細胞へ分化します（図1）。つまりモルフォゲン位置情報を分化パターンへと非線形に変換していると考えられます。

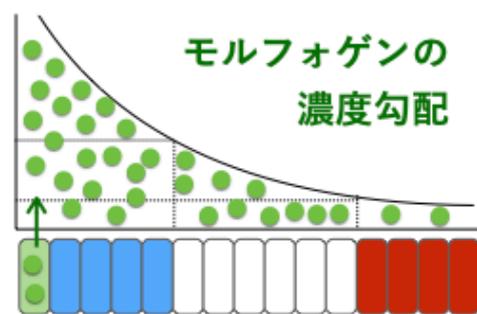


図1：モルフォゲンによる制御のモデル

また、この過程では位置情報に応じて遺伝子の発現を調節する「転写因子」と呼ばれる一群のタンパク質の発現が始まり、各細胞はその組み合わせパターンによって独自のトランスクリプトームを確立すると考えられてきました。

取得した1細胞RNA-seqデータを解析したところ、ショウジョウバエ原腸胚においては、特に転写因子をコードする遺伝子と細胞膜で機能するタンパク質をコードする遺伝子（細胞膜関連遺伝子）が細胞ごとのトランスクリプトームの特徴を表していることがわかりました。さらに、転写因子群の発現パターンは胚における位置情報を部分的に反映する一方で、細胞膜関連遺伝子群の発現パターンは細胞の分化状態をより強く反映していることがわかりました。このことは、転写因子群全体の発現パターンはアナログな位置情報を保持しているが、その転写因子群の協調的な作用によって、離散的な分化パターンに対応した細胞膜関連遺伝子など下流遺伝子の発現パターンを確立していることを示唆します。また、ショウジョウバエ胚の頭部モルフォゲンの一つとして Bicoid が知られており、*bicoid* 遺伝子の機能を阻害した胚では頭部領域が尾部領域の性質に置き換わってしまうことが知られています。*bicoid* 遺伝子機能阻害胚の1細胞トランスクリプトームを解析したところ、頭部領域の細胞はトランスクリプトームレベルで尾部化していました。つまり、確かに細胞は、少なくとも *bicoid* が欠失したことによるモルフォゲン位置情報の変化に対してトランスクリプトームのレベルで応答し、分化の方向や振る舞いを変えていることが明らかになりました。

1細胞RNA-seqでは胚から細胞を分離して解析するため、細胞が胚のどの位置に由来するのかという位置情報は失ってしまいます。この問題を克服するため、遺伝子発現情報から細胞の位置情報を推定し、それに基づいて全ての遺伝子の発現空間パターンを再構成する手法を開発してきました (<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-06-21>)。そして、今回取得した1細胞トランスクリプトームデータを用いることにより、全遺伝子の発現空間パターンをこれまでにない正確さで再構成することに成功しました。このように解析した各細胞の遺伝子発現情報を一つにまとめ、空間情報と合わせたデータをショウジョウバエ原腸胚の1細胞トランスクリプトームアトラスとしています。

### 3. 波及効果、今後の予定

今回構築したショウジョウバエ原腸胚の1細胞トランスクリプトームアトラスは、高解像度の空間情報を持っています。遺伝子発現情報は発生のみならず全ての生命現象の根幹で、本研究によりショウジョウバエ原腸胚のどの位置でどの遺伝子がどれだけ発現しているかを詳細に明らかにすることができました。また、ショウジョウバエ原腸胚はまさに細胞分化とダイナミックな形態形成が進行している発生段階であり、これまでにモデル実験系として発生制御の基本的な仕組みの研究に用いられています。本研究で構築した1細胞トランスクリプトームアトラスは、我々だけでなく世界中の研究者に活用され、ゲノム情報による発生制御の仕組みのさらなる理解へと貢献することが期待されます。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費（挑戦的萌芽研究：15K14535、基盤研究(B)：17KT0021、学術変革 (A)：22H05167、特別研究員奨励費：20J23385、先進ゲノム支援：16H0627)、JST 創発的研究支援事業 (JPMJFR204V)、内藤記念科学振興財団、京阪神グローバル研究リーダー育成コンソーシアム(K-CONNEX)の支援を受けて実施されました。

#### <用語解説>

##### トランスクリプトーム

細胞がゲノムにコードされる遺伝情報を利用する際には転写によって RNA へと変換される必要がある。この転写によって作られる RNA の全体的なパターンや量の総体をトランスクリプトームという。ある個体においてゲノムは細胞間で基本的に同一であるが、トランスクリプトームは細胞の種類や環境によって異なっており、それが細胞の機能や特性の違いの基盤になっている。また、細胞内の全 RNA を網羅的に解析する手法をトランスクリプトーム解析という。

##### 三胚葉分化

細胞が特定の機能を示す多様な細胞へと変化することを分化という。動物発生においては一つの受精卵が分裂によって細胞の数を増やしたのち、細胞は三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）のいずれかに分化する。その後、外胚葉は主に表皮や神経系、中胚葉は筋肉や血球系、内胚葉は消化器系を形成する。

##### 形態形成

一つの受精卵が分裂により細胞の数を増やしなが、各生物に固有の形を作り上げていく過程全般のこと。初めの卵割を進めている段階では胚は単純な組織構造を示すが、その後細胞分化を伴いながら細胞が特徴的な振る舞いを示すようになり、それが細胞集団として協調することによって複雑な三次元的構造が形作られる。

##### 1 細胞 RNA-seq

サンプル中に存在する RNA を DNA に逆転写し、その配列を DNA シーケンサーによって決定することで、RNA の種類や量を定量的に解析する手法を RNA-seq（シーケンシング）という。そのうち、単一細胞をサンプルとして RNA-seq 解析を実施することを特に 1 細胞 RNA-seq という。

##### トリプシン

唾液に含まれる消化酵素の一種でタンパク質を分解する。細胞間接着や細胞-基質間の接着を剥がす目的で生物学的実験によく用いられる。

##### クラスタリング解析

データ解析手法の一つで、データを似た特徴を持つグループに分ける手法の総称。データの関係性を理解するために役立つ。

## アノテーション

データに対してラベルや注釈を付ける作業のこと。

## モルフォゲン

組織中の局所の細胞が発現・分泌し、その発生源から形成される濃度勾配によって周辺の細胞の分化や形態形成を制御するシグナル因子のこと。モルフォゲンを受け取った細胞は、その濃度に応じて異なる細胞へ分化し、固有の振る舞いを示すと考えられている。その濃度勾配が組織中でどのように形成されるのか、また細胞がどのように濃度勾配を認識しているのか、などその仕組みについては未だ不明な点も多い。

## 転写因子

DNA に結合して遺伝子の発現を制御するタンパク質のこと。この転写因子群の協調的作用によって、細胞に固有のトランスクリプトームが形成されると考えられている。

## <研究者のコメント>

一つの受精卵から生物の身体が作られる実に驚くべき過程は、自然が生み出した巧妙な仕組みによって制御されています。その仕組みを解き明かしていくのはとても心躍る試みです。本成果はそんな研究の基盤となるものであり、今後、本成果を利用した研究が新たな知見をもたらしてくれることに期待しています。(坂口)

## <論文タイトルと著者>

タイトル：Single-cell transcriptome atlas of *Drosophila* gastrula 2.0

(ショウジョウバエ原腸胚の1細胞トランスクリプトームアトラス 2.0)

著者：坂口峻太、水野苑子、大河内康史、種子島千春、西村理、上村匡、門田満隆、本田直樹、近藤武史

掲載誌：Cell Reports DOI：10.1016/j.celrep.2023.112707