

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	坂口 峻太
論文題目	ショウジョウバエ原腸胚における1細胞トランスクリプトームとその細胞間差異		
(論文内容の要旨)			
<p>多くの動物の胚発生では、まずモルフォゲン勾配や細胞間相互作用によって体軸に沿った位置情報が形成され、細胞はその位置情報に応じて運命を決定し、特定の振る舞いや機能を示すことで個体発生が進行する。この位置情報に応じて細胞運命を決定する機構は古くから研究の対象とされ、遺伝学的な解析により関与する多くの遺伝子が同定されてきた。そして、位置情報に応じて細胞ごとに発現・機能する転写因子の組み合わせが決まり、その下流で固有のトランスクリプトームを確立することで細胞の振る舞いが制御されると考えられている。しかし、これまでの多くは研究では限られた数の遺伝子による理解に留まっており、ゲノムワイドな理解には至っていない。</p> <p>申請者はこの課題に挑むために、ショウジョウバエ原腸胚をモデルとし、1細胞RNA-seq技術を用いた研究を行なった。ショウジョウバエ胚ではモルフォゲンによって前後軸および背腹軸に沿った位置情報が形成され、原腸胚はおよそ6,000の細胞がそれぞれ位置に応じて異なる運命を獲得した発生段階に相当する。申請者はまず、1細胞RNA-seqの条件検討を進め、原腸胚を構成する6,118細胞の1細胞RNA-seqデータを取得し、mRNA発現プロファイルのみから77のサブクラスターに分類できること、各サブクラスターは胚空間位置に対応することを示した。そして、このデータセットを用いたバイアスのないデータ解析から、転写因子遺伝子群の発現プロファイルよりも、細胞膜関連遺伝子群の発現プロファイルの方がより正確に細胞の三胚葉分化の状態を反映していることを明らかにした。このことは、転写因子群の発現と細胞膜関連遺伝子群の発現の間の非線形な変換が作用していることを示唆する。また、二つの隣接する細胞運命の中間的な状態の遺伝子発現を示す細胞が存在することも明らかにした。さらに、ショウジョウバエ胚の前方を規定するモルフォゲンである<i>bicoid</i>の機能を欠失した胚の1細胞RNA-seq解析により、前方細胞がトランスクリプトームレベルで後方化していることを明らかにした。</p> <p>1細胞RNA-seqでは胚から細胞を解離するため、各細胞の位置情報は失われてしまう。そこで、申請者は共同研究により計算手法を開発し、本論文では新たに取得したデータをこの手法に適用することでこれまでよりも正確に全遺伝子の空間発現パターンを再構成することに成功した。また、胚全体の空間再構成と並行して、ショウジョウバエ胚の擬体節を構成する8細胞列単位の遺伝子発現の繰り返しパターンの再構成にも成功した。それにより、隣接する細胞列間では合計で52遺伝子が顕著な発現差異を示すことが明らかになった。</p> <p>以上の結果から、申請者はショウジョウバエ原腸胚の1細胞遺伝子発現をトランスクリプトームレベルで明らかにし、その細胞間差異に転写因子に加えて細胞膜関連遺伝子の寄与が大きいことを見出した。そして、連続的な位置情報に応じた転写因子の組み合わせパターンから、離散的な細胞運命パターンに対応した細胞膜関連遺伝子の発現プロファイルが形成され、それを基盤にした細胞間コミュニケーションを介して細胞の振る舞いや機能を制御しているモデルを考察した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

動物胚発生において、モルフォゲンによって位置情報が形成され、細胞が特定の運命を獲得することはよく知られている。しかしながら、多くの研究は限られた遺伝子に焦点を当てた解析にとどまっておき、未だゲノムワイドな視点から理解がされているとは言い難い。申請者はモルフォゲン勾配による位置情報形成・細胞運命決定機構がよく調べられているショウジョウバエ原腸胚をモデルとして、その過程をゲノムワイドなバイアスのない解析から理解することを試みた。

本研究では、1細胞RNA-seq技術により胚の各細胞のトランスクリプトームを取得している。申請者はより精度の高いデータを取得するために手法の改良を行い、細胞解離にトリプシンを用いた場合にはNotchシグナル標的遺伝子の発現が人為的に亢進してしまうこと、低温活性プロテアーゼによってこの遺伝子発現の人為的な変化を回避できることを示した。これは1細胞RNA-seqを実行する際の細胞解離手法の重要性を示すものである。

次に、申請者は取得した1細胞RNA-seqデータを用いたバイアスのない解析を進めた。そして、転写因子の発現プロファイルよりも、細胞膜関連遺伝子の発現プロファイルの方がより正確に細胞の三胚葉分化の状態を反映していることを提唱した。この申請者の結論の妥当性と、申請者が見出した細胞膜関連遺伝子の発現プロファイルから原腸胚での細胞の振る舞いを説明し得るのかを議論した。一般的に、転写因子の発現組み合わせによって細胞運命が決定すると考えられている。しかし本研究の結果は、少なくともショウジョウバエ原腸胚においては、転写因子をコードする遺伝子のmRNAプロファイルのみでは細胞分化状態を把握する上で限界があることを示しており、従来の考えに再考の余地を与える重要な知見と言える。

また、モルフォゲン勾配が乱れた胚では細胞が本来とは異なる運命へと転換してしまうことが知られている。しかし、そのような運命転換は限られた遺伝子の発現パターンや細胞・組織の形態形成パターンを元に調べられていることがほとんどであり、トランスクリプトームのレベルでどの程度転換しているのかは明らかになっていない。そこで申請者はショウジョウバエ胚の前方を規定するモルフォゲン*bicoid*の機能を欠失した胚の1細胞RNA-seq解析を行い、前方細胞がトランスクリプトームレベルで完全に後方化していることを示した。このことは発生における遺伝子プログラムでは、細胞はトランスクリプトームのレベルで、野生型に存在するいずれかの細胞運命に行き着くように設計されていることを示唆するものである。

さらに、申請者は新たに取得したデータを用いて正確性の高い、1細胞レベルの空間トランスクリプトームの再構成にも成功した。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、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、今後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る。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、発生生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい手法や概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和5年7月11日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日