

氏 名 Kandasamy, Ramasamy

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2199 号

学位授与の日付 2020 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Single-cell transcriptome analysis of mouse somatosensory
cortex during postnatal circuit refinement

論文審査委員 主 査 教授 平田 たつみ

教授 木村 暁

教授 中村 保一

准教授 小出 剛

部長 中岡 博史

公益財団法人佐々木研究所 附属佐々木研究所

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full

Kandasamy, Ramasamy

Title

Single-cell transcriptome analysis of mouse somatosensory cortex during postnatal circuit refinement

Summary:

Proper functioning of the mammalian cerebral cortex requires precise interconnection of neurons. This precise interconnection arises through neural activity-dependent refinement in the postnatal stages. The molecular mechanisms of activity-dependent refinement are not well understood.

The layer 4 (L4) excitatory neuron in the mouse somatosensory cortex is a widely used model to understand molecular mechanisms involved in activity-dependent circuit refinement. In mice, the whiskers, which are hair-like tactile sensory organs, form a topographic map in L4 of the somatosensory cortex, known as the barrel map. L4 excitatory neurons form a barrel-like structure and receive inputs from thalamocortical axons (TCAs), which occupy the barrel hollow. The barrel structures arise during the first postnatal week through an activity-dependent refinement process. Gene expression profiling is a promising approach for identifying candidate genes for molecular mechanisms of L4 neuron circuit refinement.

L4 neurons in the mouse somatosensory cortex comprise of two morphologically distinct subtypes, namely spiny stellate (SS) neurons and star pyramid (SP) neurons. SS neurons exhibit asymmetric basal dendritic orientation to confine their dendrites to one barrel, while SP neurons do not necessarily confine their dendrites to one barrel. This basal dendritic property of SS neurons arises during the first postnatal week through an activity-dependent refinement process. However, these two cell types are distinguished

only by the absence and presence of an apical dendrite, respectively, and nothing is known about the molecular differences between these two cell types. Even within SS neurons, those located on the edge of barrels (eSS neurons) show higher dendritic dynamics as compared to those located in the barrel center (cSS neurons). Given that different cell types exhibit varied response to activity, gene expression profiling at the level of individual cell types would give better insight to molecules that regulate barrel formation and development of dendritic orientation. To do this, in this study, I used single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) to identify cell types in L4 neurons and examine transcriptomic variation across cell types and between early (P4) and late phase (P7) of circuit refinement.

I labeled L4 neurons by in utero electroporation (IUE) at embryonic day 14.5 (E14.5) of red fluorescent protein (RFP). The embryos were let to develop, and single-cell samples were prepared at postnatal day 4 (P4) and P7. I accurately punched and obtained the barrel region, by using TCA-green fluorescent protein (GFP) mice, which express GFP in TCAs and thus aid in visualizing the barrel map. The punched tissue was dissociated, and RFP-labeled cells were obtained by fluorescence-assisted cell sorting and single-cell libraries were prepared. Following sequencing and alignment of reads, gene expression matrix was obtained. I performed clustering and identified neuronal clusters. There were 862 neurons out of 1,141 total cells at P4, and 263 neurons out of a total of 710 cells at P7. All the neurons from both P4 and P7 samples were identified as upper layer neurons (L4 or L2/3) based on *Cux1* expression.

A second step of clustering was performed to identify subtypes within neurons. Four clusters (P4A to P4D) were identified. Based on *Rorb* expression and data from previous transcriptomic analysis (Fertuzinhos et al., 2014), I identified P4A and P4B as L4 and P4C and P4D as L2/3 neurons. Four clusters (P7E-P7H) were identified at P7. P7E was identified as L4 and the other three were identified as L2/3 neurons. At P7, L4 neurons were clustered to only one cluster (P7E), which may be implied by the low sample size

at P7. By trajectory analysis I found that P4A and P7E are along one lineage and P4B belongs to a distinct lineage.

Gene expression analysis revealed that genes involved in ubiquitin proteasome system (UPS), genes involved in ATP synthesis and genes involved in regulation of mRNA are differentially expressed between subtypes of L4 neurons at P4. UPS plays important role in plasticity-related mechanism. Upregulation of UPS in P4A suggests P4A could be more plastic than P4B and would exhibit activity-dependent developmental changes. On the other hand, analysis between clusters P4A vs P7E and P4B vs P7E has identified genes that exhibit temporal dynamics during L4 neuron circuit maturation. I found that several genes encoding ribosomal subunits are upregulated at P4, which may correlate with higher demand for protein synthesis during neurite outgrowth. Genes related to calcium signaling, axon transport and synaptic vesicle release showed higher expression at P7.

Thus, in this study, I identified differentially expressed genes across cell types (P4A vs P4B) and across developmental stage (P4A vs P7E) which could be important candidate genes for molecular mechanism behind circuit refinement in barrel cortex. Moreover, for the first time this study has identified molecularly defined subtypes within L4 excitatory neurons at P4.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 Kandasamy, Ramasamy

論文題目 Single-cell transcriptome analysis of mouse somatosensory cortex during postnatal circuit refinement

マウス大脳皮質の体性感覚野には、バレルとよばれる特徴的な組織学的構造が存在する。口吻の洞毛 1 本 1 本に対応した情報処理を可能にする構造的基盤であり、生後の発達期に神経活動依存的に形成される。Kandasamy さんは、バレルが形成される際の分子機構を探る目的で、バレル入力の受け手となる体性感覚野の第 4 層の神経細胞の単一細胞転写産物解析を行った。

体性感覚野の第 4 層神経細胞は、生後 4 日目 (P4) から 7 日目 (P7) の間に劇的な形態変化をとげ、バレルに沿った配置や樹状突起の配向を獲得する。Kandasamy さんは、P4 と P7 のマウスから体性感覚野の第 4 層神経細胞を単離した。具体的には、子宮内エレクトロポレーションにより第 4 層神経細胞の核を選択的に RFP 標識し、TCA-GFP マウスを用いてバレル野を可視化することで領野特異的な組織の採取を行った。セルソーターを用いて RFP 陽性細胞を分取することで、最終的に P4 ステージから 862 個の、P7 ステージから 263 個の神経細胞の転写産物データを取得した。

Kandasamy さんは、得られたデータを用いて、まず細胞のクラスター解析を行った。上記の細胞調製法では、第 4 層神経細胞に加えて 2/3 層の神経細胞も一部混入する。Kandasamy さんは、第 4 層特異的マーカーである ROR β 遺伝子や先行研究で報告されている層特異的遺伝子の発現を指標にして、第 4 層神経細胞と 2/3 層神経細胞のクラスターの分離を行った。その上で第 4 層に属すると思われるクラスターを解析した。その結果、P4 ステージでは第 4 層の神経細胞が 2 つのクラスター (P4A、P4B) に分離されることを見出した。一方の P7 ステージでは、第 4 層神経細胞のクラスターは 1 つであった (P7E)。これらの細胞集団の分化経路推定を行ったところ、P4A が P7E の直接の前駆集団であることが示唆された。

体性感覚野の第 4 層には、形態や入力の異なる spiny stellate と star pyramid とよばれる二種類の神経細胞サブタイプが存在する。さらに spiny stellate の中でも、バレルにおける位置の違いにより樹状突起の動態が異なるサブタイプに分類できることが知られている。しかしこれまで、これらのサブタイプ間における遺伝子発現の違いは知られていない。Kandasamy さんによるクラスター解析の結果は、第 4 層神経細胞が、遺伝子発現状態の異なる細胞のグループに分かれることを示唆する初めての発見である。

P4 と P7 で見つかった合計 3 つの第 4 層神経細胞クラスターの間で、発現量の

異なる遺伝子群 (DEGs) とそれに関連するネットワークを検索した。その結果、P4A 細胞集団ではユビキチンプロテオソーム系や ATP 合成系の遺伝子の発現が増加しており、これらが P4B 集団との違いを説明すると考えられた。また、P4A や P4B に比較して、P7E ではリボソーム構成因子の発現が減少し、Ca シグナルやシナプス伝達関連の遺伝子発現量が上昇していた。この時期に起きる神経活動依存的な神経細胞の形態変化を考える上で興味深い結果である。

以上のように、Kandasamy さんは、マウス体性感覚野の第 4 層神経細胞に特化した単一細胞転写産物解析を世界に先駆けて行い、多くの新規知見を得た。今後バレル発達の分子機構を探る上でも重要な示唆を与えるものであり、遺伝学専攻の博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。