

3次元尾芽胚モデルの構築とラマン顕微分光法による
ホヤ胚形態形成過程の解析

2013年度

中村 允

主 論 文 要 旨

報告番号	○甲乙第	号	氏名	中村 允
主論文題目： 3次元尾芽胚モデルの構築とラマン顕微分光法による ホヤ胚形態形成過程の解析				
(内容の要旨) 尾索動物ホヤの尾芽胚は脊索動物固有の体制を備えている。従って、ホヤ尾芽胚の形態形成メカニズムの理解は、脊索動物に固有の体制がどのように形成されるかを解明する手掛かりになる。ホヤ胚は細胞数が少なく、構造は単純であるため、全構成細胞の数・形態・配列といった解剖学的情報、および分化状態の情報の取得は比較的容易である。しかしながら、これまで尾芽胚の1細胞レベルでの解剖学的情報を取得した報告はなかった。また分化状態の識別に用いる既存手法には、同定に用いる分子の発現時期や領域に依存すること、また同時に識別できる組織数が限られること等の問題点があった。一方、形態形成メカニズムを分子レベルで理解する上では胚内の分子組成や分布の情報が重要である。特に小分子化合物は標識が困難なため、胚内の分布を標識しないで可視化する手法が求められる。以上のような背景から、本論文ではホヤ胚の形態形成過程を解析する上で有用な、尾芽胚の解剖学的情報と、各発生段階にある胚の分化状態、そして胚内の分子組成・分布に関する情報をイメージング手法により取得・可視化することを目的とした。 第1章では、形態形成過程を研究する上でのホヤ胚の利点と従来研究をまとめ、3次元胚の構築およびラマン顕微分光法の知見について記し、最後に本論文の目的と構成を説明した。 第2章では、共焦点顕微鏡画像からカタユウレイボヤ尾芽胚の3次元的な形態を反映した3D virtual mid-tailbud embryo (3DVMTE) を構築し、ホヤ尾芽胚に関する解剖学的情報を網羅的に取得・解析したことを報告した。これにより野生型ホヤ尾芽胚各組織の細胞数が初めて判明した。また胚の3次元的な解剖学的特徴が1細胞レベルで明らかになり、カタユウレイボヤでは従来報告のなかった細胞群を、体幹側および尾部側に1群ずつ見出した。加えて細胞系譜情報と解剖学的情報を対応付けるために3D PDF形式の3DVMTEを構築し、胚を構成する約1500細胞全てに対してこれらの情報を記載した。 第3章では、ラマン顕微分光法を用いた細胞分化状態の可視化と胚内の分子組成・分布の検出について報告した。ホヤ胚から取得したラマンスペクトルの解析から、分子組成が組織間で異なる様子を明らかにした。さらにスペクトルの違いから、1002 cm ⁻¹ と1526 cm ⁻¹ のそれぞれのラマンバンドに注目することで、尾芽胚期までの筋肉および内胚葉それぞれの位置と形を非標識で可視化することに成功した。これらの組織の識別に寄与した要素（細胞小器官や分子種）を推定し、カロテノイドおよびレチノイドの胚内分布をラマン顕微分光法により可視化できることを示唆した。また細胞分化過程において、未分化細胞から分裂した2つの娘細胞の内、筋肉または内胚葉へ分化した娘細胞を、もう一方の別の分化運命をたどる娘細胞から識別することに成功した。 第4章は総括で、本研究成果である3次元胚モデルの構築およびラマン顕微分光法による、尾芽胚の形作りを含むホヤ胚の発生メカニズムについてまとめ、将来どのような解析が可能であるか議論した。さらにこれらの手法の課題と改善点について考察した。 第5章では本論文の結言を述べた。				
				以上

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name NAKAMURA, Mitsuru
Title Analysis of morphogenesis in ascidian embryo with construction of three dimensional virtual mid-tailbud embryo model and Raman spectroscopic method		
Abstract <p>The ascidian tailbud embryo has conserved characteristics of Chordata. Understanding morphogenetic mechanisms of ascidian tailbud would lead to key insights into chordate developmental mechanisms. The simple structure and a remarkably small cell number of the embryo can be made an anatomical atlas embedding anatomical information (cell number, three dimensional (3D) morphology and arrangement), and information about differentiated state of all constituent cells at single-cell level. However, no such atlas exists at present. Furthermore, conventional methods to identify the cell types have limits for usable period and region, and the number of tissues visualized simultaneously. In addition, it is important to visualize the distribution of small chemical compounds, which are difficult to label, because the composition and distribution of small chemical compounds within the embryo also influenced on the embryo morphogenesis. The purpose of this dissertation is to acquire the comprehensive anatomical information about single-cell level of mid-tailbud ascidian embryo, and to visualize the cell types, molecular distribution and molecular composition such as small chemical compounds in the embryo by using imaging methods for understanding the morphogenetic mechanisms of <i>Ciona</i> embryo.</p> <p>Chapter 1 introduces advantages and summary of previous works for study of morphogenesis in the ascidian embryo, construction of 3D embryo model, and application of Raman spectroscopy for biological fields. And the aim and composition of this dissertation were described at the end of this chapter.</p> <p>Chapter 2 describes the study about construction of the 3D atlas called 3D virtual mid-tailbud embryo (3DVMTE) with 3D computer modeling technology from real images of confocal laser scanning microscope (CLSM), and analysis of the anatomical information of 3DVMTE. Based on 3DVMTE, cell number of each tissue in tailbud embryo was revealed for the first time. Moreover, the anatomical features were described at single-cell level, and two populations of cells previously undefined in <i>Ciona</i> were identified. Then, to promote the understanding of morphogenetic mechanisms of ascidian tailbud, information of cell lineage and anatomical ontology was manually embedded to 1579 embryonic cells in the 3DVMTE in 3D PDF file.</p> <p>Chapter 3 describes the study about application of Raman spectroscopy for visualization of the cell types, molecular composition and molecular distribution in the <i>Ciona</i> embryo at different developmental stages. Analysis of Raman spectra scattered from embryos revealed differences of molecular composition between tissues. The location and structure of differentiated muscle and endoderm, up to the tailbud stage, was identified in a label-free manner by focusing on the Raman bands at 1002 or 1526 cm^{-1}. Tentative assignment of Raman bands which had represented high Raman intensity in these tissues was performed and suggested that the distribution of carotenoids and retinoids within the embryo could be visualized with Raman spectroscopic method. Furthermore, the differences between daughter cells with muscle/endoderm fate and daughter cells with other fates during differentiation were detected in label-free manner.</p> <p>Chapter 4 discusses the future analysis for understanding the developmental mechanisms with 3D embryo model and Raman spectroscopic methods. In addition, it was also proposed the future improvement for these two methods referring recent studies.</p> <p>Chapter 5 gives the conclusions of this dissertation.</p>		