

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

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

学位論文 博士（理学）

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

慶應義塾大学大学院理工学研究科

中村 允

目次

略語表 iv

第1章 緒言.....1

- 1.1 尾索動物ホヤを用いた形態形成過程の研究について 1
 - 1.1.1 脊索動物の形態形成過程を研究する上でのモデル生物 1
 - 1.1.2 系統学上の位置づけと幼生の体制 2
 - 1.1.3 形態形成過程を研究する上で有利な特徴 2
 - 1.1.4 形態形成過程の概要 4
- 1.2 本論文で用いたイメージング手法について 5
 - 1.2.1 本論文で注目した問題点 5
 - 1.2.2 3次元的な解剖学的情報の取得：3次元モデルの構築 5
 - 1.2.3 細胞の分化状態に関する情報の取得：ラマン顕微分光法 7
 - 1.2.4 分子組成・分布情報の取得：ラマン顕微分光法 7
- 1.3 本論文の目的 9
- 1.4 本論文の構成 9
- 第1章の参考文献 28

第2章 コンピュータ・モデリングによる3次元中期尾芽胚モデルの構築と解剖学的特徴の記載.....35

- 2.1 はじめに 35
- 2.2 実験方法 35
 - 2.2.1 カタユウレイボヤ中期尾芽胚共焦点顕微鏡画像の取得 35
 - 2.2.2 3次元形態情報を反映した3DVMTEと3D PDFの構築 36
- 2.3 実験結果および考察 37
 - 2.3.1 3DVMTEの作製と、各組織の細胞数および系譜情報の付加 37
 - 2.3.2 各組織の解剖学的特徴の記載 39
 - 2.3.3 3DVMTEは脊索動物の尾芽胚形成過程の解明に役立つ 46
- 2.4 第2章のまとめ 47

第2章の参考文献	63
第3章 ラマン顕微分光法による細胞分化状態の可視化およびホヤ胚内の分子組成・分布の検出.....	69
3.1 はじめに	69
3.2 実験方法	69
3.2.1 カタユウレイボヤ胚の準備	69
3.2.2 ラマン顕微鏡の条件	70
3.2.3 ラマンスペクトルおよびラマンマップの解析	71
3.3 実験結果および考察	71
3.3.1 ホヤ胚内における分子組成・分布の検出	71
3.3.2 筋肉および内胚葉の非標識での識別と分子の推定	73
3.3.3 細胞分化過程における細胞間の分化状態の定量的な識別	75
3.3.4 ラマン顕微分光法は発生生物学にとって有用な手法である	76
3.4 第3章のまとめ	77
第3章の参考文献	90
第4章 本研究で得られた知見に関する考察.....	95
4.1 結果のまとめ	95
4.2 3次元中期尾芽胚モデルを用いた今後の研究の展望	96
4.2.1 新たに報告した解剖学的特徴の形成過程の解明	96
4.2.2 野生胚の標準データとしての利用	97
4.2.3 定量的な解剖学的情報を用いた形態形成メカニズムの解析	98
4.2.4 3次元胚モデルの構築について改善が望まれる点	100
4.2.5 まとめ	101
4.3 ラマン顕微分光法を用いた今後の研究の展望	101
4.3.1 細胞分化状態を非標識で識別できる新規手法としての応用	101
4.3.2 分子組成・分布の観察による細胞分化メカニズムの解析	102
4.3.3 標識困難な分子の形態形成過程に対する影響の解析	103
4.3.4 ラマン顕微分光法について改善が望まれる点	105
4.3.5 まとめ	107
第4章の参考文献	114
第5章 結言.....	123

公刊論文目録および口頭発表目録
謝辞

略語表

3D	three-dimensional
3dve	3D virtual embryo
3DVMTE	3D virtual mid-tailbud embryo
BS	brain stem
CAB	centrosome-attracting body
CNS	central nervous system
Endo	endoderm
ES	endodermal strand
Epi	epidermis
Mes	mesenchyme
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Mus	muscle
Not	notochord
NT	caudal neural tube
OSP	oral siphon primordium
PBS	phosphate buffered saline
PDF	portable document format
PG	primordial germ cells
SV	sensory vesicle
T/H	the ratio of tail to head length
TLCs	trunk lateral cells
TVCs	trunk ventral cells
VG	visceral ganglion

第1章 緒言

1.1 尾索動物ホヤを用いた形態形成過程の研究について

1.1.1 脊索動物の形態形成過程を研究する上でのモデル生物

動物胚の個体発生では、胚を構成する多数の細胞が協調して組織や胚全体の構造を形作る。そのため構成細胞の分裂、形態変化、移動といった振る舞いを制御するメカニズムについて研究することで、生物の形態が形成される過程、すなわち形態形成過程の理解が深まる。メカニズムを解析するに当たり、各細胞の遺伝子プロファイルや発現分子の情報に加え、解剖学的特徴についての情報が必要である。すなわち、組織や胚を構成する細胞の「数」、「形態」、「配列」についての情報である。また動物胚には複数の組織細胞が存在するため、各細胞の「分化状態」についての情報が役に立つ。以上の情報を取得することで、どのような細胞集団により注目する構造の形態が形成されているのか把握することができる。

新口動物上門を形成する動物のうち（図 1.1）、我々ヒトを含む脊索動物門に分類される動物は次のような解剖学上の体制（構造）をとり、他の動物と明確に区別できる（図 1.2）（H. ジー, 2001）。

1. 中胚葉由来の脊索は体軸に沿って走る。
2. 神経系は脊索の背中側に沿って存在し、外胚葉が管状にくびれてできる。
3. 肛門より後方に尾部があり、神経索、脊索、および体壁の筋肉はその中に入り込んでいる。
4. 内柱とよばれる、ヨウ素を含んだ化合物に富んだ器官を持つ。
5. 咽頭に開く鰓裂（さいれつ。鰓孔に同じ）を持つ。（なお半索動物ギボシムシもこのような特徴を持つ（Miyamoto and Saito, 2010））

従って、これら脊索動物門に固有の構造が形成される過程を解明することで、新口動物上門に共通の祖先からどのような経緯で脊索動物門が起源し、進化し

たかの理解が深まると期待される。しかし、発生研究のモデル生物であるマウスやゼブラフィッシュは胚を構成する細胞数が多く、構成細胞1つ1つの情報を網羅的に取得することは困難である（マウス胚より細胞数が少ないゼブラフィッシュ胚でさえ、受精後18時間の尾芽胚は約16000細胞から構成される（Keller *et al.*, 2008））。

一方、尾索動物ホヤは胚を構成する細胞数の少なさや構造のシンプルさから、特定の構造や組織に限らず、胚の全構成細胞を対象とした場合でも上記の情報の取得は比較的容易である（第2章の研究で明らかになったが、受精後10.9時間のカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 尾芽胚は約1500細胞から構成される）。従って脊索動物の形態形成過程について1細胞レベルの詳細な解析を行う上で、ホヤ類は非常に良いモデル生物となる。

1.1.2 系統学上の位置づけと幼生の体制

脊索動物門は、頭索動物亜門、尾索動物亜門、脊椎動物亜門から形成されるが、ホヤ類はこの内、146種の核遺伝子（nuclear genes）を用いた分子系統学的な解析から尾索動物亜門に分類される（図1.1）（Delsuc *et al.*, 2006; 佐藤矩行, 1998）。ホヤ類のほとんどの種は孵化後、幼生期を経て変態により成体（図1.1）へと至る。成体のホヤが海底に固着した生活様式をとる一方で、幼生期のホヤはオタマジックシ型幼生として海中を浮遊する。成体では変態時に見られる尾部の退縮と共に脊索や尾部神経系が失われる（従って1.1.1に挙げた体制の**1. 2. 3.**が失われる）が、幼生は脊索動物に固有の体制をとる（図1.2, 1.3）。

1.1.3 形態形成過程を研究する上で有利な特徴

ホヤ胚は脊索動物の形態形成過程を研究する上で有利な特徴を多く有する。サンプルの入手に関して、ホヤ類の一部の種はライフサイクル全体に渡って実験室内で飼育でき、また雌雄同体で、成体1個体から卵および精子を大量に取得できる（ただし異個体の配偶子間でしか受精しない）。

胚発生は母体外で進み、発生速度は速く、カタユウレイボヤでは18°Cで飼育した場合、受精後およそ17.5時間で孵化する（図1.4）（Hotta *et al.*, 2007）。そのため発生過程全体を顕微鏡で観察しやすい。加えて受精卵の大きさはマボヤ (*Halocynthia roretzi*) で約300 μm 、カタユウレイボヤで約150 μm であり、胚は顕微鏡一視野内で全体を捉えるのに好都合なサイズである。またホヤ類の胚は

比較的少数の細胞で構成され（マボヤ幼生の場合は約 2600 細胞（佐藤, 1998））、さらに透明度が高く、全構成細胞について 1 細胞レベルで観察できる。100 年以上前の報告においてすでに発生過程の 1 細胞レベルの詳細なスケッチ（Conklin, 1905）を見ることができ、アルファベットと数字を組み合わせた各構成細胞の命名法も定義されている（図 1.5）。構成細胞の少なさに従って体の構造は他の脊索動物と比べシンプルで、脊椎動物の脊索が数百細胞から構成されるのに対しホヤの脊索は 40 細胞が 1 列に並ぶのみである（Jiang and Smith, 2007）。それにも関わらず、方向付けされた細胞分裂や移動、不等分裂、原腸陥入、尾部の形成および伸長といった脊索動物の体制構築に必要な現象が観察される。以上の特徴を備えたホヤ胚は顕微鏡を用いたイメージング手法との相性がよく、発生過程全体にわたって胚の全ての細胞を観察、解析できる点は、脊索動物の形態形成メカニズムに迫る上でまたとない有利な点である。

ホヤ類の胚は一世紀以上前から個体発生の研究に用いられており、現在までに発生過程に関して多くの知見が蓄積されている。マボヤやカタユウレイボヤといった研究に用いられる代表的なホヤでは構成細胞の発生運命および系譜が詳しく調べられており、個体差は無いと考えられている（Nishida, 2005; Cole and Meinertzhagen, 2004; Nishida 1987; Nishida and Satoh, 1985; Nishida and Satoh, 1983）。カタユウレイボヤの全ゲノム配列は既に解読されており、ゲノムサイズはヒトの約 10 分の 1、遺伝子サイズはヒトの約 2 分の 1 と非常に小さくシンプルである（Dehal *et al.*, 2002）。またゲノム情報に加え発現遺伝子（ANISEED, CINOB1, Ghost）、タンパク質（CIPRO）、細胞形態や胚の形態（ANISEED および FAB）に関するデータベースも運用され、ゲノム情報から胚の形までの異なる階層の情報を統合した研究が行える。さらに長年の研究から遺伝学的、分子生物学的実験を行う上での基盤も整備されており、トランスジェニックラインの作製も可能である（Sasakura, 2007）。

また興味深いことに、現在までの分子生物学の研究から、体節の形成を制御するホメオボックス遺伝子の発現パターン（Swalla, 2006）や、脊索の形成に *Brachyury* 遺伝子が主要な役割を担う点（Nibu *et al.*, 2013; Technau, 2001; Kavka and Green, 1997）、中枢神経系の解剖学的構造と遺伝子発現パターンの対応（Dufour *et al.*, 2006; Aruga, 2004）など、脊索動物に固有の体制の形作りに関わる遺伝子の、役割および発現パターンの種を越えた保存が報告されている。従ってホヤ胚で得られた知見は脊索動物門に固有の体制の形作りを制御する形態形成メカニズムを発見、解析する上で有用なものとして期待できる。

1.1.4 形態形成過程の概要

ここではカタユウレイボヤの発生を例に、ホヤ胚の形態形成過程の概要を記す。カタユウレイボヤは18°Cの海水中で飼育した場合、受精後およそ17.5時間で幼生を形作る（以降、受精後の時間は18°Cで飼育した場合を示す）。幼生に至るまでのカタユウレイボヤの発生段階は、形態的な特徴をもとに26の段階に定義付けされている（Hotta *et al.*, 2007）。ホヤ胚では未受精卵で既に背腹軸が決定しており、受精後におこる卵細胞質分離により頭尾軸、左右軸が決定する。受精後約2時間で2回の細胞分裂がおこり、8細胞期に至る（図1.4: stage 1-4）。その後112細胞期までに各組織への発生運命決定はほぼ完了する（図1.6A-D）。脊索動物の体制形成において主要な役割を果たす脊索細胞への分化も112細胞期までに完了する（図1.4: stage 5-10）（Nishida, 2005）。受精後4.5時間で原腸陥入が開始する。ホヤの発生では新口動物の発生様式は保存されており、原腸陥入の開始点は将来尾（肛門）側に位置し、開始点の対極に位置する点は頭部に位置する（図1.4: stage 11-13）。原腸陥入後は尾部の伸長が進行し、脊索、脊索の背側に位置する中枢神経系、腹側に位置する内胚葉、および脊索を左右から挟む位置にある筋肉といった組織の形成が進む（図1.4: stage 14-16）。受精後11時間が経過すると中期尾芽胚期となり、脊索動物に特徴的な体制の形成はほぼ完了する（図1.4: stage 17-22）（図1.6E-E'）。その後、脊索の空洞化による管形成（Denker and Jiang, 2012）、眼点や末梢神経系の形成（Pasini *et al.*, 2006）が進行し（図1.4: stage 23-25）、受精後およそ17.5時間で遊泳幼生（図1.3）へと至る（図1.4: stage 26）。

脊索動物の特徴が形態に反映される発生段階として器官形成期と呼ばれる時期が知られており、この時期には原腸胚期（図1.4: stage 11-13）、神経胚期（図1.4: Stage 14-16）、尾芽胚期（図1.4: Stage 17-25）が該当する。これまでの研究では、器官形成期にある脊索（図1.6E, 1.6E'', 紫色）、中枢神経系（図1.6E, 1.6E'', 青色および灰色）、筋肉（図1.6E', 1.6E'', 赤色）、そして体幹腹側細胞（図1.6E', 紺色）の形態形成過程について特に研究が進んでいる（図1.7-1.10）。

1.2 本論文で用いたイメージング手法について

1.2.1 本論文で注目した問題点

形態形成過程では胚を構成する多数の細胞が協調して組織や胚全体の構造を形成するが、どのような細胞集団によって形態が形成されているのか把握するためには、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」について情報を取得する必要がある。ホヤ胚ではすでに、原腸陥入直前の112細胞期（図1.4: stage 1-10）までの全構成細胞について詳細な情報が取得されている（ホヤ類の主要なデータベースの1つであるANISEEDに登録されている）。一方で、脊索動物の体制構築にとって重要な原腸陥入期以降の器官形成期（図1.4: stage 11-25）については、胚全体の解剖学的特徴を1細胞レベルで調べた報告は無かった。そのため胚や、表皮および内胚葉といった他と比べ研究が進んでいない組織の細胞「数」、「形態」や「配列」は不明であった。また中枢神経系をはじめ比較的研究が進んだ組織であっても2次元的な観察結果に基づいた報告が主であり、構成細胞の“3次元的な”「形態」や「配列」についての情報は取得されていなかった。このような解剖学的情報の不足に加え、細胞の「分化状態」を識別する手法にもホヤ胚の形態形成過程を解析する上で障害となる問題があった。この問題点については1.2.3において詳しく論じる。

1.2.2 3次元的な解剖学的情報の取得：3次元胚モデルの構築

構成細胞の「数」、「形態」および「配列」といった解剖学的情報を取得するに当たり、胚の3次元的な特徴を反映することが望ましい。Tassyらは2006年になり、コンピュータ・モデリング技術により、共焦点顕微鏡画像からホヤ胚の3次元的な形態を1細胞レベルで反映した“3次元胚モデル (three-dimensional (3D) embryo model)”を構築し、細胞数に加え形態に関する（細胞体積、表面積等、細長さ等の）定量的な情報を取得するソフトウェア (3D virtual embryo, 3dve) を報告した (Tassy *et al.*, 2006)。Tassyらの手法により、各発生段階にある胚の細胞数、細胞・組織・胚の3次元的な形態（体積や表面積等）、各細胞の胚内での位置や配列、組織間の位置的關係といった情報を取得できる（図1.11）。

3次元胚モデルを元に形態形成過程を解析した例に、Sherrardらの例 (Sherrard *et al.*, 2010) がある。SherrardらはTassyらの手法 (Tassy *et al.*, 2006) を用いて

64 細胞期から後期 112 細胞期 (図 1.4: stage 8-10) までの解剖学的情報を取得し、原腸陥入の開始に伴う各細胞の形態変化を定量的に求めることに成功した (図 1.12)。またその際特に植物極側の細胞が円柱状の形態から楔形になる様子に注目し、細胞の長さおよび表面積の変化を定量した (図 1.12B)。そして細胞膜にかかる張力を考慮して原腸陥入のシミュレーションを行い、定量データを再現するようパラメータを設定した結果、ホヤ胚の原腸陥入が内胚葉細胞の形態変化により誘導されることを示唆した (Sherrard *et al.*, 2010)。この例のように、胚の 3 次元解剖学的情報は、胚を構成する各細胞の振る舞いが胚の形態形成に及ぼす影響を解析する上で役立つ。しかしながら、これまでにホヤ胚で報告されている 3 次元胚モデルは後期 112 細胞期 (図 1.4: Stage 10) までであった。そこで本論文では、後期 112 細胞期以降の器官形成期に当たる 3 次元胚モデルを構築し、ホヤ胚まるごと 1 個体分の解剖学的情報を 1 細胞レベルで抽出することにした。

3 次元胚モデルを構築するに当たり、本論文では尾芽胚期 (図 1.4: St. 22) に注目した。尾芽胚期は脊索動物のファイロティピック段階 (phylotypic period/stage) に当たる。ファイロティピック段階とは共通の体制を持つ動物種間で保存された発生段階のことを指し、進化的に保存されているため体制の形成に重要な段階と考えられる (Slack *et al.*, 1993)。Irie と Kuratani は 4 種の脊椎動物胚 (*Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*) に対してトランスクリプトームの比較解析を行い、オルソログ遺伝子の保存度からファイロティピック段階を調べた。その結果、初期、中期、後期発生段階の内、尾芽胚期に当たる中期発生段階の保存度が最も高かった (Irie and Kuratani, 2011)。この結果は、尾芽胚期の形態形成メカニズムに対する進化的拘束が他の発生段階と比べ強く、脊索動物の体制を形作る上で重要な発生段階であることを示唆する。他の脊索動物と同様にホヤ胚においても頭尾軸に沿った脊索および神経管の形成や、脊索・中枢神経系・筋肉を含む尾部の構築など、脊索動物の体制形成は中期尾芽胚期までにほとんど完了する (図 1.4, stage 17-22; 図 1.6)。

野生胚についての 1 細胞レベルの解剖学的情報は、Sherrard らの例 (Sherrard *et al.*, 2010) のように形態形成過程にある胚や細胞の振る舞いについて定量的な解析を行う上で役立つだけでなく、変異胚との比較の際の基準となる。さらに 3 次元観察によりこれまでに報告のない解剖学的特徴の発見が期待でき、ホヤ類を始め脊索動物の尾芽胚形成過程について新たな知見を与えると考えられる。そこで本論文では、野生型カタユレイボヤ中期尾芽胚の 3 次元胚モデルを構築し、解剖学的情報を 1 細胞レベルで取得した。結果については第 2 章に記載する。さらに第 4 章でホヤ尾芽胚の形態形成メカニズムについて今後どのような解析が期待できるか議論し、また 3 次元胚モデル構築の際の課題と改善

点を挙げた。

1.2.3 細胞の分化状態に関する情報の取得：ラマン顕微分光法

ホヤ胚を構成する各細胞の「分化状態（組織）」を同定する際は、組織特異的な抗体や酵素反応の利用、*in situ* ハイブリダイゼーション、組織マーカー遺伝子のプロモーター領域と蛍光タンパクをコードする遺伝子との融合遺伝子の導入などが一般的な手法である。しかしこれらの手法は、同定に用いる分子の発現時期や領域に依存する、蛍光波長の重なり等の理由から同時に識別できる組織の数は限られる、酵素反応や *whole mount in situ hybridization* (WISH) はそれに加え、手軽だが空間分解能が低い等の問題がある。

近年、細胞の分化状態を識別する手法としてラマン顕微分光法が注目されている (Downes *et al.*, 2010)。ラマン顕微分光法では、ラマンスペクトルをもとに推定した分子組成の違いから、低浸襲かつ非標識で細胞の分化状態を識別できる (図 1.13)。また細胞内小器官の構造を識別できる点から空間分解能は十分高く、さらにマーカー遺伝子が発現しない発生段階や領域でも分化状態を識別できる。加えて複数の分化状態を同時に可視化でき、主成分分析 (principle component analysis, PCA) や k-means 法 (k-means cluster analysis, KCA) といった統計学的手法を解析に用いることで、組織間の境界や、発生過程の進行に伴う分化状態の変化を定量的に識別できる (Tan *et al.*, 2012; Chan and Lieu, 2009; Koljenović *et al.*, 2004)。

ここ数年は非標識で分化状態を識別できる利点から幹細胞の分化状態の可視化が数多く報告されている (Pascut *et al.*, 2013; Pliss, *et al.*, 2013; Downes *et al.*, 2011)。また動物体内の観察にラマン顕微鏡を応用した例としては、ショウジョウバエのサナギの変態過程で見られる *fat-body* の分布を可視化した例や、線虫の腸や筋肉といった組織の生体内構造を非標識で同時に可視化し、さらに各領域の分子種を同定した例がある (図 1.14) (Lau *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2011)。ラマン顕微分光法は既存の手法と原理的に異なる細胞分化状態識別手法であり、十分な空間分解能を有し、発生時期に依存せず、また複数の組織細胞を同時に非標識で識別可能な新規手法として期待できる。

1.2.4 分子組成・分布情報の取得：ラマン顕微分光法

ラマン顕微分光法は細胞の分化状態の識別に加え、ラマン散乱光を元に非標

識で生体試料中の分子組成および分布を検出できる (図 1.13)。観察に標識の必要が無いため、小分子化合物を含む複数の分子の分布を、1 度の測定で同時性を保ったまま可視化できる (図 1.14) (Lau *et al.*, 2012)。また共焦点レーザーラマン顕微鏡は 0.5 μm 以下の高い空間分解能を持ち、例えば細胞分裂に伴う細胞内タンパク質や脂質等の量や分布の変化を観察できる (Huang *et al.*, 2011; Hamada *et al.*, 2008)。

形態形成過程は、組織間および細胞内の分子分布を制御することで達成される。例えば 64 細胞期までのホヤ胚を観察すると、植物極側後方の細胞で不等分裂が連続して起こり、胚の形態に影響を与える。不等分裂に関わる細胞分裂面の位置は centrosome attracting body (CAB) と呼ばれるアクチンを多く含む構造体の細胞内での局在を制御することで決まる (Hibino *et al.*, 1998)。また原腸陥入時における内胚葉細胞の形態変化は、胚内のミオシン分子が不均一に分布することで生じた張力の偏りの影響を受けると示唆される (Sherrard *et al.*, 2010)。さらに脊索動物に固有の組織であり、また尾部の伸長に関わる脊索細胞のインターカレーション時に見られる葉状仮足の伸長方向は、隣接する組織細胞からのシグナルによって制御される (Munro and Odell, 2002a)。

生体内分子の胚や細胞内における分布の観察には一般的に標識した分子が用いられる。しかしこの方法では当然のことながら既知分子しか可視化できず、これまで報告にない分子種の分布は観察できない。また (蛍光波長の重なりから) 多くても数種類の分子種しか同時に観察できず、複数の分子に関わる現象を観察できない、もしくは観察する上で工夫が必要であった。加えて、モルフォゲン分子としてホヤ胚の形態形成において重要な働きをする小分子化合物については標識自体が困難であり、生体内での分布の可視化は非常に難しい。例えば retinoids の 1 種である retinoic acid は外胚葉性および内胚葉性組織の正常な発生 (Hinman and Degnan, 1998) や、遺伝子発現および形態形成の制御に関わる (Pasini *et al.*, 2012; Ishibashi *et al.*, 2005; Nagatomo *et al.*, 2003)。そのためモルフォゲン分子として、胚内の濃度分布がどのようにして細胞に位置情報を与えるか関心がもたれてきた (Sobreira *et al.*, 2011; Aulehla and Pourquie, 2010; Koop *et al.*, 2010; White and Shilling, 2008) が、2013 年になりようやくゼブラフィッシュ胚内での分布が可視化された (Shimozono *et al.*, 2013)。

以上のことから、ホヤ胚内や細胞内に存在する分子局在を可視化し局在する分子種を調べるに当たり、ラマン顕微鏡の使用により、従来手法では取得が困難なユニークな情報の取得が期待できる。

1.2.3、1.2.4 で記したように、ラマン顕微分光法は胚を構成する細胞の分化状態の識別、そして形態形成過程について分子レベルでの理解をめざす上で有用

な手法として期待できる。しかしながら発生過程にある動物胚に対して用いた例は少なく、また胚発生中の個体全体を対象に細胞分化状態を識別した報告はなかった。従って、ホヤ胚を対象に細胞分化状態の識別や、分子組成および分布の検出が可能かは不明であった。そこで第3章では、発生過程（2細胞期から尾芽胚期）にあるカタユウレイボヤ胚をラマン顕微鏡で観察し、ラマン顕微分光法のホヤ胚に対する応用可能性を検証した。さらに第4章でホヤ発生の理解を目指す上で今後どのような解析が期待できるか議論し、また胚発生を観察する上でのラマン顕微分光法の課題と改善点を挙げた。

1.3 本論文の目的

以上の様に、脊索動物の形態形成過程について1細胞レベルの詳細な解析を行う上で、尾索動物ホヤは良いモデル生物となる。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細胞分化状態、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。

1.4 本論文の構成

第1章では、ホヤ胚の形態形成を研究する上で有利な点と形態形成過程に関する従来研究についてまとめ、また本論文で用いた3次元胚モデルの構築、およびラマン顕微分光法の原理と知見を記し、最後に本論文の目的と構成について説明した。

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3次元中期尾芽胚モデル（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 portable document format (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1章 緒言

第3章では、ラマン顕微鏡を用いた細胞分化状態の可視化および胚内の分子組成・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、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。

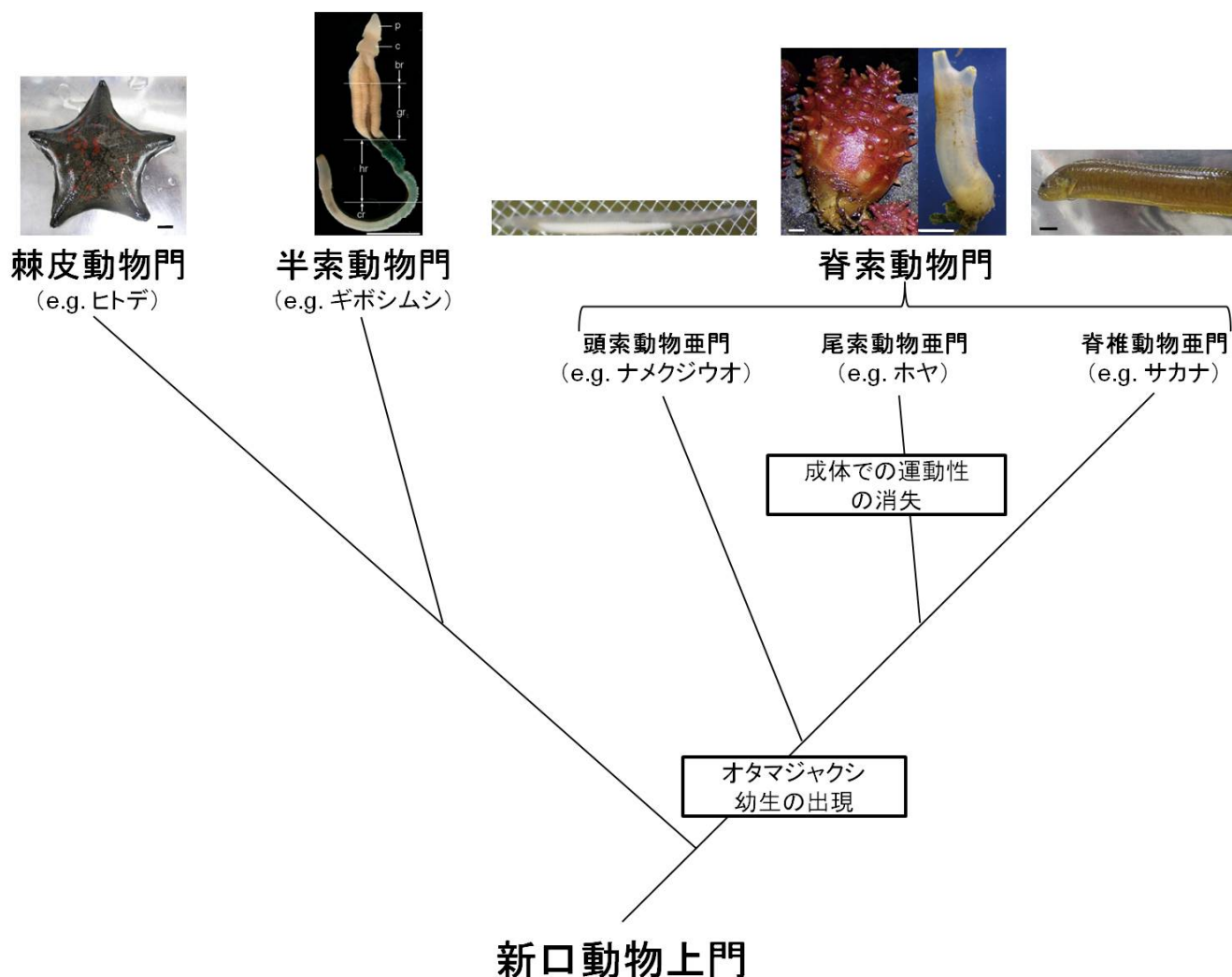


図 1.1 脊索動物の起源と進化

Delsuc ら、佐藤の文献を参考に系統樹を作製した (Delsuc *et al.*, 2006; 佐藤矩行, 1998)。ギボシムシの図は Miyamoto and Saito の論文 (Miyamoto and Saito, 2010)、ホヤの図は Lemaire の論文 (Lemaire, 2009) より抜粋し、一部改変した。写真の生物は左から、イトマキヒトデ (*Patiria pectinifera*)、シモダギボシムシ (*Balanoglossus simodensis*)、ナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*)、マボヤ (*Halocynthia roretzi*)、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*)、ダイナンギンポ (*Dictyosoma burgeri*)。

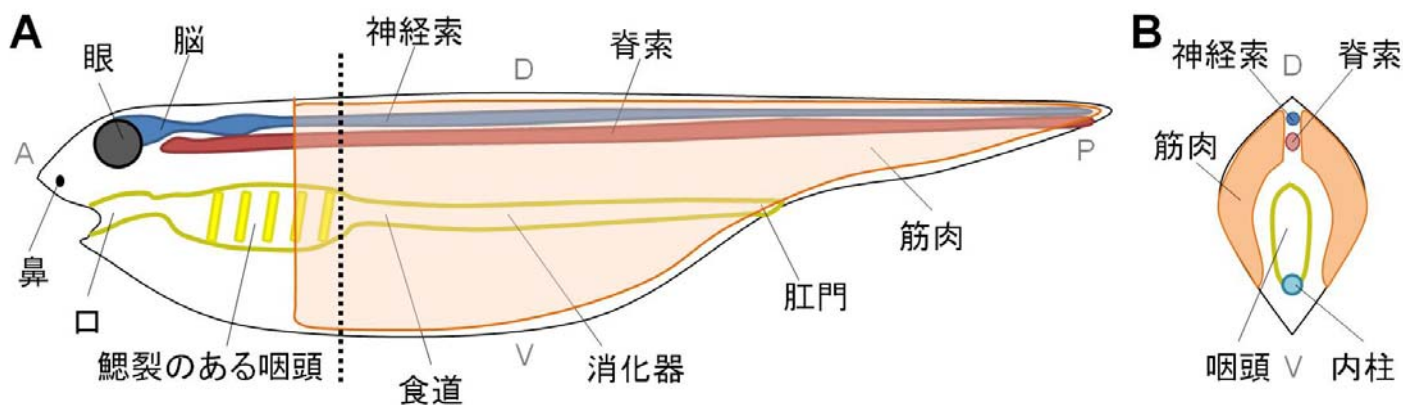


図 1.2 脊索動物の体制を表す模式図

図は H. ジーの文献を参考に作製した (H. ジー, 2001)。図 B は、図 A 内点線での断面図。我々ヒトを含む脊索動物門に分類される動物は上図のような解剖学上の体制をとる。**1.** 中胚葉由来の脊索が体軸に沿って走る。**2.** 神経系は脊索の背中側に沿って存在する。また外胚葉が管状にくびれてできる。**3.** 肛門より後方に尾部があり、神経索、脊索、および体壁の筋肉がその中に入り込んでいる。**4.** 内柱とよばれる、ヨウ素を含んだ化合物に富んだ器官を持つ。**5.** 咽頭を開く鳃裂（さいれつ。鳃孔に同じ）を持つ。

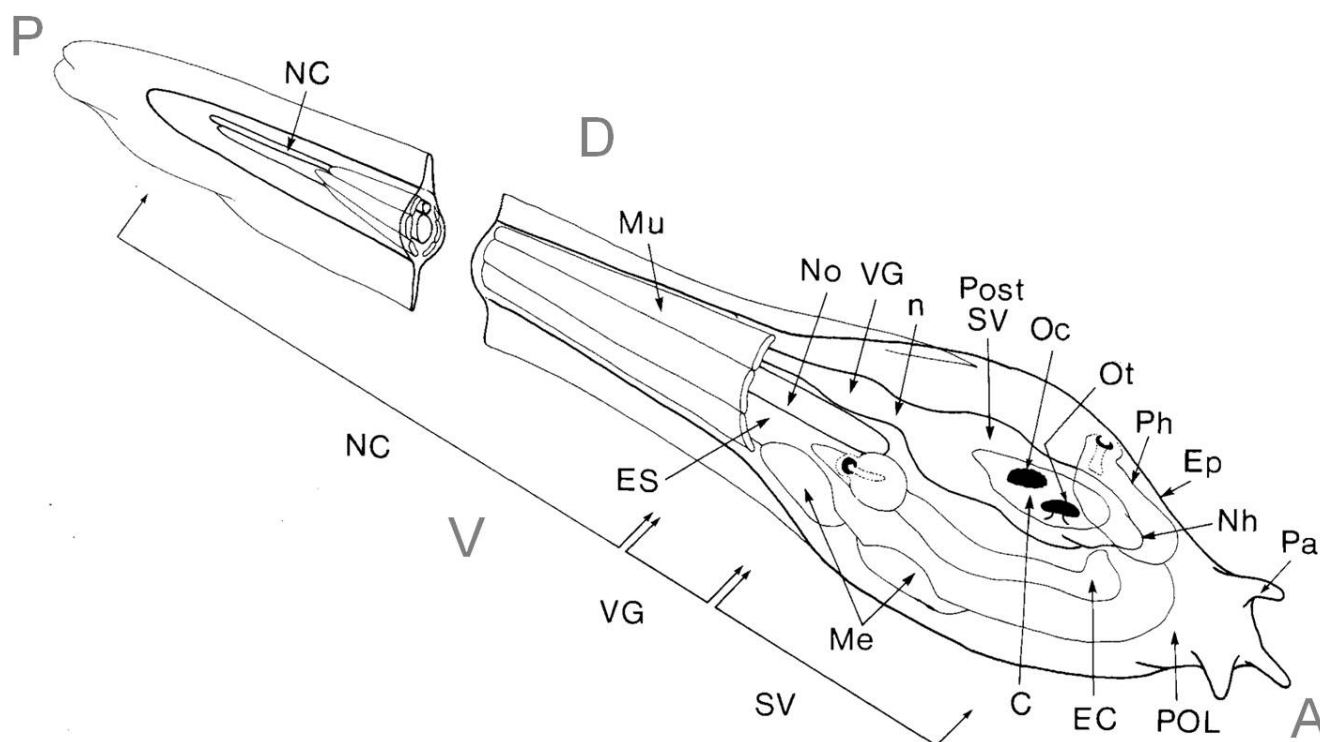


図 1.3 カタユウレイボヤ幼生の体制

図は Nicol と Meinertzhagen の論文 (Nicol and Meinertzhagen, 1991) より抜粋し、一部改変した。脊索 (No) は尾部のみに存在する。尾部中央部が最も太く、頭部および尾部に向けて先細りになる形態は他の脊索動物と同様である (Veeman and Smith, 2013)。また脊索の背側には管状構造をとる中枢神経系 (Nc) があり、脊索 (No)、筋肉 (Mu) および内胚葉索 (Es) と合わせて尾部を形成する。ホヤ幼生の内胚葉細胞は変態後、幼若体の様々な内臓 (内柱、鰓裂の開いた鰓嚢、咽頭部など) へと分化する (Hirano and Nishida, 2000)。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、C, cavity of the sensory vesicle (感覚胞の空所)、EC, endodermal cavity (内胚葉の空所)、Ep, epithelium (上皮)、ES, endodermal strand (内胚葉索)、Me, mesenchyme (間充織)、Mu, muscle band (筋肉)、n, neck (首領域)、NC, nerve cord (神経索)、Nh, neurohypophysis (神経下垂体)、No, notochord (脊索)、VG, visceral ganglion (運動神経節)、Oc, ocellus (光受容器, 眼点)、Ot, otolith (平衡器)、Ph, pharynx (咽頭)、SV, sensory vesicle (感覚胞)、Pa, papilla (付着器)、POL, pre-oral lobe (口前方の突起)





























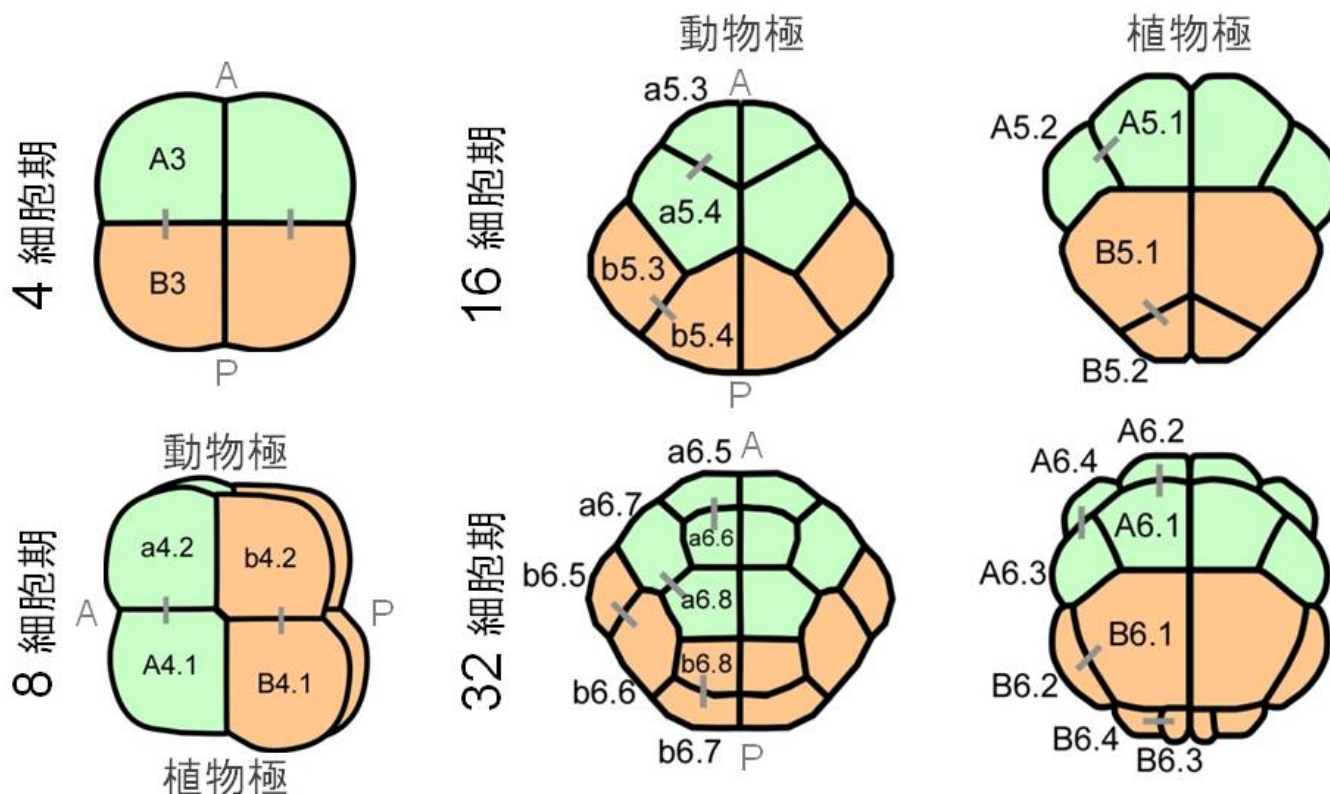
Periods of embryogenesis	Stage Name		Images	22°C	20°C	18°C	16°C
I. Zygote period	St. 1	1 cell		0min	0min	0min	0min
II. Cleavage period	St. 2	2 cell		1hr	1hr	1hr	75min
	St. 3	4 cell		84min	87min	87min	1hr 40min
	St. 4	8 cell		1hr 39min	1hr 51min	1hr 54min	2hr 15min
	St. 5a	early 16 cell		2hr 3min	2hr 15min	2hr 21min	2hr 39min
	St. 5b	late 16 cell		2hr 16min	2hr 33min	2hr 39min	3hr
	St. 6-a	early 32 cell		2hr 36min	2hr 47min	3hr 6min	3hr 27min
	St. 6-b	late 32 cell		2hr 45min	2hr 57min	3hr 12min	3hr 39min
	St. 7	44 cell			3hr 9min	3hr 21min	
	St. 8	64 cell		3hr 27min		4hr	4hr 27min
III. Gastrula Period	St. 9	76 cell		3hr 51min		4hr 12min	4hr 39min
	St. 10	112 cell		3hr 57min	4hr 9min	4hr 33min	5hr 11min
	St. 11	early gastrula		4hr 9min	4hr 21min	4hr 54min	5hr 27min
	St. 12	mid gastrula		4hr 33min	5hr 9min	5hr 39min	6hr 28min
IV. Neurula Period	St. 13	late gastrula		4hr 57min		5hr 55min	7hr 3min
	St. 14	early neurula		5hr 31min	6hr 3min	6hr 21min	7hr 39min
	St. 15	mid neurula		6hr 4min	6hr 27min	6hr 48min	8hr 35min
V. Tailbud Period	St. 16	late neurula		6hr 25min	7hr 3min	7hr 24min	9hr 51min
	St. 17	initial tailbud I		6hr 52min	7hr 55min	8hr 27min	10hr 27min
	St. 18	initial tailbud II		7hr 31min	8hr 27min	8hr 50min	10hr 51min
	St. 19	early tailbud I		7hr 40min	8hr 45min	9hr 19min	11hr 15min
	St. 20	early tailbud II		8hr 6min	9hr 3min	9hr 30min	11hr 39min
	St. 21	mid tailbud I		8hr 46min	9hr 33min	10hr 2min	12hr 15min
	St. 22	mid tailbud II		9hr 29min	9hr 57min	10hr 54min	13hr 3min
	St. 23	late tailbud I		10hr 11min	10hr 45min	11hr 54min	14hr
	St. 24	late tailbud II		11hr 23min	12hr 4min	13hr 27min	16hr 27min
VI. Larva Period	St. 25	late tailbud III		12hr 23min	14hr 5min	15hr 54min	19hr 3min
	St. 26	hatching larva		13hr 35min	15hr 39min	17hr 30min	22hr

図 1.4 カタユウレイボヤ幼生の発生過程

図は FABA データベース (Hotta *et al.*, 2007) から取得し、一部改変した。



アルファベット(A, a, B, b)

“A, a”・・・4細胞期において胚の前方に位置した細胞に由来する(黄緑色)

“B, b”・・・4細胞期において胚の後方に位置した細胞に由来する(オレンジ色)

大文字と小文字・・・8細胞期において胚の植物極側もしくは動物極側に位置した細胞に由来する

数字(O, Δ)

“O”・・・分裂後、娘細胞は母細胞の数字に+1する

“Δ”・・・分裂後、娘細胞は母細胞の数字に×2(前方側)もしくは×2-1(後方側)する

例:(母細胞)A5.2->(娘細胞)A6.3, A6.4

図 1.5 ホヤ胚における構成細胞の命名法

ホヤ胚において、構成細胞の名前はアルファベットと数字の組み合わせにより表される。細胞境界にまたがる灰色の線は、同一母細胞より分裂した娘細胞ペアを示す。4細胞期の図は胚を動植物極から、8細胞期の図は胚を側方より見た図。16細胞期と32細胞期については、動物極もしくは植物極から見た図をそれぞれ示した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)

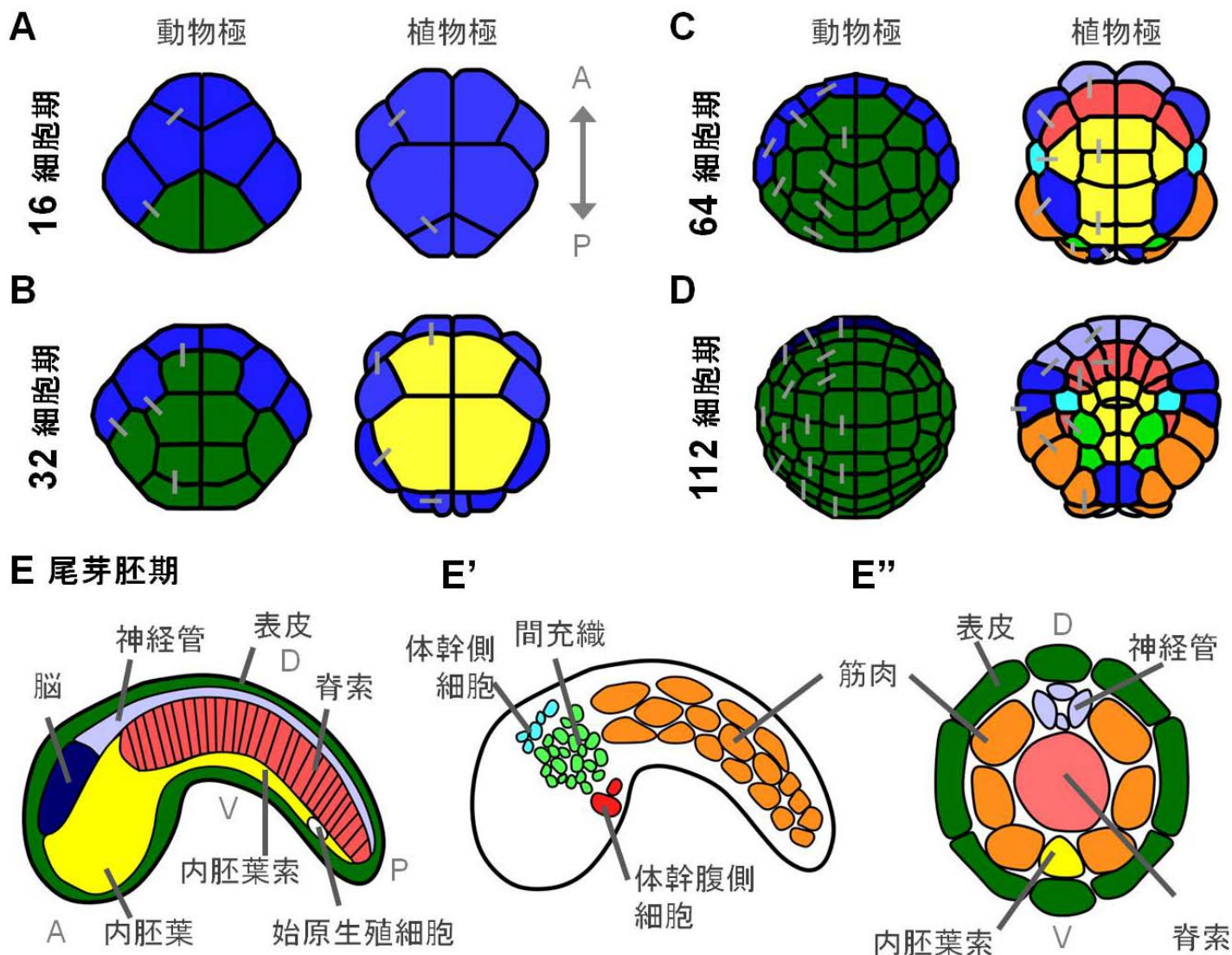


図 1.6 ホヤ胚を構成する細胞の発生運命

図は Nishida の論文 (Nishida, 2005) を参考に作製した。青色の細胞は発生運命の決定が完了していない細胞 (未分化細胞) である。その他の細胞は発生運命が1つの組織に限定されており、色の違いは組織の違いに対応する。図 A-D 中の細胞境界にまたがる灰色の線は、同一母細胞より分裂した娘細胞ペアを表す。図 E と図 E' は胚を側方より、図 E'' は尾部の切断面を前方より見た図で、図 E は正中線上の組織、図 E' は正中線より左右に位置する組織を表す。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)

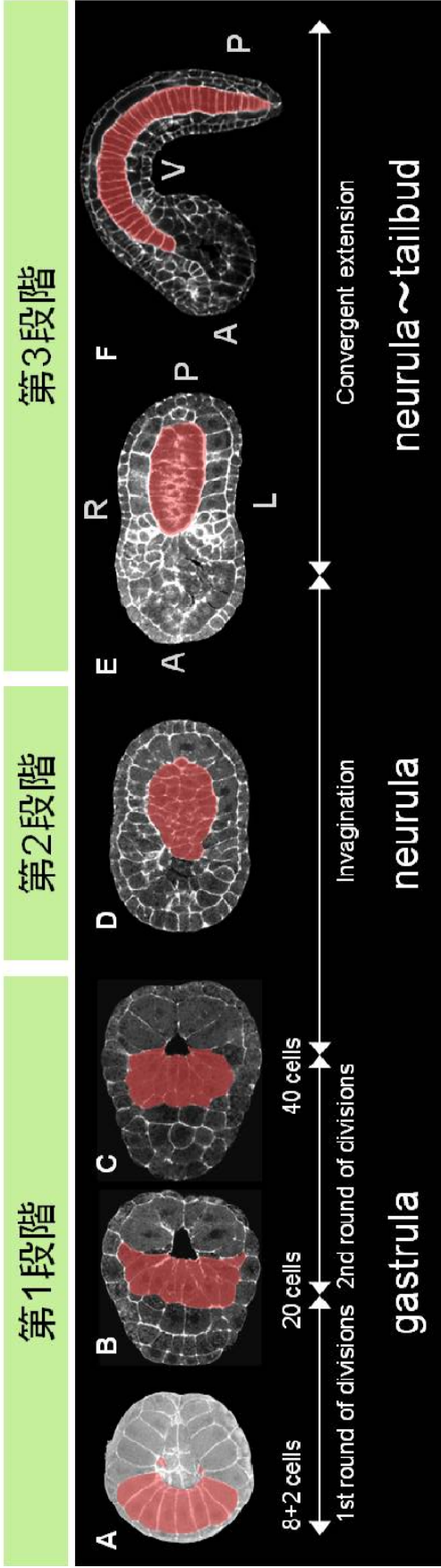


図 1.7 脊索の形態形成過程

図は Denker と Jiang の論文 (Denker and Jiang, 2012) を参考に作製した。赤色の細胞が脊索細胞。ホヤ幼生において、脊索は体の背側中央を頭尾軸にそって位置する棒状の器官である (図 1.3, No)。脊索動物の形態の中で特に重要で、ホヤを含む脊索動物の胚発生過程において尾部の伸長に関わる (Jiang and Smith, 2007)。脊索の形成過程は主に 3 段階に分けられる (Denker and Jiang, 2012)。形成過程の 1 段階目は原腸胚期に起こる。112 細胞期に脊索細胞への分化が完了した 10 細胞

(A) は、原腸胚期で頭尾軸に沿った方向に 2 回分裂し、40 個の細胞となる。この時点で脊索は左右軸方向に広い板状の形をとる (C)。続く神経胚期における形成過程の 2 段階目ではこの板が丸まるように陥入が起き、脊索は頭尾軸方向に長い円柱状の形となる (D)。形態形成の 3 段階目では脊索細胞が葉状仮足を伸ばして移動し、インターカレーションが起きる。葉状仮足の伸びる方向は、中枢神経系や筋肉など、隣り合う組織から分泌された何らかのシグナルにより制御される (Munro and Odell, 2002a; Munro and Odell, 2002b)。インターカレーションにより細胞は正中線上に 1 列に並び、同時に頭尾軸方向に脊索が伸長する (E, F)。なお、頭尾軸上の位置に従い各細胞の形態変化や細胞分裂の方向が異なっており、脊索の形態に寄与することが報告されている (Veeman and Smith, 2013)。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)

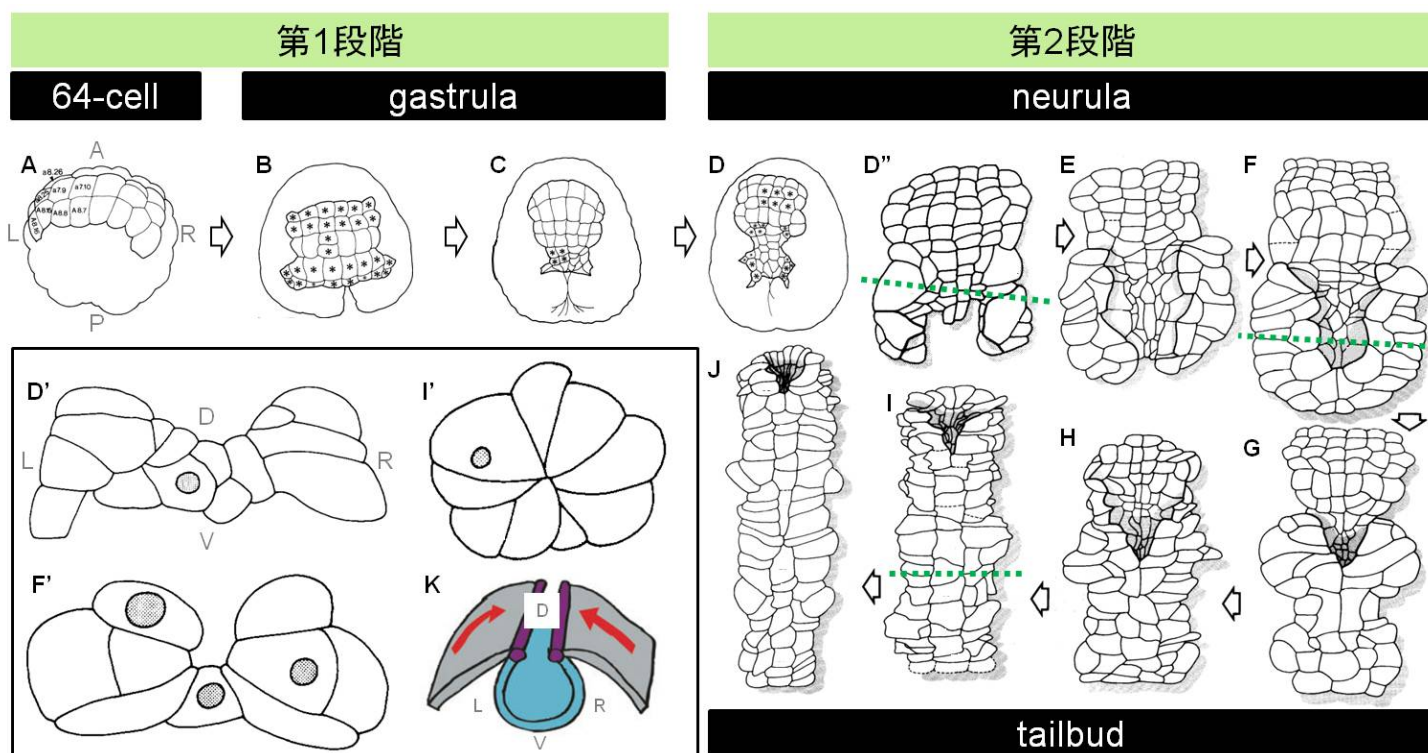


図 1.8 中枢神経系の形態形成過程

図 A-J は Nicol らの論文 (Nicol and Meinertzhagen, 1998a; Nicol and Meinertzhagen, 1998b) より、図 K は Sasakura らの論文 (Sasakura *et al.*, 2012) より抜粋し、一部改変した。図 A-D では胚の輪郭が表示されている。また分裂により生じた細胞を*で示している。図 A 中、ローマ字と数字の組み合わせは細胞系譜を表す。図 D と D'の発生段階は同じである。図 D', F, I の緑点線における切断面がそれぞれ図 D', F', I' に対応する。図 K は神経管 (水色) 閉鎖過程における表皮 (灰色および紫色) の動きを赤矢印で表す。ホヤ幼生において、中枢神経系は脊索の背側に沿って位置し、管状の構造をしている (図 1.3, Nh, SV, n, VG, NC)。幼生期の中枢神経系は約 330 個の細胞からなり、他の脊索動物と比較して細胞数は少なく構造は単純である。中枢神経系の形成過程は主に 2 段階に分けられる。中枢神経系への細胞分化は 64 細胞期から始まるが、その時点において中枢神経系は、神経板と呼ばれる左右軸方向に広い板状の形をとる (A)。形態形成の第 1 段階は原腸胚期に起こり、神経板の陥入、および尾部方向への伸長が見られる (この時点ではまだ管を形成していない) (Nicol and Meinertzhagen, 1988a) (B-C)。続いて第 2 段階は神経胚期に始まる。神経胚期では細胞の分裂と尾部方向への細胞の移動が観察される。また尾部神経系を構成する細胞の形態も頭尾軸方向に長くなる。さらに細胞の形状がくさび型になり (D'-J)、神経管背側の尾部から頭部に向けてジッパーが閉じるように神経管閉鎖が進行する (この時点で管状の構造になる) (D-J)。尾芽胚までに神経管の閉鎖はほぼ完了する

(Cole and Meinertzhagen, 2004; Nicol and Meinertzhagen, 1988b)。以上の2段階の過程で中枢神経系の形態形成は進行するが、神経管閉鎖には中枢神経系細胞のみでなく、中枢神経系細胞と隣接する表皮細胞の形態変化（正中線方向への伸長）、および移動が必要と示唆されている(K, 赤矢印) (Sasakura *et al.*, 2012; Ogura *et al.*, 2011)。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)

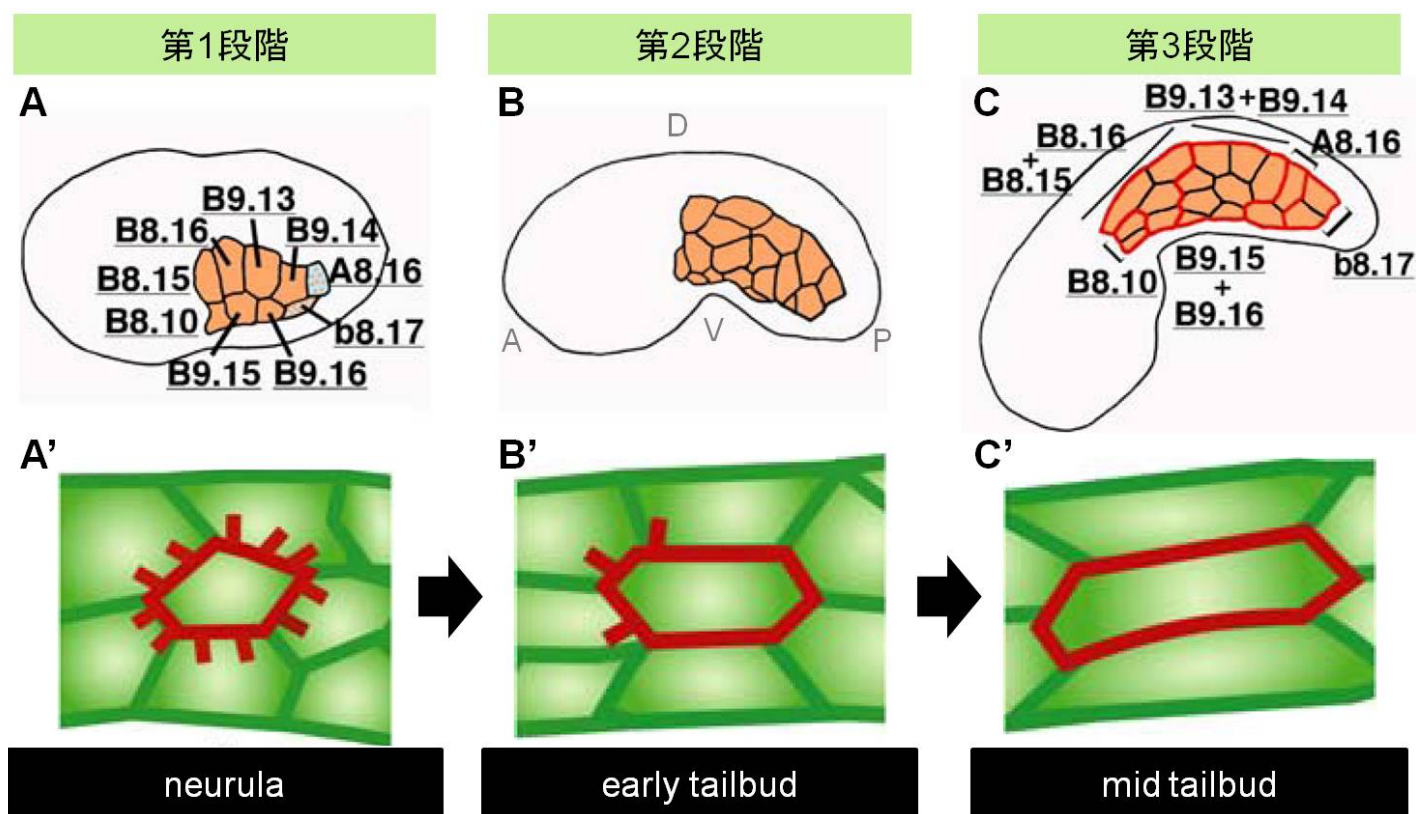


図 1.9 筋肉の形態形成過程

図は Passamaneck らの論文 (Passamaneck *et al.*, 2007) より抜粋し、一部改変した。
A, B, C : ホヤ胚を側方より見た図。図中、ローマ字と数字の組み合わせは細胞系譜を表す。図 C の赤線は系譜の境界を示す。**A', B', C'** : 筋肉の一部を拡大した図。緑線は筋肉細胞の細胞境界、赤線は中央の筋肉細胞の細胞境界および糸状仮足を表す。ホヤ幼生において、筋肉は脊索を左右から挟むように位置する。尾芽胚では 18 個の細胞が 1 対となった左右対称の構造をとる (図 1.3, Mu)。筋肉細胞の分化は 112 細胞期の 7 細胞 (カタユレイボヤでは A8.16, B7.5, B8.7, B8.8, B8.15, B8.16, b8.17 細胞に由来する。マボヤではさらに b8.19 細胞も筋肉へと分化する) に由来し、原腸胚期に完了する (Nishida, 2005)。神経胚期以降の筋肉形成過程は主に 3 段階に分けられる。第 1 段階では、各筋肉細胞はランダムな方向に細胞膜および糸状仮足を突出するような形状をしている (A, A')。続いて第 2 段階は初期尾芽胚期に進行し、各筋肉細胞の頭尾軸方向への伸長が開始し、またランダムだった糸状仮足の突出の内、頭部方向の突出のみが残る (B, B')。そして第 3 段階は中期尾芽胚期に進行し、筋肉細胞の伸長は続くが、第 2 段階まで見られた糸状仮足の突出は無くなる (C, C')。仮足の役割は不明だが、変異胚を用いた実験から仮足の突出は筋肉の頭尾軸方向の伸長に必要である (Passamaneck *et al.*, 2007)。以上の 3 段階の過程で筋肉の形成 (頭尾軸方向への

伸長)は達成されるが、脊索細胞を外科的に除去した胚では筋肉の伸長が起こらないことから、筋肉の伸長には脊索の伸長が必要である (Munro and Odell, 2002a)。またこのとき筋肉細胞間のインターカレーションや位置の変化ではなく、筋肉細胞の形態の変化が筋肉伸長の主要な役割を担うと報告されている (Passamaneck *et al.*, 2007)。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)

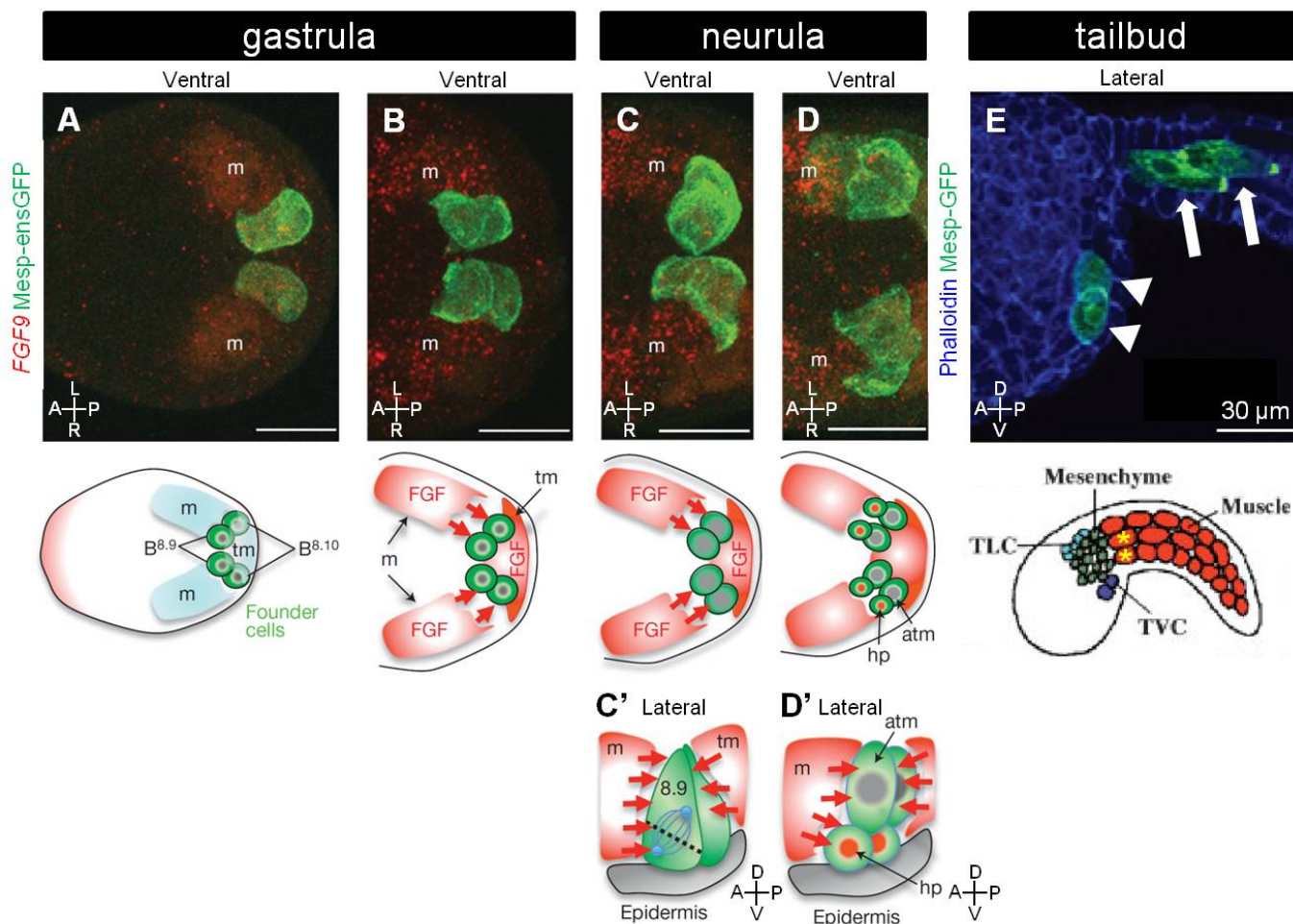


図 1.10 体幹腹側細胞の形態形成過程

図 A-D は Cooley らの論文 (Cooley *et al.*, 2011)、図 E は Norton らおよび Nishida の論文 (Norton *et al.*, 2013; Nishida, 2005) より抜粋し、一部改変した。上段は共焦点顕微鏡の画像、中段と下段は体幹腹側細胞の分化過程および胚内での位置を示す概略図。図 A-D はホヤ胚を腹側から、図 C', D', E は側方から見た図。A-D: 概略図中の赤色の領域は fibroblast growth factor (FGF) の発現が確認された組織を、赤矢印は間充織および筋肉から分泌された FGF が founder cells の不等分裂と、その後の体幹腹側細胞の細胞分化に寄与することを表す。C': 点線は細胞分裂面を表す。E: 矢頭は体幹腹側細胞の位置、矢印および*は B7.5 系列の細胞から分化した筋肉細胞の位置を示す。ホヤ尾芽胚において、体幹腹側細胞は名前の通り体幹部の腹側に位置する (図 1.5E', 紺色)。変態後は、成体の入水口の筋肉を含む体壁筋と心筋を形成する (Hirano and Nishida, 1997)。進化的には脊椎動物の顎の筋肉および心筋に対応することが遺伝子発現パターンから示唆される (Stolfi *et al.*, 2010)。体幹腹側細胞は頭部側の筋肉細胞と同じ B7.5 系列の細胞に由来し、原腸胚期には胚の尾部側に位置する (A, B)。神経胚期に生じる不等分裂により細胞運命が分かれ (C', D')、体積の小さい娘細胞が体幹腹側細胞

に (D', hp)、大きい娘細胞が筋肉細胞になる (D', atm)。この不等分裂と体幹腹側細胞への分化には、隣接組織が分泌する FGF シグナルに加え、表皮細胞との接触が必要である (C', D') (Norton *et al.*, 2013; Cooley *et al.*, 2011)。尾芽胚期になると体幹腹側細胞に分化した頭部側の 4 細胞が移動を始め、筋肉細胞から離れた後、体幹腹側に位置する (E, 矢頭) (Passamanek *et al.*, 2007)。fibroblast growth factor receptor (FGFR) の阻害により細胞移動が阻害されることから、隣接組織が分泌する FGF シグナルが細胞移動を制御すると考えられる (A-D, 赤) (Christiaen *et al.*, 2008; Beh *et al.*, 2007)。FGF シグナルを分泌する隣接組織として間充織や筋肉が挙げられる (B-D, 赤) (Cooley *et al.*, 2011)。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、atm, anterior tail muscle (前方尾部筋肉)、hp, heart progenitor (心臓原基)、m, mesenchyme (間充織)、tm, tail muscle (尾部筋肉)、TLC, trunk lateral cell (体幹側細胞)、TVC, trunk ventral cell (体幹腹側細胞)、ensGFP (微小管結合タンパク質 ensconsin と GFP の融合タンパク質)

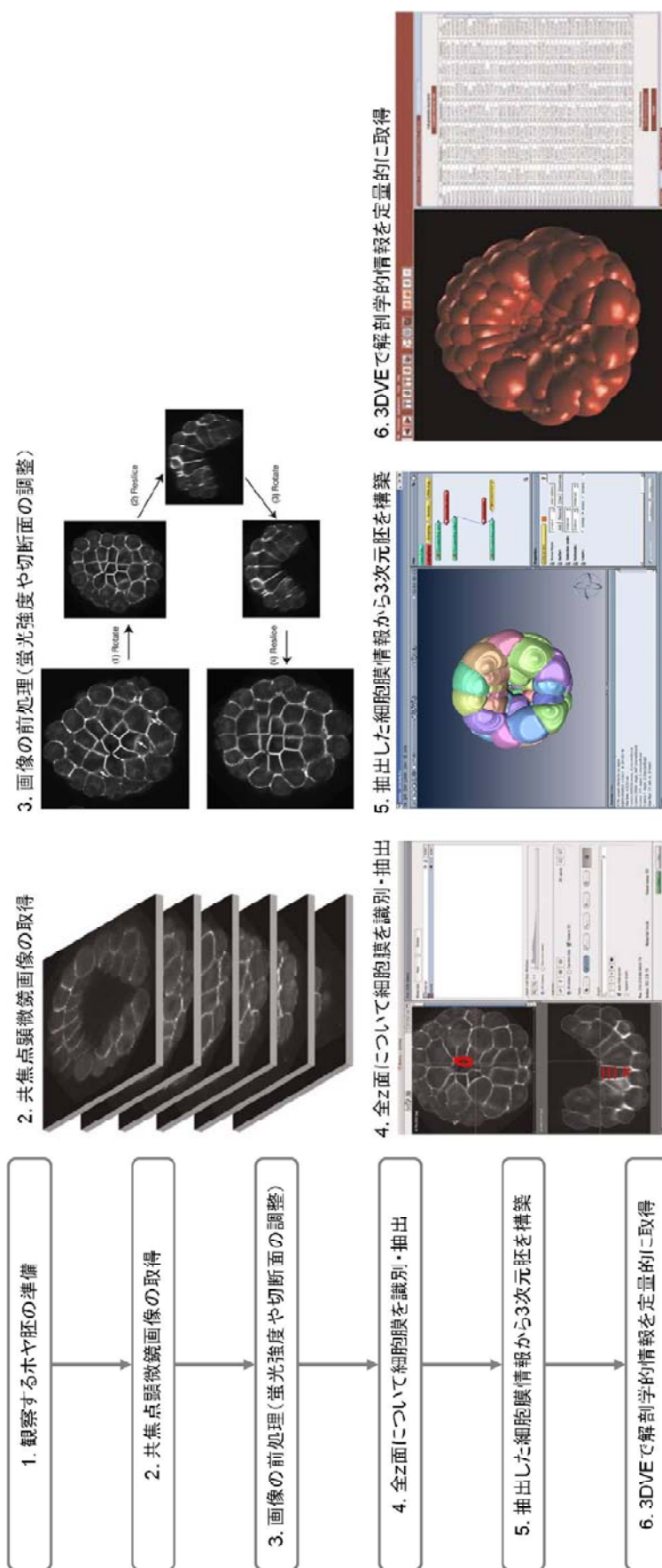


図 1.11 3次元胚モデルの構築手順

フローチャートは、Robin らおよび Tassy らが報告した 3 次元胚モデルの構築手順を参考にした (Robin *et al.*, 2011; Tassy *et al.*, 2006)。図は Robin らの論文 (Robin *et al.*, 2011)、およびホヤ発生に関するデータベースの 1 つ ANISEED よりダウンロードできる 3 次元胚モデルの構築マニュアルより抜粋し、一部改変した。

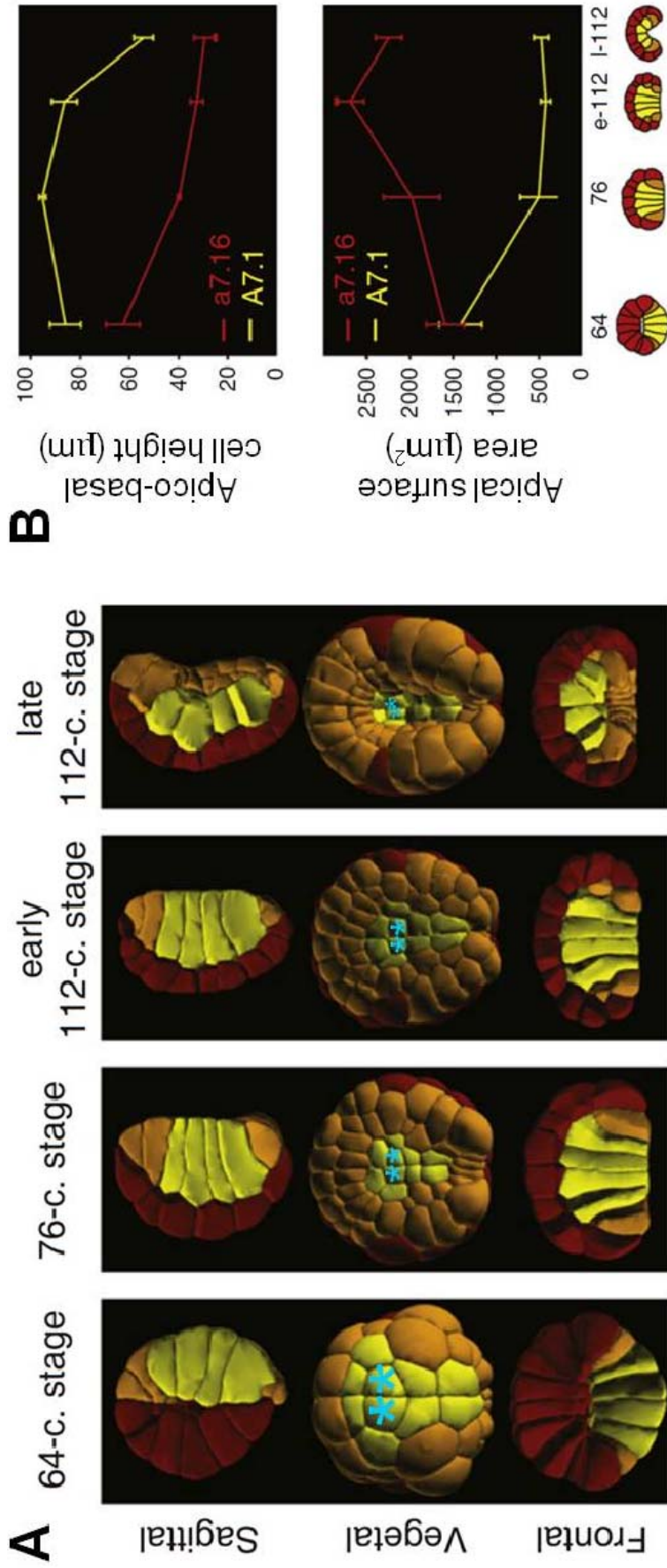


図 1.12 原腸陥入開始時期における3次元胚モデルの作成と解剖学的情報の取得

図は Sherrard らの論文 (Sherrard *et al.*, 2010) より抜粋し、一部改変した。細胞の色はそれぞれ、内胚葉が黄色、中胚葉がオレンジ色、外胚葉が赤色に対応する。図 B の a7.16 と A7.1 はそれぞれ外胚葉 (赤色) および内胚葉細胞 (黄色) の代表として原腸陥入開始に伴う形態変化を表すが、図 A の中で前後軸 (Sagittal) と左右軸 (Frontal) に垂直な断面図からは、どの細胞が a7.16 および A7.1 に該当するか判断できなかった。植物極側 (Vegetal) から見た図の内、A7.1 を*で示した。なお A7.1 はこの時期分裂しない。

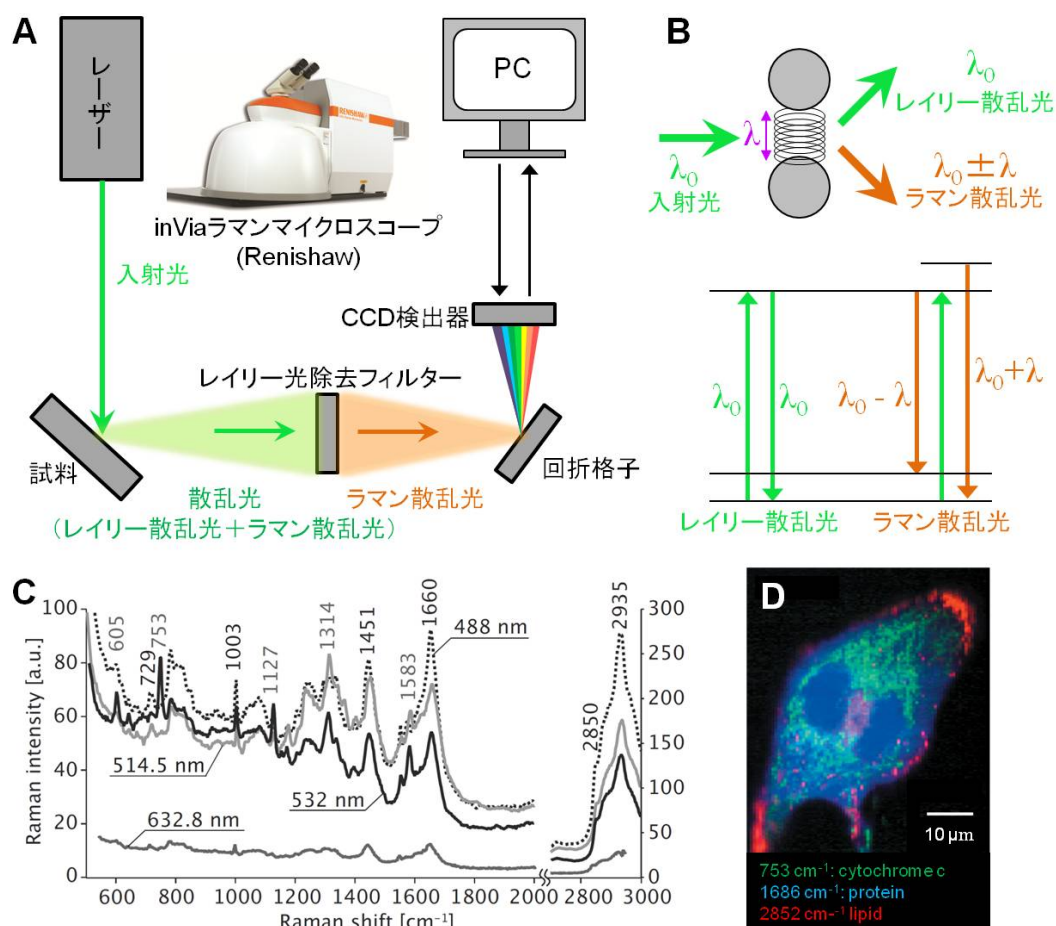


図 1.13 ラマン顕微分光法の原理

ラマン顕微鏡装置は、レーザー、試料を置くステージ、レイリー光除去フィルター、回折格子、charge-coupled device (CCD) 検出器、データの取得と解析を行う personal computer (PC) から構成される (A)。レーザーからの入射光を試料に照射すると、入射光と同じ波長を持つレイリー散乱光と、波長の変化したラマン散乱光が放出される。波長の変化は入射光と試料に含まれる分子との相互作用により生じる (B)。振動・回転運動する分子に光が入射すると光の振動と分子の運動で“うなり”が生じ、その結果、入射光と異なる波長のラマン散乱光が放出される。分子は構造に応じた特有の運動をするため、波長の変化量から分子種を同定できる。測定結果はスペクトル (C) として PC に記録され、散乱光の波長ごとの光子数 (ラマン強度) を表す。スペクトル解析により画像 (ラマンマップ) を取得できる (D)。A : ラマン顕微鏡装置の模式図。本研究では Renishaw 製の inVia ラマンマイクロスコープを用いた。B : ラマン散乱の模式図とエネルギー線図。C, D : HeLa 細胞を非標識でライブイメージングした例。Hamada らの論文 (Hamada *et al.*, 2008) より抜粋し、一部改変した。C : ラマンスペクトルの例。入射光の波長に応じて形状が異なる。横軸は、散乱光の入射光に対する波長の変化量。D : ラマンマップの例。Raman shift 位置とラマン強度から各分子の分布を可視化できる。

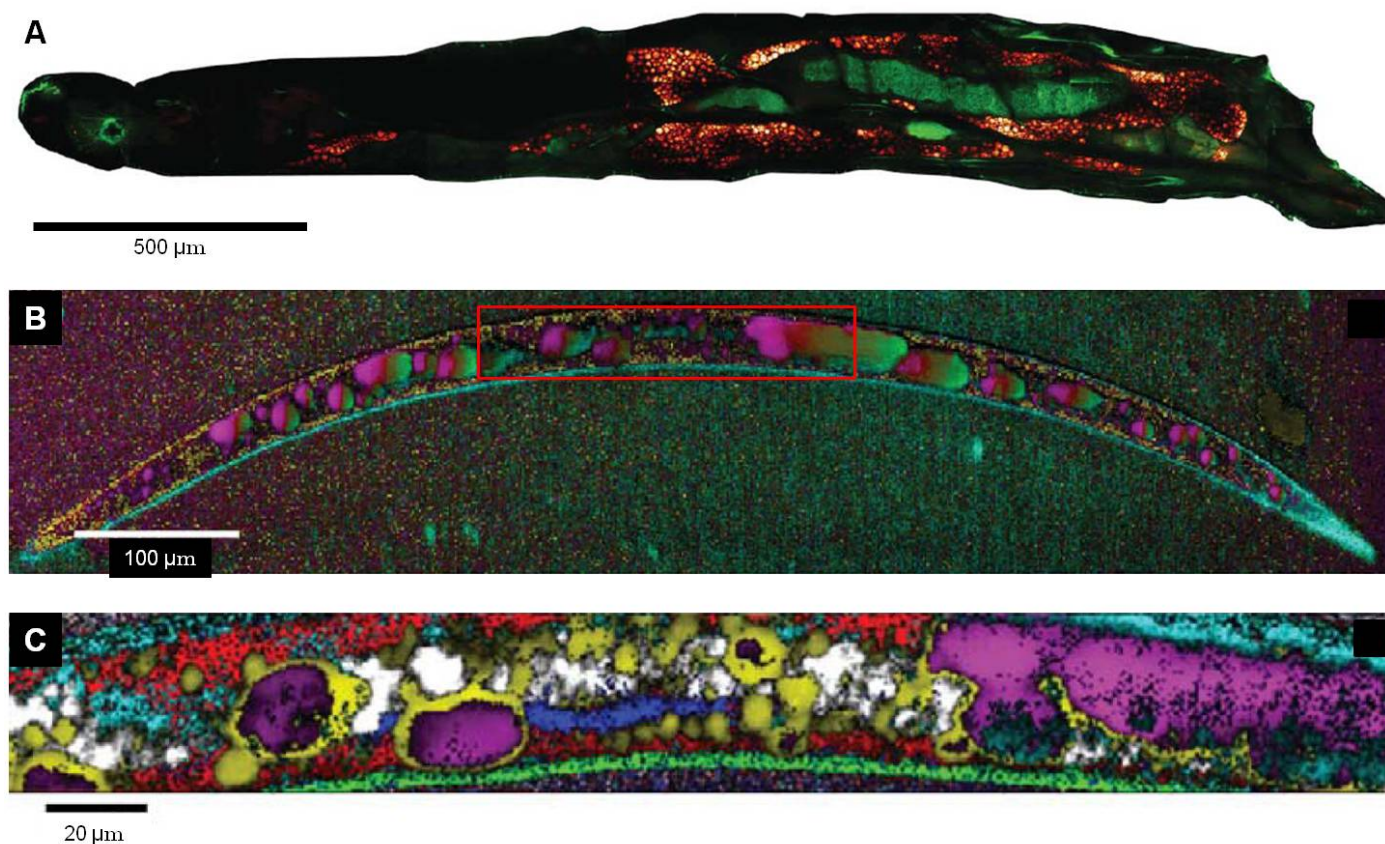


図 1.14 ラマン顕微分光法による動物体内の組織・分子組成・分布の検出

図 A は Chien らの論文 (Chien *et al.*, 2011)、図 B と C は Lau らの論文 (Lau *et al.*, 2012) より抜粋し、一部改変した。ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) および線虫 (*Steinernema kraussei*) を、非標識条件下でラマン顕微鏡により観察した例。A: ショウジョウバエ幼虫の観察結果。幼虫体内の fat-body (オレンジ色) の分布が観察できる。緑色の領域は自家蛍光によるもの。B, C: 線虫の観察結果。C: 図 B 赤枠内の領域に注目し、空間分解能を上げて観察を行った際の図。色の違いは生体内構造の違いに対応し、それぞれ脂質とタンパク質が共に豊富な領域 (黄色, 腸と推測される)、特に脂質が豊富な領域 (赤紫色, 腸と推測される)、collagen の豊富な領域 (緑色, クチクラ層と推測される)、特にタンパク質が豊富な領域 (白色)、glycogen, myosin, carotenoid/ β -carotenoid, glycoprotein, globins 等のタンパク質が豊富な領域 (赤色, 筋肉と推測される)、collagen, carotenoids の豊富な領域 (青緑色)、拡散やタンパク質の豊富な領域 (青色) を表す。この様に、Lau らは非標識で線虫の体内構造を同時識別することに成功している (Lau *et al.*, 2012)。

第1章の参考文献

- Aruga J.**, (2004), The role of *Zic* genes in neural development, *Mol. Cell. Neurosci.*, 26, 205-221
- Aulehla A. and Pourquière O.**, (2010), Signaling gradients during paraxial mesoderm development, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a000869
- Beh J., Shi W., Levine M., Davidson B. and Christiaen L.**, (2007), *FoxF* is essential for FGF-induced migration of heart progenitor cells in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Development*, 134, 3297-3305
- Chan J. W. and Lieu D. K.**, (2009), Label-free biochemical characterization of stem cells using vibrational spectroscopy, *J. Biophoton*, 2, 656-668
- Chien C.-H., Chen W.-W., Wu J.-T. and Chang T.-C.**, (2011), Label-free imaging of *Drosophila in vivo* by coherent anti-Stokes Raman scattering and two-photon excitation autofluorescence microscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 16, 016012
- Christiaen L., Davidson B., Kawashima T. et al.**, (2008), The transcription/migration interface in heart precursors of *Ciona intestinalis*, *Science*, 320, 1349-1352
- Cole A. G. and Meinertzhagen A.**, (2004), The central nervous system of the ascidian larva: mitotic history of cells forming the neural tube in late embryonic *Ciona intestinalis*, *Developmental Biology*, 271, 239-262
- Conklin E.G.**, (1905), The organization and cell-lineage of the ascidian egg, *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 13, 1-119
- Cooley J., Whitaker S., Sweet S., Fraser S. and Davidson B.**, (2011), Cytoskeleton polarity mediates localized induction of the heart progenitor lineage, *Nature Cell Biology*, 13, 952-957
- Dehal P., Satou Y., Campbell R. K., Chapman J., Degnan B.**, (2002), The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins, *Science*, 298, 2157-2167
- Delsuc F., Brinkmann H., Chourrout D. and Philippe H.**, (2006), Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates, *Nature*, 439, 965-968
- Denker E., Jiang D.**, (2012), *Ciona intestinalis* notochord as a new model to investigate the cellular and molecular mechanisms of tubulogenesis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23, 308-319
- Downes A., Mouras R. and Elfick A.**, (2010), Optical spectroscopy for noninvasive monitoring of stem cell differentiation, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, ID 101864

- Downes A., Mouras R., Bagnaninchi P., Elfick A.**, (2011), Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives, *J. Raman Spectrosc.*, 42, 1864-1870
- Dufour H. D., Chettouh Z., Deyts C., de Rosa R., Goridis C., Joly J. S., Brunet J. F.**, (2006), Precrinate origin of cranial motoneurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 8727-8732
- Hamada K., Fujita K., Smith N. I., Kobayashi M., Inouye Y., Kawata S.**, (2008), Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells, *J. Biomed. Opt.*, 13, 044027
- Hibino T., Nishikata T. and Nishida H.**, (1998), Centrosome-attracting body: A novel structure closely related to unequal cleavages in the ascidian embryo, *Develop. Growth Differ.*, 40, 85-95
- Hinman V. F., Degnan B. M.**, (1998), Retinoic acid disrupts anterior ectodermal and endodermal development in ascidian larvae and postlarvae, *Dev. Genes. Evol.*, 208, 336-345
- Hirano T. and Nishida H.**, (1997), Developmental fates of larval tissues after metamorphosis in ascidian *Halocynthia roretzi*, *Dev. Biol.*, 192, 199-210
- Hirano T., Nishida H.**, (2000), Developmental fates to larval tissues after metamorphosis in the ascidian, *Halocynthia roretzi*, *Dev. Genes Evol.*, 210, 55-63
- Hotta K., Mitsuhashi K., Takahashi H. et al.**, (2007), A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva, *Dev. Dyn.*, 236, 1790-1805
- Huang C.-K., Hamaguchi H. and Shigeto S.**, (2011), *In vivo* multimode Raman imaging reveals concerted molecular composition and distribution changes during yeast cell cycle, *Chem. Commun.*, 47, 9423-9425
- Irie N. and Kuratani S.**, (2011), Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis, *Nat. Commun.*, 2:248
- Ishibashi T., Usami T., Fujie M., Azumi K., Satoh N. and Fujiwara S.**, (2005), Oligonucleotide-based microarray analysis of retinoic acid target genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*, *Dev. Dyn.*, 233, 1471-1578
- Jiang D. and Smith W. C.**, (2007), Ascidian notochord morphogenesis, *Dev. Dyn.*, 236, 1748-1757
- Kavka A. I., Green J. B. A.**, (1997), Tales of tails: *Brachyury* and the T-box genes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333, F73-F84
- Keller P. J., Schmidt A. D., Wittbrodt J., Stelzer E. H. K.**, (2008), Reconstruction of Zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy, *Science*,

322, 1065-1069

Koljenović S., Schut T. C. B., van Meerbeeck J. P. et al., (2004), Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue, *Journal of Biomedical Optics*, 9, 1187-1197

Koop D., Holland N. D., Sémon M., Alvarez S. et al., (2010), Retinoic acid signaling targets *Hox* genes during the amphioxus gastrula stage: Insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan, *Dev. Biol.*, 338, 98-106

Lau K., Hobro A., Smith T., Thurston T., Lendl B., (2012), Label-free non-destructive in situ biochemical analysis of nematode *Steinernema kraussei* using FPA-FTIR and Raman spectroscopic imaging, *Vibrational Spectroscopy*, 60, 34-42

Lemaire P., (2009), Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: Invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians, *Dev. Biol.*, 322, 48-60

Miyamoto N., Saito Y., (2010), Morphological characterization of the asexual reproduction in the acorn worm *Balanoglossus simodensis*, *Develop. Growth Differ.*, 52, 615-627

Munro E. M. and Odell G., (2002a), Morphogenetic pattern formation during ascidian notochord formation is regulative and highly robust, *Development*, 129, 1-12

Munro E. M. and Odell G., (2002b), Polarized basolateral cell motility underlies invagination and convergent extension of the ascidian notochord, *Development*, 129, 13-24

Nagatomo K., Ishibashi T., Satou Y., Satoh N., Fujiwara S., (2003), Retinoic acid affects gene expression and morphogenesis without upregulating the retinoic acid receptor in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Mechanisms of Development*, 120, 363-372

Nibu Y., José-Edwards D. S. and Di Gregorio A., (2013), From notochord formation to hereditary chordoma: The many roles of *Brachyury*, *Biomed Research International*

Nicol D. and Meinertzhagen I. A., (1988a), Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. I. The early lineages of the neural plate, *Developmental Biology*, 130, 721-736

Nicol D. and Meinertzhagen I. A., (1988b), Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. II. Neural plate morphogenesis and cell lineages during neurulation, *Developmental Biology*, 130, 737-766

Nicol D. and Meinertzhagen I. A., (1991), Cell counts and maps in the larval central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.), *J. Comp. Neurol.*, 309, 415-429

Nishida H., (1987), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme III. Up to the tissue restricted stage, *Dev. Biol.*, 121, 526-541

- Nishida H.**, (2005), Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians, *Developmental Dynamics*, 233, 1177-1193
- Nishida H. and Satoh N.**, (1983), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme I. Up to the eight-cell stage, *Dev. Biol.*, 99, 382-394
- Nishida H. and Satoh N.**, (1985), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme II. The 16-cell and 32-cell stages, *Dev. Biol.*, 110, 440-454
- Norton J., Cooley J., Islam, A. F. M. T., Cota C. D. and Davidson B.**, (2013), Matrix adhesion polarizes heart progenitor induction in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*, *Development*, 140, 1301-1311
- Ogura Y., Sakaue-Sawano A., Nakagawa M., Satoh N., Miyawaki A. and Sasakura Y.**, (2011), Coordination of mitosis and morphogenesis: role of a prolonged G2 phase during chordate neurulation, *Development*, 138, 577-587
- Pascut F. C., Kalra S., George V., Welch N., Denning C., Notingher I.**, (2013), Non-invasive label-free monitoring the cardiac differentiation of human embryonic stem cells in-vitro by Raman spectroscopy, *Biochemical Biophysica Acta*, 1830, 3517-3524
- Pasini A., Amiel A., Rothbacher U., Roure A., Lemaire P., Darras S.**, (2006), Formation of the ascidian epidermal neurons: Insights into the origin of the chordate peripheral nervous system, *PLoS Biology*, 4, 1173-1186
- Pasini A., Manenti R., Rothbacher U., Lemaire P.**, (2012), Antagonizing retinoic acid and FGF/MAPK pathways control posterior body patterning in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*, *PLoS One*, 7, e46193
- Passamaneck Y. J., Hadjantonakis A.-K., Gregorio A. D.**, (2007), Dynamic and polarized muscle cell behaviors accompany tail morphogenesis in the ascidian *Ciona intestinalis*, *PLoS One*, 8, e714
- Pliss A., Kuzmin A. N., Kachynski A. V., Jiang H. et al.**, (2013), Nucleolar molecular signature of pluripotent stem cells, *Anal. Chem.*, 85, 3545-3552
- Sasakura Y.**, (2007), Germline transgenesis and insertional mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Dev. Dyn.*, 236, 1758-1767
- Sasakura Y., Mita K., Ogura Y. and Horie T.**, (2012), Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis, *Develop. Growth Differ.*, 54, 420-437
- Sherrard K., Robin F., Lemaire P. and Munro E.**, (2010), Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination, *Curr. Biol.*,

20, 1499-1510

Shimozono S., Iimura T., Kitaguchi T., Higashijima S. and Miyawaki A., (2013), Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development, *Nature*, 496, 363-367

Slack J. M. W., Holland O. W. H. and Graham C. F., (1993), The zootype and the phylotypic stage, *Nature*, 361, 490-492

Sobreira T. J. P., Marlétaz F., Simões-Costa M., Schechtman D. et al., (2011), Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans, *PNAS*, 108, 226-231

Stolfi A., Gainous B., Young J. J., Mori A., Levine M., Christiaen L., (2010), Early chordate origins of the vertebrate second heart field, *Science*, 329, 565-568

Swalla BJ, (2006), Building divergent body plans with similar genetic pathways, *Heredity*, 97, 235-243

Tan Y., Konorov S. O., Schulze H. G. et al., (2012), Comparative study using Raman microspectroscopy reveals spectral signatures of human induced pluripotent cells more closely resemble those from human embryonic stem cells than those from differentiated cells, *Analyst*, 137, 4509

Tassy O., Daian F., Hudson C., Vertrand V. and Lemaire P., (2006), A quantitative approach to the study of cell shapes and interactions during early chordate embryogenesis, *Current Biology*, 16, 345-358

Technau U., (2001), *Brachyury*, the blastopore and the evolution of the mesoderm, *BioEssays*, 23, 788-794

Veeman M. T., Smith W. C., (2013), Whole-organ cell shape analysis reveals the developmental basis of ascidian notochord taper, *Developmental Biology*, 373, 281-289

White R. J. and Schilling T. F., (2008), How degrading: Cyp26s in hindbrain development, *Dev. Dyn.*, 237, 2775-2790

H. ジー 著, 藤沢弘介 訳, (2001), 『脊椎動物の起源』, 培風館, 初版

佐藤矩行, (1998), 『ホヤの生物学』, 東京大学出版会, 初版

第2章 コンピュータ・モデリングによる3次元中期 尾芽胚モデルの構築と解剖学的特徴の記載

2.1 はじめに

尾芽胚期は脊索動物に固有の発生段階である。尾芽胚期の中に、幼生尾部の形成を含む脊索動物の体制が構築される。オタマジクシ型の尾部の獲得は脊索動物の進化に重要なイベントであったと考えられている (Sato, 1994)。尾芽胚の解剖学的知見は、正常胚と異常胚との比較や、異なる種間で尾芽胚の形態を比較する際に有用な情報となる。本章で記した研究では、尾索動物カタユウレイボヤ尾芽胚の解剖学的特徴を1細胞レベルで包括的に観察することを目指し、共焦点顕微鏡画像から3次元中期尾芽胚モデル(3DVMTE)を構築した。3DVMTEは実際のホヤ胚の画像から構築したため、細胞形態、位置や配列と言った尾芽胚の解剖学的特徴を、1細胞レベルで詳細に反映している。本研究では構築した3DVMTEを元に、カタユウレイボヤ尾芽胚まるごと1個体分の細胞数、および各組織の1細胞レベルでの解剖学的特徴を記載した。

2.2 実験方法

2.2.1 カタユウレイボヤ中期尾芽胚の共焦点顕微鏡画像の取得

カタユウレイボヤの成体は、舞鶴もしくは横浜で採集した個体を使用した。未受精卵および精子は、成体のホヤを外科的に解剖することで生殖輸管から取得した。コリオンを剥いた未受精卵を用いて受精を行い、中期尾芽胚期(mid-tailbud)に至るまで18°Cの海水中で飼育した。胚の固定は、pH 7.5に調整した0.1 M MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) 緩衝液にparaformaldehyde (Nacalai Tesque) を終濃度4%で溶かした水溶液中に、室温で

30分間胚を浸すことで行った。この固定の後、phosphate buffered saline (PBS) を用いて胚を洗浄した。中期尾芽胚は次の3つの基準によって定義される。1. 受精後10.9時間が経過する、2. 孵化を100%とすると62%程発生が進行している、3. 頭部長に対する尾部長の比率 (the ratio of tail to head length, T/H) が1.6から1.9である (Hotta *et al.*, 2007)。本研究ではこの定義に従い、中期尾芽胚期にあるホヤを5個体 (T/H=1.78~1.9) 入手した。その内 T/H=1.86 および 1.78 の2個体に関しては胚全体を反映した3DVMTEを構築し、残りの3個体については注目した組織の3次元形態情報を取得するのに用いた。

固定したホヤ尾芽胚を、Alexa fluor phalloidin 488 (Invitrogen) 中に4°Cで10時間以上浸すことにより細胞膜を染色した。PBSにより洗浄後、DRAQ5 (eBioscience) 中に室温で3日以上浸すことにより核を染色した。PBSで洗浄した後、isopropanol、benzyl benzoate、benzyl alcohol を用いて透明化した。細胞膜および核を染色した胚は、Olympus FV1000 confocal laser scanning microscopy を用いて観察した (0.22 × 0.22 × 0.8 μm voxel)。

2.2.2 3次元形態情報を反映した3DVMTEと3D PDFの構築

共焦点顕微鏡画像から3DVMTEを構築する作業は、RobinらとTassyらが報告した方法 (Robin *et al.*, 2011; Tassy *et al.*, 2006) に従った。細胞境界を自動で識別する方法は未だエラーも多いため、全てマニュアルで識別した。共焦点顕微鏡画像から細胞境界を抽出し、3次元的な細胞表面を構築する作業はAmira/Avizo 6 (Visage Imaging) ソフトウェアを用いて行った。Amira/Avizo 6では、マニュアルで抽出した輪郭に対しShrink処理 (x, y, z方向に2 pixelぶん領域を小さくした) およびガウシアンフィルタ処理 (3×3×3, 5×5×5, 9×9×9) を施した。つづいて、同じくAmira/Avizo 6を用い、Mraching Cubes Algorithmにより各zスタックの細胞輪郭から3次元的な細胞表面を構築した。さらにAmira/Avizo 6から出力したデータに対して、3ds Max 2011 (Autodesk) を用い、法線の方向がオブジェクトの外側に向くよう統一した。以上の手順で構築した3DVMTEの観察および解析は、3D-PDF形式の3DVMTEもしくはTassyらが報告した3dveソフトウェア (Tassy *et al.*, 2006) を用いて行った。

3D PDF形式の3DVMTEの構築はde Boerの手法 (de Boer *et al.*, 2011) に従い、Adobe Acrobat 3D version 8を用いた。PDF形式に変換する利点として、閲覧に特別なソフトウェアを必要としない点がある。本研究で構築した3D PDF形式の3DVMTEもまた閲覧に特別な有料ソフトウェアを必要としない。3D PDF形式の3DVMTEでは直感的な操作でホヤ尾芽胚の解剖学的特徴を観察できる。

上記の作業は全て、Intel Xenon 2.33 GHz (Intel corporation)、16GB の RAM、64-bit MS Windows 7 (Microsoft corporation) を搭載したコンピュータを用いた。

2.3 実験結果および考察

2.3.1 3DVMTE の構築と、各組織の細胞数および系譜情報の付加

共焦点顕微鏡画像を元にした 3DVMTE の構築

細胞境界は共焦点顕微鏡画像から明瞭に認識できた。また組織間の境界は、alexa 488 phalloidin の蛍光強度や細胞内顆粒といった染色具合の違い、および報告にある形態的特徴を元に判断した。ただし、trunk lateral cells (TLCs, 体幹側細胞; A7.6 系列由来の細胞) と間充織の境界は alexa 488 phalloidin の染色や細胞の形態からは識別できなかった。従って今回構築した 3DVMTE では TLCs は間充織に含まれる。構築した 3DVMTE は、共焦点顕微鏡画像のホヤ胚の形態をよく反映していた (図 2.1)。表 2.1 に本研究で構築した 3DVMTE を構成する組織を記した。

カタユウレイボヤ尾芽胚を構成する各組織の細胞数

これまで尾芽胚期のカタユウレイボヤ胚はおおよそ 1000 個の細胞から構成されると報告されていた (Sato, 1994)。本研究では 1 細胞レベルで 3DVMTE を構築し、より詳細に細胞数を調べた。その結果、構築した 3DVMTE は、T/H=1.86 の個体は 1579 細胞、T/H=1.78 の個体は 1446 細胞で構成されていた。各組織の細胞数は表 2.1 の通りである。興味深いことに、間充織の細胞数は左右で異なっていた (N=2; 表 2.1, 図 2.2)。また本研究により、これまでカタユウレイボヤ胚では報告のない 12 細胞を発見した (体幹側の A/A* 4.1 系列由来の 8 細胞および、尾部側の b/b* 7.13 系列由来の 4 細胞)。

T/H=1.86 の 3DVMTE の細胞数が 1579 細胞であったのに対し、T/H=1.78 の個体では 1446 細胞であった (表 2.1)。両個体とも中期尾芽胚の定義 (Hotta *et al.*, 2007) に当てはまるが、細胞数には 133 細胞の差があった。すなわち、T/H=1.78 の個体の発生段階から T/H=1.86 の個体の段階に至るためには、133 細胞分の分裂が必要である。中期尾芽胚期の長さは約 1 時間であるが (Hotta *et al.*, 2007)、胚のおよそ 10% に当たる細胞が分裂していた (T/H の値から、本研究の 2 個体の間にある時間のずれは 1 時間より少ないと考えられる)。なお、マボヤでは尾

芽胚期の中に細胞数が倍以上に増加する（約 1100 細胞から約 2800 細胞に増える）（Yamada and Nishida, 1999）ことが報告されており、尾芽胚期にあるホヤ類の胚では細胞分裂が活発に行われていると考えられる。表 2.2 から、 $T/H=1.78$ と 1.86 の個体間で最も細胞数の異なる組織は、間充織と内胚葉であった。

112 細胞期にはカタユウレイボヤの各組織への細胞分化はほぼ完了する（Nishida, 2005）。そこで次に、112 細胞期から中期尾芽胚期の間に行った細胞分裂回数を組織ごとに見積もった（表 2.3）。細胞数から、胚全体では平均して 3.8 回の分裂が起きたことになる。実際は、組織ごとに分裂回数は 1.0~5.2 回と差が見られた。最も分裂回数の多かった組織は間充織の 5.2 回で、続いて内胚葉の 4.1 回、表皮の 3.9 回であった。また組織内でも細胞系列間で分裂回数に差があった（表 2.3）。

構築した 3DVMTE の表皮は 761 細胞から構成されていた（表 2.1）。マボヤの場合、表皮の細胞数は中期尾芽胚期でおよそ 800 細胞であり、尾芽胚期以降は分裂しないと考えられている（Nishida, 1987）。

構築した 3DVMTE の中枢神経系は全部で 228 の細胞からなり、内訳は sensory vesicle (SV, 感覚胞) が 122 細胞、neck (頸部) が 14 細胞、visceral ganglion (VG, 運動神経節) が 19 細胞、caudal neural tube (NT, 尾部神経管) が 73 細胞であった（表 2.1, 図 2.5C）。発生過程にある中枢神経系の細胞数を詳細に調べた報告としては、Cole と Meinertzhagen の報告（Cole and Meinertzhagen, 2004）がある。Cole と Meinertzhagen によると、中枢神経系の細胞数は 110 細胞 (E55)、132 細胞 (E60)、162 細胞 (E65)、214 細胞 (E70)、250 細胞 (E75)、250 細胞 (E80)、266 細胞 (E85)、344 細胞 (E90)、344 細胞 (E95) と各発生段階で変化する（E + 数字の組み合わせは、Meinertzhagen らが定義したホヤの発生段階を示す）。従って、中枢神経系全体の細胞数からは、本研究で構築した 3DVMTE は Cole と Meinertzhagen の報告中、E70-75 の中枢神経系に対応すると考えられる。しかしながら、中枢神経系中、各領域の細胞数は Cole と Meinertzhagen の報告とは大きく異なった。Cole と Meinertzhagen によると、E70 における中枢神経系の細胞数は、SV が 114 細胞、neck が 26 細胞、VG が 22 細胞、NT が 52 細胞である（Cole and Meinertzhagen, 2004）。つまり前方の領域は Cole と Meinertzhagen の方が細胞数は多く、後方の領域では本研究の方が多かった。以上の違いから、細胞分裂のタイミングは領域ごとに異なっており（領域間で同期しておらず）、さらにタイミングには個体差があるのかもしれない。

構築した 3DVMTE の内胚葉（体幹部内胚葉および内胚葉索）は 199 細胞で構成されていた。孵化したマボヤ幼生の内胚葉はおよそ 500 細胞で構成されている（Nishida, 1987; Conklin, 1905）。種間で細胞数は異なるかもしれないが、内胚葉細胞は中期尾芽胚期以降に 1.3 回以上分裂すると見積もれる。

細胞系譜情報の付加

細胞系譜情報と解剖学的形態を対応付けて観察できる3Dモデルとして、本研究では3D PDF形式の3DVMTEを構築した(図2.3)。胚を構成する各細胞は表2.1に示した階層構造に従って解剖学的に分類されている。また各組織の系譜情報は、先行研究を元に付加した(例えばNishida and Satoh, 1985, 1983)。

2.3.2 各組織の解剖学的特徴の記載

この項ではT/H=1.86の3DVMTEに見られた解剖学的特徴について記す。

外胚葉性組織 (Ectodermal tissues)

表皮組織 (Epidermal tissues)

尾芽胚期ホヤ胚の表層は、表皮組織の細胞で包まれている(図2.1B, 2.1B')。尾部表皮は8列の細胞列からなる(Pasini *et al.*, 2006)が、各細胞列の細胞数は、背側の1列から時計回りに、44、37、52、33、57、33、47、34細胞(表2.1, 図2.4B, 2.4C)と、背腹側および左右側の列の細胞数が多かった。一方、尾部先端ではこの配列は崩れていた(図2.4C, Tail chip)。尾部表皮組織の細胞系譜情報は、Pasiniらの報告(Pasini *et al.*, 2006; Nishida, 1987)を元に3D PDFに付加した。

体幹側の表皮組織は表皮、palps(付着器)、oral siphon primordium(OSP, 入水口原基)から成り、446細胞で構成されていた(表2.1, 図2.4C)。幼生期のホヤの体幹側先端にはpalpsと呼ばれる器官が存在する。ホヤ幼生が海底に付着する際に使用する器官であり、円錐形の突起状の形態を持つ。3DVMTEではpalp原基細胞は表皮の先端に位置し(図2.4A)、長方形の形状をした71細胞から構成されていた(表2.1, 図2.4C)。palpsよりやや背側にはOSPが存在する(図2.4C)。OSPは中枢神経系が形作る管の先端と接触しており、4細胞からなる花冠に似た形態をしていた(図2.5K)。palpsの細胞系譜情報についてはカタユレイボヤでの報告がなかったため、暫定的にマボヤの系譜(Nishida, 1987)を参考にした(図2.4C)。OSPの細胞系譜情報は、Veemanらの報告(Veeman *et al.*, 2010; Christiaen *et al.*, 2007; Nishida, 1987)を元に3D PDFに付加した(図2.4C)。

中枢神経系 (Central nervous system, CNS)

中枢神経系は胚の背側に位置する。3DVMTEの中枢神経系は、体幹部では表皮、体幹部内胚葉、TLCsを含む間充織、脊索と接しており、尾部では表皮、脊

索、筋肉と接していた (図 2.1B')。ホヤ胚の中樞神経系は、幼生時の機能および解剖学的特徴の違いから主に 4 領域に分けられている (Meinertzhagen *et al.*, 2004; Nicol and Meinertzhagen, 1991)。前方から SV、neck、VG、NT であり、領域ごとに細胞内小器官の分布 (Crowther and Whittaker, 1986) や遺伝子発現パターン (Wagner and Levine, 2012; Imai *et al.*, 2009; Wada *et al.*, 1998) も異なる。そこで本研究では 3DVMTE で見られた解剖学的特徴をこれまでの報告と比較し、3DVMTE の中樞神経系を 6 つの領域 (anterior SV, middle SV, posterior SV, neck, VG, NT) に分けた (図 2.5C)。

構築した 3DVMTE では、尾芽胚期の中樞神経系はほぼ全域にわたり左右対称の、管状の構造をしていた (図 2.5)。管を構成する細胞数は頭尾軸の位置によって異なり、前方から、10 (middle SV)、6 (posterior SV)、4 (neck)、4 (VG)、4 (NT) であった。anterior SV については管状の構造をしていたが、中樞神経系の他の領域と比べ秩序だった構造をしていなかった (図 2.5C, 2.5D-F)。

・感覚胞 (sensory vesicle, SV)

SV は管を構成する細胞数の違いを元に、3 つの領域 (anterior, middle, posterior) に分けた (図 2.5C, 2.5D-F 中の*)。これまでの知見では、SV は幼生時の機能の違いによって anterior SV と posterior SV に分けられ (Nicol and Meinertzhagen, 1991)、加えて各領域が細胞系譜の追跡により尾芽胚のどの領域に由来するか調べられていた (Cole and Meinertzhagen, 2004)。さらに発現遺伝子の種類も anterior SV と posterior SV で異なることが知られていた (Wagner and Levine, 2012)。しかしながら、尾芽胚における解剖学的特徴の違いは明確にされていなかった。本研究では 3DVMTE に見られた解剖学的特徴をもとに、これまでの anterior SV をさらに anterior SV と middle SV にわけた。加えて anterior SV、middle SV、posterior SV に管を構成する細胞数の違いにもとづく境界を示した (図 2.5, line d)。

anterior SV に秩序だった構造が見られなかった (図 2.5G, 2.5H) のに対し、middle SV は 10 個の細胞からなる秩序だった構造により管を形成していた (図 2.5G, 2.5D' 中の*)。特に middle SV の側面を構成する細胞には、 $4 \times 4 = 16$ の規則的な並びが見られた (図 2.5H 中赤の*)。また anterior SV では腹側の細胞数 4 列の細胞であったのに対し、middle SV では 1 列であった (図 2.5G 中の*)。

middle SV と posterior SV の間にも解剖学的特徴の違いが見られた (図 2.5, line e)。middle SV と比べ posterior SV はより少ない細胞数で管を形成しており、6 個の細胞で管を形成していた (図 2.5E 中の*)。また側面を構成する細胞には $2 \times 4 = 8$ の規則的な並びが見られ (図 2.5H 中水色の*)、背側の方が細胞体積は大きかった。側面を形成する細胞数が middle SV と posterior SV で違う点は、核の位置を可視化し、細胞系譜を元に middle SV と posterior SV の境界を示した Cole

と Meinertzhagen の報告 (Cole and Meinertzhagen, 2004) と一致していた。

posterior SV では6個の細胞で管を形成していたのに対し (図 2.5E 中の*)、neck 以降の領域 (neck, VG, NT) では4個の細胞で管が形成されていた (図 2.5C, 2.5F 中の*)。この違いは Cole と Meinertzhagen が報告した posterior SV と neck の境界 (Cole and Meinertzhagen, 2004) と一致しており、本論文でも細胞数の違いを元に境界を判断した (図 2.5, line f)。一方、管の側面に位置する細胞の形が neck と比べ posterior SV の方が左右軸方向に長い点 (図 2.5I) は、細胞系譜と発現遺伝子の違いを元に領域を分けた報告 (Imai et al., 2009; Ikuta and Saiga, 2007) と一致していた。

3DVMTE に見られたその他の特徴として、anterior SV の側面に位置する2細胞は周辺の細胞と比べて大きく、前後軸方向に長かった (図 2.5H 中の白線)。また SV 領域の断面図から、尾芽胚期以降に脳胞を形成する神経管内腔を確認できた (図 2.5K, 黄線)。神経管内腔は、middle SV および posterior SV では空洞 (図 2.5J, 中矢頭) を形成していたが、anterior SV と middle SV の境界にある細胞 (図 2.5, line d; 図 2.5J, 2.5K 中赤矢印) の突出により狭くなっていた。

middle SV および posterior SV 領域の側面を形成する細胞数 (それぞれ $4 \times 4 = 16$ と $2 \times 4 = 8$) は、A. G. Cole らの報告 (Cole and Meinertzhagen, 2004: E60-75 stage) と一致していた。従って Cole らの報告に基づき、anterior SV を除く SV の細胞系譜情報は1細胞レベルで3DVMTEに付加した (図 2.5C)。

・ネック、内臓神経節、尾部神経管 (neck; visceral ganglion, VG; caudal neural tube, NT)

neck, VG, NT は、目印となる細胞の位置をこれまでの報告と比較し境界をわけた (図 2.5, line g, h)。この3領域において、管状構造はいずれも4列の細胞列から構成されていた (図 2.5C, 2.5F)。neck, VG, NT の内、VG と NT は脊索の背側と接触していた。

VG 領域の $A/A^* 12.239$ 細胞は周りの細胞より大きく、背側から見たとき側方に飛び出していた (図 2.5I 中の*)。Ikuta と Saiga の報告によると、 $A/A^* 12.239$ 細胞の前方には $A/A^* 12.240$ 細胞が位置しており、それより前方が neck、後方が VG である (Ikuta and Saiga, 2007)。そこで $A/A^* 12.239$ 細胞と周辺の細胞との位置関係を元に3DVMTEの neck と VG の境界を識別した (図 2.5, line g)。

$A/A^* 12.239$ 細胞と同様に、背側から見た時、 $A/A^* 12.118$ 、 $A/A^* 12.117$ 細胞も側方に飛び出していた (図 2.5I 中の*)。また $A/A^* 10.57$ 細胞は頭尾軸に細長い形態をしており、VG 側面にありながらも NT 側に突き出していた (図 2.5B, 2.5I)。これまでの報告から、 $A/A^* 12.117$ 細胞より前方が VG、後方が NT である (Stolfi and Levine, 2011; Ikuta and Saiga, 2007)。そこで $A/A^* 12.117$ 細胞の位置を元に、

VG と NT の境界を識別した (図 2.5, line h)。

VG の側面の細胞の内、5つの細胞が幼生の運動ニューロンへと分化する (A/A* 13.474, A/A* 12.239, A/A* 11.118, A/A* 11.117, A/A* 10.57) (Stolfi and Levine, 2011; Horie *et al.*, 2010; Ikuta and Saiga, 2007)。3DVMTE ではこの内、4つの運動ニューロン前駆細胞を確認した (図 2.5I: A/A* 12.239, A/A* 11.118, A/A* 11.117, A/A* 10.57)。残る A/A* 13.474 細胞は、A/A* 11.119 細胞 (図 2.5I) がさらに2回細胞分裂してできる。

尾部神経管は中枢神経系で最も尾部側に位置する領域を指す。尾部先端の5細胞を除き、上下左右4列の細胞列から管を構成していた。他の領域と比較し、細胞の形状は頭尾軸方向に細長かった (図 2.5C)。上下左右の細胞数は、左右18対の細胞、背側21細胞、腹側16細胞であった (表 2.1, T/H=1.86)。

以上のように、3DVMTE で見られた neck、VG、NT の境界に対応する解剖学的特徴はこれまでの報告とよく一致しており、特に neck、VG の細胞系譜情報は1細胞レベルで3DVMTE に付加することができた (図 2.5C)

中胚葉性組織 (Mesodermal tissues)

脊索 (Notochord)

尾芽胚期カタユウレイボヤ胚の脊索は尾部正中線上に位置し、40細胞から構成され、腹側に湾曲した形状をとる (図 2.6A)。1列に並んだ細胞は頭部側先端と尾部側先端の細胞を除き円盤状の形状であった (図 2.6B)。上下左右で中枢神経系、内胚葉、筋肉と接しており (図 2.6D)、頭部側先端は体幹部内胚葉、尾部側先端は表皮の Tail tip と接していた。

Nishida の報告 (Nishida, 1987) から、脊索を構成する40細胞のうち、前から32細胞は A/A*7.3 と A/A*7.7 細胞由来であり、後方の8細胞は B/B* 8.6 細胞由来である。この内 A/A*7.3 と A/A*7.7 細胞は尾芽胚期までに3回、B/B* 8.6 細胞は2回分裂する (Denker and Jiang, 2012)。さらにA系列とB系列の細胞が互いにインターカレーションすることはない (Veeman and Smith, 2013)。従って、前から32細胞の系譜は A/A*10.17-24 と A/A*10.49-56 であり、後方8細胞の系譜は B/B* 10.21-24 である (図 2.6A)。なお脊索では尾芽胚期以降に細胞分裂は起こらない (Nishikata and Satoh, 1990)。

脊索を構成するA系列の細胞体積の平均値はB系列の平均値よりも大きかった (第4章 図 4.2B) が、この結果は Veeman と Smith の報告 (Veeman and Smith, 2013) と一致していた。

筋肉 (Muscle)

筋肉は脊索の左右に位置し、片側18細胞から構成される(図2.6C, 2.6D)。細胞体積の平均値はホヤ胚の組織の中で最も大きかった (data not shown)。3DVMTEの筋肉は、表皮、中枢神経系、脊索、内胚葉索と接していた(図2.6D)。

筋肉細胞の系譜は Passamaneck らの報告 (Passamaneck *et al.*, 2007) を元に付加した(図2.6C)。興味深いことに、マボヤとカタユウレイボヤの筋肉は細胞数が異なる(マボヤは片側21細胞)。この3細胞分の違いは $b/b^*8.17$ と $b/b^*8.19$ 系列の細胞数が両方で異なることによる。カタユウレイボヤでは $b/b^*8.17$ 系列由来が2細胞、 $b/b^*8.19$ 系列由来の細胞は筋肉に分化しないのに対し、マボヤではそれぞれ3細胞($b/b^*8.17$)、2細胞($b/b^*8.19$)が筋肉細胞へと分化する(Nishida, 1987)。なおカタユウレイボヤもマボヤも、筋肉では尾芽胚期以降に細胞分裂は起こらない。

体幹腹側細胞 (Trunk ventral cells, TVCs)

体幹腹側細胞は体幹部内胚葉の後方に位置し、左右2対の細胞から構成される。alexa 488 phalloidin による染色の様子や細胞形態が周囲の細胞と異なっており、容易に識別できた(図2.1A')。3DVMTEでは表皮、体幹部内胚葉、間充織と接していた(図2.6D, 2.6E)。背側と腹側の細胞で大きさが異なり、腹側の細胞体積の方が大きかった(図2.6D, 2.7中の矢印)。2対の細胞は、 $B/B^*7.5$ 細胞の分裂により生じる (Stolfi *et al.*, 2010; Davidson, 2007)。

内胚葉性組織 (Endodermal tissues)

体幹部内胚葉 (Trunk endoderm) および内胚葉索 (Endodermal strand)

内胚葉細胞は変態後、幼若体の様々な内臓(内柱、鰓嚢、咽頭部など)へと分化する(Hirano and Nishida, 2000)。内胚葉は体幹部内胚葉(図2.7A, 黄)と尾部内胚葉索(図2.7A, ピンク)からなるが、境界の解剖学的な定義はなされていない。3DVMTEを観察すると、内胚葉索に当たる領域は2列の細胞列からなり、さらに左右の細胞が少しずつずれたフットプリントの様な並び方をしていた(図2.7C, 矢頭)。また細胞は後方先端を除き、頭尾軸方向に長細い形状をしていた(図2.7A, 2.7C)。体幹部内胚葉は表皮組織、中枢神経系、間充織、体幹腹側細胞および脊索と接し、内胚葉索は表皮、脊索、および筋肉と接していた(図2.1B', 2.6D)。細胞系譜の付加は Nishida らの報告を参考にした (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006; Nishida, 1987)。

・ B/B*7.6 系列の細胞

内胚葉索には変態時の内臓組織の形成において重要な役割を果たす、B/B*7.6 系列の細胞が位置する。B/B*7.6 細胞は原腸陥入期において非対称分裂を起こし、B/B*8.11 と B/B*8.12 細胞が生じる。この分裂の際、B/B*8.11 細胞に centrosome-attracting body (CAB) が受け継がれる (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006)。B/B*8.11 細胞は成体の腸壁の形成に関与し、一方、B/B*8.12 細胞は成体の生殖腺へと分化する (Takamura *et al.*, 2002)。

CAB には F-actin が凝集しており、従って B/B*8.11 細胞は alexa 488 phalloidin 染色することで内胚葉索の他の細胞と区別できた (図 2.7D)。3DVMTE を観察したところ、B/B*8.11 細胞は正中線上に位置し、内胚葉索の2列の細胞列に左右から挟まれていた (図 2.7F)。また表皮とは接触しておらず、内胚葉索の最後方の細胞から数えて8~13番目の細胞と接触していた (図 2.7E, 2.7F)。

一方、B/B*8.12 細胞は後期尾芽胚期までに1度分裂し、CiVH (CiVH は *vasa* の相同遺伝子である) ポジティブな4つの細胞を生じる (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006)。加えて、Nishida の報告によると、内胚葉索の最後方先端の細胞は b*8.17 系列の細胞であり、B/B*7.6 系列の細胞はその前に位置する (Nishida, 1987)。以上の報告から、3DVMTE の内胚葉索細胞の内、最後方の細胞から数えて2~5番目の細胞が B/B*8.12 細胞 (始原生殖細胞) に該当すると推測した (図 2.7E, 2.7F)。

興味深いことに、alexa 488 phalloidin 染色により、B/B*8.11 細胞の前方にも F-actin の豊富な領域が見つかった。この領域は内胚葉索の最後方の細胞から数えて17~18番目の細胞と接触していた (図 2.7E, 2.7F)。Shirae-Kurabayashi らは原腸陥入期の B7.6 細胞を CellTracer CM-DiI を注入することでラベルし、尾芽胚における娘細胞の位置を追跡した。論文中において言及はないが、結果を見ると、B/B*8.11 と B/B*8.12 細胞の他にもう1つ、CM-DiI ラベルされた細胞が B/B*8.11 細胞の前方に見られる (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006, Fig.4B)。内胚葉索における位置も対応していることから、本研究で見られた F-actin の豊富な領域は、B/B*7.6 系列の細胞かもしれない。

カタユウレイボヤ胚では報告のない細胞群

A/A*4.1 系列と推定される体幹部の細胞群

3DVMTE を構築する過程で、体幹部前方にこれまでに報告のない細胞群を見つけた (図 2.8)。alexa 488 phalloidin で染色した共焦点顕微鏡画像を見ると、これらの細胞の形態は周囲の組織とは異なっており、さらに細胞質には顆粒状の物質が見られた (図 2.8A 中の赤い矢頭)。細胞群は左右に4細胞ずつ、8つの細胞で構成されていた (N=5; 図 2.8C-D)。また表皮、内胚葉、および中枢神経系

のSV (anterior SV, middle SV) と接していた (図 2.8B)。SV との接触領域に注目して観察すると、SV の側面に位置する、周囲の細胞と比べて前後軸方向に長い細胞と接していた (図 2.5H および 2.8C' 中の白線)。

これまでの報告から、細胞群が見つかった尾芽胚のSV の腹側側面の領域には、*Ci-gnrh-X* (gonadotropin-releasing hormone 遺伝子)、*Ci-TK* (tachykinin 遺伝子)、*CLSTR00975* (ペプチド遺伝子)、*CLSTR06757* (ペプチド遺伝子) を発現する細胞がそれぞれ存在する (Hamada *et al.*, 2011)。これらの細胞の内どれかが、今回見つかった細胞群と一致するかもしれない。加えて、幼生期のマボヤの脳領域前方に、A4.1 系列の機能不明の細胞群が報告されている (Taniguchi and Nishida, 2004)。この細胞群の周辺組織との位置関係は、3DVMTE 中に見つかった細胞群と類似していた。従って新たに見つかった細胞群の系譜を、A/A*4.1 系列の細胞と推定した。

b/b* 7.13 系列と推定される尾部の細胞群

体幹部前方の細胞群に加え、尾部背側にもこれまでに報告のない細胞群を見つけた (図 2.9)。これらの細胞群は表皮と筋肉の間に位置しており、神経系を左右から挟んでいた (図 2.9 中矢印)。

見つかった4細胞の形態は、胚の左右で非対称であった (図 2.9B, 緑)。中期尾芽胚において左右の2細胞はそれぞれ接触しており (図 2.9)、また前方の細胞の下に後方の細胞が潜り込んでいた (図 2.9A)。興味深いことに、初期尾芽胚ではこれらの細胞は接触せず、頭尾軸方向に離れて位置する (data not shown)。発生が進行すると (周囲の組織との相対的な位置から推測すると) 後方の細胞が前方へと移動し、中期尾芽胚期頃、前方の細胞の下に後方の細胞が潜り込む。以上の移動は常に表皮下および筋肉の背側で進行する (data not shown)。なお初期尾芽胚期以前の胚も観察したが、細胞群の位置を特定することは困難であった。

細胞群について尾芽胚期以降の追跡は行われておらず、従って幼生期における機能は判明していない。候補としては、幼生期における位置および細胞の形態が Imai らの報告 (Imai and Meinertzhagen, 2007a, 2007b; Brown *et al.*, 2005) した細胞と類似していることから、 γ -aminobutyric acid (GABA) 抗体に対して免疫反応を示す bipolar neuron が考えられる。他の候補としては、Hamada らが報告した *CLSTR16011* 遺伝子に対する whole-mount *in situ* hybridization (WISH) で染色する細胞である。尾芽胚における細胞の位置は、3DVMTE で見つかった細胞群の位置と類似している。*CLSTR16011* 遺伝子はホルモンまたはニューロンのペプチド遺伝子と推定されている (Hamada *et al.*, 2011)。

マボヤ尾芽胚において、Nishida と Satoh は、尾部背側表皮下に左右2細胞ず

つからなる undefined cell pairs が存在することを報告した。さらに64細胞期の各割球に Horseradish peroxidase を注入することでラベルし、尾芽胚期の娘細胞の位置を diaminobenzidine により追跡し、undefined cell pairs は $b/b^*7.13$ 系列の細胞であることを明らかにした (Nishida, 1987; Nishida and Satoh, 1985)。現在までに undefined cell pairs の形態形成への影響および幼生における機能は判明しておらず、マボヤにおいても未だどの組織にも分類されていない。本研究によりカタユレイボヤ尾芽胚で見つかった尾部背側の細胞群も左右に2細胞ずつ存在しており ($N=5$)、胚内における位置に加え細胞数もマボヤの報告と一致していた。以上のことから、カタユレイボヤ尾芽胚で見つかった尾部背側の4細胞の細胞系譜について、 $b/b^*7.13$ 系列であると推測した。しかしながら、片側の2細胞が共に $b/b^*7.13$ 系列の細胞だとすると、初期尾芽胚において離れて位置する原因は不明である。

2.3.3 3DVMTE は脊索動物の尾芽胚形成過程の解明に役立つ

脊索動物の進化についての研究において、主要な目標の一つは、脊索動物に固有の形質が獲得された過程を解明することである。オタマジクシ型幼生の尾部も脊索動物に固有の形質であり、尾部の形成は尾芽胚期に進行する。従って、尾芽胚の形成に関わるメカニズムの解明が目指される。3DVMTE の構築により得た細胞数や解剖学的特徴といった知見は、メカニズムの解明を目指す上で、正常胚 (WT) の標準データとなる点で有用である。

ホヤと脊椎動物を含む他の脊索動物との間には、脊索、脊索背側において管状構造をとる中枢神経系、脊索・中枢神経系・筋肉を含む尾部といった脊索動物に固有の解剖学的特徴を始め (Satoh, 2009, 2008)、脊索における *Brachury* の発現 (Nibu *et al.*, 2013; Technau 2001; Kavka and Green 1997)、中枢神経系の領域境界 (Dufour *et al.*, 2006; Aruga, 2004; Wada *et al.*, 1998)、頭部プラコード (placode, 肥厚化表皮外胚葉) の境界 (Mazet *et al.*, 2005)、心臓原基 (Stolfi *et al.*, 2010) などに、遺伝子発現パターンの保存が見られる。これまで脊索動物尾芽胚の3次元解剖学的特徴を細胞レベルで記載した報告は無く、従って3DVMTE で得た情報はホヤ類だけでなく、その他の種を含む脊索動物の尾芽胚形成過程の解析を助けると期待される。

2.4 第2章のまとめ

本章では、共焦点顕微鏡画像から構築した3DVMTEを元に、カタユウレイボヤ中期尾芽胚の細胞数、および各組織の解剖学的特徴を記載した研究について記した。尾芽胚期は脊索動物に固有の発生段階である。尾芽胚期の中に脊索動物の体制が構築されるため、構築に関わる形成メカニズムを解析する上で、尾芽胚の解剖学的知見は有用な情報となる。本研究で構築した3DVMTEは、T/H=1.86の個体は1579細胞、T/H=1.78の個体では1446細胞で構成されており、T/H=1.86の個体に関して各組織細胞の内訳は、表皮組織836細胞、中枢神経系228細胞、脊索40細胞、筋肉36細胞、間充織218細胞、内胚葉性組織205細胞、体幹腹側細胞4細胞であった。さらにカタユウレイボヤではこれまでに報告のなかった細胞群を、体幹側(8細胞)、尾部側(4細胞)に1群ずつ発見した。また3DVMTEの観察を通して見られた各組織の解剖学的特徴について1細胞レベルで記載し、加えて細胞系譜情報を付加した。本研究で得られた脊索動物尾芽胚まるごと1個体分の細胞数、および各組織の1細胞レベルでの解剖学的な知見は、脊索動物の体制がどのような過程で形成するのか解析する上で役立つ。さらに体制獲得の起源、進化に迫る上でも有用な情報となる。

表 2.1 構築した3DVMTEの細胞数 (T/H=1.86, 1.78の2個体)。各組織は解剖学的特徴に従い階層的に表示した。

Anatomical component	Cell counts at the mid-tailbud stage	
	T/H=1.86	T/H=1.78
Whole embryo	1579	1446
Epidermis	761	742
Trunk	371	372
Tail	337	323
Dorsal	44	37
Dorso Lateral	37	34
Dorso Lateral [*]	34	37
Lateral	52	54
Ventral Lateral	33	29
Ventral Lateral [*]	33	31
Lateral [*]	47	52
Ventral	57	49
Tail Tip	53	47
Putative Oral Siphon Primordium	4	6
Putative Palps region	71	69
b/b [*] 7.13 derived cells (Undefined cells)	4	4
CNS	228	215
Putative Sensory vesicle	122	111
AnteriorSV	60	64
MiddleSV	39	33
Dorsal	2	2
Lateral	16	16
Lateral [*]	17	11
Ventral	4	4
PosteriorSV	23	14
Dorsal	4	2
Lateral	8	5
Lateral [*]	8	5
Ventral	3	2
Putative Neck	14	12
Dorsal	2	2
Lateral	5	4
Lateral [*]	5	4
Ventral	2	2
Putative Visceral ganglion	19	20
Dorsal	2	2
Lateral	6	7
Lateral [*]	7	7
Ventral	4	4
Putative Neural tube	73	72
Dorsal	21	17
Lateral	18	19
Lateral [*]	18	19
Ventral	16	17
Notochord	40	40
A	32	32
B	8	8
Muscle	36	36
B8.10	2	2
B [*] 8.10	2	2
B8.15-16	4	4
B [*] 8.15-16	4	4
B9.13-16	8	8
B [*] 9.13-16	8	8
A8.16	2	2
A [*] 8.16	2	2
b8.17	2	2
b [*] 8.17	2	2
TVCs	4	4
Mesenchyme	218	164
B7.7+8.5	114	78
B [*] 7.7+8.5	104	86
Endoderm	199	154
trunk endoderm	178	138
endodermal strand	21	16
Potential Primordial Germ Cells (B/B*9.23 + 9.24)	4	2
B/B*8.11(CAB)	2	2
Actin Rich Region	1	2
A/A [*] 4.1 derived cells (Undefined cells)	8	8

表 2.2 3DVMTE 2 個体の細胞数の比較

Tissue	Ratio= 1.78 (total: 1446 cells)	Ratio= 1.86 (total: 1579 cells)	difficence of cell number	[%]
Epidermal tissues	817	836	19	2.3
CNS	215	228	13	6.0
Notochord	40	40	0	0.0
Muscle	18 + 18*	18 + 18*	0	0.0
TVCs	4	4	0	0.0
Mesenchyme	78 + 86*	114 + 104*	54	32.9
Endodermal tissues	156	203	47	30.1
A/A*4.1 derived cells	4 + 4*	4 + 4*	0	0.0
b/b*7.13 derived cells	2 + 2*	2 + 2*	0	0.0

*がついた数字は、胚の左右一対で1組となる組織について、右側の細胞数を表す。最も右の数字は、各組織の細胞数の差が、T/H=1.78の各組織の細胞数の何パーセントに相当するかを示している。

表 2.3 112 細胞期から中期尾芽胚期の間にかかる細胞分裂回数の推定。
各組織における分裂回数は次の式を用いて推定した。

$$D = \log_2 X - \log_2 Y$$

(D: 分裂回数, X: 尾芽胚期における細胞数, Y: 112 細胞期における細胞数)

Anatomical component	Tissue	Lineage	name of blastmere at late 112-cell stage	112-cell stage	mTB stage	# of cell division from 112-cell stage
Whole embryo				112	1579	3.8
	Epidermis			50	761	3.9
		Trunk (a-line)	a8.21-24 + 8.26-32	22	371	4.1
		Tail (b-line)	b8.18 + 8.20-32	28	337	3.6
	CNS		A8.7 + 8.8 + a8.17-8.20 + 8.25 + b8.19	18	228	3.7
	Notochord			10	40	2.0
		A	A8.5 + 8.6 + 8.13 + 8.14	8	32	2.0
		B	B8.6	2	8	2.0
	Muscle			14	36	1.4
		B9.19+9.20	B7.5	1	2	1.0
		B*9.19+9.20	B*7.5	1	2	1.0
		B9.29-32	B8.15 + 8.16	2	4	1.0
		B*9.29-32	B*8.15 + 8.16	2	4	1.0
		B10.25-32	B8.7 + 8.8	2	8	2.0
		B*10.25-32	B*8.7 + 8.8	2	8	2.0
		A9.31+9.32	A8.16	1	2	1.0
		A*9.31+9.32	A*8.16	1	2	1.0
		b9.33+9.34	b8.17	1	2	1.0
		b*9.33+9.34	b*8.17	1	2	1.0
	Mesenchyme			6	218	5.2
		B7.7+8.5	B7.7 + 8.5	3	114	5.2
		B*7.7+8.5	B*7.7 + 8.5	3	104	5.1
	Endodermal tissues			12	205	4.1
		trunk endoderm	A/A*7.1 + 7.5 + B7.1 + B7.5	8	178	4.5
		endodermal strand	B/B*7.2 + 7.6 + b*8.17	4	27	2.8

分裂回数の数字を斜体で表した組織では、初期発生過程においてこれ以上細胞分裂しない

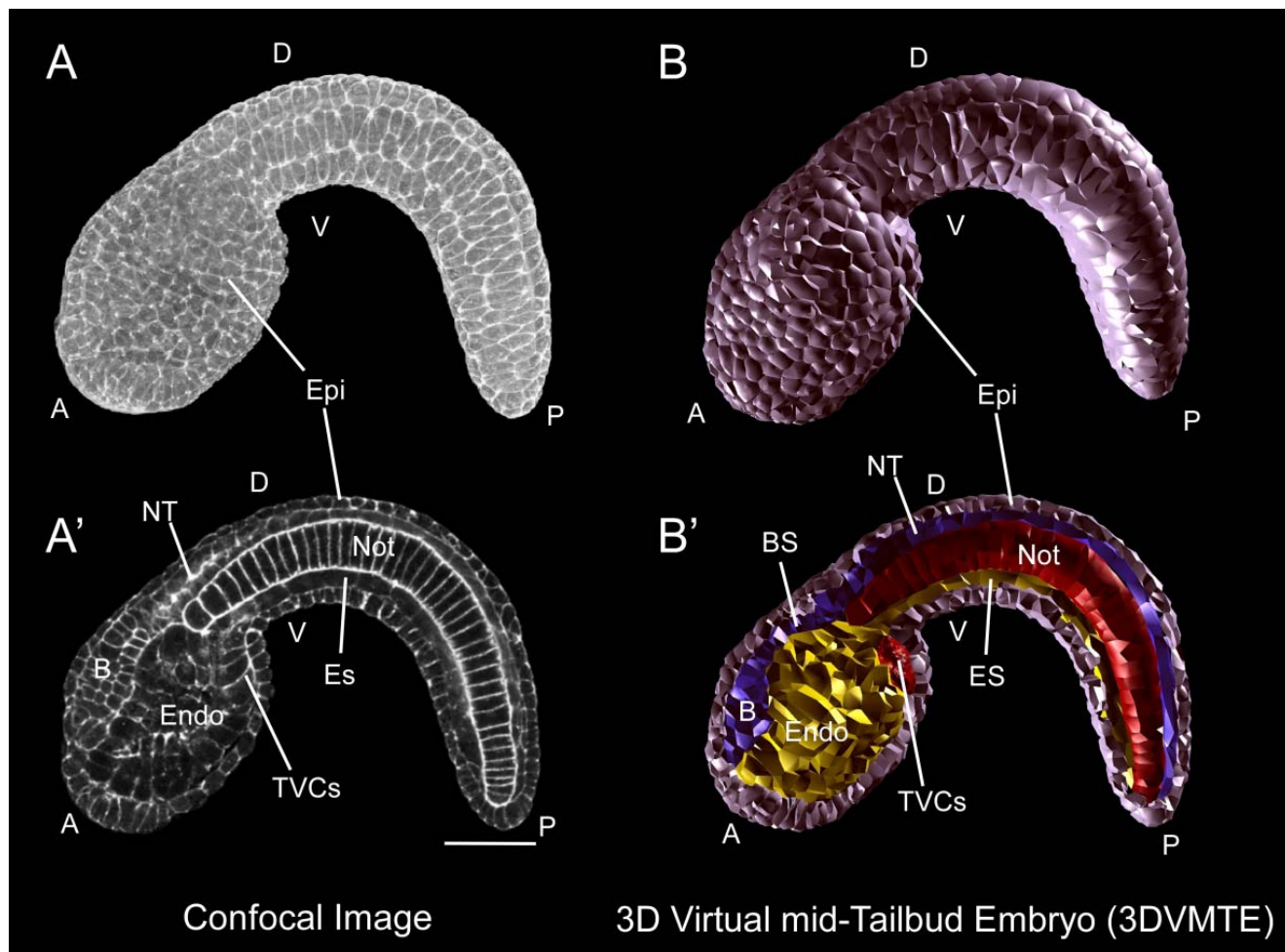


図 2.1 共焦点顕微鏡画像から構築した3次元中期尾芽胚モデル (T/H=1.86)

A, A' : alexa 488 phalloidin で染色した胚の共焦点顕微鏡画像。共に胚の側方から観察した際の図 (A, 3D 図; A', 断面図)。**B, B'** : 共焦点顕微鏡画像 (A, A') から構築した 3DVMTE。共に胚の側方から観察した際の図であるが、図 B' については一部の表皮、筋肉、間充織および、それぞれ A4.1、b7.13 系列と推定される細胞群を表示していない。カタユウレイボヤ胚の形態 (A, A') を 3DVMTE はよく反映している。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、B, brain (脳)、BS, brain stem (脳幹)、Endo, endoderm (内胚葉)、ES, endodermal strand (内胚葉索)、Epi, epidermis (表皮)、Not, notochord (脊索)、NT, caudal neural tube (尾部神経管)、TVCs, trunk ventral cells (体幹腹側細胞)、Scale bar: 25 μ m

Tissue Name	Cell Count (total1579 cells)	Lateral View	Dorsal View	Tissue Name	Cell Count (total1579 cells)	Lateral View	Dorsal View
Epi	761			Mes	114+104*		
Putative OSP	4			Endo	199		
Putative Palps	71			Potential PG Cells	4		
CNS	228			B/B*8.11 (CAB)	1+1*		
Not	40			Actin Rich Region in ES			
Mus	18+18*			A/A*4.1 derived cells (Undefined cells)	4+4*		
TVCs	2+2*			b/b*7.13 derived cells (Undefined cells)	2+2*		

図 2.2 3DVMTE を構成する各組織の細胞数 (T/H=1.86)

図中左から、組織の名前、細胞数、組織を胚の側方から見た図（表皮の領域を併せて表示している）、背側から見た図（赤線は胚の輪郭を表す）。3DVMTE は全て左側が前方、右側が後方である。*がついた数字は、胚の左右一対で1組となる組織について、右側の細胞数を表す。T/H=1.86 の3DVMTE は、全部で1579の細胞からなる。

[略記] CAB, centrosome-attracting body、CNS, central nervous system (中枢神経系)、Endo, endoderm (内胚葉)、Epi, epidermis (表皮)、Mes, mesenchyme (間充織)、Mus, muscle (筋肉)、Not, notochord (脊索)、OSP, oral siphon primordium (入水口原基)、PG, primordial germ cells (始原生殖細胞)、TVCs, trunk ventral cells 体幹腹側細胞)

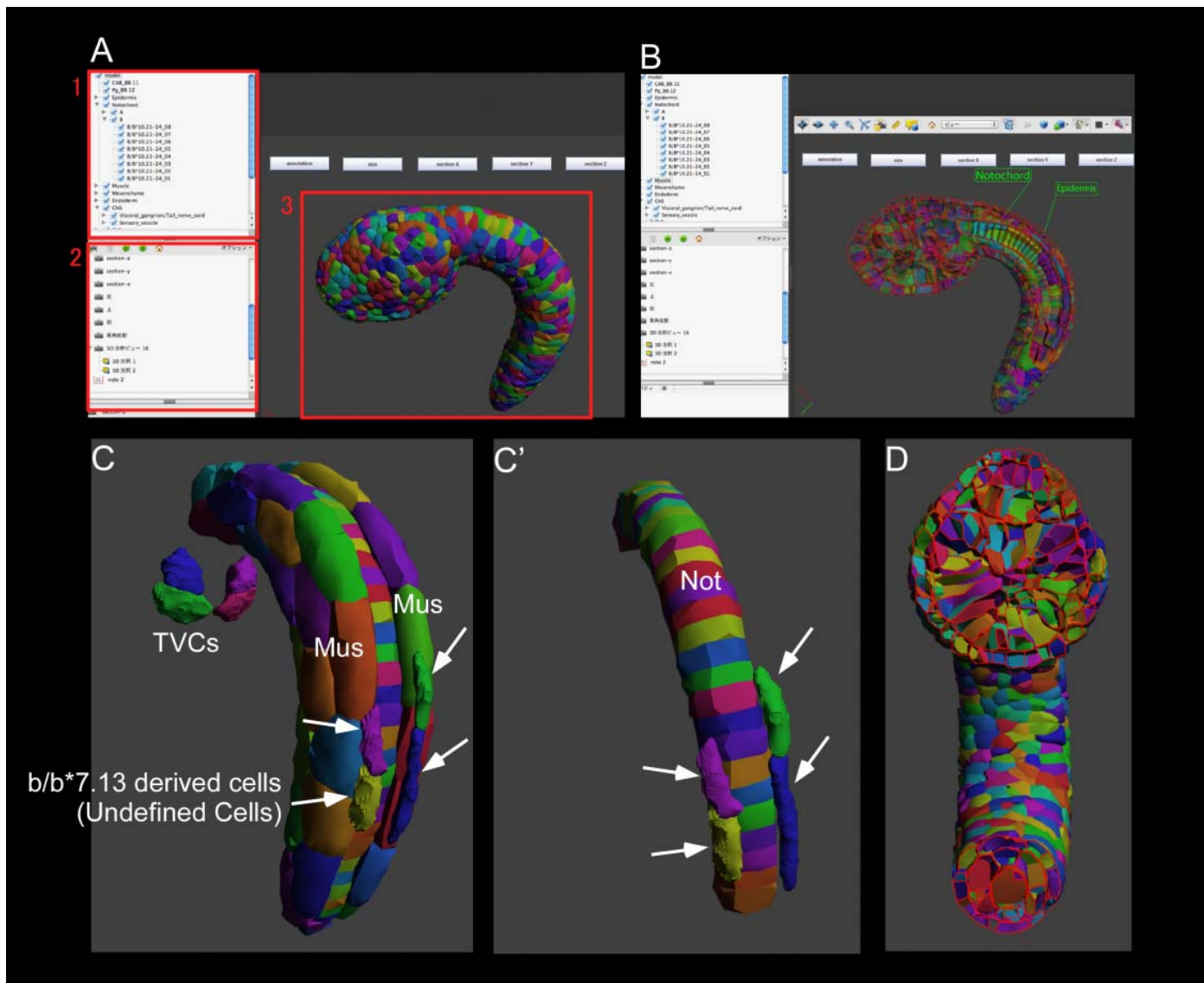


図 2.3 3D PDF 形式で保存した 3DVMTE と操作画面

A : 3D PDF の操作画面。3DVMTE を構成する各組織は解剖学的特徴に従い、階層的に記した (図中 1)。これにより、特定の組織や構造、細胞を選択して観察できる。また観察対象、角度や断面図など、観察時の条件を保存することができる (図中 2)。3D PDF を使用することで、3DVMTE の直感的な操作、観察が可能である (図中 3)。**B-D** : 3D PDF を使用した 3DVMTE の観察例。断面図 (**B**, 胚の側方から見た図; **D**, 胚の腹側から見た図)。特定の組織のみを表示し、組織間の位置関係を観察した例 (**C**, **C'**)。 **C**, **C'** : $b/b*7.13$ 系列と推定される 4 細胞が、筋肉の背側に見つかった (矢印)。

[略記] Mus, muscle (筋肉)、Not, notochord (脊索)、TVCs, trunk ventral cells (体幹腹側細胞)

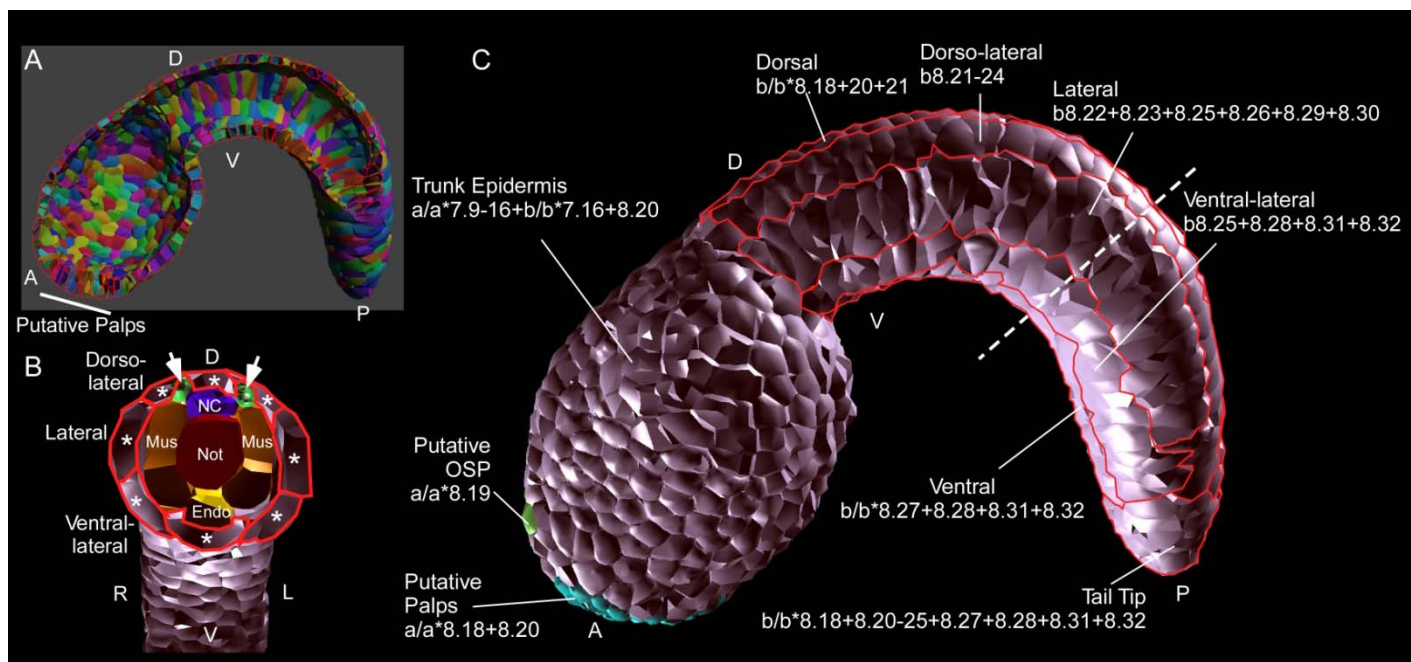


図 2.4 表皮組織の解剖学的特徴

A : 表皮の断面を胚の側方から見た図。細胞の形態から palps (付着器) と推定される領域を白線で示した。**B** : 図 C 中の白い点線の位置における断面を、前方から見た図。尾部表皮は 8 列の細胞群からなる (*)。b/b* 7.13 系列と推定される細胞が、筋肉の背側に見える (矢印)。**C** : 表皮を胚の側方から見た図。細胞の形態から OSP、palps と推定される領域をそれぞれ黄緑、水色で示した。また赤線により尾部を領域分けした。細胞系譜を領域ごとに記した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、L, left (左)、R, right (右)、Endo, endoderm (内胚葉)、Epi, epidermis (表皮)、Mus, muscle (筋肉)、NT, caudal neural tube (尾部神経管)、Not, notochord (脊索)、OSP, oral siphon primordium (入水口原基)

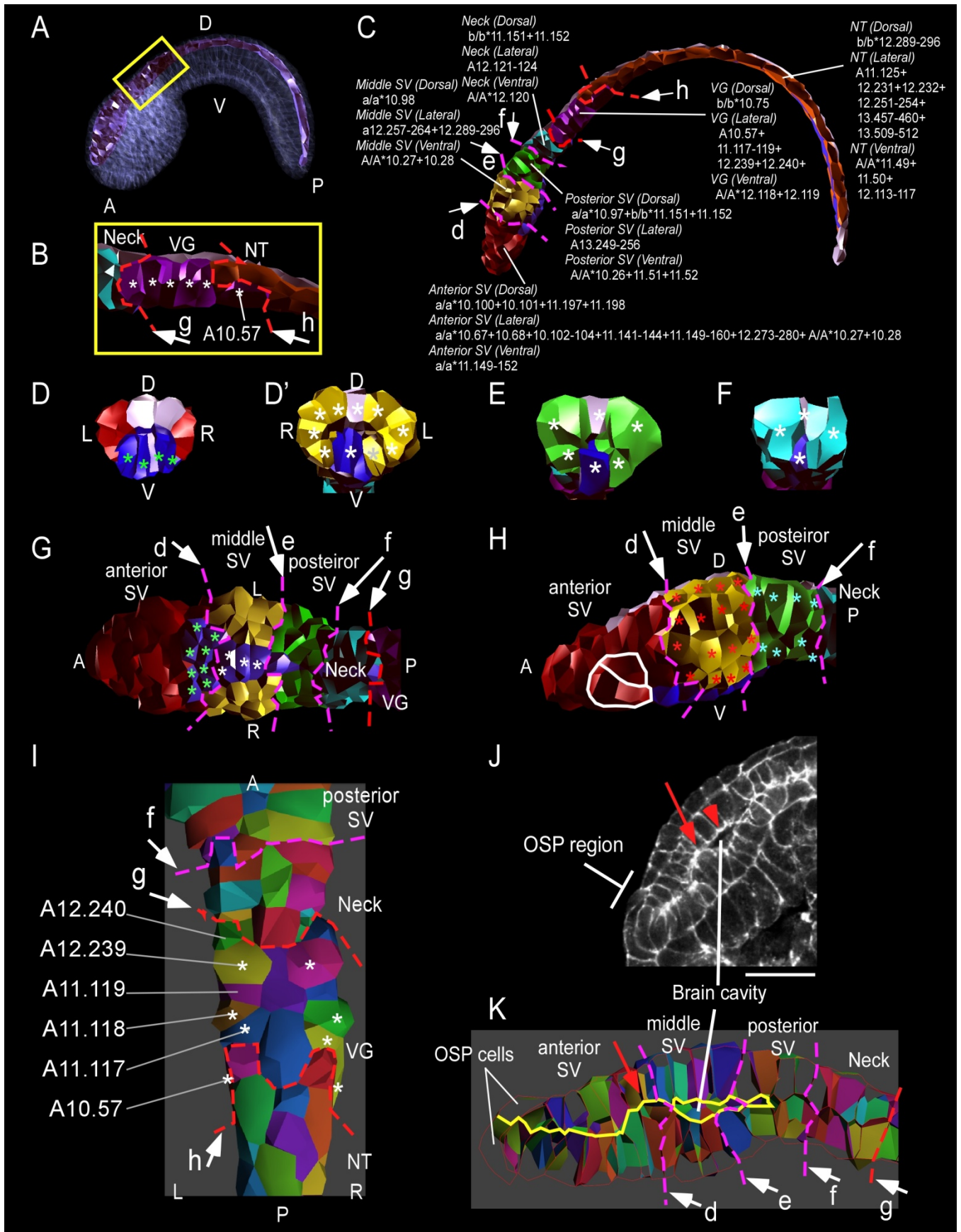


図 2.5 中枢神経系の解剖学的特徴

A : 中枢神経系全体を側方から見た図 (表皮の領域を併せて表示している)。
B-H : 解剖学的特徴から、中枢神経系を6つの領域に分けた。ピンクの点線はそれぞれ、anterior SVとmiddle SV (d)、middle SVとposterior SV (e)、posterior SVとneck (f) の境界を示す。また赤点線はそれぞれ、neckとVG (g)、およびVGとNT (h) の境界を示す。中枢神経系は管状の構造をとるが、背側の細胞を白、腹側の細胞を青で示し、左右側方の細胞については領域ごとに色を分けて示した。**B** : 図A中、黄枠の領域を拡大した図。6つの*はVGを構成する細胞の内、側面の細胞を示す。A10.57細胞は前後軸方向に細長く、周囲の細胞の形態と比べ大きく異なる。**C** : 中枢神経系の細胞系譜を領域ごとに記した。**D-F** : 図C中、ピンクの点線 (d, e, f) の位置における断面図。D、D'、E、Fの切断面はそれぞれ、d, e, fの記号に対応する。図は、前方 (D', E, F) および後方 (D) から見た図。**D** : 中枢神経系全体にわたり、anterior SV以外の領域では、腹側の細胞は1列に並んでいる (図D-F中の青い細胞)。一方anterior SVの尾部側の領域では、4列の細胞が並んでいる (図DおよびG中、緑の*)。**D'** : 断面図から、middle SVは10個の細胞 (*) により管を形成する。細胞の内訳は、背側と腹側に1つずつ、左右に4つずつである。10の細胞から成る細胞群が前方から後方にかけて4行存在する (図H中赤い*)。**E** : 断面図から、posterior SVは6個の細胞 (*) により管を形成する。細胞の内訳は、背側と腹側に1つずつ、左右に2つずつである。6の細胞から成る細胞群が前方から後方にかけて4行存在する (図H中、水色の*)。**F** : 断面図から、neck以降の領域 (neck, VG, NT) は4個の細胞 (*) により管を形成する。細胞の内訳は、背側と腹側に1つずつ、左右に1つずつである。**G** : VGより前方の中枢神経系を腹側から見た図。anterior SVおよびmiddle SVの管を形成する細胞の内 (D, D')、腹側の細胞を緑または白色の*で示した。**H** : neckより前方の中枢神経系を側方から見た図。middle SVおよびposterior SVの管を形成する細胞 (D, E) の内、側方の細胞をそれぞれ赤色と水色の*で示した。白線で囲った2つの細胞の体積は周辺の細胞と比べて大きく、また前後軸方向に長かった。**I** : posterior SVとNTの間の中枢神経系を背側から見た図。白い*で示した6細胞 (A12.240, A12.239, A11.119, A11.118, A11.117, A10.57) は体積が大きく、また左右に突き出ているため他の細胞よりも目立っていた。さらに、報告にあった細胞の並びと一致していた (Ikuta and Saiga, 2007)。**J, K** : SVを側方から見た図。Jはalexa 488 phalloidinで染色したホヤの共焦点顕微鏡画像、Kは3D PDFの断面画像。図K中黄色の領域は神経管内腔を表す。神経管内腔について、middle SVおよびposterior SVでは明瞭な空洞 (図J中赤矢頭) が見られるが、anterior SVとmiddle SVの境界にある細胞 (赤矢印) の突出により狭くなっていた。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹

側)、L, left (左)、R, right (右)、Epi, epidermis (表皮)、CNS, central nervous system (中枢神経系)、Endo, endoderm (内胚葉)、Mes, mesenchyme (間充織)、Mus, muscle (筋肉)、Not, notochord (脊索)、NT, caudal neural tube (尾部神経管)、OSP, oral siphon primordium (入水口原基)、SV, sensory vesicle (感覚胞)、VG, visceral ganglion (運動神経節)、Scale bar: 20 μ m

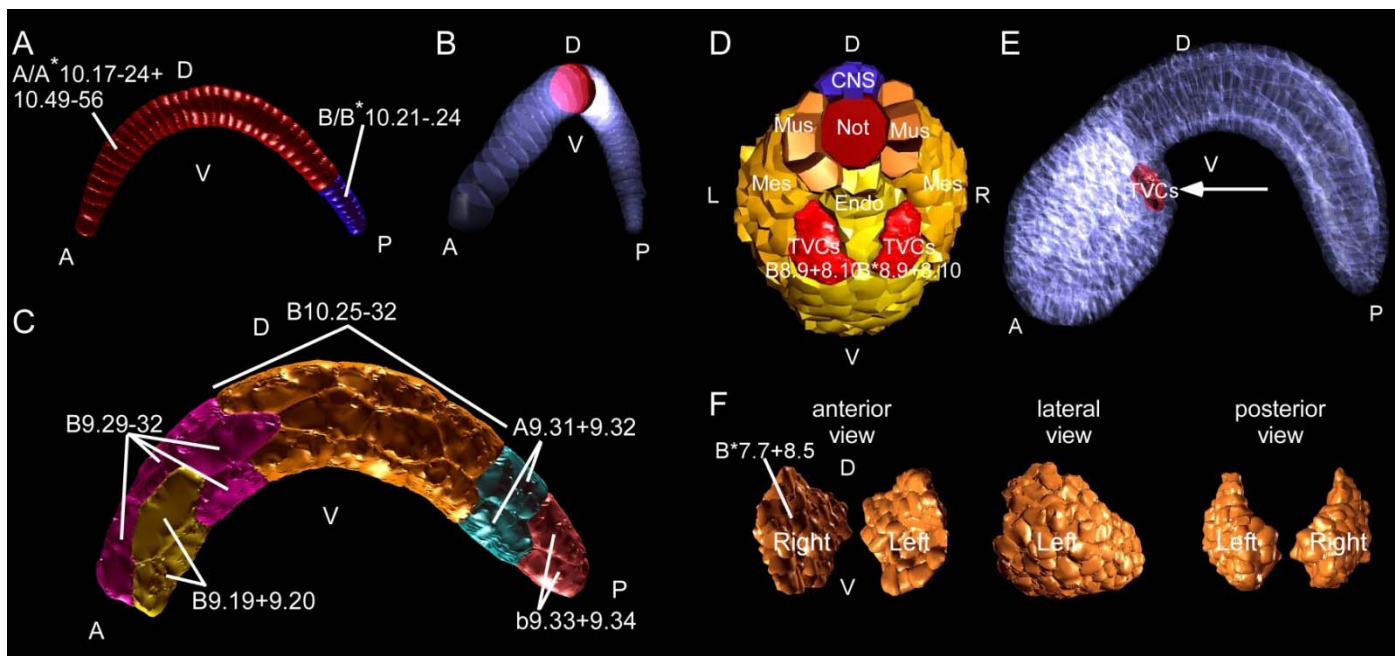


図 2.6 中胚葉性組織の解剖学的特徴

A, B : 3DVMTE 中の脊索のみを表示した図。図 A は脊索を側方から見た図。脊索は A 系列の細胞 32 個 (赤) と B 系列の細胞 8 個 (青) から構成される (A)。1 細胞のみ表示して観察すると、脊索細胞が円盤状の形態を示すことが分かる (B)。**C** : 3DVMTE 中の筋肉のみを表示し、側方から見た図。筋肉は脊索を挟むように、胚の左右に 1 つずつ存在する (D)。筋肉は片側当たり、A 系列の細胞 2 個 (水色)、B 系列の細胞 14 個 (オレンジ、ピンク、黄)、b 系列の細胞 2 個 (赤) からなる。**D, E** : TVCs の 3DVMTE 中の位置。図 D は 3DVMTE を図 E 中の矢印方向から見た図。図 E は側方から見た図 (表皮の位置を併せて表示している)。**F** : 3DVMTE 中の間充織のみを表示した図。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、L, left (左)、R, right (右)、CNS, central nervous system (中枢神経系)、Endo, endoderm (内胚葉)、Mes, mesenchyme (間充織)、Mus, muscle (筋肉)、Not, notochord (脊索)、TVCs, trunk ventral cells (体幹腹側細胞)

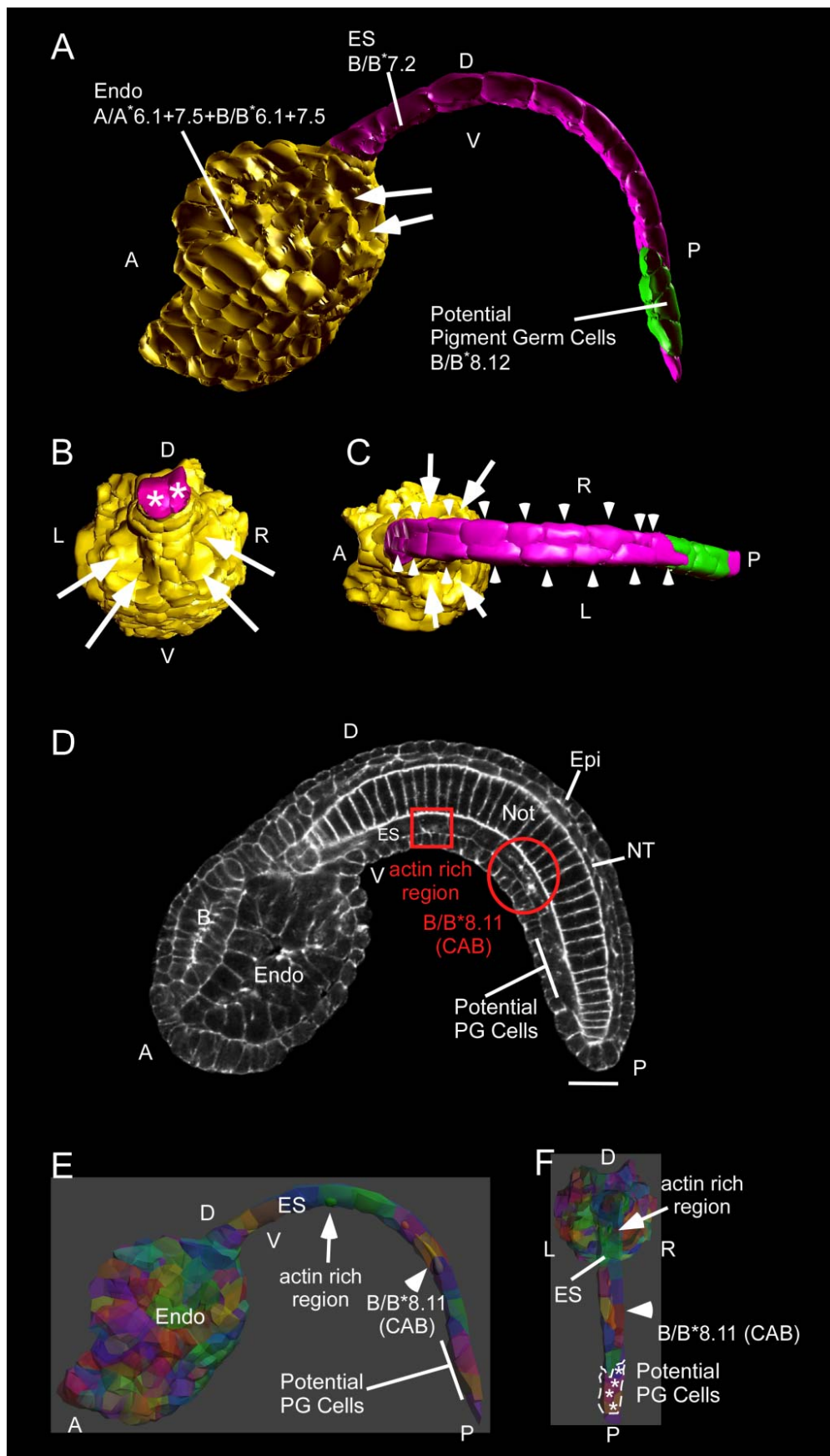


図 2.7 内胚葉性組織の解剖学的特徴

A-C : 3DVMTE 中の体幹部内胚葉 (黄)、内胚葉索 (ピンク)、PG 細胞と推定される領域 (黄緑) を表示した図。図 A は側方から、図 B は後方から (内胚葉索の一部は表示していない)、図 C は背側から見た図。矢印は TVCs が位置するへこみを示す (図 2.8D, 2.8E を参照)。内胚葉索は左右1列ずつ並んだ細胞 (図 B 中、*) によって構成されており、また左右の細胞が少しずつずれた、フットプリントの様な並び方をしている (図 C 中、矢頭)。**D-F** : B/B* 8.11 細胞 (細胞質には CAB 構造が存在する) (矢頭) およびアクチンが凝集した細胞 (矢印) の、内胚葉索中の位置。図 D は alexa 488 phalloidin で染色した胚の共焦点顕微鏡画像 (断面図)、図 E および F は 3D PDF の図。図 D および E は胚を側方から、F は後方から見た図。B/B* 8.11 細胞およびアクチンが凝集した細胞は正中線上に位置し、内胚葉索の細胞に左右から挟まれていた (F)。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、L, left (左)、R, right (右)、CAB, centrosome-attracting body、Epi, epidermis (表皮)、Endo, endoderm (内胚葉)、ES, endodermal strand (内胚葉索)、Not, notochord (脊索)、NT, caudal neural tube (尾部神経管)、PG cells, primordial germ cells (始原生殖細胞)、TVCs, trunk ventral cells (体幹腹側細胞)

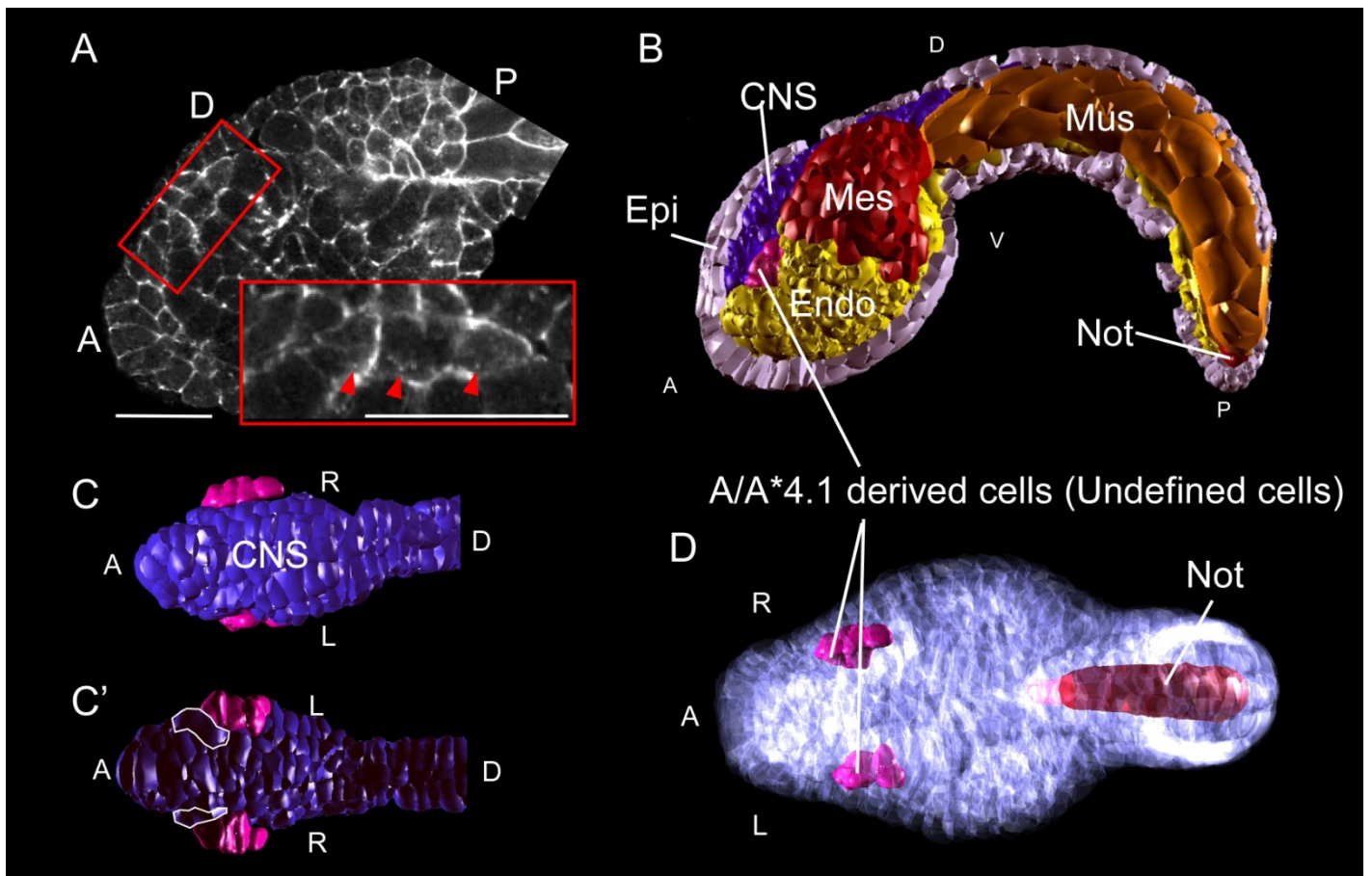


図 2.8 A/A*4.1 系列と推定される細胞群の解剖学的特徴

A : alexa 488 phalloidin で染色したホヤの共焦点顕微鏡画像 (断面図)。体幹部を側方から見た図。赤枠は、A/A*4.1 系列の 4 細胞と推定した細胞群の位置を示す。右下の図は拡大図。細胞の形態は周囲の組織と異なっており、また細胞質には顆粒状の物質 (赤い矢頭) が見られた。Scale bar は 20 μm 。 **B-D** : A/A*4.1 系列と推定した細胞群 (ピンク) の 3DVMTE 中の位置。図 **B** は側方から見た図 (表皮の一部を表示していない)、図 **C** および **D** は背側から、図 **C'** は腹側から見た図。図 **D** には表皮の領域 (白) を併せて表示している。細胞群は左右に 4 つずつ見つかった。また細胞群は中枢神経系、表皮、内胚葉と接していた (**B**)。中枢神経系との接触領域についてより詳しく見たところ、図 2.5 (H) 中で記述した他の細胞と比較して大きな細胞塊 (**C'**、白線) と接していることがわかった。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、L, left (左)、R, right (右)、Epi, epidermis (表皮)、CNS, central nervous system (中枢神経系)、Endo, endoderm (内胚葉)、Mes, mesenchyme (間充織)、Mus, muscle (筋肉)、Not, notochord (脊索)

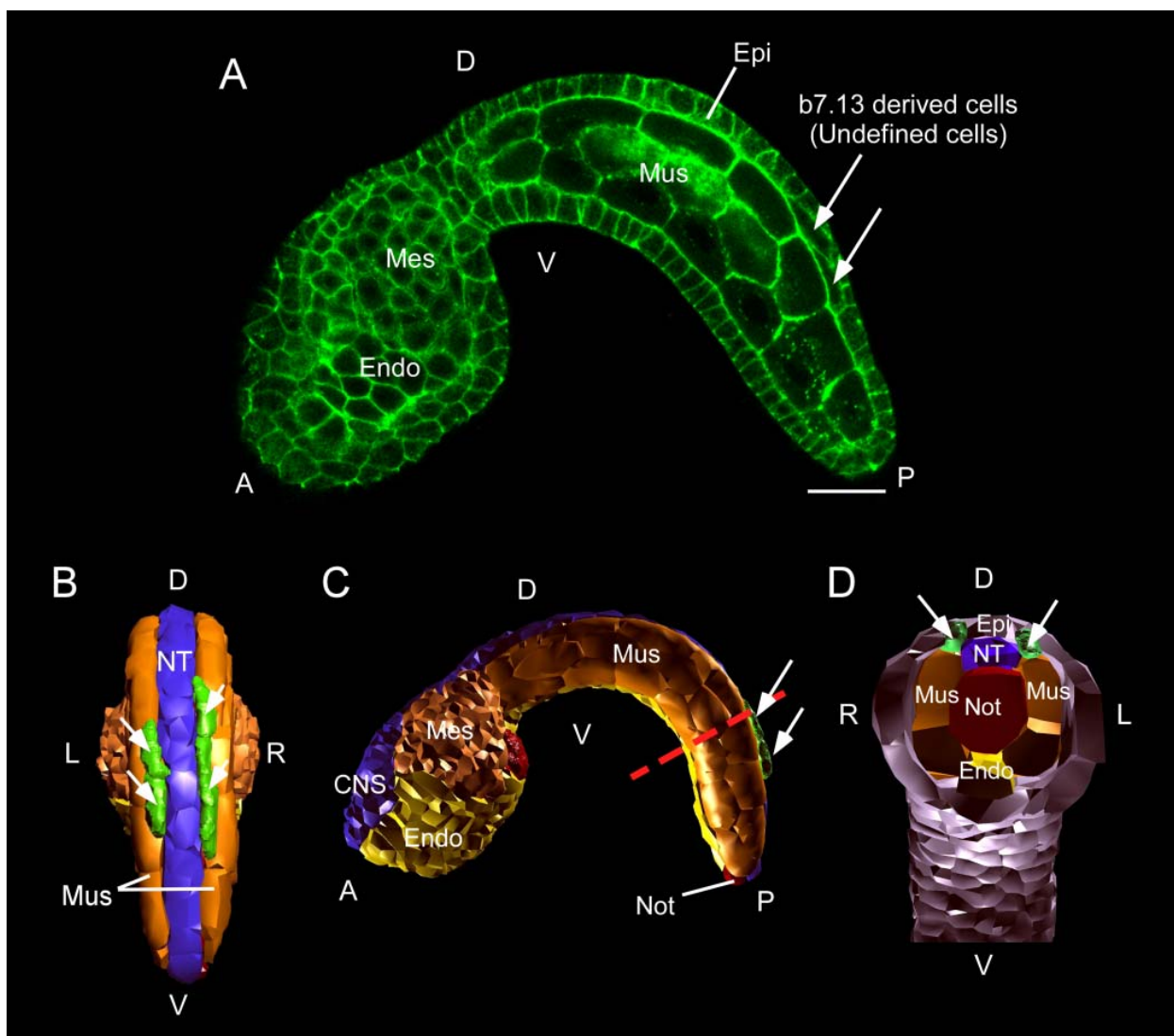


図 2.9 b/b* 7.13 系列と推定される細胞群の尾芽胚内における位置

A-D : 図 A は alexa 488 phalloidin で染色した胚の共焦点顕微鏡画像 (断面図)。図 B-D は 3DVMTE 中の各組織の位置を表した図。図 A と C は側方から、図 B は後方から見た図。図 D は図 C 中の赤い点線の位置における断面を、前方から見た図。b/b* 7.13 系列と推定される細胞 (矢印) は、筋肉の背側に見つかった。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、L, left (左)、R, right (右)、CNS, central nervous system (中枢神経系)、Endo, endoderm (内胚葉)、Epi, epidermis (表皮)、Mes, Mesenchyme (間充織)、Mus, Muscle (筋肉)、NT, caudal neural tube (尾部神経管)、Not, notochord (脊索)、Scale bar, 20 μ m

第2章の参考文献

- Aruga J.**, (2004), The role of *Zic* genes in neural development, *Mol. Cell. Neurosci.*, 26, 205-221
- Brown E. R., Nishino A., Bone Q., Meinertzhagen I. A., Okamura Y.**, (2005), GABAergic synaptic transmission modulates swimming in the ascidian larva, *Eur. J. Neurosci.*, 22, 2541-2548
- Christiaen L., Jaszczyszyn Y., Kerfant M., Kano S., Thermes V., Joly J. S.**, (2007), Evolutionary modification of mouth position in deuterostomes, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, 502-511
- Cole A. G., Meinertzhagen I. A.**, (2004), The central nervous system of the ascidian larva: mitotic history of cells forming the neural tube in late embryonic *Ciona intestinalis*, *Developmental Biology*, 271, 239-262
- Conklin E. G.**, (1905), The organization and cell lineage of the ascidian egg, *J. Acad. Nat. Sci.*, 13, 1-119
- Crowther R. J. and Whittaker J. R.**, (1986), Differentiation without cleavage: Multiple cytospecific ultrastructural expressions in individual one-celled ascidian embryos, *Developmental Biology*, 117, 114-126
- Davidson B.**, (2007), *Ciona intestinalis* as a model for cardiac development, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, 16-26
- de Boer B. A., Soufan A. T., Hagoort J. et al.**, (2011), The interactive presentation of 3D information obtained from reconstructed datasets and 3D placement of single histological sections with the 3D portable document format, *Development*, 138, 159-167
- Denker E., Jiang D.**, (2012), *Ciona intestinalis* notochord as a new model to investigate the cellular and molecular mechanisms of tubulogenesis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23, 308-319
- Dufour H. D., Chettouh Z., Deyts C., de Rosa R., Goridis C., Joly J. S., Brunet J. F.**, (2006), Precranial origin of cranial motoneurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 8727-8732
- Hamada M., Shimozono N., Ohta N. et al.**, (2011), Expression of neuropeptide- and hormone-encoding genes in the *Ciona intestinalis* larval brain, *Dev. Biol.*, 352, 202-214
- Hirano T., Nishida H.**, (2000), Developmental fates of larval tissues after metamorphosis in the ascidian, *Halocynthia roretzi*, *Dev. Genes Evol.*, 210, 55-63
- Horie T., Nakagawa M., Sasakura Y., Kusakabe T. G. and Tsuda M.**, (2010), Simple motor system of the ascidian larva: Neuronal complex comprising putative cholinergic

and GABAergic/Glycineergic neurons, *Zoological Science*, 27, 181-190

Hotta K., Mitsuhashi K., Takahashi H., Inaba K., Oka K., Gojobori T., Ikeno K., (2007), A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva, *Dev. Dyn.*, 236, 1790-1805

Ikuta T., Saiga H., (2007), Dynamic change in the expression of developmental genes in the ascidian central nervous system: revisit to the tripartite model and the origin of the midbrain-hindbrain boundary region, *Developmental Biology*, 312, 631-643

Imai J. H., Meinertzhagen I. A., (2007a), Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: I. Central nervous system, *J. Comp. Neurol.*, 501, 316-334

Imai J. H., Meinertzhagen I. A., (2007b), Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: II. Peripheral nervous system, *J. Comp. Neurol.*, 501, 335-352

Imai K. S., Stolfi A., Levine M., Satou Y., (2009), Gene regulatory networks underlying the compartmentalization of the *Ciona* central nervous system, *Development*, 136, 285-293

Kavka A. I., Green J. B. A., (1997), Tales of tails: *Brachyury* and the T-box genes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333, F73-F84

Mazet F., Hutt J. A., Milloz J., Millard J., Graham A., Shimeld S. M., (2005), Molecular evidence from *Ciona intestinalis* for the evolutionary origin of vertebrate sensory placodes, *Dev. Biol.*, 282, 494-508

Meinertzhagen I. A., Lemaire P. and Okamura Y., (2004), The neurobiology of the ascidian tadpole larva: Recent developments in an ancient chordate, *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 453-485

Nibu Y., José-Edwards D. S. and Di Gregorio A., (2013), From notochord formation to hereditary chordoma: The many roles of *Brachyury*, *Biomed Research International*

Nicol D. and Meinertzhagen I. A., (1991), Cell counts and maps in the larval central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.), *The Journal of Comparative Neurology*, 309, 415-429

Nishida H., (1987), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage, *Dev. Biol.*, 121, 526-541

Nishida H., (2005), Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidian, *Dev. Dyn.*, 233, 1177-1193

Nishida H., Satoh N., (1983), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage, *Developmental Biology*, 99, 382-394

- Nishida H., Satoh N.**, (1985), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages, *Dev. Biol.*, 110, 440-454
- Nishikata T., Satoh N.**, (1990), Specification of notochord cells in the ascidian embryo analyzed with a specific monoclonal antibody, *Cell Differ. Dev.*, 30, 43-53
- Pasini A., Amiel A., Rothbacher U., Roure A., Lemaire P., Darras S.**, (2006), Formation of the ascidian epidermal sensory neurons: insights into the origin of the chordate peripheral nervous system, *PLoS Biol.*, 4, e225
- Passamaneck Y. J., Hadjantonakis A. K., Di Gregorio A.**, (2007), Dynamic and polarized muscle cell behaviors accompany tail morphogenesis in the ascidian *Ciona intestinalis*, *PLoS One*, 2, e714
- Robin F., Dauga D., Tassy O., Sobral D., Daian F. and Lemaire P.**, (2011), Creating 3D digital replicas of ascidian embryos from stacks of confocal images, *Cold Spring harbor Laboratory Press*, 1251-1261
- Satoh N.**, (1994), *Developmental Biology of Ascidiaceans*, Cambridge Univ. Press, (Cambridge, U.K.)
- Satoh N.**, (2008), An aboral-dorsalization hypothesis for chordate origin, *Genesis*, 46, 614-622
- Satoh N.**, (2009), An advanced filter-feeder hypothesis for urochordate evolution, *Zoological science*, 26, 97-111
- Shirae-Kurabayashi M., Nishikata T., Takamura K., Tanaka K. J., Nakamoto C., Nakamura A.**, (2006), Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in *Ciona intestinalis*, *Development*, 133, 2683-2693
- Stolfi A., Gainous T. B., Young J. J., Mori A., Levine M., Christiaen L.**, (2010), Early chordate origins of the vertebrate second heart field, *Science*, 329, 565-568
- Stolfi A., Levine M.**, (2011), Neuronal subtype specification in the spinal cord of a protovertebrate, *Development*, 138, 995-1004
- Takamura K., Fujimura M. and Yamaguchi Y.**, (2002), Primordium germ cells originate from the endodermal strand cells in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Dev. Genes Evol.*, 212, 11-18
- Taniguchi K., Nishida H.**, (2004) Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*, *Dev. Growth Differ.*, 46, 163-180
- Tassy O., Daian F., Hudson C., Bertrand V., Lemaire P.**, (2006), A quantitative approach to the study of cell shapes and interactions during early chordate embryogenesis, *Curr. Biol.*, 16, 345-358
- Technau U.**, (2001), *Brachyury*, the blastopore and the evolution of the mesoderm,

BioEssays, 23, 788-794

Veeman M. T., Newman-Smith E., El-Nachef D., Smith W. C., (2010), The ascidian mouth opening is derived from the anterior neuropore: reassessing the mouth/neural tube relationship in chordate evolution, *Developmental Biology*, 344, 138-149

Veeman M. T., Smith W. C., (2013), Whole-organ cell shape analysis reveals the developmental basis of ascidian notochord taper, *Developmental Biology*, 373, 281-289

Wada H., Saiga H., Satoh N. and Holland P. W. H., (1998), Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insights from ascidian *Pax-2/5/8*, *Hox* and *Otx* genes, *Development*, 125, 1113-1122

Wagner E. and Levine M., (2012), FGF signaling established the anterior border of the *Ciona* neural tube, *Development*, 139, 2351-2359

Yamada A., Nishida H., (1999), Distinct parameters are involved in controlling the number of rounds of cell division in each tissue during ascidian embryogenesis, *J. Exp. Zool.*, 284, 379-391

第3章 ラマン顕微分光法による細胞分化状態の可視化およびホヤ胚内の分子組成・分布の検出

3.1 はじめに

形態形成過程は複数の組織細胞の協調的な働きにより達成されるため、同時に複数の細胞状態を識別できる手法が観察の際に有用である。ラマン顕微分光法は近年、低浸襲かつ非標識で細胞の分化状態を識別する手法として注目されている (Downes *et al.*, 2010)。またホヤ胚の形態形成は、生体分子の組成や局在の制御を通して達成される (Sherrard *et al.*, 2010; Lemaire, 2009)。従って、生体分子の細胞内における存在量や分布の変化についての知見は、形態形成過程を解析する上で重要な情報となる。ラマン顕微分光法では、細胞内の小分子化合物を含む分子組成および分布を分子標識することなく検出できる (Lau *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2011)。本章で行った研究では、2細胞期から尾芽胚期にあるカタユウレイボヤ胚をラマン顕微鏡で測定した。その結果、組織間で分子組成が異なる様子を検出した。さらに検出した違いを元に細胞分化状態の識別を試みた。加えて、組織の識別に寄与した要素 (細胞小器官や分子種) について推定した。

3.2 実験方法

3.2.1 カタユウレイボヤ胚の準備

カタユウレイボヤの成体は、舞鶴もしくは横浜で採集した個体を使用した。未受精卵および精子は、成体のホヤを外科的に解剖することで生殖輸管から取得した。コリオンを剥いた未受精卵を用いて受精を行い、2細胞期、4細胞期、8細胞期、16細胞期、32細胞期、64細胞期、112細胞期、原腸陥入期、神経胚

期、尾芽胚期（第 1 章 図 1.3）に至るまで 18°C の海水中で飼育した。発生段階は Hotta らが報告した定義に従って判断した (Hotta *et al.*, 2007)。胚の固定は、pH 7.5 に調製した 0.1 M MOPS 緩衝液に paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) を終濃度 4% で溶かした水溶液中に、室温で 30 分間胚を浸すことで行った。固定の後、PBS を用いて胚を洗浄した。

カタユウレイボヤ胚の細胞境界は通常、明視野顕微鏡や微分干渉顕微鏡を用いて識別可能である。しかしながら本研究で用いたラマン顕微鏡に搭載された明視野顕微鏡では困難であった。そこでこの問題を克服すべく、CellMASK Orange Plasma Membrane Stain を用いて固定胚を染色した。染色は終濃度 0.001% の CellMask (Invitrogen) を溶かした PBS 中に、18°C、暗所の条件下、1 時間固定胚を浸すことで行った。染色後の胚は PBS を用いて洗浄した。染色はラマン顕微鏡による測定を行う直前に行った。

A8.16 割球の筋肉細胞への分化を阻害する実験は、MEK 阻害剤である U0126 およびアクチン重合阻害剤である cytochalasin D を用いて行った。受精は未受精卵のコリオンを剥いた条件下で行い、終濃度 50 mg/l の streptomycin を含んだ海水中、18°C で飼育した。発生段階が 8 細胞期に達した際、終濃度 10 $\mu\text{mol/l}$ となるよう U0126 (Promega) を海水中に溶かした。さらに発生段階が 76 細胞期に達した際、終濃度 4 $\mu\text{g/ml}$ となるよう cytochalasin D (Tocris) を海水中に溶かした。U0126 および cytochalasin D を添加して飼育したホヤ胚は、受精後 22 時間が経過した時点で paraformaldehyde 固定した。別に、U0126 添加胚のコントロールとして、U0126 の溶媒である 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Nacalai Tesque) を海水に加えて発生させた胚を用意した。コントロール胚においても cytochalasin D の添加および固定については U0126 添加胚と同様の手順で行った。上記の手順で用意した U0126 添加胚およびコントロール胚の筋肉細胞について、Karnovsky らの手順 (Karnovsky and Roots, 1964) に従い、acetylcholine esterase (AChE) 活性を元に染色した。このとき、基質として acetylcholine iodide (Sigma-Aldrich) を用いた。

3.2.2 ラマン顕微鏡の条件

ラマン顕微鏡の測定にかかる時間に対してホヤ胚の発生速度が非常に早いため、胚の特定の断面を対象としたライブイメージングを行う場合でも測定は困難であった。そこで本研究では各発生段階で固定したホヤ胚に対して測定を行った。ホヤ胚の発生段階は形態的特徴 (図 1.3) を元に明確に判断できる (Hotta *et al.*, 2007) ことから、固定胚間のデータを比較することで、発生過程の進行に

よる細胞内状態の変化を追跡可能である。またモザイク発生であり細胞の系譜や位置に個体差がない (Nishida and Satoh, 1985, 1983; Nishida, 1987) ことから、胚の形態を元に各組織の位置を見積もることができる。

PBS 中のカタユウレイボヤ固定胚のラマンスペクトルは、in Via confocal microscope system (Renishaw) を用いて取得した。スペクトルの取得は胚の特定の断面に対して行い、 $x \times y = 1.2 \sim 5.6 \mu\text{m} \times 1.2 \sim 5.6 \mu\text{m}$ 間隔で実施した。サンプルへの入射光として 785 nm のレーザーを streamline mode で使用した。測定には 63×の水浸レンズ (Leica, NA 0.9) を用いた。1200-lines/mm の回折格子を使用し、 $577 \sim 1686 \text{ cm}^{-1}$ の範囲にあるラマンシフトを対象とし、ラマンスペクトルとして取得した。

3.2.3 ラマンスペクトルおよびラマンマップの解析

ラマンスペクトルの取得、解析およびラマンマップの作製は Renishaw WiRE software version 3.3 を用いて行った。スペクトル中のピーク面積 (ベースラインを基準とした面積) をラマン強度と定義し、ラマンマップは、注目するピークのホヤ胚内の各位置におけるラマン強度を反映するように作製した。ラマンマップはスペクトル中に見られる各ピークに対して作製した。

画像解析は、グレースケールマップに対し、オープンソースソフトウェアである Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) を用いて行った。解析の第1段階目では、バックグラウンドの値 (PBS が示すラマン強度) を画像データ全体から引いた。続いて、胚内の各位置間のラマン強度を比較した。統計的検定は Student's t-test により行った。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 ホヤ胚内における分子組成・分布の検出

ラマンスペクトルの取得およびラマンマップの作製

112 細胞期までのカタユウレイボヤ胚は、動物極半球および植物極半球の2層の細胞群により構成される。2層の細胞群の内、ほとんどの組織分化が植物極半球側で進行する (図 3.1A) (Nishida, 2005)。従って、112 細胞期のホヤ胚をラマ

ン顕微鏡で測定するに当たり、植物極半球の測定を行った。

112 細胞期におけるカタユウレイボヤから取得したラマンスペクトルを図 3.1B に記す。スペクトル中には多数のラマンバンド（ピーク）を見ることができ、この内 1002 cm^{-1} および 1526 cm^{-1} に位置するラマンバンドのラマン強度を求め、ホヤ胚内の各位置におけるラマン強度を反映するようにラマンマップを作製した（図 3.1C, 3.1D）。ラマンマップの作製により、胚内領域間のラマン強度の違いを視覚的に捉えることができる。

112 細胞期カタユウレイボヤ胚内における分子組成・分布の検出

112 細胞期カタユウレイボヤ胚内の分子組成および分布を可視化するため、ラマンスペクトル中（図 3.1B）の各ラマンバンドに対してラマンマップを作製し、胚内の各領域における分子組成を推測した（表 3.1, 図 3.2）。その結果、強いラマン強度を示す領域が胚内で局在する様子を観察できた。さらに、複数の局在パターンを 1 度の測定で同時に捉えることに成功した（図 3.2）。胚全域においてラマン強度の低いバンドから作製したマップでは、局在は見られるものの、ノイズが目立った（例えば 826 cm^{-1} のマップ; 図 3.1B, 3.2G）。

ラマン強度の分布パターンを指標に、取得したラマンマップを 4 つのグループ（I-IV）に分類した（表 3.1, 図 3.2）。group I に分類されたマップは 1002 cm^{-1} のラマンバンドから作製したマップのみであった。 1002 cm^{-1} のマップは筋肉細胞の領域で強いラマン強度を示した（図 3.1A, 3.2K）。group II のマップは、内胚葉細胞および脊索細胞の領域で強いラマン強度を示した（図 3.1A, 3.2）。group III のマップは CellMask のラマンバンドから作製されたマップである（表 3.1, 図 3.2, 3.3）。強いラマン強度を示す領域は胚前側の細胞に局在しており、前側以外の領域にある細胞に関してもラマン強度の分布が細胞間で異なっていた（例えば図 3.2W を参照）。細胞境界を推定する際に CellMask 染色は有用であった（図 3.1A, 3.2）。group IV には、ノイズが目立ち、また他の 3 グループと分布が異なるマップを分類した（図 3.2D, 3.2F, 3.2G, 3.2H）。 868 cm^{-1} のラマンバンドから作製したマップ（図 3.2H）は group II のマップと類似しているように見えるが、112 細胞期以外の発生段階では類似していなかった。従って group IV に分類した。

CellMask 染色がラマン強度の分布に与える影響を調べるため、CellMask 染色した胚としていない胚から作製したラマンマップを比較した（図 3.2, 3.4）。その結果、group I, II, IV のマップでは分布の傾向が維持されていた。一方 group III のマップでは分布は大きく異なった。CellMask のバンドが示すラマン強度が、ホヤ胚内の分子が示すラマン強度より強いことが原因と考えられる（図 3.3）。

3.3.2 筋肉および内胚葉の非標識での識別と分子の推定

2細胞期から尾芽胚期までの各発生段階にあるカタユウレイボヤ胚について、ラマン顕微鏡を用いた測定を行った。112細胞期の胚に対する観察結果(図3.2)から、group IおよびIIに分類されるラマンバンドに注目して解析を行った。作製したラマンマップ中の強いラマン強度を示す領域に注目し、その分布とホヤ胚内の筋肉および内胚葉の位置と比較した(図3.5-3.7)。

16細胞期以前(図3.5A-D, 3.5A'-D', 3.5A''-D'', 3.6A-D)では、ホヤ胚を構成する細胞はまだどの組織にも分化していない(図3.8A)(Nishida, 2005)。2細胞期と4細胞期のマップを見ると、group Iのマップは胚後方の領域で強いラマン強度を示した(図3.5A', 3.5B')。一方、group IIのマップは胚前方の領域で強いラマン強度を示した(図3.5A'', 3.5B'', 3.6A, 3.6B)。8細胞期のマップでは、group IのマップはB4.1割球に強いラマン強度を示したのに対し(図3.5C')、group IIのマップは細胞膜周辺の領域で強いラマン強度を示した(図3.5C'', 3.6C)。16細胞期の胚ではgroup Iおよびgroup II共に強いラマン強度を示す領域が細胞内で局在していたが、その分布は大きく異なっていた(図3.5D', 3.5D'', 3.6D)。

筋肉細胞への分化は64細胞期、内胚葉細胞への分化は32細胞期から始まる(図3.8B, 3.8C)(Nishida, 2005)。16細胞期から尾芽胚期までのgroup IとIIのマップを見ると、強いラマン強度を示す領域は、それぞれ分化した筋肉および内胚葉の位置と一致していた(図3.5, 3.6)。またこの一致はCellMask染色による影響を受けなかった(図3.5, 3.6と図3.7の比較)。以上の結果から、本研究では尾芽胚期までの筋肉および内胚葉の胚内での位置を、group IまたはIIのラマンバンドに注目することで識別することに成功した。特に注目すべき点は、ラマン顕微鏡の使用により、組織の位置を非標識で識別できる点である。

group Iに分類したラマンバンドの推定

group Iのマップ中、強いラマン強度を示す領域は筋肉の位置と一致した(図3.5E'-J')。この結果は、他の組織と比べて筋肉に多く含まれる分子が存在しており、その分子は 1002 cm^{-1} の位置にラマンバンドが出ることを示している(図3.1B, 3.2K)。

ホヤの筋肉にはmyoplasmが多く含まれる(Swalla, 2004; Bates, 1988; Conklin, 1905)。報告されている2細胞期から尾芽胚期までのmyoplasmの分布と、group Iのマップに見られた強いラマン強度を示した領域は一致していた(図3.5A'-J')。またmyoplasmは 1003 、 1158 、 1449 、 1521 、 1645 cm^{-1} の位置に主要なラマンバンドを示す(Pezolet *et al.*, 1978)。そこで対応すると考えられる 1002 、 1161 、 1439 、

1526、1660 cm^{-1} のラマンマップを、CellMask 染色を行わなかった胚を用いて作製した。その結果、1002、1439、1660 cm^{-1} のバンドから作製したマップは、筋肉の位置に強いラマン強度を示した (図 3.7A)。しかしながら、1161、1439、1526、1660 cm^{-1} のバンドから作製したマップは、筋肉に加え (1439、1660 cm^{-1})、もしくは筋肉よりも (1161、1526 cm^{-1}) 内胚葉に強いラマン強度を示した (図 3.7A)。これらのバンド位置には myoplasm の他に、lipids、carotenoids、retinoids がバンドを示す (表 3.1, 図 3.7) (de Oliveira *et al.*, 2009; Morjani *et al.*, 1998; Rimai *et al.*, 1971; Wheland *et al.*, 1970)。これらの分子がラマン強度の分布に影響を与えたのかもしれない。

mitochondria もホヤの筋肉に多く局在する (mitochondria は myoplasm と共局在する) (Patalano *et al.*, 2006; Reverberi, 1956)。実際、ミトコンドリアが示す主要ラマンバンド (Matthäus *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005) に対応すると考えられる 715、1002、1439、1660 cm^{-1} のマップは、CellMask 染色していない胚において筋肉に強いラマン強度を示した (図 3.7B)。

1002 cm^{-1} の位置には phenylalanine もバンドを示す (Pezolet *et al.*, 1978)。従って、myoplasm や mitochondria、それらに共局在するタンパク質が group I のバンドを示した分子と推定した (表 3.1)。

group II に分類したラマンバンドの推定

ホヤの内胚葉には yolk が多く含まれる (Conklin, 1905)。報告されている 16 細胞期から尾芽胚期までの yolk の分布と、group II のマップに見られた強いラマン強度を示した領域は一致していた (図 3.5A”-J”)。

卵生の脊椎動物の yolk には carotenoids が含まれる (Weiss *et al.*, 2011; Levi *et al.*, 2008; Surai *et al.*, 1998)。またホヤ胚にも carotenoids の存在が確認されている (Irie *et al.*, 2003)。carotenoids は 1010、1155、1525 cm^{-1} の位置に主要なラマンバンドを示す (de Oliveira *et al.*, 2009; Wheland *et al.*, 1970)。そこで対応すると考えられる 1015、1161、1526 cm^{-1} のラマンマップを、CellMask 染色を行わなかった胚を用いて作製した。その結果、いずれのバンドから作製したマップも、yolk (内胚葉) の位置 (Conklin, 1905) に強いラマン強度を示した (図 3.7C)。

carotenoids の代謝産物である retinoids は、ホヤ胚の yolk に局在する (Irie *et al.*, 2003)。retinoids が示す主要ラマンバンド (Morjani *et al.*, 1998; Rimai *et al.*, 1971) に対応すると考えられる 969、1015、1161、1205、1439、1597 cm^{-1} のマップもまた、CellMask 染色していない胚において内胚葉に強いラマン強度を示した (図 3.7D)。なお 1439 cm^{-1} のマップにおいては筋肉でも強いラマン強度を検出したが、myoplasm や mitochondria による影響が考えられる (表 3.1, 図 3.7A, 3.7B)。

以上の結果から、yolk に局在する carotenoids や retinoids が、group II のバンド

を示した分子と推定した (表 3.1)。ここで、carotenoids や retinoids は標識が困難なため、胚内における分布の可視化は難しい。しかし retinoids の 1439 cm^{-1} を除き、これらの小分子化合物が示す主要なバンドはそれぞれが全て同じ分布を示した (図 3.7C, 3.7D)。この結果は、carotenoids と retinoids の分布をラマン顕微鏡により可視化できることを示唆している。なお 112 細胞期の胚から作製した group II のマップでは、内胚葉細胞に加え脊索細胞でも強いラマン強度を検出した (図 3.6G)。内胚葉細胞より少ないものの、脊索細胞にも yolk が含まれる (Conklin, 1905) ことが原因として考えられる。

3.3.3 細胞分化過程における細胞間の分化状態の定量的な識別

次に、筋肉細胞および内胚葉細胞への分化過程と、ラマン強度の分布の関係を調べた。筋肉および内胚葉への分化は、16 細胞期から 64 細胞期に進行する (図 3.8A-C) (Nishida, 2005)。そこでこの時期のカタユウレイボヤ胚から作製した group I (1002 cm^{-1})、group II (1526 cm^{-1}) のラマンマップを観察した (図 3.8A'-C', 3.8A''-C'')。

筋肉および内胚葉の前駆体細胞が示すラマン強度の分布

group I のマップを観察したところ、分化した筋肉細胞 (図 3.8A'-C', オレンジ) に加え、筋肉前駆細胞 (図 3.8A'-C', *) も、他の細胞と比べて強いラマン強度を示した。同様に group II のマップにおいても、分化した内胚葉細胞 (図 3.8A''-C'', 黄) に加え、内胚葉前駆細胞 (図 3.8A''-C'', **) も、他の細胞より強いラマン強度を示した。また一部の筋前駆細胞内において、強い強度を示した領域が細胞内で局在している様子を捉えた (図 3.8A', 3.8B': A5.2, B5.1, B5.2, A6.4; 図 3.8A'', 3.8B'': A5.1, A5.2, B5.1, A6.3)。筋前駆細胞の内、A5.2 細胞と B5.1 細胞については筋肉と内胚葉の両方の細胞に分化するが (図 3.8A)、これらの細胞内の局在パターンは group I と II で異なっていた (図 3.8A', 3.8A'')。この観察結果は、分裂前の筋肉および内胚葉の前駆細胞内において、分子局在が分子種によって制御される事を示唆している。

筋肉または内胚葉へ分化した娘細胞と、その他の組織に分化する娘細胞の比較

続いて、筋肉または内胚葉へ分化した娘細胞と、その他の組織に分化する娘細胞のラマン強度を定量的に比較した (図 3.9)。その結果、筋肉または内胚葉に分化した娘細胞が示すラマン強度は、もう一方の娘細胞よりも有意に強かった (筋肉: 図 3.9A, 3.9B; 内胚葉: 図 3.9C-E)。

発生過程では、未分化細胞から様々な細胞系列への分化が起こる。本研究ではラマン強度を対象に定量的な解析を行い、脊索動物の胚発生過程において、未分化細胞から分裂した娘細胞の内、筋肉または内胚葉へ分化した娘細胞を有意に識別することに成功した。

3.3.4 ラマン顕微分光法は発生生物学にとって有用な手法である

ラマン顕微鏡を用いることで、分子組成の違いを元に、様々な解剖学的な構造を非標識で、また同時に観察することができる。これまでの報告例として、ショウジョウバエのサナギの変態過程で見られる fat-body の分布や、線虫の腸や筋肉といった組織の生体内構造を非標識で可視化した例がある (Lau *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2011)。しかしながら、発生過程にある胚をまるごと測定した例は無かった。本研究では、2 細胞期から体制の形成がほぼ完了する尾芽胚期までのカタユウレイボヤ胚をまるごと測定し、筋肉および内胚葉の位置や形を非標識で識別することに成功した (図 3.5)。また内胚葉の識別に寄与した分子の推定結果は、carotenoids および retinoids の胚内における分布をラマン顕微鏡で可視化できる事を示唆している。

ラマン顕微鏡を用いた培養幹細胞の細胞状態の識別に関しては、多くの報告例がある (El-Hagrasy *et al.*, 2012; Sathuluri *et al.*, 2011 ; Downes *et al.*, 2011)。非標識で細胞状態を識別できる技術として、特に医療分野での応用が期待されている。embryonic stem (ES) 細胞を対象にした報告では多くの場合、分化誘導のために embryoid (胚様体) が使用される。というのも、多細胞生物の細胞分化は、隣接細胞との接触が重要な役割を担うためである (Kim *et al.*, 2000; Asashima, 1994)。しかしながら、実際に細胞分化過程にある多細胞生物の胚をラマン顕微鏡によって測定し、細胞状態を識別した報告例は無かった。本研究では細胞分化過程にあるカタユウレイボヤ胚を測定し、ラマン強度に注目することで、筋肉または内胚葉に分化した娘細胞と、その他の組織に分化する娘細胞との違いを定量的に識別することに成功した (図 3.8, 3.9)。また、U0126 (MEK 阻害剤) の添加による A8.16 割球の筋肉への分化阻害も、ラマンマップの解析により可視化、判別することができた (図 3.10D)。実験は、受精後、8 細胞期に U0126 (コントロール胚では DMSO) を添加し、さらに 76 細胞期に cytochalasin D を添加して受精後 22 時間まで飼育したカタユウレイボヤ胚を用いて行った。AchE による結果と同様にラマン顕微分光法によって A8.16 割球への阻害を検出できたことから、ラマン顕微分光法による細胞状態の識別が、実際の多細胞生物の胚を対象とする場合でも有効な事を示している。

3.4 第3章のまとめ

本章では、カタユウレイボヤ胚の発生過程に対する、ラマン顕微鏡を用いた測定および解析に関する研究について記した。ラマン顕微鏡の強みの1つに、分子組成の違いを元にした、生体内の解剖学的構造の観察が挙げられる。本研究では2細胞期から尾芽胚期までの各発生段階にあるホヤ胚からラマンスペクトルを取得し解析した結果、胚内の筋肉および内胚葉の位置や形を、非標識で識別することに成功した。またラマン顕微鏡の他の強みとして、標識困難な分子を含め、組織内の生体分子の分布を一度の測定で可視化できる点が挙げられる。本研究では、ホヤ胚の筋肉または内胚葉の識別に寄与した要素（細胞小器官や分子種）を推定し、carotenoids および retinoids の胚内での分布をラマン顕微鏡により可視化できることを示唆した。さらに細胞分化過程の胚から取得したラマンマップの解析を行い、 1002 cm^{-1} または 1526 cm^{-1} のラマン強度に注目することで、筋肉または内胚葉へ分化した娘細胞とその他の組織に分化する娘細胞を、それぞれ定量的に識別仕分けることに成功した。本研究は、細胞分化過程にある脊索動物の胚をラマン顕微鏡によって測定し、細胞間の分化状態の違いを識別した最初の報告である。以上の結果は、複数の細胞分化状態の同時識別、細胞内分子組成の推定および分子分布の観察など、ラマン顕微分光法が、発生生物学的研究に有用である事を示している。

表 3.1 カタユウレイボヤ胚から取得したラマンスペクトル中のラマンバンドと、各バンドに対する分子構造、分子種および細胞小器官の候補

in 図3.2	Signal to baseline		Position [cm ⁻¹]	group	Assignments
	1st [cm ⁻¹]	2nd [cm ⁻¹]			
A	578	600	592	III	CellMask
B	600	633	615	III	CellMask
C	677	707	694	III	CellMask
D	707	727	715	IV	Choline (H ₃ C)N ⁺ , mitochondria
E	734	762	746	III	CellMask
F	776	790	783	IV	cytosine, urasil
G	812	841	826	IV	Tyr, ν (O-P-O), DNA
H	856	882	868	IV	Trp, Tyr
I	925	946	936	III	CellMask, ν (C-C), (C-O-C), glycogen
J	948	981	969	II	δ (=C-H), (C-C) backbone, retinoids
K	998	1007	1002	I	Phe, myoplasm, mitochondria
L	1008	1026	1015	II	carotenoids, retinoids
M	1047	1073	1064	III	CellMask, Chain C-C
N	1116	1129	1123	III	CellMask, ν (C-C), (C-N)protein, ν (C-O)
O	1134	1175	1161	II	myoplasm, carotenoids, retinoids
P	1191	1214	1205	II	Tyr, Phe, retinoids
Q	1241	1288	1272	III	CellMask, δ (=C-H), Trp, ν (CN), δ (NH)
R	1350	1380	1368	III	CellMask, globin
S	1382	1410	1394	III	CellMask, CH rocking
T	1427	1469	1439	III	CellMask, CH ₂ deformation, myoplasm, mitochondria, retinoids
U	1475	1489	1482	III	CellMask
V	1499	1552	1526	II	myoplasm, carotenoids
W	1572	1625	1597	III	CellMask, retinoids, nucleic acids
X	1644	1676	1660	IV	ν (C=C) lipid, myoplasm, mitochondria

各ラマンバンドに対応する分子構造、分子種および細胞小器官は、報告 (Lau *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2009; Matthaus *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005; Morjani *et al.*, 1998; Pezolet *et al.*, 1978; Rimai *et al.*, 1971; Wheland and Bartlett, 1970) を元に推定した。

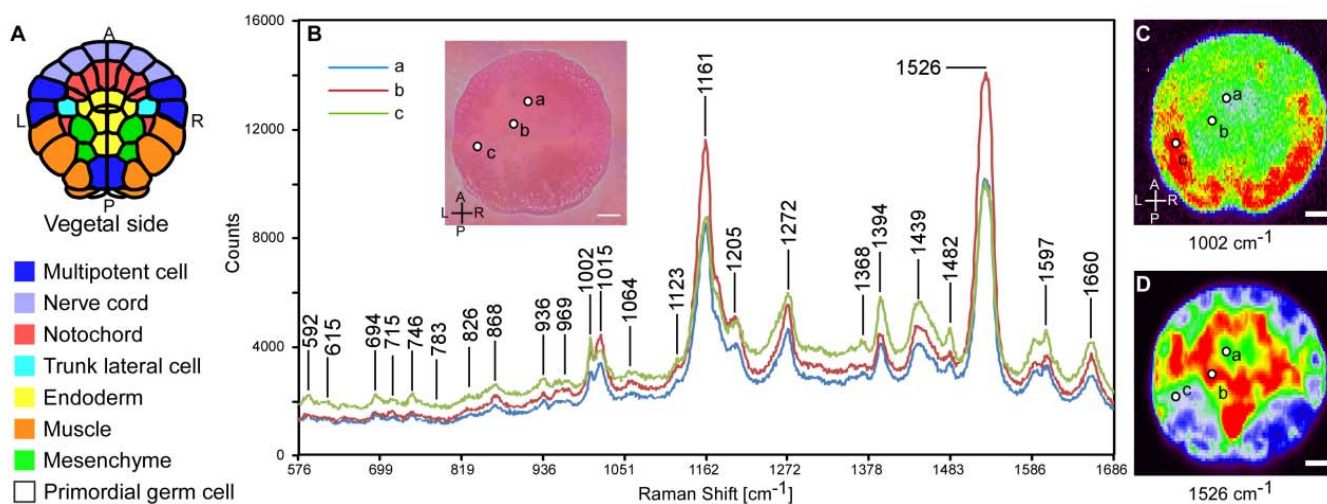


図 3.1 112 細胞期のカタユウレイボヤ胚から取得したラマンスペクトル

A : 植物極側から見たカタユウレイボヤ胚。各色はそれぞれ異なる細胞運命に対応する。**B** : 胚内の異なる 3 点 (明視野像中 a, b, c) から取得したラマンスペクトル。スペクトルの取得には CellMask で染色した胚を用いた。図中の数字はラマンバンドの位置を表す。図 3.2 の各ラマンマップは対応するラマンバンドから作製した。**C, D** : **B** のスペクトルを解析し、 1002 cm^{-1} (**C**)、 1526 cm^{-1} (**D**) に位置するラマンバンドから作製したラマンマップ。バンドのピーク面積をラマン強度と定義し、マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、
Scale bar: $20\text{ }\mu\text{m}$

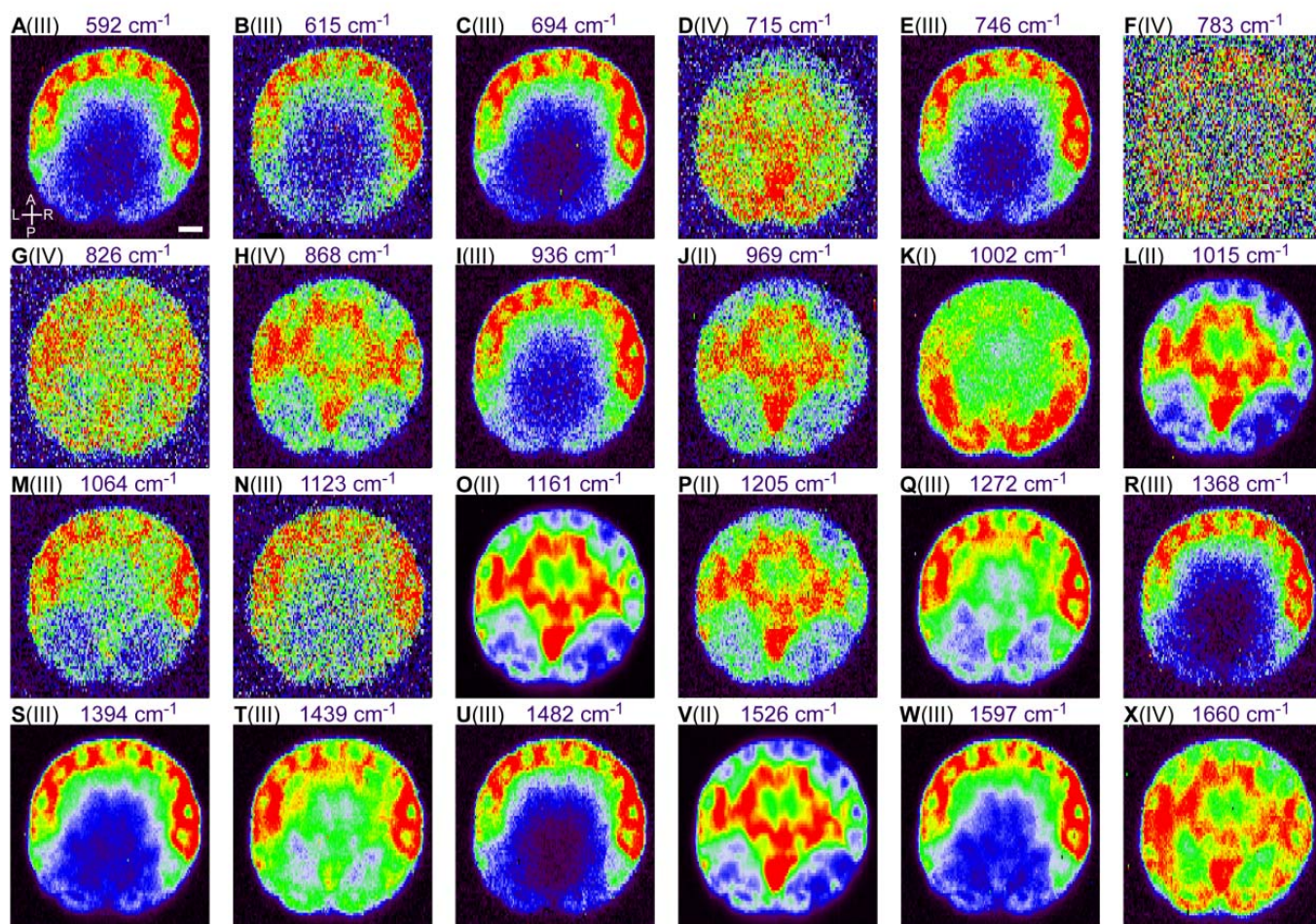


図 3.2 112 細胞期のカタユウレイボヤ胚から取得したラマンマップ

A-X : 図 3.1 の各ラマンバンドから作製したラマンマップ。マップの作製には CellMask で染色した胚を用いた。ラマンマップについて、各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。これらのマップを第 3 章(3.3.1)中に記載した基準に従い、4つのグループ (I-IV) に分類した。図中の記号 I-IV は分類されたグループを表す。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、
Scale bar: 20 μm

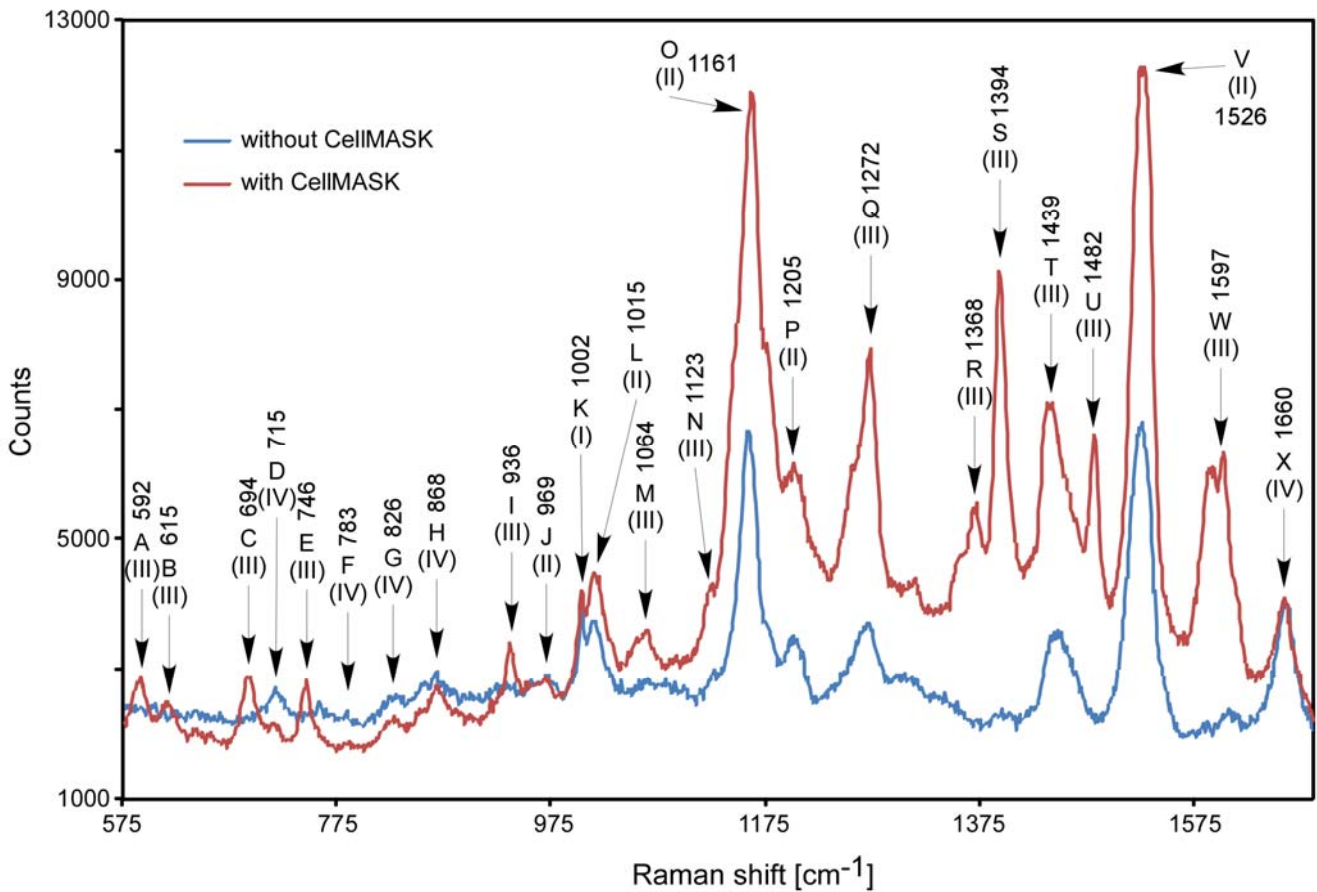


図 3.3 CellMask で染色した胚としていない胚のラマンスペクトルの比較

CellMask で染色した胚のラマンスペクトルを赤で、染色していない胚のスペクトルを青で示した。スペクトルは共に、112 細胞期カタユレイボヤ胚から取得した。図中の数字はラマンバンドの位置を表し、記号 I-IV はバンドが分類されたグループを表す。図 3.4 の各ラマンマップは、CellMask で染色していない胚のラマンバンド (青) を元に作製した。group III に分類されるラマンバンドは CellMask 染色した胚のみで検出したか、もしくは CellMask 染色によりラマン強度が強くなった。

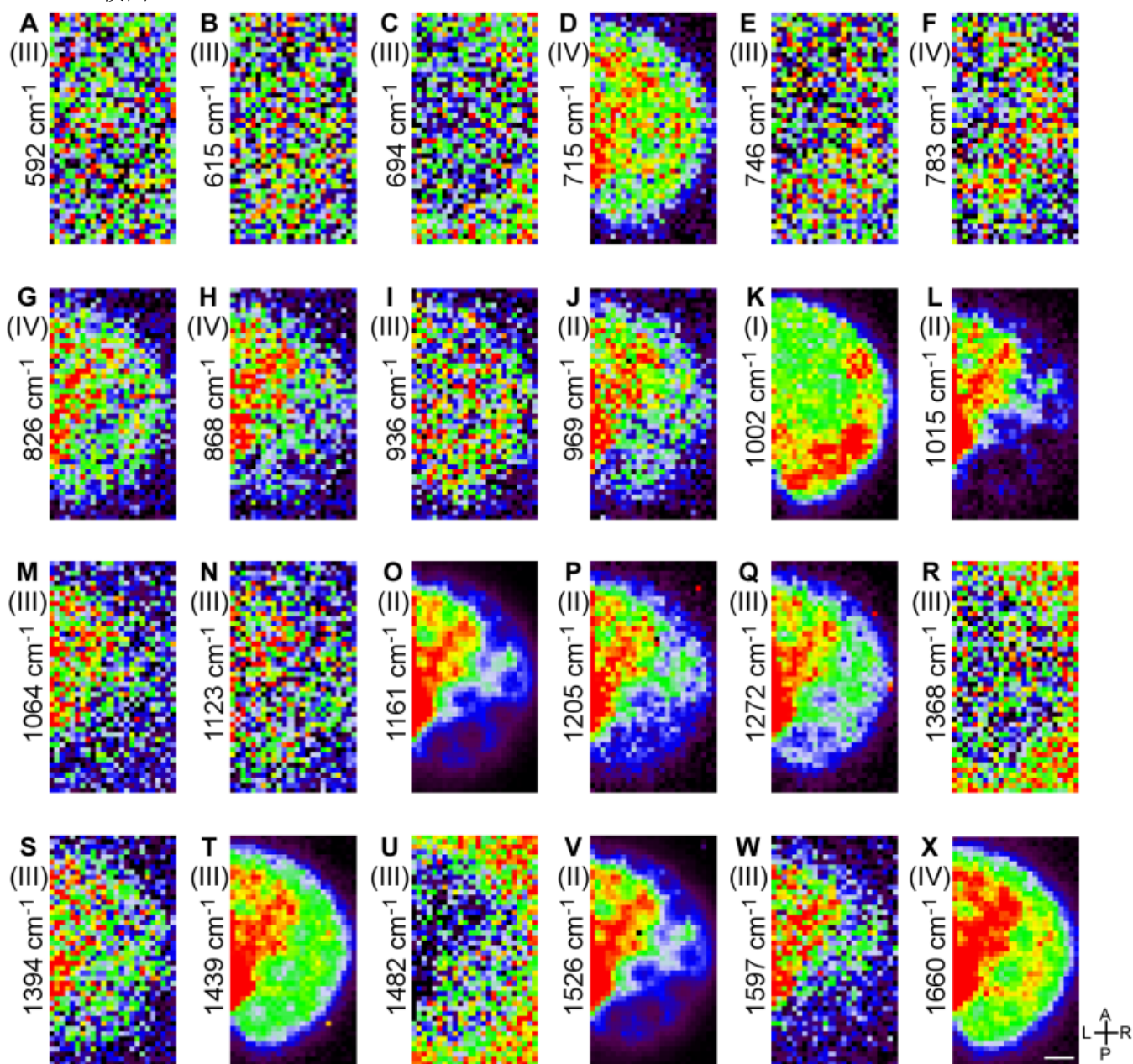


図 3.4 CellMask 染色していない 112 細胞期のカタユレイボヤ胚から取得したラマンマップ

A-X : 図 3.3 の各ラマンバンドから作製したラマンマップ。マップの作製には CellMask で染色していない胚を用いた。ラマンマップについて、各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。図中の記号 I-IV は各ラマンバンドが分類されたグループを表す。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、Scale bar: 20 μm

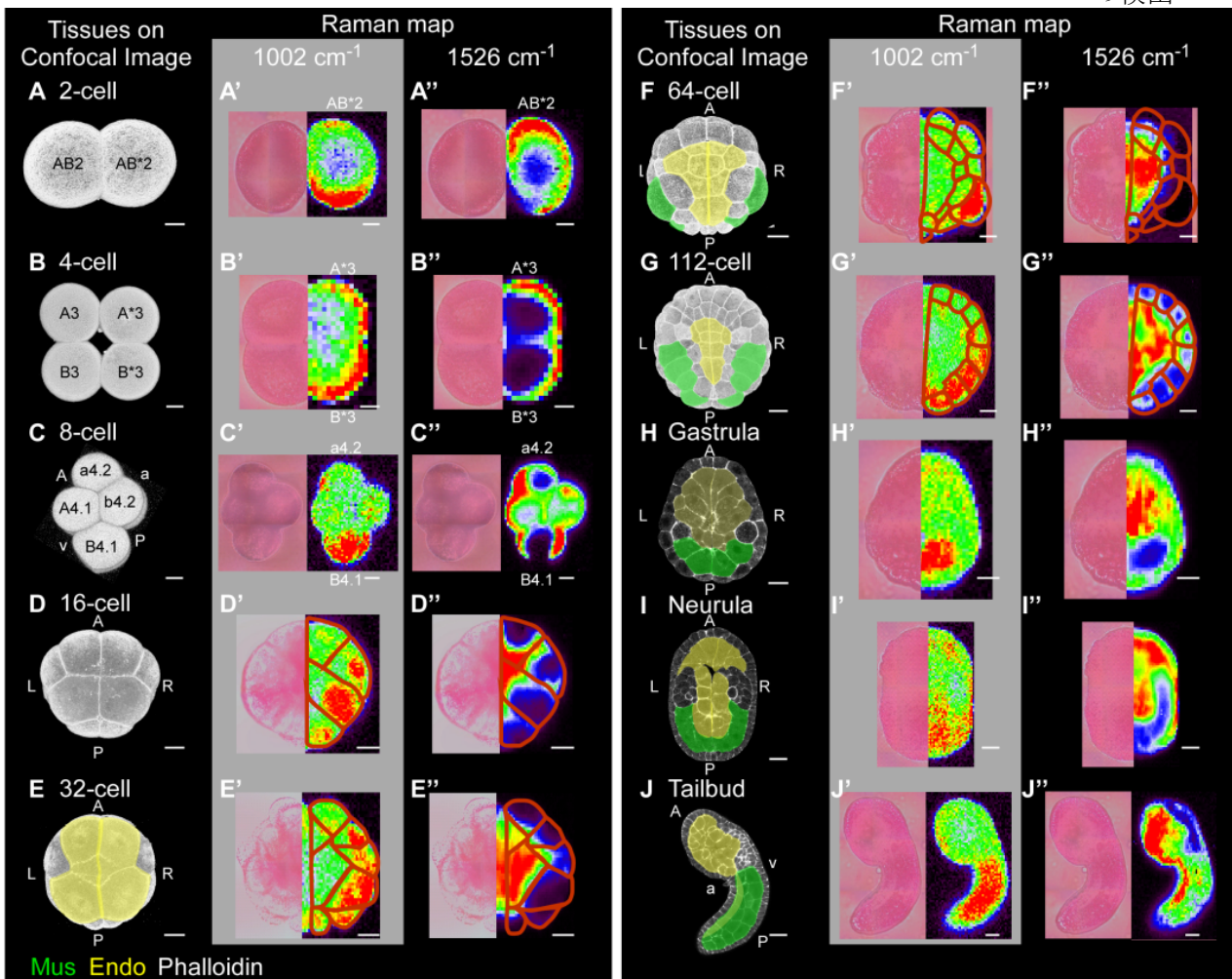


図 3.5 2細胞期から尾芽胚期のカタユウレイボヤ胚から取得したラマンマップ

A-J : phalloidin 染色を行ったカタユウレイボヤ胚の共焦点顕微鏡画像 (2細胞期から112細胞期は3D像、原腸陥入期と神経胚期は背側から見た断面像、尾芽胚期は側面から見た断面像)。筋肉および内胚葉の位置を緑色と黄色でそれぞれ示した。A'-J', A''-J'' : 胚の左半分は明視野像、右半分が 1002 cm^{-1} (A'-J'), 1526 cm^{-1} (A''-J'') に位置するラマンバンドから作製されたラマンマップ。マップの作製には CellMask で染色した胚を用いた。明視野像及び CellMask のマップを元に推定した細胞境界の位置を赤線で示した。group II に分類されたラマンバンドから作製したラマンマップは、 1526 cm^{-1} (A''-J'') に位置するラマンバンドから作製したマップと類似していた (図 3.2, 3.6, 表 3.1)。ラマンマップについて、各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、a, animal (動物極)、v, vegetal (植物極)、Mus, muscle (筋肉)、Endo, endoderm (内胚葉)、Scale bar: $20\text{ }\mu\text{m}$

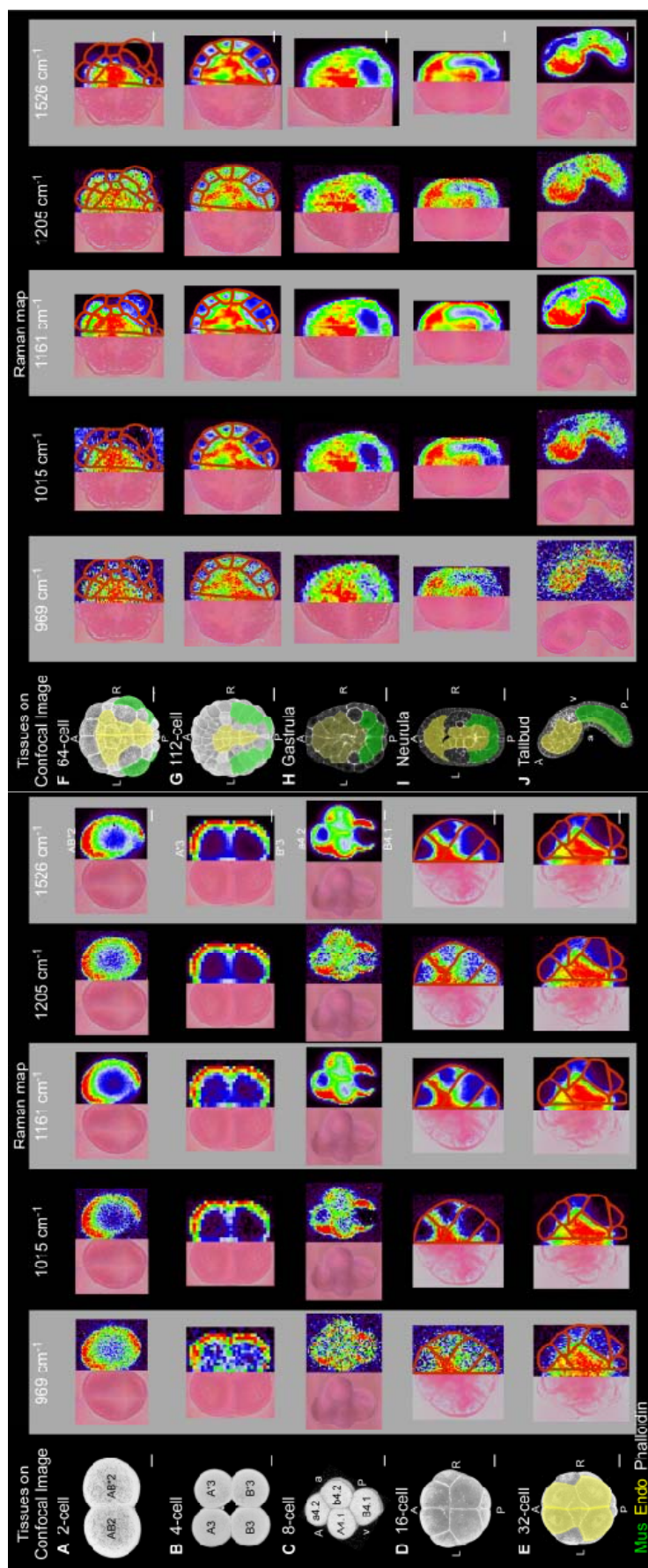


図 3.6 group II に分類されたラマンバンドから作製したラマンマップ

phalloidin 染色を行ったカタユレイボヤ胚の共焦点顕微鏡画像（2細胞期から112細胞期は3D像、原腸陥入期と神経胚期は背側から見た断面像、尾芽胚期は側面から見た断面像）について、筋肉および内胚葉の位置を緑色と黄色で示した。ラマン顕微鏡画像について、胚の左半分は明視野像、右半分が group II に分類された各ラマンバンドから作製されたラマンマップである。各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。マップの作製には CellMask で染色した胚を用いた。明視野像及び CellMask のマップを元に推定した細胞境界の位置を赤線で示した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、a, animal (動物極)、v, vegetal (植物極)、Mus, muscle (筋肉)、Endo, endoderm (内胚葉)、Scale bar: 20 μm

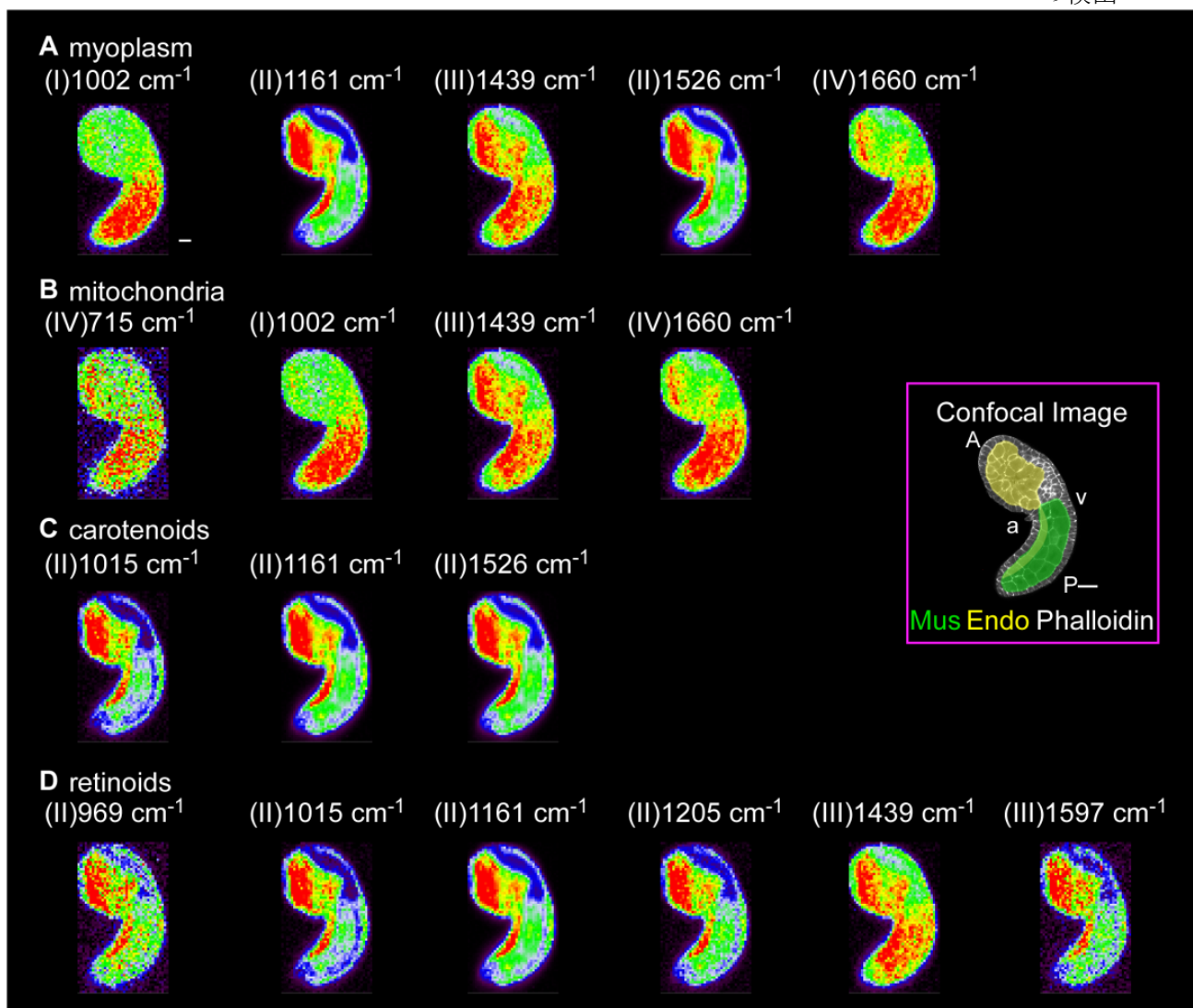


図 3.7 myoplasm, mitochondria, carotenoids, retinoids の代表的なラマンバンドから作製したラマンマップ

CellMask で染色していない尾芽胚を用いて作製したラマンマップ。各マップは、myoplasm, mitochondria, carotenoids, retinoids の代表的なバンド位置に対応するラマンバンドから作製した。各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。図中の記号 I-IV は各ラマンバンドが分類されたグループを表す。ピンクの枠で囲まれた図は phalloidin 染色を行ったカタユレイボヤ胚の共焦点顕微鏡画像（側面から見た断面像）であり、筋肉および内胚葉の位置を緑色と黄色でそれぞれ示した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、a, animal (動物極)、v, *vegetal* (植物極)、Mus, muscle (筋肉)、Endo, endoderm (内胚葉)、Scale bar: 20 μm

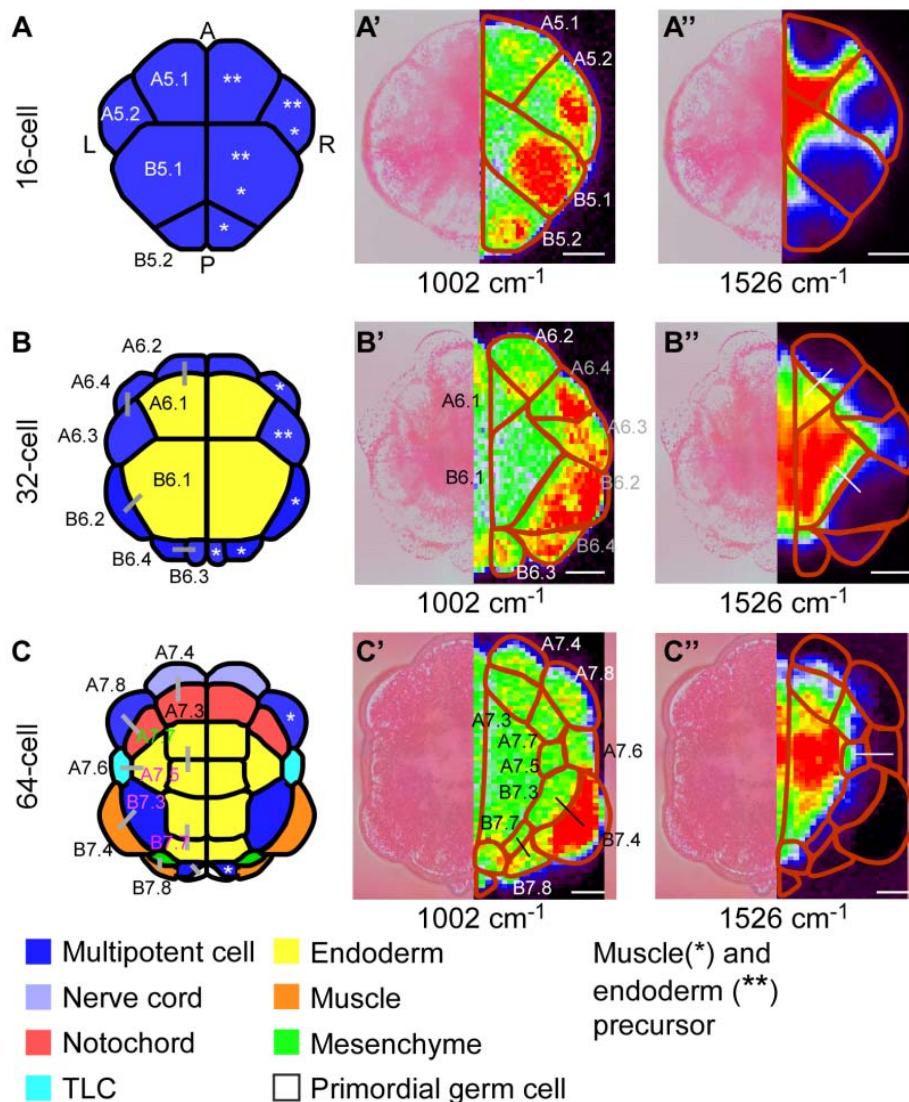


図 3.8 細胞分化過程におけるラマンマップ

A-C: 植物極側から見たカタユレイボヤ胚。各色はそれぞれ異なる細胞運命に対応する。A'-C', A''-C'': 胚の左半分は明視野像、右半分は 1002 cm^{-1} (A'-C'), 1526 cm^{-1} (A''-C'') に位置するラマンバンドから作製されたラマンマップ。全て植物極側から見た胚。マップの作製には CellMask で染色した胚を用いた。明視野像及び CellMask のマップを元に推定した細胞境界の位置を赤線で示した。2つの娘細胞の内、一方が筋肉への分化を完了しもう一方がその他の組織に分化する娘細胞ペアを黒線で示した (C')。同様に、一方が内胚葉への分化を完了しもう一方がその他の組織に分化する娘細胞ペアを白線で示した (B'', C'')。ラマンマップについて、各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、Scale bar: $20\text{ }\mu\text{m}$

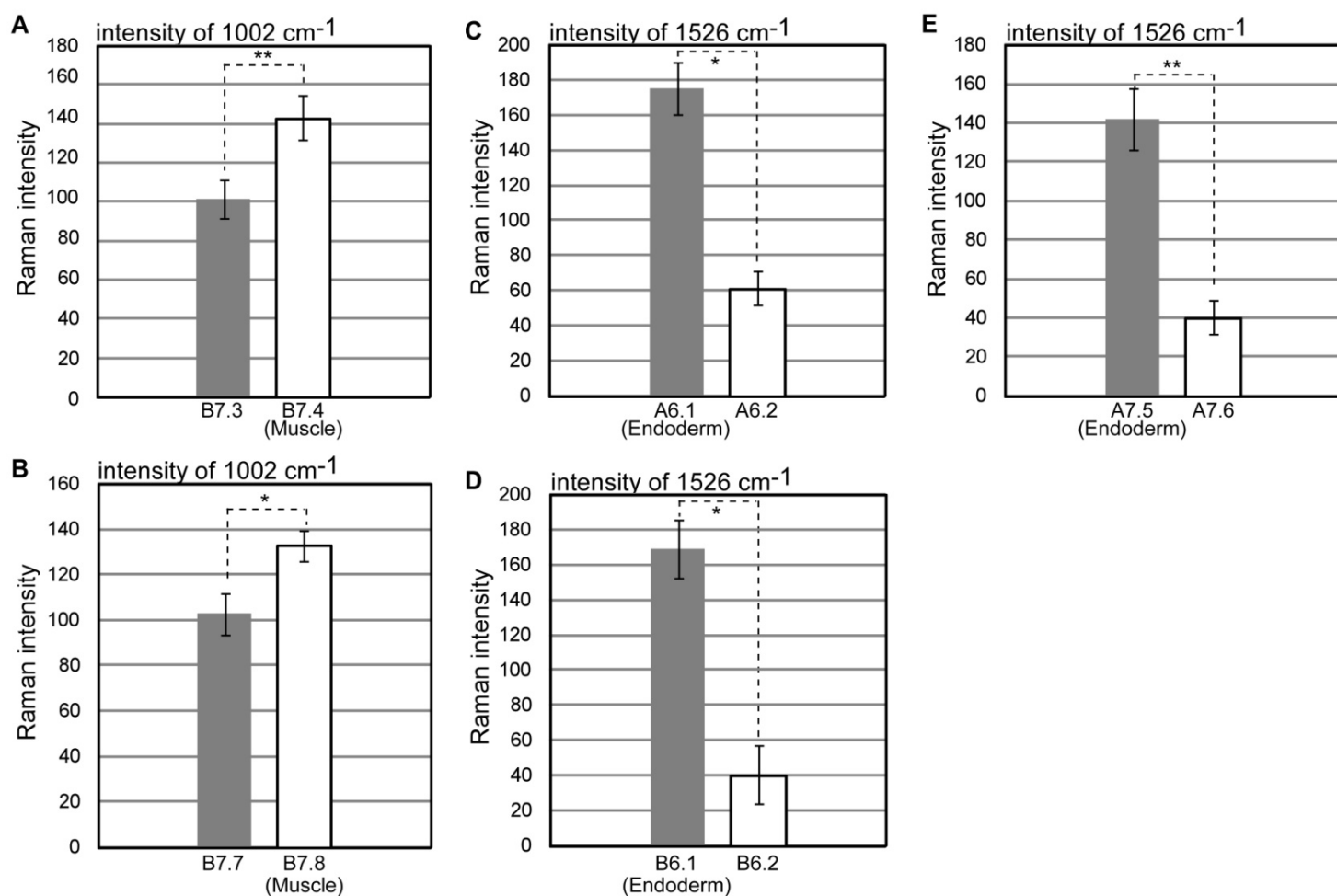


図 3.9 筋肉/内胚葉への分化が完了した娘細胞が示すラマン強度と、その他の組織に分化する娘細胞が示すラマン強度に対する統計的検定

A-E : 1002 cm⁻¹ (A, B)、1526 cm⁻¹ (C-E) に位置するラマンバンドが各割球で示すラマン強度と、その比較。解析には CellMask で染色した胚を用いた。推定した細胞境界内を Region Of Interest (ROI) として選択し、ROI 内のスポットが示すラマン強度から算出した平均値をラマン強度とした。A6.1, A6.2, B6.1, B6.1 割球のラマン強度は 32 細胞期にある胚の平均値 (4 個体) であり、A7.5, A7.6, B7.3, B7.4, B7.7, B7.8 割球のラマン強度は 64 細胞期にある胚の平均値 (5 個体) である。筋肉、内胚葉に分化する娘細胞を、割球の名前と併せて示した (図 3.8 を参照)。Student's t-test による検定から、筋肉/内胚葉へと分化した娘細胞のラマン強度は、もう一方の娘細胞よりも有意に強かった (*p<0.005, **p<0.001)。エラーバーは標準誤差 (standard error of the mean, SEM) を表す。

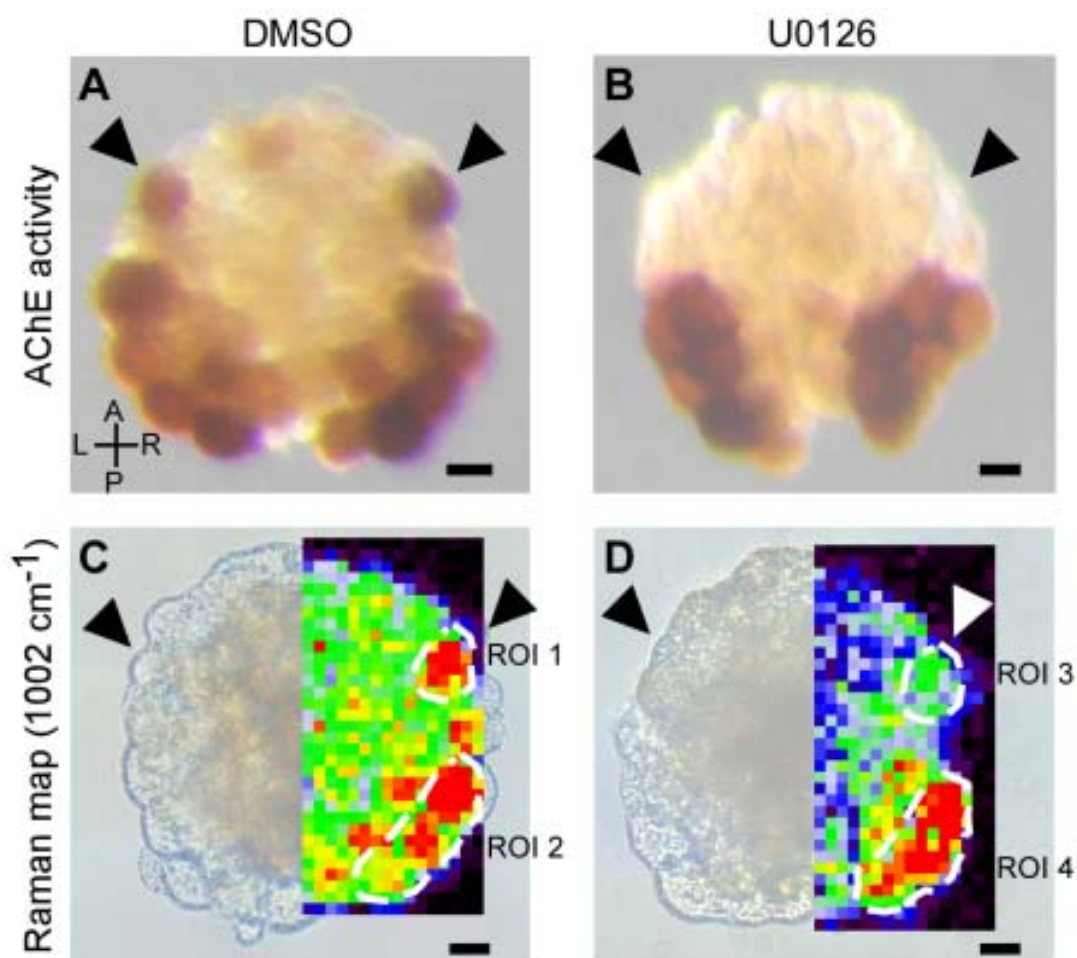


図 3.10 U0126 添加による A8.16 割球の分化阻害とラマン顕微鏡を用いた識別

受精後、8 細胞期に U0126 (コントロール胚では DMSO) を添加し、さらに 76 細胞期に cytochalasin D を添加して受精後 22 時間まで飼育したカタユウレイボヤ胚を用意した (A-D)。続いて筋肉細胞を、AChE 活性を元にした染色 (A, B)、もしくは 1002 cm^{-1} のラマンバンドを元で作製したラマンマップ (C, D) により識別した。図中矢頭は A8.16 割球の位置を示す。A, B : AChE 活性を元にした染色により、A8.16 割球の筋肉細胞への分化が U0126 の添加によって阻害されたことを確認した (茶色の生成物の消失)。C, D : 図中白い点線で囲われた領域は ROI を表す。ROI 1, および ROI 3 は A8.16 割球に相当し、ROI 2 および ROI 4 は primary muscle に相当する。ラマン強度の値に関して各 ROI 間で Student's t-test による統計的検定を行ったところ、ROI 1 と ROI 2 の間に有意差はなく ($N=4$, $p>0.15$)、一方、ROI 3 と ROI 4 の間には有意差があった ($N=6$, $p<0.005$)。すなわちラマンマップを用いた画像解析の結果は、A8.16 割球の筋肉細胞への分化が U0126 の添加によって阻害されたことを示した。なお ROI 間のラマン強度を比較するに当たり、ROI 中の各スポットが示すラマン強度から算出した平均値を、

その ROI のラマン強度の値とした。ラマンマップについて、各マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、AChE, acetylcholine esterase、Scale bar: 20 μm

第 3 章の参考文献

- Asashima M.**, (1994), Mesoderm induction during early amphibian development, *Development, Growth and Differentiation*, 36, 343–355
- Bates W. R.**, (1988), Development of myoplasm-endiched ascidian embryos, *Developmental Biology*, 129, 241–252
- Chien C.-H., Chen W.-W., Wu J.-T., Chang T.-C.**, (2011), Label-free imaging of *Drosophila* in vivo by coherent anti-Stokes Raman scattering and two-photon excitation autofluorescence microscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 16, 016012
- Conklin E.G.**, (1905), Organ-forming substances in the eggs of ascidians, *Biological Bulletin*, 8, 205–230
- de Oliveira V.E., Castro H. V., Edwards H. G. M. and de Oliveira L. F. C.**, (2009), Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis, *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 642–650
- Downes A., Mouras R. and Elfick A.**, (2010), Optical spectroscopy for noninvasive monitoring of stem cell differentiation, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, ID 101864
- Downes A., Mouras R., Bagnaninchi P., Elfick A.**, (2011), Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives, *Journal of Raman Spectroscopy*, 42, 1864–1870
- El-Hagrasy M. A., Shimizu E., Saito M., Yamaguchi Y., Tamiya E.**, (2012), Discrimination of primitive endoderm in embryoid bodies by Raman microspectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 1073–1081
- Hotta K., Mitsuhashi K., Takahashi H., Inaba K., Oka K., et al.**, (2007), A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva, *Developmental Dynamics*, 236, 1790–1805
- Huang Y.-S., Karashima T., Yamamoto M., Hamaguchi H.**, (2005), Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy, *Biochemistry*, 44, 10009–10019
- Irie T., Kajiwara S., Seki T.**, (2003), Storage of retinal in the eggs of the ascidian, *Halocynthia roretzi*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 134, 221–230
- Karnovsky M. J., Roots L.**, (1964), A “Direct-Coloring” thiocholine method for cholinesterases, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 12, 219–221

- Kim G. J., Yamada A., Nishida H.**, (2000), An FGF signal from endoderm and localized factors in the posterior-vegetal egg cytoplasm pattern the mesodermal tissues in the ascidian embryo, *Development*, 127, 2853–2862
- Lau K., Hobro A., Smith T., Thurston T., Lendl B.**, (2012), Label-free non-destructive in situ biochemical analysis of nematode *Steinernema kraussei* using FPA-FTIR and Raman spectroscopic imaging, *Vibrational Spectroscopy*, 60, 34–42
- Lemaire P.**, (2009), Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians, *Developmental Biology*, 332, 48–60
- Levi L., Levavi-Sivan B., Lubzens E.**, (2008), Expression of genes associated with retinoid metabolism in the trout ovarian follicle, *Biology of Reproduction*, 79, 570–577
- Matthäus C., Chernenko T., Newmark J. A., Warner C. M., Diem M.**, (2007), Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy *Biophysical Journal*, 93, 668–673
- Morjani H., Beljebbar A., Sockalingum G. D., Mattioli T. A., Bonnier D. et al.**, (1998), Surface-enhanced Raman scattering and fluorescence spectroscopy reveal molecular interactions of all-trans retinoic acid and RAR gamma ligand-binding domain, *Biospectroscopy*, 4, 297–302
- Nishida H.**, (1987) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme III. Up to the tissue restricted stage, *Developmental Biology*, 121, 526–541
- Nishida H.**, (2005), Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians, *Developmental Dynamics*, 233, 1177–1193
- Nishida H., Satoh N.**, (1983), Cell Lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme I. Up to the eight-cell stage, *Developmental Biology*, 99, 382–394
- Nishida H., Satoh N.**, (1985), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme II. The 16- and 32-cell stages, *Developmental Biology*, 110, 440–454
- Patalano S., Prulière G., Prodon F., Paix A., Dru P. et al.**, (2006), The aPKC-PAR-6-PAR-3 cell polarity complex localizes to the centrosome attracting body, a macroscopic cortical structure responsible for asymmetric divisions in the early ascidian embryo, *Journal of Cell Science*, 119, 1592–1603
- Pezolet M., Pigeon-Gosselin M., Caille J.-P.**, (1978), Laser Raman investigation of intact single muscle fibers: Protein conformations, *BBA Report*, 533, 263–269
- Reverberi G.**, (1956), The mitochondrial pattern in the development of the ascidian egg,

Experientia, 12, 55–56

Rimai L., Gill D., Parsons J. L., (1971), Raman spectra of dilute solutions of some stereoisomers of vitamin A type molecules, *Journal of the American Chemical Society*, 93, 1353–1357

Sathuluri R. R., Yoshikawa H., Shimizu E., Saito M., Tamiya E., (2011), Gold nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering for noninvasive molecular probing of embryonic stem cell differentiation, *PLoS One*, 6, e22802

Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M. et al., (2012), Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methods*, 9, 676–682

Sherrard K., Robin F., Lemaire P. and Munro E., (2010), Sequential activation of apical basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination, *Current Biology*, 20, 1-12

Surai P. F., Ionov I. A., Kuchmistova E. F., Noble R. C., Speake B. K., (1998), The relationship between the levels of α -tocopherol and carotenoids in the maternal feed, yolk and neonatal tissues: comparison between the chicken, turkey, duck and goose, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 593–598

Swalla B. J., (2004), Procurement and culture of ascidian embryos, *Methods in Cell Biology*, 74, 115–141

Weiss S. L., Kennedy E. A., Safran R. J., McGraw K. J., (2011), Pterin-based ornamental coloration predicts yolk antioxidant levels in female striped plateau lizards (*Sceloporus virgatus*), *The Journal of Animal Ecology*, 80, 519–527

Wheland R., Bartlett P. D., (1970), Excitation profiles of laser Raman spectra in the resonance region of two carotenoid pigments in solution, *Journal of the American Chemical Society*, 92, 3824–3825

第4章 本研究で得られた知見に関する考察

4.1 結果のまとめ

本論文では、尾索動物カタユレイボヤ尾芽胚の形態を1細胞レベルで反映する3次元中期尾芽胚モデル(3DVMTE)を構築し、構成細胞の数、形態、配列といった解剖学的情報を取得した。これにより、中期尾芽胚がどのような細胞集団によって形態が形成されているのか初めて明らかにした。またラマン顕微分光法を用い、尾芽胚期までの筋肉および内胚葉を非標識で同時に識別する新規手法を確立し、加えて胚内の分子組成および分子分布を検出した。以上のように、本論文の研究によりホヤ胚の形態形成メカニズムを解析する上で有用な新規知見を得た。

第2章に記した研究では、共焦点顕微鏡画像からカタユレイボヤ尾芽胚の3次元的な形態を反映した3DVMTEを構築した。3DVMTEからは野生型ホヤ尾芽胚および各組織の細胞数が判明し、3次元的な解剖学的特徴が1細胞レベルで明らかになった。また体幹部および尾部背側に新たな細胞群を1つずつ発見した。さらに細胞系譜情報と形態情報を対応付けて観察できる3D PDF形式の3DVMTEも併せて構築した。以上の情報はインターネット上に公開しており、自由に取得できる(<http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/3DVMTE/>)。形態形成に関わる遺伝子の種類および発現パターンには脊索動物間で保存性が見られる(Nibu *et al.*, 2013; Dufour *et al.*, 2006; Swalla, 2006)。従って本研究で得たホヤ尾芽胚まるごと1個体分の1細胞レベルでの解剖学的な知見は、ホヤ類のみでなく、脊索動物の体制がどのような過程で形成するのか解析する上でも役立つと期待される。

第3章に記した研究では、発生過程(2細胞期から尾芽胚期)にあるカタユレイボヤ胚をラマン顕微鏡で観察し、ラマン顕微分光法のホヤ胚に対する応用可能性を検証した。観察の結果、胚内に存在する分子分布を可視化でき、さらに分子組成について推定できた。また尾芽胚期までの筋肉および内胚葉の位置と形を同時に、かつ非標識で識別することに成功した。特に細胞境界を判断できた32細胞期から112細胞期の結果は、ラマン顕微鏡により1細胞レベルの空間分解能で分化状態を識別できることを示す。本研究は細胞分化過程にある脊

索動物の胚をラマン顕微鏡によって測定し、細胞間の分化状態の違いを識別した最初の報告である。得られた結果より、多細胞生物の発生過程を対象とする場合でもラマン顕微分光法による分化状態の識別が有効な事が示された。加えて組織の識別に寄与した要素について推定し、標識困難な小分子化合物の胚内における分布を、ラマン顕微鏡により可視化できる事を示唆した。

4.2 3次元中期尾芽胚モデルを用いた今後の研究の展望

4.2.1 新たに報告した解剖学的特徴の形成過程の解明

3DVMTEに見られた解剖学的特徴には未だ形成過程が明らかでない特徴があり、今後の研究が期待される。

中枢神経系の管構造は領域ごとに異なる細胞数で構成されており、前方から10 (middle SV)、6 (posterior SV)、4 (neck)、4 (VG)、4 (NT) の細胞から成る非常に規則正しい配列を示した(第2章 図 2.5)。この結果は、細胞数や分裂方向、細胞間の配置など、規則正しい配列の達成に関わる細胞制御メカニズムが領域ごとに存在することを示唆する。なお、中枢神経系では頭尾軸に沿った領域ごとに発現する遺伝子セットが異なっており (Imai *et al.*, 2009; Wada *et al.*, 1998)、細胞の配列を決定づける遺伝子の特定など、今後、発現遺伝子と形態情報を関連付けた解析が期待される。さらにホヤと脊椎動物の中枢神経系の頭尾軸に沿った遺伝子発現パターンには保存性があり (Dufour *et al.*, 2006; Aruga, 2004)、ホヤで得られた知見は脊椎動物の中枢神経系の形態形成メカニズム解明のヒントになる。細胞数が少ないホヤ胚は組織全体を1細胞レベルでイメージングできるため、形態形成過程を研究する上で良いモデルとなる。

内胚葉索では、2列の細胞列が左右非対称に並んだフットプリント様の構造が見られた(第2章 図 2.7A-C)。この細胞列に左右から挟まれる位置にはCAB構造を持つB/B*8.11細胞が存在した(第2章 図 2.7D-F)。ここで、B/B*8.11とB/B*8.12は共にB/B*7.6系列の細胞であるが、3DVMTEの内胚葉索における位置は頭尾軸方向に大きく離れていた。Shirae-Kurabayashiらの報告から、B/B*8.11細胞は尾芽胚期に頭部方向へ移動する (Shirae-Kurabayashi *et al.*, 2006)。この細胞移動の制御に、内胚葉索の細胞列が生み出す空間が関与するかもしれない。例えば内胚葉索細胞が足場になることに加え、B/B*8.11細胞の頭部方向への移動を誘導するシグナル分子が、頭尾軸に沿って濃度勾配を作っているのかもしれない。

ない。今後、尾芽胚期における B/B*8.11 細胞の極性方向を含む形態、および仮足の有無や方向性の観察による検証が期待される。他にもフットプリント様構造の形成に関して、尾部の伸長に内胚葉索は関与しない(Munro and Odell, 2002)が、内胚葉索の形成に尾部伸長が及ぼす影響については不明である。また左右対称性の破れが生じるタイミングや(左右どちらの列が前になるかといった)個体差の有無もわからない。さらに、変態時に内胚葉索は退縮し腸を形成する(Nakazawa *et al.*, 2013)が、フットプリント様の構造と退縮および腸形成との関係についてもわからない。これまで内胚葉索の形成過程や機能は他の組織と比べあまり注目されてこなかった。しかし、尾芽胚の尾部を構成するその他の組織(表皮、中枢神経系、脊索、筋肉)とは明瞭に異なる解剖学的特徴を有し、本研究の結果から内胚葉に特異的な形態形成メカニズムの存在が示唆される。始生殖細胞の移動や腸の形成など、ホヤ成体の体構築に重要な役割を担うため、内胚葉索について更なる研究の進捗が望まれる。加えて、中枢神経系の場合と同様に内胚葉(体幹部内胚葉と内胚葉索)の形態形成に関わる遺伝子には種を越えた保存性があり(Zorn and Wells, 2007; Ikuta *et al.*, 2004; Yokouchi *et al.*, 1995)、ホヤ胚は脊索動物の内胚葉の形態形成過程を研究する上で良いモデルとなりうる。

本研究により、体幹部および尾部背側に新たな 2 細胞群が見つかった(第 2 章 図 2.8, 図 2.9)。これらの細胞群について、形成過程、脊索動物固有の体制を形成する上での重要性、そして幼生、変態過程や成体での機能など不明な点が多い。細胞系譜や解剖学的位置は horseradish peroxidase を用いた実験で検証できる(Taniguchi and Nishida, 2004; Nishida, 1987; Nishida and Satoh, 1985, 1983)。体制形成への関与はマニピュレーションによる細胞の除去により確認できる(Munro and Odell, 2002)。また幼生における機能は、組織特異的プロモータを利用した組織分類(Imai and Meinertzhagen, 2007a, 2007b)、ラマン顕微鏡や質量顕微鏡を用いた分子組成の推定(Kawada *et al.*, 2011)、抗体染色や遺伝子発現パターンによる機能の推定(Hamada *et al.*, 2011; Horie *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2005)、およびレーザーアブレーション、遺伝子操作や阻害剤の添加による行動実験(Nishino *et al.*, 2011; Tsuda *et al.*, 2003)等で明らかになるだろう。

4.2.2 野生胚の標準データとしての利用

3DVMTE では、2次元画像では捉えることの難しかった尾芽胚の3次元的な解剖学的特徴を観察できる。第3章では、解剖学的特徴に従って各組織内を複数の領域に分けた(第2章表 2.1)。ここで、表皮や中枢神経系では、組織内で

見られる解剖学的特徴の違いと、細胞系譜および遺伝子発現パターンの違いが対応する (図 4.1) (Imai *et al.*, 2009; Ikuta and Saiga, 2007; Pasini *et al.*, 2006)。従って 3DVMTE は、発現遺伝子の違いが解剖学的特徴の領域間での違いに結びつくまでの、分子メカニズムの解明を目指す上で有用な情報を提供すると考えられる。例えば、変異胚が示す表現型を解析する際の有用な比較対象となる。1 細胞レベルの比較により、(遺伝子発現やタンパク質の分布など) 導入した変異が、細胞の分裂、形態や配置におよぼす影響、さらに組織や胚の形態に及ぼす影響を解析できる。3DVMTE は野生胚の標準データとして、ホヤ尾芽胚形態形成メカニズムの解明に貢献できる。さらにホヤ類の胚の知見として、他種脊索動物の尾芽胚との比較に使用することも期待される。

4.2.3 定量的な解剖学的情報を用いた形態形成メカニズムの解析

解剖学的特徴の記載に加え、体積・表面積・細胞数・球形度・直角度・扁平度・伸長度などの解剖学的情報を網羅的に定量できる点は、3次元胚モデルの構築により得られる非常に大きな利点である。定量データを元にした解析は、形態形成メカニズムの解明に繋がる (Robin *et al.*, 2011; Tassy *et al.*, 2006)。

構築した 3次元胚モデルからは組織や細胞の体積を定量できる (図 4.2)。細胞体積の制御は組織の形態に関与する (Eiraku *et al.*, 2011; Baena-López *et al.*, 2005; Lechler and Fuchs, 2005) ため、不等分裂などの現象が形態形成に及ぼす影響を解析する際に有用な情報となる。ホヤ発生では組織への運命決定は 76 細胞期にほぼ完了するが、胚全体に対する各組織の体積の割合は尾芽胚期までに大きな変化はなかった (図 4.2A)。従って、少なくとも尾芽胚期までは組織間で目立った物質のやりとりは行われぬのかもしれない。またホヤ尾芽胚の脊索は頭部側や尾部側と比べ中央部が太い (第 2 章 図 2.6A; 図 4.2B, 枠内) が、実際に 3DVMTE の脊索細胞の体積を定量した結果、他の領域と比べ中央部が大きい傾向があった (図 4.2B)。Veeman と Smith は原腸胚期以降の脊索細胞の体積変化を定量的に調べ、この傾向は原腸胚期における細胞分裂の際、中央部に近い細胞ほど体積が大きくなるよう不等分裂することで生じると指摘した (Veeman and Smith, 2013)。分裂面の制御など、脊索細胞の不等分割を制御する分子メカニズムはわかっておらず、今後の解析が待たれる。

3DVMTE の構築により、ホヤ尾芽胚を構成する細胞数の詳細が始めて明らかになった。細胞数からは、細胞分裂が活発な組織や、組織内での分裂の順序がわかる (第 2 章 表 2.1-2.3)。例えば構築した 3DVMTE 2 個体の比較から、CNS の SV では、anterior 領域の細胞が先に分裂し、その後に middle、posterior 領域

の細胞が分裂すると推測される（第2章 表 2.1）。細胞分裂の順序が組織の形態に及ぼす影響は不明であるが、分裂異常を誘導した変異胚との比較や、後述する reversible network reconnection (RNR) モデルを用いた力学的シミュレーションにより判明するかもしれない。

3次元胚モデルから取得した解剖学的情報（図 4.3B-G）の中で伸長度に注目すると、筋肉（図 4.3E）を除く植物極側の組織（図 4.3C, 4.3D, 4.3F, 4.3G: 中枢神経系・脊索・間充織・内胚葉）で76細胞期（図 4.3B-G, 赤色）とその他3つの発生期（図 4.3B-G, 紫色, オレンジ色, 青色）の間に大きな差が見られた。76細胞期以降に原腸陥入が始まり（第1章 図 1.4）、植物極側の細胞層が陥入する。従って結果は、原腸陥入が植物極側の細胞の形態変化に及ぼす影響の大きさを反映すると考えられる。Sherrard らは3次元ホヤ胚モデルより得た定量的な解剖学的情報を元に細胞膜にかかる張力を考慮したシミュレーションを行い、ホヤ胚の原腸陥入が内胚葉細胞の形態変化により誘導されることを示唆した（Sherrard *et al.*, 2010）。このように定量的な解剖学的情報は、例えばシミュレーション手法により発生の進行に伴う胚や組織の形態形成過程を力学的に理解する際に有用である。組織の形態形成過程をシミュレーションする上で注目すべきモデルとして、近年 Okuda らが報告した RNR モデルがある（Okuda *et al.*, 2012）。形態形成過程で生じる（不等分裂を含む）細胞分裂や体積の変化は、組織の力学的なバランスに影響を及ぼす（Eiraku *et al.*, 2011; Baena-López *et al.*, 2005; Lechler and Fuchs, 2005）。RNR モデルではこうした細胞増殖を考慮した組織の3次元的な形態変化について、力学シミュレーションが可能である（Okuda *et al.*, 2013a, 2013b）。ここで、3DVMTE からはホヤ尾芽胚を構成する全細胞の形態情報および座標情報が得られる。第3章の研究ではわずかに発生段階の異なる2個体分の3DVMTEを構築したが、T/H 率や各組織の細胞数が異なった（第2章 表 2.1, 2.2）。従って、2個体分の3DVMTEのデータおよびRNRモデルを用いたシミュレーションにより、ホヤ尾部伸長について力学的側面から解析できるかもしれない。例えば、表皮細胞のインターカレーション、中枢神経系細胞の分裂面や分裂順序、脊索細胞の形態変化、内胚葉索細胞のフットプリント様構造の形成が尾芽伸長に与える力学的な影響である。

以上のように、1細胞レベルの、特に3次元的な形態情報を定量的に取得することで、組織や胚の形態形成メカニズムについて解析が進むと期待される。またシミュレーション手法を取り入れることで、細胞-組織-胚全体と異なる階層の形態変化を統合した解析が可能になる。この様な解析手法は近年急速に発生生物学分野に取り入れられている。3DVMTE は実際の尾芽胚の細胞数や3次元的な形態を反映する。従ってシミュレーションなどの理論的研究に実験からのフィードバックを与え、尾芽胚の形態形成メカニズムを定量的に解析する上で

の活用が期待できる。

4.2.4 3次元胚モデルの構築について改善が望まれる点

ここまで述べたように、3DVMTE より得られる情報は尾芽胚の形態形成メカニズムの解明に有用である。しかしながら、3次元胚モデルの構築工程には改善が望まれる点はいくつかある。

最も大きな問題は、3次元胚モデルの構築に多くの時間がかかる点である。第2章の研究では、1579細胞から成る3DVMTEを1個体分構築するのに2か月程度要した。構築に要した時間のほとんどが、細胞輪郭抽出の過程でかかった。自動で細胞境界を識別する方法は未だエラーも多く、全てマニュアルで作業を行ったためである。それに対しDelibaltovらは、半自動（自動+マニュアル）で細胞境界を識別する方法を開発し、実際にホヤ尾芽胚内の脊索細胞の境界の識別を行った(Delibaltov *et al.*, 2011)。さらにVeemanとSmithはこの手法を元に、ホヤ胚の尾芽伸長に伴う脊索の形態変化を定量的に解析した(Veeman and Smith, 2013)。Veemanらの報告の様に画像情報科学の手法を取り入れることで、より一層3次元胚モデルの構築にかかる期間は短くなる。将来的にはタイムラプスイメージングにより取得した画像を元に3次元胚モデルを網羅的に構築し、時間の経過と胚全体の形態変化を対応づけた解析手法の開発が望まれる。

他の技術的な問題として、3次元胚モデルの構築には有料ソフトウェア(Avizo, 3ds Max)が必要なため汎用性がやや乏しく、(3次元的な)形態情報の定量的な取得が、いまだ一般的な手法で無い点が挙げられる。例えばImage JやFijiといったフリーソフトを用いる手法の開発および配布により問題は改善されるかもしれない。

以上2つの技術的な問題に加え、ホヤ胚の形態に関する定量的な情報がほとんど公開されていない問題がある(ANISEEDには後期112細胞期までが公開されている)。3次元胚モデルの構築に多くの時間がかかるため細胞の多い胚のモデル構築は敬遠されがちであり、また構築手法自体がいまだ一般的ではない。そのため、形態情報の取得が解析法の1つとして積極的に行われてはいない。しかしながら、形態形成に関わるメカニズムを解析する上で、胚や組織、各細胞の3次元的な形態情報は特に重要な情報である。例えば各発生段階にある野生型ホヤ胚や、特定遺伝子をノックダウンした胚の形態情報に関して研究者が自由にアクセスできるデータベースがあれば、解剖学的特徴の詳細な観察、野生胚の標準データの取得、数理解析に必要な定量情報の提供により、形態形成メカニズムに関する解析は一層進むと期待される。

4.2.5 まとめ

3DVMTE は、野生型ホヤ尾芽胚まるごと 1 個体分の 3 次元的な解剖学的特徴を 1 細胞レベルで反映する。第 2 章の研究で明らかになった、2 次元画像では捉えるのが困難な解剖学的特徴の形態形成メカニズムについて、今後更なる研究が期待される。また 3DVMTE から得られる細胞数や形態の網羅的な定量的情報は、数理解析や、シミュレーション手法を用いた尾芽胚の形態形成メカニズムの解明に利用できる。構築した 3DVMTE は野生胚の標準データとして、変異胚が示す表現型を解析する際の有用な比較対象となる。

3 次元胚モデルからは、形態形成メカニズムの解明を目指す上で非常に有用な情報を取得できる。構築時の技術的問題の解決や、3 次元形態情報が登録されたデータベースの運用により、ホヤ胚の形態形成メカニズムの更なる解明が期待される。

4.3 ラマン顕微分光法を用いた今後の研究の展望

4.3.1 細胞分化状態を非標識で識別できる新規手法としての応用

第 3 章の研究では、myoplasm や mitochondria、および retinoids、carotenoids と推定したラマンバンドを元に、非標識でホヤ胚の筋肉や内胚葉の位置・形を識別した (第 3 章 図 3.5-3.7)。中でも細胞境界を識別できた 112 細胞期までの胚については、1 細胞レベルの空間分解能で筋肉細胞、内胚葉細胞を識別できた (第 3 章 図 3.5)。またこの結果から、発生過程にある動物胚を対象とした場合でも、ラマン顕微分光法で細胞分化状態を識別できることが明らかになった。

myoplasm や mitochondria はホヤだけでなく、その他の動物の筋肉にも多量に含まれる。従ってホヤ胚だけでなく他の動物種の発生過程においても、myoplasm や mitochondria の示すラマンバンドを元に筋肉の位置や形の識別、そして未分化細胞から筋肉細胞へと分化した娘細胞の定量的な識別が可能かもしれない。例えば幹細胞の筋肉細胞への分化を検出するといった医療応用が期待される実験 (Ellis *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013) に加え、非モデル生物など分子生物学的手法の基盤があまり整っていない生体試料に対する実験においてラマン顕微分光法は相性が良いと考えられる。

既存の手法と比較した場合のラマン顕微分光法の利点として、ラマンスペクトルの細胞間での違いをもとに分化状態を識別するため、特定分子の有無に依存せずに細胞の分化状態を識別できる利点がある。既存の手法はマーカー遺伝子の発現や、特定のタンパク質、または酵素活性をもとに分化状態を識別するため、同定に用いる分子の発現時期や領域に識別の可否が依存する。例えば第3章に記した研究では、U0126の添加によるA8.16割球の筋肉への分化阻害をラマン顕微鏡により識別した(第3章 図3.10D)。しかし、Mu-2抗体を用いた場合、A8.16割球では抗原が発現しないため筋肉細胞への分化を識別できず、U0126添加の影響を評価できない(Kondoh, *et al.*, 2003; Nishikata *et al.*, 1987)。それに加え、ラマン顕微分光法は分化状態を定量的に識別できるため、分化状態のより細かい分類や、自動識別が可能である。さらに複数の分化状態を1度の測定で同時に識別できる点も、多数の組織細胞が混在する胚発生を研究する上で有用である。ホヤの尾芽胚は主に7種の細胞から構成される(表皮細胞、中枢神経系細胞、脊索細胞、筋肉細胞、間充織細胞、体幹側細胞、内胚葉細胞)。この内、第3章の研究ではgroup Iおよびgroup IIの各ラマンバンドに注目した単変量解析により、筋肉と内胚葉をそれぞれ識別した(第3章 図3.5, 3.6)。残る5つの組織の識別は、取得したラマンスペクトルに対して多変量解析を行うことで可能かもしれない。例えば、主成分分析(PCA)やk-means法(KCA)は、ラマン顕微分光法を用いた切片サンプル内の組織の識別や、発生の進行に伴う幹細胞の分化状態の定量的な識別によく用いられる(Pascut *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2012; Koljenović *et al.*, 2004)。Lauらが線虫に対して行ったように(Lau *et al.*, 2012)、ラマン顕微鏡と多変量解析を組み合わせることで、筋肉、内胚葉に加えホヤ胚内のその他の組織を同時に可視化できるかもしれない。

ホヤ胚の形態形成メカニズムを解明するためには、注目する組織細胞の胚内における位置や形を把握するため、細胞の分化状態を同定する手法が必要である。ラマン顕微分光法は分子組成を元に非標識で細胞分化状態を同定できる。高い空間分解能を有し、マーカー遺伝子の発現領域や時期に依存せず、また複数の組織を同時に識別できるため、分化状態識別のための新規手法として期待できる。

4.3.2 分子組成・分布の観察による細胞分化メカニズムの解析

第3章の研究では、細胞分化過程にある筋肉および内胚葉前駆細胞内の分子局在を観察した。その結果、強いラマン強度を示した領域は母細胞内で局在していた(第3章 図3.8)。特に前駆細胞の内、A5.2細胞とB5.1細胞については

筋肉と内胚葉の両方の細胞に分化するが（第3章 図 3.8A）、これらの細胞内の局在パターンは group I と II で異なった（図 4.4A と 4.4B および 4.4C と 4.4D; 第3章 図 3.8A', 3.8B'）。ここで、A5.2 細胞および B5.1 細胞の娘細胞の内、group I のラマンマップで強いラマン強度を示した A6.4 細胞、B6.2 細胞は筋肉前駆細胞であり（図 4.4A', 4.4C'; 第3章 図 3.8B, 3.8B'）、一方、group II のマップで強いラマン強度を示した A6.3 細胞は内胚葉前駆細胞、B6.1 細胞は内胚葉細胞である（図 4.4B', 4.4D'; 第3章 図 3.8B, 3.8B'）。固定胚を用いたため時間経過で局在がどう変化するかは不明であるが、この結果から、母細胞の分裂により分化運命の異なる娘細胞へと分子が不等分配されるよう分子局在を制御するメカニズムを、ラマン顕微鏡を用いて解析できるかもしれない。なお、ホヤ胚（16 細胞期）の A5.1 割球が分裂後、内胚葉に分化する A6.1 と中胚葉に分化する A6.2 の間で分化運命が分かれる際は、*Not* mRNA が A6.2 割球に選択的に分配されるメカニズムが重要である（図 4.5）。*Not* が分配された娘細胞は中胚葉に分化し、*Not* が分配されなかった娘細胞は内胚葉になる（図 4.5C）。この分配には、核から放出された mRNA を、A5.1 中、A6.2 側の細胞質に留める（図 4.5A, 4.5B）（*Wnt5a* を介した）メカニズムが示唆されている（Takatori *et al.*, 2010）。報告では細胞分裂前にすでに母細胞内の分子局在は制御されており、この制御が分裂直後の娘細胞間の分子組成の違い、ひいては分化運命の違いに結び付くことを示している。今後さらなるメカニズムの解明を目指す上でラマン顕微分光法が効果的な手段になるかもしれない。

ラマン顕微鏡は細胞内の複数の分子局在を、1 度の測定で同時可視化できる（第3章 表 3.1, 図 3.2）。分子組成と局在の変化を観察、分析することで、細胞内分子の局在制御および細胞分裂による娘細胞への細胞質領域の分配メカニズム、そして細胞分化メカニズムについて解明が進むと期待できる。

4.3.3 標識困難な分子の形態形成過程に対する影響の解析

第3章の研究では、ラマン顕微鏡を用いてホヤ胚内の分子分布を可視化した（第3章 図 3.2）。さらに group I のラマンバンドを myoplasm や mitochondria、およびそれらに共局在するタンパク質、そして group II のバンドを retinoids、carotenoids によるものとそれぞれ推定した（第3章 表 3.1）。

retinoids や carotenoids はホヤ胚の発生を制御する。retinoids の 1 種である retinoic acid は外胚葉性および内胚葉性組織の発生（Hinman and Degan, 1998）や、遺伝子発現および形態形成の制御（Pasini *et al.*, 2012; Ishibashi *et al.*, 2005; Nagatomo *et al.*, 2003）に関わる。さらにホヤだけでなく、retinoids は脊椎動物に

においても細胞分化や組織形成に関わる (Ross *et al.*, 2000; De Luca, 1991)。そのためモルフォゲン分子として、胚内の濃度分布がどのようにして細胞に位置情報を与えるか関心もたれてきた (Sobreira *et al.*, 2011; Aulehla and Pourquiè, 2010; Koop *et al.*, 2010; White and Shilling, 2008)。しかしながら retinoids の様な小分子化合物は標識が難しく可視化が困難である。実際、2013 年になって初めて生きたゼブラフィッシュ胚内における retinoic acid の分布が可視化された (Shimozono *et al.*, 2013)。加えて、retinoids は発生制御に重要な分子だが、動物は生体内で合成できない。従ってホヤを始め卵性の脊椎動物では親から受け継ぐか、retinoids の前駆体である carotenoids の形で胚内に蓄える (Irie *et al.*, 2010; Levi *et al.*, 2008; Irie *et al.*, 2004)。よって、carotenoids の胚内での分布、carotenoids から retinoids が合成される領域、さらに両分子の濃度変化といった情報も、胚発生を制御するメカニズムを解明する上で有用である。第3章の結果はラマン顕微分光法により retinoids や carotenoids の分布が可視化できることを示唆する。retinoic acid の例のように、添加実験や関連遺伝子の発現から胚発生で重要であるとわかっていながら、標識の困難さから胚内での分布がわからなかった分子について、ラマン顕微鏡を用いた可視化が期待できる。

retinoids、carotenoids に加え、cellulose の新規観察手法も求められる。現在確認されている中で、ホヤは cellulose を合成する唯一の動物である (Hosp *et al.*, 2012)。ホヤ類の形態形成に cellulose は重要な役割を担っており、皮嚢の形成に加え、*Ciona* では報告が無いが、ホヤの一種である *Oilopleura dioica* の脊索の伸長に cellulose の関与が示唆されている (Sagane *et al.*, 2010)。cellulose 合成酵素の遺伝子は、バクテリアから水平伝播によりホヤ類の祖先動物のゲノムに取り込まれたと考えられる (Nakashima *et al.*, 2004)。従って cellulose の発現調整や分布の制御に関わる関連遺伝子の同定は、ホヤ形態形成メカニズムだけでなく、他の生物種から取り込まれた遺伝子が、新たな種 (ホヤ類) で機能を持つようになる過程の理解に繋がる。これまで cellulose のホヤ胚内での分布を観察する手法として、電子顕微鏡 (Mancuso, 1974)、cellulose 合成酵素の遺伝子発現 (Nakashima *et al.*, 2004)、そして抗体染色 (Sasakura *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 1993) が用いられてきた。しかしながら、これらの手法は固定サンプルにのみ適用可能であり、またサンプルの準備に1週間以上を要するため、より効率的な観察手法が求められていた。Nakashima らは、2008年にフーリエ変換赤外分光顕微鏡による手法を報告した (Nakashima *et al.*, 2008)。フーリエ変換赤外分光顕微鏡では、注目する領域における cellulose 合成量の大小を1日以内に調べられる。しかし、これまで cellulose の分布を観察した報告はない。ホヤ成体から単離した cellulose をラマン分光法で分析した報告から、cellulose は $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ の位置に強いラマン強度を示す (Šturcová *et al.*, 2006, 2005)。そこで我々はラマ

顕微鏡を用いてカタユウレイボヤ幼生内の cellulose の可視化を試みた。その結果、既知の知見 (Sasakura *et al.*, 2005) と同様に幼生の体表付近の領域で比較的強いラマン強度を検出した (図 4.6B)。ラマンマップの作製に用いたバンドの強度が低く現在までにノイズが目立つマップしか得られていないが、今後、測定条件を検討することで cellulose の分布をより明確に観察できるかもしれない。ラマン顕微鏡もフーリエ変換赤外分光顕微鏡と同様に、ホヤ胚内の cellulose を既存手法と比べ非常に短時間で検出できる。ラマン顕微分光法はホヤ胚内の cellulose の発現時期、分布を可視化する新たな手法となるかもしれない。

ラマン顕微分光法で得た情報から、細胞および胚内の分子組成や分布の変化を制御するメカニズムに関して解析可能である。例えば野生胚と変異導入胚の比較により (定量 real time PCR やマイクロアレイのように)、濃度や分布変化の様子が変わる分子と変わらない分子を検出し、さらに変化パターンを元にした分類も可能かもしれない。こうして分類した分子同士の関連性 (変化しなかった分子の共通点や、同様の変化パターンを示した分子同士や、同様の変化パターンであるが時間ずれが見られる分子同士の共通点など) についての研究も、新たな分野として生物学的発見につながるかもしれない。

ラマン顕微鏡の使用により、小分子化合物などの標識困難な分子が形態形成に及ぼす影響の解明といった新たな研究の展開が期待される。その際には、分子の局在を制御する分子メカニズムについて新たな発見があると考えられる。またラマン顕微分光法では注目する分子の前駆体や代謝物質の濃度変化を分析できる。従って、分子の生産および分解の様子を併せて可視化できるかもしれない。

4.3.4 ラマン顕微分光法について改善が望まれる点

ここまで述べたように、ラマン顕微分光法により、ホヤ胚の形態形成メカニズムや細胞分化メカニズムの分子レベルでの理解が一層進むと期待できる。しかしながら、ラマン顕微鏡を用いた測定には改善が望まれる点はいくつかある。

測定を行う上で問題となるのが、測定時間が長い点である。ラマン散乱光の強度が非常に弱いため、解析に耐えうるスペクトルを得るためにはレーザーの照射時間を長めに設定する必要がある。第3章で行った研究でも、ホヤの発生速度と比べ測定時間が長く、発生過程のライブイメージングはできなかった。近年、非標識で細胞状態が識別できる利点から、ラマン顕微鏡を生体試料に用いる研究が増えてきた。それに伴い、ライブイメージング可能な程度まで測定時間を短くする試みがなされている (Slipchenko *et al.*, 2012; Das and Agrawal,

2011; Downes and Elfick *et al.*, 2010)。例えば、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS, コヒーレント反ストークスラマン散乱) を利用する手法である。CARS は通常のラマン散乱に比べ強いラマン強度を示す。そのため、高速なイメージングが可能となる (Suhaim *et al.*, 2012)。Yue らは CARS 顕微鏡を用い、三次元培養された乳がん細胞中の脂質の局在変化を、経時変化で観察した (Yue *et al.*, 2012)。CARS 顕微鏡を用いた報告の多くは細胞を対象にしたものだが、Yue らの報告から、3 次元的な構造を持った動物胚であっても分子の挙動を 4 次元 (3D + time) で観察できるかもしれない。

さらに技術的な問題として、ラマン顕微分光法では細胞境界の識別が困難な点が挙げられる。第3章の研究ではこの問題を克服するために、CellMask 染色した胚を用意した。染色により 112 細胞期までの胚で細胞境界の識別に成功した。しかし、原腸陥入期、神経胚期、および尾芽胚期の胚では識別できなかった。原因として、原腸陥入期以降の(細胞分裂による)細胞体積の減少が考えられる。従って空間分解能をより高めた測定により、測定時間は長くなるが細胞境界を識別可能かもしれない。ただしライブイメージングを行う上では CellMask を用いた染色や測定時間の長期化は望ましくない。Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS, 表面増強ラマン散乱) を用いた細胞膜の可視化も報告されているが (Li *et al.*, 2008)、表層の細胞しか観察できず、胚内部の細胞は観察できない。今後、細胞境界を識別する手法の改善が期待される。

またラマンスペクトルを元に生体試料内の分子種を推定するには、まだまだラマンバンドと生体分子を対応付けたデータが不足している。しかしながら、共焦点レーザーラマン顕微鏡を用いて線虫の生体組織ごとの分子種を推定した報告などは、分子種の分布を 0.5 μm 間隔で観察するなど (Lau *et al.*, 2012)、手法としてラマン顕微分光法は非常に魅力的である。最近ではガン細胞や 2 次代謝産物生産菌を始め、ラマンスペクトルデータから生体内分子の推定を行うためのデータベースの構築が進んでいる (Auner *et al.*, 2013; Durairandian *et al.*, 2012; Stöckel *et al.*, 2012; De Gelder *et al.*, 2007)。また有料のものでは、BIO-RAD のデータベース (INF-280053) には 112 種類の生体分子についてラマンスペクトルの情報が含まれる (BIO-RAD ラマンデータベース, 2013 年 8 月 30 日付)。さらなるデータベースの充実により、生体試料内に存在する(これまでに報告のない種を含む)分子の(存在量や分布の変化といった)挙動に関して新規な情報の取得が期待できる。例えば生体内分子の代謝過程の可視化(酵母の例に、Huang *et al.*, 2011) など、発生過程の細胞内で進行する分子レベルの現象についてより詳細な情報の取得が期待できる。また新たな研究対象として分子組成や組成の調節機構に注目し、異なる脊索動物の類似組織間で比較することで、発生メカニズムの分子レベルの種を越えた保存性など新たな知見が得られるかも

しれない。

4.3.5 まとめ

ラマン顕微分光法は分子組成を元に非標識で細胞分化状態を識別できる新規手法である。今後ホヤ胚の発生のみでなく、医学的研究や非モデル生物への応用が期待される。また標識困難な小分子化合物を含む胚内の分子組成や分布情報の取得など、ラマン顕微分光法により取得できる情報は既存手法で取得できないユニークなものを含む。さらに Renishaw の顕微鏡およびラマンスペクトル解析ソフトは第3章の研究で使用した時点では2次元的なラマンマップしか作成できなかったが、2013年に3次元的なマップの作製が可能になった。ホヤ類を含む動物胚の形態形成および細胞分化メカニズムを分子レベルで理解する上で新たな知見をもたらすと考えられる。

今後の発展が期待される測定時間の高速化によるライブイメージングや、ラマンバンドと生体分子を対応付けたデータベースの充実は、生体試料内に存在する、これまでに報告のない種を含む分子の振る舞い（組成や分布の変化）について情報の取得を可能にする。形態形成過程や細胞分化過程と、それに伴う分子組成および分布の関係を対応付けた解析により、ホヤ胚の発生メカニズムについて分子レベルでの更なる解明が期待される。

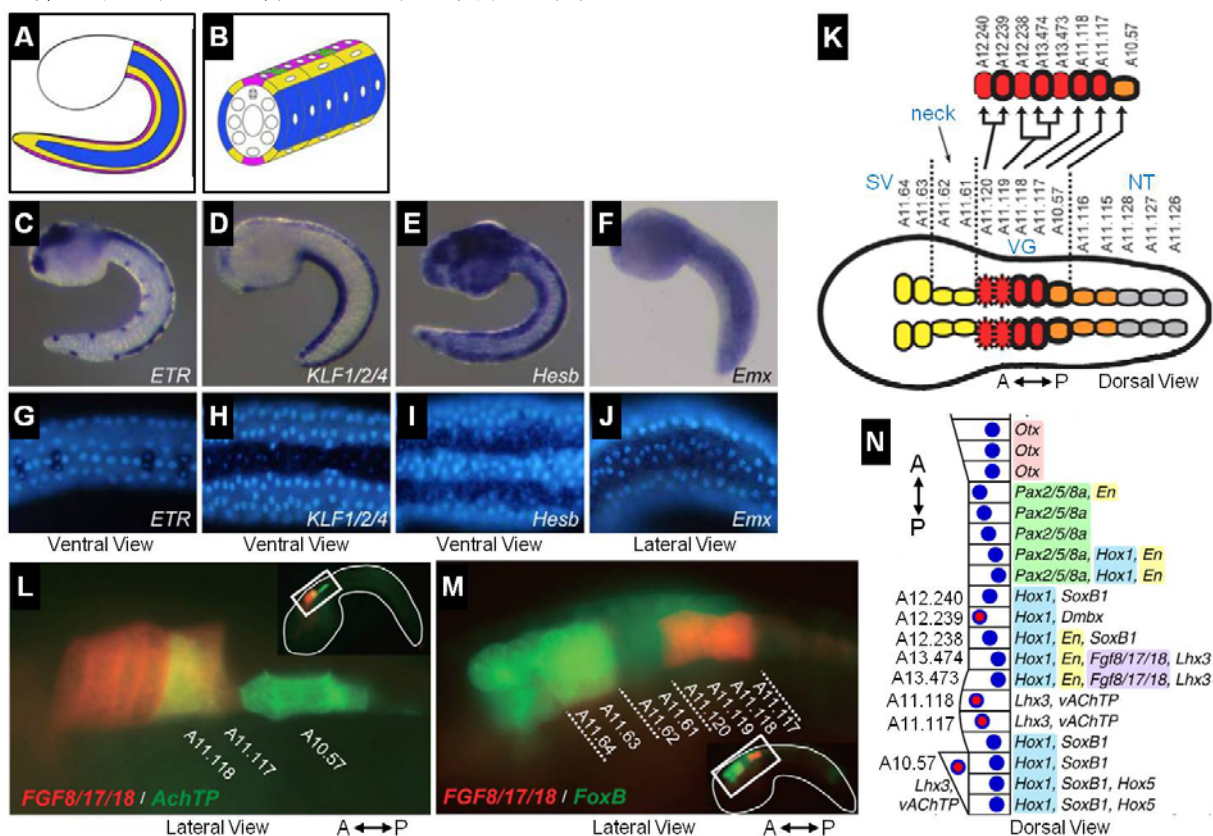


図 4.1 尾芽胚期の表皮と中枢神経系における解剖学的境界と細胞系譜および遺伝子発現パターンの対応関係

図 A-J は Pasini らの論文 (Pasini *et al.*, 2006)、図 K-M は Imai らの論文 (Imai *et al.*, 2009)、図 N は Ikuta and Saiga の論文 (Ikuta and Saiga, 2007) より抜粋し、一部改変した。A-J: 図 A、C-F、J は胚を側方より見た図。A-B: 尾部表皮の模式図。細胞系譜の違う 8 列の細胞列 (図 2.4B) が異なる色で表されている。系譜については第 2 章 図 2.4B に記した。C-J: 各遺伝子の発現領域。in situ ハイブリダイゼーション (C-F) と、その後 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) による核染色を行った結果 (G-J)。遺伝子の発現領域で蛍光強度が低い。各遺伝子の発現領域は、図 B 中、ETR は緑色 (ただし図 G は尾部側から見た図なので、図 B では見えない)、KLF1/2/4 はピンク色、Hesb は黄色、Emx は青色の領域に対応する。K-N: 中枢神経系は管構造をとる (第 2 章 図 2.5D-F) が、側面を構成する細胞のみ記されている。K: 中枢神経系の解剖学的特徴と細胞系譜の対応関係。色の違いは細胞系譜の由来に対応する (A9.16, 黄色; A9.29, オレンジ色; A9.30, 赤色; A9.32, 灰色)。解剖学的特徴の違いについて詳細は第 2 章 図 2.5 に記した。L-N: 細胞系譜と発現遺伝子の対応関係。N: 観察時、周囲の細胞と比べ解剖学的に目立つ細胞がピンク色で示されている。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、NT, caudal neural tube (尾部神経管)、SV, sensory vesicle (感覚胞)、VG, visceral ganglion (運動神経節)

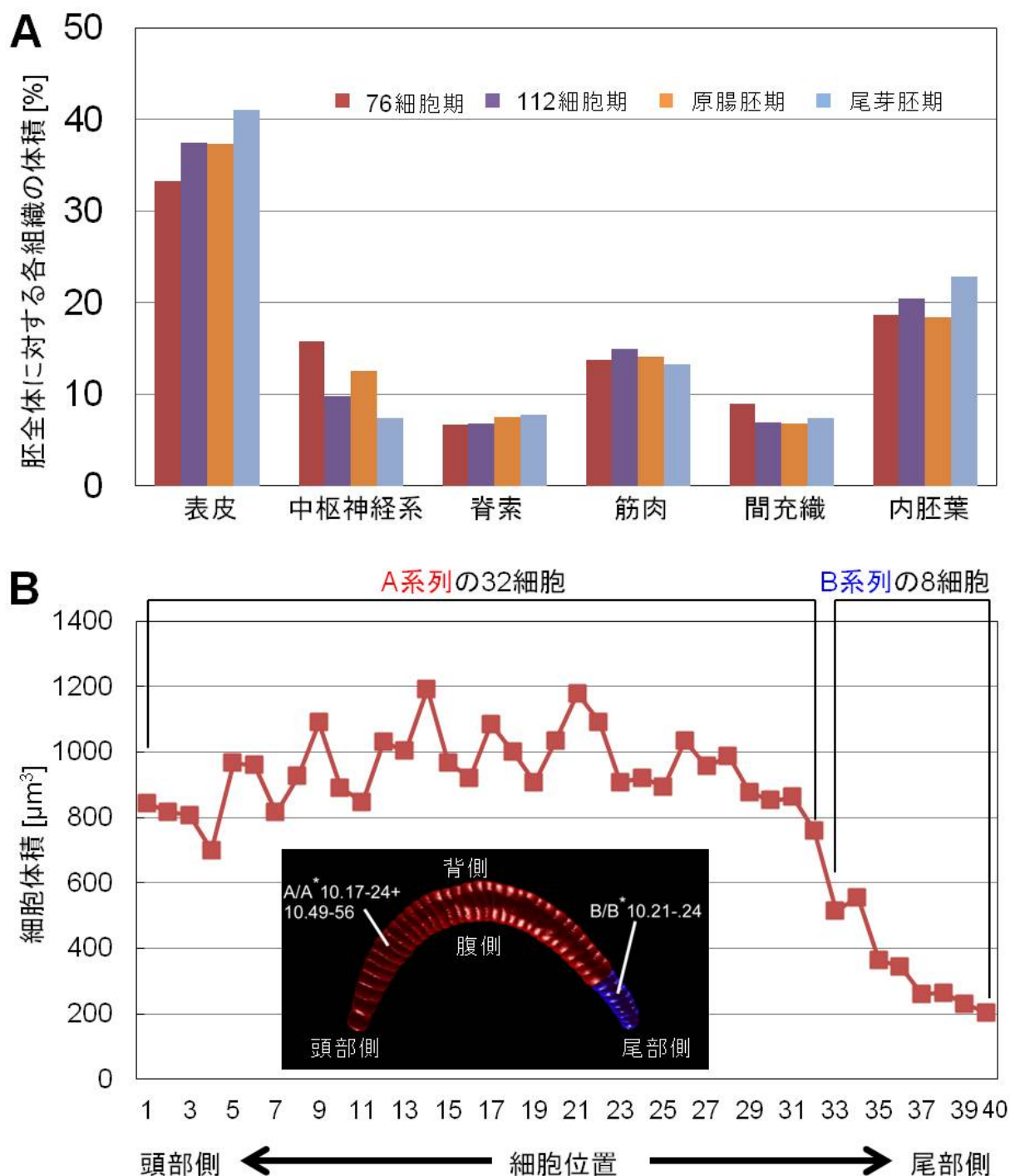


図 4.2 3次元胚モデルを用いた組織及び細胞体積の定量

体積の定量には Tassy らが作製したソフトウェア (3dve) (Tassy *et al.*, 2006) を用いた。**A** : 発生の進行に伴う、胚全体に対する各組織の体積の変化。体積は胚および各組織を構成する全細胞の平均値を用いた。76 細胞期、112 細胞期、原腸胚期の 3 次元胚モデルは、ホヤデータベースの 1 つである ANISEED (Tassy *et al.*, 2010) から取得した。尾芽胚の 3 次元胚モデルには本研究で構築した 3DVMTE を用いた。**B** : 尾芽胚の脊索 (杵内) を構成する 40 細胞の体積。

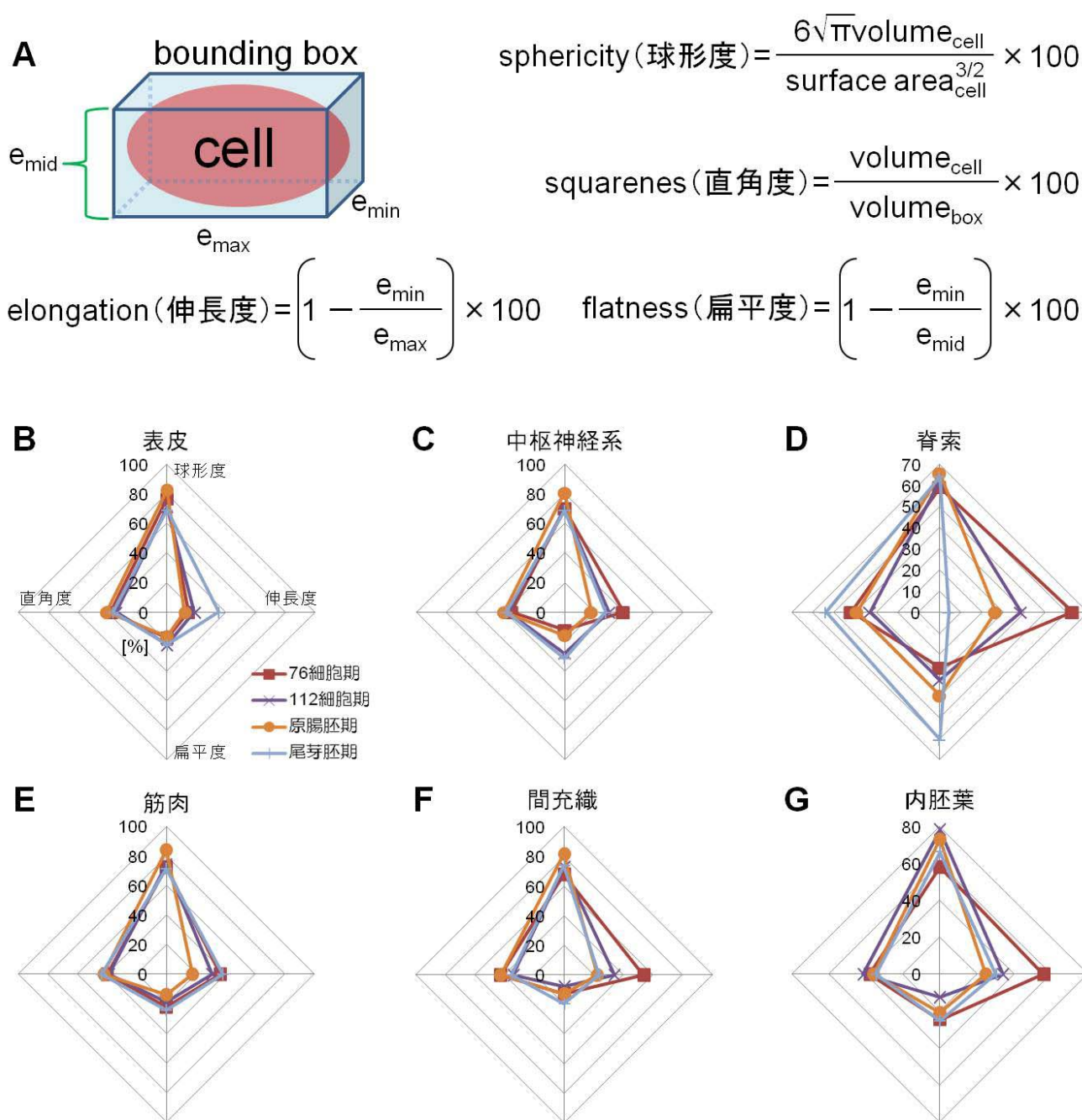


図 4.3 3次元胚モデルを用いた解剖学的情報の定量

A: 解剖学的情報の算出に用いた式 (Tassy *et al.*, 2006)。細胞が入る直方体の内、最も体積の小さな直方体を bounding box とする。box の辺の内、長さが最長の辺を e_{max} 、最短の辺を e_{min} 、中間の辺を e_{mid} として計算に用いた。**B-G**: 発生の進行に伴う、球形度・直角度・扁平度・伸長度の変化。値は各組織を構成する全細胞の平均値である。解剖学的情報は Tassy らが作製したソフトウェア (3dve) (Tassy *et al.*, 2006) を用いて取得した。76 細胞期、112 細胞期、原腸胚期の 3 次元胚モデルはホヤデータベースの 1 つである ANISEED から取得した。尾芽胚の 3 次元胚モデルには本研究で構築した 3DVMTE を用いた。

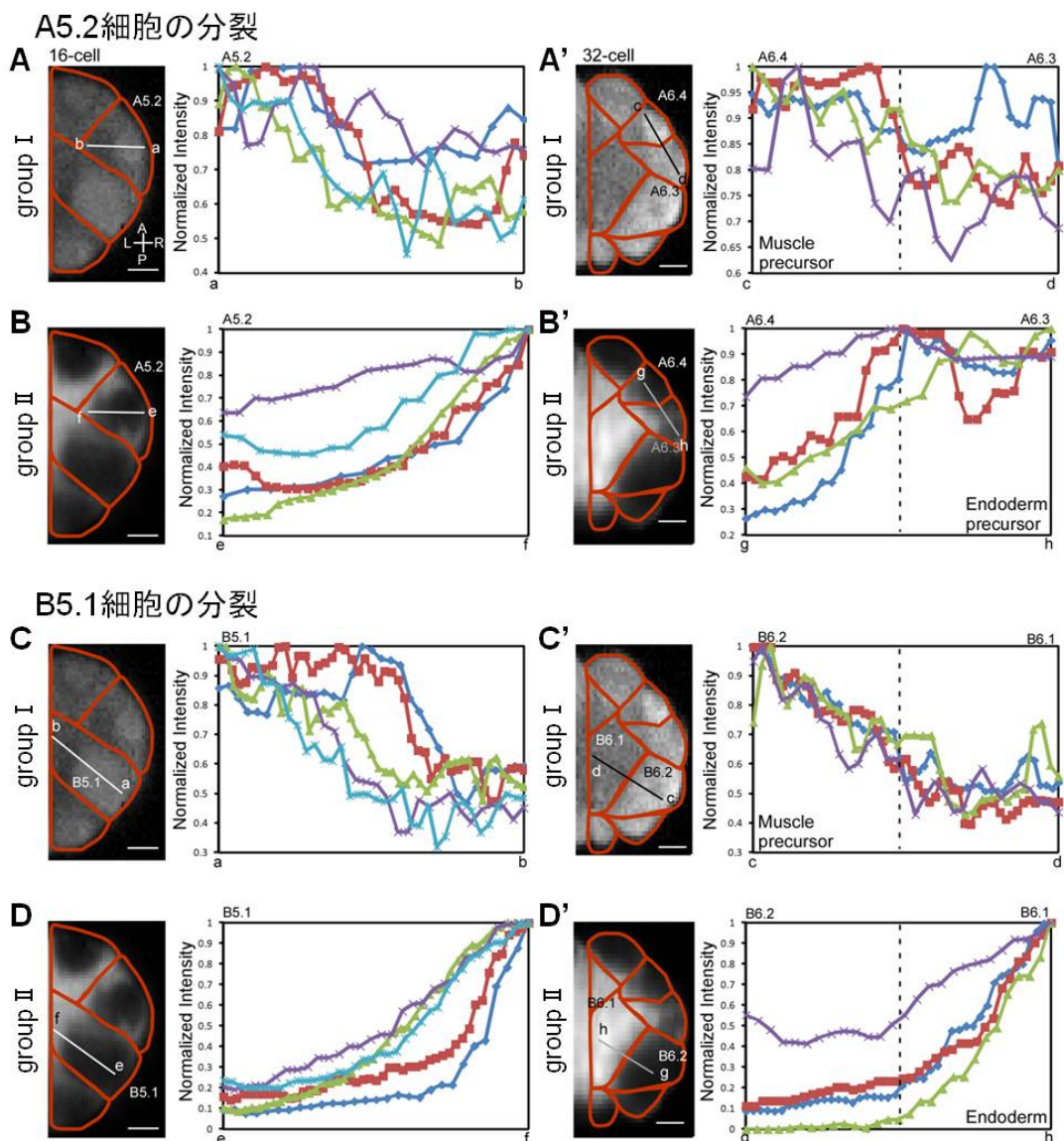


図 4.4 A5.2 細胞と B5.1 細胞に見られた強いラマン強度を示した領域の局在

A5.2 (A, B)、A6.3、A6.4 (A', B')、B5.1 (C, D)、B6.1、B6.2 (C', D') の各細胞について、group I および group II のラマンマップをグレースケールマップで表した (第 3 章内で、胚内の分子局在パターンを元を取得したラマンマップを 4 つの group に分類した)。赤線は細胞境界を示す。さらに線 a-b、e-f に対応するラマン強度を線グラフで表した。線グラフの色の違いは個体の違いに対応する。縦軸のラマン強度の値は最大値で正規化した。A5.2 細胞 (A, B) と B5.1 細胞 (C, D) に見られた強いラマン強度を示した領域の局在は、group I と group II で異なっていた。実体顕微鏡を用いた観察では、母細胞内 a,b,e,f の細胞質領域は分裂後、それぞれ c,d,g,h の娘細胞に分配されるように見えた。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、L, left (左)、R, right (右)、Scale bar: 20 μm

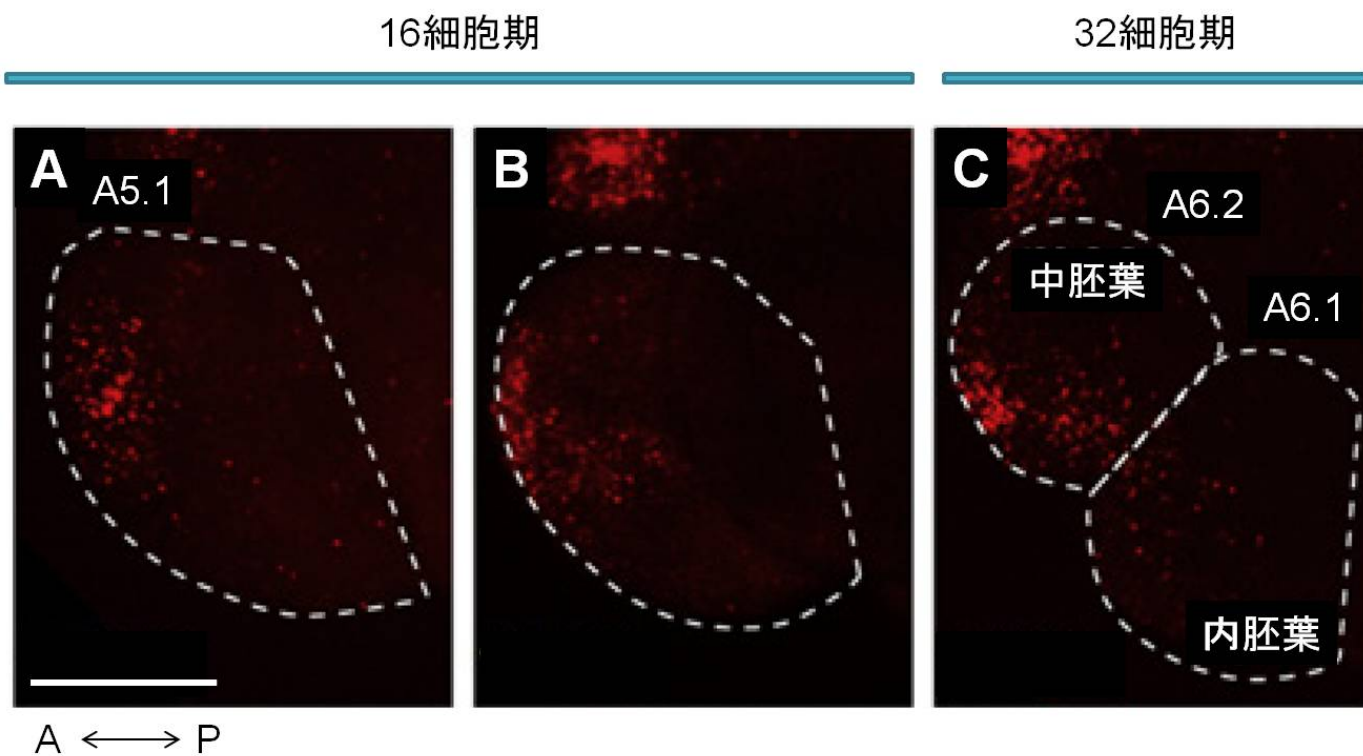


図 4.5 中内胚葉の分化運命決定に関わる *Not* mRNA の細胞内局在制御

図は Takatori らの論文 (Takatori *et al.*, 2010) より抜粋し、一部改変した。図 A から C の順に細胞分化が進行する。点線は細胞境界を示す。赤い顆粒状の物質が *Not* mRNA。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、Scale bar: 40 μ m

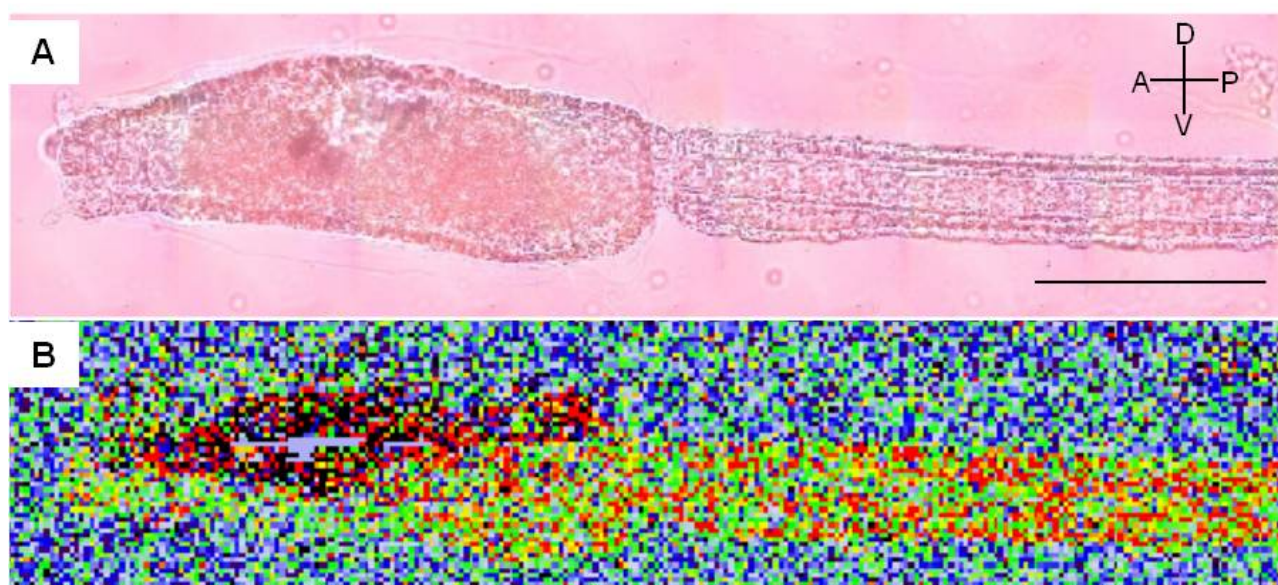


図 4.6 カタユウレイボヤ幼生内の cellulose の可視化

A : カタユウレイボヤ幼生の明視野像。**B** : 1125 cm^{-1} のラマンバンドから作製したラマンマップ。マップ中で最も大きなラマン強度を示した点が赤、最も小さなラマン強度を示した点が黒で表されるようにカラーマップを作製した。

[略記] A, anterior (前方)、P, posterior (後方)、D, dorsal (背側)、V, ventral (腹側)、Scale bar: $100\text{ }\mu\text{m}$

第4章の参考文献

- Aruga J.**, (2004), The role of *Zic* genes in neural development, *Mol. Cell. Neurosci.*, 26, 205-221
- Aulehla A. and Pourquiè O.**, (2010), Signaling gradients during paraxial mesoderm development, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a000869
- Auner A. W., Kast R. E., Rabah R., Poulik J. M., Klein M. D.**, (2013), Conclusions and data analysis: a 6-year study of Raman spectroscopy of solid tumors at a major pediatric institute, *Pediatr. Surg. Int.*, 29, 129-140
- Baena-López L. A., Baonza A. and García-Bellido A.**, The orientation of cell division determines the shape of *Drosophila* organs, (2005), *Current Biology*, 15, 1640-1644
- Brown E. R., Nishino A., Bone Q., Meinertzhagen I. A., Okamura Y.**, (2005), GABAergic synaptic transmission modulates swimming in the ascidian larva, *Eur. J. Neurosci.*, 22, 2541-2548
- Das R. S., Agrawal Y. K.**, (2011), Raman spectroscopy, Recent advancements, techniques and applications, *Vibrational Spectroscopy*, 57, 163-176
- De Gelder J., De Gussem K., Vandenabeele P. and Moens L.**, (2007), Reference database of Raman spectra of biological molecules, *Journal of Raman spectroscopy*, 38, 1133-1147
- De Luca L. M.**, (1991), Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J.*, 5, 2924-2933
- Delibaltov D., Ghosh P., Veeman M., Smith W. and Majunath B. S.**, (2011), An automatic feature based model for cell segmentation from confocal microscopy volumes, *Proc. IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging*, 199-203
- Downes A. and Elfick A.**, (2010), Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine, *Sensors*, 10, 1871-1889
- Dufour H. D., Chettouh Z., Deyts C., de Rosa R., Goridis C., Joly J. S., Brunet J. F.**, (2006), Precranial origin of cranial motoneurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 8727-8732
- Duraipandian S., Bergholt M. S., Zheng W., Ho K. Y. et al.**, (2012), Real-time Raman spectroscopy for *in vivo*, online gastric cancer diagnosis during clinical endoscopic examination, *Journal of Biomedical Optics*, 17, 081418
- Eiraku M., Adachi T. and Sasai Y.**, (2011), Relaxation-expansion model for self-driven retinal morphogenesis, *Bioessays*, 34, 17-25
- Ellis D. I., Cowcher D. P., Ashton L., O'Hagan S. and Goodacre R.**, (2013),

Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool, 138, 3871-3884

Gao Y., Cui Y., Chan J. KY, Xu C., (2013), Stem cell tracking with optically active nanoparticles, *Am. J. Med. Mol. Imaging*, 3, 232-246

Goldstein M. A., Takagi M., Hashida S., Shoseyov O., Doi R. H. and Segel I. H., (1993), Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* cellulose-binding protein A, *Journal of Bacteriology*, 175, 5762-5768

Hamada M., Shimozono N., Ohta N. et al., (2011), Expression of neuropeptide- and hormone-encoding genes in the *Ciona intestinalis* larval brain, *Dev. Biol.*, 352, 202-214

Hinman V. F., Degan B. M., (1998), Retinoic acid disrupts anterior ectodermal and endodermal development in ascidian larvae and postlarvae, *Dev. Genes. Evol.*, 208, 336-345

Horie T., Nakagawa M., Sasakura Y., Kusakabe T. G. and Tsuda M., (2010), Simple motor system of the ascidian larva: Neuronal complex comprising putative cholinergic and GABAergic/Glycinergic neurons, *Zoological Science*, 27, 181-190

Hosp J., Sagane Y., Danks G., Thompson E. M., (2012), The evolving proteome of a complex extracellular matrix, the *Oikopleura* house, *PLoS One*, 7, e40172

Huang C.-K., Hamaguchi H. and Shigeto S., (2011), *In vivo* multimode Raman imaging reveals concerted molecular composition and distribution changes during yeast cell cycle, *Chem. Commun.*, 47, 9423-9425

Ikuta T., Saiga H., (2007), Dynamic change in the expression of developmental genes in the ascidian central nervous system: revisit to the tripartite model and the origin of the midbrain-hindbrain boundary region, *Developmental Biology*, 312, 631-643

Ikuta T., Yoshida N., Satoh N. and Saiga H., (2004), *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual collinear expression in development, *PNAS*, 101, 15118-15123

Imai J. H., Meinertzhagen I. A., (2007a). Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: I. Central nervous system, *J. Comp. Neurol.*, 501, 316-334

Imai J. H., Meinertzhagen I. A., (2007b), Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: II. Peripheral nervous system, *J. Comp. Neurol.*, 501, 335-352

Imai K. S., Stolfi A., Levine M., Satou Y., (2009), Gene regulatory networks underlying the compartmentalization of the *Ciona* central nervous system, *Development*, 136, 285-293

Irie T., Kajiwara S., Kojima N., Senoo H., Seki T., (2004), Retinal is the essential

form of retinoid for storage and transport in the adult of the ascidian *Halocynthia roretzi*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 139, 597-606

Irie T., Sugimoto T., Ueki N., Senoo H., Seki T., (2010), Retinoid storage in the egg of reptiles and birds, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 157, 113-118

Ishibashi T., Usami T., Fujie M., Azumi K., Satoh N. and Fujiwara S., (2005), Oligonucleotide-based microarray analysis of retinoic acid target genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*, *Dev. Dyn.*, 233, 1471-1578

Kawada T., Ogasawara M., Sekiguchi T. et al., (2011), Peptidomic analysis of the central nervous system of the protochordate, *Ciona intestinalis*: Homologs and prototypes of vertebrate peptides and novel peptides, *Endocrinology*, 152, 2416-2427

Koljenović S., Schut T. C. B., van Meerbeeck J. P. et al., (2004), Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue, *Journal of Biomedical Optics*, 9, 1187-1197

Kondoh K., Kobayashi K. and Nishida H., (2003), Suppression of macho-1 directed muscle fate by FGF and BMP is required for formation of posterior endoderm in ascidian embryos, *Development*, 130, 3205-3216

Koop D., Holland N. D., Sémon M., Alvarez S. et al., (2010), Retinoic acid signaling targets *Hox* genes during the amphioxus gastrula stage: Insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan, *Dev. Biol.*, 338, 98-106

Lau K., Hobro A., Smith T., Thurston T., Lendl B., (2012), Label-free non-destructive in situ biochemical analysis of nematode *Steinernema kraussei* using FPA-FTIR and Raman spectroscopic imaging, *Vibrational Spectroscopy*, 60, 34-42

Lechler T. and Fuchs E., (2005), Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin, *Nature*, 437, 275-280

Levi L., Levavi-Sivan B. and Lubzens E., (2008), Expression of genes associated with retinoid metabolism in the trout ovarian follicle, *Biology of Reproduction*, 79, 570-577

Li M., Cui Y., Gao M., Luo J., Ren B. and Tian Z., (2008), Clean substrates prepared by chemical adsorption of iodide followed by electrochemical oxidation for surface-enhanced Raman spectroscopic study of cell membrane, *Anal. Chem.*, 80, 5118-5125

Mancuso V., (1974), Formation of the ultrastructural components of *Ciona intestinalis* tadpole test by the animal embryo, *Experientia*, 30, 1078

Munro E. M. and Odell G., (2002), Morphogenetic pattern formation during ascidian notochord formation is regulative and highly robust, *Development*, 129, 1-12

Nagatomo K., Ishibashi T., Satou Y., Satoh N., Fujiwara S., (2003), Retinoic acid

- affects gene expression and morphogenesis without upregulating the retinoic acid receptor in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Mechanisms of Development*, 120, 363-372
- Nakashima K., Sugiyama J., Satoh N.**, (2008), A spectroscopic assessment of cellulose and the molecular mechanisms of cellulose biosynthesis in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Marine Genomics*, 1, 9-14
- Nakashima K., Yamada L., Satou Y., Azuma J., Satoh N.**, (2004), The evolutionary origin of animal cellulose synthase, *Dev. Genes. Evol.*, 214, 81-88
- Nakazawa K., Yamazawa T., Moriyama Y. et al.**, (2013), Formation of the digestive tract in *Ciona intestinalis* includes two distinct morphogenic processes between its anterior and posterior parts, *Dev. Dyn.*, E-pub. ahead of print
- Nibu Y., José-Edwards D. S. and Di Gregorio A.**, (2013), From notochord formation to hereditary chordoma: The many roles of *Brachyury*, *Biomed Research International*
- Nishida H.**, (1987), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage, *Dev. Biol.*, 121, 526-541
- Nishida H., Satoh N.**, (1983), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage, *Developmental Biology*, 99, 382-394
- Nishida H., Satoh N.**, (1985), Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages, *Dev. Biol.*, 110, 440-454
- Nishino A., Baba S. A. and Okamura Y.**, (2011), A mechanism for graded motor control encoded in the channel properties of the muscle Ach receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 2599-2604
- Nishikata T., Mita-Miyazawa I., Deno T. and Satoh N.**, (1987), Muscle cell differentiation in ascidian embryos analysed with a tissue specific monoclonal antibody, *Development*, 99, 163-171
- Okuda S., Inoue, Y., Eiraku M., Sasai Y., Adachi T.**, (2012), Modeling cell proliferation for simulating three-dimensional tissue morphogenesis based on a reversible network reconnection framework, *Biomech. Model Mechanobiol.*, E-pub. ahead of print
- Okuda S., Inoue, Y., Eiraku M., Sasai Y., Adachi T.**, (2013a), Reversible network reconnection model for simulating large deformation in dynamic tissue morphogenesis, *Biomech. Model Mechanobiol.*, 12, 627-644
- Okuda S., Inoue, Y., Eiraku M., Sasai Y., Adachi T.**, (2013b), Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance, *Journal of Biomechanics*, 46, 1705-1713
- Pascut F. C., Kalra S., George V., Welch N., Denning C., Notingher I.**, (2013),

Non-invasive label-free monitoring the cardiac differentiation of human embryonic stem cells in-vitro by Raman spectroscopy, *Biochemical Biophysica Acta*, 1830, 3517-3524

Pasini A., Amiel A., Rothbacher U., Roure A., Lemaire P., Darras S., (2006), Formation of the ascidian epidermal sensory neurons: insights into the origin of the chordate peripheral nervous system, *PLoS Biol.*, 4, e225

Pasini A., Manenti R., Rothbacher U., Lemaire P., (2012), Antagonizing retinoic acid and FGF/MAPK pathways control posterior body patterning in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*, *PLoS One*, 7, e46193

Robin F., Dauga D., Tassy O., Sobral D., Daian F. and Lemaire P., (2011), Time-lapse imaging of live *phallusia* embryos for creating 3D digital replicas, *Cold Spring harbor Laboratory Press*, 1244-1246

Ross S. A., McCaffery P. J., Drager U. C. and De Luca L. M., (2000), Retinoids in embryonal development, *Physiological Reviews*, 80, 1021-1054

Sagane Y., Zech K., Bouquet J.-M., Schmid M., Bal U. and Thompson E. M., (2010), Functional specification of cellulose synthase genes of prokaryotic origin in chordate larvaceans, *Development*, 137, 1483-1492

Sasakura Y., Nakashima K., Awazu S. et al., (2005), Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*, *PNAS*, 102, 15134-15139

Sherrard K., Robin F., Lemaire P. and Munro E., (2010), Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination, *Curr. Biol.*, 20, 1499-1510

Shimozono S., Iimura T., Kitaguchi T., Higashijima S. and Miyawaki A., (2013), Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development, *Nature*, 496, 363-367

Shirai-Kurabayashi M., Nishikata T., Takamura K. et al., (2006), Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in *Ciona intestinalis*, *Development*, 133, 2683-2693

Slipchenko M. N., Oglesbee R. A., Zhang D., Wu W. and Cheng J.-X., (2012), Heterodyne detected nonlinear optical imaging in a lock-in free manner, *J. Biophotonics*, 10, 801-807

Sobreira T. J. P., Marlétaz F., Simões-Costa M., Schechtman D. et al., (2011), Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans, *PNAS*, 108, 226-231

Stöckel S., Meisel S., Elschner M., Rösch P. and Popp J., (2012), *Anal. Chem.*, 84,

9873-9880

Šturcová A., Davies G. R. and Eichhorn S. J., (2005), Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers, *Biomacromolecules*, 6, 1055-1061

Šturcová A., Eichhorn S.J. and Javis M. C., (2006), Vibrational spectroscopy of biopolymers under mechanical stress: Processing cellulose spectra using bandshift difference integrals, *Biomacromolecules*, 7, 2688-2691

Suhaim J. L., Boik J. C., Tromberg B. J. and Potma E. O., (2012), The need for speed, *J. Biophotonics*, 5, 387-395

Swalla B.J., (2006), Building divergent body plans with similar genetic pathways, *Heredity*, 97, 235-243

Takatori N., Kumano G., Saiga H. and Nishida H., (2010), Segregation of germ layer fates by nuclear migration-dependent localization of *Not* mRNA, *Developmental Cell*, 19, 589-598

Tan Y., Konorov S. O., Schulze H. G. et al., (2012), Comparative study using Raman microspectroscopy reveals spectral signatures of human induced pluripotent cells more closely resemble those from human embryonic stem cells than those from differentiated cells, *Analyst*, 137, 4509

Taniguchi K., Nishida H., (2004) Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*, *Dev. Growth Differ.*, 46, 163-180

Tassy O., Daian F., Hudson C., Vertrand V. and Lemaire P., (2006), A quantitative approach to the study of cell shapes and interactions during early chordate embryogenesis, *Current Biology*, 16, 345-358

Tassy O., Dauga D., Daian F. et al., (2010), The ANISEED database: Digital representation, formalization, and elucidation of a chordate developmental program, *Genome Research*, 20, 1459-1468

Tsuda M., Sakurai D., Goda M., (2003), Direct evidence for the role of pigment cells in the brain of ascidian larvae of laser ablation, *J. Exp. Biol.*, 206, 1409-1417

Veeman M. T., Smith W. C., (2013), Whole-organ cell shape analysis reveals the developmental basis of ascidian notochord taper, *Developmental Biology*, 373, 281-289

Wada H., Saiga H., Satoh N. and Holland P. W. H., (1998), Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insights from ascidian *Pax-2/5/8*, *Hox* and *Otx* genes, *Development*, 125, 1113-1122

White R. J. and Schilling T. F., (2008), How degrading: Cyp26s in hindbrain development, *Dev. Dyn.*, 237, 2775-2790

Yokouchi Y., Sakiyama J. and Kuroiwa A., (1995), Coordinated expression of *Abd-B*

第4章 本研究で得られた知見に関する考察

subfamily genes of the *Hox A* cluster in the developing digestive tract of chick embryo, *Dev. Biol.*, 169, 76-89

Yue S., Cárdenas-Mor J. M., Chaboub L. S., Lelièvre S. A. and Cheng J.-X., (2012), Label-free analysis of breast tissue polarity by Raman imaging of lipid phase, *Biophysical Journal*, 102, 1215-1223

Zorn A. M. and Wells J. M., (2007), Molecular basis of vertebrate endoderm development, *International Review of Cytology*, 259, 49-111

「BIO-RAD ラマンデータベース」

<http://www.bio-rad.com/ja-jp/product/raman-databases>, 2013年8月30日

第5章 結言

本論文では、尾索動物カタユウレイボヤ胚について、3次元中期尾芽胚モデルの作製を通して尾芽胚期の解剖学的情報を1細胞レベルで取得し、またラマン顕微分光法を用いて尾芽胚期までの筋肉および内胚葉を非標識で同時に識別する新規手法を確立した。加えて、胚内の分子組成と分布情報を取得することに成功した。さらに、得られた結果からこれらのイメージング手法の発生研究への応用可能性について検証した。本論文で得られた知見、そして3次元胚モデルの構築およびラマン顕微分光法により得られる知見は非常にユニークなものであり、ホヤ類を含む脊索動物の形態形成過程について、理解の進展に貢献することを期待する。

公刊論文目録および口頭発表目録

公刊論文

1. **Mitsuru J. Nakamura, Jun Terai, Reiko Okubo, Kohji Hotta, Kotaro Oka**, (2012), Three-dimensional anatomy of the *Ciona intestinalis* tailbud embryo at single-cell resolution, *Developmental Biology*, 372, 274-284
2. **Mitsuru J. Nakamura, Kohji Hotta, Kotaro Oka**, (2013), Raman spectroscopy imaging of the whole *Ciona intestinalis* embryo during development, *PLoS One*, 8, e71739

口頭発表

国際会議

1. **Mitsuru Nakamura, Jun Terai, Kohji Hotta, Kotaro Oka**
Three-dimensional cellular-level anatomy and comprehensive annotation of tailbud embryo in *Ciona intestinalis*, 6th International Tunicate Meeting, 2011. 7. 3-7, Canada

国内会議

1. **中村允, 寺井淳, 大久保玲子, 堀田耕司, 岡浩太郎**
コンピュータ・モデリングによるホヤ尾芽胚の1細胞レベルでの形態解析, 日本動物学会第81回東京大会, 2010. 9. 23-25, 東京
2. **中村允, 寺井淳, 大久保玲子, 堀田耕司, 岡浩太郎**
コンピュータ・モデリングによるホヤ尾芽胚の1細胞レベルでの形態解析, バイオイメージング・フォーメティクスワークショップ 2011, 2011. 1. 28-29, 横浜
3. **中村允, 寺井淳, 大久保玲子, 堀田耕司, 岡浩太郎**
3D ヴァーチャル胚構築によって明らかになったカタユウレイボヤ尾芽胚の形態学的特徴, 日本動物学会第82回旭川大会, 2011. 9. 21-23, 北海道

4. 中村允, 寺井淳, 大久保玲子, 堀田耕司, 岡浩太郎

ラマン分光顕微鏡を用いたホヤ胚における組織・生体物質の識別, 最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017-[1], 2012. 5. 18-19, 埼玉

5. 中村允, 堀田耕司, 岡浩太郎

ラマン顕微鏡を用いたカタユレイボヤ発生過程における分子局在の非標識観察, 日本動物学会第83回大阪大会, 2012. 9. 13-15, 大阪

6. 中村允, 堀田耕司, 岡浩太郎

ラマン分光顕微鏡を用いたホヤ発生過程のラベルフリーイメージング, 最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017-[2], 2012. 10. 25-27, 埼玉

7. 中村允, 堀田耕司, 岡浩太郎

ラマン顕微鏡を用いたホヤ初期胚のラベルフリーイメージング, ラマンセミナー2012, 2012. 11. 19, 東京

8. 中村允, 堀田耕司, 岡浩太郎

Label-free observation of Bio-molecular Localization Corresponding to the Cell Fate during *Ciona intestinalis* Embryogenesis by Raman Spectroscopic Imaging, 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 11-14, 福岡

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中ならびに同大学先導研究センターの共同研究員として、同大学理工学部生命情報学科 岡浩太郎教授の指導のもとに行ったものです。先生の研究室には博士課程から在籍させていただきましたが、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました。思い返すと、先生には研究室に入る前からご迷惑をおかけしてばかりでした。博士課程において在籍する研究室を決める際は、申請締切りぎりぎりの時期だったにも関わらず親身になって相談に乗っていただき、嫌な顔ひとつせず受け入れを御快諾いただきました。あの時期は間違いなく著者の人生におけるターニングポイントでした。さらに研究室に入ってから、自由に研究させてくださる一方で、必要なタイミングでは必ず鋭い御助言を頂きました。著者は頑固者で自分の考えを変えられず研究や論文執筆がなかなか進まない時期が多々ありましたが、常に暖かく見守ってくださり、機知と示唆に富む言葉をかけてくださいました。著者が後輩を育てる機会を持った際は、先生の姿を思い出し指導に当たりたいと思います。心より厚く御礼申し上げますと共に、今後とも末長くご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 堀田耕司専任講師には、実験から論文執筆まで、全ての研究活動において多大な労力を割いていただきました。また研究者人生を始めるに当たり、学生の気持ちが抜けない著者に研究者としての心構えを辛抱よく教えていただきました。先生には本当にご迷惑をおかけしましたが、そのお気持ちを無駄にしないよう、教えていただいた心構えを胸に今後の人生を歩んでまいります。心より深謝申し上げますと共に、今後とも末長くご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 井本正哉教授、松本緑准教授、ならびに舟橋啓准教授には、学位請求論文審査の副査として貴重な御助言と御指導をいただきました。ここに心より御礼申し上げますとともに、今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

修士課程まで御指導いただいた神奈川大学理学部化学科 上村大輔教授、ならびに慶應義塾大学理工学部生命情報学科 宮本憲二准教授には、博士課程での進路を決めるぎりぎりになって研究室を移るといふ著者のわがままを受け入れて下さり、その過程で大変な労力を費やして頂き、ご迷惑をおかけいたしました。

謝辞

た。先生方の温かいお心遣いに謹んで御礼申し上げます。

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 西田宏記教授には、公刊論文2本の執筆に際して貴重な御助言を賜りました。ここに感謝申し上げます。

レニショー株式会社 渡部直樹博士、村石修一氏、石沢憲章氏には、本研究を始めるまで触れたことすら無かったラマン顕微鏡の使い方から解析の基礎を、丁寧に教えていただきました。さらに会社のラマン顕微鏡を快くお貸し頂き、加えて研究発表の機会を設けて頂くなど、皆様のお力添え無くしては第3章の研究は完成いたしませんでした。ここに厚く御礼申し上げます。

東北大学理学部化学科 盛田伸一准教授、愛媛大学医学部附属病院先端医療創生センター 大嶋佑介助教、ならびに兵庫県立大学大学院生命理学研究科 中川将司助教には、ラマンスペクトルの解析法について多くの御助言を賜りました。加えて研究発表の機会をいただき、またラマン研究の面白さを伝えるお話しを通じ、著者を激励し続けていただきました。謹んで感謝申し上げます。

岡研究室の皆様とは、日常の出来事を一緒に笑い合いました。特に研究に行き詰った時は大きなエネルギーをもらいました。楽しい思い出をありがとうございます。

本研究に使用したカタユウレイボヤは、NBRP (National BioResource Project) のサポートを受け入手いたしました。一年を通して質のよいホヤを安定供給して下さいましたことに対し、ここに感謝の意を表します。

研究活動の一部は、慶應義塾先端科学技術研究センター 後期博士課程研究助成金を受けて行いました。自由な研究活動・学会活動により視野が広がったのみでなく、著者の哲学を構築する上で重要だった方々に巡り合えたことは大きな財産になりました。ここに併せて感謝申し上げます。

最後になりましたが、実家から遠く離れた地で研究活動を行う上で、経済的にだけでなく、精神的にも支えてくれた祖母、両親ならびに兄に感謝申し上げます。

平成26年1月
中村 允