

Exploring transparent organisms for bioimaging and
establishing a basis for elucidating organismal
transparency mechanism

January 2025

Takumi Shito

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	紫藤 拓巳
主 論 文 題 名 : Exploring transparent organisms for bioimaging and establishing a basis for elucidating organismal transparency mechanism (バイオイメーjingに適した透明生物の探索および生体透明性機構解明に向けた研究基盤の構築)				
(内容の要旨) 生体内に導入した蛍光タンパク質等の可視化のために生体の透明性は極めて重要である。組織が透明であるためには光の散乱や吸収を防ぐ必要があり、固定標本においては多くの組織透明化試薬が開発されてきた。発生生物学の分野でカタユレイボヤやマボヤはモデル生物として用いられてきたが、これらの種は比較的不透明な胚をもつため、極めて透明な胚を持つ <i>Phallsia mammillata</i> が新たにバイオイメーjingに適したモデル生物として台頭してきた。しかし本種の生息地はヨーロッパに限られ、世界中で入手可能で透明な胚をもつ種が望まれている。本研究では世界中で入手可能なバイオイメーjingに適した透明ホヤを探索すること、そして本種を用いて発生・進化の観点から生体の透明性機構を解明するための研究基盤を構築することを目的とした。生体透明度の定量測定系を構築し、ホヤ類における卵の透明度の多様さを発生および進化の観点から初めて明らかにした。また、透明性獲得・維持機構を明らかにするための基盤として、様々な条件下での卵透明度変化を測定する系を構築した。第1章は緒言である。背景として光吸収、反射、散乱といった透明度に影響を及ぼす要因を解説し、これまでに開発された組織透明化試薬や生物の透明度を計測する手法について述べた。第2章ではホヤ卵への透明度測定と系統解析より明らかにされたホヤ類における卵透明度の進化について述べた。ハイパースペクトルカメラを用いて、ホヤ卵の透明度を広波長域で定量測定する新規透明度測定法を確立した。日本沿岸から採取した複数のホヤ類の卵透過率スペクトルを比較した結果、ナツメボヤ科のホヤはおしなべて高い卵透明度を持つこと、本科に属するヨーロッパザラボヤ(<i>Ascidiella aspersa</i>)は窓ガラスと同等の約 90%の可視光透過率を示し、この高い卵透明度は幼生に引き継がれることを明らかにした。第3章では様々な環境条件や生理機能阻害時における卵透明度の変化を測定し、透明度は温度や塩濃度にそれぞれ負と正の相関をもつこと、細胞骨格、翻訳、ATP 阻害は卵透明度を低下させることを明らかにした。また主成分分析を用いて全 125 バンドの透過率スペクトルを二次元空間上にマッピングすることで、透明度の変化には複数の機序があることを示唆した。第4章は結言である。2, 3 章を通じて明らかになったホヤ類における多様な卵透明度、卵透明度を左右する要因をもとに、ホヤ卵の透明性を獲得・維持する機構について議論し、ヨーロッパザラボヤのモデル生物としての応用可能性について言及した。				

Thesis Abstract

No. _____

Registration Number	☒ “KOU” ☐ “OTSU” No. _____ *Office use only	Name	Takumi Shito
Thesis Title Exploring transparent organisms for bioimaging and establishing a basis for elucidating organismal transparency mechanism			
Thesis Summary Organismal transparency is highly beneficial for optical imaging with fluorescent proteins. Making tissues transparent requires preventing light scattering and absorbance. Many tissue clearing agents have developed in fixed specimens. Marine invertebrate ascidians, <i>Ciona robusta</i> and <i>Halocynthia roretzi</i> have been used as model animals for studies of developmental biology. They possess relatively opaque eggs and embryos, so <i>Phallusia mammillata</i> with transparent embryos has emerged as a new model organism for bioimaging. However, this species habitats only in Europe, so globally distributed species with transparent eggs is desired. In this study, I explored ascidian species with transparent eggs and established a basis for elucidating organismal transparency mechanism in the view of evo-devo. I developed a quantitative evaluation system for organismal transparency and, for the first time, clarified the variety of ascidian egg transparencies in the context of evo-devo. I also established quantitative measuring methods as a foundation for elucidating organismal transparency mechanism. Chapter 1 is the introduction. The physical factors affecting transparency such as light absorption and scattering, reagents to make tissue transparent, measurement methods for assessing organismal transparency are described. Chapter 2 is described about the newly developed quantification method for ascidian eggs transparency by hyperspectral imaging and the phylogenetic analysis of egg transparency among ascidians. Hyperspectral imaging was used to construct a new measurement method across a broad range of wavelengths. By comparing the transparencies of ascidian eggs sampled in Japan, I found that the class Ascidiidae have remarkably high transparency. In particular, <i>Ascidella aspersa</i> showed approximately 90% transmittance in the visible spectrum and its high transparency was maintained through the larval stage. Chapter 3 is described the measurement of eggs transparency in response to environmental factors and the inhibition of physiological functions in <i>A. aspersa</i> eggs. Transparency was negatively correlated with temperature and positively with salinity. Inhibitors of cytoskeleton, translation, and ATPase were shown to reduce transparency. Principal component analysis of the 125-band transmittance spectra and mapping onto two dimensions revealed multiple mechanisms are involved in changes in transparency. Chapter 4 is the conclusion. Based on the results of this study, hypothetical mechanisms acquiring or maintaining the organismal transparency are discussed from the perspective of evo-devo. The future possibility of <i>A. aspersa</i> as a new model organism for bioimaging are also discussed.			