慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ファイロティピック段階における形態の個体差とロバスト性
Sub Title	Morphological diversity and robustness in phylotypic stage
Author	堀田, 耕司(Hotta, Koji)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	カタユウレイボヤの未受精卵の一部を切除した卵片から矮小化(Dwarf)胚を作出する系を利用し, 発生過程において未受精卵の体積がその後の個体発生にどのように影響するのかを細胞レベルで調べた。その結果, Dwarf尾芽胚の組織ごとの細胞数は野生型(WT)尾芽胚と比較し, 減少する組織と一定である組織がある一方, 個体全体における組織ごとの体積比率はWTとDwarf間で一定であることが明らかとなった。すなわち, 卵の体積変化に関係なく, 組織ごとの体積を一定に保つ機構が存在することが示唆された。 Ascidian can produce normal-looking miniature tailbud embryos (dwarf embryo) even if unfertilized egg was partially removed. By using this dwarf embryo, we investigated how egg volume influenced on the afterward development at single cell level. As a result, it was found that several tissues (notochord, muscle and endoderm) kept the number of cells in dwarf embryo. On the other hand, other tissues (epidermis, neuron cells and mesenchyme) kept the size of each cell. However, the volume ratio of each tissue in whole-volume was same among dwarf and WT embryo. It was suggested that there is a robust mechanism to maintain a constant ratio of tissue volume regardless of egg volume.
Notes	研究種目 : 挑戦的萌芽研究 研究期間 : 2012 ~ 2014 課題番号 : 24657164 研究分野 : 進化発生生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24657164seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2014
課題番号：２４６５７１６４

研究課題名（和文）ファイロティピック段階における形態の個体差とロバスト性

研究課題名（英文）morphological diversity and robustness in phylotypic stage

研究代表者
堀田　耕司（Hotta, Kohji）

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：８０４０７１４７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：カタユウレイボヤの未受精卵の一部を切除した卵片から矮小化（Dwarf）胚を作出する系を利用し、発生過程において未受精卵の体積がその後の個体発生にどのように影響するのかを細胞レベルで調べた。その結果、Dwarf尾芽胚の組織ごとの細胞数は野生型（WT）尾芽胚と比較し、減少する組織と一定である組織がある一方、個体全体における組織ごとの体積比率はWTとDwarf間で一定であることが明らかとなった。すなわち、卵の体積変化に関係なく、組織ごとの体積を一定に保つ機構が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ascidian can produce normal-looking miniature tailbud embryos (dwarf embryo) even if unfertilized egg was partially removed. By using this dwarf embryo, we investigated how egg volume influenced on the afterward development at single cell level. As a result, it was found that several tissues (notochord, muscle and endoderm) kept the number of cells in dwarf embryo. On the other hand, other tissues (epidermis, neuron cells and mesenchyme) kept the size of each cell. However, the volume ratio of each tissue in whole-volume was same among dwarf and WT embryo. It was suggested that there is a robust mechanism to maintain a constant ratio of tissue volume regardless of egg volume.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：ascidian　ciona　phylotypic　morphogenesis　scaling　giant　chordate　evolution

１．研究開始当初の背景

ファイロティピック段階とは器官形成期において生物種間で必ず良く似た形態を経る時期のことである。近年、この段階における胚の選択遺伝子の空間的な発現パターンや遺伝子発現プロファイルが進化的に保存されていることが報告されている。脊索動物におけるファイロティピック段階における「形」がロバストに維持されている裏ではたらく機構がわかれば、脊索動物の進化と起源を解明する手掛かりとなると考えられる。ホヤの未受精卵を半分に切ってから受精させると，矮小化（Dwarf）幼生が形成される．この矮小化幼生の細胞数は正常幼生よりも少なく，その形も小さいが，組織分化は正常である（Yamada et al., 1996）．また，未受精卵の切り方によって，矮小化幼生の細胞数が変化する組織としない組織とに分けられる（Nishida et al., 1999）．このことは，未受精卵サイズに応じてその後の形態維持に組織，細胞ごとに異なる戦略があることを示唆する．

２．研究の目的

そこで本研究では、遺伝的に同一な個体を用意し、形態に擾乱を及ぼしたとき、個体全体としての形を維持するために細胞・組織レベルでどのような拘束の維持と解除がみられるかを調べ、ファイロティピック段階における個体の「形」の個体差とロバスト性を分子・細胞レベルで解明することを目的としている。そして最終的に脊索動物全般に保存されている形態維持機構について、コアとなる細胞プロセスを担う分子機構を明らかにする。

（１）3 次元的な解剖学的情報の取得：3 次元胚モデルの構築

ファイロティピック段階の形として、原腸陥入期以降の器官形成期について、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。そこでまずは、共焦点顕微鏡断層画像のセットから実際の細胞形態を反映した、野生型尾芽胚の 1 細胞レベルの 3 次元胚コンピュータ・モデルを作成することを目的とした。

（２）受精卵サイズの違いが幼生の細胞体積と細胞数に与える影響について

つづいて、カタユウレイボヤ矮小化尾芽胚を作製し， Dwarf 尾芽胚の 3 次元 CG モデルを作成する．そこから，未受精卵のサイズの違いによるその後の尾芽胚に与える影響を細胞レベルで比較解析することとした．

（３）発生過程での組織・細胞レベルの体積配分がいつ決定されるのか

細胞数が変化する組織としない組織とに分けられる一方で、個体全体の体積に対する組織の体積配分を一定にする機構の存在も示唆されたため、卵サイズ変化に伴う細胞・組織の体積配分がいつ・どのように決まるのかを調べた。

３．研究の方法

（１）共焦点顕微鏡断層画像のセットから実際の細胞形態を反映した、野生型尾芽胚の 1 細胞レベルの 3 次元胚コンピュータ・モデル 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。

（２）カタユウレイボヤの未受精卵を雌性前核が認識できるように染色し，ガラスニードルで様々な大きさに切除した．雌性前核がある切除卵の直径を測ってから受精させ，矮小化尾芽胚を作製した．作製した矮小化尾芽胚を固定，染色し共焦点レーザー顕微鏡により複数観察して断層画像を得た．得られた断層画像を基に各細胞の輪郭抽出を行い矮小化尾芽胚の 3 次元 CG モデル（3DVE）を作製した．さらに 3DVE を利用して野生型の正常な大きさの尾芽胚と比較し各組織の体積，細胞数の違いを定量比較した．また，未受精卵のサイズが小さくなったことによって各組織や細胞がどのような変化をしたか調べた．

（３）組織の体積配分は組織の運命決定と同時に決まるのではないかと仮説を立てた。そこで、体積の異なる Dwarf 胚を発生させ、ホヤでは、ほぼすべての細胞の運命決定がなされる初期原腸胚期(112 細胞期)で胚を固定し、共焦点顕微鏡で撮影をした。画像を 3 次元再構築し、組織ごとの細胞数と体積を算出し、WT 胚との比較をした。さらに、ステージごとの卵割パターンを調べるため、二光子顕微鏡を用いて Dwarf 胚の 3D リアルタイムイメージングを行った。また、人工的に卵の体積を増加させて Giant 胚を作出するため、電気的融合法やマイクロモールドとポリエチレングリコール（PEG）を組み合わせた方法を考案し、卵の融合を試みた。

４．研究成果

（１）これまで尾芽胚期のカタユウレイボヤ胚はおよそ 1000 個の細胞から構成され ると報告されていた（Satoh, 1994）。本研究では共焦点顕微鏡画像をもとに、1 細胞レベルで実際の形態を反映した 3 次元尾芽胚コンピュータ・モデルである 3DVMTE （図１）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 1579 細胞細胞で構成されていた（Nakamurak et al. 2012）。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。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。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、脊索動物進化メカニズムの解明を目指す上で、また、正常胚（WT）の標準データとなる点で有用である。



図１　野生型の尾芽胚３次元モデル 3DVMTE
本３次元尾芽胚モデル画像はジャーナルの表紙を飾った。
また、3 次元モデル作製を自動化するための手法の探索も行い、ラマン顕微鏡によって無染色で複数の組織を可視化する手法を確立した（Nakamura et al., 2013）。

（2）カタユウレイボヤの未受精卵を切除して受精させた結果，発生が正常に進んだカタユウレイボヤ矮小化尾芽胚が得られ，野生型の尾芽胚と比較すると個体の大きさは小さかった（図２）．卵体積が６０％以下の胚は原腸陥入期以後に形態の破綻が生じることを複数個体同時タイムラプスイメージングによりつきとめることができた（未発表）。

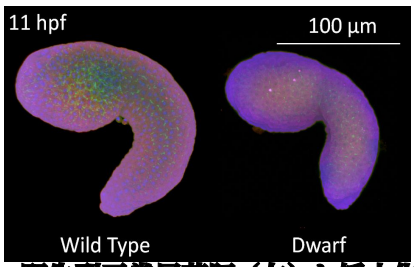

図２　野生型正常尾芽胚（左）と矮小化尾芽胚（右）
野生型個体の体積の約６０％の矮小化個体を人工的に作り出した。

また、ホヤ幼生の神経細胞数はわずか 300 ほどしかないにも関わらず、矮小化ホヤ幼生の神経細胞数はさらに著しく減少していた。正常胚と同様に明から暗への光刺激に対して正常に反応するといった行動レベルでも正常な反応を示す観察結果が得られた。神経細胞数を減らしつつ、どのようにして外界に対する正常な応答を保つ回路を保持することができるのだろうか。さらに詳細な 3 次元的な細胞配置の比較解析から、ホヤ脳胞の行・列数の違いには変化がなく、後方神経管を構成する細胞の数のみに違いがみられることが明らかになった。神経細胞についてはこのように個体のロバスト性を保つ戦略がみえてきつつある。
続いて矮小化尾芽胚の 3 次元 CG モデル（3DVE）を作成し各組織の体積，細胞数を詳細に調べた結果，興味深いことに個体全体に対する組織体積の割合は通常の尾芽胚と同じ割合で保たれていることがわかった．さらに，細胞数は変わらないが体積が減る組織（脊索、筋肉、内胚葉など）と，体積は変わらないが細胞数が減る組織（表皮、間充織など）があることを定量的に示すことができた（図３）．

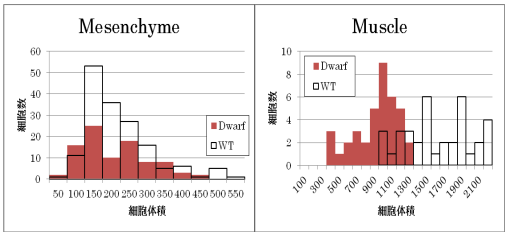

図３　各組織における細胞体積の定量
左のグラフは間充織、右のグラフは筋肉組織の１細胞あたりの体積ヒストグラム。赤が Dwarf の体積ヒストグラム、白が WT の体積ヒストグラムである。

以上の研究結果をまとめ、第 7 回国際被嚢類学会（2012 年、ナポリ）にて発表した。

112 細胞期 Dwarf 胚について個体全体に対する各組織の体積比を WT 胚と比較したところ、卵サイズを小さくすると組織運命決定がなされる 112 細胞期までに動物極側細胞である表皮の体積配分は大きくなり、植物極側である内胚葉の体積配分は小さくなることがわかった。つまり、動物極側の表皮の割合が増えた一方、植物極側の内胚葉の割合は減って

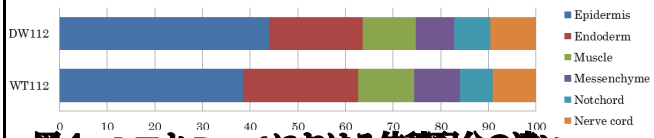

図４　WT と Dwarf における体積配分の違い
個体全体の体積を１としたときの各組織の体積の割合を色ごとに分けて示した。

いた。また、中胚葉性組織である筋肉、脊索、間充織の割合はほとんど変化しないことがわかった(図４)。
このことは少なくとも 112 細胞期までに Dwarf では WT と異なった、動物極と植物極

間での組織の体積分配に違いが生じていることを示している。もともと WT では動物極側の割球は植物極側の割球と比較して非常に小さい。すなわち、卵サイズの縮小により、動物・植物極の体積配分の非対称性が緩和される傾向があることが示唆された。今後、動物・植物極の非対称分裂過程を 3 次元で撮影し、WT と Dwarf で比較してみる必要がある。一方、組織の体積配分に関しては、先行研究の結果とあわせると、組織の運命決定と同時に決まるわけではないことが示唆された。さらに、卵のサイズと発生の進化のメカニズム解明へと研究を発展させるために、カタユウレイボヤと比較し巨大な幼生を形成する *Botryllus* 種を使用するための準備として、その発生オントロジーを確立した（Lucia et al., 2014）。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　5　件）

① Yuji Mizotani, Shun Itoh, Kohji Hotta, Etsu Tashiro, Kotaro Oka, Masaya Imoto
Evaluation of drug toxicity profiles based on the phenotypes of ascidian *Ciona intestinalis*
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015 accepted. 査読有

② Takatoshi D Yokoyama, Kohji Hotta, Kotaro Oka
Comprehensive Morphological Analysis of Individual Peripheral Neuron Dendritic Arbors in Ascidian Larvae using the Photoconvertible Protein Kaede
Developmental Dynamics, 2014 Oct;243(10):1362-73. 査読有
DOI: 10.1002/dvdy.24169

③ Lucia Manni, Fabio Gasparini, Kohji Hotta, Katherine J. Ishizuka, Lorenzo Ricci, Stefano Tiozzo, Ayelet Voskoboynik, Delphine Dauga: Ontology for the asexual development and anatomy of the colonial chordate Botryllus schlosseri. PLOSONE, 2014, May 1;9(5):e96434. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0096434

④ Mitsuru J Nakamura, Kohji Hotta, Kotaro Oka: Raman spectroscopic imaging of the whole Ciona intestinalis embryo during development. PLOSONE, 2013 Aug 20;8(8):e71739. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0071739

⑤ Nakamura MJ, Terai J, Okubo R, Hotta K, Oka K: Three-dimensional anatomy of the Ciona intestinalis tailbud embryo at single-cell resolution. Dev Biol 2012, 372:274-284. 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2012.09.007

〔学会発表〕（計　17　件）

① 菊池恵理華，山本彩加，堀田耕司，岡浩太郎: ホヤ神経管形成の 3 次元タイムラプスイメージング Three-dimensional Timelapse Imaging of Neural Tube Closure in Ciona intestinalis. 日本動物学会第 84 回岡山大会(2013 年 9 月 28 日) 岡山大学津島キャンパス（岡山県・岡山市）、口頭発表

② 横山貴星，堀田耕司，岡浩太郎: カタユウレイボヤ幼生における末梢神経のイメージング解析 Imaging Analysis of Peripheral Nervous System in Ciona intestinalis larva.日本動物学会第 84 回岡山大会(2013 年 9 月 28 日) 岡山大学津島キャンパス（岡山県・岡山市）、口頭発表

③ 小泉航，堀田耕司，岡浩太郎: カタユウレイボヤ矮小化尾芽胚の形態解析 Morphological analysis of Ciona intestinalis miniature tailbud. 日本動物学会第 84 回岡山大会(2013 年 9 月 27 日) 岡山大学津島キャンパス（岡山県・岡山市）、口頭発表

④ Wataru Koizumi, Kohji Hotta, Kotaro Oka: Comparative Anatomy of Ascidian Miniature Tailbud.7th Tunicate Meeting (2013 年 7 月 25 日) ナポリ大学、ナポリ（イタリア）、ポスター発表

⑤ Takatoshi D. Yokoyama, Kohji Hotta and Kotaro Oka: Imaging Analysis of Peripheral Nervous System in Ciona intestinalis larva. 7th Tunicate Meeting (2013 年 7 月 22 日) ナポリ大学、ナポリ（イタリア）、ポスター発表

⑥ Erika Kikuchi, Ayaka Yamamoto, Kohji Hotta and Kotaro Oka: Four-dimensional Imaging of Brain Morphogenesis in Ciona intestinalis. 7th Tunicate Meeting (2013 年 7 月 22 日) ナポリ大学、ナポリ（イタリア）、ポスター&口頭発表

⑦ Kohji Hotta: Four-dimensional Imaging of Brain Morphogenesis in Ciona intestinalis. 7th International Tunicate Meeting(2013 年 7 月 21 日) 、ナポリ（イタリア）口頭発表

⑧ 堀田耕司・小泉航・岡浩太郎:Comparative Anatomy of Ascidian Miniature Tailbud. Riken CDB meeting 2013 (2013 年 3 月 4 日)神戸理研 CDB（兵庫県・神戸市）、ポスター発表

⑨ 横山貴星・堀田耕司・岡浩太郎:Direction of peripheral neurons projection in Ciona intestinalis larval tunic revealed by imaging analysis.イメージング解析により明らかになったカタユウレイボヤ幼生被嚢内における末梢神経の投射方向.分子生物学会(2012 年 12 月 14 日)福岡国際会議場、（福岡県・福岡市）ポスター発表

⑩ 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. **カタユウレイボヤ発生過程における細胞分化に対応した局在シグナルのラマン顕微鏡を用いた探索. 分子生物学会内ワークショップ・生体分子イメージングへの新たな挑戦～ラマン分光、プローブレスイメージングによる分子機能解析とがん診断への応用～(2012 年 12 月 14 日)福岡国際会議場（福岡県・福岡市)、口頭発表**

⑪ Kohji Hotta: Anatomy and Annotation of the Ciona intestinalis tailbud embryo at single-cell resolution.2nd workshop tunicate info system（2012 年 11 月 27 日）京都大学（京都府・京都市)、口頭発表

⑫ Kohji Hotta: Three-Dimensional Anatomy of the Ciona intestinalis Tailbud Embryo at Single-cell Resolution.2012 Asia-Pacific Developmental Biology Conference (APDBC)(2012 年 10 月 5 日)Taipei Innovation City Convention Center **台北谷國際會議中心、台北市（台湾）, ポスター&口頭発表**

⑬ **中村允・堀田耕司・岡浩太郎: カタユウレイボヤ初期胚におけるラマン顕微鏡による細胞内分子の検出. 日本生物物理学会第 50 回年会（2012 年 9 月 23 日）名古屋大学東山キャンパス（愛知県・名古屋市)、ポスター発表**

⑭ **中村允・堀田耕司・岡浩太郎: ラマン顕微鏡を用いたカタユウ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 年 9 月 14 日)大阪大学豊中キャンパス（大阪府・吹田市)、口頭発表**

⑮ **中村 允, 堀田 耕司, 岡 浩太郎: ラマン分光イメージングを用いたホヤ胚発生における分子局在情報の網羅的取得と分化状態の可視化. 日本植物学会第 77 回大会（2012 年 9 月 13 日）北海道大学（札幌市・北海道）**

⑯ **中村允, 寺井 淳, 大久保 怜子, 堀田 耕司, 岡 浩太郎: バイオイメージングによる発生過程モデル化のための細胞情報取得の試み. 第２２回日本数理生物学会大会 (2012 年 9 月 12 日) 岡山大学自然科学研究科棟（岡山県・岡山市)、ポスター発表**

⑰ **中村允, 寺井 淳, 大久保 怜子, 堀田 耕司, 岡 浩太郎: 発生過程のモデル化に有用な細胞内物質局在および形態情報の取得. 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 第４回公開シンポジウム (2012 年 9 月 7 日) 広島大学理学研究科 E 棟（広島県・広島市)、ポスター発表**

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
ホヤ 3 次元尾芽胚 PDF ダウンロードページ
http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/3DVMTE/

６．研究組織
(1)研究代表者
堀田 耕司 （Hotta, Kohji）
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号：８０４０７１４７

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし