

平成21年 5月13日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18687902
 研究課題名（和文） SPIMを用いた左右性決定機構の解明と細胞移動4Dマップ構築
 研究課題名（英文） Analysis of the left-right asymmetry determination mechanism in mice and whole embryo-level cell migration map using SPIM
 研究代表者
 野中 茂紀（NONAKA SHIGENORI）
 基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准教授
 研究者番号：90435529

研究成果の概要：

哺乳類胚発生における左右性の決定機構の解明と、さらに広くマウス初期発生その他発生学の研究一般への応用を目指して、欧州分子生物学研究所 (EMBL) が開発したライトシート型顕微鏡 SPIM の改良版である DSLM (Digital Scanned Light-sheet Microscope) を、開発者の Ernst Stelzer 博士らの協力の下に導入した。

さらに DSLM でマウス胚のライブイメージングを可能するための改良を加え、6.5 日胚全体の一細胞レベルの鮮明な光学断面像を得ることに成功した。原腸陥入に伴い原条から外胚葉・内胚葉間に中胚葉が入り込んでいく様子、外胚葉細胞がエレベータ運動する様子を動画としてはじめて可視化できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,900,000	0	5,900,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	13,700,000	2,340,000	16,040,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

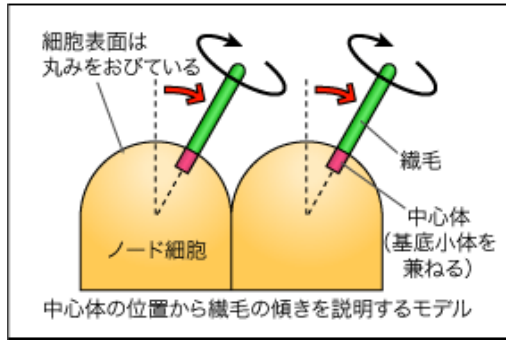
キーワード：発生・分化 生理学 細胞・組織 流体 生物物理

1. 研究開始当初の背景

我々はマウス胚発生における左右軸の決定機構を調べている。これまでに、左右軸の最初の決定は原腸陥入期におけるノードと呼ばれる組織の繊毛運動に伴う左向き水流によって決まること、その水流の生成は細胞表面に対して繊毛の生える方向が傾いていることによるものであること、その原因として細胞内の中心体の位置が関与している

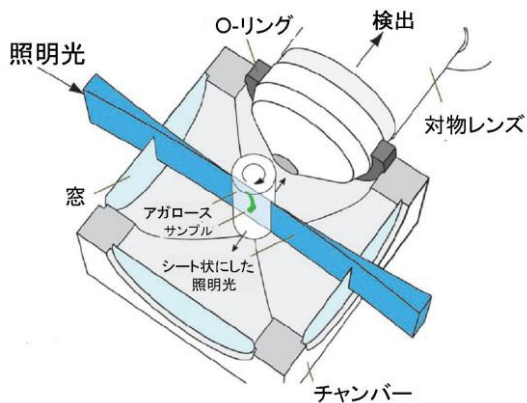
可能性を示すなど、これまでこの分野における多くの重要な知見を得てきた (*Cell* 95:829-37, 1998; *Nature* 418:96-9, 2002; *PLoS Biology*. 3:e268, 2005 など)。

一方、ノード組織の由来や、繊毛の向きに反映される細胞極性を決める機構はいまだによくわかっていない。さらに、左右軸の決定以外にも、一般にこの時期の哺乳類胚の発生については、各組織の起源、頭尾軸の決定



機構など、未知の問題がたくさん残されている。これらの問題は、蛍光タンパク質の開発など、近年のライブイメージング技術の発展により、ようやく進展が見られるようになってきたところである。

本研究開始に先立つ 2004 年、欧州分子生物學研究所 (EMBL) の Ernst Stelzer 博士のグループはライトシート型顕微鏡 SPIM (Single Plane Illumination Microscope) を発表した (Huisken et al., *Science* 305:1007-9, 2004)。



(図：SPIM の概念図。Huisken et al. より一部改変)

この顕微鏡の基本原理は、試料の側方から顕微鏡の焦点面のみに励起光を照射することにある。それによって 1mm 近い深部のイメージング、高速な 3 次元撮影を可能にしている。さらにこの顕微鏡法は、励起光による蛍光の褪色や生体への光毒性の問題が小さいという、発生のライブイメージングに好適な特徴を備えている。一方、この顕微鏡では試料をアガロース中に包埋する必要がある、そのままでは常に新しい培養液に触れていなければ育たないマウス胚のライブイメージングは不可能であった。

そこで我々は、この顕微鏡を導入し改良を加えることでマウス胚のライブイメージングに応用しようという着想に至った。

2. 研究の目的

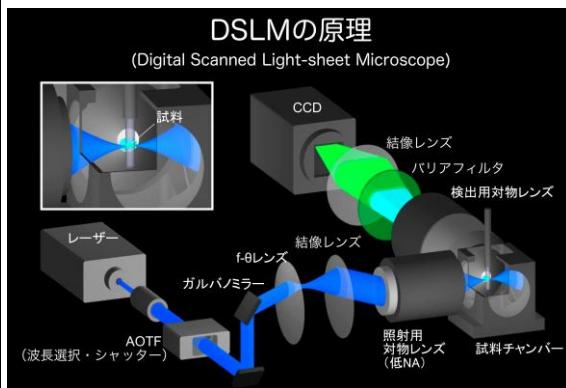
マウス発生において左右性が決められる最初のステップである胚表面の水流 (ノード流) の成因、そして水流が非対称な遺伝子発現を引き起こす機構を調べるために、EMBL が開発した SPIM (Single Plane Illumination Microscope) を導入し、マウス胚の発生を長時間連続して立体観察する系および胚体内の細胞移動を解析するシステムを構築する。

さらに、マウスの発生学全体への貢献を目的として、マウス初期胚全体の細胞分裂・移動を網羅的に調べた 4D (3 次元+時間) マップを構築する。

3. 研究の方法

まず、SPIM の技術を習得するために、ドイツ・ハイデルベルクにある Stelzer ラボを訪れ、この顕微鏡の原理、組み立ての方法を学んだ。

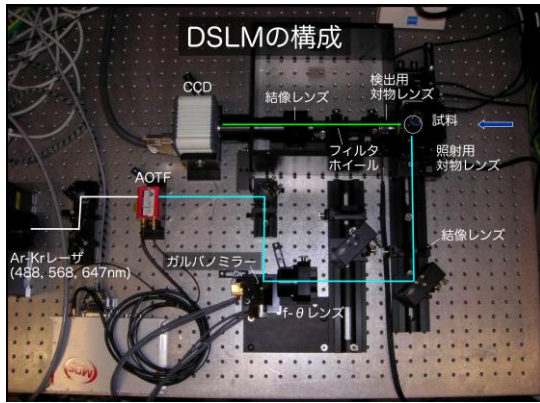
正確には、本研究課題の開始後に、より解像度や柔軟性に優れたライトシート型顕微鏡 DSLM (Digital Scanned Light-sheet Microscope) が開発されたために、こちらの技術を習得した。



(図：DSLM の概念図。Keller et al. より一部改変)

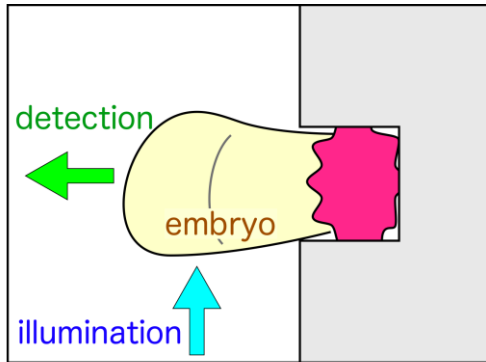
次に、所属機関においてこの顕微鏡を組み立て、画像を取得できるようにした。

さらに、大きな試料に対して複数の角度から撮影しそれを合成して鮮明な画像を得るなど、取得データの処理のためには高性能のコンピュータを必要とすることがわかったため、Stelzer 博士と DSLM の開発者である Philipp Keller 氏の協力のもと、画像処理用の高速 PC システムを構築した。



(図：実際に導入した DSLM の構成)

次に、顕微鏡の試料ホルダーとして新たなものを開発し、胚の一部を穴にはめて固定することで、アガロース中に包埋せず生きたまま観察できるようにした。



(図：試料ホルダーの概略)

さらに試料チャンバーを改良し、マウス胚培養用に温度と CO₂ 濃度を調整できるようにした。

試料としては、基礎生物学研究所（当時は京都大学）の藤森俊彦博士より、核を可視化できる H2B-GFP トランスジェニックマウス系統の供与を受けた。

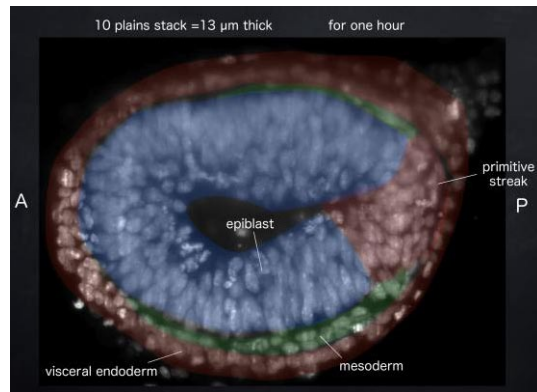
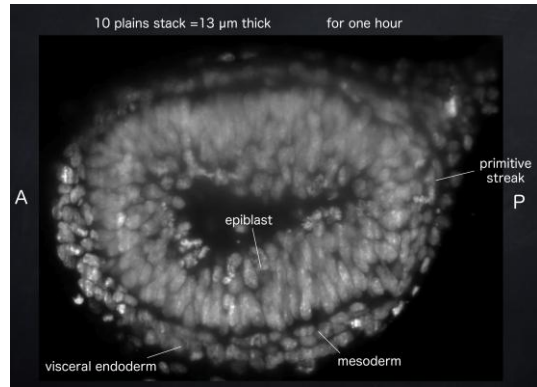
そして DSLM を使い、H2B-GFP マウス胚の XYZT タイムラプス観察を行った。

4. 研究成果

DSLM を使って生きたマウス胚のイメージングを行う系を確立したことで、原腸陥入期にあたる 6.5 日マウス胚全体について、細胞レベル以下の解像度を持つ鮮明な光学断面像を得ることに成功した。

現在、我々のシステムは、大きさ約 0.3mm の胚体全体について、最短で 90 秒ごとに 3 次元画像を撮影できる。これは他の代表的な 3 次元顕微鏡方法論である共焦点顕微鏡や

2 光子顕微鏡が到達できていない深度および時間解像度である。



(図：DSLM で撮影した 6.5 日マウス胚の光学水平断面像。下は外胚葉・中胚葉・内胚葉・原条を人工的に着色して示したもの)

本研究の現況は可視化に成功した段階であり、細胞分裂・移動マップ作りなど、詳細な発生学的な解析はまだこれからである。しかしながらこれまでに、外胚葉細胞

(epiblast) の核が将来の神経上皮組織と同じように apical-basal 間を上下するエレベータ運動を行うことを発見した。また、原条から中胚葉が陥入し、外胚葉と内胚葉の間に侵入していく様子を、世界ではじめて可視化できた。

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 2 件)

① 野中茂紀. 胚まるごとのイメージングを可能にする顕微鏡 DSLM. *メディカルバイオ* 6(1):7-8 (2009) 査読無

② 野中茂紀. ノードの繊毛と水流. *細胞工学* 27(6):564-569 (2008) 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① 野中茂紀、動物胚の4次元イメージング。
第4回イメージングサイエンスシンポジウム、平成21年3月24日、愛知県岡崎市

- ② Shigenori Nonaka, Three-dimensional tracking of growing microtubule ends by two-photon microscopy. 39th NIPS International Symposium & 7th OIB Symposium. 平成20年11月13日、愛知県岡崎市

- ③ 市川壮彦、Philipp Keller, Ernst Stelzer, 野中茂紀. New microscope enabling 3D live imaging of embryos. 第41回日本発牛生物学学会大会、平成20年5月28日、徳島県徳島市

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/~bioimg2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 茂紀 (NONAKA SHIGENORI)

基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准教授

研究者番号：90435529