

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770241

研究課題名（和文） 個体まるごと用いた4次元イメージングによる形態形成運動の定量的解析

研究課題名（英文） Quantitative Analysis of Morphogenesis by Whole-animal 4D-imaging

## 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

研究成果の概要(和文): 脊索動物の形態形成過程を細胞レベルで理解するために、本研究では、個体を構成する細胞数が少なくシンプルな体制をもつホヤを用いて個体まるごとの1細胞レベルイメージングを行った。ホヤ幼生ひのう部における新規末梢神経ネットワーク構造の3Dイメージングや尾芽胚の3Dコンピュータモデル化、および神経管閉鎖過程の3Dライブ(4D)イメージングを行い、ホヤ胚発生におけるさまざまな形態形成過程を細胞レベルで明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文): To understand morphogenesis at single-cell-level in chordate organogenesis period, ascidian embryo was used in this study. By 3D imaging of ascidian larva, a novel peripheral neuron network structure was found at larval outer tunic. Computer model of the tailbud embryo were made. By 3D-live (4D) imaging of neural tube closure, it was suggested that two independent cell movements accomplish the closure. Thus high-resolution imaging of ascidian embryogenesis enables us to understand how each cell cause morphogenesis of tissue, organ and whole-animal level.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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：末梢神経・3Dライブイメージング・進化・3D・ホヤ・神経管閉鎖

## 1. 研究開始当初の背景

一つ一つの細胞の振舞いが個体全体の形に影響を及ぼす複雑でダイナミックな生命現象の謎に迫るためには細胞レベルと個体レベルのスケラリビティのギャップを埋める研究が必要である。しかしながら、これまでの研究はモデル生物の細胞数の多さや、スケールの違いから、個体全体の形を理解す

るために全細胞の形態的情報と結びつけて解析することは困難であった。

## 2. 研究の目的

そこで、個体全体の細胞動態を同時に解析する研究基盤を構築するために、顕微鏡を用いて1細胞レベルで個体全体を観察することが可能なホヤ胚を用いて、個々の細胞のはたら

きから、細胞間相互作用、そして個体全体の形態形成に至る異なる階層の生命現象を結びつけ、形態形成運動の3次元的理解を目指すことを目的とし、以下の解析を行った。

- ①ホヤ末梢神経の構造解析
- ②尾芽胚の1細胞レベルでの3Dコンピュータモデリング
- ③神経管閉鎖過程の3Dライブイメージング

### 3. 研究の方法

(1) 蛍光ラベルされたファロイジンを用いて、ホヤ幼生のFアクチンを染色した。共焦点顕微鏡で末梢神経に関して、断層像を約100枚取得し、得られた画像を3D化することにより、ホヤ幼生ひのう部で発見された末梢神経細胞体から伸長する新規構造全体のアクチン繊維を可視化した。

(2) 形態形成シミュレーションのための細胞レベルの3Dモデル胚を作成するために、ホヤ胚を形成する全細胞に対して現実の細胞形態を反映した1細胞レベルでの3次元コンピュータグラフィックス(CG)化を行った。

(3) 小分子化合物を添加することで神経管閉鎖異常胚を作成し、(2)と同様にボリュームレンダリングを施すことで、全個体を細胞レベルでコンピュータモデル化し形態の異常を1細胞レベルで検出することを試みた。さらに、神経特異的に発現を促すプロモーターの下流に蛍光タンパク質を組み込んだ遺伝子コンストラクトを作成し、ホヤ胚に導入し共焦点顕微鏡を用い4Dイメージングを行うことによって、正常胚および神経管閉鎖異常胚における神経管形成過程における細胞の分裂・動きを1細胞レベルで追い、その違いを明らかにした。

### 4. 研究成果

(1) ホヤ末梢神経の構造解析：被嚢部全体においてネットワーク状構造を形成していた。このような体の外側に長く突き出たネットワーク構造はほとんど知られていない。これらの幼生を囲む構造全体を‘ASNET’と名付けた。より詳細に頭部ネットワーク構造を解析すると、ASNET全体を6つのサブネットワーク構造（付着器間ライン、付着器-頭部神経間ライン、左右対称体幹部網、左右非対称体幹部網、尾部末梢神経間網）に分けることができた。特に左右非対称体幹部網は、観察したすべての幼生において左側だけに存在する珍しい構造であった。また、このASNETは受精後20~22時間の幼生期に最も発達し、その後消失することがわかった。このようなネットワーク構造は、他の亜目のホヤ（マボヤ、ヤワラカウレイボヤ）でも見られたことから、ASNETはホヤではよく保存された構造であると考えられ、特に幼生期に重要な役割を

果たしている可能性がある（図1；Terakubo et al., 2010）。

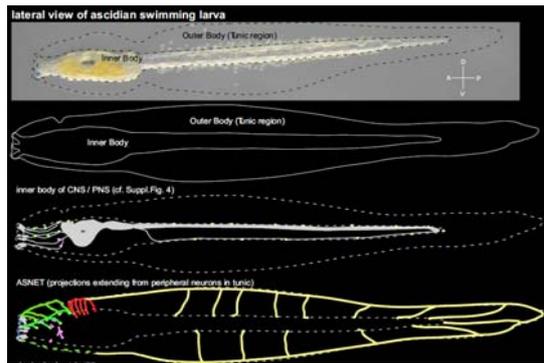


図1 ホヤ幼生ひのうでみつけた新規末梢神経ネットワーク構造の模式図

- 上から、
- 1 段目：実体顕微鏡によるホヤ幼生画像
  - 2 段目：幼生体内と体外ひのうを表す図
  - 3 段目：幼生体内の中樞神経系領域
  - 4 段目：幼生体外末梢神経ネットワーク構造

(2) 尾芽胚の1細胞レベルでの3Dコンピュータモデリング：ホヤ尾芽胚の1細胞レベルのコンピュータモデル化を行った（図2）。モデル化された胚の解析を通じ、1. 本研究で用いられた胚は1580細胞から構成されること、2. その内訳は、表皮836、神経系227、間充織219、筋肉36、脊索40、内胚葉203であること、3. 内胚葉素は左右1対の細胞列が交互に並ぶことで構成されており生殖細胞はこれらに挟み込まれていること、4. これまでに同定されていない組織が体幹側に1対同定されたことを明らかにした（Nakamura et al., Submitted）。

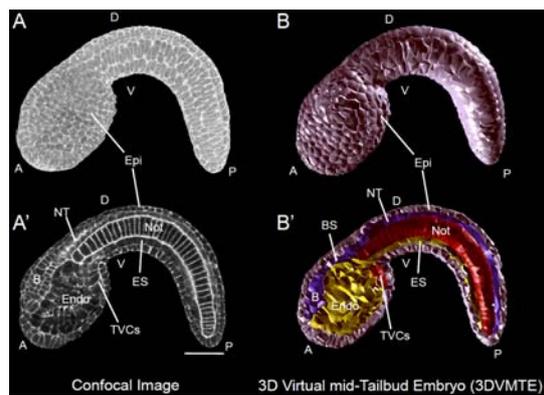


図2 ホヤ尾芽胚のコンピュータモデル化  
A, A' (Aの断面)：共焦点レーザー顕微鏡による画像  
B, B' (Bの断面)：左の画像をもとに作成されたコンピュータモデル化尾芽胚

カタユウレイボヤの正常な尾芽胚の細胞レベルの3Dアトラスを明らかにしたので、今後、このデータを標準胚として様々な比較解剖学的な解析を行いたい。具体的には尾芽胚後ΔT発生させた3次元胚との比較を行うこ

とで $\Delta T$ の間に細胞の分裂・形態・配置がどう変化していくかを追っていくことにより、幼生期までの全細胞系譜を明らかにすることや、卵細胞質の体積を人工的に $\Delta V$ だけ減らしたミニチュア胚を作成し、細胞質減少によって影響を被る細胞レベルの変化をつきとめ、尾芽胚という進化的に保存された形のロバスト性が細胞レベルでどのようにコントロールされているのかをあきらかにするといった研究を行う予定である。研究を遂行する上での問題点は3次元CG胚作成を現在人の手で行っており、非常に労力と手間がかかる点である。そのため自動画像認識技術を取り入れる予定である。

(3) 神経管閉鎖過程の3Dライブイメージング：細胞の形態変化における定量的・幾何学的情報（細胞体積・表面積・扁平度・球形度・細胞数・位置・体軸角度）を多数得ることができた。これらの情報をもとに、記述された情報をスタンダードとして神経管閉鎖障害を模したSU4984による形態異常ミュータントを正常胚と比較した。その結果、興味深いことに、正常胚から得られた胚と比較し、異常胚では尾部表皮細胞の体積が大きくなっていること、脊索細胞の核位置の乱れが検出された。このミュータントはターゲットとなる遺伝子が既知であるため、この遺伝子が神経胚期においてこのような局面に寄与している可能性が示唆された。このように、小分子化合物を有効に用いることで最終的に神経管閉鎖というイベントは高分解能でさまざまなステップに分けることができ、遺伝子ごとに割り当てられた幾何学的役割を解明できると期待される。

尾部側から頭部に“ジッパー”が移動することで生じる閉鎖に加え、哺乳類と同様に、頭部側から尾部側に向かっていく閉鎖の2種類が観察された。さらに、阻害剤による実験から、ホヤの神経管閉鎖において、尾部から頭部へ表皮細胞がジッパーのように閉じる後方からの動きと、前方神経板の頭部から尾部側への分裂後の陥入が必要であることがわかり、それらは独立して制御されている可能性があることが示唆された(図3; Terai et al., 2010, SDB-JSDB joint meeting; 寺井ら, 2011, 日本動物学会)。

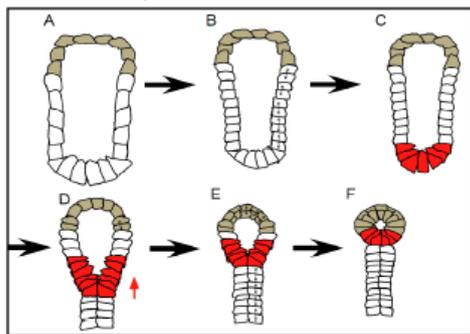


図3 ホヤの神経管閉鎖過程の模式図  
細胞内に書かれた矢印は細胞分裂を示す。  
白：後方からの神経管閉鎖で閉じる細胞群、  
灰色：前方の陥入によって閉じる細胞群（神経孔の前端となる領域）、赤：後方から前方へ移動するジッパーの部分。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

①Hiroshi Q. Terakubo, Yoko Nakajima, Yasunori Sasakura, Takeo Horie, Alu Konno, Hiroki Takahashi, Kazuo Inaba, Kohji Hotta and Kotaro Oka

Network structure of projections extending from peripheral neurons in tunic of ascidian larva  
Developmental Dynamics. 2010 Aug;239(8):2278-87.

(DD ArtPix Developmental Dynamics. 2010 Aug;239(9): page fvii) 査読有り

②Hiroki Takahashi, Kohji Hotta, Chiyo Takagi, Naoto Ueno, Nori Satoh, Eiichi Shoguchi  
Regulation of notochord-specific expression of Ci-Bra downstream genes in *Ciona intestinalis* embryos

Zoological Sci., 2010 Feb;27(2):110-118 査読有り

③Alu Konno, Maiko Kaizu, Kohji Hotta, Takeo Horie, Yasunori Sasakura, Kazuho Ikeo and Kazuo Inaba

Distribution and structural diversity of cilia in the tadpole larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*  
Developmental Biology. 2010 Jan 1;337(1):42-62. Epub 2009 Oct 14. 査読有り

④Shigehiro Yamada, Kohji Hotta, Takamasa S. Yamamoto, Naoto Ueno, Nori Satoh and Hiroki Takahashi

Interaction of notochord-derived fibrinogen-like protein with Notch regulates the patterning of the central nervous system of *Ciona intestinalis* embryos

Developmental Biology, 2009 Apr 1;328(1):1-12. 査読有り

[学会発表] (計10件)

①Kohji Hotta

Construction of 3D Virtual Tailbud Embryo For Quantitative Approach

CDB Symposium 2012 "Quantitative Developmental Biology" ポスター発表

2012年3月27日

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (神戸)

www.cdb.riken.jp/sympo2012/

②Mitsuru J. Nakamura, Jun Terai, Reiko Okubo, Kohji Hotta and Kotaro Oka

Three-dimensional cellular-level anatomy and comprehensive annotation of tailbud embryo in *Ciona intestinalis*

The 6th International Tunicate Meeting, ポスター  
一&口頭発表

McGill Univ., Montreal, Canada  
(2011年7月4日)

③Jun Terai, Mayu Suzuki, Masaya Imoto, Etsu  
Tashiro, Kotaro Oka, Kohji Hotta

Analysis of phenotype caused by temporal  
treatment of SU4984 in *Ciona intestinalis* embryo  
The 6th International Tunicate Meeting, ポスター  
一発表

McGill Univ., Montreal, Canada  
(2011年7月4日)

④Kohji Hotta, Hiroshi Q TERAKUBO,  
Mitsuru Nakamura, Yoko NAKAJIMA, Yasunori  
SASAKURA, Takeo HORIE, Alu KONNO,  
Hiroki TAKAHASHI, Kazuo INABA, Kotaro  
OKA

ASNET: Actin-based network structure in the  
tunic of ascidian larva

Society for Developmental Biology 69th Annual  
Meeting -Jointly with Japanese Society of  
Developmental Biologists、ポスター発表

Albuquerque, New Mexico, USA(2010年8月8  
日)

⑤Mitsuru Nakamura, Jun Terai, Kohji Hotta and  
Kotaro Oka

Quantitative analysis of ascidian tailbud stage  
embryo at single cell level by constructing 3D  
Virtual Embryo

Society for Developmental Biology 69th Annual  
Meeting -Jointly with Japanese Society of  
Developmental Biologists、ポスター発表

Albuquerque, New Mexico, USA(2010年8月8  
日)

⑥Jun Terai, Mayu Suzuki, Masaya Imoto, Etsu  
Tashiro, Kotaro Oka, Kohji Hotta

FGFR inhibitor affect proliferation of tail  
epidermal cells and cause neural tube closure  
defect in ascidian *Ciona intestinalis*

Society for Developmental Biology 69th Annual  
Meeting -Jointly with Japanese Society of  
Developmental Biologists、ポスター発表

Albuquerque, New Mexico, USA(2010年8月8  
日)

⑦KOHIJI HOTTA, Hiroshi Terakubo, Yoko  
Nakajima, Yasunori Sasakura, Takeo Horie, Alu  
Konno, Hiroki Takahashi, Kazuo Inaba, Kotaro  
Oka

Actin-based network structure in the tunic of  
ascidian larva revealed by confocal laser  
scanning and transmission electron microscopes  
(共焦点顕微鏡および透過型電子顕微鏡により  
明らかにされたホヤ幼生被嚢内新規ネット  
ワーク構造)

43rd Annual Meeting for the Japanese Society of  
Developmental Biologists Jointly Sponsored by  
the Asia-Pacific Developmental Biology Network,

口頭発表

Kyoto, International Conference Center (2010年  
6月22日)

⑧Kohji Hotta, Hiroshi Q TERAKUBO, Yoko  
NAKAJIMA, Alu KONNO, Takeo HORIE,  
Hiroki TAKAHASHI, Yasunori SASAKURA,  
Kazuo INABA, Kotaro OKA

Ascidian dendritic network in tunic  
2ND JOINT MEETING OF THE SFBD AND  
JSDB 2010 - From Cells to Organs

Institut Pasteur, Paris, France (2010年5月27)

⑨Alu Konno, Maiko Kaizu, Kohji Hotta, Takeo  
Horie, Yasunori Sasakura, Kazuo Inaba

Distribution and structural diversity of cilia in the  
tadpole larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*

5th International Tunicate Meeting、ポスター発表

沖縄、小禄、沖縄産業支援センター (2009年  
6月24日)

⑩Hiroshi Q. Terakubo, Hiroki Takahashi, Yoko  
Nakajima, Yasunori Sasakura, Takeo Horie, Kohji  
Hotta & Kotaro Oka

The structure and evolution of caudal epidermal  
neurons in ascidian larva

5th International Tunicate Meeting、口頭発表  
沖縄、小禄、沖縄産業支援センター (2009年  
6月23日)

[その他]

ホームページ等

①三次元個体表現型データベースのプロト  
タイプ(3DPL)作成

<http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/3dpl/top.html>

②ホヤ Anatomical ontology に基づく細胞系譜  
情報

[http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/faba/cell\\_lineage2/](http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/faba/cell_lineage2/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀田 耕司 (HOTTA KOHIJI)  
慶應義塾大学・理工学部・講師  
研究者番号：80407147

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし