

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25年 5月24日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年～2012

課題番号：22590181

研究課題名（和文）新規の全胚ライブイメージング法による体節形成の遺伝子発現ダイナミクスの時空間解析

研究課題名（英文）Spatiotemporal analysis of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm using novel whole-embryo-live-imaging method

研究代表者

近藤 晶子 (KONDOW AKIKO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：90396838

研究成果の概要（和文）：

選択的平面照明顕微鏡を用い、ゼブラフィッシュ胚全体で遺伝子発現の空間分布の時間変化を1細胞単位で記述し解析する実験系を構築し、体節形成に重要である *her1* 遺伝子の発現変動を解析することを旨とした。本研究で、ゼブラフィッシュ胚未分節中胚葉・体節を含む領域の核を、体節形成が始まる前から3分間隔で10時間に渡り、4次元（空間+時間）にイメージングできた。更に得られた動画データの解析方法を開発し、1細胞単位で記述する事ができた。また *her1* 遺伝子のレポーターゼブラフィッシュを作製するために、レポーターコンストラクトを胚に導入した。以上より、初期胚での体節形成のより詳細な時空間解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：

To analyze spatiotemporal aspects of the somitogenesis more in detail, we developed a novel experimental system describing spatiotemporal change of gene expression in the presomitic mesoderm (PSM) with single-cell resolution in zebrafish embryo using novel digital scanned laser light-sheet fluorescence microscopy. We successfully obtained 3D time-lapse images of zebrafish embryos including PSM at single-cell resolution. The images were recorded at 3 min intervals for more than 10 hours starting before the onset of somite segmentation. To generate *her1* reporter transgenic zebrafish, we injected *her1* reporter plasmid into zebrafish embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1900000	570000	2470000
2011年度	700000	210000	910000
2012年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学、体節形成

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物胚の体節の節状構造は、未分節中胚葉の前端から組織が一定時間毎に分離することで形成される。正常な体節境界の形成には、分節時計遺伝子群が未分節中胚葉で周期的な発現変動をすることが重要である。分節時計遺伝子の発現領域は尾部から頭部方向へ移動し、やがて予定分節境界で停止する。

分節時計遺伝子の発現制御には、細胞自律的周期形成、隣接細胞との同期、さらには分泌性制御因子など、複数の要因が複雑に関与している。これらの複数のシグナル経路が、さらに空間的に組合わさって制御されていると考えられる。

分節時計遺伝子の発現制御の時空間ネットワークを胚内で検証するには、遺伝子発現の空間分布の変化を1細胞単位で記述し解析する必要がある。ところがサンプルの厚さ、励起光を長時間照射し続けた時の光毒性の問題などから、レーザー共焦点顕微鏡などの従来の光学系を用いての全胚の詳細な時空間解析は制限があった。

2. 研究の目的

本研究課題では、胚が透明であるために蛍光観察に適したゼブラフィッシュ胚を、大きいサンプルを光毒性が少なく長時間観察することに適した選択的平面照明顕微鏡（DSLM）で観察することで、全胚で遺伝子発現の空間分布の時間変化を1細胞単位で記述し解析する実験系を構築することを目指した。この

実験系を用いて体節形成に重要な分節時計遺伝子である転写因子遺伝子のひとつで、hairファミリー転写抑制因子に属する *her1* 遺伝子の発現変動を解析し、さらには *her1* の発現変動に関わることが知られている要因、すなわち細胞自律的周期形成、隣接細胞との同期、さらには分泌性制御因子がどのように寄与するかを *in vivo* で明らかにすることを旨とする。

初期胚の発生過程を画像解析する技術は、脊椎動物の形態形成機構の解明といった基礎研究のみならず、医療への応用も期待される。最近、人工授精後に培養中のヒトの受精卵の発育過程を詳しく画像解析して、不妊治療成功率が高い胚を選び出す試みも始められており、本研究課題で目指す実験系が確立できれば、生殖医療への貢献も期待される。

3. 研究の方法

以下に示す流れに従って進める。

(1) 選択的平面照明顕微鏡(DSLM)を用い、ゼブラフィッシュ胚全体で遺伝子発現の空間分布の時間変化を1細胞単位で記述し解析する実験系を構築する。

DSLMは、シート状の励起光をサンプルに照射する光シート顕微鏡のひとつである。共焦点顕微鏡に比べて光毒性・褪色が少なく高速であり、ゼブラフィッシュ胚全胚のような大きいサンプル(直径約700 μ m)の3次元・長時間撮影が可能となる(Keller et al, Science 322-1065 '08)。

(2) 分節時計遺伝子 *her1* のレポーターゼブラフィッシュを作製する。

ゼブラフィッシュの分節時計遺伝子 *her1* の発現調節領域 (Gajewski et al, Development 4269-4278 '03) と蛍光レポーター遺伝子を組込んだレポーターコンストラクトを作製する。さらにゼブラフィッシュの受精卵に顕微注入することでトランスジェニック胚を作製する。

分節時計遺伝子は約 30 分周期で変動する。この速い発現変動を追跡するため、レポータータンパク質の半減期を短くする必要がある。一方、短い半減期のために蛍光シグナルが弱くなることが予想される。半減期と蛍光タンパク質の種類を検討する。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ胚全体で遺伝子発現の空間分布の時間変化を 1 細胞単位で記述し解析する実験系の構築：

速い遺伝子発現変動と細胞移動の追跡を可能とするために、顕微鏡の撮影条件の検討を行った。条件検討のため、*histone2b-EGFP* mRNA もしくは *histone2a-mCherry* mRNA を 1 細胞期の胚に顕微注入し、核を蛍光標識したゼブラフィッシュ胚を作成した。

これを用い、z 方向の間隔、及び時間間隔の至適化を行った。撮影時間の間隔をなるべく短くするために、胚の飼育温度を 29°C から 26°C に下げ、露光時間を短くするために蛍光タンパク質をコードした mRNA の胚への顕微注入量も検討した。その結果ゼブラフィッシュ胚未分節中胚葉・体節を含む領域の核を、体節形成が始まる前 (shield ステージ) から最短 3 分間隔で 10 時間に渡り、3 次元的にイメージングすることが可能となった (図 1)。

更に得られた画像データの解析方法を検討した結果、1 細胞単位で記述する事ができた。

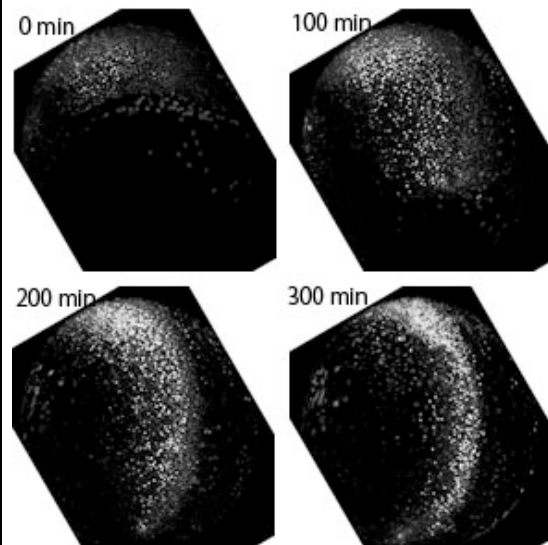


図 1 DSLM で撮影した核標識ゼブラフィッシュ胚。撮影開始からの経過時間を示す。背側から見たもの。動物極が上となる。

(2) レポーターゼブラフィッシュの作製：

速い発現変動を追跡できるレポーターゼブラフィッシュを作製するために、レポータータンパク質として、翻訳されてから蛍光が検出されるまでの時間が短い蛍光タンパク質 mCherry を用いた。また、レポータータンパク質の半減期を *her1* タンパク質と近づけるため、mRNA の半減期の制御のためには *her1* 遺伝子の 5' 及び 3' 非翻訳領域配列をレポーター遺伝子の 5' 及び 3' に挿入した。さらにタンパク質の半減期を短くするためタンパク質の不安定化配列 (ユビキチンの変異体 UbG76V) との融合タンパク質を用いた。To12 システムを用いてゼブラフィッシュ胚に導入した。得られた次世代の胚から抽出したゲノム DNA では、PCR 法でレポーター遺伝子のゲノムへの挿入が確認されたが、蛍光顕微鏡下での観察では蛍光を検出することができなかった。

そのため、レポータータンパク質として蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子を 2A ペプチド

配列を介して2コピー配置したコンストラクトの作製を試みた。その最中、蛍光タンパク質 Venus を用いて *her1* レポーターゼブラフィッシュを作製した報告があったため、こちらを用いてレポーターゼブラフィッシュの作製を進めた (Delaune et al, Developmental Cell, 23, 995-1005 '12)。現在、メガヌクレアーゼ *I-SceI* とともにレポーターコンストラクトを導入した胚を飼育中である。

以上の結果から、初期胚での体節形成のより詳細な時空間解析が可能となった。本研究の成果は、脊椎動物の体作りの仕組みを明らかにすることに役立つうえ、将来的に生殖医療への貢献も期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 晶子 (KONDOW AKIKO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号 : 90396838

(2) 研究分担者

大沼 清 (OHNUMA KIYOSHI)

長岡技術科学大学・

産学融合トップランナー養成センター

・准教授

研究者番号 : 50396834

(3) 連携研究者

小林 徹也 (KOBAYASHI J. TETSUYA)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号 : 90513359

野中 茂紀 (NONAKA SHIGENORI)

基礎生物学研究所・准教授

研究者番号 : 90435529