

# 両生類原腸胚のシングルセルトランスクリプトーム・3D マッピング

研究代表者 福井 彰雅 研究員

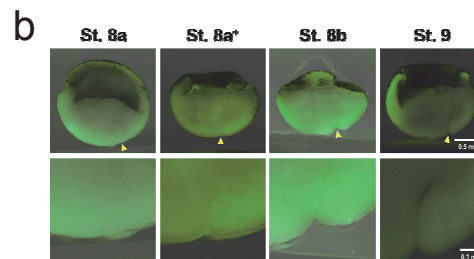
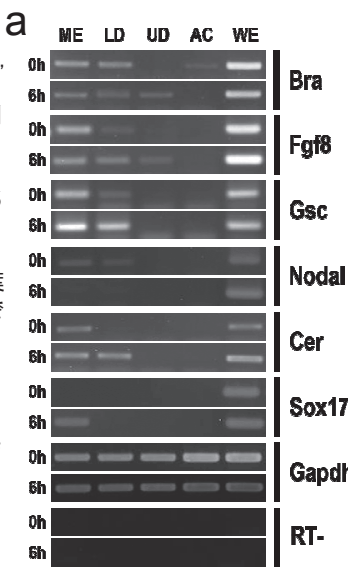
## 序論

原腸形成は全ての動物で見られる最初の形態形成運動である。この時期に外胚葉・中胚葉・内胚葉の3つの胚葉が形成され、前後軸・背腹軸・左右軸の体軸が決定され、形態形成の設計図であるボディプランが確立する。そのため、原腸形成期の個々の細胞の動態や遺伝子発現の変化は将来の形態形成に大きな影響を与える重要な情報であるが、その全貌はいまだ明らかになっていない。この研究では、原腸形成期の細胞個々の遺伝子発現アトラスを作成し、遺伝子の役割を1細胞レベルではなく、再構成された個体全体の中で理解することをめざす。

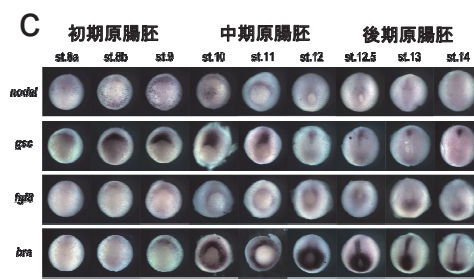
## 方法と結果

### 1. イベリアトゲイモリ原腸形成期の細胞運動と遺伝子発現パターンの解析

a. オーガナイザーでの遺伝子発現. stage 8aの初期原腸胚期に切り出した外植体よりRNAを抽出し、cDNAを合成してRT-PCRをおこなった。図は左より、中内胚葉領域(ME; mesoendoderm)、下部背側中胚葉(LD; lower dorsal meso-derm)、上部背側中胚葉(UD; upper dorsal mesoderm)、全胚(WE; whole embryo)のサンプルで、切り出し直後(0h)と6時間後(6h)のバンドを示す。遺伝子は上から、中胚葉マーカーであるbrachyury (Bra) と、その誘導因子である線維芽細胞成長因子 (Fgf8)、中内胚葉マーカーであるgoosecoid (Gsc)、とその誘導因子であるnodal、同様に中内胚葉マーカーであるcerberus (Cer)とSox17、内性遺伝子マーカーとして、代謝経路に関連するGapdhと、ゲノムDNAを含まないことを確認するための逆転写反応をおこなっていないサンプルのPCR (RT-)を示す。この結果より、UD領域では自律的に発現したFgf8によってbrachyuryが誘導されること、それ以外の中胚葉系遺伝子が発現していないのに対し、Gsc、Cerといった中内胚葉系の遺伝子は誘導因子であるnodalがほとんど発現していないのにも関わらず、LDで6時間後に発現が上昇していることが示された。

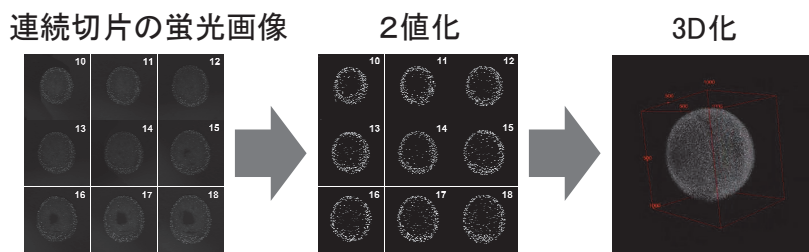


b. イベリアトゲイモリ初期胚の正中断面像。矢じりは原口の位置、下段は現口付近の拡大画像。ビブラトームで切断後、サイバーグリーンで核と細胞質を染色している。



c. イベリアトゲイモリの遺伝子発現パターン。Whole mount *in situ* hybridization (WISH)法を用いて検出している。紫色が発現領域を示す。Nodalは内胚葉から背側帯域で、gscはオーガナイザー領域で、fgf8はオーガナイザー領域から原口周辺で、braは予定中胚葉領域から脊索で発現が見られる。

### 2. 原腸胚3Dアトラスの作成



ネットアイツメガエルを用いて厚さ8 μmの連続切片を作成し、撮影後にDAPIによる蛍光画像を加工する。これらを重ね合わせることで、3次元における細胞の位置の再構築を試みている。蛍光写真の解像度を上げることで、より精密な核の情報を得ることができた。この胚では、90枚の連続切片画像を用い、予想される核の数は25,411個であった。

- ✓ イベリアトゲイモリのWISH法を確立した。今後はさらに多数の遺伝子の発現パターンを調査する。
- ✓ イベリアトゲイモリ原腸胚の細胞の直径は20~194 μmとばらつきが大きく、自動分取が困難であることがわかった。今後は核を用いたシングルセルトランスクリプトームについても検討する。
- ✓ 原腸胚の3Dアトラス作成について、現在データを蓄積中である。完全な1個体の連続切片の作製や核の重なり判定など克服すべき課題も多く、今後も方法の検討をすすめていく。