

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

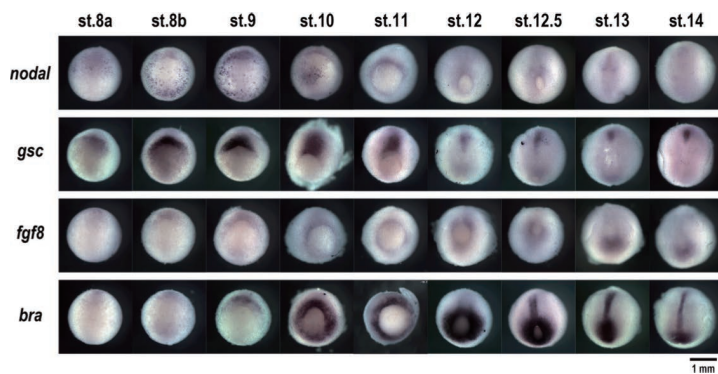
研究代表者 福井 彰雅 研究員

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、その全貌はは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。

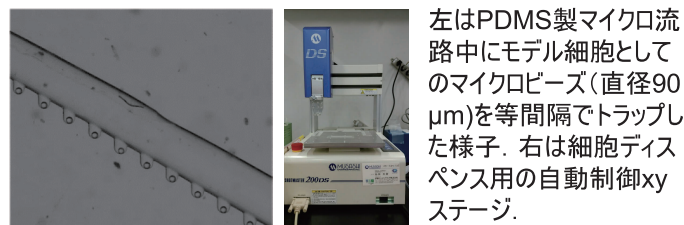
方法と結果

1. *P. waltl* 遺伝子発現パターンの解析



イベリアトゲイモリ(*P. waltl*)の各ステージ(上段)における各遺伝子(左カラム)の発現パターン。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. 細胞解離/回収条件の検討



左はPDMS製マイクロ流路中にモデル細胞としてのマイクロビーズ(直径90 μm)を等間隔でトラップした様子。右は細胞ディスペンサ用の自動制御xyステージ。

PDMS(透明シリコンゴム)で作製したマイクロ流路中に、細胞を等間隔にトラップする方法を検討した。細胞をトラップした後、流路を反転させることで、重力によってトラップ箇所から細胞を取り出し、自動ステージを備えたディスペンサによって1ウェル当たり1個の細胞を効率的に分注する技術を開発している(鈴木宏明研究室提供)。

表. 各ステージにおける細胞のサイズ

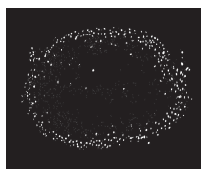
Stage.	n	Max	Min	median	average	SD
8	108	194.0	35.2	93.3	97.2	28.6
11	76	183.0	25.1	71.2	73.7	34.8
12	71	137.0	20.1	55.8	64.8	32.7
13	65	149.8	19.6	40.4	49.6	26.2

(μm)

原腸胚をEDTA等のキレート剤で処理することにより1細胞へと解離し、各ステージにおいてランダムに選ばれた細胞の直径を測定した。ステージが進行するにつれ細胞が分裂するため、平均値が減少する。原腸胚期における細胞のサイズは最大で194 μm、最小で20 μmとなり、その値には約10倍の差があることがわかった。

3. 原腸胚3Dアトラスの作成

二値化された胚の核のデータ



数μmの薄切片を作成し、撮影後に左図のようにDAPIによる蛍光画像を加工することで、3次元における細胞の位置の再構築を試みている。

まとめ

- ✓ 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。
- ✓ 細胞解離条件は確定した。マイクロ流路を用いた異なるサイズの細胞の自動分取にはさらなる改良が必要である。手動によるサンプリング後の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個体の切片が必要なためにスキルに依存する部分が大きく、今後は透明化などの方法についても検討をすすめる。