

## 研究終了報告書

### 「縞パターン形成の多様性を生み出すネットワーク」

研究期間:2020年11月～2024年3月

研究者:秋山-小田 康子

#### 1. 研究のねらい

動物の発生過程において胚を構成する個々の細胞は全体として協調し、形態形成や細胞分化の基盤となる遺伝子発現パターンを作り上げていく。同じ個体を構成する細胞は基本的には同一のゲノムにコードされた同じ分子ネットワークをもつが、細胞内外の分子の分布などの状況に応じてネットワークの経路が選択され、細胞は領域特異的、ステージ特異的に様々なダイナミクスを示すと考えられる。また、少数の分子から構成される同じ構造をもつネットワークでも、分子の関係性をわずかに変化させるだけで、異なるパターンを生じさせ得ることも数理的に示されている。本研究では、オオヒメグモの体節形成の基盤となるダイナミックで多様性のある周期的縞パターン形成を対象として、細胞の多様な振る舞いを明らかにすることを目的とした。

節足動物・鋏角類のオオヒメグモは、所属する研究室のメンバーとともに開発したモデル生物で、国際的にも利用価値が認められ、ゲノムが既に解読されている。オオヒメグモのパターン形成は一層の上皮細胞シートで起こるが、その形成様式は同じ節足動物のショウジョウバエ(昆虫類)とは明らかに異なる。オオヒメグモではヘッジホッグ(Hh)シグナルの制御下で多数の遺伝子が前後軸上で領域特異的に発現し、前後の極性パターンが形成される。同時に、ヘッジホッグ遺伝子(hh)と、Hhシグナルにより負に制御される*msx1*遺伝子が関与する3種類の遺伝子発現の進行波が現れ、頭部ではBi-splitting、胸部ではTri-splitting、後体部ではOscillationという異なるダイナミクスによる縞パターン形成が引き起こされることをこれまでの研究で明らかにしていた。しかし、ここではたらく遺伝子や分子ネットワークの多くは不明である。さらにHhシグナルは動物の発生において、シグナルソースからの距離に応じた区画パターンや繰り返しの縞パターンなどを形成するが、状況に応じて多様なパターンを生み出す仕組みはまだ分かっていない。

本研究では、このように細胞環境でHhシグナルの制御の下、多様でダイナミックなパターン形成を行うオオヒメグモ胚をシングルセルの解像度で解析し、前後の極性パターンの形成、3種類の遺伝子発現波の発生と進行、周期的な縞パターン形成を同時に実現させる分子ネットワークを明らかにすること、さらに、動物による発生様式の違いの理解へとつなげていくことを目指した。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

オオヒメグモ胚におけるパターン形成をシングルセルのレベルで理解するために、単一細胞および単一核RNA-seqの実験系を立ち上げた。細胞の単離にはまだいくつかの問題を抱えているが実験は可能となった。核の単離は胞胚期から胚帯期までに対応できる方法を確認することができた。そこで、まず胚盤期と胚帯期の胚から細胞と核のデータを取得し、解析を進めた。どちらの方法においても、またどちらの発生段階でも外胚葉・中胚葉・内胚葉の細胞集団が特定でき、外胚葉に頭部・胸部・後体部に相当する領域が検出された。さらに単一核の実験

は遺伝子発現パターンを細部まで再現できるほど高感度であることが分かった。

胚盤期の解析結果で注目すべき点は2つある。1つは、中胚葉への分化過程と考えられる細胞状態が検出できたことである。このような一過的に現れる細胞状態が検出可能な程、感度が高い実験手法であることが分かった。2つ目は前後軸の極性パターンが UMAP のプロット上に現れたことである。この UMAP のパターンは、胚の染色パターンと比較可能なものだった。さらに単一核のデータでは、後体部の縞パターン形成の Oscillation の開始に相当する遺伝子発現が捉えられた。このように、この方法がパターン形成の解析にも有効であると考えられた。

複雑なパターンが形成される胚帯期の胚の解析では、単一核のデータにより前後軸に沿った極性パターンだけではなく、体節ごとの縞パターンも UMAP のプロットに再現された。このプロット上のパターンを直線化する方法を開発し、全遺伝子の発現を一次元の軸に対する数値として取得することができた。この発現プロファイルは、それぞれの遺伝子の前後軸に沿った発現の相対的な位置関係を非常に良く反映しており、頭部の Bi-splitting、胸部の Tri-splitting、後体部の Oscillation のそれぞれを、発現の波の位相の違いまで再現した。この発現の数値データを用いて領域特異的に発現する遺伝子を抽出し、さらにその中から体節形成の波と関係する可能性のある遺伝子を選び、グループ分けした。今後の機能解析やネットワーク解析を行うための基礎となるデータが得られた。

オオヒメグモの兄弟胚を利用した時系列データの取得を進めている。体節形成時に現れる遺伝子発現の波の進行と分割のダイナミクスや、発生初期の極性形成について解析するためのデータが得られつつある。

## (2) 詳細

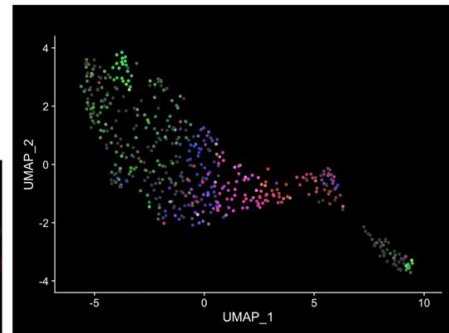
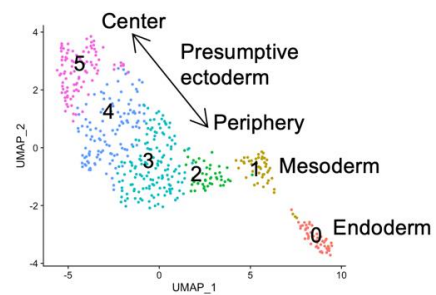
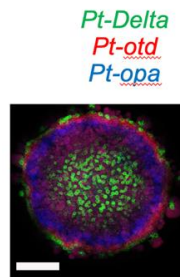
### 研究テーマ A「オオヒメグモ胚の単一細胞および単一核 RNA-seq 法の確立」

オオヒメグモ胚の初期発生を細胞レベルで解析することを目指し、単一細胞および単一核 RNA-seq 法の確立を試みた。ライブラリーの調整は市販のキットで可能であるが、細胞や核の調整には生き物独自のプロトコルが必要となる。胚盤期と胚帯期の胚を主に、さらに胞胚期の胚も使用し、細胞の単離法の開発を進めたが、一般的な緩衝液では浸透圧が合わない、細胞が沈まない、胚帯期になると細胞の解離が困難となり、胞胚期には細胞と卵黄顆粒が分離できないなど様々な問題が生じた。種々の溶液やプロテアーゼを試すことでいくつかの問題は解決でき、胚盤期と胚帯期のサンプルから単一細胞のデータを取得することに成功した。次に行った単一核の抽出は容易に実現でき、どの発生期も 20 個程の卵を用いて同様の方法で実験を進めることができた。どちらの方法でも検出した mRNA 分子数、遺伝子数ともに大きな差はなかった。以上のように、オオヒメグモ胚の単一細胞および単一核 RNA-seq の実験法を確立することができた。しかし、単離の容易さと、以下に述べるように感度の良さから、単一核 RNA-seq を中心手法として用いることとした。

### 研究テーマ B「オオヒメグモ胚盤期の前後極性の解析」

これまでの研究により遺伝子発現の情報が最も蓄積している胚盤期後期のオオヒメグモ胚を用いて単一細胞 RNA-seq 解析を行った。この時期には、円盤型の胚盤の外胚葉に同心円状に

将来の前後軸に沿ったパターンが形成され、胚盤の縁から中胚葉細胞が陥入する。Seurat を用いたクラスタリング解析では、細胞は大きな外胚葉のグループと、小さな中胚葉、内胚葉のグループに分かれた。おもしろいことに、遺伝子発現が外胚葉と中胚葉の間状態にある細胞が検出された。これはまさに中胚葉へと運命決定された細胞に相当すると考えられ、このような一過的な分化途上の状態を検出できる程、感度が高い方法であることが分かった。この解析で最も重要な結果は、UMAP のプロット上に外胚葉の前後パターンが形成されたことである。前後軸全体の極性も、局所的な発現部位の違いも再現されることが分かった。この発生段階では後体部の



体節形成の Oscillation が開始するのだが、単一核 RNA-seq の実験を行ったところ、この Oscillation の遺伝子発現の開始を捉えることができた。このように、単一細胞および単一核 RNA-seq 法は細胞分化だけでなくパターン形成の解析にも利用可能であり、さらに、後者の方法は非常に感度が高いことも分かった。

この解析で領域特異的、細胞特異的に発現する新たな遺伝子を同定することができた。同定は Seurat のクラスターマーカーの探索により行っただけではなく、特定の細胞における発現量を基準にした方法や、UMAP 上の発現パターンを利用した画像のパターンマッチングの方法により行った。データ活用の新たな方法と言える。

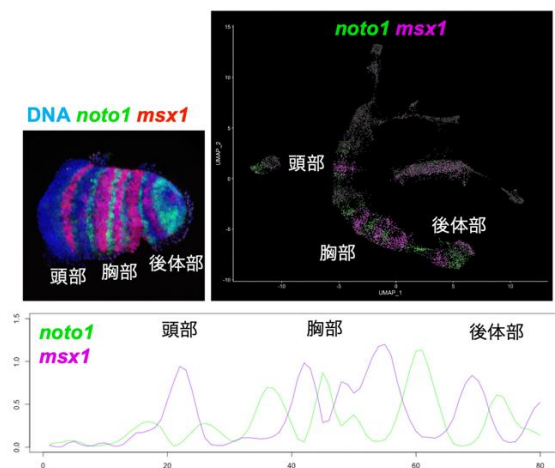
以上の結果は論文1で発表した。

#### 研究テーマ C「オオヒメグモ胚帯期の縞パターンの解析」

胚盤期の前後パターンが UMAP 上に再現されたことから、より複雑なパターンの解析も可能ではないかと考え、縞パターンが形成される胚帯期の胚を用いて単一細胞および単一核 RNA-seq 解析を行った。どちらの方法でも三胚葉が同定され、外胚葉の細胞集団中に頭・胸・後体部の各領域が検出された。さらに、単一核のデータでは縞パターンも UMAP 上に現れた。単一細胞のデータでは縞パターンは観察されなかったが、これは核と細胞質に存在する RNA のもつ情報量の違いを意味しているのかも知れない。また、単一細胞の実験では細胞の回収率が低く、解析に用いた細胞が少なかったことに影響を受けている可能性もある。

単一核のデータで前後パターンと縞パターンが UMAP のプロットに再現されたことを利用して、前後軸に沿った遺伝子発現を一次元の軸上の数値として取得する方法を開発した。この方法では、まずプロット上の細胞密度を利用して前後軸に相当するラインを引く、このラインを直線化し座標軸とする。次にプロット上の細胞に対して、はじめに引いたラインとの最短距離と、直線化した座標軸を利用し、位置座標を求める。はじめに引いたラインのごく近傍にプロッ

トされた細胞の位置座標と、それらの細胞における発現量を利用して、軸に沿った発現プロファイルをすべての遺伝子に対して取得する。この方法で構築した発現プロファイルでは、縞パターン形成時に見られる頭部の Bi-splitting、胸部の Tri-splitting、後体部の Oscillation と非常に良く似たパターンが観察された。発現の波の位相の違いまで再現されており、軸上の相対的な遺伝子発現をうまく捉えられていると考えられた。



発現プロファイルを利用して、約 200 の遺伝子を軸上で特異的な発現パターンを示すものとして選び出した。これらの遺伝子の発現だけで、前後軸に沿った極性パターンと縞パターンを再現できた。また、一部の細胞集団でこれらの遺伝子の発現をランダムにすると UMAP で軸に沿った細胞の並びが途切れることも分かった。この遺伝子セットが示すことは、前後のグローバルな極性は個々の細胞が少しずつ異なる遺伝子を発現することにより成立していることである。そして、体節の繰り返しの発現は前後極性の存在下で形成されることが考えられた。さらに、発現プロファイルの傾きを利用して、頭部・胸部・後体部の縞パターン形成の各現象の際に発現する遺伝子を、発現の波の位相ごとにグループ分けした。今後のネットワーク解析の基礎となるデータを取得することができた。

以上の内容に関して、現在、論文執筆中である。

#### 研究テーマ D「オオヒメグモ胚発生期の時系列単一核 RNA-seq データの取得」

発生における時間変化を追跡するために、時系列データの取得を進めている。同時に生まれた兄弟胚を用いて2時間ごとに4-6時点で核抽出し、ライブラリー作製を行っており、現在のところ胚盤形成途中の受精後22時間から縞パターン形成後期の60時間までのデータの取得を終えた。胞胚初期の10時間から22時間までのデータも取得中である。さらに、前後極性形成を制御する *hh* 遺伝子と、縞パターン形成に重要な役割を果たす *msx1* 遺伝子のそれぞれの RNAi 胚からのデータ取得も準備している。

### 3. 今後の展開

オオヒメグモの発生段階を追った時系列単一核 RNA-seq データの取得が間もなく完了しようとしている。時系列データの予備段階の解析では、本研究で確立した方法により取得した一次元の軸上の遺伝子プロファイルに、Bi-splitting や Oscillation に相当すると考えられる遺伝子発現の波の変化が捉えられている。このデータにより、パターン形成の時間変化が解析可能となり、縞パターン形成の各現象にはたらく遺伝子の候補を網羅的に列举できると考えている。この情報をもとに、遺伝子のノックダウン実験等を行い、パターン形成の分子ネットワークの解明へと繋げていきたい。また、単一核のサンプリングは胞胚期でも可能であることを既に確認している。このようなご

く初期のデータの解析により、発生の最も初期に起こる極性形成について理解し、極性形成から縞パターン形成までの全変化を追跡したいと思う。現在、所属する研究室でオオヒメグモの胚発生に関する数理解析が進められている。数理の研究者とも連携し、単一核解析から得られる情報を活用して、数理生物学的な方向にも研究を展開させていきたいと考えている。ここから進化解析へと発展させたい。

#### 4. 自己評価

単一細胞および単一核 RNA-seq の実験手法とデータの解析手法を確立するために多くの時間をかけたため、遺伝子機能や分子ネットワークの解析を行うことができず、新たな生物学的な発見まではたどり着けなかった。これは非常に残念な点である。しかし、単一核 RNA-seq の実験手法はどの発生ステージにも、おそらく他の動物や組織にも、対応可能なものを確立することができた。また、2時間おきに兄弟胚からサンプリングしたデータの取得が進んでおり、今後、転写状態の時間変化を精度良く解析する準備ができている。単一核 RNA-seq のデータ解析手法として発現の数値をゲノムワイドに扱うことができるものを立ち上げたため、既知の情報に頼ることなく解析を進められる。本研究により、今後の研究の発展につながる土台を築くことができた。

海外の学会での発表や論文発表を通して、クモや節足動物、単一細胞 RNA-seq に興味を持つ研究者からの問い合わせや、論文の Review の依頼が増えた。少しずつ外からの評価も高まっているのではないと思う。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 3 件

1. Akiyama-Oda, Y., Akaiwa, T., Oda, H. Reconstruction of the Global Polarity of an Early Spider Embryo by Single-Cell and Single-Nucleus Transcriptome Analysis, *Front. Cell Dev. Biol.* 2022, 10: 933220.

オオヒメグモ胚に単一細胞および単一核 RNA-seq 法をはじめて適用した。胚盤期の胚を解析したところ、三胚葉に相当する細胞集団の同定とともに、中胚葉へと分化する際に一過的に現れる細胞状態も検出できた。UMAP のプロットでは外胚葉の細胞集団に、胚の前後極性を反映したパターンが現れた。このことはゲノムワイドにノンバイアスでパターン形成の解析が可能であることを示している。さらに単一核の解析では縞パターン形成の Oscillation の開始を捉えることができ、この方法は非常に感度が高いことが分かった。

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

< 主要な学会発表 >

Akaiwa, T., Oda, H., Akiyama-Oda, Y. Reconstruction of segmented body pattern in single-nuc analysis of spider embryos. The 3rd NINS-Princeton Joint Symposium (2023.3.23, プリンストン大学、USA)

秋山-小田康子 オオヒメグモ胚のシングルセル解析:パターンの再構成が意味すること. 第 45 回 日本分子生物学会・ピペットマン 50 周年記念フォーラム「シングルセル解析の最前線～情報の付加価値を求めて」(2022.11.30, 横浜)

Akaiwa, T., Oda, H., Akiyama-Oda, Y. Reconstruction of the segmented body pattern by single-cell and single-nucleus RNA-seq of spider embryos. 第3回日仏発生生物学会(2022.11.9, ストラスブール、フランス)

<著作物>

秋山-小田康子. パターン形成の1細胞解析. 細胞. 2023, 55 (7), 65-70.

秋山-小田康子. 体節空間パターンを生み出すしくみの多様性. 生体の科学. 2022, 73 (4), 359-363.