

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06676

研究課題名（和文）シングルセル解析による体節形成の多様性を統合する分子基盤の解明

研究課題名（英文）Single-cell analysis of varied processes in stripe pattern formation

研究代表者

小田 康子（秋山康子）（Akiyama-Oda, Yasuko）

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80426650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではオオヒメグモ胚の実験系に単一細胞および単一核RNA-seq法を取り入れ、外胚葉の上皮細胞シート上に形成されるパターンを、ゲノムワイドに1細胞レベルで解析する方法を確立した。解離した細胞から得た情報のみで、前後軸に沿ったパターンが再構成できることが分かった。特に、単一核に由来するデータは精度が高く、複雑な縞パターンをも再現した。さらに、再構成されたパターンから数値データを取得し、ゲノムワイドにパターン形成を解析する系も構築した。今後の分子ネットワーク解析の土台となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前後軸に沿ったパターンを、画像情報を取り入れることなく、数値的に再構築できたことに意義がある。本研究ではこの再構築されたパターンを利用して、軸に沿った遺伝子発現をゲノムワイドに数値として取得する方法も確立した。この方法に経時サンプリングやRNAiを組み合わせることで時間変化や遺伝子相互作用の情報も取得できると考えられ、数理解析への適用も期待できる。パターン形成の領域や動物による違いの解明へと発展できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we applied single-cell and single-nucleus RNA-seq techniques to study of pattern formation in the spider embryo. We demonstrated that the data obtained with dissociated cells and nuclei successfully reconstructed the anterior-posterior pattern in the UMAP plot without the assistance of any image data. Furthermore, we established a method to obtain genome-wide and quantitative gene expression data from the reconstructed axial pattern. This study will serve as the basis of the future molecular network analysis.

研究分野：発生生物学

キーワード：パターン形成 体節形成 ゲノム クモ シングルセル トランスクリプトーム

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 節足動物の体には体節の繰り返し構造が見られる。体節形成のもととなる縞状の遺伝子発現を作り上げるためにはたらく分子機構はショウジョウバエで非常によく研究されており、ここでは転写因子のカスケードにより多核性胞胚に小さい単位の遺伝子発現領域が順々に形成され、体節ごとの縞パターンとなることが知られている。しかしこのようなパターン形成の分子機構は昆虫の中でも保存されたものではなく、脊椎動物のように遺伝子発現の振動による様式が存在することも分かっていた。

(2) 私たちが新たな実験系として開発した節足動物・鋏角類に属するオオヒメグモでは、ヘッジホッグシグナルを中心とした細胞間相互作用が初期胚のパターン形成にはたらいており、私たちはこれまでの研究で、体の領域によって異なる3種類の動的な波のような遺伝子発現により空間的に繰り返した縞パターンが形成されることを示していた。このような波はシート状に一層に並んだ外胚葉の上皮細胞が遺伝子発現を時間変化させることに起因し、頭部では **Bi-splitting**、胸部では **Tri-splitting**、後体部では **Oscillation** という動態が観察される。しかし、このような動的な発現を示す遺伝子の網羅的な同定はできておらず、その制御の分子機構に関してはほとんど分かっていなかった。さらには、波の動態の違いを生み出す分子機構については全く分かっていなかった。

(3) 単一細胞 RNA-seq 法は個々の細胞に存在する mRNA を網羅的に、かつ定量的に解析する方法として利用されるようになっていた。この方法を用いた多くの研究は現在においても細胞の分化過程を対象としている。

2. 研究の目的

体節の繰り返し構造のもととなる遺伝子発現の縞パターンの形成様式は、動物によって、また、体の領域によって異なっている。このような多様性を総合的に理解するためには、理論的な解析にも適用可能な、ゲノムワイドで細胞レベルの遺伝子発現の数値データが必要となる。

本研究はオオヒメグモ胚において単一細胞 RNA-seq 法を立ち上げて縞パターン形成時の胚を解析し、パターンを形づくっている細胞における遺伝子発現を、数値データとして1細胞レベルで空間的に再構築することを目的とした。そして、時間変化の解析や分子ネットワークの解明へと発展させることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 胚盤期の卵を用いて、オオヒメグモ胚における単一細胞 RNA-seq 法の実験系を立ち上げる。胚盤期における遺伝子発現パターンに関しては、私たちのこれまでの研究で情報が蓄積しているので、このような蓄積した情報と比較しながら、単離した細胞から得た情報に、外胚葉細胞に形成される前後のパターンがどのように含まれるかを分析し、空間パターンの再構築方法を確立する。

(2) 胚帯期の胚においても細胞の解離方法を検討し、実験法を確立する。発生の進行とともに、より複雑になる前後軸に沿った領域特異的なパターンや縞パターンの解析方法を検討する。

(3) 縞パターンで発現する遺伝子を網羅的に同定する。RNAi 法を用いて機能解析を行い、遺伝子の相互の関係を明らかにする。

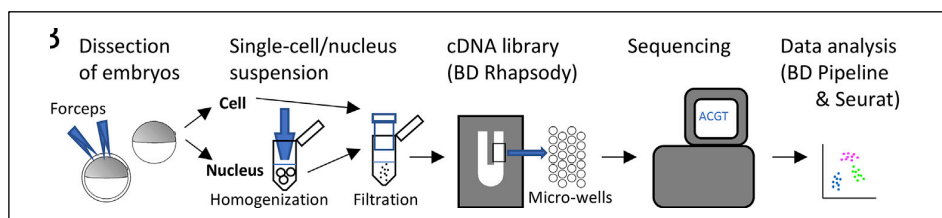
4. 研究成果

(1) オオヒメグモ胚における単一細胞および単一核 RNA-seq 法の確立

① 胚盤期の胚を用いて解離細胞の取得を試みたが、他の動物の実験系を参考にした方法では、細胞を傷つけずに解離することや解離後の細胞を沈降させることに問題が生じた。様々に検討を行い、適した緩衝液を使用し、受精膜をハンドピールしてセルストレイナーに通し Filtration することで細胞の解離と収集が可能となった。さらに、解離細胞はメタノールを含む溶液で保存可能であることも明らかにした。このことで、サンプリングとライブラリー作製が容易になった。10-20 個の卵から細胞を回収して作製したライブラリーから、細胞分化やパターン形成を解析することが可能となる情報量が得られることが分かった。

② 胚帯期の胚に対しても、胚盤期の胚と同じ方法を試みたが、細胞が解離されなかった。そこで種々のプロテアーゼを試し、解離に有効なプロテアーゼを1つ見出した。発生の進行とともに細胞がより小さくなるため細胞の沈降はさらに難しくなり、細胞の回収率には課題が残ったが、ライブラリー

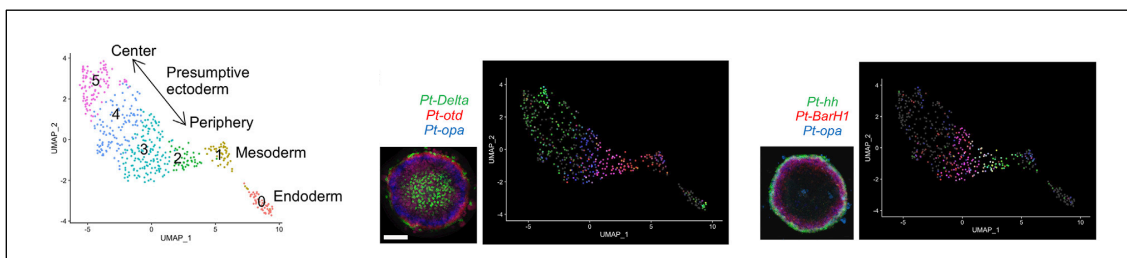
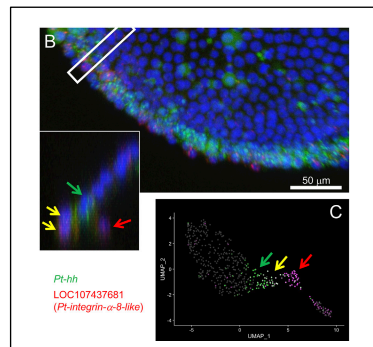
作製とデータ解析が可能となる数の細胞を集める方法を構築することができた。



③ 細胞の核に存在する RNA を解析することで、よりダイナミックな転写変化を捉えることができることを考え、単一核 RNA-seq 法を取り入れることを考えた。そこでまず、核の抽出を試みた。ホモゲナイズのやり方を調整することで、比較的容易に核を集められることが分かった。次に、ライブラリーの作製も進め、Lysis の時間を調整し、プロテアーゼを加えることで作製が可能となった。さらにイントロンのリードをカウントできるようにゲノム情報を整備した。

(2) 胚盤期の解析

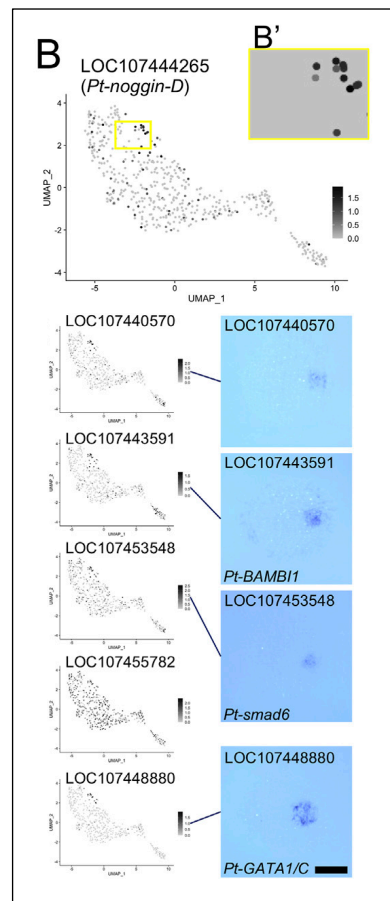
① 胚盤期の胚を用いて作製した単一細胞ライブラリーからシーケンス情報を取得し、単一細胞 RNA-seq 解析のためのパッケージである Seurat を利用して、細胞のクラスタリング解析を行った。まず、細胞の分化に関して、細胞は外胚葉・中胚葉・内胚葉に相当する 3 つのグループに大きく分かれることが分かった。胚盤の上皮細胞シートを構成するほとんどの細胞は外胚葉細胞となるが、この時期に胚盤の縁に存在する細胞は中胚葉細胞としての運命決定を受け、外胚葉細胞シートの内側に入り込む。注意深く解析すると、外胚葉細胞と中胚葉細胞の中間的な状態にある細胞の存在が示された。単一細胞 RNA-seq 解析でこのような中間状態の細胞で発現することが示唆された遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により胚で可視化すると、まさに期待される縁の細胞で染色が観察された。これは中胚葉細胞への分化途上にある細胞状態と考えられた。このように単一細胞 RNA-seq 解析は分化過程の一過的な細胞状態を検出できるほど感度が高い方法であることが分かった。



次にパターン形成に関して、胚盤には縁を将来の前側（頭部）、中心付近を将来の後側（尾部）とする大まかな前後パターンが形成されていることをこれまでの研究で明らかにしていたが、Seurat による解析の結果を示した UMAP のプロット上では、外胚葉細胞は前後の極性を反映して配置されていることが分かった。このプロット上で既知の遺伝子発現を可視化すると、胚盤全体の前後のパターンも周縁部のわずかな違いも再現されていた。つまり前後極性パターンがプロット上に再構築されたといえる。この時期の胚盤外胚葉の上皮細胞シートには明確な領域境界はなく、細胞は少しずつ異なる組み合わせの遺伝子を発現して前後極性を形成していることが分かってきた。

② この UMAP のプロット上に再構築された外胚葉細胞のパターンを利用して、類似の発現パターンを示す遺伝子を探索する方法を構築した。これはパターンマッチングのアルゴリズムを用いる方法で、この方法を用いて、背側を決める Dpp (BMP) シグナルを受け取った細胞で発現する遺伝子のパターンをテンプレートとして探索を行い、同様の細胞で発現する遺伝子を複数同定することができた。

③ 胚盤期の兄弟胚をほぼ同時にサンプリングし、単一核 RNA-seq ライブラリーと単一細胞 RNA-seq ライブラリーを作製した。単一核 RNA-seq 法でも、単一細胞と同程度のデータ量を得ることができ、上記と同様にしてクラスタリング解析を行ったところ、三胚葉に相当する細胞グループの生成と、胚盤の前後軸の再構築が確認できた。胚盤期後期には、胚盤の中心領域から後体部の体節形成に関わる遺伝子発現が開始する。詳細に解析すると、単一核 RNA-seq 法では、この中心から開始する遺伝子発現を捉えることができ、この領域で発現する新たな遺伝子を同定することができた。



(3) 胚帯期の解析

胚帯期の胚を用いて作製した単一細胞および単一核 RNA-seq ライブラリーから取得した情報を Seurat により解析したところ、上記と同様に、三胚葉に相当する細胞グループと前後のパターンが UMAP のプロット上に確認できた。特に単一核のデータを用いた解析では、より詳細な前後のパターンとともに縞パターンも再構築され、この方法がより複雑なパターンを捉えるのに適した方法であることが分かった。さらに、この再構築されたパターンをもとに前後軸に沿った遺伝子発現の数値情報を取得する方法を開発し、現在は、縞パターンで発現する遺伝子の同定と、体の3領域での遺伝子発現の違いの解析を進めている。

(4) 今後の展望

本研究では、節足動物・軟体動物のオオヒメグモで単一細胞および単一核 RNA-seq 法を立ち上げ、この方法をパターン形成の解析に適用した。画像情報を利用することなく、パターンを再現できる系は他に知られておらず、国際会議等の発表で大きなインパクトを与えることができた。この手法ではゲノム上の全遺伝子に関して1細胞レベルで発現情報を取得できる。オオヒメグモは発生の揃った卵を一度に200個程度産む。同時に生まれた兄弟胚を一定時間おきにサンプリングしライブラリー作製を行うことで、発生の時間軸に沿った1細胞レベルの情報をゲノムワイドに取得できることになる。さらに、本研究では実行できなかったが、RNAiによる遺伝子のノックダウン実験を組み合わせることにより、クモ胚の上皮細胞で起こるダイナミックな遺伝子の発現変化とそれを実現する分子ネットワークの解明へと発展できると考えている。

図の出典は Akiyama-Oda et al. (2022) *Front Cell Dev. Biol.* 10:933220.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 秋山-小田康子	4. 巻 55(7)
2. 論文標題 パターン形成の1細胞解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama-Oda Yasuko, Akaiwa Takanori, Oda Hiroki	4. 巻 10
2. 論文標題 Reconstruction of the Global Polarity of an Early Spider Embryo by Single-Cell and Single-Nucleus Transcriptome Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 933220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.933220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Motohiro, Akiyama-Oda Yasuko, Oda Hiroki	4. 巻 10
2. 論文標題 Virtual spherical-shaped multicellular platform for simulating the morphogenetic processes of spider-like body axis formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 932814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.932814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki-Yokozawa Sawa, Nanjo Ryota, Akiyama-Oda Yasuko, Oda Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Lineage-specific, fast-evolving GATA-like gene regulates zygotic gene activation to promote endoderm specification and pattern formation in the Theridiidae spider	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-022-01421-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 秋山-小田 康子	4. 巻 74
2. 論文標題 オオヒメグモ胚のパターン形成 縞パターンはどのようにできるか?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝 特集 クモのゲノム、遺伝子研究の最前線	6. 最初と最後の頁 670-676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Motohiro Fujiwara, Yasuko Akiyama-Oda, Hiroki Oda
2. 発表標題 A spider embryo based mathematical model for researching evolutionary pathway of diversity in Arthropodal embryo
3. 学会等名 第56回日本発生物学会大会(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanori Akaiwa, Hiroki Oda, Yasuko Akiyama-Oda
2. 発表標題 Genome-based, quantitative dissection of an arthropod, segmented body plan using single-nucleus RNA sequencing of spider embryos
3. 学会等名 第6回 山田シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原 基洋, 秋山-小田 康子, 小田 広樹
2. 発表標題 節足動物の体軸形成の多様化の進化過程を探る理論研究
3. 学会等名 日本植物学会 第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanori Akaiwa, Hiroki Oda, Yasuko Akiyama-Oda
2. 発表標題 Reconstruction of segmented body pattern in single-nuc analysis of spider embryos
3. 学会等名 The 3rd NINS-Princeton Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akaiwa, T., Oda, H., Akiyama-Oda, Y.
2. 発表標題 Single-nucleus RNA sequencing of segmented embryos can reconstruct the spatial periodic stripes of gene expression in the spider <i>Parasteatoda tepidariorum</i>
3. 学会等名 日本発生物学会第55回大会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akaiwa, T., Oda, H., Akiyama-Oda, Y.
2. 発表標題 Reconstruction of the segmented body pattern by single-cell and single-nucleus RNA-seq of spider embryos.
3. 学会等名 第3回日仏発生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山-小田康子
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原 良太、金山 真紀、秋山-小田 康子、青木 不学、小田 広樹、鈴木 雅京
2. 発表標題 SNPsを用いたオオヒメグモ (<i>Parasteatoda tepidariorum</i>) における性染色体の同定について
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤岩孝憲、小田広樹、秋山-小田康子
2. 発表標題 オオヒメグモ胚での全遺伝子発現パターンの推定： シングルセルRNAseq解析に基づく方法の確立
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋山-小田 康子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 生体の科学	5. 総ページ数 5
3. 書名 体節空間パターンを生み出すしくみの多様性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Databases of Genome-based Research https://www.brh2.jp BRH Data Resources https://www.brh2.jp
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小田 広樹 (Oda Hiroki) (50396222)	株式会社生命誌研究館・その他部局等・主任研究員 (94404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関