OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	オオヒメグモ体節形成をモデルとした遺伝子発現の波の動態制御機構の解明に向けたSingle-nucleus RNA sequencing解析
Author(s)	赤岩, 孝憲
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105657
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

オオヒメグモ体節形成をモデルとした遺伝子発現の波の動態制御機構の解明に向けた Single-nucleus RNA sequencing 解析

令和 7 年度

赤岩　孝憲

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程

要旨

動物の体には繰り返しの構造がよく見られる。節足動物は、体の前後軸に沿った繰り返しの外骨格（体節）を持つ。体節は、胚発生の過程で形成される遺伝子発現の縞パターンに基づいて作られ、（体節形成）その形成過程には節足動物の中でも多様性がある。体節形成の仕組みが最もよく研究されてきたショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）では、多核性胞胚における転写因子の濃度勾配に従って胚全体でほとんど同時に縞パターンを形成する。その他の多くの節足動物では、細胞からなる場（細胞場）における遺伝子発現の波の動態による逐次的なパターン形成が見られる。節足動物の体節形成の多様性を理解する為には細胞場における縞パターン形成の仕組みを理解することが重要であるが、非ショウジョウバエの節足動物において、その解析手法は十分に整っておらず、パターン形成の仕組みも十分には理解されていない。

これまで、オオヒメグモ（*Parasteatoda tepidariorum*）ゲノムに基づいた研究から、細胞外シグナルによって制御される遺伝子発現の波の動態によって胚全体に縞パターンが作られることが明らかとされてきた。また、ショウジョウバエでは体節形成への関与が知られていない遺伝子がオオヒメグモ胚全体での波の動態制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。このことは、節足動物の体節形成の多様性を理解する上で、モデルとする動物のゲノムを利用した方法論の重要性を示している。

本研究では、オオヒメグモの体節形成に関わる遺伝子と前後軸に沿った発現パターンを網羅的に探索することを目的に、体節形成期（Stage 7）のオオヒメグモ胚に Single-cell RNA-seq（ScRNA-seq）および Single-nucleus RNA-seq（SnRNA-seq）を適用した。ScRNA-seq の適用のために、酵素処理による細胞の単離方法を新たに確立した。得られたデータを解析した結果、ScRNA-seq、SnRNA-seq のいずれのデータにおいても、胚葉の違いを反映した UMAP プロットが得られた。また、SnRNA-seq のデータからは、実際の胚の外胚葉細胞の前後軸に沿った極性や、遺伝子発現の縞パターンを再構成できることを示した。そこで私は、SnRNA-seq の UMAP プロットを用いて、オオヒメグモゲノム上の全遺伝子に対する前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得し、軸に沿ってパターンを持つ遺伝子をプロファイルの数値に基づいて抽出する独自の手法を開発した。その結果、UMAP 上での前後軸の再構成に必要かつ十分な遺伝子セットとして 213 個の遺伝子が抽出できた。その中には、ショウジョウバエの体節形成関連遺伝子の他に、細胞外シグナル関連遺伝子、NCBI のデータベース上で uncharacterized な遺伝子も含まれていた。また、胚盤期（Late Stage 5）の SnRNA-seq データを用いて同様の解析を行うことで、本研究で開発した手法が他の発生ステージにも適用可能であることを確認できた。抽出された遺伝子セットについて、遺伝子発現プロファイルの微分値（傾き）を利用することで、遺伝子発現パターンの境界に基づいた解析を可能にした。

次に私は、体節形成過程におけるオオヒメグモ胚の細胞の状態変化を捉えることを目標に、SnRNA-seq の時系列データを取得した。胚盤期の終わりを開始点として 2 時間おきに、20 時間にわたってサンプリングを行った。1 つの卵嚢に含まれる卵の数とサンプルあたりに必要な卵の数を考慮して、3 つのグループに分けてサンプリングを行った（Series_A、Series_B、Series_C）。取得したそれぞれのデータセットに対して、UMAP プロットの作製および前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルの取得を行った。その結果、Series_A、Series_B のデータセットにおいて、前後軸に沿って動的に変化する遺伝子発現パターンが捉えられることを示した。Series_C のデータセットからは、UMAP プロット上で前後軸の極性がうまく再構成されなくなるタイミングがあることがわかった。

以上の結果は、オオヒメグモ胚を用いた SnRNA-seq によって、節足動物の体節形成における個々の細胞の状態の動的な変化をゲノムワイドに捉えられるデータリソースを提供できることを示す。本研究で確立された手法を足がかりとして、RNAi による機能解析や数理モデルの構築によって、節足動物の細胞場における縞パターン形成の仕組みの解明につながることが期待される。

＜目次＞

p.5-6 : はじめに

p.7-9 : 序論
p.10-16 : 材料と方法
p.17-31 : 結果
p.32-39 : 考察
p.39-40 : 結論
p.41-43 : 表
p.44-83 : 図およびその説明
p.84-93 : 参考文献
p.94 : 謝辞
p.95-114 : 補足資料
p.115-194 : 補足資料の図およびその説明

はじめに

脊椎動物の背骨や節足動物の体節など、動物の体には前後軸に沿った繰り返しの構造がしばしば見られる。このような繰り返しの構造は、胚発生時に生じる体の前後軸に沿った遺伝子発現の縞パターンに基づく。形成された縞パターンは動物種によらず似ているが、その形成過程は多様になりうる。表現型を維持しつつ、その形成過程を多様化させる仕組みを理解することは、脊椎動物、節足動物の共通祖先におけるパターン形成の仕組みの理解や、動物の多様性が生まれる仕組みを理解する上で非常に重要である（**Fig 1A**）。

動物の体節形成は生物の発生過程における最もよく知られた過程の 1 つで、その仕組みを解明しようとこれまでに実験・数理の両面から数多くの研究が進められてきた（Cooke and Zeeman, 1976, Meinhardt, 1986, Lacalli, 1990, Palmeirim *et al.,* 1997, Fujimoto *et al.,* 2008, Lauschke *et al.,* 2013, Cotterell *et al.,* 2015, Clark, 2017, Diaz-Cuadros *et al.,* 2020, Miao *et al.,* 2023）。

脊椎動物では、未分節中胚葉の前端から左右 1 対のブロック状にくびれ切れることで順々に繰り返しの体節（somite）を形成する。この過程では、細胞の再配置によって収斂伸長する三次元組織において、胚の後端から生じる遺伝子発現の周期的な振動が胚の前方へと波のように伝わることで遺伝子発現の縞パターンが 1 本ずつ作られる（**Fig 1A 左**）。脊椎動物の体節形成（somitogenesis）では、遺伝子発現ネットワークのネガティブフィードバックループおよび、細胞間のシグナル伝達による振動の同期が重要な役割を果たすことが示されている（Lewis, 2003, Yoshioka-Kobayashi *et al.,* 2020）。

節足動物における体節形成（segmentation）のメカニズムは、ショウジョウバエで最もよく調べられてきた（**Fig 1A 右**）。転写因子が核に直接影響できる多核性胞胚において、前後軸に沿った 7 本の繰り返しパターンがほとんど同時に形成される（Hafen *et al.,* 1984）。この過程では、母性効果因子、ギャップ遺伝子、ペアルール遺伝子、セグメントポラリティ遺伝子と呼ばれる遺伝子群が階層的なネットワークを形成することが知られている（Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Akam, 1987, Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992）。しかしながら、多くの節足動物では細胞場においてパターン形成が進むことから、ショウジョウバエの持つメカニズムは節足動物において派生的に生じたものと考えられている（Peel *et al.,* 2005）。そのため、節足動物における祖先的な体節形成の仕組みを理解し、その仕組みがどのように多様化したのか明らかにするためには、細胞場における体節形成の仕組みを理解することが必須である。これまでに、さまざまな節足動物を用いた、ショウジョウバエの体節形成遺伝子の相同遺伝子に基づいた研究が進められてきた。その結果、節足動物の細胞場では遺伝子発現が波のように振る舞うことで逐次的に体節を形成することが明らかとなった（Damen *et al.,* 2000, Stollewerk *et al.,* 2003, Dohle *et al.,* 2004, Choe *et al.,* 2006, Sarrazin *et al.,* 2012, Brena and Akam, 2013, Green and Akam, 2013, Rosenberg *et al.,* 2014）。しかしながら、従来の候補遺伝子に基づいた研究からは、ショウジョウバエ

で体節形成に関与しない遺伝子や、ショウジョウバエのゲノム上に存在しない遺伝子の関与について調べることはできない。そのため、細胞場における体節形成の仕組みを理解するためには、モデルとする動物のゲノムに基づいて研究を行うことが必要である。さらに、このようなアプローチは、特定のモデル生物の知見に依存しない形で体節形成を解析する基盤となり、他の非モデル動物との比較研究を加速させる可能性を持つと考えられる。

本研究で私は、オオヒメグモに着目して体節形成の研究を行った。オオヒメグモは、以下の点から節足動物の細胞場における体節形成の仕組みを理解する良いモデルになると考えられる。1. 研究室内での飼育が容易で年中卵を取得できる。2. 一度の産卵で 200–300 個の同期的に発生を進める卵を産む。3. ゲノムがすでに読まれている。4. 発生の初期（遅くとも 16 細胞期）に細胞化が完了しており、体節形成の全過程が細胞場で進行する。5. RNAi による機能解析が行える。6. 節足動物において最も祖先的に分岐したと考えられる鋏角類に属しており、祖先的な体節形成の仕組みを残している可能性がある。

これまで、オオヒメグモを用いた研究によって節足動物の細胞場における遺伝子発現の縞パターン形成の仕組みが明らかにされてきた。オオヒメグモ胚が円盤状の形態をとる胚盤から帯状の胚帯へと変化する過程で、胚の領域ごとに異なる動態を示す遺伝子発現の波によって胚全体に遺伝子発現の縞パターンが形成される（**Fig 1A 中央, B**; Oda *et al.,* 2007, Pechmann et al., 2009, Kanayama *et al.,* 2011, Schönauer *et al.,* 2016, Hemmi *et al.,* 2018, Akiyama-Oda and Oda, 2020）。近年、オオヒメグモを用いたゲノムワイドな解析から、*Pt-msx1* のような、ショウジョウバエでは体節形成への関与が知られていない遺伝子がオオヒメグモ胚全体での体節形成に重要な役割を果たしていることが示された（Akiyama-Oda and Oda, 2020）。しかしながら、オオヒメグモの体節形成に関わる遺伝子セットの全貌は明らかとなっておらず、遺伝子発現の波の動態における個々の細胞の状態変化は、一部の遺伝子でしか明らかとなっていない。

本研究で私は、オオヒメグモの体節形成に関与する遺伝子を網羅的に同定する手法の確立および、体節形成過程における個々の細胞の状態変化を明らかにすることを目的として、体節形成期のオオヒメグモ胚への ScRNA-seq および SnRNA-seq の適用を行った。ScRNA-seq の適用のために酵素処理による細胞の単離方法を開発した。その結果、解析可能な ScRNA-seq データを取得することができた。また、SnRNA-seq のデータから作製した UMAP プロットでは、外胚葉の細胞が胚の前後軸を反映して並び、実際の胚でみられる縞パターンまでもが再構成されることを見出した。この結果に基づいて、SnRNA-seq の UMAP プロットを用いることで、胚の前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルの取得およびプロファイルを用いた数値的な解析手法を独自に開発したことを報告する。また、体節形成過程における個々の細胞の状態変化を捉えるために、胚盤期から体節形成期までの時系列データを取得した。取得したデータに対して、本研究で新たに確立した解析手法を適用することで、前後軸に沿った遺伝子発現の動的な変化を捉えられることを発見した。

序論

節足動物は、体の前後軸に沿った繰り返しの体節を共有する。体節は、胚発生過程で生じる前後軸に沿った遺伝子発現の縞パターンに基づいている。形成された遺伝子発現の縞パターンは種を超えて似ているが、その形成過程は多様である（Peel *et al.,* 2005, Clark *et al.,* 2019）。これまで、ショウジョウバエを用いた遺伝学的研究によって体節形成に関わる遺伝子が包括的に特定され、節足動物の体節形成の仕組みを理解する基盤が整えられてきた（Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Akam, 1987, Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992）。その後、ショウジョウバエで体節形成に関わる遺伝子の相同遺伝子に注目することで、様々な節足動物で体節形成の仕組みが調べられてきた（Damen *et al.,* 2000, Stollewerk *et al.,* 2003, Choe *et al.,* 2006, Green and Akam, 2013, Rosenberg *et al.,* 2014）。その結果、種によって体節形成の仕組みに多様性が存在することが明らかになった。また、節足動物のゲノム解析から、ゲノム中に含まれる遺伝子セットも多様性を示すことがわかってきた（Thomas *et al.,* 2020, Hakeemi *et al.,* 2022, Aase-Remedios, 2023, Sharma, 2023, Cheatle Jarvela and Wexler, 2023）。しかしながら、節足動物における体節形成の仕組みがどのように多様化したのかは明らかとなっていない。

これまで、ショウジョウバエと比較可能なパターン形成の新たなモデル動物として、オオヒメグモを用いた研究が進められてきた。ショウジョウバエ胚では、多核性胞胚において転写因子である Bicoid が胚全体の前後軸の極性の形成に必須の役割を果たすのに対して、オオヒメグモ胚では円盤状の細胞場（胚盤）において、細胞間シグナル分子である Hedgehog が胚全体の前後軸の極性形成を司る（Driever and Nüsslein-Volhard, 1988, Driever *et al.,* 1989, Kanayama *et al.,* 2010, Akiyama-Oda and Oda, 2010, Pechmann, 2016）。縞パターン形成過程では、領域によって異なるギャップ遺伝子の濃度・組み合わせに応じて全体がほぼ同時にパターン化されるショウジョウバエ胚に対して、オオヒメグモ胚では、遺伝子発現の波の動態によって徐々にパターン化が進む。オオヒメグモ胚で見られるような遺伝子発現の波によるパターン形成は節足動物の体節形成における祖先的な仕組みと考えられており、注目されている。オオヒメグモ胚をパターン化する遺伝子発現の波の動態は胚の領域ごとに異なっており、頭部では、1 本の遺伝子発現の縞が前後軸方向に 2 本に分裂することで縞パターンを形成する（bi-splitting）。胸部では、1 本の遺伝子発現の縞が前後軸方向に同時に 3 本に分裂する（tri-splitting）。後体部では、胚の後端から周期的に生じる遺伝子発現の振動が前方に波のように伝わることで縞パターンを 1 本ずつ形成する（**Fig 1A 中央, B**; Oda *et al.,* 2007, Pechmann *et al.,* 2009, Kanayama *et al.,* 2011, Schönauer *et al.,* 2016, Hemmi *et al.,* 2018, Akiyama-Oda and Oda, 2020）。オオヒメグモは、全ゲノムが解読されていること、RNAi などの実験手法が確立されていること、数理モデルの発達といった観点から、節足動物の細胞場におけるパターン形成の仕組みを理解する非常によいモデルとなると考えられている（Hilbrant *et al.,* 2012, Posnien *et al.,* 2014, Schwager *et*

al., 2017, Oda and Akiyama-Oda, 2020, Fujiwara *et al.,* 2022)。

オオヒメグモ胚における縞パターン形成過程では、収斂伸長する細胞場で、個々の細胞の遺伝子発現の状態が変化することでパターンが発展すること（Kanayama *et al.,* 2011)、ショウジョウバエでは体節形成に関与しない遺伝子がパターン形成の重要な因子として働いていることから（Akiyama-Oda and Oda, 2020)、個々の細胞における遺伝子発現の状態の時間変化をゲノムワイドに解析することがメカニズムの解明に必要である。

ScRNA-seq および SnRNA-seq は個々の細胞の状態をゲノムワイドに定量的にバイアスのない形で取得できることから、動物の発生における細胞分化の過程を捉える強力な手法として利用されてきた（Briggs *et al.,* 2018, Wagner *et al.,* 2018, Farrell *et al.,* 2018, Pijuan-Sala *et al.,* 2019, Mittnenzweig *et al.,* 2021, Albright *et al.,* 2022, Calderon *et al.,* 2022, Sakaguchi *et al.,* 2023, Sun *et al.,* 2023, Qiu *et al.,* 2024)。また、これまでに ScRNA-seq の定量データと蛍光 in Situ Hybridization（FISH）で得られる遺伝子発現の空間パターンを統合してゲノムワイドに遺伝子発現の空間パターンを再構成する手法が発達してきたが、ゲノムワイドな定量データと胚空間とを対応させる試みは未だ難しい（Karaiskos *et al.,* 2017, Nitzan *et al.,* 2019, Okochi *et al.,* 2021, Liu *et al.,* 2022, Sakaguchi *et al.,* 2023, Vahid *et al.,* 2023)。

近年、オオヒメグモ胚を用いた ScRNA-seq および SnRNA-seq 解析が私の所属研究室を含めた複数のグループから報告されてきた（Akiyama-Oda *et al.,* 2022, Leite *et al.,* 2024, Medina-Jiménez *et al.,* 2024)。興味深いことに、胚盤期のオオヒメグモ胚を用いた研究では、少数の兄弟胚から取得したデータから作製した UMAP プロット上で、外胚葉の細胞が実際の胚盤における縁-中央の極性（将来の前後軸の極性に対応する）を反映して並ぶ様子が見られた（Akiyama-Oda *et al.,* 2022)。これらの結果から、オオヒメグモ胚を用いた ScRNA-seq、SnRNA-seq のデータ解析が胚の前後軸に沿った遺伝子発現のパターン形成の仕組みをゲノムワイドに定量的に解析する機会を提供する可能性を持つと考えられる。

私は、本研究で ScRNA-seq および SnRNA-seq を縞パターン形成期のオオヒメグモ胚に適用した。その結果、ScRNA-seq、SnRNA-seq ともに解析に十分なデータを取得することができた。また、SnRNA-seq で得られたデータから作製した UMAP プロット上では、外胚葉の細胞が実際の胚における前後軸の極性を反映して並ぶ様子が見られ、遺伝子発現の縞パターンまでもが再構成されていることを見出した。そこで私は、UMAP プロット上で再構成された前後軸のパターンを利用して、前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルをゲノムワイドに取得する独自の方法を確立した。また、取得した遺伝子発現プロファイルを用いた階層的クラスタリングによって、数値の情報のみから前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の抽出を行い、213 個の遺伝子からなる、コンピュータ上で前後軸の極性を再構成するのに必要かつ十分な遺伝子セットを抽出した。続いて、抽出した遺伝子セットを用いてオオヒメグモ胚全体でのパターンを解析する手法を確立した。

次に私は、オオヒメグモの体節形成における個々の細胞の状態変化を捉えることを目的

として、SnRNA-seq の時系列データの取得を行った。卵嚢に含まれる卵の数を考慮して 3 つに分割してデータセットを取得した。

また、SnRNA-seq のデータでは、クラスタリング解析によって中胚葉および内胚葉の細胞集団が複数のサブクラスターに分かれた。マーカー遺伝子に対する FISH を行った結果、これまで報告になかった細胞の状態の多様性を見出したので、本研究で報告する。

材料と方法

オオヒメグモの飼育及び卵の取り扱い

本研究では、25℃のインキュベータ内で明16時間、暗8時間のサイクルで継代飼育したオオヒメグモを使用した。オオヒメグモ胚の発生ステージについては、先行研究に従った（Akiyama-Oda and Oda, 2003）。1つの卵嚢から8~16個の兄弟胚をハロカーボンオイル（Sigma-Aldrich）で満たしたテラサキプレートに移し、実体顕微鏡を用いた観察からステージングを行った。Stage 7 の胚は、Late Stage 5（クムルスが胚盤の縁に到着した時点）から13時間後にサンプリングした。細胞および細胞核の単離、胚の固定において、1つの卵嚢から20-120個の卵を取り出し、漂白剤で卵殻を除去した。典型的な発生段階の卵を選択するために、取り出した卵の半分を目視での形態観察に基づいて排除した。データの信頼性を担保するために、本研究では全てのサンプリングの翌日に兄弟胚を観察し、正常に発生が進んでいることを確認した。

細胞・細胞核の単離

オオヒメグモの卵殻は、市販の漂白剤1 mL中で4分間静置することで取り除いた。蒸留水で5回洗浄したのち、CGBS-CMF（Chan and Gehring buffered saline, Ca^{2+} and Mg^{2+} Free: 55 mM NaCl, 40 mM KCl, 10 mM Tricine, pH 6.95; Chan and Gehring, 1971）に置換した。細胞の単離には 0.01%、細胞核の単離には 0.5%のウシ血清アルブミン（BSA: Nacalai Tesque, 01278-44）を添加した。受精膜はピンセットを用いて剥がした。本研究では、最大で20個のオオヒメグモ胚からサンプルの調整を行ったが、いずれのサンプルでも、10分以内に受精膜の除去を終えた。細胞の単離では、受精膜を取り除いたオオヒメグモ胚は1.0 mg/mL のエラスターゼ（Worthington）を含む CGBS-CMF に移し、室温で 5 分間静置した。その後、短時間の遠心処理によって 70 μm のセルストレイナー（pluriStrainer-Mini, 43-10070）を1回、10 μm のセルストレイナー（pluriStrainer-Mini, 43-10010）を2回通すことで、細胞懸濁液を低吸着チューブ（Eppendorf, 022431021）に回収した。エラスターゼの反応を停止させるために、BSA を最終濃度 1.0%になるように加えた。細胞核の単離は先行研究に従って進めた（Akiyama-Oda *et al.,* 2022）。受精膜を取り除いたオオヒメグモ胚は homogenization buffer[250 mM Sucrose, 10 mM Tris（pH8.0）, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton-X100, 0.1 mM DTT, 100 U/mL RNase Inhibitor（SUPERaseIn RNase Inhibitor: Invitrogen, AM2694）, 1.0% protease Inhibitor（ナカライテスク, 25955-11）]内でプラスチック棒（Fisher scientific, 12-141-368）を用いてホモゲナイズした（McLaughlin *et al.,* 2021）。懸濁液を遠心し、沈殿した細胞核を 0.5% BSA 及び 100 U/mL の RNase Inhibitor を含んだ CGBS-CMF で懸濁し、40 μm のセルストレイナー（pluriStrainer-Mini, 43-10040）を通した。単離した細胞及び細胞核は、懸濁液に CellCover（Anacyte Laboratories, 800-050）を5倍量加えることで固定し、使用まで4 ℃

で保存した。続いて、同じ卵嚢から取得したオオヒメグモ胚を固定して、FISH による染色に用いた。

ライブラリ作製およびシーケンシング

ScRNA-seq 及び SnRNA-seq のライブラリ作製には BD Rhapsody WTA amplification kit（BD Biosciences, 665915）を使用した。製品のプロトコルに以下の変更を加えた。ScRNA-seq では、冷蔵で保存していたサンプルは遠心したのちに、0.01%の BSA を含む 0.5×CGBS-CMF で懸濁した。また、細胞懸濁液をカートリッジに流し込む前に、カートリッジを 0.5×CGBS-CMF でリンスした。SnRNA-seq では、Sample バッファーに 100 U/mL の RNase Inhibitor を加え、0.5 mg/mL の Proteinase K を Lysis バッファーに加えた。また、カートリッジ上での細胞核の Lysis のステップを 2 分から 5 分に伸ばした。シーケンシングは Illumina 社の HiSeqX を用いて 150-bp の pair-end で行った。ScRNA-seq では 435,917,554 のリードが、SnRNA-seq では 485,625,106 のリードが得られた。得られたデータは Gene Expression Omnibus にデポジットした（GSE287446）。

遺伝子発現マトリクスの作製

シーケンシングによって得られたリードは Seven Bridges クラウドプラットフォーム上で BD Rhapsody WTA pipeline を用いてオオヒメグモゲノムにマッピングした（Tzani *et al.,* 2021, Akiyama-Oda *et al.,* 2022）。固有の細胞及び分子は R1 リードから特定された。R2 リードは STAR-2.5.2b（Dobin *et al.,* 2013）によって作製された STAR index を用いてオオヒメグモゲノム GCF_000365465.3_Ptep_3.0（Schwager *et al.,* 2017）上にマッピングされた。SnRNA-seq のデータのマッピングに際して、GCF_000365465.3_Ptep_3.0 のアノテーションファイルはエクソンだけでなくイントロンにマッピングされたリードについてもカウントするように変更を加えた。

データの解析環境

R による解析は、以下の環境で行った。

R version 4.2.1 (2022-06-23)
Platform: x86_64-apple-darwin17.0 (64-bit)
Running under: macOS Monterey 12.5

Matrix products: default
LAPACK: /Library/Frameworks/R.framework/Versions/4.2/Resources/lib/libRlapack.dylib

locale:

[1] ja_JP.UTF-8/ja_JP.UTF-8/ja_JP.UTF-8/C/ja_JP.UTF-8/ja_JP.UTF-8

attached base packages:
[1]stats graphics grDevices utils datasets methods base

other attached packages:
[1] dplyr_1.0.9 viridisLite_0.4.1 ggdendro_0.1.23 tidyr_1.2.0
[5] patchwork_1.1.2 cowplot_1.1.1 ggplot2_3.4.2 reshape2_1.4.4
[9] sp_1.5-0 SeuratObject_4.1.1 Seurat_4.1.1

loaded via a namespace (and not attached):
[1] nlme_3.1-157 matrixStats_0.62.0 spatstat.sparse_2.1-1
[4] RcppAnnoy_0.0.19 RColorBrewer_1.1-3 httr_1.4.4
[7] sctransform_0.3.4 tools_4.2.1 utf8_1.2.2
[10] rgdal_1.5-32 R6_2.5.1 irlba_2.3.5
[13] rpart_4.1.16 KernSmooth_2.23-20 DBI_1.1.3
[16] uwot_0.1.14 mgcv_1.8-40 rgeos_0.5-9
[19] lazyeval_0.2.2 colorspace_2.0-3 withr_2.5.0
[22] tidyselect_1.1.2 gridExtra_2.3 compiler_4.2.1
[25] progressr_0.10.1 cli_3.6.1 plotly_4.10.0
[28] scales_1.2.1 lmtest_0.9-40 spatstat.data_2.2-0
[31] ggridges_0.5.3 pbapply_1.5-0 goftest_1.2-3
[34] stringr_1.4.1 digest_0.6.29 spatstat.utils_2.3-1
[37] pkgconfig_2.0.3 htmltools_0.5.3 parallelly_1.32.1
[40] fastmap_1.1.0 htmlwidgets_1.5.4 rlang_1.1.1
[43] shiny_1.7.2 generics_0.1.3 zoo_1.8-10
[46] jsonlite_1.8.0 spatstat.random_2.2-0 ica_1.0-3
[49] magrittr_2.0.3 Matrix_1.5-3 Rcpp_1.0.9
[52] munsell_0.5.0 fansi_1.0.3 abind_1.4-5
[55] reticulate_1.25 lifecycle_1.0.3 stringi_1.7.8
[58] MASS_7.3-57 Rtsne_0.16 plyr_1.8.7
[61] grid_4.2.1 parallel_4.2.1 listenv_0.8.0
[64] promises_1.2.0.1 ggrepel_0.9.1 deldir_1.0-6
[67] miniUI_0.1.1.1 lattice_0.20-45 splines_4.2.1
[70] tensor_1.5 pillar_1.8.1 igraph_1.3.4
[73] spatstat.geom_2.4-0 future.apply_1.9.0 codetools_0.2-18

[76] leiden_0.4.2 glue_1.6.2 data.table_1.14.2
[79] png_0.1-7 vctrs_0.6.3 httpuv_1.6.5
[82] polyclip_1.10-0 gtable_0.3.0 RANN_2.6.1
[85] purrr_0.3.4 spatstat.core_2.4-4 scattermore_0.8
[88] future_1.27.0 mime_0.12 xtable_1.8-4
[91] later_1.3.0 survival_3.3-1 tibble_3.1.8
[94] cluster_2.1.3 globals_0.16.0 fitdistrplus_1.1-8
[97] ellipsis_0.3.2 ROCR_1.0-11

Seurat を用いた遺伝子発現マトリックスの解析前処理およびクラスタリング解析

本研究では、R のパッケージである Seurat (v.4.1.1; Satija *et al.,* 2015, Hao *et al.,* 2021)を用いてデータの解析を行った。状態の悪い細胞・細胞核やダブレットの可能性があるデータを除去するために、細胞・細胞核内で発現している遺伝子数及び mRNA のカウント数に基づいて解析に使用する細胞に足切りを行った。ScRNA-seq では発現している遺伝子数が 1,500 以上かつ mRNA のカウント数が 20,000 以下の細胞、Stage 7 の SnRNA-seq では発現している遺伝子数が 2,000 以上かつ mRNA のカウント数が 20,000 以下の細胞核を、Late Stage 5 の SnRNA-seq では発現している遺伝子数が 1,500 以上かつ mRNA のカウント数が 15,000 以下の細胞核を解析に使用した。

Seurat のチュートリアル（https://satijalab.org/seurat/）に従い、以下の手順でクラスタリング解析を行った。

1. Normalize 関数を用いて遺伝子発現量の対数正規化を行った。
2. FindVariableFeatures 関数によって細胞間で発現量の分散が大きい遺伝子を 2,000 個抽出した。
3. この 2,000 個の遺伝子の発現量に基づいて、RunPCA 関数による主成分分析を行い、50 次元まで線型的に次元を削減した。
4. 50 次元のデータに対して UMAP による非線形の次元削減を行い、UMAP プロット上に細胞・細胞核をプロットした。
5. FindNeighbors 関数及び FindClusters 関数を用いることで、個々の細胞・細胞核における遺伝子発現の状態をもとにクラスタリング解析を行った。

UMAP 上での遺伝子発現パターンの出力

UMAP 上での個々の遺伝子の発現パターンは FeaturePlot 関数を用いて可視化した。複数遺伝子の発現パターンを可視化するために、feature プロットを gray75 から black の色範囲で出力した後、ImageJ（Fiji, ver. 2.9.0/1.53t）を用いて画像の色を反転させたのち、RGB カラーで重ね合わせた。

クラスターのマーカー遺伝子の検出

各クラスターのマーカー遺伝子は FindMarkers 関数を用いて検出した。あるクラスター内で発現する細胞の割合は 25%以上かつ、それ以外の全クラスターで発現する細胞の割合が90%以下となる遺伝子のうち、adjusted *p*-values が 0.001 未満のものを選択した。

UMAP プロットの線型化

Stage 7 の SnRNA-seq のデータから作製した UMAP プロットを線型化する軸を作製するために、外胚葉クラスター（**Fig 2D**, クラスター0, 1, 2, 4, 5）に属する 4,129 個の細胞核の位置座標をもとに ggplot2 パッケージ（v.3.4.2）の geom_density_2d 関数を用いて等高線を作製した。頭尾の端を決めるために、*Pt-six3-1* 及び *Pt-prd2* を発現する細胞の位置情報に基づいて等高線を追加で作製した。Python（v.3.8.3）のプログラムを用いて、*Pt-six3-1* の等高線の頂点から *Pt-prd2* の等高線の頂点まで、外胚葉の細胞から作製した等高線の稜線を通るようにいくつかの点を手動でプロットした。頭尾の端の点周辺の細胞を正確に軸にマッピングするために、プロットした点の端の延長上に 2 点追加で点をプロットした。プロットした点をもとに R（v.4.2.1）の xspline 関数を用いてスプライン曲線でのフィッティングを行い、UMAP プロット上で再構築された前後軸を反映する軸を取得した。

UMAP プロット上の細胞の、線型化の軸に沿った座標を取得するために、線型化の軸を等間隔に並ぶ 10,000 個の点で表現した。Python の Numpy（v.1.22.4）を用いて、各細胞とこれらの 10,000 個の間の距離を全て計算した。それぞれの細胞と点との距離が最も近くなる組み合わせを選び、細胞を軸上にマッピングした。軸の前端からの距離を軸に沿った座標とした。前後の端の点よりも前方・後方に存在する細胞はその後の解析から除外した。

Late Stage 5 の SnRNA-seq データについても同様の解析を行った。UMAP プロットは dimension 1:45、resolution 0.5 で作製し、クラスター0, 1, 2, 3, 5, 6 に属する 4,230 個の細胞の座標値をもとに等高線を作製した（**Fig 14D**）。前後の端は、*Pt-twist* と *Pt-aslH* の発現に基づいて決めた。前端の細胞で *Pt-twist* を発現していない細胞は除外して解析を進めた。

遺伝子の発現プロファイルの取得

線型化の軸から 0.3 以内の距離に存在する細胞(Stage 7：1,387 細胞、Late Stage 5：1,138 細胞)での遺伝子発現量をスムージングすることで、軸に沿った遺伝子発現プロファイルを作製した。前後の端付近での、細胞数が少ないことによるスムージングへの影響を考慮して、線型化 UMAP プロットの前半分・後半分をそれぞれ前後の端を境に折り返すことで、2 倍の長さの線型化 UMAP プロットを作製した。スムージングは ggplot2 の geom_smooth 関数を用いて、手法を”Loess”、span を 0.05 に設定して実行し、ゲノム上の全遺伝子に対する、前後軸に沿った 160 個の点からなる遺伝子発現プロファイルが得られた。41 番目から 120 番目までの 80 個の点を胚 1 つ分の発現プロファイルとして下流の解析に用いた。

軸に沿って特徴的なパターンを持つ遺伝子の抽出

はじめに、線型化 UMAP 上で検出された 16,969 遺伝子のうち、まばらにしか発現していない遺伝子を除外した。それぞれの遺伝子について、発現している細胞間の軸上での距離を計算し、その最小値をもとに遺伝子間のユークリッド距離を算出した。その後、R の ward.D2 法を用いて階層的クラスタリング解析を行い、2 つのクラスターに分けた。一方のクラスター（946 遺伝子）では、わずかな細胞でのみ発現が見られたことから、この遺伝子セットを除いた 16,023 遺伝子についての発現プロファイルを用いて解析を進めた。それぞれの発現プロファイルについて、プロファイルを構成する 80 個の点における発現量の平均値と、最大値と最小値の差の値を算出した。次に、得られた 2 つの値を用いて遺伝子間のユークリッド距離を求め、階層的クラスタリングを 2 回繰り返し行った。得られたクラスターのうち、平均値が低く差の値が大きいものを選ぶことで、Stage 7 では、213 遺伝子が抽出された。Late Stage 5 のデータについても同様の解析を行った。線型化 UMAP プロット上で検出された 16,210 遺伝子から、1,149 遺伝子を除いた 15,061 遺伝子に対して階層的クラスタリング解析を行い、264 遺伝子が抽出された。

抽出した遺伝子を用いた UMAP プロットの作製

Stage 7 の SnRNA-seq における対数正規化後の発現マトリクスを 2 つに分割して解析を行った。片方は階層的クラスタリングによって抽出された 213 遺伝子の、外胚葉クラスターの 4,102 細胞における発現マトリクスで、もう片方は 213 遺伝子以外の 19,479 遺伝子の外胚葉クラスターの 4,102 細胞における発現マトリクスである。Late Stage 5 についても同様にして、4,230 細胞に対する 264 遺伝子の発現マトリクスと、4,230 細胞に対する 18,835 遺伝子の発現マトリクスに分割した。分割された各マトリクスを用いて、Seurat の解析手順に従い UMAP プロットを作製した。除外した遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを表示するために、マトリクス上の細胞 ID に基づいて、元の発現マトリクスにおいて一致する細胞での発現量を抽出した。

遺伝子発現量のランダム化実験

特定のクラスター内で 213 遺伝子の発現をランダム化する実験は以下の手順で進めた。まず、ランダム化するクラスターの細胞核の数と同じだけの乱数を R の sample 関数で生成した。遺伝子ごとに異なる組み合わせでランダム化するために、乱数の生成はランダム化する遺伝子の数（213 遺伝子）だけ繰り返し行った。生成した乱数に従ってカウントマトリックス上で 213 遺伝子それぞれについて発現する細胞を入れ替えた。コントロールの実験では、細胞間での発現のばらつきの大きい 2,000 遺伝子のうち、抽出された 213 遺伝子重複しないものから 213 個の遺伝子を、sample 関数を用いてランダムに選び、発現する細胞を入れ替えた。コントロール実験は 3 回繰り返し行った。ランダム化する細胞の割合を変化させる実験では、クラスター5 に属する細胞核において、ランダム化する細胞の割合を

10-90%まで変化させた。ランダム化したカウントマトリクスを用いて UMAP プロットを作製した。

軸に沿った遺伝子発現プロファイルの傾きを用いた解析

80 個の点から構成される遺伝子発現プロファイルの各点における傾きは、2 番目から 79 番目までの点では、隣接する 2 点との間での発現量の差の平均値を用い、1 番目と 80 番目の点では、隣接する 1 点との間での発現量の差の値を用いた。傾きの値を用いた相関行列は R の cor 関数を用いてピアソンの積率相関係数を算出した。

蛍光 in Situ Hybridization（FISH）

胚の固定および FISH は先行研究に従った（Akiyama-Oda and Oda, 2016）。DIG、DNP、FITC で標識された RNA プローブを使用し、抗-DIG-POD（1/1000 希釈、Roche 11 207 733 910）、抗-DNP-HRP（1/200 希釈、PerkinElmer FP1129）、抗-FITC-HRP（1/200 希釈、PerkinElmer NEF710）抗体を利用し、5-(and-6)-カルボキシフルオルセインおよび DyLight680 を用いて検出した。全てのサンプルは 4, 6-diamidino-2-phenylindole（DAPI; Sigma-Aldrich）を用いて DNA を標識した。染色した胚はスライドガラスにマウントし、TCS SPE 共焦点顕微鏡（Leica）を用いて観察した。取得した画像は Fiji（ver. 2.14.0/1.54.f.）を用いて処理した。Z-セクションは Max projection によって重ね合わせた。

結果

1. 体節形成期のオオヒメグモ胚を用いたシングルセルトランスクリプトームデータの取得

本研究ではまず、体節形成期（Stage 7, 51h after egg laying）のオオヒメグモ胚を用いたScRNA-seq および SnRNA-seq のデータ取得を行った。cDNA ライブラリは BD Rhapsody のプラットフォームを用いて作製した。このプラットフォームでは、200,000 個の仕切りを持つウェルに一定の流速で細胞を流し込むことで、20,000 個までの細胞であれば理論上ダブレットの出現を抑えられ、単一細胞の遺伝子発現データを網羅的、定量的かつバイアスなく取得できる。ScRNA-seq では 15 個、SnRNA-seq では 20 個のオオヒメグモ兄弟胚から cDNA ライブラリを作製し、HiSeqX を用いてシーケンスデータを取得した（**Fig 2B**）。ScRNA-seq のサンプリングに際して、Late Stage 5 のオオヒメグモ胚では、セルストレイナーを通すだけで細胞が単離されたが、Stage 7 では細胞間の接着の強さが変化するためかセルストレイナーを通すだけでは不十分であった。そのため、Stage 7 のオオヒメグモ胚から細胞を単離するために、酵素処理を用いた手法を開発した。Ca^{2+}、Mg^{2+}を含まないCGBS（Chan and Gehring, 1971）に 1 mg/mL のエラスターゼを溶かし、室温で 5 分反応させ、セルストレイナーに通すことで細胞を単離し、cDNA ライブラリの作製を行った。ScRNA-seq の cDNA ライブラリからは、435,917,554 リードがシーケンスされた。これらのリードをオオヒメグモゲノムのエキソンにマッピングしたところ、1,017 個の細胞に対する 16,864 遺伝子の発現マトリクスが得られた。また、SnRNA-seq の cDNA ライブラリからは 485,625,106 リードがシーケンスされ、8,421 個の細胞核に対する 21,464 遺伝子の発現マトリクスが得られた。核内にはスプライシングを受けていない未成熟な mRNA も存在することから、SnRNA-seq ではエキソン及びイントロンにマッピングすることで発現マトリクスを取得した。

サンプリングと同時に固定した兄弟胚を用いて、*Pt-hh* 及び *Pt-msx1* に対するプローブで FISH を行ったところ、ScRNA-seq、SnRNA-seq のどちらの兄弟胚においても遺伝子発現の縞パターンが確認できた（**Fig 3**）。頭部で見られる *Pt-hh* の bi-splitting のパターンから、ScRNA-seq では SnRNA-seq と比べて若干早い発生段階の胚を使用していることがわかった。

また、本研究では、以前の研究（Akiyama-Oda *et al.,* 2022）で報告していた胚盤期（Late Stage 5）の SnRNA-seq データの再解析を行うことで、Stage 7 のデータとの比較解析を行った。

2. シングルセルトランスクリプトームのデータの解析前処理

シングルセルトランスクリプトーム解析で得られたデータには、逆転写反応がうまくかからなかった細胞（核）やダブレットが含まれている可能性がある。そこで、個々の細胞（核）あたりの mRNA の種数および分子数に閾値を設け、データの前処理を行った。Stage

7 の ScRNA-seq では mRNA を 1,500 種類以上発現し、分子数が 20,000 以下の細胞を、Stage 7 の SnRNA-seq では mRNA を 2,000 種類以上発現し、分子数が 20,000 以下の細胞核を解析に用いた。Late Stage 5 の SnRNA-seq では mRNA を 1,500 種類以上発現し、分子数が 15,000 以下の細胞核を解析に用いた。前処理の結果、Stage 7 の ScRNA-seq では865個の細胞に対する13,766遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で2,553種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 9,988 個であった。Stage 7 の SnRNA-seq では、6,239 個の細胞核に対する 19,692 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞核あたり平均で 3,456 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 11,020 個であった。Late Stege 5 の SnRNA-seq では、4,820 細胞に対する 19,099 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたりで検出された遺伝子数の平均は 2,558 で、分子数の平均は 5,561 であった（Table 1）。

3. UMAP に基づいた遺伝子発現マトリクスの特徴の探索

次に、得られた遺伝子発現マトリクスが持つ特徴を調べるために、UMAP（Uniform Manifold Approximation and Projection）による次元削減およびクラスタリング解析を行った。解析には R のパッケージである Seurat (ver.4.1.1, Satija *et al.,* 2015, Hao *et al.,* 2021) を使用した。Seurat による次元削減は以下の手順で実行した。1. 個々の細胞内での遺伝子発現量の総和を 10,000 に合わせ、自然対数をとることで正規化を行った。2. 細胞間で発現量のばらつきの大きい順に遺伝子を 2,000 個リストアップした。3. リストアップされた遺伝子の発現量をもとに主成分分析（PCA: Principal Component Analysis）を行い、線型的に 50 次元まで圧縮した。4. PCA で得られた 50 次元のデータを UMAP によって 2 次元に圧縮し、出力した。まず、Late Stage 5 の SnRNA-seq 、Stage 7 の ScRNA-seq、SnRNA-seq それぞれのデータから UMAP プロットの作製とクラスタリング解析を行った。その結果、Late Stage 5 の SnRNA-seq では、11 個のクラスターからなる 1 つの大きな細胞集団と、3 つのクラスターからなる小さな細胞集団に分かれた（Fig 2C 左）。Stage 7 の ScRNA-seq では 3 個のクラスターからなる大きな細胞集団と、3 つの個別のクラスターに分かれた（Fig 2E 左）。Stage 7 の SnRNA-seq では 5 個のクラスターからなる大きな細胞集団と、5 つの個別のクラスターに分かれた（Fig 2D 左）。Late Stage 5 の SnRNA-seq のクラスター9 及び Stage 7 の SnRNA-seq のクラスター3 に属する細胞では mRNA の種数・分子数ともに他のクラスターより明らかに少なかったことから、このクラスターには状態の悪い細胞核が多く集められていると判断し、その後の解析の対象から外した（Fig 2F, G）。Stage 7 の ScRNA-seq ではそのようなクラスターは現れなかった（Fig 2H）。

次に、これらのクラスターがオオヒメグモ胚のどの細胞種と対応しているのか調べるために、既知のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを確認した。内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08*（LOC107451427）の発現パターンを調べたところ、Late Stage 5 の SnRNA-seq ではクラスター11, 12, 13 で発現が見られた（Fig 2C 中央）。Stage 7 の

ScRNA-seq ではクラスター5 で、SnRNA-seq ではクラスター7 及び 9 で発現が見られた**（Fig 2D, E 中央）**。また、中胚葉マーカーの *Pt-twist*（LOC107440133）についても同様に調べたところ、Late Stage 5 の SnRNA-seq ではクラスター7 で、Stage 7 の ScRNA-seq 及び SnRNA-seq ではそれぞれクラスター3、4 及びクラスター6、8 で発現が見られた**（Fig 2C-E 中央）**。続けて、外胚葉で領域特異的に発現する既知の遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを調べた。胚盤において同心円状に発現する *Pt-otd*（LOC107457189）、*Pt-rho*（LOC107438948）、及び *Pt-AP2-A*（LOC107452006）の UMAP プロット上での発現を調べたところ、先行研究と同様、胚盤における縁から中央の極性を反映して並ぶ様子が見られた**（Fig 2C 右、**Akiyama-Oda *et al.,* 2022**）**。次に、体節形成期のオオヒメグモ胚頭部で発現する *Pt-otd*、胸部で発現する *Pt-gas1*（LOC107438015）、後体部で発現する *Pt-AP2-A* の発現パターンを調べたところ、ScRNA-seq、SnRNA-seq いずれの UMAP プロットにおいても大きな細胞集団において発現が見られた**（Fig 2D, E 右）**。また、これらの遺伝子の UMAP プロット上でのパターンは実際の胚における頭部、胸部、後体部の並びと一致していた。これらの結果から、Stage 7 の ScRNA-seq、SnRNA-seq いずれのデータにおいても胚葉の違いが検出できていること、外胚葉クラスターにおいて、実際の胚における領域の並びが再構成されていることがわかった。

次に、ここまでの結果が特定の条件でのみ得られるものでないことを確かめるために、複数の dimension パラメータで UMAP プロットを作製した。Dimension パラメータは、PCA で得られた 50 の主成分のうちのどれを UMAP による次元削減に使用するかを決めるものである。私は、第 1-5 主成分、第 1-10 主成分、第 1-15 主成分、第 1-20 主成分、第 1-30 主成分、第 1-40 主成分までを使用した UMAP プロットをそれぞれ作製し、先に使用したマーカー遺伝子の発現パターンを調べた。その結果、第 1-5 主成分の情報から作製した UMAP プロットでは内胚葉、中胚葉、外胚葉は分離されたものの、外胚葉における領域特異的な遺伝子の発現パターンは実際の胚での並びと一致しなかった。しかしながら、それ以外の条件で作製した UMAP プロットでは一貫して胚葉の分離と外胚葉における頭部、胸部、後体部の並びが再現されていたことから、今回得られた結果は Stage 7 のデータの持つ普遍的な特徴であると結論づけた**（Fig 4）**。

SnRNA-seq の UMAP プロットでは、外胚葉を構成するクラスターが一定の方向性を持って並ぶ様子が、異なる dimension パラメータにおいても一貫して見られた**（Fig 2D、4 左）**。私は、Stage 7 の SnRNA-seq データでは外胚葉細胞の状態が方向性を持って多様化しているのではないかと考え、UMAP プロット作製時の resolution パラメータを変化させることで外胚葉クラスターが細分化される様子を調べた。パラメータを 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 3.3 と変化させた結果、ScRNA-seq、SnRNA-seq いずれのデータにおいても、resolution の増加に伴って外胚葉クラスターが細分化される様子が見られた**（Fig 2D 左、2I、5A）**。SnRNA-seq の外胚葉クラスターは、resolution のパラメータの増加に従って、一定の方向に 3, 5, 8, 11, 13 個と細分化された。一方で、ScRNA-seq の外胚葉クラスターはパラメータ

の変化に従って細分化されるものの明瞭な方向性は見られなかった。

ScRNA-seq と SnRNA-seq との間で外胚葉クラスターの並び方に違いが生じた原因として、解析に使用した細胞数の違いが考えられる。そこで私は、SnRNA-seq の細胞数を ScRNA-seq と同じになるまでランダムに減らして UMAP プロットを作製した。同じ試行を 10 回繰り返し、UMAP プロット上でマーカー遺伝子の発現パターンを調べた。その結果、10 回の試行のうち 7 回で、外胚葉クラスターが前後軸に沿って細分化される様子が見られた（**Fig 6、Trial 1-6, 8**）。しかしながら、今回の結果からは ScRNA-seq と SnRNA-seq での外胚葉クラスターの並び方の違いがサンプルサイズに起因しているのかそれとも細胞核と細胞質での転写産物の状態の違いを反映しているのか判断することはできなかった。

4. UMAP プロット上での前後軸極性の再構成

Stage 7 の SnRNA-seq の UMAP プロットにおいて、外胚葉クラスターが方向性を持って細分化されたことは、何らかの極性を反映して細胞の状態が段階的に変化していることを示唆する。Stage 7 のオオヒメグモ胚では、前後軸方向には複雑な遺伝子発現の繰り返しパターンが見られるが、背腹軸方向にはあまり複雑化していない。そこで私は、外胚葉クラスターの細胞が実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいるのではないかと考え、解析を進めた。UMAP プロット上での外胚葉クラスターの数と実際の胚での遺伝子発現パターンを考慮して、resolution のパラメータ 2.5 で作製した UMAP プロットを以降の解析に用いた（**Fig 7A**）。Seurat の FindMarker 関数を用いてそれぞれのクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子を検出し、上位 10 個の遺伝子について、個々の細胞における発現量をヒートマップに出力した（**Fig 7C**）。外胚葉クラスターを特徴づけるマーカー遺伝子のうち、領域特異的に発現するいくつかの既知の遺伝子について、実際の胚での発現パターンを FISH で可視化し、UMAP プロットでのパターンと比較した。その結果、UMAP プロットにおける発現パターンの位置関係が FISH のパターンの位置関係と完全に一致していた（**Fig 8A、矢印**）。特に、*Pt-osr-B*（LOC107451631）のような FISH における発現パターンが複数の領域にわたる遺伝子では、UMAP プロットにおいても対応する複数の領域で発現が見られた（**Fig 8A、上から 5 番目**）。一方、ScRNA-seq の UMAP プロット上では前後軸に沿った遺伝子発現パターンは完全には再構成されなかった（**Fig 5B**）。次に、Late Stage 5 の中胚葉・外胚葉クラスター（クラスター7, 1, 2, 0, 4, 3, 10）と Stage 7 の外胚葉クラスター（クラスター1, 6, 5, 2, 20, 8, 0, 9, 4, 7, 10）を特徴づけるマーカー遺伝子の発現をドットプロットで示すことで、この 2 つの発生段階の細胞の状態を比較した（**Fig 8B-G**）。Late Stage 5 のマーカー遺伝子の発現からは、Late Stage 5 の細胞が縁-中央の極性に沿って段階的に変化している様子が確認できた（**Fig 8D**、Akiyama-Oda *et al.,* 2022）。一方で、これらのマーカー遺伝子の発現からは、Stage 7 の外胚葉の細胞における前後軸に沿った状態の変化は明確には見られなかった（**Fig 8E**）。Stage 7 の細胞における Stage 7 の外胚葉のマーカー遺伝子の発現を示すドットプロットからは、マーカーとして検出されたクラスター

で強く発現し、その隣接するクラスターで弱く発現する様子が見られた（**Fig 8G**）。このことは、Stage 7 の細胞の状態が前後軸に沿って段階的に変化していることを示している。Stage 7 のマーカー遺伝子の Late Stage 5 における発現からも同様の傾向が見られたが、Stage 7 で見られたものほど顕著ではなかった（**Fig 8F**）。また、Stage 7 のクラスター1, 6, 0, 10 のマーカー遺伝子の多くは、Late Stage 5 ではほとんど発現が見られなかった。これらの結果は、Stage 7 の外胚葉細胞の状態は Late Stage 5 の細胞の状態に由来しており、新たに発現してきた遺伝子によって、発生過程で新たに生じる細胞の状態が特徴づけられていることを示している。

5. クラスタリング解析による非外胚葉細胞の同定

ここまでの解析から、Stage 7 の SnRNA-seq のデータから作製した UMAP プロット上で外胚葉の細胞が前後軸方向の極性を反映して並んでいることを明らかにされた。また、Stage 7 のマーカー遺伝子の発現を示したヒートマップから、中胚葉及び内胚葉のサブクラスターにおいて、それぞれ特異的に発現するマーカー遺伝子が検出された（**Fig 7C、クラスター16, 18, 11, 22, 12, 19, 21, 24**）。そこで私は、FISH と組み合わせた発現解析によって非外胚葉細胞の同定を行った（**Fig 12**）。まず、クラスター12 で特異的に発現するマーカー遺伝子（LOC107436131）について FISH を行い、発現パターンを調べたところ、内胚葉および胚外の一部で発現が見られた。このことから、クラスター12 は内胚葉および胚外の一部であることがわかった（**Fig 9A, B**）。次に、クラスター19, 21, 24 について、それぞれのクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の発現パターンを FISH の二重染色で調べた。クラスター19, 24 のマーカー遺伝子（LOC107439300, *Pt-tlx*: LOC107441150）の発現パターンを調べたところ、これらのクラスターはいずれも胚外の細胞であることがわかった。一方で、その分布には違いがあり、クラスター19 のマーカー遺伝子を発現する細胞はクラスター24 のマーカー遺伝子を発現する細胞と比べて胚からより離れた位置に存在していた。また、一部の細胞は両方の遺伝子を同時に発現していた（**Fig 9A, C**）。クラスター21 を特徴づける遺伝子には、胚と胚外との境界で発現することが知られている *Pt-gata-C*（LOC107448880）が含まれていた（Akiyama-Oda, and Oda, 2010）。クラスター21, 24 のマーカー遺伝子の発現を二重染色で調べたところ、片方のみを発現する細胞、両方ともを発現する細胞が確認できた（**Fig 9A, D**）。続けて、中胚葉についても同様の手法でクラスターの同定を行った。まず、クラスター16, 18 のマーカー遺伝子の発現パターンを FISH で調べたところ、クラスター16 のマーカー遺伝子（LOC107456536）は頭部の中胚葉で発現しており、クラスター18 のマーカー遺伝子（LOC107449287）は胸部の中胚葉で強く発現していた。次に、クラスター11, 22 についても同様に FISH を行った結果、クラスター11 のマーカー遺伝子（LOC107452693）は後体部の中胚葉の中でも前方の細胞で強く発現し、クラスター22 のマーカー遺伝子（LOC107457003）は後体部の中胚葉の中でも後方の細胞で発現が見られた（**Fig 9E, F、矢印**）。これらの結果は、SnRNA-seq のデータが、これま

で知られていなかった非外胚葉細胞の状態の多様性を検出できていることを示している。

次に、Stage 7 で見られた内胚葉・中胚葉のサブクラスターが Late Stage 5 のどの細胞に由来するのか推測するために、Late Stage 5 の SnRNA-seq のマーカー遺伝子の解析を行った。UMAP プロットは、クラスタリングのパラメータを dimension 1:45、resolution 1.4 に設定して作製した。UMAP プロット上では、内胚葉が 3 つのクラスターに細分化された**(Fig 10A、クラスター11, 12, 13)**。オオヒメグモ胚盤における内胚葉系の細胞には胚盤中央の原口から陥入するもの（cEND)、縁から潜り込むもの（pEND)、クムルス間充織細胞（CM cell）の 3 種類が存在する（Akiyama-Oda, and Oda, 2003, Oda *et al.,* 2007)。そこで私は、Late Stage 5 の UMAP プロットで見られた 3 つの内胚葉クラスターは発生における上記の 3 種類の内胚葉系の細胞に対応しているのではないかと考え、マーカー遺伝子を用いた FISH による発現解析を行った。それぞれのクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の個々の細胞における発現量をヒートマップで可視化したところ、クラスター11, 13 には特異的なマーカー遺伝子が存在するが、クラスター12 のマーカー遺伝子はクラスター11, 13 の細胞でも発現していることがわかった**（Fig 10D)**。また、クラスター13 のマーカー遺伝子にはクムルス間充織細胞で特異的なマーカー遺伝子として知られている *Pt-ets4*（LOC107451717）が含まれていたことから、クラスター13 はクムルス間充織細胞であると判断した**（Fig 10D, E)**。次に、クラスター11, 12 の判別を目的として、FISH の二重染色による発現解析を行った。クラスター11 に特異的に発現する LOC107443634**（Fig 10F 左）**と、クラスター11, 12 で発現する LOC107436131**（Fig 10F 右）**に対して FISH による二重染色を行ったところ、どちらの遺伝子についても、胚盤の縁・中央の両方でシグナルが検出された**（Fig 10G)**。クラスター12 の細胞は LOC107436131 のみを発現していることから、LOC107436131 のみを発現する細胞がどこにいるか調べたところ、胚盤の縁、中央のいずれにおいても存在が確認された。また、共発現している細胞についても縁・中央のいずれにも存在していた。LOC107443634 のみを発現している細胞は縁においてわずかに確認できたが中央領域にはみられなかった。加えて、縁の内胚葉で発現することが知られている *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロット上での発現はクラスター11 の中でもさらに一部の細胞に限られていたことから**（Fig 10E 右)**、Late Stage 5 の SnRNA-seq で見られた内胚葉クラスターの細分化は内胚葉細胞がどこで生じるかの違いを反映しているわけではないことがわかった。

次に、クラスター4 のマーカー遺伝子を調べたところ、*Pt-Delta* が上位のマーカーとして現れた**（Fig 10D, E 右)**。胚盤表層において *Pt-Delta* を発現する細胞はその後の発生過程で胚の下に陥入して中胚葉に分化することが知られている（Oda *et al.,* 2007)。そのため、このクラスターは胚盤中央の中胚葉細胞（cMES）であると判断した。

次に、Stage 7 の非外胚葉細胞が Late Stage 5 のどの細胞を由来としているか調べるために、マーカー遺伝子の発現を比較した**（Fig 11)**。Late Stage 5 はクラスター4, 6, 7, 11, 12, 13 の 6 クラスターを、Stage 7 はクラスター11, 12, 16, 18, 19, 21, 22, 24 の 8 クラスターを

使用した（**Fig 11A, B**）。ドットプロットを用いて、Late Stage 5、Stage 7 の各クラスターのマーカー遺伝子の発現する割合及び発現量を可視化した（**Fig 11C-F**）。まず、中胚葉の細胞についての結果を示す。Late Stage 5 のクラスター4 のマーカー遺伝子は Stage 7 のクラスター16, 18 で強い発現が見られた。Late Stage 5 のクラスター7 のマーカー遺伝子は、Stage 7 のクラスター11, 22 で強い発現が見られた（**Fig 11D**）。一方、Stage 7 のクラスター16, 18 のマーカー遺伝子は Late Stage 5 のクラスター7 では発現が確認されたが、クラスター4 では発現がほとんど見られなかった（**Fig 11E**）。Stage 7 のクラスター11, 22 のマーカー遺伝子は Late Stage 5 のクラスター4 でも発現が確認された。これらの結果から、Stage 7 のクラスター16, 18 は Late Stage 5 のクラスター7（pMES）を由来とし、Stage 7 のクラスター11, 22 は Late Stage 5 のクラスター4（cMES）を由来としていることが示唆された。次に、内胚葉の細胞についての結果を示す。Late Stage 5 のクラスター11, 12 のマーカー遺伝子は、クラスター12 で強く発現しており、19 でも発現が確認された（**Fig 11D**）。Late Stage 5 のクラスター13 のマーカー遺伝子は Stage 7 のどのクラスターでも発現がほとんど確認できなかった。Late Stage 5 のクラスター6 のマーカー遺伝子は Stage 7 のクラスター19, 21, 24 で発現が確認された。Stage 7 のクラスター12 のマーカー遺伝子は、Late Stage 5 のクラスター11 で発現が確認された（**Fig 11E**）。Stage 7 のクラスター19, 24 のマーカー遺伝子の発現は、Late Stage 5 ではほとんど確認できなかった。これらの結果から、Stage 7 のクラスター12 は Late Stage 5 のクラスター11 を由来としており、Stage 7 のクラスター19, 21, 24 は Late Stage 5 のクラスター6（胚外）の細胞を由来としていることが示唆された。

6. UMAP プロット上での遺伝子発現の繰り返しパターンの再構成

ここまでの解析で、Stage 7 の SnRNA-seq データが外胚葉における前後軸方向の極性を UMAP プロット上に再構成するのに十分な情報を含んでいることを示した。そこで私は、SnRNA-seq の UMAP プロット上では遺伝子発現の縞パターンまでもが再構成されるのではないかと考え、遺伝子発現の縞パターン形成に関わることが知られる *Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンと実際の胚での発現パターンとの比較を行った。Stage 7 のオオヒメグモ胚では、頭部で *Pt-hh* が bi-splitting によって 2 本の縞パターンを形成し、その間に *Pt-msx1* が発現する（**Fig 13A 左**）。胸部では、*Pt-msx1* と *Pt-noto1* が tri-splitting による 3 本ずつの相補的な縞パターンを形成する（**Fig 13A 右**）。後体部では、*Pt-hh*、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の発現が周期的に振動する波の動態を示すことで縞パターンを形成する（**Fig 13A**）。SnRNA-seq の UMAP プロット上で *Pt-hh*、*Pt-noto1*、*Pt-msx1* の発現を調べたところ、実際の胚と対応づけが可能な縞パターンが見られた（**Fig 13B**）。一方、ScRNA-seq の UMAP プロット上では遺伝子発現の縞パターンは見られなかった（**Fig 13C**）。この結果は、Stage 7 のオオヒメグモ胚の SnRNA-seq のデータが遺伝子発現の縞パターンを再構成するのに十分な情報を含んでいることを示している。

7. 前後軸に沿ったゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルの作製

SnRNA-seq の UMAP 上で遺伝子発現の縞パターンまでもが再構成されるという結果は、オオヒメグモのゲノム上に存在する全ての遺伝子について、前後軸方向の遺伝子発現パターンを取得できる可能性を示唆している。そこで私は、SnRNA-seq で得られた数値データのみから前後軸方向にパターンを持つ遺伝子をバイアスなく網羅的に抽出することを目標として、前後軸に沿った全遺伝子の発現プロファイルの取得を行った。遺伝子発現プロファイルを取得するために、まず UMAP を 1 つの軸に沿って線型化する方法論の確立を行った。Stage 7 の UMAP プロット（resolution : 0.5）について、クラスター0, 1, 2, 4, 5 に属する 4,129 細胞の UMAP プロットにおける座標値を取得し、その情報をもとに密度等高線を作製した。等高線の稜線が前後軸を反映する軸になると仮定し、線型化に用いる軸の情報の取得を進めた。*Pt-six3-1*（LOC107450741）と *Pt-prd2*（LOC107445228）を発現する細胞の座標値から追加の密度等高線を作製し、その頂点をそれぞれ前端、後端とすることで軸の端を決めた（**Fig 13D, 14A**）。等高線の稜線を通る点は Python のプログラムを用いて手動で取得した（**Fig 13D、黒色の点**）。取得した点の座標値を用いてスプライン曲線を作製し、線型化の軸の情報を取得した。スプライン曲線上に外胚葉の細胞をプロットすることで、軸に沿った細胞の位置情報を取得した。軸に沿ったパターンを正確に取得するために、軸からの距離が 0.3 以内の細胞の情報のみをその後の解析に用いた（**Fig 13 E, F**）。軸に沿って並ぶ細胞における遺伝子発現量に loess スムージングをかけることで、80 個の点からなる、オオヒメグモゲノム上の全遺伝子に対する、軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得した。*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* のプロファイルを確認したところ、前後軸に沿った遺伝子発現の縞パターンと対応するピークが発現プロファイル上で確認できた（**Fig 13G**）。*Pt-hh* と *Pt-msx1*、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* のプロファイルをそれぞれ重ねたところ、頭部における bi-splitting や胸部の tri-splitting、後体部の oscillation によって作られる遺伝子発現の繰り返しパターンとよく一致するピークが発現プロファイル上でも確認できた（**Fig 13H**）。また、前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子のプロファイルを重ねたところ、FISH の結果と同様、前後軸に沿って発現のピークが並ぶ確認できた（**Fig 8A, 13I**）。加えて、既知の遺伝子の FISH から取得した軸に沿った定量プロファイルと SnRNA-seq の UMAP プロットから作製したプロファイルを比較したところ、縞パターンに加えて、後体部における発現の位相のずれまでも再構成されていた（**Fig 14B**）。続けて、Stage 7 で確立した方法論の Late Stage 5 への適用を試みた。Late Stage 5 の UMAP プロット（resolution : 0.5）におけるクラスター0, 1, 2, 3, 5, 6 に属する 4,230 細胞の座標値を用いて、*Pt-twist* と *Pt-aslH*（LOC107452833）の発現を端として UMAP プロットの線型化を行った（**Fig 14C, D**）。線型化した UMAP プロットにスムージングをかけることで Stage 7 の時と同様に 80 個の点からなる、軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得した。既知の遺伝子の発現パターンとの比較によって、Late Stage 5 でも遺伝子発現プ

ロファイルが胚盤の縁から中央にかけての遺伝子発現パターンを精度良く反映していることが確認できた（**Fig 14E**）。これらの結果から、UMAP プロットの線型化と発現量のスムージングを用いて前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルを高精細に取得する方法論が確立できたと判断した。

8. 前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子のゲノムワイドな探索

次に私は、遺伝子発現プロファイルの数値データに基づいて前後軸方向に特徴的なパターンを持つ遺伝子をゲノムワイドに探索する方法の確立を試みた。遺伝子発現プロファイルを構成する 80 個の点を用いて、Stage 7 の SnRNA-seq の外胚葉で検出された 16,023 個の遺伝子それぞれについて最大値・最小値の差と平均値を計算した。これら 2 つのパラメータをそれぞれの遺伝子プロファイルの特徴量として、階層的クラスタリングを行った（**Fig 15A**）。階層的クラスタリングによって、16,023 遺伝子を 12 個のクラスターに分類した。得られたクラスターそれぞれに対して再度階層的クラスタリングを行うことで 5-7 個のサブクラスターに分類した。得られたサブクラスターの中から、パラメータの数値を基準にして 11 個のクラスターを選択し、213 個の遺伝子が前後軸にパターンを持つ遺伝子として抽出された（**Fig 15B**）。抽出された遺伝子には、ショウジョウバエの体節形成に関わる遺伝子が複数含まれていた他、ヘッジホッグに代表される細胞外シグナル関連遺伝子も多く含まれていた。また、NCBI のデータベース上で uncharacterized な遺伝子も 49 個含まれていた。一方で、これまでの研究でパターンを持つことが示されてきた遺伝子の中にはこの 213 遺伝子に含まれないものもあった（例：*Pt-krü-1*）。抽出された遺伝子に対するヘッジホッグシグナルの影響を調べるために、*Pt-hh*、*Pt-ptc*、*Pt-msx1* それぞれに対する母性 RNAi を用いた RNA-seq による発現変動遺伝子の情報に基づいて今回抽出された 213 遺伝子を分類した（Akiyama-Oda, and Oda, 2020）。その結果、213 個の遺伝子のうち 117 個の遺伝子が少なくともいずれかの遺伝子の RNAi によって発現量に優位な変化が生じることがわかった（**Fig 15E**）。

次に、これらの遺伝子セットの UMAP プロットにおける前後軸の再構成に対する寄与を調べるために、外胚葉細胞の遺伝子発現マトリクス（19,692 遺伝子、4,102 細胞）を 2 つに分割して UMAP プロットを作製した。1 つは抽出された 213 遺伝子のみの情報を持つマトリクス A（213 遺伝子、4,102 細胞）で、もう 1 つは 213 遺伝子の情報を除いたマトリクス B（19,479 遺伝子、4,102 細胞）である。マトリクス A を用いて作製した UMAP プロットでは、外胚葉の細胞が前後軸の極性に沿って並ぶ様子が見られた。また、*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の発現パターンから、遺伝子発現の縞パターンも UMAP プロット上で再構成されていた（**Fig 15C, 16A**）。一方、マトリクス B を用いて作製した UMAP プロットでは、胚の頭部、胸部、後体部の並びは再構成されたが、細かい前後軸の極性や縞パターンは再構成されなかった（**Fig 15D, 16B**）。この結果から、階層的クラスタリングによって得られた 213 個の遺伝子が、UMAP プロット上でオオヒメグモ胚全体の前後軸の極性を

再構成するのに必要かつ十分であることが示された。さらに私は、これらの遺伝子が胚の局所的な前後軸の極性の再構成に必要か調べるために、特定のクラスターのみの細胞において、これらの遺伝子の発現量をランダムに入れ替える実験を行った（Fig 17）。まず、クラスター5 の細胞について、213 遺伝子の発現をランダムに入れ替えたところ、外胚葉クラスターの連続性がクラスター5 の前後において途切れる様子が見られた（Fig 17A）。一方で、コントロール実験として 2000 個の highly variable genes からこの 213 遺伝子と重複しない 213 遺伝子をランダム化しても、UMAP プロットには大きな変化は見られなかった（Fig 17B）。加えて、外胚葉における他のクラスターにおいても同様の実験を行ったところ、全ての試行において、UMAP プロットの連続性が途切れた（Fig 17C）。続けて、クラスター5 において、ランダム化する細胞の割合を徐々に増加する実験を試みた。その結果、ランダム化する細胞の割合が増えるにつれて連続性が途切れる様子が見られた（Fig 17D）。これらの結果から、抽出された 213 遺伝子は UMAP プロット上において、胚の局所的な前後軸極性を再構築するのに必要であることがわかった。

Late Stage 5 についても同様に、遺伝子発現プロファイルの数値に基づいた階層的クラスタリングによってパターンを持つ遺伝子の抽出を行った結果、外胚葉・中胚葉で検出された 15,061 個の遺伝子から 264 個の遺伝子が抽出された（Fig 18, 19A）。Stage 7 と同様に発現マトリクスを 2 つに分割して UMAP プロットを作製した結果、これらの遺伝子が UMAP プロットにおける胚盤の縁-中央の極性を再構成するのに必要かつ十分であることが示された（Fig 19B）。

これらの結果から、前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルの数値データに基づいた階層的クラスタリングによって、コンピュータ上でオオヒメグモ胚の前後軸を再構築するのに必要かつ十分な遺伝子セットを抽出できることが示された。

9. 遺伝子発現プロファイルの微分値を用いた胚全体のパターン解析

ここまでの解析で、Late Stage 5、Stage 7 のそれぞれの SnRNA-seq データにおける前後軸の極性を UMAP プロット上で再構成するのに必要かつ十分な遺伝子セットを取得することができた。これらの遺伝子セットを用いて、前後軸に沿ったパターンの特徴を数値的に捉えるために、Stage 7 で得られた 213 個の遺伝子の発現プロファイルと Late Stage 5 で得られた 264 個の遺伝子の発現プロファイルについて、それぞれのプロファイルを構成する 80 個の点における微分値（傾き） を利用した解析を行った。遺伝子発現プロファイルの傾きを用いることで、遺伝子発現の境界を捉えられることができると考えた。まず、軸に沿った各点における傾きの値を正負に分け、絶対値の大きいものから順に 50 遺伝子をソートして可視化した（Fig 20A, B）。その結果、Late Stage 5 では胚盤の縁の中胚葉と外胚葉の境界付近及び、中央で遺伝子発現の振動によって新たに体節が形成される領域の 2 箇所で傾きの大きい遺伝子が多く見られた。Stage 7 では、Late Stage 5 と比較してより多くの領域で傾きの大きい遺伝子が見られた。この結果は、Late Stage 5 と比較して Stage

7 では前後軸のパターンがより複雑化していることを示している。次に、傾きの値を用いて各点での相関係数を算出し、ヒートマップを作製した（**Fig 20C, D, G, H**）。Late Stage 5 のヒートマップでは胚盤におけるどの領域においても明瞭なパターンは見られなかったが（**Fig 20C, E**）、Stage 7 では、胸部での tri-splitting 及び、後体部での oscillation によって体節が形成される領域と対応した位置に、相関係数が正の領域と負の領域が交互に現れる様子が見られた（**Fig 20D, F**）。次に、Stage 7 で得られた 213 遺伝子のうち、Late Stage 5 でもパターンを持つ遺伝子セットに含まれているものとそうでないもの（Stage 7 で新たにパターンを生じたもの）とに分けることで、この 2 つの発生ステージにおいて発現する遺伝子セットの変化がパターン形成においてどのような影響を及ぼすのか調べた。Late Stage 5 ですでにパターンを持っていた 105 遺伝子から作製したヒートマップでは、胸部のパターンがよく現れていた（**Fig 20F, G**）。一方、Late Stage 5 から Stage 7 までの間に新たにパターンを生じた 108 遺伝子から作製したヒートマップでは、胸部でのパターンは見られなかったが、頭部に対応する領域でのドメインのような構造と、後体部での振動に対応するパターンが明瞭に現れていた（**Fig 20F, H**）。これらの結果は、遺伝子発現プロファイルの傾きを用いた解析によって胚全体のパターンの特徴を捉えられることを示している。また、Late Stage 5 でパターンを持っている遺伝子と Stage 7 で新たにパターンを生じた遺伝子との比較によって、発生ステージ間でパターンを持つ遺伝子セットの違いがパターン形成における役割の違いを持つことが示唆された。

10. オオヒメグモの縞パターン形成を網羅する時系列データの取得及び解析前処理

私はまず、オオヒメグモ胚発生における体節形成の過程を通じた時系列データの取得を行った。クムルスが胚盤の縁に到着するタイミングを Late Stage 5 と定義して、そこから 20 時間にわたるサンプリングを計画した。しかしながら、SnRNA-seq のサンプリングでは、1 つのステージに対して 40 個の卵を準備し、典型的な発生段階の卵を 20 個選抜するため、1 つの卵嚢から全てのステージのサンプリングをすることはできなかった。そのため、オーバーラップのある 3 つのデータセットに分けてサンプリングを行った（**Fig 21；Series_A、Series_B、Series_C**）。

時系列データの解析では、得られたカウントマトリクスのうち、細胞核あたりの発現する遺伝子の種類が 1,500 以上かつ分子数が 20,000 以下のものを使用した。また、第 1 章の解析で生じた、状態の悪い細胞核が多く集められていると判断したクラスター（**Fig. 1F, G**）にはイントロンの割合が少ない細胞が多く含まれていることが判明したため、本章では、イントロンの割合が 10%以上の細胞のみを解析に使用した。また、今回取得した時系列データはオオヒメグモの発生における胚盤から胚帯への形態変化の過程を捉えたものであるため、第 1 章で使用した“縁-中央の極性”及び“前後軸の極性”という単語の使い分けが困難である。そのため、以降は“前後軸の極性”に統一して使用する。また、本研究で取得した時系列データの個々のサンプルについての解析は補足資料に示し、本章では、前後軸

に沿った遺伝子発現プロファイルの取得と、時間変化に関する部分のみ抜粋して示す。

11. 時系列データにおける前後軸の極性の解析

a. Series_A のデータ解析

Series_A は Late Stage 5 から Late Stage 5 + 8h までの 5 つのデータセットで構成されている。それぞれのデータで得られた細胞数、細胞あたり検出された遺伝子の種類および分子数は Table 3 に示した。それぞれのデータから UMAP プロットを作製したところ、Late Stage 5 + 6h までは外胚葉および中胚葉の細胞からなる大きな細胞集団と内胚葉からなる細胞集団に分かれた。Late Stage 5 + 8h では、外胚葉の大きな細胞集団と内胚葉の細胞集団に加えて、新たに 2 つの細胞集団が現れた（**Fig22 A**）。*Pt-hh* と *Pt-msx1* の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、胚の前方で *Pt-hh* が、後方で *Pt-msx1* の発現が確認できた（**Fig22 B 左**）。また、頭部における *Pt-hh* の UMAP プロット上での発現パターンの時間変化を見ると、発生が進むにつれて外胚葉と中胚葉の堺の領域に *Pt-hh* の発現が低下する細胞が複数見られた（**Fig22 B 左、矢印**）。このことは、Pt-hh の発現が胚盤の縁から後方へと波のように移動するという過去の知見と一致する（Kanayama *et al.,* 2011）。胚の後方におけるパターンの時間変化を調べたところ、Late Stage 5 + 4h の UMAP プロット上で、*Pt-msx1* の発現の後方に *Pt-hh* の発現が生じ、発生が進むにつれて *Pt-hh* ポジティブな細胞が増加する様子が見られた（**Fig22 B 左、矢頭**）。このことは、胚の後体部において *Pt-hh* と *Pt-msx1* の発現が周期的に振動する波として交互に現れるという過去の知見と一致する（Akiyama-Oda, and Oda 2020）。次に、それぞれの UAMP プロットの線型化を行い、*Pt-hh* と *Pt-msx1* の遺伝子発現プロファイルの時間変化を調べた。その結果、胚の後方で *Pt-msx1* の発現が低い領域が出現し、その領域で *Pt-hh* の発現が上昇している様子が見られた（**Fig22 B 右、矢頭**）。また、頭部においても、*Pt-hh* の発現が低い領域が現れる様子が見られた（**Fig22 B 右、矢印**）。次に、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の UMAP プロット上での発現パターンと遺伝子発現プロファイルの時間変化を調べた。その結果、UMAP プロット、遺伝子発現プロファイルの両方において、胚の後方における *Pt-msx1* の発現の後から *Pt-noto1* の発現が生じる様子が見られた（**Fig22 C、矢頭**）。また、このデータセットにおいては、胸部の tri-splitting に対応する縞パターンはまだ見られなかった。これらの結果は、Series_A の SnRNA-seq データセットがオオヒメグモ胚の前後軸に沿ったパターンの変化をよく捉えており、遺伝子発現プロファイルによってその変化する様子を数値的に捉えられる可能性をもつことを示していると考えられる。

b. Series_B のデータ解析

Series_B は Late Stage 5 + 7h から Late Stage 5 + 13h までの 4 つのデータセットで構成されている。それぞれのデータで得られた細胞数、細胞あたり検出された遺伝子の種類および分子数は Table 3 に示した。それぞれのデータから UMAP プロットを作製したとこ

ろ、Late Stage 5 + 7h では外胚葉および中胚葉の細胞からなる大きな細胞集団と内胚葉からなる細胞集団に分かれた。Late Stage 5 + 9h から Late Stage 5 + 13h の UAMP プロットでは、外胚葉の大きな細胞集団に加えて、内胚葉と中胚葉からなる 4 つの細胞集団が見られた（**Fig23 A**）。*Pt-hh* と *Pt-msx1* の UMAP プロット上での発現パターンおよび遺伝子発現プロファイルの時間変化を調べたところ、Late Stage 5 + 9h において、頭部の *Pt-hh* の発現の中から Pt-msx1 ポジティブな細胞が現れる様子が見られた（**Fig23 B、緑とマゼンタの矢印**）。また、*Pt-hh* のパターンも、始めはピークが 1 つだったものが、*Pt-msx1* の発現が上昇するにつれて 2 つに分裂する様子が見られた。胸部の *Pt-msx1* のパターンについても、始めは 1 つの大きな発現ドメインだったものが、時間変化に従って 3 つのピークがほぼ同時に生じる様子が見られた（**Fig23 B、マゼンタのドット**）。後体部においても、Pt-hh と Pt-msx1 の発現が交互に生じる様子が確認できた（**Fig23 B、白の矢印とマゼンタの矢頭**）。次に、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の UMAP プロット上での発現パターンと遺伝子発現プロファイルの時間変化を調べた。その結果、UMAP プロット、遺伝子発現プロファイルの両方において、胸部において *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現が互いに相補的な 3 つのピークを生じる様子が見られた（**Fig23 C、緑とマゼンタのドット**）。このことは、胸部における tri-splitting に関する過去の知見と一致する（Akiyama-Oda, and Oda 2020）。また、胚の後方で *Pt-noto1* と *Pt-msx1* の発現が交互に生じる様子が見られた（**Fig23 C、白の矢印とマゼンタの矢頭**）。これらの結果は、Series_B の SnRNA-seq データセットも Series_A と同様、オオヒメグモ胚の体節形成における前後軸に沿ったパターンの変化をよく捉えており、遺伝子発現プロファイルによってその過程を数値的に解析できる可能性をもつと考えられる。

c. Series_C のデータ解析

Series_C は Late Stage 5 + 12h から Late Stage 5 + 20h までの 5 つのデータセットで構成されている。それぞれのデータで得られた細胞数、細胞あたり検出された遺伝子の種類および分子数は Table 3 に示した。それぞれのデータから UMAP プロットを作製したところ、いずれのデータにおいても外胚葉からなる大きな細胞集団と中胚葉、内胚葉からなる細胞集団に分かれた（**Fig 24 A**）。*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンの変化を見たところ、Late Stage 5 + 14h までは UMAP プロット上で縞パターンを形成しているように見えたが、Late Stage 5 + 16h では胸部の細胞が *Pt-hh* ポジティブ（C では *Pt-noto1*）なものと *Pt-msx1* ポジティブなものに分かれてプロットされ、前後軸に沿った縞パターンを再構成していないように見えた（**Fig 24 B, C**）。この傾向は Late Stage 5 + 18h、Late Stage 5 + 20h でより顕著になり、*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* のパターンのみからでは胚の領域の区別も困難なプロットになった。遺伝子発現プロファイルについても、Late Stage 5 + 12h では頭部における *Pt-hh* の分裂や胸部での *Pt-msx1* の分裂、後体部で振動によって生じる周期的な縞パターンがプロファイル上で確認できたが、

Late Stage 5 + 16h ではプロファイルにおけるピークが実際の胚における縞パターンと対応がつかなくなった。このことから、UMAP プロット上で前後軸の極性が再構築されるのは Late Stage 5 + 14h までであると結論づけた。

12. 時系列データの統合による発生過程における細胞の状態変化の解析

a. Series_A

Series_A の 5 つのデータセットを merge 関数で 1 つのマトリクスに統合して、14,807 細胞に対する 20,781 遺伝子の発現マトリクスが得られた。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ、5 つのデータセットが UMAP プロット上でよく重なっている様子が見られた（**Fig25 A**）。中胚葉および内胚葉のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、*Pt-twist* の発現はクラスター11, 12, 16 で確認でき、*At_eW_012_A08* の発現はクラスター14, 15, 19, 20 で確認できた（**Fig25 B**）。加えて、領域特異的に発現する既知の遺伝子の発現パターンを調べたところ、UMAP プロット上での発現ドメインが実際の胚における位置関係と対応する形で並ぶ様子が見られた（**Fig25 C**）。これらの結果は、オオヒメグモの SnRNA-seq の時系列データが、少なくとも同じ卵嚢から取得したデータにおいては、発現マトリクスを結合するだけで異なるサンプル間でのデータの統合解析を行えることを示唆している。次に私は、UMAP プロットをステージごとに分割して出力することで、発生過程における細胞の状態変化の解析を試みた。その結果、発生過程で新たに生じる細胞の状態がクラスターレベルで確認できた（**Fig25 D、矢印**）。次に、*Pt-twist* と *At_eW_012_A08* の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、内胚葉の細胞集団には目立った変化は見られなかったが、中胚葉については、外胚葉の中から、*Pt-twist* ポジティブな細胞が新たに生じる様子が見られた（**Fig25 E、矢印**）。また、*Pt-hh* と *Pt-msx1* の UMAP プロット上での発現を調べたところ、頭部領域の発生過程で現れる *Pt-hh* ネガティブな細胞が UMAP プロット上で新たに生じたクラスターと一致することがわかった（**Fig25 F、矢頭**）。胚の後体部では、*Pt-msx1* の発現の後方に *Pt-hh* の発現が新たに生じる様子が見られ、この *Pt-hh* ポジティブな細胞が新たに生じたクラスターと対応することがわかった（**Fig25 F、印**）。これらの結果から、オオヒメグモの兄弟胚を用いた時系列データ（Series_A）の解析によって、発生過程で新たに生じる中胚葉と縞パターン形成過程で遺伝子発現の波の動態によって新たに生じる細胞の状態を捉えられることがわかった。

b. Series_B

Series_B の 4 つのデータセットを merge 関数で 1 つのマトリクスに統合して、25,176 細胞に対する 21,197 遺伝子の発現マトリクスが得られた。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ、4 つのデータセットが UMAP プロット上でよく重な

っている様子が見られた（Fig26 A）。中胚葉および内胚葉のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、*Pt-twist* の発現は 2 つの細胞集団で確認でき、*At_eW_012_A08* の発現も 2 つの細胞集団で確認できた（Fig26 B）。加えて、領域特異的に発現する既知の遺伝子の発現パターンを調べたところ、UMAP プロット上での発現ドメインが実際の胚における位置関係と対応する形で並ぶ様子が見られた（Fig26 C）。これらの結果は、Series_B の時系列データについても、発現マトリクスを結合するだけで異なるサンプル間でのデータの統合解析を行えることを示唆している。次に私は、UMAP プロットをステージごとに分割して出力することで、発生過程における細胞の状態変化の解析を試みた。その結果、発生過程で新たに生じる細胞の状態がクラスターレベルで確認できた（Fig26 D、矢印）。中胚葉および内胚葉のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンの変化を調べたところ、中胚葉の細胞集団の中に、*Pt-twist* ネガティブな細胞が現れる様子が見られた（Fig26 E、矢印）。*Pt-hh* と *Pt-mxs1* の UMAP プロット上での発現パターンからは、前端の *Pt-hh* ネガティブな細胞や bi-splitting によって生じる *Pt-hh* の縞のうちより前方のもの、胸部の tri-splitting によって生じる縞や後体部で遺伝子発現の振動によって形成される縞が、UMAP プロット上で新たに生じるクラスターと対応することがわかった（Fig26 F）。

c. Series_C

Series_C の 5 つのデータセットを merge 関数で 1 つのマトリクスに統合して、24,826 細胞に対する 20,918 遺伝子の発現マトリクスが得られた。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ、5 つのデータセットが UMAP プロット上でよく重なっている様子が見られた（Fig27 A）。中胚葉および内胚葉のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、*Pt-twist* の発現は 2 つの細胞集団で確認でき、*At_eW_012_A08* の発現も 2 つの細胞集団で確認できた（Fig27 B）。加えて、領域特異的に発現する既知の遺伝子の発現パターンを調べたところ、UMAP プロット上での発現ドメインが実際の胚における位置関係と対応する形で並ぶ様子が見られた（Fig27 C）。次に私は、UMAP プロットをステージごとに分割して出力することで、発生過程における細胞の状態変化の解析を試みた。その結果、発生過程で新たに生じる細胞の状態がクラスターレベルで確認できた（Fig27 D、矢印）。中胚葉および内胚葉のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンの変化を調べたところ、内胚葉の細胞で、新たな状態の細胞が現れる様子が見られた（Fig27 E、矢印）。*Pt-hh* と *Pt-mxs1* の UMAP プロット上での発現パターンからは、*Pt-hh* ポジティブな細胞、*Pt-msx1* ポジティブな細胞のどちらも、時間変化の間に新たな細胞が生じる様子が確認できたが、実際の胚における縞パターンと対応づけるのは困難であった（Fig27 F）。

考察

Stage 7 の ScRNA-seq、SnRNA-seq のサンプルサイズの違いについて

本研究では、Stage 7 のオオヒメグモ胚を用いて ScRNA-seq 及び SnRNA-seq の両方の手法でデータを取得したが、ScRNA-seq では SnRNA-seq と比較してサンプルサイズが小さかった。これは、サンプル作製に使用した胚の数が異なる（ScRNA-seq は 15 個、SnRNA-seq は 20 個）ことの他にも、細胞と核との間でのサンプル作製の過程の違いが考えられる。ウェルに細胞（核）懸濁液を流し込む際に、細胞核では 1×CGBS バッファーで懸濁して流し込むことで 30 分以内に核が十分沈み込むことが確認できたが、細胞では 1×CGBS ではうまく沈まず、0.5×CGBS に濃度を希釈することで細胞を沈ませた。先行研究において Late Stage 5 のオオヒメグモ胚を用いた ScRNA-seq を行った際は、1×CGBS 中で細胞は沈み、十分なサンプルサイズのデータが取得できていた（Akiyama-Oda *et al.,* 2022）。Late Stage 5 と Stage 7 の間での細胞分裂による個々の細胞の体積の縮小によって懸濁液中での細胞の沈みやすさに影響が生じたのかもしれない。このことから、より多くの胚を用いてサンプルを作製することで、Stage 7 においても十分なサンプルサイズの ScRNA-seq データの取得が可能になるのかもしれない。

UMAP プロットにおける前後軸の極性の再構築

本研究では、前後軸に沿って領域特異的に発現する既知の遺伝子の UMAP 上での発現パターンと FISH で可視化した実際の胚での発現パターンとの比較によって、オオヒメグモ胚の SnRNA-seq データから作製した UMAP プロット上で実際の胚全体における前後軸の極性が再構成されることを示した。また、前後軸に沿って縞パターンを形成する既知の遺伝子の発現パターンを調べた結果、SnRNA-seq の UMAP プロット上では、遺伝子発現の縞パターンまでもが再構成されていることが明らかとなった。このような結果はこれまでに他のいかなる動物においても見られなかったものであり、体節形成過程での個々の細胞の状態変化を明らかにする上で非常に重要な知見となる。オオヒメグモ胚では、発生においてまず前後軸方向のパターンが複雑化し、続けて背腹軸方向のパターン化が進むことから（Akiyama-Oda and Oda, 2006）、今回取得した Stage 7 の SnRNA-seq のデータには、前後軸方向の情報が多く含まれていたのかもしれない。また、頭部・胸部・後体部の細胞集団が一つの大きなクラスターを形成している点も興味深い。オオヒメグモ胚でのパターン形成は遺伝子発現の波の動態制御によって達成される。個々の細胞で遺伝子発現の ON/OFF を切り替え、波のように振る舞わせるためには、胚を構成する細胞は未分化な状態を維持している必要があると考えられる。SnRNA-seq の UMAP プロット上で外胚葉の細胞集団が一つの大きなクラスターを形成していること、前後軸に沿ったクラスターを特徴づける遺伝子の発現が隣接するクラスターでも弱く検出されていることから、前後軸の極性に従って遺伝子発現の状態が徐々に変化してはいるものの、外胚葉全体としては細胞

が未分化な状態を維持していることが示唆される（**Fig 8G**）。一方で、UMAP プロットにおける後体部の細胞集団は頭部・胸部の細胞集団からくびれて分離しかけている様子が見られた。また、UMAP プロットにおける *Pt-hh* の発現から、境界となっている部分は将来の 4 番目の脚（L4）に対応する体節であることがわかった。オオヒメグモ胚における遺伝子発現の縞パターンのうち、L4 の *Pt-hh* 以降の縞は遺伝子発現の周期的な振動によって形成されることがわかっている（Kanayama *et al.,* 2011, Hemmi *et al.,* 2018, Akiyama-Oda and Oda, 2020）。これらの結果は、オオヒメグモ胚の外胚葉において、遺伝子発現が振動する領域と、それよりも前方の領域との間で細胞の状態が比較的大きく異なることを示唆している。これまでに、オオヒメグモの胚盤ではヘッジホッグのシグナルによって胚全体が French Flag-like なパターニングを受けることが RNAi を用いた機能解析から示されている（Akiyama-Oda and Oda, 2020）。後体部に生じる遺伝子発現の振動は胚盤から胚帯への形態変化とほぼ同時に生じることから、*Pt-hh* のシグナルによってパターン化される頭部・胸部とそれ以降に生じる後体部では細胞の状態が異なっているのかもしれない。

本研究では、ScRNA-seq のデータからは前後軸の極性は曖昧にしか再構成されなかった。本研究では、サンプルサイズの違いが UMAP プロット上での前後軸の極性の再構成に与える影響について調べたが、明確な結論には至らなかった。UMAP プロット上でのパターンの再構成を曖昧にさせる他の要因として、ScRNA-seq では、細胞質に長時間残留する mRNA がノイズとなり、遺伝子発現の動的な変化によって形成される前後軸の極性が捉えられなかった可能性が考えられる。

非外胚葉細胞の多様性の検出

シングルセルトランスクリプトーム解析の長所は、細胞の多様性をゲノムワイドな遺伝子発現の状態から解析できる点である。本研究で私は、オオヒメグモ胚の非外胚葉細胞がこれまで報告されてきた以上に多様であることを明らかにした。オオヒメグモの胚発生において、内胚葉細胞は胚盤形成期に胚盤中央に生じる原口より胚盤の下に陥入するものと、胚盤の縁から潜り込むものの 2 種類が報告されている（Akiyama-Oda and Oda, 2003, Oda *et al.,* 2007, Iwasaki-Yokozawa *et al.,* 2022）。また、マーカー遺伝子の発現から、クムルス間充織や胚外の細胞集団も内胚葉性の細胞であると考えられてきた。本研究では、SnRNA-seq のクラスタリング解析と FISH を用いたマーカー遺伝子の発現パターン解析から、胚の下部に存在する内胚葉細胞に加えて、胚と胚外の境界の細胞、及び二種類の胚外の細胞を特定することができた（**Fig 12**）。

Late Stage 5 の SnRNA-seq データとの比較から、内胚葉細胞は Late Stage 5 の内胚葉細胞を由来とし、境界の細胞及び胚外の細胞は Late Stage 5 における胚外の細胞に由来することが示唆された。また、Late Stage 5 のクラスタリング解析において resolution を下げたところ、クムルス間充織の細胞は内胚葉の細胞と一つのクラスターを形成した（**Fig 10C**）。これまで、クムルス間充織細胞について、内胚葉の細胞であるという主張と中胚葉

の細胞であるという主張が混在していたが (Edgar *et al.,* 2015, Akiyama-Oda *et al.,* 2022, Prpic and Pechmann, 2022)、本研究で再解析した Late Stage 5 の SnRNA-seq データから作製した UMAP プロットは、この細胞集団が内胚葉性であることを支持している 。

中胚葉についても、胚盤の縁に存在するものと、胚盤中央部で *Pt-Delta* を発現したのちに胚盤の下に落ち込むものが報告されてきた (Oda *et al.,* 2007)。本研究では、Stage 7 の SnRNA-seq のクラスタリング解析から、胚の前後軸に沿った四種類の中胚葉が特定された **(Fig 9E, F、クラスター16, 18, 11, 22)**。Late Stage 5 のデータとの比較から、クラスター16 及び 18 は胚盤の縁の中胚葉を、クラスター11 及び 22 は胚盤中央の *Pt-Delta* 陽性細胞を由来としていることが示唆された。FISH を用いた発現パターンの解析から、クラスター16, 18 の細胞は胚の前端から外胚葉における L3 の体節周辺まで分布を広げており、クラスター11, 22 の細胞は胚の後端から L4 の体節周辺まで分布を広げていた。Late Stage 5 のクラスタリング解析では、中胚葉のクラスターは resolution を上げても細分化されなかったことから、胚盤期では均一な細胞集団であることが示唆された **(Fig 10A)**。胚盤から胚帯へと発生が進む中で中胚葉は胚全体へと分布を広げている。細胞の分布を広げながら前後軸に沿って状態を多様化させる仕組みとしては 2 つ考えられる。1 つは細胞移動によって分布を広げる中胚葉が、外胚葉から何らかのシグナルを受け取り、状態を変化させるというものである。2 つ目は、胚帯形成中にも外胚葉からの細胞の落ち込みが継続しており、中胚葉を新たに供給し続けるというものである。本研究で示した外胚葉でパターンを持ついくつかの遺伝子の UMAP プロット上での発現を見ると、中胚葉の一部の細胞においても発現が確認できる **(Fig 8A、Fig 13B)**。一方で、これらの遺伝子は内胚葉での発現は見られなかった。この結果は、胚帯形成中においても外胚葉から細胞の落ち込みが継続する可能性を示唆しているのかもしれない。中胚葉の分布拡大過程を解析する方法として、細胞のトラッキングが有効だと考えられる。オオヒメグモ胚では、16 細胞期または 32 細胞期の細胞に蛍光色素を顕微注入することで、注入した細胞のクローンをトラッキングする手法がすでに確立されている（Kanayama *et al.,* 2010)。また、市販の蛍光プローブ（SPY DNA プローブ）を胚盤と受精膜の隙間に注入することでオオヒメグモ胚を構成する全細胞をライブ観察する手法も確立されている（Fujiwara *et al.,* 2022)。これらの手法を用いることで、中胚葉の分布が広がる仕組みの理解が進むと期待される。

UMAP の線型化による数値に基づいたパターン解析

本研究において私が最も重要と考える発見は、Stage 7 のオオヒメグモ胚を用いた SnRNA-seq の UMAP プロット上で実際の胚での前後軸のパターンが再構成されたことである。この結果は、ゲノムワイドに数値データに基づいた前後軸に沿ったパターンの解析ができる可能性を示唆している。しかしながら、UMAP の二次元平面上でのパターンは数値による取り扱いが困難である。そこで私は、UMAP プロットを線型化する方法論を確立することで、ゲノム上の全遺伝子について前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得

し、数値に基づいた解析を行った。私は、取得した遺伝子発現プロファイルを元に、最大値・最小値の差及び平均値という 2 つのパラメータのみを用いた階層的クラスタリングによって軸方向にパターンを持つ遺伝子の網羅的な探索を可能にした。このような簡便で再現性の高い手法による候補遺伝子の探索によって、UMAP プロット上での前後軸の再構成に必要十分な遺伝子セットを抽出することが可能となった（**Fig 15, 16**）。また、外胚葉の個々のクラスター内で抽出した遺伝子の発現量をランダムに入れ替える実験操作により、外胚葉の細胞の連続性が途切れたことから、UMAP プロット上で見られた外胚葉の細胞の前後軸の極性に沿った配置は、限られた数の遺伝子の発現によって達成されていることが示された（**Fig 17**）。また、今回確立した手法は Late Stage 5 のデータにも適用可能であり、胚盤の縁-中央の極性を再構築するのに必要十分な遺伝子を抽出することができた（**Fig 18, 19**）。このことから、他の発生ステージにおいても、UMAP プロット上で胚空間が再構成される限りは同様の手法でパターンを持つ遺伝子の網羅的探索を達成できることが期待される。

抽出された遺伝子と RNAi との関係

Stage 7 の UMAP プロットから作製した数値プロファイルをもとに、213 個の遺伝子が前後軸方向に特徴的なパターンを持つ遺伝子として抽出された。これらの遺伝子が *Pt-hh*、*Pt-ptc*、*Pt-msx1* それぞれの RNAi 胚における発現変動遺伝子に含まれるか調べた結果から、いずれにも含まれない遺伝子が 96 個見つかった（**Fig 15E**）。これらの遺伝子のうち 66 個は Late Stage 5 ではまだ前後軸方向にパターンを持っていない 108 遺伝子によく含まれていた。先行研究では、RNAi 胚を用いた RNA-seq が Late stage 5 もしくは Stage 6 の時点で行われたことから、この 66 遺伝子は、RNA-seq のサンプリング時点では変動を検出できるほど発現していなかった可能性が考えられた。一方で、Late Stage 5 ですでにパターンを持つ 105 遺伝子においても、いずれの RNAi の影響を受けない遺伝子が 30 個見つかったことから、ヘッジホッグのシグナル非依存的にパターンを生じる遺伝子が存在する可能性が考えられる。今後は、これらの遺伝子の機能解析を行うことでオオヒメグモ胚のパターン形成の仕組みの理解が進むと考えられる。また、抽出された 213 遺伝子には、*Pt-hh* および *Pt-ptc* の RNAi で発現の変動が検出された遺伝子が多く見つかった一方、*Pt-msx1* の RNAi 胚で発現が変動した遺伝子はあまり含まれていなかった（**Fig 15E**）。この結果は、オオヒメグモの胚盤におけるパターン形成は *Pt-hh* および *Pt-ptc* がより支配的に制御していることを示唆する。この結果は *Pt-msx1* の RNAi 胚では胚盤でのパターン形成に大きな影響が見られなかった過去の知見とも一致する（Akiyama-Oda, and Oda, 2020）。

発現プロファイルの微分値を用いた解析

本研究では、軸に沿った遺伝子発現プロファイルを作製できるオオヒメグモ胚の SnRNA-seq データの利点を活かして、数値に基づいたパターン解析を行うために、プロファイルの各点における傾きを用いた手法を確立した。プロファイルの数値では各点での発現量のみしかわからないが、傾きを取得することによって発現の境界を検出することが可能となった。軸に沿った各点において発現量の変化の大きい遺伝子を並び替えたことで、Stage 7 では、Late Stage 5 と比べてパターンが複雑化している様子が見られた（**Fig 20A, B**）。Stage 7 の胸部に対応する領域では、傾きが正に大きく変化する領域と負に大きく変化する領域が一致していたことから、胸部における tri-splitting ではパターン形成は逆位相で発現する遺伝子によって達成されることを示唆している。また、後体部に対応する領域では、傾きが正に大きく変化する領域と負に大きく変化する領域の間にずれが生じており、軸に沿った幅も胸部に比べて広かった。このことから、後体部における oscillation によるパターン形成では、遺伝子発現には位相のずれが存在することを示唆している。この結果は、先行研究における FISH の結果とも一致している（Akiyama-Oda and Oda, 2020）。Late Stage 5 でパターンを持つ遺伝子とそうでないものとで遺伝子セットを分けた後に、傾きから作製したヒートマップでは、発生過程において発現が生じるタイミングが異なる遺伝子セットでは、パターン形成における働きが異なることを示唆するデータが得られた（**Fig 20C-H**）。これらの結果は、オオヒメグモ胚の体節形成において、遺伝子発現の時間的な制御が重要であることを示しており、第二章で紹介する時系列データの解析によってパターン形成に関わる遺伝子セットの変化によって体節形成過程の包括的な理解が進むことを示唆する。

時系列データを用いた解析

本研究では、オオヒメグモ胚発生における個々の細胞の状態変化の解明を目標として、SnRNA-seq の時系列データの取得・解析を試みた。オオヒメグモ兄弟胚を用いた 2 時間おきのサンプリングによって、UMAP プロット上で発生過程における前後軸方向の遺伝子発現パターンの変化する様子を捉えることができた。加えて、本研究で確立した UMAP プロットの線型化を適用することで、前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得することも可能であることが確認できた。また、遺伝子発現プロファイルからは、オオヒメグモ胚の体節形成過程をプロファイルのピークの変化として捉えられていることもわかった。また、Series ごとにデータを 1 つのマトリクスにまとめた解析では、データ統合のパッケージを使用しなくても細胞の状態の時間変化を解析できることがわかった。この結果は、オオヒメグモの兄弟胚が SnRNA-seq の時系列データを高精度で解析できる可能性を持つことを示す。

Series_A

Series_A の時系列データの解析によって、遺伝子発現の波の動態によってパターンが時間変化する様子を捉えることができた（**Fig 22**）。胚盤から胚帯への形態変化の過程において、胚盤の縁で発現する *Pt-hh* は、個々の細胞での遺伝子発現のスイッチの切り替えによって胚の後方へと波のように移動することが示されている。また、胚の後方では、*Pt-msx1* の発現が波のように前方へと伝播し、その後ろから *Pt-hh* と *Pt-msx1* の発現が周期的に振動する波として前方に押し寄せる（**Fig 1 B**, Kanayama et al., 2011, Hemmi *et al.,* 2018, Akiyama-Oda, and Oda, 2020）。UMAP プロット上における *Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の発現パターンおよび遺伝子発現プロファイルの変化から、本研究で取得した SnRNA-seq の時系列データが、オオヒメグモ胚上に縞パターンを形成する遺伝子発現の波の移動を捉えられていることがわかった（**Fig 22 B**）。オオヒメグモ胚の後体部における遺伝子発現の振動は約 5 時間の周期性を持つことが示されている（Hemmi *et al.,* 2018）。Series_A の時系列データにおいては、Late Stage 5 + 4h のデータで振動によって生じる *Pt-hh*、*Pt-noto1* の発現が検出された。そのため、Late Stage 5 + 8h までの本データにおいては 2 つ目の振動の波は検出できなかった。しかしながら、Late Stage 5 + 8h における *Pt-noto1* の発現をみると、UMAP プロットの後端で *Pt-noto1* ネガティブな細胞が現れていることから、振動の 1 周期分に対応する情報がこのデータセットに含まれていると考えられる。第一章と同様に、遺伝子発現プロファイルの数値に基づいた階層的クラスタリングによって前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子セットの抽出を行うことで、パターン形成に関わると考えられる遺伝子を網羅できると考えられる。また、パターン形成に関わる遺伝子の構成がどのように時間変化するのかも明らかにできると考えられる。

5 つのデータを 1 つのマトリクスに統合した解析では、発生が進むにつれて UMAP プロット上で新しくクラスターが生じる様子が見られた（**Fig 25 D**）。外胚葉の細胞集団をみてみると、前後の端に新たなクラスターが付け足されているように見えた（**Fig 25 D、矢印**）。*Pt-hh* と *Pt-msx1* の発現パターンから、前端に新たに生じたクラスターは *Pt-hh* の移動によって生じる *Pt-hh* ネガティブな領域に対応し、前端に新たに生じたクラスターは、*Pt-msx1* の波の後半および振動によって生じてくる領域に対応すると考えられる（**Fig 25 F**）。実際のオオヒメグモの胚発生では、細胞が配置換えをしながら遺伝子発現をダイナミックに変化させることでパターン形成を行う。そのため、本研究の UMAP プロット上では細胞集団が前後に伸びているように見えるが、あくまで遺伝子発現の状態が新しく生じているだけで、実際の胚空間に基づいて重なっているわけではないと考えられる。そのため、今後の解析においては注意が必要であるが、Series_A のデータセットのより詳細な解析によって、体節形成において波の動態が生じる際の細胞の状態変化を明らかにできるかもしれない。

細胞の分化過程を理解する上でも時系列データは非常に重要である。*Pt-twist* の UMAP プロット上での発現パターンをみると、Late Stage 5 + 4h から、新しく *Pt-twist* ポジティブなクラスターが生じていた（**Fig 25 E、矢印**）。このクラスターは、胚盤の中央から生じ

る中胚葉の細胞と考えられる。このことは、Series_A のデータセットが胚葉の分化における遺伝子発現の状態変化を明らかにできる可能性を持っていると考えられる。

Series_B

Series_B の時系列データの解析によって、遺伝子発現の波の動態によって縞パターンの現れる様子を捉えることができた（**Fig 23**）。UMAP プロット上における *Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の発現パターンおよび遺伝子発現プロファイルの変化から、本研究で取得した SnRNA-seq の時系列データが、オオヒメグモ胚における縞パターン形成過程を捉えられていることがわかった（**Fig 23 B**）。オオヒメグモ胚の頭部では、*Pt-hh* の発現の間に *Pt-msx1* の発現が生じ、その後 Pt-hh の発現が 2 つの縞に分裂する（Kanayama *et al.,* 2011, Akiyama-Oda, and Oda, 2020）本研究で得られたデータにおいても、Late Stage 5 + 9h から Late Stage 5 + 11h にかけて、頭部の *Pt-hh* ポジティブな領域内で *Pt-msx1* の発現が立ち上がってくる様子が見られた。その後、*Pt-hh* の発現が分裂する様子が、2 つのピークが現れることで検出されていた。胸部における *Pt-msx1* の波の分裂も Series_B の時系列データによって捉えられていた（**Fig 23 C**）。Late Stage 5 + 9h から Late Stage 5 + 13h にかけて *Pt-msx1* の波に 3 つのピークが見られた。*Pt-msx1* と相補的に発現する *Pt-noto1* は Late Stage 5 + 9h から Late Stage 5 + 11h にかけて前方の 2 つのピークが生じ、Late Stage 5 + 13h になって最も後方の 3 つ目のピークが現れた。この結果は、胸部における tri-splitting の過程に時間差がある可能性を示している。また、Series_B のデータでは、後体部における遺伝子発現の振動によって 2 つ目の縞が生じる様子を捉えられていた（**Fig 23 B, C**）。*Pt-noto1* との発現パターンの変化する様子からは、*Pt-noto1* ネガティブな後端の領域で *Pt-msx1* の新たな発現が生じる様子が見られる。一方、*Pt-hh* のパターンの変化を見てみると、*Pt-msx1* の新たな波が生じる際には *Pt-hh* ネガティブな領域はまだ生じていないように見える（**Fig 23 B、**Late Stage 5 + 9h）。これらの結果は、後体部における遺伝子発現の振動の仕組みにおける多様性の存在を示唆するのかもしれない。

第一章と同様に、遺伝子発現プロファイルの数値に基づいた階層的クラスタリングによって前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子セットの抽出を行うことで、パターン形成に関わると考えられる遺伝子を網羅できると考えられる。また、パターン形成に関わる遺伝子の構成がどのように時間変化するのかも明らかにできると考えられる。

5 つのデータを 1 つのマトリクスに統合した解析では、発生が進むにつれて UMAP プロット上で新しくクラスターが生じる様子が見られた（**Fig 26 D**）。Series_A では、外胚葉の前後の端に新たなクラスターが付け足されているように見えたが、Series_B のデータでは、端だけでなく、外胚葉の内部でも新たなクラスターが生じていた（**Fig 26 D、矢印**）。このことは、胚盤におけるはっきりとした境を持たないパターンから、シャープな縞パターンが生じる際に、これまではある程度均一だった細胞集団が複数の状態に分かれてくることを示しているのかもしれない。今後、これらのクラスターを特徴づける遺伝子を検出

し、機能解析を行うことで、オオヒメグモのパターン形成における重要な遺伝子を見出せるかもしれない。

細胞の分化過程を理解する上でも時系列データは非常に重要である。*Pt-twist* の UMAP プロット上での発現パターンをみると、Late Stage 5 + 4h から、新しく *Pt-twist* ポジティブなクラスターが生じていた（**Fig 25 E、矢印**）。このクラスターは、胚盤の中央から生じる中胚葉の細胞と考えられる。このことは、Series_A のデータセットが胚葉の分化における遺伝子発現の状態変化を明らかにできる可能性を持っていると考えられる。

Series_C

Series_C の時系列データからは、前後軸に沿ったパターンの複雑化というよりも、発生における細胞の状態が複雑さを増す過程が捉えられているような結果が得られた（**Fig 24**）。外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並ばなくなり、縞パターンを形成する遺伝子の発現によって大まかに分かれてくる様子が見られた（**Fig 24 B, C、Late Sgate 5 + 16h**）。UMAP プロット上で前後軸の極性が再構成されなくなった原因としては大きく 2 つが考えられる。一つは、SnRNA-seq のデータが含む情報のうち、前後軸の極性の情報以外に情報量が増えてくることである。オオヒメグモの発生では、まず前後軸のパターンが形成された後に背腹方向のパターンが複雑化してくる。このことは、UMAP プロットを作成する際に前後軸だけでなく、背腹軸の極性も含めて細胞がプロットされることを意味する。その結果、前後軸の極性が UMAP プロット上でうまく再構成されなかった可能性がある。二つ目は、前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子セットの変化が考えられる。Stage 7 の解析において、前後軸に沿ってパターンを持つ 213 遺伝子を抽出した。この遺伝子セットの中には、縞パターンをもつものだけでなく、領域特異的にシャープに発現するもの、複数の体節に渡って広範囲に発現するものといった多様なパターンを持つ遺伝子が含まれていた。また、軸に沿ったクラスターのマーカー遺伝子から作成したドットプロットにおいても、マーカー遺伝子の発現は隣接するクラスターにも重なるように発現が確認できた。これらの結果から、前後軸方向に縞パターンを持つ遺伝子のみではなく、領域特異的に発現する遺伝子も、UMAP プロット上での前後軸の極性の再構築に重要であると考えられる。前後軸の極性がうまく再構成されていないデータにおいては、これらの領域特異的な遺伝子の発現に変化が生じているのかもしれない。

結論

オオヒメグモ胚の体節形成の仕組みを包括的に理解するためには個々の細胞の状態をゲノムワイドに定量的に取得することが重要である。本章で私は体節形成期のオオヒメグモ胚への ScRNA-seq および SnRNA-seq が適用可能であることを示した。ScRNA-seq の適

用に際して、酵素処理を用いた細胞の単離方法を確立した。また、SnRNA-seq では UMAP プロット上で外胚葉の細胞が前後軸の極性を反映して並んでいることを見出した。この特徴を利用して、オオヒメグモの全遺伝子に対して前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得する独自の方法論を開発した。得られたプロファイルを用いて、前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子セットを数値に基づいて抽出することを可能にした。抽出した遺伝子の発現プロファイルの微分値を利用して胚全体のパターンを数値的に解析する手法を確立した。さらに、オオヒメグモ兄弟胚の特徴を利用することで SnRNA-seq の時系列データの取得および解析を行うことができた。個々のデータから作製した UMAP プロット上での遺伝子発現パターンの変化および、遺伝子発現プロファイルの取得によって、オオヒメグモの体節形成における遺伝子発現パターンの変化を捉えられていることを示した。今回は代表的な遺伝子のみでパターンの変化を示したが、遺伝子発現プロファイルを用いた階層的クラスタリングによるパターンを持つ遺伝子の抽出を行うことで、パターン形成に関わる可能性のある遺伝子セットの構成がどのように時間変化するのか、それらの遺伝子によってオオヒメグモ胚全体のパターンがどのように変化するのかを数値的に捉えられるようになると考えられる。本研究は、オオヒメグモ胚を用いた SnRNA-seq のデータ解析によって、体節形成過程の遺伝子発現の動的な変化を数値的に捉えられるデータリソースを生み出した。今後は、抽出された遺伝子に対して RNAi による機能解析スクリーニングを行うことで、従来の研究では見つけられなかった、オオヒメグモの体節形成に関与する遺伝子セットの全貌を明らかにできると考えられる。より詳細な機能解析を行うことで、遺伝子制御ネットワークを明らかにできる可能性も考えられる。

本研究で確立した手法が他の動物種にも適用可能であるなら、ゲノムワイドに体節形成の仕組みを比較する方法論の確立も可能になるかもしれない。ゲノムに基づいた比較解析は、節足動物の体節形成の仕組みが持ちうる多様性を理解する上で非常に重要な知見につながると期待される。

Table 1

Library	Cell	Nuc	Nuc
Stage	7	7	5l
No. of Embryos	15	20	20
No. of Cells	865	6,239	4,820
Ave. Genes/Cell	2,553	3,456	2,558
Ave. Molecules/Cell	9,988	11,020	5,561
Total. Genes	13,766	19,692	19,099

Table 2

NCBI ID	Gene Name	Stage 5I	Stage 7	Reference
LOC107440133	*Pt-twist*	pMES	Mesoderm	Oda *et al.,* 2007, Yamazaki *et al.,* 2005
LOC107451427	*At_eW_012_A08*	Endoderm, CM cells	Endoderm, Extraembryonic cells	Oda *et al.,* 2007
LOC107456525	*Pt-Delta*	pEND, cMES	Stripes	Oda *et al.,* 2007
LOC107451717	*Pt-ets4*	CM cells		Pechmann *et al.,* 2017, Iwasaki-Yokozawa *et al.,* 2022
LOC107444265	*Pt-nogginD*	Extraembryonic region		Akiyama-Oda, and Oda, 2020
LOC107457189	*Pt-otd*	Periphery	Head	Akiyama-Oda, and Oda, 2003
LOC107438948	*Pt-rhomboid*	Intermediate region		Akiyama-Oda, and Oda, 2020
LOC107438015	*Pt-gas1*		Thorax	Akiyama-Oda, and Oda, 2020
LOC107452006	*Pt-AP2A*	Center	Opisthosoma	Akiyama-Oda, and Oda, 2020
LOC107451809	*Pt-hh*	Periphery	Stripes	Oda *et al.,* 2007, Kanayama *et al.,* 2011
LOC107447678	*Pt-msx1*	Center	Stripes	Akiyama-Oda, and Oda, 2020
LOC107447988	*Pt-noto1*		Stripes	Hemmi *et al.,* 2018
LOC107450741	*Pt-six3A*		Anterior end	Kanayama *et al.,* 2011
LOC107445228	*Pt-prd2*		Stripes, Posterior end	Akiyama-Oda, and Oda, 2020
LOC107452883	*Pt-aslH*	Posterior end		Akiyama-Oda, and Oda, 2020

Table 3

Series_A

Library	Nuc	Nuc	Nuc	Nuc	Nuc
Stage	5l	5l+2h	5l+4h	5l+6h	5l+8h
No. of Embryos	20	20	20	20	20
No. of Cells	893	3,062	3,086	3,412	4,354
Ave. Genes/Cell	2,977	2,735	2,971	3,057	2,878
Ave. Molecules/Cell	7,530	6,713	7,612	7,993	7,412
Total. Genes	17,536	18,799	18,516	18,794	18,878

Series_B

Library	Nuc	Nuc	Nuc	Nuc
Stage	5l+7h	5l+9h	5l+11h	5l+13h
No. of Embryos	20	20	20	20
No. of Cells	2,945	5,477	6,941	9,813
Ave. Genes/Cell	3,327	3,274	2,939	2,849
Ave. Molecules/Cell	8,914	8,792	7,194	6,916
Total. Genes	19,091	19,494	19,491	19,818

Series_C

Library	Nuc	Nuc	Nuc	Nuc	Nuc
Stage	5l+12h	5l+14h	5l+16h	5l+18h	5l+20h
No. of Embryos	20	20	20	20	20
No. of Cells	3,261	3,070	4,295	6,516	7,684
Ave. Genes/Cell	3,497	3,062	3,117	2,779	2,818
Ave. Molecules/Cell	9,714	8,063	8,186	6,798	6,845
Total. Genes	18,846	18,259	18,650	19,006	19,495

Fig. 1

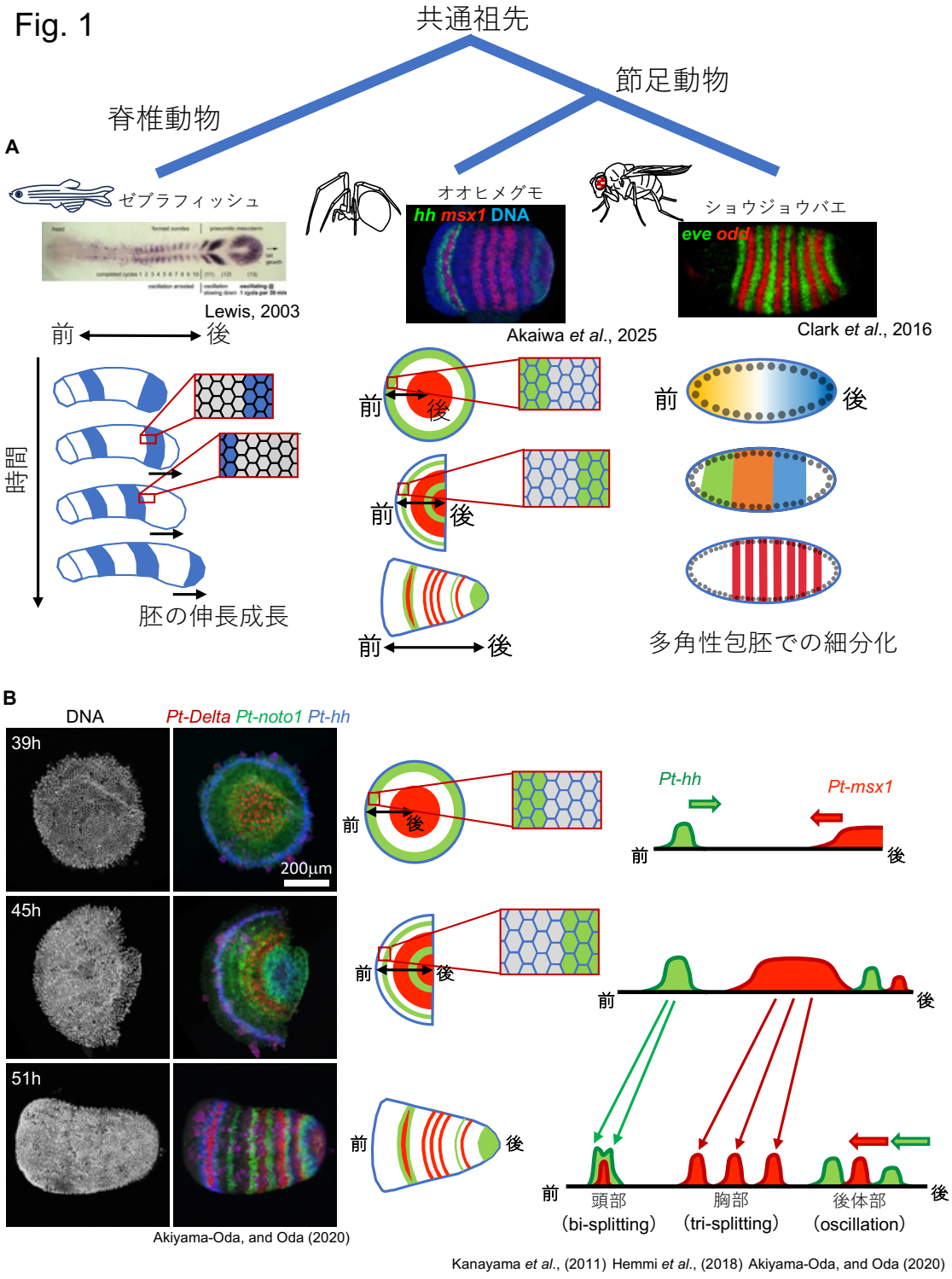

共通祖先
節足動物
脊椎動物
A
ゼブラフィッシュ
Lewis, 2003
オオヒメグモ
hh msx1 DNA
Akaiwa et al., 2025
ショウジョウバエ
eve odd
Clark et al., 2016
前
後
時間
胚の伸長成長
多角性包胚での細分化
B
DNA
Pt-Delta Pt-noto1 Pt-hh
39h
45h
51h
200μm
Pt-hh
Pt-msx1
頭部
(bi-splitting)
胸部
(tri-splitting)
後体部
(oscillation)
Akiyama-Oda, and Oda (2020)
Kanayama et al., (2011) Hemmi et al., (2018) Akiyama-Oda, and Oda (2020)

Fig 1 胚発生過程における体節形成の仕組み

A 脊椎動物（ゼブラフィッシュ）、節足動物（オオヒメグモ、ショウジョウバエ）における体節形成過程。**B** オオヒメグモ胚で起こる遺伝子発現の波の動態による体節形成。縞パターンを形成する遺伝子の FISH 画像（左）と模式図（中央）、縞パターンを形成する波の動態（右）を示す。

Fig. 2

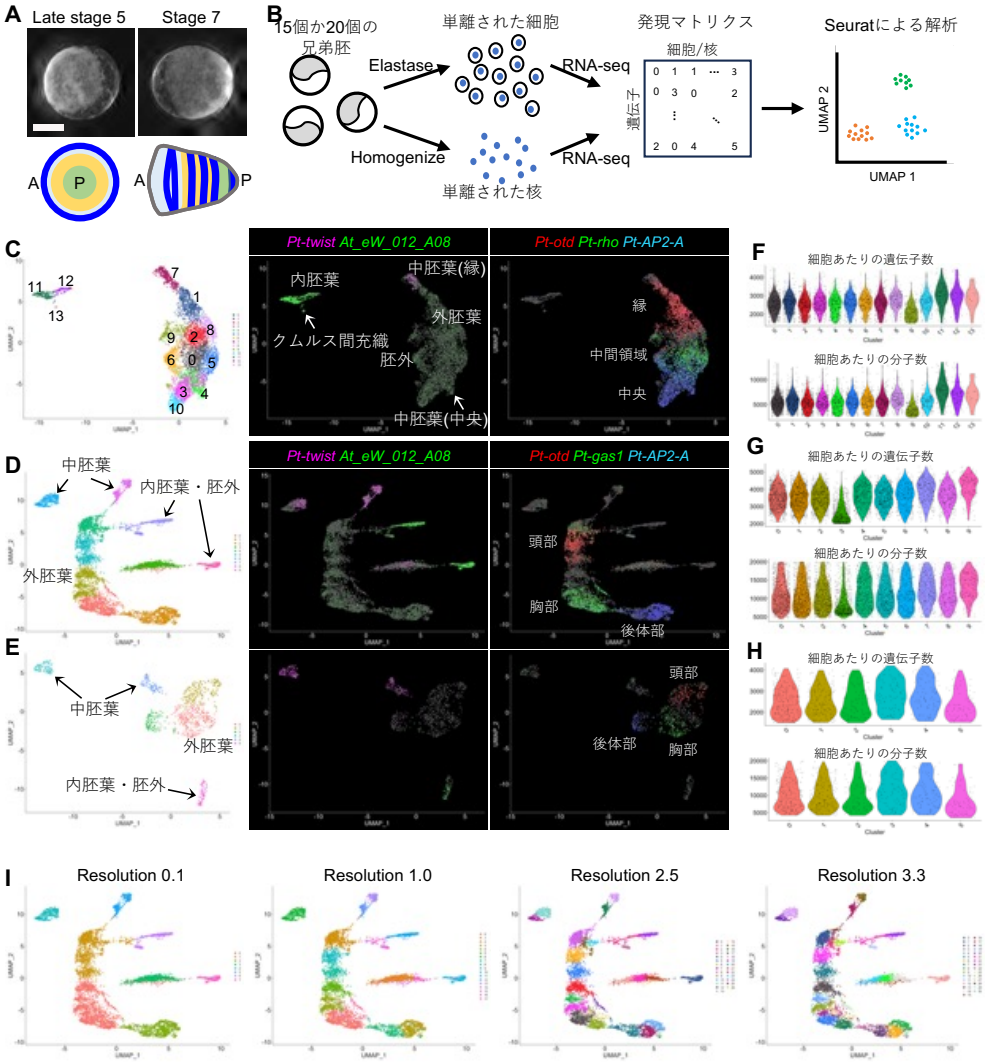


Fig 2 オオヒメグモ胚を用いた ScRNA-seq および SnRNA-seq

A Late Stage 5 および Stage 7 のオオヒメグモ胚。顕微鏡画像（上）。模式図（下）に各々のステージで見られる遺伝子発現パターンを示す。Scale bar は 200μm。**B** 本研究の流れ。**C-E** Late Stage 5 の SnRNA-seq の UMAP プロット（**C**）。Stage 7 の SnRNA-seq の UMAP プロット（**D**）。Stage 7 の ScRNA-seq の UMAP プロット（**E**）。クラスタリングのパラメータはそれぞれ dimension 1:45、resolution 1.4（**C**）、dimension 1:50、resolution 0.5（**D**）、dimension 1:50、resolution 0.5（**E**）で作製した。中胚葉と内胚葉のマーカー遺伝子の発現（中央）および領域特異的な遺伝子の発現パターン（右）。**F-H** それぞれのクラスターにおける細胞あたりで検出された遺伝子数（上）と分子数（下）を示すバイオリンプロット。**I** クラスタリングのパラメータを変化させて作製した Stage 7 の SnRNA-seq の UMAP プロット。Dimension は 1:50、resolution を 0.1, 1.0, 2.5, 3.3 に設定した。

Fig. 3

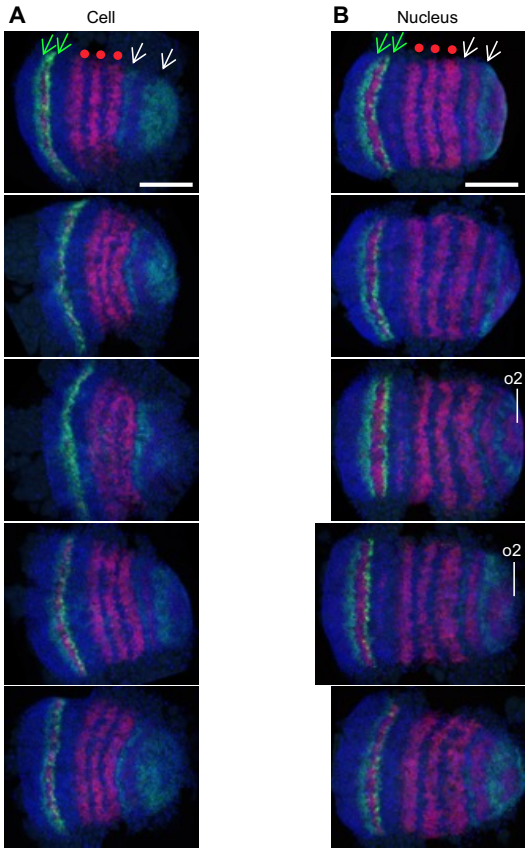


Fig 3 ライブラリ作製に使用した胚の兄弟胚を用いた FISH

Pt-hedgehog（緑）、*Pt-msx1*（赤）の転写産物を FISH で蛍光標識した。矢印およびドットで領域に特徴的な縞パターンを示した。核は DAPI を用いて染色した。

Fig. 4

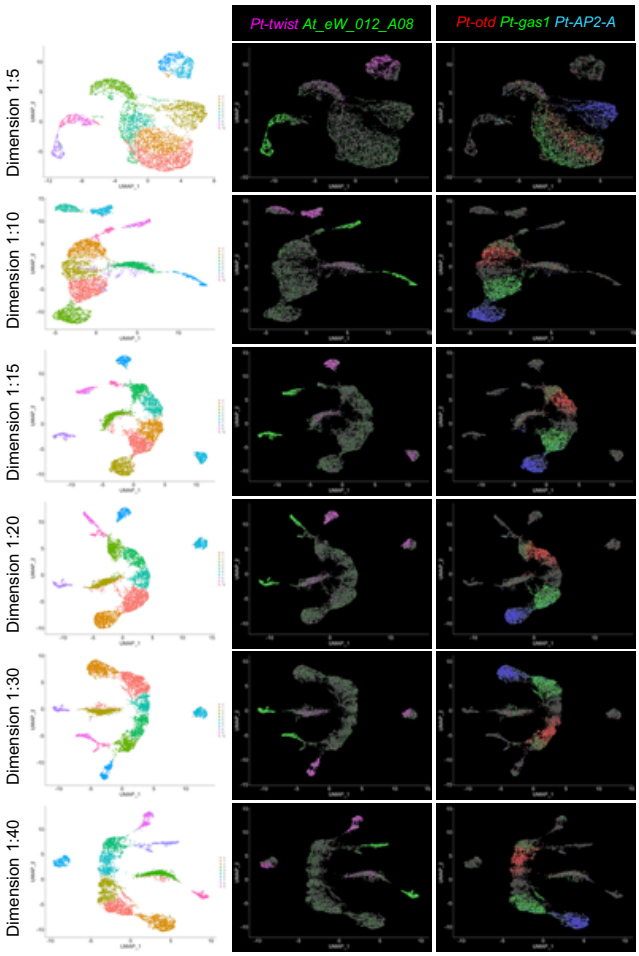


Fig 4 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

Dimension のパラメータを 1:5 から 1:40 まで変化させて作製した UMAP プロット（左）と中胚葉・内胚葉のマーカー遺伝子の発現パターン（中央）、領域特異的な遺伝子の発現パターン（右）。

Fig. 5

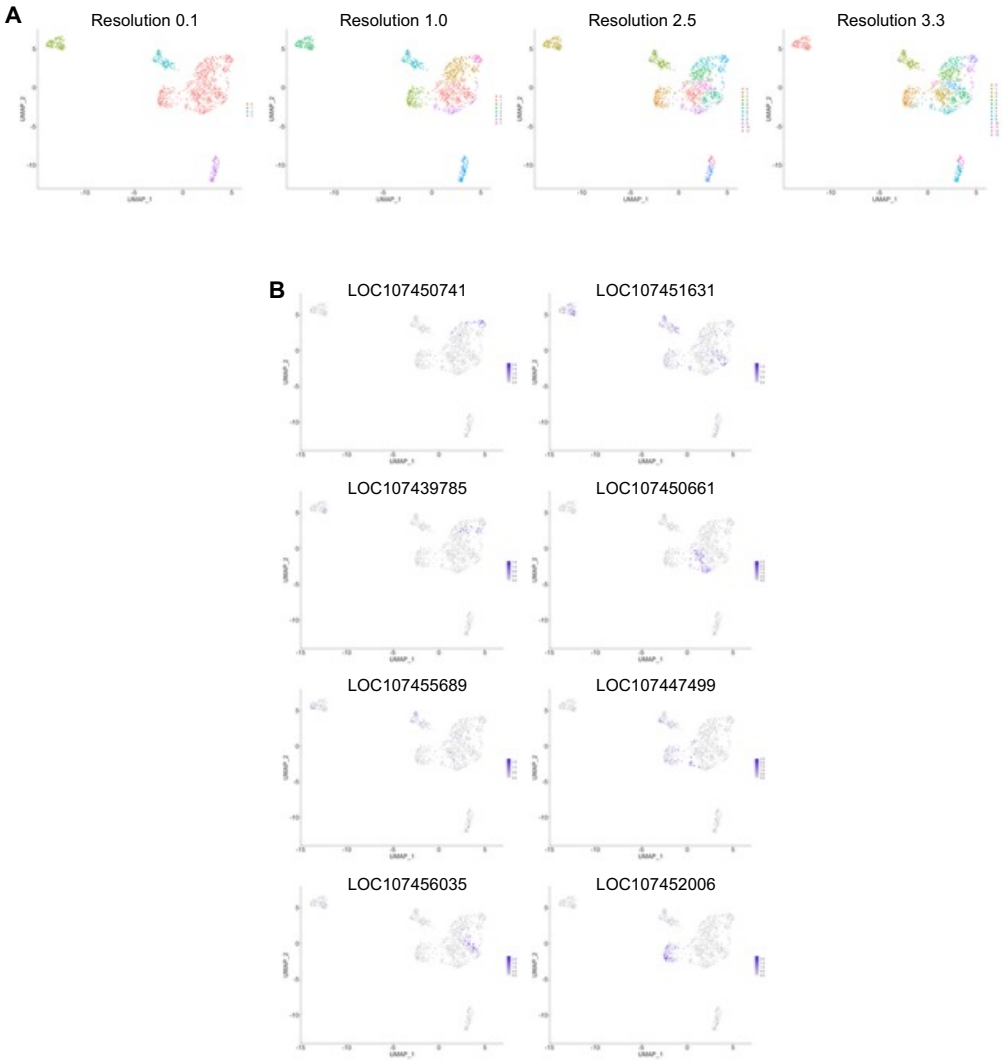


Fig 5 Stage 7 の ScRNA-seq における UMAP プロット

A クラスタリングのパラメータを変化させて作製した Stage 7 の ScRNA-seq の UMAP プロット。Dimension は 1:50、resolution を 0.1, 1.0, 2.5, 3.3 に設定した。**B** Stage 7 のオオヒメグモ胚において前後軸に特異的な領域で発現する既知の遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。

Fig. 6

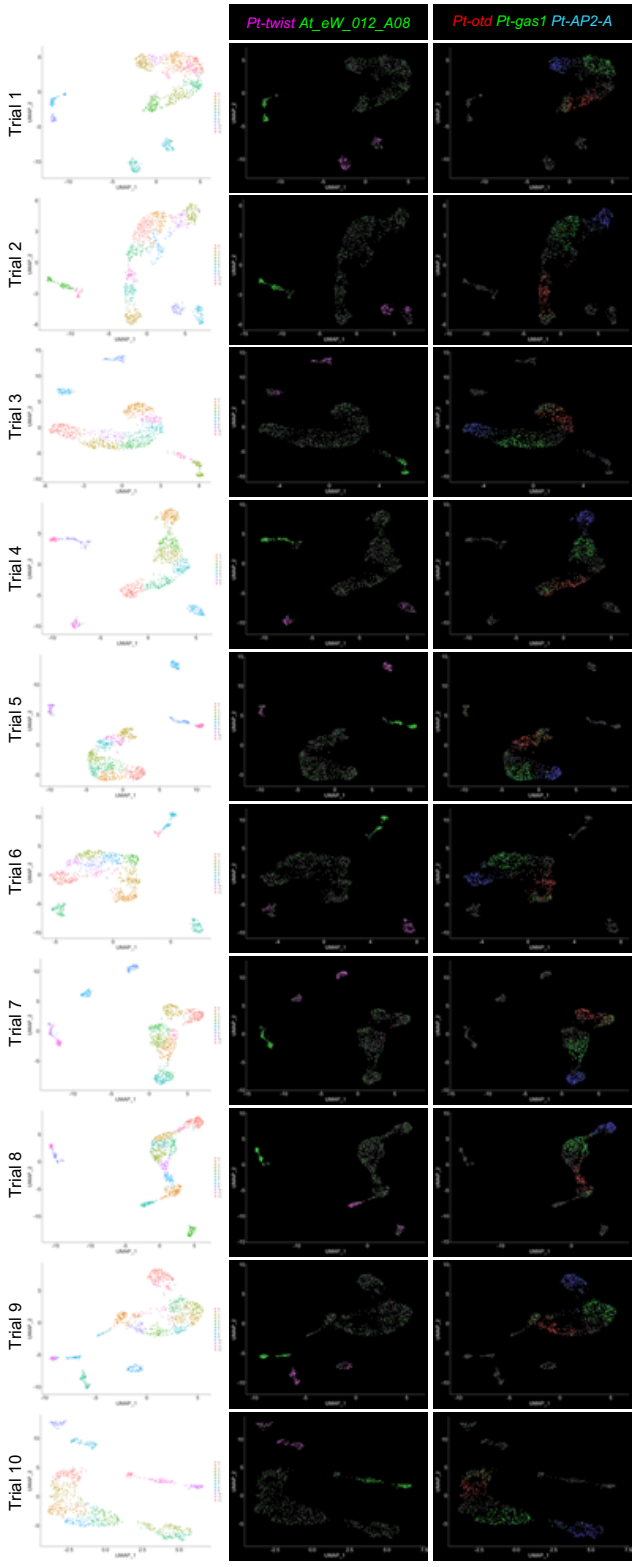

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Trial 1
Trial 2
Trial 3
Trial 4
Trial 5
Trial 6
Trial 7
Trial 8
Trial 9
Trial 10

Fig 6 細胞数を減らして作製した Stage 7 の SnRNA-seq の UMAP プロット

Stage 7 の ScRNA-seq と同じ 865 細胞まで細胞をランダムに減らした SnRNA-seq データから作製した UMAP プロット（左)。中胚葉・内胚葉のマーカー遺伝子の発現パターン（中央)。領域特異的な遺伝子の発現パターン（右)。同じ操作を 10 回繰り返し行った。

Fig. 7

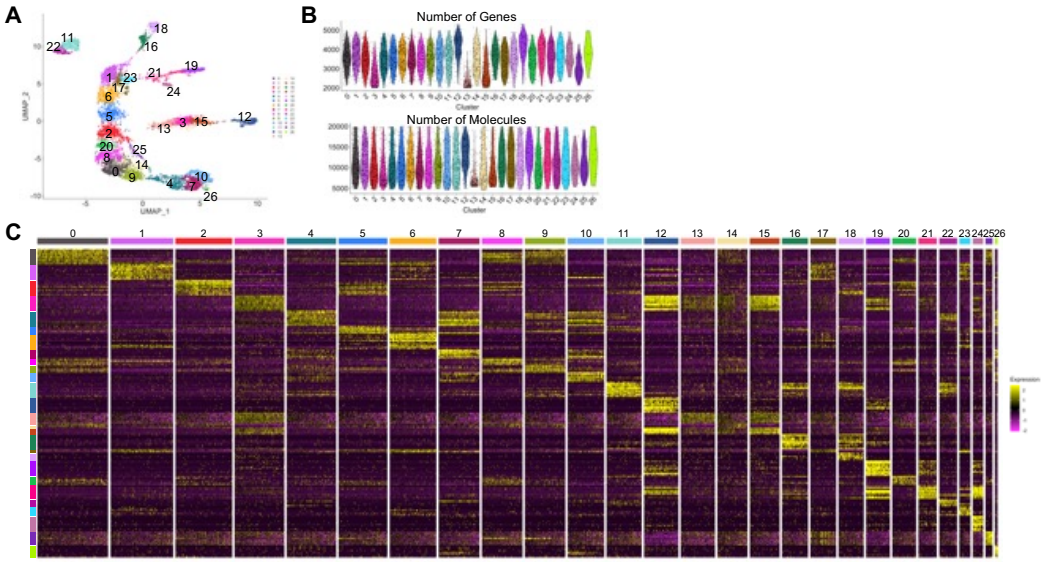


Fig 7 Stage 7 の SnRNA-seq データにおけるクラスタリング解析

A Dimension 1:50、resolution 2.5 で作製した UMAP プロット。**B** 各クラスターの細胞あたりで検出された遺伝子数（上）および分子数（下）を示すバイオリンプロット。**C** 各クラスターを特徴づける遺伝子から作製したヒートマップ。上位 10 遺伝子の発現を示し、重複した場合は始めに現れたクラスターでのみ出力した。

Fig. 8

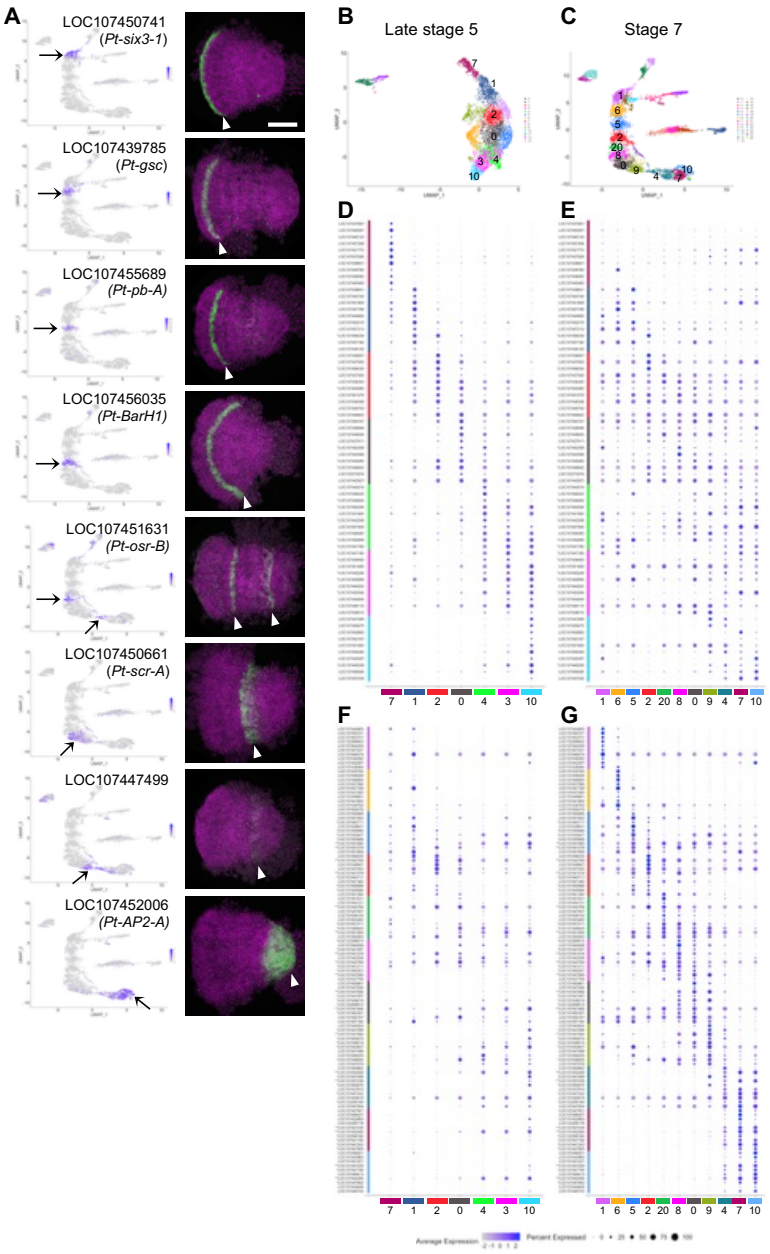


Fig 8 Stage 7 の外胚葉クラスターのマーカー遺伝子の発現パターン

A 前後軸に沿って領域特異的に発現する既知の遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン（左）と実際の胚での発現パターン（右）。UMAP プロットでの発現を黒の矢印で、実際の胚での発現領域を白の鏃で示す。Scale bar は 200μm。**B, C** Late Stage 5（B）および Stage 7（C）の UMAP プロット。外胚葉で方向性を持って並ぶクラスターに番号をつけた。

D-G Late Stage 5 および Stage 7 の番号をつけたクタスターを特徴づける遺伝子のうち上位 10 個の遺伝子の発現から作製したドットプロット。Late Stage 5 の細胞におけるマーカー遺伝子の発現を見たもの（D, E）と Stage 7 の細胞におけるマーカー遺伝子の発現を見たもの（F, G)。クラスターごとの対数正規化された平均発現量と発現する細胞の割合がドットの色の濃さおよび大きさで示されて入る。複数回現れた遺伝子についてはアスタリスクをつけて示した（*は 2 回、**は 3 回現れたことを示す)。

Fig. 9

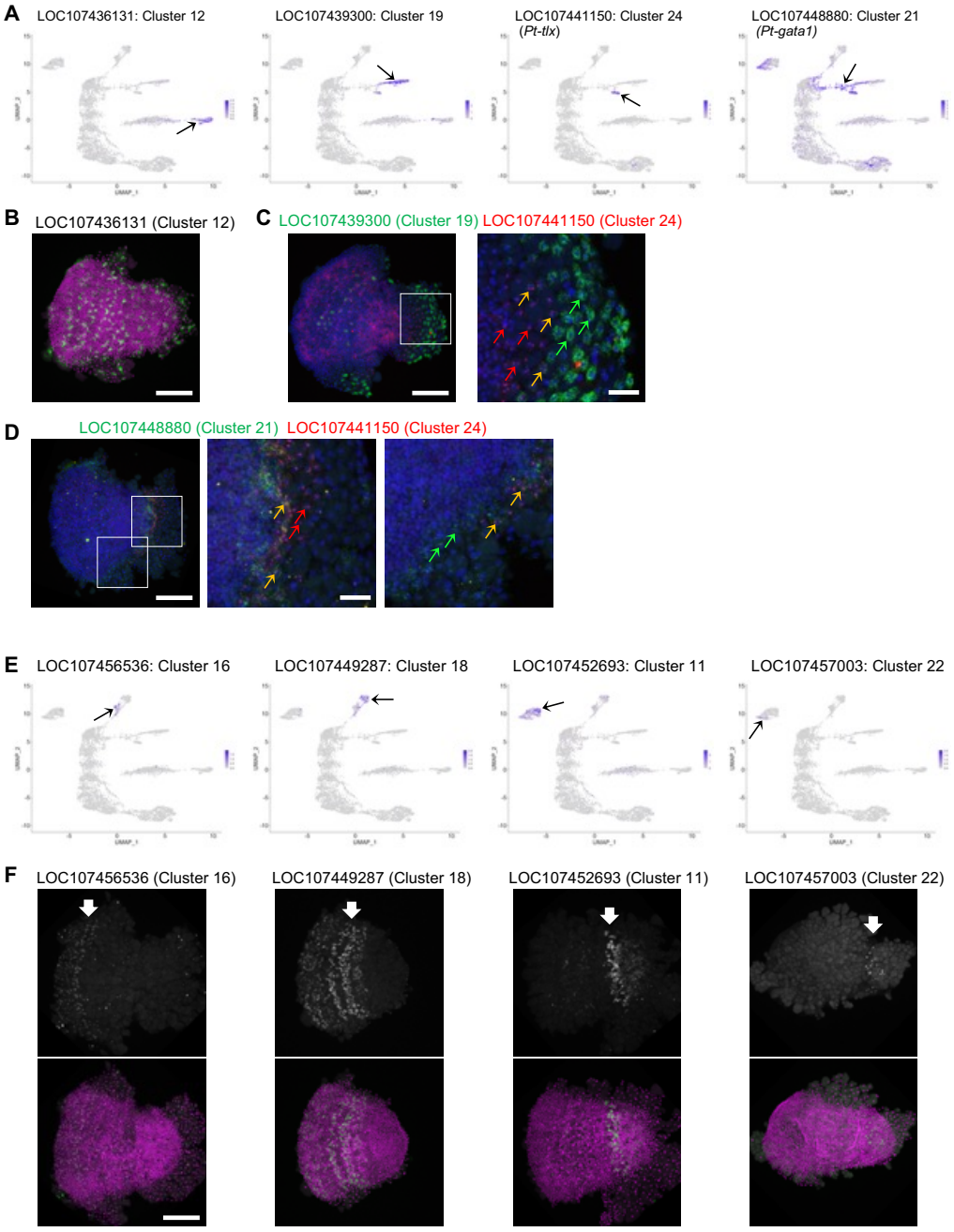


Fig 9 Stage 7 の中胚葉クラスター、内胚葉クラスターの解析

A 内胚葉および胚外のクラスターの解析に使用した遺伝子の UMAP プロット。矢印で発現するクラスターを示した。**B-D** 内胚葉クラスターおよび胚外のマーカー遺伝子の FISH 画像。LOC107436131（B, 緑）、LOC107439300（C, 緑）、LOC107441150（C, D 赤）、LOC107448880（D, 緑）。DAPI で核の DNA を標識した（B, 紫 C, D, 青）。四角で囲まれ

た枠を拡大して隣に示した。緑および赤の矢印はシングルポジティブな細胞、黄色の矢印はダブルポジティブな細胞を示す。**E** 中胚葉のクラスターの解析に使用した遺伝子のUMAPプロット。矢印で発現するクラスターを示した。**F** 中胚葉のマーカー遺伝子のFISH画像。シグナルは上下の画像に示した（下：緑）。矢印でシグナルの位置を示す。DAPI で核の DNA を標識した（紫）。スケールバーは 200μm および 50μm（拡大画像）。

Fig. 10

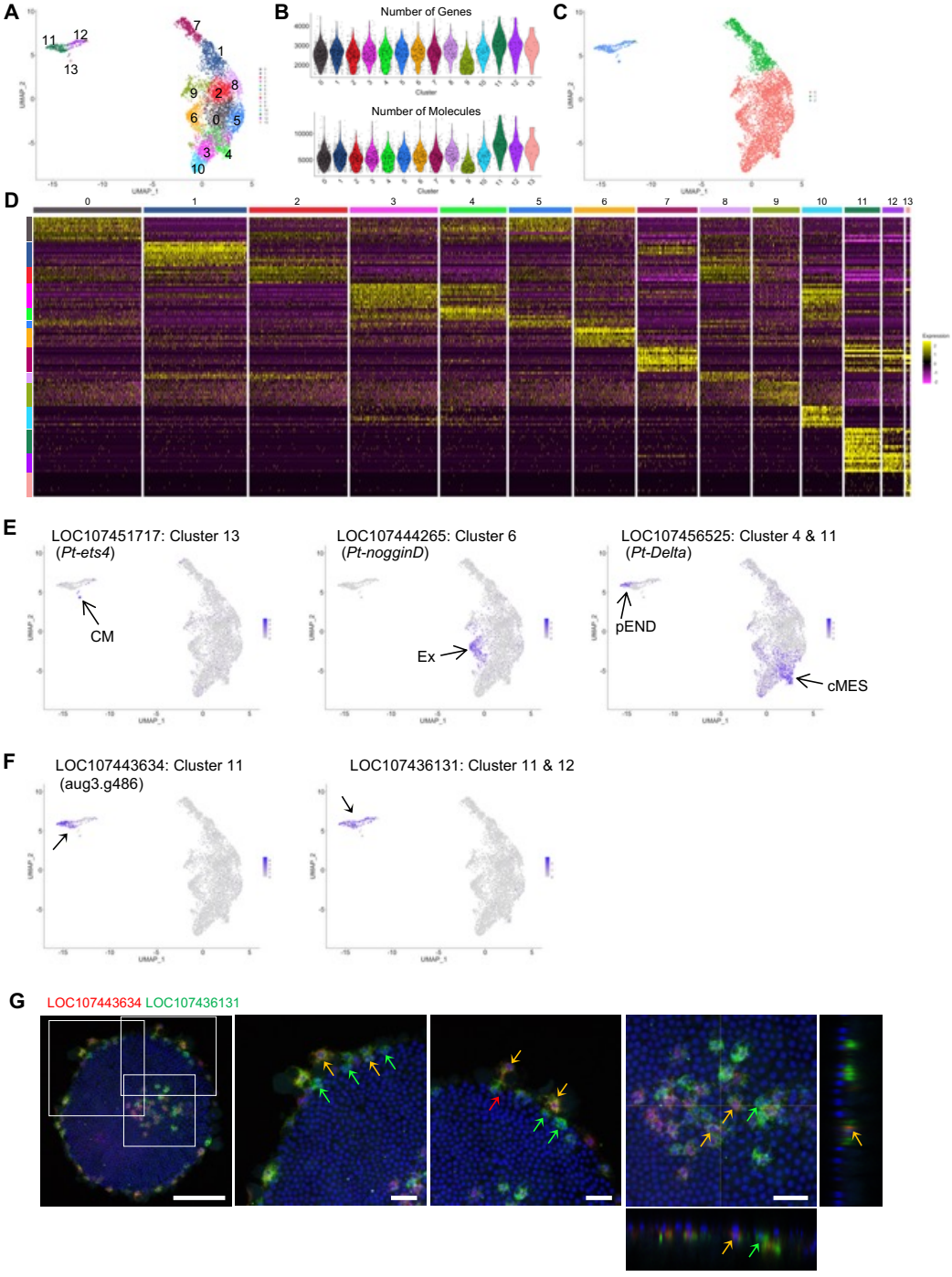


Fig 10 Late Stage 5 の SnRNA-seq データのクラスタリングおよび内胚葉細胞の特定

A Late Stage 5 の UMAP プロット。クラスターに番号をつけた。**B** バイオリンプロット。細胞あたり発現する遺伝子の種類（上）および検出された分子数（下）について、クラス

ターごとに示した。**C** Late Stage 5 の UMAP プロット。resolution のパラメータを 0.1 で作製した。**D** 個々の細胞核での遺伝子発現量（対数正規化）を示したヒートマップ。それぞれのクラスターを特徴づける遺伝子のうち上位 10 個を示す。ヒートマップ上でより上の位置にすでに現れた遺伝子は重複していない。E 既知のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107451717（クムルス間充織）、LOC107444265（胚外）、LOC107456525（縁の内胚葉および中央の中胚葉）。矢印でそれぞれ発現箇所を示した。**F** 2 つの内胚葉クラスター（クラスター11, 12）のマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。矢印で発現箇所を示した。**G** 内胚葉マーカーの FISH 画像。LOC107443634（クラスター11、赤）、LOC107436131（クラスター11 および 12、緑）。DAPI で核の DNA を標識した（青）。四角の枠を拡大して隣に示した。胚盤中央については断面図も示した。緑および赤の矢印はシングルポジティブな細胞を、黄色の矢印はダブルポジティブな細胞を示す。スケールバーは 200μm および 50μm（拡大図）。

Fig. 11

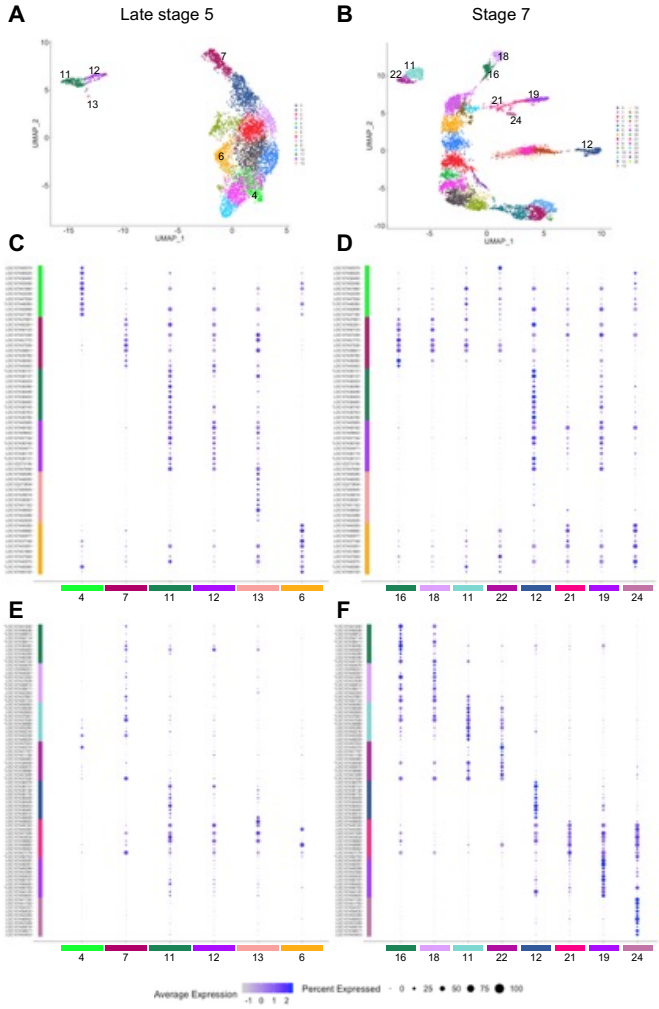
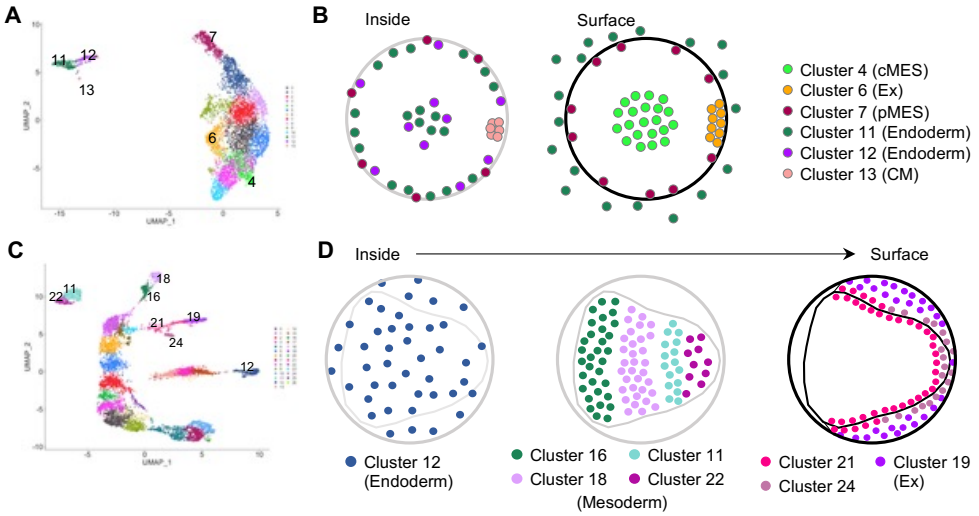


Fig 11 中胚葉および内胚葉クラスターのマーカー遺伝子の解析

A, B Late Stage 5（A）および Stage 7（B）の UMAP プロット。中胚葉および内胚葉、胚外のクラスターに番号をつけた。**C-F** Late Stage 5 および Stage 7 の番号をつけたクタスターを特徴づける遺伝子のうち上位 10 個の遺伝子の発現から作製したドットプロット。Late Stage 5 の細胞におけるマーカー遺伝子の発現を見たもの（C, D）と Stage 7 の細胞におけるマーカー遺伝子の発現を見たもの（E, F）。クラスターごとの対数正規化された平均発現量と発現する細胞の割合がドットの色の濃さおよび大きさで示されて入る。複数回現れた遺伝子についてはアスタリスクをつけて示した（*は 2 回、**は 3 回現れたことを示す）。

Fig. 12



図の作製：秋山-小田康子博士

Fig12 中胚葉および内胚葉細胞の多様性の解析

A, C Late Stage 5（A）および Stage 7（C）の UMAP プロット。中胚葉および内胚葉、胚外のクラスターに番号をつけた。**B** Late Stage 5 の胚盤の内側および表層における非外胚葉細胞の位置を示す模式図。**D** Stage 7 の胚帯の内側に位置する内胚葉および中胚葉、胚の表層の胚外細胞の位置を示す模式図。

Fig. 13

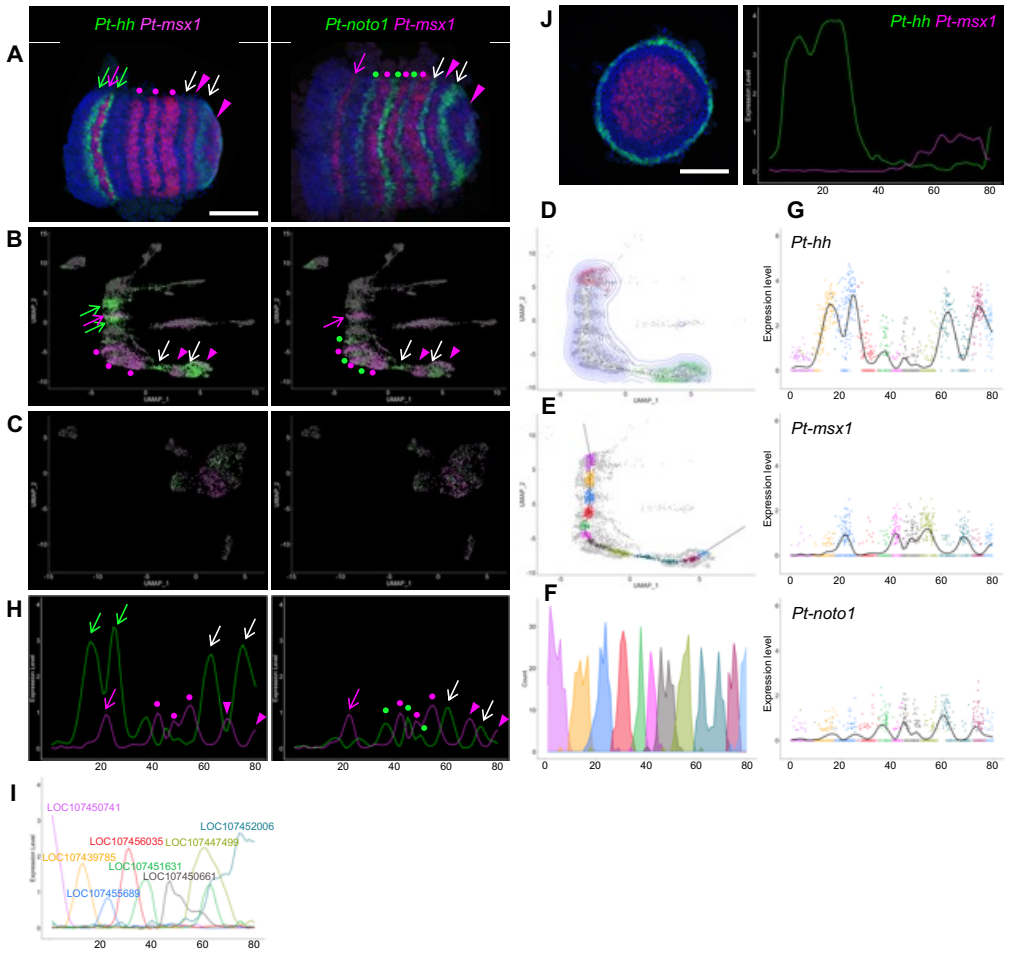


Fig13 UMAP プロットにおける縞パターンの検出と遺伝子発現プロファイルの生成

A-C 縞パターンを作る遺伝子の FISH 画像（A）および SnRNA-seq（B）、ScRNA-seq（C）の UMAP プロット上での発現パターン。*Pt-hh*（左、緑）、*Pt-noto1*（右、緑）、*Pt-msx1*（赤またはマゼンタ）。FISH 画像では、DAPI によって核の DNA を標識した。緑およびマゼンタの矢印で頭部の縞を、緑とマゼンタのドットで胸部の縞を、白の矢印およびマゼンタの矢頭で後体部の縞を示す。**D-G** UMAP プロットの線型化過程。外胚葉の細胞の座標値から作製した密度等高線（D、青）と *Pt-six3-1* および *Pt-prd2* を発現する細胞の座標値から作製した密度等高線（D、赤および緑）。UMAP プロットを線型化するスプライン曲線（E）。下流の解析に使用した細胞（色付きの細胞）の軸に沿った分布（F）。軸に沿った *Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の発現パターン（点）。遺伝子発現プロファイルを実線で示した（G）。細胞の色は resolution2.5 で作製した Stage 7 の UMAP プロットに対応する。**H** *Pt-hh*（左、緑）と *Pt-msx1*（左、マゼンタ）、*Pt-noto1*（右、緑）の遺伝子発現プロファ

イル。矢印、ドットは A, B と対応する。I Fig8-A で示した領域特異的な遺伝子の発現プロファイル。線の色は resolution2.5 で作製した Stage 7 の UMAP プロットに対応する。J Late Stage 5 における *Pt-hh*（緑）および *Pt-msx1*（赤またはマゼンタ）の FISH 画像と遺伝子発現プロファイル。DAPI によって核の DNA を標識した（青）。

Fig. 14

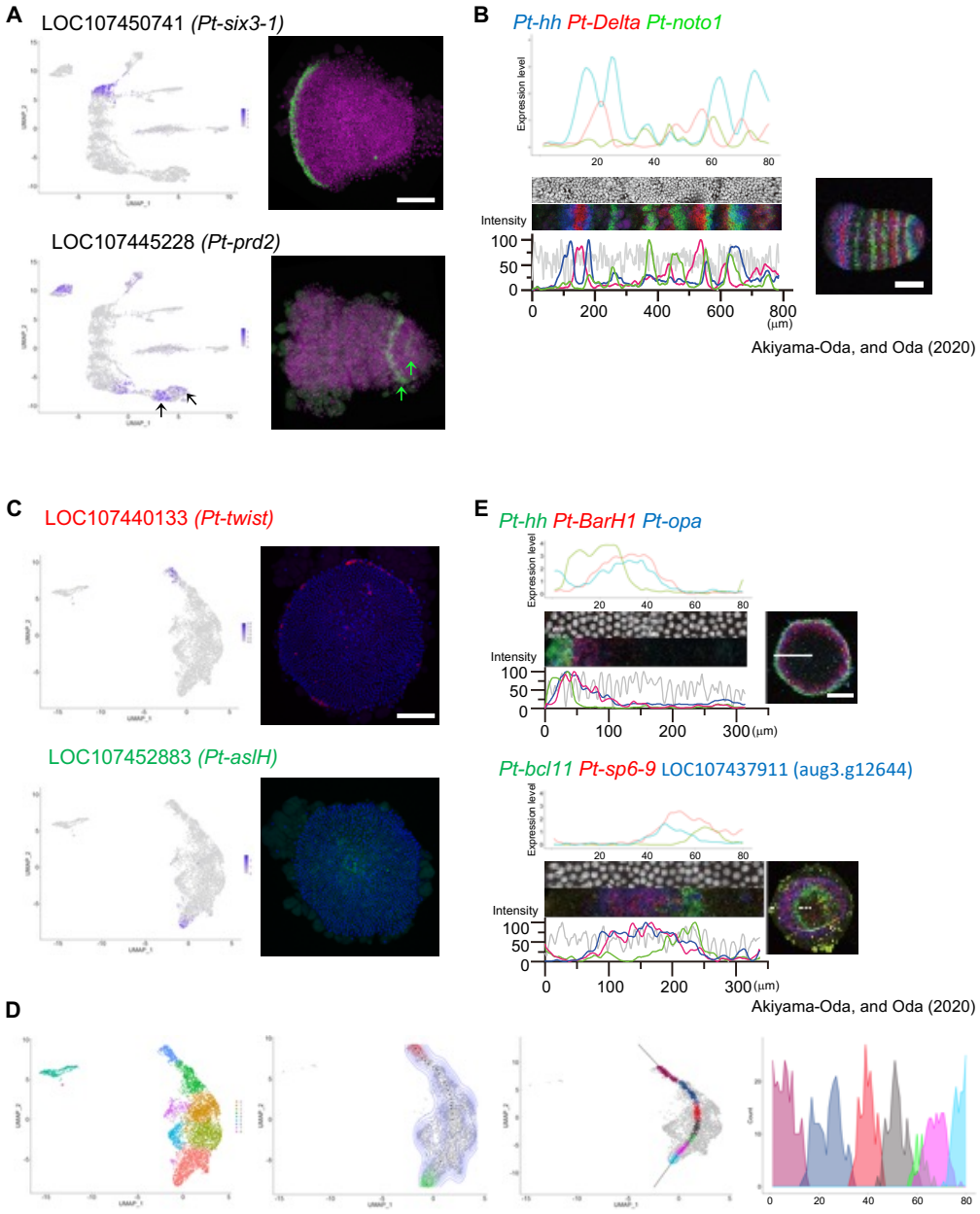


Fig14 遺伝子発現プロファイルの生成および FISH パターンとの比較

A 線型化の軸の端を決めるのに使用した遺伝子の UMAP プロット（左）および FISH 画像（右、緑）DAPI によって核の DNA を標識した（マゼンタ）。矢印は *Pt-prd2* の後体部での FISH パターンと UMAP プロット上でのパターンの対応を示す。**B** *Pt-hh*（青）、*Pt-Delta*（赤）、*Pt-noto1*（緑）の遺伝子発現プロファイル（上）と FISH 画像（下右）、FISH 画像をもとに作製した定量プロファイル（下左）。**C, D** Late Stage 5 の UMAP プロットの

線型化過程。端を決めるのに使用した遺伝子の UMAP プロット上でのパターンと FISH 画像（C)。resolution0.5 で作製した UMAP プロット（D、左)。外胚葉および胚外の細胞の座標値で作製した密度等高線（青）と端を決めるために作製した等高線（赤、緑)。線型化に使用したスプライン曲線と軸に沿った細胞の分布。細胞の色は resolution1.4 で作製した UMAP プロットにおける色と対応する（D)。**E** 遺伝子発現プロファイル（上）と FISH 画像（下右)、FISH 画像をもとに作製した定量プロファイルの比較（下左)。*Pt-hh*（緑)、*Pt-BarH1*（赤)、*Pt-opa*（青）と *Pt-bcl11*（緑)、*Pt-sp6-9*（赤)、*LOC107437911*（青）を利用した。スケールバーは 200μm。B, E の FISH 画像と定量プロファイルは Akiyama-Oda, and Oda, 2020.（CCBY4.0）より抜粋。

Fig. 15

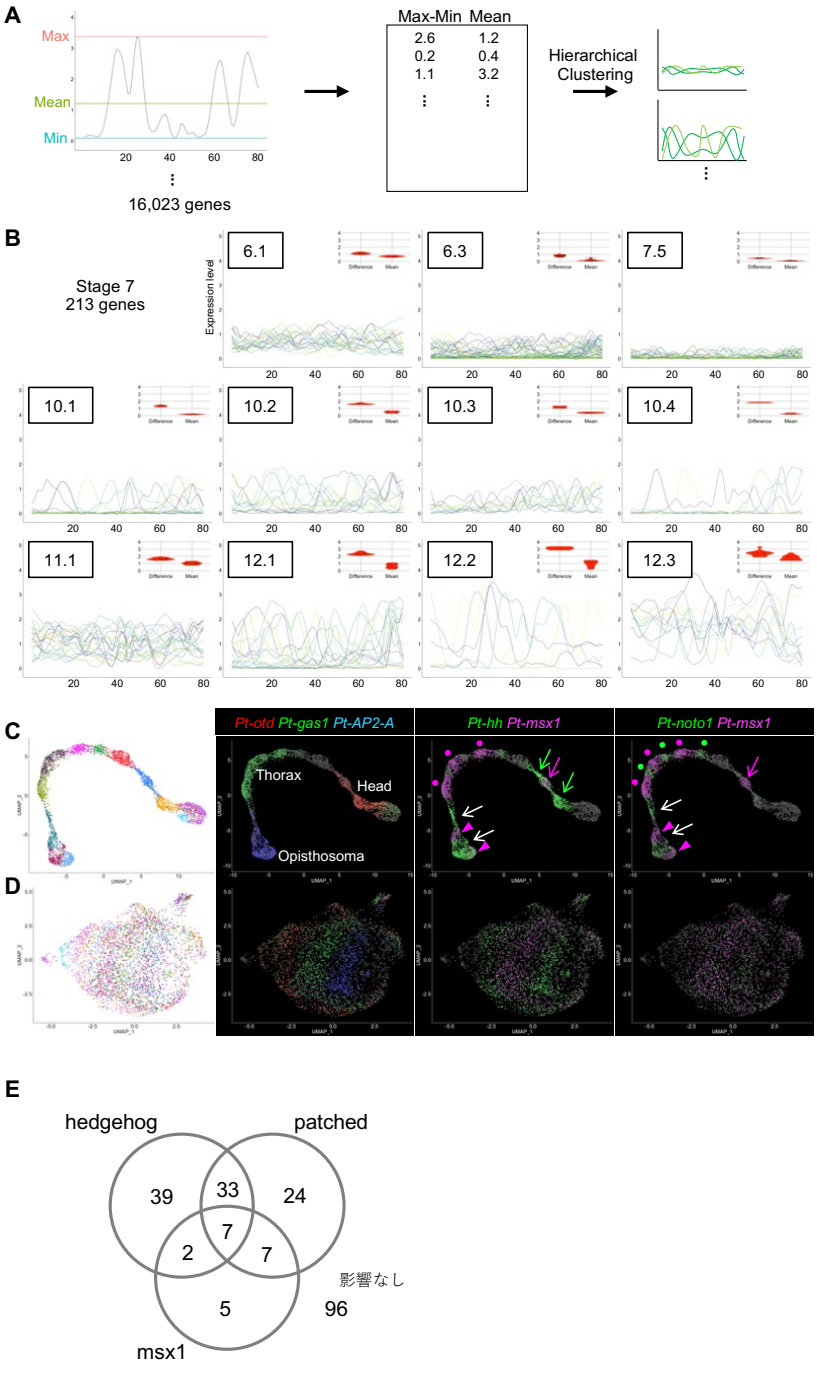


Fig15 軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の数値による抽出

A 階層的クラスタリングによる遺伝子抽出。**B** 抽出された 213 個の遺伝子の発現プロファイル。**C, D** 外胚葉の 4,102 細胞に対して、213 遺伝子のみの情報から作製した UMAP プロ

ット（左)。領域特異的な遺伝子（*Pt-otd*：赤、*Pt-gas1*：緑、*Pt-AP2-A*：青）と縞パターンを形成する遺伝子のUMAPプロット上での発現パターン。*Pt-hh*、*Pt-noto1*、*Pt-msx1*のパターンを示した。矢印、ドットはFig13A, B に対応する。**E** 抽出された213遺伝子における、pRNAiによって発現量に変動が見られた遺伝子の数を示したベン図。

Fig. 16

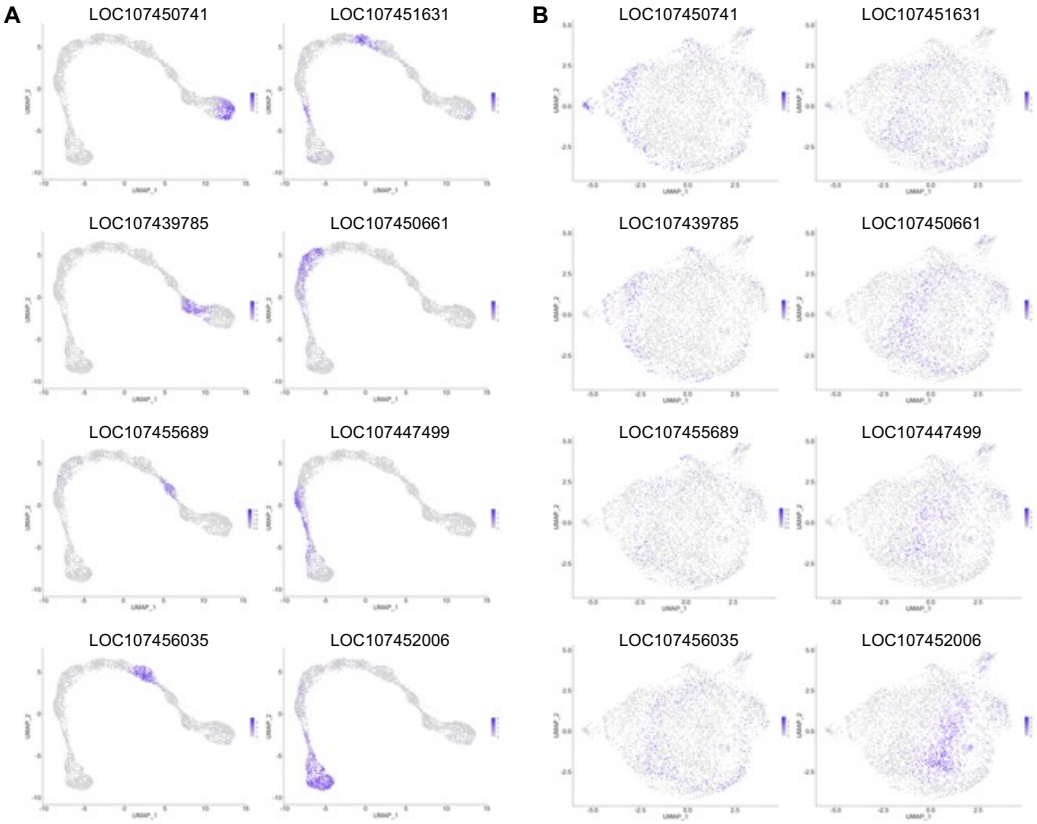


Fig16 前後軸にパターンを持つ遺伝子の UMAP プロットでの発現パターン

A, B 外胚葉の 4,102 細胞に対して、213 遺伝子のみの情報から作製した UMAP プロット（A）と 213 遺伝子を除いたマトリクスから作製した UMAP プロット（B)。Fig8A と同じ遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを示した。

Fig. 17



Fig17 クラスター内での遺伝子発現のランダム化実験

A-C 抽出された 213 遺伝子の発現量のランダム化実験。クラスター5 の細胞間でのランダム化前（A 左、青）ランダム化後（A 右、茶色）。抽出された 213 遺伝子以外の 213 遺伝子

を無作為に選び、ランダム化した対照実験（B、緑）。外胚葉で軸に沿って並ぶ10個のクラスターそれぞれで行ったランダム化実験（C、色の濃いクラスター）。**D** クラスター5 の細胞の一部で、ランダム化を行った実験。UMAP 上の割合はランダム化した細胞の割合を示す。

Fig. 18

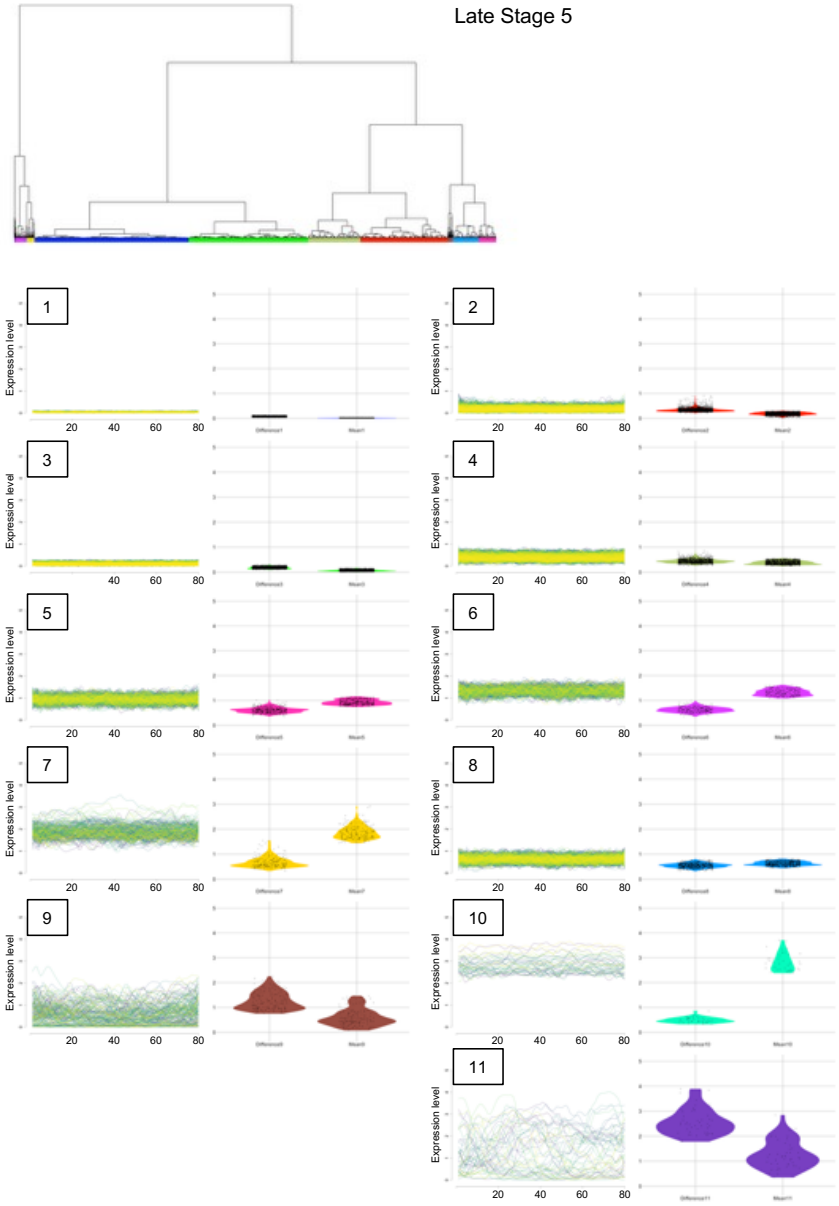


Fig18 Late Sgate 5 におけるクラスタリング解析

Late Stage 5 の遺伝子発現プロファイルをもとに行ったクラスタリング解析。クラスタリングの樹形図（上）およびそれぞれのクラスターに属する遺伝子の発現プロファイル（下図、左)。バイオリンプロットはプロファイルの平均値と最大・最小の差の値を示す（下図、右)。樹形図におけるクラスターの色とバイオリンプロットの色が対応する。

Fig. 19

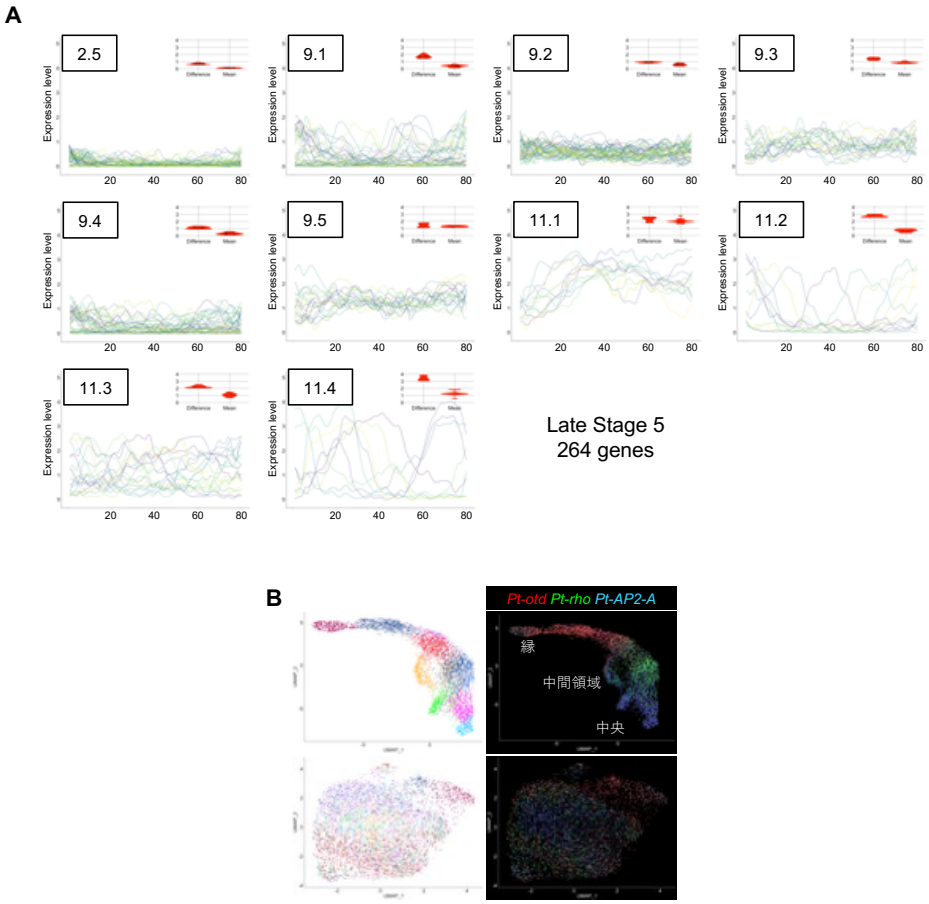


Fig 19 Late Sgate 5 で抽出された遺伝子の解析

A Late Stage 5 の遺伝子発現プロファイルから抽出された 264 個の遺伝子の発現プロファイル。グラフ内のバイオリンプロットはプロファイルの平均値と最大・最小の差の値を示す。**B** 抽出された 264 遺伝子のみの情報から作製した UMAP プロット（上）と 264 遺伝子を除いたマトリクスから作製した UMAP プロット（下）。Fig2C と同じ遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンを示す（右）。

Fig. 20

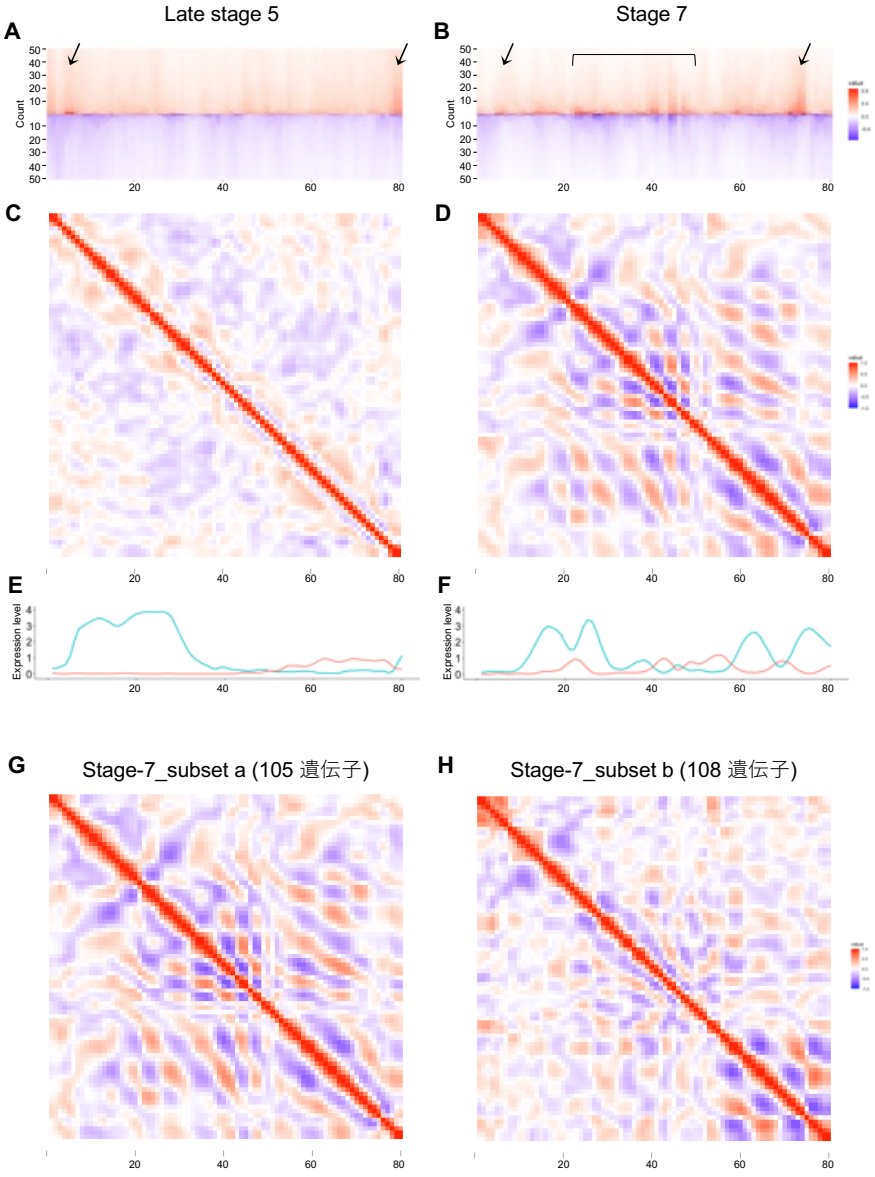


Fig20 遺伝子発現プロファイルの微分値を用いたパターン解析

A, B Late Stage 5 で抽出された 264 遺伝子および Stage 7 で抽出された 213 遺伝子の発現プロファイル上の各点での微分値を絶対値の大きい順に並べたヒートマップ。上位 50 個の遺伝子について示す。正の値は赤、負の値は青で示した。矢印と括弧で色の濃い領域を示す。**C, D** 抽出された遺伝子の微分値をもとに計算した相関係数から作製したヒートマップ。**E,**

F Late Stage 5（E）および Stage 7（F）における *Pt-hh*（青）と *Pt-msx1*（赤）の遺伝子発現プロファイル。**G, H** Stage 7 で抽出された 213 遺伝子のうち、Late Stage 5 で抽出された 264 遺伝子に含まれる 105 遺伝子（G）、含まれない 108 遺伝子（H）から作製したヒートマップ。

Fig. 21

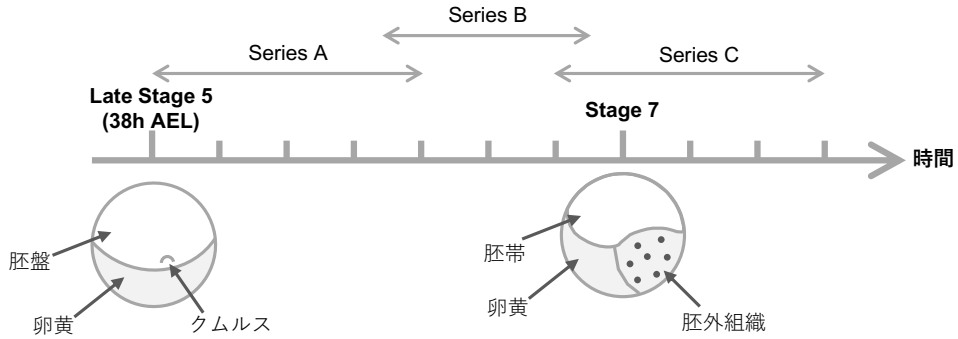


Fig21 時系列データの取得

本研究で取得した時系列データのサンプリングの模式図。クムルスが胚盤の縁に到着するタイミングを Late Stage 5（38h AEL）とし、2 時間おきにサンプルを取得した。Late Stage 5 から Late Stage 5 + 8h まで（Series_A）、Late Stage 5 + 7h から Late Stage 5 + 13h まで（Series_B）、Late Stage 5 + 12h から Late Stage 5 + 20h まで（Series_C）の 3 つのデータセットを作製した。

Fig. 22

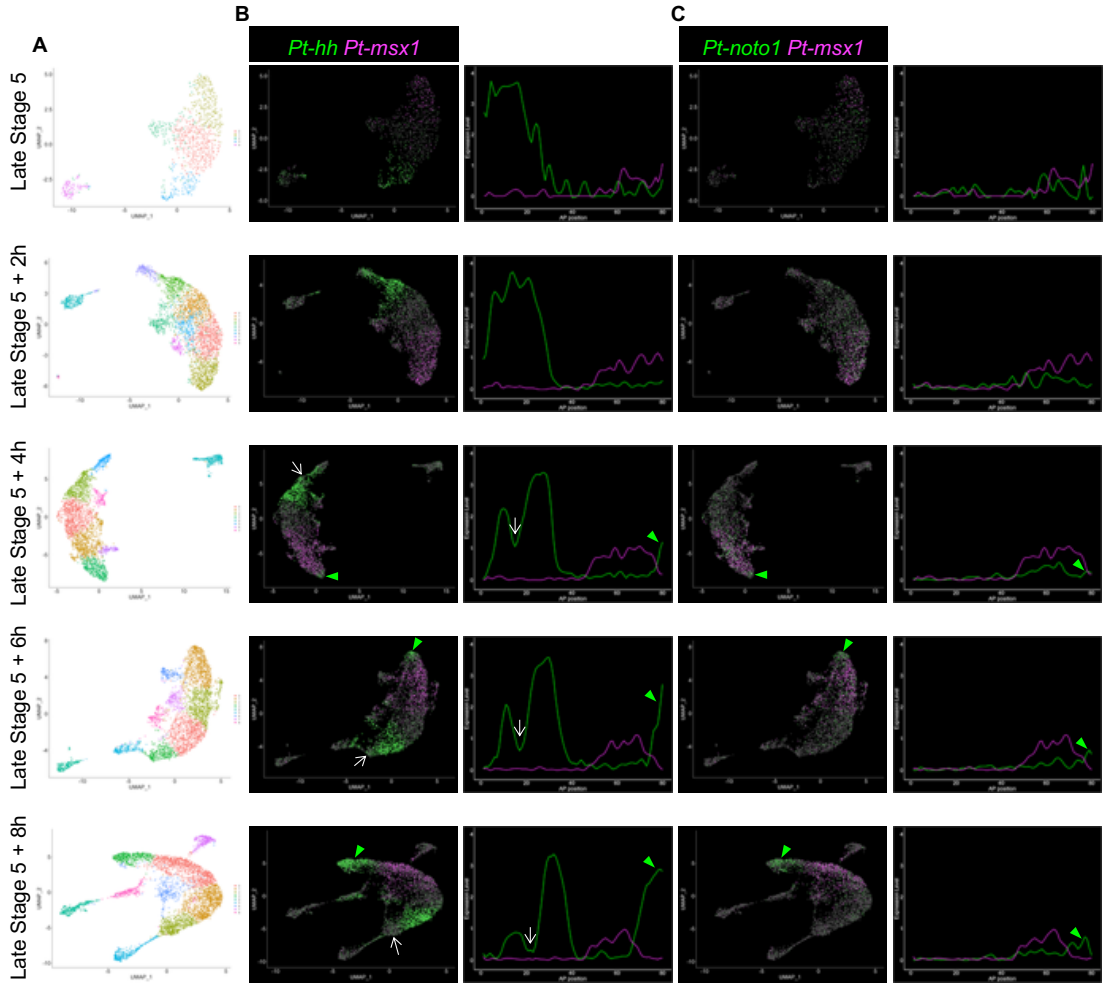


Fig22 Series_A における遺伝子発現パターンの時間変化

時系列データ（Series_A）の各データから作製した UMAP プロット（左）。オオヒメグモ胚で縞パターンを形成する遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンおよび軸に沿った発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）と *Pt-msx1*（マゼンタ）、*Pt-noto1*（緑）と *Pt-msx1*（マゼンタ）の組み合わせで示す。

Fig. 23

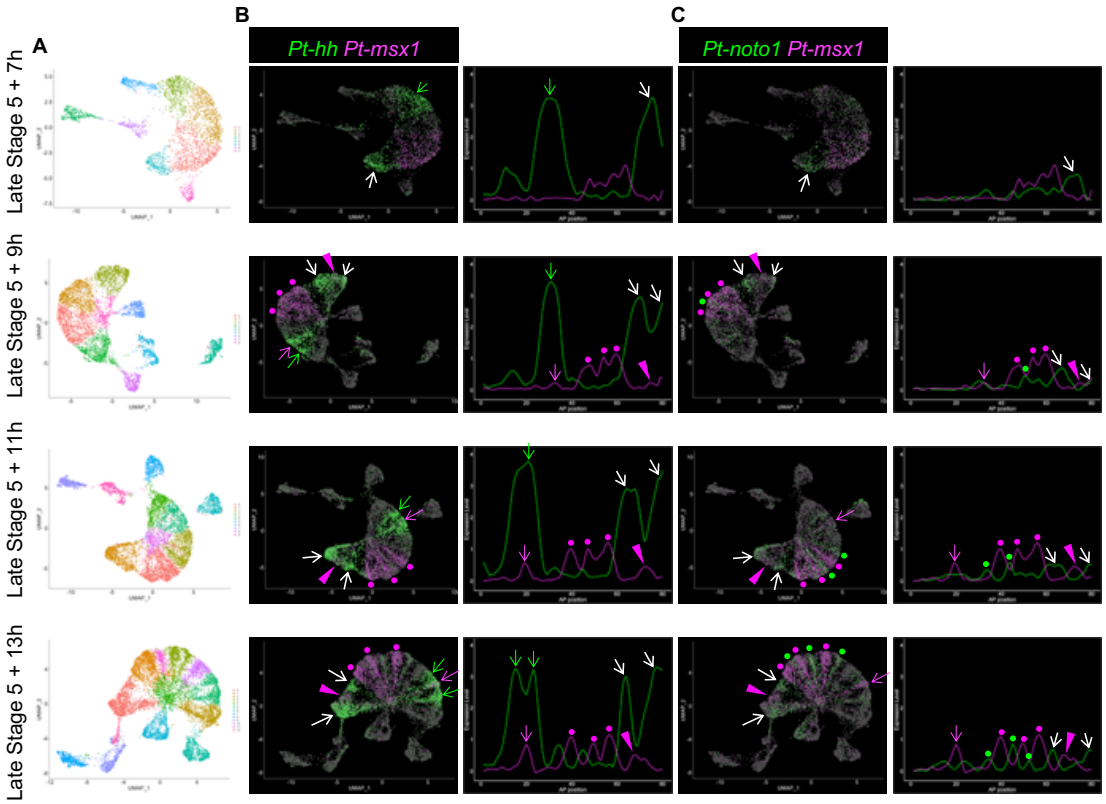


Fig23 Series_B における遺伝子発現パターンの時間変化

時系列データ（Series_B）の各データから作製した UMAP プロット（左）。オオヒメグモ胚で縞パターンを形成する遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンおよび軸に沿った発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）と *Pt-msx1*（マゼンタ）、*Pt-noto1*（緑）と *Pt-msx1*（マゼンタ）の組み合わせで示す。

Fig. 24

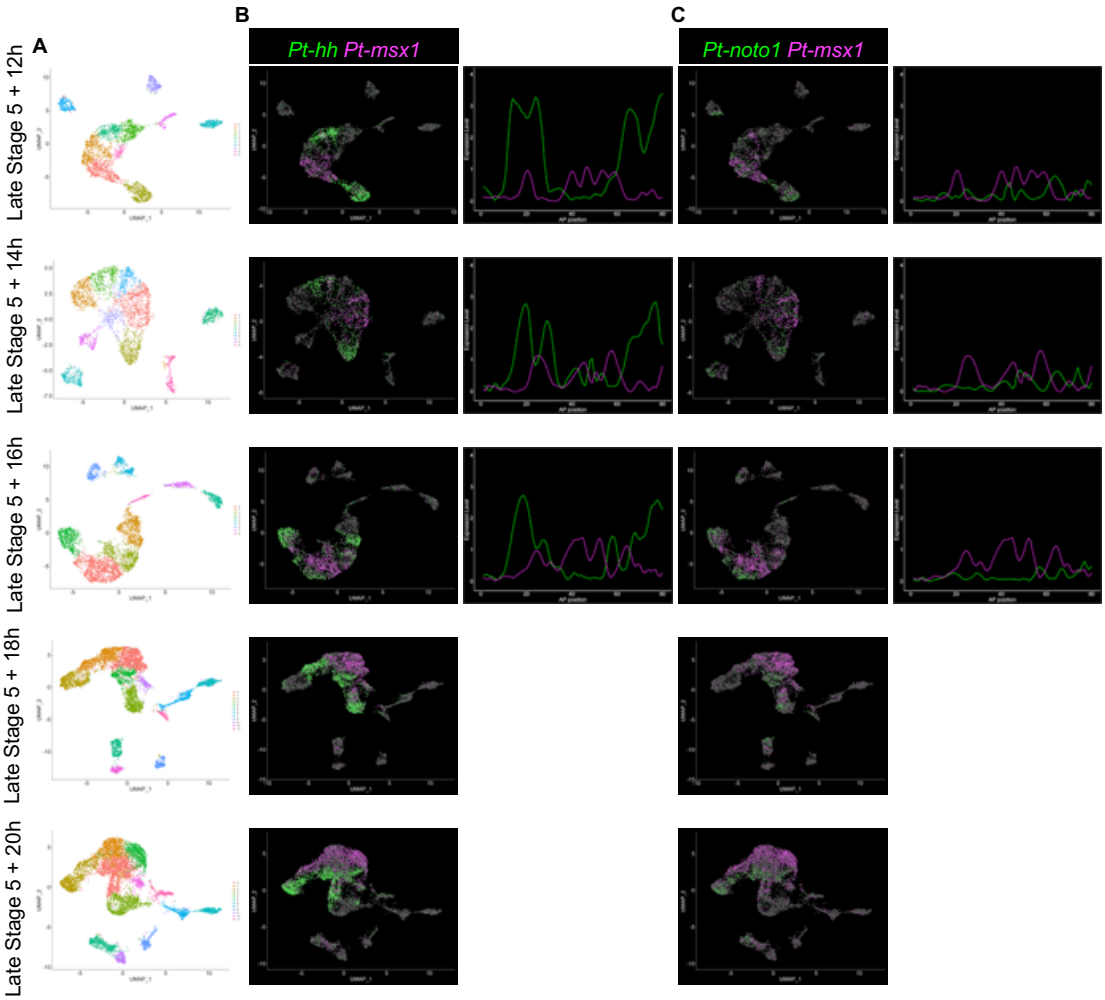


Fig24 Series_C における遺伝子発現パターンの時間変化

時系列データ（Series_C）の各データから作製した UMAP プロット（左）。オオヒメグモ胚で縞パターンを形成する遺伝子の UMAP プロット上での発現パターンおよび軸に沿った発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）と *Pt-msx1*（マゼンタ）、*Pt-noto1*（緑）と *Pt-msx1*（マゼンタ）の組み合わせで示す。

Fig. 25 Series_A

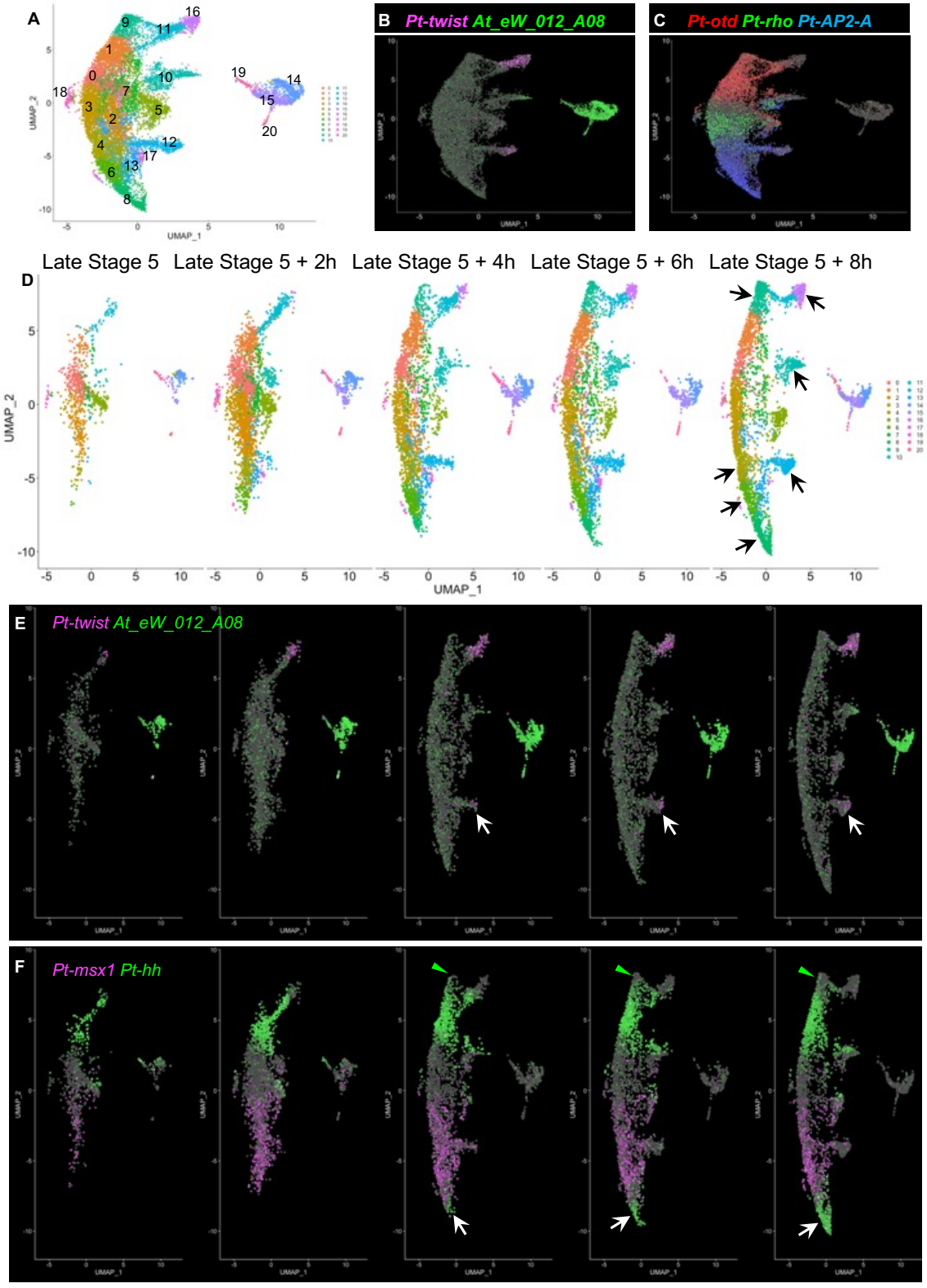


Fig25 Series_A のクラスタリング解析における細胞の状態の多様化過程

A Series_A の時系列データを一つにまとめたマトリクスから作製した UMAP プロット。数字はそれぞれのクラスターを示す。B, C 中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（B）および領域特異的な遺伝子（C）の UMAP プロット上での発現パターン。*Pt-twist*（B、マゼンタ）、*At_eW_012_A08*（B、緑）。*Pt-otd*（C、赤）、*Pt-rho*（C、緑）、*Pt-AP2-A*（C、青）。**D** A の UMAP プロットをサンプルごとに分けた UMAP。矢印は発生過程で新たに生じたクラスターを示す。**E, F** *Pt-twist*（E、マゼンタ）および *At_eW_012_A08*（E、緑）の UMAP プロット上での発現の時間変化。矢印は新たに生じた *Pt-twist* ポジティブなクラスターを示す。*Pt-hh*（F、緑）および *Pt-msx1*（F、マゼンタ）の UMAP プロット上での発現の時間変化。矢印は新たに生じた *Pt-hh* ポジティブなクラスターを示す。

Fig. 26 Series_B

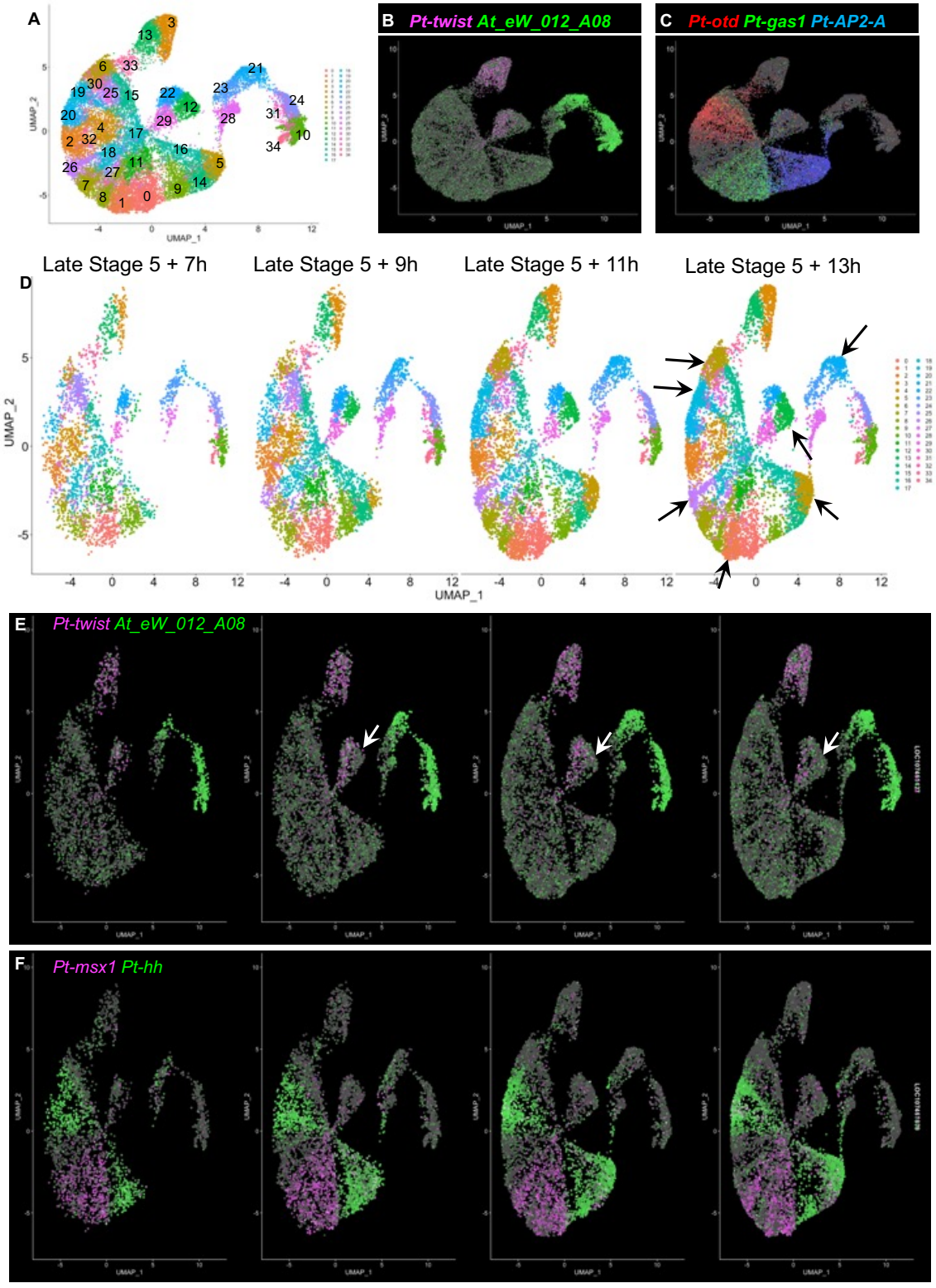


Fig26 Series_B のクラスタリング解析における細胞の状態の多様化過程

A Series_B の時系列データを一つにまとめたマトリクスから作製した UMAP プロット。数字はそれぞれのクラスターを示す。B, C 中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（B）および領域特異的な遺伝子（C）の UMAP プロット上での発現パターン。*Pt-twist*（B、マゼンタ）、*At_eW_012_A08*（B、緑）。*Pt-otd*（C、赤）、*Pt-rho*（C、緑）、*Pt-AP2-A*（C、青）。**D** A の UMAP プロットをサンプルごとに分けた UMAP。矢印は発生過程で新たに生じたクラスターを示す。**E, F** *Pt-twist*（E、マゼンタ）および *At_eW_012_A08*（E、緑）の UMAP プロット上での発現の時間変化。矢印は新たに生じた *Pt-twist* ポジティブなクラスターを示す。*Pt-hh*（F、緑）および *Pt-msx1*（F、マゼンタ）の UMAP プロット上での発現の時間変化。矢印は新たに生じた *Pt-hh* ポジティブなクラスターを示す。

Fig. 27 Series_C

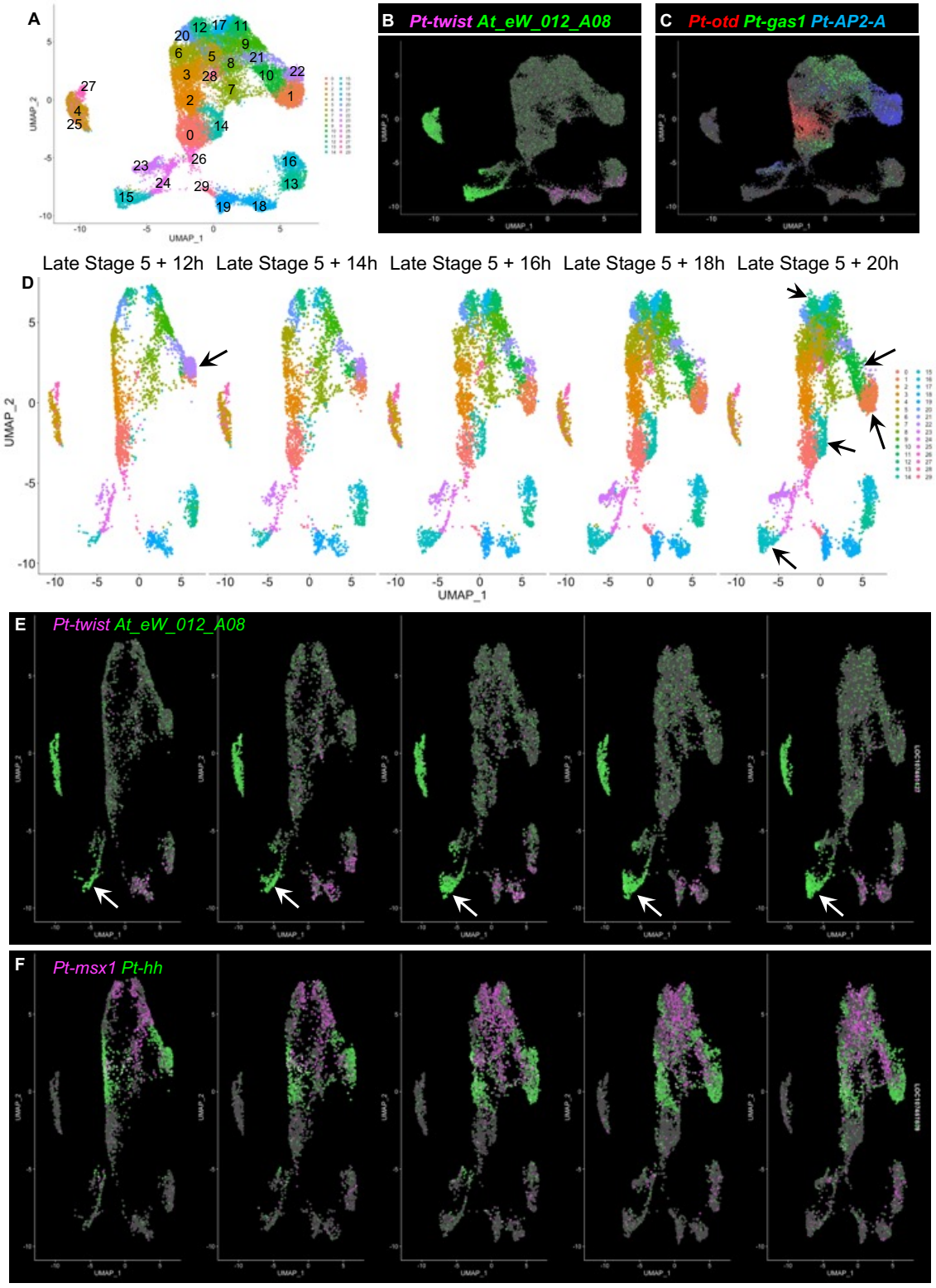


Fig27 Series_C のクラスタリング解析における細胞の状態の多様化過程

A Series_C の時系列データを一つにまとめたマトリクスから作製した UMAP プロット。数字はそれぞれのクラスターを示す。B, C 中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（B）および領域特異的な遺伝子（C）の UMAP プロット上での発現パターン。*Pt-twist*（B、マゼンタ）、*At_eW_012_A08*（B、緑）。*Pt-otd*（C、赤）、*Pt-rho*（C、緑）、*Pt-AP2-A*（C、青）。**D** A の UMAP プロットをサンプルごとに分けた UMAP。矢印は発生過程で新たに生じたクラスターを示す。**E, F** *Pt-twist*（E、マゼンタ）および *At_eW_012_A08*（E、緑）の UMAP プロット上での発現の時間変化。矢印は新たに生じた *Pt-twist* ポジティブなクラスターを示す。*Pt-hh*（F、緑）および *Pt-msx1*（F、マゼンタ）の UMAP プロット上での発現の時間変化。矢印は新たに生じた *Pt-hh* ポジティブなクラスターを示す。

参考文献

Aase-Remedios, M.E., 2023. Evolution of the Spider Homeobox Gene Repertoire by Tandem and Whole Genome Duplication. Molecular Biology and Evolution 40, msad239.

Akaiwa, T., Oda, H., Akiyama-Oda, Y., 2025. Genome-wide quantitative dissection of an arthropod segmented body plan at single-cell resolution. Commun Biol 8, 913.

Akam, M., 1987. The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. Development 101, 1–22.

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

Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2020. Hedgehog signaling controls segmentation dynamics and diversity via *msx1* in a spider embryo. Sci. Adv. 6, eaba7261.

Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2016. Multi-color FISH facilitates analysis of cell-type diversification and developmental gene regulation in the *Parasteatoda* spider embryo. Development, Growth & Differentiation 58, 215–224.

Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2010. Cell migration that orients the dorsoventral axis is coordinated with anteroposterior patterning mediated by Hedgehog signaling in the early spider embryo. Development 137, 1263–1273.

Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2006. Axis specification in the spider embryo: dpp is required forradial-to-axial symmetry transformation and sog for ventralpatterning. Development 133, 2347–2357.

Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2003. Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. Development 130, 1735–1747.

Albright, A.R., Stadler, M.R., Eisen, M.B., 2022. Single-nucleus RNA-sequencing in pre-cellularization Drosophila melanogaster embryos. PLoS ONE 17, e0270471.

Arnosti, D.N., Barolo, S., Levine, M., Small, S., 1996. The eve stripe 2 enhancer employs multiple modes of transcriptional synergy. Development 122, 205–214.

Bakken, T.E., Hodge, R.D., Miller, J.A., Yao, Z., Nguyen, T.N., Aevermann, B., Barkan, E., Bertagnolli, D., Casper, T., Dee, N., Garren, E., Goldy, J., Graybuck, L.T., Kroll, M., Lasken, R.S., Lathia, K., Parry, S., Rimorin, C., Scheuermann, R.H., Schork, N.J., Shehata, S.I., Tieu, M., Phillips, J.W., Bernard, A., Smith, K.A., Zeng, H., Lein, E.S., Tasic, B., 2018. Single-nucleus and single-cell transcriptomes compared in matched cortical cell types. PLoS ONE 13, e0209648.

Brena, C., Akam, M., 2013. An analysis of segmentation dynamics throughout embryogenesis in the centipede Strigamia maritima. BMC Biol 11, 112.

Briggs, J.A., Weinreb, C., Wagner, D.E., Megason, S., Peshkin, L., Kirschner, M.W., Klein, A.M., 2018. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. Science 360, eaar5780.

Calderon, D., Blecher-Gonen, R., Huang, X., Secchia, S., Kentro, J., Daza, R.M., Martin, B., Dulja, A., Schaub, C., Trapnell, C., Larschan, E., O'Connor-Giles, K.M., Furlong, E.E.M., Shendure, J., 2022. The continuum of *Drosophila* embryonic development at single-cell resolution. Science 377, eabn5800.

Chan, L.-N., Gehring, W., 1971. Determination of Blastoderm Cells in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2217–2221.

Cheatle Jarvela, A.M., Wexler, J.R., 2023. Advances in genome sequencing reveal changes in gene content that contribute to arthropod macroevolution. Dev Genes Evol 233, 59–76.

Choe, C.P., Miller, S.C., Brown, S.J., 2006. A pair-rule gene circuit defines segments sequentially in the short-germ insect *Tribolium castaneum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 6560–6564.

Clark, E., Akam, M., 2016. Odd-paired controls frequency doubling in Drosophila segmentation by altering the pair-rule gene regulatory network. eLife 5, e18215.

Clark, E., 2017. Dynamic patterning by the Drosophila pair-rule network reconciles long-germ and short-germ segmentation. PLoS Biol 15, e2002439.

Clark, E., Peel, A.D., Akam, M., 2019. Arthropod segmentation. Development 146, dev170480.

Cooke, J., Zeeman, E.C., 1976. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. Journal of Theoretical Biology 58, 455–476.

Cotterell, J., Robert-Moreno, A., Sharpe, J., 2015. A Local, Self-Organizing Reaction-Diffusion Model Can Explain Somite Patterning in Embryos. Cell Systems 1, 257–269.

Damen, W.G.M., Weller, M., Tautz, D., 2000. Expression patterns of *hairy* , *even-skipped* , and *runt* in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 4515–4519.

Diaz-Cuadros, M., Wagner, D.E., Budjan, C., Hubaud, A., Tarazona, O.A., Donelly, S., Michaut, A., Al Tanoury, Z., Yoshioka-Kobayashi, K., Niino, Y., Kageyama, R., Miyawaki, A., Touboul, J., Pourquié, O., 2020. In vitro characterization of the human segmentation clock. Nature 580, 113–118.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15–21.

Dohle, W., Gerberding, M., Hejnol, A., Scholtz, G., 2004. Cell lineage, segment differentiation, and gene expression in crustaceans.

Driever, W., Nüsslein-Volhard, C., 1988. A gradient of bicoid protein in Drosophila embryos. Cell 54, 83–93.

Driever, W., Thoma, G., Nüsslein-Volhard, C., 1989. Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the Drosophila embryo by the affinity of binding sites for the bicoid morphogen. Nature 340, 363–367.

Edgar, A., Bates, C., Larkin, K., Black, S., 2015. Gastrulation occurs in multiple phases at two distinct sites in Latrodectus and Cheiracanthium spiders. EvoDevo 6, 33.

Farrell, J.A., Wang, Y., Riesenfeld, S.J., Shekhar, K., Regev, A., Schier, A.F., 2018. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. Science 360, eaar3131.

Fujimoto, K., Ishihara, S., Kaneko, K., 2008. Network Evolution of Body Plans. PLoS ONE 3, e2772.

Fujiwara, M., Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2022. Virtual spherical-shaped multicellular platform for simulating the morphogenetic processes of spider-like body axis formation. Front. Cell Dev. Biol. 10, 932814.

Green, J., Akam, M., 2013. Evolution of the pair rule gene network: Insights from a centipede. Developmental Biology 382, 235–245.

Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J., 1984. Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene fushi tarazu during Drosophila embryonic development. Cell 37, 833–841.

Hakeemi, M.S., Ansari, S., Teuscher, M., Weißkopf, M., Großmann, D., Kessel, T., Dönitz, J., Siemanowski, J., Wan, X., Schultheis, D., Frasch, M., Roth, S., Schoppmeier, M., Klingler, M., Bucher, G., 2022. Screens in fly and beetle reveal vastly divergent gene sets required for developmental processes. BMC Biol 20, 38.

Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., Hoffman, P., Stoeckius, M., Papalexi, E., Mimitou, E.P., Jain, J., Srivastava, A., Stuart, T., Fleming, L.M., Yeung, B., Rogers, A.J., McElrath, J.M., Blish, C.A., Gottardo, R., Smibert, P., Satija, R., 2021. Integrated analysis of multimodal single-cell data. Cell 184, 3573-3587.e29.

Hemmi, N., Akiyama-Oda, Y., Fujimoto, K., Oda, H., 2018. A quantitative study of the diversity of stripe-forming processes in an arthropod cell-based field undergoing axis formation and growth. Developmental Biology 437, 84–104.

Hilbrant, M., Damen, W.G.M., McGregor, A.P., 2012. Evolutionary crossroads in developmental biology: the spider Parasteatoda tepidariorum. Development 139, 2655–2662.

Iwasaki-Yokozawa, S., Nanjo, R., Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2022. Lineage-specific, fast-evolving GATA-like gene regulates zygotic gene activation to promote endoderm specification and pattern formation in the Theridiidae spider. BMC Biol 20, 223.

Johnston, D.S., Nüsslein-Volhard, C., 1992. The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. Cell 68, 201–219.

Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y., Nishimura, O., Tarui, H., Agata, K., Oda, H., 2011. Travelling and splitting of a wave of hedgehog expression involved in spider-head segmentation. Nature Communications 2.

Kanayama, M., Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2010. Early embryonic development in the spider Achaearanea tepidariorum: Microinjection verifies that cellularization is complete before the blastoderm stage. Arthropod Structure & Development 39, 436–445.

Karaiskos, N., Wahle, P., Alles, J., Boltengagen, A., Ayoub, S., Kipar, C., Kocks, C., Rajewsky, N., Zinzen, R.P., 2017. The Drosophila embryo at single-cell transcriptome resolution. Science 358, 194–199.

Lacalli, T.C., 1990. Modeling the Drosophila pair-rule pattern by reaction-diffusion: Gap input and pattern control in a 4-morphogen system. Journal of Theoretical Biology 144, 171–194.

Lauschke, V.M., Tsiairis, C.D., François, P., Aulehla, A., 2013. Scaling of embryonic patterning based on phase-gradient encoding. Nature 493, 101–105.

Leite, D.J., Schönauer, A., Blakeley, G., Harper, A., Garcia-Castro, H., Baudouin-Gonzalez, L., Wang, R., Sarkis, N., Nikola, A.G., Koka, V.S.P., Kenny, N.J., Turetzek, N., Pechmann, M., Solana, J., McGregor, A.P., 2024. An atlas of spider development at single-cell resolution provides new insights into arthropod embryogenesis. EvoDevo 15, 5.

Lewis, Julian., 2003. Autoinhibition with Transcriptional Delay. Current Biology, Volume 13, Issue 16, 1398 – 1408.

Liu, C., Li, R., Li, Young, Lin, X., Zhao, K., Liu, Q., Wang, S., Yang, X., Shi, X., Ma, Y., Pei, C., Wang, H., Bao, W., Hui, J., Yang, T., Xu, Z., Lai, T., Berberoglu, M.A., Sahu, S.K., Esteban, M.A., Ma, K., Fan, G., Li, Yuxiang, Liu, S., Chen, A., Xu, X., Dong, Z., Liu, L., 2022. Spatiotemporal mapping of gene expression landscapes and developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. Developmental Cell 57, 1284-1298.e5.

McLaughlin, C.N., Brbić, M., Xie, Q., Li, T., Horns, F., Kolluru, S.S., Kebschull, J.M., Vacek, D., Xie, A., Li, J., Jones, R.C., Leskovec, J., Quake, S.R., Luo, L., Li, H., 2021. Single-cell transcriptomes of developing and adult olfactory receptor neurons in Drosophila. eLife 10, e63856.

Medina-Jiménez, B.I., Budd, G.E., Janssen, R., 2024. Single-cell RNA sequencing of mid-to-late stage spider embryos: new insights into spider development. BMC Genomics 25, 150.

Meinhardt, H., 1986. Hierarchical Inductions of Cell States: A Model for Segmentation in Drosophila. Journal of Cell Science Supplement_4, 357–381.

Miao, Y., Djeffal, Y., De Simone, A., Zhu, K., Lee, J.G., Lu, Z., Silberfeld, A., Rao, J., Tarazona, O.A., Mongera, A., Rigoni, P., Diaz-Cuadros, M., Song, L.M.S., Di Talia, S., Pourquié, O., 2023. Reconstruction and deconstruction of human somitogenesis in vitro. Nature 614, 500–508.

Miller, J., Zimin, A.V., Gordus, A., 2023. Chromosome-level genome and the identification of sex chromosomes in Uloborus diversus. GigaScience 12, 1–22.

Mittnenzweig, M., Mayshar, Y., Cheng, S., Ben-Yair, R., Hadas, R., Rais, Y., Chomsky, E., Reines, N., Uzonyi, A., Lumerman, L., Lifshitz, A., Mukamel, Z., Orenbuch, A.-H., Tanay, A., Stelzer, Y., 2021. A single-embryo, single-cell time-resolved model for mouse gastrulation. Cell 184, 2825-2842.e22.

Nitzan, M., Karaiskos, N., Friedman, N., Rajewsky, N., 2019. Gene expression cartography. Nature 576, 132–137.

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature 287, 795–801.

Oda, H., Akiyama-Oda, Y., 2020. The common house spider Parasteatoda tepidariorum. EvoDevo 11, 6.

Oda, H., Akiyama-Oda, Y., 2008. Differing strategies for forming the arthropod body plan: lessons from Dpp, Sog and Delta in the fly Drosophila and spider Achaearanea. Dev. Growth Differ. 50, 203–214.

Oda, H., Nishimura, O., Hirao, Y., Tarui, H., Agata, K., Akiyama-Oda, Y., 2007. Progressive activation of Delta-Notch signaling from around the blastopore is required to set up a functional caudal lobe in the spider Achaearanea tepidariorum. Development 134, 2195–2205.

Okochi, Y., Sakaguchi, S., Nakae, K., Kondo, T., Naoki, H., 2021. Model-based prediction of spatial gene expression via generative linear mapping. Nat Commun 12, 3731.

Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Pourquié, O., 1997. Avian hairy Gene Expression Identifies a Molecular Clock Linked to Vertebrate Segmentation and Somitogenesis. Cell 91, 639–648.

Pechmann, M., 2016. Formation of the germ-disc in spider embryos by a condensation-like mechanism. Front Zool 13, 35.

Pechmann, M., Benton, M.A., Kenny, N.J., Posnien, N., Roth, S., 2017. A novel role for Ets4 in axis specification and cell migration in the spider Parasteatoda tepidariorum. eLife 6, e27590.

Pechmann, M., McGregor, A.P., Schwager, E.E., Feitosa, N.M., Damen, W.G.M., 2009. Dynamic gene expression is required for anterior regionalization in a spider. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 1468–1472.

Peel, A.D., Chipman, A.D., Akam, M., 2005. Arthropod Segmentation: beyond the Drosophila paradigm. Nature Reviews Genetics 6, 905–916.

Pijuan-Sala, B., Griffiths, J.A., Guibentif, C., Hiscock, T.W., Jawaid, W., Calero-Nieto, F.J., Mulas, C., Ibarra-Soria, X., Tyser, R.C.V., Ho, D.L.L., Reik, W., Srinivas, S., Simons, B.D., Nichols, J., Marioni, J.C., Göttgens, B., 2019. A single-cell molecular map of mouse

gastrulation and early organogenesis. Nature 566, 490–495.

Posnien, N., Zeng, V., Schwager, E.E., Pechmann, M., Hilbrant, M., Keefe, J.D., Damen, W.G.M., Prpic, N.-M., McGregor, A.P., Extavour, C.G., 2014. A Comprehensive Reference Transcriptome Resource for the Common House Spider Parasteatoda tepidariorum. PLoS ONE 9, e104885.

Prpic, N.-M., Pechmann, M., 2022. Extraembryonic tissue in chelicerates: a review and outlook. Phil. Trans. R. Soc. B 377, 20210269.

Qiu, C., Martin, B.K., Welsh, I.C., Daza, R.M., Le, T.-M., Huang, X., Nichols, E.K., Taylor, M.L., Fulton, O., O'Day, D.R., Gomes, A.R., Ilcisin, S., Srivatsan, S., Deng, X., Disteche, C.M., Noble, W.S., Hamazaki, N., Moens, C.B., Kimelman, D., Cao, J., Schier, A.F., Spielmann, M., Murray, S.A., Trapnell, C., Shendure, J., 2024. A single-cell time-lapse of mouse prenatal development from gastrula to birth. Nature 626, 1084–1093.

Rosenberg, M.I., Brent, A.E., Payre, F., Desplan, C., 2014. Dual mode of embryonic development is highlighted by expression and function of Nasonia pair-rule genes. eLife 3, e01440.

Sakaguchi, S., Mizuno, S., Okochi, Y., Tanegashima, C., Nishimura, O., Uemura, T., Kadota, M., Naoki, H., Kondo, T., 2023. Single-cell transcriptome atlas of Drosophila gastrula 2.0. Cell Reports 42, 112707.

Sarrazin, A.F., Peel, A.D., Averof, M., 2012. A Segmentation Clock with Two-Segment Periodicity in Insects. Science 336, 338–341.

Satija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., Regev, A., 2015. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. Nat Biotechnol 33, 495–502.

Schönauer, A., Paese, C.L.B., Hilbrant, M., Leite, D.J., Schwager, E.E., Feitosa, N.M., Eibner, C., Damen, W.G.M., McGregor, A.P., 2016. The Wnt and Delta-Notch signalling pathways interact to direct pair-rule gene expression via *caudal* during segment addition in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. Development 143, 2455–2463.

Schroeder, M.D., Greer, C., Gaul, U., 2011. How to make stripes: deciphering the transition

from non-periodic to periodic patterns in Drosophila segmentation. Development 138, 3067–3078.

Schwager, E.E., Sharma, P.P., Clarke, T., Leite, D.J., Wierschin, T., Pechmann, M., Akiyama-Oda, Y., Esposito, L., Bechsgaard, J., Bilde, T., Buffry, A.D., Chao, H., Dinh, H., Doddapaneni, H., Dugan, S., Eibner, C., Extavour, C.G., Funch, P., Garb, J., Gonzalez, L.B., Gonzalez, V.L., Griffiths-Jones, S., Han, Y., Hayashi, C., Hilbrant, M., Hughes, D.S.T., Janssen, R., Lee, S.L., Maeso, I., Murali, S.C., Muzny, D.M., Nunes da Fonseca, R., Paese, C.L.B., Qu, J., Ronshaugen, M., Schomburg, C., Schönauer, A., Stollewerk, A., Torres-Oliva, M., Turetzek, N., Vanthournout, B., Werren, J.H., Wolff, C., Worley, K.C., Bucher, G., Gibbs, R.A., Coddington, J., Oda, H., Stanke, M., Ayoub, N.A., Prpic, N.-M., Flot, J.-F., Posnien, N., Richards, S., McGregor, A.P., 2017. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. BMC Biol. 15, 62.

Sharma, P.P., 2023. The Impact of Whole Genome Duplication on the Evolution of the Arachnids. Integrative And Comparative Biology 63, 825–842.

Small, S., Blair, A., Levine, M., 1992. Regulation of even-skipped stripe 2 in the Drosophila embryo. The EMBO Journal 11, 4047–4057.

Stollewerk, A., Schoppmeier, M., Damen, W.G.M., 2003. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. Nature 423, 863–865.

Sun, J., Zhang, C., Gao, F., Stathopoulos, A., 2023. Single-cell transcriptomics illuminates regulatory steps driving anterior-posterior patterning of Drosophila embryonic mesoderm. Cell Reports 42, 113289.

Thomas, G.W.C., Dohmen, E., Hughes, D.S.T., Murali, S.C., Poelchau, M., Glastad, K., Anstead, C.A., Ayoub, N.A., Batterham, P., Bellair, M., Binford, G.J., Chao, H., Chen, Y.H., Childers, C., Dinh, H., Doddapaneni, H.V., Duan, J.J., Dugan, S., Esposito, L.A., Friedrich, M., Garb, J., Gasser, R.B., Goodisman, M.A.D., Gundersen-Rindal, D.E., Han, Y., Handler, A.M., Hatakeyama, M., Hering, L., Hunter, W.B., Ioannidis, P., Jayaseelan, J.C., Kalra, D., Khila, A., Korhonen, P.K., Lee, C.E., Lee, S.L., Li, Y., Lindsey, A.R.I., Mayer, G., McGregor, A.P., McKenna, D.D., Misof, B., Munidasa, M., Munoz-Torres, M., Muzny, D.M., Niehuis, O., Osuji-Lacy, N., Palli, S.R., Panfilio, K.A., Pechmann, M., Perry, T., Peters, R.S., Poynton, H.C., Prpic, N.-M., Qu, J., Rotenberg, D., Schal, C., Schoville, S.D., Scully, E.D., Skinner, E.,

Sloan, D.B., Stouthamer, R., Strand, M.R., Szucsich, N.U., Wijeratne, A., Young, N.D., Zattara, E.E., Benoit, J.B., Zdobnov, E.M., Pfrender, M.E., Hackett, K.J., Werren, J.H., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Chipman, A.D., Waterhouse, R.M., Bornberg-Bauer, E., Hahn, M.W., Richards, S., 2020. Gene content evolution in the arthropods. Genome Biol 21, 15.

Tzani, I., Hagan, R., Clarke, C., 2021. Tracing production instability in a clonally-derived CHO cell line using single cell transcriptomics. Biotechnology and BIoengineering.

Vahid, M.R., Brown, E.L., Steen, C.B., Zhang, W., Jeon, H.S., Kang, M., Gentles, A.J., Newman, A.M., 2023. High-resolution alignment of single-cell and spatial transcriptomes with CytoSPACE. Nat Biotechnol 41, 1543–1548.

Wagner, D.E., Weinreb, C., Collins, Z.M., Briggs, J.A., Megason, S.G., Klein, A.M., 2018. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. Science 360, 981–987.

Yamazaki, K., Akiyama-Oda, Y., Oda, H., 2005. Expression Patterns of a twist-Related Gene in Embryos of the Spider Achaearanea tepidariorum Reveal Divergent Aspects of Mesoderm Development in the Fly and Spider. Zoological Science 22, 177–185.

Yoshioka-Kobayashi, K., Matsumiya, M., Niino, Y., Isomura, A., Kori, H., Miyawaki, A., Kageyama, R., 2020. Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. Nature.

謝辞

大阪大学大学院理学研究科博士後期課程の学生として、JT 生命誌研究館の細胞・発生・進化研究室にて 4 年間ご指導いただきました。

小田広樹大阪大学招聘教授には研究活動における心構えやデータの扱いなど、研究者とは何たるか、幅広くご指導いただきました。

研究員の秋山-小田康子博士には実験、データ解析、論文執筆と研究活動全般において多大なご指導をいただきました。

小田夫妻による手厚い研究指導のおかげで、自分のやりたい研究を自分の想像をはるかに超えたレベルで進められたことは感謝してもしきれません。

研究補助員の野田彰子さんには研究における備品の管理や実験のご指導等、日々の活動において大変お世話になりました。

奨励研究員の藤原基洋博士からは研究を進める上で数多くのご助言をいただきました。数理生物学的な視点からの助言や議論は数理的な思考に不慣れであった私にとって、研究の見方を深めることができる素晴らしい機会になりました。

南條稜太さん、丹羽将之さん、根岸錬さんとは、研究室でともに研究を進めるよき同僚として活発な議論の相手となってくださいました。

松野健治大阪大学教授には博士後期課程 1 年次から 4 年次までの間、博士論文の主査として大変お世話になりました。

藤本仰一広島大学教授、進藤麻子大阪大学教授、石谷太大阪大学教授には博士論文の副査として大変お世話になりました。

最後に、家族や友人をはじめとした、博士課程を通して支えてくださった全ての方々へ心よりの感謝を申し上げます。

補足資料：時系列データの個々の解析

Series_A

a. Late Stage 5

Single-nucleus RNA-seq によって、893 個の細胞核に対する 17,536 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,977 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 7,530 個であった（**Table 3**）。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、5 つのクラスターが大きく分けて 2 つの細胞集団として見られた（**Fig S1A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター3 の端に存在する細胞で発現していた（**Fig S1B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* はクラスター4 の細胞の一部で発現していた（**Fig S1D**）。このことから、クラスター4 が内胚葉の細胞で、その一部がクムルス間充織細胞であることがわかった。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S1C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S2**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はこのステージでは明確なパターンを示さなかった（**Fig S1E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター4 およびクラスター1 で見られた（**Fig S1F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はこのステージでは明確なパターンを示さなかった（**Fig S1G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107449287 は胚盤の縁側の中胚葉で発現していた。一方で LOC107452693 及び LOC107457003 の発現は明確なパターンを示さなかった。また、LOC107456536 の発現はこのデータにおいて検出されなかった（**Fig S1I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.0 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 3 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S3A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-integrin-α* 及び *Pt-prd2* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製

し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S3B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S3D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S1C, S3F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hedgehog*（*Pt-hh*）、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、胚の前方で *Pt-hh* の発現が、後方で *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現が見られた（**Fig S3G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（**Fig S3H, J**）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S3K**）。これらの結果から私は、UMAP プロットの線型化によって前後軸に沿った遺伝子発現プロファイルを取得できていると判断した。

b. Late Stage 5 + 2h

Single-nucleus RNA-seq によって、3,062 個の細胞核に対する 18,799 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,735 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 6,713 個であった（**Table 3**）。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、8 つのクラスターが大きく分けて 3 つの細胞集団として見られた（**Fig S4A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター5 と 7 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター3 の端に存在する細胞で発現していた（**Fig S4B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* はクラスター7 の細胞で発現していた（**Fig S4D**）。このことから、クラスター5 が内胚葉の細胞で、クラスター7 がクムルス間充織細胞であることがわかった。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S4C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S5**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター6 で確認できた（**Fig S4E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター5 およびクラスター2 で見られた（**Fig S4F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞

（Fig 8A, C、クラスター19, 24）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はこのステージでは明確なパターンを示さなかった（Fig S4G, H）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22）の発現を調べた。LOC107449287 は胚盤の縁側の中胚葉で発現していた。一方で LOC107452693 及び LOC107457003 の発現は明確なパターンを示さなかった。また、LOC107456536 の発現はこのデータにおいて検出されなかった（Fig S4I）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.0 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 3, 6, 7 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（Fig S6A, B）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-twist* 及び *Pt-krüppel-1* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（Fig S6B, C）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（Fig S6D, E）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（Fig S4C, S6 F）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hedgehog*（*Pt-hh*）、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、胚の前方で *Pt-hh* の発現が、後方で *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現が見られた（Fig S6G, I）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（Fig S6H, J）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（Fig S6K）。

c. Late Stage 5 + 4h

Single-nucleus RNA-seq によって、3,086 個の細胞核に対する 18,516 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,971 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 7,612 個であった（Table 3）。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、8 つのクラスターが大きく分けて 2 つの細胞集団として見られた（Fig S7A）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 で発現していた（Fig S7B）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* はクラスター4 の一部の細胞で発現していた（Fig S7D）。このことから、クラス

ター4 が内胚葉とクムルス間充織細胞で構成されていることがわかった。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S7C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S8**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター7 で確認できた（**Fig S7E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター4 およびクラスター6 で見られた（**Fig S7F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はこのステージでは明確なパターンを示さなかった（**Fig S7G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107449287 は胚盤の縁側の中胚葉で発現していた。一方で LOC107452693 及び LOC107457003 の発現は明確なパターンを示さなかった。また、LOC107456536 の発現はこのデータにおいて検出されなかった（**Fig S7I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.0 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 3, 5 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S9A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、LOC107441150 及び *Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S9B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S9D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S7C, S9F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、胚の前方で *Pt-hh* の発現が、後方で *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現が見られた（**Fig S9G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（**Fig S9H, J**）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S9K**）。

d. Late Stage 5 + 6h

Single-nucleus RNA-seq によって、3,412 個の細胞核に対する 18,794 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 3,057 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 7,993 個であった（**Table 3**）。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、8 つのクラスターが大きく分けて 2 つの細胞集団として見られた（**Fig S10A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 と 6 の一部の細胞で発現していた（**Fig S10B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* はクラスター4 の一部の細胞で発現していた（**Fig S10D**）。このことから、クラスター4 が内胚葉とクムルス間充織細胞で構成されていることがわかった。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S10C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S11**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター8 で確認できた（**Fig S10E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター4 およびクラスター6、外胚葉クラスターで見られた（**Fig S10F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はこのステージでは明確なパターンを示さなかった（**Fig S10G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107449287 は胚盤の縁側の中胚葉で発現していた。一方で LOC107456536、LOC107452693 及び LOC107457003 の発現は明確なパターンを示さなかった。（**Fig S10 I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.0 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S12A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-twist* 及び *Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S12B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S12D,**

E)。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（Fig S10C, S12F)。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は胚の後方で発現が見られた。さらに、*Pt-noto1* については、後端部での *Pt-hh* の発現と同じ領域で発現が確認された（Fig S12G, I)。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（Fig S12H, J)。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（Fig S12K)。

e. Late Stage 5 + 8h

Single-nucleus RNA-seq によって、4,354 個の細胞核に対する 18,878 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,878 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 7,412 個であった（Table 3)。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5)、9 つのクラスターが大きく分けて 4 つの細胞集団として見られた（Fig S13A)。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 と 7 で発現していた（Fig S13B)。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（Fig S13D)。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（Fig S13C)。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（Fig S14)。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター8 で確認できた（Fig S13E)。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター4 およびクラスター6、外胚葉クラスターで見られた（Fig S13F)。Stage 7 の解析で胚外細胞（Fig 8A, C、クラスター19, 24）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はこのステージでは明確なパターンを示さなかった（Fig S13G, H)。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22）の発現を調べた。LOC107449287 は胚盤の縁側の中胚葉で発現していた。一方で

LOC107456536、LOC107452693 及び LOC107457003 の発現は明確なパターンを示さなかった。(Fig S13I)。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.0 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（Fig S15A, B)。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-integrin-α*（LOC107437681）及び *Pt-irx6*（LOC107456088）を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（Fig S15B, C)。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（Fig S15D, E)。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（Fig S13C, S15 F)。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は胚の後方で発現が見られた。さらに、*Pt-noto1* については、後端部での *Pt-hh* の発現と同じ領域で発現が確認された（Fig S15G, I)。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（Fig S15H, J)。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（Fig S15K)。

Series_B

f. Late Stage5 + 7h

Single-nucleus RNA-seq によって、2,945 個の細胞核に対する 19,091 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 3,327 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 8,914 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5)、大きく分けて 4 つのクラスターが見られた（Fig S16A)。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター3, 6 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 と 7 で発現していた（Fig S16B)。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（Fig S16D)。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（Fig S16C)。また、

dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 4 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S17**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター6 で確認できた（**Fig S16E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター3 およびクラスター7 の一部、外胚葉クラスターで見られた（**Fig S16F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はどちらもクラスター6 の一部の細胞で検出された（**Fig S16G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107449287 は胚盤の縁側の中胚葉で発現していた。一方で LOC107456536、LOC107452693 及び LOC107457003 の発現は明確なパターンを示さなかった。（**Fig S16I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.5 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 2, 4, 5, 6, 7, 8 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S18A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-integrin-α* 及び *Pt-msx1* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S18B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S18D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S15C, S18F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は胚の後方で発現が見られた。さらに、*Pt-noto1* については、後端部での *Pt-hh* の発現と同じ領域で発現が確認された（**Fig S18G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（**Fig S18H, J**）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S18K**）。

g. Late Stage 5 + 9h

Single-nucleus RNA-seq によって、5,477 個の細胞核に対する 19,494 遺伝子の発

現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 3,274 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 8,792 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、大きく分けて 5 つのクラスターが見られた（**Fig S19A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4, 5 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター6 と 7 で発現していた（**Fig S19B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S19D**）。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S19C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S20**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター5 で確認できた（**Fig S19E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現はクラスター4 の一部、外胚葉クラスターで見られた。また、*Pt-Delta* の外胚葉での発現は複数のドメインで確認できた（**Fig S19F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はどちらもクラスター5 で確認できたが、発現する主要な細胞集団は異なっているように見えた（**Fig S19G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107449287 と LOC107456536 はクラスター7 で発現していた。LOC107452693 はクラスター6 で発現が確認できた。一方、LOC107457003 の発現はまだ明確なパターンを示さなかった。（**Fig S19I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.5 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S21A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-integrin-α*（LOC107437681）及び *Pt-prd2* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S21B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S21D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S19C, S21F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に

関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-hh* より前方には、*Pt-hh* ネガティブな細胞も確認できた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は外胚葉の中央付近で発現が見られた。さらに、*Pt-noto1* については、後端部での *Pt-hh* の発現と同じ領域で発現が確認された（**Fig S21G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、UMAP プロット上で見られた発現の位置関係が再現されていた（**Fig S21H, J**）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S21K**）。

h. Late Stage 5 + 11h

Single-nucleus RNA-seq によって、6,941 個の細胞核に対する 18,799 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,939 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 7,194 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、大きく分けて 5 つのクラスターが見られた（**Fig S22A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター7, 9 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 と 6 で発現していた（**Fig S22B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S22D**）。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S22C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 5 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S23**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター9 で確認できた（**Fig S22E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターに複数のドメインで見られた（**Fig S22F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はどちらもクラスター9 で発現が確認できた。また、これらの遺伝子はクラスター9 の中でも異なる集団で発現しているように見えた（**Fig S22G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。
LOC107449287 と LOC107456536 はクラスター6 で発現していた。
LOC107452693 はクラスター5 で発現が確認できた。一方、LOC107457003 の発

現はまだ明確なパターンを示さなかった。(Fig S22I)。
続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.5 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 7, 8, 9, 10, 12 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した (Fig S24A, B)。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-six3-1* 及び *Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした (Fig S24B, C)。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した (Fig S24D, E)。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた (Fig S21C, S24F)。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は外胚葉の中央付近で発現が見られた。さらに、*Pt-msx1* の発現の後方には、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の発現が交互に生じていた (Fig S24G, I)。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、頭部で *Pt-hh* を発現する領域の内部に *Pt-msx1* のピークが生じている様子や、胸部で *Pt-msx1* の発現の複数のピークが見られた。また、後体部では *Pt-hh*、*Pt-msx1* および *Pt-noto1*、*Pt-msx1* のピークが交互に生じる様子が確認された (Fig S24H, J)。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた (Fig S24K)。

i. Late Stage 5 + 13h

Single-nucleus RNA-seq によって、9,813 個の細胞核に対する 18,799 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,849 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 6,916 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5)、大きく分けて 5 つのクラスターが見られた (Fig S22A)。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター8, 9, 12 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター6 と 7 で発現していた (Fig S25B)。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった (Fig S25D)。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった (Fig S25C)。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合

においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 5 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（Fig S26）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター12 およびクラスター9 の一部で確認できた（Fig S25E）。また、*Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターで縞パターンとして見られた（Fig S25F）。Stage 7 の解析で胚外細胞（Fig 8A, C、クラスター19, 24）のマーカーとして検出された LOC107439300 はクラスター9 で、LOC107441150 はクラスター12 で発現していた（Fig S25G, H）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22）の発現を調べた。LOC107456536、LOC107449287 はクラスター6 で発現していた。LOC107452693 及び LOC107457003 の発現はクラスター7 で確認できた。（Fig S25I）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.5 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 17 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（Fig S27A, B）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（Fig S27B, C）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（Fig S27D, E）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（Fig S25C, S27F）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、UMAP プロット上で縞パターンを形成している様子が確認できた。*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は外胚葉の中央付近で発現が見られた。さらに、*Pt-msx1* の発現の後方には、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の発現が交互に生じていた（Fig S27G, I）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、頭部の *Pt-hh* のピークが 2 つに分裂する様子や、胸部で *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現の複数の相補的なピークが見られた。また、後体部では *Pt-hh*、*Pt-msx1* および *Pt-noto1*、*Pt-msx1* のピークが交互に生じる様子が確認された（Fig S27H, J）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（Fig S27K）。

j. Late Stage 5 + 12h

Single-nucleus RNA-seq によって、3,261 個の細胞核に対する 18,846 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 3,497 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 9,714 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、大きく分けて 5 つのクラスターが見られた（**Fig S28A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター8, 5 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター6 と 7 で発現していた（**Fig S28B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S28D**）。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-rho* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S28C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 5 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S29**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター8 で確認できた（**Fig S28E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターで縞パターンとして見られた（**Fig S28F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はクラスター8 の細胞で発現が見られた（**Fig S28G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107456536 と LOC107449287 はクラスター7 で発現が確認できた。LOC107452693 及び LOC107457003 の発現はクラスター6 で確認できた。（**Fig S28I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.5 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 3, 5, 8, 9, 13 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S30A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S30B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S30D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S28C, S30F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターン

を出力した結果、UMAP プロット上で縞パターンを形成している様子が確認できた。*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は外胚葉の中央付近で発現が見られた。さらに、*Pt-msx1* の発現の後方には、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の発現が交互に生じていた（**Fig S30G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、頭部の *Pt-hh* のピークが 2 つに分裂する様子や、胸部で *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現の複数の相補的なピークが見られた。また、後体部では *Pt-hh*、*Pt-msx1* および *Pt-noto1*、*Pt-msx1* のピークが交互に生じる様子が確認された（**Fig S30H, J**）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S30K**）。

k. Late Stage 5 + 14h

Single-nucleus RNA-seq によって、3,070 個の細胞核に対する 18,259 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 3,062 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 8,063 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、大きく分けて 5 つのクラスターが見られた（**Fig S31A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4, 9 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 と 8 で発現していた（**Fig S31B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S31D**）。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S31C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 5 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S32**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター9 で確認できた（**Fig S31E**）。また、*Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターで縞パターンとして見られた（**Fig S31F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 はクラスター9 で発現が確認できた（**Fig S31G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107456536 と LOC107449287 の発現はクラスター8 で確認できた。LOC107452693 及び LOC107457003 の発現はクラスター5 で確認できた。（**Fig S31I**）。
続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを

取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 2.0 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S33A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-six3* 及び *Pt-prd2* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S33B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S33D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S31C, S33F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、UMAP プロット上で縞パターンを形成している様子が確認できた。*Pt-hh* は胚の前方および後端部で発現が見られた。*Pt-msx1* と *Pt-noto1* は外胚葉の中央付近で発現が見られた。さらに、*Pt-msx1* の発現の後方には、*Pt-noto1* と *Pt-msx1* の発現が交互に生じていた（**Fig S33G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、頭部の *Pt-hh* のピークが 2 つに分裂する様子や、胸部で *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の発現の複数の相補的なピークが見られた。また、後体部では *Pt-hh*、*Pt-msx1* および *Pt-noto1*、*Pt-msx1* のピークが交互に生じる様子が確認された（**Fig S33H, J**）。次に、Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S33K**）。

l. Late Stage 5 + 16h

Single-nucleus RNA-seq によって、4,295 個の細胞核に対する 18,650 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 3,117 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 8,186 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5）、大きく分けて 3 つのクラスターが見られた（**Fig S34A**）。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター4, 7 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5 と 6 で発現していた（**Fig S34B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S34D**）。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S34C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合においてオオヒメグモ胚を構成する細胞は 2 つの細胞集団に分離し、外胚葉の細

胞は前後軸の極性を反映して並んでいたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S35**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター8 で確認できた（**Fig S34E**）。また、*Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターで見られた（**Fig S34F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 の発現はクラスタークラスター7, 8 で確認できた。また、LOC107441150 はクラスター8 で発現が確認できた（**Fig S34G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107456536 と LOC107449287 はクラスター5 で発現していた。LOC107452693 及び LOC107457003 の発現はクラスター6 で確認できた。（**Fig S34I**）。

続けて、オオヒメグモゲノム中の全遺伝子の前後軸に沿った発現プロファイルを取得するために、UMAP の線型化を行った。Dimension 1:50、resolution 1.5 で作製した UMAP プロットにおけるクラスター0, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 17 に属する細胞の位置座標を用いて密度等高線を作製した（**Fig S36A, B**）。線型化の軸の端を決めるために、*Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から密度等高線を作製し、等高線の稜線を通るように手動で点をプロットした（**Fig S36B, C**）。プロットした点をもとに作製したスプライン曲線を軸として UMAP プロットを線型化し、軸から 0.3 以内の距離にある細胞をその後の解析に使用した（**Fig S36D, E**）。領域特異的に発現する 3 遺伝子の発現プロファイルを作製したところ、UMAP プロットで見られた発現ドメインの空間的な関係が再構成されていた（**Fig S34C, S36F**）。オオヒメグモ胚における縞パターン形成に関わる重要な遺伝子である *Pt-hh*、*Pt-msx1* 及び *Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを出力した結果、UMAP プロット上で外胚葉全体を通した縞パターンは確認できなかった。（**Fig S36G, I**）。これらの遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、頭部において *Pt-hh* のピークが 2 つ確認できたが前方から 2 番目のピークが 1 番目のピークの半分程度の高さであった。胸部における *Pt-msx1* と *Pt-noto1* の相補的な発現によって形成される縞パターンは、UMAP プロット、発現プロファイルのいずれにおいても確認できなかった。また、後体部における *Pt-hh*、*Pt-msx1* および *Pt-noto1*、*Pt-msx1* のピークが交互に生じる様子についても、ピークが重なるような様子が見られた（**Fig S36H, J**）。Stage 7 の解析で使用した前後軸に沿ってパターンを持つ遺伝子の発現プロファイルを出力したところ、前後軸方向に領域特異的なパターンが見られた（**Fig S36K**）。これらの結果から、Late Stage 5 + 16h のデータにおいては、UMAP プロット上で遺伝子発現の縞パターンは再構成されていないと判断した。

m. Late Stage 5 + 18h

Single-nucleus RNA-seq によって、6,516 個の細胞核に対する 19,006 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,779 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 6,798 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:49、res 0.5)、大きく分けて 4 つのクラスターが見られた（**Fig S37A**)。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター6, 7, 11 の細胞で、中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5, 8, 10 で発現していた（**Fig S37B**)。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S37D**)。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S37C**)。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合において同様の結果が得られたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S38**)。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター11 で確認できた（**Fig S37E**)。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターで見られたが、縞パターンは示さなかった（**Fig S37F**)。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、LOC107439300 はクラスター7 で、LOC107441150 はクラスター11 で発現が確認された（**Fig S37G, H**)。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107456536 はクラスター8 で、LOC107449287 はクラスター10 で発現していた。LOC107452693 及び LOC107457003 の発現はクラスター5 で確認できた。（**Fig S37I**)。*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを調べた結果、このステージにおいても、UMAP プロット上で遺伝子発現の縞パターンは再構成されていないことがわかった（**Fig 24**)。

n. Late Stage 5 + 20h

Single-nucleus RNA-seq によって、7,684 個の細胞核に対する 19,495 遺伝子の発現マトリクスが得られた。細胞あたり平均で 2,818 種類の mRNA を発現しており、分子数は平均で 6,845 個であった。得られたマトリクスをもとに UMAP プロットを作製したところ（dim 1:50、res 0.5)、大きく分けて 4 つのクラスターが見られた（**Fig S39A**)。既知のマーカー遺伝子を用いて各クラスターの特定を行ったところ、内胚葉マーカーの *At_eW_012_A08* はクラスター6, 7, 11 の細胞で、

中胚葉のマーカーである *Pt-twist* の発現はクラスター5, 8, 9 で発現していた（**Fig S39B**）。また、クムルス間充織細胞のマーカーである *Pt-ets4* は明確な発現が見られなかった（**Fig S39D**）。外胚葉で領域特異的に発現する *Pt-otd*、*Pt-gas1* 及び *Pt-AP2-A* の UMAP プロット上での発現から、外胚葉の細胞が、実際の胚における前後軸の極性を反映して並んでいることがわかった（**Fig S39C**）。また、dimension パラメータを変更して UMAP プロットを作製しても、ほとんどの場合において同様の結果が得られたことから、ここで見られた特徴はこのデータの代表的なものであることがわかった（**Fig S40**）。胚外の細胞のマーカーである *Pt-noggin* の発現はクラスター11 で確認できた（**Fig S39E**）。また、胚盤のふち側の内胚葉及び胚盤中央における将来の中胚葉で発現する *Pt-Delta* の発現は外胚葉クラスターで見られたが、縞パターンは示さなかった（**Fig S39F**）。Stage 7 の解析で胚外細胞（**Fig 8A, C、クラスター19, 24**）のマーカーとして検出された LOC107439300 及び LOC107441150 の UMAP プロット上での発現パターンを調べたところ、LOC107439300 はクラスター7 で、LOC107441150 はクラスター11 で発現が確認された（**Fig S39G, H**）。次に、新たに検出された中胚葉のサブクラスターのマーカー（**Fig 8E, F、クラスター16, 18, 11, 22**）の発現を調べた。LOC107449287 の発現はこのステージでは確認できなかった。LOC107456536 はクラスター8 で、LOC107452693 及び LOC107457003 の発現はクラスター5 で確認できた。（**Fig S37I**）。*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1* の UMAP プロット上での発現パターンを調べた結果、このステージにおいても、UMAP プロット上で遺伝子発現の縞パターンは再構成されていないことがわかった（**Fig 24**）。

考察

UMAP プロットにおける非外胚葉細胞の分化

本章では、オオヒメグモ胚における体節形成過程を網羅する 3 つの時系列データセット（Series_A: 5 サンプル、Series_B: 4 サンプル、Series_C: 5 サンプル）を取得した。それぞれのデータから作製した UMAP プロットにおいて既知のマーカー遺伝子の発現パターンを確認し、主要な細胞の状態の検出を行った。Series_A（Late Stage 5 から Late Stage 5 + 8h）の中胚葉マーカー（*Pt-twist*）の発現パターンの変化を見てみると、Late Stage 5 では外胚葉クラスターの端に発現が確認できた（**Fig S1B、マゼンタ**）。発生が進むにつれて、*Pt-twist* ポジティブな細胞集団と外胚葉クラスターの繋がっている領域が狭まり、クラスターが分離しそうな様子が見られた（**Fig S4B, S7B, S10B, S10B**）。この傾向は Series_B（Late Stage 5 + 7h から Late Stage 5 + 13h）ではより顕著に見られ、Late Stage 5 + 11h では中胚葉と外胚葉のクラスターは UMAP プロット上でほとんど分離する様子が見られた。Series_C（Late Stage 5 + 12h から Late Stage 5 + 20h）ではすべてのデータを通して

中胚葉と外胚葉のクラスターはUMAPプロット上で空間的に分離していた。これらの結果から、Late Stage 5から発生が進む過程で中胚葉と外胚葉の細胞の状態がより異なったものとなることが示唆される。*Pt-twist*の発現パターンの時間変化からは、外胚葉クラスター内から生じる中胚葉（cMES）の存在も確認できた（Fig S7B）。これらの細胞は、胚盤の中央で*Pt-Delta*を発現する細胞が胚盤の下に落ち込むことで中胚葉に分化することが報告されている（Oda *et al.,* 2007）。本研究で得られた時系列データからもLate Stage 5 + 2hまでは外胚葉クラスターでは*Pt-Delta*のみポジティブな細胞集団が確認できたが**（Fig S4F）**、Late Stage 5 + 4hでは、*Pt-twist*、*Pt-Delta*ダブルポジティブな細胞が現れ、外胚葉クラスターから突出したように別のクラスターを形成する様子が見られた**（Fig S7A、クラスター6）**。この結果は、胚盤の中央から中胚葉の細胞（cMES）が現れる過程を捉えられていることを示唆する。また、Stage 7のSnRNA-seqデータの解析から明らかになった中胚葉のサブクラスターのマーカー遺伝子は、Late Stage 5 + 11hで初めて、Stage 7のパターンと対応する発現パターンを示した**（Fig S22I）**。また、発現の見られたクラスターのUMAPプロット上での位置から、LOC107456536とLOC107449287ポジティブな中胚葉は胚盤の縁を由来とし（pMES）、LOC107452693およびLOC107457003ポジティブな中胚葉は胚盤の中央を由来とすることが示唆された（cMES）。

内胚葉、胚外、およびクムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（*At_eW_012_A08*、*LOC107444265*、*LOC107451717*）の発現パターンからは、内胚葉性の細胞の発生過程での変化を捉えることができた。クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（*Pt-ets4*）のUMAPプロット上での発現をみると、Series_AのLate Stage 5 + 8hで明確なパターンを示さなくなった**（Fig S13D）**。Series_BおよびSeries_Cでは、いずれのデータにおいてもUMAPプロット上での明確な発現パターンは確認できなかった。本研究におけるLate Stage 5は約38h AELであるため、Late Stage 5 + 8hは約46h AELになる。先行研究では、クムルス間充織細胞におけるマーカー遺伝子（*Pt-dpp*）の発現がStage 6（40-45 AEL）の後期にかけて消失することが報告されており（Akiyama-Oda, and Oda, 2003）、今回の結果とよく一致する。胚外のマーカー遺伝子（*Pt-noggin*）の発現パターンからは、胚外の細胞集団が多様化する過程が捉えられた。Series_Aのデータにおいては、*Pt-noggin*の発現がLate Stage 5 + 2hから確認できた。また、この際、*Pt-noggin*を発現するクラスターでは、*Pt-noggin*の発現に偏りは見られなかった。Series_Bのデータでは、Late Stage 5 + 9hから、*Pt-noggin*を発現するクラスター内に*Pt-noggin*ネガティブな細胞が現れ始めた**（Fig S19E）**。その後のステージのデータにおいて、*Pt-noggin*を発現するクラスター内の*Pt-noggin*ネガティブな細胞は増加しているように見えた**（Fig S22E, S25E）**。この結果から、胚外の細胞はLate Stage 5 + 9hから状態が多様化していることが示唆された。また、胚外のクラスターにおける内胚葉マーカー（*At_eW_012_A08*）の発現を見てみると、Late Stage 5 + 6hまでは胚外のクラスターでは発現が確認できなかったが、Late Stage 5 + 7hでは*At_eW_012_A08*ポジティブな細胞が生じ始め、発生が進むにつれて胚外のクラスタ

ー全体で発現が見られるようになった（**Fig S16B, S19B, S22B, S25B**）。Stage 7 の解析で見出した胚外のサブクラスターのマーカー遺伝子（*LOC107439300, LOC107441150*）の発現は、Late Stage 5 + 7h で初めて確認できた（**Fig S16G, H**）。内胚葉マーカーの発現と比較してみると、*LOC107439300* ポジティブな細胞は *At_eW_012_A08* も発現しており、*LOC107441150* ポジティブな細胞では *At_eW_012_A08* を発現していないように見えた（**Fig S16B, G, H**）。その後の発生ステージにおいても、*LOC107439300* ポジティブな細胞では *At_eW_012_A08* も強く発現しているのに対し、*LOC107441150* ポジティブな細胞では *At_eW_012_A08* をあまり発現していないように見えた（**Fig S19B, G, H, S22B, G, H, S25B, G, H**）。これらの結果は、胚外の細胞において見られた状態の多様性が、細胞の分化の程度を反映しているものを示唆するのかもしれない。今後、時系列データをより詳細に解析することでこれらの非外胚葉系の細胞が多様化する仕組みを明らかにできると期待される。

Fig S1

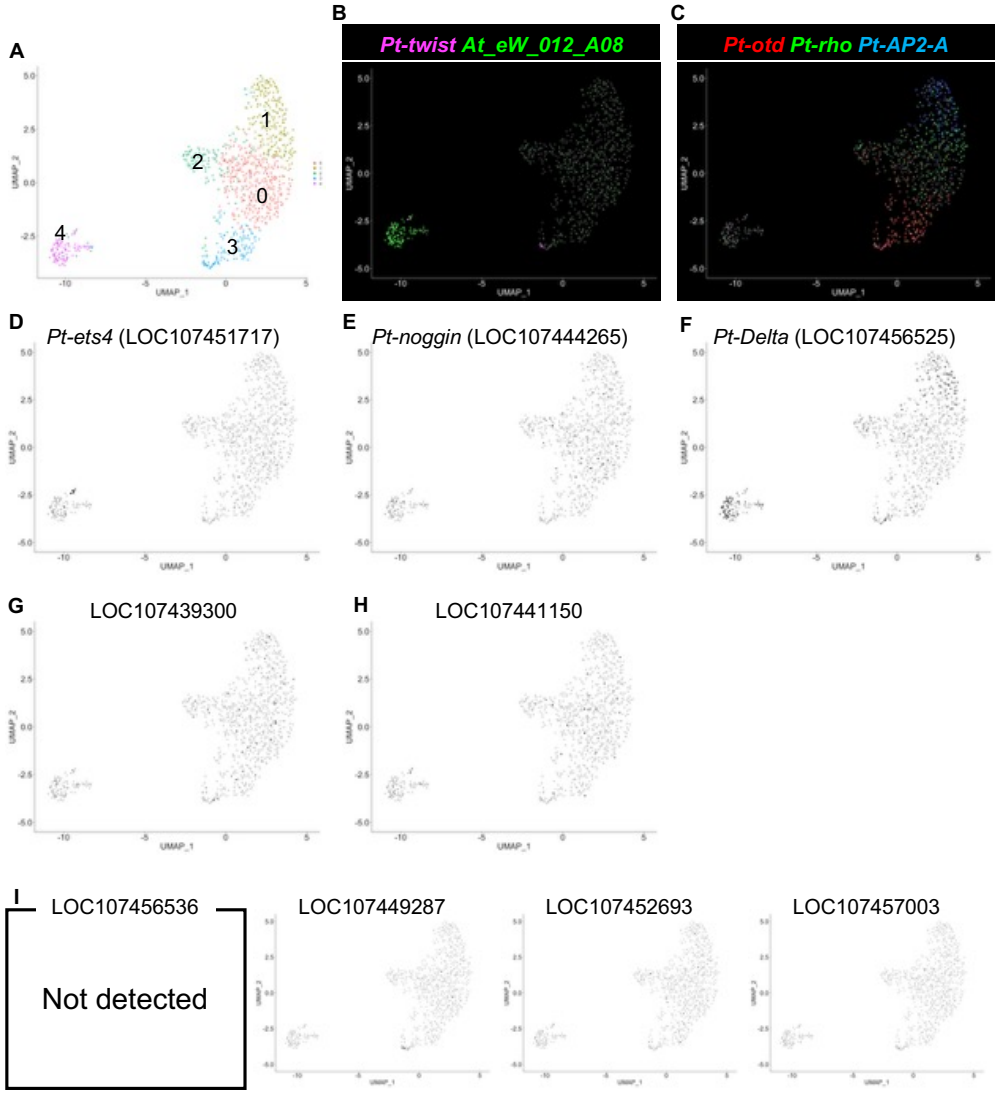


Fig S1 Late Stage 5 の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 893 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S2

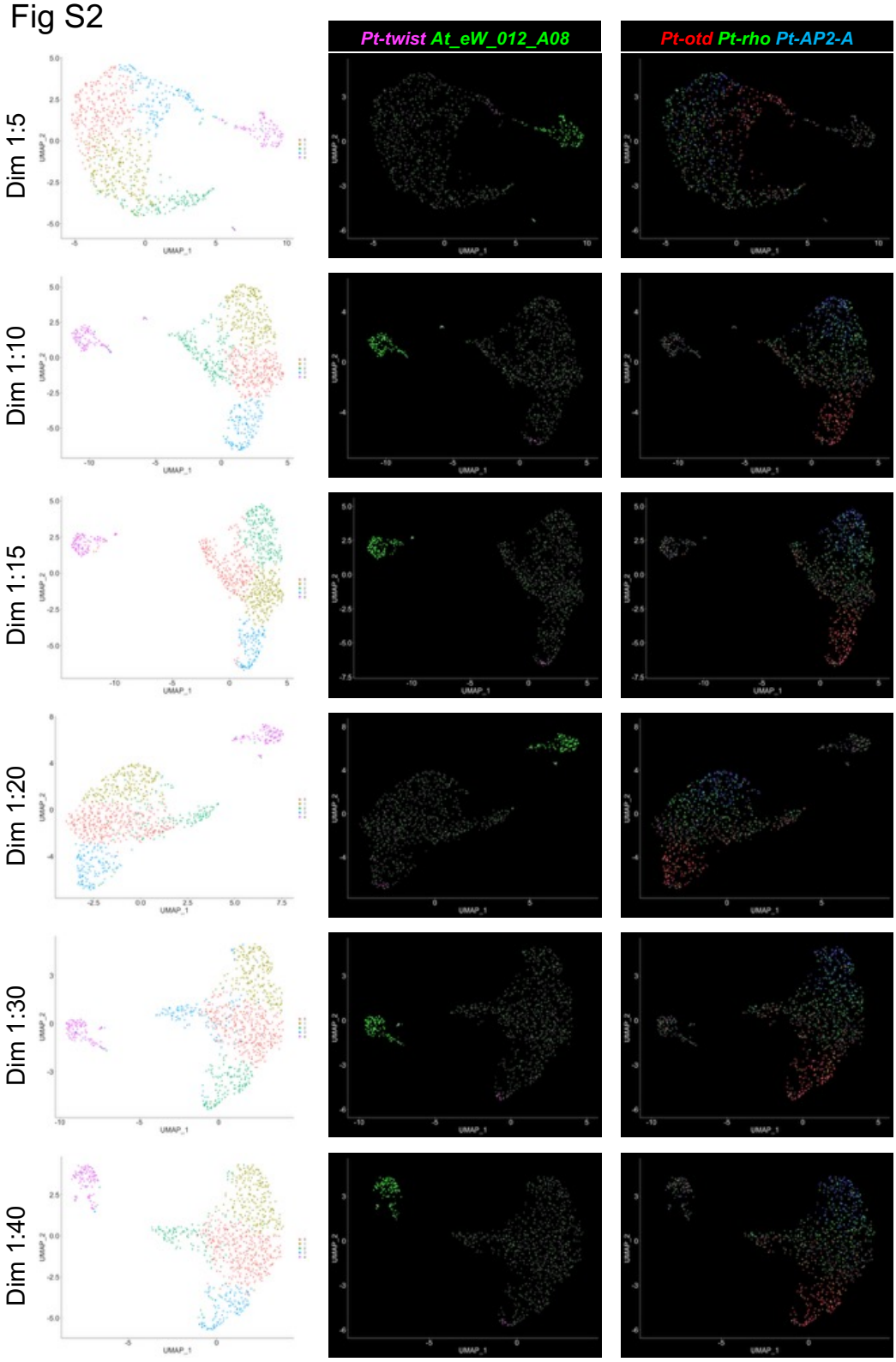

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-rho Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S2 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S3

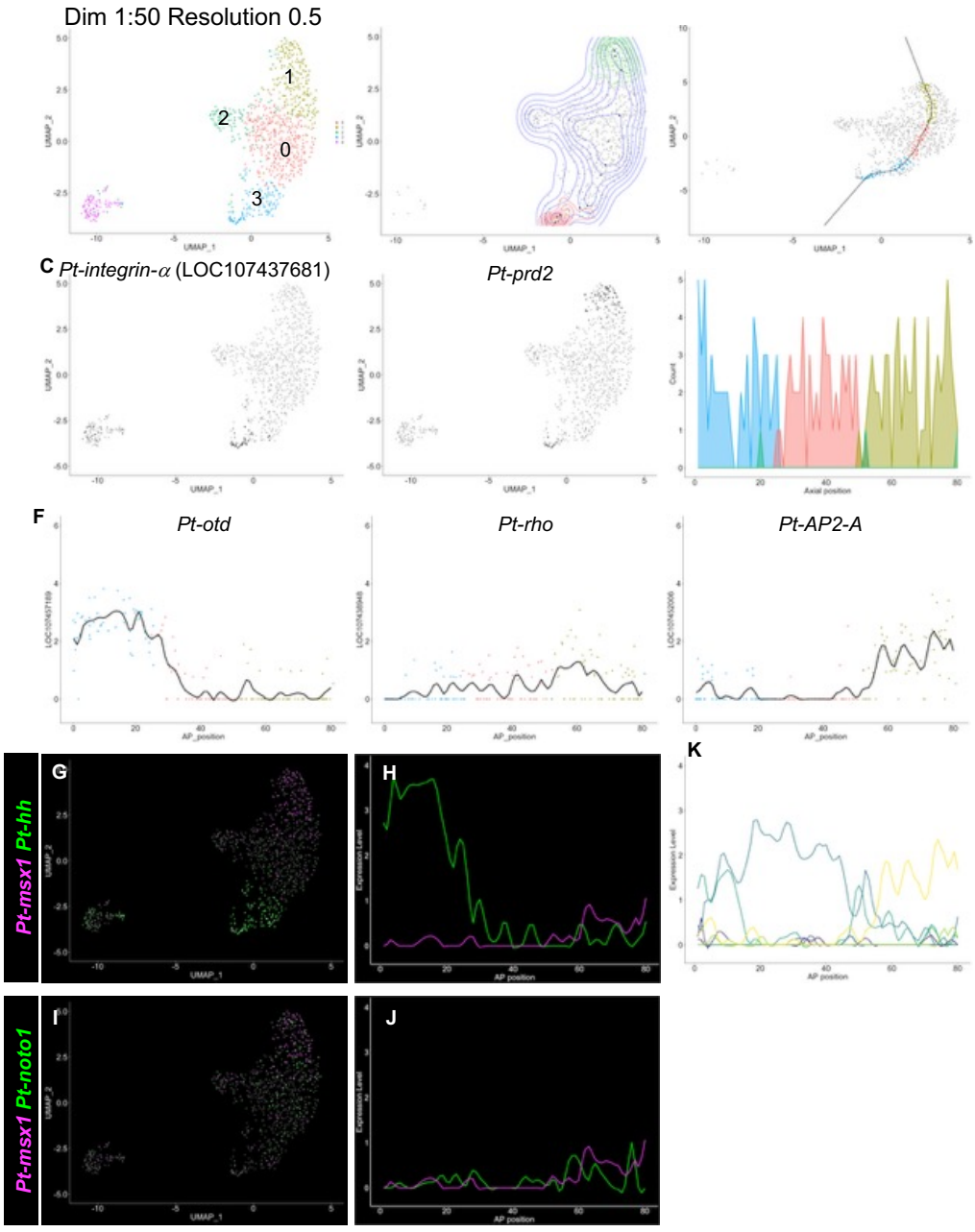


Fig S3 Late Stage 5 の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 0.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-integrin-α* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-prd2* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-integrin-α* 及び *Pt-prd2* の UMAP プロット上での発現パターン。**D** UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在

する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S4

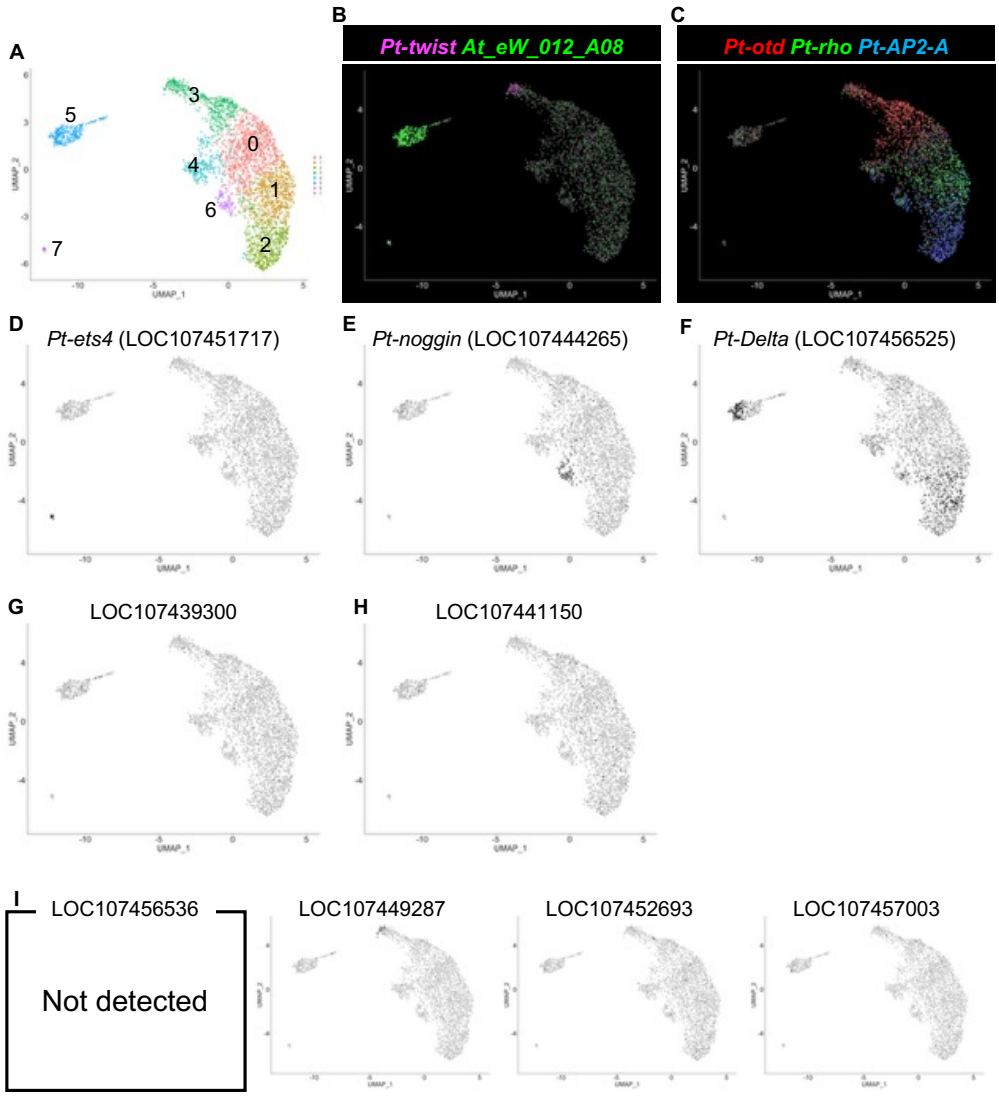


Fig S4 Late Stage 5 + 2h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 3,062 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S5

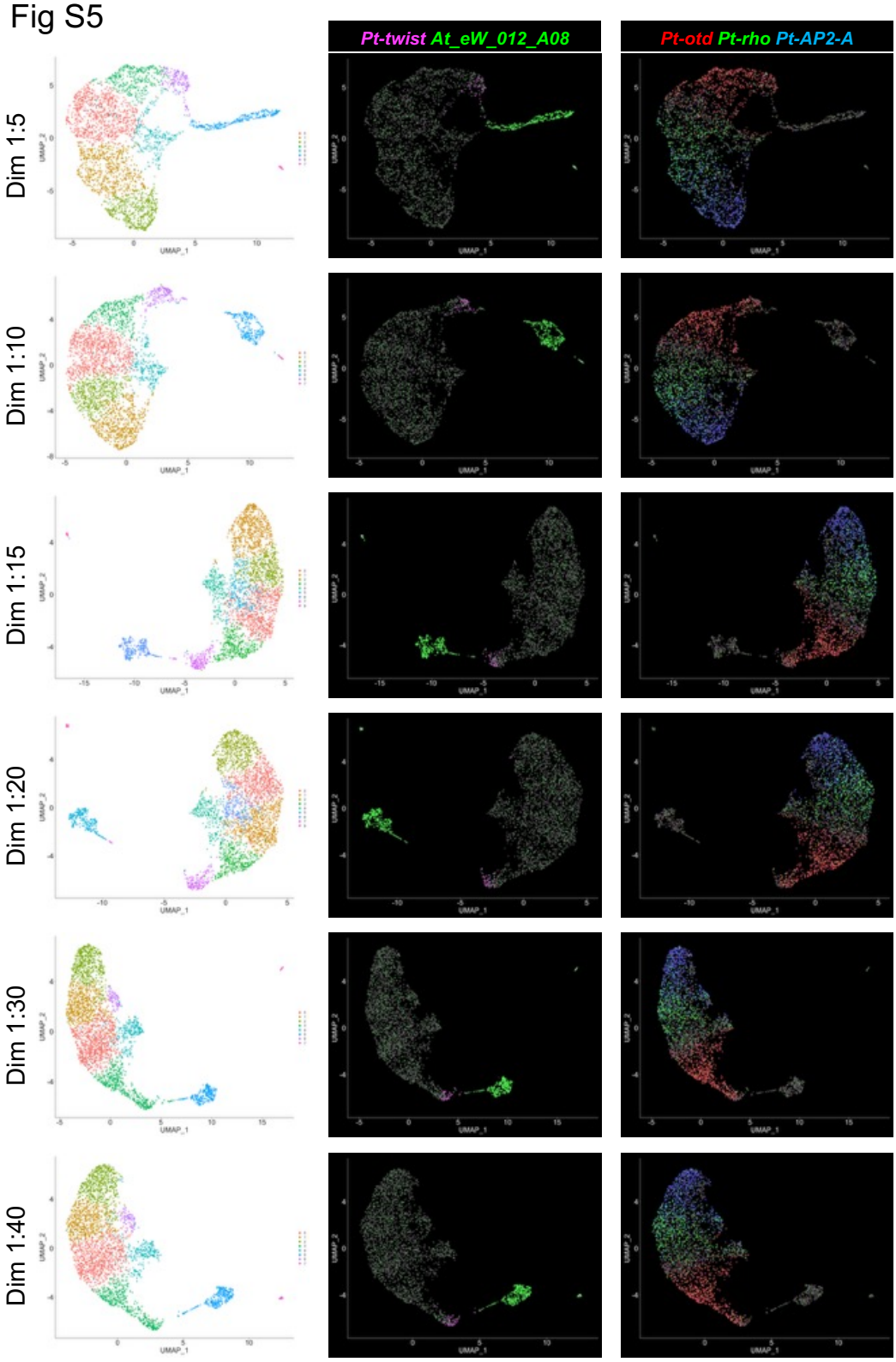

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-rho Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S5 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S6

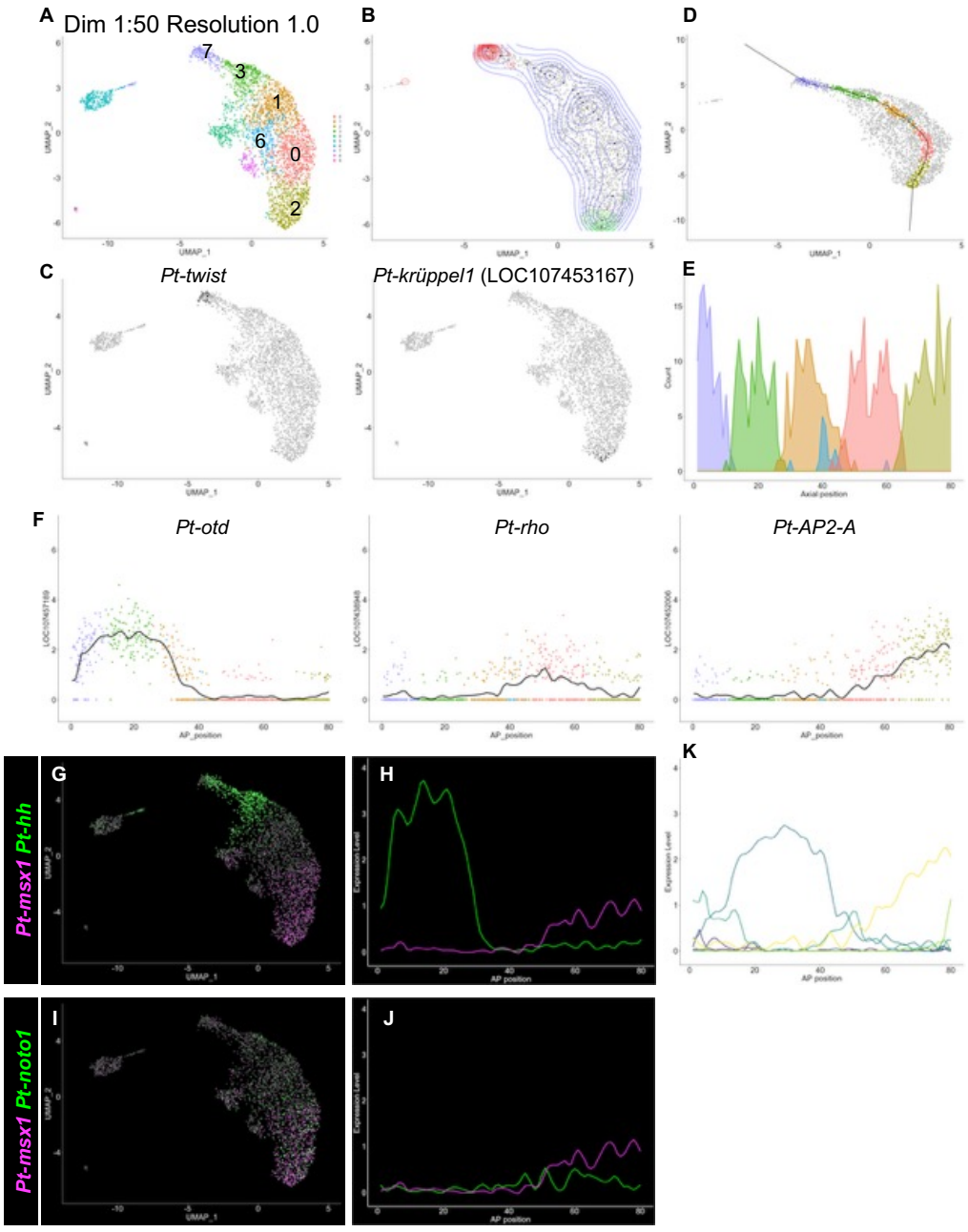


Fig S6 Late Stage 5 + 2h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.0 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-twist* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-krüppel1* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-twist* 及び *Pt-krüppel1* の UMAP プロット上での発現パター

ン。**D** UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 2h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S7

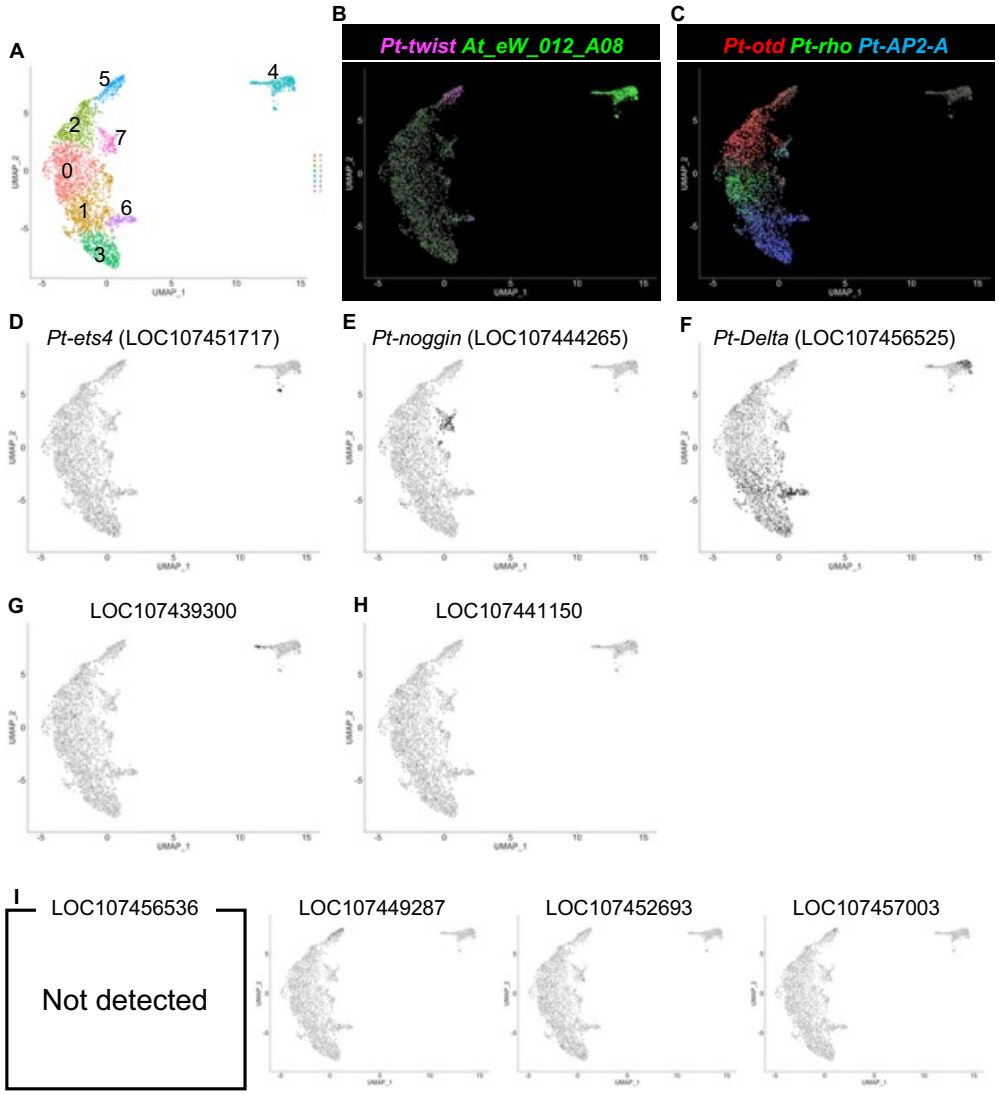


Fig S7 Late Stage 5 + 4h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 3,086 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S8

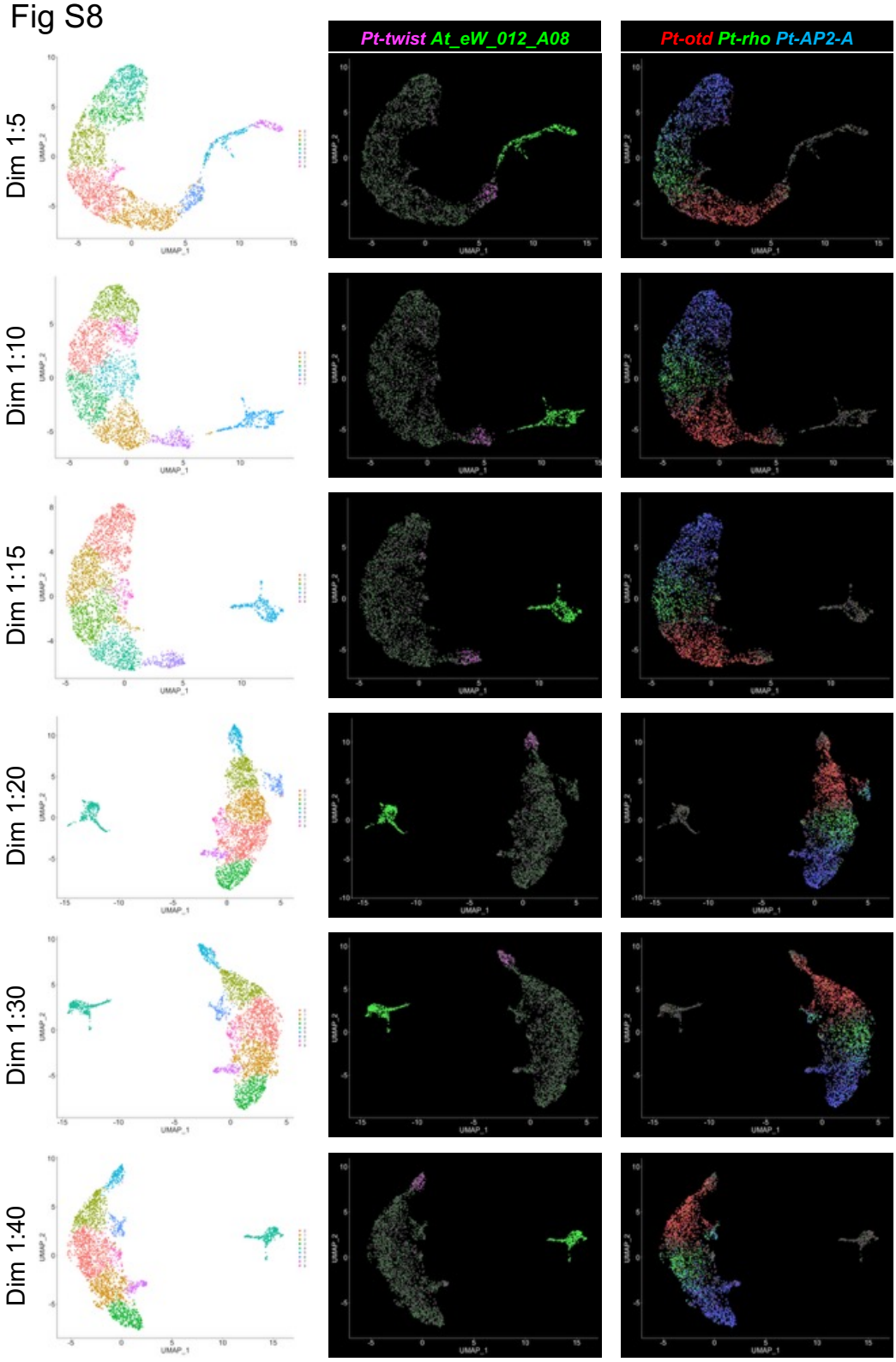

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-rho Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40
UMAP_1
UMAP_2

Fig S8 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S9

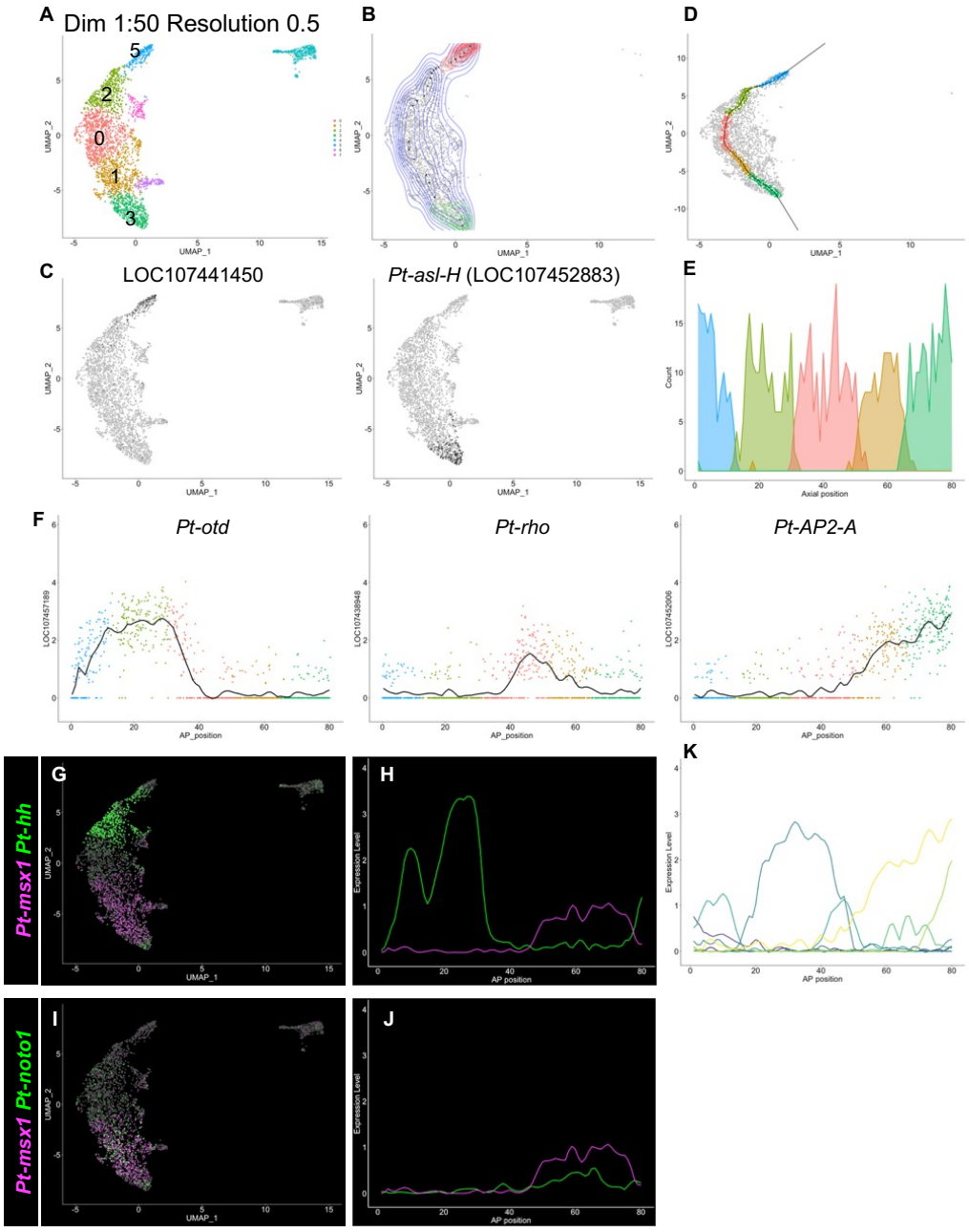


Fig S9 Late Stage 5 + 4h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 0.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、LOC107441150 を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** LOC107441150 及び *Pt-asl-H* の UMAP プロット上での発現パ

ターン。**D** UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 4h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S10

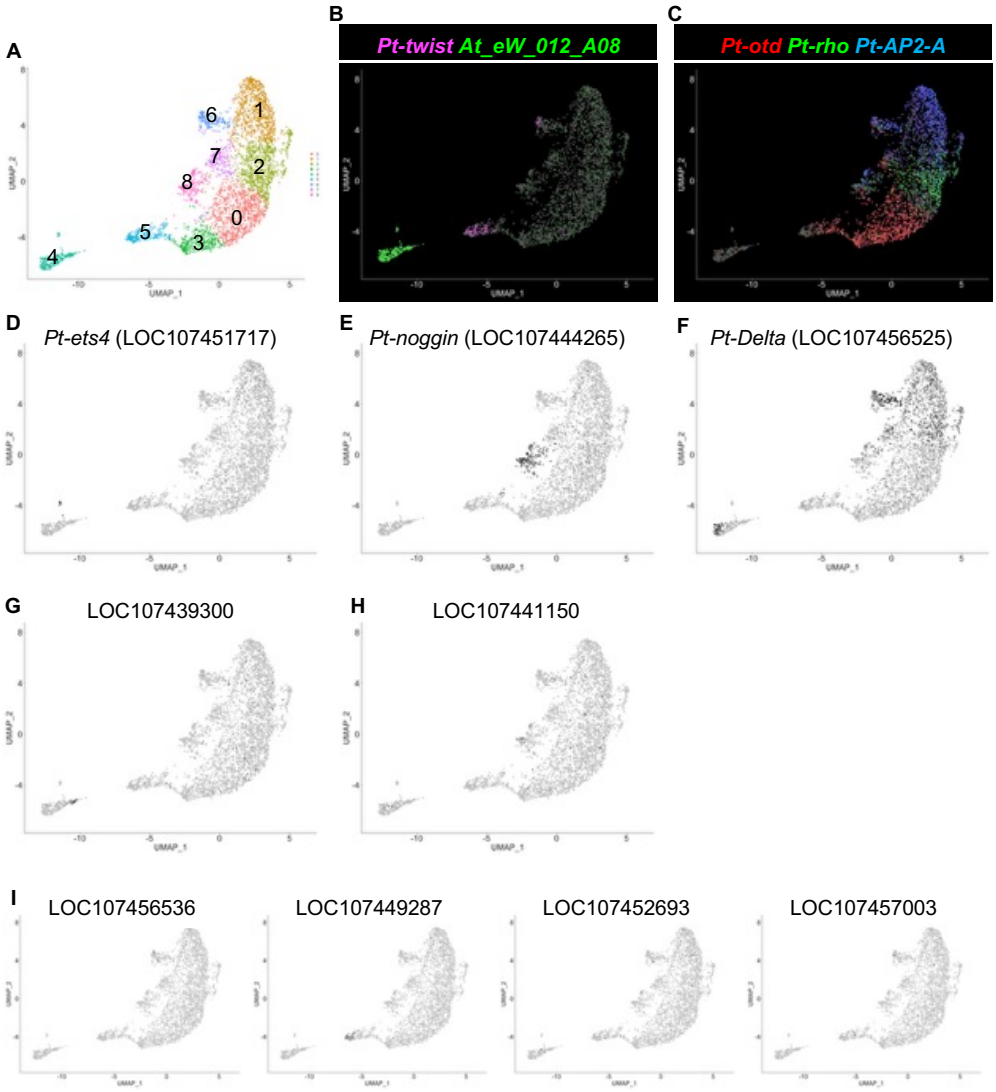


Fig S10 Late Stage 5 + 6h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 3,412 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S11

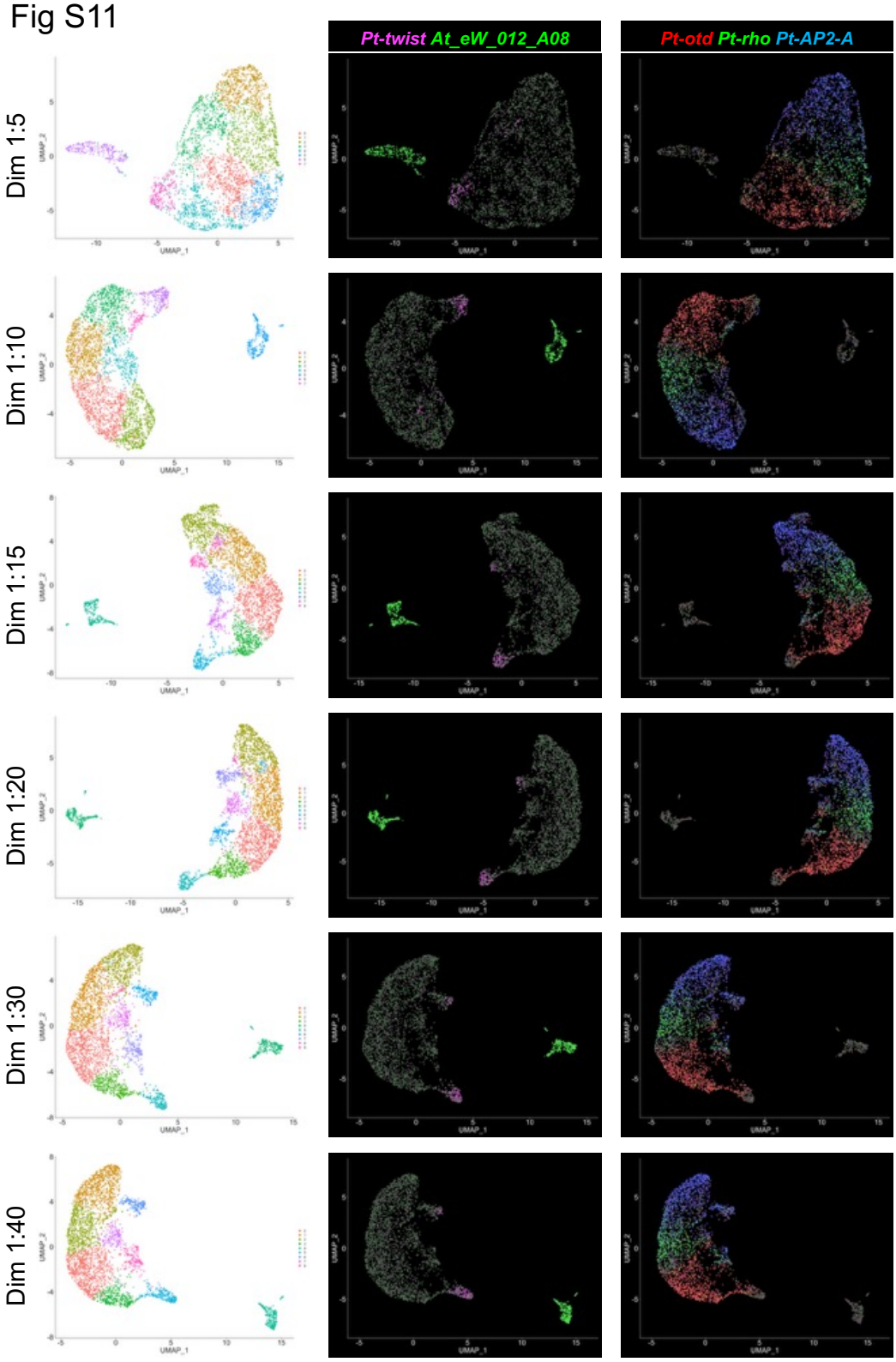

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-rho Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S11 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S12

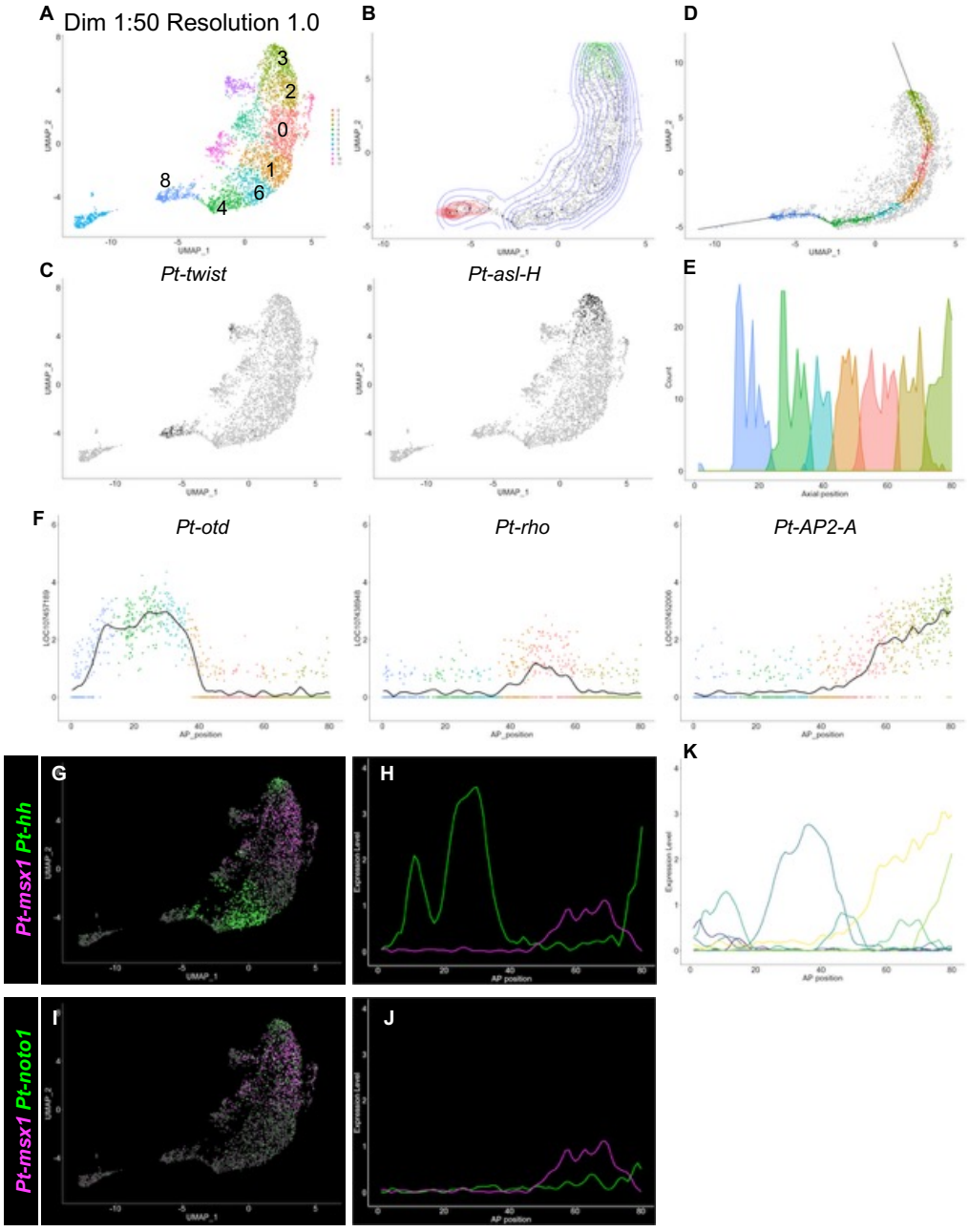


Fig S12 Late Stage 5 + 4h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.0 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-twist* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-twist* 及び *Pt-asl-H* の UMAP プロット上での発現パターン。**D**

UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 6h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S13

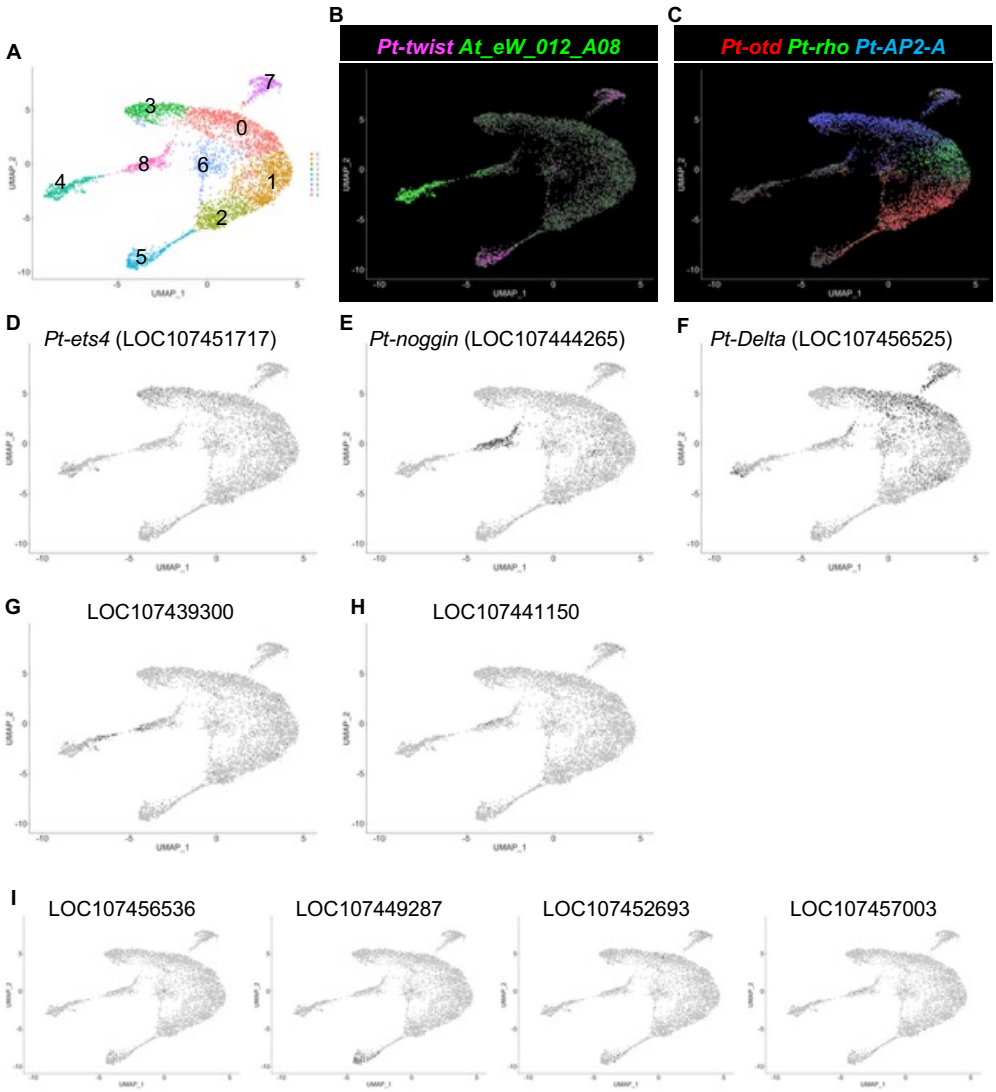


Fig S13 Late Stage 5 + 8h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 4,354 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S14

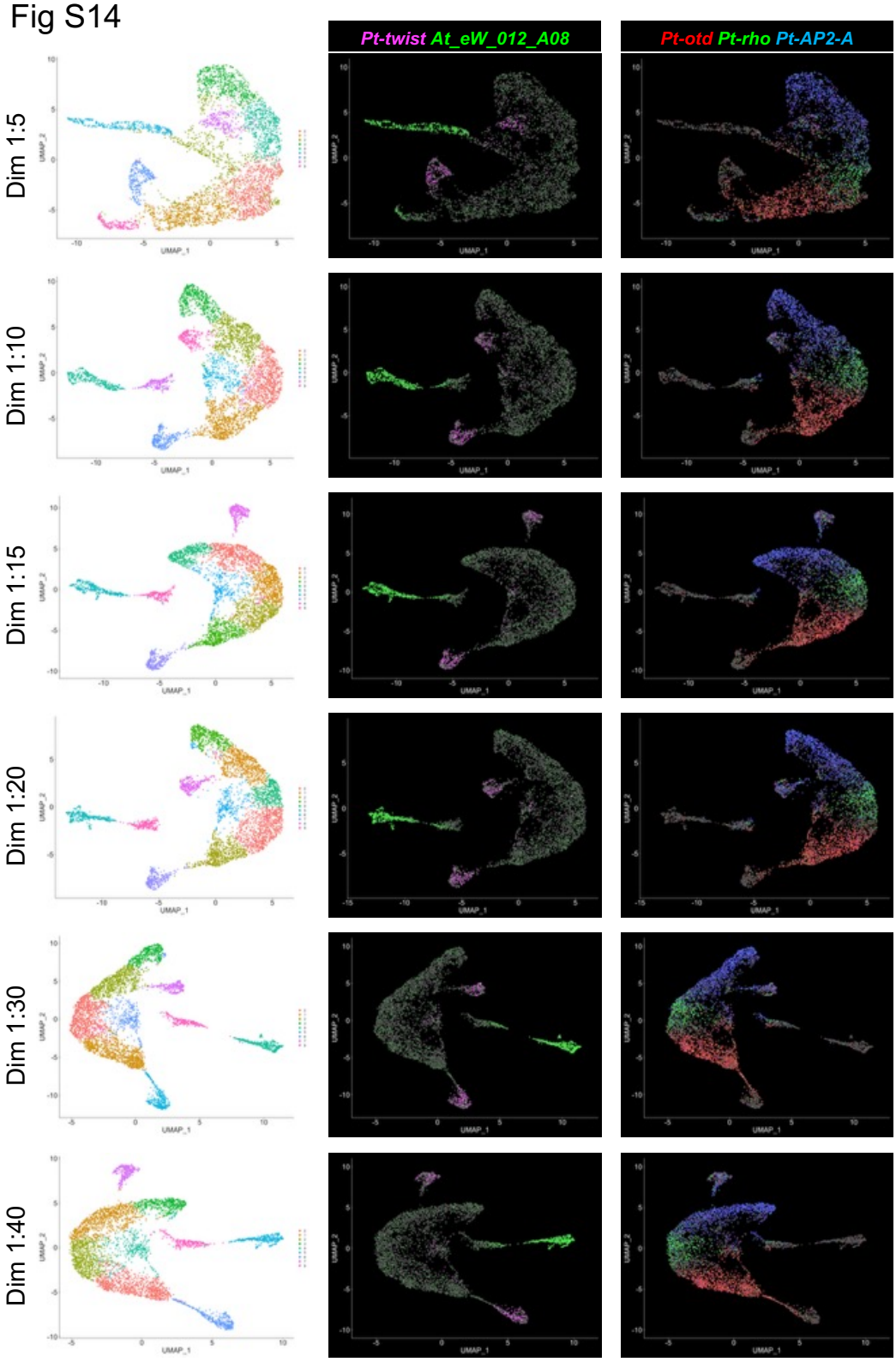

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-rho Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S14 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S15

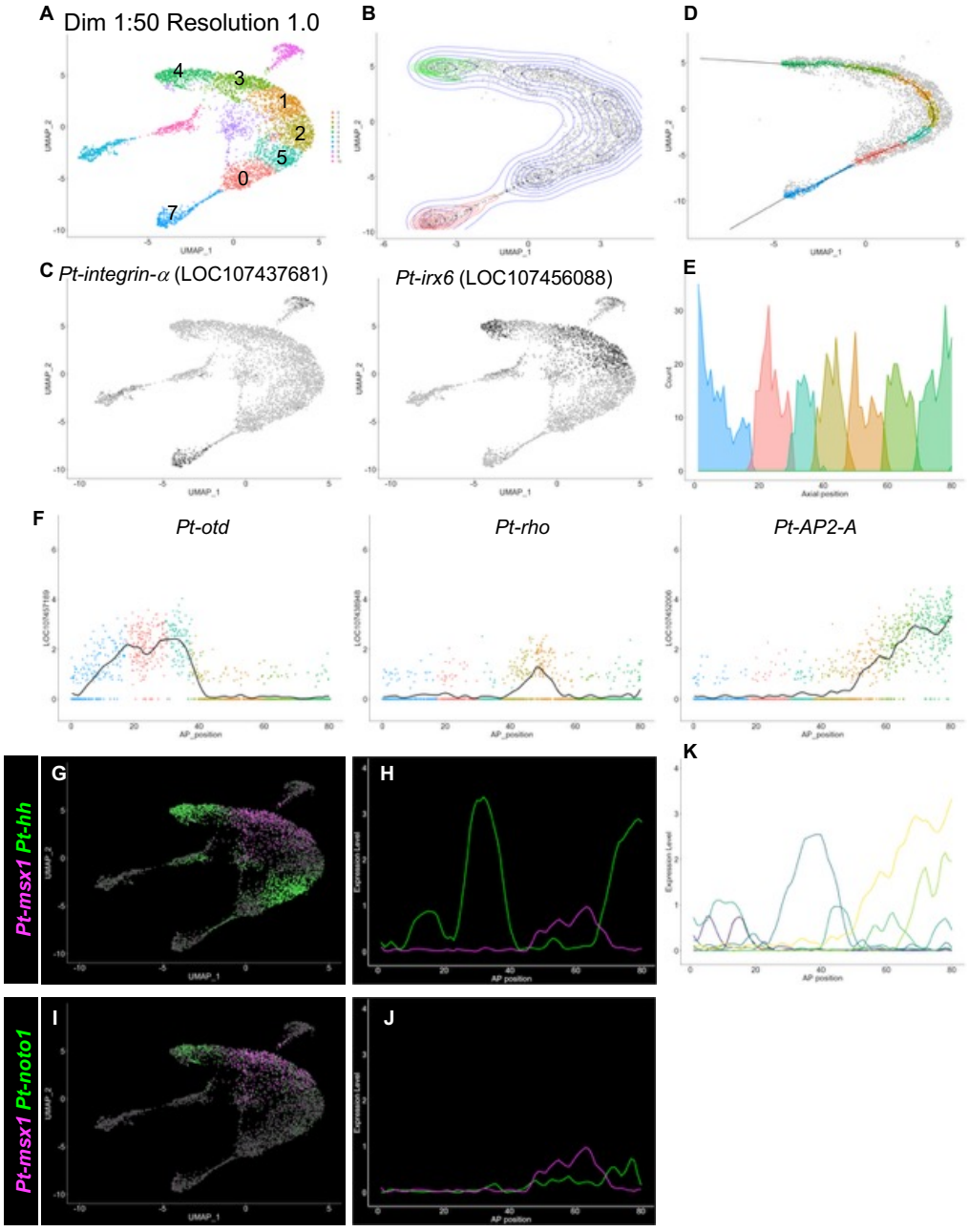


Fig S15 Late Stage 5 + 8h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.0 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-integrin-α*を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-irx6* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-integrin-α*及び *Pt-irx6* の UMAP プロット上での発現パター

ン。**D** UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 8h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S16

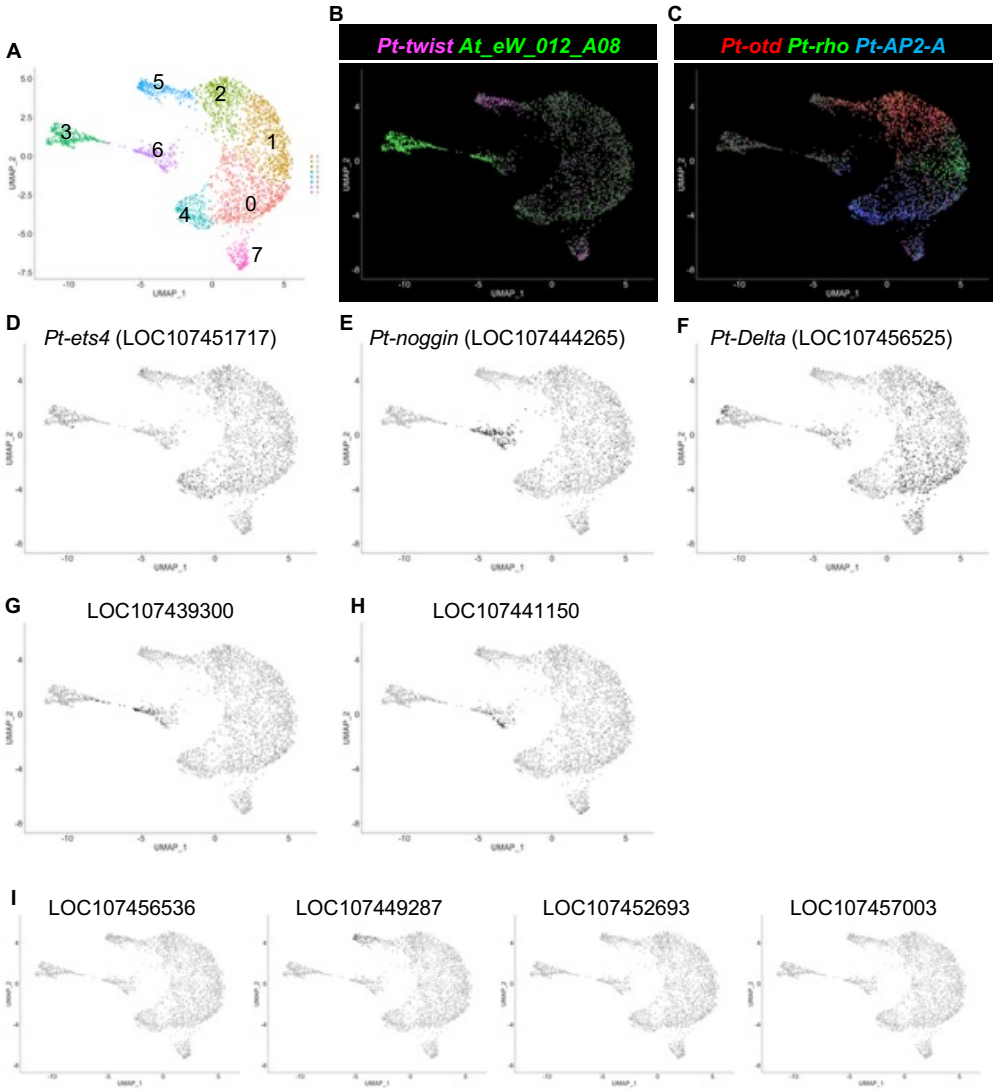


Fig S16 Late Stage 5 + 7h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 2,945 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S17

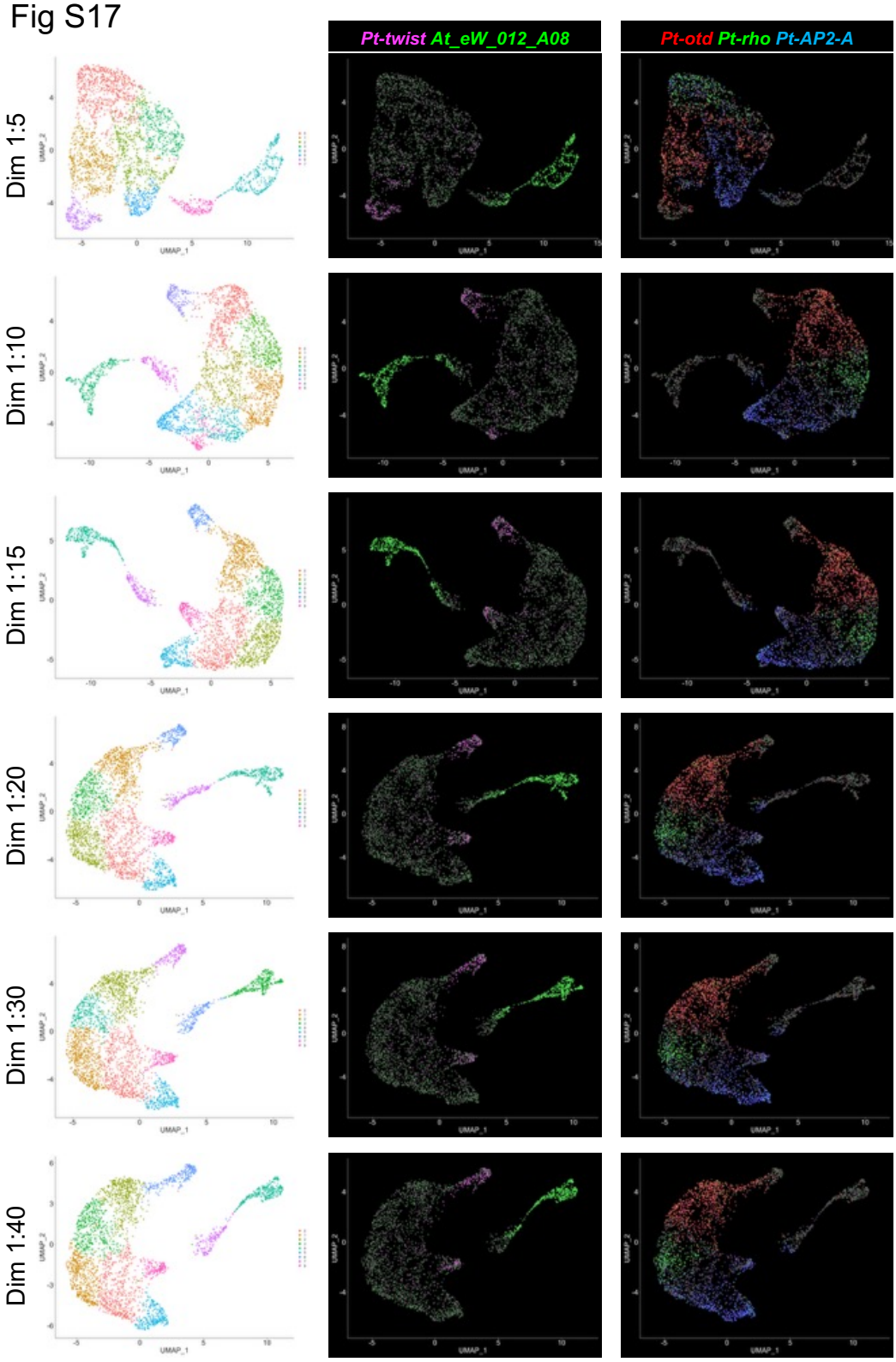

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-rho Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S17 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S18

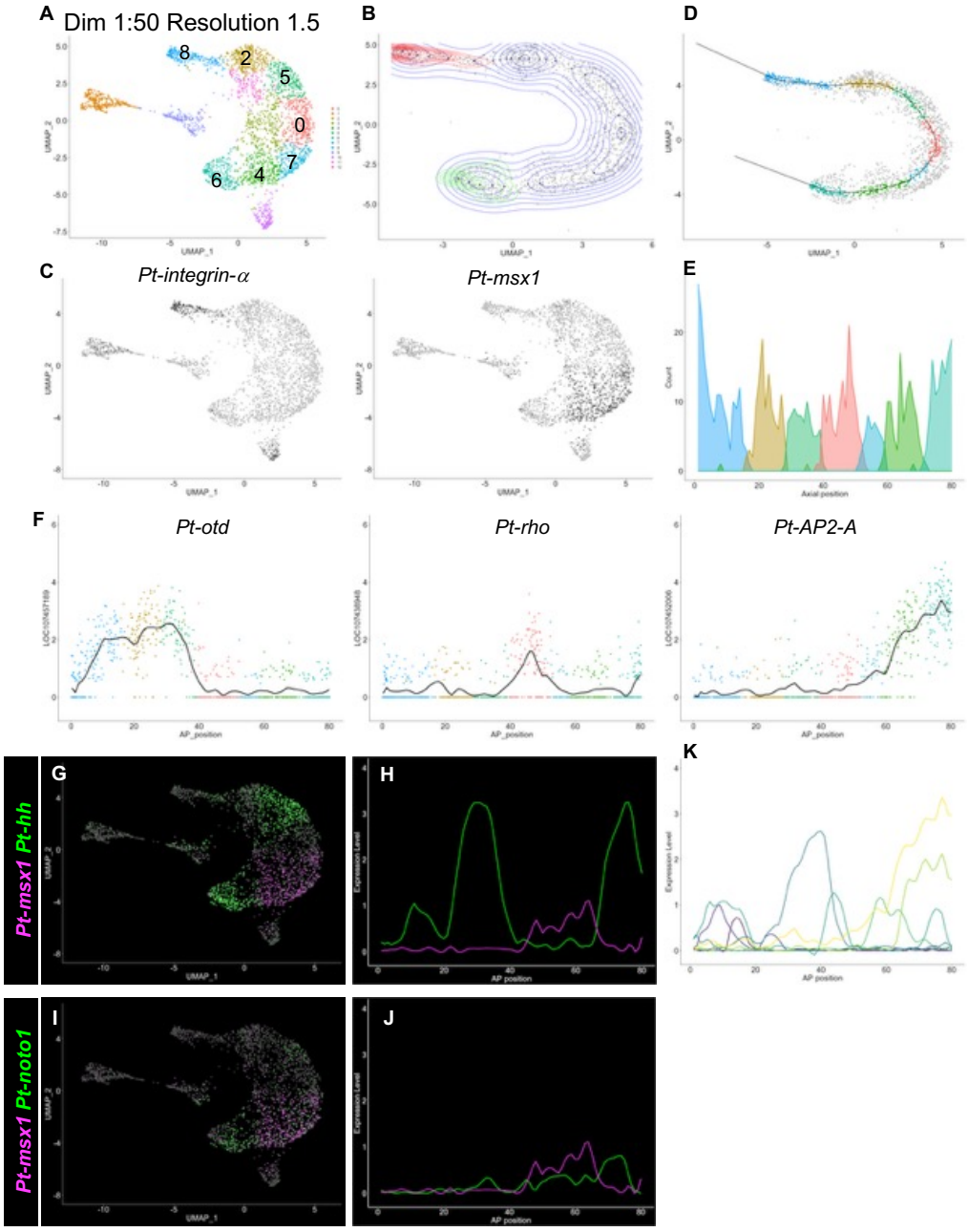


Fig S18 Late Stage 5 + 7h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-integrin-α* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-msx1* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-integrin-α* 及び *Pt-msx1* の UMAP プロット上での発現パター

ン。**D** UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 7h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S19

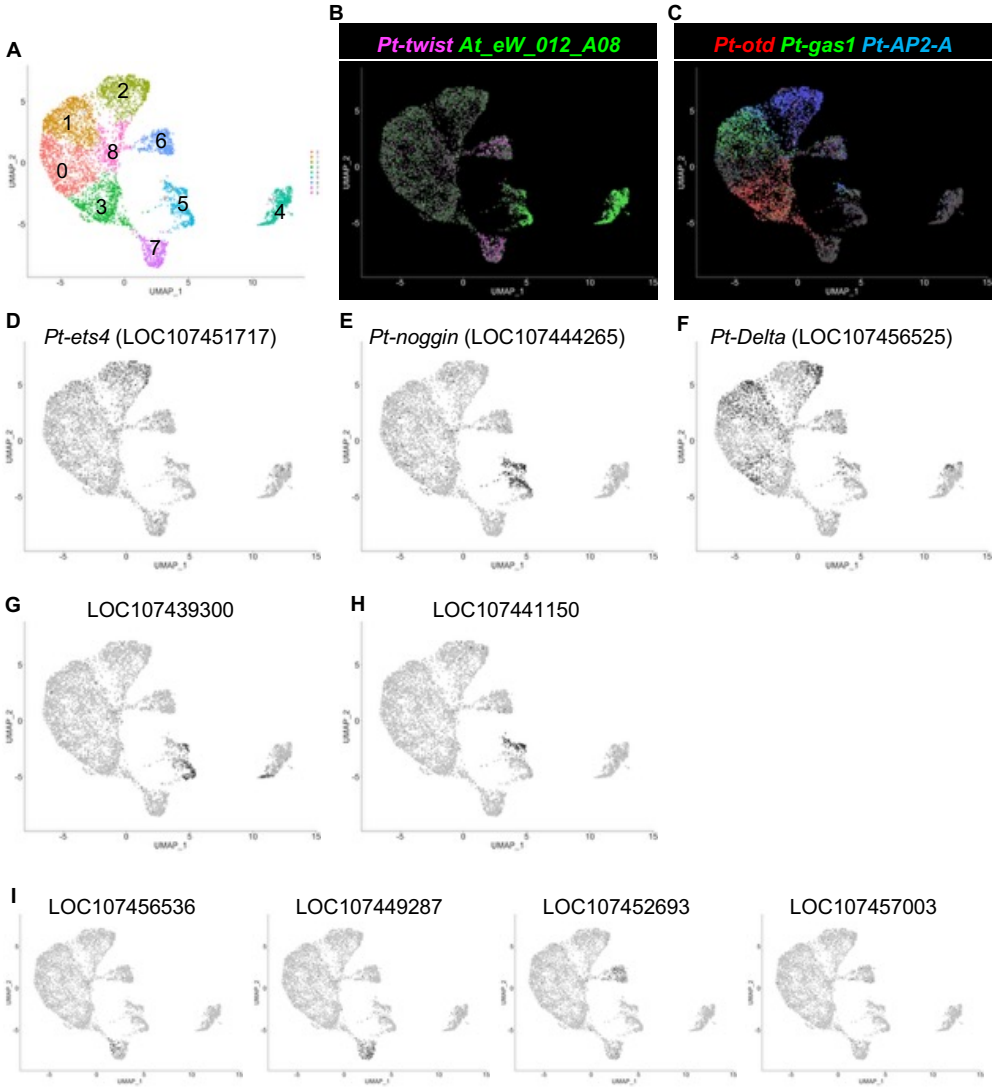


Fig S19 Late Stage 5 + 9h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 5,477 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S20

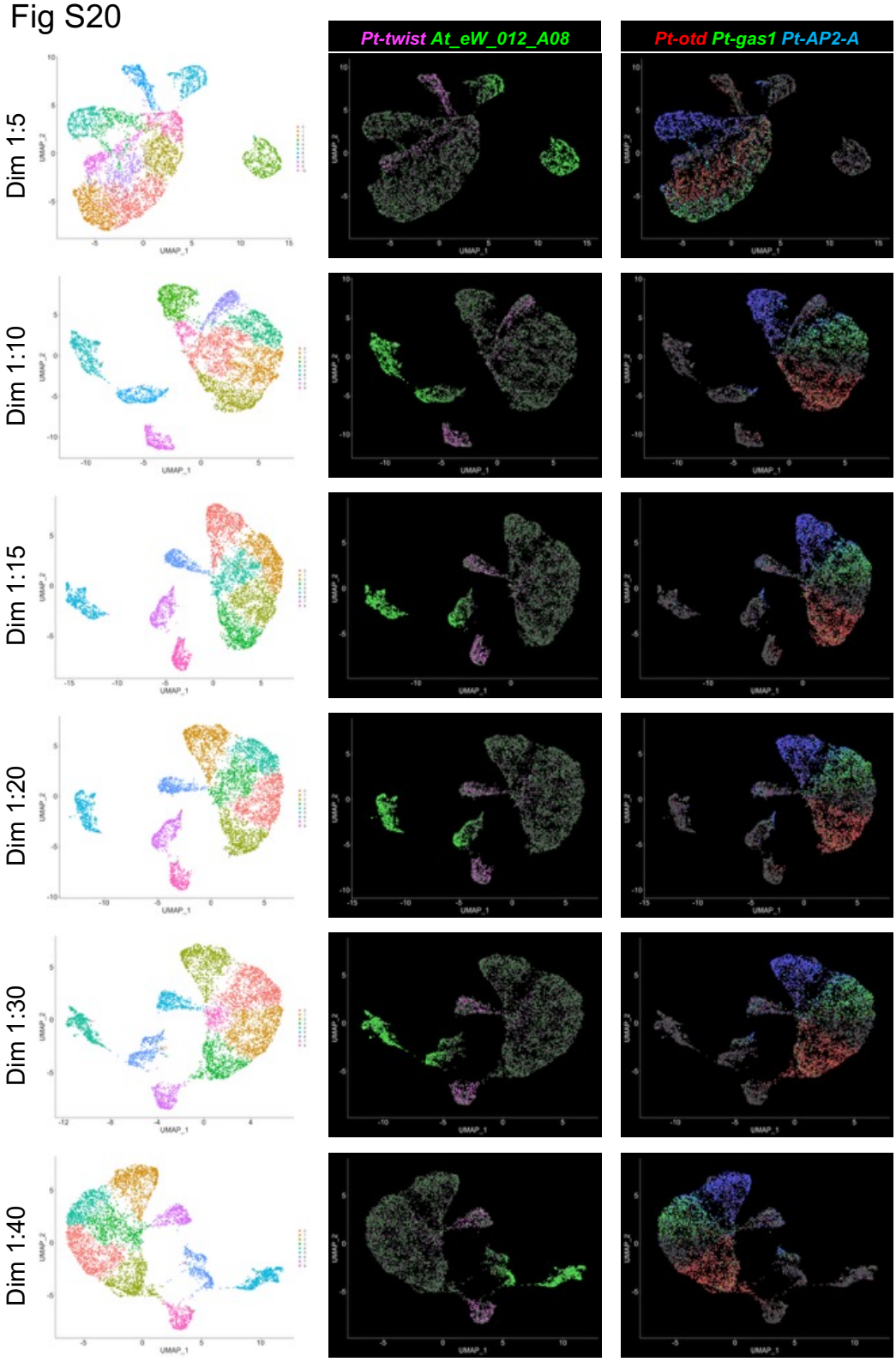

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S20 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S21

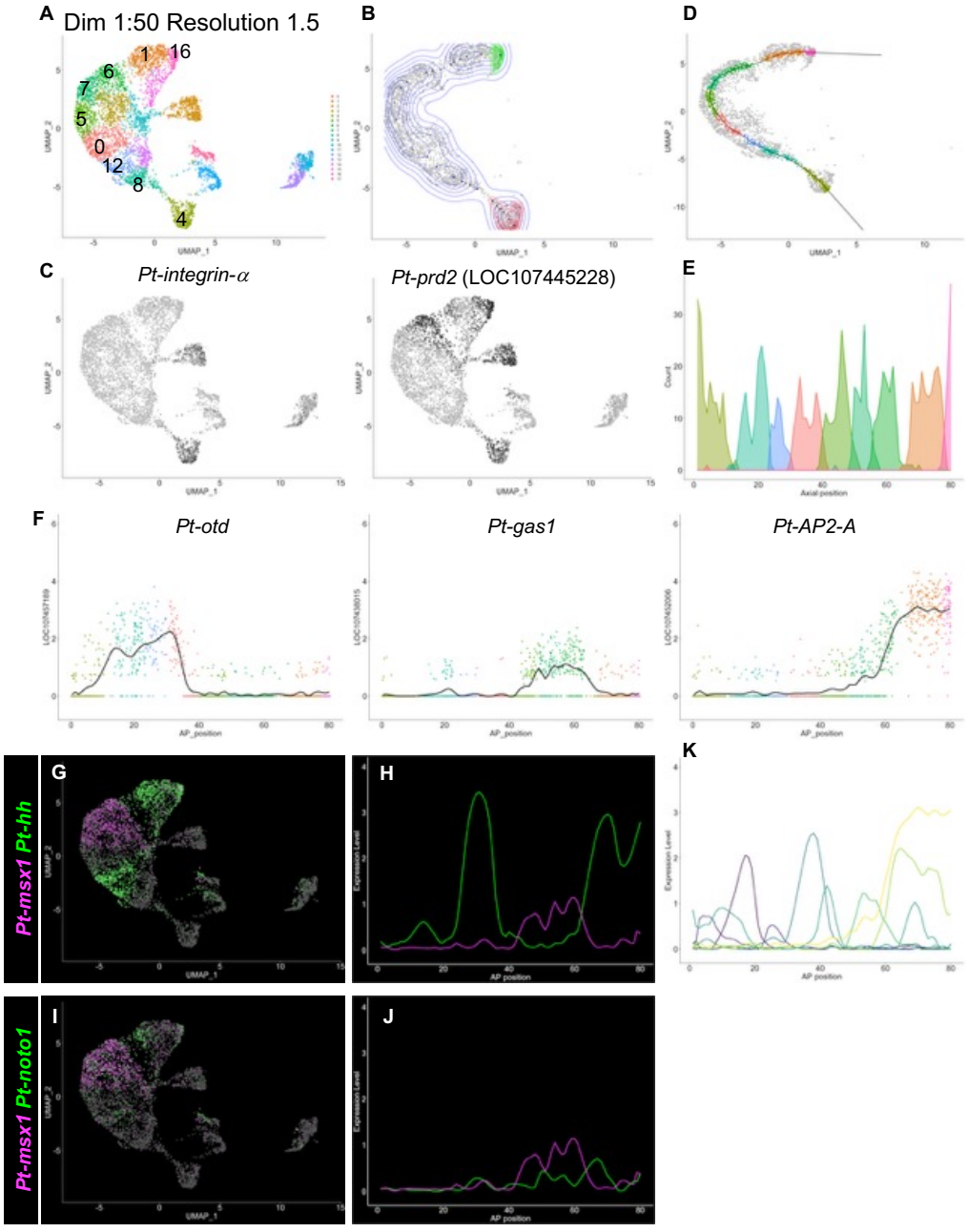


Fig S21 Late Stage 5 + 9h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-integrin-α* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-prd2* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-integrin-α* 及び *Pt-prd2* の UMAP プロット上での発現パター

ン。**D** UMAP プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 9h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S22

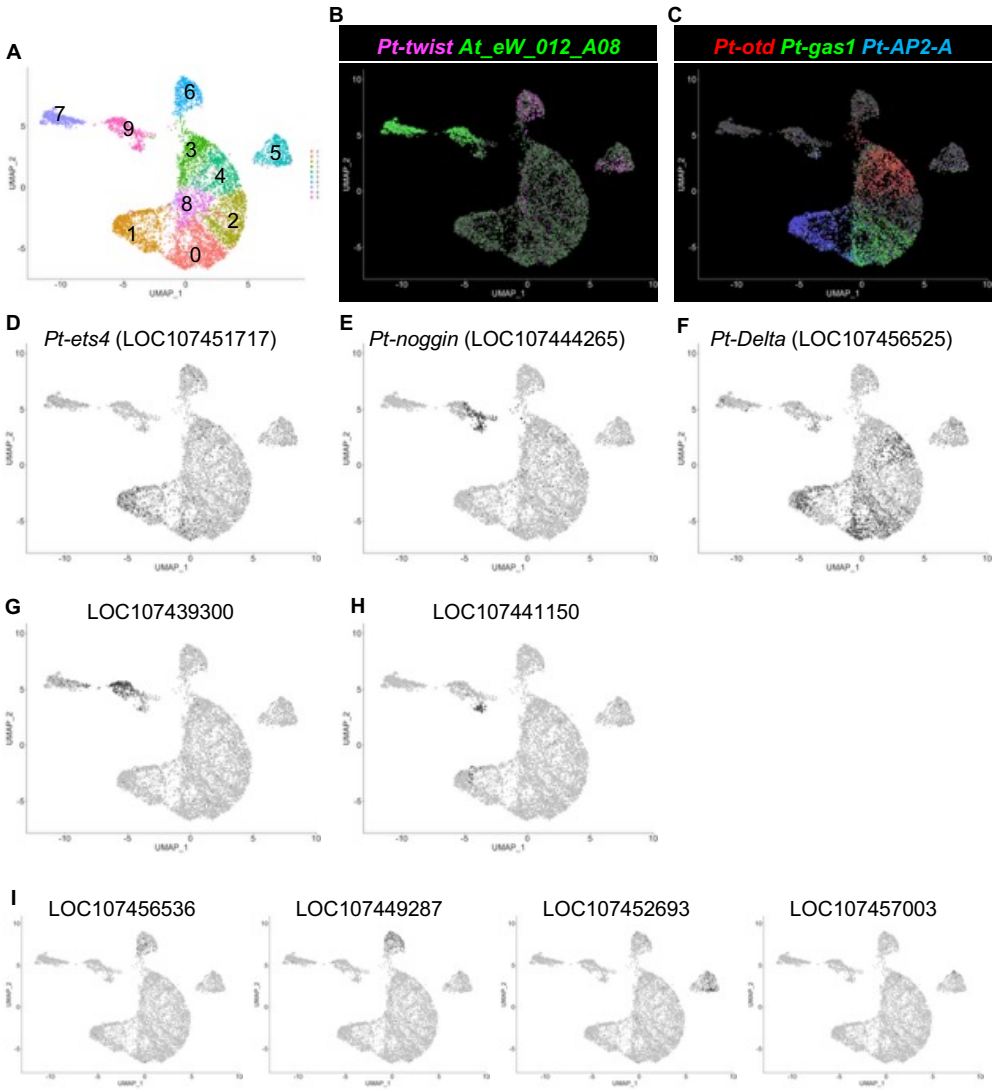


Fig S22 Late Stage 5 + 11h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 6,941 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S23

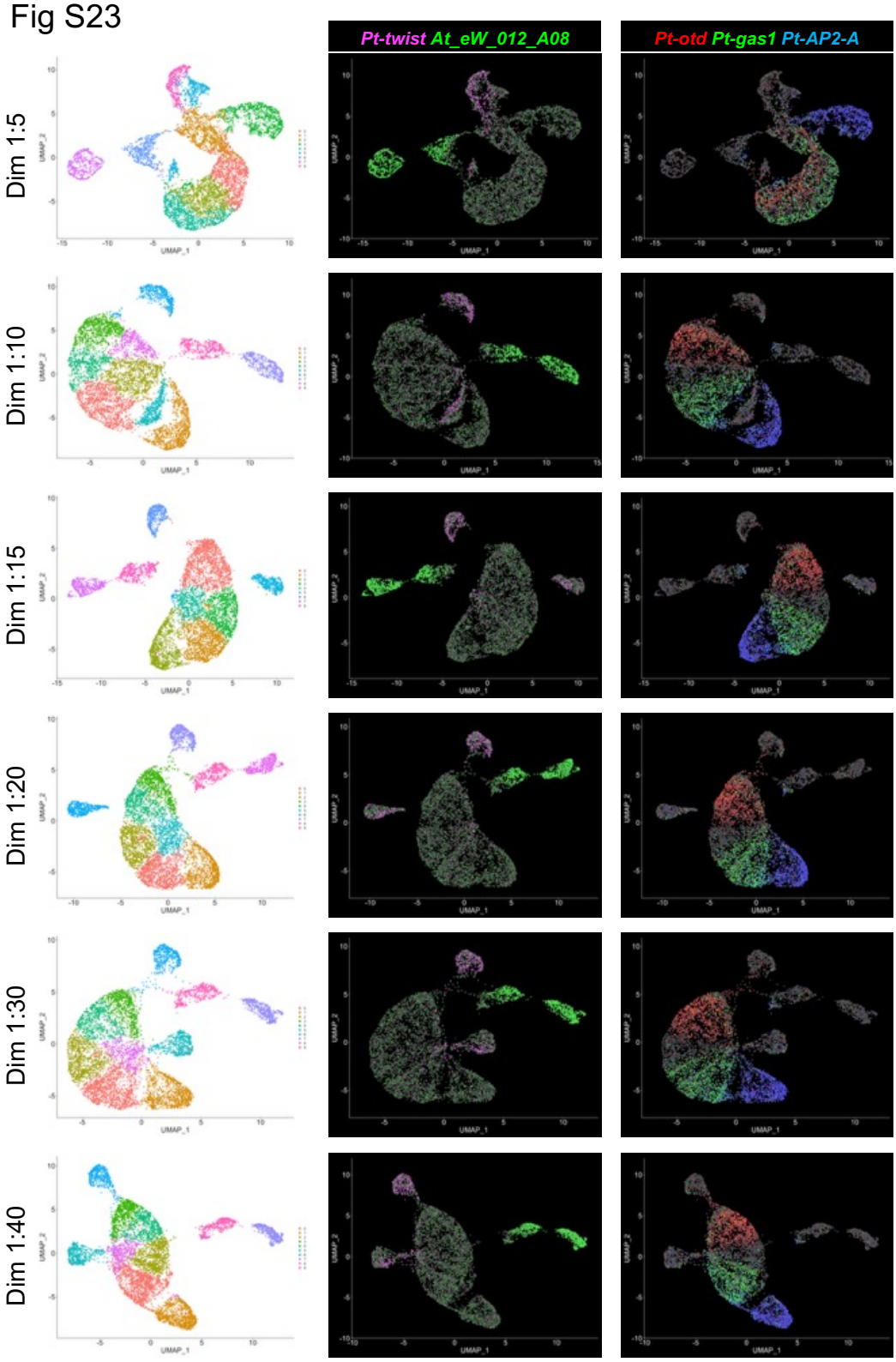

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S23 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S24

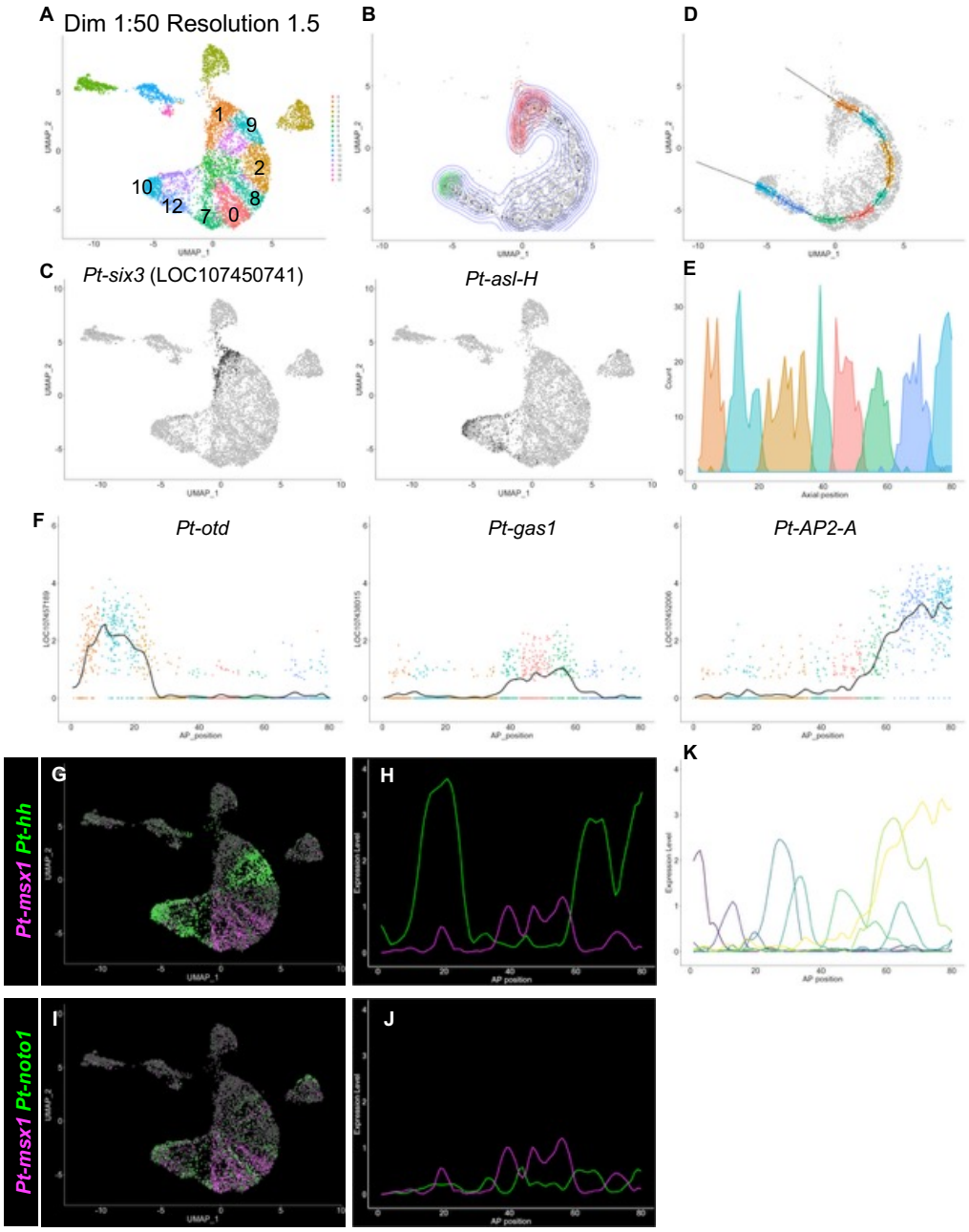


Fig S24 Late Stage 5 + 11h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-six3* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* の UMAP プロット上での発現パターン。**D** UMAP

プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 11h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S25

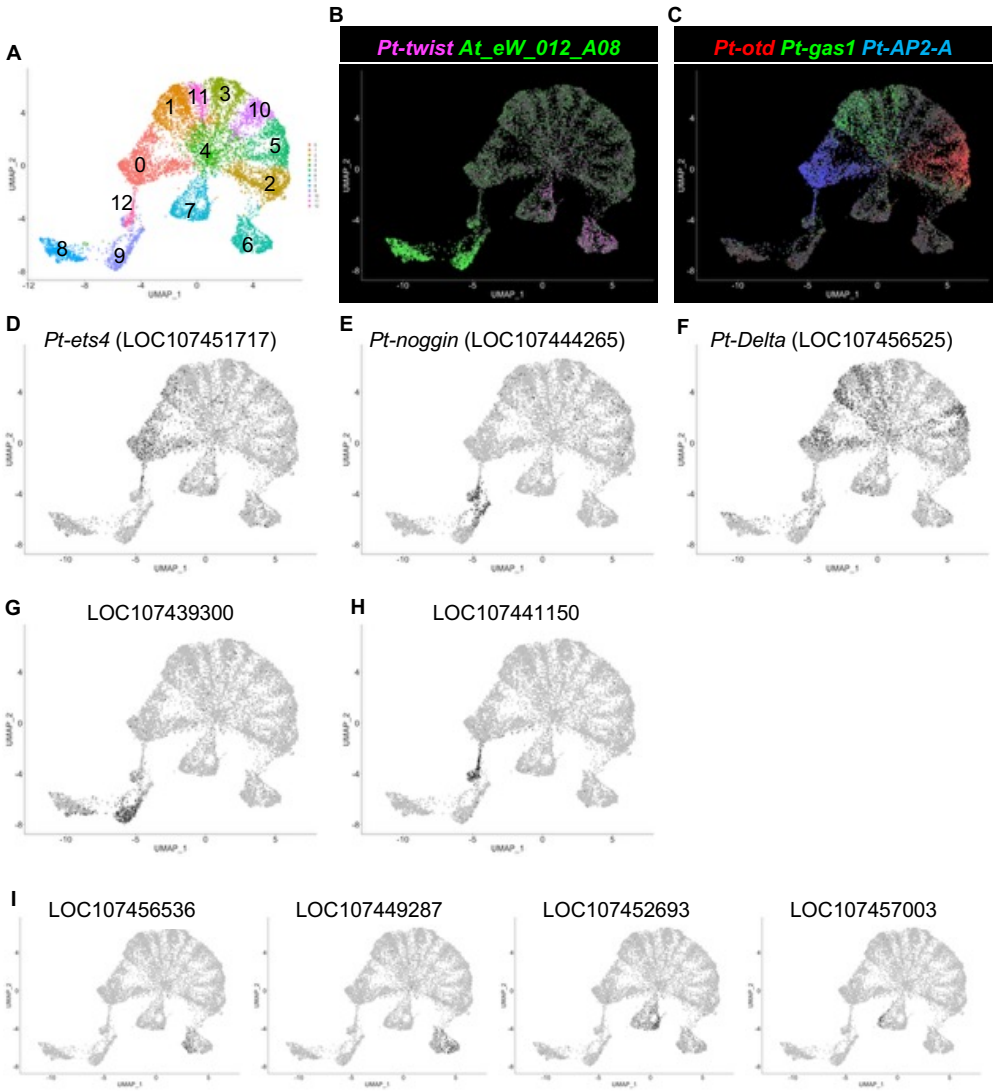


Fig S25 Late Stage 5 + 13h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 9,813 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S26

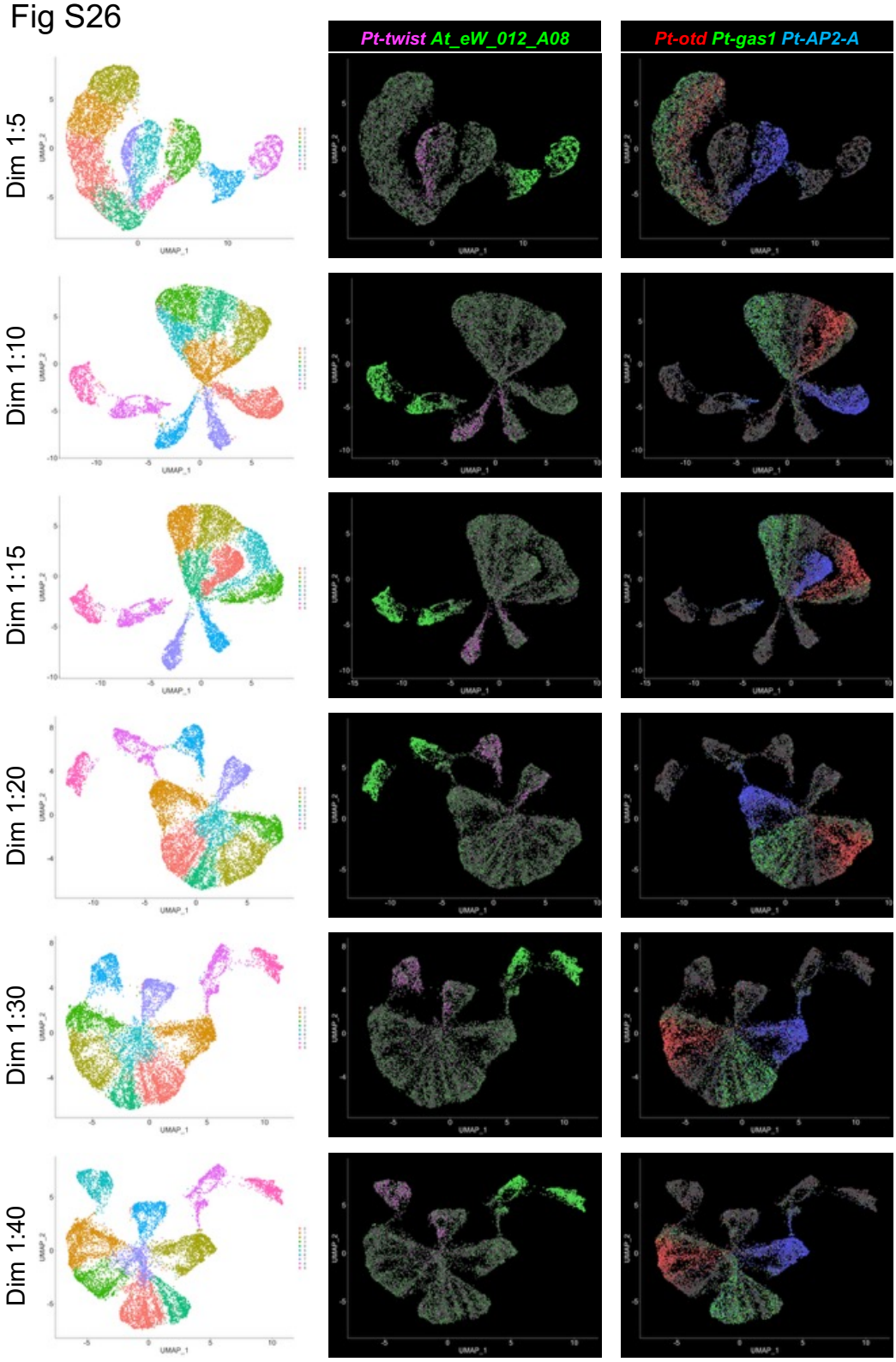

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S26 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S27

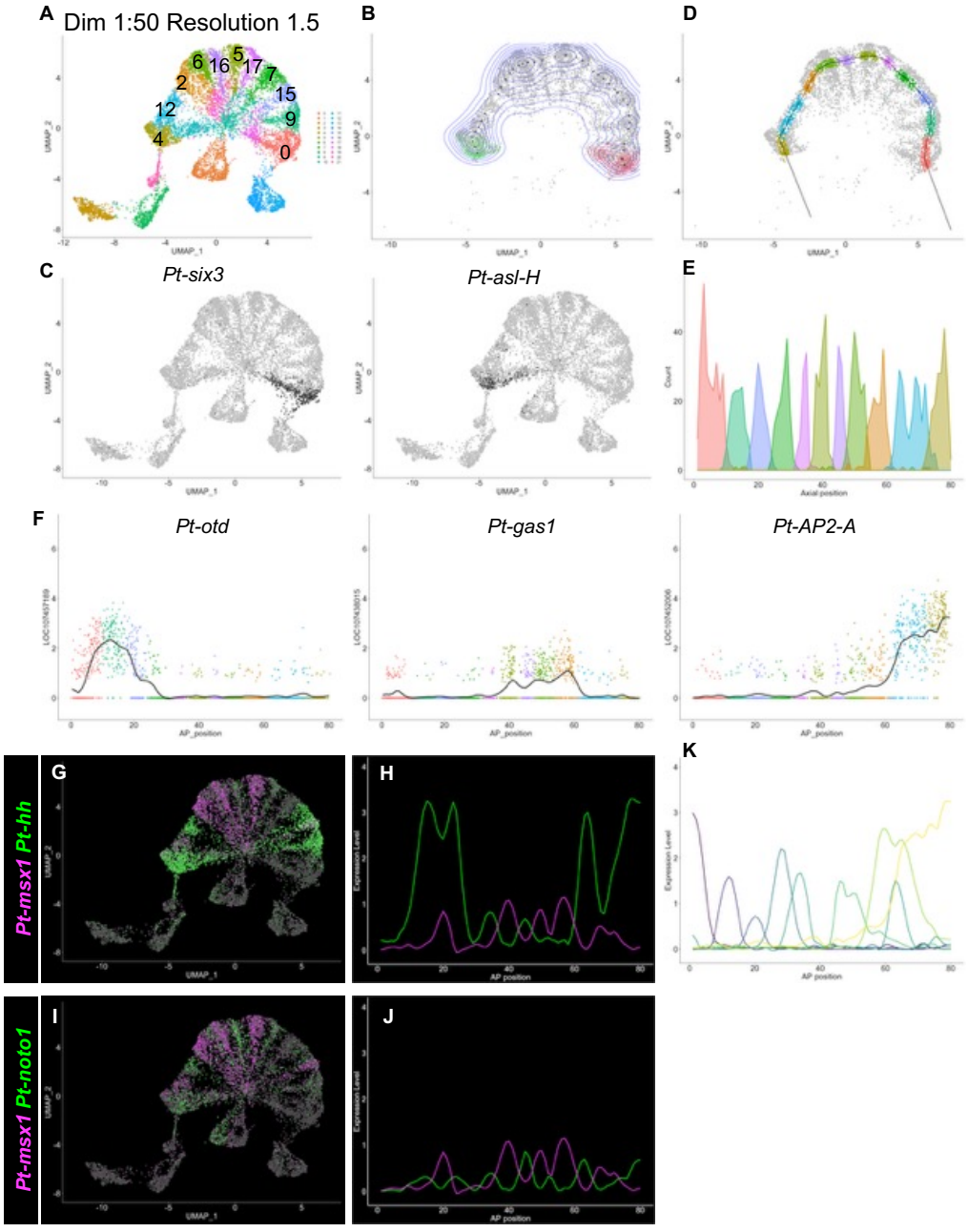


Fig S27 Late Stage 5 + 13h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-six3* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* の UMAP プロット上での発現パターン。**D** UMAP

プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 13h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S28

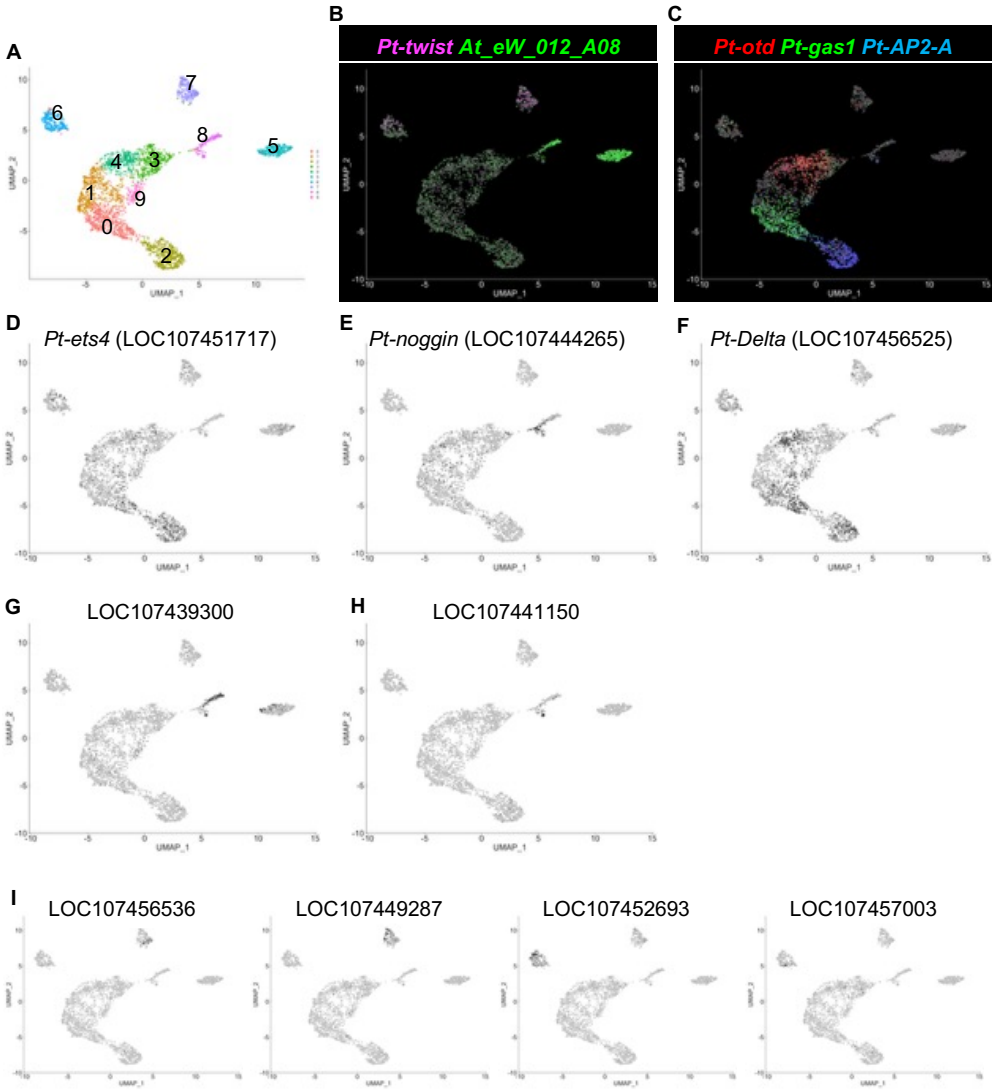


Fig S28 Late Stage 5 + 12h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 3,261 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S29

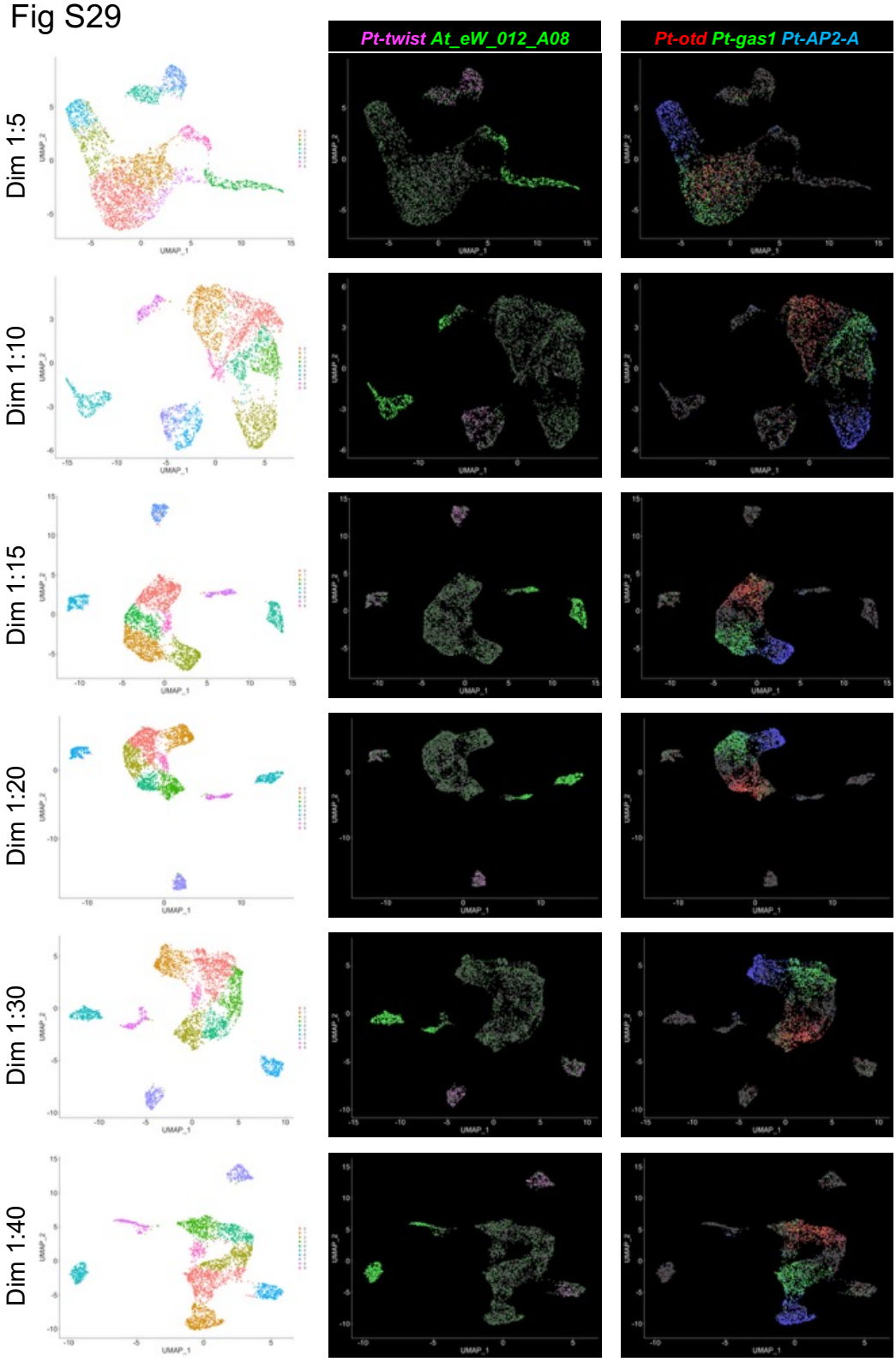

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S29 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S30

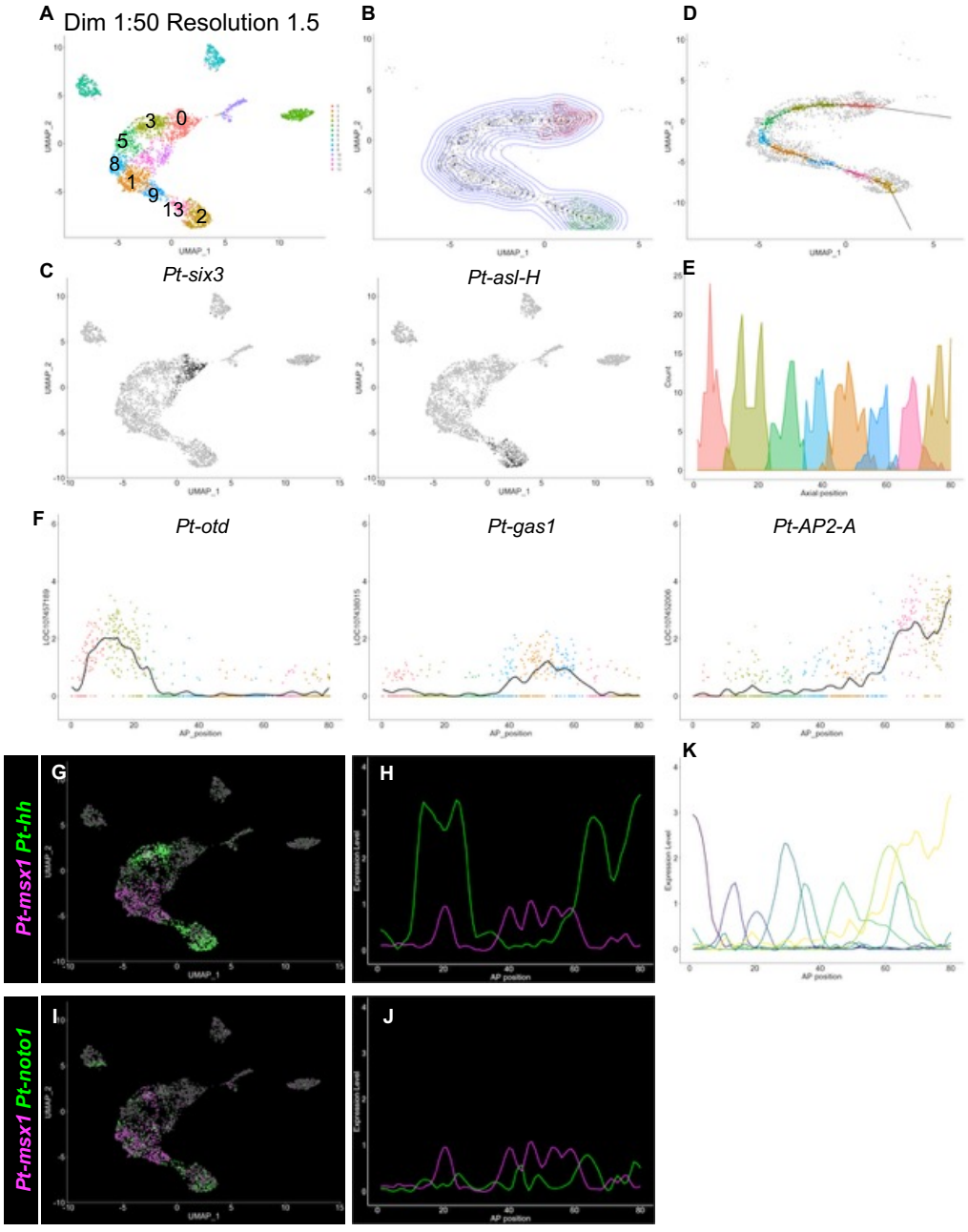


Fig S30 Late Stage 5 + 12h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-six3* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* の UMAP プロット上での発現パターン。**D** UMAP

プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 12h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S31

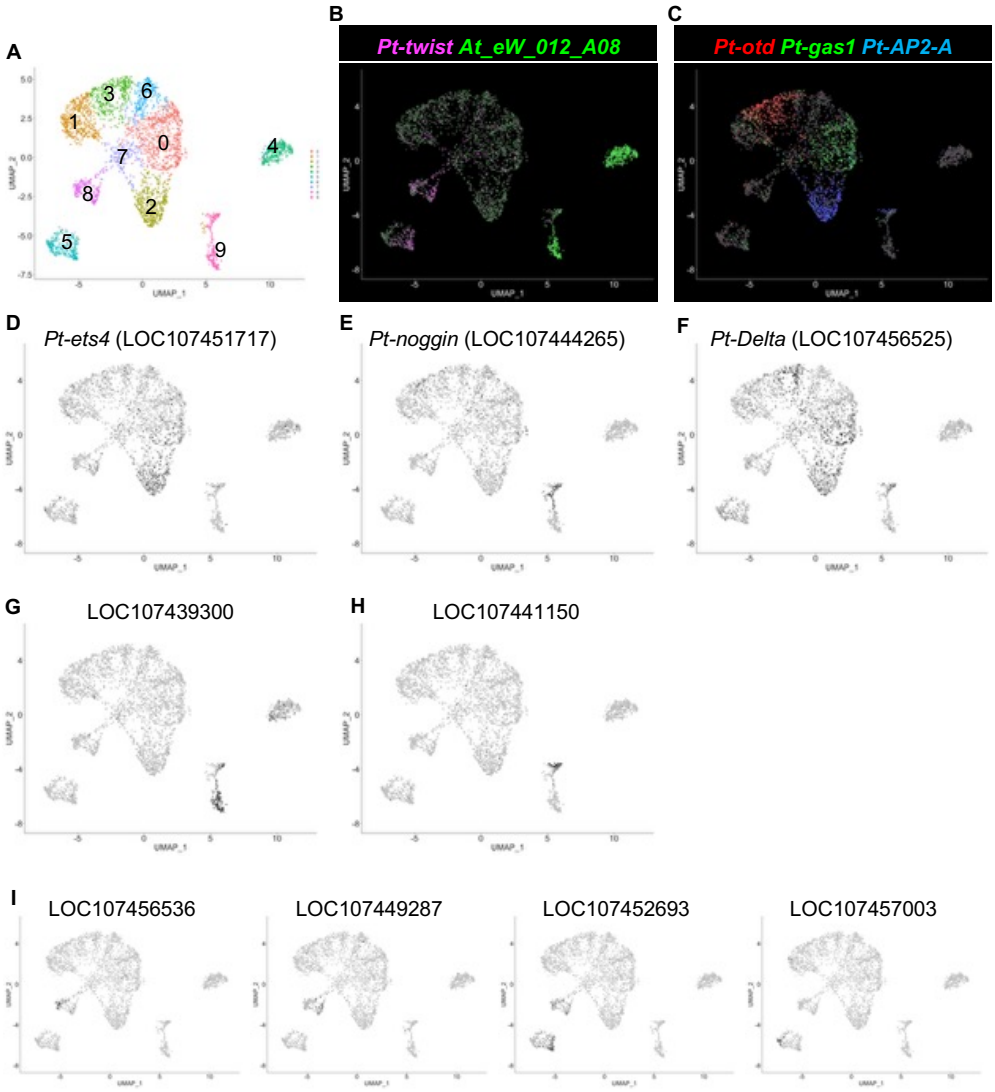


Fig S31 Late Stage 5 + 14h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 3,070 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S32

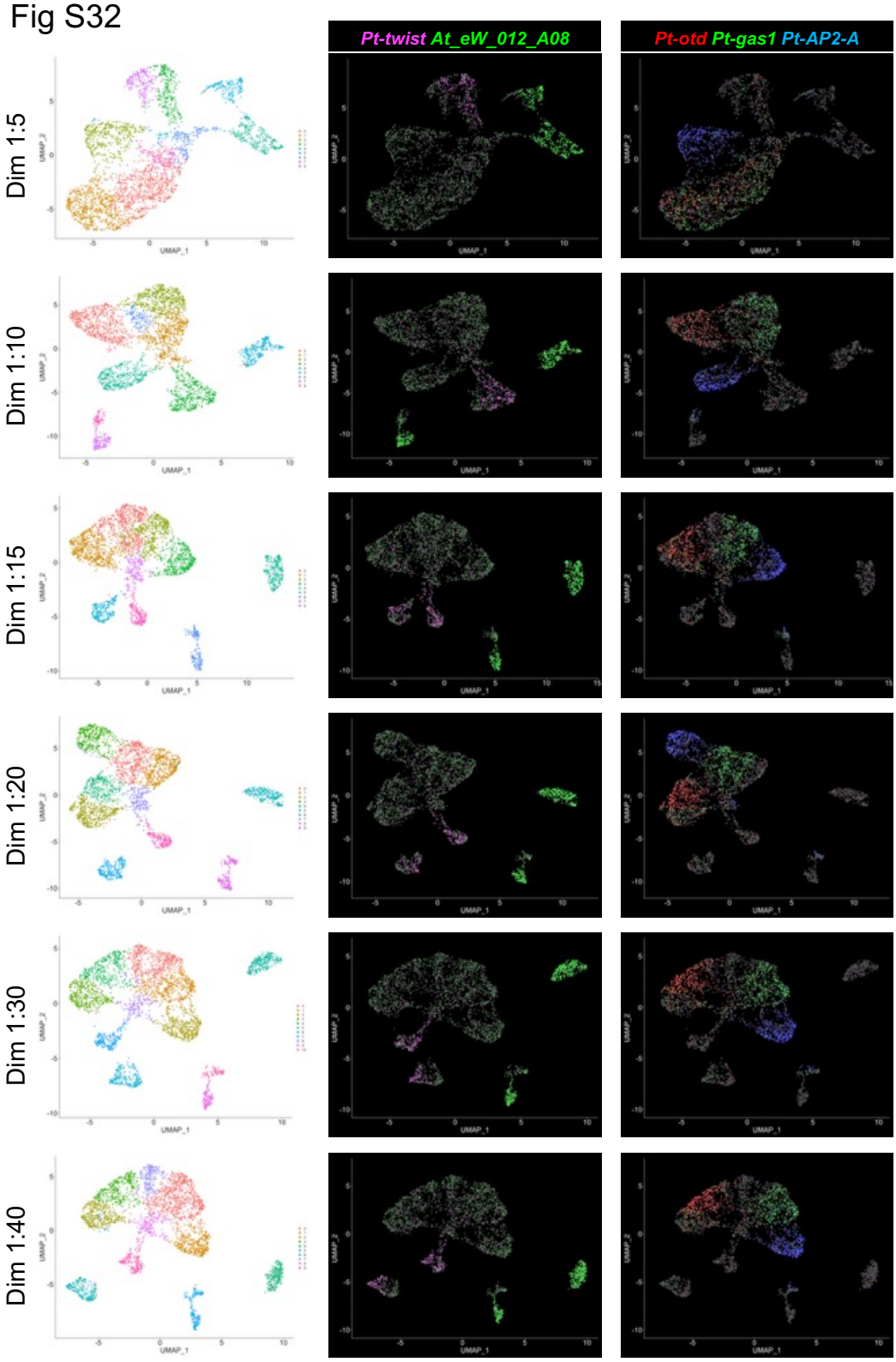

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S32 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S33

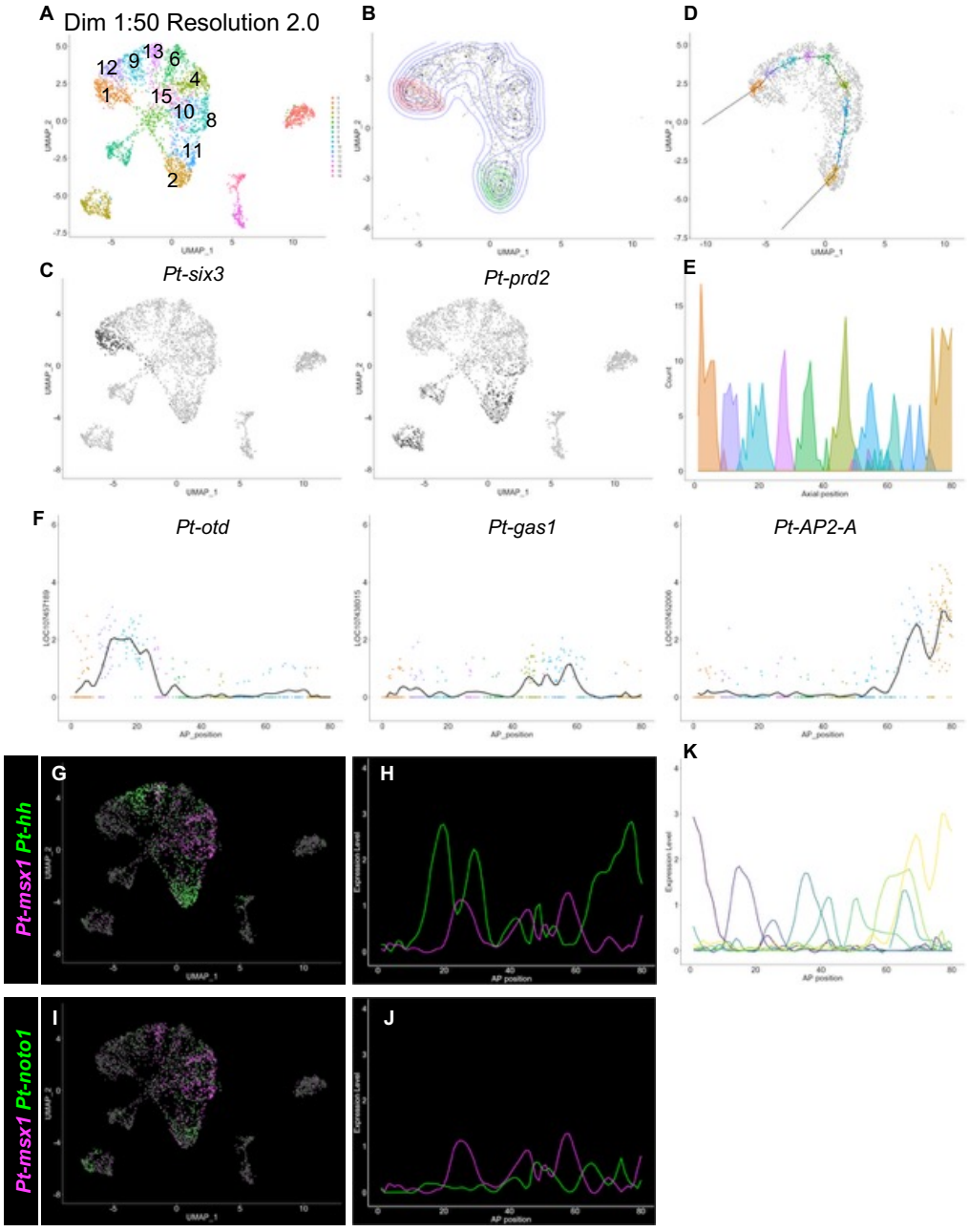


Fig S33 Late Stage 5 + 12h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 2.0 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-six3* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-prd2* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-six3* 及び *Pt-prd2* の UMAP プロット上での発現パターン。**D** UMAP

プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 14h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S34

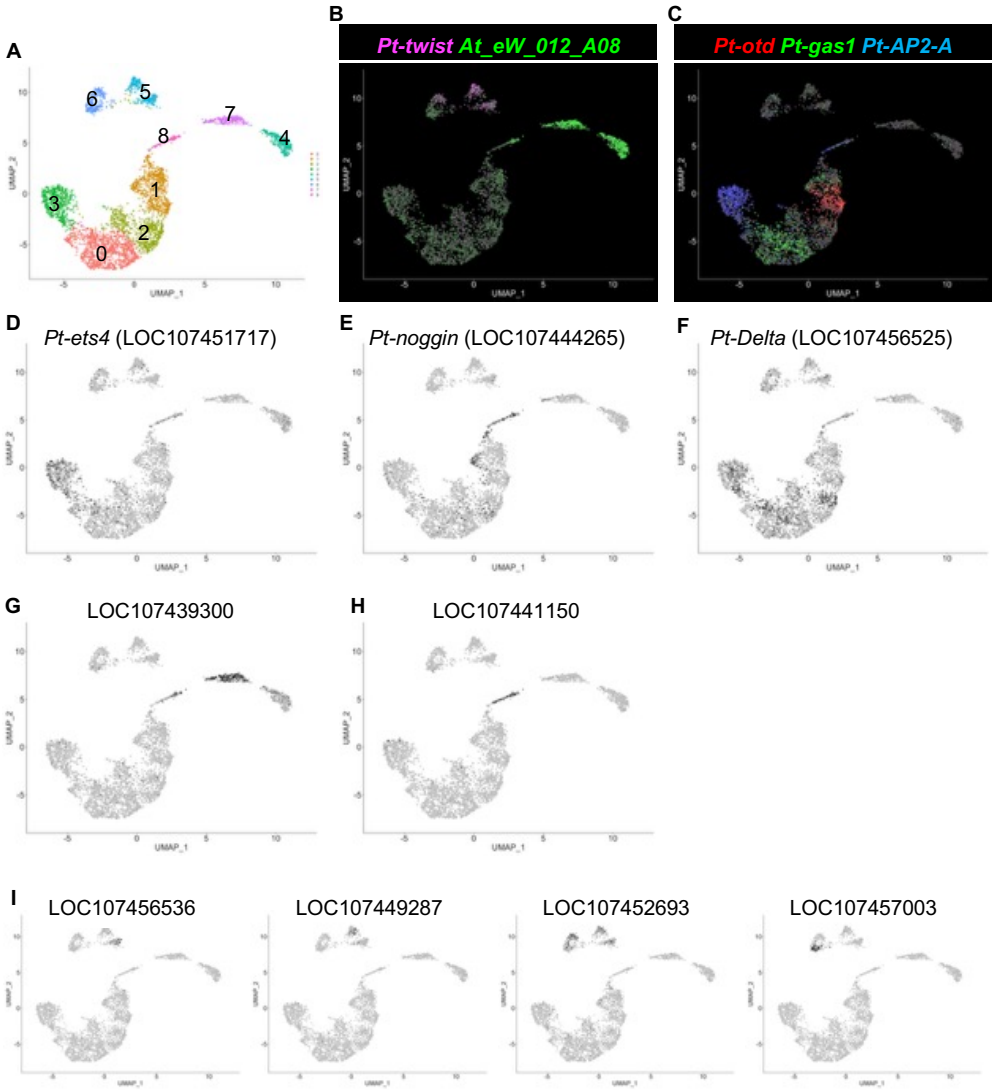


Fig S34 Late Stage 5 + 16h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 4,295 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S35

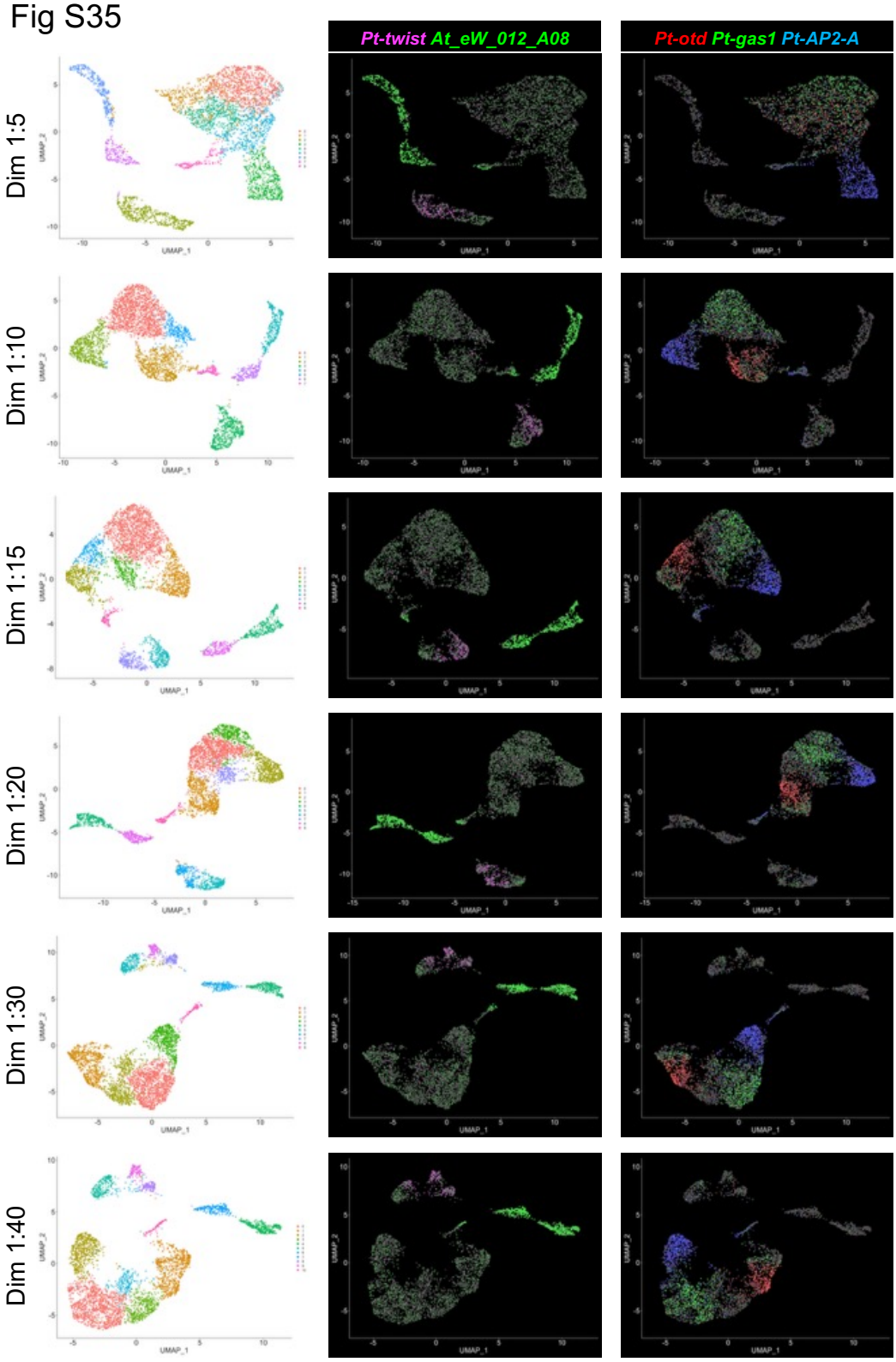

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S35 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S36

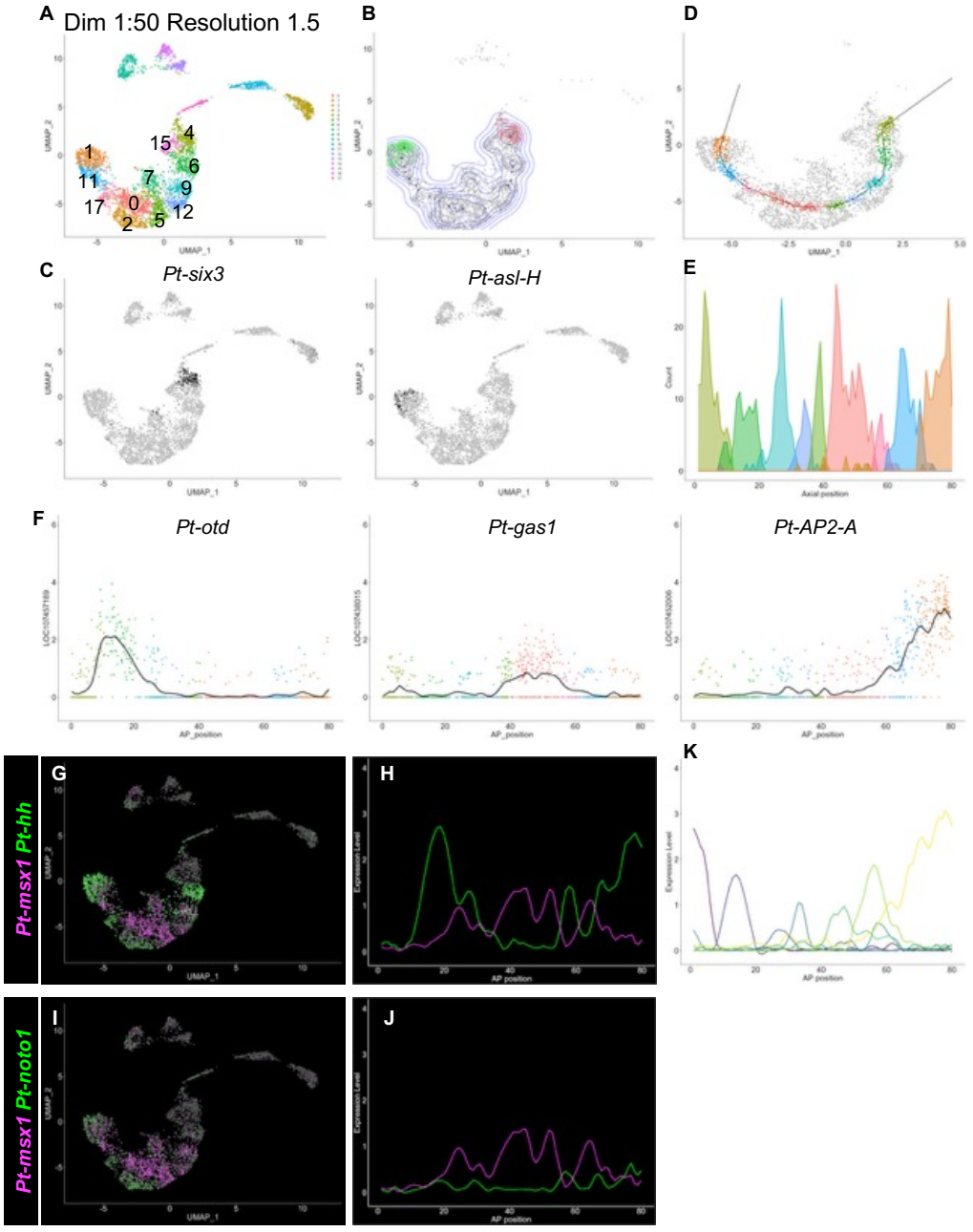


Fig S36 Late Stage 5 + 16h の UMAP プロットの線型化

A resolution のパラメータを 1.5 に設定して作製した UMAP プロット。**B** 中胚葉及び外胚葉の細胞の UMAP プロット上での位置座標から作製した等高線（青）、*Pt-six3* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（赤）、*Pt-asl-H* を発現する細胞の位置座標から作製した等高線（緑）。**C** *Pt-six3* 及び *Pt-asl-H* の UMAP プロット上での発現パターン。**D** UMAP

プロットを線型化する軸。軸から UMAP プロット上で 0.3 以内の距離に存在する細胞を色付けした。細胞の色は A のプロットにおける細胞の色に対応している。**E** 解析に使用した細胞の軸上での分布。**F** 領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。色付けされた点は個々の細胞を示す。**(G-J)** 縞パターン形成に関わる遺伝子(*Pt-hh*、*Pt-msx1*、*Pt-noto1*)の Late Stage5 + 16h での UMAP プロット上での発現パターンおよび発現プロファイル。*Pt-hh*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(G)** と軸に沿った発現プロファイル **(H)**。*Pt-noto1*（緑）及び *Pt-msx1*（マゼンタ）の UMAP プロット上での発現パターン **(I)** と軸に沿った発現プロファイル **(J)**。**K** 前後軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子の発現プロファイル。Fig 8A の遺伝子と対応する。

Fig S37

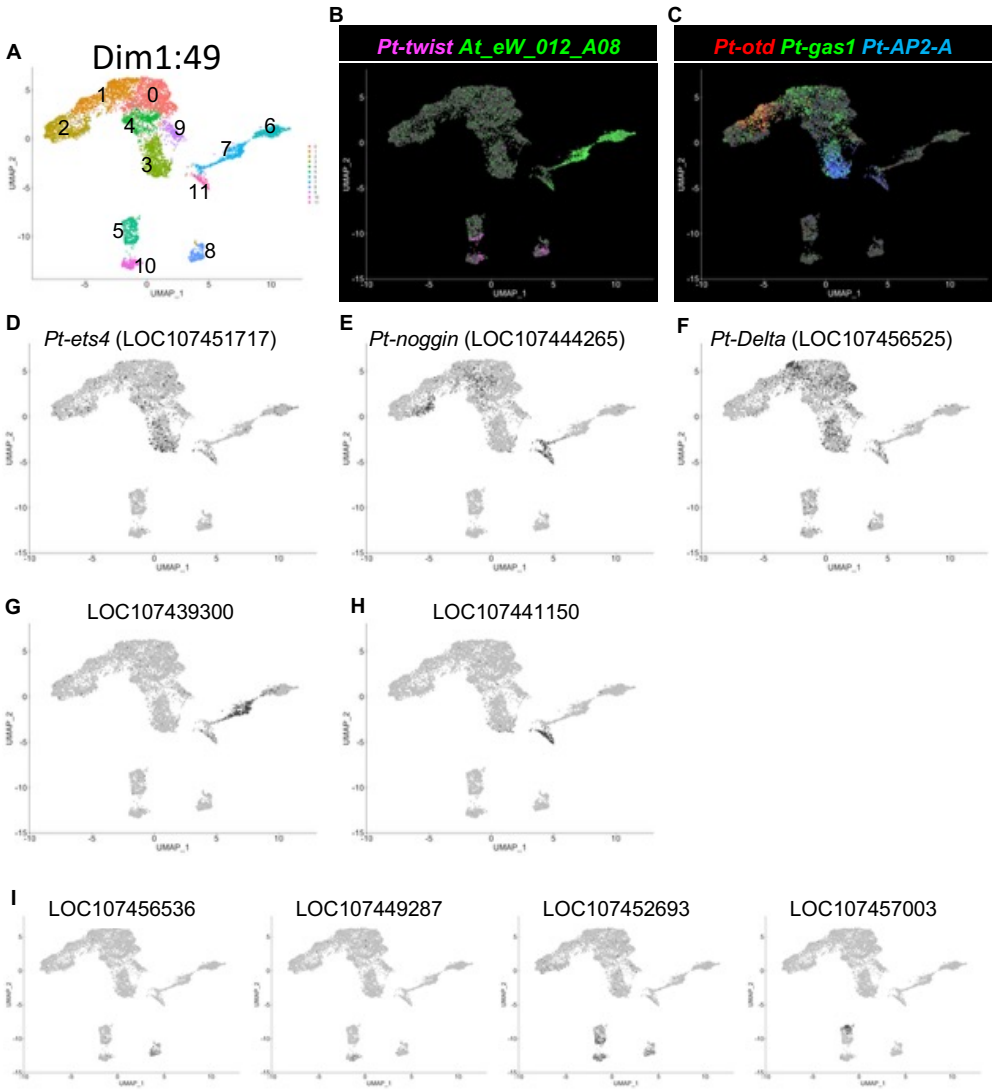


Fig S37 Late Stage 5 + 18h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 6,516 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:49、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S38

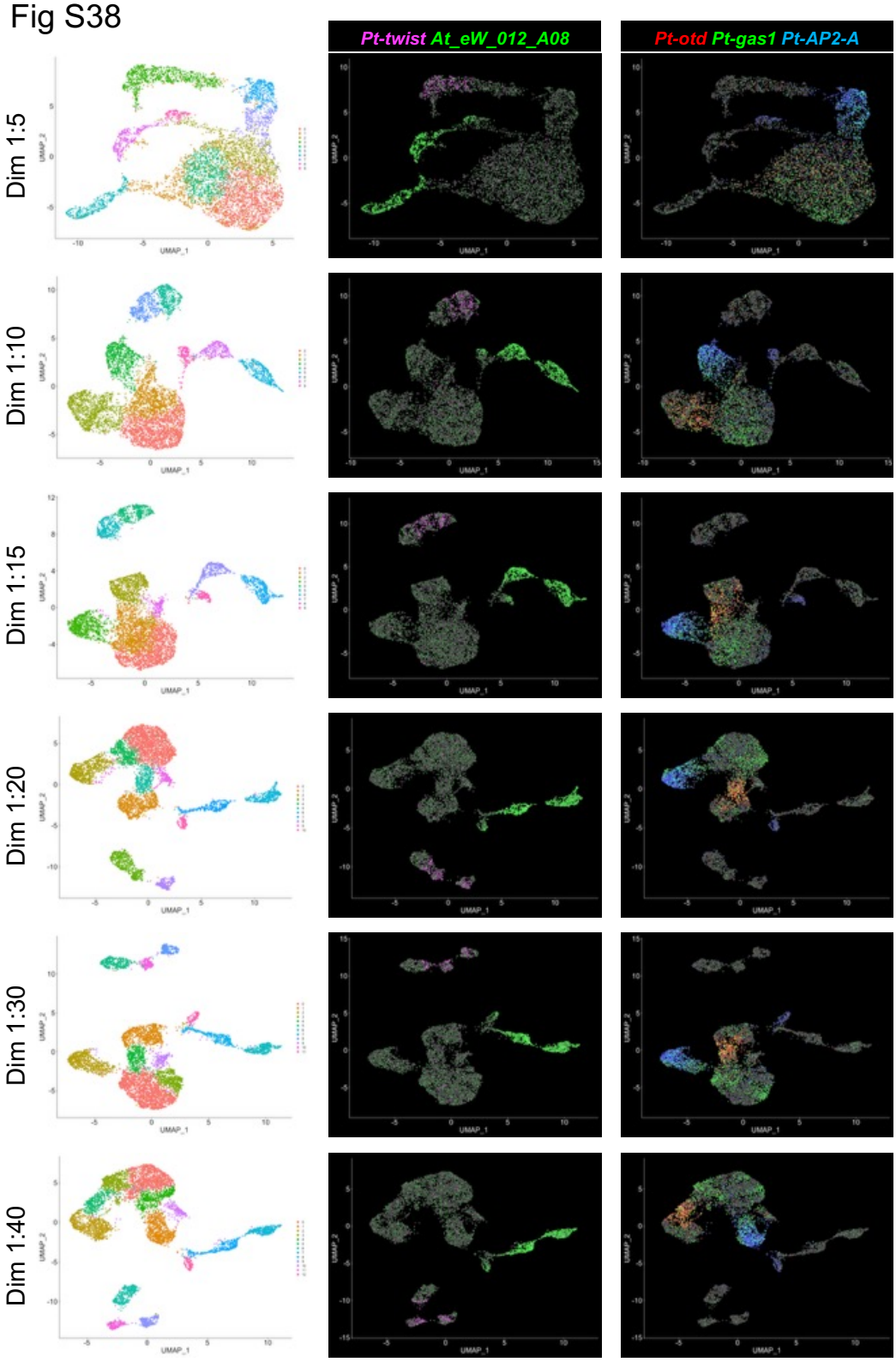

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40

Fig S38 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。

Fig S39

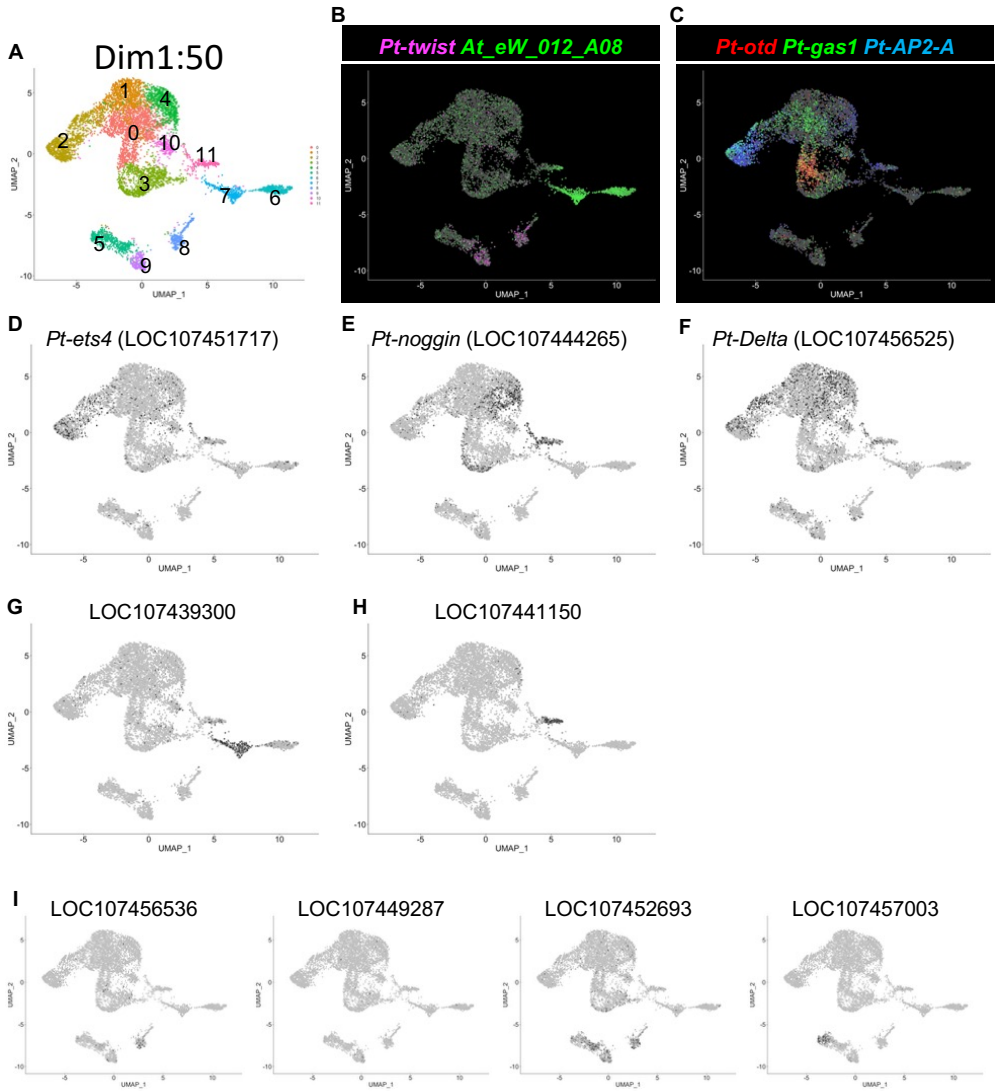


Fig S39 Late Stage 5 + 20h の Single-nucleus RNA-seq 解析

A 7,684 個の細胞のデータから作製した UMAP プロット。クラスタリングのパラメータは dimension 1:50、resolution 0.5 に設定した。プロット上の数字はクラスターの番号を示す。**B** 中胚葉マーカー及び内胚葉マーカーUMAP プロットにおける発現パターン。**C** 外胚葉で領域特異的に発現する遺伝子の UMAP プロットにおける発現パターン。**D** クムルス間充織細胞のマーカー遺伝子（LOC107451717）の UMAP プロットにおける発現パターン。**E** 胚外のマーカー遺伝子（LOC107444265）の UMAP プロットにおける発現パターン。**F** *Pt-Delta*（LOC107456525）の UMAP プロットにおける発現パターン。**(G-I)** Stage 7 の解析で新たに見つけられた胚外及び中胚葉のサブクラスターを特徴づけるマーカー遺伝子の UMAP プロット上での発現パターン。LOC107439300（**G**）、LOC107441150（**H**）、

LOC107456536 (I)、LOC107449287 (J)、LOC107452693 (K)、LOC107457003 (L)。

Fig S40

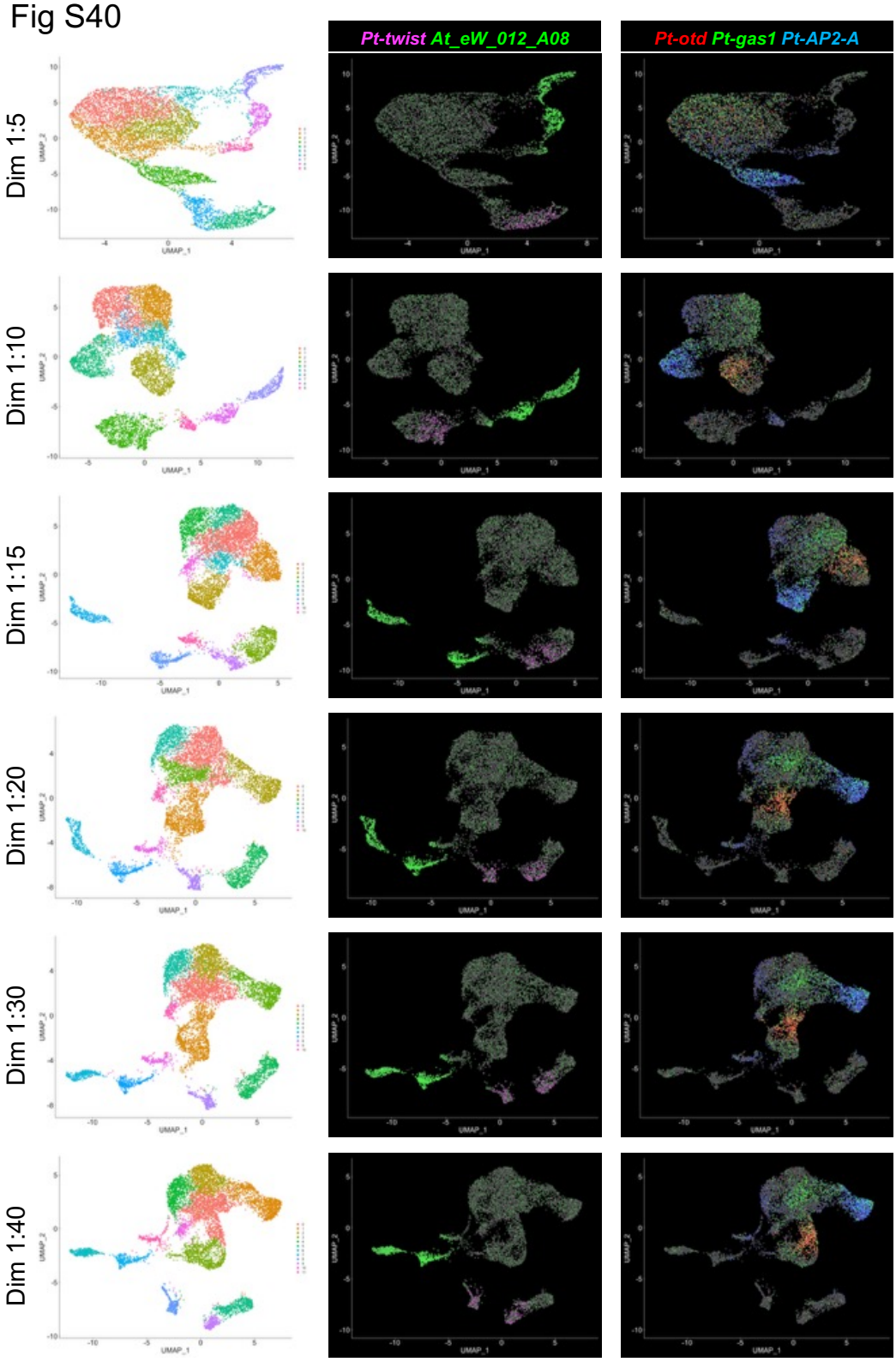

Pt-twist At_eW_012_A08
Pt-otd Pt-gas1 Pt-AP2-A
Dim 1:5
Dim 1:10
Dim 1:15
Dim 1:20
Dim 1:30
Dim 1:40
UMAP_1
UMAP_2

Fig S40 複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット

複数の dimension パラメータで作製した UMAP プロット。中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子（*Pt-twist*、*At_eW_012_A08*）及び領域特異的に発現する遺伝子（*Pt-otd*、*Pt-rho*、*Pt-AP2-A*）の発現パターンも並べて示した。