

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17018015
 研究課題名（和文） 脳の比較トランスクリプトーム解析
 研究課題名（英文） Comparative Transcriptome Study of Brain

研究代表者
 那波 宏之（NAWA HIROYUKI）
 新潟大学・脳研究所・教授
 研究者番号：50183083

研究成果の概要（和文）：DNAマイクロアレイを使って各種霊長類の脳トランスクリプトームの解析を実施した。ヒト19q13.43領域には霊長類特異的のジンクフィンガー遺伝子が多く存在するが、この領域の脳トランスクリプトームは種間で発現量・配列に大きな偏差があった。アフリカミドリザルやマモセットで配列解析したところ、当該ゲノム領域は霊長類になってから高速進化したことが判明した。従って本ゲノム領域は、霊長類の進化を考える上で重要であると考察された。

研究成果の概要（英文）：Using the DNA microarray technique, we performed comparative expression profiling of brain transcriptomes among primates. The profiling revealed the marked strain variation in mRNA signal intensity or homology of the zinc finger genes located at human chromosome 19q13.43. DNA sequence analysis suggests that this genomic region has evolved rapidly in primates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,100,000	0	3,100,000
2006年度	10,500,000	0	10,500,000
2007年度	11,200,000	0	11,200,000
2008年度	10,000,000	0	10,000,000
2009年度	10,000,000	0	10,000,000
総計	44,800,000	0	44,800,000

研究分野：特定領域研究「比較ゲノム」

科研費の分科・細目：

キーワード：霊長類、進化、ジンクフィンガー、脳、DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

ホモサピエンス（ヒト）への類人猿や旧世界猿からの進化を考える上で、脳の進化は最も重要な要素のひとつとして挙げられる。なかでも言語や高度なワーキングメモリーと認知情報処理能力などの能力はヒトへの進化過程で獲得されたヒト脳そのものに裏づけられる。本研究では、ヒト脳機能に関わるトランスクリプトーム（mRNA）を同定、解析することでヒト特有の脳機能の遺伝子基盤を探求し、さらに類人猿・旧世界猿間での脳でのトランスクリプトームと量的、構造的な

<図1>
DNAアレイを用いた脳トランスクリプトーム解析

① 発現プロファイルの種間分析

左前頭葉皮質：マカク、チンパンジー、ヒト

② 発現プロファイルの領域間分析

左前頭葉皮質；頭頂知覚野；後頭視覚野



ヒト、チンパンジー、カニクイザル、アフリカドリザル、マーモセット複数匹の前頭前野RNAを混合し、各個体に特有の条件(年齢、死亡原因、死後変化)をできるだけ希釈させた。この混合RNAよりcRNAを合成し対象遺伝子の全翻訳領域をカバーするプローブ(60mer, 平均30プローブ/遺伝子)有するカスタムオリゴDNAアレイにハイブリさせ、各シグナルを測定した。ほとんどの霊長類の脳トランスクリプトームは、ヒトシグナルの0-200%領域にそのシグナルを与え、その分散はチンパンジーで最も小さかった。



つまり、このデータは脳トランスクリプトームシグナルのパターンがヒトとチンパンジー間で最も似ていることを意味した(図3)。

遺伝子単位に代わって遺伝子内部に設定されたプローブ単位で、その各シグナル強度をヒトシグナル100として、各遺伝子ごとに各プローブシグナル強度を他の霊長類のシグナルと比較してみたところ、霊長類間で得られたパターンは、下記にあるように数種類に分類されるように思えた。

- 1) プローブシグナル強度パターンが全霊長類を通してほぼ一定で、強度だけが変っている(図4)

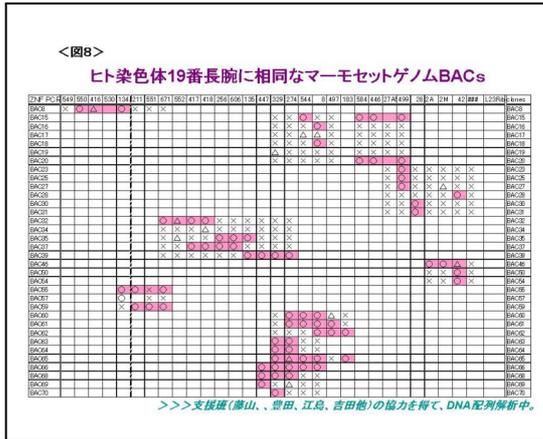
- 2) ヒトを除く霊長類のパターンのみが共通で、ヒトでのみ遺伝子構造が飛躍的に変異したと推定される(図5)
- 3) 霊長類の進化に合わせたようにヒトに近づくとつれ、シグナルのばらつき(分散)が小さくなる(図6)

パターン1は、RNAの脳内発現量変化を単純に反映している可能性が高く、逆に、パターン3の遺伝子内プローブ間のシグナル偏差は、当該遺伝子配列の変異を反映していると推定される。実際に単一遺伝子内の各プローブシグナル比の霊長類内の分散変化を指標に、ヒト染色体上に並ぶ解析対象遺伝子を見比べると、ある染色体領域にこの各プローブシグナル比の分散変化が集中していることに気付く(図7)。たとえば、ヒト染色体長腕19q13.43からテロメアまでの領域には霊長類内のRNA発現量の種間変化が大きい遺伝子、ジンクフィンガー遺伝子が70遺伝子ほど集まり、遺伝子クラスターを形成していた。

<図7> ヒト染色体19番長腕テロメア端近傍に見られるZNF遺伝子クラスターの霊長類間の発現量の高い偏差

遺伝子名称	動物種	ヒト:アブ	脳内発現	種間差	プローブ間差
zinc finger protein 416	Homo Pan Gorilla	99.7		0.36	
zinc finger protein interacting with K protein 1	Homo Pan Gorilla				
zinc finger protein 530	Coccoloba	43.6	7.87	1.41	2.1
zinc finger protein 134	Homo Pan Gorilla	99.1		0.51	
zinc finger protein 211	Homo Pan Gorilla	50-99.1		0.59	
zinc finger and SCAN domain containing 4	Eutheria		-0.44	2.43	4.7
zinc finger protein 551	Homo Pan Gorilla		72.4	33.1	1.11
zinc finger protein 154 (p42-92)	Homo Pan Gorilla		16.7	0.39	0.78
hypothetical protein F1J38288	Homo Pan Gorilla		4.39	1.13	0.63
zinc finger protein 532	Homo Pan Gorilla				
zinc finger protein 287	Simi	None	5.832	0.453	0.877
UBcd110					
similar to zinc finger protein 418		99.5			
zinc finger protein 417	Simi	None	5.75	0.54	0.76
zinc finger protein 418		99.5			
NAG18 protein					
hypothetical protein LOC73055		99.4			
zinc finger protein 236					
similar to ribosomal protein L19					
chromosome 19 open reading frame 18					
zinc finger protein 606	Eutheria	99.4		0.38	
zinc finger and SCAN domain containing 1					
zinc finger protein 135	Euarchotheria			0.32	
zinc finger protein 447	Homo Pan Gorilla		178	0.27	0.24
zinc finger protein 329	Eutheria	99.4	4.92	0.33	0.53

本研究結果を得た2006年当時、NCBIのヒトとチンパンジーゲノムデータベースは、バージョンが古く、図4のようにこの19q13.43領域の配列にはバグが多く残り、ジンクフィンガー遺伝子のアノテーションすらはつきりしていなかった。結果 ZNF417 遺伝子等は、ヒト特異的遺伝子と間違われていた歴史が有る(図7)。いずれにしても、本染色体領域には霊長類にしかオルソホモログが見つけれない霊長類特異的ジンクフィンガー遺伝子が多く存在する可能性が示唆された。霊長類の種間シグナルの偏差が、RNA発現量の違いに基づくのか、もしくは当該遺伝子の変異に由来するのかを弁別する目的で、アフリカドリザルとマーモセットの相同ゲノム配列を決定することにした。

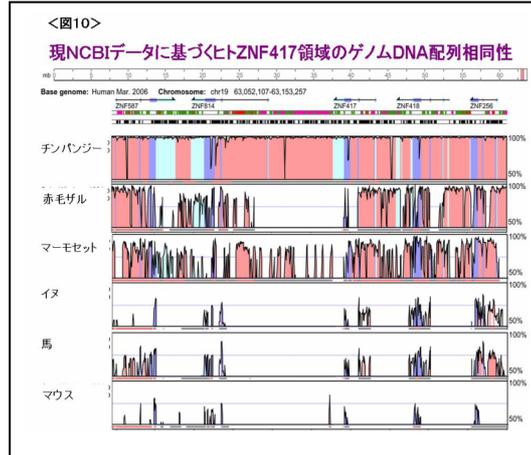


まずは BAC ライブラリーが購入できるマーモセットを対象にゲノムスクリーニングを開始した(図8)。ヒト染色体長腕 19q13.43 に相同性のあるゲノム領域約 1M 全長をほぼカバーする BAC クローンが単離できた。その一部の注目領域(下記参照)藤山教授と支援班の協力を得て、DNA 配列をほぼ完了できる段階にある。

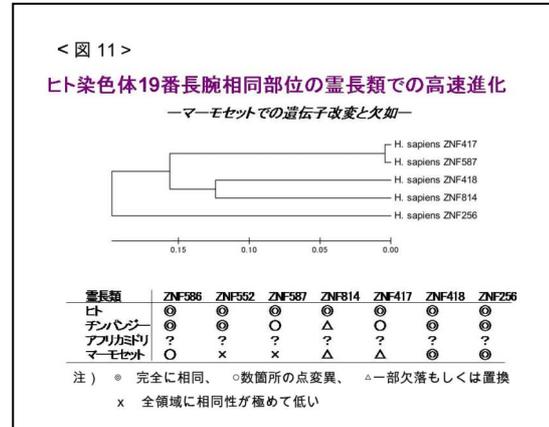


当初、我々はアフリカミドリザルの Fosmid ライブラリーを作製していたので、これを用いて当該ゲノム領域をクローニングする計画であった。しかし、実際には Fosmid ではコンテイングにギャップが多く発生するため、2次、3次スクリーニングを必要とする時間のかかる計画であることが判明した。そのため Fosmid によるゲノムスクリーニングは断念し、急遽、支援班に 5xゲノムサイズの BAC ライブラリーの作製を依頼して作製いただいた。このライブラリーを用いて、マーモセットゲノムと同様、アフリカミドリザルの当該ゲノム領域全体をほぼカバーする BAC クローンの単離に成功している(図9)。

この 1M のゲノム領域の中には霊長類中にしかジンクフィンガー遺伝子オルソログが存在しないと考えられる領域がいくつか存在する。全領域の DNA 配列決定には時間を要するため、その一部をなす ZNF586-552-587-814-417-418-256 領域に着



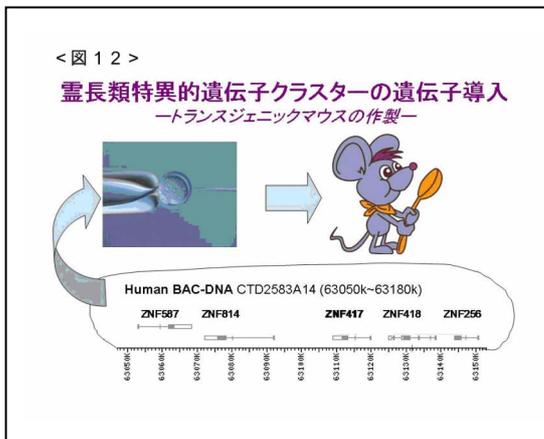
目して、研究を先行させた(図10)。NCBIの最新のゲノム情報を基にすると、ヒト ZNF587、ZNF814、ZNF417、ZNF418、ZNF256 は、マウスにはオルソログが確認されず、霊長類にほぼ特異的な遺伝子と考えられる。またこのゲノム領域に存在するジンクフィンガー遺伝子相互にも 80% - 98% の塩基配列相同性を相互に有し、近年、遺伝子重複により進化したと考えられる(図11)。ZNF814 はヒトで mRNA の存在が確認されているものの、チンパンジーの ZNF814 の DNA 配列と比較すると、3つのギャップのため、フレームシフトを生ずるため、このジンクフィンガー遺伝子が、実際に蛋白として発現しているかは不明である。もちろんゲノムDNAのシーケンスのエラーの可能性も否定できない。



マーモセットの当該遺伝子領域のBACシーケンスによると、ZNF552やZNF587は、塩基ホモロジーが50%以下になるため、オルソログは、この領域に存在しないと考えられる。また、ZNF814やZNF417についてもエキソン配列に大きな変異があり、ヒトオルソログに相当するか、他のジンクフィンガー遺伝子のパラログか判断が難しい状態に有る。いずれにしても、当該ゲノム領域は、霊長類になってから高速に進化した領域であり、脳内に発現があるものも多く、脳神経系の進化とも関係するかもしれない。従ってヒトの19q13.43の染色体領域は、ヒトを含む霊長類

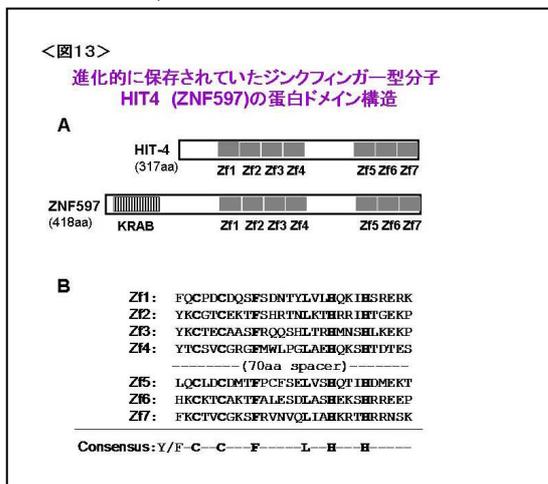
の進化を考える上で重要なゲノム領域だと考察される。

これら霊長類特異的ジंकフィンガー遺伝子の機能性を推察するために、ZNF587-814-417-418-256領域を含むヒトBAC遺伝子をマウス受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製した(図12)。導入DNAサイズは100kベースに及ぶため、非常に遺伝子導入効率が悪く、現在までに500個の受精卵にインジェクションを実施したが、得られたのは2ラインのトランスジェニックマウスだけであった。もちろん、下流遺伝子がマウスでも保存されている必要があり、その機能が発現するかどうか難しい点もあるが、他にこれらジंकフィンガー遺伝子群の機能を個体で調べる手段は、現在存在しない。その意味で、これからの本トラン

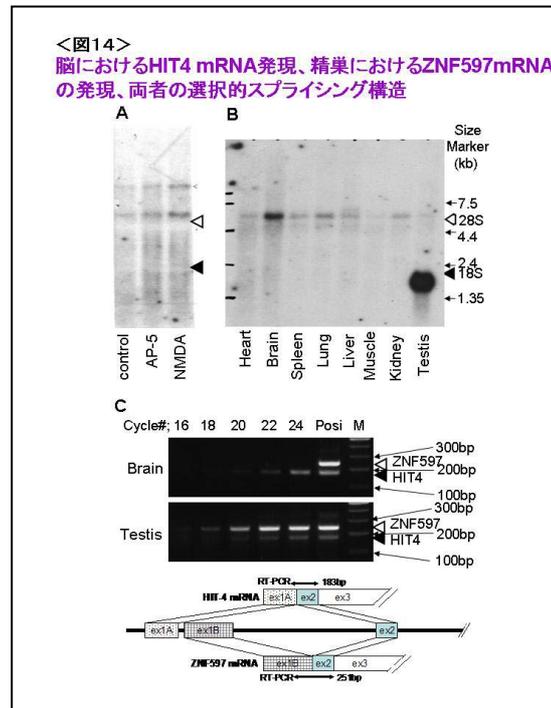


スジェニック動物の解析は興味を持たれる。

また、上記のヒト染色体長腕 19q13.43 に加え、マウス等のげっ歯類から進化的に保存されているゲノム領域 16p13.3 をコントロールゲノムとして、Fosmid を用いて霊長類からクローニングしている。本ゲノム領域にも、ジंकフィンガー遺伝子クラスター (ZNF597-174-75A-263-200-213-205-206) が存在するが、



その遺伝子のほとんどがマウスにオルソログを有する。そのうちの1つである HIT4 (ZNF597)は、7つのC2H2型のジंकフィンガーモチーフを有し、(T/A)(G/A)TATA配列にアフィニティーを持つ(図13)。



HIT4 mRNA は 配列報告の有る ZNF597 mRNA と 3' 側の配列が共通であり、ゲノムの解析や RT-PCR の解析の結果、異なるエキソンの選択的スプライシングにより産生されることが判明した(図14)。HIT4 mRNA は 全長 6k ベースであり、神経系での発現が多い。一方、ZNF597 mRNA は 全長 1.5k ベースであり精巣にのみ発現が検出された。いずれの分子も機能の報告のない転写因子であった。この遺伝子は、全身に発現が確認されるが、特に脳での発現が極めて高く、今回の in situ ハイブリダイゼーションの結果では、神経細胞に RNA 特異的発現が見られている。そのノックアウトマウスを解析したところ、神経細胞死が観察されたため、本ジंकフィンガー遺伝子は脳の発達・機能維持に関連していることが判明している。まだまだ、解析のされていないジंकフィンガー遺伝子が数百、数千個と存在するが、脳機能調節を含め重要な生体機能を担っている可能性が推定される。本事例からも、これまで注目されてこなかったジंकフィンガー遺伝子の機能解析が今後、求められる。

<謝辞>

GAIN (大型類人猿情報ネットワーク) や 京都大学霊長類研究所、国立感染研究所より、霊長類の脳の供給を受けた。また、当該研究

は、藤山教授を初め支援班との共同研究として実施された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Tanabe, Y., Hirano, A., Iwasato, T., Itohara S., Araki, A., Yamaguchi, T., Ichikawa, T., Kumanishi T., Aizawa, Y., Takahashi, H., Kakita, A., Nawa, H. Molecular characterization and gene disruption of a novel zinc-finger protein, HIT-4, expressed in rodent brain. J. Neurochemistry 112; 1035 - 1044 (2010)

査読有り

2. 那波宏之「ヒトの脳機能進化；ゲノム科学と発達脳科学の視点から」人工知能学会誌；Vol22；p49-53 (2007) 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

1. Nawa, H. Molecular and behavioral analyses of a non-human primate model for schizophrenia. 第31回日本分子生物学会+第81回日本生化学会合同年会 2008年12月9 - 12日、神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

那波 宏之 (NAWA HIORYUKI)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：50183083

(2)研究分担者

柿田 明美 (KAKITA AKIYOSHI)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：80281012 (H17-H20)

(3)連携研究者

なし