

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770240

研究課題名（和文）ヒトとチンパンジーの比較トランスクリプトーム・メチローム研究

研究課題名（英文）Comparative transcriptome and methylome study in humans and chimpanzees

研究代表者

郷 康広 (GO YASUHIRO)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：50377123

研究成果の概要（和文）：ヒトとチンパンジーにおいて、父親-母親-子供トリオを用いたゲノムワイドな発現（トランスクリプトーム）解析を行った。次世代型シーケンサーによるメッセンジャーRNAの配列解読を行い、遺伝子発現量の定量化を行った。親と子供の多型情報とアリル単位での発現量を組み合わせることにより、子供ゲノムにおける由来既知のアリル特異的な発現定量化が可能となった。その結果、チンパンジーでは、約17%にあたる遺伝子においてアリル間の発現に偏りがあることが分かった。現在、ヒトにおける同様の解析とメチル化解析も進行中である。

研究成果の概要（英文）：Whole transcriptome analyses were performed in a human and chimpanzee trio (father - mother - child) by quantifying mRNA level in each individual. Combined polymorphic information in parents and children with the amount of allele specific gene expression in children, we can quantify allele specific gene expression in children with known parental origin. The result reveals that around 17% of genes show allele biased expression in a chimpanzee child.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：比較ゲノム科学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：進化・霊長類・ゲノム・遺伝子発現・チンパンジー・トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の多様化が表現型の多様化にとって重要なステップであると、キングとウィルソンは示唆した(King and Wilson 1975, Science)。それ以降、多くの研究者が彼女らの仮説を支持してきた。21世紀に入り、ゲノム配列解読技術の飛躍的な向上、マイクロアレイなどを使ったゲノムワイドな遺伝子発

現の定量化などが可能になり、個々の遺伝子に注目した研究からのパラダイムシフトが起きつつある。さらに、2006年以降の大量並列配列決定法をそなえた次世代型シーケンサーの登場により、塩基レベルの精度を備えたより確度の高い発現解析が可能となりつつある。

マイクロアレイを使ったヒトとチンパン

ジの遺伝子発現比較（比較トランスクリプトーム）はいくつか先行研究があるものの（Khaitovich et al. 2004, *Genome Research*, Khaitovich et al. 2005, *Science*）、チンパンジーの遺伝子発現定量のためにヒト用のマイクロアレイを使わざるを得ないなどの原理的な問題点が指摘されている（Gilad et al. 2005, *Genome Research*）。それに対して、次世代型シーケンサーは、事前にゲノムの情報を必要としない事、未知の遺伝子転写産物の定量も可能である事、などの利点を持つ。これらの利点を持つ次世代型シーケンサーを用いる事で、従来のマイクロアレイでは検出できなかったヒトとチンパンジーの微細な遺伝子発現の量的・質的な差を塩基レベルの解像度で検出する事が可能となる。

もう一つの研究課題として、メチル化のゲノムワイドな比較定量化を次世代型シーケンサーによって行なう（比較メチローム）。DNA を構成する塩基の一つであるシトシンのメチル化、特に遺伝子上流にあるプロモータ領域におけるシトシンメチル化の状態変化は、遺伝子発現制御に重要な役割を果たすと考えられている。次世代型シーケンサー登場以前のメチル化の定量化は、免疫沈降法とマイクロアレイを組み合わせた方法が使われていた（現状でも多く使われている）が、マイクロアレイによる検出方法であるため、上述した問題がメチル化定量にも同様に存在する。また、そもそもヒトとチンパンジーのゲノムワイドなメチル化比較は、その方法がマイクロアレイ、次世代型シーケンサーを問わず、先行研究がない状況である。

2. 研究の目的

以下の事項を明らかにする事を目的とした。

(1) ヒトとチンパンジーにおける遺伝子発現レベルの定量化による種内・種間比較を行なう事を目的とした。

ヒトとチンパンジーのリンパ芽球様細胞株あるいは白血球を用いてメッセンジャー RNA を抽出し、次世代型シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析・比較定量化を行い、種分化（ヒト化）に大きく寄与したと考えられる候補遺伝子の精査・選定を行なう。ヒト、チンパンジーとも親子トリオからのサンプリングを行うため、得られた結果のうち、種内多型、あるいは雌雄の差による性的二型由来のものを検出できるため、ヒトとチンパンジーの種としての差を産み出す（種としてそれぞれ固定している）遺伝子発現差を検出する事が可能である。また、量的な差だけではなく、一方の種では発現しているが他方の種では全く発現が見られないといった質的に異なる遺伝子群を検出できる可能性が高く、遺伝子喪失による種分化仮説（遺伝子が一方の種だけで働かなくなる事により産み

出される差が種分化に寄与するという仮説）の検証が可能となる。

(2) ヒトとチンパンジーにおける DNA メチル化レベルの定量化による種内・種間比較

(1) で用いたリンパ芽球様細胞株あるいは白血球から DNA を抽出し、プロモータ領域を制限酵素により効率的に回収する。回収後のサンプルをバイサルファイト処理し次世代型シーケンサーにより配列決定・網羅的メチル化の定量を行い、種分化に貢献し得る候補遺伝子の精査・選定を行なう。メチル化はエピジェネティクスと呼ばれるゲノムの変化を伴わない後天的な DNA 修飾機構の主要な機構のひとつであるため、多様性を産み出す可能性（可塑性）が高く、種分化に大きく寄与し得ると考えられる。また、ヒトとチンパンジーで異なるインプリンティング遺伝子（父親か母親どちらかの対立遺伝子だけが選択的に発現される遺伝子）を発見できる可能性がある。さらに、ヒトとチンパンジーの網羅的な比較メチロームは先行研究が無いため、ここで得られる結果は、メチル化の種分化における役割を解明できる点において、進化研究に多大なインパクトをもたらすと期待される。

3. 研究の方法

ヒトおよびチンパンジーの親子トリオをサンプルとした遺伝子発現定量化、プロモータ領域における DNA のメチル化の定量化を行い、転写レベル、エピジェネティクスレベルの種分化における役割を解明する。

具体的には、ヒト親子トリオおよびチンパンジー親子トリオ由来のリンパ芽球様細胞株および白血球から RNA および DNA を抽出する。そこで得られた転写産物およびバイサルファイト処理後のプロモータ領域の配列を次世代型シーケンサーにより直接配列決定・比較解析を行なう。ヒト親子3個体、チンパンジー親子3個体を対象サンプルとし、イルミナ社の次世代型シーケンサー（HiSeq）を用いて1個体あたり5Gb程度の配列解読を行う。これは遺伝子コーディング領域を50Mbとした場合、100倍の平均被覆度に相当する配列量となる。

4. 研究成果

霊長類研究所に飼育されているチンパンジーの中で親子トリオに注目したサンプリングを行った。父親としてアキラ、母親としてアイ、子供としてアユムの血液からそれぞれ RNA を抽出した。抽出した白血球由来 RNA サンプルより次世代型シーケンサー（Illumina 社 Genome Analyzer）による比較トランスクリプトーム解析を行なった。3個体から 3.2~4.8Gb の配列を決定し、チンパ

ンジの既知配列にマッピングした結果、全遺伝子の半数以上の遺伝子において、少なくとも一つ以上のタグがマッピングされ、ゲノム配列が報告されているチンパンジー参照配列との比較において、約 10 万個の SNP 多型と 1 万数千個の INDEL (挿入欠失) 多型を検出した。また、父親-母親間に 1 万 8 千個あまりの SNP を検出し、それらのゲノム上の位置を調べたところ、コーディング領域よりも非翻訳領域 (特に 3' 末端) に SNP の存在確率がより高いという結果を得た。これは、個体差を産み出すには遺伝子発現制御領域における多様性が重要であることを示唆する結果であった。新型シーケンサーはアレル特異的な遺伝子発現の定量化が可能のため、親子トリオを調べる事によって、より直接的なインプリント遺伝子の発見が可能になり、実際にヒトやマウスで知られているインプリント遺伝子がチンパンジーにおいても確認されたのに加えて、免疫系を担う遺伝子群を中心に、今まで報告のない新規インプリント遺伝子を多数発見した。また、親個体の SNP 情報と子供個体のアレル特異的遺伝子発現情報を組み合わせる事で、由来既知のアレル特異的遺伝子発現の定量化が技術的に可能になった。その結果、およそ全遺伝子領域の約 17% に及ぶ領域に父親もしくは母親由来のアレルが選択的に発現されていることが分かった。現在、その遺伝子の詳細な解析と生物学的意義の解明を目指している。

2010 年度のチンパンジー親子トリオのトランスクリプトーム解析に加えて、2011 年度はヒト親子トリオのセルライン (リンパ芽球様細胞株) 由来 RNA のトランスクリプトーム解析を行った。ヒトトランスクリプトーム解析に使用したサンプルは既に国際コンソーシアムにおいて全ゲノムが解読されているため、トランスクリプトーム解析結果との比較検討を行った結果、数万におよび RNA と DNA の塩基の違い (RNA-DNA difference) が見つかった。これは、主にトランスクリプトーム解析におけるマッピングツールの不確実性に由来することが明らかになり、現在、既存のトランスクリプトーム解析ツール群に自製したパイプラインも加えてその正確性の検討を行っている段階である。チンパンジー親子トリオに関しても全ゲノム解析を行っており、ヒトと同様に多数の RNA-DNA difference を明らかにした。チンパンジーの全ゲノムに関しては、ライフテクノロジー社の SOLiD による従来の配列データに加えてイルミナ社の HiSeq によるデータを加えて配列を精査している段階である。また、ヒトのサンプルも親子トリオを用いているので、チンパンジーと同様に由来既知 (どちらの親から由来したアレルなのか) のアレル特異的な遺伝子発現の定量化が可能であり、解析を進め

ている段階である。

メチローム解析に関しては、研究期間中には、配列解読まで至らなかった。しかし、DNA のサンプリング、ライブラリの構築までは順調に進んでおり、3 ヶ月以内に次世代シーケンサーによる配列解読を行えるように実験を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. *Toru Sugawara, Yasuhiro Go, Toshifumi Udono, Naruki Morimura, Masaki Tomonaga, Hirohisa Hirai, and *Hiroo Imai. (2011) Diversification of bitter taste receptor gene family in western chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 28, 921-931. 査読有
DOI: 10.1093/molbev/msq279

2. Nami Suzuki, Toru Sugawara, Atsushi Matsui, Yasuhiro Go, Hirohisa Hirai, and *Hiroo Imai (2010) Identification of non-taster Japanese macaques for a specific bitter taste. *Primates* 51, 285-289. 査読有
DOI: 10.1007/s10329-010-0209-3

3. Atsushi Matsui, Yasuhiro Go, and Yoshihito Niimura (2010) Degeneration of olfactory receptor gene repertoires in primates: no direct link to full trichromatic vision. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1192-1200. 査読有
DOI: 10.1093/molbev/msq003

[学会発表] (計 2 3 件)

1. 早川卓志 チンパンジーの味覚に地域差はあるか? ~分子遺伝学からの考察~, SAGA14, 2011 年 11 月 12 日、熊本

2. Yasuhiro Go, Comparative transcriptome and genome analysis in a chimpanzee trio. International Symposium of Developmental Systems Biology on Gene Regulation and Aging, October 13, 2011, Shanghai, China.

3. 権田彩 コモンマーモセットにおける消化器系での味覚情報伝達物質の定量的解析、2011 年 10 月 6 日、第 45 回味と匂い学会大会、金沢

4. Yasuhiro Go, Comparative transcriptome and genome analysis in a chimpanzee trio. Young Researchers Conference on Evolutionary Genomics. August 2, Tokyo.

5. Takashi Hayakawa, Molecular Evolution of the Bitter Taste Receptor Gene Family in Three Chimpanzee Subspecies. Young Researchers Conference on Evolutionary Genomics. August 2, Tokyo.
6. 郷康広 ニホンザルエキソーム解析～実験動物化にむけた遺伝的バックグラウンドの解明～、日本進化学会第 13 回大会、2011 年 7 月 30 日、京都
7. 鈴木南美 ニホンザルにおける地域特異的な苦味感受性変異、日本進化学会第 13 回大会、2011 年 7 月 30 日、京都
8. 早川卓志 チンパンジー 3 亜種における苦味受容体遺伝子ファミリーの分子進化、2011 年 7 月 30 日、日本進化学会第 13 回大会、京都
9. 郷康広 ゲノムを通して我が身を知る～ヒトとチンパンジーの間にあるもの～、2011 年 7 月 18 日、第 27 回日本霊長類学会大会、犬山
10. 鈴木南美 ニホンザルにおける苦味受容体 TAS2R38 の地域特異的な感受性変異、2011 年 7 月 17 日、第 27 回日本霊長類学会大会、犬山
11. 早川卓志 チンパンジー 3 亜種における苦味受容体遺伝子ファミリーの分子進化、2011 年 7 月 17 日、第 27 回日本霊長類学会大会、犬山
12. 郷康広 ニホンザルエキソーム解析～実験動物化にむけた遺伝的バックグラウンドの解明～、2011 年 7 月 17 日、第 27 回日本霊長類学会大会、犬山
13. 郷康広 霊長類における味覚受容体の進化、2010 年 9 月 22 日、第 82 回日本遺伝学会、札幌
14. Yasuhiro Go, Evolutionary dynamics of bitter taste receptor gene repertoires in primates. September 18, 2010, European Chemoreception Research Organization XXth CONGRESS, Avignon, France
15. Atsushi Matsui, DEGENERATION OF OLFACTORY RECEPTOR GENE REPERTORIES IN PRIMATES: NO DIRECT LINK TO FULL TRICHROMATIC VISION. International Primatological Society XXIII Congress, September 16, Kyoto.
16. Yasuhiro Go, Comparative Transcriptome Analysis in Chimpanzee Trio. International Primatological Society XXIII Congress, September 13, Kyoto.
17. Nami Suzuki, Region-specific distribution of non-taster Japanese macaques. International Primatological Society XXIII Congress, September 13, Kyoto.
18. Toru Sugawara, DIVERSIFICATION OF BITTER TASTE RECEPTOR GENE FAMILY IN CHIMPANZEES. International Primatological Society XXIII Congress, September 13, Kyoto.
19. Takashi Hayakawa, INTRASUBSPECIFIC POLYMORPHISMS AND INTERSUBSPECIFIC DIVERGENCE OF BITTER TASTE RECEPTOR GENES IN CHIMPANZEES. International Primatological Society XXIII Congress, September 13, Kyoto.
20. Nami Suzuki, Genetic Polymorphism in Sensory Receptor Genes of Primates, September 12, 2010, The 4th International Symposium of the Biodiversity and Evolution Global COE project "Evolution of Sensor, Communication and Society", Kyoto.
21. 早川卓志 チンパンジー亜種集団間における苦味受容体遺伝子配列の比較解、2010 年 8 月 4 日、第 12 回日本進化学会大会、東京
22. 郷康広 チンパンジー親子トリオトランスクリプトーム解析による遺伝子発現制御機構の解明、2010 年 8 月 3 日、第 12 回日本進化学会、東京
23. Yasuhiro Go, Comparative transcriptome analysis in a chimpanzee trio. July 7, 2010, Society Molecular Biology and Evolution, Lyon, France.
- [図書] (計 2 件)
1. Hirohisa Hirai, Hiroo Imai, Yasuhiro Go (2012) Post Genome Biology of Primates (Primate Monographs) 編集
2. 郷康広 (2012) 受容体遺伝子の進化「化学受容の科学」pp71-82 (化学同人)
- [産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/bunshi/ide
nshi/index.html](http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/bunshi/ide
nshi/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷 康広 (GO YASUHIRO)

京都大学霊長類研究所・助教

研究者番号：50377123

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：