

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650234

研究課題名(和文) マカクザル実験動物化に向けた脳発達オミックス解析

研究課題名(英文) Developmental transcriptome analysis of monkey brain for the establishment of human disease model

研究代表者

郷 康広 (Go, Yasuhiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター)・新分野創成センター・特任准教授

研究者番号：50377123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの脳神経疾患や高次認知機能の解明・理解のためのマカクザルの実験動物化にむけて、発達段階における脳内遺伝子発現プロファイリングを高速シーケンサーにより行った。新生児から2歳までの計8個体の脳試料から12領域に渡るRNAのサンプリングを行い、網羅的発現解析を行った。その結果、同一個体の異なる領域間の遺伝子発現プロファイルのほうが、同一領域の異なる個体のそれよりも類似度が高いことを明らかにした。また、神経回路を基盤としたニューロンレベルでの領域特異性・回路特異性を規定する分子メカニズムの解明を目指して、複数逆行性蛍光トレーサーの注入、および同一領域内の投射の異なるニューロンの識別に成功した。

研究成果の概要(英文)：For the establishment of primate model of human neuropsychiatric diseases and high-level cognitive functions, we performed spatio-temporal brain transcriptome analysis of macaques covering 12 brain regions and 7 developmental stages. High throughput transcriptome analysis by next generation sequencer reveals that profile of gene expression is more similar between brain regions within individuals than between individuals in the same brain regions.

We also aimed to elucidate the molecular basis of regional and circuit specificities at the single neuron level. To execute this, three different fluorescent retrograde tracers were injected into three distinct part of monkey brains (thalamus, striatum, pons), and three distinct signals on neurons were successfully confirmed in the prefrontal regions. At this moment, we are going to profile molecular signatures of regional and circuit specific neurons by collecting each neuron based on the fluorescent signal by laser capture microdissection.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：バイオリソース モデル動物 ゲノム 霊長類 脳 トランスクリプトーム 疾患

1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳神経疾患や高次認知機能をより良く理解するためには、げっ歯類に変わるヒトにより近縁な霊長類のモデル動物化・実験動物化が必要不可欠である。アルツハイマーやパーキンソン病モデルマウスやラットなどの作製も精力的に行なわれているが、そもそもヒトとマウス・ラットなどのげっ歯類はその進化的類縁度および脳の形態的特徴、機能分化の程度などに大きな差異があり、げっ歯類で得られた神経ネットワークシステムをヒトに外挿する方法論そのものの限界も指摘されはじめている。そこで、ヒトのモデル動物として候補になりうるのが霊長類のマカクザルである。マカクザルの脳は、マウスやラットなどと異なり、ヒトと同様に機能遂行単位の脳機能分化がはっきりと認められ、また高次認知機能課題の遂行に長けている。同じく、高次認知機能課題の遂行に長けているチンパンジーなどの類人猿においては侵襲的な実験が不可能である現状を考慮すると、マカクザルはヒトのモデル動物として最も近縁かつ最適なモデルと考えられる。

上記のようにヒトのモデルとして適しているマカクザルではあるが、世代時間が長く多頭数の繁殖・維持に多額の投資が必要などの困難な点があるため、脳神経疾患や高次認知機能解明のために必要不可欠な脳内分子発現プロファイル・エピゲノムプロファイルなどの基礎的な情報が圧倒的に不足している。ヒトの病態モデルなどを念頭におき、生殖工学やゲノム編集などの分子生物学的手法を用いたモデル作製などを念頭においた場合においても、まずは正常なマカクザル類の脳内分子発現およびエピゲノム状態のプロファイリングを行うことは必須である。

申請者が2012年度まで所属していた京都大学霊長類研究所では約1200頭のマカクザルが飼育され、計画的な交配や出産コントロールが行われている。申請者は、2013年に自然科学研究機構新分野創成センターに異動したが、引き続き京都大学霊長類研究所との共同研究を行っており、本研究で計画する発達段階を追った複数個体からの脳試料のサンプリングが可能な状態にある。

2. 研究の目的

ヒトの脳神経疾患や高次認知機能の理解には、ヒトに最も近縁かつ動物実験が可能なモデル動物の開発が必要不可欠であるが、そのモデルとなりうるのがニホンザルやアカゲザルに代表されるマカクザル類である。本研究では、げっ歯類では代替不可能なヒトの脳神経疾患や高次認知機能解明のモデルとしてのマカクザルに注目し、モデル動物開発の端緒として、マカクザル脳機能領野単位の発達オミックス(トランスクリプトーム+メチローム)研究を行い、マカクザル脳機能単位かつ発達段階に応じた脳内分子発現プロ

ファイル・エピゲノム動態に関する基礎情報を収集することを目的とする。

また、より詳細な神経回路ネットワーク動態変遷の解明を目指し、神経トレーサーを用いたニューロンレベルでのオミックス研究にも挑戦する。

以上の研究を通して、マカクザルの脳神経サーキット解明のための方法論の確立と分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マカクザル類の脳機能領野発達オミックス研究

マカクザル脳の12領野(一次体性感覚野、一次運動野、前頭前野背外側部、前頭前野腹外側部、一次視覚野、中側頭回、腹側前帯状皮質、線条体、視床、黒質、海馬、小脳)からRNAおよびDNAを調整し、生後直後から思春期にかけての発達6段階(生後1日、2週間、1ヶ月、6ヶ月、1年、2年)における機能領野単位での網羅的遺伝子発現解析(トランスクリプトーム)およびメチル化定量解析(メチローム)を高速シーケンサーで行い、領野間・発達段階における遺伝子発現ネットワークおよびエピゲノム動態の解明を行う。得られた結果をヒトのオミックスデータと比較解析を行う事により、マカクザル脳のヒト脳モデルとしての有用性を検討する。

(2) 神経回路を基盤としたニューロンレベルでのオミックス解析方法の確立

脳内遺伝子発現およびエピゲノム動態は厳密な意味で細胞により異なる。大脳新皮質同一領野内においても層構造を反映した複数の形態的・機能的に異なるニューロンが存在する事が知られている。よって、同一領野内の遺伝子発現ダイナミクス・エピゲノム動態の解明のためには、同一領野内のヘテロなニューロン集団の識別が必要不可欠である。そのために、本研究課題では逆行性蛍光トレーサーを用いて神経回路を基盤としたニューロン種の同定を行い、レーザーマイクロダイクセクションによるニューロンの識別・単離を行う。採取した同一プロファイルニューロンからRNAおよびDNAを抽出し、ニューロン単位での網羅的遺伝子発現解析(トランスクリプトーム)およびメチル化定量解析(メチローム)の方法論を確立する。

4. 研究成果

(1) マカクザル類の脳機能領野発達オミックス研究

京都大学霊長類研究所において飼育されているマカクザル類(ニホンザル、アカゲザル)の脳試料の収集を行い、本科研費研究期間中(平成24年度および25年度)に合計10個体(1日齢・4個体、2週間齢・2個体、1ヶ月齢・1個体、6ヶ月齢・1個体、1年齢・1個体、2年齢・1個体)のサンプリングを行うことができた。サンプリングした脳試料を用いて網羅的遺伝子発現プロファイ

ル解析用の RNA を 12 の機能領野ごとに調整した。網羅的遺伝子発現プロファイルの精度の高い解析を行うためには質の良い RNA を使う必要があるため、RNA の質に関して厳密なクオリティーチェックを行った。その結果を基に 8 個体由来の 94 の網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 用ライブラリーを作製した。作製したライブラリーをイルミナ社の高速シーケンサー (HiSeq2500) を用いて 50 塩基のシングルエンドシーケンス (ライブラリーの片側のみ) の配列解読を行い、サンプル (ライブラリー) あたり 1,110 万リードの配列を取得した。

アカゲザルの参照ゲノム配列 (rheMac2) に対して、本研究で得られた配列データをトランスクリプトーム用のマッピングツール (STAR) を使いマッピングを行った後、発現解析用ソフト (cufflinks) を用いて転写産物ごとの発現量を求めた。

その結果、予備的な結果であるものの、以下の結果を得た。

マカクザル脳内遺伝子発現プロファイルの発達変化

高速シーケンサーにより配列解析を行った 8 個体・94 トランスクリプトームライブラリーのうち、配列の精度などのクオリティーチェックをパスした 7 個体・78 トランスクリプトームライブラリーを用いて、アカゲザルの参照ゲノム配列においてアノテーションされている 42,701 個の転写産物における発現量 (FPKM: Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped) を計算した。計算により求めた発現量の数値を用いて、主成分分析を行った。その結果、発達段階が同じ、もしくは近いライブラリー同士の遺伝子発現パターンがより似ている (図 1) 機能領野内の遺伝子発現類似度は、個体内のそれよりも低い (同一個体の異なる領野のほうが、同一領野の異なる個体よりも図中のプロットがまとまって集中している) ことが明らかになった (図 2)。

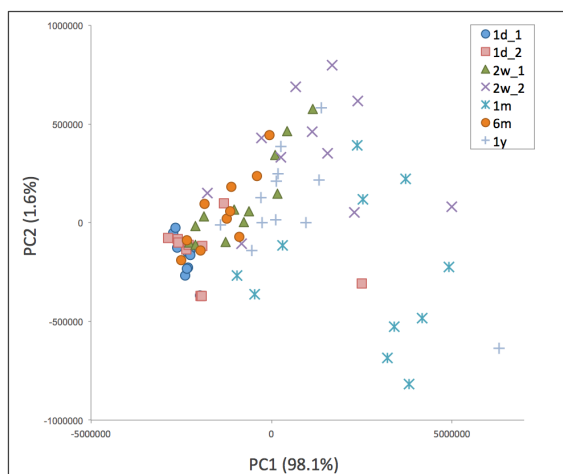


図1 マカクザル脳内遺伝子発現プロファイルの発達変化

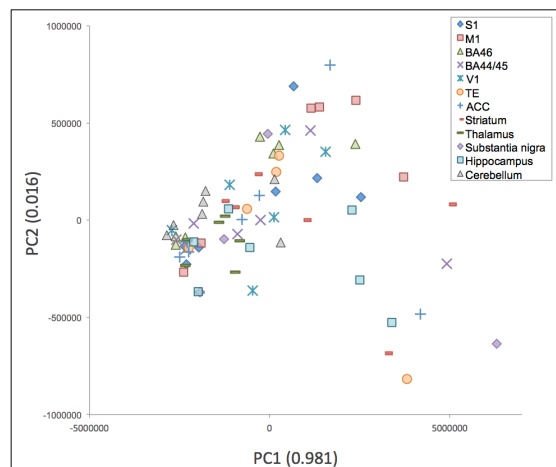


図2 マカクザル脳内遺伝子発現プロファイルの領野差

今後の解析において、特定の発達段階かつ特定領野において特異的に遺伝子発現変動が生じるような遺伝子群を同定し、どのような機能を担う遺伝子群が、特定領野・特定発達段階において変動し、それがシステムとしての脳にどのような影響を及ぼし得るかを解析することによって、マカクザルの脳内遺伝子発現プロファイルの基礎情報の集積を図る。

神経回路を基盤としたニューロンレベルでのオミックス解析方法の確立

神経回路を基盤としたニューロンレベルでの領野特異的・回路特異的発現遺伝子の同定およびエピゲノム動態の解明を行うために、マカクザル (1 個体) の視床、線条体、および橋にそれぞれ異なる蛍光を発する逆行性トレーサーの注入を行った。3 種類の逆行性蛍光トレーサーの注入を行った後、1 ヶ月後に脳試料の収集を行い、領野ごとに凍結ブロックの作製を行った。予備実験として、視床や線条体への投射が密にあることが分かっている運動野と前頭前野を対象とし、凍結脳ブロックから組織切片の作製を行った。

予備実験の結果、当該領野 (運動野および前頭前野) においてニューロン種ごと 3 種類の蛍光の存在を確認することができている。

現在、共同研究を行っている基礎生物学研究所分析室所有のマイクロダイセクション用顕微鏡 (ArcturusXT™: ライフテクノロジー社) を用い、蛍光種ごとのニューロンの単離を試みているが、マイクロダイセクション装置の蛍光フィルターの不調もあり、目的のニューロンの単離がまだできていない状況である。

蛍光色素を用いたマイクロダイセクション装置の不調が未解決な問題であるが、マイクロダイセクション自体はうまくいっているので、蛍光フィルターの制御部分を含めて、顕微鏡会社とも共同して問題の解決を図る。現在のところ、結果を得ていないが、研究計画を遂行するための方法論の確立は順調に進んでおり、順次成果を出す予定である。予

定通り実験が進んだ場合、今までの知見には
はないニューロン単位での領野特異的・回路
特異的発現遺伝子の同定が可能になる可能
性が高いと考えている。

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5件)

Takashi Hayakawa, Nami
Suzuki-Hashido, Atsushi Matsui,
Yasuhiro Go (2014) Frequent
expansions of the bitter taste
receptor gene repertoire during
evolution of mammals in the
Euarchontoglires clade. *Mol Biol Evol.*
in press 査読有

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura,
Yasuhiro Go, Kinichi Nakashima,
Kiyokazu Agata, Takuya Imamura (2014)
Bidirectional promoters are the major
source of gene activation-associated
non-coding RNAs in mammals. *BMC
Genomics* 15:35. 査読有

DOI: 10.1186/1471-2164-15-35
Sae Gonda, Shuichi Matsumura,
Shoichiro Saito, Yasuhiro Go, Hiroo
Imai (2013) Expression of taste
signal transduction molecules in the
caecum of common marmosets. *Biol Lett.*
9(4):20130409. 査読有

DOI: 10.1098/rsbl.2013.0409
Kei Fukuda, Kenji Ichiyanagi, Yoichi
Yamada, Yasuhiro Go, Toshifumi Udono,
Seitaro Wada, Toshiyuki Maeda,
Hidenobu Soejima, Naruya Saitou,
Takashi Ito, Hiroyuki Sasaki (2013)
Regional DNA methylation differences
between humans and chimpanzees are
associated with genetic changes,
transcriptional divergence and
disease genes. *J. Hum Genet.*
58(7):446-454. 査読有

DOI: 10.1038/jhg.2013.55
Takashi Hayakawa, Toru Sugawara,
Yasuhiro Go, Toshifumi Udono,
Hirohisa Hirai, Hiroo Imai (2012)
Eco-geographical diversification of
bitter taste receptor genes (*TAS2Rs*)
among subspecies of chimpanzees (*Pan
troglodytes*). *PLoS ONE* 7(8):921-931.
査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0043277

[学会発表](計19件)

郷康広「霊長類認知ゲノミクスと精神・
神経疾患をターゲットとした霊長類モ
デル動物の探索」自然科学研究機構新分
野創成センターシンポジウム「大規模脳

神経回路機能マップのその先」、東京、
2014年1月12日

郷康広「ゲノムを通して我が身を知る～
ヒトとサルの間にあるもの～」東北大・
生体生命工学研究会、仙台、2013年11
月25日

郷康広 "Spatiotemporal gene
expression trajectory in the human
and non-human ape brains", 新学術領
域研究「ゲノム・遺伝子相関」若手の会、
北海道支笏湖、2013年10月28日-30
日

Yasuhiro Go "Spatiotemporal gene
expression trajectory in the human
and non-human ape brains", Cold
Spring Harbor Meeting, Behavior &
Neurogenetics of nonhuman primates,
Cold Spring Harbor, NY, US, September
6-9, 2013.

権田彩、松村秀一、斉藤正一郎、郷康広、
今井啓雄「マーモセット盲腸における味
覚情報伝達分子群の発現解析」第29
回日本霊長類学会・日本哺乳類学会
2013年度合同大会、岡山、2013年9月
6日

Yasuhiro Go, Takao Oishi, Shuji
Shigenobu, Akiyoshi Kakita, Hiroyuki
Nawa, Philipp Khaitovich "Spatiotemporal
gene expression trajectory in the human
and non-human ape brains", NGS現場の会第3
回研究会、神戸、2013年9月4日-6日

Yasuhiro Go, Atsushi Toyoda, Tomoyuki
Aizu, Hiroo Imai, Hirohisa Hirai,
Tetsuo Yamamori, Asao Fujiyama,
Tadashi Isa "Deep Exome Sequencing
in Macaque Monkeys for the
Establishment of Primate Cognitive
and Psychiatric Disease Model", The
24th CDB meeting Genomics and
Epigenomics with Deep Sequencing,
Kobe, JAPAN, June 13-14, 2013.

郷康広「オス・メス間ゲノムコンフリク
ティングとその生物学的意義の解明」、
新学術領域研究「ゲノム・遺伝子相関」
班会議、神戸、2013年6月2日-3日

郷康広「情感はいかにゲノムによって左
右され得るのか？」平成24年度京都大
学霊長類研究所共同利用研究会「情感
を育むゲノム・脳・社会環境」、犬山、
2013年3月9日

松村研哉、郷康広、大島一彦「新生遺伝
子の転写調節機構の獲得と進化」日本進
化学会第14回大会、東京、2012年8月
23日

早川卓志、鈴木南美、松井淳、今井啓雄、
平井啓久、郷康広「真主齧類における苦
味受容体の進化」日本進化学会第14回
大会、東京、2012年8月23日

松井淳、郷康広、豊田敦、会津智幸、石

崎比奈子、今井啓雄、藤山秋佐夫、平井啓久、新村芳人「Exome データを利用した霊長類の嗅覚受容体遺伝子の比較解析」日本進化学会第 14 回大会、東京、2012 年 8 月 23 日

郷康広「ヒトとチンパンジーにおけるアレル特異的発現遺伝子の同定と遺伝子発現制御機構の進化」日本進化学会第 14 回大会、ワークショップ「遺伝子発現の相互作用と進化」東京、2012 年 8 月 23 日

落合知美、綿貫宏史朗、西村剛、郷康広、今井啓雄、伊谷原一、友永雅己、松沢哲郎「大型類人猿情報ネットワーク(GAIN)の 10 年の活動を振り返って」第 28 回日本霊長類学会大会、名古屋、2012 年 7 月 7 日

郷康広、辰本将司、豊田敦、西村理、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、藤山秋佐夫、阿形清和「チンパンジーパーソナルゲノム研究」第 28 回日本霊長類学会大会、名古屋、2012 年 7 月 7 日

早川卓志、鈴木南美、松井淳、今井啓雄、平井啓久、郷康広「霊長類味覚受容体レパートリーの進化史」第 28 回日本霊長類学会大会、名古屋、2012 年 7 月 7 日
鈴木南美、郷康広、松井淳、平井啓久、颯田葉子、今井啓雄「ニホンザル味盲多型はどのようにして集団中に広がったか」第 28 回日本霊長類学会大会、名古屋、2012 年 7 月 7 日

Nami Suzuki, Atsushi Matsui, Yasuhiro Go, Yoshiro Ishimaru, Takumi Misaka, Keiko Abe, Hirohisa Hirai and Hiroo Imai "Identification of PTC "non-taster" Japanese macaques caused by TAS2R38 dysfunction", XVI International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XVI), Stockholm, Sweden, June 25, 2012.

郷康広「霊長類ゲノム・トランスクリプトーム・メチローム研究」NGS 現場の会第二回研究会、大阪、2012 年 5 月 24 日

〔図書〕(計 5 件)

郷康広(2013)「日本心理学事典」p944.
(平凡社)
分担執筆

郷康広(2012)「日本のサル学のアした」
p.38-39 (京都通信社)
分担執筆

Michael A. Huffman, Naofumi Nakagawa, Yasuhiro Go, Hiroo Imai, Masaki Tomonaga. (2012) "Monkeys, Apes, and Humans. -Primateology in Japan-." p.52. Springer-Verlag. 分担執筆

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)
分担執筆

Hirohisa Hirai, Hiroo Imai, Yasuhiro Go (2012) Post Genome Biology of Primates (Primateology Monographs)
編集

〔その他〕

ホームページ等

<http://cnsi.nins.jp/brain/>

<https://sites.google.com/site/yasuhirog/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷 康広 (GO YASUHIRO)

自然科学研究機構新分野創成センター・特任准教授

研究者番号：50377123

(3) 連携研究者

井上 謙一 (INOUE KENICHI)

京都大学霊長類研究所・助教

研究者番号：90455395

豊田 敦 (TOYODA ATSUSHI)

国立遺伝学研究所・特任准教授

研究者番号：10267495

渡我部 昭哉 (WATAKABE AKIYA)

基礎生物学研究所・准教授

研究者番号：40290910