

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25711027

研究課題名(和文)ヒトを特徴づけるゲノム基盤解明のための脳比較トランスクリプトーム・エピゲノム研究

研究課題名(英文)Comparative brain transcriptome and epigenome analyses deciphering molecular basis of humanness

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) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトを特徴づける最も大きな特徴である脳の発達・進化を「ヒトとは何か？」という問いに対するひとつの切り口として捉え、ヒトと非ヒト類人猿を対象とした死後脳複数領域における比較トランスクリプトーム解析を行った。ヒト、チンパンジー、ゴリラ、テナガザルの脳試料を用いて、合計101個のトランスクリプトーム用のライブラリ作製を行い、次世代シーケンサーによる発現解析を行った。その結果、ヒトとチンパンジーのそれぞれの系統において特異的に発現パターンを変化させた遺伝子数を解析した結果、海馬をのぞく領域において、ヒトの系統において発現パターンが変化した遺伝子数が有意に多くなっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rapid growth in high-throughput genomic biology opens new directions for studies focusing on human evolution and search for the molecular basis of human uniqueness. One of such direction is neurogenomics, a discipline bordering functional genomics and neuroscience. Neurogenomics aims to uncover how the genome contributes to the structure and function of the nervous system. Here we investigated transcriptome features distinguishing human brain regions from those of non-human apes by using eight distinct brain regions. The results show extensive transcriptome divergence among species in all brain regions, as well as excess of human-specific transcriptome changes in all brain regions except hippocampus. Furthermore, we identified thousands of human-specific expression changes in particular regions, providing candidate genes potentially linked to the unique functions of human brain. Taken together, our analysis provides insights into the evolution of brain region functionality to humans.

研究分野：神経ゲノム科学

キーワード：ゲノム トランスクリプトーム 霊長類 類人猿 脳 進化 チンパンジー

1. 研究開始当初の背景

「宇宙とは何か」「物質とは何か」「生命とは何か」という問いにならび「ヒトとは何か」という問いは現代科学の根源的な問いである。ヒトゲノムが明らかになって10年余り、塩基配列解読技術の飛躍的進歩もあり1000人を超えるヒトの全ゲノム配列が明らかになりつつある。しかし、いきものらしさを支える表現型の可塑性・多様性はゲノムというハードにだけ組み込まれたものではない。その情報が時空間的にさまざまな制御を受けることで発露するものである。また、「ヒトとは何か」という問いに答えるためには、ヒトだけを見ていてもその完全な解を得る事はできないと考える。そこで、本研究では、ヒトをヒトたらしめている最も大きな特徴である脳の発達・進化を「ヒトとは何か」に迫る切り口として捉え、ヒトとヒトに最も近縁なチンパンジーを含めた類人猿を対象とし、おのおののゲノムが脳内においてどう時空間的に制御され、表現型として発露するか、その分子基盤を解明することを通して「ヒトとは何か」という問いを明らかにすることを目的とする。

遺伝子発現の多様化が表現型の多様化にとって重要であると、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。マイクロアレイ法の登場は個々の遺伝子研究からゲノム全体を一度に俯瞰することのできる網羅的研究へのパラダイムシフトを起こした。さらに、大量並列配列決定法をそなえた次世代シーケンサーは、単に塩基配列の解読にとどまらず、遺伝子発現の定量化、クロマチン構造解明、分子間相互作用の同定など、さまざまな生命現象を解き明かす分子解析装置の役割を果たし、塩基レベルの精度とゲノムワイドなスケールを兼ね備えた解析が可能になってきた。

ヒトと類人猿の遺伝子発現解析(比較トランスクリプトーム)はマイクロアレイによるいくつかの先行研究があるものの(Khaitovich et al. 2004, Genome Research, Khaitovich et al. 2005, Science)、ヒト以外の類人猿の遺伝子発現定量的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。それに対して、次世代シーケンサーは、事前にゲノム情報を必要としないこと、未知の遺伝子転写産物の定量化も可能であること、などの利点を持つ。これらの利点を持つ次世代シーケンサーを用いることで、従来のマイクロアレイでは検出できなかったヒトと類人猿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、かつゲノムワイドに検出することが可能となる。また、ゲノムによらないDNAの後天的な修飾機構のひとつで、遺伝子発現の時空間的な制御に重要な分子基盤としてシトシンメチル化があるが、これにいたってはヒト以外の類人猿においては網羅

的比較研究例が皆無である。

以上の背景を踏まえ、本研究では以下の2つの研究、(1)ヒト・類人猿脳における複数領域比較トランスクリプトーム解析、(2)ヒト・類人猿脳における複数領域比較エピゲノム解析、を行うことによりハードウェアとしてのゲノム情報がいかに時空間的に制御され、それがヒトとしての種の独自性に寄与したかを解明する。

2. 研究の目的

ゲノム配列という一次元の情報が、どのように時空間的に制御され、その発現の結果、細胞・組織・個体・集団・種の各階層における表現型の多様性とどう結びつくかという命題に挑戦するのが本研究課題の目的である。ヒトの大きな特徴である脳、特に前頭前野の肥大化を含めた脳の機能進化をターゲットとし、ヒトと類人猿の複数献体(個体)の死後脳8領域における網羅的・体系的遺伝子発現解析(比較トランスクリプトーム解析)、およびゲノムワイドメチル化定量解析(比較エピゲノム解析)を行うことにより、ゲノムにコードされた情報の時空間的な制御機構を、機能脳領域間、種間において解明し、その多様化に関与した遺伝子群を同定するとともに、それらの遺伝子群がいかにヒト化に寄与し得たかを解明する。

3. 研究の方法

ヒト・類人猿の脳を対象とした遺伝子発現定量化、プロモータ領域におけるDNA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でヒトを特徴づける分子基盤を明らかにする。ヒトと類人猿の脳8領域から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シーケンサーにより直接配列決定・比較解析を行う。ヒト化の最大の特徴である前頭前野の形態的な肥大化に特徴づけられる分子基盤に特に着目し、ヒト化に重要な遺伝子の同定、およびシステムとしてのネットワーク動態変化に着目した解析を行う。

具体的な方法は以下の通りである。

(1)ヒト・類人猿脳における複数領域比較トランスクリプトーム解析

ヒトおよび類人猿の脳における種間・領域間における発現ダイナミクスを解明するために以下の比較トランスクリプトーム解析を行う。

ヒトと類人猿、合計15個体程度の脳試料の8領域(運動前野、前頭前野背外側部、前頭前野腹外側部、一次視覚野、前帯状皮質、線条体、視床、小脳)を対象とし、それらの試料から抽出したRNAを断片化 cDNA合成 インデックス配列付きアダプター付加の手順でライブラリーをサンプルごとに作製する。作製したライブラリーを6サンプル毎にプールして Illumina 社 HiSeq2500 を用いて

配列決定を行う。6 サンプルあたり HiSeq2500 の 1 レーン分のデータを収集する（計 22 レーン）。

ヒト脳試料に関しては那波宏之教授、柿田明美教授（新潟大学脳研究所）と、次世代シーケンサーによる配列決定は豊田敦准教授（国立遺伝学研究所）のそれぞれ協力を仰ぎながら行う。

（2）ヒト・類人猿脳における複数領域比較エピゲノム解析

ヒトと類人猿の脳を用いて種間・領域間におけるプロモータ領域におけるシトシメチル化の定量化解析を行うことで、ヒトを特徴づける脳エピゲノム動態およびその変化を解明する。

メチル化定量用のライブラリー作製のために、プロモータ領域の効率的な回収を行う。メチル化が起きる CpG サイトが高頻度に存在するプロモータ領域を効率的に回収するために、制限酵素 MspI によりゲノム DNA を処理し、適切なサイズ分画を回収する。先行研究では、この方法により 7~8 倍にプロモータ領域が濃縮できることが明らかになっている（Meissner et al. 2008, Nature）。制限酵素処理した DNA をバイサルファイト処理する。この処理により、メチル化されていないシトシンはウラシルへと変換され、シーケンス上はチミンとして読まれるが、メチル化されているシトシンは変換されずシトシンとして読まれるため、配列決定をおこなうことで区別が可能となる。この方法をヒトと類人猿の 15 個体 8 領域に対して用い、比較メチローム解析を行うことにより、ヒト化におけるエピゲノム動態が及ぼす役割の解明、および候補遺伝子の同定を行う。

4. 研究成果

脳の肥大化、特に前頭前野の肥大化と、その結果としての言語の獲得による複雑なコミュニケーション能力は、ヒトが他の霊長類と顕著に異なる特徴である。そこで、本研究では、ヒトを特徴付ける最も大きな特徴である脳の発達・進化を「ヒトとは何か？」という問いに対するひとつの切り口として捉え、ヒトと非ヒト類人猿（チンパンジー・ゴリラ・オランウータン・テナガザル）を対象とした死後脳（8 領域：運動前野、前頭前野背外側部、前頭前野腹外側部、一次視覚野、前帯状皮質、線条体、視床、小脳）における比較トランスクリプトーム研究を行った。

新潟大学脳研究所、京都大学霊長類研究所との共同研究において収集した、ヒト 6 個体、チンパンジー 6 個体、ゴリラ 1 個体、テナガザル 1 個体の脳試料を用いて、計 101 個のトランスクリプトーム用の作製を行い、次世代シーケンサーによる発現解析を行った。具体的には、サンプル数あたり平均 3630 万リードを取得し、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、テナガザルの参照配列（ヒト：hg19、チンパンジー：panTro4、ゴリラ：gorGor3、テナガ

ザル：nomLeu3）に対してトランスクリプトーム用マッピングソフト（STAR）を用いてリードのマッピングを行った後、発現量の正規化を cufflinks および HTSeq を用いて行った。また種間および領域間における差次的発現遺伝子（Differential Expression Gene）の同定を DESeq2 を用いて同定した。その結果、小脳も含め解析対象とした 8 脳領域において、ヒトとチンパンジーは種ごとにクラスターを形成することが明らかになった（図 1）。

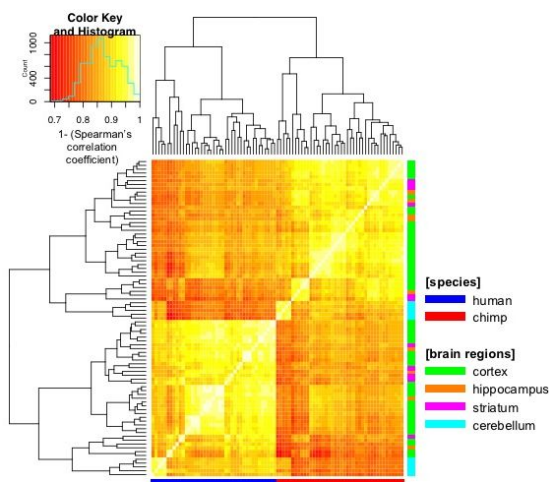


図1. 発現相同性を指標としたヒトとチンパンジーにおける脳内遺伝子発現の系統関係

また、アウトグループとしてゴリラとテナガザルを用い、ヒトとチンパンジーのそれぞれの系統において特異的に発現パターンを変化させた種特異的発現変動遺伝子（例：ヒト特異的に発現を上昇または減少させた遺伝子）の数と、脳領域ごとにヒト・チンパンジーのその割合の比較をした結果、海馬をのぞく脳領域において、ヒトに至る系統において発現パターンが変化している遺伝子の数が有意に多くなっていることを明らかにした

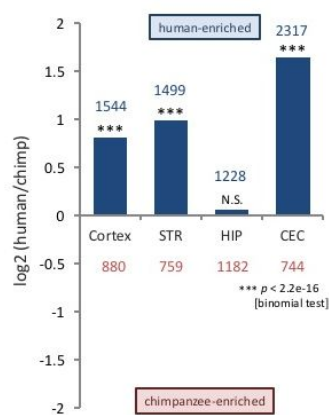


図2. ヒト・チンパンジー特異的発現変動遺伝子数とその割合

（図 2）。また、進化の過程でそれら発現パターンを変動させてきた遺伝子群には、精神・神経疾患関連遺伝子が数多く含まれることも明らかにした。

本研究で予定していたエピゲノム解析に関しては、当初全ゲノム規模での解析を考えていたが、網羅的遺伝子発現解析を多サンプ

ルにおいて解析することが可能となり、それらの解析の結果、解析対象とする遺伝子候補の絞り込みが可能となったため、特にヒト化において重要と思われる遺伝子に関してエピゲノム解析を行う予定にしている。現状においては、網羅的発現解析に用いた全ての脳試料と新たにゴリラ 2 個体を加えたサンプルにおいて良質な RNA・DNA の核酸を調整済みである。これらを用いて今後より詳細なエピゲノム解析を推進する予定である。

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7件)

Carelli FN, Hayakawa T, Go Y, Imai H, Warnefors M, Kaessmann H. (2016) The life history of retrocopies illuminates the evolution of new mammalian genes. *Genome Res.* 26(3):301-314. 査読有

DOI: 10.1101/gr.198473.115

Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Matsui A, Go Y, Ishimaru Y, Misaka T, Abe K, Hirai H, Satta Y, Imai H. (2015) Rapid expansion of phenylthiocarbamide non-tasters among Japanese macaques. *PLoS ONE* 10(7):e0132016. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0132016

Oishi T, Imai H, Go Y, Imamura M, Hirai H, Takada M. (2014) Sporadic premature aging in a Japanese monkey: A primate model for progeria. *PLoS ONE* 9(11):e111867. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0111867

Hayakawa T, Suzuki-Hashido N, Matsui A, Go Y. (2014) Frequent expansions of the bitter taste receptor gene repertoire during evolution of mammals in the Euarchontoglires clade. *Mol Biol Evol.* 31(8):2018-2031. 査読有

DOI: 10.1093/molbev/msu144

Uesaka M, Nishimura O, Go Y, Nakashima K, Agata K, Imamura T. (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

Gonda S, Matsumura S, Saito S, Go Y, Imai H. (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

Fukuda K, Ichiyanagi K, Yamada Y, Go Y, Uono T, Wada S, Maeda T, Soejima H, Saito N, Ito T, Sasaki H. (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

[学会発表](計27件)

郷康広「霊長類における精神・神経疾患関連遺伝子解析と認知ゲノミクスの展望」京都大学霊長類研究所共同利用研究会 霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合、京都大学霊長類研究所(愛知県・犬山市) 2016年3月11日~12日

郷康広「マーモセットにおける精神・神経疾患関連遺伝子多様性解析」第5回日本マーモセット研究会、東京慈恵会医科大学(東京都・港区) 2016年1月27日~28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」第64回インシリコ・メガバンク研究会、東北大学(宮城県・仙台市) 2015年11月24日
Yasuhiro Go, Qian Li, Shoji Tatsumoto, Philipp Khaitovich "Spatiotemporal gene expression trajectory in the human and non-human ape brains". Cold Spring Harbor Symposium -Behavior & Neurogenetics of Nonhuman Primates. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2015年11月17日~20日

辰本将司、郷康広、Qian Li、Liu He、大石高生、鶴殿俊史、重信秀治、柿田明美、那波宏之、Philipp Khaitovich「ヒトと類人猿における時空間比較トランスクリプトーム解析」日本遺伝学会第87回大会、東北大学(宮城県・仙台市) 2015年9月24日~26日

郷康広、辰本将司、福多賢太郎、野口英樹、早川卓志、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、阿形清和、藤山秋佐夫「チンパンジー親子トリオ全ゲノム解析による世代間直接変異率の推定および構造変化の同定」日本遺伝学会第87回大会、東北大学(宮城県・仙台市) 2015年9月24日~26日

郷康広、Qian Li、Liu He、大石高生、鶴殿俊史、重信秀治、柿田明美、那波宏之、Philipp Khaitovich「ヒトと類人猿における時空間比較トランスクリプトーム解析」第17回日本進化学会大会、中央大学(東京都・文京区) 2015年8月20日~23日

郷康広、Qian Li、Liu He、大石高生、鶴殿俊史、重信秀治、柿田明美、那波宏之、Philipp Khaitovich「ヒトと類人猿における時空間比較トランスクリプトーム解析」第31回日本霊長類学会学術

大会、京都大学(京都府・京都市) 2015年7月18日~20日
郷康広、Qian Li、Liu He、大石高生、鶴殿俊史、重信秀治、柿田明美、那波宏之、Philipp Khaitovich「ヒトと類人猿における時空間比較トランスクリプトーム解析」NGS現場の会題4回研究会、つくば国際会議場(茨城県・つくば市) 2015年7月1日~3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」東北大学脳神経科学コアセミナー、東北大学(宮城県・仙台市) 2015年5月22日
郷康広「霊長類における精神・神経疾患関連遺伝子解析と認知ゲノミクスの展望」京都大学霊長類研究所共同利用研究会 霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合、京都大学霊長類研究所(愛知県・犬山市) 2015年3月13日~14日
郷康広「ヒトを理解するための霊長類モデルの可能性 ゲノム・トランスクリプトームからのアプローチ」日本顕微鏡学会分子・細胞動態イメージング研究部会CREST 生命動態領域共催ワークショップ、東京大学(東京都・文京区) 2015年3月11日
Yasuhiro Go, Liu He, Takao Oishi, Shuji Shigenobu, Akiyoshi Kakita, Hiroyuki Nawa, Philipp Khaitovich “Spatiotemporal gene expression trajectory in the human and non-human ape brains” 生理学研究所 新潟脳研究所合同シンポジウム、新潟大学(新潟県・新潟市) 2015年3月4日~5日
郷康広、臼井千夏、石川裕恵、辰本将司「マーモセットにおける精神・神経疾患関連遺伝子解析」第4回日本マーモセット研究会大会、犬山国際観光センター(愛知県・犬山市) 2015年1月22日~23日
郷康広、辰本将司、福多賢太郎、野口英樹、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、阿形清和、藤山秋佐夫「チンパンジー親子トリオ全ゲノム解析による世代間直接変異率の推定」日本遺伝学会第86回大会、長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市) 2014年9月17日~19日
Yasuhiro Go “Direct estimation of genome-wide mutation rate in a chimpanzee family trio by ultra-deep whole genome sequencing” Symposium of MHC evolution and Human evolution、総合研究大学院大学(神奈川県・葉山町) 2014年7月26日~27日
福多賢太郎、野口英樹、豊田敦、長田直樹、郷康広、石田貴文、伊佐正、藤山秋佐夫「大規模全ゲノムシーケンシングによるニホンザルの種特異的ゲノム情報の探索」第30回日本霊長類学会大会、

大阪科学技術センター(大阪府・大阪市) 2014年7月4日~6日
早川卓志、岸田拓土、郷康広、川口恵理、会津智幸、石崎比奈子、豊田敦、藤山秋佐夫、松沢哲郎、阿形清和「非侵襲糞サンプルに基づくギニア・ボツソウの野生チンパンジーの全遺伝子配列解析」第30回日本霊長類学会大会、大阪科学技術センター(大阪府・大阪市) 2014年7月4日~6日
郷康広、辰本将司、福多賢太郎、野口英樹、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、阿形清和、藤山秋佐夫「チンパンジー親子トリオ全ゲノム解析による世代間直接変異率の推定」第30回日本霊長類学会大会、大阪科学技術センター(大阪府・大阪市) 2014年7月4日~6日
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」、星稜会館(東京都・千代田区) 2014年1月12日
21 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、東北大学(宮城県・仙台市) 2013年11月25日
22 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、支笏湖休暇村(北海道・千歳市) 2013年10月28日-30日
23 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.
24 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、岡山理科大学(岡山県・岡山市) 2013年9月6日
25 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、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2013年9月4日-6日
26 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、理化学研究所(兵庫県・神戸市)、2013年6月13日-14日

- 27 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、ANA クラウンプラザホテル神戸(兵庫県・神戸市)、2013年6月2日-3日

〔図書〕(計1件)

郷康広(2013)「日本心理学事典」p944.
(平凡社)
分担執筆

〔その他〕

ホームページ等

<http://cnsi.nins.jp/pcg/index.html>

(研究室のHP)

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

(ブレインサイエンス研究分野)

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