

**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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640065

研究課題名(和文) 霊長類疾患モデル作製にむけた霊長類パーソナルゲノム・トランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Extensive and personal genomic and transcriptome analyses for establishment of human disease primate 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

研究成果の概要(和文)：ヒト精神・神経疾患の霊長類モデル動物の開発のために、マーマセットを対象としたエキソーム解析を行い、精神・神経疾患関連遺伝子における自然発症機能喪失変異を有する個体・家系の同定を行った。マーマセット369個体を解析した結果、ヒトの精神・神経疾患に関与が強く示唆される19遺伝子において稀な(頻度5%以下)LoF変異を持つ個体が存在することを明らかにした。同定した遺伝子には、脳の発達時において神経細胞の移動に重要な役割を持つ遺伝子、中枢神経系の発生や成長、維持に重要な遺伝子、レット症候群の原因遺伝子など、多くのヒト精神・神経疾患関連遺伝子が含まれていた。

研究成果の概要(英文)：Human neuropsychiatric disease modeling using primates is challenging due to their longer life time and advanced technique requirements for creating transgenic primates compared with mice and rats. However, most of the neuropsychiatric diseases, especially psychiatric diseases, seem to be responsible for breakdown of high-level brain cognitive function. It is then using primate disease model takes advantage due to anatomical and functional similarities between human and monkey brain. As a first step for establishment of primate model, extensive genome sequence analysis (exome) have been conducted in marmoset to identify individuals or families carrying rare loss-of-functional (LoF) mutations in neuropsychiatric related genes by means of Next generation sequencing. Using 369 marmoset samples, 19 genes that have rare LoF mutations were identified. Among them, we identified the genes involved in migration of neurons during development, cell-cell signaling, DNA methylation, and so on.

研究分野：比較認知ゲノム科学

キーワード：霊長類 マーマセット ゲノム トランスクリプトーム 精神疾患 動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの疾患や認知機能の解明はとりもなおさず「ヒトとは何か」を知る試みである。ヒトを知るためにはヒトそのものを研究対象とするのが最適な方法であるが、当然ながらヒトに対して侵襲的・不可逆的な実験操作を行う事はできない。そのため、ヒトに近縁で人為的・実験的な操作が可能なモデル動物の開発が必要不可欠である。マウスをモデル動物とした研究においては、哺乳類に共通する生理状態・代謝や行動の変化の解明に多大な貢献がなされてきた。しかし、ヒトを含めた霊長類の進化の段階で大きくその能力を獲得したような形質、例えば高次認知機能やその破綻となって顕れてくる精神・神経疾患などに対してはマウスをモデルにした研究では限界がある。実際に、高次脳機能を担う大脳皮質領野においてはヒトとマウスの発現プロファイルが大きく異なっており、認知行動や精神活動の分子機構の解明にはヒトに近縁の霊長類モデルの重要性が高まっている。そのような候補となりうる霊長類として小型霊長類のマーモセットがあげられる。ヒト・マーモセット・マウスを比較した場合、マーモセットはヒトに対する進化的・遺伝的類縁性が高いだけでなく、脳の形態的・機能的類縁性もマウスのそれと比べると遥かに高いことが分かる(図1)。それだけでなく、マーモセットは霊長類のなかでも高度の社会性、コミュニケーション能力を持つため、

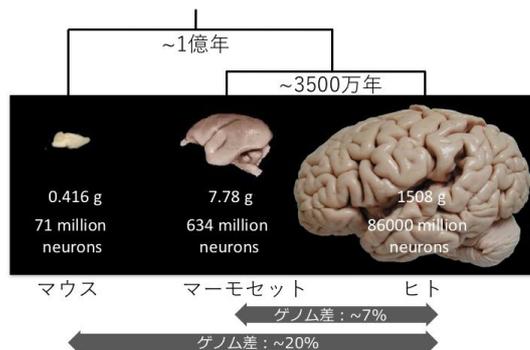


図1. マウス、マーモセット、ヒトにおける脳形態およびゲノム配列の進化的類縁性

ヒトの神経心理、認知心理学的なモデルとしてもその重要性が増している。また、世界ではじめてとなるトランスジェニックマーモセット作製に日本の研究チームが成功し、さらに、科学技術・学術審議会のもとでマーモセットを中心とした「革新的技術による霊長類の神経回路機能全容解明」を目指した国家プロジェクトが立ち上がりつつある。

しかし、そのような各方面からの重要性が認識されながらも、マーモセットにおいてはマウスなどと異なり近交系が存在しない上に、個体間の遺伝的なバックグラウンドの違いなどのゲノム情報がほとんど明らかになっていない。今後、マーモセットを真にヒトのモデル動物として開発していくためには、各個体や家系の遺伝的バックグラウンドを

明らかにしていくことが必須である。よって、本研究のパーソナルゲノム解析を推進することで個体のゲノムの違いを考慮したモデル動物の開発がより一層効果的に進むことが期待できる。

### 2. 研究の目的

ヒトの高次認知機能やその破綻として顕れる精神・神経疾患の理解には、ヒトに近縁かつ実験が可能なモデル動物の開発が必要不可欠である。そのモデルとなりうるのが小型霊長類のマーモセットである。本研究では、げっ歯類では代替不可能なヒト精神・神経疾患や高次認知機能解明のモデルとしてのマーモセットに注目し、モデル動物開発の端緒として、マーモセット 200 個体を対象とした精神・神経疾患関連遺伝子 3,323 個の全遺伝子配列決定によるパーソナルゲノム解析および機能喪失型変異を有する個体における遺伝子発現解析による自然発症ノックアウトマーモセットの同定を行ない、ヒトの疾病モデルと資する個体あるいは家系の同定を行う。また、ゲノム配列に基づいた交配による疾患モデルの開発を行うための基礎データを収集する。

### 3. 研究の方法

マーモセット 200 個体における精神・神経疾患関連遺伝子 3,323 個の全遺伝子配列の決定を超並列シーケンサーにて行い、自然発症機能喪失型変異(ナチュラルノックアウト)マーモセット個体もしくは家系の同定を行う。また、ゲノム解析の結果同定された機能喪失型変異を示す遺伝子全てにおいて、変異を有する個体を含めた発現解析をリアルタイム RT-PCR 法によって行い、当該個体・家系の遺伝子発現レベルでの影響を解析する。これらの結果を総合的に解析することで、精神・神経疾患のモデルとなる個体の選抜、次世代モデル動物作製のための効率的な繁殖計画の策定、脳構造・機能イメージングや社会性行動データなどの中間表現型(エンドフェノタイプ)解析に向けたゲノム情報の整備と知見を集積する。

具体的な方法は以下の通りである。

#### (1) 精神・神経疾患関連遺伝子群を対象としたパーソナルゲノム解析

京都大学霊長類研究所および基礎生物学研究所において飼育・繁殖されているマーモセット 200 個体を対象に、精神・神経疾患に何らかの関与が示唆されている遺伝子の全エキソン配列を決定し自然発症機能喪失型変異(ナチュラルノックアウト)マーモセット個体もしくは家系の同定を行う。

マーモセットは、胎児発生過程において、同腹仔間で血液幹細胞の融合・交換による血液マイクロキメリズムが生じることが知られている。そのため、血液(白血球)由来のゲノム DNA は同腹別仔のゲノム DNA も含むことになる。一般的にはマイクロキメリズムは

個体のジェノタイピングを行う際には不利となるが、今回はその機構を利用することにより、1個体の血液サンプルから同腹別仔の遺伝子タイピングも同時に行うことを試みる。機能喪失型変異を同定した場合は、同腹仔のどちらに（場合によっては双方ともに）変異があるかを判定するために、マイクロキメリズムが起きていない（もしくは極めて低頻度にしか起きていない）口腔内皮細胞や繊維芽細胞を用いることで、再度、詳細なジェノタイピングを行う。

#### (2) 精神・神経疾患関連遺伝子群を対象としたパーソナルトランスクリプトーム解析

平成26年度の200個体×3,323遺伝子のパーソナルゲノム解析において同定された機能喪失型変異を示す遺伝子と個体を対象とし、リアルタイム逆転写PCR (Real time RT-PCR) 法を用いて、ゲノム配列上で同定された機能喪失型変異を持つ個体(群)と機能喪失型変異を持つと考えられる個体群との間の発現解析を行う。

#### 4. 研究成果

ヒト精神・神経疾患の霊長類モデル動物の開発のために、マーモセットを対象とした実験的認知ゲノミクス研究を行った。マーモセットはマウスのような近交系がないため、遺伝的多様性を反映した表現型のばらつきが大きいと考えられる。しかし、逆にその遺伝的多様性の高さのために、疾患に関する遺伝子の異常変異をキャリアーとして保持する個体が数多くいると考えられるため、自然発症疾患の有力なモデル動物にもなり得る。そこで、国内において飼育・繁殖されているマーモセットの網羅的遺伝的解析(エキソーム解析)を行い、自然発症的な遺伝子機能喪失(Loss-of-Function)変異(以下、LoF変異)を有する個体・家系を同定し、主に、ヒト精神・神経疾患をターゲットとした霊長類モデル動物の開発を研究の目的とした。

(1) 広範な候補遺伝子解析 [3,323 遺伝子を対象]

精神・神経疾患に関与が疑われる3,323遺伝子(合計、約7Mbの配列長)を解析対象とし、マーモセット82個体を対象とした遺伝子機能喪失変異保有個体の同定を行った。その結果、精神・神経疾患との関連が強く示唆される遺伝子を対象とした場合、5遺伝子においてLoF変異を有する個体を同定した。その多くはヘテロでLoF変異を有しているが、中にはホモでLoF変異を持つ個体も同定することが可能となった。

(2) ターゲットを絞った候補遺伝子解析 [479 遺伝子を対象]

より広範な個体を対象とした解析を行うためにマーモセット個体のサンプル収集に注力を行った。その結果、2016年3月末時点で674個体のマーモセット血液サンプルを収集することが可能となった。それらのサンプルを用いて可能な限りスループットを上げ

るために、精神・神経疾患に関与が強く疑われる479遺伝子(合計、約1Mbの配列長)に解析対象を絞り込み、マーモセット287個体を対象とした遺伝子機能喪失変異保有個体の同定を行った。ここで得られた結果と、前項で得られた結果を合わせて解析した結果、マーモセットにおいては19遺伝子において稀

表1. マーモセットにおける機能喪失(Loss-of-Function)変異遺伝子

Gene	Disease (Score*)	LoF type	Genotype (REF Homo, Hetero, ALT Homo)
ARX	MR (18.45)	Stop gained, Frame shift, Splice donor	364, 1, 4 (hemi)
ATP13A2	PD (17.51)	Stop gained, Frame shift	363, 6, 0
ATXN7	OPCA (18.51)	Stop gained, Start lost, Splice acceptor	349, 20, 0
CASP1	HD (15.88)	Stop gained, Splice acceptor	321, 48, 0
FUS	ALS (18.99)	Stop gained, Frame shift, Splice acceptor	362, 7, 0
LRP8	MDD (19.58)	Stop gain	362, 7, 0
MECP2	MR (16.44)	Frame shift	368, 0, 1 (hemi)
NOTCH4	SZ (16.34)	Stop gained, Frame shift	356, 13, 0
NRG1	BD (15.21), SZ (19.01)	Stop gained, Frame shift, Splice acceptor	360, 9, 0
TTPA	SCD (19.35)	Stop gain	367, 2, 0

Disease: MR, mental retardation, PD, parkinson's disease, OPCA, olivopontocerebellar atrophy, HD, Huntington's Disease, ALS, amyotrophic lateral sclerosis, MDD, major depressive disorder, SZ, Schizophrenia, BD, bipolar disorder, SCD, spinocerebellar degeneration (\*Malacards calculated score)

マーモセットにおける479遺伝子(約1Mb)の全エクソーム配列決定解析を369個体を対象として行った。精神・神経疾患との関連が強く示唆(\*Score > 15)される10遺伝子に稀な(Minor Allele Freq. < 0.05)の機能喪失型(Loss-of-Function: LoF)変異を同定することが可能となった。

な(頻度5%以下)LoF変異を持つ個体が存在することを明らかにした(表1)。マーモセットにおいて同定した遺伝子(表1)には、脳の発達時において神経細胞の移動に重要な役割を持つリポタンパク質受容体をコードするLRP8遺伝子、上皮成長因子受容体(EGFR)の活性化リガンドとして機能し、中枢神経系の発生や成長、維持に重要な役割を担っているニューレグリンをコードするNRG1遺伝子、進行性の神経疾患であるレット症候群の原因遺伝子でありメチル化シトシン残基に結合する転写因子をコードするMECP2遺伝子など、多くのヒト精神・神経疾患関連遺伝子が含まれていた。

また、解析で同定した多型情報を用いて、日本で飼育・繁殖されているマーモセットの多様性解析を行った(図2)。その結果、マー

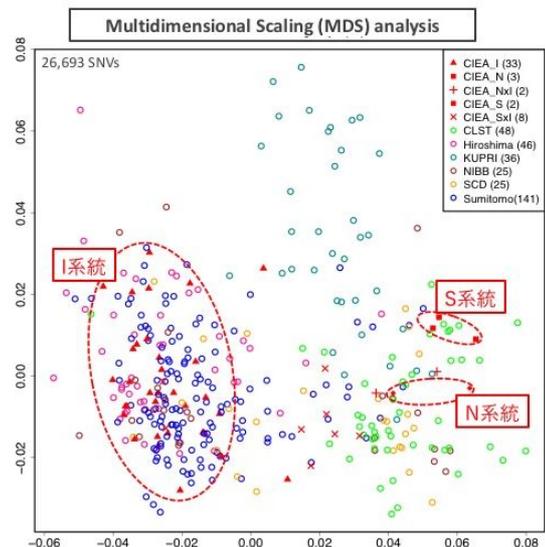


図2. 多型情報に基づいたマーモセット多様性解析

モセットの導入時点での主要3系統(I系統、S系統、N系統)が現時点でも系統ごとにクラスターを形成していること、また、他の施設でも施設ごとにクラスターを形成するこ

とが明らかになった。これらの結果を用いることで、今後の繁殖計画を立てる上で、有用な遺伝的バックグラウンドの情報を提供することが可能となった。

#### 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)

- 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. DOI: 10.1101/gr.198473.115 査読有
- 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0132016 査読有
- 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0111867 査読有
- 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. DOI: 10.1093/molbev/msu144 査読有
- 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. DOI: 10.1186/1471-2164-15-35 査読有

##### [学会発表](計19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  
「マーマセットにおける精神・神経疾患  
関連遺伝子解析」第4回日本マーマセッ  
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、岸田拓士、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

〔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