

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06834

研究課題名（和文）ヒト特異的転位因子による遺伝子発現調節と脳の進化

研究課題名（英文）Evolution of human brain and gene regulation by human-specific transposable elements

研究代表者

鈴木 俊介（Suzuki, Shunsuke）

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30431951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト特異的レトロトランスポゾンであるSVA F1がCDK5RAP2, MCT1/SLC16A1, TBC1D5遺伝子の神経系細胞における発現調節を担っていることを明らかにするため、SVA F1を両アリルで欠失させたヒトiPS細胞を神経系細胞に分化誘導した際の、ホスト遺伝子の発現動態を野生型と比較する計画であった。現在までの研究成果として、TBC1D5遺伝子座のSVA F1において両アリル欠失株、MCT1/SLC16A1遺伝子座のSVA F1においてヘテロ欠失株をCRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いて作成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類の脳の進化を引き起こした遺伝的基盤については多くが未解明であるが、遺伝子の発現調節の変化が主要な貢献をしたと考えられている。近年、ゲノム中の転位因子がホストの遺伝子発現調節を担うシスエレメントとして利用されていることが示唆されているが、ヒト特異的転位因子による遺伝子発現調節が実際にヒトの神経系細胞のどのような性質に関わっているかはほとんどわかっていない。本研究で作成したSVA F1欠失iPS細胞株の解析から、ヒト特異的転位因子が新規ゲノム機能を担っており、それが脳機能にどう関わるかなど、これまでに報告がない重要な知見が得られる可能性があり、人類学や脳科学分野への学術的貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research, I planned to clarify gene regulatory function of human-specific retrotransposon SVA F1 for CDK5RAP2, MCT1/SLC16A1 and TBC1D5 genes during neural cell development. Producing SVA F1-deleted human iPS cell lines, comparison of host genes expression dynamics during in vitro neural induction between wild type and knockout cell lines was planned. So far, human iPS cell lines with biallelic SVA F1 knockout at TBC1D5 locus and with monoallelic SVA F1 knockout at MCT1/SLC16A1 locus were produced using CRISPR/Cas9 genome editing technique.

研究分野：自然人類学

キーワード：レトロトランスポゾン iPS細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

ヒトの特徴的な形質である飛躍的に大きな脳とその高次脳機能がかさどる高度な精神活動は、ヒトと最も近縁な生物種であるチンパンジーとの分岐後、およそ 500 万年のうちに進化した。その遺伝的基盤については多くが未解明であるが、遺伝子の発現調節を担うノンコーディング領域に起きた変化が主要な貢献をしたと考えられている。近年、ヒトを含む様々な生物種において、ゲノム中に存在する転位因子由来の配列がプロモーターやエンハンサーなどのホストのゲノム機能を担うシスエレメントとして利用されていることが示唆されている (Nat Genet 2014, 46, 558-68, Cell 2015, 163, 68-83, Science 2016, 351, 1083-7)。従って、ヒト特異的な転位因子の挿入は、ヒト特異的な遺伝子発現調節の進化に貢献した有力な候補因子の一つであると考えられる。しかし現在のところ、ヒト特異的な転位因子挿入サイトと脳機能に関わる遺伝子の発現調節との因果関係を個別の遺伝子座において直接的に示した研究や、その遺伝子発現調節が実際に神経系細胞の性質に与える影響を解析した研究は非常に限られている。

申請者は、チンパンジー等のヒトと近縁な霊長類のゲノム中には存在しない、ヒト特異的な CpG アイランドやタンデムリピートに着目し、人類の進化や疾患に関わる可能性のあるヒト特異的ゲノム/エピゲノム機能の探索を行なっている (Genome Biol Evol 2016, 8, 2288-96, Biochem Biophys Res Commun 2018, 503, 1478-83, Human Genet 2019, 138, 661-72)。その中で、ゲノム中に約 80 コピー存在するヒト特異的レトロトランスポゾンである SVA F1 の解析から、SVA F1 がヒトの脳機能の進化に重要な貢献をしたと考えられる遺伝子のエンハンサーとして機能している可能性を示唆する以下の知見を得てきた (未発表)。(i) SVA F1 は遺伝子の転写開始点近傍、脳関連遺伝子近傍に有意に多く存在する。(ii) SVA F1 をイントロン内または近傍にもつホスト遺伝子についてヒトとチンパンジーの脳の相同部位での発現データを比較解析し、ヒトにおいて並外れて 2~3 倍発現量が高い次の 3 遺伝子を同定した。CDK5RAP2 は神経幹細胞の対称分裂を促進することで神経幹細胞の総量を増やし脳の増大に関わる遺伝子で、小頭症の原因遺伝子である (Nature Genet 2005, 37, 353-6, Neuron 2010, 66, 386-402)。MCT1/SLC16A1 はグリア細胞からニューロンのエネルギー源である乳酸を放出するトランスポーターである (Nature 2012, 487, 443-8)。TBC1D5 はグルコーストランスポーターである GLUT1 の細胞膜への移動に関わるオートファジー関連因子である (Mol Cell 2017, 67, 84-95)。このように、SVA F1 をもち、かつ人類の進化の過程で発現量が大きく上昇した可能性が高いこれら 3 遺伝子すべてが、脳の大きさやエネルギー供給に関わるヒトの脳機能に明らかに重要な遺伝子であった。

2. 研究の目的

「ヒト特異的レトロトランスポゾン SVA F1 は、脳の大きさやエネルギー代謝に関わる遺伝子の発現を上昇させることで、人類の脳の進化に貢献したのではないか？」という学術的「問い」に答えるため、以下の 2 つの項目を本研究の目的とする。

- ・ SVA F1 は、神経系細胞において CDK5RAP2, MCT1/SLC16A1 および TBC1D5 の発現を上昇させる役割を担うのかを明らかにする。

- ・ SVA F1 による上記 3 遺伝子の発現調節によって、神経幹細胞の対称分裂、グリア細胞における乳酸の放出およびグルコースの取込みが促進されていることを明らかにする。

3. 研究の方法

1. CDK5RAP2, MCT1/SLC16A1, TBC1D5 内の SVA F1 欠失ヒト iPS 細胞株の作出

SVA F1 が上記3遺伝子の神経系細胞における発現調節を担っていることを明らかにするため、SVA F1 を両アレルで欠失させたヒト iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導した際の、ホスト遺伝子の発現動態を野生型と比較する。そこでまず、CRISPR/CAS9 システムによるゲノム編集技術を用いて、各遺伝子中の SVA F1 の上流および下流に設計したガイド RNA の間を抜くことで、両アレルで SVA F1 を欠失したヒト iPS 細胞株を計3系統作出する。

2. 神経系細胞における SVA F1 の欠失によるホスト遺伝子の発現調節の変化の解析

SVA F1 の有無が神経系細胞におけるホスト遺伝子の発現にどう影響するかを明らかにするため、作出したそれぞれの SVA F1 欠失ヒト iPS 細胞および野生型ヒト iPS 細胞、さらに元々 SVA F1 がないチンパンジー iPS 細胞およびニホンザル iPS 細胞を実験対照として用いて神経系細胞への分化誘導実験を行い、分化に伴うホスト遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR や免疫染色で解析する。それぞれの iPS 細胞から胚様体を経由せずに神経幹細胞の細胞塊であるニューロスフェアを誘導し、その後接着培養に切り替えて適切な条件で培養を続けることでニューロンやグリア細胞であるアストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化させる。iPS 細胞からこれらの神経系細胞への分化過程において、SVA F1 と上記3遺伝子の発現上昇との関係性を明らかにしたい。

3. SVA F1 の欠失によるホスト遺伝子の発現量低下がひき起こす神経系細胞の性質変化の解析

SVA F1 の有無によるホスト遺伝子の発現量の違いが、神経系細胞の性質を実際に変化させていることを明らかにするため、それぞれの遺伝子の機能に応じて以下の解析を行う。CDK5RAP2 遺伝子座の SVA F1 の有無によって、神経幹細胞の増殖速度に差が生じるかは、神経幹細胞培養時の細胞数の継時的変化およびニューロスフェアの大きさを測定し比較することで解析する。MCT1/SLC16A1 遺伝子座の SVA F1 の有無によって、グリア細胞からの乳酸放出量に差が生じるかは、上記の分化誘導実験で得たそれぞれの iPS 細胞由来グリア細胞からの乳酸放出量を市販のラクテートアッセイキットを用いて測定し比較することで解析する。TBC1D5 遺伝子座の SVA F1 の有無によって、グリア細胞におけるグルコーストランスポーター GLUT1 の細胞膜上の局在およびグルコースの取込み量に差が生じるかは、GLUT1 の免疫染色および市販のグルコース取込み定量キットを用いて解析する。

4. 研究成果

本研究では、まず、ヒト特異的レトロトランスポゾンである SVA F1 が CDK5RAP2, MCT1/SLC16A1, TBC1D5 遺伝子の神経系細胞における発現調節を担っていることを明らかにするため、SVA F1 を両アレルで欠失させたヒト iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導した際の、ホスト遺伝子の発現動態を野生型と比較する計画であった。CRISPR/CAS9 システムによるゲノム編集技術を用いて、各遺伝子中の SVA F1 の上流および下流に設計したガイド RNA の間を抜くことで、両アレルで SVA F1 を欠失したヒト iPS 細胞株を計3系統作出する実験計画に取り組んだ。iPS 細胞以外の培養細胞では狙いどおりの欠失を引き起こすことができるガイド RNA を設計することができたが、ヒト iPS 細胞を用いて同様の実験を行うと欠失が確認できないという問題の解決に想定外に時間がかかったが、現在までの研究成果として、TBC1D5 遺伝子座の SVA F1 において両アレル欠失株、MCT1/SLC16A1 遺伝子座の SVA F1 においてヘテロ欠失株を作成することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今村 公紀 (Imamura Masanori) (80567743)	京都大学・ヒト行動進化研究センター・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関