

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17018031
 研究課題名（和文）高精度比較ゲノム地図の作成と、それに基づいた比較ゲノム構造解析研究
 研究課題名（英文）Highly Accurate Comparative Genome Mapping and Structural Genomics

研究代表者
 藤山 秋佐夫（FUJIYAMA ASAO）
 国立情報学研究所・情報学プリンシプル研究系・教授
 研究者番号：60142311

研究成果の概要（和文）：本研究では、霊長類から単孔類までの哺乳類ゲノムと硬骨魚類ゲノムを対象とした系統的かつ網羅的な比較解析により、ヒトへと向かう進化経路で起きたイベントをゲノムレベルでの変遷過程として解明することを目指して研究を行った。主要な成果の一つに、チンパンジーの常染色体とY染色体の構造決定とヒトゲノムとの比較ゲノム解析から、両者の進化経路の特徴とヒトの進化に反復配列の増幅が重要であったことを示したことがある。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to clarify the genomic events that could be important during the evolutionary processes toward development of human. One of the major discoveries of this project is that the identification of the importance of species specific amplification of repetitive sequences after the separation of human and chimpanzee about 5-million years ago. To do so, we carried out highly accurate structural analysis of chimpanzee chromosome22 and Y, and compared them with human genome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	36,900,000	0	36,900,000
2006年度	37,200,000	0	37,200,000
2007年度	36,300,000	0	36,300,000
2008年度	44,888,000	0	44,888,000
2009年度	25,000,000	0	25,000,000
総計	180,288,000	0	180,288,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム、比較ゲノム、ゲノム情報、染色体、ゲノムライブラリ

1. 研究開始当初の背景

2004年にヒトゲノムの完成配列が報告されているが、これは真正クロマチン領域を中心としたものであり、機能的に重要であることがよく知られているヘテロクロマチン領域は、ほとんど含まれていない。例えば、細胞老化やガン化との関連でテロメア領域の構

造不安定性が問題になっており、この領域の正しい構造情報を決定することは極めて重要であるにもかかわらず、サブテロメア・テロメア領域については日本の研究グループが構造決定に関与してきた一部の染色体を除いてゲノム構造情報は極めて不十分である。また、サブテロメア領域の構造について

は、細胞遺伝学的研究からヒト、チンパンジー、ゴリラ、オランウータンの間でかなりの違いのあることが知られていたが、実際にチンパンジーとヒト染色体のテロメア領域の構造とを高精度地図と配列を基に比較することにより、具体的な配列情報の違いが明らかになりつつある。

2005年に、概要配列ではあるがチンパンジー全ゲノム配列が報告され、2006年には改訂版が公開された。霊長類ではアカゲザル、その他の哺乳類では、ウシ、ブタ、オポッサムなどの概要配列が発表されるなど、比較ゲノム研究を取り巻く世界的な情勢は急速な展開を遂げている。このため、本研究班の研究計画もかなりの影響を受けているが、我々が独自に開発したゲノム資源を有効に活用することで相応の国際貢献が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに進めてきた比較ゲノム研究を継続的に発展させ、霊長類から単孔類までの哺乳類ゲノムと硬骨魚類ゲノムを対象とした系統的かつ網羅的な比較解析を通して、ヒトへと向かう進化経路で起きた進化イベントをゲノムレベルでの変遷過程として解明することを目指した。研究の実施に当たっては、特に常染色体と性染色体の比較、テロメア領域、反復配列、シンテニー等のゲノムを構成する単位に着目した。一方、種の形成に関する問題は、生物学全般にわたる基本的で重要な課題である。そこで本研究では、生物種の形成と多様化のモデルケースとしてアフリカ東部ビクトリア湖に生息する硬骨魚類であるシクリッドをとりあげ、近縁種間の比較ゲノム解析から、この種で起きた種分岐の機構解明を目指すことも含めた。以上により、脊索動物の出現から哺乳類、霊長類、ヒトへの進化という文脈の中で起きたと考えられるゲノムの構造変化過程の主要経路を明らかにする。そのため、これらの研究の基礎となるリソースの整備を支援班の協力を得ながら進めると共に、高精度地図の構築を進め、今後も重要性が増加することが予想される比較ゲノム解析のための研究基盤の整備も図る。一方で次世代シーケンサの登場により、個体（系統）間や近縁種間のゲノム構造の違いやさまざまな環境に存在する微生物集団の組成を迅速に低コストで明らかにすることが可能となりつつある。本研究では、次世代シーケンサによる配列解析システムを構築し、遺伝的多様性を明らかにすることも新たな目標に設定した。特にヒトでは遺伝的多様性がさまざまな疾患や体質、薬物応答に関与していることが示唆されており、今後テーラーメイド医療や予防医学を実現するにあたって、その基盤技術の構築が必要不可欠である。

3. 研究の方法

まず、ヒトとチンパンジーの相同染色体比較から両者の差異が明らかになった特定の反復配列について、まず両者の全ゲノムを対象に網羅的な比較解析を開始し、ヒトとチンパンジーの種分岐後に特異的に発生した反復配列の増幅・挿入イベントの全貌解明を目標に研究を進めた。また、このための対照群として旧世界ザル、新世界ザル、原猿の代表的な種について、ゲノムの部分領域を対象に同様な解析を実施するための準備を進め、それに必要なリソースの準備も行った。また、従来から進めている染色体テロメア領域についての網羅的構造解析を続行した。また、ヴィクトリア湖産シクリッドの内部系統あるいはシクリッド系統特異的に起こったと考えられる遺伝子増幅を染色体レベルの比較を順次高等動物にまで拡大することにより、脊椎動物の多様化のメカニズム解明を目指した研究を進めた。

一方、比較ゲノム研究を取り巻く世界的な情勢が米国を中心に急速な展開を見せ始めた。そのため、研究項目B02に属し、霊長類ゲノムを直接の研究対象としている6グループの連携により、霊長類、ほ乳類ゲノムでの高度保存領域の解析、霊長類におけるサブテロメア領域の比較ゲノム解析、性染色体／常染色体比較解析を年度内に開始する計画とした。テロメア領域の解析については、フィンガープリント作成による部位の特定や定量PCRによるコピー数の測定などの新しい手法を導入して解析を続行させた。

現在公開されているヒトゲノムアセンブリには、5番長腕、10番短腕、11番長短腕、18番短腕、21番長腕（以上は日本グループの寄与）と、X/Y短腕以外には配列解読がテロメアまで到達した染色体は存在しない。そこで、ヒトゲノムのテロメア領域を対象に信頼性の高いライブラリからクローンを単離し、再シーケンシングによって構造を再確認し、この情報をもとに他の霊長類ゲノムからのクローン単離や構造比較を行い、ヒトに至る染色体の再構成プロセスを明らかにすることとした。新型シーケンサの応用については、純化染色体の構造解読と比較ゲノム比較を開始した。また、個人ゲノム解析の基盤整備に向けて、ヒト由来の細胞株を用いて次世代シーケンサーによる配列解析および構造変異の検出手法の検討を始めた。

4. 研究成果

霊長類の比較ゲノム研究に関しては、単一個体由来のDNA約12 Mbの高精度配列を決定し、ヒトY染色体配列との塩基置換頻度を常染色体間での比較による数値と比較検討し、Y染色体の塩基置換頻度が常染色体のそれよりも高いことを確認するなどの成果を得た。そ

の他の霊長類、哺乳動物ゲノム解析材料として、支援班石田班員から供与された細胞株を用いてオランウータンBACライブラリの構築を進めた。また、オーストラリア国立大学Gravesグループとの共同研究も進めており、カンガルー全ゲノムのBACライブラリ構築、X染色体特異的 fosmid ライブラリを構築した。また、基盤ゲノム菅野班の支援と東京医科歯科大学石野グループとの共同研究により、カンガルー精巣、卵巣、子宮膜、下垂体、脳から全長cDNAライブラリを構築した。また、カモノハシ全ゲノムBACライブラリを構築した。

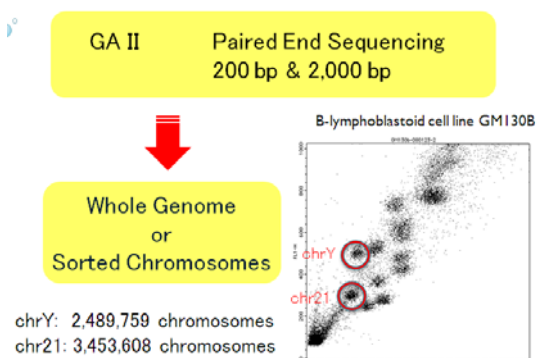
霊長類の比較ゲノム研究に関して、B02斎藤班、B02黒木班、B05矢田班野口班員、韓国KRIBB等と共同で*Nature Genetics*誌に発表した結果が米国グループとの論争になったが、チンパンジーの3亜種のうち、解析に用いた *verus* 種のY染色体は特に個体間変異が極めて少ないとの結果になった。これに関連して、藤山は、大阪市天王寺動物園、東京都多摩動物園との協力関係の確立にも務め、亜種判定、親子鑑定などの技術協力を行っている。また、B05矢田班野口班員、B02黒木班との協力でニホンザルBAC末端配列の解析を行った。国際共同研究では、オーストラリアとの関係を強化し、オーストラリア国立大学Gravesグループに加えてメルボルン大学Renfreeグループ、カンガルーゲノム解読コンソーシアムとの共同研究を新たに開始した。カンガルーゲノムについては、BACライブラリを構築し、末端配列3 X 分、76,500クローンの両末端配列を決定してコンソーシアムに提供した。カンガルー精巣ライブラリについては8万クローンの配列決定とクラスタリングを行い、内部配列解読も進めた。豊田班員は藤山班員と協力し、オランウータンゲノムからセルソーターで単離したヒト21番染色体に相当する染色体DNAを材料に用いて、新しいDNAシーケンシングシステムであるGS20による配列決定を行った。その結果、325,035リードのうち約70%がヒト21番染色体にマッピング（リピート配列のみを含むものが約10%）され、平均identityは96.3%であった。この試料から染色体特異的 fosmid ライブラリを構築した。

シクリッドの生殖前隔離の一因と考えられる体表模様の多様化に新たに着目し、領域1近藤班員と共同でゼブラフィッシュ模様変異体の解析を行った。色素細胞の発生は正常だが、そのパターンニングにのみ異常が見られる変異体として知られるレパードとジャガーの原因遺伝子の特定を行い、論文発表した。次に、これら変異体の原因遺伝子として得られたコネキシン及びカリウムイオンチャンネルに関して、シクリッドホモログの解析を行った結果、コネキシン遺伝子に関してはシク

リッド系統内で高度に保存されていることが明らかとなった。一方、カリウムチャンネル遺伝子はシクリッドの系統特異的に遺伝子重複を起こし、遺伝子配列並びに遺伝子発現の解析からこれら2つの遺伝子は機能分化が進んでいることが予測された。これまでの解析から、シクリッドの多様化に遺伝子重複が大きくかかわっている可能性を示唆する結果を得た。

2007年度に開始したB02斎藤班、植田班、那波班、黒木班との共同研究では、ヒト19番染色体長腕テロメア領域2Mbを対照領域とし、まずチンパンジーゲノムについて相同領域のクローン地図作成、ゴリラゲノムテロメア領域の比較研究を進め、チンパンジーについては、ヒト19番長腕サブテロメア領域近傍のクローン地図を完成した。一方、ゴリラ全ゲノム fosmid ライブラリから、サブテロメア領域由来のクローンを単離し、染色体上へマッピングしたところ、複数の染色体のサブテロメア領域に相同性を示すクローンが得られたため、これらのクローンの塩基配列決定を進めている。また、前年度から進めているヒトオランウータンY染色体の比較クローン地図の高精度化と高被覆度化を目標に、finger printing によるクローンの整列化とゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。新たにオランウータンY染色体特異的 fosmid ライブラリを作成し、これまでに、オランウータンY染色体の長腕と短腕、それぞれのサブテロメア候補クローンが得られている。次世代シーケンサを用いたパーソナルゲノム解析に向けた技術開発を目指し、ヒト21番染色体とY染色体の塩基配列決定を行った。リンパ芽球様細胞株GM130Bからセルソーターを用いて21番染色体（約350万本）を単離し、Genome AnalyzerIIを使用して決定した配列データ（約9224万リード）をヒト標準配列にマッピングするとともにアセンブリにより作成されたコンティグ配列との比較を行った結果、平均重複度33.8xで約36,600カ所のSNPを同定できた。

Development of basal technologies toward Personal Genome Analysis



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① The International Silkworm Genome Consortium: The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(12; Special Issue on the Silkworm Genome), 1036-1045 (2008)、査読有
- ② Stefan A. Rensing, Daniel Lang, Andreas D. Zimmer, Astrid Terry, Asaf Salamov, Harris Shapiro, Tomoaki Nishiyama, Pierre-François Perroud, Erika Lindquist, Yasuko Kamisugi, Takako Tanahashi, Keiko Sakakibara, Tomomichi Fujita, Kazuko Oishi, Tadasu Shin-I, Yoko Kuroki, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Shin-ichi Hashimoto, Kazuo Yamaguchi, Sumio Sugano, Yuji Kohara, Asao Fujiyama et al.: The genome of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 64-69 (2008)、査読有
- ③ Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu JK, Benito-Gutiérrez EL, Dubchak I, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-I T, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PW, Satoh N, Rokhsar DS. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064-1071 (2008)、査読有
- ④ Masahiro Kasahara, Kiyoshi Naruse, Shin Sasaki, Yoichiro Nakatani, Wei Qu, Budrul Ahsan, Tomoyuki Yamada, Yukinobu Nagayasu, Koichiro Doi, Yasuhiro Kasai, Tomoko Jindo, Daisuke Kobayashi, Atsuko Shimada, Atsushi Toyoda, Yoko Kuroki, Asao Fujiyama, Takashi Sasaki, Atsushi Shimizu, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Shin-ichi Hashimoto, Jun Yang, Yongjun Lee, Kouji Matsushima, Sumio Sugano, Mitsuru Sakaizumi, Takanori Narita, Kazuko Ohishi, Shinobu Haga, Fumiko Ohta, Hisayo Nomoto, Keiko Nogata, Tomomi Morishita, Tomoko Endo, Tadasu Shin-I, Hiroyuki Takeda,

Shinichi Morishita & Yuji Kohara: The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution (2007) *Nature* 447, 714-719.、査読有

- ⑤ Yoko Kuroki, Atsushi Toyoda, Hideki Noguchi, Todd D. Taylor, Takehiko Itoh, Dae-Soo Kim, Dae-Won Kim, Sang-Haeng Choi, Il-Chul Kim, Han Ho Choi, Yong Sung Kim, Yoko Satta, Naruya Saitou, Tomoyuki Yamada, Shinichi Morishita, Masahira Hattori, Yoshiyuki Sakaki, Hong-Seog Park and Asao Fujiyama: Comparative analysis of chimpanzee and human Y chromosomes unveils complex evolutionary pathway. (2006) *Nature Genetics* 38, 158-167.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 藤山 秋佐夫: ヒトとチンパンジーの個人ゲノム解読、生物多様性国際会議「霊長類のゲノム多様性研究」、京都大学霊長類研究所主催(2010年3月4~6日、犬山国際観光センター、犬山市)
- ② 藤山 秋佐夫: 超大規模配列決定がもたらす生命研究へのインパクト、日本分子生物学会春期シンポジウム (2009年5月12日、宮崎国際会議場、宮崎市)
- ③ 藤山 秋佐夫: 超大規模シーケンシングが開く新しい生物学への扉、イルミナGAセミナー (2009年7月7日、東京フォーラム、東京都)
- ④ 藤山 秋佐夫: 次世代シーケンサによるゲノム解読、日本人類遺伝学会第54回大会 (2009年9月25日、グランドプリンスホテル高輪、東京都)
- ⑤ 藤山 秋佐夫、豊田 敦、黒木 陽子: 次世代シーケンシングがもたらす比較ゲノム研究の進展、第32回日本分子生物学会 (2009年12月10日、横浜国際会議場、横浜市)
- ⑥ 藤山 秋佐夫: 超高速シーケンシングが拓く個人ゲノム解読の時代、日本臨床化学会北海道支部総会 (2009年12月19日、札幌市)
- ⑦ 藤山 秋佐夫: 超並列型シーケンサが与えるインパクト・日本分子生物学会年会シンポジウム・神戸国際会議場・神戸市・2008年12月11日
- ⑧ 藤山 秋佐夫: ゲノムが教えてくれる生物のすがた・日本分子生物学会春期シンポジウム市民講演会・慶應婦ラサホテル札幌・札幌市・2008年5月25日
- ⑨ 藤山 秋佐夫: ヒトとチンパンジーの比較ゲノム研究から見えること・第27回日本医学会総会・大阪国際会議場・大阪市・2007年4月6日

- ⑩ 藤山 秋佐夫・日本分子生物学会 2006 フォーラム(2006年12月、名古屋国際会議場、名古屋市)

[図書] (計14件)

- ① 黒木 陽子、藤山 秋佐夫: ヒトとチンパンジーの比較からゲノム機能を解明する (特集 ゲノム機能の進化) (2009) 実験医学、27、3087-3092、羊土社
- ② 黒木 陽子、藤山 秋佐夫 (分担執筆): 第21章 ゲノムと遺伝子解析「医学のための細胞生物学、永田 和弘、塩田 浩平編」(2009)、南山堂
- ③ 藤山 秋佐夫 (分担執筆): 霊長類がわかる、「研究をささえるモデル生物—実験室いきものガイド」、pp14-21、(2009)、化学同人
- ④ 小原 雄治、藤山 秋佐夫: DNAシーケンシング、特集「国立遺伝学研究所60年の歩みを映して」、(2009) 遺伝 63、97-105
- ⑤ 豊田 敦、藤山 秋佐夫: ゲノム再配列決定をいかに行うか (特集 次世代高速シーケンサーの応用と情報解析) (2009) 蛋白質核酸酵素、54、1271-1275
- ⑥ 豊田 敦、藤山 秋佐夫: 次世代シーケンサーによるゲノム解読と今後の動向、実験医学増刊「疾患遺伝子の探索と超高速シーケンサーパーソナルゲノム時代の疾患解明と治療戦略、辻省次編」(2009) 実験医学 27、1929-1935
- ⑦ 黒木 陽子、野口 英樹、豊田 敦、藤山 秋佐夫: ヒトと霊長類の比較ゲノム: 近縁種との比較から見るヒトゲノムの特徴、(2007) 細胞工学別冊 (比較ゲノム学から読み解く生命システム、監修 藤山 秋佐夫)、秀潤社、pp43-49
- ⑧ 黒木 陽子、藤山 秋佐夫: ヒトーチンパンジーY染色体の常染色体よりも早い進化 male-driven evolutionの可能性、(2007) 遺伝 別冊No20、138-143 裳華房
- ⑨ 渡邊 日出海、藤山 秋佐夫: ヒトへの進化のゲノム基盤、ヒト・霊長類の比較ゲノム解析、(2007) 実験医学 25、226-231
- ⑩ 藤山 秋佐夫: 生命の秘密に挑戦するゲノムインフォマティクス~人間とチンパンジーの違いを読み解く、(2006) 情報通信ジャーナル 24、30-31
- ⑪ 藤山 秋佐夫: 霊長類の比較ゲノム学、(2006) 実験動物ニュース 55、25-28
- ⑫ 藤山 秋佐夫、根岸 正光、高野 明彦、安達 淳: バイオ・情報の最前線 (2005) 丸善ライブラリー371
- ⑬ 黒木 陽子、野口 英樹、豊田 敦、藤山 秋佐夫: ヒトゲノム配列決定の内容と意義、ヒトとチンパンジーの比較ゲノ

ム、(2005) 蛋白質核酸酵素 50、2072-2077.

- ⑭ 黒木 陽子、野口 英樹、豊田 敦、藤山 秋佐夫: ヒトと霊長類の比較ゲノム: 近縁種との比較から見るヒトゲノムの特徴、(2005) 細胞工学 24、978-983

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome-sci.jp/>

<http://www.bioportal.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 秋佐夫 (FUJIYAMA ASAO)

国立情報学研究所・情報学プリンシプル研究系・教授

研究者番号: 60142311

(2) 研究分担者

黒木 陽子 (KUROKI YOKO)

理化学研究所・基幹研究所・研究員

研究者番号: 10344037

豊田 敦 (TOYODA ATSUSHI)

国立遺伝学研究所・生物遺伝資源情報総合センター・特任准教授

研究者番号: 10267495

渡邊 正勝 (WATANABE MASAKATSU)

東京工業大学大学院・生命理工学研究科・助教

研究者番号: 90323807

二階堂 真人 (NIKAIDOU MASATO)

東京工業大学大学院・生命理工学研究科・助教

研究者番号: 70432010

(3) 連携研究者

該当なし