

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06441

研究課題名(和文) アンデス高地集団の低圧低酸素環境への遺伝的・生理的適応に関する包括的研究

研究課題名(英文) A comprehensive study of genetic and physiological adaptation mechanisms to hypobaric hypoxia in Andean highlanders

研究代表者

安河内 彦輝 (YASUKOCHI, Yoshiki)

三重大学・地域イノベーション推進機構・助教

研究者番号：60624525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ボリビア集団の高地適応に寄与する遺伝的要因を探索した。同集団99名を対象に4座位のEGLN1ハプロタイプを推定し、その頻度とヘモグロビン(Hb)濃度との間に正の相関関係を見出した。また、TGCGモチーフを持つハプロタイプの頻度が、南米高地集団で急増したことが示唆された。次に、ボリビア高地集団25名の全ゲノム塩基配列とデータベースのその他民族集団342個体の全ゲノム配列データを用いて、正の自然選択の痕跡を探索した。その結果、7座位のゲノム領域を同定した。転写因子やヒストン修飾の作用をデータベースで推定した結果、TGFA遺伝子の転写調節がボリビア集団の高地適応に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、循環系機能の調節に関係する遺伝子群が、アンデス南米集団の高地適応に寄与してきた可能性が示された。今まで未解明であった南米高地集団の高地適応に関する分子機序の一端を明らかにした点で、この研究成果は学術的意義があるといえる。また、高いHb濃度に関する遺伝的要因を明らかにすることは、赤血球増多症などの慢性高山病に対する創薬標的遺伝子同定の一助となる。したがって、本研究成果は循環系疾患等の治療にも貢献し得る点で、社会的意義があるといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored genetic factors contributed to high-altitude adaptation in Bolivian highlanders. After genotypes of four EGLN1 genetic polymorphisms in 99 Bolivian highlanders were determined, we estimated the EGLN1 haplotypes and examined the association with hemoglobin (Hb) levels. The analysis exhibited the significant association between the haplotype frequencies and Hb levels. Our finding indicates that frequencies of haplotype with TGCG motif may have expanded in Andean highlanders. Next, a genome-wide scan was carried out to find signals of positive natural selection, using whole-genome sequence datasets of 25 Bolivians from this study and 432 individuals in other ethnic groups from databases, identifying seven genomic regions. Information on binding sites of transcription factors and histone modification in databases suggested that the regulation of TGFA gene expression may have contributed to high-altitude adaptation in Bolivians.

研究分野：分子進化学

キーワード：高地適応 EGLN1 低圧低酸素 自然選択 ボリビア アンデス

1. 研究開始当初の背景

高地に定住する人類集団のうち、主にエチオピア・チベット・アンデス集団(図1左)を対象に、高地という低圧低酸素条件に適応的な遺伝・生理要因の探索が進められてきた。アンデス高地定住集団においては、血中ヘモグロビン(Hb)濃度がその他の高地集団に比べて高く(Beall 2006)、酸素運搬能の向上を図ることで低圧低酸素環境に適応してきたと考えられている。その一方で、研究代表者らが南米ボリビア(アンデス)集団 103 検体(平均年齢 25 歳、男性 52 名・女性 51 名)の Hb 濃度を測定したところ、基準値を上回る Hb 濃度を示す個体は観察されなかった(図1右)。測定は近赤外分光画像計測法で行っているため、Hb 濃度は推定値ではある。しかし、アンデス集団の高地適応に関わる遺伝・生理要因には議論の余地があった。

研究代表者は上述した南米ボリビア集団の生理データだけでなく、ゲノム DNA 試料も取得していた。そしてすでに 10 検体の全ゲノム塩基配列を決定していたため、それらと合わせて最終的に 25 検体の全ゲノム塩基配列を決定することを目標とした。しかし予算の関係上、全ゲノム塩基配列を決定するまでに時間を要した。そこで、103 検体の *EGLN1* 遺伝子多型と生理データとの関連を調査することにした。その理由として、日本人やチベット高地集団の *EGLN1* 遺伝子多型が低圧低酸素環境下の血液学的形質と関連を示すこと(Xiang et al. 2013; Yasukochi et al. 2018)、アンデス高地集団で Hb 濃度と *EGLN1* 遺伝子多型との間に関連がなかったとする報告はあるが(Bigham et al. 2013) 解析する座位をさらに検討する余地があったことからである。

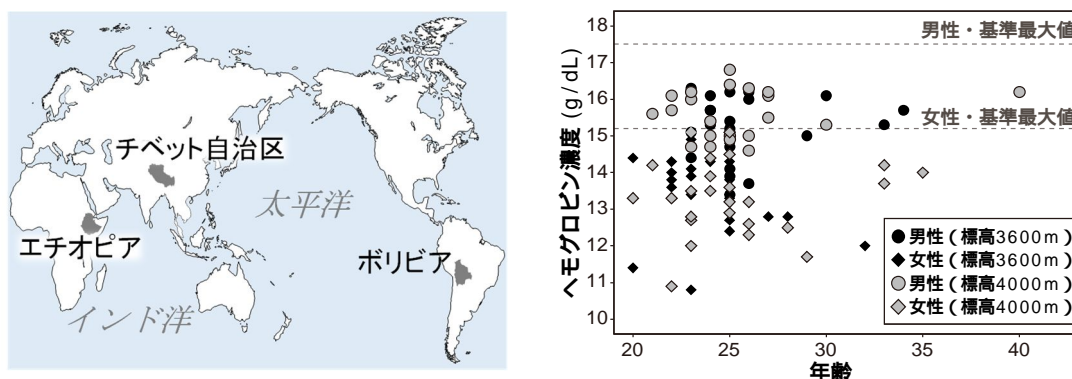


図1. アンデス(ボリビア)・チベット・エチオピア高地定住集団の地理的な位置(左)とボリビア高地定住集団 103 検体のヘモグロビン(Hb)濃度と年齢の散布図(右)

点線は、Hb 濃度基準値の最大値(男性 17.5 g/dL, 女性 15.3 g/dL; Marks & Glader 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、「アンデス高地集団の低圧低酸素環境への適応に寄与する遺伝的・生理的特性を包括的に理解する」ことを目的とした。チベット高地集団の高地適応形質に寄与する遺伝要因に関して、全ゲノムレベルで探索が行われるようになった。しかし一方で、アンデス高地集団を対象にした研究はほとんど進んでいなかった。そこで、過去に取得した南米ボリビア集団のゲノム DNA 試料と生理データを用いて、(1) 全検体の *EGLN1* 遺伝子多型と生理データとの関連解析、および(2) 25 検体の全ゲノム塩基配列を用いた自然選択シグナルの探索を行った。

3. 研究の方法

(1) *EGLN1* 遺伝子多型と生理データの関連解析

平成 28 年度(11 月末~12 月初旬)に、ボリビア共和国首都ラパスのサン・アンドレス大学(標高約 3600m)とエル・アルト大学(標高約 4000m)の協力のもと、現地大学生 103 名の生理データおよびゲノム DNA 試料を得ている。生理データは身体諸測定値や Hb 濃度、SpO₂、心拍数、血圧、血管幅、静脈画像、皮膚温、血流など多岐にわたる。これらの資料を用いて、*EGLN1* 遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)と生理データとの関連を調べた。

長さ約 81-kb の *EGLN1* 遺伝子を含むゲノム領域の SNP を網羅できるように、Haploview ver 4.2 を用いて 5 座位のタグ SNP(rs2486740, rs508618, rs12097901, rs186996510, rs1769792)を選定した。このうち、rs12097901 と rs186996510 はチベット高地集団で、rs1769792 はアンデス(ペルー)集団でそれぞれ正の自然選択の作用が示唆された座位である(Xiang et al. 2013; Lorenzo et al. 2014; Bigham & Lee 2014)。これらの SNP に対して、PCR-直接塩基配列決定法もしくは TaqMan 法による SNP genotyping assay を実施した。

SNP と生理データとの関連は、まず遺伝相加モデルと優性モデルにおいてそれぞれ線形回帰

とウェルチの t 検定を行った。統計学有意水準は 0.0125 (0.05/4 SNPs) とした。その後、有意な関連を示した SNP に対して、年齢、性別、標高で調整した一般化線形モデル (GLM) により統計学的有意性を評価した。また、IMPUTE2 ver2.3.2 を用いてそれら 4 座位のハプロタイプを推定した。ハプロタイプと Hb 濃度との相関について、負の二項分布モデルで有意性を検定した。

他の人類集団と比較するため、1000 Genomes Project (1KGP) データベースのペルー (PEL)、コロンビア (CLM)、メキシコ (MXL)、ヨーロッパ (CEU)、日本 (JPT)、アフリカ (YRI) 集団から 300 検体の全ゲノムデータを BAM 形式でダウンロードした。また、NCBI SRA データベースからポリビア集団 42 個体の全ゲノムショートリードデータを、Trimmomatic-BWA-SAMtools-Picard-GATK のパイプラインで処理し、BAM 形式データセットを生成した。これらのデータを用いて、長さ約 436.3-kb の *EGLN1* ゲノム領域に含まれる SNP の対立遺伝子 (アレル) 頻度を、ANGSD ver.0.929 により算出した。さらに、PBS (Population branch statistics: Yi et al., 2010) の改良法 (Crawford et al. 2017) により、アンデス高地集団が低地集団と分岐後にアレル頻度が顕著に高くなった領域を探索した。

(2) ポリビア高地集団における正の自然選択の探索

研究協力者である長崎大学 (現九州大学) の西村の支援もあり、ポリビア高地集団 15 個体の全ゲノム塩基配列を HiSeq X Ten もしくは NovaSeq 6000 System (Illumina) で決定し (これらの解析はマクロジェン社に委託) 計 25 個体の全ゲノムデータセットを作成した。その他に、上述した 1KGP の 6 集団 300 個体とポリビア 42 個体の計 342 個体の全ゲノムデータを用いた。ANGSD によりアレル頻度を算出し、この情報をもとに NGSadmix 解析により人類集団間の遺伝的集団構造を比較した。この NGSadmix 解析では、仮想祖先集団のアレル頻度が推定される。この情報を用いて集団間の混血の影響を最小限に抑えた上で、PBS 改良法により全ゲノムレベルで正の自然選択の痕跡を探索した。この PBS 改良法は Python スクリプトを作成して実行した。ヒストン修飾と転写因子の結合サイト予測は、ChIP-Atlas と HACER データベースを用いた。

4. 研究成果

(1) *EGLN1* 遺伝子多型と生理データの関連解析

103 検体のうち、99 検体の *EGLN1* 遺伝子 SNP 5 座位すべての遺伝子型を決定できた。これら 5 座位のうち、rs186996510 はポリビア集団で単型であったため、解析から除外した。この rs186996510 はチベット高地集団特異的な SNP であるため、実験技術的な問題ではないと考えられる。線形回帰またはウェルチの t 検定では、rs508618 と rs1769792 が Hb 濃度と有意な関連を示した ($p = 0.008-0.009$)。このうち、5% 有意水準で rs1769792 は GLM においても有意性が認められた ($p = 0.015$)。先述した通り、この SNP はペルー集団で正の自然選択が作用したことが示唆されており (Bigham & Lee 2014)、Hb 濃度との関連が見られたのは興味深い結果であった。

次に、調査した 4 座位のアレル頻度をもとにハプロタイプを推定した。ポリビア集団のハプロタイプ頻度と Hb 濃度との関係を調べたところ、有意な正の相関を示した (Yasukochi et al. 2020, 図 2 左: $p = 2.0 \times 10^{-7}$)。性別や標高で分割したデータに対しても、5% 有意水準で有意性を示した ($p = 4.2 \times 10^{-4}-0.020$)。アンデス高地集団とは対照的に、チベット集団では rs12097901 と rs186996510 の変異型の頻度と Hb 濃度とで負の相関関係にある (Xiang et al. 2013)。これら相関の正負の違いは、両集団の高地環境に対する適応機構の違いを反映しているのかもしれない。

次に、1KGP データベースの多型データからハプロタイプを生成し、南米低地集団と高地集団 (ポリビアとペルー) で比較した。ポリビア集団で頻度が最も高い TGCG ハプロタイプは Hb 濃度が高く、南米低地集団と分岐後に高地集団で頻度が急増した可能性を示した (図 2 右)。この結果は PBS 改良法においても支持された。

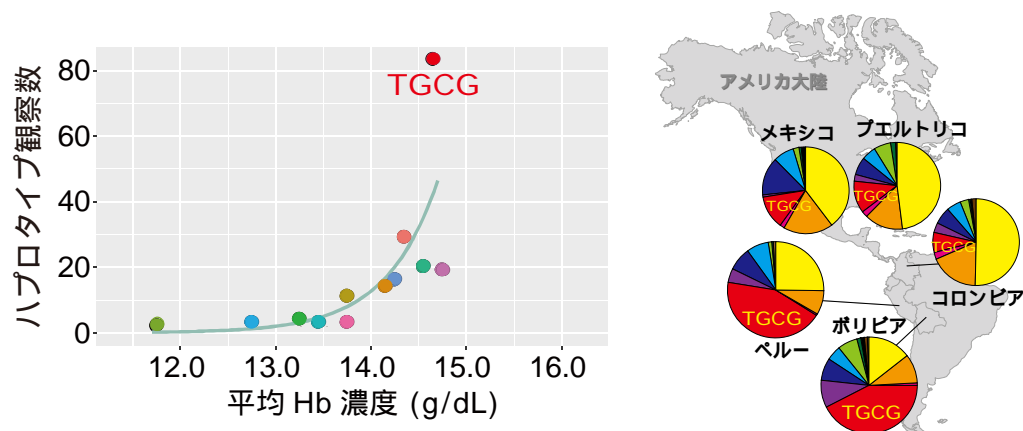


図 2 . ポリビア高地集団の *EGLN1* ハプロタイプ頻度とヘモグロビン (Hb) 濃度の関係 :
 ポリビア集団の *EGLN1* 遺伝子多型 4 座位のハプロタイプ観察数と平均 Hb 濃度 (左) と南米集団の *EGLN1* ハプロタイプ頻度分布 (右)

(2) ポリビア高地集団における正の自然選択の探索

次世代シーケンサーで得たポリビア高地集団 25 検体の全ゲノムデータと 1KGP や NCBI SRA で取得した 342 個体の全ゲノムデータに対して、ANGSD によりクオリティ・コントロールを行った。その結果、約 2230 万座位の多型データセットが生成された。次に、NGSadmix 解析により人類集団間の遺伝的集団構造を比較したところ、ポリビア集団特異的な集団構造が示された。

NGSadmix 解析結果をもとに集団間の混血の影響を最小限にした上で、PBS 改良法により正の自然選択の痕跡を探索した。近隣集団を CLM、外群を CEU として、50 座位ごとにポリビア集団に対する PBS' 値を求めた (図 3)。これら PBS' 値のうち、値が高い順から全体の 0.01% のゲノム領域を正の自然選択が疑われる領域とした。その結果、7 座位のゲノム領域 (2p13.3, 3p12.3, 3q12.1, 9q13, 9q31.2, 16q11.2, 20q11.1) が検出された。これらのうち、9q31.2 のみが *TMEM38B* 遺伝子領域内にあったが、他は遺伝子間領域やノンコーディング RNA、偽遺伝子内に位置した。*TMEM38B* 遺伝子は、先行研究においても PBS' 値が高い領域として報告されている (Crawford et al. 2017)。

その他の領域に対して周辺遺伝子の発現制御に関与していないかを調べるため、ヒストン修飾と転写因子の結合サイト予測を ChIP-Atlas の Peak Browser 解析により行った。その結果、2p13.3 の同定領域には、転写活性に関わるヒストン修飾や転写因子が複数の細胞において結合することが示唆された。さらに HACER データベースの情報によると、この同定領域は *TGFA* 遺伝子の転写活性を促進する可能性があることがわかった。*TGFA* 遺伝子は血管新生などに関係し、低酸素誘導因子 HIF (Hypoxia inducible factor) と相互作用することが報告されている (e.g., Gunaratnam et al. 2003)。さらに詳細な解析が必要ではあるが、アンデス高地集団の高地適応に *TGFA* 遺伝子の転写調節が関与する可能性を示すことができた。

本研究結果から、アンデス高地集団は *EGLN1* や *TGFA* 遺伝子などを介して酸素運搬能を向上させて、循環系の機能を低圧低酸素環境に適合させてきた可能性が示唆された。

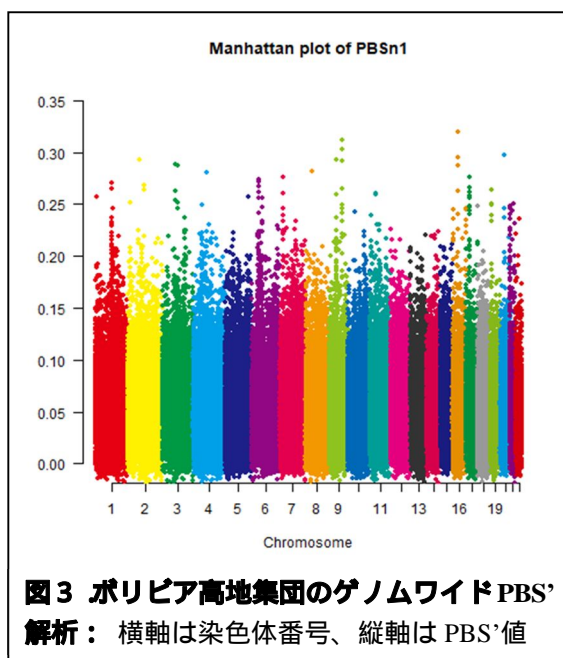


図3 ポリビア高地集団のゲノムワイドPBS'解析：横軸は染色体番号、縦軸はPBS'値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasukochi Yoshiki, Nishimura Takayuki, Ugarte Juan, Ohnishi Mayumi, Nishihara Mika, Alvarez Guillermo, Fukuda Hideki, Mendoza Victor, Aoyagi Kiyoshi	4. 巻 2020
2. 論文標題 Effect of EGLN1 Genetic Polymorphisms on Hemoglobin Concentration in Andean Highlanders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/3436581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishimura Takayuki, Ugarte Juan, Ohnishi Mayumi, Nishihara Mika, Alvarez Guillermo, Yasukochi Yoshiki, Fukuda Hideki, Arima Kazuhiko, Watanuki Shigeki, Mendoza Victor, Aoyagi Kiyoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Individual variations and sex differences in hemodynamics with percutaneous arterial oxygen saturation (SpO2) in young Andean highlanders in Bolivia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Anthropology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40101-020-00240-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda Hideki, Ugarte Juan, Nishimura Takayuki, Yasukochi Yoshiki, Onishi Mayumi, Nishihara Mika, Aoyagi Kiyoshi, Saito Toshiyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Toothache experience among Japanese and Bolivian dental school students	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japan Dental Society of Oriental Medicine	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shin Sora, Yasukochi Yoshiki, Wakabayashi Hitoshi, Maeda Takafumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Effects of acute hypobaric hypoxia on thermoregulatory and circulatory responses during cold air exposure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Anthropology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40101-020-00237-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasukochi Yoshiki, Shin Sora, Wakabayashi Hitoshi, Maeda Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptomic Changes in Young Japanese Males After Exposure to Acute Hypobaric Hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2020.559074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 安河内彦輝, 西村貴孝, 大西真由美, 西原三佳, Juan Ugarte, 福田英輝, 青柳潔
2. 発表標題 ポリビア高地集団におけるEGLN1およびSEN1遺伝子多型と循環系との関連
3. 学会等名 日本生理人類学会第80回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安河内彦輝, Sora Shin, 若林齊, 前田享史
2. 発表標題 急性低圧低酸素曝露に対する唾液由来遺伝子発現変動
3. 学会等名 日本生理人類学会第80回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安河内彦輝, 西村貴孝, 大西真由美, 西原三佳, Juan Ugarte, 福田英輝, 青柳潔
2. 発表標題 アンデス高地集団のEGLN1ハプロタイプがヘモグロビン濃度に与える影響
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Nishimura, Mayumi Ohnishi, Mika Nishihara, Juan Ugarte, Yoshiki Yasukochi, Hideki Fukuda, Shigeki Watanuki, Kiyoshi Aoyagi
2. 発表標題 Individual and sex differences of percutaneous arterial oxygen saturation (SpO ₂) in Bolivian people
3. 学会等名 The 14th International Congress of Physiological Anthropology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sora Shin, Yoshiki Yasukochi, Hitoshi Wakabayashi, Takafumi Maeda
2. 発表標題 Human physiological responses in a mild hypobaric hypoxia cold environment
3. 学会等名 The 14th International Congress of Physiological Anthropology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sora Shin, Yoshiki Yasukochi, Hitoshi Wakabayashi, Takafumi Maeda
2. 発表標題 Effects of lifestyle and body composition on body temperature in a cold environment
3. 学会等名 The 14th International Congress of Physiological Anthropology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村貴孝, 大西真由美, 西原三佳, Juan Ugarte, 安河内彦輝, 福田英輝, 安部恵代, 有馬和彦, 富田義人, 本井碧, 綿貫茂喜, 青柳潔
2. 発表標題 ポリビア高地集団における循環動態の高度差による影響
3. 学会等名 日本生理人類学会第77回大会
4. 発表年 2018年

〔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
連携研究者	西村 貴孝 (NISHIMURA Takayuki) (80713148)	九州大学・芸術工学研究院・講師 (17102)	

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		
ボリビア	Universidad Mayor de San Andres		