

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370101

研究課題名(和文) ヒト特異的形質発現を生じたゲノム変化の実験的検証

研究課題名(英文) Experimental verification of genomic changes which caused human-specific characters

研究代表者

斎藤 成也 (Saitou, Naruya)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授

研究者番号：30192587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：特定のDNA断片をトランスジェニックマウス実験により機能を調べる研究と、ゲノム比較解析研究を行なった。ヒト系統特異的にある非コードDNA配列に正の自然淘汰が生じて新しい機能を獲得したと主張した米国の研究者の報告に対して、Sumiyama & Saitou (2011)はそのDNA配列がなくなってもヒトと同じ表現型が生じることを示して、変化が機能を失うタイプのもので中立進化だった可能性を示した。またBabarinde & Saitou (2013)はゲノム比較から、霊長類特異的に進化的に保存されている非コード領域が、他の哺乳類の系統(齧歯類、食肉類、鯨偶蹄類)よりもずっと多いことを示した。

研究成果の概要(英文)：We used transgenic mice experiment for inferring function of particular DNA fragments as well as comparative genomics. Some USA researchers proposed that positive selection on short non-coding DNA created new human-specific phenotype, while Sumiyama & Saitou (2012) found same phenotype by eliminating that DNA fragment. Therefore, it is possible that phenotype emerged by loss-of-function mutations which were selectively neutral. Babarinde & Saitou (2013) conducted genome comparison and found that primate specific conserved non-coding regions are far more abundant than three other mammalian lineages (rodents, carnivores, and cetariodactyla).

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：分子・遺伝 ホミニゼーション

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀になってから、ヒトゲノムをはじめとして、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、アカゲザルといった霊長類を含むさまざまな哺乳類の完全ゲノム配列決定が進んだ。これによって人類進化研究の基盤が形成された。今後は、これらのゲノム配列データという基盤に立って進化的に興味深いさまざまな問題に挑戦して行くことになる。そのひとつが、哺乳類の共通祖先から霊長類への系統分化、さらに人類への表現型進化のプロセスをゲノムの機能から明らかにする試みである。そのゲノム情報の解析技術と、実験によるその生物学的な機能の解析技術技術的の両方における限界のために、つい最近まではこの問題に取り組むことが容易ではなかった。ところが、従来の限界を打ち破るブレイクスルー技術が今まさに出現してきており、人類進化の解明に大きな成果が期待できる時代がやってきている。その一つは次世代シーケンサー導入によって可能になった大量ChIP-seq(次世代シーケンサーを用いるクロマチン免疫沈降法)であり、もう一つは我々の研究室に在籍していた隅山健太助教(2013年10月より理化学研究所QBICのユニットリーダーに移籍、遺伝研では客員研究員)が中心となって独自に開発したハイスループットの *in vivo* ゲノム配列機能解析法(Sumiyama et al. 2010; *Genomics*)である。これらの技術を組み合わせた人類進化研究は、世界的にこれからの主流になり激しい国際的競争になると予想される。

人類学では、人類特有の形態の進化と遺伝的な進化(ゲノムの進化)との関係を明らかにすることは大変重要なテーマである。ところが、形態学と遺伝学とはそれぞれ発展してきたものの、両者を因果関係からつなぐ研究はその困難さから、ほとんど進んでいない。ゲノムのどこがどのように変化したために、人類特有の形態が進化したのかの理解はほとんど手つかずにとどまっている。形態の進化を促したゲノムの変化が実際にどこに起きているかについて、主要な発生関連遺伝子は哺乳類間で高度に保存しているため、種間の形態の差はタンパクをコードする遺伝子そのものの進化よりも、むしろその遺伝子をどのように使うのか、すなわち遺伝子発現の組織特異性や時間特異性、発現量の多寡の制御の進化によるのではないかという議論が以前からなされてきた(King & Wilson, 1975など)。主に調節遺伝子あるいは調節メカニズムの進化が形態的な差異を形成するのだろうと予想されている。ゲノムが解読される時代となり、タンパク質をコードする遺伝子領域以外の非コード領域に遺伝子の発現調節機能が数多く存在することが、解析の結果明らかになった。現在は調節領域が人類進化の原因として研究対象になる時代となっている。本研究では、進化的保存度を指標とした霊長類およびヒト特異的調節領域候補データベースとともに、ChIP-seqデータによる新たなヒト特異的調節領域候補データベースを組み合わせ、トランスジェニックマウ

スによる *in vivo* 実験解析を行うことによって、ヒト特異的な適応進化に係る可能性があるゲノム領域を特定する。ChIP-seqデータを解析するだけでは他の研究と似通っているが、我々独自の *in vivo* 実験系を組み合わせることにより、他のグループとの競争において非常に有利になると考えている。さらに近傍遺伝子機能との照合により、ゲノム配列の変化と形態の進化を関連づけられる例をヒトの進化に至る過程で発見することが目標である。

人類学分野において遺伝的変異と表現型をつなぐ実験として、トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 系を使った例はまだ少ない。本研究は新しいゲノム情報解析と独自のトランスジェニックマウス解析を組み合わせている点で非常に特色のある人類進化の研究である。

## 2. 研究の目的

ヒトとチンパンジーの共通祖先からヒトの系統が分かれた後に、ゲノム全体で1800万個前後の塩基置換が蓄積したと推定されているが、これらのどこかにヒト特異的な形質を生じたゲノム変化がある。これらの形質が正の自然淘汰によって生じたという仮定のもとに、ヒト特異的加速進化領域が抽出され、それらの中には実際にヒト特異的形質を生じたと主張された変化がある。しかしゲノム進化の大部分は自然淘汰を受けない中立進化なので、人類進化においても同様であるはずである。そこで、ヒト特異的な形質を生じている可能性のあるゲノム領域を最近開発された新手法で抽出し、それらについてトランスジェニックマウスを用いた実験で検証を行なう。

## 3. 研究の方法

本研究の計画は大きく二つに分類される。一つはヒトゲノム配列情報および他の哺乳類ゲノム情報を用いた、パイオインフォマティクス解析による調節領域におけるヒト特異性の探索である。もう一つは、ゲノム解析により抽出されたヒト特異的進化を遂げた調節領域候補について、哺乳類の発生過程において *in vivo* 機能解析を行うことである。具体的にはヒト特異的な調節領域進化が、形態形成遺伝子の発現量や発現領域の変化(ヘテロトピー)あるいは時間的变化(ヘテロクロニー)を起こすかどうかを検証する。このような変化は生物の形態進化に大きな影響を及ぼす可能性があるとしてされており、このようなヒト特異的あるいは霊長類特異的变化を発見することが目的である。

## 4. 研究成果

本研究は、教授の齋藤成也と助教(2013年10月より理化学研究所QBICのユニットリーダーに移籍、遺伝研では客員研究員)の隅山健太がそれぞれほぼ独立して進めてきたも

のである。2013年度には、齋藤成也は、指導している Isaac Babarinde を筆頭著者とする論文 "Heterogeneous tempo and mode of conserved noncoding sequence evolution among four mammalian orders" を *Genome Biology and Evolution* に発表した(論文1)。本論文では、哺乳類の中の4目(霊長目、齧歯目、肉食目、鯨偶蹄目)についてそれぞれ3種以上のゲノム配列を大規模比較し、各目に特有の、非コード領域で進化的に保存されている塩基配列(CNS)を抽出した。その結果、霊長目でもっとも多くCNSが発見され、齧歯類でもっともCNSが少なかった。このことは、霊長類で脳が大きく発達したと関連があるかもしれない。また、本研究にも関係する書籍として、齋藤は単著 "Introduction to Evolutionary Genomics" を Springer から2014年2月に刊行した。

2013年度には、隅山健太は、米国の研究グループが中心となって進めたシーラカンスゲノムの決定と解析計画にかかわり、2013年の *Nature* 誌に発表された論文(論文2)の共著者となった。特に四肢の発達にかかわる非コード領域の同定に関係した。隅山はまた京都大学の松田らのグループとの共同研究を進めて、*Journal of Neuroscience* に "GDNF and Endothelin 3 regulate migration of enteric neural crest-derived cells via protein kinase A and Rac1" という論文を発表した(論文3)。また、東京工業大学の岡田らのグループとの共同研究をおこない、*PLoS ONE* 誌に "A SINE-derived element constitutes a unique modular enhancer for mammalian diencephalic Fgf8" という論文を発表した(論文4)。

2012年度に齋藤成也が担当した研究としては、比較ゲノム解析として以下のふたつを行なった。(1)哺乳類のなかで、ヒトが属する霊長類と齧歯類のゲノムをそれぞれ2種ずつ比較し、系統特異的に高度に保存されている非コード領域を多数発見した。それらの周辺に位置するタンパク質コード遺伝子は系統ごとに異なっており、またそれらの機能は、肉眼形態を発生により生じるのにかかわる転写因子が多かった。この成果は Takahashi & Saitou (2012; *Genome Biology and Evolution*) に発表した(論文5)。(2)ヒトが属する脊椎動物の共通祖先で生じたと考えられている2回のゲノム重複により生じた非コード領域の重複領域がオーソログとして全脊椎動物で保存されており、しかもパラログ間でも保存されているものを大規模ゲノム解析により309個を見いだした。その1/3は脳での遺伝子発現調節にかかわっていた。この成果は Matsunami & Saitou (2013; *Genome Biology and Evolution*) に発表した(論文6)。

2012年度に隅山が担当したトランスジェニック実験としては、哺乳類特有の遺伝子間領域保存配列として、SINE由来の配列につい

て機能解析を行った。この結果、前脳での *fgf8* 遺伝子発現制御に関与する因子であることがわかり、詳細な機能解析を行ない、論文4の内容に貢献した。また、有胎盤類の特徴的な機能の一つである胎盤発生に関与する *Hoxa13* 遺伝子の制御配列が保存配列としてシーラカンスにも見いだされることを発見しその祖先機能の解析を進めた。この研究成果は論文2の内容に繁栄されている。このほか、隅山は共著者として、本研究に関連する論文7と論文8を発表した。

2011年度には、特定のDNA断片をトランスジェニックマウス実験により機能を調べる研究と、ゲノム比較解析研究を行なった。ヒト系統特異的にある非コードDNA配列に正の自然淘汰が生じて新しい機能を獲得したと主張した米国の研究者の報告に対して、Sumiyama & Saitou (2011) はそのDNA配列がなくなってもヒトと同じ表現型が生じることを示して、変化が機能を失うタイプのもので中立進化だった可能性を示した(論文9)。また齋藤は本研究に関連するものとして論文10を、隅山は本研究に関連するものとして論文11を発表した。

## 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11件)すべて査読有

Babarinde I. and Saitou N. (2013) Heterogeneous tempo and mode of conserved noncoding sequence evolution among four mammalian orders. *Genome Biology and Evolution*, vol. 5, pp. 2330-2343.

Amemiya C. T., Alföldi J., Lee A. P., Fan S., Philippe H., Maccallum I., Braasch I., Manousaki T., Schneider I., Rohner N., Organ C., Chalopin D., Smith J. J., Robinson M., Dorrington R. A., Gerdol M., Aken B., Biscotti M. A., Barucca M., Baurain D., Berlin A. M., Blatch G. L., Buonocore F., Burmester T., Campbell M. S., Canapa A., Cannon J. P., Christoffels A., De Moro G., Edkins A. L., Fan L., Fausto A. M., Feiner N., Forconi M., Gamielien J., Gnerre S., Gnirke A., Goldstone J. V., Haerty W., Hahn M. E., Hesse U., Hoffmann S., Johnson J., Karchner S. I., Kuraku S., Lara M., Levin J. Z., Litman G. W., Mauceli E., Miyake T., Mueller M. G., Nelson D. R., Nitsche A., Olmo E., Ota T., Pallavicini A., Panji S., Picone B., Ponting C. P., Prohaska S. J., Przybylski D., Saha N. R., Ravi V., Ribeiro F. J., Sauka Spengler T., Scapigliati G., Searle S. M., Sharpe T., Simakov O., Stadler P. F., Stegeman J. J., Sumiyama K., Tabbaa D., Tafer H., Turner-Maier J., van Heusden P., White S., Williams L., Yandell M., Brinkmann H.,

Volff J. N., Tabin C. J., Shubin N., Scharl M., Jaffe D. B., Postlethwait J. H., Venkatesh B., Di Palma F., Lander E. S., Meyer A., Lindblad-Toh K. (2013) The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature*, vol. 496, pp. 311-316.

Goto A., Sumiyama K., Kamioka Y., Nakasyo E., Ito K., Iwasaki M., Enomoto H., and Matsuda M. (2013) GDNF and endothelin 3 regulate migration of enteric neur crest-derived cells via protein kinase A and Rac1. *Journal of Neuroscience*, vol. 33, pp. 4901-4912.

Nakanishi A., Kobayashi N., Suzuki-Hirano A., Nishihara H., Sasaki T., Hirakawa M., Sumiyama K., Shimogori T., and Okada N. (2013) A SINE-derived element constitutes a unique modular enhancer for mammalian diencephalic Fgf8. *PLOS ONE*, vol. 7, no. 8, e43785. DOI: 10.1371

Matsunami M. and Saitou N. (2013) Vertebrate paralogous conserved non-coding sequences may be related to gene expressions in brain. *Genome Biology and Evolution*, vol. 5, pp. 140-150.

Takahashi M. and Saitou N. (2012) Identification and characterization of lineage-specific highly conserved noncoding sequences in mammalian genomes. *Genome Biology and Evolution*, vol. 4, pp. 641-657.

Sumiyama K., Miyake T., Grimwood J., Stuart A., Dickson M., Schmutz J., Ruddle F. H., Myers R. M., and Amemiya C. T. (2012) Theria-specific homeodomain and cis-regulatory element evolution of the Dlx3-4 bigene cluster in 12 different mammalian species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, vol. 318, no. 8, pp. 639-650.

Kamioka Y., Sumiyama K., Mizuno R., Sakai Y., Hirata E., Kiyokawa E., and Matsuda M., co-first authors. (2012) Live Imaging of Protein Kinase Activities in Transgenic Mice Expressing FRET Biosensors. *Cell Structure and Function*, vol.37, no.1, pp.65-73.

Sumiyama K. and Saitou N. (2011) Loss-of-function mutation in a repressor module of human-specifically activated

enhancer HACNS1. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, pp. 3005-3007.

Suzuki R. and Saitou N. (2011) Exploration for functional nucleotide sequence candidates within coding regions of mammalian genes. *DNA Research*, vol. 18, no. 3, pp. 177-183.

Tashiro K., Teissier A., Kobayashi N., Nakanishi A., Sasaki T., Yan K., Tarabykin V., Vigier L., Sumiyama K., Hirakawa M., Nishihara H., Pierani A., and Okada N. (2011) A Mammalian Conserved Element Derived from SINE Displays Enhancer Properties Recapitulating Satb2 Expression in Early-Born Callosal Projection Neurons. *PLOS ONE*, vol. 6, no. 12, e28497.

〔学会発表〕(計4件)

中立進化してきたホモ・サピエンス [招待有り] 齋藤成也 日本環境変異原学会 第42回大会 2013年11月29日 岡山コンベンションセンター

Neutral mutations and purifying selection dominate genome evolution [招待有り] Saitou N. Commemorative Symposium for the 29th International Prize for Biology 2013年11月22日 九州大学馬出キャンパス医学部百年講堂 大ホール

霊長類レベルと現代人レベルの人類ゲノム学研究的紹介・齋藤成也・第67回日本人類学会大会 2013年11月1日 国立科学博物館 上野本館

人類進化におけるゲノム非コード領域転写調節機能進化解析の試み・隅山 健太、齋藤 成也・第66回日本人類学会大会 2012年11月2日 慶應義塾大学 日吉キャンパス

〔図書〕(計1件)

Saitou N. (2014) *Introduction to Evolutionary Genomics*. Springer. 475頁

〔産業財産権〕出願状況(計0件)

〔その他〕(計5件)

ENCODE 計画論文の問題点・齋藤成也 生物の科学 遺伝 67(3) 275-278 2013年

遺伝子図鑑 齋藤成也他編集 悠書館・東京 2013年 272頁

生物学辞典 第5版 巖佐庸, 倉谷滋, 齋藤成也, 塚谷裕一編 岩波書店 2013年 2192頁

進化学事典 (日本進化学会編) 隅山健太 (担当:分担執筆, 範囲:17-3 転写と翻訳調節) 共立出版 2012年 996頁 (549-551)

< series モデル動物利用マニュアル >  
生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール . 隅山健太、川上浩一 (担当:分担執筆, 範囲:第6節 新しい生殖工学技術 第4項 トランスポゾンを使った 新しい高効率トランスジェニックマウス作製法)  
エル・アイ・シー 2011年 674頁(656-658)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斎藤 成也 (Saitou Naruya)  
国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授  
研究者番号: 30192587

### (2) 研究分担者

隅山 健太 (Sumiyama Kenta)  
国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・客員研究員  
研究者番号: 00370114