

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590383

研究課題名(和文) チンパンジーとヒトのFOXP2転写因子の脳内標的の異同の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of target genes for the language-related human and chimpanzee FOXP2

研究代表者

及川 恒之(OIKAWA, TSUNEYUKI)

北海道医療大学・心理科学部・教授

研究者番号：80150241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：FOXP2遺伝子は転写因子をコードしており、その機能は言語に関わる非常に興味深い遺伝子である。FOXP2の標的遺伝子を単離するため、FOXP2 transgene細胞を作成しマイクロアレイ法で検出した。この網羅的スクリーニングにより、多数抽出された。

今回は、2way ANOVA解析により、ヒトFOXP2で2個、FOXP2 isoformで31個、chimp FOXP2で6個の遺伝子が変化したところまで、候補を絞った。次に神経芽細胞腫由来Tg FOXP2の細胞を作製し、再現性を解析した。両者の細胞で発現促進された遺伝子群が数個が認められ、グリア細胞由来やマトリックス形成に関するものであった。

研究成果の概要(英文)：Mutations of the FOXP2 gene have been reported in families of specific language impairment in human. Two amino acid changes occurred in the FOXP2 genes during evolution from primate lineages to human being. Thus, the FOXP2 have been focused as an attractive gene to elucidate molecular mechanisms of language development.

We have previously performed a screening to isolate the associated genes with FOXP2 over exogenous expression in hek293 cell, using micro array techniques.

We performed again statistical comparisons for the data using 2way ANOVA. In this screening, positive genes were only 2 genes affected by Tg Human FOXP2, 31 genes by Tg Human FOXP2 isoform, and 6 genes by Tg chimpanzee FOXP2. The neuroblastoma cell lines with each randomly stable integrated Tg FOXP2 were generated. The common feature of the gene expression affected exogenous Tg in both hek293 and neuroblastoma cell were observed in several genes. These genes were associated with extracellular matrix and glia cell.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：言語関連遺伝子 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

・FOXP2 遺伝子は転写因子をコードしており、その機能は言語に関わる非常に興味深い遺伝子である。この遺伝子の突然変異はヒトでは特異的言語障害を起こすことが知られている。また、ヒトとチンパンジーとは2つのアミノ酸の違いしかない。このアミノ酸の違いがヒトで言語が発達した理由の一つとも推測される。我々は過去に言語を分子遺伝学的に解析するために、ヒト FOXP2 とチンパンジーFOXP2 の標的遺伝子の単離を試みた。ヒト FOXP2、ヒト FOXP2 isoform とチンパンジーの FOXP2 発現ベクターを作成し、別々に細胞内にトランスフェクトさせ、遺伝子導入細胞における全遺伝子の発現変化を検索した。解析する細胞の挿入染色体部位・発現時期などを厳密にそろえるために、フリップインリコンビナーゼ法および Tet ON OFF システムを用いた。テトラサイクリン添加による外部 FOXP2 遺伝子発現誘導の有無下で hek293 細胞の全 RNA サンプルを抽出し、全 RNA の発現の増減をマイクロアレイ法で検出した。その結果、ヒト FOXP2 を発現することで有意差を持って変化した遺伝子数は1,671個で、そのうち促進された遺伝子が641個、抑制された遺伝子が1,030個であった。チンパンジーFOXP2 を発現することで有意差を持って変化した遺伝子数は1,562個で、そのうち促進された遺伝子が794個、抑制された遺伝子が768個であった。ヒトの FOXP2 とチンパンジーの FOXP2 を比較すると、2,836個が有意に変化し、1,433個が促進、1,403個が抑制されていた。また、FOXP2 isoform においては、より多くの発現の違いが検出された。これらのデータは遺伝子発現アレイで網羅的に解析しただけであった。また、これらの一次スクリーニング結果は、過去の報告書で報告した。

### 2. 研究の目的

網羅的にスクリーニングされた有意差を持って発現の違いが認められる遺伝子群から、言語関連に関連すると思われる遺伝子を拾いあげ、再現性を確かめる。言語の発達における分子遺伝学的機能を推測する。

### 3. 研究の方法

・前回までの網羅的解析では、Tet ON OFF システムで、ON 3 群、OFF 3 群の student-T 解析の結果であった。これでは、多数の遺伝子候補が上がり、変化率で拾い上げても有意な遺伝子群は拾い上げられなかった。Human (Hum), Human isoform (Iso), Chimpanzee (Chimp) FOXP2 と、コントロール遺伝子 CAT の、それぞれ ON, OFF 合計 8 群、24 サンプルを partek のプログラムを利用して、2way ANOVA 解析を行い p を厳しく取り、標的細胞のスクリーニングを少数に絞り、ターゲットを明らかにした。また、アレイのスクリーニング結果を確認す

るために、Tg Hum, Iso, Chimp, (-)を安定的に neuroblastoma 由来細胞株 GOTO 細胞に挿入し、GOTO 細胞から RNA を抽出し、アレイデータで変化した遺伝子群の real-time PCR により、その再現性を解析した。

### 4. 研究成果

2way ANOVA 解析により、有意差を  $10^{-5}$  以下、さらに 1.5 倍以上の変化をきたした遺伝子群を抽出した。そこで抽出された既知の遺伝子として登録されている遺伝子数は、ヒト FOXP2 より変化した遺伝子は2個、ヒト FOXP2 isoform で変化した遺伝子は31個、chimp FOXP2 で変化した遺伝子は6個であった。

多群間の分散分析により、ヒト FOXP2 遺伝子の挿入で動いた遺伝子は、少ないことが明らかになった。これは、hek239 というヒト細胞を使用しており、その細胞からの FOXP2 の発現が、新たに加えられた exogenous な FOXP2 の遺伝子は、その遺伝子のわずかの量的変化による影響しかないと思われた。Hek239 細胞は胎児腎臓由来細胞と言われているが、神経特異的遺伝子の発現もみられ、神経やグリアに特徴的な遺伝子発現が認められる細胞であるとの解析の報告がある。

新たにヒト由来細胞である hek239 に挿入された chimp FOXP2 は、より大きな遺伝子群の動きが認められるはずであった。しかし、ヒト FOXP2 isoform の exogenous な発現による影響が、最も多数の遺伝子を抽出した。

ヒト FOXP2 isoform は、ヒトの多組織 cDNA ライブラリーで、その発現を確認した。チンパンジーの組織は入手することができなかったが、ヒトの脳では FOXP2 isoform が発現が見られるのに対し、マウス脳では FOXP2 の alternative transcript は認められず、1種類の FOXP2 の発現であった。

次に neuroblastoma 由来 GOTO 細胞ゲノムに、ランダム挿入による Tg FOXP2 の影響を解析した。Hek239 において exogenous な FOXP2 により変化した遺伝子を、この Tg FOXP2 isoform を含む GOTO 細胞で解析した。Hek239 のアレイスクリーニングと GOTO 細胞における FOXP2 isoform の影響で上昇した遺伝子群が数個が認められた。この発現が上昇した遺伝子は、グリア細胞由来や脳マトリックス形成に関するものであった。

この遺伝子群の言語への関わりは、まだ決定的な結果を得ていないが、今回の解析で、グリアや脳マトリックス形成が関与していることが示唆された。

### 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9件)

(1). Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H,

- Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 161(9):2234-43. 査読有
- (2). Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2013 161(6):1221-37. 査読有
- (3). Hosoki K, Ohta T, Natsume J, Imai S, Okumura A, Matsui T, Harada N, Bacino CA, Scaglia F, Jones JY, Niikawa N, Saitoh S. Clinical phenotype and candidate genes for the 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 158A(8):1891-6. 査読有
- (4). Hosoki K, Ohta T, Fujita K, Nishigaki S, Shiomi M, Niikawa N, Saitoh S. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion: clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int*. 2012 54(3):e22-5. 査読有
- (5). Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*. 2012 44(4):376-8. 査読有
- (6). 太田 亨 遺伝学的基礎 Prader-Willi 症候群の基礎と臨床 (診断と治療社) 2011:7-14. 査読無
- (7). Arakawa T, Ohta T, Abiko Y, Okayama M, Mizoguchi I, Takuma T. A polymerase chain reaction-based method for constructing a linear vector with site-specific DNA methylation. *Anal Biochem*. 2011 416(2):211-7. 査読有
- (8). Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011 155A(7):1511-6. 査読有
- (9). Sosonkina N, Nakashima M, Ohta T, Niikawa N, Starenki D. Down-regulation of ABCC11 protein (MRP8) in human breast cancer. *Exp Oncol*. 2011 33(1):42-6. 査読有
- [学会発表](計10件)
- (1). Identification of target genes for the language-related FOXP2 and its isoform. Ohta T, Niikawa N, Oikawa T. 平成24年 The 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (BOSTON, USA)
- (2). 言語関連転写因子 FOXP2 の標的遺伝子の同定 太田 亨, 松田律史, 及川恒之, 新川詔夫 平成23年 第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会(千葉)
- (3). 5q31.3 欠失症候群は新規の染色体微細欠失症候群である 細木華奈, 太田 亨, 夏目淳, 今井純好, 奥村彰久, 松井健, 原田直樹, Scaglia Fernando, Bacino Carlos, 新川詔夫, 齋藤伸治 平成23年 第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会(千葉)
- (4). ポアソン回帰及びモデル選択の多因子マイクロアレイ実験への適応 松田律史, 加茂憲一, 太田 亨, 及川恒之, 新川詔夫 平成23年 第34回日本分子生物学会年回(横浜)
- (5). 5q31.3 microdeletion syndrome is a clinically discernible new syndrome characterized by severe neonatal hypotonia, feeding difficulties, respiratory distress, and severe developmental delay Hosoki K, Ohta T, Natsume J, Imai S, Okumura A, Matsui T, Harada N, Scaglia F, Bacino CA, Niikawa N, Saitoh S. 平成23年 The 12th International Congress of Human Genetics / The 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Montreal, CANADA)
- (6). 微細染色体異常の同定された Angelman 症候群様表現型を呈する症例 細木華奈, 太田 亨, 新川詔夫, 小崎健次郎, 齋藤伸治 平成24年 第57回日本人類遺伝学会(東京)
- (7). 言語関連転写因子 FOXP2 の isoform の機能と標的遺伝子の同定 太田 亨, 及川恒之, 新川詔夫 平成24年 第57回日本人類遺伝学会(東京)
- (8). 過去8年間(2004 ~ 2012年)に天使病院小児科遺伝外来を受診しマイクロアレイを用いたゲノム解析を行った患者の検討 徳富智明, 太田 亨, 齋藤伸治, 奥原宏治, 飯塚進, 高橋伸浩, 小畑慶子, 新川詔夫, 外木秀文 平成24年 第57回日本人類遺伝学会(東京)

- 類遺伝学会 (東京)
- (9). ホルモン非抵抗性先端異骨症のエクソーム解析 要 匡、柳 久美子、小口 良子、成富 研二、當間 隆也、近藤 達郎、二井 英二、外木 秀文、西村 玄、吉浦 孝一郎、太田 亨、新川 詔夫、松浦 信夫、Dong-Kyu Jin 平成 24 年  
第 57 回日本人類遺伝学会 (東京)
- (10). Angelman 症候群と Prader-Willi 症候群のエピジェネティックス 太田 亨 平成 24 年 (招待講演) 第 54 回 歯科基礎医学会学術大会・総会・サテライトシンポジウム (郡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

及川 恒之 (OIKAWA TSUNEYUKI)

北海道医療大学・心理学・教授

研究者番号：8 0 1 5 0 2 4 1

### (2) 研究分担者

小林 健史 (KOBAYASHI KENSHI)

北海道医療大学・心理学・助教

研究者番号：6 0 5 8 3 9 0 3

太田 亨 (OHTA TOHRU)

北海道医療大学・個体差健康科学研究所・准教授

研究者番号：1 0 2 2 3 8 3 5

### (3) 連携研究者

( )