

脳の比較トランスクリプトーム解析

●那波 宏之¹⁾ ◆柿田 明美²⁾

1) 新潟大学脳研究所 分子神経生物学分野 2) 脳疾患リソース解析部門 脳疾患標本資源解析学分野

<研究の目的と進め方>

ホモサピエンス（ヒト）への類人猿や旧世界猿からの進化を考える上で、脳の進化は最も重要な要素のひとつとして挙げられる。なかでも言語や高度なワーキングメモリーと認知情報処理能力などの能力はヒトへの進化過程で獲得されたヒト脳そのものに裏づけられる。本研究では、ヒト脳機能に関わるトランスクリプトーム（mRNA）を同定、解析することでヒト特有の脳機能の遺伝子基盤を探索し、さらに類人猿・旧世界猿間での脳でのトランスクリプトームと量的、構造的な比較を実施することで、その進化的裏づけを取ることを目標とする。ヒトを含む霊長類の脳間や脳内での特殊化したトランスクリプトームの実態や発現情報（分子プロファイル）ならびに配列情報を解析することは、当該領域でヒトの脳進化の理解につながるばかりでなく、ヒト高次脳機能や脳疾患に関連する情報も与えるものである。

個体発生や組織分化におおきな役割を演じている一群の遺伝子ファミリーとしてジンクフィンガードメインやホメオボックスドメインを有する転写因子群が存在するが、これらの遺伝子は脳の発生、発達ばかりでなく脳の機能進化も司ると考えられる。本研究では、これらの転写因子群に焦点を当て、霊長類におけるその脳内発現変化と配列進化を明らかにすることで、上記の目標の達成を目指すものである。

<2007年度の研究の当初計画>

ヒトのジンクフィンガー遺伝子とホメオボックス遺伝子の全翻訳領域をカバーするカスタムオリゴDNAアレイを使って、霊長類の脳内トランスクリプトーム間の配列比較と発現量の比較を実施した。この解析により、霊長類の前頭前野において高い発現レベルを呈する転写因子遺伝子群やその遺伝子配列が霊長類間で大きく異なる可能性がある遺伝子群を推定することができた。実際にも、これらの遺伝子は染色体上でクラスターをなして存在し、遺伝子間の欠失、挿入、組み換えが頻繁に起きていると思われる。オリゴDNAアレイシグナルの種間差が、発現量差によるものか、配列変異によるものかを確定する目的で、脳内での発現が比較的高く、変異欠失の多そうな転写遺伝子クラスター領域（19q13.43）と少なそうな領域（16p13.3）を選びだして、ヒト、チンパンジー、カニクイザル、アフリカミドリザル、マーモセットでDNA配列決定することを計画した。また、既存のデータベースを利用し、哺乳類進化過程での当該ジンクフィンガー遺伝子の進化速度に関して考察した。

<2007年度の成果>

- ① アフリカミドリザルのゲノムライブラリーの作成；
Fosmidベクターを利用してアフリカミドリザル全ゲノムをカバーできるライブラリーを構築した。Fosmidライブラリーは完成できたので、当該2領域のスクリーニングを開始した。
- ② アフリカミドリザル、マーモセットのゲノムライブラリーのスクリーニング；

約0.5と2Mベース標的領域に対し、BACライブラリーの利用可能なマーモセットでは、約半分の領域のクローニングが終了した。Fosmidライブラリーのミドリザルでは、約4分の1領域が現在、クローニングできている。

- ③ アフリカミドリザル、マーモセットの転写因子クラスターの配列解析
順次、クローンの物理地図を作成後、支援班にお願いして配列決定する予定。
- ④ データベースを利用した当該ゲノム領域での進化速度、変異率の推定
ジンクフィンガー遺伝子クラスターを含有するヒト19q13.43染色体領域の遺伝子を、チンパンジー、マカクザル、牛、マウスのゲノムデータとの比較を実施した。ヒトにしかオルソログが見られないような遺伝子（tripartite motif-containing28）、霊長類にしかない遺伝子（ZNF466, ZNF584, ZNF749, ZFSCAN4, ZFSCAN5）が、データベース中に多く見られ、本遺伝子領域の進化における重要性が示唆された。
- ⑤ カクタムDNAアレイを用いたプロファイリング結果との比較、再評価
DNAアレイ解析結果において想定された遺伝子の変異や欠失を実際の塩基配列解析結果と比較、考察した。

<国内外での成果の位置づけ>

19q13.43の染色体領域2Mでは、図1に示すように55個のジンクフィンガー遺伝子が密集してクラスターを形成している。この領域のジンクフィンガー遺伝子クラスターはヒト全ゲノム中でも最大のもので、脳内に発現があるものも多く含まれている。哺乳類内での進化速度も極めて速く、霊長類のみにしかオルソログが存在しない遺伝子もあり、その発現、配列解析は、霊長類の進化過程を考察する上で重要な知見を与えるものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

全ゲノム情報はヒト、チンパンジー、マカクで公開されているものの、情報の更新ともに当初の解析結果は、異なっている。とくにチンパンジー、マカクで同定された当該遺伝子のDNA配列の決失、蛋白配列の変異は、基になるDNA情報のエラーに由来する可能性も含んでいる事が判明した。

<今後の課題>

配列の解析対象にしているゲノム領域は合計で2-3Mベース有り、共同研究などを通して協力を呼びかける必要がある。最終的に蛋白配列も議論するとなると1塩基の欠損も許されず、かなりハイレベルの正確なDNA配列解析が求められる。

<成果公表リスト>

今年度はクローニングに重点を置いたため、特記すべきもの無し

図1) 霊長類比較ゲノムの配列解析標的領域

ヒト染色体19番長腕のテロメア端から2Mベースの多くのジンクフィンガー分子を含む領域。ヒトの遺伝子配列と比較してチンパンジー (chimp)、マカクザル (maca)、牛 (cow)、マウス (mice) においての配列相同領域占有率 (%)、ヒトジンクフィンガー

DNAアレイ解析で得られた脳内発現量 (Array Sig)、その脳内発現量の種間分散 (AVE-SEM)、遺伝子内のプローブ間シグナル強度の分散 (Probe-SD) を表示。緑色で影を付けた遺伝子は、牛やマウスで相同領域が50%を切る進化速度の速い遺伝子、もしくは霊長類特有の遺伝子。

	Human Chromosome 19q13.43	chimp	maca	cow	mice	Array Sig	AVE-SEM	Probe-SD
	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 5							
	hypothetical protein LOC729982							
	hypothetical protein LOC126208							
	zinc finger protein 444	100	80	30	80		0.48	
	galanin-like peptide precursor							
	zinc finger and SCAN domain containing 5	100	100	40	10	2.64	0.65	6.14
	similar to zinc finger and SCAN domain containing 5	100	100	0	0			
	hypothetical protein LOC729994							
61500kb	similar to vomeronasal 2, receptor, 14 isoform 1							
	similar to GPDH, mitochondrial precursor							
	similar to Complex I intermediate-associated protein 30,							
	zinc finger protein 542	100	100	70	50		0.14	
	zinc finger protein 582	100	100	99	70	1.61	0.49	0.93
	zinc finger protein 583	100	100	99	100	4.99	0.46	0.82
	zinc finger protein 667	100	100	98	90	15.9	0.08	0.84
	zinc finger protein 471	100	100	97	90	19.05	0.11	1.07
	zinc finger protein 28 homolog (mouse)	100	100	60	70			
	zinc finger protein 470	100	100	100	70			
	sialic acid binding Ig-like lectin, pseudogene 15							
	zinc finger protein 71	100	100	70	60			
	hypothetical BC37295_3							
	olfactory receptor, family 5, subfamily AH, member 1 pseudogene							
62000kb	zinc finger, imprinted 2	100	99	5	30			
	paternally expressed 3							
	similar to piccolo (presynaptic cytomatrix protein)							
	ubiquitin specific peptidase 29							
	zinc finger, imprinted 3	100	99	70	40			
	double homeobox A							
	zinc finger protein 264	100	100	90	70		0.68	
	aurora kinase C	100	100	60	100	24.6	0.48	1.29
	similar to Zinc finger protein 264							
62500kb	zinc finger protein 460	100	100	95	60			
	zinc finger protein 543	100	100	98	60	2.6	1.07	19.9
	zinc finger protein 304	85	95	100	60			
	zinc finger protein 547	100	100	70	60			
	zinc finger protein 548	100	100	60	30		1.06	
	zinc finger protein 17	100	100	70	40			
	zinc finger protein 749	100	100	20	5			
	vomeronasal 1 receptor 1							
	zinc finger protein 772							
	zinc finger protein 419	100	100	60	3	7.99	0.24	0.72
	zinc finger protein 773	100	100	70	40			
	zinc finger protein 549	100	100	50	3	0.23	9.07	3.34
	zinc finger protein 550	100	100	60	40		0.22	
	zinc finger protein 416	100	100	70	40		0.36	
	zinc finger protein interacting with K protein 1	100	100	50	40			
	zinc finger protein 530	100	100	70	60	7.87	1.41	2.1
	zinc finger protein 134	100	100	90	50		0.51	
	zinc finger protein 211	100	100	90	30		0.59	
	zinc finger and SCAN domain containing 4	100	100	0	0	-0.44	2.48	4.7
	zinc finger protein 551	100	100	70	60	33.1	1.11	1.67
	zinc finger protein 154 (pH-92)	100	100	80	50			
	zinc finger protein 671	90	90	70	20	16.7	0.39	0.78
	hypothetical protein FLJ38288	100	100	60	0	4.39	1.13	0.63
	zinc finger protein 586	100	100	70	50			
63000kb	zinc finger protein 552	100	100	50	30			
	zinc finger protein 587	100	100	60	30	5.832	0.455	0.877
	similar to Zinc finger protein 418							
	zinc finger protein 417	100	100	60	30	5.75	0.54	0.76
	zinc finger protein 418	100	100	60	30			
	NAG18 protein							
	hypothetical protein LOC730055							
	zinc finger protein 256	100	100	100	50			
	similar to ribosomal protein L19							
	chromosome 19 open reading frame 18							
	zinc finger protein 544	100	100	30	30			
	zinc finger protein 8	100	90	30	70	10.5	0.22	1.25
	similar to envelope protein							
	GLI-Kruppel family member HKR2	100	100	60	80	4.51	0.84	43.3
	alpha-1-B glycoprotein							
	zinc finger protein 497	100	100	60	50			
	hypothetical protein BC012365							
	ribosomal protein S5							
63500kb	similar to ring finger protein 183	100	100	70	0			
	zinc finger protein 584	100	100	20	0	14.7	0.33	33.8
	zinc finger protein 132	100	100	70	20			
	FLJ45850 protein	100	100	50	50			
	zinc finger protein 324	100	100	60	60	33.7	1.2	2.15
	zinc finger protein 446	100	100	20	0	24.7	0.35	0.42
	fatty acid transporter	100	80	40	0			
	zinc finger protein 499	100	100	50	80	140	0.56	0.27
	tripartite motif-containing 28	50	70	20	5			
	chromatin modifying protein 2A	100	100	30	100			
	ubiquitin-conjugating enzyme E2M	100	90	70	80			
	myeloid zinc finger 1	100	100	90	60			
	hypothetical protein MGC2752	100	50	40	0			
	similar to 60S ribosomal protein L23a	90	90	90	90			

比較ゲノム