

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) 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、新潟大学脳研究所

<研究の目的と進め方>

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、DNAアレイやゲノムクロニングを通し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。

<2008年度の研究の当初計画>

以前に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した。その結果、進化速度の速そうなジンクフィンガー遺伝子クラスター領域 (ヒト対応 19q13.43) と進化速度の遅そうな領域 (ヒト対応 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配列比較することを計画した。特に本年度は、前年度に引き続きアフリカミドリザル、マーモセットでの当該領域のクロニングとDNA配列決定に重点を置いて研究を実施した。

<2008年度の成果>

①ヒト対応16p13.3領域のマーモセットゲノムライブラリーのスクリーニング；

約0.3 Mベース標的領域に対し、ヒト・ジンクフィンガー遺伝子をプローブとして、20万のBACライブラリーをスクリーニングし、18クローンを単離した。霊長類に共通するゲノム配列

を使ってPCRプライマーを設定し、これらクローンに含有される各ジンクフィンガー遺伝子の有無を調べたところ、内8クローンがポジであった。BACインサート両端をDNA配列解析にかけたが、ヒトの16番染色体と相同性を示したクローンは、そのなかで3つであった。

これらのBACクローンで、目的の領域がほぼカバーされていた。しかしながら、そのいずれにおいてもBACエンド片側の相同性しか見つけられず、本領域においてヒト：マーモセットのDNA配列は、かなり異なっていることが推定された。現在、支援班の協力を得て、全領域の塩基配列決定を実施している。

②ヒト対応19q13.43領域のマーモセットゲノムライブラリーのスクリーニング；

約1 Mベース標的領域に対し、ジンクフィンガー遺伝子29個をプローブとして、20万のBACライブラリーをスクリーニングした。8回に分けてスクリーニングし、計71クローンを単離した。上と同様に、このゲノム領域で霊長類に共通する配列を探し出してPCRプライマーを設定し、これらクローンに含有される各ジンクフィンガー遺伝子の有無を調べた (図1)。その結果、内32クローンがいずれかのジンクフィンガー遺伝子に対するPCRシグナルを与えた。BACインサート両端のDNA配列を決定したところ、ヒトの19番染色体と相同性を示したクローンは、そのなかで17個であった。ヒト・ジンクフィンガー遺伝子の19q13.43領域マッピングを基準にすると、これらのBACクローンは目的の領域をほぼカバーしていた。現在、支援班の協力を得て、全領域の塩基配列決定を実施している。しかしながら、各BACクローンでPCRのマッピングとDNA配列情報には矛盾がある場合も見られ、これらのBACクローンが本当にマーモセットのヒト19番染色体相同領域に連続して存在するのか、それとも進化過程で他のゲノム領域に移動・転座しているかは、FISHや今後の全塩基配列決定を待たなくては行けないかもしれない。

③ヒト対応16p13.3領域のアフリカミドリザルゲノムライブラリーのスクリーニング；

約0.3 Mベース標的領域に対し、20万のFOSMIDライブラリーの100プールをPCR法でだまかに選別後、ヒト・ジンクフィンガー遺伝子8個をプローブとしてスクリーニングし、6クローンを単離した。

④ヒト対応19q13.43領域のアフリカミドリザルゲノムライブラリーのスクリーニング；

20万のFOSMIDライブラリーを100プールに分けた後、ジンクフィンガー遺伝子29個に対するPCRを96タイタープレート中で実施中である。これにより各プールに含有されるジンクフィンガー遺伝子クローンを確認し、その後、当該ジンクフィンガー遺伝子PCR産物をプローブとして、ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを実施した。1次スクリーニングで

選定されたクローンをPCRで確認したが、擬陽性のクローンが多く含まれていた。FOSMIDライブラリーでのスクリーニングでは煩雑であることが判明したので、支援班に急遽、アフリカミドリザルのゲノムBACライブラリーの作製を依頼した。

ヒト遺伝子配列との相同性は低く、当該クローンをヒトに貼り付けるのは、難しいケースが存在することが判明した。そのため、アフリカミドリザルについてはBACライブラリーの作製が必要と考えられた。

<国内外での成果の位置づけ>

ヒトの19q13.43の染色体領域では、図1に示すように40個以上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、ヒトを含む霊長類での当該遺伝子群の発現、配列決定とそれらの比較ゲノム解析は、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。

<今後の課題>

アフリカミドリザルについてはBACライブラリーの作製を支援班に依頼しているところであり、出来上がり次第、敏感なスクリーニングの開始が望まれる。配列の解析対象にしているゲノム領域は合計で1メガベース以上有り、共同研究などを通して協力をお願いする必要がある。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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

FOSMIDライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングでは、擬陽性クローンが多く含まれていることが判明した。仮に遺伝子エキソン領域がクローニングできたとしても、クローン間のゲノム領域にギャップができてしまう。これにより単離された遺伝子が、相互につながっているのか、クラスターを形成しているのかが、はっきりしない。当初は、ヒトゲノムとの相同性を参考にマッピングできるものと推定していたが、予想より

<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

<謝辞>

GAIN (大型類人猿情報ネットワーク) や京都大学霊長類研究所より、共同研究として自然死した霊長類の死後脳の供給を受けた。

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1Mベース領域に対応するマーマセットBACクローニングの現状をしめす。ヒトでは、この領域に43遺伝子がコードされているが、そのうち40遺伝子がジンクフィンガーモチーフを持つ。○△xは、各BACクローンでの当該ジンクフィンガー遺伝子のPCR法による対応関係を示す。○△の数は、PCR法により各クローンで確認できたジンクフィンガー遺伝子の数である。BACの両エンドシーケンスはヒト配列に対しBLASTにかけられ、相同性を示したヒトの染色体番号が記述されている。

