

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名	革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト	
研究開発課題名	霊長類脳の構造・機能をささえる分子基盤解明にむけたマーモセット全脳遺伝子発現動態・エピゲノム動態解析	
機関名	大学共同利用機関法人自然科学研究機構	
研究開発 担当者	所属 役職	新分野創成センターブレインサイエンス研究分野 特任准教授
	氏名	郷 康広

2. 研究開発成果の内容

① マーモセット全脳遺伝子発現解析および技術開発

・脳機能領域(神経核・皮質各層)からのサンプリング

成体およびサブアダルトマーモセット 4 個体の凍結脳試料を用いて、クライオスタットによる冠状面組織切片を作製し (30 μm)、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法により微小領域の細胞の回収を行った。平成 27 年度は、大脳基底核 (側坐核、尾状核、被殻、淡蒼球内節、淡蒼球外節)、海馬 (CA1/CA2、CA3、DG)、扁桃体 (扁桃体中心核、扁桃体内側核、扁桃体外側核、扁桃体内側基底核、扁桃体外側基底核、前扁桃野)、後頭葉 (一次視覚野 1～6 層、および直下の白質層を含む領域を層構造に平行に 12 分割) の全 26 神経核・微小領域からのサンプリングを行い、回収した細胞から RNA の抽出を行った。その結果、いずれの領域からも次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析に用いることのできる RNA を収集することができた。

・次世代シーケンサーによる全脳網羅的遺伝子発現解析

微小神経核・領域から回収した細胞由来の微量 RNA (1ng : 約 100 細胞に相当) をテンプレートとし、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析用のライブラリを作製した。大脳基底核、海馬、扁桃体領域 (合計 14 領域) を対象とし、3 個体から作製した合計 36 ライブラリ (一部、ライブラリ未作製領域あり) をイルミナ社の次世代シーケンサー (HiSeq4000) を用いて網羅的発現解析を行った。その結果、ライブラリあたり 971 万リードの配列を取得することができた。取得した配列を用いて各領域における全遺伝子の発現量の定量化、差次的発現 (Differentially Expressed Gene) 解析などのバイオインフォマティクス解析を実施している。また、神経核の残りのサンプル、後頭葉由来 RNA を用いたライブラリ作製を行うと同時に、前頭葉、頭頂葉、側頭葉の皮質層からの LCM 法による細胞回収、RNA 抽出、ライブラリ作製、トランスクリプトーム解析を推進している。

② ハイスループット in situ hybridization (ISH) 法によるマーモセット全脳三次元遺伝子発現アトラスの作製

マーモセットにおける全脳三次元遺伝子発現アトラスの作製を行うため、国立研究開発法人理化学研究所脳科学総合研究センターの下郡チームリーダーとの連携研究として、新生児 4 個体から左右両

半球より大脳皮質それぞれ7領域、視床、中脳、小脳、計17領域における組織のサンプリングを行い、RNAの抽出を行った。それらすべてを用いて、次世代シーケンサーによるトランスクリプトームライブラリを作製（合計68ライブラリ）、その後の配列解析を行うことによりマクロレベルでの遺伝子発現量の定量化をゲノムワイドに行った。そこで得られた17領域における発現定量値を、下郡チームで開発が行われているMarmoset Gene Atlasにおいて下郡チームで行われているハイスループット in situ hybridization (ISH) 法による三次元遺伝子発現マップとの統合化を進めた（Marmoset Gene Atlas は以下で公開中：<https://gene-atlas.bminds.brain.riken.jp>）。

③ マーモセット全脳エピゲノム解析によるエピゲノム動態解析

遺伝子発現の制御に寄与する遺伝子制御領域（プロモータやエンハンサー）におけるシトシンメチル化の時空間的動態を解明するために、上記①で収集された細胞と同じ領域からDNAの抽出を行った。平成27年度は、RNAを用いた網羅的発現解析および技術開発①に比重を大きくかけたため、本研究開発業務のための次世代シーケンサーによる配列取得・情報解析には至っていない。平成28年度は、エピゲノム解析によるメチル化シトシンの定量を行い、発現動態解析で得られた結果と多面的な解析を積極的に推進する。