

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies
(Brain/MINDS)
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Comprehensive measurement and analysis of spatiotemporal
transcriptome and epigenome dynamics in the common marmoset brain
- 研究開発担当者 (日本語) 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 郷 康広
所属 役職 氏名： (英語) Yasuhiro GO
Specially Appointed Associate Professor, Department of Brain
Sciences, Center for Novel Science Initiatives, National Institutes
of Natural Sciences
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

【マーモセット全脳遺伝子発現動態解析】

霊長類の脳が正しく構築され、正しく機能するためには、ゲノムを設計図とした緻密かつ正確な時空間的遺伝子発現制御が必要不可欠である。このため、本研究開発では、全脳レベルの遺伝子発現動態を明らかにし、霊長類脳の正しい構造と機能をささえる分子基盤を解明することを目的とした。そのために、マーモセット脳におけるマイクロレベル・マクロレベルの全脳遺伝子発現動態解析を行い、マーモセット遺伝子発現アトラスを作製した。

・マイクロレベル遺伝子発現動態解析

マーモセット新鮮凍結脳試料を用い、クライオスタットによる冠状面組織切片を作製し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により微小領域からの細胞の回収を行った。神経核として、大脳基底核5領域、海馬体3領域、扁桃核6領域の合計14領域、皮質として、前頭前野背外側部、前帯状皮質、中側頭回、一次運動野、一次体性感覚野、一次視覚野の6領域を回収対象領域とし、1層から6層、および白質層を含む領域を層構造に平行に12分割した領域(計72領域)の回収を行

った（合計対象領域 86 領域）。調整した微量 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（計 270）を作製し、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いて、全 86 領域における全 36,597 遺伝子の発現量の定量化、差次的発現遺伝子の同定、遺伝子共発現ネットワーク解析などのインフォマティクス解析を行った。その結果、神経核、皮質特異的発現遺伝子だけでなく、より詳細な神経核や皮質各層特異的発現遺伝子を同定することが出来た。また、遺伝子発現遺伝子共発現ネットワーク解析からは、同一のもしくは類似の発現ネットワークの制御下にあると考えられるモジュールを多数同定した。これらは、薬理的・遺伝学的マーマセット疾患モデルの解析において、個々の遺伝子のみならず発現制御ネットワークの動態変動を解析する上でも重要な標準脳発現アトラスとなる。

これらの解析結果を効率的に国内外の研究者に利用してもらうための遺伝子発現検索インターフェースの開発を併せて行い、革新脳データポータルサイトにおいて公開を予定している。

・マクロレベル遺伝子発現動態解析

マクロレベル遺伝子発現動態解析に関しては、下郡智美チームリーダー（理化学研究所脳科学総合研究センター）と連携し、革新脳データポータルサイト内のマーマセット遺伝子アトラス（Marmoset Gene Atlas）ISH データ遺伝子におけるトランスクリプトーム解析を行った。具体的には、下郡研究室よりマーマセット新生児 4 個体、3 ヶ月齢 3 個体、6 ヶ月齢 3 個体、1 歳齢 3 個体、2 歳齢 3 個体における 17 脳領域（左右大脳 7 領野、視床、中脳、小脳）試料の提供を受け、各脳領域における遺伝子発現解析を行い、その結果を上記の遺伝子アトラスサイトにおいて公開した。

【マーマセット精神・神経疾患関連遺伝子の変異解析および遺伝子異常個体の同定】

平成 28 年度よりマーマセット精神・神経疾患関連遺伝子の変異解析および遺伝子異常個体の同定を推進した。ヒトの高次認知機能やその破綻として現われる精神・神経疾患の本質的な理解のために、マーマセットを対象としたオミックス解析を実施することで霊長類モデル動物の開発を行った。

ヒト精神・神経疾患関連遺伝子とマーマセットにおける相同遺伝子（479 遺伝子）を対象にマーマセット 369 個体を対象とした遺伝子機能喪失変異保有個体の同定を行った。その結果、10 遺伝子において稀な機能喪失変異を持つ個体を同定した。さらに、マーマセット 192 個体の配列情報を追加で取得し、計 561 個体のデータセットをまとめて再解析を行っている。

また、日本国内におけるマーマセットの網羅的遺伝子リソースの整備のために、国内 12 施設よりマーマセット血液または爪試料を収集した。平成 28 年度末時点で 1748 個体分の DNA/RNA のバイオリソースをストックすることができた。

Spatiotemporal transcriptome regulations of cells are essential for the construction of brain structure and proper function. Comprehensive analyses of the dynamics of the transcriptome in the both wild and diseased animal models also lead to understanding the molecular causality of the human neuropsychiatric disease. Here we examine the spatiotemporal transcriptome and dynamics using the common marmoset brain to identify the spatiotemporal-specific (such as layer/nucleus-specific in spatial or development-specific in temporal) modulating genes.

--- Microdissection transcriptome analysis in the common marmoset

Fine structure transcriptional profiling for nuclear subdivisions of the basal ganglia (five nuclei), hippocampus (three nuclei), amygdala (six nuclei), six cortical regions (prefrontal cortex, anterior cingulate cortex, middle temporal gyrus, primary motor cortex, primary somatosensory cortex,

primary visual cortex) has been performed by the Laser Capture Microdissection (LCM) method. Totally, 270 transcriptome libraries from 86 microdissected marmoset brain regions have been sequenced and analyzed. From the massive sequence data, we can quantify gene expressions of entire gene sets (36,597 genes) and can identify the differential expression genes (DEG) and the region-specific regulatory network module based on co-expression network analysis of gene expression data. This marmoset brain gene expression atlas can be effectively used for the comparison of transcriptome profiles and dynamics of wild/diseased marmosets.

--- Macrodissection transcriptome analysis in the common marmoset

Spatiotemporal transcriptional profiling of the marmoset brain has been performed at the macrodissection level in the collaborative project with Dr. Tomomi Shimogori (RIKEN Brain Science Institute). We used 17 macrodissected marmoset brain regions, which include the seven cortical regions from both hemispheres, thalamus, midbrain, and cerebellum, from five postnatal developmental stages (newborn, three months, six months, one year, two years). The results of postnatal developmental and spatial transcriptional profiling are available on the website of marmoset gene atlas (<https://gene-atlas.bminds.brain.riken.jp/>).

Additionally, from the fiscal year 2016, we have performed genetic variation analysis to identify the marmosets which have rare Loss-of-Functional (LoF) mutation in the neuropsychiatric related genes. Among 369 marmosets, we succeeded to identify that some marmosets have rare LoF mutation in the ten neuropsychiatric related genes.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Oishi T, Imai H, Go Y, Imamura M, Hirai H, Takada M. Sporadic premature aging in a Japanese monkey: A primate model for progeria. PLoS ONE. 2014, 9(11): e111867.
2. Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Matsui A, Go Y, Ishimaru Y, Misaka T, Abe K, Hirai H, Satta Y, Imai H. Rapid expansion of phenylthiocarbamide non-tasters among Japanese macaques. PLoS ONE. 2015, 10(7): e0132016.
3. Carelli FN, Hayakawa T, Go Y, Imai H, Warnefors M, Kaessmann H. The life history of retrocopies illuminates the evolution of new mammalian genes. Genome Research. 2016, 26(3): 301-314.
4. Yoshida K, Go Y, Kushima I, Toyoda A, Fujiyama A, Imai H, Saito N, Iriki A, Ozaki N, Isoda M. Single-neuron and genetic correlates of autistic behavior in macaque. Science Advances. 2016, 2(9): e1600558.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. マーモセットにおける精神・神経疾患関連遺伝子解析, ポスター, 郷康広, 白井千夏, 石川裕恵, 辰本将司, 第4回日本マーモセット研究会 (愛知県・犬山市 (犬山観光センター)), 2015/1/22, 国内.
2. ヒトを理解するための霊長類モデルの可能性〜ゲノム・トランスクリプトームからのアプローチ,

- 口頭（招待講演），郷康広，日本顕微鏡学会・分子細胞動態イメージング研究部会・CREST「生命動態」領域共催ワークショップ「異なるスケールをつなぐ解析技術とその応用」（東京都・文京区（東京大学）），2015/3/11，国内。
3. 霊長類における精神・神経疾患関連遺伝子解析と認知ゲノミクスの展望，口頭（招待講演），郷康広，京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」（愛知県・犬山市（京都大学）），2015/3/14，国内。
 4. ゲノムを通して我が身を知る～ヒトとサルの間にあるもの～，口頭（招待講演），郷康広，東北大学脳神経科学コアセミナー（宮城県・仙台市（東北大学）），2015/5/22，国内。
 5. Spatiotemporal gene expression trajectory in the human and non-human ape brains. 口頭，Yasuhiro Go, Qian Li, Shoji Tatsumoto, Philipp Khaitovich, Cold Spring Harbor Symposium ~Behavior & Neurogenetics of Nonhuman Primates~ (Cold Spring Harbor, NY, USA), 2015/11/19, 国外。
 6. ゲノムを通して我が身を知る～ヒトとサルの間にあるもの～，口頭（招待講演），郷康広，第64回インシリコ・メガバンク研究会（宮城県・仙台市（東北大学）），2015/11/24，国内。
 7. マーモセットにおける精神・神経疾患関連遺伝子多様性解析，口頭（招待講演），郷康広，第5回日本マーモセット研究会（ワークショップ「マーモセットゲノム解析の展望」（東京・文京区（東京慈恵会医科大学）），2016/1/27，国内。
 8. 霊長類における精神・神経疾患関連遺伝子解析と認知ゲノミクスの展望，口頭（招待講演），郷康広，京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」（愛知県・犬山市（京都大学）），2016/3/11，国内。
 9. マーモセットの血液マイクロケミズムと遺伝的多型解析，ポスター，辰本将司，臼井千夏，石川裕恵，郷康広，第32回日本霊長類学会大会（鹿児島県・鹿児島市（鹿児島大学）），2016/7/16~18，国内。
 10. Spatiotemporal gene expression trajectory in the human and non-human ape brains. 口頭（招待講演），Yasuhiro Go, 6th Joint CIN-NIPS International Symposium (Tübingen, Germany), 2016/10/11, 国外。
 11. 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，口頭（招待講演），郷康広，平成28年度第2回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・臨床研究グループ分科会（東京都・文京区（東京大学）），2016/12/11，国内。
 12. Spatiotemporal brain transcriptome architecture in the common marmoset. 口頭（招待講演），Yasuhiro Go，第6回日本マーモセット研究会・革新脳国際シンポジウム（東京都・文京区（東京大学）），2016/12/14，国内。
 13. 霊長類における精神・神経疾患関連遺伝子解析と認知ゲノミクスの展望，口頭（招待講演），郷康広，平成28年度京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」（愛知県・犬山市（京都大学）），2017/3/18，国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

特になし