

ネアンデルタール人が持っていたタンパク質が**骨格の変化**をもたらすことを発見  
—ヒトの多様性や疾患に関わるゲノムの理解に貢献—

### 発表のポイント

- ◆化石人類(ネアンデルタール人やデニソワ人などの絶滅した人類)が持っていたタンパク質の変化 (GLI3<sup>R1537C</sup>)が、細胞や個体の形質にどのような影響を及ぼすのかを発生工学的手法を用いて解析しました。
- ◆GLI3<sup>R1537C</sup> はタンパク質が本来持つ機能を保ちつつ、さまざまな遺伝子の活性を変化させることを見出しました。
- ◆化石人類と同様の変異を導入したマウスでは骨格の形態に変化が生じました。
- ◆化石人類のゲノムは現在のヒト集団にも存在しています。今回の結果は、私たちヒトの解剖学的特徴や疾患に関わるゲノムの多様性を理解するための手がかりを与えることが期待されます。

### 1. 概要

京都府立医科大学(学長 夜久 均)神経発生生物学 阿形亜子 研修員、同大学 実験動物センター 大塚 哲 准教授、同大学大学院医学研究科 神経発生生物学 野地亮太 大学院生、同 後藤 仁志 助教、同 小野 勝彦 特任教授、国立大学法人京都工芸繊維大学(学長 森迫清貴)応用生物学系 野村 真 教授(京都府立医科大学 准教授:クロスアポイントメント)は、ネアンデルタール人などの絶滅した人類に特徴的なタンパク質の変異 (GLI3<sup>R1537C</sup>)が哺乳類の解剖学的な多様性に寄与することを発見しました。

アフリカで誕生した私たちヒトの祖先は、全世界に拡散する過程でさまざまな人類集団と交雑したことがわかっています。昨年のノーベル生理学・医学賞を受賞したスバンテ・ペーボ博士らの研究によって、絶滅したネアンデルタール人やデニソワ人のゲノムの一部が現生人類のゲノムの中にも存在していることが明らかとなっています。本研究では、器官発生に重要な役割を持つタンパク質である GLI3(グリ・スリー)に注目し、化石人類が持っていたタンパク質変異がさまざまな遺伝子の活性状態や骨格に影響を与えることを発見しました。この成果により、ヒトの特徴をもたらすゲノムの進化や疾患の原因となるタンパク質の変異についての理解が深まり、ゲノム医学や進化医学の推進に貢献することが期待されます。

本研究は科研費「基盤研究(B)(課題番号 21H02591)」、小柳財団、大隅基礎科学創成財団、大学女性協会の支援により実施されました。

本論文は2023年11月2日午後4時(日本時間)に国際学術誌「*Frontiers in Cell and Developmental Biology*」にオンライン掲載されます。

## 2. 背景

アフリカ大陸で誕生した私たち現生人類の祖先は、今から約 6 万年前にアフリカから移動し全世界へと拡散していきました。その頃のユーラシア大陸には、現生人類の祖先以外にも数種の人類が存在していたことが明らかとなっています。その中でも、1856 年にドイツのネアンデルタール渓谷で発見された化石から命名されたネアンデルタール人は、頑強な骨格や特徴的な頭蓋骨の形態から、多くの人々の興味を引いてきました。2022 年のノーベル生理学・医学賞を受賞したスバンテ・ペーボ博士らの研究グループによって、ネアンデルタール人の化石からゲノム DNA が単離され、その配列が解読されました(参考文献 1)。さらに、中央アジアのデニソワ洞窟から発掘された化石については、採取された DNA が現生人類やネアンデルタール人とも異なる配列を示しており、デニソワ人と名付けられました。現生人類の祖先がユーラシア大陸に進出した際、ネアンデルタール人やデニソワ人との交雑が起こった結果、彼らのゲノム DNA の一部が私たち現生人類のゲノムの中に流入したことがわかっています。化石人類と現生人類の解剖学的・生理学的特徴がどのようなゲノムの違いによるものなのか、現在世界中の研究者が注目し研究が進められています。

本研究では、特に GLI3 と呼ばれるタンパク質に注目して解析を行いました。GLI3 はソニック・ヘッジホッグシグナル<sup>※1</sup>を伝達することで、脊椎動物の胚発生過程における器官構築に重要な役割を果たします。興味深いことに、ネアンデルタール人やデニソワ人では、GLI3 タンパク質を構成するアミノ酸のうち 1537 番目のアルギニン(R)が別のアミノ酸であるシステイン(C)へと変化していたことが明らかとなっています (GLI3<sup>R1537C</sup>、図1)。こうしたアミノ酸の変化を伴う変異は、タンパク質の構造や機能に影響を及ぼすことが予測されます。そこで、このアミノ酸の変化によって GLI3 の機能がどのように変化するのか、さらにこの変異が個体の発生にどのような影響を及ぼすのかについて、発生工学的な手法を用いて研究を行いました。

## 3. 発表内容

### ▼化石人類型の GLI3 は特異的な遺伝子の活性化状態を変化させることを発見

GLI3 は様々な遺伝子の活性化をコントロールする転写因子と呼ばれるタンパク質の1つです。そこで、化石人類型のアミノ酸置換によって GLI3 が制御する遺伝子の活性化状態にどのような変化が生じるのかを、ヒト由来の培養細胞を用いた RNA-seq<sup>※2</sup>によって検討しました。その結果、GLI3<sup>R1537C</sup> は GLI3 の主要な役割の1つであるソニック・ヘッジホッグシグナルの伝達には大きな影響を及ぼさないことがわかりました。一方、このアミノ酸変異によって影響を受ける遺伝子群も多数存在することが明らかとなり、特に細胞増殖を制御する遺伝子、骨形成に関与する遺伝子、さらにヒストンなど染色体を構成するタンパク質を産生する遺伝子の発現に大きな影響が出るということが明らかとなりました。

## 現生人類型GLI3



## ネアンデルタール人・ デニソワ人型GLI3 (GLI3<sup>R1537C</sup>)



## 化石人類型変異を 導入したマウスGli3 (Gli3<sup>R1540C</sup>)



図1 GLI3のタンパク質の構造。ネアンデルタール人、デニソワ人では1537番目のアルギニン(R)がシステイン(C)に変化している(GLI3<sup>R1537C</sup>)。マウスのGli3タンパク質では1540番目のアルギニンがヒトGLI3の1537番目のアルギニンに相当するため、このアミノ酸をシステインに変化させたマウスをゲノム編集技術によって作製した (Gli3<sup>R1540C</sup>) (GLI3<sup>R1537C</sup>は現生人類集団にも見られる)。

### ▼化石人類型の変異を導入したマウスでは骨格の形態が変化することを発見

化石人類型のアミノ酸変異が個体の発生にどのような影響を及ぼすのかを解析するため、マウスを用いた解析を行いました。マウスのGli3タンパク質では1540番目のアルギニンがヒトGLI3の1537番目のアルギニンに相当します。そこで、CRISPR(クリスパー)<sup>※3</sup>と呼ばれるゲノム編集技術を用いて、1540番目のアルギニンをシステインに変化させたGli3を持つマウスを作製しました。このマウスは正常に生まれ、成長します。しかしながら、このマウス骨格の形態を解析した結果、通常のマウスよりも頭蓋骨が大きくなっていることが明らかとなりました(図2)。また肋骨の異常なねじれや、肋骨の数の増加、腰椎の数の減少を示す個体が増えることも明らかとなりました。さらにRNA-seqによってこのマウスの遺伝子発現を解析した結果、ヒトの培養細胞の結果と同様に、染色体を構成するタンパク質を産生する遺伝子の発現に変化が生じていることが明らかとなりました。これらの結果は、GLI3のアミノ酸変異により発生に関わる様々な遺伝子の活性化状態に変化が生じることを示唆しています。

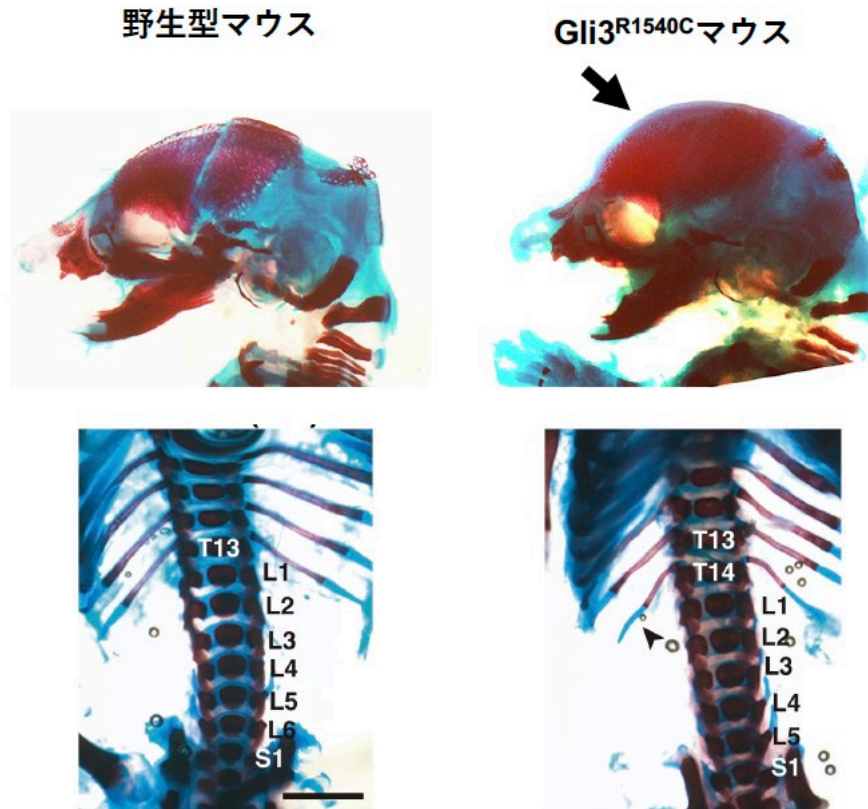


図2 Gli3<sup>R1540C</sup> マウスの骨格の変化。左側は野生型マウス。Gli3 にアミノ酸変異を導入したマウス(右側)では、頭蓋の肥大化(上段、矢印)や、肋骨の増加(下段、矢頭。Gli3<sup>R1540C</sup> では T14 が追加されている)、腰椎の減少(野生型は L6 まで形成されるが、Gli3<sup>R1540C</sup> では L5 までしか形成されていない)などが観察された。

## 5. 今後の展望

本研究により、化石人類に特徴的な GLI3 タンパク質の変化が、細胞や個体における遺伝子発現の変化や解剖学的な特徴の変化に寄与することを見出しました。本研究で着目したアミノ酸変異を引き起こすゲノム変異(一塩基多型)<sup>※4</sup>は現生人類の集団中にも存在しており、その由来はネアンデルタール人との交雑によるものであることが示唆されています。近年、この一塩基多型(rs35364414)<sup>※4</sup>と神経管閉鎖障害<sup>※5</sup>と呼ばれる先天性疾患との関連性が報告されています(参考文献 2)。今後、ゲノム医学や進化医学の研究が進展することにより、化石人類に由来するゲノムが現生人類の多様性や疾患とどのような関連があるのかが解明されていくと期待されます。ヒトの複雑な形質は、1つの遺伝子やタンパク質だけで決定されているわけではありません。ネアンデルタール人や現代人に特異的なゲノムの変異が存在するということは、こうした変異が個体の発生や環境との相互作用の中で許容されてきたということも示唆しています。ヒトの進化の過程でおきたゲノムやタンパク質の機能的変化の研究は、「ヒトとは何か」を解き明かすための重要な知見を提供することが期待されます。

### ■用語解説

※1 ソニック・ヘッジホッグシグナル:細胞の増殖や分化を調節するシグナル伝達の1つで、Sonic Hedgehog と呼ばれるタンパク質によって誘起される。ソニック・ヘッジホッグシグナルの欠損は四肢や中枢神経系などの器官形成に重篤な影響を与える。

※2 RNA-seq:細胞内に存在するすべての mRNA の配列を読み取ることで、細胞内でどのような遺伝子がどの程度活性化されているのかを解析する技術。解析は次世代シーケンサーを用いて行われる。

※3 CRISPR(クリスパー):細菌由来の DNA 切断酵素(エンドヌクレアーゼ)が特徴的な配列を認識して切断することを利用し、任意のゲノム配列を切断したり編集したりする技術。Cas9 と呼ばれる酵素がよく用いられるため、CRISPR/Cas9 と呼ばれる。本研究では Cas12a (Cpf1)という酵素を用いてゲノム編集を行なった。CRISPR/Cas9 の技術開発の功績により、エマニュエル・シャルパンティエ博士とジェニファー・ダウドナ博士は 2020 年のノーベル化学賞を受賞した。

※4 一塩基多型:ゲノム DNA の多様性の1つで、塩基配列の1つ塩基が変異したもの。特に集団中に 1%以上存在するものを多型と呼ぶ。一塩基多型のうちごく一部のものがアミノ酸配列の変化を生じる。rs35364414 はヒト集団中に存在する一塩基多型の1つであり、GLI3<sup>R1537C</sup>に相当する。

※5 神経管閉鎖障害:胎児期に神経管(脳や脊髄の原基)が正常に閉じないことで生じる先天性疾患。代表例として無脳症や二分脊椎症が知られている。神経管閉鎖障害の原因にはゲノムの変異や環境要因など多様な要因が考えられるため、今回の研究で注目した GLI3 多型(rs35364414)が存在しても必ずこの疾患が誘発されるわけではない。

## ■参考文献

- 1) Green et al. A draft sequence of the Neanderthal genome. *Science* 328:710–722 (2010)
- 2) Renard et al. Exome sequencing of cases with neural tube defects identifies candidate genes involved in one-carbon/vitamin B12 metabolisms and Sonic Hedgehog pathway. *Human Genetics* 138:703–713 (2019).

## ■論文情報

掲載誌: *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

タイトル: A Neanderthal/Denisovan GLI3 variant contributes to anatomical variations in mice

(ネアンデルタール人・デニソワ人型の GLI3 多型はマウスにおける解剖学的多様性に寄与する)

著者: 阿形 亜子<sup>1</sup>、大塚 哲<sup>2</sup>、野地 亮太<sup>1</sup>、後藤 仁志<sup>1</sup>、小野 勝彦<sup>1</sup>、野村 真<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 京都府立医科大学大学院医学研究科 神経発生生物学

<sup>2</sup> 京都府立医科大学実験動物センター

<sup>3</sup> 京都工芸繊維大学応用生物学系

DOI: 10.3389/fcell.2023.1247361

(preprint: *BioRxiv*, doi.org/10.1101/2023.07.03.547394)