

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18621

研究課題名(和文)現代人の高地適応に関連する旧人類ハプロタイプの進化の解明

研究課題名(英文)Elucidating the evolutionary process of archaic-like haplotype related to high-altitude adaptation in modern humans

研究代表者

安河内 彦輝 (YASUKOCHI, YOSHIKI)

三重大学・地域イノベーション推進機構・助教

研究者番号：60624525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、チベット集団の高地適応に関わるデニソワ人(旧人類)由来のEPAS1遺伝子多型がどのように現生人類集団に伝播したか、高地適応に関わるEGLN1遺伝子多型が低地集団の生理反応にどのような影響を及ぼすか、を明らかにすることである。デニソワ人由来のEPAS1遺伝子多型は、デニソワ人の遺伝情報を多く残す(4-6%)メラネシア集団からは検出されなかった。これは、この遺伝子多型が他の現生人類集団と分岐した後チベット集団のみに広がったことを示唆する。また日本人では、2つのEGLN1遺伝子多型と動脈血酸素飽和度(SpO2)の値、もしくはその反応時間(潜時)との間に関連がみられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to elucidate 1) how the Denisovan-like (archaic-like) haplotype related to high-altitude adaptation in Tibetan highlanders has been introduced into modern humans and 2) the association of EGLN1 genetic polymorphisms related to high-altitude adaptation with physiological responses in lowlanders with lowlander ancestry. The Denisovan-like haplotype was not detected from Melanesian populations with 4-6% of their genetic material from Denisovans, suggesting that archaic-like EPAS1 genetic variants have expanded in Tibetan highlanders after the divergence from other ethnic groups. In addition, genetic variants of two polymorphic sites around the EGLN1 gene were associated with arterial oxygen saturation (SpO2) levels and the reaction time (SpO2 latency) in Japanese lowlanders.

研究分野：分子進化学

キーワード：高地適応 EPAS1 EGLN1 旧人類 関連解析 低圧低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 旧人類由来ハプロタイプの進化過程の解明

Rasmus Nielsen らの研究チームにより、チベット集団の高地適応にその祖先集団と旧人類デニソワ人との交雑が関与したとする論文が報告された (Huerta-Sanchez et al. 2014)。これは、低酸素時に活性化する HIF-2 $\alpha$  をコードする EPASI 遺伝子領域において、チベット集団特異的な 5 つの一塩基多型 (SNP) モチーフ (AGGAA) がデニソワ人と同一であったとする内容であった。当時所属していた東京大学ヒトゲノム多様性研究室には、デニソワ人の遺伝情報を多く残すメラネシア人を含むオセアニア集団の DNA 試料を多数保有していた。そこで、メラネシア集団において当該 SNP モチーフ (旧人類由来ハプロタイプ) が観察されるかを検証することにした。

### (2) 高地適応遺伝子多型と生理反応との関連解析

近年の研究により主にエチオピア・チベット・アンデス高地定住集団 (図 1) を対象に、高地という低圧低酸素条件に適応的な遺伝・生理要因の探索が進められてきた。チベット集団においては比較的研究が進んでいるが、まだ未解明な点が多い。特に高地に適応的な遺伝子多型が低地集団にどのような影響を及ぼすかはわかっていない。九州大学の研究グループが日本人男性 47 名 (平均年齢 23 歳) を対象に実施した低圧低酸素曝露実験の生理データ、およびそれらの被験者のゲノム DNA を保有しており、これらの使用が認められている。そこで本研究では、チベット集団の高地適応に関わる遺伝子多型が、日本人集団でどのような生理応答を示すかを調査することにした。



図 1. チベット自治区・ポリビア (アンデス高地集団)・エチオピアの地理的な位置

## 2. 研究の目的

### (1) メラネシア集団におけるデニソワ人由来 EPASI ハプロタイプの探索

本研究では、分子進化学・集団遺伝学的手法により、デニソワ人との交雑で現生人類集団に伝播したハプロタイプの進化の過程を明らかにすることを最終目標とした。デニソ

ワ人と現代メラネシア人とが 4~6% のゲノムを共有しているという報告があるが、チベット集団の高地適応に関連するデニソワ人由来 EPASI ハプロタイプがメラネシア人に伝播した証拠は得られていない。そこでまず、メラネシア人を含むオセアニア集団を対象に、旧人類 EPASI ハプロタイプを探索することを目的とした。

### デニソワ人由来 HLA ハプロタイプの進化的解析

2011 年に、現生人類の HLA 領域にデニソワ人由来の対立遺伝子 (HLA-B\*73) が伝播したという研究内容が Science に報告されていた (Abi-Rached et al. 2011)。しかしその証拠は十分でなく、その妥当性を検証する必要があると考えていた。旧人類ハプロタイプの進化の過程を明らかにするという当初の研究目的と関連することから、他の HLA-B 対立遺伝子と塩基配列が大きく異なるためにデニソワ人由来とされた HLA-B\*73 が、実際に旧人類との交雑を介して現生人類集団に拡散したかを検証することにした。

### (2) 高地適応遺伝子多型と日本人の生理反応との関連解析

低地居住集団において、チベット集団やその他の高地集団で多くみられる SNP が、低酸素時における個体の生理反応にどのような影響を及ぼすのかわかっていない。本研究では、高地適応に寄与し得る遺伝的多型と日本人における生理応答との関連を解明することを目的とした。これを明らかにするために、急性の低圧低酸素曝露環境下において、高地居住集団に特異的な SNP と個体の生理反応との関連解析を試みた。

### ポリビア集団の高地適応に関わる遺伝・生理要因の解明

本研究計画を遂行する過程で、長崎大学の研究チームが中心となった研究プロジェクトに参加する機会があった。南米ポリビア (図 1) のサン・アンドレス大学 (標高約 3600m) およびエル・アルト大学 (標高約 4000m) の協力のもと、現地大学生 103 名の生理データおよびゲノム DNA 試料を得ることができた。生理データは身体諸測定値やヘモグロビン (Hb) 濃度、動脈血酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>)、心拍数、血圧、血管幅、静脈画像、皮膚温、血流など多岐にわたる。これらのデータを用いて、南米ポリビア集団の高地適応に関わる遺伝・生理要因を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) チベット集団で特異的な 5 つの EPASI 遺伝子 SNPs (rs115321619、rs73926263、rs73926264、rs73926265、rs55981512) について、オセアニア集団 112 個体 (Gidra 族 32 個体、Kusaghe 40 個体、Munda 40 個体) の DNA

試料を用いて Taqman 法による SNP genotyping assay を実施した。

NCBI や The Allele Frequency Net Database、1000 Genomes Project などのデータベースから、ヒト *HLA* クラス I 遺伝子とチンパンジーやゴリラの相同遺伝子 (*MHC* クラス I 遺伝子) の塩基配列データ、ヒト *HLA-B* 対立遺伝子の頻度データや SNP データを取得した。これらのデータを用いて、分子進化学的な観点からデニソワ人から現生人類集団に *HLA-B\*73* が伝播した可能性を検証した。

(2) 低圧低酸素曝露実験は九州大学にある環境適応研究実験施設で実施され、気圧を 0 から 2500、4000 m 相当まで段階的に下げ、その間における生理データを取得している。*EPAS1* 遺伝子のハプロタイプはチベット集団以外では検出されない可能性が高いため、チベットやアンデス集団などで高地適応に関わるとされる *EGLN1* 遺伝子の SNP を調査した。ここで、*EGLN1* は HIF-2 $\alpha$  の活性を制御する PHD2 分子をコードする遺伝子である。先行研究で高地適応に関連することが示唆された 7 つの *EGLN1* SNPs (rs12097901、rs186996510、rs480902、rs479200、rs2808611、rs2790859、rs2275279) を選定し、PCR-直接塩基配列決定法もしくは Taqman 法による SNP genotyping assay を実施した。試料は、前述した日本人男性 47 名の唾液から採取したゲノム DNA を用いた。SNP と生理データの関連解析は、二次元配置分散分析や共分散分析、一般化線形モデルなどにより統計学的有意性を評価した。

ボリビア高地集団 103 検体 (平均年齢 25 歳、男性 52 名・女性 51 名) の DNA 試料のうち、HiSeq X Ten (イルミナ社) で 10 検体の全ゲノム塩基配列を決定する。ただし、SNP と生理データの関連を解析するには十分なサンプル数ではないため、予備的解析としてボリビア集団の遺伝的な組成が現生人類集団でどのような位置にくるかを調査する。また、すべての検体の生理測定は現地でおこなっており、データとして研究室に保管している。生理データに関しては、先行研究で報告されている生理データと比較して、どのような傾向がみられるかを調査する。

#### 4. 研究成果

(1) まず、Gidra 族 32 個体について Taqman 法による SNP genotyping assay を実施したところ、すべての個体がデニソワ人由来ハプロタイプとは異なるハプロタイプを有していることがわかった。また、Kusaghe 40 個体と Munda 40 個体について 2 つの SNPs を調べた結果、すべて Gidra 族と同じ対立遺伝子であった。これらのことから、少なくとも今回解析した集団にはデニソワ人由来ハプロタイプは伝播していないことが示唆さ

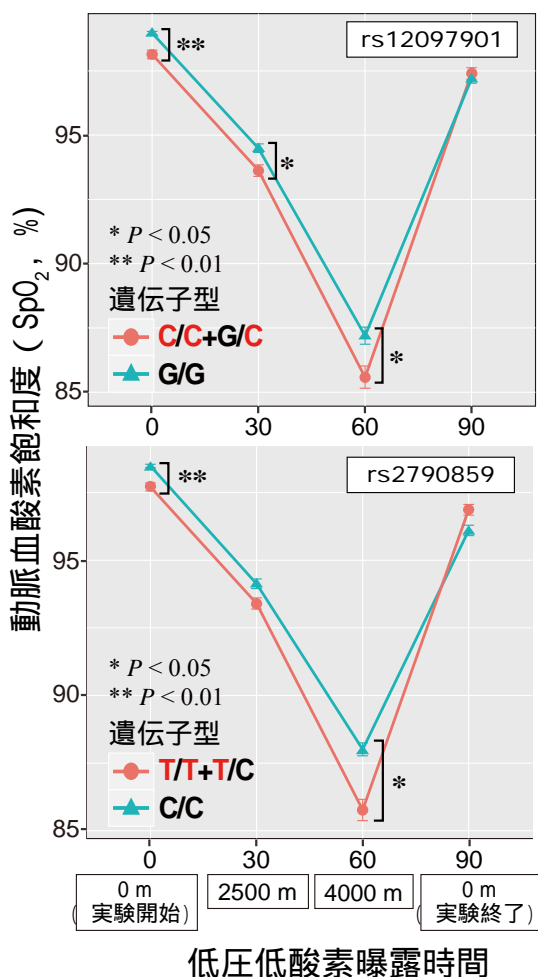
れた。メラネシア集団で目的のハプロタイプが検出されなかったことから、チベット集団以外の現生人類集団ではこのハプロタイプが見つかる可能性は低いと考えられる。また、データベースの情報から、ヒトに近縁なチンパンジーやゴリラにも旧人類ハプロタイプを持つ可能性は低いことが示唆された。

データベースの情報を用いたバイオインフォマティクス的手法により、現生人類集団における *HLA-B\*73* 対立遺伝子の進化学的解析を試みた。その結果、チンパンジーやゴリラにも *HLA-B\*73* 対立遺伝子系統が存在することがわかった。そして、*HLA-B\*73* 対立遺伝子系統がなぜ現代人のみで失われてかつデニソワ人によって再導入されたのか説明できないことや、デニソワ人からは実際に *HLA-B\*73* は検出されていないことなど、先行研究で提唱された仮説を支持する十分な証拠は得られなかった。その他の解析結果と併せて、*HLA-B\*73* は現生人類集団の中で平衡選択により長い間維持されてきた可能性が高いことが示された。この結果は、国際学術雑誌「Immunogenetics」に掲載された。

(2) 低圧低酸素曝露実験を受けた日本人男性の健常者 47 名の生理データと *EGLN1* 遺伝子多型との関連を調査した。本研究において、*EGLN1* 遺伝子内の 2 つの SNPs (rs12097901 と rs2790859) と SpO<sub>2</sub> の値に相互作用の効果がみられた (二次元配置分散分析、 $P=0.008-0.015$ )。また、SpO<sub>2</sub> の潜時 (反応時間に相当) においてもそれらの間で相関を示した (一般化線形モデル、 $P=0.003-0.014$ )。いずれにおいても、高地集団で頻度が高い対立遺伝子をもつ個体のグループは、持たないグループに比べて低い SpO<sub>2</sub> 値を示した (図 2)。さらに、IMPUTE2 プログラムを用いてハプロタイプを推定したところ、高地タイプの対立遺伝子を持つハプロタイプは、高地タイプを持たないハプロタイプに比べて SpO<sub>2</sub> の値が顕著に低かった。SpO<sub>2</sub> の値が低いと酸素運搬能も低いことが予想され、高地で適応的な対立遺伝子は、日本人ではむしろ急性高山病のリスク要因であることが示唆された。この結果は、国際学術雑誌「Journal of Physiological Anthropology」に掲載された。

先行研究により、アンデス高地集団においては、Hb 濃度がその他の高地集団に比べて高く (多くの検体が基準値以上: Beall, 2006) Hb 濃度の増加により酸素運搬能を向上させて適応したと考えられてきた。しかしながら、ボリビア (アンデス) 高地集団 103 検体の生理検査値を調査した結果、Hb 濃度の基準値を上回るような個体は観察されなかった。近赤外分光画像計測法での測定のため Hb 濃度は推定値ではあるが、アンデス集団の高地適応に関わる遺伝・生理的機序には

議論の余地があることがわかった。また、10 検体分の DNA 試料を用いて全ゲノム塩基配列を決定した。その結果、高地適応への寄与が示唆されているペルー集団特異的な SNP においてポリビア集団でも多型が存在し、両集団の遺伝的特性が他の集団に比べて類似していることが示唆された。今後さらに検体を追加し、より精度の高い解析をおこなう計画である。



**図2 . EGLN1 遺伝子多型と SpO<sub>2</sub> の関係**  
 実験曝露時間の30分と60分は標高2500mと4000mの気圧に相当。遺伝子型の赤で示された対立遺伝子は高地適応型。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yasukochi Y, Nishimura T, Motoi M, Watanuki S (2018) Association of *EGLN1* genetic polymorphisms with SpO<sub>2</sub> responses to acute hypobaric hypoxia in a Japanese cohort. *Journal of Physiological Anthropology*, 37(1): 9 (査読有)

Yasukochi Y, Ohashi J (2017) Elucidating the origin of *HLA-B\*73* allelic lineage: Did modern humans benefit by archaic introgression? *Immunogenetics*, 69(1): 63-67 (査読有)

[学会発表](計 1 件)

安河内彦輝, 西村貴孝, 本井碧, 綿貫茂喜. 低圧低酸素環境曝露による経皮的動脈血酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>) と *EGLN1* 遺伝子多型との関連解析, 日本生理人類学会, O3-3, 京都, 2017年11月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

[その他]  
 ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

安河内彦輝 (YASUKOCHI YOSHIKI)  
 三重大学・地域イノベーション推進機構・助教  
 研究者番号: 60624525

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )