

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21247039  
 研究課題名（和文）長寿と適応のホミニゼーション

研究課題名（英文）HOMINIZATION IN LIFESPAN AND ADAPTATION

## 研究代表者

石田 貴文（ISHIDA TAKAFUMI）  
 東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
 研究者番号：20184533

研究成果の概要（和文）：生命科学領域に有用な研究資材、各種哺乳類の生きた細胞とDNA、のバンクが整備された。癌抑制遺伝子p53の機能保全に関しては、霊長類ゲノムで非常に高い保存性を示したが、細胞分裂に伴うp53変異の導入阻止能はヒトに至る系譜で強化されることが示唆された。人類諸集団でp53遺伝子多型をメタ解析したところ、その地理的分布から紫外線強度との関連が示唆され、他のゲノム保守関連遺伝子にも同様の傾向が見られた。

研究成果の概要（英文）：Mammalian cell and DNA repository was established for more than 100 species. Primate p53 genes were highly conserved in the coding regions; however, cellular constraints on the p53 modification during cell senescence were strengthened along hominization. In humans, p53 codon 72 polymorphism is ubiquitously observed with a variety of frequencies; a meta-analysis for this polymorphism suggested an association between its prevalence and UV.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2009年度 | 10,100,000 | 3,030,000  | 13,130,000 |
| 2010年度 | 18,900,000 | 5,670,000  | 24,570,000 |
| 2011年度 | 7,000,000  | 2,100,000  | 9,100,000  |
| 年度     |            |            |            |
| 年度     |            |            |            |
| 総計     | 36,000,000 | 10,800,000 | 46,800,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：ゲノム・バイオリソース・適応

## 1. 研究開始当初の背景

「DNA修復能は個体の寿命に比例する」というゲノム安定性に関する説が過去に出されたが(Hart and Setlaw, 1974)、検索動物種も少ない上、再現性に乏しく信憑性が疑われていた。ヒトに至る霊長類の系統に注目し、フッ素に対するゲノム感受性を指標に、ゲノ

ム安定性を検索し、原猿ではげっ歯類型、真猿ではヒト型となる霊長類の系統進化を反映する結果を得た(Kishi and Ishida, 1993)。

一方、「生体から培養に移した細胞は、それを取り出したもとの生体の寿命を反映し、一定の分裂後に死滅する」という細胞分裂寿命に関する Hayflick の仮説(1965)が提唱さ

れていたが、必ずしも一般化できなかつた。そこで、*in vitro* の系でマカクザルの細胞寿命・老化を追跡し、癌抑制遺伝子 p 5 3 の関与を明らかにした (Shimizu and Ishida, 2002)。

この p 5 3 は、「ゲノムの守護神」として知られる多機能タンパク質で、DNA 損傷に応じて活性化し、DNA を修復し細胞を生かしたり、アポトーシスを誘導し細胞を殺したり、細胞の生死にかかわっている。その機能的な重要性から p 5 3 遺伝子は、生物種を通じて保存性が非常に高いにもかかわらず、機能特性が異なるコドン 72 多型 (Pro72Arg) がヒト固有に見つかっている。申請者らはこの Pro72Arg 多型についてアジア諸民族で詳細な分布を解明したが (Tiawech et al. 2003; Kietthubthew et al. 2003; Settheetham-Ishida et al., 2004; Kashima et al., 2007)、緯度との関連は見られなかつた。また、これらの研究と平行して、アジアヒト集団における DNA 修復遺伝子・解毒代謝関連遺伝子の多様性検索を推進してきた (Kietthubthew et al. 2006; Tiawech et al. 2005; 2006)。

## 2. 研究の目的

ゲノムの安定性にかかわる DNA 修復遺伝子群、解毒代謝酵素関連遺伝子、癌抑制遺伝子 P53 の解析を霊長類を含む哺乳類を対象におこなう (比較ゲノム研究) とともに、変異原・環境毒を作用させた場合に惹起されるゲノムの障害を解析し (細胞障害研究)、種におけるゲノムの特徴が細胞・ゲノム傷害にいかに関与するかを明らかにし、ヒトに至るゲノム保持機構を明らかにする。一方、ヒト種内変異と適応に関しては、p53 遺伝子を中心に上記遺伝子の多様性を検索し集団のニッチェとの関連を特徴付け、機能 (ゲノム安定性) 変異との関連から淘汰の検証をおこなう。

## 3. 研究の方法

研究資材の開発には、野外調査を含むサンプリングと組織培養技術を駆使した。ヒト p53 コドン 72 多型のグローバル解析にはメタ分析法を用いた。遺伝子解析は PCR・ダイレクトシーケンス法を用いた。p53 の機能解析は培養細胞を用いたレポータ解析によつた。

## 4. 研究成果

研究資材の開発については、有袋類を含む哺乳類約 65 種から 350 系統を継代可能とし、国内外を問わず第一級のバンクに成長した。人類学・霊長類学領域で有用と思われる非ヒト霊長類に関して特記すべきことは、唯一の夜行性真猿類であるヨザルの継代細胞 6 系統を、比較対象となるリスザル 4 系統と共に得たことで、活動パターンと紫外線感受性の適

応現象の検証が可能となつた。一方、霊長類以外に関しては、野生・飼育にかかわらず試料収集に努めた (主な継代細胞系統を以下のリストに示す)。特別天然記念物のニホンカモシカについては集団遺伝学解析が可能な 80 個体の試料を得、個体識別用のマイクロサテライトの選別を行った。

| 種名                                          | 株数 |
|---------------------------------------------|----|
| <i>Ailurus fulgens styani</i>               | 1  |
| <i>Ammotragus lervia</i>                    | 1  |
| <i>Arctocephalus pusilus pusilus</i>        | 1  |
| <i>Capricornis crispus</i>                  | 74 |
| <i>Cervus nippon</i>                        | 10 |
| <i>Crocuta crocuta</i>                      | 1  |
| <i>Elephas maximus</i>                      | 1  |
| <i>Felis manul</i>                          | 1  |
| <i>Gazella thomsoni</i>                     | 2  |
| <i>Giraffa camelopardalis tippelskirchi</i> | 1  |
| <i>Hystrix cristata</i>                     | 1  |
| <i>Lepus brachyurus</i>                     | 1  |
| <i>Lutra lutra</i>                          | 1  |
| <i>Macropus rufus</i>                       | 5  |
| <i>Martes memlampus memlampus</i>           | 1  |
| <i>Meles meles anakuma</i>                  | 2  |
| <i>Myrmecophaga tridactyla</i>              | 2  |
| <i>Neofelis nebulosa</i>                    | 1  |
| <i>Nyctereutes procyonoides</i>             | 2  |
| <i>Paguma larvata</i>                       | 1  |
| <i>Panthera leo persica</i>                 | 1  |
| <i>Panthera onca</i>                        | 1  |
| <i>Panthera tigris altaica</i>              | 1  |
| <i>Phascolarctos cinereus adustus</i>       | 1  |
| <i>Potamochoerus porcus</i>                 | 2  |
| <i>Prionailurus bengalensis</i>             | 1  |
| <i>Rousettus aegyptiacus</i>                | 1  |
| <i>Speothos venaticus</i>                   | 1  |
| <i>Sus scrofa</i>                           | 12 |
| <i>Ursus thibetanus japonicus</i>           | 2  |
| <i>Vulpes vulpes</i>                        | 1  |

p53 関連解析については、機能ドメインの比較解析をおこなうためのユニバーサルプライマーを設計し、広く哺乳類について配列決定を進めた。ヒト・類人猿・旧世界ザル・新世界ザル DNA を用いコード領域の塩基配列を比較したが、極めて保存性が高く、比較解析には翻訳後修飾の検討が必要と考えられた。長期継代培養したギャラゴの線維芽細胞の性状解析をした。当該細胞の p53 の塩基配列が解析できなかつたため、p21 をレポーターとして p53 の機能を継代数の少ない細胞と多い細胞で比較したところ、不死化した（継代数 100 代以上）と考えられる細胞で p53 の機能喪失が確認された。過去のデータと併せると、ヒトと齧歯類間を埋める系統で、p53 の機能保持機構に系統差存在し、ヒトに向かうホミニゼーションの方向でその「箍」がきつくなる傾向を示唆した。

既に自他共にデータの集積している Pro72Arg 多型について、関連 2154 報のレポートからフィルターをかけ 129 を選別しメタ解析をおこなった。地球規模における多型分布に有意な勾配と、いくつかの腫瘍と多型の分布に相関を見だし、紫外線強度との関連を示唆するに至った。リアルタイム PCR 法によるヒト p 5 3 コドン 7 2 多型の迅速判定の最適化をおこない、タイの共同研究者に P E F F 試料を用いてその実用性を検討して貰い有用性を確認した。

解毒代謝経路には、第 1 相と第 2 相があるが、第 2 相に焦点を当てた。欠失変異が知られている GSTM1 はこれまで、「欠失ホモ接合」対「野生型ホモ接合+ヘテロ接合」で疾患感受性が検討されてきたが、遺伝子型データの取得が望まれていた。そこで、欠失型アレルを容易に検出できる PCR の系の改良をおこない集団スクリーニングを可能とした。欠失ホモ接合の分布に関しては、GSTT1 ホモ欠失と併せ、メタ分析をすすめ、地理的勾配を見いだした。また、比較ゲノムの観点では、GSTM1 がチンパンジーでも多型性を有することを見いだした。

## 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 20 件) 全て査読有り

1. Furusawa, T., Naka, I., Yamauchi, T., Natsuhara, K., Eddie, R., Kimura, R., Nakazawa, M., Ishida, T., Inaoka, T., Matsumura, Y., Ataka, Y., Ohtsuka, R. and Ohashi, J. Hypertension Susceptibility Gene Prevalence in the Pacific Islands and Associations with Hypertension in Melanesia. *Journal of Human Genetics*, doi:10.1038/jhg.2012.147
2. Naka, I., Hikami, K., Nakayama, K., Koga, M.,

Nishida, N., Kimura, R., Furusawa, T., Natsuhara, K., Yamauchi, T., Nakazawa, M., Ataka, Y., Ishida, T., Inaoka, T., Munkhtulga, L., Iwamoto, S., Matsumura, Y., Ohtsuka, R. Tsuchiya, N. and Ohashi, J. A functional promoter polymorphism of the beta-2 adrenergic receptor gene (*ADRB2*) is associated with obesity in Oceanic populations. *International Journal of Obesity*, doi:10.1038/ijo.2012.206

3. Natphopsuk, S., Settheetham-Ishida, W., Sinawat, S., Pientong, C., Yuenyao, P. and Ishida, T. Risk factors for cervical cancer in northeastern Thailand: detailed analyses for the sexual and smoking behaviors. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* (in press)

4. Morita D, Yamamoto Y, Suzuki J, Mori N, Igarashi T, Sugita M (2013): Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *Journal of Virology* 87(1): 482-488.

5. Hirata A, Tachikawa Y, Hashimoto K, Sakai H, Kaneko A, Suzuki J, Eguchi K, Shigematsu K, Nikami H, Yanai T (2013): Spontaneous T/NK-cell lymphoma associated with simian lymphocryptovirus in a Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Journal of Comparative Pathology* 148: 43-46.

6. Ohtani, H., Naruse, T.K., Iwasaki, Y., Akari, H., Ishida, T., Matano, T. and Kimura, A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics*, 2012, 64: 669-678.

7. Naka, I., Ohashi, J., Kimura, R., Furusawa, T., Yamauchi, T., Nakazawa, M., Natsuhara, K., Ataka, Y., Nishida, N., Ishida, T., Inaoka, T., Matsumura, Y. and Ohtsuka, R. *DRD4* VNTR polymorphism in Oceanic populations. *Anthropological Science*, 2012, 120: 151-155.

8. Kurosaki, T., Ueda, S., Ishida, T., Abe, K., Ohno, K. and Matsuura, T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an AluSx element insertion into an early primate genome. *PLoS One*, 2012, 7:e38379

9. Sakae, C. and Ishida, T. Direct evidence for *Toxoplasma gondii* infection in a wild Japanese serow (*Capricornis crispus*) from mainland Japan. *J. Parasitology*, 2012, 98: 224-225.

10. Yamamoto H, Suzuki J, Matsuda A, Ishida T, Ami Y, Suzaki Y, Adachi I, Wakita T, Takeda N, Li T-C (2012): Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerging Infectious Diseases* 18 (12): 2032-2034.

11. Nakayama, K., Yanagisawa, Y., Ogawa, A., Ishizuka, Y., Munkhtulga, L., Charupoonphol, P., Supannnatas, S., Kuardei, S., Chimedregzen, U.,

Koda, Y., Ishida, T., Kagawa, Y. and Iwamoto, S. High prevalence of an anti-hypertriglyceridemic variant of the MLXIPL gene in Central Asia. *Journal of Human Genetics*, 2011, 56: 828-833.

12. Settheetham-Ishida, W., Yuenyao, P., Natphopsuk, S., Settheetham, D. and Ishida, T. Genetic Risk of DNA Repair Gene Polymorphisms (XRCC1 and XRCC3) for High Risk Human Papillomavirus Negative Cervical Cancer in Northeast Thailand. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2011, 12: 963-966.

13. Ohtani, H., Nakajima, T., Akari, H., Ishida, T. and Kimura, A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics*, 2011:63: 417-428.

14. Furusawa, T., Naka, I., Yamauchi, T., Kimura, R., Nakazawa, M., Ishida, T., Nishida, N., Eddie, R., Ohtsuka, R. and Ohashi, J. The serum leptin level and body mass index in Melanesian and Micronesian Solomon Islanders: focus on genetic factors and urbanization. *American Journal of Human Biology*, 2011, 23: 435-444.

15. Sakai T, Mikami A, Tomonaga M, Matsui M, Suzuki J., Hamada Y, Tanaka M, Miyabe-Nishiwaki T, Makishita H, Nakatsukasa M, Matsuzawa T (2011): Differential prefrontal white matter development in chimpanzees and humans. *Current Biol.* 21: 1397-1402.

16. Nakayama, K., Shotake, T., Takenaka, O. and Ishida, T. Variations in the coding region of the agouti signaling protein gene do not explain agouti/non-agouti phenotypes in macaques. *Journal of Mammalian Evolution*, 2010, 17: 211-214.

17. Kietthubthaw, S., Wickliffe, J., Sriplung, H., Ishida, T., Chonmaitree, T. and Au, W. Association of polymorphisms in proinflammatory cytokine genes with the development of oral cancer in Southern Thailand *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2010, 213: 146-152.

18. Furusawa, T., Naka, I., Yamauchi, T., Natsuhara, K., Kimura, R., Nakazawa, M., Ishida, T., Inaoka, T., Matsumura, Y., Ataka, Y., Nishida, N., Tsuchiya, N., Ohtsuka, R. and Ohashi, J. The Q223R polymorphism in *LEPR* is associated with obesity in Pacific Islanders. *Human Genetics*, 2010, 127: 287-294.

19. Fujimoto, A., Nishida, N., Kimura, R., Miyagawa, T., Yuliwulandari, R., Batubara, L., Mustofa, M.S., Samakkarn, U., Settheetham-Ishida, W., Ishida, T., Morishita, Y., Tsunoda, T., Tokunaga, K. and Ohashi, J. FGFR2, but not EDA, is associated with hair thickness in Asian populations. *Journal of Human Genetics*, 2009, 54: 461-465.

20. Settheetham-Ishida, W., Yuenyao, P.,

Kularbkaew, C., Settheetham, D. and Ishida, T. Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) Polymorphisms in Cervical Cancer in Northeastern Thailand. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2009, 10: 365-368.

[学会発表] (計 4 件)

1. Suzuki, J., Akari, H., Okamoto, M., Yoshida, T., Okabayashi, S.: Thrombocytopenia caused by SRV-4 in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). Satellite Symposium of the 5th Annual Meeting of the ASZWM, Chiang Mai, Thailand, October 2012.
2. Ishida, T. "Stress and Immunity" The 40th Annual Meeting of the Physiological Society of Thailand, International Conference, Khon Kaen, Thailand, May 2011.
3. Ishida, T. Primate cell repository now: 20-year interval since IPS-1990 and its contribution to the primate molecular studies. International Primatological Society XXIII Congress, Kyoto, Japan, September, 2010.
4. Suzuki, J., Yamamoto, H., Ishida, T., Li, T-C, Takeda, N.: Health management of macaque outdoor colonies with focus on hepatitis E infection. International Primatological Society 13th Congress Kyoto 2010, Kyoto, Japan, September 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 貴文 (ISHIDA TAKAFUMI)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号：20184533

### (2) 研究分担者

鈴木 樹理 (SUZUKI JURI)  
京都大学・霊長類研究所・准教授  
研究者番号：10175408

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：