

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570253

研究課題名(和文) マカクザル繁殖集団における適応度関連分子マーカーの開発と野生集団への応用

研究課題名(英文) MHC-linked microsatellite DNA: development of its potential as fitness-related molecular markers in captive breeding colonies of macaques and their application to a phylogeography study

研究代表者

田中 洋之(Tanaka, Hiroyuki)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：20335243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答に関係する主要組織適合抗原複合体(MHC)遺伝子に関する情報を、実験用マカクザル繁殖集団の遺伝管理に用いるため、MHC遺伝子に連鎖するマイクロサテライト(MHC-MS)の多型性を調査した。家系解析の結果、MHC-MS 8遺伝子座のハプロタイプがニホンザルでは初めて明らかになった。病死個体において、MHC-MSと病気の直接の関連はみいだされなかったが、MHC-MSは適応度に関連する分子マーカーとして分析すべきであると考えられた。ブタオザル種群の2種でMHC-MSを分析し、mtDNAの分析結果と比較したところ、地理的放散の過程で2種の地域個体群間にmtDNA浸透があったことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to utilize information on major histocompatibility complex (MHC) genes into genetic management of the captive breeding colonies of Japanese (*Macaca fuscata*) and rhesus (*M. mulatta*) macaques, polymorphisms of microsatellites linked to MHC genes (MHC-MS) were examined. The haplotypes of the eight MHC-MS loci were first determined in Japanese macaques from the results of pedigree analyses. Although no direct association was found between MHC-MS alleles and disease in macaques died of illness, it will be important to genotype MHC-MS loci, as fitness-related markers, to the genetic management of breeding colonies. Finally, polymorphism of MHC-MS was examined in two species of the *M. nemestrina* group (*M. leonina* and *M. nemestrina*). The results were compared with mtDNA phylogeography and suggested that the mtDNA introgression between local populations of *leonina* and *nemestrina* was involved in phylogeographic history of the *M. nemestrina* group.

研究分野：動物遺伝学

 キーワード：主要組織適合抗原複合体 マイクロサテライトDNA マカクザル 繁殖集団 ニホンザル アカゲザル
ブタオザル種群 系統地理学

1. 研究開始当初の背景

当研究所では、30 余年前からマカクザル（ニホンザルとアカゲザル）の繁殖集団を形成し、自家繁殖により、実験用マカクザルの生産を行っている。近縁なアカゲザルやカニクイザルと比べると、ニホンザルは、実験動物の歴史が浅く、世界的な使用頻度も遠く及ばないため、実験動物としての特性研究や繁殖集団の維持管理研究において遅れをとっている。申請者は、前回採択された基盤研究(C)「飼育下マカクザル集団の遺伝的多様性の変化と近親交配の影響に関する研究」(平成20年～22年)において、常染色体上のマイクロサテライト 14～20 遺伝子座を分子マーカーとして、1980 年代から約 30 年間の遺伝的多様性の変化を調査した。その結果、集団設立時から遺伝的多様性の低下は認められたが、現在のマカクザル繁殖集団が、ニホンザル野生群とほぼ同等の多様性を保持していることを明らかにするとともに、群れの構成個体の血縁関係を過去にさかのぼって把握することができるようになった。このとき用いたマイクロサテライトは、自然選択に対して中立であると考えられている。サルの実験動物としての有用性は、個体ごとの遺伝的背景に関する情報をより多くそろえることにより高められると考え、次の段階として、サルの「体質」に関わる分子マーカーの探索を計画した。そこで、免疫応答に密接に関わる主要組織適合抗原複合体(MHC)遺伝子に着目した。

2. 研究の目的

アカゲザルにおいては、MHC 遺伝子群は、第 4 染色体長腕の 5.3Mb にわたって、連鎖して存在する(Daza-Vamenta et al. 2004)。最も確実な MHC の遺伝子判定法は、遺伝子の塩基配列を決定することであるが、個々の遺伝子座における対立遺伝子数は多く、重複により個体によっては遺伝子の数が異なる場合もあるため、分析技術の難易度は高く、時間と費用がかかる。それ故、マカクザル繁殖集団の遺伝管理には現実的ではない。近年、このような MHC 遺伝子に連鎖するマイクロサテライトの遺伝子型を解析することにより、MHC 遺伝子を間接的に調べる方法が開発され、アカゲザルやカニクイザルに応用されるようになった(Doxiadis et al. 2007; Groot et al. 2008; Penedo et al. 2005)。分析は容易になったが、マイクロサテライト対立遺伝子の「同一染色体上の組み合わせ」であるハプロタイプを分類するためには、極端に遺伝的多様性の低い個体群を分析して、複数遺伝子座にわたってホモ接合である個体を見いだすか、数世代にわたって血縁関係の明確な試料を多数分析する必要がある。ニホンザルでは、まだこうした研究例がない。

本研究計画では、異父・異母兄弟や 3 世代以上の家系を含むマカクザル繁殖集団を研究対象にすることにより、MHC に連鎖するマ

イクロサテライトを分析し、適応度関連分子マーカーとして開発することを目的とする。その結果、(1)繁殖集団の遺伝管理の 1 項目として分析できるように、基礎的情報を蓄積する。また、(2)野生集団において、中立なマイクロサテライトとの比較を通して、その多型性の進化的な特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)マカクザルコロニーにおける MHC 連鎖マイクロサテライトの多型性

マカクザル繁殖集団の MHC 連鎖マイクロサテライトの多型性

アカゲザルの MHC 遺伝子群は、第 4 染色体長腕の 5.3Mb にわたって存在する(Daza-Vamenta et al. 2004)。多型解析の対象とした MHC 連鎖マイクロサテライトは 8 遺伝子座であり、テロメア側の D6S1691 座および D6S276 座、*Mamu-A* の *MOG* 遺伝子に連鎖した *MOG-CA* 座、*Mamu-B* の *MIC1* 遺伝子に連鎖した *MICA* 座、クラス 2 の *Mamu-DRA* 遺伝子に連鎖した *DRA-CA* 座、*Mamu-DQA/DQB* 遺伝子に連鎖した D6S2876 座、*Mamu-DPB1* 遺伝子に連鎖した D6S2741 座およびセントロメア側の D6S291 の順に位置している。

マカクザル繁殖集団におけるこれら 8 遺伝子座の多型性について基本的な情報を得るため、ニホンザル嵐山群 (n=41)、ニホンザル高浜群 (n=51)、アカゲザルインド群 (n=47) およびアカゲザル中国群 (n=48) を分析した。8 遺伝子座の効率的な遺伝子型判定を行うため、マルチプレックス PCR 法を確立した。すなわち次の 3 通りのプライマーの組み合わせで、一度の PCR で 2～3 座位を同時に PCR 増幅した：1) D6S1691、D6S276 および D6S291、2) D6S2876 および *DRA-CA*、3) *MICA*、D6S2741 および *MOG-CA*。ポリメラーゼを検討した結果、TOYOBO 社の KOD-FX を用いることにより、3 通り全てのプライマーの組み合わせで、58℃ のアニーリング温度でマルチプレックス PCR を実施することができた。ジェネティック・アナライザー 3130 を用いてフラグメント解析を行い、個体の遺伝子型を判定した。各種の集団遺伝学的パラメータを計算し、遺伝的多様性に関して中立なマイクロサテライトと比較した。また、地域集団間の遺伝距離を MHC 連鎖マイクロサテライトから推定した。MHC 連鎖マイクロサテライトのハプロタイプ（マイクロサテライト対立遺伝子の同一染色体上の組み合わせ）の推定を行うため、アカゲザルインド群およびニホンザル嵐山群を対象に家系解析を行った。

病気個体群における MHC 連鎖マイクロサテライトおよび中立マイクロサテライトの多型性

2006 年から 2010 年頃、霊長類研究所では「血小板減少症」と呼ばれる感染症が蔓延し、ニホンザル波勝群は壊滅した。打撲部分の出血、肺出血または腸管粘膜での出血によって発症が明らかとなるが、そうした個体は血小

板がほとんどなくなり死に至る。その後、血小板減少症は SRV-4 が原因ウイルスになり発症することが解明された。一方、ニホンザル高浜群では、1985 年から 1995 年の間に、下半身麻痺を呈する個体が頻繁に現れた。この病気に関しては、いまだに原因不明である。血小板減少症はウイルスが原因となる感染症であり、免疫応答と関係が深い MHC 遺伝子群の遺伝子型が、感染のしやすさや症状の程度に関係している可能性がある。今回、MHC 連鎖マイクロサテライトの遺伝子型と当研究所でみつかった病気との間に関連あるかどうか調査することを目的として、波勝群 37 個体および高浜群病気個体 8 頭の MHC 連鎖マイクロサテライトを分析し、健康な個体群と比較した。また、個体の遺伝的背景について情報を得るため、中立的なマイクロサテライト 22 遺伝子座を分析した。病気個体(群)の試料は、発症前に採集した保存血液より DNA を抽出して利用した。

(2)野生マカクザル集団への応用

ニホンザル野生個体群における主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域のマイクロサテライト座位の多様性

孤立やサイズ縮小は個体群の遺伝的多様性を減らし、絶滅リスクを増す要因になると考えられている。しかし、野生個体群の適応度変化を調査する方法は開発されておらず、霊長類研究でも新しい方法の開発が必要である。本研究では、マカクの第 4 染色体に位置し、免疫や抗病性を通じ適応度と関わりが深い主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域の遺伝的多様性につき、マイクロサテライト座位を標識に検討した。MHC クラス I 領域にある 6 座位(MHC 座位; D6S2927, D6S2920, D6S2704, D6S2601, MICA, D6S2793)およびその他のゲノム領域にある 20 座位(non-MHC 座位)を対象に、フラグメント分析で個体の遺伝子型を判定した。分析は、宮崎県幸島個体群(48 個体)、幸島以外の宮崎県全県個体群(複数群、220 個体)滋賀県大津 E 群(単一群、39 個体)につき行った。MHC 座位と non-MHC 座位のそれぞれについて、対立遺伝子数(k)とヘテロ接合率(H)を求め多様性の違いを比較した。

ブタオザル種群の野生集団における MHC 連鎖マイクロサテライトの多型調査と系統地理学的研究への応用

研究代表者は、2011 年よりキタブタオザル(*Macaca leonina*)の系統地理学的研究を継続している。本種の分布域から広範な試料採集を行い、近縁種のミナミブタオザル(*M. nemestrina*)とともにミトコンドリア塩基配列から分子系統樹を構築したところ、タイ東部からメコン川西岸に分布するキタブタオザルとスマトラノマレー半島のミナミブタオザルが互いに近縁であることが明らかになった。このことから、ブタオザル種群の地

理的放散の過程で、これらの地域集団間で交雑が起きミトコンドリアの浸透があったと予想された。この仮説を検証するためには、ミトコンドリア以外で両種を区別する分子マーカーの開発が必要であった。マカクザル繁殖コロニーを対象とした多型分析から、MHC 連鎖マイクロサテライトがニホンザルとアカゲザルのそれぞれで特徴的な対立遺伝子の頻度分布を示したので、ブタオザル種群においても種を特徴づけるマーカーの有力な候補と考えられた。本研究では、タイ東部出自のキタブタオ(単一群、35 個体)とスマトラ北部出自のミナミブタオ(単一群ではない、計 13 個体)について、MHC 連鎖マイクロサテライト 8 遺伝子座の多型解析を行い、両種で多型性の基礎情報を蓄積するとともに、種間の遺伝的な違いを定量した。また、中立的なマイクロサテライト 21 遺伝子座も分析し、MHC 連鎖マイクロサテライトの多型性と比較した。後述するように、MHC 連鎖マイクロサテライトが mtDNA で近縁とされたタイ東部のキタブタオとスマトラのミナミブタオを区別したことから、ボルネオ島産ミナミブタオ(3 地域出自、計 18 個体)およびシシオザル(ペット 18 個体)の MHC 連鎖マイクロサテライトを分析し、その結果を加えてブタオザル種群の地理的放散について考察した。

4. 研究成果

(1)マカクザルコロニーにおける MHC 連鎖マイクロサテライトの多型性

マカクザル繁殖集団の MHC 連鎖マイクロサテライトの多型性

MHC 連鎖マイクロサテライトの 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数(k)は、マカクザルの各集団で 2~11 個であった。平均では、嵐山群 5.4 個、高浜群 5.3 個、インド群 6.8 個、中国群 5.4 個であった。ヘテロ接合率の期待値(He)は、高浜群の MICA 座が 0.145 で最も低く、中国群の D6S1691 座の 0.836 が最も高かった。川本ら(2012)にならって、k および He の 8 座位の平均値について、中立的なマイクロサテライト 13 遺伝子座の平均値に対する比をとったところ、嵐山群(k 比 0.98、H 比 0.95)、高浜群(k 比 1.02、H 比 0.98)、インド群(k 比 1.42、H 比 1.16)、中国群(k 比 0.82、H 比 0.94)であった。すなわちインド群の MHC 連鎖マイクロサテライト遺伝子座は、中立的なマイクロサテライト座よりも k と He の両方で高い遺伝的多様性を示したが、残りの 3 群では、高浜群の 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数でほぼ同等の数値であった以外、MHC 連鎖マイクロサテライトの方がより多様性が低かった。D6S2876 座は、4 群全てでハーディ・ワインベルグ平衡からの有意な逸脱が認められた。全ての群れで He よりも観察値の方が小さい値であったので、Daza-Vamenta ら(2004)が報告しているように null allele の存在が疑われる。Nei の遺伝距離を計算したところ、ニホンザル 2 群間

で 0.58、アカゲザル 2 群間で 0.72 となり、MHC 連鎖マイクロサテライトは、地域集団ごとに特徴的な対立遺伝子の頻度分布があることがわかった。家系解析の結果、マカクザルの MHC 領域は密な連鎖状態にあることが予想された。インド群では、血縁のある 12 個体を加えて 59 個体中、4 世代の母子関係 8 例、3 世代の母子関係 16 例および父母子 14 例で遺伝子型の比較を行ったところ、51 個体でハプロタイプ型の推定ができた。D6S2876 座は null allele の影響により、ハプロタイプが確定できない個体があった。最も高頻度のハプロタイプは、テロメア側の D6S1691 座からセントロメア側の D6S291 座の順に、219/214/125/207/240/223/263/212 であり、全体の約 21%をしめた。ニホンザルにおける MHC 連鎖マイクロサテライトのハプロタイプ判定は、本研究が初めての試みである。嵐山群では、血縁のある 9 個体と合わせて 50 個体中、4 世代の母子関係 1 例および 3 世代の母子関係 16 例で家系解析を行ったところ、少なくとも 10 種類のハプロタイプが推定された。そのうち、ハプロタイプ 213/249/126/201/259/214/256/208 は複数の母系列に属する個体で見つかったことから、ニホンザルにおいても、MHC 領域は全長に渡って密な連鎖状態にあることが示唆された。今後は、群内の父子関係を明確にすることにより、全個体のハプロタイプ判定を行う必要がある。

病気個体群における MHC 連鎖マイクロサテライトおよび中立マイクロサテライトの多型性

嵐山群および高浜群に対する波勝群の遺伝距離は、中立マイクロサテライトにおいて、それぞれ 0.79、0.91、MHC 連鎖マイクロサテライトにおいては、それぞれ 0.61、0.60 と推定された。ゲノム全体の違いと比べると、波勝群の MHC 領域は、嵐山群および高浜群に類似した傾向があると考えられた。また波勝群には、D6S2876 座で null allele のホモ接合体や MICA 座でも null allele の存在が疑われる個体があったが、これらを含めて個体の対立遺伝子型と飼育記録や死亡時期との関連を調査したが、特に目立った傾向は見つからなかった。SRV-4 の感受性と MHC 領域の遺伝子型には直接の関係性はないと考えられた。一方、高浜群の病気個体 8 頭についても、MHC 連鎖マイクロサテライトおよび中立マイクロサテライトの多型性を健康な現在の高浜群と比較した。Nei の遺伝距離は、中立マイクロサテライトで 0.37、MHC 連鎖マイクロサテライトで 0.10 となり、2 集団の遺伝的な違いは大きくない。高浜群で過去に起きた病気についても、MHC 領域の遺伝子型とは関連が見つからなかった。しかしながら今回の試みから、実験用ザルの繁殖集団において、個体の免疫応答に関連する「体質」を分子マーカーで判定することは重要であると考えら

れた。遺伝子型判定が、MHC 領域の直接的な分析法に比べて簡単であるため、MHC 連鎖マイクロサテライトを実験用繁殖集団の遺伝管理に利用することは、将来的に必要なと考えられた。

(2) 野生マカクザル集団への応用

ニホンザル野生個体群における主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域のマイクロサテライト座位の多様性

k および H の平均値では、幸島個体群が、MHC と non-MHC のいずれでも他より低い多様性を示した。宮崎県全県個体群と大津 E 群では、指標やゲノム領域により、多様性の関係が異なっていた。一方、座位平均値で、non-MHC に対する MHC の比を比べると、幸島個体群 (k 比 0.87、H 比 1.01) に対して、宮崎県全県個体群 (k 比 1.39、H 比 0.91) と大津 E 群 (k 比 1.21、H 比 0.99) では、k 比と H 比の大小関係が逆転していた。以上の結果より、島嶼隔離にある幸島個体群では遺伝的多様性の低下とともに、MHC 領域の遺伝的多様性の変化が他個体群と異なることが示された。MHC 領域のマイクロサテライト座位の多様性を区別し比較する方法が、野生の霊長類個体群の遺伝的多様性変化と適応度変化および絶滅リスクの関係を調査するのに有効な方法になるか、今後さらに研究事例を増やし、個体群パラメータとの関係も検討して検証する必要がある。

ブタオザル種群の野生集団における MHC 連鎖マイクロサテライトの多型調査と系統地理学的研究への応用

タイ東部のキタブタオおよびスマトラ北部のミナミブタオの各集団で、MHC 連鎖マイクロサテライトの 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (k) は、それぞれ 2~9 個、5~10 個であった。また、 H_e はキタブタオで 0.16~0.85、ミナミブタオで 0.62~0.83 であった。両種の多型性の違いは、集団の構成個体の違いによるところが大きいと思われる。ブタオザル 2 種についても、D6S2876 座はハーディ・ワインベルグ平衡からの有意な逸脱を示した。マカクザル繁殖集団と同様に、 H_e よりも観察値の方が小さい値であったので、null allele が存在すると考えられる。k および H_e の平均値について、中立マイクロサテライト (21 遺伝子座) に対する MHC 連鎖マイクロサテライトの比をとったところ、キタブタオ (k 比 0.81、H 比 0.91)、ミナミブタオ (k 比 0.92、H 比 0.99) となり、両種において MHC 連鎖マイクロサテライトの多型性が、中立マイクロサテライトと同等か、それより若干低くなっていることがわかった。キタブタオとミナミブタオの遺伝距離は、中立マイクロサテライトで 0.48、MHC 連鎖マイクロサテライトで 0.76 となった。主座標分析を行ったところ、両種はそれぞれの種ごとにまとまった。以上のことから、MHC 連鎖マイクロサテライトは、

mtDNA で近縁性を示したタイ東部のキタブタオとスマトラ北部のミナミブタオを区別するマーカーとして利用できると考えられた。この結果を踏まえ、ボルネオ島のミナミブタオの MHC 連鎖マイクロサテライトのデータを加えて解析したところ、ボルネオ島のミナミブタオとキタブタオの遺伝距離は 0.81、mtDNA で大きな遺伝的分化を示したミナミブタオのスマトラ集団とボルネオ集団の遺伝距離は 0.24 となった。主座標分析の結果、ミナミブタオのスマトラ及びボルネオ集団は比較的大きな多様性を含みながらも 1 つのクラスターにまとめられ、キタブタオのクラスターと区別された。以上の結果は、キタブタオとミナミブタオの種形成後、二時的な接触により前者から後者へ mtDNA の浸透があったことを示唆する。ミナミブタオのスマトラ/マレー集団とボルネオ集団の mtDNA の大きな遺伝的分化は、スンダ大陸に広く分布した祖先集団が東西に分断されたため (Zeigler et al. 2007) と考えられているが、これは mtDNA の分析結果のみから導き出された仮説である。本研究の「mtDNA 浸透説」でも説明が可能である。また、mtDNA で分布域北部のキタブタオに近縁性を示したシシオザルの MHC 連鎖マイクロサテライトは、タイ東部のキタブタオやミナミブタオと明瞭な違いを示した。今後は、分布域北部のキタブタオの MHC 連鎖マイクロサテライトの分析を進めることにより、ブタオザル種群の生物地理学的進化に新たな考察を加えることができると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

田中洋之, 濱田穰 (2014) マカク属ブタオザル種群をめぐる分類・種構成と分子系統地理. 第 64 回日本人類学会大会 (2014/11/1, アクトシティ浜松コングレスセンター).

Tanaka H, Kawamoto Y, Malaivijitnond S et al. (2014) Phylogeography of northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*) and phylogeographic history of the *M. nemestrina* group. International Primatological Society XXV Congress Vietnam 2014 (2014/8/12, Melia Hotel)

田中洋之, 川本芳, Malaivijitnond S ら (2014) キタブタオザル (*Macaca leonina*) の系統地理とブタオザルグループの分岐シナリオ. 第 61 回日本生態学会大会 (2014/3/18, 広島国際会議場).

田中洋之, 川本芳, Malaivijitnond S ら (2013) キタブタオザル (*Macaca*

leonina) の系統地理. 第 29 回日本霊長類学会大会 (2013/9/7, 岡山理科大学) 川本芳, 樋口翔子, 田中洋之, 川本咲江 (2012) ニホンザル野生個体群における主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域のマイクロサテライト座位の多様性. 第 28 回日本霊長類学会大会 (2012/7/8, 椋山女学園大学)

〔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:
出願年月日:
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

田中 洋之 (TANAKA HIROYUKI)
京都大学・霊長類研究所・助教
研究者番号: 20335243

(2) 研究分担者

川本 芳 (KAWAMOTO YOSHI)
京都大学・霊長類研究所・准教授
研究者番号: 00177750

(3) 連携研究者

濱田 穰 (HAMADA YUZURU)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号: 40172978

(4) 研究協力者

川本 咲江 (KAWAMOTO SAKIE)
京都大学・霊長類研究所・技能補佐
樋口 翔子 (HIGUCHI SHOKO)
京都大学・霊長類研究所・技術補佐
森本 真弓 (MORIMOTO MAYUMI)
京都大学・霊長類研究所・技術職員