

平成 22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19207008
 研究課題名 (和文) 霊長類のゲノムデータを用いた近縁種間・種内多様性解析と保全生物学への応用
 研究課題名 (英文) Analysis of between-species and intra-species diversity using primate genome data and application to conservation biology
 研究代表者
 斎藤 成也 (SAITOU NARUYA)
 国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授
 研究者番号：30192587

研究成果の概要 (和文)：

霊長類の保全生物学と種内の多様性研究のために、ヒトとアカゲザルのゲノム配列の比較から、変異性の高いイントロン領域をはさんだエクソンが両種で完全に一致している領域を抽出し、未解読の霊長類の DNA 断片を増幅できる 2303 ペアのプライマーデータベース “Prim-Prim” を作成し公開した。これらのプライマーを用いて、主としてテナガザル 6 種の塩基配列決定を行い、これらプライマーの有用性を確かめた。

研究成果の概要 (英文)：

For primate conservation biology and for intraspecies diversity study, we developed database called “Prim-Prim”. Through comparison of human and macaque genomic sequences, intronic regions sandwiched with identical exonic sequences between two species were extracted, and 2,303 primer pairs which can amplify DNA fragment of unsequenced primate genomes were listed in this database, and it is open to public. We used these primers to determine nucleotide sequences of 6 gibbon species, and showed usefulness of these primers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	26,300,000	7,890,000	34,190,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
総計	40,400,000	12,120,000	52,520,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：霊長類, DNA 多型, ゲノム解析, 保全生物学, 種間交雑

1. 研究開始当初の背景

ヒトが属する哺乳綱霊長目にはおよそ 300 種が存在するが、人間を除くすべての霊長類は、いわゆるワシントン条約で「絶滅危

惧種」に指定されている。また Conservation Internationalによれば、そのうちの 1/4 が絶滅のリスクにさらされている。保全生物学的観点からみて、霊長類は重要な研究対象であ

る。ヒトに系統的にもっとも近縁な類人猿に限ってみると、チンパンジーはもっとも研究が進んでおり、近年、ミトコンドリアDNAだけでなく、核DNAについても種内の多様性が詳細に調べられている（たとえば、最近ではチンパンジーの亜種間の関係を調べた Fischer et al., 2006 (Current Biology)の論文がある）。他の大型類人猿（ボノボ、ゴリラ、オランウータン）については、主としてミトコンドリアDNAの塩基配列を比較した研究はあるが（たとえば、我々が発表した Noda et al. 2001 (J. Heredity)の論文）、核DNAはほとんど調べられていない。またアジアに分布する小型類人猿、テナガザル科 (Hylobatidae) については、ミトコンドリアDNAの塩基配列を比較した研究がいくつかあるが (Hayashi et al. 1995 (J. Mol. Evol.); 我々が発表した Noda et al. 2001 (J. Heredity) など)、科内の系統関係とその多様性を含めて、十分わかっていない。

類人猿以外の霊長類については、それらの系統関係がミトコンドリアDNAについて調べられているか、あるいは核DNAにコードされた特定の遺伝子 (MHCや血液型など) についての研究が行なわれているだけである。

日本は歴史的に類人猿を含む霊長類の研究がさかんであり、生物保全についても、大型類人猿については SAAGA (Save African and Asian Great Apes) などの活動がある。絶滅を危惧されている生物の種保存のためには、系統情報が基礎データとして重要であり、また各種内の遺伝的多様性の把握も重要である。分子系統学的研究としては、DNA雑種法による研究 (Sibley and Alquist 1987, J. Mole. Evol.)、ミトコンドリアDNAの塩基配列に基づく研究 (Horai et al. 1995, P. N. A. S.) がある。研究代表者の斎藤らは、ミトコンドリアDNAの16SRNA遺伝子領域の塩基配列をテナガザル8種で比較し、種内の遺伝的多型の程度がヒトよりも高いことを示した。最近では、平井啓久らが、一部のテナガザルについてDNAと染色体の種内変異を調べている。

ゲノムの塩基配列：ヒトゲノム配列が2004年に決定されて以来、霊長類のゲノム配列は、チンパンジーはヒト21番染色体に対応する22番染色体長腕の精密配列決定 (2004) と、全ゲノムショットガン法を用いた概要配列が、アカゲザルについては概要配列が決定・公開され、オランウータンについても、概要配列決定計画が進んでいる。

2. 研究の目的

ヒト、チンパンジー、アカゲザルのゲノム配列を比較し、3種の中で完全一致する配列が変異性の高いゲノム領域をはさんでいる部分を抽出する。この解析により、ゲノム全

体に分布する「狭鼻猿類 (ヒト上科と旧世界猿) ユニバーサルプライマー」の候補を数万種類同定し、ヒトゲノムにおける染色体上の位置とともに本研究計画専用のウェブサイト PRIM-PRIM で公開する。次に本研究では、これら狭鼻猿類ユニバーサルプライマーが挟むゲノム領域のうち、既知の遺伝子が含まれているもののうち、ヒトゲノム上の位置が各染色体で均等に分布するように考慮して、数百種類を選択する。これらのゲノム領域を、旧世界猿・類人猿それぞれについて、各種複数個体で塩基配列の決定を行ない、近縁種間の系統関係と多様性を推定する。これらの結果は、論文として発表するとともに、狭鼻猿霊長類の保全生物学研究者への基礎データとして、本研究計画専用のウェブサイト PRIM-PRIM で公開する。

この、ゲノム情報をもとにした塩基配列の解析によって、狭鼻猿霊長類各種の系統関係を解明し、同時にそれぞれの種における種内の遺伝的多様性を推定して、準絶滅危惧種の保全生物学に寄与することが、本研究の第一の目的である。

本研究の第二の目的は、近縁種間の過去の遺伝子交流パターンの推定である。現在は異所的あるいは生殖隔離が進んでいる場合には同所的に分布している近縁種も、過去に種分化した直後には、生殖隔離も地理的隔離も十分ではなかったはずである。このとき、地理的障壁の一時的消失など様々な要因によって種間雑種が生じ、その後もどし交配によって雑種集団が消失しても、長い間雑種の影響がゲノムの一部に残ることが予想される。そのような雑種の痕跡は、核ゲノム内の多領域を近縁な複数種について調べることによって、浮き立たせることができる。本研究では、まさにそのようなデータが得られるので、保全生物学研究に資するだけでなく、進化の過去の歴史を再構成し、種の分化前後の詳細をたどることをもうひとつの目的とする。

3. 研究の方法

<平成19年度>

本研究計画の遂行のために新規に購入するPCクラスターに、ヒト、チンパンジー、アカゲザルのゲノム配列をNCBIのデータベースからダウンロードする。これら3種の中で完全一致する配列 (数十bp以上の長さ) が変異性の高いゲノム領域 (数kb) をはさんでいる部分を抽出するソフトウェア (相同性検索システム BLAST を組み込んだもの) を開

発し、これを用いて相同性が高い～低い～高いというパターンをゲノム全体から検索する。これは、PCRプライマーには進化的保存性（相同性）が高い部分がふさわしいが、種内や近縁種間の変異を調べるには、変異の高い領域にしぼって解析するほうがいいからである。ただし、STR（マイクロサテライト）などのリピート領域は、遺伝子系図や系統ネットワークなどの解析にふさわしくないので、基本的に塩基置換が生じている部分を対象とする。

これらの大規模配列解析により、おそらく数万領域が抽出されると推定される。これらの配列データを、ゲノム全体に分布する「狭鼻猿類ユニバーサルプライマー」の候補として、ヒトゲノムにおける染色体上の位置とともに、本研究計画専用のウェブサイトPRIM-PRIMで公開する。「霊長類」は英語でPrimates、PCRプライマーは英語でPrimerである。どちらの単語も同じラテン語の語根を持つことから、この名称とした。PRIM-PRIMでは、このようなゲノム配列比較の結果のほか、従来霊長類遺伝学で研究されてきたDNA多型領域の検索結果についてもデータベース化する。以上のコンピュータを用いた研究は、研究代表者の斎藤が担当する。

次に本研究では、これら狭鼻猿類ユニバーサルプライマーが挟むゲノム領域のうち、既知の遺伝子が含まれているもののうち、ヒトゲノム上の位置が各染色体で均等に分布するように考慮して、数百種類を選択する。これらのゲノム領域を、旧世界猿・類人猿それぞれについて、各種複数個体で塩基配列の決定を行なう。チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、各種テナガザル、旧世界猿各種（ニホンザル、カニクイザル、ヒヒなど）、および一部の新世界猿については、細胞培養により大量のDNAを用意できるシステムを構築して、多数のゲノム領域を解析できるようにする。このシステムの構築は、研究分担者の石田が担当する。霊長類のサンプルはワシントン条約などの制約があるため、国内で調達する。ひとつは、石田が長年収集し維持している霊長類の培養細胞であり、もうひとつは京都大学霊長類研究所の共同研究あるいは国内の動物園にいる霊長類からの細胞取得である。

塩基配列の決定には、本研究計画の遂行のために新規に購入する自動塩基配列決定装置および国立遺伝学研究所と東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻にある既存の装置を用いる。研究代表者の斎藤と研究分担者の石田が担当する。

決定した塩基配列を解析して、霊長類、特に狭鼻猿類における近縁種間の系統関係と種内の多様性を推定する。これらの結果は、論文として発表するとともに、狭鼻猿類

の保全生物学研究者への基礎データとして、本研究計画専用のウェブサイトPRIM-PRIMで公開する。核DNAの場合は組換えの可能性があるので、遺伝子系図ではなく、系統ネットワークを描く。実際に、マウス亜種間と近縁種の20遺伝子を比較した結果（斎藤研究室、未発表）では、系統ネットワークにより、過去に遺伝子内組換えがあった可能性がわかっている。

<平成20年度以降>

前年度に引き続き、比較する霊長類の種数・個体数を増やして、塩基配列の決定を続行する。

一方、テナガザルのBACクローンライブラリー作成が、国立情報学研究所の藤山秋佐夫教授のグループによって平成18年度現在計画されており、平成20年度には、これらBACクローンの末端配列（BAC-end sequence; BES）が大量に決定されると予想される。これらの配列はテナガザル全ゲノムの1～2%をカバーする量となる。

そこで、本計画で初年度に構築した抽出システムに、これらテナガザルのゲノムデータも追加する。米国ですではじまっているオランウータンの全ゲノム配列決定が平成20年度以降に利用可能になれば、それらも用いて再解析を行い、「狭鼻猿類ユニバーサルプライマー」データベースをより高い品質にする。

初年度から決定をはじめた多数のゲノム領域の塩基配列を比較することによって、同一種内の分集団（亜種や地方品種など）の集団構造が、ゲノム領域ごとに異なっていることを見いだすことができると期待される。霊長類は一般に種間の生殖隔離が弱いことが知られているので、一度地理的隔離などによって種分化した後でも、近接することにより雑種が形成される可能性がある。ふたたび分かれても、ゲノムの一部には一時的な雑種形成の痕跡が残る可能性がある。本研究では、ゲノム内の多数領域を近縁種で比較することにより、そのようパターンを見いだすことができる可能性がある。

4. 研究成果

<平成19年度>

研究代表者の斎藤の研究室に、16本キャピラリーの塩基配列自動決定装置を導入した。研究分担者の石田がシロテナガザルとフクロテナガザル各10個体のDNAサンプルを提供し、それらを実験に用いた。すでにゲノム配列の解読が終了しているヒト (*Homo sapiens*) とアカゲザル (*Macaca mulatta*) のゲノム配列を比較し、変異性の高いイントロン領域をはさんだエクソンが両種で完全に一致している領域を抽出した。この中からPCRプライマーとしてのよい化学的性質を持つ部分配列を

” Primer3”により同定し、これら2303組を「狭鼻猿類ユニバーサルプライマー」の候補配列として予測した。プライマー予測の妥当性を検証するためにこれらのうち10組を用いてヒト、チンパンジー(Pan troglodytes)、シロテナガザル(Hylobates lar)、フクロテナガザル(Symphalangus syndactylus)のゲノムDNAの増幅を試みた。その結果いずれのサンプルにおいても期待される塩基配列をもつDNA断片が得られたことが確かめられた。

<平成20年度>

斎藤：昨年に続いてテナガザル2種(アジュールテナガザルとフクロテナガザル)についてイントロン領域の配列決定を進めた。データベース Prim-Prim で公開している2000箇所以上の候補領域のうち、すでに100種類の領域について、どちらの種でも塩基配列決定ができることを確認している。ただし、領域・個体によってはうまくDNAが増幅されない場合が若干存在する。ヒトゲノムとアカゲザルゲノムの比較から取り出されたイントロン配列、およびエクソン末端のPCRプライマー領域であるが、テナガザルはアカゲザルよりもヒトに系統的に近いとはいえ、分岐時間が1500万年以上なので、独自の塩基置換を蓄積したために、狭鼻猿ユニバーサルPCRプライマーとして設計したものが働かなかったものと思われる。塩基配列が決定できたものについては、これらを多重整列し、系統樹を作成したが、現在のところこれら2種間での過去の交雑を示唆するパターンはまだ発見されていない。

石田：アジア産類人猿としてテナガザルに焦点を当て、その系統分類・社会構造解明のため、ゲノム解析を進めた。テナガザル4属のうち3属4種についてミトコンドリアDNA全長の塩基配列を決定し系統解析に用いると共に、種判別に有用な領域の探索をおこない、ND3-4部分を抽出した。これらの情報をもとに、日動水テナガザル国内血統登録台帳と対照しながら、国内保有のテナガザルの種判別を逐次おこなった。一方、新たな試料の創成については、非霊長類哺乳類を中心に20種の細胞・DNAを保存した。

<平成21年度>

霊長類の保全生物学と種内の多様性研究というふたつの目的のために、“Prim-Prim”というデータベースを作成した。このデータベースは既知の霊長類ゲノム配列の比較から、未解読の霊長類のDNA断片を分子マーカーとして増幅させることのできる「霊長類ユニバーサルプライマー」2303ペアを収めている。すでにゲノム配列の解読が終了しているヒトとアカゲザルのゲノム配列を比較し、変異性の高いイントロン領域をはさんだエクソンが両種で完全に一致している領域を抽出した。この中からPCRプライマーとしてのよい化

学的性質を持つ部分配列を同定し、これらを「狭鼻猿類ユニバーサルプライマー」の候補配列として予測した。これらのプライマー58対を用いて、主として石田が収集したテナガザル6種の36個体のDNAサンプルを用い、塩基配列決定を行った。配列決定は斎藤の研究室で実施した。現在これらの配列データを解析中である。結果を2010年9月に京都で開催される国際霊長類学会で発表する予定である。

研究資材の開発・拡充については、各種霊長類のDNA・細胞に加え、広く哺乳類全般から試料を収集し、60生物種のリソースが作成できた。小型類人猿の系統分岐に関しては、属レベル、種レベル、亜種レベルで良い解像度を得られるよう、解析領域の選定をした。分子生態学・保全学への応用を念頭に、排泄物からのDNAを常染色体STRの解析に使えるよう条件設定をおこなった。以上は石田が担当した。

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11件)

1. Nakayama, K., Shotake, T., Takenaka, O. and Ishida, T. (2010) Variations in the coding region of the agouti signaling protein gene do not explain agouti/non-agouti phenotypes in macaques. *Journal of Mammalian Evolution*, (in press). 査読有
2. Kitano T., Noda R., Takenaka O., and Saitou N. (2009) Relic of ancient recombinations in gibbon ABO blood group genes deciphered through phylogenetic network analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 465-471. 査読有
3. Aarnink A., Estrade L., Apoil P. A., Kita Y. F., Saitou N., Shiina T., and Blancher A. (2010) Study of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) DRA polymorphism in four populations. *Immunogenetics*, 62(3): 123-136. 査読有
4. Matsudaira, K. and Ishida, T. (2010) Phylogenetic relationships and divergence dates of the whole mitochondrial genome sequences among three gibbon genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 454-459. 査読有
5. Hattori E., Nakajima M., Yamada K., Iwayama Y., Toyota T., Saitou N., and Yoshikawa T. (2009) Variable number of tandem repeat polymorphisms of DRD4: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with

schizophrenia. *European Journal of Human Genetics*, 17 : 793-801. 査読有

6. 齋藤成也, 鈴木留美子, 河合洋介, 石田貴文 (2009) 霊長類の種内変異を解析するための PCR プライマーデータベース Prim-Prim の開発とその応用. *DNA 多型*, 17 : 63-65. 査読無

7. Blancher A., Bonhomme M., Crouau-Roy B., Terao K., Kitano T., and Saitou N. (2008) Mitochondrial DNA sequence phylogeny of four populations of the widely distributed cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis fascicularis*). *Journal of Heredity*, 99(3) : 254-264. 査読有

8. Nakajima, T., Ohtani, H., Satta, Y., Uno, Y., Akari, H., Ishida, T. and Kimura, A. (2008) Natural selection in the TRL-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics*, 60 : 727-735. 査読有

9. Nakayama, K., Shotake, T., Takenaka, O. and Ishida, T. (2008) Variation of the melanocortin 1 receptor gene in the macaques. *American Journal of Primatology*, 70: 778-785. 査読有

10. Shimada M. K., Hayakawa S., Fujita S., Sugiyama Y., and Saitou N. (2009) Skewed matrilineal genetic composition in a small wild chimpanzee community. *Folia Primatologica*, 80(1) : 19-32. 査読有

11. Liu Y.-H., Takahashi A., Kitano T., Koide T., Shiroishi T., Moriwaki K., and Saitou N. (2008) Mosaic genealogy of the *Mus musculus* genome revealed by 21 nuclear genes from its three subspecies. *Genes and Genetic Systems*, 83 : 77-88. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 齋藤成也. 霊長類の種内変異を解析するための PCR プライマーデータベース Prim-Prim の開発とその応用, 日本 DNA 多型学会第 17 回学術集会, 2008 年 11 月 21 日, 東京

2. 齋藤成也. 霊長類ゲノム多様性解析のための Prim-Prim DB の開発とその応用, 日本人類学会第 62 回大会, 2008 年 11 月 1 日, 名古屋市

3. 松平一成, 石田貴文. ミトコンドリアゲノム配列を用いた *Hylobates* と *Symphalangus* の分岐年代推定, 日本霊長類学会, 2008 年 7 月 5 日, 東京

4. Saitou N. Utility of phylogenetic network for deciphering nucleotide sequence history, NIG International Symposium, 2008 年 3 月 28 日, 東京

5. Saitou N. Evolutionary analysis on

primates, 79th Annual Meeting of the Genetics Society of Japan, 2007 年 9 月 21 日, 岡山市

[図書] (計 2 件)

1. 齋藤成也. 講談社サイエンティフィック, 絵でわかる人類の進化 (2009) 192 頁

2. 齋藤成也. 共立出版, ゲノム進化学入門, (2007) 257 頁

[その他]

ホームページ等

<http://sayer.lab.nig.ac.jp/index-j.html>

<http://sayer.lab.nig.ac.jp/~saitou/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 成也 (SAITOU NARUYA)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授
研究者番号 : 30192587

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし