

平成 21 年 6 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19770073
 研究課題名 (和文) 実験用霊長類 (マカク属) における種内および種間の遺伝子的多様性に関する研究
 研究課題名 (英文) Inter- and Intra-specific Genetic Diversity in Genus *Macaca*.

研究代表者
 長田直樹 (Naoki Osada)
 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究員
 研究者番号：70416270

研究成果の概要：

感染症などの医学研究，創薬などの薬学研究において，哺乳類実験動物，特に霊長類はヒトと遺伝的に非常に近く，重要な位置を占める．ところが，医薬学の実験にサル類の遺伝的多様性がどのような影響を及ぼすかは全くの未知数である．また，これらの実験用霊長類のなかにどれだけの種間・種内の遺伝的多様性があるのかもはっきりとはわかっていないのが現状である．これらを明らかにするため，マカク属の中でも実験用霊長類としてメジャーなアカゲザルとカニクイザルの個体より得られたDNAの多型解析を行った．その結果，1) カニクイザルの遺伝的多様性は現生人類よりも4-5倍高い値を示す，2) カニクイザルとアカゲザルでは，種がわかれた後に遺伝子交流があったかもしれない，3) 薬剤代謝にかかわる遺伝子のいくつかは種間の遺伝子での分化度が非常に高い，ということが示された．

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	150,000	2,350,000

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：進化

1. 研究開始当初の背景

感染症などの医学研究，創薬などの薬学研究において，哺乳類実験動物，特に霊長類はヒトとの近縁性により重要な役割を占める．ところが，医薬学の実験にサル類の遺伝的多様性がどのような影響を及ぼすかは全くの未知数である．また，これらの実験用霊長類の

なかにどれだけの種間・種内の遺伝的多様性があるのかもはっきりとはわかっていないのが現状である．これまで大規模な遺伝解析が行われてきたのは，アメリカで数多く利用され，ゲノム配列も決定されたアカゲザル (*Macaca mulatta*) のみである．しかし，日本ではアカゲザルに近縁なカニクイザル (*Macaca fascicularis*) も非常によく利用

されている。したがって、二種のゲノムレベルでの違いを調べることは、両者を用いた実験結果の比較などにおいて非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

実験用霊長類として用いられているマカク属内の種内および種間の遺伝的多様性を調べる。また、近縁な霊長類間での遺伝子の分化パターンを調べることで、種分化の過程を明らかにすることが目的である。本研究では進化速度が比較的遅く、ヒトでの先行研究と定量的な比較が可能な一塩基置換 (SNP) を指標にして、サルが多様性と種差を調べていくことにする。

3. 研究の方法

インドネシア、マレーシア、フィリピン由来の非血縁カニクイザル計 24 個体、中国由来のアカゲザル系 5 個体について、常染色体上の核遺伝子 54 座位、X 染色体上の核遺伝子 9 座位について PCR 法により増幅した遺伝子断片を直接配列決定した。常染色体 54 座位のうち、27 座位は遺伝子をコードする領域、27 座位は遺伝子間領域である。また、薬剤代謝にかかわる CYP 遺伝子 (Cytochrome P450 遺伝子) 7 座位についても解析を行った。得られたデータを、集団遺伝学の理論 (isolation-with-migration モデル) に基づいて解析を行った。

4. 研究成果

研究の結果いくつかのことが明らかになった。カニクイザルの遺伝的多様性は塩基多様度でおよそ 0.3% と現生人類よりも 4-5 倍高い値を示す。このことはサルの遺伝的多様性が非常に高く、その遺伝的背景が医学実験などに非常に大きな影響を与える可能性を示している。また、フィリピン産のカニクイザルは他の産地のサルと比べて遺伝的に離れた位置にいた。個体のハプロタイプ間の遺伝距離を二次元上に展開した図を図 1 に示す。また、インドネシア、マレーシア集団は祖先集団から 5 倍ほど集団の有効サイズが大きくなっているのに対して、フィリピン集団は集団サイズが縮小したのではないかと推測が得られた。アカゲザルに関しては従来の研究と同様、祖先集団から 3 倍ほど集団サイズが大きくなったという推定が得られた。

カニクイザルとアカゲザルの平均的な遺伝距離は約 0.4% と、それぞれの種内多型よりも有意に高い値を示した。これは二種が遺伝的に分化していることを示している。ところが、

二種間には種間で共通した多型も多くみられた。常染色体上の 54 座位を利用して、集団の歴史を、合祖理論に基づき MCMC (Markov Chain Monte Carlo) 法により推定すると、両者の種分化はおよそ 100 万年前であるが、その後も弱くはあるけれど有意な量の遺伝子交流があったことが示された。この結果は現在の両者の分布域において雑種を形成していることと矛盾しない。つまり二種のサルの種分化は完全な異所的 (allopatric) によるものではなく並所的 (parapatric) に進んだのではないかということが推測される。集団の歴史の推定図を図 2 に示す。

並所的種分化のような状況では、環境に対する適応や生殖隔離にかかわるような遺伝子は、種間を超えて伝達しにくいことが予想される。これを確かめるために、薬剤代謝にかかわる CYP 遺伝子の多様性を同時に調査した。CYP 遺伝子は薬剤代謝遺伝子として有名であるが、もちろん自然界に薬剤は存在しないので、食物などに含まれる有害な物質を代謝していると考えられる。したがって、この遺伝子群が環境適応に関係している可能性は十分に考えられる。CYP 遺伝子の多様性と種差を調べたところ、いくつかでは種間の遺伝子での分化度が有意に他の遺伝子群より高かった。また、CYP3A5 遺伝子の全エクソンについて新たに 100 個体以上のアカゲザル、カニクイザルの DNA 配列を決定したところ、種によってほぼ 100% 異なっている DNA の変異を 4 カ所発見した。ほとんどの変異 (3/4) は CYP3A5 がコードするタンパク質のアミノ酸配列を変えるものであり、この分化に自然選択が強くかかわっていることが示唆された。タンパク質の立体構造を推定してみたところ、確かにこれらの変異のいくつかは基質特異性にかかわる部位に存在していた。これらの結果は、CYP 遺伝子群のいくつかは種の表現型の違いに強くかかわっていることを示唆している。

以上の結果は種分化という生物を考える上で非常に重要な情報を与えるだけでなく、霊長類を用いた実験における遺伝的バックグラウンドの重要性を示唆するものである。また、アカゲザルとカニクイザルが非常に近縁であり、アカゲザルのゲノム配列がカニクイザルの遺伝解析に利用可能であることを示している。

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 7 件)

- Yasuhiro Uno, Yutaka Suzuki, Hiroyuki Wakaguri, Yoshiko Sakamoto, Hitomi Sano, Naoki Osada, Katsuyuki Hashimoto, Sumio Sugano, Itsuro Inoue. Analysis of expressed sequence tags from liver in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A systematic identification of drug-metabolizing genes. *Febs Lett.* 582: 351-358 (2008).
- Naoki Osada, Katsuyuki Hashimoto, Yosuke Kameoka, Makoto Hirata, Reiko Tanuma, Yasuhiro Uno, Itsuro Inoue, Munetomo Hida, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keiji Terao, Jun Kusuda, Ichiro Takahashi. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics* 9: 90 (2008).
- Hisayuki Nomiyama, Kunio Hieshima, Naoki Osada, Yoko Kato-Unoki, Kaori Otsuka-Ono, Sumio Takegawa, Toshiaki Izawa, Yutaka Kikuchi, Sumio Tanase, Retsu Miura, Jun Kusuda, Miki Nakao, Osamu Yoshie, Akio Yoshizawa. Extensive Expansion and Diversification of the Chemokine Gene Family in Zebrafish: Identification of a Novel Chemokine Subfamily CX. *BMC Genomics* 9: 222 (2008).
- Naoki Osada, Sumio Sugano, Yutaka Suzuki. Evolution of Gene Expression in Human and Chimpanzee Brains. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester (2008).
- Naoki Osada, Hideki Innan. Duplication and Gene Conversion in the *Drosophila melanogaster* Genome. *PLoS Genet.* 4: e1000305 (2008).
- Naoki Osada, Shuhei Mano, Jun Gojobori. Quantifying dominance and deleterious effect on human disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 841-847 (2009).
- Shintaro Iwashita, Kentaro Nakashima, Motoki Sasaki, Naoki Osada, Si-Young Song. Multiple duplication of the bucentaur gene family, which recruits the APE-like domain of retrotransposon: identification of a novel homolog and distinct cellular expression. *Gene* 435: 88-95 (2009).

[学会発表] (計 8 件)

- カニクイザル骨髄, 脾臓, 膵臓由来 cDNA ライブラリーの解析 長田直樹, 平田誠, 田沼玲子, 亀岡洋祐, 高橋一郎 第 31

回日本分子生物学会 神戸国際展示場
2008年12月

- ヒトゲノム中の塩基置換多型と疾患関連遺伝子について 長田直樹 第 62 回 日本人類学会 愛知学院大学 2008 年 11 月
- 実験用霊長類 (マカク属) 間における遺伝子交雑と種分化について 長田直樹 第 80 回日本遺伝学会 名古屋大学工学部 2008 年 9 月
- 実験用マカク間における遺伝的分化と交雑についてのゲノム解析 長田直樹, 亀岡洋祐, 高橋一郎, 寺尾恵治 第 24 回日本霊長類学会 明治学院大学 2008 年 7 月
- カニクイザル cDNA ライブラリーコレクションの拡充とその解析 長田直樹, 橋本雄之, 楠田潤, 亀岡洋祐, 田沼玲子, 平田誠, 高橋一郎 第 30 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2007 年 12 月
- ヒトゲノム中での遺伝子発現パターンと淘汰圧との関係 長田直樹 第 79 回日本遺伝学会 岡山大学 2007 年 9 月
- ゲノムワイドな淘汰圧の検出と遺伝子発現パターンについて 長田直樹 第 9 回日本進化学会 京都大学 2007 年 9 月
- カニクイザル由来 cDNA データベースの構築、アカゲザルとの比較解析 長田直樹, 橋本雄之, 平田誠, 田沼玲子, 亀岡洋祐, 楠田潤 第 23 回日本霊長類学会 滋賀県立大学 2007 年 7 月

[図書] (計 1 件)

- Naoki Osada, Sumio Sugano, Yutaka Suzuki. Handbook of Human Molecular Evolution. David N. Cooper (Editor), Hildegard Kehrer-Sawatzki (Editor), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester .pp 1236-1241 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田直樹

独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部 研究員

研究者番号: 70416270

図 1

常染色体 54 座位の DNA 配列より推定されたインドネシア産カニクイザル (●), マレーシア産カニクイザル (■), フィリピン産カニクイザル (▲), 中国産アカゲザル (◆) のハプロタイプ間の遺伝距離 (多次元尺度構成法による)

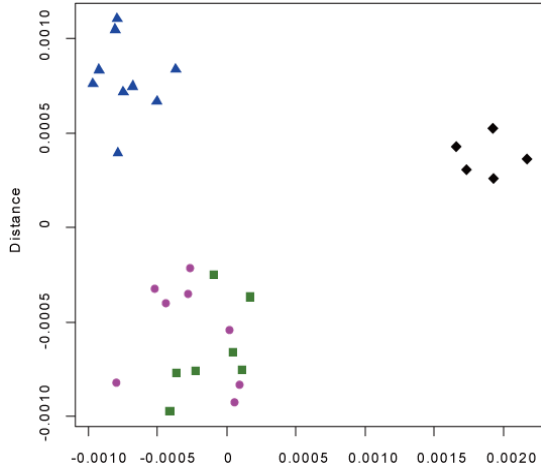


図 2 集団の歴史の推定値(IMモデルによる)

