

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590813

研究課題名(和文) 中米先住民集団の遺伝的多様性の解明：分子生物学的およびウイルス学的アプローチ

研究課題名(英文) Investigations into genetic diversity in Mesoamerican populations.

## 研究代表者

黒崎 直子 (Kurosaki, Naoko)

千葉工業大学・工学部・教授

研究者番号：60337706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、純系を保ちながらも任意の交配集団としての集団サイズを維持してきたと考えられる中米の現代先住民集団の遺伝的多様性とウイルス感染症の伝播について検討した。まず、ゲノムDNAのSTR領域における多型性分析により、民族内および民族間の遺伝的系統関係について検討した結果、比較的近接した地域に居住する集団であるにもかかわらず、それらのアリル出現頻度に大きな違いがみられた。

また、ウイルス感染症については、B型肝炎ウイルス(HBV)とエプスタインバーウイルス(EBV)の遺伝子を検出した。その結果、HBV遺伝子の検出率が約23%、EBV遺伝子の検出率は約17%であった。

研究成果の概要(英文)：This study investigated genetic diversity and transmission of viral diseases in modern indigenous groups in Central America, which are likely to have maintained randomly mating populations of relatively constant size, without substantial change to genetic identity. Analysis of polymorphisms at short tandem repeats within genomes was performed to investigate intra- and inter-ethnic phylogenetic relationships. It was found that there are considerable differences in allele frequencies among groups despite their relatively close geographic locations. Moreover, the Hepatitis B virus gene and the Epstein-Barr virus gene were detected in approximately 23% and 17% of the tested populations, respectively.

研究分野：ウイルス学

キーワード：国際保健学

## 1. 研究開始当初の背景

1492年のコロンブス新大陸到来を契機に、新大陸先住民の生活と環境のすべてが一変した。新大陸へ渡り征服者となったヨーロッパの人々によって各地で多くの先住民が殺戮されたが、真の大量殺戮は持ち込まれた伝染病によって新大陸全域で大規模に引き起こされた。ヨーロッパやアジアでは、牛・豚・羊・山羊・馬・様々な家禽といった家畜を飼い、住まいもそれらと近接していたが、新大陸ではそうではなかった。そのため、新大陸の先住民はヨーロッパ人が持ち込んだ様々な伝染病に対して免疫力がなかった。1518年、1521年、1525年、1558年、1589年の天然痘の大流行、1546年のチフスの大流行、1558年のインフルエンザの大流行、1614年のジフテリアの大流行、1618年のはしかの大流行などによって、先住民の人口は、コロンブス新大陸到来のわずか数十年後には半分以下、場所によっては数%台へと激減した。カリブ海のように先住民が事実上絶滅した地域もある。遺伝学用語でいう“ビン首効果”が新大陸各地の先住民族で大規模に起きたのである。そして、労働力を補う目的で大量のアフリカ系住民が奴隷として新大陸へ導入された結果、黄熱病などのアフリカの伝染病を新大陸へさらに持ち込むこととなった。17世紀後半からは徐々に回復したが、スペイン人との混血、アフリカ系との混血が進み、新大陸の各地でアジア系、ヨーロッパ系、アフリカ系が混在・混合した社会が形成されている。このため、新大陸先住民族の集団遺伝学的原初構造の解明は極めて難しい問題であった。集団構造の遺伝学的解明のためには、血縁関係のない試料が一定数以上必要であり、そのためにはある程度以上の大きさをもつ非血縁集団からのランダムサンプリングが不可欠である。しかし、これまで報告されてきた新大陸先住民族の集団遺伝学的研究で用いられていたサンプル数は小さく、しかも血縁関係のある小集団から得られたものであった。あるいは、複数の小集団それぞれの数個体からなる混合試料であった。したがって、これらの解析から新大陸先住民の原初的位置づけ（コロンブス到来前の集団遺伝学的特徴）を知ることは不可能であり、ましてや新大陸への人類拡散や各先住民族の類縁関係について議論することには根本的な欠陥が伴っており、新大陸先住民の集団遺伝学的研究は極めて脆弱な状況であった。近年、新大陸の人々の間で、先住民の血を受け継ぐことに対する誇りが芽生え、自らの出自を科学的に探ろうとする機運が高まってきた。しかし、征服側を祖先とする研究者と被征服側を祖先とする研究者との間での上述の

伝染病による人口減少の評価に関する感情的な議論の歴史、北米の先住民で特に顕著であるが征服側を祖先とする研究者に対する拒絶などから、どのように人類は新大陸へ渡り拡がっていったのかを解明することは地球全域への人類の適応・拡散に関する重要な課題と位置づけられながら、研究は遅々として進んでこなかった。本研究課題は、日本人研究者にとって新大陸が地理的に遠いため必ずしも関心が高いとは言えないが、欧米とくに米国の研究者は強い関心を抱いている。我々は近年、分子人類学分野で新大陸の研究を長年にわたりおこなってきた研究者（本研究に連携研究者として参加）を通じて、この研究を遂行するために最適な試料を得られるという極めて貴重な機会を得た。本研究では、征服側・被征服側のどちらにも組みしない中立的立場から、すなわち真に学問的立場から新大陸先住民の遺伝的多様性を先コロンブス時代と後コロンブス時代で求め、コロンブス渡来がヒトへ及ぼした集団遺伝学的影響を以下の方針で明らかにする。

本研究では第一に、純系を保ちながらも任意の交配集団としての集団サイズを維持してきたと考えられる現代先住民集団の遺伝的多様性を求める。この条件を満たす新世界先住民族として中米メキシコ、グアテマラ、ホンジュラス、エルサルバドルなどの先住民を対象として研究を進める。それは、これらの地域の先住民が、1492年以前より大きな集団を形成してきたこと、現在も比較的大きな集団を維持していること、移入してきたヨーロッパ系ならびにアフリカ系との混血が非常に少ない先住民族が複数集団存在することなどから、遺伝的多様性を求めるに最適な条件が整っているのが理由である。また、サンプル採取のインフォームド・コンセントを得る際に、他の提供者との血縁関係などの聞き取り調査も可能であるため、高い精度をもって非混血・非血縁のランダムサンプリングが可能である。これにより、純系としての（1492年以前の原初の系統だけを引き継ぐ）中米先住民族の遺伝的多様性を明らかにすることが可能である。

第二に、同じく中米地域の古代遺跡から出土した古人骨のDNA分析によって、1492年以前の新世界先住民族の遺伝的多様性を直接に求める。古代中米には大規模な古代都市国家が数多く存在しており、それらの遺跡からは多数の古人骨が出土している。これをもちいて、1492年以前の原初の中米先住民族の遺伝的多様性（先コロンブス時代の新大陸先住民の遺伝的多様性）を明らかにする。また、この地域では時代と共に古代都市国家が移り変わっ

ているが、複数の古代遺跡から出土した古人骨のDNA分析をおこなうことによって、時代性・地域性を含めた古代新世界先住民族の遺伝的多様性を明らかにすることが可能である。

第三に、上記で求めた現代・古代の両集団の遺伝的多様性を比較する。両者の遺伝的多様性にどのような違いが存在するのか、存在するゲノムタイプの違い、その頻度の違いなどから、コロンブス到来によるビン首効果を明らかにすることが可能である。ここで明らかにするのは、単純に人口に関するビン首効果ではなく、集団の維持に不可欠な“遺伝的多様性(多様度)”に関するビン首効果についてである。第四に、性行為や産道感染などの接触感染を主経路とする病原ウイルスの検出を現代先住民集団でおこない、ウイルス・ゲノムタイプを決定する。ゲノムタイプが存在し、その頻度に人類集団差が存在することが既に知られているヘルペスウイルス、成人T細胞白血病ウイルス、EBウイルス、B型肝炎ウイルスを分析対象とする。ウイルス・ゲノムタイプに関する既知の頻度データ、ならびに当該現代先住民集団と地理的に近くに位置し、移入してきたヨーロッパ系あるいはアフリカ系との混血が認められる近隣集団とのウイルス・ゲノムタイプの比較により、用いた現代先住民集団の社会的隔離度(純系度)を推定する。また、これにより得られた結果を上記第一項目で求めた結果の解釈、ならびに第三項目で求めた結果の解釈に応用し、深い議論と推考を進めていく。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、新大陸の現代先住民集団ならびに1492年以前の古代都市国家の遺跡から出土した古人骨をもちいて、現代・古代の両人類集団それぞれについて遺伝的多様性を求め比較することによって、先コロンブス時代の新大陸先住民集団の実像とコロンブス到来による遺伝的多様性への影響(ビン首効果の実態)を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究では、純系を保ちながらも任意の交配集団としての集団サイズを維持してきたと考えられる中米の3つの現代先住民集団の遺伝的多様性を求めると共に、同じく中米メキシコおよびグアテマラの古代遺跡から出土した古人骨のDNA分析によって、1492年以前の新世界先住民族(複数の集団)の遺伝的多型解析を行った。

さらに、性行為や産道感染などの接触感染を主経路とするウイルスの検出を上記の中米現代先住民集団でおこない、ウイルス・ゲノ

ムタイプを決定した。ウイルス・ゲノムタイプに関する既知の頻度データ、ならびに、移入してきたヨーロッパ系あるいはアフリカ系との混血が認められる近隣集団とのウイルス・ゲノムタイプの比較により、もちいた現代先住民集団の社会的隔離度(純系度)について検討した。

### (1) 現代先住民集団の遺伝的多様性の解明

純系を保ちながらも任意の交配集団としての集団サイズを維持してきたと考えられている中米メキシコおよびグアテマラの現代先住民集団の生体試料(血液ならびに口腔粘膜)を収集した。それらの試料について、ミトコンドリアDNAの高変異領域(HVR)の塩基配列を決定し、さらに、常染色体上のsingle-locus VNTRである、STR(マイクロサテライト)領域における多型性分析を行い、中米現代先住民の集団内および集団間の遺伝的系統関係およびその多様性について検討した。

長年にわたり分子人類学分野の研究をおこなってきた連携研究者の支援を得て、メキシコ(オアハカ州サポテカ族、メキシコ州マサウア族)、グアテマラ(高地キチュー族)の生体試料を各30~60個体分収集した。

収集した中米先住民族由来のDNAサンプルについてミトコンドリアD-loop領域(HVR)の塩基配列を決定し、配列間の比較およびハプログループによるタイピングにより、中米現代先住民族の集団内および集団間の遺伝的多様性の検討を行った。

同様に中米先住民族由来のDNAサンプルについて、アプライドバイオシステム社のAmpFLSTR Identifiler Kitを用いてSTR(マイクロサテライト)15座位における多型性分析を行った。

### (2) 古代先住民集団の遺伝的多様性の解明

中米メキシコのメキシコシティー近郊にあるテオティワカン遺跡(紀元前2世紀~6世紀)から出土した古人骨試料を収集した。それらの古人骨からDNAを抽出し、ミトコンドリアDNA D-loop領域の塩基配列を決定し、現代先住民と同様にハプログループのタイピングを用いて中米古代先住民の集団遺伝学的解析を行った。

長年にわたり分子人類学分野の研究をおこなってきた連携研究者の支援を得て、テオティワカン遺跡から出土した古人骨試料約100個体からDNAを抽出した。

それら古人骨由来のDNAサンプルについてミトコンドリアD-loop領域(HVR)の塩基配列を決定し、配列間の比較およびハプログループによるタイピングにより、前項で得た中

米現代先住民集団間との間で遺伝的系統分析を行った。

### (3) 接触感染を主経路とするウイルス検出とゲノムタイプの決定

接触感染を主経路とする広く一般的なウイルスであり、ウイルス・ゲノムに様々なタイプが存在すると共に、その頻度に集団差が存在することが既に知られている EB ウイルスならびに B 型肝炎ウイルスについて、収集した中米現代先住民を对象に、ウイルス遺伝子の検出とそのゲノムタイプを決定した。また、ウイルス重感染によるウイルス遺伝子の発現調節を検討するために、ウイルス遺伝子発現由来のタンパク質をプロメガ社の超高感度ルミノメーター GloMax20/20n を用いて検出し、検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### 現代先住民集団の遺伝的多様性の解明

中米現代先住民由来の DNA サンプルについて、先ずミトコンドリア D-loop 領域 (HVR) の塩基配列を決定し、さらにハプログループによるタイピングを行ったところ、検討した 3 集団のいずれも北米の先住民に多くみられるハプログループ A は全くみられず、南太平洋や南米の先住民に多くみられるハプログループ B (B2) が、サポテカ族: 98%、メキサウア族: 96%、高地キチエー族: 94% と高頻度に認められた。

さらに、中米現代先住民由来の DNA サンプルについて、STR (マイクロサテライト) 15 座位における多型分析を行ったところ、全 121 サンプルのうち、55 サンプルで 13 座位以上の型判定が可能であり、各座位において出現するアリルの分布をみると、全ての座位で特定の 3~5 のアリルに収束する傾向がみられた。一方、この分析結果においては、現代人の DNA をテンプレートとして用いているにもかかわらず、グアテマラの高地キチエー族で型判定不能となる 1 座位 (D21S11) が存在した。これについては、これまでに報告されていない特異な結果であることから、この座位において STR 配列の周辺に民族特有の変異が存在している可能性があると考えられた。そこで、この座位について、独自にプライマーの設定を変えて検討したところ、高地キチエー族 38 個体中 16 個体で STR 配列の近傍に特有の 6 塩基の挿入が出現していることが明らかになった。

#### 古代先住民集団の遺伝的多様性の解明

テオティワカン遺跡から出土した古人骨試料から DNA を抽出し、それら古人骨由来の DNA

サンプルについてミトコンドリア D-loop 領域 (HVR) の塩基配列を決定するべく、PCR による増幅を試みた。しかし、中米は火山地帯であり、土壌が酸性に傾いているため、そこから出土した骨の保存状態が悪く、DNA の断片化が進んでいることから、その検出は予想以上に困難を極めた。結局、検討した 110 個体のうち、塩基配列の決定が可能であったのは 18 個体であった。さらに、決定できた配列も部分的で、ハプログループの分類も完全には特定できないものが多かったが、概ね分類可能であったものの半数はハプログループ B 群に属していた。一方、わずか 1 個体であるが北米先住民に多くみられるものの、中米ではこれまで報告がないハプログループ X に属するものが認められた。

### 接触感染を主経路とするウイルス検出とゲノムタイプの決定

B 型肝炎ウイルス (HBV) のゲノムは約 3.2 kb あり、その遺伝子配列の 8% の違いから Genotype A から Genotype J までの 9 つの遺伝子型 (Genotype I は C の亜型) に分類されている。また、これらの遺伝子型や亜型には地域特異性が存在することも明らかとなっている。遺伝子型の違いは、HBV 感染後の症状の経過やインターフェロンの感受性、核酸アナログ製剤に対する耐性ウイルスの出現率などである。そのため、HBV 感染の有無と遺伝子型を同定することは、疫学的にも臨床的にも非常に重要である。メキシコを含む中南米は Genotype F と Genotype H の感染が多いことが知られている。メキシコには、コロンブス以降の欧州渡来人や奴隷として連れてこられたアフリカ系の人たちとその混血、そして純系を保ちながらも任意の交配集団としての集団サイズを維持してきたと考えられる中米現代先住民などがいるが、これまで中米現代先住民における HBV の感染調査は行われていなかった。そこで本研究では、中米現代先住民の DNA から HBV の遺伝子を検出するとともに、その遺伝子型を同定した。具体的には、HBV 粒子の最外殻であるエンペロタンパク質をコードする S 遺伝子に含まれる major S 領域を標的としたプライマーを設計し、nested PCR 法にて HBV の遺伝子の特異的に検出した。その結果、HBV 遺伝子の検出率は約 11% であった。また、HBV 遺伝子の分子系統解析をおこなったところ、これらは Genotype A と Genotype C であることが明らかとなった。さらに超微量に存在する遺伝子を検出できるデジタル PCR 法にて再検討したところ、HBV 遺伝子の検出率は約 23% であった。

つぎに、同集団の DNA サンプルにおける

Epstein-Barr virus (EBV) の遺伝子を検出した。EBV は、1964 年にパーキットリンパ腫の患者から発見されたウイルスで、パーキットリンパ腫だけでなく伝染性単核症や上咽頭がんの原因ウイルスである。パーキットリンパ腫は赤道地帯に地理的に限局しているが、伝染性単核症は西欧諸国に多くみられ、本邦でも最近多くなっている。EBV 遺伝子の検出は、GENBANK:V01555.2 より、109462-109674 領域の遺伝子をデジタル PCR 法にて増幅して行った。その結果、中米現代先住民族の EBV 遺伝子の検出率は約 17%であった。これらのサンプル中、HBV 遺伝子と EBV 遺伝子の両方が検出されたのは、1 サンプルであった。このサンプルについてはウイルスが重感染していることが推測された。

そこで、超高感度ルミノメーターを用いてウイルス重感染によるウイルス遺伝子の発現調節をレポータータンパク質の発現を利用して検討したところ、EBV 遺伝子は他のウイルス遺伝子の発現を増強させることはないことが確認された。このことから EBV との重感染があっても、もう一方のウイルスの発現が活性化されることはないと考えられる。

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

### 現代先住民集団の遺伝的多様性の解明

中米現代先住民族のミトコンドリア DNA のハプログループ解析において、検討した 3 集団のいずれにおいても、北米の先住民に多くみられるハプログループ A が全くみられず、南太平洋や南米の先住民族に多くみられるハプログループ B (B2) が、高頻度に認められたことは、これらの中米先住民族が、南方 (南太平洋) から南米を経て渡来した可能性を示す結果として大変興味深い。

また、中米現代先住民族の STR (マイクロサテライト) 多型分析において、出現するアレルの分布が、全ての座位で特定の 3~5 のアレルに収束する傾向がみられており、さらにその出現頻度が 3 民族で極めて類似していることから、ミトコンドリア DNA の解析結果と考え併せ、これらの民族が共通祖先を有している可能性が示唆されたことは中米現代先住民族の系統を解明する上で、大きな成果と考えられる。

一方で、グアテマラの高地キチュー族における STR (D21S11) 近傍に特有の 6 塩基の挿入が存在していることが明らかになったが、この挿入は、他の 2 民族では認められなかった。この配列の挿入時期と経緯については、さらに対象を広げて検討を進めることで中米現代先住民族の系統分析に有用な情報が得ら

れるものと期待される。

### 古代先住民集団の遺伝的多様性の解明

テオティワカン遺跡から出土した古人骨試料については、骨の保存状態が悪く、DNA の断片化が進んでいたことから、検討する総個体数の確保ができず期待した成果を上げることはできなかった。しかし、分類可能であったものの半数はハプログループ B 群に属しており、またわずかに 1 個体であるが北米先住民に多くみられる、ハプログループ X に属するものが認められたことから、この遺跡の古代民族がアメリカ大陸を北方から移動して来た可能性が高いことが判明した。

今回検討した現代先住民族と古代遺跡人骨の DNA 分析結果を考え合わせると、テオティワカンの古代人は北方系である一方、中米現代先住民族は南方系であり、祖先系が異なっている可能性が高いことが判明したことは、人類学および集団遺伝学的に極めて意義のある知見と看做される。

### 接触感染を主経路とするウイルス検出とゲノムタイプの決定

ヘルペスウイルスの仲間である Epstein-Barr virus (EBV) は広く世界に存在し、成人の感染率は 90% 以上である。本研究で中米現代先住民族の EBV 遺伝子の検出を行った結果、EBV 遺伝子の検出率は 17%であった。このことから、中米現代先住民族における EBV 感染率は世界の感染率に比べて非常に低いことが推測される。

また、B 型肝炎ウイルス (HBV) の遺伝子の検出についても nested PCR 法から超微量の遺伝子を検出できるデジタル PCR 法に切り替えて再検討した結果、中米現代先住民族における HBV 遺伝子の検出率は約 23%であった。HBV には世界中で 20 億人が感染していると推計されており、中国やアジア地域においては成人の 10% 程度が感染していると推測されている。ヨーロッパも感染率が高いことが知られているが、北米の感染率は 1% 未満であるように HBV の感染には地域差がある。本研究結果より、中米現代先住民族では、世界の感染率と比べて EBV の感染率は低いが、HBV の感染率は高いという非常に興味深い結果が得られた。さらに、HBV のゲノムタイプとしてこれまで中南米では Genotype F と Genotype H の感染が多いことが知られていたが、本研究で Genotype A と Genotype C の感染もあることが明らかになったことは新しい知見である。

## (3) 今後の展望

### 先住民集団の遺伝的多様性の解明

本研究における中米現代先住民族および古人骨由来 DNA の分析については、先住民族の

検討対象および古人骨データの蓄積をさらに進めて行くことで、地域および時間をそれぞれ軸とする三次元的な系統分析が可能と考えられる。今回の知見でも、アメリカ大陸の中央部である中米（メソアメリカ）地域が、時代により北方および南方からそれぞれ渡来した人類集団が入り組んだ形、または淘汰される形で構成されていた可能性が示唆されており、この地域特異の系統解明が進むことが大いに期待される。

接触感染を主経路とするウイルス検出とゲノムタイプの決定

ウイルス遺伝子の検出は、検出方法の条件の影響を大きく受けるため、検出感度の高い手法を用いるだけでなく、複数の遺伝子配列の検出を行うことが望ましい。それにより、ウイルス感染者を見逃すことなく検出し、ウイルスの伝播様式を解明することができると考える。

また、EBV や HBV 同様に体液を介して感染するウイルス（成人 T 細胞白血病ウイルスやヘルペスウイルス等、複数種のウイルス）の遺伝子の検出やゲノムタイプの決定を行うことで、その集団の社会的隔離度を明らかにすることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

なし

[学会発表]（計 1 件）

後藤 才郎、照沼 修、黒崎 久仁彦、植田 信太郎、王瀝、Acuna Victor、Celta Gomez-Trejo、Julio Granados、杉山 三郎、

山下 篤哉、黒崎 直子：メキシコ少数民族における HBV 感染および遺伝子型の分析（第 2 報）第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（福岡県福岡市）2012 年 12 月 11～14 日

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒崎 直子 (KUROSAKI Naoko)

千葉工業大学・工学部・教授

研究者番号 60337706

(2) 研究分担者

黒崎 久仁彦 (KUROSAKI Kunihiro)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号 60240701

(3) 連携研究者

植田 信太郎 (UEDA Shintaro)

東京大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号 20143357