

E-13 霊長類における旨味受容体 T1R1/T1R3 のアミノ酸応答性の評価

三坂巧, 石丸喜朗, 戸田安香(東大院・農生科) 所内対応者: 今井啓雄

旨味受容体 T1R1/T1R3 は多種類のアミノ酸に対し応答することが知られているが、ヒトとマウスでは応答するアミノ酸の種類が異なる。本研究では、味覚受容体発現細胞を用いた味の評価技術を利用し、様々な動物種の旨味受容体のアミノ酸応答性を調査し、旨味受容体のアミノ酸配列の違いとアミノ酸への応答性の違いを比較検討することを目的としている。

まず、リスザル、マントヒヒの肝臓サンプルからゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を鋳型として、旨味受容体遺伝子 TAS1R1 のコード領域をゲノム PCR 法により取得した。配列確認を行ったところ、ヒト T1R1 との相同性は、アミノ酸配列でリスザル T1R1 が 88%、マントヒヒ T1R1 が 93%であった。リスザル、マントヒヒともに、T1R1 のリガンド選択性に関与する残基として推定している残基に、ヒトとは異なるアミノ酸残基を保有していたため、ヒト T1R1 とは異なるアミノ酸応答性を示すことが期待された。続いて、機能解析を行うために、オーバーラッピング PCR 法を用いて TAS1R1 の 6 個のエキソン領域を連結させ、T1R1 コード領域全長を哺乳類細胞発現用ベクター(pEAK10)に挿入した。今後、得られた発現プラスミドを用いて培養細胞系により、これら非ヒト霊長類 T1R1 のアミノ酸応答性を評価する予定である。

E-14 クロリン e6 の逆行性輸送と光反応による投射選択的神経破壊法の開発

額額大輔(生理研・生体システム) 所内対応者: 宮地重弘

運動情報処理のメカニズムを深く理解するためには、脳の運動関連領域を繋ぐ各経路がどのような運動情報の出力を担っているのか詳細を明らかにすることが必要である。そのためには、特定の投射経路を選択的に破壊できれば、その経路の機能を行動レベルで明らかにできるはずである。そこで本研究では、逆行性神経トレーサーと光増感物質クロリン e6 と近赤外光レーザー照射を利用した経路選択的破壊技術の確立を目指す。クロリン e6 は、近赤外光照射により活性酸素を発生し、神経細胞を破壊することが知られている。この物質を効果的に神経終末から取り込ませ、逆行性軸索輸送させることができれば、きわめて簡便に投射選択的な神経破壊が実現できるはずである。そこで高効率の逆行性輸送物質であるデキストランを利用し、このデキストランとクロリン e6 を化学的に結合したものをサルの一次運動野に注入した。その結果、運動前野へのデキストラン-クロリンの逆行性輸送が組織学的に観察され、より効率的にサルの中枢神経系でクロリン e6 が逆行性輸送されることが確認できた。以上の結果から、デキストラン-クロリンを用いることでサルでの選択的神経破壊が可能になると考えられる。

E-15 ニホンザルを対象とした高解像度 CNV スクリーニング解析

尾崎紀夫, Aleksic Branko, 久島周(名古屋大・院・医学系研究科・精神医学分野) 所内対応者: 郷康広

自閉症スペクトラム障害、統合失調症の発症に強い影響を及ぼす稀なゲノムコピー数変異(copy number variant; CNV)が近年多数同定された。本研究では、精神疾患の妥当性の高いモデル動物を同定することを企図して、ニホンザルを対象とした CNV 解析を実施した。

ニホンザル 198 頭の末梢血から抽出されたゲノムを用い、array CGH(comparative genomic hybridization)で高解像度の CNV 解析を行った。本研究では特に表現型への強い影響が期待される頻度の低い稀な CNV に焦点を当てた。

その結果、数 10kbp 程度の小規模 CNV から数 Mb 程度の大規模 CNV までが同定された。その中には神経発達に関連する遺伝子に機能的な影響を与えるもの(特に遺伝子のコーディング領域と重なる部分の欠失)が含まれていた。さらに精神疾患の発症脆弱性への関与が報告された遺伝子に機能的な影響を与える CNV も見出した。

これら CNV を有する個体は精神疾患の霊長類モデルとなる可能性があり、表現型を含めた詳細な検討が必要である。

E-16 チンパンジー iPS 細胞の樹立と薬物動態研究への応用

松永民秀, 中村克徳, 岩尾岳洋, 佐藤大介, 小玉菜央, 奥村啓樹(名市大・院・薬), 鶴飼茜(名市大・薬)

所内対応者: 今井啓雄

【目的】本研究は、チンパンジー iPS 細胞由来肝細胞を用いて薬物動態試験等に利用可能なモデル系の構築並びにサルやヒトとの種差の原因を進化の過程から解明することを最終目標とする。本年度は、iPS 細胞樹立及び分化の技術習得のため、チンパンジーの iPS 細胞樹立研修、ヒト及びマウスの iPS 細胞樹立及び iPS 細胞の肝細胞への分化と薬物動態試験を目的とした。

【材料】マウスの線維芽細胞は、鹿児島大学の宮田教授より、ヒト iPS 細胞は国立成育医療研究センターの梅澤博士よりご供与頂いた。ヒト iPS 細胞の樹立は、生体肝移植患者より提供頂いた体細胞を用い、倫理委員会の承認内容を遵守して行った。

【結果】チンパンジー線維芽細胞から iPS 細胞樹立研修は、慶応義塾大学医学部生理学教室にて行った。また、ヒト iPS 細胞は、皮膚及び肝非実質細胞より山中因子を導入することにより樹立し、多能性、未分化マーカー高発現、アルカリホスファターゼ発現を確認した。ヒト iPS 細胞に関しては、低分子化合物を用いることにより効率よく分

化誘導する方法を確立し、薬物代謝活性等肝機能を有することを明らかにした。

【謝辞】チンパンジー線維芽細胞から iPS 細胞樹立の研修は、慶応義塾大学岡野栄之教授のご厚意により、今村公紀先生にご指導賜りました。謹んで御礼申し上げます。

E-17 腸内細菌叢について霊長類の種間・群間比較

小松勇介(生理研),兼子明久,渡邊朗野(霊長研) 所内対応者: 岡本宗裕

小型霊長類であるコモンマモセットでは、発熱量に対して放熱量の割合が高く、下痢が続き脱水・貧栄養が進むと体温低下など深刻な状態を招きやすいため、適正な腸内環境を維持することが望ましい。そこで、腸内環境をモニタする方法を確立するために良性腸内細菌である乳酸菌群の糞便中の分布を調べることを試みた。まず、乳酸菌群である、*Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属、*Enterococcus* 属の 16S リボソーム RNA の種間で差の多い領域に対して特異的な PCR プライマーが作成できるか検討を行った結果、*Bifidobacterium* 属に対して特異的なプライマーを得ることができた。次にこのプライマーを用いて、基礎生物学研究所の飼養保管施設における糞便について PCR を行ったところ、10 種類の配列が得られた。もっとも頻度が高かったのは *B. reuteri* に相当する配列で、7 ケージ中 5 ケージで観察された。次いで *B. saeculare*、*B. scardovii* に相当する配列が 4 ケージで観察された。また、霊長類研究所の飼養保管施設から得られた糞便からは、上記の高頻度の菌種のうち *B. saeculare* は観察されなかった。施設間の飼育環境の違いや系統の違いを反映した菌種である可能性が考えられるが、更に例数を増やし、配列特定を確実なものにする必要がある。

E-18 霊長類のみに存在する新規遺伝子 PIPSL の進化や機能の解明

大島一彦,松村研哉(長浜バイオ大・バイオサイエンス) 所内対応者: 郷康広

PIPSL は、RNA を介してエキソンが混成し、それに遺伝子重複が連動するという、極めて新奇なメカニズムで誕生した霊長類特異的な遺伝子である。チンパンジーの精巣では、PIPSL の RNA からタンパク質への翻訳が抑制されている。新たに誕生した遺伝子が、どのように発現調節機構を獲得、あるいは変化させたのか探るため、PIPSL 周辺のゲノム配列の比較解析を行った。PIPSL の 5' 上流域には、霊長類間で高度に保存された Primate Conserved Element が存在している。さらにこの配列が ENCODE プロジェクトの機能注釈と重なるため、この領域が PIPSL の転写制御に関わる可能性が強く示唆された。そこで、PIPSL の転写開始点から約 1.5kb 上流のこの領域や転写開始点直近の配列を用いたレポーターアッセイを行った。転写開始点直近の配列を用いた場合、転写量が有意に増加した。しかし Primate Conserved Element を含む配列では有意な変化は見られなかった。今後は PIPSL の組織特異的な発現との関連を調べるため、発現組織により近い性質の細胞株を用いる。

E-19 生活習慣と AMY1 遺伝子多型との関連

鈴木良雄, 鯉淵絵里, 櫻庭景植, 広沢正孝, 川田裕次郎(順大院・スポ健科学), 門屋遥香(順大院・スポ健), 五十嵐庸, 長岡功, 横山和仁, 松川岳久(順大院・医) 所内対応者: 今井啓雄

近年、朝食欠食率の増加が問題視されているが、低年齢の児童では、朝から無理なく朝食を摂取する児童もいるが、時間をかけても、なかなか摂取してくれない児童もいる。ところで唾液アミラーゼにはコピー数多型がある。そこで、AMY1 多型が、この個人差の原因となっている可能性を検討している。

2012 年 12 月までに、予備検討として 74 名の大学生より、DNA と唾液を採取し、アミラーゼ活性と AMY1 コピー数との関連を検討した。その結果、大学生ではコピー数と AMY1 多型との間に明確な相関は認められなかった。成長期に食事に適応することにより、大学生では AMY1 コピー数と活性の相関が消失した可能性がある。

成長期に適応が起こっているのか、もしそうであればそれは何歳ごろか、またどのような食習慣が適応を促すのかを明らかにするため、長野県・長野市内在住の、4 歳児から中学 3 年生までの 12 年代の児童(各 100 名)を対象に調査を行うこととし、2012 年 11~12 月に長野市内の保育園(4 か所)の園児(4~6 歳児: 290 名)を対象に、質問紙調査を行い、2013 年 1~2 月に唾液・DNA の採取を行った。

今後、保育園児の検体の解析を進めると共に、小中学生にも対象を拡大してゆく予定である。

E-20 霊長類皮膚発現遺伝子の進化遺伝学的解析

颯田葉子, 川嶋彩夏, 乾こゆる(総研大・先導研) 所内対応者: 郷康広

ヒトと霊長類の形態的な違いの一つとして、皮膚の構造がある。体毛の有無を含めて、汗腺や、皮下脂肪の量、温度感覚受容体、免疫系、水分調節など、さまざまな形質に関わる分子の分布がヒトと他の霊長類の間では異なることが予想される。そこで、本研究では、皮膚での遺伝子の発現量をヒトと霊長類で比較し、ヒトの形態・生理学的な特性の獲得に関連する遺伝的基盤を明らかにすることを目的としている。

平成 24 年度には、チンパンジー、オラウータン、ゴリラそれぞれ、4 個体、2 個体、2 個体の皮膚サンプル 500 mg を分与いただいた。現在は、それぞれの組織から RNA の単離をこころみている。今後は、これらの RNA のマイクロアレイ解析を行い、定性的に種間で発現量の異なる遺伝子を同定していく。また、発現量の違っている傾向にある遺伝子については、Real-Time PCR を用いて遺伝子の発現量が違うかどうか明らかにしていく。