

プローブとしたサザンハイブリダイゼーションを推進している。

ミトコンドリアDNAの塩基配列の比較による霊長類の系統関係の解析

宝来 聡・早坂 謙二(国立遺伝研)
石田 貴文(京大霊長研)

我々は、すでに10頭のニホンザルの肝臓から精製したミトコンドリアDNA (mtDNA) のDループ領域の長さに多型がみられることを報告してきた。そこで、本研究では、11地域集団由来の90頭のニホンザルの血液、培養細胞、肝臓から抽出した全DNAを材料として、PCR法によりmtDNAのDループ領域を増幅した。増幅の結果、630bp, 800bp, 970bpの長さの異なる3つの断片が得られた。さらに、制限酵素、Kpn I, Hinc IIの認識部位の有無をもとに、さきに報告した10頭を含む12集団由来、100頭のニホンザル mtDNA を8つのタイプに分類することができた。タイプ2が6集団に、タイプ5が伊豆と高崎山で観察されたが、残りの6タイプは各1地域集団でのみ見られた。また、複数の試料が得られた9領域集団中6集団では、1つのタイプのみが観察された。800bpの長さのタイプ1と4, 970bpの長さのタイプ7と8は、Dループ領域内の170bpの配列が各1回ないし2回重複していると考えられ、そのうち、Kpn I 認識部位のみを持つタイプ1と7が高浜だけで、Hinc II 認識部位のみを持つタイプ4と8が屋久島だけで観察された。先の制限酵素による解析と今回の結果から、4つの長いタイプが、630bpの短いタイプから比較的最近、独立して派生したこと、および一度重複が起こると、さらに重複がおこりやすくなることが示唆された。

霊長類におけるグロビン遺伝子の分子進化に関する研究

服巻 保幸・スパンフーチャラン(九大遺伝情報)
竹中 修(京大霊長研)

δ および β グロビン遺伝子は約4千万年前に遺伝子重複により生じたものと考えられているが、旧世界猿類では δ グロビン遺伝子の発現が全く認められず、一方新世界猿類では種々の発現量を示

し δ グロビン遺伝子は進化の過程で不活化しつつあることが知られている。そこで両猿類の δ グロビン遺伝子の構造を解析することにより、重複遺伝子の不活化の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。1) 旧世界猿類としては *Cercopithecus aethiops* の δ グロビン遺伝子をクローン化し解析を行った。すでに *Papio doguera*, *Macaca mulatta* についてはフレームシフト変異が、*Colobus polykomos* では cap サイトの欠失が明らかにされているが、このいずれの変異もまた他の遺伝子の不活化をきたすような変異も見い出せなかった。そこで近縁の *Erythrocebus patas* の δ グロビン遺伝子についてPCR法を用いて解析を行ったが同様な結果であった。現在エンハンサーの変異の可能性を検討するために、5' および3' フランキング領域の解析を進めており、旧世界猿類の δ グロビン遺伝子共通の不活化機構を明らかにできる可能性がある。2) 新世界猿類として *Oedibomidas oedipus* の δ および β グロビン遺伝子をクローン化してその塩基配列を決定した。現在この配列を参考にしてオリゴヌクレオチドを合成し、他の新世界猿類の δ グロビン遺伝子をPCR法を用いて解析中である。

課題 15

霊長類の長鎖高度不飽和脂肪酸誘導酵素の活性に及ぼす加齢の影響

藤本健四郎・金沢 文子(東北大)

n-3系高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)は生体膜の主要成分であり、脳・神経系には特に多く存在する。DHAは海産物から摂取できるが、欧米型の食生活では植物油脂中のリノレン酸がその供給源であり体内でDHAに生合成される。DHA合成能が加齢によって変化すること、脳・神経系の発達が著しい幼若期にはDHA供給が不可欠であることが示唆されているが、本実験ではカニクイザルをモデルとして検討を試みた。

胎仔120日、新生仔、成獣のカニクイザルの肝臓、脳からミクロソームを調製し、標識脂肪酸(リノレン酸またはエイコサペンタエン酸)と補酵素類を含む緩衝液中で反応させ、反応生成物を抽出し、HPLCで分画分取した後、液体シチレンー

ジョンカウンターで放射活性を測定し、合成量を求めた。また、肝臓および脳から脂質を抽出し、脂質クラスと脂肪酸組織の分析を行った。

肝ミクロソームの反応では、エイコサペンタエン酸から鎖長伸長されたドコサペンタエン酸と、さらにデルタ4デサチュラーゼにより不飽和化されたDHAの生成を認めたが、単位蛋白量あたりの生成量を比較したところ各年齢での差異を認めなかった。また、脳ミクロソームの反応ではいずれの場合にもデルタ4デサチュラーゼ活性を認めず、DHAは生合成されなかった。総反応生物量も肝臓に比べて著しく少ないものであった。

肝脂質、脳脂質の高度不飽和脂肪酸含量は共に高く、リン脂質、特にホスファチジルエタノールアミン区分に多かった。脂質クラスについて見ると、肝脂質の場合、新生仔で成獣に比べてホスファチジルエタノールアミンの存在比が高く、脳脂質では逆に低かった。詳細についてさらに検討中である。

サル各組織におけるアブシジン酸の局在とその生理的意義に関する研究

手塚 修文 (名古屋大)

動物組織に植物ホルモンの幾つかが存在していることが報告されているが、動物細胞内でのそれらの合成系や生理的役割の重要性については殆んど報告がない。この研究ではニホンザルの組織・細胞内における植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) の存在量とその生理的意義を解明するのが目的である。今回は、ABAについて解析を進める為に霊長類の血液を用いてABAの抽出法を確立したので、これについて報告する。

従来、ABAの定量には生物検定・高速液体クロマトグラフィー・免疫化学的測定法などが一般に用いられているため、これらの方法を用いて検討したが、これらのどの方法も最終的には抽出物の同定が必要であるのでガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いて同定・定量をしなければならない。そこで組織より分離したABAの検出のためにはジアゾメタンを用いてABAのメチルエステル化の必要がある。この目的のための特製装置の製作に工夫・改良を重ねて多大の労力と時間 (ほぼ1年) を要した。結局GC-MSによりABAの同定・定量法を確立するのに成功し

た。この系を用いてひきつづき、平成2年度も継続してニホンザルの血液・脳のABAの変動分布状態を詳細に調べて老化・性差などとの関連でABAの存在意義とその作用機構などについて目下検討中である。

霊長類におけるシトクロムP-450のポリモルフィズムに関する研究

大森 栄 (千葉大)

ニホンザル肝における、シトクロムP-450 (P-450) のポリモルフィズムの有無を明らかにすることを目的として、今年度は雌雄各6検体の計12検体を用い検討した結果を報告する。

1) P-450比含量について; 1個体で、他の個体に比較し約20%高値を示した以外、大きな個体差は認められず、雌雄間での差もなかった。

2) 代謝活性の個体差、雌雄差について; P-450の触媒活性について、ヒトで遺伝的に欠損しているP-450によって触媒される基質 (テストステロン、イミプラミン、デシプラミン) を選択した。テストステロンは主に6 β 位が水酸化されるが、ここで用いた12検体全てにおいて本活性が認められ、かつ性差も認められなかった。イミプラミン2位水酸化活性、脱メチル化活性においても、テストステロン6 β 水酸化活性の場合とほぼ同様の結果を得た。一方、デシプラミンの場合、2位水酸化活性には個体間ならびに雌雄間での差異は認められなかったものの、脱メチル化活性には性差が認められ、雌の方が雄に比較し約1.5倍高かった。水酸化活性と脱メチル化活性との比をとっても同様に明かな雌雄間での違いが認められた。ここにサルにおいてもP-450依存の反応が雌雄間で同一ではないことが示された。

3) ヒトで遺伝的に欠損しているP-450 (P-450N F, P-450M P) と免疫学的に類似したP-450分子種の比較; 個体間でP-450N Fが約2倍、P-450M Pが約2.8倍の違いが認められたが、欠損している個体を確認することはなかった。また、両蛋白共に、その含量に雌雄差を認めなかったことから、デシプラミンの脱メチル化反応には両酵素が関与している可能性は否定された。

今回用いた検体の中では、ニホンザル肝でのP-450の遺伝的多型を示す個体を確認することが出来なかったが、ヒトで報告されている場合の発