

去操作をくりかえす過程でIgEが失われ、免疫原としたIgEの絶対量が少なかったことが考えられる。今後は、抗ヒトIgE抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより比較的高純度・高濃度のニホンザルIgE分画を得、これを抗原として抗体の作製を進める予定である。なお、今回得られたモノクローナル抗体はその特異性を解析後、サル類のIgGを識別するモノクローナル抗体として各種検査に利用できるよう活用する。

課題 11

計画：11-1

α -グロビン遺伝子からみた霊長類の進化

竹中 晃子 (名古屋文理短大)

ヘモグロビンの α 鎖遺伝子座はヒトでは大部分が二重複している。類人猿について調べたところ、チンパンジーは8割が三重複、1割が四重複、残る1割が二重複であること、オランウータンでは2割が三重複であった。旧世界ザルのカニクイザルでは生息地域により差がみられ、タイ大陸部、フィリピン出自のものは二重複であるのに対し、マレー半島、スマトラ島出自のものは4割が三重複であること、アカゲザル、ニホンザルには三重複の頻度はきわめて少ないことをこれまでに見いだしてきた。赤道直下の熱帯多雨林にはマラリアを媒介する蚊が生息し、事実オランウータンの血液中にマラリア原虫が見いだされ、またスマトラ島のカニクイザルには著しい鉄欠乏貧血が見いだされている。これらの地域に生息する霊長類に α グロビン遺伝子座の重複が多いのではないかという仮説のもとに他の霊長類についても α グロビン遺伝子座の数を調べることが本研究の目的である。旧世界ザルの内、トクモンキー4頭、バーバリーマカク2頭、タイワンザル2頭、チベットモンキー2頭、ミドリザル2頭、ドリル1頭はいずれも α -グロビン遺伝子は二重複であった。それにたいし、インド南部に生息するシシオザルは二重複のホモ、四重複のホモ、二重複と四重複のヘテロ、二重複と単一遺伝子座のヘテロがそれぞれ1頭ずつ見いだされ、ボンネットモンキー1頭は二重複と単一遺伝子座のヘテロであり変異が大きいことが示唆された。なお、新世界ザルのパンジェ、ヨザル、

マーモセットにも二重複以外に多重複のバンドがみられた。遺伝的浮動による変異の固定とそれに及ぼす環境との関係を明らかにするには数多くの試料を取り扱わねばならないので、今後も試料数を増やしていきたいと考えている。

さらにカニクイザルの α グロビン遺伝子領域に見いだされたプロセスト遺伝子と相同性を示す遺伝子が腎、肝、脳において発現していることが明らかになった。従ってこの遺伝子の霊長類における本来の遺伝子としての進化過程、及びプロセスト遺伝子としての進化過程など今後追求していく予定である。

計画：11-2

霊長類免疫グロブリンC α 遺伝子ヒンジ領域の構造変異

河村 正二 (東京大・理・人類)

免疫グロブリンC α 遺伝子のヒンジ領域はホミノイドでは15塩基を基本単位とした繰り返し構造という特徴をもつ。ヒト及びアフリカ類人猿のC α 遺伝子では基本的に15塩基が4回繰り返した構造をもち、テナガザルC α 1遺伝子では2回繰り返した構造をもつ。それに対しC α 2遺伝子はすべてのホミノイドで単一の15塩基配列からなる。一方旧世界ザルであるカニクイザルでは15塩基配列と相同性をもたない21塩基からなる。他の旧世界ザルでのC α ヒンジ領域の構造を知るために、アカゲザル、タイワンザル、ニホンザル、ブタオザル、ベニガオザル、マントヒヒ、パタスモンキー、ミドリザル各数個体について解析した。これらのサルの末梢血より高分子DNAを抽出し、ホミノイドとカニクイザルでよく保存された領域でヒンジ領域をはさむ領域からPolymerase Chain Reaction (PCR)用のプライマーを設定し、PCRを行った。PCRで増幅されたDNAは5%ポリアクリルアミドゲルでシングルバンドであり、サイズはカニクイザルから予想されるものと同じであった。このバンドをゲル中より精製し、PCRプライマーより内側で種間で保存性の高い領域で塩基配列決定用プライマーを設定し、直接塩基配列決定を行った。その結果、旧世界ザルのC α ヒンジ領域には21塩基タイプと27塩基タイプがあることがわかった。2つのタイプは調べた旧世界ザルの種を越えて観察され、両方のタイプをもつ

個体はどの種にもみられた。このことは2つのタイプの出現は少なくともオナガザル亜科の種分化前であり、種分化後も両方のタイプが各種で維持されてきたことを意味すると考えた。また、同じ21塩基タイプ内でも塩基配列の変異性はヒンジ以外の領域に比べ高く、それらの変異の多くはアミノ酸置換であった。これらのことはヒンジ領域に変異性を増大させ維持させる正の自然淘汰の存在を示唆しており、今後さらに検討を加えてゆく。

計画：11-3

ゲノム・サブトラクションによるヒト特異的DNA領域の探索

渡辺 裕二（東京大）

ヒトとチンパンジーは遺伝的に非常に近く、相同な遺伝子間の塩基配列の違いはごくわずかでしかない。しかし両種間に形態的・生態的に大きな違いが存在することから、ゲノム全体を比較すれば塩基配列の大きく異なる領域やそれぞれの種に特異的な領域があると考えられる。そこでヒトゲノムDNAからチンパンジーゲノムDNAと相同な領域を差し引くことにより、ヒトゲノムに特異的に存在するDNA領域の探索を行った。

ヒトとチンパンジーの末梢血からゲノムDNAを抽出し、それぞれ制限酵素Mbo I・Hind IIIで切断する。両方を熱変性して一本鎖にした後1:100の割合で混合し、フェノール懸濁液中で再会合させる。ここでヒトDNAのうちチンパンジーDNAと相同な領域を含む断片は過剰に存在するチンパンジーDNAと再会合し、ヒトに特異的な領域はヒトDNAと再会合する。このヒトDNA同士が再会合した二本鎖DNAのみを制限酵素BamH Iで切断したベクター選択的にクローニングする。こうして得られた32クローンをプローブしてヒト、チンパンジー、カニクイザルのゲノムDNAについてサザンハイブリダイゼーションを行い、ゲノム中でのそれぞれの配列の有無を調べた。

今回調べたクローン中にはサザンハイブリダイゼーションでバンドの濃さがチンパンジーよりヒトで明らかに濃いクローンや、バンドの数がチンパンジーよりヒトで数多く検出されるクローンが見い出された。これらはそれぞれの配列のヒトとチンパンジーのゲノム間での相同性やコピー数の

差を反映していると考えられ、今回行ったサブトラクションによりこうした差異が検出可能であることが明らかとなった。

B. 自由研究

自由：1

骨格筋における微小循環の動態

—リンパ管系を中心として—

早川 敏之（慈恵医大・第1解剖）

骨格筋の形態と機能ともなう一筋区内におけるリンパ管系の微小循環と機能形態の動態を明らかにすることを目的としてニホンザル (*Macaca fuscata fuscata*) 3頭の左右脛骨筋を用いた。同筋の筋腹の高さで、脛骨に向かって垂直位に深層より浅層へと注射針を移動させながら微粒子活性炭 (CH44) を穿刺注入した。各個体別に0.05~5.0mlの割合にて注入した。筋から起こるリンパ管系の経路と所属リンパ節については、15分間の室温放置後のためか注入量による著しい変化を認めなかったが、大量の場合、リンパ節の黒染の度が高く浅層径リンパ節、深層径リンパ節も染め出していた。注入量については、黒染の程度によっては下記実験観察群の検索を行う上で支障を来す恐れがあるので、筋重量比や体重比などを考慮したい。一筋区内におけるリンパ管系の分布と線維タイプとの関連について見ると、筋線維タイプの分布では木村らの報告と同様中間筋・赤筋次いで白筋線維タイプの順に多く認められた。この筋線維タイプとリンパ管系の分布を対比すると、血管系（動静脈を識別するAzocarmin G, 群青）に充填されているものとして、その分布を見た今回の所見では、CH44で黒染されたリンパ管系は、筋膜下近くに多く認められたことから、白筋線維の分布との間に何らかの関連性を示唆するのもも知れない。走査形と透過型電子顕微鏡による観察では、筋膜下リンパ管は典型的なリンパ管として観察されたが、筋線間のリンパ管については前者ではCH44を充填したリンパ管を確認出来たが、後者では膠原線維や銀好性線維に伴うCH44を観察したがリンパ管とは確認できなかった。今後更に筋線維持間におけるリンパ管と筋線維内におけるT管とリンパ管との関連について検索を継続し