

から、再現性の高いニホンザル精子の精液採取法と凍結保存技術の確立に関する研究を行っている。

これまでの研究で、電気刺激による精液採取法は確立したが、昨年度に引き続いての凍結保存法の開発は、シーズン初めの霊長研の分析装置の故障により、今年度は実施できなかった。

しかしながらこれまでの予備的な実験の結果から、ニホンザルにおける精子の至適凍結条件は、代表研究者が以前、チンパンジーで得た至適条件とはかなり異なり、希釈液と保存容器については、それぞれ修正 TTE とプラスチック製ストローが、また凍害防止剤については DMSO よりもグリセリンが好適で、その濃度は 2.5% が最適であった。また冷媒には、液体窒素ガスを用いて急速に凍結するほうが適当と思われた。今後、分析装置の再導入を待って、確認の実験を行いたい。

5-3 テナガザル類の Y 染色体解析用分子マーカーの作製

田口尚弘 (高知大・黒潮圏海洋科学・海洋健康医科学)

染色体顕微切断法を使って、テナガザルの微小 Y 染色体を標的としたプローブの作製、およびクローニングを施行した。テナガザル Y 染色体から顕微切断で得られた DNA 断片を PCR で増幅し、得られた産物の由来部位を FISH 法で確認した。プローブ化した PCR 産物はテナガザルの微小 Y 染色体全体に分子雑種形成したので、プローブ作製の成功を確認できた。次にこのプローブの TA クローニングを行い、2 つのクローンからシーケンスを得ることができた。両者はほぼ同じ塩基配列であった。データベースでその塩基配列を検索したところ、チンパンジー Y 染色体で報告されているクローンと類似性を得た。また、ヒトの Y 染色体上の DAZ (無精子症欠失部) 遺伝子中の反復配列と高度の類似性を示した。さらに、FISH 解析で、このプローブの存在部位の種間比較を行った。アカゲザル Y 染色体ではシグナルは得られなかったものの、チンパンジーとヒトの Y 染色体ではユークロマチン部分にシグナルが得られた。従って、このプローブは類人猿、ヒトの Y 染色体のマーカーとして有用であることが分かった。

5-4 霊長類培養細胞株の樹立

明里宏文 (国立感染症研究所・筑波霊長類センター)

本研究では、報告者が以前確立した HVS 不死化法に基づく霊長類機能細胞の不死化技術を応用して、多

様な霊長類由来細胞株の樹立を試みた。その結果、今年度は新たに旧世界ザルとしてブタオザル (3 株)、新世界ザルとしてコモンマーモセット (2 株)、アカタマリン (1 株)、コモンリスザル (1 株)、ヨザル (1 株) の樹立に成功した。昨年度までに独自に樹立したものと合わせて、これまでに 9 種類 26 細胞株が樹立されている。今後はアフリカミドリザル、ヨザル、コモンリスザル、テナガザル、フサオマキザル等の不死化細胞株の樹立を進めるとともに、それぞれの樹立細胞株についての特性解析を行う予定である。

本研究成果により、サル類による動物モデル研究・開発等トランスレーショナルリサーチにおいて、細胞レベルの解析が可能となる。このことは動物実験を極力避けるべきとする国際的傾向とも合致するものであり非常に有意義であると考えられた。

5-5 ヒト特異的機能遺伝子およびヒト特異的偽遺伝子の探索

郷康広 (総合研究大学院大・先端科学)

本研究は、種の個別性・特異性の遺伝的基盤を明らかにするために、ヒトおよび旧世界ザルの各臓器において種特異的に発現している、もしくは発現していない (偽遺伝子化も含む) 遺伝子を探索することを目的とした。

昨年度、方法を確立するために行った実験の結果、ヒト上皮細胞でマウス上皮細胞と比較した結果、発現が有意に低下している 51 個の候補遺伝子 (多くの RNA 遺伝子を含む) を同定した。本年度は、その結果を受け、系統的によりヒトに近いマカク属を対象とし、より広範におよぶ解析をするために、各種臓器 (肝臓・膵臓・脾臓・精巣・胎盤) の収集につとめた。また、遺伝子発現の個体差を考慮し、各臓器に対して、4 個体以上からのサンプルの収集を行い、RNA 抽出・cDNA 合成まで行った。すでに方法は確立されているので、次年度以降、引き続きのサンプル収集を行うとともに、実験・解析をすすめ、ヒト化に至る過程で発現が亢進・抑制された候補遺伝子を絞り込み、その生物学的・進化的な意味付けを行う。

5-6 霊長類染色体の 3 次元核内配置と核型進化・系統進化に関する研究

田辺秀之、宝来聡 (総合研究大学院大・先端研・生命体)

本研究は、霊長類各種における核型分析データを参照しながら、間期核における染色体テリトリーの 3

次元核内配置について、3D-FISH 法により種間比較を通じて相対核内配置を明らかにするとともに、系統関係の詳細が未知な一部の種においてミトコンドリア DNA の分子系統解析を並行して行い、両者を統合した視点から霊長類の核型進化・系統進化を考察することを目的としている。特に近縁種間で進化的な染色体転座が生じている場合、対応する染色体領域の 3 次元核内配置からみた転座染色体の生成機構は興味深い。本年度は各種末梢血リンパ球より 3 次元核構造を維持した細胞核 3D スライドを作成し、ヒト 2 番染色体の短腕および長腕特異的ペインティングプローブを使用した 3D-FISH 法により、蛍光シグナルの検出条件、共焦点レーザースキャン顕微鏡による画像取得条件の検討を行った。FITC, Cy3 を 2 種類のプローブ、Cy5 を DNA 対比染色 (TOPRO-3) に対応させ、ニホンザル細胞核においても十分検出可能な蛍光強度を得る条件を確立した。現在、この条件で解析対象を各種へ拡大している。

(2) 施設利用

1 シセンキンシコウの社会構造の仮説

和田一雄

2001 年から 2004 年まで秦嶺山系で、キンシコウ西梁群を餌付けして、個体識別に基づき社会行動を観察し、社会構造の推定を行った。観察時期は主に 10-12 月と 3-4 月であった。前者には交尾期が含まれ、後者は出産期であった。毎日餌場に出てきた群れ内の社会単位、One Male Unit(OMU)はそれぞれの観察期間中は安定して同じ個体からなるものであった。それぞれの OMU は 1 頭の♂、複数♀、アカンボ・1~4 才の♂・♀を含む。交尾と grooming の大部分は OMU 内で行われていた。時期によって 5~9 個の OMU、個体数として 60-90 頭が餌場に出現した。これらの OMU は相対的に独立しているが、移動・採食・休息は同時に行うので 1 つの単位であり、band と呼ぶ。♂は 4 才になると OMU から消える。♂だけの集まりを見ているので、これを all male group とした。西梁群と初めによんだ集団はこの様に one male unit, band, all male group からなり、これらを含む全体を herd と呼ぶことにした。

4 年間で OMU の♂の交代が 2 回行われたが、♀はそのままであった。band から♀は成獣 5 頭、亜成獣 2 頭消え、新しい成獣♀が 5 頭入ってきた。また 9 つの OMU が消え、7 つの OMU が新しく入ってきた。同じ OMU の出入りは 3 回観察された。このような OMU の移動はもう一つの band の存在を暗示するのであるが、まだ直接的な証拠を持っていない。♂・♀の出入りから band は双系である可能性が高い。

2 サル肝ミクロソームのアルコール酸化酵素遺伝子 cDNA クローニング及び機能解析

渡辺和人, 舟橋達也, 山折大 (北陸大・薬・衛生化学)

我々はニホンザル肝臓より大麻成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol(Δ^9 -THC)の主代謝物の 1 つである 7-hydroxy- Δ^9 -THC から活性代謝物である 7-oxo- Δ^9 -THC への酸化を触媒するミクロソーム酵素 (Microsomal Alcohol Oxygenase, MALCO)を精製し、その MALCO 本体が CYP3A 分子種であることを明らかにしてきた。さらに、精製酵素の N 末端アミノ酸配列はカニクイザル CYP3A8 と同一であった。本年度の研究ではニホンザル (雄・3 才) 肝臓より mRNA を抽出し、CYP3A8 cDNA 等の非翻訳領域を基に設定したプライマーを用いて RT-PCR 法により cDNA をクローニングした。その塩基配列を決定したところ、カニクイザル