

知がどのようになされているのか調べた。

刺激音は伊豆シャボテン公園において飼育されているシロテナガザルのオスが自然に鳴いたソングを録音し、音声分析ソフトウェアを用いて、ノート間の時間間隔をすべて倍にしたものと、半分にしたものを作成した。このようにして作成した通常のソング(S)、ノートは同じだが間隔が倍のもの(D)、そして間隔が半分のもの(H)のそれぞれを、旭山動物園の野外ケージにおいて飼育されているシロテナガザル4頭(オトナメスとその子供3頭)に対して再生した。再生は馴化を避けるために午前中に1回、午後1回の1日2回のみとした。分析対象としたのは、子供のうち最年長のオス(5歳)の行動である。

ソングを再生中と再生後の、同じ時間のあいだの移動時間割合を分析したところ、SとDに対しては有意な差がなかったが、Hの場合のみ、再生後に移動時間が有意に多くなることが分かった。このことから、テナガザルは早いテンポのソングを聞き分けて異なる反応をしているということがいえる。

4-3 霊長類培養細胞株の樹立

明里宏文(医薬基盤研究所・霊長類センター)

対応者：平井啓久

本研究では、Herpesvirus saimiriを用いた独自の霊長類機能細胞の不活化技術を応用して、医科学研究に汎用されている多様な霊長類由来不活化細胞株ライブラリーの構築を試みた。その結果、今年度は新たにシロクチタマリン、ヨザル、フサオマキザル由来細胞株樹立に成功した。また昨年度に樹立した細胞株については、一定期間(1-2ヶ月程度)経代した後細胞変性等異常が認められない事を確認した上で液体窒素への複数バイアル保存を実施した。本研究にて最終的に樹立された霊長類由来細胞株は8種であり、本研究開始以前に樹立済のもの合わせて、10種、31細胞株の樹立に成功したことから、医科学研究に汎用されている霊長類由来細胞株ライブラリーの構築という当初の目的は達成出来たものと判断した。

本研究成果は、特にここ数年で急激に実験動物としてのニーズの高まっている新世界ザルについて、その付加価値を高める事に繋がるものと期待される。さらに、可能な限り動物実験を減少させようとする社会的要請にも合致していることから、非常に貴重な研究用リソースであると考えられる。

なお本研究により樹立された各種霊長類細胞株は国内の細胞バンクに一括して寄託される予定となっており、本邦の研究者が利用可能なリソースとして公開

される運びである。

4-4 霊長類染色体の3次元核内配置解析と分子系統進化に関する研究

田辺秀之、松井淳、天野美保(総研大・先導研・生命体)

対応者：平井啓久

本研究の目的は、霊長類における染色体レベルでの転座、逆位などの進化的な染色体再配列に関して、間期核の染色体テリトリーの3次元核内配置からみた生成機構を明らかにすることを目指している。昨年度に引き続き、今年度はマカク系統に注目し、各種末梢血リンパ球を材料としてメタフェイズ染色体のチェックを行うとともに、3D細胞核標本作製し、一部の種においてミトコンドリアDNAの全塩基配列を決定した。ヒト2番染色体短腕2pおよび長腕2q特異的DNAプローブを用いた3D-FISH法により、作成した3D細胞核標本のうち、まずヒト、チンパンジー、ニホンザルの3種での放射状核内配置の比較解析を行った。その結果、ニホンザルでは両ホモログが互いに近接している頻度は低いが、チンパンジーでは少なくとも一組のヒト2p、2qの両ホモログ同士が互いに高頻度に近接する結果となった。このことより、近縁種間での染色体再編成が生じている領域は、互いに相対核内配置が近接している可能性を持つものと考えられた。今後比較種類数を増やし、さらに検討を進める予定である。

4-5 アジアに生息するマカク類の免疫応答関連遺伝子の多型の研究

安波道郎(東京医科歯科大・院・疾患生命)

対応者：平井啓久

マカク属は霊長類の進化的に興味深い研究対象であるだけでなく、医学生物学の諸領域においてヒトの生理・病態をより忠実に反映するモデルとして有用な実験動物である。アカゲザルのサル免疫不全ウイルス(SIV)感染実験系はHIVの慢性感染からAIDSの発症に至る過程のモデルであるが、この系においてウイルス抗原特異的なCD8+T細胞が効率よく誘導されるかどうか感染抵抗性の鍵を握っており、それには主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子の多型が深く関わっている。ヒトではHLA-A,BおよびCが古典的MHCクラスI遺伝子であるが、アカゲザルではそれぞれHLA-A,Bの相同遺伝子であるMamu-A,Bが進化の過程での遺伝子重複により多コピー化しており、従来その多型解析は困難であった。我々はDNAヘテロ二重鎖コ

ンホーメーション多型を検出する RSCA 法を適用することにより、多コピー化した遺伝子配列の効率的な解析を行なうことに成功し(Tanaka-Takahashi Y, et al. 投稿準備中), Mamu-A, B ハプロタイプと SIV に対する宿主の応答との関連を見いだした。また同法はアカゲザルのみならず、ニホンザル、カニクイザルにおいても適用できる可能性があり、これらのマカク属の種においても MHC クラス I 遺伝子の多コピー化が生じていることが判った。

(2) 施設利用

1 酵母細胞を用いたサル肝 Microsomal aldehyde oxygenase 発現系の構築及び機能解析

渡辺和人, 舟橋達也, 山折大 (北陸大・薬・衛生化学)

対応者: 景山節

我々はニホンザル肝ミクロソームよりアルデヒドを対応するカルボン酸体へと酸化する酵素 (Microsomal aldehyde oxygenase, MALDO) を精製し、その N 末端アミノ酸配列から CYP2A 及び CYP2B 分子種であることを明らかにしてきた。そこで、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、ヒト CYP2A6 cDNA 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、その推測されるアミノ酸配列はヒト CYP2A6 と 91.0%, ヒト CYP2A13 では 92.3% 一致した。クローニングした cDNA を発現用ベクターを用いて酵母に導入し、発現系の構築を試みた。ニホンザル CYP2A 発現酵母よりミクロソーム画分を調製し、ニホンザル MALDO 抗血清を用いて Western blotting を行ったところ、約 50 kDa の位置に単一のバンドが検出された。現在、発現酵母より調製したミクロソーム画分を用いて本酵素の酵素化学的な特性について検討している。

3 サル胚性幹細胞の肝細胞への分化と胎齢等を考慮した薬物動態試験への応用

松永民秀, 水上紗弥香, 百瀬泰行,

村井健太郎, 大森栄 (信州大・病院薬)

対応者: 景山節

【目的】サル胚性幹細胞 (ES 細胞) から肝細胞への分化誘導に関する研究はこれまでほとんど行われていない。本研究は、カニクイザル ES 細胞から肝細胞への分化と、分化過程から見出した新規シトクロム P450 (CYP) の mRNA 発現を明らかにすることを目的とした。

【方法】サル ES 細胞より作成した胚様体 (EB) をコラーゲン処理したプレートに接着させ、培養することにより分化した。

【結果・考察】EB 培養により肝細胞マーカーが検出されたことから、肝細胞へ分化していることが示唆された。また、薬物代謝型分子種の CYP1A1, CYP2C20, CYP2D17, CYP3A66, CYP3A8 の mRNA が検出された。さらに、ヒト胎児肝細胞に特異的に発現する CYP3A7 と高い相同性を有する新規 CYP (CYP3A7m) を EB 培養