

氏名	キム ヒ ス 金 熙 洙
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1855 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 霊 長 類 学 専 攻
学位論文題目	Molecular Analyses of Gene on Y Chromosome in Primates (霊長類における Y 染色体の遺伝子解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 中 修 教 授 林 基 治 助 教 授 景 山 節

論 文 内 容 の 要 旨

本研究はヒト，チンパンジー，ボノボ（ピグミーチンパンジー），ゴリラ，オランウータン，テナガザルのヒト上科霊長類に加え，ヒビ，ニホンザル等旧世界ザルの Y 染色体 DNA の進化を明らかにしようとしたものである。

第 1 章では，それらの霊長類の Y 染色体 DNA の進化的変異を広く調べることを目的とし，PCR 法を用いて解析した。ヒトの Y 染色体のマッピングのためにデザインされたプライマーを用い，それらの霊長類から調製した DNA を鋳型として PCR 増幅を試みた。

SRY（精巣決定因子）のように対象としたすべての種のオスで増幅される DNA 領域や，ヒトのみで増幅される領域（DYZ1），ヒトとチンパンジー，ゴリラでのみ増幅される領域（DYZ233），あるいはヒトとゴリラ，オランウータンでのみ増幅される領域（DYZ250）等，ヒト上科霊長類で Y 染色体のそれぞれの領域は様々な進化を遂げていることを明らかにした。

第 2 章以下は，精巣特異タンパク質（TSPY）の進化を解析した。まずこの遺伝子の第一エクソン約 140 bp と第一イントロン約 610 bp を含む領域の塩基配列を決定し，ヒトのそれと比較した。ヒトとチンパンジーとは 1.9%，ゴリラ 4.0%，オランウータン 8.2%，マントヒビとは 16.8% の差異があった。この変異の程度は Y 染色体の ZFY 遺伝子のイントロンや，核遺伝子の β グロビンクラスターの非エクソン部に比べ高いことがわかった。それらの配列を基に系統樹を作成したところ，ヒトに最も近いのがチンパンジーで，ついでゴリラ，オランウータンの順になった。

第 3 章では三種の，フクロテナガザル，アジルテナガザル，シロテナガザルと，マントヒビ，ニホンザルの TSPY 遺伝子について，サザン分析，蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH），および塩基配列を決定し比較検討した。まず制限酵素 Hind III による切断パターンをサザン法で調べた。ヒトも含めこれらの霊長類ではオスの個体のみが陽性のシグナルを示すので，この遺伝子は Y 染色体に固有の遺伝子であると推定した。ヒトの男性では 8.3 kb の強いバンドが検出された。シロテナガザルでは

8.7 kb の弱いバンドを検出したのに対してアジルテナガザルでは8.7 kb の弱いバンドと4.8 kb に強いバンドが検出された。フクロテナガザルは11.4と4.2 kb, マントヒヒとニホンザルでは10.6 kb に弱いバンドが検出された。

この遺伝子の染色体上の位置を FISH 分析により調べたところ、ヒトの場合は長腕動原体近位部に強いシグナルが検出され、報告されているデータと一致した。シロテナガザル、マントヒヒ、ニホンザルでは長腕動原体近位部に弱いシグナルが検出された。アジルテナガザルでは同じ部位に弱いシグナルとごく近傍に非常に強いシグナルが検出され、サザン分析の強弱の二つのバンドを与えた結果と一致した。アジルとシロテナガザルは非常に近縁な種であるが、この遺伝子は大きく変化している事を明らかにした。

第4章ではニホンザルの TSPY 遺伝子の cDNA の塩基配列を決定し、またニホンザル各種臓器における遺伝子発現を調べた。ニホンザルから各種臓器を採取し mRNA を調製した。精巣からの mRNA は逆転写酵素を用い cDNA とした後、PCR 法により TSPY 遺伝子を増幅した後、クローニングして塩基配列を決定した。cDNA は976塩基対、246アミノ酸をコードする741塩基からなるオープンリーディングフレームを持っていた。

塩基配列からタンパク質のアミノ酸配列を推定した。このタンパク質は分子量が28,000, 等電点は pH 5.35 の酸性タンパク質である。特徴として、N 末端から79-105番目の27残基には8残基のアルギニンと3残基のリシンを有する。精巣決定因子 (SRY) にも同様にアルギニン、リシンに富む領域があり、その領域は DNA 結合部位と推測されている。TSPY も転写に関する DNA 結合タンパク質であると推測した。

ニホンザルの各種臓器での TSPY 遺伝子の発現を逆転写酵素と PCR を組み合わせた方法で調べたところ、腎臓、脾臓、心臓、肺、小腸、膵臓、肝臓、胃、脳、卵巣では発現されていず、二頭から調製した精巣にのみ発現していた。

論文審査の結果の要旨

ヒト上科の霊長類はテナガザルを初めとして、オランウータン、ゴリラ、チンパンジーとヒトを含む分類群である。これらの種は極めて近縁であるにもかかわらずその繁殖様式は極めて多様である。一頭のオスと一頭のメスが比較的長く続くペアを形成するテナガザル、オスメスともになわばりを持ち、なわばりの重なっている相手をパートナーとするオランウータン、一頭のオスと複数のメスからなるハレム型のゴリラ、複数とオスと複数のメスとが乱婚的な関係を持つチンパンジー、ボノボ等、彼らの繁殖構造は様々である。

これらの種ではその繁殖構造を反映しオスの形質が異なっている。例えばオスメス間の体格の差違、性的二型はゴリラ、オランウータンで非常に大きく、チンパンジーで小さい。一方造精能力を反映すると考えられる精巣重量の対体重比はチンパンジーで最も大きく、ゴリラで最小である。本研究は最終的にはこれらの形質の進化史の、遺伝子基礎と進化を明らかにすることを目的として着手したものである。

第1章ではヒトの Y 染色体マッピング用に開発された PCR 法のためのプライマーを用い、ヒト上科霊

長類とニホンザルのゲノム DNA をテンプレートとし増幅を調べている。対象とした全ての種のオスのみで増幅された精巢決定因子 (SR Y), 全ての種のオスもメスも増幅されたジンクフィンガータンパク質 ZFX / ZFY から, ヒトのみで増幅された DNA 領域 (DYZ1) まで様々であった。PCR 法による実験であるのでこの結果のみで確かなことは言えないが, Y 染色体の種々の DNA 領域が様々に進化していることを明らかにしたことは評価できる。

第 2 章では精巢特異タンパク質 (TSPY) の第一エクソンの一部と第一イントロンについて, チンパンジー, ゴリラ, オランウータンとマントヒヒで塩基配列を決定比較した。この遺伝子の進化速度は同じ Y 染色体の偽常染色体部分にある PABY や, ZFY のイントロン部分その他などより速いという結果を得ている。Y 染色体は短腕の動原体遠位部のみが減数分裂の際 X 染色体とキアズマを形成する。進化速度が速いのは予測できたことではあるが, 一つの成果であると思われた。

それらの塩基配列から系統樹を作成し, ヒトに最も近いのはチンパンジー, ついでゴリラ, オランウータンの順になると結果を得ている。これは現在までの結果と一致する。しかしこの遺伝子は父親からオスの子供に伝えられ, メスの寄与はない。このような遺伝子でもヒトに最も近縁なのはチンパンジーであるという結論は意義を有すると考えられた。

第 3 章では, TSPY 遺伝子についてテナガザル三種と, マントヒヒ, ニホンザルについて, 制限酵素切断パターンをサザン法により比較し, 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH) により同遺伝子の染色体上の位置を検討し, 塩基配列を決定した。サザン分析ではシロテナガザルは一本の弱いバンドを示したのに対し, アジルテナガザルではシロテナガザルと同じ弱いバンドの他にそれより低分子領域に非常に強いバンドを示した。FISH 分析でもアジルテナガザルは一つのシグナルとその近傍に強いシグナルを示した。これら二種は非常に近縁な種であるにもかかわらずそのように大きな差違はこの遺伝子の速い進化を示す。テナガザルの他種での分析研究が待たれる。

第 4 章では, ニホンザルの TSPY 遺伝子の cDNA の塩基配列を決定解析するとともに, ニホンザルの各種臓器でこの遺伝子の発現を調べた。このタンパク質は分子中に親水性アミノ酸残基に富む領域が複数あり, その一つの部分は塩基性アミノ酸の, アルギニンとリシンに富むことが明らかとなった。申請者は既に報告されているヒトの cDNA の配列と比較し, その領域がヒトとニホンザルでよく一致することを見いだした。さらにおなじ Y 染色体にある精巢決定因子 (SR Y) に関する研究も参考にし, TSPY 遺伝子のその領域は DNA 結合部位であると推定した。またニホンザルの 12 の各種臓器での発現を調べた結果, この遺伝子は精巢でのみ発現していることを証明した。

遺伝子の研究ではヒトの遺伝子構造の研究が最も進んでいる。しかしながらヒトの遺伝子のみを見ていたのではその機能, 進化等見過ごすこともある。本研究でヒトとニホンザルの塩基配列の比較から, TSPY タンパク質が DNA 結合部位を有し, おそらくは遺伝子の転写に関わる因子であるとの仮説を提起したこと, 遺伝子発現を詳細に検討し, ニホンザルでも精巢でのみ発現していることを証明したことは評価できる。

申請論文は, 当初目的とした高等霊長類におけるオスの形質の大きな変異の遺伝子基礎の解明という段階にはいたらなかったが, Y 染色体上の DNA 領域の様々な変異, ヒト上科霊長類での TSPY 遺伝子の

進化，テナガザルの近縁種間での同遺伝子の染色体上の位置や増幅等の大きな変異，TSPY 遺伝子の機能についての仮説の提起等，今後霊長類の Y 染色体遺伝子の進化，機能の解明に寄与するところは大きい。平成 8 年 12 月 28 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果，本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。