

results.

A-25 Integrated studies on development and aging of cognition, physiology and morphology in Primates

Ceridwen Boel (New South Wales University) 所内対応者：濱田穰

155 個体の交雑マカク個体に関して、頭蓋・下顎骨と歯牙に見られる非計測的特徴(発生学的微細異常に注目して)の肉眼と CT による観察、および接触型 3 次元座標計測装置を用いて頭蓋骨で 66 の下顎骨で 21 のランドマーク座標値を取得し、計量的特徴の解析を行った。CT 観察によって、骨内にある歯根や形成中の歯の観察から、歯の形成異常を観察した。この中でもっとも意義ある発見は、交雑個体メスで上顎犬歯の 2 分歯根の頻度が高いことである。この特徴は、これまで低頻度でニホンザルのメスに見出されている。これに加えて骨と歯の非計測的特徴では、前上顎骨(premaxilla)に過剰縫合が出現すること、インターコニュール(interconulus と interconulid)の出現、および下顎第 3 大臼歯の咬頭数の変異が認められた。一方で、他の発生学的異常の頻度が低下することも見出され、ヘテロシス(雑種強勢)の影響も推測された。頭蓋・下顎の計量的な解析の結果から、形状特徴指標で交雑個体は明瞭なクラスターをなし、二つの親種の間にあるが、一方の種にいくらか偏る傾向が見られた。このような形態異常の出現や形状特徴が、これまでに得られている遺伝子解析による交雑度とどう関連するかについて、検討を行う。

(2) 一般個人研究

B-1 サル脊髄損傷モデルを用いた軸索再生阻害因子とその抗体による神経回路修復に関する研究

山下俊英、中川浩(大阪大・院・医)、Naig Chenais(ローザンヌ連邦工科大・院・神経科学)

所内対応者：高田昌彦

これまで、霊長類モデルを用いて、軸索再生阻害因子と脊髄損傷後の神経回路網再形成による運動機能再建に焦点をあて研究を行ってきた。その結果、阻害因子のひとつである RGMa が脊髄損傷後損傷周囲部に増加することを突き止め、その責任細胞のひとつにミクログリアを同定することができた。さらに、RGMa の作用を阻害する薬物を用いて脊髄損傷後の機能回復過程および神経回路網形成の有無を検討した。その結果、RGMa 作用を阻害した群(RGMa 群)は、コントロール群(薬物投与なし)に比べ、運動機能の回復が顕著にみられた。神経回路網形成については、大脳皮質運動野と脊髄を直接連絡する神経路である皮質脊髄路を順行性トレーサーでラベルして解析を行った。順行性トレーサーでラベルされた皮質脊髄路の軸索枝の一部は、自然回復に伴って脊髄損傷部を越え、直接手や指の筋肉を制御する運動ニューロンへ結合していることが分かった。このような神経軸索枝は、RGMa 群においてより多く観察された。次に、脊髄損傷部を越えた神経軸索枝が直接運動機能の回復に寄与しているか否かを、電気生理学手法と神経活動阻害実験を併用して確認した。その結果、直接運動機能の回復に寄与している可能性を示す結果を得ることができた。これらの結果は、今後の脊髄損傷治療に役立つ知見であると考えられる。

B-2 現生ニホンタヌキの歯および骨格における種内変異

鏗本武久(愛媛大・理・地球) 所内対応者：江木直子

化石の研究に応用するために、霊長類研究所に所蔵されている現生ニホンタヌキの歯および骨格標本の形態変異を調べたところ、一部の標本の歯に特異な形態が見られた。同様の特異な形態が化石偶蹄類でも見られており、化石哺乳類の形態変異と種の同定に関して、今回のタヌキの歯の形態のデータは重要な情報を与えることがわかった。タヌキの P3 は通常二根であるが、KUPRIZ 239 の上顎 P3 は三根である。また、タヌキの P4 は通常、近遠心方向に伸びた裂肉歯状をしているが、KUPRIZ 141 の上顎 P4 は近遠心方向にあまり伸びておらず、また頬舌方向にふくれており、三角形の咬合面観をしている。始新世偶蹄類の *Entelodon* 属の上顎 P3 は通常タヌキと同様に二根であるが、*Entelodon viensis* の唯一の上顎 P3 の標本は、KUPRIZ 239 と同様の三根の形態をしている。また、*Entelodon* 属の下顎 p4 は通常、近遠心方向に伸びて頬舌方向に薄い形態をしているが、*Entelodon trofimovi* の唯一の下顎 p4 の標本は、KUPRIZ 141 の上顎 P4 に類似した、近遠心方向に短く、頬舌方向にふくれた、三角形の咬合面観をしている。上記の *Entelodon* 属の特異な形態は、属内でその種を他の種と区別する特徴(diagnosis)の一つとなっている。したがって、今回検討した霊長類研究所の現生ニホンタヌキ標本は、上記の *Entelodon* 属内の種の diagnosis の一部が単なる異常形態である可能性を示している。

B-3 腱および骨組織の効率的再生に向けた基礎研究

佐藤毅、榎木祐一郎、林直樹(埼玉医科大・医) 所内対応者：高田昌彦

咀嚼筋腱膜過形成症は、側頭筋の腱や咬筋の腱膜などが異常に肥厚し開口制限を呈する疾患であり、2005 年に口腔外科学会で認められた新しい疾患である。本疾患の病態は、顎関節や顎骨には異常がなく両側咀嚼筋の腱または腱膜の過形成であると考えられているが、発症要因は不明である。治療法は過形成した腱・腱膜の切除である。我々は、本疾患に発現する特異的なタンパク質を同定すること、腱組織の特性を解析することを目的として本研究を立案した。サルのアキレス腱、咬筋腱膜および側頭筋腱より腱組織を採取し、一部を組織学的解析およびプロテオーム解析に供し、残りについて腱細胞の単離を行い咀嚼筋腱の特性を調べる。

今回は 2009 年 5 月 5 日生のニホンザル(♂)のアキレス腱、咬筋腱膜および側頭筋腱を採取し、1 cm³の組織をマイナス 80℃で保存、1 cm³の組織をホルマリンにて固定した。また、残りの組織から腱細胞を単離して T25 フラスコにて培養した。

B-4 野生ニホンザル絶滅危惧孤立個体群の MHC 遺伝子の解析

森光由樹(兵庫県立大・自然・環境研/森林動物研究センター) 所内対応者：川本芳

兵庫県に生息しているニホンザルの地域個体群は、それぞれに分布が孤立しており遺伝的多様性の消失及び絶滅が危惧

されている。地域個体群の保全にむけて、早急な遺伝的評価・診断が必要である。MHC(主要組織適合抗原複合体)の遺伝子領域内には免疫機構を司る遺伝子や進化を反映した情報が保存されている。個体の病気に関わる、免疫や抗病性を支配する機能遺伝子が集まる領域と考えられている。しかし、野外に生息しているニホンザル集団、特に絶滅が危惧されている孤立個体群の MHC の研究は進んでいない。そこで兵庫県北部に生息している絶滅孤立個体群(美方群、7 個体)兵庫県中部に生息している個体群(大河内群、7 個体、船越山群 5 個体)と島嶼隔離個体群(淡路島個体群 7 個体)の血液サンプルを用いて MHC クラス I 領域にあるマイクロサテライト DNA 4 座位(MHC 座位)を分析した。フラグメント分析で、個体の遺伝子型を判定した。ヘテロ接合率(H)を求め多様性の違いを比較した。ヘテロ接合率は、平均値では、淡路島個体群は、0.334 であったが、絶滅危惧個体群の美方群では、0.818、大河内群では、0.719、船越群では、0.738 であった。本州に生息している群れよりも島嶼隔離された淡路島個体群の方が低い多様性を示した。今後は、他のゲノム領域にある座位(non-MHC 座位)を対象に、分析を進め、野生ニホンザル個体群の遺伝的多様性変化と絶滅リスクの関係について分析を行う予定である。

B-5 霊長類の各種組織の加齢変化

東超(奈良県医大・医・解剖学) 所内対応者：大石高生

加齢に伴う泌尿器系の内臓のカルシウム、燐、マグネシウム、硫黄、鉄、亜鉛の蓄積の特徴を明らかにするため、サル腎臓の元素含量の加齢変化を調べた。用いたサルは 28 頭、年齢は新生児から 30 歳である。サルより腎臓を乾燥重量 100mg 程度採取し、水洗後乾燥して、硝酸と過塩素酸を加えて、加熱して灰化し、高周波プラズマ発光分析装置(ICPS-7510、島津製)で元素含量を測定し、次のような結果が得られた。

①サルの腎臓においてはカルシウム、燐、マグネシウム、硫黄、鉄、亜鉛含量は加齢とともに減少傾向にあった。特に燐含量が加齢とともに有意な減少が認められた(P=0.0173)。

②サルの腎臓のカルシウム含量はすべて 2mg/g 以下で、石灰化しにくい内臓であることが分かった。

③サルの腎臓においては燐とマグネシウム含量の間に有意な相関が認められ、燐、マグネシウムが一定の比率でサルの腎臓に蓄積されることを示している。

B-6 新世界ザルに保存された鋤鼻器の機能を探る

守屋敬子、徳野博信(東京都医学研・脳構造) 所内対応者：今井啓雄

鋤鼻器は、鼻腔の嗅粘膜とは独立して存在する化学感覚器官である。多くの哺乳類の鋤鼻器は感覚器として機能しているが、霊長類においては、色覚の発達した旧世界ザルや類人猿では痕跡化している。一方、新世界ザルには鋤鼻器が存在することが知られている。しかし、鋤鼻器の感覚受容体である鋤鼻受容体の数は少なく、鋤鼻器の機能もよくわかっていない。本研究では、比較的固定標本の入手可能なコモンマーモセットを用いて、鋤鼻器の形態学的解析を行った。コモンマーモセットの鋤鼻器は、鼻腔と口腔を結ぶ切歯管に開口していた。ヒトの切歯管の口腔側は生後発達に伴って閉塞するのに対し、コモンマーモセットは成体でも開口していた。また、鋤鼻器には成熟鋤鼻ニューロンが確認され、切歯管経由でなんらかの化学物質を受容していると推察された。更に *in situ* ハイブリダイゼーションにて鋤鼻受容体の発現を解析したところ、機能的に保存されている鋤鼻受容体 7 つのうち、5 つは顕著な発現が見られたものの、残り 2 つはわずかに発現細胞が存在するだけであった。今後はこれら鋤鼻受容体の進化的解析を行う予定である。

B-7 狭鼻猿類の臼歯形状の比較分析

河野礼子(科博・人類) 所内対応者：高井正成

本研究は狭鼻猿類のさまざまな種類について、臼歯の大きさや形状を分析することにより、化石資料の系統的位置づけや、機能的特徴を検討することを目指して実施してきた。本年は中国産の化石霊長類資料を中心にさまざまな分析を進めた。中国産のマカク類とコロブス類の遊離歯化石の区別を行うために、中国産化石サル類の臼歯資料、および現生のマカク類・コロブス類の臼歯資料について、CT スキャンを実施し、データの分析を進めた。またギガントピテクスについては、臼歯の大きさの時代変化についての研究をとりまとめた。従来から知られていた資料に加えて、最近になって発見された 12 のギガントピテクス化石の産出遺跡とそこから出土した化石資料について、地質年代を通じたサイズ変化を検討したところ、後の時代になるほどギガントピテクス臼歯はサイズが大きくなるとの先行研究の結果が追認された。さらに広西チワン族自治区の岩亮洞から出土した 4 例目のギガントピテクス下顎骨標本、および遊離歯資料についても、記載論文を投稿した。

Zhang Y, Kono RT, Wang W, Harrison T, Takai M, Ciochon RL, Jin C (in press) Evolutionary trend in dental size in *Gigantopithecus blacki* revisited. JHE.

B-81 次視覚野をバイパスする頭頂連合野への視覚入力への解明

中村浩幸(岐阜大・院・医) 所内対応者：脇田真清

霊長類の外側膝状体は、2 層の大細胞層と 4 層の小細胞層、これらの層の間の koniocellular layer から成る。大および小細胞層から 1 次視覚野(V1)を経由して視覚連合野に至る神経回路は詳しく調べられているが、koniocellular layer の神経回路は不明な点が多い。本研究では、koniocellular layer から V1 を経由せず頭頂葉へ至る神経回路の存在を明らかにする目的で、1 頭のアカゲザルの V3A 野にペントバルビタール麻酔下で数種類の神経トレーサーを微量注入した。9 日後に、ペントバルビタール深麻酔下でリン酸バッファーと 4%パラフォルムアルデヒドを経路的に灌流し脳を固定した。V3A 野にビオチン化デキストランアミンを限局注入すると、同側の koniocellular layer に逆行性に標識された神経細胞が見出された。これらの神経細胞は、外側膝状体の内側約 4 分の 1 の部位で、1 層と 2 層、3 層と 4 層、4 層と 5 層の間に位置しており、

吻尾 1mm 以内に分布していた。この結果は、外側膝状体 konicellular layer から V3A 野へ直接投射が存在することを示している。

B-9 数学モデルを用いた霊長類大腿骨近位部形態の解析

稲用博史(医療法人社団いなもち医院)、関幸夫(いなもち数値機械生物学研究所) 所内対応者：平崎鋭矢

研究の目的は、ヒトとヒト以外の霊長類の骨形状の違いと行動様式の違いを比較し、骨形状の力学的条件を求める事にある。

Wolff の法則に従えば、骨は力学的ストレス(荷重)を受け、力学的に最適な形状になっている。この法則を最適化理論と考え数式で表現し有限要素法を用いて数値的に解を求めると骨に対する力学的条件を推定することが出来る。

ヒトとチンパンジーの大腿骨の形状を比較すると、ヒトは直立二足歩行ヒトには、Bicondylar Angle と呼ばれる大腿骨の傾きがある。Tardieu によれば、ヒトの Bicondylar Angle は 10 度、チンパンジーの Bicondylar Angle は 1~2 度である。

平成 25 年度の共同利用・共同研究では、以下の結果を得ていた。

ヒトの骨盤の形状は内臓を支えるために短く幅広くなった。同時に、ヒトは直立することにより大臀筋を発達させた。発達した大臀筋は腸脛靭帯の緊張を高め、チンパンジーと比べて、より外方から大転子を強く圧迫するようになった。

ヒトとチンパンジーの骨形状を求めるために、初期形状と力学的条件を設定し有限要素法を用いて計算し形状を求めた。これにより、Bicondylar Angle は大臀筋力が大きいことにより形成されることが推定された。

平成 26 年度の共同利用・共同研究では、大腿骨遠位部の形状に注目した。大殿筋によって緊張を高められた腸脛靭帯は大転子を強く圧迫する。大転子に加えられた圧迫力は、大腿骨骨幹部を通じて内顆に伝わる。このようにして、内顆において、大腿四頭筋内側広筋による圧迫力が生じることにより大腿骨遠位部における傾きを作ることが証明された。

他方、チンパンジーにおいては、大臀筋による腸脛靭帯の緊張は無く、従って腸脛靭帯による大転子への圧迫もない。同時に内顆における大腿四頭筋内側広筋による圧迫も生じない。この事により、チンパンジーの大腿骨では Bicondylar Angle は小さくなる事が分かる。

B-10 哺乳類の寛骨と脊柱(椎骨)の形態と移動運動

和田直己(山口大・共同獣医・生体システム科学)、松尾大貴(山口大・農・獣医) 所内対応者：西村剛

後肢は特に前方(頭の方)への運動における主な推進力の発生部位である。後肢と体中心のある体幹を貫く脊柱との力のやり取りが寛骨の役割である。寛骨の研究は外形形状に限定されており、断面形状に関する研究が極めて少なく、その機能についてはよく理解されていない。本研究課題では、さまざまな動物種の寛骨の外形および断面形状と動物種、動物のサイズ、ロコモーションとの関係を明らかにすることである。検体は京都大学霊長類研究所、国立科学博物館、大阪市自然史博物館、北九州命の旅博物館、関東以西の動物園、水族館から提供された。骨盤の形状解析には CT、また μ CT 撮影によるデータを用いる。これまでは 250 種を超える標本の CT 撮影を行った。このデータを用いて現在 3 次元構築の作業を行っている。現時点で 35 種の動物の寛骨の 3 次元構築を行った。外形、断面の解析は継続中である。これまでの解析結果により、坐骨長、腸骨長は体重と強い相関を示し、腸骨長と坐骨長の比は動物種によって異なることが明らかとなった。さらに解析を継続し、寛骨の形態と動物の生態の関係を明らかにする。

B-11 行動の時間配分バランスと分派行動の起こりやすさの関係

風張喜子(北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター) 所内対応者：辻大和

ニホンザルは、基本的にはメンバーがひとまとまりで暮らす凝集性の高い群れを作る。ただし、季節や群れによっては頻繁に分派行動が見られることもある。これまで、ニホンザルの群れのメンバーは、採食活動中に採食時間を削減しながら互いの動きを確認し、群れ生活を維持していることが示唆されている。群れがひとまとまりで行動するのを難しくする一因として、採食行動と互いの動きを把握する行動との時間配分上のトレードオフの関係に着目した。食物条件によって採食に偏った時間配分が行われれば、群れのまとまりを保つのが難しく、分派が起こりやすくなるだろう。このことを検証するために、宮城県金華山島に生息する野生ニホンザルを対象として、行動観察を行った。調査は、食物条件の異なるさまざまな時期(春・初夏・夏・秋・冬)に計 5 回、2 週間ずつ行った。食物を探し歩くのに多くの時間を取られる夏には、確認行動の頻度が低い傾向がうかがわれ、他の時期よりも頻繁に分派行動が観察された。引き続き、行動観察を継続し、採食行動と互いの動きの確認行動のトレードオフの関係や確認行動と分派の起こりやすさの関係について詳細な分析を行う予定である。

B-12 野生ニホンザルの絶滅危惧個体群における遺伝的交流の解明

浅田有美(兵庫県立大・院・環境人間学研究所) 所内対応者：川本芳

本研究は、絶滅が危惧されている兵庫県の野生ニホンザル地域個体群間(美方群、城崎群、大河内群)で、遺伝的交流の有無を明らかにすることを目的に行った。まず、オスに特有な Y 染色体遺伝子のマイクロサテライト 3 座位について変異を特定し、その組み合わせにより個体の Y ハプロタイプを決定した。そして、地域個体群ごとの Y ハプロタイプの出現頻度により交流の有無を検討し、ハプロタイプリッチネスにより、個体群間の遺伝的交流の程度を調べた。また、個体群の特徴を反映した結果を得るために、ミトコンドリア DNA 分析により分析個体を出生群により分類し解析を行った。その結果、3 地域個体群間で Y ハプロタイプの出現頻度に差は見られず、遺伝的交流が行われていることが示唆された。また、遺伝的交流の程度は、孤立の程度が大きい下北や、連続分布している三重県の個体群と比較した結果、美方群と城崎群では程度が小さく、大河内群は程度が大きいことが示唆された。以上の結果から、現在のところ遺伝的劣化による個体群の消滅の可能性は低く、危機的な状況ではないと考えられる。しかし、交流の程度が小さい美方群や城崎群では、今後遺伝的多様性の低下が進む可

能性もあるため、遺伝情報についての継続したモニタリングが必要だと思われる。

B-13 霊長類における甘味受容体の膜移行機序の解析

日下部裕子(農研機構 食品総合研究所) 所内対応者：今井啓雄

味覚は、他の末梢感覚と同様に、刺激に対する感受性が進化により変化することが知られている。例えば齧歯類は一部の人工甘味料を甘味と認識できないことが知られている。我々は、齧歯類とヒトでは、甘味の感受性が異なるばかりでなく、甘味受容体を構成する分子の1つである T1r3 の細胞膜上に移動する仕組み(膜移行性)が齧歯類とヒトでは異なることを最近見出した。そこで、進化過程と甘味受容体の膜移行性の関係を明らかにすることを目的に、人工甘味料に対する感受性が進化過程に伴い異なることが知られている霊長類とヒトの T1r3 の膜移行性を比較した。具体的には、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットの T1r3 の N 端に目印となるタグを付加した変異体を作製して培養細胞に導入し、タグに対する抗体染色を行うことで細胞膜上に移行した T1r3 を検出した。その結果、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットの T1r3 は、いずれもヒト T1r3 と同様、単独では細胞膜に移動できないことが明らかになった。また、これらの T1r3 はヒト T1r2 と共存させた場合は膜移行できることが示された。よって、霊長類の T1r3 の膜移行機序は、甘味感受性の進化とは関係性が低いことが示唆された。

B-14 Feeding ecology and fecal DNA analysis of wild rhesus macaques in a disturbed habitat of Southern China

Zhang Peng, Wu Chengfeng, Xia Xunxiang(Sun Yat-sen University) 所内対応者：今井啓雄

From September 1st to 20th, I visited Japan and had cooperative researches with Dr. Imai Hiroo, my counterpart at Primate Research Institute of Kyoto University. During my stay at Dr. Imai's lab, I learned the basic techniques to extract DNA from feces and amplify bar-coding regions (mtDNA) by PCR, and to estimate ratio of plant species taken by rhesus macaques in Hainan Province of China. As the results, I improved my method on DNA analysis and successfully extracted genomic DNA from feces samples of wild rhesus macaques. We also tested possible method to determine kin relationship of the study group using microsatellite markers from DNA from feces and fur samplings. I published one book in Chinese and two papers based on the funding supports. From August 11-17 of 2014, I attended the 25th congress of the International Primatological Society at Vietnam and the Bogor Symposium for Asian Primate Research in Indonesia. From 28 June-3 July, 2014, we invited Prof. Michael A Huffman to visit my primate lab of Sun Yat-sen university, China.

B-15 一卵性多子ニホンザルの作製試験

外丸祐介、信清麻子、吉岡みゆき(広島大・N-BARD)、畠山照彦(広島大・技術センター) 所内対応者：岡本宗裕

遺伝的に均一な霊長類個体を得る為に一卵性多子ニホンザルの作製を目指し、関連する生殖工学技術の検討と受精卵の移植試験を行った。①卵子採取の効率化の為に、卵巣刺激処置におけるホルモン投与量を検討し、既報の半量に減らすことでよりクオリティの高い卵子が得られる傾向が確認できた。②精子の凍結保存について検討し、保存液としてテストヨークバッファーを用い、融解後に 1mM Caffeine および 1mM dbcAMP を含む BO 液で処理することで、顕微授精等の受精補助を伴わずに体外受精卵を作製できる手法を確立した。また、受精補助処置として体外受精に先立って卵子の透明帯の一部を切開することで、受精率の向上をはかることができた。③ニホンザルの繁殖期に合わせ、体外受精卵について 1 頭、分割受精卵について 2 頭の受胎雌に移植試験を実施したが、いずれも妊娠を確認するには至らなかった。今後は、関連技術の高度化に取り組みながら、移植試験を継続する予定である。

B-16 志賀高原横湯川流域のニホンザル生態の変化の評価

和田一雄(NPO プライメイト・アゴラ バイオメディカル研究所) 所内対応者：辻大和

第一の目的である横湯川流域の群れ数についてであるが、今回の調査では、最下流域に餌付けされた A₂ 群と最上流域の C 群が発見された。1960-70 年代には下流から上流に向けて A・B・C の 3 群がいた。B 群は 1967 年に B₁・B₂ 群に分裂し、B₁ 群は 1971 年に焼額山を越えて雑魚川に移動して B₂ 群が残った。1963 年に餌付けされた A 群は 1979 年に A₁・A₂ 群に分裂して、A₂ 群は A₁ と B₂ の間に遊動域を形成した。和田は 1990 年代初期まで調査をしたがそれ以降、研究は行われなかった。

今回、横湯川下流域のリンゴ園を猿害に関して聞き込みを行ったが、リンゴ園は 1980 年代後半に猿害を受け、1995 年に山ノ内町でサル 28 頭駆除した。おそらく 1990 年代に B₂、続いて A₂ 群が里近くに下りてきて、駆除されたと推測される。C 群は横湯川最上流域で、志賀高原スキー場のリフトの 1 つ付近に居付いていたことから見て、おそらくスキー客がサルに餌を与えた結果だろうと思われる。

春の若葉、秋の果実類、冬の樹皮・冬芽を採集のためにそれぞれ 5 月、11 月、3 月に現地調査を行ったが、春と冬には目標の食物をほぼ採集できたが、果実類はほとんど見つけられず、凶作だった。現在、採集した食物類の栄養分析を行っている。

1960—90 年代の 3 群の遊動と土地利用様式の関係について、コドラート法による横湯川流域の植生資料と、10 年に及ぶシートトラップ法による果実生産量の変化の関係から現在分析中である。

B-17 新世界ザル苦味受容体 TAS2R に対するリガンド感受性多様性の検証

河村正二、松下裕香(東大・新領域) 所内対応者：今井啓雄

苦味受容体(TAS2R)は舌の味蕾に発現し苦味感覚を担っている。含まれる苦味物質の種類や量は食物によって異なるため、TAS2R の応答特性(どのような苦味物質をどれくらいの感度で受容するか)は動物種間の食性の違いに応じて異なっている可能性が考えられる。しかし、実際にそのような違いが存在するのかはほとんど分かっていない。そこで、近縁な種

間で TAS2R の応答特性が異なっている可能性を検討するため、種間で食性が異なることが知られている新世界ザル(マーモセット、オマキザル、ヨザル、クモザル、ホエザル)の TAS2R1 および TAS2R4 を培養細胞に発現させ、様々な苦味物質に対する応答をカルシウムイメージングにより比較した。その結果、TAS2R1 に関してはショウノウに対する応答の感受性が、TAS2R4 に関してはコルヒチンに対する応答の大きさが種間で異なることが明らかとなった。これらの結果から、新世界ザル種間の食性の違いが TAS2R の応答特性の違いと関連していることが示唆された。

B-18 Molecular characterization of HERV-Y family in primates

Kim Heui-Soo, Eo Jungwoo, Hee-Eun Lee(Pusan National University)

所内対応者：今井啓雄

Endogenous retroviruses (ERVs) inserted into the genome early in primate evolution. Human ERVs (HERVs) occupy about 8% of the human genome. In this study, we identified novel HERV-Y elements among 31 families. The full-length HERV-Y is located on chr8 and chr13 (HERV-Y101, -Y102, and -Y103; Table 1), and clustered with HERV-I, -T, -E, and -R in the pol-based phylogenetic relationship. HERV-Y *pol* were ubiquitously transcribed in human tissues, and also highly expressed in rhesus monkey. In addition, we observed high expression patterns in tissues from African green monkey and cotton-top tamarin, suggesting biologically important roles of HERV-Y gene products in primates.

B-19 霊長類の光感覚システムに関わるタンパク質の解析

小島大輔、鳥居雅樹(東京大・院理・生物科学) 所内対応者：今井啓雄

脊椎動物において、視物質とは似て非なる光受容蛋白質(非視覚型オプシン)が数多く同定されている。これまでに私共は、マウスやヒトの非視覚型オプシン OPN5 が UV 感受性の光受容蛋白質であることを見出し(Kojima *et al.*, 2011)、従来 UV 光受容能がないとされていた霊長類にも、UV 感受性の光シグナル経路が存在することが示唆された。そこで本研究では、OPN5 を介した光受容が霊長類においてどのような生理的役割を担うのかを推定するため、霊長類における OPN5 の発現パターンや分子機能を解析している。本年度は、ニホンザル組織よりクローニングした OPN5 cDNA の分子機能を調べるため、哺乳類培養細胞系を用いた Ca イメージング解析を行った。ニホンザル OPN5 cDNA を強制発現させた培養細胞に 11 シス型レチナルを添加した後、近紫外光パルス(387 nm)を照射したところ、細胞内 Ca⁺⁺濃度の一過的な上昇が観察された。このニホンザル OPN5 cDNA は、近紫外光受容体をコードすると考えられる。

B-20 Genetic diversity of long-tailed macaque *Macaca fascicularis* and rhesus macaque *M. mulatta*: mainly focus on their hybridization range

Srichan Bunlungsup, Suchinda Malaivijitnond (Chulalongkorn University) 所内対応者：今井啓雄

To determine the hybridization between *M. f. fascicularis* and *M. f. aurea*, blood and fecal samples of these two subspecies and the hybrid throughout Thailand and Myanmar in total 16 populations were collected. The species and subspecies of monkeys were first identified in regard to their morphological characteristics. HVSI on D-loop region was amplified to trace the genetic structure in macaque populations. SRY and TSPY genes were analyzed to trace the migration pattern. Then, mtDNA and Y-chromosome trees were constructed with 1000 bootstraps using Neighbor joining method. From our result, we proposed two hypothesized about their migration routes. Firstly, *aurea* population migrated southward along the Mergui Archipelago towards the southwestern Thailand, probably during the glacial period. After that, some of them may migrate north eastward across the low altitude of Tanasserim Hills towards mainland Thailand and islands on Thai Gulf respectively.

B-21 霊長類後肢骨格の可動性

佐々木基樹(帯広畜産大・院・医) 所内対応者：平崎鋭矢

ニシローランドゴリラの後肢を、CT スキャナーを用いて非破壊的に解析し、その足根関節と趾の可動域をチンパンジー、ニホンザル、スマトラオランウータンの可動域と比較検討した。まず、第一趾を最大限伸展および屈曲させた状態で CT 画像撮影をおこなった。さらに脛骨長軸と足底面が垂直な状態およびその位置から足を可能な限り回外させた状態の 2 通りの条件において足根関節部の撮影をおこなった。得られた CT 断層画像データを三次元立体構築して、足根関節と第一趾の可動状況を観察した。観察した全ての霊長類において足根関節部の顕著な回旋運動が観察された。さらに第一趾の屈曲と伸展に伴う第一中足骨の内転と外転が確認され、オランウータンでその可動域が最も大きく、次いでゴリラ、ニホンザル、チンパンジーの順であった。ゴリラやチンパンジーでは第一中足骨は足の背腹平面で可動しており、上下斜め方向に可動面を持つ他の 2 種の可動様式とは異なっていた。ゴリラやチンパンジーは半地上性を示しており、この中足骨の可動様式と可動範囲の違いは地上への行動圏の拡大に伴う霊長類進化の過程における形態適応の一つであるかもしれない。

B-22 霊長類 ES, iPS 細胞分化に与える環境化学物質の影響

高田達之、白井恵美、小野友梨子(立命館大・薬)、檜垣彰吾(立命館大・グローバルイノベーション研究機構)

所内対応者：今村公紀

TEKTI 発現細胞を詳細に解析するため、*TEKTI* プロモーター制御下で Venus を発現するカニクイザル ES 細胞を用いて EB 形成を行い、Venus 発現を継時的に観察した。その結果、約 6 週目から EB 表面において Venus 発現細胞が出現し、その後時間経過に伴い、Venus 発現細胞は集結し、特徴的な管状構造を形成することが確認された。またこの管状構造の表面では活発に運動する多くの繊毛が観察された。さらに電子顕微鏡を用いてこの繊毛断面を観察したところ、運動性繊毛に特徴的な 9+2 構造を有する微小管が認められた。また細胞形態は円柱状で、細胞内部に多くの分泌顆粒が観察されたことから、上皮性の細胞であると考えられた。すなわち *TEKTI* 発現細胞はその表面に多くの繊毛を有することから、*TEKTI*

は運動性の繊毛を有する細胞のマーカーとして利用可能であることが示された。またこれらの繊毛を繊毛特異的なマーカー(アセチル化チューブリン等)で染色すると精子の鞭毛とは異なる染色パターンを示した。*TEKT1* はこれまで生殖細胞分化において精子マーカーとして利用されてきたが、必ずしも精子の存在を示さないことが明らかとなった。

B-23 東京都、埼玉県、山梨県のニホンザル地域個体群の遺伝的な解析

井口基(東京の野生ニホンザル観察会) 所内対応者: 川本芳

東京都及び隣接域の埼玉県、山梨県、神奈川県に生息する個体群は、mtDNA 解析(Kawamoto et al,2007)により、関東でありながら遺伝子タイプは西日本タイプに近く、最終氷河期の遺存個体群である可能性が予想されている。

これらの個体群は 1980 年から生息状況調査を実施しており、生息群の内 58 群を特定している。また、オスの群間移動のデータも蓄積されつつある。だが、いずれも観察に基づくものであり、遺伝学調査についての蓄積はない。

2014 年は共同利用研究により、mtDNA と Y 染色体に見られる変異からこれらの地域に生息するニホンザルの成立過程及び地域内の遺伝子構成を解明する基盤として東京都、埼玉県、山梨県の生息群から糞試料 149 検体(2013 年も含む)、群れオスと群れ外のオスグループから糞試料 14 検体を採取した。

試料は特定群ごとにまとめ、mtDNA の塩基配列分析と amelogenin 標識遺伝子による性判別の実験をおこない、群れに固有のタイプを特定して、その分布図を作成した。

この結果、調査地域内のサルは他地域から大きく分化した mtDNA タイプを有すること、地域内においても mtDNA の多様性が大きいこと、タイプの分布に地理的構造が予想されることが観察されはじめています。また、オスを介した地域間交流についても遺伝子データが蓄積されつつある。

2015 年については、東京都、神奈川県を含めて検体の採取数を増加させて地域内の遺伝子構成を密に解明するとともに、オスの検体を採取してオスを介した地域間交流の実態解明をおこなう。

B-24 霊長類における眼窩骨壁の構造と眼球開眼領域の形態との関連性に関する研究

澤野啓一(神奈川歯科大) 所内対応者: 濱田穰

Fissura orbitalis superior(FOS)は、*Homo* では Canalis opticus(CO)の何倍もの大きさが有り、「くの字型」に屈曲している。しかし *Pongo, Pan, Gorilla* では、FOS の横断面形状は Fissura と言うよりも、むしろ歪んだ円形もしくは四角形に近い状態であり、*Homo* とは大いに異なる。Fissura orbitalis inferior (FOI)は、*Homo* では Orbita の外側下方に最大口径を持つ大型水滴状の断面形状によって側頭窩・側頭下窩に開口し、その断面積は個人差が大きいものの、少なくとも FOS と同等か、更にそれを上回る。このように相対的に大型の FOI を持つのは、現生 Catarrhini では *Homo* だけであり、それに準ずるのが *Hylobates* である。それに反して、*Papio, Mandrillus* 等では、FOI は非常に狭く小さくて、1~2 mm 程度の細い電線を挿入できる程度である。*Macaca* の場合にもその状態に近い。Great apes の場合には、その大きさは Cercopithecoidea よりも大きい、*Homo* よりもはるかに狭い。霊長類は、原始的な状態から高度に発達した状態に成るに従って、Orbit の壁が閉鎖的に成るという傾向を指摘されることが多い。上記の観察結果は、これに反する事例として非常に興味深い。視線の制御は、体軸と眼球運動の制御によって行われる魚類段階から、爬虫類・哺乳類段階では頸部運動中心方式に転換された。それが、霊長類進化の過程で、頸部運動・眼球運動併用方式に再度修正されて来た。bony orbital socket の壁面開口部構造と眼球開眼領域の形態は、そうした視線制御方式の改変、及び脳頭蓋内外の連絡路の改変とを反映しているものと考えられる。

B-25 中部山岳地域のニホンザル遺伝子モニタリング

赤座久明(富山県自然博物館ねいの里) 所内対応者: 川本芳

遺伝子解析により、中部地方に生息するニホンザルの群れや地域集団の類縁関係を明らかにし、地域個体群の成立過程を検討することを目的にして、DNA 試料の野外採集と分析を行った。

2015 年 9 月から 11 月にかけて、岐阜県根尾川、揖斐川流域と福井県九頭竜川源流の雲川流域で DNA 試料の糞を採集した。この地域はサルの生息情報が少なく、過去に遺伝子調査が行われていない地域である。分析の結果、ミトコンドリア DNA 調節領域(mtDNA-CR)(1015 塩基対)から、A タイプ(揖斐川上流)、B タイプ(根尾川上流)、C タイプ(揖斐川上流、根尾川上流、雲川)、D タイプ(揖斐川中流、揖斐川支流坂内川)の四つのハプロタイプを検出した。4 タイプの第二可変域(412 塩基対)に注目して、ハプロタイプを分類(Kawamoto et al 2007)すると、A は JN21 タイプ、B は JN22 タイプ、C と D は JN30 タイプであった。更に、DNA による性判別で、A,C,D はメスの個体を含む集団であることを確認した。揖斐川上流に生息する A タイプ(JN21)は、先行研究により石川県手取川、岐阜県長良川流域の生息分布が確認されており、この集団が更に揖斐川上流域に至っていることが分かった。C、D タイプ(JN30)は三重県東部、岐阜県西部、福井県南部の生息分布が知られていたが、揖斐川、根尾川、雲川流域の分布が確認されたことにより、三重県、岐阜県、福井県にかけて広域的に生息する血縁集団であることが明らかになった。

B-26 加齢変化特性を考慮できるニホンザルの四足歩行計算機シミュレーション

長谷和徳、林祐一郎(首都大・理工) 所内対応者: 平崎鋭矢

本研究では、ニホンザルモデルを用いて、霊長類のオトナ期における筋・骨格の加齢変化を調べ、運動能に対するそれらの影響を明らかにするため、これらの力学的な特性を考慮・反映し得る四足歩行の計算機シミュレーションモデルの構築を試みた。霊長類研で撮影したニホンザルのロコモーションデータや、歩容の特徴の知見を参照し、四足歩行の運動制御モデルの構築を行った。具体的には、昨年度に構築したモデルを基本とし、足先軌道関数の修正や地面反力計算の精度向上を行った。また、霊長類研より情報提供いただいた四足歩行ロボットの制御モデルを参照し、新たな脚位相制御機構

の追加も行った。シミュレーションでは足部反力などを含め、ニホンザルの特徴をよく表す歩行様式を実現できるようになった。また、四肢の運動位相を前方交叉型と後方交叉型の両方で実現し、この脚位相と身体重心位置との関係について検討した。その結果、ロコモーションパターンの形成には重心位置などの身体力学系の特性が大きく影響されることが明らかになった。ただし、加齢変化に伴う身体力学特性と歩行運動との力学的関係の解明については、更なる検討が必要である。

B-27 屋久島のニホンザルの腸内細菌の消化能力についての研究

牛田一成、土田さやか(京都府大・院・応用生命) 所内対応者：半谷吾郎

屋久島のニホンザルは、上部に棲息する個体群と下部の西部林道周辺に生息する個体群がある。上部個体群は、下部個体群と比べると特に積雪の見られる冬期にはより厳しい生活環境に耐える必要がある。樹皮など消化が困難な食物の場合、腸内細菌が宿主の栄養にもたらす貢献がより高いと推測できる。また、これまで対応者らが実施してきた屋久島ニホンザルの腸内細菌網羅解析では、多くの配列が同定不能となっているが、それは野生動物腸内細菌の分離株の情報が決定的に欠落しているためでもある。

そこで、本課題では屋久島ニホンザルの腸内細菌のうち、宿主の栄養に貢献すると考えられる細菌や未知の細菌種を分離することを目的とした。

2014年12月14日より屋久島大川林道で上部個体群の新鮮糞を採取し、ケンキポーター試験管に採取し、屋久島観察ステーションに帰着後ただちにEG血液寒天平板、BL血液寒天平板、およびMRS寒天平板に塗抹し、嫌気培養を行った。同様の操作を西部林道周辺に棲息する下部個体群に対しても行った。

その結果、上部個体群糞便からBL培地上で優占する非常に特徴的な形状の細菌が分離された。単離後、同定を試みたところ *Sarcina ventriculi* と推定された。本菌の健康人からの分離例では、概ね厳密な菜食主義者からという報告があり (Crowther, 1971 J Med Microbiol 4, 343-350) 食事との関連が強い細菌と考えられる。このグループは、現状では、分類学的な混乱も見られることから、腸管における生理についての研究は十分なされていない。この他、繊維分解性 *Bacteroides thetaiotaomicron* も分離されたが、多くの単離株が少なくとも2種の共生系と思われる混在を示し単離が困難で現状でも十分単離できていない。また下部の個体群からはタンニン分解性 *Streptococcus gallolyticus* が検出された。現在、分離が困難な細菌について、さらに検討を重ねている。

B-28 ニホンザル群における食物摂取と栄養状態および繁殖成績の関係について：幸島群と高崎山群の比較

栗田博之(大分市教委・文化財) 所内対応者：濱田穰

幸島及び高崎山での写真計測法による体長計測は、それぞれ8月と9月に実施し、前者ではメス16個体、後者では5個体のデータ収集を行った。まだ幸島群における高齢個体のデータが少なく、今後の調査における課題である。

体重については、幸島個体では体重の年変動が大きく、年変動パターンは個体間で同調していることがわかっているが、今年度は、幸島個体における年によるばらつきが高崎山個体のそれよりも大きいかどうかを分析した。十分な比較データがある2005年から2008年までの(妊娠個体がほぼいないと思われる)10月時体重の個体内のばらつきの程度を比較したところ、幸島個体の方が有意に大きいことがわかった。

また、餌(コムギ)獲得量調査については、幸島ではこれまでのデータに今年度11月に収集した2個体分のデータを追加して、上位下位3個体ずつのデータとなり、高崎山で2005~2008年の間に収集した上位下位8個体ずつのデータと比較した。その結果、幸島の上位個体は下位個体の1.8倍(エネルギーベース)の餌を、高崎山の上位個体は下位個体の1.5倍(同)の餌を獲得していた。

今後、幸島個体からのデータ不足を解消した上で、食物摂取、栄養状態、および繁殖成績との関係とその2群間の違いの解明を目指したい。

B-29 COCH 遺伝子発現の種特異性に関する検討

池園哲郎、松田帆(埼玉医科大)、松村智裕、斉藤志ほ(日本医科大) 所内対応者：高田昌彦

■研究目的

COCH 遺伝子は遺伝性難聴のひとつ DFNA9 の原因遺伝子である。COCH 遺伝子の蛋白産物である Cochlin は、(1)内耳で蛋白の70%を占め(2)4つの分子量の異なるアイソフォームを持ち(3)内耳にほぼ特異的に発現し(4)CTP が外リンパ特異的に存在している事を解明した。昨年度の研究では、ヒト外リンパでは CTP と思われるバンドが1本(糖鎖結合型)見られるのに対して、サル外リンパではバンドが2本(糖鎖結合型と糖鎖非結合型)認められ、Cochlin の機能解明に更なる研究が重要性を持つ。

■研究計画・方法

ニホンザルの外リンパを採取し、ウェスタンブロット法による蛋白解析を行う。

■これまでの研究の経緯と成果

Cochlin は内耳で最もドミナントな蛋白であるが、その機能はまだ解明されていない。

昨年度及び本年度、ニホンザルから外リンパを採取し CTP 抗体を使って比較解析した。昨年度採取の外リンパでは、バンドが2本観察され糖鎖結合の違いによるアイソフォームがあることが示唆された。本年度採取の外リンパでは、糖鎖結合型 CTP の分子種のみが検出された。

げっ歯類の外リンパでは CTP は糖鎖非結合型に相当する分子種も検出されるが、ヒトでは CTP がほぼ100%糖鎖型として存在する。今年度の結果から、ニホンザルにおける CTP の生合成過程がヒトと同様である可能性もあり、今後更なる研究が必要と考えられる。

B-30 ニホンザル二足歩行運動の生体力学的解析

萩原直道(慶應義塾大・理工・機械工)、大石元治(日本獣医生命科学大) 所内対応者：平崎鋭矢

生得的に四足歩行するニホンザルの二足歩行運動のメカニクスを、ヒトのそれと対比的に明らかにすることは、ヒトの二足歩行の起源と進化を明らかにする上で重要な示唆を提供する。このため申請者はニホンザル歩行運動の力学的解析を行ってきた。しかし近年驚くべきことに、その二足歩行は力学的には走行に近いことが、トリの二足歩行との比較運動学的分析から示唆されつつある。そこで本研究では、ニホンザルの二足歩行運動の床反力と脚のスティフネスに着目し、その移動様式の力学原理を再検証することを目的とした。

ニホンザル二頭を実験室内の歩行路の上を歩行させ、歩行路に設置した床反力計を用いてニホンザル二足歩行中の床反力を計測した。このとき歩行中の身体運動をビデオカメラで撮影し、関節点をフレーム毎にデジタル化し、その結果より歩行中の重心点の時間変化を求め、位置・運動エネルギーを算出した。また、その点と着力点を結ぶ脚軸の長さ変化と床反力データから、脚のスティフネス(脚の弾性特性)を推定した。その結果、ニホンザルの鉛直床反力波形はトリのそれと類似することを確認した。また位置・運動エネルギーの時間変化が相対的に同相で推移することから、ニホンザル二足歩行は空中期のない走行、すなわち **grounded running** となっていることが示唆された。また、ニホンザル屍体標本から、歩行に関係する主要な筋の速筋線維と遅筋線維の割合を組織学的手法によって計測する準備を行った。

B-31 霊長類色覚視物質及び味覚受容体の赤外分光研究

神取秀樹、大橋知明、野中祐貴(名工大・院工) 所内対応者：今井啓雄

ヒトを含む霊長類の網膜には、3種類(赤・緑・青)の色覚視物質が存在する。これら視物質は試料調製が困難なため、構造生物学的解析は過去に例がなく、我々の色認識メカニズムは謎のままであった。そのような現状下、我々は培養細胞を用いて発現させた霊長類の赤・緑感受性視物質に対する高精度の赤外分光測定による構造解析を成功させている(平成22、24年に論文を発表)。次なるターゲットとして、平成25年より残された青感受性視物質の構造解析に取り組んでいる。青視物質の試料調製は赤・緑視物質よりもさらに困難と考えられていたが、種々の実験条件の最適化の結果、わずか1年足らずで青視物質の試料調製および赤外分光測定を実現することができた。また平成26年にはこの青視物質に対する変異体実験にも取り組み、青視物質に特異的な構造情報の抽出にも成功している。このように我々は今後も赤・緑・青視物質の構造データからその波長制御メカニズムを構造に立脚して議論することを目指していく。

また我々は苦味受容体の赤外分光解析に向けた取り組みも行っている。その一つとして、数種類の苦味受容体を培養細胞を用いて発現させ、それらの発現量を比較することで実際の試料調製および赤外分光測定に適した苦味受容体の選択を試みた。その際最適とされた苦味受容体を用い、精度のよいスペクトルを得るため、苦味受容体を純度よく抽出する方法を模索している。

今後も色覚視物質の構造解析の成果を世界に発信できる点を踏まえ、支援いただいている霊長研に改めて謝意を表したい。

B-32 口腔における感覚受容機構の解明

城戸瑞穂(九州大・歯学研究)、合島怜央奈(佐賀大・医)、木附智子(九州大・歯) 所内対応者：今井啓雄

口腔は鋭敏な器官である。適切な口腔感覚は、哺乳類において哺乳・摂食・情報交換など多様な行動の基盤となっている。しかしながら、その機構についての理解はまだなお限られている。

口腔の感覚は、教科書的には口腔粘膜に分布している密な神経支配によると理解されている。私たちは、(狭義の)味覚とされる甘味・塩味・酸味・苦味・うまみ以外の口腔内の感覚、とくに、温度感覚や唐辛子や胡椒などのスパイスなどのへ感覚、触圧感覚などの機構の解明を目指し、こうした広義の味覚とされる感覚の分子基盤として、TRPチャネル(transient receptor potential channel)を想定し研究を進めてきた。今年度は、マーマセットの口腔試料を用い、TRPチャネル発現を解析する試料採取条件および免疫染色の条件を検討した。そして、マーマセット口腔粘膜上皮に温度および機械受容への関与が報告されている一部のTRPチャネルの発現が確認することができた。今後例数を増やし、温度感受性のTRPチャネルの発現について調べていく予定である。

B-33 霊長類におけるエピゲノム進化の解明

一柳健司、佐々木裕之、福田溪(九州大・生医研) 所内対応者：今井啓雄

我々は霊長類におけるゲノム進化とエピゲノム進化の関係を解明するため、ヒト、チンパンジー(霊長類研究所の飼育個体)、ゴリラおよびオランウータンの末梢白血球のDNAメチル化比較研究を行い、CTCFタンパク質の結合配列の出現・消失やマイクロサテライト配列の小さな変化によって、DNAメチル化状態が変化し、転写状態に影響を与えていることを世界で初めて示した(Fukuda et al. 2013, J. Human Genet.58:446-454)。

前年度にGAINよりニホンザル精子サンプルを供与頂き、全ゲノムレベルでDNAメチル化状態を解析した。本年度はさらに解析を進め、ヒト、チンパンジー、ニホンザルの精子メチル化状態の3種比較を行い、ヒト特異的に大きな低メチル化領域(数十kb以上)が多数出現していることを明らかにした。一方、小さな領域(1kb以下)のメチル化変化については、SVAやAluといったレトロトランスポゾンの特異的な挿入により、周辺のエピジェネティック状態が変化することを明らかにした。SVAはヒト集団内にも多数の挿入多型があることが知られている。そこで、数人のヒト精子サンプルについてメチル化状態を解析し、ヒト集団内でもSVA挿入によって、周辺のDNAメチル化が低下することを明らかにした(論文投稿中)。

B-34 霊長類の性的二型とその多様性の分子機序解明に向けた技術開発

太田博樹、勝村啓史、松前ひろみ(北里大・医・解剖) 所内対応者：今井啓雄

【目的】性ホルモンの周期的変動に同調して発現量が増減する遺伝子のリストを作成する

【方法】自然排卵のニホンザル2頭の estradiol と progesterone の血中濃度の経時的変動から、排卵直前と直後のそれぞれのホルモン血中濃度のピークを示す日の血液試料から RNA を抽出・精製し次世代シーケンサーにより RNAseq を行い、それぞれのピーク時で発現量が増減している遺伝子のリストを作成する。

[NGS プロトコル]

1. サンプル品質チェック
2. ライブラリー製作
 - ①total RNA から mRNA 分離
 - ②mRNA のフラグメンテーション
 - ③一本鎖 cDNA の合成
 - ④二本鎖 cDNA の合成
 - ⑤フラグメントエンドの修復
 - ⑥3'末端のアデニル化
 - ⑦両末端にアダプターをライゲーション
 - ⑧精製
 - ⑨PCR 増幅
 - ⑩ライブラリーの検証
 - ⑪ライブラリーのプーリング
3. シーケンシング
 - ①クラスタのジェネレーション(Illumina c Bot)
 - ②ラン(Illumina HiSeq2000、101×2(ペアエンド))
4. データフィルタリング
 - ①ローデータ生産
 - ②Fastq ファイル製作(CASAVA 利用 demultiplexing、QV 値の要約)

【進捗】ニホンザル2頭の排卵直前と直後の estradiol/progesterone ピーク時の血液試料から抽出した RNA の NGS 解析をおこなった。4 検体でほとんど差が無い Read 数が得られた。この Raw Data を現在解析中である。

B-35 霊長類における旨味受容体 T1R1/T1R3 のアミノ酸応答性の評価

三坂巧、石丸喜朗、戸田安香(東大・院・農生科) 所内対応者：今井啓雄

旨味受容体 T1R1/T1R3 はヒトとマウスで応答するアミノ酸の種類が異なる。本研究では、味覚受容体発現細胞を用いた味の評価技術を利用し、霊長類間における旨味受容体のアミノ酸配列の違いとアミノ酸応答性の違いを比較検討することを目的としている。

ゴリラ、オランウータン、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザル、ブタオザル、コモンマーモセット、アイアイ、キツネザルのゲノム DNA から旨味受容体遺伝子 *Tas1r1* および *Tas1r3* のコード領域をゲノム PCR 法により取得した。続いて、オーバーラッピング PCR 法を用いて *Tas1r1* および *Tas1r3* の各々6個のエキソン領域を連結させ、T1R1 および T1R3 コード領域全長を哺乳類細胞発現用ベクター(pEAK10)に挿入した。今後、得られた発現プラスミドを用いて培養細胞系により、これら非ヒト霊長類 T1R1/T1R3 のアミノ酸応答性を評価する予定である。この解析は、霊長類における味覚受容体遺伝子配列と食物選択との相関性を示す上で、非常に興味深い結果を提示しうることが期待される。

B-36 霊長類腓腹神経の比較解剖学的研究

関谷伸一(新潟県立看護大) 所内対応者：平崎鋭矢

チンパンジー胎児の腓腹神経(NS)の成り立ちと分布を調べることを目的に、平成26年度は下肢全体の皮神経の剖出を試みた。材料は京大霊長類研究所所蔵のチンパンジー胎児2頭、2側の下肢を手術用実体顕微鏡の下で解剖した。

第1例(PRI7993、左)：外側大腿皮神経(Cfl)は大腿外側から前面の皮下に分布した。後大腿皮神経(Cfp)は大腿二頭筋長頭の外側縁から皮下に出て大腿後面、膝窩、下腿後面上部に分布した。伏在神経(Sa)は下腿内側から第1、2趾背に達した。外側腓腹皮神経(Csl)は大腿二頭筋短頭(BFb)を貫通して皮下に現れ、膝関節の下方と下腿外側後面に分布した。内側腓腹皮神経(Csm)との交通はなかった。Csm は腓腹筋の内・外側頭間を下行し、外果の後ろで皮下に出て NS となり第5趾の外側趾縁に分布した。NS の枝のうち、アキレス腱の深層に向かう内側枝は確認できなかった。

第2例(PRI8507、右)：Cfl、Cfp、Sa の分布は第1例とほぼ同じであった。Csl には BFb の下縁を通るものと貫通するものがあった。NS の内側枝は存在したが脛骨神経との交通(S-T 交通)は未確認である。

チンパンジー胎児下肢の皮神経の走向および分布は、成獣あるいはゴリラとほぼ同じパターンを示した。今後は NS の内側枝の分布、特に S-T 交通の有無を明らかにしたい。

B-37 末梢心臓自律神経系形態変化に関与する進化機能解剖学的因子の探索

川島友和、佐藤二美(東邦大・医・解剖) 所内対応者：濱田穰

これまで主に、霊長類における心臓支配神経である交感神経系心臓神経と副交感神経系心臓神経の詳細な比較解剖学的解析を行ってきた。その中で、各グループ内(曲鼻猿、新世界ザル、旧世界ザル、小型類人猿、大型類人猿、ヒト)ではほぼ

一定の形態を有していることがわかり、それらはほぼ進化史を反映した移行的関係を認めた。これは、霊長類内での発生学的制約が大きいのかかもしれない。そこで、(1)霊長類内でも特殊な身体的特徴を有する種で微量な形態変化を抽出するために再検討を行うこと、(2)多様な哺乳類を対象として大きな変化を求め、などを次の課題とした。そこで、近年様々な生活環境に特化した種や特殊なロコモーションを有する種を解析して、心臓自律神経系の違いを検出することを検討している。

今年度は、本共同利用として半水棲哺乳類としてアシカ科(*Otariidae indet.*)1体と樹上生活に特化したクモザル(*Ateles sp.*)1体、その他の博物館資料として樹上性滑空哺乳類としてヒヨケザル(*Galeopterus sp.*)1体ならびにその比較としてクリハラリス (*Callosciurus erythraeus*)1体の計4体を解剖した。

その結果、各々の環境に特化した変化として、骨格、筋、体性末梢神経には有意に大きな変化を観察したが、頸胸部自律神経系の細かな神経分布には明瞭な形態変化は乏しく、その微細な変化を論じるにはサンプルサイズが必要と思われた。今後さらに様々な動物園・博物館に協力を求め、材料収集を継続し、様々な哺乳類の解析を行っていく予定である。

B-38 霊長類の前肢帯骨格の可動域の種間比較

加賀谷美幸(広島大・歯歯薬保・解剖学及び発生生物学) 所内対応者：濱田穰

樹上性の強い霊長類は前肢の運動範囲が広く、前肢帯の可動性も高いとされる。前肢帯の立体配置やその位置変化の種間の違いを明らかにするため、ニホンザル、ヒヒ、オマキザル、クモザルの成体を対象として計測を行った。獣医師の協力のもと、麻酔下、接触型三次元デジタイザを用い、前肢や前肢帯骨格の位置を示す座標を、肢位を変えて取得した。また、X線CT撮影を行い、各個体の骨格要素の形状を抽出し、先に計測した三次元データに重ねあわせることにより、前肢や前肢帯の骨格の位置関係をソフトウェア上で復元した。ヒヒやニホンザルでは、上腕骨は矢状面上の投影角にして180度程度(体幹軸の延長ライン)までしか前方挙上されないが、オマキザルでは180度以上、クモザルは約270度に達し、樹上性の強い新世界ザルでは頭背側への上腕の可動性が大きかった。これら最大前方挙上位では肩甲骨が背側へ移動し、オマキザルやクモザルでは肩甲骨関節窩が頭外側を向くが、ニホンザルやヒヒでは関節窩が頭外側かつ腹側に向く傾向があり、後二者では胸郭上部に対し棘上窩が長いとみられた。このように、前肢帯の骨格形態が肩関節の位置や向き、ひいては前肢の可動域に影響していた。

B-39 霊長類におけるマalaria感染関連遺伝子の分子進化的解析

大橋順(東京大・理)、中伊津美(東京大・理) 所内対応者：今井啓雄

マalaria感染における最も重篤な症状の一つが脳性マalariaである。脳性マalaria患者の脳血管内においてマalaria感染赤血球の凝集が観察され、凝集形成に血小板が介在していることが知られている。タイ人熱帯熱マalaria患者481名を対象に、血小板数との関連が報告されている細胞内アダプター蛋白質(SH2B3)をコードするSH2B3遺伝子中の一塩基多型(SNP)の解析を行った。SH2B3タンパクは、各種造血系細胞におけるサイトカインおよびインテグリンを介するシグナル制御分子の一つである。軽症マalaria群と脳性マalaria群とで調べたSNPのアリル頻度を比較したところ、Gアリルが軽症マalariaと比べて脳性マalariaに感受性であることを見出した(OR=1.5, P-value=0.043)。Gアリルは血小板数増加との関連が報告されており、本結果はマalaria感染赤血球と血小板との凝集塊による微小血管閉塞が脳性マalariaを引き起こす要因の一つであることを示唆している。現在、ヒト系統においてSH2B3遺伝子に正の自然選択が作用した可能性を検討すべく、マalaria患者16名と西チンパンジー3匹について、SH2B3遺伝子の全コード領域の配列決定を行っている。配列が得られれば、多型サイトと固定サイトの同義置換数と非同義置換数とを比較する(McDonald-Kreitman 検定)予定である。

B-40 網膜神経細胞のサブタイプ形成を担う分子群の霊長類における発現パターンの解析

大西暁士(理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 網膜再生医療研究開発プロジェクト)

所内対応者：今井啓雄

ヒトを含む多くの霊長類の多くは赤・緑・青色感受性の錐体視細胞に起因する3色性色覚を持つが、これら錐体視細胞のサブタイプを決定するための分子機構は不明な点が多い。マウス網膜において青・緑錐体視細胞サブタイプ決定を担う転写制御因子Pias3の発現調節に関与する因子として1型レチノアルデヒド脱水素酵素を同定し、成体マウス網膜において中心窩部分に発現が認められた。発現する網膜神経細胞について免疫組織化学的に検討した結果、一部のアマクリン細胞とミュラー細胞で局在することが分かり、マウスとマウス間では発現する神経細胞は概ね保存されている事が示唆された。

霊長類網膜の組織解析と平行してマウス網膜の緑錐体の局在する領域で高い発現を示す分子の探索を進め、幾つかの候補遺伝子を同定した。今後、霊長類網膜における発現パターンの解析およびマウス網膜におけるGOF/LOF解析により表現型を評価する予定である。

B-41 霊長類精原幹細胞の解析

久保田浩司、垣内一恵、田坂翔平(北里大・獣医) 所内対応者：今井啓雄

これまでの研究で明らかにしてきた齧歯類精原幹細胞の知見をもとに、霊長類(マウス、マカク類)精原幹細胞の性状解析を行い、培養系を確立することを目的として準備を進めてきたが、残念ながら平成26年度は霊長類研究所から新鮮組織試料を入手する機会に恵まれなかった。現時点では他施設から得られた精巣サンプルを利用して免疫組織学的解析ならびにフローサイトメトリーを用いた予備実験を行うに留まっていたが、少しずつ予備実験結果は蓄積してきている。実験機会には恵まれなかった一年ではあったが、霊長類研究所の共同利用研究会「霊長類への展開に向けた幹細胞・

生殖細胞・エピゲノム研究」にて講演し、貴重な情報交換の機会を得ることができた。研究会のオーガナイザーである霊長類研究所の今村公紀先生には改めて謝意を示したい。今後は保存サンプルの利用を含めて、より productive な共同研究体制の構築を進めていく予定である。

B-42 奥多摩湖周辺の野生ニホンザル「山ふる群」の人付けと環境教育

内藤将、島田将喜、盛恵理子(帝京科学大・生命環境) 所内対応者：辻大和

東京都奥多摩湖周辺には、明治以前には群れが生息していたが人間活動により群れが長期間消失していた「空白地帯」が存在していた。しかし近年この地帯を利用する群れ、「山ふる群」が観察されるようになった。山ふる群の遊動域は多摩川により南北に分断され、集落が集中している場所と山ふる群が生息するまで「空白地帯」であった森林の二つに分かれる。本研究は山ふる群の夏季と秋季の遊動から「空白地帯」に出現する群れの土地利用を明らかにした。

夏季と秋季共に集落付近を多く利用していた。特に秋季には庭や畑に植えてあるカキノキを採食するために集落の利用頻度が多かった。また、集落周辺では移動速度が遅く、森林内では移動速度が速かった。これらの結果は、山ふる群が季節によっては集落周辺の食物に依存していることが示唆される。しかし、他の地域の猿害群と比べ移動速度は速く、集落周辺の利用割合は少なかった。これは「空白地帯」で群れサイズを維持するために必要な広葉樹林帯が十分に確保できるためであると考えられる。したがって「空白地帯」を利用する群れは集落に依存するが、森林内で十分な資源が確保できる場合には依存度は低くなることが予想される。

B-43 ひも引き協力課題を用いたマーモセットの協力行動

草山太一(帝京大・文・心理) 所内対応者：脇田真清

他者と協力作業を行うためには、相手の行動を正確にモニターし、それに合わせて自己の行動を調整する必要がある。ヒト以外の動物を対象とした協力行動は自然観察場面において報告されている一方で、実験的分析に基づいた研究は少ない。比較認知的視点より霊長類での検討が欠かせないことも理由に、コモンマーモセットを対象に協力行動の成立要件について実験的に検討した。今年度は実験計画の初年度であることや実験期間の制約を考慮し、2つの課題を用いて協力行動の生起について調べた。2個体が同時にひもを引くことで報酬の入った容器を手元まで引き寄せられる仕掛けになっている装置を利用した「ひも引き協力課題」では個体同士がタイミングよく装置前に座ることは全く観察されなかった。また複数の個体が群飼されているケージ内に、報酬の入った容器を設置し、この容器に単独では持ち上げられないぐらいの重い蓋をして、彼らの様子を観察した(ふた開け協力課題)。その結果、上位個体が容器を占有し、複数個体が協力するような行動は認められなかった。

B-44 下北半島脇野沢の野生ニホンザル群の分裂が個体群動態に与える影響

松岡史朗、中山裕理(下北半島サル調査会) 所内対応者：古市剛史

個体数増加傾向にあった下北半島南西部の A87 群は 2012 年に 83 頭に増加し、2013 年 4 月に 43 頭(87A 群)と 22 頭(87B 群)の 2 群に分裂した。分裂 2 年目の 2014 年度の出産率、赤ん坊の死亡率は各々、87A 群 58%、9%87B 群 64%、14%と分裂前の高い出産率、低い死亡率の状態に戻った。分裂時に、0~3 歳が多数消失したが、今年度は、3 頭(32 頭中)であった。遊動は、詳細に追跡した 87A 群に関しては、前年度とほぼ同じ地域を利用していた。群れ個体数は減少したものの遊動面積は分裂前とほぼ同じで縮小は見られなかった。87B 群は、観察日数が少なく、遊動面積は定かではないが、すべての観察が 87A 群の遊動域内で会ったことから、分裂した 2 群がかつての遊動域を分割利用しているとは考えにくい。北西部の分裂時も当初、数年は同様の傾向であったが、のちに遊動域がわかれたこともあり、今後継続した観察が必要と思われる。環境利用に関しては、相変わらず秋を除く季節において、法面をよく利用していた。

B-45 ヒト膣炎のモデル動物作出のための霊長類の膣内細菌叢に関する研究

野口和浩(熊本大・院・生命科学) 所内対応者：平井啓久

ニホンザルの膣内常在細菌叢の構成を明らかにするために、今年度は 7~20 歳の 12 頭の雌について検討を加えた。その結果、分離菌数および分離頻度の最も高かった菌種は、通性嫌気性菌の streptococci、嫌気性菌の *Bacteroidaceae* および gram-positive anaerobic cocci(GPAC)であった。特に GPAC はこれらの菌種の中で最も高い分離菌数を示した。ヒトの膣内での最優勢菌種である lactobacilli は、分離菌数および分離頻度はそれぞれ 104.1 (CFU/vagina) および 40%と中等度の値であった。今回のこれらの成績はこれまでに検討した結果と大きな違いはなくほぼ同様の傾向を示していた。以上の成績より、ニホンザルの膣内細菌叢の構成は、streptococci、*Bacteroidaceae* および lactobacilli を優勢菌種として保有しているヒトやチンパンジーとは若干異なることが明らかとなった。また、ニホンザルの膣内の pH を調べた結果、平均 6.0 とヒトで報告されている成績(強酸性; pH3~4)とは異なることも明らかになった。今後はニホンザルの非繁殖期における膣内細菌叢の構成、あるいはエストロジオール等の性ホルモンと膣内細菌叢との関係について検討を加えることにより、ニホンザルの膣内常在細菌叢の構成の全容とそれに影響を及ぼす要因について明らかにできればと考えている。

B-46 マカク属霊長類における感染症抵抗性にかかわる細胞表現型解析

安波道郎(長崎大・熱研) 所内対応者：平井啓久

マカク属霊長類は、気候や感染因子など棲息環境の影響下にそれぞれのゲノムを進化させ、その結果現存集団のゲノムには種間・種内の地理的相違が見られると考えられる。実際、カニクイザルを自然宿主とするサルマラリア原虫は自然に曝露されることのないニホンザルに実験感染させると致死的な重症マラリアを惹き起こすことが分かっている。Toll 様受容体 TLR9 は細菌由来の非メチル化 CpG モチーフなど病原体パターンを広く認識するが、ヒトではマラリアの

疾患感受性を規定すると考えられている。これまでに国内の繁殖業者に由来するアカゲザル1個体、ニホンザル5個体と医薬基盤研究所、霊長類医学研究センターのカニクイザル6個体についてTLR9のコード領域3096bpの塩基配列を解読し、アカゲザルとニホンザルが極めて近縁であることが明らかにしていた。このたび霊長研のアカゲザルとニホンザルの繁殖集団それぞれ1集団(周群18個体、高浜群17個体)について同様に解析した。いずれの群もGenBankにNM_001130431として登録されている配列に一致するアレルが最頻であった(周群50.0%、高浜群58.8%個体)。ニホンザルには3か所の同義置換のみ認められたが、アカゲザルでは4か所の非同義置換と8か所の同義置換があり、中でもAla58Thr置換を有するアレルが30.6%と比較的高頻に認められた。また、カニクイザルに高頻度(12/12=100%)であったHis389Arg、His659Argもアカゲザルの2個体に認められ、この変異がfasciculata亜属とmulatta亜属の分岐前の集団に存在した多型であることが判明した。末梢血単核細胞をTLR9リガンドで刺激することによりこれらのアミノ酸置換の受容体機能に及ぼす影響について検索を進めている。

B-47 ニホンザルの中手骨と中足骨に関する機能形態学的研究

日暮泰男(大阪大・院・人間科学) 所内対応者: 平崎鋭矢

骨形態は、一般に、個体が生存中にうける機械的荷重におうじて適応的に変化する。本研究では、この類の骨の適応への理解を深めるために、ニホンザルの中手骨および中足骨の頑丈性と地上歩行時にこれらの骨にかかる圧力の大きさとの関係を検討した。骨の頑丈性の指標として、骨幹中央部の断面2次極モーメント(J)を採用した。霊長類研究所に所蔵されているニホンザルの骨格標本をもちいて、今年度は、6個体の片側の第1~5中手骨および第1~5中足骨を医療用CTで撮像した。昨年度に得たデータとあわせると、20個体分の骨についてレーザースキャナーで骨表面の3次元情報を取得し、その中の10個体についてはCT撮像もおこなったこととなった。断面2次極モーメントは、骨幹中央部の断面をうったCT画像から幾何学的に計算するか、または、骨幹中央部の表面形状から推定した。中手骨および中足骨の頑丈性と地上歩行時の圧力の大きさとの間に正確な対応関係はみられなかった。どのような機械的荷重にたいして骨がどのように反応するかはかならずしも簡単にわかるわけではなく、ニホンザルの中手骨および中足骨の形態を正確に解釈するためには、野外で観察されるような高速度の地上移動時や樹上移動時に骨にかかる圧力の大きさとの関係も今後調べる必要がある。

B-48 サル類における聴覚事象関連電位の記録

伊藤浩介(新潟大・脳研) 所内対応者: 中村克樹

明らかな適応的意義の見当たらない音楽は、何故どのように進化したのだろうか。本研究は、従来の行動指標の代わりに事象関連電位(ERP)や誘発電位(EP)を用いて、音楽の系統発生を探る試みである。すなわち、和音やメロディーなどの様々な音楽刺激に対するERP/EPを種間比較することにより、これらの音楽刺激の脳処理の進化を明らかにすることを目的とする。複数年実験計画の2年目にあたる本年度は、マカクザルを対象に、無麻酔かつ無侵襲で頭皮上からERP/EPを記録するための方法論を確立した(Itoh et al., submitted)。動物はチェアを用いて必要最低限の保定をしたことと頭部を剃毛した以外はヒトと同様の方法で、最大19チャンネルの脳波記録を行った。純音刺激に対する聴覚EPの後期成分を記録し、mP1, mN1, mP2, mN2, mSPの各成分を世界で初めて同定・命名した。これらは、ヒトの聴覚EPの後期成分であるP1, N1, P2, N2, SPにそれぞれ対応する可能性があるが、潜在時間が全体的に短いことや、mP1とmN2が大きいことなど、ヒトとの相違点も認められた。今後様々な聴覚刺激に対する脳応答を調べるにあたり、その基礎となる基盤的な知見である。

B-49 霊長類における神経栄養因子の精神機能発達に与える影響

那波宏之、難波寿明(新潟大・脳研究所 分子神経生物学分野) 所内対応者: 中村克樹

神経発達障害を病因とする統合失調症などのヒト精神疾患をモデル化するには、よりヒトに遺伝子や行動パターンが類似する霊長類が最適と考えられる。共同研究者らは、新生仔ネズミの皮下に神経栄養性サイトカインである上皮成長因子(EGF)やニューレグリン1などを投与することで、統合失調症をモデル化することに成功している。本共同利用研究課題では、同様に霊長類でもサイトカインの新生児投与で発達依存性の認知行動変化が起こせるかどうか、マーモセットおよびアカゲザルを用いて検討した。

2014年度までに、マーモセット新生児4頭へのEGF投与を実施した。また、2011年には妊娠9~11週と妊娠12~14週のマーモセット母体にEGF投与を行った。現在、その産子の行動発達を継続観察している。2014年現在、EGF投与妊娠母体より生まれたマーモセットには特記すべき行動変化は観察されていない。2010年にEGF投与を皮下投与されたマーモセット新生児は、活動量の上昇に加え、アイ・コンタクトの頻度低下を示し、タッチパネルによる逆転学習課題においてその能力が著しく低下していることが判明した。その意味では、EGFは新生児投与のほうがその効果は大きいと推定される。また、マカク新生児4頭へEGF投与を実施した。うち1頭で異常行動が認められたが、情報伝達の問題から、安楽殺処置を施され、データを取得することができなかった。

これまでの結果から、マカクザルにおいてもマーモセットにおいても、新生児期にEGFを投与することにより認知機能の変化を伴う行動異常が誘発されることが示された。今後、他の個体での変化を観察し、脳内での変化を検討する。

B-50 マーモセットにおける養育個体のオキシトシン濃度

齋藤慈子(東京大・院・総合文化) 所内対応者: 中村克樹

神経ペプチドであるオキシトシンは、げっ歯類の研究から、社会的認知・行動に関わっていることが知られているが、いまだ霊長類の社会行動とオキシトシンの関係についての研究は数が少ない。本研究は、家族で群を形成し協同繁殖をおこなう、コモンマーモセットを対象に、母親だけでなく父親の、母親出産前後のオキシトシン濃度と養育行動との関連を

調べることを目的とした。前年度までに、マーモセット型のオキシトシンを合成し、市販のオキシトシン測定用 EIA キットを用いて、マーモセット型のオキシトシンが測定可能であることを確認した。本年度は初産の 2 ペアを対象に、出産前後の採尿に加え、産後 1 週間に、以下 3 つの方法により行動のデータを取得した。1 つ目は養育のモチベーションを測定する乳児回収テスト(3 回実施)、2 つ目は 1 日 5 時点のスキャンサンプリングによる背負い行動の観察、3 つ目は 1 日 1 回 20 分間の背負い行動の観察であった。これまでのところ、それぞれの行動指標間の関係として、回収テスト潜在時間が長い個体、つまり養育のモチベーションが低い個体は、観察される背負い行動も少ないという傾向がみられているが、サンプル数が十分ではないため、引き続きサンプル数を増やしていく予定である。また、尿中オキシトシンの測定も実施する予定である。

B-51 次世代シーケンサーを用いた歯石内細菌群解析

矢野航(朝日大・歯) 所内対応者：今井啓雄

歯石化石に残存する微生物断片から古代人類集団の生物学的情報を復元する新しい手法を探索した。次世代シーケンサーによる現代人(n=1)、縄文(n=1)、縄文人骨に付着する土壌サンプル(n=1)の口腔細菌群集分析を予察的に行った。本方法では、歯石および土壌サンプルから DNA 抽出作業を行い、ここから細菌群全てのゲノム情報の復元を試みた。メタゲノム解析と呼ばれるある場所に含まれる細菌叢を生態系として復元する方法を用いた。各種に固有のプライマーを用いるのではなく、細菌群に共通するユニバーサルプライマーを用いることで、含まれる全種の復元およびその存在比を算出することができる。我々は歯石および土壌サンプルそれぞれからの DNA 抽出に成功し、それぞれの口腔細菌叢データを取得した。その結果、縄文人骨に含まれていた口腔細菌群は土壌サンプルのものとは構成比が大きくことなり、現代人骨のものに類似していた。また縄文歯石および現代人歯石からは *Prevotella* 属を始めとする口腔に固有の細菌が検出されたことから、古代人骨の歯石に保存されていた口腔細菌断片から口腔内細菌群が復元できることが分かった。

B-52 ニホンザルのアメーバ感染に関する疫学研究

橋裕司(東海大・医)、小林正規(慶応大・医)、柳哲雄(長崎大・熱研) 所内対応者：岡本宗裕

近年、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)と形態的には鑑別できない新種のアメーバ(*E. nuttalli*)がサル類から見つかっている。本研究の目的は、ニホンザルにおける腸管寄生アメーバの感染実態を明らかにすることである。今年度は、神奈川県厚木市に生息する野生ニホンザルの糞便 8 検体について解析した。糞便から DNA を抽出し、赤痢アメーバ、*E. dispar*、*E. nuttalli*、*E. chattoni*、大腸アメーバ(*E. coli*)、*E. moshkovskii* について、PCR 法による検出を試みた。その結果、*E. chattoni* が 8 検体全て(100%)から、大腸アメーバが 4 検体(50%)において陽性であった。また、*E. nuttalli* が 1 検体(12.5%)のみ陽性であった。赤痢アメーバ、*E. dispar*、*E. moshkovskii* は検出されなかった。これまでの他地域における調査でも、*E. chattoni* 感染は高率に認められ、赤痢アメーバは検出されていない。一方で、*E. dispar*、*E. nuttalli*、大腸アメーバの感染の有無については地域差があり、特に *E. nuttalli* は東日本のみ分布していることが、今回の調査においても確認された。

B-53 農作物被害を出すニホンザル群の土地利用に影響を与える要因の検討

浅井隆之、棚田晃成(鹿児島大・農) 所内対応者：半谷吾郎

ニホンザルによる農作物被害の対策を行う上で、群れの生態学的特徴を知り、集落住民の対策意識や加害動物に対する感情が対策効果にどのように関係しているかを理解することは重要である。本研究は、鹿児島県薩摩郡さつま町の農作物加害群 1 群を対象に、2013 年 3 月から 2014 年 5 月までラジオテレメトリー調査により群れの土地利用特性を調べ、また、集落住民に対して農作物被害についての聞き取り調査を行った。対象群の遊動域内における各植生の利用割合および選択指数を調べた結果、畑は夏と冬に、竹林および水田は春に特に選択され、一方秋は、これら農地の利用割合は小さく、シイ・カシ二次林などの自然植生の利用割合および選択指数が高いことが分かった。また、聞き取り調査の結果、地区単位および農家単位のいずれにおいても、被害の程度によって対策意識やニホンザルに対する感情に差があることが分かった。以上のことから、ニホンザルの被害対策では、森林の食物資源量が少なく被害の出やすい季節や、タケノコなどサルにとって嗜好性の高い作物の収穫時期に集中的に行うことが効果的であり、また、住民の意識格差をなくして集落ぐるみで取り組むことが課題であると考えられた。

B-54 サル免疫細胞を体内に持つマウス作製の試み

伊吹謙太郎、橋本隼、藤田悠平(京大・院・医) 所内対応者：明里宏文

サル胎盤由来造血幹細胞のサル化マウス作製への有用性を検討するため、アカゲザルおよびニホンザルの胎盤組織に含まれる細胞群についてフローサイトメトリーにより解析し、さらに造血幹細胞を含む細胞群を NOG マウスに移植することにより、サル化マウスの作製を試みた。本年度はアカゲザル 2 頭、ニホンザル 1 頭の計 3 頭の胎盤を分与いただいた。これらの胎盤から胎盤細胞をコラゲナーゼタイプ I の処理により分離したところ、CD34 が発現し、かつ細胞密度の小さな細胞群が 3.6±0.6%存在していることがわかった。さらにこの細胞群は HLA-DR が発現し、一方で CD45、CD3、CD14 の発現は認められなかった。造血幹細胞は細胞表面上に CD34 を発現しており、分化が進み多能性幹細胞になると HLA-DR も細胞表面上に発現することがわかっている。また、造血幹細胞等の未分化な細胞群は細胞密度が小さい(国際細胞療法学会による)とされることから、この細胞群に多能性幹細胞と考えられる比較的未分化な細胞が豊富に含まれていることがわかった。しかし、NOG マウスに移植したが、マウスにおける生着サル細胞は確認できなかった。サル胎盤に含まれる多能性幹細胞のマウスでの生着能、分化能についてはさらに今後の検討が必要と考えられた。

B-55 ニホンザルにおけるサル T 細胞白血病ウイルスの動態の解析・免疫治療

松岡雅雄、安永純一朗、菅田謙治、馬広勇、田邊順子(京都大・ウイルス研) 所内対応者：明里宏文

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)とサルT細胞白血病ウイルス1型(STLV-1)は共にデルタレトロウイルス属に含まれ、構造がよく似ている。STLV-1 および HTLV-1 感染細胞の形質が類似しており、共に T リンパ球の悪性化を惹起することから、STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 研究に極めて有用な動物モデルであると考えられる。H23 年度から本モデルを用いて生体内での感染動態および新規治療法の開発を進めている。

今年度は STLV-1 および HTLV-1 が末梢の成熟 T 細胞を標的とする機序を報告した。未熟な T リンパ球ではその分化に必須である転写因子 TCF-1 と LEF-1 を高発現しているが、これらはウイルスの複製に必要なウイルス蛋白 Tax の機能を阻害する。そのため HTLV-1/STLV-1 は TCF-1 と LEF-1 の発現が少ない成熟した末梢 T リンパ球に指向性を有すると考えられた。今まで未熟な T 細胞組織である胸腺におけるウイルス感染の程度は不明であったが、感染ニホンザルを解析し、胸腺レベルではウイルス感染が著明に抑制されていることを確認した。これらの所見は HTLV-1 が末梢血 T リンパ球を標的とし、最終的に発がんに導く分子基盤を示すものである。

B-56 Developing a model of cold-stressed primate thermoregulation from Japanese macaques (*Macaca fuscata*)

Cynthia Thompson (Grand Valley State University)、Chris Vinyard(Northeast Ohio Medical University)、Susan Williams(Ohio University) 所内対応者：半谷吾郎

This project had a successful first year. In December 2014, animals were captured and implanted with temperature loggers. During our data collection trip from December 10-23, 2014 we successfully obtained 331.25 hours of focal animal behavioral observation, 274 infrared images, 79 fecal samples (to measure hormones), and continuous weather station data. Our preliminary data indicate that Japanese macaques utilize behavioral thermoregulation during the winter. There is a significant trend for animals to use heat conserving postures (e.g. curled with limbs on body and ventrum covered) when ambient temperatures are lower (JT=4.26, P<0.001). Similarly, animals use heat conserving postures when solar radiation is lower (JT=2.06, P<0.039). However, wind speed and rain did not significantly impact posture. During this winter sample, animals also positioned themselves in sunny over shady locations during times with higher solar radiation (F=53.6, P<0.001). Likewise, sunbathing sessions with the ventrum exposed occurred during times of higher solar radiation (\bar{x} =345.3 W/m²) than sun exposure to the dorsum or lateral areas (\bar{x} =287.7 W/m²), although this difference did not reach statistical significance. Analyses of thyroid hormone levels and infrared images have not yet been conducted. A comparative summer sample will be collected in July 2015, followed by retrieval of loggers to obtain body temperature measurements.

B-57 霊長類のゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム研究

郷康広(自然科学研究機構新分野創成センター) 所内対応者：大石高生

平成 26 年度は 215 個体のマカクザル(うち 188 個体は霊長研由来)、82 個体のマーモセット(うち 9 個体は霊長研由来)の血液から調整した DNA を用いて、ヒトの精神・神経疾患関連遺伝子(約 3,400 遺伝子)と相同遺伝子の全エキソン領域の配列決定を行い、マカクザル集団およびマーモセット集団において、稀な機能喪失型変異(Loss-of-Functional mutation)をホモやヘテロで保有する個体や家系の同定を行った。その結果、マカクザルにおいては頻度が 3%以下の稀な変異でかつ機能喪失型変異が 62 の遺伝子で同定された。その中には、注意欠陥・多動性障害(ADHD)への関与が言われている DRD4、統合失調症への関与が示唆されている DISC1 などの遺伝子に機能喪失型変異を持つ個体を複数個体同定した。また、マーモセットにおいても気分障害関連遺伝子の AVPR1B(Vasopressin receptor)やハンチントン病関連遺伝子 CASP1(Cysteine peptidase)など 10 遺伝子において 10%以下の稀な変異でかつ機能喪失型変異を同定することに成功した。

B-58 SIV/SHIV/HIV-1mt の非ヒト霊長類細胞における増殖能

三浦智行(京都大学・ウイルス研究所) 所内対応者：明里宏文

霊長類研究所のアカゲザルの血液を提供して頂き、当研究室の P3 実験室内で比重遠心法により単核細胞を分離した。そこから適切な培養方法を用いることにより、リンパ球やマクロファージの培養系にもってゆき、新規に作製した SIV/SHIV/HIV-1mt 等の組換えウイルスを感染させた。感染後、培養上清中のウイルス RNA 量、逆転写酵素活性、感染力価や感染細胞中のウイルス抗原、アポトーシスマーカーあるいは細胞の生存率等を調べることにより、アカゲザルにおける新規作製ウイルスの感染性、増殖能、細胞障害活性などの性状を明らかにした。これらの基礎情報をもとに、さらにゲノム改変を加えたり、種々の新規作製ウイルスの中からウイルス研究所のサル感染実験施設でウイルス接種実験を行うウイルスを決定した。また、感染実験を行ったサルからのウイルスの再分離や、その *in vitro* での性状解析も提供して頂いた血液で行った。

B-59 ニホンザルのハドル形成による体温保持効果に関する研究

上野将敬(大阪大学大学院) 所内対応者：半谷吾郎

本研究課題では、ニホンザルがハドルを形成した際の接触部位やハドル相手の体の大きさによって、ハドル形成による体温保持効果に違いが生じるのか。また、他者と身体を接触させる際に生じる緊張を緩和するために、毛づくろい等の親和的行動がどのように用いられているのかを検討した。2014年12月2日、霊長類研究所で飼育される若桜群の成体メス3頭に、体温を測定するためのロガー埋没手術を行った。その3頭を対象として、2015年1月5日から2月19日までの期間、24日間にわたり、計180時間程度の個体追跡観察を行った。2015年10月ごろに埋め込まれたロガーを取り出した後、収集した行動データとロガーに記録された温度データを対応させて、データの分析を行う。得られた研究成果は、日本霊長類学会大会などで発表し、国際学術雑誌に投稿する予定である。

B-60 アカゲザル iPS 細胞樹立および T 細胞への分化

金子新(京都大・iPS研)、塩田達雄、中山英美、田谷かほる(大阪大・微研) 所内対応者：明里宏文

本研究は、免疫学的にヒトに近縁な霊長類から iPS 細胞を樹立し、T 系譜細胞への再分化誘導方法を確立し、そしてそれらを移植する手法によって、免疫不全症候群などのために破綻した免疫機構を再構築することが可能であるかを検証することを目的としている。

本年度は、アカゲザル末梢血から単核球を分離し、ヒト iPS 細胞誘導因子である Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc のいわゆる山中 4 因子を用いて iPS 細胞樹立を試みた。山中 4 因子導入後に添加するサイトカインの種類や低分子化合物の有無等、種々の条件を検討したところ、アカゲザルでは iPS 細胞樹立、および樹立後の維持培養においてヒトと比べてより厳密な最適化を必要とすることが明らかになった。また、樹立した iPS 細胞は、未分化マーカーにより未分化性を、奇形腫形成により多分化能を確認した。次に、種々のサイトカインカクテルを用いて造血前駆細胞への分化誘導を行い、フローサイトメトリーで表面マーカーの確認を行った。また、得られた造血前駆細胞を用いてコロニーアッセイを行い、血球分化能を確認した。今後は iPS 細胞の複数株樹立や造血前駆細胞、T 細胞系譜再分化の最適化に取り組む。

B-61 直立姿勢に伴う筋配置の再編成—乳様突起部と股関節を中心として—

長岡朋人(聖マリアンナ医科大・医)、矢野航(朝日大・歯)、滝澤恵美(茨城県立医療大・理学療法)

所内対応者：西村剛

(1)チンパンジーの乳様突起部の解剖

チンパンジーの副神経は、僧帽筋の深層に潜り込み僧帽筋へ分布する枝、胸鎖乳突筋に分布する枝を認めた。また、m. cleidomastoid の下から m. omocervicalis の表層を通過して後に向かい、後縁に沿って下行する枝を認めた。その枝は m. omocervicalis の背側に入って m. omocervicalis に潜り込み、m. omocervicalis に分布した。次に、頸神経は、m. omocervicalis と m. cleidomastoid の間に頸神経点として始まった。そして、頸神経点からは、前上方には大耳介神経、前方には頸横神経、後下方には、m. omocervicalis の貫通枝、後下方へは他に鎖骨上神経の後部が分岐した。

(2)チンパンジーの股関節部の解剖

ヒトの下肢筋、特に股関節筋の筋配置の特徴を検討するために比較対象としてチンパンジーの大腿後面と内側に位置する筋を膨出し観察の準備を進めた。膨出の過程で以下を確認した。チンパンジーの股関節筋は、ヒトとのサイズ差を考慮しても腱成分が明らかに短かった。また、隣接する筋に筋線維が付着し連絡しあう程度が、ヒトに比べて少なく筋の分離が良い。ヒト同様に膝内側に鷲足 3 筋は同じであるが停止部の交叉性は認め難かった。

(3)サバンナモンキー耳介筋の解剖

直立姿勢への進化に伴う筋配置再編成として、耳介へ付着する筋(耳介筋)の比較解剖を開始した。既にラットとヒトの同筋走行の解剖は開始しており、本年度からサバンナモンキー1体の側頭部~背部(耳介から項靭帯)までの剥皮を行った。

B-62 Genomic Evolution of Sulawesi Macaques

Bambang Suryobroto (Bogor Agricultural University) 所内対応者：今井啓雄

Sulawesi macaques are exceptional as the seven species evolved allopatrically in an island that is less than 5% of the whole coverage area of the genus *Macaca*. The island itself is part of the zoogeographical realm called Wallacea which is highly endemic. There are three issues regarding the evolution of Sulawesi macaques. The first is taxonomic status, the second phylogenetic relationship, and the third hybrid population problem. Recent development in DNA technology (next generation sequencing, NGS) leads to the ability to read the whole genome of an individual. This immense genomic data provide an opportunity to find the most taxonomically informative loci to base the phylogenetic hypotheses and also to observe the gene dynamics of hybrid population. Dr. Yohei Terai (Soken-dai) and I took fecal samples of *M. maurus*, *M. nigra*, *M. hecki*, and *M. tonkeana* from the island and in Japan we made library for the whole genomic sequencing. We used exome approach so the NGS libraries were hybridized to exon capture sequence. Quality of the exomic library is quite good, for instance, for one sample of *M. nigra* we got molecules from 278bp to 1300bp with average 561bp and their concentration was 31.5ng/ul. We performed NGS using Illumina Myseq machine to determine 300bp reads from both ends and we could get 75,339,456 sequences. We mapped the sequences to reference genome which is the genome of *M. mulatta*. The analysis is now on going.

B-63 Variation of Gene Encoding Receptor of PTC bitter taste compound in Leaf-eating Monkeys

Laurentia Henrieta Permita Sari (Bogor Agricultural University) 所内対応者：今井啓雄

T2R38 is one of *T2R* multigene families that encode receptor to recognize bitter from PTC compound. In primates, *T2R38* had been identified in human, chimpanzee, Japanese macaques and exhibit intra-species polymorphism. Polymorphism in this gene lead to different behavioural response of individual. Taster individual show aversion to bitterness from PTC, in contrast to tolerant in non-taster individuals.

Leaf-eating monkeys (Subfamily Colobines) are unique among primates because their diet mostly consisted of leaves that perceptually tasted bitter to human. Based on behavioral experiment, Chiarelli (1963) found that five individuals of three species of Colobines have non-taster phenotype. Thus, we conducted preliminary behavioral experiments of PTC-tasting on leaf-eating monkeys kept in Ragunan Zoo. The result indicated that nine individuals of genus *Trachypithecus*, *Presbytis* and *Nasalis* were all non-tasters.

Genomic DNA of leaf-eating monkey was obtained from fecal samples. After DNA extraction, *T2R38* gene region was specifically amplified using standard PCR reaction. The result showed that there are some polymorphisms in the *T2R38* genes of *T. auratus* and *T. cristatus*. To know whether the *T2R38* receptor of leaf-eating monkeys is functional or not, we are trying to conduct functional assay based on cell expression.

B-64 霊長類の嗅覚・フェロモン受容体の多様性と進化

東原和成、松井淳(東大・院・農学生命科学) 所内対応者：今井啓雄

感覚受容体には生物が環境へ適応しながら進化してきた歴史が刻まれている。なかでも嗅覚・フェロモン感覚の受容体は、摂食・危険回避・繁殖行動と密接に関連し、生物群としての社会性にも深くかかわっている。ヒトを含む霊長類と、それ以外の哺乳類 8 種のゲノムデータから、進化学的に特殊な嗅覚受容体遺伝子を同定した。これらは哺乳類にとって特別な役割があると考えられる。この遺伝子グループに属するマカクの嗅覚受容体について、様々な化学物質に対する応答をアフリカツメガエルの卵母細胞を用いたアッセイ系で測定した。これまでに RT-PCR による発現解析で、これらの嗅覚受容体遺伝子が、マカクの様々な臓器に発現していることを確認しており、生体内機能の研究へ発展させていく。

B-65 ヤクシマザルの糞中種子の二次散布者調査

松原幹(中京大・国際教養) 所内対応者：辻大和

屋久島のニホンザルが糞散布した種子の生存率、げっ歯類とヤクシカなどの哺乳類による種子捕食が与える影響を定量的に調べるのが本研究の目的である。屋久島西部地域でサル糞を採集、糞の湿重量を計測後、糞中の直径 5mm 以上の種子を除去し、種同定と糞中種子密度を計測後、耐水性絵具で着色した。種子を除去した糞に 1 種あたり 10~20 個の着色種子を埋め込み、糞を原形に近い形に成形した(以下、調整糞と呼ぶ)。半山地区に 1m x 1m の実験区を 5ヶ所設定する。木に自動撮影カメラを固定して、調整糞にメッシュの大きさの異なる覆いを被せた場所を撮影した。平成 26 年 11~12 月の調査では、げっ歯類とヤクシカ、シロハラが自動撮影カメラで確認された。覆いのない糞は、すべてシカに被食された。シカ除け覆い下の糞中種子(モクタチバナ、ハゼ、モッコク)は、メッシュサイズが大きいほど種子の消失率が高かった。一方、着色種子や、着色なしの種子は 90%以上が設置場所に残されていたことから、植物にとってヤクザルによる被食は、種子散布の効率を落とす結果につながると推測された。

B-66 類人猿における懸垂運動モデル作成のための基盤研究

大石元治(日獣大・獣医)、荻原直道(慶應大・理工)、菊池泰弘(佐賀大・医)、小藪大輔(東京大・博物館)

所内対応者：江木直子

腕を頭の上に挙げる運動は、前肢を外転させ、さらに肩甲骨が回転することにより前肢が挙上する動きからなる。ヒトにとっては日常的なものであるが、これらの動作はその他の動物にとっては一般的ではなく、霊長類においても類人猿などのごく一部の動物種に限られている。そのため、これらの動作に関係する形態学的特徴はヒトと類人猿をつなぐ特徴であり、これらの動作、あるいは関係した形態学的特徴が生じる背景となった懸垂運動は、二足歩行と同様にヒトの進化において重要なロコモーションと考えられる。現在、我々のグループでは大型類人猿の懸垂運動における筋骨格モデルの作成を進めているが、必要となる筋や骨などの定量的データは十分ではない。そこで、本研究は懸垂運動を行う霊長類の筋骨格モデルの構築を念頭に、筋や骨のパラメータを得ることを目指して実施している。本年はチンパンジー(1 個体)から筋パラメータを入手する目的で同個体の四肢を解剖し、付着部や走行を観察した。また、大型類人猿の前肢骨格について運動解析時の参照点となる解剖学的特徴について観察を行った。今後はこれらのデータをもとに数理モデルの作成を進めていきたい。

B-67 豪雪地域のニホンザルによる洞窟利用のモニタリング

柏木健司(富山大・院・地球科学) 所内対応者：高井正成

申請者らは、富山県黒部峡谷において、厳冬期にニホンザルが防寒のために洞窟を利用する生態に焦点を当て、自動センサーカメラを用いたニホンザルの洞窟利用の実態解明を進めている。1. 積雪期(2013 年 12 月-2014 年 4 月)にサル穴(ニホンザルが 2010 年度冬季以来、継続利用している洞窟)の洞口と洞内にセンサーカメラを設置した(2013 年度研究成果の未報告分)。

・1 月 7 日と 3 月 7 日にニホンザルが洞内でサル団子を作り、暖をとっている様子を約 1 時間にわたり確認した。ただし、撮影された写真は不鮮明で、個体識別は極めて困難である(図 1)。

・最寒冷期の 1 月中旬-3 月初旬は、夜間は氷点下を記録し、カメラは全く作動しなかった。この時期、ニホンザルは確実に洞窟を利用していると推測され、今後、カメラについて何らかの対策が必要である。

2. 非積雪期(2014 年 5 月-11 月)、ニホンザルは洞内に入ることはなかった。一方、ツキノワグマが洞内に入る様子が 2 度にわたり記録された(図 2)。洞窟は、これまで考えられている以上に、様々な哺乳類により利用されている可能性を示唆している。

3. 積雪期(2014 年 12-2015 年 4 月)に現在、カメラを設置中である。センサーカメラの回収・確認は、当初予定より約 1 カ月遅れの 5 月中旬頃になる予定である。

B-68 下肢骨格筋の形態と支配神経パターンの解析

荒川高光、堤真大(神戸大・院・保健)、渡邊優子、月生達矢、幅大二郎(神戸大・医・保健) 所内対応者：平崎鋭矢

アカゲザルとチンパンジーの下肢、とくに下腿の骨格筋とその支配神経の解析を行った。大腿部後面から皮膚剥離し、脛骨神経と総腓骨神経、そしてその支配筋群を肉眼で剖出、記録した。その後、今回は足底筋の支配神経のパターンに着目することとして、支配神経パターンの神経束解析を行った。神経外膜を除去した神経束レベルでは、アカゲザルの足底筋は腓側趾屈筋と共同幹を形成しており、そのすぐ近位から膝窩筋と後脛骨筋へ入る神経束が共同幹で分岐した。チンパンジーでも同様に腓側趾屈筋、膝窩筋、後脛骨筋と共同幹を形成していたが、2 例中 1 例でヒラメ筋に前方から入る筋枝が見いだされ、足底筋枝はヒラメ筋に前方から入る枝と最も近い関係にあった。アカゲザル、チンパンジーともに足底

筋枝は下腿の屈筋群と近縁のものしか発見できなかったため、両種ともに足底筋は退縮傾向にあるのかもしれない。また、ヒラメ筋枝との近縁性は、ヒトの直立二足歩行の採用にともなう系統発生において重要な示唆を与える所見と考えられた。

B-69 人工多能性幹細胞を用いた霊長類の中樞神経系の進化の解明

馬場庸平、日下部央里絵(慶應義塾大・医) 所内対応者：今村公紀

チンパンジーとヒトの神経発生を時間的空間的に比較するには大脳特定の領域を個体発生に近い形で誘導することが必要と考え、すでに樹立されていたチンパンジーiPS細胞を用い、Wnt阻害剤により前脳領域を効率良く誘導する分化誘導法を検討した。しかしながらヒトのiPS細胞の場合と異なり、皮質ニューロンや三次元的な神経上皮構造の出現は確認できなかった。使用したチンパンジーiPS細胞がnaïve stateにあると考えられ、primed stateにあるヒトiPS細胞に最適化された誘導法がそのまま適用できないことが考えられた。そこで新たにprimed stateのiPS細胞を誘導するため霊長類研より分与していただいた末梢血から単核球を増殖、大量にストックすることに成功した。今後は、ストックした細胞を使用することにより、毎回採血する必要がなくiPS細胞の誘導を検討することが可能となった。またチンパンジーiPS細胞由来神経前駆細胞に容易に遺伝子を導入することができるPiggyBacトランスポゾンベクターを用い、ASPM、HAR1、SRGAP2C遺伝子を発現するベクターを構築した。このように今年度の進捗によりiPS細胞をモデルとして、霊長類中枢神経における分子進化研究を行う上での問題点が明らかとなる一方で、研究を次の段階へと進めるための技術開発ができたと考えている。

B-70 ニホンザルフォーミウイルスとニホンザルとの共進化の可能性

宮沢孝幸、吉川祿助、下出紗弓、宮穂里江、坂口翔一(京都大・ウイルス研) 所内対応者：岡本宗裕

ヒト以外の霊長類は独自のフォーミーウイルス(FV)を保有しており、種間レベルで宿主とFVは共進化してきたことがわかってきた。ニホンザルは我が国で独自に進化してきたマカク属のサルであり、北は下北半島から南は屋久島まで広範な地域に生息しており、地域ごとに特色のある集団を形成している。本研究では種間レベルではなく、集団レベルでFVと共進化しうるか調査した。屋久島に棲息する8頭の血液から末梢血単核球を分離し、FVの分離を試みたところ、5頭からFVが分離できた。このウイルスをSFVjm Yaku-1, 2, 4, 5, 6株と命名した。SFVjm Yaku-4株を抗原に用いてWestern blottingを行ったところ、血液採取した8頭のヤクザルのうち、7頭がSFVjm抗体陽性であった。部分的gag遺伝子配列を決定し、これまで明らかにしたSFVjm分離株との配列を比較、系統樹解析したところ、ヤクザル由来SFVjmは国内分離株と異なるクラスターを形成した。さらに、他種のSFVと比較したところ、ヤクザル由来SFVjmは国内ニホンザル分離株よりも台湾ザル由来SFVに近縁であった。一方ミトコンドリアの遺伝子配列を比較すると、ヤクザルは西南日本に棲息する日本ザルのクラスターに含まれた。今回の結果から、何らかの経路でヤクザルにSFVが台湾から侵入した可能性が示唆された。

B-71 血液酸素動態分析による歩行中の姿勢制御戦略の検討

森大志(県立広島大学) 所内対応者：平崎鋭矢

本研究では、歩行を含む運動課題を実施する際の筋の血液酸素動態をCW(持続波)型NIRS(近赤外線分光法)で記録し、本法から筋活動記録(筋電図)では困難である筋局所代謝に関する新しい知見が得られるかを検証した。本年度は立位姿勢変換および歩行時のNIRS信号と筋活動を足関節の底屈および膝関節の屈曲に参与する腓腹筋から同時記録した。NIRSプローブは筋電図電極の近位隣と遠位隣に装着した。その結果、姿勢変換課題(前傾)では姿勢状態に対応した酸化ヘモグロビンレベル(oxy-Hb)と脱酸化ヘモグロビンレベル(deoxy-Hb)の変化が観察され、それらの多くは筋活動と対応していた(図1)。このことはNIRS信号が筋局所代謝を知る手掛かりになりえることを示唆する。しかし、歩行時での計測では局所血流量の大きな変化が原因と考えられるoxy-Hbとdeoxy-Hb両者同時の上昇・下降が観察された。このように歩行時には、重力加速度、筋収縮による血管の圧迫、下肢の振子運動から生じる加速度等の筋代謝以外の要因が血流量やNIRS信号に影響を及ぼすことも考えられ、本法による計測にはさらに解決すべき課題があるように考えられた。

B-72 ニホンザルにおける歯の組織構造と成長

加藤彰子(愛知学院大・歯・口腔解剖)、Tanya Smith (Harvard Univ. Human Evolutionary Biology・Dental Hard Tissue Lab) 所内対応者：平崎鋭矢

本研究課題は、生息環境の異なるマカク種の歯の成長について明らかにする目的で、ニホンザルを含むマカク6種類の大臼歯歯冠エナメル質の厚みについてX線CT画像解析により調査をおこなって来た。2013年までにデータ収集と解析を終え、本年度はこれらの成果を、American Journal of Physical Anthropology(AJPA)にて発表した。

また、大臼歯の咬頭頂付近における薄切研磨標本作製し、歯冠エナメル質(あるいは成長途中の歯根象牙質)に認められる成長線の解析を進めている。今後は、組織学的な解析により、歯の形成速度を明らかにし、食性や生息環境との関係を調査していく予定である。

B-74 ニホンザルにおける個体関係による接近方法のちがい

島悠希(京都大・院・理) 所内対応者：半谷吾郎

第三者として他個体間の親和的關係を認識し行動することについて、ニホンザルではよく知られていない。このような認知能力は、社会的知性の進化の解明において重要である。本研究の目的は、ニホンザルの群れの個体が同時に集まる休息時、個体は第三者として他個体間の親和的關係を認識し毛づくろい相手を選択していることを明らかにすることである。休息場所にやって来た個体の、毛づくろい中の個体に対する「接近」を調べた。接近とは、接近相手との距離5m以内で

3 秒間停止することとし、接近した個体はオトナメスを対象とし、接近相手は最近接個体とした。接近を、接触する位置まで接近する「接触接近」と接触しない「非接触接近」に分けた。接触接近ではすぐに接近相手と毛づくろいが始まった。親和的關係は毛づくろい頻度で示した。接近した個体と接近相手の親和的關係が、接近相手とその毛づくろい相手の親和的關係より強いときに、弱いときより接触接近する傾向にあった。これは接近した個体と接近相手の親和的關係によってのみ説明されなかった。よって、対象としたニホンザルが、第三者として他個体間の親和的關係を認識し行動を変化させている可能性が示唆された。

B-75 遺伝子解析による三重県内のニホンザルの個体群調査

六波羅聡、鈴木義久(NPO 法人サルどこネット) 所内対応者：川本芳

三重県内のニホンザルについて、保護管理を検討するため、現存する群れの遺伝的構造を把握すること、和歌山県からのタイワンザル遺伝子の拡散状況のモニタリングを目的とし、本年度は、メスと若いオス(群れ出自個体)39 個体についてミトコンドリア DNA (mtDNA)の D-loop 第 1 可変域の塩基配列の分析、オス 31 個体について Y-STR 検査を行った。

メスの D-loop 第 1 可変域については、今年度新たに 4 つのハプロタイプが検出され、亀山市周辺を境にした大きく南北 2 系統の分類に加え、滋賀県で確認されている 1 系統が検出された。

オスの Y 染色体は、同じタイプが各地で認められ、多様なタイプが広域に分布していたことから、メスで確認された mtDNA タイプ 2 系統の分布地域間でオス移住による遺伝子交流があることが示唆された。タイワンザル由来とみられるタイプは確認されなかった。

血液と比較して採取の簡易な体毛を用いてオスの Y-STR 検査を行った結果、8 個体中 3 個体で成功した。体毛も有効なサンプルであることが確認された。

来年度は、遺伝子の広域的・継続的な検査を可能にするための方法を検討しながらサンプル数を増やしていくこと、遺伝子変異の分布と個体群構造の關係などの詳細な分析をマイクロサテライト DNA 変異についても行うことで、三重県内の群れの状況をさらに細かく明らかにしていく予定である。また、国の法律改正に伴う特定鳥獣保護管理計画の改訂に際し、遺伝的な観点を保護管理計画に反映できるよう、管理単位となる個体群についても検討する予定である。

B-76 ニホンザル足筋および手筋の筋線維タイプ構成の研究

小島龍平(埼玉医科大・保健医療学・理学療法) 所内対応者：平崎鋭矢

ニホンザルの足指の運動に関与する下腿筋および足筋の筋重量および筋線維タイプ構成を検索し、足指の運動に関与する筋の機能形態学的解析を試みた。10%ホルマリンにより固定・保存された標本より足指の運動に関与する下腿筋および全ての足筋を採取し湿重量を測定した後、筋腹全横断面をカバーする切片を作成した。免疫組織化学染色を施し筋線維タイプを判別し、遅筋線維の数比(%ST)を算出した。次のような結果を得た。1)長指伸筋の筋腹は各指ごとに独立していたが、内側および外側指屈筋は各指にいく筋腹は独立しておらず一塊であった。各指の独立性は背屈では高いが底屈ではあまり高くはないと考えられる。2)下腿筋と足筋を含めた足指に作用する筋の重量は：伸筋群<屈筋群→足指の屈曲により多くの筋力、筋パワーが動員される。3)屈筋群の重量では：下腿筋群>足筋群→足指を屈曲する筋力、筋パワーの多くは下腿筋群によりまかなわれる。4)屈筋群について各指節へ停止する筋の重量をみると：末節骨>基節骨>中節骨→MP-j, PIP-j, DIP-j を含めた足指全体の屈曲に多くの筋力、筋パワーが動員される。PIP-j の選択的屈曲に動員される筋力、筋パワーは比較的少ない。基節骨へ停止する Mm. contrahentes および骨間筋は MP-j の屈曲とともに内外転に作用する。5)母指から V 指までの各指に停止する屈筋群の重量をみると：母指>III 指=IV 指>V 指>II 指。6)足筋群の多くの筋の%ST は 30%以下であり、速筋線維優位の筋線維タイプ構成を示した。7)特に足底方形筋(3.8%)、IV 指に停止する短指伸筋 (6.2%)、小指外転筋(6.9%)は著しく速筋線維優位の筋線維タイプ構成を示した。8)下腿から起こる足指の運動に関与する筋群の%ST は、伸筋群では 11.7%から 30.0%、屈筋群では 15.6%から 24.1%で、いずれも比較的速筋線維優位の筋線維タイプ構成を示した。9)筋重量および筋線維タイプ構成の結果をあわせて考えると、足指の運動の筋力、筋パワーの多くは下腿筋群が分担し、足指全体の運動に関与する。足筋は、より選択的な関節肢位の調節に関与する。足指の運動に関与する筋群は下腿筋群も足筋群も比較的速筋線維優位の筋線維タイプ構成を示した。10)これらの中で虫様筋は比較的遅筋線維の割合が高く、特に第 1 虫様筋の%ST は 46.2%と足筋の中では最も高い値を示した。筋重量は 0.03g と著しく小さく、また定量的な解析をしていないが筋紡錘が多く観察され、特異な形態を示した。手筋についても同様の解析をすすめ、手と足の比較を行っていきたい。

B-77 マカク歯髄幹細胞の細胞特性の解析と *in vivo* への応用・開発

筒井健夫(日本歯科大・生命歯・薬理学) 所内対応者：鈴木樹理

平成 26 年度は、麻酔下の混合歯列期ニホンザル 3 例の、上顎左側乳中切歯より歯髄を採取し歯髄細胞の細胞特性解析と三次元培養を行った。三次元培養を行った三次元構築体は、ニホンザル 2 例の下顎左側乳犬歯と下顎左側第一乳臼歯それぞれの歯髄腔へ移植した。歯髄の採取を行った 3 例中 2 例において、初代培養後に継代培養を行った。2 の歯髄細胞における位相差顕微鏡による形態学的観察では、紡錘形の線維芽細胞様形態と丸みを帯びた細胞形態が観察された。細胞増殖における細胞倍加時間は、それぞれ 23.64 時間と 27.98 時間であった。2 例の歯髄細胞を石灰化誘導培地にて培養した結果では、アリザリンレッド染色において陽性像が観察され、幹細胞特性の一つである分化能において石灰化が確認された。三次元培養は温度応答性培養皿を用いて三次元構築を行った。三次元構築体は、歯髄を採取した個体の歯髄腔へ移植を行った。移植の際は、乳犬歯では歯髄を 1/2、また乳臼歯では歯髄腔部位の歯髄を除去し、移植後は光重合レジンにて仮封を行った。現在は経過観察を行っている。また、以前より培養を行っている下顎右側第二乳臼歯の歯髄幹細胞は、継続培養日数が 1145 日をこえ継代数は 285 である。不死化したと考えられるこの細胞株の細胞特性についても解析を行っ

ている。

B-78 遺伝子分析を利用した飼育下のワオキツネザルの父系判定に関する研究

佐藤百恵、中尾汐莉、高木幸恵、加藤真理子、大橋岳、新宅勇太((公財)日本モンキーセンター) 所内対応者：川本芳

昨年度は、(公財)日本モンキーセンター(以下 JMC)で DNA の調製までを実施していたが、本年度は、JMC で PCR 処理まで行なう環境を整え、60 個体について分析を行った。分析には、前年度に父系判定で利用した 6 つのマイクロサテライト DNA マーカーを使い、樫の枝を使ったサンプリング方法で得た試料を用いた。

この結果、Lc5・Lc6・Lc8 の 3 つのマーカーでは比較的安定したデータが得られた。一方、69HDZ091・69HDZ208・69HDZ035 の 3 マーカーでは、シグナルが弱く解析が困難な個体が認められた。そこで、これら 3 マーカーについては、ラベルしないプライマーを 3 つ混ぜこんで 1 度目の PCR を行い、その産物から個々のマーカーをラベルしたプライマーを用いタイピングする 2 段階 PCR の方法を採用した。この改良により、安定した結果が得られるようになった。

これまでの結果では、母子関係が確認できた 20 個体について父系が特定できている。また、発情時の観察で記録されていた交尾個体とは異なる個体が父親になっている事例が判明した。今後は、母子関係を確認したのち、さらに残っている個体について父系を特定する予定である。また、変異性の高いマーカーを追加し判定精度を向上させ、プロトコールの改良を検討したい。

B-79 ヒト動脈硬化症のアカゲザルモデル作出のための基礎研究

日比野久美子、竹中晃子(名古屋文理大) 所内対応者：鈴木樹里

昨年に引き続き、LDLR(低密度リポタンパク質レセプター)遺伝子の LDL 結合領域に Cys61Tyr 変異を有する家族性高コレステロール血症インド由来アカゲザルに、0.1%コレステロール(CH)食を投与し、ヒト動脈硬化症モデルとなる可能性を検討した。14 年前に変異個体を見出し、昨年 F2 世代で初めてホモ接合型個体が生まれた。この家系についてホモ接合型 1 歳仔♀1 頭およびヘテロ接合型成体♀2 頭、1 歳仔♀1 頭を対象とした。いずれも投与前においてヒト高 LDL 血漿基準値の 140mg/dl を超えた平均 158 であったが、投与 59 日目には平均 236 となった。ホモ個体は 250 と最も高かった。ホモ個体では動脈硬化指数 LDL/HDL は 49 日目に 3.25 にまでなったが、3.5 を超えなかった。49 日目以降餌の形状が変化したので食べる量が減少したと思われる残念な結果となった。昨年のヘテロ型♂3 頭を加えて平均すると 49 日目に LDL 値は正常個体よりもヘテロ型では 80mg/dl、ホモ型では 120mg/dl も高くなった。動脈硬化指数 LDL/HDL はヘテロ型♂1 頭が 5.7 にまで達したが、HDL 値が低かったためである。サルに影響が少ないよう 0.1%CH 食を投与したが、ウサギ、マウスなどの文献では 0.3%、1%投与をしており、投与 CH 量を上げるとレセプターにより細胞内に取りこまれない LDL が血中に残り、HDL が高い個体でも動脈硬化指数 LDL/HDL が高くなる可能性が示唆された。

B-80 MC1R 遺伝子に着目したボノボの集団遺伝学的研究

本川智紀(ポーラ化成工業) 所内対応者：川本芳

MC1R(melanocortin-1 receptor)は色素細胞表面に存在する色素産生に関与するレセプターである。ヒトにおいて MC1R 遺伝子は、多様性が高く人種特異的多型が存在するため、MC1R 多型情報は、ヒトの分岐過程を考察する際に有益な情報のひとつとなっている。私はヒト以外の霊長類においても、当遺伝子のデータは分岐過程を考察する上で有益な情報となると考えている。本研究ではボノボの遺伝子を解析し、すでに保有するヒト、チンパンジーなどの遺伝子データと併せ、当遺伝子の進化過程を比較解析することを最終目的としている。

本年度は、ワンバとイオンジ合計 20 例の糞抽出 DNA から解読した MC1R 遺伝子配列(1521bp)からコンセンサス配列、および 17 所の SNP を同定した。さらにこれらの SNP について、リアルタイム PCR を用いた SNP 検出システムの構築をめざし検討を進めた。検討対象はコーディング領域で頻度の高い 3 つの SNP とプロモーター領域で最も頻度の高い 1 つの SNP である。プライマーは Custom TaqMan® Assay Design Tool(Applied Biosystems)で設計し、SNP タイピングは StepOne®Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)で検討した。現時点では再現性のあるタイピングデータが取れていないが、今後はプライマーや反応条件の検討を続け最適化を行っていく予定である。

B-81 霊長類における絶滅危惧種の保全技術の確立

佐々木えりか、井上貴史、平川玲子、島田亜樹子、高橋司、岡原純子、岡原則夫、田中真佐恵((公財)実験動物中央研究所・マーモセット研究部) 所内対応者：中村克樹

米国では絶滅危惧種のゴールデンライオンタマリン(*Leontopithecus rosalia*)の保全を目的に、米国内の動物園の動物を交換し、近交化を防ぎつつ個体数を増加させて野生に戻す取り組みが一定の成果を挙げている。しかしながら動物個体の移送、飼育環境の変化は、動物に大きなストレスを与える原因となる。公益財団法人実験動物中央研究所では、実験動物としてコロニーが維持されているコモンマーモセット(*Callithrix jacchus*)を用いて、非侵襲的受精卵採取、非侵襲的胚移植法、受精卵の超低温保存法を確立した。本研究では、京都大学霊長類研究所において飼育されているワタボウシタマリンに本技術を応用することで、他の絶滅危惧種の霊長類の遺伝資源保全が可能かを検討する。

ステロイドホルモンの一種であるプロゲステロンは、血中濃度を測定することで、性周期の把握が可能である。そこでワタボウシタマリンでも血中プロゲステロン濃度測定による性周期の把握が可能かを検討した。合計 5 頭のメスのワタボウシタマリンの静脈血より分離した血漿を用いて、EIA 法によって血中プロゲステロン濃度測定した。その結果、5 頭中 4 頭はコモンマーモセット、ヒト等と同様の性周期カーブを示し、正常に性周期を持つ事が強く示唆された。今後は、オス、メスを自然交配した後、採卵による性周期の正常性を確認し、遺伝資源保存への応用を進める予定である。

B-83 比較解剖学に基づく体幹-上肢移行領域の形態学的特徴

緑川沙織(埼玉医大・院医) 所内対応者：平崎鋭矢

腕神経叢における内側上腕皮神経(Cbm)はヒトを含む一部の類人猿にのみ存在するとされている(相山, 1968). 代表研究者は、この特徴に着目し調査を行ってきた。マカク属など四足歩行を移動様式とする霊長類では Cbm が存在しないため、このような Cbm の特徴には霊長類間の運動様式の変化に伴う胸郭と肩甲骨の位置関係の変化が関与すると考えている(緑川, 2012)。

そこで、ヒトと同じく狭鼻下目に属し腕渡りを行うチンパンジー、広鼻下目に属し腕渡りと類似した移動様式をとるクモザルを借用し肉眼解剖学的に調査を行った。

その結果、チンパンジー、クモザルとも、Th1 前枝の背側または C8,Th1 で構成される内側神経束の背側より分岐し上腕後面に分布する皮枝が観察された。この皮枝は、ヒト Cbm と同様の特徴を持つことから、チンパンジー、クモザルにおいても Cbm が存在するといえる。クモザルは広鼻下目に属するため、系統差が Cbm の出現に関与する要因ではないことがわかる。

そこで、Cbm が存在するものに共通の特徴を考えると、Cbm が存在するものは腕渡り移動を行い、Cbm が存在しないものは四足移動を行うという特徴があげられる。このことから、Cbm は腕渡りを行う霊長類に存在することが示唆される。

以上の成果は、第 31 回日本霊長類学会大会にて報告予定である。

B-84 ニホンザルにおける上殿動脈と分岐神経の位置関係

姉帯飛高 ((医)和会・日高の里) 所内対応者：平崎鋭矢

代表研究者はヒトとニホンザルを用い、上殿動脈(SGA)が仙骨神経叢を貫く位置の多様性を調査してきた。ヒトでは SGA 貫通位置と分岐神経(FN; 大腿神経、閉鎖神経、腰仙骨神経幹への枝に分岐)の位置関係を基に整理を行い、SGA は FN を基準に 3 つの経路を通ること、また基準となる FN 起始分節が変異に富むことにより、SGA 貫通位置が多様化することが明らかとなった(姉帯他, 2013)。そこで今回ニホンザル 7 体 14 側を対象に、SGA と FN の位置関係を詳細に観察した。

ニホンザル SGA は、TypeA) FN 起始分節から 2 分節尾側の神経根を貫く例; 8 側、TypeB) 2 分節尾側の神経根下縁を通る例; 2 側、TypeC) 3 分節尾側の神経根を貫く例; 4 側の 3 通りが観察された。また FN 起始分節は変異に富み、FN の頭尾側へのズレに伴う SGA 貫通位置の頭尾側へのズレも観察された。

ニホンザル SGA は FN を基準に 3 つの経路を通り、FN 起始分節の変異に伴い多様化していた。よって SGA 貫通位置の多様性について、FN との位置関係を基にヒトと同様に理解・整理できる可能性がある。

B-87 マダガスカル産稀少原猿類の遺伝子判定による血統管理法の確立

宗近功 (一般財団法人 進化生物学研究所) 所内対応者：田中洋之

国内で飼育されているキツネザル 2 種(*Eulemur macaco macaco*, *Varecia variegata*) を対象に、マイクロサテライト遺伝子座位の分析結果に基づく正確な血統管理法の確立を目的として本研究を進めている。

本年は、市川市立市川動物園の賛同を得て、クロキツネザル 3 頭(♂1/♀2)及び エリマキキツネザル 7 頭 (♂5/♀2)の遺伝子型判定を進めた。また、2011-2014 年の間に産まれたクロキツネザル(進化生物学研究所の♂3、長崎バイオパークの♂3 頭及び♀5 頭)についてもマイクロサテライトの分析を行った。

今年度の成果としては、エリマキキツネザルにおいて、新たに購入した 5 遺伝子座のプライマーとともに、一度に 4 遺伝子座を増幅するマルチプレックス PCR 法の条件設定を行い、その結果、3 回の PCR で 12 遺伝子座を分析する系を確立出来たことである。一方、クロキツネザルについては、既に確立したマルチプレックス法で 10 遺伝子座の分析を進めた。今後、この手法で 2 種のキツネザルの遺伝子型判定を継続し、新たに生まれた個体の親子判定を進めながら、国内の動物園飼育機関の全個体の遺伝子型を決定したい。

(3) 一般グループ研究

C-1 ニホンザルの月経周期における卵巣動態の解明と人工授精技術の開発

柳川洋二郎、永野昌志(北大・院・獣医)、杉本幸介、杉山ちさと、大谷彬(北大・獣医)、高江洲昇(札幌円山動物園)

所内対応者：岡本宗裕

ニホンザルにおいて凍結精子を用いた人工授精(AI)による妊娠例は無く、産子獲得には精子採取・凍結法の改善とともに、メスの卵巣動態把握と精液注入技術の開発が必要である。

のべ 18 頭のオスにのうち 12 頭において、電気射精後にカテーテルを尿道内に挿入することにより液状精液を採取できた。Tes-Tris Egg-yolk 液を基礎とした凍結保存液を使用する場合、凍結融解後の精子運動性指数(SMI)はグリセリンを含む 2 次希釈液を冷却後に添加した場合 $1.9 \pm 2.1(0-4.4)$ であったのに対し、冷却前に添加した場合は $3.2 \pm 4.7(0-13.8)$ であったため、2 次希釈液は冷却前に実施する方が良いと推察される。しかし、いずれの方法においても SMI の減少は 2 次希釈液添加時に顕著であったため、グリセリンに代わる凍害防止剤の検討が必要であると考えられた。

一方、メス 3 頭(経産 1 頭、未経産 2 頭)を用いて、AI 時の造影剤の子宮内注入試験を行った。経口ゾンデの先端を子宮頸管内に挿入し、外子宮口をプランジャーで塞ぐ方法により、経産個体でのみ造影剤が子宮内に注入できた。さらに同経産個体において月経から 10 日目に子宮内注入による AI を行ったが妊娠には至らなかった。

C-2 北限のサルにおける保全医学的研究

近江俊徳、土田修一、石井奈穂美、羽山伸一、名切幸枝(日獣大・獣医)、中西せつ子(NPO 法人どうぶつたちの病院)