

の一斉調査に加えて実施し、出生数は6群で計8頭、死亡(消失)数は1頭のみだった。③家系図と④食物リスト作成は、群れごとの担当者が随時実施し、現在まで確実に継続されている。⑤6群間の比較生態・社会学的調査は、修士の学生によるオニグルミ割り採食行動の性・年齢別比較研究をサポートした。⑥サル学を志す若手への可能な研究テーマの整理は、宮城のサル調査会の機関紙『宮城県のニホンザル』第29号を刊行し、昨年度の第28号と併せ、群れごとに整理した。

以上述べた、申請時の研究目的を着実にクリアしていく過程で、金華山ニホンザル個体群で大きな変化が起こった。南部に生息する群れ(D群)が分裂したのである。D群は、戦後1群であったものが1964年前後に分裂して誕生して以来、半世紀を超えて群れのまとまりを維持し続け、遊動域もほとんど変えることがなかった。しかも、分裂した小さい方の群れ(D2群)は、これまでの分裂によく見られていた群れの遊動域を二分するという形でなく、北東部に新たな遊動域を構えた。それだけでなくこの地域は、3群(B2群、C1群、C2群)の主要遊動域であり、残りの2群(A群、B1群)も、主稜を西から東へ越えて進出してくる地域であり、島で最も群れが込み合っている地域である。おそらく、そこに新たな遊動域を構えたということは、上記5群に大きな影響を与えるものと考えられ、どのような生態学的・社会学的な影響を与えるのかは、本研究課題からしてもきわめて重要である。

#### C-5 アカゲザル iPS 細胞樹立および免疫細胞への分化

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)、入口翔一(京都大・iPS研)

所内対応者：明里宏文

本研究では、iPS細胞から各種免疫細胞への分化誘導方法を確立し、そしてそれらの免疫細胞の自家移植によりヒト免疫不全症候群などによる破綻した免疫機構を再構築することを、免疫学的にヒトに近縁な霊長類を用いて検討することを目的とした研究である。

本年度は、免疫細胞誘導のためのソースとして3頭のアカゲザル末梢血から単核球を分離・活性化しiPS細胞樹立を試みた。前年までの条件検討により、いずれのアカゲザルからも複数のiPS細胞が得られた。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を用いてCD34陽性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、分化誘導で得られたCD34陽性細胞を用いてコロニーアッセイを行い、血球分化能も確認した。さらにはCD34陽性細胞とOP9DL1細胞との共培養によりT細胞分化能を有することが確認できたiPS細胞株について、自家移植を目的に、再生T細胞の拡大培養実験と遺伝子マーカー実験を行うなど、移植実験の準備を進めた。

#### (4) 随時募集研究

##### D-1 サルの脅威刺激検出に関する研究

川合伸幸(名古屋大・院・情報科学) 所内対応者：香田啓貴

ヒトがヘビやクモに対して恐怖を感じるのには生得的なものか経験によるのか長年議論が続けられてきた。しかし今では現在は、ヘビ恐怖の生得性は認識されているが、クモ恐怖の生得的は議論がわかる。ヒト乳児ではクモ様の図形に敏感に反応するようだが、成人では再現できない。そこで前年度に引き続いて、課題のデータを収集することができなかった2頭を対象に、毒グモがいない地域に生息するニホンザルが視覚探索課題においてクモをほかの動物よりもすばやく検出するかを検討した。すでに基本的な視覚探索の訓練と、ヘビとコアラを用いた実験はH26年度に実施していたので、クモとコアラの刺激を用いた視覚探索課題を実施した。この課題で安定して反応できるようになったため(90%以上の正答率が3日以上連続)、反応時間を測定したところ、前年度の1頭と同様に、2頭ともヘビを見つけるまでの時間のほうが早くかったが、クモとコアラでは、クモを見つける時間とコアラを見つける時間で有意な差はみられなかった。この結果は、前年度の1個体と一致していた。これらの結果はサルはクモに対する優先的な視覚情報処理を行わないことを示唆する。ただし、視覚探索課題には手続き上の問題が指摘しているため、サルがヘビに対する注意バイアスがあることを示すには、ノイズのなかからほかの動物よりも効率的にヘビを検出できることを示すなどの必要がある。

##### D-2 ニホンザルを対象とした高解像度 CNV スクリーニング解析

尾崎紀夫、Aleksic Branko、久島周(名古屋大・院・医学系・研究科精神医学) 所内対応者：今井啓雄

自閉スペクトラム症、統合失調症の発症に強く関与する稀なゲノムコピー数変異(copy number variant; CNV)が多数同定されている。本研究では、妥当性の高い精神疾患の霊長類モデルを見つけ出すことを企図して、ニホンザルを対象とした全ゲノムCNV解析を実施した。具体的には、ニホンザル379頭を対象にarray CGH(comparative genomic hybridization)を用いて高解像度の解析を実施し、多数のCNVを同定した。その1つに、10番染色体のADORA2A遺伝子(adenosine A2a receptor)を含む598kbの重複を見出した。ADORA2Aを含む重複は、発達障害や統合失調症との関連が示唆されていることから、本個体の行動観察を実施したが、現在までのところ、行動上の異常は見出していない。

##### D-3 脂質を標的としたサル免疫システムの解明

杉田昌彦、森田大輔(京都大・ウイルス研) 所内対応者：鈴木樹理

本研究グループは、アカゲザルにおいて、サル免疫不全ウイルス由来のリポペプチドを特異的に認識するT細胞の存在を明らかにし、その分子機構の解明を目指した研究を展開してきた。まずリポペプチド特異的T細胞株(2N5.1)の抗原認識を阻害する2種のモノクローナル抗体を作出しその生化学的解析を進めた結果、その認識抗原がアカゲザルMHCクラス1分子であることを見出した。そこでアカゲザル末梢血単核球よりMHCクラス1遺伝子群を単離し、それぞれをトランスフェクトした細胞を用いてT細胞株の応答を検証したところ、アカゲザルMamu-B\*098アリルを発現した細胞

がリポペプチド抗原提示能を有することが判明した。その遺伝子を大腸菌に発現させ、得られたリコンビナントタンパク質にリポペプチドを結合させた複合体の X 線結晶構造解析を行い、リポペプチド結合様式を解明した (*Nature Communications*. 7:10356, 2016)。Mamu-B\*098 分子の全体的な分子構築はペプチドを提示する旧来の MHC クラス 1 アリルと同様であったが、抗原結合溝はペプチドではなくリポペプチドの収納に最適の構造を有していた。これらの成果は、免疫学の基本パラダイムの一つである MHC クラス 1 分子によるペプチド抗原提示の固定的概念に修正を加える必要があることを示している。

#### D-4 野生チンパンジーの老齢個体の行動及び社会的地位の研究

保坂和彦 (鎌倉女子大・児童) 所内対応者: Michael A. Huffman

本年度はマハレのチンパンジー研究 50 周年を記念して、第 31 回日本霊長類学会大会の自由集会 (7 月、京都大学) やマハレ 50 周年記念展・公開シンポジウム (9 月、東京大学) を企画し、自ら本共同研究のテーマに関連する発表をおこなった。とくに近年、複数調査地で明らかになりつつある野生チンパンジーの 50 歳を超える寿命及び高い繁殖年齢について、マハレのデモグラフィック資料や老齢個体の事例を紹介しながら話題提供した。長期調査によりチンパンジーの生活史を明らかにすることが、繁殖停止後の老年期の長さの特徴があるヒトの生活史戦略の進化の理解に役立つことを主張した。また、9 月には、調査地を同じくする共同研究者とともに、学術論文集 “Mahale Chimpanzees: 50 Years of Research” をケンブリッジ大学出版局から出版した。23 章 “Gerontology (老年学)” は所内対応者との共著であり、上述したチンパンジーの生活史戦略に関する内容に加え、老齢個体に特徴的な身体・行動及び社会的地位の変化があるのかという問題 (具体的には、一方的に受ける毛づくろい関係、アルファ雄の同盟者としての地位、他個体が示す寛容性と敬意の顕著化といった側面) について、未出版の観察記録や先行研究を例示しながら論じた。

#### D-5 チンパンジー Naïve iPSC 細胞の作製

山村研一, 荒木喜美, 松本健 (熊本大・生命資源研究・支援センター) 所内対応者: 今村公紀

Naïve 型 iPSC 細胞 (Naïve iPSC) は Primed 型 iPSC 細胞 (Primed iPSC) と比較して、より始原的な分化段階に位置し、全能性の性質を保持するため、再生医学の観点から着目されている。しかし未だにその作製法が安定していない為、本研究では、チンパンジー Primed iPSC から Naïve iPSC への転換法の確立を目的とし、以下の 2 つの研究を進めた。

##### (1) シグナル阻害剤処理による転換法

市販のシグナル阻害剤を含む Repro Naïve<sup>TM</sup> 培地の交換のみで、Primed iPSC から Naïve iPSC 様の細胞を作製した。これらの細胞が、Naïve iPSC に特有のドーム型コロニーを形成し、さらに、OCT3/4, NANOG 等の幹細胞マーカーを発現することを見出した。

##### (2) 遺伝子強制発現とシグナル阻害剤処理を組み合わせた転換法

ドキシサイクリン (Dox) に依存して hNANOG 及び hKLF4 を発現する Primed iPSC 株とシグナル阻害剤を含む培地 (2iL+Dox) による培養を組み合わせ、Naïve iPSC 様細胞を作製した。現在、これらの細胞の性状を解析中である。

#### D-6 手指の triple-ratio を用いた霊長類の把握機能の解析

宇田川潤, 玉川俊広, 日野広大 (滋賀医大・解剖) 所内対応者: 江木直子

申請者らは、これまでに各指の中手骨および指節骨長から求められた triple-ratio により、霊長類が樹上性、半樹上性および地上性に分類できることを示してきた。そこで、triple-ratio と把握機能との関連を調べるため、樹上性霊長類のテナガザルと地上性のマントヒヒ前肢の標本の MRI 撮影を行い、把握時の MP, PIP, DIP 関節の角度とモーメントアーム長との関係から、各関節に発生するトルクとそれを保持するための浅・深指屈筋、手内在筋の牽引力について検討した。モーメントアーム長は両種間で差は認められなかったが、各指長で関節中心間距離およびモーメントアーム長を正規化すると、パワーグリップ時に関節に発生するトルクの保持に要する筋力はヒヒよりテナガザルで大きく、トルク発生効率が悪いことが明らかとなった。テナガザルは体を細くし体重を軽減しつつ、指を長くしてモーメントアーム長を大きくすることで関節に発生するトルクを大きくし、腕渡りなど樹上生活に適応している可能性が考えられた。一方、ヒヒの手はテナガザルに比較して強力な握力を発生可能な構造をしていることが明らかとなった。

#### D-7 セントロメアの構造と機能の進化

舛本寛, 久郷和人 (かずさ DNA 研) 所内対応者: 古賀章彦

セントロメアの形成に関与するタンパクである centromere protein B (CENP-B) は、DNA 結合ドメインをもち、17 塩基対からなるモチーフを認識して DNA に結合する。このモチーフは CENP-B box とよばれ、20 年以上前に舛本が中心となってヒトとマウスで発見したものである。すぐ後に、ゴリラ等の大型類人猿にもあることが報告された。しかし、近年のゲノム情報の膨大な蓄積にも関わらず、これ以外の生物種での同定の報告はない。我々は「適切な検出法がないために同定に至らないのであって、CENP-B box は広い範囲の生物種に存在する」との仮説を立てた。

この仮説を検証するために、霊長類の中でヒトからさらに遠い関係にある新世界ザルを対象とし、また検出法を工夫して、探索を行った。まず 6 種の培養細胞に対して免疫染色を行い、4 種でセントロメアに CENP-B の結合があるとの結果を得た。続いてセントロメア DNA の塩基配列を解読し、この 4 種のうちの 3 種 (マーモセット、リスザル、タマリン) で、候補となるモチーフを見出した。続いてクロマチン免疫沈降を行い、同定したモチーフが CENP-B box として機能することを確認した。

少なくとも新世界ザルでは、仮説は証明されたことになる。この仮説がより広範囲の生物種で正しいとすると、「CENP-B box はホストの長期的な生存に有利に作用する」との新たな仮説が成り立つ。この共同研究で、CENP-B box の進化的な

意義の追求が進展した。

#### D-8 マーモセット脳機能研究に最適化した経路選択的操作とその基盤となる回路構造解析技術の開発

渡辺雅彦, 今野幸太郎 (北海道大・院・医学研究科・解剖学講座) 所内対応者: 中村克樹

本研究課題は、文部科学省「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」の技術開発個別課題「経路選択的な神経回路解析基盤技術の開発とマーモセット脳解析への最適化」(平成26~28年度;代表機関福島県立医科大学、代表研究者小林和人教授)を、参画機関である霊長類研究所と協力して遂行する共同利用・共同研究として行った。具体的には、霊長類で繁殖・飼育されたマーモセットの固定脳とマーモセット cDNA に対するリボプローブを用いて、9種類の神経化学特性決定のためのマーカー遺伝子(グルタミン酸には VGlut1, VGlut2, VGlut3; GABA には GAD67; グリシンには GlyT2; アセチルコリンには CHT もしくは VACHT; ドパミンには DAT; ノルアドレナリン・アドレナリンには DBH; セロトニンには HTT) の in situ ハイブリダイゼーション解析技術を確認した。さらに、マーモセット脳に適用可能な VGlut1~3, GAD67, CHT, HTT, GlyT2, DBH 抗体を作製し、マーモセットの固定脳組織切片を用いてその特異性を検証することができた。

#### D-9 霊長類のみに存在する新規遺伝子 PIPSL の進化や機能の解明

松村研哉 (長浜バイオ大・院・バイオサイエンス), 大島一彦 (長浜バイオ大) 所内対応者: 今井啓雄

研究対象である PIPSL は、プロセシング済み偽遺伝子と共通の過程を経て誕生したレトロ遺伝子である。PIPSL はリン脂質キナーゼ PIP5K1A と 26S プロテアソームサブユニット S5a/PSMD4 を起源遺伝子とする。両遺伝子のフレームを維持したまま連結したキメラ mRNA が逆転写され、ゲノムに再挿入されて誕生したと考えられている。先行研究において、ヒト・チンパンジーで RNA 発現が確認されているが、その転写制御機構は明らかになっていない。

類人猿 5 系統で保存されているレトロ遺伝子 PIPSL がどのように転写制御機構を獲得したのかを明らかにするため、培養細胞 HepG2 や HeLa、及び精巣癌由来細胞株を用いたプロモーターアッセイを行い、ヒト PIPSL 上流配列の転写活性を測定した。ヒト PIPSL の転写開始点近傍に存在する TATA 様配列を欠失すると、転写量が約 70%低下することも明らかになった。これらの結果より、PIPSL の基本プロモーターを特定したと考えている。また、PIPSL 誕生後に最初に分岐した系統であるテナガザルの精巣から、内在性 PIPSL RNA を今回初めて検出した。ヒト・チンパンジーに至る系統とテナガザルでは、PIPSL の転写制御が異なる可能性が考えられる。

#### D-10 霊長類の頭骨と骨盤の形態における性差の関係

五十嵐由里子, 近藤信太郎 (日本大・松戸歯学), 久世濃子 (国立科学博物館) 所内対応者: 西村剛

##### 【1】頭骨の性差

- (1) 個体数を調査した結果、対象とする種はニホンザルとした
- (2) Ecogeographical and Phylogenetic Effects on Craniofacial Variation in Macaques(Ito et al.2014)に基づく

##### 【2】骨盤の性差

- (1) 個体数を調査した結果、対象とする種はニホンザルとした
- (2) Allometric Scaling and Locomotor Function in the Primate Pelvis (Lewton 2015)に基づく
- (3) 大型霊長類の骨盤における耳状面前溝

霊長類における妊娠・分娩の淘汰圧を推定する参考のために、ゴリラ、チンパンジー、オランウータンの骨盤の仙腸関節部骨表面を肉眼観察した。その結果、ゴリラにおいて、メスでは妊娠・分娩の回数を反映した耳状面前溝が見られたが、オスでは、妊娠・分娩とは無関係ながら顕著な耳状面前溝が現れた。一方、オランウータンでは、妊娠・分娩の有無にかかわらず耳状面前溝が全く現れなかった。チンパンジーでは、妊娠・分娩の回数を反映した耳状面前溝が見られた。これらの結果より、霊長類の妊娠・分娩が骨盤に与える負荷を解明するためには、骨盤と胎児のサイズの関係以外の要因(ロコモーション様式など、仙腸関節部にかかる負荷)も考慮する必要があることがわかった。

#### D-12 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 (近畿大・医・生理) 所内対応者: 平崎鋭矢

骨格形態は動物が生存中にうける機械的荷重におうじて変化すると一般的に考えられている。しかしながら、この考えは、おもに、上腕骨や大腿骨など大型の長骨についての知見にもとづいたものであり、小型の長骨である中手骨と中足骨に関する知見はほとんど報告されていない。本研究では、機械的荷重に対する霊長類の骨格形態の適応についての理解を深めるために、ニホンザルの中手骨と中足骨の外部形態および内部構造を定量化した。本研究は 2013 年度から継続している研究課題であり、今年度は、ニホンザル 1 個体(霊長類研究所に所蔵)について、骨の骨幹中央部の横断面を pQCT 装置(霊長類研究所進化形態分野に設置)により撮像し、pQCT 画像から、断面二次極モーメント等の断面性能を算出した。第 1~5 中手骨を、標準化した断面二次極モーメントの大きい順に並べると、3-4-2-1-5 となり、中足骨は 1-3-2-4-5 となった。こうした中手骨および中足骨の頑丈性のパターンを、それぞれの骨が地上歩行時にうける機械的荷重の大きさのパターンと比較すると、両者は正確に対応するわけではないことがわかった。このことから、骨格形態がどのような行動に対する適応なのかを予測することはかならずしも簡単ではないことがわかる。今後は、樹上移動といった他の行動時の機械的荷重との対応関係も検討する必要がある。

#### D-14 タイワンザルとニホンザルの全ゲノム解析による進化史の解明

長田直樹 (北海道大・院・情報科学研究科), 范振鑫 (四川大学・生命科学) 所内対応者: 濱田穰

東アジアに生息するマカク属のサルについての進化史を解明するために、ニホンザル二個体、タイワンザル二個体について、血液サンプルを共同利用計画に基づき使用させていただいた。得られた血液からDNAを抽出し、DNAシーケンシングライブラリを作成、Illumina社HiSeq2000を用いてそれぞれおよそ30倍の被覆度を持つリード配列を得ることができた。リード配列のクオリティは良好であり、アカゲザル参照配列にマッピングすることができた。今後、全ゲノムレベルでの変異解析を行い、それを他のマカクにおけるデータと比較することにより、両種が過去どのような歴史をたどって進化してきたかを明らかにし、その成果を発表したいと考えている。

#### D-15 トクモンキーのゲノム進化

斎藤成也(国立遺伝学研究所), Nilmini Hettiarachchi(総合研究大学院大), 長田直樹(北大・院・情報科学)

所内対応者: 早川卓志

日本モンキーセンターより、トクモンキー組織標本(エタノール浸潤)から抽出されたDNAサンプルを分与され、それをつかって、国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門(井ノ上逸郎教授)で使われているヒトのエクソーム解析プラットフォームを利用して、トクモンキーのエクソーム配列データを生成した。現在配列を解析中だが、ヒトとトクモンキーは2500万年前後の分岐年代があるので、およそ80%ほどのトクモンキーエクソンが得られたもようである。今後、カニクイザルのエクソームデータ(未発表)やゲノムデータ(既発表)と比較して、トクモンキーの系統的位置を推定する予定である。

#### D-16 志賀高原のニホンザルの生息地に関する定量的データの整備

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

これまで未発表であった、1978年に実施した志賀高原横湯川流域の植生調査のまとめを行った。調査地内に44地点の調査区を設け、各調査区に付き10x10mのクオドラットを6-8カ所設定して、中にある胸高直径1cm以上の木全てを計測した。各調査区分は、優先種に基づいてミズナラ、ブナ、ミズキなど12種の森林タイプに分類した。また、1970-80年代に同流域を利用していたB2・C群のニホンザルの遊動域を1haに区切り、植生調査で得た森林タイプから遊動域の植生を9タイプの森林に分類した。

ついで、1978-87年の10年間、同流域に5カ所設定したシードトラップの資料を分析した。1ヶ所につき1x1mのシードトラップを地上1mに6-17個設置し、9-12月にトラップ中の果実を毎月回収し、ブナ、ミズナラ、ミズキ、サワグルミ、カエデ類、サルナシ、ヤマブドウ、その他の生産量の経年変化を計測した。これらの資料に基づき、森林タイプごとの面積当たりの果実生産量を推定した。

B2・C群は1970-80年代、9-11月には同流域の中流部分を同時に利用したが、カンバ林とアカマツ・コメツガ林は避けて、他の6森林タイプを主に使用した。両群の秋の果実の利用量はそれぞれ年間2.7t、2.4tであった。両群が同時利用した中流部内では、B2群は下流側、C群は上流側を優先的に利用した。両群が消費した果実の推定値は、B2群が下流側の生産量(10.6t)の18%、C群が上流側の生産量(7.5t)の20%だった。以上のことから、両群は同流域を同時に利用するが、部分的に使い分けて、食物をめぐる競争を避けていると推定した。

#### D-17 嵐山のニホンザルの個体間の認識について

鈴木久代(兵庫県立大・院・環境人間) 所内対応者: Michael A. Huffman

嵐山B群のニホンザルは1986年、なぜ、どのような過程を経て分裂したのか? 分裂の前から高い精度で収集されていた、群れを構成する各個体の血縁関係の情報に、直接観察によって得られた、交尾行動やそれ以外の日常行動における個体間の結びつき、分裂の進行に伴ったこれらの行動の変化に関する情報を加え分析した。特に群れ内での順位や家系の優劣、親子(特に母・娘)の関係、交尾関係の履歴、加齢に伴う個体の体力の変化といった要素が、分裂に際しての個体の挙動にどう影響したかを明らかにしたい。1985年の交尾期、嵐山B群の上位オス4頭は、ともに23~22歳と高齢であった。1頭が死亡し、1位オスはメス頭の後を、2位オスは特定の上位メスの後を、ほぼ常時ついてまわった。3位オスは赤ん坊を抱いていた。この分裂で、結果的には、オスの世代が交代した。分裂は、オスとメスの交尾関係やメスの血縁関係など、普段の個体間の関係に即した形で行われたと考えられる。このことは、群れが安定している普段ではよくわからない個体間の関係性が、分裂により顕著になった点で重要である。分裂後、群れ落ちしたメス8頭は、群れの中に血縁個体が少なかった。今後は、メスの血縁度や血縁個体数の大小、分裂によるメスとオスの繁殖成功率への影響などについても検討する。今後も、受け入れ教員と密な連絡を取り、ニホンザルの他の分裂の場合と比較し、個体間の認識について論議を深める。

#### D-18 Functional Morphology of the Head and Neck of Hylobates lar.

Neysa Grider-Potter, Ryosuke Goto, Kenji Oka (Osaka University) 所内対応者: 平崎鋭矢

One of the neck's primary function is to provide head mobility. This mobility is essential in mammalian locomotion, balance, feeding, and predator vigilance but should be especially critical for primates, who engage in diverse ranges of postural and locomotor repertoires. Very little is known about variation in mobility among primates, and even less is known about how cervical vertebrae morphology affects neck range of motion (ROM). The goal of this study is to explore how cervical skeletal features correlate with range of motion of the neck.

We predict: 1) tall vertebral bodies facilitate greater ranges of flexion, 2) long, inferiorly oriented spinous processes inhibit extension, and 3) tall uncinata processes and long transverse processes inhibit lateral flexion.

Gibbon ranges of maximum flexion, extension, and lateral flexion were collected through radiographs (n=1). Radiographs were digitized and joint ROM were measured using ImageJ. Human ROM was obtained from the literature. Human (n=4) and gibbon (n=7)

cervical vertebrae were digitized using a Microscribe 3DS. Angular and linear measurements were taken from these data using Rhinoceros 3DM. Vertebral morphology and intervertebral ROM within the vertebral column were investigated using OLS regression

The negative relationship between lateral flexion and transverse process length approaches significance ( $p < 0.1$ ) and regressions have moderate fit ( $r^2_{hu} = 0.48$ ,  $r^2_{gi} = 0.52$ ). In both species, the positive relationship between lateral flexion and uncinat process height approaches significance ( $p < 0.1$ ) with moderate fit ( $r^2_{hu} = 0.66$ ,  $r^2_{gi} = 0.63$ ). Contrary to the predictions, uncinat height increases with intervertebral range of lateral flexion. No other significant relationships were found between intervertebral range of motion and morphology.

There are weak relationships between intervertebral range of motion and morphology within the ape cervical spine. It is possible that selection on mobility is secondary to other aspects of neck function, such as postural maintenance. Soft tissues may more strongly influence mobility. It is likely that intraspinal differences are too minute to show a statistically significant pattern. An interspecific comparison may elucidate a relationship between cervical form and mobility.

#### **D-19 Sequencing of Huntingtin orthologs in *Macaca fuscata***

Elena Cattaneo, Giulio Formenti (University of Milan) 所内対応者：今井啓雄

Our Italian laboratory of is focussed on the study of a severe neurological disorder, Huntington Disease (HD). More specifically, my group is investigating the evolutionary background under which the genetic mutation causative of the disease, a CAG trinucleotide repeat longer than 35 repeats within Huntingtin (Htt), has emerged. Our principal aims are: 1) the sequencing in several Non-Human Primate (NHP) species of HTT Exon 1 in order to gather a vast collection of sequencing data including Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and CAG length polymorphisms; 2) the reconstruction of HTT Exon 1 ancestral states along the human evolutionary lineage; 3) the identification of NHPs carrying long CAG repeats for disease modelling purposes.

Using the DNA samples, we have used a self-established High-Throughput protocol (Figure 1), which allowed me to correctly PCR-amplify, clone into plasmids and Sanger-sequence the Htt exon 1 in 82 different samples from *Macaca fuscata*. In particular, after PCR amplification using High-Fidelity Taq (Figure 2), products were cloned into sequencing vector PCR 4.0 and transformed into TOP10 competent bacterial cells, which were subsequently grown in 6 well Multiwell plates (Figure 3). The single colonies were plated in 96 well plates for HT plasmid DNA extraction (Figure 4).

Our hosts at PRI provided full support throughout the entire process (Figure 5). These data have shed light on the CAG length variability within this species and will be used to plan further experiments.

#### **D-20 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 はアミノ酸の味の受容体であるが、ヒトとマウスでは受け取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用いて、霊長類間における旨味受容体のアミノ酸選択性の違いを評価し、食性の違いと比較検討することを目的としている。

昨年度までに、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、キツネザルの旨味受容体遺伝子 *Tas1r1* および *Tas1r3* の配列解析を完了し、機能解析に用いる哺乳類細胞用発現ベクターの作製も行った。今年度は、細胞評価系を用いて、これらの旨味受容体のアミノ酸応答性の評価を行った。結果、これらの霊長類の間でもアミノ酸選択性に種差があることが明らかになった。特にグルタミン酸受容能に大きな違いが認められたことから、今後は変異体解析を用いて、グルタミン酸受容能に影響を与える残基の検証を行う予定である。

本研究成果は、霊長類における味覚受容体遺伝子と食物選択との相関性を示す上で非常に興味深い知見を与え得るものである。

#### **D-21 Skeletal adaptation in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in response to environmental variation across the Japanese Archipelago.**

Buck, Laura T. (University of Cambridge, Cambridge, UK), De Groote, Isabelle (Liverpool John Moores University, Liverpool, UK), Stock, Jay T. (University of Cambridge, Cambridge, UK). 所内対応者：濱田穰

This project addresses the question of skeletal plasticity to climate. We will compare skeletal shape between groups of Japanese macaques from different environments and contrast this with climate-correlated skeletal shape differences between Jomon groups from matched regions. We seek to determine whether monkeys, and by inference other non-human primates, adapt to climatic stimuli in the same way as humans do.

We are using a combination of CT scanning and traditional osteometry to collect 3D landmark, cross-sectional geometric and traditional morphometric data. We will analyse characteristics such as the globularity of the neurocranium, facial prognathism and cheek projection, nasal and orbital shape in the cranium, limb and autopod proportions, limb bone curvature and robusticity (via cross-sectional geometry), body breadth, body size and body mass in the postcrania. Laura Buck arrived at the PRI on 4<sup>th</sup> April to begin data collection. This comprises traditional osteometrics and CT scans collected by Dr Buck using the medical CT scanner at the PRI following training by Dr Ito (PRI). Eighty macaque skeletons have been chosen from the PRI collections, ten adult males and ten adult females from each of four sites with different environments (north to south: Shimokita, Nagano, Shimane and Yakushima). To date 35 skeletons have been measured and CT scanned. Analyses of scan and morphometric data will be conducted at the University of Cambridge on Dr Buck's return, to examine relationships between macaque morphology and climatic data.

From 16<sup>th</sup> March to 3<sup>rd</sup> April, Drs Buck and De Groote visited the National Museum of Science and Nature (Tsukuba), University of Kyoto and Sapporo Medical School to evaluate the Jomon sample with which to compare the macaque data being collected at PRI. We have ascertained that there is a good potential sample from sites in Hokkaido and Honshu and a number of specimens from Kyushu (see table below). We are currently contacting institutions in Kyushu with the hope of extending the sample from that region. We hope to collect data from 20 individuals from each of the four regional matches for the macaques and also 20 from Hokkaido,

which Japanese macaques have never inhabited.

#### D-22 ニホンザルの造血系および造血幹細胞にエイズウイルスが与える影響の解析

塚本徹雄, 岡田誠治(熊本大・エイズ学研究センター・岡田プロジェクト研究室) 所内対応者: 中村克樹

本研究では、ニホンザルのエイズモデルとしての可能性検証を目的とし、サル末梢血単核球(PBMC)の解析を行った。まず、NIH Nonhuman Primate Reagent Resource (www.nhpreagents.org)と代表研究者の過去データを基に、サルでの交差反応性が見られるものを中心に抗ヒト抗体をニホンザル PBMC で試験したところ、多数の抗体クローンの交差反応性が確認された(CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD95, CCR5, CD25, PD-1, HLA-DR, CD20, CD56, CD16, CD11b, CD14, CD1c, CD11c, CD123, CD163)。さらに、PBMC を PHA-P で 48 時間刺激したのちサル免疫不全ウイルス SIV (分子クローン SIVmac239)を感染させ(力価は MOI=0.001) 10 日間培養したところ、細胞内 SIV p27 染色にてウイルス増殖を確認した。このことから、ニホンザルは SIV に感受性であり、エイズモデルに相応しいこと、SIV 感染がニホンザル造血系細胞に与える影響を解析するための抗体が幅広く利用可能であることが明らかになった。

#### D-23 高磁場 MRI システムによる霊長類の脳神経回路構造の比較研究

酒井朋子, 岡野栄之(慶應), 畑純一(理研 BSI), 太田裕貴, 小川優樹, 岡野ジェイムス洋尚(慈恵・再生医), 新宅勇太(JMC), 大石健一, 森進(Johns Hopkins Uni.) 所内対応者: 濱田穰

本研究では、3次元の脳解剖画像および拡散 MRI 画像を非破壊的に撮像することで、従来の MRI 撮像技術では不可能であった、より高精細な脳構造全体の再構築(解像度 20~50 $\mu$ m)を行うことができた。本年度対象とした脳標本は、日本モンキーセンターが所有するマーモセット、ヨザル、ヤクシマザル、テナガザルの脳標本、GAIN 経路で貴研究所が所有するシロテテナガザルの頭部標本であった。さらに、これらのデータをもとに、ヒトの高度な心的機能である「共感性」に着目し、この機能に重要な役割を担っていると考えられている鉤状束に関する描写的特徴を表現に成功した。これらの研究成果は、国内の研究会および国際シンポジウム等で発表を行った。第 60 回プリマーテス研究会では優秀口頭発表賞を受賞した。現在、学術雑誌への投稿に向けての準備を進めている。

#### D-24 マーモセット疾患モデルを用いた神経回路障害ならびに分子病態の解析および治療法の開発

岡澤均, 陳西貴, 田村拓也, 藤田慶大, 田川一彦(東京医科歯科大・難治研), 泰羅雅登, 勝山成美(東京医科歯科大・医歯学総合研究科) 所内対応者: 中村克樹

正常マーモセット脳へアミロイド $\beta$ 、タウなど神経変性疾患タンパク質あるいは関連物質を注入し、認知症モデルの作出を試みる。平成 27 年度は、脳内局所への物質注入の方法について検討した。マーモセット 2 頭を用いて、適切なカニューレの選択、脳内のターゲット位置に埋め込み法、注入法を確立した。また、マーモセットの認知症における神経変性関連物質の投与の前後で認知機能を比較するための準備をおこなった。上記において想定する神経変性疾患は AD と FTLD をはじめとする認知症であり、記憶、認知等に広汎な障害が現れるとされている。平成 27 年度は、4 頭のマーモセットに視覚弁別課題・逆転学習課題、および空間位置記憶課題を訓練した。

#### D-25 オランウータンの大腿骨頭靭帯に関する研究

森健人(国立科学博物館) 所内対応者: 西村剛

哺乳類のなかでもいくつかの種は大腿骨頭靭帯をもたないとされており、霊長類の中ではオランウータンがその一種である(Endo et al., 2004)。しかしながら、過去の文献では大腿骨頭靭帯の存在を肯定したものもあり(Crelin, 1988)、真偽のほどは未だ不明確である。本研究では過去の文献では辿っていなかった大腿骨頭靭帯から大腿骨頭を栄養する血管を剖出し、改めて大腿骨頭靭帯の有無を調べる。大腿骨頭動脈は大腿骨を栄養する血管として大腿骨頭靭帯内を走行していると言われている。オランウータンの股関節の靭帯について、血管の走行を知ること、当該の靭帯が大腿骨頭動脈かどうかを知ることができる。と考える。

オランウータンの死体について肉眼解剖を行い、閉鎖動脈から寛骨臼切痕を通る寛骨臼枝を剖出した。大腿骨頭靭帯の遺残のような線維は観察されたが、血管の走行は観察できず、観察された遺残が大腿骨頭靭帯であるかどうかは判然としない。ヒトにおいては大腿骨頭靭帯が加齢とともに消失する例が知られている。今回のサンプルは老齢であり、後天的に大腿骨頭靭帯が消失している可能性は依然として残る。今後も継続して調査を続けたい。

#### D-26 異種生体環境を用いたチンパンジーiPS 細胞からの臓器作製

中内啓光(東京大・医科学・幹細胞治療), 正木英樹(東京大・医科学・幹細胞治療), 長嶋比呂志(明治大・農・生命科学科発生工学), 平林真澄(生理研・遺伝子改変動物作製室), 海野あゆみ, 佐藤秀征(東京大・医科学・幹細胞治療) 所内対応者: 今井啓雄

本課題は平成 27 年度に臨時募集研究として採択され、霊長類研究所よりチンパンジーの線維芽細胞および iPS 細胞の提供を受けた。医科学研究所にてチンパンジー線維芽細胞にリプログラミング因子を発現するセンダイウイルスベクターを導入し、iPS 細胞を樹立した。センダイウイルスは RNA ウィルスであるためにチンパンジーゲノムに挿入されないことから、外来性遺伝子を有さない(transgene free)チンパンジーiPS 細胞を得ることができた。本課題は引き続き 2016 年の一般研究に採択されたため、今後も同様に複数のチンパンジー個体から transgene free-iPS 細胞を作製し、異種動物とのキメラ形成能評価に用いる予定である。

#### D-27 霊長類の網膜の形成と維持を制御する分子機能の解析

古川貴久, 大森義裕(大阪大学・蛋白質研究所) 所内対応者: 大石高生

ヒトを含む霊長類の網膜には視野の中心部に黄斑と呼ばれる黄色味を帯びた部分があり、この部分には、色覚を司る錐体細胞が高密度で存在している。黄斑では、双極細胞・神経節細胞も高密度で存在し、視細胞1細胞当たりの双極細胞や神経節細胞の接続比率が高いため高解像度の視覚情報を得ることができる。また、黄斑の中心部には中心窩と呼ばれる窪んだ構造が存在し、この部分には血管や視細胞以外の細胞の核が存在せず光を遮る構造をできるだけ除外する仕組みとなっている。ヒトにおいて黄斑は加齢黄斑変性を含む失明に至る疾患の病変部位であり、その形成メカニズムの解明が期待されている。黄斑はマウスを含む霊長類以外の哺乳類では発達しないため、黄斑部形成の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで、私たちはサルの網膜を用いてこの黄斑部の研究を進めている。本年度は6か月齢のアカゲザル網膜をRNA laterに保存した組織からトリゾールを用いたAGPC (Acid Guanidine thiocyanate Phenol Chloroform)法によりRNAを精製した。今後、このRNAを用いて遺伝子発現を解析する予定である。

### 3. 平成27年度で終了した計画研究

霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合

実施期間：平成25～27年度

課題推進者：高田昌彦、中村克樹、大石高生、宮地重弘、平井啓久、今井啓雄

ヒトに近縁の霊長類を用いた脳科学研究は高次脳機能や精神・神経疾患病態の解明に極めて有用である。平成25年度から開始された計画研究「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」では、脳科学とゲノム科学との融合を目指して、革新的サルモデルや先端的研究手法による次世代の研究を推進することを目的としている。具体的には、認知行動を支配する神経ネットワーク活動と神経ネットワーク活動を支配する認知ゲノム発現の生物学的フレームワークを明らかにするため、サル類を用いて高次脳機能や精神・神経疾患に関する多様な研究を意欲的に展開している所外の研究者と共同利用研究を展開してきた。平成26年度と27年度には、共同利用研究会を開催し、最新の研究成果の紹介と霊長類脳科学研究に関わるさまざまな情報交換、意見交換をおこなってきた。本計画研究の成果を発展的に継承する形で、新たな計画研究「集団的フロネシスの発現と創発に関する研究」を平成28年度から開始し、霊長類脳科学の更なる展開を図っていききたい。

研究実施者

<平成25年度>

- A-1 霊長類に特異的なイムノトキシン神経路標的法の開発 (小林和人)
- A-2 霊長類モデルを用いたトゥレット症候群に有効な脳深部刺激療法の基礎的研究 (磯田昌岐)
- A-3 認知機能と行動制御における外側手綱核の役割 (松本正幸)
- A-4 行動制御に関わる高次脳機能の解明に向けた神経ネットワークの解析 (星 英司)
- A-12 霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合に向けた神経解剖学的検索 (南部 篤)
- A-15 成体脳神経新生の in vivo 動態解析技術の創出 (植木孝俊)

<平成26年度>

- A-1 複数骨格筋への単シナプス性発散投射構造の解剖学的同定 (関 和彦)
- A-2 運動異常症の霊長類モデルにおける脳活動異常の電気生理学的解析 (磯田昌岐)
- A-3 行動制御に関わる高次脳機能の解明に向けた神経ネットワークの解析 (星 英司)
- A-5 認知機能と行動制御における外側手綱核の役割 (松本正幸)
- A-11 小脳失調症の病態解析と霊長類モデルの開発 (田中真樹)
- A-12 大脳—小脳—基底核連関の構築に関する神経解剖学的研究 (南部 篤)
- A-13 霊長類に特異的なイムノトキシン神経路標的法の開発 (小林和人)
- A-17 成体脳神経新生の in vivo 動態解析技術の創出 (植木孝俊)
- A-19 遺伝子発現の生体内可視化と脳機能制御技術の確立 (南本敬史)

<平成27年度>

- A-2 ウイルスベクターを利用した霊長類モデル脳内への遺伝子導入と神経回路操作技術の開発 (小林和人)
- A-7 行動制御に関わる高次脳機能の解明に向けた神経ネットワークの解析 (星 英司)
- A-8 遺伝子発現の生体内可視化と脳機能制御技術の確立 (南本敬史)
- A-9 意欲が運動制御を支える因果律の解明 (西村幸男)
- A-14 大脳—小脳—基底核連関の構築に関する神経解剖学的研究 (南部 篤)
- A-15 認知機能と行動制御における外側手綱核の役割 (松本正幸)
- A-16 複数骨格筋への単シナプス性発散投射構造の解剖学的同定 (関 和彦)
- A-18 成体脳神経新生の in vivo 動態解析技術の創出 (植木孝俊)

(文責：高田昌彦)