

## B-93 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、霊長類各種の組織における DNA メチル化の比較解析を行ってきた (Fukuda et al. 2013, J. Human Genet.58:446-454)。GAIN より提供いただいたニホンザル精子サンプルについて、全ゲノムレベルで DNA メチル化状態を決定し、既に公表されているヒトとチンパンジーのデータを含め、精子メチル化状態の 3 種比較を行った。興味深いことに、大きな低メチル化領域 (数十 kb 以上) がヒト特異的に多数出現していることが分かった。さらに、これらの低メチル化領域はヒト特異的なコピー数多型や染色体再編成の領域に頻出していた。すなわち、精子での DNA メチル化レベルの変化がゲノム安定性の変化に寄与していると考えられる (論文投稿中)。

また、GAIN よりテナガザル精巣サンプルを頂き、RNA を抽出した。過年度に霊長研から提供いただいたチンパンジー精巣や別に入手したヒト精巣サンプルと合わせて、精巣内小分子 RNA (主に piRNA) の種間比較解析を進めている (未発表)。

### (3) 一般グループ研究

#### C-1 霊長類由来 ex vivo 培養系を用いた消化管細胞機能の解析

岩槻健, 高橋信之, 大木淳子, 熊木峻佑 (東農大), 佐藤幸治 (自然科学), 栗飯原永太郎 (シンシナシティ大)

所内対応者: 今井啓雄

本研究の目的は、これまでに報告例がないサル腸管からオルガノイドを作製し、消化管上皮細胞の機能解析のツールとして使用する事である。

当該年度では、霊長類研究所にてアカゲザルより腸管 (十二指腸、回腸、盲腸、大腸) を採取し、オルガノイドの作製を試みた。安楽死後、腸管を取り出し内容を数回 PBS にて洗浄後、抗生物質入りの PBS にて洗浄。腸管上皮細胞取得の際は、筋層が厚いため上皮の部分のみ眼下ハサミで切り出し、EDTA によりクリプトと絨毛部分を分離した後、メッシュに通しクリプトのみを分画した。大腸だけは、上皮が剥がれずオルガノイド作製を断念した。次に分画されたクリプトをマトリゲルに分散させた後、Wnt アゴニストを含む培地にて培養したところ、球体状に成長する細胞群を得た。これら球体状の細胞群を免疫染色した結果、セロトニン陽性細胞を確認する事ができ、オルガノイド培養が成功したと確認した。今後は、得られたサルオルガノイドを用いて、腸管機能を解析する予定である。

#### C-2 ヒトを含む霊長類における創傷治癒機序の進化

松本晶子 (琉球大・観光), 高橋健造, 内海大介 (琉球大・医学研究科) 所内対応者: 鈴木樹理

本研究の目的は、皮膚の厚さが霊長類の創傷治癒速度を決定する要因であるかどうかを調べるものである。共同利用及び GAIN の協力により、2015 年 11 月に、大型類人猿 3 種 (チンパンジー、ゴリラ、オランウータン) の皮膚組織試料の提供を受けた。試料はホルマリン液と RNAlater 保存溶液を用い保存した。試料は、琉球大学医学部皮膚科学教室で切り出し、皮膚の厚さ (表皮と真皮を合わせた厚さ) を測定した。

結果、ゴリラ、チンパンジー、オランウータンの順に皮膚が厚いことが明らかとなった (図 1)。本年度は試料数が各 1 個であったため、皮膚の厚さの種差を検討するには至らなかった。今後も継続して試料の収集し、創傷治癒に及ぼす皮膚の厚さの影響を検討していく。

#### C-3 マカクにおける繁殖季節性と運動のおよぼす骨格加齢への影響

松尾光一 (慶應大・医), 山海直 (医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センター), Suchinda Malaiwijitnond (Chulalongkorn 大), 森川誠 (慶應大・医) 所内対応者: 濱田穰

季節繁殖性をもつ霊長類 (ニホンザル) において、骨密度が季節に応じて変化するという仮説を検証した。鼓膜から蝸牛へ音を伝える「耳小骨」と、体重を支え運動を担う長管骨である「大腿骨」の 2 種類のさらし骨を解析対象とし、平成 26 年度からのサンプルに加えて新たな骨を解析し、これまでの解析個体総数をオス 75 個体、メス 71 個体とした。これらの個体から得た骨の骨量や骨密度を、マイクロ CT を用いて定量した。ツチ骨とキヌタ骨はそれぞれ全体を 10  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  の解像度で、大腿骨は遠位端を 120  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  の解像度で撮影した。性別や死亡時の年齢、日付を基に解析を行ったところ、オスでは季節によって骨密度に変化が見られた。そこで、オスの生体ニホンザル 14 頭を用いて、橈骨遠位端の骨密度を年 2 回、繁殖期と非繁殖期に pQCT を用いて定量し、このうち、13 頭の血中テストステロン濃度を測定した。その結果、骨密度の変化量が季節によって増減する時期が見出され、血中テストステロン濃度も骨密度変化と類似したパターンを示した。さらに、血中 25-(OH) ビタミン D3 濃度変化との関係も解析した。これらのデータは骨が、いわば加齢と若返りを毎年繰り返していることを示唆する。

#### C-4 金華山島のサル・個体数の変動と 6 群間の生態社会学的比較

伊沢紘生 (宮城のサル調査会), 杉浦秀樹 (京大・野生動物研究センター), 藤田志歩 (鹿児島大・共同獣医・行動生理・生態学研究室), 川添達朗 (京都大・理学・人類進化論), 宇野壮春, 関健太郎, 三木清雅 (東北野生動物保護管理センター)

所内対応者: 古市剛史

申請時の本研究の目的は 6 つである。①個体数の一斉調査は申請通り 2 回、秋と冬に実施した。結果は秋が 277 頭、冬が 281 頭だった。冬の方がわずかに多いのは、秋の調査時には華やかな交尾期を反映して、群間をうろつき回る群れ外オスのカウントが完璧でなかったことにもよる。②群れごとのアカンボウの出産数と死亡 (消失) 数は、春の調査を上記 2 回

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