

7.2.3 随時募集研究

2020-C-1 ナチョラピテクス化石研究の比較資料としての霊長類下腿骨調査

木村賛（東京大学総合研究博物館）所内対応者：平崎鋭矢

北部ケニア・ナチョラで発見された中新世化石ホミノイドであるナチョラピテクスの下腿骨については2つの報告がある。しかし、大きな化石集団であるナチョラピテクスにはほかにも未報告の下腿骨が見つかっている。これらの化石の特徴を検討するための比較資料として、現生霊長類下腿骨の形態を調べた。本年度はホミノイドを中心として研究所所蔵の約18種55体の霊長類下腿骨を観察・計測した。これまでに霊長類研究所ならびに国内外の研究施設で調べたものと合わせ、骨格77種256個体の霊長類（ヒトを含む）の計測値を化石との比較検討に用いた。現生霊長類種をその主なロコモーション様式により分類して分類群ごとの形態特徴を抽出した。ナチョラピテクス下腿骨は弯曲が少なく、筋付着痕が弱く、筋活動が弱かったことを思わせる。足関節の形態は、類人猿や樹上移動運動に特化したサルとは異なり、内かえし・外かえしの少ない関節運動に適応していると見られる。これらの予報的検討は、2020年12月に開かれた第38回日本霊長類学会オンライン大会にて共著者とともに発表した。

2020-C-2 サルの脅威刺激検出に関する研究

川合伸幸（名古屋大）所内対応者：香田啓貴

これまでの共同利用研究を通じて、サルはヘビを他の動物よりも早く見つけることを示して来た（Shibasaki & Kawai, 2009; Kawai & Koda, 2016, Kawai, 2019）。ヘビを見たことのないサルがヘビをすばやく検出するという事は、サルは生得的にヘビを検出する視覚システムを有していることが示唆される。しかし、これまでは視覚探索課題を用いて脅威対象の検出を評価してきた。視覚探索課題はターゲットへの注意を反映しているのか、背景刺激が注意を惹きつけるのかが不明であるとの批判がある。そこで、霊長類で初めてフリッカー課題を用いて、脅威の対象を早く検出できるかの予備的検討を行った。フリッカー課題とは、画像の一部（ターゲット）だけが異なる相似の画像をブランクを挟んで繰り返し提示し、異なる箇所をどれだけ早く正確に検出できるかを調べる手法である。

R2年度はコロナウィルスのため実験が中断し、また諸般の事情で研究が9月末までしか実施できなかったために、初期訓練を遂行するにとどまった。2頭のサルが、フリッカー課題で、背景と異なるターゲットを検出することを習得した。ただし、まだターゲットは非常に大きく、実際に自然画像や脅威対象の動物を提示するには、さらにターゲットを小さくし、また背景画像として自然画像を用いるなど、さらなる訓練が必要である。

2020-C-3 野生ボノボの人口動態と集団サイズの研究

坂巻哲也（アントワープ動物園基金・ロマコプロジェクト）所内対応者：古市剛史

申請者は現在、ボノボのエコツアーリズム開発プロジェクトのため、コンゴ民主共和国を本拠地とし、当国のロマコ森林の調査に従事している。2020年中に日本へ一時帰国した際に、霊長類研究所に数週間ほど滞在し、古市剛史教授の元で管理されているワンバの長期データの整理と分析を行なう計画であった。しかし、本年はCOVID-19のコロナ禍のため、日本への帰国時期は大幅に遅れ、2020年10月に一時帰国したものの、本計画を遂行するスケジュールを組むことができなかった。

2020-C-4 The dental phenotype of anthropoid primate hybrids: Evidence from *Macaca fuscata* and *M. cyclopis*

Emma Kozitzky (New York University) 所内対応者：濱田穰

Because of the COVID-19 pandemic, I was unable to visit Kyoto University to complete any part of the project outlined in my application to work with the Cooperative Research Program. However, I did re-apply to the program and received funding for the project 2021-B-19 "The dental phenotype of anthropoid primate hybrids: Evidence from *Macaca fuscata* and *M. cyclopis*" with the help of host researcher Eishi Hirasaki. I will collect photographs, linear measurements, and 3D surface scans of the dentitions of these taxa and their hybrids from November to December of 2021. The data derived from this project will be part of my PhD dissertation, which I aim to complete in the winter of 2022.

2020-C-5 ウイルス感染制御遺伝子の進化に関する研究

佐藤佳（東京大・医科学研）、伊東潤平、三沢尚子、小柳義夫（京都大・ウイルス・再生医科学研）

所内対応者：今井啓雄

本年度は、コロナ禍のため、検体授受のための訪問、および、計画した研究の遂行がきわめて難しい状況であった。そのため、公共データベースを用い、ヒトと霊長類の生殖細胞の分化・成熟におけるトランスポゾンとSTFsのバイオインフォマティクス解析を実施した。

2020-C-6 種の保存を目的とした野生動物の配偶子保存研究

藤原摩耶子、村山美穂（京都大・野生動物研究） 所内対応者：今井啓雄

2021年1月13日に福岡市動物園で死亡したメスチンパンジー「コナツ」（推定44歳）の卵巣を当研究室に郵送していただき、死後2日目の1月15日に受取り、種の保存のための配偶子保存の研究に供試した。卵巣は一部を組織解析用に固定した後、未成熟卵子のある皮質部を切り出し、凍結保存を実施した。その際、十分な数の卵巣皮質片を回収できたことから、凍結保護剤の異なる2種類のガラス化凍結法と、緩慢凍結法を実施した。一方、成熟した卵子は回収できず、卵子単独での凍結保存の実施は行わなかった。凍結保存前の卵巣組織の一部は組織固定し、パラフィン包埋をした後、H&E染色を実施して組織観察を行った。その結果、凍結保存を実施した卵巣には複数の未成熟卵子（原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞）が含まれることを確認し（添付写真）、この年齢（推定44歳）でも卵巣に未成熟卵子を有していることを確認できた。しかし、排卵前の成熟卵子（胞状卵胞）は観察されなかったことから、凍結保存を試みた際に回収できなかったように、本個体の卵巣は成熟卵子を持たず、本来は配偶子保存は不可能とされる状態であったと考える。未成熟卵子をターゲットとしている本研究ならば、この年齢のチンパンジーの卵巣からも多数の未成熟卵子の活用が期待できる。一方で、形態的に損傷した卵子（卵胞）も見られたことから、死後2日目には卵子の退行が始まっており、より早く、より良い状態で卵巣の回収と卵子の保存を実施することが望まれる。

回収時に残った卵巣組織の一部はDNA、RNA、タンパク質として保存したため、今後凍結前後の変化について、組織観察と合わせて、分子生物学的解析を実施する予定である。

2020-C-7 小型爬虫両生類の系統分類学

西川完途（京都大・地球環境学堂）、原壮大朗、福山伊吹、尾崎洸太郎、沈彦鵬（京都大・人間・環境）
所内対応者：高井正成

申請者は骨形態を用いることで、爬虫両生類の種や属の見直しをすることを目的としている。分類に使用する爬虫両生類は種や属の証拠となるため、骨格の観察には既存の標本をマイクロCTを用いて非破壊検査をする必要があった。これまでのマイクロCT装置では解像度が足りず、頭骨要素の観察ができなかったが、貴研究所にのマイクロCT装置(写真1)を用いることで頭骨要素の観察が可能になった。今年度はサンショウウオ属、イモリ科、チョボグチガエル属の断層撮影を行った。これらの両生類は、これまで詳細な骨格形態の種間比較の研究が乏しく、現在は属レベルの定義が難しい外部形態の計量形質に頼っている。今回の結果からいくつかの種に特徴のある頭骨要素が確認できた。この形質は種の特徴だけでなく属として定義できる可能性もあるが、観察した個体数が少ないため、種内変異を考慮しながらマイクロCTを続けていく予定である。また、両生類は軟骨も多く保持している脊椎動物である。今回、diceCTの方法(写真2)をご教授いただいたため、これから硬骨だけでなく軟骨の比較も行なっていく予定である。

2020-C-8 Comparative molecular analysis of primate embryonic development using iPSCs

Cantas Alev（京都大・高等研究院） 所内対応者：今井啓雄

During the last fiscal year (FY2020) collaborative work between the Alev-lab at ASHBI and Imai-lab at the PRI was initiated. Non human primate (NHP) fibroblasts (of different great ape-species) have been provided by Dr. Imai as part of this collaborative interaction to the Alev-lab. They will be used to generate NHP induced pluripotent stem cells (iPSCs). These NHP iPSCs will be used to establish and analyze in vitro models of primate embryonic development. Despite the ongoing virus pandemic online/virtual meetings between Dr. Imai and Dr. Alev have been continuing. During these meetings active discussions were made in preparation of joint scientific research as well as joint grant applications, including an application for a Transformative Research Type A grant, which is lead by Dr. Alev. We are confident that the initiated collaborative interactions between both labs will continue to grow in future and contribute to an overall better understanding of human and non-human primate biology.

2020-C-9 原猿類における下顎骨形態の進化生物学的研究

小藪大輔（香港市立大・獣医生命） 所内対応者：西村剛

いわゆる原猿類と括られる霊長類はツパイ Tupaiidae, メガネザル Tarsiidae, ロリス Lorisidae, キツネザル Lemuridae, インドリ Indriidae, アイアイ Daubentoniidae の6科を含む、単系統ではない多系統群である。他の霊長類に比して原猿類にみられる下顎形態の特徴は下顎骨の腹尾側に位置する Angular process 角突起の突出である。他の哺乳類を見渡すと、この部位はげっ歯類、兎形類、無盲腸類（モグラ類、トガリネズミ類、ハリネズミ類）、翼手類、皮翼類で同様に鋭角に突出することが知られる。他方、真猿類の多くではこの部位は鋭角な突出を見せず、下顎骨の腹尾側に弧を描く。霊長類を含む哺乳類では一般的に、外側方向では咬筋深層、内側方向には内側翼突筋の付着部位となっている。本研究では原猿類を真猿類と比較しながら角突起の喪失的進化の背景の解明を目指している。貴所に導入設置されているブルカー製スカ

イスキャン・マイクロ CT 装置を用いて網羅的に撮影を行った。撮像されたデータは三次元再構築ソフト Amira 5.3 を用いてボリュームレンダリング、およびマニュアル・オートを併用したセグメンテーション作業を行った。セグメンテーションの完了したデータは STL フォーマットで出力し、Geomagic にてモデルの最適化を行った。完成した三次元モデルは統計環境 R の PMCMR, ade4, Morpho, fmanova, ape 等の各種オープンソースの解析パッケージを用いて解析を進めた。角突起の形態的多様性、そしてその発生過程を三次元座標を用いて評価し、生態学的形質との連関を検証するとともに、下顎における他の突出部位である、筋突起、関節突起との定量的な連動性 modularity について検討を進めている。

2020-C-10 チンパンジーにおける位取り記数法の学習と作業記憶における加齢効果

村松明穂、山本真也（京都大・高等研） 所内対応者：足立幾磨

本研究の目的は、①ヒトにおける数の概念の進化的基盤を探ること、②発達・加齢がチンパンジーの作業記憶に与える影響を明らかにすることである。飼育チンパンジーを対象に、タッチモニタを用いたコンピュータ課題による実験的研究を行っている。

数の概念に関する研究では、既にチンパンジーが学習しているアラビア数字の系列 1 から 9 について、前方・後方に系列を延長し、数系列 0 から 19 の学習と定着を試みた。参加 7 個体すべてにおいて、数系列 0 から 19 を学習できたことが確認された。今後は、20 以上のアラビア数字についてのテスト課題を実施し、チンパンジーがどのように十進法の表記ルールを学習したのかを確認する予定である。

作業記憶に関する研究では、過去 10 年のあいだ定期的実施してきた作業記憶の課題について、現時点での各個体のパフォーマンスを確認した。また、過去 10 年間の作業記憶に関する課題のデータを各記憶媒体などから回収し、整理をおこなった。さらに、作業記憶に関する新規課題を開始した。今後は、作業記憶課題のパフォーマンスをそれぞれ年齢ごとに個体内・個体間で比較し、チンパンジーの作業記憶が 10 年でどのように変化したのかを確認する予定である。

2020-C-11 サルの発達・老化におけるクロマチン構造変化の解析

岸雄介、山中総一郎（東京大・理） 所内対応者：井上謙一

個体の発達は様々な組織の機能獲得を伴うが、逆に老化は様々な組織の機能低下を誘導し、老齢個体の生活に大きな障害をもたらす。これまでの多くの発達・老化研究はマウスを用いてその成果を挙げてきたが、マウスとヒトには大きなギャップが存在するため、ヒトの発達・老化を理解するためにはヒトの近縁種である霊長類を用いた老化研究が必須である。

クロマチン構造は発達および老化の過程で大きく変化することが知られており、また HGPS などの早老症患者ではクロマチン因子の変異が原因であることもわかっている。そのため、少なくとも老化による機能低下の原因の一つはクロマチン構造の破綻であると考えられる。

本年度は、生後数日、4-5 年齢、11-15 年齢のアカゲザルの脳から、一次視覚野、一次運動野、背側前頭前皮質、内側前頭前皮質、海馬の凍結サンプルを、また精巣・卵巣のサンプルを採取し、送付していただいた。そして、一次視覚野からニューロン核を採取し、RNA-seq 解析を実施した。現在その結果を解析中であり、今後は他の脳領域も含めてニューロン核を用いたクロマチン解析を実施する。また生殖組織の免疫染色も実施することで、脳と生殖組織の老化メカニズムの解明を目指す。

2020-C-12 Analysis of polymorphism of short tandem repeat in Gorilla

Samuel Refetoff（シカゴ大学・医）、吉村崇、Junfeng Chen（名古屋大・ITbM） 所内対応者：今井啓雄

研究代表者はこれまで一貫して甲状腺に関する研究を行ってきた。また、研究協力者は鳥類や哺乳類の甲状腺刺激ホルモン(TSH)に関する研究を行ってきた。研究代表者は最近、血液中の甲状腺刺激ホルモンが高値を示す「高 TSH 血症」の患者の遺伝解析を行ったところ、ゲノム中に存在する縦列型反復配列(short tandem repeat: STR)の多型が血液中の TSH 濃度と関連することが示唆された。同じ霊長類のニシゴリラにおいても同様な縦列型反復配列が存在することが明らかになったため、研究協力者とともに、本共同利用研究で提供していただいたニシゴリラの DNA をもとにゴリラの縦列型反復配列の多型を明らかにした。今後はさらに個体数を増やすために、他の個体についても検討することで縦列型反復配列の多型と血中 TSH 濃度の関係が明らかになることが期待される。

2020-C-13 サルの赤血球上の血液型抗原発現が転写調節領域の分子進化により規定されることの証明

小湊慶彦、佐野利恵（群馬大学大学院医学系研究科法医学講座） 所内対応者：大石高生

令和 2 年度にチンパンジー、ニホンザル、アジルテナガザルの血液および唾液の採材を進める予定であったが、新型コロナウイルスの影響により採材が行われなかった。霊長類研究所対応担当の大石先生とメールにて打ち合わせを行い、引き続き令和 3 年度も研究を継続することとした。

2020-C-14 μ CT 撮影のための筋組織染色法の改良—鳥類と霊長類—

田中郁子（産業総合研究所） 所内対応者：平崎鋭矢

CT 画像で筋を識別するために筋の染色は不可欠であるが、動物の筋を染色すると、一般的に筋は縮んで小さくなり、部位によっては変形が大きくなることもある。元の状態と比べどの程度縮んだのかについては、まだ研究例が少ないため、重量に対しての染色時間の決定方法には検討の余地がある。

本研究では染色時間に着目し、筋縮小への影響が最小となる条件を明らかにすることを目的とした。染色時間の長短と筋重量との関係から縮小量を見積もり、縮小量の最小である最適な時間を調べるために、対照実験を実施した。染色時間は経験則での時間を参考にし、それが正しいのかも同時に検証した。

対象としたのは、ウズラの足部である。個体差を考慮し、各 2 体ずつ用いた。左右大腿筋から切り出し、ルゴール溶液で染色し、 μ CT 撮影を実施した。それを Avizo を使用して、筋骨格モデルを作成した。

染色時間が最も短い条件では、CT 画像からの筋識別が不可能であるが、冷凍庫で 24 時間保存した後に再度 CT 撮影をしたところ、軟組織が十分に識別できた。

本研究ルゴール溶液のみの染色法は、1.5 倍ほど染色時間はかかるが、縮小をほぼ与えないので、デジタル解剖において効果的な手法である。

2020-C-15 霊長類 iPS 細胞を用いた脳オルガノイドのサイズと内部構造の制御解析

岡野栄之、今泉研人（慶應義塾大・医） 所内対応者：今村公紀

非ヒト霊長類 iPS 細胞として、チンパンジー皮膚線維芽細胞から episomal vector で樹立された iPS 細胞を 4 ライン、ニホンザル皮膚線維芽細胞から Sendai virus vector で樹立された iPS 細胞を 2 ライン、今村研究室から供与され、培養を行った。さらに、ヒト iPS 細胞培養において確立された脳オルガノイド培養手法を用いて、これらの iPS 細胞から脳オルガノイド作成を目指したが、正しい形態を保ったオルガノイドの作成には成功しなかった。この原因の 1 つとして、iPS 細胞の培養条件が考えられる。供与された非ヒト霊長類 iPS 細胞は feeder-free 条件あるいはそれに類似した培養条件であり、従来の脳オルガノイド培養手法において用いられる feeder 細胞を用いた iPS 細胞培養とは異なる。ヒト iPS 細胞からの脳オルガノイド作成においても、同様の feeder-free 条件は誘導効率を著しく低下させるデータを得ており、今後は、脳オルガノイド作成に最適な iPS 細胞培養条件の検討を行っていく。

2020-C-16 テナガザルの発声行動に関連する脳発現遺伝子の解析

早川卓志、五藤花（北海道大・環境科学・生態遺伝学）、郷康広（自然科学研究機構生命創成探究センター・認知ゲノム） 所内対応者：大石高生

2020 年度は凍結標本からの遺伝試料採取およびその解析に取り組んだ。研究の対象として扱ったのは、霊長類研究所に凍結保存されていたシロテテナガザル *Hylobates lar* の遺伝標本である。まず、所内対応者である大石の指導のもと、音声行動に関係すると推定される領域を含む複数の脳領域を選定した。それに従って、協力者である五藤が、脳から合計 17 か所から凍結状態を維持しながら採材を行った。また、比較対象として脳以外の 6 つの組織からも同様に採材を行った。次に、採材した組織サンプルから RNA を抽出し、RNA-Seq を行って網羅的に発現遺伝子の塩基配列を決定した。得られたデータを、協力者の郷が作成したリファレンスゲノムアセンブリや、データベースに公開されているリファレンスゲノム配列にマッピングし遺伝子発現を調べた。さらに一つの遺伝子に注目した解析や、主成分分析などの一次解析に取り組んだ。研究結果については、一部を五藤の卒業研究として発表したほか、第 15 回 PWS シンポジウムのポスターセッションや第 65 回プリマーテス研究会のライトニングトークにて発表した。

2020-C-17 タッチパネルを用いた視線検出課題

狩野文浩（京大・野生動物） 所内対応者：足立幾磨

ヒトとチンパンジーの視線の検出しやすさを検討するため、タッチパネルを用いて、ヒトとチンパンジーを対象に、視線の方向を検出する課題を行った。結果、ヒトとチンパンジー被験者ともに、チンパンジーの視線の方向よりも、ヒトの視線の方向のほうが検出しやすいということが明らかになった。刺激画像のチンパンジーとヒトの目の色をそれぞれ反転させた場合（チンパンジー画像が白い強膜を持ち、ヒト画像が黒い強膜を持つようになる）、チンパンジーの目はより検出しやすくなり、ヒトの目はより検出しにくくなった。すなわち、刺激画像の強膜の白い色がチンパンジーとヒト両種の被験者にとって視線の検出に直結していることが明らかになった。さらに詳細を分析し、投稿準備をする予定である。

2020-C-18 COVID-19 の性感染症可能性の組織学的検討

森山隆太郎（近畿大・理工） 所内対応者：鈴木樹理

マカク雄生殖腺および副生殖腺組織における ACE2 受容体免疫陽性細胞を観察した結果、精巣のライディッチ細胞、セルトリ細胞が ACE2 受容体免疫陽性であった。同様に TMPRSS2 免疫陽性細胞を観察した結果、精巣のライディッチ細胞、セルトリ細胞、精原細胞、精巣上体頭部・体部・尾部にある精巣上体管周

囲の上皮細胞、精囊、前立腺および尿道球腺の腺腔を囲む上皮細胞が TMPRSS2 免疫陽性であった。

Western blotting 法により ACE2 受容体および TMPRSS2 発現組織を同定した結果、抗 ACE2 受容体抗体でバンドが観察された組織は精巣のみであり、抗 TMPRSS2 抗体でバンドが観察された組織は精巣、精巣上体頭部・体部・尾部、精囊腺、前立腺、尿道球腺であった。また、RT-PCR 法により mRNA 発現組織を同定した結果、ACE2 受容体 mRNA 発現組織は精巣のみであり、TMPRSS2 mRNA 発現組織は精巣、精巣上体頭部・体部・尾部、精囊腺、前立腺、尿道球腺、陰茎であった。

以上より、繁殖期のマカク生殖腺・副生殖腺において ACE2 受容体と TMPRSS2 が共発現している細胞は精巣のライディッヒ細胞とセルトリ細胞であることが明らかとなった。この結果は、SARS-CoV2 が精巣のこれら細胞に感染し、造精機能障害や男性ホルモン分泌障害を引き起こす恐れのあること、さらには精子と混ざる前の精漿には SARS-CoV2 が存在しないことを示唆するものである。

2020-C-19 霊長類モデルを用いた血中ペントシジン値の正常発達軌跡の同定

新井誠、石田裕昭（都医学研・統合失調症プロジェクト）所内対応者：大石高生

本研究の目的は、マカクザルの血漿ペントシジンおよびビタミン B6 に対して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定し、乳幼児期、性成熟期、成体・中年期、高齢期におけるこれらの血液バイオマーカーの正常発達軌跡を明らかにすることである。

本研究では、マカクザルの年齢に基づき、発達区分を乳幼児期（1 歳から 2 歳）、性成熟期（4 歳から 5 歳）、成体・中年期（8 歳から 15 歳）、高齢期（18 歳から 25 歳）と設定し、各区分において雌雄それぞれ 4-6 頭ずつ末梢血を採取した。

血漿ペントシジン値について、ヒトと動物モデルの相同性を明らかにするため、ヒト健常者（20 代から 60 代男女合計 10 名）、マカクザル（性成熟期から高齢期雌雄合計 10 個体）の血漿ペントシジンを HPLC を用いて計測した。霊長類との比較のために、性成熟期（12 週齢）のマウス、モルモットの血漿ペントシジン値を計測した。

その結果、マカクザルは正常ヒトに相同する血漿ペントシジン値（正常範囲）を示した。一方でマウス、モルモットの血漿に含まれるペントシジンは極めて微量で、HPLC では検出限界値を示すことが多かった。この結果から、糖化ストレスのバイオマーカーとしての血漿ペントシジンは、マカクザルにおいてヒトと相同に計測されることが明らかになった。このことは、マカクザルがペントシジン病態を理解するためのモデル動物としての有用である可能性を示唆する。

今後、発達区分間、性別間において血漿ペントシジン値およびビタミン B6 について計測し、ヒトに近似するものとして、マカクザルから正常発達軌跡を得る。

2020-C-20 Naïve 型チンパンジーiPS 細胞の誘導と異種間キメラ動物の作製

寺村岳士（近畿大学高度先端総合医療センター再生医療部）、村川康裕（理化学研究所生命医科学研究センター）、中西真人（ときわバイオ株式会社） 所内対応者：今井啓雄

京都大学霊長類研究所において樹立されたチンパンジーiPS 細胞を用い、低分子化合物での処理により Naïve 誘導を行った。14 日間 Naïve 誘導を行ったチンパンジーiPS 細胞はマウス ES 細胞に類似した形状を示し、転写因子の発現の変化、細胞表面マーカーの発現変化を認めた。さらに、マウス胚との異種間キメラ動物作製実験において、胚体への取り込みと胎児組織への寄与を示唆する観察像が得られた。本成果は、チンパンジーiPS 細胞が Naïve 化誘導後に安定した形質を示し、典型的な基底状態を示しうる優れたヒト細胞モデルとなりうることを示している。

次年度には同細胞を用い、キメラ動物作製実験を中心にさらに検討を進める予定である。