

## 計画：12-1

### リボソーム RNA 遺伝子の変異に基づく霊長類の系統分類

鈴木 仁 (東京慈恵医大・医科研)

我々は簡便法であるリボソーム DNA (rDNA) のスパーサー上の制限酵素断片長の多型性 (RFLP) を指標とし、霊長類の系統分類を幅広く行うことを目指しているが、今回はまずこの手法が妥当なものであるかどうかを確認するために、すでに系統関係が比較的明らかになっているヒト上科の霊長類に適用し、その妥当性を確認した。さらにこれまで系統関係のあまりははっきりしなかったテナガザル3種についても解析し、それらの系統関係を明らかにした。

rDNA のスパーサー上の RFLP の分類学への応用にあたり有利な点としては、1) 進化速度が早く、近縁種間を比較可能、2) ゲノム内でのコピー数が多いので、一個体から得られる情報量が多い、3) 同一交配集団内で協調進化をしているので、同一集団内での変異は少ない、したがって調べる個体数は少なくともよい、4) ミトコンドリア DNA の場合とは異なり、核ゲノムの変異を反映している、5) 簡便な方法なので多くの種を短時間でサーベイ可能である、などが挙げられる。

12種の制限酵素を用い、サザンブロット解析を行い、制限酵素地図を作成した。それをもとに塩基置換度を推定した。ヒトに対するチンパンジー、ゴリラ、オランウータン、シロテナガザル、アジルテナガザル、ニホンザルの塩基置換度はそれぞれ2.7%、3.8%、7.3%、6.8%、7.8%、14.1%であった。これらの結果は他の分子系統樹とおおよそ一致するものであるが、オランウータンの進化速度が他の種よりも速い傾向が認められた。これがオランウータンの rDNA の染色体座位数が他の種よりも2-3倍多いことによるのか否かは今後の課題である。また、ピグミーチンパンジーとチンパンジーそして上記2種のテナガザル間の塩基置換度は両者とも0.3%であった。一方、フクロテナガザルと他2種のテナガザル間では2.4%であり、この分岐がヒト、チンパンジーの分岐と同時代に起きたものであることを示唆した。

## 計画：12-2

### ミトコンドリア DNA 変異に基づくマカカ属サル

針原伸二 (東京大・理)

本田克也 (信州大・医)

竹中 修 (京都大・霊長研)

本研究はマカカ属サルのミトコンドリア DNA (mt DNA) の制限酵素切断パターンを比較・解析することにより、種間の系統関係およびそれぞれの種の種内変異性を求め、マカカ属サルにおける種分化のメカニズムや進化や過去における移動の実態の考察をめざすものである。

まず、対象をひとつの島の中で他に例をみない特異的な種分化をとげたスラウェシマカク7種のサルにしぼり、種内および種間における mt DNA の変異を実験的に検出した。

試料は、ペットとして飼育されていた、スラウェシマカク70頭 (*M. tonkeana* 13頭, *M. hecki* 8頭, *M. nigrescens* 7頭, *M. nigra* 10頭, *M. ochreata* 12頭, *M. brunnescens* 8頭, *M. maurus* 12頭の) と、スラウェシマカクと系統的に近い関係にあるとされる、カリマンタン産の *M. nemestrina* 3頭より抽出した DNA である。10種の制限酵素 (*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Xba*I) にて切断し、ヒトの mt DNA をプローブとする Southern ハイブリダイゼーション法により各個体の mt DNA のパターンを検出した。

10種すべての制限酵素の切断により mt DNA の種内あるいは種間変異が認められ、それぞれの切断により3個から12個の切断型 (モルフ) が観察された。それぞれの制限酵素によるモルフの記載をまとめたところ、スラウェシマカクの mt DNA は、45個のタイプに分類されたが、*M. hecki* と *M. nigrescens* で共通する mt DNA タイプが1つ認められたほかは、種間で共通するタイプはなかった。また、*M. nemestrina* は3頭それぞれが異なる mt DNA タイプを有していた。mt DNA タイプ相互間の関係を最大節約法により推定したところ、*M. hecki* の1つの mt DNA タイプを中心に放射状に分岐していく図が得られ、*M. nemestrina* のタイプも、その *M. hecki* の mt DNA タイプに結びつけられた。また、関係図は概してスラウェシマカク7種の地理的分布と対応

するものであったが、*M. ochreata* が *M. hecki* と近くなるなど、検討すべき点も残った。

#### 計画：12-3

FISH法を用いた霊長類の核型進化に関する研究および霊長類細胞株作成の試み

田辺秀之・水澤 博

(国立衛試・変異遺伝・細胞バンク)

霊長類ゲノムの再配列、核型進化について考察することを目的として、染色体バンディング法とFISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 法とを組み合わせることにより、免疫グロブリンIgE遺伝子(Cε1)の比較マッピングを行なった。材料として、ヒト上科および旧新世界ザル各種の末梢血を提供していただき、PHM-MまたはCom-Aをマイトジェンとして3日間培養の後、染色体標本を作製した。QまたはGバンド法による染色体像の写真撮影の後に、同スライドを用いてヒトCε1遺伝子(染色体上の位置はヒトでは14番染色体上のterminal領域、つまり14q32.33である)をプローブDNAとしたFISH法を行なった。プローブDNA(16kb)はニックトランスレーションによりビオチン標識し、蛍光シグナルは抗ビオチン抗体およびFITC標識した2次抗体を用いて検出した。その結果、現在までに得られている各種霊長類の同遺伝子の位置は、チンパンジー15gter, シロテテナガザル17gter, アジルテナガザル17gter, ニホンザル7gter, カニクイザル7gter, セレベスマカク7gterである。チンパンジー、シロテテナガザルおよびニホンザルに関しては、既にヒト染色体特異的DNAライブラリーをプローブとした染色体ペインティング法による他の報告があり、それによるとチンパンジーの15番染色体、シロテテナガザルの17番染色体およびニホンザルの7番染色体の長腕部分がヒト14番染色体に対応している。このことから、上記の種におけるCε1遺伝子は、ヒトの14番染色体に相当する染色体上のterminal領域、つまりヒトCε1遺伝子と相同な領域に位置しており、この遺伝子とその周辺部には核型進行上、染色体間あるいは染色体内の大きな変化が見られなかったものと考えられる。また、低張処理した末梢血をTCGFを添加した培地で培養し、霊長類細胞株の作成を試みた。一過的な細胞増殖が数例確認できたが、複数種類の

細胞が混在した状態であり、現在その性状を解析中である。

#### 計画：12-4

カニクイザルのα-グロビン遺伝子領域に見いだされた未知プロセスト遺伝子について

竹中晃子(名古屋文理短大・食物栄養)

カニクイザルのα-グロビン遺伝子間領域に、117個のアミノ酸をコードする領域がプロセスト遺伝子として挿入されていることを見いだしP117と名づけた。このP117と相同の配列を持つm-RNAが肝、腎、肺および脳で発現していることが明らかになったので本来の機能を有するタンパク質がこれらの器官で発現している可能性がある。データベースで検索した結果P117の塩基配列および推定されたアミノ酸配列と相同の物は見いだされなかった。82番目から99番目のアミノ酸は疎水性が高くそれ以降には塩基性アミノ酸が多く含まれていることから、膜に関係したタンパク質の可能性が示唆された。

ヒト、チンパンジーのα-グロビン領域にはP117が存在していない。カニクイザルと近縁のマカカ属サルにおける挿入頻度を検討した。P117の塩基配列には制限酵素BamHIの切断部位が存在するため、α-グロビン遺伝子間領域のBamHI切断部位の有無をサザンハイブリダイゼーション法により検討し、P117の存在比を求めた。カニクイザルではインドネシア産(13頭)0.11、フィリピン産(21頭)0.05、タイ産(114頭)0.19、タイワンザル(2頭)0.25、ブタオザル(4頭)0、ボンネットザル(3頭)0.17、ベニガオザル(3頭)0.67、ニホンザル(64頭)0、セレベスマカク(12頭)0.06であった。カニクイザルおよびセレベスマカクにおけるα-グロビン遺伝子の多重複の地域変異とP117の地域変異との間に相関性は認められなかった。

マカカ属以外のサルのDNAのP117をPCR法により増幅し、サザンハイブリダイゼーションを行なったところヒト、チンパンジー、アジルテナガ、シロテテナガ、コモンマーモセット、リスザル、ロリス、ツパイで明瞭なバンドが得られ、オランウータン、ワタボウシタマリン、キツネザルではバンドが得られなかった。これらの結果からP117はプロセスト遺伝子として霊長類に広く存