

DNA多型によるネパール人の人類学的位置づけ

古谷, 博和
九州大学遺伝情報実験施設 | 九州大学医学部神経内科

堂浦, 克美
九州大学遺伝情報実験施設 | 九州大学脳神経病研究施設神経病理

三島, 浩道
九州大学遺伝情報実験施設

榊, 佳之
九州大学遺伝情報実験施設

他

<https://doi.org/10.15017/528>

出版情報：健康科学. 12, pp.19-22, 1990-03-28. 九州大学健康科学センター
バージョン：
権利関係：



DNA 多型によるネパール人の人類学的位置づけ

古谷博和*** 堂浦克美**** 三島浩道*
榊佳之* 川崎晃一

Evolutionary Relationships of Nepalese from an Analysis of DNA Polymorphisms

Hirokazu FURUYA***, Katsumi DOH-URA****, Hiromichi MISHIMA*
Yoshiyuki SAKAKI* and Terukazu KAWASAKI

Summary

Haplotype analysis has been served for the study of molecular evolution by means of comparing of amino acid, at first and later, DNA sequences. This technique has allowed construction of evolutionary trees between many species. Recently, genetic distance analysis based on haplotype of RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) in various kind of genes indicates a major division of human populations. This paper describes the data on the distribution of haplotypes associated with β globin and prion related protein (PrP) gene in Nepalese.

Using 3 common RFLPs in β globin gene cluster (*Hin* c II 5' to ϵ ; *Hin* d III in $\alpha\gamma$ and $\alpha\gamma$) to determine linkage of sites, 3 haplotypes have been observed in Nepalese. Among 30 chromosomes, 12 have a haplotype of (+--), 9 (-+-) and 9 (---). (Table 1)

As for the PrP gene, we used 2 DNA polymorphisms. (valine (V) for methionine (M) and leucine (L) for proline (P) substitution) In 16 chromosomes (Nepalese), 2 have "V" type and 14 have "M" type and none has "L" type. (Table 2)

Although the sample number is not enough to lead the definite conclusion, our data provides the suggestion that the Nepalese is different from Caucasoid group, but it situates near Caucasoid rather than other Asian group population (Thai and Japanese) in dendrogram of human race.

(Journal of Health Science, Kyushu University. 12: 19-22, 1990)

緒 言

人類集団の中に見られるさまざまな人種がどのように形成されてきたかということは、人類遺伝学のみならず人種間で発生頻度に違いの見られる遺伝病の研究などの分野でも興味を持たれている。人類分化の起源

について分子遺伝学の立場から解析を行ってゆく上で、近年 DNA 多型を用いて人種間の進化的距離 (evolutionary distance) を測定するといった方法が行われるようになってきた。これまで多くの人種について β -globin 遺伝子、ミトコンドリア DNA、HLA など数多くの遺伝子のハプロタイプ解析が行われ、人類

Institute of Health Science, Kyushu University 11, Kasuga 816, Japan.

*Research Laboratory for Genetic Information, Kyushu University 18, Fukuoka 812, Japan.

**Department of Neurology Kyushu University 60, Fukuoka 812, Japan.

***Neuropathology, Neurological Institute, Kyushu University 60, Fukuoka 812, Japan.

の遺伝学的系統樹 (genetic tree) の作成が試みられた。しかし、この目的のためには多数の人種間で DNA 多型を調べる必要がある。

このような中で、ネパール人はコーカサス人集団、東アジア人集団、東南アジア人集団の境界に位置しているうえ、地理的に外部の社会から孤立しており、人種が分離したあとの他の民族との接触が少ないといった特徴を有しており、遺伝学的系統樹作成のうえでも多くの情報を与えてくれると考えられる。そこでまずネパール人末梢血から DNA プロット可能なゲノム DNA を抽出し、サザンプロットによる RFLP (restriction fragment length polymorphism) の解析及び PCR (polymerase chain reaction) による DNA 多型の検出を試みた。

方 法

1. ゲノム DNA の抽出

従来の方法に従うと、末梢血からのゲノム DNA 抽出のためにはヘパリンを加えて採血した血液にデキストラン溶液を加え、赤血球成分と血漿及び白血球成分に分離し、次に後者を遠心により白血球成分と血漿成分に分離した後に白血球成分を凍結保存し、これからゲノム DNA を抽出するといった手順が必要である⁴⁾。しかしこの方法では、遠心分離機と冷凍機が必要となるため、ネパール現地での数多くのサンプル採取には適していない。そこで本来全血からの血清分離の目的で開発された採血管 (インセパック; Sekisui Medical Co., Ltd.) を用い、そこからゲノム DNA を抽出することが可能か否かを検討した。この場合白血球成分は血餅と一緒に下層に存在することになる。また、日程上の都合から採血数日後にサンプルを凍結保存することになった。

2. DNA プロットによる β グロビン遺伝子群 RFLP の検出

抽出したゲノム DNA 15サンプルについて β グロビン遺伝子上の制限酵素 *Hin* d III, *Hin* c II によって検出される3個の RFLP について調べた (図1)。 β グロビン遺伝子群 RFLP はこれまでも人種間の遺伝的距離を調べるときに良く用いられている。DNA プロットに関しては Maniatis らの方法⁵⁾に従った。

3. PCR 法を用いた DNA 多型の検出

次に制限酵素切断部位に相当しない DNA 多型を検出するために、PCR 法とドットプロットハイブリダイゼーションにより DNA 多型の検出を試みた。ここではプリオン蛋白遺伝子上に認められた DNA 多型を

調べるために、プライマーとして既知の塩基配列に基づいて目的の領域の5'上流および3'下流の塩基配列を人工的に合成して、この間の領域を酵素的に増幅した後⁵⁾、2種類のオリゴヌクレオチドをプローブとしてドットプロットハイブリダイゼーションを行って genotype を決定した。我々の研究室では既にプリオン蛋白をコードする遺伝子⁷⁾にアミノ酸置換を生じる2種類の DNA 多型を見出しており (102番目の Pro/Leu および129番目の Val/Met)¹⁾ (図2)、これを日本人 (19名)、タイ人 (11名)、白人 (5名)、ネパール人 (8名) について調べることにした。

結 果

1. ゲノム DNA の抽出

33サンプルのゲノム DNA 抽出を行ったところ、上記の方法で処理された約5mlの全血から約20~30 μ g の DNA を抽出することができた。このうちの一部をとってアガロースゲル電気泳動を行い DNA の状態を調べたところ、多少スミア状になっているものもあったが、その殆どが DNA プロット可能であると考えられた。

2. β グロビン遺伝子群 RFLP の検出

DNA プロットの結果は表1に示した。制限酵素 *Hin* d III, *Hin* c II によって検出可能な genotype

図1

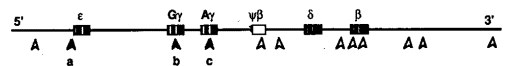


表1

| ハプロタイプ a, b, c | 英国人 | イタリア人 | インド人 | タイ人 | 日本人 | ネパール人 |
|-------------------|-----|-------|------|-----|-----|-------|
| +++ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| ++- | 0 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 |
| +- | 16 | 32 | 58 | 0 | 30 | 12 |
| -+ | 15 | 15 | 28 | 0 | 2 | 9 |
| ++ | 6 | 3 | 18 | 2 | 2 | 9 |
| --- | 0 | 0 | 2 | 30 | 0 | 9 |
| 合計 | 37 | 50 | 111 | 32 | 36 | 30 |

図1 β グロビン遺伝子群近傍に認められるハプロタイプの人種による差異 β グロビン遺伝子上に認められる RFLP を (\blacktriangle , \triangle) で示した。今回用いた DNA 多型は ϵ の5'上流の *Hin* c II 部位 (a), γ 内の *Hin* d III 部位 (それぞれ b, c) である。人種間のハプロタイプの違いを表で示した。用いたハプロタイプは図1に a, b, c で示している。ネパール人以外のデータは Weinscoat ら⁸⁾ および Shimizu ら⁶⁾ の結果による。

図 2

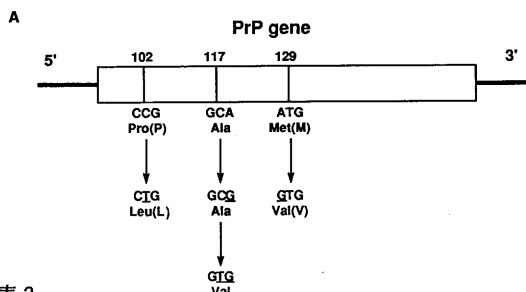


表 2

| genotype | 日本人 | タイ人 | アメリカ人* | ネパール人 |
|----------|-----|-----|--------|-------|
| V | 0 | 0 | 7 | 2 |
| M | 3 | 2 | 3 | 4 |
| 合計 | 3 | 2 | 10 | 6 |
| P | 3 | 2 | 1 | 1 |
| L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | 3 | 2 | 1 | 1 |

図 2 プリオン遺伝子上に認められる DNA 多型を示した。102番目の Pro→Leu の変異は既に Hsiao ら²⁾により、129番目の Met→Val の変異は Doh-ura ら¹⁾により報告されている。

表 2 プリオン蛋白遺伝子に見られる DNA 多型の人種間の違いを表で示した。V：129番目のアミノ酸がバリンであるもの、M：129番目のアミノ酸がメチオニンであるもの、P：102番目のアミノ酸がプロリンであるもの、L：102番目のアミノ酸がロイシンであるものを示す。*：サンプルの人種に関してははっきりしていない。

を+, -で表わしており, これは左よりβグロビン遺伝子εの5'上流のHincIIによって検出されるRFLP, ργおよびΔγ内のHindIIIによって検出される2個のRFLPを意味している。その結果, ネパール人と他の民族とのハプロタイプの頻度に違いが認められた。(ネパール人以外のデータはWeinscoatら⁸⁾およびShimizuら⁶⁾の結果による。)

3. PCRによるDNA多型の検出

結果は表2に示したとおりであり, βグロビン遺伝子群の場合と同様に人種による差が認められた。プリオン蛋白をコードする遺伝子は種によるアミノ酸配列の差がひじょうに少なく, 進化の過程で保存されている重要な蛋白と考えられている。(マウスと人との間で90%以上の相同性が認められている。)このような蛋白で人種によるハプロタイプの違いのあることは興味深く, これらのデータは今後プリオン蛋白が原因と

なって起こる疾患の遺伝子レベルからのアプローチなどに有用であろうと考えられた。

考 察

インセパックを用いたゲノムDNAの回収では大量のDNAの抽出は困難であったが, 方法が容易であり特殊な器具や器材が必要でないこと, 近年PCRによるDNA多型の検出が可能になり少量のゲノムDNAから多くのRFLPが検出可能になってきたことなどを考慮すると, 特殊な地域でのサンプル収集にきわめて有用であると考えられた。

またネパール人に関して行ったRFLP解析の結果から, 結論を出すにはまだ不十分であるがネパール人は明らかにコーカサス人種とは異なり, オリエンタルとの関係が深いことが明らかになった。しかしタイ人, 日本人よりはコーカサス人種に近い位置にいることは間違いないと考えられた。

今後もネパール人についての種々のRFLPのデータをさらに多くのサンプルから集めてゆく予定である。

謝 辞

本研究の実施に当たって, ご協力をいただいたネパール調査隊(代表: 緒方道彦九大教授; 1987年当時)の皆様, とくに検体採取, 保存に御尽力いただいた伊藤和枝助教授(中村学園大学), 上園慶子講師(九大健康科学センター)ならびにネパール・トリブバン大学医学部の共同研究者(代表: Prof. M. D. Upadhyay)の皆様へ深甚の謝意を表す。

本研究は昭和62年度ならびに63年度文部省科学研究費補助金(海外学術研究: 課題番号62041068, 63043055)の援助を受けて実施した『ネパールにおける高血圧発症要因の比較疫学的研究』(研究代表者: 緒方道彦)の一環として行われたもので, 1989年3月に出版された報告書にその一部を掲載している。

文 献

- 1) Doh-ura K., Tateishi, J., Sakaki, H., Kitamoto, T. and Sakaki, Y.: Pro→Leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163** (2): 974-979, 1989.
- 2) Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. and Prusiner, S. B.: Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature*, **338**, 342-345, 1989.

- 3) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., 1982. p. 383-389.
- 4) Ryan, J., Barker, P. E., Shimizu, K., Wigler, M. and Ruddle, F. H.: Chromosomal assignment of a family of human oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci., **80**: 4460-4463, 1983.
- 5) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, **230**: 1350-1354, 1985.
- 6) Shimizu, K.: Characteristics of β^A chromosome haplotypes in Japanese. Biochemical Genetics, **25**: 197-203, 1987.
- 7) Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B. H., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. and Weissmann, C.: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell, **40**: 735-746, 1985.
- 8) Wainscoat, J. S., Hill, A. V. S., Boyce, A. L., Hernandez, J. F. M., Thein, S. L., Old, J. M., Lynch, J. R., Falusi, A. G., Weatherall, D. u. and Clegg, J. B.: Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. Nature, **319**: 491-493, 1986.