

104. アマゾン先住民族ワオラニ族の遺伝的多様性と細菌叢から見る生活と文化

東京薬科大学 生命科学部 教授 細道 一善

概要

本研究は、エクアドル・アマゾン地域に居住する先住民族ワオラニ族を対象に、彼らの遺伝的背景および口腔内細菌叢の構成を明らかにすることを目的としたものである。言語や文化による研究では解明されていなかった彼らの起源や健康状態の特徴を、ゲノム解析および 16S rRNA 遺伝子を用いたマイクロバイーム解析を通じて総合的に理解することを目指した。

この目的を達成するため、122 名のワオラニ族の唾液 DNA に対して HLA 遺伝子のタイピングを実施するとともに、口腔内細菌叢に対して 16S rRNA 遺伝子によるマイクロバイーム解析を行った。また、多様性の解析に対しては t-SNE、UMAP などの次元削減解析を適用し、集団内の構造や他集団との関連性についても検討した。

その結果、HLA 遺伝子においては *HLA-A*、*-C*、*-B* の各遺伝子において極めて限られたアレルしか確認されず、ホモ接合の割合も高く、ワオラニ族の集団が遺伝的に均質で閉鎖的であることが示された。ゲノム次元削減解析からも、集団内の地域的多様性は乏しく、エクアドル国内他集団とは明確に区別される遺伝的特徴を持つことが示唆された。口腔内細菌叢の解析においては、*Neisseria* 属など特定の細菌群がワオラニ族に特有に多く存在しており、都市部住民とは異なる構成が明らかとなった。これらの結果から、生活様式や文化の違いが細菌叢構成に反映されている可能性が示された。

今後の課題としては、腸内細菌叢データの解析や、健康・疾患に関する臨床情報との統合解析が挙げられる。また、今回明らかになったワオラニ族の低い HLA 多様性が感染症などにどのように関与するかについても、引き続き検討する必要がある。さらに、この解析手法を他の先住民族集団に応用することで、ヒト集団における文化・環境・遺伝の関係性について、より普遍的な知見が得られると期待される。

本研究は、エクアドル政府とワオラニ族コミュニティとの協力のもと、現地大学との共同研究体制により実施された。今回の助成金により、貴重なサンプルの取得から解析実施に至るまで、機材整備およびシーケンス試薬の確保が可能となり、限られたリソースの中で高度な分子解析を実現することができた。国際共同研究を遂行するうえで不可欠な財政的基盤として、本助成は極めて重要な役割を果たした。

背景および目的

エクアドルは、コロンブス以前から存在する複数の先住民族と、ヨーロッパおよびアフリカからの移民により構成された、多様な人種・文化を有する国である。その中でもアマゾン地域に暮らす先住民族ワオラニ族は、文化・言語における研究はなされてきたが、その遺伝的起源については未解明な点が多い。ワオラニ族は主に猿肉を中心とした狩猟生活を営み、血縁を中心とした小規模な集団に分かれて生活しており、現代的な文明の影響をほとんど受けていない。

本研究で対象とする HLA とは、ヒトにおいて自己と非自己を認識し、免疫応答の入り口を担う分子であり、その遺伝子はヒトゲノムの中でも最も多様性に富む領域である。進化学的には、様々な抗原に対応するためにこの多様性が蓄積されてきたと考えられており、集団間で HLA アレル頻度およびハプロタイプ頻度に異なる特徴

が見られる。この背景には、現在の集団形成過程に至るまでの感染症との戦いや環境適応の歴史が刻まれているとされる。

一方、マイクロバイオーームとは、ヒトの体表面および内部に常在する微生物群集全体を指し、特に腸内や口腔内に存在する細菌叢は、宿主の代謝、免疫、神経活動など多様な生理機能に密接に関与していることが明らかとなっている。近年の研究では、食生活や生活環境の違いがマイクロバイオーームの構成に大きく影響し、その多様性や機能性にも顕著な違いが現れることが報告されている。これらの微生物群集は進化的にも宿主との共生関係を築いており、個体の健康や疾患の発症リスクにも影響を及ぼすため、マイクロバイオーームの解析は、生活様式や文化と生物学的特性との関連を明らかにする上で極めて有用な手段である。

本研究では、ワオラニ族の唾液を用いた遺伝子解析と細菌叢解析を通じて、彼らの遺伝的多様性とマイクロバイオーームの特徴を明らかにし、その生活様式や文化が生物学的特性にどのように影響しているかを解明することを目的とする。また、得られた HLA 遺伝子と細菌叢の多様性については機械学習を応用することで、言語・文化では明らかにできなかった起源や集団内構造の解明を試みるとともに、文明化による細菌叢の変化の理解を通じて、人類の健康・進化・多様性の理解に資する基礎情報を提供することを目指した。

方法

本研究では、ワオラニ族コミュニティの同意のもと、共同研究機関である Universidad San Francisco de Quito がサンプル採取を担当し、122 名から唾液サンプルを収集した。

HLA 遺伝子多様性の解析においては、唾液由来の DNA を使い、KAPA Hyper Plus Kit により断片化・修飾・インデックス付加を行ってライブラリーを作製した。続いて、xGen Custom Target Capture Probes により HLA 遺伝子群 (クラス I およびクラス II を含む 33 遺伝子) の全長をカバーするターゲット領域を濃縮した。ライブラリーは Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600 サイクル) を使用してペアエンドでシーケンスされ、得られたリードは GATK Best Practices に従って高品質なリファレンススペースのアラインメントとバリエーションコールを行った。HLA タイピングには、網羅性と精度を高めるために、Omixon HLA Explore、GenDX NGSengine、TypeStream Visual の 3 種の専用ツールを併用し、各アレルの同定およびハプロタイプ解析を実施した。

口腔内細菌叢の解析では、唾液から抽出した DNA に対して、細菌由来 16S rRNA 遺伝子の可変領域 (V 領域) をターゲットとした PCR 増幅を行い、Oxford Nanopore Technologies 社の MinION プラットフォームを用いて長鎖リードでシーケンスを実施した。ライブラリー作成には Native Barcoding Kit 96 V14 を使い、96 検体まで同時にバーコーディング処理を施した。得られたシーケンスデータは EPI2ME を利用して初期的な分類とフィルタリングを行い、さらに菌叢構成を比較するために QIIME2 によるタクソノミーアサイン、および LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) を用いた群間差の統計解析を実施した。

それぞれのデータについては、次元削減技術である t-SNE および UMAP を用いて視覚化を行い、HLA 遺伝子および細菌叢の多様性、集団内の構造、および他集団との関係性を可視化した。

結果および考察

本研究では、エクアドルのアマゾン地域に居住する先住民族ワオラニ族の HLA タイピングから遺伝的な多様性を明らかにし、ワオラニ族と都市部に暮らすエクアドル人を対象に口腔内細菌叢の比較解析を実施した。

ワオラニ族の HLA 遺伝子解析においては、*HLA-A*、*HLA-C* および *HLA-B* の各領域に対するタイピングを実施した結果、それぞれ 5 種類 (*HLA-A*)、6 種類 (*HLA-C*)、9 種類 (*HLA-B*) のアレルのみが検出された。これらのアレル数は他の人類集団と比較して極めて限定的である。また、ホモ接合体の割合も著しく高く、*HLA-A* においては 28 名、*HLA-C* においては 30 名、*HLA-B* においては 21 名がホモ接合を示し、その中でも 13 名は *HLA* の 3 座すべてにおいてホモ接合であった。特に注目すべき代表的な *HLA* ハプロタイプとして、A*02:11:01-C*04:01:01-B*48:02:01 (6.6%)、A*31:01:02-C*04:01:01-B*35:04:01 (2.5%)、A*02:01:01-C*01:02:01-B*15:04:01 (1.6%) が確認された。これらのハプロタイプが高頻度で存在することは、ワオラニ族が非常に狭い遺伝的プールの中で生活し、長期間にわたり集団の閉鎖性を維持してきた歴史を反映する結果と考えられる。

一方で、細菌叢の構成について、UMAP を用いた可視化解析から、両集団の細菌叢には明確な民族間クラスタリングは認められず、むしろ個人間のばらつきが顕著であることが判明した（図 1）。

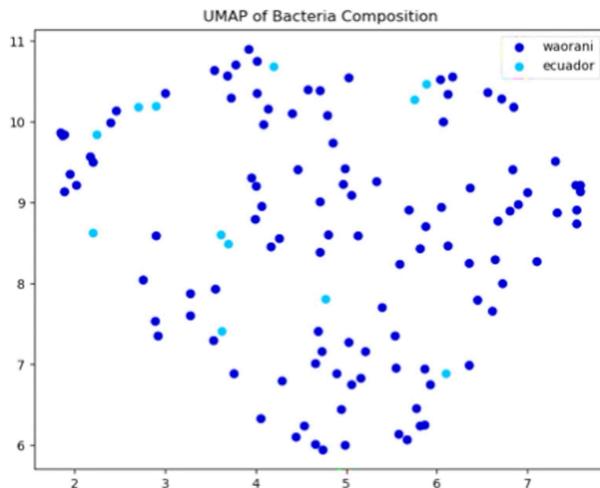


図 1. ワオラニ族と都市部エクアドル人の口腔内細菌叢間の近接性 (UMAP)

これにより、口腔内細菌叢は個体ごとの食習慣、衛生環境、遺伝的背景などの複合的な要因により形成されていることが予測された。さらに細菌叢の構成を詳細に調査したところ、高頻度で検出される細菌叢については、ワオラニ族と都市部エクアドル人の間で大きな差は認められなかった（図 2）。

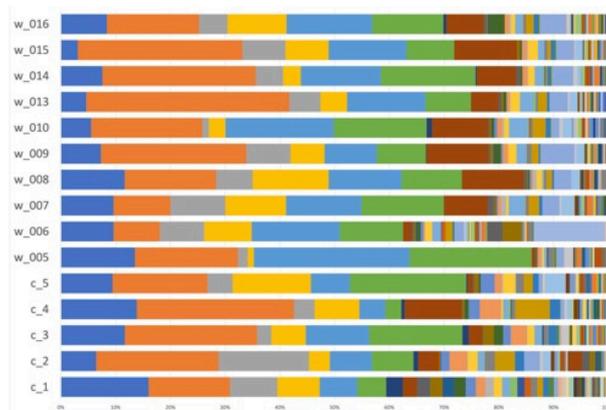


図 2. ワオラニ族と都市部エクアドル人の口腔内細菌組成
w: ワオラニ族 c: 都市部エクアドル人.

一方で、低頻度の細菌叢に関しては明らかな差異が観察され、LEfSe 解析を用いた統計的検定により、ワオラニ族において特徴的に豊富であることが示された菌属として、*Neisseria*、*Neisseriaceae*、*Burkholderiales*、*Camobacteriaceae*、*Flavobacteriaceae*、*Capnocytophaga*、*Moraxella*、*Sphingobacteriales*、*Lentimicrobium*、*Lentimicrobiaceae* が挙げられた（図 3）。

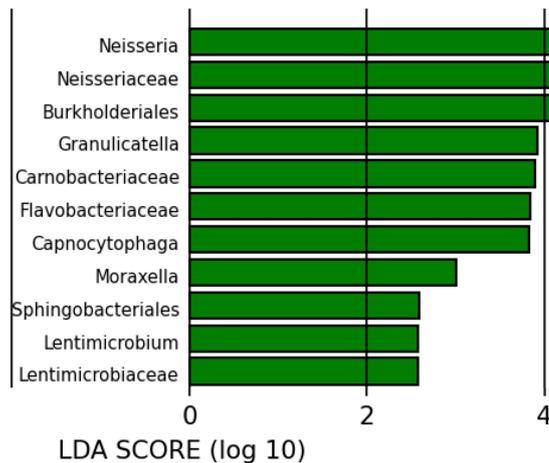


図3. LEfSeによってワオラニ族に特徴的に認められた細菌叢.

これらの細菌群は現代的な医療や歯科的ケアの影響を受けていない生活環境、すなわち自然環境との密接な関係を持つ生活様式と関連している可能性が高い。この結果から、文明化された都市部とは異なる原始的な生活環境が、特定の細菌属の定着・繁殖を促進している可能性が考えられ、衛生環境の差が口腔マイクロバイオームの構造に与える影響が明らかになった。

今回得られた HLA とマイクロバイオームの解析結果を総合的に考察すると、遺伝的には均質であるにもかかわらず、マイクロバイオームにおいては生活環境由来の多様性が保たれていることが示された。つまり、ヒト集団の遺伝的構成は限られていても、生活環境や食文化などの文化的側面はマイクロバイオームの多様性を担保する重要な因子であることを示唆している。今後の課題としては、さらに詳細な腸内細菌叢解析の実施や、疾患リスクおよび免疫応答との関連性を調査することにより、健康と疾患のメカニズム解明にも貢献できることが期待される。また、今回の研究成果は他の孤立集団や先住民族に対する比較解析にも応用可能であり、人類学および医学的視点から多角的な展開が期待される。

(完)

引用文献

- 1) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991 Jan;173(2):697-703.
- 2) Szoboszlay M, Schramm L, Pinzauti D, Scerri J, Sandionigi A, Biazzo M. Nanopore Is Preferable over Illumina for 16S Amplicon Sequencing of the Gut Microbiota When Species-Level Taxonomic Classification, Accurate Estimation of Richness, or Focus on Rare Taxa Is Required. *Microorganisms.* 2023 Mar 21;11(3):804.
- 3) Hosomichi K, Shiina T, Tajima A, Inoue I. The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *J Hum Genet.* 2015 Nov;60(11):665-73.
- 4) Hirata J, Hosomichi K, Sakaue S, Kanai M, Nakaoka H, Ishigaki K, Suzuki K, Akiyama M, Kishikawa T, Ogawa K, Masuda T, Yamamoto K, Hirata M, Matsuda K, Momozawa Y, Inoue I, Kubo M, Kamatani Y, Okada Y. Genetic and phenotypic landscape of the major histocompatibility complex region in the Japanese population. *Nat Genet.* 2019 Mar;51(3):470-480.