

平成 22 年 4 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18405034  
 研究課題名(和文) インドネシアが分子進化上の起源地と推測される東アジアの  
 イノシシ属の遺伝子調査  
 研究課題名(英文) Genetic Study on the Evolutional Origin of East-Asian  
*Sus scrofa* in Indonesia  
 研究代表者  
 石黒 直隆 (ISHIGURO NAOTAKA )  
 岐阜大学・応用生物科学部・教授  
 研究者番号：00109521

研究成果の概要(和文)：東アジアの家畜ブタおよび野生イノシシの起源地を求めて、インドネシアでの野生イノシシの遺伝的解析を行った。スマトラ島、ジャワ島、ロンボク島、シュラベシ島などから 223 頭の野生イノシシ資料を採取し、ミトコンドリア DNA のコントロール領域 574bp の塩基配列を決定して系統解析を行った。インドネシアの野生イノシシは、*Sus scrofa*, *Sus celebensis*, *Sus vurrucosus* と思われるクラスターに型別された。系統解析よりインドネシアは、東アジアに生息する野生イノシシの起源地と推測された。

研究成果の概要(英文)：To estimate the origin of Asian domestic and wild boar, genetic background of Indonesian wild boar is investigated. A total of 223 wild boar samples from several islands in Indonesia were collected and phylogenetically examined for 574bp DNA sequences of mitochondrial D-loop region. Indonesian wild boar was genetically classified into three *Sus* subspecies (*Sus scrofa*, *Sus celebensis* and *Sus vurrucosus*). The genetic study for four years indicates that Indonesian wild boar is phylogenetically located in the origin of Asian pigs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2007 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：イノシシ、ミトコンドリアDNA、分子進化、インドネシア、系統解析、  
 家畜化、起源

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本には九州、四国、本州にニホンイノシシが、琉球列島にはリュウキュウイノシシが生息する。リュウキュウイノシシはニホンイノシシに比べて体型的に小さく、遺伝的にも異なることから、東アジアのイノシシの遺存種とされてきた。石黒らは、リュウキュウイノシシの起源がベトナムの野生イノシシに近いことを偶然に発見し、リュウキュウイノシシの起源を求めて、2002年～2004年までベトナムの野生イノシシの遺伝的な調査を行った。その結果、日本、中国、台湾、韓国に生息するイノシシの多くは、ベトナムの野生イノシシに遺伝的に集約することを突き止めた。しかし、東アジア系のイノシシ属の起源地や家畜ブタの拡散と分布に関しては不明であった。

(2) 2005年3月、Larson らは Science 誌に「Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication」で、イノシシの起源地はインドネシアであることを報告した。

(3) Larson らの論文は、イノシシ属の起源がインドネシアであることを示したが、解析したサンプルの多くは、各国の博物館に所蔵されている剥製や標本から分離した DNA のデータであり、インドネシアに生息する野生イノシシの結果とするには疑問であった。

## 2. 研究の目的

(1) イノシシ属の起源地と家畜化に関して分子遺伝学的に明らかにすることを目的に本研究を企画した。特に東アジアのイノシシ属の起源はインドネシアの野生イノシシなのかをミトコンドリア DNA(mtDNA)の多型解析から解明する。人為的な影響の少ない古代イノシシの系統については、遺跡から出土した骨から古代 DNA を増幅して遺伝的に系統解析を行った。主な研究目的は以下の通りである。

(2) インドネシアの各島に生息する野生イノシシの遺伝的背景と形態的特徴を解析する。

(3) インドネシアの地理的特徴を考慮しながら生物地理学的観点から、イノシシの分子進化と起源種の存在を確認する。

(4) 東アジア系とヨーロッパ系のイノシシ属の起源がインドネシアなのかを遺伝的に検証する。

(5) 各島で飼育されている家畜ブタの遺伝的特徴を解析して、家畜ブタの移入と家畜化の系譜について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) インドネシアの多くの島には今でも野生イノシシが生息し多様性に富んだ形質を有している。野生イノシシの遺伝子調査も、歴史的に、また生物地理学的に異なる8島（スマトラ島、ジャワ島、ロンボク島、スンバワ島、フローレス島、ティモール島、シュラベシ島、パポアニューギニア島）を選定し4年間調査を実施した。野生イノシシの捕獲に関しては、現地ハンターが狩猟により捕獲した個体の肉片を用いて、総 DNA を分離・精製した。狩猟にて野生イノシシが捕獲できない場合は、現地にて標本化したイノシシ骨や博物館に収蔵されている考古資料からも骨粉を採取して残存遺伝子の分離・増幅を行った。インドネシアの野生イノシシ属には、ワシントン条約にて厳しく規制している動物種（例：バビルサ）が生息することから、試料の採取と解析には、現地の森林保安官の指導に従った。

(2) 学術調査地と研究分担：インドネシアの野生イノシシのサンプル採取地として、8島（スマトラ島、ジャワ島、ロンボク島、スンバワ島、フローレス島、ティモール島、シュラベシ島、パポアニューギニア島）を選定した。イノシシの形態的な計測は、本郷と佐々木が担当し、遺伝的な解析は、石黒と猪島が担当した。また、古代骨の計測や家畜化の文化史的研究は松井が担当した。

(3) インドネシアの共同研究者と試料の分析場所：インドネシア側の共同研究者としてボゴール農業大学の Dr. Srihadi Agungpriyono 博士とガジャマダ大学の Dr. Teguh Budipitojo 博士に依頼した。インドネシアの各地で採取したイノシシの血液や肉片からの総 DNA の分離はボゴール農業大学にて行った。

(4) 血液や肉片、および骨からの DNA の分離：採取後、凍結保管されていた血液や肉片からの DNA の分離は、QIAGEN の DNA 分離キットを用いて実施した。精製したイノシシの DNA は、ボゴール農業大学とガジャマダ大学に保管した。骨からの DNA の分離は、電気ドリルにて骨粉を採取して、解析まで冷凍保管した。

(5) mtDNA の解析と系統解析: イノシシ試料から分離した総 DNA から mtDNA の増幅と解析は、毎年、インドネシアから若手教員を岐阜大学に招聘し、DNA サンプルを持参する形で実施した。総 DNA から mtDNA の 574bp を PCR にて増幅後、mtDNA の塩基配列を決定した。その後、得られた mtDNA をこれまで解析し構築したイノシシ属の mtDNA データベースと比較し、系統解析 (近隣結合法、節約法など) を行った。

骨からの mtDNA の分離・増幅は、古 DNA 分析法に従って、脱灰後、骨粉中の蛋白を除いた後にセントリコン 30 にてサンプルを濃縮・精製して粗 DNA 液をえた。得られた粗 DNA 液から常法に従って mtDNA を増幅して解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 調査期間 4 年間 (2006 年~2009 年) の調査結果を記述する。

2006 年の調査結果: スマトラ島とジャワ島の野生イノシシより 43 サンプルを採取した。43 サンプルの mtDNA は 20 ハプロタイプに分類され、両島でのイノシシ属の遺伝的分布を明らかにした。

2007 年の調査結果: スマトラ島、ジャワ島、スンバワ島、ティモール島、フローレス島、ロンボク島から 82 サンプルを採取した。82 サンプルは 10 ハプロタイプに分類された。インドネシアの野生イノシシは多型性に富むと共にヒトの移動により島々に家畜ブタが持ち込まれていることが明らかとなった。

2008 年の調査結果: インドネシアの島の中で生物多様性に富むシュラベシ島を調査し、50 サンプルを採取した。50 サンプルの mtDNA は 19 のハプロタイプに分類された。スマトラ島やジャワ島に生息する *Sus scrofa* とは異なる *Sus celebensis* の形態的および遺伝的特徴を確認した。

2009 年の調査結果: 2008 年に引き続きシュラベシ島とパポアニューギニア島を調査し、48 サンプルを採取した。48 サンプルは 27 の mtDNA ハプロタイプに分類された。

(2) インドネシアにおける野生イノシシサンプル: 2006 年~2009 年の 4 年間に採取した野生イノシシと家畜ブタの 223 サンプルの採取場所を図 1 に示した。採取した 223 サンプルの採取地は、8 島 (スマトラ島、ジャワ島、ロンボク島、スンバワ島、フローレス島、ティモール島、シュラベシ島、パポアニューギニア島) である。



図 1 223 サンプルの採取地

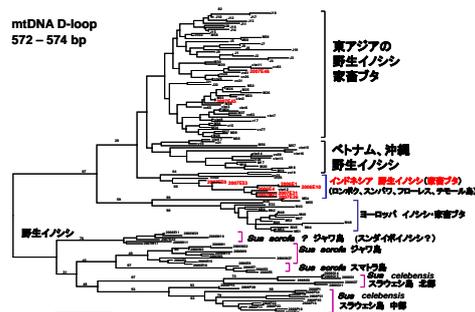
採取したサンプルの詳しい場所とサンプル数を表 1 にまとめた。ロンボク島由来の 48 サンプルとティモール島由来の 10 サンプルは家畜ブタ由来と考えられる以外は、すべて野生イノシシ由来のサンプルである。

表 1 223 サンプルの採取島とサンプル数

分離場所	サンプル数	サンプル名	
1 スマトラ島	Ache	2 E21-E22	
2	Bengkulu	10 E1-E10	
3	Jambi	1 W27	
4 ジャワ島	Bandung	6 E11, E17-E21	
5	Sumedang	5 E12-E16	
6	Garut	1 W17	
7	Cilacap	2 W18, W26	
8	Purwokerto	9 W11-W16, W19-W21	
9	Purbalingga	2 W3-W4	
10	Bandjonegara	8 W1-W2, W5-W9, W22	
11	Wonosobo	3 W23-W25	
12	Pacitan	1 W10	
13	ロンボク島	Lombok	48 E45-E46, E48-E52, E59-E68, N1-30
14	スンバワ島	Sumbawa	12 E24-E29, E47, E53-E57
15	フローレス島	Flores	5 E40-E44
16	ティモール島	Kusang	10 E30-E39
17	スラウェシ島	Paku	35 P1-P35
18	Gorontalo	15 G1-G15	
19	Kendari	19 K1-K19	
20	Makassar	5 S51-S55	
21	Manado	4 M1-M4	
22	ブトゥン島	Buton	16 B1-B16
23	ニューギニア島	Irian Jaya	4 I1-I4
合計		223	

(3) インドネシアの野生イノシシと家畜ブタの形態的な特徴と遺伝子型: インドネシアに生息する野生イノシシは、*Sus scrofa*, *Sus barbatus*, *Sus verrucosus*, *Sus celebensis* の 4 亜種である、中でも、*Sus scrofa* と *Sus verrucosus* はスマトラ島とジャワ島に生息するのが、*Sus barbatus* はカリマンタン島にのみ生息し、*Sus celebensis* はシュラベシ島にのみ生息する。形態的にも成獣では区別が可能であるが、幼獣や肉片等では区別が困難である。特に、*Sus scrofa* と *Sus verrucosus* が混在して生息する地域で採取したサンプルに関しては、遺伝的な解析が必要であった。遺伝的な解析では、4 年間に採取したイノシシ 223 サンプルについて mtDNA の D-loop 領域 (574bp) を増幅後、mtDNA の遺伝子配列を決定した。2006 年~2008 年に採取した 179 サンプルは、572bp の長さの配列と 573bp の配列に二分された。179 サンプルは 573bp の配列中 64 カ所で遺伝子多型を示した。573bp と 574bp のシュラベシ島由来のイノシシは 19 のハプロタイプに分類された。一方、mtDNA が 572bp と 573bp のイノシシは、スマトラ島、ジャワ島、ロンボク島、スンバワ島、フローレス島、ティモール島に由来した。ヨーロッパおよびアジアの家畜ブタや野生イノシシの mtDNA と比較した系統樹を図 2 に示した。

図 2. インドネシアのイノシシ属の遺伝子系統樹 近隣結合法 (572~574bp)



ロンボク島、スンバワ島、フローレス島、ティモール島より分離したイノシシは、すべて東アジアの家畜ブタおよび野生イノシシのグループに属したことから、これらのイノシシは、*Sus scrofa* であり、ヒトの移動によりアジア大陸から移入された可能性が高い。スマトラ島とジャワ島由来の *Sus scrofa* は系統樹上で二分されたことから、島により遺伝的な多様性を反映した結果と考えられる。また、ジャワ島由来のサンプルの中でも2群に分類されることから、ジャワ島には *Sus scrofa* と *Sus verrucosus* が共存していることが明らかとなった。シュラベシ島の野生イノシシ *Sus celebensis* は北部と中部の採取地により遺伝的に大きくことなることから、シュラベシ島内でも地方集団間での遺伝的な交雑は少ないものと考えられた。

2009年にシュラベシ島とパポアニューギニアにて採取した48サンプル(27ハプロタイプ)は、573bp、574bp、575bpの長さを示し、シュラベシ島の中部と南部でも大きな違いを示した。4年間の結果から、シュラベシ島に生息する *Sus celebensis* は、*Sus scrofa* や *Sus verrucosus* に比べて遺伝的には多様性に富み、シュラベシ島の地域により固有な集団を形成していることが明らかとなった。

(4) インドネシアが東アジアやヨーロッパイノシシの起源地としての考察：mtDNAの遺伝的な多様性を見る限り、インドネシアに生息する野生イノシシは、イノシシ属の祖先であると考えられる。また、そのことは、mtDNAの系統樹からも容易に推測される。本調査研究からアジアからヨーロッパ、そしてアフリカに広く生息する *Sus scrofa* の起源地はインドネシアであると強く推測される。

(5) ヒトの移動と *Sus scrofa* の生息分布：インドネシアの生物相は、フローレスラインにより大きく東西に二分される。つまり、バリ島とロンボク島とでは生物相が異なり、野生イノシシにおいてもシュラベシ島の *Sus celebensis* と *Sus scrofa* とでは遺伝的に異なる。しかし、ロンボク島の東に位置するスンバワ島、ティモール島、フローレス島で *Sus scrofa* が検出されたことは、ヒトの移動により島に移入されて野生化した可能性が高い。特にmtDNAの遺伝的解析から東アジアの大陸系の特徴を示していることから、ヒトによる移入の可能性は高いものと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① 石黒直隆、イノシシ、ブタの進化について、

て、LABIO 21、査読無 2009、16-20

- ② Ishiguro, N., Inoshima, Y. and Shigehara, N.: Mitochondrial DNA analysis of the Japanese wolf (*Canis lupus hodophilax* Temminck, 1839) and comparison with representative wolf and domestic dog haplotypes. Zoological Science, 26: 765-770, 2009. 査読有
- ③ Ishiguro, N., Inoshima, Y., Suzuki, K., Miyoshi, T., and Tanaka, T.: Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into wild boar populations. Mammal study 33: 43-49, 2008. 査読有
- ④ Ishiguro, N., Sasaki, M., Iwasa, M., Shigehara, N., Hongo, H., Anezaki, T., Long, V.T., Lan D.T.B. and Long, P.T.: mtDNA variation in Vietnamese pigs, with particular emphasis on the genetic relationship between wild boars from Vietnam and the Ryukyu Islands. Mammal study 33: 51-58, 2008. 査読有
- ⑤ Ishiguro, N., Sasaki, M., Iwasa, M., Shigehara, N., Hongo, H., Anezaki, T., Long, V.T., Hao, P.X., Trach, H.X., Nam, N.H. and Thanh, V.N.: Morphological and genetic analysis of Vietnamese *Sus scrofa* bones for evidence of pig domestication. Animal Science Journal 79: 655-664, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 石黒直隆、猪島康雄、家畜ブタを含むイノシシ属の系統とその起源、日本獣医学会、2009年9月25日、鳥取県とりぎん文化会館
- ② Wahono Esthi Prasetyaningtyas, Woro Danur Wendo, Nicholory Yosephin Paula, Teguh Budipitojo, Ita Djuwita, Srihadi Agungpriyono, Yasuo Inoshima, Naotaka Ishiguro: Mitochondrial DNA variation of Indonesia wild boar. Joint Meeting of the 3<sup>rd</sup> International Meeting on Asian Zoo/Wildlife Medicine and Conservation (AZWMC 2008) 19-20 August 2008 Indonesia.

[図書] (計1件)

- ① 石黒直隆、食糧の獲得と生産「DNA分析による弥生ブタ問題」、同成社、2009、106-116.

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naishigu/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石黒 直隆 (ISHIGURO NAOTAKA)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00109521

### (2) 研究分担者

猪島 康雄 (INOSHIMA YASUO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20355184

### (3) 連携研究者

松井 章 (MATSUI AKIRA)

独立行政法人文化財研究所奈良文化財研

究所・埋蔵文化センター・研究員

研究者番号：20157225

本郷 一美 (HONGO HITOMI)

総合大学院大学・葉山高等研究センター・

准教授

研究者番号：20303919

佐々木 基樹 (SASAKI MOTOKI)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：50332482