

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570226

研究課題名(和文) 飼育下マカク集団の遺伝的多様性の変化と近親交配の影響に関する研究

研究課題名(英文) Study on change in genetic diversity and effect of inbreeding in captive breeding colonies of macaques

研究代表者

田中 洋之(TANAKA HIROYUKI)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：20335243

研究成果の概要(和文)：京都大学霊長類研究所では、実験に用いるマカクザルを自家繁殖させている。設立から30余年経過したニホンザルおよびアカゲザルの繁殖コロニーの遺伝的变化を、マイクロサテライトDNAを分子遺伝マーカーとして用いて調査した。初期の集団から現在までに、徐々に遺伝的多様性が低下し、血縁度が上昇していることが明らかになった。しかし、依然としてニホンザル野生群と同等の遺伝的多様性を保持していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Primate research Institute, Kyoto University maintains breeding colonies of Japanese (*Macaca fuscata*) and rhesus (*M. mulatta*) macaques for biological research. We investigated genetic change of these colonies with more than 30-years history since their establishment by means of microsatellite DNA markers. From early stage to the present, genetic diversity has gradually declined and relatedness has slightly increased, although the colonies still keep genetic diversity comparable to wild troops of Japanese macaques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：霊長類、ニホンザル、アカゲザル、遺伝的多様性、近親交配

## 1. 研究開始当初の背景

分子標識の利用により野生動物集団においても血縁関係の推定が可能になったため、野生動物での近親交配の検出とその影響を調べた研究が徐々に増えてきた。しかし、野生の霊長類においては、長い寿命や生活史の観点から、こうした研究を行うのは困難であった。実験用個体の自家繁殖のためにつくられた京都大学霊長類研究所のマカクザル繁殖コロニーでは、ニホンザルやアカゲザルが、

数十頭からなる複雄複雌の群れで飼育されている。この繁殖集団は、長期にわたって母子関係の記録や血液試料が蓄積されていることから、遺伝的多様性や血縁度の変化と繁殖との関係を調べるのに好都合な材料であると考えられた。また、飼育下の動物集団の長期にわたる遺伝的变化についての資料は、まだないため、本研究が、研究機関や動物園等の飼育下の動物個体群の遺伝管理法の確立に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、集団形成後 30 余年の歴史をもつマカクザル（ニホンザルとアカゲザル）の繁殖コロニーにおいて、遺伝的多様性および集団の近交係数の経時的变化を明らかにし、毎年の出産数などの飼育記録から、遺伝的多様性と近親交配の影響との関連を調査することを目的とした。そのために次のような研究計画を立てた。ニホンザル野生群との比較ならびに他国の繁殖コロニー集団との比較を通じて、当研究所の飼育下マカクザル集団の遺伝的特徴を明確にし、長期にわたる閉鎖集団の遺伝的变化を調査する。さらに、閉鎖集団に近い環境に生息する宮崎県幸島の野生ニホンザル集団の遺伝的多様性を調査し、飼育下マカクザル集団との比較により、遺伝的特徴を近親交配の観点から分析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 霊長類研究所の飼育下マカクザル繁殖集団の遺伝的多様性の解明

当研究所のマカクザル繁殖集団は、設立されて以来 30 余年経過しているが、その間に遺伝的多様性や集団の近交係数の経時的变化に関する調査は行われてこなかった。まず、これらの繁殖集団について、現在の遺伝的多様性の特性を明らかにする目的で、マイクロサテライト DNA を遺伝マーカーとして、遺伝的多様性の定量ならびに集団遺伝学的解析を行った。

2007 年度定期検診時のニホンザル高浜群（個体数  $n=51$ ）、嵐山群（ $n=41$ ）、若桜 A 群（ $n=26$ ）、若桜 B 群（ $n=38$ ）、アカゲザルインド群（ $n=48$ ）および中国群（ $n=47$ ）を対象にして、ヒトマイクロサテライトのホモログ 15 遺伝子座の遺伝子型判定を行った。異なる蛍光標識を付したプライマーを用いて、マルチプレックス PCR 法により、一度に 2-3 種類のマイクロサテライトを増幅した後、ジェネティックアナライザー 3100 とソフトウェア GeneScan および Genotyper により、フラグメント解析を行った。遺伝子座ごとに遺伝的多様性のパラメーターを算出した後、各集団について平均ヘテロ接合率 ( $H_e$ ) を計算した。群間の遺伝的分化量を  $F_{st}$  および  $N_{ei}$  の遺伝距離によって測定した。

### (2) 飼育下アカゲザルの遺伝的多様性の特徴

野生のアカゲザルは、その広い分布域ゆえに遺伝的にも多様であることが知られている。こうした遺伝的多様性は、マカクザル繁殖コロニーにも存在すると考えられる。この研究では、当研究所のアカゲザルコロニーについて、繁殖集団設立時の基礎集団に関する遺伝的特徴と、米国アカゲザルコロニーとの

比較を通して、現在の集団の遺伝的多様性に関する特徴を明らかにすることを目的に、次のように研究をおこなった。

2007 年度に採材したインド群（ $n=48$ ）および中国群（ $n=47$ ）を分析対象とし、まず、ミトコンドリア DNA D-loop 内の HSV1 領域の塩基配列の分析を行った。Smith & McDonough (2005) のプライマー及び PCR 条件を用いて、HSV1 領域 約 800bp を増幅し、塩基配列決定を行った。BLAST により、当研究所のアカゲザルで見いだされた HSV1 配列に近縁な塩基配列を検索し、その塩基配列をもつ個体の出身地域を調べた。次に、マイクロサテライト DNA 多型の分析を行った。Kanthaswamy ら (2006) は、米国のアカゲザルコロニーの遺伝的多様性を調査、有用な 15 種類のマイクロサテライトを標準マーカーセットとして提唱した。そこで、これまで分析したマイクロサテライトとともに、標準マーカーセットを分析し、マーカーセットによる遺伝的多様性の定量への影響の検討と、米国アカゲザルコロニーとの多様性の比較を行った。

### (3) マカクザルコロニーにおける Y 染色体上マイクロサテライトの利用可能性

研究分担者の川本らは、Y 染色体上のマイクロサテライト多型をニホンザルと近縁種において調査し、3 個の多型遺伝子座を見いだした (Kawamoto et al. 2008a; 2008b)。Y 染色体は組み替えが起こらないため、3 遺伝子座でみつかると対立遺伝子の組み合わせによって、Y 染色体の詳細な分類が可能である。また、Y 染色体は父親から息子へ遺伝することから、閉鎖集団であるマカクザルコロニーでは、オス個体の父親を直接判定できる可能性がある。本研究では、アカゲザルインド群および中国群を対象に、Kawamoto ら (2008a; 2008b) の方法に従って、Y 染色体上のマイクロサテライト 3 遺伝子座の多型調査を行った。

当研究所のインド群および中国群に 2003 年から 2008 年の間に在籍していたオス個体それぞれ 32 頭を分析対象とした。Y 染色体上のマイクロサテライト 3 遺伝子座 (DYS472、DYS569、および DYS645) をマルチプレックス法によって、同時に PCR 増幅した。Applied Biosystems 社の Genetic Analyzer 3100 と同社のソフトウェア GeneScan および Genotyper を用いて、PCR 産物のフラグメント解析を行った。

### (4) マカクザルコロニーにおける遺伝的多様性の経時的变化

マカクザル (*Macaca* 属) の多くは、メスが自分の生まれた群れに生涯とどまるのに対して、オスは性成熟前後にその群れを離れるという、雌雄で異なる生活史を持つ。野生のマカクでは、オス個体の他の群れへの移入が、

遺伝的多様性の低下を防ぐ役割を担っている。霊長類研究所のマカクザル繁殖コロニーは、設立以来 30 余年、新たな個体を導入することなく閉鎖集団として維持されてきた。これまでの研究から、現在のマカクザルコロニーが比較的高い遺伝的多様性を保持していることが明らかとなったが、繁殖集団設立から遺伝的多様性はどのように変化したのか、明らかにする必要がある。こうした飼育下の動物の遺伝的多様性の経時変化に関する研究例はないため、当研究所のマカクザルコロニーが有用な情報を提供すると考えられる。本研究では、アカゲザル中国群について 1984 年から 2011 年まで、ニホンザル高浜群については 2001 年から 2011 年まで、遺伝的多様性の経時変化を調査した。

アカゲザル中国群については、1984 年から 2011 年まで(定期検診が行われなかった 1985、1988、1991、1994、2010 年を除く)、ニホンザル高浜群については 2001 年から 2011 年まで(2010 年を除く)の期間に、それぞれの群れに在籍したほぼ全ての個体について、マイクロサテライト 22 遺伝子座の遺伝子型判定を行った。それぞれの種について、遺伝子型判定が困難であった遺伝子座、または多型的でなかった遺伝子座を除いた 21 座位を用いて、遺伝的多様性の指標を計算した。また、集団の平均血縁度 (Queller & Goodnight (1989) の Relatedness を用いた)、集団間の遺伝距離および遺伝的分化量を、調査対象期間の最初の年とそれ以降の年の群れ間で求めた。

#### (5) ニホンザル幸島群の遺伝的多様性

飼育個体群との比較のため、野生ニホンザル個体群が保有する遺伝子多様性を調査した。対象は、①宮崎県串間市の幸島個体群(一群の部分調査 48 個体)、②宮崎県の九州本島に生息する野生個体(県内各所由来の 220 個体)、③滋賀県大津市の野生群(一群の全数調査 39 個体)の 3 個体群である。常染色体上のマイクロサテライト DNA 合計 20 座位を分析し、対立遺伝子数、ヘテロ接合率期待値を調べ、座位平均値を個体群の遺伝子多様性の指標とした。

## 4. 研究成果

### (1) 霊長類研究所の飼育下マカクザル繁殖集団の遺伝的多様性の解明

遺伝的多様性の指標とした 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数およびヘテロ接合率は、ニホンザルにおいて 3~14 個および 0.534~0.869、アカゲザルにおいて 4~12 個および 0.477~0.855 であった。各集団の  $H_e$  は、ニホンザルにおいて 0.598~0.657、アカゲザルにおいて 0.606 および 0.706 であった。同様

のマイクロサテライトのマーカーセットを用いた庄武・山根 (2002) の調査結果と比較したところ、当研究所のニホンザルおよびアカゲザルの各群は、ニホンザル野生群(日光群、波勝群、椿群など、0.559~0.646)と同等の遺伝的多様性を保持していることが明らかとなった。遺伝的分化の調査から、ニホンザル高浜群が他の群から分化している傾向が認められ、その大きさは、当研究所のアカゲザル 2 群間の分化量よりも大きかった。実験用個体の間引きなど、群れの性比や年齢構成の計画的な調整が、閉鎖集団において比較的高い遺伝的多様性を保持した要因のひとつになっていると考えられる。

### (2) 飼育下アカゲザルの遺伝的多様性の特徴

9 母系列からなるインド群からは 7 種類の HVS1 タイプが、7 母系列からなる中国群からは 3 種類のタイプが見いだされた(図 1)。BLAST による検索結果から、インド群の HVS1 タイプのうち、4 種類がハプログループ Ind1 に属するもの、1 種類が Ind2、もう 1 種類が Burm に近縁であることがわかった。残りの 1 種は、他の 6 種類から約 10% の違いをもつタイプであった。中国群で見つかった 3 種類のうち 2 種類が ChiE のタイプ、1 種類が ChiW2 に近縁であった。以上のことから、原産国内の異なる地域出身のアカゲザルがブレンドされ基礎個体となって、当研究所の繁殖集団が作られたことが示唆された。

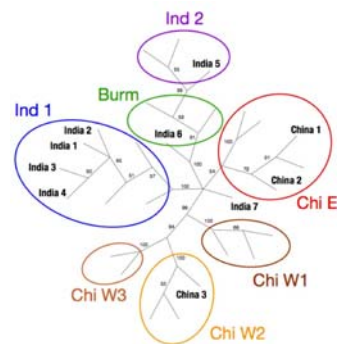


図 1 アカゲザルのミトコンドリア HVS1 塩基配列の系統関係

一方、マイクロサテライトの分析では、これまで用いてきたマーカーセットと Kanthaswamy ら(2006)のマーカーセットとの間に、定量された遺伝的多様性は大きく違わないこと、および、当研究所のアカゲザルコロニーの遺伝的多様性(インド群約 60%、中国群約 70%)が合衆国のコロニー(平均で約 75%)より、やや低くなっていることがわかった(図 2)。

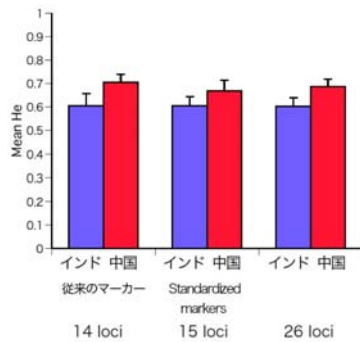


図2 霊長類研究所アカゲザルコロニーの遺伝的多様性

### (3) マカクザルコロニーにおける Y 染色体上マイクロサテライトの利用可能性

インド群においては、3 個の遺伝子座全てで 1 種類の対立遺伝子 (DYS472/ DYS569/ DYS645 : 99/247/293) しか見いだせなかった。すなわち、インド群の Y 染色体ハプロタイプは既に固定していることが明らかとなった。中国群においては、DYS472、DYS569、および DYS645 について、それぞれ 2、3、2 個の対立遺伝子が見つかり、Y 染色体ハプロタイプとしては、3 種類 (タイプ A: 108/ 274/ 275、B: 108/ 278/ 300、および C: 123/ 282/ 275) に分類できた。しかしながら、3 種類のハプロタイプが見いだされるのは 2005 年までであり、その後 2 種類に減った。2008 年の群れには、タイプ C を持つコドモが 2 頭いたが、それ以外はタイプ A であった。そのコドモが、アダルトになって息子を残さなければ、中国群からタイプ C は消失する。本研究から、閉鎖集団における Y 染色体の多型性は、短期間で急速に失われていく可能性が示唆された。

### (4) マカクザルコロニーにおける遺伝的多様性の経時的変化

アカゲザル中国群およびニホンザル高浜群ともに、遺伝的多様性は、調査対象期間中に徐々に低下していく傾向がみとめられた。1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数ならびに遺伝子多様度は、中国群において、1984 年にそれぞれ 7.6 個/座、 $0.73 \pm 0.03$  であったものが、2011 年には、6.2 個/座、 $0.68 \pm 0.03$  へ減少した。高浜群においても同様に、2001 年にそれぞれ 5.6 個/座、 $0.63 \pm 0.04$  であったものが、2011 年には、4.8 個/座、 $0.60 \pm 0.04$  へ減少した。集団の平均血縁度は、中国群で 1984 年の  $-0.020$  に対して 2011 年は  $0.053$  となり、若干の上昇が認められた。高浜群でも同様であった (2001 年  $-0.015$  に対して、2011 年  $0.046$ )。遺伝距離および遺伝的分化量の調査では、調査対象期間の初期集団の遺伝的構成が、経時的に徐々に変化していったこと

が明らかとなった。今回行った遺伝的多様性の経時的変化の調査は、関連する分野において初めての研究例であるとともに、飼育下動物集団の遺伝管理に重要な情報を与えることになると考えられる。

### (5) ニホンザル幸島群の遺伝的多様性

推定結果は、対立遺伝子数で① $5.5 \pm 1.8$  (平均値±標準偏差)、② $10.2 \pm 5.9$ 、③ $7.6 \pm 2.6$ 、ヘテロ接合率で① $0.675 \pm 0.112$ 、② $0.772 \pm 0.127$ 、③ $0.733 \pm 0.112$  となり、いずれの指標でも①<③<②の関係を示した。検定により、対立遺伝子数で①は②と③より低い、ヘテロ接合率で①は②より低いと判定された。試料数の違いを考慮する必要があるが、幸島個体群の遺伝子多様性が他所より有意に低いことが判明した。

幸島個体群は島嶼に孤立し、以前は季節的な砂州形成で九州本島とオスを介した若干の交流があったが、近年は完全に孤立した閉鎖個体群である。従って、低い遺伝子多様性は個体群の繁殖サイズが小さいことを反映した結果と考えられる。一方、九州本島の宮崎県では野生群の分布が連続的である。幸島より遺伝子多様性が高いことは、繁殖サイズが大きいことを反映した結果だと解釈できる。滋賀県の調査個体群は、中間的な遺伝子多様性を示した。調査の対象が一群だけでもかわらず、幸島より高い遺伝子多様性が観察された原因には、周辺群との遺伝的交流が考えられる。実際、滋賀県の分布調査では、調査群に隣接する野生群が確認されており、全県に及ぶ群れの分布連続性が認められている。従って、調査群は繁殖に関して開放されているため、孤立する幸島個体群より高い遺伝子多様性を示したと考えられる。

## 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 1 件)

- ① 田中洋之 (2010) 飼育下サル の 遺 伝 的 多 様 性 と 遺 伝 管 理. 京 都 大 学 グ ロ ー バ ル C O E プ ロ グ ラ ム 生 物 の 多 様 性 と 進 化 研 究 の た め の 拠 点 形 成 - ゲ ノ ム か ら 生 態 系 ま で - ( 編 ) 「生き物たちのつづれ織り」第 3 巻 Pp. 31-35. (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tanaka H, Morimoto M, Kamanaka Y, Matsubayashi K, Kawamoto S, Kawamoto Y (2010) Characterization of genetic diversity and structure of captive colonies of macaques. International Primatological Society XXIII Congress

Kyoto 2010 (2010/09/ 12-18, Kyoto).

- ② Kawamoto Y et al. (2010) Genetic characterization of social group of Japanese macaques (*Macaca fuscata*): inference from analysis of on all members of single group with microsatellite markers. Quest for Coexistence with Non-human Primates. ASIAN-HOPE 2010 IPS Pre-congress Symposium and Workshop in Inuyama (2010/9/6-10, Inuyama).
- ③ 田中洋之, 森本真弓, 釜中慶朗, 松林清明, 川本咲江, 川本芳 (2009) 飼育下アカゲザル集団の遺伝的多様性. 第25回日本霊長類学会大会 (2009/07/20, 各務原市).
- ④ 田中洋之, 森本真弓, 釜中慶朗, 松林清明, 川本咲江, 川本芳 (2008) 飼育下マカク集団の遺伝的多様性. 第24回日本霊長類学会大会 (2008/07, 東京)

[図書] (計2件)

- ① 田中洋之 (2009) 種の違いを見分けるにはどうするの? 京都大学霊長類研究所 (編著)「新しい霊長類学」講談社、Pp. 304-309.
- ② 田中洋之 (2009) チンパンジー、ゴリラ、オランウータンどれがヒトに最も近い? 京都大学霊長類研究所 (編著)「新しい霊長類学」講談社、Pp. 309-312.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 洋之 (TANAKA HIROYUKI)  
京都大学・霊長類研究所・助教  
研究者番号: 2 0 3 3 5 2 4 3

### (2) 研究分担者

川本 芳 (KAWAMOTO YOSHI)  
京都大学・霊長類研究所・准教授  
研究者番号: 0 0 1 7 7 7 5 0

### (3) 研究協力者

川本 咲江 (KAWAMOTO SAKIE)  
京都大学・霊長類研究所・技能補佐  
樋口 翔子 (HIGUCHI SHOKO)  
京都大学・霊長類研究所・技術補佐  
森本 真弓 (MORIMOTO MAYUMI)  
京都大学・霊長類研究所・技術職員