

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K01104

研究課題名(和文) 絶滅したニホンオオカミの遺伝的変遷と移動を探る動物考古学的研究

研究課題名(英文) Zooarchaeological analysis of Japanese wolves to examine the origin and distribution of their populations

研究代表者

石黒 直隆 (Ishiguro, Naotaka)

総合研究大学院大学・統合進化科学研究センター・客員研究員

研究者番号：00109521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅したニホンオオカミは謎の多い動物である。長年、ニホンオオカミは日本の固有種とされてきたが、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の解析によりニホンオオカミはタイリクオオカミの一亜種とされた。ニホンオオカミはmtDNAの解析からグループAとBに分かれたが、ニホンオオカミの起源や変遷は不明である。本研究では、古い時代の骨資料を解析することによりニホンオオカミの変遷や拡散を明らかにしようとした。解析の結果、縄文時代のニホンオオカミはすべてグループAであり、系統解析からグループBはその後一部の集団から派生した可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絶滅したニホンオオカミは謎の多い動物である。mtDNAの遺伝的解析からニホンオオカミはタイリクオオカミの一亜種であり、遺伝的に大きく2群(グループAとグループB)に分かれた。縄文時代の古い骨資料の解析からグループBはグループAの一部の集団から派生したことが本研究で明らかとなった。さらに古い骨資料を解析することにより、ニホンオオカミの起源や変遷が明らかになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The extinct Japanese wolves (*Canis lupus hodophilax*, Temminck, 1839) have many mysterious stories. The Japanese wolves have been understood as a distinct wolf species in Japan, since Temminck first described. The Japanese wolves were characterized by mitochondrial DNA (mtDNA) analysis recently and recognized an extinct subspecies of gray wolf. Based on the mtDNA sequences analyzed, the Japanese wolf populations could be classified into two groups group A and group B, which contain or lack an 8-bp insertion/deletion, respectively. To determine the origin and distribution of the Japanese wolves, mtDNA genome of archaeological specimens in the Jomon period are examined; all 4 specimens were classified into the group A. The phylogenetic analyses of mtDNA genomes of the Japanese wolves (groups A and B) with several grey wolves revealed that the group B lineage might to be divided from a part of group A lineage wolves.

研究分野：動物考古学

キーワード：ニホンオオカミ イヌ ミトコンドリア DNA 系統解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 絶滅したニホンオオカミについて

ニホンオオカミ(*Canis lupus hodophilax*, Temminck 1839)は本州、九州、四国に棲息していたが、1905年(明治38年)奈良県東吉野村鷲家口で捕獲された個体を最後に絶滅したとされる。ニホンオオカミの剥製標本は、国内に3体(国立科学博物館、東京大学農学部、和歌山県立博物館)と海外に1体(オランダ・ライデン自然史博物館)があるが、現存する骨資料も少なく遺伝的な解析が遅れていた。

#### (2) ニホンオオカミの標本と命名の謎

ニホンオオカミのタイプ標本(ライデン自然史博物館に保管)は、ドイツ人医師シーボルトが蒐集しオランダに送ったもので、当時のライデン博物館館長 Temminck が送られてきた標本を一括して *Canis hodophilax* (固有種名)と命名した。この学名が長年にわたり「ニホンオオカミは日本の固有種であるのでは?」という分類学上の謎となり、日本の動物史上最大のミステリーとなっていた。

#### (3) 民俗学からみたニホンオオカミの謎

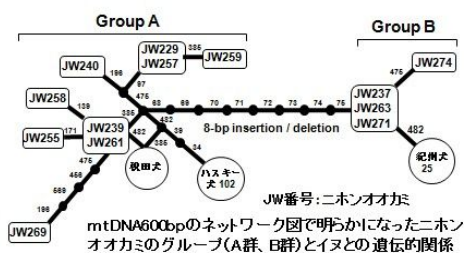
ニホンオオカミに関する謎をさらに複雑にしたのが呼び名である。ニホンオオカミは昔から「オオカミ」、「オイヌ」、「ヤマイヌ」、「オカメ」など地域によってはいろいろな名前と呼ばれていた。特に、江戸時代に本草学(小野蘭山の「本草綱目啓蒙」に代表されるように中国の薬物学で、「狼」をオオカミとし「豺」をヤマイヌとして区別した)の影響を受けて書物上では区別したこともあり、オオカミとヤマイヌを異なる動物として認識する傾向があった。江戸時代末期に出島に滞在したシーボルトも「オオカミ」と「ヤマイヌ」を別な動物と認識し、出島で飼育した後オランダに送っている。

#### (4) ニホンオオカミの形態的解析と遺伝的研究の経緯

ニホンオオカミは Temminck により *Canis hodophilax* と命名後、国内の研究者により形態的解析がなされている。今泉吉典(哺乳類学雑誌, 5: 27-32, 1970)はニホンオオカミの骨の形態的計測から、ニホンオオカミはタイリクオオカミの亜種ではなく、日本の固有種としての *Canis hodophilax* の学名を支持しており、長年この説が支持されてきた。一方、石黒ら(Zool. Sci. 26: 765-770, 2009)は骨からDNAを分離してニホンオオカミの系統を遺伝学的に初めて解析し、ニホンオオカミは日本の固有種ではなく、タイリクオオカミの一亜種であると報告した。その後、石黒らは日本の各地の博物館や埋蔵文化財センターに保管されているニホンオオカミの骨を多く解析し、ニホンオオカミは古い時代に日本列島に渡来したタイリクオオカミの一亜種であることをミトコンドリアDNA(mtDNA)のゲノム解析から明らかにした(Mol. Phylogenet. Evol. 80: 105-112, 2014)。

#### (5) ニホンオオカミの起源や進化の系譜と新たな問題点

ニホンオオカミは古い時代に日本に渡来したタイリクオオカミの亜種であることが明らかになったものの、その起源や系譜、その進化については不明のままであった。石黒ら(Zool. Sci. 33: 44-49, 2016)はmtDNAゲノムの解析から、ニホンオオカミは大きく2群(8塩基を有するグループAと8塩基を欠失したグループB)に分かれることを明らかにした(右図)。ニホンオオカミのmtDNAゲノムの配列からニホンオオカミはタイリクオオカミの配列と大きく異なり日本に渡来後に大きく進化した可能性が高いことが推察された。また、グループAとグループBに大別される骨資料の分布域をみると、グループAは西日本に、グループBは関西から関東、東北に広く分布した。つまり、ニホンオオカミは進化しながら拡散した可能性が高い。しかし、これまで遺伝的に解析した骨資料は、多くが中世以降の資料であり、古い時代の資料については解析がなされていない。そこで、ニホンオオカミの系譜や進化を明らかにするためには、国内の古い時代(後期更新世~縄文・弥生)のニホンオオカミの骨資料の解析が必要と考えた。



### 2. 研究の目的

これまで mtDNA 分析したニホンオオカミの骨資料は中世以降が多く、古い時代の骨資料は少ない。その理由として、形態的にニホンオオカミと同定される骨資料が極端に少なく解析する骨資料が乏しいこと、骨資料からの DNA の分離が困難であったことがあげられる。本研究ではこれまでに報告された考古資料を詳細に調査し、形態的にオオカミと同定できる骨資料を縄文時

代に出土した考古資料から選別して解析した。特に以下の項目に研究の焦点を当てた。

- (1)ニホンオオカミの遺伝的変遷を明らかにする目的で、後期更新世から縄文時代早期～江戸時代に至るニホンオオカミの考古資料について解析を行った。ニホンオオカミの mtDNA を解析することにより時代と共にどのように DNA 配列が変化して進化したのか明らかにしようとした。
- (2)ニホンオオカミの骨資料の出土地域から、2つのグループ(AとB)の出現や移動などが明らかにならないか mtDNA の変異を注意深く解析した。
- (3)ニホンオオカミの mtDNA の解析ばかりではなく核ゲノムの解析も行い2つのグループ(AとB)の違いが核ゲノムからも明らかにならないか解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1)本研究で解析したオオカミの骨資料およびヤマイヌの骨資料

- ・後期更新世の骨資料：愛媛県大洲市埋蔵文化財センター保管、後期更新世のオオカミの左上第3切歯 歯根 OCM-2 資料番号 JW300
- ・縄文早期の骨資料：長野県北相木考古博物館保管、 栃原岩陰遺跡のオオカミの下顎右大臼歯(M1) 資料番号 JW298
- ・縄文時代の骨資料： 長野県坂城町文化センター保管、坂城町保地遺跡 II、左右下顎、資料番号 JW294, JW295
  - 茨城県 福田貝塚、 左下顎骨 資料番号 JW291
  - 鹿児島県 黒川洞穴、右下顎骨 資料番号 JW301
  - 鹿児島県 市来貝塚、 左下顎骨 資料番号 JW302
- ・江戸・明治の骨資料：豊橋市自然史博物館保管、頭骨と下顎、資料番号 JW296
- ・本研究で解析したヤマイヌの骨資料：江戸・明治の骨資料、大町市立山岳博物館保管、「ヤマイヌのキバ」(上顎先端部) 資料番号 JW297

#### (2)形態的計測

基本的にはオオカミあるいはニホンオオカミと同定できるものについて頭蓋骨、下顎骨および歯について調査した。頭蓋骨は、最大頭骨長、基底最大長、頬骨幅、吻幅で、上顎は第4前臼歯や下顎第一臼歯であり、これまで報告されている計測値を参考とした。

#### (3) DNA 解析用の資料の採取

骨資料から歯が遊離できるものについては歯根のセメント質から残存遺伝子を抽出した。骨からの場合は基本的には骨粉を採取して行った。また、鼻腔内に腹鼻甲介が残る場合は、資料をできるだけ傷つけることなく腹鼻甲介から DNA を分離した。

#### (4) mtDNA の解析と系統解析

歯からの DNA の分離は歯根部を次亜塩素酸ナトリウムとアルコールにて洗浄後、UV を照射して表面上の汚染物を除去後、プロテナー K の抽出液に一夜つけることにより歯根のセメント質から DNA を分離した。分離した DNA は濃縮・洗浄後、通常の PCR を行い mtDNA の D-loop220bp を解析した。増幅した mtDNA からニホンオオカミの特徴を判別すると共に、8塩基の挿入/欠失の有無によりグループ A(挿入)とグループ B(欠失)に区別した。なお、通常の PCR で解析が難しい場合は、次世代シーケンサを用いて mtDNA ゲノムまで解析した。また骨粉からの DNA の分離は常法に従って残存 DNA を分離・精製した後、通常の PCR を行い解析した。通常の PCR で解析が難しい場合は、次世代シーケンサにて解析した。得られた mtDNA ゲノムは近隣結合法にて系統解析を行い、ニホンオオカミの資料間の系統関係を明らかにした。また、イヌや大陸オオカミとの遺伝的な関係についても解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)分析したオオカミやヤマイヌの骨資料からの mtDNA の解析結果

本研究ではオオカミの資料として後期更新世の資料1点、縄文早期～縄文晩期の資料6点、江戸・明治の資料1点を解析した。また、「ヤマイヌのキバ」とされてきた骨資料についても解析した。解析結果は以下の通りである。

JW300:愛媛県大洲市肱川町のカラ岩谷敷水層産とされる後期更新世のオオカミの第3切歯。切歯の歯根から DNA の抽出を行い、次世代シーケンサにて mtDNA ゲノムのわずかな部分の配列を得たが、ニホンオオカミとの関係については不明であった。

JW298:縄文早期の栃原岩陰遺跡から出土したオオカミの下顎第一臼歯。歯冠長は 28.3mm と通常のニホンオオカミ 24-26.6mm からすると大きい。後期更新世のオオカミとも思われた。次世代シーケンサにて mtDNA ゲノムの配列を得た。その結果、ニホンオオカミの配列を示し、8塩基挿入を有するタイプ A に属した。

JW294, JW295:長野県坂城町、保地遺跡 II の下顎骨。資料がもろかったことから、両下顎骨からは DNA 分析に必要な DNA を分離できなかった。

JW291:茨城県福田貝塚(縄文後期)の下顎骨。下顎第一臼歯の歯冠長は 27.6mm と大型である。次世代シーケンサにて mtDNA ゲノムの配列を得て解析した結果タイプ A であった。

JW301:鹿児島県黒川洞穴の下顎骨。右下顎第3小臼歯を解析し配列はタイプ A に属した。

JW302:鹿児島県市来貝塚の下顎骨。左下顎小臼歯を解析し配列はタイプ A に属した。

JW296:豊橋市自然史博物館が保管する資料であるが、斎藤弘吉(博物研究 11:27-31, 1938)が記載したニホンオオカミの骨資料である。鼻腔内に残存した腹鼻甲介から DNA を分離した。配列はタイプ A に属することが明らかとなった。

JW297:大町市立山岳博物館に寄贈された「ヤマイヌのキバ」とされる骨資料を解析したが、mtDNA の配列はイヌの配列を示した。上顎吻部の大きさはニホンオオカミのものに匹敵する大きさであった。

## (2) ニホンオオカミの系統解析

今回の解析で mtDNA ゲノム解析までもっていくことができた骨資料は、縄文時代の 4 資料である。これまでに解析を終えている 13 資料を含めて 17 資料の mtDNA ゲノムを用いて、オオカミとの系統関係を近隣結合法で解析した。その結果を図 1 に示した。ニホンオオカミは単系統を示して独立した一群にもとまった。縄文時代の 4 資料はグループ A に属した。今回の縄文時代のニホンオオカミの解析によりグループ A はかなり多様性を有する集団でありグループ B はその一部から派生した集団である可能性が強まった。グループ B がグループ A のどの集団から派生したかは明らかにすることはできなかったが、派生したグループ B のニホンオオカミの集団が、その後日本各地に広がったものと推察された。

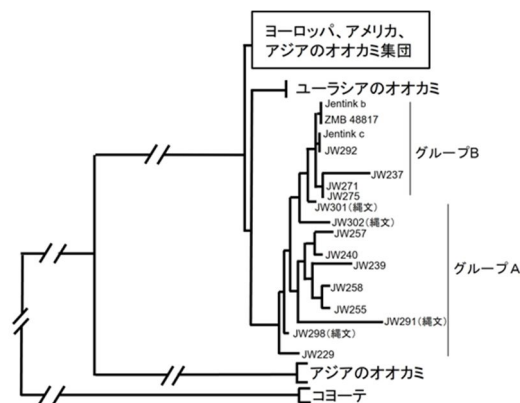


図1 ニホンオオカミとタイリクオオカミとの系統関係の略図

## (3) ニホンオオカミの地域差

これまでのニホンオオカミの mtDNA ゲノム解析により、ニホンオオカミは 8 塩基挿入を有するグループ A と 8 塩基を欠失するグループ B に大別された。江戸・明治期のニホンオオカミの骨資料からグループ A は主に西日本に、グループ B は主に中部から関東さらに東北地方で検出されていた。今回の解析で、縄文時代の遺跡から出土した骨資料 4 点はすべてグループ A に属した。地域的には、鹿児島 2 遺跡、長野県 1 遺跡、茨城県 1 遺跡である。また、豊橋市自然史博物館に寄贈された愛知県産のニホンオオカミはグループ A であり、その配列は長野県産の江戸時代の骨資料に似ていた。時代的には栃原岩陰遺跡の縄文早期が最も古かった。グループ B はグループ A より派生したと考えられるが、縄文時代の骨資料はすべてグループ A であったことからグループ B の派生時期を残念ながら特定することはできなかった。今後はさらに年代を細かく追った骨資料の解析や地域性にも配慮した解析が必要と思われた。

## (4) 核ゲノム解析からみたグループ A とグループ B について

ニホンオオカミの核ゲノム解析に関しては、グループ A とグループ B に属する骨資料についてこれまでに 8 点実施されてきている(Nature Communication 投稿中)。その結果によると核ゲノムに関してはグループ A とグループ B とともに大きな差がないことが示されている。このことは、8 塩基挿入/欠失に関する変異は進化速度の速い mtDNA に限った変異のように思われた。

## (6) まとめ

これまで解析した骨資料に比べたら、本研究では時代の古い(縄文早期~縄文晩期)骨資料から mtDNA 解析を行い、ニホンオオカミの進化の系譜や移動などを明らかにしようとした。解析した縄文時代の骨資料はすべて mtDNA ゲノムのグループ A に属しグループ B を検出できなかった。このことはグループ B の出現が縄文時代より時代の進んだ時代におきたのか?それとも縄文時代以前から起きていたが個体数が少ないことにより今回の解析では検出できなかったのか?は不明である。mtDNA ゲノム上に検出されるこの変異はニホンオオカミに特有の変異であり、タイリクオオカミやイヌには検出できないことから、ニホンオオカミが日本国内でどのように進化し拡散したかを知るよき指標であることは間違いない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuichi Matsumura, Yohey Terai, Hitomi Hongo and Naotaka Ishiguro	4. 巻 38
2. 論文標題 Analysis of the mitochondrial genomes of Japanese wolf specimens in the Siebold collection, Leiden	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 60-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/ZS200019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石黒直隆、松村秀一、寺井洋平、本郷一美	4. 巻 74
2. 論文標題 オオカミやヤマイヌと呼ばれたシーボルトが残したニホンオオカミ標本の謎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本獣医師会誌	6. 最初と最後の頁 389-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 栗林勇太、石黒直隆	4. 巻 7
2. 論文標題 ヤマイヌと呼ばれたイヌ科動物の上顎吻端部から見る長野県北安曇地方のヤマイヌ・オオカミ事情	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 市立大町山岳博物館研究紀要	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本郷 一美  (Hongo Hitomi)  (20303919)	総合研究大学院大学・統合進化科学研究センター・准教授    (12702)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺井 洋平  (Terai Yohey)  (30432016)	総合研究大学院大学・統合進化科学研究センター・助教    (12702)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関