

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010~2012

課題番号：22570089

研究課題名（和文） ヒマラヤ山地・インド亜大陸・スリランカ島嶼におけるマカクの系統地理と分類

研究課題名（英文） Phylogeography and taxonomy of macaques in Himalaya, Indian subcontinent and Sri Lanka

研究代表者

川本 芳 (KAWAMOTO YOSHI)

京都大学霊長類研究所・准教授

研究者番号：00177750

研究成果の概要（和文）：

南アジアのマカクの系統地理と種間競争を研究した。ヒマラヤ山岳地帯には新種と提案されたインドのアルナーチャルモンキーを含むアッサムモンキーの西方亜種が広く分布していた。ブータンとネパールでこの種とアカゲザルとの競争関係が異なることを確認した。一方、mtDNA の系統関係からインド亜大陸のボンネットモンキーとスリランカのトクモンキーの分岐は古く、島には高地と低地に別系統のサルが生息することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Phylogeny and interspecific competition were studied for macaques in South Asia. A wide range of Himalayan region was occupied by the western subspecies of Assamese macaques including a postulated new species of Arunachal macaques in India. Those in Bhutan and Nepal showed variation in the habitat segregation with rhesus macaques. Phylogeographical relation revealed by mtDNA study suggested that speciation of toque macaques in Sri Lanka from bonnet monkeys in India was old and there are two distinctive groups of monkeys, one in highland and the other in lowland, in the island.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 生物多様性・分類

キーワード：ヒマラヤ山地、インド亜大陸、スリランカ、マカク、系統地理と分類、ミトコンドリア DNA、遺伝分化、生態と分布

## 1. 研究開始当初の背景

アジアを中心に生息するマカク類は、更新世のアジアで爆発的に種分化を遂げたことが証明されている。種分化を遂げつつあるマカクでは、異なった種グループが競合し、特に生態的隔離要因を背景に進化したという仮説が提案され、同じ種グループの種は異所的で、種グループ内の競合と種グループ間の

非競合を原則に進化が起きると考えられている (Fooden 1982)。しかし、生態的隔離と種間競争を裏付ける過去の環境変動や分布変動については、研究が遅れており、この仮説を一般化するための根拠は十分に得られていない。

21 世紀に入り、マカクの新種が報告された。Sinha ら (2005) は、インド東北部ヒマラヤ山

岳地帯で、新種アルナーチャルマカク (*Macaca munzala*) を記載した。こうした背景から、ヒマラヤ山岳地帯、インド亜大陸、スリランカ島嶼におけるマカクの系統地理と分類は、マカク全体の種分化や進化を理解するのに重要な問題になっている。

## 2. 研究の目的

本研究では種間競合や棲み分けが系統群の種分化や系統地理ならびに分類に及ぼす影響を問題にした。また、遺伝学と生態学の情報を統合し得られる結果をもとに、マカクの新種記載の基準や判断の妥当性についても考察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

遺伝子分析では、出自が明瞭な試料のみを使い、ヒマラヤ山地の試料採取が困難な地域は糞試料でカバーした。また、スリランカは、禁輸措置以前に採取した血液試料でカバーした。本研究で重点的に調査を進めたのはブータン、ネパール、バングラデシュ、スリランカである。対象は南アジアのマカク、つまりトクモンキー種グループの3つの構成種 (アッサムモンキー、ボンネットモンキー、トクモンキー) と、カニクイザル種グループに属するアカゲザルとした。海外共同研究者と随時野外関連情報と分析結果情報を交換し、海外に設けたラボからの分析結果も提供してもらいながら研究を進めた。また、十分な議論を重ねるため、海外での発表や打ち合わせも組み込み、成果発表も企画した。

今回の研究で重要な目標となったのは、野生個体群の集団遺伝学的調査のための遺伝子分析技術の開発である。このため、糞試料から簡便で信頼性のある分析結果を得る方法を開発した。糞 DNA の STR 分析への利用につき、考案した方法と既存の方法を比較するため、ASL 法と間接シリカゲル法 (いったんエタノール固定してから乾燥保存) との成績の違いを検討した。また、調製 DNA が分析に利用できるかの判断では、Morin et al. (2001) を参考に癌原遺伝子 (oncogene) *c-myc* を利用した簡便な定量法を考案し利用した。

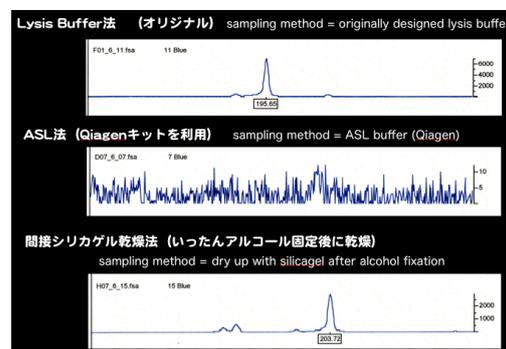
個体群調査の方法は、対象種や調査地により異なっていた。ヒマラヤ山岳地帯のブータンやネパールにおけるアッサムモンキーやアカゲザルの調査では、野生個体群が中心であったため、申請者や現地共同研究者が直接調査に赴き、可能な限りの観察と一部で発信機を装着する生態調査を実施した。また、遺伝子分析では、上記の技術を利用して糞から得た DNA 試料を用いてミトコンドリア DNA (mtDNA) を分析した。バングラデシュにおけるアカゲザル調査でも、現地共同研究者の協力を得て、都市部に孤立する個体群や国境付近の森林に生息する個体群の情報を収集し、合わせて糞試料による DNA 分析を実施し

た。スリランカのトクモンキーでは、主に形態と生態の観察による亜種分類に関係した観察情報と、各生息地で新たに糞試料を集めて既存の血液試料を利用した DNA 分析でカバーできない個体群や地域の調査を補った。

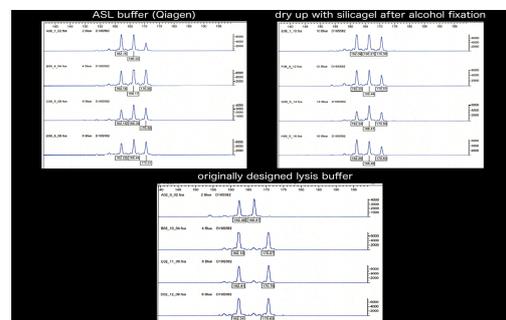
## 4. 研究成果

### (1) 糞 DNA による野外調査法の確立

独自に開発した溶解液を利用した試料採取と保存法は、特に熱帯地域の気温や湿度が高い調査地でも利用しやすく、常温保存がきく点で従来の方法より優れていた。マイクロサテライト DNA (あるいは STR) 標識のタイピング結果で既存の方法とくらべた例を図 1 に示した。A に比較した検体では、反応強度に方法による違いが認められ、ASL 法ではシグナルが弱く、ノイズレベルにあるため、タイピングができなかった。間接シリカゲル乾燥法では弱いシグナルを示す別の低分子ピークが認められ、判定に影響を与えたが、独自開発した方法では明瞭な単峰性のピークが検出できた。B の比較では、ASL 法と間接シリカゲル乾燥法で 4 検体が同じ 3 つのピークを示し、タイピングができなかった。しかし、独自に開発した方法では、2 種類のヘテロ接合体に 4 検体が区別でき、判定に問題がなかった。以上の結果から、本研究で考案した溶解液を利用した糞試料の採取法は、野外調査に有効な方法と考えられた。



A 反応強度と反応パターンの比較



B 複数反応ピークの出現の比較

図 1 異なる DNA 調製法で得た糞 DNA の STR 分析結果の比較

図2は定量PCRに代わる調製DNA試料の収率判定を電気泳動で行った例を示す。下から2番目のレーンが飼育アカゲザル個体から採取した糞を材料に、開発した調製法で得た試料のPCR産物である。希釈系列のバンドの発色とくらべることで、調製した試料は300ピコグラム以上の収率をもつと判断できる。比色による定性的な定量法だが、十分に利用でき、コストは大幅に軽減できた。

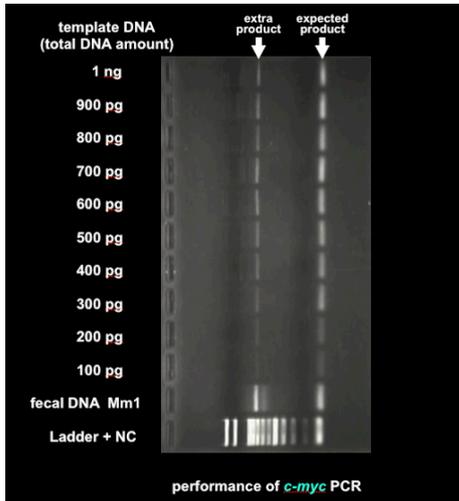


図2 *c-myc* の増幅産物の染色強度判定による調製DNA試料の判定例。

(2) バングラデシュのアカゲザルの研究

2010年までに生息を確認した情報をまとめた結果、バングラデシュ国内にはすくなくとも16地点に37群のアカゲザルが生息していた。図3は、これらの分布をまとめた地図である。アカゲザル以外のマカクの分布は限られており、その分布は東部国境地帯および東北部森林地帯と判明した。これらの地域には、ブタオザル、アッサムモンキー、ベニガ

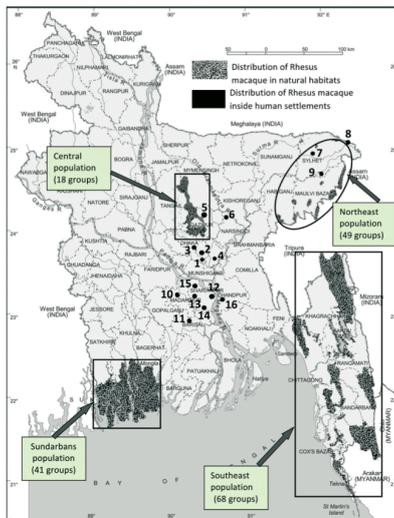


図3 バングラデシュで確認したアカゲザルの分布 (Hasan et al. 2013)。



図4 バングラデシュのアカゲザル個体群に検出したmtDNAハプロタイプの分布。紫字は各地点のハプロタイプ番号を示す。

オザル、カニクイザルが生息する。ガンジス川とブラマプトラ川が形成した広大な堆積平野の人口密集地では住家性のアカゲザル以外の生息は乏しく、種間競合による自然分布が問題になる地域はない。さらに、北西部ではアカゲザルの分布もなく、霊長類の空白地帯になっていた。

アカゲザル生息地14点から糞試料42検体を採集し、mtDNAの第1可変域配列を解読して、地域間の遺伝的分化を調査した。この結果、15種類のハプロタイプが区別できた(図4)。都市や農村に孤立する個体群には、それぞれに特徴的なハプロタイプが区別でき、母系の分断隔離を反映した地理的な構造が予想された。

既報の相同配列も加えて描いた分子系統樹を図5に示した。この結果、バングラデシュのアカゲザルはミャンマーのタイプと同じクラスターを形成すること、ミャンマー国境に近い東部の個体群に認められたハプロタイプ15以外は単系的な独立クラスターからなること、が明らかになった。従来の研究から、アカゲザルでは系統的に中国に代表されるアジア東部個体群とインドに代表されるアジア西部個体群の存在が議論されてきた (Smith and McDonough 2005)。しかし、今回の研究により、バングラデシュのアカゲザルはこれらとは異なる系統で、ベンガル湾岸地域の広大な氾濫原に生存する遺伝的に特徴的な個体群と評価できた。さらに、ミャンマー隣接地域の東部山岳地帯の個体群を除く平野部の孤立個体群は、系統樹に現れたクラスターの凝集性から判断して、共通祖先から短期間に拡大したのちに人口増加や狩猟圧等の人為的要因で現在の生息地へ分断隔離された成立の歴史をもつことが予想できた。

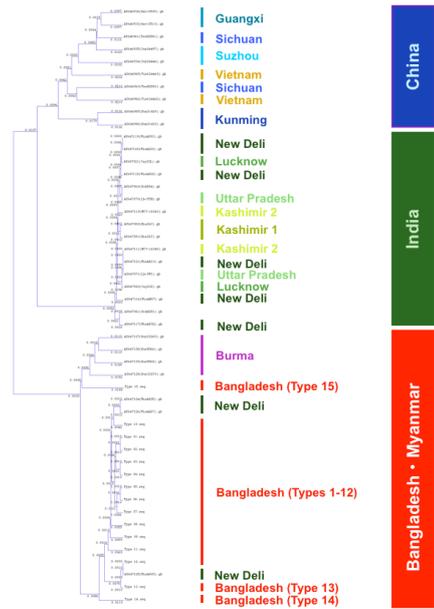


図5 バングラデシュのアカゲザル個体群に検出したmtDNAハプロタイプの分子系統関係を示す枝分かれ図。バングラデシュタイプは赤字で示した。比較に利用した他地域のタイプはSmith et al. (2007)を参照した。

(3) ヒマラヤ山岳地帯のアッサムモンキーとアカゲザルの研究

ブータンヒマラヤとネパールヒマラヤでは、アッサムモンキーとアカゲザルの生息状況が異なり、前者では異所的なのに対し、後者では同所的（あるいは接所的）であることを確認した。ブータンでのアカゲザル分布は南部国境付近の亜熱帯地域に限定されていた。つまり、両地域では種間関係の構図に違いがあり、関係種の系統地理的關係を今後精査する必要がある。なお、これまでに得ているヒマラヤ山岳地帯のアッサムモンキーのmtDNA分析結果では、新種 *M. munzala* として提案されたインドのアルナーチャルプラデーシュのサルはアッサムモンキーの西方亜種 *M. a. pelops* と同じクラスターを形成し、アッサムモンキーの地域個体群と判断できた（データは省略）。

(4) スリランカのトクモンキーの集団遺伝学的研究

スリランカ全域に分布するトクモンキーの代表的生息地 24 地点から採集した試料につき、遺伝子分析を行った。これらの調査地は 3 種類の亜種 (*sinica*, *aurifrons*, *opisthomelas*) の生息地を含んでいる。13 地点は血液試料 (Shotake et al. 1991) から、11 地点は糞試料から、試料を調製し mtDNA の非コード領域第 1 可変域 339 塩基と 16S rRNA 領域 393 塩基を比較した。島嶼内の系統地理

的な構造の解析結果は両領域で基本的に同様と判断できたので、ここでは非コード領域第 1 可変域の結果を説明する。

mtDNA ハプロタイプのクラスター分析結果を図 6 に示した。島内には明瞭に区別できる二つのクラスター (A と B) が検出できた。野外観察ないしは生息分布から判定した亜種タイプとくらべると、mtDNA のクラスターは亜種分類に一致せず、複数の亜種を同じクラスターに包含していた。つまり、個体群の成立過程を反映する母性遺伝標識から考えると、形態や生態で区別される亜種の違いは、群分裂を介したこの種の分布変遷の歴史に対応していないと解釈できる。この形質の不一致の原因としては、亜種のメルクマールとみなされる形態や生態の形質には、進化過程の適応が強く反映され、この変化が進化時間に同調していない可能性が考えられる。

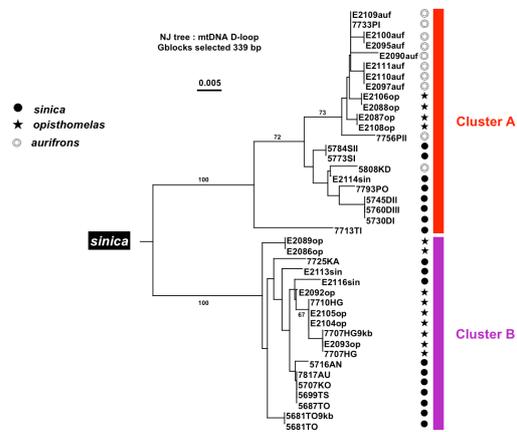


図6 mtDNA ハプロタイプのクラスター分析により描いた枝分かれ図。図中には試料個体の亜種の違いを示した。

二つの mtDNA クラスターのタイプの島内分布を図 7 に示した。ハプロタイプのグループの分布には明瞭な地理的構造が認められ、A クラスタータイプの個体群は地史的にみて島内の浸食面台地 (penepplane) の高層に生息するのに対して、B クラスタータイプの個体群は低層に生息していた。この結果は、トクモンキーの成立過程が地理的構造変化と相関する環境変動に影響されてきた歴史をもつことを示唆する。近縁種のボンネットモンキー (*M. radiate*) との分子系統解析から推定すると、トクモンキーの成立は単系的と判断できた (図 8)。さらに詳細に検討すると、mtDNA の塩基多様度から、B クラスター内では島嶼の南部地域が北部地域より古くに成立した兆候が認められた。このことから、南部の比較的湿潤な生息環境から北部の乾燥化した生息地への拡大が起きたことが考えられる。この結果は、更新世に繰り返されたスリランカ島嶼とインド亜大陸間の陸橋

形成が祖先の成立に影響せず、現存個体群はそれ以前に種分化し、種全体が島嶼に孤立した形を維持しながら、環境変動とともに地理的には標高帯と相関する進化を遂げていることを示唆する。今後の研究では、高所に孤立するとみなされてきた亜種 *opisthomelas* をはじめとして、現存個体群の地域間交流を調査し、個体群の繁殖構造や保全を考える必要がある。

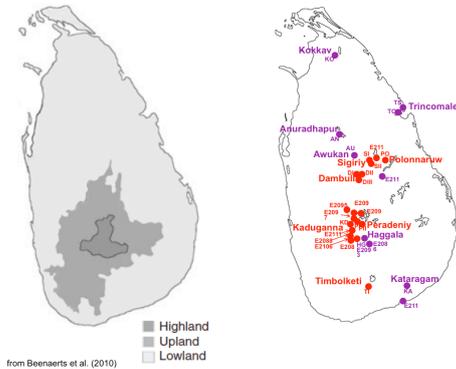


図7 左図：島内に区別できる標高帯の違い。右図：mtDNA分析で区別できた2系統のサル生息地。赤と紫はそれぞれ図6に示したAとBクラスターに対応する。

(5) トクモンキー種群の分類と成立過程

インド亜大陸のボンネットモンキー、ヒマラヤ山岳地帯のアッサムモンキー、スリランカのトクモンキーで得たmtDNAの配列情報をもとに、トクモンキー種群の関係を総合評価すると、従来の定説とは対照的にスリランカとインド亜大陸の種間分化が古く、全体はスリランカとそれ以外の地域の分岐からはじまる進化を示唆した。インド亜大陸に生息するボンネットモンキーの成立は、ヒマラヤ山岳地帯にアッサムモンキーの西方亜種 (*M. a. pelops*) が展開したのと平行的に起こった可

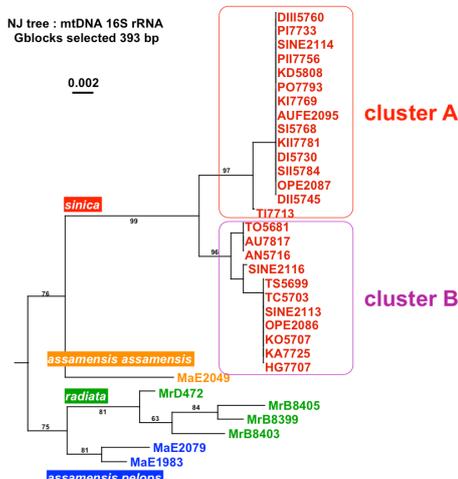


図8 mtDNA 16S rRNA 配列から推定したトクモンキーと近縁種の系統関係。

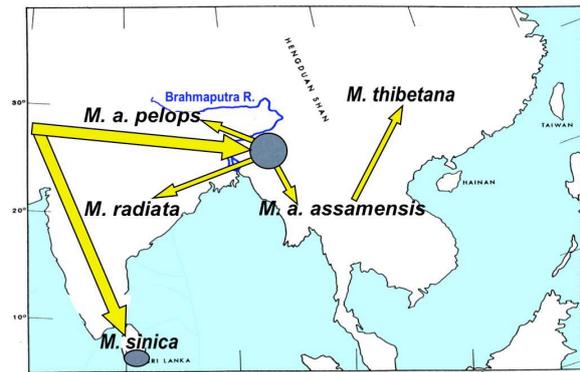


図9 トクモンキー種群の進化過程に関する仮説。

能性も視野に入れる必要がある (図9)。この仮説を検証するには、他の遺伝標識やさらに広域を調査して検討する必要がある。別系統として展開したアカゲザルとトクモンキー種群の競合問題は、アッサムモンキーやボンネットモンキーの分化時期を再検討しながら、考察しなおす必要があると考える。

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7件)

- ① Kawamoto Y, Takemoto H, Higuchi S, Sakamaki T, Hart JA, Hart TB, Naoko T, Reinartz GE, Guislain P, Dupain J, Cobden AK, Mulakwa MN, Yangozene K, Darroze S, Devos C, Furuichi T, Genetic structure of wild bonobo populations: Diversity of mitochondrial DNA and geographical distribution, PLoS ONE, 査読有, Vol 8, No. 3, 2013, e59660  
DOI:10.1371/journal.pone.0059660
- ② Hasan MK, Aziz MA, Alam SMR, Kawamoto Y, Jones-Engel L, Kyes RC, Akhtar S, Begum S, Feeroz MM, Distribution of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Bangladesh: Inter-population variation in group size and composition, Primate Conservation, 査読有, Vol. 26, 2013, pp. 125-132  
URL: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1896/052.026.0103>
- ③ Hamada Y, Yamamoto A, Kunimatsu Y, Tojima S, Mouri T, Kawamoto Y, Variability of tail length in hybrids of the Japanese macaque (*Macaca fuscata*) and the Taiwanese macaque (*Macaca cyclopis*), Primates, 査読有, Vol. 53, No. 4, 2012, pp. 397-411  
DOI:10.1007/s10329-012-0317-3
- ④ Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida

T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H, Allele frequency of antiretroviral host factor TRIMCyp in wild-caught cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), *Frontier in Microbiology*, 査読有, Vol 3, 2012, 314 DOI: 10.3389/fmicb.2012.00314

- ⑤ 川本芳、タシ ドルジ、稲村哲也、ヒマラヤにおけるミタンの利用-ブータンの交雑家畜の遺伝学研究から-、ヒマラヤ学誌、査読有、13 巻、2012、267-282  
DOI, URL : なし
- ⑥ 稲村哲也、タシ ドルジ、川本芳、ブータン極東部高地のメラックにおける牧畜の変化とその歴史的社会的背景、ヒマラヤ学誌、査読有、13 巻、2012、283-301  
DOI, URL : なし
- ⑦ キソル KC、稲村哲也、川本芳、ネパールの採集狩猟民ラウテの生活と社会変容。ヒマラヤ学誌、査読有、12 巻、2011、163-181  
DOI, URL : なし

[学会発表] (計 8 件)

- ① Norbu T, Rabgay K, Wangda P, Dorji R, Sherabla, Kawamoto Y, Hamada Y, Oi T, Chijiwa A, Ecological assessment of Assamese macaques for the control of agricultural damage in the western Bhutan Himalayas, 2012/8./29, The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok
- ② Kawamoto Y, How did monkeys reach the northern limits of their range? - Lessons from a population genetic study of Japanese macaques , 2012/8./27, The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok
- ③ Nahallage CAD, Huffman MA, Kawamoto Y, Kawamoto S, Shotake T, Phylogeography of toque monkeys in Sri Lanka , 2012/8./27, The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok
- ④ Huffman MA, Nahallage CAD, 川本芳、川本咲江、庄武孝義 「Two is company, three is a crowd: スリランカのトクモンキー (*Macaca sinica*) の系統地理」 2012/7/8、第28回日本霊長類学会大会、名古屋市
- ⑤ Hamada Y, Malaivijitnond S, Pathomthong S, Kingsada P, Son VD, Van NH, Minh NV, San AM, Thu A, Oi T, Kawamoto Y, Distribution, phylogeography and present status of macaques distributed in Indochina.

International Primatological Society XXIII Congress, 2011/09/15, Kyoto

- ⑥ Hasan MK, Feeroz MM, Kawamoto Y, Diversity and molecular phylogeny of mitochondrial DNAs of rhesus macaques in Bangladesh. International Primatological Society XXIII Congress, 2011/09/14, Kyoto
- ⑦ Hasan MK, Feeroz MM, Kawamoto Y, Distribution of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) in Bangladesh: Inter-population variation in group size and composition. IPS Pre-congress Symposium, 2010/09/06-07, Inuyama
- ⑧ Kawamoto Y, Oi T, Seino H, Kawamoto S, Higuchi S, Genetic architecture of social group of Japanese macaques (*Macaca fuscata*): Inference from analysis on all members of single group with microsatellite markers. IPS Pre-congress Symposium , 2010/09/06-07, Inuyama

[図書] (計 2 件)

- ① 白井啓, 川本芳、東京大学出版会、タイワンザルとアカゲザル: 交雑回避のための根絶計画。「日本の外来哺乳類」(山田文雄, 池田透, 小倉剛編)、2011、pp.169-202
- ② Kawamoto Y, Springer, Modes of differentiation in Japanese macaques: Perspectives from population genetics. In: The Japanese Macaques (eds. Nakagawa N, Nakamichi M, Sugiura H)、2010、pp.53-76

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/shinka/genome-diversity/kawamoto/index.phtml>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川本 芳 (KAWAMOTO YOSHI)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号 : 00177750