

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23405040

研究課題名(和文) 絶滅したエゾオオカミとニホンオオカミの起源と系譜を探る形態的および遺伝学的研究

研究課題名(英文) Genetic and morphologic studies of two extinct wolves (Ezo wolf and Japanese wolf) to know their origin and lineages

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅した日本のオオカミ(エゾオオカミとニホンオオカミ)の分類学上の位置をミトコンドリア(mt)DNAのゲノム解析により明らかにし、両オオカミの起源と系譜を海外の考古資料から調査した。エゾオオカミは、大陸のオオカミと遺伝的に近く、ニホンオオカミとは大きく異なっていた。ロシアおよび中国の古代サンプル143検体を解析したが、ニホンオオカミのmtDNA配列に近い検体は検出できなかった。また、モンゴルのオオカミ8検体および国内の現生犬426検体を解析し、ニホンオオカミのmtDNAの残存を調査したが見つからなかった。これらの結果は、ニホンオオカミはオオカミ集団の中でもユニークな系統であることを示している。

研究成果の概要(英文)：To estimate the taxonomic and phylogenetic relationship of two extinct wolf subspecies (Ezo wolf: *Canis lupus hattai* and Japanese wolf: *C. lupus hodophilax*) among gray wolves, we analyzed the complete mitochondrial (mt) genome sequences from ancient bone specimens. Their origins and lineages were also analyzed with mtDNA sequences from ancient *Canis* specimens isolated from China and Russia. Ezo wolves were genetically related with gray wolves in Eurasia, while Japanese wolves were clearly separated from gray wolves including Ezo wolves in phylogeny. Among 143 ancient *Canis* specimens from China and Russia, we did not find similar mtDNA sequences to those of Japanese wolves. Moreover, we did not find the same mtDNA sequences of Japanese wolves in 8 Mongolian wolves and a total of 426 present Japanese hunting dogs. These results indicate that Japanese wolf is identified as a unique lineage among gray wolves.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ニホンオオカミ エゾオオカミ ハイイロオオカミ オオカミ イヌ 系統解析 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

家畜の起源や家畜化事象について関心がよせられている。特に人と関係が深いイヌ(家犬)やブタの家畜化についてのモデル研究は活発である。以前、私達は、イヌおよびイノシシ属の系統について解析してきた。特に縄文時代や弥生時代の遺跡から出土した古代犬の古代 DNA 分析により日本在来犬の起源と系統を解明した。その解析途中で絶滅した日本のオオカミに関して解析する機会を得た。しかし、解析を進めるにつれて、日本のオオカミ(エゾオオカミとニホンオオカミ)に関して遺伝的な解析が何もされていないことを知った。今日まで遺伝的な解析が進まなかった理由として、両オオカミともすでに絶滅しており、解析資料が乏しいこと、さらには、骨からの DNA 分析が困難であることなどが挙げられる。また、両オオカミとも日本への渡来や遺伝的系譜は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、絶滅したエゾオオカミとニホンオオカミに焦点をあて、その起源と系譜を大陸のオオカミに求めるべく海外調査を実施する。特に、遺跡から出土した古代骨の古代 DNA 分析から日本のオオカミの起源を解き明かすと共に、東アジアでの分布と変遷を解明しようと試みた。

- (1) エゾオオカミおよびニホンオオカミの遺伝的系統を明らかにする。
- (2) 台湾、ベトナム、モンゴルでのオオカミの依存種を調査して、ニホンオオカミの分布と移動の足跡を探る。
- (3) 絶滅したエゾオオカミやニホンオオカミの祖先の解明を目的に、ロシア、中国などの国で出土したオオカミ及びイヌの古代骨からミトコンドリア(mt)DNA を分離して系統解析する。
- (4) 現在、狩猟犬として飼育されている日本在来犬の中で、絶滅したニホンオオカミの遺伝子が残存していないかを調査する。
- (5) 東アジアのオオカミの分布からイヌの家畜化の変遷や人為的影響を考察する。

3. 研究の方法

絶滅した日本のオオカミの起源と系譜を明らかにする目的で、遺跡から出土したイヌ・オオカミの古代骨について形態的計測と遺伝的解析を行った。また、現生のイヌに関しても、オオカミからの遺伝的な影響と系譜を知る目的で、遺伝子解析を行った。

- (1) 海外の調査場所や機関
インドネシア、台湾、中国、ロシアを訪問し、ニホンオオカミと同様な形態や遺伝的特徴を有するイヌ・オオカミの残存を調査した。また、海外から本調査に協力していただいた共同研究者を招聘して、本研究の総括をかねて講演会を開催した。
- (2) 古代骨の遺伝的解析
古代骨より電気ドリルで骨粉を採取し、以

下の手順にて mtDNA 遺伝子(198bp)を増幅・解析し、絶滅したエゾオオカミおよびニホンオオカミと比較検討した。

骨粉の採取 脱灰 除蛋白 試料の精製・濃縮 mtDNA の増幅(PCR) 増幅産物の精製 mtDNA のダイレクトシーケンス 配列の決定と系統解析(近隣結合法など)

(3) 現生犬の遺伝子解析

モンゴルおよび日本で飼育されている現生犬や狩猟犬より血液あるいは毛根を採取した。採取した血液および毛根に残存する細胞から総 DNA を分離精製し、mtDNA198bp の塩基配列を決定して、ニホンオオカミの配列の残存を調査した。

4. 研究成果

本研究の目的は、絶滅したエゾオオカミおよびニホンオオカミの mtDNA ゲノムを解析して、オオカミ集団の中での両オオカミの遺伝的な位置関係を明らかにすることと、諸外国の現生および古代のオオカミの遺伝子を解析して比較し、絶滅した日本の2種類のオオカミの起源と系譜を解明することである。延長した期間を含めて4年間で以下の研究成果をあげて、英文で2報および和文で2報の論文として公表した。しかし、海外試料の一部の解析結果については、未公開である。

(1) エゾオオカミおよびニホンオオカミの遺伝的系統解析と分類学上の位置や日本への渡来時期

これまで、エゾオオカミとニホンオオカミの mtDNA600bp を解析し、イヌ・オオカミ集団中での両オオカミの遺伝的位置関係を明らかにしてきた(Zool.Sci. 26:765-770,2009;Zool.Sci. 27:320-324,2010)。本研究期間内に、骨より mtDNA ゲノム(約16,000bp)を解析し、これまでに公表されているオオカミのゲノム解析から、両オオカミの分類学上の関係を明らかにした(図1、公表雑誌論文3の系統樹を改変)。

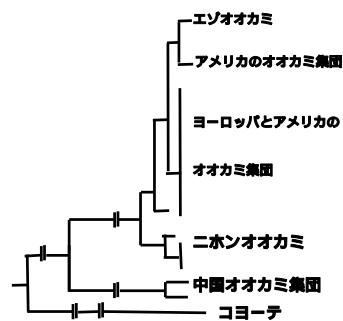


図1. エゾオオカミおよびニホンオオカミのオオカミ集団での系統関係(発表論文3を改変略図)

図1に示すごとく、エゾオオカミは、アメリカ大陸のオオカミ集団と最も近い処に位置した。特にアラスカやカナダにて棲息しているハイロオオカミと遺伝的に同じ集団に属することが明らかとなった。一方、ニホ

ンオオカミは、ヨーロッパやアメリカ大陸のハイロオオカミとは遺伝的に異なっており、中国のオオカミと遺伝的に近い関係を有していた。以前、報告した mtDNA600bp の結果と今回 mtDNA ゲノム解析で得た結果は、ほぼ同じ結果であり、ニホンオオカミはアメリカ大陸やユーラシア大陸のハイロオオカミとは遺伝的に異なっていることが、mtDNA ゲノム解析で明確に示すことができた。

一方、イヌ集団を含めた系統分析では、Savolainen らが 2002 年に提示しているイヌ集団 A 群～F 群の内、ニホンオオカミは F 群に属することが明らかとなった。このイヌ・グループ F 群の中には、紀州犬とシベリアンハスキーが含まれている。

絶滅したエゾオオカミおよびニホンオオカミの mtDNA ゲノム配列の結果を他のオオカミ集団と比較することにより、日本に渡来したオオカミの渡来時期が計算できた。つまり、遺伝子の変異による分子時計とグリーンランドの氷床を基礎とした年次データの比較から、エゾオオカミは、最終氷期前後にサハリンを経由して北海道に渡来したことが推測された。一方、ニホンオオカミは、エゾオオカミよりは古く、朝鮮半島が九州を介して本州と繋がっていた時期（約 12～13 万年前）に渡来したと思われる。また、日本に渡来したニホンオオカミの頭数は、多く見積もったとしても 2 万頭前後ではないかと推測される。

(2) ニホンオオカミと遺伝的に近い遺存種の海外調査

上記(1)の解析から、絶滅したニホンオオカミの日本への渡来は古く、大陸から日本に渡来後、日本列島に閉じ込められたのではないかと考えられた。そこで、大陸との関係が深い台湾において、同様な遺存種が先史時代に存在しなかったかを知る目的で、2012 年 3 月に、国立台湾大学および台湾考古学研究所を訪問して、遺跡から出土したイヌの骨を調査した。台湾国内で発掘された頭骨や下顎の中にはニホンオオカミの形態的特長を示す犬骨は見つからなかった。台湾の古代イヌ骨は、出土数も少なく、形態も一般的に小型であった。

さらに南方の諸島において、依存種が存在しないかをインドネシアで調査した。2012 年 3 月にインドネシア・ジャワ島のボゴール大学を訪問し、遺跡から出土したイヌ属の骨について形態的に計測した。しかし、ニホンオオカミと同様な特徴を示す骨は見つからなかった。

(3) ロシアおよび中国でのニホンオオカミの起源を調べる遺伝学的調査

2012 年～2014 の 3 年間で以下のごとくロシアと中国で調査を実施し、両国の遺跡から出土した古代骨について、古代 mtDNA 解析を行い、絶滅したニホンオオカミの起源を探った。

- ・2012 年 10 月ロシア・ウラジオストック・ロシア科学アカデミーにて調査
 - ・2012 年 11 月中国・長春、吉林大学にて調査
 - ・2013 年 7 月ロシア・エカテリンブルク・ロシア科学アカデミーにて調査
 - ・2014 年 3 月中国・長春、吉林大学にて調査
- 2012 年～2014 年にかけて調査したロシアの研究所 2 ヶ所および中国の 1 大学(吉林大学)で解析した考古資料数を表 1 に示した。ロシアおよび中国の資料とも形態的にイヌ・オオカミであることを確認後、主に下顎から遺伝子解析用の骨粉を採取して、常法に従って mtDNA 解析を行った。

表 1 . 海外の考古資料からの遺伝子解析

国	地域	年度	検体	考古資料の年代
ロシア	(ウラル地方)	2012	26 検体	1000 年～4000 年前
		2013	62 検体	1000 年～6000 年前
中国	(北東地域)	2012	20 検体	800 年～3000 年前
	(北東地域)	2014	34 検体	1000 年～4000 年前
合計			143 検体	

ロシアの考古資料の遺伝子解析について
ロシアのウラジオストック地方の 26 検体について古代 DNA 解析を行い、25 検体から mtDNA198bp を増幅した。25 検体は既知の 7 ハプロタイプと不明の 5 ハプロタイプに分類された。7 ハプロタイプ中 1 つがオオカミのハプロタイプであった。ニホンオオカミの特徴を有する資料は見つからなかった。

ロシアのウラル地方の 62 検体について解析した。62 検体中 61 検体から mtDNA198bp の DNA を増幅・検出することができた。61 検体の DNA は、既知 12 のパプロタイプと 24 の不明ハプロタイプに分類された。61 検体からもニホンオオカミと同様な配列を示す検体は検出されなかった。

中国の考古資料の遺伝子解析について
中国の吉林大学に保管されている中国北東地域のイヌ・オオカミの考古資料について、2012 年と 2014 年の 2 回にわたり調査した。調査した考古資料は、形態的にイヌ・オオカミと同定されるものであり、古代 DNA 解析には、形態的な特徴がはっきりしている下顎から採取した。2 年間の調査検体 54 検体中 49 検体から古代 mtDNA を増幅した。49 検体中 8 検体をのぞいて、既知のハプロタイプに分類された。残念ながら、ニホンオオカミと同様な mtDNA 配列を示す検体は検出されなかった。吉林大学で解析した検体の多くは、mtDNA 配列を見る限りイヌであった。

以上、ロシアおよび中国の先史時代の考古資料からは絶滅したニホンオオカミの mtDNA 配列を示す検体を見つけることができなかった。上記(1)の結果にも記したが、ニホンオオカミの日本への渡来は 12～13 万年前

であることから、今回解析したロシアおよび中国の考古資料は、すくなくとも数千年前の検体であり、大陸においても、ニホンオオカミの系統は絶滅している可能性が高い。

(4) 現生犬や狩猟犬にみるニホンオオカミの遺伝的な残存調査

オオカミが現存するモンゴルにおいて、ニホンオオカミと同様な mtDNA 配列を有する固体がいるかどうか調査した。現生のモンゴル犬やオオカミ 8 頭の mtDNA 解析を行ったが、ニホンオオカミと同じ配列の固体は見つからなかった。

また、日本各地で飼育されている狩猟犬 426 検体について mtDNA 遺伝子型を決定した。血液を採取した年度および県や地域を表 2 に示した。

表 2 国内の狩猟犬の mtDNA 遺伝子調査

年度	検体数	県や地域
2009 年	14	香川県、高知県
2010 年	119	静岡県、長野県、三重県、岐阜県、新潟県、
2011 年	145	愛知県、鹿児島県、長崎県、新潟県
2012 年	112	宮城県、山形県、岩手県、青森県
2013 年	36	北海道(十勝、函館)
合計	426	検体

解析した 426 頭の mtDNA 配列は、416 頭が既知の 26 のハプロタイプに分類されたが、10 頭は、既知のハプロタイプに該当しなかった。ニホンオオカミと同じ mtDNA 配列を有する狩猟犬は、検出できなかった。

(5) オオカミからイヌへの家畜化、ニホンオオカミの起源と変遷(本研究のまとめ)

2014 年 5 月、吉林大学の共同研究者を招聘して講演会を開くと共に本研究のまとめを行った。エゾオオカミは最終氷期に大陸から渡来したハイイロオオカミの集団であるが、ニホンオオカミは、渡来時期が 13 万年前と古く、ユーラシア大陸の考古資料の中にも、ニホンオオカミの起源を示唆する資料は得られなかった。従って、ニホンオオカミの起源やその変遷は、未だ不明のままである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Naotaka Ishiguro, Akira Matsui, Hiroki Kikuchi, Chen Quanjia, Cai Dawei, Shang Quanchao and Chunxue Wang: Mitochondrial DNA analysis of ancient dog bones from the Yanjialing, Feglin, and Xicha sites, China: China Asian Archaeology, 108-114, 2014. Doi および URL なし 審査(有)

Shuichi Matsumura, Yasuo Inoshima and Naotaka Ishiguro: Reconstructing the colonization history of lost wolf lineages by the analysis of the mitochondrial genome. Mol. Phylogenet. Evol. 80:105-112, 2014. Doi: org/10.1016/j.ympev.2014. 審査(有)
石黒直隆:動物依存体の古 DNA 分析 - イヌ、オオカミ、家畜ブタのミトコンドリア DNA 解析を中心に - 考古学ジャーナル、633:19-23,2012, Doi および URL なし 審査(有)
石黒直隆:絶滅した日本のオオカミの遺伝子系統 日本獣医師会雑誌 65 巻: 225-231,2012, URL:<http://nichiju.lin.g.r.jp/mag/06503/d1.pdf> 審査(有)

[学会発表](計 3 件)

石黒直隆、猪島康雄、柳井徳磨:絶滅した日本のオオカミの遺伝的系譜。日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、北海道大学、札幌
石黒直隆:古 DNA 分析で探る在来犬と日本のオオカミの遺伝的關係。日本人類学会、2012 年 11 月 2 日、慶応義塾大学、東京
石黒直隆:絶滅した日本のオオカミの系統。日本哺乳類学会、2012 年 9 月 23 日、麻布大学、東京

[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

松井 章 (MATSUI AKIRA)
国立行政法人国立文化財機構奈良文化財研究所、文化財研究所・奈良文化財研究所・埋蔵文化財センター・研究員
研究者番号:20157225

本郷 一美 (HONGO HITOMI)
総合研究大学院大学・准教授
研究者番号:20303919

佐々木 基樹 (SASAKI MOTOKI)
帯広畜産大学・准教授
研究者番号:50332482