

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440258

研究課題名 (和文) Phenotypic and genotypic disparity in Sri Lankan primates: Dissecting a species from its morphology, ecology, parasites and genes

研究課題名 (英文) Phenotypic and genotypic disparity in Sri Lankan primates: Dissecting a species from its morphology, ecology, parasites and genes

研究代表者

M・A Huffman (Huffman, Michael A)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：10335242

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究の目的は分類に使われてきた形態変異と糞試料で検出した遺伝子変異の比較で認められたちがいから、トクモンキーおよびラングール類の亜種分類を再評価し、スリランカ霊長類の系統地理的特性を総合的に理解することである。トクモンキーでは海拔2～2,129メートルの間に明瞭な尾長の地理的勾配が認められ、尾率は標高に従い有意に小さくなった。この形態変異は亜種境界には厳密に対応せず、むしろ本種が標高と寒さに対しアレンの法則に従う適応をもつことを示していた。新しいPCRプライマーを作成し、ラングール類の亜種の違いを試験した。これら霊長類2種の亜種の違いをさらに調査するためこれらのプライマーを利用していく。

研究成果の概要 (英文) : The goal of this research is to reassess sub-species classifications of the toque macaque and langur species, based on our recently discovered disparities between their phenotypic and genotypic traits. Across altitudes ranging 2 to 2129 m asl, a clear variation in toque macaque tail length was found. This variation did not strictly fall along putative sub-species lines, but rather is better interpreted as a species level adaptation to altitude and thermoregulation according to Allan's Rule. New primers were made for mtDNA sequencing by taking the interference caused by nuclear mitochondrial DNA into consideration and are being used to assess langur sub-species differences.

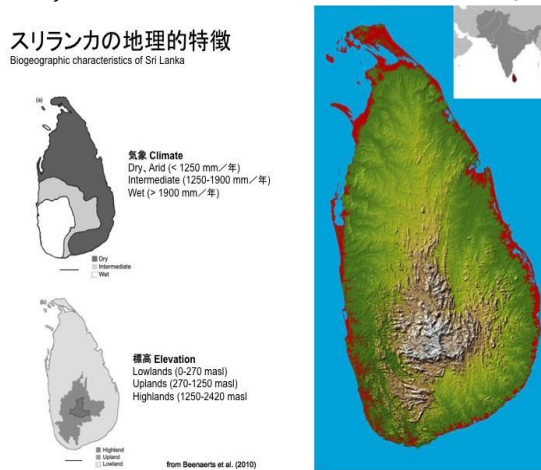
研究分野：人類学

キーワード：phylogeny speciation phenotypic traits genotypic variation toque macaque purple face langur grey langur Sri Lanka

1. 研究開始当初の背景

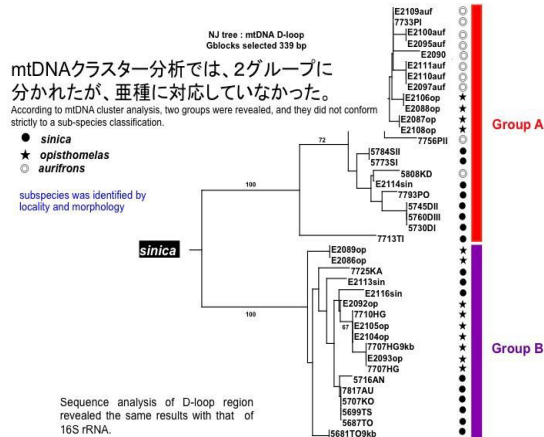
スリランカはインド南東に位置する。比較的小さい島国 (65,610km²) に反して地形や気候の多様性が顕著である。種、遺伝および生態系の多様性の面に関してスリランカは世界の生物多様性ホットスポットの1つになっている。地形的にスリランカは低地 (標高270 m以下)、中高地 (標高270~1,250 m)、高地 (標高1,250~2,420 m) の3つの台地から成り立つ。また、年間降雨量に基づいて乾燥ゾーン (1,250 mm未満)、中間ゾーン (1,250~1,900 mm)、ウェットゾーン (1,900 mm以上) の3つの主要気候帯が区別できる。

スリランカの地理的特徴
Biogeographic characteristics of Sri Lanka



スリランカには昼行性の霊長類が3種生息している。それらはグレイラングール (*Semnopithecus priam*)、3亜種を含むトクマカク (*Macaca sinica*) と4亜種を含むカオムラサキラングール (*Semnopithecus vetulus*) である。これら3種の分類は、外見の特質や生態学および地理的気候ゾーンの区分だけに基づいている。しかし、トクマカクではほとんどのデータが3亜種の中の1亜種 (*M. s. sinica*) の長期研究に基づいている。他のマカク種に比べ、トクマカクの系統地理については、血液タンパク質多型の集団遺伝学的研究を除いてほとんどわかっていなかった。カオムラサキラングールについても、採食生態学の側面を除きほとんど知られていなかった。また、スリランカのグレイラングールでは詳細な研究はこれまで皆無であった。全国規模でこれら3種を調査するうちに、亜種に特徴的とされる形質には群れ内あるいは地域を超えて例外があることに注目するようになった。つまり、従来の形態的、生態的、そして地理的分布に関する記載に基づく厳格な亜種の分け方ではなく個体変異あるいは環境への適応を反映し

た変異を疑うようになった。これを遺伝学的に検証するために、全国各地で、複数の集団からの糞便サンプルを収集しミトコンドリアDNA (mtDNA) の予備分析を行った。我々が得た結果をトクマカクの3亜種の形態学的分類と比較したところ、遺伝子による亜種分類と異なる結果が得られた。



形態学的に区別されてきた3亜種のすべてが2つの主要なmtDNAハプログループに属し、大まかにはこの2つハプログループの分布が異なる標高ゾーンに対応することを見出した。それは、古いタイプの山岳地帯と比較的に新しいタイプの沿岸地域に分かれていた。この魅力的な発見は、スリランカのトクマカク分類の理解と、亜種の一般的な定義方法に関する考え方に新たな知見を与えるものである。種の進化を理解する研究のもう一つの観点は、宿主とその寄生虫の間の関連性を調べることである。トクマカクにおける人獣共通感染症の予備研究 (ハフマン、他 2013) は、雨量の多い低地に生息する群れ個体は、高地に生息する群れ個体よりも感染率が有意に高いことを示した。これはトクマカクの寄生虫相のハプロタイプレベルに相違があるかもしれないことを示唆する。共進化している宿主と寄生虫の分子情報を利用することは独立に対象生物の系統を直接に推定する強力なツールを提供する。このアプローチはトクマカクとグレイラングールの亜種間関係にメスを入れるのに役立つかもしれない。

上記の証拠より、これらスリランカの霊長類の進化やインド亜大陸とアジアの他地域の姉妹系統群との系統関係を理解する調査には、さらに総合的なアプローチが大事であることがはっきり理解できた。

2. 研究の目的

本研究の目的はこれまでに使われてきた phenotype (表現型) と我々のデータから検出した genotype (遺伝子型) との間に最近明らかになった相違に基づいて、2つのスリランカ霊長類種、トクマカク (*Macaca sinica*) およびカオムラサキラングール (*Semnopithecus vetulus*) の亜種分類を再評価することである。結果を生態系分布と重ねることにより、これらスリランカ固有種の生態と進化をさらに理解する基礎が築けるであろう。

3. 研究の方法

スリランカの共同研究者と協力し、3年間にわたり、これらの3つの固有種、特にトクモンキーが生息しているすべての生態系・気候帯にわたって定量的かつ詳細な調査を実施した。系統地理学的分析のための糞便試料の収集、亜種を標的とする phenotypic 記述のための写真記録などを行った。それぞれの亜種を定義すると考えられる形質を区別する特徴についてこれらのデータを分析した。

試料の収集:

できる限り、遭遇した各群れから、個体の写真記録と共に、遺伝子と寄生虫評価のための糞便試料 (溶解緩衝液 lysis buffer とホルマリン液の保存試料) を非侵襲的に収集した。観察可能な診断亜種形質による phenotype 類型化のため、写真とビデオを用いて個体を記録した。GPS を使用して、各収集場所の高度と位置を記録し、全国規模で地図にプロットするデータベースに追加した。

遺伝解析:

ハフマン、川本および現地協力者 CAD ナハラゲ (京大理学博士) が、糞便試料採取や遺伝子分析の詳細な方法をスリランカのスリジャエデネプラ大学および京都大学霊長類研究所で確かめ、2007年からこれを使用している。この方法をスリランカの大学院生にも伝授し、フィールド調査で協力を得た。分子系統解析は、mtDNA ゲノム中の 16S rRNA および Dループ領域の部分配列決定によって行った。ラングール類の遺伝解析では、numt (核に転移した mtDNA) を区別することが重要である。今回の研究では、mtDNA の真の標的 DNA をロング PCR で選択し numt の干渉を防ぐ方法を試験した。最後に、霊長類種の系統地理を評価するため、分子系統関

係と DNA 変異の地理的分布とを組み合わせ評価した。

表現型解析:

マカクの診断特徴 (色パターン、頭髪の捻じれパターン - 色、毛の長さ、尾の長さなど) に注目し、個体を分類するために使用した。

4. 研究成果

平成 27 年には目標としたすべてを達成できた。結果を増やし評価したことで次の 3 つの主な結果が得られた。1) トクモンキーの尾長には集団間でちがいがあり、標高とともに長さは短くなる。この性質と亜種間変異の関係を探る目的で、サル の全身写真のデジタルイメージを使い胴長に対する尾の長さを測り集団間でこの表現型形質を非侵襲的に調べる方法を開発した。パソコン画面上でマウスを使って描いた尾と胴体のラインに沿ってピクセル距離 (pixel distance) を測定した。この方法によりサルとの距離に関係なく二つの体長の比が計算できる。現在この方法で、表現型的に区別されるトクモンキーの 3 亜種ならびに mtDNA で区別できた 2 ハプログループを代表する 23 群から平成 26 年と 27 年に集めた 172 枚の映像を使い検証を進めている。2) マカクマラリアを調べるため PCR プライマーを開発し試験した。これを使いトクモンキーで亜種と寄生虫の共進化を調査しようと考えている。3) カオムラサキラングールとグレイラングールの集団で体色変異を発見し糞試料を採取した。毛色に関係するメラノコチン 1 受容体 (MC1R) 遺伝子に突然変異があるかを調べようと考えている。ヒト以外の霊長類ではこれまでこの座位の遺伝子変異による毛色変化は発見されていない。亜種のちがいを説明する視点を提供するかもしれない。

平成 28 年には 3 つの主要成果が得られた。1) 平成 27 年の海拔 2~2,129 メートルのトクモンキー 27 地域 167 試料について明瞭な尾長の変異が認められた。尾率と標高には統計的に有意な関係があった (LMM $2=15.45$, $P<0.0001$)。この指標は標高 100 メートルごとに 0.031 (標準誤差+0.007) 減少した。この変異は亜種の境界には厳密に対応せず、むしろ本種が標高に対してアレンの法則に従う適応をもつことを示していた。2) 平成 28 年には想定されている 3 亜種に渡るさまざまな標高帯の新調査地から追加試料が得られた。標高のみが表現型変異の決定要因ではなさそうなことの外には以前と同様の傾向が確認できた。アレンの法則から予想すると、標高以上に気温の違いがさらに重要である。スリランカの高地には 2 種類の生息環境があり、それらは乾燥した山林と湿潤な山林である。同じ標高でも年間の平

均気温が異なれば、平均気温が標高に勝る影響をもつと予想された。現在この予想を検証するために気温のデータを集めている。3)核に転移した mtDNA フラグメントの影響を回避するため、新しい PCR プライマーを作成し、平成 26~28 年に集めた試料を使いカオムラサキラングールとグレイラングールの亜種の違いを試験した。これら2種の亜種の違いを調査するためさらにこれらのプライマーを利用していく。

最後にこれら3種について寄生虫の遺伝学的研究を始めた。そこでは霊長類に広くみられる腸管寄生虫の腸結節虫 (*Oesophagostomum* spp.) 鉤虫 (*Necator* spp.) 線虫 (*Strongyloides fülleborni*) ならびにマラリア (*Plasmodium cynomolgi*, *P. coatneyi*, *P. inui*, and *P. knowlesi*) のプライマーを開発した。しかし、この研究はスリランカからの試料持ち出しができなかったため完成に至らなかった。

この3年間のプロジェクトで集めた36カ所のトクモンキー群のデータを用いて、尾長変異ならびに生息地、高度、気候の相対的役割に関する結果をまとめる。私たちの研究の長期目標は、何が種を作るのか、そしてさらにこのプロセスで境界帯における亜種の相互作用の役割がどのようなものかを明らかにすることである。島の全域で各種につき集団の多様性をさらに深く理解することで、トクマカク、カオムラサキラングールおよびグレイラングールの系統地理を究明してゆきたい。

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8件)

Hasegawa, H, Kalousova, B, McLennan, MR, Modry D, Profousova-Psenkova I, Shutt-Phillips KA, Todd A, Huffman MA, Petrzalkova KJ (2016). Strongyloides Infections of Humans and Great Apes in Dzanga-Sangha Protected Areas, Central African Republic and in Degraded Forest Fragments in Bulindi, Uganda. *Parasitology International* 65:367-70. Doi: 10.1016/j.parint.2016.05.004 (May)

Hasegawa H, Shigyo M, Yanaia Y, McLennan MR, Fujita S, Makouloutoud P, Tsuchida S, Ando C, Satoh H, Huffman MA, Molecular features of hookworm larvae (*Necator* spp.) raised by coproculture from Ugandan chimpanzees and Gabonese gorillas and humans. *Parasitology International*, 査読有, 66, 2016, 12-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.11.003>

Ota N, Hasegawa H, McLennan MR, Kooriyama T, Sato H, Pebsworth PA, Huffman MA. (2015) Molecular identification of *Oesophagostomum* spp. from 'village' chimpanzees in Uganda and their phylogenetic relationship with those of other primates. *Royal Society Open Science* 2: 2015, 150471. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150471>.

Ito T, Kawamoto Y, Hamada Y, Nishimura T. (2015). Maxillary sinus variation in hybrid macaques: implications for the genetic basis of craniofacial pneumatization. *Biological Journal of the Linnean Society*, 査読有, 115: 333-347 DOI: 10.1111/bij.12528

Jadejaroen J, Kawamoto Y, Hamada Y, Malaivijitnond S (2015) An SNP marker at the STAT6 locus can identify the hybrids between rhesus (*Macaca mulatta*) and long-tailed macaques (*M. fascicularis*) in Thailand: a rapid and simple screening method and its application. *Primates*, 査読有, 57, 2015, 93-102. DOI: 10.1007/s10329-015-0502-2

Jadejaroen J, Hamada Y, Kawamoto Y, Malaivijitnond, Use of photogrammetry as a means to assess hybrids of rhesus (*Macaca mulatta*) and long-tailed (*M. fascicularis*) macaques. *Primates* 査読有, 2015, 56: 77-88. DOI: 10.1002/ajpa.22862

Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S, Maeno Y, Quang NT, Kaneko O, Huffman MA, Kawai S, Marchand RP, Carter R, Hahn BH, Culleton R, DNA from Pre-Erythrocytic Stage Malaria Parasites is Detectable by PCR in the Faeces and Blood of Hosts *International Journal of Parasitology* 査読有, 14, 2014, 467-473. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.03.002

Kawai S, Sato M, Hayashi-Kato N, Kishi H, Huffman MA, Maeno M, Culleton R, Nakazawa S Detection of a *Plasmodium knowlesi* DNA fragment in urine and fecal samples obtained from a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Malaria Journal*, 査読有, 13, 2014, 373. <http://www.malariajournal.com/content/13/1/373>

[学会発表](計6件)

Kawamoto Y, Shirai K, Naoi Y, Hagihara K, Shiratori D, Kawamoto S, Hamada Y, Kwamura A, Sugiura Y, Maruhashi T, Hayama S Assessment on hybridization of Japanese macaques with exotic rhesus macaques in Bousou Peninsula, Primate Society of Japan, July 19, 2015, Kyoto

Hamada Y, Kawamoto Y Phylogeny and classification of Assamese macaque (*Macaca assamensis*) and related taxa, Primate Society of Japan, July 20, 2015, Kyoto

Huffman MA, Kawamoto Y, Nahallage CAD, Kumara R, Shotake T, The 'grey zone' of langur phylogeography in Sri Lanka, Primate Society of Japan, July 20, 2015, Kyoto

Kawamoto Y, Genetic structure of island populations of crab-eating macaques in Indonesia and Japanese macaques, International Seminar: "Nonhuman Primates in Biology, Conservation and Biomedical Research" in Indonesia, August 31, 2014, Bogor, Indonesia

Huffman, MA, Satou M, Kawai S, Maeno Y, Kawamoto Y, Quang, N, Nakazawa S, Marchant R. The current situation of monkey malaria (*Plasmodium knowlesi*) in Khanh Phu, Vietnam. The 25th Congress of International Primatological Society, August 14, 2014, Hanoi, Vietnam

Huffman M.A. The human-primate interface - on-going zoonoses monitoring in Southeast Asia. Diversity and Conservation of Asian Primates, Kyoto University and Bogor Agriculture University International Symposium, August 18, 2014, Bogor, Indonesia

6 . 研究組織

(1)研究代表者

ハフマン、マイケル アラン

(HUFFMAN, Michael A.)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：10335242

(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：00177750

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

ナハラゲ、チャーマリ A.D. (NAHALLAGE, Charmalie AD)

スリランカのスリジャエデネプラ大学・人類学教室・教授