

第 2 章

兵庫県の子ホンザルの遺伝子解析

森光由樹・鈴木克哉

要 点

- ・兵庫県本州部に生息している 5 つの地域個体群、合計 10 群のミトコンドリア DNA 塩基配列の分析を行った結果、6 つの異なるハプロタイプが認められ、うち篠山では 2 つの異なるハプロタイプが検出された。
- ・ネットワーク解析の結果、美方および城崎の群れは、鳥取県に生息している若桜の群れに近い塩基配列、篠山の群れは京都府の嵐山の群れに近い塩基配列、大河内の群れは佐用餌付け群と近い塩基配列を示した。篠山の群れと佐用及び大河内の群れは特に遺伝的距離は離れていた。また、嵐山群と美方群との間、美方群と大河内群の間に消滅したと思われるハプロタイプが検出された。
- ・ミトコンドリア DNA 標識を用いて分析した結果、今回分析対象としたオスはすべて所属する群れのハプロタイプを示した。
- ・地域個体群の絶滅を回避し安定的に維持してゆくには、今後も各個体群の遺伝的多様性についてモニタリングを行い、遺伝的データを蓄積していくことが重要である。

key words : ミトコンドリア DNA 遺伝的多様性 遺伝子交流 オス移出入

2-1. はじめに

兵庫県に生息している子ホンザル (*Macaca fuscata*) の群れは、餌付け群を含めて 6 地域に存在しているが、それぞれ地理的に孤立している (安井 2013)。孤立した群れは他の群れと繁殖する機会が少なくなり、遺伝的交流が阻害され遺伝的多様性が失われていく可能性がある。多様性を失った群れは近交弱勢により絶滅する可能性が高くなる (Frankham *et al.* 2002)。全国の子ホンザルを対象とした遺伝分析の研究では、ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) の特徴を詳細に分析し地域間で比較した報告がある (Kawamoto *et al.* 2007)。しかし、兵庫県内に生息している子ホンザルの群れの遺伝的情報について、ほとんど報告されておらず、保護管理に利用できる情報は存在していない。そのため、各個体群の遺伝情報の蓄積は緊急課題である。

DNA は、核の他に細胞質内にあるミトコンドリアという小器官にも存在している。mtDNA の特徴は、母親由来のものだけが子どもに引き継がれ、核 DNA のような組換えを起こさない、独自の遺伝様式をとるところにある (Birky 1978; Potter *et al.* 1975)。

つまり、父系母系が入り交じる核 DNA とは異なり、連綿と続く母系系統を遡って追求することが可能である。一方、ニホンザルの群れの構成単位はメス家系で群れは母系社会である(伊谷 1972)。群れが分裂するとき、そのメンバーは均等には分かれず母系を単位に新群が形成される(小山 1977)。これは、群れの中で突然変異が蓄積すると、分裂に伴って mtDNA の変異が群れ単位で分かれることを意味する。また、mtDNA は核 DNA と比べて塩基置換の速度が 5~10 倍ぐらい高いことが知られており(Brown *et al.* 1979)、近い過去を含む系統関係を調べるのに、大変便利な分子指標である。したがって、mtDNA はニホンザルの地域個体群成立や分布拡大の過程を調べる上で有用である。

また、ニホンザルの保全を考える上で、地域個体群間でのオスの移動は重要である。ニホンザルの生殖の特徴として、オスは基本的に性成熟に達した段階で出生群を出て、他の群れへ移入し子孫を残すことが知られている(Sugiyama 1976)。オスの場合、mtDNA は 1 代限りで消失して次世代には伝達されない。したがって、この特徴を利用すれば、オトナオスとその群れのメスの mtDNA のハプロタイプを比較することで、オスの移出入を調べることが可能となる。

そこで、本研究では、兵庫県に生息しているニホンザルの地域個体群の mtDNA 非コード領域、第 2 可変機を含む 412 塩基対を分析した。そしてニホンザルの群れ間の遺伝的交流で重要なオスの移出入について mtDNA を分子標識に用いて検索を行った。

2-2. 材料と方法

個体からの試料収集

1) 地域個体群の分析

兵庫県の本州部に生息しているニホンザル 10 群(城崎 A 群、美方 A 群、篠山 A 群、B 群、C 群、D 群、大河内 A 群、B 群、C 群、佐用餌付け群)に所属しているメス個体のうち、それぞれの群れから 2 頭、計 20 頭を捕獲し血液を採取した(表 2-1)。捕獲に際しては、兵庫県から学術捕獲許可を得て群れの行動域内に箱わなを設置し捕獲した。箱わなで捕獲した個体は、麻酔を導入してから採血を行った。使用した麻酔薬は、ケタミン(商品名ケタラール第一三共プロファーマ 50mg/ml 濃度液を 1ml)とメドトミジン(商品名ドミトール日本全薬工業 1mg/ml 濃度液を 1ml)の混合麻酔液を用いた。麻酔薬ケタミンは麻薬指定のため購入及び使用にあたり県知事から許可を受けて使用した。採取した血液は、遠心分離機で白血球を分離(5000 回転で 15 分間)してから -20°C で冷凍保存し分析試料とした。

2) オス個体の分析

前述した 10 群から、各群れに所属しているオトナオス(性成熟に達している 6.5 歳以上)を 1 頭、計 10 頭を捕獲し、血液試料を採取した。上記と同じ条件で白血球を分離してから冷凍保存し分析試料とした(表 2-1)。

表 2-1 分析に供した試料

地域個体群	群名	成獣メス(頭)	成獣オス(頭)
豊岡	城崎A群	2	1
美方	美方A群	2	1
	大河内A群	2	1
大河内・生野	大河内B群	2	1
	大河内C群	2	1
	篠山A群	2	1
篠山	篠山B群	2	1
	篠山C群	2	1
	篠山D群	2	1
	佐用	佐用餌付け群	2

試料からの DNA 抽出と PCR による増幅

白血球からの DNA 抽出は、QIAamp DNA Micro Kit(QIAGEN)を用いて、添付のプロトコルに従い行った。目的領域 mtDNA Dloop 第 2 可変域 412 塩基対 (Hayasaka *et al.* 1991; Kawamoto *et al.* 2007) を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて増幅した。PCR 法とは、試験管内で DNA を増やす方法である。PCR 法による DNA の増幅は DNA サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社) を使用した。その過程は、最初に二本鎖 DNA を入れた反応液を 94°C で 5 分間加熱し熱変性させた後、①94°C で 10 秒間加熱 (二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に分離)、②45°C で 10 秒間加熱 (アニーリング: それぞれの一本鎖 DNA にプライマーとよばれる DNA 増幅に使う約 20 塩基の DNA1 本鎖の断片を結合)、③72°C で 10 秒間加熱 (伸長反応: プライマーを起点として相補的な DNA 鎖を合成)、という三つの過程を 1 サイクルとして 30 回繰り返し、最後に 72°C で 3 分間加熱 (最終伸長反応) することにより、mtDNA 非コード領域、第 2 可変域を含む 412 塩基対を増幅した。PCR は 2 μ l の DNA 溶液、2 \times PCR Buffer を 10 μ l、2mM dNTP を 4 μ l、10pmol μ l / のプライマーを Forward、Reverse それぞれ 0.8 μ l ずつ、1.0unit KOD FX Polymerase、1 μ l(Toyobo Life Science)と滅菌水を加え、合計 20 μ l にして反応を行った。プライマーは、Hayasaka *et al.* (1991)を参考に合成した。

シーケンスサンプルの調整と塩基配列の解析

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems 社)を用いて、添付のプロトコルに従いシーケンスサンプルの調製を行った。増幅した PCR 産物を 4 つの蛍光色素でラベリングした。蛍光色素でラベルされた遺伝子を Genetic Analyzer

MODEL3130 (Applied Biosystems)を使って解読した。蛍光情報から解読された塩基配列データは、TCS ネットワーク解析 <http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html> を用いて、各地域個体群の遺伝子プロフィールをまとめ、ハプロタイプの決定と系統樹の作成を行った。なお、兵庫県の孤立個体群の特徴を理解するために、隣接県に生息している嵐山群（京都府）、若桜群（鳥取県）のハプロタイプの情報を解析データに加えた。塩基配列データは、DNA データベースに登録されている配列を用いた（Gen Bank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>）。

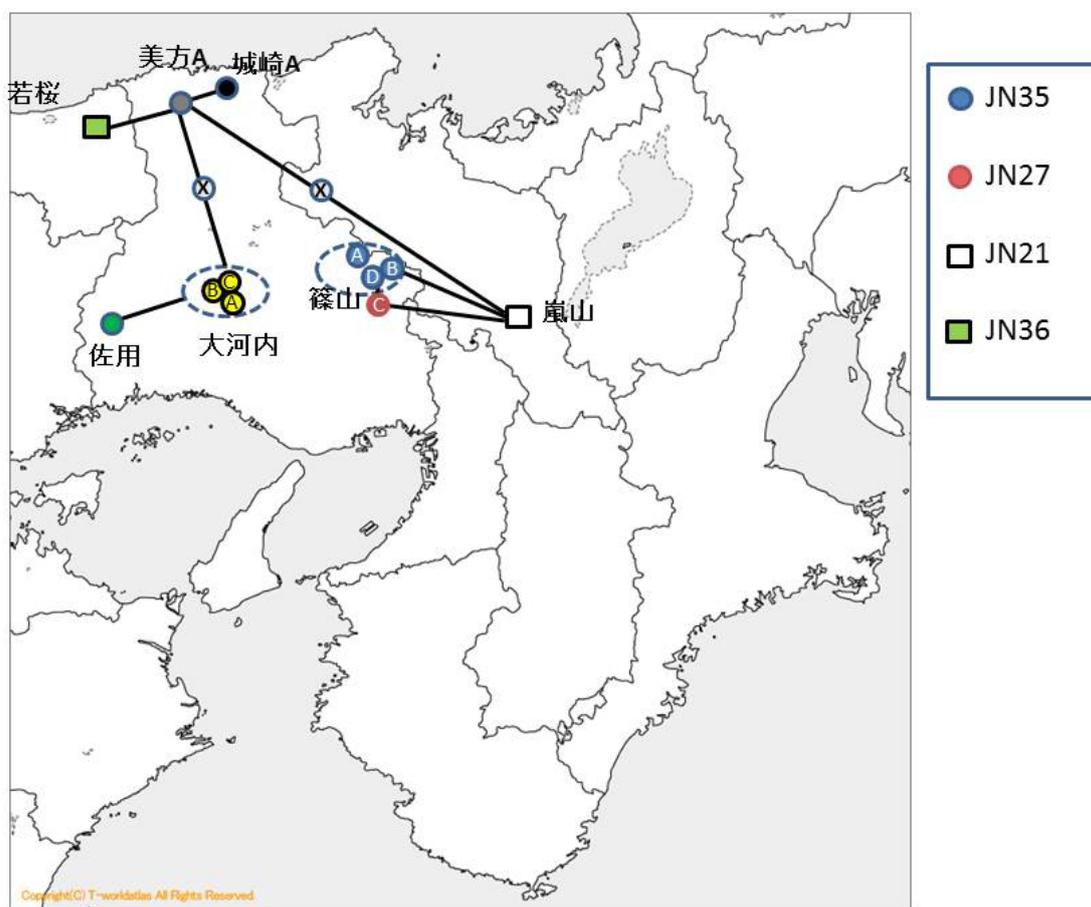


図 2-2 作成されたハプロタイプのネットワーク解析 (TCS 法)

JN コードのタイプは Kawamoto *et al.*(2007)で報告済みのタイプ、他は新たに発見されたハプロタイプを示す。ⓧは解析予想で、すでに消滅した可能性の高いハプロタイプを示す。

2-3. 結果および考察

兵庫県産ニホンザルメスの mtDNA の特徴

兵庫県の本州部に生息している 5 地域のニホンザル 10 群において mtDNA の D ループ可変域、412 塩基対の配列を解読した結果、6 つのハプロタイプを検出した (表 2-2)。それぞれの地域個体群で異なるハプロタイプを示し、このうち篠山地域個体群内では 2 つのハプロタイプが検出された。このうち、篠山 A 群、篠山 B 群、篠山 D 群のハプロタイプは Kawamoto *et al.* (2007) で報告済みのハプロタイプ JN35 と、篠山 C 群のハプロタイプは JN27 と同じであった (表 2-2)。他の地域個体群のハプロタイプは、今回の分析で新たに発見されたハプロタイプであった (表 2-2)。

美方および城崎の群れは、鳥取県に生息している若桜の群れ (JN36) に近い塩基配列を示し、篠山の群れは京都府の嵐山の群れと近い塩基配列、大河内の群れは、佐用餌付け群と近い塩基配列を示した (図 2-2)。篠山に生息している群れと佐用及び大河内の群れは特に遺伝的距離は離れていた (図 2-2)。ネットワーク解析で、嵐山群と美方群との間に、消滅したと思われるハプロタイプが 1 つ検出された。美方群と大河内群の間でも、消滅したと思われるハプロタイプが 1 つ検出された (図 2-2)。

これらハプロタイプの違いがもたらされた理由として地理的要因があげられる。例えばこれまでの先行研究では、北アルプス山系では東西 (長野県側の集団と富山県側の集団) で mtDNA のハプロタイプの系統が大きく異なっていて、分布の拡大は北アルプス稜線を超えて起きていないことが報告されている (森光ほか 2000; 赤座・川本 2006; Kawamoto *et al.* 2007)。同じことが、滋賀県琵琶湖に生息している地域個体群でも認められており、mtDNA のハプロタイプに、東西の集団で大きく二つのグループが認められ、琵琶湖が分布拡大の制限要因になっていたと推測されている (高木・川本 2002)。

しかし、兵庫県内に生息している個体群との間には、大きな山脈や河川は認められず、個体群を隔てる物理的障害があったとは考えにくい。そこで考えられるもう一つの要因として人為的影響が考えられる。明治以降から増加したサルの狩猟 (三戸・渡邊 1999) や長い人間との軋轢の中で、農業被害の防除対策として行われてきた捕獲が、連続分布していたサルの群れを局所的に消滅させ、地域個体群の孤立が進んだ可能性がある (清水ほか 1996; 室山ほか 1999)。その結果、県内で中間的なハプロタイプが消失し、それぞれの地域個体群で独自の変異が進み、異なるハプロタイプが検出された可能性がある。また、近畿・中国地方は、江戸時代後半から製塩や製鉄などの産業用の木材消費量が上昇して森林伐採が進み、はげ山となった地域が多かった (千葉 1991)。このような森林利用状況が群れの分布拡大を抑制していた可能性もある。しかし詳細はよくわかっていない。過去の化石などを分析して、現在生息している群れの遺伝子情報と比較することで、ハプロタイプの違いの理由と消滅した群れの関係が、より詳細に見えてくる可能性がある。

オスの移出入の検索

地域個体群の遺伝子マップを用いて、今回分析した成熟オス個体 10 頭の mtDNA ハプロタイプの照合を行った。その結果、所属している地域個体群（メスの mtDNA）とオスは同じ塩基配列を示し、出生群からの離脱は認められず（表 2-2）、他の群れからの移入は確認されなかった。しかし、今回分析したサンプルはわずかであり、地域個体群間でのオスの交流が無いとは言えない。今後引き続き、兵庫県に生息しているオスのサンプルを採取して分析データ数を増やす必要がある。これらの情報はニホンザルオスの移住をモニタリングする上で重要であり保護管理に有益な資料となる。

表 2-2 オスのミトコンドリア DNA のハプロタイプ

地域個体群	群名	メスのハプロタイプ	オスのハプロタイプ
豊岡	城崎A群	城崎Aタイプ	城崎Aタイプ
美方	美方A群	美方Aタイプ	美方Aタイプ
大河内・生野	大河内A群	大河内タイプ	大河内タイプ
	大河内B群	大河内タイプ	大河内タイプ
	大河内C群	大河内タイプ	大河内タイプ
篠山	篠山A群	JN35	JN35
	篠山B群	JN35	JN35
	篠山C群	JN27	JN27
	篠山D群	JN35	JN35
佐用	佐用餌付け群	佐用タイプ	佐用タイプ

2-4. まとめ

本研究から、兵庫県本州部に生息している 5 つの地域個体群の遺伝子マップを作成することができ、ハプロタイプに違いが確認できた。また、この遺伝子マップを用いることでサルの出生個体群を遺伝子データの照合で判定することが可能となった。また、地域個体群のハプロタイプのデータを用いて、オスの移出入を調査したが、今回分析対象としたオスはすべて所属する群れのハプロタイプを示した。

もし仮に地域個体群間でのオスの交流がない場合、遺伝的浮動や近親交配による遺伝的変異の消失や近交弱勢のために絶滅の可能性が高くなる (Frankham *et al.* 2002)。北米に生息しているネコ科の動物、フロリダパンサーは、近親交配の影響で、停留睾丸症の発病が多くなり、精子奇形率が著しく増加し、繁殖障害が発生した報告がある。

(Seal&Lacy 1989)。また、個体群内で近親交配が進んだ場合、繁殖障害が起こる可能

性も考えられる。現在、兵庫県のニホンザルは、毎年、実施されている個体数カウント調査で、出産率の低下は認められていない（鈴木ほか 2013）。また、妊娠率の低下などの繁殖障害についても認められていない（森光ほか 2013）。今後は、地域個体群の絶滅を回避し、安定的に維持してゆくには、個体数の増減や繁殖状況などとともに遺伝的多様性についてモニタリングを継続し、個体群の健全性の把握に努めることが重要である。分析サンプルを増やしてマクロサテライト遺伝子やY染色体遺伝子などの分析による地域個体群の遺伝的評価を実施する必要がある。

謝辞

本研究を実施するにあたり、分析技術に関して、京都大学霊長類研究所の川本芳博士からご指導いただきました。また、本研究の一部は、兵庫県立大学特別研究助成金と京都大学霊長類研究所共同利用研究（H21-A3-8）の助成を受け実施しました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 赤座久明・川本芳（2006）北アルプス周辺におけるニホンザルのミトコンドリア遺伝子変異. 霊長類研究 20 :40-41.
- Birky CWJr (1978) Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annual review of genetics*.12:471-512.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:1967-1971.
- 千葉徳爾（1991）はげ山の研究(増補改訂), pp.118-173. そしえて.東京.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA（2002）Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.: 27-39.
- Hayasaka K, Ishida T, Horai S (1991) Heteroplasmy and polymorphism in the major noncoding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: association with tandemly repeated sequences. *Molecular biology and evolution* 8:399-415.
- 伊谷純一郎（1972）霊長類の社会構造.生態学講座第 20 卷, pp. 161. 共立出版.
- Kawamoto Y, Shotake T, Nozawa K, Kawamoto S, Tomari K, Shirai K, Morimitsu Y, Takagi N, Akaza H, Fujii H, Hagihara K, Aizawa K, Akachi S, Oi T, Hayaishi S（2007）Postglacial population expansion of Japanese macaques (*Macaca fuscata*) inferred from mitochondrial DNA phylogeography. *Primates* 48: 27-40.
- 小山直（1977）ニホンザルの社会構造.人類学講座 第 2 卷 霊長類. 伊谷純一郎編, pp.225-276. 雄山閣出版.
- 三戸幸久・渡邊邦夫（1999）人とサルの社会史, pp.110-116. 東海大学出版会.

- 森光由樹・泉山茂・赤座久明・今木洋大・川本芳（2000）中部山岳地方のニホンザル地域個体群の保護管理を目的とした遺伝的モニタリング法の検討. 霊長類研究 16: 288.
- 森光由樹・鈴木克哉・中村幸子・斎田栄里奈（2013）兵庫県の野生ニホンザルにおける繁殖率把握方法の検討. 「兵庫県におけるニホンザル地域個体群の管理手法」, ワイルドライフモノグラフ 5号, pp.27-32. 兵庫県森林動物研究センター.
- 室山泰之, 鳥居春巳, 前川慎吾（1999）近畿・中国ニホンザルフォーラム. 近畿地方における野生ニホンザルの分布と保護・管理の現状. ワイルドライフ・フォーラム 5: 1-14.
- Potter SS, Newbold JE, Hutchison CA, Edgell MH (1975) Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72: 4496-4500.
- 清水聡・武田庄平・金澤忠博・朝日稔（1996）兵庫県のニホンザル分布：アンケート調査による分布の変化を中心に. 霊長類研究 12: 231-240.
- Seal US, Lacy RC（1989）Florida panther *elis concolor conyi* Viability Analysis and Species Survival Plan. Conservation Breeding Specialist Group (SSC/IUCN), Apple Valley, MN.
- Sugiyama Y (1976) Life history of male Japanese monkeys. *Advances in the Study of Behavior* 7:255-284.
- 鈴木克哉・森光由樹・山田一憲・坂田宏志・室山泰之（2013）兵庫県の生息するニホンザルの個体数とその動向. 兵庫ワイルドライフレポート 1: 68-74.
- 高木直樹・川本芳（2002）ミトコンドリア DNA を用いた滋賀県のニホンザルの遺伝的モニタリング. 霊長類研究 18:411.
- 安井淳雅（2013）兵庫県のニホンザルによる被害の現状と対策「兵庫県におけるニホンザル地域個体群の管理手法」, 兵庫ワイルドライフモノグラフ 5号, pp.2-18. 兵庫県森林動物研究センター.