[6] 環境省自然環境局生物多様性センター（2004）『種の多様性調査：哺乳類分布調査報告書』（第6回自然環境保全基礎調査）.
[7] Nozawa, K., Shotake, T., Kawamoto, Y., and Tanabe, Y.（1982）Population genetics of Japanese monkeys: Ⅱ. Blood protein polymorphisms and population structure. Primates, 23:252-271.
[8] Nozawa, K., Shotake, T., Minezawa, M., Kawamoto, Y., Hayasaka, K., Kawamoto, S., and Ito, S.-H.（1991）Population genetics of Japanese monkeys: Ⅲ. Ancestry and differentiation of local populations. Primates, 32:411-435.
[9] Kawamoto, Y., Shotake, T., Nozawa, K., Kawamoto, S., Tomari, K., Kawai, S., Shirai, K., Morimitsu, Y., Takagi, N., Akaza, H., Fujii, H., Hagihara, K., Aizawa, K., Akachi, S., Oi, T., and Hayaishi, S.（2007）Postglacial population expansion of Japanese macaques（*Macaca fuscata*）inferred from mitochondrial DNA phylogeography. Primates, 48:27-40.
[10] Hayasaka, K., Kawamoto, Y., Shotake, T., and Nozawa, K.（1987）Population genetical study of Japanese macaques, *Macaca fuscata*, in the Shimokita A1 troop, with special reference to genetic variability and relationships to Japanese macaques in other troops. Primates, 28:507-516.
[11] Hayaishi, S. and Kawamoto, Y.（2006）Low genetic diversity and biased distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Japanese macaque（*Macaca fuscata yakui*）on Yakushima Island. Primates 47:158-164.
[12] Yasuda, Y., Yamaguchi, K., Nakagawa, T., Fukusawa, H., Kitagawa, J., and Okamura, M.（2004）Environmental variability and human adaptation during the Lateglacial/Holocene transition in Japan with reference to pollen analysis of the SG4 core from Lake Suigetsu. Quaternary International 123-125:11-19.
[13] Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik R.I., Olckers, A., and Wallace, D.C.（2003）Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:171-176.
[14] 吾妻　健，石上盛敏（2002）「古代ニホンザルのDNA分析」. Asian Paleoprimatology, Vol. 2:75-88.
[15] 毛利俊雄，吾妻　健，石上盛敏，川本　芳（2000）「ミトコンドリアDNA変異を用いた種判別：沖縄県首里城出土マカク古骨と現生種の比較」，『霊長類研究』16:87-94.

3　テナガザル亜種・種分化の分子系統分析

近年，さまざまな生物で分類をより細かく分ける傾向がある。テナガザルについてもこれがあてはまる。1995年の分類[1]では1属であったテナガザル（*Hylobates*）属は，それまで染色体数に基づいて分けられていた亜属が昇格したことにより4属になった[2]。また，本節で問題とするカリマンタン南西部の *H. agilis albibarbis*（以下，アルビバルビスまたは *albibarbis* と表記する）は，従来，スマトラやマレー半島の一部に生息するアジルテナガザル（*H. agilis*）の亜種と位置づけられていた分類群であるが，グローブズ[2]は独立種として扱うことを提唱した。これは亜種が種に昇格した例といえよう。

こうした分類体系の変化にくわえて，テナガザルの系統進化の研究においては，さまざまな問題がある。大型類人猿に比して種数の多いテナガザルは，これまでにも分子を用いた系統関係の研究対象になってきた。しかし，それらの研究では，分析に含める種や種数が違っており，また分子マーカーも異なるため，研究者ごとに推定する系統関係が違う結果もみられ，依然として明らかでない状態がつづいている。それ以外にも，最近の研究では，いままで分析された個体の中に，誤同定された種が含まれていることが指摘されている[3, 4]。

どうしてこのようなことが起こるのだろうか？ 1つの原因として，形態的特徴を指標にした種や亜種の分類が専門家以外には難しいことがあげられる。テナガザルの音声コミュニケーションの特徴は，種や亜種を区別するのに良い指標とされるが[5]，これも専門の技術と分析機器が必要である（第5章1参照）。一方，形態的な分化にくらべ遺伝的な分化がすすんでいないため，テナガザルの近縁種では野生状態でも種間雑種ができるという報告がある[6]。飼育下では，こうした問題がより起こりやすいと考えられる。従来の研究では動物園や研究機関で飼育された個体が分析されたケースが多く，誤って同定された個体や雑種が分析に用いられることがあったのかもしれない。

こうした混沌とした状況を是正するため，テナガザルを多面的に研究するプロジェクトが計画され，そこで私は分子系統分析を担当した。本稿では，そのとき行った分子系統分析の方法および結果について述べる。

■テナガザル・プロジェクト

こうした状況を考えると，いかに非雑種の個体を見分け，分析に用いるかが重要となる。テナガザルは，熱帯雨林の樹上に棲むため，捕獲するのはほとんど不可能である。そのため，生息地に近い町や村でペットとして飼育されている個体を見つけ出し，試料採集を行うのが最も良い方法と考えられた。ペットのオーナーからペットの来歴についての情報も聞くことにした。プロジェクトには，テナガザルの形態分類の専門家や染色体の研究者も参加している。同一個体の形態－染色体－DNAを分析することにより，しかもより多くの個体でこうしたデータを蓄積することによって，正しい種とそれが持つ遺伝的特徴を明らかにすることをめざした。

このプロジェクトのきっかけとなったのは，テナガザルの染色体変異の解析である。アジルテナガザル（*H. agilis*）でみつかった染色体転座変異[7]の地理的分布の調査から，その変異がスマトラ産アジルテナガザルだけに特異的に分布していることが発見された（本章1参照）[3]。この事実を確かめるとともに，分子遺伝学的な分析との比較を行うため，アジルテナガザルの亜種と近縁種の研究を始めることになった。

先ほどでてきたカリマンタンのアルビバルビスは，音声コミュニケーションの特徴では，スマトラアジルテナガザルに類似するのだが，形態的な特徴，特に被毛色にアジルテナガザルと大きな違いがあるため，グローブズ[2]により独立種とされた経緯がある。しかしながら，その系統的・遺伝的位置づけについては，分子遺伝学的なデータに基づいて検証されたわけではなかった。そのため，アルビバルビスの系統的・遺伝的位置づけを明らかにすることが本プロジェクトのテーマの一つになった。

■共同研究体制の確立と試料採集

日本にはニホンザル以外の野生のサルは生息していない。したがって，ニホンザル以外のサル類を研究対象とする場合，原産国における研究機関との共同研究体制の確立は必須である。現地での調査許可を取る必要もあるし，採集した試料の処理等で実験室を借りる必要が出てくるかもしれない。今回のプロジェクトは，調査地がインドネシアである。霊長類研究所とインドネシアのボゴール農科大学は，長年の学術的な交流があるため，今回のプロジェクトについてもすぐに話し合うことができた。また，全てのサル類はワシントン条約の附属書Ⅰ類かⅡ類に含まれているため，試料の移動についても簡単にはいかない。私たちは，血液やDNA等の遺伝分析用の試料を日本に持ち込むために，インドネシアからの輸出許可書と日本への輸入許可書の申請準備に早めにとりかからねばならなかった。

私たちは，2002年8月，2003年2月および2003年9月の3回，調査・試料採集のためインドネシアを訪れた。調査に先だって，獣医であり学位を取るためボゴール農科大学で研究しているヘリ・ウィジャヤントさんが，スマトラやカリマンタンでテナガザルをペットとして飼育している人を捜し回ってくれた。私たち

は，ボゴール農科大学霊長類センター（以下，PSSP と呼ぶ）の隣のゲストハウスに滞在し，調査許可の下りるのをまって，スマトラのパダンやカリマンタンのパランカラヤ，バンジャルバルへ出かけた。

現地では，レンタカーを雇ってテナガザルをペットに持つ人のところを回った。まず，ヘリさんがオーナーにペットザルの由来を尋ね，麻酔と採血の許可をお願いした。麻酔後，速やかに採血し，デジタルカメラでテナガザルの外部形態を撮影した。採血量は，オトナから 4 ml，コドモからは 2 ml とした。ボゴールでは，PSSP の微生物学・免疫学研究室の実験室を借りて細胞培養と DNA 抽出を行った。DNA 抽出には，キアゲンの QIAamp Blood Mini Kit を使った。このキットは全血からの DNA 抽出が可能であるが，このときは，遠心分離した白血球分画を用いて，高濃度の DNA を調製した。また，滞在期間中にインドネシア・サファリパークやラグナン動物園で飼育されていたテナガザルからも試料採集を行った。

■テナガザルの試料

今回分析に用いたテナガザルは，表 1 にあげた 6 分類群からなる合計 56 頭である。外部形態の写真から雑種の疑いのあると判定された個体は，分析からはずした。動物園由来の個体については，写真判定による分類と染色体解析の結果 [8] を合わせて，雑種ではないと判断された個体のみ分析に用いた。形態観察によりスマトラ産アジルテナガザル（*H. a. agilis* または *H. a. unko*）と同定された個体は，すべて特徴的な第 8/9 染色体間相互転座変異（WAT）を持っていた。この変異をヘテロ接合でもつ個体も存在した（表 1）。また，これら 2 亜種の区別が困難な個体も含まれていた。アルビバルビスやミューラーテナガザルについては，形態観察の結果と WAT を持たないことに基づいて分子分析の対象とした。比較のため，シロテテナガザル（*H. lar*），ワウワウテナガザル（*H. moloch*）及びフクロテナガザル（*Symphalangus syndactylus*）も分析に加えた（表 1）。本研究で分析対象としたテナガザルのうち，フクロテナガザル以外の分類群は，*Hylobates* 属に属し，染色体数が $2n = 44$ 本である。この属は別名 *lar*- グループとも呼ばれる。

表１　本研究で分析されたテナガザルの試料と外部形態に基づく分類と染色体変異

試料コード	性別	由来	原産地	外部形態に基づく分類・種	第 8/9 染色体変異**
Hy0201	♂	インドネシアサファリパーク	不明	*H. agilis unko*	T/T
Hy0202	♀	インドネシアサファリパーク	不明	*H. agilis unko*	T/T
Hy0207	♀	ペット（ジャカルタ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/T
Hy0208	♂	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/+
Hy0209	♂	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/T
Hy0210	♀	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/+
Hy0211	♂	ブキティンギ動物園	スマトラ	*H. agilis unko or agilis*	T/T
Hy0212	♀	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko or agilis*	T/T
Hy0213	♀	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko or agilis*	T/T
Hy0216	♂	ラグナン動物園	不明	*H. agilis unko*	T/T
Hy0217	♀	ラグナン動物園	不明	*H. agilis agilis*	T/T
Hy0218	♂	ラグナン動物園	不明	*H. agilis unko*	T/T
Hy0219	♂	ラグナン動物園	不明	*H. agilis unko or agilis*	T/+
Hy0220	♂	ラグナン動物園	不明	*H. agilis unko*	T/T
Hy03S1	♂	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/T
Hy03S3	♀	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/T
Hy03S4	♀	ペット（スマトラ）	スマトラ	*H. agilis unko*	T/T
Hy0204	♂	インドネシアサファリパーク	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0214	♀	ラグナン動物園	不明	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0301	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	n. e.***
Hy0302	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0305	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0307	♀	ペット（カリマンタン）	不明	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0308	♀	ペット（カリマンタン）	不明	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0317	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0318	♂	ペット（カリマンタン）	不明	*H. agilis albibarbis*（?）	+/+
Hy03K1	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K2	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K3	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K4	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K5	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K6	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K7	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K8	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K9	♂	ペット（カリマンタン）	不明	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy03K10	♂	ペット（カリマンタン）	不明	*H. agilis albibarbis*	+/+
Hy0206	♀	ペット（ジャカルタ）	不明	*H. muelleri*	+/+
Hy0215	♂	ラグナン動物園	不明	*H. muelleri*	+/+
Hy0303	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0309	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0310	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0311	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0312	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0313	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0314	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0316	♂	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0319	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*	+/+
Hy0320	♂	ペット（カリマンタン）	不明	*H. muelleri*	+/+
Hy0322	♀	ペット（カリマンタン）	カリマンタン	*H. muelleri*（?）	n. e.***
Hy0323	♂	ペット（カリマンタン）	不明	*H. muelleri*	+/+

HlarPRI	♂	京都大学霊長類研究所	不明	*H. lar*	+/+
Hlar9	F	京都大学霊長類研究所	不明	*H. lar*	+/+
Hmol1	♂	PSSP*	ジャワ	*H. moloch*	−
Hmol2	♀	PSSP	ジャワ	*H. moloch*	−
Hmol3	♂	PSSP	ジャワ	*H. moloch*	−
Sia4	♂	PSSP	スマトラ	*Symphalangus syndactylus*	−

*ボゴール農科大学霊長類センター
**第 8/9 染色体相互転座（WAT）の有無　T/T：WAT のホモ接合体，T/+：WAT と正常のヘテロ接合体，+/+：正常のホモ接合体
***分析せず

■分子遺伝マーカーの選択

これまでのテナガザルの系統分析で用いられた分子マーカーは，母性遺伝するミトコンドリア DNA（mtDNA）の ND3-ND4 遺伝子領域 [4]，ND4-ND5 遺伝子領域 [9]，D-loop 領域 [10]，16S リボゾーム RNA [11]，チトクロームb [12] などである。一般的に mtDNA の中で，D-loop 領域は同種の個体間で違いが見つかるほど変異性が高いため，種内の系統地理学的研究に用いられている。一方，16S リボゾーム RNA やチトクローム b などは，種内変異の程度は低いため種レベルの系統関係の推定によく使われている。ND3-ND4 領域や ND4-ND5 領域は，テナガザルでは種レベルの系統関係の解明のために分析されている [4, 9]。今回は，アジルテナガザルとその近縁種の関係を明らかにすることが目的であるため，ND4-ND5 遺伝子領域と D-loop 領域を選んだ。

Y 染色体上の TSPY 遺伝子も分析対象にした。理由は二つある。一つは，オスについてのみであるが，mtDNA と同時に分析することにより，雑種の検出が可能であるからだ。ミトコンドリアは母親から子供に遺伝するが，Y 染色体は父親から息子へ遺伝する。したがって，同一個体で互いに別の分類群のミトコンドリア DNA と TSPY 遺伝子を持っていたら，その個体は雑種と判定される。二つ目の理由は，遺伝様式の異なる複数の分子マーカーを分析することにより，より確かな系統関係を導きたいと考えたからである。テナガザルの場合，夫婦のペアとその子供からなる家族が単位となって生活を送る。子供は成長すれば，親から離れるが，基本的にオスとメスでの生活史はそれほど変わらないと考えられている。これは，ニホンザルのように，メスは生まれた群れに生涯とどまるが，オスはオ

トナになるまでに群れをはなれるという性別で生活史が異なる種類とは対照的である。こうしたテナガザルの生活史を考えて，それぞれの性別でのみ遺伝する分子マーカーから作られる系統関係が一致すれば，それはより確からしいと考えることができる。ただし，ミトコンドリア DNA と核遺伝子では進化速度が異なるので，大きく違う場合には，期待通りにならないことを考えておかねばならない。

■塩基配列の置換パターンにおける特徴

ミトコンドリア ND4-ND5 領域及び D-loop 領域，Y 染色体の TSPY 遺伝子は，先行研究 [9, 10, 13] に記載されたプライマーと条件で，PCR 増幅を行い，ダイレクトシークエンシング法で塩基配列を決定した。これらの塩基配列の塩基置換の特徴を把握するため，本研究のテナガザル全個体とヒト（mtDNA 全塩基配列：GenBank Accession No.NC001807; TSPY: X74029）及びチンパンジー（mtDNA 全塩基配列：No.X93335; TSPY: 文献 [13]）各 1 個体の相同な塩基配列を相互比較し，グラフ化した。具体的には，二つの塩基配列間の進化距離を横軸にとり，縦軸に置換タイプごと（転換と転移）の塩基置換数をプロットした（図 1）。これにより，塩基配列に多重置換が起こりはじめる分岐関係を調べることができる [14]。進化距離は，後で述べるように，それぞれの塩基配列について，尤度比検定に基づいて選ばれた塩基置換モデルを使用して算出した。

TSPY 遺伝子の転換の塩基置換が，進化距離が大きくなっても（分岐関係が遠くなっても）直線的な増加を示した。転移は，進化距離 0.02 あたりまで直線的に増加するが（*Hylobates* 属の種間の進化距離は，0.003 ～ 0.0016），それよりも遠い関係では多重置換が起こっている可能性がある。ミトコンドリアの二つの DNA 領域でも同様の傾向がみられ，テナガザルの属間（*Hylobates* 属と *Symphalangus* 属）の進化距離（ND4-ND5: 0.245 ～ 0.442, D-loop: 0.271 ～ 0.439）よりも近縁な関係ですでに塩基配列に多重置換が起こっていると予想された。

■分子系統の推定と分類群内・群間の塩基置換頻度

本研究で得られたテナガザルの塩基配列を用いて分子系統樹を作成するため，まず，コンピュータソフトウェア（Clustal X）を使用して塩基配列の整列を行っ

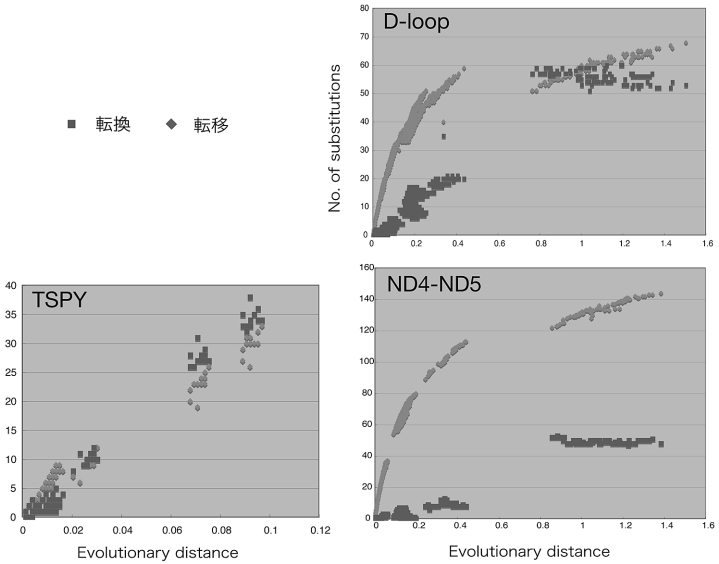

図１．分析した塩基配列の塩基置換パターン

た。次に，フクロテナガザルを外群として，DNA 領域ごとに最尤法と最節約法による系統分析を行った。最尤法に使用する塩基置換モデルについては，系統分析用ソフトウェア（Modeltest 3.6 と PAUP 4.0）により尤度比検定を行い，各 DNA 領域に相応しいモデルを選んだ（TSPY: HKY85, ND4-ND5: GTR+G, D-loop: HKY85+G+I）。最節約法では，Heuristic search 法により最節約系統樹の推定を行った。

TSPY 遺伝子では，オス個体 28 頭から 12 種類の TSPY タイプがみつかった。TSPY 遺伝子 739 塩基対（以下，bp と略す）を分析した結果は，最節約系統樹として図 2 に示した。樹形図上の数値は，ブートストラップ分析による分岐関係の信頼度である。この分岐関係は最尤法により得られた樹形と一致した。問題の種であるアルビバルビスは，同じボルネオ島に生息するミューラーテナガザルよりもスマトラのアジルテナガザルに近縁であることが明らかとなった。

mtDNA の ND4-ND5 領域の最尤法による系統樹を図 3 に示す。全ての個体から得られた 1040 bp の塩基配列を分析した。形態観察で分類された個体は，それぞれの分類群としてまとまった。分類群間の分岐関係は，最節約法の 50％ブートストラップ合意樹とほぼ一致した。しかしながら，スマトラのアジルテナガザ

ルが系統的に大きく分化した二つのタイプに分かれた点がTSPY遺伝子の樹形と異なる。一つは，アルビバルビスと姉妹群となるタイプ（*H. agilis* 1）で，もう一つは，シロテテナガザルとまとまるタイプ（*H. agilis* 2）である。では，同じmtDNAのD-loop領域の分析結果はどうなったのであろうか。図4は，D-loop領域887bpの最尤法による分析で得られた系統樹である。やはり，スマトラ産のアジルテナガザルが*H. agilis* 1と*H. agilis* 2のタイプに分かれた。ND4-ND5領域の樹形との違いは，*H. agilis* 1のクラスター内の分岐関係，ワウワウテナガザルとミューラーテナガザルが結合する点，および*H. agilis* 2タイプのハプロタイプとシロテテナガザルのハプロタイプの分岐関係であった。

最後に，各DNA領域について塩基置換頻度を分類群内と分類群間で比較する。塩基配列を相互比較し，分析した配列の長さに対する塩基置換サイトの割合の平均値を算出した。TSPY遺伝子では，分類群内ではワウワウテナガザルで比較的大きく0.68%，アジルテナガザル，アルビバルビス及びミューラーテナガザルでは，0.14～0.27%の変異性であった。分類群間では，アジルテナガザルとアルビバルビスの組み合わせで0.45 %，それ以外の組み合わせでは1%を超えた。ND4-ND5領域では分類群内の値が0.5～1.4%であるのに対して，群間は2例を除いて5.9～7.1%であった。例外とは，*H. agilis* 1と*albibarbis*の間に3%，また*H. agilis* 2と*H. lar*の間に1.7%の差異があった。D-loop領域は，より変異性が高かったが，ND4-ND5領域と同じ傾向を示した。分類群内が2.4～4.6%であり，分類群間は9.9～12.7%であった。問題の*agilis* 1と*albibarbis*の間で7.5%であり，*H. agilis* 2と*H. lar*の間は4.8%と種内の変異性に比肩する値であった。

■形態－染色体－分子の同時分析

本研究の分子系統分析では，スマトラ産アジルテナガザルのmtDNAタイプが2つの系統に分かれることを見いだした。このこと以外は，形態観察や染色体変異のタイプによる分類と矛盾のない結果であった。しかし，形態－染色体－分子による同時分析，さらにTSPY遺伝子とmtDNAの分析ではじめて雑種とわかる個体もみつかった。カリマンタンでペットとして飼われていたHy0318がそれである。染色体変異は正常のホモ接合体で，mtDNAも形態分類に矛盾なくアルビバルビスタイプであったが，TSPY遺伝子はスマトラのアジルテナガザルの

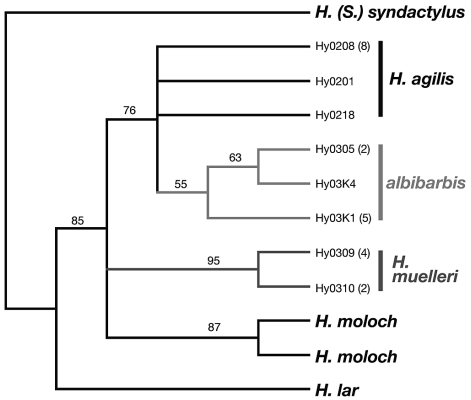

図 2　TSPY 遺伝子 739bp に基づく最節約系統樹．1000 回反復のブートストラップ分析の結果を枝上に示した．739 サイト中 702 サイトが不変サイト，13 サイトが parsimony-informative. CI = 0.95, RI = 0.92, RC = 0.872

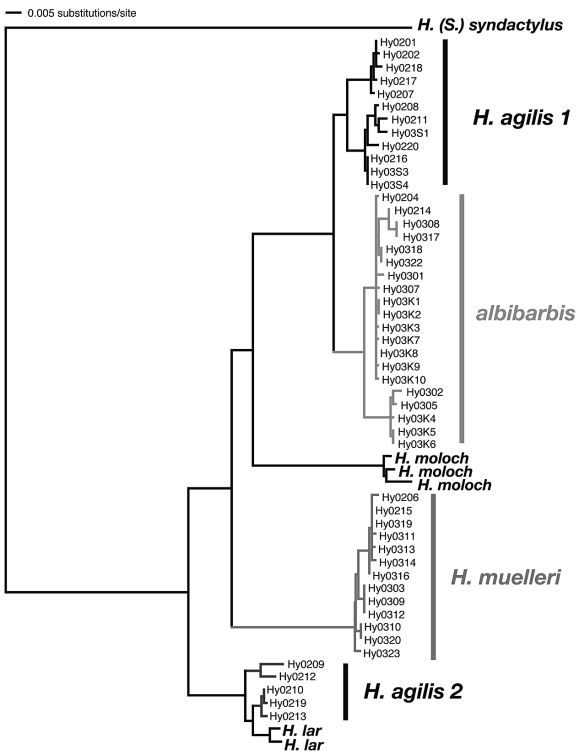

図 3　mtDNA の ND4-ND5 領域 1040bp に基づく最尤法による系統樹．
尤度比検定により選択された GTR+G モデルを使用した．

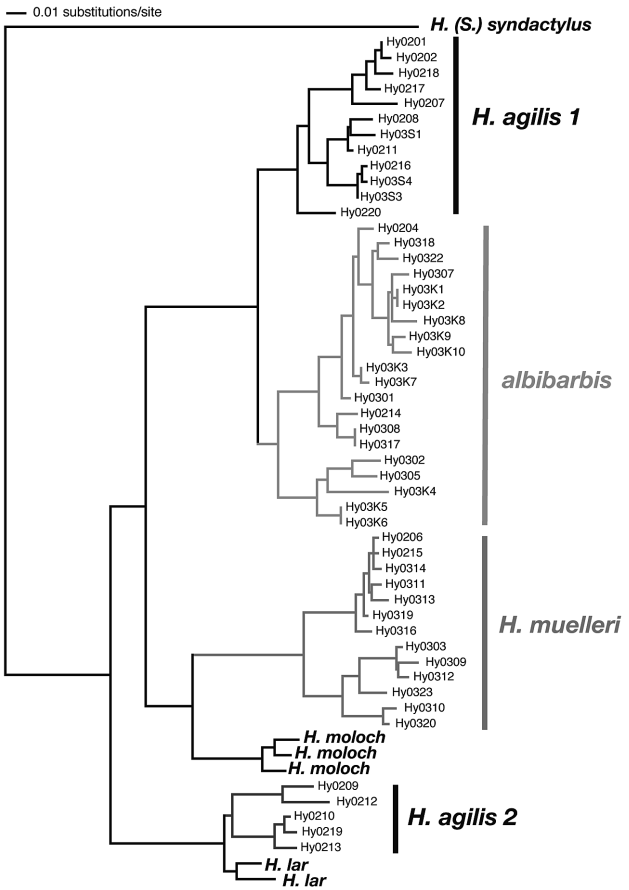

図4　mtDNA の D-loop 領域 887bp に基づく最尤法による系統樹．尤度比検定により選択された HKY85+G+I モデルを使用した．

タイプであった。出自不明の個体は十分注意して扱う必要がある。一方，オーナーからペットの出自に関する情報が得られた場合であっても，そのこと自体が非雑種の証拠とはならない例が，Hy0322 であろう。この個体は，形態の特徴からミューラーテナガザルと判定されたが，アルビバルビスタイプの mtDNA を持っていた。ミューラーテナガザルとアルビバルビスの生息地を分けるバリト川の上流では，これら 2 種の雑種が生息することが報告されている[6]。野生状態で雑種集団が存続しているようであれば，集団中に雑種同士の交配や戻し交配から生まれた様々な「雑種度」の個体が存在しているかもしれない。生息地に近い場所で飼育

されるペット個体からの試料採集は，非雑種のテナガザルから試料を得るためのもっとも確かな方法と思われたが，見た目では雑種とわからない自然雑種から偶然に試料を採集してしまう可能性は捨てきれない。

■アジルテナガザルの亜種分類と分子系統

アジルテナガザルの亜種分類と地理的分布に詳しい研究[15]によると，スマトラ島トバ湖以南の西側山岳地帯に生息する亜種が，*H. a. agilis* であり，東側の低地およびマレー半島の一部に生息する亜種が *H. a. unko* である。それぞれの亜種の中に被毛色の変異が存在する。すなわち，低地の *unko* 亜種には被毛色の黒い個体が72%含まれ，*agilis* 亜種には黒い個体は少なく，82%が淡黄色から茶色である[15]。こうなると，これら2亜種の分類の決め手は生息地ということになり，出自地域の分からない個体の亜種判定は，形態からだけでは困難であると思われる。その研究は，ボルネオ島南西部のカプアス川とバリト川で隔たれた地域に生息するアルビバルビスをもう一つの亜種 *H. a. albibarbis* として位置づけている。この亜種の被毛色は，大部分（94%）が茶色ということである。これに対して，グローブズは，はじめアルビバルビスを単に *H. muelleri* の地域変異と考えたが，外部形態で区別できるため，また，アジルテナガザルとは音声コミュニケーションの特徴は似ているものの，被毛色の違いが大きいため，アルビバルビスを両種から区別して，独立種として扱った。

それでは，今回の分子系統分析の結果をみていこう。TSPY 遺伝子の樹形からアルビバルビスは，アジルテナガザルに近縁であることは明確になった。mtDNA の分析結果は，スマトラのアジルテナガザルに大きく分化した DNA タイプが含まれていることをあきらかにした。*H. agilis* 1タイプと *H. agilis* 2タイプのうち，後者は分子系統分析や塩基配列の比較からシロテテナガザルに非常に近縁であるといえる。*H. agilis* 1タイプが，真のアジルテナガザルの mtDNA であると考えると，mtDNA の分析結果からもアルビバルビスがミューラーテナガザルよりもアジルテナガザルに近縁であることが支持される。

ND4–ND5 領域の分子系統樹では，*H. agilis* 1タイプがある程度分化した2つのクラスターに分かれているのがわかる。形態分類の結果と照らし合わせたが，必ずしも，*unko* と *agilis* というスマトラの2亜種に相当しないことがわかった。

中には，*unko* と *agilis* の区別ができない個体が存在するため，mtDNA の分析により亜種の区別が可能であるとは現時点でいうことはできない。むしろ，スマトラの 2 亜種の区別を行わないグローブズ [2] の見解を支持する結果となった。

H. agilis 2 タイプの mtDNA をもつ個体はどういった存在なのだろうか。先ほど，このタイプはシロテテナガザルに近縁であることを述べた。シロテテナガザルは，スマトラ島のトバ湖以北，マレー半島から大陸部に生息し，アジルテナガザルとは分布が重なっていない [15]。*H. agilis* 2 タイプを持つ 5 個体のうち，オスの個体はもちろんアジルテナガザルの TSPY 遺伝子を持っていた。5 頭のうち 1 頭は，動物園で飼育されている個体で，出自は不明であり，染色体変異がヘテロ接合体なので，雑種の可能性がある。残りの 4 個体は，私たちがスマトラで試料採取を行ったペット個体であった。これらの個体については，アジルテナガザルの父親とシロテテナガザルの母親から生まれた雑種とは単純に考えられないことが，共同研究者である早野さんのマイクロサテライト DNA 分析からわかっている。彼女は，ヒトのマイクロサテライトプライマーを使って 9 遺伝子座を分析し，アジルテナガザルのスマトラ集団，カリマンタン集団（本稿のアルビバルビス）およびミューラーテナガザル集団の間で対立遺伝子頻度の異質性を検定した。その過程で，*H. agilis* 1 と 2 の mtDNA タイプをもつ個体の間で対立遺伝子の分布に差異がないことを見いだしている（早野，私信）。今回の分子系統分析で比較に用いたシロテテナガザルは，当研究所の出自不明の個体であった。今回見つかったシロテテナガザル様 mtDNA をもつスマトラ産アジルテナガザルについては，さまざまなことが推測できるが，今後さらに，スマトラのシロテテナガザルをもくわえた総合的な分子遺伝学的分析が必要である。

*

分子マーカーの選択と特徴の把握は重要である。本研究で用いた mtDNA の ND4-ND5 領域と D-loop 領域は，亜種間の系統関係や種内変異の検出には有用であることがわかった。これらの 2 領域は，種レベルでは十分分化していたが，アルビバルビスとアジルテナガザルの間の差異はそれよりも小さかった。アルビバルビスをアジルテナガザルの亜種として扱うか独立種とするかは，本研究の目的ではないが，アルビバルビスがアジルテナガザルから分化したのは間違いない

と考えられる。逆に，これらの mtDNA マーカーは，テナガザルの種レベルの系統関係の推定には向いていないかもしれない。この分岐関係で多重置換が起こり始めている可能性があるためだ。一方，TSPY は進化速度が遅く，*Hylobates* 属内の系統を調べるには，変異が少ないことがわかった。テナガザル 4 属間の系統関係もまた議論が続いている問題であるので，逆に TSPY 遺伝子は属間の分析には良い標識となるかもしれない。

[1] Geissmann, T. (1995) Gibbon systematics and species identification. Int. Zoo News, 42: 467-501.

[2] Groves, C. (2001) Primate Taxonomy. Smithsonian Institution Press, Wshington.

[3] Hirai, H., Mootonick, A.R., Takenaka, O., Suryobroto, B., Mouri, T., Kamanaka, Y. Katoh, A., Kimura, N., Katoh, A., and Maeda, N. (2003) Genetic mechanism and property of a whole-arm translocation (WAT) between chromosomes 8 and 9 of agile gibbons (*Hylobates agilis*). Chromosome Res., 11: 37-50.

[4] Takacs, Z., Morales, J.C., Geissmann, T., and Melnick, D. J. (2005) A complete species-level phylogeny of the Hylobatidae based on mitochondrial ND3-ND4 gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 36: 456-467.

[5] Marshall, J.T., and Marshall, E.R. (1976) Gibbons and their territorial songs. Science, 193: 235-237

[6] Brockelman, W.Y., and Gittins, S.P. (1984) Natural hybridization in the *Hylobates lar* species group: Implications for speciation in gibbons. In "The Lesser Apes Evolutionary and Behavioural Biology" Preuschoft, H., Chivers, D.J., Brockelman, W.Y., and Creel, N. (eds.) Edingburgh Univ. Press, Edingburgh. pp.498-532.

[7] van Tuinen, P., Mootnick, A.R., Kingswood, S.C., Hale, D.W., and Kumamoto, A.T. (1999) Complex, compound inversion/translocation polymorphism in an ape: presumptive intermediate stage in the karyotypic evolution of the agile gibbons *Hylobates agilis*. Am. J. Primatol., 110: 129-142.

[8] Hirai, H., Wijayanto, H., Tanaka, H., Mootonick, A.R., Hayano, A., Perwitasari-Farajallah, D., Iskandariati, D., and Sajuthi, D. (2005) A whole-arm translocation (WAT8/9) separating Sumatran and Bornean agile gibbons, and its evolutionary features. Chromosome Res., 13: 123-133.

[9] Hayashi, S., Hayasaka, K., Takenaka, O., and Horai, S. (1995) Molecular phylogeny of gibbons inferred from mitochondrial DNA sequences: preliminary report. J. Mol. Evol., 41: 359-365.

[10] Roos, C., and Geissmann, T. (2001) Molecular phylogeny of the major hylobatid divisions. Mol. Phylogenet. Evol., 19: 486-494.

[11] Noda, R., Kim, C.G., Takenaka, O., Ferrell, R.E., Tanoue, T., Hayasaka, I., Ueda, S., Ishida, T., and Saitou, N. (2001) Mitochondrial 16S rRNA sequence diversity of Hominoids. J. Hered., 92: 490-496.

[12] Hall, L.M., Jones, D.S., and Wood, B.A. (1998) Evolution of the gibbon subgenera inferred from cytochrome b DNA sequence data. Mol. Phylogenet. Evol., 10: 281-286.

[13] Kim, H.S., and Takenaka, O. (1996) A comparison of TSPY genes from Y-chromosomal DNA of the great apes and humans: sequence, evolution, and phylogeny.Am. J. Phys. Anthropol., 100: 301-309.

[14] Xia, X. (2000) Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

[15] Marshall, J., and Sugardojito, J. (1986) Gibbon systematics. In "Comparative Primate

Biology, Vol. 1: Systematics, Evolution, and Anatomy" Swindler D.R., and Erwin, J. (eds.) Alan R. Liss, pp.137-185.

［1：平井啓久，2：川本　芳，3：田中洋之］