

ニホンザルの成立に関する集団遺伝学的研究

川本 芳
京都大学霊長類研究所

はじめに

ニホンザル (*Macaca fuscata*) は16～19種に分類されアジアを中心に分布するオナガザル科 (Cercopithecidae) マカカ属の1種で、ヒト以外の霊長類の中では最北の地域に生息する日本の固有種である。現在は北海道と南西諸島を除く日本列島の主要地域に分布するが、地域によって地域個体群の密度や連続性にはちがいがあがる (小金沢, 1995; 渡辺, 2000) (図1)。ニホンザルの種内遺伝分化については、血液型 (Nakajima *et al.*, 1970) や血液蛋白質多型 (Ishimoto, 1970, 1971; Ishimoto *et al.*, 1965, 1967, 1973, 1975; 石本, 1973; Nozawa *et al.*, 1975, 1977; Omoto *et al.*, 1970) に関する報告がある。これらの研究から指摘されているニホンザルの地域遺伝分化の特徴としては、地域集団当りの遺伝的変異性が他の生物にくらべて低い点、核にコードされた標識遺伝子の分布に地域的にみた局在傾向がある点、が挙げられる。これらの特徴は、ニホンザルの繁殖構造に分節化の傾向が著しいことが原因で生じていると予想されている (Nozawa *et al.*, 1991)。

ニホンザルの成立に関する研究としては、化石に関する古生物学的研究がおこなわれてきた。古いものとしては、山口県の安藤採石場から発見された大白歯化石があり、中期更新世中期のものとして報告されている (長谷川, 1966; Iwamoto and Hasegawa, 1972; 河村, 1989)。Jablonski (1998) によると、中国の化石出土地域の変化から、マカクの祖先は氷河期が繰り返すおとずれの第四紀に何回か北上したと考えられる。現在はサルが生息しない朝鮮半島でもマカカ属の化石が発見されており、氷河期には海面水位が低下して朝鮮海峡が陸橋化し、朝鮮半島から日本列島に祖先が移動したと想像されている。一方、分子時計を利用した近縁種との分岐時間の推定では、血液蛋白質多型から Nozawa *et al.* (1977) がアカゲザルとの分岐を約54万年前と推定し、ミトコンドリア遺伝子の制限酵素切断片多型 (RFLP) から Hayasaka *et al.* (1988) がアカゲザルとの分岐を90ないし180万年前と推定している。

Fooden (1976) はマカカ属の種を4グループに大別し、ニホンザルは系統的にカニクイザル、アカゲザル、タイワンザルと同一グループに属し、マカカ属全体の中では、新しく成立したグループの一員と考えている。このグループは、東南アジア地域を起源として、アジア大陸部へ展開し、亜熱帯から温帯地域へ北上拡大し、島嶼種としてタイワンザルとニホンザルを分化させたと考えられる。熱帯を起源とするマカカ属サル類のなかで、ニホンザルの生息地は北限にあり、種分化により寒冷環境へ適応を遂げていることが生物地理学的にみた特徴といえる。

本研究では、ミトコンドリアDNA (mtDNA) を遺伝標識としてニホンザルの地域遺伝分化について検討した。mtDNAは細胞内小器官ミトコンドリアの内膜に存在する核DNAとは異なる遺伝物質で、環状2本鎖構造をとり、ニホンザルでは約17,000塩基対のサイズをもつ (Hayasaka *et al.*, 1986)。ミトコンドリアゲノムには、電子伝達系の13種類の酵素サブユニット、22種類の転移RNA (tRNA) と、それらの翻訳に必要な2種類のリボソームRNA (rRNA

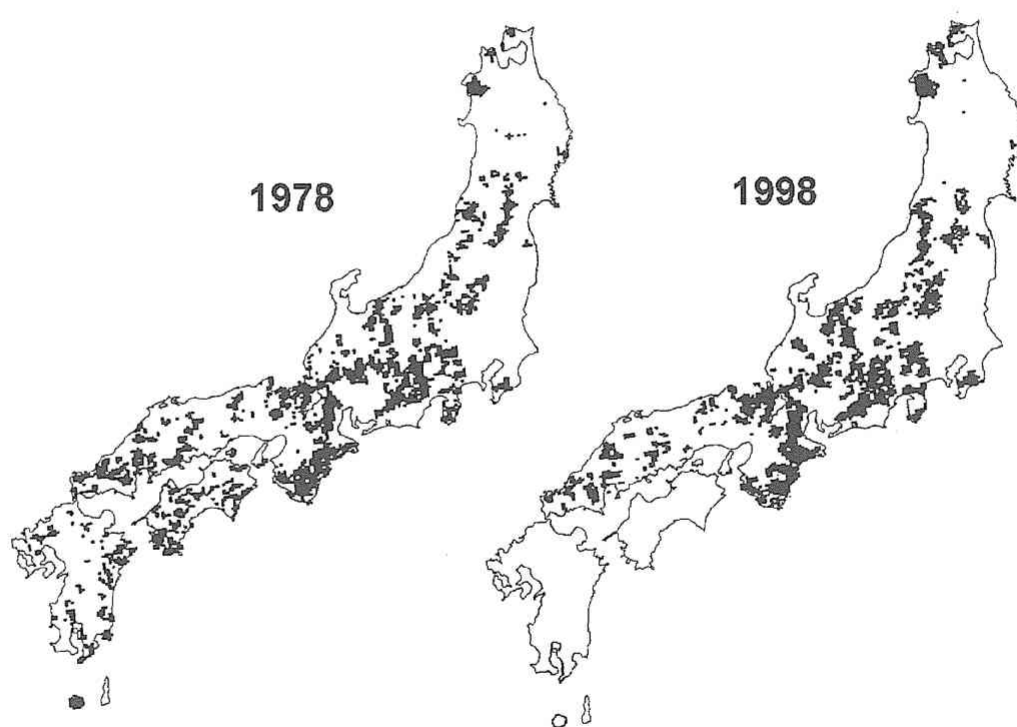


図1. ニホンザルの生息地域 (渡辺, 2000より)。

がコードされている。mtDNAは核外遺伝子であることから、特異な遺伝様式をもち、通常、サルのような哺乳類では母性遺伝する。つまり、卵の細胞質由来のmtDNAが受精を介して母から息子、娘へと遺伝し、父精子由来のmtDNAは次代に伝達されない (Hutchison *et al.*, 1974; Birky, 1978)。精子由来のmtDNAは受精卵に侵入するものの、種内交配の場合には初期胚で消滅し、結果的に伝達されないことがマウスで明らかにされている (Gyllensten *et al.*, 1991; Kaneda *et al.*, 1995)。mtDNAが示す核DNAとの際だった違いは、組み換えを起こさないことである (Hayashi *et al.*, 1985)。このため、突然変異として生じたmtDNAの構造変化は、個体間や分子間で入れ替わることなく、単純に世代を経ながら蓄積する。こうした変異の蓄積パターンは無性生殖的のみならず、進化研究や生態遺伝学的研究にmtDNAが標識として利用されるもうひとつの理由は、分子進化速度が通常の核DNAに比べて大きい点である (Brown *et al.*, 1979)。高い突然変異率から、特に近い過去の間を調べる上で便利な分子標識になる。突然変異の蓄積速度が大きいのは、複製ミスの修復機構をもたないことに原因があると考えられている (Wilson *et al.*, 1985)。mtDNAの種内・種間変異についてはこれまでに多くの生物で研究が進められてきた。霊長類に関しては、種間の系統関係をあつかう比較研究が先行してきたが (例えば, Hayasaka *et al.*, 1988a, 1988b, 1996; Garza and Woodruff, 1992; Hoelzer *et al.*, 1992; Melnick *et al.*, 1993; Zhang and Shi, 1993a; Hayashi *et al.*, 1995; Harihara *et al.*, 1996)、種内変異に関する研究も報告されている (例えば, Hayasaka *et al.*, 1986; Zhang and Shi, 1993b; Hoelzer *et al.*, 1994)。しかし、種の分布地域全体を網羅する形で詳細に調査した研究は乏しい。mtDNA変異を遺伝標識としてニホンザルの研究に適用する際には、さらに重要な意義がある。これらは、社会生態的特徴に関係するもので、ニホンザルの成立を理解する上で重要な意味をもつ。その第一は、雌雄でその生活史や拡散のパターンが大きく異なるという特徴



である。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）。雌は終生出生群に留まること（female philopatry）が原則で、雄は成熟年齢に達すると出生群から周囲の群れへと移出してゆく。しかし、母性遺伝が原則であるため、オスは核遺伝子の運搬者として地域集団間の遺伝的交流に寄与しても、mtDNA変異を次代に残すことはない。成体オスのmtDNA変異を調べて、群間や地域間の移住を推定できることになる。もうひとつの特徴は、群れが分裂する場合には母系を単位とする家系分割が起こり、雌の移住が群分裂と連動する点で

ある (matrilineal group fission)。群分裂の時には、メンバーは均等に分かれず、母系を単位として新群を形成する (小山, 1977)。この結果, mtDNA 変異の地理的分布は、群分裂の歴史を反映し、ニホンザルの成立に関係した分布地域の変遷を知る情報が得られる可能性がある。本研究では、こうした考えのもとに、日本各地に生息する野生ニホンザルについて、ミトコンドリア遺伝子変異を分析し、その変異の地理的分布にみられる特徴から、ニホンザルの分布地域の変遷を考察した。

材料と方法

調査地は、ニホンザルの野生個体群が生息する 107 地点で、集計した試料の総数は 119 である (図 2)。DNA は血液と皮膚を材料にして抽出した。血液試料の場合には、Kan *et al.* (1977) の方法に従い、DNA を調製した。血液はヘパリンナトリウムで凝固を防止し、遠心分離で白血球を含むバッフィーコートの部分を分取した。混入する赤血球を低張処理で除去したのち、タンパク質分解酵素 (Proteinase K) で消化し、さらにフェノール・クロロホルムで処理してゲノム DNA (核とミトコンドリアの DNA のいずれも含む) 試料とした。試料についての調製法を以下にまとめる。

- (1) 血液 5~10 ml のをチューブに入れて、2,000rpm で 10 分間遠心分離をおこない、バッフィーコートをパスツールピペットを使って別のチューブに移す。
- (2) 0.2% NaCl-1mM EDTA (pH8.0) を 8 ml 加えて低張処理をおこない、赤血球を壊す。
- (3) 2,000 rpm で 10 分間遠心分離をおこない、沈殿物を残して溶血液を捨てる。
- (4) 0.9% NaCl-1 mM EDTA (pH8.0) を 5 ml 加えて沈殿物を洗う。
- (5) STE (salted Tris-EDTA) を 2.5 ml 加えて強く攪拌し、沈殿物を浮遊させる
 【STE の組成】

5M NaCl	10 ml
1M Tris-HCl (pH8.0)	5 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	1 ml

 全量が 500 ml になるよう蒸留水を加える。
- (6) 浮遊液に 10% SDS を 200 μ l と proteinase K (5 mg/ml) を 40 μ l 加えてよく混合し、37°C で 2 時間反応させる。
- (7) 5M NaCl を 400 μ l, クロロフォルムとイソプロパノールの混合液 (混合比は 24:1) を 2 ml, 1M Tris-HCl (pH 8.0) で飽和したフェノールを 2 ml 加えて、ローテータで 2 時間ゆっくり混合する。
- (8) 3,000 rpm で 10 分間遠心分離をおこない、上層を透析チューブに移して、以下の外液に対して、一晚透析をおこなう。外液は途中で新しいものと 1 回交換する。
 透析外液：

1M Tris-HCl (pH 8.0)	40 ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	8 ml

 全量が 2,000 ml になるよう蒸留水を加える。
- (9) 透析チューブの中にある DNA 試料を新しいチューブに移し、予め 95°C で 10 分間の熱処理で DNase を不活化させた RNase (10 mg/ml) を 20 μ l 加えて、37°C で 10 分間反応させる。
- (10) (7), (8) の手順を繰り返す。透析終了後、透析チューブ内の液を DNA 溶液として冷所 (4°C) 保存して、分析に用いる。

なお、有害鳥獣駆除等により捕殺された個体の場合には皮膚試料を用いた。凍結保存した耳等の皮膚を材料にして、血液からのDNA調製法を改変してDNAを抽出した。約5mm四方程度の大きさの皮膚を、まずハサミないしはメスを使って出来るだけ細かく切り刻み、上記の(6)の処理をおこなう。皮膚の断片が完全に溶けて消失するまで37°Cで保温する(約3昼夜かかる)。このあとは(7)-(10)の手順に従い、DNAを調製した。調製したゲノムDNAを材料にしてD-ループ領域の部分塩基配列をPCR産物のダイレクトシーケンシング法で決定した。なお、PCRはHayasaka *et al.* (1991)の方法に準じて以下の条件でおこなった。

【プライマー】

forward primer : 5'-ATCAGGGTCTATCACCTAT-3'

reverse primer : 5'-CAAATAGGCTTGGTCCTGGCC-3'

internal primer : 5'-ACTGCCATTCCCTCAACTAA-3'

注 : internal primer はシーケンシングの際の reverse 配列決定に利用した。

【PCR 溶液の組成】 (全量 25.0 μ l の場合)

試料 DNA	2.0 μ l
10 倍濃度緩衝液	2.5 μ l
dNTP (各 2.5mM 混合液)	2.0 μ l
10 pmol プライマー	各 1.5 μ l
Taq ポリメラーゼ	0.25 μ l
純水	15.25 μ l

【PCR 条件】

94°C 5分

↓

(94°C 10秒 → 45°C 10秒 → 72°C 10秒) × 30回

↓

72°C 3分

↓

4°C

PCR産物は低融点アガロース (NuSieve GTG agarose) により回収、精製し、配列決定に利用した。3.0%ゲルを作成し、TAE buffer 中で電気泳動したのち、臭化エチジウムで染色して産物の有無、サイズを確認した。ゲルから該当するDNA断片をナイフで切り出し、65°Cで融解処理してDNAを抽出した。塩基配列決定にはABI社のPRISMモデル 310 Genetic Analyzerを使用した。ラベリングはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitにより以下の条件でおこなった。

【反応液の組成】 (全量 10.0 μ l)

PCR 産物 (濃度を約 10 ng/ μ l に調製)	4.0 μ l
0.8 pmol プライマー	2.0 μ l
Ready Reaction Mix	2.0 μ l
純水	2.0 μ l

【ラベリング反応の条件】

96°C 30秒 (hot start)

↓

(96°C 30秒 → 50°C 15秒 → 60°C 4分) × 25回

↓

4°C

表1. ニホンザルの mtDNA ハプロタイプ

地点	都府県名	mtDNA タイプ			mtDNA タイプ			mtDNA タイプ
下北1	青森	1	西伊豆	静岡	13	甲賀1	滋賀	32
下北2	青森	1	西桂	山梨	15	大山田	三重	32
下北3	青森	1	富士吉田	山梨	15	尾鷲	三重	32
下北4	青森	1	志賀高原	長野	16	熊野	三重	32
蟹田	青森	1	菅平	長野	16	御浜	三重	32
鱒ヶ沢	青森	1	真田	長野	16	椿	和歌山	32
津軽峠	青森	1	軽井沢	長野	16+1	金屋	和歌山	32
八森	秋田	1	大町	長野	17	名田庄	福井	33
雄勝	秋田	1	穂高1	長野	17	余呉	滋賀	33
五葉山1	岩手	1	王滝	長野	17	安曇川1	滋賀	33
五葉山2	岩手	2	穂高2	長野	18	安曇川2	滋賀	33
巖美溪	岩手	1	宇奈月1	富山	19	大津	滋賀	33
金華山	宮城	1	朝日	富山	20	比叡山	滋賀	33
七ヶ宿	宮城	1	宇奈月2	富山	20	甲賀2	滋賀	33
東根	山形	1	上市	富山	17+1	伊吹	滋賀	33
山寺	山形	1	大沢野	富山	17+2	湖北	滋賀	33
上山	山形	1	細入	富山	20	高月	滋賀	33
高島	山形	1	根尾	岐阜	20+1	嵐山2	京都	33
相馬	福島	1	美浜	福井	20	箕面	大阪	33
鹿島	福島	1	西浅井	滋賀	20	篠山	兵庫	33
福島	福島	1	嵐山1	京都	20	若桜	鳥取	34
朝日	新潟	1	小豆島	香川	20	淡路	兵庫	35
黒川	新潟	7	清川2	神奈川	21	臥牛山	岡山	36
日光1	栃木	3	竜山	静岡	21	阿南	徳島	37
日光2	栃木	4	新城	愛知	21	中村	高知	38
房総	千葉	5	東栄	愛知	21	広見	愛媛	38
鋸南	千葉	6	犬山	愛知	21	松野	愛媛	38+1
荒川	埼玉	8	武川	山梨	22	滑床	愛媛	38
横瀬	埼玉	8	七宗	岐阜	23	木次	島根	39
芦ヶ久保	埼玉	9	高浜	福井	26	大田	島根	39
五日市	東京	9	秦荘	滋賀	27	高崎山	大分	40
檜原	東京	9	日野	滋賀	28	久木野	熊本	40
奥多摩	東京	10	永源寺	滋賀	28	相良	熊本	41-1
丹波山1	山梨	9	土山	滋賀	28	幸島	宮崎	41
丹波山2	山梨	11	亀山	三重	28	串間	宮崎	41+1
津久井	神奈川	12	多賀	滋賀	29	鹿屋	鹿児島	41
愛川	神奈川	15	員弁	三重	29	薩摩	鹿児島	41-1
小田原	神奈川	14	北勢	三重	29	屋久島1	鹿児島	42
熱海	静岡	14	古座川	和歌山	30	屋久島2	鹿児島	43
清川1	神奈川	15	本宮	和歌山	31			

反応産物を以下のように処理して、塩基配列を解読した。

- (1) ラベリング反応後の溶液 10 μ l をチューブに移し、純水 8.0 μ l と 95% ethanol 32.0 μ l を加えて混合。室温で 10 分間静置。
- (2) 13,000 rpm で 15 分間遠心。
- (3) チューブ内の溶液を除き、70% ethanol 100 μ l を加えて 2 - 3 回チューブを転倒させる。
- (4) 13,000 rpm で 10 分間遠心。
- (5) チューブ内の溶液を除き、乾燥。
- (6) 変性剤 (TSR 溶液) を 8.0 μ l を加えてよく混合。
- (7) 96°C 2 分間変性処理。

表2. 集団のミトコンドリアDNA変異性のまとめ

	全体集団	東日本集団	西日本集団
サンプル数	119	92	27
ハプロタイプ数	49	32	17
可変サイト	50/412	27/412	33/412
Gene diversity	0.948 ± 0.011	0.916 ± 0.017	0.963 ± 0.019
Transitions	47	26	31
Transversions	3	1	2
pairwise differences	9.10 ± 4.22	5.98 ± 2.88	8.81 ± 4.19
nucleotide diversity	0.0221 ± 0.0113	0.0145 ± 0.0077	0.0214 ± 0.0113

(8) 氷上で静置

塩基配列の解読部分は、ヒトのミトコンドリア遺伝子の16591番地から412塩基分に相当するDループ領域の部分である。アラインメントからハプロタイプを分類し、塩基置換数カウントならびにサイト当りの塩基置換率推定値をもとに、変異性、タイプ間の分化度を計算した。クラスター分析の結果と試料の採集地点を比較し、地域分化の特性を検討した。なお、塩基配列データの解析には、SDSソフトウェア社の解析ソフトGENETYX MAC Ver.10.1, PHYLIP version 3.572 (Felsenstein,1993), ARLEQUIN version 2.000 (Schneider *et al.*, 2000) を使用した。

結果

1) mt DNA ハプロタイプの分類

Dループ領域の412塩基の配列を決定し、比較した結果、49種類の異なる配列が区別できた(表1)。置換サイトは合計50箇所あり、分析対象とした領域全体の12.1%に相当する(表2)。塩基置換のタイプは、transitionが47、transversionが3であった(表2)。

2) mt DNA ハプロタイプの関係

49種類のハプロタイプを対比較し、塩基置換サイトの数とs. d.値を算定した結果を表3にまとめた。置換数は22が最大値であった。置換サイト数から、各ハプロタイプの関係をMinimum Spanning Treeとして描いた結果を図3に示した。また、sequence divergence推定値を使い、タイワンザル("Mc"と記載)を外縁種としてUPGMA法で評価した結果を図4に示した。これらの結果から、ニホンザルのmtDNAハプロタイプは東西の2グループに大別できることが明らかになった。東日本のグループはタイプ7から11までの4タイプを除いたタイプ1から34までの合計32タイプである(表2)。西日本のグループはタイプ35から43までのタイプにタイプ7から11までの4タイプを加えた合計17タイプである。図2に示したように、東西のグループの境界は兵庫県と岡山県の付近となる。

mtDNAタイプの変異性は東西のグループで異なっており、東日本グループのほうが西日本グループより低い傾向を示す。表2にまとめた可変サイトの割合、gene diversity、pair-wise differenceの平均値、nucleotide diversityのいずれにおいても、この傾向が認められた。

3) 各地の mt DNA 変異の分布特徴

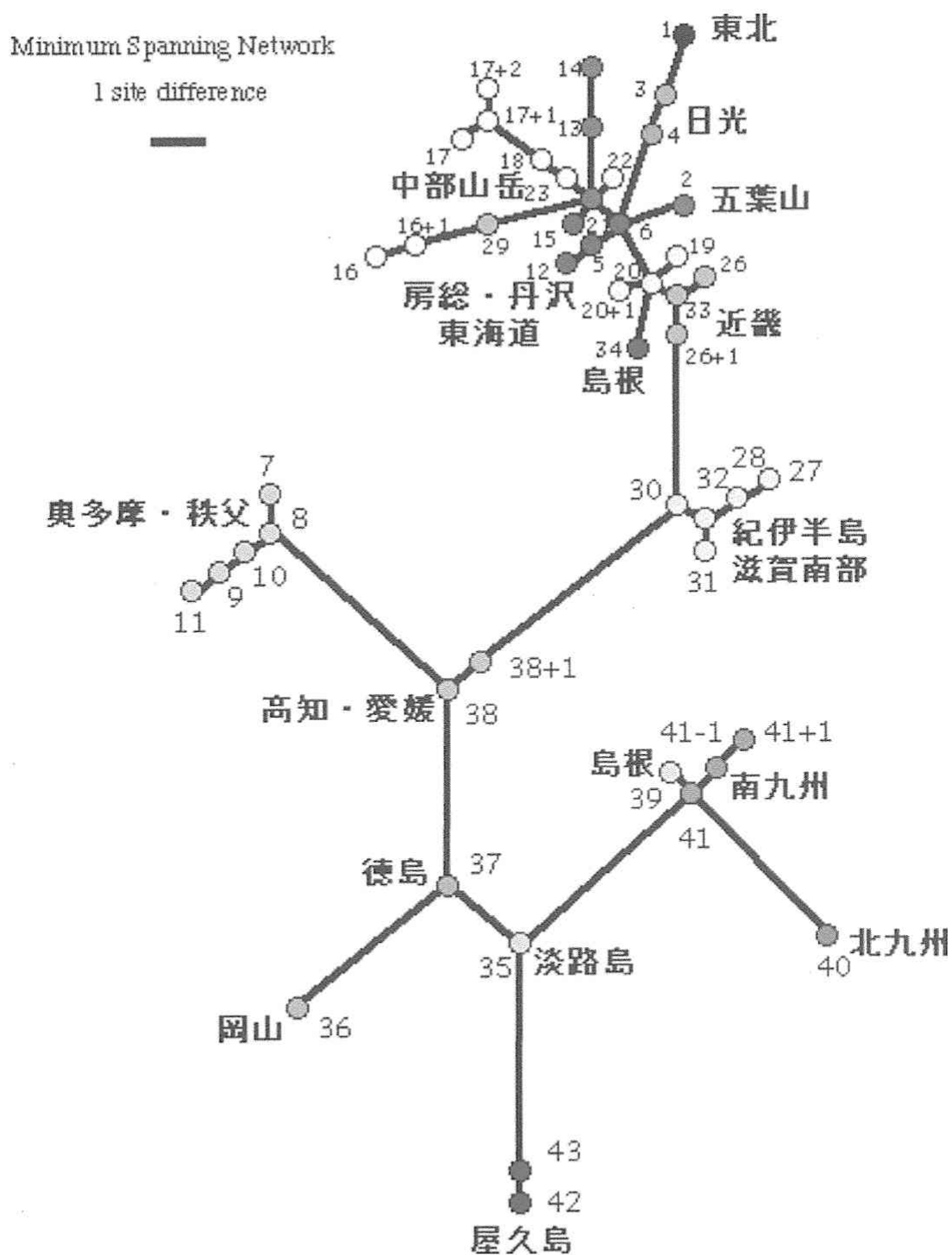


図3. Minimum Spanning Tree で表したミトコンドリア遺伝子タイプの関係。枝長は置換数に比例している。

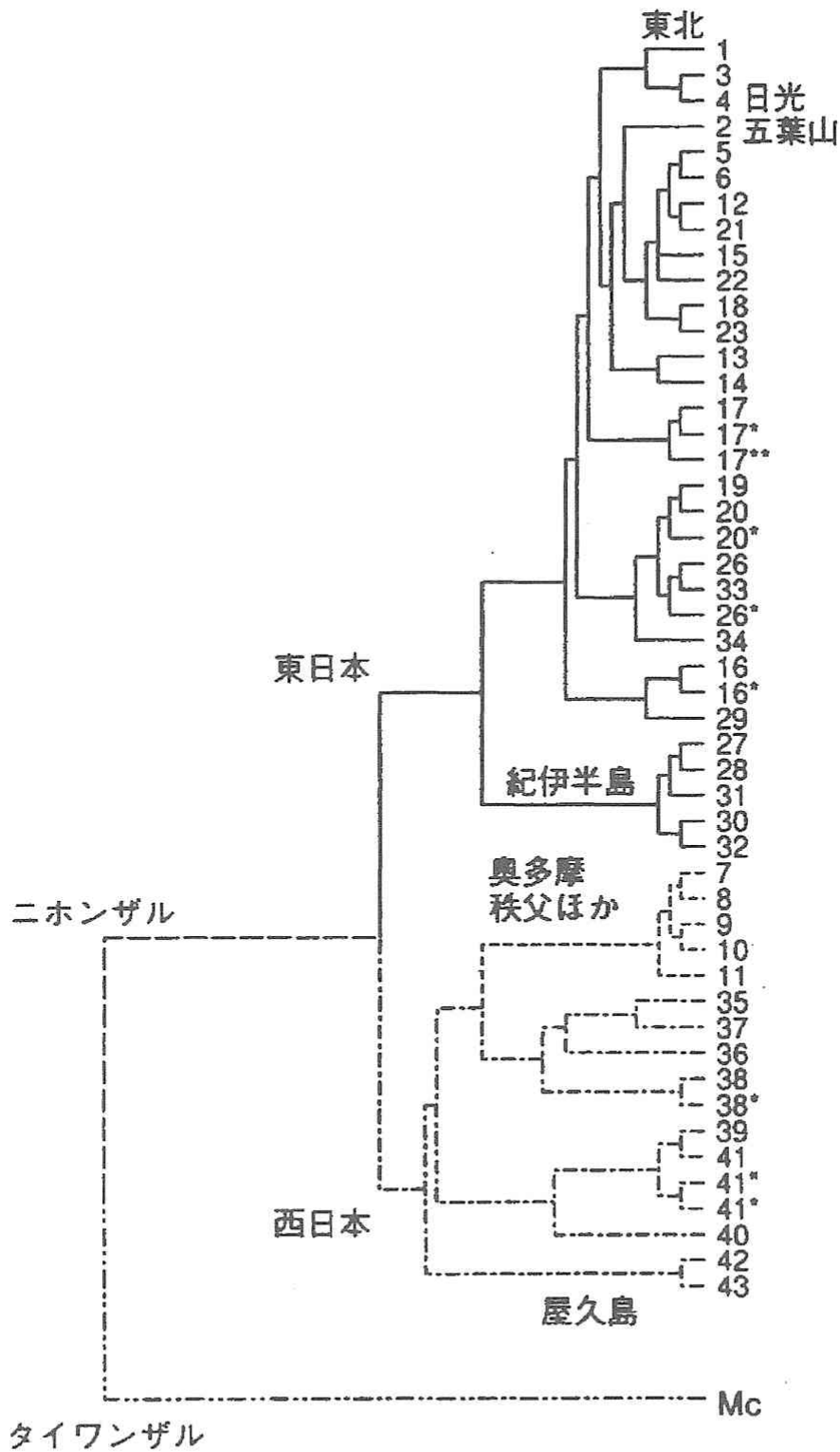


図4. Sequence divergence の推定値から UPGMA 法により描いたミトコンドリア遺伝子タイプの関係。図中の数字は遺伝子タイプを示す。上付きの★は表1に示したタイプ記号の+に対応し、*印は-に対応する。

mtDNA ハプロタイプを地域ごとにくらべると、その分布は地域で異なった特徴を示している。

東北地方の場合、岩手県南部に孤立する五葉山地域の個体群以外では、すべての調査地点で同一のタイプ（タイプ1）を観察した。一方、五葉山付近では分子系統的にタイプ1とは異なるタイプ2を検出した（図4）。17地点から21試料を集めて広域を調査したにもかかわらず、出現する変異のタイプに限られ、単一のタイプがその大多数を占める点で、東北地方のニホンザルでは著しい変異の均一性があるといえる。なお、ニホンザルのmtDNA変異全体の関係から評価すると、東北地方のタイプはすべて東日本グループに属するタイプであった。

関東地方では13地点の調査の結果、11タイプを観察した。日光では同一地点に異なる2タイプを観察した。同一地点にみられた複数のタイプは、塩基が置換しているサイト数は少なく、構造的には似た関係にある。関東地方の変異分布の特徴は、地域固有のタイプが多数ある点である。この地域にみられる変異で特記すべきことは、奥多摩と秩父に観察されたタイプ8、9、10の3種類は構造的に他のものと大きく異なっており、ニホンザルのmtDNA変異全体の関係から評価すると、西日本タイプと判定された点である（図3、図4）。

中部地方では29地点の調査で21タイプを観察した。このうち新潟県北部と山梨県東部のタイプは、関東地方の奥多摩・秩父のタイプと同一もしくは類似のタイプで、西日本タイプに大別されるタイプであった。その他のタイプは、中部山岳地帯ないしは丘陵地帯の局所に分布する地域固有のタイプである。また、ニホンザルのmtDNA変異全体の関係から評価すると、中部地方に分布する変異の大部分は東日本グループに属するものであった。この地域の特徴は、関東地方以上に多数の固有タイプが地域をかえて分布する点にある。タイプ間の分子的なちがいが小さい点も特徴的である。

近畿地方では29地点の調査をおこなったところ、9タイプを観察した。このうち滋賀県南部から和歌山県の地域にある27、28、30、31、32の5タイプは東日本グループに属するもので

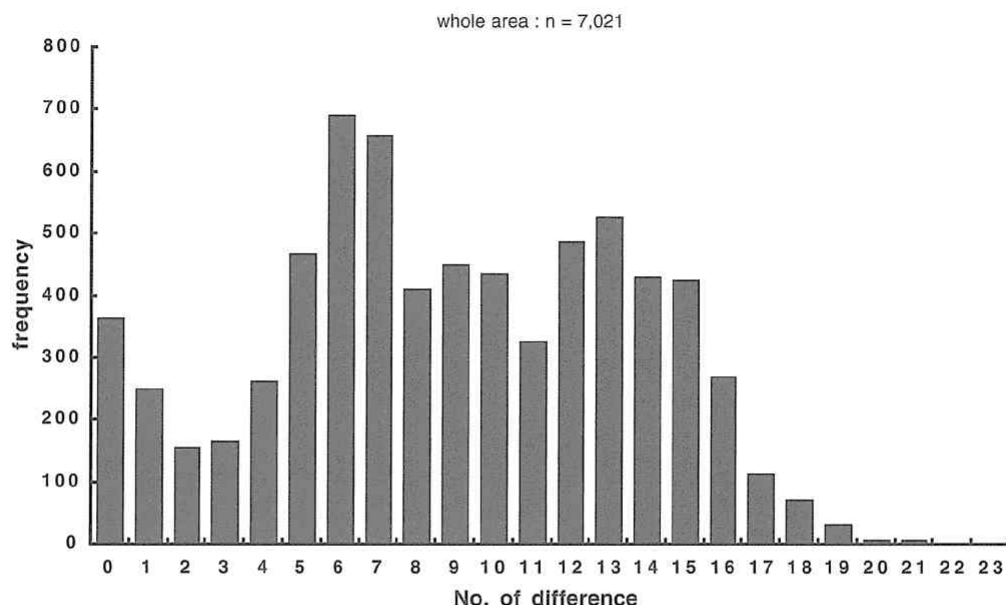


図5. ニホンザル全体について描いた mismatch distribution。横軸は対比較したタイプ間の塩基置換数を示し、縦軸はその事例数を示す。

はあるが、他タイプとは別の小クラスターを形成している（図4）。また、淡路島にみられたタイプ35は、他地点とは異なり、西日本グループに属するタイプであった。これ以外の地点で観察したタイプはすべて東日本グループに属しており、特にタイプ33は兵庫県、大阪府、京都府、滋賀県、福井県の5府県におよぶ広い地域に分布している。近畿地方は西日本タイプが東日本タイプに移行する地域で、紀伊半島を中心とした一群のタイプと中部地方へつながるそれ以外の別群のタイプで全体が成り立っている。中部や関東地方にくらべると、異なるタイプの数は少ないようである。

中国・四国地方では10地点の調査をおこなった結果、7タイプを検出した。このうち、小豆島と鳥取県東部では、東日本グループに属するタイプがみられ、これ以西の中国・四国地方のタイプはすべて西日本グループに属するものであった。西日本グループのタイプは、相互の構造が比較的異なっており、東日本グループのタイプ間より置換数が多い特徴を示した（図3、図4）。

九州地方では屋久島を含む9地点を調べた。この結果、6タイプが区別できた。これらのタイプは、屋久島の2タイプも含めて、すべて西日本グループに入り、中国・四国地方と同様に、お互いの構造的な差が大きい。特に屋久島の2タイプと九州本土にみられたタイプとの違いは置換数で大きな違いを示した。また、中国地方と九州地方の関係をみると、北九州のタイプが他から外れる傾向を示した（図3、図4）。

考察

本研究により、ニホンザルの mtDNA 変異の全貌が明らかになった。重要な点は、全体が東西の2グループに分割でき、しかもグループ内の分化パターンの性格にちがいがあがる点である。ここで、歴史的な集団サイズの急増を検討する際に用いられる mismatch distribution について考えてみる。図5、6、7はハプロタイプ間の塩基置換数を対比較し、mismatch distribution としてヒストグラムにまとめたものである（Rogers and Harpending, 1992）。図5はニホンザ

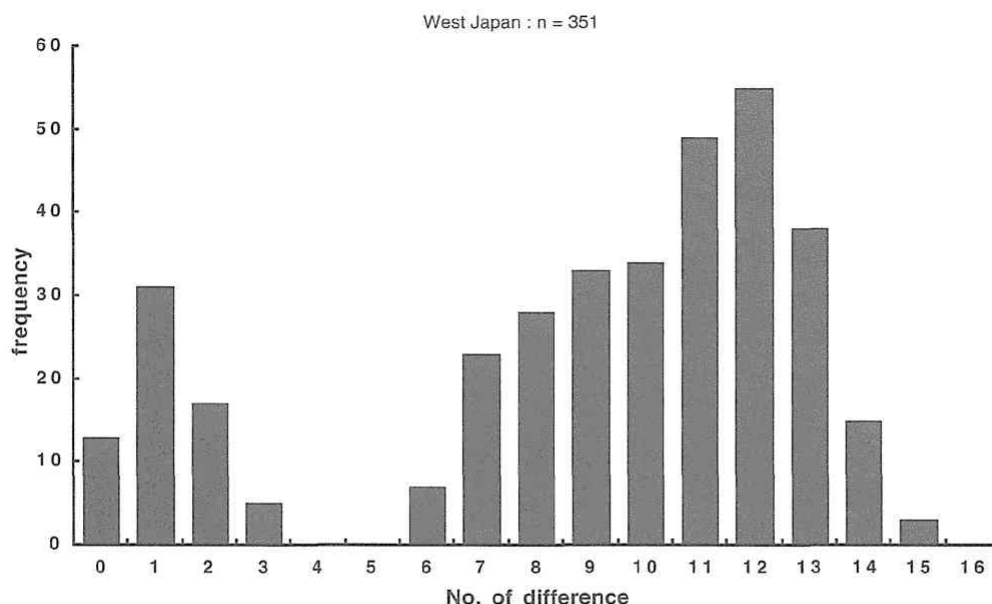


図6. 西日本タイプについて描いた mismatch distribution.

ル全体の場合、図6は西日本グループだけの場合、図7は東日本グループだけの場合を示す。パターンを東西で比較すると、西日本では対比較したときの置換サイト数 (pairwise difference) の平均値が8.81なのに対して、東日本では5.98と小さくなる。また、グラフの形をみると、西日本では単純な一峰性の形からの崩れ方が著しい。東日本では原点付近に分布のこぶがあるものの、明瞭なピークが認められる。以上の特徴は、西日本のサルと東日本のサルの成立にちがいがあことを示唆する。発見されたタイプ間の分化度が大きい西日本のサルは、歴史的に古いと解釈することができる。東日本では北限の東北地方でほとんど個体変異が認められず、現在の生息状況では分断隔離が著しい状況であるにもかかわらず、mtDNAには高い均一性がある。この結果は、この地域の個体群の成立が歴史的に新しいことを意味している。東北地方ほどではないにせよ、東日本タイプが分布する地域では、西日本の場合にくらべて、遺伝的分化の程度が全般的に低くなっている。このことは、東日本グループを構成するパプロタイプ間の分化は、西日本グループの場合に比べて小さいことを意味している。置換数が単純に時間に比例した違いを反映するのであれば、西日本のニホンザルに比べて東日本に分布するニホンザルはその進化的な分布に要した時間が短いことになる。

対照的に、西日本グループの場合は、屋久島、九州・山陰西部、四国・淡路島、さらには東日本に位置する奥多摩・秩父といったクラスターが明瞭に区別でき、タイプ間ないしはクラスター間で大きな置換数の相違が認められた。このクラスターでは、中間タイプが多数欠けており、調査地点の不足を考慮しても、この傾向は東日本の場合と大きく異なっている。こうした特徴から、西日本のサルはその成立の起源が東日本にくらべて古いことが考えられる。

西日本が古く、東日本が新しいという予測をニホンザルの祖先の分布地域の変遷として解釈するなら、環境の変動にともなう分布地域の変化の可能性を考える必要がある。特に、現在の東北地方で著しい均一性があることから、近い過去において、祖先が生息できなかった状況、つまり地域個体群が消滅したことが考えられよう。この具体的な可能性としては、中期更新世のどこかで祖先が大陸から侵入したあとの氷期、つまり最終氷期の環境変化の影響が想像される。

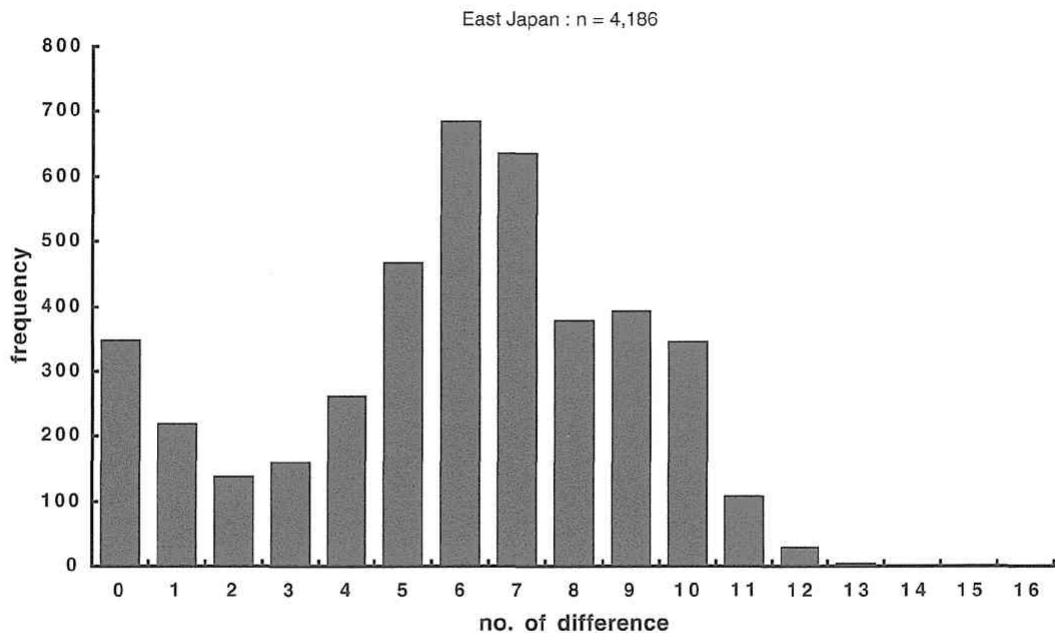


図7. 東日本タイプについて描いた mismatch distribution。

図8は、花粉化石の調査をもとに最終氷期の一番寒冷化した時期の日本列島の地形と植生を復元したものである(Tsukada,1982)。現在の植生図(図9)とくらべると、最終氷期には各植生要素が現在より緯度の低い場所か低地に広がっていたことがわかる。ニホンザルは、季節繁殖をおこないながら冷温帯落葉広葉樹林の中でも冬を凌いで生息できる寒さに適応した種である。しかし、ニホンザルといえども針葉樹で被われた亜寒帯で暮らすのは難しい。今から約2万年くらい前の東北地方は、亜寒帯針葉樹林で被われていたため、ニホンザルが生息できない地域であっ

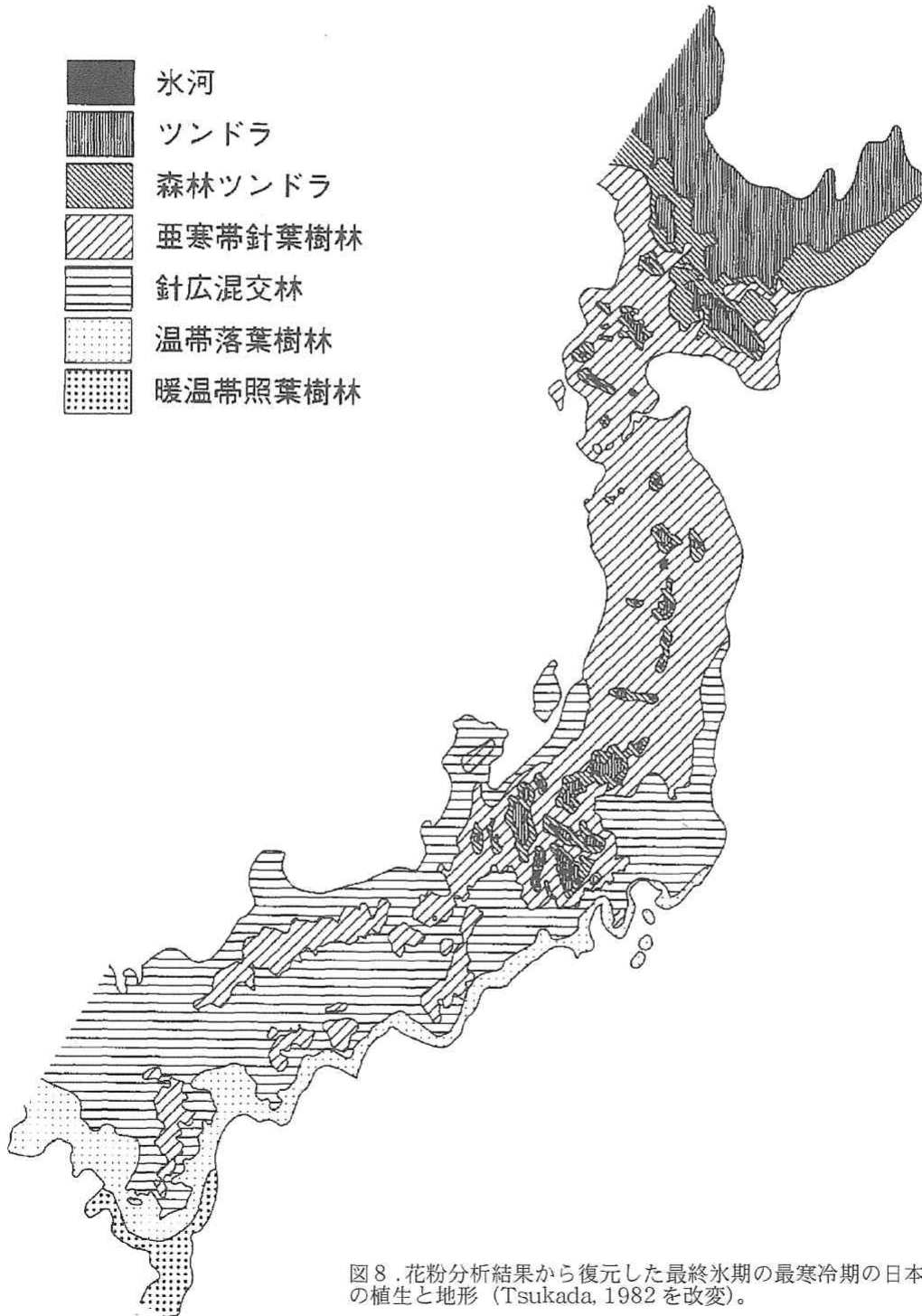


図8.花粉分析結果から復元した最終氷期の最寒冷期の日本列島の植生と地形 (Tsukada, 1982 を改変)。

たとえられる。サルは氷期に東北から姿を消し、現在よりも分布を西に移していて、最終氷期をすぎてからブナなどの落葉広葉樹林帯が北上するにつれて分布を東に拡大し東北地方に達したとえられる。このように考えると、ニホンザルのmtDNAに観察できた東西分化や東北地方の均一性が説明できる。西日本ほどではないものの、東日本のサルでも mismatch distributionのパターンはきれいな一峰性の分布ではなかった。最終氷期以降の急激な分布域の拡大だけなら、こうしたことにはならない。ヒストグラムの形は、拡大のあとに局所的なサイズの減少などの影響で、拡大のなごりが歪められたことを示すのかもしれない。

血液蛋白質多型に関する先行研究の結果では、ミトコンドリア遺伝子とは対照的に、下北半島

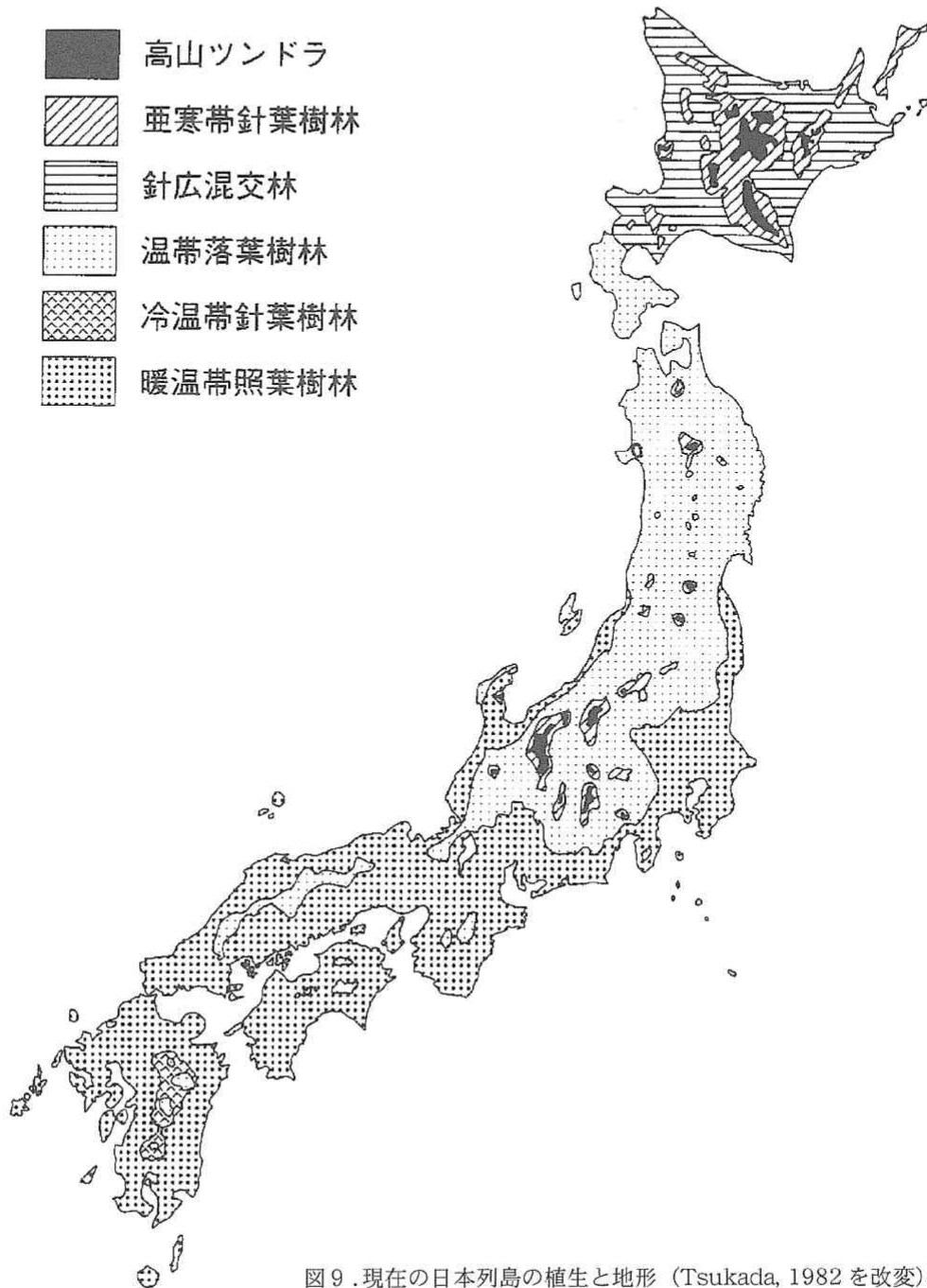


図9. 現在の日本列島の植生と地形 (Tsukada, 1982 を改変)。

脇野沢の群れで南に生息するサルより高い遺伝的変異性の報告がある (Hayasaka *et al.*, 1987)。mtDNAが均一であるにもかかわらず、東北地方のサルでなぜ核遺伝子がコードする蛋白質に高い変異性があるのか。ニホンザルの分布全体の辺縁部に生息する集団では、下北だけでなく千葉県房総半島の孤立集団などでも、期待される低変異性とは逆の傾向を示す集団がいる。この理由は簡単ではないが、辺縁部への隔離に付随して遺伝子の頻度が短期間に大きく変化するような特別の機構 (いわゆる、びん首効果と呼ばれるような) の影響があるのかもしれない。固定化に至らず高いheterogeneityを残す少数の遺伝子座が、偶発的な結果として平均値を高めていることが考えられる。

気候変化に伴う植生変化によって、ニホンザルの祖先は温暖化した時期には分布地域を東ないしは北あるいは高地へ拡大させ、寒冷化した時期には南ないしは西あるいは低地へと変えてきたというのがニホンザル成立過程の実態といえよう。しかし、寒冷期に退却するだけだったかどうかについては慎重に検討すべき問題がある。mtDNA 変異では、岩手県の五葉山や奥多摩・秩父には周囲と分子系統的に起源の異なるタイプが分布する。これらが北部や高地に寒冷期が去るまで踏みとどまった遺存個体群である可能性は検討を要する問題である。

謝辞

本研究に際しては、京都大学霊長類研究所の茂原信生教授と庄武孝義教授に多大のご援助をいただきました。また、分担者の方々からも、情報や資料の提供ならびに研究に関するご指導を賜りました。

日本各地のサルについて遺伝子分析を進めた本研究では、長年ニホンザルの研究、観察をおこなっておられる多数の方々から試料採取、生息情報提供等でご協力いただきました。個人名は記しませんが、これらの方々のご理解とご協力がなければ、本研究を実現することはできませんでした。ここに深甚なる謝意を表します。

本研究は、科学研究費補助金 (基盤研究(B)(1), 課題番号 11440249、研究代表者: 茂原信生、基盤研究(A)(2), 課題番号 09358017、研究代表者: 庄武孝義)、ならびに COE 形成基礎研究費 (課題番号 10CE2005、研究代表者: 竹中修) の援助を受けて行いました。

引用文献

- Birky, C.W., Jr. (1978) Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.*, 12:471-512.
- Brown, W.M., George, Jr. M. and Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1967-1971.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fooden, J. (1976) Provisional classification and key to living species of macaques I (Primates: Macaca). *Folia Primat.*, 25:225-236.
- Garza, J.C. and Woodruff, D.S. (1992) A phylogenetic study of the gibbons (*Hylobates*) using DNA obtained noninvasively from hair. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 3: 202-210.
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Josefsson, A. and Wilson, A. C. (1991) Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352:255-257.
- Harihara, S., Kawamoto, Y., Suryobroto, B., Omoto, K. and Takenaka, O. (1996) Differentiation of mitochondrial DNA types in Sulawesi macaque. In: *Variations in the Asian Macaques*, Shotake, T. and Wada, K. (eds.), Tokai University Press, Tokyo, pp. 1-36.
- 長谷川善和 (1966) 日本の第四紀小型哺乳動物化石相について. *化石*, 11: 31-40.

- Hayasaka, K., Horai, S., Shotake, T., Nozawa, K. and Matsunaga, E. (1986) Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese monkeys, *Macaca fuscata*. *Jpn. J. Genet.*, 61 :345-359.
- Hayasaka, K., Kawamoto, Y., Shotake, T. and Nozawa, K. (1987) Population genetic 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.
- Hayasaka, K., Gojobori, T. and Horai, S. (1988a) Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 5:626-644.
- Hayasaka, K., Horai, S., Gojobori, T., Shotake, T., Nozawa, K. and Matsunaga, E. (1988b) Phylogenetic relationships among Japanese, rhesus, Formosan, and crab-eating monkeys, inferred from restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 270-281.
- Hayasaka, K., Ishida, T. and Horai, S. (1991) Heteroplasmy and polymorphism in the major noncoding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: Association with tandemly repeated sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 6:399-415.
- Hayasaka, K., Fujii, K. and Horai, S. (1996) Molecular phylogeny of macaques: Implications of nucleotide sequences from an 896-base pair region of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 1044-1053.
- Hayashi, J.-I., Tagashira, Y. and Yoshida, M.C. (1985) Absence of extensive recombination between inter- and intra-species mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, 160:287-295.
- 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.
- Hoelzer, G.A., Hoelzer, M.A. and Melnick, D.J. (1992) The evolutionary history of the sinica-group of macaque monkeys as revealed by mtDNA restriction site analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1: 215-222.
- Hoelzer, G.A., Dittus, W.P.J., Ashley, M.V. and Mehaick, D.J. (1994) The local distribution of highly divergent mitochondrial DNA haplotypes in toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *Mol. Ecol.*, 3:451-458.
- Hutchison, C.A. III, Newbold, J.E., Potter, S.S. and Edgell, M.H. (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251:536-538.
- Ishimoto, G. (1970) Red cell phosphohexose isomerase variants in primates. *J. Anthrop. Soc. Nippon*, 78:334-338.
- Ishimoto, G. (1971) Electrophoretic patterns of red cell NADH dehydrogenase in macaque monkeys. *J. Anthrop. Soc. Nippon*, 79:382-387.
- 石本剛一(1973) マカク属サルの血液蛋白変異に関する研究 3. マカク血液蛋白多型の特徴, 人類学雑誌, 81:1-13.
- Ishimoto, G., Toyomasu, T. and Uemura, K. (1965) Electrophoretic study of serum proteins of Japanese macaques. *Primates*, 6:271-282.
- Ishimoto, G., Toyomasu, T. and Uemura, K. (1967) Serum transferrins of Japanese macaques: comparison with other species of monkeys. *Primates*, 8:29-34.
- Ishimoto, G., Kuwata, M. and Shotake, T. (1973) Polymorphism of red cell NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in macaque monkeys. *J. Anthrop. Soc. Nippon*, 82:52-58.
- Ishimoto, G., Kuwata, M. and Shotake, T. (1975) A variant hemoglobin found in *Macaca fuscata*: Another polymerizing hemoglobin of macaques. *J. Anthrop. Soc. Nippon*, 83:233-243.
- 伊谷純一郎(1972) 霊長類の社会構造 「生態学講座第20巻」 共立出版, pp. 1-161, 東京.
- Iwamoto, M. and Hasegawa, Y. (1972) Two macaque fossil teeth from the Japanese Pleistocene. *Primates*, 13:77-81.
- Jablonski, N.G. (1998) The response of catarrhine primates to Pleistocene environmental fluctuations in East Asia. *Primates*, 39:29-37.
- Kan, Y.W., Dozy, A.M., Trecartin, R. and Todd, D. (1977) Identification of a nondeletion defect in α -thalassemia. *N. Engl. J. Med.*, 297: 1081-1084.

- Kaneda, H., Hayashi, J.-I., Takahama, S., Taya, C., undahl, K.F. and Yonekawa, H.(1995) Elimination of paternal mitochondrial DAN in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:4542-4546.
- 河村善也, 亀井節夫, 樽野博幸(1989)日本の中・後期更新世の哺乳動物相. 第四紀研究, 28:317-326.
- 小金沢正明(1991)ニホンザルの分布と保護の現状およびその問題点, 野生動物保護「21世紀への提言」日本自然保護協会, 東京, pp.124-157.
- 小山直樹(1977)ニホンザルの社会構造. 「人類学講座第2巻 霊長類」(伊谷純一郎編), 雄山閣出版, 東京, pp.225-276.
- Melnick, D.J., Hoelzer, G.A., Absher, R. and Ashley, M.V.(1993) MtDNA diversity in rhesus monkeys reveals overestimates of divergence time and paraphyly with neighboring species. Mol. Biol. Evol., 10:282-295.
- Nozawa, K., Shotake, T. and Ohkura, Y.(1975) Blood protein polymorphisms and population structure of the Japanese macaque, *Macaca fuscata fuscata*. In: "Isozyme IV. Genetics and Evolution", Markert, C.L. ed., Academic Press, New York, pp. 225-241.
- Nozawa, K., Shotake, T., Ohkura, Y. and Tanabe, Y.(1977) Genetic variations within and between species of Asian macaques. Jpn. J. Genet., 52: 15-30.
- Nozawa, K., Shotake, T., Minezawa, M., Kawamoto, Y., Hayasaka, K., Kawamoto, S. and Ito, S.(1991) Population genetics of Japanese monkeys : III. Ancestry and differentiation of local populations. Primates, 32:411-435.
- Omoto, K., Harada, S., Tanaka, T., Nigi, H. and Prychodko, W.(1970) Distribution of the electrophoretic variants of serum alpha₁-antitrypsin in six species of the macaques. Primates, 11:215-218.
- Rogers, A.R. and Harpending, H.(1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Mol. Biol. Evol., 9:552-569.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L.(2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Tsukada, M.(1982) *Cryptomeria japonica*: Glacial refugia and late-glacial and postglacial migration. Ecology, 63:1091-1105.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Jr., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D. and Stoneking, M.(1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc., 26:375-400.
- 渡辺邦夫(2000) 本州各地の地域個体群とその絶滅危険度評価, 本州のニホンザル 現状と保護管理の問題点, ニホンザル保護管理のためのワーキンググループ編, pp. 1-5.
- Zhang, Y. P. and Shi, L. M.(1993a) Phylogenetic relationships of macaques as inferred from restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. Folia Primatol., 60:7-17.
- Zhang, Y. P. and Shi, L. M.(1993b) Phylogeny of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) revealed by mitochondrial DNA restriction enzyme analysis. Int. J. Primatol., 14:587-605.