

アジルテナガザルの亜種分化に関する総合調査

(研究課題番号：14405020)

平成14年度～15年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成16年11月

研究代表者 平井啓久
京都大学霊長類研究所

まえがき

従来、テナガザル類の分子系統進化研究は、動物園あるいは研究施設で飼育管理されている個体を利用したものがほとんどであった。その結果は研究グループ間で異なることが良く見受けられる。その理由は一概に述べられないが、そういった矛盾を生む原因のひとつに分類同定の間違いがあげられる。飼育施設で管理されているテナガザルの多くは、出自が不明であることと、形態分類が非常に難しい（特にテナガザル亜属において）ことが重なって、施された種（亜種）同定が間違っている場合が非常に多い。出自が明確であれば分布特性から亜種を同定することも可能となるのだが、それが不明であるがために同定も不明確となり、結果的に飼育施設内で種間・亜種間交雑が生じる場合が多い。こういった個体の遺伝子試料を研究解析に用いれば、用いた個体に応じて食い違った結果になることは避けられない。

我々は、先行研究において、テナガザル亜属類の第8・9染色体間に全腕転座（WAT8/9 と命名）が存在することを見つけた。発見当初、その変異は4種に共有されていた。使用した染色体試料は動物園の飼育個体から供与されたものであったが、この結果は遺伝学的には理解しがたいものであった。そこで、形態写真や音声を収集し、分類の専門家に同定を依頼したところ、かなり大きな同定ミスが明らかになった。これも出自が不明であったがために生じたことである。結果的に、WAT8/9 はアジルテナガザル種に特異的な染色体変異であることが明らかになった。さらに他の研究グループのデータと突き合わせてみると、スマトラ由来のアジルテナガザルに特異的であることが推測できた。しかし、出自が不明な個体が含まれていたことから、結論を得るまでにはいたらなかった。

そこで、我々の推測を明らかにする目的で、出自の明確な個体から遺伝試料を収集し、形態、染色体、DNA の3視点からアジルテナガザルの亜種分化を総合的に解析することを計画し、本科学研究費補助金の支給を受けるにいたった。

今回の調査で、スマトラ、ボルネオ両島のアジルテナガザルは分子遺伝学的にはもっとも近い関係にあるが、WAT8/9 がスマトラ集団だけに特異的に存在するために、染色体レベルではもっとも大きな相違をもつことが明らかになり、我々の推測が正しかったことが確認された。

研究組織

研究代表者：平井啓久（京都大学霊長類研究所 助教授）

研究分担者：田中洋之（京都大学霊長類研究所 助手）

研究分担者：後藤俊二（京都大学霊長類研究所 助手）

研究協力者

早野あづさ（京都大学霊長類研究所 非常勤研究員 流動部門）

Hery Wijayanto、Dyah Perwitasari-Farajallah、Diah Iskandriati、Dondin Sajuthi
（ボゴール農科大学霊長類研究センター（インドネシア））

Alan R. Mootnick（テナガザル保全センター（アメリカ合衆国））

研究経費

（金額単位 千円）

実施年度	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	3、700	0	3、700
平成15年度	3、600	0	3、600

研究発表

学会誌等

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

平井啓久、田中洋之、早野あづさ（2004）インドネシアにおけるテナガザルの遺伝学的調査 霊長類研究 **20**: 123-127.

Tanaka H, Wijayanto H, Mootnick AR, Iskandriati D, Perwitasari-F D, Sajuthi D, Hirai H (2004) Molecular phylogenetic analyses of subspecific relationships in agile gibbons (*Hylobates agilis*) using mitochondrial and TSPY gene sequences. *Folia Primatologica* 75 (Supl. 1): 112-113.

Hirai H, Wijayanto H, Tanaka H, Mootnick AR, Iskandriati D, Perwitasari-F D, Sajuthi D (2005) A whole-arm translocation (WAT8/9) separating Sumatran and Bornean agile gibbons, and its evolutionary features. *Chromosome Research* **13**: 123-133.

Wijayanto H, Hirai Y, Kamanaka Y, Katho A, Sajuthi D, Hirai H (2005) Patterns of C-heterochromatin and telomeric DNA in two representative groups of small apes, the genera *Hylobates* and *Symphalangus*. *Chromosome Research* **13**: 717-724.

口頭発表

Hirai H, Wijayanto H, Tanaka H, Mootnick AR, Iskandriati D, Perwitasari-F D, Sajuthi D (2004) A chromosome landmark separating Sumatran and Bornean agile gibbons. The XX Congress of the International Primatological Society, August 22-28, 2004, Torino, Italy.

Tanaka H, Wijayanto H, Mootnick AR, Iskandriati D, Perwitasari-F D, Sajuthi D, Hirai H (2004) Molecular phylogenetic analyses of subspecific relationships in agile gibbons (*Hylobates agilis*) using mitochondrial and TSPY gene sequences. The XX Congress of the International Primatological Society, August 22-28, 2004, Torino, Italy.

平井啓久、Wijayanto H、田中洋之、Mootnick AR、早野あづさ、Perwitasari-F D、, Iskandriati D、Sajuthi D (2004) スマトラおよびボルネオアジルテナガザルを区別する顕著な染色体標識 第76回日本遺伝学会 平成16年9月27日～29日 (大阪大学)

早野あづさ、田中洋之、Wijayanto H、Perwitasari-F D、, Mootnick AR、平井啓久 (2004) マイクロサテライト解析からみたアジルテナガザルおよびミューラーテナガザルの遺伝的組成 第20回日本霊長類学会大会 平成16年7月2日～4日 (犬山市)

目次

まえがき（平井啓久）

第1章 調査状況（Hery Wijayanto）

第2章 形態分類（Alan R. Mootnick）

第3章 個体写真データ（平井啓久、田中洋之、Hery Wjiyanato、Dyah Perwitasar-Farajallah）

第4章 試料収集・解析遺伝データ一覧表（全員）

第5章 染色体分化（平井啓久）

第6章 ミトコンドリア DNA および TSPY の分化（田中洋之）

第7章 マイクロサテライト DNA の分化（早野あづさ）

第8章 出版原著論文：Genetic mechanism and property of a whole-arm translocation (WAT) between chromosomes 8 and 9 of agile gibbons (*Hylobates agilis*). Chromosome Research 11: 37-50.

第9章 その他出版物：インドネシアにおけるテナガザルの遺伝学的調査 霊長類研究 20巻2号（投稿中原稿）

あとがき（平井啓久）

第 1 章

FIELD WORK REPORT OF GIBBON RESEARCH IN KALIMANTAN AND SUMATRA, INDONESIA

Hery Wijayanto

Introduction

Research project on the Genetics of Kalimantan and Sumatra Agile Gibbons entitled “Comprehensive study of subspeciation of agile gibbons” is a joint research between Primate Research Institute, Kyoto University and Primate Research Center, Bogor Agricultural University, founded by Japan Government. The objective of the research is to find out the genetics and biogeographically evolutions of agile gibbon.

Sampling location

To obtain the blood samples from the origin habitat, samples were taken from pet gibbons, which were captive near their natural habitat, and zoos. Blood samples of Sumatran agile gibbons were collected from West Sumatra (Padang, Payakumbuh, Solok Selatan, Lubuk Sikaping, Bukit Tinggi, Pasaman, and Sijunjung), while Kalimantan agile gibbons from Central Kalimantan (Palangkaraya and Pangkalanbun), and South Kalimantan (Banjarmasin, Banjar Baru, and Martapura).

The sampling were taken under the licensee of Indonesian Research Authority/Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) and Indonesian Forestry Protection and Nature Conservation/Perlindungan Hutan dan Pelestarian Alam (PHKA) with the kind help from the rangers of the local Natural Resources Conservation Office/Balai Konservasi Sumber Daya Alam (BKSDA) in West Sumatra, Central Kalimantan, and South Kalimantan.

Sumatra and Kalimantan were choosing as the locations of blood sampling of gibbons since both of the islands are the nature habitat of agilis. *H. agilis albibarbis* (Kalimantan) and *H. agilis agilis* and *H. agilis ungko* (Sumatra) are belonging to the same species *H. agilis*. Recently, a subspecies *H. agilis albibarbis* promoted to be separated as a species rank (Groves, 2001).

Transportations

Sumatra and Kalimantan are two of the biggest islands in Indonesia. The transportations provided from Jakarta to Kalimantan are plane and ship, while to Sumatra are plane, ship, and bus. In the present research, the transportation from Jakarta to Kalimantan and Sumatra are by plane, while local transport in Kalimantan and Sumatra by car.

Observations to find the pet gibbons were done by crossed check the animal data recorded in the BKSDA to the location of the pet owner. During reconfirmation process, there were many cases found that the recorded animal have been died. However, the owner usually has gold information about the other pet gibbons owner. With such method, the team found many unrecorded pet gibbons. The new unrecorded pet gibbons, then were reported to the local BKSDA.

Blood sampling

Whole blood (less than 1 ml/kg) was collected with a heparinized syringe from gibbon under anesthetized with ketamine hydrochloride (less than 10 mg/kg bw by an intramuscularly injection), save in the 4°C less then 5 days before proceed in the laboratory. Chromosome preparation and DNA isolation were done in the Virology and Immunology Laboratory, Primate Research Center, Research Institute, Bogor Agricultural University, while the Chromosome analysis were done in Molecular Biology Department of Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama.

Although some of the owners did not allow the team to taking the blood from their pet, but most of them have a good cooperation. In case of the owners refuse the team to collect their pet blood, there was nothing to do. All of the samples were got by good persuasive and approach to the owners.

Itinerary Sampling Schedule

I. August, 2002, Sumatra.

August 2, 2002: Went to West Sumatra by plane.

August 3, 2002 : Arrange fieldwork plan with Local BKSDA.

August 5-10, 2002: field observation to find the pet gibbons around West Sumatra by car.

August 11, 2002: Blood sampling in Payakumbuh, Kubang Tungkek, and Bukit Tinggi by car.

August 12, 2002: Blood sampling in Panti and Pasaman Timur by car.

August 13, 2002: Returned back to Bogor by plane.

August 13, 2002: Cells culture in PRC-IPB Bogor.

August 15, 2002: Blood sampling in Ragunan Zoo by car.

August 15, 2002: Cells culture in PRC-IPB Bogor.

August 16, 2002: Chromosome preparation in PRC-IPB Bogor.

August 18, 2003: Chromosome preparation in PRC-IPB Bogor.

II. February, 2003, Kalimantan

February 11, 2003: Went to Central Kalimantan by plane.

February 12, 2003: Arrange fieldwork plan with Local BKSDA.

February 13-15, 2003: Field observations to find the pet gibbons around Central Kalimantan by car.

February 15, 2003: Went to South Kalimantan by car.

February 16-17, 2003: Field observations to find the pet gibbons around South Kalimantan by car.

February 17, 2003: Returned back to Palangka Raya, Central Kalimantan by car.

February 18-20, 2003: Blood sampling in Palangka Raya, Central Kalimantan by car.

February 20, 2003: Went to South Kalimantan by car.

February 21, 2003: Blood sampling in Banjar Baru and Martapura, South Kalimantan by car.

February 22, 2003: Returned back to Bogor by plane.

III. September 2003, Sumatera.

September 12: 2003: Went to West Sumatra by plane.

September 13, 2003: Arrange fieldwork plan with Local BKSDA.
 September 15-19, 2003: Field observation to find the pet gibbons by car.
 September 20, 2003: Blood sampling in Padang by car.
 September 21, 2003: Blood sampling in Solok Selatan by car.
 September 22, 2003: Returned back to Bogor by plane.
 September 23, 2003: Cells culture in PRC-IPB Bogor.
 September 26, 2003: Chromosome preparation in PRC-IPB Bogor.

IV. September 2003, Kalimantan.

September 24, 2003: Went to Central Kalimantan by plane.
 September 25, 2003: Arrange fieldwork plan with Local BKSDA in Palangkaraya.
 September 25, 2003: Went to Pangkalanbun by plane.
 September 26, 2003: Meeting with local rangers.
 September 27-28, 2003: Blood sampling in Pangkalanbun, by car.
 September 29, 2003: Returned back to Bogor by plane.
 September 30, 2003: Cells culture in PRC-IPB Bogor.
 October 3, 2003: Chromosome preparation in PRC-IPB Bogor.

Comment

Blood sampling in Sumatra was very much harder than in Kalimantan, since the gibbon population in Sumatra have been extremely decreased in the last decade cause by deforestation activity. Beside that, many people believe that agile gibbon related with black magic. That is why they did not like to captive agile gibbon. The distance between one to the other samples in Sumatra are also so far (some of them separate about 350 km away).

Contrary with situation in Sumatra, in Kalimantan was little easier to find pet gibbons. Kalimantan has a better and wider habitat of gibbons than Sumatra. However, if the Indonesian government does not seriously taking care of The Kalimantan Natural Resources, IUCN predicted that in the next 10 year, Kalimantan agile gibbon would be also extinct. Sampling in Kalimantan was done in Central Kalimantan and South Kalimantan.

In Central Kalimantan sampling was taken from Palangka Raya and Pangkalanbun. These two cities separate about 600 km. It takes about 75 minutes by plane and 11 hours by bus. In South Kalimantan, blood samples collect from Banjarbaru and Martapura. Banjarbaru located 300 km southern Palangkaraya. It takes 5 hours by car from Palangkaraya. Banjar baru and Martapura is small town where many kind of natural jewelry stones produce. Generally, Kalimantan have a better habitat for many primates than Sumatra.

Samples Data of the Sumatra and Kalimantan Agile Gibbon

Number	Sex	Facility	Origin	Sampling date	Age
				(dd/m/yr)	
<i>Sumatra agile gibbons</i>					
02 01S	Male	TSI	Unknown	6/8/2002	Adult

02 02S	Female	TSI	Unknown	6/8/2002	Adult
02 06S	Female	Pet-Jkt	Bengkulu	7/8/2002	Adult
02 07S	Female	Pet-Jkt	Muara Labuh	7/8/2002	Adult
02 08S	Male	Pet Payakumbuh	Pasaman	11/8/2002	Adult
02 09S	Male	Pet Kubang Tungkek	Riau	11/8/2002	Juvenile
02 10S	Female	Pet Kubang Tungkek	Riau	11/820/02	Adult
02 11S	Male	KB Bukit Tinggi	Lembah Harau	11/8/2002	Adult
02 12S	Female	Pet Panti	Hutan Lundar	12/820/02	Adult
02 13S	Female	Pet Pasaman Timur	Pasaman Barat	12/8/2002	Adult
02 14S	Female	KB Ragunan	Unknown	15/8/2002	Adult
02 16S	Female	KB Ragunan	Unknown	15/8/2002	Adult
02 18S	Male	KB Ragunan	Unknown	15/8/2002	Adult
02 19S	Male	KB Ragunan	Unknown	15/8/2002	Adult
02 20S	Male	KB Ragunan	Unknown	15/8/2002	Adult
03 01S	Male	Pet Padang	Solok Selatan	20/9/2003	Adult
03 03S	Female	Pet Padang	Sijunjung	20/9/2003	Adult
03 04S	Male	Pet Solok Selatan	Solok Selatan	21/9/2003	Adult
<i>Kalimantan agile gibbons</i>					
03 01K	Female	Pet Palangka Raya	Pangkalanbun	18/2/2003	Adult
03 02K	Female	Pet Palangka Raya	Tumbang Jutuh	18/2/2003	Adult
03 03K	Female	Pet Palangka Raya	Buntok	18/2/2003	Adult
03 04K	Male	Pet Palangka Raya	Barito Utara	19/2/2003	Adult
03 05K	Female	Pet Palangka Raya	Palangkaraya	19/2/2003	Adult
03 06K	Female	Pet Palangka Raya	Unknown	19/2/2003	Juvenile
03 07K	Female	Pet Palangka Raya	Unknown	19/2/2003	Adult
03 08K	Male	Pet Palangka Raya	Palangkaraya	19/2/2003	Juvenile
03 09K	Male	Pet Palangka Raya	Buntok	20/2/2003	Juvenile
03 10K	Male	Pet Palangka Raya	Buntok	20/2/2003	Adult
03 11K	Male	Pet Palangka Raya	Buntok	20/2/2003	Adult
03 12K	Female	Pet Palangka Raya	Buntok	20/2/2003	Adult
03 13K	Female	Pet Palangka Raya	Muara Teweh	20/2/2003	Adult
03 14K	Female	Pet Palangka Raya	Muara Teweh	20/2/2003	Adult
03 15K	Female	Pet Palangka Raya	Unknown	20/2/2003	Adult

03 16K	Male	Pet Palangka Raya	Barito Timur	20/2/2003	Adult
03 17K	Male	Pet Palangka Raya	Palangkaraya (?)	20/2/2003	Juvenile
03 18K	Male	Pet Palangka Raya	Unknown	20/2/2003	Adult
03 19K	Female	Pet Banjar Baru	Buntok	21/2/2003	Juvenile
03 20K	Male	Pet Banjar Baru	Buntok (?)	21/2/2003	Adult
03 21K	Male	Pet Martapura	Pangkalanbun	21/2/2003	Adult
03 22K	Male	Pet Banjar Baru	Buntok	21/2/2003	Adult
03 23K	Male	Pet Banjar Baru	Unknown	21/2/2003	Adult
03 24K	Male	Pet Banjar Baru	Unknown	21/2/2003	Adult
03 25K	Male	Pet Pangkalanbun	Pangkalanbun	27/9/2003	Adult
03 26K	Male	Pet Pangkalanbun	Pangkalanbun	27/9/2003	Adult
03 27K	Male	Pet Pangkalanbun	Kotawaringin Brt	27/9/2003	Subadult
03 28K	Male	Pet Pangkalanbun	Kotawaringin Brt	27/9/2003	Subadult
03 29K	Female	Pet Pangkalanbun	Mendawai	27/9/2003	Adult
03 30K	Male	Pet Pangkalanbun	Nangabulik	27/9/2003	Subadult
03 31K	Male	Pet Pangkalanbun	Unknown	27/9/2003	Subadult
03 32K	Male	Pet Pangkalanbun	Unknown	28/9/2003	Adult
03 33K	Male	Pet Pangkalanbun	Unknown	28/9/2003	Adult
03 34K	Male	Pet Pangkalanbun	Unknown	28/9/2003	Adult

TSI : Taman Safari Indonesia (Indonesian Safari Park)

KB : Kebun Binatang (Zoo)

Post-anaesthetized care

After blood taking, all of the animals were observed to ensure that the procedure did not have any negative effects. The observation time usually last between 15 – 45 minutes. During two hours after blood taking, the owner did not allow feeding their animals. Fortunately, there were no side effects found in all of the animals during blood collecting.



Map of Sumatra



Map of Kalimantan

第 2 章

TAXONOMY OF AGILE AND MUELLER'S GIBBONS

Alan R. Mootnick

INTRODUCTION

Gibbons, Family Hylobatidae (Gray, 1870) are small, arboreal apes, inhabiting the tropical and semi-deciduous forests of South East Asia, and a small section of South Asia. Gibbons are distributed from North East India and North West Bangladesh, South China, Laos, Vietnam, Cambodia, Thailand, Malaysian Peninsula, Sumatra, Borneo, and Java. Some gibbon species go through pelage color changes during infancy and before adulthood. The impact of malnutrition, pregnancy, age, nursing, and housing (e.g. indoors only or in full sunlight) can affect their coloration. It is easy to confuse some gibbon species' vocalization. There is some difficulty with distinguishing some gibbon subspecies. Taxonomists use different names to describe the same coloration. Over the years, there have been many reassessments of the number and names of gibbon genera, species and subspecies (Elliot, 1913; Groves, 1972; Marshall and Sugardjito, 1986; Roos and Geissmann, 2001; Groves, 2001), with a current taxonomic listing of 12 species (Brandon-Jones, et al. 2004) and some taxonomists feel there are up to 14 gibbon species (Groves, 2001). Some gibbon species in their native habitat hybridize within their own genus of *Nomascus* and *Hylobates*. Confiscated gibbons have a loss of a dearth of information that includes their geographical range. Museum specimens can be faded from sunlight, or preservatives, which can change the pelage coloration, or labelled incorrectly. Some museum specimens were listed as adults, but the pelage and dentition revealed that they were subadults in a color transition. The tags and file cards for some of the gibbon skins in some museums did not always match, making it time consuming to assess the gibbons species or subspecies. Some published taxonomic descriptions have been incomplete or ambiguous. Given these variables, it is not surprising that rescue centers and breeding facilities may encounter difficulties in the species identification of gibbons.

METHODS

Identification of species and subspecies (Geissmann 1995; Marshall & Sugardjito 1986) was done using only information about locality (for animals of known origin) and photographs (face, profile, head, chest, back, genital tuft, hand, arm, leg and foot) taken under anesthesia after blood sampling (see pictures of each individual). Table 1 lists taxonomic identification, place of origin (if known), and morphs of chromosome 8 and haplotypes of mitochondrial DNA TSPY (testis specific protein, Y encoded) in the 57 gibbons encountered this time.

GENUS *HYLOBATES* (Illiger, 1811)

The remaining gibbon species are classified in the genus *Hylobates*. This genus has a diploid chromosome number of 44. In this paper I will refer to this genus only by the number of chromosomes, the 44 chromosome group. The female genital swelling is most prominent in this genus, and mainly in *Hylobates agilis*, *H. albibarbis*, *H. lar*, *H. muelleri*,

and *H. moloch*. The genital swelling is not as great in *H. pileatus*, and I have not observed enough adult female *H. klossii* to make a statement.

***Hylobates agilis* (Cuvier, 1821). Agile or dark-handed gibbon (pictures #1-#17)**

H. agilis is referred to as the agile or dark-handed gibbon. This species is subdivided into two subspecies. This is one of the smallest gibbon species. Males and females can be either buffish, brownish, reddish, or blackish in color. Males and immature females have whitish brows and cheek patches, which resemble a whitish beard. The hair of the male's genital tuft is 50 mm long and generally the same color, or slightly paler than, the body hair (Marshall and Sugardjito, 1986). Starting at the chin females begin to lose their cheek patches at 6 yrs of age and can finish their color change between 7 – 14 yrs of age. Adult females who have been housed in low light conditions or who have nutritional deficiencies may lack the white brow and resemble *H. klossii*. The lumbar and rump of young infants is mixed with slightly lighter coloration. The great call of the female agile gibbon is somewhat similar to the female lar gibbon's.

Morphologically, there is a small but observable difference between *H. a. agilis* and *H. agilis unko*. Pelage examination from male and immature females with dark pelage from live and museum specimens of *H. agilis unko* and *H. a. agilis* were compared. Distinct differences were found in study skins from Sumatra that were examined depending on the elevation they were formally living in.

Groves (2001) has suggested that the Bornean agile gibbon (*H. a. albibarbis*) be elevated to its own species, and be referred to as the Bornean white-bearded gibbon (*Hylobates albibarbis*). Due to the morphological differences (Hirai et al., 2003), I agree with this recommendation.

***Hylobates agilis agilis* (Cuvier, 1821). Mountain agile gibbon**

The mountain agile gibbon's pelage is buff, reddish-orange, reddish-brown, brown or black with white cheek patches that connect at the chin and brow. The female's brow is white and not always divided in the middle.

***Hylobates agilis unko* (Lesson, 1840). Lowland agile gibbon**

The lowland agile gibbon possesses few characteristics that reliably distinguish it from *H. a. agilis*. The cheek patches are creamy -white to a grizzled white, sparse, and do not connect at the chin or brow. The adult female's brow marking is thin and short and well-separated in the middle. Some specimens have a lumbar region that is paler than is the body hair.

***Hylobates albibarbis* Lyon, 1911. Bornean white-bearded gibbon (pictures #18-#37)**

The bearded gibbon is light brown with dark-brown to brown-black underparts, hands, feet, and cap, with a white brow, and the lumbar region is buff. This species can have black fingers and toes. Its song has longer and slower notes when compared with the mountain and lowland agile gibbon.

***Hylobates muelleri* (Martin, 1841). Mueller's, Bornean, or gray gibbon (pictures #38-#51))**

There are three subspecies. Adult male and female are identical in coat color, which varies from grey to grey-brown, or blackish. The hair of the adult male's genital tuft is 25 mm long (Marshall and Sugardjito, 1986) and is typically darker than the body hair. Infants' coats are lighter than their parents'. This species lacks a uniform appearance in areas of geographic overlap with other Mueller's gibbon subspecies. The great call of the female Mueller's gibbon is somewhat similar to that of female pileated gibbons. Marshall and Sugardjito (1986) describe three subspecies. Eastern Mueller's gibbon (*H. m. muelleri*) and Abbott's gray gibbon (*H. muelleri abbotti*) are sometimes difficult to distinguish from moloch gibbons because of similarities in coat color. *H. muelleri funereus* is occasionally misidentified as the white-bearded gibbon (*H. albibarbis*) for the same reason.

***Hylobates muelleri muelleri* (Martin, 1841). Eastern Mueller's gibbon**

The eastern Mueller's gibbon are pale gray or gray-brown with a black cap, ventrum, hands, feet, and inner aspects of the limbs. It has a thick white brow.

***Hylobates muelleri funereus* I. Geoffroy St. Hilaire, 1850. Northern Mueller's gibbon**

Northern Mueller's gibbon is dark gray or gray-brown with black to blackish-brown cap, ventrum, throat, inner aspects of the limbs, and genitals. Outer area of the lower limbs and tips of the fingers and toes are generally paler or buffish-gray. Toes and fingers are black on specimens from southern regions where the subspecies overlap geographically with *H. m. muelleri*. There is a report of a blackish color phase in the Kinabatangan Wildlife Sanctuary (Ancrenaz, 2001).

***Hylobates muelleri abbotti* (Kloss, 1929). Abbott's gray gibbon**

Abbott's gray gibbon has short, mouse-gray body hair and can have dark hair in the genital region. The brow is slightly paler than the head hair. As populations are closer to the bordering area of *H. m. funereus* they sometimes have black hair on the throat and/or a slightly darker cap, and upper chest and inner aspects of the limbs, reflecting subspecific hybridization in overlap zones.

REFERENCES

- Ancrenaz, M, 2001, Observations of previously undocumented gibbons and orangutans in the Kinabatangan Wildlife Sanctuary, *The Gibbons Voice* 5:1-3.
- Brandon-Jones, D., Eudey, A.A., Geissmann, T., Groves, C.P., Melnick, D.J., Morales, J.C., Shekelle, M., and Stewart, C B., 2004. Asian primate classification. *International Journal of Primatology* 25:97-164.
- Elliot, D. G., 1913, *Hylobates*, Pp. 149-180. vol. 3. in: *A review of the primates*,

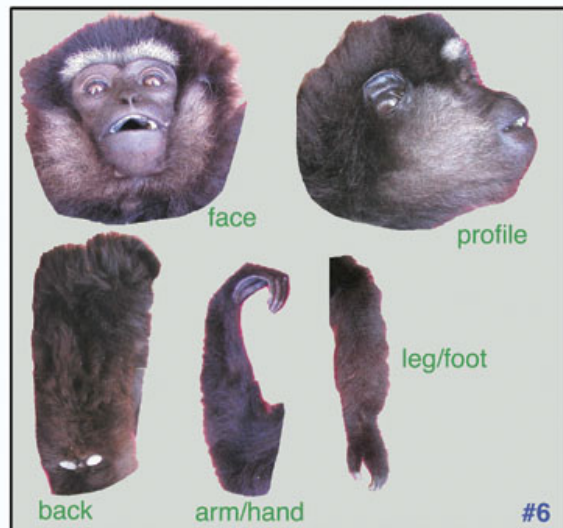
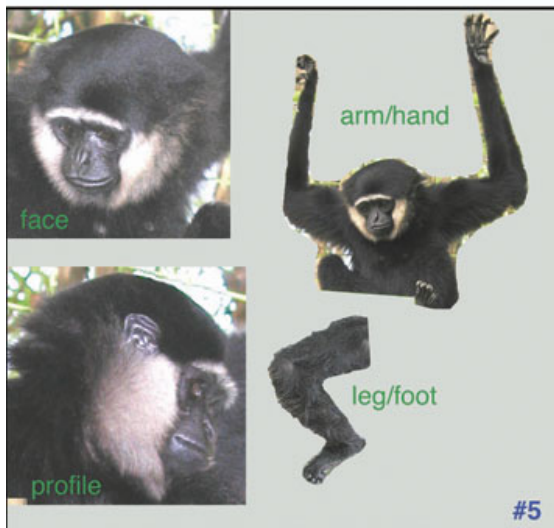
- monograph*. New York: American Museum of Natural History.
- Geissmann, T., 1995, Gibbon systematics and species identification, *International Zoo News* 42:467-501.
- Gray, J. E. (1870). Catalogue of mammalia. Catalogue of monkeys, lemurs, and fruit-eating bats in the collection of the British Museum. London, British Museum of Natural History. Vol.8, 4, 9-12.
- Groves, C.P., 1972, Systematics and phylogeny of gibbon, Pp. 1-89, vol. 1. in: *Gibbon and Siamang*, (Ed. Rumbaugh, D.M.), Basel: S. Karger.
- Groves, C. (2001). *Primate taxonomy*. In: D'Araujo E. (ed), Washington, DC: Smithsonian Institution Press. 350 p.
- Hirai H., Mootnick A.R., Takenaka O., Suryobroto B., Mouri T., Kamanaka Y., Katoh A., Kimura N., Katoh A., 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(1):37-50.
- Marshall, J.T. and Sugardjito, J., 1986, Gibbon systematics, Pp. 137-185, in: *Comparative primate biology*, (Eds. Swindler, D.R. and Erwin, J.), New York: A.R. Liss.
- Roos, C. and Geissmann, T., 2001, Molecular phylogeny of the major Hylobatid divisions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19:486-494.

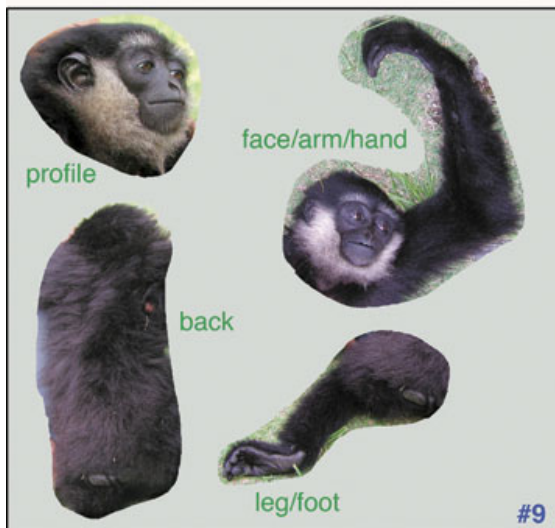
第 3 章

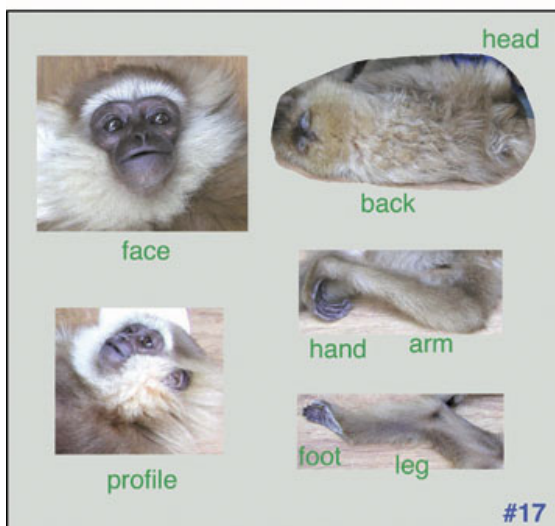
個体写真データ

平井啓久、田中洋之、Hery Wijayanto、Dyah Perwitasar-Farajallah
(写真撮影者)

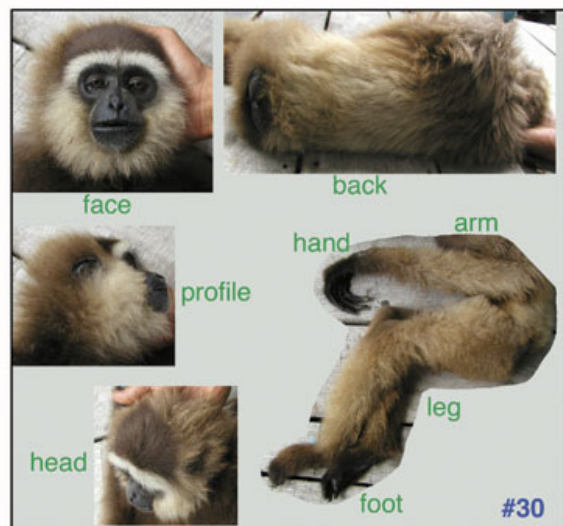
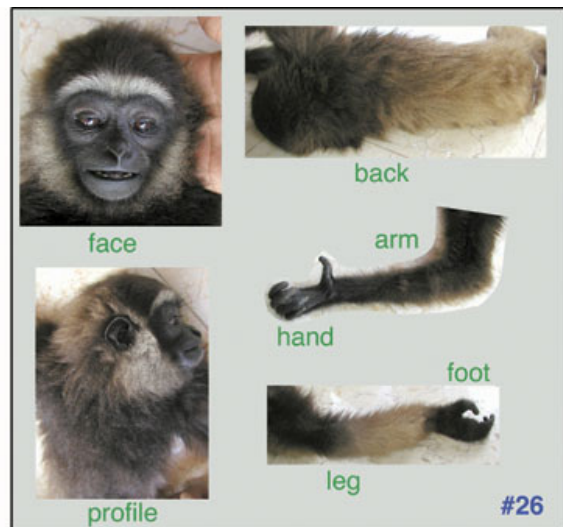
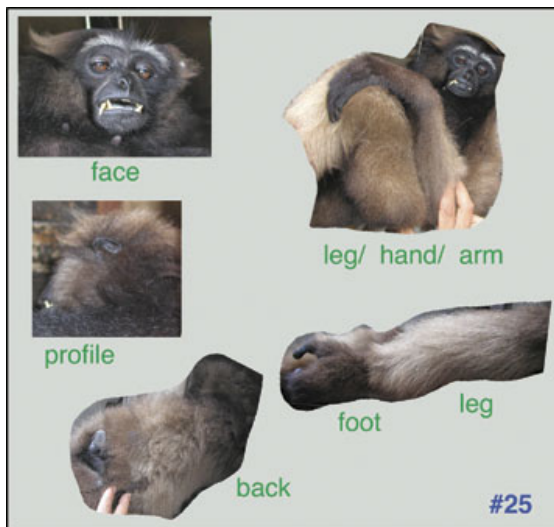
今回分類同定に用いた形態写真を全 57 個体分掲載した。写真撮影は同定の指標となる正面顔、横顔、背中、頭頂部、腕、手、大腿、足を中心に行った。撮影が麻酔下採血終了直後に行われたので、多くの個体が覚醒前の寝ぼけた顔になっていることをご容赦願いたい。すべての個体は麻酔後の覚醒経過は順調で、麻酔による事故は全くなかったことを、付け加えておきます。

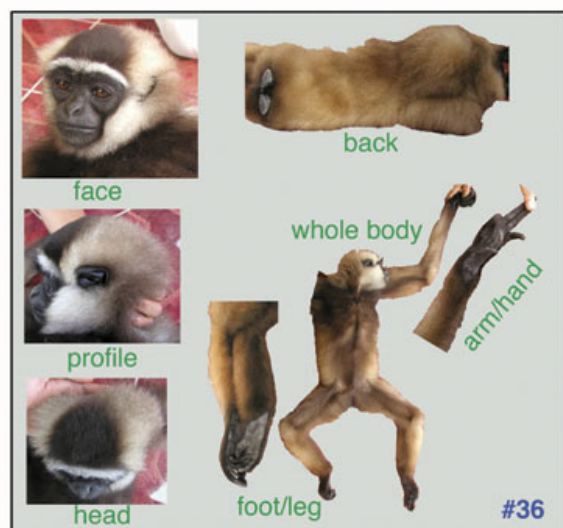
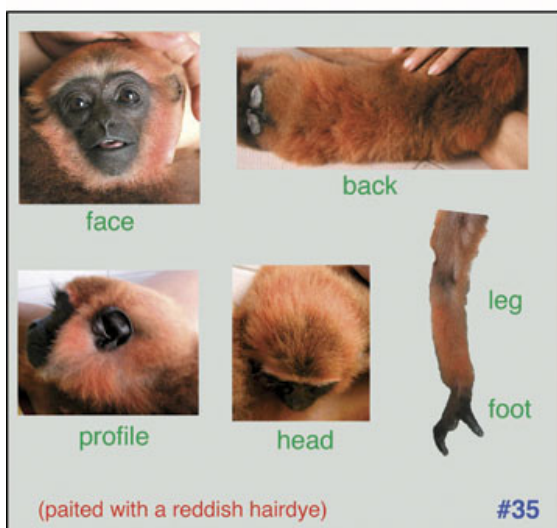
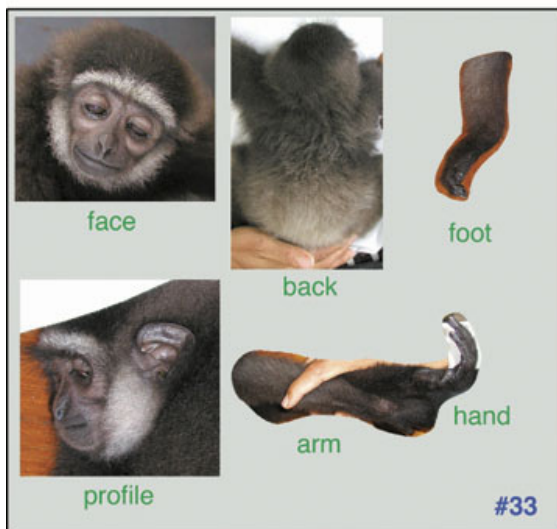






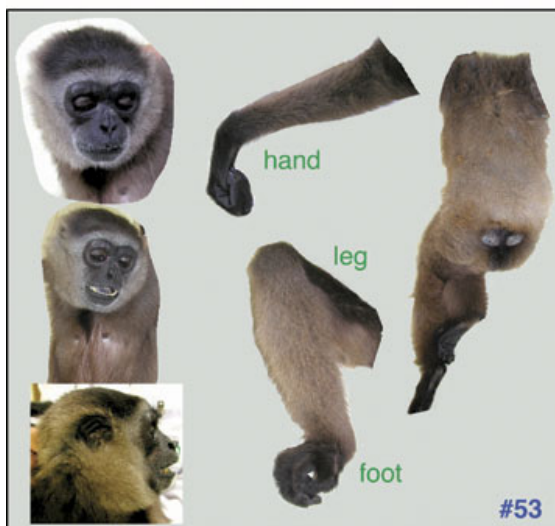
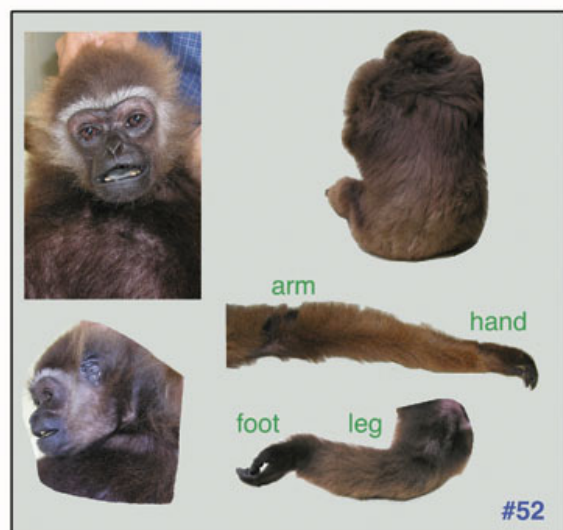
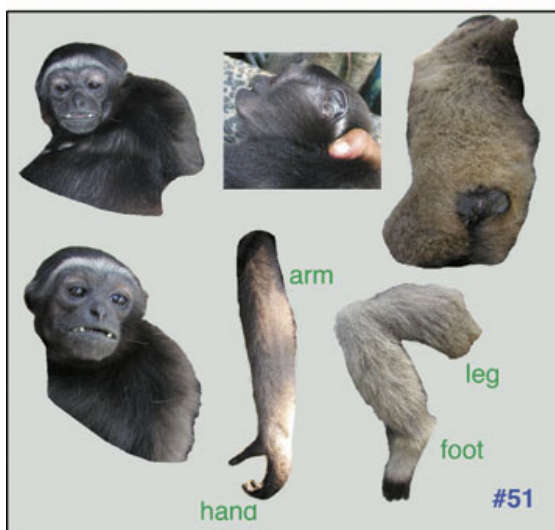
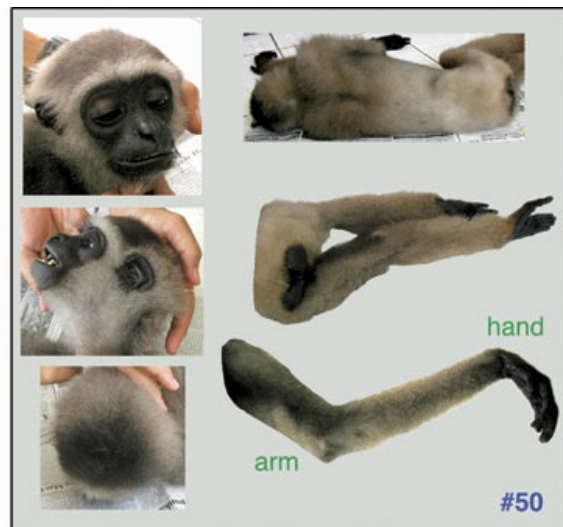


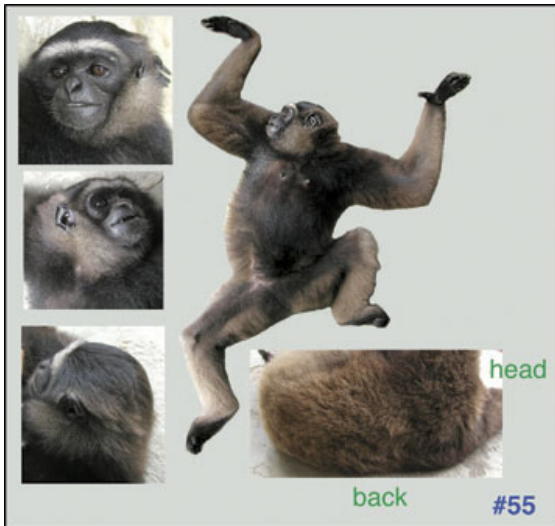












第4章 (全員)

個体、出生地、種・亜種分類同定、染色体タイプ、DNA タイプの各情報リスト

Table 1. Sample and genetic data of agile and Müller's gibbons collected from Sumatra and Borneo (Kalamantan).

N o.	Individual No. & Name	Sex & body weight	Origin	Facility	Sampling date & place	Species or Subspecies	Morph of chrom. 8	mt DNA	TSPY
1	02-8	Male	Pasaman, Sumatra	Personal pet	11/08/02 Payakumbuh	<i>H. a. unko</i>	8a.b/8c'	<i>agilis</i> 1	<i>agilis</i>
2	02-9	Male	Riau, Sumatra	Personal pet	11/08/02 Kubang Lungkek	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 2	<i>agilis</i>
3	02-11 Uowuo	Male	Lembah Nature Reserve, Sumatra	Bukit Tinggi zoo	11/08/02 Bukit Tinggi	<i>H. a. unko</i> or <i>H. a. agilis</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 1	<i>agilis</i>
4	03S-1 Yoki	Male	Solok Selatan, Sumatra	Personal pet	20/09/03 Padang	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 1	<i>agilis</i>
5	02-7	Female 5.0 kg	Muaralabuh, Sumatra	Personal pet	07/08/02 Jakarta	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 1	-
6	02-10 Kity	Female	Ujung Batu, Riau, Sumatra	Personal pet	11/08/02 Kubang Lungkek	<i>H. a. unko</i>	8a.b/8c'	<i>agilis</i> 2	-
7	02-12	Female	Lundar Harau, Sumatra	Personal pet	12/08/02 Petok, Pantii	<i>H. a. unko</i> or <i>H. a. agilis</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 2	-
8	02-13 Bijey	Female	Ujung Pasaman Barat, Sumatra	Personal pet	12/08/02 Pasaman Timur	<i>H. a. unko</i> or <i>H. a. agilis</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 2	-
9	03S-3 Hengki	Female	Sijunjung, Sumatra	Personal pet	20/09/03 Padang	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis</i> 1	-

10	03S-4	Female	Perkebunan PTPVI, Solok Selatan, Sumatra	Personal pet	21/09/03 Sungai Sungkai	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis 1</i>	-
11	02-1 Jeki	Male 6 kg		Taman Safari	06/08/02 Bogor	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis 1</i>	<i>agilis</i>
12	02-16 Room 23	Male 4.9 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis 1</i>	<i>agilis</i>
13	02-18 Room 24	Male 4.8 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis 1</i>	<i>agilis</i>
14	02-19 Room 20	Male 4.9 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. a. unko</i> or <i>H. a. agilis</i>	8a.b/8c'	<i>agilis 2</i>	<i>agilis</i>
15	02-20 Room 15	Male 4.4 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. a. unko</i>	8c'/8c'	<i>agilis 1</i>	<i>agilis</i>
16	02-2 Bodi	Female 4.3 kg		Taman Safari	06/08/02 Bogor	<i>H. a. unko</i>	8a.b/8c'	<i>agilis 1</i>	-
17	02-17 Room Ext.	Female 2.7 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. a. agili</i>	8c'/8c'	<i>agilis 1</i>	-
18	03-5 Panki	Male	Palankaraya, Kalimantan	Personal pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
19	03-6 Chacha	Male	Palankaraya, Kalimantan	Personal pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8a.b	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
20	03K-1 Hengki	Male 2.6 kg	Pangkalanbun, Kalimantan	Personal pet	27/09/03 Pangkalanbun	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
21	03K-2 Rino	Male 5.6 kg	Pangkalanbun, Kalimantan	Personal pet	27/09/03 Pangkalanbun	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8a.b	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
22	03K-3 Yuyun	Male 3.0 kg	Kotawaringin, Barat, Kalimantan	Personal pet	27/09/03 Pangkalanbun	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>

23	03K-4	Male	Kotawaringin, Barat, Kalimantan	Personal pet	27/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
24	03-1	Female	(Pangkalanbun)	Personal pet	18/02/03	<i>H. a. albibarbis</i>	N	<i>albibarbis</i>	-
25	03-2	Female	Tumbangjutih, Kalimantan	Personal pet	18/02/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	-
26	03-17	Female	Palankaraya, Kalimantan	Personal pet	20/02/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	-
27	03K-5	Female	Mendawai, Kalimantan	Personal pet	27/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	-
28	03K-6	Female	Nangabulik, Kalimantan	Personal pet	27/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	-
29	02-4	Male	(Kalimantan)	Taman safari	06/08/02	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8a.b	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
30	03-18	Male		Personal pet	20/02/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	<i>agilis</i>
31	03K-9	Male		Personal pet	28/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
32	03K-10	Male		Personal pet	28/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	<i>albibarbis</i>
33	03-7	Female		Personal pet	19/02/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	-
34	03-8	Female		Personal pet	19/02/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8a.b	<i>albibarbis</i>	-
35	03K-7	Female		Personal pet	27/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8c/8c	<i>albibarbis</i>	-
36	03K-8	Female		Personal pet	28/09/03	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	-

37	02-14 Room 9	Female 5.3 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. a. albibarbis</i>	8a.b/8c	<i>albibarbis</i>	-
38	03-9 Upeng	Male 1.6 kg	Buntok, Kalimantan	Personal Pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
39	03-10 Haris	Male 2.0 kg	Buntok, Kalimantan	Personal Pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8c/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
40	03-16 Pucu	Male 2.4 kg	Temiang Layang, Kabupaten, Barito Timur, Kalimantan	Personal pet	20/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
41	03-23 Taro	Male 4.4 kg	Muara Teweh, Kalimantan	Personal pet	21/02/03 Banjarbaru	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8a.b	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
42	03-3 Milu	Female	Buntok, Kalimantan	Personal pet	18/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8c/8c	<i>muelleri</i>	-
43	03-11 Joni	Female 4.4 kg	Buntok, Kalimantan	Personal pet	19/02/03PPalan gkaraya	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8a.b	<i>muelleri</i>	-
44	03-12 Rika	Female 2.5 kg	Buntok, Kalimantan	Personal pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	-
45	03-13 Rini	Female 5.8 kg	Muara Teweh, Kalimantan	Personal pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8a.b	<i>muelleri</i>	-
46	03-14 Ucit	Female 4.6 kg	Muara Teweh, Kalimantan	Personal pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8a.b	<i>muelleri</i>	-
47	03-19 Dona	Female 2.8 kg	Ampah, Buntok, Kalimantan	Personal pet	21/02/03 Banjarbaru	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	-
48	03-22 Eko	Male? 4.0 kg	Buntok, Kalimantan	Personal pet	21/02/03 Banjarbaru	<i>H. muelleri</i>	N	<i>albibarbis</i>	(not amplified)
49	02-15 Room 7	Male 4.8 kg		Ragunan zoo	15/08/02 Jakarta	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
50	03-20 Dono	Male 3.4 kg		Personal pet	21/02/03 Banjarbaru	<i>H. muelleri</i>	8c/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>

51	02-6	Female 6.0 kg	(Bengkulu)	Personal pet	07/08/02 Jakarta	<i>H. muelleri</i>	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	-
52	02-5 Jeko	Male		Taman safari	06/08/02 Bogor	<i>H. muelleri</i> Captive hybrid?	8c'/8c'	<i>agilis</i> 1	<i>agilis</i>
53	02-3 Doni	Male		Taman safari	06/08/02 Bogor	Hybrid?	8c/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
54	03-4 Bayu	Male	Barito Utara	Personal pet	19/02/03 Palangkaraya	<i>H. muelleri</i> Hybrid?	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>
55	03-15 Boy	Female 4.5 kg		Personal pet	20/02/03 Palangkaraya	<i>H. a. albibarbis</i> Hybrid?	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	-
56	03-21 Ricky	Male? 3.8 kg	(Pangkalanbun)	Personal pet	21/02/03 Martapura	<i>H. a. albibarbis</i> Hybrid?	8a.b/8a.b	<i>muelleri</i>	(not amplified)
57	03-24 Indra	Male 4.0 kg		Personal pet	21/02/03 Banjarbaru	<i>H. muelleri</i> Hybrid?	8a.b/8c	<i>muelleri</i>	<i>muelleri</i>

Number 1-17, Sumatran agile gibbons (*H. agilis unko* or *H. agilis agilis*). Number 18-37, Bornean agile gibbons (*H. agilis albibarbis*). Number 38-51, Muller's gibbons (*H. muelleri*). Number 52-57, Hybrids estimated by morphology. 8a.b, 8a morph or 8b morph distinguished by a small pericentric inversion. 8c, a morph rearranged by a large pericentric inversion. 8c', a morph consisting of the short arm of chromosome 8 and the long arm of chromosome 9 formed by a whole-arm translocation between chromosomes 8 and 9 (WAT8/9).

第6章

TSPY 遺伝子及びミトコンドリア DNA の系統分析による アジルテナガザル (*Hylobates agilis*) の亜種間関係

田中 洋之

はじめに

アジルテナガザル (*Hylobates agilis*) には、スマトラ島の山岳地帯に分布する *H. a. agilis*, スマトラ島低地とマレー半島の一部に分布する *H. a. unko* 及びボルネオ島南東部 (カリマンタン) に生息する *H. a. albibarbis* の3亜種が知られている (Marshall and Sugardjito, 1986). しかしながら、最近の分類は、スマトラとマレー半島に亜種分類をみとめず (*H. agilis*), カリマンタン産亜種を種に昇格させた (*H. albibarbis*) (Groves, 2001). カリマンタンの *albibarbis* は、ボルネオで異所的に分布するミューラーテナガザル (*H. muelleri*) と被毛色において非常に類似しているが (Groves, 2001), 発声方法は、*H. agilis* そのものであるといわれており (Marshall and Sugardjito, 1986), その系統的な位置づけは不明である.

これらのテナガザルが属する *Hylobates* 亜属は, *lar* グループとも呼ばれ, $2n=44$ の染色体数を持つテナガザルのグループである. 野生状態でも種間雑種が報告されるほど遺伝的に近縁であり (Brockelman and Gittins, 1984), 動物園や研究機関で飼育されているテナガザルでは, こうした問題がいつそう憂慮されている (Hirai et al., 2003).

これまで Hirai et al. (2003) は, van Tuinen et al. (1999) がアジルテナガザルで最初に報告した染色体相互転座変異がスマトラ産のアジルテナガザルだけに存在することを推測した. これにより, 染色体変異の分類に基づいて, 研究機関や原産国で捕獲下にあるテナガザルの分類の再検討を提唱したのは, Hirai et al. (2003) である.

本研究は, アジルテナガザルの亜種分化の過程を形態分類—染色体変異—分子系統の観点から同時に比較解析を行うため計画されたプロジェクトにおいて,

分子系統解析を担当するものである．このため、スマトラやカリマンタンで出自の明確な個体から試料採集を行い、また、近縁なミューラーテナガザルや同じ *lar* グループのシロテナガザル (*H. lar*) も比較のため加えて、Y 染色体上の TSPY 遺伝子とミトコンドリア DNA の ND4-ND5 遺伝子領域の系統分析を行ったので、報告する．

材料と方法

試料採集および DNA 抽出

本研究は、雑種ではない純粋の種や亜種から血液試料を得ることに重点をおいた．そのため、自然生息域に近い町や村でペットとして飼育されている個体を探し、ペットのオーナーの了解を得て、採血、外部形態の撮影ならびにペットの出自に関するインタビューを行うという方法をとった．調査および試料採集は、2002 年 8 月および 2003 年 9 月にスマトラ島のパダン市近郊、2003 年 3 月にボルネオ島の中央カリマンタン州パランカラヤ周辺および南カリマンタン州のバンジャルバル周辺、2003 年 9 月に中央カリマンタン州パンカランブン周辺で行われた．また、インドネシアサファリ公園 (Taman Safari Indonesia; TSI) やジャカルタ市のラグナン動物園 (Ragunan Zoo) で飼育されるアジルテナガザルおよびミューラーテナガザルからも血液試料を得た．さらに、京都大学霊長類研究所で飼育されているシロテナガザル (*H. lar*) も比較のため、分析に加えられた (表 1)．

血液は、麻酔下の個体から凝固防止用のヘパリンが少量加えられた注射筒を用いて、成獣個体から 4 ml、若齢個体から 2 ml 採集された．採血後、血液試料は、氷とアイスボックスを用いて涼しい状態で保管され、ボゴール農科大学霊長類研究センターの微生物学・免疫学研究室に持ち込まれた．

DNA 抽出を行うため、1 ml の血液を遠心分離し、白血球分画を 200 ml の滅菌生理食塩水に浮遊させた．QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAgen 社) を用いて、キットのプロトコールに従い、白血球試料から DNA を抽出した．DNA 試料は、4 °C で保存され、アイスボックスを用いて、京都大学霊長類研究所へ運ばれた．

試料採集を行った個体の外部形態の写真に基づいて、Alan Mootnick 氏 (テナガザル国際研究センター；本報告書参照のこと) により、種・亜種の同定なら

びに雑種であるかどうかの判断が行われた。本研究では、外部形態の分類で雑種と判定された個体は、分析から除外した。従って、表 1 に示したように 52 個体のテナガザルが分析対象になった。

PCR および DNA シークエンシング

Y 染色体上の TSPY 遺伝子(精巣特異的タンパク質遺伝子; Testis-specific protein Y) ならびにミトコンドリアの ND4-ND5 遺伝子領域が、分子マーカーとして解析に用いられた。TSPY 遺伝子は、Kim and Takenaka (1996)に記載されたプライマーと PCR 条件に従って、標的領域を増幅した。ND4-ND5 遺伝子領域については、Hayashi et al. (1995)で報告されているプライマーのうち、L12686 と H12752R を使用し、同論文の PCR 条件を参考にして、増幅を行った。

PCR 産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen 社)により精製された後、増幅に用いたプライマーを使用し、BigDye Terminator Ver. 3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社)に従ってシークエンシング反応に供された。各遺伝子領域の塩基配列は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)により、両方向から解読し、Sequence Navigator (Applied Biosystems 社)を使ってコンピュータ上で確認した。

系統分析と種内および種間の塩基多様度の推定

TSPY 遺伝子については、オス 31 個体から得られた 739 塩基対の塩基配列が系統分析と塩基多様度の推定に用いられた。塩基配列は、CLUSTAL X (Thompson et al. 1997)を用いてアライメントを行った。系統分析は、PAUP* (Swofford, 2003)を用いて最節約法により行われた。シロテナガザル(以下、*lar*と記載)は外群として用いられた。分岐関係の信頼性を評価するためにブートストラップ確率(1000 回のデータの最抽出に基づく; PAUP*による)と崩壊係数(decay index; Eriksson, 1998 の AutoDecay を利用)をもとめた。さらに、TSPY 遺伝子の各ハプロタイプ間の遺伝子系譜ネットワークが、TCS (Clement, 2000)を用いて推定された。このプログラムは、Templeton et al. (1992)の分岐分類学のアルゴリズムを採用している。

ミトコンドリア ND4-ND5 領域については、全個体から得られた 1039 塩基対の塩基配列が分析された。CLUSTAL X を用いて塩基配列のアライメントを行った後、PAUP*を用いて最節約法と最尤法により分子系統樹の推定を行った。

両分析法とも、*lar* が外群として用いられた。最節約法において、分岐関係の信頼性を、TSPY の場合と同様に、ブートストラップ確率と崩壊係数により評価した。最尤法による系統推定は、予め、Modeltest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) の尤度比検定により選択された進化モデル (Tamura and Nei (Tamura and Nei, 1993) + G) と塩基配列データから推定されたパラメータを用いて、PAUP*により行われた。

TSPY 遺伝子と ND4-ND5 遺伝子領域についての種内および種間の塩基多様度を、ハプロタイプのペア比較により、'P'-distance (置換塩基サイト数/全塩基サイト数) としてもとめた。

結 果

TSPY 遺伝子

分析した 31 個体から 9 個の TSPY ハプロタイプが見つかった。スマトラの *H. agilis* (以下, *agilis* と記載) で 3 タイプ、カリマンタンの *H.a. albibarbis* (以下, *albibarbis*) で 3 タイプ、*H. muelleri* (以下, *muelleri*) で 2 タイプが区別された。これらのハプロタイプについて、最節約法による系統分析を行った結果、4 個の等しく最節約な樹形がえられた。図 1 a は、そのうちの一つである。各分類群のハプロタイプは分類群ごとにまとまり、*albibarbis* のクラスターは *agilis* のクラスターにより近縁であった。図 1 b は、TSPY の遺伝子系譜ネットワークである。*agilis* と *albibarbis* で見いだされたハプロタイプには、分類群内よりも *agilis* と *albibarbis* の間でより近縁な組み合わせが存在したが、系統分析と遺伝子系譜分析の結果は、TSPY 遺伝子が各分類群を区別できることを示した (図 1 a, b)。形態と染色体変異による分類 (表 1) と TSPY ハプロタイプの分類は、1 例を除いて、一致した (下記参照)。

TSPY 遺伝子の種内および種間の塩基多様度は、表 2 にまとめられている。複数のハプロタイプが見つかった *agilis*, *albibarbis* および *muelleri* の分類群内の塩基多様度は、0.3 % 未満であった (0.0014-0.0027)。分類群間の塩基多様度は、*agilis*–*albibarbis* 間で 0.0045 であった以外、1 % を超えた (0.0111–0.0131) (表 2)。

ミトコンドリア ND4-ND5 遺伝子領域

52 個体中、異なる個体どうしで同一の塩基配列を示す例がいくつかあったため、合計 42 個の塩基配列が分析対象になった。図 2 a と b は、それぞれ最節約法および最尤法によって推定された系統樹である。これら 2 つの異なる方法で再構築された系統樹の分岐関係は、ほぼ一致した。外群に *lar* を用いたとき、スマトラの *agilis* が大きく 2 つの系統に分岐していることが明らかとなった (*albibarbis* に近縁なクラスターを *agilis* 1、系統樹の基部に位置するクラスターを *agilis* 2 とした；図 2 a, b)。*albibarbis* および *muelleri* は、それぞれの分類群のクラスターを形成した。

表 3 に、ND4-ND5 領域についての分類群内および群間の塩基多様度をまとめた (*agilis* 1 と *agilis* 2 を異なる分類群として扱った)。分類群内の塩基多様度は、0.5 % から 1.4 % であった。一方、分類群間の多様度は、*lar*–*agilis* 2 間と *agilis* 1–*albibarbis* 間の組み合わせを除くと、6 % 前後の大きさであった。*lar*–*agilis* 2 間の違いは 1.7 % で、分類群間の多様度と比肩しうる程度であった。*agilis* 1–*albibarbis* 間の 3 % の多様度は、他の分類群間の多様度のおよそ半分の大きさであり、TSPY 遺伝子の場合とよく似ていた。

なお、2 個体で形態・染色体の分類と分子マーカーによる分類に不一致が見つかった。試料番号 30 (Hy0318; ♂) は、形態分類では *H. a. albibarbis* と判定され、染色体変異とミトコンドリアタイプと矛盾はなかったが、TSPY 遺伝子は *agilis* タイプであった。また、試料番号 48 (Hy0322; ♀) は、形態分類では *H. muelleri* と判定されたが、ミトコンドリアが *albibarbis* タイプであった。

2 つの遺伝子領域の塩基多様度の比較

図 3 は、テナガザルの各分類群内・群間の塩基多様度を 2 つの分子マーカーで比較したものである。ミトコンドリア ND4-ND5 領域は、分類群内及び群間について、TSPY 遺伝子のおよそ 5～6 倍高い変異性を示した。

考 察

分子系統分類と形態分類・染色体変異との対応関係

本研究では、外部形態の観察から雑種ではないと判定された個体の試料を分析した。また、それらの個体は、第 8・9 染色体間相互転座変異についても解析が行われている (表 1；第 4、5 章参照)。今回、各分類群について多数の

試料を遺伝様式の異なる 2 種類の分子マーカーによって分子系統分析を行ったところ (TSPY 遺伝子は父親からオスの子供に遺伝し、ミトコンドリア遺伝子は母親から子供に遺伝する)、2 個体の例外を除いて、各分子マーカーによって区別されたクラスターと形態分類及び染色体変異の分布とが一致した (表 1, 図 1, 2). すなわち、スマトラに生息する *H. agilis* にのみ染色体転座変異が認められることが、系統的に支持されることが明らかになった. 例外の 2 頭 (試料番号 30 と 48) は、結果的には、それぞれ亜種間雑種や種間雑種と考えなければならないが、分析に用いた 2 種類の遺伝子領域は、遺伝的組み替えが起こらないため、雑種といえどもそれらの遺伝子のタイプはどれかの分類群に属することになる. 従って、今回分析したテナガザル各分類群が分類群ごとに特徴的な遺伝子タイプをもつという結果には影響しない. 逆に、詳細な形態観察により雑種ではないと判断されても、ごく低い頻度で雑種が含まれている可能性を示唆する. このことは単一の分子マーカーや単独の分析法では検出できないため、系統や進化の研究に用いる材料は、十分注意して扱う必要があることを示している.

TSPY 遺伝子 (図 1) とミトコンドリア遺伝子 (図 2) から構築された分子系統樹の相違点は、TSPY 遺伝子で一つにまとまったスマトラ産の *H. agilis* が、ミトコンドリアで大きく分岐した 2 つのクラスターに分かれたことである (*agilis* 1 と *agilis* 2). スマトラには、*H. a. agilis* と *H. a. unko* の 2 亜種が区別されていたが、この亜種分類とミトコンドリア系統樹の 2 つのクラスターは対応していない (表 1, 図 2). ミトコンドリアの樹形図 (図 2 a, b) の基部に位置するクラスター (*agilis* 2) の塩基配列は、外群の *H. lar* に近縁であることが塩基多様度の比較により明らかになっている (表 3 ; 図 3). しかしながら、この *agilis* 2 に属するミトコンドリアタイプの由来については、さらなる調査が必要である. 本研究の *H. lar* は出自が不明であるため、この種についても出自地域の明らかな試料を比較に用いなければならない. アジルテナガザルの分布域を考慮すると、スマトラ東北部やマレー半島の *H. lar* を分析に加える必要がある. さらに、*H. lar* は、*H. agilis* や *H. muelleri* と同様に *Hylobates* 亜属に属する近縁種であったため、今後は、別亜属のテナガザルを外群とした分析が必要である.

カリマンタン産アジルテナガザルの系統的位置づけ

Groves (2001)は、近年、カリマンタン産アジルテナガザルを独立種 (*Hylobates albibarbis*) として扱うようになった。これまで、*albibarbis* はスマトラの *H. agilis* やボルネオの *H. muelleri* と遺伝学的に比較されたことはなかったため、本研究は、この種の系統的な位置づけや起源に関して有用な情報となる。TSPY 遺伝子とミトコンドリアを用いた系統分析において、*albibarbis* のクラスターは *H. agilis* のクラスターと姉妹群となった (図 1, 図 2)。一方、これら 2 種類の遺伝子に関する塩基多様度の比較から、*agilis-albibarbis* 間 (ミトコンドリアの場合は、*agilis* 1-*albibarbis* 間) の進化的距離は、種内の多様度よりも大きいことが分かった (図 2, 3 ; 表 3)。これらの事実により、*albibarbis* は、*H. agilis* と共通祖先を分かち合う姉妹群であり、スマトラとボルネオが地理的に隔離されたのち、つまり遺伝的な交流を行うことが不可能になったのち、徐々に分化が進んでいったと考えられる。さらに、そのような系統的な分岐は、今回比較に用いた *Hylobates* 亜属の他のテナガザルの種形成が行われたあとに起きたと推測される。

一方、*albibarbis* の起源に関する可能性のひとつに、スマトラからボルネオに渡った *H. agilis* とすでにボルネオに生息していた *H. muelleri* との雑種化を挙げ研究者もいる (Hirai et al., 2003)。今回用いた分子マーカーは、組み合わせて用いることにより個体の雑種判定に利用できるが、こうした問題にはあまり役に立たない。マイクロサテライトや AFLP 等、核遺伝子のマーカーを分析することにより、ゲノムの混ざり具合を 3 者で比較する必要があるだろう。しかしながら、*albibarbis* と同定された個体が、ミトコンドリアおよび TSPY 遺伝子において *albibarbis* を特徴づける遺伝子タイプを持っていたことから、*albibarbis* の雑種起源の可能性は低いと思われる。

本研究は、分子系統解析を用いて、アジルテナガザルの亜種分化のプロセスの解明につながる知見を引き出すことを目的にした。各分類群について多数の個体を分析したことにより、*albibarbis* と *H. agilis* の近縁性が明らかになった。そして、染色体相互転座変異がスマトラ産 *H. agilis* だけに見つかるという Hirai et al. (2003) および第 5 章の発見は、アジルテナガザルの亜種分化の過程、言い換えれば地理的隔離後の分化の過程で起きたイベントとして、分子系統分類によって支持されることが明らかになった。一方、今回用いた分子マーカーは、スマトラ島のアジルテナガザルの 2 亜種 (*H. a. agilis* と *H. a. unko*) を区別せず、

Groves (2001) の提唱する分類を支持する結果となった。また、スマトラの *H. agilis* で見いだされた大きく分岐したミトコンドリアの2系統については、今後解決されるべき課題となった。今回、分析したテナガザルはいずれも *Hylobates* 亜属に属し、扱った分類群数は4と少ない。アシルテナガザルの亜種分化のさらなる解明や近縁種との系統的な分化の過程の解明のためには、今後、マレー半島のアシルテナガザルというまでもなく、スンダ諸島に生息する全ての *Hylobates* 亜属のテナガザルと別亜属の種もふくめた分析が必要である。

引用文献

- Brockelman, W.Y. & Gittins, S.P. (1984) Natural hybridization in the *Hylobates lar* species group: Implications for speciation in gibbons. In: Preuschoft, H., Chivers, D.J., Brockelman, W.Y. & Creel, N., eds. *The Lesser Apes Evolutionary and Behavioral Biology*, Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 498-532.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**: 1657-1659.
- Eriksson, T. (1998) AutoDecay ver. 4.0 (program distributed by the author) Bergius Foundation, Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm.
- Groves, C. (2001) *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Hayashi, S., Hayasaka, K., Takenaka, O. & Horai, S. (1995) Molecular phylogeny of gibbons inferred from mitochondrial DNA sequences: Preliminary report. *Journal of Molecular Evolution*, **41**: 359-365.
- Hirai, H., Mootnick, A.R., Takenaka, O., Suryobroto, B., Mouri, T., Kamanaka, Y., Katoh, A., Kimura, N., Katoh, A., & Maeda, N. (2003) Genetic mechanism and property of a whole-arm translocation (WAT) between chromosomes 8 and 9 of agile gibbons (*Hylobates agilis*). *Chromosome Research*, **11**: 37-50.
- Kim, H.-S. & Takenaka, O. (1996) A comparison of TSPY genes from Y-chromosomal DNA of the great apes and human: Sequence, Evolution and phylogeny. *American Journal of Physical Anthropology*, **100**: 301-309.
- Marshall, J. and Sugardjito, J. (1986) Gibbon systematics. In: Swindler, D.R. & Erwin, J., eds. *Comparative Primate Biology, Vol. 1: Systematics, Evolution, and Anatomy*, Alan R. Liss, New York, pp. 137-185.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.
- Swofford, D.L. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 512-526.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**: 619-633.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876-4882.

van Tuinen, P., Mootnick, A.R., Kingswood, S.C., Hale, D.W. & Kumanoto, A.T. (1999)
Complex, compound inversion/translocation polymorphism in an ape:
presumptive intermediate stage in the karyotypic evolution of the agile gibbon
Hylobates agilis. *American Journal of Physical Anthropology*, **110**: 129-142

表 1. 本研究の分子系統分析に用いられた試料と形態分類ならびに染色体相互転座変異の分類

試料番号 ^{a)}	個体番号	性別	出自 ^{b)}	生息地	形態分類	WAT8/9 ^{c)}
1	Hy0208	M	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/+
2	Hy0209	M	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/T
3	Hy0211	M	Taman Bukittinnggi	Sumatra	<i>H. agilis unko or agilis</i>	T/T
4	Hy03S1	M	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/T
5	Hy0207	F	Pet in Jakarta	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/T
6	Hy0210	F	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/+
7	Hy0212	F	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko or agilis</i>	T/T
8	Hy0213	F	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko or agilis</i>	T/T
9	Hy03S3	F	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/T
10	Hy03S4	F	Pet in Sumatra	Sumatra	<i>H. agilis unko</i>	T/T
11	Hy0201	M	TSI	unknown	<i>H. agilis unko</i>	T/T
12	Hy0216	M	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. agilis unko</i>	T/T
13	Hy0218	M	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. agilis unko</i>	T/T
14	Hy0219	M	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. agilis unko or agilis</i>	T/+
15	Hy0220	M	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. agilis unko</i>	T/T
16	Hy0202	F	TSI	unknown	<i>H. agilis unko</i>	T/T
17	Hy0217	F	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. agilis agilis</i>	T/T
18	Hy0305	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
20	Hy03K1	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
21	Hy03K2	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
22	Hy03K3	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
23	Hy03K4	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
24	Hy0301	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	-
25	Hy0302	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
26	Hy0317	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
27	Hy03K5	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
28	Hy03K6	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
29	Hy0204	M	TSI	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
30	Hy0318	M	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. agilis albibarbis</i> ??	+/+
31	Hy03K9	M	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
32	Hy03K10	M	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
33	Hy0307	F	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
34	Hy0308	F	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
35	Hy03K7	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
36	Hy03K8	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
37	Hy0214	F	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. agilis albibarbis</i>	+/+
38	Hy0309	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
39	Hy0310	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
40	Hy0316	M	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
41	Hy0323	M	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. muelleri</i>	+/+
42	Hy0303	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
43	Hy0311	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
44	Hy0312	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
45	Hy0313	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
46	Hy0314	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
47	Hy0319	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i>	+/+
48	Hy0322	F	Pet in Kalimantan	Kalimantan	<i>H. muelleri</i> ??	-
49	Hy0215	M	Ragunan Zoo	unknown	<i>H. muelleri</i>	+/+
50	Hy0320	M	Pet in Kalimantan	unknown	<i>H. muelleri</i>	+/+
51	Hy0206	F	Pet in Jakarta	unknown	<i>H. muelleri</i>	+/+
-	HlarPRI	M	PRI	unknown	<i>H. lar</i>	+/+
-	Hlar9	F	PRI	unknown	<i>H. lar</i>	+/+

^{a)} #19, #52~#57 は雑種である可能性があったため分析から除外した。

^{b)} TSI: インドネシアサファリ公園, PRI: 京都大学霊長類研究所。

^{c)} 第 8・9 染色体間相互転座(WAT)の分類. T/T: WAT ホモ接合体, T/+ : WAT と正常のヘテロ接合体, +/+ : 正常ホモ接合体。

表 2. テナガザル分類群内および分類群間の TSPY 遺伝子の塩基多様度

分類群	群内	群間		
		2	3	4
1. <i>lar</i> (1) ^{a)}	-	0.0122	0.0131	0.0115
2. <i>agilis</i> (3)	0.0027	-	0.0045	0.0102
3. <i>albibarbis</i> (3)	0.0027		-	0.0111
4. <i>muelleri</i> (2)	0.0014			-

^{a)} カッコ内の数字は、本研究で見いだされた TSP のハプロタイプ数を示す.

表 3. テナガザル分類群内および分類群間のミトコンドリア ND4-ND5 領域の塩基多様度

分類群	群内	群間			
		2	3	4	5
1. <i>lar</i> (2) ^{a)}	0.0067	0.0592	0.0170	0.0672	0.0594
2. <i>agilis</i> 1 ^{b)} (10)	0.0142	-	0.0655	0.0301	0.0638
3. <i>agilis</i> 2 ^{b)} (5)	0.0131		-	0.0706	0.0626
4. <i>albibarbis</i> (16)	0.0091			-	0.0642
5. <i>muelleri</i> (9)	0.0052				-

^{a)} カッコ内の数字は本研究で見いだされたハプロタイプ数を示す.

^{b)} ミトコンドリア分子系統樹（図 2）で認められたアジルテナガザルの 2 つのクラスターは、異なる分類群として扱った.

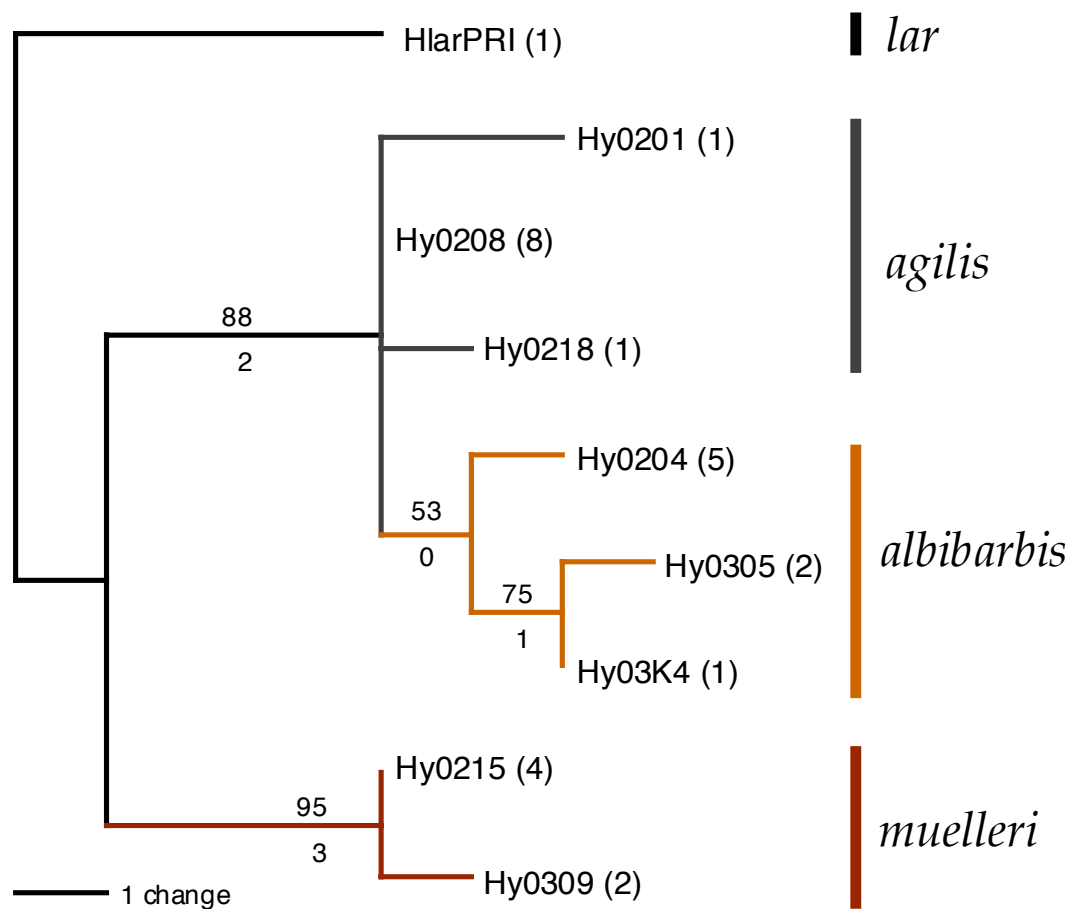


図 1 a. TSPY遺伝子（739塩基対）の系統分析に基づく *Hylobates* 亜属テナガザルの系統関係.

系統樹は、最節約法で得られた 4 個の最節約樹形のひとつ（樹長＝19）。各枝の上下の数字は、それぞれブートストラップ確率および崩壊計数を示す。個体番号の後ろのカッコ内の数字は、その個体と同じ遺伝子タイプを示した個体数をあらわす；Hy0208（＝Hy0209, 0211, 0216, 0219, 0220, 0318 および 03S1），Hy0204（＝Hy03K1, 03K2, 03K3 および 03K10），Hy0305（＝Hy03K9），Hy0215（＝Hy0310, 0320 および 0323），Hy0309（＝Hy0316）。

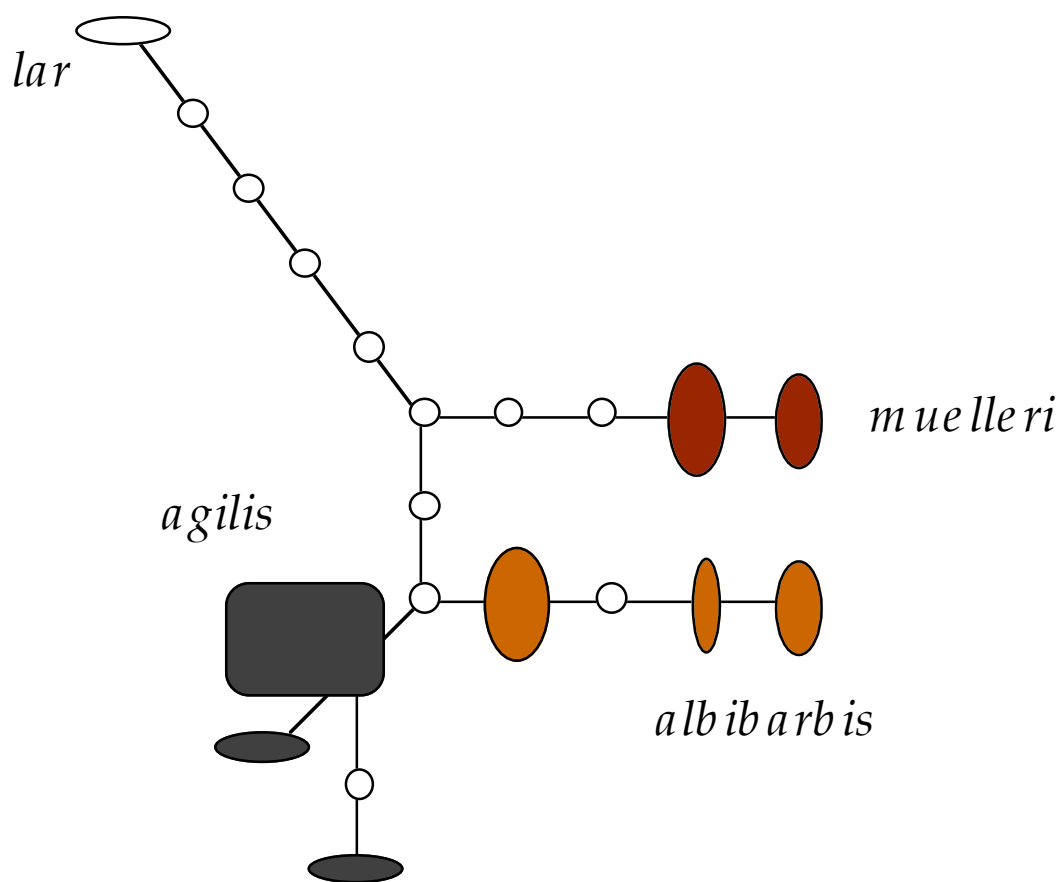


図 1 b. TSPYハプロタイプの遺伝子系譜ネットワーク

色のついた楕円は異なるTSPY遺伝子のハプロタイプをあらわし、楕円の大きさはそのハプロタイプを持つ試料数に相当する（図 1 aの説明を参照）。○は本研究では見いだされなかったハプロタイプをあらわし、○や楕円の間バーは1塩基置換に相当する。

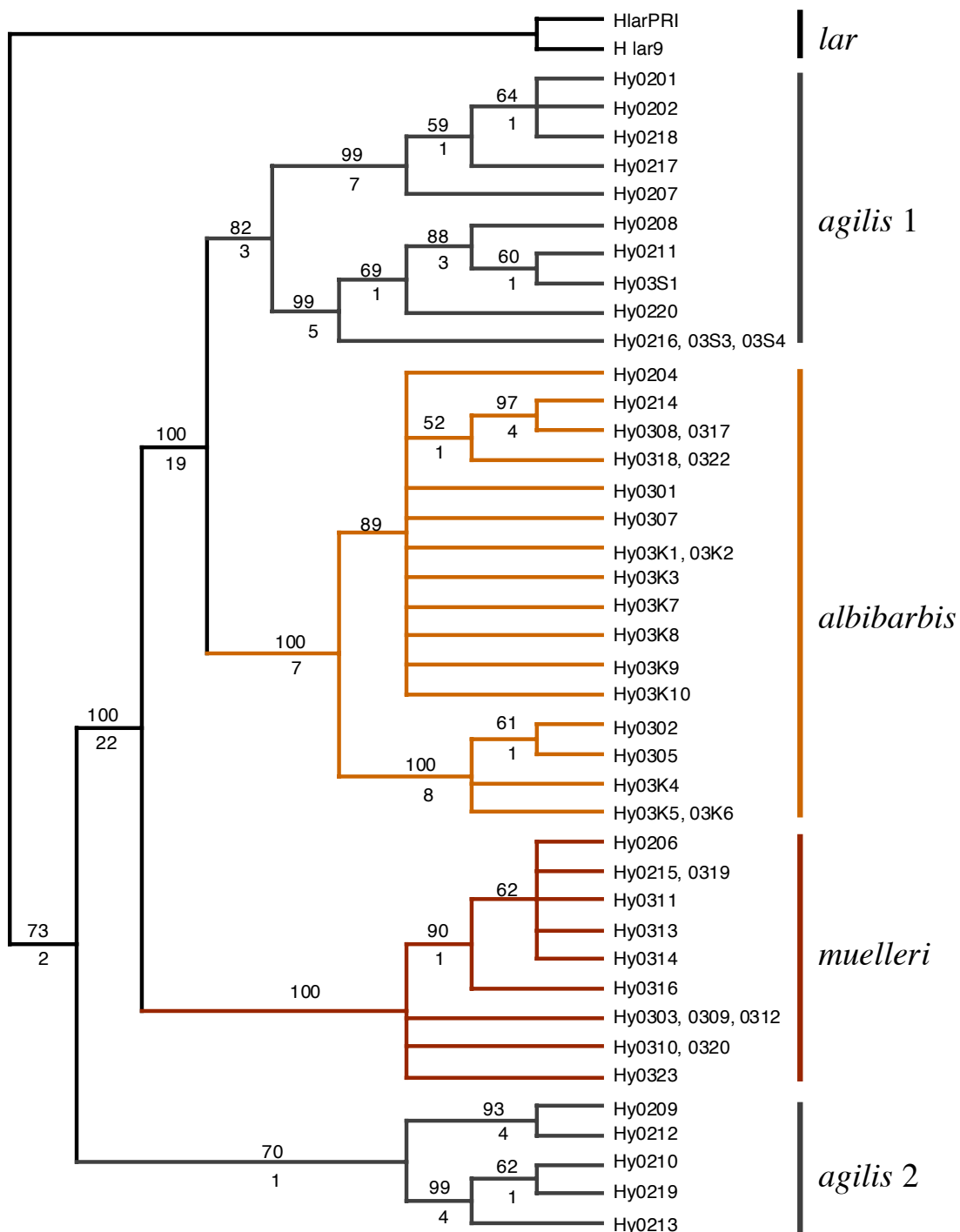


図 2 a. ミトコンドリアND4-ND5遺伝子領域（1039塩基対）の系統分析に基づく *Hylobates* 亜属テナガザルの系統関係。

系統樹は最節約法で得られた 8 個の樹形の厳密合意樹（樹長=232）。各枝の上下の数字は、それぞれブートストラップ確率および崩壊計数を示す。

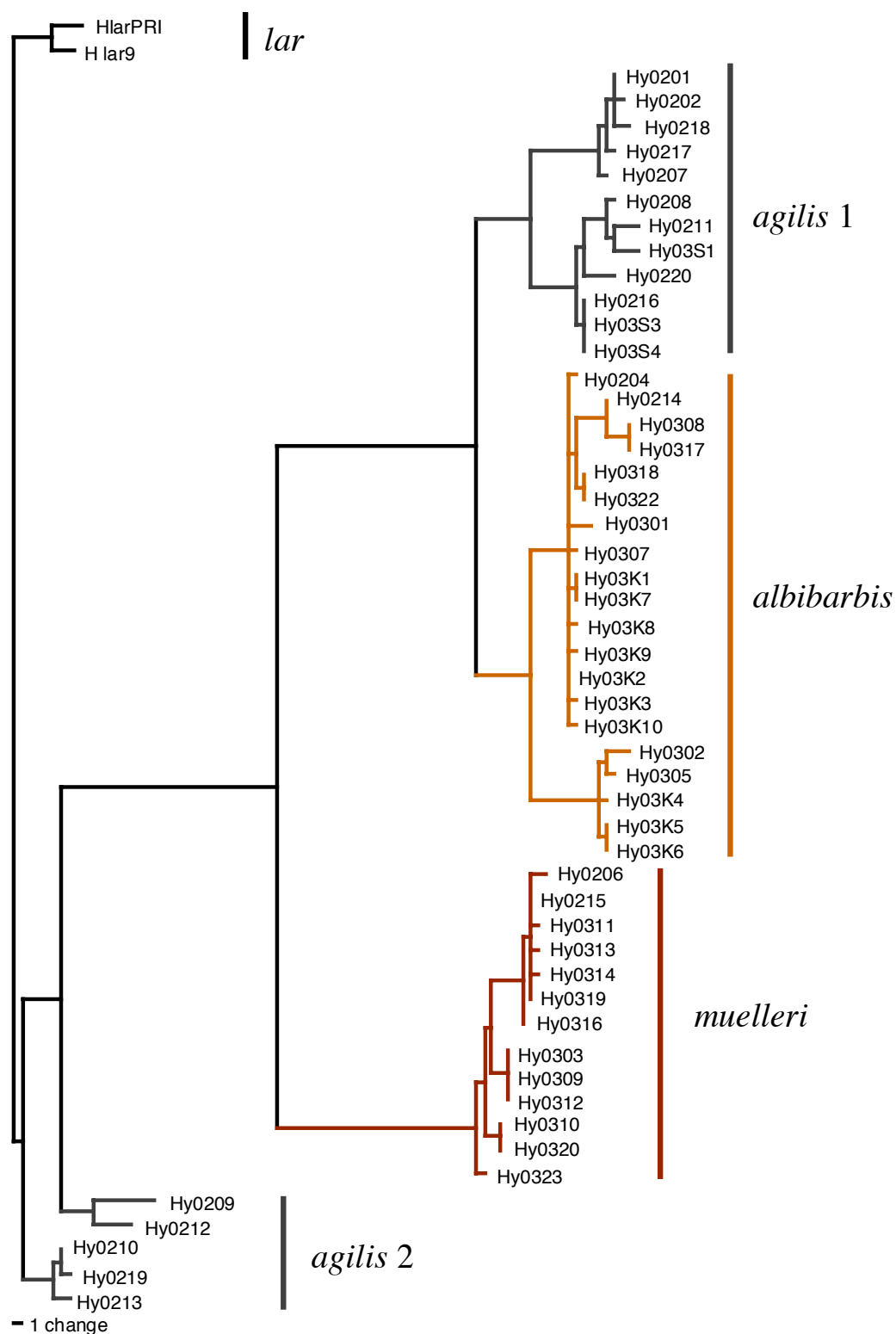


図 2 a. ミトコンドリアND4-ND5遺伝子領域（1039塩基対）の系統分析に基づく *Hylobates* 亜属テナガザルの系統関係.

図は、Tamura and Nei モデルを用いて最尤法により推定した系統樹.

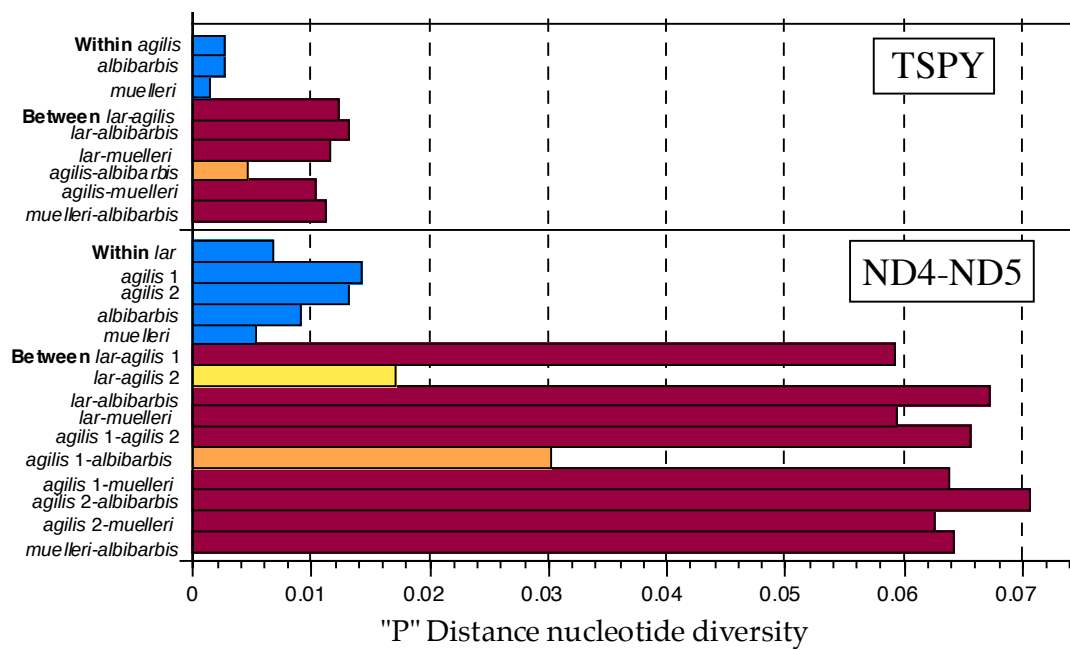


図3. TSPY遺伝子とミトコンドリアND4-ND5領域に関する
テナガザル分類群内および分類群間の塩基多様度

第 9 章

霊長類研究 情報・話題

タイトル：

インドネシアにおけるテナガザルの遺伝学的調査

著者：

平井啓久、田中洋之、早野あづさ

京都大学霊長類研究所

はじめに

テナガザル類は、絶滅危惧種として CITES（絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約：ワシントン条約）の附属書 I（絶滅のおそれのある種）に記載されている。高木原生林を本来の生息地とする彼らは、森林の伐採によってその生息環境を急激に失いつつある。そのため、テナガザル類を保全する試みが色々な地域で始まっている。我々が訪れたインドネシアの保護区でも、不法伐採で生息地が損なわれた例を目の当たりにした。不法伐採者は結構粗暴なため、森林警察官は拳銃を手放せないらしい。

生物の保全計画を有効なものにするためには、やみくもに実施するのではなく、最近保全生物学分野で提唱されている Evolutionarily Significant Unit (ESU)（例えば Crandall et al., 2000）（本稿では「進化的に生じた生物多様性の構成単位」と解釈し、通称「進化遺産のまとまり」とする）のよう具体的な指標に基づいて計画する必要がある。そのためには、生態学的な観察のみならず、集団

や個体の遺伝的な背景を正確に捉えることが求められる。すなわち、保全生物学には、形態的な種分類と生息地データに加えて、種の多様性や歴史展開を理解するうえで最も重要な情報となる遺伝学的データが欠かせない。

最近、我々はアジルテナガザル類に特異な染色体変異（第8・9染色体間全腕転座、WAT8/9）を発見した（van Tuinen et al., 1999; Hirai et al., 2003）。現在最も良く使われている分類体系では、アジルテナガザルは、スマトラのトバ湖以南とマレー半島の一部に生息する低地アジルテナガザル *Hylobates agilis unko* (UN)、高地アジルテナガザル *H. agilis agilis* (AG)、およびボルネオ（インドネシア領カリマンタン州）に生息する *H. agilis albibarbis* (AL) の3亜種が認められている（Marshall & Sugardjito, 1986; Geissmann 1995）。先行研究の累積データから、我々は、WAT8/9変異はスマトラの2亜種だけに存在するらしいという推測を立てた（Hirai et al., 2003）。もしそれが正しいければ、アジルテナガザルの亜種分化を評価する標識のひとつとして重要である。そこで、その推測を確認すべく「アジルテナガザルの亜種分化に関する総合調査」プロジェクトを組織し、2002年、2003年に調査をおこなった。共同研究機関はインドネシア・ボゴール農科大学霊長類研究センターと米国テナガザル保全センターである。研究内容は染色体、DNA、および形態分類の3視点から総合的にアジルテナガザルの亜種分化を解析するものである。従来、テナガザルにおいては、今回のような多角的視点、あるいはまとまった個体数を用いた集団遺伝学的解析はほとんど見られなかった。

テナガザル研究の問題点

従来、テナガザル類の分子系統進化研究は、動物園や研究施設等の飼育個体を使い、しかも1種数個体を対象とした解析が主であった。こういった解析では研究グループ間によって結果が食い違う場合も少なくなかった。その理由としていくつかあげられるが、第一の問題点は研究施設等で飼

育管理されいている個体の多くが、出生地が不明であることと、テナガザル類（特にテナガザル亜属）の形態分類が非常に難しいことがあいまって、施される種同定が不確かであるということがあげられる。さらに、その同定の不明瞭さが原因となっていて、飼育個体間の種間（亜種間）雑種が誕生しているケースも少なくない（van Tuinen et al. 1999）ことも問題をおおきくしている。

我々自身の先行研究でも、出自の不明な飼育個体を用いたデータは亜種間あるいは種間で遺伝的変異が混合している状況が認められ、考察に苦慮するケースもあった（未発表データ）。こういったディレンマを打開し自然界に息づいている「進化的遺産のまもり」を明らかにするためには、出自の明確な個体から試料を収集し、詳細な形態学的同定ととも各種の遺伝的標識を用いて総合的に解析するところが第一の道である。

試料収集

出自が明確な個体を材料とするといっても、テナガザルの場合、野外に生息する個体を直接捕獲することは不可能に近いし、保全の意味からも可能な限り野生群に人為的な負荷をかけるのは避けたい。もちろん、野生群の糞や毛を採取し DNA を解析することはできるが、それでは限られた DNA しか解析できず、大きいサイズの DNA や染色体、ならびに形態を指標とした多角的な解析はできない。だから、本来の生息地の近くでペットとして飼育されている個体を尋ね歩き、出自の明らかない個体を探ることが、現在のところ最も有効な方法である。

ペットの探索はスマトラではパダン市周辺の町や村を車で走り回り、事前情報を基に所有者を尋ね歩いた。カリマンタンではパンカランブーン、パランカラヤ、バンジャルマシンの各都市内の所有者を訪問した。所有者はペットの採血とインタビューを快く受け入れてくれた。試料収集した個体（57 個体）の半数以上（31 個体）は出自の明確な個体であった（図 1 参照）。

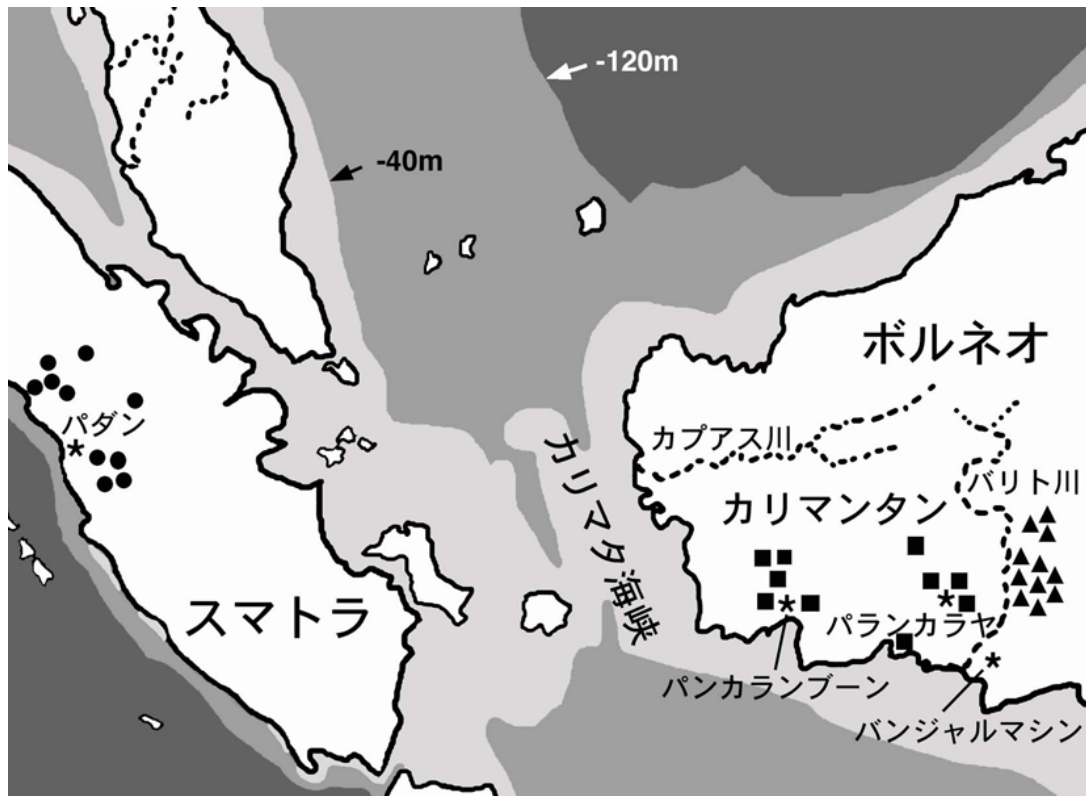


図 1. 調査地とペットの出生地を示すインドネシアの部分的な地図。*調査地の拠点とした主要都市。●スマトラアジルテナガザルの出生地。■ボルネオアジルテナガザルの出生地。▲ミューラーテナガザルの出生地。色の濃淡は最終氷期に変化した海岸線の位置を示す。白色、現在の陸地。薄灰色、40メートル下降期。灰色、120メートル下降期。濃灰色、最終氷期の海。

採血後直ちに、形態分類用の各種部位（正面顔、横顔、頭頂部、手、腕、足、脚、胸部、背中）をデジタルカメラで撮影した。形態による同定は、出自の明確な個体は出生地と写真データ、出自の不明な個体は写真データだけを用いて行った。ペット探索中に、テナガザル保護グループの行が耳に入った。彼らのプロジェクトはペットを全てリハビリテーションセンターに保護し、その後森林に解放するといふものらしいが、遺伝的背景を調査するといふ無秩序に解放することは、正しい行為だといえない。なんとなれば、ペットの中には周囲の森林から捕獲されたものだけで

はななく、遠くの地域の、かし、持ち込まなれた個体も含まま
れを実可の基の、るす性も、べな「の。本。の進化で、の、野的産の、の集な景とを題調まり、無為未し、を明確に
るのが我々の課題である。

試料の入手

昨今、生物資源を豊富に所有する諸国は、遺伝的
資源の流出を制限し、各種試料の国解し、外持ち出
は汎用性が高いために、取り扱いはない。調査も好ま
ドネシアも例外で、問題は、日本国は、機材不足で不
まに実験を調査国で行うことは、可能に近い。
可能な。

そこで、我々はまず CITES の輸出・輸入許可
書を取得する手続をとった。インドネシアからは、
書由来の試料を輸出する許可証を得るため、ワシントン
条約の附属書 I（学術研究目的）の輸入手続を行
わなければならない。

取得した輸入許可書を基に相手国に輸出許可証
を申請する。これが大変である。大変といっても、
申請書はインドネシアの対応研究者が作成してく
れ、申請の、申請そのものは問題ないのだけれど、
申請から輸出許可書を取得するまで、忍耐力を
ためられる。再三再四対応研究者が催促して、や
ったと1年で輸出許可書を取得するこができた。
対応者いわく、それでも早い方らしい。申請中に
収集した試料は許可がでるまで、対応者の研究機
関に留め置かれた。インドネシアで、染色体の細
胞培養と、DNA 抽出を行い保存した。最近、血
液の国外持ち出しは禁止されている。CITES を取
得することで、実験が心置きなく日本国内ででき、
論文投稿時に CITES 番号を記入することで試料
入手に、関する問題が起らないのであれば、今後
も研究試料の輸出入許可書を取得することが、研

究を円滑に行うためには最善の道である。インドネシア科学協会(LIPI)は、今後海外との資・試料交換の取り決めをより明確(契約制度)にしてい くことを考案中らしい。

染色体解析

新たに発見された染色体変異 WAT8/9 の検出には、ヒトの染色体彩色プローブを用いた蛍光インシツ－ハイブリダイゼーション法で行った。テナガザル亜属の染色体はヒトの染色体を通してみると、51回の相互転座が過去生じている(Juach et al. 1992)。WAT8/9 転座の祖先染色体である第8染色体は、ヒト染色体 16、5、22、17、および9からなり、第9染色体は17と9からなっている。起こり方から推測して、WAT8/9 の発生を確認する最適なプローブは、ヒト9、17、22の3種類である。

異なる蛍光色素で標識したこれら3種のプローブを同時に染色体標本にのせ、染色体とのハイブリダイゼーションを行うと、蛍光顕微鏡のもとでそれぞれのプローブと反応した領域が3色の異なる色(例えば、9は赤系、17は緑系、22は黄系)で検出できる。

テナガザル亜属には、第8染色体に3タイプの逆位(8a, 8b, 8c)が、種を超えて存在することが古くから知られている。新たに見つかった転座変異 WAT8/9 は、8cと9の長腕全体が交換しているものだった。その変異体をそれぞれ8c'と9'とした。今回収集した49個体を調査してみると、スマトラアジルテナガザル(UN/AG)群だけに8c'が存在し(17個体の内13個体が8c'/8c':9'/9'ホモ接合体、4個体が8a/8c':9/9'あるいは8b/8c':9/9'のヘテロ接合体)、他のボルネオアジルテナガザル(AL)群とミューラーテナガザル(MU)群は逆位変異8a, 8b, 8cだけが多型的に混在していた。

今回のデータと今まで行われた疫学的調査データを統合してみると、おもしろい事実が浮かび上がった。予測できる8c'との第8染色体のヘテロ接合体は、8a/8c'、8b/8c'、および8c/8c'である。ところが、実際に観察されたヘテロ接合体の13

個体は、前 2 者の組み合わせだけで、8c/8c'の組み合わせは全く観察されていない。観察データは 13 個体と乏しいが、8c タイプがスマトラ集団にかつて存在したと仮定しなければ 8c'は発生し得ないので、8c/8c'のヘテロ個体が存在しない理由として、今のところ機序は不明ではあるが、8c と 8c'の間になんらかの染色体不適合が働いている可能性がある。すなわち、交配後生殖隔離が起こっている可能性がある。

DNA 解析

TSPY のハプロタイプ（単相型）の塩基配列差から作成したネットワークに、マイクロサテライト DNA の遺伝的分化（ F_{ST} : 集団間の遺伝的分化程度の指数）と染色体変異（WAT8/9）のデータを統合したところ、以下のことが明らかになった。

TSPY の配列は UN/AG 群と AL 群の間では、最も近いところで 2 塩基、最も遠いところで 7 塩基の差がある。UN/AG 群と MU 群の間は、近いところで 6 塩基、遠いところで 9 塩基、AL 群と MU 群の間では、近いところで 6 塩基、遠いところで 10 塩基の差がそれぞれ認められた。さらに、マイクロサテライト DNA の遺伝的距離は、UN/AG 群と AL 群の間は $F_{ST} = 0.0314$ 、UN/AG 群と MU 群の間は $F_{ST} = 0.0849$ 、そして AL 群と MU 群の間は $F_{ST} = 0.0558$ だった。すなわち、DNA データは両方とも UN/AG 群と AL 群の間が遺伝的に最も近いことを示した。しかし、染色体は AL 群と MU 群が同じ逆位変異を共有しているのに対して、UN/AG 群だけが特異的に WAT8/9 を獲得したことを示している（未発表データ）。

これらのデータから推測できることは、最終氷期に海岸線が低下し（40～120 メートル）スンダ列島が陸続きになった時期に、最も長くカリマタ海峡に残っていた草木回廊を通して、MU が最初にスマトラからボルネオに移住し、続いて AL が移住した構図が推測できる。そして、海岸線の上昇によってカリマタ海峡ができたことで、スマトラとボルネオが隔離された後、UM/AG 集団に WAT8/9 が発生し、瓶首効果による遺伝的浮動で

スマトラ島内に固定されつつあるのが現在の状況ではないだろうか（図 1 参照）。先にふれた 8c と 8c' の間の染色体不適合性は、その固定を早める機構として働いたものと思われる。

おわりに

今回の調査は出自の明確なテナガザル標本群を形態、染色体、DNA の 3 視点から同時に解析したことに大きな意義がある。なぜならば、従来は出自が不明なために分類同定が不明確な個体を含む試料を、DNA あるいは染色体の単独で解析した例がほとんどであるが、今回は出自の明確な個体を含む集団を、上記 3 視点から同時に解析し、その成果を突き合わせた結果、3 項目のデータの信憑性が、それぞれの立場から確認されたからである。だから今回の成果は精度の高い遺伝的評価データであるとして位置付けられる。

従来は経験的に保全単位として認識されていたスマトラのアジルテナガザル、ボルネオのアジルテナガザル、およびミューラーテナガザルが、今回の遺伝的評価によって、それぞれ特異な遺伝的単位（「進化遺産のまとまり」）を有することが明らかになった。これは保全計画にとって非常に有用なデータと思われる。

今後も海外調査研究を展開し、出自の明確な個体の遺伝試料を集め、将来の保全計画に資するデータとして、テナガザル科の各種群の「進化遺産のまとまり」を明確にしおきたい。そういったデータの蓄積は、現在論争になりつつある分類学的再考に対しても、何らかの示唆を与えられることができると思う。

謝辞

この研究に関わる現地調査はインドネシア共和国ボゴール農科大学霊長類研究センターならびに野生生物森林保護局の職員の方々に多大な支援を頂いた。ここに記して感謝の意を表したい。本研究は日本学術振興財団の科学研究費（基盤研究 B：海外調査（代表：平井啓久））ならびに 21 世紀 COE 生物多様性研究プロジェクト（A14、京都

大学) から援助を受けました。

引用文献

- Crandall KA, Binida-Emonda ORP, Mace GM, Wayne RK 2000: Consedering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol Evol 15: 290-295.
- Geissmann T 1995: Gibbon systematics and species identification. Int Zoo News 42: 467-501.
- Hirai H, Mootonick AR, Takenaka O, Suryobroto B, Mouri T, Yosirou K, Katoh A, Kimura N, Katoh A, 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.
- Jauch A, Weinberg J, Stayon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T 1992: Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8611-8615.
- Marshall J, Sugardjito 1986: Gibbon systematics. In Swindler DR, Erwin J (eds): Comparative Primate Biology, Vol. 1: Systematics, Evolution, and Anatomy, Alan R. Liss, New York, pp. 137-185.
- Van Tuinen P, Mootnick AR, Kingswood SC, Hale DW, Kumamoto AT 1999: Complex, compound inversion/translocation polymorphism in an ape: presumptive intermediate stage in the karyotypic evolution of the agile gibbon *Hylobates agilis*. Am J Phys Anthropol 110: 129-142.

あとがき

ここに報告したように、今回の調査は出自の明確なテナガザル標本群を形態、染色体、DNA の 3 視点から同時に解析したことに大きな意義がある。なぜならば、従来は出自が不明なために分類同定が不明確な個体を含む試料を、DNA あるいは染色体の単独で解析した例がほとんどであるが、今回は出自の明確な個体を含む集団を、上記 3 視点から同時に解析し、その成果を突き合わせた結果、3 項目のデータの信憑性が、それぞれの立場から確認されたからである。だから今回の成果は精度の高い遺伝的評価データであると位置付けられる。

従来は経験的に保全単位として認識されていたスマトラのアジルテナガザル、ボルネオのアジルテナガザル、およびミューラーテナガザルが、今回の遺伝的評価によって、それぞれ特異な遺伝的単位（「進化遺産のまとまり」）を有することが明らかになった。これは保全計画にとって非常に有用なデータと思われる。

今後も海外調査研究を展開し、出自の明確な個体の遺伝試料を集め、テナガザル類の進化をひもとくとともに将来の保全計画に資するデータとして、テナガザル科の各種群の「進化遺産のまとまり」を明確にしておきたい。今それをやっておかなければ、早晚絶滅に瀕するテナガザル類の保全を計画する遺伝学的データが得られなくなる可能性がある。そういったデータの蓄積は、現在論争になりつつある分類学的再考に対しても、何らかの示唆を与えることができるものと思われる。