

古代ニホンザルの DNA 分析

吾妻健・石上盛敏
高知医科大学

導入

本研究では、列島内でのニホンザルの成立と分布域消長の歴史を探るため、遺跡から発掘される骨片ならびに狩猟で採取された毛皮などに残るミトコンドリアDNAのD-ループ可変領域の塩基配列を標識として、現生のサルと過去のサルの比較を行う。特に東北地方のニホンザルの過去分布に関する調査を目標とする。現生のニホンザルの調査結果によれば、東北地方のニホンザルではミトコンドリアDNAの均一性が著しく高く、この原因は最終氷河期以後の分布地域の拡大にあると想像されている。しかし、現在東北地方ではニホンザル生息域が寸断され、絶滅が危惧される状態にある。そこで本研究では、なるべく広い地域と異なった時代についてmtDNAのD-ループ可変領域の分析を行うため、遺跡骨片、厩猿などの遺骨や古骨の組織標本を収集し、母性遺伝をする、この遺伝標識を用いて東北地方を中心としたニホンザル成立過程と分布域の変遷について検討を加える。

材料と方法

古代骨からのDNAの回収並びにPCRの方法については、ヒトやオオカミなどの哺乳類からの報告があるので、それらを参考にした(Pääbo, 1989; Thomas *et al.*, 1989; Kolman & Tuross, 2000; Scholz *et al.*, 2000; Marota & Rollo, 2002)。以下に骨試料からのDNA抽出法を列記する。

1) 骨の粉末化

- (1) 骨表面をアルコールでふき、さらにドリルで削って上層部を取り除く。
- (2) 削られた表面から骨の内部までドリルで削り、骨粉を集める。この時、骨髓部まで達しないようにする。
- (3) 新しい15mlファルコンチューブに骨粉を移す。

2) 脱灰

- (1) 骨粉の入った15mlファルコンチューブに0.5 M EDTA (pH 8.0) 8 mlを加え、暗所37℃で2～3日間震盪する。その間、遠心(3000rpm, 10min, 20℃)後、上清を捨て2～3回EDTAを交換する。
- (2) EDTAによる白濁が消えたらさらに遠心(3000rpm, 10min, 20℃)して上清を捨てる。
- (3) 次に0.5 M EDTA (pH 8.0) 5 ml, 10 % ラウリルサルコシル 300 μ l, 50 mg/ml プロテイナーゼ K 100 μ lを加え、暗所37℃で1～2日間インキュベートする。

表1. PCR の条件

	1st PCR	2nd PCR
Initial denaturation	94°C 60 sec	94°C 60 sec
Denaturation	94°C 30 sec	94°C 30 sec
Annealing	50°C 30 sec	50°C 30 sec
Extension	72°C 60 sec	72°C 60 sec
Additional Extension	72°C 60 sec	72°C 60 sec
PCRの回数	40回	30回

表2. PCR 反応液

Template	1.00 μ l
3.5U/ μ l Taq DNA Polymerase	0.25 μ l
Expand HF buffer, 10 x conc. with 15 mM MgCl ₂	5.00 μ l
2.5 mM dNTP	4.00 μ l
10 mM forward primer	3.00 μ l
10 mM reverse primer	3.00 μ l
dH ₂ O	33.75 μ l
Total	50.00 μ l

表3. プライマーの塩基配列

Forward	塩基配列
mdl-L	5'-ATCAC GGGTCTATCACCTA-3'
mdl-79	5'-GCACGCAACCCCATTCAGT-3'
mdl-99	5'-TAGCGACTCCCACCAT-3'
mdl-121	5'-CGTCCTGAATGCGCCTG-3'
mdl-130	5'-ATGCGCCTGTCTTTGATT-3'
mdl-161	5'-TCGCACCTACGTTCAATATT-3'
mdl-168	5'-TACGTTCAATATTCTAGC-3'
mdl-237	5'-CATGCTTG TAGGACATA-3'
mdl-243	5'-TTGTAGGACATA(C/T)TAATA-3'
mdl-248	5'-GGACATA(C/T)TAATAACCAT-3'
Reverse	
mdl-239	5'-GAATTAAATAACACCTT-3'
mdl-244	5'-AGCATGAATTAAATAACAC-3'
mdl-263	5'-GTTATTAGTATGTCCTAC-3'
mdl-308	5'-GTTTGATAAGATACGGTT-3'
mdl-341	5'-GTTTGGATGAAGTCGGAGA-3'
mdl-350	5'-CAAGAGTGGGTTTGGATGAA-3'
mdl-393	5'-GGCTCCGACTGGATATGTTA-3'
mdl-420	5'-TGTG(C/T)ACACCCAAAAGAT-3'

2) DNA 抽出

- (1) 骨粉が溶解した後、遠心 (3000rpm, 10min, 20°C) して上清を新しい 15ml ファルコンチューブに移す。
- (2) 上清に等量の中性フェノール (pH7.8) を加え、フェノール抽出を 1～2 回行う。この時

古代ニホンザルのDNA分析

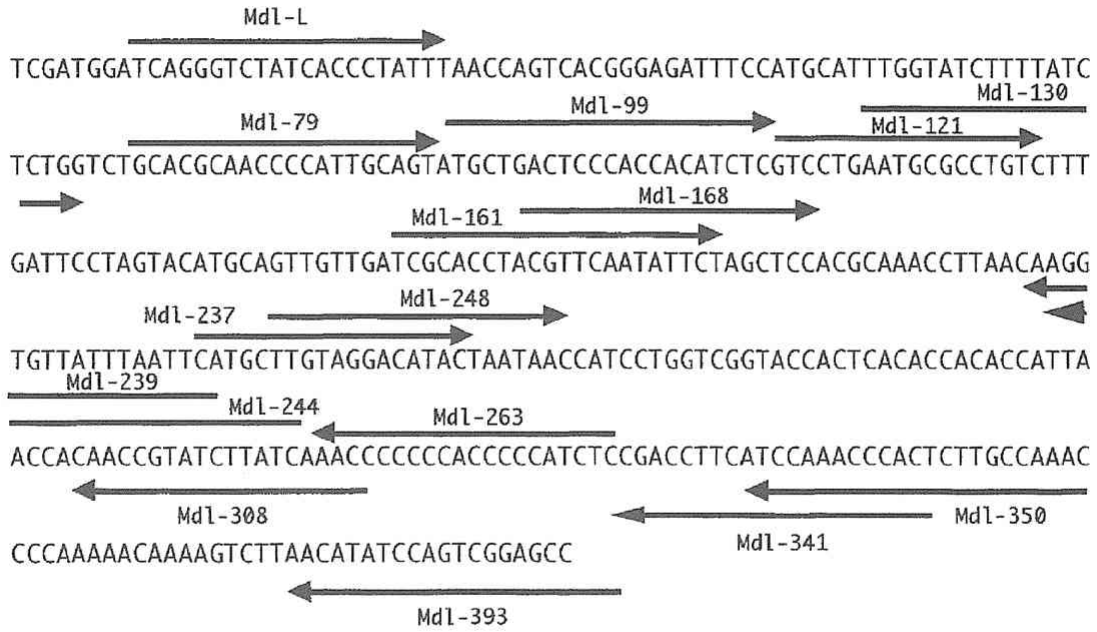


図1. *Macaca* 属古骨ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の PCR 増幅のために設計されたプライマーの位置。

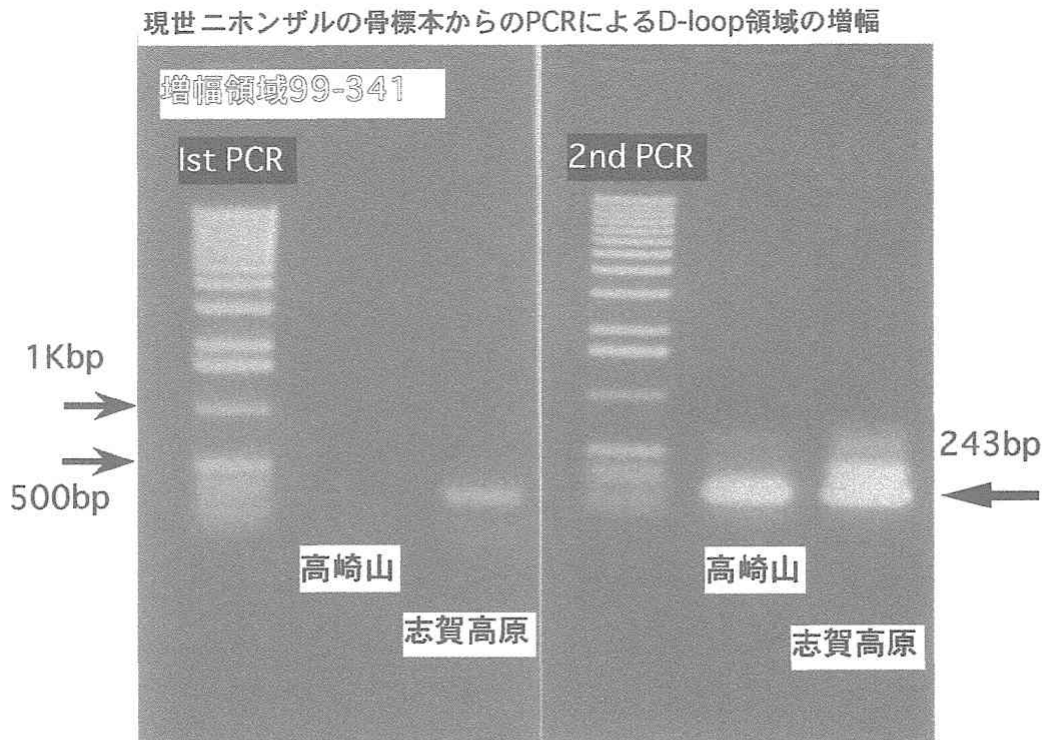


図2. 高崎山と志賀高原由来の骨標本のPCR増幅の試み。

1. Shiragami	1:GACTCCCACCACATCCCGTCCTGAATGCGCCTGTCTTTGATTCCCTAGTACATGCAGTTAT
2. Kinkazan	1:.....
3. Shigakogen	1:.....T.....
4. Obama	1:.....T.....G.
5. Yakushima	1:.....G.
1. Shiragami	61:TGATCGCACCTACGTTCAATATTCTAGCTCCACGCAAGCTTTAGCAAGGTGTTATTTAAT
2. Kinkazan	61:.....
3. Shigakogen	61:.....A...A.C.....
4. Obama	61:.....A.C.....
5. Yakushima	61:.....A...C.....
1. Shiragami	121:TCATGCTTGTAGGACATACTAATAACCATCCTAGTCGGTACCACTCACACCACACCATTA
2. Kinkazan	121:.....
3. Shigakogen	121:.....A.....T...T...C..
4. Obama	121:.....G.....
5. Yakushima	121:.....T.....AA..T.G.....T...T.G.C.
1. Shiragami	181:ACCGC-AACCGTATCTTATCAAACCCCCCACCCCATCTCCGACCTTCATCCA
2. Kinkazan	181:.....-
3. Shigakogen	181:...A.-.....
4. Obama	181:...A.-.....
5. Yakushima	181:...A.T.....

図3. 現世ニホンザル由来骨試料からの塩基配列アライメント。

Ajigasawa-G-type1	1:ATGCTGACTCCCACCACATCCCGTCCTGAATGCGCCTGTCTTTGATTCCCTAGTACATGCA
Ohfunato-G-type2	1:.....T.....
Sumida-G-type15	1:.....T.....
Ajigasawa-G-type1	61:GTTATTGATCGCACCTACGTTCAATATTCTAGCTCCACGCAAGCTTTAGCAAGGTGTTAT
Ohfunato-G-type2	61:...G.....A...C.....
Sumida-G-type15	61:...G.....A...A.C.....
Ajigasawa-G-type1	121:TTAATTCATGCTTGTAGGACATACTAATAACCATCCTAGTCGGTACCACTCACACCACAC
Ohfunato-G-type2	121:.....C.....
Sumida-G-type15	121:.....T...T..
Ajigasawa-G-type1	181:CATTAACCGCAACCGTATCTTATCAAACCCCCCACCCCATCTCCGACCTTCATCCA
Ohfunato-G-type2	181:.....A.....
Sumida-G-type15	181:...C....A.....

図4. 制限酵素切断パターン (RFLP) のタイピングとミトコンドリアDNA D-loop (mdl-99 ~ mdl-341) の塩基配列。

表 4 . 秋田県由来の厩猿の試料

試料	地域	内容	提供者
秋田A	川辺町	左手	佐藤善一郎
秋田B	川辺町	とりあげ婆	佐藤純一郎
秋田C	秋田市	厩ザル	三浦茂彦
秋田D	鳥海町	厩ザル	村上尚三
秋田F	南外村	厩ザル	今野隆栄

EDTA 溶液は塩濃度が高いので、フェノール層より下層にくることに注意。

- (3) 等量のクロロホルムを加え、クロロホルム抽出を 1 回行う。
- (4) 得られた上清を Vivaspin カラム (Vivaspin 2 ml, VivaScience 社) で遠心 (5000g, 5 min, 20 ℃), さらに 2 ml milli-Q 水で 3 ～ 5 回水洗いを行い EDTA を除去する。
- (5) 最終的にカラムに残った DNA 溶液(150 ～ 200 μ l)をピペットで回収する。

3) PCR 増幅

回収された DNA 溶液を用いて PCR 増幅を行なう。PCR 条件, 反応液, 使用したプライマーの塩基配列は表 1, 表 2, 表 3 にそれぞれ示している。またプライマーの位置は図 1 に示した。

結果

1) 現世の骨標本

骨標本から実際 PCR 増幅が可能であるか検討を行った。まず現世のニホンザルの骨標本から DNA を回収し, PCR 増幅の条件を検討した。白神, 金華山, 高崎山, 志賀高原, 小浜, 屋久島由来の骨標本から, 骨粉を削り取り DNA を回収して PCR 増幅を試みた。その結果少なくとも 2ndPCR で増幅することが分かった。図 2 にはその例として高崎山と志賀高原由来のサル骨標本からの PCR 増幅の電気泳動パターンが示されている。図 3 は, ABI370 (DNA シーケンサー) にて決定された塩基配列のアライメントである。ここではプライマーは mdl-99-mdl-341 を使用し

Ajigasawa-I	1:ATGCTGACTCCCACCACATCCCGTCCTGAATGCGCCTGTCTTTGATTCCCTAGTACATGCA
Ohfunato-II	1:.....T.....
Akita-D	1:.....
Ajigasawa-I	61:GTTATTGATCGCACCTACGTTCAATATTCTAGCTCCACGCAAGCTTTAGCAAGGTGTTAT
Ohfunato-II	61:...G.....A...C.....
Akita-D	61:.....
Ajigasawa-I	121:TTAATTCATGCTTGTTAGGACATACTAATAACCATCCTAGTCGGTACCACTCACACCACAC
Ohfunato-II	121:.....C.....
Akita-D	121:.....
Ajigasawa-I	181:CATTAAACGCAACCGTATCTTATCAAACCCCCCACCCTCTCCGACCTTCATCCAAA
Ohfunato-II	181:.....A.....
Akita-D	181:.....

図 5 . 川本による I 型及び II 型と鳥海町厩猿 (Akita-D) の D-loop 領域 (99-341)。

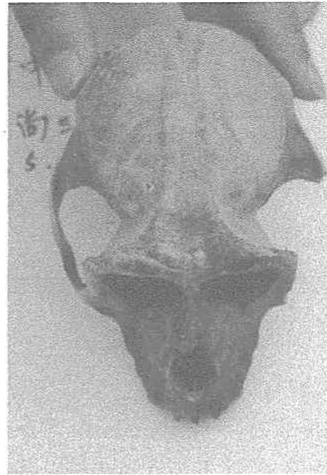


写真1. 鳥海町の厩猿（秋田D）、村上尚三氏提供。

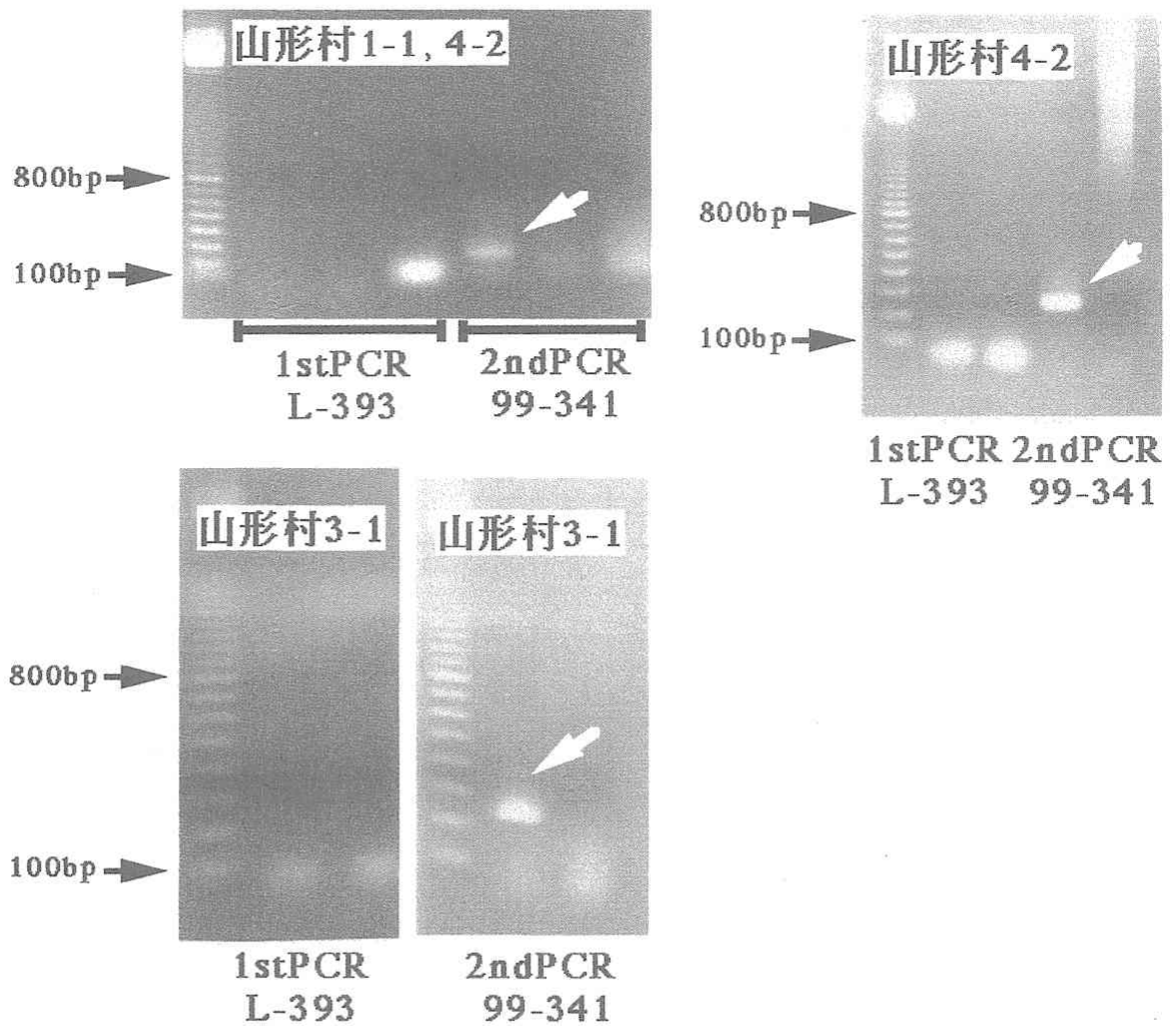


図6. 岩手県山形村から得られた厩猿サンプルの D-loop 領域 (L-393 ; 99-341) の PCR 増幅。いずれも nested 2ndPCR (99-341) で増幅することができる。



写真2. 奈良時代の多賀城址から発掘された、ニホンザルの脛骨と大腿骨。

た。この実験から実際にサル骨標本からDNAがPCR増幅されることが証明された。川本ら（未発表）は、現世のニホンザルのmtDNAを単離し、制限酵素による切断パターンを調べ、そのタイピングを行ったが、今回そのタイピングと塩基配列によるタイピングが一致するかどうかについて調べてみた。その結果、例として図4に示すように両者のタイピングに重なりがなく、1対1に対応することが分かった。現世のニホンザルに関して得られた結果を以下に示す。1）長い間研究室に保存されていたニホンザルの遺骨標本からPCRの方法によりミトコンドリアDNAのD-loop領域の約240ベースを増幅することができた。2）各遺骨標本から得られた塩基配列は、それらの遺骨標本の地域と同一あるいはそれに近い地域から採集された、現存するニホンザルの塩基配列と同一であった。3）今回の塩基配列の決定による分析結果は制限酵素による分析結果と良く対応した。

2) 秋田県由来の厩猿

秋田県から表4に示すサンプルが得られたので、これらのサンプルについて分析を行なった。これらの五つのサンプルについてDNA回収並びにPCR増幅を行ったところ、鳥海町の厩猿（秋田D：村上尚三氏提供、写真1参照）のD-loop領域240bp（mdl-99～mdl-341）を増幅することができた。その塩基配列をダイレクトシーケンシングにより調べたところ、図5のアライメントから明らかなように、I型（川本、未発表）に属することが分かった。他の4つのサンプルに関しては現在検討中である。

3) 岩手県山形村由来の厩猿

岩手県山形村から比較的新しい（50年～100年前）時代のもと思われる厩猿試料を得て、DNA回収並びにPCR増幅を行った（図6）。山形村の厩猿の今回の試料は表5に示したように1998年12月21日～12月22日に入手したサンプル！～\$（計4検体）である。今回入手した山形村の厩猿サンプル4個体は、塩基配列を明らかにした結果、すべてII型（大船渡）と一致した。ニホンザルが絶滅している岩手県北部でこのタイプが発見されたことから、この地域にはか

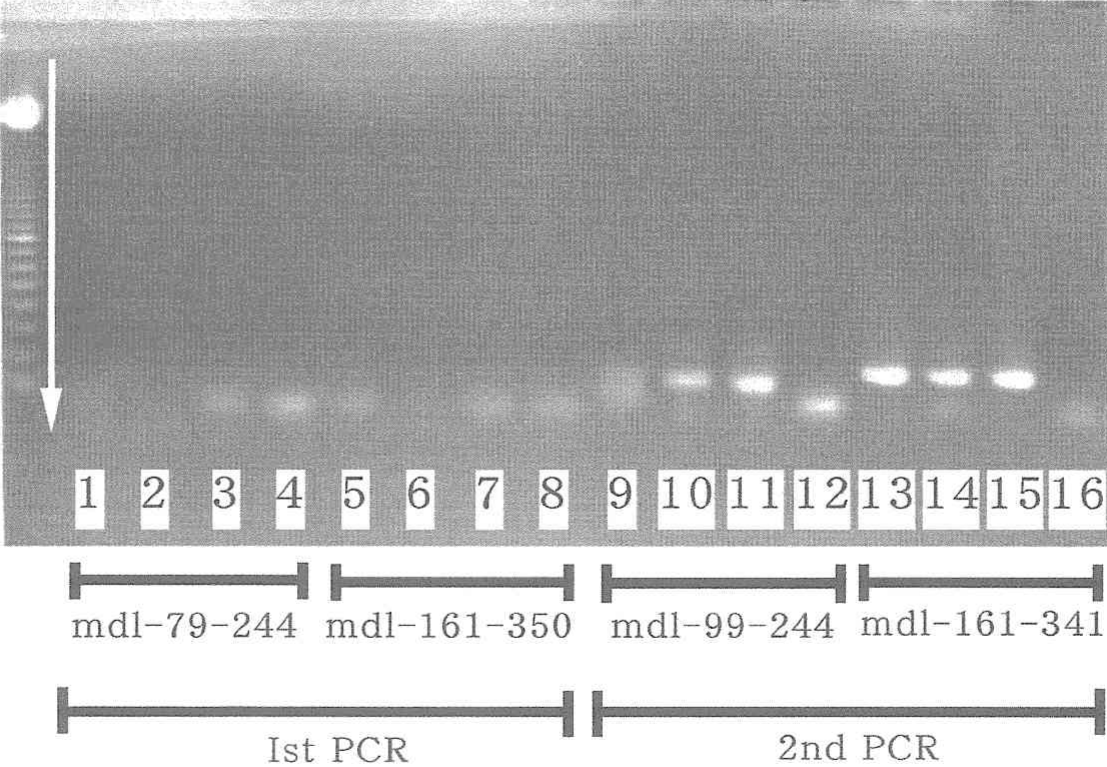


図 7. 4 組みのプライマーセットを用いて増幅された、多賀城遺骨の PCR 産物。

Ajigasawa-I	1:ATGCTGACTCCCACCACATCCCGTCCTGAATGCGCCTGTCTTTGATTCCCTAGTACATGCA
Tagajo tibia	1:.....
Ohfunato-II	1:.....T.....
Ajigasawa-I	61:GTTATTGATCGCACCTACGTTCAATATTCTAGCTCCACGCAAGCTTTAGCAAGGTGTTAT
Tagajo tibia	61:.....
Ohfunato-II	61:...G.....A...C.....
Ajigasawa-I	121:TTAATTCATGCTTGTTAGGACATACTAATAACCATCCTAGTCGGTACCACTCACACCACAC
Tagajo tibia	121:.....
Ohfunato-II	121:.....C.....
Ajigasawa-I	181:CATTAACCGCAACCGTATCTTATCAAACCCCCCACCCTCTCCGACCTTCATCCAAA
Tagajo tibia	181:.....
Ohfunato-II	181:.....A.....

図 8. 多賀城から発掘された、ニホンザル脛骨の mtDNA の D-loop 領域の PCR 増幅により得られた塩基配列アライメント(240bp)。

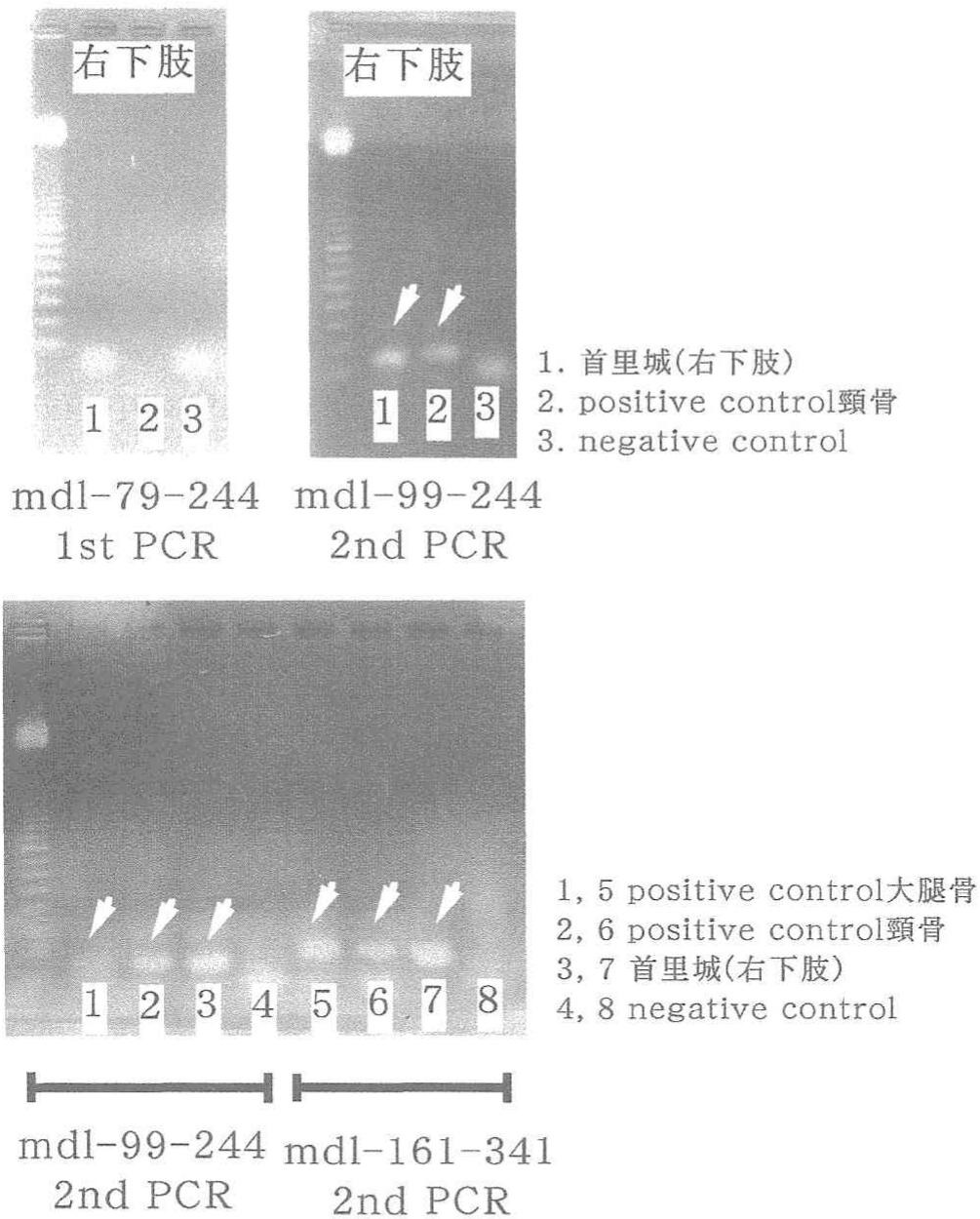


図9. 首里城から発掘された、*Macaca* 属の右下肢骨におけるミトコンドリア DNA の D-loop 領域の PCR 増幅。M：マーカー、L：サンプル、C：コントロール

(1) サンプル 1 の PCR 増幅

左側：1stPCR による mdl-79/mdl-244 (前半領域) および mdl-161/mdl-350 (後半領域) の増幅。

右側：2ndPCR (semi-nested) による mdl-99/mdl-244 (前半領域) および mdl-161/mdl-341 (後半領域) の増幅。矢印は 2ndPCR (semi-nested) において検出された 2 つのバンド (180bp、145bp) を示している。1stPCR ではバンドは検出されない。

(2) サンプル 2 の PCR 増幅

左側：1stPCR による mdl-79/mdl-244 (前半領域) および mdl-161/mdl-350 (後半領域) の増幅。右側：2ndPCR (semi-nested) による mdl-99/mdl-244 (前半領域) の増幅。矢印は 2ndPCR (semi-nested) において検出されたバンド (145bp) を示している。1stPCR ではバンドは検出されない。

(3) サンプル 2 の PCR 増幅

左側：1stPCR による mdl-161/mdl-350 (後半領域) の増幅。右側：2ndPCR (semi-nested) による mdl-161/mdl-341 (後半領域) の増幅。矢印は 2ndPCR (semi-nested) において検出されたバンド (180bp) を示している。1stPCR ではバンドは検出されない。

Ajigasawa(Type1)	1:CGTCCTGAATGCGCCTGTCTTTGATTCTAGTACATGCAGTTATTGATCGCACCTACGTT
Ohfunato(Type2)	1:.....G.....
Shurijo-1	1:.....G.....
Shurijo-2	1:.....G.....
Yakushima	1:.....G.....
Macaca mulatta	1:.....T.....G.....
Ajigasawa(Type1)	61:CAATATTCTAGCTCCACGCAAGCTTTAGCAAGGTGTTATTTAATTCATGCTTGTAGGACA
Ohfunato(Type2)	61:.....A...C.....
Shurijo-1	61:.....A...C.....
Shurijo-2	61:.....A...C.....
Yakushima	61:.....A...C.....
Macaca mulatta	61:.....A.....
Ajigasawa(Type1)	121:TACTAATAACCATCCTAGTCGGTACCACTCACACCACACCATTAAACCGC-AACCGTATCT
Ohfunato(Type2)	121:.....C.....A.-.....
Shurijo-1	121:..T.....AA..T.G.....T...T.G.C...A.T.....
Shurijo-2	121:..T.....AA..T.G.....T...T.G.C...A.T.....
Yakushima	121:..T.....AA..T.G.....T...T.G.C...A.T.....
Macaca mulatta	121:..C....T....C..C.GACG.----.....CC..T.A.T.....
Ajigasawa(Type1)	181:TATCAAACCCCCCACCCTTCCTCCGACCTTCATCCA
Ohfunato(Type2)	181:.....
Shurijo-1	181:.....
Shurijo-2	181:.....
Yakushima	181:.....
Macaca mulatta	181:.....

図 1 0. 首里城から発掘された、*Macaca* 属骨の mtDNA D-loop 領域の PCR 増幅により得られた塩基配列アライメント。

つて五葉山と同じ母系に由来する個体群が生息しており、東北地方の他所と異なる起源をもつ個体群を形成していたと予想できた。本研究により山形村から得られた既猿の雌個体試料が、岩手県南部に孤立している五葉山系のサルと同一の塩基配列を有することを確認することに成功した。この結果から、かつて北上山系に生存していたニホンザル地域個体群が、他の東北諸地域の個体群と母系祖先を異にする系統である可能性が高まった。

4) 宮城県多賀城由来のニホンザル遺骨

奈良時代（3世紀から9世紀）の骨と思われる、多賀城址から発掘された、ニホンザルの2骨、脛骨（No177 ES981012. ESD5021B）並びに大腿骨（No1525 ES980827. FSD5161B）（写真2）についてDNA回収並びにPCR増幅を行った。この2つの骨は、奥松島縄文村歴史資料館、菅原弘樹氏からの提供である。菅原氏によればこれらのサルの骨は、陸奥国府多賀城のすぐ側を流れる奈良時代の河川から出土したもので、河川からは多量のウマをはじめ、ウシ、シカ、イノシシ、イヌなどの解体された骨が散乱した状態で出土しており、これらのサルは、出土した周辺に生息していたものが捕獲、食用に供されたものなのか、あるいは他の地域から愛玩の対象として持ち込まれたものなのかは不明とのことである。今回これらの骨についてPCR増幅を試みた結果、図7に示したように、脛骨のDNAの増幅に成功した。そして塩基配列を決定した結果（図8）、I型であることが判明した。一方、大腿骨は、PCR増幅はされたが、塩基配列決定はまだなされていない。

5) 沖縄県首里城由来のニホンザル遺骨

次に約400年前の骨と思われる16世紀～17世紀の沖縄県首里城遺跡から出土した成獣♀の下顎M2近心歯根1サンプルについてDNA回収並びにPCR増幅を行った。

方法：PCR増幅に用いたサーマルサイクラーはPerkin Elmer Gene Amp PCR System 2

古代ニホンザルのDNA分析

表5．岩手県山形村由来の厩猿の試料

個体番号①～④	地域	提供	PCR増幅部位	備考
①-1	岩手県山形村	長内氏所有	大後頭孔右後縁	
①-2	岩手県山形村	長内氏所有	左眼窩裏	
①-3	岩手県山形村	長内氏所有	左眼窩裏	
①-4	岩手県山形村	長内氏所有	左眼窩事上部	
②-1	岩手県山形村	浦野氏所有	左頬骨基部	破損大の個体
③-1	岩手県山形村	浦野氏所有	大後頭孔左前縁部	右頬骨弓欠損個体 adult ♀
④-1	岩手県山形村	久保氏所有	右頬骨弓基底	adult ♂
④-2	岩手県山形村	久保氏所有	下顎左下部	adult ♂

表6．風穴洞穴由来の試料

試料	地域	内容	番号
縄文1	風穴洞穴	メス・頭蓋骨(側頭部の骨粉)	KZ96 P55 13・14・15
縄文2	風穴洞穴	性別不明・左橈骨骨幹(骨粉)	KZ96 O54 5
縄文3	風穴洞穴	性別不明・上腕骨遠位部(骨粉)	KZ96 P54 23

表7．鹿児島大学農学部西中川駿氏より提供（骨 16、 歯 16、 計 32）

採集地域	内容	個数	時代	個体番号
草野1	草野貝塚サル 1	骨2	縄文・薩摩	19HS, 109163
		歯2		8L29, 1001115
中岳洞穴	特記なし	骨1	縄文・大隈	4
麦之浦	11H-III 4	骨1	縄文・薩摩	54
	11H-IV	骨1		548
	10-II区	歯1		119
	V層	歯1		1,125
黒川洞穴1	特記なし	骨2	縄文・薩摩	6-3 No2
		歯2		F IV同-7
川上貝塚1(=市来貝塚)	特記なし	骨1	? 縄文後期	T127-49
		歯2		41T1
柊原貝塚1	A9、一括25	骨2	縄文・大隈	KKA-9, KKA-9
柊原貝塚3	B-11一括サル	骨1	縄文・大隈	KKB11-16
	B-10-IV1974	骨1		
	A-13-IV2783	歯1		KK2783A137
黒橋貝塚1(熊本)	宝山一括	歯1	特記なし	
	I-8 III層	骨1		番号なし
		骨1		E-9V層
	D-10-II-B	歯1		
	G-8 II層	歯1		
一陣長崎鼻(種子島)	No.21982	歯1	縄文後期	番号なし、
阿獄1(種子島)	特記なし	歯1	弥生	番号なし
かじ場跡	A地点	骨2	特記なし	番号なし
		歯2		

400を使用した。なお、PCR産物の精製はスピンカラム300 (MicroSpinTMS-300 HR Column; Amersham Pharmacia Biotech 社製) で精製した。

結果: はじめに、従来のD-loop増幅(242bp)のためにデザインされた、2組みのプライマー、mdr-L/mdr-393 (1st PCR) およびmdr-99/mdr-341 (2nd PCR) を用いて、増幅を試みたところ、バンドは検出されなかった。そこで、この増幅領域を2つに分け、それぞれ増幅する大きさが150bp前後になるようにプライマーをデザインした。前半部はmdr-79/mdr-244 (1st PCR) およびmdr-99/mdr-244 (seminested 2nd PCR)、後半部はmdr-161/mdr-350 (1st PCR) およびmdr-161/mdr-341 (seminested 2nd PCR) を用いて増幅を試みたところ、2つのtemplateからそれぞれ約145bp (前半部) および180bp (後半部) のバンドが増幅された。これらの増幅バンドを精製して、塩基配列を決定し、前半部と後半部の配列をアライメントしたところ、200bp, 239bpの塩基配列が得られた(図9)。これらの配列を6つの既知配列: 鯨ヶ沢(タイプ1)(川本, 未発表), 大船渡(タイプ2)(川本, 未発表), ヤクシマザル(川本ら, 未発表), *Macaca mulatta* (India)(川本, 未発表) とアライメントしたところ、図10から分かるように、2つのDNAサンプルともヤクシマサルと同一の配列であることが判明した。なお、この結果は、毛利ら(2000)によりすでに報告されている。

今後の課題

表6の試料(写真3, 4, 5参照)は今回PCR増幅を試みたが、増幅しなかったサンプルである。今後継続して、検討していきたい。表7の試料は鹿児島大学農学部西中川駿氏より提供を受けた縄文時代の遺骨であるが、今後PCR増幅して、塩基配列を決定する予定である。また写真5は種子島由来の*Macaca*属の遺骨である。今後これらの遺骨についてもミトコンドリアDNAタイピングをする予定である。

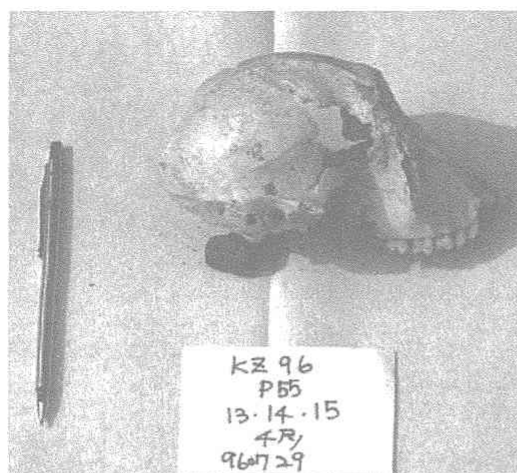


写真3. 縄文1

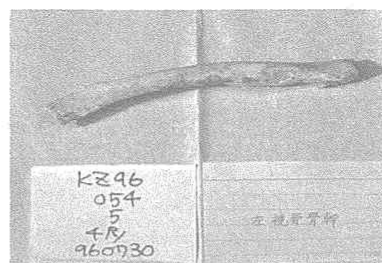


写真4. 縄文2



写真5. 縄文3

まとめ

今回の研究では、秋田県鳥海町、岩手県山形村、宮城県多賀城、沖縄県首里城からのニホンザルの遺骨のミトコンドリアDNAのD-ループ可変領域の塩基配列を決定した。その結果、鳥海町と多賀城がI型で、山形村がII型であることが分かった。この結果は、川本(1997)の現世のタイピングの分布と極めて良く呼応するとともに、現在分布していない地域にも、かつてI型やII型が存在していたことが確証された。一方、首里城の遺骨は、ヤクシマザルと同じタイプを持っていることが分かった。したがって、この首里城出土骨は16～17世紀前後に屋久島から沖縄に持ち込まれたサルの遺骨と考えられた。

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）の援助を受けて行った。

参考文献

- Kolman, C.J., Tuross, N. (2000) Ancient DNA analysis of human populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 111(1): 5-23.
- Marota, I., Rollo, F. (2002) Molecular paleontology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(1): 97-111.
- 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存種の比較。 *霊長類研究* 16 : 87-94.
- Pääbo, S. (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86(6): 1939-43.
- Scholz, M., Bachmann, L., Nicholson, G.J., Bachmann, J., Giddings, I., Ruschoff-Thale, B., Czarnetzki A., Pusch C.M. (2000) Genomic differentiation of Neanderthals and anatomically modern man allows a fossil-DNA-based classification of morphologically indistinguishable hominid bones. *Am. J. Hum. Genet.*, 66(6): 1927-32.
- Thomas, R.H., Schaffner, W., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1989) DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 340(6233): 465-7.

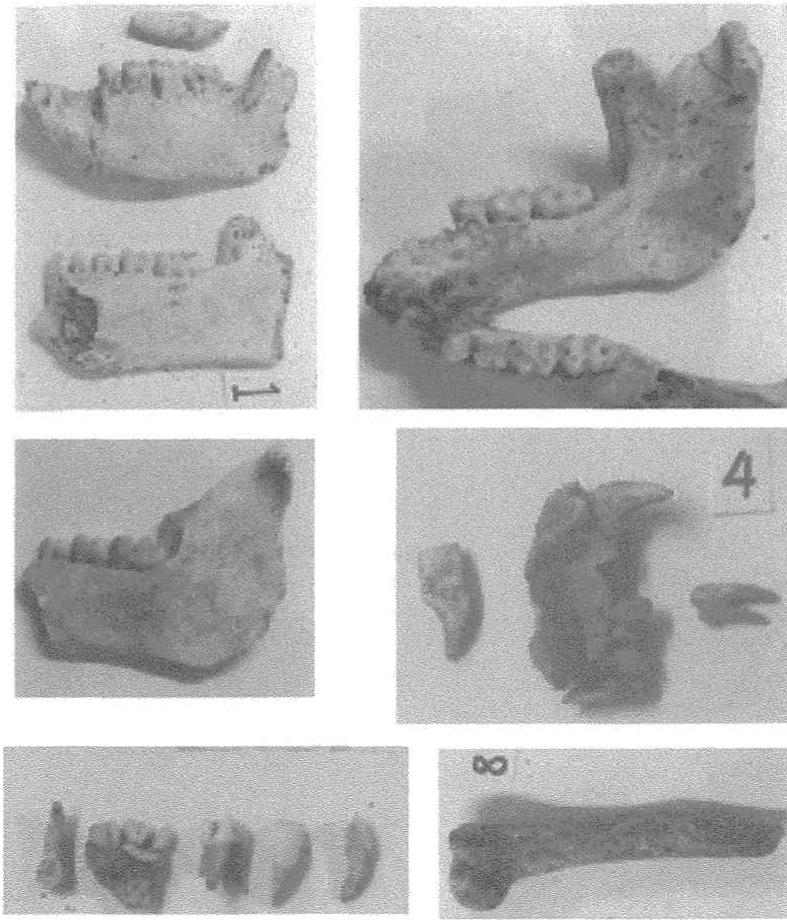


写真 6. 種子島由来の *Macaca* 属の骨格と歯。左上側：左右下顎と犬歯，右上側：左右下顎骨、中央左：右下顎骨、中央右側：右上顎骨片と犬歯、小白歯、下左側：上顎の切歯など，下右側：上腕骨近位部。