

2. 保護管理にむけた神奈川県の一ホンザル地域個体群の遺伝的モニタリング法の検討

森光由樹¹⁾

Examination of Genetic Monitoring Method for the Conservation of the Local Populations of the Japanese Macaque in the Kanagawa Prefecture

Yoshiki Morimitsu

要約

神奈川県に生息している一ホンザル 3 つの地域個体群、南秋川、丹沢、西湘で採取された合計 20 個体のミトコンドリア DNA の D ループ可変域、412 塩基対について解読作業を行った。その結果、神奈川県内 3 つの地域個体群に 4 つのハプロタイプを確認した。ハプロタイプの違いの理由は、最終氷期の間に分断隔離された地域個体群に生じた分化が反映している可能性がある。また、有害駆除や市街地や道路などの人口産物の影響により過去に連続して分布していた群れは分断孤立、もしくは絶滅した結果、遺伝的に違いが観察された可能性もある。今回、神奈川県に生息している一ホンザルの mtDNA の特徴を整理した。今回の結果は、将来、一ホンザルの保護管理を遂行する上での重要な基礎資料の一部になると考えられた。

(1) はじめに

南関東地域に生息している一ホンザルの農業被害は深刻な状況である。被害防除として、電波発信機を利用した追い払い、電気柵などが実施されているが効果を得るには多大な労力や費用がかかりあまり普及していない。一方で、サルが生息地は道路開発、宅地造成などで分断もしくは縮小されている。また被害対策の一環として実施されている有害駆除は増加数を上回る捕殺などにより、いくつかの一ホンザルの群れは絶滅もしくは孤立しており、地域個体群の存続が危ぶまれている(小金澤, 1995; 今木ほか, 1998; 羽山ほか, 1991)。このような危機的状況の中で科学的根拠をもとに保護管理を行うことは、目下の急務である。孤立した群れは他の群れと繁殖する機会が少なくなり、遺伝的交流が阻害され遺伝的多様性は失われていく。多様性を失った群れは近交弱勢により絶滅する可能性が高くなる。現在、一ホンザルの遺伝的特徴を整理した研究に、ミトコンドリア遺伝子を RFLP によって実施した研究がある(川本, 1997)。しかし、保護管理のために利用できるまでには至っていない。手法の開発は緊急課題である。保護管理に役立つための遺伝的モニタリング法を開発するためには、まず遺伝子をもつ特徴と一ホンザルの社会構造や生活史の特徴を整理して作業を進めていく必要がある。DNA は、核の他に細胞質内にあるミトコンドリアという小器官にも存在している。ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) の特徴は、母親由来のものだけが子供に引き継がれ核 DNA のような組換えを起こさないという独自の遺伝様式をとる(Birky, 1978; Potter *et al.*, 1975)。つまり、父系母系が入り交じる核 DNA とは異なり連続と続く母系系統を追求することが可能である。一方、一ホンザルの群れの構成単位はメス家系で群れは母系社会である(伊谷, 1972)。群れが分裂するとき、そのメンバーは均等には分かれず母系を単位に新群が形成される(小山, 1977)。これは、群れの中で突然変異が蓄積すると、分裂に伴って mtDNA の変異が群れ単位で分かれることを意味する。地域個体群の遺伝的モニタ

リングを行う上で有効である。また、mtDNA は核 DNA と比べて塩基置換の速度が 5 ~ 10 倍ぐらい高いことが知られており(Brown *et al.*, 1979)、特に近い過去の系統関係を調べるのに大変便利な分子指標である。メスは出生群にとどまるので、分析を進めていく上で問題はないが、オスの場合、基本的に性成熟を期に他の群れへ移り渡るといった性質があり、遺伝情報を得る時には、不都合が生じる。オスの試料を遺伝子分析に用いる場合、新生児から 4 歳くらいまでであれば、出生群の個体であると断定できるので問題は無いが、それ以上の年齢の個体の場合は、他の地域からの移入個体である可能性もあるので、得られた遺伝情報がその地域の遺伝的特徴を反映しているものかどうかかわからない。よって、材料を採取する時には、捕獲場所と性別および年齢について、記録を行い、採取された試料の中から、その群れ生まれの個体を選んで遺伝子分析を進めていく必要がある。以上の特徴を念頭に置きながら、神奈川県産一ホンザルの地域個体群の遺伝分析を実施した。また、隣接県山梨県で捕獲された個体についても分析を実施した。本研究の最終目的は、地域個体群の遺伝的特徴を整理することにある。そして、得られた資料を用いて地域個体群保護・管理体制整備のための基礎的知見を提供することである。

(2) 材料および方法

材料は、群れからの離脱の可能性のない個体、メスから採取したもののみを用いた(表 1, 図 1)。材料採取場所は、南秋川、丹沢および西湘地区において、学術捕獲した個体より血液を採取した。血液は、ヘパリンナトリウムにて凝固防止し、遠心分離により白血球を採取した。試料は、遺伝子の分析を行うまで -20℃にて冷凍保存した。DNA の抽出は、市販されているキット QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN 社) を用いて Protocol の指示に従いゲノム DNA を含むすべての DNA の抽出を行った。抽出した DNA を鋳型にミトコンドリア DNA の D ループ可変域、412 塩基対について PCR 法による増幅を試みた。この際に用いたプライマーの塩基配列は Hayasaka *et al.* (1991) より引用した(表 2)。塩基配列の解読は PCR ダイレクトシー

1) 野生動物保護管理事務所 現) 兵庫県立大学 自然・環境科学研究所 森林動物研究センター



図 1. 材料採取場所

表 1. 遺伝分析に用いた試料と採集場所

NO.	サンプル番号	地域個体群	市町村名	地域名	群名	年齢区分
1	448	南秋川	相模湖町	千木良	K1群	成メス
2	509	南秋川	藤野町	和田	K2群	成メス
3	537	丹沢	愛川町	八菅神社	鳶尾群	成メス
4	568	丹沢	厚木市	宮の里	飯山群	成メス
5	571	丹沢	厚木市	宮の里3丁目	飯山群	成メス
6	574	南秋川	藤野町	和田	K1群	成メス
7	576	南秋川	藤野町	下岩	K3群	ワカメス
8	577	南秋川	相模湖町	底沢	K2群	成メス
9	579	丹沢	清川村	法論堂	煤ヶ谷群	成メス
10	583	南秋川	藤野町	上沢井	K3群	成メス
11	586	丹沢	清川村煤ヶ谷	関東鉱産	川弟群	成メス
12	589	南秋川	藤野町	和田	K1群	成メス
13	661	丹沢	厚木市	棚沢	鳶尾群	成メス
14	663	丹沢	津久井町	馬石	ダムサイト群	成メス
15	678	西湘	熱海市	伊豆山地区	T2群	成メス
16	704	丹沢	厚木市	幣山	鳶尾群	ワカメス
17	710	丹沢	伊勢原市	子易	日向群	成メス
18	714	南秋川	上野原市	子伏	K1	成メス
19	434	西湘	小田原市	板橋	S群	成メス
20	358	西湘	小田原市	早川	H群	成メス

表 2. プライマーの塩基配列 (Hayasaka *et al.*, 1991)

Saru4 (塩基数20)	ATCAGGGTCTATCACCTAT
Saru4.5 (塩基数20)	TTAGTTGAGGAATGGCAGT

ケンス法 Genetic Analyzer ABI 社 Model317 を用いて実施した。コンピュータのハードディスク内に記録されている分析結果を分析解析用ソフト GENETYX-MAC ver.10.0 および Edit View-J 4.0 を用いて、データの解析をおこなった。また、分析にて得られた情報を解釈しやすい形にするため、クラスタリング (類型化) を行った。

(3) 結果と考察

20 の地域から採取した個体の mtDNA の D ループ可変域、約 412 塩基対を比較分析した結果、mtDNA は、4 種類のタイプに分類することができた。それぞれ材料を採取した場所については表 1 に、また mtDNA の変異と群れとの関係については、表 3 と図 2 に示した。南秋川地域個体群、丹沢地域個体群、西湘地域個体群の mtDNA のタイプはそれぞれ異なったタイプを示した。丹沢地域個体群の中で 2 つのハプロタイプが観察された。南秋川、丹沢、西湘のそれぞれの遺伝子の違いの理由の一つとして地理的關係が大きく関与しているものと予測される。すなわち、丹沢と西湘との間には、東名高速道路や小田原、秦野などの市街地が位置している。人間の作った人口産物が分布

表 3. 地域個体群と mtDNA 変異との関係

NO.	サンプル番号	地域個体群	群名	遺伝子タイプ
1	448	南秋川	K1群	A
2	509	南秋川	K2群	A
3	537	丹沢	鳶尾群	B
4	568	丹沢	飯山群	C
5	571	丹沢	飯山群	C
6	574	南秋川	K1群	A
7	576	南秋川	K3群	A
8	577	南秋川	K2群	A
9	579	丹沢	煤ヶ谷群	C
10	583	南秋川	K3群	A
11	586	丹沢	川弟群	B
12	589	南秋川	K1群	A
13	661	丹沢	鳶尾群	B
14	663	丹沢	ダムサイト群	C
15	678	西湘	T2群	D
16	704	丹沢	鳶尾群	B
17	710	丹沢	日向群	B
18	714	南秋川	K1	A
19	434	西湘	S群	D
20	358	西湘	H群	D

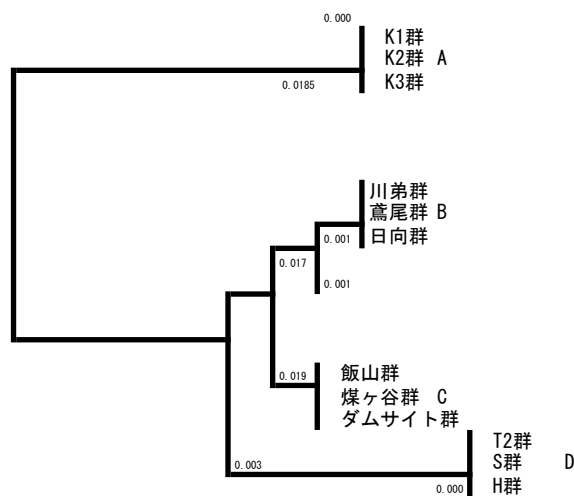


図 2. 神奈川県内に生息するニホンザルミトコンドリア DNA の系統樹 (UPGMA Method) GENETYX-MAC:Evolutionary Tree

域を広げていく上でなんらかの物理的障害があった可能性がある。また、二つめの理由として有害駆除の影響が考えられる。長い人間との軋轢の中で、農業被害の防除対策として有害駆除が実施され、連続して分布していたサル群は分断し徐々に孤立、もしくは絶滅した結果、各地位個体群で遺伝的な情報が蓄積され異なって観察された可能性も考えられる。またもう一つの理由として、歴史的な背景が考えられる。最終氷期の間に分断隔離された地域個体群に生じた分化が反映している可能性がある。今回、神奈川県に生息しているニホンザル地位個体群の mtDNA の特徴を整理することができた。しかし実際に遺伝学的手法がニホンザルの保護管理に有効なものとなるには、個々の地域個体群の遺伝的特徴をさらに多数の試料を集めて明らかにしてゆく必要がある。生物の保全において地域個体群間の遺伝的交流が保証されることが重要であるとされている (鷲谷・矢原, 1996; 樋口編, 1997; Frankham *et al.*, 2002)。ニホンザルの生殖の特徴として、オスは基本的に性成熟に達した段階で出生群を出て、他の群れへ移入し子孫を残すこ

とが知られている。今回、オスの検体についての分析はデータに混乱をおこす可能性があるため実施しなかった。ニホンザルの保全を考える上で地域個体群間でのオスの交流は重要である。前項でも述べたが、オスの場合 mtDNA は 1 代限りで消出してしまふ。この特徴を利用すれば、オスの移住もしくは拡散を調べることが、可能である。今後とも、継続して捕獲された個体についての採集・分析をおこなうことが、神奈川県内のニホンザルの保護管理を行う上で必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、京都大学霊長類研究所の川本芳博士より、ご助言をいただきました。お礼申し上げます。

文 献

- Birky, C. W. Jr., 1978. Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Ann. Rev. Genet.*, 12: 471-512.
- Brown, W., M. M. George Jr. & A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1967-1971.
- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe, 2002. Introduction to conservation genetics. 617pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- 羽山伸一・稲垣晴久・鳥居隆三・和秀雄, 1991. 有害駆除が野生ニホンザルの個体に与える影響: 捕獲記録の分析. *霊長類研究*, 7: 23-33.
- 樋口広芳(編), 1997. 保全生物学. pp253. 東京大学出版会, 東京.
- Hayasaka, K., T. Ishida & S. Horai, 1991. Heteroplasmy and polymorphism in the major noncoding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: association with tandemly repeated sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 8: 399-415.
- 今木 洋・大泉山茂之・岩丸大作・岡田充弘・岡野美佐夫・蒲谷 肇・小金澤正昭・白井 啓・森光由樹, 1998. 関東甲信越におけるニホンザルの分布と保護管理に関する現状. *ワイルドライフ・フォーラム*, 4 (2): 35-52.
- 伊谷純一郎, 1972. 霊長類の社会構造, 生態学講座 第 20 巻. 161pp. 共立出版, 東京.
- 川本 芳, 1997. ミトコンドリア DNA 変異を利用したニホンザル地域個体群の遺伝的モニタリング. *ワイルドライフ・フォーラム*, 3 (1): 31-38.
- 小金澤正昭, 1995. 地理情報システムによるニホンザル地域個体群の抽出と孤立度. *霊長類研究*, 11 (2): 59-65.
- 小山直樹, 1977. ニホンザルの社会構造. 伊谷純一郎編, 人類学講座 第 2 巻 霊長類., pp.225-276. 雄山閣出版, 東京.
- Potter, S.S., J. E. Newbold, C. A. Hutchison III . & M. H. Edgell, 1975. Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4496-4500.
- 鷲谷いづみ・矢原徹一, 1996. 保全生態学入門. 270pp. 文一総合出版, 東京.