

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

2022年 5月 27日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 京都大学生態学研究センター (採択時の所属:京都大学霊長類研究所)

職 名 助教

氏 名 田中 洋之

助 成 の 種 類	令和3年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	霊長類の「種」の再検討:南アジア大陸部ラングールの形態と分子系統地理			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) なし			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要/報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		DNA分析用試薬・消耗品	452,982円	
		卓上微量高速遠心器	276,320円	
		双眼鏡 NikonモナークHG	93,800円	
		コンピューター MacBook Air	130,680円	
ソフトウェア Microsoft Office		26,166円		
書籍「遺伝子の百科事典」	19,228円			
SDカード	824円			
当財団の助成に つ い て	海外研究者との共同研究を継続するために、今回の助成に大変助けられました。コロナ禍で海外渡航はできませんでしたが、当研究室に保存されていた試料の分析とデータの解析を実施し、その結果を電子メールで連絡することにより、研究の継続や発展性について話し合うことができました。ありがとうございました。			

研究成果の概容

研究活動推進助成

研究課題名：霊長類の種の再検討：南アジア大陸部ラングールの形態と分子系統地理

京都大学生態学研究センター

田中洋之

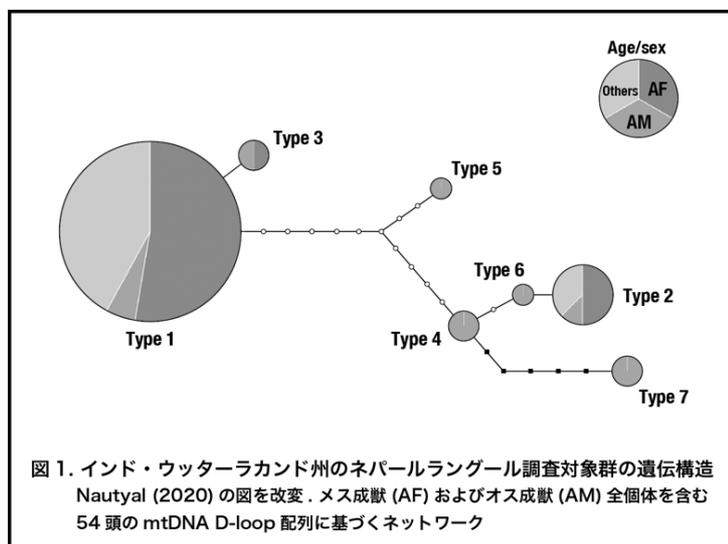
(採択時の所属：京都大学霊長類研究所)

現在 480 前後にまでふくれあがった霊長目の種数は、保全対象となった亜種が種に昇格した例を多数含むと考えられる。本研究は、ヒマラヤ地域に生息するネパールラングール、ハイロラングールおよびカシミールラングールの 3 種（これらはヒマラヤラングールと総称される）を対象に、中立な分子遺伝マーカーを用いて系統分類学的な位置付けを確認したのち、高地適応に関係する形態と分子進化を研究し、「保全対象としてふさわしい管理単位」を見出すことを目的として、計画された。

京都大学財団の 2021 年度研究活動推進助成を受けて、2021 年度は、Nautyal (2020) が研究対象としたネパールラングール 1 群のデータおよび試料を用いて、計画していた研究の一部を継続した。

(1) インド・ウッターラカンド州のネパールラングール対象群の系統的位置づけ

Nautyal (2020)は、インド・ウッターラカンド州の標高約 1500m に位置する山村近くに生息するネパールラングール 1 群（約 70 個体）を対象とし、博士論文の研究を行った。この群れの遺伝的構造を調べるため、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) のチトクローム b (Cyt b) 遺伝子と D-loop 領域の塩基配列を分析したところ、群れ全体で 7 種類の mtDNA タイプが見つかった (図 1)。そのうち、メス成獣個体で 3 タイプ (Type 1–3) が見つかったことから、過去にメスの移入または群れの融合があったことが示唆された。さらにメス成獣個体と同一の mtDNA タイプをもつオス成獣が見つかったことから、対象群の群れで生まれ、一旦他の場所へ移出した後、戻ってきた可能性があることがわかった。

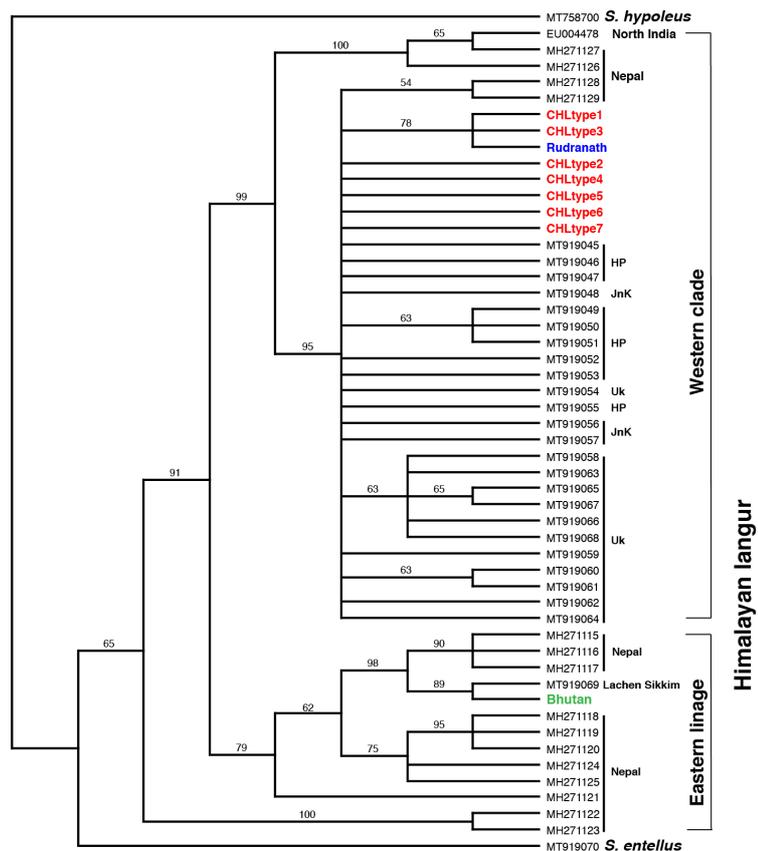


2021 年度は、こうして対象群で見つかった 7 種類の mtDNA タイプの、ヒマラヤ地域に広く分布するヒマラヤラングールにおける系統的な位置づけを調べることを目的に、先行研究の Arekar et al. (2020) と Khanal et al. (2018) の塩基配列データとともに系統分析を行った。コロナ禍で海外へのサンプリング調査ができなかったため、当研究室に保管されていた Nautyal 氏

が採取したウッターラカンド州の Rudranath（標高 3600m）およびブータンの共同研究者 Tshewang Norbu 氏が採集したブータン各地のネパールラングールのサンプルを新たに分析し、これらの塩基配列データも系統分析に加えた。Khanal et al. (2018)は、Cyt b 遺伝子全長 1140 塩基対および D-loop 領域全長 1090 塩基対を用いて、ネパール国内のネパールラングールの系統地理を研究したのに対して、Arekar et al. (2020)は、インドのヒマラヤラングール（試料採集地点から、上述した3種のラングールを含むと考えられる）で Cyt b 遺伝子 775 塩基対の配列決定を行い、Khanal et al. (2020)の Cyt b 遺伝子のデータと併せて分析した。そこで、我々のネパールラングールの系統的な位置づけを明らかにするため、Arekar et al. (2020)が用いた Cyt b 遺伝子のデータセットとともに系統分析を行った。その結果を図2に示す。

図2. ヒマラヤラングール地域個体群の系統関係

ミトコンドリア チトクロームb遺伝子800塩基対に基づく近隣結合法によるブートストラップ合意樹。*S. hypoleus*および*S. entellus*は外群。
CHLtype 1-7, Rudranath およびBhutan は、本研究で得られた塩基配列。
HP: Himachal Pradesh, JnK: Jammu & Kashmir, Uk: Uttarakhand



ウッターラカンド州のネパールラングール対象群 (CHL type1~7) と Rudranath の個体群は、ヒマラヤラングールの Western clade に、ブータンのサンプルは Eastern lineage にそれぞれ含まれた。試料採集地点の地理的な位置を考慮すると矛盾はないが、Cyt b 遺伝子では地域個体群間の遺伝的変異性が低いため、ヒマラヤラングールの詳細な系統地理を明らかにするのは困難であると考えられた。我々の対象群はウッターラカンド出自であるが、Western clade の中で Arekar et al. (2020)のウッターラカンドの個体群とクラスターを作ることがないうえ、地域間の系統関係も不明瞭である。対象群で見つかった7種類の mtDNA タイプの塩基配列において、Cyt b 遺伝子の部分だけを比較すると、タイプ2および4~7は同一配列とみなされた。従って、ヒマラヤラングールの地域個体群間の系統関係を明らかにするには、Khanal et al. (2018)や我々の研究のように、D-loop 領域の塩基配列を使用する必要がある。

(2) 高地適応に関する mtDNA マーカーの開発

高地における形態的・生態的適応についてのラングールの研究は乏しい。Nautiyal 氏の調査地では、ヒマラヤ高地（標高 3000m 以上）の個体が低山地帯の個体に比べ大柄であるとの観察がある(H. Nautiyal, 私信)。今回実施した中立な mtDNA マーカー（Cyt b 遺伝子および D-loop 領域）を用いた分子系統分析では、標高 1500m に生息する対象群と Rudranath 群が同種であることは確認できたが、生息地環境への適応に関する情報は得られない。チベット高原の家畜ヤクでは、mtDNA の ATP6 および ATP8 遺伝子が高地適応に関連しているとの報告がある(Wang et al., 2018)。霊長類では、これまでアカゲザルにおける ATP6 遺伝子(Zhao et al., 2020)とキンシコウにおける NADH2 および NADH6 遺伝子(Yuet et al., 2011) で高地適応に関連した遺伝子変異が見いだされている。従って、本研究では ATP6、ATP8、NADH2 および NADH6 遺伝子を分析すべく、塩基配列決定実験のために、ハヌマンラングール (Sterner et al., 2006)とネパールラングール (Guo et al., 2019)の mtDNA 全ゲノムデータからプライマーを設計した。現在、保存 DNA 試料を用いて実験を継続している。高地適応に関する遺伝的な変化を見いだすことができれば、Moritz (1995) が提唱した「進化的に重要な単位」に生物学的な情報を加えた「保全対象としてふさわしい管理単位」の提唱が可能になり、保全すべき個体群の優先順位づけに役立つ情報となる。

引用文献

- Arekar, K., Sathyakumar, S. & Karanth, K. P. (2020). Integrative taxonomy confirms the species status of the Himalayan langurs, *Semnopithecus schistaceus* Hodgson, 1840. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. doi: 10.1111/jzs.12437
- Guo, K.-J., & Li, F.-Jun. (2019). The complete mitochondrial genome of *Semnopithecus schistaceus*. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 2888-2889. doi: 10.1080/23802359.2019.1660270
- Khanal, L., Chalise, M. K., Wan, T. & Jiang, X. (2018). Riverine barrier effects on population genetic structure of the Hanuman langur (*Semnopithecus entellus*) in the Nepal Himalaya. *BMC Evol Biol*, 18(1), 159. doi: 10.1186/s12862-018-1280-4
- Moritz, C. J. (1995) Use of molecular phylogenies for conservation. *Phil Trans R Soc Lond B*, 349, 113-118.
- Nautiyal, H. (2020). Behavioral ecology of the Central Himalayan Langur (*Semnopithecus schistaceus*) in the human dominated landscape: Multi-species interactions and conservation implications. *PhD thesis, Kyoto University, Japan*, Pp. 159
- Sterner, K. N., Raaum, R. L., Zhang, Y.-P., Stewart, C.-B. & Disotell, T. R. (2006). Mitochondrial data support an odd-nosed colobine clade. *Mol Phylogenet Evol*, 40(1), 1-7. doi: 10.1016/j.ympev.2006.01.017
- Yu, Li, Wang, Xiaoping, Ting, Nelson, & Zhang, Yaping. (2011). Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in high-altitude adaptation. *Mitochondrion*, 11(3), 497-503. doi: 10.1016/j.mito.2011.01.004
- Zhao, P., Zhang, K., Zuxiang, J., Diyan, L., Meng, X., Zhang, M., Yao, Y. & Huailiang, X. (2020). Genetic characterization of rhesus macaque populations along the southeastern Qinghai-Tibetan plateau based on a mitochondrial ATP6 gene closely related to energy metabolism. doi: 10.21203/rs.3.rs-17209/v1