

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

2023年 04月06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 野生動物研究センター

職 名 准教授

氏 名 Michael Alan Huffman

助 成 の 種 類	令和4年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	A tail of two species- behavior, phenotype, and genetics of the Sri Lankan langurs			
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) 生態学研究センター・助教・田中 洋之			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
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	
		旅費	1,000,000	
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)			

A tail of two species- behavior, phenotype, and genetics of the Sri Lankan langurs

Bergmann (1847) と Allen (1877) の法則は、恒温動物において体温維持のために、寒冷な高緯度に生息する種／集団は、低緯度の種／集団に比べて、四肢や胴体の体表面積が大きくなり (Bergmann)、尾、手足、鼻、耳など付属器官が短くなる (Allen) と予測するものである。これらの仮説は、約 200 年前に発表されて以来、世界中の多くの哺乳類で実証されてきた。霊長類マカク属 (23 種) において、生息地域の緯度と体表面積および相対尾長 (RTL) の種間変異でこれらの法則が適用できることが認められた。マカク属内の各種群 (*sinica*, *fascicularis*, *silenus*, *arctoides*) において、最も尾が長く体の小さな祖先的な種は南・東南アジア熱帯に生息し、基本的に分布の重複はなく、緯度が高くなるにつれて、尾の短い体の大きな種が生息するようになる (Fooden 1979, 1988, 1997, 2006)。これらの情報は、環境・気候変動に対する進化的適応を理解する上で重要であるが、各種の行動様式や消化・採食戦略の影響を受けて変化した形質という観点からの考察はこれまでにない。

アジアのマカク種群内における Allen の法則の検証とは異なり、研究代表者は、スリランカ固有種で海拔 0~2420m の多様な生態気候帯に生息する、*sinica* 種群のトクモンキー (TM: *Macaca sinica*) において、種内で Allen の法則を検証したところ、RTL において明確な気候的・高度的変動が見られたため、Allen の法則と合致した形態的適応と結論した (Huffman et

al. 2020; Huffman 2018 京大財団研究報告書)。TM の胴体や手足の体表面積についても、海拔の上昇に従って大きくなる傾向がみられ、Bergmann の法則も成り立つと考えられた (Huffman et al. 2020) (Figure 1)。

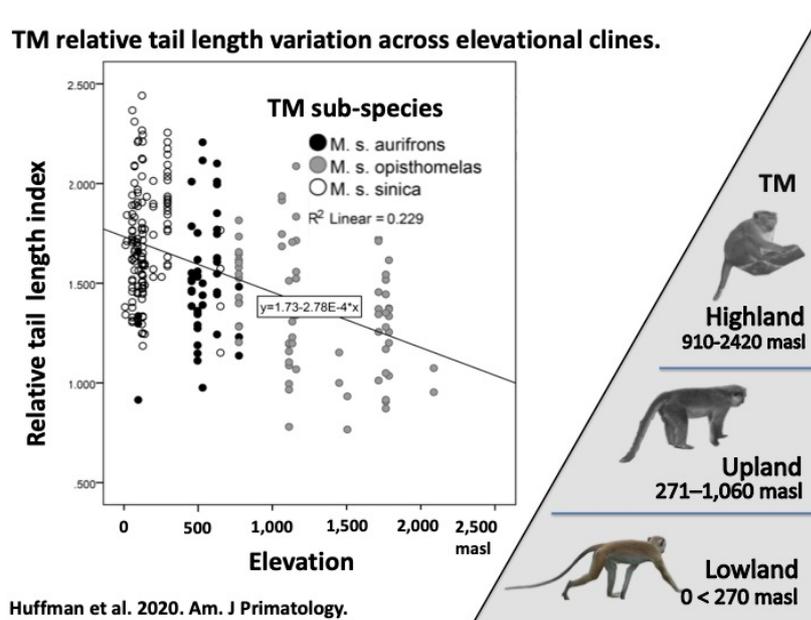


Figure 1. Summary of results on toque macaque RTL and body mass in response to elevation.

スリランカの他の昼行性霊長類である *Semnopithecus* 属の 2 種、樹上性で葉食性のカオムラサキラングール (PFL : *Semnopithecus vetulus* 4 亜種) と陸上性で葉食性-未熟果実食性のグレーラングール (GL : *Semnopithecus priam thersites*) については、生息地ごとの詳細な形態情報はなく、Allen と Bergmann の法則の検証は行われたことはない。PFL と GL のオトナは、それぞれに同所的な陸上性で雑食性である TM よりも体サイズにおいて大柄であるため、行動様式や消化・採食戦略の要因が、3 種間や種内の生息地ごとの形態的変動に関与している可能性がある。この問いを検討することが本研究の目的である。

今回受けた京大財団の支援に基づいて、予備広域野外調査を行うことにした。Sri Jayewardenepura 大学の共同研究者やその大学院生の協力を受けて、生息地環境の異なる数カ所の PFL と GL の生息地を訪ね、基礎的な生態学的情報、目撃できるサル個体からデジタル写真データと糞便サンプルを集め、その一部を用いて、次の 3 項目を行うことにした：① Huffman et al. (2020) が開発したデジタル写真測定方法を用いて、PFL と GL の相対尾長 (RTL) の計測を試みる。② PFL と GL の分布に基づき、生態気候帯と RTL の関係性を評価する。③ 採取した糞試料から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 遺伝子において寒さ (標高) に対する適応的な分子進化の探索を行う。

方法

デジタル写真による非侵襲的な形態分析法

オープンソースの LibreCAD Ver. 2.2 (2 次元コンピュータ支援設計アプリケーション) を使用して、RTL を算出する。コンピューターマウスにより、サルの画像の尾と背の輪郭をなぞって尾部と体幹部のピクセル数を記録し、Tail to Trunk Index (TTI= 尾部画素数/体幹画素数) を算出することができる。この値を非侵襲的な RTL と定義した (Huffman et al. 2020)。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の全塩基配列の比較

mtDNA の全塩基を 4 種類のプライマーペアで増幅し、さらに個々の遺伝子領域を PCR 増幅した後、塩基配列決定を行う。詳細については、下記③を参照。

成果

本予備調査は、2022 年 12 月 15 日から 2023 年 1 月 6 日にかけて、スリランカで行った。その間、中央山岳高地帯 (Hakgala, Nuwara Eliya)、北西低地沿岸帯 (Mannar 島、Madhu)、北中央中間帯 (Mihintale) を訪れ、PFL と GL の撮影と糞便採集を行った。今回訪問した 5 ヶ所は PFL と GL の生息地を代表する生態気候帯の低地乾湿地帯、湿潤地帯や高地の湿潤地帯である (Figure 2)。

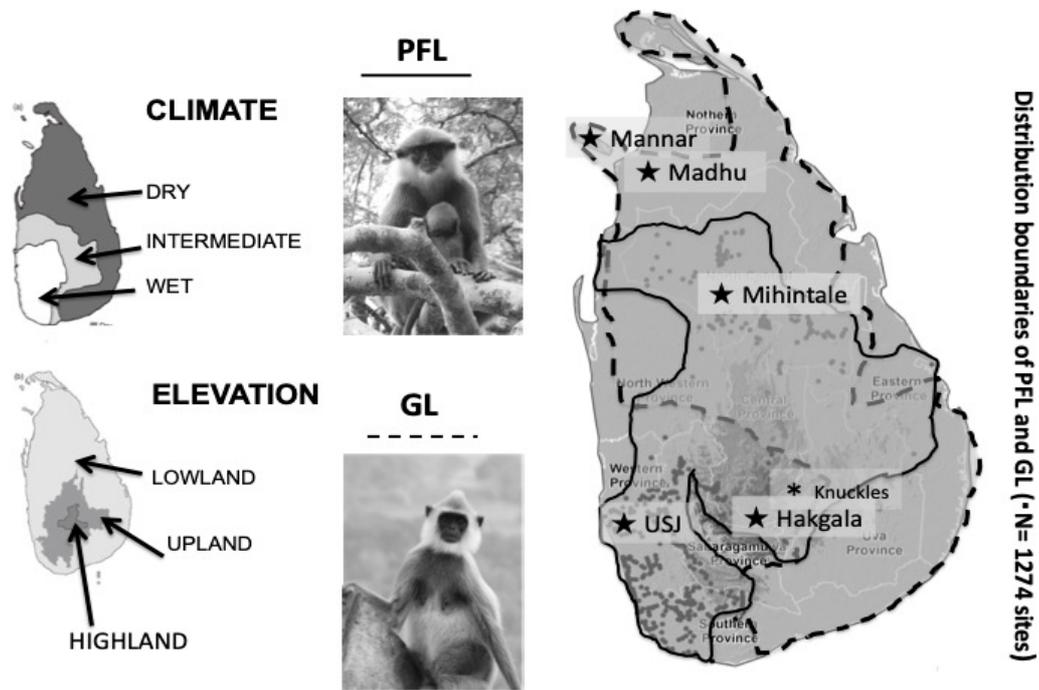


Figure 2. The climatic and elevational zones of Sri Lanka and the survey sites visited.

生態学的気象学的な基礎情報は **Table 1** に記載してある。標高が高くなるにつれて、平均最高気温が下がることが認められた。

① の成果

撮影した写真 55 枚のうち、15 個体分の体幹・尾長を測定するのに適したものは選別された。その資料から、訪問した 5ヶ所と以前に収集した 1 個体のデータ (PFL、N=7 個体 ; GL、N=8 個体) を用いて、RTL と平均 TTI を算出した (**Table 1**)。トクモンキーのために開発した方法がラングール種に適用できることを確認することができた。

② の成果

全体的に、標高が上がるにつれて、TTI の値が減少する傾向が認められた (**Table 1**)。特に低地の乾燥地帯のみに広く生息する GL の標高による TTI(尾長)の減少は目だてていた。ところが、底地から高地に広く分布している PFL はそれほど、TTI の減少の傾向は認められなかった。PFL は、トクモンキーに比べて、標高に対する尾長の短縮が認められなかった (**Figure 3**)。

Table 1. Basic ecological and climatic site information and species' average sample Tail/Trunk Index. * Knuckles Information Center sample data was collected during a previous trip but is used here to supplement high altitude sample representation.

Location, species	Average T/T Index (N indiv.)	Elevation (masl)	Mean Annual Temp. C	Mean annual rainfall (mm)	Latitude °	Longitude °	Altitudinal Climatic Zone
Mannar Island, GL	2.1285 (2)	0	30	139	9.050000	79.833330	Dry Lowland
Madhu Church, GL	-	50	30	139	8.85502	80.20284	Dry Lowland
Nugegoda USJ campus area, PFL	1.6390 (3)	8	30	320	6.851948	79.901656	Wet Lowland
Mihintale, GL	1.6737 (6)	122	27	1364	8.355250	80.513570	Dry Lowland
PFL	1.4594 (2)	122	27	1364	8.355250	80.513570	Dry Lowland
*Knuckles Information Center, PFL	1.1906 (1)	1112	19	2540	7.328781	80.861297	Wet Highland
Hakgala, PFL	1.2732 (1)	1715	18	2300	6.924903	80.821853	Wet Highland

Relative tail length(TTI) by elevation

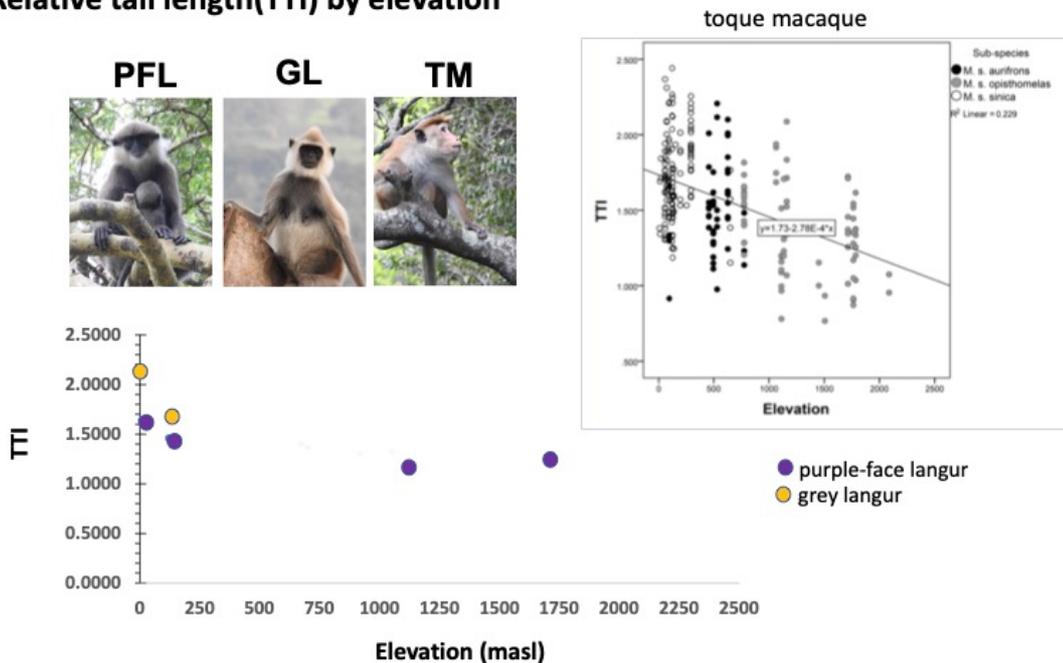


Figure 3. Relative tail length variation by elevation in purple-face langurs and grey langurs compared to previous results of toque macaques of Sri Lanka.

③の成果:遺伝

PFL の 4 亜種が区別される PFL において、中央高地に生息する亜種 (*S. v. monticola*) の高地適応に関して、形態学的調査に加え、ミトコンドリア DNA 遺伝子における適応的な分子進化の探索を目的として、実験系の確立およびスリランカにおける試料採集のための野外調査を行った。

霊長類における高地適応に関係する分子の研究は少ない。アカゲザル (*Macaca mulatta*) (Zhao et al. 2020) においてミトコンドリアの ATP6 遺伝子で、またキンシコウ (*Rhinopithecus roxellana*) (Yu et al. 2011) においては NADH 脱水素酵素遺伝子で、高地適応と関連した分子変化が報告されている。本研究では、高地及び低地に生息するパープルフェイスラングールでミトコンドリア DNA (mtDNA) の全塩基配列を比較するため、mtDNA の全塩基を 4 種類のプライマーペアで増幅し、さらに個々の遺伝子領域を PCR 増幅した後、塩基配列決定を行う実験系を確立した。第 1 PCR では、Yu et al. (2011) が開発したプライマーと本研究で作成したプライマーを使った。第 2 PCR では、第 1 PCR の産物と個々の遺伝子領域を増幅するためのプライマーを使用する。今回、mtDNA の ATP6 遺伝子、ATP8 遺伝子、NADH 脱水素酵素遺伝子のサブユニット 2 (以下、ND2) およびサブユニット 6 (ND6) の 4 遺伝子について PCR のためのプライマーを作成した。予備実験として、スリランカ産グレイラングール (*S. priam thersites*) やインド産及びブータン産ネパールラングール (*S. schistaceus*) の保存 DNA 試料を用いて、PCR 増幅及び塩基配列決定実験を実施し成功した。

スリランカでの野外調査では、中部州ヌワラエリヤ管区の Hakgala Botanical Garden にてパープルフェイスラングール高地亜種 (*S. v. monticola*) の遺伝分析用の糞試料 10 個を採集した。また、北中部州の Mihintale で低地亜種 (*S. v. philbricki*) の試料採集を試みたが採材できなかった。一方、比較系統地理学の試料として、北部州マンナール管区の Madu Church にてグレイラングールの糞試料 6 個を採集した。

Sri Jayewardenepura 大学人類学教室の DNA 実験室で、採集した糞試料のうちパープルフェイスラングール 6 試料及びグレイラングール 4 試料から DNA 抽出を行い、第 1 PCR を実施した。第 1 PCR の PCR 産物を日本に持ち帰り、共同研究者の田中の実験室にて、パープルフェイスラングールの ATP6、ATP8、ND2 及び ND6 の 4 遺伝子について、第 2 PCR を行い、それぞれの遺伝子の塩基配列を決定することができた。

今後の課題

これまで Huffman は、スリランカ固有種のトクザル (*Macaca sinica*) において、体温維持のための形態的適応変化である Allen と Bergmann の法則が成り立つことを明らかにした。気候帯及び標高帯の異なる生息地間で相対尾長 (RTL) における顕著な変化が見られた。本研究は、トクザルと同所的に生息するカオムラサキラングール (PFL) とグレイラングール (GL) において初めて、RTL が Allen の法則に従う形態的な適応進

化の検証を試みたが、現時点、データはまだ少ないため、統計的に検討することはできず、結論を述べることはできない。

しかし、今回の研究成果によって、一つの作業仮説を考え出すことができた。樹上性 PFL は進化の過程で、素早く移動したり、樹上で採食したりする際にバランスをとるために長い尾を維持する必要がある、代わりに寒い場所での体温調節のために手足や体の表面積を大きくしている (Bergman の法則) ののではないかということである。それを実証するためには、体表面積の測定方法を開発する必要がある。

今後は、体温維持だけでなく、形態変化の要因となりうる移動パターンやエネルギー制約に関わる消化・採食戦略などについても、生息地ごとにラングール各種とトクマカクを比較しながら明らかにしていく必要があるだろう。これを検証するためには、サンプルサイズを増やす必要がある。

適応的分子進化の研究については、パープルフェイスラングールの他の 3 亜種の試料採集を行い、高地亜種とともに mtDNA の全塩基配列を決定し、高地適応に関連する遺伝子変異の探索を行う計画である。同時に、高地適応には関係しない中立な進化をしていると考えられる D-loop 領域やチトクローム b 遺伝子の塩基配列の比較から、パープルフェイスラングール 4 亜種の亜種分化の過程、またグレーラングールとの比較系統地理を研究する必要がある。