日本で飼育されているテナガザルの ミトコンドリア DNA (cytochrome b 遺伝子) による種判定

松平一成^{1,2)}, 前田洋一³⁾, 幣原奈央子¹⁾, 石田貴文^{1)*}

1) 東京大学大学院理学系研究科 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

2) Faculty of Science, Chulalongkorn University 254 Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

3) 愛媛県立とべ動物園 〒791-2191 愛媛県伊予郡砥部町上原町 240

(2020 年 11 月 1 日受領, 2021 年 3 月 13 日採択)

要 約

東南アジアとその周辺に生息するテナガザルは、およそ 20 に及ぶ多くの種に分類されている。日本の動物園・研究機関で飼育されているテナガザルは、公益社団法人日本動物園水族館協会のテナガザル国内血統登録台帳に登録されているが、過去の外見のみに基づく種判定の曖昧さや、近年の分類体系の大きな変更に伴い、種登録情報の更新が待たれていた。本研究は、客観的に評価が可能な遺伝情報を用いて種を同定し、登録情報の更新を行うことを目的とした。具体的には、153 個体を対象にミトコンドリア DNA の cytochrome b 遺伝子の配列 (1,140 塩基対) を決定し、テナガザル各種の参照配列との類似度に基づき、種を判定した。また、配列決定ができなかった 14 個体については、上記 153 個体との血縁関係などから、種を判定した。その結果、特にボルネオ島・スマトラ島に生息する *Hylobates* 属の個体の種の登録情報に更新が行われた。また、*Hylobates* 属の 4 個体については、参照配列に類似の配列がなく、他の遺伝マーカーの利用の必要性が示唆された。登録情報の更新に従い、フクロテナガザル、シロテナガザル、ボウシテナガザルの飼育個体群は今後も維持が可能である一方、その他の種は、個体数が少なく、個体群を維持していくことが困難であると示唆された。更新された登録情報が、今後の飼育管理・繁殖計画に利用されていくことが期待される。

キーワード：cytochrome b 遺伝子, 種判定, テナガザル, 保全生物学

— 日本野生動物医学学会誌 26(2) : 35-42, 2021

序 論

テナガザルは東南アジアとその周辺に生息する霊長目テナガザル科の小型類人猿である。現生のテナガザルは染色体数の異なる *Nomascus* 属 (2n = 52), *Symphalangus* 属 (2n = 50), *Hylobates* 属 (2n = 44), *Hoolock* 属 (2n = 38) の 4 属の下に 15 から 20 種に分類されており [1, 2], IUCN のレッドデータリストでは絶滅危惧 IA 類 (CR) から絶滅危惧 II 類 (VU) に該当するとされている [3]。日本では動物園、研究機関において、およそ 150 個体のテナガザルが飼育されている。公益社団法人日本動物園水族館協会の種保存委員会 (現生物多様性委員会) が各飼育施設の協力のもと、全個体の情報を毎年調査し、テナガザル国内血統登録台帳を作成しており、飼育個体群維持のための繁殖計画や、飼育施設間の動物の移動などに利用している。

テナガザルは多くの種、亜種に分類されているが、他に比べて体サイズが大きいフクロテナガザル (*Symphalangus syndactylus*) を除くと、形態学的にはどれも似通っており、毛色と鳴き声が種、亜種の判別に重要な特徴となっている [4, 5]。しかし、同種内でも個体差がみられ、中間的な外見の個体がいるなど、必ずしも明確な判定基準とはなっておらず、海外の動物園においても登録情報に誤りがあることがしばしば報告されている [6-8]。テナガザルの寿命は長く、日本で飼育されている個体の中には数十年前に飼育施設へ導入されたものも多く、由来が明確でない場合が少なくない。そのような個体は、導入時に種名が登録されているものの、その真偽が不明な例も指摘されてきた。また、近年の分子系統学的研究により、亜種とされてきたものが種に変更されたり、新種が記載されるなど、テナガザルの分類体系が変化しており [1, 2, 9-11], 飼育施設への導入時の種登録情報が正しくても、現行の分類体系とは一致しない事態も想定され、遺伝学的情報に基づく登録情報の更新が急務であった。特に近年の大きな変更点としては、ミューラーテナガザル (*Hylobates muelleri*) の亜種とされていた 3

* 責任著者：石田貴文 (E-mail: tishida@bs.s.u-tokyo.ac.jp)

表 1 プライマー配列

プライマーセット	Forward プライマー	Reverse プライマー
A	5'-CCACGACCAATGATACGAAA-3'	5'-AAGGTGACTTTGTCCGGTTG-3'
B	5'-CCACGACCAATGATACGAAA-3'	5'-GTTTGATCCTGTTTCGTGTA-3'
C	5'-AATGATATGAAAAACCATCGTTGTA-3' ^{*1}	5'-GTTTGATCCTGTTTCGTGTA-3'
D	5'-AATGATATGAAAAACCATCGTTGTA-3' ^{*1}	5'-ATGAGGAGGAGGAGAAATAGTCCTAG-3'
E	5'-AATGATATGAAAAACCATCGTTGTA-3' ^{*1}	5'-GGGGTGAAGGTAATTTTGTG-3'
F	5'-AGTCTGAGGCGGCTATTTCAG-3'	5'-CGGCTTACAAGACCGGTGT-3'
G	5'-AGACAACGCCACACTCACAC-3'	5'-GTCCTTGGAAGGAGGTTTC-3'
H	5'-CACGCTTTTTCACCTTCCAT-3'	5'-CGGCTTACAAGACCGGTGT-3'
I	5'-GCCCTGCACCTTCTATTTCCT-3'	5'-CGGCTTACAAGACCGGTGT-3'

^{*1}参考文献 [9]。各個体について、プライマーセット A-I の内、いずれか 2 つを用いて cytb 遺伝子の 1,140 塩基対の配列を決定した。

つがそれぞれ種 [ミューラテナガザル (*Hylobates muelleri*), アボットハイイロテナガザル (*Hylobates abbotti*), キタハイイロテナガザル (ヒガシハイイロテナガザル) (*Hylobates funereus*)] に格上げされたこと [1, 9], ホオアカテナガザル (*Nomascus gabriellae*) が, ミナミホオアカテナガザル (*Nomascus gabriellae*) とキタホオアカテナガザル (*Nomascus annamensis*) に分けられたこと [11], ヒガシフーロックテナガザル (*Hoolock leuconedys*) の一部の集団が, 新種のカオリーフーロックテナガザル (スカイウォーカーフーロックテナガザル) (*Hoolock tianxing*) と記載されるようになったこと [2] があげられる。どの変更もミトコンドリア DNA (mtDNA) の分岐年代を主な根拠とするもので, どの種の問題 (species concept) を用いるかによって, これらを種, 亜種ないしは個体群のどれに分類するか議論の余地があるが, 本稿では IUCN の最新の分類 [3] に従い, 全 20 種とした。

テナガザルの飼育集団を今後維持していくためには, 定期的な繁殖による新規個体の創出が必要であるが [12], 種間, 属間で容易に交雑個体が生じてしまうテナガザルでは [13, 14], 正確な種 (または亜種) の判別が欠かせない。本研究では, 日本国内で飼育されているテナガザルの mtDNA の配列を調査することで, 各個体の (母系の) 種を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

本研究では, 国内の 44 の動物園・研究機関で飼育されているテナガザル科の雄 79 個体, 雌 74 個体, 合計 153 個体を対象として, 分子遺伝学的情報に基づいたテナガザルの種判定を行った。具体的には, 種, 亜種の基準となる参照 DNA 塩基配列の情報が最も充実している mtDNA の cytochrome b (cytb)

遺伝子, 1,140 塩基対について各個体の塩基配列を決定し, 参照配列との比較によって, 種判定を行った。

遺伝子試料は非侵襲性に優れた糞便を用いた。糞便の採取はエタノールとシリカビーズによる 2 ステップ法 [15] を用いた。多くの飼育施設について, 各施設に試料採取用の器材と採取方法の説明書を送付し, 各施設の協力者による採取後, 糞便試料を東京大学の研究室に返送する形で採取を行った。採取は 2011 年から 2013 年に実施し, 一部については, それ以前に施設から個別に提供を受けたものを用いた。得られた乾燥糞便の内, およそ 100mg を用いて, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, ドイツ) に一部改良を加えた方法 [11] で DNA 抽出を行った。また, 4 個体については本調査に先立って研究室で保有していた血液, 組織由来の DNA を用いた。

得られた DNA を鋳型とし, cytb 遺伝子の 1,140 塩基対について 2 領域に分けて PCR 増幅を行った。様々な種を対象に行ったため, 個体ごとに異なる複数のプライマーセットを用いた (表 1)。PCR 反応液は, AmpliTaqGold (Thermo Scientific, アメリカ) を 0.75U, PCR Buffer II for AmpliTaqGold を 1x, MgCl₂ を 2mM, dNTP を各 200μM, BSA を 4mg/mL, 各プライマーを 200nM の終濃度で調整し, DNA 溶液 2μL を加えて全量 25μL とした。94℃ 9 分の酵素活性化の後, 94℃ 30 秒の熱変性, 57℃ 30 秒のアニーリング, 72℃ 1 分の伸長反応を 40 回繰り返し, 最後に 72℃ 10 分の伸長反応を行った。アガロースゲル電気泳動によって PCR 増幅を確認後, 残りの PCR 産物を FavorPrep PCR Clean-Up Mini Kit (Favorgen, 台湾) によって精製した。サンガー法による塩基配列の決定は FASMAC (日本) に依頼した。

シーケンス波形は MEGA4 [16] または MEGA6 [17] によって確認し, 各個体の配列を確定した。これらの配列は

図 1 cytb 遺伝子 (1,140bp) による近隣結合系統樹の全体像と *Symphalangus* 属の詳細
A: 全体像。
B: *Symphalangus* 属。太字は今回認められたハプロタイプ, 細字は GenBank から得た参照配列をそれぞれ示す。() 内の数字は, 各ハプロタイプを保有していた個体数である。

GenBank から得た参照配列 (GenBank アクセッション番号: GU321245-GU321329, GU594996-GU595022) [9, 18] と合わせて, MEGA6 を用いて近隣結合系統樹 [19] を作成した。その際, 配列間の進化距離は p 距離を用いて計算し, 1,000 回のブートストラップ検定を行った。

結果

解析の結果、153 個体について cytb 遺伝子の配列を決定でき、全部で 58 のハプロタイプが検出され (図 1-3)、日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した (アクセッション番号: LC576757-LC576814)。各ハプロタイプは 1 個体のみに見られたものから、25 個体に見られたものまで幅があった。

系統樹上での参照配列との類似関係から種判定を行った結果、対象個体は *Hoodlock* 属以外の 3 属の内、いずれかであると判定された(図 1-3)。その内訳は、28 個体(9 ハプロタイプ、Jssyn01-09)がフクロテナガザル(図 1B)、3 個体(2 ハプロタイプ、Jnleu01-02)がキタホオジロテナガザル(*Nomascus leucogenys*)(図 2)、13 個体(7 ハプロタイプ、Jhpil01-07)がボウシテナガザル(*Hylobates pileatus*)(図 3)、77 個体(15 ハプロタイプ、Jhlar01-15)がシロテナガザル(*Hylobates lar*)(図 3)、8 個体(8 ハプロタイプ、Jhagi01-08)がアジル

テナガザル (*Hylobates agilis*) (図3), 4 個体 (4 ハプロタイプ, Jhalb01-04) がボルネオシロヒゲテナガザル (*Hylobates albibarbis*) (図3), 6 個体 (3 ハプロタイプ, Jhmmu01-03) がミューテナガザル (図3), 6 個体 (5 ハプロタイプ, Jhmab01-05) がアボットハイイロテナガザル (図3) であった。この内, アジルテナガザルの mtDNA は多系統性を示し, 8 個体中 4 個体が, シロテナガザルの mtDNA に似通った配列を示した (図3)。

これに加えて、4 個体 (3 ハプロタイプ, Jhybrid01-03) については、配列から母系の種は特定できたが (図 2, 3), 外見, 両親の情報から、種間交雑個体であると判定された。キタホオジロテナガザル × ミナミホオアカテナガザルの 2 個体 (Jhybrid01) については、雄 1 個体について mtDNA の配列がミナミホオアカテナガザルのものであった一方、外見はキタホオジロテナガザルのものであったため、種間交雑個体と判定され、同一の父母を持つと記録されていた妹についても、同様に種間交雑個体と判定された。キタホオジロテナガザル × シロテナガザルの 1 個体 (Jhybrid02) については、この個体の染色体を対象とした研究において、父母の組み合わせが推定されており [20], 今回の mtDNA による結果は、母がシロテナガザルであることを確認する形となった。アジロテナガザル

Nomascus

図2 cytb 遺伝子 (1,140bp) による近隣結合系統樹の *Nomascus* 属の詳細
太字は今回認められたハプロタイプ、細字は GenBank から得た参照配列をそれぞれ示す。() 内の数字は、各ハプロタイプを保有していた個体数である。灰色の網掛けは交雑個体の持っていたハプロタイプである。

Hylobates

図3 cytb 遺伝子 (1,140bp) による近隣結合系統樹の *Hylobates* 属の詳細
太字は今回認められたハプロタイプ、細字は GenBank から得た参照配列をそれぞれ示す。() 内の数字は、各ハプロタイプを保有していた個体数である。灰色の網掛けは交雑個体の持っていたハプロタイプである。

×ボルネオシロヒゲテナガザルの1個体 (Jhybrid03) については、mtDNA の配列がボルネオシロヒゲテナガザルのものであった一方、本調査によって父がアシルテナガザルと判定されたため、種間交雑個体と判定された。

また別の4個体にみられた3つのハプロタイプ

(Jhylobates01-03) は、分子系統樹において、*Hylobates* に属することが示唆されたが、これまでに報告されているどのテナガザルのハプロタイプともクラスターを形成しなかった。そのため、cytb 遺伝子に基づく種判定ができなかった (図3)。

考 察

テナガザルにおいて、参照配列が最も充実している cytb 遺伝子 [9, 18] について比較することで、多くの個体の（母系の）種を判定することができた。しかし、cytb 遺伝子の比較だけでは、種判定が困難な場合が存在した。ひとつは、多系統性を示したアジルテナガザルである。これまでに報告されていたアジルテナガザルの cytb 遺伝子配列は、ボルネオシロヒゲテナガザルの配列と姉妹群を形成するものであった [9]。本研究では、8 個体中 4 個体が、アジルテナガザルの参照配列よりもシロテナガザルの参照配列に似通った配列を持っており、系統樹上では、シロテナガザルのクラスターの中に位置する結果となった（図 3）。しかしながら、外見が明らかにアジルテナガザルであったこと、またスマトラ島のアジルテナガザルについて mtDNA の NADH dehydrogenase 4 遺伝子—NADH dehydrogenase 5 遺伝子の配列を調査した先行研究の結果 [21, 22]（配列は未公開）と矛盾しないものであったことから、アジルテナガザルと判定した。先行研究において多くの野生由来の個体がシロテナガザルの配列と類似の配列を保持していたこと [21, 22]、シロテナガザルの中でも特に分布が近接しているスマトラ島北部の亜種（*Hylobates lar vestitus*）とマレー半島南部の亜種（*Hylobates lar lar*）の cytb 配列のいずれかに最も類似していたことから、このグループの配列は、野生下での交雑を通じたシロテナガザルからアジルテナガザルへの mtDNA の遺伝子浸透に起因すると考えられた。日本国内で飼育されているテナガザルに限れば、今後問題となることは考えにくい、海外の動物園などでは、データの蓄積によって、全く同一の cytb 配列がアジルテナガザルとシロテナガザルで観察される可能性がある。この点を考えると、将来的には mtDNA だけでなく、核 DNA における種判定マーカーの開発が必要となると考えられた。

cytb 遺伝子の比較だけでは、種判定が困難であったもうひとつの場合は、これまで報告されている参照配列のいずれともクラスターを形成しなかった 4 個体（3 ハプロタイプ）である。cytb 遺伝子の系統樹上では、アジルテナガザルとボルネオシロヒゲテナガザルの配列の姉妹群となったが、この関係の信頼性を示すブートストラップ値は低く、分岐も深いため、これら 3 つのハプロタイプの系統学的位置づけは、はっきりしなかった。また毛色などからは、ミューテナガザル、アボットハイイロテナガザル、キタハイイロテナガザル、アジルテナガザル、ボルネオシロヒゲテナガザルのいずれかではないかと考えられたが、結論づけることは困難であった。分岐の深さを基に種を定義すると、これらの個体は未記載の新種ということになるが、実際には、上記に挙げたボルネオ島かスマトラ島のテナ

ガザルの一種が、mtDNA において多系統性を維持しているものと推察される。これらの個体の種判定については、（1）比較対象となる、由来が明確なボルネオ島とスマトラ島のテナガザルの mtDNA 配列を多数決定すること、または（2）これらの個体の核 DNA のゲノムワイド解析を *Hylobates* 属の各種とともに実施することで解決すると期待される。また、観察された 3 つのハプロタイプの mtDNA の系統樹上の位置は、mtDNA の全長を決定し、系統解析を行うことで、明確になると考えられる。

登録されている母仔関係に反して、cytb 遺伝子のハプロタイプが共有されていない組み合わせが 2 件認められた。ボウシテナガザルでみられた 1 件については、母仔の配列の差異が 1,140 塩基の内、1 塩基の置換と小さかったこと、加えて、この仔は誕生以来母親と同居しており、過去にこの動物園で同種の他の雌が飼育されていた記録はなく、取り違え等による個体識別の誤りの可能性がなかったことから、ハプロタイプの違いは、突然変異に由来すると考えられた。シロテナガザルでみられたもう 1 件については、配列の差異が 8 塩基の置換と大きく異なり、上記のような母親の生殖系列の細胞における突然変異では説明できない。そのため、対象個体の動物園間の移動等に伴う取り違えに起因すると考えられた。飼育下の個体を維持していくためには、正しい種判定に基づく繁殖だけでなく、遺伝的多様性を消失させないような雌雄の組み合わせでの繁殖も重要である。これには、血縁関係を正確に把握することが必要で、核 DNA による詳細な血縁解析が望まれるが、今回の調査のように mtDNA の一部の配列だけでも、血縁関係を簡略に把握するのに有用であることが示された。

本研究で cytb 遺伝子の塩基配列を決定した 153 個体以外に、試料採取が困難等の要因で、塩基配列情報が得られなかった 14 個体が登録台帳に残された。それらのうち 10 個体は、親子・兄弟姉妹の血統登録情報と塩基配列情報を基に、ボウシテナガザル 1 個体、シロテナガザル 7 個体、ミューテナガザル 1 個体、交雑個体 1 個体（アジルテナガザル × ボルネオシロヒゲテナガザル）と判定された。残りのフクロテナガザル 4 個体については、形態学的に種判別が可能であったことから、それまでの登録情報を採用した（表 2）。

本調査によって、日本国内で飼育されているテナガザル 167 個体について種の登録情報が整備され、今後の日本国内の飼育テナガザルの管理に有用な情報が得られた。登録情報の改訂はボルネオ島、スマトラ島に生息する *Hylobates* 属の種において多くみられ、従来アジルテナガザルまたはワウワテナガザル（ジャワテナガザル）と登録されていた個体の多くが、ボルネオ島の別の種へと登録変更された。これは、これらの個体の外見が互いに似通っており、外見からの判断が容易でないこと、

表2 種判定の結果

種	判定前個体数 ^{*1}	判定後の個体数	cytb による判定未実施個体数 ^{*2}
<i>Symphalangus syndactylus</i> フクロテナガザル	28	28	4
<i>Nomascus leucogenys</i> キタホオジロテナガザル	3	3	0
<i>Hylobates pileatus</i> ボウシテナガザル	13	13	1
<i>Hylobates lar</i> シロテナガザル	77	77	7
<i>Hylobates agilis</i> アジルテナガザル	21	8	0
<i>Hylobates albibarbis</i> ボルネオシロヒゲテナガザル	0	4	0
<i>Hylobates muelleri</i> ミュラーテナガザル	1	6	1
<i>Hylobates abbotti</i> アボットハイイロテナガザル	0	6	0
<i>Hylobates moloch</i> ワウワウテナガザル (ジャワテナガザル)	5	0	0
<i>Hylobates klossii</i> クロステナガザル	1	0	0
種間雑種 ^{*3}	4	4	1
判定不可 ^{*4}	0	4	0
計	153	153	14

^{*1} cytb 遺伝子の塩基配列から種判定を実施した個体数である。

^{*2} cytb 遺伝子の塩基配列が得られず、他個体との血縁関係、または外見を基に種判定を実施した個体数である。

^{*3} キタホオジロテナガザル×ミナミホオアカテナガザル、キタホオジロテナガザル×シロテナガザル、アジルテナガザル×ボルネオシロヒゲテナガザルの種間雑種を含む。

^{*4} cytb 遺伝子の塩基配列は決定されたが、参照配列に類似のものがなかった個体数である。外見からアジルテナガザル、ボルネオシロヒゲテナガザル、ミュラーテナガザル、アボットハイイロテナガザル、キタハイイロテナガザルのいずれかと考えられる。

Hylobates 属の中では特にボルネオ島の分類群に大きな改訂がなされたことによる。改訂された登録情報に基づく、フクロテナガザル、シロテナガザル、ボウシテナガザルについては個体数も多く、mtDNA の遺伝的多様性も確保されていることから、継続的な繁殖によって飼育個体群を維持していくことが可能であると期待される。一方、他の種については、日本国内だけでの飼育個体群の維持は困難である。海外の動物園では、限られた飼育リソースの中で飼育個体群を維持する為に、飼育個体群維持への貢献可能性に基づいて飼育個体を選別することも議論されているが [12]、動物福祉の観点から、できるだけ同種の個体を集めて飼育する、更なる交雑が生じないように考慮した上で異種であっても同居させるなど、今後の飼育方法の改善に、本研究に基づく登録情報の改訂が利用されると期待される。

謝 辞

本研究は公益社団法人日本動物園水族館協会の種保存委員会（現生物多様性委員会）の「DNA を用いたテナガザルの種・亜種判定事業」（2011 年度、2012 年度）として実施した。事業への賛同、試料採取・情報提供に協力いただいた釧路市動物園、旭川市旭山動物園、札幌市円山動物園、仙台市八木山動物公園、日立市かみね動物園、那須ワールドモンキーパーク、宇都宮動

物園、東武動物公園、草津熱帯園、千葉市動物公園、市川市動物園、東京都恩賜上野動物園、東京都多摩動物公園、羽村市動物公園、横浜市立金沢動物園、横浜市立よこはま動物園、小諸市動物園、飯田市立動物園、甲府市遊亀公園附属動物園、三島市立公園楽寿園、伊豆シャボテン動物公園、浜松市動物園、豊橋総合動植物公園、日本モンキーセンター、名古屋市東山動物園、いしかわ動物園、鯖江市西山動物園、京都市動物園、福知山市動物園、大阪市天王寺動物公園事務所、神戸市立王子動物園、株式会社池田動物園、福山市立動物園、宇部市ときわ動物園、高知県立のいち動物公園、愛媛県立とべ動物園、到津の森公園、福岡市動物園、別府ラクテンチ、西海国立公園九十九島動植物園、宮崎市フェニックス自然動物園、鹿児島市平川動物公園、京都大学霊長類研究所、大阪大学大学院（人間科学研究科・生物人類学研究分野）の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Roos C. 2016. Phylogeny and classification of gibbons (*Hylobatidae*). In *Evolution of Gibbons and Siamang* (Reichard UH, Hirai H, Barelli C eds.), pp. 151-164. Springer, New York.
2. Fan P-F, He K, Chen X, Ortiz A, Zhang B, Zhao C, Li Y-Q, Zhang H-B, Kimock C, Wang W-Z, Groves C, Turvey ST, Roos C, Helgen KM, Jiang X-L. 2017. Description of a new

- species of *Hoolock* gibbon (Primates: Hylobatidae) based on integrative taxonomy. *Am J Primatol* 79: e22631.
3. IUCN. 2020. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2020-2. www.iucnredlist.org
 4. Geissmann T. 1995. Gibbon systematics and species identification. *Int Zoo News* 42: 467-501.
 5. Mootnick AR. 2006. Gibbon (Hylobatidae) species identification recommended for rescue or breeding centers. *Primate Conserv* 21: 103-138.
 6. Mootnick A. 1984. Census of gibbons in north America. In *The Lesser Apes* (Preuschoft H, Chivers DJ, Brockelman WY, Creel N eds.), pp. 61-73. Edinburgh University Press, Edinburgh.
 7. Schilling D. 1984. Gibbons in European zoos. In *The Lesser Apes* (Preuschoft H, Chivers DJ, Brockelman WY, Creel N eds.), pp. 51-60. Edinburgh University Press, Edinburgh.
 8. Chen H-C, Geissmann T, Chen P-C. 2004. A survey of the taxonomic status of captive gibbons in Taiwan. *Raffles B Zool* 52: 265-269.
 9. Thinh VN, Mootnick AR, Geissmann T, Li M, Ziegler T, Agil M, Moisson P, Nadler T, Walter L, Roos C. 2010. Mitochondrial evidence for multiple radiations in the evolutionary history of small apes. *BMC Evol Biol* 10: 74.
 10. Thinh VN, Hallam C, Roos C, Hammerschmidt K. 2011. Concordance between vocal and genetic diversity in crested gibbons. *BMC Evol Biol* 11: 36.
 11. Thinh VN, Mootnick R, Thanh VN, Nadler T, Roos C. 2010. A new species of crested gibbon, from the central Annamite mountain range. *Vietnamese J Primatol* 4: 1-12.
 12. Melfi VA. 2012. *Ex situ* gibbon conservation: status, management and birth sex ratios. *Int Zoo Yb* 46: 1-11.
 13. Myers RH, Shafer DA. 1979. Hybrid ape offspring of a mating of gibbon and siamang. *Science* 205: 308-310.
 14. Brockelman WY, Gittins SP. 1984. Natural hybridization in the *Hylobates lar* species group: implications for speciation in gibbons. In *The lesser apes* (Preuschoft H, Chivers DJ, Brockelman WY, Creel N eds.), pp. 498-532. Edinburgh University Press, Edinburgh.
 15. Nsubuga AM, Robbins MM, Roeder AD, Morin PA, Boesch C, Vigilant L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol Ecol* 13: 2089-2094.
 16. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2004. MEGA4: evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
 17. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
 18. Thinh VN, Rawson B, Hallam C, Kenyon M, Nadler T, Walter L, Roos C. 2010. Phylogeny and distribution of crested gibbons (genus *Nomascus*) based on mitochondrial cytochrome b gene sequence data. *Am J Primatol* 72: 1047-1054.
 19. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
 20. Hirai H, Hirai Y, Domae H, Krihara Y. 2007. A most distant intergeneric hybrid offspring (Larcon) of lesser apes, *Nomascus leucogenys* and *Hylobates lar*. *Hum Genet* 122: 477-483.
 21. 田中洋之. 2007. テナガザル亜種・種分化の分子系統分析. 霊長類進化の科学 (京都大学霊長類研究所 編), pp. 450-464. 京都大学学術出版会, 京都.
 22. Hirai H, Hayano A, Tanaka H, Mootnick AR, Wijayanto H, Perwitasari-Farajallah D. 2009. Genetic differentiation of agile gibbons between Sumatra and Kalimantan in Indonesia. In *The Gibbons* (Lappan S, Whittaker DJ, eds.), pp.37-49. Springer, New York.

Species Identification of Captive Gibbons in Japan by Using Mitochondrial DNA (cytochrome b) Sequences

Kazunari MATSUDAIRA^{1,2)}, Yoichi MAEDA³⁾, Naoko SHIDEHARA¹⁾ and Takafumi ISHIDA^{1)*}

1) Graduate School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

2) Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

3) Tobe Zoological Park of Ehime Prefecture, 240 Kamiharamachi, Tobe, Iyo District, Ehime 791-2191, Japan

(Received 1 November 2021; accepted 13 March 2021)

ABSTRACT

The gibbons inhabiting Southeast Asia and its vicinity are classified into about 20 species. In Japan, gibbons reared in zoos and research institutes are registered in the studbook managed by the Japanese Association of Zoos and Aquariums. Species identification based mainly on the phenotypic traits and recent major taxonomic changes required updates of the registration information. This study aimed to identify species of those gibbons using genetic information that grants objective identification and to update the registration information. Specifically, we determined the cytochrome b gene sequence (1,140 base pairs) of mitochondrial DNA for 153 gibbon individuals and identified their species by referring to the registered sequences of each gibbon species. Sequence information was unavailable to 14 individuals whose species were then identified based on their kin relationship to the 153 individuals mentioned above (10 individuals) or the genus-specific traits (four *Symphalangus* individuals). As a result, the species identities of several Bornean and Sumatran *Hylobates* individuals were updated. Among 153 gibbons with sequence data, four *Hylobates* individuals were unspecified due to the lack of the relevant reference sequences. In conclusion, in Japan, 1) the captive populations of *Symphalangus syndactylus*, *Hylobates lar*, and *Hylobates pileatus* can be maintained in the future, 2) the small population size for the remaining species will limit their survival, and 3) the present updated registration information will contribute to the future breeding management.

Key words: conservation, cytochrome b, gibbons, species identification

— *Jpn J Zoo Wildl Med* 26(2) : 35-42, 2021

* Corresponding author : Takafumi ISHIDA (E-mail: tishida@bs.s.u-tokyo.ac.jp)