原 著

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生種の比較

毛利俊雄¹⁾・吾妻 健²⁾・石上盛敏²⁾・川本 芳¹⁾

1) 京都大学霊長類研究所

2) 高知医科大学環境保健学教室

はじめに

近年、人類学を中心に考古学の分析に遺伝子解析の技法を導入した研究が展開されるようになった(例えば, Pääbo *et al.*, 1988 ; Horai *et al.*, 1991 ; Oota *et al.*, 1995 ; Krings *et al.*, 1997)。こうした研究では、可変性の高いミトコンドリアDNAの特定領域の塩基配列比較がおこなわれることが多く、現存する遺伝子との比較により、系統や起源の問題が議論されている。ヒト以外の霊長類を対象にした研究では、現存する種内や近縁種間にみられる遺伝子変異の研究も十分におこなわれていないために、分子考古学的解析は進んでいないのが現状である。

今回、われわれは沖縄県首里城から出土したマカク古骨について、ミトコンドリアDNA変異を用いて種判別を試みた。先史、歴史時代をつうじてヒト以外の霊長類の生息が知られていない沖縄県から出土したサルの骨格がミトコンドリアDNAの抽出・分析によってヤクシマザル *Macaca fuscata yakui* と同定できたので報告する。

出土骨の概要

骨は1999年に沖縄県教育庁文化課によって実施された首里城跡南側斜面部発掘調査において、管理用道路地区から出土した。年代は、調査地点

が琉球大学跡地で攪乱をうけているため明確ではないが、共伴する陶磁器類から16~17世紀前後と捉えられている。

出土骨はほとんどクリーム色を呈し、焼かれた形跡や顕著なカットマーク、切削痕などは観察されない。残っている骨はしっかりしているが、いずれも破片か、または欠けたところがある骨で、完全な骨は含まれていない。サルのほかにイヌ *Canis familiaris*, ウマ *Equus caballus*, ブタ *Sus domesticus*, ニホンジカ *Cervus nippon*, ヤギ *Capra aegagrus*, 鳥類(ニワトリ *Gallus gallus* 程度の大きさ)などが出土している。

サルの骨は2個体によって由来すると推定される。

10歳前後の成体メス(個体A)によって由来するとおもわれる骨は胸椎4片、腰椎2片、仙骨(第1仙椎の頭側半)、肋骨14片(すべて長さ3センチ未満の破片)、右上顎骨、下顎骨、(以下、すべて左右)上腕骨、尺骨、橈骨、大腿骨、脛骨、腓骨の合計35片である。歯は、右上顎骨の破片に植立する犬歯から第2大臼歯までの5本、下顎骨に植立する左側大臼歯3本と右側第4小臼歯・第1大臼歯の5本、合計10本と下顎右第2大臼歯の近心歯根が残っている。

別の個体(個体B)によって由来する左右の尺骨がある。左右とも近位端をふくむ長さ5センチ程度の破片である。肘頭の骨端が未癒合なので、未成熟

個体由来であるが、個体 A の尺骨よりやや大きい。個体 B が個体 A と同一種であるとすれば、5～6歳のオスと推定される。

個体 A の歯の萌出時期と咬耗の関係をみると、野生ザルより飼育ザルのものに類似している。そこで年齢推定は、飼育ザルの歯の咬耗との比較によっておこなった。

個体 A の残存部位は全身にわたっているのもので、埋葬され、その後攪乱をうけたものと解釈することも可能である。ただし、かなり細かな肋骨の破片が出土しているのに、手・足・尾の骨がまったく出土していないのは多少不自然な印象である。

個体 B は、フック状の特異な形態をしめす尺骨近位部が、左右そろって、ほぼ同じ大きさの破片として、しかも他の部位をまったく伴わずに残っていることに強い人為を感じさせられるが、いっぽうで、割れ目は左右とも、白骨化の後に折れた状態で、とくに人為を示唆していない。

形態から確実に種を同定することはかなり困難である。大臼歯のバイロフォドンティ（二稜歯性）からオナガザル科（旧世界ザル）であることがわかる。また、大臼歯の咬頭が高くないのでコロブス亜科は排除され、オナガザル亜科である。地理的に遠いアフリカのオナガザル亜科の可能性を排除するとマカカ属のサルがのこる。ところが、マカカ属は 19 種（Fooden, 1980）と種数が多く、いくつかの種はサイズのちがいによって排除できるものの、積極的な種の同定はやはり困難である。

材料と方法

出土骨の遺伝子分析

(1) DNA の抽出

分析に供した出土骨試料は、10 歳前後の成体メス（個体 A）である。まず、右下肢骨をミニドリルで削り骨粉にした。削った骨粉は 0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液にて、暗所室温下、7～8 日間震盪し、その間、2～3 回 EDTA 溶液を交換した。その後、遠心（3,000 rpm, 10 分間）により上清を除き、さらにプロテネース K を含む溶液（0.5 M EDTA 5 ml, 10 % ラウリルサルコシル 300 μ l, 50 mg/ml プロテネース K 100 μ l）

を加え 37℃で 1 昼夜から 2 昼夜インキュベートした。その後遠心（3,000 rpm, 10 分間）により得られた上清を等量の中性フェノール（pH 7.8）で 2 回、クロロホルムで 1 回処理し、3,000 rpm, 10 分間遠心後、セントリコン（Centricon concentrators 30, Amicon 社）にて、3,000 rpm で 30～60 分間遠心を繰り返し（3～5 回）、EDTA を除去した。最終的にカラムから約 100 μ l の DNA 溶液を回収した。再現性の確認のため、同様の操作を 2 回行ない、2 つの独立した DNA 溶液を template として PCR 増幅に用いた。

(2) PCR 反応液

PCR 反応液は以下に示した。

反 応 液

template	1.00 μ l
3.5U/ μ l Taq DNA Polymerase	0.25 μ l
Expand HF buffer, 10 $\times$ 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

(3) PCR 増幅に用いたプライマー

ミトコンドリア DNA D-loop の可変域 242 bp を増幅するためにプライマーを設計した。使用したプライマーおよび PCR 増幅の条件は以下に示した。プライマーの位置は図 1 に示した。増幅にはサーマルサイクラー Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 を使用した。なお、PCR 産物の精製はスピнкаラム 300 (MicroSpin™ S-300 HR Column ; Amersham Pharmacia Biotech 社製)でおこなった。

使用したプライマー

mdl-L(forward):

5'-ATCACGGGTCTATCACCTA-3'

mdl-79(forward):

5'-GCACGCAACCCCATTCAGT-3'

図1 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 増幅のために設計されたプライマーの位置。プライマーの設計に際しては、Hayasaka *et al.* (1991) の報告したニホンザル Type I の配列 (本図に示した塩基配列) を参考にした。なお、図中の塩基番号はヒトのミトコンドリア遺伝子の 16,564 番目の塩基に相同な塩基を 1 番目にした場合の塩基部位を示す。また、プライマー名に含まれる数値は、プライミングサイトの起点に相当する塩基番号を表している。

mdl-99(forward):

5'-TATGCTGACTCCCACCACAT-3'

mdl-161(forward):

5'-TCGCACCTACGTTCAATATT-3'

mdl-244(backward):

5'-AAGCATGAATTAAATAACAC-3'

mdl-341(backward):

5'-GTTTGGATGAAGGTCGGAGA-3'

mdl-350(backward):

5'-CAAGAGTGGGTTTGGATGAA-3'

mdl-393(backward):

5'-GGCTCCGACTGGATATGTTA-3'

PCR 増幅の条件

Initial denaturation	94 °C 60 秒間
PCR サイクル	40 回
Denaturation	94 °C 30 秒間
Annealing	50 °C 30 秒間
Extension	72 °C 60 秒間

現存種の遺伝子分析

形態特徴から、出土骨はマカカ属のサルであることが明らかであった。沖縄周辺地域では、日本列島にニホンザル、中国およびインドシナ半島にアカゲザル、台湾にタイワンザル、インドシナ半島、マレー半島、フィリピン、インドネシアの島嶼部にカニクイザルが現在分布している。これらのサルは、いずれも Fooden (1976) によって 4 つに分類されたマカカ属の species group のうちの *fascicularis* group の構成種である。首里城のサルは、これらの種のいずれかであろうと予想をたて、現存種について遺伝子分析をおこなった。比較のために、ニホンザル *M. fuscata* (ホンダザル *M. f. fuscata* とヤクシマザル *M. f. yakui*)、アカゲザル *M. mulatta* (中国、ラオス、インド)、タイワンザル *M. cyclopis*、カニクイザル *M. fascicularis* (フィリピン、インドネシア) について、ミトコンドリア DNA D-loop の相同部位の塩基配列を決定した。血液から調製したゲノム DNA を試料として、Hayasaka *et al.* (1991) に

準じて PCR による増幅をおこない、上記の mdl-99, mdl-341 のプライマーを用いてダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。

結果と考察

出土骨の遺伝子分析

はじめに、従来の D-loop 増幅 (242bp) のためにデザインした 2 組のプライマー, mdl-L/mdl-393 (1st PCR) および mdl-99/mdl-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 mdl-79/mdl-244 (1st PCR) および mdl-99/mdl-244 (seminested 2nd PCR)、後半部は mdl-161/mdl-350 (1st PCR) および mdl-161/mdl-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) のバンドが増幅できた (図2)。

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ンメントしたところ、200bp および 239bp の塩基配列が得られた。これらのうち 200bp の配列を現存種について得た配列とアラインメントしたところ、図3に示したように、出土骨由来の DNA サンプルはヤクシマザルの配列と完全に一致した。

現存種の遺伝子分析

出土骨との比較のためにおこなったマカカ属 4 種のミトコンドリア DNA D-loop 領域の塩基配列決定では、塩基置換にくわえて、塩基の挿入・欠失を含む突然変異領域が 4 箇所検出できた (図3の矢印 A ~ D)。

ニホンザルの場合、ホンダザルとヤクシマザルの間で 1 塩基 (T) の挿入・欠失の違いが認められ (図3の矢印 B)、ヤクシマザルで D-loop の全長が 1 塩基大きかった。なお、ヤクシマザルと同じ塩基が同じ部位に挿入されている例がインド由来のアカゲザルで認められた。しかし、ニホンザル同様にアカゲザル種内でもこの挿入変異は多型

図2 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。サンプル 1 と 2 はふたつの独立した DNA 試料溶液を意味する。M: マーカー, L: サンプル, C: マイナスコントロール

(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 ではこれらの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 3 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。

Shuri	1	CGTCCTGAATGCGCCTGTCTTTGATTCTAGTACATGCAGTTGTTGATCGCACCTACGTT	60
M.f.y.	1		60
M.f.f.(Kohjima)	1		60
M.c.	1	T.....	60
M.m.(China)	1	T.....	60
M.m.(Laos)	1		60
M.m.(India)	1	T.....	60
M.fas.(J)	1	A.....	60
M.fas.(Pk)	1	A..A.....	60
M.fas.(T)	1	A..A..A.....	60
M.fas.(Ph A)	1	A..A..A.....	60
M.fas.(Ph B)	1	A..A..A.....	60
M.fas.(Ph C)	1	A..A..A.....	60
M.fas.(Ph D)	1	A..A..A.....	60
M.fas.(Ph E)	1	A..A..A.....	60
M.fas.(Ph F)	1	A..A..A.....	60

Shuri	61	CAATATTCTAGCTCCACGCAAACTTCAGCAAGGTGTTATTTAATTCATGCTTGTAGGACA	120
M.f.y.	61		120
M.f.f.(Kohjima)	61		120
M.c.	61	A.G...CCT.A.....C.....A.....	120
M.m.(China)	61	C.T.....	120
M.m.(Laos)	61	T.....	120
M.m.(India)	61	T.....	120
M.fas.(J)	61	A...C.T...G.....	120
M.fas.(Pk)	61	C.T...G.....C.....	120
M.fas.(T)	61	C.T...G..AC.....C.....	120
M.fas.(Ph A)	61	C.T...G.....C.....	120
M.fas.(Ph B)	61	C.T...G.....C.....	120
M.fas.(Ph C)	61	T.....C.T...G.....C.....	120
M.fas.(Ph D)	61	C.T...G.....C.....	120
M.fas.(Ph E)	61	C.T...G.....C.....	120
M.fas.(Ph F)	61	C.T...G.....C.....	120

Shuri	121	TATTAATAACCATCCTAGTCAA-TATCGCTCACACTACATCGTCAACCACTAACC GTATC	179
M.f.y.	121		179
M.f.f.(Kohjima)	121	...C.....C.....A.C.....C.A.T.....	178
M.c.	121	...C.....T.T.....C.....A.C.....C..C.ACT.....-C.....G..	178
M.m.(China)	121	...CC.....CT.C.AC.....-C.....C.ACT.....-C.....G..	169
M.m.(Laos)	121	...T.C.AC.....-C...A.C.....C...C.A.T.....-G..	178
M.m.(India)	121	...CC.....T.....C.C.G.---C.....C.AC...T.....	175
M.fas.(J)	121	...C.G...T.G..T.AC..GG..C.AT.TC...C.GC.AAT..A.CAC...A..C.	180
M.fas.(Pk)	121	...CC.....T.G..TC.AC...G..C.AT..T...C...C.AAT..A.CA...A..C.	180
M.fas.(T)	121	...CC.....T.G..T...C..GA..C.AT..C...C...C.AAT..A.CAC...A..C.	180
M.fas.(Ph A)	121	...C.....T.G..T..AC...G..C.AT..TT..C.GC.AAT..A.CAC...A..C.	180
M.fas.(Ph B)	121	...C.....T.G..T..AC...A..C.AT..T...C.GC.AAT..A.CAC...A..C.	180
M.fas.(Ph C)	121	...C.....T.G.GT..AC...A..C.AT..TA..C.GC.AAT..A.CAC...A..C.	180
M.fas.(Ph D)	121	...CC.....T...TC.AC...G..C.AT..T...C.GC.AAT..A.CACG...A..C.	180
M.fas.(Ph E)	121	...C.....T...T..AC...G..C.AT..T...C.GC.AAT..A.CAC...A..	180
M.fas.(Ph F)	121	...C.....T...T..AC...G..C.AT..C...C.GC.AAT..A.CAC...A..	180

Shuri	180	TTATCAAACCCCCC-ACCCCC-	200
M.f.y.	180		200
M.f.f.(Kohjima)	179		199
M.c.	179		199
M.m.(China)	170		190
M.m.(Laos)	179		199
M.m.(India)	176		196
M.fas.(J)	181	C	202
M.fas.(Pk)	181	C	201
M.fas.(T)	181	C	202
M.fas.(Ph A)	181	C	201
M.fas.(Ph B)	181	C	201
M.fas.(Ph C)	181	C	201
M.fas.(Ph D)	181	C	201
M.fas.(Ph E)	181	C	201
M.fas.(Ph F)	181	C	201

図3 首里城から出土した *Macaca* 属サル の右下肢骨におけるミトコンドリア DNA の D-loop 領域の PCR 増幅により得られた塩基配列アラインメント。アラインメントは Clustal V (Higgins *et al.*, 1991) を用いて求めた。Shuri: 首里城出土サル, M. f. y.: ヤクシマザル, M. f. f. (Kohjima): 宮崎県幸島のホンダザル, M. c.: タイワンザル (京都大学霊長類研究所の飼育個体), M. m. (China): 中国由来のアカゲザル (京都大学霊長類研究所の飼育個体), M. m. (Laos): ラオスのアカゲザル, M. m. (India): インド由来のアカゲザル (京都大学霊長類研究所の飼育個体), M. fas. (J): インドネシアのジャワ島 Jatibarang のカニクイザル, M. fas. (Pk): インドネシア領ボルネオ島 (カリマンタン) Pangkalanbun のカニクイザル, M. fas. (T): インドネシアのスマトラ島南部のタブアン (Tabuan) 島のカニクイザル, M. fas. (Ph A~F): フィリピン諸島のカニクイザル。本図では、塩基の置換部位のみを示した。また、矢印で挿入・欠失変異のある 4 箇所 (A~D) を示し、欠失部位はハイフン記号 (-) で表した。なお、本配列は、図 1 に示した配列の 3 行目冒頭から 6 行目前半の部分に相当する。

的で、ラオスと中国由来のアカゲザルでは欠失していた。

アカゲザルの場合、複数の塩基が関係する複雑な挿入・欠失変異領域が認められた(図3の矢印A)。ニホンザル同様にアカゲザルでもすべての地域でこの領域の初めの部分に1塩基の欠失がある。一方、比較した3地域由来の試料のうち、ラオス由来のものは、この欠失部分のうしろに欠失がないのにたいし、中国由来のものではさらに9塩基が連続して欠失し、インド由来のものでは断続的に合計4塩基(3塩基と1塩基の部分に分かれる)が欠失していた(図3の矢印A)。

タイワンザルの場合、ニホンザル種内のホンダザルがもつ挿入・欠失特性と同様の特徴を示した。

カニクイザルの場合、上記の各種とは異なる挿入・欠失変異が認められた。第1は他種にないAないしGの挿入箇所である(図3矢印Aのはじめの部分)。第2と第3の箇所は、比較した配列の最下流部に位置するCの反復配列の中にあり、いずれも conserved sequence block (Walberg & Clayton, 1981; Hayasaka *et al.*, 1991) の構成配列である(図3の矢印CとD)。この部分の挿入・欠失変異は、カニクイザルの種内で地域的な違いがある。反復部分の基本構造は第2箇所(Cm) + A + 第3箇所(Cn) [ただし、mとnはCの反復回数を表す] で、ボルネオ島やフィリピン諸島のカニクイザルでは m=7 n=5 なのに対して、ジャワ島のカニクイザルでは m=7 n=6、スマトラ島南部洋上に位置するタブアン島のカニクイザルでは m=8 n=5 の個体がみつけた。なお、カニクイザル以外のサルでは、いずれも m=7 n=5 でボルネオやフィリピンのカニクイザルと同じであった。また、ヤクシマザルとインドのアカゲザルだけに認めたTの挿入部分(図3の矢印B)にはカニクイザルすべてで塩基挿入があり、ボルネオ島がTなのに対して、ほかはCで多型的であった。

首里城出土のサルは、塩基の挿入・欠失部位においても、完全にヤクシマザルの配列と一致していた。従って、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

えられる。

塩基の挿入・欠失部位を除いて、相同と判定できたD-loop領域190塩基長にみられる塩基置換から、遺伝子の構造類似性をもとにニホンザル、タイワンザル、アカゲザル、カニクイザルの関係をみた結果を図4に示す。塩基置換サイトは190塩基中に45サイトあり、短い配列にもかかわらず情報量が多い。図4の結果では、タイワンザルとアカゲザルは分離できないものの、塩基置換だけからでもニホンザル、カニクイザル、タイワンザル/アカゲザルの3グループが区別できた。

図4 比較したD-loop領域の相同部位の配列(挿入・欠失部位は除いた190塩基の配列)からNJ法で描いた各種マカクの配列類似性。PHYMLIP (Felsenstein, 1993)により、クラスタリングならびにbootstrap値(100 replicates)の計算をおこなった。斜体の数字はbootstrap値を示す。塩基置換数の推定は2パラメータ法を用い、transitionとtransversionの比は観察データから、20.5:1と仮定した。図中の集団名については図3の説明を参照。

今後の展望

ミトコンドリア DNA の D-loop 領域は突然変異を蓄積しやすいため、種間および種内の近縁な個体群の系統評価に有用な分子標識として利用されている。今回の研究により、マカカ属のサルにおいても、種の判別に有用な変異がこの分子に蓄積していることが明らかになった。4 種の比較では、塩基の単なる置換だけでなく、挿入・欠失タイプの変異がこの部分にかなり存在し、特定の部位にある塩基の挿入や欠失だけでもマカカ属の種の違いを判定できることがわかった。さらに、これらの挿入・欠失タイプの変異には、種内の地域差を反映する例が、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルで観察された。こうした変異に関して種内の分布状況を今後の調査で明らかにできれば、サルを対象にした分子系統学、分子生態学はもとより、分子考古学の研究を進めるうえでも有益と考えられる。

今回の出土骨は、過去においても現在においてもサルの自然分布の証拠がない沖縄から発見されたものだった。状況証拠から考えて、人為的に外部から持ち込まれたサルの遺骸と推察できたが、その来歴を問うには、形態情報にくわえて遺伝子分析からの情報が有用だった。今後、有史以来のヒトとサルの交渉史を探るうえで、こうした遺伝子分析技術を利用した考古学的研究は新しい知見とヴィジョンをもたらし、霊長類学の新局面の開拓に貢献するものと考えている。また、古骨や化石からの遺伝子情報を適正に評価するためには、現生霊長類の遺伝子特性を種内の地域間や、種間で調査することがきわめて重要であることを強調したい。

謝 辞

本研究の骨試料分析においては、名古屋大学文学部渡辺誠教授、沖縄県教育庁文化課盛本勲氏に多大のご協力を賜りました。謹んで感謝申し上げます。

本研究は、文部省科学研究費補助金（基盤研究 B「後氷期におけるニホンザルの成立過程の総合的研究」課題番号 11440249 代表者：茂原信生

および基盤研究 A「ヤクニホンザルの実験動物化」課題番号 09358017 代表者：庄武孝義）の援助を受けました。

引用文献

- Felsenstein J 1993 : PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fooden J 1976 : Provisional classification and key to living species of macaques (Primates: *Macaca*). *Folia Primat.* 25: 225-236.
- Fooden J 1980 : Classification and distribution of living macaques (*Macaca* Lacépède, 1799). In Lindburg DG (ed) : *The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp.1-9.
- Hayasaka K, Ishida T, Horai S 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.
- Higgins D G, Bleasby A J, Fuchs R 1991 : CLUSTA L V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* 8: 189-191.
- Horai S, Kondo R, Murayama K, Hayashi S, Koike H, Nakai N 1991 : Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 333: 409-417.
- Krings M, Geisert H, Schmitz R W, Krainitzki H, Pääbo S 1997 : DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5581-5585.
- Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S 1995 . A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98 : 133-145.
- Pääbo S, Gifford J A, Wilson AC 1988 : Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.* 16 : 9775-9787.
- Walberg M W, Clayton D A 1981 : Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 9: 5411-5421.

(Summary)

Species Identification by Mitochondrial DNA: A Case Study of Macaque Remains from Shuri Castle, Okinawa

Toshio MOURI¹⁾, Takeshi AGATSUMA²⁾, Moritoshi IWAGAMI²⁾
and Yoshi KAWAMOTO¹⁾

1) *Primate Research Institute, Kyoto University*

2) *Department of Environmental Health Science, Kochi Medical School*

We report a species identification by mitochondrial DNA of a partial macaque skeleton excavated from Shuri Castle, Okinawa, the estimated age of which is around the 16th or 17th century AD. Species identification by gross morphology was not possible because of the following reasons; sufficient parts are not preserved, no natural distribution of non-human primates including macaque is recorded in the Ryukyu islands, and the genus *Macaca* is highly speciose. DNA amplification of D-loop variable region (ca 200 bp) was first unsuccessful with the use of previously devised sets of primers which encompass the whole region, and is accomplished by using newly devised sets of primers, each of which is designed for anterior or posterior portion of the targeted region. Sequenced DNA of the Shuri macaque completely agrees with a sequence of Yaku macaques (*Macaca fuscata yakui*). For the

comparison with or species identification of Shuri macaque, we sequenced the same region of DNA (variable region of D-loop) from four species of macaques (*Macaca fuscata*, *M. cyclopis*, *M. mulatta* and *M. fascicularis*). Ample variations of substitutions and insertion/deletion mutations are discovered both intra- and inter-specifically. A neighbor-joining tree based on nucleotide substitutions is depicted with bootstrap values (Fig. 4). In this study, a monkey skeletal remain excavated from Okinawa is safely identified as a Yaku macaque by the use of mitochondrial DNA. This suggests a promising future of genetic analyses for archaeological information retrieval. It is also emphasized that, for the proper assessment of the genetic information from archaeological remains, fuller genetic studies of the living animals are critically important.

毛利俊雄 京都大学霊長類研究所
〒484-8506 犬山市官林

Toshio MOURI Primate Research Institute, Kyoto University
Kanrin, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan
e-mail: mouri@pri.kyoto-u.ac.jp