

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14605

研究課題名(和文) テングザルの前胃内微生物叢の種内変異と適応的意義

研究課題名(英文) Intraspecific variation in fore-stomach microbial communities of proboscis monkeys

研究代表者

松田 一希 (MATSUDA, Ikki)

中部大学・創発学術院・准教授

研究者番号：90533480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、多様な植生環境に棲むテングザル(前胃発酵霊長類)が、単調な植生に棲むものに比して、より多様な前胃内微生物叢を有することを明らかにすることである。2年間のプロジェクト内に、野生個体4、半野生個体1、飼育個体1の合計6個体より前胃の内容物の収集に成功し、分析を行った。その結果、牛のルーメンなどの偶蹄類に共生し、セルロース分解を行っている細菌を多数検出した。また、前胃内微生物叢の多様度が、テングザルの生息環境によって大きく異なることを発見した。加えて、前胃内容物をもちいた酵素活性実験から、前胃内微生物がヘミセルロースを中心に植物細胞壁の分解を行っていることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated on the intraspecific variation in fore-stomach microbial communities of proboscis monkeys inhabiting mangrove and riverine forests, Sabah, Borneo, Malaysia. We found that proboscis monkeys have a similar microbe community to that in ruminants including *Ruminococcus* sp., *Prevotella* sp., *Oscillospira* sp. and *Selenomonas* sp. In addition, the diversity of microbe community was much higher in the proboscis monkeys living in a riverine forest compared to those in a mangrove forest, suggesting that the differences of their food habits between riverine and mangrove forests strongly influence their microbe community.

研究分野：霊長類学

キーワード：前胃 テングザル コロブス 反芻 前胃内細菌 霊長類

### 1. 研究開始当初の背景

単一菌種の分離培養を必要としないメタゲノム解析より(Qin et al. 2010)、野生霊長類の糞から膨大な腸内細菌の情報が得られるようになり、その種内/種間比較が盛んに行われている(Ochman et al. 2010)。結腸・直腸での微生物発酵(後腸発酵)を行う多くの霊長類では、糞由来の腸内細菌がその消化機能や効率、共進化的意義の理解に重要な情報を提示する。だが霊長類の中のコロブス類は、複数に分かれた胃に共生する微生物を利用し(前胃発酵)、セルロースを分解してエネルギーを得ており、前胃内微生物も消化機能に影響している。しかし野生コロブス類の前胃内微生物の収集は困難なため、解析手法は確立されているが未知の研究領域であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、多様な植生環境に棲むテングザル(前胃発酵霊長類)が、単調な植生に棲むものに比して、より多様な前胃内微生物叢を有すことを明らかにすることである。植生が多様な川辺林に棲むテングザルは、植生の単調なマングローブ林に生息するものに比して、極めて季節変化に富む多様な食性を示す(Matsuda et al. 2009)。つまり川辺林のテングザルは、季節変動する多様な食物に柔軟に対応するため、多様な前胃内微生物叢を有していると予測できる。一方マングローブ林のテングザルは、特定の植物の醗酵に特化した単調な微生物叢を有している可能性が高い。

川辺林のテングザルで報告されている、シロアリ食にも着目し、テングザルの前胃内微生物叢とシロアリの腸内細菌叢の類似性の検討も、研究目的の一つとした。偶蹄類が餌とする草本に付着した微生物を前胃に定着させるように、テングザルもシロアリ腸内に共生するセルロース分解微生物を前胃内に定着させ、マングローブ林のものよりも多様な微生物叢を維持している可能性が高い。

### 3. 研究の方法

本研究は、報告者が12年にわたり維持・管理しているキナバタンガン川下流域(マレーシア・サバ州)のスカウ村(川辺林)とアバイ村(マングローブ林)を拠点に実施した。ここでは基礎的な生態学資料が揃っており、本研究を速やかに実施することができた。

前胃内の微生物叢の分析のため、テングザルを捕獲し、ヒト小児用の胃内容物の吸引器具を用いて、麻酔中のテングザルの胃内容物を収集した。テングザルの捕獲には、現地政府の野生生物局から専門の獣医師チームを派遣してもらい、麻酔銃による捕獲を行った。その結果、野生個体4、半野生個体1、飼育個体1の合計6個体より前胃の内容物を収集し、国際法に基づいて日本国内へサンプルを輸送、分析を行った。

前胃内容物は、凍結乾燥後、DNA抽出を行

い、次世代シーケンサーで、テングザルの前胃内微生物由来のrRNA遺伝子配列を包括的に解析した。

前胃内容物から、セルラーゼ活性の有無を確認するための測定を試みた。まず、前胃内容物を遠心し、上清と沈殿物(固形物)に分け、沈殿物に界面活性剤(CellLytic B)を用い、酵素活性の溶出を試みた。また同様に、前胃内容物について、キシラナーゼ活性の測定を試みた。基質にはMacIlvane緩衝液(pH6.0)に溶解した0.25%Beechwood xylanを用い、前胃内容物の上清及びCellLytic Bによる沈殿抽出物を粗酵素液と用いた。酵素反応は、基質100 $\mu$ lに対して粗酵素液10 $\mu$ lを混合し、37 $^{\circ}$ C30分間行った。

テングザルの前胃内微生物叢と、シロアリの腸内細菌叢との類似性の比較のため、網翅上目の共生バクテリアデータベースであるdictDBを用いた予備的な解析も実施した。

### 4. 研究成果

テングザルの前胃内微生物由来のrRNA遺伝子配列を包括的に解析した結果、*Ruminococcus* sp.、*Prevotella* sp.、*Oscillospira* sp.、*Selenomonas* sp.のような、牛のルーメンなどの偶蹄類に共生し、セルロース分解を行っている細菌を多数検出することができた。野生コロブス類の前胃内微生物の研究は、テングザルではもちろんのこと、他のコロブス類でも前例がなく、前胃内の微生物叢を同定するだけでも学術的価値は高いといえる。加えて、前胃内微生物叢の多様度が、テングザルの生息環境によって大きく異なることを発見した。より多様な森林環境で、200種近い植物種を摂取する川辺林に生息するテングザルでは、微生物叢の高い多様度が検出された。いっぽう、植生/食性が単調である、マングローブに生息する個体からは、低多様度の微生物叢を検出した。テングザルの前胃内微生物叢は、その生息地の環境によって大きく異なることが明らかとなった。

前胃内容物を遠心して得られた上清からは、ほとんどセルラーゼ活性が得られなかった。一方、遠心後の沈殿物からは活性が得られたサンプルがみられた。また、セルロース分解で生じたオリゴ糖を単糖にする $\beta$ -グルコシダーゼ活性については、本サンプルからはほとんど検出されなかった。以上より、セルロース消化の主役が原生物などではなく、微生物であることが示唆された。また、キシラナーゼ活性の測定では、上清において明確なキシラナーゼ活性を示すサンプルは見当たらなかったが、沈殿抽出物に明らかなキシラナーゼ活性が認められるものもあった。沈殿抽出物に弱いセルラーゼ活性も存在しているサンプルもあり、前胃内微生物がヘミセルロースを中心に植物細胞壁の分解を行っていることも示唆された。

テングザル前胃に分布する微生物叢を網翅上目の共生バクテリアデータベースであ

る dictDB を用いた予備解析では、全体としては Firmicutes が主要な微生物叢で有り、一部のサンプルでは Bacteroidetes が微生物叢の半分以上を構成していた。これらのバクテリア叢はシロアリとは異なるものであったが、一部のサンプルにおいては 3% ほどシロアリ腸内においても分布する *Treponema* グループに属するスピロヘータの存在が認められた。ただし、これらのスピロヘータは哺乳類の腸管内にも存在することから、シロア由来の微生物との相関性については、さらなる詳細解析が必要であると考えられる。

#### <引用文献>

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010, 464:59-65.

Ochman H, Worobey M, Kuo CH, Ndjango JB, Peeters M, Hahn BH, Hugenholtz P: Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol* 2010, 8:e1000546.

Matsuda I, Tuuga A, Higashi S: The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *Am J Primatol* 2009, 71:478-492.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 11 件)

Li Y, Arakawa G, Tokuda G, Watanabe H, Arioka M: Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a beta-glucosidase from the xylophagous cockroach *Panesthia angustipennis spadica* displaying high specific activity for cellobiose. *Enzyme Microb Technol* 2017, 97:104-113 (査読有) .

Matsuda I, Clauss M, Tuuga A, Sugau J, Hanya G, Yumoto T, Bernard H, Hummel J: Factors Affecting Leaf Selection by Foregut-fermenting Proboscis Monkeys: New Insight from in vitro Digestibility and Toughness of Leaves. *Sci Rep* 2017, 7:42774 (査読有) .

Matsuda I, Chapman CA, Shi Physilia CY, Mun Sha JC, Clauss M: Primate Resting Postures: Constraints by Foregut Fermentation? *Physiol Biochem Zool* 2017, 90:383-391 (査読有) .

徳田岳: シロアリ消化システムの変遷. *生物科学* 2017, 68: 142-153 (査読有) .

Arakawa G, Kamino K, Tokuda G, Watanabe H: Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a Prominent  $\beta$ -Glucosidase from the Gut of the

Xylophagous Cockroach *Panesthia angustipennis spadica*. *Journal of Applied Glycoscience* 2016, 63:51-59 (査読有) .

Bernard H, Bili R, Matsuda I, Hanya G, Wearn OR, Wong A, Ahmad AH: Species Richness and Distribution of Primates in Disturbed and Converted Forest Landscapes in Northern Borneo. *Tropical Conservation Science* 2016, 9 (査読有) .

Inoue E, Ogata M, Seino S, Matsuda I: Sex Identification and Efficient Microsatellite Genotyping Using Fecal DNA in Proboscis Monkeys (*Nasalis larvatus*). *Mammal Study* 2016, 41:141-148 (査読有) .

Matsuda I: Reproducibility of field science in non-human primates. *Japanese Psychological Review* 2016, 59:114-117(査読有) .

Matsuda I, Otani Y, Bernard H, Wong A, Tuuga A: Primate Survey in a Bornean Flooded Forest: Evaluation of Best Approach and Best Timing. *Mammal Study* 2016, 41:101-106 (査読有) .

Matsuda I, Ancrenaz M, Akiyama Y, Tuuga A, Majalap N, Bernard H: Natural licks are required for large terrestrial mammals in a degraded riparian forest, Sabah, Borneo, Malaysia. *Ecol Res* 2015, 30:191-195(査読有) .

Matsuda I, Sha JC, Ortmann S, Schwarm A, Grandl F, Caton J, Jens W, Kreuzer M, Marlina D, Hagen KB, Clauss M: Excretion patterns of solute and different-sized particle passage markers in foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) do not indicate an adaptation for rumination. *Physiol Behav* 2015, 149:45-52 (査読有) .

##### [学会発表](計 9 件)

Tokuda G, Fukui C「Bacterial xylanolysis in the hindgut of the xylophagous higher termite, *Nasutitermes takasagoensis*」 Joint meeting of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan OIST (沖縄県国頭郡) 2016.11.17.

Matsuda I, Abram NK, Stark DJ, Sha JCM, Ancrenaz M, Goossens B, Tuuga A, Kubo T 「Demography and conservation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the lower Kinabatangan, Sabah, Borneo, Malaysia」 International Primatological Society Congress NAVY PIER (米国シカゴ) 2016.8.26.

松田一希、John Sha、Ismon Osman、Sen Nathan、Danica Stark、Benoit Goossens、Diana Ramirez、村井勲裕、清野悟、香田啓貴「大きな鼻を持つテングザルの雄はモテるのか？」第 32 回日本霊長類学会

鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）  
2016.7.17.

松田一希「コロブス類の重層社会ーヒ  
ヒ類と比較してー」第32回日本霊長類  
学会自由集会 鹿児島大学（鹿児島県鹿  
児島市）2016.7.15.

松田一希、John Sha、Ismon Osman、Sen  
Nathan、清野悟、香田啓貴「テングザル  
の鼻はなぜ長い？」第63回日本生態学  
会 仙台国際センター（宮城県仙台市）  
2016.3.21.

松田一希「テングザル研究：パワーエ  
コロジーに未来はあるか？（宮地賞受賞  
講演）」第63回日本生態学会 仙台国際  
センター（宮城県仙台市）2016.3.22.

Matsuda I, Hummel J, Sha JCM, Tuuga A,  
Clauss M 「Ruminant-Like Primate,  
Proboscis Monkey in Borneo: Physiological  
Similarity and Difference from Functional  
Ruminants」Vth International Wildlife  
Management Congress 札幌コンベンショ  
ンセンター（北海道札幌市）2015.7.30.

松田一希「どうやって論文をまとめる  
かー効率の良い書き方」第31回日本霊  
長類学会 企画自由集会（より充実した  
研究を目指してー若手霊長類研究者へ  
のエール）京都大学（京都府京都市）  
2015.7.20.

松田一希、Physilia CYS、Sha JCM、Clauss  
M 「霊長類の休息姿勢：なぜコロブス  
類は垂直姿勢を好むのか？」第31回日  
本霊長類学会 京都大学（京都府京都市）  
2015.7.20.

#### 〔図書〕（計1件）

Matsuda I, Fukaya K, Pasquaretta C, Sueur  
C: Factors Influencing Grooming Social  
Networks: Insights from Comparisons of  
Colobines with Different Dispersal Patterns.  
In Dispersing Primate Females. Edited by  
Furuichi T, Yamagiwa J, Aureli F: Springer;  
2015: 231-254（査読有）.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松田 一希 (MATSUDA, Ikki)

中部大学・創発学術院・准教授

研究者番号：90533480

##### (2)研究分担者

松井 広樹 (MATSUI, Hiroki)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：30346001

徳田 岳 (TOKUDA, Gaku)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：90322750

##### (3)連携研究者

今井 啓雄 (IMAI, Hiroo)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：60314176

福田 真嗣 (FUKUDA, Shinji)

慶應義塾大学大学院・政策メディア研究科・

特任准教授

研究者番号：80435677