

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15203

研究課題名(和文) 葉食適応したコロブス亜科の味覚・解毒分子基盤の進化機構の解明

研究課題名(英文) Evolution of taste sense and detoxification mechanism in the leaf eating colobine monkeys.

研究代表者

橋戸 南美(鈴木)(Hashido, Nami)

中部大学・創発大学院・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：60772118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：葉食性の霊長類であるコロブス類は、葉に含まれる毒性物質を検出する苦味感覚と、解毒を行う消化管内細菌をどのように特殊化させて葉食に適応したかを解明することを目的とし、コロブス類の苦味受容体解析および消化管内微生物の機能解析を行った。青酸配糖体を受容する苦味受容体は、近縁のオナガザル類に比べてコロブス類では高い感受性を示した。また、テングザルの胃内容物からは、植物に含まれる多様な糖を分解する機能を持つ新種の乳酸菌を発見した。葉食性のコロブス類では苦味感覚を利用して葉を選択し、胃に共生する細菌により葉に含まれる多様な物質を分解して葉食に適応してきたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、コロブス類の一種であるテングザルの前胃内には新種の乳酸菌が共生していることを発見した。この乳酸菌は植物に含まれる複数の糖を分解する高い活性を示しており、また飼育・野生どちらの個体にも共生していることから葉食性のテングザルの生存に欠かせない重要な乳酸菌であることが推測された。この知見は多様な食性特徴を示す霊長類の進化を探る上で重要な知見であり、食性の変化に応じて消化管内微生物の種類や機能が適応して変化していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand evolutionary background of bitter taste sense and detoxification mechanism in the leaf-eating colobine monkeys, we analyzed function of bitter taste receptor and isolated their gastrointestinal bacteria. Responsibility of TAS2R16 which is receptor for α -glucoside such as prunasin and amygdalin were compared between vervet monkey and western red colobus. TAS2R16 of red colobus showed higher sensitivity to prunasin than vervet monkey. Using flesh fecal samples of captive colobine monkeys, we isolated several lactic acid bacteria (LAB) species. Furthermore, three strains isolated from forestomach sample of proboscis monkeys were novel species and proboscis monkey specific LAB. This LAB species was isolated from both captive and wild individuals, suggesting that this LAB is important to survive in both captive and wild environment. Our results suggest that these characteristics of taste sense and gastrointestinal bacteria may help their leaf eating diet.

研究分野：分子進化

キーワード：味覚 解毒 乳酸菌 苦味受容体 コロブス 霊長類 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

オナガザル上科に属する2亜科のうち、コロブス亜科は霊長類の中でも唯一、3-4つにくびれた複胃をもち、前胃発酵を行う種であり、葉食に特化している。一方で、オナガザル亜科は単胃をもち他の霊長類種と同様に後腸発酵を行い、果実食性である。葉には毒性を示す二次代謝物質が多く含まれており、これらを採食する動物は苦味感覚により忌避または選択している。取り込んでしまった毒性物質は肝臓や腸内細菌の働きにより解毒されている。葉食性のコロブスでは反芻動物に似た複胃をもつため、葉の毒性物質を分解できる能力を持ち、そのため苦味感覚も他の霊長類に比べて鈍くなっていると考えられてきた。しかし、コロブスにおける毒性物質の解毒機構、苦味感受性のどちらについてもその詳細は明らかになっていない点が多い。

2. 研究の目的

採食選択に関わる「味覚」、葉に含まれる毒性物質を分解する「解毒」に着目し、葉食適応を果たしたコロブス亜科、果実食のオナガザル亜科と比較して、どのようにこれらを変化・進化させて葉食適応を果たしたかを解明する。そして「味覚」と「解毒」の両者を比較することで、これらの相関進化関係を明らかにする。これらを通じて、葉食適応したコロブス亜科における味覚・解毒分子基盤の進化機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オナガザル亜科およびコロブス亜科における苦味受容体の機能解析

苦味受容体遺伝子解析

ボルネオ島で同所的に生息する霊長類4種を対象とする予定であったが、サンプル輸出の許可までに時間を要してしまったため、キバレ国立公園に同所的に生息する3種(オナガザル亜科:ベルベットモンキー、コロブス亜科:アカコロブス、アビシニアコロブス)を対象とした。Lysis buffer チューブに採取したフンからDNAを抽出し、遺伝子試料として用いた。

アカゲザル、テングザルのゲノム配列を用いて、約30種類の苦味受容体遺伝子増幅用のプライマーを設計し、遺伝子配列を決定した。それぞれの種についての苦味受容体遺伝子の機能遺伝子・偽遺伝子数を決定した。

苦味受容体 TAS2R16 機能解析

サリシンやアルブチンなどのβグルコシドを受容する苦味受容体 TAS2R16 の機能解析を行った。増幅した PCR 産物を用いて発現ベクターを作成し、HEK293 培養細胞に苦味受容体遺伝子を発現させ、カルシウムイメージング法により苦味受容体 TAS2R16 の機能解析を行った。

(2) コロブス亜科における消化管内微生物の分離培養および機能解析

消化管内細菌の分離・同定

コロナ禍による海外渡航の制限により野生個体の試料を採取することができなかったため、飼育テングザルの前胃および直腸内容物、飼育コロブス(アビシニアコロブス、ドックランゲル)の糞便試料を用いて、消化管内微生物の培養を行った(よこはま動物園との共同研究)。

各試料は採取後、嫌気性検体希釈液に採取し、BL 寒天培地に塗抹後、37 度嫌気条件下で 48 時間培養を行った。また、二次代謝物質の分解を行う菌の分離を目的としているため、1%のアミグダリンを含む培地で 48 時間培養を行ったのち、BL 寒天培地に塗抹し、菌の分離を行った。得られた分離株の 16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析により細菌種同定を行った。

分離菌の機能解析

分離した菌の生理生化学的特徴を明らかにするため、塩耐性試験、至適発育温度試験、糖分解性試験(API)および酵素活性測定(API ZYM)、菌体脂肪酸組成分析、タンナーゼ活性測定試験等の試験を行った。

4. 研究成果

(1) オナガザル亜科およびコロブス亜科における苦味受容体の機能解析

苦味受容体遺伝子解析

苦味受容体遺伝子数を比較したところ、ベルベットモンキーは24個、アカコロブスは20個、アビシニアコロブスは26個の機能遺伝子が得られた。他の2種では機能遺伝子でアカコロブスのみで偽遺伝子化している苦味受容体遺伝子が5つ見られた。コロブス亜科がオナガザル亜科に比べて遺伝子数が少なくなっているわけではなく、苦味受容体の遺伝子数の比較からは、コロブス亜科の苦味感覚が鈍化しているという明確な証拠は得られなかった。

苦味受容体 TAS2R16 機能解析

ベルベットモンキー、アカコロブス、アビシニアコロブスの3種で苦味受容体 TAS2R16 の機能解析を行ったところ、アビシニアコロブスではサリシンに対する反応性が低かった(図1)。一方で、予備的なデータではあるが、青酸配糖体のプルナシンに対しては、ベルベットモンキーに比べてアカコロブス、アビシニアコロブスで高い反応性が見られた。アカコロブス、アビシニアコロブスではプルナシンを含む葉を採食しており、葉に含まれるプルナシンを検出することで青酸配糖体の摂取過多を防いでいる可能性が示唆された。しかしまだデータ数が少ないため、今後より詳細に機能解析を行う必要がある。

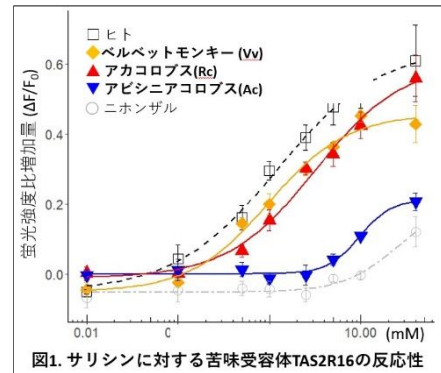


図1. サリシンに対する苦味受容体TAS2R16の反応性

(2) コロブス亜科における消化管内微生物の分離培養および機能解析

消化管内細菌の分離・同定

飼育テングザルの前胃および直腸内容物、飼育コロブス(アビシニアコロブス、ドゥクラングール)の糞便試料から、乳酸菌を含む多数の消化管内細菌の分離培養を行った。その中で、飼育テングザルの前胃内容物からこれまでに発見されていない新種とみられる乳酸菌5株を分離したため、本乳酸菌種を中心に詳細な遺伝子解析および生理生化学性状試験・機能解析を行った。

テングザルより分離した乳酸菌株 YZ01-YZ05 は、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* と最も近縁な種であり(図2)、相同性は新種提唱スタンダード 98.7% よりも低い 98.2% であった。そのため、本菌種を新種 *Lactobacillus nasalidis* として国際誌 IJSEM 誌 (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) に論文を発表した (Suzuki-Hashido *et al.* 2021)。

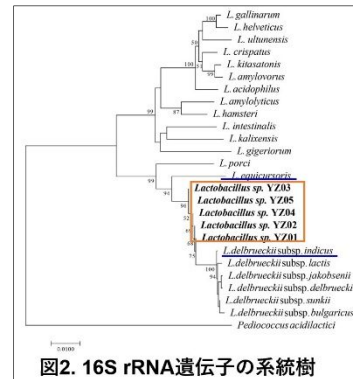


図2. 16S rDNA遺伝子の系統樹

分離菌の機能解析

本研究で新種提唱を行った *Lactobacillus nasalidis* の標準株 YZ01^T は近縁種 *L. delbrueckii* subsp. *indicus* とは異なり、アミグダリン、アルブチン、セロピオース、サリシンを含む7種類の糖に対する分解能を示した(表1)。

また本乳酸菌種の16S rDNA 遺伝子配列を、先行研究の野生テングザル前胃細菌叢の次世代シーケンス配列データ (Hayakawa *et al.* 2018) と比較したところ、同種の乳酸菌を野生テングザルも保有しており、飼育野生問わずテングザルに共生する重要な消化管内細菌種であると

考えられた。本菌種は植物由来の多様な糖を分解することができるため、本菌種のこうした能力が葉食を行うテングザルの食性を支えている可能性が考えられる。

本乳酸菌種の二次代謝物質分解能力を検証するために、タンニン分解酵素のタンナーゼ活性や、青酸配糖体のシアン基を分解する酵素ニトリラーゼ活性の測定を行ったが、これまでに他菌種との違いは見られていない。現在、液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いて、より詳細に解毒能力を測定する実験系の検討をしているため、今後、本菌種を含めたコロブス亜科の消化管内細菌の解毒能力を議論する予定である。

コロナ禍での研究活動であったため、海外渡航や国内出張が制限されてしまい、予定していた対象種すべての解析や比較を行うことはできなかったが、対象種の変更や、野生ではなく飼育個体を対象とするなど、テーマの中で柔軟に対応し、限られた中での成果を得られることができた。「味覚」と「解毒」の両者の相関進化についての明確な結論は得られなかったが、葉食性のコロブス類では苦味感覚を利用して葉を選択し、胃に共生する特徴的な細菌により葉に含まれる多様な物質を分解して葉食に適応してきたことが示唆された。

宿主	テングザル					インド産乳製品	ウマ
	菌株由来	前胃内容物					
菌株名	YZ01	YZ02	YZ03	YZ04	YZ05		<i>L. equicursoris</i>
糖分解性 (API 50CH)							
グルコース	+	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	-	-	-	-	-	+	+
マルトース	+	+	+	+	+	-	+
メリピオース	-	-	-	-	-	-	W
トリハロース	+	+	+	+	+	-	-
セロピオース	+	+	+	+	+	-	+
ラクトース	+	+	W	-	W	+	+
ゲンチオピオース	+	+	W	+	W	-	+
ライノース	-	-	-	-	-	-	W
スターチ	-	-	-	-	-	-	W
アルブチン	+	+	+	+	+	-	+
サリシン	+	+	+	+	+	-	+
アミグダリン	+	+	+	+	+	-	W
酵素活性 (API ZYM)							
α-ガラクトシダーゼ	-	-	-	-	-	W	+
β-ガラクトシダーゼ	+	+	W	W	W	+	+
α-グルコシダーゼ	W	W	W	W	W	-	+
β-グルコシダーゼ	W	+	+	+	+	W	W
NaCl耐性							
4.0%	+	+	+	+	+	+	-

<引用文献>

Hayakawa T, Nathan S, Stark DJ, Saldivar DAR, Sipangkui R *et al.* First report of foregut microbial community in proboscis monkeys: are diverse forests a reservoir for diverse microbiomes? Environmental Microbiology Reports. 2018; 10:655–662.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Tsuyoshi, Hayakawa Takashi, Suzuki-Hashido Nami, Hamada Yuzuru, Kurihara Yosuke, Hanya Goro, Kaneko Akihisa, Natsume Takayoshi, Aisu Seitaro, Honda Takeaki, Yachimori Syuji, Anezaki Tomoko, Omi Toshinori, Hayama Shin ichi, Tanaka Mikiko, Wakamori Hikaru, Imai Hiroo, Kawamoto Yoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Phylogeographic history of Japanese macaques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biogeography	6. 最初と最後の頁 1420 ~ 1431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jbi.14087	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki-Hashido Nami, Tsuchida Sayaka, Hayakawa Takashi, Sakamoto Mitsuo, Azumano Akinori, Seino Satoru, Matsuda Ikki, Ohkuma Moriya, Ushida Kazunari	4. 巻 71
2. 論文標題 Lactobacillus nasalidis sp. nov., isolated from the forestomach of a captive proboscis monkey (Nasalis larvatus)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 4787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Purba Laurentia Henrieta Permita Sari, Widayati Kanthi Arum, Suzuki-Hashido Nami, Itoigawa Akihiro, Hayakawa Takashi, Nila Sarah, Juliandi Berry, Suryobroto Bambang, Imai Hiroo	4. 巻 61
2. 論文標題 Evolution of the bitter taste receptor TAS2R38 in colobines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Primates	6. 最初と最後の頁 485 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10329-020-00799-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hanya G, Morishima K, Koide T, Otani Y, Hongo S, Honda T, Okamura H, Higo Y, Hattori M, Kondo Y, Kurihara Y, Jin S, Otake A, Shiroisih I, Takakuwa T, Yamamoto H, Suzuki H, Kajimura H, Hayakawa T, Suzuki-Hashido N, Nakano T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Host selection of haematophagous leeches (Haemadipsa japonica): implications for iDNA studies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 842-855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1440-1703.12059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Widayati KA, Yan X, Suzuki Hashido N, Itoigawa A, Purba LHPS, Fahri F, Terai Y, Suryobroto B, Imai H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional divergence of the bitter receptor TAS2R38 in Sulawesi macaques.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ecology and evolution	6. 最初と最後の頁 10387-10403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.5557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Itoigawa A, Hayakawa T, Suzuki-Hashido N, Imai H.	4. 巻 286
2. 論文標題 A natural point mutation in the bitter taste receptor TAS2R16 causes inverse agonism of arbutin in lemur gustation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the Royal Society B	6. 最初と最後の頁 20190884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rspb.2019.0884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishi E, Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Tsuji Y, Suryobroto B, Imai H	4. 巻 59
2. 論文標題 Functional decline of sweet taste sensitivity of colobine monkeys.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Primates	6. 最初と最後の頁 523-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10329-018-0679-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 橋戸南美, 土田さやか, 東野晃典, 清野悟, Diana A Ramirez Saldivar, Benoit Goossens, 松田一希, 牛田一成.
2. 発表標題 野生および飼育テングザルの前胃由来細菌がもつ植物二次代謝産物分解能.
3. 学会等名 第37回日本霊長類学会大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋戸南美, 土田さやか, 早川卓志, 東野晃典, 清野悟, 松田一希, 牛田一成.
2. 発表標題 テングザル前胃由来の新種乳酸菌の同定およびその機能特性.
3. 学会等名 第35回日本霊長類学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋戸南美, 糸井川壮大, 早川卓志, Amanda D Melin, 河村正二, Colin A Chapman, 松田一希, 今井啓雄
2. 発表標題 同所的に生息する旧世界ザルにおける苦味受容体の遺伝的・機能的多様性.
3. 学会等名 第34回日本霊長類学会大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋戸南美, 早川卓志, 辻大和, Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, Sarah Nila, Kanthi Arum Widayati, Bambang Suryobroto, 今井啓雄.
2. 発表標題 旧世界ザル苦味受容体の遺伝的多様性.
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川卓志, 橋戸南美.
2. 発表標題 霊長類の苦味受容体遺伝子ファミリー進化の再検討.
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木-橋戸 南美, 早川 卓志, 辻 大和, Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, Sarah Nila, Kanthi Arum Widayati, Bambang Suryobroto, 今井 啓雄.
2. 発表標題 旧世界ザルの苦味受容体遺伝子の適応的進化.
3. 学会等名 第33回日本霊長類学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木-橋戸 南美.
2. 発表標題 霊長類における苦味感覚の多様性.
3. 学会等名 日本味と匂学会第51会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Tsuji Y, Purba LHPS, Nila S, Widayati KA, Suryobroto B, Imai H.
2. 発表標題 Evolution of bitter taste receptor genes in the Old World Monkeys.
3. 学会等名 The 6th International Workshop on Tropical Biodiversity and Conservation. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木-橋戸南美 (辻大和・中川尚史 編)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 東京大学出版会	5. 総ページ数 336
3. 書名 日本のサル 哺乳類学としてのニホンザル研究	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
マレーシア	サバ大学			
カナダ	マギル大学			