

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06846

研究課題名(和文) 猛毒種子の採食がヤマガラ体内の寄生虫・腸内微生物に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effects of consumption of toxic seeds on endoparasites in the varied tit *Sittiparus varius*

研究代表者

吉川 徹朗 (Yoshikawa, Tetsuro)

大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00646127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヤマガラという鳥類が有毒植物シキミの種子を頻繁に食べることが内部寄生者の減少につながる可能性を検討した。日本各地で捕獲したヤマガラおよび他のスズメ目鳥類から得た糞に対して、DNAメタバーコーディングを行った。その結果、これらの鳥類から多様な内部寄生者を検出した。スズメ目の他種に比べヤマガラは内部寄生者の検出率が低かったが、シキミの自生地/非自地のヤマガラ個体群間では検出率に有意な違いは見られなかった。ヤマガラにおける有毒種子の摂食の影響については内部寄生者以外の側面を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野鳥の糞に対してDNAメタバーコーディングという分析手法を適用することにより、日本のスズメ目鳥類が多様な内部寄生者に感染している実態が明らかになった。こうした内部寄生者の一部には、野生鳥類だけでなく家禽類に対しても有害な影響を与えるものも知られている。本研究で得られたデータは、これらの内部寄生者の感染実態や鳥類群集における感染経路を解明する上で有用な基礎情報になると期待される。

研究成果の概要(英文)：I explored whether the varied tit *Sittiparus varius* can reduce its endoparasites by consuming seeds of a toxic plant. I performed DNA metabarcoding for droppings of the varied tit and other passerine species, and detected a wide array of endoparasites in these birds. Detection rate of endoparasites in the varied tit was lower than other species, but I found no significant difference in detection rate between the varied tits at sites with and without the toxic plant. The effects of consumption of the toxic seed in this bird need further explorations in relation to factors besides its endoparasites.

研究分野：生態学

キーワード：内部寄生者 有毒植物 生物間相互作用 種子散布

## 1. 研究開始当初の背景

シキミ科の樹木シキミ *Illicium anisatum* は、果実・種子・葉などの全植物体に神経毒アニサチンを含む猛毒植物である。だが、これまでの研究により、予想以上に多くの動物がこの猛毒植物と相互作用を持っていることがわかった。特にシジュウカラ科の鳥類ヤマガラ *Sittiparus varius* はシキミの種子を食べ、一部を林床に貯えることでこの植物の種子散布に寄与していることが先行研究で分かっている<sup>1</sup>。ヤマガラはシキミにとって決定的な種子散布者であり、この樹木と密接な相利関係を結んでいた。シキミの自生する森林では、少なくともその結実期である初秋に、ヤマガラはシキミ種子を高頻度で採食していた。有毒物質を含む種子を多食して植物毒を摂取することは、ヤマガラにとって何らかのメリットがあると考えられるが、それがこの鳥の生態にどのような影響を与えているかについては、まったくわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、このヤマガラとシキミの特異な相利共生関係に注目し、その生態と進化のプロセスの解明を目指した。特に注目するのは、この相利関係がヤマガラと他の生物の相互作用に波及効果をもち、ヤマガラに何らかの利益を与えている可能性である。鳥類と相互作用を持つ存在として重要なのが寄生者である。鳥類はさまざまな分類群の寄生者に曝されており、その感染の有無は鳥類個体の生存率や適応度に影響すると見られている。このため鳥類は寄生者に対する防衛となるさまざまな形質や行動を進化させていると見られている<sup>2</sup>。だが、鳥類と寄生者との相互作用のあり方や、それに対する鳥類の適応については未だ知見が乏しいのが現状である。

そこで本研究では、ヤマガラの摂取したシキミの有毒成分が、ヤマガラ内部寄生者を減少させる駆除効果をもつという仮説を立て、これを検証する。鳥類の内部寄生者の検出・定量はこれまで困難であったが、糞の DNA メタバーコーディングという新しい手法を適用することで、この仮説の検証を試みた。具体的には、シキミ食のあるヤマガラ個体群とシキミ食のない個体群において内部寄生者の検出率の比較を行うことで仮説を検証する。ヤマガラの内部寄生者の時空間的変動とシキミ食との関連性の有無を評価する。

先述したように、鳥類における内部寄生者の感染状況、内部寄生者群集の実態については不明な部分が多い。日本におけるヤマガラを含むスズメ目鳥類においても、血液中の内部寄生者に関するもの<sup>3</sup>を除けば、どのような内部寄生者がどのような頻度で見られるかについての既存の知見が乏しい。そのため、ヤマガラ以外のスズメ目の種についても、糞の DNA メタバーコーディングにより内部寄生者の群集を把握し、ヤマガラにおける内部寄生者の感染状況の比較対象とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 日本のスズメ目鳥類における内部寄生者感染状況の調査

まずスズメ目の多様な鳥類について糞サンプリングおよび DNA メタバーコーディングを行い、内部寄生者の検出を行った。日本各地の森林で鳥類をカスミ網などで捕獲し、捕獲個体を紙袋内にしばらく保管することで、糞サンプルを取得する手法をとった。捕獲と糞のサンプリングは主に東日本で行い、さらに各地の共同研究者から提供された糞サンプルを加えた。なお、ヤマガラ以外の分析対象のスズメ目鳥種がシキミの有毒種子を食べないことは、先行研究で確認されている。

得られた糞は冷凍保存したのち、DNA を抽出し PCR にかけて、DNA メタバーコーディングを行った。内部寄生者の検出手法として、18s rRNA 遺伝子領域のユニバーサルプライマーにより糞組織についてメタバーコーディングを行い、幅広い動物の OUT (operational taxonomic unit) を検出した。18s rRNA 遺伝子領域は、細菌などの微生物も含めた、きわめて広範囲の動物の検出に適用可能な遺伝子領域であり、動物全体を対象とした DNA メタバーコーディングにおいてよく利用されている。メタバーコーディングにおいて検出された OTU に対して、解析ソフト Claident<sup>4</sup> に内蔵されている BLAST 検索で 90% 以上の一致度に達するという基準で同定した。

なお動物の糞のメタバーコーディングの際には、対象動物種自体の DNA 配列が多量に検出されることにより糞に含まれる餌動物や寄生者の配列の増幅が阻害されることがある。だが予備実験において、対象種自体の DNA 配列の複製を阻害するブロッキングプライマーの使用は必要でないことが判明したため、そのまま実験を行った。

### (2) ヤマガラにおける内部寄生者感染率とシキミ採食との関連の検討

ヤマガラについても日本各地のサイトにおいて捕獲し、糞のサンプリングを行った。各捕獲サイトについては、その周辺でのシキミ自生の有無を目視および分布図より確認した。シキミ自生地として、静岡県伊豆市湯ヶ島および愛媛県久万高原町の常緑広葉樹林で捕獲調査を行った。これらの 2 サイトでは、捕獲と同時期またその直前においてシキミの結実が見られ、ヤマガラによるシキミ種子採食が確認されている。シキミの非自生地のサイトとしては、埼玉県横瀬町・鳩山町の落葉広葉樹林などでの糞サンプルを入手した。これらのサイトで得られた糞サンプルに対して、(1)と同様の手法で DNA メタバーコーディングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 日本のスズメ目鳥類における内部寄生者感染状況の調査

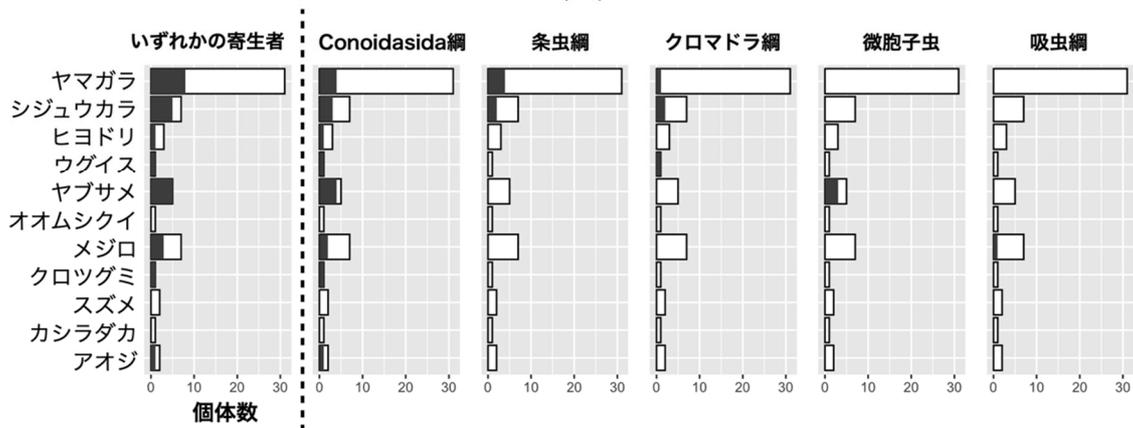
ヤマガラ以外のスズメ目鳥類計 10 種の 31 個体から糞サンプルを得た。その内訳はシジュウカラおよびメジロ各 7 個体、ヤブサメ 5 個体、ヒヨドリ 3 個体、ウグイス・アオジ・スズメ各 2 個体、オオムシクイ・クロツグミ・カシラダカ各 1 個体である。

これらの鳥の糞について、18s rRNA 遺伝子領域での DNA メタバーコーディングを行ったところ、内部寄生者である可能性が高い、複数の微生物分類群の OTU が複数検出された。それら寄生者とみられる分類群は、微胞子虫門の微胞子虫、アピコンプレックス門の Conoidasida、扁形動物門の吸虫綱・糸虫綱、線形動物門のクロマドラ綱である。

これら 5 つの分類群のうちで、最も多くのスズメ目個体から検出されたのは、アピコンプレックス門 Conoidasida (コクシジウム類およびグレガリナ類) であり、10 種中 7 種の鳥から検出された。次に多くの個体で検出されたのは、サナダムシに代表される糸虫綱だった。だが糸虫綱はシジュウカラの個体においてのみ検出された。また微胞子虫はヤブサメでのみ検出され、吸虫綱はメジロでのみ検出されるなど、特定の寄生者分類群と鳥種との関連を示唆する結果が得られた。内部寄生者の検出確率もっとも高いのはヤブサメ (5 個体中 5 個体, 100%) で、次がシジュウカラ (7 個体中 5 個体, 71%) であった。また 1 個体から複数分類群の寄生者が検出されたケースも、シジュウカラやヤブサメで見られた。

本研究により日本の野生のスズメ目鳥類に多様な内部寄生者が感染している実態が明らかになった。Conoidasida のコクシジウム類はニワトリなどの家禽の消化管に寄生してコクシジウム症を引き起こすことが知られているが、日本の野生のスズメ目鳥類でも感染率が高いことが明らかになった。ただし捕獲地点や季節などの要因を揃えるだけの個体数が確保できていないため、感染率や寄生者相の種間での違いについては、更に個体数を増やして分析する必要がある。

図 1 :  
ヤマガラとスズメ目鳥類各種における  
調査個体数 および 寄生者が検出された個体数(黒)



##### (2) ヤマガラにおける内部寄生者感染率とシキミ採食との関連の検討

調査を行ったヤマガラ 27 個体からも、複数の内部寄生者が確認された (図 1)。検出された内部寄生者は、アピコンプレックス門の Conoidasida、扁形動物門の糸虫綱、線形動物門のクロマドラ綱、およびイクチオスポレア、ミクソゾア亜門の 5 つの分類群である。これらのいずれかの分類群の寄生者が検出された個体は全体の約 26% であり、この検出率はシジュウカラやメジロ、ヤブサメに比べると低かった (図 1)。もっとも多くのヤマガラ個体で検出されたのは糸虫綱であり (4 個体)、続いて Conoidasida であった (3 個体)。微胞子虫や吸虫綱はヤマガラでは検出されなかった。イクチオスポレアとミクソゾア亜門は他のスズメ目鳥類では検出されなかったが、それぞれヤマガラ各 1 個体でのみ検出された。

シキミの自生地と非自生地でヤマガラの内部寄生者の検出率を比較し、シキミ採食と内部寄生者感染の関連性を検討した。少なくとも 1 タイプの内部寄生者が検出されたのは、シキミ自生地で捕獲した 12 個体中では 5 個体 (42%)、非自生地で捕獲した 15 個体中では 2 個体 (13%) であった (図 2)。糸虫綱はシキミ自生地の個体でのみ検出された。内部寄生者の検出率はシキミ自生地の個体の方が高かったが、自生地の個体と非自生地の個体の間には、検出率に統計的に有意な違いは見られなかった (カイ二乗検定,  $p = 0.21$ )。

今回の研究では、ヤマガラによるシキミ毒の摂取が内部寄生者に影響を与えている可能性に対して否定的な結果が得られた。シキミの主要な毒成分であるアニサチンは、中枢神経系の GABA<sub>A</sub> 受容体のアンタゴニストとして働く神経毒であり<sup>5</sup>、脊椎動物や節足動物に対する毒性が確認されているが、原生生物なども含んだ内部寄生者には毒性をもたない可能性が考えられる。ただし今回の調査は、コロナ禍の影響もありヤマガラの捕獲が難航し、調査個体数や地点数がかなり少ない点に注意する必要がある。捕獲を行ったシキミ自生地は主に暖温帯の常緑広葉樹林であり、シキミ非自生地は落葉広葉樹林であった。このような森林タイプなどの統制されていない要因が寄生者検出率に影響している可能性もある。またシキミ非自生地でもヤマガラは別の有毒種子を食べている可能性が高く、その影響も検討する必要がある。

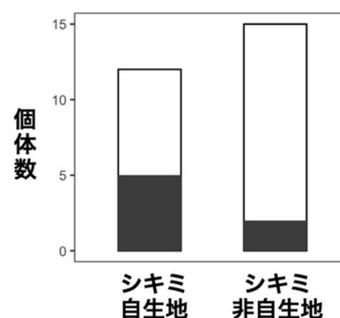
DNA メタバーコーディングによる生物分布検出には、実際には分布しているにもかかわらず検出されないという偽陰性が生じる可能性がある。この点は内部寄生者についても同様であり、今後、消化管の解剖や糞の検鏡による寄生者検出の結果と照合し、偽陰性の程度を評価し、分析の妥当性を検討する必要がある。

なお並行して行ってきたシキミ種子の野外モニタリングから、森林性の齧歯類であるアカネズミ *Apodemus speciosus* も種子の消費者・散布者となる可能性を示唆する成果を得た。以前の研究<sup>1</sup>でヒメネズミ *Apodemus argenteus* がシキミ種子を運んでいることがわかっていたが、同属のアカネズミが種子散布者になりうるかどうかについては不明であった。この成果について論文にまとめ、哺乳類学の国際学術誌 *Mammal Study* に受理された<sup>6</sup>。今後、ヤマガラ以外のシキミ食動物についても植物毒摂取のもたらすさまざまな影響について検討することが重要と考えられる。

## 引用文献

- 1) Yoshikawa et al. (2018) *Ecological Research* 33(2): 495–504
- 2) Clayton et al. (2010) *Open Ornithology Journal* 3: 41–71
- 3) Nagata (2006) *Ornithological Science* 5(1): 105–112
- 4) Tanabe and Toju (2013) *PLOS ONE* 8(10) e76910
- 5) Kudo et al. (1981) *Neuroscience Letters* 25: 83–88
- 6) Yoshikawa (2023) *Mammal Study* 48(2): 131–135

図2：  
シキミ自生地と非自生地の  
ヤマガラにおける内部寄生者の検出状況  
白：非検出個体  
黒： 検出個体



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tetsuro Yoshikawa	4. 巻 48
2. 論文標題 The large Japanese field mouse ( <i>Apodemus speciosus</i> ) as a consumer and potential disperser of seeds of the neurotoxic Japanese star anise ( <i>Illicium anisatum</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mammal Study	6. 最初と最後の頁 131-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3106/ms2022-0042	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川徹朗・安藤温子・松井晋・石倉日菜子・川路則友・佐藤重穂・三上かつら・上田恵介
2. 発表標題 糞のDNAメタバーコーディングによって検出されたスズメ目鳥類の内部寄生者
3. 学会等名 日本鳥学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川徹朗
2. 発表標題 鳥と植物をつなぐ多様なネットワークを紐解く（黒田賞受賞記念講演）
3. 学会等名 日本鳥学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川徹朗
2. 発表標題 猛毒のシキミ <i>Illicium anisatum</i> の種子はどのようにして運ばれるのか？
3. 学会等名 日本野鳥の会 鳥ゼミ（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	上田 恵介  (Ueda Keisuke)  (00213348)	立教大学・名誉教授・名誉教授   (32686)	

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
---------	---------