

## 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：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291100

研究課題名(和文) 霊長類の食性と腸内細菌との共進化

研究課題名(英文) Coevolution of primate diet and and gut microbiota

研究代表者

半谷 吾郎 (Hanya, Goro)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：40444492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌が霊長類の消化機能にどう影響しながら、霊長類と共進化してきたのかを明らかにすることを目的とする。生態学的時間スケールと、進化的時間スケールの両方で、霊長類の食性が変化した場合に、腸内細菌相がどう変化し、霊長類の消化機能にどう影響するのかを解明する。最初に解析の終了した屋久島のニホンザルを対象とした研究では、食性の季節変化に応じて、腸内細菌相が変化し、葉食の時期に細菌の多様性が高くなることが分った。また、食性の異なる屋久島海岸部と、上部域のニホンザルの新鮮な糞を用いて試験管内消化試験を行うと、上部域の糞の方が、海岸部の糞よりガスの発生量が多く、発酵能力が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aims to reveal the coevolution process of primates and their gut microbiota. We clarify the changes of gut microbiota in response to the changes in primate diet, both at ecological and evolutionary time scales, and how it affects the digestion of the host primates. In our study in Yakushima, we clarified that the gut microbe species composition changes annually, in response to the seasonal fluctuations of the diet. Bacteria species diversity was highest in the leaf-eating season. We conducted in vitro digestibility assay using fresh feces of Japanese macaques in Yakushima as inoculum and dry leaf powder as substrate. Feces from highland, where macaques eat more leaves than lowland, are shown to have higher ability of fermentation.

研究分野：動物生態学

キーワード：霊長類 食性 腸内細菌 共進化 次世代シーケンス 16S rRNA 消化 ニホンザル

## 1. 研究開始当初の背景

種間相互作用研究に残された最大の挑戦は、動物とその体内の微生物との関係である。宿主は、腸内細菌の膨大な遺伝子セットを利用して、消化機能を進化させてきた可能性がある。しかし、微生物の多くは個別に分離培養することが困難で、その膨大な種数・個体数のゆえに、従来、共生微生物の全貌を捕らえることは困難だった。しかし、単一菌種の分離培養過程を必要としないメタゲノム解析手法の登場で、その構成や機能など全体像の解析が可能となった。

霊長類は純粋な昆虫食から、果実食、純粋な葉食まで、多様な食性をもつ種が含まれている。食性の季節変化、系統進化、消化管の形態など、宿主の生存や進化と腸内細菌の関連を明らかにする上で、霊長類は最適な題材である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌が霊長類の消化機能にどう影響しながら、霊長類と共進化してきたのかを明らかにすることである。生態学的時間スケール(季節変化)と、進化的時間スケール(系統進化)の両方で、霊長類の食性が変化した場合に、腸内細菌相がどう変化し、霊長類の消化機能にどう影響するのかを、野生霊長類の行動観察に基づく採食生態学、腸内細菌のメタゲノム解析、分子生物学的手法による腸内細菌の機能解析による知見を統合して解明する。

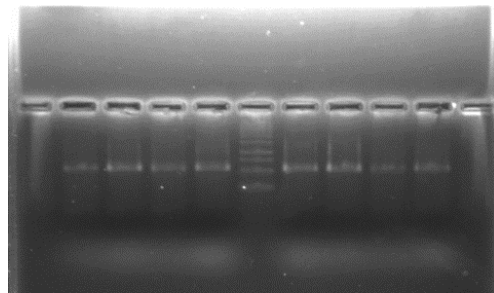
具体的には、(1)生態学的時間スケールの研究: 野生ニホンザル・ブタオザル・オランウータン・テングザル・クロシロコロブスの食性の季節変化と、メタゲノム解析による霊長類の腸内細菌相の関連の解明、(2)進化的時間スケールの研究: 上記5種を含む、狭鼻猿多種の腸内細菌相が、宿主の系統関係・食性の進化・消化システムの進化とどう対応するのかを解明、(3)植生の異なる上部域と海岸部のニホンザルを対象に、宿主の食性の季節変化・消化システムに対応した腸内細菌相の機能の差異を、試験管内消化率試験によって解明、という3つの研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1)(2)については、2013-2015年度にかけて、日本、マレーシア、ウガンダで野外調査を実施した。野生ニホンザル・ブタオザル・オランウータン・テングザル・クロシロコロブスを年間にわたって追跡し、食性を記録するとともに、排泄直後の糞を採取して、界面活性剤である SDS を含む lysis buffer に保存し、常温で保管した。糞試料の収集を、上記集中的な調査対象以外の、同所的に生息する霊長類についても行った。

採取した糞は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA について、細菌のバーコード領域である 16S rRNA 遺伝子の V1V2、もしくは V3V4 領域を増幅し、Illumina 社の次世代シーケンサ Miseq を用いて配列を解読した。

海外の劣悪な電気環境でも可能な採取・保存法の開発、PCR 増幅の条件の検討に 2 年程度を要したが、最終的にどの霊長類種であっても安定的に結果の得られる実験プロトコルを確立した(下図、16S rRNA の V3V4 領域を増幅した電気泳動写真)。



(3)については、ニホンザルの食性が標高によって大きく異なる屋久島で、果実食の多い海岸部と、葉食の多い上部のヤクスギ林の両方で、2016年5月に、新鮮な糞を採取した。この糞を接種源とし、ヒサカキの葉の乾燥粉末を基質とする試験管内発酵試験を実施した。糞の懸濁液と葉の粉末を、二酸化炭素を充填した密封瓶に入れ、37度で24時間保管し、そのあいだ、6時間ごとにガスの発生量を瓶に注射針を指してその目盛りを読むことで測定した(下図)。



Measure gas production

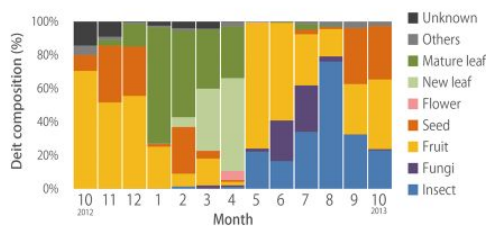
## 4. 研究成果

(2)については、2016年度から、本研究と同名の科学研究費国際共同研究強化を実施し、ガボンや中国など、本研究には含まれていなかった地域でも試料の採取を行い、種比較の数を増やして実施中である。そのため、ここでは(2)の研究結果については述べない。

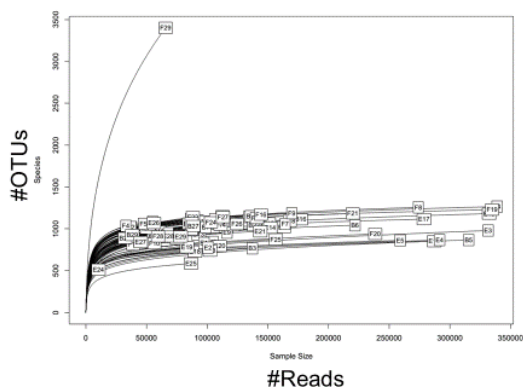
(1)については、研究期間内に、屋久島のニホンザルについてはデータ解析を終えることができたが、他の4種については、シーケンスが終了した時点で研究期間が終了し、現在データ解析中である。したがって、屋久島の結果について述べる。

屋久島海岸部に生息する、2群に属する3頭のニホンザルの糞試料76個を解析した。ニホンザルの食性は、季節によって大きく変化していた(下図)。

### Seasonal change in the diet and gut microbe



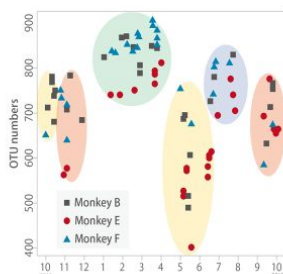
配列が97%以上相同なものを Operational Taxonomic Unit (OUT)とし、それぞれの糞試料中のリード数とOUTの関係(Rarefaction curve)を描くと、1サンプルを除いて、50000



リード程度で飽和することが分った。ひとつの糞試料中のOUTの数は500-1000のあいだだった(下図)。

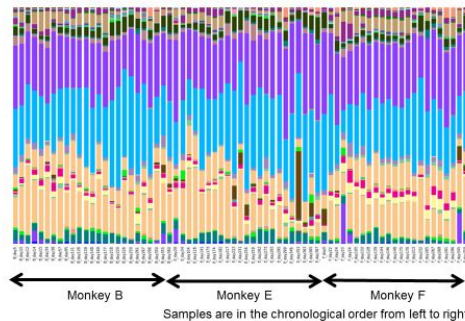
食性の季節変化と腸内細菌の種構成には相関があり、冬の葉食の時期に細菌の種多様性が高くなり、そこから、初夏の果実期になると多様性が減少することが分った(下図)。

### Alpha-diversity in gut microbiota



また、出現する種も季節により移り変わり、それは3個体間でおおむね同調して変化していた(下図、科レベルの解析結果)。

### Gut microbe composition: family level



(3) 屋久島のサルの糞を用いた試験管内消化試験で、上部域の糞の方が、海岸部の糞よりガスの発生量が多く、発酵能力が高いことが示された。葉食が中心の上部域では、葉をより効率よく消化できるように、腸内細菌相が変化していることがわかった。

### 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19件)

1. Hamada A, Hanya G (2016) Frugivore assemblage of *Ficus superba* in a warm-temperate forest in Yakushima, Japan. *Ecological Research* 31: 903-911. DOI: 10.1007/s11284-016-1398-z

2. Hanya G, Bernard H (2016) Seasonally consistent small home range and long ranging distance in *Presbytis rubicunda* in Danum Valley, Borneo. *International Journal of Primatology*: 37:390-404. DOI: 10.1007/s10764-016-9907-z

3. Ando H, Setsuko S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Yamasaki M, Hanya G, Inoue-Murayama M, Isagi Y (2016) Seasonal and inter-island variation in the foraging strategy of the critically endangered Red-headed Wood Pigeon *Columba janthina nitens* in disturbed island habitats derived from high-throughput sequencing. *Ibis* 158: 291-304. DOI: 10.1111/ibi.12345

4. Ushida K, Tsuchida S, Ogura Y, Hayashi T, Sawada A, Hanya G (2016) Draft genome sequences of *Sarcina ventriculi* isolated from wild Japanese macaques in Yakushima island. *Genome Announcements* 4: e01694-15. DOI:10.1128/genomeA.01694-15

5. Kurihara Y, Hanya G (2015) Comparison of feeding behavior between two different-sized groups of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*). *American Journal of Primatology* 77: 986-1000. DOI: 10.1002/ajp.22429
6. Hanya G, Bernard H (2015) Different roles of seeds and young leaves in the diet of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*): Comparisons of availability, nutritional properties and associated feeding behavior. *International Journal of Primatology* 36: 177-193. DOI: 10.1007/s10764-015-9819-3
7. Ancrenaz M, Sollmann R, Meijaard E, Hearn AJ, Ross J, Samejima H, Loken B, Cheyne SM, Stark DJ, Gardner PC, Goossens B, Mohamed A, Bohm T, Matsuda I, Nakabayashi M, Lee SK, Bernard H, Brodie J, Wich S, Fredriksson G, Hanya G, Harrison ME, Kanamori T, Kretzschmar P, Macdonald DW, Riger P, Spehar S, Ambu LN & Wilting A (2014) Coming down from the trees: Is terrestrial activity in Bornean orangutans natural or disturbance driven? *Scientific Reports* 4: 4024. DOI: 10.1038/srep04024
8. Hanya G, Fuse M, Aiba S, Takafumi H, Tsujino R, Agetsuma N & Chapman C (2014) Ecosystem impacts of folivory and frugivory by Japanese macaques in two temperate forests in Yakushima. *American Journal of Primatology* 76: 596-607. DOI: 10.1002/ajp.22253.
9. Otani Y, Sawada A & Hanya G (2014) Short-term separation from groups by male Japanese macaques: costs and benefits in feeding behavior and social interaction. *American Journal of Primatology* 76: 374-384. DOI: 10.1002/ajp.22241
10. Sawada A, Sato H, Inoue E, Otani Y & Hanya G (2014) Mycophagy among Japanese macaques in Yakushima: fungal species diversity and behavioral patterns. *Primates* 55: 249-257. DOI: 10.1007/s10329-013-0396-9
11. Sato H, Ichino S & Hanya G (2014) Dietary modification by common brown lemurs (*Eulemur fulvus*) during seasonal drought conditions in western Madagascar. *Primates* 55: 219-230. DOI: 10.1007/s10329-013-0392-0
12. Matsuda I, Tuuga A, Bernard H, Sugau J & Hanya G (2013) Leaf selection by two Bornean colobine monkeys in relation to plant chemistry and abundance. *Scientific Reports* 3: 1873. DOI: 10.1038/srep01873
13. Sha JCM & Hanya G (2013) Temporal food resource correlates to the behavior and ecology of food-enhanced long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Mammal Study* 38: 163-175. DOI: 10.3106/041.038.0305
14. Tsuji Y, Hanya G & Grueter CC (2013) Feeding strategies of primates in temperate and alpine forests: a comparison of Asian macaques and colobines. *Primates* 54: 201-215. DOI: 10.1007/s10329-013-0359-1
15. Otani Y, Yoshihiro S, Takahata Y, Zamma K, Nagai M, Kanie M, Hayaishi S, Fujino M, Sugaya K, Sudo M, Amanai S, Kaneda M, Tachikawa Y, Fukunaga Y, Okahisa Y, Higashi K & Hanya G (2013) Density of Japanese macaque (*Macaca fuscata yakui*) males ranging alone: seasonal and regional variation in male cohesiveness with the group. *Mammal Study* 38: 105-115. DOI: 10.3106/041.038.0206
16. Sha JCM & Hanya G (2013) Diet, activity, habitat use and ranging of two neighboring groups of food-enhanced long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology* 75: 581-592. DOI: 10.1002/ajp.22137
17. Hanya G, Tsuji Y & Grueter CC (2013) Fruiting and flushing phenology in Asian tropical and temperate forests: implications for primate ecology. *Primates* 54: 101-110. DOI: 10.1007/s10329-012-0341-3
18. Hanya G & Chapman CA (2013) Linking feeding ecology and population abundance: a review of food resource limitation on primates. *Ecological Research* 28: 183-190. DOI: 10.1007/s11284-012-1012-y
19. Hanya G & Bernard H (2013) Functional response to fruiting seasonality by a primate seed predator, red leaf monkey (*Presbytis rubicunda*). *Tropical Ecology* 54: 383-395

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 栗原洋介、半谷吾郎 屋久島に生息する二

ホンザルの高順位個体は採食競合による利益を得ているか。第 64 回日本生態学会大会, 2017 年 3 月。

2. 本田剛章、半谷吾郎 屋久島山頂部におけるヤクシマザルの季節移動。第 64 回日本生態学会大会, 2017 年 3 月。

3. 栗原洋介、半谷吾郎 屋久島海岸域に生息するニホンザルにおけるエネルギー収支の季節変化。第 32 回日本霊長類学会大会, 2016 年 7 月。

4. 半谷吾郎、Henry Bernard ボルネオ島・ダナムバレーのレッドリーフモンキーの遊動パターン。第 32 回日本霊長類学会大会, 2016 年 7 月。

5. 栗原洋介・半谷吾郎 屋久島に生息するニホンザルにおけるエネルギーバランスの季節変化。第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月。

6. 肥後悠馬, 本田剛章, 半谷吾郎, 梶村恒 屋久島における植生の垂直分布に着目した森林性野ネズミの種構成と生態特性の比較。第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月。

7. 半谷吾郎 低密度下でのシカと植生の関係: 屋久島のヤクスギ林の場合。第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月。

8. 栗原洋介・半谷吾郎 ニホンザルは行動圏の周縁で食物パッチ利用を変化させる。第 31 回日本霊長類学会大会, 2015 年 7 月。

9. Kurihara Y, Hanya G Japanese Macaques Change Food Patch Use on the Periphery of the Home Range. Vth International Wildlife Management Congress, 2015 年 7 月。

10. 半谷吾郎、宮田晃江、好廣眞一、高畑由起夫、古市剛史、栗原洋介、早石周平 屋久島のニホンザル分布の過去 20 年間の変化。第 31 回日本霊長類学会大会, 2015 年 7 月。

11. 半谷吾郎, 中野隆文. 屋久島の吸血性ヤマビルの宿主選択。第 62 回日本生態学会大会, 2015 年 3 月。

12. 栗原洋介、半谷吾郎。ニホンザルは行動圏の周縁で採食樹利用を変化させるか。第 62 回日本生態学会大会, 2015 年 3 月。

13. 澤田晶子、早川卓志、栗原洋介、半谷吾郎、岸田拓土、阿形清和。野生ニホンザルの腸内細菌叢は採食パターンに応じて変化するのか。第 62 回日本生態学会大会, 2015 年 3 月。

14. Kurihara Y, Hanya G. Comparison of Feeding behavior between two different-sized groups of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*). XXV Congress of International Primatological Society, 2014 年 8 月。

15. Hanya G, Bernard H. Eating seed or young leaf?: Comparison of chemical and distributional properties for red leaf monkeys in Danum Valley, Borneo. XXV Congress of International Primatological Society, 2014 年 8 月。

16. 栗原洋介、半谷吾郎。小さい群れは長距離移動する? -屋久島海岸域に生息するニホンザルにおける採食行動の群間比較-。第 61 回日本生態学会大会, 広島国際会議場(広島), 2014 年 3 月。

17. 澤田晶子、福田真嗣、半谷吾郎。野生ニホンザルの腸内細菌叢解析: サンプル保存方法による影響の比較。第 61 回日本生態学会大会, 広島国際会議場(広島), 2014 年 3 月。

18. 大谷洋介、澤田晶子、半谷吾郎。ニホンザルのオスは集団からの一時離脱を繰り返し、集団形成コストを補償する。日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会, 岡山理科大学(岡山), 2013 年 9 月。

19. Sawada A, Sato H, Inoue E, Otani Y, Hanya G. Fungi as food resources for Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*) on Yakushima Island, Japan. The 36th meeting of the American Society of Primatologists, Caribe Hilton Hotel, Puerto Rico, 2013 年 6 月。

〔図書〕(計 1 件)

Hanya G (2013) Japanese macaques: habitat-driven divergence in social dynamics. In: Primates and Cetaceans: Field Research and Conservation of Complex Mammalian Societies. Yamagiwa J, Karczmarski L (eds.), Springer, Tokyo, pp. 99-114

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/shakai-seitai/ecolcons/hanya/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

半谷 吾郎 (HANYA, GORO)  
京都大学・霊長類研究所・准教授  
研究者番号：4 0 4 4 4 4 9 2

### (2)研究分担者

松田 一希 (MATSUDA, Ikki)  
中部大学・創発学術院・准教授  
研究者番号：9 0 5 3 3 4 8 0

牛田 一成 (USHIDA, Kazunari)  
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：5 0 1 8 3 0 1 7

金森 朝子 (KANAMORI, Tomoko)  
京都大学・霊長類研究所・研究員  
研究者番号：2 0 6 2 5 0 7 4

### (3)連携研究者

村山 美穂 (MURAYAMA, Miho)  
京都大学・野生動物研究センター・教授  
研究者番号：6 0 2 9 3 5 5 2

### (4)研究協力者

なし