

令和 元年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0256

研究課題名（和文）霊長類の食性と腸内細菌との共進化（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Coevolution of primate diet and gut microbe(Fostering Joint International Research)

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） 11,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

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、生態学的時間スケールと、進化的時間スケールの両方で、霊長類と共進化してきたのかを明らかにすることを目的とし、霊長類の系統関係・消化システムと腸内細菌相類似度の関係の解明と、腸内細菌の消化機能についての研究を行った。前者に関しては、基課題で収集した試料も含め、日本、中国、タイ、マレーシア、ウガンダ、ガボンの31種の霊長類について比較を行った。後者については、食性の異なる屋久島の上部域と海岸部のニホンザルについて、試験管内発酵試験と遺伝子解析を組み合わせて、腸内細菌の機能を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腸内細菌が消化や免疫機能、神経系と関連して、ヒトの健康に大きな影響を与えていることが注目されている。ヒトは進化の過程できわめて特殊な食性を獲得しており、とくに現代日本人は、料理された、栄養価の高い食事を恒常的に摂取している点で、ほかのどの動物とも、ヒトのこれまでの進化過程のいずれとも異なっている。動物が腸内細菌をどのように利用して暮らしているかを理解するためには、より厳しく、季節的に大きく変動する環境で暮らす、多数の動物種を対象にした研究が不可欠である。多数の種の腸内細菌を比較し、さらに腸内細菌の消化機能を明らかにする本研究は、きわめて学術的価値の高いものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify how gut microbe has coevolved with primate diet, with special reference to the digestive function, both at the ecological and evolutionary time scales. For that purpose, first, we examined the relationship between primate phylogeny and/or digestive system and the similarity of gut microbe species composition by collecting samples from 31 species of non-human primates living in Japan, China, Thailand, Malaysia, Uganda and Gabon. Second, in order to understand the digestive function of the gut microbe, we conducted in vitro fermentation assay and genetic analysis for the fresh fecal samples collected for Japanese macaques living in the highland and lowland of Yakushima, where they have contrasting diets.

研究分野：動物生態学

キーワード：腸内細菌 霊長類 共進化 食性 系統 消化 16S rRNA 発酵

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌研究は、種間関係研究に残された大きなフロンティアである。宿主の動物は、リグニンを分解するシロアリに見られるように、腸内細菌の膨大な遺伝子セットを、自分自身では消化できない栄養素の消化に利用している可能性がある。本研究費の基課題であった科学研究費基盤研究 B「霊長類の食性と腸内細菌との共進化」では、腸内細菌が霊長類の消化機能にどう影響しながら、生態学的時間スケールと、進化的時間スケールの両方で、霊長類と共進化してきたのかを明らかにすることを目的としていた。(1)6種の野生霊長類の行動観察と糞の収集を通じ、食性の季節変化と腸内細菌相の関連を、細菌のバーコード領域である 16S rRNA を指標としたアンプリコン解析により解明、(2)日本、ボルネオ、東アフリカの約 15 種の霊長類の系統関係・消化システムと腸内細菌相類似度の関係の解明、(3)屋久島のニホンザルで、培養・単離による腸内細菌の消化機能の解明を行った。

2. 研究の目的

本研究では、基課題で取り組んだうちの二つの課題、すなわち、霊長類の系統関係・消化システムと腸内細菌相類似度の関係の解明と、腸内細菌の消化機能についての研究を、さらに発展させて行った。

前者については、基課題で収集した日本、ボルネオ、東アフリカの約 15 種の霊長類に加え、ガボン、中国、タイで新たに試料の収集を行い、およそ 30 種のアジア・アフリカの霊長類を対象にして、比較を行った。後者に関しては、食性の異なる屋久島の海岸・上部域で、ニホンザルの新鮮な糞を収集し、試験管内で発酵実験を行うとともに、その試料について 16S rRNA アンプリコン解析、およびメタゲノム解析を行って、消化機能の違いをもたらす細菌及び遺伝子の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌の種間比較に関する研究

ガボンでは、2017 年 2 月から 3 月に、熱帯生態学研究所(Institut de Recherches en Ecologie Tropicale) およびムカラバ・ドウドウ国立公園 (Parc National de Moukalaba-Doudou) を訪問し、野生霊長類 8 種(シロエリマンガベイ (*Cercocebus torquatus*)、ホオジロマンガベイ (*Lophocebus albigena*)、キタタラポワン (*Miopithecus ogouensis*)、オオハナジログエノン (*Cercopithecus nictitans*)、クチヒゲグエノン (*C. cephus*)、カンムリグエノン (*C. pogonias*)、ゴリラ (*Gorilla gorilla*)、チンパンジー (*Pan troglodytes*))の糞試料を収集した。採取した糞は、10% SDS を主成分とする Lysis buffer に保存した。日本に持ち帰ってから、ビーズ破碎後に QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。細菌のバーコード領域である 16S rRNA の V3V4 領域を増幅し、その配列を次世代シーケンサ Miseq で解読した。得られた配列を、細菌の 16S rRNA 領域の塩基配列のデータベースと照合し、種を同定した。

同様に、2018 年 2 月から 3 月に、中国を訪問し、広東省、広西チワン族自治区、雲南省、陝西省、安徽省に生息する、野生のアカゲザル (*Macaca mulatta*)、チベットモンキー (*M. thibetana*)、シロアタマラングール (*Trachypithecus leucocephalus*)、ウンナンシシバナザル (*Rhinopithecus bieti*)、キンシコウ (*R. roxellana*) の糞試料を、ガボン産霊長類と同様の方法で収集した。2018 年 11 月に再度訪中し、これらの糞試料について、ガボン産の試料と同様に、遺伝子解析を中山大学で実施した。

また、タイでも共同研究者に試料の収集を依頼し、カニクイザル (*M. fascicularis*)、ベニガオザル (*M. arctoides*)、アッサムモンキー (*M. assamensis*)、キタブタオザル (*M. leonina*)、ファイヤールトン (*T. phayrei*)、ダスキールトン (*T. obscurus*) の糞試料を収集し、2019 年 1 月に日本に輸出した。これらの試料の遺伝子解析は、まだ実施していない。

(2) 腸内細菌の機能に関する研究

2016 年 5 月に、屋久島の海岸部と上部域で、新鮮なニホンザルの糞を採取した。遺伝子試料を採取後、数時間以内に保冷状態で実験室に持ち帰り、糞の懸濁液を、ヒサカキの葉の乾燥粉末と混ぜ合わせ、発酵瓶に二酸化炭素を充填し、密栓して、攪拌しながら、24 時間 37 度で保温した。6 時間に 1 回、ゴム栓に注射針を指して、ガスの発生量を測定した。24 時間後、栓を開けて懸濁液を採取し、冷凍保存した。

懸濁液はテクノプロ・R&D 社に依頼して、短鎖脂肪酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で計測した。

遺伝子試料は、チューリッヒ大学進化生物・環境学研究所に持ち込み、ガボン産試料と同様に、DNA を抽出して、16S rRNA の解析を行った。また、NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep for Illumina を用いてライブラリを作成し、次世代シーケンサ HiSeq でメタゲノム解析を行った。

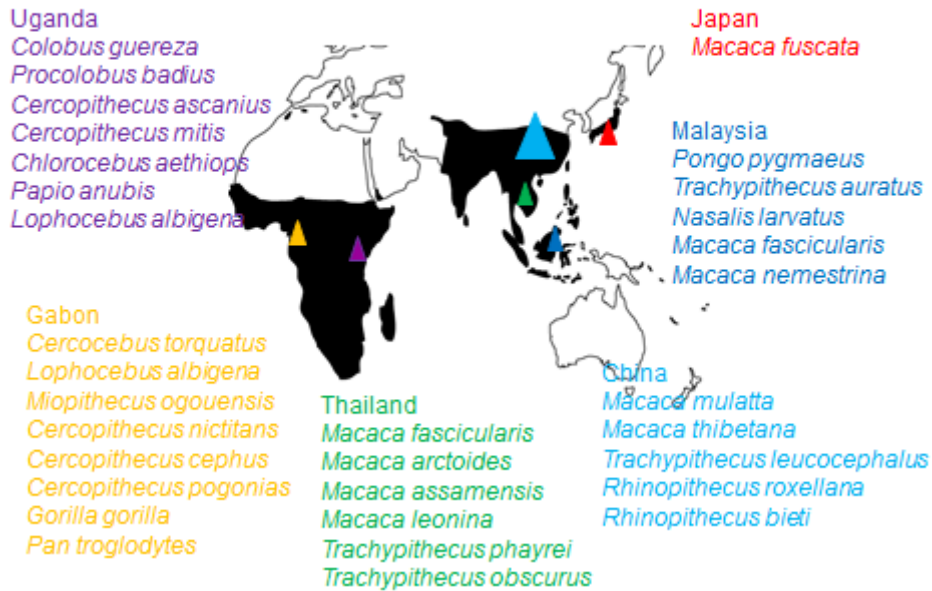
4. 研究成果

(1) 腸内細菌の種間比較に関する研究

現在、まだすべての遺伝子解析が終了していない。アジア・アフリカ産のヒト科・オナガ

ザル科の 31 種の霊長類の腸内細菌叢を、比較する予定である。

Compare gut microbe species composition over the Old World



(2) 腸内細菌の機能に関する研究

試験管内発酵実験の結果、屋久島上部域の糞は、ガスの発生量と、短鎖脂肪酸の産生量が、海岸部より多いことが分かった。また、短鎖脂肪酸の組成も、上部域と海岸部で異なっていることが分かった。つまり、葉をより多く食べていると、腸内細菌が葉をより効率的に発酵できることが示された。

遺伝子解析の結果、上部域と海岸部で細菌の操作的に定義した種(operational taxonomic unit; OUT)や多様性指数は変わらなかったものの、種構成はこの 2 地域ではっきり分かれていた。現在、さらに詳しい解析を進めている。

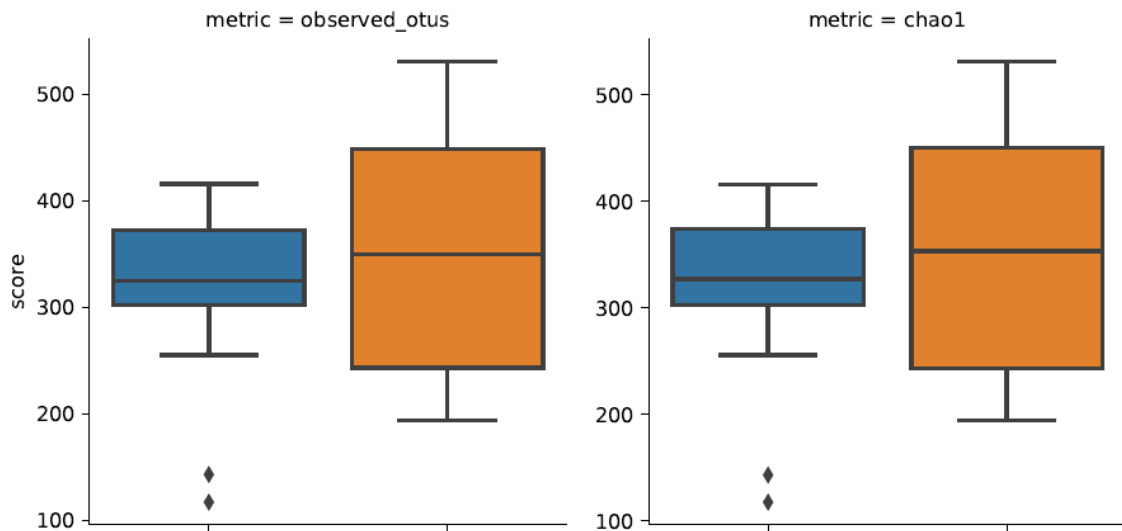


図. 海岸部(青)と上部域(オレンジ)の腸内細菌の OUT 数(左)と多様性指数(右)

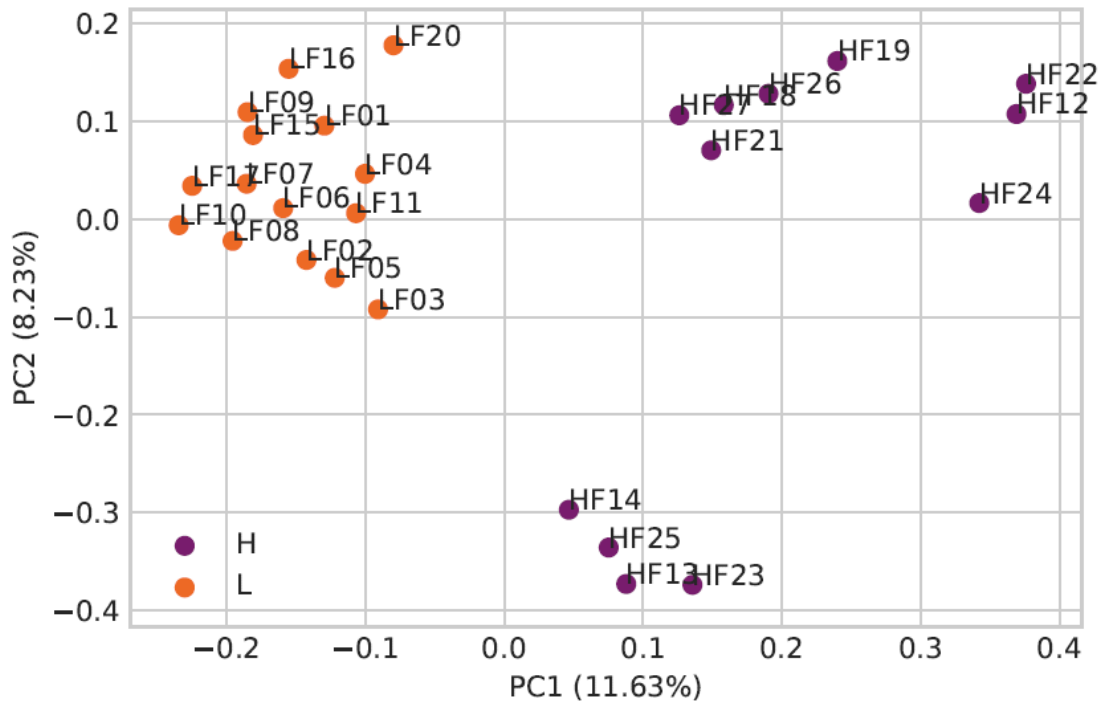


図 腸内細菌の種構成。H(上部域)とL(海岸部)で、大きく二つに分かれている。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計15件)

1. Kurihara Y, Hanya G (2018) Within-population variations in home range use and food patch use of Japanese macaques: A perspective of intergroup hostility. *Folia Primatologica* 89: 397-414. DOI: 10.1159/000493574
2. Sha JCM, Kurihara Y, Tsuji Y, Take M, He T, Kaneko A, Suda-Hashimoto N, Morimoto M, Natsume T, Zahariev A, Blanc S, Hanya G. (2018) Seasonal variation of energy expenditure in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Journal of Thermal Biology* 76: 139-146. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2018.07.009
3. Hayakawa T, Sawada A, Tanabe AS, Fukuda S, Kishida T, Kurihara Y, Matsushima K, Liu J, Akomo-Okoue E, Gravena W, Kashima M, Suzuki M, Kadowaki K, Suzumura T, Inoue E, Sugiura H, Hanya G, Agata K. (2018) Improving the standards for gut microbiome analysis of fecal samples: Insights from the field biology of Japanese macaques on Yakushima Island. *Primates* 59: 423-436. DOI: 10.1007/s10329-018-0671-x
4. Hanya G, Otani Y, Hongo S, Honda T, Okamura H, Higo Y (2018) Activity of wild Japanese macaques in Yakushima revealed by camera trapping: Patterns with respect to season, daily period and rainfall. *PLoS ONE* 13: e0190631. DOI: 10.1371/journal.pone.0190631
5. Hanya G, Naito S, Namioka E, Ueda Y, Sato Y, Pastrana JA, He T, Yan X, Saito M, Costa RFP, Allanic M, Honda T, Kurihara Y, Yumoto T, Hayakawa T (2017) Morphometric and genetic determination of age class and sex for fecal pellets of sika deer (*Cervus nippon*). *Mammal Study* 42: 239-246. DOI: 10.3106/041.042.0406
6. Thompson CL, Powell BL, Williams SH, Hanya G, Glander KE, Vinyard CJ (2017) Thyroid hormone fluctuations indicate a thermoregulatory function in both a tropical (*Alouatta palliata*) and seasonally cold-habitat (*Macaca fuscata*) primate. *American Journal of Primatology* e22714. DOI: 10.1002/ajp.22714.
7. Sha JCM, Kaneko A, Suda-Hashimoto N, He T, Take M, Zhang P, Hanya G (2017) Estimating activity of Japanese macaques (*Macaca fuscata*) using accelerometers.

American Journal of Primatology e22694. DOI: 10.1002/ajp.22694.

8. Kurihara Y, Hanya G (2017) Comparison of energy balance between two different-sized groups of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*). Primates 58: 413-422. DOI: 10.1007/s10329-017-0607-x

9. 宮田晃江、好廣眞一、高畑由起夫、萬田正治、古市剛史、栗原洋介、早石周平、半谷吾郎 (2017). 屋久島のニホンザル生息状況の過去 20 年間の変化. 霊長類研究 33: 35-42. DOI: 10.2354/psj.33.001

10. Matsuda I, Clauss M, Tuuga A, Hanya G, Yumoto T, Bernard H, Hummel J (2017) Factors affecting leaf selection by foregut-fermenting proboscis monkeys: New insight from in vitro digestibility and toughness of leaves. Scientific Reports 7: 42774. DOI: 10.1038/srep42774

11. Bernard H, Bili R, Matsuda I, Hanya G, Wearn OR, Wong A, and Ahmad AH. (2016) Species richness and distribution of primates in disturbed and converted forest landscapes in northern Borneo. Tropical Conservation Science 9: 1-11. DOI: 10.1177/1940082916680104

12. 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

13. 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

14. 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

15. 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

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 半谷吾郎、大谷洋介、本郷峻、本田剛章、岡村弘樹、肥後悠馬. カメラトラップで明らかになった野生ニホンザルの活動時間. 第 33 回日本霊長類学会大会. 武蔵大学

2. 栗原洋介、半谷吾郎. 屋久島に生息するニ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 03 月. 早稲田大学

3. 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 03 月. 早稲田大学

4. 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 07 月. 鹿児島大学

5. 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 07 月. 鹿児島大学

〔図書〕(計 1 件)

1. 半谷吾郎、松原始 サルと屋久島: ヤクザル調査隊とフィールドワーク. 旅するミシン店、東京

〔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/>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：清水健太郎

ローマ字氏名：SHIMIZU, Kentaro

所属研究機関名：チューリッヒ大学

部局名：進化生物・環境学研究所

職名：准教授

研究協力者氏名：アルフレッド・ンゴマンダ

ローマ字氏名：Alfred Ngomanda

所属研究機関名：Institut de la Recherche en Ecologie Tropicale

部局名：進化生物・Institut de la Recherche en Ecologie Tropicale

職名：所長

研究協力者氏名：張鵬

ローマ字氏名：ZHANG, Peng

所属研究機関名：中山大学

部局名：人類学部門

職名：教授

研究協力者氏名：范鹏飞

ローマ字氏名：FANG, Pengfei

所属研究機関名：中山大学

部局名：生物学部門

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：スチンダ・マライビジトノンド

ローマ字氏名：Suchinda Malaivijitnond

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。