

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650145

研究課題名(和文) 霊長類が真菌の多様性維持に果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of primates on the maintenance of fungi species diversity

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ニホンザルが非常に多様なキノコを採食することを明らかにしたが、本研究では、この次の段階の研究として、ニホンザルの糞の存在によって土壌中の真菌相が変化することを実験的に証明することを目的とした。屋久島で30個のサルの糞を採取した。これらの糞を顕微鏡観察すると、胞子が見つかり、また死細胞の染色液で染まらなかったことから、サルが生きた状態で胞子を運んで糞とともに排泄することが確認された。さらに、このサルの糞を、5つの条件を設けて土壌に接種した。接種後、1月、3か月、1年後の土壌を採取した。土壌および糞のDNA解析により、糞の接種で土壌中の真菌相にどのような変化が起きたのかを明らかにする。

研究成果の概要(英文)：We have already clarified that Japanese macaques eat a wide variety of species of fungi fruiting bodies. In this study, as a next step, we aimed to prove that soil fungi species composition changes by the addition of feces of macaques that eat fungi fruiting bodies. We collected 30 feces of Japanese macaques in Yakushima. According to the microscopic observations, most of the feces contained live fungi spores. These feces were set on the ground of Yakushima under five different conditions to discriminate the effects of macaques' spore dispersal and the increase of ammonia fungi. Soil was collected after 1 month, 3 months, and 1 year of the experiments. Changes in fungi species composition are clarified by the DNA analysis of these soil and fecal samples.

研究分野：生態学

キーワード：真菌 霊長類 胞子散布 次世代シーケンス ニホンザル 屋久島 子実体

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、挑戦的萌芽研究「ニホンザルのキノコ食を通じた菌類の孢子散布機構の解明」(平成 23 年、24 年度)で、屋久島のニホンザルが 1 年間で少なくとも 67 種もの多様なキノコ(子実体)を採食することを示した(Sawada et al., 2014)。これまで、哺乳動物がこれほど多種のキノコを食べることは知られていなかった。他方、オーストラリアの研究では、哺乳類排除柵を設けると、柵内で菌の多様性や土壌中の孢子の密度が数年間で低下する(Gehring et al. 2002 Ecology Letters)。調査地にはキノコ食の哺乳類が多く、この結果は哺乳類がキノコ食を通じて菌類の多様性に影響することを示唆する。しかし、その因果関係は実際には不明であり、その間を埋める研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、この次の段階の研究として、サル糞の存在によって土壌中の真菌相が変化することを実験的に証明することを目的とした。申請者らの、ニホンザルの採食生態に関する過去の研究の蓄積を踏まえ、最終的に、森林生態系の中で、哺乳類が真菌の多様性維持に影響を与えることを証明する。

3. 研究の方法

屋久島の西部林道で、2013 年の 6 月、7 月、9 月にそれぞれ 10 個の排泄直後のサル糞を採取した。そのうち一部を DNA 解析のためエタノール保存した後、以下の 4 つの処理を行った。(1)土壌に安置し、それ以上動物の攪乱を受けないように、幅 20cm 程度のプラスチック製の籠で糞を覆う。(2)土壌に安置し、(1)の籠と同じ大きさのアクリル製の透明の箱で覆う。(3)残りをオートクレーブで滅菌し、冷えた後、(2)同様に土壌安置。(4)調査基地に持ち帰り、蒸留水と糞の懸濁液を、軌道振とう機で 60rpm、30 分間攪拌した上澄み(これにより孢子が取り出せる; Gordon and Comport 1998 Mycologia)を土壌付与、アクリル箱を設置、さらにコントロールとして(5)何も置かず、籠だけを設置する条件を設定した。屋久島国有林 275 林班内で、これらの籠・箱を設置し、同時にその場所の土を採取してエタノール保存した。付置後 1 か月後、3 か月後、1 年後に付置場所の土壌を採取し、最後に籠・箱を回収して撤去した。

この野外実験で用いた同じ 30 個のサル糞の一部を、冷蔵状態で霊長類研究所に持ち帰った。糞の懸濁液を、死細胞を染色するトリパンブルーで染色したのち、顕微鏡観察した。

また、霊長類研究所内で、最初にオートクレーブ滅菌した土壌でポットで栽培していたアベマキの実生に、これらのサル糞を接種

し、同時にポットの土を採取してエタノール保存した。この実生を 2014 年 3 月に掘り返し、ポットの土と、実生の根を採取し、顕微鏡観察用に菌根のプレパラートを作成するとともに、DNA 採取用にエタノール保存した。

これらのサンプルを、土壌については TAKARA NucleoSpin Soil Kit で、糞については QIAamp DNA Stool Mini Kit で、菌根については DNeasy Plant Mini Kit で DNA 抽出を行った。最終的に得られた試料数は、屋久島の野外実験の土壌が 516、サル糞が 30、犬山の室内実験の土壌が 100 (うちサル糞接種前が 40、接種後が 36、未接種のコントロールが 24)、菌根が 60 である。屋久島での野外実験中に、設置していた箱・籠が移動したり、犬山での室内実験中に枯死したアベマキ実生もあったため、試料数はもとのサル糞の試料数の倍数になっていない。

抽出した DNA を Qubit 定量したのち、それに応じて濃度を調整しながら真菌特異的に増幅するプライマ (ITS1F_KYO1 および ITS2_KYO2-nexR) で PCR 増幅を行った。

4. 研究成果

現在、シーケンス結果の解析は完了していないため、土壌中の真菌相が変化することを実験的に証明することはできていない。そのため、顕微鏡観察の結果について述べる。

観察したほとんどすべての糞で、孢子が観察され、死細胞を染色するトリパンブルーで染色されなかったことから、サルが生きた孢子を運ぶところまでは、確認することができた。

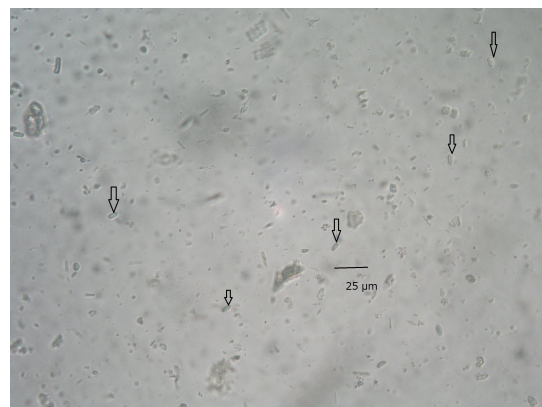


写真 1 サル糞の中で観察された孢子(矢印)。

また、室内の接種実験の根を観察したところ、サル糞接種、未接種の実生いずれでも、菌根の形成が確認された。アベマキ種子を蒔種する前に、土壌はオートクレーブ滅菌したが、その後は滅菌状態に置いていたわけではないため、未接種の実生でも外部から何らかの真菌が入り込んで、菌根を形成したものと思われる。菌根を形成する種は顕微鏡観察では同定できなかったため、今後 DNA 解析で明らかにしていく。

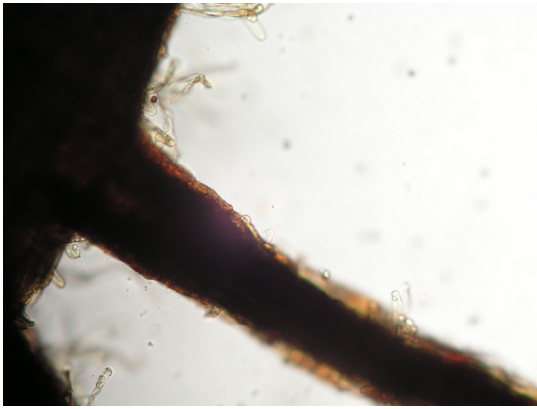


写真2 サル糞を接種していない実生の根。太く見えるのがアベマキの細根で、その周りの、細かいのが菌糸。細根は菌根を形成しているため、不透明に見える。



写真3 サル糞を接種した実生の根。

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13件)

1. 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

2. 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.

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

11. 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

12. 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

13. 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 9件)

1. 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.

2. 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.

3. 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か. 第62回日本生態学会大会, 2015年3月.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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年度合同会大会, 岡山理科大学(岡山), 2013年9月.

9. 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 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(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

(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: 40444492

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし