

野生のニホンザルはどのような腸内細菌を持っているか？

—屋久島のフィールドでのマイクロバイーム解析の挑戦—

概要

腸内細菌は食べ物の消化を助け、動物の健康を守る役割を持っています。人間のような雑食動物や、草食動物、または肉食動物には、それぞれの食性に合わせた異なる役割の腸内細菌が共生しています。それでは日本の森林に暮らし、私たちと同じ霊長類の間でもあるニホンザルは、どのような腸内細菌を持っているのでしょうか？ 京都大学霊長類研究所 早川卓志 特定助教、半谷吾郎 同准教授、中部大学創発大学院 澤田晶子 学振特別研究員、学習院大学理学部 阿形清和 教授らの研究グループは、野生のニホンザルの糞便の DNA を分析し、どのような腸内細菌を持っているかを明らかにしました。また、実験施設（ラボ）から遠く離れた森林でのフィールドワークにおいて、どのように野生動物の糞便を集め、腸内細菌の DNA を保存し、ラボまで持ち運んで分析するかという手法を確立しました。本手法は、本学の大学院生や留学生を対象に実施している「屋久島フィールド・ゲノム科学実習」で実践しました。フィールドワークとラボワークが融合した研究の現場で、本手法が使われることが期待されます。今後、日本特有の四季によって変化する森の食べ物にどのようにニホンザルの腸内細菌が適応しているのかなど、より詳細なニホンザルの腸内細菌の研究に挑戦していきます。

本成果は、2018年6月25日に国際学術誌「Primates」にオンライン掲載されました。



(左) ヤマモモの果実を食べる5月の屋久島のニホンザル。野生のニホンザルがどのような腸内細菌をもちいて、森の食べ物を消化しているのかを、本研究では明らかにしました。

(右) 2014年5月の屋久島フィールド実習の様子。京大の大学院生・留学生たちが、ニホンザル（右上に小さく見えます）の行動を熱心に観察し、糞を落とすのを待っています。京大の伝統であるフィールドワークと腸内細菌を分析するラボワーク技術の融合に成功しました。（写真提供：ともに早川卓志）

1. 背景

動物の消化管には無数の腸内細菌が生息しており、食べ物の消化を助けています。ヒトのお腹の中には 1000 種 100 兆個の腸内細菌が暮らしていると考えられています。腸内細菌の全体のことを腸内細菌叢（そう）と呼びます。腸内細菌叢のバランス（どんな役割をもった細菌種がどれぐらいの割合で共生しているのか）は、動物の健康に大きな影響を与えます。

従来、どのような腸内細菌が共生しているのかを知るためには、糞便に含まれている菌を、実験室のシャーレの上で培養して調べる必要がありました。培養困難な菌種も多く、腸内細菌叢の全体像をつかむのは容易ではありませんでした。しかし、次世代シーケンサーという DNA の解析機器の登場によって、糞便中の細菌の遺伝子 DNA の塩基配列を網羅的に決定し、どんな菌種がどのような割合で含まれているかを明らかにできるようになりました。遺伝子をベースにして調べる細菌叢の概念のことをマイクロバイームと呼びます。

腸内細菌は食物の消化に関わるため、食べ物の種類によって細菌叢の構成が大きく変わります。炭水化物を中心に食べる人とタンパク質や動物性脂肪を中心に食べる人のマイクロバイームは、異なる腸内細菌によって構成されています。ヒト以外の動物の世界でも同じで、雑食、草食、肉食動物の腸内のマイクロバイームは異なります。マイクロバイーム解析は動物の生態や進化の研究において不可欠なものになっています。

ヒトがどのようなマイクロバイームを持って進化してきたのかを知るためには、ヒトに近縁な動物、すなわち霊長類の腸内細菌叢を調べる必要があります。野生の霊長類の主要な生息地は森林で、しかもその多くが熱帯林です。腸内細菌叢は糞便から分析することができますが、野外で落とされた糞便ではすぐにお腹の中と異なる菌が増殖し、さらに DNA が簡単に分解してしまいます。したがって、森の中でマイクロバイーム解析のための糞便サンプルを集め、保存し、実験室まで運搬する手法の確立が必要でした。

また、私たち日本人にとって最も身近な（ヒト以外の）霊長類である野生のニホンザル（*Macaca fuscata*）のマイクロバイームも、これまでに調べられていませんでした。北は下北半島から、南は屋久島まで、四季変化が豊かな野山に生息し、日本人も口にしている山菜や果物なども食べています。ときに人里に現れて農作物に被害も与えることもあります。ヒトの進化を理解し、そして日本人を知るためには、日本人とともに歩んできた野生のニホンザルのマイクロバイームを知ることは重要です。

京都大学は半世紀以上にわたり、フィールドワーク（野外での研究活動）の手法を基本として、日本各地の野生のニホンザルの生態や社会を明らかにしてきました。特に屋久島の照葉樹林に暮らす野生のニホンザルでは、1970 年代から餌付けなどをせず自然な姿のままの長期生態調査がおこなわれており、こうした調査の歴史は 1993 年の屋久島の自然遺産登録の契機ともなっています。



屋久島の西部林道のニホンザル（提供：早川卓志）

本研究では、京大が持つ屋久島のフィールドステーション（調査基地）をベースとして、伝統的なフィールドワークの手法で野生のニホンザルから糞便を採取し、マイクロバイーム解析をおこないました。大学院生や留学生が屋久島の現地で、フィールドワークとラボワークの双方を学ぶ「屋久島フィールド・ゲノム科学実習」でも本解析を実践し、基礎研究から教育実践まで幅広い応用が可能な手法であることを示しました。

2. 研究手法・成果

1970年代から長期調査がおこなわれている屋久島の西部林道の野生のニホンザルを対象に研究をおこないました。西部林道のニホンザルは京都大学などのグループによる長期調査によって人なれしており、行動を直接観察することができます。餌付けをしていないので、自然な姿を記録できます。個体識別をして、自由に森の中を活動するニホンザルを追跡し、糞便を収集しました。糞便には食べ物の消化物だけではなく、腸内細菌も一緒に出てきています。しかし、排泄されて外気に触れた瞬間に、多くの腸内細菌は死に、別の関係ない細菌が増殖してしまいます。そこで排泄を確認したら、速やかに糞便を採取することを心がけました。

森の中には冷蔵庫や冷凍庫がありません。フィールドステーションで用意した保冷箱をもちいて、外気にふれていない糞の中身を冷蔵庫の中のような状態で保存し、菌叢の活動を抑える形で持ち運んで、フィールドステーションでただちに凍結しました。菌叢を維持する理想的なサンプリングに近い方法になります。また、RNA later とライシスバッファ（lysis buffer）という、DNA を安定に保存できる 2 種類の保存液にも糞便を浸けて、冷やさずに持ち帰りました。これは保冷箱すら用意できないような森の中での調査を想定しており、「理想的な」手法と同じ結果が得られるか検証しました。

採取後、できる限り早くフィールドステーションに持ち帰り、京大本学の実験室に運搬して、DNA 解析をおこないました。実験では、ヒトなどの研究で一般的に使われるマイクロバイーム解析の手法を適用しました。細菌の 16S rRNA という遺伝子の塩基配列を、ニホンザルの糞便から抽出した DNA から PCR 法（DNA の対象領域を特異的に増幅して解析する手法）によって増幅し、次世代シーケンサーのひとつ MiSeq で網羅的に解読しました。16S rRNA の配列は細菌種によって異なるため、含まれていた 16S rRNA の塩基配列の種数を数え、それぞれの塩基配列をデータベースに照合することで、どんな菌種がどれぐらいの割合で含まれていたかを判定できます。次世代シーケンサーから得られた膨大な塩基配列の処理には、共同研究者の田辺晶史博士（龍谷大学）が開発したソフトウェア Claident を用いました。



屋久島の西部林道でのフィールド実習の様子（提供：早川卓志）

さらに京都大学霊長類研究所で飼育されているニホンザルからも、フィールドと全く同じ方法で糞便を採取し、比較しました。屋久島での調査は2014年5月と7月の異なる時期に2回おこないました。その結果、

- ① 野生のニホンザルの菌叢は、飼育のニホンザルよりも多様性が高い（多くの菌種がバランスよく生息している）ことがわかりました。
- ② ニホンザルの腸内細菌叢にはプレボテラ属 (*Prevotella*) という細菌の仲間が多く含まれていました。
- ③ RNA/ater やライシスバッファーをもちいてサンプルを常温で保存・運搬しても、含まれている細菌の種類を安定的に調べることができました。ただし、細菌のバランス（それぞれの細菌種がどれぐらいの割合で検出されるか）には少なからず影響が出ました。

今回の研究の大きな成果は、野生のニホンザルがどのような腸内細菌叢を持っているかをはじめて明らかにできたとともに、野外でも実践可能なサンプリング手法のスタンダードと注意点を示すことができたことです。

2014年5月の屋久島での調査は「屋久島フィールド・ゲノム科学実習」の中でおこなわれました。1999年に屋久島・上屋久町の主催ではじまった「屋久島フィールドワーク講座」の流れを汲む伝統のある実習です。その後、京都大学グローバル COE プログラム、現在は京都大学・霊長類学・ワイルドライフサイエンス (PWS) リーディング大学院の実習として受け継がれています。この実習では、英語を公用語として留学生や外国人研究者を交えて実施し、伝統的なフィールドワークと最先端のラボワークを同時に学ぶ機会を提供しています。今回の論文の研究メンバーにも、留学生を含む当時の実習生が加わっています。基礎研究から教育実践まで幅広い応用が可能な、研究環境のグローバル化を象徴する研究結果となりました。



(左) 野外で綿棒を用いて糞便を採取する様子 (右) 収集したサンプル (写真提供：ともに早川卓志)

3. 波及効果、今後の予定

本研究は腸内細菌叢という観点でのニホンザルの生態研究の発展につながるとともに、海外の野生霊長類の調査での研究手法の活用が期待されます。予備的な結果ですが、今回の研究で、ヤマモモの果実が豊富な初夏の5月と、昆虫を食べ始める7月とでは、ニホンザルの腸内細菌叢に違いがあることが示唆されました。他の熱帯の国々とは異なり、ニホンザルは厳しい四季の季節変化に柔軟に適応しています。地域や季節など要因がどうニホンザルの腸内細菌叢に影響を与えているのか、今後の研究で調べていきたいと思えます。

また、人工的な餌で育つ飼育下のニホンザルの腸内細菌叢は、屋久島の野生のニホンザルとは異なる多様性を持つことが示唆されました。野生のニホンザルにも様々な生活を送る個体や集団がいます。中には人里にあらわれて、農作物を食べるニホンザルもいます。保全や獣害対策の観点からも、日本各地の生息地の食べ物の多様性に対して、どのようにニホンザルの腸内細菌叢が適応しているのか、調査していく必要があります。ニホンザルで多く検出されたプレボテラ属という細菌のグループは、ヒトのマイクロバイオーームにおいて、食習慣の違いに関係していると考えられており、ヒトとニホンザルとの比較研究も期待されます。

今回、常温で持ち運ぶことができ、大学院実習でも実践できる簡便なマイクロバイオーームの解析手法を提案できました。国や地域によっては、山奥でのキャンプ生活でのフィールドワークを余儀なくされることも少なくありません。そうした場面においても実践可能なマイクロバイオーームのサンプリング法は、知られざる生態をもった野生動物の研究の発展に寄与することでしょう。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、京都大学・霊長類学・ワイルドライフサイエンス (PWS) リーディング大学院が2014年春季に開催した「屋久島フィールド・ゲノム科学実習」の成果を含みます。科学研究費補助金 基盤研究(B) (25291100、17H01911)、特別研究員奨励費 (12J04270)、若手研究(B) (25840170、16K18630)、および国際共同研究加速基金 (15KK0256) の助成を受けました。

<論文タイトルと著者>

タイトル: Improving the standards for gut microbiome analysis of fecal samples: insights from the field biology of Japanese macaques on Yakushima Island (糞便サンプルをもちいた腸内細菌解析の手法の改良: 屋久島のニホンザルのフィールド生物学からの考察)

著者: 早川卓志、澤田晶子、田辺晶史、福田真嗣、岸田拓士、栗原洋介、松島慶、Jie Liu、Etienne-Francois Akomo-Okoue、Waleska Gravena、鹿島誠、鈴木真理子、門脇浩明、鈴木崇史、井上英治、杉浦秀樹、半谷吾郎、阿形清和

掲載誌: Primates DOI: <https://doi.org/10.1007/s10329-018-0671-x>

こちらからどなたでもお読みになれます Springer Nature SharedIt: <https://rdcu.be/2KC6>