

DNA解析を通じた上高地のニホンザルの水生昆虫食の解明

長原衣麻 (信州大学理学部生物学コース・進化人類学研究室3年)

背景

ニホンザルの昆虫食：**夏期利用・陸生種**が主

屋久島：7月に最多(摂取量：約10~20%) (Hanya, 2003)

志賀高原：夏に利用(糞中体積比：4%以下)⇔冬は0% (Suzuki, 1965)

白神山地：糞中出現頻度：夏は51.9%⇔冬は約3~13% (Enari et al., 2005)

+年齢・食性の関係：**コドモ**が昆虫を多く採食@屋久島 (Hanya, 2003)

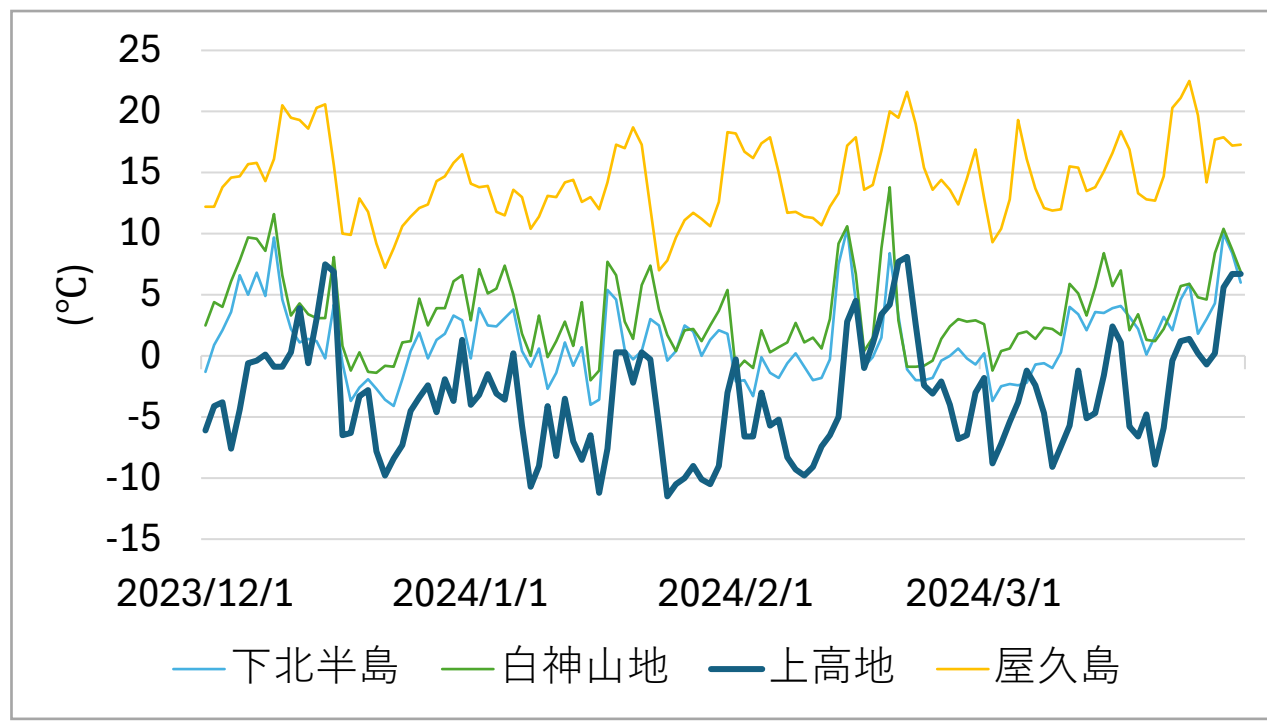
○上高地(中部山岳地域)集団：非ヒト霊長類生息地のうち**最寒地**の一つに生息

(厳冬期の最低気温-25°C：分布北限の北北半島より寒冷)

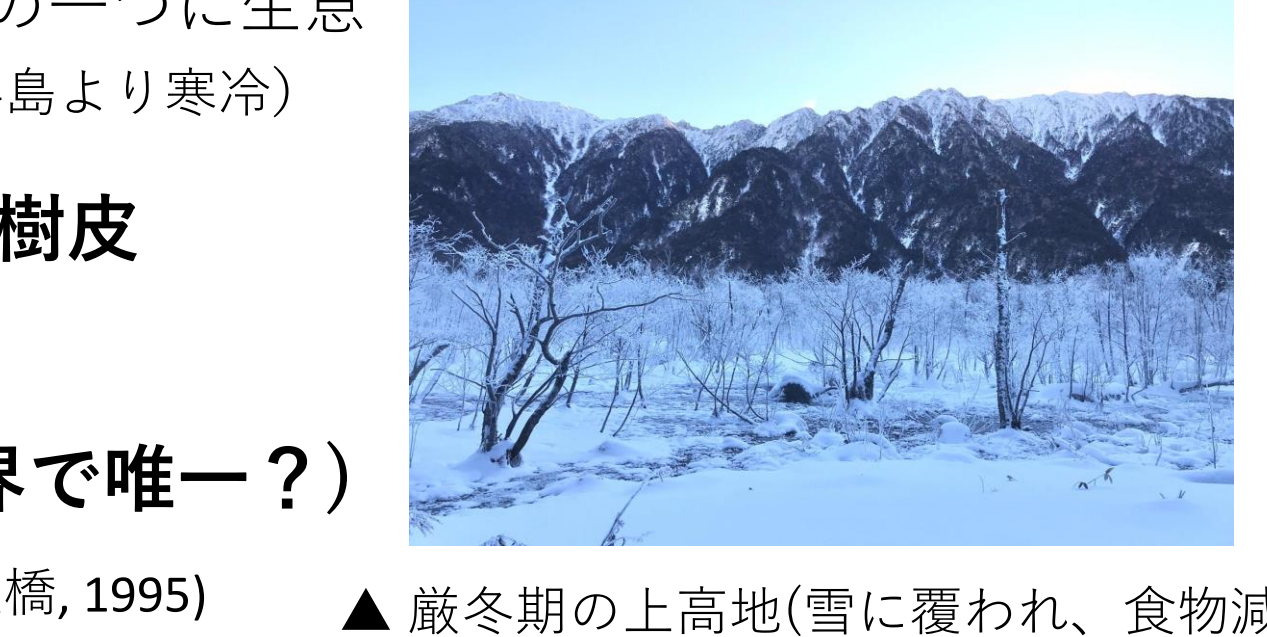
・厳冬期の主な食物：**ササの葉・樹皮**
...糞中体積比は87% (大橋, 1995)

◀**厳冬期の水生昆虫食**(世界で唯一?)

...糞中出現頻度は約10~50% (大橋, 1995)



▲上高地の気温(2023年12月~2024年3月)
*各地のデータ：信州山の環境科学センター・気象庁より



▲厳冬期の上高地(雪に覆われ、食物減)

【目的：昆虫食を行う個体の傾向 & 採食する昆虫相を解明】

行動観察(動画解析)

○昆虫を採食するニホンザル個体の傾向が分かる!

+複数個体の行動を詳細に記述できる

△採食する昆虫種の特定は難しい...

糞中DNA解析

○採食する昆虫種が詳しく分かる!

+従来手法(水洗・破碎)より正確な検出ができる

△どのような個体が昆虫を採食するかは分からない...

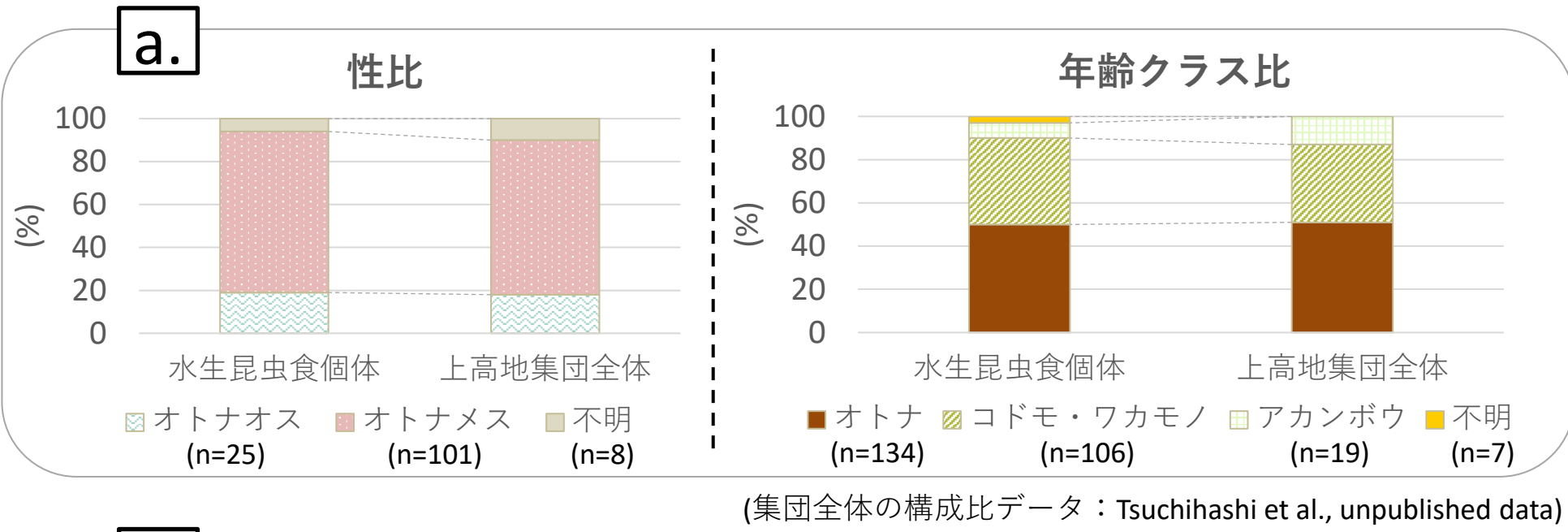
本研究の新規性

高解像度の映像解析での行動観察 & DNA解析での網羅的な種検出
マクロ・ミクロ両視点で上高地ニホンザルの昆虫食究明

結果

・水生昆虫食：**全ての性・年齢クラス**で観察、採食速度・方法：**コドモとオトナ**で差なし & **アカンボウ**独自の技術

・厳冬期において昆虫食は継続(陸生昆虫も含む) + **河川の氾濫後は陸生種・止水や緩流の水生種のみ採食**



(集団全体の構成比データ：Tsuchihashi et al., unpublished data)

a. 性・年齢クラスの構成比：全体 - 水生昆虫食個体間に明確な差なし
⇒ **全ての性・年齢クラスで水生昆虫食**

*年齢クラスの「不明」は少なくともコドモ以上
*カイ二乗検定を実施(性比： $\chi^2=6$, $df=4$, $p=0.1991$ / 年齢クラス比： $\chi^2=12$, $df=9$, $p=0.2133$)

b. 平均採食速度は**アカンボウ**→**コドモ**以上で約2倍に上昇

(+オトナ・ワカモノでは、昆虫食と並行で魚を探すことで採食速度が低下)

⇒**コドモはすでにオトナと同等の採食技術をもつ?**

c-1. 採食方法は年齢で異なる

...コドモ以上：石への操作(図中*)の割合は減少(石：掌より大きい操作対象)

c-2. 採食場所も年齢で異なる

...採食中の後脚の浸水：アカンボウではわずか20%以下

⇒**アカンボウは独自の方法・場所で採食している?**

(+α) 採食方法：昆虫の生活型に対応

「吸い出す」の11/12回

：携葉型の種(トビケラ)を採食

「指でつまむ」の35/48回

：匍匐型・遊泳型の種を採食(カワゲラ・カゲロウ)

(「吸い出す」の残り1回は巻貝を、「指でつまむ」の残り13回は携葉型の種を採食)

(表1) 検出された昆虫種：系統解析に基づいた遺伝的種

*配列一致率で分類レベル確定(種：98%~、属：97%~、科：94%~、目：85%~)

綱 class	目 order	科 family	学名	和名
カゲロウ目 Ephemeroptera	Ephemeroptera	Ameletidae	Ameletus sp. 1	ヒメフタオカゲロウ属の一種
		Ameletus sp. 2	ヒメフタオカゲロウ属の一種	
		Drumella basalis	オオマダラカゲロウ	
		Leptophlebiidae	Paraleptophlebia westoni	ウェストントビロカゲロウ
カワゲラ目 Plecoptera	Plecoptera	Isorychiidae	Isorychia valida	チラカゲロウ
		Perilodidae gen. sp. 1	アミメカワゲラ科の一種	
カメムシ目 Hemiptera	Hemiptera	Perilodidae gen. sp. 2	アミメカワゲラ科の一種	
		Nemouridae	Nemoura fulva	オナシカワゲラ
		Phytocoris intricatus	カスミカメムシ科の一種(和名なし)	
		Miridae	Miridae sp. 1	カスミカメムシ科の一種
カメムシ目 Hemiptera	Hemiptera	Miridae	Miridae sp. 2	カスミカメムシ科の一種
		Cicadellidae	Hemiptera sp. 1	カメムシ目の一種
		Hemiptera	Hemiptera sp. 2	カメムシ目の一種
		Hemiptera	Hemiptera sp. 3	カメムシ目の一種
カメムシ目 Hemiptera	Hemiptera	Aphididae	Hemiptera sp. 4	カメムシ目の一種
		Psocidae	Psococeraspis nubila 1	チャヤチ科の一種
		Psocidae	Psococeraspis nubila 2	チャヤチ科の一種
		Caeciliusidae	Psococeraspis nubila 3	チャヤチ科の一種
カメムシ目 Hemiptera	Hemiptera	Stenopsocidae	Psococeraspis nubila 4	チャヤチ科の一種
		Psocidae	Psococeraspis nubila 5	チャヤチ科の一種
		Psocidae	Psococeraspis nubila 6	チャヤチ科の一種
		Psocidae	Psococeraspis nubila 7	チャヤチ科の一種
ハエ目 Diptera	Diptera	Cecidomyiidae	Diptera sp. 2	ハエ目の一種
		Diptera	Diptera sp. 3	ハエ目の一種
		Tipulidae	Nephrotoma favescescens	ガガンボ科の一種(和名なし)
		Lauxaniidae	Lauxania cylindricornis	シマバエ科の一種(和名なし)
チョウ目 Lepidoptera	Lepidoptera	Noctuidae	Noctuidae gen. sp.1	ヤガ科の一種
		Lepidoptera	Lepidoptera sp. 1	チョウ目の一種
		Lepidoptera	Lepidoptera sp. 2	チョウ目の一種
		Lepidoptera	Lepidoptera sp. 3	チョウ目の一種
トビケラ目 Trichoptera	Trichoptera	Zygaenidae	Pryeria sinica	ミノウスバ
		Lepidoptera	Lepidoptera sp. 5	チョウ目の一種
		Tortricidae	Lepidoptera sp. 6	チョウ目の一種
		Unknown	Lepidoptera sp. 7	チョウ目の一種
トビケラ目 Trichoptera	Trichoptera	Hydropsychidae	Parapsyche aureocapitata	コガネツトビケラ
		Limnephilidae	Hydatophylax nigrovittatus	クロモンエグリトビケラ
		Phryganeidae	Eubasilissa regina	ムラサキトビケラ
		Phryganeidae	Semblis melaleuca	ゴマフトビケラ

・解析サンプルの約**93%**で昆虫を検出(26/28日・群)

⇒**厳冬期を通して昆虫食を継続**

・多様な**陸生昆虫**の利用
+冬期は**樹皮下**にいる種も検出

・検出された水生昆虫種数(表2)
：**2/15以降減少**

+急流域に生息する水生昆虫

：**2/15以降は検出されず**(表1・赤色点線枠内)

...2/14を境に気温上昇 & 融雪・河川氾濫

⇒**河川内での採食場所を変更**

(表2) 2/14前後で検出された昆虫種の内訳

	~2/14	2/15~
KT	水生12種 +陸生14種	水生2種 +陸生5種
KK	水生5種 +陸生2種	水生2種 +陸生3種
KM	水生4種 +陸生9種	水生0種 +陸生3種

・2/15以降：**止水・緩流域**の水生昆虫を利用(表1・橙色実線枠内)

⇒**河川氾濫後も、アクセス可能な水域での水生昆虫食は継続**

*陸生昆虫食の傾向は2/14前後で変化なし(2/14:22サンプル、2/15~:6サンプルを解析...検出種総数に差あり)

考察

・水生昆虫は厳冬期における重要な食物?

採食方法：アカンボウ~コドモ期で獲得した技術をその後も維持?

+アカンボウも独自の技術を採用して採食(石自体を操作・後脚が水に浸からない場所を選ぶ)

⇒**アカンボウ期からの水生昆虫食開始**：食物としての重要性を示唆

・樹皮食(樹皮剥ぎ)と同時に陸生昆虫食?

：**樹皮下で越冬する昆虫を積極的に採食している可能性**

...樹皮と一緒に口にただけとは考えにくい頻度・種数の検出 / 冬期に1cm以上の大きさの種も検出：ニホンザルも視認可能



▲樹皮食の様子



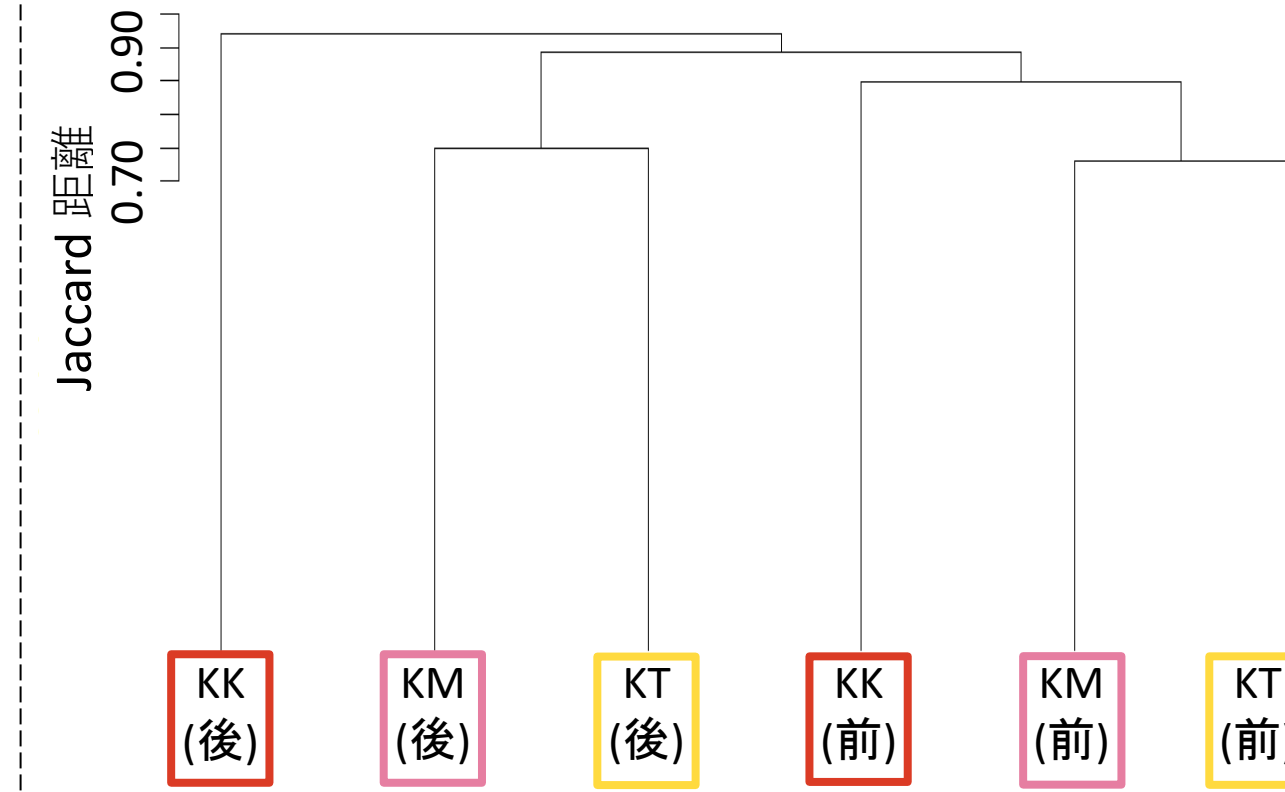
◀全年齢クラスの個体が同時に川で水生昆虫を採食している様子

・2/14の河川氾濫後、採食する昆虫種数は減少

⇔アクセス可能な水域の水生種、陸生種の採食は継続

上高地ニホンザルにとっての昆虫：多少条件が悪化しても採食場所の工夫で長期利用できる食物?

全ての性・年齢クラスでの水生昆虫食 + 河川氾濫後も採食場所を工夫して継続 ⇒ 厳冬期の生存に寄与か



・群別の群集解析：全ての群において2/14前後での食性の違いを示唆 + 群間の差 < 2/14前後の差 (Jaccard距離：1に近いほど類似していない)

方法

調査対象

長野県上高地の野生群：KT群、KK群、KM群

一行動観察

○高解像度ビデオカメラで撮影した水生昆虫食の**映像の解析**

：性・年齢クラス・採食速度・採食方法・採食した昆虫種を記録(2022, 2023年1~3月撮影)

・水辺にいる群の追跡中にアドリブサンプリングで撮影(採食途中の切り抜き/群識別はなし/追跡が困難な場所での記録はなし)

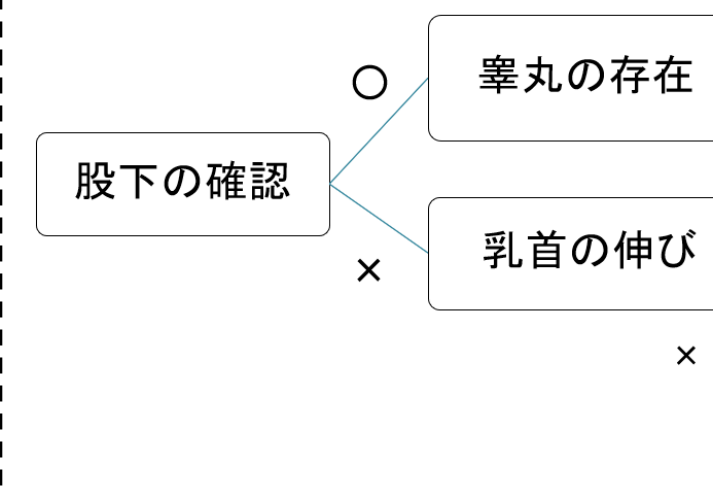
・つまむなどの操作を伴って手や石に口をつける：1回の採食とカウント

・以下では「もの」：掌より小さい、「石」：掌より大きいとする 指先でものをつまんで口に運ぶ行動：「指でつまむ」、掌で水ごとすくったものを口に運ぶ行動：「手ですくう」、指先で水中から拾ったものに口をつけて中身を吸い取る行動：「吸い出す」、舌で石表面をなめることを「石をなめる」、舌は出さずに石表面に口唇をつける行動：「石に口をつける」、石表面を歯でこすがる行動：「石を歯でこすがる」

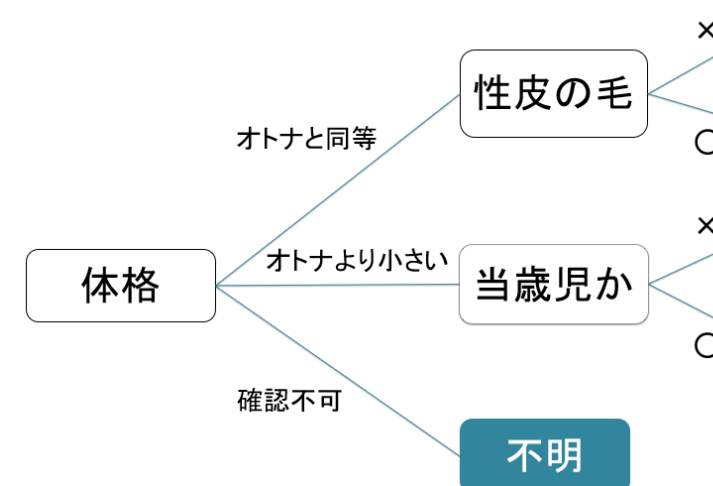
・魚探索：水面を複数回見回したり、水面下に手を素早く差し入れたりする行動

・オトナ：性皮に毛がなく露出した個体(+メスは乳首が伸びた個体)、ワカモノ：オトナ同様の体格をもつが性皮に毛が残る個体、コドモ：体格から1~3歳と判断した個体、アカンボウ：体格から当歳児と判断した個体

・性別判断のフローチャート



・年齢クラス判断のフローチャート



○糞中DNAの**メタバーコーディング**

MtInsects-16S プライマー(mtDNA 16S rRNA領域が対象)を使用

↳昆虫類に汎用+種識別が可能(Takenaka et al., 2023)

・同日に採取した糞から抽出したDNAはそのうちの最低濃度サンプルの割合を1とし、その他は(最低濃度/各サンプル濃度)の割合ずつ混合(群ごと)

・解析対象：2024/1/12 ~ 2024/3/1に採取した28日分/134サンプル(4.8 ± 1.87, 2~8)

*解析対象末尾の数値は(1日あたりの採取サンプル数の平均 ± SD, 最小値~最大値)を示す

○**独自のデータベース**を作成し、検出した配列を照合

↳以下より得られた配列を登録
①上高地の河川で実施した環境DNA解析結果(*1,*2と照合して種同定)
②上高地で採取した水生昆虫類のDNA解析結果(*1,*2と照合して種同定)
③神奈川県水生昆虫類DNAデータベース(*1)
④公共データベースGenbankに登録されている節足動物DNA(*2)

・解析結果の整理にはqime2 v.2022.11 (Bolyen et al., 2019)を使用

・シーケンスアライメントにはローカルBLASTを使用(BLAST条件：閾値 1e-40 / 配列一致率98%以上を種レベル、97%以上を属レベル、94%以上を科レベル、85%以上を目レベルと設定)

*結果(表)では種レベルで特定できなかったものは「...の一種」と表記

・アライメント長308-bpに基づくNJ樹を用いて、mPTP web serviceおよびbPTP Species delimitation serverでの遺伝的な種の推定・各PTPモデルでの解析を実行+単系統となる傾向の見た一部の群でABGDを実行

・検出種のデータを用いて採食した昆虫相の群集解析を実行(R 4.3.2でデータセットをJaccard非類似度指数に変換後、Ward法で計算しプロット)

データ解析でお世話になった系統進化学研究室の重田将之介さま・土木研の岡本聖矢さま、現地調査でお世話になった大阪大学の田島知之先生・大谷洋介先生、貴重なデータをご提供いただいた信州山の環境科学センターの皆様、多数の有益なコメントをくださった進化人類学・系統進化学研究室メンバーの皆様、調査にあたって許認可等のご協力を賜った環境省・林野庁・文化庁・自然公園財団の皆様、この場を借りて心より感謝申し上げます。環境省の定める特別保護地区内では、自然環境保全のため長野県・岐阜県が定める「自然環境保全条例」・「希少野生動植物保護条例」を遵守し、自然公園法特別保護地区(環中中国許第2304172号)、特別地域(環中中国許第2304173号)、文化財保護法(4文庁第1389号、4文庁第5098号)、漁業法・水産資源保護法 特別採捕(長野県松本地域振興局指令5松農第6号の1、6松農第9号の2)の許可を受けています。また、本研究は長野県科学振興会(NPS2023317:代表者・長原衣麻)、信州大学山岳科学研究拠点重点研究(2024年度No. 1101:代表者・松本卓也)、JSPS科研費(23H03881:代表者・松本卓也、24H00116:代表者・山内太郎)の助成を受けました。