

## 論文内容の要旨

氏名 : 和田 典子

博士の専攻分野の名称 : 博士 (生物資源科学)

論文題名 : カブトムシ幼虫の腸内環境と微生物の相互作用

森林における生物資源には、植物細胞壁構成成分や、それを分解して成長するキノコや真菌の細胞壁構成成分、そして細菌細胞壁構成成分などが含まれている。これらの成分は、その腐朽段階において様々な生物によって分解・利用される過程を経る。特に、森林性昆虫は、その食性から未利用生物資源の有効利用に活用できる酵素群や細菌叢をもつ、重要な遺伝子資源として考えられ、バイオマス利用に対しての応用も期待されている。森林性昆虫を含む土壌動物で、未利用生物資源の一つである腐植を摂食している生物は、一括して「分解者」と位置づけられ、現在は、微生物食者・落葉変換者・生態系改変者という3つの機能的摂食グループに分類されている。森林の有機物質は、最初に細菌や真菌などの土壌微生物によって分解され、それは線虫、原生生物とダニ類などの微生物食者の餌となり、その存在が土壌微生物を分散させる。次に、土壌微生物と微生物食者によって部分的に分解された落葉に由来する栄養分を得ることで、ササラダニやコガネムシ幼虫などの落葉変換者は生存する。最後に、ミミズなどの生態系改変者は、土壌物理環境を改変・攪乱することによって他の生物への生息環境に大きな影響を及ぼしている。これらの生態系改変者の腸管は、一般的に腸内で有機物質を分解させる共生細菌を含んでいる。多種の植物成分を資化する森林性昆虫類は、機能的摂食グループに分類すると、落葉変換者や生態系改変者に属している。

落葉変換者であるシロアリは最も糖質分解の研究が進んでおり、木材を摂食し、摂取したセルロースが、唾液腺で分泌されたセルラーゼや腸管内に分布している微生物によって分解する。一方、コガネムシ科幼虫は、植物の根、枯死植物遺体、腐敗木材など、様々な供給源からの植物細胞壁構成成分などを資化し、幼虫の腸内細菌の活動を通じてこれらの供給源から栄養素とエネルギーを得ており、主に落葉変換者の能力を持つと考えられているが、その腸内環境や細菌叢について報告が少ないため、餌料の分解過程が昆虫の種によって異なる可能性も示唆されている。

本研究で研究対象としたカブトムシ(*Trypoxylus dichotomus*)は、日本で最もよく知られているコガネムシ科の一種であり、その幼虫は、腐植土を摂食分解する落葉変換者の性質と、他の生物に良好な環境を作り出す生態系改変者という複合した側面を兼ね備え、一般に、広葉樹林の林床に由来する腐朽材やそれらを含む土壌を摂食することで成長する。したがって、この幼虫の摂食・消化・吸収にかかわる性質を解明することは、コガネムシ科幼虫の森林生態系における分解者としての役割を解明するとともに、バイオマス資源を有効利用するための一助となると考えられる。カブトムシ幼虫の腸管全体における消化および吸収の活動と機能を解明することを目的に、腸管を特徴づける構造や多糖類分解酵素、そして、多糖類に由来する中間代謝物の部位特異的な挙動と共に、その腸内環境における細菌群集構造を解明し、双方の関連性を明らかにすることを試みた。

### 1. カブトムシ幼虫の消化管内容物の通過時間

土壌動物であるカブトムシ幼虫は、幼虫である約9か月間に腐植質を摂食し続け成長をしている。餌料の摂食による幼虫の消化吸收過程における消化酵素の作用時間の推定のためには、摂食した餌料が腸管を通過(滞留)する時間の解明が必要である。そこで、色彩や含有成分が異なる餌料を摂食させ、排泄された糞の色彩とC/N比(炭素窒素比)を経時的に測定することで、腸管内通過時間の推定を試みた。

#### 1.1 飼育条件

カブトムシ3齢幼虫を窒素分の含有量が1.3%の茶色の腐葉土で飼育後、飼育条件1として、窒素分が0.5%と少なく、黄色みがかかったクヌギチップで28日間飼育した。その後幼虫のみを取り出し、飼育条件2として再度腐葉土に餌替えし、28日間飼育した。幼虫体重と排泄糞重量を経時的に(0、6、22、47、72、

93、168、334、501、670 時間後) 測定し、飼育土 (クヌギマットあるいは腐葉土) の重量を実験の前後で測定した。実験終了後、排泄糞と実験後の飼育土は真空凍結乾燥し、全乾重量を測定した。なおコントロールとして、飼育実験開始時のクヌギマットおよび腐葉土も同様の全乾重量測定を行った。

## 1.2 排泄糞の色彩

餌を腐葉土からクヌギチップに変更した飼育条件 1 における糞の色彩変化は、目視において 22 時間から 47 時間で変化し、その後はほぼ一定であった。同様に、餌をクヌギチップから腐葉土に変更した飼育条件 2 でも、餌替え後 22 時間から 47 時間で色彩が変化した。さらに分光色差計で餌と糞の分析を行ったところ、糞の明度は、飼育条件 1 では 22~47 時間の間に大きく変化した。飼育条件 2 では、餌換え後 6~22 時間で変化した。また、彩度と色相も、明度と同様の変化を示した。

## 1.3 排泄糞の C/N 比

次に、糞と餌の C/N 比分析を行った。飼育条件 1 において、飼育 6 時間後の C/N 比は飼育実験開始時の腐葉土の C/N 比とほぼ同等であり、47 時間後の比は飼育実験開始時のクヌギマットの C/N 比とほぼ同等となった。また、最終的に C/N 比は、168 時間目までは経時的に増加したが、その後はほぼ一定となった。

飼育条件 1 が終了後、続けて行った飼育条件 2 では、餌替え後 6 時間後の C/N 比は  $171.2 \pm 8.1$  で、飼育条件 1 での終了時 (670 時間目) の C/N 比よりはわずかに減少した。さらに餌換え後 47 時間の C/N 比は  $34.3 \pm 1.6$  となり、飼育実験開始時の腐葉土の C/N 比  $29.9 \pm 2.5$  とほぼ同等まで減少した。最終的に C/N 比は、飼育条件 2 の餌換え後 93 時間までは経時的に減少したが、同 168~670 時間ではほぼ一定となった。

以上より、飼育中に特性の異なる餌を交換して与えることで、カブトムシ幼虫の腸管内容物のほぼすべてが、摂食後 47 時間で排出されることが示された。

## 2. カブトムシ幼虫の腸内環境と多糖分解酵素系

カブトムシ幼虫の腸管内容物の通過時間が解明され、餌料の滞留時間が推定できたため、実際に餌料が通過・滞留する部位であるカブトムシ幼虫の消化と吸収活動と機能の解明に影響を及ぼす因子について、腸管を細分化することで、部位特異的な挙動の解明を試みた。

### 2.1. 腸管構造とガス濃度

コガネムシ科幼虫は種によって腸管構造に違いがあるため、まず初めに解剖し、部位の特定を行った。その結果、腸管の構造は、前腸・中腸・後腸であることが確認された。中腸には盲嚢が 3 ケ所あり、中腸と後腸は細管で連結していた。大きな袋状の後腸は内部に顆粒状の突起があった。腸管の形態を考慮の上、実際の実験では以下のように腸管部位を決めた。前腸は、非常に細い管状器官であるため中腸の一部とみなした。中腸は盲嚢の位置を基準として 7 分割とし、後腸は 3 分割とした。ガス濃度を測定したところ、腸内は低酸素状態で、メタンは後腸でのみ検出され、水素は中腸でのみ検出された。これらの結果から、メタン発酵を含む嫌気性発酵がカブトムシ幼虫の腸管内で生じていることが示唆された。

### 2.2 腸管内 pH と関連する物質

腸管を 10 分割にして測定した pH は、餌である飼育腐葉土が中性付近であるのに対し、中腸の前半から後腸の後端まで、pH 8 以上のアルカリ性であった。特に中腸の中央部の pH が 10 以上の強アルカリ性を示した。中腸の中央部以降は、pH は腸管に沿って低下し、後腸の後半部では pH 8 となった。昆虫幼虫の腸内はアルカリ性であることが一般的であり、鱗翅目幼虫の中腸はカリウムポンプを保持していることが明らかになっている。そこで陽イオン分析を行ったところ、カリウムが圧倒的に多く、飼育腐葉土中や後腸と比較して中腸で非常に高かった。さらに、カリウムと対をなす主要な陰イオンとして重炭酸の測定を行ったところ、飼育腐葉土中や後腸と比較して中腸での重炭酸濃度が高い値を示し、そのアルカリ性に関与するカリウム濃度と重炭酸濃度の挙動は一致していた。pH の高い中腸では、カリウムに対する重炭酸のモル比は 1 未満でカリウムが過剰であった。一方後腸では、モル比は 2 以上で重炭酸が過剰であった。飼育腐葉土と糞では、カリウム濃度は同程度であり、後腸と同様に重炭酸が過剰であった。

以上の結果から、腸内の pH 調節は、主に pH 8 以下の飼育腐葉土や糞では炭酸、pH 8 付近の中腸前半・

後半および後腸では炭酸水素カリウム、pH 9 以上の中腸の中央部では炭酸カリウムにより行われていると考えられ、腸内 pH はカリウムと重炭酸が関与するカリウムポンプによって調節されることが示唆された。

### 2.3 腸内成分の構成糖

強アルカリ条件下の腸内で、摂食した成分がどのように分解されているかを明らかにするため、幼虫が摂食している腐葉土中の構成成分を分析した。スマイグラフで C/N 比を測定したところ、約 30 となり炭素が多く、腐葉土は、糖成分由来の炭素と 10-25% のリグニンによって構成されていると推定された。

次に餌および腸管内容物の中に含まれる糖について、水に可溶性の成分（可溶性糖）と不溶性の成分（不溶性糖）とに分けて構成糖分析を行なった。腸管を中腸と後腸に 2 分割とした場合の可溶性成分について見ると、腐葉土を構成する糖は、可溶性糖が不溶性糖より少なかったが、中腸では可溶性糖が多かった。一方、後腸では不溶性糖が多く、糞では可溶性糖と不溶性糖がほぼ同量であった。また、腸管部位ごとの構成糖の組成は、可溶性糖ではグルコースが多く、特に中腸で多量に含まれていた。それに対し、不溶性糖では中腸・後腸共にキシロースが最も多く、次にグルコースであった。これらの結果は、餌が腸管を通過する間にその糖組成が変化していることを示し、糖が腸内で分解・吸収されている可能性が考えられた。

### 2.4 多糖分解酵素系と代謝物の推移

腸内の構成糖に基づく酵素活性測定における、多糖分解活性の至適 pH は中性、グリコシダーゼ活性の至適 pH は弱酸性だった。その単位タンパクあたりの比活性量は、多糖分解活性は中腸が高く、基質として使用された多糖類の中では、可溶性デンプン、 $\beta$ -1,4-キシラン、 $\beta$ -1,3-グルカンおよびペクチンの順で分解活性が高かったが、対照的に CM-セルロースに対する分解活性は著しく低かった。グリコシダーゼ活性では、単位タンパクあたりの比活性量は、 $\beta$ -キシロシダーゼと  $\beta$ -グルコシダーゼが高かった。さらに、酵素の分泌部位を特定するために、腸管を中腸 7 分割・後腸 3 分割と細分化して測定を行ったところ、中腸の前半において、 $\beta$ -1,3-グルカンおよび  $\beta$ -1,4-キシラン分解の高い活性が検出され、また、 $\beta$ -グルコシダーゼと  $\beta$ -キシロシダーゼの相対活性も高かった。したがって、 $\beta$ -1,3-グルカン・ $\beta$ -1,4-キシランについては、構成単糖まで分解する酵素システムを備えていることが明らかにされた。

さらに、酵素活性が高い特定の中腸の部位においては、可溶性糖の糖濃度が上昇していたため、 $\beta$ -1,3-グルカンおよび  $\beta$ -1,4-キシランから可溶性糖が誘導されていることが示唆された。加えて、糖が代謝して生じる腸管内容物中の有機酸 11 種について測定を行った。結果として、酢酸、シュウ酸、およびコハク酸が腸管内容物のすべてのサンプルで検出され、酢酸濃度が最も高かった。一方、後腸でも、多糖分解の原因となる酵素活性の増加が観察されたが、可溶性糖と酢酸の増減は中腸とは異なっていた。したがって、中腸と後腸内での物質代謝が異なっていることが示唆された。

以上の結果から、腸内環境は、部位によってさまざまな要素が腸管に沿って変化しており、分析されたデータは、中腸と後腸の腸内環境の違いを明確に示した。中腸では水素が検出され、アルカリ性の高い部位で多糖分解酵素により生成した可溶性糖から酢酸が生成することが示された。一方、後腸では多糖分解活性が後腸の先端で増加するが、酢酸は後腸の後端にかけて減少して、メタンが検出されていることから、メタン発酵が行われていることが示唆された。腸管を細かく分画することによって、カブトムシ幼虫の多糖から単糖への分解が、すべて中腸の最初の部位が主体であるという多糖分解形式は、これまでに報告された他のコガネムシ科幼虫やシロアリで報告された後腸が主体の分解形式とは異なることを解明した。

## 3. カブトムシ幼虫の腸内細菌叢

カブトムシ幼虫の腸内は、部位特異的な環境であることがわかり、糖質分解経路の存在が示唆された。そこで、これまで解明された腸内環境に細菌叢がどのように関与しているかを明らかにするために、腸管に沿った細菌群集の機能を特徴づけることを試みた。

### 3.1 腸管で特異的に検出される 16S rRNA 遺伝子配列と各部位の細菌叢

カブトムシ 3 齢幼虫の腸管を細分化（中腸：7 分割、後腸：3 分割）後、内容物の DNA を抽出し、その細菌叢を PCR-DGGE、クローニングを用いて分析を行った。

### 3.1.1 PCR-DGGE 分析

DGGE プロファイルとそれに基づく PCA 分析の結果は、その細菌群集の構造が中腸と後腸の内容物では著しく異なっていることを示していた。特に中腸後半部から後腸前半部への細菌群集構造の変化が顕著であり、中腸と後腸の接続部分を細菌を含む腸内容物が通過し起こると考えられ、それぞれの部位が異なる物理化学的条件を持っていることが影響していると考えられる。また、DGGE バンドの解析結果は、検出された細菌の配列が、既存の配列との相同性が低いことを示唆しており、各部位ごとの細菌叢は、腸管の部位によって異なっていた。中腸で最も優占化しているバンドは、中腸内においても部位によってその割合は異なっており、この傾向はカブトムシ 3 齢幼虫の別個体でも同様だった。後腸から糞にかけて検出されたバンドは *Bacteroides* sp. HAWD3 (KU886094) と 97%の相同性を示した。中腸から後腸、糞まで検出されたバンドは Uncultured bacterium clone Cast045 (GU450372) と 99%の相同性を示した。また、既知の細菌としては、*Clostridium diolis* strain SH1 (NR025542) と 95%の相同性を示した。この *Bacteroides* 属細菌や *Clostridium* 属細菌は、カブトムシ幼虫の腸内環境に適合する要素を持つことから、腸内で生育し、糖分解などへの寄与が示唆された。

### 3.1.2 クローンライブラリー

中腸で最も優占化しているバンド配列の特性をより明確にするために、16S rRNA 遺伝子の完全な配列をクローニングした。クローンライブラリーで得られた完全長の 16S rRNA 遺伝子配列は、中腸で最も優占化しているバンド配列と同一の配列を含んでいた。このクローンは既知の細菌 *Anaeroplasma abactoclasticum* (M25050.1) と 88%の相同性を示し、Uncultured bacterium clone Pau4 (KT251043) と 98%の相同性を示した。

クローンライブラリーを構築することで、中腸内容物の PCR-DGGE 結果で優占化する 16S rRNA 遺伝子配列を特定し、便宜上、このシーケンスを「*Gut T. dichotomus*」(GTD) 配列と定義した。

## 3.2 カブトムシ幼虫の腸内環境と腸内細菌叢との関連性

カブトムシ幼虫の腸管では、特に中腸において部位特異的に pH とカリウムイオンが変化し、その細菌叢も特異であることが分かった。そこで、特に GTD 配列と腸内環境との関係を明らかにするために、腸管部位における GTD 配列と腸内成分のデータ比較を行った。GTD 配列を持つ細菌の増減は、pH、カリウムイオン濃度、酢酸、および重炭酸の増減と相関する傾向があり、この研究で提示されたデータの多くに基づいて、GTD 配列が幼虫の中腸環境に適応することによって優占的になったと推察された。

カブトムシ幼虫の腸内細菌群集の構造と機能を検討した結果、3 齢幼虫の細菌群集構造は、特定の Uncultured bacterium clone が優占的であること示された。また、分析方法に関係なく普遍的に検出された GTD 配列は、中腸での優占度が部位によって異なっていた。この GTD 配列を持つ細菌については、腸内環境との関連性が示唆された。

## 本研究の総括

本研究では、落葉変換者と生態系改変者の能力を持つカブトムシ幼虫をモデル動物として幼虫腸内の環境、多糖分解酵素や細菌叢について検討を行った。

カブトムシ幼虫が摂食した餌料は、腸内を 47 時間以内で通過し、pH が低い中腸前半部で、多糖分解酵素が作用し、可溶性糖が生成され、次にカリウムポンプが働いている中腸のアルカリ性の高い部位で有機酸まで分解される過程を明らかにした。これまで昆虫における摂食物の分解が行われる主要な腸管部位は後腸であるとされていたが、これらの結果は、カブトムシ幼虫においては中腸である可能性が高いことを明らかにした。また、中腸において、腸内環境に適応した細菌として遺伝子配列が決定された GTD 配列を持つ細菌は、餌成分への分解の関与が考えられ、カブトムシ幼虫とその腸内細菌の双方の相乗効果によって腐植が分解・利用されていることが示唆された。

本研究でのカブトムシ幼虫腸内での多糖の分解利用の動態解析により、カブトムシ幼虫の森林生態系における分解者としての機能が明らかとなり、これを応用することで、幼虫の腸内細菌由来の多糖分解酵素の産業での利用やプロバイオティクスへの応用、あるいは、幼虫の活動によるバイオマスの堆肥化やその過程における発酵等によるエネルギー利用に活用できる可能性を示した。