

# カブトムシ幼虫の腸内環境と微生物の相互作用

日本大学大学院生物資源科学研究科

和田 典子

2021

序論	1
本論	7
1 カブトムシ幼虫の消化管内容物の通過時間と成長量	7
1.1 試料と方法	7
1.1.1 供試昆虫	7
1.1.2 消化管重量の測定	8
1.1.3 異なる餌料（飼育土）を用いた3齢幼虫の飼育	8
1.1.4 色彩分析	9
1.1.5 C/N比測定	10
1.1.6 統計解析	10
1.2 結果	12
1.2.1 消化管重量	12
1.2.2 飼育実験幼虫の体重変化と糞積算重量	12
1.2.3 幼虫糞の色彩変化	14
1.2.4 炭素，全窒素とC/N比	14
1.3 考察	16
1.3.1 3齢幼虫の体重変化と炭素・窒素含有量	16
1.3.2 C/N比測定によって得られた消化管内容物の通過時間	17

1.3.3 幼虫の窒素分の摂取と動向	18
1.4 小括	22
2 カブトムシ幼虫の腸内環境と酵素活性	23
2.1 材料と方法	23
2.1.1 供試虫の飼育と供試組織	23
2.1.2 pH 測定	24
2.1.3 陽イオン分析	24
2.1.4 重炭酸イオン測定	25
2.1.5 構成糖分析	25
2.1.5.1 試料の調製	25
2.1.5.2 方法	26
2.1.6 多糖分解酵素活性測定	27
2.1.6.1 試薬	27
2.1.6.1.1 基質	27
2.1.6.1.2 基質溶液濃度の調整	28
2.1.6.1.3 緩衝液	28
2.1.6.2 酵素液調製	29

2.1.6.3	活性測定方法および活性単位	29
2.1.6.4	可溶性全糖分析	30
2.1.7	有機酸分析	30
2.1.8	ガス分析	32
2.1.9	昆虫における多糖分解酵素遺伝子の検索	33
<b>2.2</b>	<b>結果</b>	<b>35</b>
2.2.1	pH	35
2.2.2	陽イオン	35
2.2.3	重炭酸イオン	36
2.2.4	有機酸	36
2.2.5	ガス分析	37
2.2.6	構成糖	37
2.2.7	幼虫腸管における多糖分解酵素系および可溶性糖	38
2.2.7.1	3分割腸管中の多糖分解酵素系	38
2.2.7.1.1	至適pH	38
2.2.7.1.2	多糖分解活性	38
2.2.7.1.3	グリコシダーゼ活性	39
2.2.7.2	10分割腸管中の多糖分解酵素系と可溶性糖	40

2.2.7.2.1	$\beta$ -1,3-グルカン分解酵素系	40
2.2.7.2.2	$\beta$ -1,4-キシラン分解酵素系	41
2.2.7.2.3	全糖量	41
2.2.7.3	カブトムシにおける多糖分解酵素遺伝子	41
<b>2.3</b>	<b>考察</b>	<b>43</b>
2.3.1	腸内のアルカリ性成分	43
2.3.2	有機酸	44
2.3.3	多糖分解酵素活性	45
2.3.4	酵素分泌部位の特定	50
<b>2.4</b>	<b>小括</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>カブトムシ幼虫の腸内細菌叢</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>材料と方法</b>	<b>54</b>
3.1.1	幼虫の採集, 実験室での飼育, 解剖	54
3.1.2	DNA 抽出	55
3.1.3	PCR-DGGE 解析	56
3.1.4	主成分分析	58
3.1.5	多様性分析	58
3.1.6	クローンライブラリー解析	59

3.1.7	系統解析	60
3.1.8	細菌の多糖分解酵素遺伝子の検索	60
3.1.9	16S rRNA 遺伝子配列のアクセッション番号	60
<b>3.2</b>	<b>結果</b>	<b>62</b>
3.2.1	PCR-DGGE 分析におけるカブトムシ幼虫の腸内の微生物 群集構造	62
3.2.1.1	幼虫の成長段階における腸内細菌叢の推移	62
3.2.1.2	飼育腐葉土，中腸内容物，後腸内容物，糞の細菌 群集構造	62
3.2.1.3	飼育腐葉土の細菌群集構造	63
3.2.1.4	中腸内容物の細菌群集構造	63
3.2.1.5	中腸腸管壁の細菌群集構造	64
3.2.1.6	後腸内容物，後腸腸管壁，糞の細菌群集構造	65
3.2.1.7	中腸から後腸への消化管の移動に伴う細菌群集 構造の変化	66
3.2.2	バンド 11 のクローンライブラリー解析	66
3.2.3	既存の細菌ゲノムの糖質分解酵素遺伝子	67
<b>3.3</b>	<b>考察</b>	<b>70</b>

3.3.1	カブトムシ幼虫の腸内の細菌群集構造	70
3.3.2	カブトムシ幼虫の中腸で特異的な細菌	73
3.3.3	GTD 配列を持つ細菌の機能の推定と腸内環境における これらの配列を持つ細菌の部位特異的存在量間の関係	75
3.3.4	GTD 配列や他の部位に特異的な細菌の機能についての 遺伝学的推測	75
3.4	小括	77
	図表	78
	総括	126
	謝辞	135
	参考文献	137

## 序論

カブトムシ (*Trypoxylus dichotomus*) は、日本の代表的なコガネムシ科の昆虫であり、その幼虫は、腐植の体積減少に大きく寄与することや、幼虫の存在によって他の土壌生物が活性化され、木材由来バイオマスの分解を促進することから (Nijima, 2002)、森林生態系で分解者としての役割を果たしていると考えられている。

森林生態系における木材由来バイオマスは、倒木、葉、枝等で構成されており、これらの有機堆積物の利用は、持続可能な物質循環のために非常に重要である。近年、間伐によって生産される木材などのリグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール製造が進められているが、製造プロセスの中で大きく影響する一つの要因が酵素の価格であり、メーカー市販の酵素は一般的に高価である (Takimura *et al*, 2013)。したがって、将来の持続可能性を高める手段として、木材由来バイオマスの用途を拡大するには、この資源に存在する主要な多糖類をそれらの構成単糖類に変換するための技術を開発する必要がある。

そこで注目されるのが、実際の自然界において、木材などの有機堆積物を餌料とし、直接または間接的に利用することで、含有している多糖類を分解していると考えられている森林性昆虫であり、これまでに様々な報告がされてきた (Martin, 1983; Terra & Ferreira, 1994; Watanabe & Tokuda, 2010; Ni & Tokuda, 2013)。しかしながら、木材由来バイオマスの分解により生成される腐植などの未利用生物資源についての報告は少ない。

森林性昆虫を含む土壌生物の中で、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 (Lavelle *et al.*, 1997). 森林の有機物質は、最初に細菌や真菌などの土壤微生物によって分解され、それらは線虫、原生生物、ダニ類などの微生物食者の餌料となり、土壤微生物を分散させる。次に、土壤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、シロアリ、コガネムシ科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、土壤物理環境を改変・攪乱することによって他の生物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である生物の消化管は、一般的に腸内で有機物質を分解させる共生細菌が生息している (Kaneko, 2007). 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の中で、高等シロアリにおける初期の研究では、シロアリが木材から摂取したセルロースは、独自のセルラーゼにより分解されると考えられていた (Slaytor, 2000). しかし、その後の研究では、高等シロアリと下等シロアリの後腸の内部共生細菌が、シロアリが摂取するセルロースベースの難分解性多糖類の分解に関与していることが示されている (Tokuda *et al.*, 2007; Hongoh *et al.*, 2011; Ransom-Jones *et al.*, 2012). さらに、シロアリの後腸にヘミセルロース分解細菌の存在や (Schäfer *et al.*, 1996), その他の多くの研究が高等シロアリの後腸の細菌群集を調査した報告であり (Rossmassler *et al.*, 2015), シロアリの消化の主要な部位は後腸であると言われている。

一方、Li & Brune (2005b) によれば、植物由来の繊維の分解は、主にコガネムシ科幼虫によると述べられているが、この幼虫は、植物の根

や枯死植物遺体，腐敗木材などの腐植質を利用するが，セルロースは利用せず，餌料に含まれる微生物と植物由来の栄養に依存しており (Scholtz & Chown, 1995)，主に落葉変換者としての能力を持つと考えられている。

コガネムシ科幼虫における植物由来成分の消化は，消化酵素の存在とともに，消化管の構造と腸内環境に依存していると考えられ，消化管の機能を理解するためには，幼虫の消化吸収過程において基本となる，餌料が消化管を通過または滞留するのにかかる時間，幼虫の成長量や消化管の構造，そして生理学的機能等の特徴を関連付けることが不可欠である。

コガネムシ科幼虫の消化管は大きく前腸，中腸，後腸の3部分に分かれている (Wiedemann, 1930; Wildbolz, 1954; Crome, 1957; Bayon, 1980b; Lemke *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012)。摂食した餌料は，消化管を移動し，部位ごとに餌料の成分を消化・吸収し，残渣を糞として排出する。

その消化管の中で，中腸のpHは高アルカリ性である。コガネムシ科幼虫では，*Oryctes nasicornis* (Bayon, 1980b)のpH 11.7，*Costelytra zealandica* (Biggs & McGregor, 1996)のpH 10.9，*Pachnoda marginata* (Cazemier *et al.*, 1997)のpH 11.7，*Pachnoda ehippiata* (Lemke *et al.*, 2003)のpH 10.7など，中腸のpHが高いという報告が多数ある。Terra (1988)は，コガネムシ科幼虫の中腸の高pHは，餌料である植物中にタンニンが豊富に含まれていることと相関があり，植物細胞壁からヘミセルロースを分離するために重要であること，また，Li & Brune (2005a, 2005b)は，*P. ehippiata*幼虫が腐食性の餌料を摂食した場合，中腸が高pHである場合，ペプチドと多糖類が高分子の物質から分離され，得られた代

謝物が溶解して消化管で利用され，腐植物質の消化が可能となると述べている．

このような腸内環境をもつコガネムシ科幼虫の食性を分析し特徴づけるための最も効率的な方法の1つは，幼虫の消化酵素を検出することである．コガネムシ科幼虫の消化酵素に関する情報は，幼虫ごとの食性の解明 (Ritcher, 1958)と，それらの産業利用のための技術の確立 (Koyama *et al.*, 2003a) を容易にする．これまでに，コガネムシ科幼虫の消化管における多糖類の消化酵素の報告は以下の通りである；セルラーゼ活性：*P. marginata* (Cazemier *et al.*, 1997), *Xylotrupes gideon* (Mishra & Sen-Sarma, 1985); アミラーゼ活性：*C. zealandica* (Biggs & McGregor, 1996); キシラナーゼ活性：*P. marginata* (Cazemier *et al.*, 1997);  $\beta$ -glucosidase: *O. nasicornis* (Bayon, 1980b), *P. marginata* (Cazemier *et al.*, 1997), *X. gideon* (Mishra & Sen-Sarma, 1985).

以上のように，コガネムシ科幼虫の消化酵素の研究は，植物細胞壁構成多糖であるセルロースやヘミセルロース，貯蔵性多糖であるデンプンについて行われてきたが，コガネムシ科幼虫は，担子菌などの真菌によって分解された枯死植物を餌料としている．このような餌料には，担子菌などの構成多糖類である $\beta$ -1,3-グルカンが豊富に含まれていると考えられているが， $\beta$ -1,3-グルカン分解のメカニズムに関する研究は少ない．

また，多糖は多糖分解系の酵素によって単糖となり，その後有機酸にまで分解されると予想され，コガネムシ科幼虫の消化管で生成する有機酸について報告されている；酢酸：*P. marginata* (Cazemier *et al.*, 1997), *P. ehippiata* (Lemke *et al.*, 2003); 乳酸：*P. marginata* (Cazemier *et al.*, 1997), *P. ehippiata* (Lemke *et al.*, 2003), *Melolontha melolontha* (Egert

*et al.*, 2005); コハク酸: *P. ehippiata* (Lemke *et al.*, 2003), *M. melolontha* (Egert *et al.*, 2005). しかしながら、これまでの報告では、酵素活性と有機酸生成は消化管全体に由来するとされており、部位による特異性はまだ報告されていない。

さらに、コガネムシ科幼虫は多様な消化管内共生微生物を擁し、新奇微生物およびその有用活性酵素の供給源となりうる (Huang *et al.*, 2010). いくつかのコガネムシ科幼虫の消化管における細菌群集構造も報告されている: *P. ehippiata* (Egert *et al.*, 2003), *C. zealandica* (Zhang *et al.*, 2008), *Holotrichia parallela* (Huang *et al.*, 2010).

これらの、コガネムシ科幼虫の消化管に関する研究は、後腸がセルロースおよびヘミセルロース消化の主要部位であることを示しており (Huang *et al.*, 2010), 昆虫の腸内細菌および消化機能に関する研究のほとんどは、後腸に焦点を合わせている。

腐葉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ているカブトムシ幼虫は、他のコガネムシ科幼虫よりも比較的体重が重く、3齢では、*P. ehippiata*幼虫の約10倍の重さであり (Lemke *et al.*, 2003), 実験材料として適している。これまでの報告に基づき、カブトムシ幼虫の消化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には、部位特異的に消化管を特徴づける必要がある。さらに、多糖類に由来する中間代謝物の部位特異的な化学的挙動、消化に関連する細菌叢などを明らかにすることも重要であると考えられる。

そこで本研究では、以下3つの項目について検討を加えた。

1) カブトムシ幼虫における餌料による成長量について、消化管の生重量に関する基本的データ、消化管全長を摂食物が通過するのに要する

時間、幼虫の餌と糞における窒素分の挙動の3点について検討した。

摂食物通過時間の計測に際して、消化管内容物の交換を明確にする目的で、実験中に餌料の変更を行い、それぞれの餌料と排出糞のC/N比を計測することで、対象餌料の通過時間を明らかにする方法をとった。

2) カブトムシ幼虫の消化管を分割し、物理化学的および生化学的条件を各部位で分析した。

pH、陽イオン濃度、重炭酸イオン濃度、水素、メタン、酸素のレベルを物理化学的要因として選択し、有機酸と多糖類の消化酵素を生化学的要因として選択した。これらの生化学的要因は、枯死植物に由来する多糖類分解の消化および吸収活性に関連する代謝プロファイルを理解するために不可欠であり、物理化学的要因は、これらの活動が発生する環境を特徴づけるために必要である。本研究では、多糖類の分解に関与する酵素の活性、中間代謝物を、消化管の部位別に測定した。

3) カブトムシ幼虫の消化管内の多糖分解酵素の起源を特定し、これらの酵素を産業目的に使用するためには、消化吸収に関連すると考えられる幼虫の消化管の細菌群集の構造と機能の特徴づけが必要である。

そこで、細菌群集構造の一次解析として有効的な方法である変性濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) を用い、消化管部位別の細菌群集を詳細に調査した。

上記の項目を精査することにより、カブトムシ幼虫の生理・生化学的機能を解明し、森林生態系での役割を明らかにすると共に、未利用資源としてのカブトムシ幼虫およびその腸内微生物の可能性を見出すことを目的とした。

## 本論

### 1. カブトムシ幼虫の消化管内容物の通過時間と成長量

コガネムシ科幼虫の森林バイオマスの消費量など，森林生態系への影響を推定するためには，その消化・分解過程を解明する必要がある．幼虫が摂食後，摂食物が消化管を通過（滞留）するのにかかる時間の測定は，幼虫腸内での消化酵素の作用時間などを推定する上で重要である．

カブトムシ幼虫を含むコガネムシ上科は，例外なく幼虫の齢数が3とされている (Ritcher, 1958)．小島 (2019) は，カブトムシ幼虫は孵化して3か月ほどでほぼ最大の体重（メス約22 g，オス約32 g）となり，その後の幼虫の体重は小さな増減を繰り返すが，蛹になるまでの7か月間はほぼ変わらずに維持されるとしている．しかし竹石 (2006) は，平均体重と標準偏差をそろえたカブトムシ3齢幼虫を腐葉土で26日間飼育したところ，飼育前体重が約10 gであるのに対し，飼育後は体重が約20 gとなり，顕著な体重増加を認めている．これにより，カブトムシ幼虫はその最大値に達するまでは，3齢であっても成長の余地があるといえる．したがって，本研究では，餌料を積極的に摂食し，なおかつ体重増加が予想される最大体重値以下の3齢幼虫を，消化管通過時間測定の実験に供した．

#### 1.1 試料と方法

##### 1.1.1 供試昆虫

昆虫は頭幅を測定後，最大体重値（小島，2019）に達していないカブトムシ3齢幼虫を実験に供試した．3齢幼虫は，餌料として十分な量の腐葉土（自然応用科学社）を含むプラスチックケージ（31.5L；10幼

虫 / ケージ) で予備飼育を行った。

### 1.1.2 消化管重量の測定

カブトムシ幼虫における，餌料の消化管通過時間を推定するための基礎データとして，飼育実験に供試する幼虫とは別個体を用いて，その体重，消化管重量を測定した．幼虫は，氷上で冷却してから滅菌水で洗浄し，頭部，中腸，後腸に解剖した (Fig. 1)。

消化管重量は，腸管壁を含む腸管（中腸・後腸・全消化管）( $n = 28$ ) と，腸管壁を除いた腸管内容物（中腸内容物・後腸内容物・全消化管内容物）( $n = 6$ ) の重量を測定した。

### 1.1.3 異なる餌料（飼育土）を用いた3齢幼虫の飼育

消化管通過時間測定のための飼育実験方法の概略をFig. 2に示した．幼虫は1.1.1に基づき，2019年秋まで累代飼育していた3齢幼虫 ( $n = 10$ ，飼育開始前平均体重 ( $18.07 \pm 4.97$  g)) を個別に飼育した。

#### 飼育条件1

飼育期間は，2019年10月28日-11月25日の28日間とした．個別飼育の容器内の温湿度をデータロガー (Thermo Recorder TR72U, T&D Corp.) で測定した (温度： $20.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ；湿度： $48 \pm 7.7\%$ )．1Lのプラスチック容器に飼育土として約200 gのクヌギマット (「ふるさとMaxクヌギマット」<sup>®</sup>，フジコン製) と100 gの蒸留水を混合し，攪拌した (含水率約70%)．7日ごとに容器に散水することにより土壌水分を維持した．幼虫体重と排泄糞重量は経時的に (0, 6, 22, 47, 72, 93, 168, 334, 501, 670時間後) 測定し，クヌギマット (飼育土) 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，全乾後の重量を測定した．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 ( $n = 3$ ) も同様の全乾重量測定を行った．

## 飼育条件2

飼育期間は，2019年11月25日-12月23日の28日間とした ( $n = 6$ ) ．温湿度を飼育条件1と同様に測定した（温度： $16.2 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ，湿度： $50.8 \pm 7.1\%$ ) ．各幼虫は，1Lのプラスチック容器に飼育土として約200 gの腐葉土（自然応用科学社）と100 gの蒸留水を混合し，攪拌した．腐葉土（飼育土）の加湿は，飼育条件1と同様に行った（含水率約64%）．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）測定した（飼育条件1と飼育条件2を連続した場合の時間表記は，670，676，692，717，742，763，838，1004，1171，1340時間とした）．腐葉土（飼育土）の重量は，実験前後に測定した．実験終了後，排泄糞と試験後の腐葉土（飼育土）は真空凍結乾燥し，飼育条件1と同様に全乾重量を測定した．コントロールとして，飼育実験開始時の腐葉土 ( $n = 3$ ) も同様の全乾重量測定を行った．

### 1.1.4 色彩分析

飼育条件1および2において，糞の色彩を記録するため写真撮影を行った．

また，飼育終了前後の試料（クヌギマット，腐葉土，糞）を真空凍結乾燥し，粉碎してふるい（40メッシュ，サン・コーポレーション）を通過させた ( $n = 3$ ) ．水平に静置したサンプルに対して垂直方向から分光色差計（NF555，日本電色工業株式会社）を

当てた．光源はD<sub>65</sub>を選択し，視野10°とし， $L^*a^*b^*$ モードにより明度 $L^*$ （0の黒から100の白），色空間座標 $a^*$ （負の緑から正の赤）および $b^*$ （負の青から正の黄）を測定した．また $a^*$ および $b^*$ を用いて，彩度（ $C^* = a^{*2} + b^{*2}$ ）<sup>1/2</sup>，色相は $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ を算出した．

### 1.1.5 C/N比測定

色彩分析で調製したサンプルを使用して，全窒素・全炭素測定装置（Sumigraph NC-220F，住化分析センター）を用いて全炭素・全窒素量を定量し，C/N比を算出した．測定条件は同装置のマニュアルに従った．即ち，測定時間は全窒素・全炭素同時測定で12分/1試料（purge 60秒，pump 300秒，MEAS 270秒）とし，キャリアガス用高純度ヘリウムガス（純度99.995%以上）と助燃用高純度酸素ガス（純度99.99%）を使用した．

### 1.1.6 統計解析

実験ごとに用いた個体は以下の通りである：消化管重量（腸管壁を含む腸管 28 個体，腸管壁を除いた腸管内容物 6 個体），飼育条件 1（体重と糞重量 6 個体，色彩 3 個体，C/N 比 6 個体），飼育条件 2（体重と糞重量 6 個体，色彩 3 個体，C/N 比 3 個体）．

各データは，平均±標準偏差を示した．また，消化管重量測定の結果は湿重量に基づいて示し，Spearman の順位相関検定で統計的に評価し， $p < 0.05$  で有意差ありとした．飼育実験の測定結果は，湿重量および乾燥重量に基づいて示し，ウィルコクソンの順位和検定と  $t$  検定を使用して統計的に評価し， $p < 0.05$  で有意差ありとした．Spearman の順

位相関検定とウィルコクソンの順位和検定は、Bell Curve for Excel（株式会社 社会情報サービス）で行った。

## 1.2 結果

### 1.2.1 消化管重量

カブトムシ3齢幼虫における摂食物の消化管通過時間を推定する基礎データとして、まず消化管重量を測定した。幼虫体重の平均は $14.2 \pm 4.2$  g ( $n = 28$ ; 平均 $\pm$ 標準偏差, 以下同様), 消化管部位別重量の平均は, 中腸が $4.1 \pm 1.2$  g, 後腸が $3.5 \pm 1.0$  gであった。体重に対する消化管全体の重量割合は $54.4 \pm 7.2\%$ であった。

次に, 幼虫の腸管壁を除いた腸管内容物のみの重量を測定した。幼虫体重の平均は $21.4 \pm 2.6$  g ( $n = 6$ ), 各腸管内容物重量は, 中腸内容物重量 $3.9 \pm 0.8$  g, 後腸内容物重量 $2.7 \pm 0.8$  gであった。中腸内容物と後腸内容物を合計した全消化管内容物重量の幼虫体重に対する割合は,  $30.7 \pm 4.2\%$ であった。

さらに, 幼虫の総体重に対する各要素の重量間の相関関係を求めたところ, すべての組み合わせに関して有意な正の相関関係が認められた ( $p < 0.05$ , Spearmanの順位相関検定, Table 1)。

### 1.2.2 飼育実験幼虫の体重変化と糞積算重量

幼虫体重と排泄糞重量を経時的に測定した結果をFig. 3に示した。クヌギマットを餌とした飼育条件1の場合, 飼育開始時の体重に対して, 飼育終了時にはわずかな減少が見られ, 続けて行った腐葉土を餌とした飼育条件2の場合は体重が増加傾向を示したが, 共に有意差はなかった (Fig. 3A)。それぞれの条件での飼育終了時における体重増加率に関しては, 飼育条件2のみで有意差が見られた ( $p < 0.05$ ,  $t$ 検定)。

飼育実験1と2を通算した糞積算重量は湿重量で $187.1 \pm 32.5$  g, 乾燥重量で $57.6 \pm 13.4$  gであった (Fig. 3B)。また, 飼育条件ごとの糞乾燥重量

平均は、飼育条件1では $30.3 \pm 5.1$  g (含水率:  $72.1 \pm 3.8\%$ ) , 飼育条件2では $27.3 \pm 8.6$  g (含水率:  $73.7 \pm 16.8\%$ ) ( $n = 6$ ) であった.

飼育条件1では、飼育開始時のクヌギマット乾燥重量が $90.4 \pm 4.3$  g なのに対し、飼育終了時である670時間後の糞乾燥重量平均が $30.3 \pm 5.1$  g で、飼育開始時の餌の約34%が糞として排泄され、幼虫の平均体重は飼育開始時より約8%減少していた (Fig. 3A, 3B) . 飼育条件2では、飼育開始時の腐葉土乾燥重量が $105.9 \pm 2.3$  gなのに対し、飼育終了時の糞乾燥重量平均 $27.3 \pm 8.6$  gで、飼育開始時の餌の約26%が糞として排泄され、幼虫の平均体重は飼育開始時より約14%増加していた (Fig. 3A, 3B) .

飼育条件1から飼育条件2にわたって連続実験を行った3個体において、飼育条件1の糞排泄量 (乾燥重量) は $39.0 \pm 7.3$  gとなり、飼育開始時の餌の約43%が糞として排泄された. 一方、飼育条件2の糞排泄量 (乾燥重量) は $36.5 \pm 10.3$  gとなり、飼育開始時の餌の約34%が糞として排泄された.

さらに、幼虫が1時間あたりに排出する糞重量を計算したところ、飼育条件1, 2ともに飼育開始後93時間までは排出量が増加したが、その後いったん減少し、さらに再び増加が見られた (Fig. 3C) .

ここで、各飼育条件開始時の体重の30.7%を消化管内容物重量とし、排泄された糞の積算重量 (湿重量) と比較した (Table 2) . 飼育条件1の飼育開始時の推定消化管重量は $4.4 \pm 1.0$  gであり、糞の積算重量が消化管重量を超えたのは22時間後であった. 飼育条件1に続いて行った飼育条件2の飼育開始時の推定消化管重量は $4.1 \pm 1.2$  gであり、糞の積算重量が消化管重量を超えたのは餌換え後47時間 (飼育開始後717時間) であ

った (Table 2) .

### 1.2.3 幼虫糞の色彩変化

幼虫糞の色彩は、飼育条件1では22-47時間の間に大きく変化したがる、その後の大きな変化は見られなかった (Fig. 4) . 続けて餌を腐葉土に変えた飼育条件2では、餌換え後22-47時間である飼育開始後692-717時間に色彩が変化した (Fig. 4) .

分光色差計で分析を行ったところ、糞の明度 ( $L^*$ ) は、飼育条件1では22-47時間の間に大きく変化したがる、その後の大きな変化は見られなかった (Fig. 5) . 続けて餌を腐葉土に変えた飼育条件2では、餌換え後6-22時間 (飼育開始後676-692時間) の間に色彩が変化した (Fig. 5A) . 彩度 ( $C^*$ ) と色相 ( $h$ ) も、明度 ( $L^*$ ) と同様の変化を示した (Fig. 5B, 5C) .

### 1.2.4 炭素、全窒素とC/N比

飼育実験開始時の腐葉土とクヌギマットのC/N比の測定を行ったところ、腐葉土は $29.9 \pm 2.5$ 、クヌギマットは $90.3 \pm 1.4$ であった ( $n = 3$ ) . また、腐葉土の乾燥重量 $112.2 \pm 2.6$  gに含有される全炭素量は $43.7 \pm 3.3$  g、全窒素量は $1.5 \pm 0.0$  gであり、クヌギマット乾燥重量 $88.0 \pm 3.4$  gに含有される全炭素量は $41.6 \pm 1.8$  g、全窒素量は $0.5 \pm 0.0$  gであった.

次に飼育条件1において、経時的に採取した糞のC/N比を測定した (Table 3) . 飼育6時間後のC/N比は $31.4 \pm 2.3$ であり、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C/N比は $96.9 \pm 14.2$ となり飼育実験開始時のクヌギマットのC/N比とほぼ同等となり、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 (Table 3) .

その後続けて行った飼育条件2で得たサンプルについて、同様にC/N比の測定を行った ( $n=3$ , Fig. 6) . 飼育条件2での飼育開始6時間後である676時間目の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(飼育開始後717時間目)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時間である飼育開始後763時間までは経時的に減少したが、同168-670時間である飼育開始後838-1340時間ではほぼ一定となった (Fig. 6) .

## 1.3 考察

### 1.3.1 3齢幼虫の体重変化と炭素・窒素含有量

小島(2019)によると、元来幼虫がより大きく成長するためには分解の進んだ餌の摂取が重要である。今回、分解が進んでいない餌料であるクヌギマットを用いた飼育条件1と、分解が進んでいる餌料である腐葉土を用いた飼育条件2を比較すると、飼育条件1のクヌギマットより腐葉土を摂食した時に体重は増加傾向を示した。詳細に述べると、カブトムシ幼虫の糞排泄量に対する体重変化は、窒素分が少ないクヌギマット飼育では、飼育開始時のクヌギマット乾燥重量が90 gなのに対し、28日間で排泄された糞乾燥重量が30 gで、飼育開始時の餌の約34%が糞として排泄され、幼虫の平均体重は飼育開始時より約8%減少した。クヌギマットより、窒素分の多い腐葉土飼育では、飼育開始時の腐葉土乾燥重量が106 gなのに対し、28日間で排泄された糞乾燥重量は27 gで、飼育開始時の餌の約26%が糞として排泄されたのみであるが、幼虫の平均体重は飼育開始時より約14%増加していた (Fig. 7)。また、実際に餌と排泄された糞に含まれる炭素・窒素量は、幼虫の糞排泄量(乾燥重量として)が摂食量と同等であると仮定した場合、飼育条件1のクヌギマット39.0 g中の全炭素量約18 g、全窒素量約0.2 gであり、排泄された全糞(乾燥重量39.0±7.3 g)に含まれる全炭素量は17.9±3.6 g、全窒素量は0.1±0.0 gであった。一方、飼育条件2の腐葉土36.5 g中の全炭素量約14 g、全窒素量約0.5 gであり、排泄された全糞(乾燥重量36.5±10.3 g)に含まれる全炭素量は15.3±4.4 g、全窒素量は0.5±0.2 gであった。

したがって、飼育条件1の同重量のクヌギマットと糞における全炭素量は同量だったが、糞の全窒素量はクヌギマットの半分に減少して

いた。一方、飼育条件2において、腐葉土と糞の全炭素と全窒素量はほぼ同量だった。

一般的に広葉樹材の窒素量についての知見は限られているが、概してその値は少ない。ブナ科の落葉高木であるスタジイの枝に占める窒素の割合は0.75%、炭素の割合は46.26%となり、そのC/N比は61.7となる（落ら、2008）。本研究の飼育条件1で餌として使用したクヌギマット中のクヌギもスタジイと同じブナ科であるが、その窒素の割合は約0.5%、炭素の割合は47.3%となっており、スタジイと同じく窒素の割合は低値であった。

以上から、カブトムシ3齢幼虫の成長には、窒素が大きく影響することが示唆され、摂取する窒素量が幼虫の体重増加の制限因子になっている可能性が考えられるが、体重の増加因子の一因と予測される餌料の炭素組成についても詳細な分析が必要である。

### 1.3.2 C/N比測定によって得られた消化管内容物の通過時間

カブトムシ3齢幼虫消化管の重量について検討したところ、消化管壁を除いた消化管内容物は体重の約30%であることが示された。したがって、幼虫体重の約30%に相当する量の糞が排出されると、消化管内容物が入れ替わるものと推定された。本研究で実験に供試した幼虫の体重のデータから、内容物の消化管通過に要する時間は22-47時間と推定された。

実際に糞の色彩は目視でも22-47時間で変化しているのが認められた。さらに糞の色彩分析は、飼育条件1では22-72時間に明度 ( $L^*$ )、彩度 ( $C^*$ )、色相 ( $h$ ) に変化が見られた。一方で、飼育条件2では餌換え後6-22時間である飼育開始後676-692時間で値に変化があったが、

総じて、糞の色彩分析の結果は、幼虫の消化管内容物重量に基づく消化管内通過時間の推定値を裏付けていた。

またC/N比の結果では、飼育条件1において飼育実験開始時のクヌギマットと糞のC/N比が同等となるのは22-47時間後であった。その後、餌を腐葉土に戻した飼育条件2でも餌替え後47時間である飼育開始後742時間で、糞のC/N比が腐葉土のC/N比と同等となった。

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消化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。

コガネムシ科幼虫の消化管内容物の通過については、木材・牛糞混合物で飼育した*O. nasicornis*（オウシュウサイカブトムシ、カブトムシ亜科）の終齢幼虫で全消化管の摂食物通過は18時間15分とされている（Bayon, 1980a）。今回得られたカブトムシ幼虫の摂食物通過は47時間であり、同亜科であっても幼虫の種や体重などによって異なる可能性が考えられた。

また、これまでコガネムシ上科の生態研究におけるC/N比測定は、窒素分獲得戦略の推察（荒谷, 2002 ; Holter & Scholtz, 2007 ; Holter, 2016）や、雑食性の種の各食物アイテムの重要性の推定の方法（Koyama *et al.*, 2003b）として用いられてきたが、本研究では、C/N比を用いることによって消化管内容物の排出時間の明確化が可能となった。

### 1.3.3 幼虫の窒素分の摂取と動向

本研究では、餌を腐葉土とした飼育条件2では、幼虫の体重は増加傾向にあったが、クヌギマットとした飼育条件1における28日間で、カブトムシ3齢幼虫6頭の体重は減少し、餌の摂食と糞の排泄をしているの

にもかかわらず成長が見られなかった。

3齢幼虫の摂食が成長に直接反映しないこと（小島，2019）は，齢による成長と成熟の非同時性を示唆するものである．すなわち1-2齢では成長のためにもっぱら摂食を行い，3齢になると成長せず，摂食で得たものは成虫へと変態するための生理的変化・成熟のためにのみ利用されるという可能性が考えられる．しかしながら，いずれの齢にあっても窒素分と炭素分の摂取は必須と考えられ，3齢における筋肉成長以外の面での窒素要求性に興味を持たれる．

一般に陸生昆虫の窒素代謝物は主に尿酸であり，尿酸はマルピーギ管を介して分泌され，中腸-後腸接合部で腸管に合流の後，通常は糞で排泄されるが，木材摂食性シロアリやゴキブリでは，尿酸は脂肪体にかなりの濃度に蓄積する可能性があるといわれている（Brune & Ohkuma, 2011）．また，平山（2003）は，窒素栄養が著しく乏しい食餌環境下で日常的に生育するウンカやアブラムシのような昆虫の窒素代謝システムがきわめて特異的であり，窒素代謝産物の排泄を抑制し，窒素を共生微生物の代謝系を介して，栄養学的に利用価値の高い必須アミノ酸に変換する非常に高度な窒素リサイクリング機構が機能していると述べている．実際に，Andert *et al.* (2008) と Li & Brune (2007)は，腐植食性の*P. marginata*および*P. ehippiata*の3齢幼虫では，土壌中のペプチド成分を栄養源としており，強アルカリ性の中腸でタンパク質分解によって大量の遊離アミノ酸が生じること，また，後腸でもアミノ酸発酵性細菌により，遊離アミノ酸からアンモニアへの転換やアミノ酸から酢酸やプロピオン酸が生じていることを報告している．これらの幼虫の腸内では，摂食物の消化管通過に従い，有機窒素と無機窒素は硝酸や亜硝酸アンモニアとなり，さらに気体窒素（N<sub>2</sub>）となって空気中

に放出され、糞は窒素分が非常に少ないと考えられている。本来昆虫における成虫全身のC/N比は約3-6で、ガの幼虫では約6である (Bennett & Hobson, 2009)。甲虫目では、カミキリムシ幼虫体のC/N比は5-8であり、窒素割合は7-8% (桐山ら, 2019) であり、幼虫の生命維持には多くの窒素が必要とされる。

今回飼育条件1で餌料としたクヌギマツのようにやや貧窒素性の場合、糞中に排泄される窒素がクヌギマツである餌より減少することから、窒素分を尿酸として体内に貯蔵し、これを後の変態の際に利用したり、餌料中の元々少ない窒素を共生微生物によって変換されたアミノ酸として幼虫の体内に吸収していると示唆された。しかしながら、幼虫の体重が減少したことから、餌料中の窒素だけでは、幼虫が要求する窒素分を充足することができなかつたと考えられる。一方、飼育条件2で餌料とした腐葉土の場合には、餌料中の窒素が十分に存在し、貯蔵・栄養素として吸収し、また体内に貯蔵することによって、餌料と糞での窒素含有量に差がでることなく幼虫の体重が増加したと考えられた。

以上のことから、餌料の有機窒素濃度によって消化管における窒素吸収の割合がコントロールされていると推定された。

また、飼育条件1のクヌギマツで飼育した場合、C/N比の値は摂食物の消化管通過が完了する47時間目以降も上昇し、C/N比が安定するまでに500時間を要した。それに対し、腐葉土を摂食させた飼育条件2においては、飼育開始47時間後にC/N比が低下して安定した。この安定化には、摂食する餌による細菌叢の変化が予想されるが、コガネムシ科幼虫の餌の違いにおける細菌叢の違いについての報告は非常に少ない。Huang & Zhang (2013) は、*H. parallela*の1齢・2齢・3齢幼虫の後腸内

細菌叢を中国国内の様々な産地について調査した結果は、産地ごとに細菌叢の違いは、土壌のpH、有機炭素量、総窒素量、気温などが関係していると述べている。本研究のカブトムシ幼虫における飼育条件2において、餌と糞の炭素量と窒素量の変化は少なかったが、飼育条件1においては、餌と糞の炭素量は変化が少ないのにも関わらず、C/N比の増加が安定化するのに長時間を要することから、窒素量の変化が消化管内の細菌叢の安定化に影響したと予想された。カブトムシ幼虫の栄養生理に関しては、さらに腸内細菌叢の構成と機能の変化について餌の窒素量との関係を検討する必要がある。

## 1.4 小括

カブトムシの3齢幼虫を用い、摂食物の消化管通過時間を明らかにするため、2種類の餌を摂食させて体重と糞の色彩やC/N比の変化を分析した。その結果、餌が摂食後に消化管から完全に排泄されるのは47時間と推定された。また、幼虫の成長量は、腐葉土で飼育した場合は体重が増加したが、クヌギマットでは減少した。飼育に用いた餌のC/N比を比較すると、腐葉土が約30であるのに対してクヌギマットは約90であり、クヌギマットで飼育した幼虫の体重減少に餌の窒素分が影響を及ぼしていることが示唆された。

カブトムシ幼虫の消化管内の環境の維持と調節には、摂食物の通過時間が関連していると考えられるが、餌の組成（窒素含量）はあまり影響を与えなかった。一方、餌と糞のC/N比の差から、腸内細菌叢への影響が示唆された。

## 2. カブトムシ幼虫の腸内環境と酵素活性

カブトムシ幼虫の消化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には、その腸内環境を部位特異的に特徴づける必要がある。特に多糖類に由来する中間代謝物の部位特異的な挙動を明らかにすることが重要である。本章では、腸内における多糖類の分解と吸収に関連する代謝プロファイルを理解するために、酵素活性、中間代謝物、消化管の部位特異性について検討した。

### 2.1 材料と方法

#### 2.1.1 供試虫の飼育と供試組織

幼虫は、餌料として適切な量の飼育腐葉土を含むプラスチックケージ (31.5 L) で 10 頭ごとに飼育した。腸内環境についての実験では、約 50 頭の 3 齢幼虫を使用した。解剖時の平均体重±標準偏差 (範囲) は  $20.9 \pm 6.2$  (12.8-33.0) g であった。酵素活性についての実験では、10 頭の 3 齢幼虫を使用した。解剖時の平均体重±標準偏差 (範囲)  $20.7 \pm 3.9$  (16.6-26.8) g であった。

幼虫は、1.1.2 に記載された方法で解剖した。生化学的特性と消化管におけるそれらの局在との関係をさらに理解するために、Bayon (1980b) を参照し、盲嚢の位置に基づいて、中腸と後腸をそれぞれ 7 部位と 3 部位に分割した。中腸および後腸は、それぞれ M および H とし示し、その後に分割位置を番号で示した (Fig. 8A, 8B)。

M1 には、前腸全体と中腸の最初の部位が含まれている。M2 から M6 は、M1 から続く中腸である。M7 には、中腸の末端部位と、中腸と後腸を接続する「細いチューブ」の一部が含まれている。H1 には「細いチューブ」の一部と後腸の最初の部位が含まれ、H2 から H3 には残り

の後腸が含まれている．M4 と M5，および H2 と H3 は，同じ長さに分割した．

### 2.1.2 pH 測定

消化管内の pH 測定には 3 頭の幼虫を使用した．分離した中腸と後腸は，半凍結するまで冷凍庫で冷却し，分割した．各腸管部位からの約 0.2-0.4 mL の粘性液体内容物をコンパクト防水 pH メーター (B-212, 堀場製作所) のフラット pH センサーに直接置き，開口部を遮光カバーで閉じ (Fig. 9) ，製造元の指示に従って pH を測定した．解剖した腸管切片の両端の表面の pH 値は切片に含まれる液体の pH 値と類似していたため，各切片の両端の pH 値を分析に使用した．さらに，湿っている糞の pH も，同様に測定した．

### 2.1.3 陽イオン分析

陽イオン分析では 5 頭の幼虫を使用した．腸管を 10 部位に分けた後，各部位の腸管壁を取り除いた腸内容物と腐葉土は無処理で凍結乾燥させたが，糞は粉碎してから凍結乾燥させた．陽イオン分析は，Yasuda & Hasegawa (1976) の方法に変更を加えて実施した．

1 g の凍結乾燥サンプルを 50 mL の 1M 塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 溶液に懸濁し，懸濁液を 15 分間隔で攪拌しながら 70°C で 1 時間加熱した後，室温で一晩インキュベートした．次に，懸濁液をガラス繊維フィルター (GFP) で吸引濾過し，沈殿物を 50 mL の 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液で洗浄した．最後に，濾液を 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液で 200 倍に希釈し，実験のストック溶液として使用した．このストック溶液は分析時に濃度調整した．

ナトリウムイオンとカリウムイオンの濃度は炎光分析法で測定し、カルシウムイオンとマグネシウムイオンの濃度は原子吸光分光光度法にて測定した (A-1000 / A-2000: Hitachi High Technology, 東京, 日本) .

#### 2.1.4 重炭酸イオン測定

重炭酸イオン測定には、10 頭の幼虫を使用した。幼虫の消化管を 10 部位に分割した後、各部位の重量を測定した。重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) は、JIS K 0101 : 1998e (Japanese Standards Association, 1998) に記載されている分離滴定法を変更して測定した。各部位別に、重量に対し 10 倍量のイオン交換水を加えて懸濁した。懸濁溶液に対し、pH 4.8 になるまで、0.01M 硫酸を加えた。すべての値は、サンプルの湿重量に基づいて示した ( $\mu\text{mol} / \text{g of organ}$ ) .

#### 2.1.5 構成糖分析

##### 2.1.5.1 試料の調製

構成糖分析には、3 頭の幼虫を使用した。解剖後の幼虫の腸管を中腸と後腸の 2 分割とし、腸管壁を除いた腸内容物を試料として使用した。

まず、50 ml チューブに腸内容物と冷滅菌ミリ Q 水を 20 ml 加えた。次に、ボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、 $10,000 \times g$ , 20 分間、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した上清を別の容器に移した。さらに沈殿物に冷滅菌ミリ Q 水を 20 ml 加え、洗浄および上清回収の操作を 2 度繰り返した。集めた上清 (総量約 50 ml) を水可溶性糖とし、沈殿物を水不溶性糖とした。水可溶性糖を含んだ抽出液は、桐山ロートを用いてガラス繊維フィルター (GFP) で浮遊物の除去を行った後に、溶液をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターを用いて  $40^\circ\text{C}$  以下で濃縮乾固した。

また、水不溶性糖は凍結乾燥した。

### 2.1.5.2 方法

構成糖分析は、Borchardt & Piper (1970) ; 篠田・稲葉 (1985) によるアルジトールアセテート法を一部改変し、以下の要領で分析を行った。

イノシトール 1 g を内部標準として精秤して、50 ml にメスアップした。約 0.2 g の試料を精秤して小型試験管にとり、72% 硫酸 3 mL を加え、30°C で時々かき混ぜながら 1 時間放置した。この試料を 200 mL 三角フラスコ中に、蒸留水 84 ml を使って全量移した。シリコン栓で密封して、120°C のオートクレーブ中で 1 時間処理した。冷却後、内部標準として上述のイノシトール液 5 mL をホールピペットを用いて加え、よく混合した。以上の操作は全て定量的に行った。この溶液より 20 mL 程度をビーカーに取り、水酸化バリウム溶液（飽和及び希釈溶液）を用いて、pH 5.5 にし、同時に糖が変性しないようにアルカリ性になるのを避けた。遠心分離を行い、上澄み液 25 mL を 100 mL のナス型フラスコにとり、水素化ホウ素ナトリウム 80 mg を加えて混合し、室温で 1.5-2 時間放置し、試料をアルジトールとした。

過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解するために、氷酢酸を水素ガスの発生がやむまで加えた。ロータリーエバポレーターを用いて 60°C 以下で溶液を濃縮し、シロップ状とした。最後に、メタノール 10 mL を加えて濃縮乾固した。この操作を 2 回行ってホウ酸をメチルボレイトとして留却した。その後 105°C の乾燥機中で 15 分放置し、十分試料を乾燥させた。無水酢酸 7.5 mL 濃硫酸 0.5 mL の混合液を加え、50-60°C の温浴中で 1 時間反応させ、試料をアセチル化した。5 分間放冷後、アセチル化物を氷水 70 g に攪拌しながらスポイトを用いて、ゆっくりと

滴下した。全体を分液ロートに移し、アルジトールアセテートを 25 mL, 15 mL 及び 10 mL のジクロロメタンを用いて順次抽出した。抽出液を合わせ、酸を除去するために水 10 mL で洗浄した。抽出したジクロロメタン溶液をロータリーエバポレーターを用いて 75°C以下で濃縮し、シロップ状とした。水 1 mL を加えて濃縮乾固し、残渣にアセトン 2 mL を加えて溶かし、この溶液 2  $\mu$ L を GLC (GC-9A, 島津製作所) で分析した。水素炎イオン化検出器 (FID) を使用し、キャリアガスとして窒素 (N<sub>2</sub>) を使用した。2m×3mm I.D.のガラスカラムには、10%Reoplex400 を含浸させた 3%ECNSS-M ChromosorbW / AW-DMCS (60-80 メッシュ, ジーエルサイエンス株式会社) を充填した。カラム温度は 200°C, インジェクターと検出器の温度は両方とも 240°Cとした。

## 2.1.6 多糖分解酵素活性測定

### 2.1.6.1 試薬

#### 2.1.6.1.1 基質

酵素反応の基質として使用した多糖類および*p*-ニトロフェニルグリコシド (*p*NP-グリコシド) は以下の通りである。

多糖分解活性分析に使用した基質を以下に示した。カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC ; Cellogen®BS), 可溶性澱粉, キチン (グリコールキチン) は, それぞれ第一工業製薬, 和光純薬工業, 生化学工業から購入した。

リン酸膨潤セルロースは, Green (1963) の方法に従い, 脱脂綿を材料に調製した。 $\beta$ -1,3-グルカンは, Cirelli & DE Lederkremer (1976)の方法に従い, 茯苓粉末もしくはカードラン (和光純薬工業) をアルカリに溶解させて, NaBH<sub>4</sub>で還元, 中和, 透析し, 還元末端還元型を調製し

た.  $\beta$ -1,4-キシランは, 市販カラスミギキシラン (生化学工業) もしくはオートスプレットキシラン (Sigma) をアルカリに溶解させて,  $\text{NaBH}_4$  で還元, 中和, 透析し, 還元末端還元型を調製した.

$\beta$ -1,4-マンナンは, 海藻のヒラミルから Iriki & Miwa (1960) の方法を改良して調製した. ペクチンは, シトラスペクチン (和光純薬工業) 用い, Kamimiya *et al.* (1974) の方法に基づいて, 70%エタノールで3回洗浄し使用した.

この研究で使用したグリコシダーゼ活性測定用基質は, *p*-ニトロフェニル (*p*NP)  $\alpha$ -グルコシド, *p*NP  $\beta$ -グルコシド, *p*NP  $\beta$ -キシロシド, *p*NP  $\beta$ -マンノシド, *p*NP  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニド (Sigma) を使用した.

#### 2.1.6.1.2 基質溶液濃度の調整

多糖分解活性測定用基質については, 多糖類の水溶液あるいは懸濁液を調製後, その濃度をフェノール硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) で測定し, 各多糖の主要構成単糖換算で1% (w/v) になるように糖濃度を調整した. ただしキシランについては0.04%になるように濃度を調整した.

グリコシダーゼ活性測定用基質については, 5種のグリコシダーゼ活性測定用基質の10 mM溶液を活性測定用基質溶液として使用した.

#### 2.1.6.1.3 緩衝液

酵素抽出用緩衝液には, 500 mMの塩化ナトリウム (NaCl) を含む100 mMの*N*- (2-アセトアミド) -2-アミノエタンスルホン酸 (ACES; Sigma) の緩衝液 (pH 7.5) もしくは500 mM NaCl溶液を使用し, 酵素活性測定用緩衝液には{3, 3-ジメチルグルタル酸; トリス (ヒドロキシ

メチルアミノ)メタン(和光純薬工業製);2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(和光純薬工業製)より成る100 mMのGTA緩衝液(pH 3.0-11.0)と200 mMの酒石酸・酒石酸ナトリウム緩衝液(pH 1.0-4.0)を使用した.

#### 2.1.6.2 酵素液調製

特に明記しない限り,すべての手順は4°Cで実行され,すべての溶液は事前に4°Cに冷却した.

腸管の摘出は2.1.1に従って行い,消化管を前腸(頭部を含む),中腸,後腸に分離した(Fig. 9A, 9B).さらに分析するまで,各部位を凍結保存(-80°C未満)した.内容物を含む凍結した各腸管を氷上で解凍し,医療用はさみを使用して細かく切り,乳鉢と乳棒で均質化し,抽出用緩衝液(ACES/NaOH溶液)に懸濁した.懸濁液を10,000×gで15分間遠心分離し,上清を酵素活性分析に使用した.また,この実験では6頭の幼虫を使用した.

幼虫の酵素分泌部位を特定するために,さらに4頭の幼虫を解剖し,消化管(内容物と腸壁を含む)を中腸7分割,後腸3分割の10部位に分割した.各切片を乳鉢と乳棒で均質化し,抽出用緩衝液である500 mM塩化ナトリウム(NaCl)溶液に懸濁して,腸内抽出液を調製した.懸濁液を10,000×gで15分間遠心分離し,それぞれの上清を酵素活性分析に使用した.

酵素液中のタンパク質濃度は,牛血清アルブミンを標準物質としてCBB-G250(Sigma)を用いた色素結合法(Bradford, 1976)で測定した.

#### 2.1.6.3 活性測定方法および活性単位

多糖分解活性の測定は以下のように行った。合計50  $\mu\text{L}$ の腸内抽出液を500  $\mu\text{L}$ の1%基質溶液, 250  $\mu\text{L}$ の300 mM GTAバッファー, および200  $\mu\text{L}$ の $\text{H}_2\text{O}$ と混合し, 30°Cでインキュベートした。還元糖の濃度は, Somogyi-Nelson法 (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)を改変し, Anzai *et al.* (1988, 1991)の方法で測定した。反応混合物を1000  $\mu\text{L}$ のSomogyi-Nelson銅試薬と混合し, 15分間煮沸し, 氷上で急速に冷却し, 次に1000  $\mu\text{L}$ のNelson試薬と混合した。15分後, 混合物を3000  $\mu\text{L}$ の $\text{H}_2\text{O}$ で希釈し, 分光光度計 (UV-1200, 島津製作所)を使用して500 nmでの吸光度を測定した。多糖分解活性の1単位は, 基質多糖から1分あたり1  $\mu\text{mol}$ の単糖に相当する還元糖を生成するために必要な活性として定義した。

グリコシダーゼ活性測定は, Anzai *et al.* (1988, 1991)の方法を改変して実施した。終濃度で5 mM *p*-ニトロフェノール (*p*NP) グリコシド, 100 mM GTAバッファー, および50  $\mu\text{L}$ の腸内抽出液を含む合計200  $\mu\text{L}$ の反応溶液を30°Cでインキュベートした。次に, 4 mLの100 mM 炭酸ナトリウム水溶液を添加して反応を停止し, 420 nmでの吸光度に基づいて*p*NPを定量した。グリコシダーゼ活性の1単位は, 1分あたり1  $\mu\text{mol}$ の*p*NPを生成するために必要な活性として定義した。

#### 2.1.6.4 可溶性全糖分析

酵素抽出液の可溶性糖量は, フェノール-硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956)によって測定した。

#### 2.1.7 有機酸分析

この分析で使用した試薬はすべて和光純薬工業株式会社から購入した。揮発性脂肪酸の分析は Gorbach *et al.* (1976)の方法を改変して行

った。

腸内容物を直径 13mm のスクリーキャップ付きガラス試験管に入れた。次に、200  $\mu$ L の 50%硫酸を試験管に加えて pH  $\leq$  2 にし、続いて 0.04 g の NaCl と 1 mL のエチルエーテルを加えて混合した。1,132  $\times$  g, 室温で 10 分間遠心分離した後、エチルエーテル層をバイアルに移し、CaCl<sub>2</sub> を添加し、GLC (GC-9A, 島津製作所) を使用してサンプルを分析した。水素炎イオン化検出器 (FID) を使用し、キャリアガスとして窒素 (N<sub>2</sub>) を使用した。2 m $\times$ 3 mm I.D.のガラスカラムには、10% Reoplex400 を含浸させた 3%ECNSS-M ChromosorbW / AW-DMCS (60-80 メッシュ, ジーエルサイエンス株式会社) を充填した。カラム温度は 130 $^{\circ}$ C, インジェクターと検出器の温度は両方とも 250 $^{\circ}$ Cだった。

酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 酪酸, イソ吉草酸, 吉草酸, イソカプロン酸, およびカプロン酸を標準として使用した。各標準は 10 mM (1 mEq / 100 mL) 溶液として調製し, 分析のために 10  $\mu$ L のサンプルを注入した。保持時間とピーク面積に基づいて定量分析を行い, 結果を  $\mu$ mol / g of organ として示した。

不揮発性脂肪酸およびその他の有機酸の抽出は, Cropper & Heywood (1957); Japan Oil Chemists' Society (2013) を改変して行った。

腸内容物を凍結乾燥し, 直径 13mm のスクリーキャップガラス試験管に移した。メタノール (2 mL) をサンプルに添加し, 60 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした (メタノール-硫酸法)。1 mL の蒸留水と 500  $\mu$ L のクロロホルムを加えた後, サンプルを混合し, 1,132  $\times$  g で 10 分間室温で遠心分離した。クロロホルム層を GLC 用のガラスバイアルに移した。2  $\mu$ L のサンプルを, GLC (GC-14B, 島津製作所) を使用して分析した。水素炎イオン化検出器 (FID) を使用し, キャリアガスとして窒

素 (N<sub>2</sub>) を使用した。分析用のカラムは、30m×0.25mm I.D.の DB-FFAP (Agilent Technologies, カリフォルニア州) を用い、インジェクターと検出器の温度は両方とも 250°Cとした。カラム温度は、40°Cのカラムオーブンの初期温度を 10 分間維持し、温度が 250°Cに達するまで 5°C/分の速度で上昇させ、そこで 10 分間維持した。コハク酸、ピルビン酸、オキサロ酢酸、シュウ酸、マロン酸、およびフマル酸を標準として使用した。標準液は、ピルビン酸を 10 mM (1 mEq / 100 mL) 溶液に、残りの標準は 5 mM (1 mEq / 100 mL) 溶液として調製し、保持時間とピーク面積に基づく定量分析のために 2μL のサンプルを注入した。結果は、μmol /g of organ として表記した。

ギ酸は、F キット (JK International) を使用して測定した。ギ酸は、NAD<sup>+</sup>の存在下でギ酸デヒドロゲナーゼによって炭酸水素塩に酸化される。反応によって生成される NADH の量はギ酸の量に化学量論的に比例するため、NADH の増加量を、340 nm (UV-1260, 島津製作所) での吸光度で測定した。

### 2.1.8 ガス分析

メタンと水素の分析は次のように実行した。幼虫の消化管 ( $n = 6$ ) を中腸と後腸の部位に分割し (Fig. 8), 腸管各部位をバイアルに入れ、ブチルゴム栓をした。分析には、飼育腐葉土、中腸、後腸、および直腸に残っている糞を使用した。バイアル内の腸管と糞は、12 cm の長さの針を使用して解剖した。室温で 2 時間放置後、バイアルのヘッドスペースガスは気密シリンジを使用してサンプリングし、サンプル中の水素とメタンは、GLC (GC323, ジーエルサイエンス) を使用して同時に分析した。熱伝導度検出器 (TCD) と、キャリアガスとして窒素 (N<sub>2</sub>)

を使用した。3m×3.2mm I.D.のステンレスカラムには、13 XS モレキュラーシーブ（60-80 メッシュ，ジーエルサイエンス）を充填した。

酸素分析では，FOXY 酸素センサーシステム（オプトシリウス株式会社）を使用し，溶存酸素濃度を Salazar&Nanny (2010)の方法を改変して測定した。外径 790  $\mu\text{m}$ ，長さ 90 mm のステンレス鋼針（21G）を酸素プローブとして使用した。ルテニウム錯体を含む光ファイバー（直径 300  $\mu\text{m}$ ）を使用して，針に引き込まれた酸素に応答した錯体の蛍光強度の変化を検出した。使用前に，酸素プローブは，大気（21%O<sub>2</sub>）と 0.1%ヒドロサルファイトナトリウム（0%O<sub>2</sub>）を含むイオン交換水を使用して校正した。測定時の腸管固定法は，Brune *et al.* (1995)の方法を改変して行った。0.6%ゲランガム溶液（和光純薬工業）をアクリル容器に注ぎ，約 5 mm の厚さに固化させた。次に幼虫を解剖し，消化管を固化したゲランガム上に移した。さらに，消化管の上にゲランガム溶液を注ぎ固化した後，酸素プローブを使用して，さまざまな腸管部位の溶存酸素濃度（ $\mu\text{mol/g}$ ）を測定した。

### 2.1.9 昆虫における多糖分解酵素遺伝子の検索

腸内容物中の多糖分解活性の由来を調べるために，NCBI GenBank にてカブトムシにおける多糖分解に関連する遺伝子配列の検索を行った。なお，NCBI GenBank にはアセンブルされた whole genome shotgun sequence (GCA\_014905495.1)，RNA-Seq データ (IADJ01000000, IABQ01000000 など)が登録されており，以下のカブトムシが属しているコガネムシ科昆虫由来の酵素遺伝子配列を query とした：セルラーゼ遺伝子 (*Oryctes rhinoceros*, QGX749671); アミラーゼ遺伝子 (*O. rhinoceros*, QEI22884);  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子 (*Tenebrio molitor*,

ACS36221);  $\beta$ -1,4-キシラーナーゼ遺伝子 (*Hypothenemus hampei*, ADN94682);  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子 (*T. molitor*, AAG260208).

まず、既報のコガネムシ科昆虫由来の酵素遺伝子配列を query に、Database を Transriome Shotgun Assembly (TSA), Organism を *T. dichotomus* (taxid: 273928, カブトムシ)とし、tblastn 検索を行い、アミノ酸配列の相同性を確認した (Stephen *et al.*, 1997).

次に Hit した配列を query に、Database を Whole-genome shotgun contigs (wgs), Organism を *T. dichotomus* (taxid: 273928, カブトムシ)とし、blastn 検索を行い、カブトムシゲノムに対応配列があるかを確認した (Zheng *et al.*, 2000).

## 2.2 結果

### 2.2.1 pH

まず、カブトムシ幼虫の消化管を中腸と後腸の2分割にし、pH測定を行った。その結果、pHは中腸内容物で10.70、後腸内容物で8.45であった。さらに、腸管を中腸7分割・後腸3分割の10部位に細分された腸内容物のpHを測定した。

各部位のpH測定値と飼育腐葉土および糞 ( $n=3$ ) を Fig. 10 に示した。サンプル間でpHプロファイルにわずかな違いがあり、すべての幼虫個体で次のような一般的な傾向が観察された。中腸前半部 (M1 および M2) では、pH が 7.57 から 8.55 に上昇した。中腸中央部 (M3-M5) では、pH はほぼ 10 で一定だった。中腸後半部 (M6 および M7) で pH が低下し始め、後腸 (H1-H3) では pH 8 で一定に保たれた。飼育腐葉土の pH (5.60) は腸内容物の pH よりも低く、糞の pH (7.80) は後腸の pH と同様だった。

### 2.2.2 陽イオン

次に、イオン濃度が pH にどのように影響するかを明らかにするために、各部位のカリウムイオン、ナトリウムイオン、カルシウムイオン、およびマグネシウムイオンの濃度プロファイルを測定した ( $n=5$ , Fig. 11, Table 4)。M1 から H3 までのナトリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンは  $35 \mu\text{mol/g}$  未満の濃度で存在したが、カリウムイオンは  $35 \mu\text{mol/g}$  を超え、腸管の長さによって変化した。中腸の M2 から M6 までのカリウムイオンの濃度は  $200 \mu\text{mol/g}$  を超えており、他の腸の部位や飼育腐葉土や糞で測定された濃度よりも有意に高かった。特にカリウムイオン濃度のプロファイルは、腸管全体の pH の

プロファイルを密接に反映していた (Fig. 12).

### 2.2.3 重炭酸イオン

さらに、カリウムと対をなす主要なアニオンとして重炭酸イオンが考えられたため、測定を行った ( $n=10$ , Fig. 13). 重炭酸イオンも、飼育腐葉土中や後腸と比較して、中腸での値が非常に高かった. 結果として、重炭酸イオンのプロファイルは、腸管の部位ごとの pH のプロファイル、カリウムイオン濃度のプロファイルを密接に反映していた (Fig. 14).

### 2.2.4 有機酸

カブトムシ幼虫の腸管における有機酸 (陰イオン) を分析した. 合計 11 の有機酸を測定し ( $n=5$ ), 結果は Fig. 15, Table 5 に示した. 同定された有機酸のうち、酢酸, シュウ酸, コハク酸がすべてのサンプルで検出された. 最も豊富な有機酸は酢酸であったため、腸内の酢酸の分布に注目した (Fig. 15, Table 5) .

飼育腐葉土中の酢酸濃度は  $6.82 \mu\text{mol/g}$  であり、濃度は M1 から M2 へと徐々に増加し、M3 で最高濃度である  $13.63 \mu\text{mol/g}$  となり、高い酢酸濃度は M6 まで維持された. M6 の後、濃度は  $0.99 \mu\text{mol/g}$  になる H3 まで徐々に減少した (Fig. 15) .

酢酸と比較して、他の有機酸の濃度はかなり低かった (Table 5) . ギ酸は一般的に中腸で検出され、M1 から M6 まで  $0.5 \mu\text{mol/g}$  以上の濃度だった. M7 のギ酸濃度は M1-M6 の部位よりも低く、後腸ではギ酸は検出されなかった. 酢酸やギ酸と同様に、中腸でもコハク酸を検出したが、後腸では濃度が低かった. シュウ酸は M1 から H3 (M7 を

除く) まで  $1 \mu\text{mol} / \text{g}$  を超える濃度で検出され, シュウ酸の濃度は後腸で維持された. 中腸のプロピオン酸濃度は低かったが, 後腸 (H1) の濃度は上昇した.

一方, 酪酸, イソ酪酸, バレイン酸, イソバレイン酸, イソカプロン酸, カプロン酸は検出されなかったか, 極めて微量で検出された.

### 2.2.5 ガス分析

溶存酸素 (DO) およびその他のガス測定の結果を Table 6 に示した. 中腸の DO 濃度は  $0.001\text{-}0.036 \mu\text{mol} / \text{g}$  の範囲だったが, 後腸の DO 濃度は  $0.001\text{-}0.013 \mu\text{mol} / \text{g}$  の範囲だった (Table 6). DO 測定の結果は, 消化管全体が低酸素であることを示した. このような条件下では, メタンは後腸でのみ検出され ( $0.12 \mu\text{mol} / \text{g}$ ), メタン発酵によって生成されたことを示唆した. 一方, 水素は中腸でのみ検出された ( $0.22 \mu\text{mol} / \text{g}$ ).

### 2.2.6 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餌である腐葉土, 腸管内容物, および糞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.

腸管を中腸と後腸の 2 分割とした場合の可溶性成分は, 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 (Fig. 16A). 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. 構成糖の組成は, 可溶性糖で

はグルコースが最も多く含まれ，特に中腸で多量に含まれていた．一方，不溶性糖ではキシロースが最も多く含まれており，次にグルコースであった (Fig. 16B~16F)．

## 2.2.7 幼虫腸管における多糖分解酵素系および可溶性糖

### 2.2.7.1 3分割腸管中の多糖分解酵素系

#### 2.2.7.1.1 至適 pH

酵素の至適 pH 値は，Fig. 17 と Fig. 18，Table 7 と Table 8 にまとめた．

$\beta$ -1,3-グルカンと $\beta$ -1,4-キシラン分解活性の至適 pH はほぼ中性だった．それに対し，ペクチンと可溶性デンプン分解活性の至適 pH は中性から弱アルカリ性だった．一方，CMC，リン酸膨潤セルロース， $\beta$ -1,4-マンナン，キチンの分解活性は弱く，至適 pH は測定できなかった (Fig. 17) ．

$\beta$ -グルコシダーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの至適 pH は 5.5-5.9 の範囲内であったが， $\beta$ -マンノシダーゼと $\beta$ -N-アセチル-グルコサミニダーゼの pH は 4.1-5.2 の範囲内であった．一方，全ての腸管部位における $\alpha$ -グルコシダーゼや前腸抽出液中の $\beta$ -キシロシダーゼの活性は非常に弱く，その至適 pH は測定できなかった (Fig. 18) ．

#### 2.2.7.1.2 多糖分解活性

次に，至適 pH での各総活性量および比活性を Table 7 にまとめた．

全体として，多糖分解活性は前腸または後腸よりも中腸で高かった．基質として使用された 8 種の多糖類の中で，活性は可溶性デンプンが最も高く，次に $\beta$ -1,4-キシラン， $\beta$ -1,3-グルカンおよびペクチンが続い

た．対照的に，CMC に対して弱い活性が検出され，リン酸膨潤セルロース， $\beta$ -1,4-マンナン，およびキチンを使用した場合，加水分解活性はほとんど検出されなかった．

CMC に対するセルラーゼ活性は非常に弱かったため，至適 pH を測定できなかった．したがって，CMC 分解の活性量は，pH 7.0 の GTA 緩衝液を使用して測定した．多糖類分解活性に関しては，中腸のアミラーゼの総活性は著しく高く，後腸の総活性量の約 90 倍だった．さらに，中腸の $\beta$ -1,3-グルカナーゼおよび $\beta$ -1,4-キシラナーゼ活性は，後腸の約 3-4 倍だった．しかし，ペクチナーゼの総活性は，腸管部位による変化はなかった．アミラーゼは，すべての腸管部位からの抽出液中の多糖分解活性の中で最も強い活性を示し，次に $\beta$ -1,3-グルカナーゼ， $\beta$ -1,4-キシラナーゼおよびペクチナーゼが続いた．この傾向は，単位タンパク当たりの比活性 (mU / mg Protein) や，単位臓器重量当たりの比活性 (mU / g Organ) でも同様であった．

#### 2.2.7.1.3 グリコシダーゼ活性

至適 pH での各総活性量および比活性を Table 8 に示した．

試験した 5 種類の pNP-グリコシドの中で，pNP  $\beta$ -N-アセチルグルコサミニドに対して最も高い活性が検出され，次に pNP  $\beta$ -マンノシド，pNP  $\beta$ -グルコシド，pNP  $\beta$ -キシロシドが検出されたが，pNP  $\alpha$ -グルコシド分解活性は検出されなかった．前腸では， $\beta$ -キシロシダーゼ活性の至適 pH が測定できなかったため，総活性は，pH 6.0 の GTA バッファーを使用して測定した．

$\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼでは，前腸の総活性は中腸の約 2 倍，後腸の約 7 倍と著しく高かった．また，中腸における $\beta$ -グルコシ

ダーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの総活性は後腸の約 1.5 倍であり、中腸における $\beta$ -マンノシダーゼ活性は後腸の約 3.3 倍であった。 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを除いて、中腸のグリコシダーゼの比活性は後腸よりも高かった。

$\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -マンノシダーゼ、および $\beta$ -キシロシダーゼの最も高い活性は中腸抽出液で検出されたが、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの最も高い活性は前腸抽出液で検出された。

この傾向は、単位タンパク当たりの比活性 (mU / mg Protein) や、単位臓器重量当たりの比活性 (mU / g Organ) でも同様であった。

#### 2.2.7.2 10 分割腸管中の多糖分解酵素系と可溶性糖

$\beta$ -1,3-グルカンと $\beta$ -1,4-キシランは、共に真菌と枯死植物に由来する腐植の主成分であるため、幼虫の餌料中に含有されている可能性が非常に高い。したがって、この 2 種の多糖分解酵素系について、幼虫の腸管内での分解をより詳細に調べるために、腸管を 10 分割して、それらの多糖分解活性および腸管内の可溶性糖量を分析した。

測定値は Table 9 と Table 10 にまとめ、部位特異的なプロファイルは Fig. 19 に示した。

##### 2.2.7.2.1 $\beta$ -1,3-グルカン分解酵素系

$\beta$ -1,3-グルカン分解活性は、M1 で最も高く、M2-M7 にかけて減少し、その後 H1 で再び活性が上昇したが、その後 H2 および H3 では減少した (Fig. 19A)。また、 $\beta$ -グルコシダーゼについては、中腸 M1 と後腸 H1 において、高い分解活性が検出された (Fig. 19A)。

#### 2.2.7.2.2 $\beta$ -1,4-キシラン分解酵素系

$\beta$ -1,4-キシラン分解活性は, M1 で最も高く, M2-M5 にかけて減少し, その後 M6-M7 で再び活性が上昇したが, その後 H1-H3 では減少した (Fig. 19B) .  $\beta$ -キシロシダーゼの相対活性も M1 で高く, M6, H1, H2 で弱い相対活性が検出されたが, 多くの部位で活性が検出されなかった (Fig. 19B) .

#### 2.2.7.2.3 全糖量

腸管内容物の多糖類が, 多糖分解酵素によって単糖まで分解されているかを検討するために, 可溶性の全糖量を測定した. その結果, 全糖量は, M1 で最も高く, M2-M5 にかけて減少し, その後 M7 で再び活性が上昇したが, その後 H1-H3 では減少した (Fig. 20) .

#### 2.2.7.3 カブトムシにおける多糖分解酵素遺伝子

本研究において, 腸管壁を含む腸内抽出液について酵素活性測定を行った結果, カブトムシ幼虫腸内で多糖の種類によって分解酵素系が異なることが解明された. 腸内における多糖分解は, 幼虫自身あるいは腸内細菌による多糖分解酵素の分泌が考えられる. そこで, カブトムシの公開遺伝子情報に, 既報のコガネムシ科昆虫の多糖分解酵素遺伝子と類似な配列が存在するかを調査した.

調査の結果, 既報のコガネムシ科昆虫の多糖分解酵素遺伝子のいくつかの類似する配列が見つかった (Table 11) .

*O. rhinoceros* (サイカブトムシ) のセルラーゼ (QGX74967) と推定アミノ酸配列で 90% (421/467) の同一性を示す配列が見つかった. この配列は, カブトムシ 3 齢幼虫の spindle shaped cell で発現していた.

また、*O. rhinoceros* のアミラーゼ (QEI22884) と推定アミノ酸配列で 75% (369/393) の同一性を示す配列が見つかった。この配列は、カブトムシ 3 齢幼虫の horn primordia (角の原基) で発現していた。

*T. molitor* (チャイロコメノゴミムシダマシ) の $\beta$ -1,3-グルカナーゼと推定アミノ酸配列で 56% (212/378) の同一性を示す配列、 $\beta$ -グルコシダーゼと推定アミノ酸配列で 82% (364/468) の同一性を示す配列がそれぞれ見つかり、これら 2 つの配列は、カブトムシ 3 齢幼虫の horn primordia (角の原基) で発現していた。一方、 $\beta$ -1,4-キシラナーゼに相当する配列は検出できなかった。

## 2.3 考察

### 2.3.1 腸内のアルカリ性成分

昆虫の中腸はアルカリ性であることが多くの研究で報告されている (Lemke *et al.*, 2003; Brune 2014; Šustr *et al.*, 2014). 鱗翅目幼虫の中腸の高い pH は, 杯状細胞の  $K^+$ -ATPase によって調節されるカリウム輸送に関連しており, 鱗翅目幼虫の中腸には炭酸カリウムが蓄積していた (Dow, 1984). また Bayon (1981) は, *O. nasicornis* (オウシュウサイカブトムシ) の中腸および盲囊からカリウムイオンが分泌されることを報告した. 一方, シロアリでは, 中腸と後腸の間の“混合セグメント”と呼ばれる部位でカリウムイオンおよび重炭酸塩が腸のアルカリ化に影響を与えていると述べられている (Bignell *et al.*, 1983; Kappler & Brune, 1999; Kumara *et al.*, 2016).

カブトムシ幼虫の腸内 pH は, 中腸中央部 (M4 と M5) で最も高くなり, 中腸の後半部で低くなっていく. また, 中腸のカリウム濃度が後腸, 糞および飼育腐葉土のカリウム濃度よりも著しく高いことを示していた. したがって, カリウムイオンは中腸前半部 (M1, M2, M3) で分泌され, 中腸後半部 (M6 および M7) で吸収されるとも推察される. しかしながら, Bayon (1981) における *O. nasicornis* 幼虫の中腸細胞に関する報告では, 鱗翅目幼虫でカリウムポンプの機能をもつ杯状細胞を持たず, この幼虫の中腸細胞は杯状細胞のように高度に分化した超微細構造がなくても杯状細胞と同じ役割を果たす可能性もあり, カリウム分泌についても鱗翅目幼虫の分泌機構とは異なるとも考えられ, カブトムシ幼虫でも同様の可能性が考えられた.

さらにカブトムシ幼虫におけるカリウムに対する重炭酸のモル比と pH について比較すると, pH の高い中腸では, そのモル比は 1 未満で

カリウムが過剰であるのに対し，後腸ではモル比は 2 以上で重炭酸が過剰となっていた．また，飼育腐葉土と糞では，カリウム濃度は同程度で，後腸と同様に重炭酸が過剰となっていた (Fig. 21) . したがって，カブトムシ腸内における pH 調節は，主に pH 8 以下の飼育腐葉土や糞では炭酸，pH 8 付近の中腸前半部・後半部および後腸では炭酸水素カリウム，pH 9 以上の中腸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 (Fig. 22) .

カブトムシ幼虫における腸内のカリウムイオンの pH への関連性をさらに理解するためには，幼虫の腸管壁の顕微鏡観察やカリウムポンプに関与する V-ATP アーゼ分析が必要だと考えられた．

### 2.3.2 有機酸

Bayon & Mathelin (1980) は，セルロース分解の生成物は主に酢酸であり，昆虫によるその後の利用のために後腸壁を通過していると述べており，酢酸の分布を解明することは，カブトムシ幼虫の消化の機能とメカニズムを理解するために重要であると考えられる．しかしながら，これまで，他のコガネムシ科幼虫の消化管における酢酸濃度の報告は，中腸全体を用いた分析が行われ (Bayon, 1980b; Lemke *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2005)，中腸や後腸による分布の違いやその詳細については明らかになっていなかった．近年，腐敗性のハエである *Penthetria holosericea* (双翅目：ケバエ科) 幼虫の腸内酢酸濃度が，中腸前半部で 0.9 mM, 後腸中央部で 0.4mM であると報告されたが (Šustr *et al.*, 2014)，各臓器の差が解明されたのみで詳細な分布については報告されていなかった．

本研究では、カブトムシ幼虫の腸管における酢酸の濃度勾配について詳細に分析を行い、中腸の部位によって濃度勾配があることを解明したことから、酢酸が後腸ではなく中腸壁を通過し、エネルギー源として吸収されている可能性が考えられた。また、カブトムシ幼虫の後腸の酢酸濃度は、中腸と比較して減少し、メタンが検出されたことから、嫌気性発酵がカブトムシ幼虫の後腸で起きていると考えられた。一方、酢酸以外の有機酸の中で、ギ酸は、水素と二酸化炭素に分解できると予想され、中腸で検出された水素はギ酸に由来すると推定された。

### 2.3.3 多糖分解酵素活性

本研究から、カブトムシ幼虫の腸内容物中の各種多糖分解酵素活性が検出された。この幼虫のアミラーゼ活性は、Yamane *et al.* (1965)によってすでに報告されているように、至適 pH は中性である。カブトムシ幼虫では、腸管部位によらずアミラーゼ活性が検出され、特に腸内 pH が高い中腸においてアミラーゼ活性は最も高かった (Table 7)。カブトムシ幼虫での高いアミラーゼ活性は、他のコガネムシ科幼虫であるコフキコガネ亜科の *Melolontha vulgaris* (Courtois *et al.*, 1962)、およびハナムグリ亜科の *Cetonia* (Schlottke, 1945) と *Potosia* (Schlottke, 1945) と一致していた。一方、カブトムシ幼虫と同一の分類である *X. gideon* (カブトムシ亜科) の場合、後腸にアミラーゼは存在しなかった (Mishra & Sen-Sarma, 1985)。

*Cetonia aurea* 幼虫では、中腸の実際の pH (11.0-11.5) よりアミラーゼの至適 pH 範囲は 6.5-8.5 と低かったことは、摂取した食物の影響であると述べている (Schlottke 1945)。また、至適 pH と実際の pH の不一

致は，甲虫の幼虫の進化に起因するという報告もある (Johnson & Rabosky, 2000). 本研究のカブトムシ幼虫の腸内抽出液中の多糖分解活性の至適 pH は，腸内 pH と同一ではなかったが，腸内 pH 下での多糖分解酵素の活性は，至適 pH の活性の 50% を超えており，これらの多糖分解活性がカブトムシの腸管で非常に活性が高いことを示唆している．また，グリコシダーゼ活性についても，pH 10 において， $\beta$ -マンノシダーゼおよび $\beta$ -キシロシダーゼにおいて最大活性の約 50%，および $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび $\beta$ -グルコシダーゼにおいて最大活性の約 20% を保持していたことから，酵素が作用する腸内環境の pH と至適 pH 範囲との間の不一致は異常ではなく，生理学的な妥協である可能性も考えられた．

一方，多糖分解活性および対応するグリコシダーゼ，すなわち $\beta$ -1,3-グルカナーゼに対応する $\beta$ -グルコシダーゼ， $\beta$ -1,4-キシラナーゼに対応する $\beta$ -キシロシダーゼの至適 pH 値はそれぞれ弱酸性であった．中腸抽出液中の $\beta$ -1,4-キシラナーゼでは，至適 pH が 6.2 と 7.6 の 2 重ピークとして検出された． $\beta$ -1,4-キシラン分解活性の酸性側のピーク (pH 6.2) は， $\beta$ -キシロシダーゼの影響を受けた可能性が考えられた．これまでの研究においても，*Shirahoshizo rufescens* Roelofs 幼虫のアカマツのヘミセルロース (キシロースとマンノースを含む) 分解酵素の至適 pH に 2 重のピークがあり (Yamane *et al.*, 1963)，カブトムシ幼虫のキシラナーゼと同様の理由が考えられた．

また，カブトムシ幼虫では，CMC の分解に対する非常に弱いセルラーゼ活性が検出された．この現象は，コフキコガネ亜科の *Polyphylla fullo* (Debris *et al.*, 1964)，*M. vulgaris* (Courtois & Chararas, 1966)，*Sericesthis geminata* (Soo Hoo & Dudzinski, 1967) や，ハナムグリ亜科の

*P. marginate* (Cazemier *et al.*, 1997) の結果と一致していた。

コガネムシ科幼虫のキシラン分解に関する報告によると, Cazemier *et al.* (1997) は, 腐植性である *P. marginata* 幼虫の中腸と後腸の両方でキシラナーゼ活性を検出した。また, 土壌摂食性でスジコガネ亜科である *Anomala polita* 幼虫の腸内容物からのみキシラナーゼ活性を検出したが, ハナムグリ亜科またはカブトムシ亜科からは検出されなかった (Mishra & Sen-Sarma, 1985)。一方, 土壌摂食性のコフキコガネ亜科である *C. zealandica* の3齢幼虫では, 後腸でのみキシラナーゼ活性を検出し, これは細菌起源であると推定している (Bauchop & Clarke, 1975)。しかしながら, 動物の糞を餌料としているマグソコガネ亜科の *Aphodius rufipes* はキシラナーゼを持たない (Holter, 1974)。以上のように, コガネムシ科幼虫のキシラナーゼ活性は種によってかなり異なっていた。

グリコシダーゼ活性の中で, *N*-アセチルグルコサミニダーゼ ( $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ) については, 前腸や中腸で高い総活性や比活性が検出された。 $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは加水分解酵素であり, 糖タンパク質の糖鎖などに作用して,  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミンを遊離させる酵素である。カブトムシ幼虫の腸内において, *N*-アセチルグルコサミニダーゼの予想される機能としては, 餌料成分にキチン質が含有していた場合の分解酵素の役割や, 生育中の脱皮への関与である。

まず, 餌料成分について考えると, カブトムシ幼虫は, 外骨格を持つ他の昆虫や小型生物を摂食する肉食性ではなく腐植性で, 腐葉土中の担子菌類由来の $\beta$ -1,3-グルカンを利用していると推定されている。担子菌類には $\beta$ -1,3-グルカン以外にもキチンが約4-8%含有され, (吉田

ら, 1996), シイタケでは, 子実体形成時に $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産し, 栄養菌糸中のキチンを $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニドまで分解し, 子実体キチンの合成やエネルギー源に利用している(金野, 2013). したがって, カブトムシ幼虫が餌料として $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼを含有した腐葉土を摂食したことで, 前腸での $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性が高く検出された可能性が考えられる.

次に, 幼虫の脱皮への関与であるが, 古賀(1986)によれば, 昆虫は, 脱皮の調節や分解物の再利用という資源の節約のために, キチナーゼとN-アセチルグルコサミニダーゼという基質特異性の異なるキチン分解に関与する酵素を生成していると述べている.

また, カイコ幼虫におけるN-アセチルグルコサミニダーゼは, 組織中には少なく, 血液および脱皮液に多量に存在し, その性質によって血液に存在するタイプ(血液型)と脱皮液に存在するタイプ(脱皮型)の2種類がある. その酵素の幼虫における臓器中での分布としては, 皮膚組織, 中腸組織, 後部絹糸線, 脂肪体および睾丸と多くの部位に分布している. 物質の消化器官である中腸組織では, 食桑中に高濃度の血液型の $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼが単独で検出され, 幼虫型から蛹型へ変態期には脱皮型の $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼとキチナーゼが共に出現していた(木村, 1977).

基本的に, キチン分解に関与するキチナーゼとN-アセチルグルコサミニダーゼは, 変態時に作用すると予想されるが, キチン質を多量に含まない後部絹糸腺および中腸組織に, 変態期を中心に脱皮型の $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼがキチナーゼとともに出現している. これらの組織に接続する前部絹糸腺, 前腸や直腸は, キチンの存在が予

想されるラメラ構造ある内膜を持つことから、変態に伴う両組織の組織解離と両酵素活性の変動とに関連が示唆されている(木村, 1977). しかしながら, 昆虫のキチン分解酵素は, 植物などの類似酵素とは性質が異なるため, キチン分解には直接関与せず, 糖代謝に関係するという説もある(古賀, 1986). 本研究の多糖酵素活性測定で用いた3齢幼虫は, 2齢幼虫の脱皮後, 1か月以上飼育された個体であり, 次の脱皮である“蛹化”までには少なくとも2か月以上の期間がある幼虫であるため, この酵素が脱皮に関連したとは考えにくい. また, カイコ幼虫の中腸組織において食桑中に高濃度の $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼが単独で検出されていることから, 餌料の摂食によって $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性化が示唆された.

腸管を3分割にして行った多糖分解酵素活性測定の結果は, カブトムシ幼虫の腸管における,  $\beta$ -1,3-グルカンと $\beta$ -1,4-キシランをそれぞれの構成単糖にまで分解する完全な酵素システムを備えていることを示していた. そこで, さらに腸管を10分割することで, 幼虫の腸管における酵素の分泌部位の特定を試みた. 腸管を10分割した場合のM1部位には, 前腸全体と中腸の最初の部位を含んでいる. コガネムシ科幼虫の唾液腺の局在は不明であるが(Crome, 1957), カブトムシ幼虫における多糖類に対する高い分解活性がM1で検出されたため, この部位には唾液腺が含まれている可能性がある. これまで, 昆虫における多糖分解酵素について, 下等シロアリでは, 唾液腺と後腸が $\beta$ -グルコシダーゼの主要な分泌部位であることが報告されている(Veivers *et al.*, 1982; Inoue *et al.*, 1997). また, Mishra & Sen-Sarma (1985)は, コガネムシ科の *A. polita* 幼虫では, 唾液にさまざまな消化酵素が含まれていると述べている. これらのデータを考慮すると, カブトムシ幼虫の唾液

腺が M1（前腸全体と中腸の最初の部位）にある可能性があるが，さらに詳細な分析が必要となる．

カブトムシ幼虫の腸内における $\beta$ -1,3-グルカンおよび $\beta$ -1,4-キシラン分解活性は M1 から M3 で大幅に低下し，並行して，可溶性糖の濃度が低下し，その状態は M6 まで維持された．さらに，多糖分解活性と可溶性糖の増減に対応するように，酢酸濃度は M1 から M2 に増加した．したがって， $\beta$ -1,3-グルカンおよび $\beta$ -1,4-キシランの分解による単糖の生成やその後の酢酸への代謝も，主にカブトムシ幼虫の中腸前半部の M1 で発生したことを示唆していた (Fig. 20)．

一方，中腸後半部および後腸前半部においても，多糖分解の開始となる酵素活性の増加が観察された．例えば， $\beta$ -1,4-キシラナーゼでは M5 から M7， $\beta$ -1,3-グルカナーゼおよび $\beta$ -グルコシダーゼの M7 から H1 への推移である．ただし，これらの部位で，可溶性糖と酢酸の濃度のプロファイルについては，対応する変化はなく，この酵素活性の増加は，酢酸の代謝に影響を与えなかったと考えられた．

#### 2.3.4 酵素分泌部位の特定

Tokuda (2019) によれば，コガネムシ科の中腸または後腸のいずれかで検出されたセルラーゼ，ヘミセルラーゼ，およびペクチナーゼの活性は腸内の共生細菌に由来するとされているが，詳細は明らかになっていない．シロアリの研究では，餌料の初期分解が唾液腺で分泌されたセルラーゼによって起こり，その後細菌によって更なる分解が起こるとされており (Brune, 2014; Brune and Ohkuma, 2011)，カブトムシ幼虫でも昆虫自身と細菌の双方の酵素によって餌料が分解されると考えられる．

本研究では多糖分解酵素の由来についてさらに考察を加えるため、公開データベースに登録されているカブトムシゲノム、トランスクリプトーム情報に既報のコガネムシ科由来多糖分解酵素と類似の配列が含まれるかを調査した。

調査の結果、カブトムシ幼虫のトランスクリプトームデータにコガネムシ科由来セルラーゼ、アミラーゼ、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼとそれぞれ類似の配列が見られ、それらに相当する配列がカブトムシゲノムにイントロンを含む形で見つかったことから、腸内の餌料の分解に幼虫自身の分泌する酵素が活性を持つ可能性が考えられた。一方、NCBIに登録されているゲノム配列の中で、カブトムシに一番近縁である *O. rhinoceros* のセルラーゼ遺伝子は実際には発現していないとの報告がある (Shelomi *et al.*, 2019)。

カブトムシゲノムとトランスクリプトームに多糖分解酵素遺伝子に類似する配列は見られたが、配列のカバー率、同一性の最も高かったトランスクリプトームが3齢幼虫の *spindle shaped cell* や *horn primordia* (角の原基) に由来しており、幼虫の腸内で発現しているかは判断できなかった。また、カブトムシで予測されるセルラーゼ遺伝子配列と *O. rhinoceros* のセルラーゼ遺伝子は約90%と高い同一性であるが、カブトムシ幼虫の腸内でセルラーゼ活性は検出されておらず、遺伝子が発現されていない可能性が考えられた。特に、腸内容物でキシラナーゼ活性が高かったのにも関わらず、*H. hampei* のキシラナーゼと高い同一性を示す配列をカブトムシ遺伝子情報から見つけることができなかつたため、腸内容物中のキシラナーゼ活性は細菌が分泌している可能性が考えられた。本研究で検出された各酵素が、細菌由来であることを調査するためには、細菌の分離・単独培養を試みる必要がある。

## 2.4 小括

カブトムシ幼虫の腸内における，腸管部位に特徴的な物理化学的および生化学的特性の測定を行った (Fig. 23)．カブトムシ幼虫の大きさは，他のコガネムシ科幼虫よりも比較的大きいため，幼虫の消化管をスライスしたサンプルを使用して詳細かつ正確な分析が可能であった．

消化管をその長さに沿って部位別に分割することにより，pH，カリウムイオン，重炭酸イオン，酢酸，および多糖類の分解が，すべて消化管の長さに沿って著しく変化し，中腸が特異な環境を持っていることを示すことができた．これらの知見は，多糖類の分解が腸管の部位に特異的であり，M1 が特に明確な特徴を持っていることを示唆している．さらに，多糖類の分解，単糖の生成，および下流の代謝は，主にカブトムシ幼虫の中腸の前半部で起きるようであり，後腸がセルロースおよびヘミセルロースの主要な部位であることが示された他のコガネムシ科幼虫に消化に関する以前の研究 (Huang *et al.*, 2010) と矛盾していた．

オオシロアリ (*Hodotermopsis sjostedti*) の  $^{13}\text{C}$  標識セルロースを使用した実験では，セルロースの加水分解が後腸で始まり，対応する下流の代謝が後腸で起こることが示された (Tokuda *et al.*, 2014)．また，下等シロアリの共生原生生物が，後腸に生息することはよく知られており (Honigberg, 1970; Inoue *et al.*, 2000)，同様の結果がイエシロアリ (*Coptotermes formosanus Shiraki*)でも報告されている (Nakashima *et al.*, 2002)．したがって，下等シロアリでは，多糖類の分解と下流の代謝は主に後腸で起こっていると考えられている．

本研究の結果は，カブトムシ幼虫における多糖類の分解の主要な部位が，後腸ではなく中腸であり，餌料に適応した消化システムを構築

し、エネルギーを早く得ている可能性を示唆している。また、消化管の機能を分析のためにそれらを細分化する方法は、昆虫の消化管における腸管部位ごとの特異的な役割の深い理解に貢献すると考えられた。

### 3. カブトムシ幼虫の腸内細菌叢

カブトムシ幼虫の腸内環境の物理化学的および生化学的性状の測定により，中腸と後腸では腸内環境が部位特異的であることが明らかになり，消化作用の一部は腸内細菌に依存している可能性が推定された．したがって，カブトムシ幼虫の消化管における細菌群集の構成と機能も，部位特異的に異なると考えられた．そこで，カブトムシ幼虫の消化管の全長に沿って，部位別の細菌群集構造を解析した．特に，中腸と後腸の細菌群集構造の部位特異的な違いを明らかにするために，これらの部位をそれぞれ7部位と3部位に細分し，細菌群集について詳細に分析を行うことで，腸内環境や多糖分解に細菌叢がどのように関与しているかを明らかにすることを目的に実験を行なった．

#### 3.1. 材料と方法

##### 3.1.1 幼虫の採集，実験室での飼育，解剖

腸内細菌叢については，1-3 齢幼虫を使用した．実験に使用した幼虫は，2004 年から 2019 年にかけて神奈川県藤沢市（北緯 35 度 23 分，東経 139 度 27 分）の腐葉土の多い林床から採取した．必要に応じて，昆虫養殖業者（DOS Corporation，大阪，日本）からも購入した．幼虫は，餌料として適切な量の飼育腐葉土を含むプラスチックケージ（31.5 L; 10 幼虫/ケージ）で飼育した．

1 齢および 2 齢幼虫は，飼育期間・体重・頭幅から分類した．3 齢幼虫は，解剖する前に，採集後約 1 か月間飼育した．解剖方法は，2.1.1 と同様に行った．1 齢幼虫は内容物を含む全消化管を，2 齢幼虫と 3 齢幼虫は内容物を含む中腸と後腸に分割して使用した．

さらに腸管部位による詳細な実験を行うために，3 齢幼虫では，消

化管を中腸 7 分割，後腸 3 分割した後，内容物と腸管壁（Fig. 24）に分けた．サンプル名を，中腸内容物は CM1-CM7，後腸内容物を CH1-CH3 とした．腸管壁を供する場合は，各切片を滅菌生理食塩水で少なくとも 3 回洗浄し，中腸腸管壁を WM1-WM7，後腸腸管壁を WH1-WH3 とした．DNA は，CM1-CM7，CH1-CH3，WM1-WM7，WH1-WH3，飼育腐葉土 (BH) と幼虫の糞 (F) からも抽出し，以下の実験に使用した．

### 3.1.2 DNA 抽出

この実験では，1 齢幼虫を 3 頭，2 齢幼虫を 3 頭，3 齢幼虫を 6 頭（予備実験：3 頭，本実験 3 頭）を使用し，すべての各幼虫サンプルを個別に処理した．DNA 抽出は，ISOIL Beads Beating kit（ニッポンジー）を製造元の指示に従って使用した．

各サンプル（各腸管部位からの内容物 0.5 g もしくは部位別の腸管壁）をビーズ入りチューブに採取し，65°C に加温した Lysis Solution BB を 950  $\mu$ L，Lysis Solution 20s を 50  $\mu$ L 添加した．ボルテックスで 10 秒攪拌し，65°C で 15 分間インキュベートした後，20°C，13,000 rpm で 1 分間遠心分離した．上清 600  $\mu$ L を 2 mL チューブに移し，Purification Solution を 400  $\mu$ L 添加後，転倒攪拌した．さらにクロロホルム 600  $\mu$ L を添加後，ボルテックスで 15 秒間攪拌し，20°C，13,000 rpm で 15 分間遠心分離した．水層 800  $\mu$ L を 2 mL チューブに移し，Precipitation Solution を 800  $\mu$ L 添加後，転倒攪拌し，4°C，15,000 rpm で 15 分間遠心分離した．上清を捨て，Wash Solution を 1 mL 添加後，転倒攪拌し，4°C，15,000 rpm で 10 分間遠心分離した．上清を捨て 70% エタノールを 1 mL，Ethachinmate を 2  $\mu$ L 添加した．ボルテックスで 5 秒攪拌し，4°C，1,500 rpm で 5 分間遠心分離した．上清を捨て，60°C で 10 分間

風乾した後、沈殿を TE (pH 8.0) 100  $\mu$ L に溶解させた。抽出 DNA は 4°C で保存した。

### 3.1.3 PCR-DGGE 解析

次に、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3 領域をターゲットとする PCR-DGGE を、Watanabe *et al.* (2001) の方法を改変して行った。PCR は、細菌の 16S rRNA 遺伝子のプライマーセット (341F および 534R) を使用して増幅した。DGGE を使用して対応する PCR 産物を検出するために、GC クランプを 341F プライマーの 5' 末端に付加した。各 50 $\mu$ L の PCR 反応液には、25 pmol の各プライマー、4 $\mu$ L の dNTP mixture (各 2.5 mM)、5 $\mu$ L の 10 $\times$ Ex Taq バッファー (Mg<sup>2+</sup> plus)、2.5U の ExTaq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, Inc.)、および 1 $\mu$ L の鋳型 DNA を添加した。PCR 増幅はサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories) で行なった。タッチダウン増幅プロファイルは次のとおりである：まず、第 1 ステップとして 96°C、10 分インキュベートした。第 2 ステップは、最初に、変性反応として 96°C、1 分、アニーリング反応として 64°C、1 分、伸長反応として 72°C、2 分を行い、その後、アニーリング温度を 2 サイクル毎に 1°C ずつ下げ、最終的にアニーリング温度が 55°C になるまで反応を繰り返した。第 3 ステップは、変性反応として 96°C、1 分、アニーリング反応として 55°C、1 分、伸長反応として 72°C、2 分の反応を 28 サイクル行った。

PCR 増幅産物を 1.5% アガロースゲルでの電気泳動により確認し、目的の増幅バンドを QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製し、最終量 200ng の PCR 産物を得た。

DGGE は、Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories)

を使用して、30-70%の尿素とホルムアミド勾配（40%[v / v]ホルムアミドと 7M 尿素を含む 100%変性溶液）のある 10%ポリアクリルアミドゲルを使用して行った。アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率は 37.5 : 1 とした。電気泳動は、58°Cで 3.5 時間、200V の定電圧で行った。DNA マーカーは DGGE マーカーII(ニッポンジーン株式会社)を用いた。電気泳動後、ゲルを SYBR<sup>®</sup>GreenI Nucleic Acid Gel Stain（タカラバイオ）で 30 分間染色し、Typhoon 9410 variable mode imager（GE Healthcare）を用いて検出した。

DGGE バンドの相対的な存在量は、Quantity One Ver. 4.5.2 ソフトウェア（Bio-Rad Laboratories）を使用して半定量的に決定した。すなわち、1つのレーンの合計強度(TI)が、その移動度に基づいて各バンド(IEB)の強度とともに推定した。各バンドの相対存在量（RA）は、次の式で計算した： $RA（\%） = IEB / TI \times 100$ 。

DGGE ゲル上のターゲットバンドは、UV 照射下で分取した。まず、分取したゲルバンドと TE バッファー（200 $\mu$ L）を 37°Cで一晩インキュベートした。次に、酢酸ナトリウム（3 M, 20 $\mu$ L）とエタノール（99.5%，400 $\mu$ L）を加え、サンプルを混合し、-20°Cで少なくとも 2 時間冷却した。次に、サンプルを 15,000 rpm で 4°Cで 30 分間遠心分離し、上清を除去した。エタノール（70%，400 $\mu$ L）を上澄みに加えて混合し、15,000 rpm, 4°Cで 20 分間遠心分離してサンプルを分離した後、上澄みを除去した。最後に、60°Cで乾燥後、沈殿物を TE バッファー（20 $\mu$ L）に溶解した。

DGGE ゲルから分取したバンドを精製し、上記の PCR 条件を用いて、再度 PCR を行った。再増幅した PCR 産物は、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen）を製造元の指示に従って使用して精製した。シーケンス

分析は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を使用し、電気泳動は ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で行った。

分析された DGGE バンドの配列は、必要に応じて分析後に手動で修正され、修正配列は GENETYX Ver.14 (GENETYX Corp.) を使用して取得した。配列は Find Chimeras (Wright *et al*, 2012) を使用して確認され、キメラ配列はその後の分析から除外した。米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の BLAST データベースを使用して、200 塩基対からなる類似の配列を特定した。さらに、登録した配列および相同性データは、BLAST データベースから取得した。データ取得のために、NCBI nucleotide collection の 16S ribosomal RNA gene sequences (bacteria and archaea) と高い相同性を示す配列を抽出した。

### 3.1.4 主成分分析

DGGE バンドパターンの類似性は、主成分分析 (PCA) を用い、バンドパターンを分析することによって視覚化した。統計分析とプロットは、R software package version 3.3.3 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) を使用して行った。

### 3.1.5 多様性分析

Quantity One Ver. 4.5.2 ソフトウェア (Bio-Rad Laboratories) を使用して、ゲルバンドを解析した。また、細菌叢の変化を評価するために、DGGE バンドの多様性指数を Shannon-Wiener index (Shannon, 1948) および Simpson index (Simpson, 1949) を使用して計算した。 $S$  は各ゲルレーンのバンド数を示した。

$$\text{Shannon - Wiener} = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i = \sum_{i=1}^s (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

$$\text{Simpson indexes} = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

### 3.1.6 クローンライブラリー分析

PCR は、PCR-DGGE 分析で使用したのと同じ DNA サンプルを使用して行った。タカラバイオ™ホットスタートバージョン（タカラバイオ）と MyCycler サーマルサイクラーPCR キット (Bio-Rad Laboratories) を使用した。16S rRNA 遺伝子は、バクテリアを標的とするプライマーペア 27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', *Escherichia coli* 16S rRNA 遺伝子 : 8-27) および 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', *Escherichia coli* 16S rRNA 遺伝子 : 1513-1492) を使用して腸内容物から抽出した DNA から増幅した。得られた PCR 産物は、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を使用して精製した。

次に、細菌の 16S rRNA 遺伝子の増幅産物を、pGEM-T Easy Vector システム (Promega) を製造元の指示に従って使用して、大腸菌 DH5α にクローニングした。ランダムに選択したクローンをチェックして、標準的なベクターターゲット PCR およびゲル電気泳動を介してインサートサイズを確認した。DNA は、ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で、製造元 (Applied Biosystems) の指定に従って BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を使用してシーケンスした。Find Chimeras (Wright *et al.*, 2012) を使用して同定したキメラ配列は除外した。

最後に、DNA データベース内の配列の検索は、米国国立バイオテク

ノロジー情報センターの `blastn` プログラムを使用して行った。配列アラインメントは `ClustalW2.1` を使用して行った。

### 3.1.7 系統解析

塩基配列データ解析は、16S rRNA 遺伝子について行い、細菌の塩基配列を `ClustalW 2.1` (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>, Thompson *et al.*, 1994) を使用して配列アラインメントを実行した。その後、近隣結合法 (Saitou, 1987) による系統樹を `Mega6` (Tamura *et al.*, 2013) で構築した。樹形の分岐パターンについては 1000 回のブートストラップ検定 (Felsenstein, 1985) を行なった。

### 3.1.8 細菌の多糖分解酵素遺伝子の検索

カブトムシ幼虫の腸内で検出された細菌の機能について、既報の細菌の Complete Genome からその機能の推測を試みた。

まず、DGGE バンドやクローン配列を query に、Database を Nucleotide collection (nr/nt) とし、`blastn` 検索を行い、DNA 配列の検索を行った (Zheng *et al.*, 2000)。次に Hit した配列の中で、Complete Genome が登録されている細菌でアノテーションされた Protein name から、対応する酵素遺伝子があるか確認した。

### 3.1.9 16S rRNA 遺伝子配列のアクセッション番号

DGGE バンドに由来する部分的な 16S rRNA 遺伝子配列、およびクローンライブラリー分析に由来する完全な 16S rRNA 遺伝子配列は、アクセッション番号 AB735679, LC375133, LC375134 (DGGE バンド) および LC373224-LC373238 (クローン) として日本 DNA データバンク

(DDBJ) に寄託した.

## 3.2 結果

### 3.2.1 PCR-DGGE 分析におけるカブトムシ幼虫の腸内の細菌群集構造

#### 3.2.1.1 幼虫の成長段階における腸内細菌叢の推移

本実験の開始前に、1 齢から 3 齢の幼虫について、各 3 頭 (3 つの biological replicates; 1 齢幼虫 : A-C, 2 齢幼虫: D-F, 3 齢幼虫: G-I) の腸管内容物の細菌群集構造を PCR-DGGE 分析によって分析した。これらの分析の結果は、中腸と後腸の細菌群集構造が異なることを示した (Fig. 25)。

予備実験の結果をもとに、本実験を行った。追加の 3 頭の 3 齢幼虫 (3 齢幼虫 J・K・L, 3 つの biological replicates) の腸管をさらに細分化し (中腸 : 7 分割, 後腸 : 3 分割), PCR-DGGE 分析を行った (Fig. 26, Fig. 27)。3 頭の幼虫のうちの 1 頭から得られた代表的なデータを Fig. 26 (幼虫 J) に示し、他の 2 頭の幼虫から得られたデータを Fig. 27 (幼虫 K・L) に示した。

各齢の幼虫で多くのバンドが検出され、そのバンドパターンは同じ成長段階では類似していた。さらに、同じ腸管部位の DGGE バンドは、実験ごとに同じ移動度だった。これらのデータは、個々の幼虫間の細菌群集構造の違いを考慮する必要がないことを示していた。したがって、以降は 3 齢幼虫 J について詳細に解析を行った。

#### 3.2.1.2 飼育腐葉土、中腸内容物、後腸内容物、糞の細菌群集構造

まず、飼育腐葉土、中腸内容物、後腸内容物、糞の細菌群集構造の比較を行った。腸管 10 分割の DGGE プロファイルは、中腸と比較すると後腸と糞の細菌叢はバンド数が多く (Fig. 26, Table 12)、優占化する細菌にも違いがみられた。また、DGGE に基づく PCA 分析は、CM、

CHはそれぞれまとまったグループをもっていたが、そのグループは独立して位置していた。FはCHの同様の位置にあったが、BHは他のすべてのサンプルから離れていた (Fig. 28)。

### 3.2.1.3 飼育腐葉土の細菌群集構造

BHの細菌群集の分析では、2つの主要なバンドが観察された (Fig. 26)。バンド2は、Uncultured bacterium clone SBYB\_2224 (JN438659)に対して98%の相同性を示し、バンド3および17a-17bは、Uncultured bacterium clone 1112855455242 (HQ118362)に対してそれぞれ95%の相同性を示した (Table 13)。

### 3.2.1.4 中腸内容物の細菌群集構造

CM2-CM6では、BHでは検出されなかった1つの特に主要なバンド (バンド11a-11e) と3つの主要なバンド (バンド12, 13, 14) が検出された。

バンド11a-11eの16S rRNA遺伝子配列の違いは2%未満であり、Operational Taxonomic Unit (OTU)が構築された。OTUは、*Protaetia aurichalcea*の腸からクローニングされたUncultured bacterium clone Pau4 (KT251043)に対して98%以上の相同性を示した (Table 13)。また、2番目に近い配列はUncultured bacterium clone ANTPL\_TC57 (HM192939)であり、その相同性は90%であった。バンド11a-11eは、CM1-CM5での最も高い相対存在量の25.9-56.9%であり (Fig. 29)、CM6およびCM7でも観察された。またバンド11の中腸内容物における部位特異的分布は幼虫J-Lの3個体で類似した推移を示した (Fig. 30)。

他の3つの主要なバンド、12a-12c, 13a-13d, および14a-14dでは、

それぞれ、Uncultured bacterium clone FFCH1250 (EU134638)に対して96%の相同性、Uncultured bacterium clone Pau13 (KT251047)に対して93%の相同性、およびUncultured bacterium clone Pau19 (KT251051)に対して97%の相同性を示した (Table 13). 4つの配列のうち3つ (Band11, 13, および 14) の最も近い配列は、*P. aurichalcea* の腸に由来する配列だった。

対照的に、CM7の細菌群集構造は、CM1-CM6の細菌群集構造とは多少異なっていた (バンド 19, 20, および 21, Fig. 26, Fig. 29). CM1からCM6では検出されなかったいくつかの主要なバンドがCM7で検出され、そのうちの1つであるバンド 19は、Uncultured bacterium clone PeM18 (KT251050)に対して93%の相同性を示した (Table 13). CM7におけるバンド 19の相対存在量は16.4%であり (Fig. 29), この値はバンド 11の値と類似していた。また、バンド 20と21は両方とも、*Pragia* sp. CF-458 chromosome, complete genome に対し、99%および100%の相同性であり、相対存在量は25.0%であった。

### 3.2.1.5 中腸腸管壁の細菌群集構造

WM1-WM7の細菌群集構造を比較した (Fig. 26 および Fig. 28). 主要なバンドである51a-51eは、WM2-WM6で検出された。これらの配列の違いは1%未満であり、11a-11eによって構築されたOTUと99%同一であり、11a-11eと同一であることを示した。これらの配列は、Uncultured bacterium clone Pau4 (KT251043)に対して98%以上の相同性も示した (Table 13). さらに、バンド51a-51eは、WM2-WM6で最も高い相対存在量 (18.6-38.7%, Fig. 29) を示した。

他の3つの主要なバンド (バンド 53, 54a-54b, 55a-55b) がWM2と

WM4 で検出された。これらのバンドは、中腸内容物では検出されなかった。これらの配列の違いは 1%未満であり、OTU はバンド 53, 54a-b および 55a-b によって構成された。これらの配列は、*Enterobacter sp.* strain BHUJPCS-20 (MN078054) に対して 97%の相同性を示した (Table 13)。バンド 53, 54a-54b および 55a-55b の相対的存在量の合計は 16.1 から 40.8%の間であった (Fig. 29)。一方、CM1-CM4 ではバンド 53-55 と同様の移動度を示すバンドが検出されたが、バンド 53-55 とは配列が異なっていた。

### 3.2.1.6 後腸内容物, 後腸腸管壁, 糞の細菌群集構造

3.2.1.1 に示すように、後腸, 後腸内容物および糞の細菌群集構造は非常に類似していた (Fig. 26, Fig. 28)。後腸内容物のバンド数は、中腸内容物のバンド数よりも多かった (Table 12)。

バンド 34a-34c と 44 の 16S rRNA 遺伝子配列の違いは 1%未満であり、OTU が構築された。この OTU は、Uncultured bacterium clone Cast045 (GU450372) に対して 99%以上の相同性を示した (Table 13)。このバンドは、CH1-CH3 および糞で優勢で、相対存在量は 10.9-22.0%だった (Fig. 29)。

さらに、バンド 34a-34d と同じ移動度を示すバンド 16a-16c も CM5-CM7 で検出され、バンド 34a-34c および 44 と同様の移動パターンを示すバンドが、後腸内容物および糞で観察された。しかしながら、その他には、後腸内容物と後腸腸管壁との間で共通するバンドは検出されなかった。

バンド 31, 32, 33, 35, 36, および 37 (Fig. 26) を含むいくつかのバンドは、後腸内容物および/または糞に特異的だった。バンド 33 は

後腸内容物のみで観察され，Uncultured bacterium clone denovo2668\_554\_38588 (MF221998)と相同性があった．バンド 31b および 31c は，*Bacteroides* sp. HAWD3 (KU886094)に対して 97%の同一性を示した (Table 13)．また，バンド 32 は Uncultured Clostridiales bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: RsW01-074, およびバンド 35a-35c は Uncultured bacterium clone denovo12739\_575\_17323 と 96%の同一性を示した．しかしながら，バンド 36 と 37 の 16sRNA 遺伝子配列は分析できなかった．

一方，後腸腸管壁の各部位のバンドパターンはほぼ同一だった (Fig. 26)．3つの主要なバンド (バンド 62a-62c, 63a-63c, および 64) が WH1-WH3 で共通して観察されたが，後腸内容物 (CH1-CH3) では検出されなかった (Fig. 26)．バンド 62a-62c は，Uncultured Bacteroidetes bacterium clone Ec167\_037 (KM650706)に対して 87%の相同性を示し，63a-63c および 64 は，Porphyromonadaceae bacterium enrichment culture clone B\_MM\_12 (KY101560)に対して 87%の相同性を示した (Table 13)．

### 3.2.1.7 中腸から後腸への消化管の移動に伴う細菌群集構造の変化

幼虫が摂食した餌料は，分解されながら中腸から後腸に移動すると考えられるため，細菌叢の推移を検討した．その結果，CM6，CM7，CH1 で同じ移動度を示すバンド (つまり，CM6 のバンド 16b, CM7 の 16c, CH1 の 34a) が観察されたが，CH1 のバンド数は CM6 および CM7 中のバンド数よりも多かった (Fig. 26, Table 12)．また，細菌群集構造は，CM6 から CM7 へと徐々に変化し，CM7 から CH1 へと大きく変化した (Fig. 28)，CH1 で細菌叢の変化は終了し，F まで維持された (Fig. 26, Fig. 28)．

### 3.2.2 バンド 11 のクローンライブラリー分析

DGGE バンドの中で、特に中腸で優占化しているバンド 11 に相当する 16S rRNA 遺伝子の完全な配列をクローニングした。CM3 から抽出した DNA を用いて構築したクローンライブラリーから、バンド 11 の 16S rRNA 遺伝子の 1468bp 配列からなる 17 個のクローンを取得した。これらの 17 個のクローン間の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性は 98% 以上であった。

17 個のクローンはいずれも、既知の 16S rRNA 配列に対して有意な相同性を示さなかった。しかし、いずれも *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 (Fig. 31)。これらの結果は、相同性検索において、バンド 11 で観察したのと同じ傾向を示したため、バンド 11 に由来するクローンがあると考えた。便宜上、これらのシーケンスを「Gut T. dichotomus」(GTD) と定義した。

### 3.2.3 既存の細菌ゲノムの糖質分解酵素遺伝子

カブトムシ幼虫の腸内で最も優占化している Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA partial sequence clone: GTD (LC373224 など) については、ゲノム配列データがないため、細菌の機能については解明されていない。そこで、GTD 配列の 16S rRNA 遺伝子配列に相同性を持つ他の細菌の Complete Genome からその機能の推測を試みた。

GTD 配列は、既存の 16S rRNA 遺伝子では *Anaeroplasma abactoclasticum* (M25050) が一番類似している (Identities: 1284/1463 (88%) Gaps: 37/1463 (2%))。しかしながら、*Anaeroplasma abactoclasticum*

(M25050)のゲノム配列は登録されていなかった。そこで、NCBI Genome で検索したところ、同じ *Anaroplasma* 属の *Anaeroplasma bactoclasticum* ATCC27112 の Whole genome shotgun sequencing project が登録されていた。そこで、アノテーションされている Protein name から、糖質分解などに関連する酵素遺伝子検索を行った。その結果、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼに関する遺伝子が存在していたが、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ、 $\beta$ -1,4-キシラナーゼ、セルラーゼや、これらの多糖に関連するグリコシダーゼ遺伝子は検出できなかった (Table 14)。

16S rRNA 遺伝子に 87.5%の相同性があった *Acholeplasma palmae* J233 (NC022538) の Complete Genome には、今回分析を行った多糖分解酵素系に関与する酵素遺伝子は検出されなかった。16SrRNA 遺伝子に 87.2%の相同性があった *Acholeplasma brassicae* (EO681348) の Complete Genome には、 $\alpha$ -アミラーゼと $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子に 87.0%の相同性があり、湖水由来の *Acholeplasmataceae bacterium Mahy22* (AP024412) の Complete Genome には、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼと $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子が検出された。一方、16SrRNA 遺伝子に 87.2%の相同性があった *Terenicutes bacterium MO-XQ* (CP017948) の Complete Genome には、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のみが検出された。

中腸から後腸，糞まで優占化していた *Clostridium diolis* (NZ\_CP043998) の Complete Genome には、約 30 の glycoside hydrolase family や 9 種のグリコシダーゼ活性遺伝子が検出された。また、後腸で優占化していた *Bacteroides thetaiotaomicron* (NZ\_CP040530) では、約 18 の glycoside hydrolase family や 4 種のグリコシダーゼ活性遺伝子が検出された (Table 14)。

また，木材成分に含有されているリグニン分解に関与する glutathione peroxidase (EC:1.11.1.9) が，*Anaeroplasma bactoclasticum* ATCC27112, *Acholeplasma palmae* J233 (NC022538), *Acholeplasmataceae* bacterium Mahy22 (AP024412), *Terenicutes bacterium* MO-XQ (CP017948), *Clostridium diolis* (NZ\_CP043998) , *Bacteroides thetaiotaomicron* (NZ\_CP040530) から検出された (Table 14) .

### 3.3 考察

カブトムシ幼虫について、腸管の細菌群集の構造と機能を分析した。その結果は、幼虫の消化管の部位によって細菌群集構造の違いがあり、Uncultured bacterium clone が優占的であることを示した。特に、使用した分析方法に関係なく中腸で優占化する細菌由来の 16S rRNA 遺伝子配列が検出され (DGGE : バンド 11, クローニング : GTD 配列), このシーケンスを「Gut T. dichotomus」(GTD) として定義した。

#### 3.3.1 カブトムシ幼虫の腸内の細菌群集構造

中腸内容物 (CM) の DGGE プロファイルとそれに基づく PCA 分析は、後腸内容物 (CH) で得られたものとは著しく異なり、カブトムシ幼虫の腸内細菌群集は部位特異的に構築されていることを示していた。

飼育腐葉土で検出されたバンド 3 は、マイナーバンドであるが、中腸内容物でもバンド 17 として検出され、配列が同一であった。したがって、飼育腐葉土中の細菌が中腸内容物の細菌叢に影響を与える可能性が考えられた。しかしながら、飼育腐葉土から中腸内容物まで、連続して存在する細菌は少なく、中腸内容物で特異的に優占化する細菌が多く検出されるようになる。

特に、カブトムシ幼虫の腸内細菌叢解析で、最も注目すべきは、中腸内容物 (CM) の PCR-DGGE で検出されたバンド 11 である。この配列を持つ細菌は、幼虫の起源に関係なく、分析したほとんどすべてのカブトムシ幼虫で検出された。一方、このバンド 11 以外のバンドは、その相対的存在量が実験間で異なっていた。さらに、この配列を持つ細菌が中腸内容物で優占的であり、相対的な存在量が部位によって特異的に変化することも示した。また、この中腸内容物のバンド 11 は、

中腸腸管壁にもバンド 51 として存在していた (Fig. 26, Table 13). 1. 3.2 で示した通り, カブトムシ幼虫の摂食した餌料が, 完全に排泄されるのは 47 時間である. *O. nasicornis* (オウシュウサイカブトムシ) 幼虫では, 排泄される 18 時間の内, 中腸に 8.5 時間, 後腸に 4 時間, 滞留しているとされている (Bayon, 1980a). この結果から推測すると, カブトムシ幼虫の中腸では約 22 時間, 後腸で約 17 時間滞留すると考えられる. したがって, 摂食した餌料は中腸に 22 時間しか滞留できないため, バンド 11 を持つ細菌は内容物とともに後腸へ移動すると考えられるが, 後腸ではバンド 11 は検出されなかった. しかしながら, 中腸内容物のバンド 11 と同配列を持つバンド 51 が, 中腸腸管壁から検出されたため, この細菌は中腸通過中に中腸腸管壁に付着・保持および増殖することが考えられた. また, 中腸内容物と共に後腸に移動したバンド 11 は, 後腸内ではその腸内環境に適合できず, 生存できないため死菌となり分解され, バンドが検出されない可能性が考えられた.

一方, バンド 16, 34a-34c および 44 の細菌は, 中腸内容物に含まれ, 消化物と共に後腸に移動し, 糞にも検出されることから, 幼虫の腸内環境の変化に適応し生存することが示唆された.

また, DGGE 解析で検出されなかった細菌が中腸内容物に存在し, 後腸内容物に存在する細菌群集に寄与している可能性も考える. 中腸 (pH 10.7) から後腸 (pH 8.5) への急速な pH の変化が, 中腸内容物中のマイナーであった細菌が, 後腸内容物での増殖に寄与している可能性がある. 例えば, 中腸の内容物に存在する芽胞を持つ細菌は, 後腸に入った後, pH の低下によって出芽するように誘導される可能性がある.

カブトムシ幼虫では, 後腸の細菌群集構造が中腸の細菌群集構造よ

りも多様であることが解明された。幼虫の後腸内容物から検出されたバンド 31 は、*Bacteroides sp.* HAWD3 (KU886094) と 97% の相同性を示し、既知の細菌では、*Bacteroides thetaiotaomicron* strain JCM 5827 (NR112142) に対して 96% の相同性を示した。*B. thetaiotaomicron* は、もともと健康な成人の便から分離された細菌である (Xu *et al.*, 2003)。一般的に、*Bacteroides* 属は、多種多様な食用植物多糖類を分解することが知られている (Xu *et al.*, 2003)。

また、後腸内容物では、バンド 31 だけでなく、バンド 34 が特徴的なバンドであった。バンド 34 は、Uncultured bacterium clone Cast045 (GU450372) に対して 99% の相同性を示し、既知の細菌の中で、バンド 34 は *Clostridium diolis* strain SH1 (NR025542) に対して 95% の相同性を示した。*C. diolis* strain SH1 は、腐敗した藁から分離され、生育 pH 範囲は 5.5-8.5 (至適 pH: 7.0) であると報告されている (Biebl & Spröer, 2002)。この菌株は、多種多様な炭水化物および炭水化物誘導体 (例えば、グルコース、キシロース) を発酵させることができ、グルコースからの発酵生成物は、酪酸および酢酸である (Biebl & Spröer, 2002)。本研究において、カブトムシ幼虫の後腸で弱い多糖分解活性と酢酸が検出されており、これらの発見は、これらの細菌の数種が幼虫の腸機能と消化の維持に寄与することを示唆している。

また、バンド 62a-62c, 63a-63c, および 64 が由来する細菌が、中腸内容物や腸管壁に存在しないことから、後腸腸管壁表面および/または内部に生息していると考えられる。しかしながら、後腸内容物に特定のバンド (つまり、バンド 31, 32, 33, 35, 36, および 37) が後腸腸管壁に由来する細菌としては検出されず、一部は矛盾している (Fig. 26)。

幼虫の腸管で、中腸 M7 から後腸 H1 をつなぐ細い管は、中腸の一部であると考えられるため、CM7 は中腸の他の部位と同様の細菌群集構造を持っていると考えられる。しかしながら、PCR-DGGE の結果によると、細菌群集構造は CM6 から CH1 の間で大幅に変化した (Fig. 26, Fig. 28)。これは、中腸と後腸の接続部分を細菌を含む物質が通過することで起こり、それぞれの部位が異なる腸内環境を持つことが影響していることが示唆された。

実際に、中腸 M7 の物理化学的および生化学的環境は、中腸の他の部位とはとは異なっている (Fig. 23)。中腸 M7 の pH と酢酸濃度は、中腸の他の部位よりも比較的 low、後腸の酢酸濃度の値と類似していた。したがって、中腸 M7 の物理化学的および生化学的条件の違いが、中腸内容物の CM1-CM6 と CM7 の間の細菌群集構造で観察された違いに関与している可能性がある。しかしながら中腸 M7 と後腸 H1 をつなぐ細い腸管のみの細菌群集構造と物理化学的特徴を詳細に分析することができなかった。したがって、現時点では、この腸管の機能と細菌群集構造の変化との関係は不明である。さらなる研究で、消化管の細菌群集構造と酵素活性との関連性を特徴付ける必要がある。

### 3.3.2 カブトムシ幼虫の中腸で特異的な細菌

カブトムシ幼虫の中腸において、部位特異的分布を持つ細菌の主要な DGGE バンドの特性をより明確にするために、16S rRNA 遺伝子の全長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 16S rRNA 遺伝子配列を用いた相同性検索は、この配列を持つ細菌の主要な DGGE バンドで検出した配列と同じ傾向を示したため、同一のクローンを得ることができたが、この配列は、既知の細菌とは相同性が

低かった。

現在、Uncultured bacterium clone Pau4 は、この配列を持つ細菌の分類と機能を推測するために使用できる唯一の情報であるが、配列の単離源がコガネムシ科の *P. aurichalcea* の幼虫か成虫かが不明である。*P. aurichalcea* とカブトムシはどちらもコガネムシ科に属するため、両種の幼虫は似たような食性を持っていると考えられている (Gujarathi *et al.*, 2014)。したがって、昆虫の食性に関連して類似した細菌が腸内で生息していると考えられた。

これまで、コガネムシ科幼虫の腸内細菌について、いくつかの研究が行われてきた (Egert *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010, Egert *et al.*, 2005; Pittman *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013; Ziganshina *et al.*, 2018)。しかしながら、中腸の優占的な細菌に関しては、ほとんど報告されていなかった (Egert *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Egert *et al.*, 2005)。*P. ehippiata* 幼虫の中腸では、Actinobacteria が優占的であったが (Egert *et al.*, 2003) , *M. melolontha* (Egert *et al.*, 2005) と *C. zealandica* の 2 齢幼虫 (Zhang *et al.*, 2008) では、中腸で優占的な細菌は観察されなかった。

したがって、コガネムシ科幼虫の腸内細菌叢に関するいくつかの研究は、後腸の細菌群集の構造と組成に焦点を合わせていた (Pittman *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013; Ziganshina *et al.*, 2018)。これらの報告では、後腸の優占的な細菌には、Clostridiales (Pittman *et al.*, 2008), Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Enterococcaceae, Enterobacteriaceae (Huang *et al.*, 2013), Bacteroidales, Actinobacteria (Ziganshina *et al.*, 2018) が含まれていた。

*O. nasicornis* 幼虫の後腸細菌叢では、Actinomycetales,

Porphyromonadaceae, Rikenellaceae, Turicibacteraceae, unclassified Clostridiales, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Desulfovibrionaceae, Enterobacteriaceae が報告されていた (Ziganshina *et al.*, 2018).

これらの研究と比較して、本研究のカブトムシ幼虫の腸内細菌叢は、コガネムシ科幼虫の中腸における細菌群集構造と優占的な細菌のより詳細な分析を提供すると考えている。

### 3.3.3 GTD 配列を持つ細菌の機能の推定と腸内環境におけるこれらの配列を持つ細菌の部位特異的存在量間の関係

カブトムシ幼虫の中腸環境と中腸機能の両方が部位特異的に異なり、pH とカリウムイオンの分布が消化管の長さに沿って著しく変化し、これらの違いは消化管の機能に由来することを示している。

DGGE 分析における GTD 配列を持つ細菌の相対的な存在量は、中腸の pH、カリウム濃度、酢酸濃度、重炭酸イオンのプロファイルの変化と密接に関連していた (Fig. 32)。

腸管内がアルカリ性であることは、他のコガネムシ科の中腸 (Bayon, 1980b; Biggs & Mcgregor, 1996; Cazemier *et al.*, 1997; Lemke *et al.*, 2003; Engel & Moran, 2013)、ならびに鱗翅目幼虫およびシロアリ (Engel & Moran, 2013) で一般的である。鱗翅目幼虫と同様に、カブトムシ幼虫は中腸で高い pH (およびカリウム濃度) を維持していると考えられる。この研究で提示したデータの多くに基づいて、GTD 配列を持つ細菌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測した。

### 3.3.4 GTD 配列や他の部位に特異的な細菌の機能についての遺伝学的推測

カブトムシ幼虫の腸内で優占化している細菌は、Uncultured bacterium clone がほとんどであるため、16S rRNA 遺伝子配列に相同性がある既知の細菌の Complete Genome からその機能の推測を試みた。その結果、カブトムシ幼虫の中腸内で優占化している GTD 配列に関連がある *Anaeroplasma* 属や *Acholeplasma* 属の Complete Genome には、 $\alpha$ -アミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子が存在していた。したがって、カブトムシ幼虫の中腸内におけるデンプン分解活性は多糖分解活性の中で最も高く、この活性には GTD 配列を持つ細菌の関与が示唆された。一方、*Anaeroplasma* 属や *Acholeplasma* 属の Complete Genome には、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子があるのにも関わらず、カブトムシ幼虫腸内における  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は検出されていない。したがって、カブトムシ幼虫の腸内容物（腸管壁も含む）から検出された多糖分解酵素系の由来について、幼虫由来か細菌由来かを考察した。

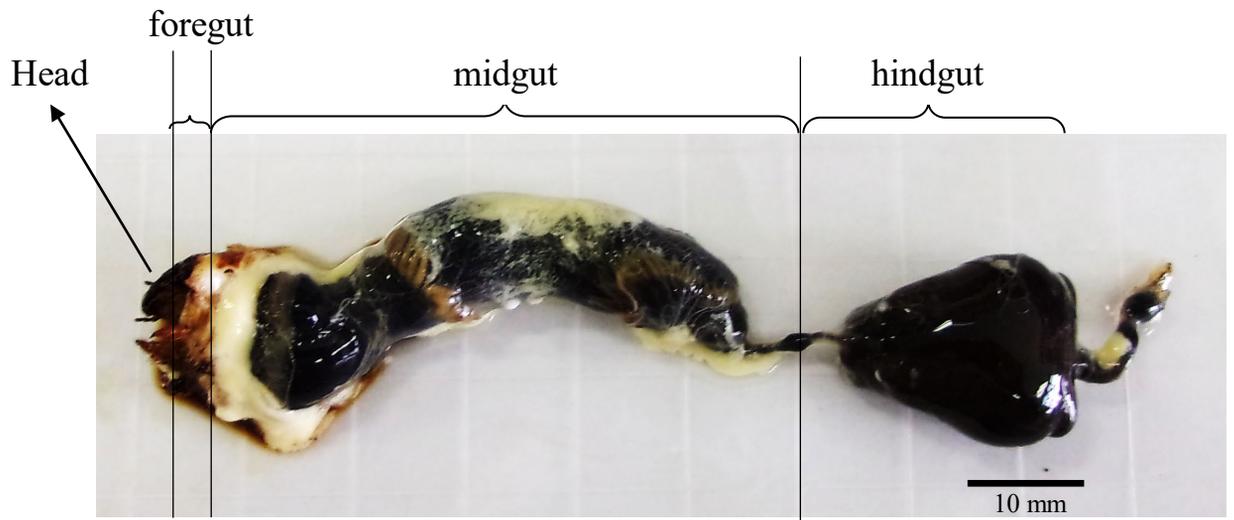
昆虫ゲノムの機能解析と細菌ゲノム解析の結果、糖質分解については、幼虫と腸内細菌に糖質分解酵素遺伝子がある可能性があるため、双方が幼虫の腸内で糖質分解に寄与していると考えられるが、セルロース分解については、酵素遺伝子があっても機能していない可能性が考えられた。

また、リグニン分解に関与する glutathione peroxidase (EC:1.11.1.9) が、カブトムシ幼虫の腸内に生息すると推測される 6 種の細菌に由来する Complete Genome から検出された。しかしながら、カブトムシ幼虫の餌料と糞でリグニン量に増減がなく（本郷，2020）、その腸内では分解されていないと考えられた。したがって、リグニン分解に関与する glutathione peroxidase も、幼虫の腸管で機能していない可能性があり、今後検討が必要である。

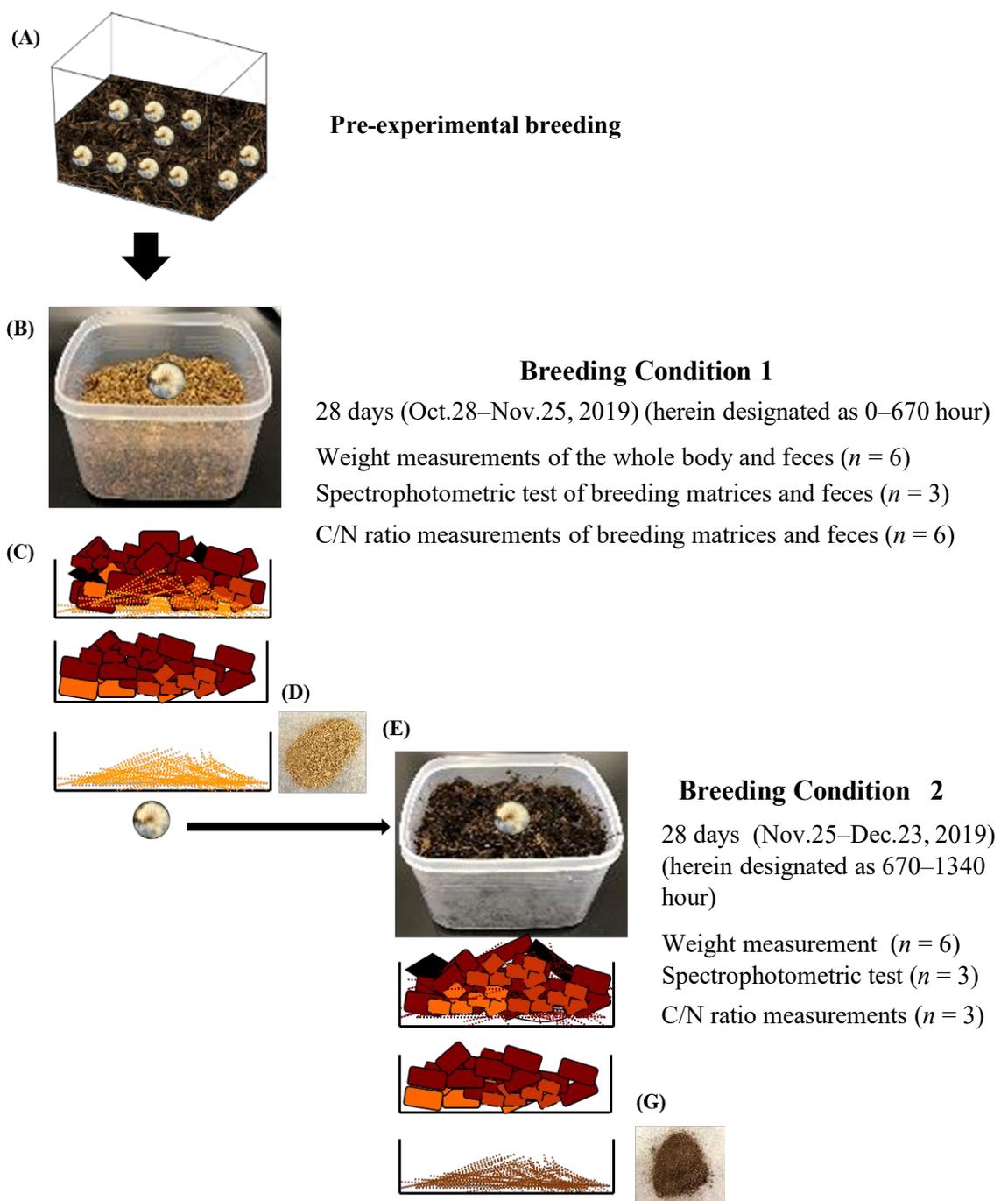
### 3.4 小括

カブトムシ幼虫の消化管の細菌群集構造の腸管部位による違いを解明するために、中腸と後腸をそれぞれ 7 部位と 3 部位に細分化して分析したところ、次のことが明らかになった (Fig. 33). 1) 中腸内容物と後腸内容物の細菌群集構造が大幅に異なる, 2) 中腸後半部から後腸前半部の細菌群集構造は大きく変化し, この変化は, 消化された物質が中腸と後腸を接続する細い消化管を通過することで生じ, その変化は, 腸内環境の変化による, 3) 幼虫の消化管には, 新奇, 希少, および/または未知の細菌が生息している, 4) GTD 配列を持つ細菌や *Bacteroides* 属, *Clostridium* 属細菌はカブトムシ幼虫の腸内の物質分解に寄与する.

カブトムシ幼虫は, 腐葉土に含まれる多糖類を分解する能力があるため, カブトムシ幼虫は森林材料の循環に重要な役割を果たす. したがって, これらの結果は, カブトムシ幼虫の消化管に存在する細菌を使用して, 木材由来バイオマスに見られる多糖類をより効果的に利用できることを示唆している. この研究の最初の目的は達成したが, いくつかの不明確な点が残っている. 消化管全体に沿った細菌群集の機能をさらに理解するために, 追加の NGS 分析や細菌のゲノム解析が必要であると考えられる.



**Fig. 1** The digestive tract of *Trypoxylus dichotomus* 3rd instar larvae.



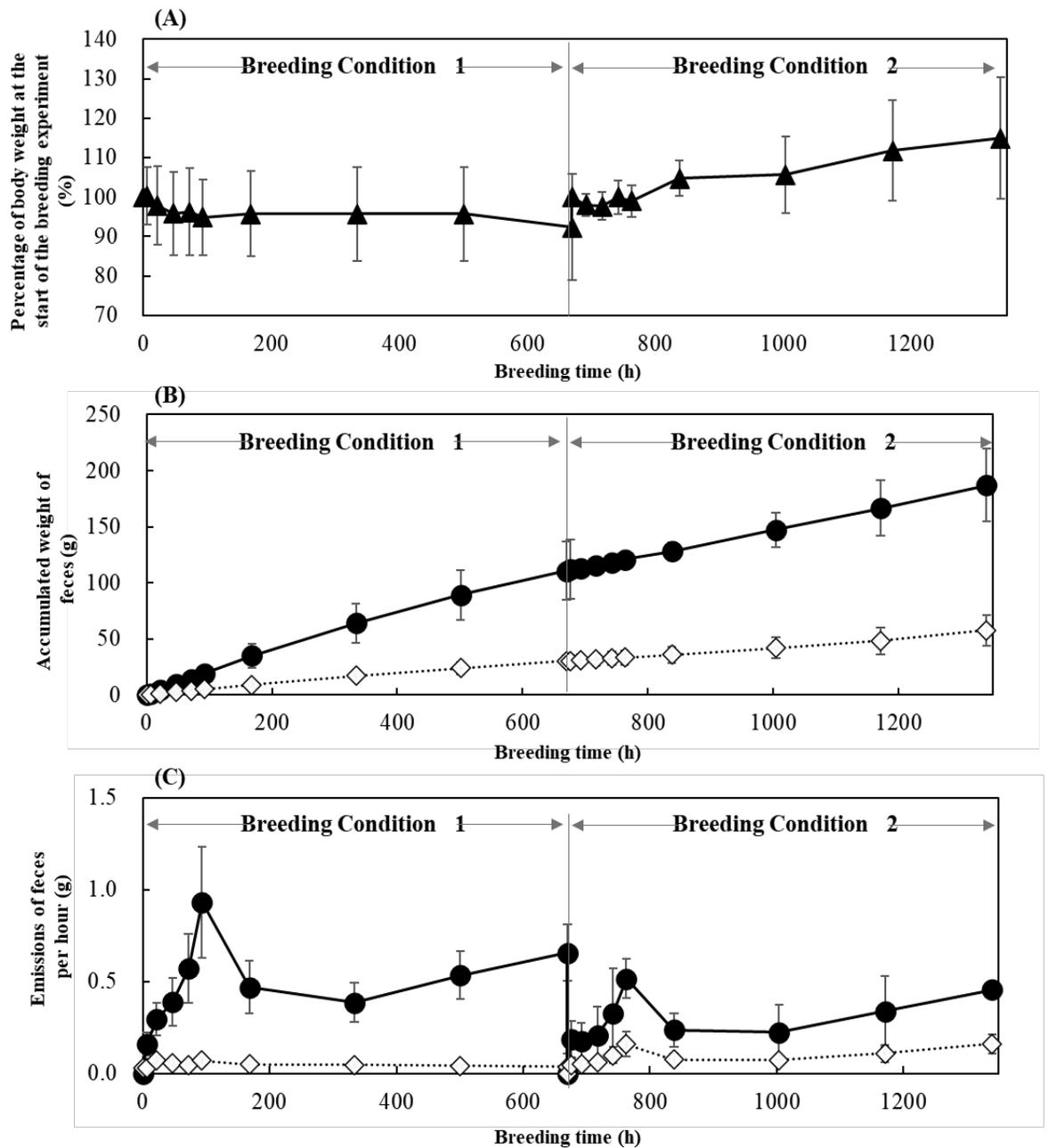
**Fig. 2 Flow of breeding conditions of *T. dichotomus* 3rd instar larvae.**

(A) Before starting the breeding experiment, ten larvae were reared in a plastic cage (31.5 L) containing adequate amounts of humus as a breeding matrix. (B) Next, the larvae were bred by changing the matrix from humus to 200 g of "Kunugi mat" (+ 100 g of distilled water) (Breeding Condition 1: 28 days). (C) During breeding, each larva and its feces were successively weighed. (D) Breeding matrix and feces were freeze-dried, and then each sample was crushed for C/N ratio analysis. (E) After completion of Breeding Condition 1, the breeding matrix was changed from 200 g of "Kunugi mat" (+ 100 g of distilled water) to 200 g of humus (+ 100 g of distilled water) (Breeding Condition 2: 28 days). The larvae and their feces were weighed, and the samples were prepared in the same manner as in Breeding Condition 1. (F) During breeding, each larva and its feces were successively weighed. (G) Breeding matrix and feces were freeze-dried, and then each sample was crushed for C/N ratio analysis.

**Table 1 Comparison of wet weight of each part with respect to the whole body weight of  
*Trypoxylus dichotomus* 3rd instar larvae.**

	midgut	hindgut	Total gut weight	Weight excluding gut
Body weight	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

The third instar larvae of the beetle ( $n = 28$ ) were bred under Breeding humus.



**Fig. 3 Results of breeding experiments of *T. dichotomus* 3rd instar larvae.**

Bars represent standard deviations. Breeding time indicates the elapsed time for each breeding condition. Breeding condition 1 is specified as 0 to 670 hours. Breeding condition 2 is specified as 670 to 1340 hours. The total continuous time for the two breeding conditions is specified as 0 to 1340 hours.

(A) Changes in larval body weight (▲) during breeding experiments ( $n = 6$ ).

(B) The accumulated weight of feces during breeding experiments ( $n = 6$ ). All values are means of fresh weight (●) or dry weight (◇).

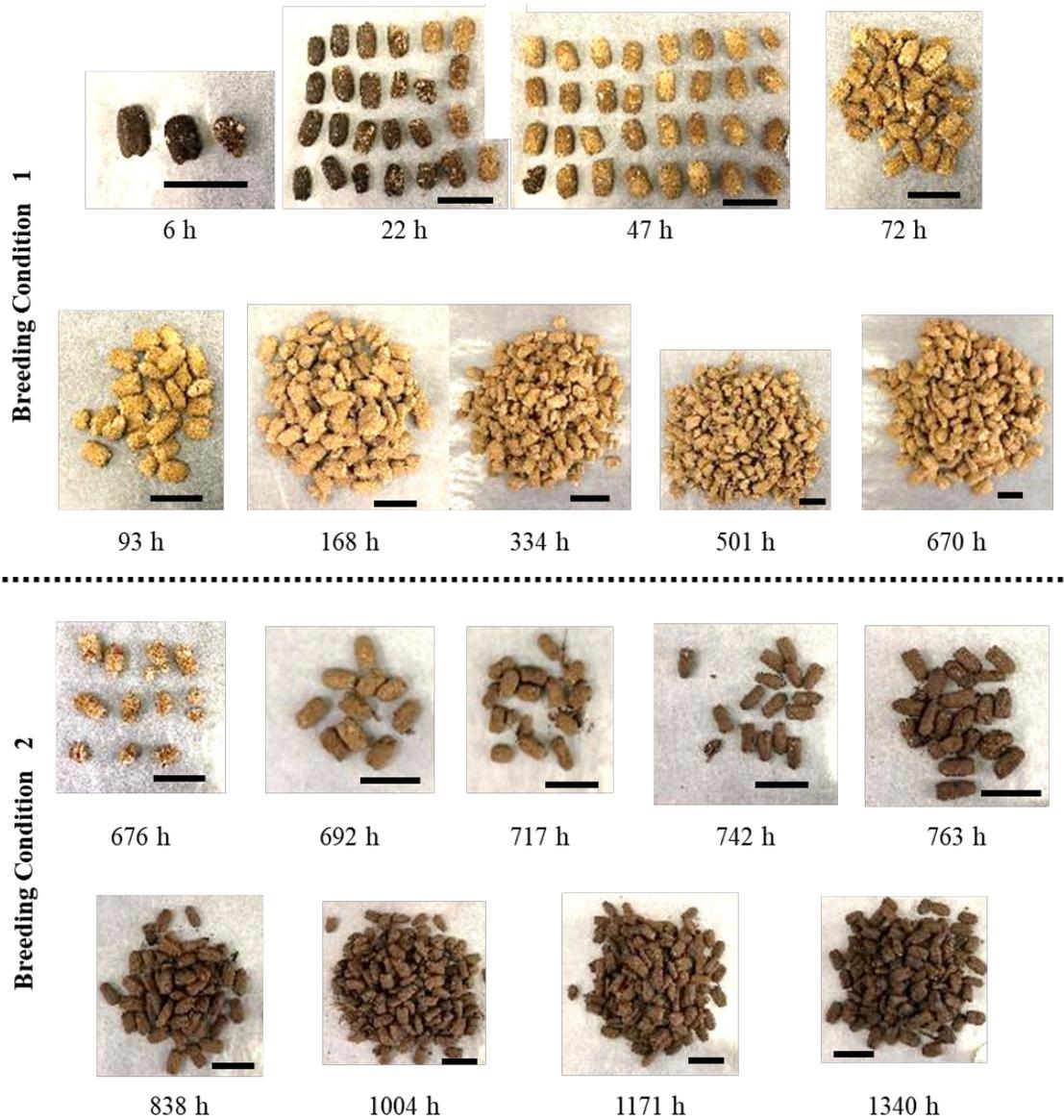
(C) Weight of feces excreted by the larvae per hour ( $n = 6$ ). All values are means of fresh weight (●) or dry weight (◇).

**Table 2 Comparison of weights of whole body and whole gut and cumulative wet weight of excreted feces of *T. dichotomus* 3rd instar larvae ( $n = 6$ ) reared in two different conditions (average  $\pm$  S.D.).**

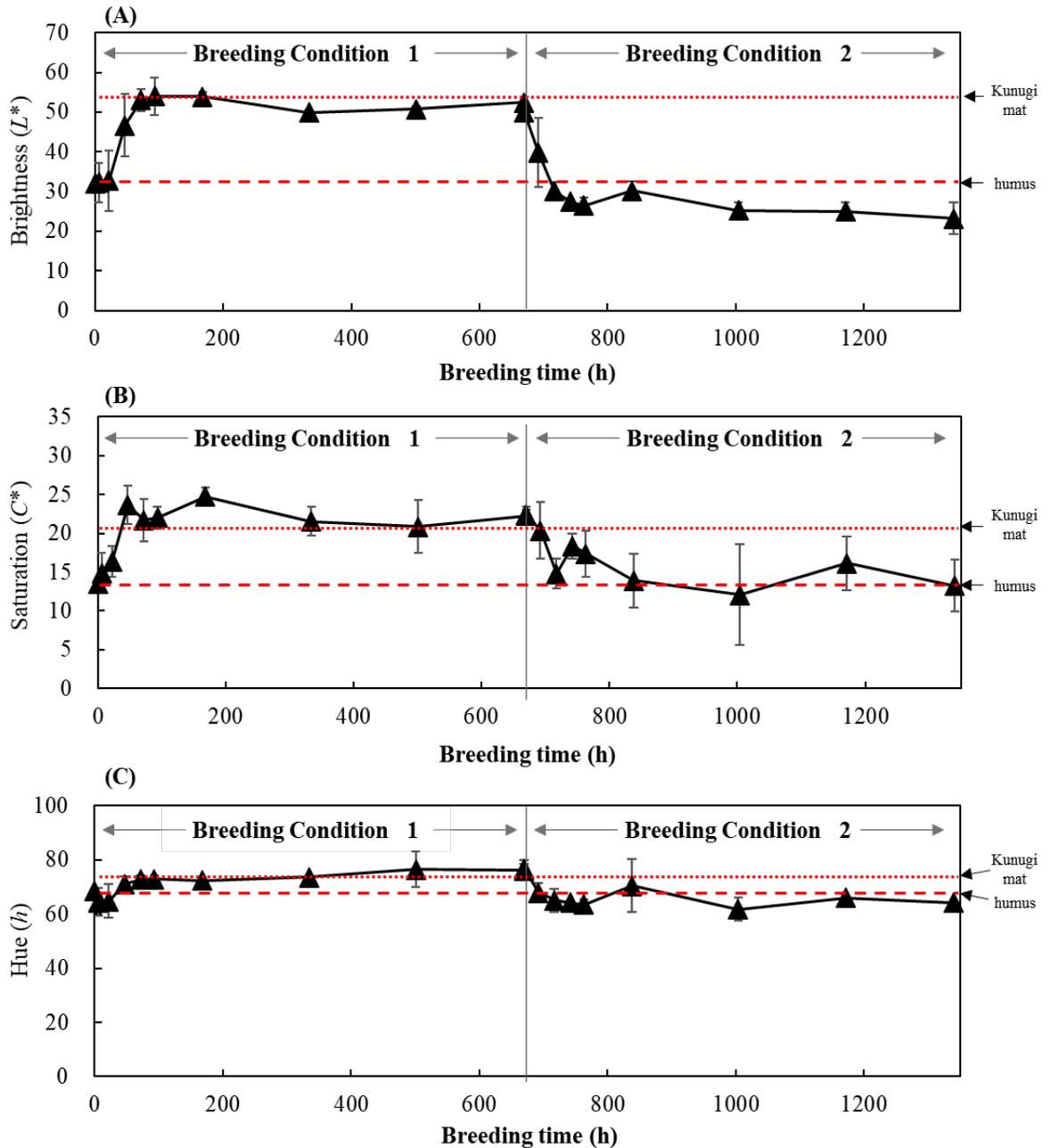
	Larval weight at the start of the experiment (g)	Weight of larval gut at the start of the experiment (g) <sup>a)</sup>	Cumulative wet weight of excreted feces (g)									
			Breeding time (h) <sup>b)</sup>									
			0 (670)	6 (676)	22 (692)	47 (717)	72 (742)	93 (763)	168 (838)	334 (1004)	501 (1171)	670 (1340)
Breeding Condition 1	14.8 $\pm$ 3.4	4.4 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 1.4	9.8 $\pm$ 3.2	14.3 $\pm$ 4.7	19.6 $\pm$ 6.3	35.1 $\pm$ 10.7	64.0 $\pm$ 17.8	89.4 $\pm$ 22.0	110.9 $\pm$ 26.4
Breeding Condition 2	13.7 $\pm$ 3.8	4.1 $\pm$ 1.2	0.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 1.6	5.2 $\pm$ 2.5	8.2 $\pm$ 3.8	10.8 $\pm$ 5.1	17.8 $\pm$ 8.0	37.1 $\pm$ 15.1	56.4 $\pm$ 24.6	77.0 $\pm$ 32.5

<sup>a)</sup> The gut accounts for 30.7% of the total body weight at the start of the experiment (see text).

<sup>b)</sup> The experiments were carried out, first in Breeding Condition 1 (0–670 hour), and then in Breeding Condition 2 (670–1340 hour), consecutively.



**Fig. 4** The color change of excreted feces of *T. dichotomus* 3rd instar larvae. The collected feces were freeze-dried before the analysis. Scale bar 10 mm.



**Fig. 5** The color parameters in the spectrophotometric tests of excreted feces of *T. dichotomus* 3rd instar larvae.

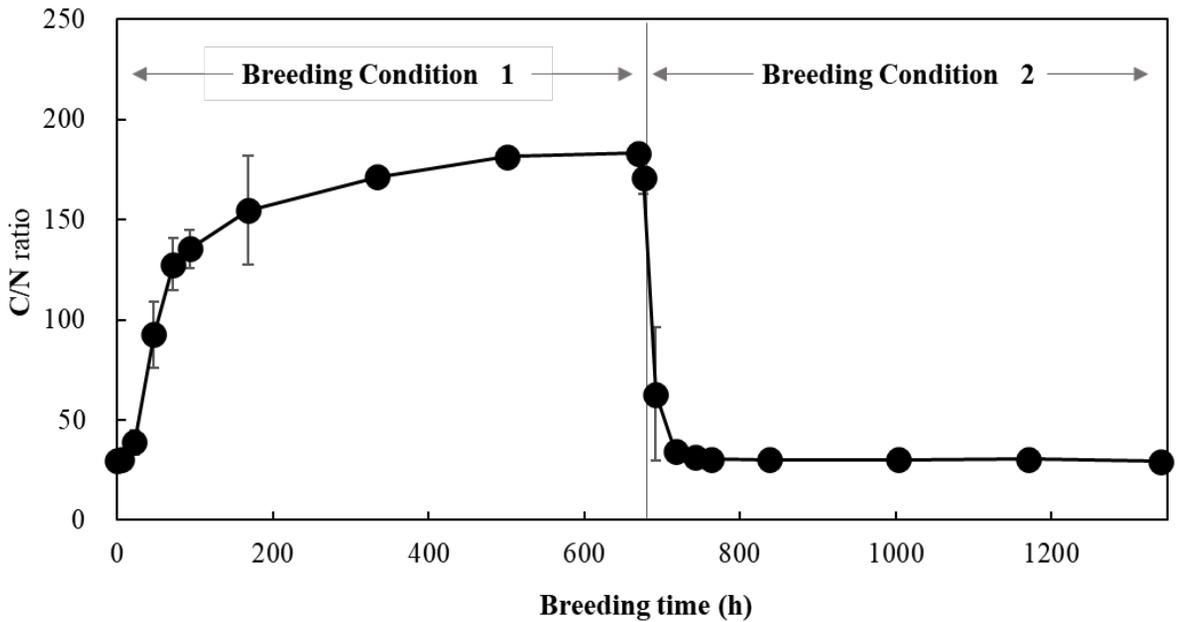
Bars represent standard deviations ( $n = 3$ ). (A) Brightness ( $L^*$ ), (B) Saturation ( $C^*$ ), (C) Hue ( $h$ ). The values of the color parameters at the start of the breeding experiment (0 hours) were shown by the dotted line for “Kunugi mat” and the broken line for humus.

**Table 3 The time course change of C/N ratio (average  $\pm$  S.D.) of feces excreted by *T. dichotomus* 3rd instar larvae under Breeding Condition 1 <sup>a)</sup>.**

	Larval weight at the start of the experiment (g)									
	0	6	22	47	72	93	168	334	501	670
C/N ratio	29.9 $\pm$ 2.5 <sup>b)</sup>	31.4 $\pm$ 2.3	42.1 $\pm$ 8.4	96.9 $\pm$ 14.2	128.72 $\pm$ 20.2	140.7 $\pm$ 17.4	150.4 $\pm$ 18.1	167.8 $\pm$ 6.9	176.4 $\pm$ 7.3	178.0 $\pm$ 7.3

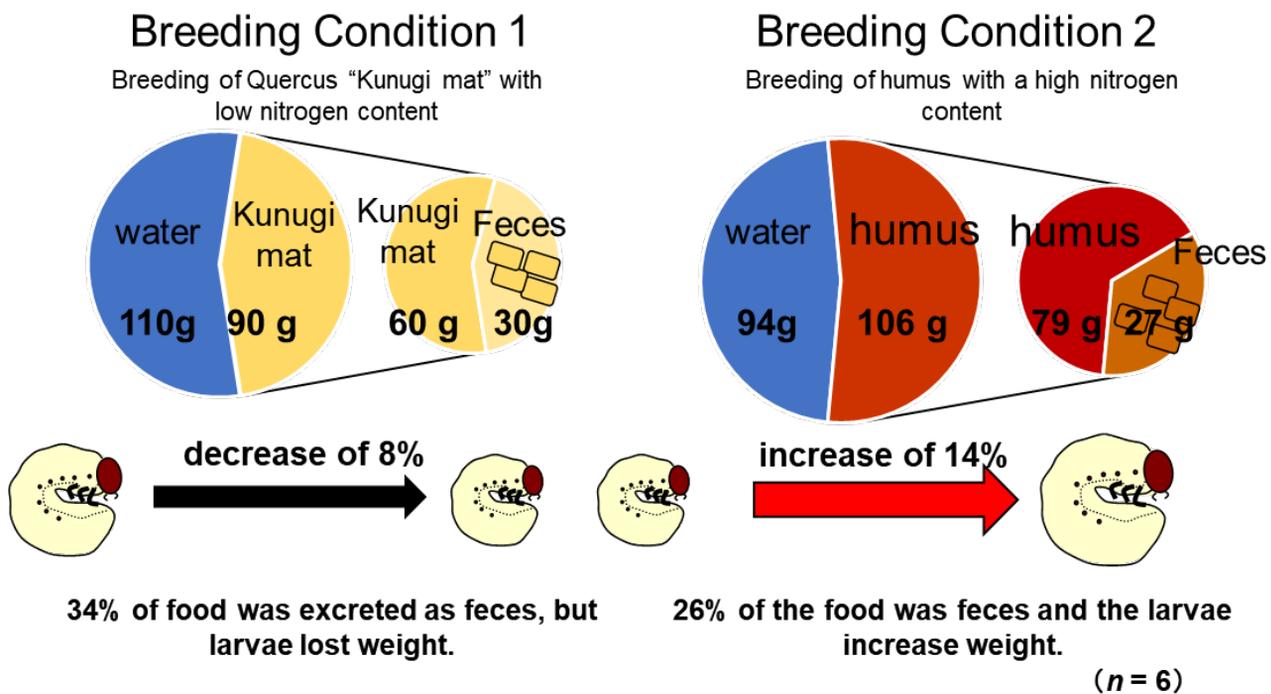
<sup>a)</sup>  $n = 6$

<sup>b)</sup> The C/N ratio value of 0 hour was for that of humus at the start of the experiment ( $n = 3$ ).

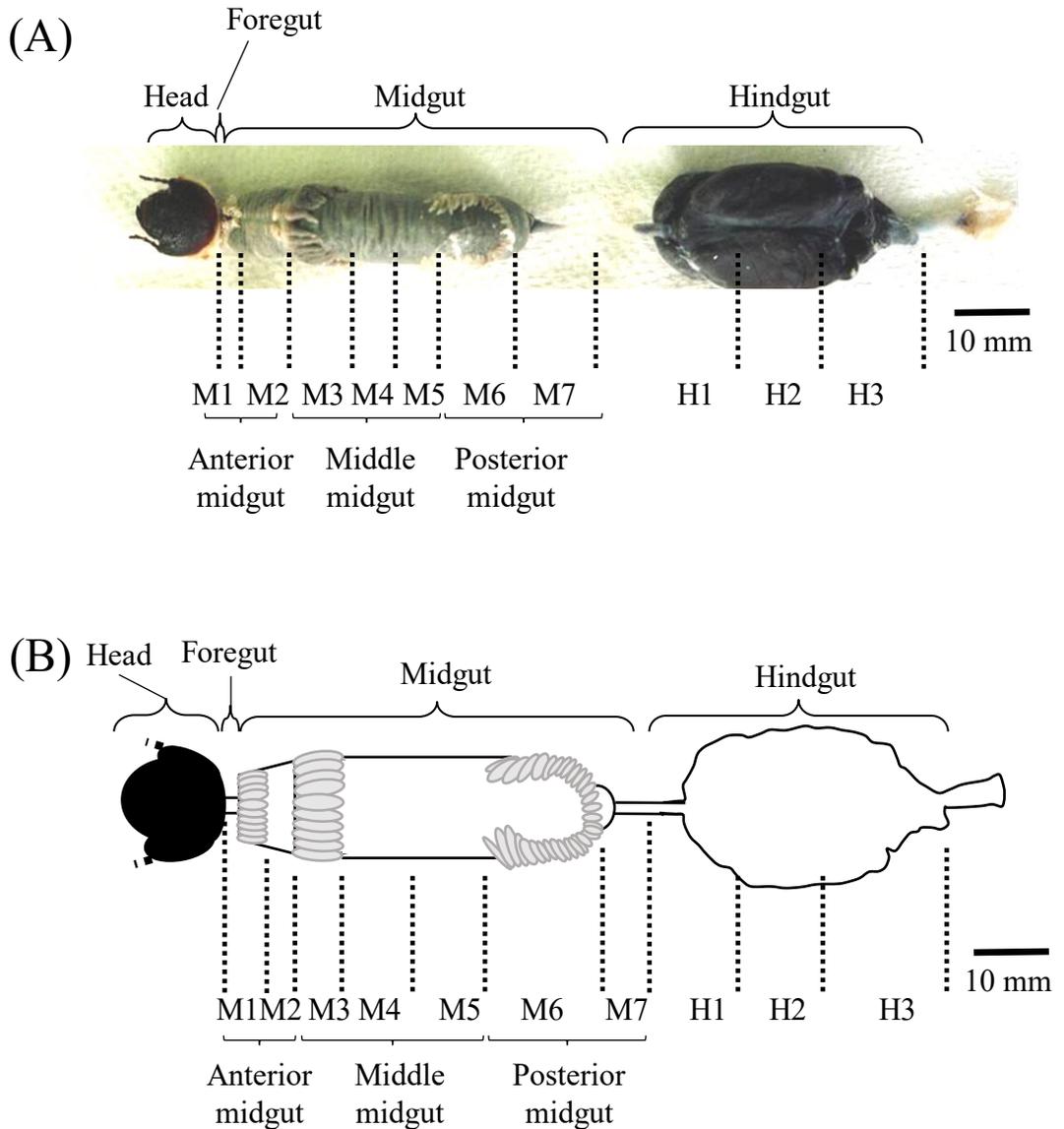


**Fig. 6 Time course change of C/N ratio in consecutive breeding from Breeding Condition 1 to 2.**

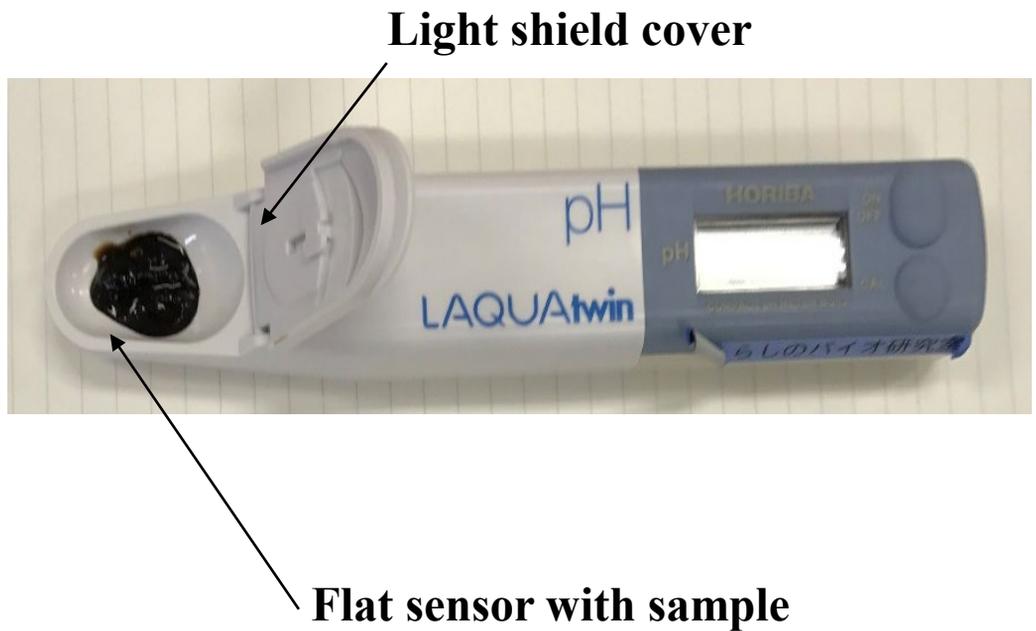
Bars represent standard deviations ( $n = 3$ ). The value of the C/N ratio at the start of the breeding experiment (0 hours) was  $29.9 \pm 2.5$  for humus and  $90.3 \pm 1.4$  for “Kunugi mat”.



**Fig. 7** Weight change with respect to fecal excretion of *T. dichotomus* 3rd instar larvae.

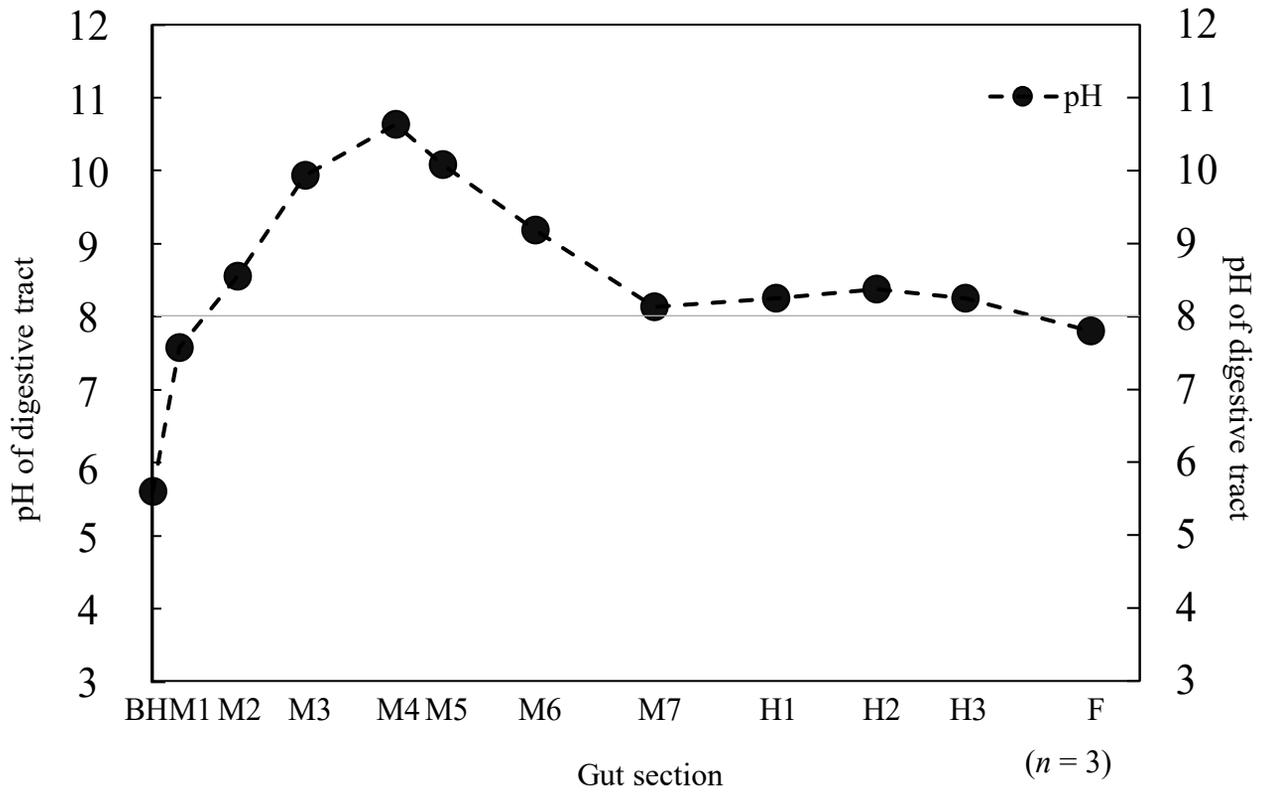


**Fig. 8 Digestive tract of a *Trypoxylus dichotomus* larva (A) dissected and (B) schematic.** The digestive tract was divided into three general regions (head, midgut [including foregut] and hindgut), with the midgut (M) and hindgut(H) further divided into seven and three sections, respectively. The M1 section contains the entire foregut and the first section of the midgut. Sections M2-M6 are the midgut continued from M1. Section M7 contains the terminal section of the midgut and part of the “thin tube” that connects the midgut to the hindgut. H1 contains part of the “thin tube” and the first section of the hindgut, and H2-H3 is the rest of the hindgut. M4 and M5, as well as H2 and H3, are of equal length. BH, breeding humus; F, feces.



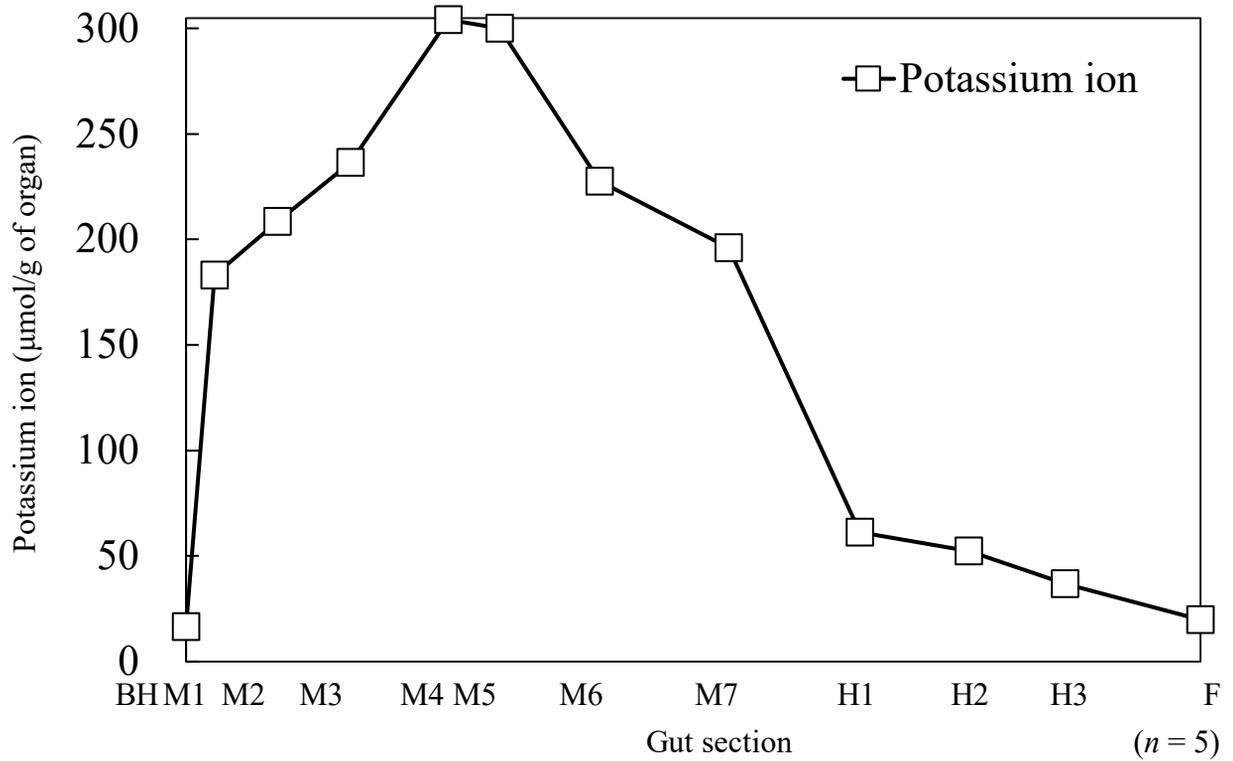
**Fig. 9 pH measurement of gut contents in the gut from *T. dichotomus* larvae.**

Since the weight of the gut contents was less than 1 g, the pH of the gut contents was measured using a compact pH meter.



**Fig. 10 pH distribution in the gut of *T. dichotomus* larvae.**

The measurement was performed with a Compact waterproof pH meter (B-212; Horiba, Kyoto, Japan). The abbreviations for gut sections (M1-H3), BH, F are taken from Fig. 8.



**Fig. 11 Potassium ion distribution in the gut of *T. dichotomus* larvae.**

Potassium ion : flame luminosity method,(A-1000 / A-2000; Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan).

**Table 4 Cation concentrations<sup>a)</sup> in the larval digestive tract of *T. dichotomus* larvae.**

	<i>n</i>	BH <sup>b)</sup>	M1 <sup>c)</sup>	M2	M3	M4	M5	M6	M7	H1	H2	H3	F <sup>d)</sup>
Potassium ion		16.53 ± 1.57	183.11 ± 30.02	208.55 ± 26.19	236.48 ± 26.50	304.02 ± 21.67	300.09 ± 30.56	227.64 ± 20.65	196.15 ± 23.37	61.38 ± 13.36	52.35 ± 3.30	36.78 ± 4.65	19.86 ± 3.65
Calcium ion	5 <sup>e)</sup>	44.20 ± 5.47	26.10 ± 4.13	32.80 ± 3.74	29.19 ± 4.01	22.25 ± 1.83	21.72 ± 2.01	23.62 ± 1.10	20.90 ± 5.49	25.31 ± 5.20	31.17 ± 2.37	33.28 ± 2.88	54.32 ± 9.89
Magnesium ion		15.28 ± 2.14	12.40 ± 1.10	12.97 ± 1.66	11.51 ± 1.96	7.13 ± 0.78	7.02 ± 1.12	8.68 ± 0.64	8.16 ± 2.08	10.02 ± 2.33	11.91 ± 1.20	12.57 ± 1.01	19.55 ± 3.70
Sodium ion		4.94 ± 0.41	4.47 ± 1.26	4.42 ± 2.85	4.69 ± 3.72	3.78 ± 2.54	3.79 ± 2.52	3.49 ± 1.74	6.09 ± 4.25	1.29 ± 0.59	1.42 ± 0.55	1.91 ± 0.53	5.20 ± 0.96

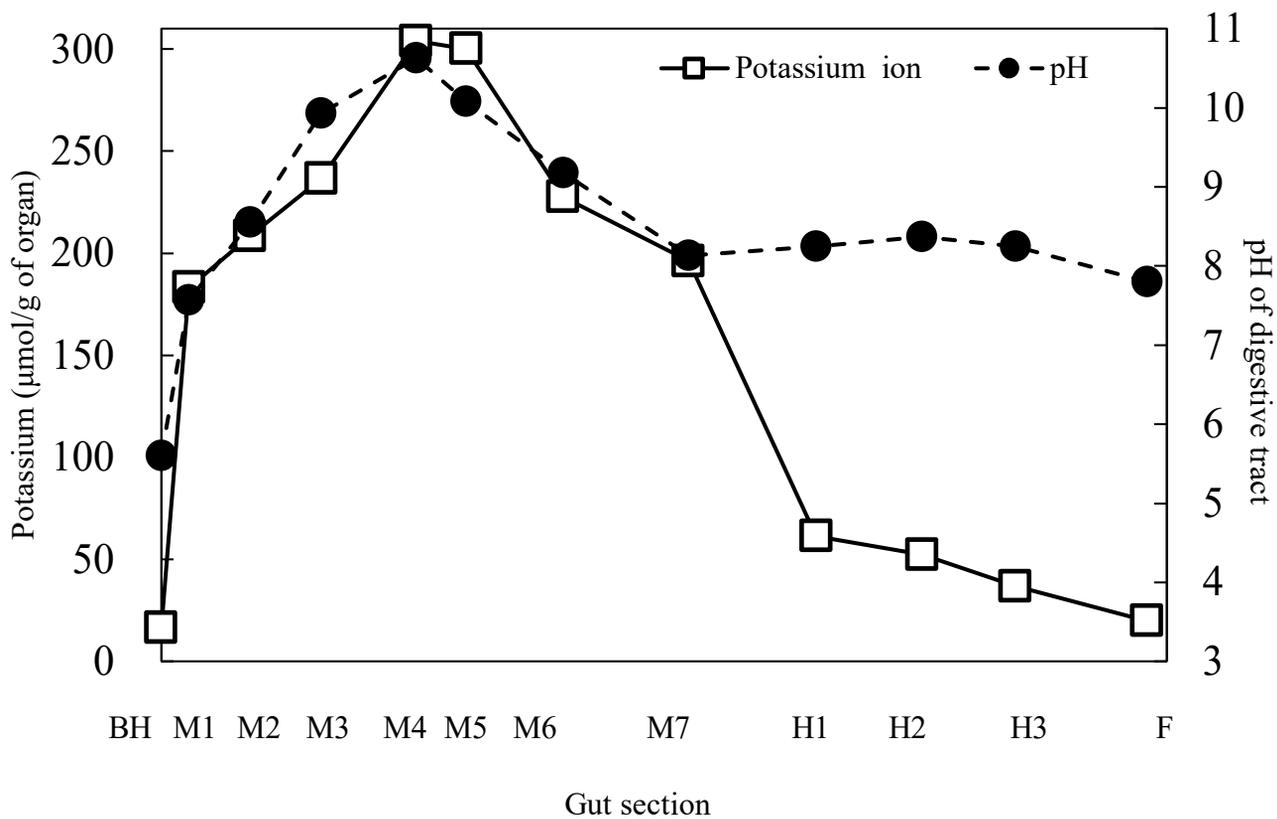
<sup>a)</sup> µmol/g of organ: A All values are based on the sample fresh weight and are reported as the mean ± standard deviation for *n* larvae.

<sup>b)</sup> BH: Breeding humus

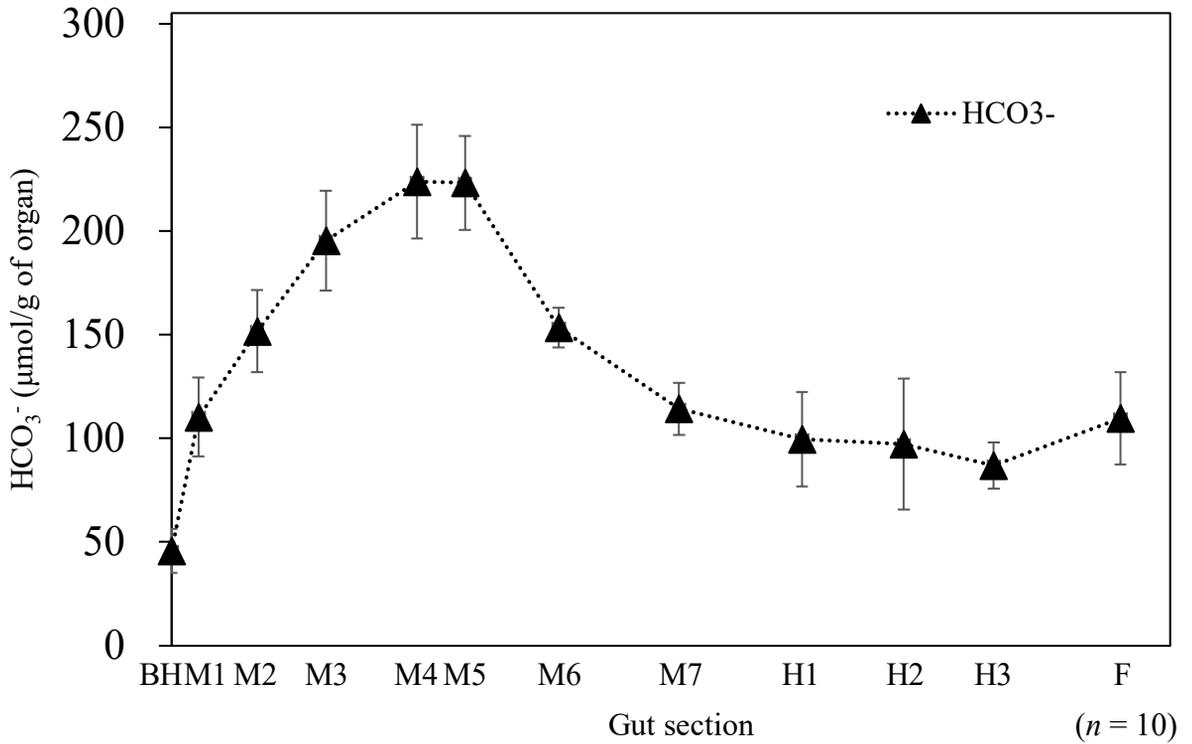
<sup>c)</sup> The midgut and hindgut regions were denoted as M and H, respectively, followed by a number indicating segment position number.

<sup>d)</sup> F: feces

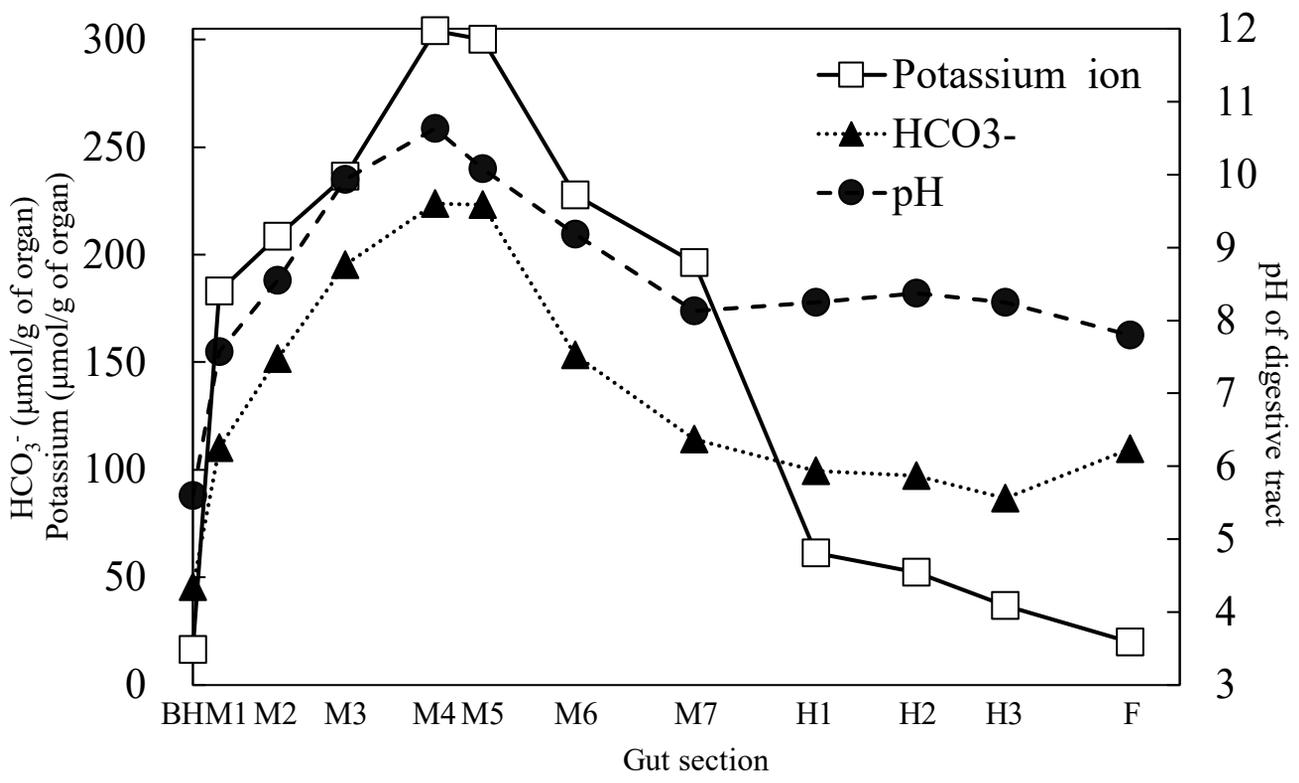
<sup>e)</sup> In cation analysis, sample size for BH and F was 3 individuals.



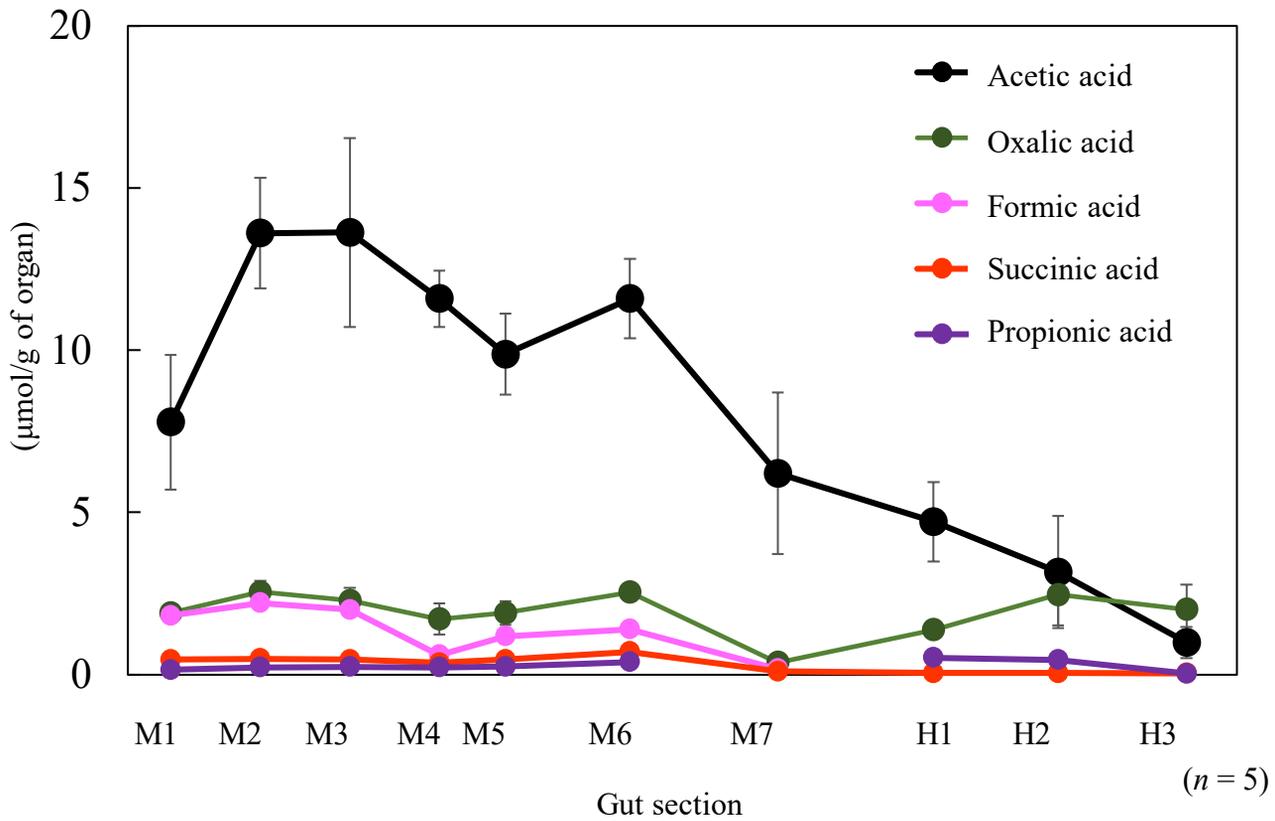
**Fig. 12** Profile of pH and potassium ions in in the gut of *T. dichotomus* larvae.



**Fig. 13 Distribution of bicarbonate in the gut of *T. dichotomus* larvae.**  
The separation titration method described in JIS K 0101: 1998 was slightly modified.



**Fig. 14** Profile of pH and potassium ion in the gut of *T. dichotomus* larvae.



**Fig. 15 Distribution of organic acids in the gut of *T. dichotomus* larvae.**

Undetectable : Butyric acid, isobutyric acid, valeic acid

Undetectable or trace detection : Isovaleic acid, isocaproic acid, caproic acid

**Table 5 Organic acid concentration<sup>a)</sup> in the digestive tract of *T. dichotomus* larvae.**

	<i>n</i>	BH <sup>b)</sup>	M1 <sup>c)</sup>	M2	M3	M4	M5	M6	M7	H1	H2	H3	F <sup>d)</sup>
Acetic acid		6.82 ± 1.57	7.78 ± 2.08	13.61 ± 1.71	13.63 ± 2.91	11.59 ± 0.87	9.88 ± 1.25	11.59 ± 1.22	6.20 ± 2.49	4.71 ± 1.22	3.16 ± 1.73	0.99 ± 0.48	8.04 ± 4.19
Oxalic acid		2.10 ± 0.58	1.90 ± 0.24	2.55 ± 0.34	2.28 ± 0.40	1.71 ± 0.48	1.90 ± 0.36	2.54 ± 0.27	0.37 ± 0.16	1.38 ± 0.23	2.46 ± 0.95	2.01 ± 0.76	1.49 ± 0.39
Formic acid		N.D. <sup>e)</sup>	1.82 ± 0.07	2.21 ± 0.08	2.00 ± 0.09	0.60 ± 0.03	1.18 ± 0.06	1.40 ± 0.11	0.17 ± 0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Succinic acid		0.02 ± 0.01	0.46 ± 0.11	0.49 ± 0.05	0.46 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.46 ± 0.09	0.70 ± 0.07	0.10 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Propionic acid		N.D.	0.15 ± 0.09	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.10	0.39 ± 0.13	N.D.	0.52 ± 0.24	0.45 ± 0.21	0.03 ± 0.03	0.01 ± 0.02
Isovaleric acid	5	N.D. <sup>e)</sup>	0.05 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.22 ± 0.15	0.16 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.13	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.02	N.D.
Isobutyric acid		N.D.	0.02 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.10	N.D.	N.D.	N.D.	0.05 ± 0.02	N.D.
Butyric acid		N.D.	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02	N.D.	0.10 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.00	N.D.
Valeric acid		0.04 ± 0.07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	N.D.	N.D.
Isocaproic acid		0.02 ± 0.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Caproic acid		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 ± 0.05	N.D.	N.D.

<sup>a)</sup> μmol/g of organ: All values are based on the sample fresh weight and are reported as the mean ± standard deviation for *n* larvae.

<sup>b)</sup> BH: Breeding humus

<sup>c)</sup> The midgut and hindgut regions were denoted as M and H, respectively, followed by a number indicating section number

<sup>d)</sup> F: feces

<sup>e)</sup> N.D.: Not detected by analytical methods (<0.01 μmol/g of organ)

**Table 6 Gas concentration<sup>a)</sup> in the digestive tract of *T. dichotomus* larvae.**

	<i>n</i>	BH <sup>b)</sup>	M1 <sup>c)</sup>	M2	M3	M4	M5	M6	M7	H1	H2	H3	F <sup>d)</sup>
Dissolved oxygen	2	N.T. <sup>e)</sup>	0.004	0.003	0.005	0.007	0.009	0.025	0.036	0.013	0.001	0.001	N.T.
Methane	6	N.D. <sup>f)</sup>	0.009	0.002	0.001	0.012	0.002	0.010	0.025	0.006	0.002	0.000	N.T.
Hydrogen		N.D.				N.D.					0.12 ± 0.03		N.D.
						0.22 ± 0.07					N.D		N.D.

<sup>a)</sup>  $\mu\text{mol/g}$  of organ: All values are based on the sample fresh weight and are reported as the mean  $\pm$  standard deviation for *n* larvae.

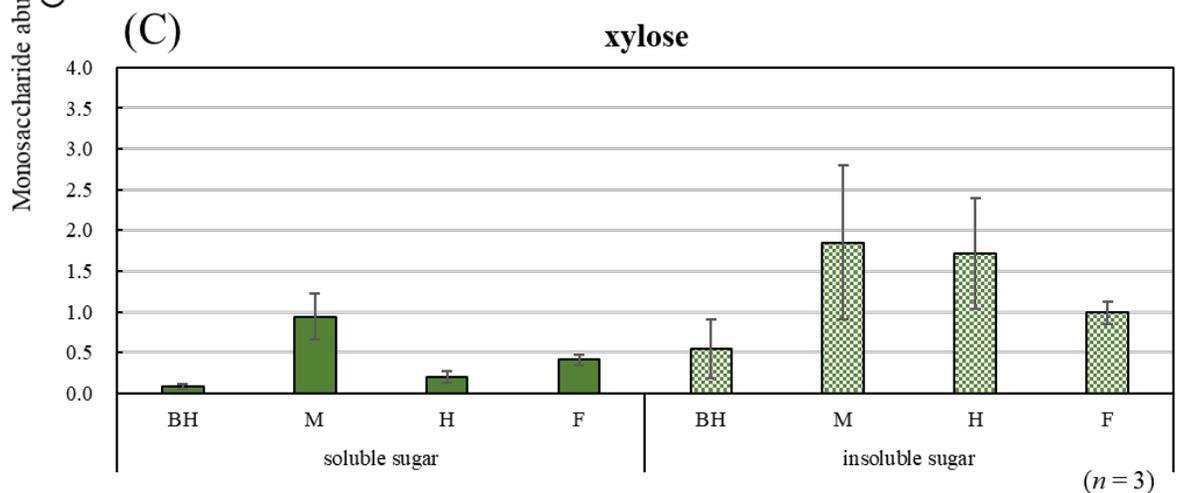
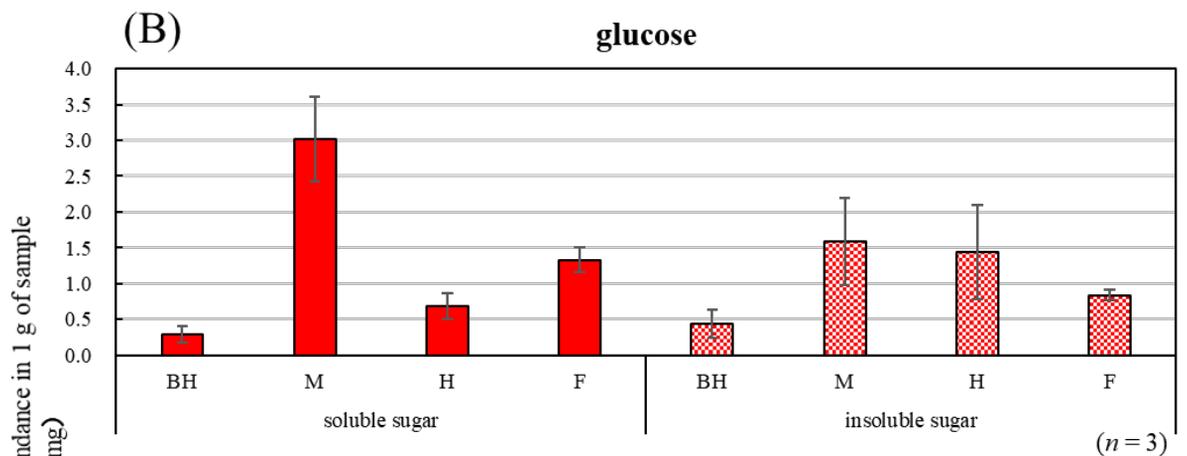
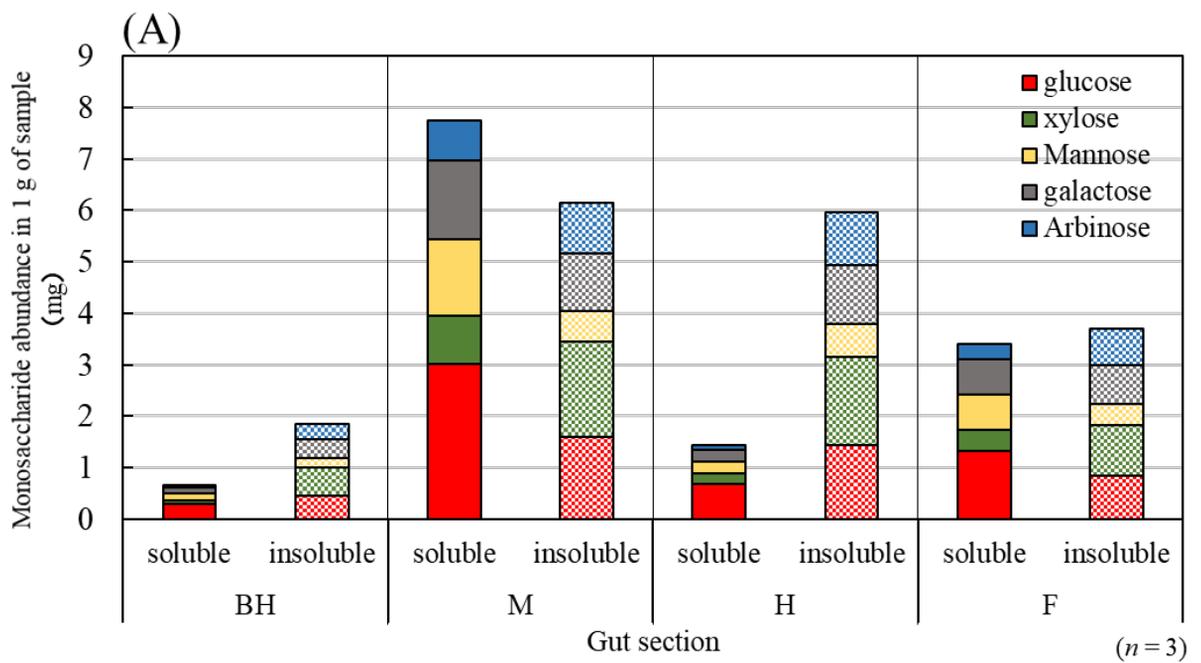
<sup>b)</sup> BH: Breeding humus

<sup>c)</sup> The midgut and hindgut regions were denoted as M and H, respectively, followed by a number indicating section number

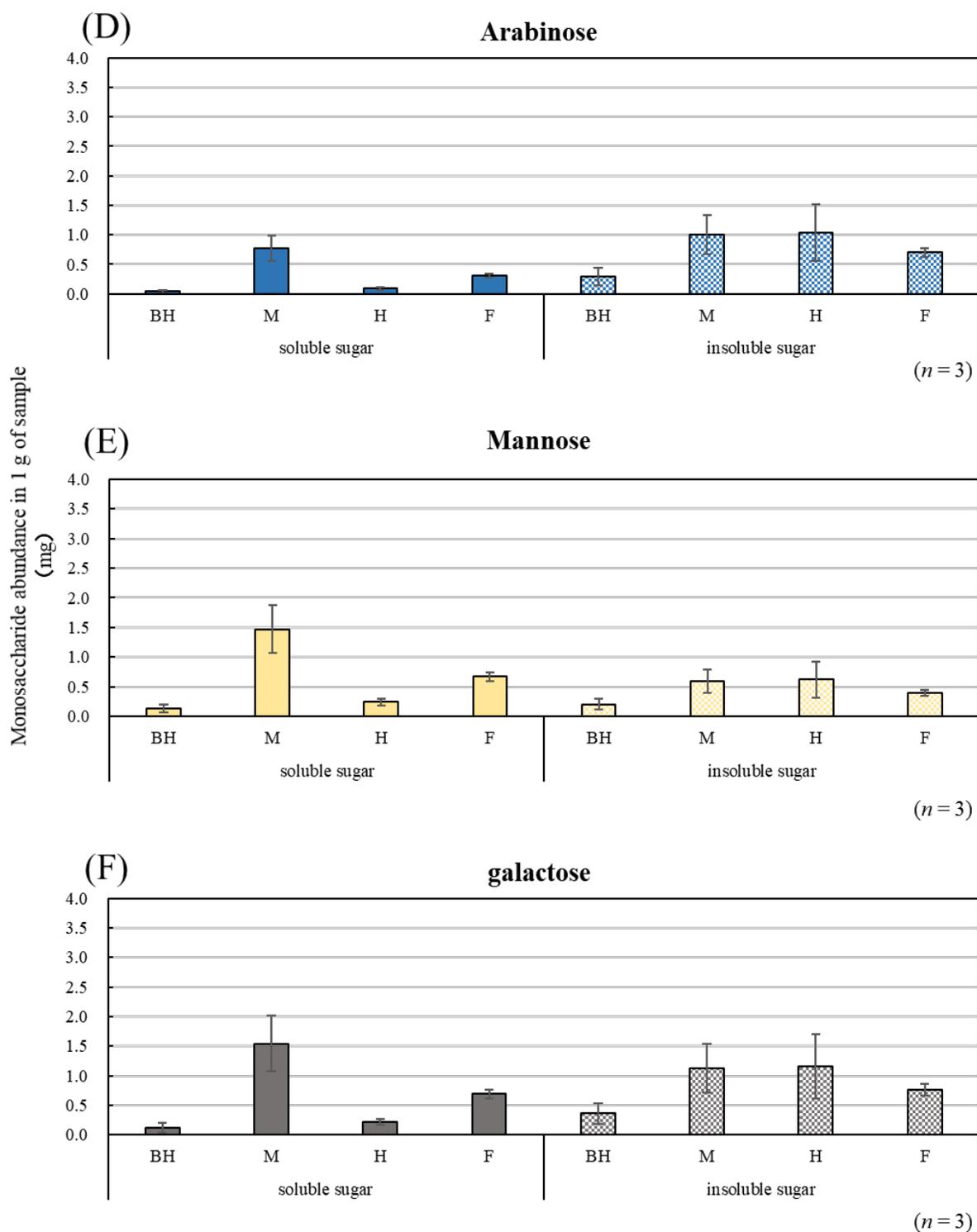
<sup>d)</sup> F: feces

<sup>e)</sup> N.T.: not tested

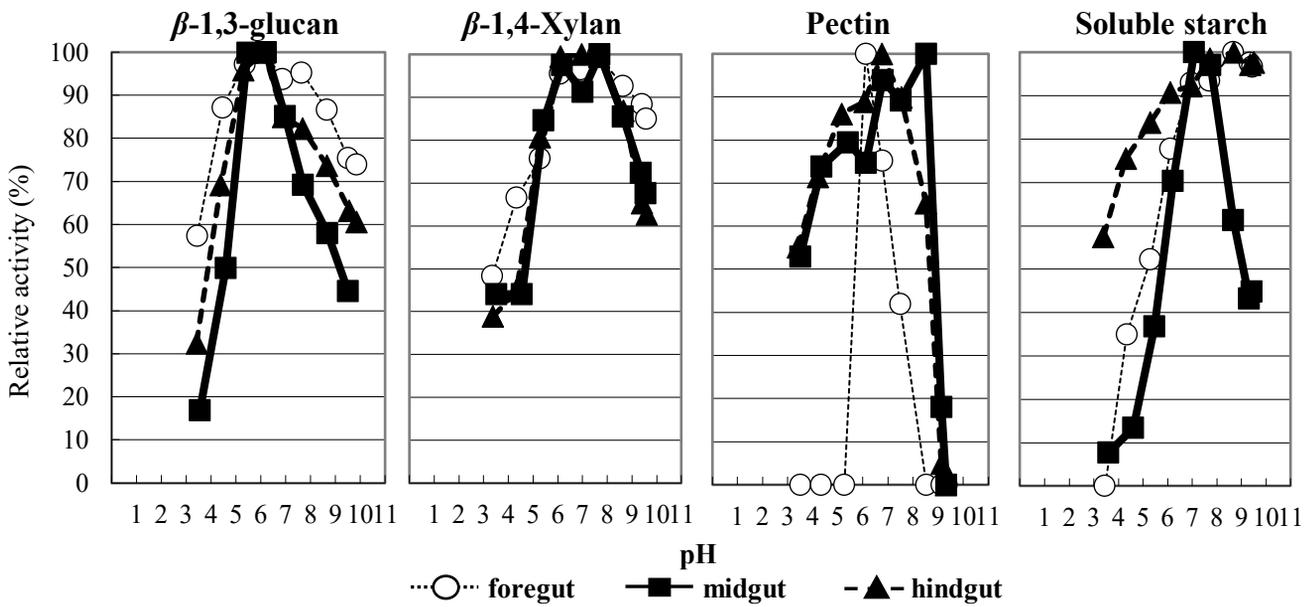
<sup>f)</sup> N.D.: Not detected by analytical methods ( $<0.01 \mu\text{mol/g}$  of organ) without dissolved oxygen.



**Fig.16** Composition and distribution of monosaccharide of gut contents in the gut of *T. dichotomus* larvae.

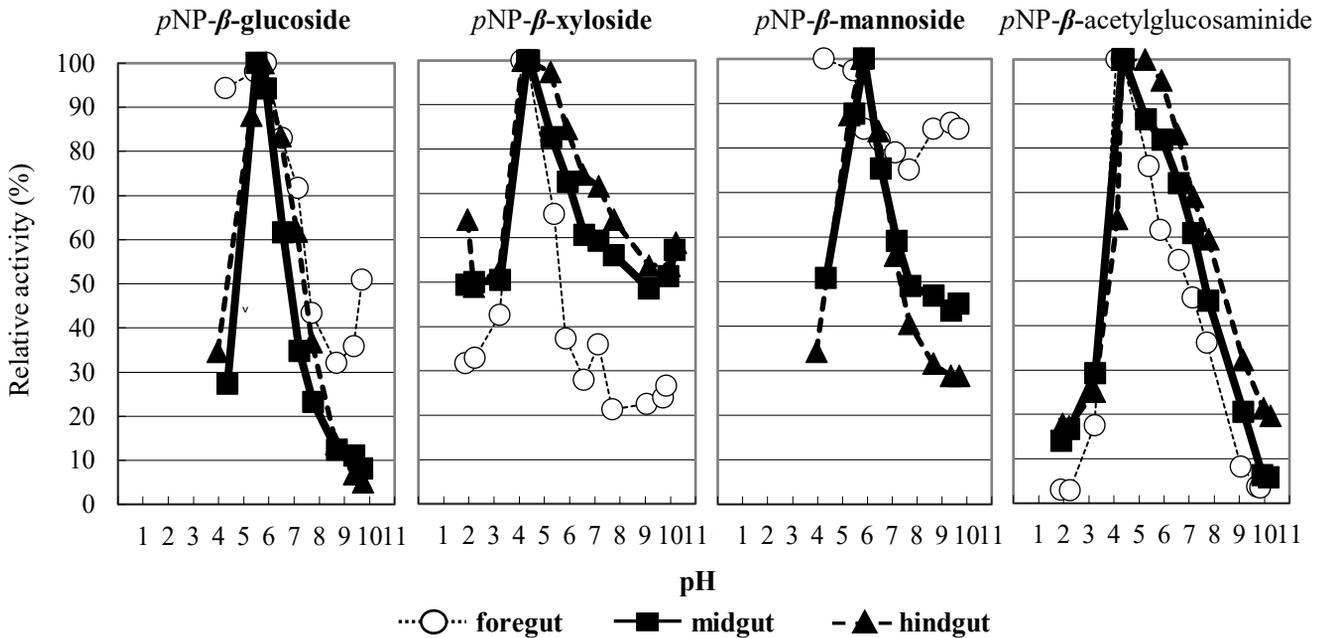


**Fig.16 Composition and distribution of monosaccharide of gut contents in the gut of *T. dichotomus* larvae.**



**Fig. 17** The pH profile of glycanases from the gut of *T. dichotomus* larvae.

The activity is weak and the optimum pH cannot be measured: CM-cellulose, phosphate swollen cellulose,  $\beta$ -1,4-mannan, chitin.



**Fig. 18** The pH profile of glycosidases from the gut of *T. dichotomus* larvae.

The activity is weak and the optimum pH cannot be measured:  $\alpha$ -glucoside.

**Table 7 Glycanase activities from the larval digestive tract of the *T. dichotomus*.**

Organ	Substrate	Optimum pH	Total Activity (mU)	Specific Activity	
				(mU / mg Protein)	(mU / g Organ)
Foregut	CM-cellulose	ND <sup>a)</sup>	188 <sup>b)</sup> ± 25 <sup>c)</sup>	4.79 ± 0.55	164 ± 23
	$\beta$ -1,3-glucan	6.15	194 ± 24	4.95 ± 0.69	169 ± 26
	$\beta$ -1,4-xylan	7.63	1733 ± 415	44.25 ± 11.37	1514 ± 9
	Pectin	6.11	2540 ± 360	64.86 ± 8.20	2219 ± 8
	Soluble starch	8.66	127 ± 26	3.23 ± 0.63	111 ± 19
Midgut	CM-cellulose	ND <sup>a)</sup>	319 ± 28	8.11 ± 0.77	52 ± 6
	$\beta$ -1,3-glucan	6.22	3066 ± 220	77.95 ± 4.15	502 ± 36
	$\beta$ -1,4-xylan	6.18, 7.69	7094 ± 543	180.36 ± 16.14	1162 ± 3
	Pectin	8.53	2982 ± 261	75.80 ± 7.18	488 ± 1
	Soluble starch	7.07	13,520 ± 569	343.74 ± 13.19	2214 ± 85
Hindgut	CM-cellulose	ND <sup>a)</sup>	80 ± 14	5.85 ± 1.02	16 ± 4
	$\beta$ -1,3-glucan	6.14	856 ± 87	62.63 ± 6.94	170 ± 20
	$\beta$ -1,4-xylan	6.98	2039 ± 311	149.19 ± 27.82	404 ± 8
	Pectin	6.76	2836 ± 105	207.51 ± 13.08	562 ± 4
	Soluble starch	8.69	145 ± 36	10.61 ± 3.02	29 ± 8

<sup>a)</sup> Not detected; <sup>b)</sup> total activity for the carboxymethyl cellulose (CMC) degradation was measured using GTA buffer at pH 7.0; <sup>c)</sup> SE, standard error ( $n = 6$ ); the organ weight used is as follows: foregut, 0.7759–1.8733 g; midgut, 3.7972–8.7650 g; hindgut, 3.1010–7.0759 g.

**Table 8 Glycosidase activities from the larval digestive tract of the *T. dichotomus*.**

Organ	Substrate	Optimum pH	Total Activity (mU)	Specific Activity	
				(mU / mg Protein)	(mU / g Organ)
Foregut	<i>p</i> NP $\beta$ -glucoside	5.89	5.09 <sup>b)</sup> $\pm$ 0.83 <sup>c)</sup>	0.13 $\pm$ 0.02	4.4 $\pm$ 0.83
	<i>p</i> NP $\beta$ -xyloside	N.D. <sup>a)</sup>	3.10 $\pm$ 0.38	0.08 $\pm$ 0.01	2.7 $\pm$ 0.41
	<i>p</i> NP $\beta$ -mannoside	4.10	34.40 $\pm$ 4.25	1.75 $\pm$ 0.61	24.4 $\pm$ 3.61
	<i>p</i> NP $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminide	4.10	1397.83 $\pm$ 127.30	71.08 $\pm$ 7.56	992.5 $\pm$ 99.64
Midgut	<i>p</i> NP $\beta$ -glucoside	5.50	94.70 $\pm$ 3.21	2.41 $\pm$ 0.13	15.5 $\pm$ 0.81
	<i>p</i> NP $\beta$ -xyloside	5.89	25.91 $\pm$ 4.23	0.66 $\pm$ 0.09	4.2 $\pm$ 0.63
	<i>p</i> NP $\beta$ -mannoside	4.33	301.72 $\pm$ 50.75	18.03 $\pm$ 8.35	43.1 $\pm$ 8.91
	<i>p</i> NP $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminide	4.33	702.00 $\pm$ 51.74	41.95 $\pm$ 4.12	100.3 $\pm$ 14.39
Hindgut	<i>p</i> NP $\beta$ -glucoside	5.77	59.04 $\pm$ 3.80	4.32 $\pm$ 0.38	11.7 $\pm$ 0.54
	<i>p</i> NP $\beta$ -xyloside	5.77	17.20 $\pm$ 2.59	1.26 $\pm$ 0.18	3.4 $\pm$ 0.48
	<i>p</i> NP $\beta$ -mannoside	4.13	91.18 $\pm$ 11.74	8.29 $\pm$ 1.18	15.2 $\pm$ 3.60
	<i>p</i> NP $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminide	5.24	198.57 $\pm$ 45.04	18.05 $\pm$ 4.09	33.2 $\pm$ 13.76

<sup>a)</sup> Not detected; <sup>b)</sup> total activity for xyloside was measured using GTA buffer at pH 6.0; <sup>c)</sup> SE, standard error ( $n = 6$ ); the organ weight used is as follows: foregut, 0.7759–1.8733 g; midgut, 3.7972–8.7650 g; hindgut, 3.1010–7.0759 g.

**Table 9 Glycanase activities in the larval digestive tract of *T. dichotomus*.**

Gut section	<i>β</i> -1,3-glucan			<i>β</i> -1,4-xylan			Soluble total sugar (mg / g organ)
	Total activity (mU)	Specific activity		Total activity (mU)	Specific activity		
		(mU / mg protein)	(mU / g organ)		(mU / mg protein)	(mU / g organ)	
M1 <sup>a)</sup>	360 ± 61.5 <sup>b)</sup>	22.7 ± 5.0	174.7 ± 40.1	124.3 ± 0.8	17.0 ± 1.0	133.5 ± 11.6	32.3 ± 2.1
M2	77.3 ± 20.9	11.6 ± 1.0	80.4 ± 19.2	99.1 ± 0.8	12.1 ± 0.7	91.7 ± 3.7	23.9 ± 4.0
M3	36.5 ± 2.6	5.2 ± 0.4	28.0 ± 3.8	25.3 ± 10.2	2.9 ± 0.4	26.3 ± 5.2	19.5 ± 3.2
M4	16.4 ± 4.9	5.4 ± 0.9	33.3 ± 5.8	11.4 ± 3.8	0.6 ± 0.5	15.5 ± 9.4	17.3 ± 4.5
M5	25.3 ± 8.1	6.6 ± 0.9	25.7 ± 6.4	16.7 ± 4.4	4.8 ± 0.5	22.1 ± 1.9	18.4 ± 1.4
M6	78.8 ± 14.7	8.8 ± 2.3	56.2 ± 5.6	77.5 ± 3.5	10.8 ± 1.7	63.6 ± 8.5	15.6 ± 2.4
M7	26.7 ± 4.2	6.4 ± 1.0	51.5 ± 25.1	43.4 ± 24.3	13.8 ± 4.5	129.4 ± 19.9	21.0 ± 3.3
H1	173.3 ± 69.8	53.3 ± 2.2	116.1 ± 35.5	67.7 ± 8.4	11.8 ± 0.6	43.0 ± 12.8	13.4 ± 1.4
H2	13.3 ± 1.8	2.0 ± 0.3	7.4 ± 1.0	39.8 ± 9.1	6.7 ± 0.5	28.9 ± 5.4	14.3 ± 1.5
H3	8.4 ± 3.7	1.7 ± 0.6	4.9 ± 1.9	27.4 ± 8.4	4.4 ± 1.5	10.4 ± 6.4	14.1 ± 1.4

<sup>a)</sup> Midgut and hindgut regions are denoted as M and H, respectively, followed by a number indicating the segment position number.

<sup>b)</sup> Each value represents the mean ± standard deviation of three replicate gut sections.

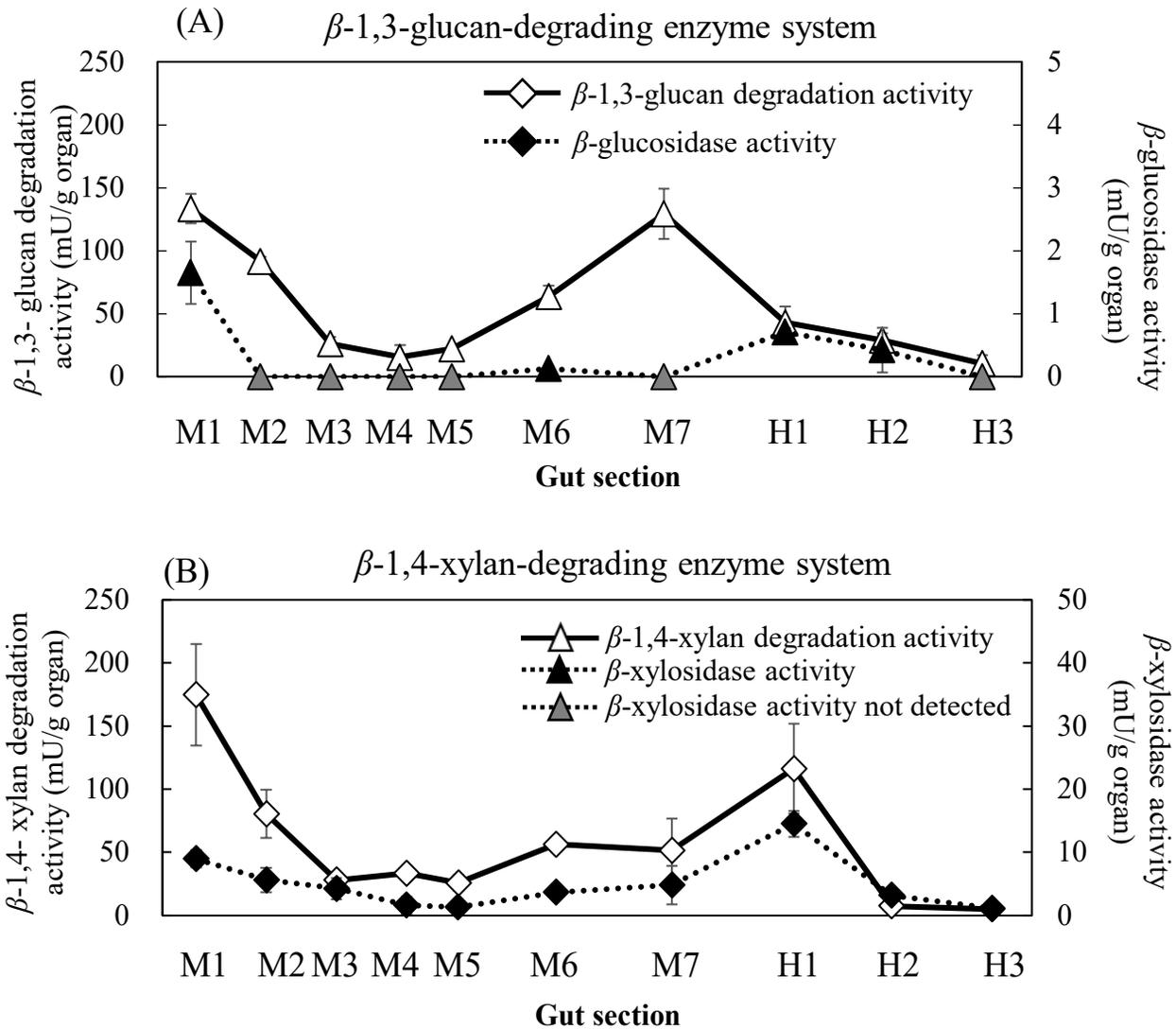
**Table 10 Glycosidase activities in the larval digestive tract of *T. dichotomus*.**

Gut section	<i>p</i> NP $\beta$ -glucoside			<i>p</i> NP $\beta$ -xyloside		
	Total activity (mU)	Specific activity		Total activity (mU)	Specific activity	
		(mU / mg protein)	(mU / g organ)		(mU / mg protein)	(mU / g organ)
M1 <sup>a)</sup>	10.7 $\pm$ 3.1 <sup>b)</sup>	1.2 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 1.3	2.1 $\pm$ 1.4	0.2 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.5
M2	5.8 $\pm$ 3.1	1.0 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 1.9	N.D. <sup>c)</sup>	N.D.	N.D.
M3	3.3 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 1.7	N.D.	N.D.	N.D.
M4	1.1 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 1.3	N.D.	N.D.	N.D.
M5	1.0 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 1.0	N.D.	N.D.	N.D.
M6	5.5 $\pm$ 1.3	0.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.0	0.02 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.0
M7	1.7 $\pm$ 1.5	0.5 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 3.0	N.D.	N.D.	N.D.
H1	18.1 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 2.0	1.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
H2	6.7 $\pm$ 2.7	0.9 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.7	0.1 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.4
H3	2.1 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.5	N.D.	N.D.	N.D.

<sup>a)</sup> Midgut and hindgut regions were denoted as M and H, respectively, followed by a number indicating the segment position number.

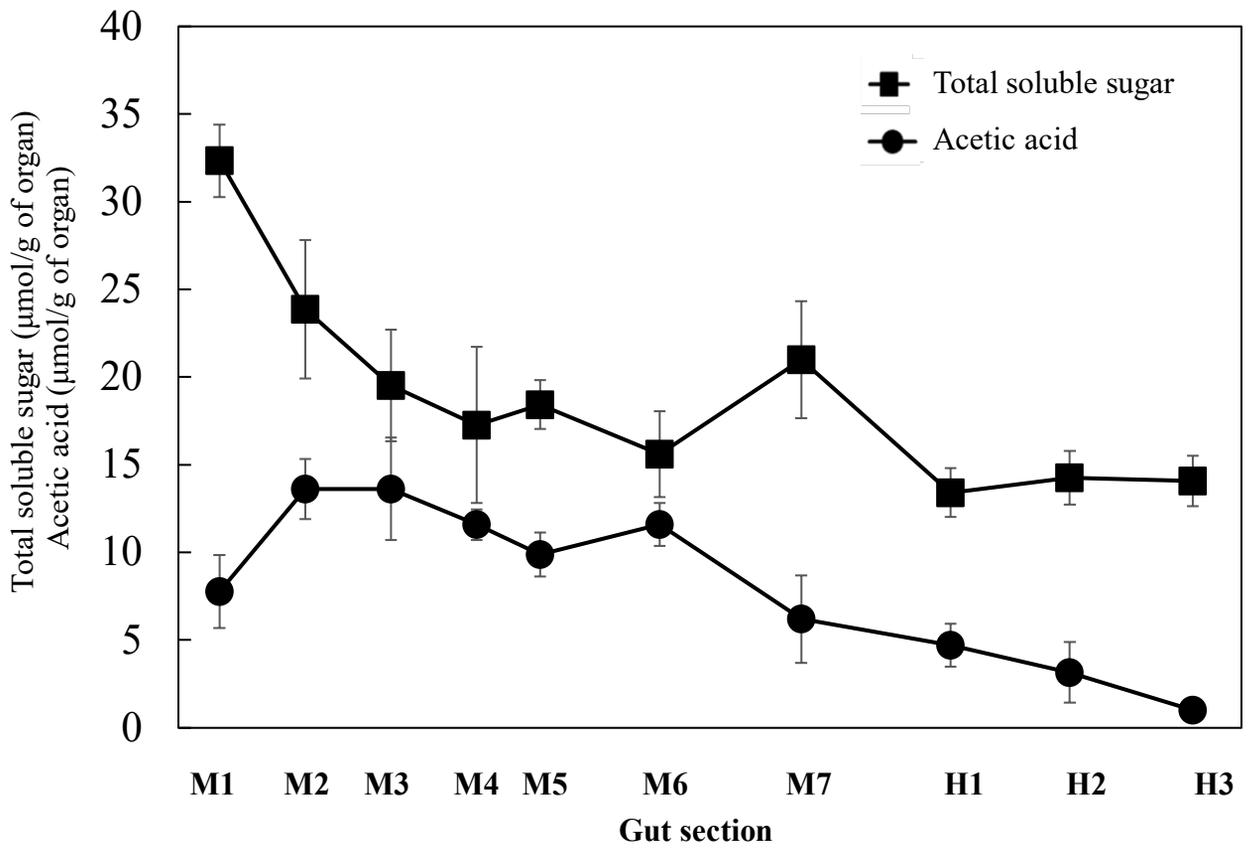
<sup>b)</sup> Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation of three replicate gut sections.

<sup>c)</sup> N.D.: not detected (<0.1 mU).



**Fig. 19 Site-specific distribution of polysaccharide metabolites in the digestive tract of *T. dichotomus* larva.**

Specific activity (mU/g organ) of (A)  $\beta$ -1,3-glucan-degrading enzyme system (—◇—,  $\beta$ -1,3-glucan degradation activity; ···◆···,  $\beta$ -D-glucosidase activity) and (B)  $\beta$ -1,4-xylan-degrading enzyme system (—△—,  $\beta$ -1,4-xylan degradation activity; ···▲···,  $\beta$ -D-xylosidase activity; ···▲···, no detection of  $\beta$ -D-xylosidase activity [ $<0.1$  mU]). In all experiments, error bars indicate SD ( $n \geq 3$ ). H, hindgut; M, midgut.

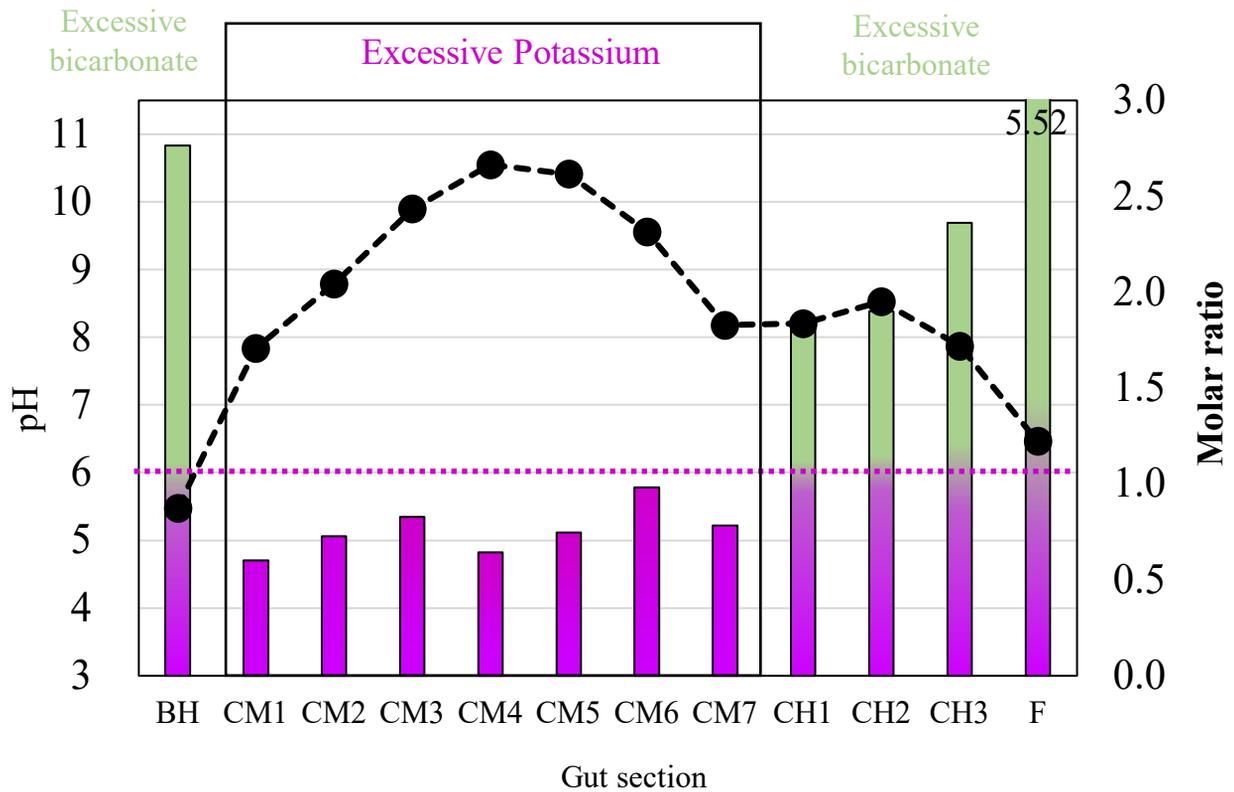


**Fig. 20** Distribution of Soluble total sugar and acetic acid, which are polysaccharide metabolites in the gut of *T. dichotomus* larvae.

**Table 11 Identity of putative amino acid sequences in polysaccharide degrading enzymes between *T. dichotomus* and Scarabaid insects.**

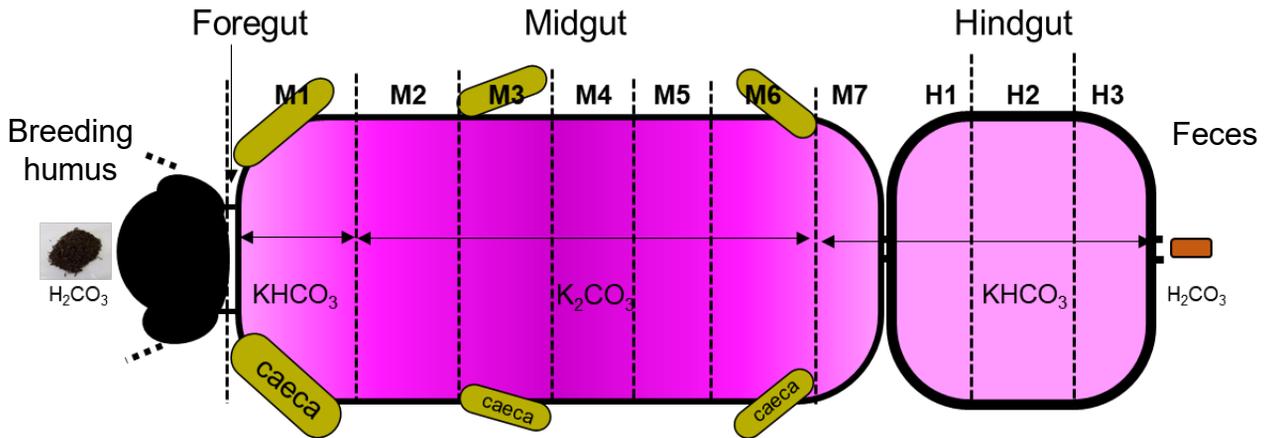
Enzyme name	Insect	NCBI Accession No.	food habitat	Identity* (%)
Cellulase (GH9)	<i>Oryctes rhinoceros</i>	QGX74967	larva: decayed wood adult: Coconut tree	90% (421/467)
amylase	<i>Oryctes rhinoceros</i>	QEI22884	larva: Dead tree adult: Coconut tree	75% (369/393)
$\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase)	<i>Tenebrio molitor</i>	ACS36221	larva: Vegetable waste, Dog food adult: Grain	56% (212/378)
$\beta$ -1,4-xylanase	<i>Hypothenemus hampei</i>	ADN94682	adult: Coffee berry	Not applicable
$\beta$ -glucosidase	<i>Tenebrio molitor</i>	AAG26008	larva: Vegetable waste, Dog food adult: Grain	82% (364/468)

\* The number in parentheses is the number of matching amino acid residues between *T. dictotomus* and other Scarabaid insects.



**Fig. 21 Molar ratio and pH of  $\text{HCO}_3^-$  (bicarbonate) ion to  $\text{K}^+$ .**

Molar ratio =  $\text{HCO}_3^- / \text{K}^+$ . The increase / decrease in apparent bicarbonate concentration was linked to pH and potassium ion concentration. In the midgut of CM4 near pH 10,  $\text{K}^+ : \text{HCO}_3^- = 1 : 0.64$ . In the hindgut,  $\text{K}^+ : \text{HCO}_3^- = 1 : 2$ .



**Fig. 22 pH regulation in *T. dichotomus* larvae.**

Breeding humus:  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , M1:  $\text{KHCO}_3$ , M2-M6:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , M7 & H1-H3:  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , Feces:  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .

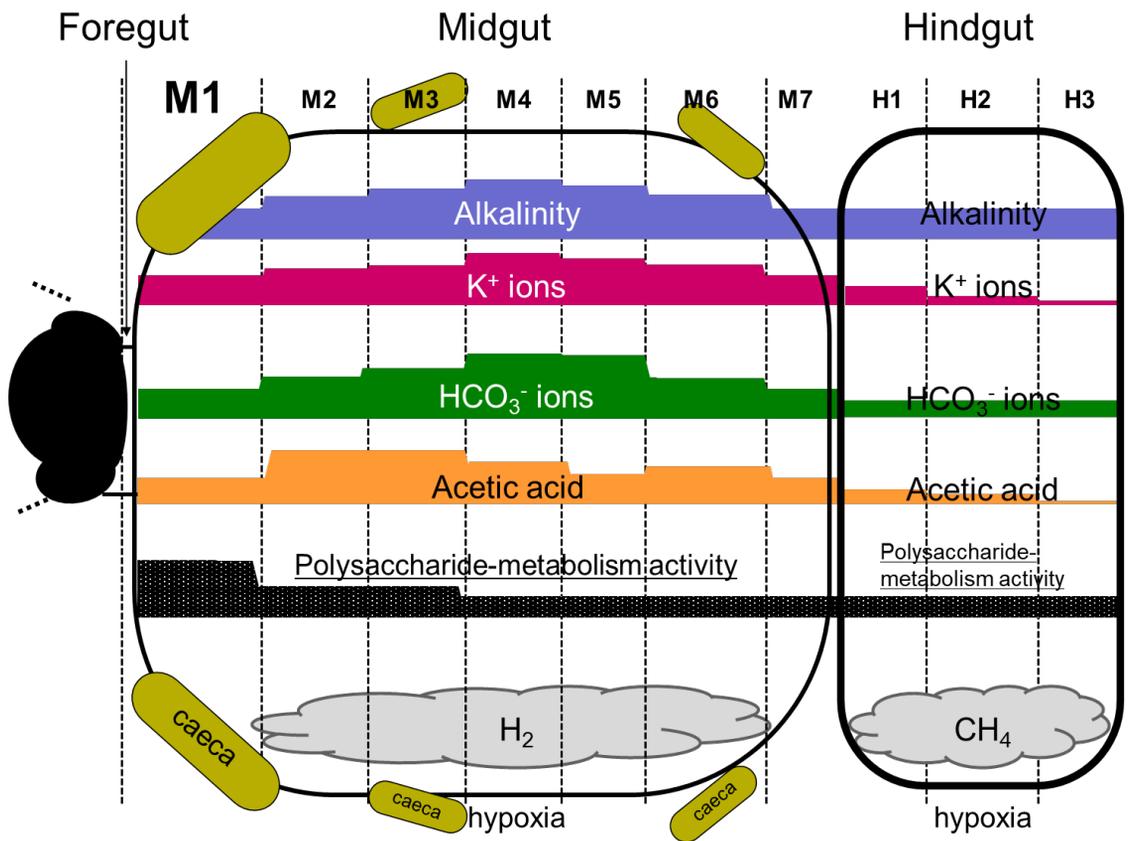
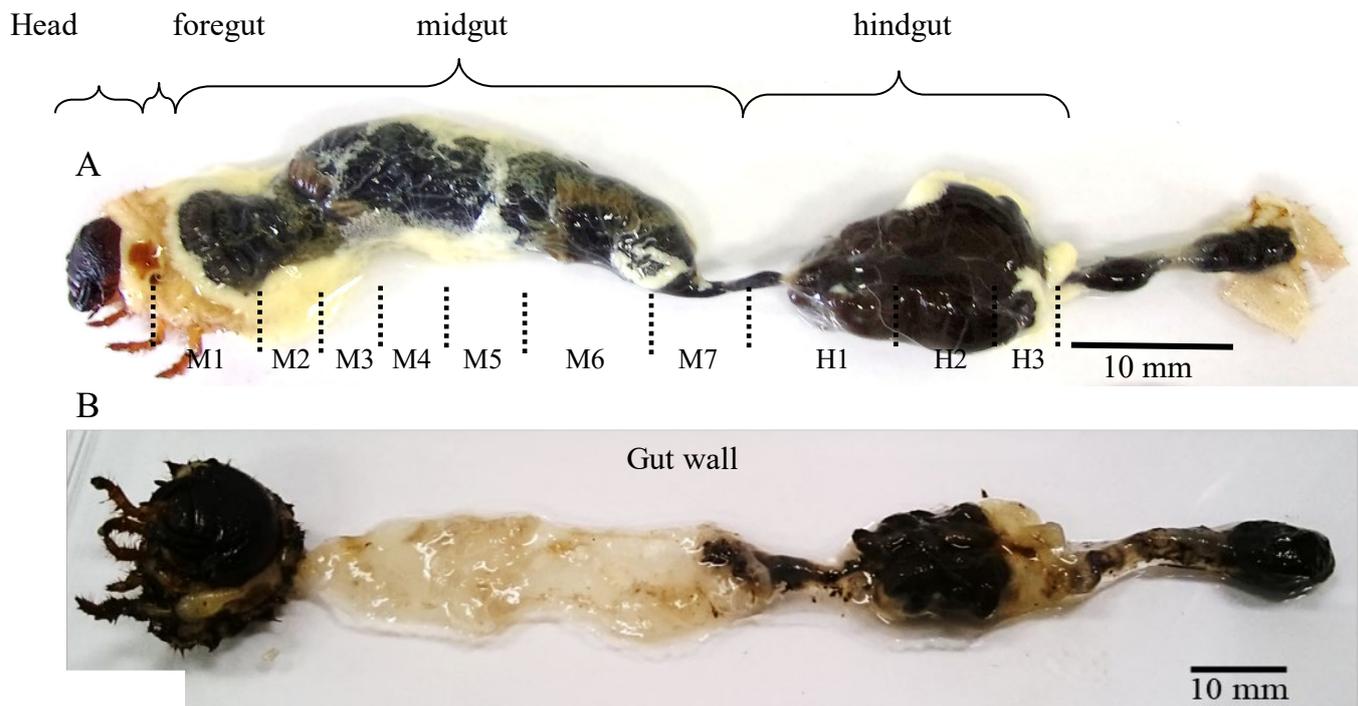
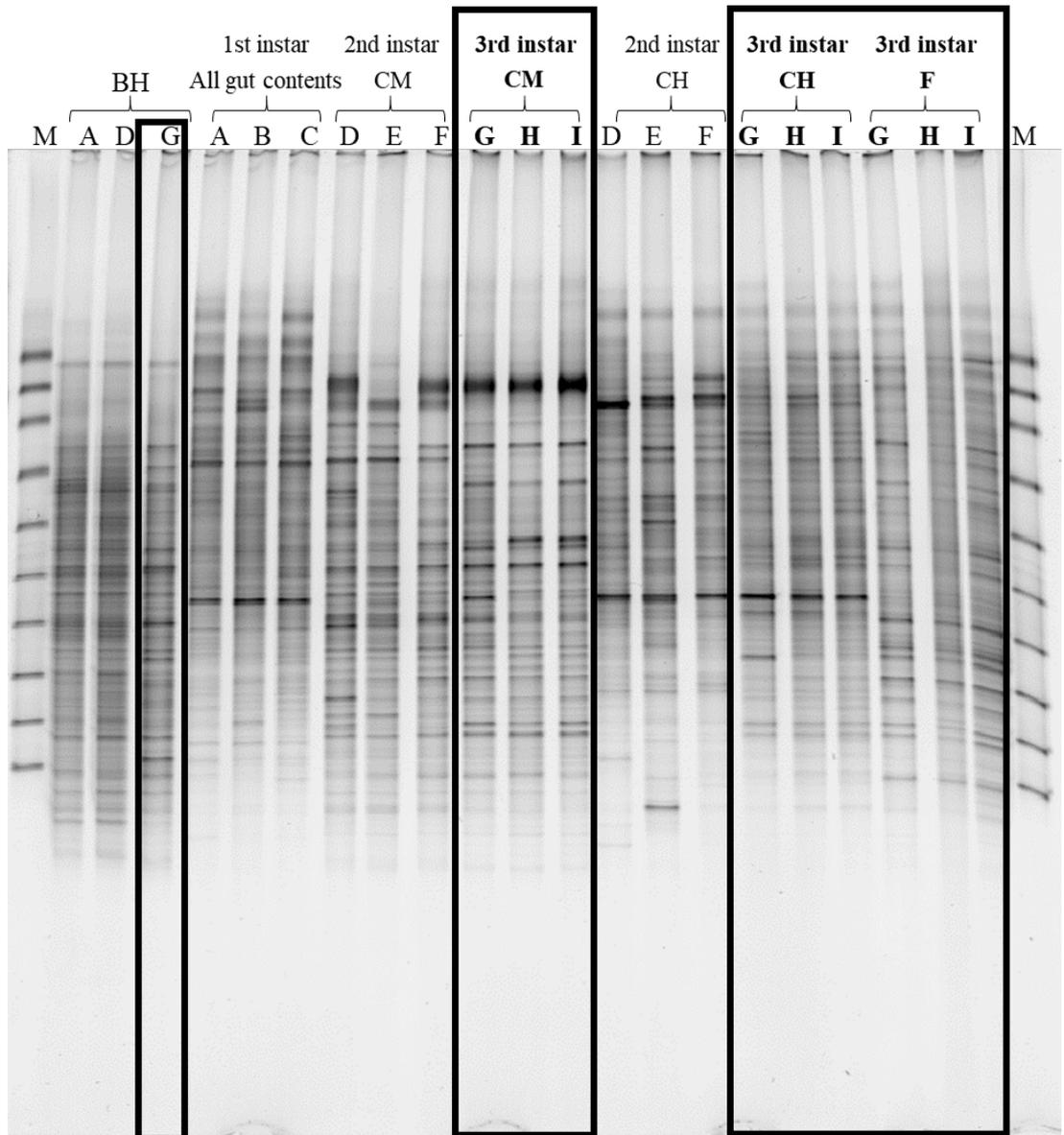


Fig. 23 The gut environment of *T. dichotomus* larvae.



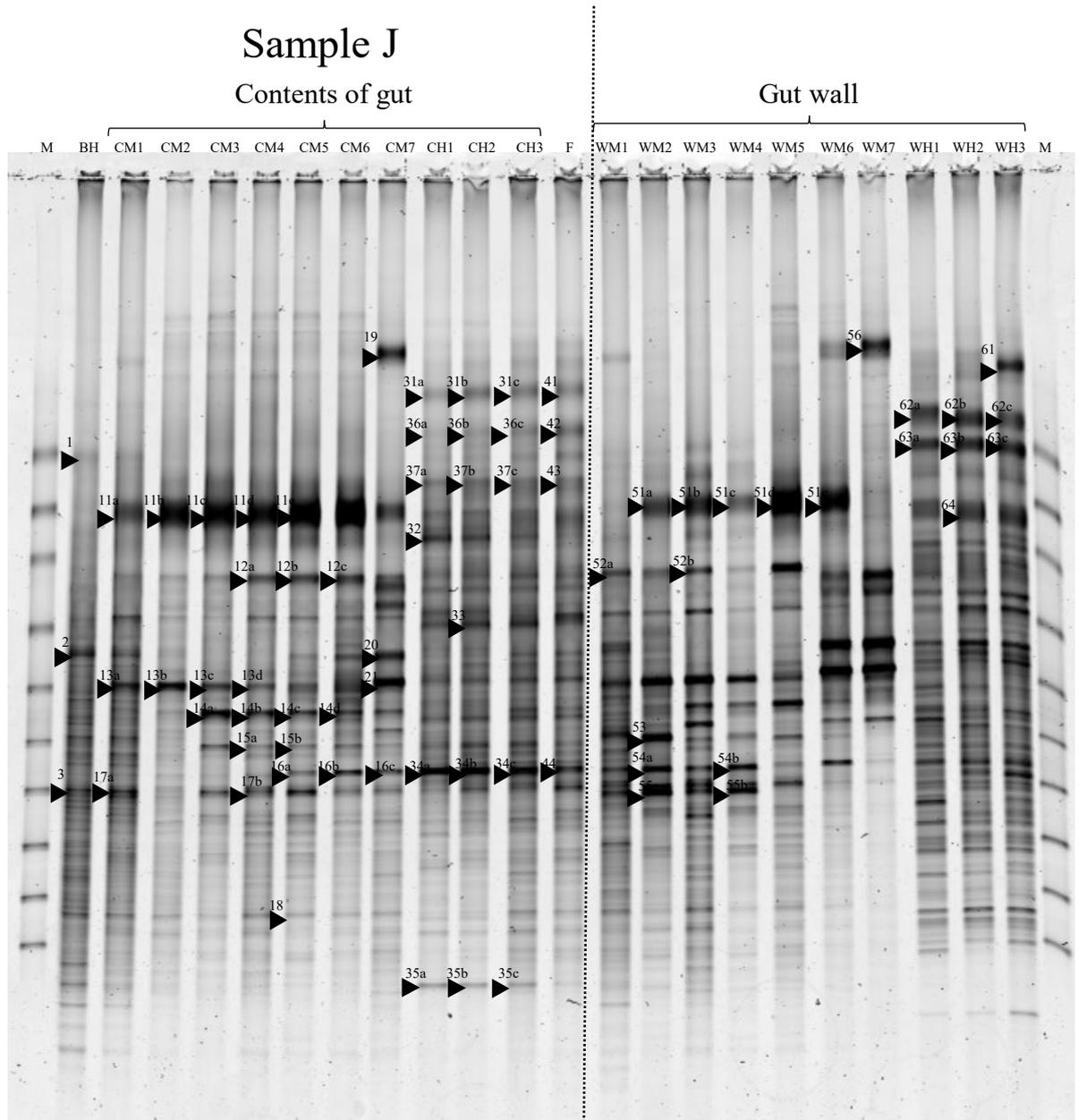
**Fig. 24 The gut structure and gut wall from *T. dichotomus* larvae.**

(A) The digestive tract is divided into section samples designated M1 to H3. Midgut contents are designated CM1-CM7 and hindgut contents are designated CH1-CH3. Enlarged view of M1, which includes the foregut. (B) Gut of larva after washing with saline.



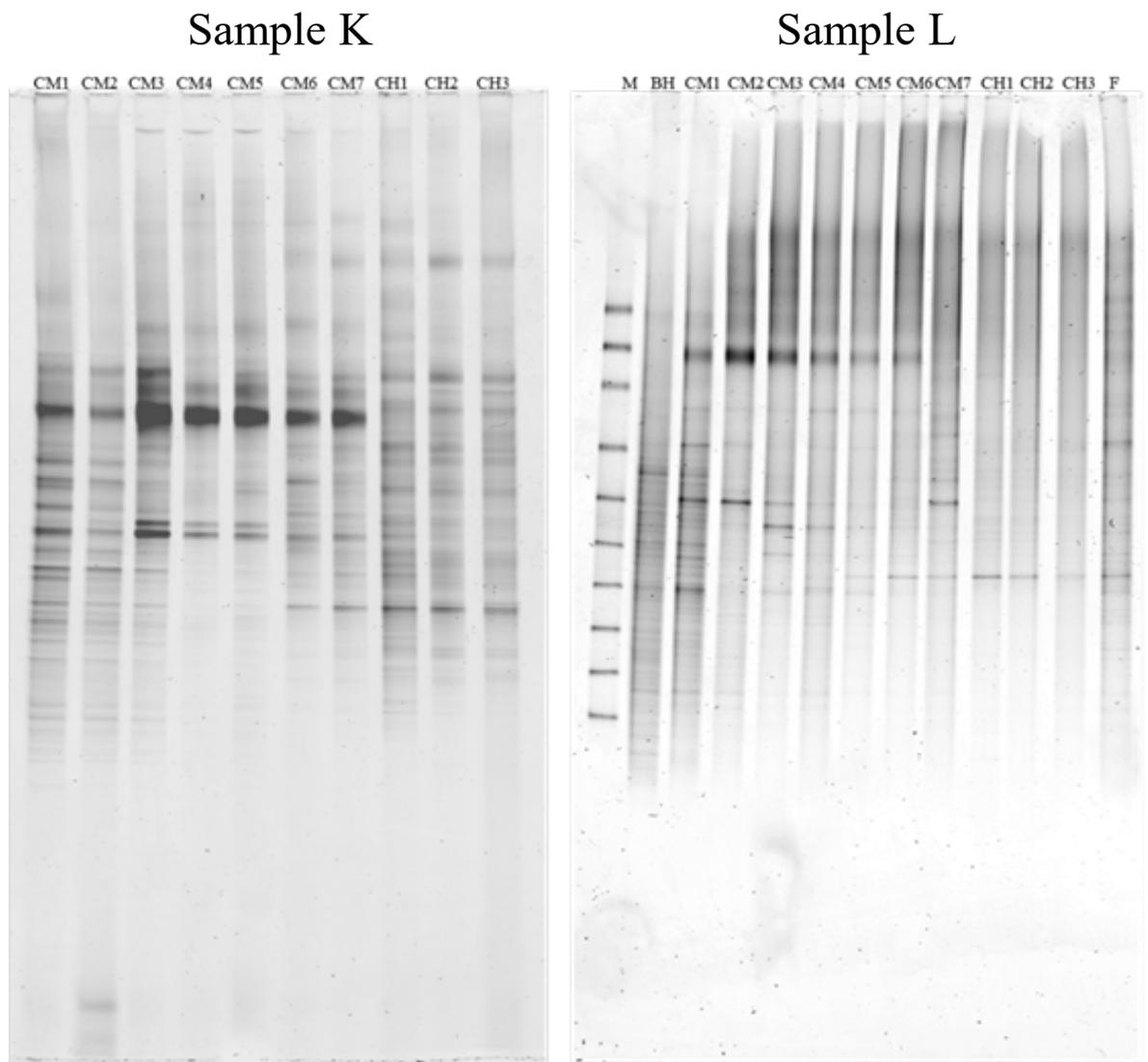
**Fig. 25 Results of PCR-DGGE analysis of gut bacteria according to growth stage in *T. dichotomus* larvae.**

The gut bacteria of 1st to 3rd instar larvae were analyzed using PCR-DGGE. M, BH, and F indicate DGGE markers, breeding humus, and feces, respectively. CM and CH show results for the contents of the midgut and hindgut, respectively. Three larvae were used for each stage (1st instar: A-C, 2nd instar: D-F, 3rd instar: G-I). The larvae were housed in plastic cages (31.5 L; 10 larvae/cage) containing adequate amounts of breeding humus as a food source. Breeding humus was collected from the plastic cage of one larva from each stage (1st instar: A, 2nd instar: D, 3rd instar: G). In the case of 1st instar larvae, the total contents of the gut were used for the experiment. On the other hand, for the 2nd and 3rd instar larvae, the gut was divided into the midgut and the hindgut (see Fig. 3-1) and the gut contents were analyzed.



**Fig. 26 PCR-DGGE profile of the bacterial flora in the gut contents of and the gut wall from *T. dichotomus* larvae.**

CM1-CM7 and CH1-CH3 show results for the contents of the midgut and hindgut, respectively. Bands are numbered in each category: BH (1-3), CM1-CM7 (11-21), CH1-CH3 (31-37), and F (41-44). When the gut wall was provided, each section was washed with sterile saline at least 3 times. The gut wall of midgut was designated as WM1-WM7(51-55) and the gut wall of hindgut was designated as WH1-WH3(61-64). Bands with the same number exhibited the same mobility and were sub-categorized from “a” to “e” by sample.



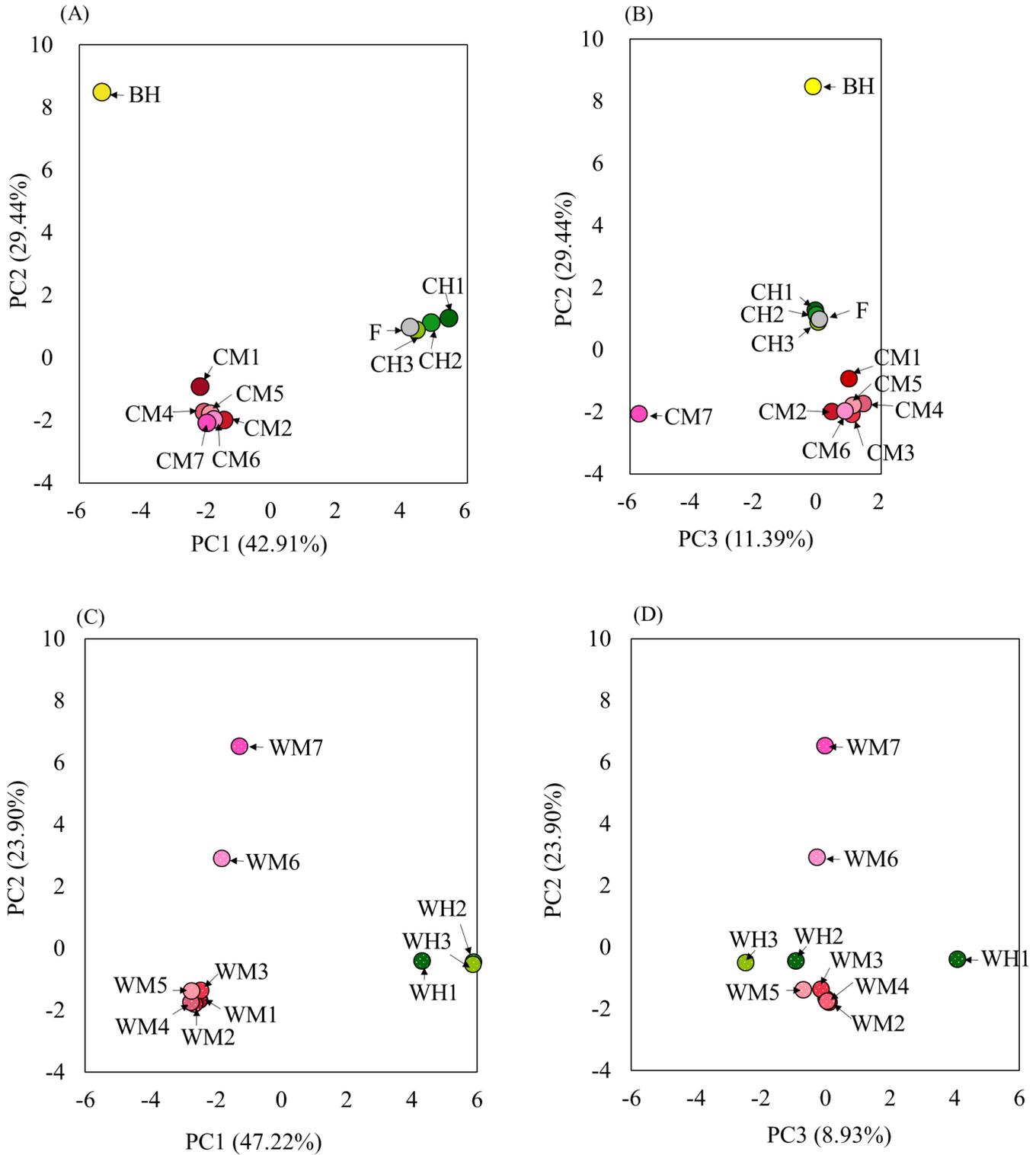
**Fig. 27 Results of PCR-DGGE analysis of gut bacteria when the digestive tract of *T. dichotomus* larvae was divided into 10 sections.**

Except for the typical data (Fig. 3-3), the DGGE profiles of two larvae are shown (Samples K and L). M, BH, and F indicate DGGE marker, reproductive humus, and feces, respectively. CM1-CM7 and CH1-CH3 correspond to the dissected section of the digestive tract of *T. dichotomus* larvae between CM1 and CH3.

**Table 12 Diversity index of the contents of the digestive tract from *T. dichotomus* larvae based on DGGE band analysis.**

	<i>S</i>	Shannon-Wiener index	Simpson's index
BH	33	3.258	0.953
CM1	29	2.986	0.932
CM2	26	2.308	0.818
CM3	23	2.390	0.865
CM4	30	2.835	0.913
CM5	28	2.794	0.916
CM6	30	2.834	0.922
CM7	25	2.720	0.917
CH1	28	2.866	0.918
CH2	30	2.984	0.932
CH3	30	3.153	0.946
F	31	3.119	0.943
	<i>S</i>	Shannon-Wiener index	Simpson's index
WM1	30	3.015	0.940
WM2	27	2.677	0.906
WM3	31	2.987	0.936
WM4	21	2.260	0.855
WM5	31	2.846	0.919
WM6	19	2.436	0.889
WM7	17	2.266	0.873
WH1	36	3.346	0.960
WH2	31	3.194	0.952
WH3	34	3.304	0.957

We examined the gel bands using Quantity One version 4.5.2 software (Bio-Rad Laboratories, Inc.). *S* represents the number of bands in each gel lane. We calculated the diversity index of the DGGE bands to evaluate changes in the microbial flora. The diversity index was calculated using the Shannon-Wiener, and Simpson indexes.



**Fig. 28 PCA analysis of the DGGE profiles in the gut contents and gut wall.**

Sample details are described in the Materials and Methods. In (A) the plot of CM3 is hidden by that of CM7; therefore (B) is additionally shown. (C) and (D) show the results of the gut wall.

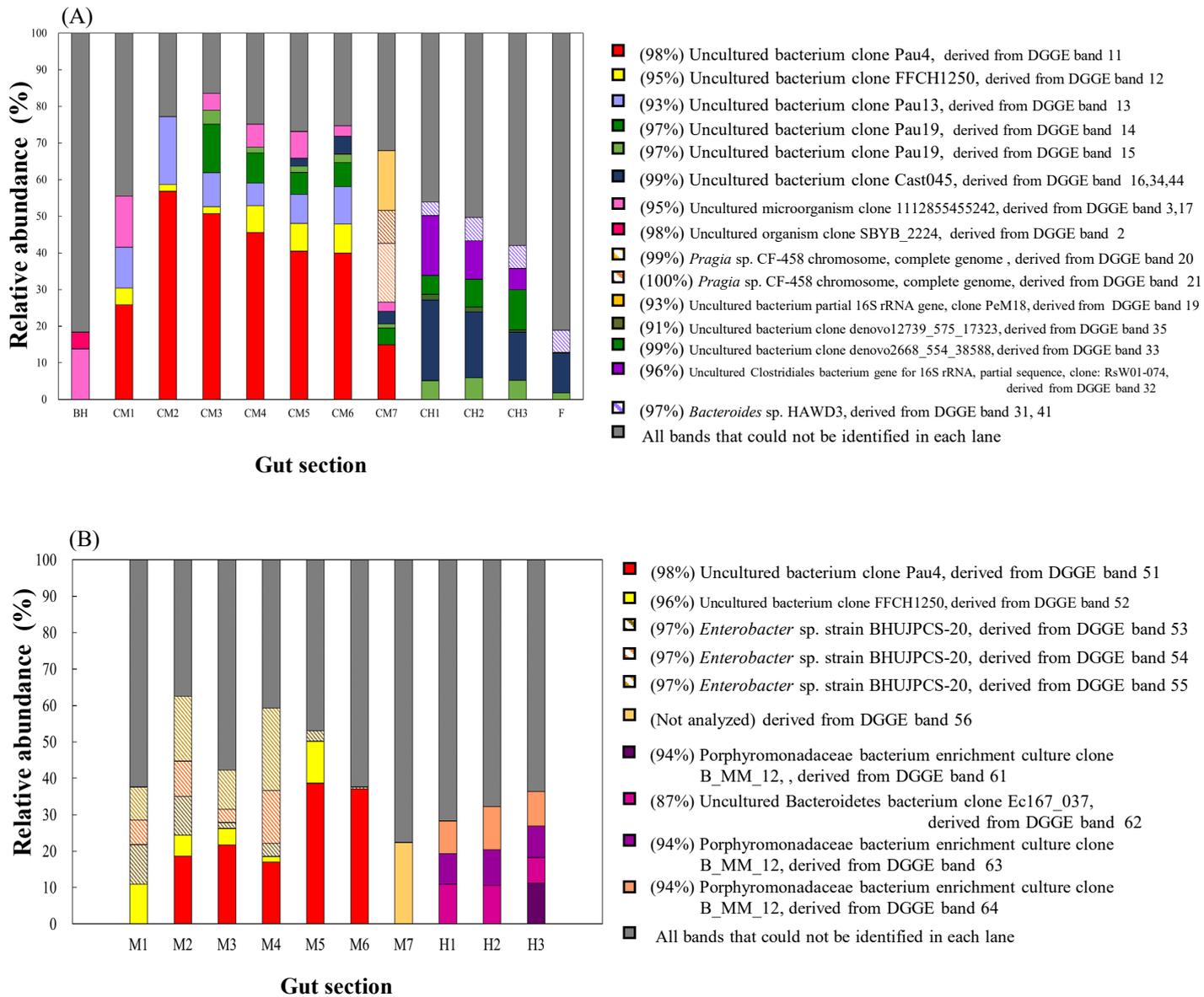
Percentages on axes denote the amount of variance explained by the principal component.

**Table 13 16S rDNA sequences showing maximum identity to the major bacterial populations identified by DGGE analysis, as shown in Fig. 26.**

Band	Maximum identity (%)	Gap (%)	Closest sequence	NCBI accession no.
1	159/166 (96%)	0/166 (0%)	<i>Microvirga</i> sp. CDVBN77	MK938302
2	163/166 (98%)	0/166 (0%)	Uncultured bacterium clone SBYB_2224	JN438659
3, 17a-17b	157/166 (95%)	1/166 (0%)	Uncultured bacterium isolate 1112855455242	HQ118362
11a-11e, 51a-51d	179/182 (98%)	0/182 (0%)	Uncultured bacterium clone Pau4	KT251043
12a-12c	185/192 (96%)	1/192 (0%)	Uncultured bacterium clone FFCH1250	EU134638
13a-13d	157/169 (93%)	0/169 (0%)	Uncultured bacterium clone Pau13	KT251047
14a-14d	190/196 (97%)	5/192 (2%)	Uncultured bacterium clone Pau19	KT251051
15a-15b	190/196 (97%)	5/196 (2%)	Uncultured bacterium clone Pau19	KT251051
16a-16c, 34a-34c, 44	165/166 (99%)	0/166 (0%)	Uncultured bacterium clone Cast045	GU450372
18	158/176 (90%)	8/176 (4%)	<i>Cellulomonas</i> sp. S3-166	JQ660127
19	178/191 (93%)	0/191 (0%)	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone PeM18	AJ576387
20	190/191 (99%)	0/191 (0%)	<i>Pragia</i> sp. CF-458 chromosome, complete genome	CP034752
21	191/191 (100%)	0/191 (0%)	<i>Pragia</i> sp. CF-458 chromosome, complete genome	CP034752
31b-31c, 41	181/186 (97%)	0/186 (0%)	<i>Bacteroides</i> sp. HAWD3	KU886094
32	164/171 (96%)	2/171 (1%)	Uncultured Clostridiales bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: RsW01-074	AB198500
33	164/166 (99%)	0/166 (0%)	Uncultured bacterium clone denovo2668_554_38588	MF221998
35a-35c	166/183 (91%)	3/183 (1%)	Uncultured bacterium clone denovo12739_575_17323	MF306562

53, 54a-54b, 55a-55b	187/192 (97%)	1/192 (0%)	<i>Enterobacter</i> sp. Strain BHUJPCS-20	MN078054
61	179/186 (96%)	0/186 (0%)	Uncultured bacterium clone MgKI1c002F01	KP690958
62a-62c	165/190 (87%)	6/190 (3%)	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone Ec167_037	KM650706
63a-63c	175/186 (94%)	0/186 (0%)	Porphyromonadaceae bacterium enrichment culture clone B_MM_12	KY101560
64	175/186 (94%)	0/186 (0%)	Porphyromonadaceae bacterium enrichment culture clone B_MM_12	KY101560

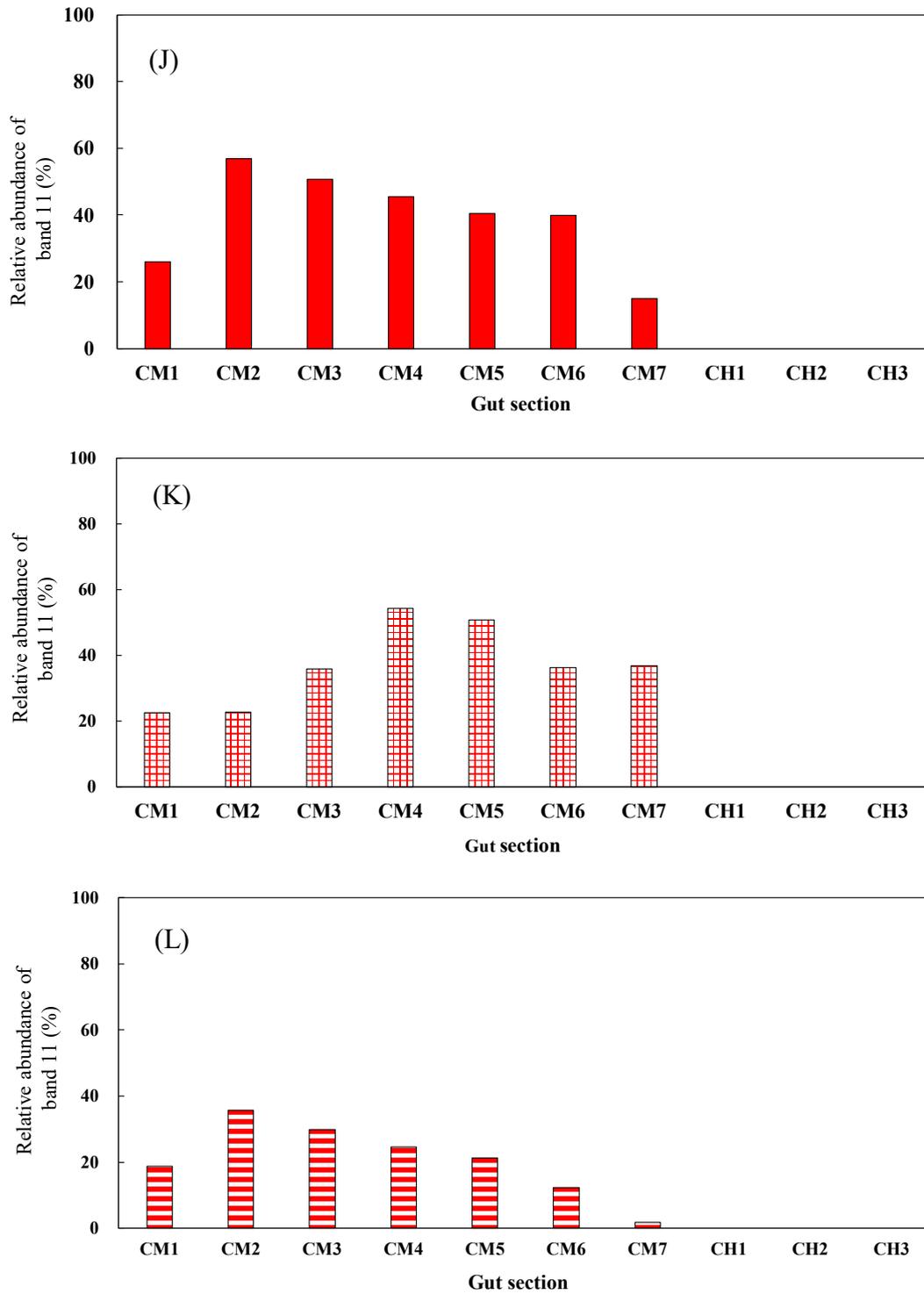
DGGE bands are numbered in each category: BH (1-3), CM1-CM7 (11-21), CH1-CH3 (31-37), F (41-44), WM1-WM7 (51-55), WH1-WH3 (61-64). Bands with the same number exhibited the same mobility and were sub-categorized as “a” to “e” by sample.



**Fig. 29 Relative abundance of each bands in the gut of *T. dichotomus* larvae.**

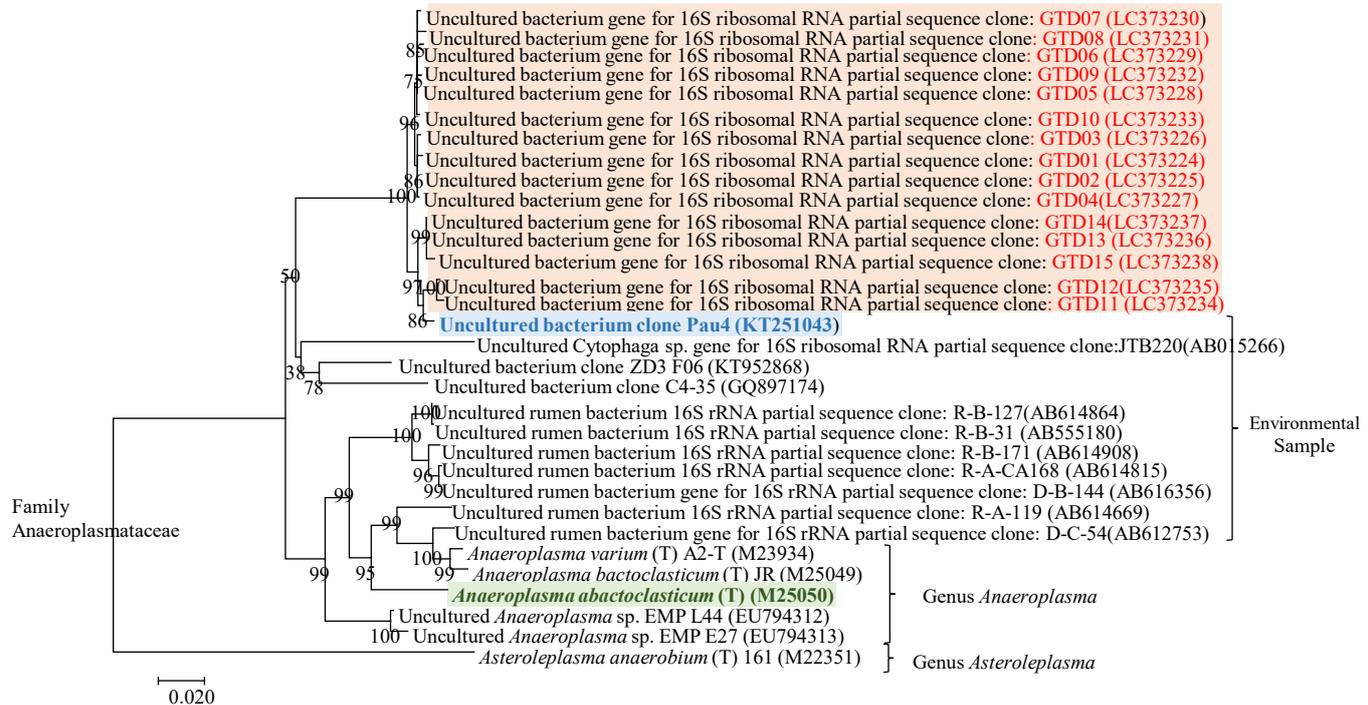
The Y-axis shows the relative abundance (%). The percentage distribution was calculated based on the relative abundance of all PCR-DGGE bands in each lane. Except for the typical data (Fig. 3-5). Relative abundance of each bands was calculated based on Figure 3-5.

(A): gut content, (B): gut wall.



**Fig. 30 Relative abundance of band 11 in the gut of *T. dichotomus* larvae.**

The Y-axis shows the relative abundance (%). The percentage distribution was calculated based on the relative abundance of all PCR-DGGE bands in each lane. Relative abundance of bands 11 were calculated based on Figs. 3-3 and 3-4.



**Fig. 31 Phylogenetic analysis of bacteria with GTD sequence from the gut of *T. dichotomus* larvae.**

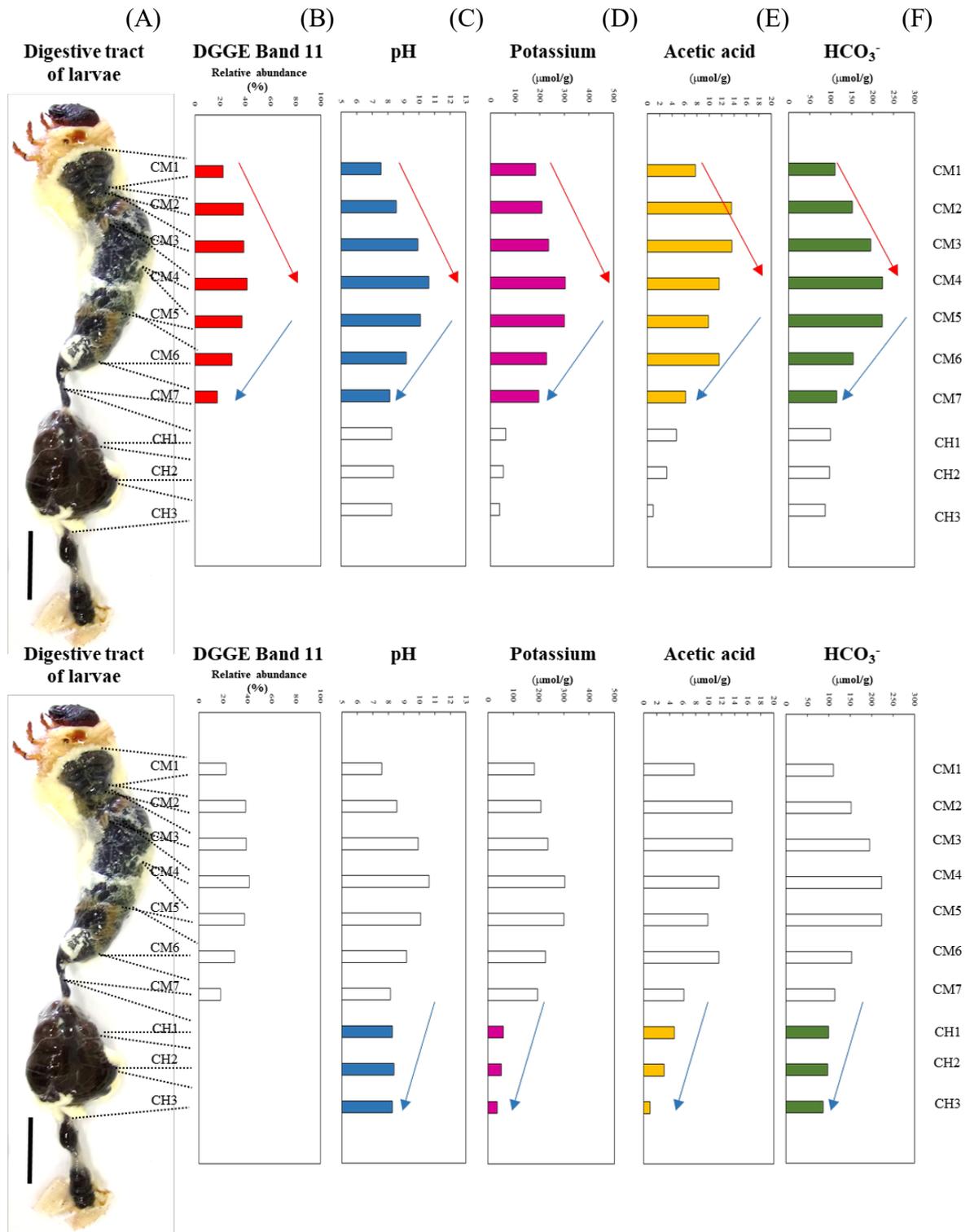
Bootstrap test (1000 replicates) . Evolutionary distances :Kimura 2-parameter . The optimal tree with the sum of branch length = 0.94271124. There were a total of 1464 positions in the final dataset. Species used as the outgroup was *Asteroleplasma anaerobium* (T) 161 (M22351).

**Table 14 Genes of enzymes that degradate the components of humus derived from bacteria.**

Accession No.	NZ_CP040530	NZ_CP043998	GCA_0024550015	NC_022538	NC_022549	AP024413	CP017948
Strain <sup>1)</sup>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium diolis</i>	<i>Anaeroplasmabactoclasticum</i> ATCC27112	<i>Acholeplasma palmae</i> J233	<i>Acholeplasma brassicae</i>	<i>Acholeplasmataceae bacterium</i> Mahy22	<i>Tenericutes bacterium</i> MO-XQ
Isolation source	Human feces	Rotten straw	Lumens of Cow and sheep	No description	No description	Lake water	Subseafloor sediment
Protein count	4698	5008	1923	1449	1708	1779	2092
<b>glycoside hydrolase family</b>	○ <sup>2)</sup> 30 (GH10,20,43)	○18 (GH1,18,31,43,127)	○4 (GH3,53)	○8 (GH28,43,88)	○5 (GH10,16,18,20,78)	× <sup>2)</sup>	×
cellulase	×	×	×	×	×	×	×
cellulase family glycosylhydrolase	×	×	○	×	×	×	×
α-amylase	○2	○	○	×	○	○3	○
β-glucosidase (EC:3.2.1.21)	○3	×	×	×	×	○	×
β-mannosidase (EC:3.2.1.25)	○	×	×	×	×	×	×
β-galactosidase (EC:3.2.1.23)	○12	○	○2	×	○2	○	×
xylan 1,4-β-xylosidase (EC:3.2.1.37)	×	×	×	×	×	×	×
β-N-acetylhexosaminidase	○3	×	×	×	○3	×	×
β-N-acetylglucosaminidase	○	×	×	×	×	○	×
β-mannosidase	○	×	×	×	×	×	×
α-glucosidase	×	○2	○	×	○3	○	○
α-L-fucosidase (EC:3.2.1.51),	○3	×	×	×	×	×	×
α-mannosidase (EC:3.2.1.24),	○	×	×	×	×	×	×
α-N-arabinofuranosidase (EC:3.2.1.55)	○	○	×	×	×	×	×
<b>Lignin degradation enzymes</b>							
glutathione peroxidase (EC:1.11.1.9)	○	○2	○2	○	○	○	○
catalase/oxidase (EC:1.11.1.21)	○	×	○	×	×	×	×
chloride peroxidase (EC:1.11.1.10)	×	×	×	×	×	×	×
glycolate oxidase (EC:1.1.3.15)	×	×	×	×	×	○	×

<sup>1)</sup> Strain the guts closely related to the bacteria detected in the digestive tract of *T.dichotomus* larvae.

<sup>2)</sup> Indicates the presence (○) or absence (×) of the gene. The number attached to the circle indicate the number of genes.



**Fig. 32 Relationships among the gut components and GTD sequences of *T. dichotomus* larvae.**

(A) The digestive tract was divided into sections designated CM1 to CH3; (B) relative abundances of the band11; (C) pH profile of the digestive tract ; (D) profile of potassium concentration; (E) profile of acetic acid concentration ; (E) profile of  $\text{HCO}_3^-$ .

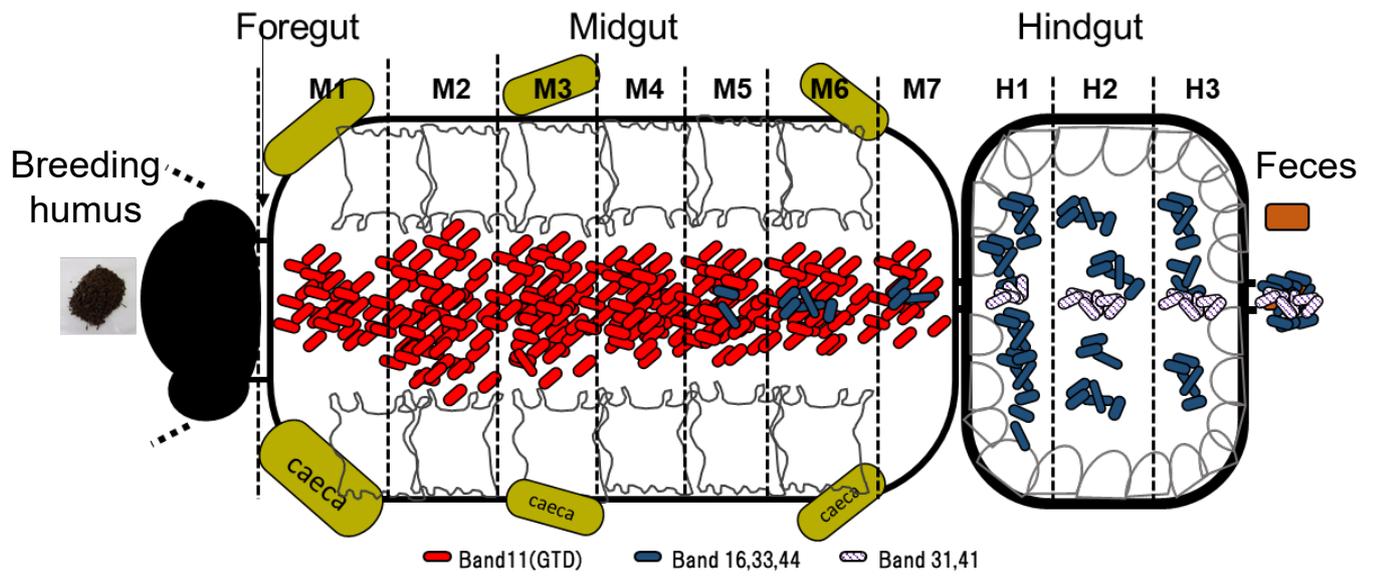


Fig. 33 Distribution of gut microflora in *T. dichotomus* larvae.

## 総括

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、そして細菌の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。このように、多種の植物成分を資化する森林性昆虫類は、森林生態系において、落葉変換者や生態系改変者という機能を持つとされている。

森林性昆虫類の中で、落葉変換者であるシロアリは最も研究が進んでおり、木材を摂食し、取り込まれたセルロースが、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されることが明らかになっている。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。しかし、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や食性によって異なる可能性が予想されている。

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昆虫の一種であり、その幼虫は、広葉樹林の林床を構成する腐朽材やそれらを含む土壌を摂食することで成長し、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ていると考えられる。したがって、この幼虫の摂食、消化と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。本研究では、カブトムシ幼虫の消化管全体における消化および吸収の活動について、その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析し、双方の関連性を明らかにすることを試みた。

まず、飼育中に餌料をかえることでカブトムシ幼虫における腸内通過時間と成長量について検討した。腸管内容物のほぼすべてが摂食後 47 時間で排出され、成長量は餌料の成分に依存することが示唆された。

次に、カブトムシ幼虫の腸内環境について解析した。幼虫の腸管の構造は、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、中腸と後腸は細い管で連結していた。大きな袋状の後腸は内部に顆粒状の突起があった。分析のために、中腸と後腸を細分化する場合は、腸管の形

態を考慮の上、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。腸内のガス成分を分析したところ、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腸管内で生じていることが示唆された。

腸管を10分割にして測定した腸内容物のpHは、餌料である飼育腐葉土が中性付近であるのに対し、中腸前半部でpH 8以上となり、特に中腸中央部のpHが10以上の強アルカリ性を示した。中腸中央部以降は腸管に沿って低下し、後腸後半部ではpH 8となった。また、腸内容物のpHの挙動と関連するカリウムや重炭酸濃度の挙動は連動していた。したがって、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付近の中腸前半部・後半部および後腸では炭酸水素カリウム、pH 9以上の中腸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、腸内の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。

さらに、強アルカリ条件下の腸内において、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。スミグラフでC/N比を測定したところ、約30となり炭素が多かった。したがって、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、餌料および腸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。まず、消化管を中腸と後腸に 2 分割とした場合の可溶性成分について見ると、腐葉土に含まれる糖は、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。構成糖の組成は、可溶性糖ではグルコースが最も多く含まれ、特に中腸で多量に含まれていた。それに対し、不溶性糖ではキシロースが最も多く含まれており、次にグルコースであった。これらの結果は、餌料が腸管を通過する間に消化され、部位によって糖組成が変化することを示唆した。

腸内容物の構成糖に基づき存在が予想された各種多糖分解活性の至適 pH は中性で、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で高く、基質として使用した多糖類の中では、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、中腸前半部において、 $\beta$ -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-グルカンと $\beta$ -1,4-キシランについては、それぞれの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、酵素活性が高い中腸の前半の部位においては、可溶性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。また、糖が代謝して生じる腸内容物中の有機酸を分析したところ、酢酸、シュウ酸、コハク酸がすべての部位の腸管内容物で検出され、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の傾向は中腸とは異なっていた。したがって、中腸と後腸内の物質代謝が異なっていることが示唆された。

以上の分析結果から、腸内環境は、さまざまな要素が腸管に沿って変化しており、中腸と後腸の部位による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、酢酸を利用したメタン発酵が行われている可能性が考えられた。消化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主体の分解形式とは異なることがこの研究により解明された。

カブトムシ幼虫の腸内環境の分析により、腸内は部位によって変化する特異的な環境であることがわかり、糖質分解経路の存在も示唆された。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、消化管に沿った細菌群集の機能の特徴づけることを試みた。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、腸内容物の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。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内容物と後腸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た。また、DGGEバンドの解析結果は、細菌叢は腸管の部位によって異なっており、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いた。中腸で最も優占化しているバンド11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、別個体のカブトムシ3齢幼虫でも同様だった。この、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 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 分析で優占化していることが明らかになった 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。また、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、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* 属細菌は嫌気性であり、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、糖分解などに寄与している可能性が考えられた。

カブトムシ幼虫の消化管では、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, および重炭酸イオン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.

以上, 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 時間以内で通過する. この間, カブトムシ幼虫の中腸内では, pH が中性付近の中腸前半部で, 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アルカリ性の高い部位で有機酸まで分解される過程が明らかになった. 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, 今回の結果は, 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示唆した.

また, 中腸において, 腸内環境に適応した GTD 配列を持つ細菌は, 餌料成分の分解への関与が考えられ, 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った。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腸内細菌のプロバイオティクスへの応用、あるいは、幼虫の活動が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が示された。

## 謝辞

本論文の執筆にあたり，始終適切なる御指導，御鞭撻を賜りました日本大学大学院生物資源科学研究科利用科学専攻 木口 実教授，西尾俊幸教授，川井 泰教授，安齋 寛特任教授に心から深く感謝致します。

本研究は文部科学省 21 世紀 COE プログラム平成 14 年度採択プログラム「微生物共生系に基づく新しい資源利用開発」のテーマの一つである「昆虫腸管における植物細胞多糖類資化性共生微生物の分子生態学的解析」の一環として開始されたものであり，拠点リーダーの別府輝彦元教授に心から深く感謝致します。また，本実験の多くは日本大学生物資源科学部生命科学研究科で行われたものであり，上田賢志教授，高野英晃准教授に深く感謝致します。

また，本研究を遂行するにあたり，カブトムシ幼虫腸内細菌叢解析をご指導いただきました日本大学生物資源科学部応用生物学科 故中嶋睦安名誉教授，砂入道夫前教授，岩淵範之准教授，沖嘉尚助教，竹石英伯博士，食品生命学科山崎眞狩元教授，荻原博和特任教授，カブトムシ幼虫腸内環境の解析において，酵素活性につきまして御指導いただきました日本大学生物資源科学部森林資源科学科岩田隆太郎特任教授，山根明臣元教授，石津敦元教授，また，炎光分析・原子吸光分析を御指導いただきました日本大学生物資源科学部生命化学科植物栄養生理学研究室の野口章教授，ならびに長谷川功名誉教授，GC 分析による水素およびメタン分析をご指導いただきました日本大学生物資源科学部諸過程志澤泰彦准教授，カブトムシ幼虫の通過時間と成長量において，C/N 比の御指導をいただいた日本大学生物資源科学部生命化学科隅田裕明特任教授，ならびに色彩解析について御指導をいただいた日本大学生物資源科学部くらしの生物学科水野真二専任講師，カブトムシ幼虫に関連する遺伝子解析に関し，細菌ゲノム解析について御指導

をいただいた日本大学生物資源科学部生命化学科中川達功教授，昆虫ゲノム解析についてご指導いただいた日本大学生物資源科学部澤井学非常勤講師に心から感謝いたします．

また，実験を行うにあたり，機器分析にご協力を頂きました日本大学生物資源科学部総合研究所の栗林実験助手をはじめとする歴代の副手・実習助手・嘱託職員の皆様に心から深く感謝致します．

さらに，常日頃からあたたかい励ましとご助言を頂きました日本大学生物資源科学部の諸先生方，研究活動を共に行った日本大学生物資源科学部森林動物学研究室員の方々，分子微生物学研究室とくらしのバイオ研究室の学生さんに厚く御礼申し上げます．

## 参考文献

- Andert, J., Geissinger, O. and Brune, A. (2008) Peptidic soil components are a major dietary resource for the humivorous larvae of *Pachnoda* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology*, **54**: 105–113.
- Anzai, H., Enami, Y., Chida, O., Koshi, A., Omuro, T., Uchida, N. and Nishide, E. (1991) Polysaccharide digestive enzymes from midgut gland of abalone. *Bulletin of College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University*, **48**: 119–127. (in Japanese with English abstract)
- Anzai, H., Uchida, N. and Nishide, E. (1988) Interfering effects of the buffer solutions on the method of Somogyi and Nelson. *Bulletin of College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University*, **45**: 23–27. (in Japanese with English abstract)
- 荒谷邦雄 (2002) 腐朽材の特性がコガネムシ類の資源利用パターンと適応度に与える影響. *日本生態学会誌*, **52**: 89–98.
- Bauchop, T. and Clarke, R.T.J. (1975) Gut microbiology and carbohydrate digestion in the larva of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *New Zealand Journal of Zoology*, **2**: 237–243.
- Bayon, C. (1980a) Transit des aliments et fermentations continues dans le tube

- digestif d'une larve xylophage d'insecte: *Oryctes nasicornis* (Coleoptera, Scarabaeidae). *C. R. Séances l'Acad. Sci, Sér. D, Sci. Nat.*, **290**: 1145–1148, plt. 1. (in French)
- Bayon, C. (1980b) Volatile fatty acids and methane production in relation to anaerobic carbohydrate fermentation in *Oryctes nasicornis* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology*, **26**: 819–828.
- Bayon, C. (1981) Ultrastructure de l'épithélium intestinal et flore pariétale chez la larve Xylophage d'*Oryctes nasicornis* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **10**: 359–371. (in French)
- Bayon, C. and Mathelin, J. (1980) Carbohydrate fermentation and by-product absorption studied with labelled cellulose in *Oryctes nasicornis* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology*, **26**, 833–840.
- Bennett, P. M. and Hobson, K. A. (2009) Trophic structure of a boreal forest arthropod community revealed by stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) analyses. *Entomological Science*, **12**: 17–24.
- Biebl, H. and Spröer, C. (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Journal of Systematic Applied Microbiology*, **25**: 491–497.

- Biggs, D.R. and McGregor, P.G. (1996) Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26**: 69–75.
- Bignell, D.E., Oskarsson, H., Anderson, J.M., Ineson, P. and Wood, T.G. (1983) Structure, microbial associations and function of the so-called “mixed segment” of the gut in two soil-feeding termites, *Procupitermes aburiensis* and *Cubitermes severus* (Termitidae, Termitinae). *Journal of Zoology*, **201**:445–480.
- Borchardt, L.G. and Piper, C.V. (1970) A gas chromatographic method for carbohydrates as alditol-acetates. *Tappi*, **53**: 257–260.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Brune, A. (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, **12**: 168–180.
- Brune, A., Emerson, D. and Breznak, A. (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink: Microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:

2681–2687.

- Brune, A. and Ohkuma, M. (2011) Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. In: Bignell, D.E., Roisin, Y. and N, Lo. (eds), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*, pp. 439–475, Springer, Dordrecht.
- Cazemier, A.E., Den Camp, H.J.M.O., Hackstein, J.H.P. and Vogels, G.D. (1997) Fibre digestion in arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology A Physiology*, **118**: 101–109.
- Cirelli, A.F. and de Lederkremer, R.M. (1976) A gel-forming (1→3)- $\beta$ -D-glucan isolated from *Cyttaria hariatii* Fischer. *Carbohydrate Research*, **48**: 217–223.
- Courtois, J.E. and Chararas, C. (1966) Les enzymes hydrolysant les glucides (hydrates de carbone) chez les insectes xylophages parasites des conifères et de quelques autres arbres forestiers. *Beihefte zu Material und Organismen*, **1**: 127–150. (in German)
- Courtois, J.E., Petek, F. and Kolahi-Zanouzi, M.A. (1962) Étude des osidases du hanneton. *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales.*, **156**: 565–566. (in German)
- Crome, W. (1957) Zur Morphologie und Anatomie der Larve von *Oryctes nasicornis* L. (Col. Dynastidae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift, Neue Folge*, **4**: 228–262. (in German)
- Cropper, F.R. and Heywood, A. (1957) The analysis of fatty acid and fatty alcohols

- by vapour phase chromatography. In: Desty, D.H. (eds), *Vapour Phase Chromatography*, pp. 316–331, Butterworths Scientific Publications, London.
- Debris, M.M., Chararas, C. and Courtois, J.E. (1964) Répartition des enzymes hydrolysant les polyssacharides chez quelques insectes parasites des peupliers et un xylophage du cèdre. *Comptes Rendus Séances de la Société de Biologie Filiales.*, **158**: 1241–1243. (in German)
- Dow, J.A.T. (1984) Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *American Journal of Physiology*, **246**: 633–655.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**: 350–356.
- Egert, M., Stingl, U., Bruun, L.D., Pommerenke, B., Brune, A. and Friedrich, M.W. (2005) Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:4556–4566.
- Egert, M., Wagner, B., Lemke, T., Brune, A. and Friedrich M.W. (2003) Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied Environmental Microbiology*, **69**: 6659–6668.

- Engel, P. and Moran, N.A. (2013) The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Review*, **37**: 699–735.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an Approach using the bootstrap. *Evolution*, 783–791.
- Gorbach, S.L., Mayhew, J.W., Bartlett, J.G., Thadepalli, H. and Onderdonk, A.B (1976) Rapid diagnosis of anaerobic infections by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens. *The Journal of Clinical Investigation*, **57**: 478–484.
- Green, J.M. (1963) Drying reactivity of cellulose. In: Whistler, R.L. (eds), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Volume 3, 1st edition, pp. 95–103, Academic Press: New York.
- Gujarathi, G.R. and Pejaver, M.K. (2014) Life cycle studies of *Protaetia aurichalcea* (Cetoniinae:Cetonidae:Scarabaeidae) in household biocompost. *Species*, **10**: 86–97.
- 平山力 (2003) 昆虫の特異な窒素再利用システム. 化学と生物, **41**:164–170.
- Holter, P. (1974) Food utilization of dung-eating *Aphodius* larvae (Scarabaeidae). *Oikos*, **25**: 71–79.
- Holter, P. (2016) Herbivore dung as food for dung beetles: Elementary coprology

for entomologists. *Ecological entomology*, **41**: 367–377.

Holter, P. and Scholtz, C.H. (2007) What do dung beetles eat? *Ecological Entomology*, **32**: 690–697.

本郷凜太 (2020) カブトムシ幼虫の森林資源利用に関する研究, 日本大学修士論文.

Hongoh, Y. (2011) Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. *Cellular and molecular life sciences*, **68**: 1311–1325.

Honigberg, B. (1970) Protozoa associated with termites and their role in digestion. *In*: Krishna, K. and Weesner, F.M. (eds), *Biology of Termites*, Volume 2, pp. 1–36, Academic Press, New York.

Huang, S.W., Zhang, H.Y., Marshall, S. and Jackson, T.A. (2010) The scarab gut: a potential bioreactor for bio-fuel production. *Insect Science*, **17**: 175–183.

Huang, S. and Zhang, H. (2013) The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS One*, **8**:e57169.

Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T. and Yamaoka, I. (2000) Symbiotic associations with protists. *In*: Abe, T., Bignell, D.E. and Higashi, M. (eds), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, pp. 275–288, Kluwer Academic

Publishers, Dordrecht.

Inoue, T., Murashima, K., Azuma, J.I., Sugimoto, A. and Slaytor, M. (1997)

Cellulose and xylan utilization in the lower termite *Reticulitermes speratus*.

*Journal of Insect Physiology*, **43**: 235–242.

Iriki, Y. and Miwa, T. (1960) Chemical nature of the cell wall of the green algae,

Codium, Acetabularia and Halicoryne. *Nature*, **185**: 178–179.

Japan Oil Chemists' Society (2013) JOCS Standard Method 2.4.1.2-2013,

“Preparation of Methyl Ester of Fatty Acids (Boron Trifluoride–Methanol

Method)”. In: Japan Oil Chemists' Society (eds), *The JOCS Standard Methods*

*for the Analysis of Fats, Oils and Related Materials*, 2nd English edition, Japan

Oil Chemists' Society, Tokyo.

Japanese Standards Association (1988) Kogyouyousuishikenhou (Testing methods

for industrial water) (JIS K0101 1998), Tokyo. (in Japanese)

Johnson, K.S. and Rabosky, D. (2000) Phylogenetic distribution of cysteine

proteinases in beetles: Evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive

strategy in Cerambycidae. *Comparative biochemistry and physiology B*, **126**:

609–619.

Kamimiya, S., Nishiya, T., Izaki, K. and Takahashi, H. (1974) Purification and

- properties of pectin *trans*-eliminase in *Erwinia aroideae* formed in the presence of nalidixic acid. *Agricultural of biological chemistry*, **38**: 1071–1078.
- Kaneko, N. (2007). Introduction to Soil Ecology-Biodiversity of soil Animals and their ecosystem functioning-, 1st edition, Tokai University Press, Tokyo.
- Kappler, A. and Brune, A. (1999) Influence of gut alkalinity and oxygen status on mobilization and size-class distribution of humic acids in the hindgut of soil-feeding termites. *Applied Soil Ecology*, **13**: 219–229.
- 木村滋 (1977) 昆虫の $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼとキトビアーゼ-その存在をめぐって-. 日本農芸化学学会誌, **15** (5): 263–268.
- 桐山 哲・八神早季・山中康如・岩田隆太郎 (2019) ルリボシカミキリおよびヨツスジトラカミキリの幼虫の穿孔様式と栄養摂取生態. 昆虫 (ニューシリーズ), **22** (4): 141–154.
- 古賀大三 (1986) 昆虫脱皮とキチン分解酵素. 日本農芸化学学会誌, **24** (8): 506–512.
- 小島 渉 (2019) 不思議だらけのカブトムシ図鑑. 彩図社, 東京.
- 金野尚武 (2013) きの子類が生産する糖質加水分解酵素. 木材保存, **39** (2): 60–70.
- Koyama, M., Iwata, R. and Yamane, A. (2003a) Comparison of larval growth of two scarabaeids fed with mixture of cow dung and wood chip. *Japan Journal of*

*Environmental Entomological Zoology*, **14**: 1–7.

Koyama, M., Iwata, R., Yamane, A., Katase, T. and Ueda, S. (2003b) Nutrient intake in the third instar larvae of *Anomala cuprea* and *Protaetia orientalis* submarmorea (Coleoptera: Scarabaeidae) from a mixture of cow dung and wood chips: Results from stable isotope analyses of nitrogen and carbon. *Applied Entomological Zoology*, **38**: 305–311.

Kumara, R.P., Saitoh, S., Aoyama, H., Shinzato, N. and Tokuda, G. (2016) Metabolic pathways in the mixed segment of the wood-feeding termite *Nasutitermes takasagoensis* (Blattodea (Isoptera): Termitidae). *Applied Entomology and Zoology*, **51**: 429–440.

Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O. W. and Dhillion, S. (1997) Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology*, **33**: 159–193.

Lemke, T., Stingl, U., Egert, M., Friedrich, M.W. and Brune, A. (2003) Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 6650–6658.

Li, X. and Brune, A. (2005a) Digestion of microbial biomass, structural

- polysaccharides, and protein by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Soil Biology and Biochemistry*, **37**: 107–116.
- Li, X. and Brune, A. (2005b). Selective digestion of the peptide and polysaccharide components of synthetic humic acids by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 1476–1483.
- Li, X. and Brune, A. (2007) Transformation and mineralization of soil organic nitrogen by the humivorous larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Plant and Soil*, **301**: 233–244.
- Martin, M.M. (1983) Cellulose digestion in insects. *Comparative biochemistry and physiology A*, **75**: 313–324.
- Mishra, S.C. and Sen-Sarma, P.K. (1985) Carbohydrases in *xylophagous coleopterous* larvae (Cerambycidae and Scarabaeidae) and their evolutionary significance. *Material und Organismen*, **20**: 221–230.
- Nakashima, K., Watanabe, H., Saitoh, H., Tokuda, G. and Azuma, J.I. (2002) Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**: 777–784.
- Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, **153**: 375–380.

- Ni, J. and Tokuda, G. (2013) Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advance*, **31**: 838–850.
- Nijima, K. (2002) [Making compost from cattle excrement and wood chips [II]]. *Agriculture and Horticulture*, **77**: 368–372 (in Japanese).
- 落 修一・尾崎正明・牧 孝徳 (2008) 草木系バイオマスの組成分析データ集. 土木研究所資料 4095 土木研究所材料地盤研究グループリサイクルチーム, つくば.
- Pittman, G.W., Brumbley, S.M., Allsopp, P.G. and O’Neill, S.L. (2008) “*Endomicrobia*” and other bacteria associated with the hindgut of *Dermolepida albohirtum* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 762–767.
- Ransom-Jones, E., Jones, D.L., McCarthy, A.J. and McDonald, J.E. (2012) The Fibrobacteres: an Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microbial Ecology*, **63**: 267–281.
- Ritcher, P. O. (1958) Biology of Scarabaeidae. *Annual of Revolution and Entomology*, **3**: 311–334.
- Rossmassler, K., Dietrich, C., Thompson, C., Mikaelyan, A., Nonoh, J.O., Scheffrahn, R.H., Sillam-Dussès, D. and Brune, A. (2015) Metagenomic analysis of the microbiota in the highly compartmented hindguts of six wood-

- or soil-feeding higher termites. *Microbiome*, **3**: 56.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees'. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406–425.
- Salazar, C. and Nanny, M.A. (2010) Influence of hydrogen bonding upon the TiO<sub>2</sub> photooxidation of isopropanol and acetone in aqueous solution. *Journal of Catalysis*, **269**: 404–410.
- Schlottke, E. (1945) Über die Verdauungsfermente im Holz fressender Käferlarven. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, **61**: 88–140.
- Scholtz, C. H. and Crowson, S. L. (1995) The evolution of habitat use and diet in the Scarabaeoidea: a phylogenetic approach. In: Pakaluk, J. and Šlipiński, S.A. (eds), *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*, pp. 356–374, Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
- Schäfer, A., Konrad, R., Kuhnigk, T., Kämpfer, P., Hertel, H. and König, H. (1996) Hemicellulose degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *Journal of Applied Bacteriology*, **80**: 471–478.
- Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System*

*Technical Journal*, 379–423.

Shelomi, M., Lin, S.S. and Liu, L.Y. (2019). Transcriptome and microbiome of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) larvae. *BMC Genomics*, **20**: 1–13.

篠田善彦・稲葉政満 (1985) 木材成分の化学, 木材科学実験書 II 化学編, 日本木材学会創立 30 周年記念事業委員会 [編], pp 187–190, 中外産業調査会, 東京.

Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, 163.

Slaytor, M. (2000) Energy Metabolism in the Termite and Its Gut Microbiota. In: Abe, T., Bignell, D.E. and Higashi, M. (eds), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, 10th edition, pp. 307–332, Springer, Dordrecht, Netherlands.

Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*, **195**: 19–23.

Soo Hoo, C.F. and Dudzinski, A. (1967) Digestion by the larva of the pruinose scarab, *Sericesthis geminata*. *Entomokogia Experimentalis et Applicata*, **10**: 7–15.

Stephen, F. A., Thomas, L. M., Alejandro, A. S., Jinghui, Z, Zheng, Z, Webb, M. and Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*, **25**:3389–3402.

- Šustr, V., Stingl, U. and Brune, A. (2014) Microprofiles of oxygen, redox potential, and pH, and microbial fermentation products in the highly alkaline gut of the saprophagous larva of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae). *Journal of Insect Physiology*, **67**: 64–69.
- 竹石英伯 (2006) カブトムシ幼虫腸内微生物叢の解析と応用. 日本大学博士論文.
- Takimura, O., Yanagida, T., Fujimoto, S. and Minowa, T. (2013) Estimation of bioethanol production cost from rice straw by on-site enzyme production. *Journal of The Japanese Institute of Landscape Architecture*, **56**: 150–155. (in Japanese with English abstract)
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725–2729.
- Terra, W.R. (1988) Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **21**: 675–734.
- Terra, W.R. and Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comparative biochemistry and physiology B*, **109**: 1–62.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**:4673-4680.
- Tokuda, G. (2019) Plant cell wall degradation in insects: Recent progress on endogenous enzymes revealed by multi-omics technologies. *In*: Jurenka, R. (eds), *Advances in Insect Physiology*, Volume 57, 1st edition, pp. 97–134, Academic Press, New York.
- Tokuda, G., Tsuboi, Y., Kihara, K., Saitou, S., Moriya, S., Lo, N. and Kikuchi, J. (2014) Metabolomic profiling of <sup>13</sup>C-labelled cellulose digestion in a lower termite: insights into gut symbiont function. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**: 1789.
- Tokuda, G. and Watanabe, H. (2007) Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *FEMS microbiology letters*, **3**: 336–339.
- Veivers, P.C., Musca, A.M., O'Brien, R.W. and Slaytor, M. (1982) Digestive enzymes of the salivary glands and gut of *Mastotermes darwiniensis*. *Insect Biochemistry*, **12**: 35–40.
- Watanabe, H. and Tokuda, G. (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annual of Revolution and Entomology*, **55**: 609–632.

- Watanabe, K., Kodama, Y. and Harayama, S. (2001) Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, **44**: 253–262.
- Wiedemann, J.F. (1930) Die Zelluloseverdauung bei Lamellicornierlarven. *Zeitschrift Für Morphologie Und Ökologie Der Tiere*, **19**: 228–258. (in German)
- Wildbolz T (1954) Beitrag zur Anatomie, Histologie und Physiologie des Darmkanals der Larve von *Mololontha melolontha* L. *Mitteilungen Der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, **27**, 193–239. (in German)
- Wright, E.S., Yilmaz, L.S. and Noguera, D.R. (2012) DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 717–725.
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V. and Gordon, J.I. (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science*, **299**: 2074–2076.
- Yamane, A., Nitto, M. and Shibamoto, T. (1963) Food habit of forest insects (II). The carbohydrate-hydrolyzing enzymes from the larvae of *Shirahoshizo rufescens* Roelofs (in Japanese). *Trans. 74th Meeting Japan Forest Society*, **1**: 345–348.

- Yamane, A., Nitto, M. and Shibamoto, T. (1965) Food habit of forest insects (V). Comparison of carbohydrate-hydrolyzing enzymes from the larvae of wood-boring beetles, Japanese horned scarabaeid, and pine egggar (in Japanese). *Trans. 74th Meeting Japan Forest Society*, **1**: 393–395.
- Yasuda, K. and Hasegawa, N. (1976) [Soil analysis (7.5.1). *Atomic Absorption Analysis*], pp. 302–303, Kodansha Scientific Co., Ltd., Tokyo. (in Japanese)
- 吉田博・佐々木弘子・藤本水石・菅原龍幸 (1996) 担子菌類菌体の化学成分組成. *日本食品化学工学会誌*, **43**(6), 748–755.
- Zhang, H. and Jackson, T.A. (2008) Autochthonous bacterial flora indicated by PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments from the alimentary tract of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Applied Microbiology*, **105**: 1277–1285.
- Zheng, W., Zhao, Y. and Zhang, H. (2012) Morphology and ultrastructure of the hindgut fermentation chamber of a melolonthine beetle *Holotrichia parallela* (Coleoptera: Scarabaeidae) during larval development. *Micron*, **43**: 638–642.
- Zheng, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *Journal of Computational Biology*, **7**:203–14.
- Ziganshina, E.E., Mohammed, W.S., Shagimardanova, E.I., Vankov, P.Y., Gogoleva,

N.E. and Ziganshin, A.M. (2018) Fungal, bacterial, and archaeal diversity in the digestive tract of several beetle larvae (coleoptera). *BioMed Research International*, Article ID 6765438.