

機関番号：42686
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580164
 研究課題名(和文) カブトムシ幼虫の腸内細菌叢

研究課題名(英文) MICROBIAL FLORA IN DIGESTIVE TRACT OF TRIPOXYLUS DICHOTOMA(L.)LARVAE

研究代表者

安齋 寛 (ANZAI HIROSI)
 日本大学短期大学部・生物資源学科・教授
 研究者番号：70168029

研究成果の概要(和文)：カブトムシ幼虫の腸内細菌叢は、1 齢から 2 齢の間に腸内に定着し、その菌叢は、飼料に含まれる多糖類の種類によって変化し、特異的な菌叢が定着することが推定された。カブトムシ幼虫腸内や糞からは、キシランを分解する細菌が単離された。

研究成果の概要(英文)：Intestinal flora of the beetle larva were established between first and second stage of larva. The intestinal flora were changed on the kind of polysaccharide in foodstuff. The intestinal flora specified to the polysaccharide were established in the gut of larva. Xylan degrading alkaliphilic bacteria were isolated from the intestine of beetle larva.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：糖質生化学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：カブトムシ、幼虫、腸内細菌叢、物質循環、飼料組成、成長段階

1. 研究開始当初の背景

(1) 森林において、落葉落枝として林床に供給される有機物は土壤中の微生物や土壌動物により分解され、循環利用されている。特に土壌動物の活動は、摂食活動や糞の排泄により、落葉落枝を断片化し土壌の形成を促進する。熱帯雨林においては、多重共生系(体内に原生生物と共生関係を持つ微生物が共生する)を構築しているシロアリが貧弱な土壌微生物の代わりに物質循環に寄与していると考えられているが、温帯の落葉広葉樹林

での分解者に関する定量的な研究は少ない。

(2) 森林における土壌動物の物質循環への効果を知るための基盤となるのが、その腸内環境とそこに棲息する共生微生物叢である。カブトムシは日本を代表する大型の森林性甲虫であり、その幼虫が森林土壌中で森林の物質循環に及ぼす影響を評価するためには、腸内微生物叢の解析は重要である。

(3) カブトムシの終齢幼虫を使った実験結果から、幼虫は腸内環境を調節して腸内細菌叢をコントロールし、餌料中の多糖成分を分

解・発酵させてエネルギーを得ていると考えられた。しかし、幼虫が孵化してからどの段階で腸内細菌叢が定着し、成長過程においてどのように細菌叢が変化していくかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

カブトムシ幼虫のライフサイクルにおける腸内細菌叢の変遷を追跡調査し、森林の物質循環に作用する森林性昆虫の機能を理解する一助とする。

3. 研究の方法

カブトムシ幼虫の腸内細菌叢の変化を成長段階と飼育環境（飼料）を切り替えることにより追跡し、腸内環境の測定と合わせて、カブトムシ幼虫の腸内細菌叢が定着する過程を明らかにする。

(1) 成長段階による変化：腐葉土を飼料とし、同一飼育環境で、初齢幼虫から2齢、3齢幼虫と生長するに従い変化する腸内細菌叢を、飼育環境である腐葉土及び、糞中の細菌叢と併せてPCR-DGGE法並びにT-RFLP法で解析する。腐葉土で飼育したカブトムシ幼虫について、1齢は腸管全体を、2齢幼虫は腸管を中腸・後腸の2分割に、3齢幼虫は腸管を10分割(中腸7分割・後腸3分割)にし、各部位から内容物と腸管壁に分離してDNAを抽出した。次に16S rDNAをT-RFLP用蛍光プライマーを用いてPCR増幅し、1000bpの増幅断片を精製後、再PCRを行ってから制限酵素Bsl Iで消化した断片のプロファイルから細菌叢を推定した。

(2) 飼料組成による変化：3齢幼虫を腐葉土に含まれる特定の多糖類を添加した飼料で飼育した場合の腸内細菌叢の変化を解析する。飼料として腐葉土だけを餌としてカブトムシ幼虫を飼育した飼育箱中の残渣を篩で分けとり、これを基材として、セルロース(β-1,4-グルカン)、カードラン(β-1,3-グルカン)、バーチウッドキシラン(β-1,4-キシラン)、ヒラミルマンナン(β-1,4-マンナン)の粉末をそれぞれ別に5%添加した粉末飼料を調製した。3齢幼虫を各飼料で36日間個別に飼育した。対象として基材と腐葉土を用いた。飼育終了後、幼虫を解剖し、中腸と後腸に分割してDNAを抽出した。次に(1)と同様な方法で16S rDNAをT-RFLP用蛍光プライマーを用いてPCR増幅し、1000bpの増幅断片を精製後、再PCRを行ってから制限酵素Bsl Iで消化した断片のプロファイルから細菌叢を推定した。

(3) 優占化細菌の単離・分類と機能：0.5%のキシランまたはグルコースを含むアルカリ性培地(pH10)を用い、好气的条件下

でカブトムシ幼虫の腸管から細菌を単離した。

4. 研究成果

(1) 成長段階による変化：各成長段階で幼虫を飼育した腐葉土から得られたT-RFLPのプロファイルはほぼ同一で、生育の場でありかつ飼料である腐葉土の細菌叢はほぼ変化しないことが確認された。(図1)

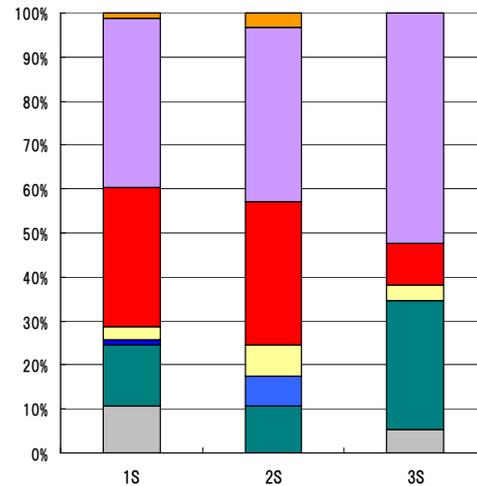


図1 飼育土（腐葉土）中の細菌叢

1S：1齢幼虫用、2S：2齢幼虫用、3S：3齢幼虫用

腐葉土の中で生育した3齢幼虫の腸管を10分割した場合の細菌叢をPCR-DGGE法とT-RFLP法で併せて解析を行ったところ、中腸と後腸ではそのパターンが異なるが、腸管内容物では、中腸に共通の特異的ピーク(菌種不明の7600TU)が検出され、その他にLactobacillales目が検出された。後腸では主にBacteroides、Clostridium、Bifidobacteriumの各属が検出された。

(図2)

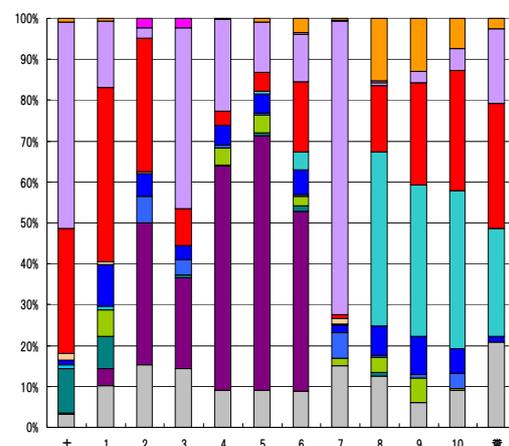


図2 カブトムシ3齢幼虫の腸内細菌叢(10分割の内容物)

腸管壁では、中腸において菌種不明の 9400TU(*Clostridium* subcluster X I V a、Enterobacteriales 目)と Lactobacillales 目が検出され、後腸では腸管内容物と同様の菌種が検出された。(図 3)

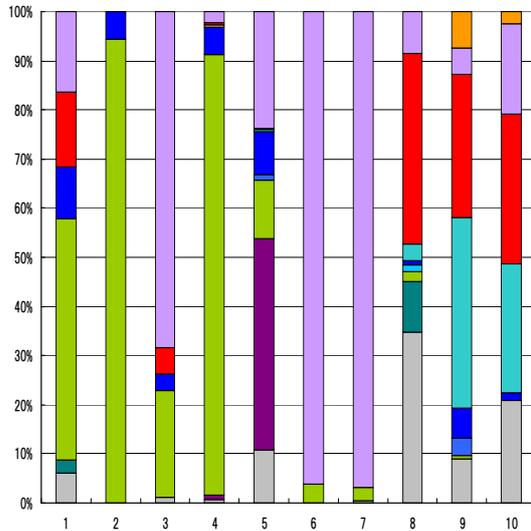


図 3 カブトムシ 3 齢幼虫の腸内細菌叢 (10 分割の腸管壁)

この結果は、PCR-DGGE 法やクローニングの結果と一致していた。また、腸管内の環境(酸素濃度・pH等)により、細菌のすみわけがされていることが改めて示唆された。

2 齢と 3 齢幼虫を比較すると中腸、後腸それぞれでパターンが類似しており、2 齢では既に 3 齢と同じ細菌叢が定着していると推定された。(図 4)

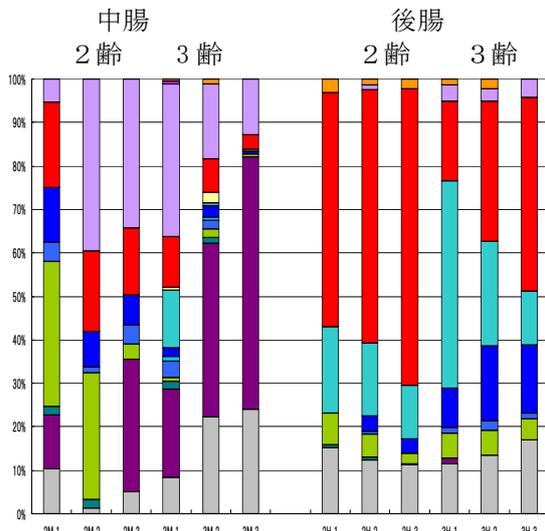


図 4 カブトムシ幼虫の腸内細菌叢 (中腸と後腸内容物の 2 齢と 3 齢の比較)

これに対し、1 齢幼虫は 2 齢、3 齢幼虫の後腸のパターンと類似していることから、腸内細菌叢が 1 齢の期間に大きく変化し、特異的ピークを示す細菌が定着すると推定された。(図 5)

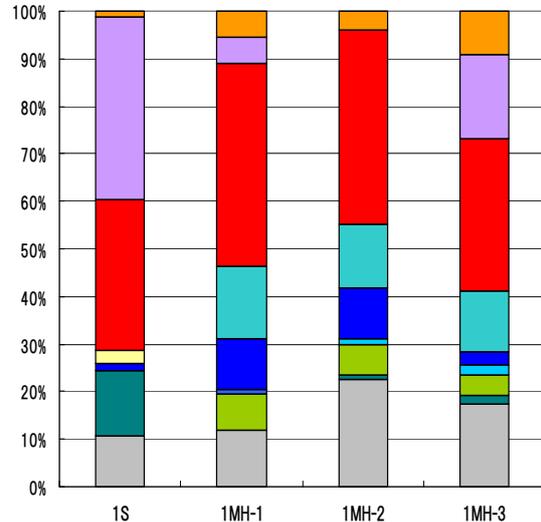


図 5 カブトムシ 1 齢幼虫の腸内細菌叢 1 S:腐葉土、1 MH:1 齢幼虫腸管

現在、より詳細な実験を行う為、卵から 1 齢、2 齢までの腸内細菌叢の解析を計画している。

(2) 飼料組成による変化: カブトムシの 3 齢幼虫にセルロース、カードラン、キシランを 5% 添加した飼料を 36 日間投与し、その腸内細菌叢を腐葉土を飼料とした場合と比較した。中腸では、セルロース、カードランを添加した場合、Lactobacillales 目が顕著に優占化したのに対し、キシランでは 760 OTU に出現する未同定の菌が優占しており、腐葉土と類似した菌叢を示した。

Lactobacillales 目の構成は、カードランとセルロースで異なり、中腸では β -1,3-グルカナーゼ活性が強くセルラーゼ活性が検出されないこととの関連性が推定された。

後腸では *Bacteroides* 属と *Clostridium* 属が優占化する傾向は飼料の組成によらず共通しているが、*Clostridium* 属の cluster 構成がセルロースとカードランでは異なっていた。また、後腸では、キシランを添加した場合、*Bifidobacterium* 属が優占化する傾向が見られた。(図 6)

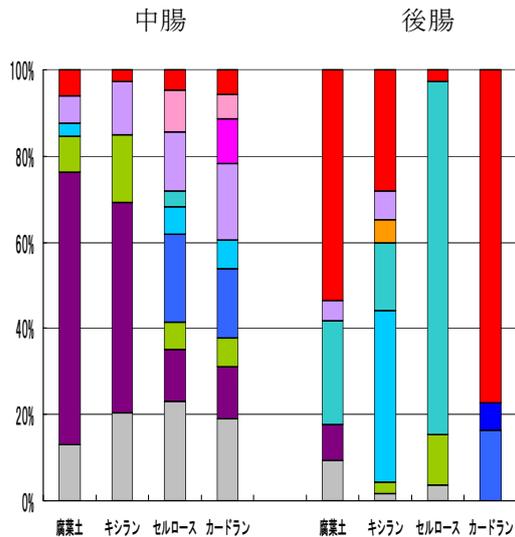
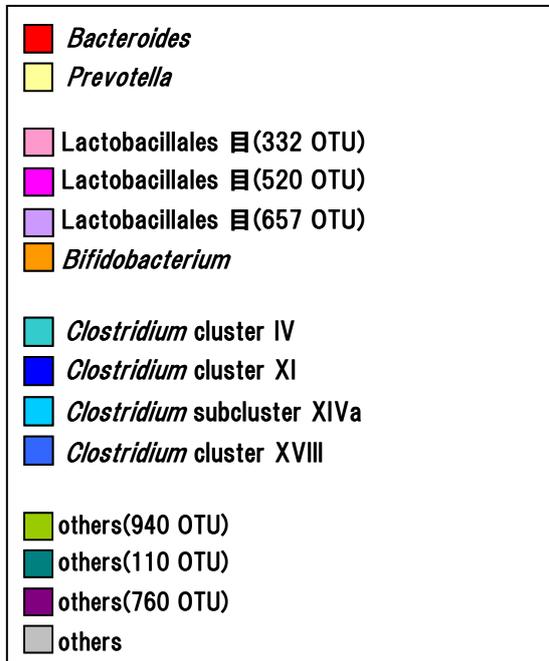


図6 カブトムシ幼虫腸内細菌叢の餌料による変化

以上の結果は、添加した多糖類の構成単糖がセルロースとカードランがグルコースであるのに対し、キシランではキシロースであること、腐葉土を餌料とした幼虫の中腸内容物の不溶性多糖類の構成単糖はキシロースが最も多いことから、摂取する多糖類の構成単糖の組成がカブトムシ幼虫の腸内細菌叢に影響していることが示唆された。



なお、図中の凡例は上記の通りである。

(3) 優占化細菌の単離・分類と機能：研究分担者(砂入)が、カブトムシ幼虫の腸内から好アルカリ性のキシラナーゼ生産菌(

Bacillus trypoxylicola) を単離した。この細菌は好気性のグラム陽性桿菌で、遊走性は無く、胞子を形成し、30℃、pH9.0 で良く増殖した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Tomoko Aizawa, Makoto Urai, Noriyuki Iwabuchi, Mutsuyasu Nakajima,

Michio Sunairi

Bacillus trypoxylicola sp. nov., xylanase-producing alkaliphilic

bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae

(*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 査読有り(2010), 60:61-66

[学会発表] (計3件)

①和田 典子、竹石 英伯、岩淵 範之、砂入 道夫、中嶋 睦安、安齋 寛：カブトムシ幼虫腸内細菌叢の成長段階による変化、日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011/03/27, 京都

②和田 典子、竹石 英伯、岩淵 範之、砂入 道夫、中嶋 睦安、安齋 寛、カブトムシ幼虫腸内細菌叢の餌料組成による変化、日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010/03/28, 東京

③和田 典子、竹石 英伯、岩淵 範之、砂入 道夫、中嶋 睦安、安齋 寛、カブトムシ幼虫の腸内環境と微生物叢の部位別変化-代謝とPCR-DGGE解析-日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009/03/28, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安齋 寛 (ANZAI HIROSI)

日本大学短期大学部・生物資源学科・教授
研究者番号：70168029

(2) 研究分担者

岩田隆太郎 (IWATA RYUTARO)

日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：90213298

砂入道夫 (SUNAIRI MICHIO)

日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：80196906