

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24657017

研究課題名（和文）地下性甲虫の飼育法検討及び昆虫－微生物相互作用に関する基礎研究

研究課題名（英文）Basic studies on insect-microbial interaction of the hypogeal beetle and development of their breeding method

研究代表者

新部 一太郎（NIIBE, Ichitaro）

島根大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：10613961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：地下性甲虫の一種であるタイシャクナガチビゴミムシを飼育下で安定して生存させるための要素として生息地で優占する微生物の関与が示唆された。本種は抗生物質の施用によって生存期間が延長し、また糖質の餌よりも肉質の餌によって安定して生存した。抗生物質、肉質餌の双方がない場合でも生息地の土壌を飼育系に導入することで類似した効果が見られたことから生息地の微生物が抗生物質と良質の栄養源を供給している可能性が高い。特に微生物が自身のために生産した抗生物質を甲虫が一方的に利用するという新たな共生関係について言及した。

研究成果の概要（英文）：It was suggested that the stable surviving of *Trechiana yokoyamai*, a hypogeal beetle, depend on the microorganisms dominating their habitat. The survival time of the beetle was extended by introducing antibiotic to their breeding substrate and survival stability was supported by animal origin food than sugar base food. The soil of their habitat including few microbes could alternate the effect of antibiotics and animal origin food for the beetles survival. Especially, I referred the new commensal relationship between beetles and microorganisms that is the beetle depends on the antibiotics produced by the microorganisms for oneself.

研究分野：生態学

キーワード：地下性甲虫の飼育 昆虫微生物相互作用 必須栄養素の供給 抗生物質の生産

1. 研究開始当初の背景

申請者らが行ってきた地下性甲虫の生態学的研究から、彼らは形態上の適応のみならず生態的にも適応が進んでいることが明らかになりつつあった。例えば、地下性甲虫を野外ケージで飼育した場合には2年以上の寿命が確認できたのに対して実験室下での飼育では数か月しか生存しなかった。このことは彼らの生育に必要な要素が地下空間に特異的であることを示唆している。一方で地下空間には特定の微生物が優占している場合が多いことが見出されたが、これには抗生物質などの他種の生育を排除する仕組みが関与していると思われる。申請者はこうした地下に特異的な微生物やその生産物が甲虫の必須栄養素であったり、あるいは免疫系を補完して感染症を抑止することに関係しているのではないかと考えた。

古くから地下水性のヨコエビが滅菌環境下で生存できないことは知られており、微生物による必須栄養素の供給について言及されていた⁽¹⁾。地下性甲虫に関しては調査されていないが同様の可能性が考えられる。また、昆虫と微生物の共生関係は様々な場面で見られることから地下空間における特異的な共生関係があったとしても不思議ではない。ただし、寄主微生物によって宿主の免疫が補完されているのではないかという仮説は一般的ではない。

洞窟などの地下空間は一見すると特殊だが地球上の至る所に存在し、そこに生息する節足動物と微生物の相互作用も広く共通していると思われることから、その解明は地上での関係についても新たな視点をもたらす可能性がある。一方で地下空間での調査には困難が多く多数のサンプルを得ることも難しいため地下性甲虫と微生物の生態、その相互作用についての研究はほとんど進んでいない。申請者はそのような問題点を解消しながら地下における昆虫と微生物の相互作用について解明することを目指した。

2. 研究の目的

地下性甲虫と微生物の相互作用を調べる上で大きな問題点は、多くの場合で対象の甲虫が希少であり、野外個体群を利用しての大規模な試験ができないことである。仮に地下性甲虫の飼育手法を開発して今後の研究材料を飼育下で安定的に得られれば問題の一つは解決できる。したがって、第一の目的は地下性甲虫の飼育法を確立することである。また、実験室下での飼育手法を検討することは地下空間と人工的な飼育系の差異を明らかにすることであり、彼らの生態・相互作用を追跡することも目的に含まれる。具体的には、物理環境の違い、共存する微生物の違い、栄養条件の違いが生存に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。加えて生存に影響のある微生物についてもより詳細に解析し、共存のメカニズムを追跡する。

3. 研究の方法

・研究対象として中国地方の地下空間に広く分布しているタイシャクナガチビゴミムシ *Trechiana yokoyamai* を用いる。地下性甲虫の中では大型(体長6mm程度)で生息数が多く、1日で数十個体のサンプルを採集可能であることから、本種を選定した。

(1) *T. yokoyamai* の飼育下での生存に必要な条件の探索

本種の飼育条件について、生息地の湿度が90%RH以上で安定しているのに対して実験室下では湿度がコントロールできていないことから、各温度帯で高湿度を維持できる飼育装置を作成し、温湿度の違いが生存に及ぼす影響について検証した。飼育床はすべて乾いた濾紙とした。

生息域の温湿度を模した環境(12/85%RH)が整ったのち、栄養条件の違いが生存に及ぼす影響を確認滅菌したジャガイモ寒天培地と肉食魚の餌を給餌して体重の推移と生存期間を追跡した。このとき飼育床材として洞窟土壌を用いたが、これが栄養源として使われる可能性があったためろ紙を使用した区も設けた。

体内への共生も含め微生物による生存期間への影響を検証するため抗菌剤抗真菌剤(ゲンタマイシン 0.5mg/mg; アムホテリシン B5ug/mg; テトラサイクリン 50ug/mg 混合液を飼育床に噴霧)し、微生物の関与を排除した場合の生存期間を追跡した。

生息域の微生物が生産した物質が抗生物質や高栄養餌として実際に機能しているかどうかを確かめるために、の実験を生息域土壌や微生物抽出物に置き換えて実験を行った。

(2) 地下微生物の分類群特定と単利培養

地下性甲虫の生存に関与していると思われる微生物について、生息地土壌の微生物フローラをキノンプロファイル法とPCR-DGGE法を用いて解析し、分類群を特定する。

各種選択培地を用いてで特定された微生物の単利培養を試みる。

(3) *T. yokoyamai* の繁殖にかかわる因子の追跡

野外個体群の繁殖周期を明らかにすることによって飼育下で生存可能になった個体を繁殖させるために必要な因子について推測する。

4. 研究成果

(1)

通常のインキュベーターで高湿度を維持すると多くの場合は結露が生じ、これは生存に悪影響であった。インキュベータを無風式として、個別ケージを透湿防水紙で覆うことによってこの問題を解決し、高湿度の飼育環境を創出した。これを用いて各温湿度で野外で採集した個体を餌なしで飼育したところ

表 1 のように顕著な違いは見られなかった。湿度 60%以下では長期間生存した個体が見られないがそれ以外の温湿度区では個体差のほうが大きかった。このことから飼育系の温湿度は 60%RH 以上の安定した湿度条件であれば多少の変更は障害にならないと思われる。

表 1 様々な温湿度下での *T. yokoyamai* の生存日数

	85%以上	85-60%	60%以下
6℃	32d; 24d; 66d		
12℃	Ave. 28.7d		
18℃	10d; 36d; 24d	44d; 12d; 16d	
24℃	18d; 20d; 38d	12d; 34d	24d; 18d; 20d

※各数値は生存日数。12℃85%以上はサンプル数が多いため平均値

餌の違いによって生存期間に大きな差は見られなかったが肉質餌では初期の体重増加が認められた。また、糖質餌とろ紙の飼育床の組み合わせは生存に悪影響を及ぼした(図 1)。実験室下であっても生息地である洞窟の土壌を導入することで生存期間が延びたことからそこに含まれる物質がそれによって維持される環境要素が生存にとって必要であることが予想される。

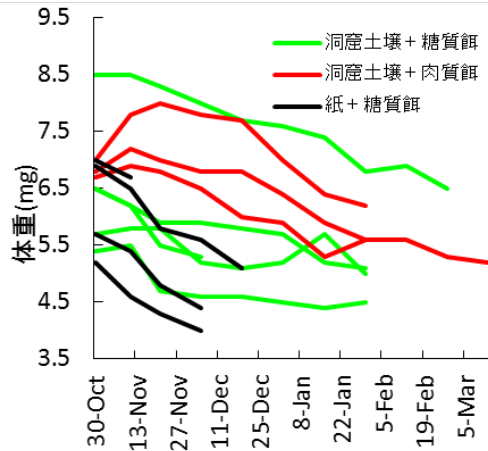


図 1 餌と飼育床の違いが *T. yokoyamai* の体重変化および生存期間に及ぼす影響

飼育系への抗生物質の施用は餌質の違い以上に生存期間を延長した(表 2)。採集可能な個体数に限りがあるため各区のサンプル数が十分ではないが、生存期間が短かった飼育床材が腐葉土(未滅菌)とガラス濾紙の区画で特に顕著に効果が見られた。また抗生物質を施用した上で肉質餌を給餌した場合がもっとも生存期間が長くなった。抗生物質の影響は予想よりも大きく、実験室下で外来の微生物による感染を受けて死亡が早まっている可能性が示唆される。また試験に続いて、肉質餌による生存期間延長が再確認されたことと洞窟土壌を導入した区では餌がなくても短期の死亡が見られないことから肉質餌と洞窟土壌に共通して含まれる栄養素

が生存に必要な栄養の一部であることが推測される。

表 2 抗生物質の施用と餌質及び飼育床の違いによる *T. yokoyamai* の生存期間(月)

	餌				
	無	糖質	肉質	肉質+ 抗生物質	糖質+ 抗生物質
腐葉土	0.7±0.3 (n3)	1.1±0.3 (n3)	0.8±0.3 (n3)	3.8±1.3 (n3)	0.8±0.2 (n3)
ガラス濾紙	1.4±0.3 (n4)	---	2.4±1.6 (n4)	7.8±3.1 (n6)	2.7±0.8 (n3)
洞窟土壌	3.4±1.8 (n6)	4.1±0.9 (n4)	4.8±1.1 (n5)	5.1±2.1 (n3)	3.7±2.3 (n3)

餌を与えなかった場合にも生の洞窟土壌を導入した区では比較的生存期間が長くなった(表 3)。これを滅菌してしまうと効果が弱まる傾向があることから、滅菌によって失われる成分が生存に必要なと思われる。図 2 にあるような地下空間に頻繁に見られる放線菌を 50%エタノールで破碎抽出して滅菌下で脱アルコールした抽出液は試験で施用した抗生物質と類似する効果を示した。このことから地下の放線菌が抗生物質等の生理活性物質を生産している可能性が示唆される。

表 3 生息地土壌及び微生物抽出物施用時の *T. yokoyamai* の生存期間(月)

	餌		
	無	糖質	肉質
腐葉土	0.7±0.3 (n3)	1.1±0.3 (n3)	0.8±0.3 (n3)
生の洞窟土壌	3.4±1.8 (n6)	4.1±0.9 (n4)	4.8±1.1 (n5)
滅菌洞窟土壌	1.8±0.9 (n3)	1.8±0.8 (n3)	3.2±1.6 (n4)
ガラス濾紙	1.4±0.3 (n4)	---	2.4±1.6 (n4)
ガラス濾紙+ 放線菌破碎物	1.2±0.5 (n3)	---	4.3±0.6 (n4)



図 2 地下空間に見られる放線菌類

上記の結果は、地下空間において微生物の生産する物質が甲虫にとって重要な栄養源であり、また微生物自身のために生産している抗生物質等を甲虫が免疫系の不足を補うために利用しているという仮説を支持している。どの栄養素を微生物に依存しているのか、といった点を追及する必要はあるが、地下水性ヨコエビでの指摘¹⁾があってから半世紀以上を経て実験的に確認した意義は少なくないだろう。また、微生物の生産する抗生物質のいわばおこぼれにあやかるという共生関係の発見は本研究の大きな成果である。

(2)

T. yokoyamai の生息地から持ち帰った土壌をキノプロファイル法を用いて群集解析したところ多くのサンプルで MK-9 が優占する単純な群集であることがわかった。また PCR-DGGE 法による遺伝子レベルでの解析ではメジャーバンドは3本に集約され、これらのうち少なくとも2つは *Flankia* 属の細菌と相同性の高い塩基配列を持っていた。*Flankia* 属の細菌は非マメ科植物と根粒を形成することでも知られるが、空中窒素の固定に関わる遺伝子も保持している。本研究とは別に洞窟壁面の微生物群集の窒素安定同位体比を追跡したところ、大気中の同位体比と近い値が得られたことから、地下空間で微生物によって空中窒素が固定されていると思われる⁽²⁾。従って地下微生物が甲虫に供給している栄養素の一つは有機体の窒素である可能性が考えられる。

地下で優占する微生物についてより詳細に機能解析するために種々の選択培地を用いて土壌からの単離培養を試みたが、PCR-DGGE 法で得られたメジャーバンドと合致する配列を持つ細菌は研究期間内に単離することはできなかった。甲虫の飼育に微生物の関与が考えられることから、飼育系をより確実なものにするためには今後も単離に向けた試行錯誤は必要だろう。

(3) *T. yokoyamai* の繁殖に関する情報を得るため、野外個体の卵巣発育を時期ごとに調査したところ、明確な同調性は見られなかったが4-10月頃に発達した卵巣を持つ個体が多くみられた(図3)。また、新成虫は11月から増え始めることと4月頃に個体の移動分散が見られることが先の野外個体群の調査から明らかになっている。これらのことから「春」に相当する刺激は飼育下での繁殖にとっても重要であると考えられる。地下空間の気温は安定的だが場所によっては冬期と春期で5程度の差異が生じる場合もある。そこで、交尾後の個体に低温刺激(5あるいは10・2週間)を与えてその後の産卵行動と卵巣発達を追跡したが、卵巣発達も産卵に関する行動も見られなかった。過去の調査から洞窟においては「春」に一過的な流入有機物の増加が起こることがわかっており⁽³⁾、これをキューとして利用する水生生物も知られている⁽⁴⁾。今後はそうした観点からも刺激を与えてはどうかと考えている。

本研究の一番の目的は *T. yokoyamai* を飼育下で増殖させて生態研究のための材料を供給することであるが、その目的に対しては道半ばと言わざるを得ない。当初よりも生存期間は大幅に延長し、微生物との関係性についても明らかになってきたが、繁殖に関する習性のいくつかが未解明で、飼育下での次世代の生産にたどり着く前に研究期間満了と

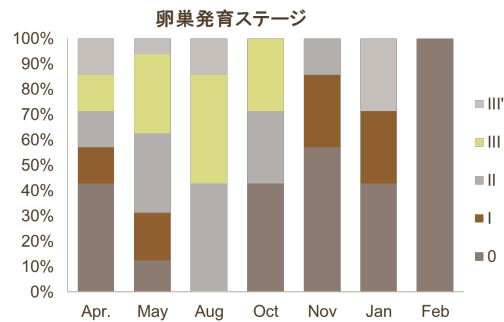


図3 *T. yokoyamai* 野外個体の卵巣発育状況。0は未発達、IIIが成熟卵 III'は黄体が観察された卵巣。

なった。しかしながら、昆虫と微生物の相互作用に関する新しい視点を示し、次なる課題を整理したことで、萌芽期の研究として一定の役割を果たせたのではないかと考えている。

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 件)

〔学会発表〕(計4件)

新部一太郎、卵巣発達から見るタイシャクナガチビゴミムシ *Trechiana yokoyamai* の繁殖周期、日本洞窟学会 41 回大会、2015 年 10 月 30 日 - 11 月 2 日、高知県土佐山田町龍河荘

新部一太郎、タイシャクナガチビゴミムシ *Trechiana yokoyamai* の飼育系に対する抗生物質等の影響、日本洞窟学会 40 回大会、2014 年 9 月 5 - 6 日、長崎県西海市西海公民館

新部一太郎、洞窟生態系における微生物の役割 - 特に動物群集との関係について - 、日本洞窟学会 39 回大会、2013 年 11 月 16 - 17 日、東京都新宿区ミスペース会議室

新部一太郎、タイシャクナガチビゴミムシ *Trechiana yokoyamai* の生存に関与する微生物学的な要素、日本昆虫学会 73 回大会、2013 年 9 月 14 - 16 日、北海道札幌市北海道大学札幌キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新部 一太郎 (NIIBE Ichitaro)
島根大学・生物資源科学部・研究員
研究者番号：10613961

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし