

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22317

研究課題名(和文)腸内細菌に由来する匂いは昆虫の社会を司るか? - アリを題材に -

研究課題名(英文)Do odors derived from gut microbiota regulate insect society?: the case of ants

研究代表者

濱口 京子 (Hamaguchi, Keiko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：60343795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の社会行動に腸内細菌叢に由来する匂いが関与する可能性が指摘されているが、その実証研究は殆ど進んでいない。本研究では、好蟻性昆虫が、アリ巣に住み込むための化学擬態の一部に腸内細菌叢に由来する匂いを利用している可能性に着目し、その素地となるような腸内細菌叢の共通性が両者間に認められるかを検証した。その結果、同巣のアリと好蟻性昆虫の間には、腸内細菌叢の共通性はほぼ見られず、本研究で用いた好蟻性昆虫は化学擬態に腸内細菌を利用していないと考えられた。また腸内細菌に由来する匂いが、アリでは未開拓の揮発性成分である可能性に注目し、揮発性成分の捕集を試みたが、本研究では解析に足る量を捕集できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アリと好蟻性昆虫との間に腸内細菌が介在する同巣認識システムが存在する可能性は低いことを示した。この結果は、昆虫の社会行動における腸内細菌の寄与、という黎明期にある研究分野において、今後の研究の方向性を示す実証例の一つとしての意義を持つ。また、16Sアンプリコンシーケンスを行うと細胞内共生微生物が優占して腸内細菌叢を把握しにくいという、昆虫ではしばしば生じうる問題について、これを軽減できる可能性のある実験手法を考案した。揮発性物質の捕集については具体的な成果が得られなかったが、問題点の抽出ができたので、さらなる研究への利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that the social behavior of insects may be regulated by hosts' gut microbiota through the chemicals derived from the microbiota. Based on this argument, we hypothesized that 1) myrmecophilous insects use the odors derived from their gut microbiota to chemically mimic their host ants, and 2) the odors contain volatile compounds. To test first hypothesis, we examined the gut microbiota of myrmecophiles and their host ants, and compared them using metagenomic analysis. However, their microbiota did not show commonality, suggesting that the myrmecophiles do not use the gut microbiota for chemical mimicry, i.e., the first hypothesis was rejected. Thereafter, we attempted to collect the volatile substances from ants and their nests, but the amount of obtained substances was not sufficient to apply them to the subsequent analysis. Therefore, to test the second hypothesis, the collection method of volatiles should be improved.

研究分野：森林昆虫学

キーワード：アリ 好蟻性昆虫 社会性 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌は、医学・健康分野で近年大変注目され、研究が進められている。なぜならば、腸内細菌は人間の生理的機能に著しく寄与しており、その役割の多様さと重要さは想像以上だからである。さらに、腸内細菌に由来する“匂い”は人間の行動やコミュニケーションにも深く関与していることが、最近では明らかにされてきている。

一方、昆虫においては、行動やコミュニケーションに腸内細菌に由来する“匂い”が寄与するか否かについては、シロアリの巣仲間認識¹⁾やショウジョウバエのメイトチョイス²⁾で時代に先駆けた実証研究が数例あり、このテーマの将来性も予測されている³⁾。しかし関連する実証研究が散見されるようになったのは、メタゲノム解析のハードルが大幅に下がったここ数年であり、まだこの視点の方向性を見通せるような実証例は報告されていない。

社会性昆虫であるアリに注目すると、アリがケミカルコミュニケーションの手段として用いる「体表炭化水素型」に腸内細菌が関与するとの仮説があり、それに基づいた研究が2～3報告されているものの、両者の関係はまだはっきりしない。また、不揮発性の「体表炭化水素」とは別に、腸内細菌に由来する「揮発性物質」が、家族臭としてアリの同巣認識に作用する可能性も充分考えられるが、アリの同巣認識における「揮発性物質」の研究自体がまだ殆ど行われておらず、ましてや腸内細菌の関与については全く研究されていない。

昆虫、特に社会性昆虫において、“匂い”がコミュニケーションに果たす役割は極めて大きいため、これに腸内細菌が関与しているとすれば、その社会行動の進化を読み解きなおせるほどの新たな視点になるはずである。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢に由来する匂いが、昆虫の社会行動に寄与しているか否かを明らかにすることを究極的な目標として、その第一ステップとなる研究を行う。アリの同巣認識に注目し、腸内細菌叢の類似性が同巣認識に及ぼす影響について、腸内微生物叢解析および匂い物質の分析を通して検証する。

(1) アリと好蟻性昆虫との腸内細菌叢比較

好蟻性昆虫とは、アリの巣空間、餌、防衛力などを利用して生活する昆虫を指し、幅広い分類群に存在する。それらとアリとの親密度には種間差があり、巣内を逃げ回って過ごす種がある一方で、巣仲間として認識されて口移しの栄養交換を行う種もあり、ホストに化学擬態することが知られている種もある。同じ居住空間で生活することを通して、腸内細菌叢の共有、ひいては“匂い”の共有が生じ、同巣認識の一助となる可能性は充分にある。そこで、アリとアリの巣に住みこむタイプの好蟻性種を材料とし、両者の間に腸内細菌叢の共通性が認められるかを検証する。アリ 好蟻性昆虫ペアを複数種にわたって網羅的に比較検討することにより、腸内細菌叢の共有の是非に関する全体像をつかむ。

(2) アリ由来の揮発性匂い物質の捕集

抗生物質処理実験や、各種素材による捕集を通して、揮発性物質と腸内細菌叢との関係にアプローチする。

3. 研究の方法

(1) アリと好蟻性昆虫との腸内細菌叢の比較

アリとその巣に住み込む好蟻性昆虫を野外から採集し、-20℃、99.5%エタノール内で保存した。5%次亜塩素ナトリウムで1分間滅菌処理後、滅菌水で3回洗浄した。顕微鏡下で解剖し、Qiagen PowerSoil Pro kit を用いて腸内容物と腸管部分から別々に DNA を抽出した。16S リボソーム RNA 遺伝子の V3/V4 領域を増幅し、外注(生物技研)にて、16S アンプリコンシーケンス(細

菌叢解析)を行った。非計量多次元尺度法 (NMDS) および直接比較により、各材料種間の腸内細菌叢の類似性を比較した。

(2) アリ由来の揮発性匂い物質の捕集

アリの同巣認識に寄与する揮発性物質の捕集法を開発するとともに、揮発性物質生産に腸内細菌が関与するかを明らかにするために、以下の実験を行った。

ヒラアシクサアリのワーカー50匹ずつを入れた区を5つ作り、抗生物質(ペニシリン-ストレプトマイシン)濃度を0, 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/mLになるように加えたシヨ糖液を与え、アリが接触できないように金属メッシュで二重に覆った捕集剤(MT)を設置した。週に一回、死亡したワーカー数をカウントしながら一か月飼育し、1か月後に捕集剤を回収し、ガスクロマトグラフ分析(GC-FID および GC-MS)にて匂い成分の解析を行った。

クロナガアリの野外巣と結婚飛行シーズンに採集した女王、ワーカー、オス、およびクロナガアリの通常の時期の巣、それぞれについて、吸着剤(TA)と捕集剤(MT)によって、揮発性の匂い成分の捕集を行った。また固相マイクロ抽出法 SPME を用いた捕集も試みた。各捕集物はガスクロマトグラフ分析で揮発性成分の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) アリと好蟻性昆虫との腸内細菌叢比較

野外から採集した、8ペアのアリ-好蟻性昆虫を材料とした(表1)。

16S アンプリコンシーケンスの結果、アリから得られる菌由来の OTU 数(OTU:類似性の高い配列群を一つにまとめたもの。“種”の代用となる。)は 16.2 ± 5.7 (SE) と非常に少なかった。さらに、アリおよび好蟻性昆虫では *Wolbachia* などの細胞内共生微生物の感染率が比較的高いことが報告されている

が、本研究でも、腸管全体で解析を行うと、サンプルによっては細胞内共生微生物の OTU がそのほとんどを占め、腸内微生物叢を把握できないという問題が生じた(図1)。

そこで腸管と腸内容物に分けて解析したところ、サンプル数が少なく有意ではないものの、腸内容物では腸管よりも細胞内共生微生物の OTU 率が抑えられて腸内細菌の OTU 種数をより多く得られる例が見られたので、本研究では全てのサンプルについて腸管と腸内容物にわけて解析を行うことにした(図2)。

16S アンプリコンシーケンスの結果の一部を図3に示す。腸内細菌叢は昆虫の分類群ごとにまとまる傾向にあった(PERMANOVA, $p < 0.01$)。また、OTU レベルで直接比較したところ、2例を除いては、同巣のアリと好蟻性昆虫が菌の OTU を共有する例はなかった。

表1. 16Sアンプリコンシーケンスを行ったサンプル

アリ	好蟻性昆虫
アシナガキアリ <i>Anoplolepis gracilipes</i>	シロオビアリヅカオオロギ <i>Myrmecophilus albicinctus</i>
カワラケアリ <i>Lasius sakagamii</i>	クボタアリヅカオオロギ <i>Myrmecophilus kubot</i>
クロオオアリ <i>Camponotus japonicus</i>	クボタアリヅカオオロギ <i>Myrmecophilus kubotai</i>
トビロシワアリ <i>Tetramorium tsushimae</i>	クボタアリヅカオオロギ <i>Myrmecophilus kubotai</i>
トビロケアリ <i>Lasius japonicus</i>	マダラマルハヒロスコガ <i>Ippa conspersa</i> (巢外)
トビロシワアリ <i>Tetramorium tsushimae</i>	アリヅカムシの仲間 <i>Pselaphinae</i>
ハヤシクロヤマアリ <i>Formica hayashi</i>	ヨコヅナアリヅカムシ <i>Batrissodellus palpalis</i>
ハヤシクロヤマアリ <i>Formica hayashi</i>	トゲアリスアブ <i>Microdon oitanus</i>

比較対象として、自由生活性コオロギ(エンマコオロギとマダラスズ)も解析した。

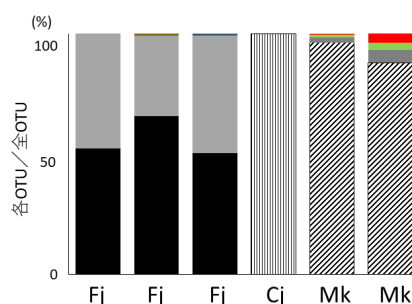


図1. 16Sアンプリコンシーケンスにおける細胞内共生微生物の検出率
Fj: クロヤマアリ、cj: クロオオアリ、Mk: クボタアリヅカオオロギ
■: *Wolbachia*、■: *Entomoplasmatales*、□: *Blochmannia*、▨: *Rickettia*、カラー部分: 腸内細菌

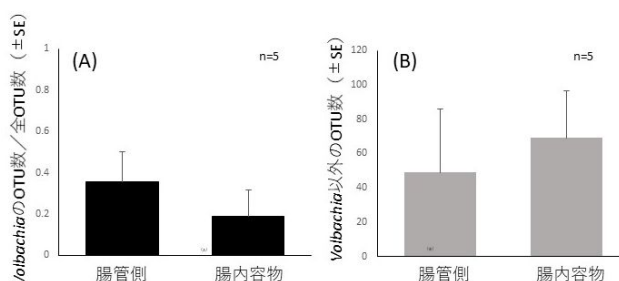


図2. 腸管と腸内容物に分けて16Sアンプリコンシーケンスを行った場合の *Wolbachia* の検出率

(A) 各サンプルの全OTUに占める *Wolbachia* のOTUの割合、
(B) 各サンプルで得られた *Wolbachia* 以外のOTU数。

以上のことから、アリと好蟻性昆虫との間には腸内細菌叢の普遍的な類似性は認められず、好蟻性昆虫がアリの巣に住み込むにあたって、腸内細菌叢の共通性を利用している可能性は非常に低いと考えられた。なお、OTUを共有した2例とはクボタアリヅカコオロギ vs クロオオアリおよびトゲアリスラブ vs ハヤシクロヤマアリであり、前者は2つのOTUが、後者は3つのOTUが共通であった。相同性検索 (BLAST) を行ったところ、これらの OTU 配列はいずれも昆虫との共生関係が示唆されている菌と相同性が高く、細胞内共生微生物も含まれると思われた。これらの菌がアリと好蟻性昆虫との社会的関係に寄与している可能性は低いと推察されるが、共有に至る仕組みや普遍性、共有する意義については今後の研究テーマとして興味をもたれるところである。

それ以外の知見として、同じコオロギ上科でも、自由生活性のコオロギ (エンマコオロギ、マダラスズ) と好蟻性のアリヅカコオロギとでは大きく腸内細菌叢が異なった。一方、結果には示さなかったが、アリヅカコオロギからは、ヤマアリ属のアリと、“属レベル”で共通する菌 (Lactobacillus 属) (OTU レベルでは異なる) が主要な菌の一つとして検出された。これは、食生活の類似が、機能的に類似した腸内細菌叢の維持をもたらす例と推察された。

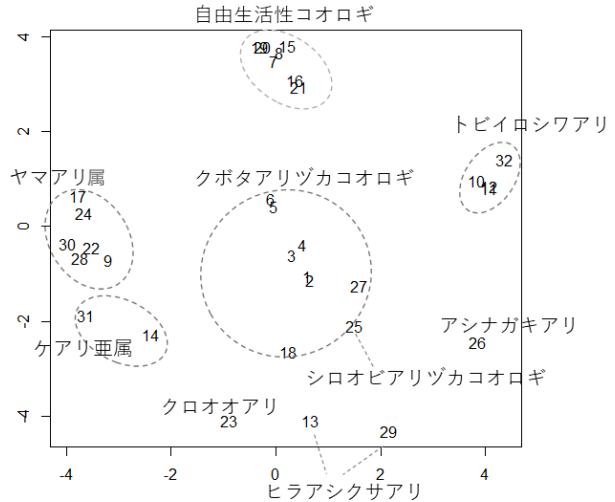


図3. アリ、アリヅカコオロギおよび自由生活性のコオロギの腸内細菌叢のNMS (Bray-curtis)

(2) アリ由来の揮発性匂い物質の捕集

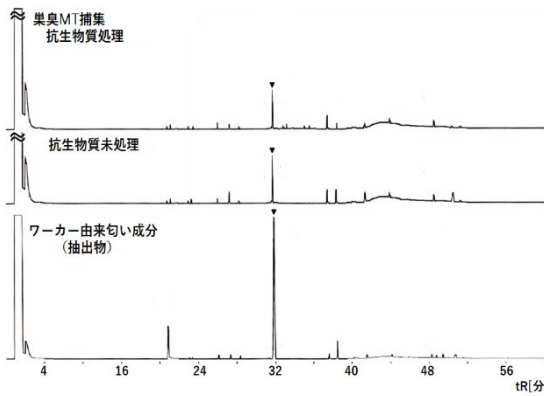


図4 ヒラアシクサアリ由来の匂い成分と抗生物質処理・未処理の巣臭の比較クロマトグラム

ヒラアシクサアリの人口巣に抗生物質を与えた実験では、抗生物質処理区でもワーカーは殆ど死亡せず、処理濃度による差異は認められなかった。また設置した捕集剤(MT)をガスクロマトグラフ分析 (GC-MS) したところ、ヒラアシクサアリ由来と思われる揮発性物質は検出されたものの、その量は非常に少なく、処理区間での差異は認められなかった (図4)。抗生物質処理方法および揮発性物質の捕集法については、さらなる検討が必要と考えられた。

結婚飛行当日のクロナガアリの野外巣に図5のように吸着剤 (TA) および捕集剤 (MT) を設置し、ポンプを用いて揮発性物質の捕集を試みた。ガスクロマトグラフ分析 (GC-FID 及び GC-MS) の結果、いくつかの匂い成分は検出されたが、アリの巣口に特有な匂いである可能性は低い。また、採集した結婚飛行前の有翅雌雄とワーカーは、捕集材 (MT) での空気捕集と溶媒浸漬による抽出により由来成分の比較を行なったが、いずれも揮発性フェロモン相当の沸点を示す成分は殆ど検出されなかった。クロナガアリのワーカーや巣臭も、同様の方法で空気捕集を試みたが、巣間差異を示す匂い成分は検出されなかった。

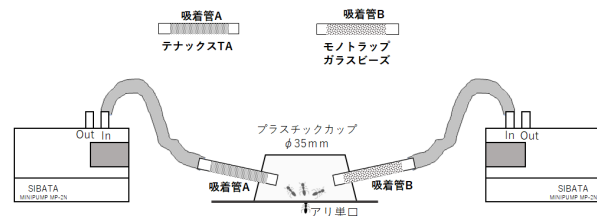


図5 アリ巣口での匂い捕集：テナックスTA (吸着管A) とモノトラップ (吸着管B) を用いた空気捕集

いずれのアリ種でも、SPME を用いると、興奮させた時に分泌する揮発性の警報フェロモンを捕集剤 (MT) よりも効率的に捕集・検出できることを確認したが、平常時の巢臭やアリの匂いに関しては SPME でも捕集効率は低く、巢間比較には至らなかった。以上のことから、本研究ではアリ由来の揮発性物質の捕集法を確立することはできなかった。

まとめ

以上の結果から、今回用いたアリと好蟻性昆虫種との間に限って言えば、腸内細菌が介在する同巢認識システムが存在する可能性は低いと考えられた。仮説は否定されたものの、同じ巢に住み、餌を共有するにも関わらず、菌の共有が殆ど生じないという結果は興味深い。この結果が、分類群の異なる昆虫同士の腸内細菌の共有が生理的 / 形態的に困難であることを示すならば、腸内細菌叢と社会性との関わりを検証する材料としては、アリと好蟻性昆虫との関係はあまり適していないのかもしれない。しかし、この点についてはさらなる検証を行う必要がある。なお本研究では、アリの腸内細菌叢がそもそも貧弱であるのに加え、16S アンプリコンシーケンスを行うと *Wolbachia* などの細胞内共生微生物が優占し、比較検証に足る OTU 数を得にくいという問題が改めて確認された。さらなる検証は必要であるが、この問題を軽減しうる手法として、腸内容物と腸管とを分けて DNA 抽出するというシンプルな手法を考案した。

アリの社会行動における揮発性の“匂い”が果たす役割は、未解明かつ非常に興味深いテーマである。本研究期間内には揮発性物質に関する具体的な成果は得られなかったが、抽出された手法上の問題点を改良すれば、次のステップに進められると考えられた。

引用文献

- 1) Matsuura, K. (2001) Nestmate Recognition Mediated by Intestinal Bacteria in a Termite, *Reticulitermes speratus*. *Oikos* 92: 20-26.
- 2) Sharon, G. Segal, D. Ringo, JM. Hefetz, A. Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E. (2010) Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 20051–20056.
- 3) Lizé, A., McKay, R. and Lewis, Z. (2013) Gut microbiota and kin recognition. *Trends Ecol. Evol.* 28: 325-326.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Hamaguchi Keiko, Takeuchi-Kaneko Yuko	4. 巻 24
2. 論文標題 Devibursaphelenchus alienae n. sp. isolated from the bark of dead Quercus aliena in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 205 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Masuya Hayato, Hamaguchi Keiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Neomisticus platypi n. sp. and N. variabilis n. sp. (Tylenchomorpha: Anguinidae) from dead oak trees in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 361 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanzaki, N., Fujimori, Y. & Hamaguchi, K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Isolation of Sheraphelenchus sucus from Epuraea (Haptoncus) ocularis collected from an Anoplolepis gracilipes nest in Okinawa, Japan (Short Communication)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 濱口京子, 佐藤隆士	4. 巻 42
2. 論文標題 クロヤマアリの餌構成に関する一観察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 蟻	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱口京子・宮下俊一郎・北條賢・秋野順治
2. 発表標題 アリの巣に向かって生えるミヤコアオイ ひとつの観察例として
3. 学会等名 第62回日本蟻類研究会大会講演要旨集
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱口京子・神崎菜摘・佐藤隆士・木野村恭一・秋野順治
2. 発表標題 アリとアリツカココロギの腸内微生物叢について
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hamaugchi, K. and Sato, Takashi
2. 発表標題 Lifespans of two queen morphs of <i>Temnothorax spinosior</i> under experimental conditio
3. 学会等名 IUSSI International Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱口京子・高原隆子・秋野順治
2. 発表標題 トゲアリのワーカーが一回に運ぶ甘露の量について
3. 学会等名 第63回日本蟻類研究会大会講演要旨集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本晴俊・秋野順治
2. 発表標題 生みの親より育ての親：クロヤマアリの巣仲間認識能形成
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋野順治
2. 発表標題 アリの同巣認識と繁殖・採餌活動－フェロモンとの複合
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	秋野 順治 (Akino Toshiharu) (40414875)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授 (14303)	
研究 分担者	神崎 菜摘 (Kanzaki Natsumi) (70435585)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------