

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292108

研究課題名(和文) シロアリ防除の新展開 - ミネラル・水代謝システムの解明とその攪乱技術の開発

研究課題名(英文) New evolvement in termite control -Elucidation of mineral and water metabolic system and technical development in their disruption-

研究代表者

大村 和香子 (OHMURA, WAKAKO)

国立研究開発法人 森林総合研究所・木材改質研究領域・領域長

研究者番号：00343806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)： 新たなシロアリ防除法の開発に資するため、シロアリのミネラル・水利用メカニズムの特徴を精査した。ミネラル利用に関しては、部位別のミネラル含有量や、銅塩に対する味覚反応の比較から、アメリカカンザイシロアリがイエシロアリよりも銅に対する耐性が高いことが推察された。水利用に関しては、イエシロアリについて階級別に消化系におけるアクアポリン分布を調べた結果、職蟻の唾液腺に多量に発現していること、兵蟻の唾液腺には分布しないことなどを明らかにした。さらに、 α -グルコシダーゼ活性の比較から、同じ水分の分泌器官であるが、活性がある唾液腺と活性のない唾液嚢で異なる役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The mechanism for the mineral and the water supply of the economically important pest, *Coptotermes formosanus* and *Incisitermes minor* was elucidated in order to establish a new termite control method. For the mineral utilization, the tolerance to copper in *I. minor* was supposed to be higher than that in *C. formosanus* by measuring the mineral content in each part of termite body and the taste response to copper ion. For the water utilization, it was found in *C. formosanus* that aquaporin is expressed predominantly in the salivary gland of the workers and not detected within that of soldiers, as a result of investigating the distribution of aquaporin in the digestive system of each caste. In addition, the function of the salivary gland and water-sac was completely different in α -glucosidase activity, i.e. it was active in the salivary gland but not in the water-sac, despite of the same role as water keeper.

研究分野：木質科学

キーワード：シロアリ 代謝生理 ミネラル 水分 アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

陸上生態系の分解者であるシロアリは、土壌を利用して住まいとなる巣を形成したり、土壌を建設資材として巣から餌・水場への通路に「蟻道」と呼ばれる専用のトンネルを作る。木造家屋等に甚大な被害を与える在来種のイエシロアリやヤマトシロアリはこのタイプの社会性昆虫である。一方、レイビシロアリ科(別名:乾材シロアリ)に分類されるシロアリ種は、野外でも土壌と全く接することなく、乾燥した枯立木や木材の中だけで生活する。侵入外来種アメリカカンザイシロアリ(以下、アメリカカンザイ)は、最近、国内被害発生件数が急増している乾材シロアリであり、被害実態の把握と防除対策の確立が急務となっている。

代表者は、シロアリが木材をかじるときの‘道具’となる大顎の材料特性を検討したところ、大顎表面に強度を付与すると考えられるマンガン(Mn)や亜鉛(Zn)の局在とその種による違いを見出し、シロアリの咬合力ならびに大顎の強度発現における生体構成金属の重要性を証明した(Ohmura *et al.*, 2007a,b; 鈴木・大村ら, 2009)。また、研究分担者(東)・研究協力者(神原)の昆虫の水輸送に関する研究において、排泄系組織を解析したところ、虫体内に水分を維持し、体内に水を行き渡らせるしくみが生化学的にわかってきた(Azuma *et al.*, 2012)。

そこで種固有のミネラル・水利用システムを追究することによって、それらを攪乱する新たな防除法の開発が可能になると考えた。

2. 研究の目的

社会性昆虫であるシロアリが木材や土壌から摂取する各種ミネラルや水分の体内における動態を追跡し、「個」の代謝生理の究明と、他個体・他階級と栄養交換ならびに情報コミュニケーションで繋がる家族集団(超個体)としての存続に関わる「集団」の代謝生理の評価の両面から、シロアリのミネラル・水利用メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 供試シロアリ

イエシロアリは2008年に鹿児島県日置市にて採取、森林総合研究所構内の恒温恒湿室にて飼育した巣から、アメリカカンザイシロアリは、2010年に東京都内の被害家屋から入手した被害材を、同上の恒温恒湿室中、アクリル製大型デシケーター内で厳重に管理し、それらの被害材から、各々、適宜必要数の個体を取り出して使用した。

(2) ミネラルへの味覚反応と代謝の種間差に関する研究

① 摂食試験

FeCl₃(無水), AlCl₃(無水), ZnCl₂(無水), CuCl₂·2H₂O, H₃BO₃の1 mM, 10 mM

水溶液を調製し、アカマツ辺材(木口20×20×厚さ5 mm)およびセルロースろ紙(直径30 mm, ADVANTEC No.2)に対して、各々300 μl, 100 μl 滴下し試験体とした。1試験容器につきイエシロアリは職蟻50頭、アメリカカンザイシロアリは擬職蟻5頭を入れて各試験体を強制摂食させた。

② ミネラル分析

試験に供試した個体を頭部、胸部+腹部、消化管に分け、アメリカカンザイシロアリについては糞についても105°Cで6時間乾燥、超精密天秤で計量後、硝酸一過酸化水素を用いて加熱・分解し、ICP/MS分析に供した。

③ 無機塩類に反応する味覚感覚子の特定

10 mM NaClベースのCuCl₂水溶液を調製し、チップレコーディング法によりシロアリの触角上の感覚子から特異的な応答が得られる感覚子を特定した。

④ シロアリ触角上の感覚子の顕微鏡観察

チップレコーディング時に光学顕微鏡下で反応する感覚子の位置を定めたあと、走査電子顕微鏡下で微細構造の観察を行った。

(3) シロアリの水代謝に関する研究

① タンパク質抽出およびウェスタンブロット解析

イエシロアリ職蟻10頭より前腸、中腸、後腸、直腸、唾液腺、貯水嚢、マルピーギ管を摘出し、0.1%デオキシコール酸ナトリウム(DOC)、0.15 M NaCl、5 mM EDTAを含む10 mM HEPES緩衝液(pH 7.5)で磨砕・遠心し、タンパク質可溶化画分を得た。得られたタンパク質は5頭等量をSDS-PAGEにより分離し、IgG精製した抗カイコDRIP抗体を用いウェスタンブロット解析した。

② 免疫組織化学

イエシロアリ職蟻より摘出した唾液腺およびマルピーギ管をブアン固定液に浸し、室温下で減圧浸透させた後、氷上で4~6時間固定した。固定試料はエタノール系列で段階的に脱水処理しキシレンに浸漬した後、パラフィンへ浸透・包埋した。包埋組織は小型回転式マイクロトームで4 μm厚の切片にし、IgG精製した抗カイコDRIP抗体を用い蛍光染色もしくはDAB染色で免疫組織化学を行った。

③ 幼若ホルモン類縁体による兵蟻誘導

イエシロアリ職蟻へ幼若ホルモン類縁体(JHA)であるメトプレン4 μgを含浸させたろ紙を摂食させ、前兵蟻および兵蟻を人為的に誘導した。これらのJHA処理個体および無処理の職蟻と兵蟻の唾液腺を摘出し、上記と同様の方法でウェスタンブロット解析した。

④ 粗酵素液の調製および酵素活性の測定

イエシロアリ職蟻の唾液腺(唾液嚢付き)、唾液腺のみ、唾液嚢のみをそれぞれ0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)中で20頭分摘出した後、同緩衝液200 μLの入ったマイクロチューブに移し磨砕・遠心した上清を粗酵素液とした。各粗酵素液25 μLに0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)中に溶解し

た 0.2%セロビオース 225 μ L を加え攪拌した後、37°C で 5 分間酵素反応させグルコースを生成した。グルコースの定量は、グルコース C II -テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いた。反応液中に含まれるグルコース濃度は、分光光度計（UVmini-1240、島津製作所）を用い 505 nm の波長で吸光度を測定することで算出した。

4. 研究成果

(1) ミネラルへの味覚反応と代謝の種間差に関する研究

① 体内における各種ミネラルの局在箇所の間差

アメリカカンザイシロアリおよびイエシロアリで、各部位の単位乾燥重量あたりのミネラル量で比較すると、サンプル間でバラツキが大きいものの消化管で最も多く検出された。1mM CuCl_2 試験区（基材：アカマツ辺材）では、アメリカカンザイシロアリの消化管においてイエシロアリの消化管の約 10 倍量のミネラル量が検出され、同濃度、同基材の ZnCl_2 試験区や FeCl_3 試験区でもアメリカカンザイシロアリの方がイエシロアリと比較して多くのミネラル量が検出されたが、 AlCl_3 試験区や H_3BO_3 試験区では両種の差はほとんどなかった。

以上のことから体内でのミネラル吸収特性が両種で異なり、ミネラルの種類によっても吸収特性が異なることが明らかとなった。

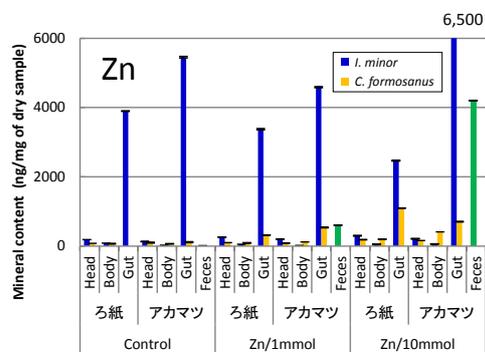


図1 アメリカカンザイシロアリとイエシロアリの体内におけるZnの局在箇所の違い

(青:アメリカカンザイシロアリ、黄色:イエシロアリ)

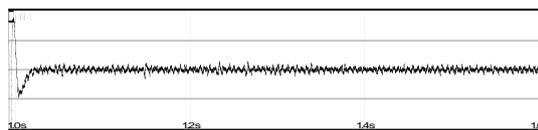
② 銅塩に対する味覚応答の違い

アメリカカンザイシロアリでは触角上の感覚子のうち、各刺激液のベースである 10 mM NaCl には反応しないが、 CuCl_2 に反応する感覚子を特定した。これらの感覚子は触角各節前方に普遍的に存在し、1 μ M まで希釈しても反応したことから、 CuCl_2 に対して鋭敏に反応することが示された。一方、イエシロアリでは同様の位置に存在する感覚子が CuCl_2 に反応し、さらに 10 mM NaCl 自体に反応したことから、イエシロアリが NaCl に対して鋭敏に反応することが明らかとなった。



図2 アメリカカンザイシロアリの触角上の感覚子

10mM NaCl



1 μ M CuCl_2

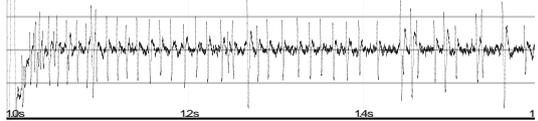


図3 アメリカカンザイシロアリ触角上の感覚子における NaCl と CuCl_2 への反応の違い

(2) シロアリの水代謝の特徴

① イエシロアリで発現するアクアポリンの種類とその発現部位

ウェスタンブロット解析の結果、唾液腺およびマルピーギ管において、アミノ酸配列から推定される分子量 (26, 162 Da) 付近に DRIP タイプのアクアポリン 25.7 kDa のシグナルが得られ、特に唾液腺で多量に発現していた (図4)。

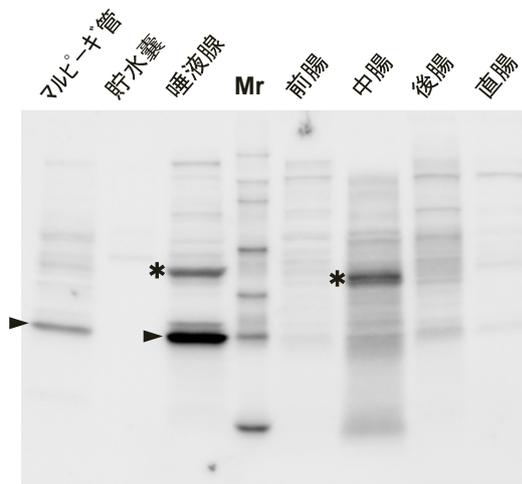


図4 組織特異的に発現するイエシロアリ DRIP タイプアクアポリン

さらに、唾液腺および中腸より抽出したタンパク質の可溶化画分において、分子量 28.1 kDa のポリペプチドのシグナルが顕著に検出された。得られたシグナルの特異性を、免疫吸収抗体を用いたコントロール解析で確認したところ、28.1 kDa のポリペプチドが抗

Bombyx PRIP 抗体に特異的に反応していることが明らかとなった。一般的にアクアポリンの分子量が 25~30 kDa の範囲にあることから、イエシロアリ職蟻には DRIP タイプアクアポリン以外に、PRIP 様タンパク質が存在することが示唆された。さらに、イエシロアリ職蟻中腸を前方と後方に分断しウェスタンブロット解析に供したところ、PRIP 様タンパク質は中腸前方で発現していることが明らかとなった。また、階級が異なる兵蟻の中腸においては、PRIP 様タンパク質の発現が確認されなかった。

② 兵蟻への分化に伴う水代謝の変化

JHA 処理 1 ヶ月後に前兵蟻、2 ヶ月後に兵蟻が出現した (図 5 上)。これら処理個体に加え、無処理の職蟻と兵蟻の唾液腺をウェスタンブロット解析した結果、兵蟻への分化とともに、イエシロアリ DRIP が消失することが明らかとなった (図 5)。また、非特異的なポリペプチドについても同様の傾向にあることが示された (図 5*)。

シロアリの唾液は木材の円滑な咀嚼・嚥下に始まる多くの生理的役割を担っており、特にイエシロアリヤマトシロアリといった地下シロアリの職蟻は、セルラーゼ等の消化酵素の分泌、摂食刺激による職蟻の集合⁽⁶⁾などに唾液を用いている。一方で、兵蟻は防衛に特化した頭部形態により、自ら餌を食べることができず職蟻に扶養されている。兵蟻唾液腺でアクアポリンの発現がみられなかったことは、両者の生活における唾液腺の生理的役割の違いを支持する結果といえる。

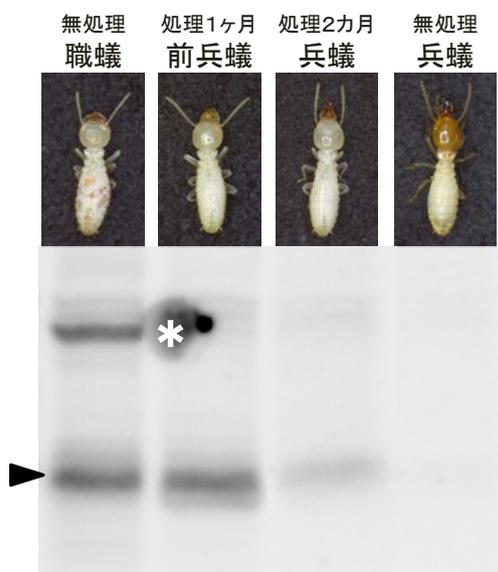


図 5 カースト特異的に発現するイエシロアリ DRIP タイプアクアポリン

③ 唾液の機能解明

水分の分泌器官である唾液腺と唾液嚢の機能的差異を推定するために、両者の β -グルコシダーゼ活性を測定した結果、酵素活性は唾液腺のみでみられ、唾液嚢では酵素活性が確認されなかった (図 6)。

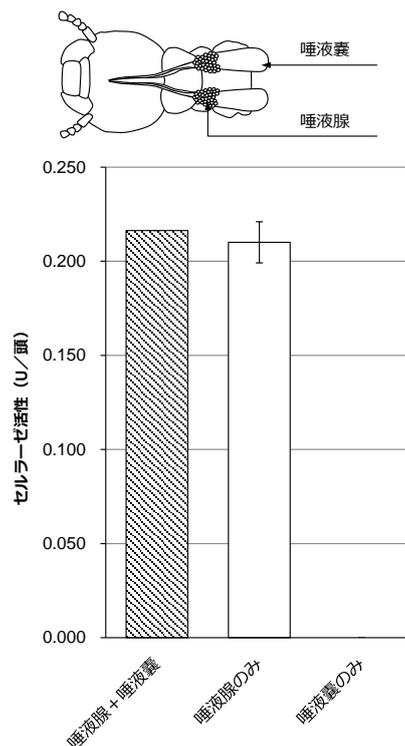


図 6 唾液腺、唾液嚢におけるセルラーゼ活性の違い

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 3 件)

- ① Mariya Maruyama, Kohei Kambara, Hideshi Naka, Masaaki Azuma, Insect water-specific aquaporins in developing ovarian follicles of the silk moth *Bombyx mori*: role in hydration during egg maturation, *Biological Bulletin*, 査読有、229、2015、58-69
- ② 大村和香子、シロアリの感覚と行動に関する総合的研究、環動昆、査読有、26、2015、69-76
- ③ Kohei Kambara, Tomone Nagane, Wakako Ohmura, Masaaki Azuma, Aquaporin water channel in the salivary glands of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* in predominant in workers and absent in soldiers, *Physiological Entomology*, 査読有、39、2014、94-102

[学会発表] (計 1 2 件)

- ① 神原広平、大村和香子、丸山麻理弥、東政明、シロアリの水輸送に関わる新たな

アクアポリンの同定と特徴付け、第 66 回日本木材学会年次大会要旨集、2016 年 3 月 27 日、123、名古屋大学（愛知県名古屋市）

- ② 大村和香子、神原広平、シロアリの摂食行動の種間比較－銅化合物に対する検討－第 27 回日本環境動物昆虫学会年次大会要旨集、2015 年 11 月 29 日、49、関西大学（大阪府吹田市）
- ③ 神原広平、大村和香子、東政明、イエシロアリ職蟻の中腸で特異的に発現する水チャンネル「アクアポリン」の特徴づけ、第 65 回日本木材学会年次大会要旨集、2015 年 3 月 18 日、113、タワーホール船堀（東京都江戸川区）
- ④ Kohei Kambara、Masaaki Azuma、Wakako Ohmura、Aquaporin in the salivary glands of the worker termites, XVII International Union for the Study of Social Insects Abstract Book、2014 年 7 月 16 日、232、Cairns (Australia)
- ⑤ Wakako Ohmura、Yuko Itoh、Ikuo Momohara、Akira Makita、Evaluation of wood preservatives against the drywood termite, *Incisitermes minor*, XVII International Union for the Study of Social Insects Abstract Book、2014 年 7 月 16 日、244、Cairns (Australia)
- ⑥ 神原広平、東政明、大村和香子、イエシロアリ唾液腺の働き－水分利用の分子メカニズム－、第 30 回日本木材保存協会年次大会研究発表論文集、2014 年 5 月 27 日、32-33、メルパルク東京（東京都港区）
- ⑦ 大村和香子、伊藤優子、神原広平、東政明、木材加害シロアリ種のミネラル摂取と体内吸収特性、第 64 回日本木材学会年次大会要旨集、2014 年 3 月 15 日、80、愛媛県民文化会館ひめぎんホール（愛媛県松山市）
- ⑧ 大村和香子、伊藤優子、神原広平、東政明、アメリカカンザイシロアリとイエシロアリの数種の無機塩類に対する嗜好性比較、第 25 回日本環境動物昆虫学会年次大会要旨集、2013 年 11 月 16 日、20、神戸大学（兵庫県神戸市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

本成果の一部を JST FS シーズ顕在化タイプへの展開を兼ねた「鳥取大学東京ビジネス交流会」において報告。

(http://www.cjrd.tottori-u.ac.jp/seeds.cgi/disp.cgi?data_num=20131001105015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 和香子 (OHMURA, Wakako)
国立研究開発法人森林総合研究所・木材改質研究領域・領域長
研究者番号：00343806

(2) 研究分担者

東 政明 (AZUMA, Masaaki)
鳥取大学農学部・教授
研究者番号：20175871

伊藤 優子 (ITOH, Yuko)

国立研究開発法人森林総合研究所・立地環境研究領域・主任研究員
研究者番号：60353588

(3) 研究協力者

神原 広平 (KAMBARA, Kohei)
国立研究開発法人森林総合研究所・木材改質研究領域・主任研究員
研究者番号：60727577

勝又(和田) 綾子 (KATSUMATA(WADA), Ayako)

ノースカロライナ州立大学・研究員