

シロアリ腸内共生微生物の新規機能とカーフト特異性に関する研究

2020

稲垣 辰哉

目次

第1章 序論.....	4
第2章 シロアリの腸内微生物による巣内衛生維持.....	14
2.1 はじめに.....	14
2.2 材料と方法.....	16
2.3 結果.....	23
2.4 考察.....	26
付録 巣内酢酸量の定量.....	29
第3章 ヤマトシロアリにおけるカースト特異的腸内微生物群集.....	31
3.1 ヤマトシロアリにおけるカースト・性特異的腸内原生生物群集.....	31
3.1.1 はじめに.....	31
3.1.2 方法.....	34
3.1.3 結果.....	35
3.1.4 考察.....	40
3.2 ヤマトシロアリにおける腸内バクテリア群集のカースト間比較.....	43
3.2.1 はじめに.....	43

3.2.2 材料と方法	44
3.2.3 結果	48
3.2.4 考察	55
3.3 ヤマトシロアリにおける繁殖虫分化時の原生生物量変動	57
3.3.1 はじめに	57
3.3.2 方法	59
3.3.3 結果	60
3.3.4 考察	61
第4章 シロアリ初期コロニーにおける腸内原生生物量の変動	63
4.1 同性ペアとの比較	63
4.1.1 はじめに	63
4.1.2 材料と方法	64
4.1.3 結果	67
4.1.4 考察	73
付録 卵の発生に伴った栄養量の推移	75
4.2 単独創設ペアとの比較	76

4.2.1 はじめに	76
4.2.2 材料・方法	78
4.2.3 結果	79
4.2.4 考察	85
第 5 章 腸内原生生物群集のカースト間差の種間比較	88
5.1 はじめに	88
5.2 材料・方法	89
5.3 結果	91
5.4 考察	93
第 6 章 総合考察	95
要約	99
学位公表論文	101
謝辞	102
引用文献	105

第1章 序論

腸内微生物との共生

我々ヒトを含む多くの動物の腸内には非常に多様な微生物が共生している(Ley et al. 2008)。その数も膨大で、ヒトにおいては腸内細菌は全身の細胞数よりも多い 100 兆個以上にも達し(Peterson et al. 2014)、40~60 兆個と試算されるヒトの体細胞数の 2~3 倍に相当する。これらの微生物は宿主の代謝や消化吸収に大きな影響を与えることが知られている。また近年、マウスなどのモデル生物を用いた研究から、栄養面だけではない貢献も明らかになってきている。その一つに免疫機能への貢献がある。腸内微生物が抗菌物質を生産すること(Peterson and Scharf 2016a)や宿主の免疫機能を促進するような物質を生産する(Rodrigues et al. 2010)ことが知られている。また、多くの微生物が存在することで腸内のニッチを占有し、病原性の微生物が侵入してくることを防ぐ(Stecher and Hardt 2011)ことも知られている。これは colonization resistance と呼ばれており、腸内に多くの微生物を棲まわせておく意義として着目されている。ヒトにおいては腸内微生物が様々な疾病、例えば炎症性腸疾患(Hörmannspurger and Haller 2010)や糖尿病(Wang et al. 2012; Karlsson et al. 2013)、さらにはパーキンソン病の原因となる可能性も指摘されており(Sampson et al. 2016)、我々が健康な生活を送る上でも腸内微生物は重要な存在である。

腸内微生物は宿主の健康だけでなく、動物の行動においても重要な役割を占めることが明らかになっている。マウスを用いた実験では、腸内微生物を持たない無菌個体では不安行動が増える(De Palma et al. 2015)ことや、神経発達が遅れる(Heijtz et al. 2011)ことが知られている。またショウジョウバエでは交尾相手の選択に腸内微生物の群集組成が関わっていることが知られている(Gil et al. 2010)。このように、腸内微生物は宿主の生理・行動の両方に大きな影響を与える存在であることが言える。これらの微生物の群集と、宿主はどのような関係にあるのだろうか。

腸内微生物と宿主の関係としては絶対共生関係のような特定の宿主にのみ見られる関係から日和見感染といった様々な宿主に広くみられるものまで多岐にわたる。特に昆虫において、その関係性は多様である(Engel and Moran 2013)。昆虫の腸は前腸、中腸、後腸により構成されるが、昆虫の分類群によって共生微生物が棲む場所は大きく異なっている。前・後腸は外胚葉由来の組織であり、その表面はクチクラに覆われている(Engel and Moran 2013)。後腸は主に水分の再吸収を行う器官であることが知られている。一方で中腸は内胚葉由来の組織であり、ここで消化酵素の分泌や栄養分の吸収が行われている。一部のカメムシでは中腸内に細菌が多く存在している(Ohbayashi et al. 2015)が、シロアリの仲間では後腸に微生物の多くが生息している(Ohkuma and Brune 2011)。宿主との関係性も多岐にわたり、宿主の生存に必須であるものから、特に生育する上で必要ではない微生物も多く存在する。前者のような共生関係においては、その伝播方法も重要である。例えば、マルカメムシ *Megacopta punctatissima* は産卵した卵塊の付近に共生細菌を含んだカプセルを産み落とし、幼虫がそれを摂取する形で垂直伝播させる(Fukatsu and Hosokawa 2002)。ホソヘリカメムシ *Riptortus pedestris* においては、腸内に共生細菌である *Burkholderia* 属のみが通過できる仕組みを持ち、環境中から選抜することで、盲嚢と呼ばれる器官に微生物を共生させている(Ohbayashi et al. 2015)。一方で、特定の腸内微生物との共生がみられない分類群もあり、例えば鱗翅目(Hammer et al. 2017)やナナフシ目(Shelomi et al. 2013)が知られている。これらの昆虫の腸内には微生物は存在するものの、環境中から偶発的に腸内に侵入したものがほとんどであり、餌の消化吸収は自身の酵素で行っているとされている。昆虫の中でもシロアリは特に腸内微生物群集と絶対共生関係にあることで知られており、その消化・吸収の大部分を腸内の複数種の微生物に依存している。

シロアリと腸内微生物

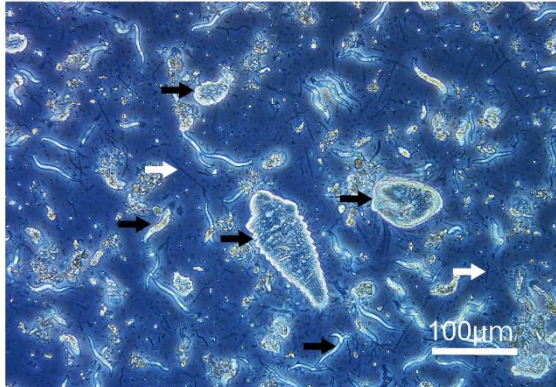
シロアリと腸内微生物群集の共生関係は、シロアリの祖先であるキゴキブリから1億5千万年もの間維持されてきた(Ohkuma et al. 2009)。シロアリ腸内には主に原生生物、バクテリア、古細菌が生息することが知られている(Brune and Dietrich 2015)。原生生物は下等シロアリと呼ばれる比較的祖先的なグループにおいてみられる単細胞の真核生物で、シロアリ腸内に生息するものは鞭毛虫(flagellate)と呼ばれている。それらはすべてオキシモナス綱もしくはパラバサリア綱に属しており(Kitade 2007)、その多くが鞭毛を持ち泳ぎ回る様子が観察される。それらの原生生物はシロアリ体外では生きていくことができず(Cleveland 1923; Andrew 1930)、現在知られているシロアリ腸内原生生物はシロアリの腸内特異的である(Ohkuma and Brune 2011)。原生生物が腸内においてどのような代謝を行っているかはその多くが不明である。というのも、これまでに多くの研究者がシロアリ共生原生生物の培養に挑んできたが、成功した例はほとんどなく(Yamin 1981; Odelson and Breznak 1985)、単離培養株は現存していないためである。いくつかの原生生物種では体内に木片を取り込んでいる様子が見受けられ、木材消化に関与していることが考えられる。また他の細菌や原生生物の捕食が見受けられることもある(Radek et al. 2019)が、実際に何を餌としているのかはその大部分がよくわかっていない。ほかにシロアリ腸内の重要な微生物としてバクテリアが挙げられる。バクテリアは単細胞の原核生物で、シロアリ腸内には非常に多様に存在する。遊離しているバクテリアの他にも原生生物の体内や体表面にも多くのバクテリアが存在していることが知られており、宿主の原生生物と様々な物質のやり取りを行っている(Hongoh et al. 2008)。古細菌については現存する種についていくつかの記載がなされている程度であり、情報は非常に少ない(Brune and Dietrich 2015)。このように、シロアリ腸内微生物群集は様々な分類群の微生物を多く含み、それらとシロアリ、さらにそれら同士の相互作用のもとに成り立っているといえるだろう。

これらのシロアリ腸内共生微生物は、個体間のやり取りを通じてシロアリの腸内のみ

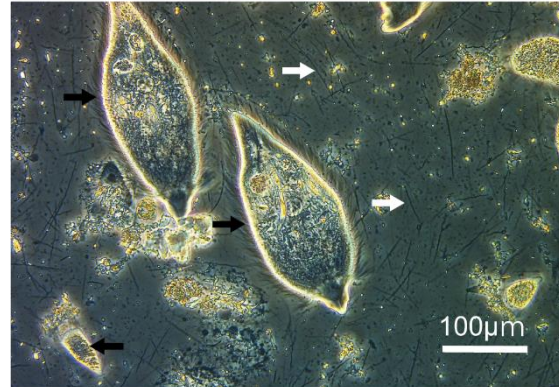
で維持されてきた。シロアリは孵化後から腸内に共生微生物を有しているわけではなく、ヤマトシロアリでは3齢から原生生物を持つ(Yamaoka et al. 1986)ことが知られている。また、ワーカーは脱皮前に原生生物を失うため、脱皮直後の個体も原生生物を持たないことが知られている(Andrew 1930; Nalepa 2017)。このような原生生物を持たない個体は、他個体から直接腸液を受け取ることで腸内原生生物を得ることが知られている(Andrew 1930)。これは肛門食(proctodeal trophallaxis, anal-feeding)と呼ばれており、ある個体の腹部の先端にもう一方の個体が直接口をつけて排出された腸液を摂取する行動である。次世代を担う羽アリにおいても、巣仲間から腸内微生物の群集を受け取って飛び立ち、次世代に垂直伝播させることが知られている(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004; Benjamino and Graf 2016)。このようなシロアリ腸内のみでの微生物群集の維持によって、原生生物・バクテリアにおいてシロアリとの共種分化パターンが生じている(Noda et al. 2007)。

シロアリと原生生物の共生関係は非常に長い間維持されてきたが、その関係は必ずしも安定ではない。高等シロアリと呼ばれる、より派生的なシロアリ科(Termitidae)のグループにおいては、原生生物を全く持っていないことが知られている(Ohkuma and Brune 2011; Brune and Dietrich 2015)。これは、シロアリと原生生物の共生関係が一度失われたことを表しており、高等シロアリでは腸内においてバクテリアと共生している。主に木材を主食とする下等シロアリに対して、高等シロアリはキノコ栽培、土食、草食などの多様な食性を獲得していることが知られている。高等シロアリのもつバクテリア群集もそれぞれの種特異的であり、さらに腸の形態や腸内環境も下等シロアリとは大きく異なることが明らかになっている(Bignell 2011)。このように、シロアリと共生微生物群集の共生関係は維持・崩壊の両方がみられており、この背景を明らかにすることは生態学的に非常に重要である。

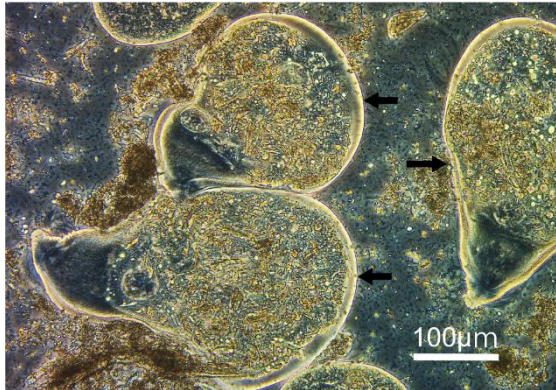
(A) *Reticulitermes speratus*



(B) *Coptotermes formosanus*



(C) *Zootermopsis nevadensis*



(D) *Hodotermopsis sjostedti*

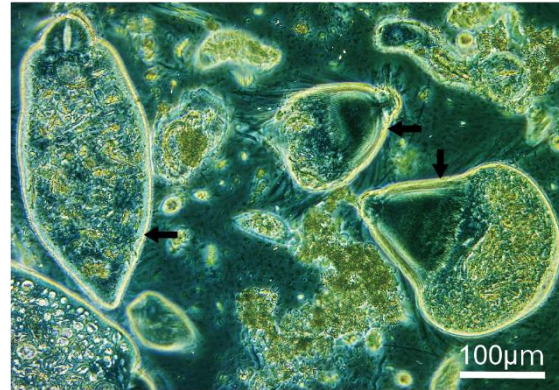


図 1.1 シロアリ腸内共生微生物群集

微生物の種組成はシロアリの種特異的である。黒矢印が原生生物、白矢印がバクテリアを示す。(A)ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus*、(B)イエシロアリ *Coptotermes formosanus*、(C)ネバダオオシロアリ *Zootermopsis nevadensis*、(D)オオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti*。

シロアリ腸内微生物が何を餌とし、どのような代謝を行っているかはその多くが謎に包まれているが、現在、シロアリにとっての栄養面での貢献が主に明らかになっている。最も重要な機能としては木材の消化である。主に原生生物とその共生バクテリアが、木材の主要構成成分であるセルロースを二酸化炭素と水素にまで分解し(Yamin 1981)、さらにバクテリアがそれらを還元的酢酸生成によって酢酸にする(Leadbetter et al. 1999)。酢酸はシロアリにとっての炭素源、エネルギー源であるといわれている。もう一つの重要な機能としては窒素固定である。木材は非常に窒素の少ない環境であることが知られているため、シロアリは腸内微生物の代謝を通じて不足している窒素を得る。窒素固定は腸に浸透した空気中の窒

素をアンモニウムイオンにすることによって行われる(Breznak et al. 1973)。これ以外にも、間接的な証拠ではあるが脂質の代謝にも関わっていることが示唆されている(Mauldin 1982)。さらに、微生物そのものも栄養として重要である。肛門食による腸液交換の際に、シロアリは中腸で微生物そのものを消化することでタンパク質などの栄養を得るといわれている(Brune and Dietrich 2015)。

シロアリの腸内原生生物は古くから多くの研究者に着目されてきた。形態による種の記載(Koidzumi 1921; Yamin 1979)から操作実験(Light and Sanford 1928)・遺伝子発現解析(Tartar et al. 2009)や、近年では次世代シーケンサーを用いて細菌群集を網羅的に解析する、メタゲノム解析が盛んに行われている(Scharf 2015; Benjamino and Graf 2016; Michaud et al. 2019)。これまでの研究では、シロアリ腸内微生物群集は、主に木材の消化を通じてワーカーのタスクを支えるものとしての認識がなされている。だが社会性昆虫として知られるシロアリには繁殖を担う王・女王などワーカー以外にも多くのカースト(社会役割)が存在し、それぞれの従事するタスクも大きく異なることが考えられる(Wilson 1971)。シロアリと腸内共生微生物群集の相互作用や維持・崩壊の背景を明らかにするにはワーカーのみならず社会や生活史全体に着目した研究が必要となるであろう。

シロアリの生活史及びカースト分化

シロアリのコロニーの多くは巣から飛びたった羽アリが雌雄で創設することにより始まる(Nutting 1969)。この際には創設虫は二匹で巣の構築、採餌、産卵、幼虫の世話などのタスクを行う必要がある。ワーカーの数が増えてくると、繁殖以外のタスクはワーカーに任せ、王や女王は繁殖に専念する(Hartke and Baer 2011)。これは繁殖分業と呼ばれ、ワーカーや巣の防衛を担う兵アリはその一生を繁殖せずに終える。このように、シロアリの生活史においてそのタスクは時間的・空間的に大きく変動する(図 1.2)。そのため、それぞれの個体が持つ腸内微生物も、大きく変動することが考えられる。

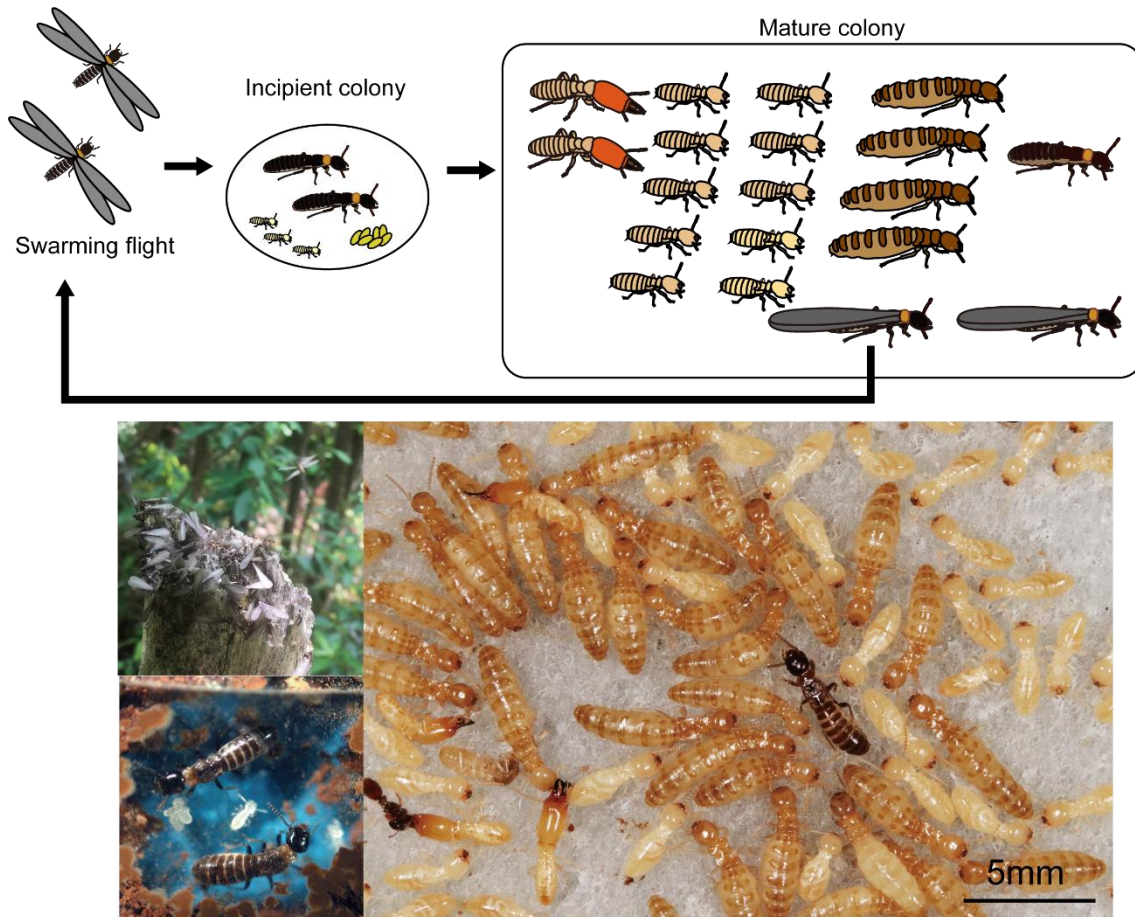


図 1.2 ヤマトシロアリの生活史

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* の生活史を示す。(上) 巣から飛び立った羽アリがペアとなって初期コロニーを創設する。創設女王は二次女王に置き換わり、巨大なコロニーを形成する。(下) 左上が羽アリの群飛の様子を、左下が初期コロニーを、右が成熟コロニーを表す。多くの成熟コロニーには一匹の創設王と多くの二次女王、数万～数十万ともいわれるワーカーと兵アリが含まれる。

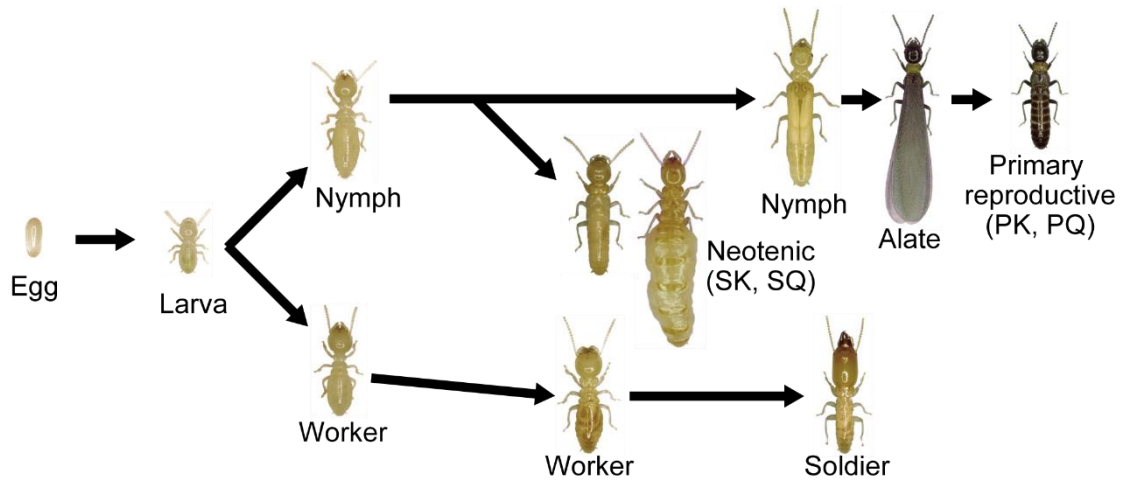
シロアリの巣内において、それぞれの個体はどのような発生過程を経て繁殖虫もしくはワーカーとなるのだろうか。シロアリの中には 2 種類の発生経路があることが知られている。それは Two-way 経路、One-way 経路と呼ばれる分化経路である (Roisin and Korb 2011; 図 1.3)。

Two-way 経路は下等シロアリの一部と高等シロアリに見られる分化経路で、個体の分化運命が幼虫期の初期に決定される(Noirot and Pasteels 1987)。ニフ経路とワーカー経路が存在し、ニフ経路に入った個体は繁殖カーストとなる。繁殖カーストには、羽アリとなって巣から飛び立ち、新しいコロニーを創設して繁殖を行う個体と、巣内で繁殖虫(neotenic)となって繁殖を行う個体が存在する。ワーカー経路に入った個体はワーカーとして採餌や防衛、巣内の清掃などのタスクに従事し、一生を繁殖せずに終える。ワーカーの一部は兵アリとなって巣の防衛を担う。一方で One-way 経路は下等シロアリの一部に見られ、個体の分化運命は終齢まで決定しない。全てのワーカー(擬職蟻、pseudergate と呼ばれる)は繁殖虫となる分化ポテンシャルを持ち、ワーカーの終齢の一部がニフとなって羽アリに分化する、もしくは巣内で繁殖を行う個体(neotenic)となる(Noirot and Pasteels 1987)。

これらのカースト分化経路は、それぞれのシロアリにおける採餌戦略と大きく関係している。Two-way 種は巣のエリアと採餌エリアが異なる、foraging 型の採餌を行う(Korb 2007; Korb and Hartfelder 2008)。これには central-place-forager と呼ばれるような、王と女王が存在する場所が決まっており、ワーカーはそこから外に出て採餌を行うものと、multiple-site-nester という、複数の木材を利用して、その中で繁殖中枢が存在する場所と採餌場所が分かれているものが含まれている(Shellman-Reeve 1997)。一方で One-way 種は wood-dweller もしくは one-piece type と呼ばれており、一つの木材を利用して、その中に繁殖中枢と採餌場所が存在する(Shellman-Reeve 1997)。

以上のように、シロアリにおけるタスクは同種内においてカースト・生活史の各側面によって異なり、さらに種間でも大きく異なることがいえる。それぞれの宿主のタスクに腸内微生物はどのように貢献しているのだろうか。

(A) Two-way pathway



(B) One-way pathway

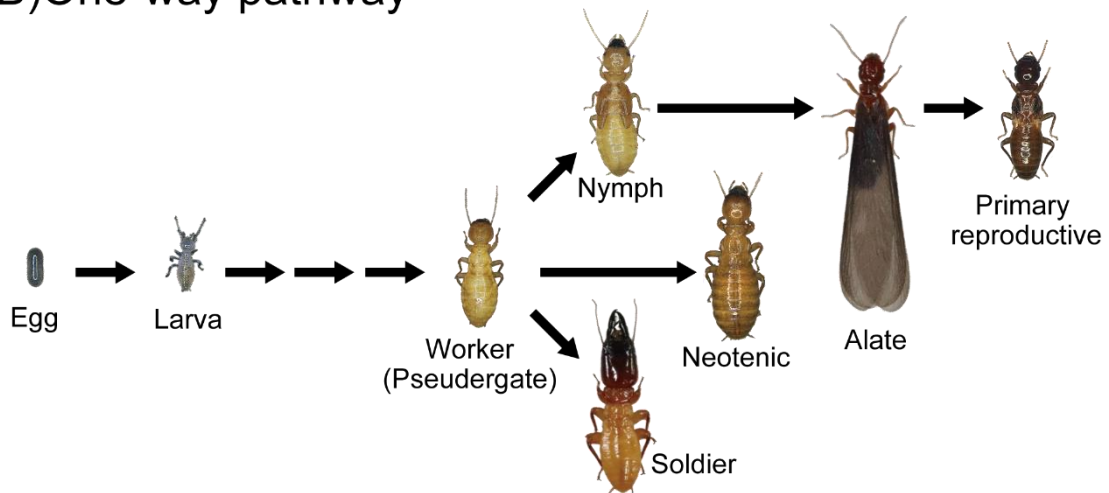


図 1.3 シロアリのカースト分化経路

上図が Two-way 分化経路を表す。個体の分化運命は若齢幼虫の時点で決まり、ニンフ経路（上）とワーカー経路（下）に分かれる。ニンフ経路の個体は巣内で繁殖虫となるか羽アリとなって巣から飛び立ち、新しい巣を創設して繁殖を行う。写真はヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus*。下図が One-way 分化経路を表す。個体の分化運命はワーカー（擬職蟻と呼ばれる）の終齢まで決まらず、全ての個体は繁殖中へ分化するポテンシャルを持つ。写真はネバダオオシロアリ *Zootermopsis nevadensis*。

本研究の目的

本研究の目的は、シロアリにおける様々なタスクに対して腸内微生物がどのように貢献しているのかを明らかにすることである。

まず**第2章**では、シロアリの腸内微生物群集の多機能性という視点から新規機能を明らかにした。セラチア菌という、赤色色素を生産するバクテリアを用いた実験系を立ち上げ、シロアリの腸内微生物による巣内衛生維持への貢献を明らかにした。

続いて第3章から第5章にかけては、シロアリのカーストごとに持つ微生物群集に着目することでそれぞれの個体のタスクと腸内微生物の関係を明らかにした。**第3章**においてはヤマトシロアリの成熟コロニーに着目し、カースト・性ごとの腸内原生生物、バクテリア群集を明らかにした。さらに繁殖虫分化に伴う原生生物量の変動を追うことで分化やタスクの変化と原生生物量の間を明らかにした。**第4章**においてはヤマトシロアリの創設コロニーに着目し、創設時の子への栄養投資に原生生物がどのように貢献しているかを明らかにした。**第5章**においては祖先的なシロアリと派生的なシロアリにおける原生生物量のカースト間差を比較し、原生生物量のカースト間差が生じた進化的プロセスについても考察を行った。

第2章 シロアリの腸内微生物による巣内衛生維持

2.1 はじめに

微生物と真核生物との相互作用は多岐にわたり、あらゆる生物においてみられる。微生物と宿主の関係は、アブラムシに必須栄養を提供するブフネラ *Buchnera aphidicola* のような絶対共生関係(Moran et al. 2008)から植物病原菌(Scott 1972)のような寄生関係まで多岐にわたり、共生微生物は宿主の行動や生理に大きな影響を与えている。これまでの多くの研究は相利共生微生物や病原菌といった、特定の宿主と密接な関係にある微生物に着目してきた。だが一方で、常在菌と呼ばれる、一般的には特定の宿主にとって有益でも害を及ぼすとも考えられていない微生物も、様々な宿主の生態に大きな影響を与えることが明らかになってきている(Casadevall and Pirofski 2000)。生活史の大部分を宿主に依存する絶対共生菌や絶対寄生菌と異なり、常在菌は環境中に普遍的に存在し、宿主に依存することなく生育できる(Alekshun and Levy 2006; Anttila et al. 2015)。そのような常在菌の中には、環境中で優占した際や、免疫力の低下した個体に対しては日和見的に感染を起こす日和見感染菌と呼ばれる微生物が多く存在する(Klainer and Beisel 1969; Poindexter and Washington 1974)。だが宿主と常在菌や日和見感染菌との相互作用はあまり着目されてこなかった。

社会性昆虫は多くの微生物と様々な形での相互作用を持つ(Schmid-Hempel 1998; Hughes et al. 2008)。その中でもシロアリと腸内微生物は消化共生系として着目されてきた。腸内微生物は木材の消化や窒素固定を通じて宿主の生存に必要な炭素・窒素源を提供する。腸内微生物の多くはシロアリの腸の外では生存できず、両者は絶対共生関係にあることが知られている(Ohkuma and Brune 2011)。近年、腸内微生物が栄養だけでなく病原微生物に対する免疫に貢献することが明らかになってきている。シロアリ腸内微生物は真菌類の消化酵素として β -1,3-グルカナーゼ(Rosengaus et al. 2014)とアミド加水分解酵素(amidohydrolase 2)を生産(Peterson and Scharf 2016a)することによって病原菌からの防衛に貢献していることが明らかになった。さらに腸内微生物を除去することで病原微生物に対する感染率が上が

ることが知られている(Veivers et al. 1982; Sen et al. 2015)。そのような個体免疫だけでなく、巣内に多く存在する常在菌や日和見感染菌(Lee and Wood 1971; Holt and Lepage 2000; Rosengaus et al. 2003)を抑制し、衛生を保つこともシロアリのコロニーの生存の上で重要であることが考えられる。例えばイエシロアリにおいては、巣材の表面に抗菌物質を生産する細菌を付着させて巣内衛生を保っていることが知られている(Chouvenc et al. 2013)。腸内微生物が病原菌を抑制する効果を持つことを考慮すると、巣内の日和見菌の増殖抑制にも貢献しているのではないだろうか。本章においては、実験系を確立し、この仮説の実証を行った。

本章で用いるネバダオオシロアリ *Zootermopsis nevadensis* は多くの細菌と原生動物を腸内に持っていることが知られている(Nalepa 1991; Mikaelyan et al. 2016)。ネバダオオシロアリの営巣形態はワンピース型と言われており、単一の腐朽材の中に巣を作る(Castle 1934)。ネバダオオシロアリの巣材の中には多くの病原菌と日和見感染菌が含まれていることが知られている(Rosengaus et al. 2003)。それらの微生物の中でもセラチア菌は典型的な日和見感染菌で、環境中に普遍的に存在している。シロアリの巣や死体から頻りに単離され(Grimont and Grimont 1978)、通常はシロアリに害を及ぼさないが、高濃度のセラチア菌はシロアリに対して致死性を持つことが知られている(De Bach and Mcomie 1939; Osbrink et al. 2001)。本節の実験においてはネバダオオシロアリの巣からセラチア菌を単離・培養して使用した。このセラチア菌の系統はプロジギオシンと呼ばれる赤色の色素を生産する(Dimitrov 1970)。そのため環境中での有無が非常にわかりやすく、さらに色素量を測定することで容易にセラチア菌量を定量することができる。よって、ネバダオオシロアリとセラチア菌を用いた実験系を立ち上げることでシロアリ腸内微生物が巣内日和見感染菌の抑制に貢献しているという仮説を検証することができる。

上記の仮説を検証するために、腸内微生物を除いたシロアリと腸内微生物を保有するシロアリにセラチア菌を与えて、それぞれのシロアリの周囲で増殖したセラチア菌量を定

量した。次に、腸内微生物によって生産される酢酸(Hongoh et al. 2008)がセラチア菌の抑制に貢献しているという仮説を立てた。それを検証するために、腸内酢酸濃度を腸内微生物を持つシロアリと除去されたシロアリ間で比較した。さらに腸内酢酸がセラチア菌の抑制に十分であるかを確認するために様々な濃度の酢酸によるセラチア菌の抑制試験を液体培養により行った。

2.2 材料と方法

シロアリ

ネバダオオシロアリは Archotermopsidae 科に属するシロアリで、アメリカ西海岸原産の種である。本章においては日本の兵庫県川西市に侵入・定着している個体群を用いた(Yashiro et al. 2018)。2016 年度に兵庫県川西市においてネバダオオシロアリの成熟コロニーを4個(GPS333, GPS116, KN160820a, KN160820c)採集した。採集後のコロニーからシロアリを取り出し、スチロールケース内でベイマツ材をスライスしたチップを用いて飼育し、25°Cの全暗条件で維持した。

セラチア菌の単離

ネバダオオシロアリから腸内微生物を除去し、長期飼育を行った後に巣内に増殖したセラチア菌を単離培養した。具体的にはまず、 1.0×10^3 mg/L のテトラサイクリンと 2.0×10^3 mg/L のメトロニダゾールを含む溶液をセルロース粉末に混ぜ、ネバダオオシロアリに与えた。4日後、蒸留水 5mL、ドライイースト 0.25g、トレハロース 0.25g、ポーキニン B 50 μ L を含むタオルペーパー(CONDOR Towel Paper; The Yamazaki Corporation, Japan)を与えた。2か月飼育した後に、タオルペーパーの赤色変色を確認した。この赤色色素を生産するバクテリアを単離するために、タオルペーパーを LB 寒天培地上に移した。培地は 0.01%の antibiotic-antimycotic (GIBCO 15240, Invitrogen Co.)を含み、最終濃度にして 1.0 U/mL の

penicillin G sodium、1.0 µg/mL の streptomycin sulfate、2.5 ng/mL の amphotericin B を含んでいた。赤色色素生産バクテリアをこの培地上において 28°C で培養し、増殖した赤色のコロニーを取り出して LB 液体培地内で増殖させた。

バクテリアの種は 16s rRNA 遺伝子配列を解析することにより特定した。まず LB 液体培地内において 28°C 条件下で 7 日間培養し、Wilson (1997) の方法にのっとり DNA を抽出・精製した。プライマーは以下の配列のものを使用した。Forward: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、Reverse: 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCCGCA-3'。これらは大腸菌の 16SrRNA 配列の 8-27, 1521-1540 番に相当する (Brosius et al. 1978; Zhang et al. 2009)。得られた 16SrRNA 遺伝子配列 (1008bp, GenBank accession no. MG770609) から赤色色素生産バクテリアはセラチア菌 (*Serratia marcescens*) であることが明らかになった。

得られたセラチア菌のテトラサイクリン、メトロニダゾール耐性を確認した。テトラサイクリン 1.0×10^3 mg/L とメトロニダゾール 2.0×10^3 mg/L、テトラサイクリン 0.5×10^3 mg/L とメトロニダゾール 1.0×10^3 mg/L を含む LB 液体培地、そして抗生物質の無い培地をコントロールとしてそれぞれ 5 繰り返し用意し、10µL のセラチア培養液を加え、培養を行った。その結果、テトラサイクリン 1.0×10^3 mg/L とメトロニダゾール 2.0×10^3 mg/L、テトラサイクリン 0.5×10^3 mg/L とメトロニダゾール 1.0×10^3 mg/L をそれぞれ含む培地においてコントロールと比較してセラチア菌の増殖が抑制されていた (Welch's t test, テトラサイクリン 1.0×10^3 mg/L とメトロニダゾール 2.0×10^3 mg/L: $t=5.9$, $df=4.0$, $P=0.004$; テトラサイクリン 0.5×10^3 mg/L とメトロニダゾール 1.0×10^3 mg/L: $t=6.2$, $df=4.0$, $P=0.003$)。この結果から、本研究で用いたセラチア菌は薬剤耐性を獲得していないといえる。

シロアリからの腸内微生物除去

ネバダオオシロアリの 2 つのコロニー (コロニー I: KN160820a、コロニー II: GPS333) を実験に使用した。コロニー I からは 48 匹の擬職蟻を、コロニー II から 24 匹の擬職蟻と 24 匹

の若齢ニフを取り出した。それぞれのコロニーから取り出した個体を微生物除去(GM-)・コントロール(GM+)の2つの処理区に分けた。まず腸内微生物除去個体においては、テトラサイクリン 1.0×10^3 mg/L とメトロニダゾール 2.0×10^3 mg/L を含む 1mL の蒸留水を 70mm ろ紙に含ませて与えた。GM-の個体には抗生物質を含まない蒸留水を同様にして与えた。4日後、薬剤を取り除くために、不織布を敷いた 90mm シャーレ上にシロアリを移し、2日間飼育した。

セラチア菌への暴露

コントロール・微生物除去処理区の個体をそれぞれ2つに分け、片方にはセラチア菌を与え(S+)、もう一方にはコントロールとして LB 液体培地を与えた(S-)。具体的には、まず 30mm シャーレ内においてろ紙上に栄養液(1%グルコースと 1%イースト抽出物を含む)を含ませ、そこにセラチア培養液を加えて1晩 28°Cで培養したのちにそれぞれのシロアリに与えた。2日後にシロアリを取り出し、蒸留水でシロアリを軽く洗浄した。24 ウェルプレート(Falcon, USA)に 15mm ろ紙を1枚敷き、50 μ L の栄養液(上記のものと同組成)を加えた上にシロアリを1匹ずつ置いた。空気の交換を防ぐために、パラフィルムとキムタオルで上部を覆った。1日後、シロアリとろ紙を取り出した。シロアリは解剖して腸を取り出し、原生生物量を測定し、酢酸量を定量した。ろ紙についてはセラチア菌の生産した色素を抽出し、色素量を定量した。それぞれのコロニーは以下の4処理区に分けられた：(GM-/S+ (colony I: N = 11, colony II: N = 10), GM-/S- (colony I: N = 10, colony II: N = 11), GM+/S+ (colony I: N = 11, colony II: N = 12), and GM+/S- (colony I: N = 12, colony II: N = 12)) 処理の途中で脱皮した個体や死亡した個体は取り除いた。セラチア暴露処理に使用されたセラチア量は以下の通りであった： 1.75×10^{10} (colony I, GM+), 2.80×10^{10} (colony I, GM-), 2.35×10^{10} (colony II, GM+), and 3.06×10^{10} (colony II, GM-)。

セラチア菌量定量

セラチア菌の増殖量を赤色色素の量から推定するために、540nm の吸光度とセラチア菌のコロニー形成単位(colony forming units, CFUs)の検量線を作成した。セラチア菌の培養液の二倍希釈を6回行い希釈系列とし、コントロールに蒸留水を用い、それぞれ3繰り返し用いた。色素抽出の方法は、まずクロロホルム・メタノール 1:1 混合液 400 μ L に培養液の希釈系列を 100 μ L 加え、混合した。1時間後、分離したクロロホルム層とメタノール・水層のうち、セラチア菌の生産する赤色色素(プロジギオシン)を含むクロロホルム層をピペットで取り出し、クロロホルムをドラフトチャンバー内で揮発させた。チューブ内に残った色素に 120 μ L のメタノールを加えて溶解させた後に 100 μ L を取り出して 540nm の吸光度を分光光度計(Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific, China)を用いて測定した。コロニー形成単位については、LB 寒天培地上に 10^5 希釈したセラチア培養液(2.49×10^{11} CFUs/mL)を播き、1日後にセラチア菌のコロニー数をカウントした。100 μ L の溶液中のコロニー形成単位の総量をセラチア菌量として、次の式により推定した： $(Serratia\ abundance) = (OD_{540}) \times 1.7 \times 10^{11} + 7.0 \times 10^8$ ($P < 0.001$, $R^2 = 0.9926$)。

次に上記の、シロアリへのセラチア暴露実験で得られたろ紙上のセラチア菌量を色素量より推定した。まずろ紙を凍結乾燥機(EYELA FREEZE DRYER FD-1000, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)を用いて乾燥させ、以下の方法で色素を抽出した。まずクロロホルム・メタノール 1:1 混合液 400 μ L にろ紙を加え、1時間後に 200 μ L の蒸留水を加えた。これ以後の操作は上記と同様にして 540nm の吸光度を測定した。セラチア菌暴露に用いたろ紙についてもこの方法でセラチア量を定量した。

腸内酢酸濃度の定量

シロアリ腸内の酢酸濃度を定量するために、2回目の希釈前の腸液サンプルを用いた(コロニーI：200 μ L 中に溶解、コロニーII：1mL 中に溶解)。事前に他個体を用いた測定か

ら、コロニーIIでは酢酸濃度が高いことが明らかになっていたため、より薄く希釈した溶液を用いた。サンプルから上澄みを10 μ L取り出し、酢酸定量キット(Bioassay Systems, USA)と蛍光プレートリーダーFluoroskan Ascent FL (Thermo LabSystems, China)を用いて酢酸量を定量した。腸内微生物除去処理区において、酢酸量が検出レベル以下であったために測定値が負の値となった個体については値をゼロに置換して解析を行った。次にシロアリの後腸の体積を推定するために、シロアリの生重量と後腸体積の検量線を作成した。3コロニーから擬職蟻と若齢ニフをそれぞれ取り出し(GPS333: 擬職蟻5匹と若齢ニフ5匹、GPS116: 擬職蟻5匹と若齢ニフ5匹、KN160820c: 擬職蟻5匹と若齢ニフ4匹)、体重を測定した後に後腸を取り出した。取り出した後の後腸はPBS内で微針を用いて固定し、撮影機付きの実体顕微鏡を用いて撮影した(SZX7, OLYMPUS)。撮影した後腸については3-4つの楕円回転体に近似することで体積を測定した。それぞれのコロニーにおける後腸の体積は $7.29 \pm 0.83 \mu\text{L}$ (GPS333)、 $8.10 \pm 0.69 \mu\text{L}$ (GPS116)、 $4.93 \pm 0.82 \mu\text{L}$ (KN160820c)(平均値 \pm 標準誤差)であった。線形回帰の結果、腸の体積は以下の式で推定した。(gut volume [μL]) = (fresh weight [mg]) \times 0.1734 + 0.4696 ($P < 0.001$, $R^2 = 0.45$)腸内の酢酸濃度については酢酸量を上の式で推定した腸体積で割ることにより算出した。この実験で使用した個体数は以下のとおりであるGM-/S+ (コロニーI: N = 10, コロニーII: N = 10), GM-/S- (コロニーI: N = 10, コロニーII: N = 11), GM+/S+ (コロニーI: N = 11, コロニーII: N = 12)、GM+/S- (コロニーI: N = 12, コロニーII: N = 12)。

セラチア菌の成長に酢酸が及ぼす影響

セラチア菌の成長に酢酸が及ぼす影響を明らかにするため、酢酸濃度がそれぞれ48、24、12、6、3、0mMのLB液体培地を用意し、セラチア菌を培養し増殖量を定量した。また、酢酸を添加することによるpHの低下がセラチアの増殖量に影響を与えることが考えられる(Edwards et al. 1985; Davey 1994; Rousk et al. 2009)ため、pHの低下がセラチア菌の増殖

に与える影響について塩酸を用いて検証した。24mM の酢酸と 12mM の塩酸をそれぞれ用いて pH を 4.5 に合わせた LB 培地とコントロールとして何も加えていない LB 培地でのセラチア菌の生育を比較した。また、50mM の酢酸と 14mM の塩酸をそれぞれ用いて pH を 4.2 に合わせた LB 培地とコントロールとして何も加えていない LB 培地でのセラチア菌の生育を比較した。それぞれの処理区について 10 繰り返し行った。培地の pH はコンパクト pH メーター (LAQUA Twin B-712; Horiba Ltd., Japan) を用いた。それぞれの培地に 10 μ L のセラチア培養液(酢酸の dose-response 実験: 2.3×10^{11} CFUs/mL、pH 調整実験: 5.2×10^{11} CFUs/mL)を加えて、28°Cで 4 日間振とう培養を行った。セラチア菌量は上記の色素測定法を用いて定量した。

統計解析

原生生物量、ろ紙上のセラチア量、腸内酢酸濃度についてそれぞれのコロニーにおける処理区間でペアワイズ t 検定を用いて比較を行った。有意水準 α についてボンフェローニ法を用いて補正した ($\alpha=0.00417$)。セラチア菌に対する酢酸濃度の影響は、異なる酢酸濃度下のセラチア菌量を分散分析と Tukey 法により比較することで明らかにした。同様の方法を用いて、酢酸と塩酸を使用して pH を調整した培地でのセラチア菌量の比較を行った。セラチア菌量を色素量から推定するために、線形回帰を用いて CFU と OD540 の検量線の式を得た。同様にしてシロアリの腸の体積と生重量の検量線を求めた。これらの解析はバージョン 3.4.1 の R(R Core Team 2017)を用いて行った。

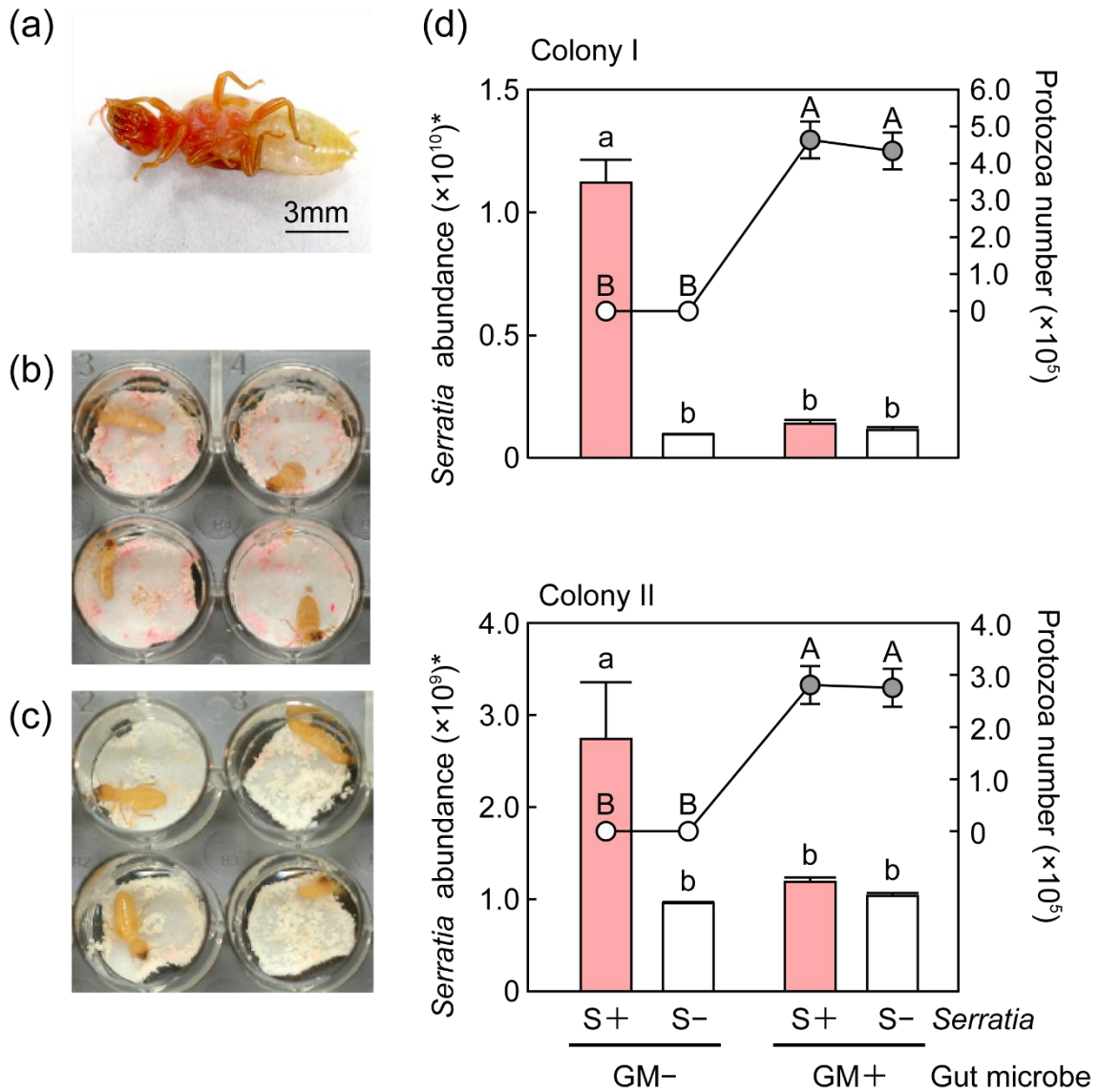


図 2.1 腸内微生物によるセラチア菌の増殖抑制

(a)セラチア菌による日和見感染によって死亡したシロアリ。セラチア菌の生産する赤色素、プロジギオシンによって体色に変化している。(b)セラチア菌がろ紙上に広がる時ろ紙は赤く染まる。一方で、(c)増殖が抑制された際にはろ紙は白いままである。(d)プロットはそれぞれの処理区による腸内原生生物総個体数を、棒グラフはろ紙上のセラチア菌増殖量を表す。エラーバーは標準誤差を表す。異なるアルファベット間で有意差がみられた (ペアワイズ t 検定、 $P < 0.00417$ 、ボンフェローニ補正)。

2.3 結果

シロアリの腸内微生物除去とセラチア菌の増殖

腸内微生物を除去し、セラチアを暴露した処理区(GM-/S+)では、腸内微生物を持っている状態でセラチア菌を暴露した処理区(GM+/S-)と比較して多くのセラチア菌がろ紙上で増殖していた(図 2.1)。前者ではろ紙が赤く染まっていたのに対して、後者ではろ紙は白色のままであった(図 2.1)。セラチア菌を与えられていないシロアリの処理区についてもろ紙は白色のままであった。抗生物質を与えたシロアリは腸内に全く原生生物を持っていなかったことから、抗生物質を用いた腸内微生物除去処理は効果的であることが明らかになった。GM+/S-の処理区においてコロニーIのほうがIIよりも多くの原生生物を持っていた(Welch's t-test, $t = -2.5$, $df = 20.2$, $P = 0.018$)。腸内微生物除去を行ったシロアリとコントロールのシロアリにおいて生存率は変わらなかった(Fisher's exact provability test, colony I, GM+: 23/24, GM-:22/24, $P = 1.00$; colony II, GM+: 24/24, GM-:21/24, $P = 0.23$)。セラチアの感染により死亡したと思われる、死体が赤色に変色していた個体は2匹のみであった。一方はコロニーIのGM+/S+処理区において脱皮した個体で、もう一方はコロニーIIのGM-/S+処理区の個体であった。残りの4匹の死亡個体について死因は不明であった。

シロアリ腸内酢酸濃度

酢酸濃度は原生生物個体数と同様の傾向を示しており、腸内原生生物を持つシロアリでは腸内微生物除去個体と比べて酢酸濃度が有意に高かった(図 2.2)。腸内原生生物を持つシロアリの酢酸濃度はコロニーIでは40~70mM、コロニーIIでは80~130mMであった(図 2.2)。コロニーIにおいて、GM+/S+処理区の個体はGM+/S-処理区の個体よりも腸内酢酸濃度が有意に高かった(図 2.2)。一方でコロニーIIにおいては両者の差はみられなかった。GM+/S-処理区においてコロニーIIの個体のほうがコロニーIの個体よりも有意に腸内酢酸濃度が高かった。

酢酸のセラチア増殖抑制効果

12mM、24mM、48mM の酢酸はセラチア菌の増殖を強く抑制していた (図 2.3)。一方で 3mM、6mM の酢酸では抑制効果はみられなかった (図 2.3)。12mM の酢酸を含む液体培地におけるセラチアの増殖量はコントロールの培地と比べて 1/4 以下であった (コントロール: $7.1 \pm 1.6 \times 10^{10}$ CFUs/mL, 12 mM の酢酸を含む培地: $1.7 \pm 0.36 \times 10^{10}$ CFUs/mL, 平均値 \pm 標準誤差)。また、塩酸 12mM を用いて pH を 4.5 に調整した培地ではセラチア菌の抑制効果がみられなかったが、酢酸 24mM を含み同様の pH であった培地ではコントロールと比べてセラチア菌の増殖が強く抑制されていた (塩酸 12 mM を含む培地: $2.9 \pm 0.71 \times 10^{11}$ CFUs/mL, 酢酸 24 mM を含む培地: $7.4 \pm 1.3 \times 10^9$ CFUs/ mL, コントロール: $2.5 \pm 0.23 \times 10^{11}$ CFUs/mL, mean \pm SE; Tukey's HSD after ANOVA, コントロールと塩酸を含む培地との比較: $P = 0.85$, コントロールと酢酸を含む培地との比較: $P = 0.0012$)。同様に、塩酸 14mM を用いて pH を 4.2 に調整した培地ではセラチア菌の抑制効果がみられなかったが、酢酸 50mM を含み同様の pH であった培地ではコントロールと比べてセラチア菌の増殖が強く抑制されていた (塩酸 14mM を含む培地: $2.5 \pm 0.37 \times 10^{11}$ CFUs/mL, 酢酸 50 mM を含む培地: $4.7 \pm 1.2 \times 10^9$ CFUs/mL, コントロール: $2.5 \pm 0.33 \times 10^{11}$ CFUs/mL, mean \pm SE; Tukey's HSD after ANOVA, コントロールと塩酸を含む培地との比較: $P = 0.99$, コントロールと酢酸を含む培地との比較: $P < 0.001$)。よって、酢酸によるセラチア菌の抑制効果は pH のみによるものではないことが明らかになった。

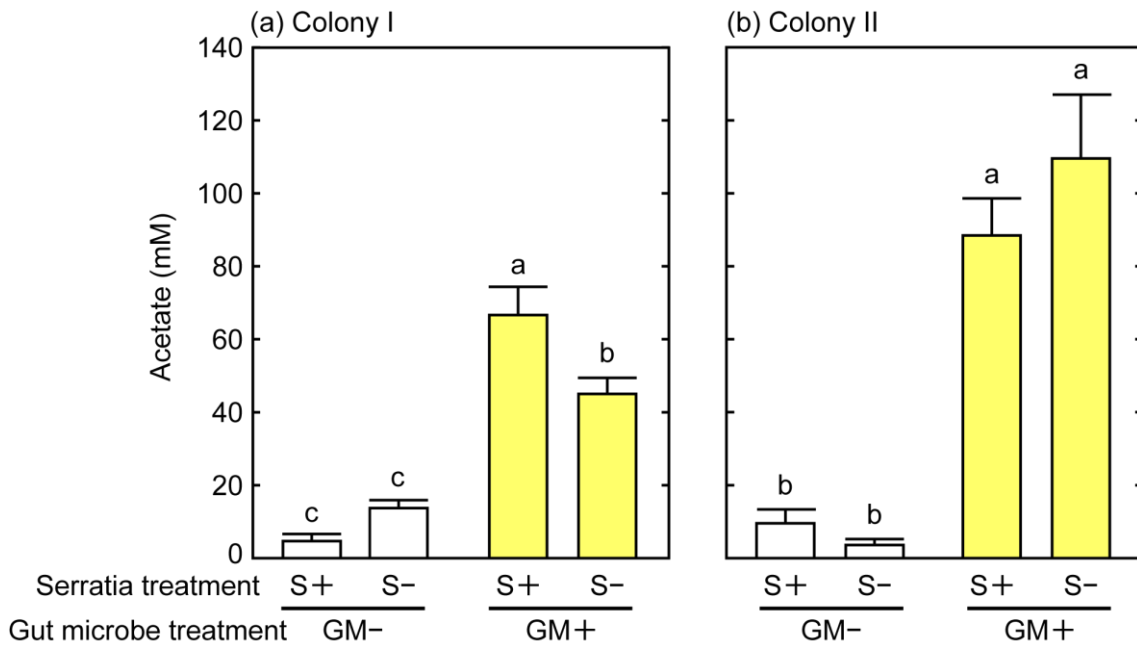


図 2.2 シロアリ腸内酢酸濃度

横軸はそれぞれの処理区を、縦軸は腸内酢酸濃度を表す。それぞれのコロニーにおいて、異なるアルファベット間で有意差がみられた（ペアワイズ t 検定、 $P < 0.00417$ 、ボンフェローニ補正）。エラーバーは標準誤差を表す。

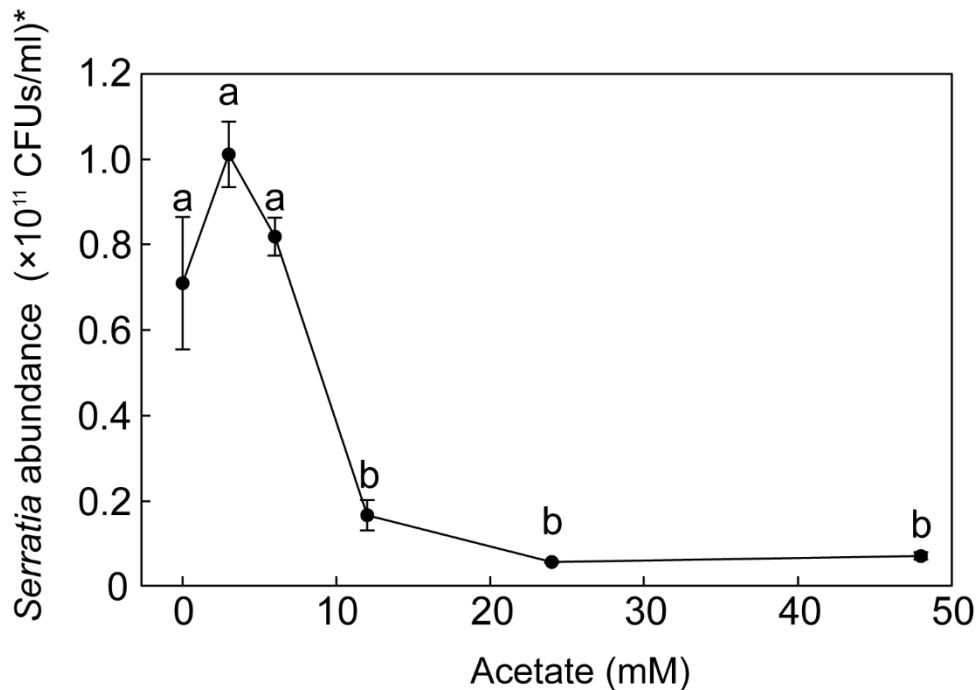


図 2.3 酢酸によるセラチア菌の抑制効果

酢酸によるセラチア菌の抑制作用。異なるアルファベット間で有意差がみられた（ANOVA 後の Tukey HSD、 $P < 0.05$ ）。エラーバーは標準誤差を表す。

2.4 考察

本章において、シロアリの腸内微生物は巣内の日和見感染菌の抑制に貢献していることが明らかになった。腸内微生物を除去したシロアリはろ紙上、つまり周囲の環境中におけるセラチア菌の増殖を抑制できなかったが、腸内微生物を持つシロアリでは抑制していた。シロアリがセラチア菌を与えられていない際にはろ紙は白色に保たれていた（図 2.1）ことから、腸内微生物除去処理区でセラチアがみられた理由としてはセラチアがシロアリの腸をきたまま通過し、フンの排泄時に散布されたためであると考えられる。また、腸内微生物が生産する酢酸はセラチア菌の抑制に十分であることが分かり（図 2.2, 2.3）、これは pH の低下のみによるものではないことも明らかになった。先行研究ではネバダオオシロアリの腸内 pH は 6.5~7.5 であることが知られているが(Bignell and Anderson 1980)、一方でセラチアの生育に適した pH は 5~9 である(Grimont and Grimont 1984)ため、pH はセラチアの抑制要因にならないことが考えられる。よって、本章の研究により腸内共生微生物の消化プロセスにおいて生産された物質がシロアリの巣内衛生の維持に貢献していることが明らかとなった。

このような酢酸の複数機能はどのように生じたのであろうか。化学物質の合成にはコストがかかるため、一つの物質を多くの目的に使用することが適応的であることが考えられ、酢酸についても同様のことが言えるだろう。シロアリと腸内微生物の共生関係において酢酸は腸内微生物によって生産され、シロアリにとってはエネルギー源であることが知られている(Ohkuma and Brune 2011)。シロアリが摂食した木片は腸内原生生物とその共生バクテリアによって酢酸と二酸化炭素、水素にまで分解される(Hongoh et al. 2008)。その後、スピロヘータのような酢酸合成細菌が還元的酢酸生成により二酸化炭素と水素を用いて酢酸を合成する(Leadbetter et al. 1999)。微生物にとっては、酢酸は分泌者の他の競争的微生物を抑制する物質として分泌されることが知られている(Noda and Hayashi 1980; Sharma et al. 2014)。酢酸は細胞内の酸性化とタンパク質の変性をもたらすが(Ishii et al. 2012)、酢酸合成

菌は高い酢酸濃度に対して耐性を持つことが知られている(Wood 1992)。それと同様に、シロアリ腸内微生物は高濃度の酢酸環境中で生存しており、さらに酢酸は巢内の日和見感染菌に対する抑制物質として働くことが明らかになった。したがって、環境中の微生物が他の微生物の抑制に用いていた酢酸を、シロアリが腸内での共生を始める際に栄養物質として転用した、というシナリオが考えられる。また、本章におけるデータからシロアリが巢内の日和見感染菌に対して腸内の酢酸濃度を高め、防衛することが示唆された。原生生物を持つシロアリのうちセラチア菌に暴露された処理区では、セラチアに暴露されていない処理区と比較して高い腸内酢酸濃度を示した(図2.2)。このことは、効果はコロニー依存的ではあるものの、シロアリの腸内に侵入したセラチア菌が腸内酢酸濃度の上昇を引き起こしたことを示唆している。この結果をもたらす要因として、セラチア菌の生産する化学物質が①腸内微生物の酢酸生成を促進した、②シロアリの酢酸吸収を抑制した、もしくはその化学物質によって③シロアリが肛門食の頻度を抑えて酢酸を腸内に貯蔵したことが考えられる。この結果が一方のコロニーのみで見られた背景としては、先行研究でも示されていたようにコロニーにおける腸内微生物群集の違いが原因だろう(Boucias et al. 2013; Scharf et al. 2017)。また、GM+/S-処理区において腸内原生生物の総量についてもコロニー間で異なることを明らかにした。だが酢酸濃度は逆の傾向を示したため、原生生物の総量のみで酢酸濃度は説明されないことも明らかになった。どのようにシロアリ腸内微生物が巢内日和見感染菌に応答するのか、さらにそのコロニー間差がなぜ生じるかということに関してはさらなる研究が必要であろう。

社会性昆虫は共生微生物を病原菌からの防衛に用いることが知られている。例えばイエシロアリは巢の壁上に抗菌物質を生産する放線菌を棲まわせている(Chouvenc et al. 2013)。また近年、腸内微生物が病原菌に対する防衛に貢献していることが明らかになった。ヤマトシロアリと同属である *Reticulitermes flavipes* においては、腸内微生物の除去によりセラチア菌と昆虫病原菌のメタリジウムの感染率が上がることが知られている(Veivers et al. 1982;

Sen et al. 2015)。ネバダオオシロアリの腸内微生物は β -1,3-グルカナーゼを(Rosengaus et al. 2014)、*R. flavipes* の腸内微生物はアミド加水分解酵素(amidohydrolase 2)を生産(Peterson and Scharf 2016a)することによって病原菌からの防衛に貢献している。本章においては、シロアリ腸内微生物が個体免疫に加えて日和見感染菌の巣内での抑制にも貢献していることを明らかにした。さらに腸内微生物の生産する酢酸がその機能に貢献していることを明らかにした。腸内微生物がセラチア菌を抑制するメカニズムについては、酢酸による抑制の他にも、栄養をめぐる競争(Stecher and Hardt 2008)やニッチの占有(Stecher and Hardt 2011)、宿主の免疫の強化(Ivanov et al. 2009)が考えられる(Peterson and Scharf 2016b)。また、腸内微生物によって生産された物質が体外に排出されてセラチア菌を抑制することもありうるだろう。シロアリは多くの種の微生物と腸内で共生しているが、その群集がどのように宿主の防衛に貢献をするかということについてはさらなる研究が必要となるだろう。

シロアリ腸内微生物群集は宿主の生存に必須である栄養を供給している (Brune and Dietrich 2015)。この群集の大きな特徴としては原生生物とバクテリアの複雑な相互作用であろう。この腸内微生物群集の多様性や組成は個体やコロニーによって大きく変わり(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004)、環境要因やコロニーの状況によっても左右される (Inoue et al. 1997; Shimada et al. 2013; Inagaki and Matsuura 2016; Lo Pinto et al. 2016)。近年のメタゲノム解析技術の発達により微生物群集の網羅的解析が可能になりつつある(Brune 2014)。さらに遺伝子発現や代謝産物の網羅的解析技術についてもめざましい発展を遂げている (Scharf 2015)。これからのシロアリと腸内微生物の相互作用研究を進めるうえではこのような網羅的解析に加えて、宿主と微生物の相互作用について栄養のみならず社会免疫、コロニー状況、環境要因などの観点からも微生物群集動態を調べていく必要があるだろう。

付録 巢内酢酸量の定量

本章の付録においては、巢内の酢酸量定量の結果を示す。方法としてはまず 2.2 節と同様に抗生物質を与えてネバダオオシロアリの擬職蟻から腸内微生物を除去した。腸内微生物除去個体とコントロールの個体を 2 匹一組にしてろ紙を敷いたシャーレ内で 1 週間飼育した。ろ紙を取り出して重量を測り、85 μ L の蒸留水を加えて攪拌した。液中の酢酸濃度を 2.2 節と同様に、キットを用いて蛍光強度を測定することで求め、酢酸の絶対量を算出した。その後ろ紙を凍結乾燥機(EYELA FREEZE DRYER FD-1000, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)を用いて乾燥させて、ろ紙の重量を計測し、測定前のろ紙の含水量を求めた。酢酸の絶対量とろ紙の含水量からろ紙上の酢酸濃度を算出した。

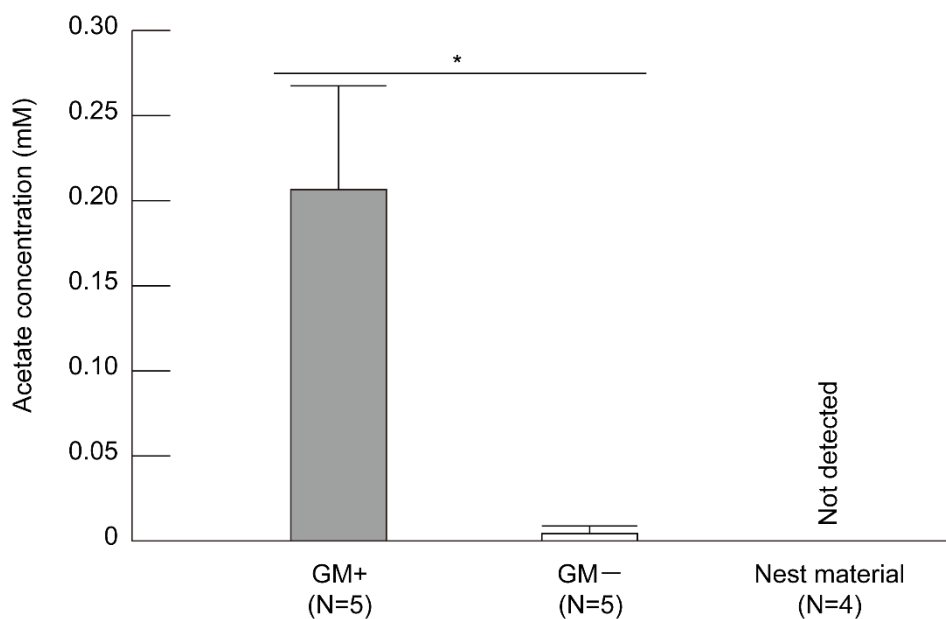


図 2.4 ろ紙上、巢内の酢酸量

左から腸内微生物を持つ個体、腸内微生物を持たない個体を飼育したろ紙上の酢酸濃度、巢材の酢酸濃度。ろ紙上の酢酸濃度を比較した。エラーバーは標準誤差を表す。Welch's t-test, $t = 3.31$, $df = 4.04$, $P = 0.0292$

その結果、腸内微生物を持つネバダオオシロアリはろ紙上に酢酸を散布していた。だが、その量は 0.3mM と非常に少なく、セラチア菌の抑制には不十分であった。さらに巢材からは酢酸は検出されなかった。よって腸内微生物の生産する酢酸は主に腸内においてセラチア

菌の抑制効果を発揮していることが考えられる。酢酸は揮発性の物質でありその場にとどめておくことが困難であるため、主に腸内で抑制効果を発揮しているのだろう。先行研究ではシロアリのフンにおいても抗菌タンパクが含まれることが明らかになっている (Rosengaus et al. 2014)。腸内微生物によって生産されたそれぞれの物質の特性によって、どの場で効果を発揮するかが異なるのかもしれない。

第3章 ヤマトシロアリにおけるカースト特異的腸内微生物群集

3.1 ヤマトシロアリにおけるカースト・性特異的腸内原生生物群集

3.1.1 はじめに

多くの動物は体内で多様な微生物と共生している(Ley et al. 2008)。腸内における共生微生物群集は多様であり、宿主の成長や行動、免疫などに影響を与えることが知られている(Rodrigues et al. 2010; Heijtz et al. 2011; De Palma et al. 2015)。逆に、宿主の生理状況や環境要因は腸内微生物群集に影響することが知られている(De Filippo et al. 2010; Muegge et al. 2011; Priya et al. 2012)。それだけではなく、宿主の性も腸内微生物群集の組成に影響することが知られており、哺乳類(Markle et al. 2013; Gomez et al. 2015; Shastri et al. 2015)、魚類(Bolnick et al. 2014)や昆虫(Menasria et al. 2014)で近年研究が進められている。腸内微生物群集の性差は腸の pH(Feldman and Barnett 1991; Prewett et al. 1991; Freire et al. 2011)、ホルモン(Markle et al. 2013)、免疫(Restif and Amos 2010; Schomburg et al. 2010)の性差に起因すると考えられている。このように、宿主と腸内微生物の相互作用は種内で一様ではなく、性によっても異なることが明らかになってきたことで、宿主の性と共生微生物の関係は近年注目されてきている。

相利共生の最もよく知られる例として下等シロアリと腸内原生生物の関係がある(Cleveland 1923)。原生生物群集はシロアリの種特異的であることが知られている(Kirby 1937; Honigberg 1970)。両者は絶対共生関係にあり、腸から原生生物を抜いた状態ではシロアリは3~4週間しか生きることができず(Cleveland 1923; Andrew 1930)、シロアリを飢餓状態に置くと原生生物は減少していく(Hu et al. 2011)。これまでのシロアリと原生生物の研究ではおもに木材の消化や栄養の生産機能に着目されてきた(Ohkuma and Brune 2011)。原生生物のカースト間差(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004)、コロニー間差(Cook and Gold 1999)、季節に伴う変化(Lo Pinto et al. 2016)、創設後の変化(Shimada et al. 2013)が研究されているが、これらは宿主の餌の変化が原生生物群集の違いをもたらした結果であると解釈できる。社会性の膜翅目とは異なり、雌雄ともに労働に従事するシロアリにおいて、共生微生物

物群集の性差が存在するのだろうか。そもそもこれまで、シロアリのワーカーは不妊であるため、その性差にはほとんど着目されてこなかった。一部の高等シロアリにおいてはワーカーの雌雄で外部形態が大きく異なるため、行動や生理的な性差に着目されているが(Haifig et al. 2011; Toga et al. 2016)、外部形態に大きな差のない下等シロアリでは行動的・生理的性差に関する研究は少なく(Mitaka et al. 2016; Toga et al. 2016)、化学受容体において非繁殖カーストでの性差が知られるにとどまっている(Mitaka et al. 2016)。そこで本研究では、ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* において繁殖虫と非繁殖カーストの原生生物群集を、性差という観点から調べた。

ヤマトシロアリの共生原生生物は 8 属 13 種が記載されている(Kitade 2007)。本研究では *Pyrsonympha* spp. (*Pyrsonympha grandis*, *P. modesa*)、*Dinenympha exilis*、*D. parva*、*D. leidy*、*Dinenympha* spp. (*D. rugosa*、*D. porteri*)、*Trichonympha agilis*、*Teranympha mirabilis*、*Holomastigotes elongatum* を Kitade(2007)に従って判別した。それ以外の原生生物は「small protozoa (*Trichomonas* sp.、*Hexamastix* sp.、*Microjoenica* sp.)」としてカウントした(図 3.1.1)。

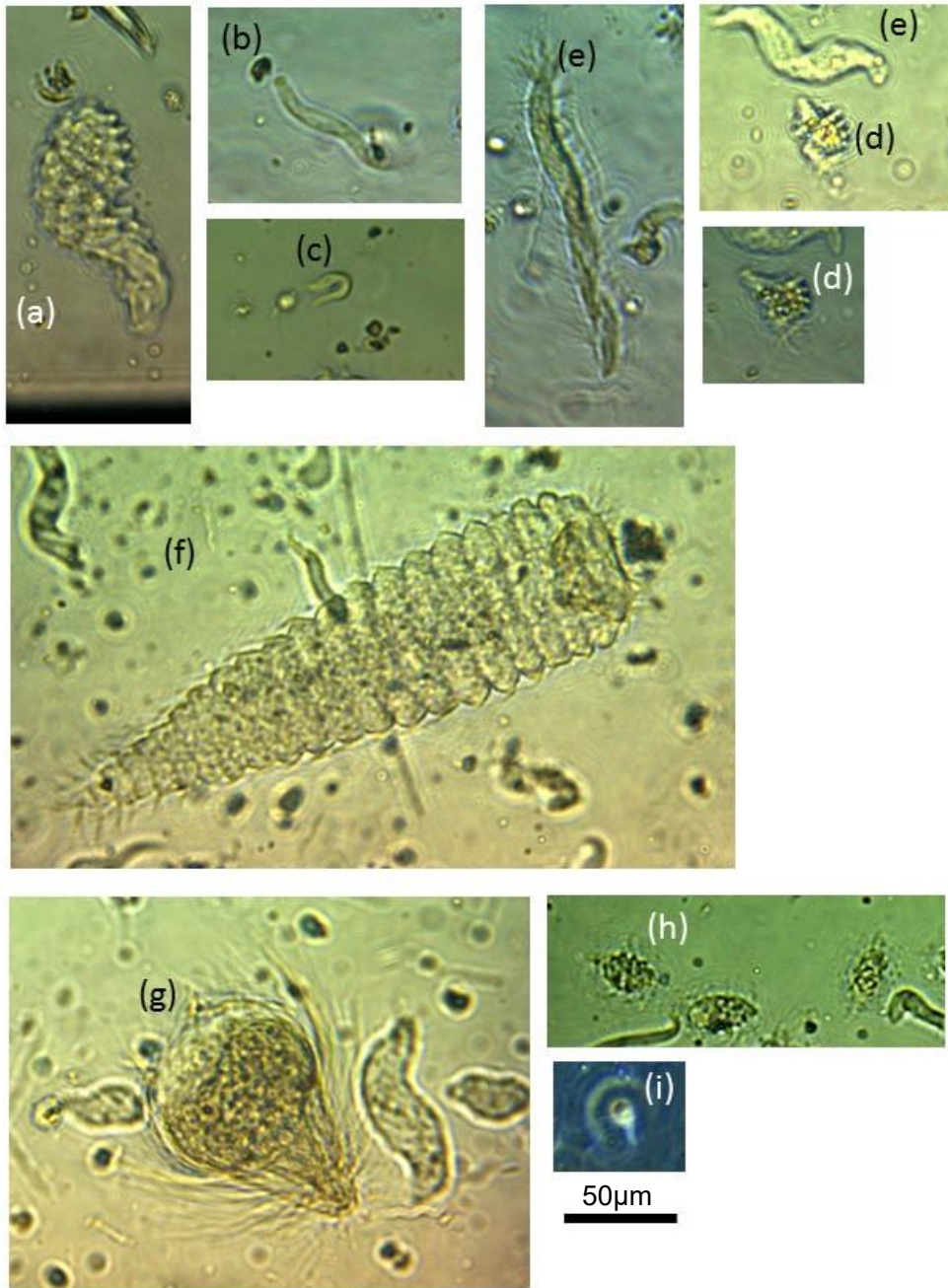


図 3.1.1 ヤマトシロアリで観察される原生生物

上から(a)*Pyrrsonympha* spp., (b)*Dinenympha exilis*, (c)*D. parva*, (d)*D. leidyi*, (e)*Dinenympha* spp., (f)*Trichonympha agilis*, (g)*Teranympha mirabilis*, (h)*Holomastigotes elongatum*, (i)small protozoa

3.1.2 方法

シロアリの採集

ヤマトシロアリの成熟コロニーを6コロニー(A-F)、島根(A)、京都(B、C)、愛媛(D)、広島(E、F)から採集した。樹種はそれぞれマツ(G、H)、スギ(A、C)、ヒノキ(B)であった。創設王と二次女王、ワーカー、兵アリを取り出し、実験に用いた。さらにワーカーのみのコロニーを6つ(G-L)京都から採集した。ワーカーと兵アリは腹板の腹部末端節の観察により雌雄を判別した(Zimet and Stuart 1982)。

原生生物のカウント、ワーカーの腸の重量測定

コロニーA-Fから取り出した各カーストの腸内原生生物の個体数を数えた。それぞれのコロニーにおいて創設王、二次女王5匹、ワーカーと兵アリの雌雄それぞれ5匹ずつ用いた。各個体の生重量を測定し、腸をピンセットで取り出した。腸は0.45%の塩化ナトリウム水溶液100 μ l中に入れ、ピンセットを用いて細かく引き裂いた。そこから20 μ lを取り出して血球計算盤(C-chip hemocytometer; NanoEntek, Korea)に流し入れた。血球計算盤上の16区画から2区画をランダムに選び、その中の原生生物数を数えた。原生生物の種判別はKitade (2007)を参考にし、*Pyrsonympha* spp. (*P. grandis* and *P. modesa*)、*Dinenympha exilis*、*D. parva*、*D. leidyi*、*Dinenympha* spp. (*D. rugosa* and *D. porteri*)、*Trichonympha agilis*、*Teranympha mirabilis*、*Holomastigotes elongatum*、の8種と、small protozoa (*Trichomonas* sp.、*Hexamastix* sp.、*Microjoenica* sp.)の計9タイプの個体数を数えた。血球計算盤上の2マスは0.4 μ lに相当するので、以下の数式を用いてシロアリ1匹当たりの原生生物個体数を推定した[カウントした原生生物個体数 \times サンプルを入れた塩化ナトリウム水溶液の体積(100 μ l)]/[原生生物をカウントした区画の体積 (0.4 μ l)] (Lewis and Forschler 2004; Hu et al. 2011)。コロニーG-Lから取り出したワーカーの生重量を測定し、腸を取り出した後に腸以外の部位の生重量を測定した。生重量から腸以外の重量の値を差し引くことで腸の重量を算出した。

統計解析

A-F コロニーにおいて原生生物個体数にカースト間（ワーカー、兵アリ、二次女王、創設王）、性間で違いがみられるかどうかを二元配置の分散分析を用いて調べた。その後、ワーカーと兵アリのそれぞれにおいて総原生生物量と各原生生物種の量がコロニーと性によって異なるかどうか、交互作用がみられるかどうかを調べるために以下の解析を行った。原生生物の個体数を応答変数に、生重量、コロニー、性の効果とコロニーと性の交互作用を説明変数に、quasi-Poisson 分布を仮定した GLM を用いた。各説明変数の効果が有意だったかを調べるために尤度比検定を用いた。またワーカーにおいて各原生生物種の存在割合がコロニーと性によって異なるかどうか、交互作用がみられるかどうかを調べるために以下の解析を行った。原生生物の割合を応答変数に、生重量、コロニー、性の効果とコロニーと性の交互作用を説明変数に、quasi-binomial 分布を仮定した GLM を用いた。各説明変数の効果が有意だったかを調べるために尤度比検定を用いた。G-L コロニーのワーカーにおいて腸の重量がシロアリの生重量、コロニー、性にどのように影響されるかを調べるために、腸の重量を応答変数に、生重量、コロニー、性とそれぞれの交互作用を目的変数にとった重回帰分析を行った。統計解析は R.3.2.2 を用いて行った。

3.1.3 結果

原生生物量解析

ワーカーと兵アリの推定原生生物総個体数は 1 匹当たりそれぞれ 94833.3 ± 3871.2 (平均値 \pm 標準誤差、 $N = 60$)と 39309.3 ± 1596.2 ($N = 59$)であった(図 3.1.2)。創設王($N = 6$)と二次女王($N = 30$)には原生生物が全く存在しなかった。原生生物個体数には有意なカースト間差が見られたが性差は見られず、交互作用も有意ではなかった(two-way ANOVA, caste: $F_2 = 264.18$, $P < 0.001$, sex: $F_1 = 0.013$, $P = 0.91$, caste \times sex: $F_2 = 0.63$, $df = 2$, $P = 0.53$, 図 3.1.2)。ワー

カーにおいて原生生物総量にはコロニーと性の交互作用がみられた(GLM, 尤度比検定, $\chi^2_5 = 11.84, P=0.037$, 図 3.1.3)。一方で兵アリには有意な性差、コロニーと性の交互作用は見られなかった(GLM, 尤度比検定, sex: $\chi^2_1 = 1.76, df=1, P = 0.185$; colony \times sex: $\chi^2 = 2.18, df=5, P = 0.82$)。

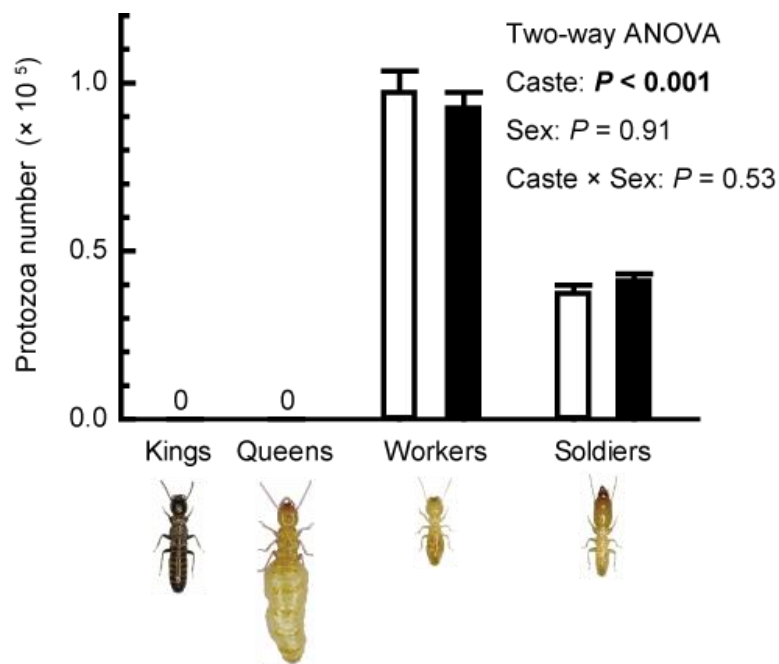


図 3.1.2 ヤマトシロアリにおける原生生物総個体数のカースト間差

縦軸は推定個体数を、横軸は各カーストを表す。白が雄、黒が雌を表す。エラーバーは標準誤差を表す。

原生生物種ごとの傾向としては、ワーカーで3種において有意な性差が見られ、性とコロニーの交互作用は3種において有意であった。性差がみられた種は *D. leidyi* (GLM, 尤度比検定, $\chi_1^2 = 10.23, P = 0.0014$)、*T. mirabilis* (GLM, 尤度比検定, $\chi_1^2 = 8.59, P = 0.0034$)、small protozoa (GLM, 尤度比検定, $\chi_1^2 = 5.84, P = 0.016$)であった。コロニーと性の交互作用がみられた種は *Pyrsonympha* spp. (GLM, 尤度比検定, $\chi_5^2 = 18.07, P = 0.0029$)、*Dinenympha* spp. (GLM, 尤度比検定, $\chi_5^2 = 17.57, P = 0.0035$)、*T. mirabilis* (GLM, 尤度比検定, $\chi_5^2 = 32.25, P < 0.001$)であった。兵アリにおいては *D. leidyi* のみで有意な性差が見られた (GLM, 尤度比検定, $\chi_1^2 = 6.16, P = 0.0131$) が、コロニーと性の交互作用はどの種でも見られなかった (GLM, 尤度比検定, $\chi_5^2 = 1.97-10.08, P = 0.073-0.853$)。

それぞれのコロニーにおいては、ワーカーでは B、C コロニーにおいて原生生物総個体数の性差がみられた (GLM, 尤度比検定, Holm correction, B: $\chi_1^2 = 19.54, P < 0.001$, C: $\chi_1^2 = 8.98, P = 0.0137$, others: $\chi_1^2 = 0.0016-2.94$, 図 3.1.3)。コロニーCでは *Pyrsonympha* spp. の個体数において性差が見られ (GLM, 尤度比検定; colony C: $\chi_1^2 = 40.06, P < 0.001$; others: $\chi_1^2 = 0.108-5.98$; 図 3.1.3)、コロニーBでは *D. exilis* において (GLM, 尤度比検定, Holm correction; $\chi_1^2 = 7.62, P = 0.035$; others: $\chi_1^2 = 0.005-5.762$, 図 3.1.3)、コロニーFでは *T. agilis* において性差が見られた (GLM, 尤度比検定, Holm correction, $\chi_1^2 = 8.39, P = 0.004$; others: $\chi_1^2 = 0.373-2.139$, 図 3.1.3)。兵アリにおいては、*Pyrsonympha* spp. ではどのコロニーにおいても性差は見られなかった (GLM, 尤度比検定, Holm correction, $\chi_1^2 = 0.17-4.50$, 図 3.1.3)。

コロニーDにおいて *D. exilis* の個体数の性差が見られ (GLM, 尤度比検定, Holm correction; $\chi_1^2 = 7.38, P = 0.04$; others: $\chi_1^2 = 0.114-2.834$; 図 3.1.3)、コロニーFにおいて *T. agilis* の個体数の性差が見られた (GLM, 尤度比検定, Holm correction; $\chi_1^2 = 13.61, P = 0.001$; others: $\chi_1^2 = 0.00002-1.211$; 図 3.1.3)。

ワーカーの腸の重量においてはコロニーと性の交互作用が見られ (linear model, F-test; colony \times sex: $F_{3,120} = 4.00, P = 0.002$, 図 3.1.5)、また生重量とは正の相関を持ち (linear model,

F-test; weight: $F_{1,120} = 79.36, P < 0.001$)、コロニーごとに有意に異なる結果となった(linear model, F-test; colony: $F_{5,120} = 2.74, P = 0.022$)。一方で性差は有意ではなかった(linear model, F-test; sex: $F_{1,120} = 1.92, P = 0.169$)。重量とコロニー、重量と性、および重量とコロニーと性の交互作用は有意ではなかった(linear model, F-test; weight \times colony: $F_{5,120} = 1.53, P = 0.185$, weight \times sex: $F_{1,120} = 0.45, P = 0.502$, weight \times colony \times sex: $F_{5,120} = 0.47, P = 0.80$)。

原生生物の種組成

ワーカーにおいて、原生生物種の割合は *Dinenympha* spp. で最も高く、*D. exilis*、*D. parva*、*D. leidy*、*Pyrronympha* spp.、*H. elongatum*、small protozoa、*T. agilis*、*T. mirabilis* の順に高い割合を占めていた。ワーカー全体において原生生物種の割合の平均 (\pm 標準誤差) は割合の高いものから 47.93 ± 1.31 、 33.56 ± 1.28 、 6.18 ± 0.37 、 4.07 ± 0.39 、 2.91 ± 0.20 、 2.38 ± 0.14 、 2.12 ± 0.20 、 0.76 ± 0.09 、 $0.08 \pm 0.02\%$ であった(N = 60)。

原生生物の種組成においてもコロニー間差とコロニー内における性差が見られた(図 3.1.4)。ワーカーにおける各原生生物種の存在割合をコロニー、性間で比較したところ、有意な性差が *D. parva* (GLM, 尤度比検定, $\chi^2_1 = 6.29, P = 0.012$)、*D. leidy* (GLM, 尤度比検定, $\chi^2_1 = 16.44, P < 0.001$)、*T. mirabilis* (GLM, 尤度比検定, $\chi^2_1 = 7.41, P = 0.006$)、small protozoa (GLM, 尤度比検定 ratio test, $\chi^2_1 = 6.51, P = 0.011$)においてみられた。またコロニーと性の交互作用は *Pyrronympha* spp. (GLM, 尤度比検定, $\chi^2_5 = 18.90, P = 0.002$)、*T. agilis* (GLM, 尤度比検定, $\chi^2_5 = 12.08, P = 0.034$)、*T. mirabilis* (GLM, 尤度比検定, $\chi^2_5 = 33.90, P < 0.001$)において有意であった。兵アリにおいては、どの原生生物種においても性差、コロニーと性の交互作用も見られなかった(GLM, 尤度比検定, sex: $\chi^2_1 = 0.06-3.23, P = 0.07-0.80$, colony \times sex: $\chi^2_1 = 2.08-9.73, P = 0.08-0.84$)。

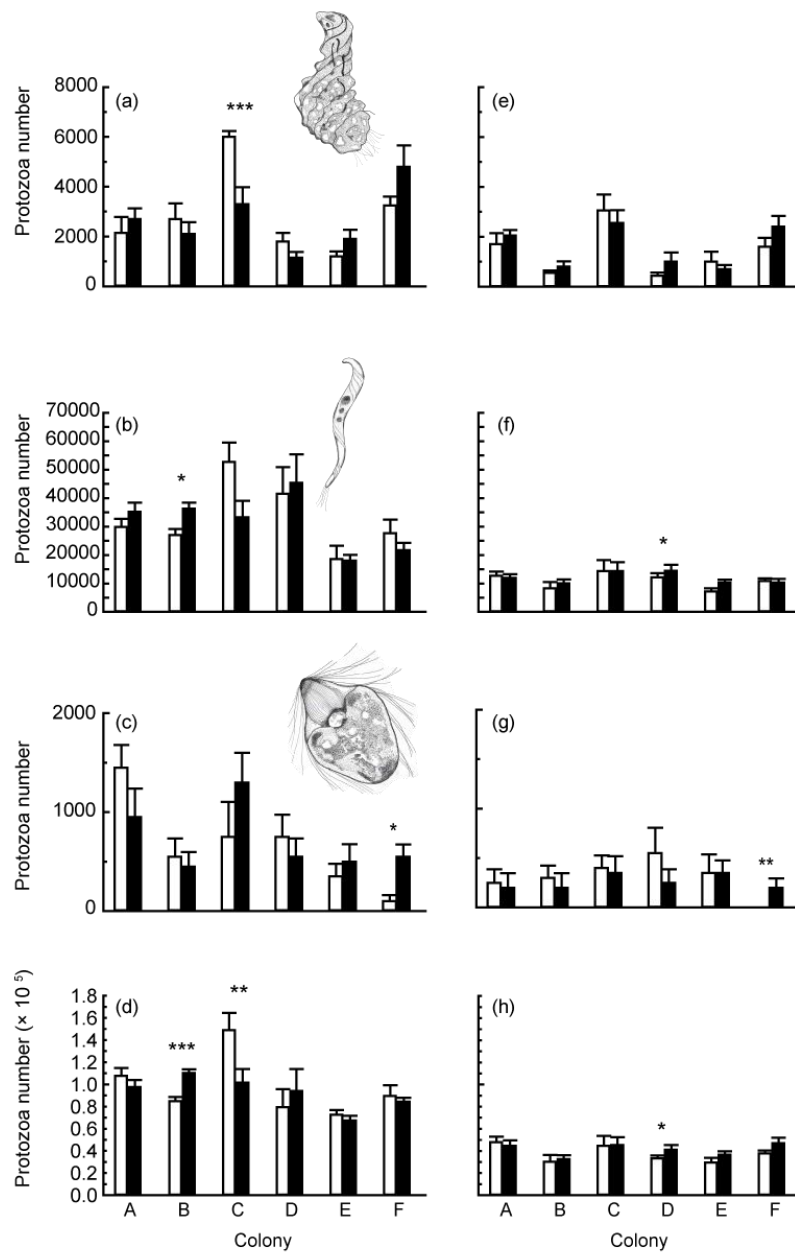


図 3.1.3 ヤマトシロアリのワーカー、兵アリにおける原生物種ごとのコロニーごと性間比較

縦軸はシロアリ 1 個体あたりの原生物の推定個体数、横軸はコロニーを表し、白が雄、黒が雌を表す。ワーカー(a, b, c, d)と兵アリ(e, f, g, h)における *Pyrsonympha* spp. (a, e)、*Dinonympha exilis* (b, f)、*Trichonympha agilis* (c, g)、総原生物量(d, h)の性間比較。エラーバーは標準誤差を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Holm 補正を行った。

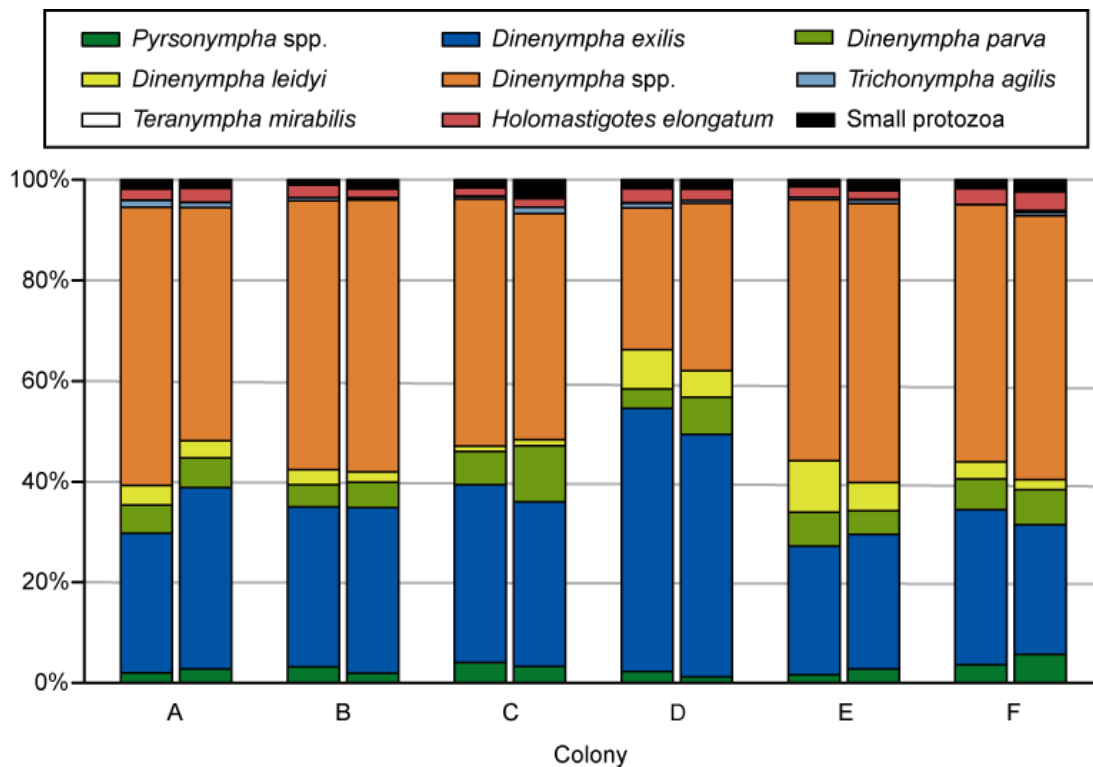


図 3.1.4 コロニーごとの原生生物組成の性間比較

縦軸は割合、横軸はコロニーを表し、それぞれのコロニーにおいて左が雄、右が雌のワーカーを表す。

3.1.4 考察

本研究によって初めてワーカーの持つ原生生物量と割合にコロニー依存的な性差が見られることが分かった。雄の方が雌よりも原生生物を多く持つコロニーもあれば、その一方で逆の傾向を示すコロニーもみられた(図 3.1.3)。原生生物の種によってもその傾向は異なり、雄に多く見られる種や雌に多く見られる種もみられた(図 3.1.3)。ワーカーにおいては原生生物 9 種中 5 種が個体数において有意な性差もしくはコロニーと性の交互作用を示し、割合において 6 種が有意な性差もしくはコロニーと性の交互作用を示した。よってワーカーはコロニー、性によって異なる原生生物群集を持つといえる。宿主の餌の違いは原生生物群集の違いを生み出す。そのためコロニー(Cook and Gold 1999)やカースト間(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004)において原生生物群集が異なることが知られている。本研究

は同じ餌を食べていると考えられているワーカーにおいてはじめて原生生物群集の性差を発見したものである。

兵アリにおいては *D. leidyi* のみで性差がみられたが他の原生生物種においては性差が見られなかった。この原因としては、兵アリはワーカーから肛門食によって餌を摂取する (Cleveland 1925; Su and La Fage 1987) ために餌の影響を直接的に受けにくいことが考えられる。ワーカーの性によって肛門食の内容物や頻度は大きく偏らないのではないのだろうか。また兵アリはワーカーと異なり繁殖虫に分化することがない (Roisin and Korb 2011) ために生理的な性差が少ないことも原因と考えられる。

本研究で明らかになったワーカーの持つ原生生物群集のコロニー依存的性差の原因はいくつか挙げられる。その一つとして個体の腸の大きさ (重量) が原生生物の総量に大きく関係するだろう。本研究において、ヤマトシロアリのワーカーの腸の重量は雌の体サイズが大きいという性的二型 (Matsuura 2006) に従わないことが明らかになった (図 3.1.5)。腸の重量のコロニー依存的性差は原生生物総量のコロニー依存的性差が生じる原因の一つであることが考えられる。腸の重量のコロニー依存的性差の原因は遺伝子型や環境要因であることが考えられるが、本節の研究からは明らかになっていない。腸の重量だけでなく遺伝子発現や化学的性質、機能などの面から腸について調べることでその原因が明らかになるだろう。また、無脊椎動物においては宿主の餌が腸内微生物に与える影響が性によって異なることが分かっている (Bolnick et al. 2014)。それに加えて、ホルモンや免疫には性差があり (Restif and Amos 2010; Schomburg et al. 2010; Markle et al. 2013)、それが腸内微生物に影響する (Cleveland 1949; Engel and Moran 2013) ことで腸内微生物の性差が生じることもありうる。またコロニー間の、例えば気候や樹種、材の腐朽具合はコロニー間の餌の状態の違いを生み出す。そのため、本研究で明らかになった原生生物群集のコロニー依存的性差は餌の影響の性非対称性もしくは免疫やホルモンの性差に起因することが考えられる。

多くの動物において、腸内微生物が宿主の行動 (Heijtz et al. 2011; Cryan and Dinan 2012;

De Palma et al. 2015)、ホルモン分泌(Shin et al. 2011; Storelli et al. 2011)、免疫(Engel and Moran 2013)、巣仲間認識(Matsuura 2001; Kirchner and Minkley 2003; Minkley et al. 2006)などに影響することが知られている。シロアリにおいても、原生生物群集の性差がこれらの上で述べた行動や生理的性差につながる事が考えられる。だが原生生物群集を構成するそれぞれの種の役割としては木材の消化や栄養の生産(Ohkuma and Brune 2011)以外にはよくわかっていない。原生生物種と群集が環境要因やシロアリの性に対してどのように応答し、逆にシロアリの個体や社会にどのように影響するかを明らかにするにはさらなる研究が必要であろう。本研究によって、シロアリの非繁殖カーストにおいても性の重要性が示唆された。この現象の原因とその結果引き起こされる現象について研究することでシロアリにおける宿主と共生微生物の関係により深く迫ることができるだろう。

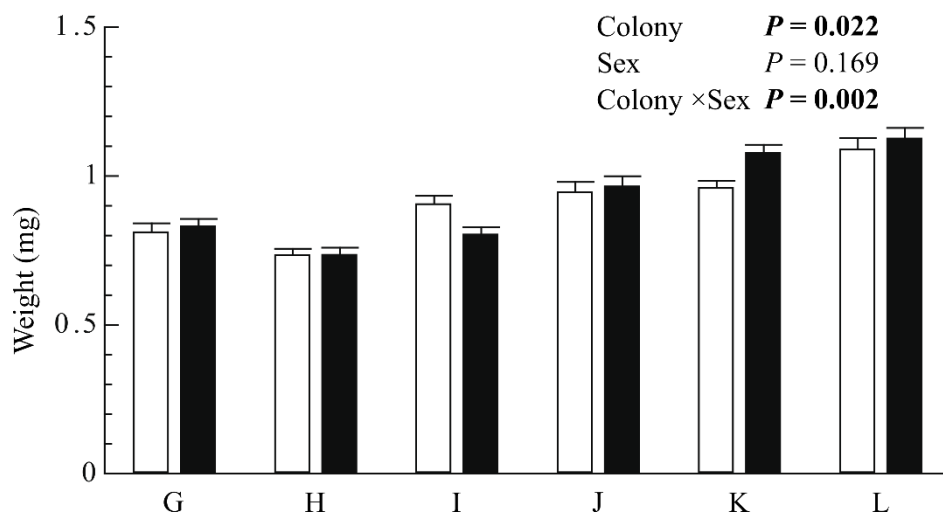


図 3.1.5 ワーカーの腸重量のコロニー、性間比較

縦軸は腸の重量、横軸はコロニーを表し、白が雄、黒が雌のワーカーを表す。エラーバーは標準誤差を表す。重回帰分析、weight: $P < 0.001$, weight \times colony; weight \times sex; weight \times colony \times sex: $P > 0.05$

3.2 ヤマトシロアリにおける腸内細菌群集のカースト間比較

3.2.1 はじめに

多くの動物の腸内には細菌が生息しており、餌の消化や栄養の生産、免疫機能への貢献、さらには行動や神経発達にも影響を与えていることが知られている(Ley et al. 2008)。腸内には多様な細菌群集が存在していることが一般的に知られている。腸内に存在する細菌群集はニッチを占有することで病原性微生物の増殖を抑制する働きがあることが知られている(Engel and Moran 2013)。よって細菌は群集として腸内に存在することで宿主に利益をもたらす。一方で特定の細菌種の機能にも注目が集まっている。例えばビフィズス菌の一種が分泌した酢酸が宿主の細胞に取り込まれ、免疫機能を促進することが知られている(Fukuda et al. 2011)。また、乳酸菌の仲間の多くは腸内環境を整える働きがあるとされ、胃腸炎に対する薬剤としての効用が示されている(Shornikova et al. 1997)。このように、腸内細菌は群集としても、それぞれの種単体としても宿主に大きな影響を与える。

シロアリの腸内共生微生物として代表的なものに原生生物と細菌がある。原生生物は下等シロアリと呼ばれる比較的祖先的なグループで見られるが、高等シロアリと呼ばれる、派生的なシロアリ科では失われている(Ohkuma and Brune 2011)。一方で細菌はどの分類群においても腸内に共生している。下等シロアリにおいては、原生生物の体内・体表面に共生している細菌と、遊離しているものが知られている。原生生物共生細菌は宿主である原生生物と物質の交換を行い、木材消化のプロセスにも大きく関与する(Hongoh et al. 2008)。遊離細菌は窒素固定や、還元的酢酸生成に大きく貢献していることが知られている(Breznak et al. 1973; Leadbetter et al. 1999)。特にスピロヘータ門に属する細菌はシロアリの腸内から多く単離され、重要な役割を担っていると考えられている(Leadbetter et al. 1999)。高等シロアリにおいてはその腸内細菌組成は種ごとに大きく異なり、土食や草食、キノコ食といった多様なそれぞれの食性を支えていると考えられている。特にキノコ栽培を行う高等シロアリの仲間では、シロアリ、キノコ、腸内細菌がそれぞれ分担し

て草本や木材の消化を担っていることが明らかになっている(Poulsen et al. 2014)。腸内の細菌はそれぞれのシロアリの食性を反映しているが、シロアリ同種内ではそれぞれのカーストはどのような細菌を有しているのだろうか。それぞれのタスクに適したような微生物を持っているのだろうか。

前節での研究によりヤマトシロアリでは王・女王は全く腸内原生生物を持たず、ワーカー、兵アリのみが持つことが明らかになった。それぞれのカーストにおいて、腸内細菌群集は大きく異なることが予測される。これまでの研究において、繁殖虫の持つ腸内微生物にはほとんど着目されてこなかった(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004; Benjamino and Graf 2016)。ヤマトシロアリを用いて王・女王を含めた個体の腸内細菌を調べることで、繁殖虫という、シロアリにおいて最も重要な繁殖を担う個体を支える共生微生物を明らかにする第一歩となるだろう。

本節において、ヤマトシロアリのそれぞれのカーストが持つ腸内細菌叢を明らかにするために、イルミナ社の次世代シーケンサーMiSeq 用いて 16SrRNA 遺伝子に着目した細菌群集解析を行った。得られた結果から細菌群集ネットワークを構築し、解析を行うことで繁殖虫特異的な細菌を明らかにした。さらに、特に顕著な傾向を示した王・女王特異的な細菌については、TA クローニングを用いて 16SrRNA 遺伝子の全長を得て、系統解析を行った。

3.2.2 材料と方法

シロアリ

2018年5月に滋賀県においてヤマトシロアリのコロニーを2つ(TI016, TI017)採集し、王、女王、ワーカー、兵アリを取り出した。それぞれの位置情報は以下のとおりである。TI016: 緯度 35.07806° , 経度 136.08299° , TI017: 緯度 35.07411° , 経度 136.08719° 。ワーカーと兵アリについては腹部先端の形態をもとに雌雄に分けた(Zimet and Stuart 1982)。創設王1匹、二次女王5匹、ワーカーのオス5匹、メス5匹、兵アリのオス4匹、メス4匹をコロ

ニーから取り出して使用した。まず滅菌水で体表を軽く洗浄した後に頭部を切り離し、腹部の先をピンセットでつまんで全腸を取り出した。取り出した腸については 0.6mL チューブに入れて−80°Cで保管した。

DNA 抽出とシーケンシング

保存した腸について、PowerSoil DNA isolation Kit(MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)を用いて、プロトコルに従って DNA 抽出を行った。抽出した DNA について、16S rRNA をターゲットとした細菌ユニバーサルプライマー(フォワード: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'、リバーズ: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC)を用いてアンプリコン PCR を行った。増幅領域は 16S rRNA の V3-V4 領域で、約 550bp である。1 サンプルにつきゲノム DNA を 2.5μL、1μM フォワード、リバープライマーをそれぞれ 5μL、2×KAPA HiFiHotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, WA, USA)を 12.5μL 混合して PCR 反応液を作成した。PCR 条件は以下の通りである。95°Cで 3 分間変性処理し、その後、95°Cで 30 秒(変性)、55°Cを 30 秒(アニーリング)、72°Cを 30 秒(伸長反応)の処理を 25 サイクル繰り返したのちに 72°Cで 5 分間処理した。次に AMPure XP(Beckman Coulter, Pasadena, CA)ビーズを用いて PCR 産物の精製を行い、遊離プライマーとプライマーダイマーを取り除いた。次に、増幅した遺伝子配列にインデックス配列およびシーケンスアダプターを付加するためにインデックス PCR を行った。2ndPCR の反応液はアンプリコン PCR 産物 5μL、NexteraXT インデックスプライマー1(N7xx)(Illumina, San Diego CA)を 5μL、NexteraXT インデックスプライマー2(S5xx)を 5μL、2×KAPA HiFiHotStart ReadyMix を 25μL、ミリ Q を 10μL 含んでいた。PCR 条件は以下の通りである。95°Cで 3 分間変性処理し、その後、95°Cで 30 秒(変性)、55°Cを 30 秒(アニーリング)、72°Cを 30 秒(伸長反応)の処理を 8 サイクル繰り返した後に 72°Cで 5 分間処理した。産物を再び AMPure

XP ビーズを用いて精製した。得られた PCR 産物を、東京工業大学の本郷研究室において MiSeq を用いて 16SrRNA 配列のシーケンシングを行った。

シーケンシングデータ解析

得られた 16S のリードについてのデータを、統計解析ソフト R のパッケージ DADA2 を用いて解析した。DADA2(Callahan et al. 2016)を用いることでそれぞれのリードを 1 塩基レベルで区別することができる。それぞれの細菌遺伝子配列は ASV(Amplicon sequence variant)と呼ばれる。本研究においては 1 ASV を 1 OTU(Operational taxonomic unit)としてバクテリアの種の基準として扱った。得られた各 OTU について、細菌データベース Silva (Quast et al. 2013; <https://www.arb-silva.de/>) を用いて種を決定した。得られた OTU について、まず真核生物や古細菌として判定されたものを除去した。次に、サンプルごとの低頻度出現 OTU、すなわち、各サンプルのリード総数に対して 0.1%未満の OTU を除去した。次にサンプルごとのリード数を合計 1000 になるように希釈化(rarefaction)を行った。得られた細菌群集データについて、各個体から検出された OTU 数とシンプソンの多様度指数について、ペアワイズ U 検定を用いて 2 コロニーのカースト間で比較した。シンプソンの多様度指数 D については以下の式を使用した。

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

ここで S は群集に含まれる OTU 数で、 p_i は種 i の個体数が、群集の全個体数に占める割合である。この値は群集の種多様性が高いほど 1 に近づく。

また、各カースト・コロニーにおける腸内細菌群集をネットワークの構築・PERMANOVA・NMDS(非計量多次元尺度法)を用いて比較した。PERMANOVA, NMDS については統計解析ソフト R 3.5.1(R core team 2018)のパッケージ vegan を用いて行った。ネットワークの構築については R のパッケージ igraph を用いてデータを生成した後に GePhi 0.9.2(Bastian and Heymann 2009)を用いてネットワークを描画した。

繁殖虫特異的バクテリアの系統解析

用いたコロニーのうち 1 コロニー(TI016)において、顕著に王、女王に特異的に優占している細菌の配列がみられた。その細菌配列は 16S rRNA 配列の V3-V4 領域のみでは分類群が不明であったため、16SrRNA の全長配列を得て系統解析を行った。手法としては TA クローニングを用いた。まず、コロニーTI016 の二次女王の腸の抽出 DNA に対して 16SrRNA をターゲットとしたプライマーを用いて PCR を行った。使用プライマーは Forward: 27F-Mix 5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3', Reverse: 1390R 5'-ACGGGCGGTGTGTACAA-3' であった。反応液は合計 20 μ L で、2.5mM dNTP Mix 1.6 μ L, 10 \times Ex-taq buffer 2.0 μ L, 10 μ M Primer mix 2.0 μ L, Ex taq 0.1 μ L, DNA template 1.0 μ L, ミリ Q 13.3 μ L を含んでいた。反応サイクルは 94 $^{\circ}$ C 3 分の後に 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分 50 秒を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C で 10 分処理した。次に産物を電気泳動にかけて、ゲルを切り出した。FAST gene ゲル/PCR 抽出キット (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)を用いて切り出したゲルから DNA を回収した。次に pGEM-T-Easy-Vector-Systems(Promega, Madison, WI, USA)を用いてライゲーションを行った。2 \times Rapid Ligation buffer 5 μ L, pGEM-T Easy Vector 1 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, PCR products(2 サンプル使用、TI016 King: 23.8ng/ μ L を 5 μ L, TI016 SQ: 45.2 ng/ μ L を 3 μ L 加えた)を含む反応液を混合して 4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。次に、大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)を行った。まず大腸菌 *Escherichia coli* JM109 コンピテントセル(Takara, Tokyo Japan)に上記の反応液を全量加えて、氷上に 20 分置いた。42 $^{\circ}$ C、50 秒でインキュベートした後に SOC solution を 90 μ L 加えて 37 $^{\circ}$ Cで 1 時間 30 分インキュベートした。遠心して大腸菌を底に集めて上澄みを捨て、0.1M TPTG10 μ L と 20mg/mL X-GAL20 μ L を混合した。LB 寒天培地を用意し、培地上に 10mg/mL のアンピシリン 100 μ L を播き、反応液を 50 μ L 播いた。37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、培地を冷蔵庫で保管した。寒天培地上に増殖したコロニーのうち、白色のものを選んでほかの LB 培地に打ちし、ライブラリーの作成を行った。残りについて colony direct PCR を行い、産物の長さを確認した。産物の電気泳動結果から 1500bp 近くの

バンドを示すものを選び、ライブラリーから菌体を取り出して 200 μ L の 100mg/mL アンピシリンを含む 20mL の LB 培地内で一晩培養した。次に、アルカリ SDS 法を用いて大腸菌内のプラスミドを取り出した。次に BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, UK)を用いて 16SrRNA 遺伝子の増幅を行い、得られた産物についてジェネティックアナライザーを用いて配列を決定した。

得られた配列について MEGA-X(Kumar et al. 2018)を用いて系統解析を行った。NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)のデータベースをもとに最尤推定法を用いて系統樹を作成した。

3.2.3 結果

シーケンシングの結果

MiSeq を用いたアンプリコンシーケンスの結果、得られたリード数は合計 559759 リード、OTU は 2576 得られた。ここから低頻度のものを除去し、1 サンプル当たり 1000 リードとなるように希釈化を行い、解析した。最終的に用いられた OTU は 1132 であった。細菌の遺伝子配列データベース Silva との照合の結果、942 OTU がバクテリアとして検出された。17 門が検出され、その中でも Firmicutes 門、Spirochaetota 門、Bacteroidota 門、Proteobacteria 門、Actinobacteriota 門、Elusimicrobiota 門の多様性が高かった。属ごとのリード数では、*Treponema* 属、*Deslfovibrio* 属、*Endomicrobium* 属、*Pseudomonas* 属が多く検出された。

カーストごとの OTU 数は大きく異なり(図 3.2.1)、ワーカー、兵アリは多くの細菌を持っていたが繁殖虫は比較的少ない傾向にあった。特にコロニー TI016 についてはその傾向が顕著にみられ、中には検出された OTU が 1 種のみである女王も見られた(図 3.2.1)。カースト・コロニーにおける細菌ネットワーク構築の結果、兵アリとワーカーは多くの腸内細菌を共有しているのに対して、王・女王は特有の細菌を多く持つことが分かった(図 3.2.2)。

それぞれの個体で見られた細菌群集をコロニー、カースト、性、コロニーとカーストの

交互作用を説明変数に取った多変量解析(PERMANOVA)により比較したところ、カースト、コロニーの効果と、カーストとコロニーの交互作用が有意に検出された(PERMANOVA, caste: $F_2 = 15.4, P < 0.001$, colony: $F_1 = 11.0, P < 0.001$, caste \times colony: $F_2 = 7.3, P < 0.001$)。一方で性の効果は有意にみられなかった(PERMANOVA, $F_2 = 1.2, P = 0.25$)。NMDS(非計量多次元尺度法)の結果、どちらのコロニーにおいても王、女王は顕著にワーカーや兵アリと異なる細菌群集を持つことが明らかになった(図 3.2.3)。王と女王を除いたワーカー、兵アリのみでの解析の結果、コロニー、カーストごとに細菌群集が大きく異なっていた(図 3.2.3)。

腸内細菌ごとの相対量については、両コロニーのワーカー、兵アリは多様な微生物を腸内に持っていたのに対して、王と女王は非常に少ない種の細菌に優占されている傾向がみられた。特に TI016 コロニーにおいて顕著であり、王も女王も 1 種の細菌(OTU 0)が優占していた。一方で TI017 においては王において *Pseudomonas* 属細菌が優占していたが、女王においては共通の優占種はみられず、TI016 よりも多様性は高い傾向にあった(図 3.2.3, 3.2.4)

王・女王特異的細菌の系統解析

王と女王特異的細菌の系統解析の結果、OTU 0 はスピロヘータ門に属していることが明らかになった(図 3.2.5)。だが、既知種のクレードには属しておらず、シロアリ腸内から単離されるような細菌とも近縁ではなかった。最も近縁であった種はイスラエルの塩田に生息するアルテミアの腸内から単離された未培養の細菌(Tkavc et al. 2011)であった。

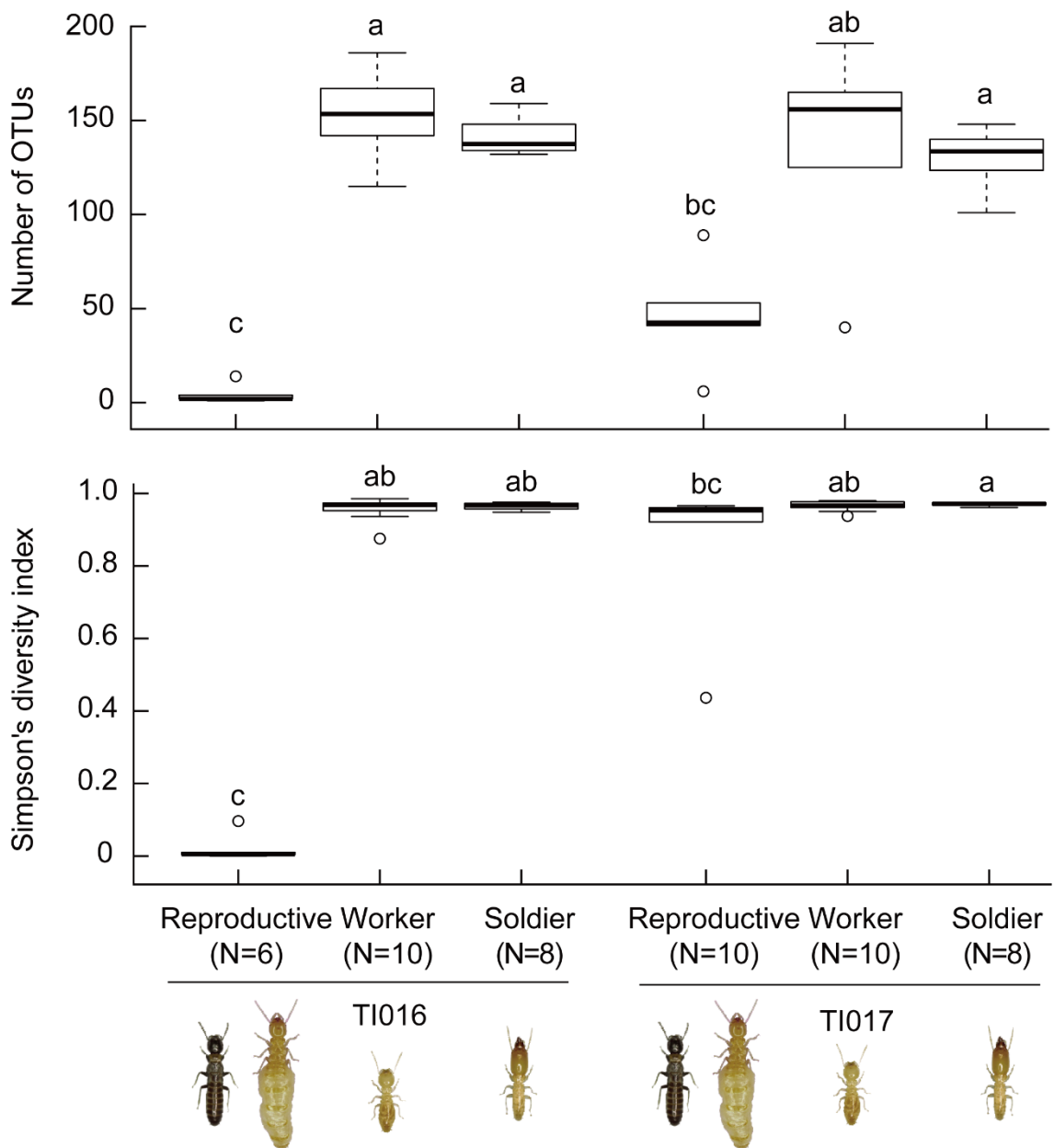


図 3.2.1 カーストごとの腸内細菌の多様性

上のグラフは各サンプルにおいて検出された OTU 数を、下のグラフは Simpson の多様性指数を表している。箱ひげ図の中央の太線は中央値を表す。箱の最上端は第 3 四分位数、箱の最下端は第 1 四分位数をあらわす。外れ値((第 1 四分位数-1.5*(第 3 四分位数-第 1 四分位数))以上もしくは(第 3 四分位数+1.5*(第 3 四分位数-第 1 四分位数))以下)をプロットで示した。異なるアルファベットは有意差(ペアワイズ U 検定、Holm correction, $P < 0.05$)を表す。

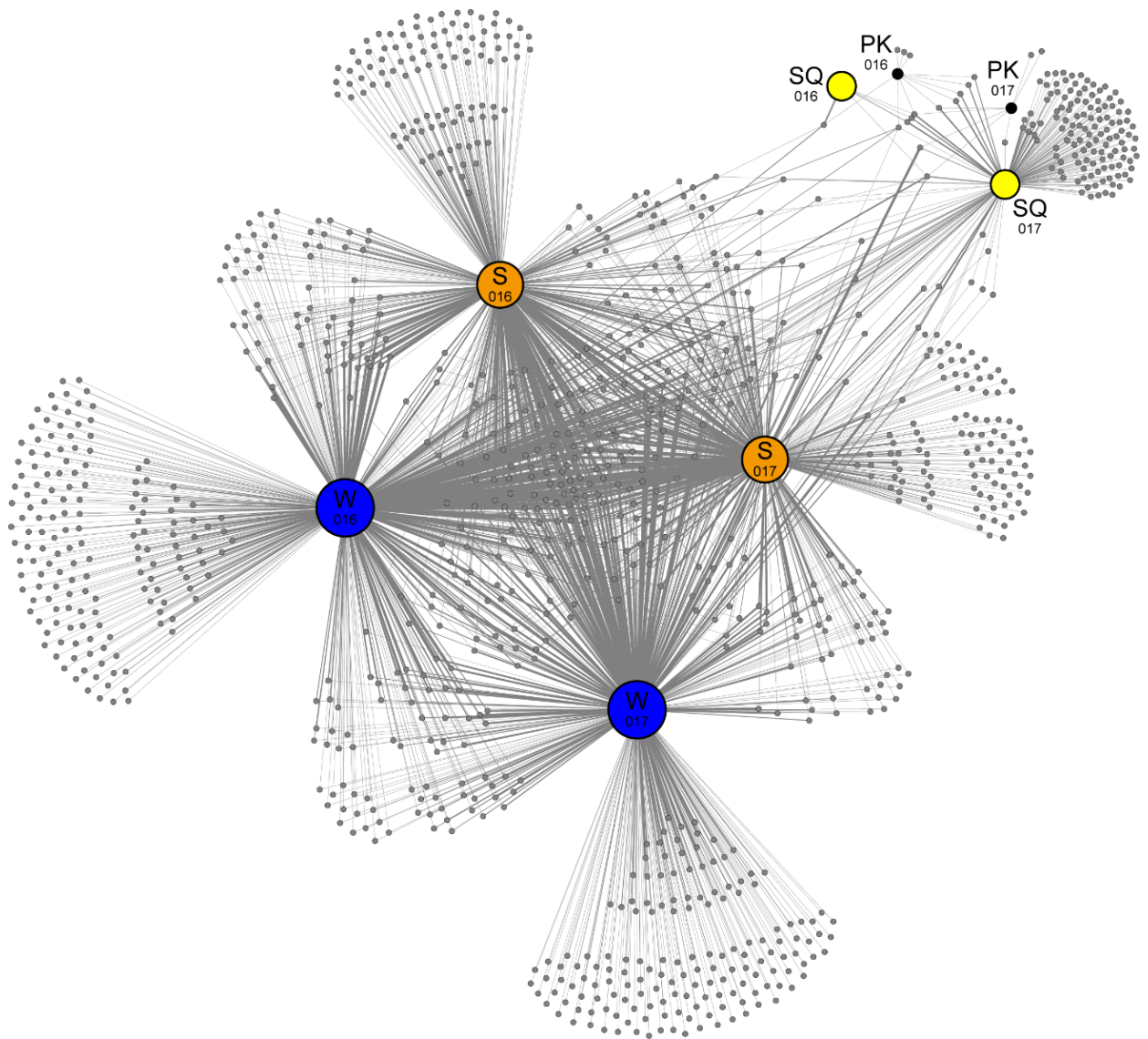


図 3.2.2 腸内細菌ネットワーク

灰色の丸は腸内細菌の OTU を表し、青丸はワーカー、橙色の丸は兵アリ、黄色は二次女王、黒丸は王を表す。丸同士を結ぶ線は、その腸内細菌が各カーストから検出されたことを示しており、検出個体が増えるほど線は太くなる。

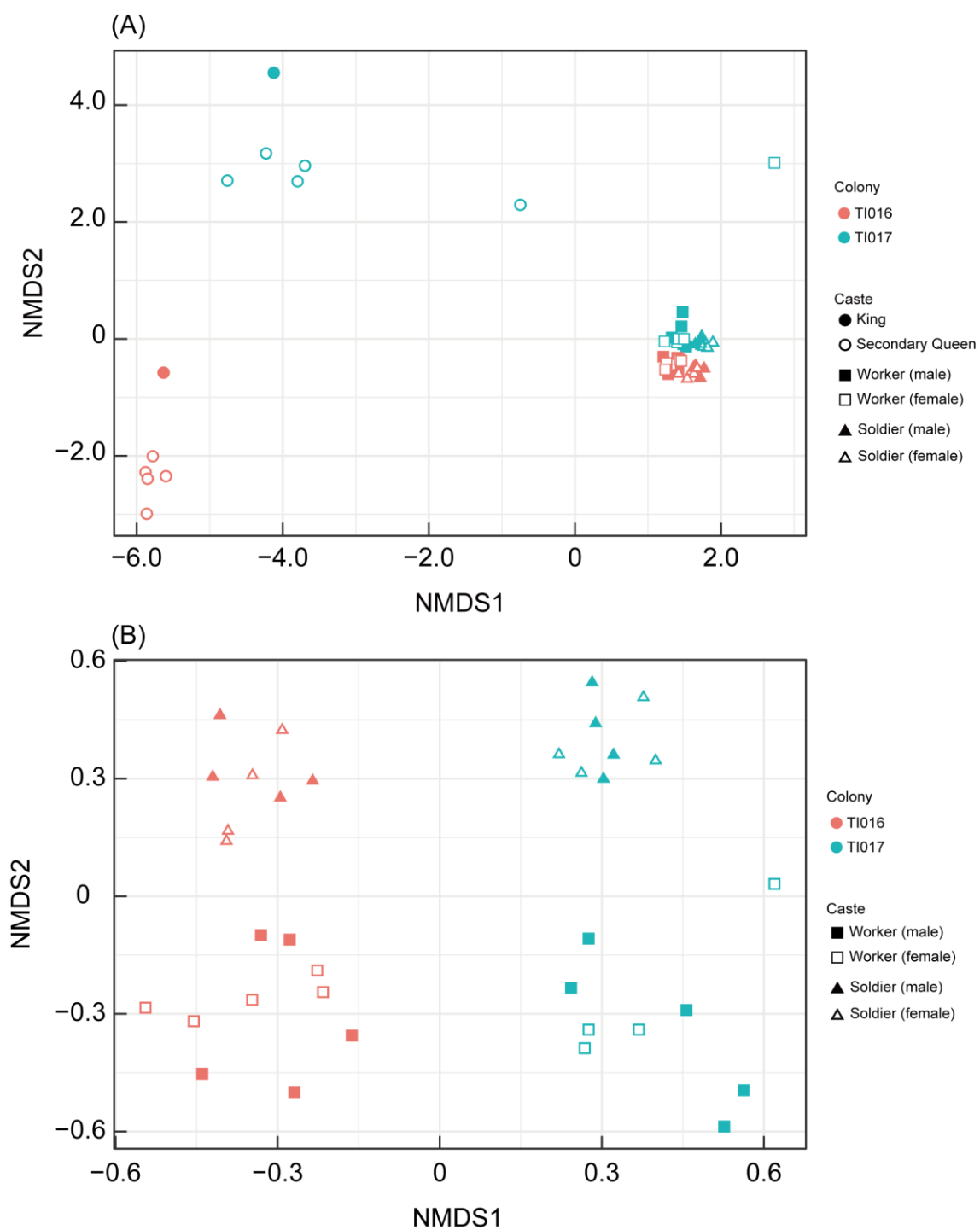


図 3.2.3 カーストごとの腸内細菌群集の比較

NMDS (非計量多次元尺度法) の結果を示している。赤色がコロニーTI016、水色がコロニーTI017を示す。黒丸が王、白丸が二次女王、黒四角がオスワーカー、白四角がメスワーカー、黒三角がオス兵アリ、白三角がメス兵アリを表す。(A)全てのカーストを含めた結果と、(B)ワーカー、兵アリのみの結果を示す。(B)についてはコロニーTI017のメスワーカーにおいて極端な外れ値を示したため除外した。

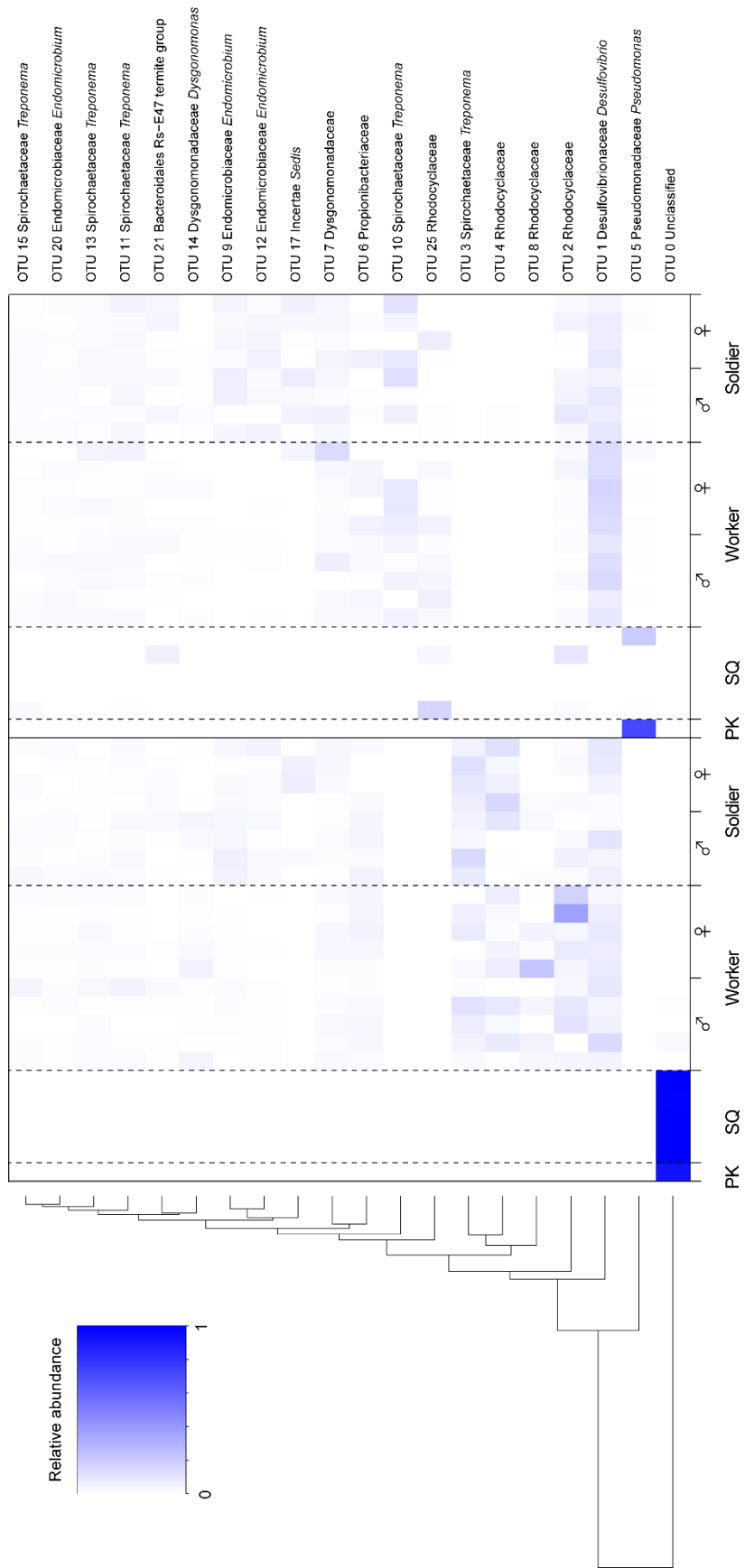


図 3.2.4 各個体における腸内細菌の相対頻度のヒートマップ
 腸内細菌については、希釈後に得られたリード数の総数が多い順の上位 20 OTU について記載した。

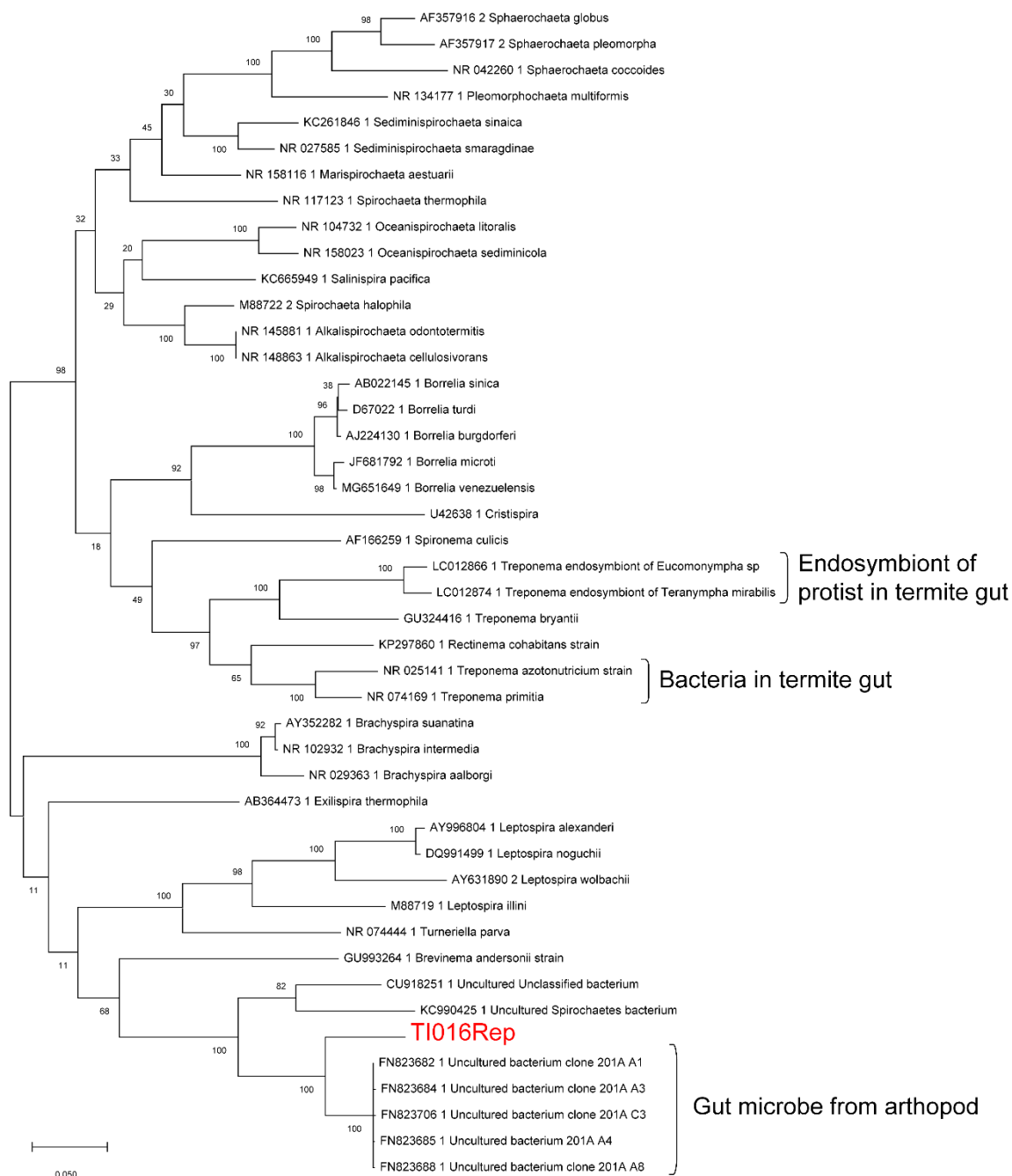


図 3.2.5 王・女王特異的細菌の系統的位置

TI016 コロニーの王、女王の腸内に優占していた腸内細菌(OTU 0 : TI016Rep)について系統解析を行った結果を示す。配列は NCBI データベースより、スピロヘータ門に属する各属の細菌から 1000bp 以上の配列が記載されているものから選んだ。値はブートストラップ値を示す。NCBI の Accession No.と種名を記している。

3.2.4 考察

本節の研究により、ヤマトシロアリの腸内細菌群集はカースト・コロニー特異的であることが明らかになった。王・女王はワーカー、兵アリと比べて少ない種数の腸内細菌を持っていた。これは、ワーカーや兵アリには原生生物の共生バクテリアが多く含まれており、さらに環境中から細菌を多く取り込むためであると考えられる。兵アリは直接木材を摂取しないが、ワーカーからの肛門食を受ける(Cleveland 1925; Su and La Fage 1987)ことで腸液に含まれる環境中の微生物も受け取っていると予測される。コロニーの特異性が強く出た理由としては、それぞれの巣の環境の違いが挙げられる。3.1 節では腸内原生生物についてはどのコロニーでも保有する種は同様であったが、細菌についてはコロニーごとに共通の種もあればそれぞれに特有の種もあった(図 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4)。よって、ヤマトシロアリ腸内細菌は祖先からの垂直伝播により得られた種と環境中から水平伝播により得た種が混在して形成している群集であることが言える。

本節において、TI016 コロニーから王、女王特異的細菌を特定した。これはスピロヘータ門に属する新規の細菌であった。このことは、これまでに明らかになってこなかった、腸内細菌の新規機能の存在を示唆している。例えば、繁殖に対して何らかの貢献をしていることが考えられる。さらに、最も近縁な種が節足動物の未培養腸内細菌であったことから、環境中からでなくシロアリ腸内に特異的な種であることも示唆された。また、割合はわずかながらもワーカーと兵アリもこの細菌を有していた。このことから、新しく分化した女王がこの細菌をワーカーから受け取り、腸内で増殖させていることが考えられる。

一方で TI017 コロニーからは王、女王特異的な細菌は検出されなかった。王で *Pseudomonas* 属の細菌が多く検出されたが、この細菌は環境中からも多く単離されるものであるため、シロアリ腸内特異的であることは考えにくい。本節で用いた2つのコロニーは地理的に近い位置に存在していたが、繁殖虫における腸内細菌叢は大きな違いがみられた。コロニーごとに繁殖虫の持つ細菌が大きく異なる理由は不明であるが、コロニーのサイズや

年齢が関係しているかもしれない。

シロアリの巣は創設王と創設女王の二匹から始まる(Nutting 1969)。創設ペアは腸内原生生物、バクテリアを持っており、採餌と子育てを2匹で行う。創設コロニーから成熟コロニーに至るまで、今回見られたような微生物群集のカースト特異的パターンはどのように形成されるのだろうか。今回、一部のワーカーからも繁殖虫特異的細菌が検出されたことから、羽アリにおいても繁殖虫特異的細菌を持っていることが予測される。そのようなそれぞれのカースト特異的細菌をどの段階で各カーストに再配分するのだろうか。シロアリはコロニーの成熟過程において多くの種からなる群集から数種を取り出してそれぞれの個体で培養するシステムを持つと考えられる。そのメカニズムを明らかにすることで新たな微生物培養技術の開発にもつながるのではないだろうか。

3.3 ヤマトシロアリにおける繁殖虫分化時の原生生物量変動

3.3.1 はじめに

多くの動物において腸内微生物との共生関係が知られている。腸内微生物は宿主の消化や栄養獲得に大きく貢献するだけでなく、行動や神経発達にも強い影響を与えることが明らかになりつつある。腸内微生物と宿主の関係は宿主の生活史を通して必ずしも一定ではないことが分かってきている。宿主の成長に伴って摂取する餌や腸の形態、生理特性が変化することによってそこに生息する細菌群集も次第に変化していくことが知られている (Jašarevi et al. 2016)。一方で腸内微生物が必須である宿主は生活史を通じて共生微生物を維持するメカニズムを持つだろう。例えばカメムシの一種では腸内にポケット状の構造を持ち、そこに多くの共生細菌を棲まわせていることが知られている (Ohbayashi et al. 2015)。腸内微生物群集の変化を宿主の生活史を通して追うことで両者の関係をより詳細に明らかにすることができるだろう。

腸内微生物と宿主との共生関係の中でもシロアリは腸内微生物と絶対共生関係にあることが知られている (Cleveland 1923; Andrew 1930)。シロアリは木材の消化を共生微生物に依存し、共生微生物もシロアリの腸内でしか生存できないものがほとんどである (Cleveland 1923; Andrew 1930)。そのため、シロアリにとって共生微生物を腸内で維持し続けることは非常に重要であることが考えられる。だがその一方で、シロアリ巣内には腸内微生物をほとんど持たない個体も存在することが明らかになった。3.1 節、3.2 節の研究によって、ヤマトシロアリの王と女王はワーカーや兵アリとは大きく異なった腸内微生物群集を持ち、特に原生生物は全く持っていないことが明らかになった。このことは、成熟コロニーにおいて王と女王は木材の消化を完全にワーカーに依存し、繁殖に専念していることを意味している。このカースト特異的な腸内原生生物量のパターンはどのように生じるのだろうか。王はもともと羽アリであり、コロニーから分散し、巣を新しく創設する。この際に木材を消化して栄養を得る必要があり、腸内原生生物をもとの巣から運んでくる必要がある。もともと原生

生物を持っていた王はいつ原生生物を失うのだろうか。Shimada et al (2013)により、コロニー創設 1 年後の、ワーカーが十分に存在する時期にほとんどの原生生物を失うことが明らかになっている。これは多くのワーカーが存在することで木材の消化を彼らに依存し、自らは繁殖に専念するようになったためだと考えられる。一方で、女王はどの時期に原生生物を失うのだろうか。

ヤマトシロアリは Two-way 型の繁殖経路を持ち、ワーカー経路と繁殖経路が存在する(第 1 章 シロアリの生活史及びカースト分化参照)。ワーカー経路はワーカーもしくは兵アリとしての発生経路であり、一生を繁殖せずに終える。いっぽうで繁殖経路に入った個体はニンフと呼ばれる。ニンフはその中から羽アリとなって巣から飛び立ち、新たな巣を創設して繁殖を行う個体と、巣内で繁殖虫の跡継ぎとして二次王、二次女王となる個体が存在する。ヤマトシロアリにおいては野外のコロニーの多くが 1 匹の創設王と複数の二次女王からなる(Yashiro and Matsuura 2014)。ニンフから二次女王に分化し、繁殖を行うまでのどの時期に原生生物を失うのだろうか。原生生物量とカースト分化の時期を合わせて解析することでニンフが木材の消化をやめ、ワーカーに依存する時期が明らかになるだろう。

本節において、繁殖というタスクと原生生物量の関係を明らかにするために、メスのニンフの繁殖虫分化に伴う原生生物量の変動を追った。ヤマトシロアリのニンフはウィングパッドと呼ばれる特殊な中胸、後胸背板の構造を有しており、ワーカーと容易に識別できる。通常ニンフはコロニー内では繁殖虫への分化は女王フェロモンにより抑制されているが、巣から単離することで繁殖虫に分化させることができる。そこでコロニーからニンフとワーカーを取り出して、飼育装置内での分化実験を行った。性成熟の度合は卵巢の長さを測定し、また産卵の有無についても明らかにした。

3.3.2 方法

シロアリ

2018年9月に京都においてヤマトシロアリのコロニーを二つ採集し、ワーカーと3歳のニフを取り出した。30 mmシャーレに不織布とろ紙を敷き、蒸留水で適度に湿らせた。それぞれのコロニーについて、1シャーレあたりワーカー100匹とオスまたはメスのニフ1匹を入れて、25°C、全暗条件で飼育し、毎日観察した。

解剖

ニフが繁殖虫に分化する際、体色の変化がみられる(図 3.3.1)ため、目視で繁殖虫へ分化した日を知ることができる。それぞれのニフについて分化日を明らかにし、その中からランダムに分化当日、分化一週間後、二週間後のタイミングで繁殖虫を取り出した。繁殖虫を取り出したシャーレについてはワーカーをオス3匹、メス3匹取り出した。取り出した個体については、頭部を切断した後に腸を取り出して原生生物の観察を行った。取り出した腸を100 μ Lの0.45%塩化ナトリウム水溶液中に入れてピンセットで裂いた後にペッスルで攪拌し、20 μ L取り出して血球計算版(C-chip hemocytometer; NanoEntek, Korea)に入れて倒立顕微鏡(Leica DMIL LED)で観察し、原生生物の数を測定した。同様の操作をコロニーから取り出したニフについても行った。繁殖虫とニフについては腸を取り出した後のサンプルから卵巣を取り出した。その長さについて画像解析ソフト ImageJ を用いて測定した。コロニーごとに各処理区から5個体の繁殖虫を回収した。ニフが分化する前にワーカーが繁殖虫分化した場合は、その都度取り出して除去した。

3.3.3 結果

メスニフから繁殖虫への分化にかけて、腹部が肥大化していき、卵巣は次第に長くなった(図 3.3.1, 3.3.2)。さらに分化後 1 週間から成熟した卵も卵巣内に見受けられた。原生生物量に関しては、繁殖虫分化時の脱皮の際にほとんどを失い、その後は全く持っていなかった(図 3.3.2)。一方でワーカーのもつ原生生物量はニフの繁殖虫分化の際にも変化しなかった(GLM, LRT, quasi-poisson 仮定, $\chi^2_3 = 2.94, P = 0.40$)。産卵は分化後 2 週間後から観察された。

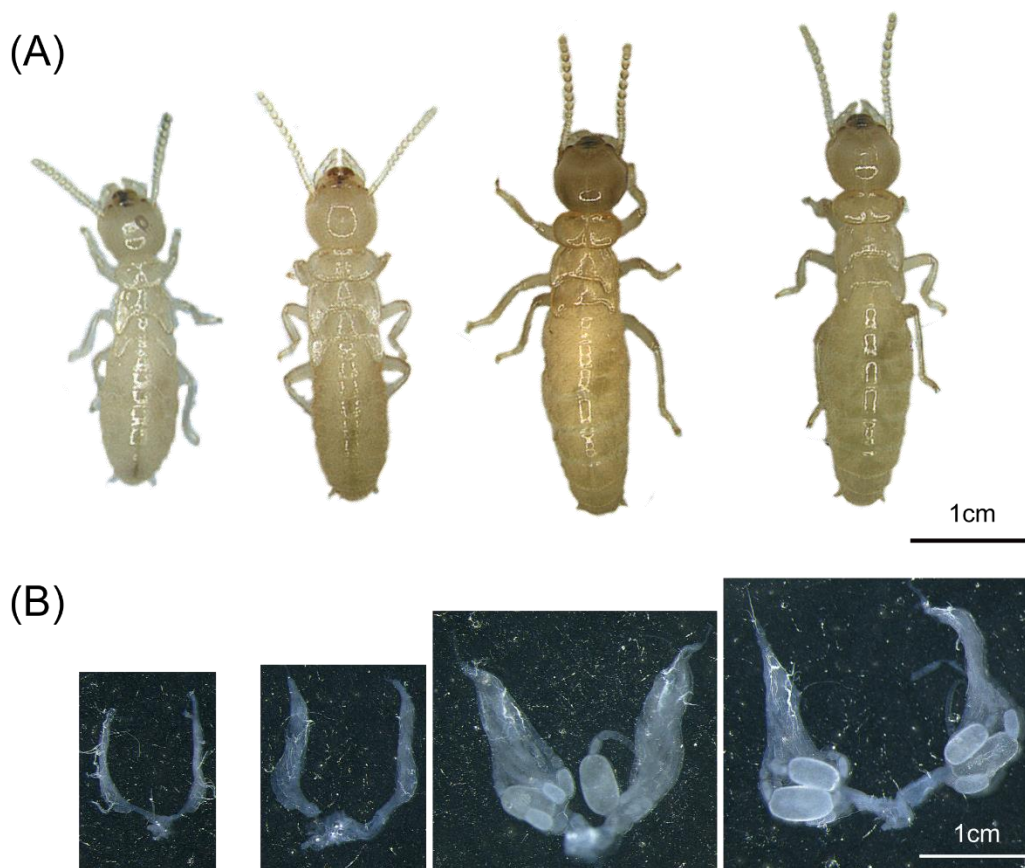


図 3.3.1 メス生殖虫の性成熟

(A)左からメスニフ、繁殖虫分化時、分化後一週間、二週間経過後の個体。(B)メスニフ、繁殖虫分化時、分化後一週間、二週間経過後の卵巣。1、2 週間後には成熟した卵がみられる。バーは 1cm。

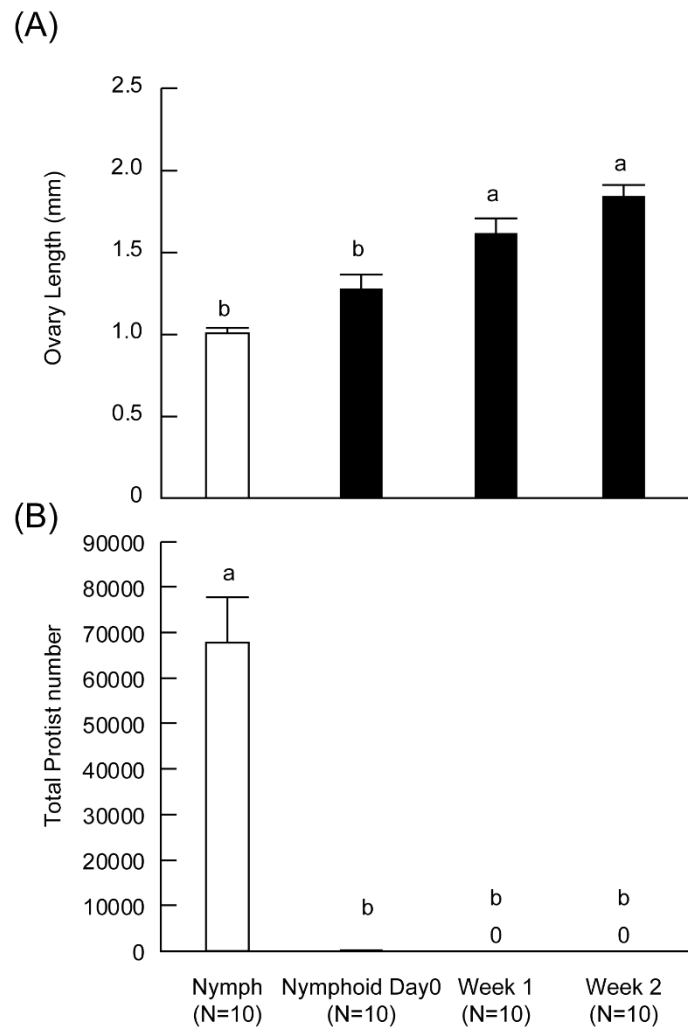


図 3.3.2 繁殖虫分化に伴う卵巣サイズ及び原生生物量の変動

横軸は左からメスニンフ、繁殖虫分化時、分化後 1 週間、分化後 2 週間。(A)卵巣サイズの変動を示す。(B)腸内原生生物総量の変動を示す。エラーバーは標準誤差。異なるアルファベットは有意差を表している(Tukey's HSD after ANOVA, $P < 0.05$)。

3.3.4 考察

本節の結果から、ヤマトシロアリにおけるメスニンフは卵生産の開始時以前の、繁殖虫分化の際の脱皮時に原生生物を失い、そのままの状態を維持するということが明らかになった(図 3.3.2)。繁殖虫分化時に、木材の消化は周囲のワーカーに完全に依存するようになったことが考えられる。分化後から卵巣は徐々に発達していった(図 3.3.1)が、この成長に必要な栄養についてもワーカーからの給餌に依存していることが考えられる。

繁殖虫に分化した直後については、ほぼ原生生物を持たなかったが一部の個体ではわずかに有していた。この理由としては以下の二つが考えられる。分化直後は肛門食を引き続き受けたために原生生物が後腸に侵入したため、もしくは脱皮を一部の原生生物がやり過ぎたためと考えられる。シロアリの原生生物は脱皮のたびに失われるが、長翅型のニンフが羽アリへと脱皮をする際のみ原生生物が一部残ることが報告されている(Nalepa 2017)。このことが同様にニンフから繁殖虫への脱皮の際に起こったことが考えられるが、巢内にとどまって繁殖を行う女王の腸内にとどまることは原生生物にとって利益がほとんどないため、後者の可能性は低いことが推測される。

繁殖虫に分化する前のニンフには原生生物が一定量存在していたことから、分化前のニンフはワーカー的形質を持つ、つまり木材消化に従事していることが考えられる。分化時に原生生物を完全に持たなくなるということは、分化直後から繁殖虫として周囲のワーカーに扱われることが考えられる。つまり、ワーカーからの給餌物やグルーミング頻度などに変化がみられるのではないだろうか。さらに女王フェロモンの分泌についてもこの時期に変化することも考えられる。分化直後の繁殖虫や周囲のワーカーの行動、化学物質についても調べることで腸内原生生物を失った背景についても明らかにできるだろう。

シロアリは自身の腸内に微生物を持つことで酢酸などの一部の物質を取り込むことができるといわれている。繁殖虫が、利益のある原生生物をすぐさま失うのはなぜだろうか。その理由の一つとして、繁殖器官を発達させるうえでのコストが考えられる。腹部の膨満に従い、女王の腹部は卵巣で満たされていく。このスペースを確保するには早急に腸内から微生物を排し、後腸を小さく保つ必要があるのではないだろうか。シロアリにおいて腸内共生原生生物は利益をもたらす存在であり、そのコストについてはこれまで全く着目されてこなかったが、共生関係の維持や崩壊を議論する上ではなくてはならないものであるだろう。

第4章 シロアリ初期コロニーにおける腸内原生物量の変動

4.1 同性ペアとの比較

4.1.1 はじめに

多くの生物にとって、胞子や種子、羽アリといった分散体の定着は生活史において重要な期間である。分散体は多くの場合、限られた栄養を用いて新たな生息地に定着する必要がある(Bonte et al. 2012)。分散体の持つ資源が限られることの背景として以下の二つが挙げられる。まず、分散体の生産数とサイズのトレードオフがある(Lack 1954; Smith and Fretwell 1974; Roff 1992; Leishman et al. 2009)。これは、親の持つ資源が限られるため多くの分散体を生産する場合には一つ当たりのサイズ、つまり持つ資源が少なくなる。もう一つはサイズと飛翔能力のトレードオフである。特に風散布を行うような分散体では重量が小さいほど遠くに散布される(Levin et al. 2003; Bonte et al. 2012; Clobert et al. 2012)。例えば、タンポポのように風散布を行うような植物は非常に軽量の種子を多く生産する(Levin et al. 2003)。社会性昆虫の羽アリにおけるサイズもこれらの選択圧の元で進化してきたことが考えられる。

シロアリにおいて、羽アリは一夫一妻のペアのみでワーカーの助けなしに巣を創設する(Nutting 1969; Nalepa and Jones 1991; Shellman-reeve 1997)。創設虫は腸内微生物により木を消化するだけでなく、繁殖や子育てに従事する。このような状況においては、羽アリは木材消化や繁殖のための資源を多く持つことが有利になるだろう。実際に、体サイズの大きい羽アリは生存率やコロニー創設成功率が高いことが知られている(Matsuura and Nishida 2001; Chouvenc 2019)。だが、木材消化や繁殖に用いる資源は分散のための飛翔をするうえで重荷となるだろう。そのため羽アリはワーカーよりも非常に少ない量の腸内原生物を持ち(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004; Benjamino and Graf 2016)、繁殖器官も小さいままである(Watson 1972; Afzal and Salihah 1985; Dean and Gold 2004; Shimada and Maekawa 2010; Shimada et al. 2013)。分散後は、羽アリは飛翔の制約から解放され、巣の構築や採餌、繁殖、子育てといったコロニー創設における様々なタスクに従事し始める。彼らは限られた資源

を用いて、どのようにこれらのタスクをこなし、コロニーを創設するのだろうか。

ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) において、新しいコロニーは主に雌雄ペアによって創設される。この一夫一妻のペアに加えて、同性ペア (メス同士、オス同士) によってもコロニー創設が行われることが明らかになっている (Kusaka and Matsuura 2018)。メス同士のペアにおいては、メスは単為生殖によって子孫を残すことができる (Matsuura and Nishida 2001)。一方でオス同士のペアにおいては他コロニーとの融合時にそのコロニーのオスを殺して巣を乗っ取ることで自らの子孫を残すことが知られている (Mizumoto et al. 2016)。メス同士のペアにおいては一夫一妻のペアよりも多くの卵を生産するが、雄同士のペアでは卵は全く生産されない。このように繁殖スケジュールが大きく異なる 3 つのペアを比較することによって、シロアリの創設虫がどのように栄養を得て、それをどこに配分するかを明らかにすることができるだろう。

本節においてはヤマトシロアリのオスメス、メス同士、オス同士のペアにおける繁殖スケジュール、腸内微生物の変動、栄養配分パターンを明らかにした。原生生物量の変動は定量 PCR を用いて行い、栄養量の変動と卵や幼虫数の変動と合わせて解析を行った。さらに創設虫の栄養配分パターンを明らかにするために、体のパーツ (頭、胸、腹) ごとのタンパク質・脂質量を調べた。

4.1.2 材料と方法

シロアリ

2016 年 4 月に、京都市内においてヤマトシロアリのコロニーを 1 つ採集した。羽アリを取り出して雌雄を分け、湿らせた不織布を敷いたシャーレ上に置いた。翅はシロアリ自身によって、もしくはピンセットを用いることで外した。それぞれの羽アリを用いてオスメス、メス同士、オス同士のペアを作成し、餌として褐色腐朽材培地 (セルロース: 褐色腐朽材粉

末=1:1) を詰めた 15mL の遠沈管内に入れた。遠沈管は全暗、25°Cで保管した。コロニー創設後 1 週間ごとにオスメスを 5 ペア、メス同士を 3 ペア、オス同士を 3 ペアランダムに選び、巣を取り出して卵と幼虫の数を測定した。それぞれの創設虫については体重を測ったのちに腸を取り出し、体のパーツを頭、胸、腹に分けた。腸は 0.6mL チューブに入れて-20°Cで保存し、体についてはパーツごとに 20 μ L の PBS(136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)に入れ、-20°Cで保管した。同様の操作を雌雄 5 匹ずつの羽アリについても行った。ペアの取り出しはコロニー創設後 1~12、24 週後に行った。

原生生物定量

本節の研究においては、ヤマトシロアリに生息する原生生物 (第 3 章参照) のうち、パラバサリア門に属する原生生物をターゲットとしたユニバーサルプライマーを用いて、定量 PCR 法により定量を行った。パラバサリア門に属する原生生物のうち、*Trichonympha agilis* と *Teranympha mirabilis* は特に大型であることが知られており (Koidzumi 1921; Kitade 2007)、*T. agilis* については木材消化に大きく貢献していることが明らかになっている (Hongoh et al. 2008)。まず、-20°Cで保管している腸のサンプルから、PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) を用いて DNA 抽出を行った。定量 PCR においてはパラバサリア門原生生物の 18S リボソーマル RNA をターゲットとしたユニバーサルプライマーを用いた。このプライマーは先行研究においてヤマトシロアリの同属別種である *Reticulitermes flavipes* の原生生物定量に用いられており、シロアリの DNA やバクテリアの DNA では増幅しないことが明らかになっている (Benjamino and Graf 2016)。このプライマーの配列は Para361F-5'CGCGAAACTTACCCACTCG-3' と Para510R-5'TTACCGCAGCTGCTGGC-3'となっている。定量 PCR は以下の組成で行った:10 μ L の Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)、0.4 μ L の 10 μ M フォワード、リバープライマー、7.2 μ L の ミリ Q、2 μ L の DNA テンプレート。反応は StepOnePlus real-time

PCR system (Applied Biosystems)を用いて、95°C (10 分)、40 サイクルの 95°C (30 秒)、64°C (30 秒)、72°C (30 秒)のサイクルで行った。それぞれのサンプルの Ct 値(Cycle threshold)は増幅フェーズに測定した。PCR 後に 60°C~90°Cにおける乖離曲線を作成し、非特異的増幅の有無を確認した。それぞれの反応において、9.004、90.04、900.4、9,004 コピーの DNA を含むサンプルを用いて Ct 値と DNA のコピー数の検量線を作成し、各サンプルの DNA コピー数を推定した。得られたデータは StepOne software を用いて解析した。エラーの出たサンプルや解離曲線が複数ピークを示したサンプルについては再度測定を行った。再測定後にもエラーの出た 4 サンプルについては解析から除去した (メスの羽アリ、3 週後のメス同士ペアのメス、12 週後のオスメスペアのオスとメス同士ペアのメス)。

タンパク質・脂質量の定量

羽アリと創設虫において、それぞれの体のパーツ (頭・胸・腹) のタンパク質と脂質量を測定した。まず PBS 内のサンプルをペッスルを用いて破碎し、遠心を行った(10,000rpm、5 分、4°C)。次に Bradford Protein Assay Kit (TaKaRa, Tokyo, Japan)を用いてタンパク質を測定した。まず 4 μ L の上澄みと 200 μ L のブラッドフォード液を混合し、分光光度計(Multiskan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて波長 595nm の吸光度(OD595)を測定した。タンパク質の希釈系列 (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 μ g/mL) を用いることで OD595 とタンパク質量の検量線を作成した。サンプルの残りの液については、Lipid Quantification Kit (Colorimetric, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) を用いて脂質量を測定した。まず、サンプルに 18M の硫酸を混合して 90°C10 分でインキュベートした。次にバニリン液と混合し、37°Cで 15 分インキュベートした。分光光度計を用いて 540nm の吸光度を測定することにより、不飽和脂肪酸量を測定した。脂質の希釈系列 (0, 39, 78, 156, 313, 625, 1250, 2500 mg/dL) を用いて吸光度との検量線を作成し、サンプル液の脂質濃度を測定した。それぞれの体のパーツにおけるタンパク質、脂質量について算出した。

統計解析

それぞれのペアにおいて、原生生物量への週の効果をクラスカルウォリス検定を用いて調べた。同性内の異なるペア間において生重量、タンパク質総量、脂質総量について t 検定を用いて比較した。それぞれの体のパーツにおけるタンパク質、脂質量について、創設後の時間（週）の効果線を線形回帰により調べた。オスメスペアにおいては、性の効果と性と週の交互作用についても調べた。これらの解析は統計ソフト R 3.5.1 (R core team 2018) を用いて行った。

4.1.3 結果

繁殖スケジュールと原生生物量の変動

オスメス、メス同士、オス同士のどのペアにおいても原生生物量は週ごとに異なっていた (Kruskal-Wallis rank-sum test; male in MF, $\chi^2_{13} = 49.4, P < 0.001$; female in MF, $\chi^2_{13} = 48.9, P < 0.001$; FF, $\chi^2_{13} = 46.7, P < 0.001$; MM, $\chi^2_{13} = 53.2, P < 0.001$, 図 4.1.1)。どのペアにおいても、創設後 5, 6 週において原生生物量が上昇し、7 週後には急速に減少していた (図 4.1.1)。メス同士のペアはオスメスペアと比べて産卵量が多く、オス同士では全く産卵はみられなかった (図 4.1.1)。オスメス、メス同士のペアにおいて幼虫の孵化は 6 週後から見られた (図 4.1.1)。

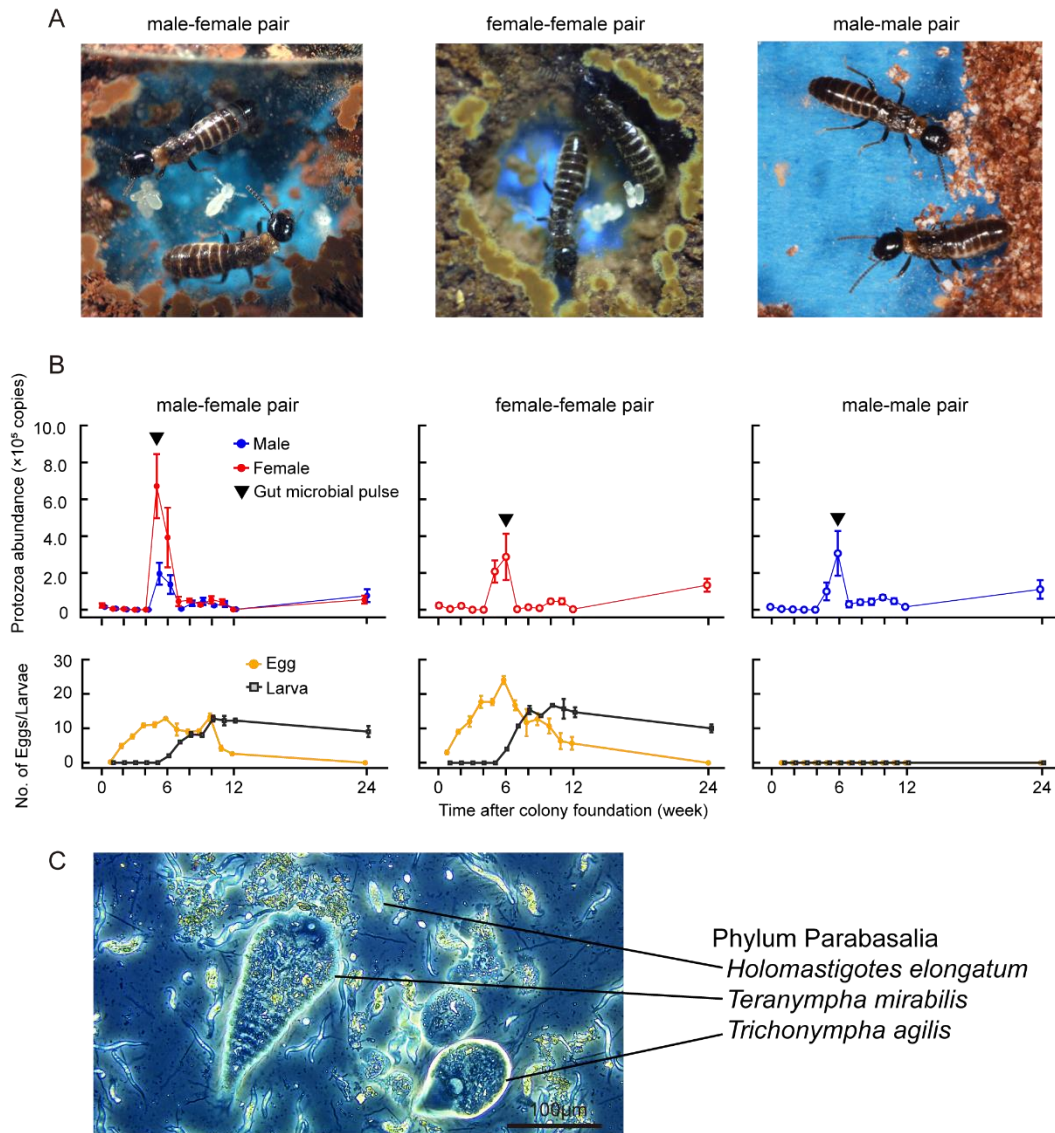


図 4.1.1 ヤマトシロアリのオスメス、メス同士、オス同士創設ペアにおける繁殖スケジュールと腸内微生物の変動

(A)ヤマトシロアリにおける 3 タイプの創設ペア。左からオスメス、メス同士、オス同士。
 (B)各ペアにおける原生生物量（上）と卵・幼虫量（下）の変動。原生生物量は週ごとに異なっていた(Kruskal-Wallis rank-sum test, $P < 0.001$)。黒の逆三角形は原生生物パルスのタイミングを示している。下のグラフにおいて、黄色と灰色のプロットはそれぞれ卵、幼虫を表す。エラーバーは標準誤差を表す。(C) 本節の研究において着目した、パラバサリア門の原生生物。

生重量と栄養量の変動

オスメスペアのそれぞれの性について、生重量とタンパク質、脂質の総量について同性ペアとの比較を行った。コロニー創設後 10 週目から 24 週目にかけて、オス同士ペアの個体の重量がオスメスペアのオスよりも重くなっていた(T-test, Holm correction, $P < 0.05$, 図 4.1.2)。一方でメス同士ペアの個体とオスメスペアのメスでは差がみられなかった(図 4.1.2)。コロニー創設後 9 週目から 24 週目にかけて、タンパク質、脂質の総量がオス同士ペアの個体においてオスメスペアのオスよりも多くなっていた(T-test, Holm correction, $P < 0.05$, 図 4.1.2)。メス同士ペアの個体とオスメスペアのメスでは、コロニー創設後 4 週目においてタンパク質量がオスメスペアのメスで多くなっていた以外は、タンパク質、脂質共に有意な差はみられなかった(図 4.1.2)。

創設虫における資源配分パターン

オスメスペアにおいて、雌雄の創設虫の各パーツ（頭・胸・腹）におけるタンパク質量は減少傾向にあった(ANOVA; head, $\beta = -0.12 \pm 0.037$, mean \pm SE, $F_1 = 11.50$, $P < 0.001$; thorax $\beta = -0.57 \pm 0.071$, mean \pm SE, $F_1 = 65.46$, $P < 0.001$; abdomen, $\beta = -0.44 \pm 0.077$, mean \pm SE, $F_1 = 31.83$, $P < 0.001$, 図 4.1.3)。胸部におけるタンパク質量はメスよりもオスのほうが多かったが(ANOVA; $F_1 = 4.02$, $P = 0.047$, 図 4.1.3)、頭部と腹部については雌雄間で有意な差はみられなかった(ANOVA; head, $F_1 = 0.027$, $P = 0.87$; abdomen, $F_1 = 0.053$, $P = 0.82$, 図 4.1.3)。オスメスペアのタンパク量において、どのパーツについても週と性の交互作用はみられなかった(ANOVA; head, $F_1 = 0.27$, $P = 0.60$; thorax, $F_1 = 1.46$, $P = 0.23$; abdomen, $F_1 = 0.71$, $P = 0.40$, 図 4.1.3)。メス同士のペアにおいても、各パーツにおけるタンパク質量は減少傾向にあった(ANOVA; head, $F_1 = 12.5$, $P < 0.001$, $\beta = -0.20 \pm 0.06$, mean \pm SE; thorax, $F_1 = 52.0$, $P < 0.001$, $\beta = -0.60 \pm 0.08$; abdomen, $F_1 = 13.9$, $P < 0.001$, $\beta = -0.40 \pm 0.10$, 図 4.1.3)。

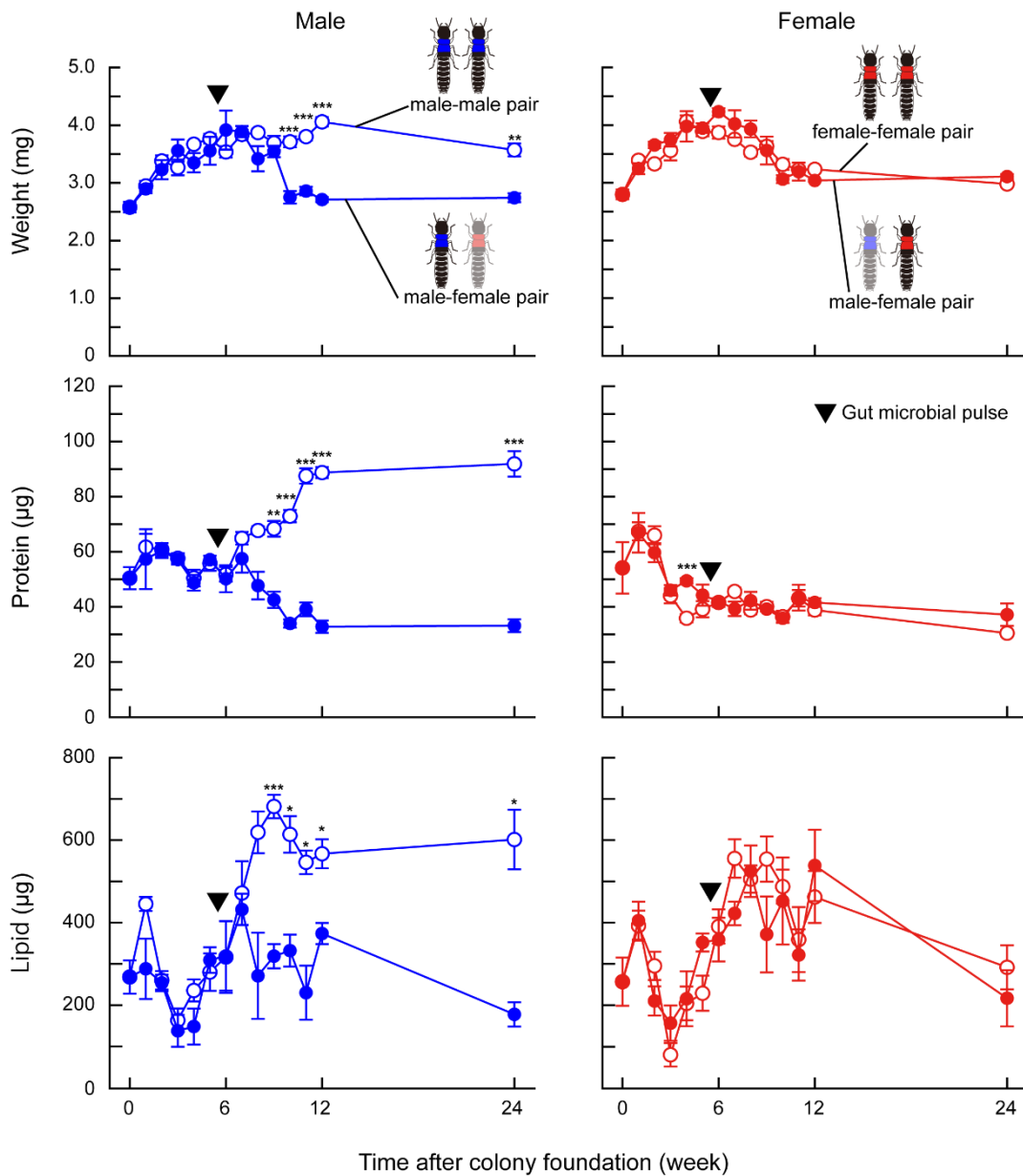


図 4.1.2 創設虫における体重と資源量の推移

創設虫における生重量（上部）、タンパク質量（中部）、脂質量（下部）を、雌雄それぞれについてオスメスペアと同性ペアにおいて比較した。左からオス間比較、メス間比較の結果を示しており、それぞれのグラフにおいて青丸もしくは赤丸はオスメスペアを、白塗りのプロットは同性ペアのデータを表している。各週においてペアと単独飼育において比較を行った(T-test, Holm correction, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。エラーバーは標準誤差を表す。

一方でオス同士のペアにおいては、体のどのパーツにおいてもタンパク質量は増加傾向にあった(ANOVA; head, $F_1 = 12.0$, $P < 0.001$; $\beta = 0.22 \pm 0.06$, mean \pm SE; thorax, $F_1 = 60.2$, $P < 0.001$, $\beta = 0.49 \pm 0.06$; abdomen, $F_1 = 122.6$, $P < 0.001$, $\beta = 1.23 \pm 0.11$, 図 4.1.3)。

脂質量については、オスメスペアの個体の頭と腹においては週の効果はみられなかった(ANOVA; head, $F_1 = 0.086$, $P = 0.77$; abdomen, $F_1 = 1.48$, $P = 0.23$, 図 4.1.3)。頭部と胸部の脂質量はメスのほうがオスよりも有意に多かった(ANOVA; head, $F_1 = 11.2$, $P = 0.0012$; abdomen, $F_1 = 4.54$, $P = 0.035$, 図 4.1.3)。オスメスペア個体の胸部の脂質量においては、性と週の交互作用が有意であった(ANOVA; $F_1 = 9.35$, $P = 0.0027$, 図 4.1.3)。つまり、メスの胸部の脂質量は増加傾向にあったが、オスにおいてはほぼ一定であった(female, $\beta = 5.29 \pm 1.2$; male, $\beta = 0.78 \pm 0.83$, 図 4.1.3)。メス同士ペアにおいては、胸部の脂質量は増加傾向にあったが、頭部と腹部の脂質量は週に伴った変化の傾向はみられなかった(ANOVA; head, $F_1 = 3.35$, $P = 0.07$; thorax, $F_1 = 23.6$, $P < 0.001$, $\beta = 5.88 \pm 1.2$, mean \pm SE; abdomen, $F_1 = 0.07$, $P = 0.79$, 図 4.1.3)。オス同士ペアの個体においては、体の各パーツにおける脂質量は増加傾向にあった(ANOVA; head, $F_1 = 5.82$, $P = 0.018$, $\beta = 1.06 \pm 0.44$; thorax, $F_1 = 63.1$, $P < 0.001$, $\beta = 10.37 \pm 1.30$; abdomen, $F_1 = 17.00$, $P < 0.001$, $\beta = 7.65 \pm 1.86$, 図 4.1.3)。

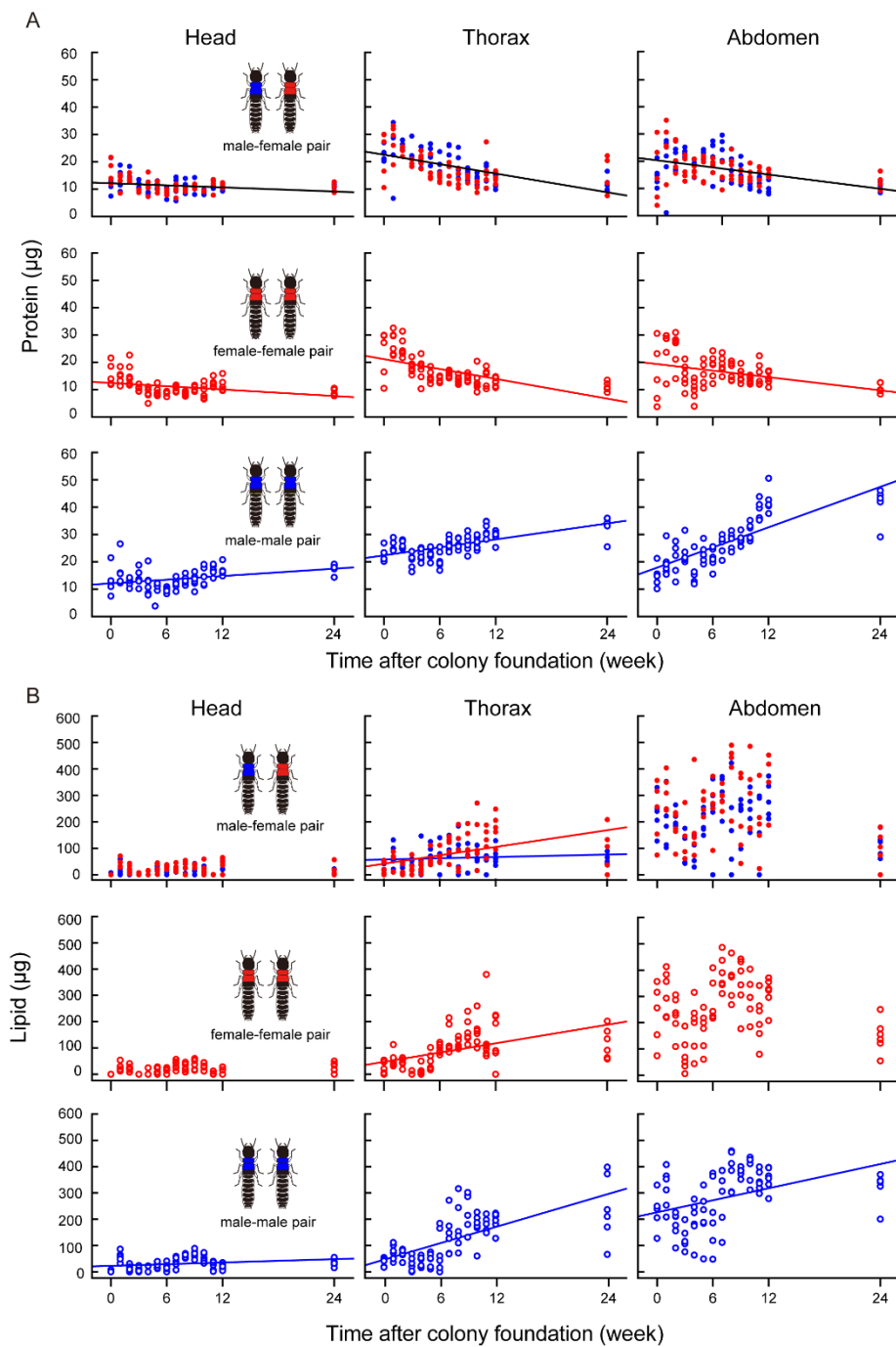


図 4.1.3 創設虫における資源配分パターンの推移

創設虫の頭・胸・腹における(A)タンパク質量、(B)脂質量を示す。上からオスメス、メス同士、オス同士ペアを表し、左から頭、胸、腹についてのデータである。オスメスペアにおいて、青丸はオスを、赤丸はメスを表す。それぞれのデータにおいて、週の効果が有意であった場合($P < 0.05$)に線形回帰直線を示している。オスメスペアにおける胸部の脂質については週と性の交互作用が有意であったためオスの回帰直線を青、メスの回帰直線については赤でそれぞれ示した。

4.1.4 考察

本節において、シロアリの繁殖スケジュール、腸内微生物の変動、資源分配パターンの統合的解析を初めて行った。さらに、腸内原生生物量の急激な上昇と減少（以後、原生生物パルスと呼ぶ）がオスメス、メス同士、オス同士の全てのペアで同時に起こることを見出した（図 4.1.1）。幼虫の生まれないオス同士のペアにおいては原生生物パルス後にタンパク質、脂質量がともに増加していた（図 4.1.2）ことから、原生生物パルスは創設虫に栄養を提供していることが考えられる。一方で幼虫の存在するオスメスやメス同士のペアにおいては、タンパク質、脂質量共に減少していた（図 4.1.2）ことから、パルスによって得た栄養を幼虫に与えていたことが考えられる。また、本節の結果から創設虫は体の各パーツに蓄えた栄養分を繁殖に用いていることが示唆された。オスメス、メス同士のペアにおいて、頭・胸・腹のタンパク質量は創設後から減少していた一方で、オス同士のペアでは増加していた（図 4.1.3）。特に、オスメス、メス同士ペアにおける胸部タンパク質の減少は飛翔筋の消化を反映していることが考えられる(Light and Weesner 1955; Nutting 1969)。また、オスメス、メス同士ペアにおいて脂質量の部位特異的変動を見出した。その一方でオス同士のペアでは脂質量はどの部位においても単調増加していた（図 4.1.3）。よって、本節の研究によって、シロアリの創設虫は貯蔵栄養と腸内微生物を繁殖スケジュールに応じてコントロールし、使用していることが示唆された。

ヤマトシロアリにおいて、オス同士のペアにおいても適応的利益が存在する。Mizumoto et al. (2016)において、創設コロニーが融合する際にオス同士のペアは融合先のオスを殺してメスを乗っ取ることで子を残す機会を得ていることが示されている。さらに、ペアのオスの生存率は単独オスよりも高く、2年以上は生存できることが飼育コロニーにおいても確認されている。コロニー融合が頻繁に起こらない状況下においても、オス同士でペアを組むことは有利に働く。というのも、天敵による捕食圧が非常に高いため、ペアのメスを探して野外を歩き回るとは死亡リスクが高いからである(Mizumoto et al. 2016)。そのため、オス同士

ペアの個体において体重を増加させ、栄養を多く得ること（図 4.1.2）はコロニー融合後のオスとの闘争において有利に働くだろう。

オスメスペアのオスは幼虫への給餌に貢献しているが、オス同士のペアには幼虫が存在しない。よって、創設後 24 週目におけるオス同士のペアとオスメスペアのタンパク質・脂質量を比較することで創設初期のオスの繁殖投資量を明らかにすることができる。本節における結果から、オスメスペアのオスは 58.7 μ g のタンパク質と 423.8 μ g の脂質を幼虫に投資していることが明らかになった。これは、それぞれオスの羽アリの 1.16 匹と 1.58 匹分に相当する。つまり創設虫による投資量は羽アリが初期に持つ栄養量を大きく上回っており、このことは腸内微生物による栄養の獲得が創設初期における繁殖投資において大きな役割を担うことを表している。

原生生物パルスは創設虫にとって大きな利益をもたらすだろう。その一方で、腸内微生物群集にとっては大きなボトルネックをもたらすことになることが考えられる。原生生物パルス以外にも、成熟コロニーからの群飛の際にも腸内微生物群集にはボトルネックがかかるだろう(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004; Benjamino and Graf 2016)。こうしたボトルネックは通常、生物種の減少につながる(Barrett and Kohn 1991; Wisely et al. 2002; Dlugosch and Parker 2008a, b)。だが、同種のシロアリの腸内原生生物はほぼ同様の種構成であることが知られている(Kitade 1993; Kitade et al. 2012, 2013)。このことはシロアリ腸内において種構成を保存するような仕組み、例えば負の頻度依存選択などのメカニズムが存在していることを示唆している。よって、シロアリと腸内微生物の共生系は生物多様性の維持メカニズムを明らかにする上でも良い系となりうるだろう。

付録 卵の発生に伴った栄養量の推移

本付録において、ヤマトシロアリの卵の発生に伴ったタンパク質量・脂質量の推移について示す。まず、研究室室内で維持した成熟コロニーから卵を取り出した。卵は先行研究の基準をもとに、実態顕微鏡を用いて発生段階ごとに5ステージに分けた(Matsuura and Kobayashi 2007)。それぞれのステージの卵を25個ずつ回収して5個ずつにわけ、重量を測定した。PBSをそれぞれのチューブに加えて、タンパク質・脂質量を上記と同様にして測定し、卵1個当たりのタンパク質・脂質量を算出した。

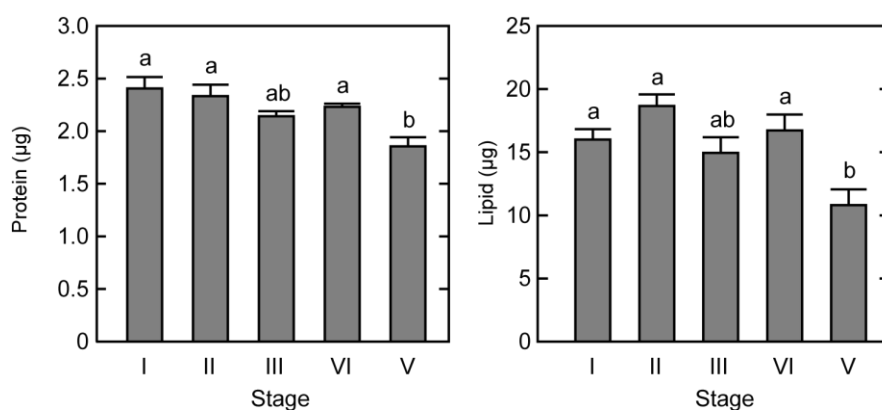


図 4.1.4 卵の発生に伴った資源量の変化

一卵当たりの(A)タンパク質・(B)脂質量を示す。横軸は卵の発生ステージを表している。エラーバーは標準誤差を表し、異なるアルファベットは有意に異なることを示す(Tukey's HSD after ANOVA, $P < 0.05$)。

結果、産卵直後のステージ I の卵は1個あたり $2.41 \pm 0.11 \mu\text{g}$ のタンパク質、 $16.00 \pm 0.82 \mu\text{g}$ の脂質を持っていた(図 4.1.4)。これらはメス羽アリの持つタンパク質の 4.44%、脂質量の 6.23%に相当する。メスの羽アリの持つ貯蔵タンパク質、脂質量は初期にどれほど卵を生産できるかを定める重要な要素となるだろう。また、タンパク質・脂質量は卵の発生に伴って減少していた(図 4.1.4)。卵の発生に伴って幼虫の体組織が形成されていくことが知られている(Matsuura and Kobayashi 2007)。消費されたタンパク質や脂質は発生過程で幼虫の体組織を形成するために使用されたと考えられる。

4.2 単独創設ペアとの比較

4.2.1 はじめに

微生物との共生は多くの生物においてみられる。アブラムシとブフネラのような、単一種の微生物を共生器官に棲まわせているようなもの(Moran et al. 2008)から、腸内微生物群集のように複数種の微生物を有しているもの(Engel and Moran 2013)など多岐にわたる。共生微生物にとっては、その個体数を増やし、次世代へと確実に伝播されることが利益となるだろう。したがって、宿主との利害関係が一致する単一種の共生微生物とは異なり、複数種が存在する微生物群集においては微生物同士の競争が生じる。そのような状況では、宿主や他の微生物の利益を差し置いて利己的にふるまう微生物が有利であると考えられる(Crespi 2001)。よって、複数種の微生物と宿主間の相利共生関係は不安定であると考えられてきた(Sachs and Simms 2006; Leigh 2010)。こうした関係を安定化させる要因の一つとして宿主による懲罰(sanction)や褒賞(reward)がある。これは、利己的に増殖する微生物を抑制することや逆に宿主にとって適した微生物の増殖を促進することにより、利己的な一部の細菌のみが増殖することを抑えることである(Yu 2001; Kiers et al. 2003)。このように、宿主と微生物群集の共生関係の維持において宿主側からのコントロールは重要な役割を持つ。

シロアリは非常に多様な腸内微生物と共生関係にある。その多くはシロアリの腸内特異的であり、祖先のキゴキブリから1億5千万年もの間群集が維持されてきた。キゴキブリは亜社会性昆虫であり、親がペアで子育てを行う(Nalepa 1984)。つまりシロアリと腸内微生物の共生関係は、個体間の相互作用がほぼ常に存在する状況下で維持されてきたといえるだろう。若齢の個体や脱皮直後の個体には腸内微生物がほとんど存在しない(Yamaoka et al. 1986; Nalepa 2017)ため、そのような個体は他個体から肛門食という行動を通じて微生物群集を受け取る(Andrew 1930)。栄養を得るうえでも個体間の相互作用は重要である。シロアリの腸内微生物群集は主に後腸内に生息している(Brune and Dietrich 2015)。後腸は栄養吸収の主な器官ではない(Engel and Moran 2013)ため、シロアリは他個体の腸液を直接摂取する、肛

門食という行動を通じて腸内微生物の生産した栄養を中腸で吸収する(Brune and Dietrich 2015)。シロアリにとって腸内微生物は必須であるが、必ずしもすべての個体に腸内微生物が存在しているわけではない。特に原生生物に関しては、脱皮直前にいなくなること(Nalepa 2017)や繁殖虫には存在しないこと(Shimada et al. 2013; Inagaki and Matsuura 2016)が明らかになっている。この両者の関係において、どちらに主導権が存在するか、つまり宿主もしくは微生物によるコントロールの存在については明らかになっていない。

原生生物の腸からの完全な排除以外にも、シロアリが原生生物量をコントロールしていることを示唆するデータが得られている。4.1 節の研究において、ヤマトシロアリは創設後の幼虫孵化タイミングに原生生物パルスを起こすことが明らかになった。これは幼虫の孵化タイミングにおける原生生物量の急激な増加と減少で、創設虫にとって幼虫に給餌する栄養を得る手段となっているだろう。一方でこれは微生物にとってコストとなるため、シロアリ側のコントロールにより生じていることが考えられる。このような原生生物量の変動は、どのようにして起きているのだろうか。シロアリは基本的にその生活史において2匹以上の集団で生活する。そのような状況下では個体同士の相互作用が生じ、肛門食のような栄養交換も可能となる。原生生物量を変動させるうえでこのような個体間の相互作用は必要なのだろうか。さらに栄養を得ることは単独個体でも可能なのだろうか。本研究においてはこの問いに対して、シロアリの創設虫を単独で飼育し、その原生生物量と栄養量の変動を追うことでアプローチした。

本節においては、単独個体でも原生生物パルスを起こすことができるのかどうかを明らかにするために、ヤマトシロアリの羽アリを用いてオスメスペア、メス単独、オス単独個体の創設コロニーを作成し、繁殖スケジュール、原生生物量、タンパク質量の変動を調べた。さらにパルスによって得た栄養をどこに蓄積しているかを明らかにするために、創設虫の部位ごと(頭・胸・腹)におけるタンパク質量の変動を追った。また、各処理区における巣の創設開始時期が繁殖スケジュールに影響を与えることが考えられるため、コロニー回収

時に創設虫が存在した場所についても記録し、繁殖スケジュールおよび原生生物量の変動と照らし合わせて解析した。

4.2.2 材料・方法

シロアリ

2017年4月に、京都においてヤマトシロアリのコロニーを1つ採集した。4.1節と同様にして羽アリから翅を除去して雌雄に分けた。餌として褐色腐朽材培地（セルロース：褐色腐朽材粉末=1:1）を押し固めて30mmシャーレに入れ、オスメスペア、メス単独、オス単独個体をそれぞれシャーレ内に入れた。シャーレは全暗、25°Cで保管した。コロニー創設後1週間ごとにオスメスを5ペア、メス単独個体を5匹、オス単独個体を5匹ランダムに選び、巣を取り出して卵と幼虫の数を測定した。取り出す際に、創設虫のいた場所(巣材の内部、下部、外)を記録した。それぞれの創設虫については体重を測ったのちに腸を取り出し、体のパーツを頭、胸、腹に分けた。腸は0.6mLチューブに入れて-20°Cで保存し、体についてはパーツごとに20 μ LのPBS(136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)に入れ、-20°Cで保管した。同様の操作を雌雄5匹ずつの羽アリについても行った。ペアの取り出しはコロニー創設後1~10週後に行った。

原生生物定量

4.2節と同様にしてパラバサリア門に属する原生生物量の定量を、qPCRを用いて行った。本節の研究においては全てのサンプルについてエラーは検出されなかった。

タンパク質の定量

4.2節と同様にしてタンパク質の定量を体の各パーツ（頭・胸・腹）について行った。

統計解析

それぞれのペアにおいて、原生生物量が週ごとに異なるかを、クラスカルウォリス検定を用いて調べた。さらに、回収時に創設虫がいた場所について、外部と内部(巣材の下部と内部)にいた割合を、二項分布を仮定した GLM を用いてペア間・週間で比較した。同性間の異なる処理 (ペアか単独か) 間において生重量、タンパク質総量について t 検定を用いて比較した。それぞれの体のパーツにおけるタンパク質、脂質量について、創設後の時間 (週) の効果を線形回帰により調べた。オスメスペアにおいては、性の効果と性と週の交互作用についても調べた。これらの解析は統計ソフト R 3.5.1(R core team 2018)を用いて行った。

4.2.3 結果

繁殖スケジュールと原生生物量の変動

ペア創設、単独創設の両方において原生生物量は週ごとに変動していた(Kruskal-Wallis rank-sum test; male in MF, $\chi^2_{10} = 41.8, P < 0.001$; female in MF, $\chi^2_{10} = 43.7, P < 0.001$; Single female, $\chi^2_{10} = 33.1, P < 0.001$; Single male, $\chi^2_{10} = 39.2, P < 0.001$)。オスメスペア、オス単独創設においては 4.1 節の結果と同様に創設後 5, 6 週目に原生生物量の急激な増加がみられ、7 週後に減少していた (図 4.2.1)。一方でメス単独創設においては原生生物量の急激な増加が創設後 6, 7 週目に見られ、8 週目に減少しており、1 週間のずれがみられた。繁殖スケジュールについてもメス単独創設で 1 週の遅れがみられた (図 4.2.1)。オスメスペアでは 1 週目から産卵が、6 週目から幼虫の孵化がみられたのに対してメス単独創設では産卵は 2 週目から、幼虫の孵化は 7 週目からみられた (図 4.2.1)。また、本節においては 5, 6 週目の原生生物パルスに加えて創設直後にも原生生物の増加がみられた。オスメスペアでは 2 週目に、メス単独創設では 3 週目に原生生物量が増加していた (図 4.2.1)。一方でオス単独創設では創設初期の原生生物量の増加はみられなかった(図 4.2.1)。

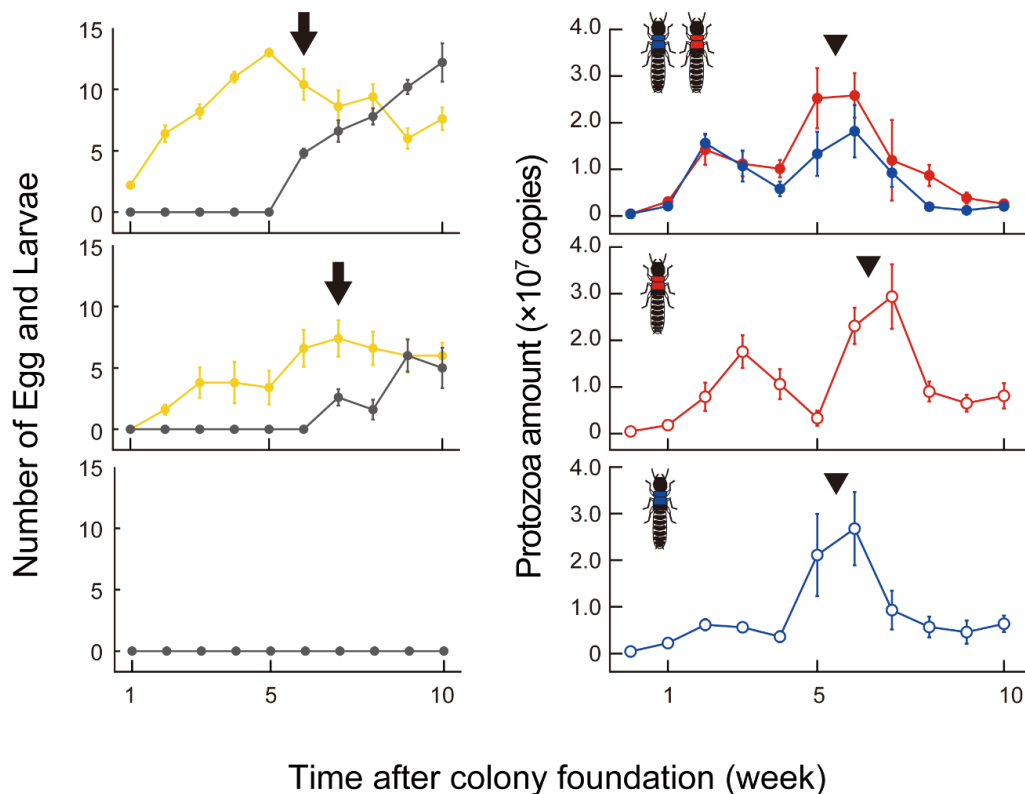


図 4.2.1 ペア創設と単独創設における繁殖スケジュールと原生生物量の変動

左のグラフは創設コロニー内の卵（黄色）、幼虫（灰色）の数を表す。黒矢印は幼虫の孵化タイミングを示す。右はパラバサリア門に属する原生生物量の変動を表す。上からオスメス、メス単独創設、オス単独創設。原生生物パルスのタイミングを逆三角で示している。原生生物量はどの処理区においても週ごとに変動していた(Kruskal-Wallis rank-sum test, $P < 0.001$)。

巣作りのタイミング

本節においては創設虫が巣作りを開始するタイミングについても観察した。巣作りのタイミングはペアごとに異なっていたが、週の効果はみられなかった(GLM, binomial distribution, pair: $\chi^2_2 = 25.2, P < 0.001$; week: $\chi^2_1 = 0.16, P = 0.69$)。オスメスペアについては実験開始直後から巣材に潜り込み、巣作りを行っていた(図 4.2.2)。一方でオス単独、メス単独創設においては 1 週目においては多くの個体が巣材の外を歩き回っている様子が観察された(図 4.2.2)。

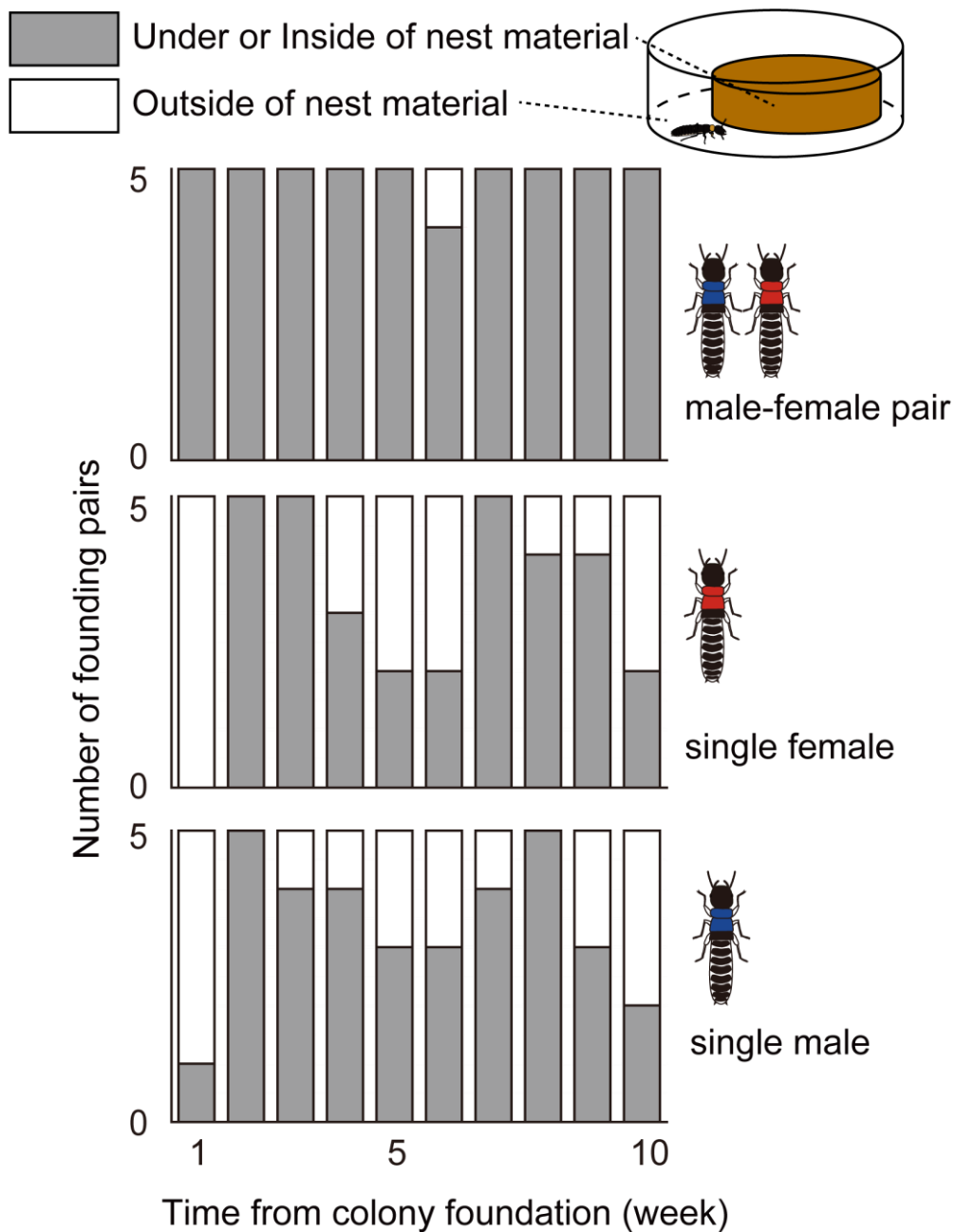


図 4.2.2 ペア創設と単独創設における創設開始タイミングの比較

上からオスメスペア、メス単独、オス単独創設。毎週回収した5つの創設コロニーにおける創設虫の場所を示している。灰色は巣材の下もしくは内部を、白色は巣材の外を歩いていたことを示している。

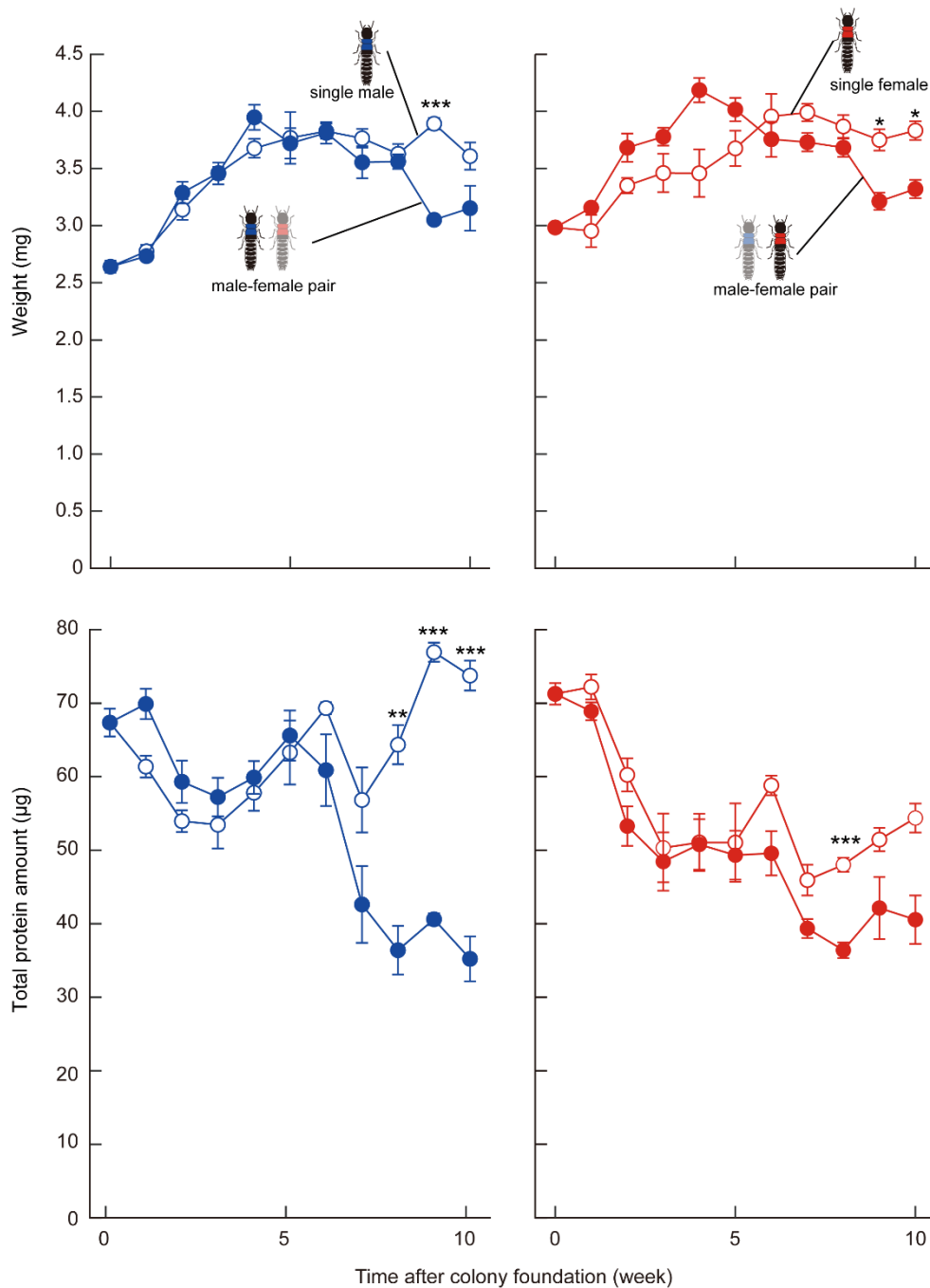


図 4.2.3 ペア創設と単独創設における体重およびタンパク質量の比較

上より生重量、総タンパク質量の同性内比較を示す。左からオス間比較、メス間比較の結果を示しており、それぞれのグラフにおいて青丸もしくは赤丸はオスメスペアを、白塗りのプロットは単独飼育のデータを表している。各週においてペアと単独飼育において比較を行った(T-test, Holm correction, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。エラーバーは標準誤差を表す。

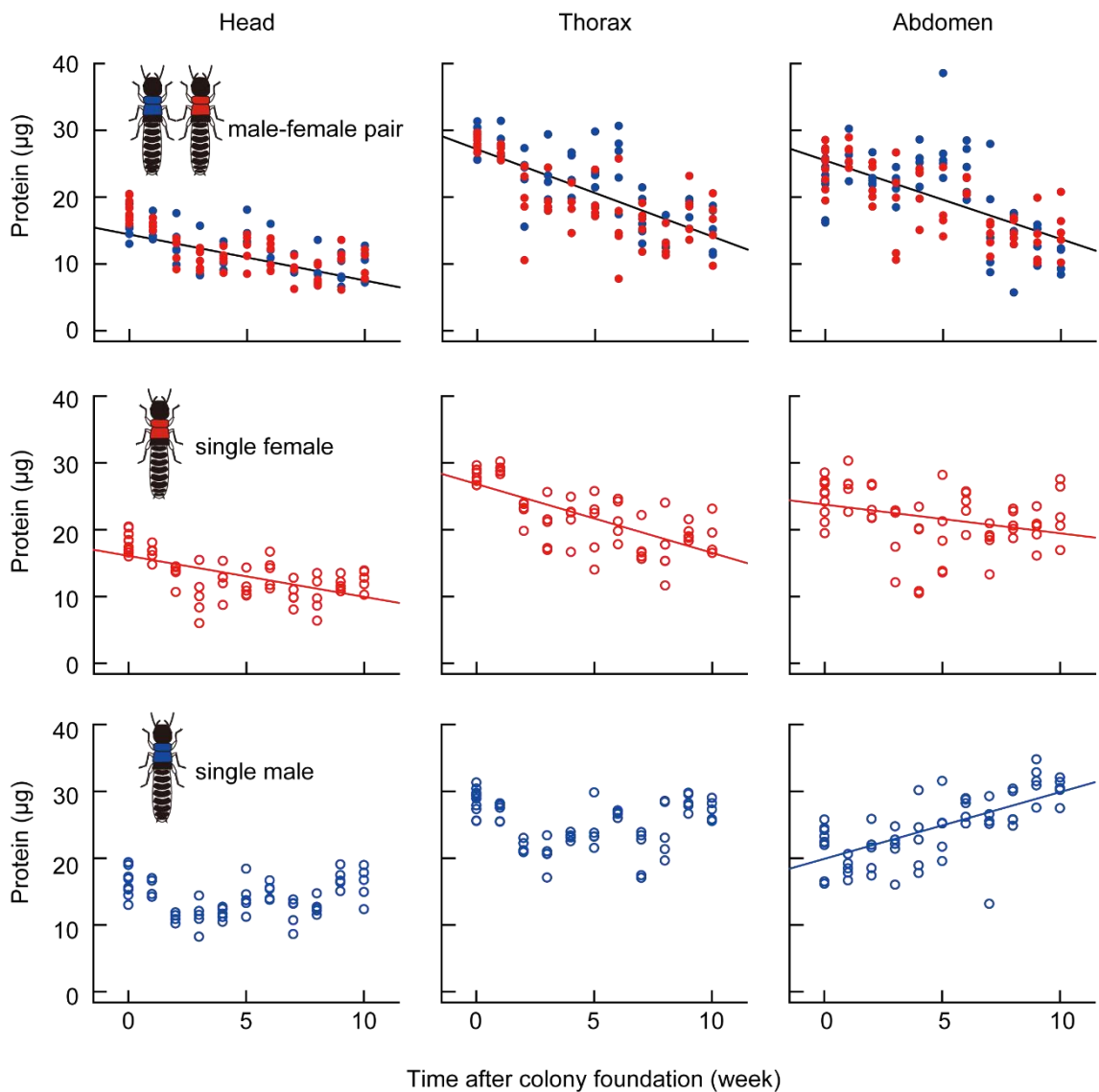


図 4.2.4 ペア飼育と単独飼育における創設虫のタンパク質配分パターン

創設虫の頭・胸・腹におけるタンパク質量を示す。上からオスメス、メス単独、オス単独を表し、左から頭、胸、腹についてのデータを示している。オスメスペアにおいて、青丸はオスを、赤丸はメスを表す。それぞれのデータにおいて、週の効果有意であった場合(ANOVA, $P < 0.05$)に線形回帰直線を示している。

タンパク質量及び生重量の変動

オスメスペアのそれぞれの性について、生重量とタンパク質の総量について単独創設個体との比較を行った。コロニー創設後9週目においては、オス単独創設の個体の重量がオスメスペアのオスよりも重くなっていた(t-test, Holm correction, $P < 0.05$, 図 4.2.3)。メスについては、コロニー創設後9、10週目においてメス単独の個体の性重量がオスメスペアのメスよりも重くなっていた(t-test, Holm correction, $P < 0.05$, 図 4.2.3)。コロニー創設後8週目から10週目にかけて、タンパク質の総量がオス単独創設の個体においてオスメスペアのオスよりも多くなっていた(t-test, Holm correction, $P < 0.05$, 図 4.2.3)。メス単独創設個体とオスメスペアのメスでは、コロニー創設後8週目においてタンパク質量がオスメスペアのメスで多くなっていた(t-test, Holm correction, $P < 0.05$, 図 4.2.3)。

創設虫の体の各パーツにおけるタンパク質量としては、オスメスペアにおいては頭・胸・腹どの部位でも減少傾向にあった(ANOVA; head, $\beta = -0.76 \pm 0.069$, mean \pm SE, $F_1 = 122.1$, $P < 0.001$; thorax $\beta = -1.31 \pm 0.11$, mean \pm SE, $F_1 = 136.9$, $P < 0.001$; abdomen, $\beta = -1.18 \pm 0.12$, mean \pm SE, $F_1 = 88.89$, $P < 0.001$, 図 4.2.4)。胸部のタンパク質において性の効果が有意であり、オスのほうが多くのタンパク質を持っていた(ANOVA, $F_1 = 12.63$, $P < 0.001$, 図 4.2.4)。頭部、腹部のタンパク質は雌雄では有意差は検出されなかった(ANOVA, effect of sex; head: $F_1 = 0.0021$, $P = 0.96$, abdomen: $F_1 = 1.20$, $P = 0.28$, 図 4.2.4)。また、どの部位においても性と週の交互作用は検出されなかった(ANOVA, interaction effect of week and sex; head: $F_1 = 0.56$, $P = 0.45$, thorax: $F_1 = 0.36$, $P = 0.55$, abdomen: $F_1 = 0.017$, $P = 0.90$, 図 4.2.4)。メス単独飼育個体においては、全ての部位でタンパク質が減少傾向にあった(ANOVA; head, $\beta = -0.61 \pm 0.11$, mean \pm SE, $F_1 = 33.5$, $P < 0.001$; thorax, $\beta = -1.03 \pm 0.13$, mean \pm SE, $F_1 = 64.8$, $P < 0.001$; abdomen, $\beta = -0.43 \pm 0.17$, mean \pm SE, $F_1 = 6.58$, $P = 0.012$, 図 4.2.4)。オス単独飼育個体においては、頭部と胸部では週との相関はみられなかった(ANOVA; head, $F_1 = 0.0015$, $P = 0.97$; thorax, $F_1 = 0.12$, $P = 0.73$, 図 4.2.4)が、腹部では増加傾向にあった(ANOVA; abdomen, $\beta = 1.00 \pm 0.14$, mean \pm

SE, $F_1 = 48.0$, $P < 0.001$, 図 4.2.4)。

4.2.4 考察

本節において、ヤマトシロアリの創設虫は単独でも原生生物の増加と減少、つまり原生生物パルスを起こすことができることが明らかになった(図 4.2.1)。さらにオス単独個体においては、パルスによって栄養を得られることも明らかになった(図 4.2.2, 4.2.3)。メス単独個体においては、パルスのタイミングがオスメス、オス単独個体と比較して 1 週間遅れて生じていた。さらに繁殖開始と幼虫の孵化もオスメスと比べて 1 週間遅れていた。その一方でオス単独ペアにおいては、巣の創設開始時期はオスメスペアと比べて 1 週間遅れていたにも関わらず、原生生物パルスのタイミングはオスメスペアと同時期であった。したがって、メス単独創設でのパルスを起こすタイミングのずれは創設開始のずれではなく、繁殖開始もしくは幼虫の孵化時期のずれによるものであることが考えられ、シロアリが原生生物パルスを幼虫の孵化と同調させて起こすメカニズムの存在が示唆された。さらにタンパク質量の変化から、オス単独個体においてはパルスによって得た栄養を腹部に蓄積していることが分かった(図 4.2.3)。このことは、オス単独個体はまず腹部に存在する生殖器官に栄養をフローさせることを示唆している。

ヤマトシロアリの初期コロニーの多くは雌雄のペアで創設される。だがその一方で、異性のペアを見つけることのできなかつた個体は同性ペアもしくは単独でも腐朽材中に潜り込んで仮の巣を作ることが知られている(Kusaka and Matsuura 2018)。オス同士のペアはコロニー融合の際に融合先のコロニーのオスを殺してメスを乗っ取ることで子孫を残すことが知られている(Mizumoto et al. 2016)。これは、群飛後の探索行動には大きな捕食リスクを伴うため、異性のペアが見つからなくても巣を作ることが適応的であるためである。一方で単独創設個体はペアの個体と異なり、生存率は非常に低く、1 年以上は生きられないことが分

かっている(Matsuura et al. 2004; Mizumoto et al. 2016)。そのため彼らは巣を作った直後にも頻繁に出歩き、群飛直後の羽アリを探して出歩く(Mizumoto et al. 2017)。本節の研究においても、単独創設個体はペア個体と比べて巣外に出歩く割合が高かった(図 4.2.2)。特に一週間後はほとんどの個体が出歩いた。そのため、メス単独個体では産卵開始と幼虫孵化のタイミングが遅れたことが考えられる。群飛の時期が過ぎ、羽アリと出会う機会が失われた後には単独個体でも繁殖を開始し、他コロニーとの融合の機会を待つのではないだろうか。

シロアリの腸内共生原生生物は後腸にのみ生存している。後腸は外胚葉由来の器官であり、表面はクチクラで覆われている(Engel and Moran 2013)。物質の消化吸収を主に行う中腸とは異なり、後腸では主に水分の再吸収が行われている。したがってシロアリは腸内微生物の生産する栄養や微生物そのものを、肛門食を介して中腸で消化・吸収していると考えられている。それでは単独飼育個体において栄養の吸収はどのように行われているのだろうか。一つの可能性としては、肛門食が行われない環境下では、フンを排出し、それを摂食することで栄養を得たことが考えられる。さらに先行研究ではシロアリ後腸には小さな穴のようなものが多く観察されており、ここから栄養を吸収する可能性についても議論されている(Breznak and Pankratz 1977)。本研究においてどのようなメカニズムで原生生物パルスを起こし、その栄養を得たかは不明であるが、肛門食のある状況とない状況を比較することで、シロアリが共生微生物の生産する栄養を受け取るうえでの個体同士の相互作用の重要性が明らかになるだろう。

シロアリの腸内共生原生生物は祖先のキゴキブリから維持されてきた(Ohkuma et al. 2009)。キゴキブリは亜社会性であり、一夫一妻で子育てを行う(Nalepa 1984)。つまり、シロアリ腸内原生生物は、宿主の個体間相互作用が生じる状況でのみ維持されてきたということである。このように複数個体が存在することは腸内微生物の種組成を維持していくうえで役に立つと考えられる。羽アリの持つ微生物量は非常に限られているため(Cook and Gold 1998; Lewis and Forschler 2004; Benjamino and Graf 2016)、ボトルネック効果により失われた

種を配偶相手から補うことができるためだ。本節の研究から、シロアリは単独個体でも原生生物パルスを起こすことができることが明らかになった。このパルス前後やその後の種組成の変遷を見ることで、シロアリ腸内微生物の種組成の維持において複数個体で創設することの意義が明らかになるだろう。

第5章 腸内原生生物群集のカースト間差の種間比較

5.1 はじめに

腸内微生物群集はあらゆる動物においてみられる。その組成は宿主の摂取する餌や、様々な生理特性を反映する。シロアリにおいても同様で、宿主の餌が主に土食か、草食か、木材食かどうかで腸内微生物群集は大きく変動する(Dietrich et al. 2014)。さらにシロアリの種によっては腸の構造や生理活性が大きく異なり、腸内細菌群集の組成にも影響を与える。例えば高等シロアリにおいては微生物が生息する後腸は複数のコンパートメントに分かれており、それぞれにおける pH が異なり、細菌群集も異なることが知られている(Brune and Dietrich 2015)。腸内微生物群集の種間での違いを明らかにすることは、微生物との共進化の過程を知る上でも重要だろう。

下等シロアリにおいて、種間の重要な差異としてカーストの分化経路がある。カースト分化経路は Two-way と One-way の 2 種類がある (第 1 章 シロアリの生活史及びカースト分化参照)。Two-way の分化経路を持つ種においては、ニンフ経路とワーカー経路の二種類の分化経路が存在し、個体の分化運命は比較的早い時期に決定する。つまり繁殖虫は特異的な発生経路を持ち、労働個体(ワーカー、兵アリ)とは大きく異なる発生を経ることが言える。一方で One-way の分化経路を持つ種では、全ての個体がワーカー(擬職蟻、pseudergate と呼ばれる)の最終齢まで発生し、そこから一部が繁殖虫へと分化する。よって繁殖虫への分化はワーカー発生の延長線上であり、両者は発生学上も近い個体であることが言える。One-way 種よりも Two-way 種のほうが女王の産卵量が多く、ワーカーとの個体差が大きい傾向がある(Nozaki and Matsuura 2019)。この 2 タイプの発生経路を持つシロアリにおいて、繁殖虫とワーカーの持つ腸内微生物はどのように異なるのだろうか。両者を比較することによって、繁殖虫特異的な腸内微生物群集がシロアリ一般的な形質であるのか、それともシロアリの進化過程で起源したものであるかを明らかにすることができるだろう。

本研究において、One-way 種として Archotermopsidae 科に属するネバダオオシロアリ

Zootermopsis nevadensis とオオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* を用いた。ネバダオオシロアリはアメリカ西海岸が原産地の種で、日本の兵庫県川西市に侵入・定着している(Yashiro et al. 2018)。オオシロアリは日本原産種で、屋久島や奄美大島に分布している。Two-way 種としてはミゾガシラシロアリ科(Rhinotermitidae)に属するヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* とイエシロアリ *Coptotermes formosanus* を用いた。それぞれの種において、繁殖虫を容易に視認可能である。繁殖虫、ワーカーにおける原生生物量の比較を行った。

5.2 材料・方法

ネバダオオシロアリ *Zootermopsis nevadensis* については、野外での採集後に研究室内で飼育したコロニーを 16 個用いた。採集は兵庫県川西市で行われ、コロニーの解体後に湿らせたベイマツのチップを敷いたプラスチックケースを用いて全暗条件で飼育した。擬職蟻由来の二次王・二次女王と擬職蟻を取り出し、実験に使用した。コロニーから取り出した個体の体重を測定したのちに頭部を切り離して全腸をピンセットを用いて取り出し、100 μ L の Trager Solution U(Trager 1934)内で攪拌した。そこから 20 μ L 取り出して 10 倍希釈し、希釈液から 20 μ L とりだして血球計算版を用いて原生生物の数をカウントした。*Trichonympha* 属の大型原生生物については 16 マス内(3.2 μ L に相当)の数を数え、その他の原生生物については 2 マス(0.4 μ L に相当)内の数をカウントした。1 個体あたりの原生生物総個体数を算出した。

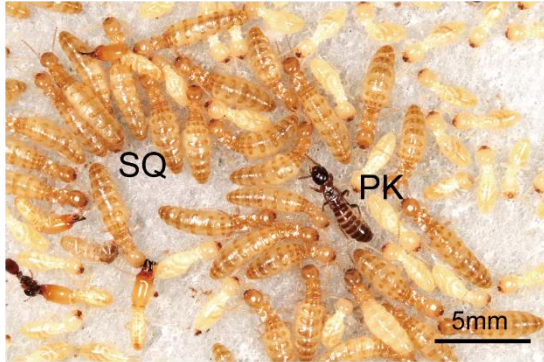
オオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* については、野外での採集後に研究室内で飼育したコロニーを 2 個用いた。採集は奄美大島で行われ、野外で採集したコロニーを解体して取り出し、ベイマツ材とコロニーの巣材をプラスチックケースに入れて 25 $^{\circ}$ C、全暗条件で飼育した。擬職蟻由来の二次王及び二次女王、兵アリを取り出して実験に使用した。コロニーから取り出した個体の体重を測定したのちに頭部を切り離して全腸をピンセットを用いて取り出し、100 μ L の 0.6%塩化ナトリウム水溶液中で攪拌した。そこから 20 μ L 取り出して 20

倍希釈し、希釈液から 20 μ L とりだして血球計算版を用いて原生生物の数をカウントした。*Trichonympha* 属と *Eucomonympha* 属の大型原生生物については 16 マス内(3.2 μ L に相当)の数を数え、その他の原生生物については 2 マス(0.4 μ L に相当)内の数をカウントした。1 個体あたりの原生生物総個体数を算出した。

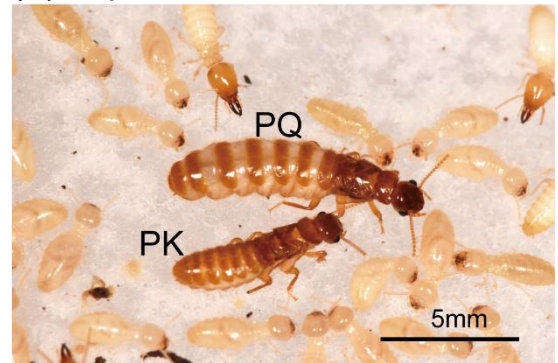
イエシロアリ *Coptotermes formosanus* Shiraki (Rhinotermitidae)に関しては、研究室内の創設コロニーを 5 個使用した。創設の方法としては 2013、2014 年に和歌山県御坊市にて、有翅虫を含むコロニーを採集し、実験室にて同じコロニー由来の有翅虫の雌雄ペアに巣を形成させた。褐色腐朽材培地を用いて創設し、必要に応じて砂と餌のベイマツ材を加えた。すべてのコロニーには羽アリ由来の繁殖虫(創設王および創設女王)が存在していた。巣内のワーカー・兵アリを含めた個体数はすべてのコロニーで 1000 を超えていた(1033~3147 個体)。創設王、女王、ワーカー、兵アリを実験に使用した。個体の体重を測定した後に頭部を切断し、ピンセットで腹部をつまんで全腸を取り出した。取り出した腸を滅菌済みの 100 μ L 0.6%塩化ナトリウム水溶液内で破碎した。20 μ L 取り出して血球計算板に入れ、原生生物の数をカウントした。全ての原生生物について、16 マス内(3.2 μ L に相当)の数を数え、1 個体あたりの原生生物総量を算出した。

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* については、本節においては 3.1 節において示したデータと同一のものを比較のため示す。

(A) *Reticulitermes speratus*



(B) *Coptotermes formosanus*



(C) *Zootermopsis nevadensis*



(D) *Hodotermopsis sjostedti*

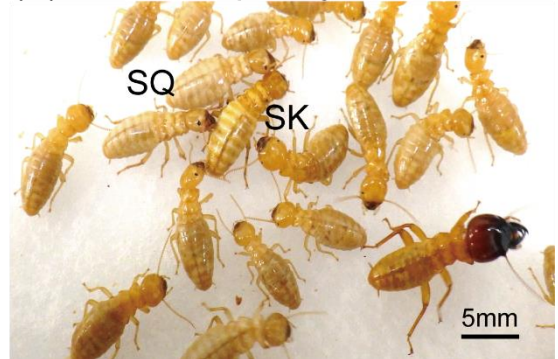


図 5.1 本節で使用したシロアリ

(A)ヤマトシロアリ。中央の黒い個体が創設王(PK)、周囲の、色が濃く腹部の膨満した個体が二次女王(SQ)。(B)イエシロアリ。中央下の個体が創設王(PK)、中央上の個体が創設女王(PQ)。(C)ネバダオオシロアリ。中央左の茶色の個体が二次王(SK)、上の個体が二次女王(SQ)。(D)オオシロアリ。中央の黄色がかった個体が二次王(SK)、その上の白色がかった個体が二次女王(SQ)。

5.3 結果

四種それぞれで原生生物量をワーカー、繁殖虫間で比較した。ヤマトシロアリ、イエシロアリにおいてはどのコロニーの王、女王も原生生物を全く持っていなかった。一方でオオシロアリ、ネバダオオシロアリにおいてはどのコロニーでも王・女王は原生生物を持っており、その量もワーカーと変わらなかった(図 5.2)。オオシロアリにおいては女王の卵巣に黄体が観察されたことから、産卵を経験した女王であることが考えられる。ネバダオオシロア

リにおいてもほとんどの繁殖虫の卵巣に黄体が観察された。また、原生生物量について繁殖虫における雌雄差は確認されなかった。

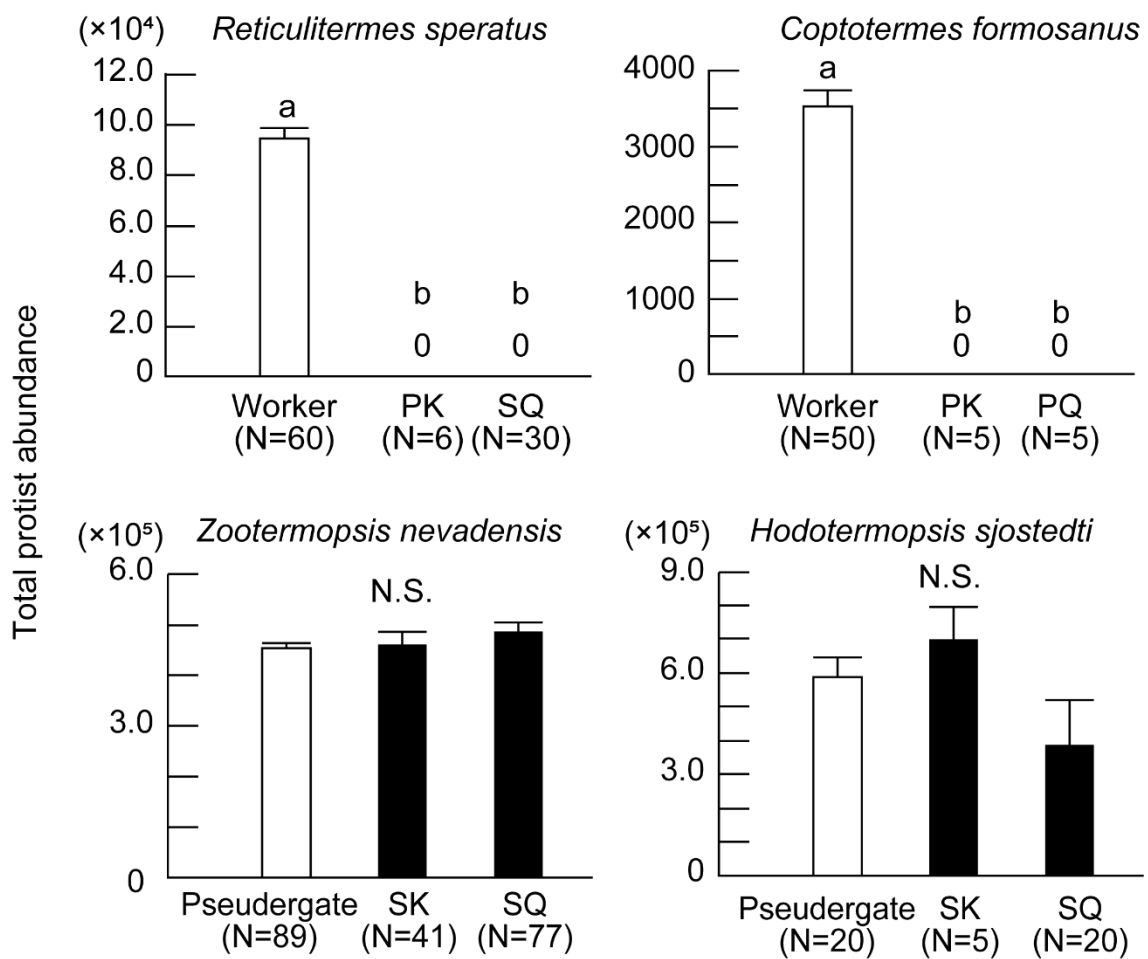


図 5.2 繁殖虫とワーカーの原生生物量

上が左からヤマトシロアリ、イエシロアリを表し、下のグラフが左からネバダオオシロアリ、オオシロアリを表す。エラーバーは標準誤差を示す。それぞれの種においてカースト間の原生生物量を比較した。異なるアルファベットは有意差を表す (Tukey's HSD after quasi-Poisson 分布を仮定した GLM, $P < 0.05$)。

5.4 考察

本節の研究により、Two-way 種のシロアリにおいては王・女王は全く腸内原生生物を持たない一方で、One-way 種のシロアリは王・女王共にワーカーと同様の量の原生生物を持つことが明らかになった。このことから、Two-way 種の繁殖虫はワーカーに木の消化を完全に依存しているが、それに対して One-way 種の繁殖虫は木材消化能力を有していることがいえる。さらにその量もワーカー有意な差は認められなかったため、ワーカーと同様の能力を持ちつつ繁殖を行っていることが考えられる。

今回使用した4種類のうち、One-way 種であるオオシロアリ、ネバダオオシロアリは Archotermopsidae 科に属しており、Two-way 種でミゾガシラシロアリ科(Rhinotermitidae)に属するヤマトシロアリ、イエシロアリよりも祖先的な種である(Bourguignon et al. 2015)。今回の結果から、シロアリ社会において繁殖虫が原生生物を持たなくなったプロセスが示唆された。Two-way 種の多くは One-way 種よりも女王とワーカーの形態的差異が大きい(Nozaki and Matsuura 2019)ため、原生生物の繁殖虫における喪失と繁殖力が関連していることも考えられる。祖先的な種において繁殖虫から原生生物を抜くなどの操作実験によりこの問いにアプローチできるだろう。

One-way 種のシロアリでは王・女王はなぜ原生生物を維持しているのだろうか。至近要因としては、ワーカーと発生上非常に近く、原生生物を排除するメカニズムを持っていないという生理的制約が考えられる。一方で、繁殖虫自身が原生生物を持つ利益としては、免疫力の向上が考えられる。第2章において、脱皮直後の原生生物を持たない個体や原生生物を抜いた個体においてセラチア菌に直接感染する様子が観察された。さらに先行研究から、腸内微生物を抜くと病原菌に感染しやすくなることが知られている(Veivers et al. 1982; Sen et al. 2015)。よって王や女王は自らに原生生物を持つことで免疫力を高めているのではないだろうか。それぞれの種のコロニーを観察すると、ヤマトシロアリやイエシロアリでは繁殖虫のいる場所は固い木材や巣材に覆われ、特徴的な構造が観察されるが、オオシロアリやネバ

ダオオシロアリではそのような構造は見受けられなかった。繁殖虫の居場所の衛生環境が保たれない One-way 種においては、繁殖虫は自らの身を病原菌や日和見感染菌から守る必要があるのではないだろうか。社会全体として王・女王をどのように扱うかという側面も、シロアリと腸内微生物群集の共生関係の維持や崩壊を考察する上で重要であると考えられる。

第6章 総合考察

多くの原生生物、バクテリアからなるシロアリの腸内微生物群集は1億5千万年もの間、シロアリの腸内で維持されてきた(Ohkuma et al. 2009)。特に原生生物はシロアリの祖先であるキゴキブリから宿主と共生関係にあることが知られている(Nalepa 1991; Ohkuma et al. 2009)。シロアリは個体間で腸液のやり取りをすることにより微生物群集を交換し、維持してきた。種内においては非常に安定なこの共生関係であるが、シロアリ全体で見ると必ずしも安定ではなく、高等シロアリと呼ばれる派生的なシロアリのグループでは腸内から原生生物を失っている。このような絶対共生関係の維持・崩壊の背景を解明する上で、宿主と共生微生物の相互作用の全貌を明らかにすることが重要な意味を持つ。本研究では社会性昆虫のシロアリにおける様々なタスクに着目し、腸内微生物がそれをどのように支えているかを明らかにすることを目的とした。

成熟コロニーにおけるシロアリのワーカーは、採餌・巣の構築・子育てなどの様々な労働に従事する。その中でも、巣内の衛生環境維持は非常に重要である。というのも、シロアリの巣内には卵や幼虫といった免疫の弱い個体が多く、さらに血縁者が高密度で生息しているために日和見感染菌の発症と感染が起りやすいからである。本研究によって、シロアリの腸内微生物が日和見菌の増殖を抑制し、巣内衛生の維持に寄与することが明らかになった(第2章)。この機能には腸内微生物が木材を消化した結果生産する酢酸が、日和見菌を抑制することにより貢献していた。酢酸はシロアリにとっての栄養物質として機能しており(Ohkuma and Brune 2011)、さらに環境中の微生物にとっては他の競争的な微生物を抑制する物質として機能する(Noda and Hayashi 1980; Sharma et al. 2014)ことを考慮すると、シロアリは環境中の酢酸生成微生物を取り込むことで栄養と他の微生物からの防衛の両方を同時に手に入れたことが考えられる。このように他の微生物を抑制する機能は様々な腸内微生物においてみられる(Buffie and Pamer 2013)。また、シロアリにおいても真菌分解酵素を腸内

微生物が生産することで病原菌の感染を防いでいることも明らかになっている (Rosengaus et al. 2014; Peterson and Scharf 2016a)。これらの機能についても、ある微生物における他の微生物抑制機能をシロアリが二次的に利用することで生じたことが考えられる。環境中の微生物の様々な性質はこのような複数機能を持つ共生微生物の前適応となりうるだろう。第2章の研究から、シロアリ腸内微生物は、ワーカーの多くのタスクを支える重要な存在であることが明らかになった。

だが、シロアリの巣内にはワーカーのみならず様々なカーストが存在する。王・女王といった繁殖カーストである (Wilson 1971)。繁殖カーストは交尾、産卵などの繁殖行動に専念する個体である。ヤマトシロアリを用いてこれらを含めたカースト間で腸内原生生物を比較したところ、ワーカーや兵アリと異なり、王・女王は原生生物を全く持っていなかった (第3章)。これは王や女王は木材の消化を完全にワーカーに依存しているためであると考えられる。さらに腸内のバクテリアを調べたところ、王・女王ではワーカーと兵アリと比較して細菌の多様性が少なかった。特に一方のコロニーでは繁殖虫特異的バクテリアを検出した。このバクテリアは既存のクレードには属しておらず、腸内細菌の新規機能の存在を示唆するものであった (第3章)。さらに成熟コロニーにおいて女王分化プロセスと原生生物量の関係を調べたところ、女王分化の際に原生生物を失い、その後回復しないことが明らかになった (第3章)。これらのことから、繁殖虫は繁殖に特化した個体へと分化する際に原生生物を失い、木材消化をワーカーに依存するようになることが言える。繁殖虫から特異的に検出されたバクテリアは、繁殖を支えるものなのかもしれない。繁殖虫特異的な細菌の役割を明らかにする上では、シングルセルゲノム解析やカースト間での入れ替え実験など、分子生物学・生態学の両側面からのアプローチが有効であろう。

シロアリの生活史において、一個体が繁殖と木材の消化を同時に行う時期が存在する。それがコロニー創設期である。巣から飛び立った羽アリは主に雌雄でペアを作り、採餌・巣の構築・繁殖を2匹で行う。コロニー創設期の繁殖スケジュール、原生生物量、栄養量につ

いて時系列を追って調べたところ、創設王・女王は繁殖を行いながら原生生物を保有していることが明らかになった。さらに、原生生物量の急激な上昇と下降パターン（原生生物パルス）が幼虫の孵化と同期して起こることを発見し、これが幼虫へ投資する栄養に貢献することを見出した。このことは、シロアリは自らの繁殖スケジュールに合わせて原生生物量をコントロールしていることを示唆する。また、単独個体で巣を創設させることで、原生生物パルスを単独でも起こすことができることが明らかになった。パルス前後の創設虫の腸における遺伝子発現解析や微生物の種組成の解析を行うことで、シロアリがどのようにして、どの微生物をコントロールしているかが明らかになるだろう。先行研究では、コロニー創設1年後に創設王・女王は原生生物をほとんど失うことが明らかになっている(Shimada et al. 2013)。創設虫は、ワーカーが十分存在しない時期には原生生物量をコントロールしてそのものを栄養とし、ワーカーが増えた後に原生生物を受け渡し、完全に繁殖に専念することが考えられる。

第5章では、繁殖虫特異的な腸内微生物保有パターンがシロアリ一般的であるかを明らかにするために、One-way のカースト分化経路を持つ種と Two-way の分化経路を持つ種でカースト間の原生生物量の違いを調べた。その結果、前者では王と女王がワーカーと同じ量の原生生物を持っていたのに対して、後者では王・女王は全く原生生物を持っていなかった。One-way の種が Two-way の種よりも祖先的であることを考えると、社会全体として繁殖虫に原生生物を分配しないようなシステムを獲得したことが示唆された。この原因については、ワーカーがそもそも原生生物を与えなくなったことと、繁殖虫が原生生物を排除するようになったことの2通りが考えられる。前者の仮説の検証については、ワーカーと繁殖虫の行動観察が有効であろう。また、後者については、原生生物の培養実験が有効であると考えられる。現在、シロアリ腸内原生生物の単離培養の成功例はほぼないが、群集そのものを短期間維持することは可能である(Rosengaus et al. 2014)。よって繁殖虫の腸内容物を含む状態で原生生物を培地内で維持し、その量が保たれるかどうかを見ることで、繁殖虫が原生

生物を排除するような物質を生産しているかどうかを明らかにすることができるだろう。

また、今回使用した4種について、One-way の種よりも Two-way の種のほうが女王とワーカーの形態的差異が大きく、産卵量も多い(Nozaki and Matsuura 2019)。このことから、原生生物を持たなくなったことと繁殖力との密接な関係が示唆された。

本研究において、腸内微生物の新規機能とカースト特異性に着目し、生態学的アプローチ、微生物学的アプローチを行ってきた。腸内微生物の多機能性が明らかになり、シロアリにとっての腸内微生物の重要性が強調された一方で、繁殖に特化すると原生生物を持たなくなるというパターンも見られた。これまでのシロアリ腸内微生物研究においては、繁殖虫にはほとんど着目されてこなかったため、今回得られた結果は両者の相互作用、共進化を明らかにする上で重要な知見であるだろう。

これまでの共生微生物の研究においては、微生物は宿主に必須な栄養を生産することで繁殖に貢献するという面が強調されてきた。だが今回の研究において、繁殖への特化に伴い腸内微生物の多くを失うというパターンを見出した。このことから、繁殖虫自身が原生生物を持つことによるコストの存在が予測される。この問いにアプローチするには、代謝産物解析や遺伝子発現解析などの分子生物学的手法を用いて、そもそもそれぞれのカーストの腸内微生物群集が何を生産しているかを明らかにすることや、カースト間での微生物群集を入れ替えることで繁殖への影響を見る生態学的手法など、様々な側面からのアプローチが必要となるだろう。共生関係の維持・崩壊を考察する上では、共生微生物のベネフィットのみならずコストについて明らかにすることも重要である。今回得られた、繁殖へのコストという視点を持って研究を進めることで、シロアリと腸内微生物の1億年も続きながら崩壊した絶対共生関係の謎が明らかになるだろう。

要約

微生物との共生は動植物において普遍的にみられ、共生微生物は宿主の行動・生理に大きな影響を与える。そのなかでもシロアリ腸内の共生微生物群集は一億五千万年もの間宿主との共生関係を維持しており、木材消化や窒素固定を通じて宿主に炭素・窒素源を供給することが知られている。両者は絶対共生関係にあり、互いに単独では生存できない。王・女王といった繁殖カーストとワーカー・兵アリといった非繁殖カーストからなる社会を形成するシロアリにおいて、共生微生物群集は宿主の様々なタスクに大きく貢献することが考えられる。本研究では腸内微生物の新規機能として巣内衛生への寄与を明らかにした。またシロアリの腸内共生微生物群集についてカースト・性間・種間で比較を行った。さらに巣の創設期に着目し、腸内微生物量の変動からその機能について考察した。本論文は以下のよう

に要約される。

第1章では、これまでの動物と腸内微生物との共生に関する研究について概観し、社会性昆虫、特にシロアリにおける腸内共生微生物の機能や宿主との相互作用についての研究の概要を述べた。

第2章では、シロアリ腸内微生物の新規機能として巣内衛生維持への貢献を明らかにした。セラチア菌を用いた、日和見菌測定の実験系を確立し、シロアリ腸内微生物は酢酸を生産することによりセラチア菌の増殖抑制に貢献していることを明らかにした。このことからもともと微生物が他の微生物を抑制するために用いていた酢酸をシロアリが栄養源として二次的に利用していることが示唆された。

第3章では、ヤマトシロアリの腸内共生微生物群集をカースト・性間で比較した。王と女王では原生生物を全く保有していないことを明らかにした。さらにワーカーにおいて原生生物量のコロニー依存的な性差を見出した。この結果はワーカーにおける雌雄間分業の存在を示唆するものとして意義深い。また、繁殖虫特異的な腸内細菌を発見した。このバクテリアは既存のクレードに属さなかったことから、腸内細菌の新規機能の存在を示唆して

いる。繁殖虫への分化に伴う原生生物量の変化を調べたところ、繁殖虫に分化する際の脱皮において速やかに原生生物を失い、その後再獲得しないことで腸内に原生生物が存在しない状態を保つことが明らかになった。このことからシロアリは繁殖への特化に伴って腸内微生物を排除することが示唆された。

第4章では、シロアリの初期コロニー特異的な腸内原生生物量の変動パターンを明らかにした。コロニー創設実験により、幼虫の孵化タイミングと同調した原生生物量の急激な増加と減少を見出し、これが幼虫に投資する栄養に貢献していることを示唆した。このことからシロアリによる微生物コントロールのメカニズムの存在が推測された。

第5章では、繁殖虫とワーカーの原生生物量の違いについて複数種のシロアリを用いて種間比較を行った。その結果、祖先的な種であり、繁殖虫とワーカーの形態的差異の小さいオオシロアリとネバダオオシロアリでは繁殖虫も原生生物を有していた。比較的派生的な種であり、繁殖虫とワーカーの形態的差異の大きいヤマトシロアリとイエシロアリにおいては王・女王共に原生生物を全く持っていなかった。このことは繁殖への特化に伴って原生動物を排除するようになったことを示唆している。

第6章では、本研究の総合考察と、シロアリ共生微生物群集研究の今後の展望を示した。

学位公表論文

Inagaki T. & Matsuura K. (2018) Extended mutualism between termites and gut microbes: nutritional symbionts contribute to nest hygiene. *The Science of Nature*, 105, 52

Inagaki T. & Matsuura K. (2016) Colony-dependent sex differences in protozoan communities of the lower termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ecological Research*, 31, 749-755

謝辞

本研究を進めるうえで多くの方々にたいへんお世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。

まず、指導教員である京都大学農学研究科昆虫生態学研究室の松浦健二教授には、日々の研究生活において、多大な指導を賜りました。実験の進め方からフィールド調査、飼育技術をご教示いただき、論文の書き方についても根気強く指導していただきました。先生とフィールド調査や実験、学会をご一緒させていただく中で研究者として、さらに教育者としての在り方を学ばせていただきました。その中で、研究を通して自らが人としてどうあるべきかを深く考えさせられました。たいへん感謝しております。土畑重人助教には統計解析手法のアドバイスや論文執筆の際にコメントをいただきました。学生実験 TA や京都大学博物館における企画展示「虫を知りつくす」の際にはたいへんお世話になりました。また、本論文の主査を担当して頂いた松浦健二教授の他、副査を担当して頂いた京都大学農学研究科昆虫生理学研究室の大門高明教授、化学生態学研究室教授の森直樹教授には、論文へのコメント・審査の労を賜りました。心から感謝いたします。

研究室のポスドクの方々にも多くの刺激を受けてきました。この場を借りて感謝申し上げます。小林和也博士（現：京都大学フィールド科学研究センター講師）には分子実験や統計解析手法について助言をいただきました。瀧側太郎博士（現：大阪市立大学准教授）には、qPCR の手法を丁寧に教えていただき、学会発表や論文執筆の際も親身に相談に乗っていただきました。宮国泰史博士（現：琉球大学教育学部）には沖縄調査の際に大変お世話になりました。矢代敏久博士（現：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）にはシロアリの写真を提供いただきました。前野浩太郎博士（現：国際農林水産業研究センター）からは、過酷な土地での研究を進める姿勢と強靱な精神力に多くを学びました。高田守博士にはシロアリの飼育方法や野外でのフィールド調査、実験の進め方など様々なアドバイスをいただきました。田崎英祐博士にはクローニングをはじめとする様々な分子実験の手法

をご教示いただきました。石橋朋樹博士には博士論文公聴会に際して多くのアドバイスをいただきました。また、研究室の諸先輩方にも大変お世話になりました。三高雄希博士（現京都工業繊維大学）には研究から日々の生活に至るまで様々な相談に乗っていただきました。水元惟暁博士（現アリゾナ州立大学）とは採集や学会などご一緒させていただき、その姿勢に多くを学ばせていただきました。野崎友成博士（現基礎生物学研究所）とは共同実験を通じて多くのディスカッションをさせていただき、公私において様々な助言をいただきました。事務中西智子氏には物品の購入や予算の運営など、事務手続きに関して大変お世話になりました。昆虫生態学研究室の学生諸氏にはシロアリ採集や実験の多くを手助けしていただきました。研究室の方々とは他愛もない会話から研究のディスカッションに至るまで、多くの楽しい時間を共有させていただきました。5年間の院生生活が充実したものであったのもひとえに皆様方のおかげです。ありがとうございました。

また、東京工業大学の本郷裕一教授には MiSeq を使わせていただき、また研究の相談にも多く乗っていただきました。猪飼桂氏にはメタ 16S 解析などの分子生物学的手法をご教授いただき、解析方法のアドバイスも多くいただきました。神川龍馬助教には、原生生物学者としての見地から様々なアドバイスをいただき、研究室の設備も貸していただきました。Rebeca Rosengaus 教授（ボストン大学）には学会の際に研究内容に対するコメント、アドバイスをいただき、後日研究室訪問をした際も温かく出迎えていただきました。Edward Vargo 教授（テキサス A&M 大学）、Nancy Moran 教授（テキサス大学オースティン校）、Naomi Pierce 教授（ハーバード大学）には研究室訪問及びセミナーでの講演を快く承知していただきました。英語での発表と議論の貴重な機会をいただき、非常に実りのある経験となりました。北島薫教授（京都大学熱帯林環境学研究室）は、修士からは研究室を変えると言っていた私を学部生の間受け入れてくれ、院に行ってから度も度々助言をいただきました。先生とのパナマでのフィールドワークは、私が生物群集の成り立ちに興味を持つきっかけとなりました。感謝しております。

本研究の多くは日本学術振興会特別研究員制度及び科研費の支援を受けました。

最後に、これまでの学生生活を心身共に支えてくださった両親に心からお礼を申し上げます。ありがとうございました。

引用文献

- Afzal M, Salihah Z (1985) Sex ratio, occurrence of parthenogenesis, ovarian development and oviposition behaviour of the primary reproductives of *Bifiditermes beesoni* (Gardner) (Isoptera, Kalotermitidae). *Zeitschrift für Angew Entomol* 100:132–146. doi: 10.1111/j.1439-0418.1985.tb02767.x
- Alekshun MN, Levy SB (2006) Commensals upon us. *Biochem Pharmacol* 71:893–900. doi: 10.1016/j.bcp.2005.12.040
- Andrew BJ (1930) Method and rate of protozoan refaunation in the termite *Termopsis angusticollis* hagen. *Univ Calif Publ Zool* 33:449–470
- Anttila J, Kaitala V, Laakso J, Ruokolainen L (2015) Environmental variation generates environmental opportunist pathogen outbreaks. *PLoS One* 10:e0145511. doi: 10.1371/journal.pone.0145511
- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants; implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University press, pp 3–30
- Bastian M, Heymann S (2009) Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. In: *International AAAI conference on weblogs and social media*. pp 361–362
- Benjamino J, Graf J (2016) Characterization of the core and caste-specific microbiota in the termite, *Reticulitermes flavipes*. *Front Microbiol* 7:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00171
- Bignell DE (2011) Morphology, physiology, biochemistry and functional design of the termite gut: an evolutionary wonderland. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) *Biology of termites: a modern synthesis*. Springer, Heidelberg, pp 375–412
- Bignell DE, Anderson JM (1980) Determination of pH and oxygen status in the guts of lower and higher termites. *J Insect Physiol* 26:183–188. doi: 10.1016/0022-1910(80)90079-7
- Bolnick DI, Snowberg LK, Hirsch PE, et al (2014) Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate

- gut microbiota. *Nat Commun* 5:. doi: 10.1038/ncomms5500
- Bonte D, Van Dyck H, Bullock JM, et al (2012) Costs of dispersal. *Biol Rev* 87:290–312. doi: 10.1111/j.1469-185X.2011.00201.x
- Boucias DG, Cai Y, Sun Y, et al (2013) The hindgut lumen prokaryotic microbiota of the termite *Reticulitermes flavipes* and its responses to dietary lignocellulose composition. *Mol Ecol* 22:1836–1853. doi: 10.1111/mec.12230
- Bourguignon T, Lo N, Cameron SL, et al (2015) The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. *Mol Biol Evol* 32:406–421. doi: 10.1093/molbev/msu308
- Breznak JA, Brill WJ, Mertins JW, Coppel HC (1973) Nitrogen fixation in termites. *Nature* 244:577–580. doi: 10.1038/244577a0
- Breznak JA, Pankratz HS (1977) In situ morphology of the gut microbiota of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus* Shiraki]. *Appl Environ Microbiol* 33:406–426
- Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 75:4801–4805. doi: Doi 10.1073/Pnas.75.10.4801
- Brune A (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Microbiol* 12:168–180. doi: 10.1038/nrmicro3182
- Brune A, Dietrich C (2015) The gut microbiota of termites: digesting the diversity in the light of ecology and evolution. *Annu Rev Microbiol* 5:607. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155715
- Buffie CG, Pamer EG (2013) Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 13:790–801. doi: 10.1038/nri3535
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869

- Casadevall A, Pirofski LA (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* 68:6511–6518. doi: 10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000
- Castle GB (1934) The damp-wood termites of western United States, genus *Zootermopsis* (formerly, *Termopsis*). In: Kofoid CA (ed) *Termites and termite control*. University of California press, Berkeley, pp 273–310
- Chouvenc T (2019) The relative importance of queen and king initial weights in termite colony foundation success. *Insectes Soc* 66:177–184. doi: 10.1007/s00040-019-00690-3
- Chouvenc T, Efstathion CA, Elliott ML, Su N-Y (2013) Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite. *Proc R Soc B* 280:20131885. doi: 10.1098/rspb.2013.1885
- Cleveland LR (1923) Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. *Proc Natl Acad Sci* 9:424–428. doi: 10.1073/pnas.9.12.424
- Cleveland LR (1925) The feeding habit of termite castes and its relation to their intestinal flagellates. *Biol Bull* 48:295–308. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Cleveland LR (1949) Hormone-induced sexual cycles of flagellates. *J Morphology* 85:197–295
- Clobert J, Baguette M, Benton TG, Bullock JM (2012) *Dispersal ecology and evolution*. Oxford University press
- Cook TJ, Gold RE (1998) Organization of the symbiotic flagellate community in three castes of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 31:25–39
- Cook TJ, Gold RE (1999) Symbiotic hindgut flagellate communities of the subterranean termites *Reticulitermes virginicus* and *Reticulitermes flavipes* in Texas (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 34:533–544
- Crespi BJ (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 16:178–183. doi:

10.1016/S0169-5347(01)02115-2

Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13:701–12. doi: 10.1038/nrn3346

Davey KR (1994) Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *Int J Food Microbiol* 23:295–303. doi: 10.1016/0168-1605(94)90158-9

De Bach PH, Mcomie WA (1939) New disease of termites caused by bacteria. *Ann Entomol Soc Am* 32:137–146. doi: <https://doi.org/10.1093/aesa/32.1.137>

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci* 107:14691–6. doi: 10.1073/pnas.1005963107

De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, et al (2015) Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nat Commun* 6:7735. doi: 10.1038/ncomms8735

Dean SR, Gold RE (2004) Sex ratios and development of the reproductive system in castes of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ann Entomol Soc Am* 97:147–152. doi: 10.1603/0013-8746(2004)097[0147:sradot]2.0.co;2

Dietrich C, Köhler T, Brune A (2014) The cockroach origin of the termite gut microbiota: Patterns in bacterial community structure reflect major evolutionary events. *Appl Environ Microbiol* 80:2261–2269. doi: 10.1128/AEM.04206-13

Dimitrov DP (1970) About the fluorescence of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Zeitschrift für Naturforsch* 25:762–763. doi: <https://doi.org/10.1515/znb-1970-0727>

Dlugosch KM, Parker IM (2008a) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol Ecol* 17:431–449. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x

Dlugosch KM, Parker IM (2008b) Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history

- evolution despite genetic bottlenecks. *Ecol Lett* 11:701–709. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01181.x
- Edwards CA, Duerden BI, Read NW (1985) The effects of pH on colonic bacteria grown in continuous culture. *J Med Microbiol* 19:169–180. doi: 10.1099/00222615-19-2-169
- Engel P, Moran NA (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37:699–735. doi: 10.1111/1574-6976.12025
- Feldman M, Barnett C (1991) Fasting gastric pH and its relationship to true hypochlorhydria in humans. *Dig Dis Sci* 36:866–9. doi: 10.1007/BF01297133
- Freire AC, Basit AW, Choudhary R, et al (2011) Does sex matter? the influence of gender on gastrointestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm* 415:15–28. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.069
- Fukatsu T, Hosokawa T (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl Environ Microbiol* 68:389–396. doi: 10.1128/AEM.68.1.389-396.2002
- Fukuda S, Toh H, Hase K, et al (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543–547. doi: 10.1038/nature09646
- Gil S, Daniel S, Ringo JM, et al (2010) Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 107:20051–20056. doi: 10.1073/pnas.1302980110
- Gomez A, Luckey D, Taneja V (2015) The gut microbiome in autoimmunity: Sex matters. *Clin Immunol* 159:154–162. doi: 10.1016/j.clim.2015.04.016
- Grimont F, Grimont PAD (1984) *Serratia*. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* 1–22. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01167.
- Grimont PAD, Grimont F (1978) The genus *Serratia*. *Annu Rev Microbiol* 32:221–248. doi: 10.1007/0-387-30746-X_11

- Haifig I, Jost C, Janei V, Costa-Leonardo AM (2011) The size of excavators within a polymorphic termite species governs tunnel topology. *Anim Behav* 82:1409–1414. doi: 10.1016/j.anbehav.2011.09.025
- Hammer TJ, Janzen DH, Hallwachs W, et al (2017) Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci* 114:9641–9646. doi: <https://doi.org/10.1101/132522>
- Hartke TR, Baer B (2011) The mating biology of termites: A comparative review. *Anim Behav* 82:927–936. doi: 10.1016/j.anbehav.2011.07.022
- Heijtz RD, Wang S, Anuar F, et al (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci* 108:3047–3052. doi: 10.1073/pnas.1010529108
- Holt JA, Lepage M (2000) Termites and soil properties. In: Abe T, Bignell DE, Higashi M (eds) *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands., pp 389–407
- Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, et al (2008) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc Natl Acad Sci* 105:5555–5560. doi: 10.1073/pnas.0801389105
- Honigberg B (1970) Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: Krishna K, Weesner F (eds) *Biology of termites, vol II*. Academic Press, New York, London, pp 1–36
- Hörmannspenger G, Haller D (2010) Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 300:63–73. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.006
- Hu XP, Song D, Gao X (2011) Biological changes in the Eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera, Rhinotermitidae) and its protozoa profile following starvation. *Insectes Soc* 58:39–45. doi: 10.1007/s00040-010-0114-1
- Hughes DP, Pierce NE, Boomsma JJ (2008) Social insect symbionts: evolution in homeostatic fortresses. *Trends Ecol Evol* 23:672–677. doi: 10.1016/j.tree.2008.07.011

- Inagaki T, Matsuura K (2016) Colony-dependent sex differences in protozoan communities of the lower termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ecol Res.* doi: 10.1007/s11284-016-1387-2
- Inoue T, Murashima K, Azuma JI, et al (1997) Cellulose and xylan utilisation in the lower termite *Reticulitermes speratus*. *J Insect Physiol* 43:235–242. doi: 10.1016/S0022-1910(96)00097-2
- Ishii S, Kishi M, Yamagami K, et al (2012) The use of mammalian cultured cells loaded with a fluorescent dye shows specific membrane penetration of undissociated acetic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:523–529. doi: 10.1271/bbb.110824
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139:485–498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
- Jašarevi E, Morrison KE, Bale TL (2016) Sex differences in the gut microbiome – brain axis across the lifespan. *Philos Trans R Soc London B* 371:12–17. doi: 10.1098/rstb.2015.0122
- Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al (2013) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498:99–103. doi: 10.1038/nature12198
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* 425:78–81
- Kirby H (1937) Host-parasite relations in the distribution of protozoa in termites. *Univ Calif Publ Zool* 41:
- Kirchner WH, Minkley N (2003) Nestmate discrimination in the harvester termite *Hodotermes mossambicus*. *Insectes Soc* 50:222–225. doi: 10.1007/s00040-003-0667-3
- Kitade O (2007) Characteristics and host-symbiont relationships of termite gut flagellates. *Japanese J protozoology* 40:101–112
- Kitade O (1993) Symbiotic protistan faunae of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Japan Archipelago. *Sociobiology* 23:135–153

- Kitade O, Hayashi Y, Noda S (2013) Symbiotic protist communities in the termite *Coptotermes formosanus* in Japan and a comparison of community structures between workers and soldiers. Japan J Protozool 46:21–29. doi: 10.18980/JJPROTOZOO.46.1-2_21
- Kitade O, Hayashi Y, Takatsuto K (2012) Variation and diversity of symbiotic protist composition in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjoestedti*. 45:29–36
- Klainer AS, Beisel WR (1969) Opportunistic infection: a review. Am J Med Sci 258:431–456
- Koidzumi M (1921) Studies on the intestinal protozoa found in the termites of Japan. Parasitology 13:235–309
- Korb J (2007) Termites. Curr Biol 17:R995–R999
- Korb J, Hartfelder K (2008) Life history and development - A framework for understanding developmental plasticity in lower termites. Biol Rev 83:295–313. doi: 10.1111/j.1469-185X.2008.00044.x
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kusaka A, Matsuura K (2018) Allee effect in termite colony formation: influence of alate density and flight timing on pairing success and survivorship. Insectes Soc 65:17–24. doi: 10.1007/s00040-017-0580-9
- Lack D (1954) The natural regulation of animal numbers. Oxford University press, Oxford, U.K.
- Leadbetter JR, Schmidt TM, Graber JR, Breznak JA (1999) Acetogenesis from H₂ plus CO₂ by spirochetes from termite guts. Science 283:686–689. doi: 10.1126/science.283.5402.686
- Lee KE, Wood TG (1971) Termites and soils. Academic Press, London
- Leigh EG (2010) The evolution of mutualism. J Evol Biol 23:2507–2528. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02114.x
- Leishman MR, Wright IJ, Moles AT, Westoby M (2009) The evolutionary ecology of seed size. In:

- Seeds: the ecology of regeneration in plant communities. pp 31–57
- Levin SA, Muller-Landau HC, Nathan R, Chave J (2003) The ecology and evolution of seed dispersal. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:575–604. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132428
- Lewis JL, Forschler BT (2004) Protist communities from four castes and three species of *Reticulitermes* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Ann Entomol Soc Am* 97:1242–1251. doi: 10.1603/0013-8746(2004)097[1242:pcffca]2.0.co;2
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, et al (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 6:776–788. doi: 10.1038/nrmicro1978
- Light SF, Sanford MF (1928) Experimental transfaunation of termites. *Calif Univ Publ Zool* 31:269–274
- Light SF, Weesner M (1955) The incipient colony of *Tenuirostritermes tenuirostris* (Desneux). *Insectes Soc* 2:135–146
- Lo Pinto M, Varrica G, Agrò A (2016) Temporal variations in symbiotic hindgut protist community of the subterranean termite *Reticulitermes lucifugus* Rossi in Sicily. *Insectes Soc* 63:143–145. doi: 10.1007/s00040-015-0449-8
- Markle JGM, Frank DN, Mortin-toth S, et al (2013) Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 339:1084–1088. doi: 10.1126/science.1233521
- Matsuura K (2001) Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. *Oikos* 92:20–26
- Matsuura K (2006) A novel hypothesis for the origin of the sexual division of labor in termites: Which sex should be soldiers? *Evol Ecol* 20:565–574. doi: 10.1007/s10682-006-9117-9
- Matsuura K, Fujimoto M, Goka K (2004) Sexual and asexual colony foundation and the mechanism of facultative parthenogenesis in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Soc* 51:325–332. doi: 10.1007/s00040-004-0746-0

- Matsuura K, Kobayashi N (2007) Size, hatching rate, and hatching period of sexually and asexually produced eggs in the facultatively parthenogenetic termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Appl Entomol Zool* 42:241–246. doi: 10.1303/aez.2007.241
- Matsuura K, Nishida T (2001) Comparison of colony foundation success between sexual pairs and female asexual units in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Popul Ecol* 43:119–124. doi: 10.1007/PL00012022
- Mauldin JK (1982) Lipid synthesis from [14C]-acetate by two subterranean termites, *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus*. *Insect Biochem* 12:193–199. doi: 10.1016/0020-1790(82)90008-7
- Menasria T, Moussa F, El-Hamza S, et al (2014) Bacterial load of German cockroach (*Blattella germanica*) found in hospital environment. *Pathog Glob Health* 108:141–7. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000136
- Michaud C, Hervé V, Dupont S, et al (2019) Efficient but occasionally imperfect vertical transmission of gut mutualistic protists in a wood-feeding termite
- Mikaelyan A, Thompson CL, Hofer MJ, Brune A (2016) The deterministic assembly of complex bacterial communities in guts of germ-free cockroaches. *Appl Environ Microbiol* 82:1256–1263. doi: 10.1128/AEM.03700-15
- Minkley N, Fujita A, Brune A, Kirchner WH (2006) Nest specificity of the bacterial community in termite guts (*Hodotermes mossambicus*). *Insectes Soc* 53:339–344. doi: 10.1007/s00040-006-0878-5
- Mitaka Y, Kobayashi K, Mikheyev A, et al (2016) Caste-specific and sex-specific expression of chemoreceptor genes in a termite. *PLoS One* 11:e0146125. doi: 10.1371/journal.pone.0146125
- Mizumoto N, Fuchikawa T, Matsuura K (2017) Pairing strategy after today's failure: unpaired termites synchronize mate search using photic cycles. *Popul Ecol* 59:205–211. doi: 10.1007/s10144-017-

0584-3

- Mizumoto N, Yashiro T, Matsuura K (2016) Male same-sex pairing as an adaptive strategy for future reproduction in termites. *Anim Behav* 119:179–187. doi: 10.1016/j.anbehav.2016.07.007
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* 42:165–190. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130119
- Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, et al (2011) Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 332:970–974
- Nalepa CA (1991) Ancestral transfer of symbionts between cockroaches and termites: an unlikely scenario. *Proc R Soc B* 246:185–189. doi: 10.1098/rspa.1966.0046
- Nalepa CA (1984) Colony composition, protozoan transfer and some life history characteristics of the woodroach *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Dictyoptera: Cryptocercidae). *Behav Ecol Sociobiol* 14:273–279. doi: 10.1007/BF00299498
- Nalepa CA (2017) What kills the hindgut flagellates of lower termites during the host molting cycle? *Microorganisms* 1–28. doi: 10.3390/microorganisms5040082
- Nalepa CA, Jones SC (1991) Evolution of monogamy in termites. *Biol Rev* 66:83–97. doi: 10.1111/j.1469-185X.1991.tb01136.x
- Noda F, Hayashi K (1980) Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soy sauce. *Appl Environ Microbiol* 40:452–457
- Noda S, Kitade O, Inoue T, et al (2007) Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol Ecol* 16:1257–1266. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03219.x
- Noirot C, Pasteels JM (1987) Ontogenetic development and evolution of the worker caste in termites. *Experientia* 43:851–860. doi: 10.1007/BF01951642
- Nozaki T, Matsuura K (2019) Evolutionary relationship of fat body endoreduplication and queen

- fecundity in termites. *Ecol Evol* 1–11. doi: 10.1002/ece3.5664
- Nutting WL (1969) Flight and colony foundation. In: Krishna K, Weesner F (eds) *Biology of termites*, vol I. Academic Press, New York, pp 233–282
- Odelson D a, Breznak J a (1985) Nutrition and growth characteristics of *Trichomitopsis termopsidis*, a cellulolytic protozoan from termites. *Nutrition* 49:614–621
- Ohbayashi T, Takeshita K, Kitagawa W, et al (2015) Insect’s intestinal organ for symbiont sorting. *Proc Natl Acad Sci* 112:201511454. doi: 10.1073/pnas.1511454112
- Ohkuma M, Brune A (2011) Diversity, structure, and evolution of the termite gut microbial community. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) *Biology of termites: a modern synthesis*. Springer, Heidelberg, pp 413–438
- Ohkuma M, Noda S, Hongoh Y, et al (2009) Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach *Cryptocercus*. *Proc R Soc B* 276:239–245. doi: 10.1098/rspb.2008.1094
- Osbrink WLA, Williams KS, Connick WJ, et al (2001) Virulence of bacteria associated with the Formosan subterranean termite (Isoptera : Rhinotermitidae) in New Orleans, LA. *Biol Control* 30:443–448. doi: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-30.2.443>
- Peterson BF, Scharf ME (2016a) Metatranscriptome analysis reveals bacterial symbiont contributions to lower termite physiology and potential immune functions. *BMC Genomics* 17:772. doi: 10.1186/s12864-016-3126-z
- Peterson BF, Scharf ME (2016b) Lower termite associations with microbes: Synergy, protection, and interplay. *Front Microbiol* 7:1–7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00422
- Peterson CT, Sharma V, Elmén L, Peterson SN (2014) Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clin Exp Immunol* 179:363–377. doi: 10.1111/cei.12474
- Poindexter HA, Washington DT (1974) Microbial opportunism in clinical medicine. *J Natl Med Assoc*

- Poulsen M, Hu H, Li C, et al (2014) Complementary symbiont contributions to plant decomposition in a fungus-farming termite. *Proc Natl Acad Sci* 111:14500–5. doi: 10.1073/pnas.1319718111
- Prewett EJ, Smith JTL, Nwokolo AM, et al (1991) Twenty-four hour intragastric acidity and plasma gastrin concentration profiles in female and male subjects. *Clin Sci* 80:619
- Priya NG, Ojha A, Kajla MK, et al (2012) Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS One* 7:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0030768
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Radek R, Meuser K, Altinay S, et al (2019) Novel lineages of oxymonad flagellates from the termite *Porotermes adamsoni* (Stolotermitidae): the genera *Oxynympha* and *Termitimonas*. *Protist* 170:125683. doi: 10.1016/j.protis.2019.125683
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Restif O, Amos W (2010) The evolution of sex-specific immune defences. *Proc R Soc B* 277:2247–55. doi: 10.1098/rspb.2010.0188
- Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, et al (2010) Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329:1353–5. doi: 10.1126/science.1190689
- Roff DA (1992) The evolution of life histories: theory and analysis. Chapman & Hall, New York
- Roisin Y, Korb A (2011) Social organisation and the status of workers in termites. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) *Biology of termites: a modern synthesis*. Springer, Dordrecht, pp 133–164
- Rosengaus RB, Moustakas JE, Calleri D V, Traniello JFA (2003) Nesting ecology and cuticular microbial loads in dampwood (*Zootermopsis angusticollis*) and drywood termites (*Incisitermes minor*, *I. schwarzi*, *Cryptotermes cavifrons*). *J Insect Sci* 3:1–6. doi: <https://doi.org/10.1093/jis/3.1.31>

- Rosengaus RB, Schultheis KF, Yalonetskaya A, et al (2014) Symbiont-derived β -1,3-glucanases in a social insect: mutualism beyond nutrition. *Front Microbiol* 5:1–11. doi: 10.3389/fmicb.2014.00607
- Rousk J, Brookes PC, Bååth E (2009) Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl Environ Microbiol* 75:1589–1596. doi: 10.1128/AEM.02775-08
- Sachs JL, Simms EL (2006) Pathways to mutualism breakdown. *Trends Ecol Evol* 21:585–592. doi: 10.1016/j.tree.2006.06.018
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al (2016) Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell* 167:1469–1480.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.018
- Scharf ME (2015) Omic research in termites: an overview and a roadmap. *Front Genet* 6:76. doi: 10.3389/fgene.2015.00076
- Scharf ME, Cai Y, Sun Y, et al (2017) A meta-analysis testing eusocial co-option theories in termite gut physiology and symbiosis. *Commun Integr Biol* 10:1–13. doi: 10.1080/19420889.2017.1295187
- Schmid-Hempel P (1998) *Parasites in social insects*. Princeton University Press
- Schomburg L, Stoedter M, Renko K, et al (2010) Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice. *Biochem J* 429:43–51. doi: 10.1042/BJ20091868
- Scott KJ (1972) Obligate parasitism by phytopathogenic fungi. *Biol Rev* 47:537–572. doi: 10.1111/j.1469-185X.1972.tb01081.x
- Sen R, Raychoudhury R, Cai Y, et al (2015) Molecular signatures of nicotinoid-pathogen synergy in the termite gut. *PLoS One* 10:1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0123391
- Sharma M, Modi DR, Saxena M (2014) Role of lactic acid bacteria as probiotics in health and disease. *La Prensa Medica Argentina* 100:4. doi: 10.4172/lpma.1000147

- Shastri P, McCarville J, Kalmokoff M, et al (2015) Sex differences in gut fermentation and immune parameters in rats fed an oligofructose-supplemented diet. *Biol Sex Differ* 6:13. doi: 10.1186/s13293-015-0031-0
- Shellman-reeve J (1997) Advantages of biparental care in the wood-dwelling termite, *Zootermopsis nevadensis*. *Anim Behav* 54:163–70. doi: 10.1006/anbe.1996.0412
- Shellman-Reeve JS (1997) The spectrum of eusociality in termites. In: Choe JC, Crespi BJ (eds) *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. Cambridge, pp 52–93
- Shelomi M, Lo W-S, Kimsey LS, Kuo C-H (2013) Analysis of the gut microbiota of walking sticks (Phasmatodea). *BMC Res Notes* 6:1. doi: 10.1186/1756-0500-6-368
- Shimada K, Lo N, Kitade O, et al (2013) Cellulolytic protist numbers rise and fall dramatically in termite queens and kings during colony foundation. *Eukaryot Cell* 12:545–550. doi: 10.1128/EC.00286-12
- Shimada K, Maekawa K (2010) Changes in endogenous cellulase gene expression levels and reproductive characteristics of primary and secondary reproductives with colony development of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Insect Physiol* 56:1118–1124. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.011
- Shin SC, Kim SH, You H, et al (2011) *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* 334:670–674. doi: 10.1126/science.1212782
- Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, et al (1997) *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24:399–404. doi: 10.1097/00005176-199704000-00008
- Smith CC, Fretwell SD (1974) The optimal balance between size and number of offspring. *Am Nat* 108:499–506
- Stecher B, Hardt WD (2011) Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol* 14:82–91. doi: 10.1016/j.mib.2010.10.003

- Stecher B, Hardt WD (2008) The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 16:107–114. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.008
- Storelli G, Defaye A, Erkosar B, et al (2011) *Lactobacillus plantarum* promotes drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab* 14:403–414. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.012
- Su NY, La Fage JP (1987) Initiation of worker-soldier trophallaxis by the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Soc* 34:229–235. doi: 10.1007/BF02224355
- Tartar A, Wheeler MM, Zhou X, et al (2009) Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Biotechnol Biofuels* 2:25. doi: 10.1186/1754-6834-2-25
- Tkavc R, Ausec L, Oren A, Gunde-Cimerman N (2011) Bacteria associated with *Artemia* spp. along the salinity gradient of the solar salterns at Eilat (Israel). *FEMS Microbiol Ecol* 77:310–321. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01112.x
- Toga K, Hanmoto S, Suzuki R, et al (2016) Sexual difference in juvenile-hormone titer in workers leads to sex-biased soldier differentiation in termites. *J Insect Physiol* 87:63–70. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.02.005
- Trager W (1934) The cultivation of a cellulose-digesting flagellate, *Trichomonas termopsidis*, and of certain other termite protozoa. *Biol Bull* 266:182–190
- Veivers PC, O'Brien RW, Slaytor M (1982) Role of bacteria in maintaining the redox potential in the hindgut of termites and preventing entry of foreign bacteria. *J Insect Physiol* 28:947–951. doi: 10.1016/0022-1910(82)90111-1
- Wang J, Qin J, Li Y, et al (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490:55–60. doi: 10.1038/nature11450
- Watson JAL (1972) Ovarian activity during development of incipient colonies of the termite, *Hodotermes*

- mossambicus*. J Insect Physiol 18:603–607. doi: 10.1016/0022-1910(72)90090-X
- Wilson EO (1971) The insect societies. Harvard Univ. Press., Cambridge
- Wilson K (1997) Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. (eds) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 2.4.1-2.4.5
- Wisely SM, Buskirk SW, Fleming MA, et al (2002) Genetic diversity and fitness in black-footed ferrets before and during a bottleneck. J Hered 93:231–237. doi: 10.1093/jhered/93.4.231
- Wood BJ (1992) The lactic acid bacteria volume 1. Springer US, Boston, MA
- Yamaoka I, Sasabe K, Terada K (1986) A timely infection of intestinal protozoa in developing hindgut of the termite (*Reticulitermes speratus*). Zoolog Sci 3:175–180
- Yamin M a (1981) Cellulose metabolism by the flagellate *Trichonympha* from a termite is independent of endosymbiotic bacteria. Science 211:58–59. doi: 10.1126/science.211.4477.58
- Yamin MA (1979) Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foà reported from lower termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the Wood-Feeding Roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). Sociobiology 4:1–120
- Yashiro T, Matsuura K (2014) Termite queens close the sperm gates of eggs to switch from sexual to asexual reproduction. Proc Natl Acad Sci 111:17212–17217. doi: 10.1073/pnas.1412481111
- Yashiro T, Mitaka Y, Nozaki T, Matsuura K (2018) Chemical and molecular identification of the invasive termite *Zootermopsis nevadensis* (Isoptera: Archotermopsidae) in Japan. Appl Entomol Zool 53:215–221. doi: 10.1007/s13355-018-0545-0
- Yu DW (2001) Parasites of mutualisms. Biol J Linn Soc 72:529–546. doi: 10.1006/bjil.2000.0514
- Zhang CX, Yang SY, Xu MX, et al (2009) *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditidoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae).

Int J Syst Evol Microbiol 59:1603–1608. doi: 10.1099/ijms.0.003871-0

Zimet M, Stuart A (1982) Sexual dimorphism in the immature stages of the termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 7:1–7