シロアリの資源分配機構に関する社会生理学的研究

2024

小西 堯生

目次

第1章	5 序論
1-1	生物の集団的ふるまいと社会生理学4
1-2	社会性昆虫における分業システム5
1-3	研究モデルとしてのシロアリ9
1-4	シロアリの窒素利用13
1-5	本研究の目的16
第2章	エと女王に特異的な尿酸の分解と繁殖への寄与
2-1	はじめに17
2-2	材料と方法
2-3	結果
2-4	考察
2-5	補足資料
第3章	王の代替りに伴うワーカーの尿酸蓄積と感染症リスクの増加
3-1	はじめに
3-2	材料と方法
3-3	結果
3-4	考察
3-5	補足資料
第4章	□ 巣レベルの繁殖システムにおける地理的変異61
4-1	はじめに
4-2	材料と方法

4-3	結果
4-4	考察
4-5	補足資料74
第5章	非巣仲間排除行動に対する王と女王の影響
5-1	はじめに
5-2	材料と方法92
5-3	結果
5-4	考察100
5-5	補足資料103
第6章	総合考察104
要約	
謝辞	
学位公表論文	
巻末付	録1 王室が採集されたコロニーにおける王と女王の組成データ
巻末付	録2 キアシシロアリ巣内から得られた <i>Trichopsenius</i> 属の好白蟻性ハネカクシ 146
引用文	献148

第1章 序論

1-1 生物の集団的ふるまいと社会生理学

生物の世界は入れ子状の構造を呈しており、細胞が組織を構成し、組織が器官を構成し、 器官が個体を構成し、といった階層性を見いだすことができる。さらに一部の生物には、こ の延長線上に多数の個体が機能的に統合された集団、すなわち社会(society)なる階層が存在 する。Wilson(1975)は、生物の社会を「単なる性行動ではない協調的性質を伴う相互コミュ ニケーションによって組織化された同種個体の集団」と定義し、これは現在でも幅広く受け 入れられている。生物の社会集団は、時にあたかもひとつの個体のように振る舞うことから、 超個体(superorganism)とも形容される(Wheeler 1911; Hölldobler and Wilson 2009; Boomsma and Gawne 2018)。これは多数の細胞が機能的に統合された多細胞生物の個体とのアナロジーで ある。それでは、集団レベルの巨視的なパターンは、どのような機構によって社会の構成要 素である個体レベルの微視的な相互作用から維持されているのだろうか。これは生物学に おける重要な問いのひとつである。このような視点から社会集団と個体の間に存在するメ カニズムの解明を目指す研究分野は、個体内部の組織化を対象とする生理学(physiology)と のアナロジーから、社会生理学(sociophysiology, social physiology)あるいは超個体の生理学と 呼ばれる(Secley 1995)。

超個体が単なる比喩にとどまらず、生命現象を理解する上で重要な切り口として注目さ れ始めた背景には、「細胞の集合体としての個体」と「個体の集合体としての社会」に共通 した機構がみられることが社会生理学的研究により明らかになってきたことが挙げられる (Johnson and Linksvayer 2010; Friedman et al. 2020)。例えば、個体の階層でみられる恒常性や 栄養のフロー、異物の排除、および化学物質を介した情報の伝達といった機構は、社会の階 層においても見いだされる。後述の社会性昆虫(social insect)における、コロニー内個体間の 栄養や生理活性物質の受け渡しを介した環境応答などはその好例である。これは自然選択 (natural selection)が生物学的階層における個体レベルだけでなく、特定の条件の下では社会 集団レベルでも働くことを示唆している(Sober and Wilson 1998; Keller 1999; Folse and Roughgarden 2010; Birch and Okasha 2014; Okasha 2016)。実際にそれぞれの生命現象がどのよ うに進化したかに関しては、個々に適応的意義や遺伝的背景を考慮することなしに議論で きないため注意を要するが、集団レベルの挙動は社会生活を営む生物の生態学的な成功に とって重要な意味を持つ。社会集団の表現型(phenotype)は、個体単位で観察される行動的・ 形態的・生理的な形質から、巣の構造や物質のフローのように社会単位でのみ観察される形 質まで様々である(Jandt et al. 2014; Lemanski et al. 2019)。

1-2 社会性昆虫における分業システム

生物の集団における社会的な相互作用の中でも特に複雑なものは、アリやハチ、シロア リなどの高度に組織化されたコロニーを形成して生活を営む社会性昆虫に見いだされる。 社会性昆虫は、生態系におけるバイオマスの大きさから、地球上で最も繁栄している生物の 一群といわれてきた(Korb 2008; Bar-On et al. 2018)。その生態学的な成功の所以は、主に血縁 者から構成されるコロニー内の分業(division of labor: DOL)に帰される。社会性昆虫における 分業の形式は多岐にわたっており、特定のタスクに応じて行動的・形態的・生理的に専門化 したサブ集団はカースト(caste)と呼ばれる(Oster and Wilson 1978)。卵生産に特化して生殖腺 の発達とともに腹部が著しく肥大した女王カーストや、防衛に特化して武器形質を備えた 兵隊カーストなどはその典型例である(図 1-1)。分業システムのような個体横断的な形質が 適応上の利点を持って進化してきた仕組みや、個体間の相互作用がコロニーの統合性を維 持する仕組みは、今日まで研究対象として注目を集めてきた。

昆虫における社会性(sociality)を定義するための基準としては、(1)共同育児:同種の複数 個体が協力して子を育てる、(2)世代重複:世代の異なる個体が労働に寄与する、(3)繁殖分 業:繁殖する個体と繁殖しない個体が存在する、の 3 つが提唱されている(Michener 1969; Wilson 1971)。一般に社会性昆虫と呼ばれるのは、これらすべてを満たす真社会性(eusociality) に該当する昆虫である。一方で、いずれにも該当しないものは単独性(solitary)と呼ばれるが、 単独性と真社会性の間にも亜社会性(subsocial)、擬似社会性(quasisocial)、半社会性(semisocial) といった中間段階が存在する。繁殖分業は、中でも社会性昆虫を特徴づける傑出した性質で ある。多くの社会性昆虫において、巣内のごく一部の個体が生殖カーストとして繁殖を行う 一方、圧倒的多数の個体は非生殖カーストとして採餌や子育て、防衛、巣内衛生の維持とい った繁殖以外の労働に従事する(Wilson 1971, 1975)。これはコロニーを超個体と捉える視点 からは、しばしば多細胞生物の生殖細胞系列(germ line)と体細胞系列(somatic line)の関係に 例えて議論される(Wheeler 1911; Hölldobler and Wilson 2009; Boomsma and Gawne 2018)。体細 胞系列は配偶子を残さないため、生殖細胞系列に対する自己犠牲であるとみなすことがで きる。繁殖成功すなわち適応度(fitness)を子の数とその生存率で表すとき、非生殖カースト や体細胞系列の適応度はゼロである。「繁殖を行わない形質がなぜ進化したのか」という問 いは、自然選択により生物の進化を理解する上での難題であった。

Hamilton(1964)は、自身で繁殖を行うことにより得られる適応度だけでなく、血縁者への 利他行動(altruistic behavior)を通して間接的に得られる適応度も含めた包括適応度(inclusive fitness)に着目して、血縁選択(kin selection)の理論を提唱した。例えば、ある条件の下で個体 に利他行動をさせる遺伝子が存在すると仮定する。このとき、その遺伝子を発現した個体が 同じ遺伝子を潜在的に有する別の個体(血縁者)を援助することによって得られる適応度上 の利益が、行為の適応度上のコストを上回る場合には、結果として利他行動の遺伝子は集団 中に広まっていくと考えられている。実際に、昆虫における真社会性の起源は、クローン繁 殖を行うものや産雄性単為生殖を行うものなど、コロニー内血縁度が高いグループに偏っ ている(Crozier and Pamilo 1996; Pike et al. 2007)。この原理は階層を問わず適用可能であり、 上述の生殖細胞系列と体細胞系列の関係についても、同一個体内の細胞は基本的にクロー ンであることから、多細胞生物の進化において細胞間に血縁選択が働いたと解釈すること ができる(Michod and Roze 2001)。一方で、実際の社会性昆虫には、雌が複数の雄と交尾を行 う種など、コロニー内個体が必ずしも高い血縁関係で結ばれていないものも存在する (Wilson and Hölldobler 2005)。これは真社会性の起源と、その後のコロニー維持機構の進化が 別の問題であることを示唆している(Hughes et al. 2008)。例えば、個体間の血縁度が高いほ ど利他行動により得られる包括適応度利益は増加するが、遺伝的な均一性は病気の伝染を 容易にするなどのリスクも伴う(Schmid-Hempel 1998)。

社会性昆虫の生殖カーストは極めて高い繁殖能力を有する。例えば、シロアリの一種 Macrotermes subhyalinus では、女王が1日に約4万個の卵を産むと推定されており、これは 生重量にして体重の 1/3 に相当する(Wyss-Huber and Lüscher 1975)。その背景には、巣内の資 源分配における非対称性があると合理的に予測される(Hunt and Nalepa 1994; Wheeler 1996)。 実際に、巣内の栄養や有用な生理活性物質が生殖カーストへ集中することが多くの社会性 昆虫において知られている。例えば、セイヨウミツバチ(Apis mellifera)では、女王が生涯に わたりローヤルゼリー(royal jelly)と呼ばれるタンパク質や糖質に富む餌を与えられる (Laidlaw 1992)。社会性昆虫のコロニー内で採餌活動を担うのはワーカーであり、それ以外 の個体は基本的にワーカーから餌の吐き戻しや排泄物を受け取って栄養としている (Wheeler 1918; Sleigh 2002; Meurville and LeBoeuf 2021)。このようなコロニー個体間の餌の受 け渡しは栄養交換(trophallaxis)と呼ばれ、社会生活の根本となる行動である。さらに、近年 の分析技術の向上により、交換される液体には栄養だけでなく、巣仲間を認識する鍵となる 炭化水素や、消化や免疫に関与するタンパク質、成長やカースト分化を制御するホルモンな ど、様々な生理活性物質が含まれることが明らかになっている(LeBoeuf et al. 2016; Snir et al. 2022; Tasaki et al. 2023)。このような巣内の資源分配がどのように制御されているかを明らか にすることは、社会性昆虫における分業システムを理解する上で鍵となるが、その分子生理 基盤に関しては未解明な点が多い。



図 1-1. 社会性昆虫のコロニーと分業システム。例として、日本で最も普通かつ広範にみら れるシロアリ種であるヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)のコロニーを示す。社会性昆 虫には、王や女王として繁殖に専念する個体(生殖カースト)と、ワーカーや兵隊として繁殖 以外の労働に従事する個体(非生殖カースト)が存在する。王と女王は巣内の繁殖を一手に担 っている。生殖カーストの高い繁殖能力の背景には、巣内の資源分配における非対称性があ ると合理的に予測される。図中の K は王(king)、Q は女王(queen)、W はワーカー(worker)、 S は兵隊(soldier)を表す。黄色および白色はそれぞれ生殖カーストと非生殖カーストを示す。

1-3 研究モデルとしてのシロアリ

シロアリの社会性は、同じ社会性昆虫であるアリやハチとは独立に進化したものであり、 コロニーの構造や性決定様式などの基本的な生態に関しても大きく異なっている(Thorne 1997)。このため、シロアリを材料とした研究は、真社会性ハチ目を対象に行われてきた膨 大な先行研究の後追いではない独自の発見をもたらし、社会性昆虫における分業システム の理解に寄与する新たな視点を提供することが期待される。一方で、巣の隠蔽性・閉鎖性ゆ えの採集や飼育実験の困難さといったシロアリ特有の課題も存在し、未解明な点が非常に 多い。

シロアリには長らくシロアリ目(order Isoptera)という独立の目が与えられていたが、近年 は系統関係を考慮してゴキブリ目シロアリ科(order Blattodea, family Termitidae)とするべき (Inward et al. 2007)、あるいはゴキブリ目シロアリ下目(order Blattodea, infraorder Isoptera)とす るべき(Lo et al. 2007)という意見がある。シロアリは、既知種のすべてが真社会性に該当す る。一般的に、コロニーは生殖カーストである王と女王を中心に、将来的に有翅虫や補充生 殖虫となるニンフ、非生殖カーストであるワーカーと兵隊から構成される。一部の種ではワ ーカーが生殖カーストへの分化能を有していることを考慮して、分化能を失ったものを真 のワーカー(true worker)、分化能を維持しているものを擬職蟻(pseudergate)と区別して呼ぶこ ともある(Korb and Hartfelder 2008)。多数の有翅虫が巣から飛び立つ現象を群飛(swarm)と呼 び、群飛後に翅を落としてペアとなった雌雄により新たなコロニーが創設される(Nutting 1969)。シロアリのカーストの中で成虫と呼べるものは有翅虫(および有翅虫が成熟した王と 女王)のみであり、残りは補充生殖虫も含めすべて発生学的には幼虫である。幼生・幼体の 性質を残したまま生殖器官が成熟して繁殖が可能になる幼形成熟(neoteny)が一般的にみら れるのもシロアリの特徴である(Myles 1999)。基本的に各カーストには雄個体と雌個体が存 在し、両性が協働して社会生活を営む点で、雌社会であるアリやハチのコロニーとは異なる。 また、シロアリでは両性が2倍体である一方、単数倍数性(haplodiploidy)の性決定様式を持

つアリやハチでは雄が1倍体で雌が2倍体である(Cook 1993; Heimpel and de Boer 2008)。

シロアリのカースト分化経路は大きく2つのタイプに分類される(Legendre et al. 2013)。 個体発生の初期に分岐があるものは二分岐型(あるいは two-way 型)と呼ばれる(図 1-2a)。二 分岐型では、ニンフ経路とワーカー経路が存在し、ニンフ経路に入った個体が生殖カースト となる。生殖カーストには、有翅虫となって巣から飛び立ち、新しいコロニーを創設するも のと、巣内にとどまって補充生殖虫として繁殖を行うものが存在する。一部の種では、ワー カーが生殖カーストに分化する潜在的な能力が残っているが、野外ではほとんど観察され ない(Roisin and Pasteels 1987; Matsuura et al. 2018)。一方で、終齢まで分化運命が決定しない ものは直列型(あるいは one-way 型)と呼ばれる(図 1-2b)。直列型では、全てのワーカーが生 殖カーストへの分化能を有する。興味深いことに、これらのカースト分化経路はそれぞれの 採餌戦略とも大きく関係している(Korb and Hartfelder 2008)。二分岐型の分化経路をとる種 では、王室エリアと採餌エリアが明確に異なる。これには塚やカートン状の巣を作ってワー カーが巣外で採餌を行うタイプと、複数の木材にまたがって営巣するタイプが含まれる。一 方で、直列型の分化経路をとる種では、基本的に単一の木材に営巣するため王室エリアと採 餌エリアの境界が不明瞭である。営巣材は餌資源であると同時に捕食者など外部環境に対 するシェルターとしても機能している。

日本には20種以上のシロアリが分布するが、その多くは南西諸島に生息しており、本州 における木造建築物のシロアリ被害は、大半がヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)と西 南日本の沿岸部を中心に分布するイエシロアリ(*Coptotermes formosanus*)によるものである。 本研究では、日本で最も普通かつ広範にみられるヤマトシロアリを主な材料とする。ヤマト シロアリは、無性生殖(単為生殖)による女王位継承(asexual queen succession: AQS)と呼ばれ る特殊な繁殖システム(図 1-3)が発見されたことも相まって、カースト特異的な適応につい て最もよく研究されてきたシロアリ種のひとつでもある(Matsuura 2017)。群飛後に1ペアの 有翅虫が一夫一妻でコロニーを創設し、それぞれ創設王(primary king: PK)および創設女王 (primary queen: PQ)となる。創設女王は単為生殖によって自身の遺伝子のみを受け継ぐ多数 の二次女王(secondary queen: SQ)を生産するため、創設王が生きている限りコロニー内の近 親交配が回避される(Matsuura et al. 2009)。一方で、創設王が死亡して、創設王と創設女王の 遺伝子を持つ二次王(secondary king: SK)がコロニー内の繁殖を引き継ぐと、不可避的に近親 交配が生じてコロニーは終焉を迎えると考えられている。したがって、創設王は生き続ける 必要がある。実際に、野外で二次王が繁殖を担うコロニーは稀である(Matsuura et al. 2018)が、 王の代替り後にコロニーが終焉を迎える至近要因は解明されていない。



図 1-2. シロアリのカースト分化経路。(a)二分岐型(two-way 型)の概念図。ニンフ経路とワー カー経路が存在し、ニンフ経路に入った個体が生殖カーストとなる。一部の種では、ワーカ ーが生殖カーストに分化する潜在的な能力が残っているが、野外ではほとんど観察されな い。(b)直列型(one-way 型)の概念図。全てのワーカーが生殖カーストへの分化能を有する。 より厳密に、分化能を失ったものを真のワーカー(true worker)、分化能を維持しているもの を擬職蟻(pseudergate)と区別して呼ぶこともある。





図 1-3. ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)における無性生殖(単為生殖)による女王位継 承(asexual queen succession: AQS)。巣から飛び立った有翅虫は一夫一妻でコロニーを創設し、 それぞれ創設王(primary king: PK)および創設女王(primary queen: PQ)となる。創設女王は単為 生殖によって多数の二次女王(secondary queen: SQ)を生産するため、コロニーが生きている 限り遺伝的に不死である。一方で、創設王が死亡して二次王(secondary king: SK)がコロニー 内の繁殖を引き継ぐとコロニーはまもなく終焉を迎えると考えられている。これらを踏ま え、本学位論文では創設王と創設女王が繁殖を担うコロニーを創設期(early stage)、創設王と 創設女王および二次女王が繁殖を担うコロニーを成長期(growth stage)、創設王と二次女王が 繁殖を担うコロニーを成熟期(mature stage)、二次王と二次女王が繁殖を担うコロニーを終末 期(terminal stage)として扱う。ワーカー(worker)および有翅虫(alate)は王と女王の有性生殖に より生産される。

1-4 シロアリの窒素利用

シロアリの食性は種によって異なるが、主にセルロースの分解により栄養を得ている点 で共通している(Donovan et al. 2001)。多くのシロアリ種が餌とする木材中のセルロースは、 それ自体が難分解性であるだけでなく、さらに難分解性のリグニンにより覆われているた め、ワーカー間で栄養交換が繰り返されることにより少しずつ消化されていく。このとき、 共生微生物が代謝において重要な役割を担っており(Breznak and Brune 1994; Brune and Ohkuma 2011; Brune 2014)、その様式により大きく2つのタイプに分類される。消化管内の 共生バクテリアや巣内で栽培しているキノコ(担子菌類)がセルロースの分解に働くものは 高等シロアリ(higher termite)と呼ばれ、消化管内の共生バクテリアと原生動物がセルロース の分解に働くものは下等シロアリ(lower termite)と呼ばれる。木材は炭素を多く含む一方で 窒素に乏しい(Matsumoto 1976; La Fage and Nutting 1978; Higashi et al. 1992)ことから、シロア リでは不足しがちな窒素源を獲得・節約するための様々な戦略が進化してきた。例えば、土 壌食や共生微生物による窒素固定、脱皮殻のリサイクルなどである(Hungate 1941; Benemann 1973; Breznak et al. 1973; Chouvence 2020; Tong et al. 2021; Mullins et al. 2021)。これらに加えて、 シロアリは窒素代謝産物をそのまま排泄することなく、巧妙に再利用を行っていることが 明らかになっている(図 1-4、 1-5)。

窒素化合物がシロアリにとって限られた資源であること、そしてタンパク質の合成を伴 う繁殖において重要であることを考慮すると、シロアリの窒素利用は社会性昆虫における 繁殖分業に即した巣内の資源分配を理解するための理想的なモデルとなる可能性がある。 窒素化合物は、その代謝産物である尿酸(uric acid)の形で脂肪体(fat body)と呼ばれる組織に 蓄積される(Potrikus and Breznak 1980a; Breznak 1982; Brune 2014)。多くのゴキブリ種と同様、 シロアリにおいても脂肪体組織に尿酸細胞(urocyte)と呼ばれる、尿酸の貯蔵に特化した細胞 が存在する(Cochran 1985; Costa-Leonardo et al. 2013; Nozaki et al. 2023)。シロアリの脂肪体に 蓄えられた尿酸はマルピーギ管(Malpighian tubule)を経由して後腸に輸送され、*Citrobacter* 属 や Enterococcus 属、Clostridium 属などの嫌気性細菌の働きでアンモニアが生産されてアミ ノ酸合成の材料になる(Potrikus and Breznak 1980b, 1981; Thong-On et al. 2012; Waidele et al. 2019)。シロアリ自身の組織中には窒素リサイクルの最初の反応を触媒する酵素である尿酸 オキシダーゼ(urate oxidase, uricase)が見出されないことから、尿酸の分解は共生微生物に完 全に依存していると考えられてきた。さらに興味深いことに、シロアリは後腸内で生成した 窒素化合物を自身で利用することはできず、コロニー内個体間の栄養交換を行うことでは じめてアクセスが可能になる(Brune 2014)。ただし、これらの知見はいずれもワーカーのみ を用いた研究から得られたものである。一方で、その他のカーストの尿酸代謝に関する知見 はほとんど存在しないものの、王と女王が繁殖のために自身の体内で尿酸を利用できるこ とを仄めかす研究(Shellman-Reeve 1990; Elliott and Stay 2007)がある(本論文 2-1 を参照)。



図 1-4. シロアリの脂肪体における尿酸(uric acid)の蓄積。(a)シロアリの脂肪体組織は、脂肪 滴を伴う脂肪細胞(adipocyte)と尿酸顆粒を伴う尿酸細胞(urocyte)から構成される。写真は脂 肪体細胞を位相差顕微鏡で観察したもの。解剖した脂肪体をスライドガラス上に直接マウ ントし、4% paraformaldehyde(PFA)で固定した後にカバーガラスで押し潰しを行った(本論文 3-2 を参照)。(b)尿酸の構造式。尿酸は、分子量 168 の有機化合物である。



(a)

図 1-5. シロアリにおける尿酸を介した窒素リサイクル。(a)窒素リサイクルの既知経路と関 連する酵素。EC から始まる4組の数字は酵素番号(enzyme commission number)を表す。シロ アリ自身の組織中には尿酸オキシダーゼ(urate oxidase, uricase)が見出されないことから、尿 酸の分解は共生微生物に完全に依存していると考えられてきた。(b)シロアリ体内の窒素代 謝産物の動態。シロアリの脂肪体に蓄えられた尿酸はマルピーギ管を経由して後腸に輸送 され、後腸内の嫌気性細菌の働きでアンモニアが生産されてアミノ酸合成の材料になる。後 腸内で生成した窒素化合物は、栄養交換を介して次の個体に渡される。

1-5 本研究の目的

社会性昆虫には、王や女王として繁殖に専念する個体と、ワーカーや兵隊として繁殖以 外の労働に従事する個体が存在する。王と女王は巣内の繁殖を一手に担っており、資源は生 殖カーストへ集中的に分配される。繁殖に必要な資源を王と女王に集中させる機構の解明 は、社会性昆虫の分業システムを理解する上で鍵となる。本学位論文では、社会性昆虫シロ アリの分業システムを支える資源分配機構を、巣レベルのマクロな視点から現象を捉える 社会生理学的アプローチにより理解することを目的とする。本学位論文は、序論と総合考察 を含めた全6章から構成される。

第2章と第3章ではコロニー内個体間で受け渡される特定の物質の利用能力が王と女王 に限定されることで資源が繁殖を行う個体に集中するという仮説を立て、検証を試みた。繁 殖において重要な窒素化合物の代謝に着目することにより、窒素代謝産物である尿酸を介 した資源分配機構の存在を明らかにした。また、王と女王に特異的な尿酸の分解能力に基づ く巣レベルの代謝システムが、コロニーの免疫機能を維持する上でも重要であることが示 唆されるなど、分業を支える分子生理基盤に関する多くの新たな知見を得た。

本研究は、精力的な野外調査によってシロアリの王と女王を多数確保することで実施さ れた。第4章では広域分布種であるヤマトシロアリを対象に全国規模の調査を行う中で発 見した、巣レベルの繁殖システムにおける地理的変異について報告した。第5章では巣レベ ルの異物排除システムである非巣仲間への攻撃行動に着目して、シロアリの行動形質がコ ロニーの最も重要な構成要素である王と女王の在不在といった社会環境要因によって変化 することを実証した。

最後に、第6章では本研究の総合考察として、社会生理学的研究の今後の展望を示すと ともに、現象の分子生理学的基盤と生態学的背景の双方に着目する重要性を強調した。

第2章 王と女王に特異的な尿酸の分解と繁殖への寄与

2-1 はじめに

社会性昆虫を特徴づける傑出した性質のひとつに繁殖分業が挙げられる。巣内のごく一 部の個体が生殖カースト(王や女王)として繁殖を行う一方で、圧倒的多数の個体は非生殖カ ースト(ワーカーや兵隊)として繁殖以外の労働に従事する(Wilson 1971, 1975)。このような分 業システムの根底には、コロニー内の資源分配における偏りがある(Hunt and Nalepa 1994; Wheeler 1996)。実際にアリやハチ、シロアリなど多くの社会性昆虫において、栄養を生殖カ ーストに集中させることが知られている。例えば、セイヨウミツバチ(*Apis mellifera*)では、 幼虫期にタンパク質や糖質に富むローヤルゼリーを給餌される量によって生殖/非生殖カー ストへの分化が決定し、女王に分化した個体は生涯にわたりこの栄養豊富な餌を与えられ る(Laidlaw 1992)。ローヤルゼリーを主成分とする餌を大量に与えられた幼虫は成長が早く、 卵巣が発達して女王に分化する。一方、与えられなかった幼虫は体サイズが小さく、卵巣が 未発達なワーカーとなる。このような特定の個体への資源の集中がどのように制御されて いるかを研究することは、昆虫における分業システムを理解する上で非常に重要であるが、 その分子生理基盤については未解明な点が多い。本研究では、繁殖において重要な窒素化合 物に着目し、その利用能力が王と女王に限定されることで資源が繁殖を行う個体に集中す るという仮説を立て、検証を試みる。

この仮説を検証するのに適した材料が、木材を餌とするシロアリである。木材は炭素を 多く含む一方、窒素に乏しい(Matsumoto 1976; La Fage and Nutting 1978; Higashi et al. 1992)こ とから、シロアリでは不足しがちな窒素を獲得・節約するための様々な戦略が進化してきた。 例えば、土壌食、共生微生物による窒素固定、脱皮殻のリサイクルなどである(Hungate 1941; Benemann 1973; Breznak et al. 1973; Chouvenc 2020; Tong et al. 2021; Mullins et al. 2021)。この ようにして得られた貴重な窒素化合物は、その代謝産物である尿酸(uric acid)の形で脂肪体 (fat body)と呼ばれる組織に蓄積される(Potrikus and Breznak 1980a; Breznak 1982; Brune 2014)。 多くのゴキブリ種と同様、シロアリにおいても脂肪体組織に尿酸細胞(urocyte)と呼ばれる、 尿酸の貯蔵に特化した細胞が存在する(Cochran 1985; Costa-Leonardo et al. 2013; Nozaki et al. 2023)。シロアリの脂肪体に蓄えられた尿酸はマルピーギ管を経由して後腸に輸送され、後 腸内の嫌気性細菌の働きでアンモニアが生産されてアミノ酸合成の材料になるという効率 的な窒素リサイクルが行われている(Potrikus and Breznak 1980b, 1981; Thong-On et al. 2012; Waidele et al. 2019)。シロアリ自身の組織中には窒素リサイクルの最初の反応を触媒する酵 素である尿酸オキシダーゼ(urate oxidase, uricase)が見出されないことから、尿酸の分解は後 腸の共生微生物に完全に依存していると考えられてきた。さらに興味深いことに、シロアリ は後腸内で生成した窒素化合物を自身で利用することはできず、コロニー内個体間の栄養 交換を行うことではじめてアクセスが可能になる(Brune 2014)。ただし、これらの知見はい ずれもワーカーのみを用いた研究から得られたものである。一方で、その他のカーストの尿 酸代謝に関する知見はほとんど存在しないものの、王と女王が繁殖のために自身の体内で 尿酸を利用できることを仄めかす研究がある。ネバダオオシロアリ(Zootermopsis nevadensis) では、尿酸を添加した餌を与えることにより、創設後の王と女王が残す子の個体数が増加す ることが報告されている(Shellman-Reeve 1990)。Elliott and Stay(2007)は、性成熟に伴い腹部 が肥大した女王の脂肪体では、腹部の肥大前と比較して尿酸の蓄積が減少する点に着目し て、卵生産を行う女王において尿酸窒素が大量に消費されている可能性について議論して いる。シロアリの尿酸利用は、社会性昆虫における繁殖分業に即した巣内の資源分配を理解 するための理想的なモデルとなる可能性がある。

ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*,図 2-1)は、単為生殖による女王位継承(asexual queen succession: AQS)と呼ばれる独特な繁殖システム(本論文 1-3 を参照)ゆえ、カースト特 異的な適応の観点から最もよく研究されているシロアリ種のひとつである(Matsuura 2017)。 他のシロアリ種と同様、1 ペアの有翅虫が一夫一妻でコロニーを創設し、それぞれ創設王 (primary king: PK)および創設女王(primary queen: PQ)となる。創設女王は単為生殖によって自 身の遺伝子のみを受け継ぐ多数の二次女王(secondary queen: SQ)を生産するため、コロニー が生きている限り遺伝的に不死である(Matsuura et al. 2009)。一方で、創設王が死亡して二次 王(secondary king: SK)がコロニー内の繁殖を引き継ぐと近親交配が生じてコロニーは終焉を 迎えると推測されており、創設王は生き続ける必要がある。ヤマトシロアリでは、長寿や代 謝、繁殖に関わる多くのカースト特異的な遺伝子の発現が報告されてきた(Mitaka et al. 2016, 2020; Tasaki et al. 2018; Shigenobu et al. 2022)。これらを踏まえて、本種はシロアリにおいて カースト間の比較解析を行うための材料として適しているといえる。

本研究では、先行研究(Mitaka et al. 2016)で公開されたヤマトシロアリの全カースト(雌雄 のワーカー、兵隊、有翅虫、初期コロニーの王と女王、成熟コロニーの王と女王)のトラン スクリプトームデータを解析することにより、尿酸代謝に関わる酵素の遺伝子発現を調べ た。RNA-seq 解析により、成熟コロニーの王と女王のみで尿酸オキシダーゼ遺伝子(*RsUAOX*) が発現していることが明らかになったため、カースト・組織別の定量的 PCR(quantitative PCR: qPCR)により、シロアリ体内のどこで尿酸オキシダーゼ遺伝子が高発現しているのかを調べ た。次に、尿酸の分解と繁殖の関係を調べるために、ワーカーを王室から隔離して飼育し、 生殖カーストに分化した個体と分化しなかった個体で尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現量と 尿酸量を比較した。また、尿酸オキシダーゼ遺伝子を標的とした RNA 干渉(RNA interference: RNAi)と尿酸オキシダーゼ阻害剤の投与により、生殖カーストにおいて尿酸の分解を抑制し た際の繁殖への影響を観察した。最後に、尿酸がコロニー内でワーカーから生殖カーストに 供給されているかを調べた。



図 2-1. ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)のコロニー。本種は、カースト特異的な適応 の観点から最もよく研究されているシロアリ種のひとつである。王や女王として繁殖に専 念する個体(生殖カースト)と、ワーカーや兵隊として繁殖以外の労働に従事する個体(非生 殖カースト)が存在する。王と女王は巣内の繁殖を一手に担っており、資源は生殖カースト へ集中的に分配されると考えられている。図中のKは王(king)、Qは女王(queen)、Wはワー カー(worker)、Sは兵隊(soldier)を表す。巣内には単為生殖により生産された多数の女王がみ られる。黄色および白色はそれぞれ生殖カーストと非生殖カーストを示す。

2-2 材料と方法

サンプルと処理

実験に使用したヤマトシロアリのコロニーは、2017 年から 2021 年にかけて日本国内の 二次林で巣材ごと採集した。野外で創設女王は稀である(Matsuura et al. 2009)ため、本研究で は基本的に創設王と二次女王を成熟コロニーの王と女王として用いた。すべてのコロニー は、実験の開始まで餌として褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を与えられ、25℃全暗条件下 で管理された。qPCR 用のサンプルとして、シロアリの全身または分離した組織を-80℃で 一時保存した。各カーストの性は、先行研究(Hayashi et al. 2003)に従い、腹部末端の形態を もとに判別した。本研究では、特別な許可の取得は不要であった。また、実験動物の取り扱 いについては、京都大学における動物実験の実施に関する規程に従った。

はじめに、尿酸代謝に関わる酵素の遺伝子発現を調べるため、先行研究(Mitaka et al. 2016) で報告されたヤマトシロアリの全カースト(雌雄のワーカー、兵隊、有翅虫、初期コロニー の王と女王、成熟コロニーの王/女王)のトランスクリプトームデータを用いて解析を行った。 以下に各サンプルの詳細を記す。有翅虫は、群飛期(4 月から 5 月)に 3 つのコロニーから採 集されたものである。さらに、各コロニーから追加で 5 ペアの有翅虫が褐色腐朽材培地 (Mitaka et al. 2023)を詰めたシャーレ(直径 90 mm)にそれぞれ導入され、6 か月後に初期コロ ニーの王と女王として取り出された。ワーカー、兵隊、成熟コロニーの王と女王は、繁殖期 (7 月から 10 月)に 4 つのコロニーから採集されたものである。これらのトランスクリプト ームデータの解析により、成熟コロニーの王と女王のみで尿酸オキシダーゼ遺伝子 (*RsUAOX*)の発現が観察されたため、カースト・組織別 qPCR によってシロアリ体内のどこ で尿酸オキシダーゼ遺伝子が高発現しているのかを調べた。qPCR に用いたワーカー、兵隊、 成熟コロニーの王と女王は、繁殖期に6つのコロニーから採集した。

次に、尿酸の分解と繁殖の関係を調べるために、ワーカーを王と女王の不在下で飼育し、 生殖カーストに分化した個体と分化しなかった個体で尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現量と

尿酸量を比較した。4 つのコロニーからそれぞれ 200 個体のワーカーを、褐色腐朽材培地 (Mitaka et al. 2023)を詰めたシャーレ(直径 55 mm)に導入した。このような王室から隔離され た集団では、一部のワーカーがエルガトイド(ergatoid)と呼ばれる補充生殖虫に分化し、硬化 した表皮や幅広い胸部、伸長した腹部など形態の特徴からワーカーとの識別が可能である (Miyata et al. 2004; Sun et al. 2017)。3 か月後、雌雄のワーカーおよびワーカー由来の補充生 殖虫をそれぞれ 1 個体ずつ取り出し、尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現量(1 コロニーあたり 2 繰り返し)と体内の尿酸量(1 コロニーあたり 3 繰り返し)を調べた。

さらに、尿酸オキシダーゼ遺伝子を標的とした RNAi と尿酸オキシダーゼ阻害剤の投与 により、生殖カーストにおいて尿酸の分解を抑制した際の繁殖への影響を観察した。RNAi には、4つの成熟コロニーを用いた。尿酸オキシダーゼ遺伝子を標的とした小干渉 RNA(small interfering RNA: siRNA)溶液を、各コロニー1 個体の女王にインジェクションした。コントロ ールとして、改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子(enhanced green fluorescent protein: EGFP)を標 的とした siRNA 溶液を各コロニー1 個体の女王にインジェクションした。処理後の女王と 100 個体のワーカーを、褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を詰めたシャーレ(直径 40mm)に 導入した。7 日後、再び各インジェクション処理を行った。さらに7日後、産卵数をカウン トするとともに、qPCR によりノックダウンの効果を確認した。追加で、siRNA 溶液のイン ジェクション 24 時間後の女王を用いて qPCR により標的遺伝子の発現量を調べ、より短期 的な RNAi の効果についても確認した(1 コロニーあたり 2 繰り返し)。尿酸オキシダーゼ阻 害剤の投与には、5つの成熟コロニーを用いた。尿酸オキシダーゼ阻害剤を各コロニー1個 体の女王にインジェクションした。コントロールとして、蒸留水(DW)を各コロニー1 個体 の女王にインジェクションした。処理後の女王と 100 個体のワーカーを、褐色腐朽材培地 (Mitaka et al. 2023)を詰めたシャーレ(直径 40 mm)に導入した。7 日後、産卵数をカウントし た。

最後に、尿酸が非生殖カーストから生殖カーストに供給されているかを調べるため、ワ

ーカーからの給餌物で構成される女王の中腸内容物を分析した。成熟コロニーの王と女王 は、摂食を完全にワーカーによる給餌に依存している(Du et al. 2017)。脂肪体で合成された 尿酸が中腸に逆流することはない(Brune 2014)ため、女王の中腸内容物から尿酸が検出され れば、ワーカーから受け取ったものであると考えられる。5 つの成熟コロニーからそれぞれ 女王5個体とワーカー5個体を無作為に取り出し、中腸内容物の尿酸量を測定した。中腸は、 先端の細いピンセットで腹部末端2節を引っ張ることで摘出した。その後、同じピンセット を用いて中腸組織から内容物を搾り出した。さらに、王と女王の存在がワーカー体内の尿酸 量に与える影響についても調べた。王と女王を含む集団、王のみを含む集団、女王のみを含 む集団、王を含まない集団の間で尿酸量を比較した。王と女王の集団は、王1個体、女王1 個体、ワーカー500 個体から構成された。王のみを含む集団は、王1個体、女王1 個体、ワーカー500 個体から構成された。そのみを含む集団は、王1個体、女王1 (Mitaka et al. 2023)を詰めたスチロールケース(100×100×29 mm)に導入した。3 か月後、雌 雄5個体のワーカーを無作為に取り出し、体内の尿酸量を測定した。

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

先行研究(Mitaka et al. 2016)で公開されたヤマトシロアリの全カースト(雌雄のワーカー、 兵隊、有翅虫、初期コロニーの王と女王、成熟コロニーの王と女王)のトランスクリプトー ムデータを用いて解析を行った。データは日本 DNA データバンク(DNA Data Bank of Japan: DDBJ)に登録されている(BioProject PRJDB3531, BioSample SAMD00026264-SAMD00026323, Sequence Read Archive DRR030795-DRR030854)。これらのシーケンシングは沖縄科学技術大 学院大学(Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University: OIST)の HiSeq 2000(Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて行われた。シーケンシングに関する詳細は、先 行研究(Mitaka et al. 2016)に記載されている。生データはクラウドコンピューティングを基 盤とした塩基配列解析ツール DDBJ Read Annotation Pipeline を用いてトリミングを行い、ク オリティスコアが 20 未満の塩基を各リードの 5'末端および 3'末端から除去した。残ったリ ードは Trinity v2.5.0(Grabherr et al. 2011)を用いて de Bruijn graph algorithm により *de novo* ア センブリされた。ヤマトシロアリにおける尿酸の代謝に関与する酵素遺伝子の配列は、アメ リカ国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information: NCBI)に登録さ れている複数のシロアリ種(*Z. nevadensis, Cryptotermes secundus*)の配列をクエリとして、先行 研究(Mitaka et al. 2016)のトランスクリプトームデータに対して BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)によるアミノ酸配列の相同性検索を行うことで入手した(e-value のカットオフ値 は 1E-60)。各遺伝子の発現量は RSEM v1.2.8(Li and Dewey 2011)を用いて推定された。生成 されたカウントデータを TMM(Trimmed mean of M-value)正規化法(Robinson et al. 2010) を用いて遺伝子発現解析を行った。カーストおよび性の効果について、FDR(false discovery rate) < 0.05 を有意水準として発現変動遺伝子(differentially expressed gene: DEG)を抽出した。 また、カースト特異的な発現がみられた尿酸オキシダーゼ遺伝子については分子系統解析 を行った(章末の補足資料を参照)。

qPCR による遺伝子発現の定量

尿酸オキシダーゼ遺伝子のプライマーは、Primer3Plus(https://primer3plus.com/cgibin/dev/primer3plus.cgi)を用いて設計した。コントロールとしては、先行研究(Hojo et al. 2011; Tasaki et al. 2020)においてヤマトシロアリを対象に用いられている 5 種類のハウスキーピン グ 遺 伝 子 [*RsG6PD*(*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*, accession number: FX983730), *RsGAPDH*(*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, accession number: FX983172), *RsACT*(*beta-actin*, accession number: FX983744), *RsND5*(*NADH dehydrogenase subunit 5*), *RsEF1a*(*elongation factor-1 alpha*)]を用いた。qPCR に用いた各プライマーの配列は補足資料 (表 2-S2)に示す。最適なハウスキーピング遺伝子の選択には、NormFindeR(Andersen et al. 2004)を用いた。上述の方法で準備したシロアリの全身または組織(脂肪体、精巣/卵巣、その他の組織)のサンプルについて、RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いてトータル RNA を個々に抽出した。ワーカーと兵隊の組織サンプルについては、3 個体をプールして 十分な量の RNA を確保した。PrimeScriptTM RT reagent kit(Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて 抽出した RNA から直ちに cDNA を合成し、-20°Cで保存して qPCR に用いた。qPCR には Applied Biosystems[®] StepOneTM system with Power SYBRTM Green PCR master mix(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いた。すべての手法は、製造元のプロトコルに従った。 2^(-ΔΔC_T)法(Livak and Schmittgen 2001)を用いて、遺伝子の相対発現量を求めた。

尿酸量の測定

尿酸量の測定は Uric Acid Assay Kit(Abcam, Cambridge, UK)を用いて行った。各サンプル を 0.6 mL チューブに入れ、Uric Acid Assay Buffer を 100 µL 加えて粉砕した。4°C、15000 rpm で 2 分間遠心後、上清を回収して 10 倍希釈した。上清サンプル 50 µL に Fluorometric Reaction Mix 50 µL(Uric Acid Assay Buffer 47.6 µL、Uric Acid Probe 0.4 µL、Uric Acid Enzyme Mix 2 µL を混合したもの)を加えて 37°Cの暗所で 30 分間反応させた後、Fluoroskan Ascent FL(Thermo Fisher Scientific)を用いて蛍光強度を測定した(Ex/Em = 530/590 nm)。また、Uric Acid Standard 溶液を段階希釈(0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 nmol/well)して蛍光強度を測定し、検量線を作成して 尿酸量を求めた。さらに、体サイズの差を考慮して、尿酸量は生重量で割って補正した。

尿酸分解の阻害

RNAi は、インジェクションにより siRNA 溶液を投与する方法を採用した。siRNA は siDirect(v2.0; http://sidirect2.rnai.jp/)を用いて設計した。尿酸オキシダーゼ遺伝子を標的とす る 2 種類の siRNA を各 100 μM 混合した。コントロール遺伝子としては、同様に昆虫を対象 とした先行研究(Ando and Fujiwara 2013; Takahashi et al. 2021)に従い、改変型緑色蛍光タンパ ク質遺伝子を用いた。siRNA は FASMAC(Kanagawa, Japan)から購入した。RNAi に用いた各 siRNA の配列は補足資料(表 2-S3)に示す。ガラスキャピラリー(Narishige, Tokyo, Japan)を取 り付けた FemtoJet® 4i マイクロインジェクター(Eppendorf, Hamburg, Germany)を用いて女 王の胸部腹側に 100 µM の siRNA 溶液 1 µL をインジェクションした。尿酸オキシダーゼ阻 害剤の投与についても同様に、インジェクションによる方法を採用した。本研究では、ラッ ト(*Rattus norvegicus*)を用いた研究(Johnson et al. 1969)の方法を参考に、尿酸オキシダーゼの 強力な *in vivo* 阻害剤であるオキソン酸カリウム(potassium oxonate)を使用した。両面テープ を用いてシロアリを固定し、ガラスキャピラリー(Narishige)を装着した FemtoJet® 4i マイク ロインジェクター(Eppendorf)を用いて女王の胸部腹側に 1 µL の 10 mM オキソン酸カリウム 溶液をインジェクションした。コントロールとしては、同量の DW を用いた。

統計解析

すべての統計解析は R v4.0.5(R Core Team 2021)を用いて行った。相対的な遺伝子発現量 と尿酸量は正規分布を仮定した一般化線形モデル(generalized linear model: GLM)と一般化線 形混合モデル(generalized linear mixed model: GLMM)、産卵数はポアソン分布を仮定した GLM を用いて解析した。GLM では、処理区を固定効果とした。GLMM では、処理区を固 定効果、コロニーをランダム効果とした。モデルに対する各固定効果の寄与を調べるために 尤度比検定(likelihood ratio test)を実施した。効果が有意であった場合、各群間の差異を検出 するために、multcomp パッケージ(Hothorn et al. 2008)の glht 関数を用いて Tukey's HSD 検定 による多重比較を実施した。図中のエラーバーは標準誤差(standard error: SE)を示している。 アスタリスクは、群間に有意差があったことを表している(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。

2-3 結果

尿酸代謝に関わる酵素遺伝子のトランスクリプトーム解析

ヤマトシロアリの全カーストのトランスクリプトームデータを用いて、尿酸代謝に関わ る 3 つの酵素遺伝子[キサンチンデヒドロゲナーゼ遺伝子(*RsXDH*, accession number: ICSS01000001)、尿酸オキシダーゼ遺伝子(*RsUAOX*, accession number: ICSS01000002)、アラン トイナーゼ遺伝子(*RsALN*, accession number: ICSS01000003); 図 2-2]を同定した。注目すべき ことに、尿酸の酸化を触媒する尿酸オキシダーゼの遺伝子が、成熟コロニーの王と女王のみ で発現していた(caste: FDR < 0.001, sex: FDR = 1.000, caste × sex: FDR = 1.000; 図 2-2b)。キサ ンチンデヒドロゲナーゼ遺伝子(caste: FDR = 1.000、sex: FDR = 1.000, caste × sex: FDR = 1.000; 図 2-2b)およびアラントイナーゼ遺伝子(caste: FDR = 0.557, sex: FDR = 1.000, caste × sex: FDR = 1.000; コ 2-2b)の発現量に関してはカースト・性間で有意差はなかった。アラントイカー ゼ遺伝子とウレアーゼ遺伝子は、いずれのカーストにおいても検出されなかった。

尿酸オキシダーゼ遺伝子のカースト・組織別 qPCR

成熟コロニーの王と女王の脂肪体のみで、尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現がみられた。 尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現量に対するカースト(ワーカー、兵隊、生殖カースト)と組織 (脂肪体、精巣/卵巣、その他の組織)の組み合わせの効果は有意であった(カーストと組織の 交互作用項を含む; likelihood ratio test, male: df = 6、 χ^2 = 80.75, p < 0.001; female: df = 6, χ^2 = 41.04, p < 0.001, 図 2-3)。生殖カーストの脂肪体における尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現量 は、ワーカーの脂肪体(Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 2-3)、ワーカー のその他の組織(Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 2-3)、兵隊の脂肪体 (Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 2-3)、兵隊の脂肪体 (Tukey's HSD test, male: p < 0.001, 図 2-3)、兵隊の毛動化の組織(Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 2-3)、兵隊の危動船(Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 2-3)、兵隊のその他の組織(Tukey's られた。雄ワーカーの脂肪体に対する相対的な発現量を図に示す。

分化実験

興味深いことに、ワーカーから補充生殖虫に分化した個体では尿酸オキシダーゼ遺伝子 の発現が確認された。ワーカー由来の王/女王における尿酸オキシダーゼ遺伝子の発現量は、 ワーカーと比較して有意に高かった(likelihood ratio test, male: df = 1, χ^2 = 7.03, p = 0.0149; female: df = 1, χ^2 = 28.15, p < 0.001, 図 2-4a)。雄ワーカーに対する相対的な発現量を図に示 す。また、ワーカー由来の王/女王における体内の尿酸量は、ワーカーと比較して有意に低 値であった(likelihood ratio test, male: df = 1, χ^2 = 6.62, p = 0.0145; female: df = 1, χ^2 = 52.59, p < 0.001, 図 2-4b)。雌雄ともに同様の傾向がみられた。

尿酸分解の阻害

尿酸オキシダーゼ遺伝子(標的遺伝子)および改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子(対照遺伝 子)を対象とした siRNA 溶液をインジェクションした場合の繁殖への影響を調べた。尿酸オ キシダーゼ遺伝子のノックダウンにより、女王あたりの産卵数は有意に減少したが (likelihood ratio test, df = 1, χ^2 = 10.90, p < 0.001, 図 2-5a)、2 度目のインジェクションから7 日 後の標的遺伝子の発現量に関しては処理区間で有意差はなかった(likelihood ratio test, df = 1, $\chi^2 = 0.51$, p = 0.475)。このため、siRNA 溶液のインジェクション 24 時間後の女王を用いて qPCR により標的遺伝子の発現量を調べ、RNAi のより短期的な効果についても確認した。 実験区(*RsUAOX*)におけるインジェクション 24 時間後の標的遺伝子の発現量は、対照区 (*EGFP*)と比較して有意に低かった(likelihood ratio test, df = 1, $\chi^2 = 5.16$, p = 0.0317, 図 2-5b)。 また、女王の初期体重に処理区間で有意差がないことを確認した(likelihood ratio test, longterm: df = 1, $\chi^2 = 0.023$, p = 0.880; short-term: df = 1, $\chi^2 = 0.017$, p = 0.892)。対照区に対する相対 的な発現量を図に示す。さらに、オキソン酸カリウム(尿酸オキシダーゼ阻害剤)および DW(コントロール)をインジェクションした場合の繁殖への影響を調べた。尿酸オキシダー ゼ阻害剤の投与により、女王あたりの産卵数が有意に減少した(likelihood ratio test, df = 1, χ^2 = 27.93, p < 0.001, 図 2-5c)。また、女王の初期体重に処理区間で有意差がないことを確認した(likelihood ratio test, df = 1, χ^2 = 0.13, p = 0.718)。上述の実験中に死亡した個体はいなかった。

コロニー内における尿酸のやりとり

女王の中腸(図 2-6a, ワーカーからの給餌物が貯留している)の内容物、およびワーカーの 中腸の内容物から尿酸が検出された。女王の中腸内容物における尿酸量は、ワーカーの中腸 内容物よりも有意に高値であった(likelihood ratio test, df = 1、 χ^2 = 23.38, p < 0.001, 図 2-6b)。 さらに、王や女王の不在下ではワーカー体内における尿酸の蓄積が促進されることがわか った。尿酸量に対する王と女王の有無(王と女王を含む集団、王のみ含む集団、女王のみ含 む集団、王と女王を含まない集団)の効果は有意であった(likelihood ratio test, male: df = 3, χ^2 = 46.65, p < 0.001; female: df = 3, χ^2 = 53.01, p < 0.001, 図 2-6c)。王と女王を含む集団における ワーカーの尿酸量は、王のみを含む集団(Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 2-6c)お よび王を含まない集団(Tukey's HSD test, male: p < 0.001, 図 2-6c)と比較し て有意に低値であった。雌雄ともに同様の傾向がみられた。



図 2-2. ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)全カーストの RNA-seq データを用いた尿酸の 代謝に関わる酵素遺伝子のトランスクリプトーム解析。(*a*)シロアリにおける窒素リサイク ルの既知経路と関連する酵素。これまで、シロアリは組織中に尿酸オキシダーゼを持たず、 体内の尿酸分解は後腸内の共生微生物に完全に依存していると考えられていた。(*b*)検出さ れた各酵素遺伝子の発現パターン。アラントイカーゼ遺伝子およびウレアーゼ遺伝子はい ずれのカーストにおいても検出されなかった。図中の young king/queen は初期コロニーの王 /女王、mature king/queen は成熟コロニーの王/女王を表す。青色と赤色はそれぞれ雄と雌を 示す。CPM(counts per million)の平均値をカースト・性間で比較した。エラーバーは標準誤差 を表す。統計解析の結果は各グラフの左上に記した(*FDR < 0.05, **FDR < 0.01, ***FDR < 0.001; n.s., not significant)。



図 2-3. qPCR による尿酸オキシダーゼ遺伝子(*RsUAOX*)発現量のカースト・組織間比較。遺 伝子発現量は雄ワーカーの脂肪体を 1 としたときの相対値を示す。図中の king/queen はそ れぞれ成熟コロニーの王/女王を表す。FB は脂肪体(fat body)、Tes/Ova は精巣/卵巣 (testis/ovary)、Oth はその他の組織(the others)を示す。エラーバーは標準誤差を表す。異なる 文字は群間に有意差があったことを示している(Tukey's HSD tests, p < 0.05)。



図 2-4. 分化実験によるワーカーとワーカー由来の王/女王の比較。ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*)のワーカーは生殖カーストの不在下で補充生殖虫に分化する能力を 有する。(*a*)qPCR による尿酸オキシダーゼ遺伝子(*RsUAOX*)発現量の比較。遺伝子発現量は 雄ワーカーを 1 としたときの相対値を示す。(*b*)体内の尿酸量の比較。図中のエラーバーは 標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差があったことを示している(likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。



図 2-5. 尿酸分解の阻害がシロアリの繁殖に与える影響。RNAi による尿酸オキシダーゼ遺 伝子(*RsUAOX*)のノックダウンと尿酸オキシダーゼ阻害剤の投与を行った。(*a*)尿酸オキシダ ーゼ遺伝子の RNAi が女王の産卵数に与える影響。コントロールとしては、改変型緑色蛍光 タンパク質遺伝子(*EGFP*)の RNAi を行った。(*b*)尿酸オキシダーゼ遺伝子の RNAi が標的遺 伝子の発現量に与える影響。遺伝子発現量は *EGFP* を 1 としたときの相対値を示す。(*c*)尿 酸オキシダーゼ阻害剤の投与が女王の産卵数に与える影響。尿酸オキシダーゼ阻害剤とし ては、オキソン酸カリウム(potassium oxonate: PO)を使用した。コントロールとしては、同量 の蒸留水(distilled water: DW)を投与した。図中のエラーバーは標準誤差を表す。アスタリス クは群間に有意差があったことを示している(likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p< 0.001; n.s., not significant)。



図 2-6. 王と女王の存在が尿酸のやりとりに与える影響。(a)女王の中腸(白矢印)。内部はワ ーカーからの給餌物で満たされている。(b)中腸内容物に含まれる尿酸量をワーカー(非生殖 カースト)と女王(生殖カースト)で比較。アスタリスクは群間に有意差があったことを示し ている(likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。(c)ワーカ ー体内の尿酸量を王と女王を含む集団、王のみ含む集団、女王のみ含む集団、生殖カースト を含まない集団で比較。異なる文字は群間に有意差があったことを示している(Tukey's HSD tests, p < 0.05)。図中のエラーバーは標準誤差を表す。

2-4 考察

シロアリにおいて、窒素代謝産物である尿酸を分解する尿酸オキシダーゼの遺伝子が、 成熟コロニーの王と女王のみで発現していることが明らかになった。本研究は、シロアリの 組織中に尿酸オキシダーゼが存在することを実証した初めての報告である。これまで、シロ アリ自身はこの酵素を持たず、土壌食や窒素固定、共食いなどの様々な戦略によって獲得し た窒素化合物に由来する尿酸の分解は、後腸内の共生微生物に完全に依存していると考え られていた。また、尿酸オキシダーゼによる尿酸の分解がシロアリの繁殖に寄与することも 明らかになった。尿酸オキシダーゼ遺伝子を標的とした RNAi、および尿酸オキシダーゼ阻 害剤の投与により尿酸の分解を抑制された女王では産卵数の減少が確認された。RNAi によ る遺伝子のノックダウンの効果が一時的なものであったにもかかわらず、シロアリにおい て産卵という表現型に明確な影響を与えたことは注目に値する。 実際に、 他の昆虫種では代 謝に関わる単一遺伝子のサイレンシングが繁殖能力に影響を与えるという報告がある (Fraga et al. 2013; McMillan et al. 2018; Cheng et al. 2020)。さらに、尿酸はワーカーから生殖カ ーストに栄養交換を介して供給されることが明らかになった。これらの結果は、コロニー内 個体間で受け渡される特定の物質の利用能力が王と女王に限定されることで資源が繁殖を 行う個体に集中するという仮説を強く支持する。生殖カーストの尿酸代謝に関する知見は ほとんどなかったが、一部の先行研究(Shellman-Reeve 1990; Elliott and Stay 2007)は王と女王 が繁殖のために自身の体内で尿酸を利用できることを示唆していた。

昆虫における貯蔵尿酸の利用は、しばしば共生微生物との代謝経路の共有という観点から議論されてきた。例えば、トビイロウンカ(*Nilaparvata lugens*)は、体内の菌細胞に共生する酵母様の微生物が持つ酵素を利用して窒素リサイクルが行うことがわかっている(Hongoh and Ishikawa 1997)。同様の関係はベニツチカメムシ(*Parastrachia japonensis*)とその中腸内に局在する*Erwinia* 様細菌にもみられる(Kashima et al. 2006)。ゴキブリは脂肪体内部に*Blattabacterium* と呼ばれる細胞内共生菌を有し、尿酸分解系に関与している(Sabree et al.

2009; Patiňo-Navarrete et al. 2014)。シロアリはゴキブリの近緑種であるが、原始的なシロア リ種である Mastotermes darwiniensis を除く全ての種で Blattabacterium が失われている(Costa-Leonardo et al. 2013)。代わりにシロアリでは、後腸内に存在する嫌気性細菌が持つ酵素によ り尿酸窒素がアミノ酸合成の材料として利用可能な形態(すなわちアンモニア)に変換され ると考えられている(Potrikus and Breznak 1980b, 1981; Thong-On et al. 2012; Waidele et al. 2019)。 本研究では、尿酸オキシダーゼの遺伝子が王と女王のみで発現していることを示した一方 で、アンモニアを合成する下流の酵素(アラントイカーゼとウレアーゼ)の遺伝子はいずれの カーストにおいても検出されなかった。したがって、シロアリの王と女王における尿酸の分 解が繁殖に寄与するメカニズムは、ワーカーにおける既知の窒素リサイクル経路とは異な る可能性がある。今後、安定同位体標識された尿酸を用いたトレーサー実験などにより、尿 酸の栄養学的価値を検証するとともに、貯蔵された尿酸から繁殖アウトブットまでの代謝 経路を直接的に調べる必要がある。また、本研究で用いたヤマトシロアリでは、ワーカーと 兵隊が後腸内に様々な原生動物を持つのに対し、王と女王は腸内原生動物を持たない (Inagaki and Matsuura 2016)。このような共生微生物のカースト非対称性も、王と女王に特異 的な尿酸の分解と関係があるかもしれない。

シロアリの王や女王は、なぜワーカーから有用な代謝産物を直接受け取らずに脂肪体内 で尿酸を自ら分解するのだろうか。例えば、尿酸がその化学的性質ゆえ、やりとりにおいて 最適な形態である可能性がある(尿酸は水への溶解度が低いため、栄養交換の際に個体から の水分損失を抑えることができるなど)。また、尿酸は窒素源として利用されるのではなく、 シロアリの王や女王にとって別の重要な機能を持つ可能性もある。そのため、シロアリにお ける尿酸およびその代謝産物の機能を調べることが重要である。シロアリにおいて尿酸は、 DNA やタンパク質、脂質などの生体分子に損傷を与える活性酸素(reactive oxygen species: ROS)を消去する抗酸化物質であることが実証されている(Tasaki et al. 2017)。また、尿酸は尿 酸オキシダーゼによって酸化され、アラントインと過酸化水素(H2O2)、二酸化炭素(CO2)を
生成する。このアラントインは、動物や植物において細胞増殖や創傷治癒の促進、ストレス 耐性の向上に関与することが知られている(Shestopalov et al. 2006; Kaur et al. 2021)。 Shestopalov et al.(2006)によると、ヒト(*Homo sapiens*)では妊娠 7-8 週目に胎盤でアラントイ ン量が増加するが、この期間は栄養膜細胞の子宮内膜への侵入が開始するため、活発な細胞 増殖を伴う。著者らはこれらの現象においてアラントインが重要な役割を果たす可能性に ついて議論している。シロアリの王と女王の持続的な高い繁殖能力(Tasaki et al. 2021)にも、 アラントインの機能が関与しているかもしれない。また、有翅虫と初期コロニーの王/女王、 成熟コロニーの王/女王で尿酸の代謝に関連する遺伝子の発現が異なることは、王と女王の 一生において窒素代謝の様式が変化することを示唆する。これは、コロニーを創設した王と 女王は最初の子に窒素源を供給する必要があるが、ワーカーが出現してコロニーが安定す ると巣内の窒素フローが変化するという先行研究の観察(Mullins and Su 2018; Chouvenc 2019, 2022)とも一致する。

コロニー内での尿酸のやりとりにおいて、王と女王の存在が重要な役割を担っている。 尿酸の受け取り手である王や女王をコロニーから除去すると、ワーカーの体内で尿酸量が 増加することが確認された。興味深いことに、両方の生殖カーストを失った場合と片方の生 殖カーストを失った場合の影響に有意な差はみられなかった。ワーカーが体内に蓄積でき る尿酸量には上限があるのかもしれない。このようなシロアリの繁殖における尿酸分解の 重要性を考慮すると、分化能を有するワーカーが補充生殖虫への分化前に繁殖のための資 源を獲得できることは理にかなっている。本研究の結果は、飼育下で数か月間維持されたシ ロアリのワーカーが脂肪体内に尿酸を徐々に蓄積することを報告した先行研究(Potrikus and Breznak 1980a; Lovelock et al. 1985; Chappell and Slaytor 1993)にも矛盾しない。シロアリでは コロニー内の特定のカースト、特に王と女王がいない状況下では様々な生理的・行動的な変 化が生じる(Korb et al. 2009; Ishikawa and Miura 2012; Penick et al. 2013; Konishi and Matsuura 2021)。本研究は、シロアリを用いた生態学的研究を行う際に、社会的な文脈を考慮するこ とが重要であることを実証するものである。

結論として、シロアリにおいて成熟コロニーの王と女王に特異的な尿酸の分解が繁殖に 寄与する。これは、繁殖において重要な窒素化合物の利用能力における非対称性が、王と女 王による繁殖の独占という形で現れるコロニーの統合性を少なくとも部分的に維持してい ることを示唆している。本研究は、社会性昆虫における繁殖分業の本質を資源の利用という 観点から解明した。さらに、植食性の生物にとって、限られた窒素源を獲得・保存する戦略 は生態学的な成功の鍵を握っている。今回の発見は、生物における窒素利用様式の進化につ いても新たな知見を提供するものである。

2-5 補足資料

尿酸オキシダーゼ(ウリカーゼ)遺伝子の分子系統解析

ヤマトシロアリの尿酸オキシダーゼ遺伝子(*RsUAOX*)の系統関係を確認するために、 MUSCLEを用いてアミノ酸配列のアラインメントを行い、trimAl v1.2rev59(Capella-Gutiérrez et al. 2009)を用いてトリミングを行い、MEGA X(Kumar et al. 2018)を用いて分子系統解析を 行った(図 2-S1)。系統樹は、ベイズ情報量規準を考慮する Le_Gascuel_2008 model(Le and Gascuel 2008)に基づく最尤法により作成した。シロアリ種(*Reticulitermes speratus* および *Cryptotermes secundus*)および他の昆虫種(ゴキブリ目、カメムシ目、ハチ目、コウチュウ目、 チョウ目およびハエ目)から 42 種の尿酸オキシダーゼ遺伝子ホモログのアミノ酸配列を入 手して解析に使用した。さらに、InterProScan(https://www.ebi.ac.uk/interpro/)を用いて、アミ ノ酸配列からタンパク質ファミリーとドメインの推定も行った(表 2-S1)。



図 2-S1. 尿酸オキシダーゼ(ウリカーゼ)遺伝子のアミノ酸配列の分子系統樹。 Le_Gascuel_2008 model に基づく最尤法により系統樹を作成した。系統樹は対数尤度が最大 (-6564.33)になるものを採用した。発見的探索のためのガイドツリーは、JTT model により推 定された距離行列に Neighbor-Joining and BioNJ algorithm を適用し、対数尤度がより高い樹 形を選択することで得られた。また、配列の部位間の進化速度の違いをモデル化するために 離散ガンマ分布を用いた[5 categories (+G, parameter = 0.5936)]。系統樹は縮尺に合わせて描 かれ、枝の長さはサイトあたりの置換数で計測された。最終的なデータには合計 258 の座位 があった。これらの分子系統解析には MEGA X を用いた。枝分かれ部分の数字はブートス トラップ値を示す。

表 2-S1. アミノ酸配列から推定されたタンパク質ファミリーとドメイン

Gene name	AC (sequence)	Туре	Name	GO IDs	Library
RsUAOX	IPR002042 (18–326)	Domain	Uricase	-	TIGR03383 (TIGRFAMs)
					PF01014 (PFAM)
					PIRSF000241 (PIRSF)
					PR00093 (PRINTS)
					PTHR42874 (PANTHER)
	IPR019842 (176–203)	Domain	Uricase, conserved site	GO:0006144	DS00266 (DDOSITE DATTEDNS)
				GO:0004846	r 500300 (r KOSITE_PATTEKNS)
	no IPR (32–161, 167–319)	Homologous superfamily	Tetrahydrobiopterin biosynthesis enzymes-like	-	SSF55620 (SUPERFAMILY)
	no IPR (18–324)	Homologous superfamily	Urate Oxidase	-	G3DSA:3.10.270.10 (CATH-Gene3D)
	no IPR (1–25)	-	Disorder_prediction	-	mobidb-lite (MOBIDB_LITE)

Target gene	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	
DellAOV	Forward; CGTGGTTGAGGCGTCTGTT	92	
KSUAUA	Reverse; GAGAGAAGATGAAGGCGTGGTT		
$D_{\pi}ND5$	Forward; GCTGGGGGGGGTTATTCATTCCAT	125	
KSINDO	Reverse; GGCATACCACAAAGGGCAAAA	125	
DeFFIe	Forward; GGTGATGCGGCTATTGTTAACC	73	
KSEF 10.	Reverse; GTGGTGGGAATTCTGAGAAAGATT		
D-CADD	Forward; GCACTTTGTTCGTTCTGATGAGTT	144	
KSGOFD	Reverse; TCACTACACACTTCATCTGCCTTCT	144	
D-CADDU	Forward; CCATAGAAAAGGCTTCTGCACATT		
RSGAPDH	Reverse; AACAACAAACATTGGGGCATC	GGCATC	
Dr. 1CT	Forward; AAATCGTGCGTGACATCAAA	168	
KSACI	Reverse; GGAACAGAGCCTCAGGACAG		

Target gene	Sequence (5'-3')	
DellACV (arging 1)	Sense; CGACAAUAAGGACAUCAUUGC	
RSUAOA (region 1)	Antisense; AAUGAUGUCCUUAUUGUCGCC	
Dell4OV (region 2)	Sense; CAUAACCACGCCUCAUCUUC	
RSUAOA (region 2)	Antisense; AGAUGAAGGCUGGUUAUGAU	
ECED	Sense; GCAUCAAGGUGAACUCAAGA	
LGFP	Antisense; UUGAAGUUCACCUGAUGCCG	

第3章 王の代替りに伴うワーカーの尿酸蓄積と感染症リスクの増加

3-1 はじめに

多数の個体が機能的に統合された生物の社会集団は、時にあたかもひとつの個体のよう に振る舞い、超個体(superorganism)と形容される(Wheeler 1911; Hölldobler and Wilson 2009; Boomsma and Gawne 2018)。これは多数の細胞が機能的に統合された多細胞生物の個体との アナロジーである。超個体の典型例としては、アリやハチ、シロアリなどの社会性昆虫に見 いだされるような、主に血縁者から構成されるコロニーを挙げることができる。社会性昆虫 は、生態系におけるバイオマスの大きさから、地球上で最も繁栄している生物の一群といわ れてきた(Korb 2008; Bar-On et al. 2018)。その生態学的な成功は、コロニー内の分業によるも のと考えられている。社会性昆虫には、王や女王として繁殖に専念する個体(生殖カースト) と、ワーカーや兵隊として繁殖以外の労働に従事する個体(非生殖カースト)が存在する (Wilson 1971, 1975)。社会性昆虫の生殖カーストは極めて高い繁殖能力を有する。例えば、 シロアリの一種 Macrotermes subhvalinus では、女王が1日に約4万個の卵を産むと推定され ており、これは生重量にして体重の 1/3 に相当する(Wyss-Huber and Lüscher 1975)。しかしな がら、超個体としての社会性昆虫のコロニーは、(一部の種では生殖カーストも含め)個体が 置換されていくにもかかわらず、永続するシステムではない。 社会性昆虫のコロニーが終焉 を迎える至近要因を研究することは、生物における社会システムの維持機構を理解する上 で非常に重要であるが、未解明な点が多い。

社会性昆虫におけるコロニーの終焉を扱うのに最適な材料として、日本で最も普通にみ られるヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)が挙げられる。ヤマトシロアリは、単為生殖に よる女王位継承(asexual queen succession: AQS)と呼ばれるユニークな繁殖システム(本論文 1-3 を参照)が発見されたことも相まって、最もよく研究されているシロアリ種のひとつであ る(Matsuura 2017)。他のシロアリ種と同様、1ペアの有翅虫が一夫一妻でコロニーを創設し、 それぞれ創設王(primary king: PK)および創設女王(primary queen: PQ)となる。創設女王は単為 生殖によって自身の遺伝子のみを受け継ぐ多数の二次女王(secondary queen: SQ)を生産する ため、コロニーが生きている限り遺伝的に不死である(Matsuura et al. 2009)。一方で、創設王 が死亡すると、創設王と創設女王の遺伝子を持つ二次王(secondary king: SK)がコロニー内の 繁殖を引き継ぐものの、不可避的に近親交配が生じる弊害によりコロニーはまもなく終焉 を迎えると推測されている(図 3-1a)。実際に、野外で二次王が繁殖を担うコロニーはきわめ て少ない(Matsuura et al. 2018)が、王の代替りが巣の終焉を引き起こす至近要因は解明されて いない。これらの知見は、ヤマトシロアリにおける王の代替りに関する研究が、社会性昆虫 のコロニーが終焉を迎えるメカニズムを理解するための理想的なモデルとなることを示唆 する。

本研究では、コロニーの終焉を引き起こすと推測されている王の代替りの前後で個体の 生理学的形質を比較した。その結果、王の代替りに伴ってワーカーの脂肪体において窒素代 謝産物である尿酸の蓄積が起こることが明らかになったため、尿酸がシロアリに与える負 の影響について調べた。尿酸は、生物一般に生体内の活性酸素種(reactive oxygen species: ROS) を消去する強力な抗酸化物質としての生理機能を持つことが知られている(Becker et al. 1991)。ROS は生体内の好気性代謝の副産物として生じる、酸素分子に由来する反応性の高 い物質(スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素など)の総称で あり、過剰になると DNA やタンバク質、脂質などの生体分子に損傷を与える。一方で、ROS は生物の免疫系において重要な役割を担っている(Dröge 2002; Apel and Hirt 2004; Dowling and Simmons 2009)。これらを踏まえ、シロアリの体内における尿酸の過剰が ROS の欠乏を 引き起こし、免疫機能を低下させるという仮説を立て、検証を試みた。ワーカーに尿酸を経 ロ摂取させることにより体内の尿酸量を増加させて ROS 量を減少させる系を確立し、尿酸 投与処理区と尿酸非投与処理区で免疫機能が低下した個体に対して病原性を示す日和見感 染菌に曝露した際の生存率を比較した。さらに、尿酸投与処理により日和見感染菌に曝露し

45

た際の生存率が低下したため、ROS を消去する別の抗酸化物質の投与を行い、感染症リス クの増加が ROS の欠乏によるものであることを確認した。

3-2 材料と方法

サンプルの採集と処理

ヤマトシロアリのコロニーは、日本国内の二次林において巣材ごと採集した。他の地下 性シロアリ種と同様、ヤマトシロアリは木材の深部に王室を作る隠蔽的な営巣習性を持つ。 林内の木材に営巣するコロニーを発見し、卵と1 齢幼虫の分布から王室の位置を推定した。 木材の王室を含む部分をノコギリで切り出し、実験室に持ち込んで解体を行った。採集後に 分化した補充生殖虫をカウントするのを避けるため、10 日以内にすべての王と女王を材か ら取り出した。翅アリ由来の生殖虫である創設王/女王と補充生殖虫である二次王/女王は、 体色および棄翅痕の有無により区別した。各カーストの性は、先行研究(Hayashi et al. 2003) に従い、腹部末端の形態をもとに判別した。すべてのコロニーは実験室で餌として褐色腐朽 材培地(Mitaka et al. 2023)を与え、25℃の全暗条件下で管理した。本研究では、特別な許可の 取得は不要であった。また、実験動物の取り扱いについては、京都大学における動物実験の 実施に関する規程に従った。

はじめに、コロニーの終焉を引き起こすと推測されている王の代替りの前後で個体の生 理学的形質を比較した。創設王と二次女王が繁殖を担う王の代替り前(成熟期)のコロニーと、 二次王と二次女王が繁殖を担う王の代替り後(終末期)のコロニーについて、個体を解剖して 組織の顕微鏡観察を行ったところ、王の代替り後のコロニーではワーカーの脂肪体におい て尿酸顆粒の顕著な増加がみられた。そこで、定量的な評価を行うために、ワーカー体内の 尿酸量を王の代替り前後で比較した。コロニーから雌雄のワーカーをそれぞれ 5 個体ずつ 取り出し、体内の尿酸量を測定した。王の代替り前、王の代替り後でそれぞれ 10 コロニー 繰り返しを行った。 次に、ワーカーに尿酸を経口摂取させることにより体内の尿酸量を増加させて ROS 量を 減少させる系を確立した。尿酸投与処理区は、褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)に対して尿 酸を 1%(w/w)となるように添加してシャーレ(直径 40 mm)に 3 g 詰め、100 個体のワーカー を導入した。尿酸は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.(Osaka, Japan)から購入して用いた。 尿酸非投与処理区は、褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)のみを同量詰め、100 個体のワーカ ーを導入した。1、2、3 週間後に雌雄のワーカーをそれぞれ4 個体ずつ取り出し、体内の尿 酸量(1 コロニーあたり2 繰り返し)および ROS 量(1 コロニーあたり2 繰り返し)を調べた。 各処理について4 コロニー繰り返しを行った。

尿酸の投与により体内の尿酸量が増加し、ROS 量が減少することが確認されたため、上 述の方法で準備した 2 処理区(尿酸投与処理区、尿酸非投与処理区)の 3 週間目のワーカー を、免疫機能が低下した個体に対して病原性を示す日和見感染菌に曝露した際の生存率を 比較した。日和見感染菌としては、ヤマトシロアリの巣内から単離・培養したセラチア菌 (Serratia marcescens)を使用した。セラチア菌は典型的な日和見感染菌であり、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も頻繁に単離され(Grimont and Grimont 1978)、 通常はシロアリに害を及ぼさないが、免疫機能が低下した個体に対して病原性を示すこと が知られている(De Bach and Mcomie 1939; Connick et al. 2001; Osbrink et al. 2001)。セラチア 菌はプロジギオシン(prodigiosin)と呼ばれる赤色の色素を生産するため、環境中での有無が わかりやすい(Inagaki and Matsuura 2018)。なお、セラチア菌は尿酸の利用能力を持たない (Lehejčkova et al. 1987)。シャーレ(直径 40 mm)にセラチア培養液(4.3 × 10¹⁰ CFUs/mL)を 200 μL 加えた濾紙(直径 35 mm)を敷き、30 個体ずつ導入した。これは、Reticulitermes 属の複数 種で報告されている、実験室内で 1 年以上の長期飼育が可能なワーカー集団の規模を上回 っている(Pichon et al. 2007; Ghesini and Marini 2009)。セラチア菌への曝露後から 10 日間、ワ ーカーの生存率を記録した。コントロールとしては、シャーレ(直径 40 mm)に LB 液体培地 を 200 μL 加えた濾紙(直径 35 mm)を敷き、同様に 30 個体ずつ導入した。各処理について 4 コロニー繰り返しを行った。さらに、尿酸投与処理によりセラチア菌に曝露した際の生存率 が低下したため、ROS を消去する別の抗酸化物質(L-アスコルビン酸)を尿酸と同じ条件で経 口摂取させ、セラチア菌に曝露した際の生存率を調べた。

脂肪体細胞の顕微鏡観察

脂肪体における尿酸の蓄積を視覚化するために、脂肪体細胞の顕微鏡観察を行った。一 般に、シロアリの脂肪体細胞は脂肪滴を伴う脂肪細胞(adipocyte)と尿酸顆粒を伴う尿酸細胞 (urocyte)から構成される(Elliott and Stay 2007; Costa-Leonardo et al. 2013)。脂肪体の解剖は、 実体顕微鏡 SZX7(Olympus, Tokyo, Japan)下で行った。シロアリの脂肪体は白い不定形の組織 であり、消化管および生殖腺の周囲に存在する(Costa-Leonardo et al. 2013)。気管やマルピー ギ管など他の組織の混入を避けるため、最大限の注意を払った。解剖した脂肪体はスライド ガラス上に直接マウントし、4% paraformaldehyde(PFA)で 5 分間固定した。その後、カバー ガラスで押し潰しを行い、位相差顕微鏡 DM IL LED(Leica, Hamburg, Germany)下で観察した。

尿酸量の測定

尿酸量の測定は Uric Acid Assay Kit(Abcam, Cambridge, UK)を用いて行った。各サンプル を 0.6 mL チューブに入れ、Uric Acid Assay Buffer を 100 µL 加えて粉砕した。4°C、15000 rpm で 2 分間遠心後、上清を回収して 10 倍希釈した。上清サンプル 50 µL に Fluorometric Reaction Mix 50 µL(Uric Acid Assay Buffer 47.6 µL、Uric Acid Probe 0.4 µL、Uric Acid Enzyme Mix 2 µL を混合したもの)を加えて 37°Cの暗所で 30 分間反応させた後、Fluoroskan Ascent FL(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて蛍光強度を測定した(Ex/Em = 530/590 nm)。ま た、Uric Acid Standard 溶液を段階希釈(0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 nmol/well)して蛍光強度を測定 し、検量線を作成して尿酸量を求めた。さらに、体サイズの差を考慮して、尿酸量は生重量 で割って補正した。

ROS 量の測定

ROS 量の測定は ROS Assay Kit(Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて行った。各サンプルを 1.5 mL チューブに入れ、Highly Sensitive DCFH-DA Dye を Loading Buffer Solution で 1000 倍 希釈して作製した Highly Sensitive DCFH-DA Working Solution を 150 µL 加えて粉砕した。室 温(25°C)で 30 分間反応させた後、15000 rpm で 2 分間遠心して上清を 100 µL 回収した。蛍 光強度の測定は Fluoroskan Ascent FL(Thermo Fisher Scientific)を用いて行った(Ex/Em = 485/538 nm)。得られた蛍光強度を任意単位(arbitrary unit: AU)の ROS 量として扱った。さら に、体サイズの差を考慮して、ROS 量は生重量で割って補正した。

セラチア菌の単離と培養

ヤマトシロアリの巣内からセラチア菌を単離培養した。ワーカーの死骸のうち、体色が 赤色に変化しているものを lysogeny broth(LB)寒天培地上に移した。28℃で 24 時間培養し、 形成された赤色色素生産バクテリアのコロニーを滅菌した白金耳を用いて再び LB 寒天培 地上に移し、培養することにより単離した。その後、単離した細菌を LB 液体培地中で増殖 させることで細菌培養液を作成した。バクテリアの種同定は、16S rRNA 配列を解析するこ とにより行った。DNA の抽出および精製は、先行研究(Wilson 2001)の方法に従って行った。 16S rRNA 配列の増幅には、10F/800R(Forward: 5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3', Reverse: 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')プライマーを使用した。精製された PCR 産物の配列決定は、 ABI 3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて行った。得られ た配列(565 bp)について blastn プログラム(Altschul et al. 1997)を用いた相同性検索を行った ところ、*S. marcescens* strain KABOSH1 の 16S rRNA 配列(GenBank accession number: OQ550114)と 100%の相同性を示し、上述の赤色色素生産バクテリアはセラチア菌であるこ とが確認された。セラチア菌の菌液濃度については、LB 寒天培地上に段階希釈したセラチ ア培養液を播種し、24時間後にコロニー形成単位を計測することで決定した。

統計解析

すべての統計解析は R v4.0.5(R Core Team 2021)を用いて行った。尿酸量と ROS 量は正規 分布を仮定した一般化線形混合モデル(generalized linear mixed model: GLMM)、尿酸投与処理 の生存率は二項分布を仮定した GLMM を用いて解析した。GLMM では、処理区を固定効 果、コロニーをランダム効果とした。モデルに対する各固定効果の寄与を調べるために尤度 比検定(likelihood ratio test)を実施した。また、セラチア菌に曝露した際の生存率はログラン ク検定(log-rank test)を用いて解析した。図中のエラーバーは標準誤差(standard error: SE)を示 している。アスタリスクは、群間に有意差があったことを表している(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。異なる文字は有意水準p < 0.05(必要に応じて Bonferroni 法で補正)で群間に 有意差があったことを示している。

3-3 結果

王の代替りがワーカー体内の尿酸量に与える影響

興味深いことに、王の代替りに伴ってワーカー体内における尿酸の蓄積が促進されることが明らかになった。他のシロアリ種における脂肪体細胞の記載(Elliott and Stay 2007; Costa-Leonardo et al. 2013)と同様、ヤマトシロアリの脂肪体には尿酸顆粒を伴う尿酸細胞が観察された。王の代替り後には、ワーカーの脂肪体において尿酸顆粒の著しい増加が認められた(図 3-1b)。二次王と二次女王が繁殖を担う王の代替り後(終末期)のコロニーにおけるワーカー体内の尿酸量は、創設王と二次女王が繁殖を担う王の代替り前(成熟期)のコロニーと比較して有意に高値であった(likelihood ratio test, male: df = 1, χ^2 = 17.48, p < 0.001; female: df = 1, χ^2 = 17.57, p < 0.001, 図 3-1c)。雌雄ともに同様の傾向がみられた。

尿酸の蓄積が日和見感染菌に曝露した際の生存率に与える影響

尿酸投与処理により、ワーカー体内の尿酸量は増加し、ROS 量は減少した。尿酸投与処 理区では、ワーカーの脂肪体において尿酸顆粒が時間の経過とともに増加した(図 3-2a)。尿 酸投与処理区におけるワーカー体内の尿酸量は、尿酸非投与処理区と比較して有意に高い 値を示した(likelihood ratio test, week 1: df = 1, χ^2 = 103.59, p < 0.001; week 2: df = 1, χ^2 = 173.40, p < 0.001; week 3: df = 1, χ^2 = 303.92, p < 0.001, 図 3-2b)。尿酸投与処理区におけるワーカー 体内の ROS 量は、尿酸非投与処理区と比較して有意に低い値を示した(likelihood ratio test, week 1: df = 1, χ^2 = 8.72, p = 0.005; week 2: df = 1, χ^2 = 6.22, p = 0.016; week 3: df = 1, χ^2 = 8.80, p= 0.005, 図 3-2c)。また、1、2、3 週間目のいずれにおいても処理区間でワーカーの生存率に 有意差はなかった(likelihood ratio test, week 1: df = 1, χ^2 = 0.02, p = 0.895; week 2: df = 1, χ^2 = 0.54, p = 0.462; week 3: df = 1, $\chi^2 = 0.17$, p = 0.682, 図 3-S1)。

尿酸投与処理により日和見感染菌に曝露した際の生存率が低下した。死亡した個体は、 セラチア菌が生産する赤色色素プロジギオシンにより体色が変化していた(図 3-3a)。尿酸投 与処理区におけるセラチア菌に曝露されたワーカーの生存率は、尿酸非投与処理区と比較 して有意に低かった(log-rank test with Bonferroni correction, p < 0.001, 図 3-3b)。なお、セラチ ア菌に曝露されなかった場合、処理区間でワーカーの生存率に有意差はなかった(log-rank test with Bonferroni correction, p = 1.000, 図 3-3b)。さらに、別の抗酸化物質である L-アスコ ルビン酸投与処理によっても日和見感染菌に曝露した際の生存率が低下した。L-アスコルビ ン酸投与処理区におけるセラチア菌に曝露されたワーカーの生存率は、L-アスコルビン酸非 投与処理区と比較して有意に低かった(log-rank test with Bonferroni correction, p < 0.001, Fig. 3-3c)。また、L-アスコルビン酸投与処理によってワーカー体内の ROS 量が減少していること も確認した(likelihood ratio test, week 3: df = 1, χ^2 = 4.42, p = 0.039, 図 3-S2)。



図 3-1. ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)における王の代替りに伴うワーカーの尿酸蓄 積。(a)王位・女王位継承の概念図。本種では、王の代替りに伴ってコロニーが終焉を迎える と推測されている。(b)王の代替り前(成熟期)のコロニー(左)と王の代替り後(終末期)のコロ ニー(右)でワーカーの脂肪体細胞の形態を比較。白色の矢印は尿酸細胞に付随した尿酸顆粒 を示す。(c)王の代替り前後でワーカー体内の尿酸量を比較。図中の PK は創設王(primary king)、 PQ は創設女王(primary queen)、SK は二次王(secondary king)、SQ は二次女王(secondary queen)、 W はワーカー(worker)を示す。エラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差 があったことを示している(likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。



図 3-2. 尿酸投与処理によるワーカー体内の尿酸量と活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)量の変化。(a)位相差顕微鏡を用いて脂肪体細胞の形態を処理区間で比較。白色の矢印 は尿酸細胞に付随した尿酸顆粒を示す。(b)体内の尿酸量を処理区間で比較。(c)体内の ROS 量を処理区間で比較。図中の UA-は尿酸非投与処理区、UA+は尿酸投与処理区を示す。エ ラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差があったことを示している (likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。



図 3-3. 尿酸の蓄積が日和見感染菌に曝露した際の生存率に与える影響。(a)未処理のワーカ ー(左)と、日和見感染菌であるセラチア菌(Serratia marcescens)への曝露により死亡したワー カー(右)。セラチア菌が生産する赤色色素プロジギオシンによる体色の変化がみられる。(b) セラチア菌に曝露後の生存率を処理区間で比較。図中の UA-は尿酸非投与処理区、UA+は 尿酸投与処理区を示す。(c)別の抗酸化物質(L-アスコルビン酸)を尿酸と同じ条件で投与し、 セラチア菌に曝露した際の生存率。図中の AsA-は L-アスコルビン酸非投与処理区、AsA+ は L-アスコルビン酸投与処理区を示す。S-はセラチア菌への曝露なし、S+はセラチア菌へ の曝露ありを示す。異なる文字は群間に有意差があったことを示している(log-rank test with Bonferroni correction, p < 0.008)。

3-4 考察

ヤマトシロアリにおいて、王の代替りに伴うワーカーの尿酸蓄積が感染症リスクを増加 させることを発見した。興味深いことに、本種のコロニーが終焉を迎える引き金になると考 えられてきた王の代替りに伴って、ワーカー体内の尿酸量が増加することが明らかになっ た。そこで、尿酸の投与により人為的にワーカー体内の尿酸量を増加させたところ、日和見 感染菌であるセラチア菌に曝露した際の生存率が低下した。セラチア菌に曝露しなかった 際の生存率に尿酸投与処理の有無で有意差がみられなかったことは、尿酸自体にはシロア リの組織に対する物理的毒性がないことを示唆している。本研究は、これまで議論されてい なかった、尿酸の蓄積がシロアリに与える負の影響を実証した初めての研究である。

過剰になると生体分子に損傷を与える ROS を消去する強力な抗酸化物質としての生理 機能を持つ尿酸は、シロアリにおいてもストレス環境下で生存に寄与する物質として理解 されてきた(Tasaki et al. 2017)。一方で、ROS は抗微生物ペプチド(antimicrobial peptide: AMP) やメラニンとともに病原体を攻撃するほか、シグナル伝達分子としての機能を持つなど、自 然免疫系において重要な役割を担っていることが生物一般に知られており(Dröge 2002; Apel and Hirt 2004; Dowling and Simmons 2009)、尿酸の過剰による ROS の欠乏は免疫機能の低下 を引き起こす可能性がある。実際に、サシチョウバエの一種(*Lutzomyia longipalpis*)などハエ 目の昆虫では、尿酸の投与により ROS を消去することで日和見感染菌に曝露した際の生存 率が低下することが報告されている(Diaz-Albiter et al. 2012)。本研究においても、尿酸投与 処理により体内の ROS 量が減少し、セラチア菌に曝露した際の生存率が低下することが確 認された。さらに、ROS を消去する別の抗酸化物質(L-アスコルビン酸)の投与処理によって も、同様にセラチア菌を用いた感染試験における生存率が低下した。これらの結果は、抗酸 化物質である尿酸の過剰による ROS の欠乏が免疫機能の低下を引き起こしたことを示唆す る。今後、感染時の遺伝子発現を調べるなど、シロアリにおいて尿酸の蓄積が感染症リスク を増加させる具体的なメカニズムを解明する必要がある。

本研究の結果は、シロアリのコロニーが王の代替り後に終焉を迎える至近要因の一端を 説明し得る、新しいシナリオを提起する。ヤマトシロアリでは、創設王が死亡して二次王が コロニー内の繁殖を引き継ぐと近親交配の弊害によりコロニーはまもなく終焉を迎えると 推測されてきたが、実際に王の代替りが巣の終焉を引き起こす至近要因は未解明であった。 尿酸の蓄積による感染症リスクの増加が、シロアリにおいてどの程度普遍的なものである かを調べることは今後の課題であるが、飼育下でシロアリの体内に尿酸が蓄積する現象は 先行研究においても複数のシロアリ種で報告されている(Potrikus and Breznak 1980a; Lovelock et al. 1985; Chappell and Slaytor 1993)。環境中には、多くの病原菌に加え、常在菌の 中にも免疫機能が低下した個体に対して病原性を示す日和見感染菌が存在する(Klainer and Beisel 1969; Poindexter and Washington 1974)。シロアリをはじめとする社会性昆虫のコロニー にとって、病原菌や日和見感染菌の増殖を抑制することがきわめて重要であることは、多く の先行研究において強調されてきた。社会性昆虫では、その特徴である個体間の濃厚接触や 遺伝的な均一性が病気の伝染を容易にするというリスクを伴う(Schmid-Hempel 1998)。一方 で、個体の免疫系に加えて、グルーミングや死体の埋葬などコロニー内個体が協力して病気 が蔓延するリスクを抑える機構を有することが知られており、社会免疫(social immunity)と 呼ばれる(Cremer et al. 2007; Wilson-Rich et al. 2009; Cremer and Sixt 2009)。本研究は、個体・ 社会レベルで抗酸化物質と ROS のバランスを保つことが、社会免疫の重要な側面である可 能性を指摘する。

木材を餌とするシロアリにおける尿酸の蓄積は、主に窒素源としての再利用という観点 から議論されてきた。木材は炭素を多く含む一方で窒素に乏しい(Matsumoto 1976; La Fage and Nutting 1978; Higashi et al. 1992)ことから、シロアリでは不足しがちな窒素を獲得・節約 するための様々な戦略が進化してきた。例えば、土壌食、共生微生物による窒素固定、共食 いや脱皮殻のリサイクルなどである(Hungate 1941; Benemann 1973; Breznak et al. 1973; Chouvenc 2020; Tong et al. 2021; Mullins et al. 2021)。さらに、シロアリはこのようにして得ら れた窒素化合物の代謝産物をそのまま排泄することなく、尿酸の形で脂肪体に貯蓄する (Potrikus and Breznak 1980a; Breznak 1982; Brune 2014)。従来、シロアリはこの尿酸を分解し て窒素源として再利用していると考えられてきたが、 シロアリ(ワーカー)の組織中からは尿 酸分解を触媒する酵素が検出されないことから、脂肪体に蓄えられた尿酸はマルピーギ管 を経由して後腸に輸送され、後腸内の嫌気性細菌の働きでアンモニアが生産されてアミノ 酸合成の材料になると考えられてきた(Potrikus and Breznak 1980b, 1981; Thong-On et al. 2012; Waidele et al. 2019)。これに対し Konishi et al. (2023)は、先行研究の知見がいずれもワーカー のみを用いた実験により得られたものであることに着目し、王と女王のみが尿酸を分解す る酵素を持つことを発見し、尿酸の分解が繁殖に寄与していることを実証した。また、尿酸 がワーカーから生殖カーストに受け渡されており、尿酸の受け取り手である王と女王を取 り除いたコロニーではワーカー体内の尿酸量が増加していくことも報告した(Konishi et al. 2023)。それでは、なぜ創設王を失った後に増加したワーカー体内の尿酸量は、二次王が出 現した後も元に戻らないのだろうか。今後、酵素活性に基づく尿酸の消費量や、コロニー内 個体間の栄養交換に与える影響など、様々な観点から創設王と二次王の比較解析を行う必 要がある。また、このような尿酸の蓄積が、分解者の不在が引き起こす滞留によるものだけ でなく、王と女王からの隔離による酸化ストレス応答としての側面を持つ可能性があるこ とも考慮する必要がある。実際に、同じ社会性昆虫であるアリの一種 Camponotus fellah で は、社会集団からの孤立が酸化ストレス応答を引き起こすことが明らかになっている(Koto et al. 2023)。本研究の結果は、王や女王による尿酸の分解が、抗酸化物質と ROS のバランス を保ち、コロニーの免疫機能を維持する上でも重要であることを示唆している。

結論として、シロアリにおいてワーカーの尿酸蓄積が感染症リスクを増加させる。本研 究は、巣レベルでの代謝と免疫の生理学的連関に着目して、社会性昆虫のコロニーが終焉を 迎えるメカニズムを理解する上で新たな視点を提供するものである。また、応用昆虫学の観 点からは、シロアリは木造建築物を食害する害虫でもあり、その被害額は世界で年間 500 億 ドルにも及ぶと推定されている(Korb 2007)。本研究の結果は、尿酸を経口摂取させてシロア リの免疫系を抑制し、コロニーを日和見感染により崩壊させる技術など、害虫管理にも応用 できる可能性がある。安価で人体への毒性の低い尿酸は、現在世界中で使用されている殺虫 剤の代替品となるかもしれない。

3-5 補足資料



図 3-S1. 尿酸投与処理がワーカーの生存率に与える影響。図中のUA-は尿酸非投与処理区、 UA+は尿酸投与処理区を示す。エラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差 があったことを示している(likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。1、2、3 週間目のいずれにおいても尿酸投与処理の有無でワーカーの生存率に 有意差がみられなかったことは、尿酸自体にはシロアリの組織に対する物理的毒性がない ことを示唆している。



図 3-S2.3 週間の L-アスコルビン酸投与処理がワーカー体内の活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)量に与える影響。図中の AsA-は L-アスコルビン酸非投与処理区、AsA+は L-アスコルビン酸投与処理区を示す。エラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差があったことを示している(likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。L-アスコルビン酸投与処理によりワーカー体内の ROS 量が減少することが確認されたため、これらを用いて日和見感染菌であるセラチア菌(*Serratia marcescens*)に曝露する感染試験を行った。

第4章 巣レベルの繁殖システムにおける地理的変異

4-1 はじめに

生物の形態や体サイズ、餌、繁殖様式といった生活史形質(life history trait)は、環境要因の影響を受けるため、しばしば地理的な変異を示す(Pannebakker et al. 2008; Liefting et al. 2009; Bai et al. 2016; Burke and Bonduriansky 2018)。特に変温動物(ectotherm)においては、恒温動物 (endotherm)のように代謝による体温の調節を行うことができないため、気温が生活史形質を 左右する最も重要な要因のひとつとなる(Roff 1980; Angilletta et al. 2006; Doucet et al. 2009)。 例えば、広域分布種であり世界的に農作物の害虫となっているオオタバコガ(*Helicoverpa armigera*)では、寒冷地の個体群において幼虫の成長速度が増大する傾向があることが知ら れており、活動可能な期間が短い環境への適応と考えられている(Chen et al. 2019)。このよ うに、変温動物が分布を拡大して異なる環境に適応する上で、温度ストレス環境下で生存す るための戦略が鍵となる。

社会性昆虫では、上述の個体レベルの形質に加え、社会レベルの形質が環境要因の影響 を受ける。社会性昆虫のコロニーは基本的に血縁者から構成され、ごく一部の個体が王や女 王として繁殖を行う一方、圧倒的多数の個体はワーカーや兵隊として繁殖以外の労働に従 事する(Wilson 1971, 1975)。しかしながら、侵略的外来種となっている一部のアリ種やシロ アリ種は、しばしば侵入先で血縁関係にない個体が混在する巨大なコロニーを形成するこ とが報告されている(Hölldobler and Wilson 1977; Morel et al. 1990; Tsutsui and Suarez 2003; Perdereau et al. 2010; Boulay et al. 2014; Eyer and Vargo 2021)。これは、侵入先の個体群におけ る遺伝的多様性の低下がコロニー間の敵対性を消失させ、融合が起こりやすくなるためと 考えられている。コロニーサイズの増大は採餌や防衛の効率を上昇させる(Bourke 1999; Anderson and McShea 2001; Cerdá et al. 2002; Ruel et al. 2012)など、このような社会システムの 変化が侵入先の環境での生態学的な成功にも繋がる。したがって、コロニーの社会システム がどのように侵入先の環境に適応するのかを明らかにすることは、社会性昆虫の地理的適応を理解する上で重要である。

シロアリは一般的には熱帯の昆虫であるが、一部の種は温帯や亜寒帯に適応している (Eggleton et al. 1994; Evans et al. 2013)。日本のヤマトシロアリ(Reticulitermes speratus)は、北 海道の冷帯から屋久島の亜熱帯まで生息する広域分布種である(Takagi and Ogai 2015)。本種 では、単為生殖による女王位継承(asexual queen succession: AQS, 図 4-1a)と呼ばれる特殊な 繁殖システム(本論文 1-3 を参照)が知られている(Matsuura 2017)。他のシロアリ種と同様、1 ペアの有翅虫が一夫一妻でコロニーを創設し、それぞれ創設王(primary king: PK)および創設 女王(primary queen: PQ)となる。創設女王は単為生殖によって自身の遺伝子のみを受け継ぐ 多数の二次女王(secondary queen: SQ)を生産するため、創設王が生きている限りコロニー内 の近親交配が回避される(Matsuura et al. 2009)。一方で、創設王が死亡して、創設王と創設女 王の遺伝子を持つ二次王(secondary king: SK)がコロニー内の繁殖を引き継ぐと、近親交配が 生じてコロニーは終焉を迎えると推測されており、創設王は生き続ける必要がある。しかし ながら、寒冷地ではこのような有翅虫によるコロニー創設と創設王の長期生存を前提とし たコロニーの維持は困難であると予測される。雌雄の有翅虫はコロニーの創設後に約10個 の卵を産むが、孵化までに約 35 日(Matsuura and Kobayashi 2007)、ワーカーになるまでには 数か月を要する。 また、 ヤマトシロアリは越冬中の凍死リスクを低減するために王室を地下 に移動させることが知られており(Takata et al. 2023)、気温が低いほど深くまで掘る必要があ る。これらを踏まえると、有翅虫の群飛から越冬の開始までの期間が短くなる寒冷地では、 初期コロニーが地下に潜るために必要なサイズまで成長することができず、越冬中に死亡 するリスクが高い可能性がある。

本研究では、ヤマトシロアリの繁殖システムに地理的変異がみられるという仮説を立て、 検証を行った。はじめに、日本各地で採集したコロニーの王と女王の組成を調べた。その結 果、本州以南では採集されたコロニーの大半で創設王と二次女王が繁殖を担っていたのに

62

対し、分布の北限である北海道では採集されたすべてのコロニーで二次王と二次女王が繁殖を担っていた。そこで、飼育実験により二次王の下で維持される個体数を本州個体群と北海道個体群で比較した。さらに、これらの地理的適応の分子基盤を調べるため、RNA-seqを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

4-2 材料と方法

サンプルの採集と処理

日本国内(分布の北限である北海道と南限である屋久島を含む)の二次林において、ヤマ トシロアリのコロニーを巣材ごと採集した。他の地下性シロアリ種と同様、ヤマトシロアリ は木材の深部に王室を作る隠蔽的な営巣習性を持つ。林内の木材に営巣するコロニーを発 見し、卵と1齢幼虫の分布から王室の位置を推定した。木材の王室を含む部分をノコギリで 切り出し、実験室に持ち込んで解体を行った。採集後に分化した補充生殖虫をカウントする のを避けるため、10日以内にすべての王と女王を材から取り出した。翅アリ由来の生殖虫 である創設王/女王と補充生殖虫である二次王/女王は、体色および棄翅痕の有無により区別 した。各カーストの性は、先行研究(Hayashi et al. 2003)に従い、腹部末端の形態をもとに判 別した。すべてのコロニーは実験室で餌として褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を与え、 25℃の全暗条件下で管理した。RNA-seq 解析のために、サンプルを-80℃で一時保存した。 本研究では、特別な許可の取得は不要であった。また、実験動物の取り扱いについては、京 都大学における動物実験の実施に関する規程に従った。

日本各地で採集したコロニーの王と女王の構成を調べた結果、本州以南では採集された コロニーの大半で創設王と二次女王が繁殖を担っていたのに対し、分布の北限である北海 道では採集されたすべてのコロニーで二次王と二次女王が繁殖を担っており、繁殖システ ムに地理的変異がみられた。そこで、飼育実験により二次王の下で維持される個体数を個体 群間で比較した。二次王が繁殖を担うコロニーは、ニンフ雌雄 10 個体ずつとワーカー500 個体から構成される分集団を作成することで得られた。王室から隔離された集団では、ニン フやワーカーが補充生殖虫に分化し、硬化した表皮や幅広い胸部、伸長した腹部など形態の 特徴から識別が可能である(Miyata et al. 2004; Sun et al. 2017)。補充生殖虫の分化に対して兵 隊が影響を与える可能性を排除するために、兵隊は含めなかった。各集団は、褐色腐朽材培 地(Mitaka et al. 2023)を詰めたスチロールケース(100×100×29 mm)に導入した。コロニーは 上述の条件下で 6 か月間維持した。2 か月ごとに、各カースト(ニンフ、ニンフ由来の二次 王/女王、ワーカー、ワーカー由来の二次王/女王、兵隊)の個体数を数えた。各処理区につい て 7 コロニー繰り返しを行った。さらに、両個体群の二次王について、RNA-seq を用いて網 羅的遺伝子発現解析を行った。二次王を得るために、褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を詰 めたシャーレ(直径 55 mm)に雌雄ニンフ 5 個体とワーカー180 個体を導入した。1 か月後、 雄ニンフ由来の二次王を 1 個体ずつ取り出した。各個体群について 4 コロニー繰り返しを 行った。

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

上述の方法で準備したサンプルから、RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)を用いてトータル RNA を個々に抽出した。RNA サンプル は Macrogen Japan Corp.(Tokyo, Japan)に発送され、TruSeq stranded mRNA kit(Illumina, San Diego, CA, USA)を用いてライブラリーの調製、NovaSeq 6000(Illumina)を用いてシーケンシ ングが行われた。得られた生データに対して fastp v0.23.2(Chen et al. 2018)を用いてトリミン グを行い、低品質なリードを除去した。残ったリードは STAR v2.7.9(Dobin et al. 2013)を用 いてヤマトシロアリのリファレンスゲノム上にアラインメントされた。遺伝子の発現量は RSEM v1.3.3(Li and Dewey 2011)を用いて推定した。生成されたカウントは、TMM(trimmed mean of M-value)正規化法(Robinson and Oshlack 2010)を用いて遺伝子発現解析を行った。個

体群の効果について、FDR(false discovery rate) < 0.05 を有意水準として発現変動遺伝子 (differentially expressed gene: DEG)を抽出した。また、検出された DEG に対して、それぞれ の TPM(transcripts per million)をもとに、gplots パッケージの heatmap.2 関数を用いてヒート マップを作成した。

統計解析

すべての統計解析は R v4.0.5(R Core Team 2021)を用いて行った。コロニー内の各カース ト(ニンフ、ニンフ由来の二次王/女王、ワーカー、ワーカー由来の二次王/女王、兵隊)の個体 数は、ポアソン分布を仮定した一般化線形モデル(generalized linear model: GLM)を用いて解 析した。GLM では、個体群を固定効果とした。モデルに対する各固定効果の寄与を調べる ために尤度比検定(likelihood ratio test)を実施した。図中のエラーバーは標準誤差(standard error: SE)を示している。アスタリスクは、群間に有意差があったことを表している(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。

4-3 結果

繁殖システムの地理的変異

日本各地で採集したコロニーの王と女王の構成を調べたところ、520 コロニーのうち、 13 コロニーが創設期(創設王と創設女王が繁殖を担う)、31 コロニーが成長期(創設王と創設 女王および二次女王が繁殖を担う)、430 コロニーが成熟期(創設王と二次女王が繁殖を担う)、 46 コロニーが終末期(二次王と二次女王が繁殖を担う)であった(図 4-1b)。興味深いことに、 本州以南では 94.4%のコロニーで創設王が繁殖を担っていたが、北限集団である北海道で は 18 コロニーすべてで二次王が繁殖を担っており、繁殖システムにおける地理的変異がみ られた。さらに、北海道個体群における王と女王の個体数は、他の地域と比較して有意に多 かった(king: $df = 1, \chi^2 = 3448.5, p < 0.001$; queen: $\chi^2 = 7541.9, df = 1, p < 0.001$, 図 4-1c)。

飼育実験

北海道個体群は本州個体群と比較して、より多くの個体が二次王の下で維持された (likelihood ratio test, month 2: $df = 1, \chi^2 = 211.30, p < 0.001$; month 4: $df = 1, \chi^2 = 273.54, p < 0.001$; month 6: $df = 1, \chi^2 = 246.92, p < 0.001$, 図 4-2)。さらに、北海道個体群は本州個体群と比較し て、より多くのニンフが二次王(likelihood ratio test, month 2: $df = 1, \chi^2 = 9.61, p = 0.002$; month 4: $df = 1, \chi^2 = 8.91, p = 0.003$; month 6: $df = 1, \chi^2 = 8.91, p = 0.003$, 図 4-2)および二次女王 (likelihood ratio test, month 2: $df = 1, \chi^2 = 8.91, p = 0.003$, 図 4-2)および二次女王 (likelihood ratio test, month 2: $df = 1, \chi^2 = 8.74, p = 0.003$; month 4: $df = 1, \chi^2 = 7.93, p = 0.005$; month 6: $df = 1, \chi^2 = 8.74, p = 0.003$)に分化した。すべての分集団において、ニンフの二次王および 二次女王への分化が確認された。雌ワーカーの一部も二次女王に分化したが、ワーカー由来 の二次女王の個体数については、個体群間で有意差がみられなかった(likelihood ratio test, month 2: $df = 1, \chi^2 = 0.58, p = 0.445$; month 4: $df = 1, \chi^2 = 0.24, p = 0.626$; month 6: $df = 1, \chi^2 = 0.79, p = 0.375$)。また、兵隊の個体数についても、個体群間で有意差はみられなかった(likelihood ratio test, month 2: $df = 1, \chi^2 = 0.20, p = 0.654$; month 4: $df = 1, \chi^2 = 1.02, p = 0.313$; month 6: $df = 1, \chi^2 = 1.83, p = 0.176$)。

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

シーケンシングの結果、総リード数は 4.2-6.3G bp、GC 含量は 42-43%、クオリティスコ ア(Q30)は 92-93%であった(表 4-S1)。計 8 サンプルのトランスクリプトームデータ(Honshu SK: N=4; Hokkaido SK: N=4)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った結果、個体群間で 124 の DEG が検出された。そのうち本州個体群で高発現していたものは 38 遺伝子、北海道個 体群で高発現していたものは 86 遺伝子であった(図 4-3a)。DEG の詳細な情報は補足資料(表 4-S2, 3)に示す。本州個体群で高発現がみられた遺伝子は、*Hemolymph lipopolysaccharidebinding protein(LBP*, FDR = 0.022, 図 4-3b)のようなパターン認識タンパクの遺伝子、*Serine* protease snake(snk, FDR = 0.008, 図 4-3b)や Serine protease persephone(psh, FDR = 0.042, 図 4-3b)のようなシグナルタンパクの遺伝子、Lysozyme(FDR < 0.001, 図 4-3b)のような抗菌性物 質の遺伝子といった免疫関連遺伝子のほか、Ejaculatory bulb-specific protein 3(Ebp1II)(FDR < 0.001, 図 4-3b)のような雄の繁殖形質に関わる可能性があるものが含まれていた。免疫関連 遺伝子の分類については、シロアリを対象にトランスクリプトーム解析を行っている先行 研究(Hussain et al. 2013; Mitaka et al. 2017)に従った。一方で、北海道個体群で高発現がみら れた遺伝子には、Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit(IGFALS, FDR < 0.001, 図 4-3b)のようなインスリン様成長因子(insulin-like growth factor: IGF)の担体と してその機能を調節する遺伝子や、Cytochrome P450 4C1(CYP4C1, FDR = 0.044, 図 4-3b)や Glutathione S-transferase 1-1(GstD1, FDR = 0.027, 図 4-3b)、UDP-glucuronosyltransferase 2B20(UGT2B20, FDR = 0.048, 図 4-3b)のような解毒酵素の遺伝子といった代謝関連遺伝子の ほか、takeout(FDR=0.017, 図 4-3b)のような雄の繁殖形質に関わる可能性があるものが含ま れていた。検出された DEG のうち、本州個体群において高発現していた 11 遺伝子および 北海道個体群において高発現していた 26 遺伝子は機能未知であった。



図 4-1. ヤマトシロアリ(Reticulitermes speratus)における繁殖システムの個体群間比較。(a)王・ 女王位継承の概念図。1 ペアの有翅虫が一夫一妻でコロニーを創設し、それぞれ創設王 (primary king: PK)および創設女王(primary queen: PQ)となる。創設女王は単為生殖によって多 数の二次女王(secondary queen: SQ)を生産するため、コロニーが生きている限り遺伝的に不 死である。一方で、創設王が死亡して二次王(secondary king: SK)がコロニー内の繁殖を引き 継ぐと近親交配が不可避的に生じ、コロニーは終焉を迎えると推測されている。(b)王と女 王の組成を個体群間で比較。(c)王と女王の個体数を北海道とそれ以外の個体群で比較。図中 のエラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差があったことを示している (likelihood ratio test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n.s., not significant)。



図 4-2.6 か月間の飼育実験による個体数の推移とカースト分化の個体群間比較。二次王が繁殖を担うコロニーは、ニンフ雌雄 10 個体ずつとワーカー500 個体から構成される分集団を 作成することで得られた。(*a*)総個体数を個体群間で比較。(*b*)ニンフ由来の二次王の個体数 を個体群間で比較。図中の SK は二次王(secondary king)を示す。エラーバーは標準誤差を表 す。アスタリスクは群間に有意差があったことを示している(likelihood ratio test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001; n.s., not significant)。



図 4-3. 二次王のトランスクリプトームデータを用いた網羅的な遺伝子発現量の個体群間比較。(*a*)ヒートマップは 124 の発現変動遺伝子(differentially expressed gene: DEG)について発現量の差異を示す。発現量は白色ほど高く、赤色ほど低い。左側の樹は発現量の階層クラスタリングと対応する。(*b*)代表的な DEG。図中のエラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは群間に有意差があったことを示している(*FDR < 0.05, **FDR < 0.01, ***FDR < 0.001; n.s., not significant)。

4-4 考察

広域分布種であるヤマトシロアリを対象に全国規模の野外調査を行った結果、繁殖シス テムに地理的変異がみられることを発見した。本州以南では採集されたコロニーの約 85% で創設王と二次女王が繁殖を担っていた(成熟期)のに対し、分布の北限である北海道では採 集されたすべてのコロニーで二次王と二次女王が繁殖を担っていた(終末期)。また、北海道 個体群は本州以南の個体群と比較して、1 コロニーあたりの王と女王の個体数が顕著に多か った。このような繁殖システムの地理的変異をもたらした背景は、寒冷地では有翅虫による コロニー創設と創設王の長期生存を前提としたコロニーの維持が困難であることにより説 明できる可能性がある。雌雄の有翅虫はコロニーの創設後に約 10 個の卵を産むが、孵化ま でに約35日(Matsuura and Kobayashi 2007)、ワーカーになるまでには数か月を要する。また、 ヤマトシロアリは越冬中の凍死リスクを低減するために王室を地下に移動させることが知 られており(Takata et al. 2023)、気温が低いほど深くまで掘る必要がある。これらを踏まえる と、有翅虫の群飛から越冬の開始までの期間が短くなる寒冷地では、初期コロニーが地下に 潜るために必要なサイズまで成長することができず、越冬中に死亡するリスクが高いと予 測される。これらを踏まえて、寒冷地では資源を有翅虫の生産に投資せずに補充生殖虫の生 産に回し、多数の二次王と二次女王が近親交配を繰り返しながらコロニーを存続する派生 系の繁殖システムが進化したというシナリオを提起する。有翅虫によらないコロニーの創 設としては、分巣(fission)あるいは出芽(budding)と呼ばれるような分集団が新巣となるもの (Peeters and Ito 2001)、人為的な要因によるものなどが挙げられるが、これらを実証するため にはさらなる調査が必要である。

興味深いことに、飼育実験においても北海道個体群では本州個体群と比較してより多く の個体が二次王の下で維持された。ヤマトシロアリでは、創設王が死亡して、創設王と創設 女王の遺伝子を持つ二次王がコロニー内の繁殖を引き継ぐと、近親交配が生じてコロニー は終焉を迎えると推測されてきた。実際に、近親交配の弊害は複数のシロアリ種において直 接的あるいは間接的に示されている(DeHeer and Vargo 2006; Calleri et al. 2006; Eyer and Vargo 2022)。北海道個体群では二次王と二次女王による近親交配の弊害が軽減されている可能性 がある。また、ニンフから生殖カーストへの分化を個体群間で比較したところ、北海道個体 群では本州個体群と比較してより多くの個体が二次王および二次女王に分化した。これは 野外コロニーにおける二次王および二次女王の個体数の傾向とも一致する。北海道個体群 では本来有翅虫になる雌雄のニンフが巣内に留まって二次王および二次女王に分化してい る可能性がある。また、北米に生息する同属のシロアリ種 R. flavipes を対象とした先行研究 でも、寒冷地の個体群において多数の二次王および二次女王が近親交配を行うコロニーの 割合が増加することが示されており、越冬中に死亡する個体数を生殖カーストの繁殖能力 の向上により補うことが寒冷地適応の鍵となる可能性が指摘されている(Esenther 1969; Raffoul et al. 2011)。社会性昆虫一般に、生殖カーストの個体数増加に伴うコロニーサイズの 増大は、採餌や防衛の効率を上昇させる(Bourke 1999; Anderson and McShea 2001; Cerdá et al. 2002; Ruel et al. 2012; Perdereau et al. 2015)。また、多数の王と女王が存在することは、コロ ニー内の遺伝的多様性を維持するのに寄与する(Vargo 2019)。以上の知見は、寒冷地では多 数の二次王と二次女王が繁殖を担うコロニーが維持される方向に選択が働くことを示唆し ている。

RNA-seq を用いて二次王の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、個体群間で 124 の DEG が検出され、これには免疫や代謝に関わる可能性がある遺伝子が含まれていた。本州 個体群では LBP のようなパターン認識タンパクの遺伝子、snk や psh のようなシグナルタン パクの遺伝子、Lysozyme のような抗菌性物質の遺伝子など、複数の免疫関連遺伝子の高発 現がみられた。このことは、環境中の病原菌による感染症リスクが本州以南と北海道で異な ることを示唆している。一方、北海道個体群では IGFALS のような IGF の担体としてその機 能を調節する遺伝子、CYP4CI や GstD1、UGT2B20 のような解毒酵素の遺伝子など、複数の 代謝関連遺伝子の高発現がみられた。また、本州個体群で高発現していた EbpIII や北海道
個体群で高発現していた takeout など、雄特異的に発現して繁殖形質に関わる可能性がある ものがみられたことも興味深い。EbpIII は、交尾時に雄から雌に移行して再交尾を妨げるプ ラグの形成に関わることがショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)を用いた研究で明ら かになっている(Ludwig et al. 1991)。takeout は、求愛行動の促進に関わることが同じくショ ウジョウバエを用いた研究で明らかになっている(Dauwalder et al. 2002)。今後、二次王以外 のカーストのトランスクリプトームデータを用いたさらなる遺伝子発現解析や、個々の遺 伝子に着目した機能解析が実施されることで、生活史形質の差異に関わる分子生理基盤の 理解が進むことが期待される。

AQS はシロアリにおいて複数回起源しており、有性生殖と無性生殖を使い分けることに よる近親交配の回避が、シロアリにとって最適な繁殖システムであると推測されてきた (Dedeine et al. 2016; Matsuura 2017; Hellemans et al. 2019)。一連の結果から、ヤマトシロアリ が有翅虫によるコロニーの創設が困難な寒冷地に適応する上で、AQS という洗練された繁 殖システムを犠牲にして、多数の二次王と二次女王が近親交配によりコロニーを維持する 二次戦略としての繁殖システムを進化させたことが示唆された。本研究は、社会性昆虫にお ける環境に応じた繁殖システムの柔軟な適応進化を解明するものである。

4-5 補足資料

ワーカー体内の尿酸量を個体群間で比較

本州個体群の成熟期(創設王と二次女王が繁殖を担う)と終末期(二次王と二次女王が繁殖 を担う)、および採集されたコロニーすべてが終末期であった北海道個体群についてワーカ ーの尿酸蓄積を比較した。それぞれ 10 コロニーずつ用い、各コロニーから雌雄のワーカー を 5 個体ずつ取り出して体内の尿酸量を測定した。尿酸量の測定は Uric Acid Assay Kit(Abcam, Cambridge, UK)を用いて行った。各サンプルを 0.6 mL チューブに入れ、Uric Acid Assay Buffer を 100 µL 加えて粉砕した。4℃、15000 rpm で 2 分間遠心後、上清を回収して 10 倍希釈した。上清サンプル 50 µL に Fluorometric Reaction Mix 50 µL(Uric Acid Assay Buffer 47.6 µL、Uric Acid Probe 0.4 µL、Uric Acid Enzyme Mix 2 µL を混合したもの)を加えて 37℃ の暗所で 30 分間反応させた後、Fluoroskan Ascent FL(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて蛍光強度を測定した(Ex/Em = 530/590 nm)。また、Uric Acid Standard 溶液を段 階希釈(0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 nmol/well)して蛍光強度を測定し、検量線を作成して尿酸量を 求めた。さらに、体サイズの差を考慮して、尿酸量は生重量で割って補正した。すべての統 計解析は R v4.0.5(R Core Team 2021)を用いて行った。 尿酸量は正規分布を仮定した一般化線 形混合モデル(generalized linear mixed model: GLMM)を用いて解析した。GLMM では、処理 区を固定効果、コロニーをランダム効果とした。モデルに対する各固定効果の寄与を調べる ために尤度比検定(likelihood ratio test)を実施した。効果が有意であった場合、各群間の差異 を検出するために、multcomp パッケージ(Hothorn et al. 2008)の glht 関数を用いて Tukey's HSD 検定による多重比較を実施した。 図中のエラーバーは標準誤差(standard error: SE)を示してい る。異なる文字は、有意水準 p < 0.05 で群間に有意差があったことを表している。

興味深いことに、二次王が繁殖を担うコロニーにおけるワーカーの尿酸蓄積は、北海道 個体群においてもみられた。ワーカー体内の尿酸量に対する個体群(本州、北海道)とステー ジ(成熟期、終末期)の組み合わせの効果は有意であった(個体群とステージの交互作用項を 含む; likelihood ratio test, male: df = 2、 χ^2 = 24.03, p < 0.001; female: df = 2, χ^2 = 23.86, p < 0.001, 図 2-3)。北海道個体群におけるワーカー体内の尿酸量は、本州個体群の終末期との間に有意 差がみられず(Tukey's HSD test, male: p = 0.831; female: p = 0.700, 図 4-S1)、本州個体群の成熟 期と比較して有意に高い値を示した(Tukey's HSD test, male: p < 0.001; female: p < 0.001, 図 4-S1)。 雌雄ともに同様の傾向がみられた。これらの結果は、北海道の個体群ではワーカーの 尿酸蓄積が本州以南の個体群と同様に生じているものの、その負の影響(前章を参照)が軽減 されていることを示唆している。



図 4-S1. ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)における繁殖システムの地理的変異に基づ いた、尿酸蓄積の個体群間比較。本州個体群の成熟期(王の代替り前:創設王と二次女王が繁 殖を担う)と終末期(王の代替り後:二次王と二次女王が繁殖を担う)、および採集されたコロ ニーすべてが終末期であった北海道個体群でワーカー体内の尿酸量を比較。エラーバーは 標準誤差を表す。異なる文字は群間に有意差があったことを示している(Tukey's HSD tests,*p* < 0.05)。

ニンフの不在下におけるワーカーのカースト分化を個体群間で比較

ヤマトシロアリでは、ニンフだけでなくワーカーも補充生殖虫への分化能を有する (Miyata et al. 2004)。飼育実験により、ワーカー由来の二次王の下で維持される個体数につい ても個体群間で比較した。二次王が繁殖を担うコロニーは、ワーカー500 個体から構成され る分集団を作成することで得られた。補充生殖虫の分化に対して兵隊が影響を与える可能 性を排除するために、兵隊は含めなかった。各集団は、褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を 詰めたスチロールケース(100×100×29 mm)に導入した。コロニーは上述の条件下で6か月 間維持した。2か月ごとに、各カースト(ワーカー、ワーカー由来の二次王/女王、兵隊)の個 体数を数えた。各処理区について7コロニー繰り返しを行った。

ニンフ由来の二次王コロニーと同様に、北海道個体群は本州個体群と比較して、より多 くの個体が二次王の下で維持されることが明らかになった(likelihood ratio test, month 2: df =1, $\chi^2 = 201.23$, p < 0.001; month 4: df = 1, $\chi^2 = 197.44$, p < 0.001; month 6: df = 1, $\chi^2 = 128.17$, p <0.001, 図 4-S2a)。一方で、ワーカー由来の二次王(likelihood ratio test, month 2: df = 1, $\chi^2 = 0.25$, p = 0.617; month 4: df = 1, $\chi^2 = 0.20$, p = 0.655; month 6: df = 1, $\chi^2 = 0.18$, p = 0.670, 図 4-S2b)およ び二次女王(likelihood ratio test, month 2: df = 1, $\chi^2 = 2.11$, p = 0.146; month 4: df = 1, $\chi^2 = 0.83$, p =0.361; month 6: df = 1, $\chi^2 = 1.48$, p = 0.223)については、個体群間で有意差はみられなかった。 ワーカーの二次王および二次女王への分化はすべての分集団において確認された。興味深 いことに、北海道個体群は本州個体群と比較して、より多くのワーカーが兵隊に分化した (likelihood ratio test, month 2: df = 1, $\chi^2 = 3.14$, p = 0.076; month 4: df = 1, $\chi^2 = 7.36$, p = 0.007; month 6: df = 1, $\chi^2 = 5.82$, p = 0.016)。これは、ニンフの存在下でワーカーの兵隊分化数に個体群間 で有意差はみられなかった(本論文 4-3 を参照)ことと対照的である。



図 4-S2. 6 か月間の飼育実験による個体数の推移とカースト分化傾向の個体群間比較。二次 王が繁殖を担うコロニーは、ワーカー500 個体から構成される分集団を作成することで得ら れた。(*a*)総個体数を個体群間で比較。(*b*)ワーカー由来の二次王の個体数を個体群間で比較。 図中の SK は二次王(secondary king)を示す。エラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは 群間に有意差があったことを示している(likelihood ratio test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001; n.s., not significant)。

表 4-S1. RNA-seq	に用いたサンプ	ルと・	その統計量
-----------------	---------	-----	-------

Sample ID	Location	Caste	Weight (mg)	Total read bases (bp)	Total reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Hon_SK_1	Honshu	Secondary king	3.03	4,928,826,462	48,800,262	42.55	57.45	97.21	92.56
Hon_SK_2	Honshu	Secondary king	3.41	4,514,053,398	44,693,598	42.13	57.87	97.50	93.17
Hon_SK_3	Honshu	Secondary king	2.75	5,862,793,662	58,047,462	43.26	56.74	97.27	92.67
Hon_SK_4	Honshu	Secondary king	3.33	6,325,597,882	62,629,682	43.08	56.92	97.30	92.67
Hok_SK_1	Hokkaido	Secondary king	3.11	5,721,156,716	56,645,116	42.82	57.18	97.37	92.86
Hok_SK_2	Hokkaido	Secondary king	3.66	5,403,957,126	53,504,526	41.77	58.23	97.05	92.41
Hok_SK_3	Hokkaido	Secondary king	4.22	4,157,059,000	41,159,000	42.24	57.76	97.02	92.35
Hok_SK_4	Hokkaido	Secondary king	3.46	4,206,763,524	41,651,124	42.79	57.21	97.16	92.47

表 4-S2.2 群間比較で検出された発現変動遺伝子(DEG)のうち、本州個体群の二次王で高発現していた遺伝子の一覧

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN05650	pol: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17.6	8.819197563	3.015681325	67.28197456	2.35E-16	8.57E-13	-
ANN29999	LRRTM3: Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 3	8.121163368	2.390387852	51.9570767	5.67E-13	1.24E-09	-
ANN04564	Ejaculatory bulb-specific protein 3	3.937951013	11.4377789	50.75269026	1.05E-12	1.91E-09	-
ANN18717	Fibronectin	3.262773181	4.553506703	47.87827206	4.54E-12	6.19E-09	-
ANN29998	ISLR2: Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein 2	4.974956841	1.965376422	38.26052265	6.19E-10	6.15E-07	-
ANN06547	CCHa1-R: Neuropeptide CCHamide-1 receptor	2.725963542	4.168312302	31.76048206	1.74E-08	1.59E-05	-
ANN34162	Protein of unknown function	8.450227588	2.66981921	29.22292187	6.45E-08	4.70E-05	-
ANN18845	Lysozyme	3.11163206	4.137376847	29.18555002	6.58E-08	4.70E-05	A1ZBX6
ANN10283	At1g75040: Pathogenesis-related protein 5	2.611436788	5.255607675	26.02203568	3.38E-07	0.000179845	-
ANN34920	mariner¥T: Mariner Mos1 transposase	3.105722377	2.2951087	25.97576845	3.46E-07	0.000179845	-
ANN10341	POL: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412	3.085397149	4.951581371	25.11423845	5.40E-07	0.000268296	-
ANN10732	ZNF271: Zinc finger protein 271	3.24915738	3.313950399	23.73967542	1.10E-06	0.000481903	-
ANN12284	Protein of unknown function	1.75352572	5.92741095	20.73964334	5.26E-06	0.001690501	-
ANN24311	ZNF271: Zinc finger protein 271	6.971123815	1.42228094	20.57233996	5.74E-06	0.001792153	-
ANN27470	Protein of unknown function	1.872382784	5.899294427	20.50417112	5.95E-06	0.001805538	-
ANN32748	pain: Transient receptor potential cation channel protein painless	2.498602426	3.957218812	20.16097145	7.12E-06	0.002046546	-

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN08526	Tnks2: Poly [ADP-ribose] polymerase tankyrase-2	7.334176903	1.741288618	19.42389905	1.05E-05	0.002789318	-
ANN27222	Nrt: Neurotactin	3.266001221	5.979756285	18.1595019	2.03E-05	0.004824448	M9MS15
ANN06566	snk: Serine protease snake	3.897299786	1.081038472	16.90535286	3.93E-05	0.008233592	X2JCP6
ANN20320	Protein of unknown function	3.421960673	3.879178904	16.81058145	4.13E-05	0.008233592	-
ANN34161	Protein of unknown function	6.320704404	0.938969026	16.80360979	4.15E-05	0.008233592	-
ANN32419	Protein of unknown function	5.711953312	0.524703574	15.55590037	8.01E-05	0.013153576	-
ANN17185	ZNF271: Zinc finger protein 271	6.029457872	2.056260224	15.49704721	8.26E-05	0.013274947	Q9VUS0
ANN34997	TY3B-G: Transposon Ty3-G Gag-Pol polyprotein	2.669883935	7.958634465	15.15830541	9.89E-05	0.014999635	-
ANN09858	RDH12: Retinol dehydrogenase 12	3.867073271	1.968879065	14.69797563	0.000126182	0.01790144	-
ANN16545	Rdh11: Retinol dehydrogenase 11	1.416639255	6.118296971	14.40025797	0.000147782	0.020179641	-
ANN06561	CFDP2: Craniofacial development protein 2	5.272903666	0.254877181	14.12625505	0.000170941	0.021968954	-
ANN26042	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein	4.008235298	1.798527518	14.09986042	0.000173357	0.022020326	-
ANN30773	Protein of unknown function	2.82965902	6.892502945	13.49702561	0.000238942	0.028371753	-
ANN21143	Protein of unknown function	6.05758623	0.790123254	13.35197478	0.000258151	0.030095923	-
ANN24328	TY3B-G: Transposon Ty3-G Gag-Pol polyprotein	3.832000433	0.826577705	13.222399	0.000276623	0.03147743	-
ANN12641	Nep1: Neprilysin-1	2.562666025	5.09178576	12.90240161	0.000328161	0.036538936	-
ANN18793	TIGD4: Tigger transposable element-derived protein 4	3.449611473	1.176314572	12.84806751	0.000337828	0.036538936	-
ANN12180	Protein of unknown function	2.851503239	1.835496702	12.68162821	0.000369266	0.038367454	-
ANN06739	psh: Serine protease persephone	3.299923314	2.786636721	12.47470797	0.000412499	0.041556522	A1ZAG9

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN17762	ZSCAN12: Zinc finger and SCAN domain-containing protein 12	5.263223721	2.665152942	12.35291382	0.000440299	0.042470855	-
ANN08743	Protein of unknown function	6.429098958	1.041852776	12.11478948	0.000500235	0.045920719	-
ANN20797	Protein of unknown function	4.709521109	1.182428433	11.9814847	0.000537318	0.048111943	-

表 4-S3.2 群間比較で検出された発現変動遺伝子(DEG)のうち、北海道個体群の二次王で高発現していた遺伝子の一覧

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN25151	PGBD4: PiggyBac transposable element-derived protein 4	-9.513732908	3.55976873	90.78668875	1.60E-21	1.75E-17	-
ANN01495	IGFALS: Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	-6.52085057	3.582751371	76.42451408	2.29E-18	1.25E-14	-
ANN16384	POL: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412	-8.258057165	2.39580777	59.14249641	1.47E-14	4.01E-11	-
ANN11433	pol: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17.6	-4.258056707	3.007324876	49.47965166	2.00E-12	3.13E-09	-
ANN05034	pol: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 17.6	-5.509027077	3.649877457	43.82986944	3.58E-11	4.35E-08	-
ANN24445	grik2: Glutamate receptor ionotropic, kainate 2	-3.153730004	4.141882777	39.20888651	3.81E-10	4.16E-07	-
ANN34212	Gld: Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	-2.509769452	7.252547053	29.75195117	4.91E-08	4.13E-05	-
ANN30956	C13G5.2: Uncharacterized protein C13G5.2	-3.51861341	5.053140218	29.09592305	6.89E-08	4.70E-05	-
ANN27075	PNLIPRP2: Pancreatic lipase-related protein 2	-2.727443267	7.300932341	28.8826373	7.69E-08	4.94E-05	Q9VB92
ANN29389	PGBD4: PiggyBac transposable element-derived protein 4	-4.562111316	1.020252843	27.22260856	1.81E-07	0.000110045	-
ANN06274	Chymotrypsin BI	-2.244985464	6.907666024	26.40375064	2.77E-07	0.000159262	-
ANN03892	TIGD6: Tigger transposable element-derived protein 6	-3.254074862	2.454603419	24.93318065	5.94E-07	0.000281897	-
ANN06549	CCHa1-R: Neuropeptide CCHamide-1 receptor	-2.448358515	3.1187475	24.65386626	6.86E-07	0.000312276	-
ANN11677	Protein of unknown function	-6.907628967	2.342811336	23.08583994	1.55E-06	0.000650934	-
ANN31430	Protein of unknown function	-2.787041429	3.891518133	22.97285606	1.64E-06	0.000664766	-
ANN24324	KBP: Probable glutamate receptor	-3.403722713	3.322063283	22.74786244	1.85E-06	0.000720631	-

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN24926	TIGD6: Tigger transposable element-derived protein 6	-2.625979941	3.426160251	22.30592171	2.32E-06	0.00087576	-
ANN19242	abfB: Extracellular exo-alpha-L-arabinofuranosidase / M145	-2.091523138	7.057309215	22.08615986	2.61E-06	0.000949232	-
ANN08850	R1A1-element¥ORF2: Putative 115 kDa protein in type-1 retrotransposable element R1DM	-2.415711641	2.851613033	21.68686389	3.21E-06	0.001126821	-
ANN05803	Ttpal: Alpha-tocopherol transfer protein-like	-2.316107147	7.149648155	21.63323126	3.30E-06	0.001126821	Q81099
ANN05880	FucTA: Glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase A	-1.986452599	6.223915836	21.40858587	3.71E-06	0.001228472	Q9W0F6
ANN06713	Protein of unknown function	-2.114347496	3.942541929	20.36249038	6.41E-06	0.001891726	-
ANN01751	Gld: Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	-1.810497648	8.791021336	19.90663263	8.13E-06	0.00227773	-
ANN30942	Protein of unknown function	-1.571490625	5.662972253	19.83548899	8.44E-06	0.002304992	Q86BL9
ANN26380	Tret1-2: Facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog	-1.818102328	6.393401221	19.2995545	1.12E-05	0.002906107	A0A1Z1CGZ4
ANN01754	CYP6J1: Cytochrome P450 6j1	-2.417145529	5.647916817	19.02434911	1.29E-05	0.00327875	-
ANN20226	Protein of unknown function	-1.78558886	4.489463011	18.92204281	1.36E-05	0.003380734	Q2PE11
ANN24919	Protein of unknown function	-2.114064003	8.112796102	18.2003202	1.99E-05	0.004824448	-
ANN32772	LOXL2: Lysyl oxidase homolog 2	-2.016302383	5.795498637	18.08384254	2.11E-05	0.004913188	Q9W2C9
ANN24918	Protein of unknown function	-3.286379013	4.07555924	17.99885889	2.21E-05	0.005030443	-
ANN10141	Myrosinase 1	-2.005553606	7.47851299	17.80459349	2.45E-05	0.005457353	-
ANN24343	nrf-6: Nose resistant to fluoxetine protein 6	-2.414068386	3.087845841	17.31527639	3.17E-05	0.006917758	-
ANN01547	Protein of unknown function	-1.709904293	8.704777708	17.22438297	3.32E-05	0.007114435	-
ANN19011	CIB1: Calcium and integrin-binding protein 1	-1.678664149	6.334976629	16.80966027	4.13E-05	0.008233592	-
ANN02159	Ance: Angiotensin-converting enzyme	-1.710251245	5.752568744	16.72105725	4.33E-05	0.008446153	-

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN07660	SETMAR: Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR	-1.945012685	3.824384934	16.19680657	5.71E-05	0.010941301	-
ANN05437	Venom carboxylesterase-6	-1.791132383	7.362942046	16.11773784	5.95E-05	0.011190013	-
ANN24214	Protein of unknown function	-1.815298917	7.200395909	16.05277608	6.16E-05	0.011190013	-
ANN19062	Protein of unknown function	-1.34093205	6.864825621	16.04423	6.19E-05	0.011190013	-
ANN24404	glr-3: Glutamate receptor ionotropic, kainate glr-3	-2.151363515	5.715406079	16.02579208	6.25E-05	0.011190013	-
ANN30944	Protein of unknown function	-1.74486166	6.379719155	15.80480068	7.02E-05	0.012373034	-
ANN26413	Protein of unknown function	-2.789586687	1.629318524	15.76352697	7.18E-05	0.012445193	-
ANN06285	GGH: Gamma-glutamyl hydrolase	-1.803611332	5.171741089	15.69716637	7.43E-05	0.012688132	Q8IQM9
ANN25345	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein	-2.169603143	6.66289117	15.54529301	8.06E-05	0.013153576	-
ANN27876	ANK3: Ankyrin-3	-3.843540054	0.267700262	15.54241622	8.07E-05	0.013153576	-
ANN08478	mask: Ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask	-1.443187886	5.359440328	15.31880854	9.08E-05	0.014376597	-
ANN20025	Caspase-1	-1.501474204	5.953864921	15.27625927	9.29E-05	0.014494042	Q7KHI6
ANN15797	Protein of unknown function	-6.787414549	0.923217164	15.18040141	9.77E-05	0.014999635	Q9VE07
ANN29964	APOD: Apolipoprotein D	-3.249396831	6.516921168	15.10809617	0.000101527	0.01519288	-
ANN12369	mtmr4: Myotubularin-related protein 4	-2.146391008	3.359705585	15.0565154	0.000104339	0.01540276	-
ANN20816	Protein takeout	-1.887733884	3.40750987	14.86348148	0.000115579	0.016834468	Q9VNT0
ANN03167	GVQW3: Protein GVQW3	-2.231593901	1.952924119	14.78909578	0.000120229	0.017281294	-
ANN27694	Gemin7: Gem-associated protein 7	-2.136761691	3.876963894	14.50863586	0.000139518	0.019513493	-
ANN15052	Protein of unknown function	-1.803004528	11.14414466	14.48717082	0.000141117	0.019513493	Q9V3A0

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN30589	Gel: Gelsolin	-1.566175054	8.954833092	14.37543765	0.000149743	0.020194956	-
ANN32111	Protein of unknown function	-3.326053562	1.667004885	14.2947808	0.000156298	0.020821895	-
ANN11819	Protein of unknown function	-5.252473114	0.076260942	14.15727032	0.000168146	0.021967692	-
ANN15204	pol: RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey	-1.518221524	4.990425181	14.14862668	0.00016892	0.021967692	-
ANN07907	WARS2: TryptophantRNA ligase, mitochondrial	-1.64443019	6.357040036	13.9953875	0.00018326	0.023010671	Q9VVL8
ANN18211	LINE-1 reverse transcriptase homolog	-4.706887642	1.247002721	13.89821645	0.000192982	0.023956023	-
ANN30556	Protein of unknown function	-6.589420644	0.693469652	13.64929722	0.000220324	0.027042886	-
ANN16455	GstD1: Glutathione S-transferase 1-1	-1.756982401	6.544355381	13.60253063	0.000225881	0.027416913	-
ANN14179	Protein of unknown function	-1.579177379	6.70720466	13.51408519	0.00023678	0.028371753	-
ANN05319	pol: RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey	-7.639035245	1.527500216	13.34601312	0.000258973	0.030095923	-
ANN24917	Protein of unknown function	-4.722076098	-0.204659726	13.29893042	0.000265558	0.030536325	-
ANN01819	Protein of unknown function	-1.232327325	7.059641936	12.91143239	0.000326581	0.036538936	Q9VU22
ANN11103	AGAP009593: Zinc carboxypeptidase A 1	-1.68188608	9.486780602	12.88004775	0.000332104	0.036538936	Q9VCM8
ANN24414	KBP: Probable glutamate receptor	-2.233200598	1.869325495	12.85639091	0.000336329	0.036538936	-
ANN19713	Protein of unknown function	-3.235018974	1.124932423	12.79675758	0.000347221	0.037186648	-
ANN14864	Lip1: Lipase 1	-2.039113183	3.962426979	12.77454508	0.000351368	0.037265482	-
ANN12375	RTase: Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS	-2.437243723	3.925473996	12.685454	0.000368511	0.038367454	-
ANN25322	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein	-2.019840025	9.092053933	12.66635332	0.000372295	0.038367454	-
ANN23581	Amacr: Alpha-methylacyl-CoA racemase	-1.419350532	7.567171584	12.45537251	0.000416791	0.041556522	Q9VDL4

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN30323	POSTN: Periostin	-1.504547748	6.83267198	12.44702323	0.000418659	0.041556522	Q86B96
ANN20024	Protein of unknown function	-4.041227397	1.67320442	12.43977216	0.000420287	0.041556522	-
ANN25885	Protein of unknown function	-1.752471751	4.714728768	12.43102309	0.000422261	0.041556522	-
ANN04475	AKR1E2: 1,5-anhydro-D-fructose reductase	-1.428586944	7.499239291	12.3746852	0.000435194	0.042446974	D2A6K3
ANN04994	Protein of unknown function	-2.130352542	3.174927909	12.33754012	0.00044394	0.042470855	-
ANN08693	ANKRD1: Ankyrin repeat domain-containing protein 1	-2.009394256	2.992199995	12.32428752	0.000447103	0.042470855	-
ANN13348	Mal-A3: Maltase A3	-1.311815738	5.717265867	12.27724269	0.000458515	0.043179494	-
ANN12221	Protein of unknown function	-2.116046259	3.956682153	12.2209899	0.000472549	0.044120684	-
ANN27741	CYP4C1: Cytochrome P450 4C1	-1.439935934	8.812083765	12.20096122	0.000477649	0.044218962	-
ANN17773	Protein of unknown function	-2.800177781	0.660861191	12.06584563	0.00051354	0.046749267	-
ANN05801	TTPAL: Alpha-tocopherol transfer protein-like	-1.466758447	6.674529748	12.01681834	0.000527226	0.04759851	-
ANN18911	UGT2B20: UDP-glucuronosyltransferase 2B20	-1.547868621	6.385865831	11.95181568	0.000545942	0.048486709	-
ANN13617	APN1: Aminopeptidase N	-1.166475742	7.709463255	11.93121238	0.000552012	0.048630513	-

本州個体群の創設王のトランスクリプトームデータを加えた発現量解析

先行研究(Mitaka et al. 2016)で公開されたヤマトシロアリの RNA-seq データベースから本 州個体群の創設王のデータを入手し、本州個体群の創設王と二次王、北海道個体群の二次王 の3 種類の王について遺伝子発現解析を行った。創設王のトランスクリプトームデータは 日本 DNA データバンク(DNA Data Bank of Japan: DDBJ)に登録されている(BioProject PRJDB3531, BioSample SAMD00026264-SAMD00026323, Sequence Read Archive DRR030795-DRR030854)。得られた生データに対して fastp v0.23.2(Chen et al. 2018)を用いてトリミング を行い、低品質なリードを除去した。残ったリードは STAR v2.7.9(Dobin et al. 2013)を用い てヤマトシロアリのリファレンスゲノム上にアラインメントされた。遺伝子の発現量は RSEM v1.3.3(Li and Dewey 2011)を用いて推定した。生成されたカウントは、TMM(trimmed mean of M-value)正規化法(Robinson and Oshlack 2010)を用いて正規化し、R v4.0.5(R Core Team 2021)の edgeR バッケージ v3.4.2(Robinson et al. 2010)を用いて遺伝子発現解析を行った。本 州個体群の創設王と北海道個体群の二次王を持続可能(sustainable)群、本州個体群の二次王 を持続不可能(unsustainable)群として 2 群間比較を行い、FDR(false discovery rate) < 0.05 を有 意水準として発現変動遺伝子(differentially expressed gene: DEG)を抽出した。

計 12 サンプルのトランスクリプトームデータ(Honshu PK: N = 4; Honshu SK: N = 4; Hokkaido SK: N=4)を用いて網羅的な遺伝子発現の2群間比較を行った結果、持続可能群と 持続不可能群で 17 の DEG が検出された。そのうち持続可能群で有意に高発現していたも のは2遺伝子(表 4-S4)、持続不可能群で有意に高発現していたものは 15遺伝子(表 4-S5)で あった。持続可能群で高発現していた2遺伝子はともに転移因子(transposable element: TE)に 関わるものであった。持続不可能群で高発現していた 15遺伝子の中には、同じく転移因子 に関わるものや、二次王のみの個体群間比較でも検出された *Ejaculatory bulb-specific protein* 3遺伝子のような雄の繁殖形質に関わる可能性があるものがみられた。

表 4-S4.2 群間比較で検出された発現変動遺伝子(DEG)のうち、持続可能群で高発現していた遺伝子の一覧

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN08850	R1A1-element¥ORF2: Putative 115 kDa protein in type-1 retrotransposable element R1DM	-3.265158653	3.959085974	26.45965349	2.69E-07	0.000567586	-
ANN16384	POL: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412	-7.019810489	2.090803813	15.904676747	0.000066614	0.043906894	-

表 4-85.2 群間比較で検出された発現変動遺伝子(DEG)のうち、持続不可能群で高発現していた遺伝子の一覧

Gene ID	Gene name	logFC	logCPM	LR	P-value	FDR	UniProt ID
ANN34920	Similar to mariner¥T: Mariner Mos1 transposase	3.398447816	1.990689984	40.15763282	2.34E-10	2.47E-06	-
ANN34162	Protein of unknown function	8.165102625	2.310658935	32.4824926	1.20E-08	6.34E-05	-
ANN04564	Ejaculatory bulb-specific protein 3	4.143581406	10.96380491	30.1074192	4.09E-08	0.000143694	-
ANN27222	Nrt: Neurotactin	3.417183032	5.57531746	27.03545653	2.00E-07	0.000526661	M9MS15
ANN32419	Protein of unknown function	5.422545492	0.439484143	22.24088105	2.40E-06	0.004227157	-
ANN06566	snk: Serine protease snake	3.567425792	0.9389731	20.89643349	4.85E-06	0.007004806	X2JCP6
ANN34161	Protein of unknown function	6.033424181	0.776914633	20.72074644	5.31E-06	0.007004806	-
ANN18793	TIGD4: Tigger transposable element-derived protein 4	3.976754564	0.971695789	18.66988882	1.55E-05	0.018211485	-
ANN12180	Protein of unknown function	3.524489139	1.555056364	16.94595401	3.85E-05	0.039648178	-
ANN10341	POL: Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412	2.750585286	4.663406347	16.79322526	4.17E-05	0.039648178	-
ANN27401	ANK1: Ankyrin-1	1.477007299	5.421591013	16.6371894	4.53E-05	0.039648178	E0A9E1
ANN21143	Protein of unknown function	5.757887929	0.637013004	16.49128903	4.89E-05	0.039648178	-
ANN15120	resilin: Pro-resilin	4.480281136	0.029771912	16.23046471	5.61E-05	0.04224797	Q9VE45
ANN18992	Protein of unknown function	4.450526143	0.021439602	15.92821261	6.58E-05	0.043906894	-
ANN32821	Protein of unknown function	2.684827684	1.130736717	15.6843581	7.48E-05	0.046427553	-

第5章 非巣仲間排除行動に対する王と女王の影響

5-1 はじめに

社会性昆虫の社会システムは、主に血縁者から構成されるコロニー内個体間の利他行動 によって維持されている(Wilson 1971, 1975)。圧倒的多数を占める非生殖カースト(ワーカー や兵隊)は、次世代の生殖カースト(王や女王)に対する利他行動を通して間接的に適応度利 益を得ている(Hamilton 1964)。しかしながら、利他行動は対象が血縁者であるという保証が あってこそ行為者にとって適応的である。そのためには、ある個体が血縁者であるかっかを 識別して侵入者を排除し、労働寄生による資源の漏洩および適応度利益の減少を防ぐ機構 が必要であると考えられている(Breed 2014)。実際に、多くの社会性昆虫が巣仲間と非巣仲 間を区別することが知られている(Breed 2014)。実際に、多くの社会性昆虫が巣仲間と非巣仲 間を区別することが知られている(Wallis 1964; Crozier and Pamilo 1996; Abbot 2022)。シロア リでは、コロニー間の敵対性がしばしば報告されている一方で、同種異巣の個体どうしが遭 遇したときの反応は変化に富み、殺し合う場合(Thorne and Haverty 1991; Shelton and Grace 1996)から敵対性を示さずコロニーが融合する場合(Matsuura and Nishida 2001; Simkovic et al. 2018)まで様々である。昆虫の社会は、非巣仲間に対して攻撃的な行動を示すとき「閉じて いる」、非巣仲間を受け入れるとき「開かれている」と定義される(Wallis 1964)。シロアリの コロニーがなぜ、そしてどのように閉じている社会と開かれている社会を使い分けている のかに関しては未解明な点が多い。

シロアリの攻撃行動は、遺伝的要因だけでなく、実験条件を含む社会環境要因にも大き く左右される(Grace 1996; Shelton and Grace 1997a, b; Polizzi and Forschler 1998, 1999; Matsuura 2001; Matsuura and Nishida 2001; Bulmer and Traniello 2002; Simkovic et al. 2018)。例えば、一 般的に用いられるシャーレを用いた敵対性試験は、通常は巣外に出ないシロアリの行動を 撹乱された環境下で評価する不適切な手法であるという指摘がある(Matsuura 2002; Cornelius and Osbrink 2003; Messenger and Su 2005; Chouvenc et al. 2011; Chouvenc and Su 2017; Simkovic et al. 2018)。また、コロニーサイズ(Polizzi and Forschler 1998)や侵入コロニーのニン フ率(Matsuura and Nishida 2001)といった社会的な要因も、敵対性に影響を与えることが知ら れている。シロアリの攻撃性に関する研究がこれまで矛盾した結果を報告してきた理由の ひとつに、実際の巣を取り巻く社会要因および環境要因を反映した条件下での実験が困難 であることが挙げられる。このように、シロアリの攻撃性に影響を与える可能性がある要因 を明らかにすることが重要である。

本研究では、ヤマトシロアリ(Reticulitermes speratus)において、王と女王の存在がワーカ ーおよび兵隊の非巣仲間への攻撃行動に及ぼす影響に着目した。実験条件と自然条件とで しばしば異なる重要な要因は、守るべき王と女王の存在である。しかし、従来の研究におい て、王と女王の存在が利他的カーストの非巣仲間に対する攻撃性に及ぼす影響は考慮され てこなかった。生殖カーストの存在によって非生殖カーストの攻撃性が異なるのであれば、 王と女王を加えることで、ワーカーと兵隊のみを用いていた従来のアッセイによるデータ よりも敵対性をより明確に検出することが可能になると考えられる。王と女王の存在がシ ロアリの攻撃行動に与える影響を調べるために、コロニーを王と女王を含む集団と、王と女 王を含まない集団に分けて、侵入者に対するワーカーおよび兵隊の攻撃性を比較した。

5-2 材料と方法

サンプルの採集と処理

ヤマトシロアリは、日本で最も普通かつ広範にみられるシロアリ種である。本実験には、 2018年6月に京都府の二次林で巣材ごと採集した3つの成熟コロニーを用いた。すべての コロニーは実験室で餌として褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を与え、25℃の全暗条件下 で管理した。本研究では、特別な許可の取得は不要であった。また、実験動物の取り扱いに ついては、京都大学における動物実験の実施に関する規程に従った。

実際の巣構造を再現して攻撃行動を観察するため、ガラス板とスチロール棒を使用して

200×200×7 mm のガラスセル(図 5-1)を作成した。ガラスセル内の 16 個の部屋にはそれぞ れ褐色腐朽材培地(Mitaka et al. 2023)を詰め、一角には侵入者を導入するための 4 mm の入り 口を設けた。3 コロニーをそれぞれ王と女王を含む集団、王と女王を含まない集団に分けた。 王と女王を含む集団は、王(創設王)1 個体、女王(二次女王)20 個体、兵隊 20 個体、ワーカー 500 個体から構成され、王と女王を含まない集団は兵隊 20 個体、ワーカー521 個体から構 成された。創設王と二次女王を生殖カーストとして用いたのは、単為生殖による女王位継承 (asexual queen succession: AQS)を特徴とするヤマトシロアリの成熟コロニーでは主要な繁殖 カーストである(Matsuura 2017)ためである。ヤマトシロアリは撹乱された状況では通常の攻 撃行動を行わない可能性があるため、Matsuura(2001)の実験手法に従い、各集団をガラスセ ルに導入後1週間静置した。

攻撃性試験

すべての攻撃性試験は 2018 年 7 月、ガラスセルにシロアリを導入してから 3 週間以内に 実施した。由来が同じコロニーのペアを含む 6 集団の全ペア間で、ランダムな順序で攻撃性 試験を行った。他種の侵入者としては、イエシロアリ(Coptotermes formosanus)のワーカーを 用いた。まず、一方のガラスセルから無作為に 1 個体のワーカーを選び、他方のガラスセル の入り口から導入した。侵入個体を識別するため、腹部を青色のペイントマーカーで標識し た。その後、侵入者とホスト集団の間の行動を 1 分間動画撮影した。攻撃性試験のスコア は、後退/無視/アンテネーション/グルーミングを 0 点(攻撃性なし)、押し返しを 1 点(低い攻 撃性)、噛みつきを 2 点(高い攻撃性)として記録した。各試験の最高得点を記録した。この手 法は、同属のシロアリ種 *R. flavipes* を対象とした先行研究(Simkovic et al. 2018)で用いられて いるスコアを改変したものである。また、侵入者と接触した個体のうち攻撃行動を示したも のの割合(アクティブ率)を調べた。ワーカーと兵隊の行動を別々に観察したのは、この 2 つ の非生殖カーストはともにコロニー防衛に参加する(Shelton and Grace 1996)が、分化能の点 で異なるためである(ワーカーは王や女王の不在下で生殖カーストに分化できるが、兵隊は 分化できない)。侵入者としては毎回異なる個体を用い、各ペア1分間隔で10回の繰り返し を行った。

統計解析

すべての統計解析は R v4.0.5(R Core Team 2021)を用いて行った。攻撃性試験のスコアは 順序ロジスティック回帰モデル(ordinal logistic regression model)を用いて解析した。順序ロジ スティック回帰モデルでは、処理区とコロニーを固定効果とした。処理区は、ホストにおけ る王と女王の有無と侵入者タイプの組み合わせを交互作用込みで固定効果とした。また、コ ロニーも固定効果に含めることによりコロニー間差を考慮した。さらに、各処理区について、 カーストの効果や、侵入者として用いた集団における王と女王の有無の効果も調べた。侵入 者と接触した個体のうち攻撃行動を示したものの割合(アクティブ率)は、二項分布を仮定し た一般化線形混合モデル(generalized linear mixed model: GLMM)を用いて解析した。GLMM では、処理区(ホストにおける王と女王の有無と侵入者タイプの組み合わせ)を固定効果、コ ロニーをランダム効果とした。モデルに対する各固定効果の寄与を調べるために尤度比検 定(likelihood ratio test)を実施した。効果が有意であった場合、各群間の差異を検出するため に、multcomp パッケージ(Hothorn et al. 2008)の glht 関数を用いて Tukey's HSD 検定による多 重比較を実施した。図中のエラーバーは標準誤差(standard error: SE)を示している。異なる文 字は、有意水準 p < 0.05 で群間に有意差があったことを表している。

94



図 5-1. 攻撃性試験に用いたガラスセル。上面図(左)と入口の拡大図(右)を示す。異なるタイ プの侵入者(同種の巣仲間、同種の非巣仲間、他種)を入口から導入した際のホストの攻撃性 を3段階で評価した。攻撃性試験のスコアは、後退/無視/アンテネーション/グルーミングを 0点(攻撃性なし)、押し返しを1点(低い攻撃性)、噛みつきを2点(高い攻撃性)として記録し た。他種の侵入者としては、イエシロアリ(Coptotermes formosanus)のワーカーを用いた。

5-3 結果

侵入者に対するワーカーと兵隊の攻撃性

王と女王を含まない集団では同種の非巣仲間に対する攻撃性の欠如がしばしば観察され た一方で、王と女王を含む集団では同種の非巣仲間に対して一貫して高い攻撃性を示した。 ワーカー・兵隊ともに、攻撃性試験のスコアに対する処理区(ホストにおける王と女王の有 無と侵入者タイプの組み合わせ)の効果は有意であった(likelihood ratio test, worker: df = 5, χ^2 = 111.20, p < 0.001, 図 5-2a; soldiers: df = 5, χ^2 = 249.37, p < 0.001, 図 5-2b)。王と女王を含む 集団では、王と女王を含まない集団と比較して同種の非巣仲間に対する攻撃性が有意に高 かった(Tukey's HSD test, worker: p < 0.001, 図 5-2a; soldier: p < 0.001, 図 5-2b)。なお、同種の 巣仲間に対する攻撃性は、王と女王の有無で有意差はみられなかった(Tukey's HSD test, worker: p = 1.000, 図 5-2a; soldier: p = 0.254, 図 5-2b)。同様に、他種に対する攻撃性について も、王と女王の有無で有意差はみられなかった(Tukey's HSD test, worker: p = 0.874, 図 5-2a; soldier: p = 0.999, 図 5-2b)。

ワーカーと兵隊はともにコロニー防衛に参加したが、兵隊の方が同種の非巣仲間および 他種の侵入者に対して高い攻撃性を示した。攻撃性スコアに対するカーストの効果は、同種 の非巣仲間に対する攻撃性(likelihood ratio test, royal-present: df = 1, χ^2 = 48.55, p < 0.001; royalabsent: df = 1, χ^2 = 14.10, p < 0.001)および他種に対する攻撃性(royal-present: df = 1, χ^2 = 18.81, p < 0.001; royal-absent: df = 1, χ^2 = 20.16, p < 0.001)において有意であった。なお、同種の巣仲 間に対する攻撃性については、カースト間で有意差はみられなかった(likelihood ratio test, royal-present: df = 1, χ^2 = 0.20, p = 0.652; royal-absent: df = 1, χ^2 = 0.07, p = 0.797)。さらに、侵 入者として用いた集団における王と女王の有無が攻撃性試験のスコアに影響を与えるかど うか調べたところ、同種の巣仲間に対する攻撃性[Tukey's HSD test, worker: p = 1.000 (royalpresent), p = 0.997 (royal-absent); soldier: p = 1.000 (royal-present), p = 0.342 (royal-absent)]におい ても、同種の非巣仲間に対する攻撃性[Tukey's HSD test, worker: p = 0.482 (royal-present), p = 0.994 (royal-absent); soldier: p = 1.000 (royal-present), p = 0.369 (royal-absent)]においても有意差 はみられなかった。

侵入者と接触した個体のうち攻撃行動を示したものの割合(アクティブ率)

ワーカー・兵隊ともに、アクティブ率に対する処理区(ホストにおける王と女王の有無と 侵入者タイプの組み合わせ)の効果は有意であった(likelihood ratio test, worker: df = 5, χ^2 = 235.48, p < 0.001, 図 5-3a; soldiers: df = 5, χ^2 = 263.15, p < 0.001, 図 5-3b)。王と女王を含む集 団では、王と女王を含まない集団と比較して同種の非巣仲間に対するアクティブ率が有意 に高かった(Tukey's HSD test, worker: p < 0.001, 図 5-3a; soldier: p < 0.001, 図 5-3b)。なお、同 種の巣仲間に対するアクティブ率は、兵隊では王と女王の有無でわずかに有意差がみられ たものの、ワーカーでは有意差がみられなかった(Tukey's HSD test, worker: p = 0.943, 図 5-3a; soldier: p = 0.016, 図 5-3b)。他種に対するアクティブ率についても、王と女王の有無で有 意差はみられなかった(Tukey's HSD test, workers: p = 0.989, 図 5-3a; soldiers: p = 0.888, 図 5-3b)。



図 5-2. 侵入者(同種の巣仲間、同種の非巣仲間、他種)に対するワーカーおよび兵隊の攻撃性 を王と女王の存在下/不在下で比較。(a)ワーカーの攻撃性。(b)兵隊の攻撃性。攻撃性試験の スコアは、後退/無視/アンテネーション/グルーミングを0点(攻撃性なし)、押し返しを1点 (低い攻撃性)、噛みつきを2点(高い攻撃性)として記録した。図中のエラーバーは標準誤差 を表す。異なる文字は群間に有意差があったことを示している(Tukey's HSD test, p < 0.05)。



図 5-3. 侵入者(同種の巣仲間、同種の非巣仲間、他種)に対するワーカーおよび兵隊のアクテ ィブ率(侵入者と接触した個体のうち攻撃行動を示したものの割合)を王と女王の存在下/不 在下で比較。(a)ワーカーのアクティブ率。(b)兵隊のアクティブ率。異なる文字は群間に有 意差があったことを示している(Tukey's HSD test, *p* < 0.05)。

5-4 考察

シロアリにおいて、王と女王の存在下では不在下と比較して、ワーカーや兵隊の非巣仲 間に対する攻撃性が高いことを発見した。また、巣内に王と女王が存在することにより、非 巣仲間と接触したワーカー・兵隊のうち、攻撃行動を示す個体の割合が増加することも明ら かになった。本研究は、シロアリにおいて王と女王の存在が同種の非巣仲間への攻撃性に影 響を与えることを明確に示した初めての報告である。本研究の結果は、シロアリにおいて 様々な社会要因および環境要因がコロニーの敵対性に影響を与える可能性を指摘した先行 研究(Grace 1996; Shelton and Grace 1997a, b; Polizzi and Forschler 1998, 1999; Matsuura 2001; Matsuura and Nishida 2001; Bulmer and Traniello 2002; Simkovic et al. 2018)にも矛盾しない。

社会性昆虫における文脈依存的な行動の変化は、しばしば分化能を有する個体の利己性 の観点から議論されてきた(Abbot et al. 2001; Korb and Lenz 2004; Ishikawa and Miura 2012)。 すなわち、直接適応度利益が利他行動によって得られる包括適応度利益を上回るという条 件下では、分化能を有する個体が利己的に行動することが適応的である可能性がある。例え ば、社会性アブラムシ Pemphigus obesinymphae では、他のコロニーに導入された個体はコロ ニー防衛に参加せず、自らの成長と繁殖に投資することが知られている(Abbot et al. 2001)。 シロアリ種 Cryptotermes secundus でも、餌が不足して巣の状態が悪化するとワーカーは有翅 虫に分化して自身の繁殖を優先するようになる(Korb and Lenz 2004)。また、オオシロアリ (Hodotermopsis sjostedti)は、生殖カーストへの分化能を有するワーカーは王と女王の存在下 で外敵のアリ(Formica japonica)に対して高い攻撃性を示すが、分化能を有しない兵隊の攻撃 性は王と女王の存在に依存しないことがわかっている(Ishikawa and Miura 2012)。しかしなが ら、ヤマトシロアリを用いた本研究では、生殖カーストへの分化能を有するワーカーだけで なく、分化能を有しない兵隊についても、王と女王の不在下で攻撃性が低下した。これらの 結果は、攻撃性の低下が単に分化能を有する個体の利己性だけでは説明できないことを示 唆している。 シロアリの王や女王が生産するフェロモンが引き金となり、ワーカーおよび兵隊の認識 あるいは行動発現の閾値が変化する可能性がある。ヒアリの仲間(Solenopsis invicta)を用いた 先行研究(Vander Meer and Alonso 2002)でも、女王アリが生産するフェロモンが巣仲間認識の 鍵となる物質に対するワーカーの感受性を変化させることが示唆されている。シロアリの ワーカーと兵隊の攻撃性が王や女王のフェロモンによって制御されている場合、王室から の距離に応じて攻撃性が変化する可能性がある。巣内の位置に応じて個体の攻撃性を変化 させることで、コロニーの防衛コストを削減することができると推測される。この仮説は、 実際の巣の規模を反映した大規模な実験装置(章末の補足資料を参照)を用いて攻撃性試験 を行うことで検証できるかもしれない。また、王と女王を含む集団と含まない集団の両方で、 ワーカー・兵隊ともに他種のシロアリに対しては一貫して高い攻撃性を示した。これらの結 果は、王と女王の不在下でもワーカーおよび兵隊が侵入者を攻撃する能力を失っていない ことを意味している。それでは、なぜ同種の非巣仲間に対する攻撃性は王と女王の存在に影 響されるのだろうか。王と女王の有無によって、個体(あるいはコロニー)にとって脅威とな るものが異なる可能性がある。

ワーカーと兵隊はともにコロニー防衛に参加したが、侵入者に対する攻撃性は兵隊の方 がワーカーよりも高い傾向にあった。シロアリのコロニー防衛におけるワーカーと兵隊の 役割の違いについては、先行研究においてもしばしば議論されている(Thorne 1982; Binder 1988)。特に、*Reticulitermes* 属のシロアリ種に関しては、兵隊が額腺分泌物(frontal secretion) を防衛に用いないことや兵隊率が低いことを挙げて、兵隊よりむしろワーカーの方が防衛 の主力であると述べられることもあった(Zalkow et al. 1981)。しかしながら、*Reticulitermes* 属 の兵隊が行う、頭部を栓のようにして巣の入り口を塞ぐフラグモシス防衛(phragmotic defense)は、巣の構造があってはじめて成り立つものである(Deligne et al. 1981; Matsuura 2002; Yanagihara et al. 2018)。本研究では、巣の構造やカーストの構成など、実際のコロニーに特 徴的な社会環境要因を考慮した条件下で攻撃行動の評価を行うことにより、ヤマトシロア リの兵隊がコロニー防衛において主要な役割を担っていることを示した。

社会性昆虫の巣仲間認識に関する先行研究の多くは、鍵となる物質の特定に焦点を当て てきた(Shelton and Grace 1996; Richard and Hunt 2013)。多くのアリ種では体表炭化水素 (cuticular hydrocarbon: CHC)が巣仲間認識において重要な役割を果たすことが示されている (Richard and Hunt 2013)が、シロアリでは敵対性パターンと CHC パターンが一致しないとい う報告もある(Su and Haverty 1991)。一般的に、シロアリはコロニー特有の化学成分を「コロ ニーマーカー」として巣仲間認識に利用していると考えられている(Shelton and Grace 1996, 1997b)。実験室内でのアッセイにおいて常に王と女王の存在を考慮することは困難かもしれ ないが、野外コロニーの社会環境を反映して敵対性をより明確に検出することがすること が可能になれば、しばしば敵対性の欠如を報告してきた先行研究の結果を再解釈できる可 能性がある。本研究の結果は、シロアリにおける巣レベルの自他認識メカニズムを解明する 上で重要な基盤情報を提供するものである。

5-5 補足資料





図 5-S1.本研究で用いたガラスセル(図 5-1)の応用例。中央のガラスセルは左右のガラスセ ルを繋ぐ通路となっており、折り返し回数を増やしたり、通路セルの枚数を増やしたりする ことにより距離の調節が可能。ガラスセルの一角には侵入者を導入するための入り口を設 けておく。例えば、王と女王が存在するセル(左)と王と女王が存在しないセル(右)で侵入者 に対するワーカーおよび兵隊の攻撃行動を比較することで、シロアリの攻撃性が王室から の距離に応じて変化するか検証を行うことができる。

第6章 総合考察

本学位論文では、社会性昆虫シロアリの資源分配機構を、巣レベルのマクロな視点から 現象を捉える社会生理学的アプローチにより理解することを目的として研究を行った。さ らに、資源分配機構の解明を糸口として、シロアリの繁殖分業を支える様々な巣レベルの機 構を発見した。最後に、本研究を総合的に考察するとともに、シロアリの社会生理学的研究 の今後の展望について述べる。

第2章と第3章では、コロニー内個体間で受け渡される特定の物質の利用能力が王と女 王に限定されることで資源が繁殖を行う個体に集中するという仮説を立て、検証を試みた。 まず、RNA-seq を用いた遺伝子発現解析を行い、繁殖において重要な窒素化合物の代謝に関 連する遺伝子の発現量をカースト間で比較した。その結果、窒素代謝産物である尿酸を分解 する酵素(尿酸オキシダーゼ)の遺伝子が、王と女王のみで発現していることを発見した。そ こで、RNA 干渉を用いた尿酸オキシダーゼ遺伝子のノックダウンおよび尿酸オキシダーゼ 阻害剤の投与を行い、尿酸の分解が繁殖に寄与することを実証した。また、ワーカーからの 給餌物で構成される女王の中腸内容物を分析することで、尿酸がワーカーから生殖カース トに供給されていることを明らかにした。以上の結果から、王と女王のみがコロニー内個体 間で受け渡される尿酸の分解能を有することにより、繁殖に有用な物質を得ていることが 示唆された。これらを踏まえて、尿酸の分解が繁殖に寄与するメカニズムに着目した。遺伝 子発現解析の結果、尿酸からタンパク質の材料であるアミノ酸を合成する経路に必要な酵 素(アラントイカーゼおよびウレアーゼ)の遺伝子は、 いずれのカーストにおいても検出され なかった。この結果は、尿酸が窒素源として利用されるのではなく、その代謝産物が持つ生 理機能が繁殖において有用であることを示唆する。尿酸が尿酸オキシダーゼにより分解さ れると、5-ヒドロキシイソ尿酸を経由してアラントインに変換される。 アラントインは動物 や植物において細胞増殖や創傷治癒の促進、ストレス耐性の向上に関与することが知られ ており(Shestopalov et al. 2006; Kaur et al. 2021)、繁殖において有用な物質の候補として有望 である。ただし、シロアリの王と女王が、昆虫における既知の窒素リサイクルとは異なる代 謝経路により尿酸をアミノ酸や核酸の合成に利用している可能性も否定できない。今後、安 定同位体標識された尿酸を用いたトレーサー実験などにより、貯蔵された尿酸が分解され てから産卵という形でアウトプットされるまでの具体的な代謝経路を明らかにすることで、 シロアリの繁殖に関わるメカニズムの理解が進むと期待される。本研究により、生殖カース トと非生殖カーストが存在することで相補的に成立する、巣レベルの代謝分業(metabolic division of labor)が示されたといえる(図 6-1)。社会性昆虫におけるコロニー内個体間の代謝 プロセスの共有は、近年注目を集めている研究分野である(Negroni and LeBoeuf 2023)。この ような個体横断的な形質が、種によって食性や微生物との共生様式などの生態が大きく異 なるシロアリにおいてどの程度進化的に保存されているかを調べることも今後の課題であ る。本研究は、社会性昆虫の繁殖分業を支える分子生理基盤を理解する上で新たな視点を提 供するものである。

次に、尿酸の受け取り手である王と女王をコロニーから除去し、王と女王の存在が巣内 の尿酸フローに与える影響を調べた。その結果、王と女王の不在下では、ワーカー体内の尿 酸量が増加することが確認された。また、体内の尿酸量が増加したワーカーでは、免疫機能 が低下した個体に対して病原性を示すセラチア菌に曝露した際の死亡率が上昇することを 発見した。これらの結果から、王と女王による尿酸の分解が、コロニーの免疫機能を維持す る上でも重要であることが示唆された。尿酸は、生物一般に体内の活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)を消去する強力な抗酸化作用を持つ(Becker et al. 1991)。活性酸素種は過 剰になると生体分子に損傷を与える一方で、免疫系において重要な役割を担っていること が多くの生物で報告されている(Dröge 2002; Apel and Hirt 2004; Dowling and Simmons 2009)。 このため、シロアリの体内における尿酸の過剰が、ROSの欠乏に伴う免疫機能の低下を引 き起こす可能性がある。本研究では、実際に体内の尿酸量が増加することにより ROS 量が 減少することが確認された。さらに、ROS を消去する別の抗酸化物質(L-アスコルビン酸)の 投与処理によっても同様にセラチア菌に曝露した際の生存率が低下した。今後の課題は、シ ロアリにおいて尿酸の蓄積が感染症リスクを増加させる、より具体的なメカニズムを調べ ることである。また、本研究の結果は、尿酸を経口摂取させてシロアリの免疫系を抑制し、 コロニーを日和見感染により崩壊させる技術など、害虫管理にも応用できる可能性がある。 安価で人体への毒性の低い尿酸は、現在世界中で使用されている殺虫剤の代替品となるか もしれない。

尿酸というひとつの物質に着目することにより、シロアリにおけるミクロなレベルから マクロなレベルにわたる様々な現象を明らかにした本学位論文の独創的な視点は、今後の 社会生物学に大きなインパクトを与えることが期待される。シロアリにおける尿酸の機能 に関しては、共生微生物の働きを利用した窒素排泄物のリサイクルという観点から多くの 研究が行われてきた。昆虫は一般に、爬虫類や鳥類と同様、余剰な窒素を尿酸に変換して解 毒・排泄している(Nation 2015)。動物が摂取した窒素化合物が代謝される過程で発生するア ンモニアは細胞にとって毒性が高いため、速やかに解毒される必要がある。昆虫の場合、ア ンモニアがグルタミンに変換された後、プリン代謝経路に入って尿酸となる。尿酸は水への 溶解度が低く、排泄に伴う水分損失を抑えることができるため、陸上で生活する昆虫にとっ て好都合な窒素排泄物の形態と考えられてきた。しかしながら、シロアリでは尿酸がほとん ど排泄されず、窒素排泄物とは全く異なる別の機能を有していることが明らかになってき た。安定同位体標識を用いたトレーサー実験および腸内細菌における尿酸分解能の評価に より、脂肪体に一時的に貯蔵された尿酸がマルピーギ管経由で後腸に輸送され、嫌気性細菌 が持つ酵素の働きを利用してアミノ酸の合成が行われる経路が存在することが示されてい る(Potrikus and Breznak 1980b, 1981; Thong-On et al. 2012; Waidele et al. 2019)。シロアリ自身の 組織中には尿酸オキシダーゼが見出されず、尿酸の分解は共生微生物に完全に依存してい ると考えられてきたが、これらの知見はいずれもワーカーのみに焦点を当てた研究から得 られたものであった。本研究は、シロアリの王と女王のみが尿酸を分解する酵素を持つこと を発見し、尿酸の分解が繁殖に寄与することを実証した。一方で、シロアリ体内の尿酸量が 増加するメカニズムに関しては依然として未解明な点が多い。飼育下でシロアリの体内に 尿酸が蓄積する現象は、先行研究においても指摘されてきた(Potrikus and Breznak 1980a; Lovelock et al. 1985; Chappell and Slaytor 1993)。本研究では、尿酸がワーカーから生殖カース トに供給されていることを踏まえ、王と女王から隔離することによりワーカー体内の尿酸 量が増加することを確認した。ただし、このような尿酸の蓄積は、分解者の不在が引き起こ す滞留によるものだけでなく、王と女王からの隔離による酸化ストレス応答としての側面 を持つ可能性があることも考慮する必要がある。実際に、同じ社会性昆虫であるアリの一種 *Camponotus fellah* では、社会集団からの孤立が酸化ストレス応答を引き起こすことが明らか になっている(Koto et al. 2023)。

本研究は、精力的な野外調査によってシロアリの王と女王を多数確保することで実施さ れた。第4章では、広域分布種であるヤマトシロアリを対象に全国規模の調査を行う中で発 見された、巣レベルの繁殖システムにおける地理的変異について報告した。生物の形態や体 サイズ、餌、繁殖様式といった生活史形質(life history trait)は環境要因の影響を受けるため、 しばしば地理的な変異を示す(Pannebakker et al. 2008; Liefting et al. 2009; Bai et al. 2016; Burke and Bonduriansky 2018)。社会性昆虫では、上述の個体レベルの形質に加え、社会レベルの形 質が環境要因の影響を受ける。単為生殖による女王位継承(asexual queen succession: AQS)と 呼ばれる特殊な繁殖システム(本論文 1-3 を参照)を持つ本種では、創設王が死亡して二次王 がコロニー内の繁殖を引き継ぐと、近親交配が生じてコロニーは終焉を迎えると考えられ てきた。しかしながら、本州以南では採集されたコロニーの約 85%で創設王と二次女王が 繁殖を担っていた一方で、分布の北限である北海道では採集されたすべてのコロニーで二 次王と二次女王が繁殖を担っていた。飼育実験の結果、北海道個体群では本州個体群と比較 してより多くの個体が二次王の下で維持されることが確認された。また、北海道個体群では より多くの個体が二次王および二次女王へ分化するなど、カースト分化にも個体群間で差 異がみられた。さらに、RNA-seq を用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、個体群間 で 124 の発現変動遺伝子が検出され、これには免疫や代謝に関わる可能性がある遺伝子が 含まれていた。以上の結果から、ヤマトシロアリが有翅虫によるコロニーの創設が困難な寒 冷地に適応する上で、AQS という洗練された繁殖システムを犠牲にして、多数の二次王と 二次女王が近親交配によりコロニーを維持する二次戦略としての繁殖システムを進化させ たことが示唆された。本研究は、社会性昆虫における環境に応じた繁殖システムの柔軟な適 応進化を解明するものである。社会性昆虫の王と女王への関心は、特殊な繁殖システムの発 見(Wenseleers and Van Oystaeyen 2011; Matsuura 2017)や長寿に関する研究(Keller and Genoud 1997; Keller 1998; Tasaki et al. 2021)を通じて、近年ますます高まりつつある。

巣内の繁殖を一手に担う王と女王はシロアリのコロニーにおいて最も重要な構成要素で あるにもかかわらず、その採集の困難さから従来の研究では実験系に組み込まれてこなか った。本研究の一連の結果が示しているように、シロアリの生理・行動形質が生殖カースト の存在という社会環境要因にきわめて敏感であることは、シロアリを材料として用いる際 に留意すべき点であろう。第5章では、非巣仲間排除行動に着目し、巣の物理構造を考慮し た行動評価系を確立して侵入者に対する攻撃性に影響を与える要因の検証を行った。その 結果、王と女王の存在下では不在下と比較してワーカーや兵隊の非巣仲間に対する攻撃性 が高いことを発見した。また、巣内に王と女王が存在することにより、非巣仲間と接触した ワーカー・兵隊のうち、攻撃行動を示す個体の割合が増加することも明らかになった。これ らの結果から、巣内の位置に応じて個体の攻撃性を変化させることにより、コロニー防衛の コストを削減していることが示唆された。詳細な機構の解明については今後の課題である が、おそらく王や女王が生産するフェロモンが引き金となり、認識あるいは行動発現の閾値 を変化させると考えられる。シロアリの攻撃性に関する研究がしばしば矛盾した結果を報 告してきた理由のひとつに、実際の巣を取り巻く社会要因および環境要因を反映した条件
下での実験が困難であることが挙げられる。実験室内のアッセイにおいて常に王と女王を 考慮することは難しいかもしれないが、コロニーの社会環境を反映して敵対性をより明確 に検出することが可能になれば、先行研究の結果を再解釈することができる。本研究で得ら れた知見は、シロアリの研究における重要課題のひとつである、巣レベルの自他認識メカニ ズムを解明する上でも重要な基盤情報といえる。

本学位論文では、分子生理基盤の理解を目的としながらも、シロアリの生活史やコロニ ーの社会構造といった生態学的な視点から現象を捉えることに一貫して重きを置いた。社 会性昆虫のコロニーにみられるような集団レベルのふるまいは、個々の個体が単純な内部 規則と局所情報に基づいて機械的に反応した結果、個体の性質からは単純に予測できない ような複雑なパターンが生じたものであると考えられている。例えば、シロアリの複雑な蟻 道や塚は、ワーカーがフェロモンに応答して木片を運んだり積み重ねたりすることによっ て形成される(Bonabeau et al. 1998; Mizumoto et al. 2015)。このように、構成要素の総和にと どまらない巨視的な性質が表れることを創発(emergence)、システムの下位レベルを構成す る多くの要素間の相互作用のみに基づいてシステム全体でのパターンが創発する過程を自 己組織化(self-organization)と呼び、これらは社会生理学のキーワードとなっている(Camazine et al. 2001)。そして言うまでもなく、昆虫の社会システムは構成要素である個体の相互作用 だけでなく、それらを取り巻くあらゆる生物的・非生物的環境との相互作用の中で維持され ている。シロアリは分解者として物質循環において重要な役割を担っているとともに、その 巣を基点として多種多様な生物との関係を構築しており、生態系において非常に大きな影 響力を有する(Sugimoto et al. 2000; Jouquet et al. 2006; Ulyshen 2016)。したがって、巣内の資 源分配機構に関する議論も、カーストや性といった種内の要素のみならず、共生微生物や病 原微生物、社会寄生者といった周辺要素との関係まで拡張して包括的になされるべきであ る。例えば、腸内微生物群集は、窒素固定や消化への関与など、その機能が明らかになるに つれてコロニーの代謝系の一部と見なされるようになってきた(Brune and Ohkuma 2011; Brune 2014)。他にも、好白蟻性昆虫(termitophilous insect)など、その生活史の一部あるいはす べてをシロアリのコロニー環境に依存する社会寄生生物の存在が知られているが、シロア リとの関係については未解明な点が非常に多い。また、近年は巣の構造そのものにも注目が 集まっている。例えば、シロアリの糞で塗り固められた巣材には多種多様な共生微生物が存 在し、これには *Streptomyces* 属の放線菌など、病原微生物の増殖を抑制して巣の耐病性に寄 与するものが含まれることが複数のシロアリ種で確認されている(Chouvenc et al. 2013; Zhou et al. 2021)。このように、「超個体」の枠組みを同種個体の集団から注目するそれぞれの形質 と相互作用し得る範囲へと拡張し、現象の理解を試みていくことが、社会性昆虫のコロニー を扱う研究の今後の方向性として重要であろう。



図 6-1. 窒素代謝産物である尿酸(uric acid)を介した資源分配機構の概念図。尿酸を分解する 酵素である尿酸オキシダーゼ(urate oxidase)の遺伝子が王と女王のみで発現しており、尿酸 の分解は繁殖に寄与する。尿酸は、ワーカーからワーカーへの給餌物、およびワーカーから 生殖カーストへの給餌物に含まれている。一連の結果により、コロニー内個体間で受け渡さ れる尿酸の利用能力が王と女王に限定されることで、資源が繁殖を行う個体に集中するこ とが示唆された。矢印は餌の受け渡しを表す。 社会性昆虫には、王や女王として繁殖に専念する個体と、ワーカーや兵隊として繁殖以 外の労働に従事する個体が存在する。王と女王は巣内の繁殖を一手に担っており、資源は生 殖カーストへ集中的に分配される。繁殖に必要な資源を王と女王に集中させる機構の解明 は、社会性昆虫の分業システムを理解する上で鍵となる。本研究ではヤマトシロアリを用い て、コロニー内個体間で受け渡される特定の物質の利用能が王と女王に限定されることで 資源が繁殖を行う個体に集中するという仮説を立て、検証を試みた。さらに、資源分配機構 の解明を糸口として、シロアリの繁殖分業を支える様々な巣レベルの機構を発見した。本論 文は以下のように要約される。

第1章では、生物の集団的ふるまいを対象とした研究の意義について述べるとともに、 社会性昆虫における分業システムと資源の分配に関する研究について概観した。さらに研 究モデルとしてシロアリを用いる妥当性を主張し、本研究の目的を示した。

第2章と第3章では、繁殖において重要な窒素化合物の利用に着目し、RNA-seqを用い た遺伝子発現解析によって窒素代謝に関連する遺伝子の発現量をカースト間で比較した。 その結果、窒素代謝産物である尿酸を分解する酵素(尿酸オキシダーゼ)の遺伝子が、王と女 王のみで発現していることを発見した。そこで、RNA 干渉を用いた尿酸オキシダーゼ遺伝 子のノックダウンおよび尿酸オキシダーゼ阻害剤の投与を行い、尿酸の分解が繁殖に寄与 することを実証した。また、ワーカーからの給餌物で構成される女王の中腸内容物を分析す ることで、尿酸がワーカーから生殖カーストに供給されていることを明らかにした。以上の 結果から、王と女王のみがコロニー内個体間で受け渡される尿酸の分解能を有することに より、繁殖に有用な物質を得ていることが示唆された。これらを踏まえて、尿酸の分解が繁 殖に寄与するメカニズムに着目した。遺伝子発現解析の結果、尿酸からタンパク質の材料で あるアミノ酸を合成する経路に必要な酵素の遺伝子は、いずれのカーストにおいても検出 されなかった。この結果は、尿酸が窒素源として利用されるのではなく、その代謝産物が持 つ生理機能が繁殖において有用であることを示唆する。次に、尿酸の受け取り手である王と 女王をコロニーから除去し、王と女王の存在が巣内の尿酸フローに与える影響を調べた。そ の結果、王と女王の不在下では、ワーカー体内の尿酸量が増加することが確認された。また、 体内の尿酸量が増加したワーカーでは、免疫機能が低下した個体に対して病原性を示すセ ラチア菌に曝露した際の死亡率が上昇することを発見した。これらの結果から、王と女王に よる尿酸の分解が、コロニーの免疫機能を維持する上でも重要であることが示唆された。

第4章では、広域分布種であるヤマトシロアリを対象に全国規模の野外調査を行う中で 発見された、巣レベルの繁殖システムにおける地理的変異について報告した。単為生殖によ る女王位継承(asexual queen succession: AQS)と呼ばれる特殊な繁殖システムを持つ本種では、 創設王が死亡して二次王がコロニー内の繁殖を引き継ぐと、近親交配が生じてコロニーは 終焉を迎えると推測されてきた。実際に、本州以南では採集されたコロニーの約85%で創 設王と二次女王が繁殖を担っていた。一方で、分布の北限である北海道では採集されたすべ てのコロニーで二次王と二次女王が繁殖を担っていた。飼育実験の結果、北海道個体群では 本州個体群と比較してより多くの個体が二次王の下で維持されることが確認された。また、 北海道個体群ではより多くの個体が二次王および二次女王へ分化するなど、カースト分化 にも個体群間で差異がみられた。さらに、RNA-seqを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った ところ、個体群間で124の発現変動遺伝子が検出され、これには免疫や代謝に関わる可能性 がある遺伝子が含まれていた。以上の結果を踏まえ、有翅虫によるコロニーの創設が困難な 寒冷地に適応する上で、AQS という洗練された繁殖システムを犠牲にして、多数の二次王 と二次女王が近親交配によりコロニーを維持する二次戦略としての繁殖システムを進化さ せたというシナリオを提起した。

第5章では、巣レベルの異物排除システムである非巣仲間への攻撃行動に着目して、シ ロアリの行動形質がコロニーの最も重要な構成要素である王と女王の在不在といった社会

112

環境要因によって変化することを実証した。巣の物理構造を考慮した行動評価系を確立し て侵入者に対する攻撃性に影響を与える要因の検証を行った結果、王と女王の存在下では 不在下と比較してワーカーや兵隊の非巣仲間に対する攻撃性が高いことを発見した。また、 巣内に王と女王が存在することにより、非巣仲間と接触したワーカー・兵隊のうち、攻撃行 動を示す個体の割合が増加することも明らかになった。これらの結果から、巣内の位置に応 じて個体の攻撃性を変化させることにより、コロニー防衛のコストを削減していることが 示唆された。

第6章では、本研究の総合考察として、社会生理学的研究の今後の展望を示すとともに、 現象の分子生理学的基盤と生態学的背景の双方に着目する重要性を強調した。 本研究を進める上で、多くの方々にお世話になりました。この場を借りて皆様にお礼申 し上げます。

指導教員である京都大学大学院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薫陶を賜りました。実験の計画から論文の執筆に至るまで、決し て要領が良いとはいえない私に根気強くお付き合いいただき、心より感謝の意を表します。 また、研究に必要な技術・知識のみならず、科学者・教育者としてのあるべき姿勢や人生哲 学に至るまでご教示いただき、自らが人としてどう生きるべきか深く考えさせられました。 医学部から農学研究科への進学という大きな進路変更についても、先生のご理解とご協力 なくしては実現いたしませんでした。土畑重人助教(現:東京大学准教授)には、日頃の議論 の中で大変示唆に富んだご指摘をいただきました。また、データの解析手法についても懇切 丁寧なご指導を賜りました。令和3年度より着任された高田守助教からは、フィールド調査 や実験をご一緒させていただく中で材料生物との向き合い方を学びました。また、論文執筆 の際にも親身に相談に乗っていただきました。

研究室のポスドクの方々にも大変お世話になり、その研究に対する真摯な姿勢に多くを 学びました。田崎英祐博士(現:新潟大学助教)には、分子生物学実験を中心に様々な実験の 手法を丁寧にご指南いただきました。また、研究テーマや興味の方向性が似ていたことから、 日常的に有意義な議論をしていただきました。三高雄希博士(現:テキサスA&M大学、日本 学術振興会海外特別研究員)には、化学分析と遺伝子発現解析に関してご教示いただいたほ か、論文執筆の際にも親身に相談に乗っていただきました。石橋朋樹博士(現:理化学研究 所、基礎科学特別研究員)には、分子生物学実験や画像データの処理、プレゼン資料の作成 について実践的なご指導を賜りました。高橋迪彦博士には、バイオインフォマティクス全般 に関して丁寧にご教示いただきました。 昆虫生態学研究室の先輩・同期・後輩の皆様には、公私にわたり本当に多くの助言と刺 激をいただきました。野嵜友成博士(現:基礎生物学研究所助教)には、昆虫の細胞観察につ いて丁寧にご指南いただいたほか、学会発表や論文執筆の際にも親身に相談に乗っていた だきました。稲垣辰哉博士(現:コーネル大学、日本学術振興会海外特別研究員)には、シロ アリの腸内共生微生物についてご教示いただきました。Matthew Kamiyama 博士には、多く の英文を校閲していただき、ネイティブスピーカーの視点から貴重なご意見をいただきま した。井戸川直人博士(現:東京都立大学、日本学術振興会特別研究員 PD)には、申請書の作 成や学位審査の準備に際して多くの助言をいただきました。大竹遼河氏(現:知能情報シス テム株式会社)には、統計解析の手法について丁寧にご教示いただきました。Kunpeng Liu 氏 と Yao Wu 氏からは、日々の研究生活を共にする中で、英語で議論する技術を学びました。 修士課程までの同期である永井秀弥氏(現:アクセンチュア株式会社)、堀場菜摘氏(現:タキ イ種苗株式会社)、鹿野直人氏(現:京都府立桂高等学校)、および後輩の皆様には、温かい励 ましの言葉をいただくとともに、弛んだ精神にたびたび喝を入れていただきました。また、 中西智子氏には、あらゆる事務手続きを迅速かつ正確に処理していただきました。

本論文の副査を担当してくださった昆虫生理学研究室の大門高明教授、植物遺伝学研究 室の吉田健太郎教授には、論文へのコメントおよび審査の労を賜り、心から感謝いたします。 海洋生物機能学研究室の佐藤健司教授には、安定同位体を用いたトレーサー実験の分析手 法について丁寧にご指南いただきました。学部時代の指導教員である医学部人間健康科学 科の伊吹謙太郎准教授には、大学院に進学した後も多くの有意義な討論をしていただき、微 生物学や免疫学に関して幅広くご指導を賜りました。山形大学の金尾太輔助教には、好白蟻 性昆虫について分類学的な見地から数多くのご教示をいただくとともに、論文執筆につい てもご指導いただきました。フライブルク大学のJudith Korb 教授とバリ生態環境科学研究 所の Mireille Vasseur-Cognet 博士には、シロアリの尿酸代謝に関する重要な知見を共有して いただきました。森林総合研究所森林昆虫研究領域の皆様には、研究室訪問およびセミナー での講演を快く承知していただきました。国立遺伝学研究所の皆様には、スーパーコンピュ ータシステムの利用に際して大変お世話になりました。

本研究の大部分は、日本学術振興会の科学研究費助成事業の支援を受けて行われました。 また、国際学会への参加に際しては、国際社会性昆虫学会日本地区会の海外渡航援助制度を 利用させていただきました。

最後に、これまで支えてくれた家族に心から感謝いたします。ありがとうございました。

学位公表論文

- <u>Konishi T</u>, Tasaki E, Takata M, Matsuura K (2023) King- and queen-specific degradation of uric acid contributes to reproduction in termites. *Proceedings of the Royal Society B* 290:20221942
- <u>Konishi T</u>, Matsuura K (2021) Royal presence promotes worker and soldier aggression against non-nestmates in termites. *Insectes Sociaux* 68:15-21

その他、参考となる論文

- Takata M, Yabe K, Noro T, Mizote S, <u>Konishi T</u>, Tasaki E, Matsuura K (2023) A method for estimating colony size using queen fecundity in termites under field conditions. *The Science of Nature* 110:35
- Takata M, <u>Konishi T</u>, Nagai S, Wu Y, Nozaki T, Tasaki E, Matsuura K (2023) Discovery of an underground chamber to protect kings and queens during winter in temperate termites. *Scientific Reports* 13:8809
- <u>Konishi T</u>, Kanao T (2021) The first record of termitophilous *Trichopsenius* (Coleoptera, Staphylinidae) from a nest of *Reticulitermes flaviceps* (Blattodea, Rhinotermitidae) in Yonagunijima Island. *Elytra, New Series* 11:315–316

巻末付録1 王室が採集されたコロニーにおける王と女王の組成データ

ヤマトシロアリ(Reticulitermes speratus)のコロニーは、2018-2021年の繁殖期(5-9月)に、 近畿地方(兵庫県、京都府、三重県、奈良県、大阪府、滋賀県)で採集された。他の地下性シ ロアリ種と同様、ヤマトシロアリは木材の深部に王室を作る隠蔽的な営巣習性を持つ。林内 の木材に営巣するコロニーを発見し、卵と1齢幼虫の分布から王室の位置を推定した。木材 の王室を含む部分をノコギリで切り出し、実験室に持ち込んで解体を行った。採集後に分化 した補充生殖虫をカウントするのを避けるため、10日以内にすべての王と女王を材から取 り出した。翅アリ由来の生殖虫である創設王/女王と補充生殖虫である二次王/女王は、体色 および棄翅痕の有無により区別した。各カーストの性は、先行研究(Hayashi et al. 2003)に従 い、腹部末端の形態をもとに判別した。すべての統計解析はRv4.0.5(R Core Team 2021)を用 いて行った。採集されたコロニー中の王の代替り前のコロニーと王の代替り後のコロニー の割合は、二項分布を仮定した一般化線形モデル(generalized linear model: GLM)を用いて解 析した。GLM では、採集月を固定効果とした。モデルに対する各固定効果の寄与を調べる ために尤度比検定(likelihood ratio test)を実施した。p<0.05を有意水準とした。

野外調査の結果、王と女王が採集された 469 コロニーのうち、12 コロニー(2.56%)が創設 期(創設王と創設女王が繁殖を担う)、33 コロニー(7.04%)が成長期(創設王と創設女王および 二次女王が繁殖を担う)、402 コロニー(85.71%)が成熟期(創設王と二次女王が繁殖を担う)、 22 コロニー(4.69%)が終末期(二次王と二次女王が繁殖を担う)であった(図 S1-1a)。すなわち、 王の代替り前のコロニーが 95.31%を占めるのに対し、王の代替り後のコロニーはわずか 22 コロニー(4.69%)であった。この傾向は先行研究(Matsuura et al. 2018)で報告されたものに矛 盾しない。創設期のコロニーでは 1 個体の創設王と 1 個体の創設女王、成長期のコロニー では 1 個体の創設王と 1 個体の創設女王および 47.9 ± 9.8(mean ± SE)個体の二次女王、 成熟期のコロニーでは 1 個体の創設王と 49.6 ± 1.8(mean ± SE)個体の二次女王、終末期 のコロニーでは 2.5 ± 0.6(mean ± SE)個体の二次王と 52.1 ± 10.9(mean ± SE)個体の二 次女王が繁殖を担っていた。興味深いことに、採集されるコロニーの社会構造には季節性が みられ、終末期(王の代替り後)のコロニーの割合は春に低下することが明らかになった。王 の代替り前のコロニーと王の代替り後のコロニーの割合に対する採集月の効果は有意であ った(likelihood ratio test, df = 1, χ^2 = 5.67, p = 0.017, 図 S1-1b)。これらの結果は、コロニーの 消長に季節性があることを示唆している。全コロニーの詳細な情報は表 S1-1 に示す。



図 S1-1. 王室が採集されたコロニーにおける王と女王の組成。コロニーは、2018-2021 年の 繁殖期(5-9 月)に、近畿地方(兵庫県、京都府、三重県、奈良県、大阪府、滋賀県)で採集され た。(a)創設期(創設王と創設女王が繁殖を担う)、成長期(創設王と創設女王および二次女王 が繁殖を担う)、成熟期(創設王と二次女王が繁殖を担う)、終末期(二次王と二次女王が繁殖 を担う)の割合。(b)終末期コロニーの割合の季節変化。棒グラフの上の数字は各月に採集さ れたコロニー数の合計を表す。PK は創設王(primary king)、PQ は創設女王(primary queen)、 SK は二次王(secondary king)、SQ は創設女王(secondary queen)を示す。

Colony no	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queep	No. of secondary aveen	Stage
Colony no.	Date	Dantuut	Dongnuut	i reiceare	to, or primary king	to, of secondary killg	The or primary queen	The of secondary queen	Stage
1	2018/5/1	35.079383	136.085150	Shiga	1	0	0	16	mature
2	2018/5/1	34.946783	136.364183	Shiga	1	0	0	27	mature
3	2018/5/1	35.079705	136.084935	Shiga	1	0	0	52	mature
4	2018/5/29	35.078033	136.084983	Shiga	1	0	0	8	mature
5	2018/5/29	35.078583	136.085117	Shiga	1	0	0	16	mature
6	2018/5/29	35.074450	136.087000	Shiga	1	0	0	25	mature
7	2018/5/29	35.063817	136.040467	Shiga	1	0	0	43	mature
8	2018/5/29	35.063450	136.041167	Shiga	1	0	0	47	mature
9	2018/5/29	35.076967	136.085017	Shiga	1	0	0	87	mature
10	2018/5/29	35.074117	136.087200	Shiga	1	0	0	100	mature
11	2018/5/29	35.074767	136.086450	Shiga	0	4	0	173	terminal
12	2018/6/5	35.005517	135.804817	Kyoto	1	0	1	8	growth
13	2018/6/5	35.003317	135.808833	Kyoto	1	0	0	12	mature
14	2018/6/5	35.005550	135.804367	Kyoto	1	0	0	21	mature
15	2018/6/5	35.003283	135.808433	Kyoto	1	0	0	27	mature
16	2018/6/5	35.003233	135.809133	Kyoto	1	0	0	30	mature

表 S1-1. 王室が採集されたコロニーにおける王と女王の組成データ

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
17	2018/6/5	35.003417	135.809617	Kyoto	1	0	0	34	mature
18	2018/6/5	35.004950	135.805633	Kyoto	1	0	0	38	mature
19	2018/6/5	35.003017	135.809767	Kyoto	1	0	0	51	mature
20	2018/6/5	35.003500	135.808650	Kyoto	1	0	0	55	mature
21	2018/6/5	35.002867	135.809633	Kyoto	1	0	0	71	mature
22	2018/6/5	35.002683	135.809783	Kyoto	1	0	0	78	mature
23	2018/6/5	35.003100	135.809517	Kyoto	1	0	0	85	mature
24	2018/6/5	35.002967	135.809750	Kyoto	1	0	0	112	mature
25	2018/6/5	35.003500	135.809367	Kyoto	0	1	0	11	terminal
26	2018/6/9	34.964833	136.387567	Shiga	1	0	1	2	growth
27	2018/6/9	34.946267	136.363650	Shiga	1	0	0	83	mature
28	2018/6/9	34.954117	136.376933	Shiga	1	0	0	88	mature
29	2018/6/9	34.947050	136.364850	Shiga	1	0	0	175	mature
30	2018/6/17	35.024850	135.785417	Kyoto	1	0	0	47	mature
31	2018/6/20	35.426783	135.993867	Shiga	1	0	1	27	growth
32	2018/6/20	35.458550	135.993650	Shiga	1	0	1	49	growth
33	2018/6/20	35.456167	135.991983	Shiga	1	0	1	71	growth
34	2018/6/20	35.369650	135.921267	Shiga	1	0	0	8	mature
35	2018/6/20	35.426783	135.994100	Shiga	1	0	0	11	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
36	2018/6/20	35.425750	135.996950	Shiga	1	0	0	20	mature
37	2018/6/20	35.425367	135.996917	Shiga	1	0	0	23	mature
38	2018/6/20	35.426317	135.997917	Shiga	1	0	0	26	mature
39	2018/6/20	35.427467	135.994850	Shiga	1	0	0	33	mature
40	2018/6/20	34.950650	136.369700	Shiga	1	0	0	42	mature
41	2018/6/20	35.369500	135.920617	Shiga	1	0	0	43	mature
42	2018/6/20	35.459250	135.993800	Shiga	1	0	0	48	mature
43	2018/6/20	35.459817	135.994350	Shiga	1	0	0	58	mature
44	2018/6/20	35.457217	135.992533	Shiga	1	0	0	77	mature
45	2018/6/26	35.281133	135.945500	Shiga	1	0	0	22	mature
46	2018/6/26	35.280683	135.969800	Shiga	1	0	0	30	mature
47	2018/6/26	35.276983	135.980667	Shiga	1	0	0	33	mature
48	2018/6/26	35.276900	135.980467	Shiga	1	0	0	54	mature
49	2018/6/26	35.276450	135.987700	Shiga	1	0	0	61	mature
50	2018/6/26	35.277167	135.980117	Shiga	1	0	0	102	mature
51	2018/6/26	35.276733	135.981533	Shiga	1	0	0	103	mature
52	2018/6/26	35.283550	135.943533	Shiga	1	0	0	114	mature
53	2018/7/16	35.024383	135.784650	Kyoto	1	0	0	45	mature
54	2018/7/17	35.004900	135.810633	Kyoto	1	0	0	23	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
55	2018/7/17	35.004483	135.811100	Kyoto	1	0	0	25	mature
56	2018/7/17	35.003217	135.808900	Kyoto	1	0	0	28	mature
57	2018/7/17	35.002550	135.809000	Kyoto	1	0	0	39	mature
58	2018/7/17	35.004900	135.807883	Kyoto	1	0	0	54	mature
59	2018/7/17	35.005367	135.805100	Kyoto	1	0	0	71	mature
60	2018/7/21	35.339283	135.926633	Shiga	1	0	1	0	early
61	2018/7/21	35.319217	135.961267	Shiga	1	0	0	17	mature
62	2018/7/21	35.338700	135.927467	Shiga	1	0	0	27	mature
63	2018/7/21	35.323433	135.948267	Shiga	1	0	0	41	mature
64	2018/7/21	35.339283	135.926633	Shiga	1	0	0	58	mature
65	2018/7/21	35.317750	135.969383	Shiga	1	0	0	104	mature
66	2018/8/6	35.004767	135.808750	Kyoto	1	0	0	49	mature
67	2018/8/6	35.004633	135.809117	Kyoto	1	0	0	73	mature
68	2018/8/15	35.002100	135.810333	Kyoto	1	0	0	27	mature
69	2018/8/15	35.003830	135.805940	Kyoto	1	0	0	71	mature
70	2018/8/15	35.003400	135.806600	Kyoto	1	0	0	124	mature
71	2018/8/22	35.366050	135.914230	Shiga	1	0	0	10	mature
72	2018/8/22	35.151033	135.838383	Kyoto	1	0	0	27	mature
73	2018/8/22	35.113520	135.798820	Kyoto	1	0	0	49	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
74	2018/8/22	35.365967	135.913983	Shiga	1	0	0	59	mature
75	2018/8/22	35.110950	135.807267	Kyoto	1	0	0	61	mature
76	2018/8/22	35.159567	135.800717	Kyoto	1	0	0	65	mature
77	2018/8/22	35.112050	135.808383	Kyoto	1	0	0	66	mature
78	2018/8/22	35.110850	135.807150	Kyoto	1	0	0	84	mature
79	2018/8/27	35.374333	135.884767	Shiga	1	0	1	3	growth
80	2018/8/27	35.365767	135.915750	Shiga	1	0	0	8	mature
81	2018/8/27	35.363467	135.883067	Shiga	1	0	0	20	mature
82	2018/8/27	35.368510	135.908820	Shiga	1	0	0	21	mature
83	2018/8/27	35.361500	135.884170	Shiga	1	0	0	30	mature
84	2018/8/27	35.360967	135.905850	Shiga	1	0	0	51	mature
85	2018/8/27	35.361867	135.905817	Shiga	1	0	0	69	mature
86	2018/8/27	35.368017	135.908317	Shiga	1	0	0	178	mature
87	2018/8/27	35.365550	135.914117	Shiga	1	0	0	229	mature
88	2018/8/27	35.175717	135.824483	Kyoto	0	1	0	102	terminal
89	2018/8/30	35.176683	135.826050	Kyoto	1	0	0	17	mature
90	2018/8/30	35.175783	135.825667	Kyoto	1	0	0	36	mature
91	2018/8/30	35.176250	135.825950	Kyoto	1	0	0	38	mature
92	2018/8/30	35.061933	136.046883	Shiga	0	1	0	68	terminal

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
93	2018/9/6	35.458417	135.995217	Shiga	1	0	0	17	mature
94	2018/9/6	35.425650	135.997150	Shiga	1	0	0	18	mature
95	2018/9/6	35.359350	135.956650	Shiga	1	0	0	23	mature
96	2018/9/6	35.359883	135.959400	Shiga	1	0	0	28	mature
97	2018/9/6	35.358850	135.956117	Shiga	1	0	0	30	mature
98	2018/9/6	35.360367	135.955783	Shiga	1	0	0	31	mature
99	2018/9/6	35.456067	135.995933	Shiga	1	0	0	50	mature
100	2018/9/6	35.424733	135.996833	Shiga	1	0	0	60	mature
101	2018/9/6	35.456850	135.994317	Shiga	1	0	0	69	mature
102	2018/9/6	35.458100	135.995217	Shiga	1	0	0	73	mature
103	2018/9/6	35.456717	135.994367	Shiga	0	5	0	21	terminal
104	2018/9/11	35.130867	135.765150	Kyoto	1	0	1	30	growth
105	2018/9/11	35.059661	135.783061	Kyoto	1	0	0	33	mature
106	2018/9/23	35.037533	135.798717	Kyoto	1	0	0	63	mature
107	2019/5/1	35.005163	135.810809	Kyoto	1	0	1	13	growth
108	2019/5/1	35.004075	135.804985	Kyoto	1	0	1	25	growth
109	2019/5/1	35.001433	135.809683	Kyoto	1	0	0	53	mature
110	2019/5/2	35.058317	135.786317	Kyoto	1	0	0	58	mature
111	2019/5/3	35.003900	135.805133	Kyoto	1	0	0	12	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
112	2019/5/3	35.004017	135.805017	Kyoto	1	0	0	64	mature
113	2019/5/14	35.006650	135.807700	Kyoto	1	0	0	4	mature
114	2019/5/14	35.002717	135.807467	Kyoto	1	0	0	15	mature
115	2019/5/14	35.007167	135.806683	Kyoto	1	0	0	26	mature
116	2019/5/14	35.004750	135.807597	Kyoto	1	0	0	27	mature
117	2019/5/14	35.003455	135.807280	Kyoto	1	0	0	28	mature
118	2019/5/14	35.001815	135.806640	Kyoto	1	0	0	48	mature
119	2019/5/14	35.128600	135.779617	Kyoto	1	0	0	68	mature
120	2019/5/14	35.007467	135.806767	Kyoto	1	0	0	69	mature
121	2019/5/15	35.007100	135.806817	Kyoto	1	0	0	54	mature
122	2019/5/21	35.390151	135.926720	Shiga	1	0	1	44	growth
123	2019/5/21	35.389680	135.926960	Shiga	1	0	1	46	growth
124	2019/5/21	35.457767	135.954317	Shiga	1	0	0	37	mature
125	2019/5/21	35.391067	135.927000	Shiga	1	0	0	42	mature
126	2019/5/21	35.392233	135.927350	Shiga	1	0	0	43	mature
127	2019/5/21	35.457933	135.953150	Shiga	1	0	0	105	mature
128	2019/5/21	35.452050	135.963183	Shiga	1	0	0	112	mature
129	2019/5/21	35.390350	135.927017	Shiga	1	0	0	298	mature
130	2019/5/21	35.390183	135.927083	Shiga	0	1	0	53	terminal

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
131	2019/5/31	35.024933	135.785983	Kyoto	1	0	0	11	mature
132	2019/5/31	35.024895	135.785359	Kyoto	1	0	0	129	mature
133	2019/6/6	35.063728	136.043251	Shiga	1	0	0	13	mature
134	2019/6/6	35.444238	136.008506	Shiga	1	0	0	19	mature
135	2019/6/6	35.517887	136.046785	Shiga	1	0	0	20	mature
136	2019/6/6	35.063697	136.043539	Shiga	1	0	0	39	mature
137	2019/6/6	35.063568	136.044747	Shiga	1	0	0	66	mature
138	2019/6/6	35.517815	136.046813	Shiga	0	4	0	61	terminal
139	2019/6/12	35.059314	135.783337	Kyoto	1	0	0	18	mature
140	2019/6/20	35.024797	135.785375	Kyoto	1	0	0	44	mature
141	2019/6/24	34.860844	135.485894	Osaka	1	0	0	7	mature
142	2019/6/24	34.867747	135.477921	Osaka	1	0	0	13	mature
143	2019/6/24	34.860792	135.485997	Osaka	1	0	0	21	mature
144	2019/6/24	34.868925	135.478782	Osaka	1	0	0	21	mature
145	2019/6/24	34.865688	135.496533	Osaka	1	0	0	23	mature
146	2019/6/24	34.862447	135.484740	Osaka	1	0	0	25	mature
147	2019/6/24	34.861889	135.485718	Osaka	1	0	0	27	mature
148	2019/6/24	34.860992	135.485831	Osaka	1	0	0	31	mature
149	2019/6/24	34.862680	135.485267	Osaka	1	0	0	32	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
150	2019/6/24	34.861267	135.485862	Osaka	1	0	0	36	mature
151	2019/6/24	34.865526	135.497429	Osaka	1	0	0	42	mature
152	2019/6/24	34.865516	135.496536	Osaka	1	0	0	46	mature
153	2019/6/24	34.870676	135.477877	Osaka	1	0	0	60	mature
154	2019/6/24	34.863933	135.477692	Osaka	1	0	0	67	mature
155	2019/6/24	34.860865	135.485550	Osaka	1	0	0	73	mature
156	2019/6/24	34.864747	135.499350	Osaka	1	0	0	101	mature
157	2019/6/24	34.864697	135.500364	Osaka	1	0	0	136	mature
158	2019/6/24	34.863473	135.478385	Osaka	0	1	0	39	terminal
159	2019/7/16	34.941040	136.353600	Shiga	1	0	1	68	growth
160	2019/7/16	35.076706	136.085573	Shiga	1	0	0	10	mature
161	2019/7/16	34.939423	136.351452	Shiga	1	0	0	23	mature
162	2019/7/16	35.076103	136.087271	Shiga	1	0	0	23	mature
163	2019/7/16	35.077900	136.085435	Shiga	1	0	0	26	mature
164	2019/7/16	35.076422	136.085141	Shiga	1	0	0	26	mature
165	2019/7/16	34.941935	136.354537	Shiga	1	0	0	28	mature
166	2019/7/16	34.941722	136.360742	Shiga	1	0	0	30	mature
167	2019/7/16	34.941213	136.354073	Shiga	1	0	0	56	mature
168	2019/7/16	34.941592	136.354210	Shiga	1	0	0	61	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
169	2019/7/16	34.939161	136.336083	Shiga	1	0	0	69	mature
170	2019/7/16	34.938098	136.351605	Shiga	1	0	0	72	mature
171	2019/7/16	34.938092	136.351879	Shiga	1	0	0	103	mature
172	2019/7/31	35.362098	135.955726	Shiga	1	0	0	8	mature
173	2019/7/31	35.362224	135.956592	Shiga	1	0	0	14	mature
174	2019/7/31	35.359768	135.958156	Shiga	1	0	0	35	mature
175	2019/7/31	35.361511	135.954870	Shiga	1	0	0	35	mature
176	2019/7/31	35.361345	135.956381	Shiga	1	0	0	89	mature
177	2019/7/31	35.006643	135.810069	Kyoto	1	0	0	136	mature
178	2019/8/6	35.338873	135.927794	Shiga	1	0	0	4	mature
179	2019/8/6	35.338052	135.926711	Shiga	1	0	0	20	mature
180	2019/8/6	35.337413	135.928640	Shiga	1	0	0	21	mature
181	2019/8/6	35.338658	135.927544	Shiga	0	1	0	9	terminal
182	2019/8/27	34.966122	135.841432	Kyoto	1	0	1	0	early
183	2019/8/27	34.967195	135.843168	Kyoto	1	0	0	18	mature
184	2019/8/27	34.968048	135.840642	Kyoto	1	0	0	27	mature
185	2019/8/27	34.968482	135.844459	Kyoto	1	0	0	45	mature
186	2019/8/27	34.967741	135.845104	Kyoto	1	0	0	49	mature
187	2019/8/27	34.967440	135.845212	Kyoto	1	0	0	54	mature

	D (T	· · · ·		X 6 1 11		X7 0 1		
Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
188	2019/8/27	34.967969	135.840495	Kyoto	1	0	0	59	mature
189	2019/8/31	35.384414	135.879063	Shiga	1	0	1	3	growth
190	2019/8/31	35.418879	135.951181	Shiga	1	0	1	58	growth
191	2019/8/31	35.387183	135.876225	Shiga	1	0	0	10	mature
192	2019/8/31	35.412648	135.937218	Shiga	1	0	0	85	mature
193	2019/8/31	35.411165	135.935858	Shiga	1	0	0	101	mature
194	2019/8/31	35.412697	135.937104	Shiga	1	0	0	132	mature
195	2019/8/31	35.385171	135.878230	Shiga	0	1	0	43	terminal
196	2019/9/3	35.432163	135.924517	Shiga	1	0	1	87	growth
197	2019/9/3	35.432548	135.924580	Shiga	1	0	0	28	mature
198	2019/9/5	34.966658	135.846043	Kyoto	1	0	0	13	mature
199	2019/9/5	34.966396	135.846019	Kyoto	1	0	0	22	mature
200	2019/9/5	34.967694	135.846433	Kyoto	1	0	0	36	mature
201	2019/9/5	34.966780	135.845670	Kyoto	1	0	0	38	mature
202	2019/9/5	34.922911	135.845880	Kyoto	0	8	0	119	terminal
203	2019/9/7	34.949701	135.840503	Kyoto	1	0	1	23	growth
204	2019/9/7	34.953099	135.840001	Kyoto	1	0	0	3	mature
205	2019/9/7	34.952357	135.839457	Kyoto	1	0	0	5	mature
206	2019/9/7	34.953161	135.840282	Kyoto	1	0	0	12	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
207	2019/9/7	34.950788	135.839388	Kyoto	1	0	0	47	mature
208	2019/9/7	34.949414	135.840275	Kyoto	1	0	0	72	mature
209	2019/9/7	34.960125	135.851071	Kyoto	0	1	0	20	terminal
210	2020/5/7	34.842458	135.945491	Kyoto	1	0	1	0	early
211	2020/5/7	34.804784	135.877529	Kyoto	1	0	0	22	mature
212	2020/5/7	34.806935	135.875596	Kyoto	1	0	0	29	mature
213	2020/5/7	34.835755	135.944376	Kyoto	1	0	0	29	mature
214	2020/5/7	34.842756	135.945514	Kyoto	1	0	0	35	mature
215	2020/5/7	34.836700	135.943399	Kyoto	1	0	0	39	mature
216	2020/5/7	34.852882	135.940412	Kyoto	1	0	0	39	mature
217	2020/5/7	34.835805	135.944421	Kyoto	1	0	0	40	mature
218	2020/5/7	34.842062	135.946036	Kyoto	1	0	0	43	mature
219	2020/5/7	34.804928	135.876761	Kyoto	1	0	0	45	mature
220	2020/5/7	34.842731	135.945717	Kyoto	1	0	0	140	mature
221	2020/5/26	34.836583	135.943777	Kyoto	1	0	1	46	growth
222	2020/5/26	35.154968	135.775879	Kyoto	1	0	1	56	growth
223	2020/5/26	35.119619	135.619173	Kyoto	1	0	0	1	mature
224	2020/5/26	35.159497	135.776958	Kyoto	1	0	0	15	mature
225	2020/5/26	35.120951	135.617223	Kyoto	1	0	0	38	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
226	2020/5/26	35.119634	135.618499	Kyoto	1	0	0	39	mature
227	2020/5/26	35.144427	135.627163	Kyoto	1	0	0	44	mature
228	2020/5/26	35.113297	135.609391	Kyoto	1	0	0	49	mature
229	2020/5/26	35.112604	135.609498	Kyoto	1	0	0	74	mature
230	2020/5/26	35.113104	135.609114	Kyoto	1	0	0	80	mature
231	2020/5/26	35.113289	135.609075	Kyoto	1	0	0	87	mature
232	2020/6/2	35.531395	136.159400	Shiga	1	0	0	22	mature
233	2020/6/2	35.520777	136.139901	Shiga	1	0	0	23	mature
234	2020/6/2	35.537082	136.159491	Shiga	1	0	0	25	mature
235	2020/6/2	35.514952	136.129032	Shiga	1	0	0	39	mature
236	2020/6/2	35.520859	136.138804	Shiga	1	0	0	41	mature
237	2020/6/2	35.568303	136.126372	Shiga	1	0	0	56	mature
238	2020/6/2	35.514571	136.129988	Shiga	1	0	0	58	mature
239	2020/6/2	35.514739	136.129975	Shiga	1	0	0	59	mature
240	2020/6/2	35.567281	136.126487	Shiga	1	0	0	92	mature
241	2020/6/2	35.521270	136.139037	Shiga	1	0	0	104	mature
242	2020/6/2	35.521994	136.139167	Shiga	1	0	0	134	mature
243	2020/6/2	35.536931	136.159344	Shiga	0	1	0	15	terminal
244	2020/6/16	35.028004	135.800440	Kyoto	1	0	0	38	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
245	2020/6/16	35.037475	135.796888	Kyoto	1	0	0	60	mature
246	2020/6/16	35.027988	135.800288	Kyoto	1	0	0	80	mature
247	2020/6/23	34.801293	135.874925	Kyoto	1	0	1	35	growth
248	2020/6/23	34.829654	135.873655	Kyoto	1	0	0	11	mature
249	2020/6/23	34.730940	135.934183	Nara	1	0	0	14	mature
250	2020/6/23	34.802750	135.874849	Kyoto	1	0	0	17	mature
251	2020/6/23	34.769312	135.925579	Kyoto	1	0	0	19	mature
252	2020/6/23	34.769037	135.926142	Kyoto	1	0	0	20	mature
253	2020/6/23	34.830873	135.882122	Kyoto	1	0	0	23	mature
254	2020/6/23	34.768900	135.926299	Kyoto	1	0	0	25	mature
255	2020/6/23	34.736262	135.925237	Nara	1	0	0	26	mature
256	2020/6/23	34.769222	135.926220	Kyoto	1	0	0	27	mature
257	2020/6/23	34.831332	135.872818	Kyoto	1	0	0	28	mature
258	2020/6/23	34.769809	135.926922	Kyoto	1	0	0	29	mature
259	2020/6/23	34.769301	135.925746	Kyoto	1	0	0	34	mature
260	2020/6/23	34.829463	135.873054	Kyoto	1	0	0	35	mature
261	2020/6/23	34.769558	135.927397	Kyoto	1	0	0	37	mature
262	2020/6/23	34.735847	135.925072	Nara	1	0	0	40	mature
263	2020/6/23	34.806115	135.875955	Kyoto	1	0	0	41	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
264	2020/6/23	34.729875	135.934438	Nara	1	0	0	52	mature
265	2020/6/23	34.802312	135.874661	Kyoto	1	0	0	55	mature
266	2020/6/23	34.803947	135.876051	Kyoto	1	0	0	59	mature
267	2020/6/23	34.769171	135.926241	Kyoto	1	0	0	60	mature
268	2020/6/23	34.735847	135.925072	Nara	1	0	0	60	mature
269	2020/6/23	34.769413	135.925503	Kyoto	1	0	0	61	mature
270	2020/6/23	34.729869	135.934390	Nara	1	0	0	63	mature
271	2020/6/23	34.830548	135.873066	Kyoto	1	0	0	64	mature
272	2020/6/23	34.736155	135.925333	Nara	1	0	0	74	mature
273	2020/6/23	34.768998	135.926642	Kyoto	1	0	0	77	mature
274	2020/6/23	34.829777	135.873496	Kyoto	1	0	0	85	mature
275	2020/6/23	34.736274	135.925067	Nara	1	0	0	92	mature
276	2020/6/23	34.831290	135.873144	Kyoto	1	0	0	95	mature
277	2020/7/8	35.027838	135.800487	Kyoto	1	0	1	0	early
278	2020/7/8	35.027860	135.799413	Kyoto	1	0	0	52	mature
279	2020/7/8	35.028020	135.799994	Kyoto	1	0	0	76	mature
280	2020/7/9	35.028191	135.801806	Kyoto	1	0	0	31	mature
281	2020/7/12	34.799928	135.874068	Kyoto	1	0	1	37	growth
282	2020/7/12	34.773618	135.926726	Kyoto	1	0	1	109	growth

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
283	2020/7/12	34.773777	135.926507	Kyoto	1	0	0	7	mature
284	2020/7/12	34.801191	135.876978	Kyoto	1	0	0	18	mature
285	2020/7/12	34.802052	135.876762	Kyoto	1	0	0	18	mature
286	2020/7/12	34.801403	135.875721	Kyoto	1	0	0	26	mature
287	2020/7/12	34.777177	135.912693	Kyoto	1	0	0	27	mature
288	2020/7/12	34.777397	135.924038	Kyoto	1	0	0	40	mature
289	2020/7/12	34.777313	135.924238	Kyoto	1	0	0	46	mature
290	2020/7/12	34.773335	135.927182	Kyoto	1	0	0	49	mature
291	2020/7/12	34.799343	135.873587	Kyoto	1	0	0	51	mature
292	2020/7/12	34.800245	135.874311	Kyoto	1	0	0	51	mature
293	2020/7/12	34.800049	135.874672	Kyoto	1	0	0	56	mature
294	2020/7/12	34.777364	135.924327	Kyoto	1	0	0	57	mature
295	2020/7/12	34.801323	135.875781	Kyoto	1	0	0	68	mature
296	2020/7/12	34.777563	135.923957	Kyoto	1	0	0	101	mature
297	2020/7/12	34.773157	135.927630	Kyoto	1	0	0	109	mature
298	2020/7/12	34.799830	135.874163	Kyoto	1	0	0	109	mature
299	2020/7/12	34.777294	135.923464	Kyoto	1	0	0	111	mature
300	2020/7/12	34.774283	135.926117	Kyoto	1	0	0	124	mature
301	2020/7/12	34.801972	135.877531	Kyoto	1	0	0	130	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
302	2020/7/12	34.801475	135.875920	Kyoto	0	1	0	59	terminal
303	2020/7/22	35.027707	135.785830	Kyoto	1	0	0	112	mature
304	2020/7/29	35.316312	135.719796	Kyoto	1	0	1	0	early
305	2020/7/29	35.334996	135.739046	Kyoto	1	0	1	25	growth
306	2020/7/29	35.335201	135.738397	Kyoto	1	0	1	45	growth
307	2020/7/29	35.326737	135.741864	Kyoto	1	0	1	61	growth
308	2020/7/29	35.316549	135.719793	Kyoto	1	0	0	7	mature
309	2020/7/29	35.334929	135.739264	Kyoto	1	0	0	28	mature
310	2020/7/29	35.325787	135.741184	Kyoto	1	0	0	33	mature
311	2020/7/29	35.316936	135.719667	Kyoto	1	0	0	36	mature
312	2020/7/29	35.313987	135.717005	Kyoto	1	0	0	37	mature
313	2020/7/29	35.316513	135.719555	Kyoto	1	0	0	75	mature
314	2020/7/29	35.312146	135.716136	Kyoto	1	0	0	99	mature
315	2020/7/29	35.333320	135.740148	Kyoto	0	1	0	5	terminal
316	2020/7/29	35.318250	135.719245	Kyoto	0	1	0	14	terminal
317	2020/7/29	35.316280	135.720285	Kyoto	0	1	0	20	terminal
318	2020/8/13	35.568843	136.195994	Shiga	1	0	0	20	mature
319	2020/8/13	35.568672	136.195781	Shiga	1	0	0	46	mature
320	2020/8/19	34.900346	135.521881	Osaka	1	0	0	13	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
321	2020/8/19	34.953516	135.626009	Kyoto	1	0	0	30	mature
322	2020/8/19	34.897229	135.513274	Osaka	1	0	0	34	mature
323	2020/8/19	34.897263	135.513292	Osaka	1	0	0	36	mature
324	2020/8/19	34.896155	135.509136	Osaka	1	0	0	62	mature
325	2020/8/19	35.568734	136.196045	Shiga	1	0	0	80	mature
326	2020/8/19	34.895265	135.511327	Osaka	1	0	0	98	mature
327	2020/8/19	34.935724	135.567132	Osaka	1	0	0	121	mature
328	2020/8/28	35.043154	134.822256	Hyogo	1	0	0	10	mature
329	2020/8/28	34.942602	134.699706	Hyogo	1	0	0	22	mature
330	2020/8/28	34.943624	134.692573	Hyogo	1	0	0	37	mature
331	2020/8/28	35.054696	134.858261	Hyogo	1	0	0	56	mature
332	2020/8/28	35.015117	134.803562	Hyogo	1	0	0	66	mature
333	2020/8/28	35.055617	134.858735	Hyogo	1	0	0	72	mature
334	2020/8/28	35.042846	134.822169	Hyogo	1	0	0	79	mature
335	2020/8/28	35.055870	134.859124	Hyogo	1	0	0	89	mature
336	2020/8/28	35.055703	134.858745	Hyogo	1	0	0	96	mature
337	2020/8/28	35.014582	134.803689	Hyogo	0	1	0	11	terminal
338	2020/8/28	34.941803	134.699853	Hyogo	0	1	0	31	terminal
339	2020/8/30	35.027807	135.800321	Kyoto	1	0	1	0	early

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
340	2020/9/5	35.054383	135.347050	Hyogo	1	0	1	0	early
341	2020/9/5	35.053822	135.346316	Hyogo	1	0	0	9	mature
342	2020/9/5	35.116307	135.429326	Kyoto	1	0	0	14	mature
343	2020/9/5	35.052420	135.344871	Hyogo	1	0	0	17	mature
344	2020/9/5	35.116358	135.429179	Kyoto	1	0	0	18	mature
345	2020/9/5	35.095234	135.363783	Hyogo	1	0	0	29	mature
346	2020/9/5	35.114953	135.430745	Kyoto	1	0	0	35	mature
347	2020/9/5	35.054383	135.347050	Hyogo	1	0	0	55	mature
348	2020/9/5	35.099640	135.369416	Hyogo	1	0	0	88	mature
349	2020/9/5	35.095047	135.363173	Hyogo	1	0	0	115	mature
350	2020/9/5	35.052176	135.345026	Hyogo	0	6	0	97	terminal
351	2020/9/5	35.116678	135.429953	Kyoto	0	12	0	173	terminal
352	2020/9/10	35.062862	135.317788	Hyogo	1	0	0	23	mature
353	2020/9/10	35.060265	135.319880	Hyogo	1	0	0	37	mature
354	2020/9/10	35.086110	135.373789	Hyogo	1	0	0	48	mature
355	2020/9/10	35.062921	135.317572	Hyogo	1	0	0	52	mature
356	2020/9/14	35.130831	135.140665	Hyogo	1	0	0	5	mature
357	2020/9/14	35.164425	135.279621	Hyogo	1	0	0	5	mature
358	2020/9/14	35.158804	135.290516	Kyoto	1	0	0	8	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
359	2020/9/14	35.139655	135.261388	Hyogo	1	0	0	21	mature
360	2020/9/14	35.159349	135.289849	Kyoto	1	0	0	30	mature
361	2020/9/14	35.059828	135.319838	Hyogo	1	0	0	32	mature
362	2020/9/14	35.164930	135.279109	Hyogo	1	0	0	34	mature
363	2020/9/14	35.062557	135.317888	Hyogo	1	0	0	38	mature
364	2020/9/14	35.135244	135.254884	Hyogo	1	0	0	47	mature
365	2020/9/14	35.164073	135.279485	Hyogo	1	0	0	67	mature
366	2020/9/14	35.163668	135.280086	Hyogo	1	0	0	69	mature
367	2020/9/14	35.161790	135.282221	Hyogo	1	0	0	71	mature
368	2020/9/14	35.060303	135.319663	Hyogo	1	0	0	84	mature
369	2020/9/14	35.158605	135.290227	Kyoto	1	0	0	114	mature
370	2020/9/27	35.020223	135.800718	Kyoto	1	0	0	14	mature
371	2020/9/27	35.135880	135.254958	Hyogo	1	0	0	58	mature
372	2021/5/10	35.001445	135.484543	Kyoto	1	0	0	38	mature
373	2021/5/11	34.781057	135.983785	Kyoto	1	0	0	15	mature
374	2021/5/15	34.801299	136.050573	Mie	1	0	0	10	mature
375	2021/5/15	34.871451	135.970460	Shiga	1	0	0	16	mature
376	2021/5/18	34.801509	136.050753	Mie	1	0	0	25	mature
377	2021/5/18	34.798055	136.028060	Mie	1	0	0	30	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
378	2021/5/27	35.441814	136.004962	Shiga	1	0	1	0	early
379	2021/5/27	35.457413	135.997236	Shiga	1	0	0	35	mature
380	2021/5/27	35.456782	135.991796	Shiga	1	0	0	64	mature
381	2021/5/30	35.021158	135.801474	Kyoto	1	0	0	37	mature
382	2021/5/30	35.020098	135.800725	Kyoto	1	0	0	38	mature
383	2021/6/1	35.044270	135.800339	Kyoto	1	0	0	16	mature
384	2021/6/1	35.043139	135.799106	Kyoto	1	0	0	24	mature
385	2021/6/1	35.044076	135.801411	Kyoto	1	0	0	28	mature
386	2021/6/1	35.044381	135.802215	Kyoto	1	0	0	77	mature
387	2021/6/5	35.063370	135.123710	Hyogo	1	0	1	21	growth
388	2021/6/5	35.070112	135.599430	Kyoto	1	0	1	38	growth
389	2021/6/5	35.063218	135.123712	Hyogo	1	0	1	325	growth
390	2021/6/5	35.067920	135.121402	Hyogo	1	0	0	5	mature
391	2021/6/5	35.067910	135.121560	Hyogo	1	0	0	7	mature
392	2021/6/5	35.069871	135.115349	Hyogo	1	0	0	22	mature
393	2021/6/5	35.062923	135.123533	Hyogo	1	0	0	32	mature
394	2021/6/5	35.063049	135.123537	Hyogo	1	0	0	42	mature
395	2021/6/5	35.063880	135.123170	Hyogo	1	0	0	52	mature
396	2021/6/5	35.062950	135.123890	Hyogo	1	0	0	53	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
397	2021/6/5	35.068040	135.121350	Hyogo	1	0	0	56	mature
398	2021/6/5	35.063796	135.123491	Hyogo	1	0	0	71	mature
399	2021/6/5	35.057669	135.783207	Kyoto	1	0	0	72	mature
400	2021/6/5	35.058155	135.783874	Kyoto	1	0	0	130	mature
401	2021/6/6	34.924158	136.312845	Shiga	1	0	1	0	early
402	2021/6/6	35.066950	135.123449	Hyogo	1	0	0	37	mature
403	2021/6/8	34.939098	136.335940	Shiga	1	0	1	71	growth
404	2021/6/8	34.927944	136.311077	Shiga	1	0	0	18	mature
405	2021/6/8	34.939241	136.335855	Shiga	1	0	0	19	mature
406	2021/6/8	34.939023	136.336862	Shiga	1	0	0	22	mature
407	2021/6/8	34.928253	136.310753	Shiga	1	0	0	50	mature
408	2021/6/8	34.939040	136.335891	Shiga	1	0	0	53	mature
409	2021/6/8	34.938828	136.336033	Shiga	1	0	0	62	mature
410	2021/6/8	34.923539	136.313058	Shiga	1	0	0	77	mature
411	2021/6/10	34.978888	135.180938	Hyogo	1	0	0	22	mature
412	2021/6/10	34.984417	135.182893	Hyogo	1	0	0	28	mature
413	2021/6/10	35.009518	135.278722	Hyogo	1	0	0	28	mature
414	2021/6/10	34.984425	135.182725	Hyogo	1	0	0	34	mature
415	2021/6/10	34.979302	135.181728	Hyogo	1	0	0	42	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
416	2021/6/10	35.030539	135.787050	Kyoto	1	0	0	88	mature
417	2021/6/10	35.009863	135.278503	Hyogo	1	0	0	110	mature
418	2021/6/10	35.009004	135.278863	Hyogo	1	0	0	149	mature
419	2021/6/15	34.946314	136.328031	Shiga	1	0	0	19	mature
420	2021/6/15	34.865213	136.347316	Mie	1	0	0	61	mature
421	2021/6/15	34.948108	136.336017	Shiga	1	0	0	70	mature
422	2021/6/18	34.992470	136.460789	Mie	1	0	1	11	growth
423	2021/6/18	34.986157	136.461878	Mie	1	0	0	16	mature
424	2021/6/18	34.986727	136.462190	Mie	1	0	0	17	mature
425	2021/6/18	34.998650	136.468430	Mie	1	0	0	18	mature
426	2021/6/18	34.998067	136.467817	Mie	1	0	0	24	mature
427	2021/6/18	34.999534	136.467779	Mie	1	0	0	28	mature
428	2021/6/18	34.990178	136.462458	Mie	1	0	0	29	mature
429	2021/6/18	34.996672	136.466119	Mie	1	0	0	31	mature
430	2021/6/18	35.004883	136.471347	Mie	1	0	0	33	mature
431	2021/6/18	34.999450	136.468151	Mie	1	0	0	35	mature
432	2021/6/18	34.999273	136.468234	Mie	1	0	0	44	mature
433	2021/6/18	34.999008	136.468830	Mie	1	0	0	44	mature
434	2021/6/18	34.998590	136.468480	Mie	1	0	0	49	mature

Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
435	2021/6/18	34.997957	136.467834	Mie	1	0	0	55	mature
436	2021/6/18	34.992445	136.460338	Mie	1	0	0	62	mature
437	2021/6/18	34.992052	136.460518	Mie	1	0	0	70	mature
438	2021/6/18	34.998670	136.468384	Mie	1	0	0	71	mature
439	2021/6/18	34.998631	136.469283	Mie	1	0	0	97	mature
440	2021/6/18	34.998623	136.469441	Mie	1	0	0	119	mature
441	2021/6/18	34.993823	136.461285	Mie	1	0	0	133	mature
442	2021/6/24	35.252444	135.387313	Kyoto	1	0	1	0	early
443	2021/6/24	35.157174	135.558272	Kyoto	1	0	1	75	growth
444	2021/6/24	35.259100	135.390142	Kyoto	1	0	0	15	mature
445	2021/6/24	34.748482	136.002333	Kyoto	1	0	0	29	mature
446	2021/6/24	35.257156	135.385760	Kyoto	1	0	0	45	mature
447	2021/6/24	34.747606	136.002328	Kyoto	1	0	0	61	mature
448	2021/6/24	35.157353	135.558191	Kyoto	1	0	0	67	mature
449	2021/7/6	35.028185	135.800092	Kyoto	1	0	0	37	mature
450	2021/7/9	34.997808	136.473214	Mie	1	0	0	46	mature
451	2021/7/9	34.997236	136.473844	Mie	1	0	0	51	mature
452	2021/7/19	35.097848	135.679941	Kyoto	1	0	1	0	early
453	2021/7/19	35.205955	135.667436	Kyoto	1	0	1	0	early
Colony no.	Date	Latitude	Longitude	Prefecture	No. of primary king	No. of secondary king	No. of primary queen	No. of secondary queen	Stage
------------	-----------	-----------	------------	------------	---------------------	-----------------------	----------------------	------------------------	----------
454	2021/7/19	35.205967	135.667297	Kyoto	1	0	1	20	growth
455	2021/7/19	35.128376	135.668914	Kyoto	1	0	1	23	growth
456	2021/7/19	35.097715	135.679972	Kyoto	1	0	1	27	growth
457	2021/7/19	35.204004	135.660065	Kyoto	1	0	0	24	mature
458	2021/7/19	35.203851	135.659599	Kyoto	1	0	0	45	mature
459	2021/7/19	35.191350	135.701775	Kyoto	1	0	0	55	mature
460	2021/7/19	35.097967	135.679708	Kyoto	1	0	0	59	mature
461	2021/7/19	35.191114	135.701019	Kyoto	1	0	0	72	mature
462	2021/7/19	35.205140	135.666464	Kyoto	1	0	0	72	mature
463	2021/7/19	35.097776	135.680042	Kyoto	1	0	0	92	mature
464	2021/7/19	35.205767	135.667232	Kyoto	1	0	0	98	mature
465	2021/7/29	35.222639	135.637333	Kyoto	0	1	0	3	terminal
466	2021/8/16	35.158080	135.573161	Kyoto	1	0	0	34	mature
467	2021/8/16	35.164867	135.575398	Kyoto	1	0	0	39	mature
468	2021/8/27	35.065991	136.173897	Shiga	1	0	0	16	mature
469	2021/8/27	35.123071	136.180543	Shiga	1	0	0	41	mature

巻末付録 2 キアシシロアリ巣内から得られた Trichopsenius 属の好白蟻性ハネカクシ

シロアリハネカクシ族(tribe Trichopseniini)は、コウチュウ目ハネカクシ科ヒゲブトハネカ クシ亜科(order Coleoptera, family Staphylinidae, subfamily Aleocharinae)に属する好白蟻性の一 群である。本族のタイプ属である *Trichopsenius* 属は、日本産 5 種(Naomi and Terayama 1986, 1996)、中国産 1 種(Jiang et al. 2023)、アメリカ産 5 種(Seevers 1957)、スペイン産 1 種(Kistner and Assing 1995)、モロッコ産 1 種(Kanao and Maruyama 2019)の 13 種類から構成される。日 本産の 5 種はそれぞれ本州、屋久島、奄美大島、徳之島、西表島に分布し、すべての種が *Reticulitermes* 属のシロアリを寄主とする。*Reticulitermes* 属のシロアリは北海道から南西諸 島まで国内に広く分布するが、日本産 *Trichopsenius* 属に関する知見は、上述の 5 種が記載 されて以降、更新されていない。

筆者は、*Reticulitermes* 属のシロアリを対象に全国規模のサンプリングを行う中で、沖縄 県の与那国島においてキアシシロアリ(*Reticulitermes flaviceps*)の巣内から未記載種と考えら れる *Trichopsenius* 属の好白蟻性ハネカクシを採集した。キアシシロアリを宿主とする好白 蟻性ハネカクシはこれまで他属も含め記録がないことから、形態学的特徴の記載とともに ここに報告する。

種: Trichopsenius sp.

標本:1〇(99%エタノール);山形大学保管

採集地: 沖縄県八重山郡与那国町与那国(24 27'09.21"N, 123 00'21.81"E, alt. 198 m) 採集日: 2021 年 3 月 7 日

採集者: 小西堯生

備考:西表島においてヤエヤマシロアリ(*R. yaeyamanus*)の巣内から採集されたヤエヤマ シロアリハネカクシ(*T. crassicornis*)の雄個体と形態を比較したところ、以下の相違点が認め られた:触角はわずかに細く扁平で、雄交尾器は中央片(median lobe)の先端部(apical lobe)が より強く腹側に湾曲し、側片(paramere)の先端部(paramerite)の幅はやや狭い。好白蟻性ハネ カクシの大半に寄主特異性がみられること(Kistner 1969)、キアシシロアリを寄主とする好白 蟻性ハネカクシの報告がないことを踏まえると、上述の形態差は今回得られた個体が未記 載種であることを示唆する。追加の標本、特に同地の雌個体を入手してさらなる形態比較や 分子系統解析を実施することで、分類学的な位置づけを行うことが今後の課題である。



図 S2-1. 与那国島においてキアシシロアリ(*Reticulitermes flaviceps*)の巣内から採集された、 未記載種と考えられる *Trichopsenius* 属の好白蟻性ハネカクシ。

引用文献

- Abbot P (2022) Defense in social insects: diversity, division of labor, and evolution. Annu Rev Entomol 67:407–436. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-082521-072638
- Abbot P, Withgott JH, Moran NA (2001) Genetic conflict and conditional altruism in social aphid colonies. Proc Natl Acad Sci U S A 98:12068–12071. https://doi.org/10.1073/pnas.201212698
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402. https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64:5245–5250. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Anderson C, McShea DW (2001) Individual versus social complexity, with particular reference to ant colonies. Biol Rev Camb Philos Soc 76:211–237. https://doi.org/10.1017/s1464793101005656
- Ando T, Fujiwara H (2013) Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. Development 140:454–458. https://doi.org/10.1242/dev.085241
- Angilletta MJ Jr, Oufiero CE, Leaché AD (2006) Direct and indirect effects of environmental temperature on the evolution of reproductive strategies: an information-theoretic approach.

Am Nat 168:E123-35. https://doi.org/10.1086/507880

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55:373–399. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

- Bai Y, Dong J-J, Guan D-L, et al (2016) Geographic variation in wing size and shape of the grasshopper *Trilophidia annulata* (Orthoptera: Oedipodidae): morphological trait variations follow an ecogeographical rule. Sci Rep 6:32680. https://doi.org/10.1038/srep32680
- Bar-On YM, Phillips R, Milo R (2018) The biomass distribution on Earth. Proc Natl Acad Sci U S A 115:6506–6511. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115
- Becker BF, Reinholz N, Leipert B, et al (1991) Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. Chest 100:176S-181S.

https://doi.org/10.1378/chest.100.3_supplement.176s

- Benemann JR (1973) Nitrogen fixation in termites. Science 181:164–165. https://doi.org/10.1126/science.181.4095.164
- Binder BF (1988) Intercolonial aggression in the subterranean termite *Heterotermes aureus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Psyche 95:123–137. https://doi.org/10.1155/1988/28452
- Birch J, Okasha S (2014) Kin selection and its critics. Bioscience 65:22–32. https://doi.org/10.1093/biosci/biu196
- Bonabeau E, Theraulaz G, Deneubourg J, et al (1998) A model for the emergence of pillars, walls and royal chambers in termite nests. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353:1561–1576. https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0310

- Boomsma JJ, Gawne R (2018) Superorganismality and caste differentiation as points of no return: how the major evolutionary transitions were lost in translation. Biol Rev Camb Philos Soc 93:28–54. https://doi.org/10.1111/brv.12330
- Boulay R, Arnan X, Cerdá X, Retana J (2014) The ecological benefits of larger colony size may promote polygyny in ants. J Evol Biol 27:2856–2863. https://doi.org/10.1111/jeb.12515
- Bourke (1999) Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. J Evol Biol 12:245–257. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1999.00028.x
- Breed MD (2014) Kin and nestmate recognition: the influence of W. D. Hamilton on 50 years of research. Anim Behav 92:271–279. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.02.030
- Breznak JA (1982) Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. Annu Rev Microbiol 36:323–323. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.36.100182.001543
- Breznak JA, Brill WJ, Mertins JW, Coppel HC (1973) Nitrogen fixation in termites. Nature 244:577–580. https://doi.org/10.1038/244577a0
- Breznak JA, Brune A (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. Annu Rev Entomol 39:453–487. https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.002321
- Brune A (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. Nat Rev Microbiol 12:168– 180. https://doi.org/10.1038/nrmicro3182
- Brune A, Ohkuma M (2011) Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) Biology of termites: a modern synthesis. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 439–475

Bulmer MS, Traniello JFA (2002) Lack of aggression and spatial association of colony members in

Reticulitermes flavipes. J Insect Behav 15:121–126.

https://doi.org/10.1023/a:1014440414618

- Burke NW, Bonduriansky R (2018) The geography of sex: sexual conflict, environmental gradients and local loss of sex in facultatively parthenogenetic animals. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 373:. https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0422
- Calleri DV, McGrail Reid E, Rosengaus RB, et al (2006) Inbreeding and disease resistance in a social insect: effects of heterozygosity on immunocompetence in the termite *Zootermopsis angusticollis*. Proc Biol Sci 273:2633–2640. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3622
- Camazine S, Deneubourg J-L, Franks NR, et al (2001) Self-organization in biological systems. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. Bioinformatics 25:1972–1973. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348
- Cerdá X, Dahbi A, Retana J (2002) Spatial patterns, temporal variability, and the role of multi-nest colonies in a monogynous Spanish desert ant. Ecol Entomol 27:7–15. https://doi.org/10.1046/j.0307-6946.2001.00386.x
- Chappell DJ, Slaytor M (1993) Uric acid synthesis in freshly collected and laboratory-maintained *Nasutitermes walkeri* hill. Insect Biochem Mol Biol 23:499–506. https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90058-Z
- Chen C, Yang H, Xue F, Xia Q (2019) Geographical variation in life-history traits suggests an environmental-dependent trade-off between juvenile growth rate and adult lifespan in a

moth. Bull Entomol Res 109:626-632. https://doi.org/10.1017/S0007485318001001

- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 34:i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560
- Cheng Y, Li Y, Li W, et al (2020) Effect of hepatocyte nuclear factor 4 on the fecundity of *Nilaparvata lugens*: Insights from RNA interference combined with transcriptomic analysis. Genomics 112:4585–4594. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.08.002
- Chouvenc T (2020) Limited survival strategy in starving subterranean termite colonies. Insectes Soc 67:71–82. https://doi.org/10.1007/s00040-019-00729-5
- Chouvenc T (2019) The relative importance of queen and king initial weights in termite colony foundation success. Insectes Soc 66:177–184. https://doi.org/10.1007/s00040-019-00690-3
- Chouvenc T (2022) Eusociality and the transition from biparental to alloparental care in termites. Funct Ecol 36:3049–3059. https://doi.org/10.1111/1365-2435.14183
- Chouvenc T, Bardunias P, Li H-F, et al (2011) Planar arenas for use in laboratory bioassay studies of subterranean termites (Rhinotermitidae). Florida Entomologist 94:817–826. https://doi.org/10.1653/024.094.0413
- Chouvenc T, Efstathion CA, Elliott ML, Su N-Y (2013) Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite. Proc Biol Sci 280:20131885. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1885
- Chouvenc T, Su N-Y (2017) Testing the role of cuticular hydrocarbons on intercolonial agonism in two subterranean termite species (*Coptotermes*) and their hybrids. Insectes Soc 64:347–355. https://doi.org/10.1007/s00040-017-0552-0

Cochran DG (1985) Nitrogen excretion in cockroaches. Ann Rev Entomol 30:29–49. https://doi.org/10.1146/annurev.en.30.010185.000333

- Connick WJ, Osbrink WLA, Wright MS, et al (2001) Increased mortality of *Coptotermes* formosanus (Isoptera: Rhinotermitidae) exposed to eicosanoid biosynthesis inhibitors and Serratia marcescens (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). Environ Entomol 30:449–455. https://doi.org/10.1603/0046-225X-30.2.449
- Cook JM (1993) Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. Heredity 71:421–435. https://doi.org/10.1038/hdy.1993.157
- Cornelius ML, Osbrink WLA (2003) Agonistic interactions between colonies of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in New Orleans, Louisiana. Environ Entomol 32:1002–1009. https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.1002
- Costa-Leonardo AM, Laranjo LT, Janei V, Haifig I (2013) The fat body of termites: functions and stored materials. J Insect Physiol 59:577–587. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.009
- Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social immunity. Curr Biol 17:R693–R702. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008
- Cremer S, Sixt M (2009) Analogies in the evolution of individual and social immunity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364:129–142. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0166
- Crozier RH, Pamilo P (1996) Evolution of social insect colonies: sex allocation and kin selection. Oxford University Press, Oxford, UK

Dauwalder B, Tsujimoto S, Moss J, Mattox W (2002) The Drosophila takeout gene is regulated by

the somatic sex-determination pathway and affects male courtship behavior. Genes Dev 16:2879–2892. https://doi.org/10.1101/gad.1010302

- De Bach PH, Mcomie WA (1939) New diseases of termites caused by bacteria. Ann Entomol Soc Am 32:137–146. https://doi.org/10.1093/aesa/32.1.137
- Dedeine F, Dupont S, Guyot S, et al (2016) Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. Mol Phylogenet Evol 94:778–790. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.020
- DeHeer CJ, Vargo EL (2006) An indirect test of inbreeding depression in the termites *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. Behav Ecol Sociobiol 59:753–761. https://doi.org/10.1007/s00265-005-0105-9
- Deligne J, Quennedey A, Blum MS (1981) The enemies and defense mechanisms of termites. In: Hermann HR (ed) Social insects. Academic Press, New York, NY, pp 1–76
- Diaz-Albiter H, Sant'Anna MRV, Genta FA, Dillon RJ (2012) Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. J Biol Chem 287:23995–24003. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376095
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29:15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635
- Donovan SE, Eggleton P, Bignell DE (2001) Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. Ecol Entomol 26:356–366. https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00342.x

- Doucet D, Walker VK, Qin W (2009) The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects. Cell Mol Life Sci 66:1404–1418. https://doi.org/10.1007/s00018-009-8320-6
- Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. Proc Biol Sci 276:1737–1745. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1791
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82:47–95. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001
- Du H, Chouvenc T, Su N-Y (2017) Development of age polyethism with colony maturity in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Environ Entomol 46:311–318. https://doi.org/10.1093/ee/nvw162
- Eggleton P, Williams PH, Gaston KJ (1994) Explaining global termite diversity: productivity or history? Biodiversity & Conservation 3:318–330. https://doi.org/10.1007/BF00056505
- Elliott KL, Stay B (2007) Juvenile hormone synthesis as related to egg development in neotenic reproductives of the termite *Reticulitermes flavipes*, with observations on urates in the fat body. Gen Comp Endocrinol 152:102–110. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.03.003
- Esenther GR (1969) Termites in Wisconsin. Ann Entomol Soc Am 62:1274–1284. https://doi.org/10.1093/aesa/62.6.1274
- Evans TA, Forschler BT, Grace JK (2013) Biology of invasive termites: a worldwide review. Annu Rev Entomol 58:455–474. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153554
- Eyer P-A, Vargo EL (2021) Breeding structure and invasiveness in social insects. Curr Opin Insect Sci 46:24–30. https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.01.004

- Eyer P-A, Vargo EL (2022) Short and long-term costs of inbreeding in the lifelong-partnership in a termite. Commun Biol 5:389. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03317-9
- Folse HJ 3rd, Roughgarden J (2010) What is an individual organism? A multilevel selection perspective. Q Rev Biol 85:447–472. https://doi.org/10.1086/656905
- Fraga A, Ribeiro L, Lobato M, et al (2013) Glycogen and glucose metabolism are essential for early embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. PLoS One 8:e65125. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065125
- Friedman DA, Johnson BR, Linksvayer TA (2020) Distributed physiology and the molecular basis of social life in eusocial insects. Horm Behav 122:104757. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104757
- Ghesini S, Marini M (2009) Caste differentiation and growth of laboratory colonies of *Reticulitermes urbis* (Isoptera, Rhinotermitidae). Insectes Soc 56:309–318. https://doi.org/10.1007/s00040-009-0025-1
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 29:644–652. https://doi.org/10.1038/nbt.1883
- Grace JK (1996) Absence of overt agonistic behavior in a northern population of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 28:103–110
- Grimont PA, Grimont F (1978) The genus *Serratia*. Annu Rev Microbiol 32:221–248. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.001253

Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behaviour I, II. J Theor Biol 7:1–52.

https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90038-4

- Hayashi Y, Kitade O, Kojima J-I (2003) Parthenogenetic reproduction in neotenics of the subterranean termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Entomol Sci 6:253–257. https://doi.org/10.1046/j.1343-8786.2003.00030.x
- Heimpel GE, de Boer JG (2008) Sex determination in the Hymenoptera. Annu Rev Entomol 53:209–230. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093441
- Hellemans S, Dolejšová K, Křivánek J, et al (2019) Widespread occurrence of asexual reproduction in higher termites of the *Termes* group (Termitidae: Termitinae). BMC Evol Biol 19:131. https://doi.org/10.1186/s12862-019-1459-3
- Higashi M, Abe T, Burns TP (1992) Carbon-nitrogen balance and termite ecology. Proc Biol Sci 249:303–308. https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0119
- Hojo M, Toga K, Watanabe D, et al (2011) High-level expression of the *Geranylgeranyl diphosphate* synthase gene in the frontal gland of soldiers in *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Arch Insect Biochem Physiol 77:17–31.
 https://doi.org/10.1002/arch.20415
- Hölldobler B, Wilson EO (2009) The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies. W. W. Norton & Company, New York, NY
- Hölldobler B, Wilson EO (1977) The number of queens: an important trait in ant evolution. Sci Nat 64:8–15. https://doi.org/10.1007/bf00439886
- Hongoh Y, Ishikawa H (1997) Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. Zoolog Sci

14:581-586. https://doi.org/10.2108/zsj.14.581

- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. Biom J 50:346–363. https://doi.org/10.1002/bimj.200810425
- Hughes WOH, Oldroyd BP, Beekman M, Ratnieks FLW (2008) Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. Science 320:1213–1216. https://doi.org/10.1126/science.1156108
- Hungate RE (1941) Experiments on the nitrogen economy of termites. Ann Entomol Soc Am 34:467–489. https://doi.org/10.1093/aesa/34.2.467
- Hunt JH, Nalepa CA (1994) Nourishment and evolution in insect societies. Westview Press, Boulder, CO
- Hussain A, Li Y-F, Cheng Y, et al (2013) Immune-related transcriptome of *Coptotermes formosanus* Shiraki workers: the defense mechanism. PLoS One 8:e69543. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069543
- Inagaki T, Matsuura K (2016) Colony-dependent sex differences in protozoan communities of the lower termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Ecol Res 31:749–755. https://doi.org/10.1007/s11284-016-1387-2
- Inagaki T, Matsuura K (2018) Extended mutualism between termites and gut microbes: nutritional symbionts contribute to nest hygiene. Naturwissenschaften 105:52. https://doi.org/10.1007/s00114-018-1580-y
- Inward D, Beccaloni G, Eggleton P (2007) Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. Biol Lett 3:331–335.

https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0102

Ishikawa Y, Miura T (2012) Hidden aggression in termite workers: plastic defensive behaviour dependent upon social context. Anim Behav 83:737–745. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.12.022

Jandt JM, Bengston S, Pinter-Wollman N, et al (2014) Behavioural syndromes and social insects: personality at multiple levels. Biol Rev Camb Philos Soc 89:48–67. https://doi.org/10.1111/brv.12042

- Jiang R-X, Huang X-D, Chen X-S (2023) Discovery of the termitophilous genus *Trichopsenius* Horn, 1877 (Coleoptera, Staphylinidae, Aleocharinae) from China with description of a new species. ZK 1152:35–43. https://doi.org/10.3897/zookeys.1152.99290
- Johnson BR, Linksvayer TA (2010) Deconstructing the superorganism: social physiology, groundplans, and sociogenomics. Q Rev Biol 85:57–79. https://doi.org/10.1086/650290
- Johnson WJ, Stavric B, Chartrand A (1969) Uricase inhibition in the rat by s-triazines: an animal model for hyperuricemia and hyperuricosuria. Proc Soc Exp Biol Med 131:8–12. https://doi.org/10.3181/00379727-131-33791
- Jouquet P, Dauber J, Lagerlöf J, et al (2006) Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. Appl Soil Ecol 32:153–164. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.07.004
- Kanao T, Maruyama M (2019) A new species of the termitophilous genus *Trichopsenius* Horn, 1877 (Coleoptera, Staphylinidae, Aleocharinae) from Morocco. Elytra, New Series 9:297–303

Kashima T, Nakamura T, Tojo S (2006) Uric acid recycling in the shield bug, Parastrachia

japonensis (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. J Insect Physiol 52:816–825. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.05.003

- Kaur H, Chowrasia S, Gaur VS, Mondal TK (2021) Allantoin: emerging role in plant abiotic stress tolerance. Plant Mol Biol Rep 39:648–661. https://doi.org/10.1007/s11105-021-01280-z
- Keller L (1998) Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. Insectes Soc 45:235– 246. https://doi.org/10.1007/s000400050084

Keller L (1999) Levels of selection in evolution. Princeton University Press, Princeton, NJ

- Keller L, Genoud M (1997) Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. Nature 389:958–960. https://doi.org/10.1038/40130
- Kistner DH (1969) The biology of termitophiles. In: Krishna K, Weesner FM (eds) Biology of termites. Academic Press, New York, NY, pp 525–557
- Kistner DH, Assing V (1995) A new species of Trichopseniinae from Europe (Coleoptera: Staphylinidae). Sociobiology 26:299–304
- Klainer AS, Beisel WR (1969) Opportunistic infection: a review. Am J Med Sci 258:431–456. https://doi.org/10.1097/00000441-196912000-00007
- Konishi T, Matsuura K (2021) Royal presence promotes worker and soldier aggression against nonnestmates in termites. Insectes Soc 68:15–21. https://doi.org/10.1007/s00040-020-00799-w
- Konishi T, Tasaki E, Takata M, Matsuura K (2023) King- and queen-specific degradation of uric acid contributes to reproduction in termites. Proc Biol Sci 290:20221942. https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1942

- Korb J (2008) Termites, hemimetabolous diploid white ants? Front Zool 5:1–9. https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-15
- Korb J (2007) Termites. Curr Biol 17:R995-9. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.033
- Korb J, Hartfelder K (2008) Life history and development a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. Biol Rev Camb Philos Soc 83:295–313. https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2008.00044.x
- Korb J, Lenz M (2004) Reproductive decision-making in the termite, *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae), under variable food conditions. Behav Ecol 15:390–395. https://doi.org/10.1093/beheco/arh033
- Korb J, Weil T, Hoffmann K, et al (2009) A gene necessary for reproductive suppression in termites. Science 324:758. https://doi.org/10.1126/science.1170660
- Koto A, Tamura M, Wong PS, et al (2023) Social isolation shortens lifespan through oxidative stress in ants. Nat Commun 14:5493. https://doi.org/10.1038/s41467-023-41140-w
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35:1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
- La Fage JP, Nutting WL (1978) Nutrient dynamics of termites. In: Brian MV (ed) Production ecology of ants and termites. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 165–232
- Laidlaw HH (1992) Production of queen and package bees. In: Graham JM (ed) The hive and the honey bee. Dadant & Sons, Hamilton, IL, pp 989–1042
- Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. Mol Biol Evol 25:1307–1320. https://doi.org/10.1093/molbev/msn067

- LeBoeuf AC, Waridel P, Brent CS, et al (2016) Oral transfer of chemical cues, growth proteins and hormones in social insects. Elife 5:. https://doi.org/10.7554/eLife.20375
- Legendre F, Whiting MF, Grandcolas P (2013) Phylogenetic analyses of termite post-embryonic sequences illuminate caste and developmental pathway evolution. Evol Dev 15:146–157. https://doi.org/10.1111/ede.12023
- Lehejčkova R, Demnerova K, Kralova B, et al (1987) Screening of microorganisms with uricase activity. Biotechnology & Bioindustry 2:25–27. https://doi.org/10.1080/02052067.1987.10819296
- Lemanski NJ, Cook CN, Smith BH, Pinter-Wollman N (2019) A multiscale review of behavioral variation in collective foraging behavior in honey bees. Insects 10:. https://doi.org/10.3390/insects10110370
- Li B, Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics 12:323. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323
- Liefting M, Hoffmann AA, Ellers J (2009) Plasticity versus environmental canalization: population differences in thermal responses along a latitudinal gradient in *Drosophila serrata*.
 Evolution 63:1954–1963. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00683.x
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-ΔΔCT) method. Methods 25:402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
- Lo N, Engel MS, Cameron S, et al (2007) Save Isoptera: a comment on Inward et al. Biol. Lett.

3:562-3; discussion 564-5

- Lovelock M, O'Brien RW, Slaytor M (1985) Effect of laboratory containment on the nitrogen metabolism of termites. Insect Biochem 15:503–509. https://doi.org/10.1016/0020-1790(85)90063-0
- Ludwig MZ, Uspensky II, Ivanov AI, et al (1991) Genetic control and expression of the major ejaculatory bulb protein (PEB-me) in *Drosophila melanogaster*. Biochem Genet 29:215– 239. https://doi.org/10.1007/BF00590103
- Matsumoto T (1976) The role of termites in an equatorial rain forest ecosystem of West Malaysia. Oecologia 22:153–178. https://doi.org/10.1007/BF00344714
- Matsuura K (2017) Evolution of the asexual queen succession system and its underlying mechanisms in termites. J Exp Biol 220:63–72. https://doi.org/10.1242/jeb.142547
- Matsuura K (2001) Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. Oikos 92:20–26. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.920103.x
- Matsuura K (2002) Colony-level stabilization of soldier head width for head-plug defense in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Behav Ecol Sociobiol 51:172– 179. https://doi.org/10.1007/s00265-001-0426-2
- 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. https://doi.org/10.1303/aez.2007.241
- Matsuura K, Mizumoto N, Kobayashi K, et al (2018) A genomic imprinting model of termite caste determination: not genetic but epigenetic inheritance influences offspring caste fate. Am Nat

191:677-690. https://doi.org/10.1086/697238

- Matsuura K, Nishida T (2001) Colony fusion in a termite: what makes the society "open"? Insectes Soc 48:378–383. https://doi.org/10.1007/pl00001795
- Matsuura K, Vargo EL, Kawatsu K, et al (2009) Queen succession through asexual reproduction in termites. Science 323:1687. https://doi.org/10.1126/science.1169702
- McMillan EA, Longo SM, Smith MD, et al (2018) The protein kinase CK2 substrate Jabba modulates lipid metabolism during *Drosophila* oogenesis. J Biol Chem 293:2990–3002. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.814657
- Messenger MT, Su N-Y (2005) Agonistic behavior between colonies of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) from Louis Armstrong Park, New Orleans, Louisiana. Sociobiology 45:1–15
- Meurville M-P, LeBoeuf AC (2021) Trophallaxis: the functions and evolution of social fluid exchange in ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News 31:1–30. https://doi.org/10.25849/MYRMECOL.NEWS_031:001
- Michener CD (1969) Comparative social behavior of bees. Annu Rev Entomol 14:299–342. https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.001503
- Michod RE, Roze D (2001) Cooperation and conflict in the evolution of multicellularity. Heredity 86:1–7. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00808.x
- Mitaka Y, Akino T, Matsuura K (2023) Development of a standard medium for culturing the termite *Reticulitermes speratus*. Insectes Soc. https://doi.org/10.1007/s00040-023-00907-6

Mitaka Y, Kobayashi K, Matsuura K (2017) Caste-, sex-, and age-dependent expression of immune-

related genes in a Japanese subterranean termite, *Reticulitermes speratus*. PLoS One 12:e0175417. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175417

- 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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146125
- Mitaka Y, Tasaki E, Nozaki T, et al (2020) Transcriptomic analysis of epigenetic modification genes in the termite *Reticulitermes speratus*. Insect Sci 27:202–211. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12640
- Miyata H, Furuichi H, Kitade O (2004) Patterns of neotenic differentiation in a subterranean termite, *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Entomol Sci 7:309–314. https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2004.00078.x
- Mizumoto N, Kobayashi K, Matsuura K (2015) Emergence of intercolonial variation in termite shelter tube patterns and prediction of its underlying mechanism. Royal Society Open Science 2:150360. https://doi.org/10.1098/rsos.150360
- Morel L, Meer RKV, Lofgren CS (1990) Comparison of nestmate recognition between monogyne and polygyne populations of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). Ann Entomol Soc Am 83:642–647. https://doi.org/10.1093/aesa/83.3.642
- Mullins A, Chouvenc T, Su N-Y (2021) Soil organic matter is essential for colony growth in subterranean termites. Sci Rep 11:21252. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00674-z
- Mullins A, Su N-Y (2018) Parental nitrogen transfer and apparent absence of N₂ fixation during colony foundation in *Coptotermes formosanus* Shiraki. Insects 9:.

https://doi.org/10.3390/insects9020037

- Myles TG (1999) Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. Sociobiology 33:1–43
- Naomi S, Terayama M (1986) Taxonomic study on the subfamily Trichopseniinae (Coleoptera, Staphylinidae) of Japan, with descriptions of three new species. Kontyû 54:697–705
- Naomi S, Terayama M (1996) A new species of *Trichopsenius* Horn (Coleoptera: Staphylinidae) from Japan. New Entomologist 45:84–86

Nation JL (2015) Insect physiology and biochemistry, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, FL

- Negroni MA, LeBoeuf AC (2023) Metabolic division of labor in social insects. Curr Opin Insect Sci 59:101085. https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101085
- Nozaki T, Tasaki E, Matsuura K (2023) Cell type specific polyploidization in the royal fat body of termite queens. Zoological Lett 9:20. https://doi.org/10.1186/s40851-023-00217-6
- Nutting WL (1969) Flight and colony foundation. In: Krishna K, Weesner FM (eds) Biology of Termites. Academic Press, New York, NY, pp 233–282
- Okasha S (2016) The relation between kin and multilevel selection: an approach using causal graphs. The British Journal for the Philosophy of Science 67:435–470. https://doi.org/10.1093/bjps/axu047
- Osbrink WLA, Williams KS, Connick WJ, et al (2001) Virulence of bacteria associated with the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in New Orleans, LA. Environ Entomol 30:443–448. https://doi.org/10.1603/0046-225X-30.2.443

- Oster GF, Wilson EO (1978) Caste and ecology in the social insects. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Pannebakker BA, Garrido NRT, Zwaan BJ, van Alphen JJM (2008) Geographic variation in hostselection behaviour in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina clavipes*. Entomol Exp Appl 127:48–54. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00666.x
- Patiño-Navarrete R, Piulachs M-D, Belles X, et al (2014) The cockroach *Blattella germanica* obtains nitrogen from uric acid through a metabolic pathway shared with its bacterial endosymbiont. Biol Lett 10:20140407. https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0407
- Peeters C, Ito F (2001) Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. Annu Rev Entomol 46:601–630. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.601
- Penick CA, Trobaugh B, Brent CS, Liebig J (2013) Head-butting as an early indicator of reproductive disinhibition in the termite *Zootermopsis nevadensis*. J Insect Behav 26:23–34. https://doi.org/10.1007/s10905-012-9332-x
- Perdereau E, Bagnères A-G, Dupont S, Dedeine F (2010) High occurrence of colony fusion in a European population of the American termite *Reticulitermes flavipes*. Insectes Soc 57:393– 402. https://doi.org/10.1007/s00040-010-0096-z
- Perdereau E, Bagnères A-G, Vargo EL, et al (2015) Relationship between invasion success and colony breeding structure in a subterranean termite. Mol Ecol 24:2125–2142. https://doi.org/10.1111/mec.13094
- Pichon A, Kutnik M, Leniaud L, et al (2007) Development of experimentally orphaned termite

worker colonies of two *Reticulitermes* species (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 50:1015–1034

- Pike N, Whitfield JA, Foster WA (2007) Ecological correlates of sociality in *Pemphigus* aphids, with a partial phylogeny of the genus. BMC Evol Biol 7:185. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-185
- Poindexter HA, Washington TD (1974) Microbial opportunism in clinical medicine. J Natl Med Assoc 66:284–291
- Polizzi JM, Forschler BT (1998) Intra- and interspecific agonism in *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. virginicus* (Banks) and effects of arena and group size in laboratory assays. Insectes Soc 45:43–49. https://doi.org/10.1007/s000400050067
- Polizzi JM, Forschler BT (1999) Factors that affect aggression among the worker caste of *Reticulitermes* spp. subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J Insect Behav 12:133–146. https://doi.org/10.1023/A:1020925414283
- Potrikus CJ, Breznak JA (1980a) Uric acid in wood-eating termites. Insect Biochem 10:19–27. https://doi.org/10.1016/0020-1790(80)90034-7
- Potrikus CJ, Breznak JA (1980b) Anaerobic degradation of uric Acid by gut bacteria of termites. Appl Environ Microbiol 40:125–132. https://doi.org/10.1128/aem.40.1.125-132.1980
- Potrikus CJ, Breznak JA (1981) Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: A strategy for nutrient conservation. Proc Natl Acad Sci U S A 78:4601–4605. https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4601

R Core Team (2021) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for

Statistical Computing, Vienna, Austria

- Raffoul M, Hecnar SJ, Prezioso S, et al (2011) Trap response and genetic structure of eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in Point Pelee National Park, Ontario, Canada. Can Entomol 143:263–271. https://doi.org/10.4039/n11-008
- Richard F-J, Hunt JH (2013) Intracolony chemical communication in social insects. Insectes Soc 60:275–291. https://doi.org/10.1007/s00040-013-0306-6
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616
- Robinson MD, Oshlack A (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biol 11:R25. https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25
- Roff D (1980) Optimizing development time in a seasonal environment: the "ups and downs" of clinal variation. Oecologia 45:202–208. https://doi.org/10.1007/BF00346461
- Roisin Y, Pasteels JM (1987) Caste developmental potentialities in the termite *Nasutitermes novarumhebridarum*. Entomol Exp Appl 44:277–287. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1987.tb00556.x
- Ruel C, Cerdá X, Boulay R (2012) Behaviour-mediated group size effect constrains reproductive decisions in a social insect. Anim Behav 84:853–860. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.07.006
- Sabree ZL, Kambhampati S, Moran NA (2009) Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. Proc Natl Acad Sci U S A 106:19521–19526.

https://doi.org/10.1073/pnas.0907504106

Schmid-Hempel P (1998) Parasites in social insects. Princeton University Press, Princeton, NJ

- Seeley TD (1995) The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Seevers CH (1957) A monograph on the termitophilous Staphylinidae (Coleoptera). Fieldiana 40:1– 334
- Shellman-Reeve J (1990) Dynamics of biparental care in the dampwood termite, Zootermopsis nevadensis (Hagen): response to nitrogen availability. Behav Ecol Sociobiol 26:. https://doi.org/10.1007/bf00170895
- Shelton TG, Grace JK (1996) Review of agonistic behaviors in the lsoptera. Sociobiology 28:155– 176
- Shelton TG, Grace JK (1997a) Impact of low temperature conditioning on intercolonial agonism in *Coptotermes formosanus* (lsoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 30:197–211
- Shelton TG, Grace JK (1997b) Suggestion of an environmental influence on intercolony agonism of Formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). Environ Entomol 26:632–637. https://doi.org/10.1093/ee/26.3.632
- Shestopalov AV, Shkurat TP, Mikashinovich ZI, et al (2006) Biological functions of allantoin. Biology Bulletin 33:437–440. https://doi.org/10.1134/S1062359006050037
- Shigenobu S, Hayashi Y, Watanabe D, et al (2022) Genomic and transcriptomic analyses of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*: gene duplication facilitates social evolution.
 Proc Natl Acad Sci U S A 119:. https://doi.org/10.1073/pnas.2110361119

- Simkovic V, Thompson GJ, McNeil JN (2018) Testing for aggression and nestmate recognition in the Eastern subterranean termite (*Reticulitermes flavipes*). Insectes Soc 65:281–288. https://doi.org/10.1007/s00040-018-0608-9
- Sleigh C (2002) Brave new worlds: trophallaxis and the origin of society in the early twentieth century. J Hist Behav Sci 38:133–156. https://doi.org/10.1002/jhbs.10033
- Snir O, Alwaseem H, Heissel S, et al (2022) The pupal moulting fluid has evolved social functions in ants. Nature 612:488–494. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05480-9
- Sober E, Wilson DS (1998) Unto others: the evolution and psychology of unselfish behavior. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Su N-Y, Haverty MI (1991) Agonistic behavior among colonies of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae), from Florida and Hawaii: lack of correlation with cuticular hydrocarbon composition. J Insect Behav 4:115– 128. https://doi.org/10.1007/BF01092555
- Sugimoto A, Bignell DE, MacDonald JA (2000) Global impact of termites on the carbon cycle and atmospheric trace gases. In: Abe T, Bignell DE, Higashi M (eds) Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 409–435
- Sun Q, Haynes KF, Hampton JD, Zhou X (2017) Sex-specific inhibition and stimulation of workerreproductive transition in a termite. Naturwissenschaften 104:79. https://doi.org/10.1007/s00114-017-1501-5
- Takagi E, Ogai T (2015) New distribution record of *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera: Rhinotermitidae) in the coldest highland in central Japan. Sociobiology 62:460–461

- Takahashi M, Okude G, Futahashi R, et al (2021) The effect of the *doublesex* gene in body colour masculinization of the damselfly *Ischnura senegalensis*. Biol Lett 17:20200761. https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0761
- Takata M, Konishi T, Nagai S, et al (2023) Discovery of an underground chamber to protect kings and queens during winter in temperate termites. Sci Rep 13:8809. https://doi.org/10.1038/s41598-023-36035-1
- Tasaki E, Komagata Y, Inagaki T, Matsuura K (2020) Reproduction deep inside wood: a low O2 and high CO2 environment promotes egg production by termite queens. Biol Lett 16:20200049. https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0049
- Tasaki E, Mitaka Y, Nozaki T, et al (2018) High expression of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 in long-lived termite kings. Aging 10:2668–2683. https://doi.org/10.18632/aging.101578
- Tasaki E, Mitaka Y, Takahashi Y, et al (2023) The royal food of termites shows king and queen specificity. PNAS Nexus 2:gad222. https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad222
- Tasaki E, Sakurai H, Nitao M, et al (2017) Uric acid, an important antioxidant contributing to survival in termites. PLoS One 12:e0179426. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179426
- Tasaki E, Takata M, Matsuura K (2021) Why and how do termite kings and queens live so long? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 376:20190740. https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0740
- Thong-On A, Suzuki K, Noda S, et al (2012) Isolation and characterization of anaerobic bacteria for symbiotic recycling of uric acid nitrogen in the gut of various termites. Microbes Environ 27:186–192. https://doi.org/10.1264/jsme2.me11325

- Thorne BL (1997) Evolution of eusociality in termites. Annu Rev Ecol Syst 28:27–54. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.27
- Thorne BL (1982) Termite-termite interactions: workers as an agonistic caste. Psyche 89:133–150. https://doi.org/10.1155/1982/86584
- Thorne BL, Haverty MI (1991) A review of intracolony, intraspecific, and interspecific agonism in termites. Sociobiology 19:115–145
- Tong RL, Aguilera-Olivares D, Chouvenc T, Su N-Y (2021) Nitrogen content of the exuviae of Coptotermes gestroi (Wasmann) (Blattodea: Rhinotermitidae). Heliyon 7:e06697. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06697
- Tsutsui ND, Suarez AV (2003) The colony structure and population biology of invasive ants. Conserv Biol 17:48–58. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.02018.x
- Ulyshen MD (2016) Wood decomposition as influenced by invertebrates. Biol Rev Camb Philos Soc 91:70–85. https://doi.org/10.1111/brv.12158
- Vander Meer RK, Alonso LE (2002) Queen primer pheromone affects conspecific fire ant (Solenopsis invicta) aggression. Behav Ecol Sociobiol 51:122–130. https://doi.org/10.1007/s002650100417
- Vargo EL (2019) Diversity of termite breeding systems. Insects 10:. https://doi.org/10.3390/insects10020052
- Waidele L, Korb J, Voolstra CR, et al (2019) Ecological specificity of the metagenome in a set of lower termite species supports contribution of the microbiome to adaptation of the host.
 Anim Microbiome 1:13. https://doi.org/10.1186/s42523-019-0014-2

Wallis DI (1964) Aggression in social insects. In: Carthy JD, Ebling FJ (eds) The natural history of aggression. Academic Press, London, pp 15–22

Wenseleers T, Van Oystaeyen A (2011) Unusual modes of reproduction in social insects: shedding light on the evolutionary paradox of sex. Bioessays 33:927–937. https://doi.org/10.1002/bies.201100096

Wheeler D (1996) The role of nourishment in oogenesis. Annu Rev Entomol 41:407–431. https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002203

Wheeler WM (1911) The ant-colony as an organism. J Morphol 22:307–325. https://doi.org/10.1002/jmor.1050220206

Wheeler WM (1918) A study of some ant larvae, with a consideration of the origin and meaning of the social habit among insects. Proc Am Philos Soc 57:293–343

Wilson EO (1971) The insect societies. Harvard University Press, Cambridge, MA

Wilson EO (1975) Sociobiology. Harvard University Press, Cambridge, MA

- Wilson EO, Hölldobler B (2005) Eusociality: origin and consequences. Proc Natl Acad Sci U S A 102:13367–13371. https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102
- Wilson K (2001) Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr Protoc Mol Biol Chapter 2:Unit 2.4. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. Annu Rev Entomol 54:405–423. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301

Wyss-Huber M, Lüscher M (1975) Protein synthesis in 'fat body' and ovary of the physogastric queen of *Macrotermes subhyalinus*. J Insect Physiol 21:1697–1704. https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90182-1

Yanagihara S, Suehiro W, Mitaka Y, Matsuura K (2018) Age-based soldier polyethism: old termite soldiers take more risks than young soldiers. Biol Lett 14:20180025. https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0025

- Zalkow LH, Howard RW, Gelbaum LT, et al (1981) Chemical ecology of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. virginicus* (Banks) (Rhinotermitidae): chemistry of the soldier cephalic secretions. J Chem Ecol 7:717–731. https://doi.org/10.1007/BF00990304
- Zhou L-F, Wu J, Li S, et al (2021) Antibacterial potential of termite-associated *Streptomyces* spp. ACS Omega 6:4329–4334. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05580