

DA  
4467  
2007



「餌—昆虫—腸内微生物叢」系を用いた  
新規微生物スクリーニング法の開発とその利用

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生物機能科学専攻  
博士（生物工学）学位論文

林 新



08010833

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 既往の研究	
2-1 微生物スクリーニング	6
2-2 昆虫（シロアリ）の生態	10
2-3 昆虫（シロアリ）と腸内微生物叢共生系	11
第3章 イエシロアリ <i>Coptotermes formosanus</i> Shiraki と腸内微生物叢の 共生系を用いた新規微生物スクリーニング法の開発	
3-1 序	19
3-2 フェノール人工餌が <i>C. formosanus</i> 自身に与える影響	19
3-3 フェノール人工餌が <i>C. formosanus</i> 腸内原生動物叢に与える影響	25
3-4 フェノール人工餌が <i>C. formosanus</i> 腸内全細菌数に与える影響	27
3-5 寒天培地を用いた <i>C. formosanus</i> 腸内微生物叢中のフェノール分解 菌の検出およびコロニーカウントによる定量	29
3-6 メンブランフィルター培養法を用いた <i>C. formosanus</i> 腸内微生物叢 中のフェノール分解菌の特異的検出および定量	32
3-7 PCR-DGGE 解析	36
3-8 Plate Wash (PW)PCR-DGGE 解析	45
3-9 第3章の考察	50
第3章の要約	56

第4章	高等シロアリタカサゴシロアリ ( <i>Nasutitermes takasagoensis</i> Shiraki) と腸内微生物叢の共生関係を対象とした新規微生物スクリーニング法の利用	
4-1	序	58
4-2	フェノール人工餌が <i>N. takasagoensis</i> 自身に与える影響	58
4-3	メンブランフィルター培養法を用いた <i>N. takasagoensis</i> 腸内微生物叢中のフェノール分解菌の検出および定量	63
4-4	PCR-DGGE 解析	66
4-5	PWPCR-DGGE 解析	75
4-6	第4章の考察	82
4-7	第4章の要約	86
第5章	総括	88
	引用文献	92
	謝辞	99

## 第1章 緒言

19世紀から20世紀にかけて、多くの有用微生物が純粋培養技術を用いて分離され、微生物産業に急速な発展をもたらした。しかし、純粋培養技術を用いて新規な微生物を獲得することは困難になりつつある。様々な分子生物学的手法により、自然界に存在する99%以上の微生物が、従来の純粋培養技術では分離培養できないことが明らかとなっている (Amman *et al.*, 1995)。この問題を解決するための方法の一つとして、新規な微生物スクリーニング法の開発が考えられる。我々は、多くの微生物が自然界においては多種の生物と強固な共生関係を築いて存在していることに着目した。そのような共生関係の例としては、シロアリと腸内微生物叢 (Ohkuma *et al.*, 2003), rhizobia -regume (Hirsh *et al.*, 2001) や地衣類の共生 (Ahmadjian and Jacobes 1981) などがあげられる。そこで我々は、微生物と他種の生物との共生関係を積極的に利用して、目的の微生物を効率的にスクリーニングする方法を考えた。

我々は昆虫と腸内微生物叢の共生関係に特に着目し、これを餌を介して成立している「餌-昆虫-腸内微生物叢」系 (Fig. 1-1) と考え、下等シロアリのイエシロアリ (*Coptotermes formosanus* Shiraki) の職ア리를モデル生物として用いて研究を行ってきた。昆虫の腸内は、昆虫が食した餌を微生物が連続的に分解し、分解物は腸壁からの吸収および肛門からの排出によって除去される、いわば一種の連続培養系として考えることができる (Fig. 1-2)。連続培養系では、基質を分解でき難い増殖速度の遅い微生物は系外に wash out してしまい、基質を分解し増殖速度が速い微生物が腸内に滞留し、高濃度化されることが推定される。我々はこのような考え方を基にして、*C. formosanus* に人工餌を与え、餌成分の変化に応じた腸内微生物叢の変化をモニターした。その結果、*C. formosanus* (木

材摂食昆虫)の餌成分を木材からグルコースに変化させたとき、時間の経過に伴い腸内微生物叢が木材分解微生物叢からグルコース分解微生物叢に大きく変化し、最終的には木材を摂食させても分解できず、長期間生存できないシロアリに変化することを明らかにした(椎名, 2001、Tanaka *et al.*, 2006)。この結果は昆虫の食す餌成分を変化させたとき、連続培養系において昆虫の腸内微生物叢の構成が変化し、餌成分の分解に適した増殖能の高い微生物が優占種になることを示唆している。換言すると、任意の餌成分を炭素源として含む人工餌を昆虫に与えることで、もし昆虫が生存するならば、難分解性物質を分解でき、且つ増殖能の高い微生物が腸内に優占的に増殖し、且つ濃縮されることが考えられる。

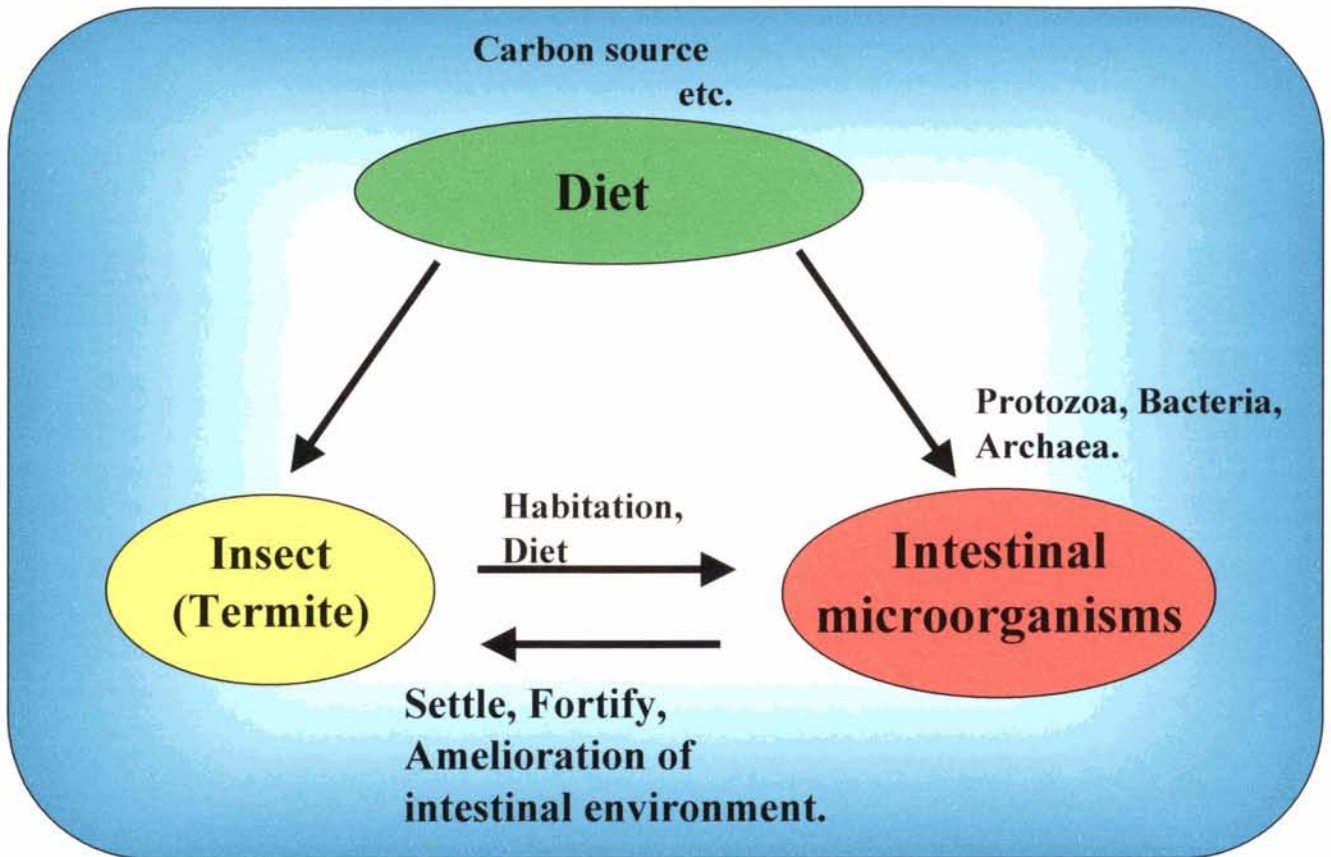
そこで本研究では、昆虫と腸内微生物叢の共生系を人工餌により積極的に変化させ、検出限界以下の低濃度でしか存在していなかった目的の微生物(餌成分分解菌)を腸内に検出可能な高濃度に濃縮し、効率的に分離することのできる新たなスクリーニング法の開発を試みた。

第一に、昆虫の一例として、日本に生息する木材食性昆虫である下等シロアリのイエシロアリ *C. formosanus* を用い、新規微生物スクリーニング法の開発を行った。*C. formosanus* は腸内に3種の原生動物と細菌が共生している。*C. formosanus* が食す餌を、木材に代えて木材成分の中で難分解性のリグニンの関連化合物であるフェノールを含む人工餌を与えることで、もともと腸内にわずかしか存在していなかったフェノール分解菌が濃縮され、効率よく目的微生物(フェノール分解菌)をスクリーニング可能になるかどうか確認を行い、新規微生物スクリーニング法を確立した。

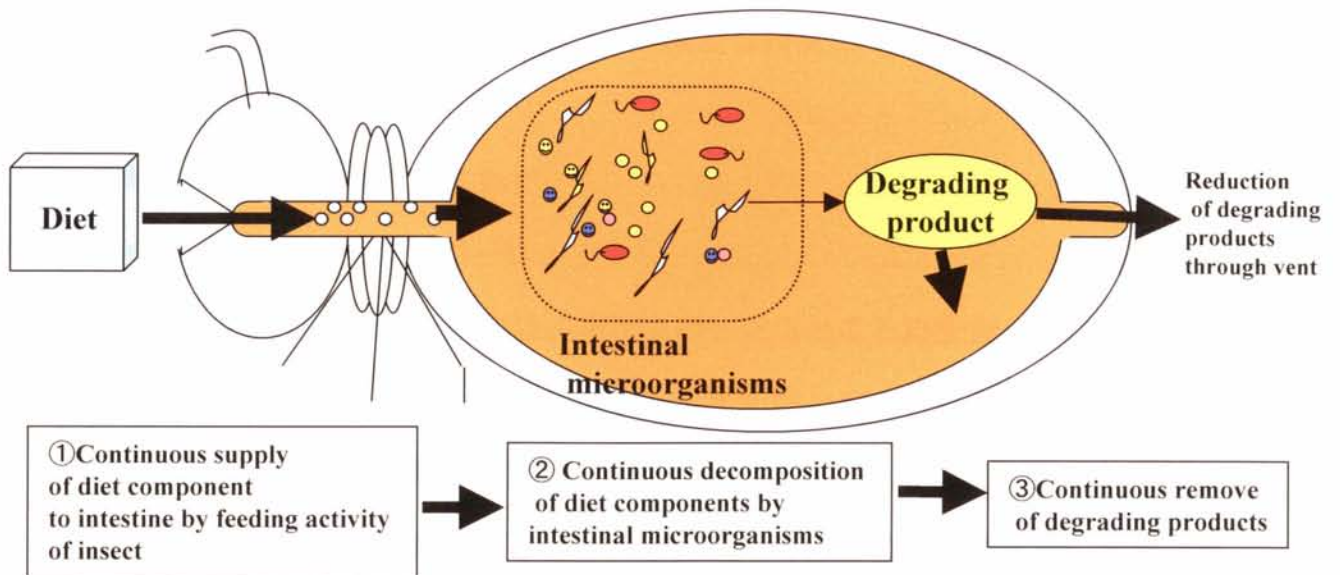
次に、*C. formosanus* で確立した微生物スクリーニング手法が他の様々な昆虫でも適用可能な応用性の広い手法であるかどうか確認することを目的として、

*C. formosanus* とは構成が大きく異なり、腸内微生物叢が細菌のみで構成されている高等シロアリのタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis* Shiraki) を用いて検討した。

本研究を通じて、自然界の微生物の共生系の一つである昆虫と腸内微生物叢の共生関係を積極的に制御し利用する、新たな有用微生物のスクリーニング法を提案したい。



**Fig.1-1. Schematic diagram of the interrelationship among feed, Insect (termite), and intestinal microorganisms.**



**Fig. 1-2. Schematic diagram of continuous degrading process of diet components by insect (termite) and intestinal microorganisms.**



## 第2章 既往の研究

本章では、本研究の意義、位置づけを明らかにすることを目的として、1) 微生物スクリーニング、2) 昆虫（シロアリ）の生態、3) 昆虫（シロアリ）と腸内微生物叢の共生関係についての代表的な研究について概観した。

### 2-1 微生物スクリーニング

#### 2-1-1 微生物スクリーニングとは

微生物のスクリーニングとは、地球上のいたるところに生育している微生物の潜在能力に期待して、目的にかなう生化学的能力を持つ微生物を自然界から探索することをいう（福井、別府 1985）。このような考え方を基に、19 世紀後半から 20 世紀初頭にかけて、パスツールやコッホらによって微生物の純粋培養技術が確立されて以来、多くの有用微生物が自然界から分離されてきた。特に、応用微生物学者を中心とする微生物スクリーニングを行う者は、“土壌こそ有用物質生産菌の宝庫であり、これを分離源として利用するのが微生物スクリーニングの本道である”と考え、土壌を主な対象としてスクリーニングが進められてきた。

#### 2-1-2 微生物スクリーニング技術

次に、微生物のスクリーニングを支えてきた代表的な 2 つの基本技術に関して概説する

##### 平板培養

平板培養とは、微生物スクリーニングにおいて単一の微生物つまり純粋培養株を得るために最も広く用いられる手法である。微生物の入った試料（微生物懸濁液）を平板培地上に摂取し培養することで、初めに一匹であった微生物

が増殖し、目に見えるコロニーと呼ばれる細胞集塊を形成させることで、単一のみの微生物細胞を獲得することができる。

平板培養によって微生物の培養を最初に行った科学者は、コッホである (Madigan *et al.*, 2003)。コッホは種々の微生物を培養するために、初めはゼラチンを培地の固定剤として主に用いていた。しかしながらゼラチンは多くの病原微生物 (コッホは主にヒト病原細菌の分離を目的としていた) の成長に最適な温度である 37 °C では凝固しないなど、利用性の面で非常に多くの問題点があった。そこで、コッホは寒天平板培地を用いた微生物分離法を開発した。寒天は、多くの微生物の培養に適しており、寒天平板培地によって有用微生物のスクリーニングのみならず、微生物学研究は飛躍的に発展し、今日でも寒天培地は一般的に用いられている。

### 集積培養

特殊な物質を分解、資化する微生物を分離したいとき、通常の試料中にはそのような細菌が多く存在することはないので、集積培養を行う必要が出てくる。集積培養とは、目的とする微生物の生育に対応した限定条件下で、特定の微生物種の増殖を旺盛にすることである。具体的には、特定の物質を唯一の炭素源として用いることが一般的である。微生物が生育するためには、炭素源を摂取できなければならないため、培地中の炭素源を分解資化できる微生物のみが増殖して優先種となる。たとえば、メタノール資化性菌やセルロース分解菌をスクリーニングする時には、メタノールやセルロースを単一の炭素源として用いて集積培養を行う。また一般的な集積培養は、フラスコや試験管を用いた回分培養によるものである。

しかし、微生物が種々の物質代謝を行いながら増殖することを考えると、培

養の時間経過にしたがって、pH や酸素濃度など限定した培養条件が変化することが考えられる。このよう培養環境は、もはや限定条件を保った集積培養とはいえない。そのため通常の集積培養は、数回の移植をくりかえして行う。

Watanabe らは、連続培養を用いてフェノール分解活性汚泥からフェノール分解菌を分離し、回分培養によって得られる微生物とは異なる微生物をスクリーニングできることを見出している (Watanabe *et al.*, 1998)。しかし、連続培養は、回分培養に比べて操作が煩雑でありコンタミネーションが起り易いなど、実験系の管理が困難であるため、一般的にあまり行われていない。

### 2-1-3 培養困難な微生物の存在とそれらを培養するための試み

#### 培養できない（困難な）微生物の存在

1977 年微生物の蛍光顕微鏡を用いた計数法が導入されてから (Hobbie *et al.*, 1977)、自然界には、生きているが培養できない微生物 [Viable but Non-Culturable (以下 VBNC)] が、自然界全体の微生物の 90%以上と極めて多数存在していることが明らかとなってきた。また、16S rDNA 解析を初めとする分子生物学的手法による解析によっても、環境中には培養できない未知の微生物が存在していることが明らかとなってきた (Amman *et al.*, 1995)。培養できない微生物が多数存在するのは、次に示すような多くの原因によるものと考察されている。(小暮 1999)。

1. 寒天に添加する栄養基質の種類、濃度が適当でない。
2. 寒天の乾き具合、あるいは水分活性が適当でない。
3. 培地成分、培養容器などに抗菌性物質がある。
4. 培養条件（温度、湿度、光、酸素濃度）などが適当でない。
5. 培地に接種する前に何らかの理由で死滅する。

6. 寒天培地と空気との接触が増殖を阻害する。
7. 天然で細胞塊を形成した微生物が一つのコロニーを作る。
8. 増殖が遅く、数週間ではコロニーを形成できない。
9. 増殖の早い他の菌に増殖を阻害される微生物がいる。
10. 抗菌性物質を出すほかの菌に増殖が阻害される。
11. 他の菌や生物と共存しなければ増殖できない菌が存在する。
12. ウィルスが菌を殺す。
13. 先天的にコロニーを作れない菌が存在する。
14. 菌に老化あるいはプログラム化された死がある。
15. 全菌数として計数される中に非生物体粒子が存在する。

#### 新たな微生物スクリーニングの試み

現在、これまで獲得が困難であった微生物をスクリーニングするための、多くの試みがなされてきた。その数例を下に挙げる。

Tamaki らは、培地の凝固剤に用いられているゲル化剤として寒天ばかりが慣例として用いられていることに問題点を見出し、ゲル化剤を寒天に代えてゲランガムを使用して環境中から微生物のスクリーニングを試みたところ、寒天培地を用いるよりも環境中から多くの微生物を検出し、さらに多種類の新規微生物が獲得できることを見出している(Tamaki *et al.*, 2005)。この研究は、従来一般的に用いられてきた寒天培地を用いた平板培養の問題点を明示し、さらにその問題点を異なるゲル化剤を用いることでブレイクスルーを試みた画期的な研究のひとつであるといえよう。

また、Manome らは、新規微生物が獲得できない理由として、分離培養困難な微生物の中には、スクリーニング系の中の特に増殖能の高い微生物によって生

育が阻害されるためであると考え、微生物細胞一つ一つを、個別のゲルビーズに包括して培養することで、新規な微生物を獲得することに成功している（ゲルマイクロドロップフローサイトメトリー法；Manome *et al.*, 2001）。

また、このほかにも新たな発想の下で新規な微生物のスクリーニング法および微生物利用技術の開発が盛んに行われている（工藤と大熊, 2004）。

## 2-2 昆虫（シロアリ）の生態

本項では、新規微生物のスクリーニングを行うための対象として捉えた昆虫、特に等翅目（シロアリ目）を中心に概説する。

### 2-2-1 昆虫

昆虫とは節足動物門大顎亜門の一綱である。カマアシムシ類、トビムシ類、無翅昆虫類および有翅昆虫類の4亜綱からなる。昆虫は種類数が生物界の中で群を抜いて多く、約77万種と動物の総種類数の70%以上を占めている（松光ら1992）。昆虫の体は、頭・胸・腹の3部分に明瞭に区分される。頭部には一対の触角、3対の口器（大顎、小顎、下唇）および一対の複眼と通常3つの単眼があり、胸部は3体節で、3対の脚と一般に2対の翅がある。腹部は7~13体節、普通は11体節で、有翅昆虫対の生態では付属肢がない。気管系はきわめてよく発達し、呼吸はもっぱらこれにより行われる。血管系は開放血管系である。唾液腺があり、中腸腺はなく、外胚葉由来のマルピーギ管がある。（生物学辞典 岩波）

### 2-2-2 シロアリ

本研究でモデル昆虫として用いたシロアリは、節足動物門、昆虫綱、等翅目

(シロアリ目) に属する昆虫である。熱帯および亜熱帯を中心として莫大な種数と存在量を誇る昆虫の一つであり、石炭紀頃に、ゴキブリと共通の祖先から進化したと考えられている。現在、世界中で 7 科 281 属約 2600 種以上のシロアリが知られており、現在も新種の発見が進んでいる(竹松, 2001; 渡辺ら, 2001)。このようにシロアリが世界中で繁栄した最大の理由として、木材や植物枯死体など他の生物がほとんど利用できないバイオマスを栄養源として利用できるようになったという点が上げられる。

シロアリは下等シロアリと高等シロアリの 2 つに大別することができる。下等シロアリと呼ばれるのはムカシシロアリ科、オオシロアリ科、レイビシロアリ科、ミゾガシラシロアリ科、シュウカクシロアリ科、ノコギリシロアリ科の 6 科に分類されるシロアリである。高等シロアリと呼ばれるのはシロアリ科の 1 科であるが、シロアリ全種の約 70% を占める(安部, 1989)。

### 2-3 昆虫(シロアリ)と腸内微生物叢の共生関係

2-2 では、昆虫特にシロアリについて概説したが、本項では、本研究で特に着目した昆虫と腸内微生物の共生に関する研究について概説する。

#### 2-3-1 昆虫と腸内微生物叢の共生関係全般

昆虫の多くの種は、腸内に微生物を共生させており、腸内微生物の果たす栄養生理的役割は非常に大きい(清水 1995)。昆虫綱は 4 亜綱で構成されるが、そのうち約 10 目の昆虫から食物の消化に関係した微生物との共生系が報告されているため(東, 安部 1992)、非常に多くの昆虫が微生物との共生関係を有していると考えられる。いくつか例を挙げると、コオロギ(Santo Domingo *et al.*, 1998)、アザミウマ(thrips)(de Vries *et al.*, 2004)、バッタ(Dillon and Charnley 1995)、マイ

マイガ (Broderick *et al.*, 2004)、ゴキブリ (Zurek and Keddie 1996) などがあげられるが、昆虫の中でも最も腸内微生物叢が研究されているのはシロアリである。

### 2-3-3 シロアリの腸内微生物叢の共生関係

ここでは、これまでに報告されているシロアリ腸内の微生物とその機能に関して概説する。下等シロアリ (*C. formosanus*) および高等シロアリ (*N. takasagoensis*) の腸の構造の概略図を Fig. 2-1 に示す。シロアリは、後腸部が大きく肥大した構造をしており、ここに高密度に微生物が存在している。

#### 腸内原生動物

下等シロアリの腸内には、原生動物が存在している。下等シロアリの腸内原生動物は、1856年 Lespes によって発見された(東正彦, 安部琢哉, 1992)。シロアリ腸内の原生動物は古くから分類研究が行われており、Yamin (1979)によると1979年までにトリコモナス目、オキシモナス目、超鞭毛虫目の原生動物約434種に関する記載がされており、シロアリの種類によって原生動物の種類や数が異なる。

シロアリの後腸内で、原生動物は非常に高密度に存在している。ヤマトシロアリを例にあげると、1匹あたりの腸に存在する原生動物は5~12万細胞で、その重量はシロアリの体重の約1/3も占めている(Brune and Friedrich, 2000)。これらの原生動物はシロアリの腸内に特化した絶対共生性の嫌気性原生動物であり、特にオキシモナス目と超鞭毛虫目はシロアリの腸管のみから報告されている(井上, 2001)。これらの原生動物の多くはその細胞内に木片を取り込む事や、セルロースを選択的に取り込むことが確認されているため、原生動物は木材の分解において大きな役割を担っていると考えられている(Yamaoka and Nagatani,

1975 ; Yamaoka and Nagatani, 1977 ; Yamaoka, 1979)。

### 腸内細菌

また、シロアリ腸内細菌として乳酸菌などが単離され(Bauer *et al.*, 2000) 、単離株の生理学的特性に関する研究はされているが、その数は決して多くない。腸内に存在するほとんどの細菌が培養困難な種類の細菌であり、培養できる細菌は顕微鏡下で観察できる細菌の10%に満たないと言われている(Tholen *et al.*, 1997)。一例を挙げると、顕微鏡下では形態的に多様なスピロヘータが非常に多く観察でき、自然界においてシロアリの腸内ほど高密度にスピロヘータが存在する環境は他に知られていない。唯一の報告として、Leadbetterら(1999)によって *Zootermopsis angusticollis* からスピロヘータが分離され、それらが水素と二酸化炭素から酢酸を生成することが実証されている。しかしながらスピロヘータは偏性嫌気性菌であり難培養であるため、分離培養された例は非常に少ない。

また分子生物学的手法の発展により、直接環境中の細菌叢からDNAを抽出し、遺伝子を解析することで培養を介さず腸内微生物叢を解析することが可能となってきた(Amman *et al.*, 1998)。個々の微生物が有する遺伝子の塩基配列の情報から、水素生産菌、乳酸菌、硫酸還元菌、酢酸生成菌、窒素固定菌、またメタン生成古細菌など多様な微生物の存在が明らかになっている(Ohkuma 2003 and references therein)。

### シロアリの木材成分分解に関する研究

自然界において多くのシロアリは、木材などの枯死植物を餌としている。ここでは、まず木材の主成分について簡単に述べた後、シロアリによるそれら木



材成分の分解に関する研究に関して概説する。

木材は主成分としてセルロースを約 50%、ヘミセルロースおよびリグニンを約 20~30%それぞれ含んでおり、それ以外は抽出成分である(中野ら,1983)。また、樹種によりこれらの成分の構成比は若干異なる。木材は、セルロースの微細繊維(マイクロフィブリル)を中心にヘミセルロース、リグニンが周囲に存在した強固な構造をしている。鉄筋コンクリートに例えると、セルロース繊維が鉄筋で、周りをヘミセルロース、リグニンというコンクリートで固定されているようなイメージである。次に3つの主要構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンについて概説する。

セルロース：D-グルコースが $\beta$ -1,4結合によって直鎖状に連なった高分子である。また、その直鎖が複数お互いに水素結合で結合し、強固な構造をとっている。木材をはじめ、植物の主要成分であり地球上に最も多く存在するバイオマスである。

ヘミセルロース：セルロース以外の多糖成分の総称である。よく知られているものとしては、主にキシロースからなるキシラン、マンノースからなるマンナンなどが知られている。ほとんどは複数種の単糖が結合したヘテロ多糖として存在している。

リグニン：フェニルプロパノイドを基本単位に主に構成され、それらが3次元的にC-C結合やエーテル結合など複数の結合様式によって構成された高分子であり、難分解性の物質として知られる。

次にシロアリの木材成分の分解プロセスに関して概説する。

## シロアリのセルロース分解

下等シロアリのセルロース分解に関しては、1924年Cleavelandらの研究によって、シロアリの木材（セルロース）分解には、原生動物が大きく関与していることが明らかとなった(Cleaveland, 1924)。彼らは36°Cでシロアリを24時間処理し腸内原生動物を除去すると、シロアリが木材の消化能を失い木材を摂食して長期間生存できなくなるという現象を見出し、原生動物が木材分解に関して主要な役割を持つと結論づけた。この研究以来、シロアリの木材分解は完全に腸内微生物（原生動物）に依存しており、シロアリ自身はセルロース分解能を有していないという説が一般的になった。

しかし Yokoe ら(1964)によって、ヤマトシロアリにおいて原生動物だけでなく、シロアリ自らもセルラーゼを生産している可能性が示唆された。その後 Yamaoka や Nagatani ら(1975)によって、ヤマトシロアリは自らが生産するセルラーゼと原生動物由来のセルラーゼという、由来が異なる2種類のセルラーゼの相乗効果によって効率的に木材が分解されることが示唆された。さらに Watanabe ら(1998)によって、シロアリの細胞由来のセルラーゼ遺伝子が特定され、シロアリ自身がセルロース分解能を有することが明らかとなり、下等シロアリが自ら生産するセルラーゼと、原生動物が生産するセルラーゼの2つの由来のセルラーゼを用いてセルロース分解を行っていることが遺伝子レベルで明らかとなった。

一方、高等シロアリ腸内には原生動物が共生しておらず細菌のみが共生している。一般にシロアリにおいては、腸内微生物叢が木材中のセルロース分解に大きく関わっていると考えられているが、実際には微生物が高密度に存在する領域に存在するセルラーゼ活性はわずかである。またセルラーゼ生産細菌が腸内より分離された例はほとんどなく、細菌がセルロース分解に関わっているかどうかは、不明な点が多い。

現在では、高等シロアリの中腸から、シロアリ自身が生産したセルラーゼを分泌していることが遺伝子レベルで明らかとなっており(Tokuda *et al.*, 1999)、セルロース分解に関しては高等シロアリ自身が大きく関与していると考えられている。

また、高等シロアリの中でもキノコシロアリは、シロアリがコロニー内で栽培したキノコ（糸状菌）の生産したセルラーゼを利用していると考えられている(Martin and Martin 1978; Abo-Khatwa, 1978; Rouland *et al.*, 1988)。これはキノコシロアリ体内から精製されたセルラーゼと、糸状菌から精製されたセルラーゼの性質、分子量が酷似したという研究結果に基づいた説である。

#### シロアリのヘミセルロース分解

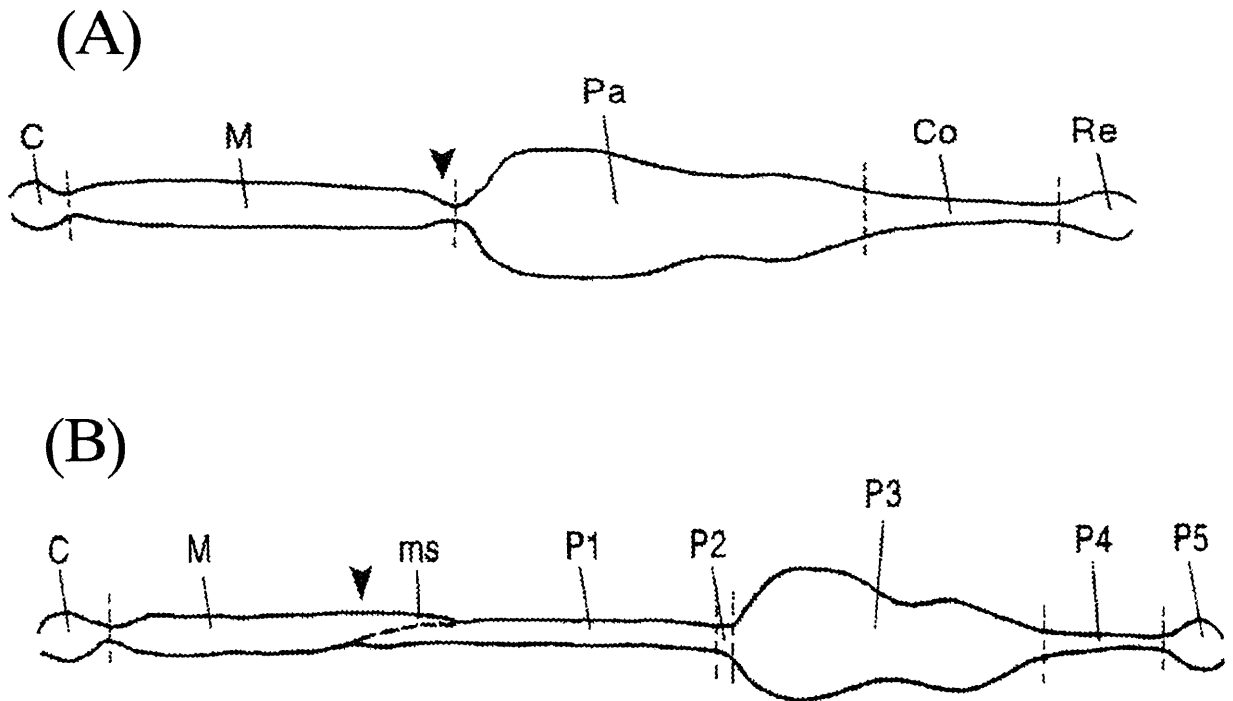
シロアリのヘミセルロース分解に関しては、1997年 Inoue らが下等シロアリであるヤマトシロアリの原生動物がキシラン分解能を有することを明らかにしている(Inoue *et al.*, 1997)。また、キシラナーゼ生産能を持つ酵母、細菌がシロアリより単離されている(Schafer *et al.*, 1996)。さらにそれらの菌株を利用した酵素生産、水素生産など実用化に向けた研究も行われている(Taguchi *et al.*, 1996)。以上のような研究から、下等シロアリがヘミセルロースであるキシラン分解能を有することが明らかとなっている。

#### シロアリのリグニン分解

シロアリによるリグニン分解に関しては、あまり明らかになっていない。これまでの研究では、腸内原生動物の体内にリグニンが取り込まれ、わずかに変性されるという報告がある(Kyou *et al.*, 1996)。各種シロアリで、リグニンモデル化合物の分解が行われるという報告はされているが(Hirai *et al.*, 2000)、リグニン

分解能を持った微生物の単離例は少なく (Kato *et al.*, 1998, Kuhnigk T *et al.*, 1994) 、シロアリがリグニン分解を積極的に行っているかどうか明らかとなっていないのが現状である。しかしながら、シロアリのリグニン消化率が 17~24% という報告もあるため (Itakura *et al.*, 1995)、リグニンの分解がシロアリ腸内で起こっていることは間違いない。

以上のように、これまでに多くの微生物スクリーニング法が開発され、多くの有用微生物のスクリーニングが試みられてきた。しかしながら、未だスクリーニングできない微生物は自然界に膨大に存在している。したがって、今後新しい発想のもとで、新規な微生物スクリーニング法が開発が期待されている。本研究では、昆虫の腸内を一種の連続培養系として用い、与える餌成分を制御することで、目的の餌成分分解菌を腸内に濃縮する方法を開発した。このようなコンセプトで開発された微生物スクリーニング法はこれまでに報告がなく、新規性の高い、独創性のある手法といえる。



**Fig. 2-1. Schematic diagrams of the termite guts.**

**(A) Lower Termite (*C. formosanus*)**

**(B) Wood-feeding higher termite (*N. takasagosensis*)**

**Abbreviation**

C: Crop (Foregut), M: Midgut, Pa: Paunch, Co: Colon, Re: rectum

※ Pa~Re= hindgut

ms: mixed segment, P1: ileum, P2: enteric valve, P3: Paunch,

P4: colon, P5: rectum

※ P: Proctodeal = Hindgut

## 第3章

### *Coptotermes formosanus* Shiraki (イエシロアリ)と腸内微生物叢の共生関係を用いた新規微生物スクリーニング法の開発

#### 3-1 序

「餌—昆虫—腸内微生物叢」系を用いた微生物スクリーニング法の開発に当たり、用いるモデル昆虫の条件として、①実験室での飼育が容易であること、②用いる昆虫の餌成分分解と共生する腸内微生物叢の関係がよく知られていること、以上2つを考慮して、西日本以南を中心に生息する木材摂食昆虫のイエシロアリ *Coptotermes formosanus* Shiraki (以下 *C. formosanus*) を用いて研究を行った。また、目的の微生物を濃縮させるためのモデル餌成分として、難分解性で木材の主成分の一つであるリグニンに関連した構造を有する芳香族化合物フェノールを選択した。フェノールは細胞膜機能の阻害(Yap *et al.*, 1999)や、タンパク質変性作用など生物一般に毒性を有する物質であるため、フェノールの摂食による、*C. formosanus* 自身への影響(生存状態など)にも注目しつつ、腸内微生物叢の変化を捉えることを重視した。

#### 3-2 フェノール人工餌が *C. formosanus* 自身に与える影響

##### 3-2-1 材料および方法

###### シロアリ

京大大学生存圏研究所より譲与された *C. formosanus* の職アリ(Fig.3-1)を用いた。*C. formosanus* 腸内には Fig. 3-1 に示す3種の原生動物と多種類の細菌が共生している。アカマツ(*Pinus densiflora* Sieb)の木材片を用いて、 $30 \pm 2^\circ\text{C}$  で飼育した。

### 人工餌の調製および人工餌を用いた *C. formosanus* の飼育

田中ら (2006) の方法を用いて人工餌を調製した。15 g/l のアガロース (TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan) を蒸留水に溶解させ、121°C, 15 min オートクレーブした。50 g/l フェノールをφ 0.22 μm durapore filter (Millipore)を用いて滅菌し、滅菌したアガロース溶液と種々のフェノール濃度 (50, 100, 150, 200 mg/l) になるように混ぜ合わせた。溶液は滅菌シャーレの中で固化させた。コントロールとして、15 g/l アガロースのみ、およびアガロースとアカマツ木粉 (粒径 100μm 以下) を含む人工餌を調製した。固化したアガロースゲルは 25×25×5 mm サイズにカットした。25 匹の *C. formosanus* と人工餌を滅菌ポリスチレンケース (30×30×10 mm) に入れ、30°C で飼育した。また *C. formosanus* を飢餓状態で飼育するため 25 匹の *C. formosanus* のみを入れたポリエチレンケースを十分な湿度を保ち飼育した (滅菌水を張った滅菌ガラスシャーレ内に置き蓋をした)。飼育中生存している *C. formosanus* の数を経時的に計数し、生存率を算出した。生存率は、その時生存している *C. formosanus* の数を、初発の生存数 (25 匹) を 100% として表したものである。*C. formosanus* の体重は 10 匹の *C. formosanus* をそれぞれのケースからランダムにピックアップし、化学天秤を用いて測定し、一匹あたりの平均値として算出した。全ての実験は 3 連で行った。

### 3-2-2 結果

Figure 3-2 は人工餌成分が *C. formosanus* の生存率に及ぼす影響を表している。木粉人工餌、アガロース人工餌および飢餓条件で飼育した *C. formosanus* の 20 日後の生存率は、それぞれ 95%、78.7%、57.3%であった。一方 50 mg/l および 100 mg/l のフェノールを含む人工餌を摂食した *C. formosanus* の 20 日後の生存率はそれぞれ 38.7%、17.3%であった。150 mg/l および 200 mg/l のフェノール濃度

の人工餌では、15日以内に全ての *C. formosanus* は死滅した。また、木粉、アガロース、50 mg/l および 100 mg/l のフェノールを含む人工餌では、それぞれ肉眼によって餌の摂食が観察されたが、150 mg/l および 200 mg/l のフェノールを含む人工餌ではほとんど摂食が観察されなかった。

Figure 3-3 は摂食実験期間中における *C. formosanus* の体重の変化を表している。木材を摂食している初期の *C. formosanus* (摂食期間 0 日目) の平均体重は 3.94 mg だった。木粉、アガロースおよび 100 mg/l フェノールを含む人工餌を摂食させた 20 日後の体重は、それぞれ 3.42 mg、2.41 mg、2.22 mg であった。以上の結果は、*C. formosanus* の生存がフェノールによって阻害され、木粉人工餌と比較してアガロースおよびフェノール人工餌の両者をそれぞれ摂食することによりシロアリの体重が著しく減少したことを示している。



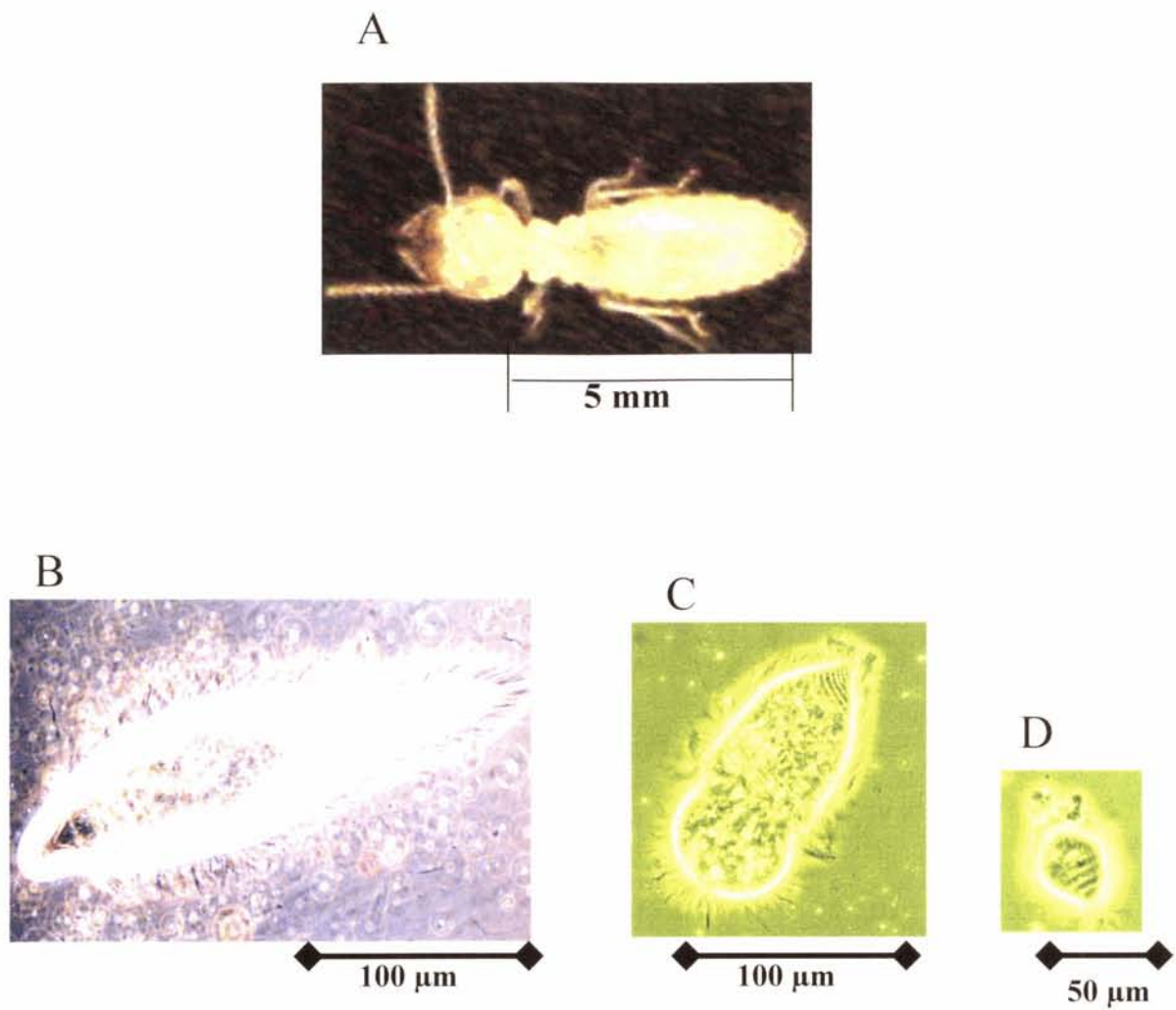


Fig. 3-1. Photographs of *Coptotermes formosanus* Shiraki and three species of intestinal protozoa.

A: *Coptotermes formosanus* Shiraki, B: *Pseudotrychonympha grassii*  
 C: *Holomastigotoides hartomanni* and D: *Spirotrichonympha leidy*

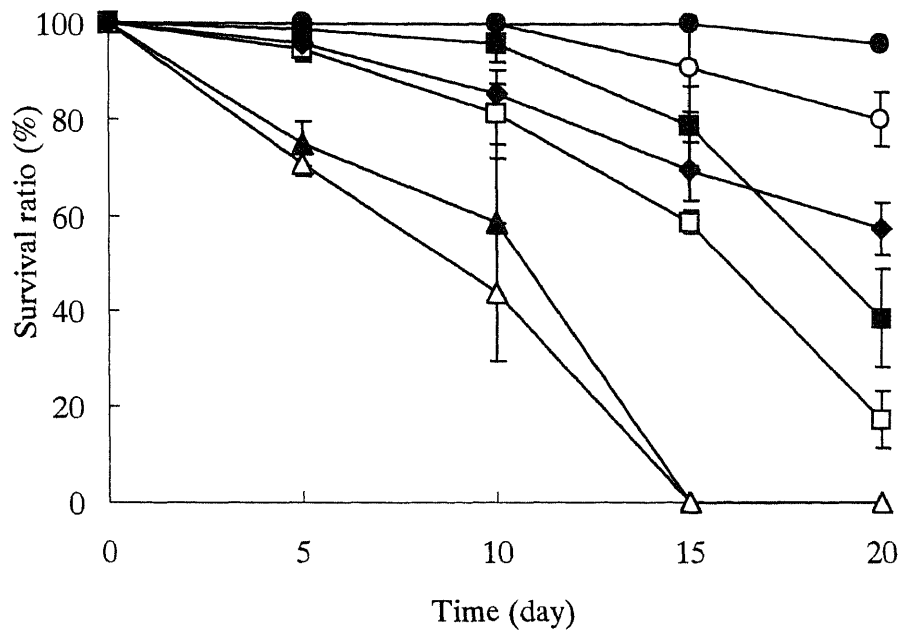


Fig. 3-2. Survival of *C. formosanus* during feeding on various artificial diets. Error bars are  $\pm$ SD (n=3).

Symbols: closed circle, wood powder; open circle, agarose; closed square, 50 mg/l phenol; open square, 100 mg /l phenol; closed triangle, 150 mg/l phenol; open square, 200 mg/l phenol artificial diet; closed diamond, starvation.

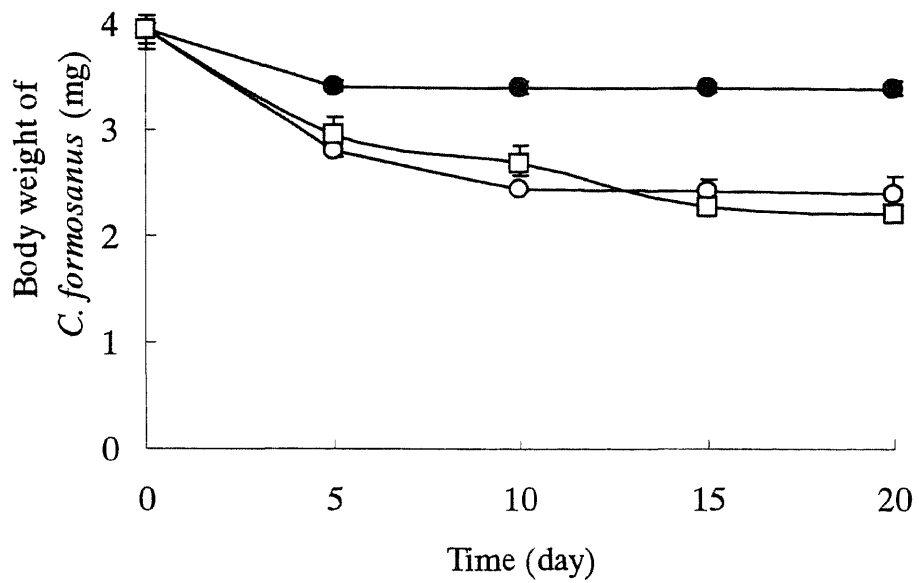


Fig. 3-3. Changes in the body weight of *C. formosanus* during feeding on various artificial diets. Error bars are  $\pm$ SD (n=3).

Symbols: closed circle, wood powder;  
 open circle, agarose;  
 open square, phenol (100 mg/l).

### 3-3 フェノール人工餌が *C. formosanus* 腸内原生動物叢に与える影響

#### 3-3-1 材料および方法

*C. formosanus* 腸内原生動物を経時的に観察および計数した。木材、アガロース人工餌および 100 mg/l フェノール人工餌をそれぞれ与えた 3 匹の職アリをランダムに集めた。それらの後腸を鋭利なピンセットを用いて肛門側から摘出して回収した。それらを 30  $\mu$ l の Trager U solution (Trager, 1934) 中に懸濁し、後腸を溶液中で穏やかに粉碎し、原生動物を分散させた。原生動物の種類は顕微鏡観察によって識別した。それぞれの種類の原生動物を Improved Neubauer 計算版 (Kayagaki Irikakogyo Ktd., Tokyo, Japan) を用いて計数した。

#### 3-3-2 結果

Figure 3-4 は木材、アガロースおよび 100 mg/l のフェノールを含む人工餌を摂食した *C. formosanus* の腸内原生動物の総数の変化を示している。アガロースおよびフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の両方で急激な腸内原生動物数の減少が見られた *Pseudotrychonympha grassi* (large protozoa) と *Holomastigotoides hartmanni* (middle protozoa) は 5 日間で全て消失し、*Spyrotrichonympha leidyi* (small protozoa) も 10 日後には全て消失していた。原生動物の消失は、Figure 3-2 に示す *C. formosanus* の体重の減少と傾向が一致していた。

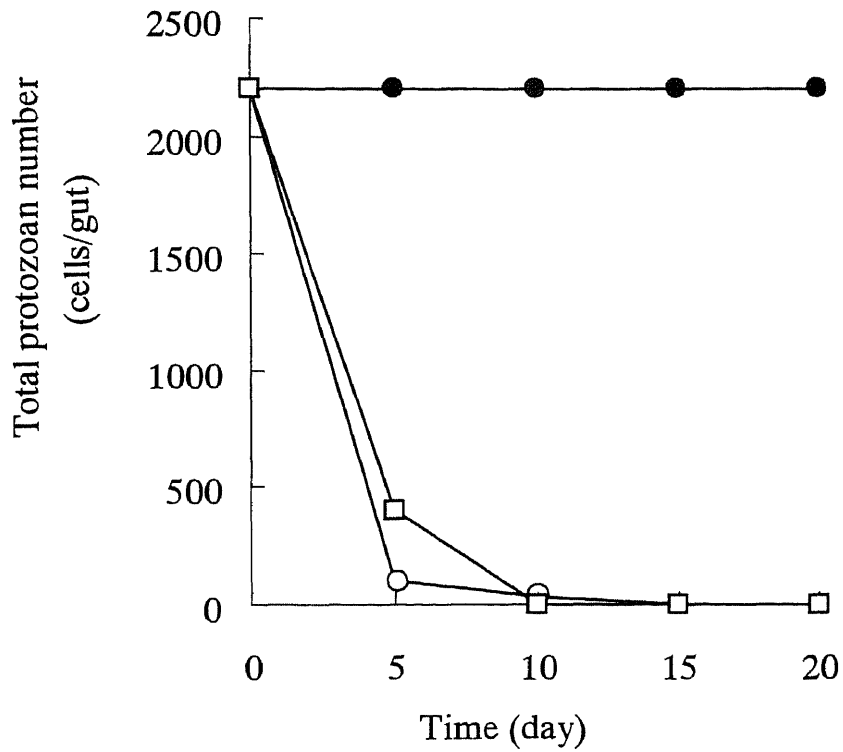


Fig. 3-4. Changes in the total number of protozoa in hind gut of *C. formosanus* during feeding on various artificial diets.

Symbols: closed circle, wood powder; open circle agarose; open square, phenol (100 mg/l).

### 3-4 フェノール人工餌が *C. formosanus* 腸内全細菌数に与える影響

#### 3-4-1 材料および方法

前述の 3-3-1 と同様の方法で腸内微生物叢の懸濁液を調製した。懸濁液中の全細菌数は、細菌用計算盤 (Kayagaki Irikakogyo Ltd., Tokyo, Japan) を用いて顕微鏡観察により計測した。

#### 3-4-2 結果

Figure 3-5 はアガロースおよび 100 mg/l のフェノールを含む人工餌を摂食した *C. formosanus* 全細菌数の経時変化を示している。アガロースおよびフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の両者で急激な腸内全細菌数の減少が見られた。実験 0 日目の *C. formosanus* (木材摂食) の腸内全細菌数は  $4.0 \times 10^7$  cells/gut であったが、アガロース人工餌、フェノール人工餌を摂食することによって、*C. formosanus* 腸内全細菌数は 5 日間でそれぞれ  $3.1 \times 10^6$  と  $2.5 \times 10^6$  と 10 分の 1 以下まで減少した。

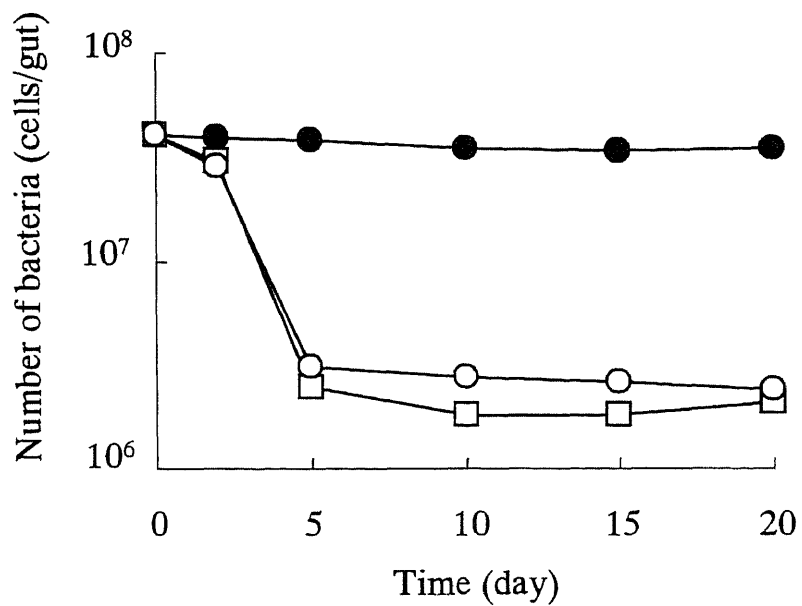


Fig. 3-5. Changes in the total number of bacteria in hind gut of *C. formosanus* during feeding on artificial diets. Symbols: closed circle, wood powder; open circle, agarose; open square, phenol (100 mg/l) artificial diet.

### 3-5 寒天培地を用いた *C. formosanus* 腸内微生物叢中のフェノール分解菌の検出およびコロニーカウントによる定量

#### 3-5-1 材料および方法

##### 寒天平板培養

木材、アガロース人工餌およびフェノール人工餌で 10 日間飼育した *C. formosanus* 腸内におけるフェノール分解菌を定量するため、腸内微生物叢を寒天培地を用いて培養した。5 匹分の後腸を鋭利なピンセットを用いて肛門側から摘出して回収した。後腸は 1 ml の 500 mg/l フェノールを単一炭素源として含む MP500 培地 (以下の成分を含む (per liter) 2.75 g  $K_2HPO_4$ 、2.25 g  $KH_2PO_4$ 、1.0 g  $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.1g NaCl、0.02 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、0.01 g  $CaCl_2$ ) (Watanabe *et al.*, 1998) 中でホモジェネートした。腸懸濁液 (100  $\mu$ l) を 900  $\mu$ l の MP500 培地で希釈した。この操作を数回繰り返すことで、適当濃度の腸懸濁液を調製した。希釈した腸懸濁液を MP500 寒天培地 (MP500 を 1.5% 寒天ゲルで固定したもの) に接種し、10 日間 30°C で培養した。培養後、MP500 寒天培地に生じたコロニーを計数し、Colony Forming Unit per gut (CFU/gut) を算出した。実験は全て 3 連で行った。

##### 微生物のフェノール分解能の判定

コロニーを形成した微生物のフェノール分解能を確認するため、液体培養による培養を試みた。コロニーを滅菌した爪楊枝でピックアップし、L 字試験管 (Taitec, Saitama Japan) に入った 5 ml の MP500 培地に接種し、30°C、30 strokes/min で振とう培養を 2-7 日間行った。培養後、液体培地中のフェノール濃度を Phenol



Test Wako (Wako, Osaka, Japan)を用いて測定し、フェノールの分解が確認された微生物をフェノール分解菌と判定した。

### 3-5-2 結果

Figure 3-6 は木材、アガロースおよび 100 mg/l フェノール人工餌をそれぞれ 10 日間摂食させた *C. formosanus* の腸内微生物叢を MP500 寒天培地を用いて平板培養することによって得られた CFU/gut を示している。木材、アガロースおよび 100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内微生物叢の CFU/gut はそれぞれ  $3.4 \times 10^4$ 、 $5.4 \times 10^4$ 、 $1.9 \times 10^5$  であった。次に 100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内微生物叢から得られた 85 の微生物コロニーをランダムにピックアップして、フェノール分解能を調べた。その結果 85 中 83 のコロニー形成菌がフェノールを分解することができなかった。つまり、100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内微生物叢から非常に高い CFU/gut 値が認められたにもかかわらず、ほとんどのコロニー形成菌(97.6%)はフェノール分解能を有していなかった。そのため、MP500 寒天培地ではフェノール分解菌以外の微生物もコロニーを形成するため、フェノール分解菌の検出および定量には適さないことが明らかとなった。

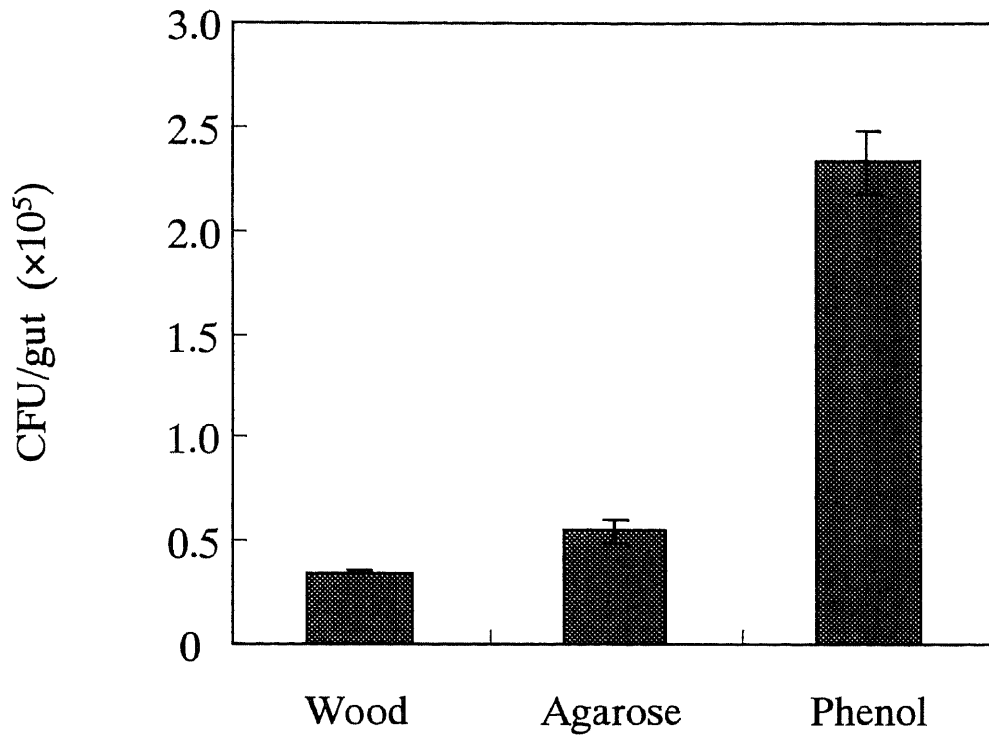


Fig. 3-6. Number of colony forming units obtained per gut of *C. formosanus* fed with various artificial diets. The colonies were formed on MP500 agar plate. Error bars are  $\pm$ SD (n=3).

### 3-6 メンブランフィルター培養法を用いた *C. formosanus* 腸内微生物叢中のフェノール分解菌の特異的検出および定量

3-5の寒天平板培地を用いた検討の結果から、MP500 寒天培地を用いる従来法では、500 mg/lのフェノールに耐性を有し、フェノールを分解せずアガーやアガー由来のオリゴ糖などを消費するような微生物もコロニーを形成すると考えることができた。それゆえフェノール分解菌のみを検出および定量するために、培養系にフェノールのみを単一の炭素源として含むメンブランフィルター培養法を試みた。この方法ではアガーは用いず、PVDFメンブランフィルター上に腸内微生物叢を捕集し、微生物叢はメンブランを通して供給される液体培地成分のみを利用する。そのため、液体培地中に含まれるフェノールを分解し代謝できる微生物のみが増殖しコロニーを形成することが考えられる。

#### 3-6-1 材料および方法

腸懸濁液は3-5-1と同様の方法で調製した。はじめに、Milliflex フィルターファネルユニット HVWP 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore MA USA)を吸引ろ過装置にセットした。5 mlのMP500培地をあらかじめファネルユニットのファネル部分に注ぎ、そこに100  $\mu\text{l}$ の希釈した腸懸濁液をいれ、腸内容物をMP500培地に均一に分散させた。液体画分はろ過することで除去し、腸内微生物はメンブランフィルター上に回収した。フィルターを液体培地カセット MXLMC0120 (Millipore MA USA)にセットし、30°Cで10日間培養した。培養後は、メンブランフィルター上に生じたコロニーを計数し、CFU/gutを算出した。実験は全て3連で行った。さらに、生じたコロニーのうち50個をランダムにピックアップし、それらのフェノール分解能の判定を前述の方法(P 29~30 参照)で行った。なお木材も

しくはフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* から算出した CFU/gut 値と、前述の顕微鏡観察によって得られた全細菌数を用いて、全細菌数に対する腸内のフェノール分解菌の比率を存在比として概算した。

### 3-6-2 結果

Figure 3-7 はメンブランフィルター上に形成された CFU/gut 数を示している。木材およびアガロース人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内微生物叢からはわずかなコロニー (~200 CFU/gut) のみしか検出されなかった。一方、100 mg/l フェノール人工餌を摂食させた *C. formosanus* 腸内微生物叢からは  $2.87 \times 10^3$  CFU/gut のコロニーが検出された。生じたコロニーの中から 50 コロニーをランダムにピックアップしてフェノール分解能を調べた結果、50 全てのコロニー形成菌がフェノールを分解した。Table 3-1 は木材およびフェノール人工餌を 10 日間摂食させた *C. formosanus* 腸内の全細菌数、メンブランフィルター培養法を用いて検出したフェノール分解菌数および全細菌に対するフェノール分解菌の存在比を示している。腸内の全細菌数に対するフェノール分解菌の存在比はそれぞれ  $5.0 \times 10^{-6}$ 、 $1.0 \times 10^{-3}$  である。この数値を比較すると、フェノール人工餌を摂食させることによって全腸内細菌数に対するメンブランフィルター培養法によって検出されたフェノール分解菌の存在比が 200 倍高まると考えることができる。これらの結果から、メンブランフィルター培養法がフェノール分解菌のみを検出するために有効であり、100 mg/l フェノール人工餌を 10 日間摂食させた *C. formosanus* 腸内には、フェノール分解菌が濃縮されることが示された。

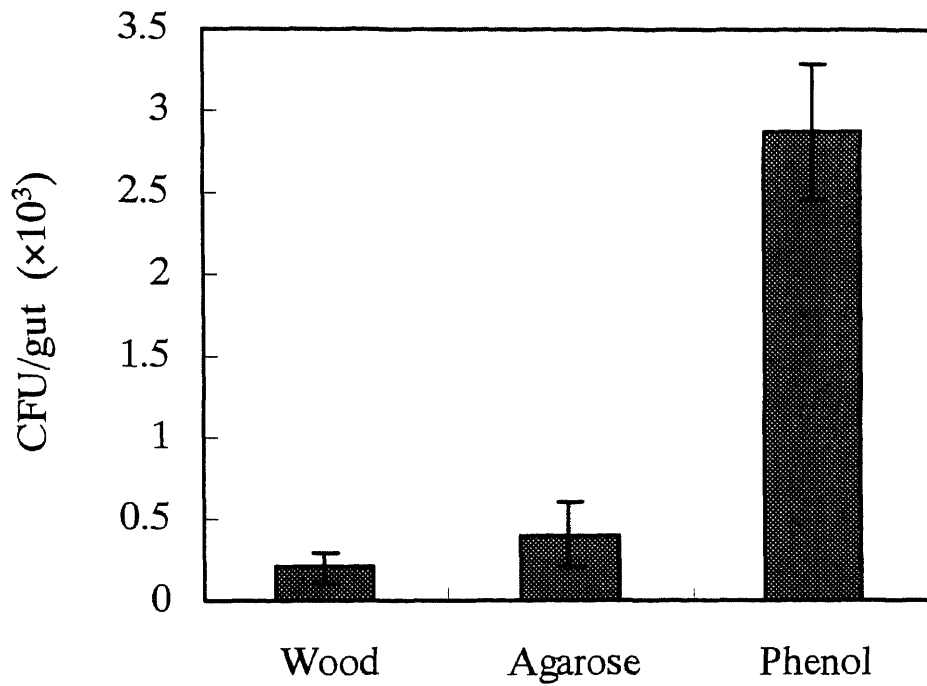


Fig. 3-7. Number of colony forming units obtained per gut of *C. formosanus* fed with various artificial diets. The colonies were formed on PVDF membrane filter supplemented with MP500 liquid medium. Error bars are  $\pm$ SD (n=3).

**Table 3-1. Comparison of total bacterial number, phenol degrading bacteria and existence ratio of phenol degrading-bacteria in intestine of *C. formosanus* fed with wood and phenol.**

<b>Diet</b>	<b>Number of Total bacteria [cells/gut] (A)</b>	<b>Number of phenol-degrading bacteria [CFU/gut] *(B)</b>	<b>Existence ratio of phenol degrading bacteria [ (B)/(A)]</b>	<b>(2) / (1)</b>
<b>Wood</b>	$4.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^{-6} \dots (1)$	-
<b>Phenol**</b>	$2.8 \times 10^6$	$2.8 \times 10^3$	$1.0 \times 10^{-3} \dots (2)$	<b>200</b>

**\* Obtained by using membrane filter method**

**\*\* Feeding time: 10 days**

### 3-7 PCR-DGGE 解析

メンブランフィルター法を用いることで、培養可能なフェノール分解菌がフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内に濃縮していることが実証された。しかし、多くの培養できない微生物もシロアリ腸内には存在する。それゆえ、細菌叢の構成を解析するのに一般的な PCR-DGGE 法を用いてシロアリの腸内における全細菌叢の解析を試みた。さらに、フェノール人工餌を摂食させた *C. formosanus* 腸内細菌叢を、従来の集積培養によって得られる細菌叢と比較した。

#### 3-7-1 材料および方法

##### 集積培養

5 匹分の木材摂食 *C. formosanus* の腸を鋭利なピンセットを用いて肛門から摘出し、5 ml の MP500 培地に接種した。腸懸濁液を L 字型試験管 (Taitec, Saitama, Japan) に入れ、30°C、30 strokes/min で振とう培養した。微生物の増殖は経時的に Spectronic 20A (Shimadzu Japan) を用いて OD<sub>660</sub> を測定することでモニターした。培地中のフェノール濃度を Phenol Test Wako (Wako, Osaka, Japan) を用いて定量した。フェノールが完全に消費された時点で、培養液中の菌体を遠心分離 (10,000 × g, 5min) によって回収した。

##### DNA 抽出および touchdown PCR

それぞれの餌条件から 10 匹ずつシロア리를ランダムに集め、後腸を鋭利なピンセットを用いて摘出した。後腸および前述の集積培養によって得られた菌体から Fast DNA kit (Bio 101 Inc. Vista, CA, USA) を用いて、全 DNA をそれぞれ抽出

した。得られた全 DNA の抽出液を鋳型として、F341-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGG AGGCAGCAG-3')、518R (5'-GTATTACCGCGGTGCTGG-3')のプライマーセット (Ogino *et al.*, 2001)を用いて、16S rDNA の V3 領域を増幅した。PCR reaction mixture(20  $\mu$ l)の組成は以下の通りである。0.5U *Ex Taq* hot start version(TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan), 0.5  $\mu$ l 全 DNA, 2  $\mu$ l 10 $\times$  PCRbuffer, 0.25  $\mu$ M each primer 100  $\mu$ M each dNTP。PCR 反応は Touchdown PCR program を用いた。反応プログラムは以下の通りである：{preheat 94 $^{\circ}$ C 5min、denature 94 $^{\circ}$ C 1 min と annealing 65 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ C [2 サイクル毎 1 $^{\circ}$ C 下がる]1 min、extension 72 $^{\circ}$ C 1min を 20 サイクル行い、次に 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min を 10 サイクル行った。最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 min 反応させた (Ogino *et al.*, 2001) }。反応生成物を QIA quick (Qiagen, Crawley, United Kingdom)を用いて精製し、精製物の O.D.<sub>260</sub> を測定することで、DNA 濃度を測定した。

### DGGE 解析

得られた PCR 増幅産物 250 ng を DGGE に供した。DGGE マーカーとして、以下の最近由来の 16S rDNA 断片の混合溶液を用いた。海水サンプルから得られた *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752 のクローン、*Balneatrix alpica*、*Agrobacterium gelatinovorum*、*Methylomicrobium album*、Sargasso Sea  $\alpha$ -proteobacterium、*Sulfitobacter pontiacus*、*Erythrobacter* sp. および *Emiliana huxleyi*。DGGE は D-Code System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)を用いて行った。8%のポリアクリルアミドゲルを調製し、0.5 $\times$ TAE buffer (1 $\times$ TAE は 0.04M Tris base、0.02M 酢酸 Na、10mM EDTA [pH7.4]を含む)を用いて電気泳動を行った。DGGE ゲルとしては 20~70%の変性剤である尿酸とホルムアミドの



濃度勾配がかかったものを用いた。100%変性剤とは40%[vol/vol]ホルムアミドと7M尿素を含むものである。DGGE電気泳動は35V, 60°C一定(定電圧定温下)で24時間行った。泳動終了後、ゲルはSYBR Gold (Molecular Probes., Eugene, OR)を用いて染色し、UVトランスイルミネータを用いてDNAを可視化後、泳動像を撮影し、DGGEバンドプロファイルをimage-analyzing system (Image Master Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)を用いて解析し、その結果からバンドの輝度と移動度を算出した。また、各バンド間におけるバンドパターンの類似度(Cs)を(1)式(Sorensen, 1948)を用いて計算し、それらの類似度を基に系統樹を構築した。

$$Cs = 2j / (a+b) \quad (1)$$

$j$ はLane AとBにおける共通のバンド数であり、 $a$ と $b$ はLane A, Bにおけるそれぞれのトータルのバンド数を表す。

#### **DGGE バンドの DNA のシーケンシング**

木材摂食、アガロース人工餌摂食およびフェノール人工餌摂食のシロアリ腸内細菌叢、さらに集積培養により得られた細菌叢のそれぞれのDGGEバンドプロファイルを比較し、フェノール摂食シロアリ腸内微生物叢においてのみ特異的に見られた、2本のバンド (Fig. 3-8) をカミソリを用いて切り出した。切り出したバンドを100  $\mu$ lの滅菌超純水にいれ、4°C下で3日間静置しDNAを溶出させた。DNA溶出液0.5  $\mu$ lを鋳型にしてプライマー GC-2 (5'-GAAGTC ATCATGACCGTTCTGGCACGGGGGGCCTA-3') (Ogino *et al.*, 2001)および518rを用いて上記に示す、touchdown PCRを前述の条件と同様 (P. 37 参照) に行い、V3

領域を再増幅させた。増幅産物を PGem<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega)を用いてクローニングした。ライゲーション産物をコンピテントセル *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ に導入した。白色コロニーをランダムにピックアップし、ベクター由来の配列を持つプライマーT7とSP6を用いてインサートチェックした。目的挿入断片の入ったプラスミドDNAを QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, Crawley, U.K.)を用いて抽出した。Plasmid DNA中の挿入断片の塩基配列を CEQ 2000 XL (Beckman)を用いて、シーケンシングした。得られた全てのシーケンシングデータを Seqman (DNASTar)を用いて解析した。得られたクローンの全配列について、Blast search (Atschul *et al.*, 1990, 1997)による相同性検索を行い、既知の類似の細菌との比較を行った。得られたシーケンシングデータは Clustal W (Thompson *et al.*, 1994)を用いてアライメントを行った。

### 3-7-2 結果

Figure 3-8は3種類の餌を与えて飼育した *C. formosanus* の腸内細菌叢と、木材摂食シロアリの腸内微生物叢を集積培養することによって得られた微生物叢のバンドパターンを示している。Figure 3-9は Sorensen の式を用いて細菌叢間のバンドパターンの差異と類似性を基にした系統樹を示している。木材とフェノール人工餌をそれぞれ摂食した *C. formosanus* の細菌叢の類似度は35%であったのに対し、フェノール人工餌とアガロース人工餌をそれぞれ摂食した細菌叢の類似度は58%であった。フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の腸内微生物叢と、集積培養によって得られた微生物叢の類似度は12%しかなかった。これらの結果は *C. formosanus* の腸内細菌叢の構成は人工餌のタイプに大きく依存して変化することを示している。さらに、フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の腸内微生物叢は MP500 培地を用いた集積培養によって得られる微

生物とは異なっていた。Figure 3-8 に示したバンド A および B の DNA シーケンスを解析した。Band A および B はフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の腸内微生物叢のみで存在していたバンドである。Figure 3-10 は、得られた DNA シーケンシングのアライメントデータを示している。Table 3-2 は Band A および B に含まれるそれぞれの DNA のシーケンスと最も高い相同性を示す細菌の種およびアクセッションナンバーを示している。バンド A 中のシーケンスのひとつに *Pseudomonas nitroreducens* (EF107515) と 98% の相同性を示すものがあった。この細菌は 1, 2, 4-trichlorobenzene 分解菌として報告されている。その他の Band A, B に含まれたシーケンスは培養できない *Clostridium* や *Bacteroides* と高い相同性を有していたが、それらの機能は未知である。

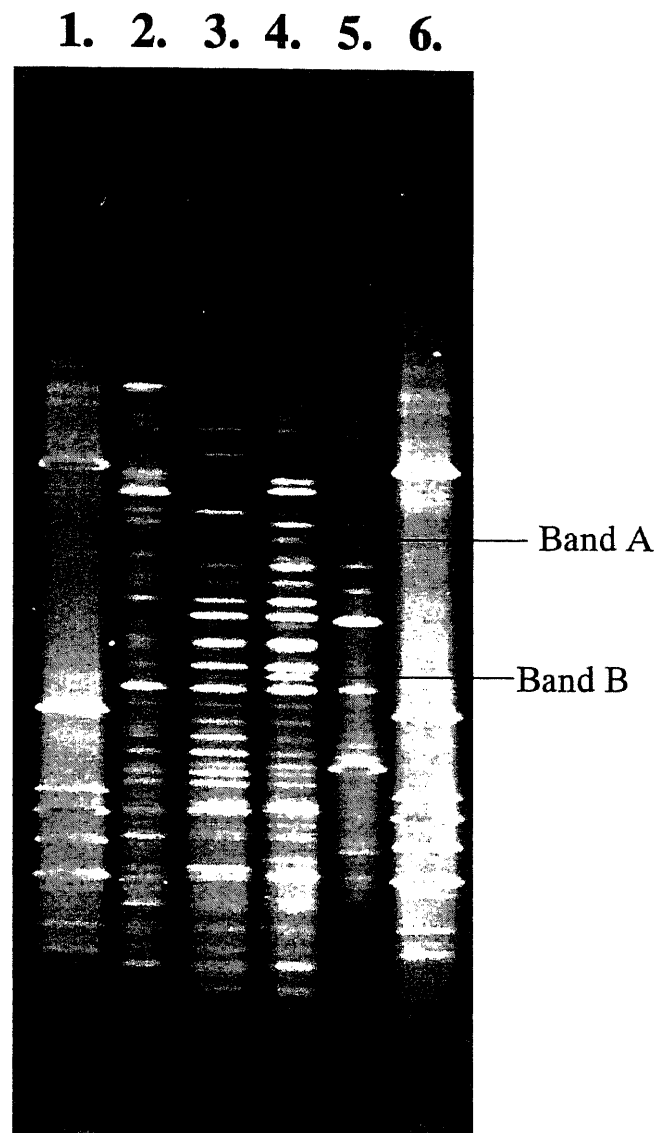


Fig. 3-8. Photograph of denaturing gel electrophoresis (DGGE) of partial 16S rDNA of intestinal bacteria in *C. formosanus* fed with various artificial diets for 10 days, and bacteria in enrichment culture of intestinal microorganisms in Wood-feeding *C. formosanus*.

1. and 6. DGGE marker; 2. wood; 3. Agarose; 4. Phenol;  
5. enrichment culture with MP500.

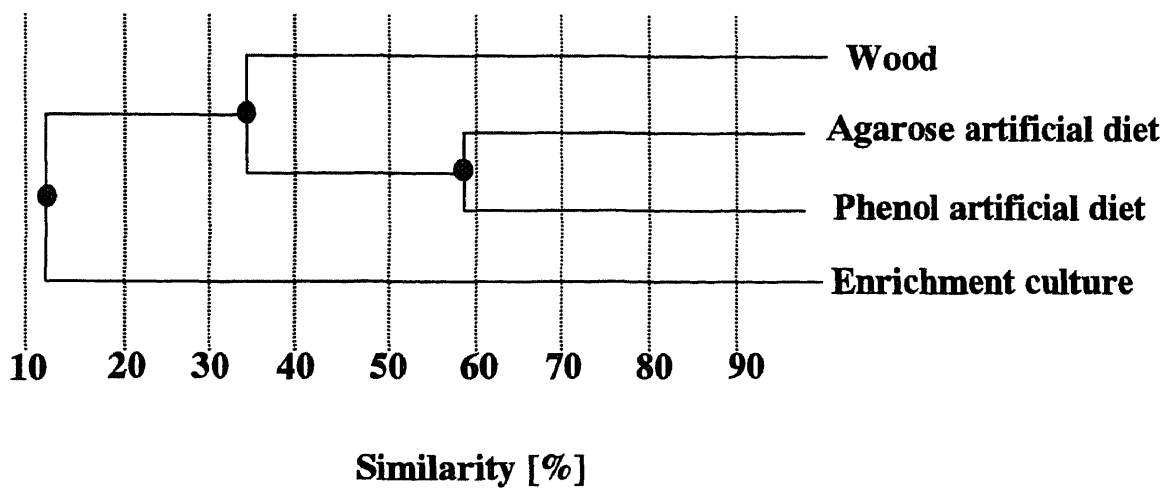


Fig. 3-9. Cluster analysis (UPGAMA method) of DGGE band pattern obtained from *C. formosanus* fed with various artificial diets (scale represent the percentage of divergence).

```

BandA-1 1 CGGGAGGCAGCAGT GAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCG 60
BandA-2 1 CGGGAGGCAGCAGT AGGGAATATTGGGCAATGGGAGCAATCCTGACCCAGCCATGCCGCG 60
BandA-3 1 CGGGAGGCAGCAGT GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCACGCCGCG 60
BandB 1 CGGGAGGCAGCAGT GAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCG 60
AB088937 1 CGGGAGGCAGCAGT GAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCG 60
AY571428 1 CGGGAGGCAGCAGT AGGGAATATTGGGCAATGGGAGCAATCCTGACCCAGCCATGCCGCG 60
EF107515 1 CGGGAGGCAGCAGT GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG 60
AY953243 1 CGGGAGGCAGCAGT GAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTCGCG 60
*****
BandA-1 61 TGAATGAAGAAGGCGATACAACGTTGTAAAGTCTTTTGCAGGGGAGTAAAAAGAGGCAC 120
BandA-2 61 TGCAGGAAGACGGCGCTATGC-GTTGTAAACTGCTTTTGTGCGGGAATAAAATATGCTAC 119
BandA-3 61 TGTGTGTAGAAGGTCTTCGGA--TTGTAAAGCACTTAAAGTGGGAGGAAGGGCAGTAAG 118
BandB 61 TGAAGGATGACGGCCCTACGG-GTTGTAAACTTCTTTTGTATGGGAGTAAAAAGACTAC 119
AB088937 61 TGAAGGAAGACGGCCCTACGG-GTTGTAAACTTCTTTTGCAGGGGAATAAAAAGCGGGAC 119
AY571428 61 TGCAGGAAGACGGCGCTATGC-GTTGTAAACTGCTTTTGTGCGGGAATAAAGTTATCTAC 119
EF107515 61 TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGA--TTGTAAAGCACTTAAAGTGGGAGGAAGGGCAGTAAG 118
AY953243 61 TGAAGGATGACGGCCCTACGG-GTTGTAAACTTCTTTTGTATGGGAGTAAAAAGACTAC 119
** * ** * * ***** **** ** *
BandA-1 121 GTG-TGCCTTATTGTATGTACTTTGC-----GAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG 169
BandA-2 120 TAG-TAGTGTATTGCAGGTACCGTAA-----GAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG 168
BandA-3 119 TTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTG 173
BandB 120 GCG-TAGTCTATTGCAAGTACCATAC-----GAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG 168
AB088937 120 GTG-TCCCCTGTTGCATGTACCTFGC-----GAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG 168
AY571428 120 GTG-TAGATAGTTGCATGTACCGTAA-----GAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG 168
EF107515 119 TTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTG 173
AY953243 120 GCG-TAGTCTATTGCAAGTACCATAC-----GAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG 168
* ** * ***** * ***** **

```

**Fig. 3-10. Alignment of partial sequences of 16S rDNA cloned from excised bands from DGGE gel (Fig. 3-8) and reference bacteria in database (Gene Bank).**

**Table 2 Sequencing results of the DGGE band (Fig. 3-8).**

Band name	Bacterial strains which had the highest similarity	Accession No.
Band A -1	Uncultured bacteroidaceae bacterium, Clone Rs-E83	AB088937
-2	Uncultured bacterium clone RsaHw538	AY571428
-3	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	EF107515
Band B	Uncultured anaerobic bacterium clone B-4C	AY953243

### 3-8 Plate Wash(PW)PCR-DGGE 解析

メンブランフィルター培養法によって生じたコロニーを計数することで、*C. formosanus* 腸内にフェノール分解菌が濃縮されることが実証された。しかしコロニーを計数しただけではコロニーを形成した微生物の種数に関しては分からない。そこで、PWPCR (Stevenson *et al.*, 2003)-DGGE 法を用いて、プレート上に生じた全てのフェノール分解細菌を比較し解析することを試みた。

#### 3-8-1 材料および方法

木材摂食 *C. formosanus* および 100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内微生物叢のそれぞれをメンブランフィルター培養法によって培養した。メンブランフィルター上に生じた全細菌コロニーを滅菌蒸留水を用いて懸濁し、懸濁液を 1.5 ml チューブに移し遠心分離 (12,000 ×g, 10 min) して、全細菌コロニーを回収した。菌体の全 DNA を Fast DNA kit を用いて抽出し、前述の PCR-DGGE 法と同様の方法 (P. 36-39 参照) で解析した。

#### 3-8-2 結果

Figure 3-11 は木材摂食した *C. formosanus* および 100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の腸内微生物叢それぞれからメンブランフィルター培養法によってコロニーを形成した全フェノール分解菌のバンドパターンをあらわしている。Figure 3-12 は、得られた DNA シーケンシングのアライメントデータを示している。Table 3-3 はそれぞれの全細菌コロニーで検出されたバンド数および検出されたバンド DNA のシーケンス結果を表している。各レーンで検出された DGGE バンドの数は、スクリーニングされたフェノール分解菌の種類の数



に対応している。

木材を摂食した *C. formosanus* から得られた全細菌コロニーから検出されたバンド数は3本であったが、フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* から得られたバンド数は9本であった。木材を摂食した *C. formosanus* 腸内細菌叢から検出されたバンド Wf-1, Wf-2 および Wf-3 のバンド DNA シーケンスは、Blast 検索の結果、*Salmonella paratyphi* strain 50973 (DQ683179) と 99%、*Citrobacter* sp. SVUB3(AM401577)と 97%、*Citrobacter* sp. SVUB3 (AM401577)と 99%の相同性をそれぞれ示した。フェノール人工餌摂食した *C. formosanus* 腸内細菌から検出されたバンド Pf-1, Pf-2, Pf-3, Pf-4, Pf-5, Pf-6 からは、Uncultured *Pseudomonas* bacterium (DQ171526)と 99%、*Pseudomonas* sp. pDL01 (AF125317) と 100%、Uncultured *Pseudomonas* bacterium (DQ171526)と 99%、Uncultured *Pseudomonas* bacterium (DQ171526)と 100%、*Pseudomonas aeruginosa* strain PD100 (AY825034) と 99%、Enterobacteriales bacterium H0407 (DQ822788)と 98%の相同性をそれぞれ示した。フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内からは、特に *Pseudomonas* 属の細菌が多種検出されることが明らかとなった。

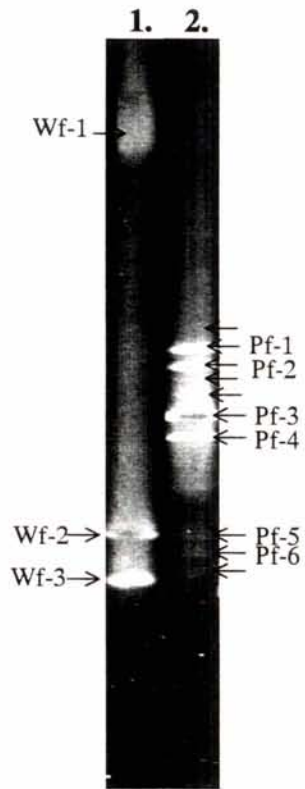


Fig. 3-11. Photograph of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA of total bacterial colonies formed on membrane filter from intestinal microorganisms of *C. formosanus* fed with wood and 100 mg/l phenol. 1. wood; 2. phenol. The arrows show the detected bands and DNA of nominated bands were sequenced.

```

Wf-1      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  60
Wf-2      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACTATGGGCGCAAGCCAGATGCAGCCATGCCGCGT  60
Wf-3      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  60
Pf-1      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
Pf-2      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
Pf-3      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
Pf-4      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
Pf-5      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
Pf-6      1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  60
DQ683179 1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  60
AM401577 1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  60
DQ171526 1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
AF125317 1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
AY825034 1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT  60
DQ822788 1  GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  60
***** ** ***** ***** *** * *****

Wf-1      61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGTGTTGAGTTA  120
Wf-2      61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGGTTGAGTTA  120
Wf-3      61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGGTTAAGTTA  120
Pf-1      61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGCAAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTA  120
Pf-2      61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTA  120
Pf-3      61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGCAAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTA  120
Pf-4      61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTA  120
Pf-5      61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTA  120
Pf-6      61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGTGTTGAGTTA  120
DQ683179 61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGTGTTGAGTTA  120
AM401577 61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGGTTAAGTTA  120
DQ171526 61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTA  120
AF125317 61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTA  120
AY825034 61  GTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTA  120
DQ822788 61  GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAGGGAGGAAGGTGTTGAGTTA  120
** ***** ***** *** **** ***** ** ***** **

Wf-1      121  ATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Wf-2      121  ATAACCGTAGCCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Wf-3      121  ATAACCTTAGCCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Pf-1      121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Pf-2      121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Pf-3      121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Pf-4      121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Pf-5      121  ATATCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
Pf-6      121  ATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
DQ683179 121  ATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
AM401577 121  ATAACCTTAGCCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
DQ171526 121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
AF125317 121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
AY825034 121  ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
DQ822788 121  ATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG  172
*** * ***** ***** ***** *****

```

**Fig. 3-12. Alignment of partial sequences of 16S rDNA clones from excised bands from PWPCR-DGGE gel (Fig. 3-11) and reference organisms in database (Gene Bank).**

**Table 3-3 Total numbers of DGGE bands and their sequencing results in Fig. 3-11.**

Total band number	Band name	Strain which had the highest similarity	Accession No.	Similarity	
Wf	3	Wf-1	<i>Salmonella paratyphi</i> strain 50973	DQ683179	99%
		Wf-2	<i>Citrobacter</i> sp. SVUB3	AM401577	97%
		Wf-3	<i>Citrobacter</i> sp. SVUB3	AM401577	99%
Pf	9	Pf-1	Uncultured Pseudomonadales bacterium	DQ171526	99%
		Pf-2	<i>Pseudomonas</i> sp. pDL01	AF125317	100%
		Pf-3	Uncultured Pseudomonadales bacterium	DQ171526	99%
		Pf-4	Uncultured Pseudomonadales bacterium	DQ171526	100%
		Pf-5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PD100	AY825034	99%
		Pf-6	Enterobacteriales bacterium H0407	DQ822788	98%

Wf: total bacterial colonies obtained by membrane filter method from wooc-feeding *C. formosanus*

Pf: Total bacterial colonies obtained by membrane filter method from *C. formosnaus* fed with phenol artificial diet

### 3-9 第3章の考察

フェノールを含む人工餌を摂食させた時、*C. formosanus* の生存率は著しく低下したが、これはフェノールが細胞膜の機能などを阻害する毒性物質であるからだと考えられる(Yap *et al.* 1999)。また、アガロース人工餌や飢餓条件よりフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の生存率の低下が著しいという結果 (Fig. 3-2)も、フェノール人工餌を摂食することによる生存率の低下は、飢餓によるものではなくフェノールの毒性によるものであることを示している。さらに、*C. formosanus* の 20%は 10 日以内で死滅してしまうのに対し、長期間生き残る *C. formosanus* も存在しているという結果は興味深い。つまりこの結果は同じ親から生まれ同じ巣に住んでいるシロアリ間でもフェノールの毒性に対する感受性に個体差が存在することを示唆している。フェノールを含む人工餌を摂食して *C. formosanus* が生き残る場合には下記に示すような段階的なステップが存在していると考えられる：(1) シロアリ自身がフェノールに対してある程度の耐性を有していること、(2) 木材を食べている元々の *C. formosanus* 腸内に存在するフェノール分解菌の存在によってフェノールの無毒化がなされること、(3) フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内にフェノール分解菌が濃縮されることでフェノール分解能が強化されること。すなわち、もともとフェノールに耐性のある *C. formosanus* だけが初めに生き残り、次にフェノール分解菌が時間経過に伴って腸内に濃縮され、それによって、より長期間生き残ることができるようになると考えられる。したがって、本研究で開発した微生物スクリーニング法は、第一段階として生き残った昆虫（目的微生物叢を腸内に濃縮した昆虫）を選抜し、第二段階として生き残った昆虫から目的の難分解性物質分解微生物を効率的にスクリーニングする新規な手法であるといえる。

アガロースおよびフェノール人工餌を食した *C. formosanus* の体重が減少する

と同時に腸内原生動物も消失している。*C. formosanus* をはじめとする下等シロアリの腸内において、腸内原生動物はシロアリの全体重の約 1/3 を占めると報告されている (Brune and Friedrich, 2000)。この研究では、アガロースおよびフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* は体重が 1/3 以上減少している。それゆえ、原生動物の物理的な重量だけでなく、原生動物の消失によるその他の生理学的な影響によってより大きな *C. formosanus* の体重の減少が起こったことが考えられる。

本研究では、様々な濃度のフェノール (50, 100, 150, 200 mg/l) を含む人工餌を *C. formosanus* に与えた。しかし、150 および 200 mg/l 濃度のフェノール人工餌を与えて飼育した *C. formosanus* は長期間生存することができなくなった。さらに、肉眼による観察によっても、人工餌の消費量が非常に小さいことが明らかだった。これは、ほんの少量の人工餌、つまり少量のフェノールしか腸内に取り込まれていないことを意味している。また、飢餓条件と同様の方法で、滅菌蒸留水の代わりに 200 mg/l フェノール水溶液を用いたところ、*C. formosanus* の生存が阻害された(data not shown)ことから、フェノール人工餌からわずかに揮発したフェノールの毒性によって *C. formosanus* が死滅したと考えられる。一方、*C. formosanus* は 50 よび 100 mg/l のフェノールを含む人工餌を非常によく摂食していた。50mg/l フェノール人工餌と 100 mg/l フェノール人工餌を摂食させた *C. formosanus* の腸内微生物叢の CFU/gut (フェノール分解菌のコロニー形成数) を比較するため、メンブランフィルター培養培養法を用いた。100 mg/l フェノール人工餌を与えた *C. formosanus* の CFU/gut 値は高い値を示した( $2.83 \times 10^3$  CFU/gut)が、50 mg/l フェノール人工餌を与えた *C. formosanus* からは低い値 ( $5.02 \times 10^2$  CFU/gut) を示した。これは、100 mg/l フェノール人工餌のほうが腸内のフェノールの濃度 (つまり毒性) が高いため、それらを除くためのシステム

がより強く働いた結果、腸内におけるフェノール分解菌の濃度が高まったことが原因として考えられる。以上の結果は、フェノール分解菌を *C. formosanus* の腸内に濃縮するためのフェノールの最適濃度としては、100 mg/l 程度の比較的高濃度であるが、摂食活動および生存を阻害しない濃度に抑える必要があることを意味している。

MP500 寒天培地を用いた場合、多数のコロニーがフェノールを含む人工餌から生じたが、コロニーの 97%以上がフェノール分解能を有していなかった。MP500 寒天培地では、500 mg/l のフェノールに耐性を有するとともに、フェノール、アガーもしくはアガー由来のオリゴ糖を分解利用できる微生物がコロニーを形成したと考えられる。アガーは熱によって分解し、低分子化することが知られているため (Khomutov *et al.*, 1994)、オートクレーブ滅菌によってアガーの一部が分解され、微生物はその分解物を利用して増殖することが考えられる。したがって、寒天培地を用いた方法はフェノール分解菌のみの分離には適さない。一方、メンブランフィルター培養培養法では、フェノールのみが単一の有機炭素源として含まれており、フィルターにはタンパク質のような有機物はほとんど吸着されないため、フェノール以外の炭素源となりえる物質の影響が最小に抑えられている。それゆえ、メンブランフィルター培養培養法は特定の物質を分解する微生物をスクリーニングする方法として、従来の平板培養法より適していると考えられる。なお本研究では微生物スクリーニングは全て好気条件下のみで行っているため、嫌気条件下での検討を今後行う必要がある。

PCR-DGGE 法によって、フェノール人工餌を食した *C. formosanus* の腸内細菌叢が、木材摂食の *C. formosanus* の細菌叢とは大きく異なることが示された。つまり、フェノール人工餌を *C. formosanus* に与えることによって、腸内細菌叢は大きく変化した。*Pseudomonas nitroreducens* (EF107515) と 98%の相同性を示す

Band A (Fig. 3-8) に含まれる DNA シーケンスが、フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* の腸内に確認された。*Pseudomonas nitroreducens* (EF107515) は 1, 2, 4-trichlorobenzene の分解細菌として報告されている。フェノールや 1, 2, 4-trichlorobenzene のような芳香族化合物の分解微生物は、木材摂食 *C. formosanus* にはわずかにしか存在していないが、そのような分解菌はフェノール人工餌を摂食させることで、フェノールの高い分解能および増殖能によって DNA バンドとして検出可能になるまで *C. formosanus* 腸内に濃縮されたことが考えられる。*Clostridium* や *Bacteroides* (培養できない偏性嫌気性菌) と高い相同性をもつ細菌の DNA がフェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内の band A および B から確認された。これらの細菌の機能は未知であるが、フェノールを分解していることも考えられる。フェノールの分解は主に好気条件下での分解が報告されているが (Feist and Hegeman 1969)、嫌気的な分解も報告されている (Heider and Fuchs 1997)。そのため、*Clostridium* や *Bacteroides* のような偏性嫌気性菌によって、*C. formosanus* の腸内においてもフェノールの嫌気的な分解が起こっている可能性も考えられる。

フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内細菌叢とアガロース人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内細菌叢の類似度(57%)は、フェノール人工餌摂食した *C. formosanus* 腸内細菌叢と木材摂食 *C. formosanus* 腸内細菌叢の類似度(35%)より高い。つまり、フェノール人工餌摂食 *C. formosanus* 腸内細菌叢は、アガロース人工餌摂食 *C. formosanus* 腸内細菌叢と比較的類似していた。両者の餌を食した *C. formosanus* では、10 日後には腸内原生動物が消失し、全細菌数が 1/10 以下に減少した。*C. formosanus* をはじめ下等シロアリの腸内では、原生動物と細菌との強固な共生関係が存在していることが良く知られている (Ohkuma 2003 and references there in)。また腸内原生動物の重要な機能の一つとして食菌があげら



れる[Brune and Friedrich (2000) and reference there in]。したがってフェノール人工餌摂食による *C. formosanus* 腸内原生動物の消失は、腸内細菌叢にも大きな影響を及ぼしている。つまり、原生動物の消失は、*C. formosanus* 腸内にフェノール分解菌を腸内に濃縮するための重要な要素の一つであるかもしれない。

本研究によって、フェノール人工餌を食した *C. formosanus* の腸内細菌叢は、従来の集積培養法 {木材摂食 *C. formosanus* の腸内微生物叢を人工培地 (MP500) を用いた集積培養法} によって得られた細菌叢とは異なることが立証された。本研究では、集積培養は L 字管を用いて好気条件下で回分培養することにより行った。その結果、培地中のフェノール濃度や pH は培養中に変化した。(なお、本研究では嫌気 L 字管 (Tanaka *et al.*, 1993)を用いて *C. formosanus* 腸内細菌叢の嫌気培養も試みたが、微生物の増殖およびフェノールの消費が起こらず、フェノール分解菌を集積することができなかつた。) 一方、*C. formosanus* の腸内では栄養源は *C. formosanus* の摂食活動によって連続的に供給されるが、有機酸などの微生物の代謝産物は腸壁からの吸収や肛門からの排出などによって連続的に除去される。したがって、*C. formosanus* の腸は連続培養系とみなすことができる。それゆえ、増殖速度の低い微生物 (餌成分を利用できないもしくは利用能の低い微生物) は wash out される一方、増殖速度の高い微生物 (効率的に餌成分を利用できる微生物) は保持され、腸内において優占種となることが考えられる。実際にスクリーニングによって得られた微生物として、*Pseudomonas* に近縁な種が検出された (Table 2)。それらはフェノールをはじめとする芳香属化合物分解菌として良く知られているため、木材摂食 *C. formosanus* では検出限界以下の低濃度であったそれらの分解菌が、フェノール人工餌を摂食させることによって *C. formosanus* 腸内においてフェノールを積極的に分解利用して増殖し、優占化したと考えられる。

フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内微生物叢から得られたバンド数は、集積培養によって得られたバンド数より多い (Fig. 3-8) ことから、フェノール人工餌摂食した *C. formosanus* 腸内には 従来の集積培養より多種類の微生物が保持されていることが示された。これは、シロアリの腸内が均一な環境ではなく、水素および酸素の濃度勾配が存在していること (Brune *et al.*, 1995) が原因の一つとして考えられる。つまり、*C. formosanus* 腸内には、従来の集積培養と比較して、様々な物理化学的環境に適応したより多種の微生物が腸内に保持されたことが考えられる。

また、PWPCR-DGGE 解析によってメンブランフィルター培養法を用いることでコロニーを形成した全細菌を解析した結果、フェノール摂食 *C. formosanus* 腸内からフェノール分解菌をスクリーニングした方が、木材摂食 *C. formosanus* 腸内からフェノール分解菌をスクリーニングする従来法(3 バンド)より、より多種類 (9 バンド) のフェノール分解菌をスクリーニング可能であることが立証された。実際に本研究では、PWPCR-DGGE 解析によって、木材摂食 *C. formosanus* 腸内からはスクリーニングできなかつた *Pseudomonas* 属の細菌が、フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* 腸内から多数スクリーニングされた (Table 2)。より多種類の菌がスクリーニング可能になった原因としては、腸内にもともとわずか (検出限界以下) しか存在していないフェノール分解菌が、*C. formosanus* にフェノール人工餌を摂食させる連続培養系において、優占種もしくは検出可能になるまで腸内に増殖速度が高いため濃縮されたことが考えられる。

これらの結果から、本研究のスクリーニング法 (特定の物質を単一炭素源として昆虫に摂食させることにより昆虫の腸内にその物質を分解する微生物を濃縮し効率的にスクリーニングする方法) はより多様な微生物を分離するために有効であることが示された。

### 3-9 第3章の要約

本章では、「餌—昆虫—腸内微生物叢」系を用いた新規微生物スクリーニング報の開発を目的として、モデル昆虫として木材食性昆虫の *C. formosanus* の職アリを用いた。*C. formosanus* 腸内には3種の原生動物と多種の細菌が共生している。*C. formosanus* が摂食する木材（アカマツ）に代えて、難分解性でリグニン関連化合物であるフェノールを 100 mg/l 含む寒天ゲルを人工餌として与えた。*C. formosanus* はフェノールの毒性に対して個体差があり、全体の約 20% は 10 日以内に死滅したが、20 日以上生き残る個体も 17% 程度存在した。顕微鏡観察および PCR-DGGE 法によって腸内微生物叢の解析を行った結果、フェノール人工餌を摂食することにより、腸内微生物叢が大きく変化することが明らかとなった。また、その細菌叢の構成は従来の集積培養によって得られる細菌叢とは大きく異なっていた。木材あるいはフェノール人工餌を 10 日間摂食し生存した *C. formosanus* の腸内微生物叢から、フェノール(500 mg/l)を単一炭素源として含む寒天培地を用いてフェノール分解菌をスクリーニングした。その結果、木材を摂食した *C. formosanus* 腸内からは  $3.4 \times 10^4$  CFU/gut のコロニーが生じたが、フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* からは  $2.3 \times 10^5$  CFU/gut と多数のコロニーが検出された。しかしながら、これらのコロニーの 90% 以上がフェノール分解能を示さないフェノール耐性菌であった。次にフェノール分解菌のみをスクリーニングするため、寒天平板培養法に代えてメンブランフィルター培養法を用いた結果、木材摂食 *C. formosanus* からは  $2.0 \times 10^2$  CFU/gut のコロニーしか生じなかったのに対し、フェノール人工餌摂食 *C. formosanus* からは  $2.8 \times 10^3$  CFU/gut のコロニーが生じ、その全てがフェノール分解能を有していた。以上の結果からフェノール人工餌摂食によって、フェノール分解菌が *C. formosanus* 腸

内に濃縮されることが明らかとなった。さらにメンブランフィルター培養法により得られた全てのコロニーを回収して PCR-DGGE 解析 (PWPCR-DGGE 法) した結果、木材摂食の *C. formosanus* 腸内から直接スクリーニングした場合 3 種類 (DGGE バンド数) のフェノール分解菌しか得られなかったのに対し、フェノール人工餌摂食によって検出限界外の低濃度であった多種類のフェノール分解菌を高濃度化し、9 種類 (DGGE バンド数) の分解菌を効率的にスクリーニングできる事が示された。

## 第4章

高等シロアリタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis* Shiraki) と腸内微生物叢の共生関係を対象とした新規微生物スクリーニング法の利用

### 4-1 序

第3章では、下等シロアリである *C. formosanus* と腸内微生物叢の共生関係を用いて、餌成分を木材から難分解性物質のフェノールに代えて与えたとき、長期間生き残った *C. formosanus* 腸内には、フェノール分解菌が濃縮されることを明らかにした。それにより、本研究で開発した微生物スクリーニング法は、従来の集積培養法より多種の目的とする難分解性物質分解微生物（フェノール分解菌）を効率的にスクリーニング可能であることを示してきた。

第4章では、第3章で確立した微生物スクリーニング法が、*C. formosanus* 以外の昆虫でも適用可能な応用性の高い手法かどうか確認する第一歩として、*C. formosanus* とは異なる腸内微生物叢を有する昆虫である、高等シロアリの *N. takasagoensis* を用いて同様の検討を行った。*C. formosanus* と *N. takasagoensis* の主な違いは、*C. formosanus* 腸内には3種の原生動物と細菌が共生しているのに対し、*N. takasagoensis* 腸内には細菌のみが共生していることである。

### 4-2 フェノール人工餌が *N. takasagoensis* 自身に与える影響

#### 4-2-1 材料および方法

##### シロアリ

沖縄県西表島より採集した *N. takasagoensis* の職アリを用いた。*N. takasagoensis* は、Fig. 4-1 に示すような大型の巣をイタジイの樹上に営巣するのが特徴である。

西表島で *N. takasagoensis* が生息していた巣と餌木であるイタジイを大型のポリバケツにいれ、十分に湿度を保ち  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  で飼育した。

#### 人工餌の調製および人工餌を用いた *N. takasagoensis* の飼育

田中ら (2006) の方法を用いて人工餌を調製した。15 g/l のアガロース (TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan) を蒸留水に溶解させ、 $121^\circ\text{C}$ , 15 min オートクレーブした。50 g/l フェノールを  $\phi$  0.22  $\mu\text{m}$  durapore filter (Millipore) を用いて滅菌し、滅菌したアガロース溶液と種々のフェノール濃度 (50, 100 mg/l) になるように混ぜ合わせた。溶液は滅菌シャーレの中で固化させた。コントロールとして、15 g/l アガロースのみ、およびアガロースとイタジイ木粉 (粒径 100 $\mu\text{m}$  以下) を含む人工餌を調製した。固化したアガロースゲルは 25x25x5 mm サイズにカットした。25 匹の *N. takasagoensis* と人工餌を滅菌ポリスチレンケース (30x30x10 mm) にいれ、 $30^\circ\text{C}$  で飼育した。またシロアリを飢餓状態で飼育するため、25 匹の *N. takasagoensis* のみを入れたポリエチレンケースを十分な湿度を保ち飼育した (滅菌水を張った滅菌ガラスシャーレ内に置き蓋をした)。飼育中生存しているシロアリの数を経時的に計数し、生存率を算出した。生存率は、初発の生存数 (25 匹) を 100% として、その残存割合として表した。

#### 4-2-2 結果

Figure 4-2 に人工餌成分が *N. takasagoensis* の生存率に及ぼす影響を示した。アガロース人工餌および飢餓条件で飼育した *N. takasagoensis* の7日後の生存率は、それぞれ 82.7% および 72.0% であった。一方、50 mg/l のフェノールを含む人工餌を摂食した *N. takasagoensis* の7日後の生存率は 41.3% であり、その後10日以内に全ての *N. takasagoensis* が死滅した。100 mg/l のフェノールを含む人工餌で

は、7日以内に全ての *N. takasagoensis* が死滅した。以上の結果は、*N. takasagoensis* の生存がフェノールの毒性によって著しく阻害されることを示している。

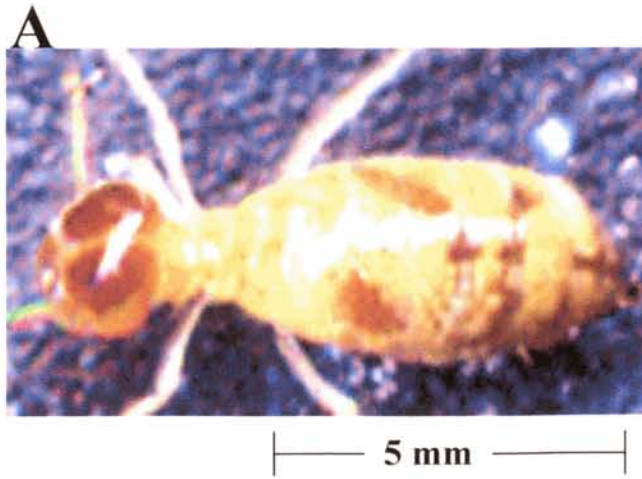


Fig.4-1. Photographs of *Nasutitermes takasagoensis* Shiraki (worker) and their nest.

A: *Nasutitermes takasagoensis* Shiraki (worker)

B: Nest



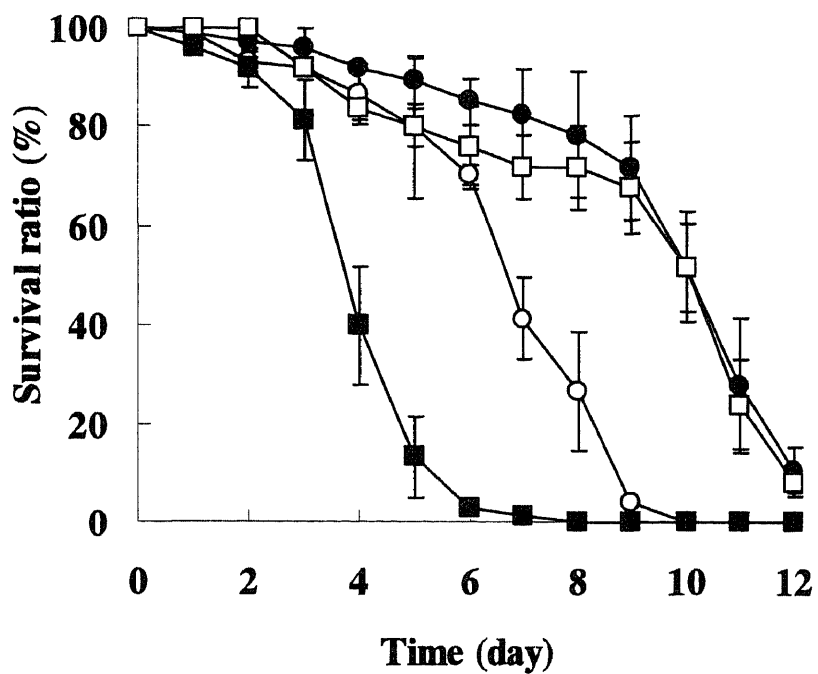


Fig. 4-2. Survival of *N. takasagoensis* during feeding on various artificial diets. Error bars are  $\pm$ SD (n=3).

Symbols: closed circle, agarose; open circle, 50 mg/l phenol; closed square, 100 mg/l phenol; open square, starvation.

#### 4-3 メンブランフィルター培養法を用いた *N. takasagoensis* 腸内微生物叢中のフェノール分解菌の検出および定量

種々の餌成分でそれぞれ7日間飼育した *N. takasagoensis* 腸内から、メンブランフィルター培養法を用いてフェノール分解菌のスクリーニングを試みた。

##### 4-3-1 材料および方法

木材、アガロース人工餌および 50 mg/l フェノール人工餌をそれぞれ摂食した *N. takasagoensis* 5匹分の後腸を鋭利なピンセットを用いて肛門側から摘出し回収した。後腸は 1 ml の 500 mg/l フェノールを単一炭素源として含む MP500 培地 (第3章 P. 29 参照) 中でホモジェネートした。腸懸濁液 (100  $\mu$ l) を 900  $\mu$ l の MP500 培地で希釈した。この操作を数回繰り返すことで、適当濃度の腸懸濁液を調製した。Milliflex フィルターファネルユニット HVWP 0.45  $\mu$ m (Millipore MA USA) を吸引ろ過装置にセットした。5 ml の MP500 培地をあらかじめファネル部分に注ぎ、100  $\mu$ l の希釈した腸懸濁液をいれ、腸内容物を MP500 培地に均一に分散させた。液体画分はろ過することで除去し、腸内微生物はメンブランフィルター上に回収した。フィルターを液体培地カセット MXLMC0120 (Millipore MA USA) にセットし、30  $^{\circ}$ C で 10 日間培養を行った。培養後は、メンブランフィルター上に生じたコロニーを計数し、CFU/gut を算出した。実験は全て3連で行った。

##### 4-3-2 結果

Figure 4-3 は、木材、アガロース人工餌およびフェノール人工餌をそれぞれ7日間摂食し、生き残った *N. takasagoensis* 腸内細菌叢をメンブランフィルター培養法によって培養し、形成された CFU/gut 数を示している。メンブランフィルタ

一培養法で得られるコロニーは、ほぼ全てがフェノール分解菌であることをすでに実証している（第3章 P. 33 参照）。木材およびアガロース人工餌を摂食した *N. takasagoensis* 腸内微生物叢からは、それぞれ  $6.00 \times 10^2$  CFU/gut、 $2.00 \times 10^3$  CFU/gut と比較的少数のコロニーが形成された。一方 100 mg/l フェノール人工餌を摂食させた *N. takasagoensis* 腸内微生物叢からは  $3.91 \times 10^5$  CFU/gut（第3章 P. 33 参照）のコロニーが検出された。さらにランダムに 50 コロニーをピックアップしてそれらのフェノール分解能を調べたところ、*C. formosanus* の場合と同様に全てのコロニーがフェノール分解菌であることが確認された。以上の結果から、50 mg/l フェノール人工餌を7日間摂食させ生き残った *N. takasagoensis* 腸内には、フェノール分解菌が濃縮されることが明らかとなった。

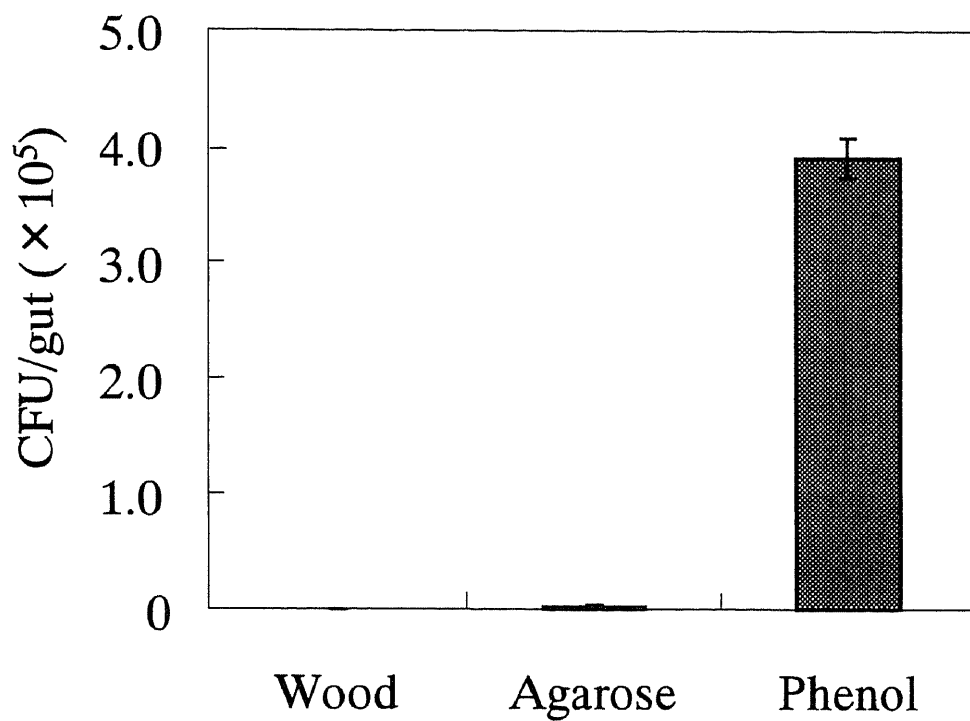


Fig. 4-3. CFU/gut of microbes in gut of *N. takasagoensis* fed with various feeds. Colonies were formed on PVDF membrane filter supplemented with MP500 liquid medium. Error bars are  $\pm$ SD (n=3).

#### 4-4 PCR-DGGE 解析

メンブランフィルター培養法を用いることで、培養可能なフェノール分解菌が *C. formosanus* の場合と同様に、フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* 腸内に濃縮されることが実証された。しかし、多くの培養できない微生物もシロアリ腸内には存在する。そこで PCR-DGGE 法を用いて、*N. takasagoensis* 腸内細菌叢全体の変化を解析した。さらに、フェノール人工餌を摂食させた *N. takasagoensis* 腸内微生物叢と、木材摂食 *N. takasagoensis* 腸内微生物叢を従来の集積培養にすることによって得られる微生物叢とを比較した。

##### 4-4-1 材料および方法

###### 集積培養

5 匹分の木材摂食 *N. takasagoensis* の腸を鋭利なピンセットを用いて肛門から摘出し、5 ml の MP500 培地に接種した。腸懸濁液を L 字型試験管 (Taitec) に入れ、30°C, 30 strokes/min で振とう培養を行った。微生物の増殖経過を知るため、Spectronic 20A (Shimadzu) を用いて OD<sub>660</sub> を経時測定した。培地中のフェノール濃度は Phenol Test Wako を用いて定量した。フェノールが完全に消費された時点で、培養液中の菌体を遠心分離 (10,000 ×g, 5min) によって回収した。

###### DNA 抽出およびタッチダウン PCR

木材、アガロース人工餌および 50 mg/l フェノール人工餌それぞれ 7 日間食した *N. takasagoensis* 10 匹ずつをランダムに集め、後腸を鋭利なピンセットを用いて摘出した。後腸および前述の集積培養によって得られた菌体から、Fast DNA kit (Bio 101 Inc. Vista, CA, USA) を用いて、全 DNA を抽出した。得られた全 DNA の抽出液を鋳型として、F341-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGG

CGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')、518R (5'-GTATTACCGCGGTGCTGG-3')のプライマーセット(Ogino *et al.*, 2001)を用いて、16S rDNAのV3領域を増幅した。PCR reaction mixture(20  $\mu$ l)の組成は以下の通りである。0.5U *Ex Taq* hot start version(TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan), 0.5  $\mu$ l 全 DNA, 2  $\mu$ l 10 $\times$  PCRbuffer, 0.25  $\mu$ M each primer 100  $\mu$ M each dNTP。PCR 反応は Touchdown PCR program を用いて行った。反応プログラムは以下の通りである：(preheat 94 $^{\circ}$ C 5min、denature 94 $^{\circ}$ C 1 min と annealing 65 $^{\circ}$ C ~55 $^{\circ}$ C [2 サイクル毎 1 $^{\circ}$ C 下がる]1 min、extension 72 $^{\circ}$ C 1min を 20 サイクル行い、次に 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min を 10 サイクル行った。最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 min 反応した(Ogino *et al.*, 2001)。反応生成物を QIA quick (Qiagen)を用いて精製し、精製物 O.D.<sub>260</sub> を測定することで、DNA 濃度を概算した。

### DGGE 解析

得られた PCR 増幅産物 250 ng を DGGE に供した。DGGE には D-Code System (Bio-Rad)を用いた。8%のポリアクリルアミドゲルを調製し、0.5 $\times$  TAE buffer(1 $\times$  TAE は 0.04M Tris base、0.02M 酢酸 Na、10mM EDTA[pH7.4]を含む)を用いて電気泳動した。DGGE ゲルには 20~70%の変性剤である尿酸とホルムアミドの濃度勾配がかかったものを用いた。DGGE 電気泳動は 35V, 60 $^{\circ}$ C 一定(定電圧定温下)で 24 時間行った。泳動終了後、ゲルは SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR)を用いて染色し、UV トランスイルミネータを用いて DNA を可視化し、泳動像を撮影した。DGGE バンドプロファイルを image-analyzing system (Image Master Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて解析し、バンドの輝度と移動度を算出した。各バンド間におけるバンドパターンの類似度 (Cs)を (1)式 (P. 38 参照)を用いて計算し、それらの類似度を基に系統樹を構築

した。

### DGGE band のシーケンシング

木材摂食、アガロース人工餌摂食およびフェノール人工餌摂食 *N.takasagoensis* 腸内細菌叢、さらに集積培養により得られた細菌叢 DGGE バンドのプロファイルと比較し、フェノール摂食 *N.takasagoensis* 腸内微生物叢においてのみ特異的に見られた、2本のバンド (Fig. 6) をカミソリを用いて切り出した。切り出したバンドは 100  $\mu$ l の滅菌超純水にいれ、4°C 下で 3 日間静置し DNA を溶出させた。DNA 溶出液 0.5  $\mu$ l を鋳型にしてプライマー GC-2 および 518r 用いて上記に示す touchdown PCR を前述の条件 (P. 65 参照) と同様に行い、V3 領域を再増幅させた。増幅産物を PGem<sup>®</sup> -T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニングした。ライゲーション産物をコンピテントセル *E. coli* DH5- $\alpha$  に導入した。白色コロニーをランダムにピックアップし、ベクター由来の配列を持つプライマー T7 と SP6 を用いてインサートチェックした。目的挿入断片の入ったプラスミド DNA を QIAprep spin miniprep kit (Qiagen) を用いて抽出した。Plasmid DNA 中の挿入断片の塩基配列を CEQ 2000 XL (Beckman) を用いて、シーケンシングした。得られた全てのシーケンシングデータを Seqman (DNASTar) を用いて解析した。得られたクローンの全配列について、Blast search による相同性検索を行い、既知の類似の細菌との比較を行った。得られたシーケンシングデータは Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いてアライメントを行った

#### 4-4-2 結果

Figure 4-4 は 3 種類の餌を与えて飼育した *N. takasagoensis* の腸内細菌叢と、木材摂食シロアリの腸内微生物叢を集積培養することによって得られた微生物叢のバンドパターンを示している。Fig. 4-5 は Sorensen の式を用いて細菌叢間のバンドパターンの差異と類似性を基にした系統樹を示している。木材とフェノール人工餌をそれぞれ摂食した *N. takasagoensis* の細菌叢の類似度は 86%であったのに対し、フェノール人工餌とアガロース人工餌をそれぞれ摂食した細菌叢の類似度は 90%であった。フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* の腸内微生物叢と、集積培養によって得られた微生物叢の類似度は 31%しかなかった。これらの結果は、*N. takasagoensis* の腸内細菌叢の構成は人工餌のタイプに依存して変化することを示している。さらにフェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* の腸内微生物叢は、MP500 培地を用いた集積培養によって得られる微生物叢とは大きく異なることを示している。Figure 4-6 は、得られた DNA シーケンシングのアライメントデータを示している。Table 4-1 はフェノール人工餌摂食した *N. takasagoensis* 腸内細菌叢のみに見られた 3 つのバンド (バンド A~C : Figure 4-4) の DNA シーケンスと最も相同性の高かった細菌、アクセッションナンバーおよび相同性を示している。バンド A からは、Unculturable Bacteroidales bacterium (AB192156) と 96% および Uncultured Bacteroidetes bacterium clone IS019B35 (AY806836) と 85% の相同性を示す DNA 計 2 種類の DNA が検出された。バンド B からは、*Flavobacterium* R2-13 (AJ876659) と 100% および Unculturable *Treponema* sp. (AB191965) と 98% の相同性を示す計 2 種類の DNA が検出された。バンド C からは、Unculturable Clostridiales bacterium (AB255917) と 97%、Uncultured bacterium gene, clone M-P1-94 (AB188591) と 96% および *Desulfovibrio intestinalis* (Y12254) と 93% の相同性を示す計 3 種類の DNA が検出



された。検出された DNA バンドはそのいずれもが、培養できない微生物もしくは偏性嫌気性菌と相同性が高かった。また、Band B-1 以外の全てが、*N. takasagoensis* を含むシロアリ腸内から検出された細菌の DNA であった。

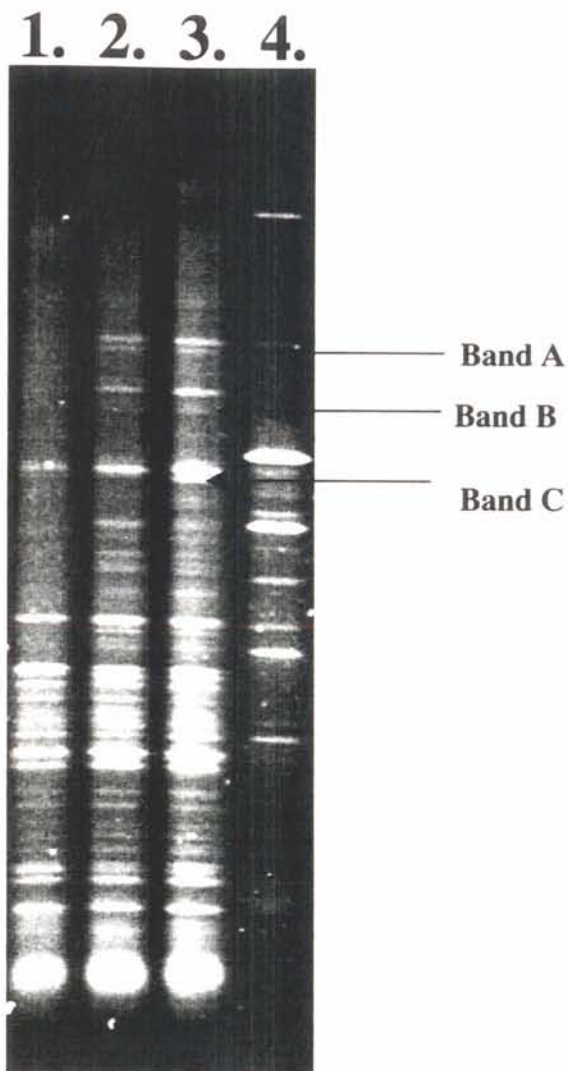
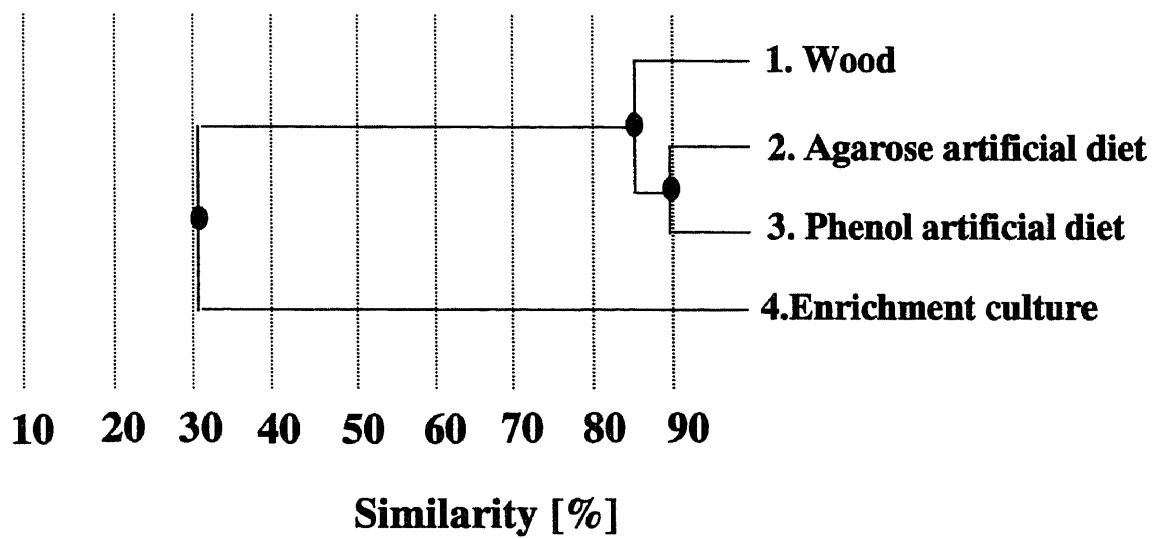


Fig. 4-4. Photograph of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA of intestinal bacteria in *N. takasagoensis* fed with various artificial diets for 7 days, and bacteria in enrichment culture of intestinal microorganisms in *N. takasagoensis*.

1. wood; 2. agarose; 3. phenol; 4. enrichment culture with MP500.  
A, B and C: three excised bands for sequence.



**Fig. 4-5. Cluster analysis (UPGAMA method) of DGGE band pattern obtained from *N. takasagoensis* fed with various artificial diets (scale represent the percentage of divergence).**

BandA-1	1	CGGGAGGCAGC-AGTGAGGAATATTGG--TCAATGGTCGAGAGACTGAACCAGCCATGCC	57
BandA-2	1	CGGGAGGCAGC-CGTGAGGAATATTGG--TCAATGGCCGGAAGCCTGAACCAGCCATCCC	57
BandB-1	1	CGGGAGGCAGC-AGTGAGGAATATTGG--TCAATGGTCGCAAGACTGAACCAGCCATGCC	57
BandB-2	1	CGGGAGGCAGC-AGCTAAGAATATTCC--GCAATGGCCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCC	57
BandC-1	1	CGGGAGGCAGC-AGTAGGGAATATTGG--ACA-TGGAGGCAACTCTGATCCAGCAACGCC	57
BandC-2	1	CGGGAGGCAGC-AGTAGGGAATATTGC--ACAATGGCCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCC	57
BandC-3	1	CGGGAGGCAGC-AGTGAGGAATATTGG--TCAATGGCCGAGAGCCTGAACCAGCCATGCC	60
AB192156	1	CGGGAGGCAGC-AGTGAGGAATATTGG--TCAATGGTCGGAAGACTGAACCAGCCATGCC	57
AY806836	1	CGGGAGGCAGC-AGTGAGGAATATTGG--TCAATGGTCGGAAGACTGAACCAGCCATGCC	57
AB191965	1	CGGGAGGCAGC-AGCTAAGAATATTCC--GCAATGGCCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCC	57
AJ876659	1	CGGGAGGCAGC-AGTGAGGAATATTGG--TCAATGGTCGCAAGACTGAACCAGCCATGCC	57
AB255917	1	CGGGAGGCAGC-AGTAGGGAATATTGG--TCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCAACGCC	57
AB188591	1	CGGGAGGCAGC-AGTGGGAATATTGC--ACAATGGCCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCC	57
Y12254	1	CGGGAGGCAGC-AGTGGGAATATTGC--GCAATGGCCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCC	57
	1	***** ** * ***** ** ** * * **** ** * **	
BandA-1	58	GCGTGCAGGAAAACAGCCCTATGGGTTTTAAACTGCTTTTGTACCAGAGGTAAAAA----	113
BandA-2	58	GCGTGCAGGAAGAATGTCTTACAGATTGTAACCTGCTTTTCCATTAGAATAATAAG----	113
BandB-1	58	GCGTGCAGGATGACCGTCTTATGGATTGTAACCTGCTTTTGTAC--GGGAAGAAAC----	111
BandB-2	58	GCGTGGATGACGAAGGCCGA-AAGGTTGTAATAATCCTTTTGGCG--GCGAAGAAGAAGGC	114
BandC-1	58	GCGTGAATGATGAAGGTCTT-CGGATTGTAAGTTCTTTTATAC--GGGAAGAAAA----	110
BandC-2	58	GCGTGAGTGATGAAGGTCTT-CGGATCGTAAAGCTCTTTAGTCT--GGGAAGAA-----	108
BandC-3	61	GCGTGAGGGATGAAGGCCCTT-CGGGTCGTAACCTCTGTCAGAG--GGGAAGAACCTGCG	117
AB192156	58	GCGTGAAGGAAGACCGCGCTATGCGTTGTAACCTTCTTTTGTAC-AAGGTTAAAAA----	112
AY806836	58	GCGTGCAGGAAGAATGCTTATGGGTTGTAACCTGCTTTTATAT--GGGAAGAATA----	111
AJ876659	58	GCGTGCAGGATGACCGTCTTATGGATTGTAACCTGCTTTTGTAC--GGGAAGAAAC----	111
AB191965	58	GCGTGGATGAGGAAGGCCGA-AAGGTTGTAATAATCCTTTTGGCG--GCGAAGAAGAAGGC	114
AB255917	58	GCGTGAATGATGAAGGTCTT-CGGATTGTAAGTTCTTTTATAC--GGGAAGAAAA----	110
AB188591	58	GCATGGGTGATGAAGGTCTT-CGGATCGTAAAGCCCTTTAGTCT--GGGAAGAA-----	108
Y12254	58	GCGTGAGGGATGAAGGTCTT-CGGATCGTAAACCTCTGTACAGAA--GGGAAGAAAACCGCA	114
		** ** ** * * * * ** * ** * *	
BandA-1	114	--GCGCGCACGTGTGCCGATTAAGATATTGTACGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG	170
BandA-2	114	----GGGACCTGTCTCTGATGCAGGTATAATGGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG	168
BandB-1	112	--ACTCCTACGTGTAGGGCTTGACGGTACCCTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG	168
BandB-2	115	GCGGAGGGAATGCCGTGCCGGTGACGCCGCCCGCGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTG	173
BandC-1	111	-----AAA-----TGACGGTACCGTATGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTG	150
BandC-2	109	-----TAAA-----TGACGGTACCGTATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTG	150
BandC-3	118	CCGTTCTAATCAGCGCGCACTGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTG	176
AB192156	113	--GCA-GCACGTGTGCTTGTGTAAGTATTGTACGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG	168
AY806836	112	--AGGAGTACGTGACTTTGATGACGGTACCATATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG	168
AJ876659	112	--ACTCCTACGTGTAGGGCTTGACGGTACCCTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG	168
AB191965	115	GCGGAGGGAATGCCCGCCGGTGACGCCGCCCGCGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTG	173
AB255917	111	-----CAA-----TGACGGTACCGTATGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTG	151
AB188591	109	-----TAA-----TGACTGTACCAGAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTG	148
Y12254	115	CCGTGCTAATCAGCGGTGCATTGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTG	173
		* * * * * ** * ** * **	

**Fig. 4-6. Alignment of partial sequences of 16S rDNA clones from eight excised bands from PWPCR-DGGE gel (Fig. 4-4) and reference organisms in database (Gene Bank).**

**Table 4-1. Sequencing result of the DGGE bands in Fig. 4-4.**

Band name	Bacterial strains which had the highest similarity	Accession No.	similarity
BandA	-1 Uncultured bacteroidales bacterium	AB192156	96%
	-2 Uncultured Bacteroidetes bacterium clone IS019B35	AY806836	85%
BmdB	-1 <i>Flavovacterium</i> sp. R2_13	AJ876659	100%
	-2 Uncultured Treponema sp.	AB191965	98%
BandC	-1 Uncultured Clostridiales bacterium	AB255917	97%
	-2 Uncultured bacterium gene, clone: M-P1-94	AB188591	96%
	-3 <i>Desulfovibrio intestinalis</i>	Y12254	93%

#### 4-5 PWPCR-DGGE 解析

メンブランフィルター培養法によって生じたコロニーを計数することで、*N. takasagoensis* 腸内にフェノール分解菌が濃縮されることが実証された。しかしコロニーを計数しただけではコロニーを形成した微生物の種数に関しては分からない。そこで、PWPCR-DGGE 法を用いて、プレート上に生じた全てのフェノール分解細菌を比較解析することを試みた。

##### 4-5-1 材料および方法

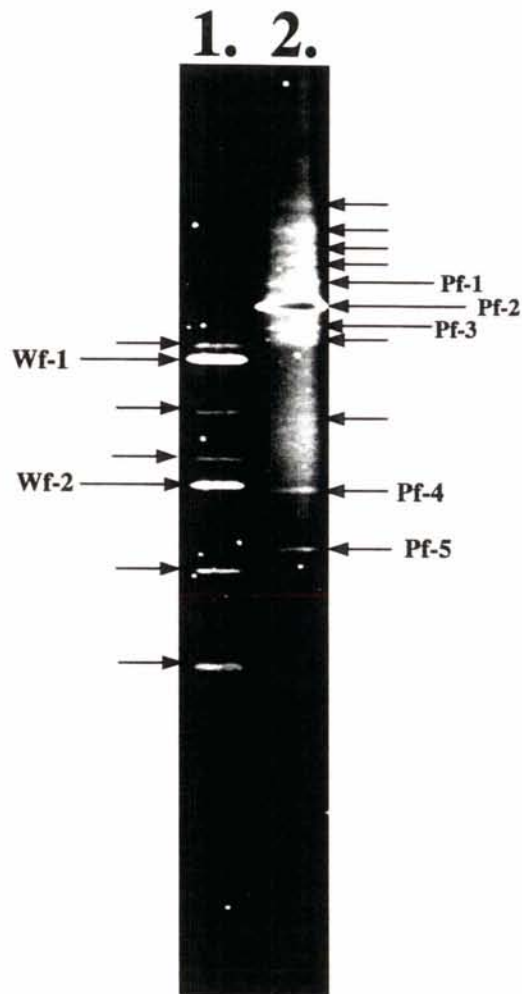
木材摂食 *N. takasagoensis* および 100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* 腸内微生物叢をそれぞれメンブランフィルター培養法によって培養した。メンブランフィルター上に生じた全細菌コロニーを滅菌蒸留水を用いて懸濁し、懸濁液を 1.5 ml チューブに移し遠心分離 (12,000 ×g, 10 min) して、全細菌コロニーを回収した。菌体の全 DNA を Fast DNA kit を用いて抽出し、前述の PCR-DGGE 法と同様の方法で解析した。

##### 4-5-2 結果

Figure 4-7 に木材摂食した *N. takasagoensis* および 100 mg/l フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* の腸内微生物叢それぞれからメンブランフィルター培養法によってコロニーを形成した全フェノール分解菌のバンドパターンを示した。Figure 4-8 は、得られた DNA シーケンシングのアライメントデータを示している Table 4-2 はそれぞれの全細菌コロニーで検出されたバンド数および検出されたバンドの DNA シーケンスの結果を表している。木材摂食 *N. takasagoensis* からは、7 本のバンドが検出されたのに対し、フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* からは 11 本のバンドが検出された。フェノール人工餌摂食 *N.*

*takasagoensis* 腸内から検出された DGGE バンドの中で、特にバンドの輝度の高かったバンド (Wf-1, Wf-2, Pf-1~5) のシーケンシングの結果を Table 4-2 に示す。Wf-1 および Wf-2 のバンドの DNA シーケンスは、*Enterobacter* sp. ydwj-5 (EF028156) と 100%、*Acinetobacter* sp. HX-2006 (DQ989375) と 99% の相同性をそれぞれ示した。Pf-1, Pf-2, Pf-3, Pf-4 および Pf-5 のバンドの DNA シーケンシングは、*Chryseobacterium* sp. DGR-M7 と 100%、*Pseudomonas fluorescens* strain ost5 (AF125317) と 100%、*Acinetobacter* sp. HX-2006 (DQ989375) と 99%、*Citrobacter* sp. SVUB3 (AM401577) と 99%、Unculturable bacterium clone CobP5-16 (AY160857) と 96% の相同性をそれぞれ示した。

Figure 4-9 に木材摂食した *C. formosanus*, 100 mg/l、フェノール人工餌摂食した *C. formosanus*、木材摂食した *N. takasagoensis* および 50 mg/l フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* の腸内微生物叢それぞれからメンブランフィルター培養法によってコロニーを形成した全フェノール分解菌のバンドパターンを示した。Fig. 4-10 は Sorensen の式を用いて Fig. 4-9 に示した細菌叢間のバンドパターンの差異と類似性を基に構築した系統樹を示している。この 4 種類の細菌叢の類似度は、どの細菌叢間においても非常に低く、最も高いもの (100 mg/l フェノール人工餌摂食 *C. formosanus* と 50 mg/l フェノール人工餌摂食した *N. takasagoensis* 間の類似度) においても 35% 程度しかなかった。



**Fig. 4-7. Photograph of PWPCR-DGGE of 16S rDNA of total bacterial colonies formed on membrane filter from intestinal microorganisms of *N. takasagoensis* fed with wood and 50 mg/l phenol artificial diet, respectively.**

**1. wood, 2. phenol.**

**Allows shows the detected bands and DNA of nominated bands were sequenced.**



```

Wf-1      1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG 60
Wf-2      1  CGGGAGGCAGCAATGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG 60
Pf-1      1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCGCG 60
Pf-2      1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG 60
Pf-3      1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG 60
Pf-4      1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG 60
Pf-5      1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGTCAATGGTCGGGAGACTGAACCAGCCAATCCGCG 60
EF028156 1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG 60
DQ979375 1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATCCGCG 60
EF033513 1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCGCG 60
AF125317 1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG 60
AM401577 1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG 60
AY160857 1  CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGTCAATGGTCGAGAGACTGAACCAGCCAATCCGCG 60
          1  ***** ** ***** ***** * ** **** ***** ****
Wf-1      61  TGTATGAAGAAGGCCCTTCGG-GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGT 119
Wf-2      61  TGTGTGAAGAAGGCCCTTATG-GTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGT 119
Pf-1      61  TGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTGTATAGGGATAAACCTACTCTCG 120
Pf-2      61  TGTGTGAAGAAGGCCCTTCGG-GTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAAGCT 119
Pf-3      61  TGTGTGAAGAAGGCCCTTCGG-GTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAAGCT 119
Pf-4      61  TGTATGAAGAAGGCCCTTCGG-GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGTTAAGGT 119
Pf-5      61  TGAAGGAAGACGGTATTATGTATTGTAACCTTCTTTGGCAGGGGAGTAAAAAGGATCACG 119
EF028156 61  TGTATGAAGAAGGCCCTTCGG-GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGT 119
DQ989375 61  TGTGTGAAGAAGGCCCTTATG-GTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGT 119
EF033513 61  TGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTGTATAGGGATAAACCTACTCTCG 120
AF125317 61  TGTGTGAAGAAGGCTTCGG-ATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGT 119
AM401577 61  TGTATGAAGAAGGCCCTTCGG-GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGTTAAGGT 119
AY160857 61  TGAAGGAAGACGGTATTATGTATTGTAACCTTCTTTTGCAGGGGAGTAAAGTGAGGGATG 120
          ** ** ** ** * * ***** **** ** *
          * ** ** ** * * ***** **** ** *

Wf-1      120 TAATAACCGCAG-CAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG 173
Wf-2      120 TAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG 174
Pf-1      121 TGAGA-GTA-----GCTGAAGTACTATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTG 168
Pf-2      120 TAATACGCTCAT-CAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG 173
Pf-3      120 TAATACGCTCAT-CAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG 173
Pf-4      120 TAATAACCTTAG-CCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACTGGCTAACTCCGTG 173
Pf-5      120 AGTTGGTTC-----CTTGAAGTACCCTGAGAACAAGCATCGGCTAACTCCGTG 168
EF028156 120 TAATAACCGCAG-CAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG 173
DQ989375 120 TAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG 174
EF033513 121 TGAGA-GTA-----GCTGAAGTACTATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTG 168
AF125317 120 TAATACCTTGCT-GTTTGGACGTTACCAACAGAAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG 173
AM401577 120 TAATAACCTTAG-CCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG 173
AY160857 121 TATCC-TTT-----ATTGTAGGTACCTTGCAGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG 169
          * ** ** ** * * ***** **** ** *

```

**Fig. 4-8. Alignment of partial sequences of 16S rDNA clones from eight excised bands from PWPCR-DGGE gel (Fig. 4-7) and reference organisms in database (Gene Bank).**

**Table 4-2. Total numbers of DGGE bands and their DNA sequence results.**

Total band number	Band name	Strain which had the highest similarity	Accession No.	Similarity	
Wf	7	Wf-1	<i>Enterobacter</i> sp. ydwj-5	EF028156	100%
		Wf-2	<i>Acinetobacter</i> sp. HX-2006	DQ989375	99%
Pf	11	Pf-1	<i>Chryseobacterium</i> sp. DGR-M7	EF033513	100%
		Pf-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain ost5	AF125317	100%
		Pf-3	<i>Acinetobacter</i> sp. HX-2006	DQ989375	98%
		Pf-4	<i>Citrobacter</i> sp. SVUB3	AM401577	99%
		Pf-5	Uncultured bacterium clone COB P5-16	AY160857	96%

Wf: total bacterial colonies obtained by membrane filter method  
from wood feeding *N. takasagoensis*

Pf: Total bacterial colonies obtained by membrane filter method  
from *N. takasagoensis* fed with phenol artificial diet

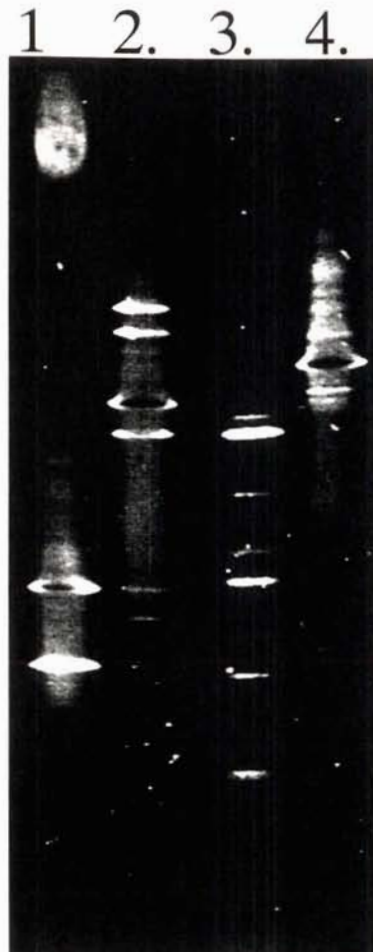


Fig. 4-9. Photograph of PWPCR-DGGE of 16S rDNA of total bacterial colonies formed on membrane filter from intestinal microorganisms of *C. formosanus* and *N. takasagoensis* fed with wood and phenol artificial diet, respectively.

1. *C. formosanus* (wood), 2. *C. formosanus* (phenol),  
3. *N. takasagoensis* (wood) and 4. *N. takasagoensis* (phenol).

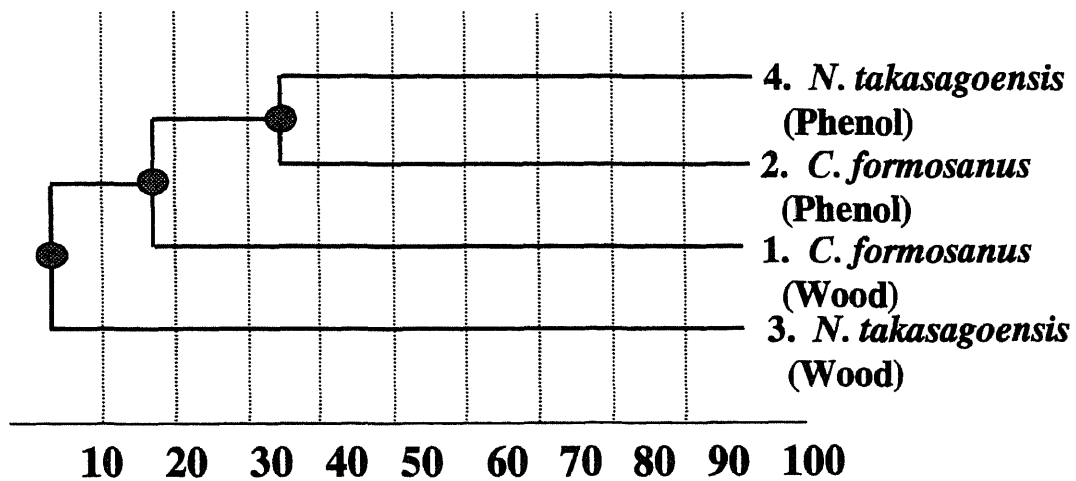


Fig. 4-10. Cluser analysis (UPGAMA method) of PWPCR-DGGE band pattern (scale represent the percentage of divergence).

#### 4-6 第4章の考察

(本文中の *C. formosanus* との比較に関しては、3章を参照のこと)

アガロース人工餌および飢餓条件よりも、フェノール人工餌摂食による生存率の低下が著しいことから、フェノールの毒性によって *N. takasagoensis* の生存が著しく阻害された。また、*C. formosanus* では 100 mg/l のフェノールを含む人工餌を与えた場合 20 日以上生存する個体が存在したのに対し (Fig. 3-1)、*N. takasagoensis* は 7 日間で全ての個体が死滅している (Fig. 4-1)。この結果から、*N. takasagoensis* のフェノールの毒性に対する感受性が *C. formosanus* に比べて非常に高いことが分かった。*N. takasagoensis* は *C. formosanus* に比べて餌の摂食量が多かったため、単位体重あたりのフェノールの暴露量が多かったと考えられる。この単位体重あたりのフェノールの暴露量の違いがフェノール毒性に対する感受性が高かった一要因として考えられる。アガロース人工餌および飢餓条件下においても、*N. takasagoensis* は *C. formosanus* より生存率の低下が著しい。この結果からは、*N. takasagoensis* は *C. formosanus* よりも貧栄養状態に弱く (炭素源の要求量大きい)、もしくは本研究で用いた人工餌飼育のストレスに対して感受性が高いことが考えられる。したがって、本法を様々な昆虫で適用する場合、人工餌の餌成分濃度を、昆虫種に応じて個々に工夫する必要があると考えられる。

メンブランフィルター培養法によるフェノール分解菌のスクリーニングの結果、木材摂食 *N. takasagoensis* 腸内からは  $6.0 \times 10^2$  CFU/gut の分解菌しか検出されなかったのに対し、フェノール人工餌摂食 *N. takasagoensis* 腸内からは、 $3.9 \times 10^5$  CFU/gut の分解菌が検出された (Fig. 4-3) ことから、フェノール人工餌摂食によって *N. takasagoensis* 腸内にフェノール分解菌が濃縮されることが明らかとなった。この結果は *C. formosanus* だけでなく、*N. takasagoensis* でも、本スクリーニ

ング法が適用可能であることを示している。

木材摂食 *N. takasagoensis* およびフェノール人工餌摂食 *N. takasagoensis* 腸内の CFU/gut 値を比較すると、フェノール人工餌摂食の方が約 650 倍大きい。摘出した腸の形態を観察した結果、フェノール人工餌を摂食することにより、腸の大きさが縮小していることが確認された。この結果から、少なくとも全細菌数はフェノール人工餌摂食によって減少していることが考えられる（全細菌数の計数は行っていない）。したがって、フェノール人工餌摂食によって、フェノール分解菌が全細菌数に対する存在比として、少なくとも 650 倍以上は濃縮されたと考えられる。フェノール人工餌を与えた *C. formosanus* では、フェノール分解菌の濃縮率が 200 倍であった（第 3 章 P. 33 参照）ため、*C. formosanus* と比較して、フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* の腸内に濃縮されるフェノール分解菌の濃縮率は高いことが明らかとなった。

フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* 腸内からメンブランフィルター培養法によって検出されたフェノール分解菌の数 ( $3.9 \times 10^5$  CFU/gut) は、*C. formosanus* の場合 ( $2.8 \times 10^3$  CFU/gut : P. 33 参照) と比較して非常に高い。フェノール分解菌が腸内に濃縮されることで、昆虫体内でフェノールが無毒化され、より長く昆虫が生き残ることができるという考え方に対して、この結果は矛盾しているように考えられる。フェノール人工餌による飼育下では、シロアリは表皮と人工餌が接触する、わずかに揮発したフェノールが気相部に存在する、などフェノールが後腸微生物まで運ばれるまでにシロアリ自身がフェノールの毒性の影響を受ける。*N. takasagoensis* は、シロアリ自身のフェノール耐性が *C. formosanus* と比較して小さいためにフェノール分解菌の濃縮することによる解毒システムが腸内に構築されても、比較的短期間で死滅したと考えられる。

フェノール人工餌を摂食させることで、7 日間生き残った *N. takasagoensis* 腸

内細菌叢が変化することが、PCR-DGGE 法によって示された。しかし、フェノール人工餌を摂食した腸内細菌叢のバンドパターンの類似度が、*C. formosanus* では 35%と非常に小さい値であったのに対し、*N. takasagoensis* では 86%であり、*C. formosanus* より細菌叢の変化が小さかった。*N. takasagoensis* 腸内で DGGE バンドパターンの変化が小さかった理由としては、以下のことが考えられる。① *C. formosanus* の人工餌摂食期間（10 日間）より *N. takasagoensis* のほうが短期間（7 日間）であったため、腸内の微生物叢の変化が小さかった。② *N. takasagoensis* の腸内微生物叢は細菌のみで構成されているため、*C. formosanus* では、腸内原生動物の消失と同時に原生動物と共生関係にある細菌が多く消失したが、*N. takasagoensis* 腸内ではそれほどダイナミックな変化が起こらなかった。③腸の大きさが縮小していることから、細菌数全体が減少していることは明らかだが、DGGE バンドとして検出されなくなるほど数が減少した種はほとんどなかった（DGGE バンドとして検出される検出限界内で各種微生物の増減が起こった）。

フェノール人工餌を摂食した *N. takasagoensis* 腸内細菌叢と、木材摂食 *N. takasagoensis* 腸内微生物叢を集積培養することによって得られた細菌叢とは大きく異なっていた。この結果は *C. formosanus* と同様の傾向を示した。これは、本研究で用いた集積培養が L 字管を用いた回分培養で行ったのに対し、3 章で述べたように、昆虫 (*N. takasagoensis*) 腸内は一種の連続培養系であるため、回分培養とは異なる細菌が増殖して滞留することにより、優占種となるからであると考えられる。しかしながら、フェノール人工餌摂食 *N. takasagoensis* 腸内細菌叢のみで特異的に見られたバンドをシーケンシングした結果 (Table 4-2)、培養できない細菌、もしくは偏性嫌気性菌のクローンのみが検出された。また Band B-1 以外の微生物は全て *N. takasagoensis* も含むシロアリの腸内から検出された

細菌のクローンと高い相同性を示していた。既知のフェノール分解菌と高い相同性を示す DNA は検出されなかったため、DGGE 解析では、フェノール分解菌が濃縮されたかどうか論じることはできなかった。PCR-DGGE では、PCR バイアスなどの欠点があり、存在している細菌を定量的に捕らえることはできない。したがって、細菌数が減少してもある程度の量が腸内に残存していたら DGGE バンドとして検出される。*N. takasagoensis* 腸内は、完全混合型の連続培養系でもなく、また腸壁に強固に付着して存在する細菌も多数いるため、フェノール分解菌以外の微生物も多数残留することが考えられる。PCR-DGGE 法では解析法として限界があるため、その他のより定量的な解析手法（定量的 PCR 等）を用いた解析を行うことにより詳細な細菌叢の変化をモニターすることができると考えられる。

PWPCR-DGGE 解析によって、木材摂食時には 7 本のフェノール分解菌の DGGE バンドが検出されたのに対し、フェノール人工餌を摂食させることで、これまで検出されなかったバンドを含む 11 本のフェノール分解菌の DGGE バンドが検出された。これらのバンドは、検出限界以下の低濃度で存在していたフェノール分解菌が、フェノール人工餌摂食によって検出可能になるまで高濃度化し、効率的にスクリーニング可能になったために生じたものだと考えられる。また、フェノール人工餌摂食シロアリ腸内から *Pseudomonas fluorescens* がスクリーニングされたが、この細菌は芳香族化合物分解菌としての報告も多数ある (Heinaru E *et al.*, 2001; Merimaa M *et al.*, 2006)。そのためこれらの芳香族化合物分解菌が、フェノール人工餌摂食によって腸内に濃縮され、効率的にスクリーニングされたものと考えられる。

*N. takasagoensis* からスクリーニングされた全フェノール分解菌の PWPCR-DGGE のバンドパターンが、*C. formosnaus* からスクリーニングされたも



のとは大きく異なっていた (Fig. 4-9, 4-10)。この結果は、用いる昆虫種を変化させることにより、同じ機能を有する細菌をスクリーニングする場合でも、異なる種類の細菌が獲得される可能性を示している。つまり、様々な種類の昆虫に、本研究で開発した微生物スクリーニング法を適用することで、より多種の目的微生物の獲得の可能性がある。

以上の検討により、原生動物と細菌から構成される腸内微生物叢を有する *C. formosanus* を用いて確立した微生物スクリーニング法が (第3章)、腸内微生物叢の構成が大きく異なり細菌のみで構成される *N. takasagoensis* でも適用可能なより応用性の高い方法であることが明らかとなった。

#### 4-7 第4章の要約

本章では、*C. formosanus* で確立した手法が応用性の高い方法かどうか確認する第一歩として、*C. formosanus* とは異なり、腸内に細菌のみが共生する昆虫 *N. takasagoensis* の職アリを用いて検討を行った。*N. takasagoensis* は *C. formosanus* よりもフェノールの毒性に対する感受性が高く、50 mg/l フェノール人工餌を摂食させた場合、7日間で全体の60%程度が死滅したが、9日程度まで生存する個体も4%程度存在した。次に、木材あるいはフェノール人工餌それぞれを7日間摂食し生存した *N. takasagoensis* 腸内からメンブランフィルター培養法を用いてフェノール分解菌をスクリーニングした結果、木材摂食の *N. takasagoensis* からは  $6.0 \times 10^2$  CFU/gut のコロニーしか生じなかったのに対し、フェノール人工餌摂食の *N. takasagoensis* からは、 $3.9 \times 10^5$  CFU/gut のコロニーが生じた。このCFU/gut値は *C. formosanus* と比較して非常に高い値であった。さらにPWPCR-DGGE解析により、木材摂食した *N. takasagoensis* から直接スクリーニングした場合DGGEバンド数にして7種類の分解菌が得られたのに対し、フェノール人工餌を摂食

させた *N. takasagoensis* の腸内からは 11 種類と、検出限界以下の低濃度のフェノール分解菌を高濃度化し、効率的にスクリーニングできることが明らかとなった。なお、*N. takasagoensis* からスクリーニングされたフェノール分解菌は、*C. formosanus* からスクリーニングしたフェノール分解菌とは異なるものであった。以上の結果より、本法が *C. formosanus* だけでなく、異なる腸内微生物叢を有する *N. takasagoensis* でも適用可能な、応用性の高い手法であることが示された。

## 第5章 総括

現在、従来の純粋培養技術を用いて新規な微生物を獲得する事が困難になりつつあり、この現状は微生物関連産業で大きな問題になっている。この解決策の一つとして新規な微生物スクリーニング法の開発が切望されている。このような現状をふまえ、自然界の複合生物系の中で働く微生物に着目し、それらを積極的に制御して利用する事を考案した。本研究では、特に、昆虫と腸内微生物（餌成分の分解に大きく関わる）の共生系に着目した。昆虫の腸内微生物による餌成分分解プロセスは、昆虫の摂食活動によって餌成分が連続的に供給され、次にそれらが微生物によって連続的に分解され、分解物が昆虫に吸収されるもしくは肛門からの排出によって連続的に除去される。すなわち昆虫の腸内は一種の連続培養系ととらえることができる。連続培養系としての昆虫の腸内では、餌成分を分解し増殖できる微生物が滞留し、その他の微生物の多くは wash out されることが予想される。上記の考え方を基に、昆虫に与える人工餌成分を制御することによって、目的の餌分解微生物を腸内に濃縮し効率的にスクリーニングする新規手法の開発を行った。

第1章では、本研究の背景と目的について述べた。

第2章では、従来の一般的な微生物スクリーニング手法、昆虫（シロアリ）の生態、シロアリを中心とした昆虫と腸内微生物叢の共生関係に関する既往の研究について紹介し、本研究の目的と背景を明らかにした。

第3章では、「餌—昆虫—腸内微生物叢」系を用いた新規微生物スクリーニング法の開発を目的として、モデル昆虫として木材食性昆虫のイエシロアリ

*Coptotermes formosanus* Shiraki の職アリを用いて検討した。*C. formosanus* 腸内には3種の原生動物と多種の細菌が共生している。*C. formosanus* が摂食する木材(赤松)に代えて、難分解性で lignin 関連化合物であるフェノールを 100 mg/l 含む寒天 gel を人工餌として与えた。*C. formosanus* はフェノールの毒性に対して個体差があり、全体の約 20%は 10 日以内に死滅したが、20 日以上生き残る個体も 17%程度存在した。顕微鏡観察および PCR-DGGE 法によって腸内微生物叢の解析を行った結果、フェノール人工餌を摂食することにより、腸内微生物叢が大きく変化することが明らかとなった。また、その細菌叢の構成は従来の集積培養によって得られる細菌叢とは大きく異なっていた。木材あるいはフェノール人工餌を 10 日間摂食し生存した *C. formosanus* の腸内微生物叢から、フェノール (500 mg/l)を単一炭素源として含む寒天培地を用いてフェノール分解菌をスクリーニングした。その結果、木材を摂食した *C. formosanus* 腸内からは  $3.4 \times 10^4$  CFU/gut のコロニーが生じたが、フェノール人工餌を摂食した *C. formosanus* からは  $2.3 \times 10^5$  CFU/gut と多数のコロニーが検出された。しかしながら、これらのコロニー形成菌の 90%以上がフェノール分解能を示さないフェノール耐性菌であった。次にフェノール分解菌のみをスクリーニングするため、寒天平板培養法に代えてメンブランフィルター培養法を用いた結果、木材摂食 *C. formosanus* からは  $2.0 \times 10^2$  CFU/gut のコロニーしか生じなかったのに対し、フェノール人工餌摂食 *C. formosanus* からは  $2.8 \times 10^3$  CFU/gut のコロニーが生じ、その全てがフェノール分解能を有していた。以上の結果から、フェノール人工餌摂食によって、フェノール分解菌が *C. formosanus* 腸内に濃縮されることが明らかとなった。さらにメンブランフィルター培養法により得られた全てのコロニーを回収して PCR-DGGE 解析 (PWPCR-DGGE 法) した結果、木材摂食の *C. formosanus* 腸内から直接スクリーニングすることにより DGGE バンドとして3種類のフェノー

ル分解菌が得られたのに対し、フェノール人工餌摂食によって検出限界以下の低濃度であった多種類のフェノール分解菌を高濃度化し、DGGE バンドとして9種類の分解菌を効率的にスクリーニングできる事が示された。

第4章では、*C. formosanus* で確立した方法がより応用性の高い方法であるか確認する第一歩として、*C. formosanus* とは異なり、腸内に細菌のみが共生する昆虫 *N. takasagoensis* の職アリを用いて検討を行った。*N. takasagoensis* は *C. formosanus* よりもフェノールの毒性に対する感受性が高く、50 mg/l フェノール人工餌を摂食させた場合、7日間で全体の60%程度が死滅したが、9日間程度まで生存する個体も4%程度存在した。次に、木材あるいはフェノール人工餌それぞれを7日間摂食し生存した *N. takasagoensis* 腸内からメンブランフィルター培養法を用いてフェノール分解菌をスクリーニングした結果、木材摂食の *N. takasagoensis* からは  $6.0 \times 10^2$  CFU/gut のコロニーしか生じなかったのに対し、フェノール人工餌摂食の *N. takasagoensis* からは、 $3.9 \times 10^5$  CFU/gut のコロニーが生じた。このCFU/gut値は *C. formosanus* と比較して非常に高い値であった。さらにPWPCR-DGGE解析により、木材摂食した *N. takasagoensis* から直接スクリーニングした場合、DGGE バンド数にして7種類の分解菌が得られたのに対し、フェノール人工餌を摂食させた *N. takasagoensis* の腸内からは11種類と、検出限界以下の低濃度のフェノール分解菌を高濃度化し、効率的にスクリーニングできることが明らかとなった。なお、*C. formosanus* からスクリーニングしたフェノール分解菌とは異なるものであった。以上の結果より、本法が *C. formosanus* だけでなく *N. takasagoensis* でも適用可能な、より応用性の高い方法であることが示された。

本研究では、新規な有用微生物の獲得が困難になっている現状を打破するための新規微生物スクリーニング法の開発を目的とした。そのために、昆虫に与える人工餌成分を制御することで、目的の餌分解菌（フェノール分解菌）を濃縮し効率的にスクリーニング可能になることを、2種類の昆虫 *C. formosanus* および *N. takasagoensis* を用いて証明した。今後は本手法を用いて、様々な昆虫や人工餌成分を組み合わせることによって、これまで獲得することが困難であった有用微生物を効率的にスクリーニングされることが期待される。本法は今後、新規な有用微生物の獲得が切望されている微生物関連産業の活性化に大きく貢献することが期待される。

## 引用文献

**Abo-Khatwa N** (1978) Cellulase of fungus-growing termites: A new hypothesis on its origin., *Experientia*, 34: 559-560.

**Ahmadjian V and Jacobs JB** (1981) Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck., *Nature*, 289: 169-172.

**Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410

**Altschul SE, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402

**Amman RI, Ludwig W and Schleifer KH** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation., *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169

**Bauer S, Tholen A, Overmann J, and Brune A** (2000) Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques., *Arch. Microbiol.*, 173: 126-137

**Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM and Handelsman J** (2004) Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods., *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 293-300

**Brune A, Emerson D and Breznak JA** (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink; Microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites., *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2681-2687

**Brune A and Friedrich M** (2000) Microecology of the termite guts: structure and function on a microscale., *Curr. Opin. Microbiol.*, 3: 263-269

**Cleaveland LR** (1924) The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar., Biol. Bull., 46: 117-127

**de Vries EJ, Jacobs G, Sabelis MW, Menken SBJ and Breeuwer JAJ** (2004) Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp. and western flower thrips., Proc. R. Soc. Lond. B, 271: 2171-2178

**Dillon RJ and Charnley AK** (1995) Chemical barriers to gut infection in the desert locust – in-vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*., J. Invertebr. Pathol., 66 (1): 72-75

**Domingo JSW, Kaufman MG, Klug MJ, Holben WE, Harris D and Tiedje JM** (1998) Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets., Mol. Ecol., 7 (6): 761-767

**Feist CF and Hegeman GD** (1969) Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of transential pathways., J. Bacteriol., 100: 869-877

**Heider J and Fuchs G** (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds., Eur. J. Biochem., 243: 577-596

**Hirai H, Shinzato N, Nagasawa A, Watanabe Y and Kurane R** (2000) Degradation of lignin model compounds by various termites., Mokuzai Gakkaishi, 46(1): 63-67

**Hobbie JE, Daley RJ and Jasper S** (1977) Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy., Appl. Environ. Microbiol., 33: 1225-1228

**Hirsch AM, Lum MR and Downie JA** (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?, Plant Physiol., 127: 1484-1492

**Inoue T, Murashima K, Azuma JI, Sugimoto A and Slaytor M** (1997) Cellulose and xylan utilization in the lower termite *Reticulitermes speratus*., J. Insect Physiol., 43: 235-242



**Itakura S, Uesima K, Tanaka H and Enoki A** (1995) Degradation of wood component by subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki., *Mokuzai Gakkaishi*, 41(6): 580-586

**Kato K, Kozai S and Sakuranaga M** (1998) Degradation of lignin compound by bacterita from termite guts. *Biotechnol. Lett.*, 20 (5): 459-462.

**Khomutov LI, Ptichkina NM, Sheenson VA, Lashek NA and Panina NI** (1994) Thermal-degradation of polysaccharides., *Russ. J. Appl. Chem.*, 67 (4): 574-577

**Kuhnigk T, Borst EM, Ritter A, Kampfer P, Graf A, Hertel H and Konig H** (1994) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites., *System. Appl. Microbiol.*, 17: 76-85

**Kyou K, Watanabe T, Yoshimura T and Takahashi M** (1996) Lignin modification by termite and its symbiotic bacteria., *Wood Res.*, 83: 50-54

**Leadbetter JR, Schmidt TM, Graber JR and Breznak JA** (1999) Acetogenesis from H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> by spirochetes from termite guts., *Science*, 283: 686-689

**Madigan MT, Martinko JM and Parker J** (2003) Brock 微生物学(オーム社) p. 22

**Manome A, Zhang H, Tani Y, Katsuragi T, Kurane R and Tsuchida T** (2001) Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells., *FEMS Microbiol. Letters*, 197: 29-33

**Martin MM, and Martin JS** (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis* : The role of acquired digestive enzyme., *Science*, 199: 1453-1455

**Muyzer G, de Waal EG, Uitterlinden AG** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA., *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700

**Ogino A, Koshikawa H, Nakahara T, Uchiyama H** (2001) Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses., *J. Appl. Microbiol.*, 91 (4): 625-635

**Ohkuma M** (2003) Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: 1-9

**Rouland C, Civas A, Renoux J and Petek F** (1988) Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp., *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B: 449–458

**Schafer A, Konrad R, Kuhnigk T, Kampf P, Hertel H and König H** (1996) Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut., *J. Appl. Bacteriol.* 80 (5): 471-478

**Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H** (2002) Succession of Bacterial Community Structure along the Changjiang River Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Library Analysis., *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5142-5150

**Sorensen T** (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content., *Biol. Skr.*, 4: 1-34

**Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA** (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes., *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (8): 4787-4755

**Swartz MN and Gordon N** (1959) Agarase from an agar-digesting bacterium., *J. Bacteriol.*, 77: 403-409

**Taguchi F, Hasegawa K, Saito T and Hara K** (1996) Simultaneous production of xylanase and hydrogen using xylan in batch culture of *Clostridium* sp. strain X53., *J. Ferment. Bioeng.*, 81 (2): 178-180

**Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y** (2005) Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques., *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (4) 2162-2169

**Tanaka H, Aoyagi H, Shina S, Dodo Y, Yoshimura T, Nakamura R, Uchiyama H** (2006) Influence of the artificial diet components on the structure and function of the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 907-917

**Tanaka H, Nakanishi M, Ogbonna JC, Ashihara Y and Yajima M** (1993) Development of an apparatus for cultivation of anaerobic microorganisms., *Biotech. Tech.*, 7 (3): 189-192

**Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice., *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680

**Tholen A, Schink B and Brune A** (1997) The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence for oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 24: 137-149

**Trager W** (1934) The cultivation of a cellulose-digesting flagellate, *Trichomonas termopsidis*, and certain other termite protozoa., *Biol. Bull.*, 66: 182-190

**Watanabe H, Noda H, Tokuda G and Lo N** (1998) A cellulase gene of termite origin., *Nature*, 394: 330-331

**Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S** (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4396-4402

**Yamaoka I and Nagatani Y** (1975) Cellulose digestion system in the termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe).I. Producing site and physiological significance of two kinds of cellulase in the worker., *Zoo. Mag.*, 84: 23-29

**Yamaoka I and Nagatani Y** (1977) Cellulose digestion system in the termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe). II. Ultra structural change related to the ingestion and digestion of cellulose by the flagellates, *Trichonympha agilis*., *Zoo. Mag.*, 86: 34-42

**Yamaoka I** (1979) Selective ingestion of food by termite protozoa, *Trichonympha agilis*., *Zoo. Mag.*, 88: 174-179

**Yamin MA** (1979) Scanning electron microscopy of some symbiotic flagellates from the termite *Zootermopsis*., *Trans Amer. Micros. Soc.* , 98 (2): 276-279

**Yap LF, Lee YK and Poh CL** (1999) Mechanism for tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 833-840

**Zurek L and Keddie BA** (1996) Contribution of the colon and colonic bacterial flora to metabolism and development of the American cockroach *Periplaneta americana* L., *J. Insect Physiol.*, 42 (8): 743-148

東正彦、安部琢哉(1992) 地球共生系とは何か (川那部浩也 編、平凡社、p.40

安部琢哉(1989) シロアリの生態、東京大学出版会、p.1-50

工藤俊章、大熊盛也 難培養微生物研究の最新技術 - 未利用微生物資源へのアプローチ - (2004)、シーエムシー出版、p.20-31、p203-223、p.251

木暮一啓(1999) 環境を支配している培養できない細菌群,バイオサイエンスとバイオインダストリー、**57** (11): 11-16

椎名俊介: 餌によるイエシロアリ腸内微生物叢の制御とその解析.  
筑波大学バイオシステム研究科 2001年修士論文

清水 潮 (1995) 微生物の共生系、学会出版センター p.35

竹松葉子 (2001) シロアリの分類と多様性, 化学と生物, 39 , 393-400

中野準三、樋口隆昌、住本昌之、石津敦(1983) 木材化学、ユニ出版株式会社、  
p.5-7

福井三郎、別府輝彦 編 (1985) スクリーニング技術 講談社サイエンティフ  
イク、p.49

松光光夫、大野正男、北野日出男、後閑暢夫、松本忠夫 (1992) 昆虫の生物学、  
玉川大学出版部、p. 3-4

## 謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成は、終始、筑波大学 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 元教授 田中秀夫 博士（現 同大学 名誉教授）のご指導のもとに行われたものであり、その間、多大なご教示とご助言を賜りました。ここに謹んで御礼申し上げます。

研究成果を論文としてまとめるにあたり、多大なご指導とご助言をいただきました、筑波大学 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 教授 向高祐邦 博士に謹んで御礼申し上げます。

研究成果を論文としてまとめるにあたり、適切なお指導をいただきました、同大学 同研究科 同専攻 教授 内山裕夫 博士、同大学 同研究科 同専攻 教授 土居修一 博士、ならびに同大学 同研究科 同専攻 助教授 青柳秀紀 博士に厚く御礼申し上げます。

また論文作成に当たり、適切なお教示を賜りました、ナイジェリア大学教授 James C. Ogbonna 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究における諸実験の遂行ならびに論文作成に当たりましては、興和(株) 興和総合科学研究所 岩崎昭夫 博士、センカファーマシー 金川雅彦 氏に多大なご助言とご指導を賜りましたことを、ここに厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、多大なご協力と暖かい励ましをいただき、さらに思い出多き学生生活をともにすごしました細胞機能開発工学研究室の諸氏に心より感謝申し上げます。また研究の基礎を築いてくださった銅道百合氏（現 アサマ化成株式会社）、椎名俊介 氏（現 旭硝子株式会社）、中村領介 氏（現 三重県中央農業改良普及センター）に深く感謝申し上げます

最後に、これまで私を支えてくださった両親と姉に心から感謝の意を表し、この博士論文をささげます。