

好熱菌発酵産物の給与によるカブトムシ幼虫の  
性特異的な成長促進に関する研究

2024年1月

千葉大学大学院 園芸学研究科  
環境園芸学専攻 園芸科学コース

浅野風斗

(千葉大学審査学位論文)

# 好熱菌発酵産物の給与によるカブトムシ幼虫の 性特異的な成長促進に関する研究

2024年1月

千葉大学大学院 園芸学研究科  
環境園芸学専攻 園芸科学コース

浅野風斗

## 目次

・総合序論	p5
・参考文献	p9
・図一覧	p14
第1章 好熱菌発酵産物の給与が引き起こすヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢の変化	
・序論	p15
・実験材料と方法	p18
1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験	
2 次世代シーケンサーを用いたヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢変化の解析	
・結果	p22
・考察	p26
・参考文献	p30
・図一覧	p39
第2章 好熱菌発酵産物のメス特異的な成長促進をもたらすメカニズム	
・序論	p51
・実験材料と方法	p 54
1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験	
2 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の解剖と体内組織のサンプリング	
3 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫腸管内のカチオン濃度ならびに有機酸濃度	

#### 4 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の脂肪体における遺伝子発現比較

・結果	p59
・考察	p65
・参考文献	p69
・図表一覧	p79
・総合考察	p99
・参考文献	p103
・図表一覧	p105
・謝辞	p111

## 【総合序論】

カブトムシ類はコガネムシ科に属しており、幼虫の時期に腐葉土や朽ち木などの腐敗した植物を食べて成長し、完全変態する仲間に分類される大型の昆虫である。卵、幼虫、蛹、成虫の4つのライフステージをもち、幼虫期には3つのステージ(2回加齢する)を得て蛹になる(Karino et al., 2004)。

カブトムシ類はペットとして非常に人気があり、成虫の体が大きい個体は付加価値が高い。昆虫の仲間は成虫になると体が大きくなるため、幼虫の時期に体を大きくすることが大きな体を持つ成虫を誕生させるために重要である(Mirth and Riddiford, 2007)。

カブトムシ幼虫の餌となる腐葉土や朽ち木は微生物の代謝によって部分的に分解されており(Sánchez et al., 2017)、それを餌とするカブトムシの幼虫においても腸内細菌叢を通じて難分解木質バイオマスの分解が行われており、結果として生態系における炭素と窒素の循環に関与していることが知られている(Miyamoto et al., 2022)。また、東南アジアに生息しているサイカブトムシ *Oryctes rhinoceros* 幼虫の腸内細菌叢は、朽ち木を食べることから、似たような食性をもつシロアリの腸内細菌叢と類似している(Shelomi et al., 2019)。サイカブトムシ *O. rhinoceros* 幼虫の腸管内には木質バイオマスの分解に関わる *Elusimicrobium* 属の細菌が生息していることが確認されているが、この細菌はシロアリの後腸及びコガネムシの仲間である *Pachnoda ephippiata* でも同様に腸内で生息していることが報告されている(Shelomi et al., 2019)。一方で、一部のカブトムシにおいて腸内細菌叢により、餌である腐植物の分解に加えカブトムシ宿主自体も腐食物を分解する酵素を有していることが示唆されている。実際に、*O. rhinoceros* は植物由来の難分解性多糖を分解することができる酵素であるβ-1,4 エンドグルカナーゼを分泌する(Shelomi et al., 2019)。

昆虫腸内細菌(あるいは共生菌)が、餌である腐植物を分解する過程においてさまざまな有機酸を産生することが報告されている。例えば、前述の *Elusimicrobium* 属は腐植物を分解する過程で得られる単糖類の代謝を行い様々な有機酸を産生することができると報告されている(Geissinger et al., 2009 ; Zheng et al., 2015 ; Zheng et al., 2016 )。コガネムシの仲間である *Pachnoda ephippiata* は腸内が高アルカリに保たれており、腸内微生物が腐植物を分解し酢酸やプロピオン酸を生産している(Andert et al., 2007)。高アルカリの環境は難消化性多糖の溶解度が増すことから(Isizu ,1973)、餌である木質バイオマスが分解され易くなると考えられる。同じく腐食物を食べるシロアリの腸内も pH がアルカリ条件になっており、腸内微生物が有機酸を生成している(Brune et al., 1995; Inagaki and Matsuura, 2018)。さらに、微生物由来の酢酸がシロアリ病害菌である *Serratia marcescens* の増殖を抑制している(Inagaki and Matsuura, 2018)。酢酸はシロアリのエネルギー源となっており、腸管内の酢酸で呼吸に必要な要求量を 100%賄うことができる(Tholen et al., 2000)。以上を踏まえ、腸管内に到達した木質バイオマスは宿主腸管内の高アルカリ条件下で溶解度が高まることで、腸内細菌により分解が促進され、得られた単糖類から産生された有機酸が昆虫の発育に関与していると考えられる。

幼虫の生育においては栄養面における生育の促進に加え、前胸腺から分泌されるホルモンにより、幼虫や蛹の脱皮や成虫の分化が制御されることにより幼虫の大きさが調整されている(Thummel, 2001)。昆虫の脱皮と変態は、エクジステロイドと幼若ホルモン(Juvenile Hormone : JH)の作用と相互作用によって複雑に制御されている(Kayukawa et al., 2016)。完全変態の昆虫では、20-ヒドロキシエクジゾン(20E、主要な活性エクジステロイド)は JH が存在している状態では、幼虫から幼虫への脱皮を誘導する。JH の力価が最終幼虫期に低下すると、20E は幼虫-蛹および蛹-成虫の脱皮(変態)を誘導する。このように、JH は幼虫の早熟変態を防ぐ上で重要な役割を果たしている(Kayukawa et al., 2016)。加え

て、東南アジア原産のメタリフェルホソアカクワガタムシ *Cyclommatus metallifer* において成虫のオスの大きさは、蛹になる前の形態である前蛹前期の段階の幼若ホルモンの分泌量に正の相関があることが報告されている(Gotoh et al., 2011)。一方でカブトムシ類の幼虫では経験的に発酵度が高い餌をあげることで幼虫が大きくなることがわかっているが、餌による幼虫の大きさと JH の役割についての報告はほとんどない。

私の所属する研究室では、好熱菌発酵産物(図1)が動植物に及ぼす機能性に関する評価研究を進めている。好熱菌発酵産物は、港で陸揚げされる商品価値の少ない小エビやカニ、小魚などの未利用海産資源を原料とし、好気条件・自己発酵熱による高温下で行う repeated fed-batch 方式によりコンポスト(堆肥)化した資材である(Niisawa et al., 2008)。

以前の先行研究より、好熱菌発酵産物が家畜豚や魚の生産性を向上することを明らかにしてきた(Tanaka et al., 2015; Ito et al., 2016)。好熱菌発酵産物が脊椎動物に及ぼす影響とその変化をもたらすメカニズムは少しずつ明かされつつあるが、好熱菌発酵産物が昆虫にもたらす影響について調査されたことはない。しかしながら、事例として好熱菌発酵産物を肥料として利用している農家の方から、好熱菌発酵産物を施肥した後に積み上げていた土壌からヤマトカブトムシの幼虫が多数確認されている報告が上がっていた。カブトムシ類の食性や上記の報告を踏まえると好熱菌発酵産物をカブトムシ類の幼虫が摂取することによって有益な影響をもたらしている可能性があると考えられる。

本研究ではヘラクレスオオカブトムシ幼虫に好熱菌発酵産物を給与することによって及ぼされる影響とその原因を解明するべく研究をおこなった。

第1章では、ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢の解析及びヘラクレスオオカブトムシ幼虫に好熱菌発酵産物を給与することによる生理的影響及びその変化をもたらす因子

について調査を行った。その結果、好熱菌発酵産物給与区においてヘラクレスオオカブトムシのメス幼虫の成長促進効果が確認された。また、糞便中の細菌叢解析から、好熱菌発酵産物を含む腐葉土で育ったメスの幼虫では、健康なツシマヒラタクワガタムシ (*Dorcus titanus castarnicolor*) の幼虫の腸管内で優先的に存在している (病原体に感染したクワガタムシ幼虫では存在量が減少している) モリクテス綱が増加していることが明らかになった (Kwak et al., 2019)。

第2章では、ヘラクレスオオカブトムシの幼虫において、好熱菌発酵産物の給与による成長促進効果のメカニズムを宿主の腸管内の物質並びに遺伝子発現に焦点を当てて解析を試みた。49 日間の給与実験において、好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫の成長が促進され、再現性が得られた。49 日目において幼虫の解剖を行なって腸管内の物質の変化と脂肪体由来の遺伝子発現の変動を調査した。解析の結果、ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸管内のカリウムイオンの濃度が好熱菌発酵産物の給与によって中腸に対する局在性を高めた。また、腸管内の有機酸の濃度が好熱菌発酵産物の給与によって増加していた。さらに、幼虫の脂肪体から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行なった結果、好熱菌発酵産物を与えたメス幼虫においてのみ、幼虫の成長を促進する幼若ホルモン (JH) と結合して体内で輸送するタンパク質である、幼若ホルモン結合タンパク質 (Juvenile Hormone Binding Protein : JHBP) の遺伝子発現が増加し、免疫活性の指標であるディフェンシンなどの発現が減少していた。この結果は好熱菌発酵産物というプロバイオティクスが腸管内のイオン濃度の調節により餌である腐葉土の分解効率を高め、JHBP の発現上昇による JH の運搬効率の向上がヘラクレスオオカブトムシのメス幼虫の生育に影響を与えていることを示唆している。

## 【引用文献】

Andert J, Geissinger O, Brune A. Peptidic soil components are a major dietary resource for the humivorous larvae of *Pachnoda spp.* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J Insect Physiol.* 2008 Jan;54(1):105-13. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.08.006. Epub 2007 Aug 19. PMID: 17880994.

Brune A, Emerson D, Breznak JA. 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.* 1995 Jul;61(7):2681-7. doi: 10.1128/aem.61.7.2681-2687.1995. PMID: 16535076; PMCID: PMC1388494.

Geissinger O, Herlemann DP, Mörschel E, Maier UG, Brune A. The ultramicrobacterium "*Elusimicrobium minutum*" gen. nov., sp. nov., the first cultivated representative of the termite group 1 phylum. *Appl Environ Microbiol.* 2009 May;75(9):2831-40. doi: 10.1128/AEM.02697-08. Epub 2009 Mar 6. PMID: 19270135; PMCID: PMC2681718.

Gotoh H, Cornette R, Koshikawa S, Okada Y, Lavine LC, Emlen DJ, Miura T. Juvenile hormone regulates extreme mandible growth in male stag beetles. *PLoS One.* 2011;6(6):e21139. doi: 10.1371/journal.pone.0021139. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21731659; PMCID: PMC3120829.

Inagaki T, Matsuura K. Extended mutualism between termites and gut microbes: nutritional symbionts contribute to nest hygiene. *Naturwissenschaften*. 2018 Aug 30;105(9-10):52. doi: 10.1007/s00114-018-1580-y. PMID: 30291510.

Ishizu A. Behavior of Carbohydrates to Oxygen-Alkali 1973 Volume 27 Issue 8 Pages 371-377. <https://doi.org/10.2524/jtappij.27.8.371>

Kayukawa T, Nagamine K, Ito Y, Nishita Y, Ishikawa Y, Shinoda T. Krüppel Homolog 1 Inhibits Insect Metamorphosis via Direct Transcriptional Repression of Broad-Complex, a Pupal Specifier Gene. *J Biol Chem*. 2016 Jan 22;291(4):1751-1762. doi: 10.1074/jbc.M115.686121. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26518872; PMCID: PMC4722455.

Kwak KW, Lee H, Park K, Kim E, Han MS, Kim N, Kim YS. Preliminary identification of gut microbes between normal and diseased *Dorcus titanus castanicolor* (Coleoptera: Lucanidae). *Int J Indust Entomol*. 2019 39: 45–53

Ito T, Miyamoto H, Kumagai Y, Udagawa M, Shinmyo T, Mori K, Ogawa K, Miyamoto H, Kodama H. Thermophile-fermented compost extract as a possible feed additive to enhance fecundity in the laying hen and pig: Modulation of gut metabolism. *J Biosci Bioeng*. 2016 Jun;121(6):659-664. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.014. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26896863.

Karino K, Seki N, Chiba N Larval nutritional environment determines adult size in Japanese horned beetles *Allomyrina dichotoma* Ecological Research 2004 19: 663 – 668

Mirth CK, Riddiford LM. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. Bioessays. 2007 Apr;29(4):344-55. doi: 10.1002/bies.20552. PMID: 17373657.

Miyamoto H, Asano F, Ishizawa K, Suda W, Miyamoto H, Tsuji N, Matsuura M, Tsuboi A, Ishii C, Nakaguma T, Shindo C, Kato T, Kurotani A, Shima H, Moriya S, Hattori M, Kodama H, Ohno H, Kikuchi J. A potential network structure of symbiotic bacteria involved in carbon and nitrogen metabolism of wood-utilizing insect larvae. Sci Total Environ. 2022 Aug 25;836:155520. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155520. Epub 2022 May 1. PMID: 35508250.

Niisawa C, Oka S, Kodama H, Hirai M, Kumagai Y, Mori K, Matsumoto J, Miyamoto H, Miyamoto H. Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost. J Gen Appl Microbiol. 2008 Jun;54(3):149-58. doi: 10.2323/jgam.54.149. PMID: 18654036.

Sánchez ÓJ, Ospina DA, Montoya S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. Waste Manag. 2017 Nov;69:136-153. doi: 10.1016/j.wasman.2017.08.012. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28823698.

Shelomi M, Lin SS, Liu LY. Transcriptome and microbiome of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) larvae. BMC Genomics. 2019 Dec 9;20(1):957. doi: 10.1186/s12864-019-6352-3. PMID: 31818246; PMCID: PMC6902462.

Tanaka R, Miyamoto H, Inoue S, Shigeta K, Kondo M, Ito T, Kodama H, Miyamoto H, Matsushita T. Thermophile-fermented compost as a fish feed additive modulates lipid peroxidation and free amino acid contents in the muscle of the carp, *Cyprinus carpio*. J Biosci Bioeng. 2016 May;121(5):530-5. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.006. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26702954.

Tholen A, Brune A. Impact of oxygen on metabolic fluxes and in situ rates of reductive acetogenesis in the hindgut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. Environ Microbiol. 2000 Aug;2(4):436-49. doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00127.x. PMID: 11234932.

Thummel CS. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. Dev Cell. 2001 Oct;1(4):453-65. doi: 10.1016/s1534-5807(01)00060-0. PMID: 11703937.

Zheng H, Brune A. Complete Genome Sequence of *Endomicrobium proavitum*, a Free-Living Relative of the Intracellular Symbionts of Termite Gut *Flagellates* (Phylum *Elusimicrobia*). Genome Announc. 2015 Jul 16;3(4):e00679-15. doi: 10.1128/genomeA.00679-15. PMID: 26184928; PMCID: PMC4505116.

Zheng H, Dietrich C, Radek R, Brune A. *Endomicrobium proavitum*, the first isolate of *Endomicrobia* class. nov. (phylum *Elusimicrobia*)--an ultramicrobacterium with an unusual cell cycle that fixes nitrogen with a Group IV nitrogenase. *Environ Microbiol.* 2016 Jan;18(1):191-204. doi: 10.1111/1462-2920.12960. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26119974.

## 【図一覧】

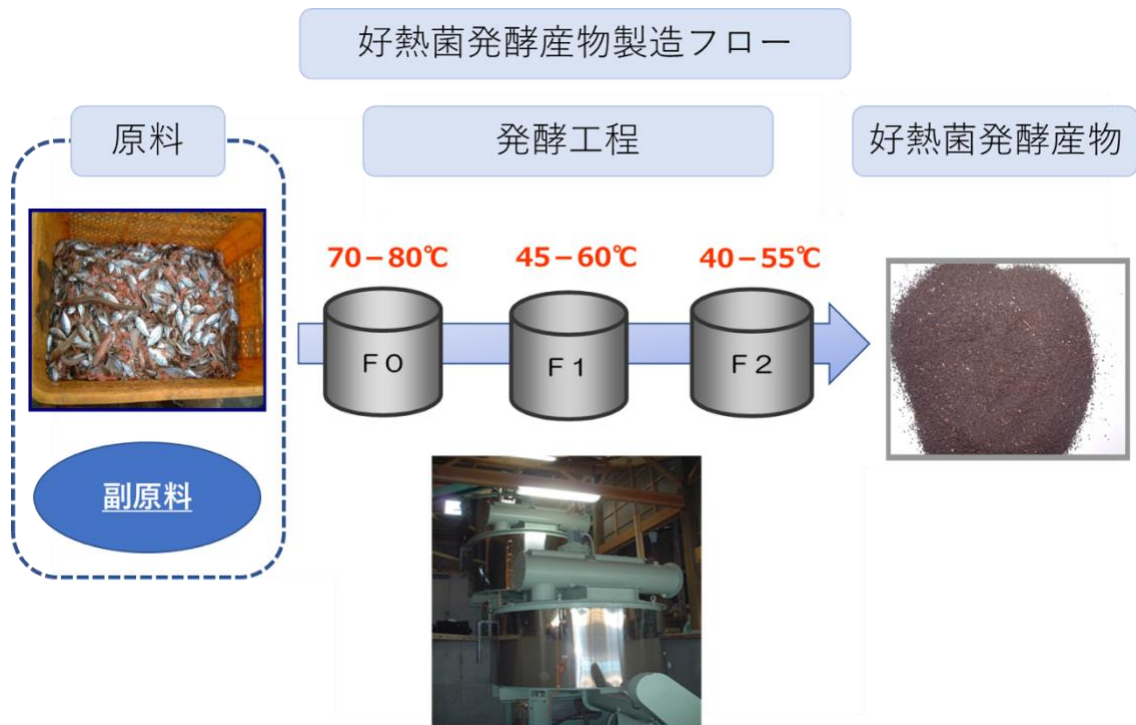


図1. 千葉大学大学院 園芸学研究科 生物化学研究室で取り扱っている好熱菌発酵産物の製造工程

商品価値がないエビ、小魚を主原料とし、三段階の発酵段階を経て堆肥化している。

# 第1章「好熱菌発酵産物の給与が引き起こすヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢の変化」

## 【序論】

ほとんどの動物には、宿主の健康状態や発育に影響を与える微生物が定着している。アブラムシ類の *Aphididae* は、バクテリオサイトとして知られる宿主の特殊な細胞内に偏性細胞内共生細菌であるブフネラ *Buchnera aphidicola* が定着しており、アブラムシとブフネラの内部共生はアブラムシの成長と繁殖において必須である(Douglas, 1998)。ブフネラ種に近縁な共生細菌はミナミアオカメムシ *Nezara viridula* の腔腸に定着しており、これらの共生細菌を除去すると、宿主昆虫の成長遅延と不妊を引き起こすことが判明している(Hosokawa et al., 2006)。ほとんどの細胞内共生細菌は、義務的共生または条件的共生に関係なく、母体を介して垂直感染する(Moran et al., 2008)。対照的に、オナガカメムシ *Riptortus clavatus* は環境土壌から *Burkholderia* と呼ばれる共生細菌を獲得することが判明し、このカメムシと *Burkholderia* の共生は宿主の環境適応に有益な効果をもたらす(Kikuchi et al., 2007)。これらの共生細菌は、宿主昆虫の微生物叢を支配しており(Moran et al., 2008; Kikuchi et al., 2005)、共生微生物と宿主昆虫の間に相利的有益な関係が確立されていることを示している。

木食性甲虫の幼虫は腸管内に微生物が豊富に存在しており、そこで多様な微生物種が定着し、セルロースとヘミセルロースが代謝によって異化される。したがって、木材を食べる昆虫の腸内微生物叢は、リグノセルロース資材の分解のための天然資源として研究されてき

ている(Watanabe and Tokuda., 2010)。好気性微生物と通性嫌気性微生物が、木材を食べる甲虫 *Anolophora glabripennis* の幼虫で優勢であることが判明し、中腸における酸素依存的リグニン分解が微生物の酵素によって触媒されることが判明している (Scully et al., 2013)。ほとんどのコガネムシ幼虫は草食性または腐食性であり、その細菌群集がセルロース分解の原因となっている (Bayon and Mathelin, 1980; Huang et al., 2012)。細菌のセルロース分解酵素に加えて、サイカブトムシ *Oryctes nasicornis* は内因性の  $\beta$ -1,4-グルカナーゼを持っており、宿主と微生物が連携して腐食物の分解を行なっていると考えられる (Shelomi et al., 2019)。

家畜や人間では、腸管にラクトバチルス属およびビフィズス菌のようないくつかの細菌が定着しており、一部の細菌はプロバイオティクスとして使用されている。FAO/WHO によれば、プロバイオティクスは「適切な量で投与された場合に宿主に健康上の利益をもたらす生きた微生物」と定義されている (Hill et al., 2014)。私の所属する研究室では近年、経口投与することにより、従来のマウスの飼料効率を改善できるプロバイオティクス細菌である *Bacillus hisashii* (*Caldibacillus hisashii* に改名 (Gupta et al., 2020)) を同定した (Miyamoto et al., 2013; Nishida et al., 2015)。この細菌は、海洋動物資源から生成された好熱菌発酵産物から分離され、フィルミクテス属の菌種が優先している (Niisawa et al., 2008)。好熱菌発酵産物は発酵飼料添加物として使用されており、魚 (Tanaka et al., 2010, Tanaka et al., 2016)、鶏 (Ito et al., 2016)、および豚の繁殖力を向上させる (Miyamoto et al., 2012; Ito et al., 2016)。この成長改善効果はマウスでも観察されている (Miyamoto et al., 2013)。

本研究では、ヘラクレスオオカブトムシ *Dynastes hercules* の幼虫における好熱菌発酵産物による成長促進効果について研究をした。ヘラクレスオオカブトムシは世界最大のカブトムシであるためペットとして非常に人気があり、体が大きい成虫の個体は付加価値が高い

ため大型個体の産出のためのモデルとして有益であると考え。ヘラクレスオオカブトムシの幼虫は、腐葉土からなる枯れて腐った木材や落ち葉を食べ生育する。72日間の給餌実験中に、好熱菌発酵産物を給与したメスの幼虫の成長を促進することが判明した。また、糞便中の腸内細菌プロファイルから、好熱菌発酵産物を含む腐葉土で生育させたメス幼虫ではモリクテス綱に属する細菌の相対存在量が好熱菌発酵産物を給与していないメス幼虫と比較して、増加していることが明らかになった。

## 【実験材料と方法】

### 1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験

好熱菌発酵産物がヘラクレスオオカブトムシ *D. hercules hercules* に与える影響を調査するためにヘラクレスオオカブトムシ幼虫を生育させて、好熱菌発酵産物の給与試験を行った。

#### 1-1 ヘラクレスオオカブトムシの入手と飼育条件

*D. hercules hercules* (Linnaeus) の未後食(羽化してから餌を摂取していない状態)のオスとメスの成虫ペアを、Lumber Jack Co. Ltd (東京、小金井) から購入した。これらの成虫は日本国内で育種されて得られたものである。羽化したばかりの成虫は約 1~2 ヶ月間餌を与えず、その後市販のカブトムシゼリーを与え飼育した。30 日間の給餌期間の後、ペアの成虫を交配させた。餌となる腐葉土は月夜野きのこ園株式会社(群馬県)から購入し、いくつかの止まり木を入れた容器(43×26×31.5cm)に投入した。腐葉土の高さは18cmにセットした。交配確認後、メス成虫を上記の容器内で飼育し、バナナを与えた。メス成虫が産卵を行ったあと、孵化後2週間前後の1齢幼虫をブロー容器(容積2L)に移した。オスとメスの幼虫は、2 齢幼虫期後期または 3 齢幼虫期初期(孵化後 90±10 日)で、以前に先行研究で記載されているヘロルド器官の有(オス)または無(メス)によって区別された(Morita、2018)。これらの幼虫は、好熱菌発酵産物の有無にかかわらず、腐葉土で満たされたブロー容器(容積2L)内で単独飼育を行った。

## 1-2 幼虫飼育条件と排出糞の保存

好熱菌発酵産物は、以前に記載された先行研究のプロトコルに基づいてに製造された (Niisawa et al., 2008)。好熱菌発酵産物の成分分析の結果は、炭素約 40%、窒素 4%、リン 2%、カリウム 1%、カルシウム 4% であった (Ishikawa et al., 2013)。好熱菌発酵産物を腐葉土とよく混合し、次にブロー容器に、1% (w/w) の好熱菌発酵産物を含む腐葉土、または好熱菌発酵産物を含まない腐葉土を充填した。腐葉土は蒸留水で加湿され、2 か月ごとに交換した。幼虫の表面の腐葉土をブラシで除去し、好熱菌発酵産物の有無にかかわらずブロー容器に幼虫を移してから0日、14日、28日、42日、72日後に幼虫の重量を測定した。好熱菌発酵産物の有無にかかわらず、試験開始後の 0 日目と 46 日目に糞便を回収した。秤量用プラスチック皿の表面をエタノールで滅菌し、その上に各幼虫を置き糞便の排泄を待った。皿上に排泄された糞便は、排泄後 1 時間以内に液体窒素中で凍結し、使用するまで-80°Cで保存した。

## 2 次世代シーケンサーを用いたヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢変化の解析

カブトムシ類の幼虫の腐食物の分解は腸内細菌と連携して行なっていると考えられるため、腸内細菌叢の解析は宿主の健康状態をはじめとする内外環境の指標になり得ると考えられる。ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢の特性を明らかにするため、次世代シーケンサーの一種である Miseq を用いて解析を行った。

## 2-1 排出糞の DNA 抽出

DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, CA, USA) を使用して約 0.25 g の新鮮な糞便から全 DNA を調製し、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, USA) を使用して定量を行った。

## 2-2 細菌の 16S rRNA 遺伝子の配列解析

細菌の 16S rRNA 遺伝子の V4 領域(515F-806R)は、以前の先行研究に従って Illumina MiSeq で配列決定をした(Fu et al., 2020; Wang M et al., 2020)。得られた配列を、Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) を使用してフィルタリングした。トリミングされたサンプルあたり 10,000 リードは、以前に記載された先行研究のプロトコルに従って、QIIME 1.9.1 を使用して分析した (Caporaso et al., 2010)。フィルタリングされた配列は、97% の類似性で定義された分類単位 (Operational Taxonomic Unit : OTU) にクラスター化した。α 多様性と β 多様性は、R ソフトウェア (バージョン 3.6.2 および 4.0.5) を使用して可視化した。観測された OTU の数と、α 多様性として Chao1、Shannon、および Simpson index の値を評価した。β 多様性は、サンプル全体の OTU 分布に基づいて重み付けまたは重み付けされていない UniFrac 解析を用いた主座標分析 (PCoA) によって推定された。門および属の細菌集団の相対存在量は、大部分 (検出された集団の > 1%) から選択され、表示された。2 つのグループ間のスチューデントの t 検定を使用して、平均値間の差異を調べた。すべての 16S rRNA 遺伝子データセットは、DDBJ Sequence Read Archive (アクセッション番号: DRA012196) に寄託された。

線形判別分析 (Linear Discriminant Analysis : LDA) 効果サイズ (LDA Effect Size : LEfSe) 分析(以下、LEfSe 解析)は、オンライン Galaxy バージョン 1.1.2

(<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) を使用して実行された。属レベルでの有意差のある細菌存在量は、ノンパラメトリック要因のクラスカル・ウォリス検定 ( $p < 0.05$ ) を使用して検出され、生物学的一貫性はペアワイズ ウィルコクソン検定 ( $p < 0.05$ ) を使用して評価した。最後に、それぞれの腸内細菌叢の異なった特徴が LDA を使用して推定され、LEfSe 解析に基づく樹形図を LDA スコアを使用して視覚化した。識別特徴の対数 LDA スコアの閾値は 2.0 に設定した。

## 【結果】

### 1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験

生後約 90 日のヘラクレスオオカブトムシの幼虫の雌雄を判別し、好熱菌発酵産物の有無にかかわらず腐葉土中で 72 日間生育させた。好熱菌発酵産物給与区では終濃度 1% (w/w) で腐葉土とよく混合させた。腐葉土への好熱菌発酵産物の給与はメス幼虫の成長を特異的に促進させ (図2)、給与後 14 日目で幼虫の体重の増加が観察された。72 日目に好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫の相対体重は、0 日目の幼虫の体重と比較して最大 1.65 倍増加したが、給与していない腐葉土で飼育した幼虫の体重は 1.25 倍の増加にとどまった。オス幼虫の体重は、好熱菌発酵産物の有無にかかわらず、72 日間の飼育期間中で最大 1.8 倍と急速に増加した。これらの結果は、好熱菌発酵産物を腐葉土に添加するとメス幼虫の成長が促進されることを示している。

### 2 次世代シーケンサーを用いたヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢変化の解析

#### 2-1 ヘラクレスオオカブトムシの成長によって伴う腸内細菌叢の変化

ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の体重増加は、0 日目から 42 日目までの飼育期間中に特に観察され、その後平衡に達した (図2)。次に、糞便サンプルを 0 日目と 46 日目に収集した。オスとメス幼虫の 0 日目の糞便サンプルを、それぞれ 0-MC および 0-FC (好熱菌発酵産物を給与しない「対照区」)、および 0-MT および 0-FT (好熱菌発酵産物給与する「好熱菌発酵産物給与区」と設定した。同様に、46-MC および 46-FC という記号は 46 日目の対照区のサンプルに対応し、46-MT および 46-FT は 46 日目の好熱菌発酵産物

給与区のサンプルを示している。各グループは 4 匹の幼虫を用いており、各糞便サンプルの細菌組成は 16S rRNA 遺伝子の配列を解析することによって OTU に基づいてクラスタ化した。

すべての配列データを組み合わせると、放線菌、フィルミクテス、プロテオバクテリア、バクテロイデスの 4 つの門が糞便中で優勢であり、糞便細菌の 90%以上を占めることがわかった(図3)。その中で、糞便細菌全体の約 50% を占める、最も豊富な 10 種類の細菌を抽出した。その操作によって キシラニミクロビウム属、シュードキサントモナス属、パルディバクター属、ツリシバクター属、バチルス属に属する細菌の同定に成功し、放線菌目、ルミノコッカス科、コマナモス属、クロストリジウム属に属する細菌も糞便中に豊富に存在していることがわかった(図3)。

次に、対照区のデータを使用して、試験開始 46 日目の糞便細菌組成の増減に関連した腸内細菌叢の変化を測定した (0-MC 対 46-MC; 0-FC 対 46-FC)。オス幼虫では、 $\alpha$  多様性指数は 46 日間の飼育期間中に変化を示さなかった。しかし、メスサンプルの OTU 数は増加し ( $p < 0.1$ )、 $\alpha$  多様性指数 (Chao 1 および Shannon) は 46 日目の飼育期間後に増加傾向を示した ( $p < 0.1$ ) (図4A)。46-MC サンプルと 46-FC サンプル間で多様性指数を比較すると、OTU 数は増加傾向を示し ( $p < 0.1$ )、メス幼虫のサンプルでは Chao 1 指数が増加した。UniFrac PCoA プロットでは、オスとメス幼虫の糞便中の腸内細菌叢の違いは有意ではなかったものの、0 日目のサンプルの糞便細菌組成が 46 日目の糞便サンプルの糞便細菌組成とは異なってクラスタ化されていることを示した (図4B)。これらの結果は、糞便の細菌組成が幼虫の成長に関連して変化するが、幼虫の性別が細菌プロファイルに及ぼす影響は限られていることを示した。

次に、LEfSe 解析を使用して、成長に伴い増減している細菌のプロファイルを特徴付けた。LEfSe 解析は、統計的有意性に関する標準検査と生物学的一貫性および効果の関連性に関する検定を組み合わせることにより、2 つの細菌集団間の差異を示すことができる

(Segata et al., 2011)。今回は 0-MC と 0-FC サンプルの配列データ、および 46-MC と 46-FC サンプルの配列データをそれぞれ組み合わせて比較した。LEfSe 解析は、対照区の 0 日目と 46 日目の配列データを比較することによって実行された。綱レベルでは、バクテロイディア綱、バチルス綱、クロストリジウム綱、ベータプロテオバクテリア綱、およびモリクテス綱の存在量が、0 日目のサンプルと比較して 46 日目のサンプルで増加していた。対照的に、いくつかの綱、すなわち、アシドバクテリア綱、フラボバクテリア綱、サブロスピラエ綱、サーモミクロビア綱およびガンマプロテオバクテリア綱の存在量は、46 日間の飼育期間中に減少していた(図5)。次に、46 日目のサンプルまたは 0 日目のサンプルで LEfSe 解析によって、高い LDA スコア ( $>|2.0|$ ) を示した細菌種を選択した(図5B)。これらの細菌種のほとんどの集団は、オスとメスの両方のサンプルで 46 日間の飼育期間中に同様の傾向を示したが、いくつかの種はオスまたはメスのサンプルのみで高い LDA スコア ( $>|2.0|$ ) を示した。(図6と図7)。次に、オスとメスのサンプル間で高い LDA スコアを示した細菌種を選択し、色付きの丸でマークをした(図5B)。オスサンプルにおけるバチルスおよびラクタバチルス属の存在量の増加、およびメスサンプルにおけるパルディバクターおよびクロストリジウム属の存在量の増加は、LEfSe 解析によって示された。(図6)。クリセオバクテリウム、ルチバクテリウム、ハイレモネラ、ストレプトコッカスなどのいくつかの属の存在相対比は、メス幼虫の成長に伴って著しく減少した(図7)。これらの結果は、オスとメス幼虫両方の幼虫の糞便細菌数が幼虫の成長中に劇的に変化し、いくつかの細菌種の存在量が性別に依存して変化したことを示している。

### 2-3 好熱菌発酵産物の給与によって伴う腸内細菌叢の変化

メス幼虫の成長は、腐葉土に好熱菌発酵産物を添加することによって促進された(図2)。次に、46 日目の糞便サンプル(46-MC 対 46-MT および 46-FC 対 46-FT)の細菌群集を比較することにより、ヘラクレスオオカブトムシの腸内細菌叢に対する好熱菌発酵産物の影響

を評価した。α 多様性に対する好熱菌発酵産物の成長促進効果は、オス幼虫サンプルでは有意ではなく (46-MC vs 46-MT)、Chao 1 指数は 46-FC サンプルと比較して 46-FT サンプルで減少した (図8A)。UniFrac PCoA プロットでは、好熱菌発酵産物の給与による細菌集団の明確な違いは示されなかったものの (図8B)、好熱菌発酵産物給与区 (46-MT および 46-FT) からの UniFrac PCoA データは、対照区 (46-MC および 46-FC) と比較して互いに密接にクラスター化されていた。したがって、好熱菌発酵産物が細菌プロファイルに及ぼす影響は非常に限られていたが、好熱菌発酵産物給与区の細菌プロファイルは相互に似通っていることを示している。

次に、好熱菌発酵産物非給与の対照区と好熱菌発酵産物給与区間の細菌種の違いを調べるために LEfSe 解析を実行した (図9)。オス幼虫では、好熱菌発酵産物の添加により、フィルミクテス門の割合が増加したが、これは主にルミノコッカス科の存在量の増加によって引き起こされた。メスの幼虫では、モリクテス綱が高い LDA スコアで検出されたため、好熱菌発酵産物の給与によってメス幼虫の腸内でその存在量が顕著に増加したことを示している。このモリクテス綱の個体数の増加は、アコレプラズマ科の存在量の増加によって説明された。メス幼虫では、好熱菌発酵産物の給与によって、ガンマプロテオバクテリア綱の数が減少した。興味深いことに、腐葉土に好熱菌発酵産物を混合することにより、オスメス両方の幼虫でプランクトミクス門の存在量が減少した。この結果は、好熱菌発酵産物給与によるメス幼虫の成長促進に関連する細菌群が LEfSe 解析によって同定されたのは、ごく少数であることを示している。

## 【考察】

### 1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験

今回の研究では、好熱菌発酵産物を給与することでヘラクレスオオカブトムシの成長に影響をもたらすのか、またもたらした場合はそのメカニズムの一端を解明するために腸内細菌叢の視点から研究を進めた。結果として、ヘラクレスオオカブトムシのメス幼虫において対照区と比較して好熱菌発酵産物給与区では、相対比で約 1.35 倍もの成長促進効果がみられた。オスの幼虫はもともとメスと比べて急速に生育するため、好熱菌発酵産物を給与してもその成長速度の違いを見ることがメス幼虫と比較するとはっきりとした結果に現れない可能性が伺える。しかしメス幼虫の場合はオスに比べてもとの成長が緩やかなので、発酵産物を給与したことによる影響が現れやすい可能性がある。次項で次世代シーケンサーを用いたヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢を解析する事で、好熱菌発酵産物給与区のメスのみに増減の変化が確認できた細菌の特性を加味してメス幼虫の成長促進の原因を考察する。

### 2 次世代シーケンサーを用いたヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢変化の解析

今までの先行研究には、腸内細菌群集に対する幼虫齢の影響を記載した報告はわずかしかなかった(Hu et al., 2017; Wang et al., 2020)。ある研究では、マツマダラカミキリ *Monochamus alternatus* の幼虫の 1 齢から 5 齢までの段階的な成長に応じた、各齢の細菌組成について報告している。門の組成は 5 齢すべてで同様であったが、腸内で優勢な細菌種は、*M. alternatus* の 1 齢から 5 齢までの幼虫の発育中に変化した(Hu et al., 2017)。多くの昆虫で観察されたように、4 つの門、プロテオバクテリア、フィルミクテス、アクチノバクテリア、バクテロイデスが *M. alternatus* の腸内で優勢であった(Douglas, 2015)。

これらの 4 つの門は、本研究におけるヘラクレスオオカブトムシ幼虫の糞便細菌群集の主要構成要素でもあった (図3)。

カブトムシ類の幼虫の優勢な細菌種は餌の影響を受けているという報告がある (Kim et al., 2017)。実際、*M. alternatus* の腸内で優勢な細菌種は、ヘラクレスオオカブトムシの幼虫の糞便で見つかった細菌種とは異なっていた。*M. alternatus* の幼虫は木食性であり、ヘラクレスオオカブトムシの幼虫は腐食性であるため、これら 2 つの甲虫の餌に含まれる環境細菌常在菌は完全に異なる予想され、その結果、それぞれの幼虫の腸内微生物叢が異なることに繋がった。私の飼育環境では、飼育期間中同じ腐葉土を幼虫に与えたが、腐葉土自体は「発酵」したものである。実験期間中、腐葉土は 23°C に維持されたが、保存された腐葉土中の細菌組成も 46 日間の飼育期間中に変化すると予想された。したがって、46 日間の飼育期間中の糞便細菌組成の変化は、幼虫の腸状態の時間依存的変化、および/または腐葉土の細菌組成の変化によって引き起こされる可能性がある。

本研究において、糞便中に最も豊富に存在する腸内細菌の属はキシラニミクロビウムであった (図3)。この OTU の配列の BLAST 検索により、最も近い *Xylanimicrobium pachnodae* であることが示された。この細菌は、セルロース分解性およびキシラン分解性細菌としてコンゴに生息しているハナムグリの一種 *Pachnoda marginata* 幼虫の腸から分離され (Cazemier et al., 2003; Stackebrandt and Schumann, 2004)、*Cellulosimicrobium variabile* と密接な関連を示している (Bakalidou et al., 2002)。後者の細菌は、セルロース分解性およびキシラン分解性微生物としてシロアリの後腸から分離されたものである。*X. pachnodae* は高レベルのキシラナーゼとエンドグルカナーゼを分泌するため、この細菌はリグノセルロースの分解に重要である可能性が高く、最終的にはヘラクレスオオカブトムシの幼虫の栄養補給に関与していると考えられる。

また、腸内細菌群集が宿主幼虫の性別によって影響を受けることも観察された。オスとメスの幼虫は同じ腐葉土で飼育されたが、46 日間の飼育期間中に属レベルでメス幼虫に特有の変化、クロストリジウムとパルディバクターの割合が増加し、クリセオバクテリウム、ルチバクテリウム、ハイレモネラ、およびストレプトマイセスの割合が減少したことが観察された(図5、図7)。オス幼虫では、ラクトバチルスとバチルス属の 2 つの属種が、成長に伴って存在量の増加を示した(図5、図6)。興味深いことに、クロストリジウム属とラクトバチラス属は、人間と家畜において有益なプロバイオティクスとしての特徴を持っている(Reid, 1999; Guo et al., 2020)。以上を踏まえ、これら 2 つのプロバイオティクスとして作用する可能性がある細菌は、オスとメス幼虫の間で異なっている可能性がある。

好熱菌発酵産物の給与により、メス幼虫の成長が促進されていた。UniFrac PCoA 分析では、対照区と好熱菌発酵産物給与区に明確な差異が示されなかったため、限られた数の細菌が好熱菌発酵産物から誘発された変化を示し、メス幼虫の生育を促進する可能性がある。LEfSe 解析による 46-FC サンプルと 46-FT サンプル間の細菌群集の比較では、モリクテス綱の割合が増加しているが、プランクトミクス門とガンマプロテオバクテリア綱の割合が減少していることが示された。好熱菌発酵産物の添加後、46 日サンプル中のプランクトミクス門の割合は、ヘラクレスオオカブトムシのオスおよびメス幼虫の両方で減少した。対照的に、好熱菌発酵産物を含む腐葉土中で生育したメス幼虫では、ガンマプロテオバクテリア綱の割合の減少とモリクテス綱の割合の増加が優先的に観察されていた(図9)。0 日目と 46 日目の対照区間で細菌プロファイルを比較した場合(0-FC 対 46-FC)、メス幼虫の成長に伴ってガンマプロテオバクテリア綱の割合が減少し、モリクテス綱の割合が増加することが判明した。したがって、好熱菌発酵産物の給与により、ガンマプロテオバクテリア綱とモリクテス綱の個体数の成長に伴う変動が増幅され、最終的にメス幼虫の成長が促進されたと考えられる。モリクテス綱に属するアネロプラズマ属およびアコレプラズマ属と、ガンマプロテオバクテリア綱に属するシュードモナス属、ルテイモナス属およびステノトロフォモナス属

が、それぞれモリクテス綱およびガンマプロテオバクテリア綱の高い LDA スコアに寄与する可能性のある微生物として同定された。興味深いことに、これら 2 つの分類群は、ツシマヒラタクワガタムシ *Dorcus titanus castarnicolor* の幼虫の健康状態と関連していた (Kwak et al., 2019)。ガンマプロテオバクテリア綱に属する *Pseudomonas knackmussii* の割合は病気の幼虫で増加し、モリクテス綱に属する *Acholeplasma brassicae* は健康な幼虫でのみ見つかった。報告されているモリクテス綱のほとんどはヒトと家畜の片利共生生物であるが (Razin et al., 1998)、モリクテス綱のいくつかの種は健康な節足動物で優先的に見られる。実際、モリクテス綱は真菌を育てるアリの中で相利共生生物として維持されている (Sapountzis et al., 2018)。好熱菌発酵産物中ではモリクテス綱の細菌は検出されなかったため (Niisawa et al., 2008)、モリクテス綱はヘラクレスオオカブトムシの中で相利共生生物として作用し、好熱菌発酵産物はメス幼虫の成長を促進するプロバイオティクス材料として機能する可能性が高く、腸内共生菌がモリクテス綱の増殖をサポートしていると想定される。結論として、腐葉土に対する好熱菌発酵産物の給与は腸内細菌叢を変化させ、ヘラクレスオオカブトムシのメスの幼虫の環境適応力を高めたと推測される。

## 【引用文献】

Bakalidou A, Kämpfer P, Berchtold M, Kuhnigk T, Wenzel M, König H.

*Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2002 Jul;52(Pt 4):1185-1192. doi: 10.1099/00207713-52-4-1185. PMID: 12148626.

Bayon C, Mathelin J Carbohydrate fermentation and by-product absorption studied with labelled cellulose in *Oryctes nasicornis* larvae (Coleoptera:Scarabaeidae). J Insect Physiol. 1980;26: 833-840.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303. Epub 2010 Apr 11. PMID: 20383131; PMCID: PMC3156573.

Cazemier AE, Verdoes JC, Reubsæet FA, Hackstein JH, van der Drift C, Op den Camp HJ. *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2003;83(2):135-48. doi: 10.1023/a:1023325817663. PMID: 12785307.

Douglas AE. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu Rev Entomol.* 1998;43:17-37. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.17. PMID: 15012383.

Douglas AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu Rev Entomol.* 2015 Jan 7;60:17-34. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020822. Epub 2014 Oct 8. PMID: 25341109; PMCID: PMC4465791.

Fu G, Wu J, Han J, Zhao L, Chan G, Leong K. Effects of substrate type on denitrification efficiency and microbial community structure in constructed wetlands. *Bioresour Technol.* 2020 Jul;307:123222. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123222. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32244073.

Guo P, Zhang K, Ma X, He P. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J Anim Sci Biotechnol.* 2020 Feb 20;11:24. doi: 10.1186/s40104-019-0402-1. PMID: 32099648; PMCID: PMC7031906.

Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Nov;70(11):5753-5798. doi: 10.1099/ijsem.0.004475. Epub 2020 Oct 27. Erratum in: Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Dec;70(12):6531-6533. PMID: 33112222.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Aug;11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24912386.

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. PLoS Biol. 2006 Oct;4(10):e337. doi: 10.1371/journal.pbio.0040337. PMID: 17032065; PMCID: PMC1592312.

Chen H, Hao D, Wei Z, Wang L, Lin T. Bacterial Communities Associated with the Pine Wilt Disease Insect Vector *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) during the Larvae and Pupae Stages. *Insects*. 2020 Jun 17;11(6):376. doi: 10.3390/insects11060376. PMID: 32560536; PMCID: PMC7348839.

Huang S, Sheng P, Zhang H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):2563-2577. doi: 10.3390/ijms13032563. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22489111; PMCID: PMC3317674.

Ishikawa K, Ohmori T, Miyamoto H, Ito T, Kumagai Y, Sonoda M, Matsumoto J, Miyamoto H, Kodama H. Denitrification in soil amended with thermophile-fermented compost suppresses nitrate accumulation in plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Feb;97(3):1349-59. doi: 10.1007/s00253-012-4004-5. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22434570.

Ito T, Miyamoto H, Kumagai Y, Udagawa M, Shinmyo T, Mori K, Ogawa K, Miyamoto H, Kodama H. Thermophile-fermented compost extract as a possible feed additive to enhance fecundity in the laying hen and pig: Modulation of gut metabolism. *J Biosci Bioeng*. 2016 Jun;121(6):659-664. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.014. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26896863.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jul;73(13):4308-16. doi: 10.1128/AEM.00067-07. Epub 2007 May 4. PMID: 17483286; PMCID: PMC1932760.

Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jul;71(7):4035-43. doi: 10.1128/AEM.71.7.4035-4043.2005. PMID: 16000818; PMCID: PMC1169019.

Kim JM, Choi MY, Kim JW, Lee SA, Ahn JH, Song J, Kim SH, Weon HY. Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two *Cerambycidae* species (Coleoptera). *J Microbiol.* 2017 Jan;55(1):21-30. doi: 10.1007/s12275-017-6561-x. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28035595.

Kwak KW, Lee H, Park K, Kim E, Han MS, Kim N, Kim YS. Preliminary identification of gut microbes between normal and diseased *Dorcus titanus castanicolor* (Coleoptera: Lucanidae). *Int J Indust Entomol.* 2019 39: 45–53

Miyamoto H, Seta M, Horiuchi S, Iwasawa Y, Naito T, Nishida A, Miyamoto H, Matsushita T, Itoh K, Kodama H. Potential probiotic thermophiles isolated from mice after compost ingestion. *J Appl Microbiol.* 2013 Apr;114(4):1147-57. doi: 10.1111/jam.12131. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23311468.

Miyamoto H, Kodama H, Udagawa M, Mori K, Matsumoto J, Oosaki H, Oosaki T, Ishizeki M, Ishizeki D, Tanaka R, Matsushita T, Kurihara Y, Miyamoto H. The oral administration of thermophile-fermented compost extract and its influence on stillbirths and growth rate of pre-weaning piglets. *Res Vet Sci.* 2012 Aug;93(1):137-42. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.06.018. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21774954.

Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet.* 2008;42:165-90. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130119. PMID: 18983256.

Morita S A day in the life of a Kabuto-mushi (rhinoceros beetle) lab. 2018  
<https://thenode.biologists.com/a-day-in-the-life-of-a-kabuto-mushi-rhinoceros-beetle-lab/lablife/>

Niisawa C, Oka S, Kodama H, Hirai M, Kumagai Y, Mori K, Matsumoto J, Miyamoto H, Miyamoto H. Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from

the compost. *J Gen Appl Microbiol*. 2008 Jun;54(3):149-58. doi: 10.2323/jgam.54.149. PMID: 18654036.

Nishida A, Miyamoto H, Horiuchi S, Watanabe R, Morita H, Fukuda S, Ohno H, Ichinose S, Miyamoto H, Kodama H. *Bacillus hisashii* sp. nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophile-fermented compost. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015 Nov;65(11):3944-3949. doi: 10.1099/ijsem.0.000516. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26268484.

Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec;62(4):1094-156. doi: 10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998. PMID: 9841667; PMCID: PMC98941.

Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Sep;65(9):3763-6. doi: 10.1128/AEM.65.9.3763-3766.1999. PMID: 10473372; PMCID: PMC99697.

Sapountzis P, Zhukova M, Shik JZ, Schiott M, Boomsma JJ. Reconstructing the functions of endosymbiotic Mollicutes in fungus-growing ants. *Elife*. 2018 Nov 20;7:e39209. doi: 10.7554/eLife.39209. PMID: 30454555; PMCID: PMC6245734.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 12: R60.

Shelomi M, Lin SS, Liu LY. Transcriptome and microbiome of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) larvae. BMC Genomics. 2019 Dec 9;20(1):957. doi: 10.1186/s12864-019-6352-3. PMID: 31818246; PMCID: PMC6902462.

Stackebrandt E, Schumann P. Reclassification of *Promicromonospora pachnodae* Cazemier et al. 2004 as *Xylanimicrobium pachnodae* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2004 Jul;54(Pt 4):1383-1386. doi: 10.1099/ijs.0.63064-0. PMID: 15280318.

Tanaka R, Miyamoto H, Kodama H, Kawachi N, Udagawa M, Miyamoto H, Matsushita T. Feed additives with thermophile-fermented compost enhance concentrations of free amino acids in the muscle of the flatfish *Paralichthys olivaceus*. J Gen Appl Microbiol. 2010 Feb;56(1):61-5. doi: 10.2323/jgam.56.61. PMID: 20339222.

Tanaka R, Miyamoto H, Inoue S, Shigeta K, Kondo M, Ito T, Kodama H, Miyamoto H, Matsushita T. Thermophile-fermented compost as a fish feed additive modulates lipid peroxidation and free amino acid contents in the muscle of the carp, *Cyprinus carpio*. J Biosci Bioeng. 2016 May;121(5):530-5. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.006. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26702954.

Wang M, Xiang X, Wan X. Divergence in Gut Bacterial Community Among Life Stages of the Rainbow Stag Beetle *Phalacrognathus muelleri* (Coleoptera: Lucanidae). Insects. 2020 Oct 21;11(10):719. doi: 10.3390/insects11100719. PMID: 33096611; PMCID: PMC7589407.

Wang S, Xue N, Li W, Zhang D, Pan X, Luo Y. Selectively enrichment of antibiotics and ARGs by microplastics in river, estuary and marine waters. *Sci Total Environ.* 2020 Mar 15;708:134594. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134594. Epub 2019 Nov 3. PMID: 31796269.

Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic systems in insects. *Annu Rev Entomol.* 2010;55:609-32. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085319. PMID: 19754245.

## 【図一覧】

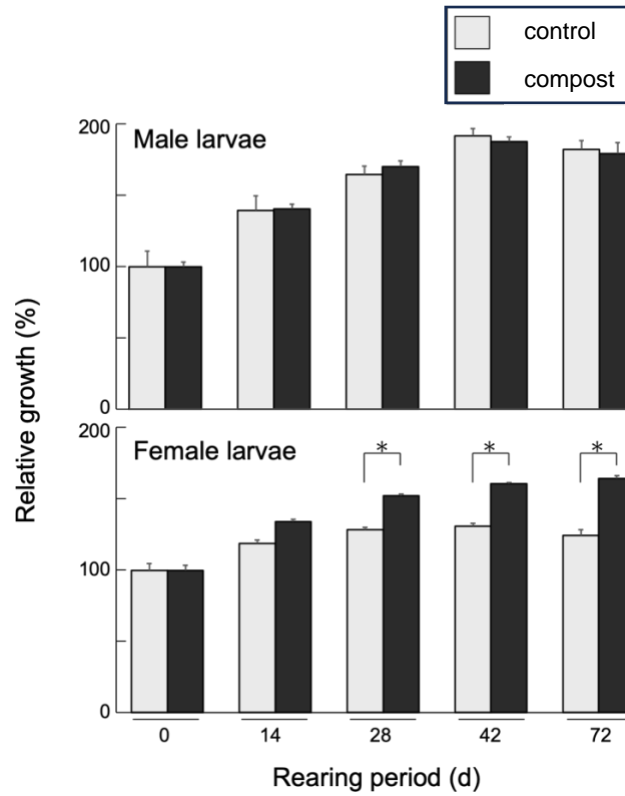


図2. 好熱菌発酵産物を腐葉土に給与することによる、ヘラクレスオオカブトムシのメス幼虫の成長促進効果

生後約 90 日の幼虫を、好熱菌発酵産物の有無にかかわらず (0 日) 腐葉土に移し、その後 72 日間飼育した。実験開始時の体重の平均値の相対値を示す。

\* $p < 0.05$ 。

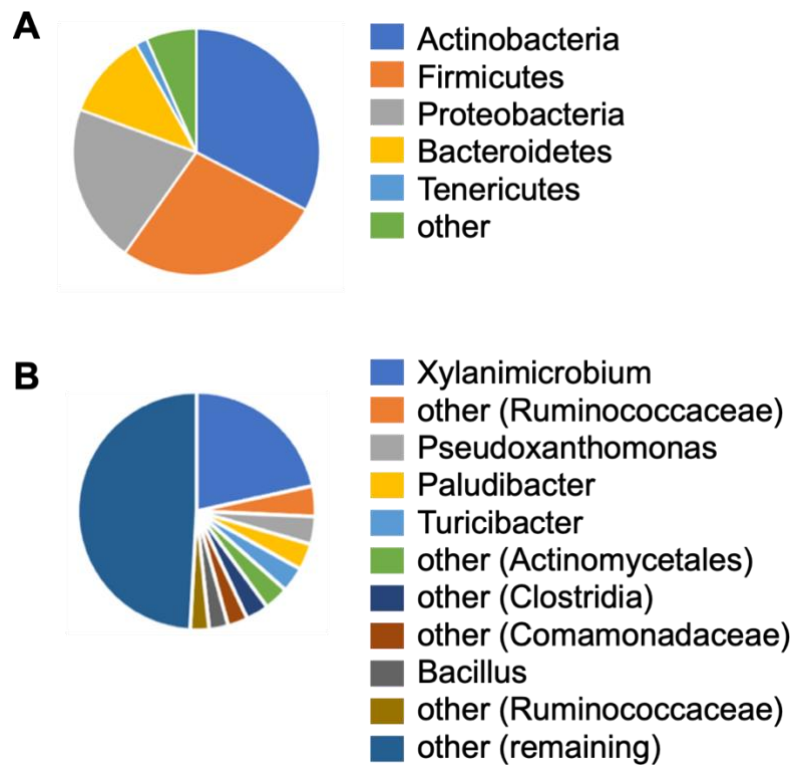


図3. ヘラクレスオオカブトムシの幼虫の糞中に見られる優勢な門 (A) と属 (B)

すべての配列データ (0-MC、0-FC、0-MT、0-FT、46-MC、46-FC、46-MT、46-FT) を結合した上で属をわけて表示した。最も豊富な 10 属の相対的な存在量を示す。

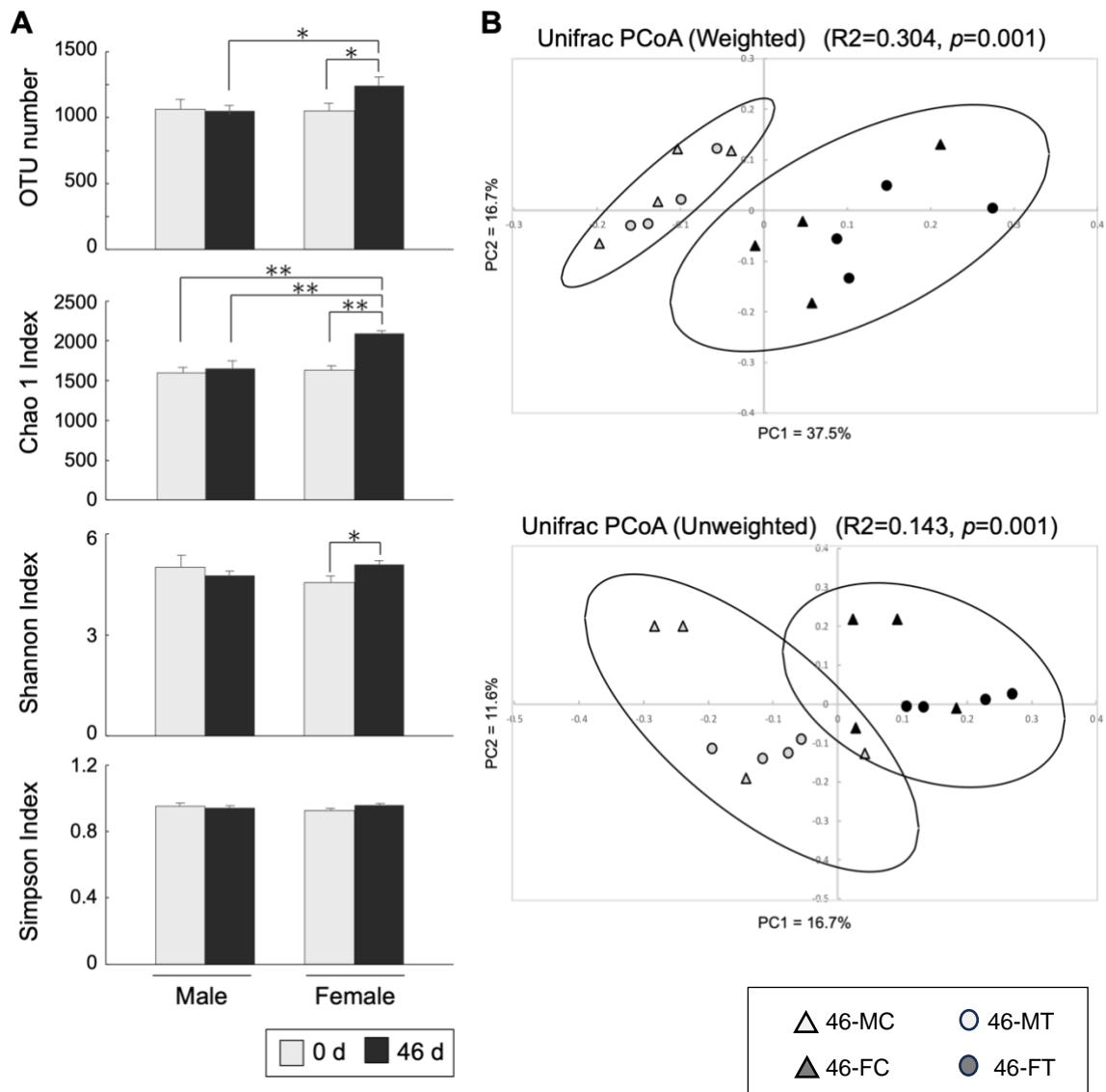
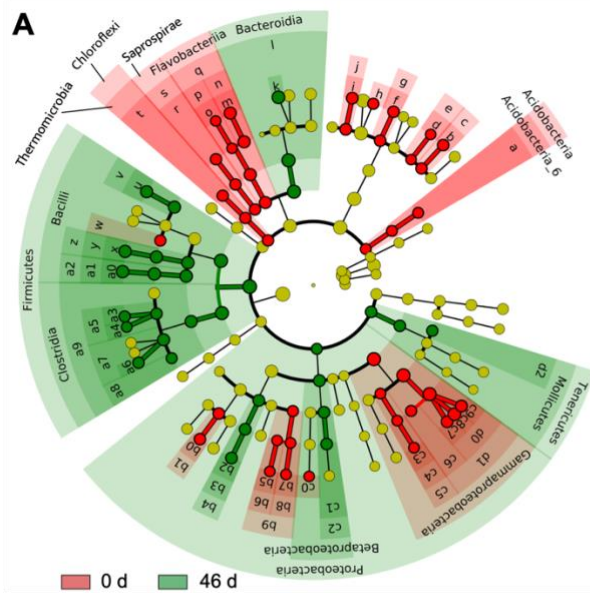
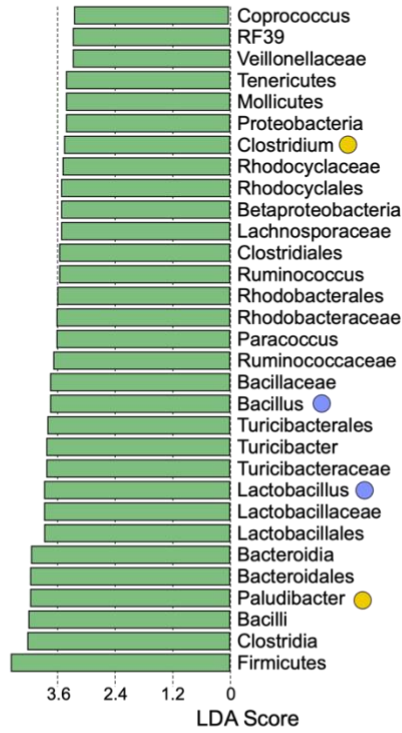
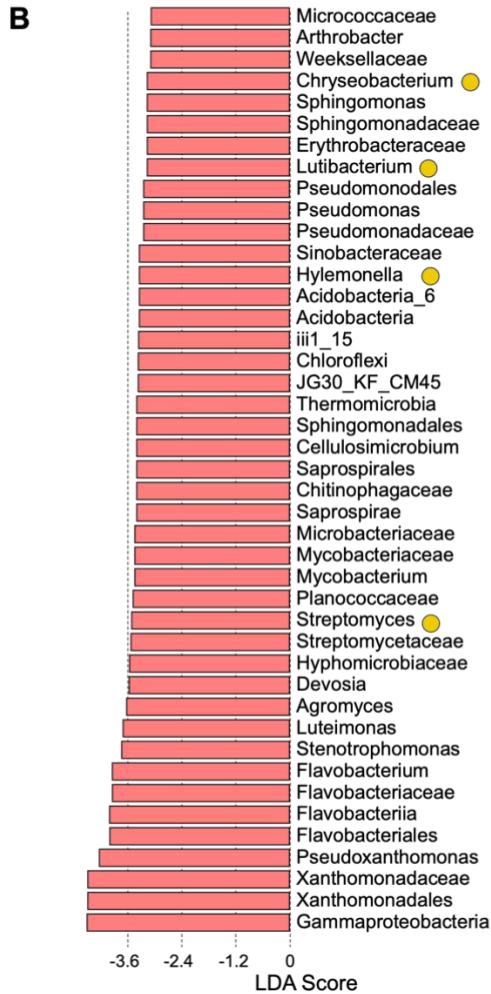


図4. 試験開始から 0 日目(0-MC および 0-FC) および 46 日目 (46-MC および 46-FC) に収集された好熱菌発酵産物を含まない腐葉土(対照区)で飼育した幼虫糞便中の細菌群集の豊富さと多様性の指数

(A)  $\alpha$ -多様性指数。\*  $p < 0.1$ 、\*\*  $p < 0.05$ 。(B) 重み付けまたは重み付けされていない UniFrac 距離を使用した PCoA プロットによって示された  $\beta$  ダイバーシティ インデックス。95% 信頼区間は、0 日サンプルと 46 日サンプルの周囲の楕円として表示される。



- a: iii1\_15
- b: Agromyces
- c: Microbacteriaceae
- d: Arthrobacter
- e: Micrococcaceae
- f: Mycobacterium
- g: Mycobacteriaceae
- h: Cellulosimicrobium
- i: Streptomyces
- j: Streptomycetaceae
- k: Paludibacter
- l: Bacteroidales
- m: Flavobacterium
- n: Flavobacteriaceae
- o: Chryseobacterium
- p: Weeksellaceae
- q: Flavobacteriales
- r: Chitinophagaceae
- s: Saprospirales
- t: JG30\_KF\_CM45
- u: Bacillus
- v: Bacillaceae
- w: Planococcaceae
- x: Lactobacillus
- y: Lactobacillaceae
- z: Lactobacillales
- a0: Turicibacter
- a1: Turicibacteraceae
- a2: Turicibacterales
- a3: Clostridium
- a4: Coprococcus
- a5: Lachnospiraceae
- a6: Ruminococcus
- a7: Ruminococcaceae
- a8: Veillonellaceae
- a9: Clostridiales
- b0: Devosia
- b1: Hyphomicrobiaceae
- b2: Paracoccus
- b3: Rhodobacteraceae
- b4: Rhodobacterales
- b5: Lutibacterium
- b6: Erythrobacteraceae
- b7: Sphingomonas
- b8: Sphingomonadaceae
- b9: Sphingomonadales
- c0: Hylemonella
- c1: Rhodocyclaceae
- c2: Rhodocyclales
- c3: Pseudomonas
- c4: Pseudomonadaceae
- c5: Pseudomonadales
- c6: Sinobacteraceae
- c7: Luteimonas
- c8: Pseudoxanthomonas
- c9: Stenotrophomonas
- d0: Xanthomonadaceae
- d1: Xanthomonadales
- d2: RF39

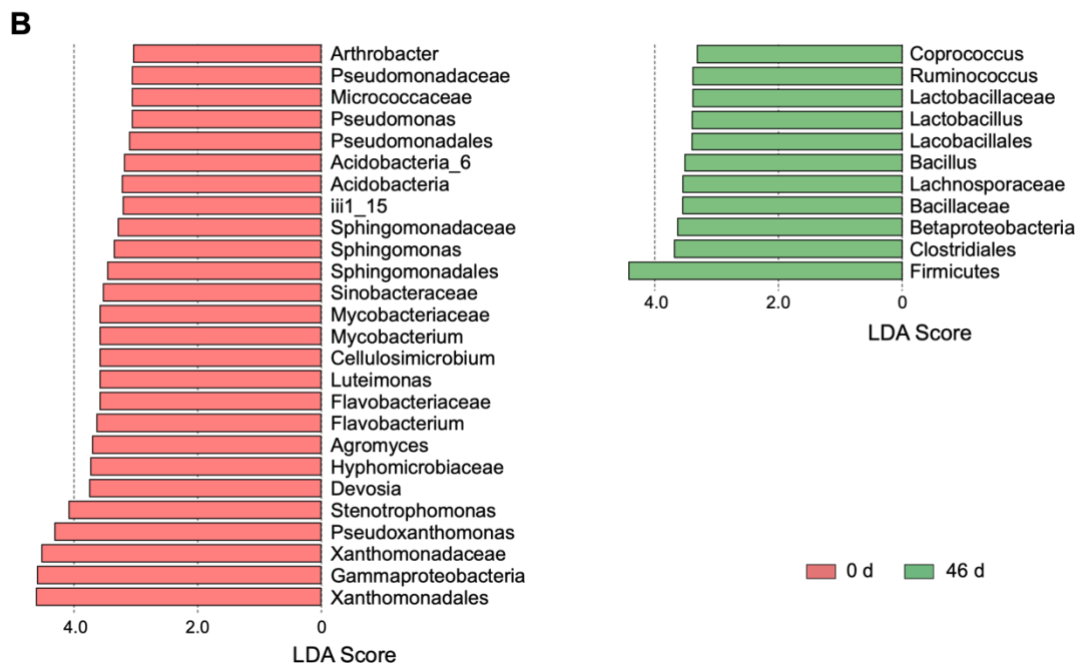
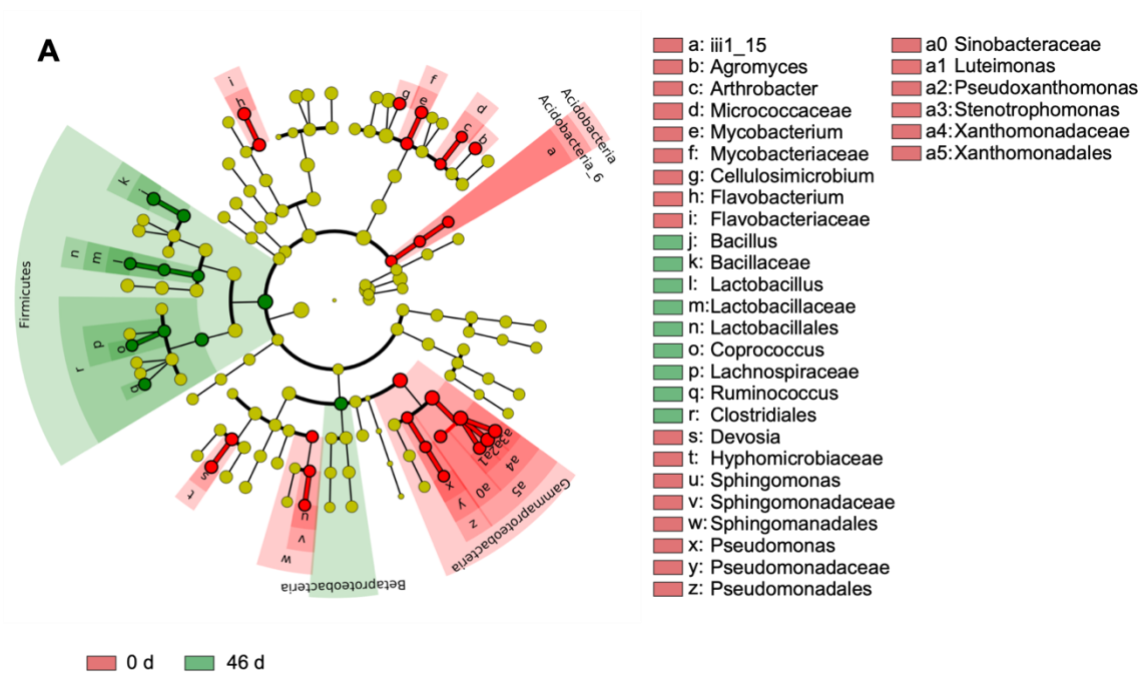


0 d 46 d

図 5. 試験開始から 0 日目と 46 日目に採取された糞便で確認された有意差のある細菌分類群の LEfSe 解析

(A) 好熱菌発酵産物を含まない腐葉土で育てたオスとメスの幼虫から得られた糞便細菌 16S rRNA 遺伝子配列の組み合わせデータを使用して、樹形図を構築した。

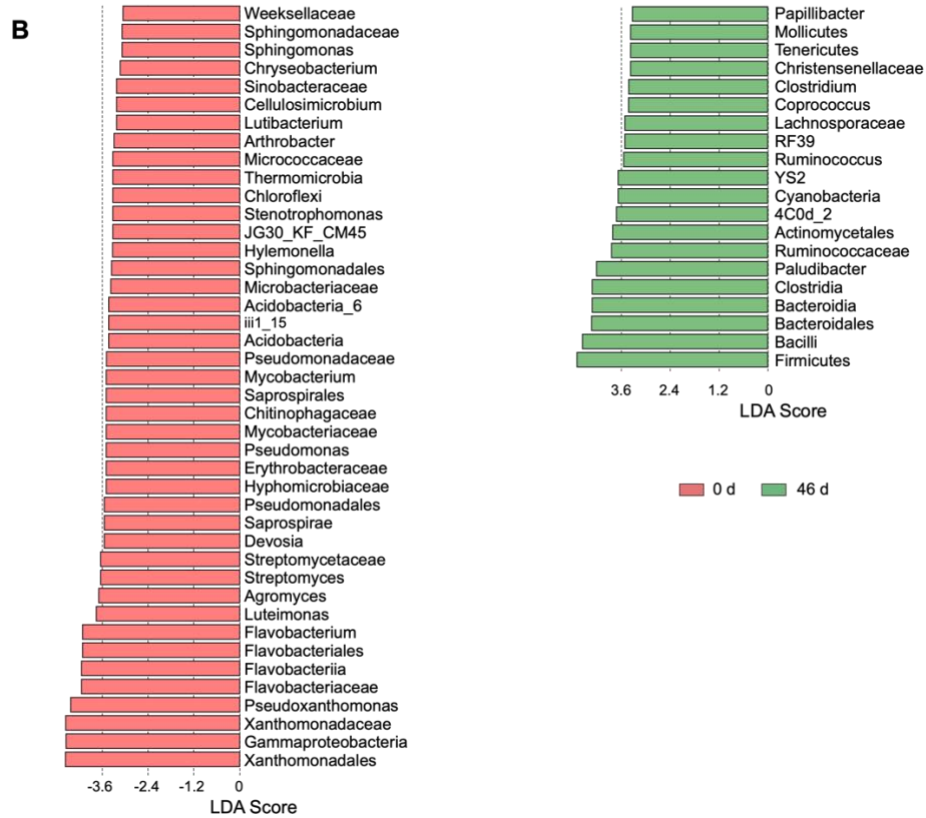
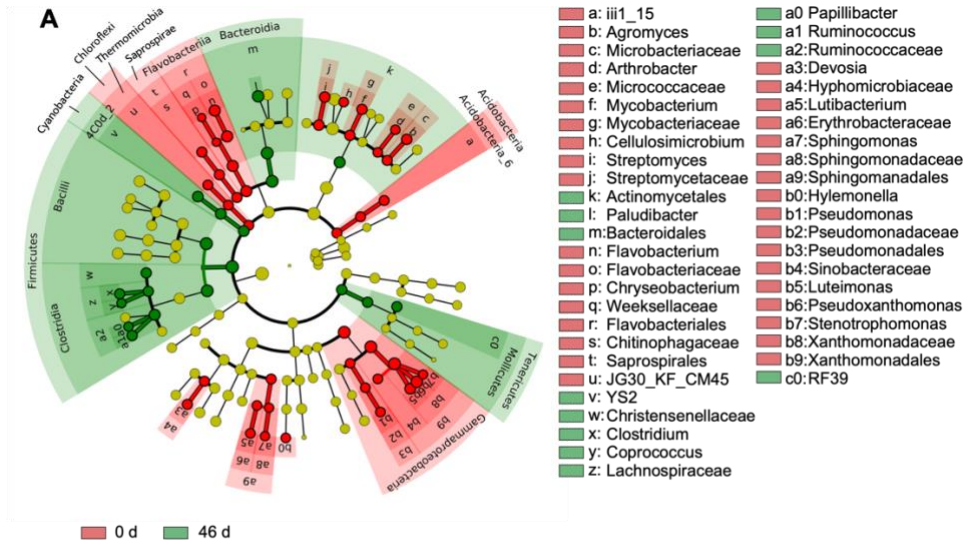
(B) 高い LDA スコア ( $>|2.0|$ ) を持つ細菌分類群。オス幼虫サンプルとメス幼虫サンプルによって差次的に寄与した高い LDA スコアは、それぞれ青とオレンジの丸で示した。



6

図6. 試験開始後 46 日目の好熱菌発酵産物非給与区(対照区)または、好熱菌発酵産物給与区(好熱菌発酵産物給与区)のオス幼虫から採取された糞便で確認された有意差のある細菌分類群の LEfSe 解析

(A) 樹形図 (B) 高い LDA スコア (>2) を持つ細菌分類群



☒ 7

図7. 試験開始後 46 日目の好熱菌発酵産物非給与区(対照区)または、好熱菌発酵産物  
給与区(好熱菌発酵産物給与区)のメス幼虫から採取された糞便で見つかった有意  
差のある細菌分類群の LEfSe 解析

(A) 樹形図 (B) 高い LDA スコア (>2) を持つ細菌分類群

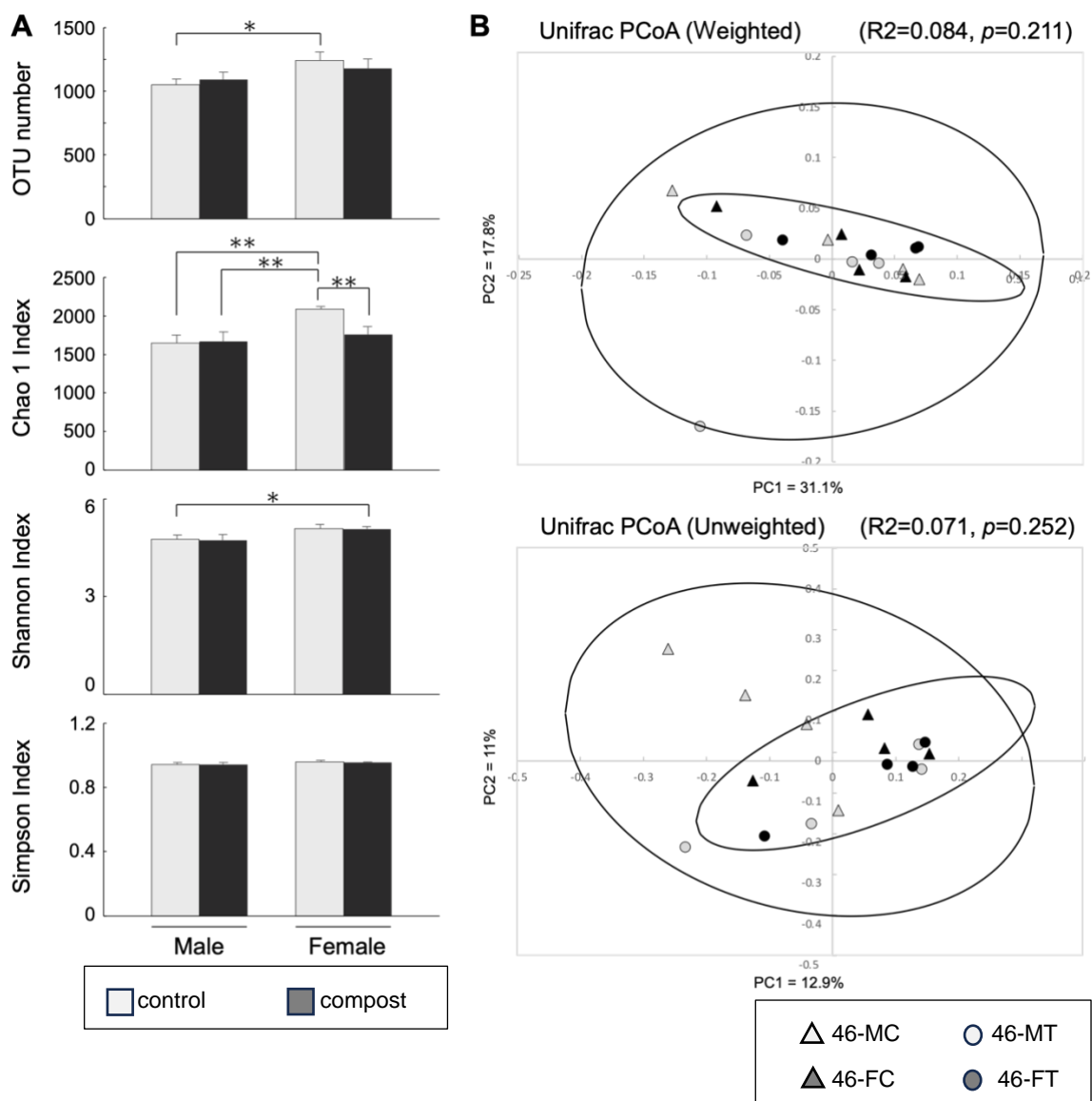


図8. 好熱菌発酵産物非給与区(対照区)(46-MC および 46-FC) または、好熱菌発酵産物給与区の(46-MT および 46-FT) 46 日目に収集された糞便中の細菌群集の豊富さと多様性の指数

(A)  $\alpha$ -多様性指数。 \*\*  $p < 0.05$ 。(B) 重み付けまたは重み付けされていない

UniFrac 距離を使用した PCoA プロットによって示された  $\beta$  ダイバーシティ インデックス。95% の信頼区間は、対照区と好熱菌発酵産物給与区の周囲の楕円として表示されている。

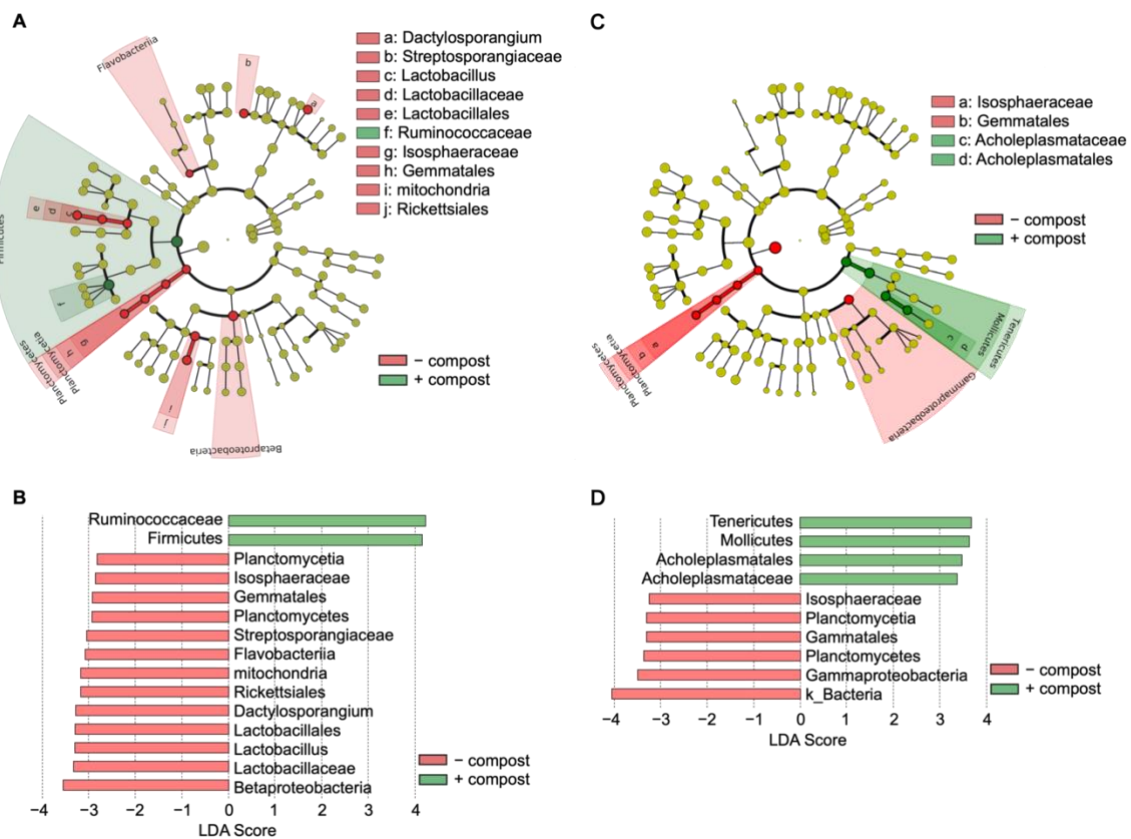


図9. 好熱菌発酵産物非給与区(対照区)(46-MC および 46-FC) または、好熱菌発酵産物給与区の (46-MT および 46-FT) 46 日目に採取された糞便で見つかった有意差のある細菌分類群の LEfSe 解析  
オスのカブトムシ幼虫 (A、B) とメスのカブトムシ幼虫 (C、D) から糞便を収集した。

(A、C) 樹形図。(B、D) 高い LDA スコア ( $>|2.0|$ ) を持つ細菌分類群。

## 第2章「好熱菌発酵産物のメス特異的な成長促進 をもたらすメカニズム」

### 【序論】

カブトムシ類やクワガタムシ類はペットとして人気の高い種類が多く、特に大型の成虫は魅力的である。完全変態甲虫の成虫の体の大きさは、蛹になる直前の幼虫の体の大きさによって決まるため(Chafino et al., 2019; Karino et al., 2004)、幼虫の生育を促進するための繁殖技術が長年研究されてきた。例えば、クワガタムシの幼虫は腐植した木材を食べて成長するが、キノコ菌糸を蔓延させたおがくず(菌糸瓶)で飼育されることがよくある。この繁殖技術はクワガタムシの幼虫の成長に非常に効果があり、日本のクワガタムシ飼育者の間で非常に人気がある。ヘラクレスオオカブトムシ *Dynastes hercules* やヤマトカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* などのコガネムシの場合、幼虫は腐植性であり、幼虫の成長にはより発酵が進んだ餌が好まれている(Miyamoto et al., 2022)。最近、私は、好熱菌発酵産物を腐葉土に混合して給与させることにより、ヘラクレスオオカブトムシのメス幼虫の成長が促進されることを示した(Asano et al., 2023)。したがって、発酵したおがくずや腐葉土を使用するとカブトムシの幼虫の成長を促進することができ、生息環境の微生物や腸内微生物によって食餌の木質バイオマスが分解されると、カブトムシ類やクワガタムシ類の幼虫の成長が促進されることが示唆された。さらに、好熱菌発酵産物の給与により、性依存的に幼虫の成長が促進されたため、腸内微生物叢が宿主幼虫の生理学的反応に影響を与えている可能性もある(Asano et al., 2023)。

哺乳類の腸とは異なり、甲虫の腸は極度のアルカリ性条件を有している(Andert et al., 2008; Bayon, 1980; Hobbie et al., 2012)。餌である木質バイオマスはアルカリ条件下で膨潤し、その結果セルロースの重合と結晶化度が低下する(Zborowska et al., 2022)。実

際、食餌としての木質バイオマスの利用可能性は、カブトムシの幼虫の腸のアルカリ度と相関していた(Grayson, 1958)。腔腸内のアルカリ度が高いことは、カリウムイオンの供給によって単純に説明することができる (Dow, 1992)。次に、膨潤した木質バイオマスは腸内細菌によって発酵され、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸などの有機酸に変換される (Andert et al., 2008; Lemke et al., 2003)。これらの有機酸は幼虫の成長エネルギーとして使用されている (Schroeder et al., 2022)。木食性のシロアリ *Reticulitermes flavipes* において、酢酸はセルロースとヘミセルロースの主要な代謝産物であり、シロアリの主要な呼吸源である (Odelson and Breznak, 1983)。したがって、腸内のカリウムイオン濃度と食物の木質バイオマスからの有機酸の生成は、幼虫の成長を決定する重要な要素である可能性がある。

昆虫では、幼若ホルモン (Juvenile Hormone : JH) とエクジステロイドという 2 つのホルモンが、発生 (幼虫の脱皮と蛹への変態) と幼虫の成長期間を制御している。完全変態の昆虫では、主要な活性エクジステロイドである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) が、JH の存在下で幼虫間の脱皮を誘導する (Kayukawa et al., 2016)。幼虫の最終齢では、20E は JH 発現レベルの低下後に幼虫と蛹の脱皮を誘導し、JH が幼虫の早熟変態を妨げることを示している (Kayukawa et al., 2016)。JH は分泌器官であるアラタ体によって産生され、アラタ体の切除によりショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の幼虫の成長速度 (実験期間中の幼虫の体重の増加) が低下した (Mirth et al., 2014)。タバコスズメガ *Manduca sexta* では、その体の大きさは JH とエクジステロイドのレベルによって制御され、餌の質による体の大きさの可塑性は幼虫の成長速度によって決まる (Davidowitz et al., 2004)。したがって、食事の質が JH レベルを調節する可能性がある。さらに、性依存性の JH 効果がいくつかの昆虫で報告されている。オス成虫のサイズと前蛹期の JH レベルの間に正の相関関係がメタリフェルホソアカクワガタムシ *Cyclommatus metallifer* で見つかっている (Gotoh et al., 2011)。コナカイガラムシ *Planococcus kraunhiae* の成虫

は極端な性的二型を有しており、幼体と形態があまり変わらないメス成虫と翅を有するオス成虫に分かれている。オスの翅の形成は、2 齢幼虫および前蛹期の幼虫の高レベルの JH に依存しているが、そのような高レベルの JH はメス幼虫では観察されなかった (Vea et al., 2016)。

ここでは、好熱菌発酵産物の給与によるヘラクレスオオカブトムシ *Dynastes hercules* の幼虫の成長促進のメカニズムについて研究した。第1章の研究によりヘラクレスオオカブトムシの幼虫を 1% (w/w) の好熱菌発酵産物を混合した腐葉土で飼育すると、メスの幼虫の成長促進効果が観察された (Asano et al., 2023)。好熱菌発酵産物によるこの性特異的な成長速度の促進のメカニズムを解明するために、私は好熱菌発酵産物を給与して飼育した幼虫と給与しない幼虫の腹腔内 pH、カチオンおよび有機酸の濃度を測定した。さらに、脂肪体の RNA プロファイルを決定した。本研究の結果は、好熱菌発酵産物の給与により、中腸内容物中のカリウムイオン濃度が増加し、メス幼虫で幼若ホルモン結合タンパク質 (Juvenile Hormone Binding Protein : JHBP) をコードする遺伝子が発現したことを示した。

## 【実験材料と方法】

### 1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験

好熱菌発酵産物がヘラクレスオオカブトムシに与える影響を調査するためにヘラクレスオオカブトムシ幼虫を生育させて、好熱菌発酵産物の給与試験を行った。

#### 1-1 昆虫の入手と飼育条件

##### 昆虫と飼育状況

国内で繁殖した *D. hercules hercules* (Linnaeus) の成虫は、Lumber Jack Co. Ltd (東京、小金井) から購入した。腐葉土の準備と成虫の飼育条件については、第1章並びに以前の先行研究に準じている (Asano et al., 2023)。交配後、メスの成虫を腐葉土 (月夜野きのこ園株式会社、群馬県) を入れた容器で飼育した。2 齢後期または 3 齢初期 (孵化後  $100 \pm 10$  日) で得られたオスとメスの幼虫を、1% (w/w) の好熱菌発酵産物を含むまたは含まない腐葉土を充填した 2 L 容積のブロー容器内で単独飼育を行った。好熱菌発酵産物を腐葉土に混合した餌を幼虫に与えた直前を 0 日目とし、49 日間飼育をおこなった。好熱菌発酵産物には、約 40% の炭素、4% の窒素、2% のリン、1% のカリウム、および 4% のカルシウムが含まれている (Ishikawa et al., 2013)。

## 2 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の解剖と体内組織のサンプリング

好熱菌発酵産物が宿主(ヘラクレスオオカブトムシ幼虫)に及ぼす直接的影響を確認するために、腸内容物の組成及び遺伝子発現比較を行うために解剖並びに臓器のサンプリングを実施した。

### 2-1 試験内容および好熱菌発酵産物の給与

幼虫の体重を 0、14、28、42、49 日で測定するために、幼虫の表面の腐植をブラシで除去した後、各幼虫の重量を測定した。49 日目の体重測定後、幼虫を滅菌皿上に置いた。排便後、糞便を 1 時間以内に液体窒素中で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。糞便の収集後、幼虫の解剖は基本的に 後述の先行研究に記載された方法(Ogata and Iwabuchi, 2017)に従って実行した。各幼虫を、5 mL の 70% (v/v) エタノールの入った 100 mL ビーカーに 30 分間入れた。幼虫をエタノールに浸すと、前腸にあった未消化の腐葉土が吐き出された。幼虫の表面を 1% (v/v) 食器用洗剤(ママレモン、ライオン株式会社、東京、日本)を使用して洗浄し、その後幼虫を 100% エタノールで 30 分間麻酔した。次いで、幼虫を滅菌濾紙上に置き、解剖した。幼虫の腹部の側面の皮膚を、眼科用ハサミを使用して縦軸に沿って切り開いた。脂肪体をピンセットで除去し、組織をリン酸緩衝生理食塩水で 1 回洗浄し、1.5ml エッペンチューブに移し、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。次に、中腸と後腸全体を除去し、各臓器を使用するまで 50 mL の遠心管に  $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 3 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫腸管内のカチオン濃度ならびに有機酸濃度

カブトムシ類幼虫の餌である腐葉土の主成分であるキシランやセルロースはアルカリ条件下で可溶化されやすいため、カブトムシ類の幼虫の腸管内はアルカリ性に保たれていると考

えられている。また、腸管内の腐葉土は微生物などによって酢酸をはじめとする有機酸に変換され宿主の恒常性の維持などに重要な役割を担う可能性が示唆されている。好熱菌発酵産物の給与がヘラクレスオオカブトムシ幼虫のカチオン及び有機酸の分布にどのような変化を及ぼすか調査した。

### 3-1 pH、カチオンおよび有機酸の濃度の測定

凍結した中腸および後腸サンプルを氷上で解凍した。腸内容物をよく混合し、直接 pH 測定機(HM-20J、東亜 DKK、東京、日本)に供した。次に、腸内容物 0.1 g を 900  $\mu$ L の蒸留水に懸濁し、10 分間ボルテックスした。この混合物を 13,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離し、得られた上清をイオンクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィーを用いて分析した。

カチオン濃度を測定するときは、0.2  $\mu$ m シリンジフィルター（ジューエルサイエンス株式会社、東京、日本）を使用して上清を濾過した。濾液中のカチオンをイオン分析装置（IA-300、東亜ディーケーケー株式会社、東京、日本）で定量した。

有機酸の濃度を測定するとき、上清を 0.4 $\mu$ m シリンジフィルター(Advanced Microdevices Ltd.、アンバーラー、インド)で濾過した。得られた濾液を Amicon Ultra 0.5 (分子量 3 kDa 以上を除去可能; Merck Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国)に通した。濾液中の有機酸のレベルは、Shim-pack SCR-102H カラム を備えた HPLC Prominence システム（島津製作所、京都、日本）を使用して測定した。

## 4 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の脂肪体における遺伝子発現比較

好熱菌発酵産物によるメス特異的な成長促進は宿主の腸内細菌叢の変化だけではなく、遺伝子発現の変動など複数の要因によるものだと考えられる。解剖時に摘出した脂肪体から RNA 抽出を行い、トランスクリプトーム解析を実施することによって好熱菌発酵産物の影響を評価した。

### 4-1 RNA 抽出とトランスクリプトーム解析

脂肪体の凍結サンプルを Sepasol-RNA Super-G (ナカライテスク、京都、日本) の溶液に移し、製造業者のプロトコールに従って全 RNA を抽出した。DNase 処理と得られた全 RNA の精製は、FavorPrep Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corp.、屏東市、台湾) を使用して実行された。

抽出された脂肪体からの全 RNA は、mRNA ライブラリーの調製と mRNA 配列決定のために Eurofins genomics (東京、日本) に委託された。mRNA をポリ (A)+ RNA として精製し、NovaSeq 6000 プラットフォーム (Illumina、サンディエゴ、米国) を使用してペアエンド 150 bp 配列データを生成した (BioProject ID: PRJDB16153、RUN ID: DRR489622-37)。fastp (バージョン 0.23.2) を使用してアダプター配列をトリミングし、長く連続する N 配列および/または長さが 50 bp 未満の配列を含む低品質のリードを廃棄した。読み取られたデータはトリミングされ、Trinity (バージョン 2.15.1) を使用して新たに組み立てられた。得られたコンティグ配列は、Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO バージョン 5.4.7、遺伝子セット) のベンチマークによって評価され、Bowtie2 (バージョン 2.4.2) および RSEM を使用して各サンプルの読み取りデータをアライメントすることによって各遺伝子の発現レベルが計算された。(バージョン 1.3.3)。クラスター分析は、R (バージョン 4.3.1) を使用して、100 万あたりの転写産物 (TPM) として正規化された発現データを

使用して実行された。カウントデータは、edgeR (バージョン 3.42.4) によって差次的に発現された遺伝子 (DEG) を特定するために使用した。DEG には、UniProt (Swiss-Prot および UniProtKB (昆虫分類学)) データに対する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST バージョン 2.13.0) 検索によって注釈が付けられた。

## 【結果】

### 1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫に対する好熱菌発酵産物の給与試験

生後約 100 日のヘラクレスオオカブトムシの幼虫の雌雄判別を行い、腐葉土の中で好熱菌発酵産物の有無にかかわらず 49 日間飼育した（図 10）。第 1 章および以前の先行研究（Asano et al., 2023）に報告されているように、好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫の成長促進効果が観察され、この効果は好熱菌発酵産物を混合した腐葉土へ幼虫を移してから 14 日後に観察された。49 日後、好熱菌発酵産物を混合した腐葉土で飼育されたメス幼虫の相対体重は、0 日の幼虫の体重と比較して最大 2.5 倍増加したが、好熱菌発酵産物なしの腐葉土で飼育された幼虫の体重は 1.8 倍増加した。オス幼虫には好熱菌発酵産物による明確な成長促進効果は確認されなかった。そして、これらの幼虫について以下の分析を行った。

### 2 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫腸管内の pH,カチオン濃度ならびに有機酸濃度

カブトムシ類の幼虫は成虫になると体が大きくなるため、体の大きさは餌となる腐葉土を幼虫期間の間にどれだけ多く食べることができ、効率よく消化することができるかによって決定づけられる。メス幼虫の成長促進は腸管内の環境が変化していることが推測されたため、腸内 pH,カチオン濃度,有機酸濃度に焦点を当てて分析を行った

## 2-1 中腸と後腸内容物の pH

好熱菌発酵産物を介したメス幼虫の成長促進について考えられる説の 1 つとして、メス幼虫の腸内の pH の増加による木質バイオマスの利用効率の増加が挙げられる。中腸内容物の pH は 8.6 から 9.5 の範囲であり、予想通り、中腸の管腔液がアルカリ性を示している。後腸液の pH は中性だった (図 11)。好熱菌発酵産物の給与による pH のわずかな上昇がオス幼虫の中腸で観察された。しかし、好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫では、中腸と後腸の両方の管腔内容物の pH は、対照区の pH と比較した場合、差異を示さなかった。これらの結果は、好熱菌発酵産物給与区と非給与区(対照区)と比較した場合、メス幼虫の腸管 pH 値に明確な差がなかったことを示している。

## 2-2 中腸および後腸のカチオン濃度

イオンクロマトグラフィーにより、以下のカチオン、アンモニウムイオン、カルシウムイオン、リチウムイオン、マグネシウムイオン、カリウムイオン、ナトリウムイオンの濃度を測定した。中腸および後腸の内容物中に最も豊富なイオン種はカリウムイオンであり、好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫の中腸におけるその濃度は対照区の 2.8 倍まで増加し、約 8,500 ppm に達した。メス幼虫の後腸では、好熱菌発酵産物給与区のカリウム濃度が減少し、対照区のカリウム濃度が顕著に増加した(図 12)。同様に、好熱菌発酵産物給与区のオス幼虫のカリウムイオンは、対照区と比較して中腸で増加し、後腸で減少した(図 13)。これらの結果は、中腸と後腸の間のカリウムイオンの腸内分布が好熱菌発酵産物の給与によって劇的に変化したことを示している。興味深いことに、好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫の後腸ではナトリウムイオンが特異的に増加した。好熱菌発酵産物を与えることによって誘発される他の顕著な変化は、腸内のアンモニウムイオン濃度である。中腸では、対照区の雄雌

幼虫の両方で約 300~400 ppm のアンモニウムイオンが検出され、その濃度は好熱菌発酵産物給与区では 5~10 ppm に減少した(図 12、図 13)。したがって、好熱菌発酵産物で育てた幼虫ではカリウムとアンモニウムのイオン濃度が変化した、性依存的な変化を示すカチオンは存在していなかった。

### 2-3 中腸および後腸の有機酸濃度

腸内容物の HPLC 分析によるクロマトグラムは、7 つの異なるピークを示し、5 つのピークは、コハク酸、乳酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸として検出された(図 14)。最大ピークの保持時間は約 17.5 分で、これはイソ酪酸の保持時間と同様である。しかし、カラム温度を下げると、このピークがイソ酪酸のピークから分離されることが観察された。これまでこのピークの化合物を同定することができなかったため、今後はこの同定できていない有機酸を RT-17 と呼ぶ。RT-17 のピークの面積が全測定サンプルの中で最も大きかったため、イソ酪酸を標準物質として RT-17 を定量した。メスとオス幼虫の腸内容物の有機酸濃度をそれぞれ図 15 と図 16 に示した。

イソ酪酸を標準物質として計算された RT-17 の量は、対照区のメスの中腸では約 3,000 mg/L であったが、好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫では最大 4,700 mg/L まで増加した。その後、後腸内の RT-17 の量は 73% (対照区)、84% (好熱菌発酵産物給与区) と大幅に減少し、1,000 mg/L 未満まで減少した(図 15)。コハク酸とギ酸の濃度は、オスとメスの両方の腸の後腸で著しく減少した(図 15、図 16)。メスの中腸内の酢酸と乳酸との量は、対照区の幼虫と好熱菌発酵産物給与区の幼虫間で同じであった。メスの後腸におけるこれら 2 つの有機酸の濃度は、中腸に比べて 25 ~ 50% 減少した。オスの腸では、後腸のプロピオン酸は対照区では検出されず、好熱菌発酵産物給与区の後腸の酢酸濃

度は、好熱菌発酵産物給与区の幼虫の中腸の濃度と比較して増加した(図 16)。おそらく、好熱菌発酵産物給与区のオス幼虫の後腸では木質バイオマスの発酵がまだ活発に行われていたと思われる。糞便中には、酢酸と RT-17 が検出された(図 17)。RT-17 の糞便濃度は後腸の濃度と同様であった。糞便中の酢酸濃度は、後腸の濃度と比較すると顕著に減少した。糞便中の有機酸濃度には性差は確認されなかった。

腐葉土中の有機酸を測定したところ、乳酸、ギ酸と酢酸が低濃度で検出され、RT-17 は検出されなかった(図 18)。これらの結果から、RT-17 は中腸の主要な発酵産物であり、後腸で大幅に異化または吸収されることから、RT-17 がヘラクレスオオカブトムシ幼虫の栄養にとって重要であることが示唆された。

### 3 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の遺伝子発現比較

好熱菌発酵産物の給与によりメス幼虫が効率よく成長する仕組みを解明するために、脂肪体中の mRNA プロファイルを測定した。好熱菌発酵産物給与区のオス、好熱菌発酵産物給与区のメス、非給与区(対照区)のオス、対照区のメスの 4 つのグループの mRNA 配列から生成されたリード データは、それぞれ 8,460 万、8,480 万、8,420 万、8,730 万リードであった。これらすべてのリードデータを使用した de novo アセンブルの結果、コンティグ数は 76,145 配列、配列長加重平均 (N50) は 2,309 bp となった。この組み立てられたデータについて、インセクトデータセット (insect\_odb10) による BUSCO 評価は、完全な遺伝子の BUSCO が 95.0%、断片化された遺伝子の BUSCO が 1.8%、欠落している遺伝子の BUSCO が 3.2% であった。次に、読み取ったデータをこの組み立てられたデータと位置合わせして、各サンプルの発現レベルを導き出した。その結果、すべてのサンプルの配列率は約 96%であった。de novo アセンブルデータとのアライメントにより得られた発

現データを用いて階層的クラスタリングにより樹形図を描画したところ、メスにおける好熱菌発酵産物の有無により遺伝子発現プロファイルが変化することが示唆された(図 19)。対照的に、オス幼虫の好熱菌発酵産物の有無の間には有意な差はなかった。したがって、mRNA プロファイルに対する好熱菌発酵産物の効果は、好熱菌発酵産物給与区と対照区のメス幼虫サンプル間の mRNA プロファイルを比較することによって、より明確に示された。組み立てられた各配列は DN 番号として表示され、Uniprot データベースを使用して注釈が付けられた。

好熱菌発酵産物給与区のメス幼虫の脂肪体では、合計 110 個の遺伝子が DEG として検出され、そのうち 49 個の遺伝子が上方制御され、61 個の遺伝子が下方制御されていた(表 1)。最も上方制御されている遺伝子 (DN1122\_c1\_g1\_i4) は、血リンパ幼若ホルモン結合タンパク質 (JHBP) をコードしている。好熱菌発酵産物給与区のメス幼虫における下方制御された遺伝子は、ディフェンシン(DN1324\_c0\_g1\_i5)、すなわち誘導性抗菌ペプチドをコードしている(Hwang et al., 2009; Ishibashi et al., 1999)。好熱菌発酵産物給与区の幼虫の下方制御遺伝子の機能的に分類された 2 つのカテゴリーを発見した(表 2)。1 つのカテゴリには、数種類のペプチダーゼ/プロテアーゼをコードする 6 つの遺伝子が含まれている。別のカテゴリーには、キチン結合タイプ 2 ドメイン含有タンパク質など、栄養周囲基質 (PM) に関連するタンパク質をコードする 7 つの遺伝子が含まれている。次に、JHBP、プロテアーゼ (DN2668\_c0\_g1\_i1)、PM 関連タンパク質 (DN5996\_c0\_g1\_i1)、ディフェンシンの 4 つの代表的な遺伝子を選択し、オスとメスのトランスクリプトーム データから TPM として計算されたそれらの発現値を示した(図 20)。JHBP の機能は JH の結合・運搬をしており、JH を標的細胞に送達するには JH の JHBP への結合が必要である(Kramer et al., 1974; Ritdachyeng et al., 2012)。JH-JHBP の複合体は、血リンパを介して標的細胞に送達される。JHBP 遺伝子の発現は、対照区と好熱菌発酵産物給与区のオス幼虫の両方で検出された。JHBP 遺伝子の発現は対照区メス幼虫では検出されな

かったが、好熱菌発酵産物給与区のマス幼虫ではオス幼虫とほぼ同レベルの発現レベルに達した(図 20)。ディフェンシン遺伝子は、対照区のマス幼虫では高レベルで発現していたが、好熱菌発酵産物給与区のマス幼虫では、その発現はオス幼虫で見られるのと同様のレベルまで減少した(図 20)。推定上のトリプシン様セリンプロテアーゼをコードする遺伝子(DN2668\_c0\_g1\_i1)は、対照区のマス幼虫で優先的に発現され、その発現はオスおよびメスの好熱菌発酵産物給与区の幼虫でも低かった(図 20)。ペプチダーゼ/プロテアーゼのカテゴリーにある 6 つの遺伝子のうち、4 つの遺伝子(DN5342\_c0\_g2\_i1、DN27482\_c0\_g1\_i1、DN28385\_c0\_g1\_i1、および DN37931\_c0\_g1\_i1)は、推定上のトリプシン様セリンプロテアーゼと同様の発現パターンを示した(図 21)。PM は、腸管の内層として見られるマイクロフィブリル構造である。PM の主成分はキチンとタンパク質であり、PM 自体は昆虫に特有のものである (Peters, 1992)。ペリトロフィンのような PM タンパク質のほとんどはキチン結合ドメインを持っている (Zhao et al., 2016; Rodríguez-de la Noval et al., 2019)。キチンデアセチラーゼは、PM の強度を維持すると考えられている (Han et al., 2015)。キチン結合タイプ 2 ドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子(DN5996\_c0\_g1\_i1) は、対照区のマス幼虫のみで高い発現を示し、オスの対照/好熱菌発酵産物給与区の幼虫およびメスの好熱菌発酵産物給与区の幼虫では発現していなかった(図 20)。PM タンパク質のカテゴリーにある他の 6 つの遺伝子(表 3)も同様の発現パターンを示した(図 22)。これらの結果は、好熱菌発酵産物を腐葉土に混合した後、マス幼虫の脂肪体において JHBP 遺伝子が高度に発現していることを示している。ディフェンシン、ペプチダーゼ/プロテアーゼ、および PM タンパク質は病原体感染に対する防御システムに関連していると考えられているため、マス幼虫は好熱菌発酵産物給与下で飼育することにより健康な状態で成長した可能性がある。

## 【考察】

### 1 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫腸管内の pH とカチオン濃度の関係

この研究の注目すべき発見の 1 つは、好熱菌発酵産物を含む腐葉土を与えることによるヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸管全体のカリウムイオン分布の変化である。腸(中腸+後腸)内のカリウムイオンの総量を推定し、中腸と後腸のカリウムイオンの各割合を計算した(図 23)。カリウムイオンの総量は、オス幼虫の腸の方がメス幼虫の腸よりわずかに高かったが、対照区と好熱菌発酵産物給与区の幼虫の腸内容物の間では同じであった。好熱菌発酵産物給与区では、総カリウムイオンの 68% と 56% がそれぞれメスとオスの幼虫の中腸に局在していた。対照的に、対照区のメスおよびオスの幼虫の中腸には、総カリウムイオンのわずか 18% および 13% しか見つからなかった。したがって、好熱菌発酵産物を含む腐葉土での飼育は、特にメス幼虫において、中腸内のカリウム濃度の上昇制御を引き起こした。腸管内のアルカリ度は過剰なカリウムイオンによって確立され(Dow, 1992)、腸のアルカリ度と幼虫の成長の間には相関関係がある(Grayson, 1958)ため、中腸内の高カリウムイオン濃度の維持がおそらく腐葉土の分解促進に関係している。これは好熱菌発酵産物を介したメス幼虫の成長促進効果に部分的に関連している。腸上皮およびマルピーギ管は、血リンパから腔腸内へ、およびその逆の上皮輸送を介してカリウムイオン濃度を調節する(Pacheco et al., 2014; Silva et al., 2019; Kapoor et al., 2021)。腸上皮およびマルピーギ管におけるカリウムイオン輸送の機能に対する好熱菌発酵産物の影響はまだ解明されていない。

この研究で使用された腐葉土にはアンモニアがほとんど含まれていなかったため(図 18)、アンモニアは中腸で生成され、性別に関係なく対照区幼虫の濃度は 300~400 ppm に達した。対照的に、好熱菌発酵産物給与区の幼虫の中腸では、アンモニアのレベルが大幅に減少した(図 12、図 13)。腐食性の餌を食べるコガネムシ *Pachnoda* spp.の幼虫では、腐

葉土中のペプチドが中腸で分解され、生じたアミノ酸が宿主または腸内細菌によって同化されると考えられる。宿主または腸内細菌によって利用されなかった残りのアミノ酸は発酵してアンモニアとなり、後腸では高レベルのアンモニアが観察される (Andert et al., 2008)。*Pachnoda* 属の中腸にはアミノ酸発酵細菌の数が少ないため、アミノ酸発酵によるアンモニア生成の主な器官は後腸であると考えられている (Andert et al., 2008)。*Pachnoda* とは対照的に、ヘラクレスオオカブトムシの対照区幼虫の中腸内容物中に高レベルのアンモニアが存在することは、アミノ酸発酵によるアンモニア生成が主に中腸で起こることを示唆している。一方、好熱菌発酵産物給与区の幼虫の中腸内のアンモニアは雌雄の幼虫ともに顕著な低下し、腐葉土に好熱菌発酵産物を加えることで宿主や腸内細菌によるアミノ酸の吸収効率が向上することが示唆された。中腸上皮によるアンモニアの取り込みがタバコスズメガ *Manduca sexta* で報告されているため (Blaesse et al., 2010)、好熱菌発酵産物を介した宿主によるアンモニア取り込みの強化が腸内のアンモニア濃度の低さの原因である可能性もある。興味深いことに、家畜豚に好熱菌発酵産物を補給した後、家畜豚の糞便中のアンモニア濃度も減少した (Ito et al., 2016)。ほとんどの昆虫の窒素化合物の異化された廃棄物は尿酸である。北米のシロアリ的一种 *Reticulitermes flavipes* では、尿酸は後腸に分泌され、アンモニアに変換され、最終的には腸内微生物叢によって同化される (Brune et al., 2014)。対照区のヘラクレスオオカブトムシ幼虫の後腸ではアンモニアレベルが減少しているため、後腸でアンモニアの同化が起こっている可能性がある。

## 2 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫腸管内の有機酸濃度

腐食性甲虫の幼虫では、腐植質中の多糖類の発酵分解が宿主の栄養にとって重要な経路である (Egert et al., 2005)。酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸は哺乳動物の腸内での炭水化物の主な発酵生成物であるが、腐食性甲虫の幼虫や木食性のシロアリ *R.*

*flavipes* の腸内では酢酸が優勢な脂肪酸である(Egert et al., 2005; Hobbie et al., 2012)。シロアリ *R. flavipes* では、酢酸が呼吸の主な基質と考えられている (Hobbie et al., 2012)。酢酸もヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内で主要な脂肪酸であるが、その濃度は中腸内容物と後腸内容物の両方で濃度に大きな変化はなかった(図 15、図 16)。これは、酢酸が宿主の栄養において役割は限定的であることを示唆している。酢酸の代わりに、別の主要な有機酸である RT-17 がヘラクレスオオカブトムシ幼虫の主な栄養源を占めている可能性がある。オスとメスの好熱菌発酵産物給与区の幼虫の腸内容物中で RT-17 が約 1,000 ~ 1,500 ppm 増加したため、好熱菌発酵産物給与区の幼虫の中腸で観察されたカリウムイオンの増加による潜在的な pH 上昇が、RT-17 の濃度の増加によって中和される可能性がある。

### 3 ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の脂肪体における遺伝子発現比較

ディフェンシンおよびセリンプロテアーゼは甲虫の自然免疫系を構成していることが示されている。これらのタンパク質の産生は、昆虫の体内に病原性細菌を注入することによって誘導できる。PM は宿主昆虫の腸を病原体の侵入から保護し、また植物由来の抗栄養素によって引き起こされる損傷も防ぐ (ying et al., 2014)。PM 関連タンパク質とディフェンシンやプロテアーゼなどの防御タンパク質をコードする遺伝子は、メスの対照幼虫の脂肪体で優先的に発現され、好熱菌発酵産物給与区の幼虫では発現が減少した。これらの結果は、好熱菌発酵産物を含む腐葉土で成長したメス幼虫が健康な状態を維持し、それが成長の改善に関連していることを示唆している。別の可能性としては、これらの防御遺伝子が JH レベルの増加によって下方制御されているということである。ディフェンシン、プロテアーゼ、および PM タンパク質をコードするほとんどの遺伝子(図20、21、22)は、オス幼虫および好熱菌

発酵産物給与区のみス幼虫では低レベルで発現し、JHBP 遺伝子はより高いレベルで発現していた。後者の可能性についての研究例はまだ報告されていない。

注目すべきことは、好熱菌発酵産物給与区のみス幼虫の脂肪体における JHBP 遺伝子の発現が、対照区のみス幼虫における発現レベルよりも高かったことである。JHBP 遺伝子は主にオオタバコガ *Helicoverpa armigera* (Zhang et al., 2019) およびタケノコ穿孔虫 *Omphira fuscidentalis* (Ritdachyeng et al., 2012) の幼虫脂肪体で発現している。鱗翅目の幼虫では、JH 分子の 99% 以上が JH-JHBP 複合体として存在している (Hidayat および Goodman, 1994)。JHBP 遺伝子の発現は基本的に JH 力価の変化と一致しており、急速な成長を示す幼虫段階で上方制御されていた (Zhang et al., 2019)。したがって、好熱菌発酵産物の給与による JHBP 発現の上方制御は、ヘラクレスオオカブトムシのみス幼虫における JH 力価の一貫した上方制御を示唆しており、これが最終的にのみス幼虫の成長速度の加速に寄与すると考えられる。最後に、私の以前の報告では、好熱菌発酵産物を含む腐葉土での飼育による糞便微生物叢の変化が示された。のみスの幼虫では、モリクテス綱に属する細菌が好熱菌発酵産物によって特異的に増加した (Asano et al., 2023)。好熱菌発酵産物によって引き起こされる腸内細菌叢の変化と、JHBP の発現または JH 力価の変化との関係を調査することは価値がある。

## 【引用文献】

Andert J, Geissinger O, Brune A. Peptidic soil components are a major dietary resource for the humivorous larvae of *Pachnoda* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). *J Insect Physiol.* 2008 Jan;54(1):105-13. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.08.006. Epub 2007 Aug 19. PMID: 17880994.

Asano F, Tsuboi A, Moriya S, Kato T, Tsuji N, Nakaguma T, Ohno H, Miyamoto H, Kodama H. Amendment of a thermophile-fermented compost to humus improves the growth of female larvae of the Hercules beetle *Dynastes hercules* (Coleoptera: scarabaeidae). *J Appl Microbiol.* 2023 Jan 23;134(1):lxac006. doi: 10.1093/jambio/lxac006. PMID: 36626791.

BAYON C. Volatile fatty acids and methane production in relation to anaerobic carbohydrate fermentation in *Oryctes nasicornis* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Insect Physiol.* 1980 **26**, 819—828.

Brune A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Mar;12(3):168-80. doi: 10.1038/nrmicro3182. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24487819

Chafino S, Ureña E, Casanova J, Casacuberta E, Franch-Marro X, Martín D. Upregulation of E93 Gene Expression Acts as the Trigger for Metamorphosis Independently of the Threshold Size in the Beetle *Tribolium castaneum*. *Cell Rep.* 2019 Apr 23;27(4):1039-1049.e2. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.094. PMID: 31018122.

Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF The effects of environmental variation on a mechanism that controls insect body size. *Evol. Ecol. Res.* 2004 6: 49–62

Dow JA. pH GRADIENTS IN LEPIDOPTERAN MIDGUT. *J Exp Biol.* 1992 Nov 1;172(Pt 1):355-375. doi: 10.1242/jeb.172.1.355. PMID: 9874748.

Egert M, Stingl U, Bruun LD, Pommerenke B, Brune A, Friedrich MW. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Environ Microbiol.* 2005 Aug;71(8):4556-66. doi: 10.1128/AEM.71.8.4556-4566.2005. PMID: 16085849; PMCID: PMC1183286.

Gotoh H, Cornette R, Koshikawa S, Okada Y, Lavine LC, Emlen DJ, Miura T. Juvenile hormone regulates extreme mandible growth in male stag beetles. *PLoS One.* 2011;6(6):e21139. doi: 10.1371/journal.pone.0021139. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21731659; PMCID: PMC3120829.

Grayson J.M.D. Digestive tract pH of six species of Coleoptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1958 ;51:403–405

Hobbie SN, Li X, Basen M, Stingl U, Brune A. Humic substance-mediated Fe(III) reduction by a fermenting *Bacillus* strain from the alkaline gut of a humus-feeding scarab beetle larva. *Syst Appl Microbiol.* 2012 Jun;35(4):226-32. doi: 10.1016/j.syapm.2012.03.003. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22525666.

Hwang JS, Lee J, Kim YJ, Bang HS, Yun EY, Kim SR, Suh HJ, Kang BR, Nam SH, Jeon JP, Kim I, Lee DG. Isolation and Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprinsin) from the Dung Beetle, *Copris tripartitus*. *Int J Pept.* 2009;2009:136284. doi: 10.1155/2009/136284. Epub 2009 Oct 22. PMID: 20721297; PMCID: PMC2915626.

Blaesse AK, Broehan G, Meyer H, Merzendorfer H, Weihrauch D. Ammonia uptake in *Manduca sexta* midgut is mediated by an amiloride sensitive cation/proton exchanger: Transport studies and mRNA expression analysis of NHE7, 9, NHE8, and V-ATPase (subunit D). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2010 Dec;157(4):364-76. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.08.004. Epub 2010 Aug 7. PMID: 20696265.

Han G, Li X, Zhang T, Zhu X, Li J. Cloning and Tissue-Specific Expression of a Chitin Deacetylase Gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Response to *Bacillus thuringiensis*. *J Insect Sci.* 2015 Jul 10;15(1):95. doi: 10.1093/jisesa/iev076. PMID: 26163665; PMCID: PMC4677497.

Hidayat P, Goodman WG. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1994 24 (7): 709-715. doi: 10.1016/0965-1748(94)90058-2.

Hobbie SN, Li X, Basen M, Stingl U, Brune A. Humic substance-mediated Fe(III) reduction by a fermenting *Bacillus* strain from the alkaline gut of a humus-feeding scarab beetle larva. *Syst Appl Microbiol.* 2012 Jun;35(4):226-32. doi: 10.1016/j.syapm.2012.03.003. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22525666.

Ishibashi J, Saido-Sakanaka H, Yang J, Sagisaka A, Yamakawa M. Purification, cDNA cloning and modification of a defensin from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Eur J Biochem.* 1999 Dec;266(2):616-23. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00906.x. PMID: 10561605.

Ishikawa K, Ohmori T, Miyamoto H, Ito T, Kumagai Y, Sonoda M, Matsumoto J, Miyamoto H, Kodama H. Denitrification in soil amended with thermophile-fermented compost suppresses nitrate accumulation in plants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Feb;97(3):1349-59. doi: 10.1007/s00253-012-4004-5. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22434570.

Ito T, Miyamoto H, Kumagai Y, Udagawa M, Shinmyo T, Mori K, Ogawa K, Miyamoto H, Kodama H. Thermophile-fermented compost extract as a possible feed additive to enhance fecundity in the laying hen and pig: Modulation of gut metabolism. *J Biosci Bioeng.* 2016 Jun;121(6):659-664. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.10.014. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26896863.

Kapoor D, Khan A, O'Donnell MJ, Kolosov D. Novel mechanisms of epithelial ion transport: insights from the cryptonephridial system of lepidopteran larvae. *Curr Opin Insect Sci.* 2021 Oct;47:53-61. doi: 10.1016/j.cois.2021.04.001. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33866042.

Karino, K., Seki, N. & Chiba, M. Larval nutritional environment determines adult size in Japanese horned beetles *Allomyrina dichotoma*. *Ecol Res* 2004 **19**, 663-668.

Kayukawa T, Nagamine K, Ito Y, Nishita Y, Ishikawa Y, Shinoda T. Krüppel Homolog 1 Inhibits Insect Metamorphosis via Direct Transcriptional Repression of Broad-Complex, a Pupal Specifier Gene. *J Biol Chem*. 2016 Jan 22;291(4):1751-1762. doi: 10.1074/jbc.M115.686121. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26518872; PMCID: PMC4722455.

Kramer KJ, Sanburg LL, Kézdy FJ, Law JH. The Juvenile Hormone Binding Protein in the Hemolymph of *Manduca sexta* Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Feb;71(2):493-7. doi: 10.1073/pnas.71.2.493. PMID: 16592141; PMCID: PMC388033.

Lemke T, Stingl U, Egert M, Friedrich MW & Brune A (2003) Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Environ Microbiol* 69: 6650–6658.

Mirth CK, Tang HY, Makohon-Moore SC, Salhadar S, Gokhale RH, Warner RD, Koyama T, Riddiford LM, Shingleton AW. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 May 13;111(19):7018-23. doi: 10.1073/pnas.1313058111. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24778227; PMCID: PMC4024895.

Miyamoto H, Seta M, Horiuchi S, Iwasawa Y, Naito T, Nishida A, Miyamoto H, Matsushita T, Itoh K, Kodama H. Potential probiotic thermophiles isolated from mice after compost ingestion. *J Appl Microbiol.* 2013 Apr;114(4):1147-57. doi: 10.1111/jam.12131. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23311468.

Miyamoto, H., Asano, F., Ishizawa, K., Suda, W., Miyamoto, H., Tsuji, N., Matsuura, M., Tsuboi, A., Ishii, C., Nakaguma, T., Shindo, C., Kato, T., Kurotani, A., Shima, H., Moriya, S., Hattori, M., Kodama, H., Ohno, H., Kikuchi, J. (2022) A potential network structure of symbiotic bacteria involved in carbon and nitrogen metabolism of wood-utilizing insect larvae. *Sci. Total Environ.* doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155520. PMID: 35508250

Niisawa C, Oka S, Kodama H, Hirai M, Kumagai Y, Mori K, Matsumoto J, Miyamoto H, Miyamoto H. Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost. *J Gen Appl Microbiol.* 2008 Jun;54(3):149-58. doi: 10.2323/jgam.54.149. PMID: 18654036.

Odelson DA, Breznak JA. Volatile Fatty Acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Appl Environ Microbiol.* 1983 May;45(5):1602-13. doi: 10.1128/aem.45.5.1602-1613.1983. PMID: 16346296; PMCID: PMC242507.

Ogata N, Iwabuchi K. Relevant principal factors affecting the reproducibility of insect primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017 Jun;53(6):532-537. doi: 10.1007/s11626-017-0140-7. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28229336; PMCID: PMC5486689.

Pacheco CA, Alevi KCC, Ravazi A, de Azeredo Oliveria MTV Review: Malpighian tubule, an essential organ for insects. *Entomol Ornithol Herpetol.* 2014 3:1000122 <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0983.1000122>

Peters W. Peritrophic Membranes. *Springer Berlin Heidelberg*, 1992 **30**, 482–483.

Ritdachyeng E, Manaboon M, Tobe SS, Singtripop T. Molecular characterization and gene expression of juvenile hormone binding protein in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *J Insect Physiol.* 2012 Nov;58(11):1493-501. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.09.002. Epub 2012 Sep 21. PMID: 23000738.

Rodríguez-de la Noval C, Rodríguez-Cabrera L, Izquierdo L, Espinosa LA, Hernandez D, Ponce M, Moran-Bertot I, Tellez-Rodríguez P, Borrás-Hidalgo O, Huang S, Kan Y, Wright DJ, Ayra-Pardo C. Functional expression of a peritrophin A-like SfPER protein is required for larval development in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Sci Rep.* 2019 Feb 22;9(1):2630. doi: 10.1038/s41598-019-38734-0. PMID: 30796291; PMCID: PMC6385298.

Schroeder, B.G.; Logroño, W.; Rocha, U.N.d.; Harms, H.; Nikolausz, M. Enrichment of Anaerobic Microbial Communities from Midgut and Hindgut of Sun Beetle Larvae (*Pachnoda marginata*) on Wheat Straw: Effect of Inoculum Preparation. *Microorganisms* 2022, *10*, 761. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040761>

Silva JR, Amaral DT, Viviani VR. Comparison of the Malpighian tubules and fat body transcriptional profiles of *Zophobas morio* larvae (Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2019 Mar;29:95-105. doi: 10.1016/j.cbd.2018.11.007. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30463043.

Vea IM, Tanaka S, Shiotsuki T, Jouraku A, Tanaka T, Minakuchi C. Differential Juvenile Hormone Variations in Scale Insect Extreme Sexual Dimorphism. *PLoS One*. 2016 Feb 19;11(2):e0149459. doi: 10.1371/journal.pone.0149459. PMID: 26894583; PMCID: PMC4760703.

Yin J, Yang S, Li K, Guo W, Cao Y. Identification and molecular characterization of a chitin-binding protein from the beet webworm, *Loxostege sticticalis* L. *Int J Mol Sci*. 2014 Oct 22;15(10):19147-61. doi: 10.3390/ijms151019147. PMID: 25340980; PMCID: PMC4227266.

Zborowska M, Waliszewska H, Waliszewska B, Borysiak S, Brozdowski J, Stachowiak-Wencek A. Conversion of Carbohydrates in Lignocellulosic Biomass after Chemical Pretreatment. *Energies*. 2022; 15(1):254.

<https://doi.org/10.3390/en15010254>

Zhao D, Liu B, Zhang YK, Guo W, Li SY, Lu XJ, Li RJ. Structural and biochemical characteristics of chitin-binding protein SeCBP66 from *Spodoptera exigua* (Hübner). *Genet Mol Res*. 2016 Aug 12;15(3). doi: 10.4238/gmr.15038789. PMID: 27525954.

Zhang W, Liang G, Ma L, Jiang T, Xiao H. Dissecting the Role of Juvenile Hormone Binding Protein in Response to Hormone and Starvation in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*. 2019 May 22;112(3):1411-1417. doi: 10.1093/jee/toz027. PMID: 30789202.

## 【図表一覧】

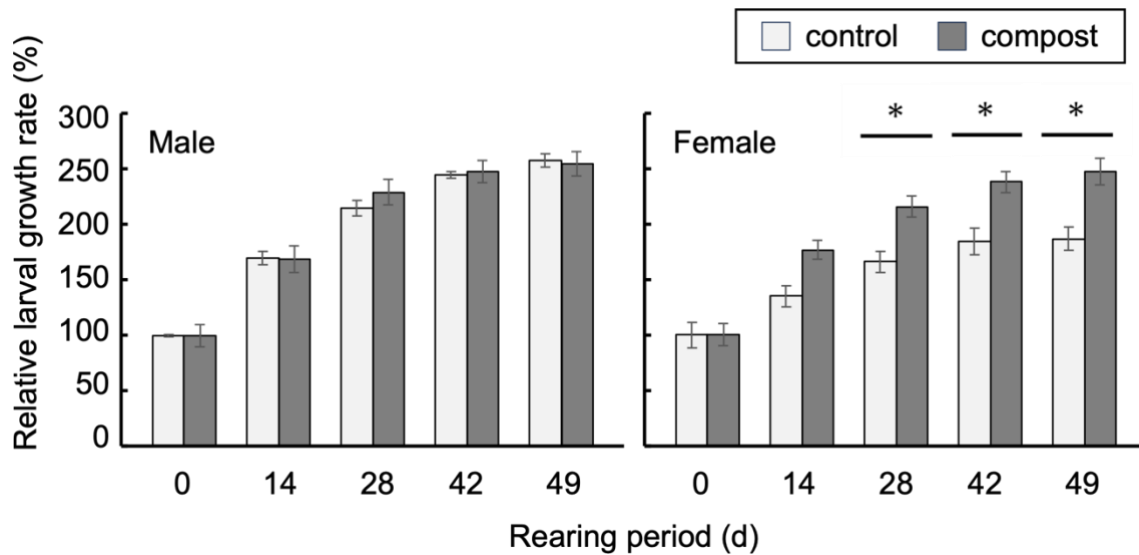


図10. 好熱菌発酵産物の給与によるヘラクレスオオカブトムシメス幼虫の成長促進効果

幼虫を好熱菌発酵産物の有無にかかわらず腐葉土に移し(0日)、その後49日間飼育した。実験開始時の体重の平均値の相対値を示す。バーは標準偏差を意味する。

\* $p < 0.05$ 。  $n = 4$ 。

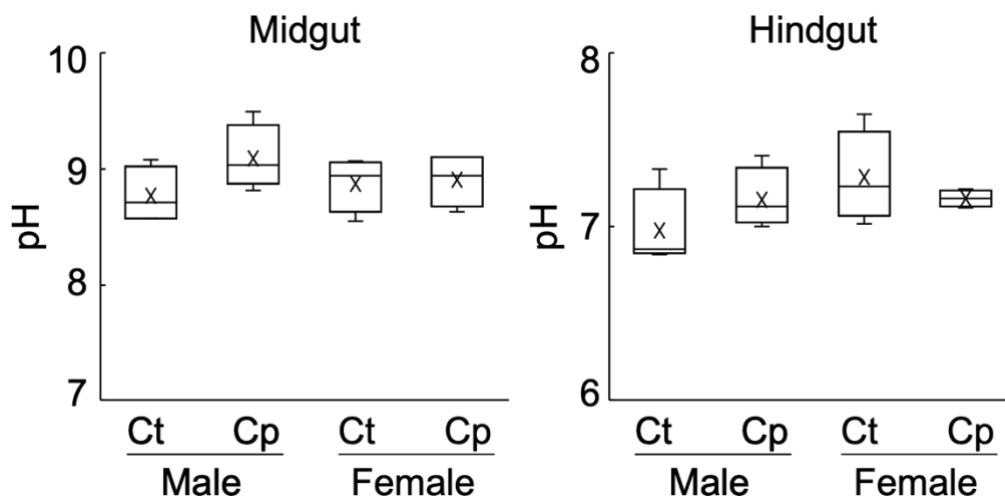


図11. ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内容物の pH

Ct と Cp はそれぞれ対照区と好熱菌発酵産物給与区を示す。

中央の線は中央値、「x」は平均値を示す。ひげの上端と下端は、それぞれデータの最大値と最小値を示す。n = 4。

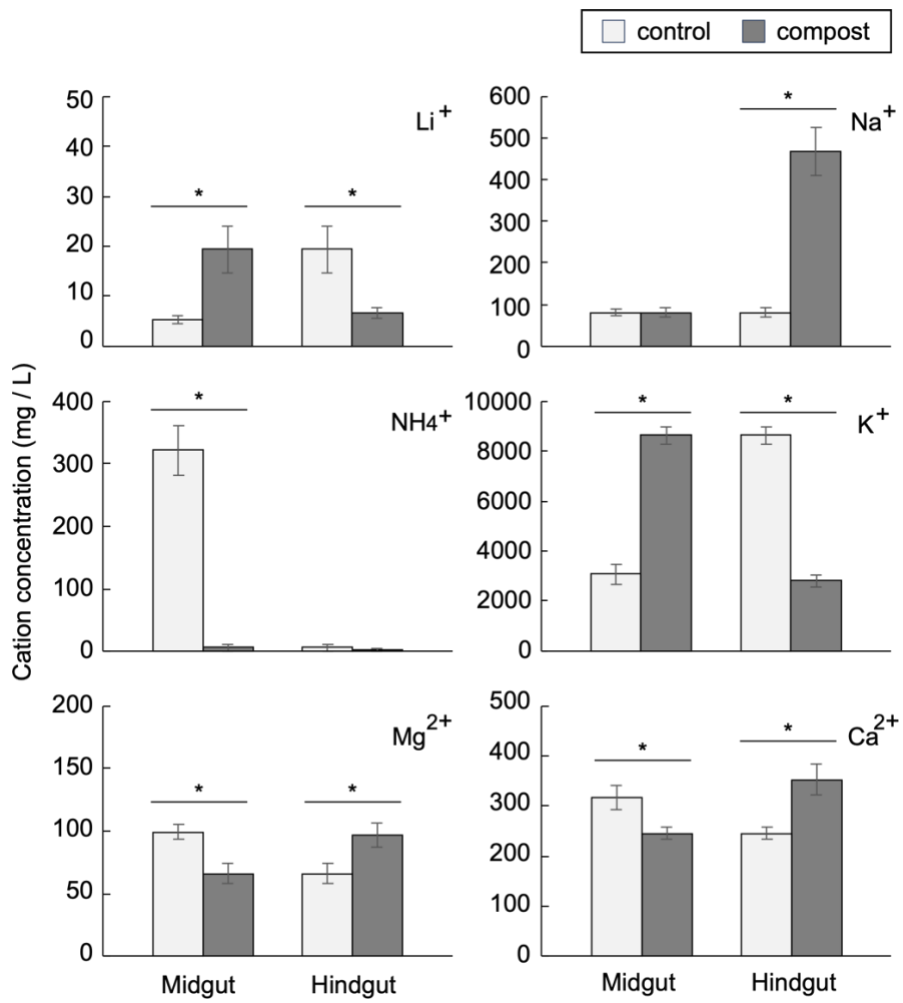


図12. メスのヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸液中のカチオン濃度

バーは標準偏差を意味する。\* $p < 0.05$ 。n = 4。

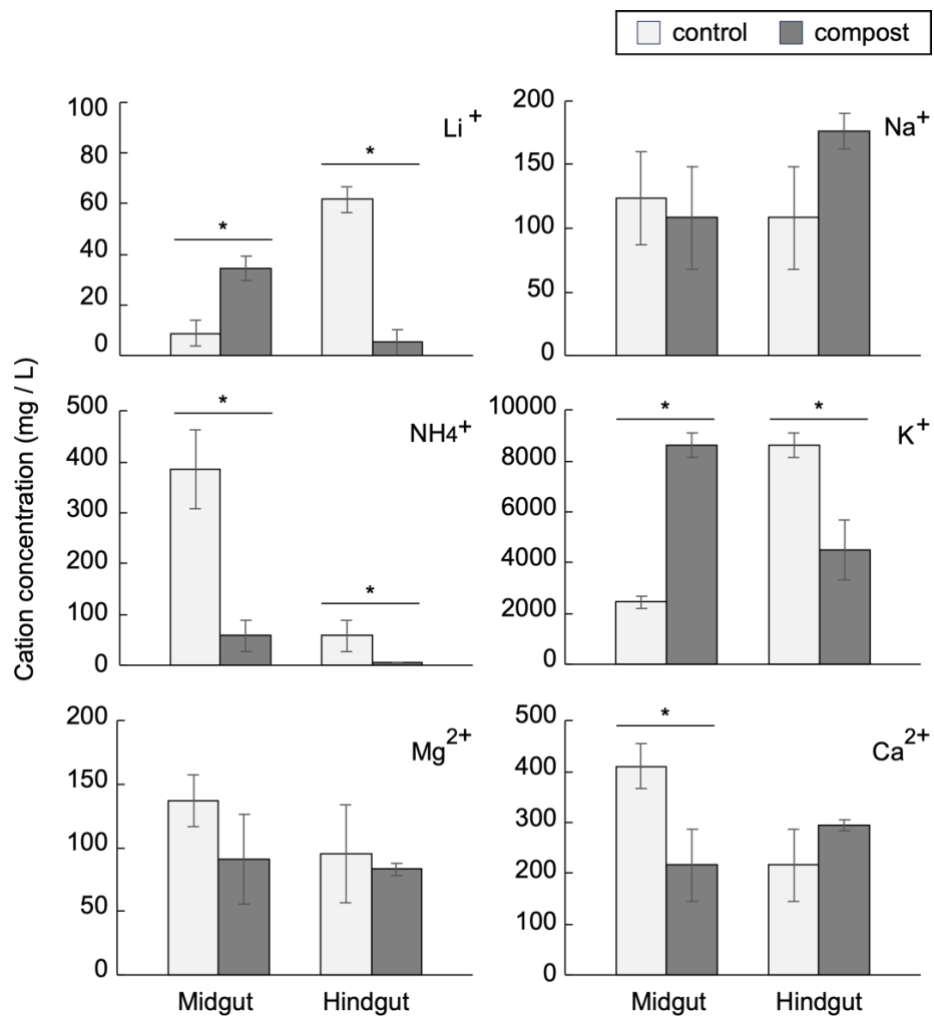


図13. ヘラクレスオオカブトムシのオス幼虫の腸液中のカチオン濃度

バーは標準偏差を意味する。\* $p < 0.05$ 。n = 4。

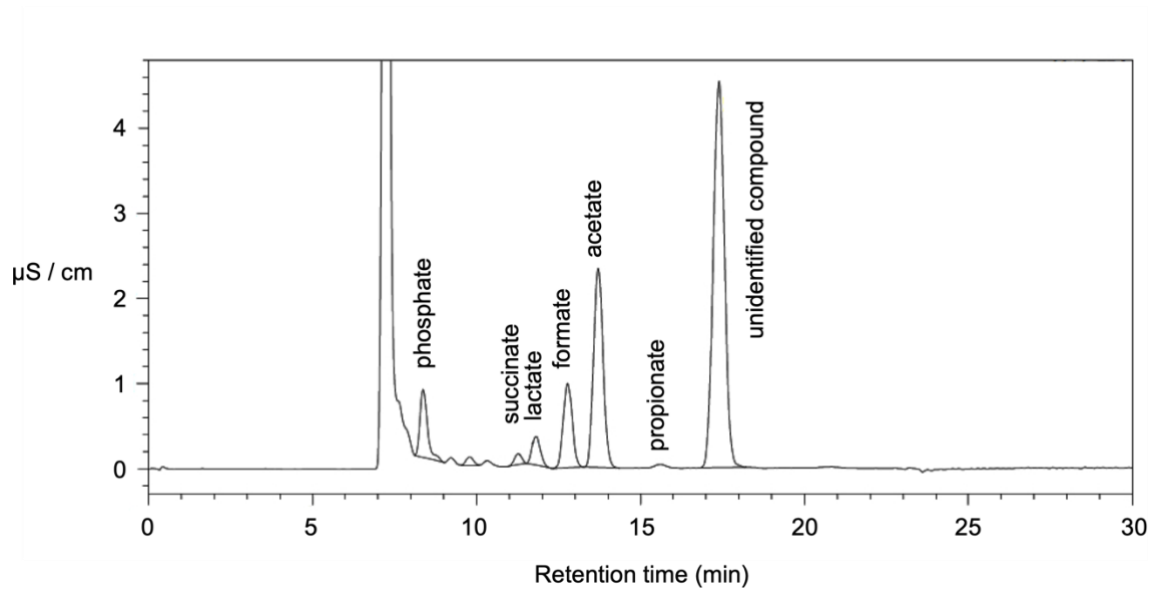


図14. 対照区のマス幼虫の中腸内容物を分析した、主要な有機酸を示す HPLC のクロマトグラム

保持時間約 17.5 分のピークは未同定である。本論文ではこの未同定のピークを RT-17 と呼ぶ。

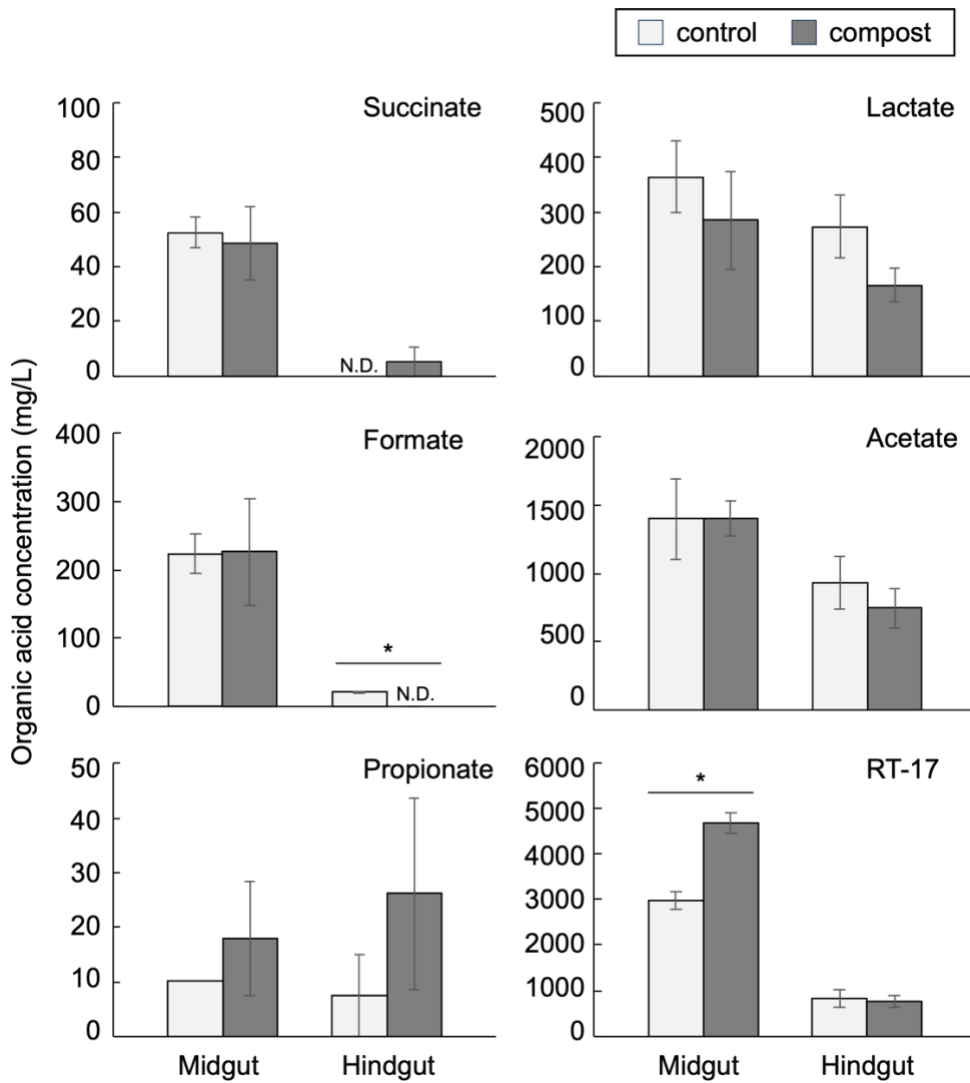


図15. メスの腸内容物の有機酸

RT-17 は確認された化合物で、その保持時間は約 17.5 分である。N.D.は検出されないことを意味する。バーは標準偏差を意味する。\* $p < 0.05$ 。n = 4。

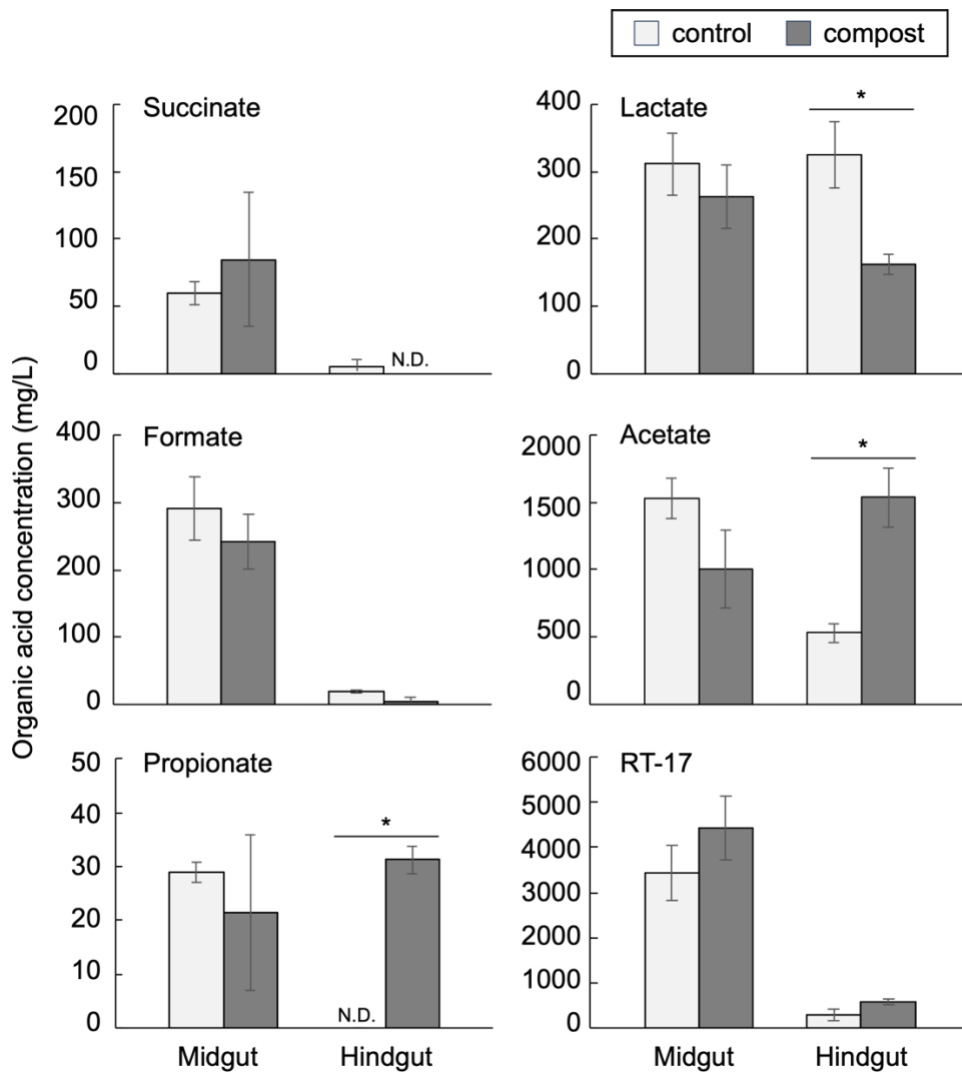


図16. オスの腸内容物に含まれる有機酸

RT-17 は確認された化合物で、その保持時間は約 17.5 分である。N.D.は検出されないことを意味する。バーは標準偏差を意味する。\* $p < 0.05$ 。n = 4。

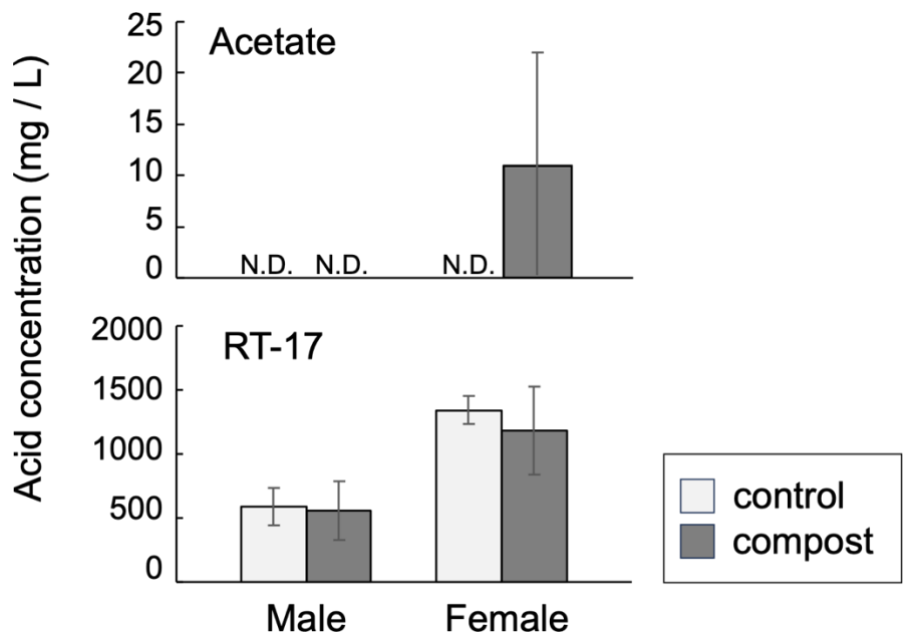


図17. ヘラクレスオオカブトムシのオスとメスの幼虫の糞便中の酢酸と RT-17 の濃度

N.D.は検出されないことを意味する。バーは標準偏差を意味する。\* $p < 0.05$ 。

n= 4。

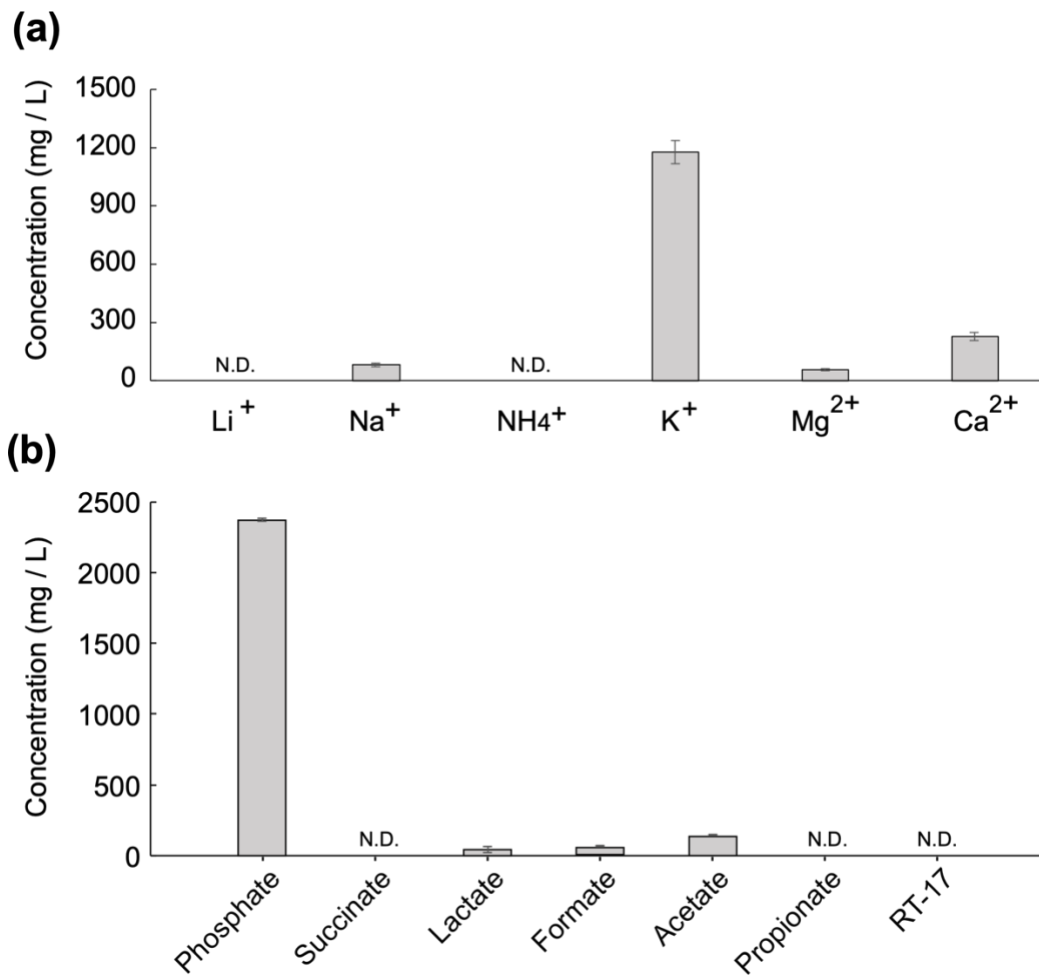


図 18. 腐葉土中のカチオン、リン酸、有機酸濃度

(a) 腐葉土中のカチオンの濃度。(b) 腐葉土中のリン酸と有機酸の濃度。N.D.は検出されないことを意味する。バーは標準偏差を意味する。n = 3。

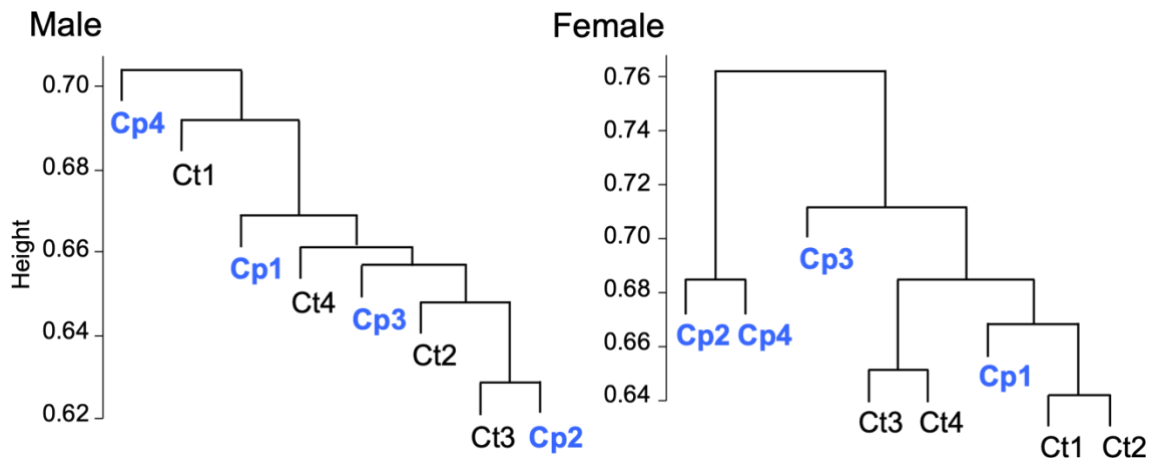


図19. ヘラクレスオオカブトムシのオスとメスの幼虫によって発現される遺伝子の階層クラスター階層分析

対照区の腐葉土で飼育された 4 匹の幼虫 (Ct1 ~ 4) と好熱菌発酵産物を混合し腐葉土で飼育された 4 匹の幼虫 (Cp1 ~ 4) をトランスクリプトーム解析に供した。性別ごとの 8 つのサンプルのうち少なくとも 1 つで発現された 74,571 個の遺伝子から樹形図を生成した。

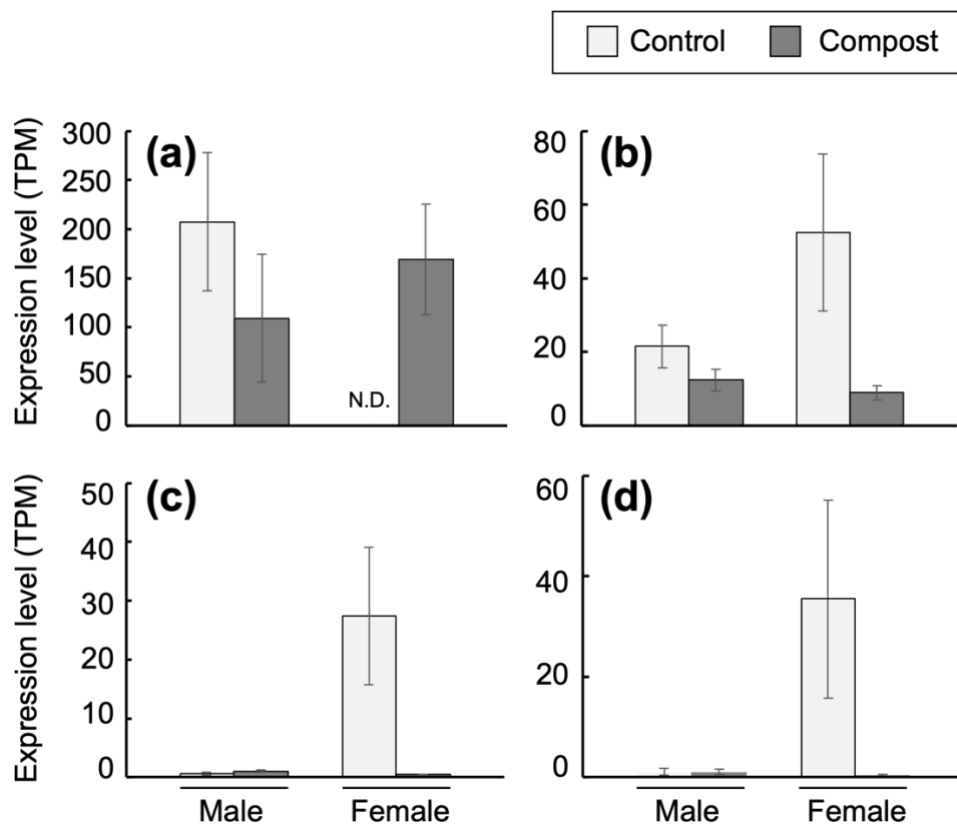
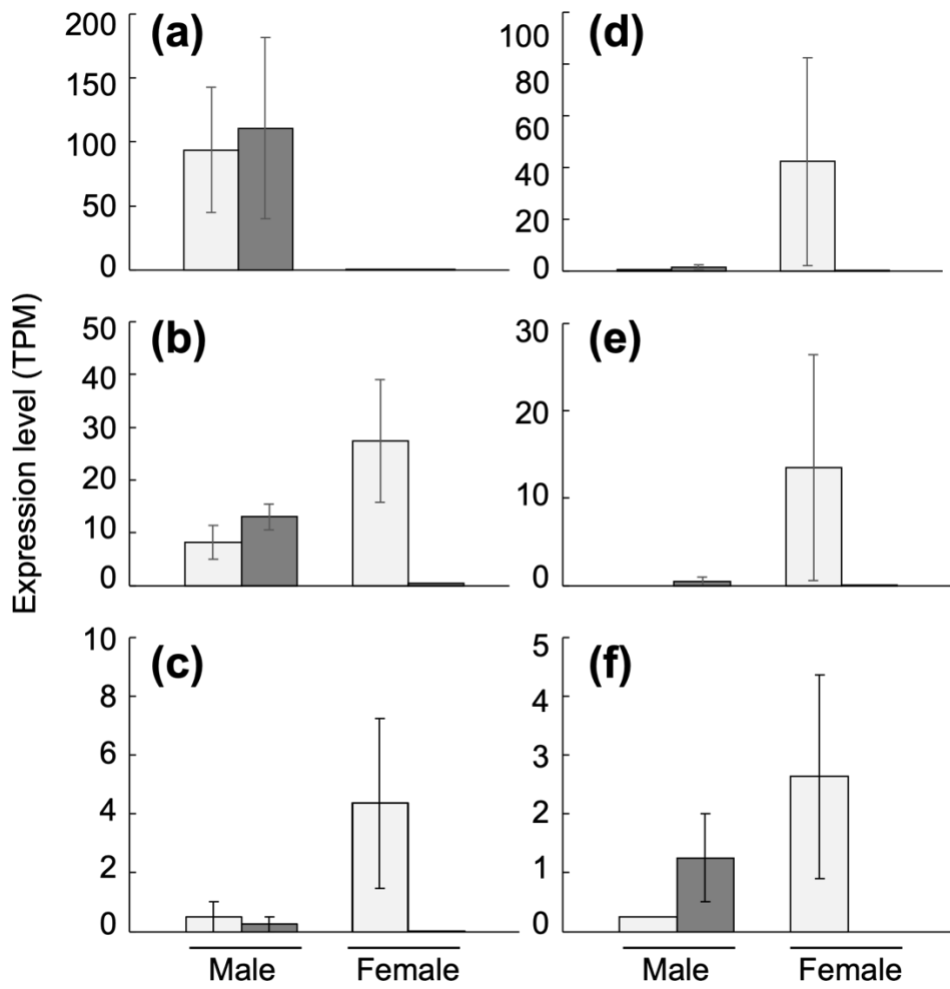


図20. メスの対照区幼虫と好熱菌発酵産物給与区の幼虫との比較で見つかった 4 つの代表的な DEG の発現パターン

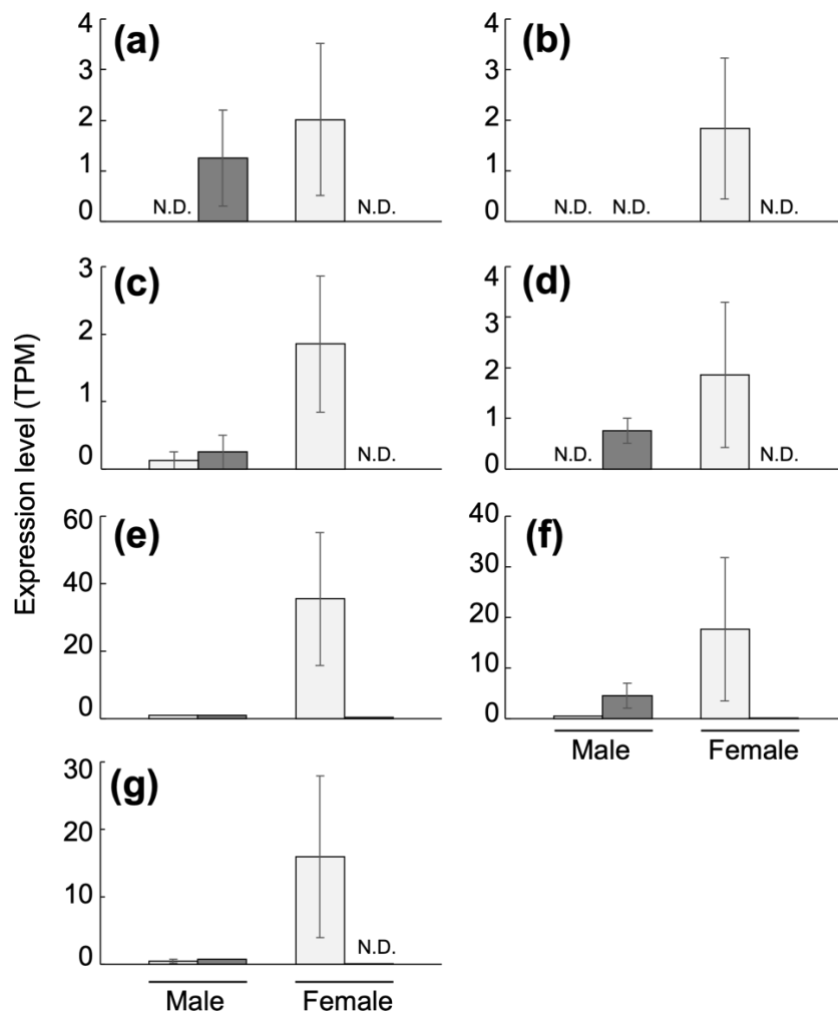
DEG は表 1 に示した。このデータは、オスとメスの幼虫から得られた 100 万マッピング リードあたりの転写産物 (TPM) をまとめて示している。データは以下の遺伝子の発現パターンを示している。(a) 血リンパ JHBP 遺伝子 (DN1122\_c1\_g1\_i4)、(b) デフェンシン (DN1324\_c0\_g1\_i5)、(c) トリプシン様セリン プロテアーゼ (DN2668\_c0\_g1\_i1)、(d) キチン結合 2 型ドメイン含有タンパク質 (DN5996\_c0\_g1\_i1)。バーは標準偏差を意味する。n = 4。



☒21

図21. メス対照区幼虫と好熱菌発酵産物給与区幼虫との比較で見つかった 4 つの代表的な DEG の発現パターン。

これらの DEG は、ペプチダーゼ/プロテアーゼのカテゴリーとしてリストされている (表 2)。オスとメスの幼虫から得られた 100 万マッピング リードあたりの転写産物 (TPM) をまとめて示した。この図は、以下のタンパク質をコードする遺伝子の発現パターンを示している。(a) ペプチダーゼ (DN1598\_c1\_g1\_i20)、(b) 推定トリプシン様セリンプロテアーゼ (DN2668\_c0\_g1\_i1)、(c) セリンプロテアーゼ 6 (DN5342\_c0\_g2\_i1)、(d) セリンプロテアーゼ 12 (DN27482\_c0\_g1\_i1)、(e) ペプチダーゼ S1ドメイン含有タンパク質 (DN28385\_c0\_g1\_i1)、および (f) セーヌプロテアーゼ (DN37931\_c0\_g1\_i1)。バーは標準偏差を意味している。n = 4。



☒22

図22. メス対照区幼虫と好熱菌発酵産物給与区幼虫との比較で見つかった 4 つの代表的な DEG の発現パターン

これらの DEG は、栄養性マトリックス関連タンパク質のカテゴリーとしてリストされている (表 3)。オスとメスの幼虫から得られた TPM をまとめて示している。この図は、以下のタンパク質をコードする遺伝子の発現パターンを示している。(a) 推定周栄養性マトリックスタンパク質 (DN961\_c0\_g1\_i1)、(b) 推定周栄養性マトリックスタンパク質 (DN961\_c0\_g1\_i4)、(c) キチン結合 2 型ドメイン含有タンパク質 (DN2259\_c0\_g2\_i3)、(d) キチン結合 2 型ドメイン含有タンパク質 (DN2259\_c0\_g3\_i5)、(e) キチン結合 2 型ドメイン含有タンパク質 (DN5996\_c0\_g1\_i1)、および (f) 推定キチンデアセチラーゼ (DN46633\_c0\_g1\_i1)、および (g) ペリトロフィン (DN51506\_c0\_g1\_i1) バーは標準偏差を意味している。 n = 4。

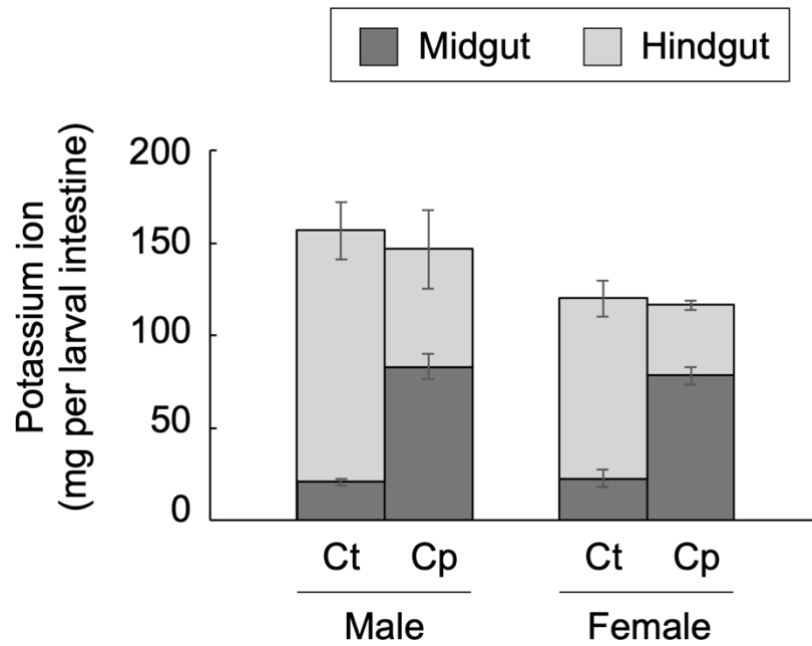


図23. 各幼虫の腸内カリウムイオン量

腸内の総カリウムイオン量はさらに中腸量と後腸量に分けられる。Ct と Cp はそれぞれ対照区と好熱菌発酵産物給与区の幼虫を意味する。バーは標準偏差を意味する。n = 4。

表1 好熱菌発酵産物給与区のメス幼虫の DEG

Table S1 List of differential expression genes in a comparison of the two groups of female larvae with (Cp) and without (Ct) compost.

Transcript_id	logFC (Cp/Ct)	logCPM	PValue	FDR	UniprotKB_accession	Description
DN1122_c1_g1_i4	14.26687827	6.887243058	1.24825E-11	0.001773E-08	A0A076BCC80	Hemolymph juvenile hormone-binding protein
DN1297_c0_g1_i5	10.91109704	3.554414577	4.21645E-06	0.003655186	A0A482WDY8	Frizzled and/or Fz domain containing protein
DN869_c0_g2_i12	10.23145812	2.86278925	2.30485E-18	6.95581E-14	A0A8K0K5F9	Uncharacterized protein
DN231_c0_g1_i4	10.15751696	2.81347536	1.37435E-08	4.14765E-05	A0A8K0CAV3	KASH domain-containing protein
DN5977_c0_g1_i9	10.07515229	2.7333425	2.49325E-08	6.27032E-05	A0A076AU54	lysozyme
DN310_c0_g1_i22	9.862588129	2.527149098	7.17263E-08	0.000127331	A0A5N4AK56	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
DN6914_c0_g1_i1	9.749085559	2.447115473	3.51679E-16	5.30666E-12	A0A076BAV3	RNA binding protein (Fragment)
DN2157_c0_g1_i15	9.525930792	2.210811242	3.30479E-05	0.014885873	A0A076B0V5	Uncharacterized protein
DN7853_c0_g1_i3	9.287217895	1.9786336	2.60915E-07	0.000393708	A0A076BCP6	Centrosome-associated protein 350
DN4048_c0_g1_i6	9.109945547	1.824386261	8.5774E-05	0.031567972	A0A076AYD0	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 (Fragment)
DN3378_c0_g1_i11	9.123039248	1.824386261	1.44507392	4.17593E-06	A0A076BGD2	RZZ complex subunit KNTC1/ROD C-terminal domain-containing protein
DN4078_c0_g1_i9	8.724378786	1.44507392	4.17593E-06	0.003655186	A0A076BGD2	Actin binding protein (Fragment)
DN2157_c0_g1_i17	8.896277802	1.614391656	0.000120256	0.038199587	A0A076B0V5	Uncharacterized protein
DN187_c0_g1_i4	8.638079247	1.365378351	1.36425E-09	4.57485E-06	A0A076B1A7	Ras-related protein Rab
DN8713_c0_g1_i2	8.418356369	1.161516434	1.3628E-05	0.008129082	A0A076AUJ6	Laminin subunit alpha (Fragment)
DN1209_c0_g1_i47	8.301088666	1.056312917	6.72524E-08	0.000126997	A0A076BDJ2	Armadillo repeat containing protein (Fragment)
DN4635_c0_g1_i1	8.274399575	1.052192397	2.76801E-05	0.013052483	A0A076AZ15	Uncharacterized protein
DN187_c0_g1_i8	8.511628877	1.244566829	7.41106E-05	0.028674146	A0A1Y1MZA6	Genome assembly, chromosome: 17
DN333_c0_g1_i11	8.162771367	0.930701358	6.73303E-08	0.000126997	A0A9N9SFU7	Rho GTPase-activating protein 21
DN2206_c0_g1_i53	8.114839625	0.885434077	2.17279E-07	0.00034512	A0A1Y1NIG7	RNA-directed DNA polymerase
DN419_c2_g1_i7	8.085380809	0.861620352	4.70178E-05	0.019885235	A0A139WUJ1	non-specific serine/threonine protein kinase
DN2325_c2_g1_i11	7.979526261	0.863249066	6.01141E-07	0.000863897	A0A076AWP7	PUM-HD domain-containing protein
DN2186_c0_g1_i7	7.882763191	0.678288646	0.000121514	0.038199587	A0A1Y1LA28	ZZ-type domain-containing protein
DN36856_c0_g1_i2	7.84583973	0.645280103	8.91471E-05	0.032028229	A0A076AVO4	Zinc finger protein
DN1688_c1_g1_i23	7.843643444	0.647154378	0.000133418	0.039474783	A0A076BGH3	Zinc-finger associated domain containing protein (Fragment)
DN56719_c0_g1_i2	7.686315103	0.509239114	1.87034E-06	0.001881502	A0A076AVN7	Histone deacetylase complex subunit SAP130 C-terminal domain-containing protein (Fragment)
DN3772_c0_g1_i1	7.630357458	0.464611901	0.000143087	0.041106412	A0A9N9TD28	Genome assembly, chromosome: 11
DN4736_c1_g1_i3	7.396992591	1.66006869	0.000119942	0.038199587	A0A9N9SL10	Protein kinase domain-containing protein
DN288_c0_g1_i9	7.435176181	0.29598826	6.35623E-06	0.004795618	A0A076BH50	Helicase
DN11435_c0_g1_i3	6.865026777	0.722031344	7.68907E-07	0.000988187	A0A7F5RKE3	Genome assembly, chromosome: 4
DN278_c0_g1_i2	6.798557294	-0.230132446	4.65445E-05	0.019985235	A0A076BBJ7	Protein polybromo-1-like Protein
DN3868_c0_g1_i4	6.783826524	-0.246143858	9.77384E-05	0.03429821	A0A076AZA8	C3H1-type domain-containing protein
DN929_c0_g1_i2	6.694486552	1.762716338	3.10058E-05	0.014177618	A0A8K0GJX2	snRNA-activating protein complex subunit 3
DN2522_c0_g1_i2	6.617238597	-0.368708607	0.000104934	0.035951959	A0A482VJC1	Rho GTPase-activating protein 190
DN1617_c0_g2_i1	6.564929081	-0.409333018	0.000118184	0.038199587	A0A076BD43	Teneurin-m (Fragment)
DN2822_c0_g1_i8	6.564127152	0.304208544	1.83712E-05	0.010267137	A0A8K0D098	ABC transporter domain-containing protein
DN5658_c0_g2_i6	6.447262432	-0.494230866	0.000131461	0.039474783	A0A9N9SX76	Genome assembly, chromosome: 2
DN2492_c0_g1_i3	6.438616272	-0.5055065163	0.000173208	0.047520513	A0A076BFV0	ZZ-type domain-containing protein (Fragment)
DN2469_c0_g1_i3	6.426618609	-0.507378351	0.000131514	0.039474783	A0A1B6C1X0	Reverse transcriptase domain-containing protein
DN12354_c1_g1_i12	6.415811013	-0.517042075	0.000110413	0.037023992	A0A8K0D415	Rab-GAP TBC domain-containing protein
DN929_c0_g1_i32	6.392770156	-0.532111128	0.000137378	0.040251809	A0A1Y1K217	Lipid desaturase domain-containing protein
DN1851_c0_g1_i19	5.613874096	1.688275524	0.00015771	0.044481605	A0A8K0GJX2	Rho GTPase-activating protein 190
DN3461_c0_g1_i45	5.576396963	0.270427167	7.09299E-05	0.028674146	A0A076B178	Actin binding protein (Fragment)
DN534_c0_g1_i2	4.548406565	3.252113128	2.09205E-05	0.011274301	A0A076AWW8	SAM domain-containing protein
DN534_c0_g1_i2	4.548406565	3.252113128	2.09205E-05	0.011274301	A0A076AWW8	Uncharacterized protein

表1 続き

DN12914_c0.g1.i2	-1.993075406	7.26616014	2.85192E-05	0.013241258	AOA4C1WQX8	Uncharacterized protein
DN12439_c0.g1.i2	-2.008923401	6.262000069	2.24601E-05	0.011891625	AOA7M7MVX9	Uncharacterized protein LOC113219380
DN11698_c1.g3.i3	-2.0423668831	6.482026063	3.83398E-05	0.016768937	AOA4C1WQX8	Uncharacterized protein
DN11698_c0.g1.i1	-2.080123224	4.231719832	3.77566E-05	0.028676723	AOA7M7MVX9	Uncharacterized protein LOC113219380
DN17664_c0.g1.i3	-2.082158754	5.909438642	2.78791E-05	0.028674146	AOA9P0B9N2	Genome assembly, chromosome: 5
DN930_c0.g1.i7	-2.09209741	9.226303409	1.27751E-05	0.008032051	AOA8S9WK16	Uncharacterized protein
DN12439_c0.g1.i3	-2.142218869	7.31404677	3.4681E-05	0.008129082	AOA8S9WK16	Uncharacterized protein
DN930_c0.g1.i21	-2.164583965	10.18997588	9.60761E-06	0.006443283	AOA0M9AY72	Uncharacterized protein
DN930_c0.g1.i12	-2.197456456	6.969626292	7.98516E-06	0.00547691	AOA5E4NGN7	Uncharacterized protein
DN930_c0.g1.i14	-2.229211248	7.893135754	3.94116E-06	0.003655186	AOA151IRK4	Uncharacterized protein
DN17664_c0.g1.i4	-2.252835157	3.975470595	5.634E-05	0.023291589	AOA9P0B9N2	Genome assembly, chromosome: 5
DN25009_c0.g1.i1	-2.271507825	6.1916818	6.64086E-06	0.004888162	AOA151IRK4	Uncharacterized protein
DN11698_c1.g1.i1	-2.297493514	7.882370443	4.23909E-06	0.003655186	AOA8S9WK16	Uncharacterized protein
DN11698_c1.g3.i2	-2.317536374	7.71693123	1.6707E-06	0.001756993	EOVHC5	Uncharacterized protein
DN36512_c2.g1.i1	-2.321762859	7.611963985	4.65881E-06	0.003799948	AOA8S9WK16	Uncharacterized protein
DN12439_c0.g1.i1	-2.405123408	6.877966123	2.4985E-06	0.002432332	AOA7M7MVX9	Uncharacterized protein
DN24812_c0.g1.i5	-2.52313375	6.975643375	1.02033E-05	0.006694015	#N/A	Uncharacterized protein LOC113219380
DN1324_c0.g1.i5	-2.617618291	3.588912799	7.95384E-05	0.030004852	AOA6B9ESC3	Defensin (Fragment)
DN13229_c0.g1.i2	-2.864212523	5.339811435	9.35484E-05	0.033214101	AOA6P7G7D0	Troponin I isoform X14
DN27989_c0.g1.i1	-3.062504031	3.507273902	8.32987E-05	0.031039453	#N/A	#N/A
DN30009_c0.g1.i1	-3.402724707	2.935025081	0.000120255	0.038199567	#N/A	Uncharacterized protein
DN11160_c0.g1.i1	-3.639477513	1.461598776	8.76565E-05	0.031872116	AOA139WA62	Peptidase
DN1598_c1.g1.i20	-4.983063392	0.008422478	0.000100763	0.034953296	AOA0T6B3L5	Putative trypsin-like serine protease
DN2668_c0.g1.i1	-5.967687546	4.12810758	3.40509E-12	3.4254E-08	AOA5C0C9M4	Alpha-2-macroglobulin domain-containing protein
DN510_c1.g1.i9	-5.9863649	2.635644159	0.000169964	0.047058286	AOA0T6B2H23	Calcineurin-like phosphoesterase (Fragment)
DN27989_c0.g1.i1	-6.152470503	3.292444411	0.000131998	0.039474783	AOA0T6B495	Cytochrome P450 (Fragment)
DN3769_c0.g1.i3	-6.42654098	-0.514446947	0.000106655	0.03616557	AOA0T6B1B6	#N/A
DN1979_c3.g1.i2	-6.467469536	-0.480793838	0.000133157	0.039474783	#N/A	F-box domain-containing protein
DN7637_c0.g1.i2	-6.559976109	-0.408339032	0.000140739	0.040838991	AOA0T6AZD1	Uncharacterized protein
DN2481_c0.g2.i1	-6.603502258	1.047594849	7.55681E-05	0.028867956	AOA5C0C9M9	Chitin-binding type-2 domain-containing protein
DN5966_c0.g1.i1	-6.605703017	2.165017938	2.48866E-05	0.012317282	AOA139WFB5	Protocadherin Fat 4 isoform X1
DN1913_c0.g1.i4	-6.659031818	-0.334902183	0.000144381	0.041106412	AOA1W4WB55	Pre-mRNA-splicing regulator female-lethal(2)D
DN5524_c0.g1.i9	-6.804863929	-0.227992615	5.76871E-05	0.023526219	AOA8K0CTR5	Serine protease 6
DN5342_c0.g2.i1	-6.94840072	1.351883686	1.09415E-05	0.001214742	AOA0T6B9T9	Large ribosomal subunit protein eL6
DN13131_c0.g1.i3	-7.293408432	1.571458343	1.00628E-06	3.12726E-07	AOA5C0C9M9	Uncharacterized protein (Fragment)
DN2481_c0.g1.i1	-7.340012934	3.491938364	6.21743E-11	0.008311387	E2B455	Uncharacterized protein (Fragment)
DN611_c1.g2.i7	-7.563446265	0.409903542	1.40605E-05	0.003758917	AOA8K0DAB3	SAM domain-containing protein
DN474_c0.g1.i6	-7.677440031	0.497794089	4.48395E-06	0.00221053	AOA5C0C9R1	Putative chitin deacetylase
DN46633_c0.g1.i1	-7.682480225	3.952922206	1.31845E-07	0.038199567	AOA0T6B178	Actin binding protein (Fragment)
DN1851_c0.g1.i3	-7.804559302	0.63482833	0.000118584	0.022324306	AOA5C0CAW9	Serine protease
DN37931_c0.g1.i1	-7.912226079	0.709240935	5.32605E-05	0.046757695	AOA9J6BEU1	Chitin-binding type-2 domain-containing protein
DN2259_c0.g2.i3	-7.957117076	0.751698513	0.000167329	0.012317282	AOA0T6AW22	SET domain-containing protein
DN11432_c0.g1.i1	-8.177198874	0.947766558	2.46594E-05	0.008311387	AOA0T6BCP6	Centrosome-associated protein 350
DN7853_c0.g1.i2	-8.333751675	1.088968626	1.4321E-05	0.0013052483	AOA9J6BEU1	Chitin-binding type-2 domain-containing protein
DN2259_c0.g3.i5	-8.395610366	1.145518649	2.71522E-05	0.000123784	COLL31	Peritrophin
DN51506_c0.g1.i1	-8.401907549	2.557694467	5.74233E-08	0.0012378832	AOA0T6B766	RNA helicase
DN37931_c0.g1.i1	-8.461179178	1.204173198	1.10175E-06	0.038424903	AOA5C0C9J0	Putative peritrophic membrane matrix protein
DN661_c0.g1.i4	-8.482539036	1.228383344	0.000122504	0.004799618	AOA0T6B2M1	RNA binding protein (Fragment)
DN1383_c1.g1.i1	-8.627853337	1.353332384	6.28666E-06	0.004630139	AOA8K0GDK0	Unkempt protein
DN3013_c0.g1.i2	-8.633660462	1.355892341	5.83006E-06	4.65226E-05	DNBWRJ3	Usteine--fRNA ligase
DN3882_c0.g1.i1	-8.712049129	1.429801833	1.69571E-08	2.05697E-06	DNWSR7	Fukutin-related protein-like protein
DN28_c1.g1.i2	-8.758408288	1.474302974	5.45273E-10	0.0012317282	AOA5C0C9J0	Putative peritrophic membrane matrix protein
DN661_c0.g1.i1	-8.851672589	1.56589305	2.46571E-05	0.000977059	AOA8K0C9K5	Peptidase S1 domain-containing protein
DN28385_c0.g1.i1	-9.083121423	3.19939181	7.1228E-07	0.001756993	AOA0T6B521	arginine--fRNA ligase
DN859_c0.g1.i24	-9.153441626	1.847491567	1.68635E-06	0.00547691	AOA7M7G261	MD-2-related lipid-recognition domain-containing protein
DN47266_c0.g1.i1	-9.334224696	2.023110529	7.89027E-06	0.000123784	AOA8K0GJC2	Protein asunder
DN2897_c0.g1.i2	-9.581384504	2.259085705	5.37996E-08	0.0013052483	AOA0T6B949	Cytochrome P450 (Fragment)
DN2502_c2.g1.i8	-9.79719708	2.59188801	2.76093E-05	0.012103608	AOA8K0GHX5	Myosin-IB
DN1372_c0.g1.i3	-9.804854652	2.474981877	2.32615E-05	0.00088187	BOZBPO	Serine protease 12
DN27482_c0.g1.i1	-10.54270204	4.815966319	7.85861E-07	0.001024716	AOA6A3O67	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5
DN299_c1.g1.i6	-11.02559892	3.666068156	2.00921E-05			

表2 好熱菌発酵産物給与区のメス幼虫の DEG 中のタンパク質分解酵素関連遺伝子

Table S2 List of six genes categorized as peptidases/proteases among the DEGs.

Transcript_id	logFC	logCPM	PValue	FDR	UniprotKB_accession	Description
DN1598_c1_g1_i20	-4.983063392	0.008422478	0.000100763	0.0349533	AOA0T6B3L5	Peptidase
DN2668_c0_g1_i1	-5.967887546	4.12810758	3.41E-12	3.43E-08	AOA5C0C9M4	Putative trypsin-like serine protease
DN5342_c0_g2_i1	-6.94840072	1.351883686	1.09E-05	0.00702558	AOA8D4J1J6	Serine protease 6
DN37931_c0_g1_i1	-7.912226079	0.709240935	5.33E-05	0.02232431	AOA5C0CAW9	Serine protease
DN28385_c0_g1_i1	-9.083121423	3.19939181	7.12E-07	0.00097706	AOA8K0C9K5	Peptidase S1 domain-containing protein
DN27482_c0_g1_i1	-10.54270204	4.815969319	7.86E-07	0.00098819	BOZBP0	Serine protease 12

表 3 好熱菌発酵産物給与区のメス幼虫の DEG 中の PM 関連遺伝子

Table S3 List of seven genes include with two isoforms categorized as the proteins associated with peritrophic matrix among the DEGs.

Transcript_id	logFC	logCPM	PValue	FDR	UniprotKB_accession	Description
DN5996_c0_g1_i1	-6.605703017	2.165017938	2.49E-05	0.012317282	A0A139WF85	Chitin-binding type-2 domain-containing protein
DN46633_c0_g1_i1	-7.682480225	3.952982206	1.32E-07	0.000221053	A0A5C0C9R1	Putative chitin deacetylase
DN2259_c0_g2_i3	-7.957117076	0.751698513	0.000167329	0.046757695	A0A9J6BEU1	Chitin-binding type-2 domain-containing protein
DN2259_c0_g3_i5	-8.395610366	1.145518649	2.72E-05	0.013052483	A0A9J6BEU1	Chitin-binding type-2 domain-containing protein
DN51506_c0_g1_i1	-8.401907549	2.557694467	5.74E-08	0.000123784	C0LL31	Peritrophin
DN961_c0_g1_i4	-8.482539036	1.223833344	0.000123504	0.038424903	A0A5C0C9J0	Putative peritrophic membrane matrix protein
DN961_c0_g1_i1	-8.851672589	1.56589305	2.47E-05	0.012317282	A0A5C0C9J0	Putative peritrophic membrane matrix protein

## 【総合考察】

本研究ではヘラクレスオオカブトムシに焦点を当て、宿主-微生物の相互作用及びそれに付随する影響に関する内容について研究を行った。その結果として、ヘラクレスオオカブトムシ幼虫の腸内細菌叢にはセルロースを分解する *Ruminococcaceae* 科に属する細菌が存在しており、それが成長期である第3齢幼虫初期から中期にかけてその割合が増加すること、さらに好熱菌発酵産物を給与したメス幼虫においてはモリクテス綱が増加していることが明らかになった。モリクテス綱は、ツシマヒラタクワガタムシ (*Dorcus titanus castarnicolor*) の幼虫の健康状態と関連していることがわかっている (Kwak et al., 2019)。よって、腸内細菌叢の違いによってメス特異的に生育差が生じる結果はカブトムシ類の幼虫の生育に適した餌であっても、性差に依存する生育メカニズムがあることを示している。

好熱菌発酵産物の給与により、メス特異的成長促進効果と、幼虫の腸内のカリウムイオンの分布が調節された。また、ヤマトカブトムシの幼虫の中腸の pH は 10.7 と高アルカリ条件である事が報告されており (Wada et al., 2014)、ヘラクレスオオカブトムシ幼虫においても中腸管内の pH は9とアルカリ条件下であった。セルロースはアルカリ条件下で可溶化が進むことから (Ishizu, 1973)、カブトムシ類の幼虫の腸管内は餌である木質バイオマスの分解に適した特性を有している事が推測される。好熱菌発酵産物給与区の幼虫の中腸内のカリウムイオン濃度が雌雄に関係なく上昇することにより腐植質の発酵・分解が促進され、その結果未確認の有機酸と思われる、RT-17 が生成される。この未確認の有機酸は、後腸内の宿主または腸内微生物叢によって急速に同化されると考えられる。脂肪体の RNA プロファイルは、幼若ホルモン結合タンパク質 (Juvenile Hormone Binding Protein : JHBP) 遺伝子が対照区と好熱菌発酵産物給与区の両方のオス幼虫、および好熱菌発酵産物給与区のメス幼虫で発現していることを示した。これらの結果は、中腸におけるカリウムイオンの

増加により腐葉土からの栄養源の利用効率が改善された条件下で、メス特異的な幼虫の成長の促進が JHBP 遺伝子の発現の増加と関連していることを示唆している。

昆虫においてプロバイオティクスあるいはプレバイオティクスの給与が性特異的に寿命を伸ばすという報告はいくつかされている (Zou et al., 2009, Wang et al., 2013) が、性特異的に成長促進効果をもたらすという研究内容は私が調べた限りでは確認できなかった。よって昆虫におけるプロバイオティクスの給与による性特異的な影響が生育にも及んでいる可能性があることを示した。好熱菌発酵産物の給与によりどのようなメカニズムで腸管内のカチオンの勾配が変動するのか、JHBP と JH の変動と腸内細菌叢の変動がどのように関連しているのかなど更なる研究が必要であるといえる。

本研究ではヘラクレスオオカブトムシの好熱菌発酵産物によるヘラクレスオオカブトムシ幼虫の成長促進を引き起こす原因について追求していった。ヘラクレスオオカブトムシは日本国内では愛玩動物としての価値があるため、大型の個体を生み出すメカニズムの解明は昆虫ファンのニーズを満たす価値のある個体を安定して生み出すために有益な情報になると考えられる。また本研究の内容を応用し、資源としてカブトムシ類を活用するための生産効率向上においても役立てられる可能性が期待できる。現在養魚の飼料(タンパク源)として一般的に用いられている魚粉(マイワシの乾燥粉末)は高騰し続けているため、養殖魚の値段も高騰している。また、日本におけるマイワシの漁獲量は資源保護の観点から減少の一途を辿っておりピーク時の平成 3 年と比較して平成29年度の漁獲量が 1/10 程度に低下している(農林水産省、2017)。そのため代替飼料として植物由来のタンパク質の研究が進められているが、動物が体外から摂取する必要がある必須アミノ酸のバランスの問題で植物タンパク質だけでは代替するのが厳しい現状である(山本、2010)。現在新たなタンパク源として昆虫タンパクが注目されつつあり、コオロギなど一部の昆虫において研究が進められている。カブト

ムシ類の資源利用の観点より、私はヤマトカブトムシ幼虫 *Trypoxylus dichotomus* の体組成やアミノ酸、脂肪酸組成をケルダール法及び HPLC、ガスクロマトグラフィーによって計測をした(表4、表5、表6)。カブトムシ類幼虫の餌である木質バイオマスは大部分が難消化性多糖でありタンパク質の含有量は少ないのにも関わらず、ヤマトカブトムシ幼虫乾燥粉末はタンパク質が 51%と豊富に存在していた(表4)。養魚飼料のタンパク源となっているマイワシの乾燥重量あたりのタンパク質量は約 60%(日本食品標準成分表)であるが、マイワシは動物性プランクトンをはじめとする動物由来の物を食べるため、カブトムシ類とマイワシの食性を考慮するとカブトムシ類はタンパク源として生産効率が優れていると考えられる。また、植物タンパク質では不足しがちなリジンが豊富に存在していた(表5)これは、代表的な植物タンパク質の一つである小麦の 2.2%(日本食品標準成分表)と比較すると高水準である。脂肪酸組成はオレイン酸及びパルミチン酸が豊富に検出された(表6)が、この脂肪酸組成は肉類に近い値であった(日本食品標準成分表)。よってカブトムシ幼虫をタンパク源として効果的に使用できる可能性がある。実際にマルハニチロ株式会社協力のもとヤマトカブトムシ幼虫乾燥粉末をサクラマスに給付、新江ノ島水族館協力のもとカブトムシ類幼虫乾燥粉末並びに幼虫液状ペーストをカタクチイワシ、ハタハタ、シロギスに給付したところ餌と認識し、摂取していることが観察できた。

カブトムシ幼虫のタンパク源は餌から摂取している可能性を考慮し、餌となるキノコ廃菌床(キノコ栽培後に排出されるおがくずの塊)並びに排出糞の成分分析を実施した。その結果予想と反して、カブトムシ糞の窒素含量は餌となる廃菌床と比較すると減少するどころか増加傾向にあり、土壤中の炭素と窒素の割合を示す C/N 比もカブトムシ糞では減少している(表7、表8)ため、糞中で微生物代謝が活発に行われていることが推測される。さらに、食性が似ているクワガタムシにおいても空気中から窒素固定を行っているという報告がある(蔵之内、2012)。以上を踏まえ、カブトムシの幼虫も同じく大気中の窒素を取り入れ、タンパク質を腸

内細菌、あるいは自身で合成している可能性があると考えられる。このことからカブトムシ幼虫は自然界において朽木やおがくずを栄養源に生育し、窒素源を豊富に含む糞を排出することにより、土壌の栄養分の豊富さを維持し、生態系の安定に対して重要な分解者としての役割を担っていると考えられる(図24)。

カブトムシ類は日本国内では最も一般的な昆虫として広く認知されているが、学術的な知見および昆虫を活用した社会実装の研究両方において他の昆虫と比較すると未だに謎が多く取り残されている。今後はカブトムシ類が生態系においてどのような役割を持つかその見識を深めていく事が必要であると言える。

## 【引用文献】

Ishizu A. Behavior of Carbohydrates to Oxygen-Alkali 1973 Volume 27 Issue 8

Pages 371-377 DOI [https://doi.org/10.2524/jtappij.27.8\\_371](https://doi.org/10.2524/jtappij.27.8_371)

Kwak KW, Lee H, Park K, Kim E, Han MS, Kim N, Kim YS. Preliminary identification of gut microbes between normal and diseased *Dorcus titanus castanicolor* (Coleoptera: Lucanidae). *Int J Indust Entomol.* 2019 39: 45–53

Wada N, Sunairi M, Anzai H, Iwata R, Yamane A, Nakajima M.

Glycolytic Activities in the Larval Digestive Tract of *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera: Scarabaeidae).

*Insects.* 2014 May 5;5(2):351-63. doi: 10.3390/insects5020351. PMID: 26462688;

PMCID: PMC4592593.

Wang C, Wheeler CT, Alberico T, Sun X, Seeberger J, Laslo M, Spangler E, Kern B, de Cabo R, Zou S. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr).* 2013

Feb;35(1):69-81. doi: 10.1007/s11357-011-9332-3. Epub 2011 Nov 16. PMID:

22083438; PMCID: PMC3543742.

Zou S, Carey JR, Liedo P, Ingram DK, Müller HG, Wang JL, Yao F, Yu B, Zhou A.  
The prolongevity effect of resveratrol depends on dietary composition and calorie  
intake in a tephritid fruit fly. *Exp Gerontol.* 2009 Jun-Jul;44(6-7):472-6. doi:  
10.1016/j.exger.2009.02.011. Epub 2009 Mar 3. PMID: 19264118; PMCID:  
PMC3044489.

藏之内利和

クワガタムシにおける空中窒素利用の可能性 里山の人気者は物質循環の立役者  
公共財団法人日本農芸化学会 Vol.50 No.6 Page. 400 - 401 (2012 年)

山本剛史

養殖用飼料における植物性原料の利用性とその改善に関する研究  
*Nippon Suisan Gakkaishi* 76(3), 344-347 (2010)

日本食品成分表 2020

JANコード/ISBNコード:9784263707500

養殖業の持続的発展

水産白書 平成 25 年

農林水産省

[https://www.jfa.maff.go.jp/e/annual\\_report/2013/pdf/25suisan1-1-1.pdf](https://www.jfa.maff.go.jp/e/annual_report/2013/pdf/25suisan1-1-1.pdf)

## 【図表一覧】



図 24 カブトムシ幼虫の生態系における位置づけ

表4 *Trypoxylus dichotomus* の幼虫の栄養成分の割合

	分析値(%)
粗蛋白	51
粗脂肪	12.2
粗灰分	6.1
水分	17

表5 *Trypoxylus dichotomus* の 3 齢幼虫のアミノ酸組成

	アミノ酸組成 (%)
アスパラギン酸	9.1
グルタミン酸	15.4
セリン	7.1
ヒスチジン	2.7
グリシン	6.4
トレオニン	5.4
アルギニン	4.8
アラニン	6.6
チロシン	8.5
システイン	0.6
バリン	0.4
メチオニン	0.7
フェニルアラニン	4.2
イソロイシン	5.1
ロイシン	7.3
リジン	5.9
プロリン	9.9

表6 *Trypoxylus dichotomus* の 3 齢幼虫の脂肪酸組成

脂肪酸	カブトムシ幼虫 ヘキサン抽出	カブトムシ幼虫 エタノール抽出	参考 たばこ葉
16:0(パルミチン酸)	34.2	20.3	14.5
16:1(パルミオレイン酸)	12.8	12	2.5
16:2	0.3	0.4	0.9
16:3	0	0.4	8.5
18:0(ステアリン酸)	2.4	6.4	2.3
18:1(オレイン酸)	46.1	43.9	2
18:2(リノール酸)	4.2	16.2	6.5
18:3( $\alpha$ -リノレン酸)	0	0.3	62.8

表7 廃菌床の成分分析値

	数値	単位
灰分	13.8	%
pH	5.9	-
電気伝導率	1.53	mS/cm
窒素全量(N)	2.56	%
リン酸全量(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	2.94	%
加里全量(K <sub>2</sub> O)	1.28	%
石灰全量(CaO)	3.8	%
苦土全量(MgO)	1.18	%
C/N 比	13	-

表8 カブトムシ糞の成分分析値

	数値	単位
灰分	13.65	%
pH	6.4	-
電気伝導率	2.18	mS/cm
窒素全量(N)	2.78	%
リン酸全量(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	2.78	%
加里全量(K <sub>2</sub> O)	1.41	%
石灰全量(CaO)	3.42	%
苦土全量(MgO)	1.01	%
C/N 比	11	-

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、興味深い研究テーマと充実した環境を与えてくださり、たくさんのご迷惑をかけながらも私のことを最後まで見放さずに手厚くご指導を賜りました児玉浩明教授、並びに時には厳しく、時には私のことを叱咤激励してくださり優しく見守ってくださった宮本浩邦連携客員教授、トランスクリプトームデータ解析を始め私が苦手意識を持つドライな実験に対して全面的にサポートしていただき、ルーズな日常生活を送る私に対して我が子のようにご指導、ご注意をしていただいた宮原平講師に深く感謝いたします。また、6年半にわたり研修生として私を引き受け、恵まれた環境にて研究をさせていただき、次世代シーケンサーによる解析など実験にご協力いただきました理化学研究所総合生命医科学研究センター粘膜炎システム研究グループ大野博司グループディレクター、加藤完研究員、テクニカルスタッフの朝倉三貴様、新奈緒子様、環境資源科学研究センターバイオマス研究基盤チーム守屋繁晴専任研究員、環境代謝分析研究チーム坪井亜里沙客員研究員、並びに理化学研究所および横浜私立大学生命医科学研究科生命医科学専攻細胞医科学部門免疫生物学研究室（鶴見キャンパス）の皆様、株式会社サーマステクニカルスタッフの石井千歳様、辻直子様、中熊映乃様、松浦真紀子様、皆様、ケルダール法による粗タンパク質の定量にご協力していただいた食品栄養学研究室の江頭祐嘉合教授、藤盛萌夏様、カブトムシ幼虫飼料の成分分析、並びに幼虫飼料給付試験にご協力していただいたマルハニチロ株式会社の森脇俊尚様、新江ノ島水族館の北田貢様、スタッフの皆様、木耳バガス廃菌床の提供にご協力していただいた日本リファイン株式会社の坪井誠様、濱本祥吾様、皆様、椎茸おがくず廃菌床の提供にご協力していただいた高橋きこの園の高橋夏樹様に心より深くお礼申し上げます。また、9年間ご指導賜りました園芸学研究科の先生方、卒業・修了された先輩方を含む生物化学研究室の皆様には、研究だけでなく様々な面において見守り支えていただきました。最後に9年間学びの環境を与えてくださり、私を育ててくれた両親に心より深く感謝し、御礼申し上げます。