

休眠越冬を行うエゾシロチョウ *Aporia crataegi adherbal* の中腸あるいは その周辺組織に定着・保持された細菌および食草由来葉緑体の解析

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 清水 俊宏

1. はじめに

北海道固有種であるエゾシロチョウ (*Aporia crataegi adherbal*) は、リンゴやナシなどのバラ科植物木本類を食草とし、重篤な食害をもたらす。また、幼虫は集団で糸を吐いて葉を丸めたシェルターをつくり、2~3 齢幼虫として越冬する。エゾシロチョウの幼虫を飼育する際、人工餌に凍結リンゴ葉粉末を添加して初めて摂食と生育が促進されることが観察された。食草植物選択に腸内共生微生物が関与する例が報告されていることから、エゾシロチョウの摂食選好性と虫体の成長持続にはリンゴ葉に含まれる化学物質に加え、細胞内共生細菌や中腸内細菌叢が深く関係しているのではないかと考えた。本研究では 1) 幼虫・成虫個体の腸内細菌叢を PCR-DGGE および次世代シーケンサー (NGS) によって解析し、生育ステージ別に菌叢の特徴を比較した。さらに実験過程で、1 週間以上の絶食下に置いた 2 齢幼虫群中腸から回収した DNA に葉緑体が高比率で存在することを偶然見出し、これが食草として用いた *Malus* 属 (バラ科) 由来のものであることを確認した。そこで 2) 中腸あるいはその周辺組織に保持された食草由来葉緑体の探索を試みた。

2. 方法

1) 北大第一農場 (2017~2019 年, 4 月~12 月) で捕獲したエゾシロチョウの卵・幼虫・蛹・成虫虫体を表面殺菌し、全個体の中腸に加え、メス成虫では卵巣内未熟卵、オス成虫では精管を無菌的に取り出し、それぞれ DNA を回収した。これら DNA をテンプレートとして細菌 16S rRNA 用ユニバーサルプライマーで得た PCR 増幅産物について、DGGE および NGS 法による菌叢解析を行った。

2) 同様に捕獲したエゾシロチョウ幼虫の腸管および周辺組織を取り出した後、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて赤色自家蛍光を持つ構造体の観察およびその蛍光スペクトル計測を行った。

3. 結果と考察

1) 農業害虫である鱗翅目幼虫ヨウトウガやタバコスズメガの腸内微生物叢が多く調査されているが、今回初めてエゾシロチョウの腸内細菌叢を生育ステージ別に解析することができた。幼虫、成虫とも、検出されたそのほとんどが土壌および植物圏に存在する普遍菌、宿主にとって病原体となり得る細菌であった。これらは幼虫および成虫が摂食した食餌由来のものであると考えられ、エゾシロチョウは腸内常在細菌に依存していないことが示唆された。一方で、生殖器官細胞内の共生細菌である *Wolbachia* 属細菌も検出された。他の鱗翅目シルビアシジミにおいて食草転換に *Wolbachia* が関与している例があることから、この細菌が寄主植物選択に関与しているかどうかの検証を行う必要がある。

2) 蛍光顕微鏡観察により、この赤色自家蛍光を持つ球形構造体は主に幼虫の中腸後部と繋がるマルピーギ管内に存在することが示された。この球状構造体の蛍光スペクトルはクロロフィルのそれと類似していたことから、食草の葉緑体由来と考えられた。これまでにマルピーギ管内の葉緑体構造物に関する報告例はないことから、これは幼虫期に休眠越冬するエゾシロチョウに特徴的な現象であり、休眠時の個体維持に何らかの機能を有している可能性が示唆される。