

〔報告〕 歴史的木造建造物を加害するオオナガシバンムシ幼虫のセルラーゼ活性について

木川 りか・雪 真弘*・佐藤 嘉則・遠藤 力也*²・小峰 幸夫
原田 正彦*³・大熊 盛也*^{1,2}

1. はじめに

2008年、栃木県日光市にある輪王寺の三仏堂（本堂・国指定重要文化財）において、解体修理中の部材にオオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* による被害が確認された^{1,2)}。さらに、2010年に日光の木造建造物約70棟において捕虫テープ（ハエ取り紙）を用いた大規模な昆虫調査によって、この昆虫はこの地域における木造建造物を加害する主要な数種類のシバンムシのうちの一つであることが明らかになった³⁻⁵⁾。これらのシバンムシ類は日光の歴史的建造物をとりまく屋外環境に棲息すると推察されている^{4,5)}。

オオナガシバンムシの被害では、辺材のみならず硬い心材までが粉状にぼろぼろにされ、被害材は部材としての強度をほぼ失ってしまう（図1）^{1, 6-8)}。このような激甚な被害を及ぼす木材害虫の例としては他にシロアリがよく知られており、シロアリの被害ではセルロースを分解する酵素（セルラーゼ）などの作用により木材の構成成分が顕著に分解され、年輪にそって木材がほぼ空洞化する状況になることが知られている⁹⁻¹¹⁾。このような木材成分の分解過程には、シロアリの腸管に共生する微生物が産生するセルラーゼが関与していることがかなり前から知られているが^{10,11)}、近年の研究によって、シロアリ自身もセルラーゼ遺伝子を有しており、唾液腺からセルラーゼを分泌していることが明らかにされている^{12,13)}。さらに、シロアリ以外にも、木材害虫のカミキリムシ類の一種や、セルロース性の材質を加害するゴキブリ類のなかにも昆虫自身のゲノムにセルラーゼの遺伝子を有するものがあることがわかってきている¹⁴⁾。

そこで、本研究では、歴史的建造物の心材を顕著に加害するオオナガシバンムシが、シロアリのようにセルラーゼなどの酵素を使って木材成分を分解しているのではないかと考え、オオナガシバンムシの幼虫のセルラーゼ活性を調査した。その結果、少なくとも木材を加害している期間の幼虫については、有意にセルラーゼ活性が検出されることがわかったので報告する。

2. 材料と方法

2-1. 供試虫

オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* の幼虫は、2013年4月に日光山輪王寺三仏堂の被害材から虫粉を振り落としのち、回収したものを使用した。オオナガシバンムシは、例年6月ごろ羽化することが判明している²⁻⁵⁾。したがって、実験を行った2013年4月16日、および同年5月21日に用いた幼虫は、それぞれ終齢幼虫に近いか、蛹化直前の個体と考えられる。4月中旬の個体は、まだ活発に動いており、体色は白色であったが、5月下旬の大型の個体は体色が黄色味を帯びてきており、ほとんど動かないものが多かった。

また、活性を比較するために、強いセルラーゼ活性を有する昆虫として、オオシロアリ

*理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム *²理化学研究所 バイオリソースセンター

*³(公財)日光社寺文化財保存会

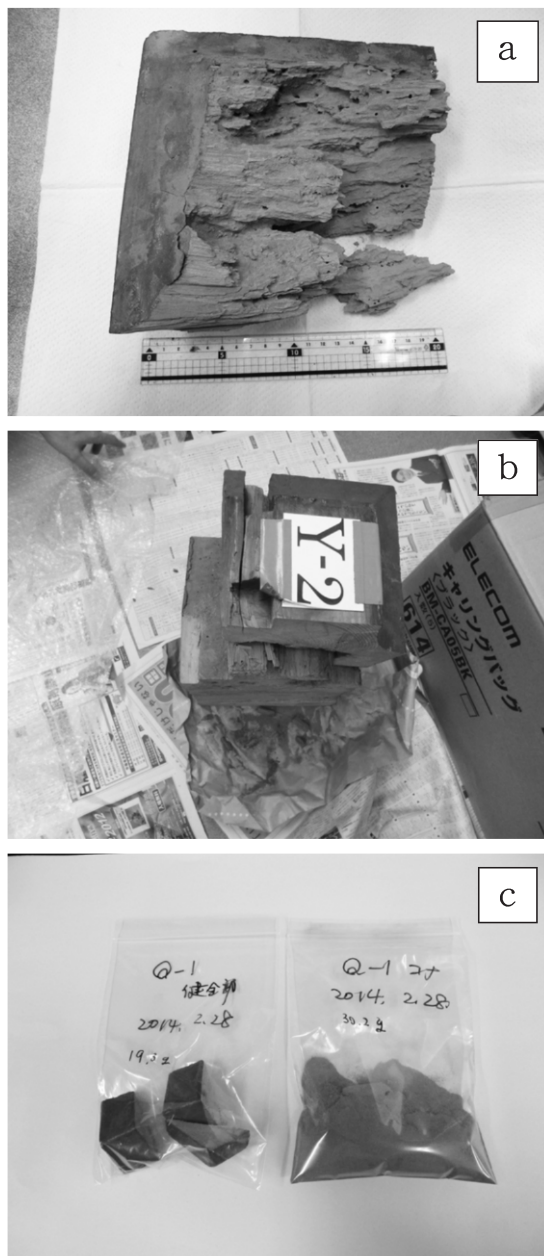


図1 オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* の被害材の例 (a: Q-1, b: Y-2) および採取した健全部分と虫損部木粉の例 (c)

硬い部材が激甚に加害され、加害されて粉状になる。粉がつまっている部分では部材の強度がほとんどなくなっている。

Hodotermopsis sjostedti の職蟻を使用した。

そのほか一般には木材を加害しない文化財害虫として、タバコシバンムシ *Lasioderma sericorne* 幼虫および成虫、ヒメカツオブシムシ *Attagenus japonicus* 幼虫、ヒメマルカツオブシムシ *Anthrenus verbasci* 成虫についてもセルラーゼ活性の測定を試みた。

2-2. セルラーゼ活性の測定

<供試虫の粗抽出液の調製>

オオナガシバンムシ幼虫, オオシロアリ職蟻, ヒメカツオブシムシ幼虫については, 各々の供試虫を1個体ずつ, 体積が小さいタバコシバンムシの幼虫, 成虫, ヒメマルカツオブシムシ成虫については2個体ずつを滅菌した精製水で洗ったのち, オートクレーブで滅菌した乳鉢の中に入れ, 液体窒素を加えて急速に凍結させ, 乳棒ですり潰した。そののち, プロテアーゼ阻害剤 (Protease Inhibitor, Cocktail, EDTA free ナカライテスク) を1/100容量加えた100mM 酢酸バッファー (pH5.5) 200 μ l を加えてよく氷上で攪拌し, 14,000rpm, 10分, 4 $^{\circ}$ Cで遠心し, 上清を回収して粗抽出液とした。

<粗抽出液のタンパク質量>

各々の粗抽出液について, 原液, 10倍希釈用液, 100倍希釈用液をそれぞれ5 μ l用意し, それぞれをDCプロテインアッセイキット (Bio-Rad) により反応を行い, 分光光度計 (Beckman DU800) で750nmの吸光度を測定することにより, タンパク質濃度の定量を行った。なお, 検量線は, BSA (Bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン) を用い, 0~1.5ng/mlの濃度のなかで6点を測定して作成した。

<粗抽出液のセルラーゼ等酵素活性測定のための基質>

セルロース等を分解する酵素には多くの種類があるが, 今回は主に3種類の酵素活性を調査するために, 以下のような基質を使用した。

非結晶性セルロースとして carboxymethyl cellulose (CMC) : 結晶構造をとっていない可溶性セルロースで, 反応性が高いため, セルラーゼの活性があるかどうかを判定する際に使用する。ここでは, 2% CMC sodium salt (ナカライテスク) を100mM 酢酸バッファー (pH5.5) に溶かしたものを使用した。CMCを分解し, 還元糖を生成する酵素をここでは総称して, CMCaseと呼ぶ。

ヘミセルロースの主成分としてキシラン (xylan) : 植物の細胞壁に存在するヘミセルロースの主成分であるキシランを分解する酵素の活性を判定するために使用する。ここでは, 3%キシラン (ブナ由来, ナカライテスク) を100mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH5.5) に溶かしたものを使用した。キシランを分解し, 還元糖を生成する酵素をキシラナーゼ (xylanase) と呼ぶ。

結晶性セルロースの分解に関わる酵素活性をみる基質としての pNP- β -cellobioside : 一般に, 結晶性セルロースのほうが, 非結晶性のものよりも分解されにくい。ここでは, 5mM 4-Nitrophenyl β -D-cellobioside (pNP-G2) (東京化成工業株式会社) を基質として使用した。結晶性セルロースを分解する酵素を総称して, cellobiohydrolaseと呼ぶ。

<酵素反応で生成する還元糖量の測定>

CMCを基質にした場合: 2% CMC100 μ l, 昆虫粗抽出液50 μ l, 500mM 酢酸バッファー (pH5.5) 20 μ l, 滅菌精製水30 μ l を氷上で混合し, 総量200 μ lの反応液を調整した。その後, 37 $^{\circ}$ Cで所定の時間反応をさせ, 経時的に50 μ lずつを回収し, 氷上で3,5-ジニトロサリチル酸 (DNS) (東京化成工業株式会社) 溶液*を100 μ l加えて100 $^{\circ}$ Cで5分間熱して酵素反応を停止させた。その溶液を氷上で5分間静置したのち, 滅菌精製水を450 μ l加えて混合し, 10分間静置したのち, 分光光度計 (Beckman DU800) にて540nmの吸光度を測定した。反応のブランクとして, 反

応0時間の反応液の吸光度を測定し、所定時間反応後の反応液の吸光度から差し引いた値を吸光度の増加分とみなした。

グルコース溶液を0.125~2.500mg/mlの範囲で6点作成し、濃度0の溶液を加えた7点で検量線を作成し、生成した還元糖量を決定した。

* DNS 溶液は0.5M 水酸化ナトリウム水溶液40mlに DNS 0.25g を加え溶解させ、酒石酸カリウムナトリウム 4水和物15.0g を加えてさらに溶解させたのち、50ml にメスアップし、調製した。

キシランを基質にした場合：上記の CMC 溶液のかわりに、3%キシラン溶液100 μ l を使用し、CMC の場合と同様に、酵素反応をさせたのち生成した還元等量を測定した。

pNP-G2を基質にした場合：5mM pNP-G2溶液40 μ l、昆虫粗抽出液50 μ l、500mM 酢酸バッファ-20 μ l、滅菌精製水90 μ l を氷上で混合し、総量200 μ l の反応液を調整した。37°C で所定の時間（30分間）反応をさせたのち、1M 炭酸ナトリウム200 μ l を加え、分光光度計（Beckman DU800）にて410nm の吸光度を測定し、生成した *p*-ニトロフェノール (pNP) の量を測定した。なお、検量線は pNP 標準液を用いて作成した。

<比活性の算出>

CMCase 活性は、酵素液 1 ml が1分間に 1 μ mol の還元糖を生成する酵素量を 1 U として定義し、同様に、xylanase 活性は、酵素液 1 ml が 1 分間に 1 μ mol のキシロースを生成する酵素量、cellobiohydrolase 活性は、酵素液 1 ml が 1 分間に 1 μ mol の pNP を生成する酵素量をそれぞれ 1 U として定義する。比活性は、昆虫の粗抽出液のタンパク質濃度を測定したのち、単位タンパク質量 (mg) あたりの酵素活性 (U/mg) として示した。

<CMC プレートを使った活性測定>

CMC プレート (50mM 酢酸バッファ (pH5.5), 1.5% agar, 1% CMC) 上に昆虫由来の各部位をのせ、37°C で 1 晩静置した。その後、各部位を取り除き、グルコース CII-テストワコー 10ml (Wako) をプレートに加え、37°C で 5 分間反応させたのち、液を取り除き、写真撮影を行った。

2-3. 健全材および被害部木粉の結晶性セルロース含量の測定

<試料>

オオナガシバンムシに加害された部材 (Q-1, Y-2) から、虫に加害されていない健全部と、虫損部の木粉をそれぞれ採取し (図 1 c に例を示す)、単位重量あたりの結晶性セルロースの量を定量した。使用した試料は以下の 5 通りである。

健全部試料 Q-1-H

健全部試料 Y-2-H

虫損部木粉 Q-1-P

虫損部木粉 Y-2-1

虫損部木粉 Y-2-2

<測定方法>

Foster ら (2010)¹⁵⁾および Updegraff (1969)¹⁶⁾の方法を改変して以下の方法で行った。

・絶乾重量の測定：試料約500mg をあらかじめ秤量したふた付きガラス試験管に入れ、

105°Cで4時間乾燥した。デシケーター内で室温に戻した後、秤量した。

- ・脱脂：絶乾試料約500mgに70%エタノール20mlで2時間、メタノール・クロロホルム混液（1：1，体積比）20mlで4時間，順に抽出した。アセトンで洗浄した後，105°Cで4時間乾燥し秤量した。脱脂処理前後の絶乾重量の差を抽出成分量とした。
- ・除デンプン処理：脱脂済試料約1gを105°Cで4時間乾燥し，秤量した。0.1M酢酸バッファー（pH5.0）15mlを加え，80°Cで20分間保持した。室温まで冷却した後，0.01%アジ化ナトリウム700 μ l， α -アミラーゼ（Sigma，A-3403）250 μ lを加えた（脱脂試料1gあたり5000Uに相当）。室温で2日間振とう機で攪拌し，除デンプンした。沸騰水中で10分間保持して酵素反応を停止した後，脱イオン水で3回，アセトンで1回洗浄した。105°Cで4時間乾燥し秤量した。
- ・Updegraff 処理および結晶性セルロースの酸加水分解
Updegraff 試薬（硝酸：酢酸：水＝1：2：8，体積比）を用いて脱脂済試料を分解した。この処理により非結晶性多糖類および大部分のリグニンが可溶化し，結晶性セルロースと一部のリグニンが不溶性沈殿として残る。
脱脂済試料約10mgにUpdegraff 試薬1mlを加え，121°Cで30分間加熱した。脱イオン水で1回，アセトンで3回洗浄した後，室温で一晩乾燥した。72wt%硫酸175 μ lを加え，室温で30分間加水分解した。攪拌した後さらに室温で15分間加水分解した。反応終了後，脱イオン水825 μ lを加えた。
- ・アンスロン硫酸法によるグルコース量の定量
加水分解後の試料を脱イオン水で200倍希釈した。希釈した試料および標準グルコース溶液（5～40 μ g/mlグルコース）200 μ lにアンスロン試薬（2%アンスロンを濃硫酸に溶解したもの）400 μ lを静かに加えた。攪拌した後，80°Cで30分間加熱し，反応させた。反応終了後ただちに流水で冷却し，分光光度計で625nmの吸光度を測定した。標準グルコース溶液の吸光度から検量線を作成した。

3. 結果

3-1. オオナガシバンムシ幼虫のセルラーゼ活性の有無の予備的検討

CMC，およびキシランの分解の程度を還元糖量を測定することによって調べた（2013年4月16日）。30分と，2時間50分後の結果を測定し，経時的に還元糖の量が増えるかどうかをみることによって，セルラーゼ（この場合はCMCase）およびキシラナーゼの活性の有無を調べた。その結果を図2a，bに示す。

オオシロアリ1個体の抽出液の場合と比較すると，全体に活性は弱いものの，オオシロアリよりは体積の小さいオオナガシバンムシの幼虫1匹の抽出液でも有意にCMCase，およびキシラナーゼの活性が検出された。

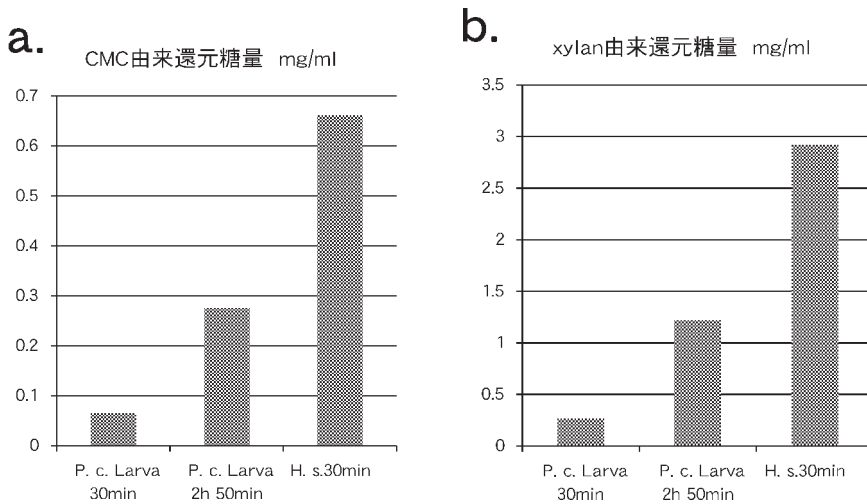


図2 オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* (P.c.) 幼虫, オオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* (H.s.) 職蟻の粗抽出液の CMC, キシランの分解活性 (2013年4月16日に測定実施)
a. CMCの分解に由来する還元糖量 (mg/ml)
b. キシランの分解に由来する還元糖量 (mg/ml)

3-2. オオナガシバンムシ幼虫のセルラーゼ活性の測定

オオナガシバンムシ幼虫, オオシロアリ職蟻3個体ずつについて, それぞれ1個体ずつから独立に粗抽出液を調製し, その1/4容量を使って, それぞれ CMC, キシラン, pNP-G2を基質として30分間の分解活性を測定した(2013年4月16日)。その結果について, それぞれの酵素活性を比活性として示した結果を図3 a~c に示す。

CMC, キシランについては, 非常に強い酵素活性をもつオオシロアリ職蟻と比較すると, それらを分解する酵素活性は弱いものの, オオナガシバンムシ3個体でも, 有意に活性が検出された(図3 a, b)。

一方で, 興味深いことには, 結晶性セルロースの分解に重要とされるセロビオヒドロラーゼの活性に相当する pNP-G2を基質とした場合の活性は, オオシロアリと同等以上の比活性が検出された(図3 c)。このことは, オオナガシバンムシが硬い心材でもぼろぼろに食害することと関連する可能性も考えられる。

なお, より活発に動いていたオオナガシバンムシ幼虫の個体(Larva 1)では, 元気がなくあまり動かない幼虫の個体よりも, 全般に高い酵素活性が検出される傾向がみられた。

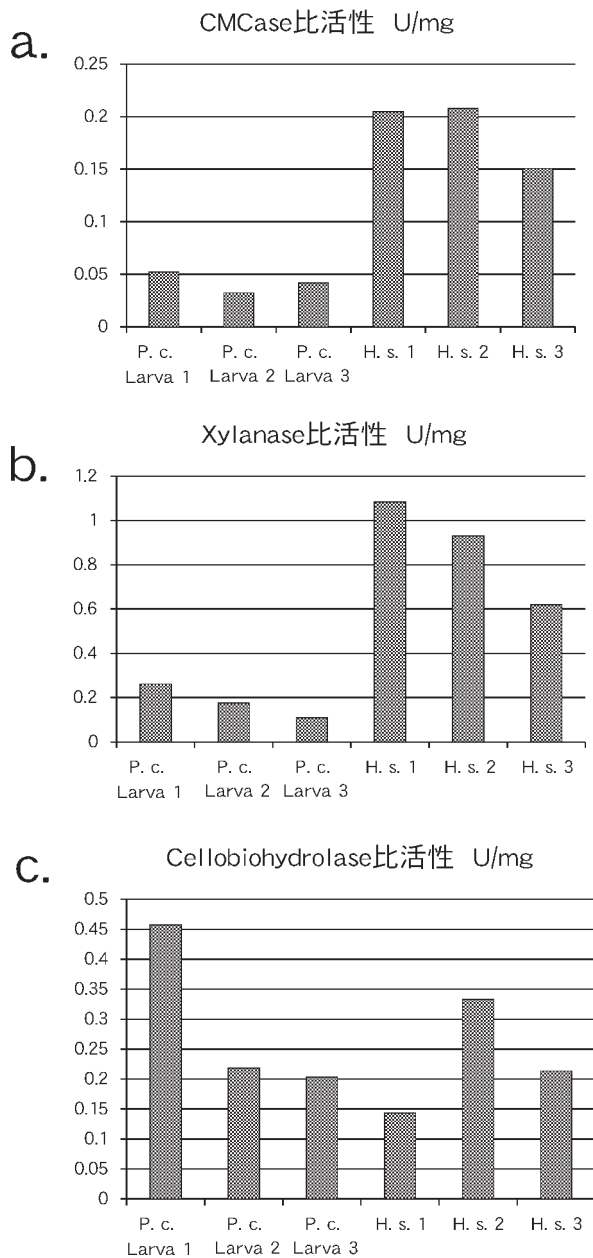


図3 オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* (P.c.) 幼虫, オオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* (H.s.) 職蟻の粗抽出液の CMCase, キシラナーゼ, cellobiohydrolase の比活性 (2013年4月16日に測定実施)

- a. CMCase の比活性 (U/mg)
- b. キシラナーゼの比活性 (U/mg)
- c. cellobiohydrolase の比活性 (U/mg)

3-3. そのほかの文化財害虫のセルラーゼ活性の調査

一般には木材を加害しない文化財害虫として、タバコシバンムシ(幼虫および成虫)、ヒメカツオブシムシ(幼虫)、ヒメマルカツオブシムシ(成虫)についてもセルラーゼ活性の測定を試みた。

一個体の体積の小さいタバコシバンムシ幼虫、成虫、ヒメマルカツオブシムシ成虫については2個体ずつから3回独立に合計6個体を使って3回の測定を実施し、ヒメカツオブシムシ幼虫については1個体ずつを3回独立に合計3個体を使って3回の測定を実施した。

一方、オオナガシバンムシ幼虫については、2013年5月21日に実施した測定の時点で入手できた個体のうち、体色がまだ白色でよく動いていたオオナガシバンムシの幼虫1個体、および蛹化する直前と考えられ、黄色化してほとんど動かなくなったオオナガシバンムシの幼虫2個体を用いて測定を実施した。

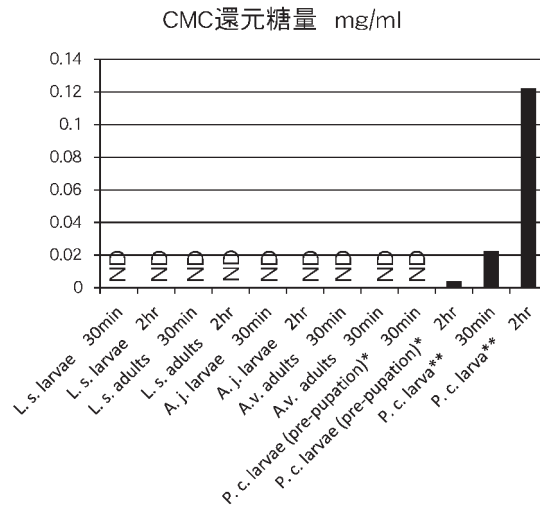
各々調製した粗抽出液の1/8容量を使用し、酵素反応を開始して、30分後、2時間後のCMCあるいはキシランの分解によって生成した還元糖量を測定した(図4)。

タバコシバンムシ幼虫および成虫、ヒメカツオブシムシ幼虫、ヒメマルカツオブシムシ成虫については、独立に調製した3粗抽出液の各測定結果の平均を示した。CMCの有意な分解活性は、いずれについても検出されず(図4a, ND)、キシランについてもごく少量の分解がみられたただけであった(図4b)。

一方、実験を実施した2013年5月21日の時点で、体色がまだ白色でよく動いていたオオナガシバンムシの幼虫1個体(図4, P. c. larva**)については、図2、図3の実験と同様に明らかなCMC、キシランの分解が検出された。

これに対し、この実験を実施した2013年5月21日の時点で、蛹化する直前と考えられ、体色が黄色に変化し、表皮が硬化してほとんど動かなくなったオオナガシバンムシの幼虫2個体(図4, P. c. larvae (pre-pupation)*)では、明らかなセルラーゼやキシラナーゼの活性が検出されなかった。このことから、オオナガシバンムシの幼虫が蛹化する前には、これらの酵素活性が非常に低下する可能性が示唆される。

a.



b.

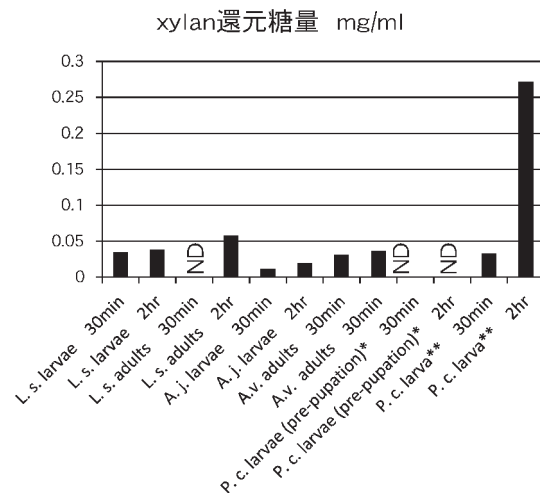


図4 各供試虫の粗抽出液のCMC，キシランの分解活性（2013年5月21日に測定実施）
CMCの分解に由来する還元糖量（mg/ml）
キシランの分解に由来する還元糖量（mg/ml）

ND：反応時間0のときの吸光度をブランクとして値が0以下になった場合を「検出されず」（ND）として示した。larvae, larva：幼虫，adults：成虫

タバコシバンムシ *Lasioderma serricorne* (L. s.) 幼虫および成虫，ヒメカツオブシムシ *Attagenus japonicus* (A. j.) 幼虫，ヒメマルカツオブシムシ *Anthrenus verbasci* (A. v.) 成虫：粗抽出液3つの測定値の平均値を示す。

*オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* (P. c.) 幼虫：蛹化前の2個体の各粗抽出液の平均値を示す。

**オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* (P. c.) 幼虫：まだ体色が白く，活動している1個体の粗抽出液の測定値を示す。

3-4. CMC プレートによるオオナガシバンムシ幼虫の部位ごとのセルラーゼ活性の調査

図5は、2013年4月16日の時点で、体色がまだ白色で、活発に動き回っているオオナガシバンムシの幼虫1個体から消化管を摘出し、部位ごとにCMCプレートにのせて、CMCを分解する活性をおおまかに調べたものである。この幼虫は、ある程度動いていたものの、解剖をすると、ほとんど消化管のなかには食物は入っておらず、空の状態であった。ただ、このような状態でも、少なくとも幼虫の消化管のなかで前胃の部位(図5、スポット2)では、有意にセルラーゼ活性が見いだされ、頭部とその後部の消化管でも若干の活性があることが示唆された。

ただし、ここで示したのは、あくまで1個体の調査結果であり、前項でみたように、幼虫の成長段階や幼虫の活発度、消化管が食べ物でどの程度満たされているか、によっても結果は異なってくる可能性はある。

3-5. 部材の健全部と虫損部木粉の成分の調査

オオナガシバンムシに加害された部材(Q-1, Y-2)(図1)から、虫に加害されていない健全部と、虫損部の木粉をそれぞれ採取し、単位絶乾重量あたりの結晶性セルロースの量を定量した。表1には、各試料について絶乾重量1mgあたりの有機溶媒抽出成分および結晶性セルロースの測定値を示し、図6には結晶性セルロース量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 絶乾試料)を示す。

絶乾重量1mgあたりの結晶性セルロース含量の測定結果について、健全部と虫損部の粉状部分を比較すると、全体量としてみると、粉状になっている部位で激減しているというわけではないものの、虫損部の木粉部分のほうが、結晶性セルロース含量の測定値として明らかに小さい値が出ている。このことから、虫損部の木粉には、未消化の結晶性セルロースがかなり含まれるものの、部分的には結晶性セルロースが減少していると推測され、オオナガシバンムシ

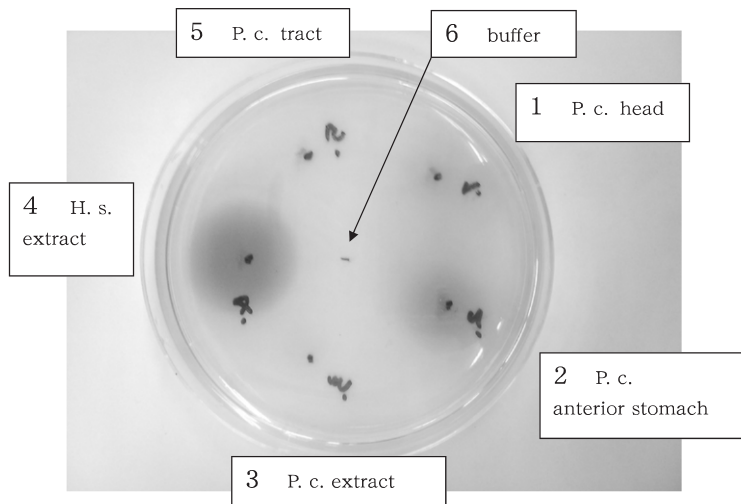


図5 CMCプレートによる部位別セルラーゼ活性試験(2013年4月16日実施)

オオナガシバンムシ(P.c.)幼虫1個体を解剖し、以下の部位別にCMCを含むプレートにのせた。1.頭部、2.前胃、3.オオナガシバンムシ幼虫粗抽出液 $5\mu\text{l}$ (図2の個体の粗抽出液の1/40容量)、4.オオシロアリ(H.s.)職蟻粗抽出液 $5\mu\text{l}$ (図2の個体の粗抽出液の1/40容量)、5.前胃よりも後部の消化管、6.緩衝液 $5\mu\text{l}$ (陰性対照)

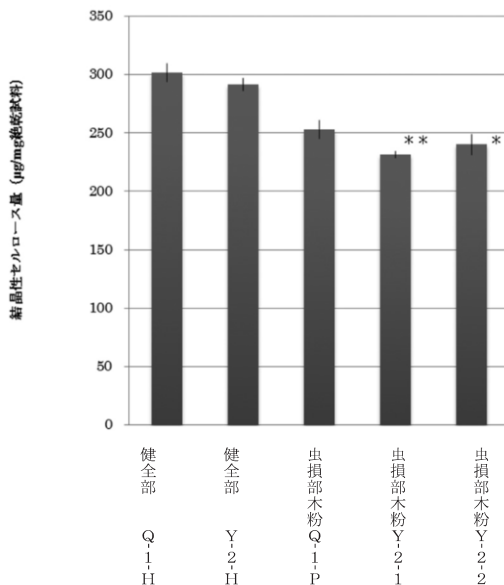


図6 オオナガシバンムシに加害された部材の健全部分と虫損部木粉部分の単位絶乾重量あたりの結晶性セルロース含量

値は3測定の平均値±標準誤差

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (スチューデントの t 検定)

幼虫にセルラーゼ活性が存在するという前項までのデータを支持するものと思われる。

未消化の結晶性セルロースが木粉に含まれる理由については、次節で考察する。

4. 考察

オオナガシバンムシについては、人工的な飼育方法が確立されておらず、幼虫は建造物の被害材から集めてくるしかなかったため、今回調査できる幼虫の個体数には限りがあった。十分に実験を反復するだけの個体数を得ることが難しかったため、今回の結果は、あくまでも、ある条件下でのオオナガシバンムシの幼虫を調べた結果、このような現象が見いだされたという報告にとどまる。

限られた個体数での調査ではあったが、今回の実験によって活発に動いているオオナガシバンムシ幼虫の個体では、セルロースやヘミセルロースを分解する酵素の活性が有意に見いださ

表1 オオナガシバンムシに加害された部材の健全部分と虫損部木粉部分の有機溶媒抽出成分および結晶性セルロース含量 (単位絶乾重量 1 mg あたり)

	有機溶媒抽出成分 (μg/mg)	結晶性セルロース (μg/mg)
健全部 Q-1-H	0.0503 ± 0.0018	302 ± 7.8
健全部 Y-2-H	0.0614 ± 0.0014	291 ± 5.4
虫損部虫粉 Q-1-P	0.0973 ± 0.0006	253 ± 7.7
虫損部虫粉 Y-2-1	0.0874 ± 0.0018**	231 ± 2.9**
虫損部虫粉 Y-2-2	0.0862 ± 0.0035*	240 ± 9.0*

値は3測定 of 平均値±標準誤差

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (スチューデントの t 検定)

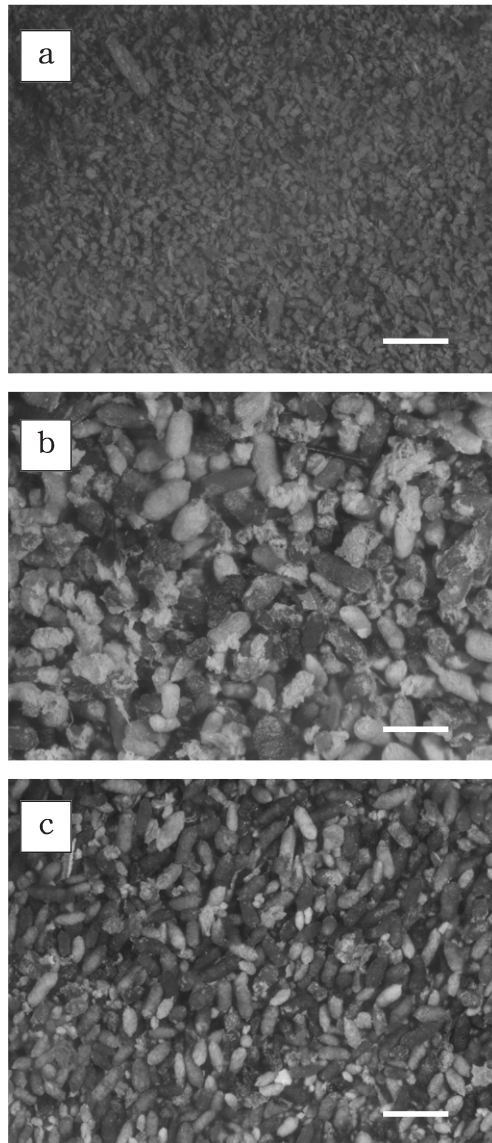


図7 オオナガシバンムシ *Priobium cylindricum* に加害された部材の木粉(a)と、クロトサカシバンムシ *Trichodesma japonicum* の被害による木粉(b)、ケブカシバンムシ *Nicobium hirtum* の被害による木粉(c)の顕微鏡観察像
バーはいずれも1mm。

れた。活発な幼虫では全般に酵素活性も強い傾向がみられ、非常に活発に動いていた図3のオオナガシバンムシ幼虫 Larva 1として示された個体では、検出された酵素活性も全般に高かったのに対し、やや動きが不活発な個体(図3の幼虫 Larva2, 3)では、酵素活性が低い傾向がみられた。さらには、蛹化する直前と考えられる、体色が白色から黄色がかった体色に変化し、表面も硬くなり、ほとんど動かなくなった幼虫の個体(図4のオオナガシバンムシ larvae (pre-pupation), 2個体)では、ほとんど有意なセルラーゼ活性が検出されなかった。

以上のように、少なくとも木材を加害し、活発に活動している時期のオオナガシバンムシの

幼虫からは、有意にセルラーゼ活性が検出されたことから、木材を加害している最中のオオナガシバンムシの幼虫では、酵素を使って効率よくセルロースやヘミセルロースを分解している可能性が示唆される。その一方で、蛹化前など、木材を消化していない状態ではその活性は下がると推察される。

また、オオナガシバンムシに加害された部材2つについて、加害を受けていない健全な部分と、虫損を箇所から回収した木粉部分について、単位絶乾重量あたりの結晶性セルロースの含量を測定したところ、結晶性セルロースの含量は虫損部木粉部分では、隣接する健全部分よりも減少していた。しかし、その減少量は限定的であり、かなりの量の結晶性セルロースが残っているという結果が得られた。

この理由としては、(1) オオナガシバンムシによる被害で出る木粉がすべてこの虫の消化管を経由しているかどうかわからない(かじっても一部を吐き出している可能性)、(2) 消化管を通過していたとしても、成長に必要な量以上に木をかじり吞み込んで排出している可能性、(3) セルロースはある程度分解するが、主にヘミセルロースのほうを利用している、などが考えられるが、現時点で詳細は不明である。

ただし、以上のことと関連する知見としては、オオナガシバンムシの木粉を顕微鏡で観察すると、不定形のおがくずのような形状をしており(図7a)、木材を加害する他の種類のシバンムシであるクロトサカシバンムシやケブカシバンムシなどの木粉のような、いわゆる俵型にきれいに成形された虫糞がはっきりと観察される状態のもの(図7b,c)とは明らかに木粉の形状が異なる¹⁷⁾ということがある。したがって、オオナガシバンムシの不定形の木粉の場合では、すべてが消化管を通過しているかどうかについても不明であり、木粉のすべての部分の結晶性セルロースが効率よく分解される状況になっていない可能性もある。

しかしながら、今回得られたデータを総合的に考察すると、少なくとも木材を活発に加害している時期のオオナガシバンムシの幼虫は、セルラーゼ活性を有し、建造物のセルロースなどの木材成分を、シロアリのように酵素を使って分解、資化している可能性が考えられる。

なお、今回データは示していないが、予備的に試料の絶乾重量あたりのリグニン含有量を調査したところ、虫粉では健全部よりもリグニン含有量が有意に多くなっており(未発表データ)、加害されて粉状になっている部位ではセルロースの含有量が減少し、リグニンの含有量が多くなっている傾向があることが窺えた。このことは粉状部分の色味が健全部の色よりも褐色にみえることと対応していると思われる。

謝辞

本実験を実施するにあたり、貴重な助言をいただきました東京大学名誉教授、杉山純多博士、および供試虫としてタバコシバンムシの幼虫および成虫を快くご供与くださいましたイカリ消毒株式会社技術研究所、木村悟朗氏、また、部材の虫損部および健全部の結晶性セルロース、リグニン等の含量の定量について多大なご協力をいただきました京都大学農学研究科の粟野達也博士、藤井義久教授に深く感謝いたします。最後に本発表をご許可くださいました日光山輪王寺の関係者の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 小峰幸夫, 木川りか, 原田正彦, 藤井義久, 藤原裕子, 川野邊渉: 日光山輪王寺本堂におけるオ

- オナガシバンムシ *Priobium cylindricum* による被害事例について, 保存科学, **48**, 207-213(2009)
- 2) 小峰幸夫, 原田正彦, 野村牧人, 木川りか, 山野勝次, 藤井義久, 藤原裕子, 川野邊渉: 日光山輪王寺本堂におけるオオナガシバンムシの発生状況に関する調査について, 保存科学, **49**, 173-181 (2010)
 - 3) 原田正彦, 野村牧人, 木川りか, 小峰幸夫, 林美木子, 川野邊渉, 石崎武志: 栃木県日光山内・中宮祠・中禅寺の歴史的建造物を対象とした捕虫テープによる広域害虫調査について, 保存科学, **50**, 111-121 (2011)
 - 4) 林美木子, 小峰幸夫, 木川りか, 原田正彦, 川野邊渉, 石崎武志: 日光の歴史的建造物において捕虫テープ(ハエ取り紙)に捕獲された甲虫の集計方法と調査結果, 保存科学, **50**, 123-132(2011)
 - 5) 小峰幸夫, 林美木子, 木川りか, 原田正彦, 三浦定俊, 川野邊渉, 石崎武志: 日光の歴史的建造物で確認されたシバンムシ類の種類と生態について, 保存科学, **50**, 133-140 (2011)
 - 6) 木川りか, 鳥越俊行, 今津節夫, 本田光子, 原田正彦, 小峰幸夫, 川野邊渉: X線CTスキャナによる虫損部材の調査, 保存科学, **48**, 223-231 (2009)
 - 7) 鳥越俊行, 木川りか, 原田正彦, 小峰幸夫, 今津節夫, 本田光子, 川野邊渉: X線CTによる被害材の調査と害虫の活動検出への応用, 保存科学, **49**, 191-196 (2010)
 - 8) 藤井義久, 藤原裕子, 原田正彦, 木川りか, 小峰幸夫, 川野邊渉: 穿孔抵抗測定法を用いた文化財建造物の構造部材の虫害評価に関する一考察 日光輪王寺における虫害を事例として, 保存科学**48**, 215-222 (2009)
 - 9) 山野勝次: 「写真でわかるシロアリの被害・生態・調査」文化財虫菌害研究所 (2005)
 - 10) Ohkuma, M., Brune, A.: Chapter 15, Diversity, Structure, and Evolution of the Termite Gut, in D. E. Bignell et al. (eds.), *Biology of Termite: A Modern Synthesis*, Springer Science and Business Media B.V. pp413-438 (2011)
 - 11) Brune, A., Ohkuma, M.: Chapter 16, Role of the Termite Gut Microbiota in Symbiotic Digestion, in D. E. Bignell et al. (eds.), *Biology of Termite: A Modern Synthesis*, Springer Science and Business Media B.V. pp439-476 (2011)
 - 12) Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., Nathan L.: A Cellulase Gene of Termite Origin, *Nature*, **394**, 330-331 (1998)
 - 13) Nathan L., Tokuda, G., Watanabe, H.: Chapter 3 Evolution and Function of Endogenous Termite Cellulases, in D. E. Bignell et al. (eds.), *Biology of Termite: A Modern Synthesis*, Springer Science and Business Media B.V. pp51-67 (2011)
 - 14) Watanabe, H., Tokuda, G.: Cellulolytic Systems in Insects, *Annual Rev. Entomol.* **55**, 609-632 (2010)
 - 15) Foster, C. E., Martin T. M., Paury, M.: Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (Lignocellulosic Biomass) Part II: Carbohydrates. *Journal of visualized experiments*, **37**, <http://www.jove.com/details.php?id=1837,doi=10.3791/1837> (2010)
 - 16) Updegraff, D. M.: Semimicro Determination of Cellulose in Biological Materials, *Analytical Biochemistry*, **32**, 420-424. (1969)
 - 17) 小峰幸夫, 木川りか, 林美木子, 原田正彦, 三浦定俊, 川野邊渉, 石崎武志: 日光の歴史的建造物で採取した虫糞調査: シバンムシ科甲虫各種間の虫糞形状比較, 保存科学, **51**, 191-199(2012)

キーワード: 歴史的建造物 (historic buildings); シバンムシ (death watch beetle); オオナガシバンムシ (*Priobium cylindricum*); セルラーゼ (cellulase)

Cellulase Activity of Larvae of a Deathwatch Beetle *Priobium cylindricum* which Severely Damage Wooden Historic Buildings

Rika KIGAWA, Masahiro YUKI*, Yoshinori SATO, Rikiya ENDOH*²,
Yukio KOMINE, Masahiko HARADA*³ and Moriya OHKUMA*²

A rare anobiid species in Japan, *Priobium cylindricum*, was found by chance in the restoration work of the Sambutsu-do of Rinnohji temple in 2008. Severe damage was found in some structural wooden pieces of the temple. The damage was very severe in hard (heart) wood, showing a powdery state and many holes of various sizes.

Such severe damage of heart wood is commonly observed in timbers infested by termites, which are known to digest cellulose and hemicellulose effectively with enzymes such as cellulases. From observations of significant damage of heart wood of wooden historic buildings by *Priobium cylindricum*, we suspected that the anobiid might also utilize enzymes to damage cellulose of wood. Larvae of *Priobium cylindricum* were collected from infested wooden parts of the Sambutsu-do, and enzymatic activity of crude extract of the insect larvae was measured in comparison with that of a termite species, *Hodotermopsis sjostedti*, and other common insect species that affect cultural objects, such as *Lasioderma serricorne*, *Attagenus japonicas* and *Anthrenus verbasci*.

As a result, crude extracts of the active larvae of *Priobium cylindricum* showed enzymatic activity of CMCase, xylanase and cellobiosidase. Comparative activity values of CMCase and xylanase were lower than those of a termite of *Hodotermopsis sjostedti*, but that of cellobiosidase which represents cellulase activity of crystalline cellulose was almost the same as that of *Hodotermopsis sjostedti*. However, larvae of *Priobium cylindricum* just before pupation did not show significant activity of such enzymes. This suggests that at least the active larvae of *Priobium cylindricum* that are infesting wood have detectable enzymatic activity. Larvae and adults of *Lasioderma serricorne*, larvae of *Attagenus japonicas* and adults of *Anthrenus verbasci* did not show significant cellulase activity.

Crystalline cellulose content of the powdery parts infested by *Priobium cylindricum* was measured and compared with the healthy parts of the same timber. The result showed a decrease of crystalline cellulose content in the infested powdery parts, and this seemed to be consistent with the detection of cellulase activities from the active larvae of *Priobium cylindricum*.

*Biomass Research Platform Team, Riken Biomass Engineering Program Cooperation Division, Riken Center for Sustainable Resource Science

*²Japan Collection of Microorganisms/Microbe Division, Riken BioResource Center

*³Association for the preservation of the Nikko World Heritage Site Shrines and Temples