

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14797

研究課題名(和文) シロアリ腸内原生生物の細胞内共生スピロヘータ細菌のゲノム動態と種分化

研究課題名(英文) Genome dynamics and species divergence of endosymbiotic spirochetes of termite-gut protists

研究代表者

大熊 盛也(OHKUMA, Moriya)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・室長

研究者番号：10270597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：共生の初期進化過程にあると考えられる細胞内共生スピロヘータ細菌を有するシロアリ腸内のセルロース分解性原生生物において、細胞内共生細菌のシングルセルゲノム解析を行い、原生生物1細胞内の共生細菌のゲノム配列は相同性がきわめて高いことを明らかにした。また、細胞内共生スピロヘータ細菌とその宿主原生生物とシロアリの分子系統を比較解析して、3者間の共種分化関係を明らかにしたが、複数種の原生生物が1種のシロアリ腸内に生息する場合、比較的高頻度の細胞内共生細菌の交換があったと推定された。

研究成果の概要(英文)：Single-cell genome analyses of endosymbiotic spirochete bacteria of a termite-gut cellulolytic protist species, which are considered to be in an initial stage of the endosymbiosis, revealed a high-level genome sequence similarity within a single protist cell. Cospeciating relationships among the protists, their spirochete endosymbionts, and their host termites were inferred, but frequent host switches of the endosymbionts have been likely occurred during the evolution in the case that multiple protist species are present in the same gut community.

研究分野：微生物学

キーワード：共生 微生物 進化 種分化

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生は、単細胞の原生生物のみならず、昆虫などの多細胞生物にも広く見られ、生物の適応や生存に重要な役割を果たしている。細胞内の共生細菌は、適応進化の結果、ゲノムの縮小化が普遍的に認められる。これは、細胞内という環境のみで生育するための遺伝子セットを残し、それ以外の不要な遺伝子が排除された結果と考えられる。また、細胞内共生細菌は、世代を超えて受け継がれていく過程で、ボトルネック効果により淘汰されて、遺伝的にほぼ均一の集団となって宿主と共種分化していることが多い。

最近、シロアリ腸内のセルロース分解性の原生生物の細胞内に共生する *Treponema* 属のスピロヘータ細菌を見だし、腸内での共生に重要な炭素と窒素の代謝の二重の機能を果たしていることを明らかにした(引用文献)。興味深いことに、細胞内共生スピロヘータ細菌のゲノムは、サイズが大きく縮小化が進んではないが、遺伝子の機能カテゴリー分類のパターンには別種の原生生物の細胞内共生細菌の縮小化したゲノムとの類似性が認められ、細胞内共生が成立したばかりの初期の段階にあり、ゲノムをダイナミックに適応・進化させている過程にあると推定した。このような、機能面で大変重要であるが、共生の初期進化過程にある細胞内共生の例はめずらしく、細胞内共生の成立と進化過程を知る大変興味深いユニークな題材と考えられた。

この研究を行なった原生生物種と近縁な原生生物種が別種のシロアリにも生息しており、細胞内共生細菌も近縁な系統であることも見出していた。複数の系統種の原生生物で細胞内共生細菌のゲノムを比較解析することができれば、細胞内共生における共生細菌のゲノム動態と種分化の関係を理解することにつながると考えられた。

自然環境中の微生物は、異種の微生物が複雑な群集を構成しており、多くは難培養なものである。群集を丸ごと扱うメタゲノム解析は盛んに行われているが、一般には群集を構成する個々の微生物のゲノム情報を得ることは困難である。しかし、シングルセルでのゲノム情報解析技術の進展もあり、この細胞内共生スピロヘータ細菌をはじめとして、複数のシロアリ腸内共生細菌について培養を介することなく、シングルセルゲノム解析で機能を解明する成果を挙げられるようになってきた。このようなシングルセルゲノム解析により、原生生物1細胞内の共生細菌のゲノム多様性も解析できると期待された。

2. 研究の目的

(1) このユニークで他に例の少ない成立初期の過程にある細胞内共生スピロヘータ細菌について、原生生物1細胞内での共生細菌、および、複数種のシロアリとそれらの腸内に生息する複数種の原生生物の細胞内共生細菌を題材として、シングルセルゲノム解析によりゲノムの多様性を調べることで、細胞内共生成立の初期段階のゲノム進化の理解に大きなインパクトをもたらす知見が得られると期待される。

(2) また、細胞内共生スピロヘータ細菌を有する近縁の複数の原生生物について、原生生物と細胞内共生細菌、および、それらの宿主シロアリの系統を比較解析して、3者が共種分化したものであるかを検討する。1種のシロアリに細胞内共生スピロヘータ細菌を有する原生生物が1種の場合と、腸内に複数種生息する場合を比較して、細胞内共生細菌の種分化について考察する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内共生スピロヘータ細菌を有する原生生物の1細胞をマイクロマニピュレータ装置によって分取して、セルソータ装置を用いて細胞内共生細菌をシングルセルに分離・分取した。分取した共生細菌の1細胞を用いて全ゲノム増幅後に、次世代シーケンサーによりゲノム概要配列情報を決定し、アセンブルと遺伝子機能を推定した。ゲノム概要配列は、細菌ゲノムに共通に見られる百数十の遺伝子の有無からゲノム完全率を算出して評価した。決定したゲノム配列情報は、複数のシングルセルサンプル間で相同性等の比較を行った。

(2) 複数種のシロアリにおいて、細胞内共生スピロヘータ細菌を有する原生生物をマイクロマニピュレータ装置によって1細胞に分取した。分取した共生細菌を含む原生生物1細胞から全ゲノム増幅し、原生生物と細胞内共生細菌の rRNA 遺伝子を、細胞内共生細菌では *gyrB* 遺伝子も、それぞれ PCR 増幅してクローニング後、それぞれの配列を決定した。宿主シロアリもミトコンドリア遺伝子を PCR 増幅して配列を決定し、シロアリ、原生生物、細胞内共生細菌の3者で分子系統解析を行って、3者間での系統関係の比較を行った。

4. 研究成果

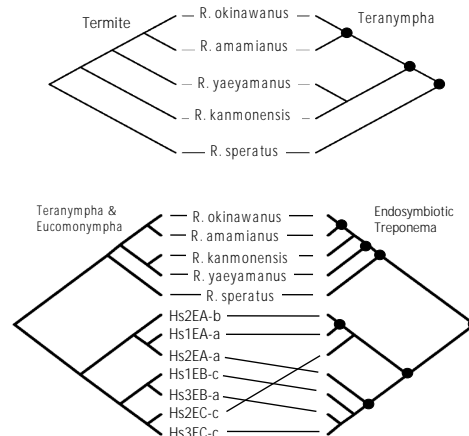
(1) オオシロアリ腸内には、3または4種の *Eucomonympa* 属原生生物が生息しており、それぞれ細胞内共生スピロヘータ細菌を有していた。細胞内共生細菌の原生生物1細胞内、および、原生生物細胞間でのゲノムの多様性を解析するため、原生生物の1細胞内の複数の共生細菌のゲノム概要配列の解読を行った。分取した1細胞の原生生物から、セ

ルソー装置を用いて細胞内共生細菌をシングルセルに分離・分取することに成功し、4から12の細胞内共生細菌のシングルセルゲノム解析を実施した。ゲノム完全率を算出すると1割強から7割程度までと、共生細菌サンプルによって相当に解読精度が異なり、単純な比較は困難であったが、単一原生生物細胞由来の共生細菌では極めて相同性が高い遺伝子配列が得られた。比較的ゲノム完全率の高い同一原生生物細胞由来のゲノム配列情報を合わせてアセンブルすると、9割程度までのゲノム完全率が得られ、ゲノムの均一性が確認された。一方で、原生生物細胞間では、単一原生生物細胞内のものに比べ相同性は低くなっていた。

(2) 細胞内共生スピロヘータ細菌の種分化を考察するため、オオシロアリ腸内の3種の*Eucomonympha*属原生生物、および、*Reticulitermes*属のシロアリ5種のシロアリ腸内から細胞内共生スピロヘータ細菌を有する*Teranympa*属の原生生物を1細胞に分離・分取して、原生生物と共生細菌の遺伝子配列を決定して分子系統学的に解析した。1細胞の原生生物からは、調べた範囲内ではほぼ同一の共生細菌の遺伝子配列が得られ、原生生物1細胞に共生するスピロヘータ細菌がきわめて均一な系統からなる集団であることを確認した。これらスピロヘータ細菌が、*Teranympa*属原生生物の細胞内に特異的に共生していることも蛍光 *in situ* hybridization によって確認した。1細胞からの解析にもかかわらず、原生生物の遺伝子配列は2つの異なる遺伝子配列が取得されたが、転写産物の解析からは片方の遺伝子配列のみが検出され、片方のみが機能していると考えられた。

シロアリ、原生生物、細胞内共生細菌のそれぞれで、分子系統解析を行って比較した結果、各シロアリ腸内に1種のみが生息するとされている*Teranympa*属原生生物の系統関係は、宿主シロアリの系統、および、細胞内共生細菌の系統関係と有意に一致しており、3者が共種分化してきたものであることが強く示唆された(図参照)。*Eucomonympha*属原生生物の細胞内共生細菌は、'*Treponema intracellularis*'と暫定名が付けられていたが(引用文献)、*Teranympa*属原生生物の細胞内共生細菌は、これとは異なる種として、'*Treponema teratonymphae*'と暫定の学名を提唱した。一方で、*Eucomonympha*属原生生物の系統と細胞内共生細菌の系統は必ずしも一致せず(図参照)、同一シロアリ種の腸内に複数種の原生生物が共存することから、共生細菌の交換が比較的高頻度に生じてきたものと考えられた。'*T. teratonymphae*'についてもシングルセルゲノム解析を実施して、*Eucomonympha*属原生生物の細胞内共生細菌と同様に、水素と二酸化

炭素からの還元的酢酸生成、および、窒素固定の機能が推定され、腸内で炭素と窒素の代謝の二重の重要な共生機能を果たしていると推定された。



図上、5種の*Reticulitermes*属のシロアリの系統関係(左)とそれらの腸内の*Teranympa*属原生生物の系統関係を比較した模式図。両者の系統関係は概ね一致しており、共種分化してきたものと考えられる。図下、左は5種の*Reticulitermes*属のシロアリ腸内の*Teranympa*属原生生物とオオシロアリ腸内の*Eucomonympha*属原生生物の系統関係(左)および、それらの細胞内共生スピロヘータ細菌の系統関係(右)を模式的に示したものの。*Eucomonympha*属の原生生物は、(Hs2EA-b, Hs1EA-a, Hs2EA-a)と(Hs1EB-c, Hs3EB-a)と(Hs2EC-c, Hs3EC-c)の3種の系統に分けられるが、それらの細胞内共生細菌の系統は原生生物の系統と一致しない場合が認められる。

<引用文献>

Ohkuma M, Noda S, Hattori S, Iida T, Yuki M, Starns D, Inoue J, Darby AC, Hongoh Y. Acetogenesis from H₂ plus CO₂ and nitrogen fixation by an endosymbiotic spirochete of a termite-gut cellulolytic protist. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112: 10224-10230 (2015).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Noda Satoko, Shimizu Daichi, Yuki Masahiro, Kitade Osamu, Ohkuma Moriya Host-symbiont cospeciation of termite-gut cellulolytic protist of the genera *Teranympa* and *Eucomonympha* and their *Treponema* endosymbionts. Microbes and Environments 33(1), 26-33 2018, 査読有

DOI: 10.1264/j sme2.ME17096

北出理、野田悟子
シロアリの腸内共生原生生物群集の特性と機能、
生物科学 68 巻 3 号 pp.154-164 2017 年、
査読有
http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/068_03.htm

〔学会発表〕(計 12 件)

清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子
シロアリ腸内原生生物と *Treponema* 属細菌との細胞内共生の系統進化
第三回山岳科学学術集会、2017 年 12 月 16 日、
山梨大学甲府キャンパス(甲府)

雪真弘、大熊盛也
シングルセルゲノム解析によるシロアリ腸内原生生物と細胞内・表面共生細菌の共生関係の解明
第 50 回日本原生生物学会大会第 1 回日本共生生物学会大会合同大会
2017 年 11 月 19 日、筑波大学筑波キャンパス(つくば)

清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子
細胞内共生 *Treponema* 属性菌と Teranymphiidae 科原生生物、シロアリの三者による共種分化
環境微生物系学会合同大会 2017、2017 年 8 月 29-31 日、東北大学川内北キャンパス(仙台)

清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子
Teranympa 属原生生物と宿主シロアリの共種分化
第 49 回日本原生生物学会大会、2016 年 10 月 10 日、岡山大学津島キャンパス(岡山)

野田悟子、雪真弘、大熊盛也
バイオマスの循環を支えるシロアリの多重共生系
第 19 回日本水環境学会シンポジウム、2016 年 9 月 14 日、秋田県立大学秋田キャンパス(秋田)

大熊盛也、雪真弘、David Starns、桑原宏和、本郷裕一
シロアリ腸内の難培養性細菌のシングルセルゲノム解析
日本微生物資源学会第 23 回大会、2016 年 7 月 5 日 千葉大学西千葉キャンパス(千葉)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大熊盛也 (OHKUMA, Moriya)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・室長
研究者番号: 10270597

(2) 研究分担者

野田悟子 (NODA, Satoko)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 80342830

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

雪真弘 (YUKI, Masahiro)