

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07555

研究課題名（和文）シロアリの交雑がもたらす共生微生物群集の置換の過程と宿主に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文）Replacement process of symbiotic microbial communities caused by host hybridization and its effects on host termite

研究代表者

北出 理 (Kitade, Osamu)

茨城大学・理工学研究科（理学野）・教授

研究者番号：80302321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）：日本列島に分布するヤマトシロアリ属とその腸内の原生物群集の組成調査を行い、トカラ列島を含む未調査地域で原生物の種組成を解明した。またミトコンドリア遺伝子の配列から宿主の系統樹を推定した結果、トカラ列島では原生物の種組成から、沖永良部島では遺伝子の配列から異種シロアリ間の原生物の水平伝播が強く示唆された。

ヤマトシロアリとカンモンシロアリを実験的に交雑させ、原生物群集の変化を形態と塩基配列から調査した。雑種コロニーで、初め原生物の群集は混合組成になる。その後全コロニーで時間経過とともに種組成・個体数比はヤマトシロアリの群集に近づいた。特異的塩基配列の継承は有意に偏った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はシロアリの共生微生物群集を材料に、特に宿主交雑がもたらす群集融合の過程の解明を行った。極めて長期に隔離された自然群集を融合させる実験や、共生微生物群集を融合させる実験はこれまで行われておらず、本研究の融合実験の試みは生物群集と共生微生物を対処とする生態学研究において大きな意義がある。

また、島嶼の分離と融合を繰り返してきた日本列島のシロアリで、実際に共生微生物群集を調査し、交雑と原生物の水平転移を確認するとともに、実験的研究との比較検討を行った点でも意義がある。

研究成果の概要（英文）：We examined symbiotic protist communities of the *Reticulitermes* termite species distributed in the Japan archipelago and revealed species composition in the uninvestigated areas including the Tokara archipelago. Host termite phylogeny inferred by us from mitochondrial gene sequences and the symbiont species composition data strongly suggested horizontal symbiont transfer between ancestral host species in the Tokara archipelago and the Okinoerabu Is. We also carried out hybridization experiments between *R. speratus* and *R. kanmonensis*, and examined change of community composition over time using both morphological observation and microbiota analysis using SSU rDNA. In the hybrid colonies the community first showed "mixed-type" species composition and then it gradually approached to the typical community structure of *R. speratus*. Succession of parent species-specific rDNA sequences to the hybrid offspring colonies exhibited strong and significant bias.

研究分野：生態学

キーワード：共生微生物 群集構造 社会性昆虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シロアリ腸内の原生生物と最近の群集は、宿主ごとに特異的な組成を持つ。ヤマトシロアリとカンモンシロアリという2種のシロアリが交雑すると、その群集が混合され、最終的に片方の群集の種の組成へと置き換わることを最近私たちは明らかにした。宿主の交雑に伴う共生生物群集の混合はこれまで研究されていなかったため、新規性の高い発見であるが、交雑が起きてから最終的に片方の親種由来の群集に収束するまでの時間的変化は未調査であり、組成の置換過程の理解にはこれが不可欠である。一般の群集でも、モデル実験とマイクロコスム実験から、群集混合の後の新群集へ種の継承は、親群集の構成種が隔離されて一定期間相互作用を経ていた場合に偏りを生じやすいことが予測されていたが、シロアリの共生原生生物群集は極めて長期間の隔離と種間相互作用を経た複雑な群集であり、異種宿主の群集の混合後の経時変化の観察はその過程の理解にも特に重要である。

日本列島では特に南西諸島でヤマトシロアリ属が多くの種に分化している。南西諸島ではこれらの祖先種の侵入と現在の系統への分化の過程で、実は異種間交雑が生じた可能性が十分あり、原生生物組成や宿主の遺伝子にその痕跡が残っている可能性がある。ヤマトシロアリ属の種の分布と原生生物組成は、研究代表者らにより南西諸島の代表的な島では調査が行われてきたが、トカラ列島をはじめ未調査の島嶼が残されている。このため、これらの島嶼を含めて共生原生生物組成の再調査を行うことで、異種間交雑の痕跡の確認と、交雑の際にどのような組成変化が生じたかの推定を行う必要がある。

さらに宿主の交雑等によって生じる、原生生物の異種間での入れ替わりが、木質分解能力や異種認識など、宿主の生態に対していかなる影響を与えるかも明らかでなかった。これを明らかにするためには、宿主から原生生物を除去した後にワーカーを混合させ、行動観察と酵素活性の測定をおこなう必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点を検討し、群集の置換過程とその成因、宿主生態への影響を解明することを目的とした。

- (1) 日本産ヤマトシロアリ属の共生原生生物組成を野外調査で明らかにする。特に南西諸島で未調査の島嶼について、宿主シロアリの分布調査と、共生原生生物組成の形態・分子手法による調査を行う。さらに宿主の系統推定と特定の原生生物種の系統推定を行い、原生生物組成の変異と進化過程を明らかにする。
- (2) ヤマトシロアリとカンモンシロアリの2種を交雑させ、原生生物群集が置換されていく際の群集構造の時間変化を、形態と遺伝子の配列情報から追跡する。各種原生生物の量的変化から安定状態に至る際の相互作用を明らかにする。
- (3) 共生原生生物の酸素による除去とワーカー混合による原生生物群集の置換の方法を確立する。さらに酵素活性の測定と行動実験から、原生生物の置換が宿主シロアリの木質分解活性と巣仲間認識に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 日本産ヤマトシロアリ属の分布と共生原生生物組成の調査

鹿児島県のトカラ列島の5島(口之島、中之島、諏訪之瀬島、悪石島、宝島)、奄美大島、徳之島、喜界島、沖永良部島、与論島、沖縄県の沖縄島、久米島、北部宮古列島(宮古島・伊良部島・下地島・池間島)、多良間島、石垣島、西表島、与那国島でヤマトシロアリ属のコロニーを採集した。

宿主シロアリからDNAを抽出し、宿主の腸内容物の鍍銀染色標本を作成するとともに腸内容物のDNAを抽出し、COI, COII, ITS領域の配列をサンガー法で決定し、最尤法で宿主系統樹を推定した。

また、1コロニーあたり5個体の宿主腸内容物の観察を行い、原生生物の種組成と宿主の種・コロニー個体間の変異を調査する。特にアマミシロアリとオキナワシロアリの2種については、原生生物種の個体数のデータを個体ごとに取得し、個体間の差と、後者については雌雄間の差を調査した。

さらに、原生生物の1種 *Teranympa mirabilis* について、全ゲノム増幅を行った後にPCR増幅したSSUrRNA遺伝子の配列をサンガー法で決定し、最尤法による系統推定を行った。

(2) シロアリ2種の交雑後の原生生物群集の経時変化の調査

2017年に山口県でカンモンシロアリ、茨城県でヤマトシロアリの有翅虫を採集し、異種の雌雄ペアを用いてコロニーを多数創設させたが、死亡率が高かったため、再度やり直すこととした。2018年に、山口県宇部市でカンモンシロアリ、茨城県水戸市でヤマトシロアリの有翅虫を採集しこれを交雑させた。その後、野外コロニー、共生原生生物組成の時間的変化(交雑後80日、120日、240日、500日)を、微分干渉顕微鏡と血球計算盤を用いた形態観察と種ごとの個体数の計数により調べた。さらに、上と同じコロニーの個体の腸内容物から抽出したDNAを鋳型に、SSUrDNAの一部をPCRで増幅し、増幅産物をイルミナ社 Miseq を用いて網羅的塩基配列解析を行うことで、塩基配列データに基づく共生原生生物組成の変化のモニタリングを行った。

(3) 異種間での共生原生生物の置換が宿主のセルラーゼ活性と種間認識に及ぼす影響の調査につなげるため、酸素による原生生物の除去、異種ワーカー間でのコロニー混合、有翅生殖虫の交

雑を試した。またセルラーゼ、エンドグルカナーゼ、キシラナーゼの活性測定の方法を検討した。

4. 研究成果

(1) 日本産ヤマトシロアリ属の分布と共生原生成物組成、宿主系統との対応について

形態に基づく宿主の同定により、北部トカラ列島(口之島・中之島・諏訪之瀬島)では、ヤマトシロアリとアマミシロアリ、南部トカラ列島(悪石島・宝島)ではアマミシロアリ、奄美大島・徳之島ではアマミシロアリとミヤタケシロアリ、喜界島・沖永良部島ではアマミシロアリ、与論島・沖繩島・久米島・北部宮古列島(宮古島・伊良部島・下地島・池間島)でオキナワシロアリ、多良間島・石垣島・西表島でヤエヤマシロアリ、与那国島でヤエヤマシロアリとキアシシロアリに該当すると考えられるコロニーの分布を確認した。宿主の分子系統解析の結果、日本列島の宿主は渡瀬線に対応してヤマトシロアリとそれ以外の種の2クレードに大分された。宿主は基本的には種ごとにクレードを形成するが、沖永良部島個体群で2種に特徴的なハプロタイプが見られ、与那国島の個体群はヤエヤマシロアリのハプロタイプと明確に区別できなかった。

原生成物組成は、基本的に宿主種特異的な種組成であったが、トカラ列島のアマミシロアリで、トカラ列島以外ではヤマトシロアリからしか見つからない原生生物が1種見られた。分子系統解析で推定された樹形との比較から、アマミシロアリで見られた特異的原生生物は宿主種(ヤマト-アマミ)間で水平感染したことが、トカラ列島と沖永良部島では過去に宿主の交雑が生じ、その影響がミトコンドリアDNAと原生生物に残っているものと考えられた。さらに、トカラ列島のアマミシロアリの上唇亜先端刺毛の本数が他個体群と比べ変異が多く、ヤマトシロアリと同様にこれを欠くコロニーも見られることもこれと矛盾しない。

また、オキナワシロアリの5コロニーについて、雌雄の宿主間で組成の差を検討し、無作為化検定によって個体数の雌雄差を検討したが、有意な差はみられなかった。さらにコロニーの一部については、SSUrRNA 遺伝子の網羅的配列解析のためのDNA抽出を行った。

ヤマトシロアリ属5種について、大型の共生原生生物である *Teranympa mirabilis* の細胞から SSUrRNA 遺伝子の配列を取得して系統解析を行った結果、系統樹の樹形は宿主系統樹の樹形とよく一致した。

(2) 異種シロアリの交雑後の共生原生生物組成の経時変化について

形態観察による原生生物の組成調査では、ヤマトシロアリとカンモンシロアリの交雑コロニーでは、腸内の原生生物の種は交雑後80日では両親種に特異的な種が混ざったものであったが、各種の個体数比は両親種と異なる特異的なものであった。これが時間経過とともに通常のヤマトシロアリのコロニーに特徴的な比率にほぼ近づき、片方の親種の組成へと収束することが明らかになった。このような変化は複数の交雑実験コロニー間で共通しており、種間の選択過程が混合後に成立する群集構造を強く決定すると考えられた。ただし、トカラ列島で生じた野外コロニーの交雑では片方の親種の組成への置きかわりではない1種のみでの水平転移が生じており、この相違の理由は不明である。

SSUrRNA 遺伝子の網羅的読み取りによるモニタリングでも、基本的に同様な結果が得られた。親種に特異的な配列については、それが両親種が共通して持つ種であったとしても、基本的にヤマトシロアリに特異的な配列が交雑種に受け継がれ、カンモンシロアリ特異的な配列は消失へ向かった。ただし *Teranympa mirabilis* の配列だけはカンモンシロアリ由来のものに収束しヤマト由来配列は消失した。遺伝子配列を用いた統計学的検定(GLMM と尤度比検定)の結果、親種特異的な配列の継承には5%水準で有意な偏りがあった。このことは、両親種内で共存していた種が木質代謝を介した長期の相互作用により共適応していることを示す。

(3) 共生原生成物の置換が宿主のセルラーゼ活性と種間認識に及ぼす影響について

腸内の共生微生物の置換を行うための準備のため、高圧酸素による原生生物の除去の条件検討を行った。さらに、木質分解酵素活性の測定のための準備と予備実験を行った。しかしながら、異種のワーカークループを融合させる実験が、ワーカークループ間の敵対性が非常に強いためにうまくいかなかった。このため、研究期間中には残念ながら異種間での置換を行わせることができなかった。木質分解酵素の活性については、現在交雑コロニーの個体と、通常の種内交配コロニーを用いて活性の測定を現在行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Noda, M. Sakamoto, C. Aihara, M. Yuki, M. Katsuhara, and M. Ohkuma	4. 巻 68
2. 論文標題 Lactococcus termiticola sp. nov., isolated from the gut of higher termite Nasutitermes takasagoensis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IJSEM	6. 最初と最後の頁 3832-3836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Noda, C. Aihara, M. Yuki, and M. Ohkuma	4. 巻 6
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Lactococcus sp. Strain NtB2, Isolated from the Gut of the Termite Nasutitermes takasagoensis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announc	6. 最初と最後の頁 e00445-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00445-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noda Satoko, Shimizu Daichi, Yuki Masahiro, Kitade Osamu, Ohkuma Moriya	4. 巻 vol.33
2. 論文標題 Host-symbiont cospeciation of termite-gut cellulolytic protists of the genera Teranympa and Eucomonympha and their Treponema endosymbionts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes. Environ.	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 北出理、野田悟子	4. 巻 68
2. 論文標題 シロアリの共生原生生物群集の特性と機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物科学	6. 最初と最後の頁 154-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北出 理
2. 発表標題 久米島・北部宮古諸島・与那国島におけるヤマトシロアリ属の共生原生生物
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihiro Aihara, Megumi Katsuhara, Mitsuo Sakamoto, Masahiro Yuki, Moriya Ohkuma, Satoko Noda
2. 発表標題 <i>Lactococcus termiticola</i> sp. nov., isolated from the gut of the higher termite <i>Nasutitermes takasagoensis</i>
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Yuki, Hirokazu Kuwahara, Satoko Noda, Yuichi Hongoh, Moriya Ohkuma
2. 発表標題 Comparative genome analysis of two endosymbiotic <i>Treponema</i> species of cellulolytic protists in the termite gut
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北出 理、野田悟子
2. 発表標題 沖永良部島・与論島におけるヤマトシロアリ属の共生原生生物の種組成
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石神広太、北出 理
2. 発表標題 腸内容物がシロアリに与える効果：誘引性・摂食量・糞を置く行動に関して
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緑川穂野花、北出 理
2. 発表標題 子個体の入替えがシロアリ初期コロニーの成長に及ぼす効果
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子
2. 発表標題 細胞内共生Treponema属細菌とTeranymphidae科原生生物、シロアリの三者による共種分化
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 雪真弘、桑原宏和、河合幹彦、伊澤和輝、David Starns、清水美智留、野田悟子、本郷裕一、大熊盛也
2. 発表標題 シングルゲノム解析から推定された原生生物細胞表面共生細菌のファージ感染耐性機構
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北出理、根本まなみ
2. 発表標題 ヤマトシロアリ共生原生動物群集の構造と多様性に温度が与える影響
3. 学会等名 日本原生動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木聖典、北出理
2. 発表標題 沖縄島及び奄美諸島に生息するヤマトシロアリ属の共生原生動物の群集構造
3. 学会等名 日本原生動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子
2. 発表標題 シロアリ腸内原生動物とTreponema属細菌との細胞内共生の系統進化
3. 学会等名 第三回山岳科学学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉野大智、大熊盛也、野田悟子
2. 発表標題 シロアリ腸内原生動物種間の木質分解酵素遺伝子発現量の比較
3. 学会等名 第三回山岳科学学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北出理、Park, Yung Chul、徳田岳
2. 発表標題 韓国産キゴキブリCryptocercus kyebangensisの共生原生生物組成
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野田悟子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 139
3. 書名 昆虫に共生する原生生物（「アメーバの話」）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野田 悟子 (Noda Satoko) (80342830)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	