

平成21年 6月23日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380045
 研究課題名（和文） ムカシシロアリ細胞内共生細菌ブラタバクテリウムの全ゲノム機能解析

研究課題名（英文） Genome analysis of *Blattabacterium* sp.

研究代表者

渡辺 裕文 (Watanabe Hirofumi)

独立行政法人 農業生物資源研究所 昆虫・微生物間相互作用研究ユニット 主任研究員

研究者番号：10355745

研究成果の概要：ブラタバクテリウムゲノムの分離精製法を確立しそのゲノムサイズ(650 kbp)を決定した。また分離したゲノムDNAの配列を解読し、523 kbpのドラフトコンティグを作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：絶対共生細菌・脂肪体・ゲノム・パルスフィールド・電気泳動・パーコール
 コンティグ・ゴキブリ目

1. 研究開始当初の背景

シロアリ類は、食材性ゴキブリ類から派生した共通祖先をもつと言われるが、現存最下等種であるムカシシロアリ (*Mastotermes darwiniensis*) を除く他のシロアリではこのようなゴキブリ的形質が失われている。ゴキブリ的形質のひとつにゴキブリに特化した脂肪体の細胞内共生菌ブラタバクテリウム (*Blattabacterium* spp.) の存在が挙げられる。ムカシシロアリの脂肪体でも細胞内共生細菌 *Blattabacterium* が観察されるが、他のシロアリではこの細菌が見つからない。近年、アブラムシ、クロオオアリ、ツェツェバエなどの *Buchnera* (ブフネラ) 属細胞内共生細菌の全ゲノムが解読され、ホストのアミノ酸代謝におけるこれら共生者の役割が明らかに

なっているが、ゴキブリ類においては尿酸を窒素源として再利用可能な形に転換する役割をブラタバクテリウムが担っていると100年以上前から想像されてきたがそのゲノム構造はまったく不明であった。一方、シロアリ類も窒素源が不足する木材を餌としており、ムカシシロアリのブラタバクテリウムの機能とゴキブリ由来の同細菌との機能の差、ブラタバクテリウムを失った他のシロアリの窒素代謝機能の変化とゴキブリーシロアリの宿主進化との関係についても同様に興味もたれた。

2. 研究の目的

①ブラタバクテリウムゲノム配列から、ホ

スト栄養代謝に関わると考えられる遺伝子を洗い出し、宿主体内におけるブラタバクテリウムの役割と他のシロアリ類におけるブラタバクテリウム消失の理由の解明、②ブラタバクテリウムの進化・系統関係を明らかにすること、③ホスト-共生者間の関係構築に働く遺伝子を解明するための情報を得ることを目的として、ムカシシロアリ（および比較対象であるゴキブリ類）のブラタバクテリウムの単離法を確立し、そのゲノム DNA を分離精製したうえゲノムの解読をおこなった。

3. 研究の方法

ムカシシロアリおよびオオゴキブリ脂肪体を等張液中で破碎した懸濁液を材料として、①パーコールに密度差遠心でブラタバクテリウム細胞を分離するため2層に重層するパーコールの濃度の検討、②パルスフィールド電気泳動(PFGE)によるブラタバクテリウムゲノムの分離を可能にするため、(1)制限酵素処理条件の検討、(2)PFGE の条件の検討を行った。

これらの検討により最適化された条件でブラタバクテリウムゲノムの大量精製を行い、得られたゲノミック DNA をφ29DNAポリメラーゼによって非特異的に増幅し、ゲノムの塩基配列をサンガー法および454法で解読した。得られた配列情報に対してコンピューター処理を行い532 kbpのドラフトコンディグ配列を決定した。

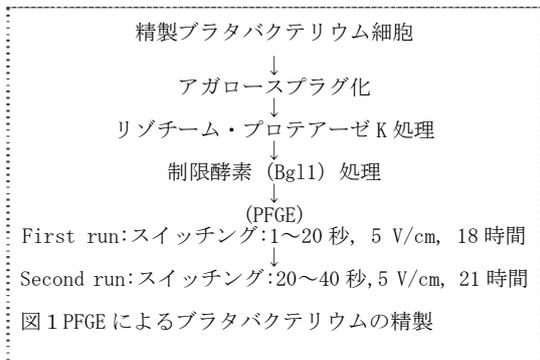
4. 研究成果

①ブラタバクテリウムのパーコール密度差遠心による分離方法を確立した(表1, 図2)。

表1. オオゴキブリおよびムカシシロアリのブラタバクテリウムのパーコール密度差遠心による分離条件

パーコール	オオゴキブリ	ムカシシロアリ
上層	30%(V/V)	16%(V/V)
下層	70%(V/V)	40%(V/V)

②オオゴキブリおよびムカシシロアリ由来ブラタバクテリウムゲノム DNA の PFGE による分離精製技術を確立した(図1, 2)。



③オオゴキブリ由来ブラタバクテリウムのゲノムサイズ (650 kbp) を PFGE により決定した(図2)。

③640 余りの ORF を開き 523 kbp にわたるオオゴキブリ由来ブラタバクテリウムゲノムのドラフトコンティグを作成した。

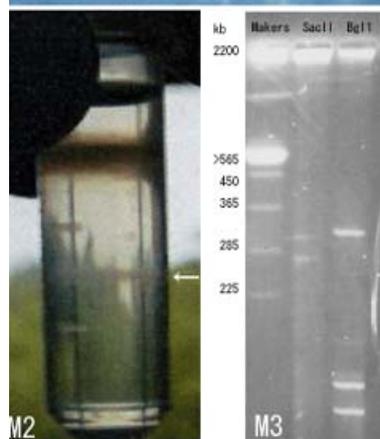
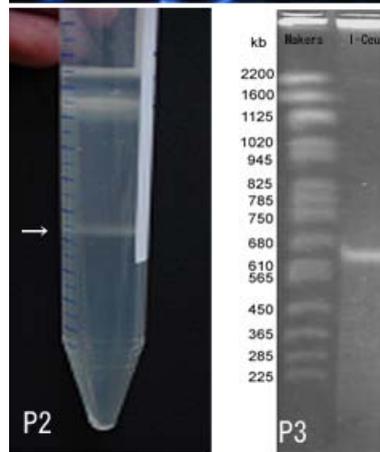
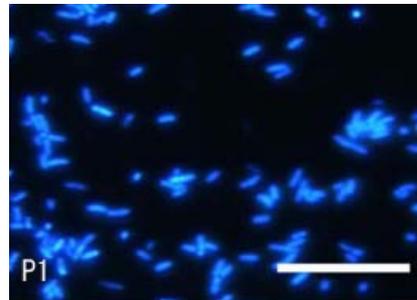


図2 オオゴキブリ(P)およびムカシシロアリから分離されたブラタバクテリウム細胞(1), 密度差遠心によるバンド(2)および PFGE で分離されたゲノム DNA(3)

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 1 件)

Gaku Tokuda, Nathan Lo, Aya Takase, Akinori Yamada, Yoshinobu Hayashi, and Hirofumi Watanabe (2009) Purification and partial genome characterization of the bacterial endosymbiont *Blattabacterium cuenoti* from the fat bodies of cockroaches. BMC Research Notes1: 118-126.

[学会発表] (計 0 件)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 裕文 (Watanabe Hirofumi)

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫・微

生物間相互作用研究ユニット 主任研究員

研究者番号: 10355745

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

徳田 岳 (琉球大学熱帯生物圏研究センター)

Nathan, Lo (シドニー大学)

Claudio Bandi (ミラノ大学獣医学部准教授)