

平成 20 年 10 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687002

研究課題名 (和文) 培養不能微生物のゲノム解析

研究課題名 (英文) Genome analysis of uncultivable microbes

研究代表者

本郷, 裕一 (Hongoh Yuichi)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・協力研究員

研究者番号：90392117

研究成果の概要：地球上の 99%以上の微生物種は培養法が不明であり、その生理・生態はほとんど未知である。本研究では、シロアリ腸内に共生する培養不能細菌の 1 種の少数細胞から、DNA 合成酵素を使用することで全遺伝子情報を 1 千万倍に増幅して完全解読する手法の確立を試み、世界で初めて成功した。これにより、これまで詳細が不明であったシロアリと腸内原生生物、腸内細菌の複雑な 3 者共生機構を世界で初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	1,200,000	3,600,000	1,560,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生態・環境

キーワード：難培養、微生物、細菌、共生、ゲノム、シロアリ、昆虫、バイオマス

1. 研究開始当初の背景

シロアリは、腸内微生物と共生することで木材のみを餌として繁栄している。しかし、それら微生物の大部分が難培養性であるため、既存の研究手法は適用できず、個々の微生物種の機能や相互作用については未知のままであった。そこで、それらを解明するための革新的な解析系の確立が希求されていた。

2. 研究の目的

(1) 難培養性細菌のゲノム完全長を解読するための手法を確立する。

(2) 同手法により、シロアリ腸内共生培養不能細菌の機能を解明する。

(3) ゲノム解析の前提となる、シロアリ腸内微生物群集の構造解析を進める。

3. 研究の方法

(1) ゲノム解析

シロアリ腸内に共生するセルロース分解性原生生物の、さらにその細胞の中だけに生息する細菌をマイクロマニピュレーターを用いて数百細胞回収し、Phi29 DNA 合成酵素を使って等温全ゲノム増幅を行なった。これにより約 1 千万倍に増幅されたゲノムを配列

解析し、遺伝子情報からその細菌の機能を予測した。

(2) 群集構造解析

各種シロアリ腸内細菌群集から、PCR法によって16S rRNA遺伝子の特異的に増幅し、配列解析することで、難培養性細菌も含めた腸内細菌群集の構造を推定した。また、そこで得られた遺伝子配列を利用して、各種(群)細菌を、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法によって蛍光顕微鏡で特異的に検出し、その配列が由来する細菌細胞の形態・局在の特定を行なった。

4. 研究成果

(1) ゲノム解析

① ヤマトシロアリ腸内に共生する、培養できない原生生物トリコニンファ・アギリス1細胞に含まれる培養不能細菌 Rs-D17 (未培養新門 TG1 所属) の 1.1Mb の環状染色体配列再構築に成功した。これは、複雑な微生物群集内の難培養性細菌からの世界初のゲノム完全長取得であり、培養株が存在しない真正細菌門からのゲノム完全長取得としても世界初である。

同染色体は 761 個のタンパク質コード遺伝子に加え、121 個もの偽遺伝子 (突然変異で機能を喪失した遺伝子) を含んでいた。これらの解析により、Rs-D17 細菌は、細胞壁合成系、防御系、膜輸送系などの遺伝子群を偽遺伝子化・消失させる一方、アミノ酸・ビタミン合成に特化していることが初めて明らかとなった。通常の細菌の増殖に必須な染色体複製開始因子 DnaA の遺伝子まで偽遺伝子化しており、宿主細胞外では生存できない可能性が高い。栄養源は宿主の細胞内に存在すると考えられるグルコース 6 リン酸とグルタミンなどに依拠しており、宿主細胞に頼った、細胞内小器官のような進化を遂げてきたことが示唆された。

シロアリは、窒素分が乏しくかつ難分解性の木質のみを餌としている。その木質を分解するのがトリコニンファなどのシロアリ特異的の原生生物であることは古くから知られていた。今回の研究成果により、その原生生物が細胞内に保有する共生細菌が、グルタミンなど窒素化合物の変換を行ない、多様なアミノ酸やビタミン類を合成して原生生物やシロアリに供与していることが示唆された。つまり、シロアリ・原生生物・細菌が、互いの弱点を補い合う相利共生機構の一端を、世界で初めて明らかにできた。

今回確立した手法を用いて、以下の②で記すように、さらに様々な培養不能微生物種のゲノムを解析することで、シロアリ腸内共生系研究は飛躍的に進むはずであり、木材の大害虫であるシロアリの駆除、また木質バイオマスからの次世代バイオ燃料創成へのヒン

トを得る事が期待できる。

② イエシロアリ腸内に共生する、培養できない原生生物シュードトリコニンファ・グラッシイ 1 細胞に含まれる培養不能細菌 CfPt1-2 ('*Candidatus* Azobacteroides pseudotrichonymphae') と命名、バクテロイデス門所属) の 1.1Mb の環状染色体配列再構築に成功した。

同染色体は 758 個のタンパク質コード遺伝子と 22 個の偽遺伝子を保有していた。Rs-D17 同様に細胞壁の成分であるリポ多糖合成遺伝子群を欠き、他のバクテロイデス目細菌では多数存在する、細胞外分泌性糖分解酵素群も全くなかった。一方、バクテロイデス門からは見つかった事の無い空中窒素固定遺伝子群が見出された。また、宿主である原生生物の窒素老廃物と推定される尿素とアンモニアを再利用し、19 種類のアミノ酸といくつかのビタミン類を合成できることも判明した。

この細菌は、セルロース分解性の宿主原生生物細胞質に豊富に存在すると考えられるグルコースなどを炭素・エネルギー源にするとともに、原生生物の最終代謝産物である水素を利用して嫌気呼吸を行なうことも示唆された。つまり、イエシロアリの腸内では、原生生物細胞内で木質 (セルロース/ヘミセルロース) 分解と空中窒素固定がカップリングして行なわれていることが判明した。

この腸内共生微生物複合体が、世界的な木材害虫であるイエシロアリ属の、巨大なコロニーと破壊的な木質消化能力を支えていると考えられる。

(2) 群集構造解析

上記ゲノム解析実験と平行して、各種シロアリ腸内共生細菌の群集構造・局在解析を行なった。1 種類のシロアリから 50 種類以上の配列が取得され、統計学的に 1000 種以上の細菌が 1 種類のシロアリの共生すると推定された。細菌相はシロアリ種内で高度に保存され、また異なるシロアリ種間では、細菌種は異なるものの同じシロアリ特異的細菌系統群に属するものが大多数を占める事が判明した。つまり、シロアリ腸内細菌群は日和見的に腸内に生息するのではなく、長い時間にわたってシロアリと共進化を遂げてきた系統群であることが示唆された。

また各種細菌の局在を FISH 法で決定した所、多くが腸内原生生物の細胞内あるいは表面に種特異的に付着することが明らかになった。その 1 例が上述の Rs-D17 細菌で、この細菌は原生生物トリコニンファ・アギリスの細胞内にのみ生息する。

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 16 件)

- ① Hongoh Y., Sharma V.K., Prakash T. et al. (2008) Genome of an endosymbiont coupling N₂-fixation to cellulolysis in protist cells in termite gut. *Science* in press (査読有、原著)
- ② Hongoh Y., Sharma V.K., Prakash T. et al. (2008) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 5555-5560 (査読有、原著)
- ③ Ohkuma M., Noda S., Hongoh Y. et al. (2008) Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and cockroach *Cryptocercus*. *Proceedings of the Royal Society B (Biological Sciences)* in press (査読有、原著)
- ④ Inoue J., Noda S., Hongoh Y., Ui S., Ohkuma M. (2008) Identification of endosymbiotic methanogens and ectosymbiotic spirochetes of gut protists of the termite *Coptotermes formosanus*. *Microbes and Environments*. 93: 94-97 (査読有、原著)
- ⑤ 本郷裕一、大熊盛也 (2008) 「シロアリ腸内共生微生物群の多様性とゲノム解析」 *Journal of Environmental Biotechnology* (環境バイオテクノロジー学会誌) 8: 29-34 (査読無、総説)
- ⑥ 本郷裕一、大熊盛也 (2008) 「ゲノムから解き明かす難培養性細菌の機能」 *化学と生物* (日本農芸化学会誌) in press (査読無、総説)
- ⑦ 大熊盛也、本郷裕一 (2008) 「難培養微生物のゲノム解析技術とシロアリ腸内微生物の共生機構」 *バイオインダストリーとサイエンス* in press (査読無、総説)
- ⑧ 大熊盛也、本郷裕一、野田悟子 (2008) 「シロアリ腸内微生物の多重共生-バイオマス資源を高効率に利用する共生」蛋白質核酸酵素 in press (査読無、総説)
- ⑨ Hongoh Y., Sato T., Dolan M. F. et al. (2007) The motility symbiont of the termite-gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the “*Synergistes*” group. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6270-6276 (査読有、原著)
- ⑩ Hongoh Y., Sato T., Noda S. et al. (2007) *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of termite gut protists. *Environmental Microbiology* 9: 2631-2635 (査読有、原著)
- ⑪ Yamada A., Inoue T., Noda S., et al. (4/6 番目) (2007) Evolutionary trend of phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the gut community of wood-feeding termites. *Molecular Ecology* 16: 3768-3777 (査読有、原著)
- ⑫ Ohkuma M., Sato T., Noda S. (ラスト/6) (2007) The candidate phylum ‘Termite Group 1’ of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 467-476 (査読有、原著)
- ⑬ Noda S., Kitade O., Inoue T. et al. (7/11 番目) (2007) Coevolutionary history of a triplex symbiotic system of termites, their gut protists, and bacterial endosymbionts of the protists. *Molecular Ecology* 16: 1257-1266 (査読有、原著)
- ⑭ Hongoh Y., Deevong P., Hattori S. et al. (2006) Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6780-6788 (査読有、原著)
- ⑮ Deevong P., Hongoh Y., Inoue T. et al. (2006) Effect of temporal preservation on molecular study of complex microbial community in the gut of the termite *Microcerotermes* sp. *Microbes and Environments*. 21: 78-85 (査読有、原著)
- ⑯ Inoue T., Takematsu Y., Yamada A. et al. (2006) Diversity and abundance of termites along an altitudinal gradients in Khao Kitchagoot National Park, Thailand. *Journal of Tropical Ecology* 22: 609-612 (査読有、原著)

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 佐藤朋之 (2008. 11) 「シロアリ腸内原生生物に細胞内共生する *Alphaproteobacteria* 新属細菌の検出と分子系統解析」第 24 回日本微生物生態学会 (予定) (北大)
- ② 本郷裕一 (2008. 10) 「シロアリ腸内共生系研究の最前線ーゲノムから解き明かす培養不能微生物群の実体ー」産業技術総合研究所公開セミナー (産総研、つくば)
- ③ Hongoh Y. (2008. 8) "Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell" 12th International Society for Microbial Ecology (ISME-12) (Cairns, Australia)
- ④ Sato T. (2008. 8) "Simultaneous association of *Desulfovibrio* and Termite Group 1 of bacteria with a single flagellate cell in termite guts" 12th International Society for Microbial Ecology (ISME-12) (Cairns, Australia)
- ⑤ 本郷裕一 (2008. 3) 「シロアリ腸内共生系ゲノム解析」日本農芸化学会 2008 年度大会 (公開シンポジウム「微生物による地球炭素循環と環境バイオテクノロジー」(名城大、名古屋))
- ⑥ 本郷裕一 (2008. 3) 「培養不能シロアリ腸内細菌のゲノム全長取得と解析」第 81 回日本細菌学会総会 (公開シンポジウム「ゲノム微生物学の展開」(京都))
- ⑦ 本郷裕一 (2008. 3) 「偽遺伝子が明らかにしたシロアリ腸内共生未培養新門細菌の適応進化」第 2 回日本ゲノム微生物学会 (阪大)
- ⑧ 本郷裕一 (2007. 12) 「培養できない細菌のゲノム完全長取得による機能推定の試み」理研公開セミナー (和光)
- ⑨ Hongoh Y. (2007. 11) "Complete genome of an uncultured bacterial symbiont in the termite gut" 応用ゲノム国際会議 (東京)
- ⑩ 本郷裕一 (2007. 9) 「シロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌の全ゲノム解析」第 23 回日本微生物生態学会 (公開シンポジウム「微生物生態学における環境ゲノムミクス」(愛媛大))
- ⑪ Ohkuma M. (2007. 9) "Toward understanding the function of highly structured symbiotic microbial community in the gut of termites" ISME-Asia (愛媛

大)

- ⑫ 本郷裕一 (2007. 7) 「培養不能細菌のゲノム全長解析」第 6 回微生物研究会 (公開シンポジウム「微生物の潜在能力を探る」) (理研、和光)
- ⑬ 大熊盛也 (2007. 7) 「シロアリ腸内原生生物とその細胞内共生細菌の共進化」日本進化原生生物学研究会 (JANSTEC、横浜)
- ⑭ 本郷裕一 (2007. 3) 「シロアリに共生する難培養性腸内細菌の全ゲノム配列の決定と解析」日本ゲノム微生物学会第一回年会 (かずさ)
- ⑮ Hongoh Y. (2006. 8) "Culture-independent characterization of the novel candidate phylum TG3 in domain Bacteria" 11th International Society for Microbial Ecology (ISME-11) (Vienna, Austria)

〔その他〕

ホームページ等

1. 理研プレスリリース (2008. 4. 1) 「シロアリ腸内微生物のゲノム解読に世界で初めて成功」

<http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2008/080401/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本郷 裕一 (Hongoh Yuichi)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・協力研究員

研究者番号 : 90392117