

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23780336  
 研究課題名（和文） 食材性昆虫に共生する真核単細胞微生物の木質分解遺伝子の進化と生態  
 研究課題名（英文） Evolution and ecology of cellulolytic enzyme genes in termite gut protist  
 研究代表者  
 野田悟子（NODA SATOKO）  
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授  
 研究者番号：80342830

研究成果の概要（和文）：食材性昆虫シロアリの消化管内には、難培養性の原生生物が複数種類存在し、効率的な木質分解を行っている。しかし、共生原生生物は培養が難しいこと等から解析が困難で、その知見は非常に乏しい。そこで、各原生生物種から木質分解に関わる酵素遺伝子を取得して解析を行った。これらの結果から、原生生物は複数ある木質分解酵素遺伝子の発現量を制御して、効率的な木質分解を行っているとは推定される。

研究成果の概要（英文）：The relationship between termites and microbial community in their gut is a well-known example of symbiosis, which aids efficient digestion of recalcitrant lignocellulose. Because the symbiotic protists are extremely difficult to cultivate, our knowledge about their physiology and functions are poor. In this study, single cell approach was applied for the symbiotic protist to investigate the process for lignocellulose degradation. These results suggests that the GHF gene was selectively expressed from many homologous genes in the genome, it probably attributed to the efficient degradation of lignocellulose by the gut protists.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：木質分解酵素遺伝子、共生原生生物、シロアリ

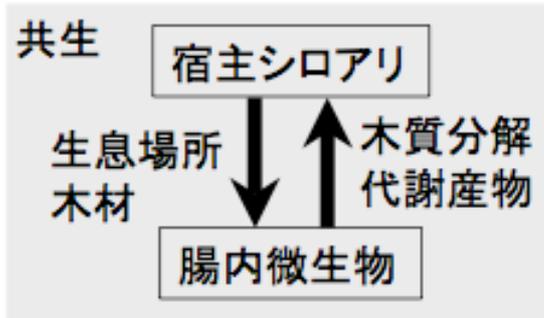
## 1. 研究開始当初の背景

食材性昆虫シロアリの消化管内には、難培養性の真核単細胞微生物である原生生物が複数種類存在し、1匹のシロアリ腸内で原核生物（細菌と古細菌）と共に共生微生物群集を構成している。原生生物の種組成は宿主シロアリの種に特異的で、宿主の種が同じであれば生息地域が異なっても同じ種類の原生生物のセットが共生している。このようなシロアリの後腸内に生息する微生物は、宿主の代謝に重要な役割を果たしていることが知られており、特に木質成分の分解を行っている原生生物が腸内から消失するとシロアリは木材をほとんど利用することができなく

なる（図.1）。

社会性昆虫であるシロアリはコロニーと呼ばれる家族集団で生活し、同巢の個体間で肛門から出される消化管内容物を摂食することにより共生原生生物の受け渡しを行っている。そのためシロアリと原生生物は細胞外共生にも関わらず、宿主の系統と共生原生生物の系統進化が一致（共進化）していることが報告されている。一方で、共生原生生物はシロアリ類に特徴的で他の環境からは見つからず、培養が難しいことから、詳細な木質の分解代謝や分解関連遺伝子の進化に関する知見は非常に乏しい。

図.1 シロアリ共生系



シロアリは、摂食した枯死材の主要成分であるセルロースやヘミセルロースのほぼ100%を分解・利用することが知られている。この高効率性には共生微生物が重要な役割を果たしており、特に結晶性セルロースのほとんどは大型の原生生物によって効率よく分解されると考えられている。これまでに研究代表者らは原生生物群全体の網羅的なメタ EST (Expressed Sequence Tags) 解析を進めており、共生系ではセルラーゼやヘミセルラーゼ等の多様な糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase, GH) 遺伝子が高発現していることを明らかにしている。また解析の結果から、原生生物由来の GH はカビや担子菌類の GH 遺伝子とは系統的に異なり、シロアリ共生原生生物が進化の過程で独自に獲得した遺伝子であることが示唆されている。

GH はアミノ酸配列を基に、100 種類以上のファミリー (GHF) に分類されている。研究代表者らが行ったメタ EST 解析では、複数の GH ファミリーから多様な配列が得られたが、シロアリ共生系には複数種類の原生生物が混在しているため、各遺伝子がどの原生生物種に由来しているのかは未同定のままである。そこでまず、各原生生物種がどのファミリーの木質分解酵素遺伝子のセットを有しているのか解析し、保有する遺伝子から木質分解の効率性を考察する。

## 2. 研究の目的

本研究では、シロアリ共生原生生物が持つ木質分解酵素遺伝子群を対象として、各共生原生生物種がどのような基質に作用する木質分解酵素遺伝子のセットを有しているのか解析し、効率的な木質分解の機構を明らかにすること、並びにそれら木質分解酵素遺伝子の進化的起源に関する知見を得ることを目的とした。研究代表者らの予備的な実験では、SSU rRNA 遺伝子の多型解析に基づいて推定した原生生物の種数よりも、遥かに多様な遺伝子配列が検出されるファミリーの GH が存在していた。この結果は一種の原生生物が同じファミリーに分類される複数の GH 遺

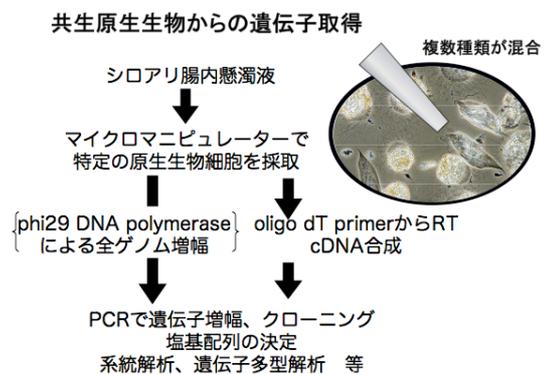
伝子を保有している事を示唆している。そこで、原生生物種内に同一ファミリーの GH 遺伝子が何種類存在しているのかを明らかにする。併せて、各原生生物種が有する同一ファミリーの GH 遺伝子をターゲットとして系統解析を行い、シロアリ共生原生生物にユニークな遺伝子が、原生生物の進化初期に獲得されたのか、他生物種から遺伝子が水平伝播等で獲得されたのかを明らかにする。得られた結果から、原生生物が木質分解関連酵素遺伝子を獲得した生態学的な意義や表現型進化を考察する。

## 3. 研究の方法

鹿児島県に生息するオオシロアリ腸内の原生生物が有する酵素遺伝子を解析することとした。オオシロアリには 20 種以上の原生生物が共生しているが、顕微鏡観察で細胞内に木片が取り込まれている大型細胞の *Eucomonympha* 属、*Trichonympha* 属等を最初のターゲットとした。

1 匹のシロアリ腸内には複数種類の原生生物が混在しているため、顕微鏡下で形態を見分けながらマイクロマンピュレーターで原生生物の 1 細胞を分取した。分取した 1 細胞を鋳型として等温ゲノム増幅法で全ゲノム DNA を増幅、または逆転写酵素を用いて、cDNA の合成を行った。PCR プライマーは共生原生生物群集で高発現していると推定された GHF7、45 のセルラーゼ及び、GHF10 のキシラナーゼ遺伝子をターゲットとして、EST 解析で取得した原生生物由来の配列とカビ等の他生物由来の遺伝子配列を比較考慮して設計した。これらのプライマーを用いて PCR で各遺伝子を増幅し、T-ベクターと連結後、大腸菌の系でクローニングした。その後、各サンプルからコロニーを釣菌して塩基配列を決定し、各配列を相同性によりグループ化して、データベース検索等の配列解析を行った。

図.2 実験手法の概略図



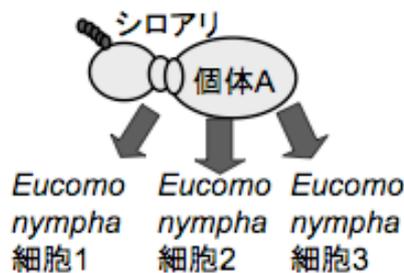
GHF7 遺伝子については、パイロシークエンサーを用いて、大規模な配列決定を行った。

先に調製した DNA 並びに cDNA を鋳型として、高正確性の DNA ポリメラーゼにより、遺伝子を PCR で増幅した。この際、プライマーにはパイロシーケンスで必要なアダプター配列と、サンプルを識別するためのバーコード配列を付加したものを使用した。得られた配列は、Mothur ソフトウェアを用いて解析した。

#### 4. 研究成果

まず、鹿児島県に生息するオオシロアリ腸内の原生物が発現している酵素遺伝子を解析した。新たに設計した GHF7, 45 のセルラーゼ、GHF10 のキシラナーゼ遺伝子増幅用の PCR プライマーを使用し、各原生物細胞が発現する遺伝子を解析した。細胞内に木片が取り込まれている大型の *Eucomonympha* 属、*Trichonympha* 属を 1 細胞づつを鋳型として、RT-PCR を行ったところ、全てのサンプルから DNA の増幅が確認できた。それぞれの増幅産物をクローニング後、各サンプルからコロニーを釣菌して塩基配列を決定したところ、GHF7, 45, 10 の各遺伝子は、2 種の原生物のいずれの細胞でも、1 つの主要な遺伝子が発現していると推定された。また、同一の細胞から GHF7, 45, 10 遺伝子が取得できることから、原生物は複数の木質分解酵素遺伝子を保有しており、各細胞内でそれらが同時に発現機能していることが明らかになった。

図. 3 サンプルの概要 1



ついで、保有する遺伝子から木質分解の効率性を考察するため、ゲノムにコードされる遺伝子の多型を解析した。原生物の単一細胞からゲノム DNA を等温増幅法で調製し(図 3)、各原生物細胞が有する GHF7 のセルラーゼ遺伝子をクローニングした。それぞれのサンプルからコロニーを釣菌して塩基配列を決定したところ、いずれの細胞からも複数の異なる配列が得られた。そこで、パイロシーケンス法で塩基配列を決定して網羅的に解析を行った。その結果、細胞間で共通の配列も検出されたが、多くは細胞ごとにユニークな配列で、多型が非常に多いことが明らかになった。これらのことから、原生物はゲノム中に複数のセルラーゼ遺伝子を重複して保有していると考えられた。また、この

ような遺伝子多重化が高効率な木質分解に関連していることが推察された。

同様に、同一コロニー内の宿主個体が異なる場合(図. 4)、宿主コロニーが異なる同じ原生物種が有する遺伝子(図. 5)についても解析を行った。その結果、それぞれのサンプルの遺伝子多型に明確な違いは確認されなかった。

図. 4 サンプルの概要 2

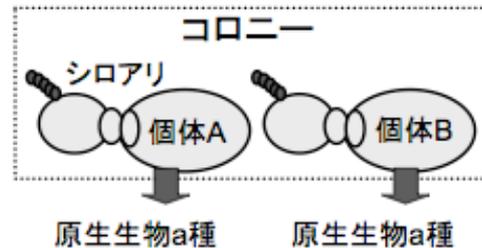
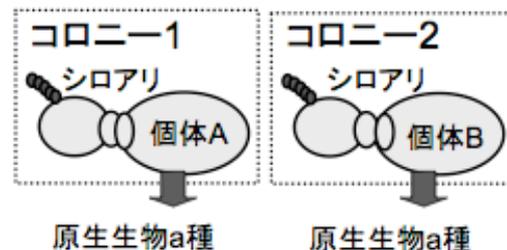


図. 5 サンプルの概要 3



1 匹のシロアリ腸内の原生物の種内の多様性はこれまで報告されていないため、今回検出された多型が原生物種自体の種多様性なのか、同種のバリエーションなのかは分からない。また、原生物のゲノムの倍数性に関する知見もないが、シロアリ共生原生物と同じパラバサリア門で唯一ゲノム解析が行われている *Trichomonas vaginalis* のゲノムサイズは 160Mbp 程度と推定されており、非常に大きいことが報告されている。*T. vaginalis* のゲノム中には細胞骨格のアクチン遺伝子が 20 以上存在していると推定されることから、パラバサリア門原生物では生育に必要な遺伝子がゲノム中に多コピー存在する傾向があることも推定される。また、単為生殖のみを行う分類群では、変異の固定が起こりにくいために、遺伝子の多様化が見られることが知られている。シロアリの共生原生物では有性生殖は確認されていないため、このような増殖様式との関連も考えられる。

今回明らかにした共生原生物のセルラーゼ遺伝子の多重化や種多様性が高効率な木質分解能を有する要因の一つと考えられる。

#### 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)

なし

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) A. Thong-On, K. Suzuki, S. Noda, J. Inoue, S. Kajiwara, M. Ohkuma “Isolation and Characterization of Anaerobic Bacteria for Symbiotic Recycling of Uric Acid Nitrogen in the Gut of Various Termites” *Microbes. Environ.*, vol. 27 pp. 186-192 2012年
- (2) S. Noda, C. Mantini, J. Inoue, O. Kitade, E. Viscogliosi, M. Ohkuma Molecular phylogeny and evolution of Parabasalia with new protein markers and improved taxon sampling. *PlosOne* vol. 7 e29938, 2012年

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 行仕圭佑、雪真弘、大槻隆司、大熊盛也、宇井定春、野田悟子 : 食材性昆虫に共生する原生生物の木質分解酵素遺伝子の多型解析 日本微生物生態学会 豊橋 2012年9月
- (2) S. Noda, Eric Viscogliosi, M. Ohkuma : Molecular phylogeny and evolution of Parabasalia with new protein markers and improved taxon sampling. International symposium on microbial ecology, Denmark, 2012年8月
- (3) 高柳美希、北出理、大槻隆司、宇井定春、大熊盛也、野田悟子 : シロアリの共生 Spirotrichonympha 綱原生生物の分子系統解析 日本微生物生態学会 京都 2011年10月

〔図書〕(計2件)

- (1) 野田悟子 “昆虫に共生する原生生物” 環境と微生物の辞典 (日本微生物生態学会編, 朝倉書店) 印刷中 2013年
- (2) 野田悟子 “環境微生物のオミックス解析” 生物工学会誌, vol. 90, p. 654, 2012年

〔その他〕

ホームページ等  
山梨大学研究者総覧-野田 悟子  
[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_DispeDetail.Scholar](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DispeDetail.Scholar)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野田 悟子 (NODA SATOKO)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授  
研究者番号 : 80342830

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者