

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02897

研究課題名（和文）未培養原生生物1細胞ゲノム解析系の確立とシロアリ腸内木質分解性原生生物の機能解明

研究課題名（英文）Establishing single-cell genomics of uncultured protists and elucidation of functions of cellulolytic protists in the termite gut

研究代表者

本郷 裕一（Hongoh, Yuichi）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：90392117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、シロアリ腸内に共生して木質分解を担う未培養原生生物(単細胞真核生物)の単一細胞からゲノムDNAとRNAを増幅して試料を調製し、次世代シーケンサーを用いてゲノムと遺伝子転写産物の配列を網羅的に取得した。これらの結果を統合して情報解析することで、シロアリ腸内原生生物の基幹代謝系を予測することに初めて成功した。本手法は他の真核細胞にも適用可能であり、多様な未培養原生生物種の生理機能の解明へとつながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中には多様な原生生物種が生息し、生態系において重要な役割を担っている。ところが、そうした原生生物の中には難培養性の種も多く、それらの詳細な生理・生態は未知である。本研究課題では、木材の大害虫であるシロアリの腸内に共生して木片消化を担っている未培養原生生物を題材として、ゲノム解析によってその代謝機能を予測する手法を確立した。この成果は、生態系の実態解明と未培養原生生物種の産業利用にも道を開くものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we prepared both genomic DNA and RNA of a single, uncultured protist cell in the termite gut. We obtained their sequences using next-generation sequencers and computationally analyzed the data. As a result, we were able to predict the basic metabolic pathways of the protist for the first time. With this methodology, it is expected that functional analysis of uncultured protists based on their genomes will significantly progress.

研究分野：微生物生態学

キーワード：微生物生態 未培養微生物 1細胞ゲノミクス 共生 腸内微生物 原生生物

## 1. 研究開始当初の背景

環境中に生息する多様な微生物種の多くは難培養性で、培養をベースとした従来の微生物学的手法では研究対象とすることが困難であった。それが1990年代以後に分子生物学的手法が導入され、特に2000年代後半から次世代DNAシーケンサーが普及すると、未培養微生物群集を対象としたメタゲノム・ビニング(微生物群集全体から取得したDNA断片を、情報解析学的に微生物種ごとに仕分けて機能予測する手法)あるいは1細胞ゲノミクス的手法が確立し、これまで全く機能未知であった多様な微生物種の、ゲノム情報に基づく生理・生態の解明が飛躍的に進んだ。しかしながら、メタゲノム・ビニングや1細胞ゲノミクスは、基本的には原核生物(細菌・アーキア)を対象として最適化されてきた研究手法であり、ゲノムが数十~万倍もあり構造も複雑な原生生物(単細胞真核生物)のゲノム解読には未だ大きな困難がともなっている。

例えばシロアリ腸内には、木材の大害虫であるシロアリの木片消化を担う特異な原生生物群集が必ず共生しているが、それらは培養不能であり、木片を消化していること以外、代謝機能はほとんどわかっていない。シロアリ腸内には、シロアリ特異的な腸内細菌群集も共生しているが、その機能については、メタゲノム・ビニングと1細胞ゲノミクスによって着実に解明が進んでいることと対照的である。特に、原生生物細胞に共生する細菌の様々な機能もゲノム配列から解読されている一方で、その宿主である原生生物の代謝系が未知であるため、シロアリ腸内の多重共生メカニズムは、根本的には不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本課題の目的は、シロアリ腸内の未培養原生生物種を題材として、原生生物1細胞ゲノミクス的手法を最適化・確立するとともに、実際にシロアリ腸内共生原生生物の1細胞からのゲノム解読を試み、その基幹代謝系を予測することである。

## 3. 研究の方法

微生物群集を対象としたメタゲノム・ビニングにおいて、真核生物(原生生物)由来のゲノム断片を識別するプログラムも過去に開発されているが、その精度は低く、効果は限定的である。また、真核生物は遺伝子が(アミノ酸をコードせず、切り出される)イントロンを含むため、ゲノム配列のみを取得しても遺伝子の予測が非常に困難である。そのため、イントロンが切り出されたあとのmRNA(転写産物)配列を網羅的に取得してゲノム配列と比較することで、遺伝子の位置を特定しなければならない。ところがメタゲノミクスでは同種であっても多様な系統由来のゲノム配列が混在し、また1細胞ゲノミクスの場合には、同種であっても異なる細胞からゲノム配列と転写産物配列を取得した場合には、やはり系統の違いから配列にも大きな違いがあるはずで、上手くいかないことが予想される。

そこで本研究では、シロアリ腸内原生生物の単一細胞からまず核をマイクロマニピュレーションで採取して等温全ゲノム増幅を行い、次世代シーケンサーでゲノムDNA配列を取得する。同時に、残りの細胞質部分も採取しておき、SMART法によってmRNA(実際には相補的DNA鎖[cDNA])を増幅して転写産物配列を次世代シーケンサーで網羅的に取得した。

注意点として、シロアリ腸内原生生物を含め、原生生物の細胞質・核・細胞表面には複数の原核生物種が特異的に共生していることが非常に多い。そのため、必然的に取得配列にはこれら原核生物の配列が混入してしまうことになる。こうした共生原核生物も一般に培養不能である上に、新規性が高い系統に属することが多いため、原生生物の1細胞ゲノミクスと並行して細胞共生細菌の分子生態学的同定とゲノム配列取得も行ない、混入配列の識別を確実にする必要がある。最終的には、宿主原生生物だけではなく、これら細胞共生細菌も含めた「ホロビオント」の機能予測を目指すこととした。

## 4. 研究成果

### (1)材料の選定

シロアリ腸内には大きく分けてパラバサリア門とプレアクソスティラ門の原生生物が共生している。その中で対象とする原生生物種の条件として、ゲノムサイズが比較的小さいことが望ましかったが、そういう種は細胞も小さく、(mRNA量も少ないために)1細胞転写産物解析が上手くいかない可能性が高いことが判明した。また、小型種は木片分解にはあまり寄与していない可能性もあり、本研究の生態学的な意義が薄れてしまう。そうしたことも考慮しながら、いくつかの原生生物種で試行錯誤した結果、最終的には、直径100マイクロメートルの中~大型細胞で、かつ多核(100~200くらいの核を持つ)の種類を材料として選択した。同原生生物種は大量の木片を細胞に取り込んでおり、明らかに木質消化を行っている。そして、ゲノムサイズを測定したところ、合計では30Gb以上もの膨大なDNA含量であるが、1核あたりは300Mb以下程度とさほど大きくないので、ゲノム解析対象としては最適と判断した。

## (2) 細胞共生細菌の同定とゲノム解読

シロアリ腸内原生生物はほぼ全ての種が必ず複数の原核生物種（細菌かメタン生成アーキア）をその細胞に共生させている。本研究では、まずそれら共生細菌叢の群集構造と局在を明らかにした。その結果、12種類もの細菌が同時に共生していることが判明した。そのうち4種類は常に共生している絶対共生体で、残り8種類は、宿主細胞によっては不在のこともある日和見型共生体であった。これら共生細菌各種について、蛍光ハイブリダイゼーション（FISH）法による局在解析を実施したところ、原生生物細胞表面、細胞質、さらには核内にまでそれぞれ特異的に細菌が共生していた。これらのゲノム配列を取得するため、宿主原生生物1細胞を界面活性剤で破壊し、核が混入しないように注意しながら、残りの部分をマイクロマニピュレーションで採取した。等温全ゲノム増幅法によってDNAを調製し、イルミナMiSeq（次世代シーケンサー）で共生細菌叢メタゲノム配列を取得、情報解析学的ビンニングによって共生細菌種ごとにゲノムを再構築し、機能を予測した。その結果、細胞質共生エンドミクロビウム属細菌は、動物が合成できない必須アミノ酸とビタミン類の供給を担い、細胞表面共生スピロヘータは空中窒素（N<sub>2</sub>）の固定による窒素分補給を担う相利共生体であると予測された。一方、核内共生ヌクレオコッカスは、自身ではほとんど何も合成できない、宿主原生生物に完全に依存する寄生体であることなどが判明した。

## (3) 原生生物の1細胞ゲノム・転写産物配列の取得

対象原生生物種の1細胞全ゲノム増幅試料を複数個調製し、MiSeqで予備的に配列解析をして、最も品質が高い試料を選抜した。国立遺伝学研究所に依頼して、同選抜試料からイルミナNovaSeq6000で配列を330Gb取得してアセンブル（ゲノム断片の結合）した。結合したゲノム配列断片（コンティグ）を、宿主原生生物由来のものと、混入細菌由来のものに仕分ける必要があったが、これが予想以上に難航した。それは、上記で取得した細胞共生細菌ゲノムの混入にとどまらず、シロアリ腸液中の多種多様な原核生物、さらには木片由来と見られる多様な植物・真菌類のゲノム断片まで混在しており、それらをできるだけマニュアルで判別しながら除去していった。最終的に、総塩基長約150Mbの原生生物ゲノム断片群を取得した。同一細胞由来の網羅的転写産物配列もMiSeqで取得し、ゲノム配列と照合することで遺伝子の位置を特定した。遺伝子数は約28,000であった。真核生物に保存されている遺伝子の個数から判断すると、既知の培養可能な近縁寄生性原生生物（トリコモナスなど）のゲノム配列と同程度に高品質・高完成度のドラフト・ゲノム配列を取得できたことが明らかとなった。

## (4) 原生生物と共生細菌で構成される「ホロビオン」の基幹代謝系

取得した原生生物ゲノムを情報解析によって解読した結果、木片由来の糖を、解糖系を経て酢酸・二酸化炭素・水素などに発酵することが確認できた。一方、動物の必須アミノ酸など、多くの窒素化合物を合成できないことが初めて明らかとなった。すなわち、細胞質に常に局在するエンドミクロビウムのような窒素化合物を供給する共生細菌の存在なくして、生存困難であることが確認できた。この原生生物の基幹代謝系は、既知の寄生性・病原性の近縁種とほとんど同じであり、そこに木質を分解する酵素群の遺伝子をおそらく細菌から獲得したことで、シロアリの生存を可能とする、稀有な木質分解性原生生物へと進化したと考えられる。

以上のように、本研究によって、未培養原生生物の1細胞ゲノム解析系を確立し、これまで未知であったシロアリ腸内原生生物の基幹代謝系を初めて解明することができた。今後、さらに多くの未培養原生生物種のゲノム解読を進めることで、生態系の「ダークマター」解明に貢献できるはずである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 本郷裕一	4. 巻 36
2. 論文標題 環境中の未培養原生生物種の1 細胞ゲノム解読手法の確立	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IFO Research Communications	6. 最初と最後の頁 15-28
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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Mariko, Kuwahara Hirokazu, Murakami Takumi, Takahashi Kazuki, Kajitani Rei, Toyoda Atsushi, Itoh Takehiko, Ohkuma Moriya, Hongoh Yuichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Parallel reductive genome evolution in <i>Desulfovibrio</i> ectosymbionts independently acquired by <i>Trichonympha</i> protists in the termite gut	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 2288 ~ 2301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-020-0688-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林京平, 桑原宏和, 猪飼桂, 高橋一樹, 稲垣辰哉, 吉岡拓哉, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物 <i>Stephanonympha</i> 細胞に共生する多様な細菌系統の局在と機能予測
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回札幌大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本郷裕一, 猪飼桂, 桑原宏和, 小林京平, 豊田敦, 伊藤武彦, 大熊盛也
2. 発表標題 シロアリ腸内木質分解性原生生物（パラバサリア門）のゲノム解析
3. 学会等名 日本共生生物学会第6回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡拓哉, 伊澤和輝, 桑原宏和, 竹内真理子, 加藤大貴, 澤村岩風, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 細胞内共生Endomicrobium属細菌の基幹代謝系の差異と進化過程の考察
3. 学会等名 日本共生物学会第5回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡拓哉, 伊澤和輝, 桑原宏和, 竹内真理子, 加藤大貴, 澤村岩風, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 比較ゲノム解析による細胞内共生Endomicrobium属細菌の多様性と進化過程の考察
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本郷裕一, 猪飼桂, 桑原宏和, 小林京平, 豊田敦, 伊藤武彦, 大熊盛也
2. 発表標題 シロアリ腸内木質分解性原生生物(パラバサリア門)のゲノム解析
3. 学会等名 日本共生物学会第6回大会(医科歯科大)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林京平, 桑原宏和, 猪飼桂, 高橋一樹, 稲垣辰哉, 吉岡拓哉, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物Stephanonympha細胞に共生する多様な細菌系統の局在と機能予測
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回札幌大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡拓哉, 伊澤和輝, 桑原宏和, 竹内真理子, 加藤大貴, 澤村岩風, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物共生Endomicrobium属細菌の完全長ゲノム比較で見出された基幹代謝系の改変
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋一樹, 桑原宏和, 堀川雄太郎, 伊澤和輝, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物に細胞内共生するClostridiales目細菌の比較ゲノム解析
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yiting Liu, 桑原宏和, 間淵貴子, 木原久美子, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物運動共生スピロヘータのゲノム解析
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 傅潔洋, 桑原宏和, 木原久美子, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物Mixotricha paradoxa細胞表面共生Bacteroidales目細菌のゲノム解析
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	山田 明德  (Yamada Akinori)  (40378774)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授   (17301)	
研究 分担者	瀬川 高弘  (Segawa Takahiro)  (90425835)	山梨大学・大学院総合研究部・講師   (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------