

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23657013

研究課題名(和文) シロアリの異種混合コロニーを用いたシロアリ共生微生物群集の成立過程の解析

研究課題名(英文) Studies on the formation process of symbiotic microbial community using host hybridization technique

研究代表者

北出 理 (Kitade, Osamu)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：80302321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微生物群集が形成される時の特性を明らかにするため、種特異的な共生微生物組成をもつ3種のシロアリを交雑させ、雑種コロニーに新たに形成される群集を調査した。多くの場合、雑種の微生物群集の組成は、特定の安定な親種の組成に収束した。また宿主の抗生物質処理は雑種の微生物群集組成の成立に有意な負の影響を与えた。これらの結果は微生物の間の長期間の共適応過程を反映すると考えられる。さらに温度が原生生物群集構造に与える影響と、2種のシロアリの共生原生生物組成を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate characteristics of microbial community in its formation process, we crossed three termite species harboring species-specific symbiotic microbial compositions, and examined community structure of newly formed symbiont community of their hybrids. In most cases symbiont compositions in the hybrid termites converged to a stable composition of a particular parent species. Antibiotic treatment had significant negative effects on the establishment of symbiotic protist compositions of the hybrid colonies. These results probably reflect long-term complex co-adaptation between symbiotic microorganisms. We also clarified effects of temperature on the sybiotic protist community structures and protist faunae of the field colonies of two host termite species.

研究分野：動物生態学

キーワード：共生 原生生物 群集 群集構造 群集の混合

## 1. 研究開始当初の背景

シロアリの消化管内にはパラバサリア類・オキシモナス類に属する木質分解能をもつ共生原生生物が複数種共生し、群集を構成する。群集の種組成は、シロアリの種に特異的である。シロアリ類は、多数の血縁個体がコロニーを構成して生活するが、孵化・脱皮直後のシロアリは原生生物を持たず、そのような個体は肛門食により原生生物を巣仲間から受け取る。さらに、消化管内には多種の細菌・古細菌も存在し、これらが原生生物と相利共生関係にある。

シロアリの共生原生生物群集を用いると、宿主の雑種を人為的に作ることにより、きわめて長期の適応過程を経た自然群集の急激に混合の後に、新たな群集が形成されていく過程が観察可能になる。また抗生物質による処理を用いた原核生物の除去実験や、遺伝子解析手法を用いた詳細な組成の解析を行うことも可能であり、シロアリと共生原生生物の系は、群集生態学の問題に対して自然群集を用いた繰り返しのある操作実験によって答えることを可能にする優れた研究対象となりうる。

## 2. 研究の目的

以上の状況を背景に、以下の4点を目的として研究を行った。

- (1) 自然の原生生物群集を使った操作実験を行い、群集の成立過程と成立要因を解析する
- (2) 原生生物群集に大きな影響を与える事が予測される物理的環境要因(温度)と、生物的環境要因(原核微生物との共生関係)が群集構造に与える影響を解析する
- (3) 野外調査によりシロアリ類の共生原生生物群集組成の特性を解析する
- (4) 共生微生物に遺伝的多型の検出手法を適用し、群集生態学的解析につなげる

## 3. 研究の方法

(1) シロアリの異種混合コロニーにおける、原生生物群集の組成の変化の解析

複数種のシロアリに雑種をつくらせ、共生微生物群集の急激な混合を起こさせた後の、原生生物群集の変化を観察した。奄美大島で採集したアマミシロアリ *Reticulitermes amamianus* とミヤタケシロアリ *R. miyatakei*、茨城県で採集できるヤマトシロアリ *R. speratus* の3種の雌雄有翅生殖虫を用い、6通り(種×雌雄)の組合せで異種間ペア形成を行わせる。同時に3通りの同種ペアも作成する。60日後、120日後、600日後の各組合せのコロニーを対象に、1コロニーあたり5個体のシロアリについて原生生物各種の個体数を検査し、組成の経時的変化を調査した。

(2) 物理的・生物的環境要因が原生生物群集組成に与える影響の解析  
温度条件が原生生物群集に与える影響の解析のため、温度条件を8、18、23、

28と変えてそれぞれヤマトシロアリの実験コロニーを2ヶ月間飼育し、原生生物群集の組成変化を調べる実験を行った。

また、2種のシロアリが保有していた共生原生生物群集が、雑種形成による急激な群集混合の後に再構築される際に、消化管内に共存する多種の細菌が与える影響について調査した。カンモンシロアリとヤマトシロアリの2種のワーカー群の双方あるいは片方にアンピシリンを投与してから混合し、30日間の飼育の後に消化管内の原生生物の種組成を調査した。

(3) 野外のシロアリ類の原生生物組成の調査

徳之島でオオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* の野外巣を採集し、原生生物組成の調査を行うとともに、これまでの本種の野外調査データをまとめた。またイエシロアリ *Coptotermes formosanus* の野外コロニーの原生生物群集を調査することで、その群集組成の変異を明らかにするとともに、統計解析によりワーカーとソルジャーのカスト間での群集構造の相違を解析した。

(4) 共生微生物への遺伝的多型の検出手法の開発と適用

ヤマトシロアリとカンモンシロアリの2種を材料に、長期飼育した2種の雑種コロニーと野外コロニーで、腸内微生物群集を比較する実験を行った。当初計画を変更し、次世代シーケンサーにより真性細菌のSSUrRNA遺伝子の一部の配列を取得し、構成の比較を試みた。

## 4. 研究成果

(1) シロアリの異種混合コロニーにおける、原生生物群集の組成の変化の解析

ペア形成から60日後に同種の生殖虫を交配させたコロニーの群集組成は親種の組成から変化しない(アマミシロアリでは1種の欠損)のに対し、異種生殖虫を交雑させたコロニーでは一旦特異的な種が混合された群集となり、その後決まった組成に収束していく傾向が示された。600日後には、ヤマトとカンモン、ヤマトとアマミの雑種コロニーでは、調べたコロニーは全てヤマト型の組成に収束した。一方、カンモンとアマミの同種コロニーは、両種の特異的組成の中間的な組成に収束した。各型のコロニーの群集構造の類似性にも同様の傾向がみられた。消化管内原生生物群集は種のランダムな組合せによりできるわけではなく、安定な群集は特定の種の組からなること、またカンモンシロアリやアマミシロアリに対してヤマトシロアリのもつ組成はより安定であり、近縁種間での雑種形成の際に後者の組成への置換が起きることが示唆される。

(2) 物理的・生物的環境要因が原生生物群集組成に与える影響の解析

個体数や平均種数は比較的高温の28実験区で最大になったが、多変量解析の結果、

野外コロニーに近い群集構造をとるのは18、次いで23であり、8や28では大きく組成が異なることが示された。温度の周期的変化が群集組成と安定性に大きく影響することが示唆される。

### (3) 野外のシロアリ類の原生生物組成の調査

オオシロアリの保有する共生原生生物組成は *Trichomitopsis* sp.種を除いて南西諸島各島で共通であり、保有率も極めて高かった。*T. sp.*は多くの島で島ごとにその有無が異なっていたが、屋久島では巣により有無が異なっていた。屋久島でこの種を保有する巣としない巣がそれぞれ固まって分布することは、本種の多巢性を示唆する可能性がある

イエシロアリの野外コロニーの共生原生生物の調査の結果、本州西部から八重山諸島までの地域で基本的な3種については全宿主個体が保有しているが、寄生的な小型種1種の有無がコロニーによって異なることが明らかになった。群集組成の変異を明らかにするとともに、ワーカーとソルジャーのカスト間での群集構造の相違を解析し、群集サイズが小さいソルジャーで群集構造の変異が大きい事を明らかにした。

### (4) 共生微生物への遺伝的多型の検出手法の開発と適用

腸内共生細菌の SSUrRNA 遺伝子の解析の結果、人為的に作成した雑種コロニーの消化管内容物からは、現状では片方の親種により近い構成の SSUrRNA 遺伝子の配列が取得され、細菌も偏って配列が引き継がれる傾向が示唆されている。

## 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 7 件)

- ① J. Inoue, K. Oshima, W. Suda, M. Sakamoto, T. Iino, S. Noda, Y. Hongoh, M. Hattori, M. Ohkuma "Distribution and evolution of nitrogen fixation genes in the phylum Bacteroidetes" *Microbes and Environments*, 30, 11-50, 2015, 査読有, doi: 10.1264/jsme2.ME14142.
- ② 野田悟子, 大熊盛也 "「メタトランスクリプトーム研究の現状」常在細菌叢が操るヒトの健康と疾患" *実験医学増刊号*, 32, 693-698, 2014, 査読無
- ③ T. Sato, H. Kuwahara, K. Fujita, S. Noda, K. Kihara, A. Yamada, M. Ohkuma, Y. Hongoh "Intranuclear verrucomicrobial symbionts and implication of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut" *ISME journal*, 8, 1008-1009, 2014, 査読有, doi: 10.1038/ismej.2013.222
- ④ O. Kitade, Y. Hayashi, S. Noda "Symbiotic protist communities in the termite *Coptotermes formosanus* in Japan and a comparison of

community structures between workers and soldiers" *Jap. J. Protozool.*, 46, 21-29, 2013, 査読有, URL: <http://protistology.jp/journal/jjp46/jjp46p21-p29.pdf>

- ⑤ 野田悟子 "環境微生物のオミックス解析" *生物工学会誌*, 90, 654, 2012, 査読無, URL: [https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9010/9010\\_biomedica\\_1.pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9010/9010_biomedica_1.pdf)
- ⑥ O. Kitade, Y. Hayashi, K. Takatsuto, T. Matsumoto "Variation and diversity of symbiotic protist composition in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjoestedti*." *Jap. J. Protozool.*, 45, 29-36, 2012, 査読有, URL: <http://protistology.jp/journal/jjp45/jjp45p29-p36.pdf>
- ⑦ 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." *PLoS One*, 7, e29938, 2012, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0029938

〔学会発表〕(計 18 件)

- ① 北出理, 竹内智勇 "ヤマトシロアリにおける初期コロニーと成熟コロニーの相互作用" 日本生態学会第 62 回大会, 2015.3.21, 鹿児島大学, 鹿児島県・鹿児島市
- ② 北出理, 池内康介 "他種間のシロアリにおける腸内原生生物の交換にバクテリアが与える影響" 日本生態学会第 62 回大会, 2015.3.21, 鹿児島大学, 鹿児島県・鹿児島市
- ③ 角田 滉平, 北出理 "*Hodotermopsis sjoestedti* の野外巣におけるコロニー構造と繁殖様式" 日本生態学会第 62 回大会, 2015.3.19, 鹿児島大学, 鹿児島県・鹿児島市
- ④ O. Kitade "Dynamics of symbiotic protist community after community mixing through the hybridization of two host termite species." 2nd Asian congress of protistology. 2014.11.28, University of Kalyani, Kalyani, India.
- ⑤ 米山真吾, 行仕圭祐, 天野公貴, 雪真弘, 飯田敏也, 大熊盛也, 宇井定春, 野田悟子 "シロアリ腸内原生生物が有する糖質加水分解酵素の多型解析" 環境微生物系学会合同大会, 2014.10.23, アクトシティ浜松コングレスセンター, 静岡県・浜松市
- ⑥ S. Noda, M. Yuki, T. Iida, K. Gyoji, K. Amano, S. Suzuki, M. Ohkuma, S. Ui "Genetic diversity of cellulolytic enzymes in the termite-gut protists." International symposium on microbial ecology, 2014.8.28, Coex Convention Center, Seoul, Korea.
- ⑦ D. Meloni, J. Inoue, S. Noda, M. Ohkuma "Horizontal gene transfers from bacteria in the glycolytic pathway of termite-gut symbiotic protists." International symposium on microbial ecology, 2014.8.28, Coex Convention Center, Seoul, Korea.
- ⑧ 北出理, 高津戸香, 滋田友恒 "「ニフ遺

伝子型」卵の導入がヤマトシロアリの初期コロニーに与える影響" 日本生態学会第 61 回大会, 2014.3.17, 広島国際会議場, 広島県・広島市

- ⑨ 矢吹健太, 北出理 "ヤマトシロアリの初期コロニーにおけるコロニー間相互作用" 日本生態学会第 61 回大会, 2014.3.16, 広島国際会議場, 広島県・広島市
- ⑩ 藤田一磨, 佐藤朋之, 桑原宏和, 野田悟子, 大熊盛也, 本郷裕一 "シロアリ腸内原生生物核内共生細菌の同定と宿主への遺伝子水平伝播" 日本微生物生態学会第 29 回大会, 2013.11.23-25, 鹿児島大学, 鹿児島県・鹿児島市
- ⑪ 北出理, 来栖嘉宏 "腸内原生生物群集における群集混合後の種組成の変化" 日本原生動物学会第 46 回大会, 2013.11.10, 広島大学, 広島県・西条市
- ⑫ 北出理, 来栖嘉宏 "シロアリ 3 種の雑種コロニーにおける共生原生生物群集の変化" 第 60 回日本生態学会大会, 2013.3.7, 静岡県コンベンションアーツセンター, 静岡県・静岡市
- ⑬ 北出理 "イエシロアリの共生原生生物群集の種組成と群集構造" 第 45 回日本原生動物学会大会, 2012.11.24, 兵庫県立大学, 兵庫県・姫路市
- ⑭ 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第 28 回大会, 2012.9.20-22, 豊橋科学技術大学, 愛知県・豊橋
- ⑮ S. Noda, E. Viscogliosi, M. Ohkuma "Molecular phylogeny and evolution of Parabasalia with new protein markers and improved taxon sampling" International symposium on microbial ecology, 2012.8.19-24, Bella Center, Copenhagen, Denmark
- ⑯ 北出理, 高津戸香 "オオシロアリ野外巢のカスト組成・性比と共生原生生物組成" 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会, 2012.3.29, 近畿大学, 奈良県・奈良市
- ⑰ 根本まなみ, 北出理 "ヤマトシロアリの共生原生生物群集に対する温度の影響" 日本生態学会第 59 回大会・第 5 回東アジア生態学会連合大会, 2012.3.20, 龍谷大学, 滋賀県・大津市
- ⑱ 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" 第 27 回日本微生物生態学会, 2011.10.9, 京都大学, 京都府・京都市

〔図書〕(計 2 件)

北出理 東京化学同人 "シロアリ(行動生物学事典)" 2013, p261-262

野田悟子 朝倉書店 "昆虫に共生する原生生物(環境と微生物の事典)". 2014, 448pp

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北出理 (KITADE Osamu)  
茨城大学・理学部・准教授  
研究者番号: 80302321

### (2) 研究分担者

野田悟子 (NODA Satoko)  
山梨大学・総合研究部・准教授  
研究者番号: 80342830

### (3) 連携研究者

なし