

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292047

研究課題名(和文) Bacteroidales目細菌の窒素固定と水素利用の新機能の解明

研究課題名(英文) Study on novel functions of nitrogen fixation and hydrogen utilization in bacteria of the order Bacteroidales

研究代表者

大熊 盛也(OHKUMA, Moriya)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・室長

研究者番号：10270597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：Bacteroidales目細菌において、窒素固定あるいは古細菌の水素代謝に関連する遺伝子をゲノム上に有する細菌種を見出し、培養株で活性を検出した。シロアリ腸内の窒素固定と水素利用還元的酢酸生成に働く細菌として、セルロース分解性原生生物の細胞内共生スピロヘータを同定した。この細胞内共生細菌と原生生物の細胞表層に共生するBacteroidales目細菌2種について、シングルセルゲノム解析で機能と共生機構の解明を行なった。

研究成果の概要(英文)：We found bacterial species in the order Bacteroidales that harbor genes for nitrogen fixation or genes homologous to archaea for hydrogen utilization in the genomes, and we detected the respective activities in their representative cultured strains. We identified an endosymbiotic spirochete species of a termite-gut cellulolytic protist species that contributes to the activities for both nitrogen fixation and hydrogen-utilizing reductive acetogenesis in the gut. Through single-cell genome sequencing, we investigated functions and symbiotic mechanisms of this endosymbiont and two ectosymbiotic Bacteroidales species attached onto cell surface of termite-gut protists.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物機能 窒素固定 水素代謝 共生 シングルセルゲノム 還元的酢酸生成 Bacteroidales目細菌
スピロヘータ

1. 研究開始当初の背景

Bacteroides, *Porphyromonas*, *Prevotella* などの属を含む Bacteroidales 目細菌は、人の腸内や口腔内の常在細菌として多くの分離株が得られており、健康に関わる細菌として古くから研究が盛んである。一方で、本目の細菌は他の動物や様々な自然環境にも多様なものが生息しているが、人常在細菌に比べて研究は決して十分になされていない。

研究代表者らはこれまでに、高効率なセルロース資源の利用機構の解明を目的としたシロアリ腸内共生微生物群集についての研究において、シロアリ腸内にも新規系統群をなす多様な Bacteroidales 目細菌が生息することを明らかとした。腸内の原生生物の細胞内や表層に特異的に共生する種も複数解明した。これらのうち、セルロース分解性の大型原生生物の細胞内共生する Bacteroidales 目細菌が、宿主シロアリの腸内細菌細胞全体の 6-8 割をも占める種で、宿主原生生物と共種分化してきたものであることを明らかにし、培養を介さずに完全ゲノムを解読して *Azobacteroides* 属と命名した。細胞内共生細菌は、原生生物がセルロースを分解して生じる糖を発酵する代わりに、シロアリの食べる材に欠乏する窒素源を窒素固定で得て、アミノ酸やビタミンなどの窒素化合物を生合成して宿主に供給すると推定された。

それまでに、Bacteroidales 目(さらに上位の分類群の Bacteroidetes 門)において、窒素固定機能とその遺伝子の存在についての知見はなく、この *Azobacteroides* 属細菌が初めての報告であった。また、高い水素生成能はシロアリ腸内共生微生物の特徴であるが、水素生成に主に働く原生生物のヒドロゲナーゼの解析の過程で、細胞分画した *Azobacteroides* 属細菌に高い水素利用ヒドロゲナーゼ活性を検出していた。しかし、解読ゲノムには既知の典型的なヒドロゲナーゼ遺伝子は認められなかった。ゲノム配列を精査し、候補遺伝子として古細菌の水素関連代謝に関与する heterodisulfide reductase と sulphydrogenase のホモログ遺伝子群を見いだした。

2. 研究の目的

近年、Bacteroidales 目の分離培養株でも人常在細菌ばかりでなく、多様な環境由来の分離株のゲノム配列も数多く解読されるようになってきた。*Azobacteroides* 属細菌のゲノム解析で新しく見いだした窒素固定と水素利用の新機能について、分離培養株を利用し、多様な Bacteroidales 目細菌群におけるこれら遺伝子群の分布とその意義を明らかにすることを目的とした。

また、シロアリ腸内の共生微生物における窒素固定と水素利用の機能について、腸内で主な働きをしている共生微生物や Bacteroidales 目細菌の関与・貢献を明らかにすること、これら機能に関連した遺伝子を明らかにすることも目的として研究を行った。

3. 研究の方法

Azobacteroides 属で見出された窒素固定遺伝子と古細菌の水素代謝関連酵素ホモログ遺伝子と相同なものを分離培養株のゲノム情報において検索した。研究代表者の所属機関で整備している微生物株のコレクションも利用し、一部はゲノム情報も解読して検索に供した。ゲノム上に見出された窒素固定遺伝子については、分子系統学的に解析し、その進化について考察した。また、ゲノム情報からこれらの機能関連遺伝子が認められた種については、培養可能な微生物株を用いて活性を測定した。

シロアリ腸内の共生微生物については、窒素固定活性と、水素利用活性として原生生物のセルロース分解・発酵過程で生ずる二酸化炭素を還元して酢酸を生成する反応に注目して活性測定を行った。腸内の微生物群集を分画して活性を測定して、腸内でこれら機能に働く微生物の局在を推定した。また、原生生物の細胞内・細胞表層に共生する細菌について、セルソーターを用いてシングルセルに分離後、全ゲノムを増幅してゲノム解析を実施した。得られたゲノム情報から共生細菌の機能を推定した。

4. 研究成果

(1) Bacteroidetes 門細菌のゲノム配列情報を検索して、窒素固定機能に必須と考えられている *nifHDKENB* の 6 つの遺伝子をもつ総計 8 種の Bacteroidales 目細菌を同定した。これらは、7 属にわたる目内の広い系統に分散しており、分離源も様々な環境であった。これらのうち 5 種については、培養株にてアセチレン還元法で窒素固定活性を検出した。系統解析の結果、8 種の細菌の窒素固定遺伝子は嫌気性細菌が有する窒素固定遺伝子の系統の中で単系統となった。窒素固定能は Bacteroidales 目の祖先が有していた機能がこれら 8 種に残っているもので、他の多くの目内の系統では恐らく生態・生息環境と関連して窒素固定能を失ったものと考えられた。また、自然環境中から培養を介さずに直接解析された *nifH* 遺伝子配列のなかで、シロアリ腸内から得られた遺伝子配列の多くがこれら Bacteroidales 目細菌の窒素固定遺伝子に相同であり、Bacteroidales 目の細菌がシロアリ腸内での窒素固定に重要な役割を果たしていると考えられた。

水素代謝に関しては、ゲノム上に古細菌の水素代謝関連酵素のホモログ遺伝子を有しているが、典型的なヒドロゲナーゼ遺伝子を有していない Bacteroidales 目細菌 2 種を同定した。そのうち *Dysgonomonas hofstadii* の培養株を用いて、ベンジルピオロゲンを電子受容体として水素利用ヒドロゲナーゼ活性を検出することができた。活性の検出は再現性が得られたが、用いた測定条件下で数分間程度で消失するというものであり、水素からの電子が細胞内で他の反応に利用されて速やかに消費されているものと考えられた。

(2) シロアリ腸内の細菌による窒素固定と水素利用の 2 つの機能を確認するため、オオシロアリ (*Hodotermopsis sjostedti*) において腸内容物を分画して活性を測定した。水素利用に関しては、シロアリ腸内に特徴的な活性である水素を利用して二酸化炭素から還元的に酢酸を生成する活性として測定した。その結果、大型のセルロース分解性の *Eucomonympha* 属原生生物の細胞内共生細菌が、窒素固定では腸内のほとんどの活性を、還元的酢酸生成では腸内の 6 割程度の高い活性を担っていた。一般に窒素固定反応は水素によって阻害されるが、この細胞内共生細菌ではむしろ水素存在下で活性が増加しており、セルロースを分解して盛んに水素を生成する原生生物細胞内への適応進化と考えられた。細胞内共生細菌を同定したところスピロヘータ門の *Treponema* 属に分類された。

この細胞内共生スピロヘータ細菌をシングルセルに分離してゲノム解析を実施し、これら 2 つの機能を果たすために適した代謝上の細胞内共生機構を解明した。細胞内共生によって、原生生物のセルロースの代謝で生じる還元力（水素）が効率良く処理され、原生生物の分解・代謝が促進されると考えられた。酢酸はシロアリのエネルギー源として利用されるが、原生生物と細胞内共生細菌により、セルロース由来の炭素源のほとんどを酢酸に変換できる。また、窒素固定と固定窒素をアミノ酸やビタミンに生合成するためのエネルギーは、セルロース分解の中間体の糖を利用・代謝することで満たされていると考えられた。このように、原生生物と細胞内共生細菌は、それぞれの代謝の分担と代謝産物の授受を介して効率的に働いていると考えられた。

細胞内共生スピロヘータ細菌のゲノムは、顕著な縮小化は認められず、これまでゲノム解読された原生生物の細胞内共生細菌とは異なっていた。一方、この細胞内共生細菌は、スピロヘータに特徴的な螺旋状の細胞形態ではない桿菌で、実際に形態や運動性に関わる鞭毛遺伝子などが認められず、また、ゲノム上の遺伝子の機能カテゴリーの割合も他

の細胞内共生細菌に類似していた。これらのことから、このスピロヘータ細菌は、細胞内共生の比較的初期段階にあるものと考えられた。ゲノム上には数多くのトランスポゾン様配列がみられ、それら可動性因子によってゲノムが大きく再編されていく過程にあるのかもしれない。また、原生生物の細胞内に共生する *Desulfovibrio* 属細菌のゲノムも解読し、水素利用機能について推定した。

(3) シロアリ腸内のセルロース分解性原生生物の細胞表層で共生する Bacteroidales 目細菌として、*Symbiothrix* 属細菌と *Armantifilum* 属細菌の 2 種について、シングルセルゲノム解析を実施した。これらの細胞表層細菌は、原生生物の細胞内で窒素固定をする *Azobacteroides* 属細菌と姉妹系統関係にある。

Symbiothrix 属細胞表層共生細菌の場合、予想に反して、窒素固定遺伝子がゲノム上に認められなかった。一方で、セルロース・ヘミセルロースの分解酵素遺伝子が数多く認められ、木質成分の分解への関与が推定された。これまでセルロース分解性原生生物を共生させているシロアリ腸内では、細菌は分解にほとんど寄与していないと考えられていた。しかし、ゲノム上には結晶性セルロースの分解に重要な酵素遺伝子は見られず、この細菌が細胞表層で木質成分を部分分解したのちに、原生生物が細胞内に取り込んで完全分解を果たすという機能分担の可能性が考えられた。

Armantifilum 属細胞表層共生細菌のゲノムには、*Symbiothrix* 属細菌とは異なり、セルロース分解関連酵素遺伝子は乏しかったが、*Azobacteroides* 属のものと同様の高い窒素固定遺伝子に加えて、金属補因子の異なる酵素をコードするもう一つの窒素固定遺伝子 (*anf*) が見出された。以前の研究で、*Armantifilum* 属細菌が腸内で優占するシロアリでは、この *anf* 遺伝子が腸内で主に発現する窒素固定遺伝子であることが判明しており、*Armantifilum* 属細菌が腸内での窒素固定に主要な役割を果たしていることが確認できた。

古細菌の水素関連代謝酵素ホモログの遺伝子は、*Azobacteroides* 属、*Symbiothrix* 属、*Armantifilum* 属細菌のゲノムに共通してみられた。これらの細菌における水素からの電子受容体については未解明であるが、共通した反応である可能性がある。水素利用の古細菌のホモログ遺伝子と窒素固定遺伝子の両者をもつ、Bacteroidales 目の分離培養株は本研究では見出せず、*Symbiothrix* 属細菌は窒素固定遺伝子を有していないので、両者の機能は独立したものである可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

- 1 Kuwahara H, Yuki M, Izawa K, Ohkuma M, and Hongoh Y. 2017. Genome of ' *Ca. Desulfovibrio trichonymphae* ', an H₂-oxidizing bacterium in a tripartite symbiotic system within a protist cell in the termite gut. *ISME J.* 11(3): 766-776. 査読有 doi: 10.1038/ismej.2016.143
- 2 Igai, K., M. Itakura, S. Nishijima, H. Tsurumaru, W. Suda, T. Tsutaya, E. Tomitsuka, K. Tadokoro, J. Baba, S. Odani, K. Natsuhara, A. Morita, M. Yoneda, A. R. Greenhill, P. F. Horwood, J. Inoue, M. Ohkuma, Y. Hongoh, T. Yamamoto, P. M. Siba, M. Hattori, K. Minamisawa, and M. Umezaki. 2016. Nitrogen fixation and *nifH* diversity in human gut microbiota. *Sci. Rep.* 6: 31942. 査読有 doi: 10.1038/srep31942
- 3 雪 真弘、大熊 盛也. 2016. 難培養微生物のシングルセルゲノム解析 バイオサイエンスとインダストリー 74(6): 488-491. 査読無
- 4 Ohkuma, M. 2016. The outset of another nitrogenase. *Environ. Microbiol.* 18(1): 4. 査読無 doi: 10.1111/1462-2920.13001
- 5 Yuki, M., H. Kuwahara, M. Shintani, K. Izawa, T. Sato, D. Starns, Y. Hongoh, and M. Ohkuma. 2015. Dominant ectosymbiotic bacteria of cellulolytic protists in the termite gut also have the potential to digest lignocellulose. *Environ. Microbiol.* 17(12): 4942-4953. 査読有 doi: 10.1111/1462-2920.12945
- 6 Ohkuma, M., S. Noda, S. Hattori, T. Iida, M. Yuki, D. Starns, J. Inoue, A.C. Darby, and Y. Hongoh. 2015. Acetogenesis from H₂ plus CO₂ and nitrogen fixation by an endosymbiotic spirochete of a termite-gut cellulolytic protist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112(33): 10224-10230. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1423979112
- 7 Inoue J., K. Oshima, W. Suda, M. Sakamoto, T. Iino, S. Noda, Y. Hongoh, M. Hattori, and M. Ohkuma. 2015. Distribution and evolution of nitrogen fixation genes in the phylum *Bacteroidetes*. *Microbes Environ.* 30(1): 44-50. 査読有 doi:10.1264/jjsme2.ME14142
- 8 Pramono, A.K., M. Sakamoto, T. Iino, Y. Hongoh, and M. Ohkuma. 2015. *Dysgonomonas termitidis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(Pt2): 681-685.

査読有 doi:10.1099/ijs.0.070391-0

- 9 雪 真弘、大熊 盛也. 2015. シロアリ腸内共生系の解明 日本微生物生態学会誌 30(1): 2-4. 査読無
- 10 Yuki, M., K. Oshima, W. Suda, M. Sakamoto, T. Iida, M. Hattori, and M. Ohkuma. 2014. Draft genome sequence of *Bacteroides reticulotermitis* strain JCM 10512^T, isolated from the gut of a termite. *Genome Announc.* 2(1): e00072-14. 査読有 doi:10.1128/genomeA.00072-14

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1 大熊 盛也. 2015 年 12 月 シロアリ腸内の原生生物の細胞内で効率的に働く共生細菌 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「はたらく細胞内共生体」 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)(招待講演)
- 2 Ohkuma M. 2015 年 9-10 月 CO₂- and N₂-fixing endosymbionts of termite-gut cellulolytic protists. 2nd International Symposium and 4th Annual Research Meeting on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. 筑波大学大学会館(茨城県つくば市)(招待講演)
- 3 大熊 盛也 2015 年 8 月 シロアリ腸内の原生生物細胞内の細菌の共生と進化 日本進化学会第 17 回大会 ワークショップ"Endosymbiosis and Organellogenesis" 中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)(招待講演)
- 4 Ohkuma M. 2014 年 10 月 Metabolic integration across endosymbiotic communities. National Academy of Science, USA, Arthur M. Sackler Colloquium "Symbioses becoming permanent: The origins and evolutionary trajectories of organelles". Irvine CA, USA (招待講演)
- 5 Ohkuma M. 2014 年 7 月 Molecular studies of termite-gut protists on cellulose utilization. IUSSI 2014, International Union for the Study of Social Insects International Congress. Cairns, Australia (招待講演)

〔図書〕(計 3 件)

- 1 大熊 盛也 2016. 第 7 章 シロアリ共生微生物 「共生微生物-生物と密接に関わるミクロな生命体- 大野博司(編)」化学同人 pp. 75-84.
- 2 雪 真弘、大熊 盛也. 2015. シングルセルゲノム解析技術の現状と展望 「難培養微生物研究の最新技術 III-微生物の生き様に迫り課題解決へ- 大熊 盛也、野田 悟子(監修)」シーエムシー出版 pp. 30-40.
- 3 大熊 盛也. 2014. 88. シロアリと微生物 「環境と微生物の事典 日本微生物生態学会編」 朝倉書店 pp. 198-199.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

〔その他〕

プレスリリース（計 2 件）

1 シロアリ腸内の原生生物の表面共生細菌
がリグノセルロース分解に寄与 - 1 細胞の
細菌をゲノム解析することで解明 - 2015
年 7 月

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150706_1/

2 シロアリは腸内微生物によって高効率に
エネルギーと栄養を獲得 2015 年 5 月

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150512_2/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大熊 盛也 (OHKUMA, Moriya)

理化学研究所バイオリソースセンター・
室長

研究者番号：10270597

(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

本郷 裕一 (HONGO, Yuichi)

東京工業大学生命理工学研究科・教授

研究者番号：90392117

(4)研究協力者

雪 真弘 (YUKI, Masahiro)

井上潤一 (INOUE, Jun-ichi)