

平成30年6月18日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18604

研究課題名(和文) シロアリ腸内原生生物に核内共生する細菌のゲノム解析および宿主への遺伝子水平伝播

研究課題名(英文) Genomics of intranuclear bacteria of the termite gut protist and gene transfer from the bacteria to the host

研究代表者

桑原 宏和 (Kawahara, Hirokazu)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10528053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリ腸内には、原生生物、原核生物が共生しており、さらにその原生生物の細胞外、細胞質、核内にまで原核生物が共生するといった多重共生系が存在する。本研究では、*Trichonympha agilis*の核内に共生する2種のVerrucomicrobia門細菌のゲノム解析を行った。ゲノム解析の結果、*T. agilis*核内共生細菌は、多くの代謝産物を自ら合成することが出来ず、宿主にそれらを依存しているのではないかと考えられた。またIII型分泌装置の一部を持ち、宿主との共生に関与しているのではないかと考えられた。核内共生細菌のゲノム解析により宿主との共生関係の一端を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Termites harbor protists and prokaryotes in their guts. Furthermore the protists generally establish a symbiotic relationship with multiple species of prokaryotes, which reside in their cytoplasm, attach onto the cell surface or nucleoplasm. However the functions of the symbionts and the symbiotic mechanisms mostly remain unclear due to difficulties to culture the symbionts and the hosts. In this study, we have performed a genome analysis of intranuclear Verrucomicrobial symbionts of *Trichonympha agilis*. The genome analysis suggests that the intranuclear symbionts are not able to synthesize many metabolites and depend on the host for the metabolites. In addition, the genomes have partial genes for type III secretion system, suggesting that the type III secretion system is possibly utilized for the host-symbiont interaction. The genome analysis of intranuclear symbionts revealed part of the symbiotic relationship with the host.

研究分野：共生ゲノム

キーワード：共生 ゲノム 核内共生 難培養微生物 シロアリ

## 1. 研究開始当初の背景

シロアリは植物枯死体のみを餌として繁殖する社会性昆虫で、腸内に莫大な数のセルロース分解性原生生物(単細胞真核生物)と多様な真正細菌、および古細菌が共生している。ある種の原生生物は、さらにその細胞内に複数種の真正細菌を共生させており、多様な共生系を研究するための格好の材料である。1944年にKirbyが顕微鏡観察により、シロアリ腸内原生生物 *Trichonympha* の核内に微生物が存在することを明らかにしていたが、その正体は長い間謎であった。

代表者らは、2種類の *Verrucomicrobia* 門細菌 (K1, K2) が *T. agilis* 核内に同時、あるいは一方のみが共生していることを明らかとし (図1)、1944年に発見された核内共生体の正体を、約70年後に *Verrucomicrobia* 門細菌であると突き止めることができた。また、2種類の核内共生細菌の16S rRNA 遺伝子が、宿主核へ水平伝播し、偽遺伝子化していることも明らかとした (Sato, Kuwahara et al. ISMEJ 2014)。さらに *T. agilis* の細胞質に別種の *Verrucomicrobia* 門細菌が共生することも発見している。

しかしながら、これら核内共生細菌の機能は不明で、宿主との共生関係の詳細はわかっていない。

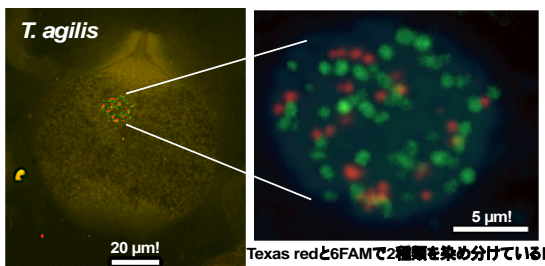


図1 FISH解析: 核内に2種類の *Verrucomicrobia* 門細菌が共生

## 2. 研究の目的

シロアリ腸内に共生する微生物のほとんどは培養が困難であり、その機能、生態は不明である。本研究では、*T. agilis* の核内または細胞質共生 *Verrucomicrobia* 門細菌のゲノム解析を行い、機能を推定し宿主との共生関係を明らかとする。さらに水平伝播した遺伝子をプローブに染色体 FISH を行い、実際に核にコードされていることを証明し、宿主ゲノム内で水平伝播した遺伝子が、どのように進化してきたのかを明らかとする。

## 3. 研究の方法

• DNase I とマイクロメスをを用いた宿主 DNA の分解による核内共生 *Verrucomicrobia* 門細菌の取得

*T. agilis* の核内共生 *Verrucomicrobia* 門細菌のゲノム解析にあたり、2種類が共存した状態では、ゲノムシーケンスした配列が、どちらのものか識別するのが困難である。そこで、FISH 解析により、1種類の *Verrucomicrobia* 門細菌が、*T. agilis* 核内に共生する割合の高いシロアリコロニーを用い、*T. agilis* 1核を DNase I 中でメスで切開し、宿主の核 DNA を分解後、PCR チューブに回収し、DNase を失活させることで核内共生 *Verrucomicrobia* 門細菌を取得する。

• セルソーターによる細胞質/核内共生 *Verrucomicrobia* 門細菌の分取

FISH 解析により、細胞質に *Verrucomicrobia* 門細菌が大量に存在する割合の高いコロニーを探索し、それを用い細胞質 *Verrucomicrobia* 門細菌特異的プローブで染色後、細胞をセルソーターで分取する。また核内 *Verrucomicrobia* 門細菌の共生する割合の高いコロニーを用い、2種類の核内 *Verrucomicrobia* 門細菌に特異的なプローブで染色後、それらをセルソーターで分取する。

• 培養を介さない全ゲノム増幅によるゲノム DNA の調製

少数の細胞からコンタミネーションを除いた全ゲノム増幅方法については、所属研究室で方法を確立しており (Hongoh et al. PNAS 2008)、上記のように取得したサンプルについて全ゲノム増幅を行う。全ゲノム増幅後、目的の共生細菌由来のゲノム DNA が取得できているかを調べるため、まずはそれぞれに特異的なプライマーを用いて16S rRNA 遺伝子の PCR を行う。その結果、目的の1種類の *Verrucomicrobia* 門細菌のみが検出されたサンプルについて真正細菌用のプライマーを用い、16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行う。これらにより、全ゲノム増幅したゲノム DNA が、主に目的の共生細菌由来であることを確認し、ゲノムシーケンスを行うサンプルを決定する。

• ゲノムライブラリー作製 / シーケンス / アッセムブル / フィニッシング

Truseq PCR-free ライブラリー調製キット (Illumina) を用い、インサート長が約 600bp のペアエンドライブラリーを作製する。また、インサート長 2~3kb、4~5kb のライブラリーを、Nextera mate pair ライブラリー調製キット (Illumina) を用いて作製する。次世代シーケンサー-Illumina Miseq のシーケンスキット V3 (300 bp x 2) を用い、ゲノムシーケンスを行う。さらに PacBio を用いシーケンスを行う。得られた配列をアッセムブルし、コンティグ / scaffold を作製する。コンティグ間のギャップ配列のシーケンスは、PCR 増幅後、サンガー法でプライマーウォーキングにより決定する。以上の方法により、*T. agilis* の核内および細胞質に共生する *Verrucomicrobia* 門細菌

のゲノム配列を取得する。

#### ・ゲノム情報解析

ゲノム配列から rRNA、tRNA および ORF を抽出し、相同性検索により遺伝子を同定する。ゲノムにコードされている遺伝子セットから共生細菌の代謝系を推定する。また、近縁な細菌とのゲノム比較から、原核生物に普遍的にコードされている遺伝子の有無、ゲノム構造について解析する。

2 種類の核内共生 Verrucomicrobia 門細菌のゲノムが得られた場合には、それらを比較し核内での役割を明らかにする。さらに核内共生と細胞質共生 Verrucomicrobia 門細菌のゲノムを比較し、どの遺伝子が核内か細胞質共生を決めているのかを明らかにする。また、これらとゾウリムシの核内に共生する *Holospora* のゲノムとを比較することで、普遍的な核内共生機構を明らかとする。

#### ・宿主への水平伝播遺伝子の検索/染色体 FISH

宿主 *T. agilis* のゲノム配列から Verrucomicrobia 門細菌 (真正細菌) に相同性の高い配列を検索し、16S rRNA 偽遺伝子以外の水平伝播した遺伝子を探索する。さらに水平伝播した遺伝子をプローブに染色体 FISH を行い、実際に核にコードされていることを証明し、宿主ゲノム内で水平伝播した遺伝子が、どのように進化してきたのかを明らかとする。

## 4. 研究成果

*T. agilis* の核内共生 Verrucomicrobia 門細菌のゲノム解析にあたり、FISH 解析により、1 種類の Verrucomicrobia 門細菌が、*T. agilis* 核内に共生する割合の高いシロアリコロニーを発見した。そのコロニーを用い、*T. agilis* 1 核を DNase I 中でメスで切開し、宿主の核 DNA を分解後、PCR チューブに回収し、DNase を失活させることで核内共生 Verrucomicrobia 門細菌を取得した。このままでは、ゲノム DNA 量が微量なため全ゲノム増幅を行った後、目的の共生細菌由来のゲノム DNA が取得できているかを調べるため、真正細菌用のプライマーを用い、16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。その結果、2 種類 (K1, K2) それぞれの核内共生細菌を主に含むサンプルを取得出来ていたことが明らかとなった。

また FISH 解析により、*T. agilis* の核が肥大し核内に 1 種の共生細菌が充満している個体を発見した。その核のみをマイクロマニピュレーターを用いて回収し、DNase 処理後、ゲノム増幅、次世代シーケンサーライブラリー調製、ゲノムシーケンスを行った。ゲノム増

幅は、鋳型となる DNA が 1 細胞由来のような微量であると、増幅バイアスの影響が大きくなりゲノムの再構築が難しくなる場合がある。先ほどの核内に充満している細菌を用いることで、ゲノム増幅のバイアスの影響を抑えることができ、質の高いゲノムを得ることが期待できる。

これらのゲノム DNA サンプルを用い、Illumina Miseq のペアエンドおよびメイトペア・ライブラリー、さらに PacBio を用いゲノムシーケンスを行った。

また、*T. agilis* の細胞前部に絶対共生する *Ca. Desulfovibrio trichonymphae* の完全長ゲノム配列 (1.4 Mb) の取得に成功し、*T. agilis* 細胞内での複雑な共生関係の一端を明らかとした。さらに今回の核内共生細菌の情報を加えることで、より詳細な共生機構を明らかにできると考えられる。

ゲノムシーケンス後、シーケンスリードのクオリティーコントロールを行った後、上述の *Ca. Desulfovibrio trichonymphae* と同時共生細菌の Rs-D17 のゲノムにリードをマッピングし、核内共生細菌以外のリードを除いた。マッピングされなかったリードをアッセンブルした結果、核内共生 Verrucomicrobia 門細菌 (K1, K2) のそれぞれ約 1 Mb のドラフトゲノムを取得することができた。

ゲノム解析の結果、*T. agilis* 核内共生細菌は、多くの代謝産物を自ら合成することが出来ず、宿主にそれらを依存しているのではないかと考えられた。また III 型分泌装置の一部を持ち、宿主との共生に関与しているのではないかと考えられた。

今後これら未培養微生物の詳細なゲノム解析により、核内共生細菌の機能、および宿主との共生関係の一端を解明する。さらに異なる種の核内共生細菌のゲノムを比較することにより、核内共生機構の詳細を明らかにする。

また、細胞質共生 Verrucomicrobia 門細菌について FACS とマイクロマニピュレーションを用いて細胞の取得を試みている。

染色体 FISH については現在プローブを作製しハイブリ条件などを検討している。

#### 参考文献

Sato T.\*, Kuwahara H.\*, Fujita K., Noda S., Kihara K., Yamada A., Ohkuma M., Hongoh Y. (\*Equally contributed),

Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut

The ISME Journal 8: 1008-1019 (2014).

Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Taylor TD, Kudo T, Sakaki Y, Toyoda A, Hattori

M, Ohkuma M. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell.  
Proc Natl Acad Sci U S A 105: 5555-5560 (2008).

#### 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 4 件)

1. Yuniar Devi Utami, Hirokazu Kuwahara, Takumi Murakami, Takahiro Morikawa, Kaito Sugaya, Kumiko Kihara, Masahiro Yuki, Nathan Lo, Pinsurang Deevong, Sasitorn Hasin, Warin Boonriam, Tetsushi Inoue, Akinori Yamada, Moriya Ohkuma, Yuichi Hongoh  
Phylogenetic Diversity and Single-Cell Genome Analysis of “Melainabacteria”, a Non-Photosynthetic Cyanobacterial Group, in the Termite Gut.  
Microbes and environments 33.1 (2018): 50-57.

2. Izawa Kazuki, Kuwahara Hirokazu, Sugaya Kaito, Lo Nathan, Ohkuma Moriya, Hongoh Yuichi  
Discovery of ectosymbiotic Endomicrobium lineages associated with protists in the gut of stolotermitid termites.  
Environmental microbiology reports 9.4 (2017): 411-418.

3. Masahiro Yuki, Mitsuo Sakamoto, Hirokazu Kuwahara, Yuichi Hongoh, Moriya Ohkuma  
Draft Genome Sequence of *Lactococcus* sp. Strain Rs-Y01, Isolated from the Gut of the Lower Termite *Reticulitermes speratus*.  
Genome announcements 5.38 (2017): e00999-17.

4. Hirokazu Kuwahara, Masahiro Yuki, Kazuki Izawa, Moriya Ohkuma, Yuichi Hongoh  
Genome of ‘*Ca. Desulfovibrio trichonymphae*’, an H<sub>2</sub>-oxidizing bacterium in a tripartite symbiotic system within a protist cell in the termite gut.  
The ISME journal 11.3 (2017): 766.

[学会発表](計 3 件)

1. 名倉有一、桑原宏和、原田真実、豊田敦、大熊盛也、本郷裕一  
シロアリ腸内原生生物の核内に共生する未培養 Verrucomicrobia 門細菌の多様性とゲノム解析  
ゲノム微生物学会 2018

2. Hirokazu Kuwahara, Yuichi Hongoh  
Functional genomics of multiple endo- and ectosymbionts of termite gut protists  
“BIOLOGY OF SYMBIOSIS” WORKSHOP

2017

3. 桑原宏和、雪真弘、伊澤和輝、大熊盛也、本郷裕一  
シロアリ腸内原生生物に共生する *Desulfovibrio* 属細菌のゲノム解析による 3 者間共生システムの解明  
日本微生物生態学会 2016

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

桑原 宏和 (KUWAHARA, Hirokazu)  
東京工業大学 生命理工学院 助教  
研究者番号：10528053