

令和元年6月13日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08109

研究課題名(和文) シロアリの材食性を担う共生原生生物の遺伝子重複と木質分解能の関係

研究課題名(英文) Influence of gene duplication and cellulolytic ability of symbiotic protists on adaptability of the termite to xylophagy.

研究代表者

野田 悟子 (NODA, Satoko)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：80342830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食材性昆虫シロアリ自身は木材を効率よく消化できず、腸内に共生する難培養性の原生生物が木材成分の分解に主要な働きを担っている。本研究では、各原生生物の分解能が共生系全体にどのように寄与しているのか明らかにすることを目的とし、細胞ごとの木質分解酵素遺伝子発現量を定量解析する手法や、原生生物の細胞サイズによる分画条件を検討した。これらの結果から、共生系の木質分解においては大型原生生物の寄与が非常に大きい、小型原生生物や原核生物の木質分解が協同的に機能することで高い効率性が生じていることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロアリに共生するパラバサリア門原生生物は培養が難しく、生理学的・遺伝学的解析があまり進んでいない生物群の一つである。パラバサリア門原生生物の多くはシロアリ類の消化管のみで生息が報告されているが、ヒトの代表的な性感染症トリコモナス症の病原原生生物や、トリ等の動物に寄生する種も含まれている。しかし、シロアリ類の共生種以外では木質分解能は報告されておらず、昆虫・微生物間の共生成立過程や原始的な真核単細胞微生物(原生生物)の生態環境への適応進化過程の解明のモデルとして意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：A protistan community in the gut of wood-feeding lower termite is essential for the survival of termites that thrive on cellulosic matter. The gut symbiotic protists are extremely difficult to cultivate, our knowledge about their degradation process of lignocellulose and metabolism are poor. In this study, we analyzed that the expression level of glycoside hydrolase gene of each protist cell and the role to decomposition of wood materials. This study revealed that large protist species mainly contributed to decomposition of wood. However, the cooperative decomposition with small protist species and prokaryote is probably essential for more efficient degradation of wood.

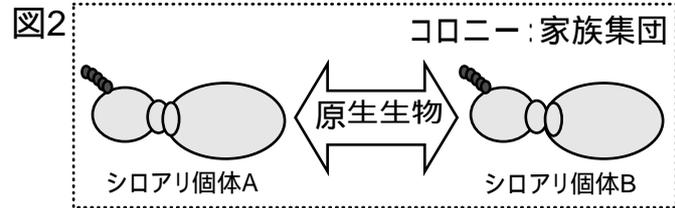
研究分野：微生物生態学

キーワード：シロアリ 共生原生生物 セルラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、細菌や古細菌と共に共生微生物群集を構成している(図1)。



共生原生生物は宿主が脱皮する際に腸内から一旦消失するが、コロニーと呼ばれる家族集団のシロアリ個体間での消化管内容物の受け渡しにより再感染する(図2)。このため、宿主シロアリと原生生物は進化的にも密接な関係となっている。様々な共生微生物が宿主の代謝に重要な役割を果たしているが、特に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。しかしながら共生原生生物は培養が難しく、木質分解についての知見は乏しい。そこでこれまでの研究で、培養を介さずに原生生物群全体を対象として発現遺伝子解析(メタトランスクリプトーム)を行い、原生生物がセルラーゼ等の多様な木質分解に関わる糖質加水分解酵素(Glycoside hydrolase Family, GHF)遺伝子を高発現していることを明らかにした。原生生物が有するGHF遺伝子の多くは、木質分解活性を有する*Fusarium*属等のカビや*Trichoderma*属等の担子菌類等、他の真核生物由来のGHFと全く異なり、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た。一方で、細菌等から水平伝播によって獲得されたと推定されるGHF遺伝子も検出されている。

共生原生生物群集で高発現しているGHFのうち、結晶性セルロースに作用するGHF7のセロピオヒドロラーゼ(CBH)、非結晶性のセルロースに作用するGHF45のエンドグルカナーゼ(EG)、ヘミセルロースを分解するGHF10のキシラナーゼ(Xyl)遺伝子の解析から、原生生物は1細胞のゲノム上にタイプの異なる複数の遺伝子を有し、木質分解に寄与していることが推定された。また、相同遺伝子が重複して存在している可能性や一部の遺伝子が偽遺伝子化していることが推定されたが、偽遺伝子や多型の数は原生生物種や遺伝子ごとに異なり、これらの違いが木質分解に果たす役割などについては不明であった。

2. 研究の目的

日本国内最大のシロアリ種であるオオシロアリ1匹の腸内には、約20種10万細胞もの原生生物が棲息している。共生系の木質分解効率は非常に高く、シロアリが摂食した木材に含まれるセルロースやヘミセルロースの9割以上が分解・代謝されている。しかし、原生生物の1細胞内で木質のほとんどが小分子にまで分解・代謝されているのか、原生生物種や細胞ごとに特異的な基質を分解するののかは明らかにされていない。効率的な木質分解システムを理解する上で、個々の原生生物細胞内のGHF遺伝子の発現を明らかにすることは非常に重要と考えられる。

本研究では、細胞分画等の物理的な手法や宿主シロアリの食餌条件の検討等により、共生系全体の木質分解活性に寄与する各原生生物種の寄与を明らかにすることを目的とする。さらに、GHF遺伝子の発現を細胞ごとに解析する手法を開発し、同種の原生生物が共生系内で同じ機能を担っているのか、細胞の状態により活性が異なるのかを明らかにする。細胞ごとの酵素活性が共生群集全体にどのように寄与しているのか解析することで、効率的な木質分解に対する知見を得る。遺伝子重複の頻度と発現量の関係や、遺伝子の獲得進化と酵素活性について考察し、遺伝子重複がもたらす生態学的な意義を解明する。

3. 研究の方法

・効率的な木質分解活性測定系の構築

セルラーゼ活性測定においては、反応生成物である還元糖を定量する方法が用いられている。DNS(3,5-ジニトルスリチル酸)法、ソモギー・ネルソン法、およびテトラゾリウムブルー法が代表的な還元糖定量法とされる。このうち、グルコースでの定量範囲が最も低濃度であるテトラゾリウムブルー法を用いた測定法を検討した。シロアリ腸内には20種類程度の原生生物種が混在しているため、特定の原生生物の活性を測定するのは非常に難しいため、原生生物の細胞サイズの違いによる遠心分画を試みた。

・原生生物1細胞からのcDNA調製法と定量RT-PCR法の検討

セルラーゼ(GHF7,45等)、キシラナーゼ(GHF10)遺伝子を対象として、原生生物細胞毎の遺伝子発現量を測定した。1細胞の発現量を評価する手法として定量PCR(qPCR)法を検討した。定量PCR用のプライマーは、既に行っているパイロシーケンスで得られたGHF遺伝子の多型解析の結果も参考にして設計した。相対定量の内蔵性コントロールには、シロアリ共生原生生物を含むパラバサリア門原生生物の系統マーカーとしてよく用いられる解糖系酵素GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)や、これまでに系統解析で取得した系統マーカー遺伝子を用いて検討した。宿主シロアリの食餌条件を変更し、原生生物種の構成にどのような変化が見られるか、細胞数の計数を行った。また、検討した条件下の各原生生物細胞の遺伝子発現量は定量PCRで算出した。

4. 研究成果

セルラーゼ(GHF7,45等)とキシラナーゼ(GHF10)遺伝子を対象として、原生生物細胞毎の遺伝子発現量を測定する系の確立を行った。これまでに明らかにした各原生生物種のGHF遺伝子多型のデータをもとに、定量PCR用のプライマーの設計を行った。対象とする原生生物遺伝子をクローニングしてコントロールプラスミドを調整し、プライマーの特異性と増幅効率をチェックした。1細胞から得られるmRNAは極微量であることから、PCRのサイクル数や条件を検討し、定量限界を設定した。オオシロアリ共生原生生物種の*Trichonympha*属及び*Eucomonympha*属の1細胞から調整したcDNAから、ハウスキーピング遺伝子を含む4種類の遺伝子の発現量をqPCR法で測定可能な系を構築することができた。いくつかの1細胞を解析したところ、両原生生物ともにGHF7のセロビオヒドロラーゼ遺伝子をもっとも高発現していることが明らかになった。また、細胞ごとの遺伝子コピー数は大きく異なることが推定された。いずれのGHF遺伝子も、細胞あたりの遺伝子コピー数は*Eucomonympha*属原生生物の方が多いと推定された。

甲虫(カブトムシやクワガタ)類の幼虫のエサとして用いられる発酵木材チップや、ろ紙(セルロース)等の人工飼料でのシロアリの飼育が可能か検討したところ、ヤマトシロアリでは発酵木材チップでシロアリの生存率や原生生物叢に大きな影響は見られなかったが、オオシロアリは発酵木材チップで生存率が極端に低くなった。そのため、ろ紙をベースにした人工飼料を用いることが適当と考えられた。人工飼料でシロアリの飼育して各原生生物の細胞数を計数したところ、条件によっては特定の原生生物種の細胞数が増加または減少した。

腸内微生物を大型原生生物、小型原生生物、原核生物に分画して酵素活性を測定する系の構築を行った。低速遠心の回転数と時間を検討して、腸内微生物をおおよそ細胞サイズ(大型、小型、細菌)により分画する条件を決定した。分画した細胞は少量であるため、超音波などの物理的破碎方法では溶液のロスが多く酵素の回収量が低くなることから、粗酵素の調整は界面

活性剤を用いて行った。複数の基質を用いて酵素活性を測定したところ、いずれの活性も大型原生生物の濃縮画分がもっとも高かったが、小型原生生物や原核生物の画分からも活性は検出された。

共生系の酵素活性は原生生物の遺伝子発現量の変動以外に、1匹の腸内に生息する原生生物の細胞数も影響することが予想されたため、シロアリ腸内の酵素活性測定とともに、各原生生物種の細胞数がどのように変動するのか解析を行った。原生生物が消失する条件であるスターチ飼育で、いずれの基質に対しても著しく活性が減少した。一方で、セルロースで飼育したシロアリでは、カルボキシメチルセルロース(CMC)に対する活性は上昇したが、粉末セルロースに対する活性に影響は見られなかった。また、餌に含まれるキシランの有無によって、キシランに対する酵素活性に影響はなかった。

原生生物の細胞あたりの遺伝子コピー数を検出・解析したところ、飼育条件によらずいずれの細胞でもGHF7のセロピオハイドロラーゼ遺伝子がもっとも高発現していたが、細胞ごとの遺伝子コピー数は大きく異なることが推定された。一方で、GHF10遺伝子コピー数は木質飼育で高い傾向が見られた。

以上の結果から、共生系の木質分解においては大型原生生物の寄与が非常に大きい、小型原生生物や原核生物の木質分解が協同的に機能することで高い効率性が生じていることが推定された。遺伝子は構成的に発現していることが推定されたことから、木質から人工飼料への変更により一部の原生生物の細胞数が増えることで、活性が上昇することが推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) S. Noda, M. Sakamoto, C. Aihara, M. Yuki, M. Katsuhara, and M. Ohkuma “*Lactococcus termiticola* sp. nov., isolated from the gut of higher termite *Nasutitermes takasagoensis*” *IJSEM* 2018 年 vol.68, p.3832-3836. 査読あり
- (2) S. Noda, C. Aihara, M. Yuki, and M. Ohkuma “Draft Genome Sequence of *Lactococcus* sp. Strain NtB2, Isolated from the Gut of the Termite *Nasutitermes takasagoensis*” *Genome Announc*, 6: e00445-18, 2018 年 査読あり
- (3) S. Noda, D. Shimizu, M. Yuki, O. Kitade, and M. Ohkuma “Host- symbiont co-speciation of termite-gut cellulolytic protists of the genera *Teranympha* and *Eucomonympha* and their *Treponema* endosymbionts” *Microbes. Environ.*, vol.33, p.26-33, 2018 年 査読あり
- (4) 北出理、野田悟子：シロアリの腸内共生原生生物群集の特性と機能 *生物科学* 68 巻 3 号 p.154-164 2017 年 4 月 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) Chihiro Aihara, Megumi Katsuhara, Mitsuo Sakamoto, Masahiro Yuki, Moriya Ohkuma, Satoko Noda: *Lactococcus termiticola* sp. nov., isolated from the gut of the higher termite *Nasutitermes takasagoensis* 日本微生物生態学会 2018.7.11
- (2) Masahiro Yuki, Hirokazu Kuwahara, Satoko Noda, Yuichi Hongoh, Moriya Ohkuma: Comparative genome analysis of two endosymbiotic *Treponema* species of cellulolytic protists in the termite gut 日本微生物生態学会 2018.7.11
- (3) 清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子:シロアリ腸内原生生物と *Treponema* 属細菌との細胞内共生の系統進化 山岳科学学術集会 2017.12.16
- (4) 吉野 大智、大熊 盛也、野田 悟子:シロアリ腸内原生生物種間の木質分解酵素遺伝子発現量の比較 山岳科学学術集会 2017.12.16
- (5) 雪真弘、桑原宏和、河合幹彦、伊澤和輝、David Starns、清水美智留、野田悟子、本郷裕一、大熊盛也:シングルゲノム解析から推定された原生生物細胞表面共生細菌のフェージ感染耐性機構 日本微生物生態学会 2017.8.29
- (6) 清水大地、北出理、雪真弘、大熊盛也、野田悟子:細胞内共生 *Treponema* 属細菌と Teranymphidae 科原生生物、シロアリの三者による共種分化 日本微生物生態学会 2017.8.29

- (7) 北出理, 佐藤渚, 野田悟子, 飯田敏也, 大熊盛也: 長期に隔離された腸内共生微生物群集では群集レベルの競争が生じるか? 日本微生物生態学会 2016.10.24
- (8) 清水大地, 北出理, 雪真弘, 大熊盛也, 野田悟子 *Teranympa* 属原生生物と宿主シロアリの共種分化 原生動物学会 2016.10.10
- (9) 野田悟子, 雪真弘, 大熊盛也: バイオマスの循環を支えるシロアリの多重共生系 水環境学会 シンポジウム 招待講演 2016.9.14

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 野田悟子 “昆虫に共生する原生生物” アメーバーの話(永宗喜三郎 島野智之 矢吹彬憲 編, 朝倉書店) p.62-64、総ページ数 139、2018 年

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。