

令和元年5月29日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19423

研究課題名(和文)細胞共生による原生生物の同所的種分化の可能性

研究課題名(英文) Possibility of sympatric speciation of protists by cellular symbiosis

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物の種分化過程には様々な類型がある。本研究では、シロアリ腸内共生原生生物(単細胞真核生物)を題材として、原生生物と原核生物(細菌とアーキア)の細胞共生が原生生物の同所的種分化を引き起こすという仮説を立て、その検証を行った。その結果、材料とした原生生物はこれまで1属1種と考えられていたが、細胞内にメタン生成アーキアが共生するか否かで明確に2種に分離されることを明らかにした。また、同共生アーキアのゲノムを解読したところ、自由生活型の近縁種との相違が少なく、比較的最近成立した共生系であることが示唆された。追加の検証が必要ではあるが、以上によって、細胞共生による種分化の可能性が強く示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
生物の「種」がどのように形成されたか、というのは生物学上の重要なテーマである。本研究課題では、新たな種分化過程の仮説を提唱し、該当する可能性のある事例を材料として検証した。その結果、単細胞真核生物である原生生物の場合、細胞内に原核生物(細菌と古細菌)が共生することで種分化を引き起こす可能性が強く示唆された。これは、多様な原生生物種の存在を(部分的に)説明する、進化学上の重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to test my hypothesis that single-celled eukaryotes (protists) can speciate by acquiring symbiotic prokaryotes. For this purpose, I selected a termite-gut protist genus as the material to be examined. Although the protist genus has been regarded monospecific, I demonstrated that it comprises two distinct species and that the two species can be discriminated by the presence or absence of endosymbiotic archaea. The genome analysis of the symbiotic archaeon indicated that the genome is very similar to its free-living relatives; the symbiosis has emerged relatively recently. Thus, this study strongly suggests that cellular symbiosis with prokaryotes can lead to speciation of a protist, though further studies are needed to prove this.

研究分野：分子生態学

キーワード：共生 種分化 原生生物 腸内微生物 メタン菌

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

1. 研究開始当初の背景

シロアリは、腸内共生原生生物が木質を分解・発酵して生じる酢酸を主な炭素・エネルギー源としている。害虫駆除・木質バイオマス燃料開発などの応用面からも、この原生生物群集は注目され続けているが、培養不能なため生理・生態の多くは未知のままである。その中でも大きな謎の一つが、なぜ複数種の原生生物が常に同時共生しているのか、である。いずれも木質分解を行うとされており、競争排除されるか、シロアリ世代間で垂直伝播される際のボトルネック効果で、一部の種類が欠落しても不思議ではない。ところが実際には、シロアリ個体・コロニー間で原生生物群集は保持されており、系統的に近縁な複数種の原生生物を同時に保有するシロアリ種も多い。例えばヤマトシロアリは少なくとも7種類の *Dinenympha* 属原生生物を同一腸内に常に保有している。こうした原生生物の種多様性はどのように形成されてきたのであろうか。

本課題の代表研究者・本郷らは、これまで1属1種と考えられてきた原生生物種において、メタン菌が多数細胞内共生している細胞と、全く共生していない細胞の2型があることを発見した。興味深いのは、メタン菌保有細胞と非保有細胞では、その細胞形態に相違があるように見えることで、予備的解析では18S rRNA 遺伝子配列にもわずかだが相違があった。即ち、同原生生物種の一部の系統にメタン菌が共生したことで原生生物が形質置換し、系統間で種分化しはじめている可能性がある。そこで本郷は、種分化の新たな類型として、「原核生物の細胞共生による原生生物の同所的種分化」を提案した。

2. 研究の目的

「原生生物が原核生物との細胞共生によって同所的種分化を遂げる」という、研究代表者・本郷の仮説を検証することを目的とする。実験材料には、上記のメタン菌保有型と非保有型が存在するシロアリ腸内原生生物の1種を用いる。まず両細胞型が形態的・分子系統学的に一貫した相違をもつことを証明する必要がある。また、メタン菌共生型と非共生型間で比較転写産物解析ならびに比較メタボローム解析を行い、両者が異なる機能を持つことを実証する。これらにより、メタン菌共生によって同原生生物が形質置換してニッチ分化を生じ、同所的に種分化しつつある、または既にしていることを証明する。

3. 研究の方法

同原生生物種のメタン菌共生細胞と非共生細胞の光学顕微鏡観察を行い、細胞の長軸と短軸の長さを計測するとともに、一貫した形態学的特徴の差異を探索した。また、透過型電子顕微鏡観察を行い、両者の細胞内の構造を比較した。次に、マイクロマニピュレータで1細胞ずつ分取し、それぞれのメタン菌保有の有無と形態学的特徴を記録した上で、18S rRNA 遺伝子配列を取得して分子系統解析を実施した。さらに両者の機能的相違を解明するにあたり、同細胞内共生メタン菌の分子系統解析とゲノム解読もを行い、同時共生している細菌叢の群集構造解析とメタゲノム配列取得も試みた。原生生物自身の機能も予測するため、単離した1細胞からの転写産物解析とメタボローム解析も試みた。

4. 研究成果

2019年5月時点で論文未発表の内容を含むため、一部の詳細は省いた。

(1)メタン菌保有型と非保有型の間での原生生物細胞形態比較および分子系統解析

顕微鏡下での計測と特徴比較を行った結果、メタン菌保有型と非保有型で細胞サイズと長

軸・短軸の比率が明確に異なることを明らかにした。また核の位置にも一貫した差異があった。18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果、両群間の配列差異は小さいものの、それぞれが明確に単系統を形成した。即ち、共生メタン菌の有無と細胞サイズ・形態学的特徴、さらに 18S rRNA 遺伝子配列は一貫して異なっており、これまで 1 属 1 種と考えられてきた同原生生物種が実際には 2 種に分化しており、共生メタン菌の有無が鍵となっている可能性が高いことを実証できた。

(2) 細胞内共生メタン菌及び共生細菌叢の分子系統解析とメタゲノム解析

両細胞型の相違の鍵となっているメタン菌に着目し、分子系統解析を行った結果、*Methanobrevibacter* 属と *Methanomassiliicoccus* 属が 1 種ずつ検出された。それぞれに特異的なプローブを設計して蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行ったところ、原生生物細胞内で両者が同時に局在することを確認した。嫌気条件下での共生メタン菌単離培養の試みは不成功に終わったため、同原生生物細胞内の原核生物叢のメタゲノム配列を取得し、種ごとの仕分け（ピニング）を試みた。その結果、*Methanobrevibacter* 属共生メタン菌のドラフトゲノム再構築に成功した。情報解析によって基本代謝系を予測し、水素と二酸化炭素からのメタン生成能を保持していることなどを明らかにした。同時に細胞内共生している *Endomicrobium* 属細菌のドラフトゲノム配列取得にも成功したが、他の原生生物種に細胞内共生している *Endomicrobium* 属細菌種と比較して水素産生を含む解糖・発酵経路に特徴があることが判明した。水素を消費するメタン菌との共局在が同細菌の進化に影響した可能性があり、現在追加実験・解析中である。

(3) 原生生物の 1 細胞機能解析の試み

培養不能原生生物種の機能予測には 1 細胞ゲノム解読が一つの手手段だが、シロアリ腸内原生生物種は極端にゲノムサイズが大きく、困難である。そこで、1 細胞転写産物解析とメタボローム解析を試みることにした。前者はモデル真核生物では成功例が多数あるものの、本課題のような非モデル生物を使用する場合、モデル生物用のプロトコルでは良好な結果を得られないことが多い。実際、本課題でも様々な手法による最適化に時間を要している。現在、取得した配列の情報解析を実施中であり、今後も解析を継続する必要がある。1 細胞メタボローム解析はさらに困難であるが、様々な条件検討後、現在、サンプル調製済みで、今後解析していく予定である。

以上のように、当初の主目的である、「原核生物との細胞共生による原生生物の同所的種分化」が実際に生じている可能性を強く示唆する証拠を得ることができた。より詳細な原生生物の機能レベルでの差異の解析は未達成であるが、方法論の最適化が進んでおり、今後継続していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Utami Y.D., Kuwahara H., Igai K., Murakami T., Sugaya K., Morikawa T., Nagura Y., Yuki M., Deevong P., Inoue T., Kihara K., Lo N., Yamada A., Ohkuma M., Hongoh Y. (2019) Genome analyses of uncultured TG2/ZB3 bacteria in ‘Margulisbacteria’ specifically attached to ectosymbiotic spirochetes of protists in the termite gut. *The ISME Journal* 13: 455–467 (原著、査読有り)

Murakami T., Onouchi S., Igai K., Ohkuma M., Hongoh Y. (2019) Ectosymbiotic bacterial microbiota densely colonize the surface of thelastomatid nematodes in the gut of the wood-feeding cockroach *Panesthia angustipennis*. *FEMS Microbiology Ecology* 95: fiy238 (原著、査読有り)

Hongoh Y. and Ohkuma M. (2018) Chapter 5 "Termite gut flagellates and their methanogenic and eubacterial symbionts" in the book "(Endo)symbiotic Methanogenic Archaea" (Microbiology Monographs) (Ed. Hackstein J.H.P.) 2nd edition. SpringerNature pp.55-80 (総説、査読無し)

本郷裕一(2018)「ゲノム解析によるシロアリ腸内原生生物共生細菌の役割の解明」しるあり(公益社団法人日本しるあり対策協会 機関誌) 169: 12-26 (総説、査読無し)

Murakami T., Segawa T., Takeuchi N., Sepulveda G.B., Labarca P., Kohshima S., Hongoh Y. (2018) Metagenomic analyses highlight the symbiotic association between the glacier stonefly *Andiperla willinki* and its bacterial gut community. *Environmental Microbiology* 20: 4170–4183(原著、査読有り)

〔学会発表〕(計8件)

主な発表(学会等):

2018.10.3(招待講演) Yuichi Hongoh "Multi-layered symbiotic system in the termite gut". 第46回内藤カンファレンス(札幌)(国際学会)

2018.8.13-18(ポスタ発表) Miho Sakai, Katsura Igai, Takako Mabuchi, Hirokazu Kuwahara, Nathan Lo, Moriya Ohkuma, Kumiko Kihara, Yuichi Hongoh "Genome analysis of a methanogenic endosymbiont of a novel *Mixotricha* protist species in the termite gut", 17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME17) (Leipzig, Germany)

2018.10.27(招待講演) Yuichi Hongoh "Genomics of uncultivable bacteria deciphers multilayered symbiotic system in the termite gut" 2018 World Life Science Conference (WLSC: 世界生命科学大会、中国科学技術省主催)(北京)

2018.8.20(招待講演) Yuichi Hongoh "Genomics of uncultivable bacteria deciphers multilayered symbiotic system in the termite gut" International Workshop on Insect Gut Microbiology in Max Planck Institute (Marburg, Germany)

2018.3.5-7(ポスタ発表) 酒井海帆、猪飼桂、間淵貴子、木原久美子、桑原宏和、伊藤隆、Nathan Lo、大熊盛也、本郷裕一「シロアリ腸内原生生物細胞内に共生する未培養メタン菌のゲノム解析」第12回日本ゲノム微生物学会年会(京大)

〔図書〕(計0件)

〔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：<http://www.hongoh.bio.titech.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：木原 久美子

ローマ字氏名：Kumiko Kihara

所属研究機関名：熊本高等専門学校

部局名：生物化学システム工学科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50622916

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福田 真嗣（慶応大学・政策メディア研究科・特任教授）

ローマ字氏名：Shinji Fukuda

研究協力者氏名：酒井 海帆（東京工業大学・生命理工学院・大学院生）

ローマ字氏名：Miho Sakai

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。