

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2007～2010

課題番号： 19380055

研究課題名(和文)

シロアリ腸内の原生生物と細胞共生細菌の代謝共生機構の解明

研究課題名(英文)

Symbioses of flagellates and bacteria in the gut of termites

研究代表者

大熊 盛也 (OHKUMA, MORIYA)

独立行政法人理化学研究所・微生物材料開発室・室長

研究者番号： 10270597

研究成果の概要(和文)：

シロアリ腸内の様々なセルロース分解性の原生生物とその細胞共生細菌を同定・検出し、共進化関係を推定した。細胞内共生細菌2種について、培養を介さずに微量細胞から全ゲノムを増幅後に完全ゲノムを解読し、窒素栄養の供給に働く共生機構を解明した。また、メタトランスクリプトーム解析により原生生物の主要代謝を推定し、還元力を水素で効率良く処理する機構を明らかにした。水素を介した細胞内共生細菌との代謝共生関係も推定した。

研究成果の概要(英文)：

Various associations between cellulolytic protists and bacteria in the gut microbial community of termites were identified, detected, and investigated in terms of their co-evolutionary relationships. The complete genome sequences of two endosymbiotic bacterial species, determined after the whole genome amplification starting from small numbers of the manually isolated cells, disclosed their symbiotic relationship involving the provision of essential nitrogenous nutrients. The primary metabolism of the protists that efficiently eliminates reducing equivalents as molecular hydrogen was inferred from their meta-transcriptomic analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：細胞内共生、難培養微生物、微生物ゲノム、原生生物、共進化、セルロース資源、窒素固定、水素生成

1. 研究開始当初の背景

シロアリの腸内には高密度に原生生物と原核生物が共生している、セルロース資源の効率良い分解と利用を担っている。共生微生物群のほとんどは難培養性なので、培養を介さずに腸内の微生物群集構造の解明を行ってきた。

共生微生物の大半は未だ培養されていない複数の新門を含む新規種であること、原生生物の細胞内・表層や腸壁など種によって異なる空間分布を示す複雑な多重の共生系であることを明らかにしてきた。共生微生物の機能に関しても、原生生物によるセルロース分解、共生細菌による窒素固定などを機能関連遺伝子群の解析を中心に解明を試みてきた。

特に、腸内のセルロース分解性の原生生物はシロアリ体重の1/3までを占めると言われており、腸内で優占する細菌種のほとんどは原生生物の細胞内・細胞表層に共生する細菌であった。従って、腸内の主要な代謝は原生生物とその細胞共生細菌に担われていると考えられた。

2. 研究の目的

シロアリ腸内の代表的な原生生物と細胞共生細菌のそれぞれの機能、特に主要な代謝能の解明をめざし、両者の相互作用も推定して、腸内共生系における効率的なセルロース資源の利用機構を明らかにすることを目的とした。また、様々な原生生物種と細胞共生細菌を分子系統学的に同定・検出して比較し、両者の共進化についても考察した。

3. 研究の方法

大型原生生物の1細胞から細胞内共生細菌数百細胞をマイクロマニピュレーターを用いて単離し、全ゲノムを増幅後にゲノム解析を行なった。原生生物については、cDNAライブラリーを網羅的な Expressed Sequence Tags (EST) 解析を行なった。様々な原生生物種の細胞を単離し、PCR, RT-PCRにより原生生物と共生細菌の分子系統マーカー遺伝子を増幅して解析した。特異的なプローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションによる検出も行なった。

4. 研究成果

セルロース分解に重要な原生生物であるヤマトシロアリの *Trichonympha agilis*、および、イエシロアリの *Pseudotriconympha grassii* の細胞内共生細菌について、完全ゲノムを解読した。前者の細胞内共生細菌は未培

養新門 Termite Group 1 に属するものであり、後者は Bacteroidales 目の細菌で、いずれも宿主原生生物と（後者は宿主シロアリとの3者の関係でも）共種分化してきたものである。どちらのゲノムとも縮小進化過程にあると考えられたが、多くのアミノ酸・ビタミン類生合成系遺伝子群が維持されており、後者では窒素固定遺伝子群も見られた。シロアリが摂食する枯死材は窒素源に乏しく、原生生物がセルロースを分解して生じる糖をもらう代わりに、これら細胞内共生細菌は必須の窒素栄養化合物を供給する役割を果たすと考えられた。

P. grassii から鉄型ヒドロゲナーゼ遺伝子とその酵素を解析し、細胞分画も行って細胞内小器官ヒドロゲノソームにおいて高い水素生成能を明らかにした。一方で解読ゲノムには典型的なヒドロゲナーゼ相同遺伝子は認められなかったが、細胞内共生細菌に高い水素取込み活性を検出し、生成した水素を効率的に利用して原生生物のセルロース分解を促進する共生関係も推定した。また、*T. agilis* にはいわゆる硫酸還元細菌である *Desulfovibrio* 属の細菌も細胞内共生しており、宿主原生生物のヒドロゲノソームの密集した近辺に局在しており、水素の利用性が推定された。実際にこの細菌は水素利用と硫酸還元に関与する遺伝子群を発現させていたが、腸内の硫酸塩濃度は低く、水素利用のための他の電子受容体の関与が示唆された。

原生生物細胞における細菌との共生は、複数種の細菌が関わるより複雑なものであり、窒素栄養源ばかりでなく水素の授受という代謝上多面的な共生関係と考えられた。

イエシロアリの原生生物群の EST 解析も行ない、特に *P. grassii* においては、細胞質でセルロース分解と解糖の過程で生じる還元力をリンゴ酸を介してヒドロゲノソームに輸送して最終的に水素として処理することにより、効率良くセルロース資源を利用する代謝を推定した。

様々な原生生物種と細胞共生細菌種を同定・検出して分子系統学的に解析した結果、同属の原生生物種とその特異的な細胞内・表層細菌は、共通祖先の組み合わせから共種分化により生じたものであることを推定した。一方、異なる属の原生生物では、異なる系統の細菌が共生しており、恐らく腸内で複数回特異的な共生関係が確立したものと考えられた。また、シロアリと近縁の *Cryptocercus* 属のキゴキブリの原生生物を分子系統学的に比較解析して、これらの昆虫の祖先が原生生物を獲得し、これら昆虫と共に多様化したものと推定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計29件)

- ① Okabe, S., M. Oshiki, Y. Kamagata, N. Yamaguchi, M. Toyofuku, Y. Yawata, Y. Tashiro,

- N. Nomura, H. Ohta, M. Ohkuma, A. Hiraishi, and K. Minamisawa. A great leap forward in microbial ecology. *Microbes Environ.* 25: 230-240 (2010) 査読有
- ② Bonfante, P., K. Visick, and M. Ohkuma. Symbiosis-symbiosis in the omics era-. *Environ. Microbiol. Rep.* 2: 475-478 (2010) 査読無
- ③ Todaka, N., T. Inoue, K. Saita, M. Ohkuma, C. A. Nalepa, M. Lenz, T. Kudo, and S. Moriya. Phylogenetic analysis of cellulolytic enzyme genes from representative lineages of termites and a related cockroach. *PLoS One* 5: e8636 (2010) 査読有
- ④ Noda, S., Y. Hongoh, T. Sato, and M. Ohkuma. Complex coevolution of symbiotic Bacteroidales bacteria of various protists in the gut of termites. *BMC Evol. Biol.* 9: 158 (2009) 査読有
- ⑤ Noda, S., C. Mantini, C. Bordereau, O. Kitade, M. F. Dolan, E. Viscogliosi, and M. Ohkuma. Molecular phylogeny of parabasalids with emphasis on the order Cristamonadida and its complex morphological evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52: 217-224 (2009) 査読有
- ⑥ Sato, T., Y. Hongoh, S. Noda, S. Hattori, S. Ui, and M. Ohkuma. *Candidatus* *Desulfovibrio trichonymphae*, a novel intracellular symbiont of the flagellate *Trichonympha agilis* in termite gut. *Environ. Microbiol.* 11:1007-1015 (2009) 査読有
- ⑦ Ohkuma, M., S. Noda, Y. Hongoh, C. A. Nalepa, and T. Inoue. Inheritance and diversification of symbiotic hypermastigid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach *Cryptocercus*. *Proc. R. Soc. B.* 276:239-245 (2009) 査読有
- ⑧ 大熊盛也、本郷裕一、シロアリ腸内微生物の多重共生、生物の科学遺産、63: 110-113 (2009) 査読無
- ⑨ 大熊盛也、本郷裕一、動物と窒素固定細菌の共生は成立するか？-シロアリ腸内での共進化・共生機構からみえてきたもの、化学と生物、47: 307-309 (2009) 査読無
- ⑩ Ohkuma, M. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends Microbiol.* 16: 345-352 (2008) 査読有
- ⑪ Hongoh, Y., V. K. Sharma, T. Prakash, S. Noda, H. Toh, T. D. Taylor, T. Kudo, Y. Sakaki, A. Toyoda, M. Hattori, and M. Ohkuma. Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science* 322:1108-1109 (2008) 査読有
- ⑫ Hongoh, Y., V. K. Sharma, T. Prakash, S. Noda, T. D. Taylor, T. Kudo, Y. Sakaki, A. Toyoda, M. Hattori, and M. Ohkuma. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5555-5560 (2008) 査読有
- ⑬ Inoue, J. -I., S. Noda, Y. Hongoh, S. Ui, and M. Ohkuma. Identification of endosymbiotic methanogen and ectosymbiotic spirochetes of gut protists of the termite *Coptotermes formosanus*. *Microbes Environ.* 23:94-97 (2008) 査読有
- ⑭ 大熊盛也、本郷裕一、難培養性微生物のゲノム解析技術とシロアリ腸内微生物の共生機構、バイオインダストリー、25: 81-88 (2008) 査読無
- ⑮ 大熊盛也、本郷裕一、野田悟子、シロアリ腸内微生物-バイオマス資源を高効率に利用する多重共生-、蛋白質核酸酵素、53: 1841-1849 (2008) 査読無
- ⑯ Inoue, J. -I., K. Saita, T. Kudo, S. Ui, and M. Ohkuma. Hydrogen production by termite-gut protists: characterization of iron hydrogenases of parabasal symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. *Eukaryot. Cell* 6:1925-1932 (2007) 査読有
- ⑰ Noda, S., O. Kitade, T. Inoue, M. Kawai, M. Kanuka, K. Hiroshima, Y. Hongoh, R. Constantino, V. Uys, J. -H. Zhong, T. Kudo, and M. Ohkuma. Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotriconympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol. Ecol.* 16: 1257-1266 (2007) 査読有
- ⑱ Ohkuma, M., T. Sato, S. Noda, S. Ui, T. Kudo, and Y. Hongoh. The candidate phylum "Termite Group 1" of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60: 467-476 (2007) 査読有
- ⑲ Hongoh, Y., T. Sato, M. F. Dolan, S. Noda, S. Ui, T. Kudo, and M. Ohkuma. The motility symbiont of the termite-gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the "Synergistes" group. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6270-6276 (2007) 査読有
- ⑳ Hongoh, Y., T. Sato, S. Noda, S. Ui, T. Kudo, and M. Ohkuma. *Candidatus* *Symbiothrix dinenymphae*: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of termite gut protists. *Environ. Microbiol.* 9: 2631-2635 (2007) 査読有
- [学会発表] (計15件)
- ① Ohkuma, M. Symbioses of cellulolytic

protists and their intracellular bacteria in the gut of termites. 第2回日韓シンポジウム“Microbial diversity and Asian ecosystems” (日本微生物生態学会、韓国微生物学会)、2010年11月筑波 (招待講演)

- ② Ohkuma, M. Complete genome sequence of bacterial endosymbionts of termite-gut protists and exploiting yet-uncultured microbial resources. The International Symposium for the Conservation and Sustainable Use of Asian Microbial Resources, 2010年10月、東京 (招待講演)
- ③ Ohkuma, M. Complete genomes of uncultured bacterial endosymbionts of cellulolytic protists in the gut of termites. International Conference on Culture Collections 12 (ICCC12), 2010年9月、Florianopolis, Brazil (招待講演)
- ④ Ohkuma, M. Symbioses in the gut microbial community of termites for efficient cellulose digestion. The Society for Industrial Microbiology, SIM Annual Meeting and Exhibition 2009, 2009年7月、Toronto, Canada (招待講演)
- ⑤ Ohkuma, M. Symbioses of flagellates and bacteria for efficient digestion in termite gut. Canadian Institute for Advanced Research, Integrated Microbial Biodiversity Program, 2009 Annual General Meeting, 2009年6月、Asilomer USA (招待講演)
- ⑥ Ohkuma, M. Symbioses of flagellates and bacteria in termite guts and their roles for efficient digestion. 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME12, 2008年8月、Cairns, Australia (招待講演)
- ⑦ Ohkuma, M. Noda, S., and Y. Hongoh. Toward understanding the function of highly structured symbiotic microbial community in the gut of termites. International Symposium on Microbial Ecology ISME Asia 2007, 2007年9月、愛媛 (招待講演)

[図書] (計9件)

- ① Ohkuma, M. and A. Brune. Diversity, structure, and evolution of gut microbial community. *In* D. E. Bignell, Y. Roisin, and N. Lo (eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer, pp. 413-438 (2011)
- ② Brune, A. and M. Ohkuma. Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. *In* D. E. Bignell, Y. Roisin, and N. Lo (eds.), *Biology of Termites:*

A Modern Synthesis. Springer, pp. 439-475 (2011)

- ③ Hongoh, Y. and M. Ohkuma. Termite gut flagellates and their methanogenic and eubacterial symbionts. *In* J. H. P. Hackstein (ed.), *Microbiology Monographs vol. 9: (Endo)symbiotic methanogenic archaea*. Springer, pp. 55-79 (2010)
- ④ 野田悟子、大熊盛也、微生物群集のメタトランスクリプトーム解析、服部正平 (監修) *メタゲノム解析技術の最前線*、シーエムシー出版、pp. 127-136 (2010)
- ⑤ 大熊盛也、難培養微生物研究の将来像、大熊盛也、工藤俊章 (監修) *難培養微生物研究の最新技術II-ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望*、シーエムシー出版、pp. 281-287 (2010)
- ⑥ 大熊盛也、動物との共生、(財)発酵研究所 (監修) *IFO微生物学概論*、培風館、pp. 437-444 (2010)
- ⑦ 大熊盛也、生態系にみる微生物資源 昆虫体内-シロアリ、その他の昆虫-、*In* 辨野義己、渡邊信、三上囊、鈴木健一郎、高島昌子 (eds.) *微生物資源国際戦略ガイドブック*、(株)サイエンスフォーラム、pp. 103-110 (2009)

[産業財産権]

- 出願状況 (計1件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

2008年11月プレスリリース「シロアリの強力な木質分解能を支える驚異の腸内共生機構を解明」
<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2008/081114/detail.html>

2008年4月プレスリリース「シロアリ腸内微生物のゲノム解読に世界で初めて成功」
<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2008/080401/detail.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大熊 盛也 (OHKUMA, MORIYA)

独立行政法人理化学研究所・微生物材料開発室・室長
10270597

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし