

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06334

研究課題名(和文) シロアリ共生原生生物群集組成を規定する要因の解明

研究課題名(英文) Microbial Community Structure and Functional Potential in the termite gut

研究代表者

野田 悟子 (Noda, Satoko)

茨城大学・理工学研究科(理学野)・教授

研究者番号：80342830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食材性昆虫であるシロアリ自身は、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群集が木材成分の分解に主要な働きを担っている。いくつかの組成の人工飼料でシロアリを飼育し、腸内の原生生物の組成がどのような挙動を示すのか検討したところ、エサの違いによりシロアリ1匹あたりの原生生物細胞数が増加する種と変化がない種が見られた。一方で、原生生物1細胞あたりの木質分解酵素遺伝子の発現量は、腸内原生生物群集全体の酵素活性と相関が見られなかった。また、原生生物の木質分解酵素遺伝子の構造予測を行ったところ、他生物の酵素と類似の立体構造が推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロアリ自身は木材消化能力が低く、消化管に共生する原生生物が木質成分の分解に主要な役割を担っている。DNA塩基配列の解析技術は近年飛躍的に進歩し、ゲノム解析が多くの生物を対象として行われている。しかし、非モデル生物では解析が不十分で、リファレンスデータとして利用できる情報も極端に少ないのが現状である。本研究の結果から、生物活性などの情報を整備することで、インベントリーに新たな情報を追記することが可能である。本研究は環境中の真核微生物の生態や生物間の共生がどのような機能的基盤によって成り立っているのかという研究にも波及効果を与えうる。

研究成果の概要(英文)：A protistan community of termite gut is essential for efficient digestion of wood materials. We analyzed that the effect of feed on community structure of protist in the termite gut. Several feeding conditions effectively changed composition of the protist species. However, it was not influenced expression levels of most glycoside hydrolase genes of each protist cell. The predicted structure based on amino acid sequences of GHF enzymes showed high similarity with the enzymes derived from fungus. This result imply that these enzymes play similar catalytic activity in the termite gut.

研究分野：微生物生態学

キーワード：シロアリ 原生生物 共生

### 1. 研究開始当初の背景

シロアリは熱帯や亜熱帯を中心に 2700 もの種数を擁する多様性の高い昆虫であり、熱帯地域でのバイオマスは非常に大きい。シロアリにこのような生物学的成功をもたらした要因として、社会性の獲得と多様な消化管内微生物との共生が挙げられる。シロアリの消化管には、難培養性の真核単細胞生物である原生生物が複数種存在し、細菌や古細菌と共に複雑な共生微生物群集を構成している。このような共生微生物の獲得により、多くの動物には利用困難な、未利用のバイオマス資源である植物遺体を餌として利用することが可能になった。腸内の原生生物は宿主が脱皮する際に一旦消失するが、家族集団のシロアリ個体間で消化管内容物の受け渡し(肛門食栄養交換)が行われることで再感染する(図1)。脱皮したての個体は、消化管から原生生物が消失しているため木材を分解できないが、宿主の社会性により安定して腸内微生物が世代を超えて受け継がれていく。一般的なシロアリ腸内共生系には、数種から 20 種以上の原生生物が混在している(図2)が、共生原生生物の種組成は宿主の系統と強い相関があることが報告されている。すなわち、宿主種が同じであれば、地理的にはなれた地域に生息するシロアリでも同じ原生生物種が腸内に共生している。

図1

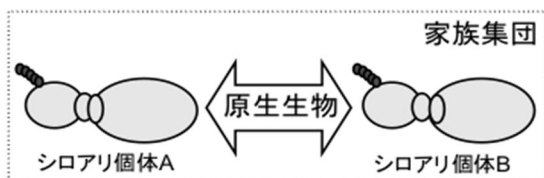
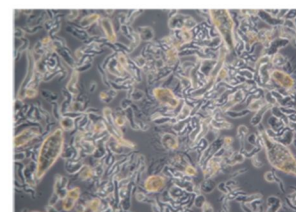


図2 シロアリ腸内の原生生物群集

細胞の大きさや形態も様々な複数種が混在している



シロアリと腸内の原生生物の関係は古くから相利共生の例としてよく知られている。一方で、共生原生生物は嫌気性で培養が非常に難しく、木材分解についての知見は非常に乏しい。申請者らは、原生生物群集全体を対象とした網羅的な発現遺伝子解析(メタトランスクリプトーム)を行い、原生生物が多様な木質分解に関わる酵素遺伝子を高発現していることを明らかにしている。これらの一部については、遺伝子の由来する原生生物種の推定を行い、原生生物 1 種が複数の酵素遺伝子をゲノム上にコードしていることを明らかにしている。しかし、配列情報から基質特異性などを推定することは非常に難しく、実際にどのような基質に対してどのくらいの効率性を発揮する酵素を有しているのかは不明である。

### 2. 研究の目的

生物種ごとにそれぞれの環境に適応した種が選別され、同じ資源を利用する種間での競争が起こることで勝者が資源を独占的に利用する場合や、生物集団の個体数が激減することによるボトルネック効果により、群集の多様度が減少することが知られている。シロアリは木質バイオマスのみを摂食するため、腸内微生物が利用できる餌資源は単一で限られている。さらに、宿主シロアリの脱皮や生殖虫(女王と王)が新しい家族集団を創始する際に、原生生物群集サイズが小さくなる。ところが、腸内原生生物群集は宿主の生息地域や採集時期によらずほぼ同じ種構成で、種の構成比も大きくは変わらない。そこで本研究では、複数種から構成される腸内原生生物群集が共存して安定的に受け継がれる要因(生物間相互作用)を、木質分解という機能から理解することを目指す。

### 3. 研究の方法

特定の細胞の分取には、マイクロマニピュレーターやフローサイトメトリー装置が用いられてきた。しかし、一般的にフローサイトメトリー装置は高速分取が可能である一方で、特に大きな細胞を分取することが難しく、顕微鏡下で細胞の形態を観察しながら精度良く細胞を分取できるマイクロマニピュレーターは効率が非常に悪いという問題があった。そこで、マイクロ流体チップを用いた細胞の分取装置など、効率的に細胞分取できるか検討を行った。また、活性測定

がどの程度の細胞数で測定可能であるのかなども併せて検討を行った。原生生物の木質分解酵素遺伝子の発現量と酵素活性の挙動は定量 PCR 法により評価した。

一部の酵素遺伝子については大腸菌のタンパク質異種発現系を用いて、酵素学的性質を解析することにもチャレンジした。コールドショック発現系などのベクターに目的酵素遺伝子を連結して、タンパク質生産と酵素活性を測定した。また、アミノ酸配列を基に構造予測ソフトを用いて、タンパク質の構造予測を行った。

#### 4. 研究成果

特定の原生生物細胞のみを効率よく回収するために、目的とする原生生物の存在比率が高くなるような飼育条件を検討した。いくつかの組成の人工飼料でシロアリを飼育し、腸内の原生生物の組成がどのような挙動を示すのか検討したところ、エサの違いによりシロアリ 1 匹あたりの原生生物細胞数が増加する種と変化がない種が見られた。これまで原生生物が消失することが報告されているスターチによる飼育では、比較的大型の原生生物は短期間で消失した。しかし、スターチ以外の飼育条件では存在比率が変動するものの、特定の種のみが完全に消失するということはなかった。腸内原生生物全体の酵素活性測定から、1 回あたり  $10^2$ - $10^3$  程度の細胞数が必要と考えられた。研究協力者の予備的な検討から、マイクロ流体チップを用いた細胞の分取法では分取はできるものの細胞数を多く回収するにはかなりの時間がかかることから、酵素活性測定用にはさらなる改良が必要と推定された。そのため、原生生物種の由来を同定した酵素遺伝子の酵素学的性質から、木質分解に対する知見を得ることを試みた。

各酵素遺伝子の酵素学的性質を明らかにするため、すでに構築していた原生生物の発現遺伝子ライブラリーから、配列相同性をもとに木質分解酵素を選抜して発現用プラスミドを構築した。目的酵素遺伝子の N 末端には原生生物の食飽への移行シグナル配列が推定されたため、酵素ドメインのみをベクターと連結してプラスミド構築をしたところ、不溶性タンパク質として発現した。シャペロン共発現やリフォールディングを試みたが、可溶性タンパク質は得られなかった。そこで、シグナル領域を含む全長を用いて発現用プラスミドを再構築したところ、可溶性タンパク質として発現させることができた。しかし、この可溶性タンパク質は酵素活性が検出されず、ヒスチジンタグを用いたアフィニティー精製でもカラムに吸着しなかった。

ターゲットタンパク質の配列は、いずれも木質分解酵素の特定のファミリーに共通して保存されている活性部位のグルタミン酸残基が 2 カ所保存されており、タンパク質全体としては活性ドメインの保存性も高いことから、木質分解酵素活性を有するものと推定された。ターゲットタンパク質と配列が比較的類似している酵素の立体構造との比較から、2 カ所の活性部位はともに、基質と特異的に結合するための溝（基質結合ポケット）である内部に配置していると推定された。本研究で可溶性タンパク質として発現の成功した酵素は、N 末端にヒスチジンタグを導入していたが、アフィニティー精製の際にカラムに吸着しなかった。このことから、His-Tag を含む N 末端のシグナル領域が基質結合ポケットに折り畳まれて、基質との結合を疎外している可能性が考えられた。N 末端配列はタンパク質自体の可溶化に寄与していることから、アミノ酸残基長や GST などの基質結合ポケットに入り込まない比較的大きな Tag を連結させることで、活性の検出も可能と推定される。原生生物種により異なるファミリー（GHF）の酵素遺伝子を保有している場合もあることから、複数種が協同的に機能することが効率性に影響を与えていると考えられる。以上の結果から、木質分解への寄与や保有する酵素機能の違いが異なる原生生物種が共生系で共存を可能にしていることが推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Noda, F. Koyama, C. Aihara, N. Ikeyama, M. Yuki, and M. Ohkuma, M. Sakamoto	4. 巻 70
2. 論文標題 Lactococcus insecticola sp. nov. and Lactococcus hodotermopsis sp. nov., isolated from the gut of the wood-feeding lower termite Hodotermopsis sjostedti	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Syst. Evol. Microbiol	6. 最初と最後の頁 4514-4522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.004309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gile Gillian H., Taerum Stephen J., Jasso-Selles Daniel E., Sillam-Duss?s David, Ohkuma Moriya, Kitade Osamu, Noda Satoko	4. 巻 172
2. 論文標題 Molecular Phylogenetic Position of Microjoenia (Parabasalia: Spirotrichonymphea) from Reticulitermes and Hodotermopsis Termite Hosts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protist	6. 最初と最後の頁 125836 ~ 125836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.protis.2021.125836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 野田悟子	4. 巻 67
2. 論文標題 シロアリと共生微生物	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 モダンメディア	6. 最初と最後の頁 460-466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森浩佐, 雪真弘, 飯野隆夫, 野田悟子, 大槻隆司, 大熊盛也
2. 発表標題 シロアリ腸内から分離した新規細菌の取得とゲノム解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森浩佐, 雪真弘, 飯野隆夫, 野田悟子, 大槻隆司, 大熊盛也
2. 発表標題 シロアリ腸内から分離したBacteroidetes門の新規性細菌のゲノム解析
3. 学会等名 微生物資源学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北出 理, 野田 悟子
2. 発表標題 日本産ヤマトシロアリ属の共生原 生生物組成と宿主交雑の影響
3. 学会等名 生態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山人也, 相原千洋, 奥秋望夢, 坂本光央, 雪真弘, 大熊盛也, 野田悟子
2. 発表標題 シロアリから単離した新規Lactococcus属細菌の分類学的検討
3. 学会等名 微生物資源学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田悟子
2. 発表標題 遺伝子とゲノム配列情報に基づいた系統分類
3. 学会等名 微生物資源学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北出 理, 石神 広太, 嶋田 拓也, 野田 悟子
2. 発表標題 トカラ列島におけるヤマトシロアリ属のシロアリと共生原生生物組成
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田 悟子, 北出 理, 大熊盛也
2. 発表標題 Spirotrichonympha綱原生生物の分子系統解析
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相原 千洋, 吉野 大智, 野田 悟子
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物の木質分解酵素活性に食餌が与える影響
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Nods, O. Kitade
2. 発表標題 Biogeography of Reticulitermes termites and distribution of symbiotic flagellate protists
3. 学会等名 Ecology and evolution of termite gut microbes (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田 悟子
2. 発表標題 Parabasal ia門原生生物の系統進化と共生系の共種分化
3. 学会等名 原生生物・寄生虫・進化セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 北出理、野田悟子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 -
3. 書名 "パラバサリア" 原生生物学事典	

1. 著者名 野田悟子、北出理	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 -
3. 書名 "シロアリに共生する原生生物" 原生生物学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------