

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16208

研究課題名（和文）シロアリ腸内原生生物の多種共存機構の解明

研究課題名（英文）Fine-scale phylogenetic diversity and underlying mechanisms of coexisting oxymonad protists in termite guts

研究代表者

猪飼 桂 (Igai, Katsura)

東京工業大学・生命理工学院・研究員

研究者番号：60806438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： ヤマトシロアリ腸内に共生するオキシモナス目原生生物群集に着目した。同オキシモナス目原生生物群集の真の種多様性と多種共存機構の解明を目的として、高解像度分子系統解析、種分化シミュレーション、および種間ニッチ分化の検証を行なった。同オキシモナス目原生生物群集についてはこれまで形態学的に10種が記載されてきたが、解析の結果、実際には分子系統学的に非常に近縁かつ独立した33種もが共存していること、さらに各種が固有のニッチを保有するエコタイプに相当する可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は難培養性のシロアリ腸内原生生物の種多様性と多種共存機構について新たな研究方法と知見を提示した。種とはなにかまた自然界の多様な多種共存機構の理解は、生物学および生態学の根幹的テーマである。本研究の成果は、シロアリ腸内原生生物ばかりでなく、近年発展著しい原生生物(全般)の種多様性研究に貴重な知見を付与するものである。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the true diversity and underlying mechanism of the coexistence of oxymonad symbiont community in guts of the termite *Reticulitermes speratus*, this study performed fine-scale phylogenetic analysis, in silico simulation of speciation, and examination of interspecies niche differentiation of the protist community. The results strongly suggested the possibilities that phylogenetically closely related but distinct 33 oxymonad species coexist in a gut of *Reticulitermes speratus* and that the predicted species correspond with ecotypes with different niches.

研究分野：微生物生態学

キーワード：種多様性 種分化 多種共存 共生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シロアリは木材を消化できる数少ない動物として知られるが、その高効率な木質分解能力の大部分は 1.5 億年以上前に獲得したと推定される木質分解性腸内原生生物(単細胞真核生物)の働きによる。シロアリ腸内体積の 9 割を原生生物が占めており、複数種がそれぞれ数千から数万匹ずつ(合計で数万から数十万匹)共存する。シロアリ腸内原生生物は絶対嫌気性の鞭毛虫(パラバサリア門とプレアクソスティラ門)で純粋培養が極めて困難である。シロアリと腸内原生生物の関係は絶対的相利共生のモデルとして着目されてきた一方で、原生生物の分類は 1920 年代の形態分類にほとんど依拠してきた。例えば日本に最も広く分布するヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)腸内には少なくとも 16(形態)種が記載されるが、その真の多様性は未知であった。種多様性という基盤情報の欠如ゆえ、なぜほぼ木質しかインプットがない腸内に近縁な生物が共存しうるのかという多種共存のメカニズムもほとんど不明であった。

### 2. 研究の目的

ヤマトシロアリ腸内原生生物 16(形態)種のうち特に近縁であることが予想されたプレアクソスティラ門オキシモナス目原生生物 10 種に着目した。申請者が行なった同原生生物の細胞表面共生細菌(ectosymbiont)研究から、実際にはさらに多くの種ないしは系統が共存している可能性を予想していた。そこで本研究では第一にヤマトシロアリ腸内オキシモナス目の真の種多様性を明らかにすること、第二に多種共存を成立させるメカニズムを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) オキシモナス目原生生物 1 細胞分子系統解析

既知の形態種に限らず形態的に識別できるオキシモナス目原生生物を微分干渉顕微鏡下で 1 細胞(原生生物個体)ずつ、最低 3 細胞、マイクロマニピュレーションで採取した。採取時に原生生物の画像も取得した。各 1 細胞サンプルから DNA を等温全ゲノム増幅法により調製後、これを鋳型として 18S rRNA 遺伝子全長配列を PCR 増幅後、クローニングとサンガー法による配列決定、分子系統解析を行なった。以上の作業により、原生生物の形態と分子系統を直接照合させた。

#### (2) オキシモナス目原生生物網羅的多様性解析

(1)の方法だけでは腸内オキシモナス目群集の系統多様性を網羅できない可能性が高い。そこで、(1)において既知オキシモナス目 10 形態種の 18S rRNA 遺伝子全長配列を取得した時点で、オキシモナス目特異的プライマーを設計し、地理的に離れた 2 つのヤマトシロアリコロニー(2 コロニー間距離 80 km)の全腸 DNA サンプルから、オキシモナス目群集の 18S 配列を網羅的に取得した(アンプリコンシーケンス解析)。このとき、原生生物細胞 1 細胞についても同プライマーによるアンプリコンシーケンスを行うことにより、1 細胞内の 18S rRNA 遺伝子多型情報(ゲノム内多型)も取得し、解析時に利用した。加えて、ヤマトシロアリと同属の *Reticulitermes flavipes*、ヤエヤマシロアリ(*Reticulitermes yaeyamanus*)、ヤマトシロアリの祖先型の腸内共生系を保有すると予測されるオオシロアリ(*Hodotermopsis sjostedti*)の腸内オキシモナス群集(参考文献 1)について、同様のアンプリコンシーケンス解析を実施した。

#### (3) オキシモナス目原生生物エコタイプシミュレーション

シロアリ腸内オキシモナス目原生生物は、基本的には無性生殖で繁殖すると考えられる。細菌学分野において「無性生殖を行う細菌の種とは、繰り返しの自然選択によって形成された固有のニッチを共有するエコタイプ(ecotype)である」というエコタイプ仮説(参考文献 2)は、理論的にも広く受け入れられ実験的にも支持されている。そこで無性生殖性のオキシモナス目群集についてエコタイプ理論を土台とした種分化シミュレーションを試みた。(1)で取得したヤマトシロアリ腸内オキシモナス目 18S rRNA 遺伝子多様性情報と分子系統情報を用いて、遺伝的浮動と自然選択をパラメータとするシミュレーションを実施した。

#### (4) オキシモナス目原生生物 1 細胞転写産物解析

(3)で予測されたヤマトシロアリ腸内オキシモナス目エコタイプのうち特に近縁な 3 種について、1 細胞転写産物解析を実施した。微分干渉顕微鏡下で対象エコタイプを 1 細胞ずつ採取し、独自に改変した Smart-seq 法により cDNA 取得と増幅を行なった。1 エコタイプにつき最低 3 細胞を取得した。ライブラリー調整についても改変を加え、MiSeq を使用して高品質な配列を取得した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヤマトシロアリ腸内オキシモナス目原生生物群集の遺伝的多様性

ヤマトシロアリ腸内で知られるオキシモナス目 10 形態種の 18S rRNA 遺伝子配列と、全腸

DNA から網羅的に取得したオキシモナス目特異的 18S rRNA 遺伝子配列を用いて分子系統解析を行なった。系統樹(414 sites)には既知形態種を含まない分子系統クラスター(遺伝子距離 1% 以下)が複数見られた。そこで、少しずつ形態が異なるオキシモナス 1 細胞を追加採取し、画像取得と 18S rRNA 全長配列取得を行なった。最終的に 56 細胞からの情報を用いて、すべてのオキシモナス目原生生物分子系統クラスターと細胞形態を照合させた。本研究により、ヤマトシロアリ腸内オキシモナス目群集全体の多様性と分子系統関係がはじめてに明らかになった。

#### (2) ヤマトシロアリ腸内オキシモナス目原生生物群集エコタイプ

(1)で取得した 18S rRNA 遺伝子多様性情報と系統樹を用いてエコタイプシミュレーションを行った。解析の結果、(1)で示された分子系統クラスターの多くがエコタイプに相当すること、また合計 33 のオキシモナス目エコタイプが存在することが高い尤度をもって推定された。推定されたエコタイプは、異なるヤマトシロアリコロニーおよび個体間で共有されていた。シロアリ腸内原生生物がシロアリ世代間で伝播される際には、原生生物の個体数が著しく減少しボトルネックが掛かることが予想されてきた。しかしながら今回のシミュレーション結果から、オキシモナス目群集の進化における遺伝的浮動の影響は非常に小さく、強い自然選択によりオキシモナス目群集の種(エコタイプ)多様性が維持されている可能性が強く支持された。

#### (3) シロアリ腸内オキシモナス目原生生物の多様化の系譜

ヤマトシロアリ属各種の共通祖先は、オオシロアリの腸内原生生物群集を水平伝播で獲得したと推定されている(参考文献 1)。そこで、それぞれ少なくとも 10 種、6 種、5 種、7 種のオキシモナス形態種の存在が知られるヤマトシロアリ、ヤエヤマシロアリ、*R. flavipes*、オオシロアリの同原生生物群集を解析対象とし、オキシモナス目群集の分岐の系譜を推定することを試みた。結果として本解析では、祖先オキシモナス目原生生物群集がどのように分岐してきたのかを正確に追跡するのに十分な解像度が得られなかった。オオシロアリと *R. flavipes* の間で分岐した *Reticulitermes* 属シロアリサンプルが推定の鍵を握ると予想され、候補となるシロアリサンプルの入手を計画している。一方で、ヤマトシロアリ腸内オキシモナス系統について興味深い知見が得られた。ヤマトシロアリ腸内には、形態学的に類似しているものの細胞表面細菌の付着形式で識別できる 4 種(*Dinenympha porteri* type II, type III, type IV, *D. leidy*)が存在する。本解析の結果、これら 4 種はヤマトシロアリ腸内で各種が特異的に細胞表面共生細菌との関係を築き、独立した分子系統(エコタイプ)に進化した可能性が強く示唆された。

#### (4) 近縁オキシモナス目エコタイプの機能分化(論文発表前のため一部詳細を控える)

小型(50  $\mu\text{m}$  未満)原生生物から高品質の転写産物配列を取得するための実験系を構築することに予想以上の時間を要した。しかし最終的には、細胞の溶解方法またライブラリー調整を改変することにより、小型原生生物からも大型原生生物や培養細胞の 1 細胞転写産物と同等レベルのデータ(配列平均コンティグ長 1000 塩基以上)を取得することを実現した。同原生生物のゲノムサイズは数十 Gb 以上あると推定されるために、これまで転写産物配列解析を第一選択としてきた。高品質な転写産物配列を取得した場合であっても相対的に低発現の代謝遺伝子については未検出なのかコードされていないのかは判別できない。そこで今後ロングリードシーケンスによりゲノム配列を取得し、網羅的転写産物配列とドラフトゲノム情報に基づく、オキシモナス目原生生物の詳細な機能分化の検証をすすめる。

#### 参考文献

1. Kitade O. 2004 *Microbes and Environments* 19(3), 215-220.
2. Cohan F. M. 2001 *Systematic Biology* 50(4), 513-524.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Katsura Igai, Osamu Kitade, Jieyang Fu, Kazumi Omata, Takahiro Yonezawa, Moriya Ohkuma, Yuichi Hongoh	4. 巻 31
2. 論文標題 Fine-scale genetic diversity and putative ecotypes of oxymonad protists coinhabiting the hindgut of Reticulitermes speratus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Ecology	6. 最初と最後の頁 1317-1331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mec.16309	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 猪飼 桂	4. 巻 172
2. 論文標題 シロアリ腸内原生生物の種多様性を見つめなおす	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 しるあり	6. 最初と最後の頁 62-66
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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 猪飼 桂, 北出 理, 傳 潔洋, 尾又一実, 米澤隆弘, 大熊盛也, 本郷裕一
2. 発表標題 シロアリ腸内共生原生生物群集におけるエコタイプ・シミュレーション解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣辰哉, 猪飼桂, 本郷裕一, 松浦健二
2. 発表標題 シロアリの王・女王特異的な腸内微生物群集動態
3. 学会等名 日本共生学会第4回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Inagaki, Katsura Igai, Yuichi Hongoh, Kenji Matsuura
2. 発表標題 Royal-specific gut microbiota in termites
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Igai K., Kitade O., Fu J., Ohkuma M., Hongoh Y.
2. 発表標題 Fine-scale phylogenetic structure and putative ecotypes in the oxymonad community in <i>Reticulitermes speratus</i> .
3. 学会等名 OIST Mini Symposium “Ecology and Evolution of Termite Gut Microbes” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪飼 桂、北出 理、傅 潔洋、大熊 盛也、本郷 裕一
2. 発表標題 ヤマトシロアリ腸内オキシモナス群集におけるエコタイプ仮説の検証
3. 学会等名 原生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪飼 桂
2. 発表標題 シロアリ腸内原生生物はどこから来たのか？ 何者か？ どこに行くのか？
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

1. 発表者名 Tatsuya Inagaki, Katsura Igai, Kazuki Takahashi, Yuichi Hongoh
2. 発表標題 Dynamics of symbiotic protist community in termite gut associated with caste differentiation and vertical transmission process
3. 学会等名 19th International Union for the Study of Social Insects Congress (IUSSI) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya Inagaki, Katsura Igai, Kazuki Takahashi, Yuichi Hongoh
2. 発表標題 Dynamics of gut microbiota in termite associated with host's adult eclosion and dispersal
3. 学会等名 10th Congress of the International Society of Symbiosis, 3rd International Conference on Holobionts (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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