

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650158

研究課題名(和文) 環境ゲノミクスによるシロアリ腸内ファージ群集解析と害虫防除への応用の可能性

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of phages in the termite gut and potential for application in pest control

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリは枯死材のみを餌とする昆虫で、地球の物質循環において重要な役割を果たすと同時に、人間にとっては木材の大害虫でもある。その高効率な木質消化能力の大部分は、腸内に共生する微生物群集によるものである。本研究では、その腸内共生細菌叢を攻撃する可能性があるバクテリオファージ群集のゲノム解析を初めて行い、その群集構造とファージが感染する腸内細菌種の同定に、一部成功した。

研究成果の概要(英文)：Termites feed exclusively on dead plant matter. They play important roles in the global carbon cycle, although they are also destructive pests of wooden buildings. Their ability to digest lignocellulose is mostly attributable to the symbiotic gut microorganisms. In this study, a bacteriophage community that infects the symbiotic gut bacteria was comprehensively analyzed, and specific bacterial hosts of some phages were successfully identified.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生 腸内細菌 昆虫 シロアリ ウイルス ファージ ゲノム

1. 研究開始当初の背景

シロアリは植物枯死体のみを摂食する社会性昆虫で、温帯から熱帯にかけて巨大なバイオマスを占める重要な分解者である。人間にとっては木造建築物の大害虫であり、その駆除・防除費用は日本だけで年間 1000 億円に達するとも言われている。

シロアリの高効率な木質分解能力は、シロアリ自身よりもその腸内に共生する微生物群集に負う所が大きい。シロアリ腸内微生物は 1.5 億年以上前から共生していると推定されており、シロアリ腸内に特異的な種群で構成されている。通常、数種類の原生生物（単細胞真核生物）と数百種類の細菌、数種類のアーキア（古細菌）で構成されており、宿主シロアリによって代々受け継がれている。

シロアリ腸内共生微生物は、基礎・応用科学の両面で長年に渡り注目されてきたが、大多数の種類が培養不能であるため、詳細な研究が未だに進んでいない。特に、腸内ウイルス群集に関する研究はほとんど行われたことが無い。しかし、一般にウイルスは微生物生態系において重要な役割を担っており、シロアリ種ごとに特徴的な腸内微生物群集構造の決定にもウイルスが関与している可能性がある。したがって、基礎・応用科学両面で重要なシロアリ腸内共生系を理解するには、ウイルスの研究は欠かせないはずである。

2. 研究の目的

(1) シロアリ腸内ウイルス群集構造の解明。

これまで、シロアリ腸内のウイルス群集を網羅的に研究した例は全く無い。シロアリ腸内共生系におけるウイルスの役割を解明する上での基盤情報として、まずウイルスメタゲノム解析を行い、ウイルスの種類、保有遺伝子群のリストを作成する。

(2) シロアリ腸内ファージの宿主細菌特定。

シロアリ腸内に存在するウイルスの多くは、細菌に寄生するバクテリオファージと予想される。一般にファージは特定の細菌種のみに感染する性質を持っており、その宿主を特定する。特に、シロアリ腸内における木質消化の中心である原生生物の細胞内に共生する細菌は、共生系で重要な役割を担っており、それら細胞内共生細菌を宿主とするファージの有無と種類を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ウイルスメタゲノム解析。

シロアリ腸内容物からウイルス画分を抽出した例が無い場合、試行錯誤しながら実験を行った。最終的に、市販のウイルス用 DNA 抽出キットで処理して DNA を取得した。ウイルスにはゲノムが二本鎖 DNA のもの以外に一本鎖 DNA や RNA のものが存在するが、ここで

は二本鎖 DNA ウイルスを標的とした。

抽出した DNA の一部を用いて、次世代シーケンサー（イルミナ MiSeq）で配列解析を行った。得られた配列同士を結合（アセンブル）し、ウイルスゲノムあるいはその一部の再構築を目指した。再構築したゲノム上の遺伝子の位置と機能を、コンピュータープログラムによって予測した。

(2) シロアリ腸内ファージの宿主細菌特定。

ファージの宿主細菌を推定する方法はいくつかあるが、シロアリ腸内細菌群が培養不能であるため、培養に依存した手法は使用できない。ここでは、優占的な培養不能腸内細菌種のゲノム配列を取得し、その配列情報を用いる方法を採用した。

まず、シロアリ腸内原生生物の細胞内あるいは細胞表面に共生する細菌種に注目した（腸内での最優占種群でもある）。これら培養不能細菌種のゲノム配列を、全ゲノム増幅法を利用して取得し、そのゲノム上の CRISPR 領域のスペーサー配列を探索した。これらの配列とファージゲノム断片との照合を行うことで、ファージと宿主細菌種を対応づけることにした。CRISPR/Cas システムは細菌とアーキアに見られる対ファージ防衛装置である。細菌にファージ DNA が侵入すると、それを検知した CRISPR/Cas システムがそのファージ DNA を切断し、切断した断片を細菌ゲノム上の CRISPR 領域に「スペーサー」として取り込む。すると、次回に同じ配列を持つファージが侵入してきた時に、迅速にその配列を目印として DNA を切断するという、原核生物版の「免疫」システムである。

CRISPR が存在しない細菌種においては、tRNA 遺伝子などのウイルスとの共有配列から宿主を判定した。

4. 研究成果

(1) シロアリ腸内ウイルス群集構造の解明。

シロアリ腸内からウイルス画分の分取に成功した。得られたメタゲノム断片の少なくとも 7 割以上がウイルス由来であった。その多くはファージ由来と推定されたが、全て新規な配列で、既知の配列とは相同性が低かった。完全長ゲノムと見なせる環状染色体 DNA も複数再構築できた。現在、詳細な情報解析を継続している（学会発表 など）。

(2) シロアリ腸内ファージの宿主細菌種の特定。

シロアリ腸内細菌ゲノム配列の取得と CRISPR 領域の同定。

まず、シロアリ腸内細菌のゲノム配列取得を試みた。本研究課題開始時点で存在したのは、本郷らが 2008 年に解読したシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌 2 種のみ（参考文献）であった。このうちの 1 種、

“*Candidatus* Endomicrobium trichonymphae” (未培養細菌は正式に命名することができないため“*Candidatus*”、つまり“候補”とつけて仮命名する)の Rs-D17 系統型で、そのゲノム上には数多くの制限酵素の偽遺伝子(機能を失った遺伝子のこと)と、外見上機能的と見られる CRISPR 領域が存在した。2008 年当時、本郷は、この細胞内共生細菌の祖先が腸内で自由生活を送っていた時にはファージの感染を頻繁に受けており、そのため多数の制限酵素(これもファージ DNA を切断する機構)と CRISPR/Cas システムを保有していたが、細胞内共生体として進化する過程でファージの感染が無くなり、その結果として制限酵素が不要となって偽遺伝子化した、と考察していた。同様に、CRISPR/Cas システムも実際には機能していないと考えていた。

ところが、本研究課題で新規に同 Rs-D17 細菌の別株のゲノム完全長配列を取得して比較したところ、予想外の結果となった。両ゲノムは別株だが同種同系統型の細菌であり、ゲノム構造と配列は酷似していた。ところが、CRISPR のスペーサー配列(約 120 個、合計約 4 kb)のみが全く異なっていた。つまりこの CRISPR/Cas システムは機能しており、かつ外来 DNA の侵入に晒されていることを示していた。このことから、細胞内共生体ではあっても、ファージの攻撃を受けている可能性が高くなった(原著)。

この“*Ca.* Endomicrobium trichonymphae”に加えて、さらに 3 種の *Endomicrobium* 属の細胞内共生細菌のゲノム配列を取得したところ、同様に機能的とみられる CRISPR/Cas システムを保有していた(原著、学会発表 など)。

また、*Endomicrobium* 属細菌の他に、同じく原生生物細胞内共生細菌である“*Ca.* *Treponema intracellularis*”(参考文献)と、原生生物細胞表面共生細菌である“*Ca.* *Desulfovibrio trichonymphae*”(原著)及び“*Ca.* *Symbiothrix dinenymphae*”(原著)のゲノム解析を行ったところ、いずれも CRISPR 領域を保有していた。

(3) シロアリ腸内細菌の CRISPR スペーサーとファージメタゲノムの照合。

(1) で取得したシロアリ腸内ファージメタゲノムと(2) で取得した各種原生生物細胞内あるいは細胞表面共生細菌の CRISPR スペーサー配列を照合した。もしファージがこれらの細菌種に感染するのであれば、スペーサーとファージメタゲノム断片が一致するはずである。

その結果、ファージメタゲノムを取得したシロアリ種の腸内細菌の CRISPR スペーサーの多くが、同ファージメタゲノム断片と合致した。これにより、シロアリ腸内原生生物の細胞内共生細菌もファージの感染を受けることが、初めて証明された(論文準備中、学

会発表 など)。

(4) シロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌ゲノムと同時取得されたファージゲノム。

上述の各種腸内細菌に加えて、“*Ca.* *Azobacteroides pseudotrichonymphae*” ProJpt-1 系統型のゲノム配列を、シロアリ腸内原生生物 *Pseudotrichonympha* sp. の細胞内から取得した際、同時にファージの環状ゲノム DNA も再構築された。このファージゲノム上には tRNA 遺伝子が存在し、その配列は同 *Azobacteroides* 細菌の tRNA に最も高い相同性を示した。これらのことから、同ファージは *Azobacteroides* を宿主とする可能性が極めて高い。この tRNA 遺伝子は、宿主 *Azobacteroides* 細菌のコドン使用頻度とファージのコドン使用頻度の偏りを是正する役割があるものと推定された。同ファージゲノム上の遺伝子の多くは機能未知で、宿主細菌との相互作用についての知見は現時点では得られていない。いずれにしても、上述の *Endomicrobium* 属細菌の例と並んで、細胞内に絶対共生(自由生活相を持たず永久に細胞内のみで生息)する細菌において初めて見つかったファージの感染例である(原著)。

参考文献

- Hongoh *et al.* (2008) *PNAS* 105: 5555-60
Hongoh *et al.* (2008) *Science* 322: 1108-9
Ohkuma *et al.* (2015) *PNAS* 112: 10224-30

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Pramono AK, Kuwahara H, Itoh T, Toyoda A, Yamada A, Hongoh Y. Discovery and complete genome sequence of a bacteriophage from an obligate intracellular symbiont of a cellulolytic protist in the termite gut. *Microbes Environ.* 査読有、advanced online published, 2017
DOI.org/10.1264/j sme2.ME1617

Kuwahara H, Yuki M, Izawa K, Ohkuma M, Hongoh Y. Genome of ‘*Ca.* *Desulfovibrio trichonymphae*’, an H₂-oxidizing bacterium in a tripartite symbiotic system within a protist cell in the termite gut. *ISME J.* 査読有、Vo. 11, 2017, pp.766-776
DOI:10.1038/ismej.2016.143

Izawa K, Kuwahara H, Kihara K, Yuki M, Lo N, Itoh T, Ohkuma M, Hongoh Y. Comparison of intracellular “*Ca.*

Endomicrobium trichonymphae” genomovars illuminates the requirement and decay of defense systems against foreign DNA. *Genome Biol Evol.* 査読有、Vol.8、No.10、2016、pp.3099-3107
DOI: 10.1093/gbe/evw227

Yuki M, Kuwahara H, Shintani M, Izawa K, Sato T, Starns D, Hongoh Y., Ohkuma M. (2015) Dominant ectosymbiotic bacteria of cellulolytic protists in the termite gut also have the potential to digest lignocellulose. *Environ Microbiol.* 査読有、Vol.17、No.12、2015、pp.4942-4953
DOI: 10.1111/1462-2920.12945

〔学会発表〕(計15件)

麥島雄太、伊澤和輝、河合幹彦、桑原宏和、雪真弘、大熊盛也、本郷裕一、シロアリ腸内ファージメタゲノム解析と宿主腸内細菌の同定、日本微生物生態学会第31回大会、2016.10.23-24、横須賀市文化会館

伊澤和輝、麥島雄太、桑原宏和、河合幹彦、木原久美子、Nathan Lo、雪真弘、伊藤武彦、大熊盛也、本郷裕一、対ファージ防衛機構が示す *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の適応進化、第18回日本進化学会大会、2016.8.25-27、東工大(大岡山)

本郷裕一、1細胞ゲノムとメタゲノムから読み解くシロアリ腸内多重共生系、平成28年度EIRISプロジェクト研究成果報告会、2017.3.10、豊橋技大、招待講演

本郷裕一、シロアリ腸内多重共生系の進化、日本進化学会第18回大会、2016.8.26、東工大(大岡山)

本郷裕一、シロアリと絶対共生する腸内微生物群集の進化と機能、第27回日本生体防御学会総会、2016.7.8、九大、招待講演

本郷裕一、ゲノムから読み解くシロアリ腸内難培養微生物群集の多重共生機構、第89回日本細菌学会総会、2016.3.24、大阪国際交流センター、招待講演

伊澤和輝、桑原宏和、木原久美子、Nathan Lo、雪真弘、大熊盛也、本郷裕一、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の比較ゲノム解析と機能予測、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016.3.4-5、東工大(大岡山)

麥島雄太、伊澤和輝、河合幹彦、桑原宏

和、雪真弘、大熊盛也、本郷裕一、シロアリ腸内ファージメタゲノム解析と腸内細菌 CRISPR スペーサー配列との照合、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016.3.4-5、東工大(大岡山)

Izawa K, Kuwahara H, Kihara K, Lo N, Yuki M, Ohkuma M, Hongoh Y.、Comparative genomics of endomicrobial symbionts associated with distinct protist species in the termite gut、日本微生物生態学会第30回大会、2015.10.18-19、土浦亀城プラザ

Hongoh Y.、Single cell genomics deciphers the complex symbiotic system in the termite gut microbiota、第11回国際ゲノム会議、2015.5.21、一橋講堂、招待講演

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本郷 裕一 (HONGO, Yuichi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：90392117