

難培養性細菌のゲノム解析によるシロアリ腸内共生機構の解明

本郷裕一 (東京工業大学 生命理工学研究科)
yhongo@bio.titech.ac.jp

はじめに

シロアリは植物枯死体のみを餌とする社会性昆虫で、温帯から熱帯にかけて分布する重要な分解者である。特に熱帯では、土壌昆虫の95% (重量) をも占めており、地球の炭素循環において鍵となる役割を果たしている。人間にとっては木造建築物の重要害虫でもあり、長年その防除法が研究されてきたが、最近では、木質由来の次世代バイオ燃料開発への応用という観点から、その高効率な木質分解能力は新たな注目を集めている。しかし、シロアリの木質分解と生存に必須の役割を果たす腸内微生物群 (原生生物、真正細菌、古細菌) との共生メカニズムは、実はよくわかっていない。それらの共生微生物の大部分が未だに分離培養に成功していないためである。

筆者らはこれまで、培養を介さない方法によってシロアリ腸内共生系の解明を試み、1種類のシロアリが数百種のシロアリ特異的な未培養腸内微生物群を保有し、その群集構造は宿主シロアリ種内で保存されること、それぞれの微生物種が腸内で特定の局在を持つことなどを明らかにしてきた^{1,6}。しかし、それら個々の微生物種の機能や相互作用は不明のままであり、突破口となる革新的な解析系の確立が希求されてきた。そこで筆者は、phi29 DNA 合成酵素による等温全ゲノム増幅法を用いた、個々の難培養性微生物種のゲノムの完全長配列取得を発案し、取り組んできた。以下に、その概要とそれによって初めて解明されたシロアリ腸内細菌優占種の機能を紹介する。

ヤマトシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌 Rs-D17 のゲノム完全長配列の取得

ゲノム解析の標的としたのは、シロアリ腸内原生生物 (単細胞真核生物) の細胞内にだけ生息する Termite Group 1 (TG1) 細菌の一種である。TG1 は未培養真正細菌門の一つで、筆者らによる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析によって、多様なシロアリ腸内原生生物種の種特異的な細胞内共生細菌であることが明らかとなっている⁷。しかし、それ以外の情報は全く存在しなかった。本研究では、その TG1 細菌門に属する、Rs-D17 と名付けた培養不能細菌種を標的とした (図1)。宿主は、ヤマトシロアリ腸内でセルロース分解を担う難培養性原生生物 *Trichonympha agilis* で、複数系統の混入を避けるため、宿主1細胞のみをマイクロマニピュレーターで物理的に単離して用いた。原生生物細胞膜を界面活性剤で緩やかに破壊し、漏出した細胞内共生 Rs-D17 細菌を数百細胞、毛細管で回収した。

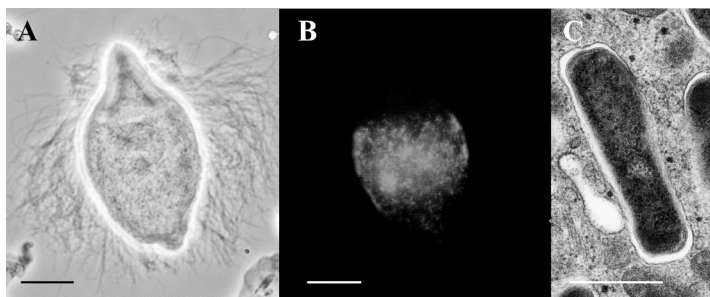


図1 原生生物 *Trichonympha agilis* と細胞内共生細菌 Rs-D17

(A) ヤマトシロアリ腸内に共生するセルロース分解性原生生物 *Trichonympha agilis* の位相差顕微鏡像。バーは20 μm 。(B) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる同原生生物細胞内に共生する Rs-D17 細菌の検出。バーは20 μm 。(C) Rs-D17 細菌の透過型電顕像。バーは0.5 μm 。

細菌ゲノムの完全長配列取得には通常10億個以上の細胞が必要である。そこで、回収した Rs-D17 細胞をアルカリ溶解・変性したのち、phi29 DNA 合成酵素で約1千万倍に全ゲノム増幅し (図2)、454パイロシーケンサーとサンガー法による配列解析を行なった。その結果1.1 Mbの単一の環状染色体完全長配列の再構築に成功した⁸。

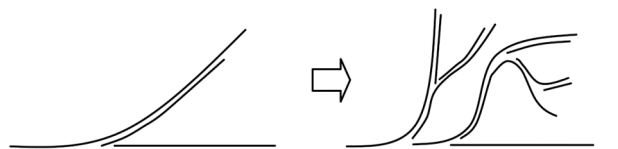


図2 Phi29 DNA polymerase による多重置換増幅
ランダムプライマーとの組み合わせにより、ゲノム全領域を多重に複製し、30°C、数時間で数千万倍以上に増幅可能。「シングルセル・ゲノミクス」の中核技術である。

原生生物細胞内共生細菌 Rs-D17 の機能と進化

得られた染色体配列は 761 個のタンパク遺伝子をコードしていたが、それに加えて 121 個もの偽遺伝子が発見された。これは、Rs-D17 細菌のゲノムが縮小進化過程にあることを示している。既知の配列との相同性から代謝系を予測したところ、Rs-D17 細菌は、グルコース-6 リン酸を主な炭素・エネルギー源とする、絶対嫌気性の発酵性細菌であることが明らかになった。宿主原生生物によるセルロース分解産物であるグルコースは豊富に宿主細胞質に存在するはずであり、またリン酸化物を取込むことで、自身の ATP を節約している (図 3)。

一方、窒素源については、アンモニア輸送体 AmtB とグルタミン合成酵素 GlnA の遺伝子が偽遺伝子化しており、宿主からのグルタミン供給が必須である。しかし、15 種類のアミノ酸と数種のビタミン類の合成系は保持していた。このことは、細胞壁成分のリ多糖合成系や多数の制限酵素ユニットなどの防御系、各種輸送体などの遺伝子の多くが偽遺伝子化していたことと対照的である。

シロアリは窒素分をほとんど含まない枯死材のみを餌としているため、シロアリも腸内原生生物も、餌の木材・木片から必須窒素化合物を補給できない。それらを合成し、供給するのが Rs-D17 細菌ではないかと考えられる。Rs-D17 細菌では、染色体複製開始因子 DnaA の遺伝子まで偽遺伝子化しており、宿主細胞外での増殖能を既に失っている可能性が高い。つまり、Rs-D17 細菌は窒素化合物合成に特化した、原生生物のオルガネラのような進化を遂げてきたと考えられる。

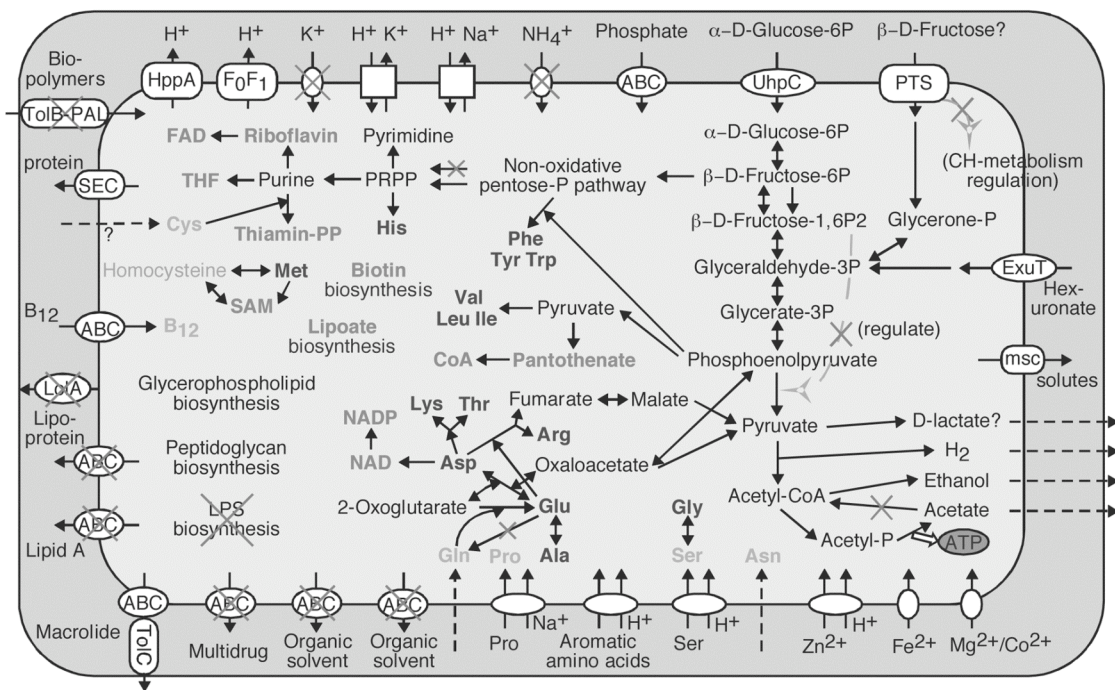


図 3 ヤマトシロアリ腸内原生生物 *Trichonympha agilis* の細胞内共生細菌 Rs-D17 の予想代謝図

細胞壁合成系、制限酵素、膜間輸送体など多くの遺伝子群が存在しないか偽遺伝子化 (×で表示) している一方、アミノ酸とビタミン合成系は豊富に残されていた。

イエシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌 CfPt1-2 のゲノム完全長配列の取得

上記手法を用い、イエシロアリ腸内原生生物 *Pseudotriconympha grassii* の細胞内共生細菌 CfPt1-2 (図 4) についてもゲノム完全長配列取得を試み、1.1 Mb の環状染色体配列再構築に成功した⁹。

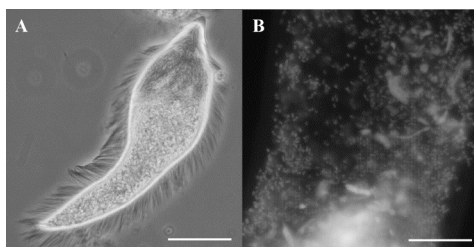


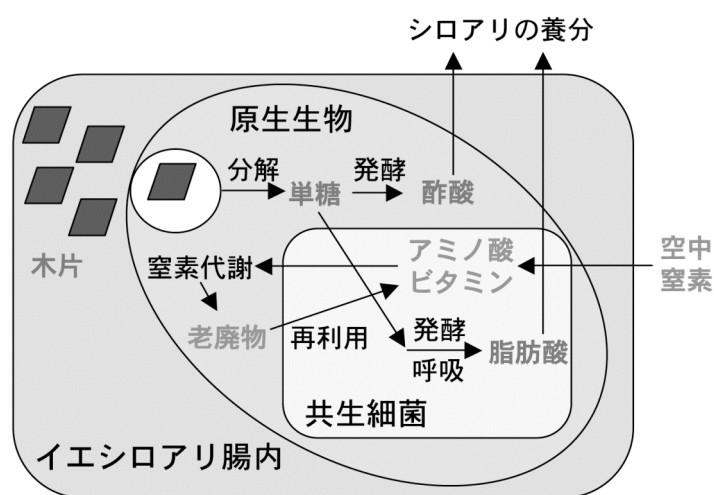
図 4 原生生物 *Pseudotriconympha grassii* と細胞内共生細菌 CfPt1-2

(A) イエシロアリ腸内共生原生生物 *Pseudotriconympha grassii* の位相差観察像。同シロアリの木質分解に必須。培養不能。バーは 50 μm 。(B) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる同原生生物細胞内に共生する CfPt1-2 細菌の検出 (小粒)。本研究で“*Candidatus Azobacteroides pseudotriconymphae*”と命名した。培養不能。バーは 10 μm 。

原生生物細胞内共生細菌 CfPt1-2 の機能と進化

CfPt1-2 細菌は分子系統学的に Bacteroidetes 門 Bacteroidales 目のシロアリ腸内由来未培養細菌クラスターに属し¹⁰、水素を消費することが示唆されていた以外は、全く機能未知であった¹¹。ゲノム解読の結果、Rs-D17 同様に、細胞壁合成系や制限酵素などの防御系、膜間輸送体など多くの遺伝子を消失している一方で、19 種類のアミノ酸合成系と数種のビアミン合成系を維持していた。さらに注目されるのは、空中窒素固定遺伝子群 (*nif* オペロンなど) を保有していたことである。これは Bacteroidetes 門からは初めての発見である。nitrogenase をコードする *nifH* 遺伝子の発現も RT-PCR により確認した。また、原生生物の窒素老廃物と予想されている尿素とアンモニアを取込んで再利用する系も存在した。

イエシロアリは *P. grassii* を失うと、他種の原生生物が健在でも、木片分解能を失うことが知られており¹²、必須の共生体である。CfPt1-2 細菌は、その *P. grassii* の 1 細胞あたりに数万細胞も共生しており、合計で、腸内細菌細胞総数の 6-7 割をも占めている¹³。それが空中からの窒素補給能力を持っていたのである。CfPt1-2 細菌の炭素源は、原生生物によるリグノセルロース分解産物のグルコース、キシロース、ウロン酸であり、解糖系によるこれらの発酵と、水素を電子供与体とするフマル酸呼吸に



よって ATP を生成していると予想された。これら単糖と水素は原生生物細胞内に豊富に存在するはずである。つまり、シロアリと原生生物が窒素分に乏しい枯死材を食食するのに連動する形で、原生生物細胞内共生細菌が空中から窒素を補給して、アミノ酸などを合成・供給するという、極めて高度に進化した多重共生系の存在が初めて明らかになったのである (図 5)。

図 5 イエシロアリにおけるシロアリ—原生生物—細菌の多重共生機構

おわりに

わずかに数百個の細菌細胞からゲノム完全長が取得できるというのは、数年前までは予想もできなかった技術革新である。現在、筆者を含め、いくつかの研究グループが、この技術をさらに発展・最適化して、環境中の単一細菌細胞からの全ゲノム配列を取得する「シングルセル・ゲノミクス」確立を目指している。これに成功すれば、これまで全く未知であった多くの環境中難培養性細菌種の機能が解明可能となり、産業応用にも大きく資することになるであろう。地球上の 99%以上の微生物種は現時点で培養不能であり、膨大なフロンティアが、まだ至る所に存在するのである。

謝辞

本研究の多くは、独立行政法人理化学研究所・環境分子生物学研究室で行われたものです。大熊盛也・理研 BRC-JCM 室長、野田悟子・山梨大准教授、豊田敦・遺伝研特任准教授、服部正平・東大教授、V.K. Sharma・理研リサーチアソシエイトをはじめとする多くの共同研究者の先生方に、厚く御礼申し上げます。また、同研究室主任であられた工藤俊章先生 (現・長崎大教授) と、学生時代を通じてご指導賜りました故・石川統先生 (東大名誉教授) に心より深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Hongoh, Y., Ohkuma, M., and Kudo, T., Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 231 (2003).
- 2 Hongoh, Y. et al., Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6590 (2005).

- 3 **Hongoh, Y.** et al., Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the
fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Mol. Ecol.* **15**, 505 (2006).
- 4 **Hongoh, Y.** et al., Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the
candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial
groups dominant in termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6780 (2006).
- 5 **Hongoh, Y.** et al., The motility symbiont of the termite gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of
the "Synergistes" group. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6270 (2007).
- 6 **Hongoh, Y.** et al., *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of
termite gut protists. *Environ. Microbiol.* **9**, 2631 (2007).
- 7 Ohkuma, M. et al., The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity,
distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**,
467 (2007).
- 8 **Hongoh, Y.** et al., Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist
cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5555 (2008).
- 9 **Hongoh, Y.** et al., Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in
termite gut. *Science* **322**, 1108 (2008).
- 10 Noda, S. et al., Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha* spp.),
their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol. Ecol.* **16**, 1257 (2007).
- 11 Inoue, J. et al., Hydrogen production by termite gut protists: characterization of iron hydrogenases of
parabasalian symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. *Eukaryot. Cell* **6**, 1925 (2007).
- 12 Yoshimura, T., Contribution of the protozoan fauna to nutritional physiology of the lower termite,
Coptotermes formosanus Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Wood Res.* **82**, 68 (1995).
- 13 Noda, S. et al., Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha*
grassii in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8811 (2005).