

# 培養できないシロアリ腸内共生発酵性細菌のゲノム解析

本郷 裕一  
東京工業大学 生命理工学院

## 研究の目的

シロアリは枯死植物体のみを摂食し、分解者として地球の炭素循環に大きく貢献している。その高効率な木質消化能力の大部分はシロアリ腸内に特異的な共生微生物群集の働きによるものであり、基礎・応用研究両面で大きな注目を集めてきた。しかし、その多様な腸内共生微生物（原生生物、真正細菌、古細菌）の大多数は難培養性であるため、詳細な共生機構は未知のままである。本研究では、下等シロアリ腸内の未培養優占細菌種の一つ、*Candidatus Symbiothrix dinenymphae* (Bacteroidales 目) (図 1) について 1 細胞ゲノム解析を行い、木質分解共生系への寄与を解明することを目的とした。

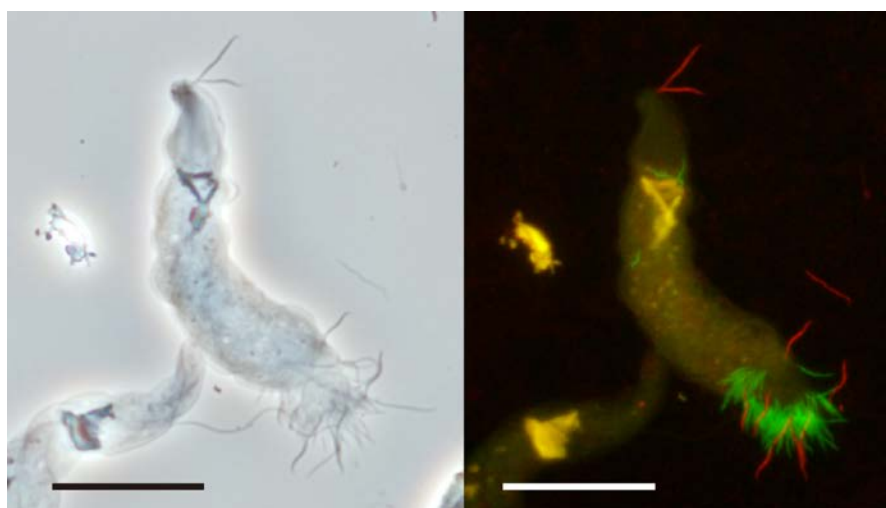


図 1 ヤマトシロアリ腸内原生生物 *Dinenympha porteri* の細胞表面に付着共生する *Candidatus Symbiothrix dinenymphae* (6-FAM ラベル、緑色) とスピロヘータ (Texas Red ラベル、赤色)。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法で特異的に検出した。左図は位相差観察像で右図は落射蛍光観察像。バーは 20  $\mu\text{m}$ 。詳細は文献 (1)。

## 方法

ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) の腸内微生物群集を蛍光セルソーター (FACS) で 1 細胞ずつ分取し、Repli-g Ultrafast Kit (キアゲン) を用いて等温全ゲノム増幅を行った。各増幅産物について PCR とサンガー法で 16S rRNA 遺伝子配列を取得し、*Ca. S. dinenymphae* の細胞サンプルを判別した。これら 1 細胞ゲノム増幅産物の Illumina MiSeq を用いたペアエンド及びメイトペア配列解析を行い、アセンブル後、BLAST による配列相同性検索と GC 含量などにより断片 (contig) をスクリーニングして、標的細菌由来ではないと判定した配列を除外した。残った配列断片上の遺伝子を予測し、配列相同性検索にもとづいて遺伝子機能を推定した。

また、*Ca. S. dinenymphae* は木質分解性原生生物 *Dinenympha* の細胞表面付着共生体であることがわかっており (図 1) (1)、細菌細胞の構造及び宿主原生生物細胞との結合部位を詳細に観察するため、透過型電子顕微鏡による観察も行った。

## 結果

取得したドラフトゲノムの総塩基長は 3.5 Mb で、多様な細菌分類群で保存されるシングルコピー遺伝子の数に基づいて計算したゲノム被覆率は約 82%、推定ゲノムサイズは約 4.3 Mb であった。*Ca. S. dinenymphae* は原生生物の共生細菌だが (図 1、2)、原生生物細胞内共生細菌 *Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae* (Bacteroidales 目) のゲノムサイズが 1.1 Mb にまで縮小していたのとは対照的である (2)。機能面では、*Ca. A. pseudotrichonymphae* と同様に、単糖を解糖系を経て酢酸に発酵し、同時にフマル酸呼吸によって ATP を生産する。またほとんどのアミノ酸の生合成能を保持していたが、*Ca. A. pseudotrichonymphae* の最大の特徴である窒素固定に関連する遺伝子は、*Ca. S. dinenymphae* ゲノム上からは発見されなかった。

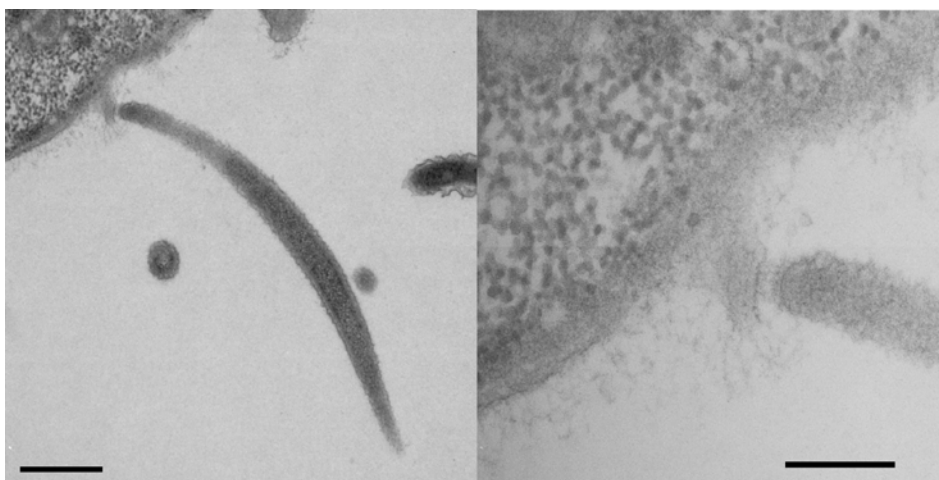


図 2. 原生生物細胞表面付着共生細菌 *Candidatus Symbiothrix dinenymphae* の透過型電子顕微鏡観察像。右の拡大図では、宿主由来とみられる台座のような構造体に繊維上物質で同細菌の先端部が結合していた。バーは左図が 500 nm で右図が 200 nm。詳細は文献 (3) を参照。

一方、*Ca. S. dinenymphae* ゲノム上には、*Ca. A. pseudotrichonymphae* では見られない多様な糖質分解酵素 (GH) の遺伝子群が存在した。これらの GH は 16 ファミリーに分類され、セルロース分解に必要な *endo-β-1,4-endoglucanase* と *β-glucosidase* を含んでいた。ただし、堅牢なセルロース結晶構造を破壊する *cellobiohydrolase* は見つからず、セルロースの非結晶部分を消化すると考えられる。それ以外には、*endo-β-1,4-xylanase*、*endo-1,5-α-L-arabinosidase*、*α-mannosidase* など、ヘミセルロース分解酵素遺伝子が多数存在していた。つまり、同細菌は原生生物に付着共生しながらこれらの糖質加水分解酵素群を分泌していることになるが、同酵素群が細菌細胞壁内に局在してセルロースやヘミセルロースの水溶性断片を捕捉・消化するのか、あるいは細胞外に分泌されて木片分解に寄与するのかは不明である (図 3)。興味深いのは、同細菌ゲノムには Bacteroidetes 門細菌にしばしば見られる滑走運動関連タンパク遺伝子群が、少なくとも見かけ上は機能的な状態で保持されていることである。同細菌は原生生物 *Dinenympha* の細胞表面に特異的に局在しており、腸内で自由生活する可能性は考えられていなかった。原生生物から離れて木片に付着することが有り得るのか、それとも原生生物共生体に進化する以前の祖先型の名残なのか、糖質加水分解酵素群の局在・活性評価とともに、今後の研究課題である。

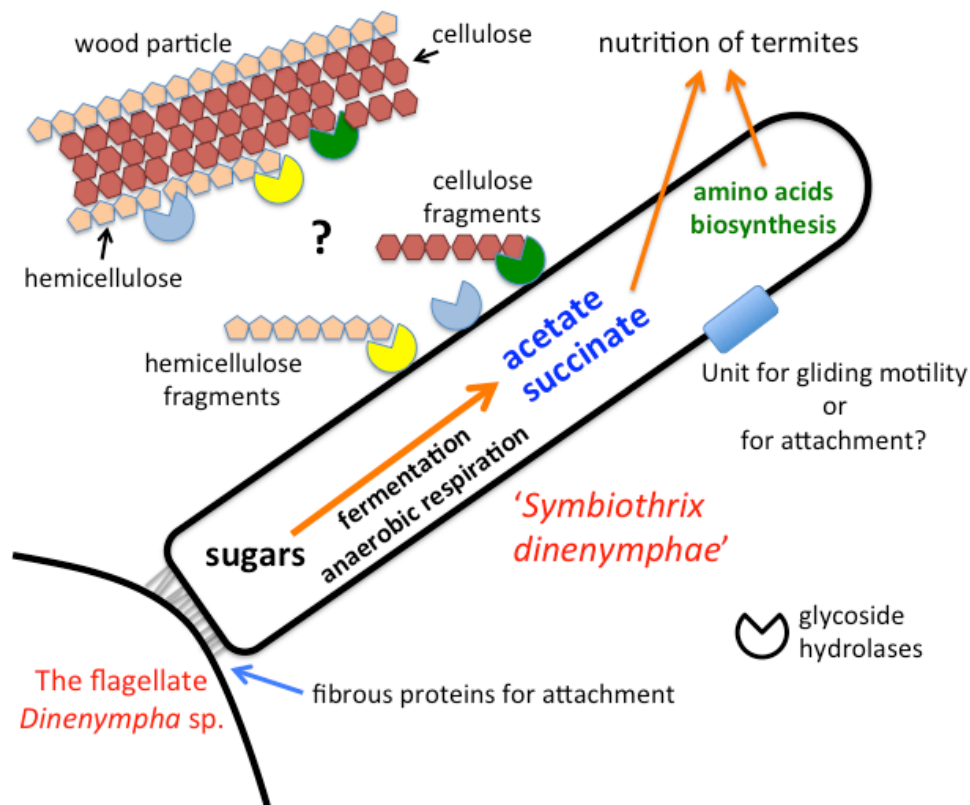


図3. 未培養細菌 *Candidatus Symbiothrix dinenymphae* の1細胞ゲノム解析により推定された機能の概要。

## 結論

ヤマトシロアリ腸内細菌群集の2.5%を占める未培養優占細菌種 *Candidatus Symbiothrix dinenymphae* は、木質分解性原生生物 *Dinenympha* の細胞表面付着共生体であり、その1細胞ゲノム解析により、同細菌も木質分解に関与することが示唆された。つまり同細菌は木質消化による酢酸生成と各種アミノ酸合成などにより宿主シロアリに寄与すると考えられるが、一方で、宿主原生生物にどのような利点があるのか不明であり、原生生物に付着共生する適応的意義の解明という点では謎が残った。

## 文献

- 1) Hongoh Y, Sato T, Noda S, Ui S, Kudo T, Ohkuma M (2007) *Candidatus Symbiothrix dinenymphae*: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of termite gut protists. *Environ. Microbiol.* **9**, 2631-2635
- 2) Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Toh H, Taylor TD, Kudo T, Sakaki Y, Toyoda A, Hattori M, Ohkuma M (2008) Genome of an endosymbiont coupling  $N_2$  fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science* **322**, 1108-1109
- 3) 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.* **17**, 4942-4953