

高効率バイオリサイクル共生システムの解明

シロアリ腸内の共生微生物による有効な資源利用メカニズムを解き明かす

「変換と制御」領域 大熊 盛也

要 旨

シロアリ腸内のセルロース分解性の様々な原生生物について、その細胞内・細胞表層で共生する細菌を培養を介さない分子生物学的な方法で同定した。これらの細胞共生細菌のなかには、セルロースの分解によって生じる水素と二酸化炭素から還元的に酢酸を生成し、原生生物の分解を促進する一方で宿主シロアリにエネルギー源をより多く提供する働きがあることがわかった。細胞共生細菌による還元的酢酸生成、窒素固定の他、培養を介さない網羅的な解析により原生生物のセルロース分解、水素生成などの機能に関連した遺伝子群を多数得た。

1 研究のねらい

自然界で効率よく資源を利用するシステムを細胞・分子レベルで理解し、資源の有効利用・バイオリサイクルについて学ぶ。このために、セルロースの高い分解能を有し、得られるエネルギーのほとんどを酢酸に変換して有効利用しているシロアリの腸内共生システムを題材に、共生微生物群による高効率性の要因を探る。シロアリは特に熱帯地域に圧倒的な量で存在する土壌昆虫で、陸上生態系での枯死植物から始まる腐食連鎖において大変重要な役割を果たす昆虫であり、その働きの多くは共生微生物によってもたらされると考えられている[総説として、M. Ohkuma, Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 1-9 (2003)]

しかしながら、シロアリ腸内の共生微生物は、大半が培養が困難な微生物であり、どのような微生物がどのような機能を果たしているかはほとんど解明されていない。原生生物についても細胞形態による分類の他は詳細な研究はなされていなかった。そこで、我々は培養を介さない分子生物学的な方法を適用して共生微生物の研究を行ってきた結果、シロアリの腸内には多くの未知の微生物が共生していることを明らかとした。また、原生生物の細胞内や細胞表層に様々な細菌が共生していることも見出し、微生物群が多重に共生しあった関係で

あることも明らかとなった。

本研究では、種々の原生生物と細菌の細胞レベルでの共生に注目し、共生の進化過程をみすえて、どのような細菌種が細胞共生するかを明らかにする。特に上述の効率性をもたらす特徴的な機能に着目し、培養を介さない方法で腸内での局在・存在状態と機能をリンクさせて統合的にこの多重共生システムを理解する。本研究は、自然界の複合的な共生システムを微生物機能のレベルで直接詳細に解析する先駆的な研究であると位置づけられる。

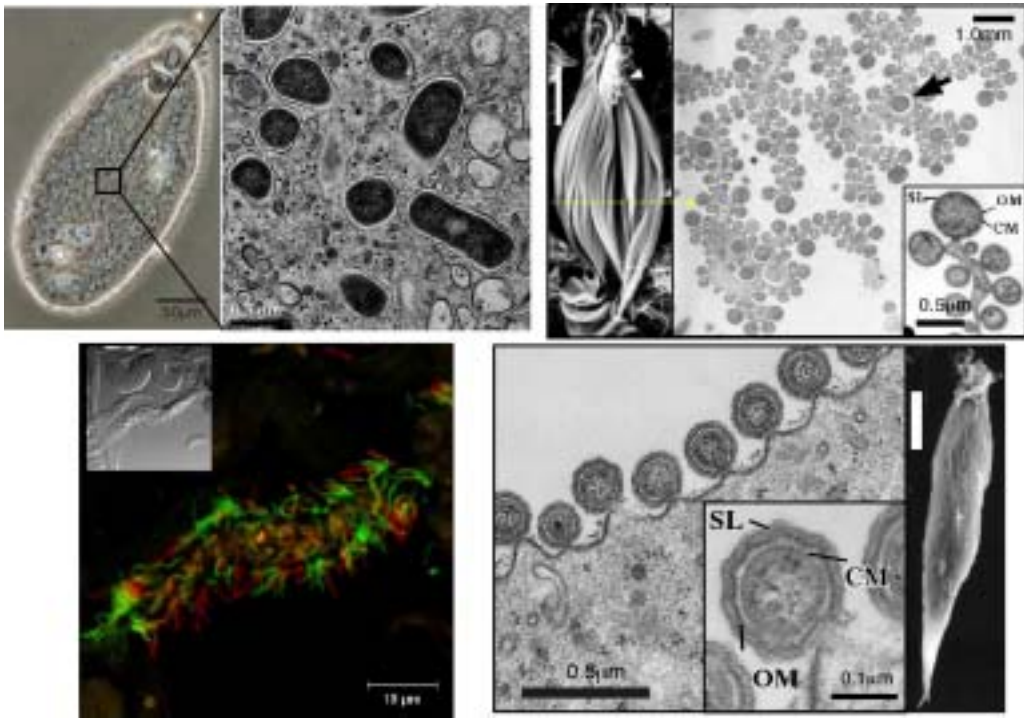
2 研究成果

2.1 原生生物に細胞共生する多様な細菌

様々な原生生物種について、細胞レベルで共生する細菌を解析した。これまでに、原生生物の細胞表層に共生する種々のスピロヘータ細菌、および、細胞内に共生するメタン生成細菌、シロアリ腸内から見出した細菌の分類体系で最も高次の門 (Phylum) レベルで新規の細菌群 (TG1 と命名) を明らかとしていた。マイクロマニピュレータ装置とキャピラリー (微細管) を用いて、顕微鏡下で原生生物種を見分けながら物理的に単離し、共生細菌の rRNA 遺伝子等を PCR 増幅してクローンを解析し、分子系統学的に同定した。さらに、同定した遺伝子配列に特異的なプローブを作製し、細胞形態を維持したままの蛍光 *in situ* hybridization (FISH) 法により、原生生物細胞への局在、分布を調べた。

その結果、桿菌様のスピロヘータ細菌がいくつかの大型原生生物に高密度に細胞内共生することを見出した。細胞内スピロヘータは、細胞表層のスピロヘータのうちのある種のものが、恐らく細胞内へ入って生じたと分子系統学的に推定された。スピロヘータは一般に運動性をもたらす螺旋状の細胞形態を特徴とするが、細胞内で運動性が不必要となり、螺旋状の形態も同時に失ったと考えられる。どのような機能的な関係が細胞表層から細胞内への進化をもたらしたのか興味を持たれた。

この他に多くの原生生物種の細胞表層に Bacteroidales 目 (門の下位の分類体系) の細菌が付着共生している例を多く見出した。いずれも良く似た細胞壁構造にもかかわらず、少なくとも3つ以上の異なる系統群に分れ、宿主原生生物の分類群と細胞形態に与える影響は複雑であった。ある種の原生生物の細胞内にも Bacteroidales の共生細菌を見出したが、細胞の外から内への系統関係はこれまで解析した範囲では得られなかった。多くの原生生物で、スピロヘータと Bacteroidales のものが同一細胞の表層に共生しており、さらに、細胞内に別種の共生細菌を有して3種の細菌と細胞共生する原生生物も見出した。



左上、原生生物 *Eucomonympha* sp. と細胞内共生スピロヘータの TEM 像。左下、*Dinenumpha porteri* の細胞表層に共生する 2 種のスピロヘータの FISH。右上、*Hoplonympha* sp. の SEM 像 (scale, 10 μm) と細胞表層に共生する Bacteroidales 細菌の TEM 像。矢印は細胞内に取り込まれた細菌細胞。右下、*Devescovina* sp. の SEM 像 (scale, 10 μm) と細胞表層に共生する Bacteroidales 細菌の TEM 像。SL, surface layer; OM, outer membrane; CM, Cellular membrane。

原生生物とその細胞内・細胞表層に共生するものの他、腸壁に付着するもの、腸内を自由生活するものなど、シロアリ腸内の微生物群集構造を解明し、それぞれの微生物種がそれぞれ特定の場所に局在していることを明らかとした。特に大型の原生生物の細胞内共生細菌は腸内細菌群の大半を占め、腸内の代謝・機能に大変重要な役割を果たしていると考えられた。

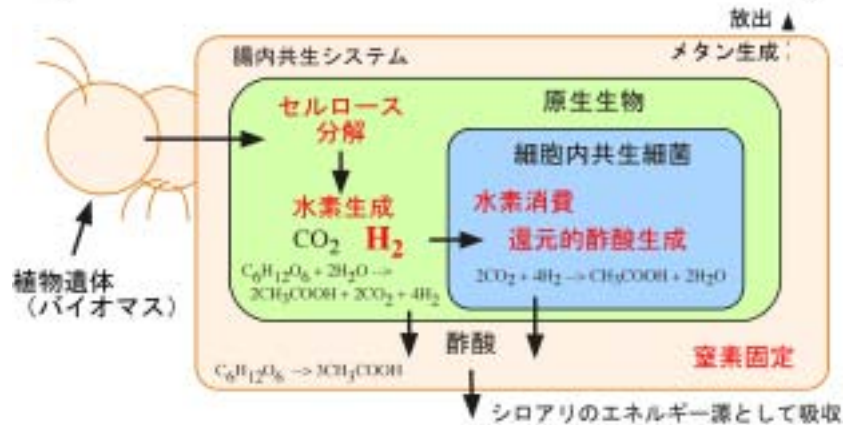
2.2 原生生物と細胞共生細菌の機能的相互作用

シロアリ腸内の特徴的な代謝を参考に原生生物の細胞共生細菌の機能を推定した。シロアリによって細かくかみ砕かれた木片やセルロース片は、腸内で原生生物に取り込まれ原生生物の細胞内で分解される。セルロースは酢酸にまで分解され、生じた酢酸はシロアリに吸収されてシロアリのエネルギー源となる。分解の副産物として水素と二酸化炭素が生じるが、特に水素は分解によって生じる還元力の処理産物で、効率よく除かれないと分解過程そのものが滞ってしまう。実際に、腸内の原生生物は強力なセルロース分解能と同時に高い水素生成能を有している。

腸内にはメタン生成細菌が生息して水素と二酸化炭素からメタンを生成して水素の処理に働くが、シロアリの場合、メタン生成よりもむしろ、二酸化炭素から還元的に酢酸を生成する反応が水素（還元力）の主要な捨て場となっている。メタン生成に比べ還元的酢酸生成は熱力学的に不利な反応であり、シロアリ腸内におけるこの高い還元的酢酸生成能は、一般の嫌気的な微生物生態系には見られない特徴である。生じたメタンはシロアリに利用されることなく捨てられてしまうが、酢酸はシロアリに吸収利用されるので、セルロース由来の資源を実に効率良く利用する理想的なシステムである。

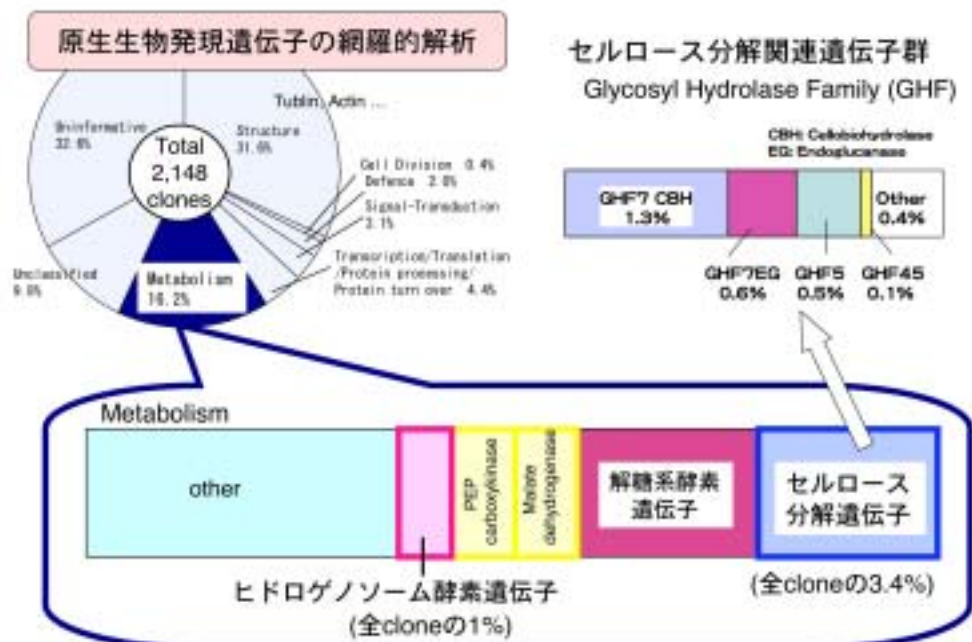
そこで、原生生物と細胞共生する細菌が、還元的酢酸生成能を有するか、嫌気性条件下で微小分画した細胞を用いた生理・生化学的解析と機能関連遺伝子の分子生物学的な研究を通して検討した。大型原生生物の細胞内スピロヘータ細菌に、水素依存性の二酸化炭素からの還元的酢酸生成能を検出し、腸内で検出される活性の6割程度を占めることを明らかとした。これは還元的酢酸生成が関与する新規の細胞共生関係で、シロアリ、原生生物、細胞内共生細菌の3者にとっての相利共生であった。なぜシロアリでは他の微生物生態系にない高い還元的酢酸生成能を有するか、この細胞共生関係によって合理的に説明できた。水素を生成する原生生物細胞内に共生することにより、メタン生成細菌よりも優先的に基質を利用することができるからである。さらに、細胞内共生スピロヘータ細菌の分子系統・進化過程を考えると、種間の水素伝達を介した共生関係が細胞の外から内への進化を誘起したという大変興味深い考察が可能となった。

シロアリ腸内の原生生物と細胞共生細菌の機能的関係



2.3 腸内共生原生生物の機能へのアプローチ

腸内の原生生物混合相から培養を介さず直接遺伝情報を解析する手法を適用した。原生生物混合細胞から発現 cDNA ライブラリーを構築し、大腸菌においてセルロース分解活性を検出して、セルラーゼ遺伝子を取得することができた。また、cDNA ライブラリーから2000クローン程度を無作為抽出して部分塩基配列を決定し、相同性検索を行なって、原生生物が発現する遺伝子を網羅的に解析した (Expressed Sequence Tag [EST]解析)。



半数のクローンが既知のものと有意な相同性を示さない新規配列(従って機能未知)であったが、セルロース分解に関与する糖質分解酵素群 (Glycosyl Hydrolase Family : GHF) のホモログは全クローンのうち3%含まれていた。分解関連遺伝子が高発現していることが、高い分解能の要因の一つと考えられた。多くを占めていた GHF7をはじめとして、GHF5, 11, 45の遺伝子群が原生生物のセルロース分解に役割を果たしていることを明らかとした。GHF5のセルラーゼについては大腸菌で発現した組み換え酵素が典型的なエンドグルカナーゼであることを確かめた。また、嫌気的エネルギー産生器官で水素生成の場であるヒドロゲノソームの代謝に関わると予測される遺伝子は、全クローンの約1%であり、水素生成酵素遺伝子も複数得ることができた。EST解析からは、原生生物の細胞質の解糖系からピルビン酸を介して直接ヒドロゲノソームに入る代謝経路よりむしろ、リンゴ酸を介したバイパス経路が強く働くと推定された。これらの発現遺伝子がどの原生生物種由来であるかは、物理的に単離した細胞を用いて同定する方法を確立した。

3 今後の展開

シロアリ腸内の共生微生物に特徴的な機能については、多くの機能関連遺伝子群を得ることができた。今後はこれらが大腸菌等で異種発現させて、遺伝子産物を生化学的に解析して有用性を検討する。シロアリ腸内共生微生物による窒素固定では、通常では認められない高水素分圧下でも働く酵素であることを明らかとしており、原生生物のセルロース分解酵素、水素生成酵素と合わせて応用に期待される。

真核生物のミトコンドリアなどの細胞内小器官は、細胞内共生細菌が起源と言われており、また、ミトコンドリアとヒドロゲノソームが同一の細胞内共生細菌を起源とするのかも盛んに議論されている。本研究において見出したような多様な細菌群と原生生物の細胞レベルでの共生関係は、「いにしえ」の細胞共生で何が起こったのかを研究する「現存する」モデルとして大変興味深い。

自然界には莫大な種の生物が生息しており、長い進化の過程で適応・淘汰収斂を繰り返して効率良い様々な変換・制御システムを構築してきたのではないだろうか。未だ解明されていない自然界の効率的なシステムを深く理解して、それに学ぶことは重要と考える。

謝 辞

本研究は、JST 研究員の野田悟子博士、井上徹志博士、城島透博士、斎田佳菜子技術員と行ったものである。共同研究していただいた多くの方々、学生諸氏に深く感謝いたします。貴重なご助言を頂いた領域総括の合志陽一先生ならびにアドバイザーの先生方、いつも御支援いただきました領域事務所の方々に心より御礼申し上げます。

研究成果リスト

(発表論文)

原著論文

1. S. Noda, T. Iida, O. Kitade, H. Nakajima, T. Kudo, M. Ohkuma. Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, in press (2005).
2. S. Noda, T. Inoue, Y. Hongoh, M. Kawai, C. C. Nalepa, C. Vongkaluang, T. Kudo, M. Ohkuma. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in Bacteroidales attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environ. Microbiol.*, 7, in press (2005).
3. Y. Hongoh, P. Deevong, T. Inoue, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, M. Ohkuma, C. Vongkaluang, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Intra- and interspecific comparison of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, in press (2005).
4. H. Nakajima, Y. Hongoh, S. Noda, Y. Yoshida, R. Usami, T. Kudo, M. Ohkuma. Phylogenetic and morphological diversity of Bacteroidales members associated with the gut wall of termites. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.
5. Y. Taprab, T. Johjima, Y. Maeda, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, N. Noparatnaraporn, M. Ohkuma, T. Kudo. Symbiotic fungi produce laccases potentially involved in phenol degradation in fungus combs of fungus-growing termites in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, in press (2005).
6. A. Yamada, T. Inoue, D. Wiwatwitaya, M. Ohkuma, T. Kudo, A. Sugimoto. Ecological function of nitrogen fixed by termites in tropical forests, Thailand. *Ecosystems*, 8, in press (2005).
7. Y. Hongoh, L. Ekpornprasit, T. Inoue, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, M. Ohkuma, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Intra-colony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Mol. Ecol.*, in press.
8. S. Noda, M. Kawai, H. Nakajima, T. Kudo, M. Ohkuma. Identification of two lineages of Bacteroidales ectosymbionts associated with a termite gut protist, *Oxymonas* sp., and their

in situ detection. *Microbes Environ.*, in press.

9. S. Moriya, T. Inoue, M. Ohkuma, Taprab, Y., T. Johjima, P. Suwanarit, U. Sangwanit, C. Vongkaluang, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Fungus community analysis of fungus garden in termite nest. *Microbes Environ.*, in press.
10. H. Nakajima, Y. Hongoh, R. Usami, T. Kudo, M. Ohkuma. Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and bacterial community colonizing on the gut epithelium. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54, 247-255 (2005).
11. M. Ohkuma, T. Iida, O. Kuniyo, H. Yuzawa, S. Noda, E. Viscogliosi, T. Kudo. Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Hypermastigae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 35, 646-655 (2005).
12. T. Inoue, S. Moriya, M. Ohkuma, T. Kudo. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. *Gene*, 349, 67-75 (2005).
13. T. Thongaram, Y. Hongoh, S. Kosono, M. Ohkuma, S. Trakulnaleamsai, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. *Extremophiles*, 9, 229-238 (2005).
14. A. Yamada, T. Inoue, M. Ohkuma, T. Kudo, A. Sugimoto. Fungus-growing termites determine carbon flow from above- to belowground pools and restrict the biomass of soil-feeding termites. *Ecol. Res.*, 20, 453-460 (2005).
15. T. Inoue, Y. Hongoh, C. Klangkaew, Y. Takematsu, C. Vongkaluang, N. Noparatnaraporn, M. Ohkuma, T. Kudo. Plasticity and specificity of termite nest structure. *Sociobiology*, 45, 671-678 (2005).
16. P. Deevong, S. Hattori, A. Yamada, S. Trakulnaleamsai, M. Ohkuma, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Isolation and detection of methanogens from the gut of higher termites. *Microbes Environ.*, 19, 221-226 (2004).
17. D. Gerbod, E. Sanders, S. Moriya, C. Noël, H. Takasu, N. M. Fast, P. Delgado-Viscogliosi, M. Ohkuma, T. Kudo, M. Capron, J. D. Palmer, P. J. Keeling, E. Viscogliosi. Molecular phylogenies of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 572-580 (2004).
18. M. Ohkuma, H. Shimizu, T. Thongaram, S. Kosono, K. Moriya, S. Trakulnaleamsai, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. An alkaliphilic and xylanolytic *Paenibacillus* species isolated from the gut of a soil-feeding termite. *Microbes Environ.*, 18, 145-151 (2003).
19. T. Thongaram, S. Kosono, M. Ohkuma, Y. Hongoh, M. Kitada, T. Yoshinaka, S. Trakulnaleamsai, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Gut of higher termites as a niche for alkaliphilics as shown by culture-based and culture-independent studies. *Microbes Environ.*, 18, 152-159 (2003).
20. Y. Hongoh, H. Yuzawa, M. Ohkuma, T. Kudo. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221, 299-304

(2003).

21. Y. Hongoh, M. Ohkuma, T. Kudo. Molecular analysis of bacterial flora in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44, 231-242 (2003).
22. S. Noda, M. Ohkuma, A. Yamada, Y. Hongoh, T. Kudo. Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 625-633 (2003).

著書・総説など

1. M. Ohkuma, Y. Hongoh, T. Kudo. Chapter 12. Diversity and molecular analyses of yet-uncultivated microorganisms. /n H. König, A. Avarma (eds.), Soil Biology Volume 6, Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. Springer-Verlag, Heidelberg, in press.
2. S. Moriya, S. Noda, M. Ohkuma, T. Kudo. In situ hybridization of termite hindgut microbes. /n E. Hilario, J. F. Mackay (eds.), DNA-analysis by nonradioactive probes. Humana Press, Totowal, NJ, USA, in press.
3. 工藤俊章、大熊盛也（監修）バイオテクノロジーシリーズ 難培養微生物研究の最新技術 - 未利用微生物資源へのアプローチ -、シーエムシー出版（2004）.
4. 野田悟子、大熊盛也、難培養微生物の研究 9 .機能遺伝子による解析とその mRNA の検出、/n 工藤俊章、大熊盛也（監修）難培養微生物研究の最新技術 - 未利用微生物資源へのアプローチ -、シーエムシー出版、pp. 83-93, (2004).
5. 斎藤雅典、岩瀬剛二、大熊盛也、辺境に残された貴重な宝物 - 学際シンポジウム「微生物の寄生と共生：その進化と適応」報告、日本微生物生態学会誌、19, 54-56, (2004).
6. 大熊盛也、工藤俊章、シロアリ共生微生物への培養を介さないアプローチ、日本農芸化学会誌(ミニレビュー「難培養微生物資源へのアプローチ」) 77, 1237-1239, (2003).
7. 大熊盛也、共生微生物は極限環境微生物か？、極限環境微生物学会誌（研究最前線）、2, 4-5, (2003).
8. 大熊盛也、シロアリ-微生物共生系の分子生態学的研究、日本農芸化学会誌（受賞総説）、77, 846-851, (2003).
9. 大熊盛也、シロアリ腸内の微生物共生システム、日本農芸化学会誌（ミニレビュー「共生微生物のバイオフロンティア」) 77, 134-136, (2003).

(学会発表)

1. M. Ohkuma. Cellular symbioses within the symbiotic microbial community in the gut of termites. Okazaki Biology Conference (OBC) on "Terra Microbiology", Sep. (2004).
2. 大熊盛也、シロアリと微生物共生系の分子生態学的研究、筑波大学生命環境科学研究科21世紀 COE

プログラム第1回若手シンポジウム「環境応答の分子機構とバイオ機能の高度利用」、2004年3月

3. 大熊盛也、シロアリ・微生物共生系の分子生態学的研究（平成15年農芸化学奨励賞受賞記念講演）、日本農芸化学会関東支部第1回例会、2003年6月
 4. 大熊盛也、工藤俊章、シロアリ腸内の共生微生物の機能とマイクロエコロジー、日本農芸化学会大会（シンポジウム「難培養微生物資源へのアプローチ」）、2003年3月
- 他国際会議13件、国内学会35件

（受賞）

1. 2003年3月、日本農芸化学会農芸化学奨励賞：大熊盛也、「シロアリ・微生物共生系の分子生態学的研究」
2. 2004年7月、Journal of Eukaryotic Microbiology, Co-Winner of The William Trager Award for Outstanding Paper of the Year : S. Moriya, J. B. Dacks, A. Takagi, S. Noda, M. Ohkuma, W. F. Doolittle, T. Kudo. Molecular evolution of three oxymonad genera: *Pyrsonympha*, *Dinenympha* and *Oxymonas*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 190-197, (2003).
3. 2004年8月、10th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-10), Best Poster Award : S. Hattori, M. Ohkuma, H. Yuzawa, T. Kudo. Symbiotic relationship between cellulose-utilizing protists and their associated homoacetogenes in the gut of lower termite.
4. 2004年10月、The 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10), Best Poster Award : Y. Hongoh, M. Ohkuma, S. Trakulnaleamsai, P. Deevong, T. Inoue, C. Vongkhaluang, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Novel (sub)divisional lineages of bacteria found from the gut of termites.
5. 2004年11月、日本微生物生態学会第20回大会、ポスター賞：野田悟子、工藤俊章、大熊盛也、「シロアリ腸内原生生物とその共生CFBグループ細菌の系統・進化」