

《農芸化学奨励賞》

ゲノム解析によるシロアリ腸内共生難培養性細菌の機能解明



理化学研究所 前田バイオ工学研究室 環境分子分解科学研究チーム 協力研究員 本郷 裕一

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極めて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いま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もつことなどを明らかにしてきた。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。そこで筆者らは、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。

1. シロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌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

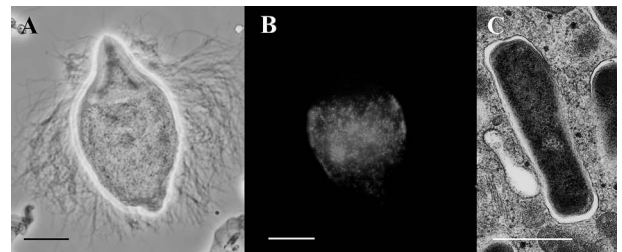


図1 原生生物 *Trichonympha agilis* と細胞内共生細菌 Rs-D17
(A) ヤマトシロアリ腸内に共生するセルロース分解性原生生物 *Trichonympha agilis* の位相差顕微鏡像。バーは20 μm 。(B) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる同原生生物細胞内に共生する Rs-D17 細菌の検出。バーは20 μm 。(C) Rs-D17 細菌の透過型電顕像。バーは0.5 μm 。

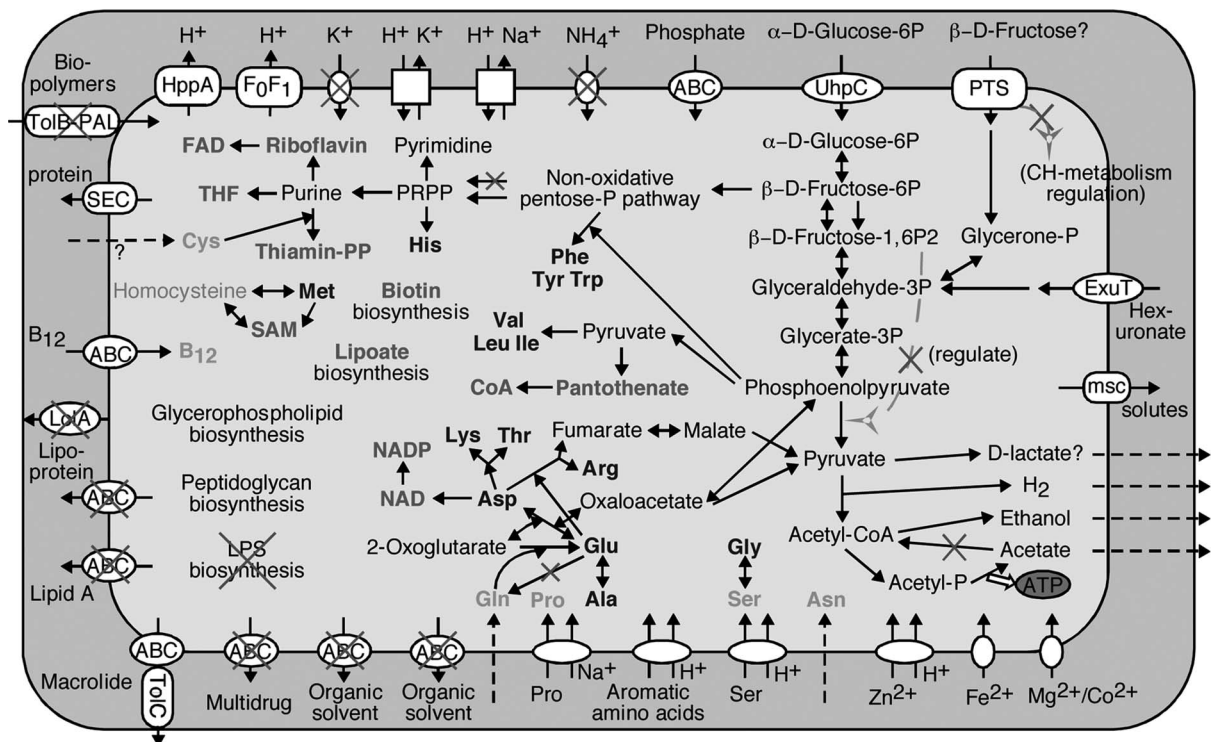


図2 ゲノム配列から予測した Rs-D17 細菌の代謝マップ
偽遺伝子化によって機能を喪失したと考えられる系は×印をつけた。

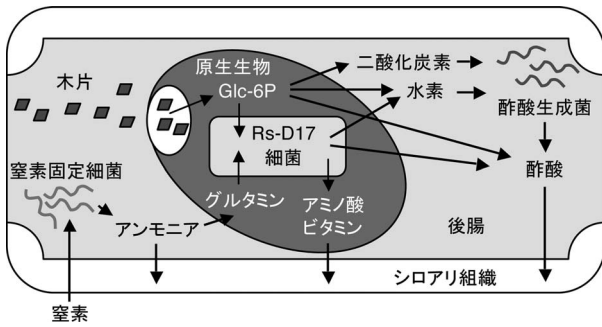


図3 明らかとなったシロアリ，原生生物，細菌の多重共生

菌であることが明らかとなっている。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と名づ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。

細菌ゲノムの完全長配列取得には通常1億個以上の細胞が必要である。そこで、回収したRs-D17細胞をアルカリ融解・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、454パイロシーケンスとサンガー法による配列解析を行った。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。

2. シロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌の機能と進化

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個もの偽遺伝子を保有していた。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り込むことで、自身のATPを節約している(図2)。

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、細胞壁成分のリポ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(図3)。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すで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。

おわりに

このようにシロアリ腸内には、セルロース分解を担う共生原

生生物の細胞内にさらに共生して窒素化合物合成を担う細菌が存在しており、複雑な多重共生系が働いていることが明らかとなった。今回確立した、少数細胞からのゲノム完全長取得系は、他の難培養性細菌の機能解明にも大いに役立つはずである。実際、筆者らはこの後、イエシロアリ腸内に共生する、木片消化に必須な原生生物 *Pseudotriconympha grassii* の、その細胞内にだけ生息する培養不能細菌 CfPt1-2 のゲノム完全長配列取得にも成功している。CfPt1-2はBacteroidales目の新属細菌で、一つの原生生物細胞内に約10万個も生息し、腸内細菌細胞総数の7割をも占めているが、その機能はほとんど未知であった。

上記手法によって取得したCfPt1-2細菌ゲノムのサイズは1.1 Mbとやはり縮小していたが、驚くべきことに、空中窒素固定遺伝子群をコードしていた。これはBacteroidetes門細菌からは初めての発見である。さらに、宿主原生生物の窒素老廃物を再利用して多様なアミノ酸とビタミン類を合成する経路も保有していた。炭素・エネルギー源には宿主によるリグノセルロース分解の産物を用いている。つまり、Rs-D17細菌の窒素化合物変換機能に加え、窒素固定・再利用能をもっていたのである。この成果は最近 *Science* 誌に掲載された。

今後は、このゲノム解析手法の改良を進めながら、多様な難培養微生物種のゲノム解読に挑戦していく予定である。地球上の99%以上の微生物種は現時点で培養法が不明であり、その機能も未知である。これらの微生物種のゲノムを解読することができれば、それらの生態系への寄与の解明のみならず、これまで未利用であった膨大な遺伝子資源の獲得にもつながり、産業応用が期待できる。

本研究は、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。研究をご支援くださった大熊盛也・理研環境分子分解科学チームチームヘッド、服部正平・理研客員主管研究員・東京大学教授、榊佳之・理研ゲノム科学総合研究センター(GSC)所長(現豊橋技術科学大学・学長)の各先生方に厚く御礼申し上げます。ゲノム配列解析は理研GSCゲノム基盤施設シーケンス技術チームの豊田敦・上級研究員(現国立遺伝学研究所・特任准教授)の豊富なお経験とご尽力により、完全長配列再構築にまで到達いたしました。豊田先生ならびにシーケンスチームのスタッフの方々にも心よりの御礼を申し上げます。“iMetaSys”による自動アノテーションは、理研GSCシステム基本情報解析チーム(現基幹研究所・メタシステム解析チーム)のVineet K. Sharma博士、Tulika Prakash博士ら、Todd Taylorチームヘッドのグループのご協力を得て行われました。心より感謝申し上げます。配列登録を担当された、同チームの藤英博博士にも御礼申し上げます。また本研究を側面から支えてくださった、野田悟子博士、井上徹志博士、城島透博士、服部聡博士、守屋繁春研究員ほか環境分子生物学研究室に在籍した研究員の方々ならびに技術員と学生の方々にも深く感謝いたしております。現在の所属長である理研・バイオ工学研究室の前田瑞夫先生にも御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました環境分子生物学研究室主任研究員(現長崎大学教授)の工藤俊章先生ならびに学部・大学院を通じてご指導賜りました東京大学名誉教授の故石川統先生に心より厚く御礼申し上げます。