T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シロアリ腸内原生生物に細胞内共生するElusimicrobia門細菌の新規ゲノム配列取得と比較ゲノム解析
Title(English)	
著者(和文)	伊澤和輝
Author(English)	Kazuki Izawa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10419号, 授与年月日:2017年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:本郷 裕一,岩﨑 博史,田中 幹子,二階堂 雅人,山田 拓司
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10419号, Conferred date:2017/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　理学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	伊澤　和輝	指導教員（主）： Academic Advisor(main)	本郷　裕一
		指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）

Endomicrobium 属（Elusimicrobia 門）の細菌は、下等シロアリにおける腸内最優占種群の一つである。Elusimicrobia 門からは 2 種の腸内自由生活型の細菌が単離培養されているが、*Endomicrobium* 属細菌の多くはシロアリ腸内に共生する木質分解性原生生物の細胞内共生体であり、これらの細胞内共生体の培養成功例は無い。このため、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の研究は DNA 配列に基づいて行われている。2008 年には、シロアリ腸内原生生物トリコニンファの細胞内に共生する未培養種 ‘*Candidatus* Endomicrobium trichonymphae’ の Rs-D17 系統型（以下 Ri2008 株）のゲノム配列が解読された。解析の結果、Rs-D17 系統型は近縁な腸内自由生活型細菌の約 2/3 ほどのゲノム（約 1.1Mb）を持ち、ゲノム上に予測されたタンパクコード遺伝子数の約 15%が偽遺伝子であったことからゲノム縮小進化過程にあることが示唆されていた。また代謝経路の予測から、Rs-D17 系統型は木質分解産物である単糖の供給を宿主原生生物から受ける代わりに、植物枯死体に乏しいアミノ酸や補酵素を合成・供給する役割を担うことが示唆されていた。しかしながらこれ以後、細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌のゲノム配列の報告は無く、これらの生理・生態・進化に関する研究は進展していなかった。

本研究では、複数の同細菌群のゲノム配列を新規に取得し、比較することで、このシロアリ腸内優占種群の生理・生態・進化の網羅的な理解を目指した。まず、上記の Rs-D17 系統型の別株（以下 Ti2015 株）のゲノム完全長配列を取得することにより、短い進化時間で生じた差異から、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌におけるゲノム進化の傾向を見出すことを試みた。さらに、複数種の *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌のゲノム配列を取得し、比較ゲノム解析を行うことで、より長い進化時間を隔てた系統型間でのゲノムの多様性と共通性を明らかにすることを目標とした。

比較した Rs-D17 系統型の 2 株（Ri2008 と Ti2015）の染色体全域の配列相同性は 98.6%で、ほとんどの遺伝子・偽遺伝の種類と位置も一致していた。ところが、外来 DNA に対する防御機構に差異が見られた。制限修飾系と CRISPR/Cas システムは 2 株において独立に偽遺伝子化が進んでおり、外来 DNA に対する防御機構が細胞内共生にともなって退化しつつあると考えられる。一方、両株で保持されていた CRISPR/Cas システムでは、100 個以上あったスペーサー配列（外来 DNA 断片）が両株間で完全に異なっており、このシステムが稼働していること、即ち細胞内共生細菌であるにも関わらず、外来 DNA の侵入を受け続けていることを示唆している。これは細胞内共生細菌としては初めての発見である。

さらに、新規に取得した細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌のゲノム 4 系統型のうち、3 系統型のゲノム上にも、多数の制限修飾系の遺伝子・偽遺伝子と機能的と見られる CRISPR/Cas システムが存在しており、シロアリ腸内原生生物の細胞内共生体においては、おそらく原生生物の食作用に付随して、ファージなどが宿主細胞内へ侵入するため、外来 DNA に対する防御機構を完全には退化させずに、ある程度維持する必要があると考えられる。

本研究で新規にゲノム配列を取得した細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌 5 系統型は、それぞれ別種のシロアリ腸内原生生物の種特異的共生体であるが、いずれもゲノムサイズが 1.0Mb～1.4Mb 程度と腸内自由生活型と比べて小さく、偽遺伝子を多数含んでおり、自由生活時に必要だった機能遺伝子群が退化する、ゲノム縮小進化過程にあった。ゲノム解析を行った何れの系統型も、単糖とそのリン酸化物のトランスポーターを保有しており、宿主原生生物から、木質の分解産物である単糖の供給を受け、発酵によりエネルギーを生産すると予測される。また、共通してアミノ酸と補酵素の合成に関わる遺伝子群を豊富に保持しており、*Endomicrobium* 属細胞内共生体は、シロアリが食糧とする植物枯死体に乏しい窒素化合物の合成・供給の機能を担うとみられる。さらに、植物由来糖質を酢酸に発酵する経路も共通していたことから、シロアリの炭素源として酢酸を供給していると考えられる。一方、近縁の腸内自由生活型細菌や、他のシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌（スピロヘータとバクテロイデス）が持つ空中窒素固定遺伝子群は保持しておらず、シロアリ腸内共生スピロヘータなどが持つ水素除去機能も持たないとみられた。

このように、5 系統型の細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌は共通した共生機能を担っていると考えられたが、一方で、解糖系、クエン酸回路、アンモニアの利用、細胞壁合成系などに関わる遺伝子の有無と偽遺伝子化には差異が見られ、それらは宿主原生生物種の代謝系などの違いや、同時共生する他細菌種との共進化の結果かもしれない。

さらに本研究では、原生生物の細胞内ではなく、細胞表面に共生する *Endomicrobium* 属細菌を初めて発見した。

16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析によると、シロアリ腸内で自由生活するとみられる *Endomicrobium* 属細菌と単系統を成したため、それらから進化したと考えられる。今後、細胞表面共生体のゲノム配列を取得することで、シロアリ腸内共生系の特徴である、原生生物と細菌の細胞共生について、より理解を深めることができるだろう。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　理学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	伊澤　和輝	指導教員（主）： Academic Advisor(main)	本郷　裕一
		指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

The genus *Endomicrobium* (phylum Elusimicrobia) is a dominant bacterial group in the gut of basal termite lineages (order Isoptera). The majority are obligately intracellular symbionts of cellulolytic gut protists; because they are unculturable, study of the endosymbiotic *Endomicrobium* has been conducted based on their DNA/RNA sequences. In this study, to address their physiology, ecology and evolution, we newly reconstructed several endosymbiotic *Endomicrobium* genomes and conducted comparative genome analysis. These genomes were much smaller in size, compared to that of a free-living *Endomicrobium* isolate and contained many pseudogenes; these *Endomicrobium* endosymbionts are in the course of genome reduction. Nevertheless, they retained apparently intact, multiple defense systems against foreign DNA in their small genomes. This strongly suggests that these endosymbionts are subjected to attacks by phages even in their intracellular lifestyle.

I further analyzed these genomes, focusing on the metabolic pathways. The surveyed genomes commonly have potential to take up monosaccharides that derived from cellulolysis by the host protist and to synthesize amino acid and cofactors that are deficient in wood particles ingested by the termite host. However, the repertoires of the genes and pathways involved in the amino acid biosynthesis, glycolysis, TCA cycle, and cell wall biogenesis, were partly different among the endosymbionts. These differences might be attributable to the host metabolisms and/or the presence of other, co-inhabiting endosymbionts.

Additionally, we discovered *Endomicrobium* ectosymbionts of termite-gut protists and examined their morphology, host specificity and phylogenetic positions. The identified *Endomicrobium* ectosymbionts were polyphyletic, and each lineage constituted a monophyletic cluster with putatively free-living members found from termite guts. This implies that the ectosymbiotic *Endomicrobium* lineages have evolved multiple times from free-living lineages.

These results have significantly promoted the understanding of this dominant and unique bacterial group, the genus *Endomicrobium*, in the termite gut.

備考 ： 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).