

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,岩崎 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)	要約
Type(English)	Outline

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

生体システム専攻 本郷研究室 伊澤和輝
指導教員 本郷裕一

Endomicrobium 属(*Elusimicrobia* 門)の細菌は下等シロアリの腸内における優占細菌種群の一つである。これまでに *Elusimicrobia* 門からは 2 種の単離培養株が報告されているが、*Endomicrobium* 属の多くは原生生物の種特異的な細胞内共生細菌であり、これらの培養成功例はない。このため、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の研究は主に DNA 配列に基づく手法により行われてきた。

‘*Candidatus Endomicrobium trichonymphae*’ はシロアリ腸内に生息する *Trichonympha* 属原生生物の細胞内に常に共生しており、これまでに細胞外での存在が確認された例はない。このうちの 1 系統型である‘*Ca. Endomicrobium trichonymphae*’ Rs-D17 系統型は、ヤマトシロアリ腸内の *Trichonympha agilis* に細胞内共生する系統型であり、2008 年にゲノム完全長配列が解読された (以下 Ri2008 株と呼ぶ)。この細菌は 1.1Mb 程の小さいゲノムを持ち、予測されたタンパクコード遺伝子数の約 15%が偽遺伝子とみられたことから、ゲノム縮小進化過程にあることが示唆されていた。さらに Ri2008 株は、宿主原生生物から木質分解産物である単糖の供給を受ける代わりに、植物枯死体中に乏しいアミノ酸や補酵素を宿主原生生物とシロアリに供給する役割を担うことが予測されていた。

しかしながらこれ以降、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌のゲノム配列の報告は無く、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の生理・生態・進化についての研究は進展していなかった。そこで本研究では、シロアリ腸内原生生物の細胞内に共生する *Endomicrobium* 属細菌のゲノム配列を取得し、その特徴とゲノム進化を解明することを目指した。

まず、短い進化時間における *Endomicrobium* 属細菌のゲノム進化に迫るため、Rs-D17 系統型の別株 (Ti2015 株と呼ぶ)のゲノム完全長配列を新たに取得し、Ri2008 株との比較ゲノム解析を行った。両株間の染色体全域の塩基配列相同性は 98.6%で、殆どの機能的な遺伝子と偽遺伝子の種類、またそれらのゲノム上の位置も共通していた。ところが、制限修飾系と CRISPR/Cas システムにおい

では、両株間で差異がみられた。制限修飾系遺伝子群については、機能的な遺伝子と偽遺伝子のレパートリーが株間で異なっており、また CRISPR/Cas システムについては、Ri2008 株に 3 つあった同システムのうち、Ti2015 株では 1 つが偽遺伝子化、1 つが欠失していた。これは、細胞内共生に伴い、外来 DNA に対する防御機構を維持する自然選択圧が緩んでいることを示唆している。しかしながら、両株で保存されていた CRISPR/Cas システムについては、CRISPR 中のリピート配列が同一であった一方で、Ri2008 株に 112 個、Ti2015 株に 128 個存在したスペーサー配列は完全に異なっていた。これは、この CRISPR/Cas システムが新たに外来 DNA 断片を取り込んでおり、機能していること、つまり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、後述する異なる原生生物種の細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌 4 系統型のうち 3 系統型のゲノム配列からも複数の制限修飾系と CRISPR/Cas システムが発見された。このことから、複数の制限修飾系と CRISPR/Cas システムを保持することが多くの *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌に共通の性質であることが示唆された。ここから、これまでに報告されてきた昆虫細胞内共生細菌とは異なり、*Endomicrobium* 属細胞内共生細菌は、宿主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ある程度保持する必要があると考えられる。

次に、より長い進化時間を隔てた *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の共通性と多様性に迫るため、異なる原生生物種の細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌 4 系統型のゲノム配列を取得し、種間比較ゲノム解析を行った。

解析の結果、各 *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌はいずれも自由生活型よりも小さいゲノムを持ち、ゲノム上に多くの偽遺伝子が残存することから、ゲノム縮小過程にあることが示唆された。一方で、各種単糖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た。さらに、各 *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌は多数のアミノ酸や補酵素の合成に関わる遺伝子を保持していたことから、いずれの *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌も、シロアリが食糧とする植物枯死体に乏しいアミノ酸や補酵素を、宿主原生生物やシロアリに合成・供給するという機能を共通して担うと考えられる。しかしながら、合成可能なアミノ酸のレパートリーや、解糖系、クエン酸回路などの主要代謝系に差

異が存在した。この差異は、それぞれの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。

最後に、本研究では *Endomicrobium* 属細菌の原生生物細胞表面共生体 6 系統型を 2 種のシロアリの腸内から初めて発見した。透過型電子顕微鏡による観察から、この細胞表面共生体は、細胞の先端から伸びた管状の構造物によって、原生生物の細胞表面に付着していた。また系統解析から、細胞表面共生 *Endomicrobium* 属各系統型は、それぞれ腸内自由生活型とみられる *Endomicrobium* 属系統型と単系統を形成しており、腸内自由生活型から独立に進化したと考えられる。一方、今回発見した細胞表面共生体は、細胞内共生系統群と近縁ではなく、細胞表面共生体から細胞内共生体が進化したとは言えなかった。

これらの成果は 2 種しか単離培養されていない *Elusimicrobia* 門の知見を大幅に拡充するもので、特に *Endomicrobium* 属細胞内共生細菌の生理・生態・進化の解明に大きく貢献するものである。