

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	細胞内共生Clostridia綱細菌の生態と進化過程の解明
Title(English)	
著者(和文)	高橋一樹
Author(English)	Kazuki Takahashi
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12839号, 授与年月日:2024年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:本郷 裕一,伊藤 武彦,増田 真二,二階堂 雅人,山田 拓司
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12839号, Conferred date:2024/9/20, 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

## 論文要約

Clostridia 綱は Bacillota 門に属する、土壌や水圏、汚泥、動物消化管等様々な環境から検出される細菌分類群の一つである。特にウシやヒト、シロアリ等多くの動物種の消化管における優占系統群の一つで、食物の分解により宿主へ栄養を供給し、また、さまざまな化合物を合成することで腸内環境の恒常性の維持に貢献していると考えられている。しかし、動物消化管内で優占する Clostridia 綱細菌系統群は多くの未培養種を含んでおり、その多様性や機能については未解明な点が多い。

これまで多くの Clostridia 綱細菌が発見され記載されてきたが、そのほとんどが自由生活型であった。しかしシロアリ腸内原生生物の共生細菌叢の解明を目指した先行研究では、いくつかの Clostridia 綱細菌系統が検出されてきていた。そこで本研究では、シロアリ腸内原生生物から検出された Clostridia 綱細菌複数系統を対象にその局在解析とゲノム解析を行うことで、細胞共生 Clostridia 綱細菌と宿主原生生物の関係を明らかにし Clostridia 綱の多様性に関する知見を拡充するとともに、自由生活型から細胞共生体へ至るまでの進化過程の解明を目指した。

まずシロアリ腸内原生生物に共生する Clostridia 綱細菌の系統的多様性と宿主原生生物細胞での局在を明らかにした。原生生物 1 細胞をマイクロマニピュレーションにより単離し、細胞を溶解後、原核生物の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR を行うことで、3 系統の Clostridia 綱細菌を検出した。得られた配列は Eubacteriales 目 Oscillospiraceae 科内の環境由来細菌系統群に属し、単系統群を形成した。これら 3 系統を対象とした FISH (fluorescence in situ hybridization) 解析を行ったところ、これらは原生生物の細胞内に共生していることが明らかとなった (図 1)。その局在は細菌系統によってさまざまに凝集体をつくるものや、細胞質全体に分散して共生するものを発見した。細胞形態も系統ごとに異なり、細胞サイズは小さいものは 0.5-1  $\mu\text{m}$ 、大きいものは 1-2  $\mu\text{m}$  ほどであり、3 系統のうち 2 系統は芽胞を生成していた。同細菌群は共通して日和見共生体であり、シロアリコロニーごとに宿主原生生物種への共生頻度が異なっていた。

次にこれら細胞内共生 Clostridia 綱細菌のゲノム解析を行い、その生理生態を推測した。原生生物 1 細胞内に共生する Clostridia 綱細菌細胞をマイクロマニピュレーションにより回収し、等温全ゲノム増幅により DNA を調製後、次世代・第三世代シーケンサーを用いて配列を取得することで、2 系統の完全長ゲノム配列と 1 系統のドラフトゲノム配列の構築に成功した。ゲノム解析の結果、同細菌は共通してゲノムサイズが約 1.0-1.3 Mbp にまで縮小し、自身では核酸もアミノ酸も合成不能な上に ATP 生産もできないことが明らかとなった (図 2)。またシロアリ腸内原生生物の相利共生細菌がよく持つ、窒素固定関連遺伝子や還元的酢酸生成遺伝子、木質分解関連遺伝子は検出されなかった一方で、補酵素やアミノ酸のトランスポーター、ATP と ADP の交換輸送体である ATP/ADP translocase を保有していた。さらに、そのゲノム配列からは一般に真核生物に特有な遺伝子が複数見つかった。

*Legionella* 属細菌などの寄生性細菌では、このような真核生物様遺伝子を用いて宿主の細胞プロセスに干渉することで、宿主の食作用から逃れ宿主細胞内で増殖することが知られており、細胞内共生 Clostridia 綱細菌においても宿主細胞内環境への適応に関して同様の戦略がとられていることが示唆された。よって Oscillospiraceae 科では、ATP を含む、自身で合成できない生体分子を宿主に頼り生活する偏性細胞内寄生/片利共生体が出現していることが明らかとなった。

公開データベース上のゲノム配列を用いて大規模な系統解析を行ったところ、シロアリ腸内原生生物の細胞内共生 Clostridia 綱細菌は、同様にゲノムサイズが小さい MAG (metagenome-assembled genome : メタゲノム由来再構成ゲノム配列) と単系統群をつくった (図3)。その小さなゲノムサイズから、本研究ではこの系統群を small genome clade (SGC) と命名した。SGC に属する MAG はヒト、マウス、反芻動物、鳥類、昆虫など多様な動物種の消化管に由来し、シロアリ腸内原生生物の細胞内共生体と同様に、アミノ酸や補酵素、核酸合成系のほとんどを欠損していた。また SGC に属する反芻動物由来系統群を対象とした FISH 解析の結果、これらはルーメン繊毛虫の細胞内共生体であることが明らかとなった。これらの結果から、偏性細胞内寄生/片利共生 Clostridia 綱細菌はシロアリ腸内以外の多様な動物種の消化管に分布し、特に反芻動物においては繊毛虫の細胞内共生体であることが明らかとなった。比較ゲノム解析と gene flux analysis の結果からは、SGC ではその共通祖先の段階で、ATP/ADP translocase の獲得、数種のアミノ酸合成能や CRISPR/Cas システムの喪失、トランスポーターの基質特異性の低下が起こったと推測された。また SGC に属する系統はそれぞれ多様な真核生物様遺伝子を有しており、分子擬態による宿主細胞内環境への適応は、SGC 細菌において一般的であることが示唆された。

SGC 細菌は、シロアリ腸内のみならず、反芻動物やヒトの消化管、水環境に生息するアメーバから検出されたことから、様々な嫌気環境に広汎に生息すると考えられる。特に動物腸内からの検出数が多く、真核生物-細菌間の寄生関係は、動物消化管生態系を形作る要素の一つであることが示された。

これらの成果は Clostridia 綱の知見を大幅に拡充するものであり、また、宿主依存的な生態への移行過程の理解にも貢献するものである。

図表

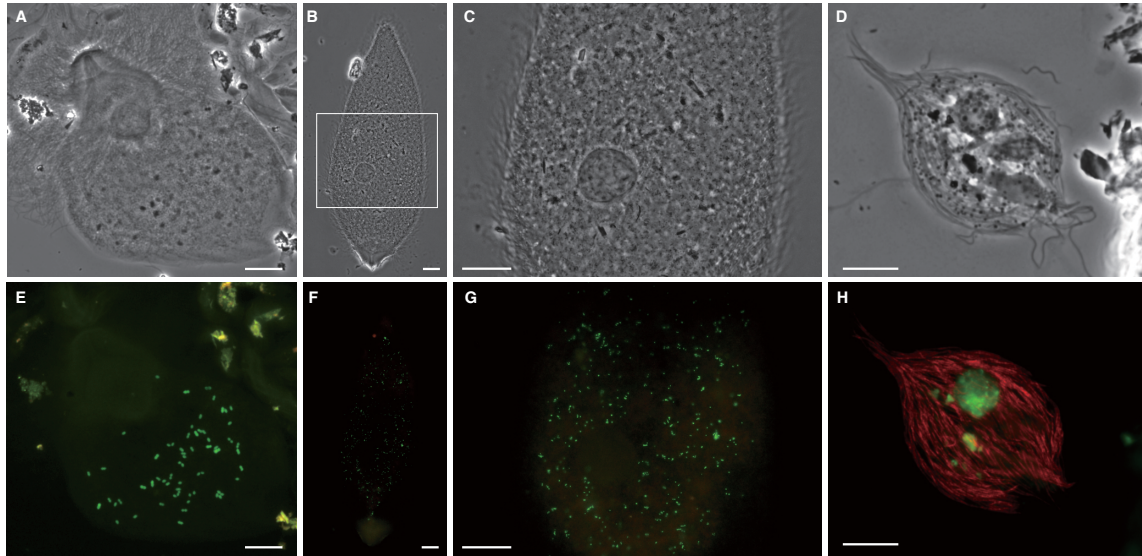


図 1 細胞内共生 Clostridia 綱細菌の FISH による検出。

RsTa-C01 系統、CfP3-15 系統、NkDv07 系統の FISH 像 (A-H)。

(A, E) ヤマトシロアリ腸内 *T. agilis* の位相差顕微鏡像と特異的プローブによる RsTa-C01 系統 (6-FAM、緑) の染色。

(B, C, F, G) イエシロアリ腸内 *Pseudotrichonympha grassii* の位相差顕微鏡像と特異的プローブによる CfP3-15 系統 (6-FAM、緑) の染色。F と G は B と C で囲まれた範囲の拡大図。

(D, H) スギオシロアリ腸内 *Devescovina* sp. の位相差顕微鏡像と、細胞表面に共生する Bacteroidales 目細菌 (Texas-Red、赤) と NkDv07 系統 (6-FAM、緑) の対比染色。

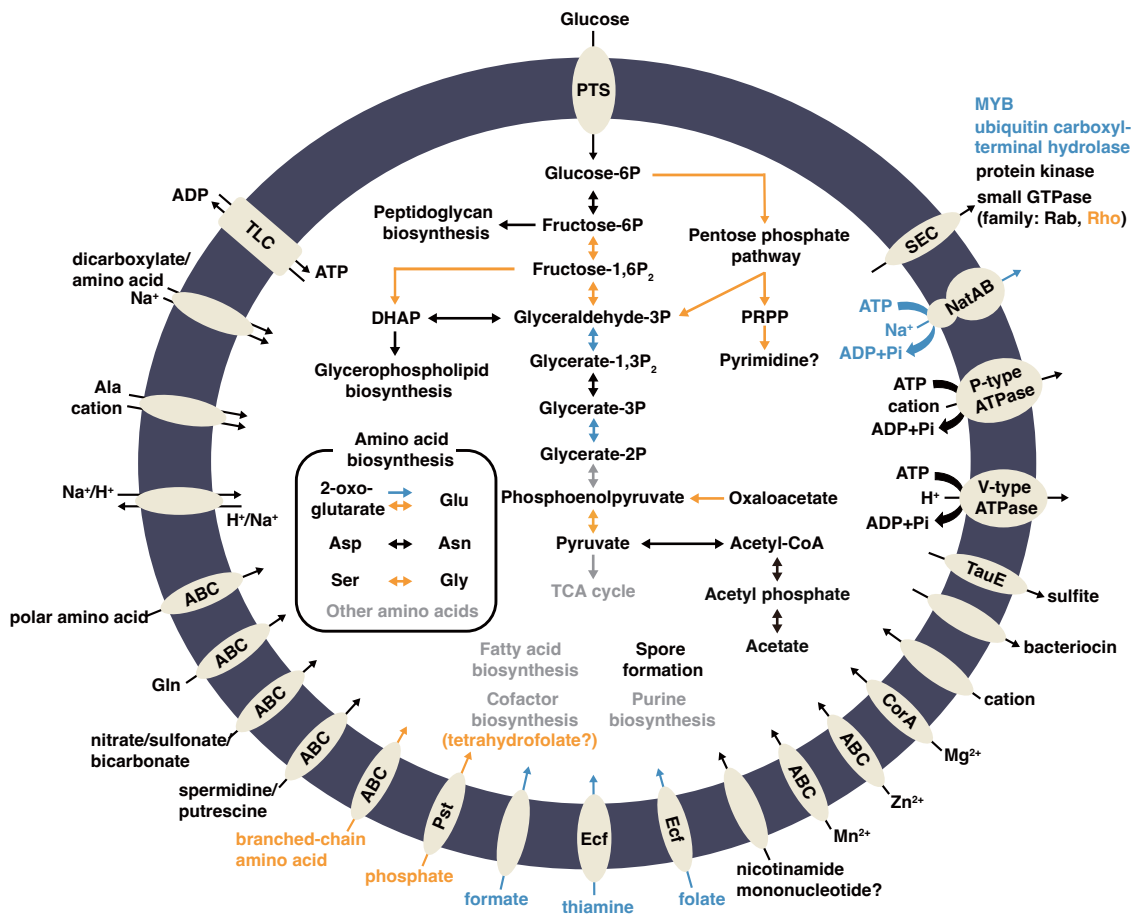


図2 保有遺伝子から予測された CfP3-15 系統と RsTa-C01 系統の代謝系。

DHAP はジヒドロキシアセトンリン酸を表す。CfP3-15 系統のみ保持していた経路は黄色で、RsTa-C01 系統のみ保持していた経路は水色で、両者のゲノム配列上に存在しなかった経路は灰色で示した。

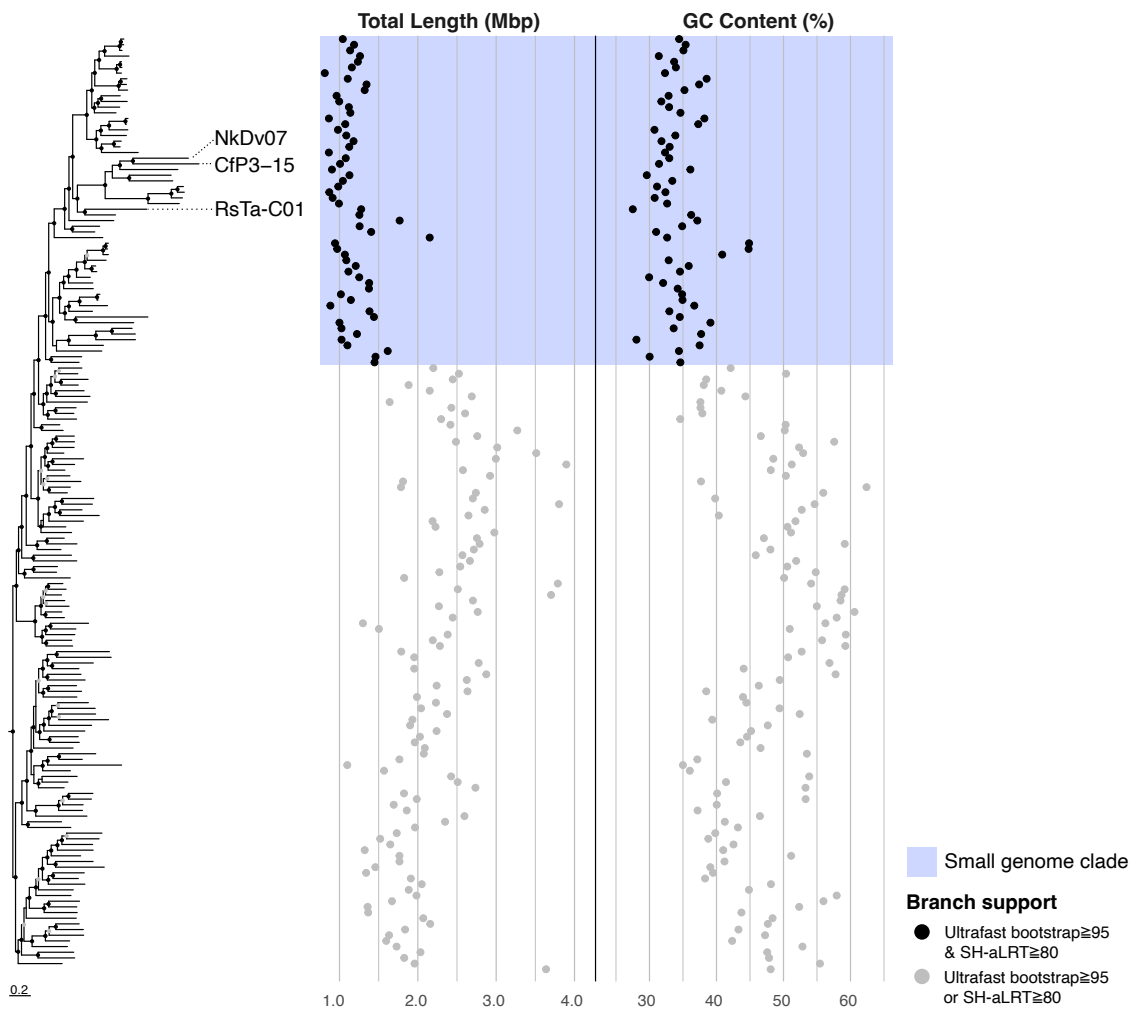


図3 Acutalibacteraceae 科とに属する細菌のシングルコピー遺伝子に基づく分子系統樹。IQ-TREE を用いて最尤法 (LG+F+I+R10 モデル) により作成した。左から系統樹、配列長、GC 含量を示した。