

2008年11月14日  
独立行政法人 理化学研究所

## シロアリの強力な木質分解能を支える驚異の腸内共生機構を解明

- イエシロアリの原生生物と細菌による多重共生メカニズムが明らかに -

木材の世界的な大害虫として知られるイエシロアリは、日本、中国、米国など世界各国の木造建築物に打撃を与え続けています。その被害額は、日本では年間数100億円、米国では1,000億円以上とされています。その破壊的な木質分解能力は、腸内に共生する微生物群の力によるものです。しかし、それらの微生物群は大部分が培養することができず、詳細な共生メカニズムは謎のままでした。

基幹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は、これらのシロアリの驚異の多重共生メカニズムの解明に挑戦しています。研究チームは、横浜研究所生命情報基盤部門らとともに、イエシロアリの木材消化の最も重要な役割を果たしている原生生物の細胞内だけに生育している細菌「CfPt1-2」のゲノムの完全解読に成功しました。

その結果、この細菌が、原生生物の木質分解の産物をエネルギー源として空気中の窒素を吸収し、さらに原生生物の窒素老廃物をリサイクルして、さまざまなアミノ酸やビタミンを合成していることがわかりました。これによって、強固で栄養分の偏った木材のみを餌としながらも、窒素分の欠乏に陥ることなく、イエシロアリは驚異的な増殖力を発揮できるというわけです。イエシロアリ・原生生物・細菌の多重共生機構の解明によって、木質からのバイオ燃料の開発や新しい害虫駆除法の開発に貢献すると期待されます。



図 イエシロアリ(左)と腸内原生生物 *P. grassii*(右上)、細胞内共生細菌 CfPt1-2(右下)

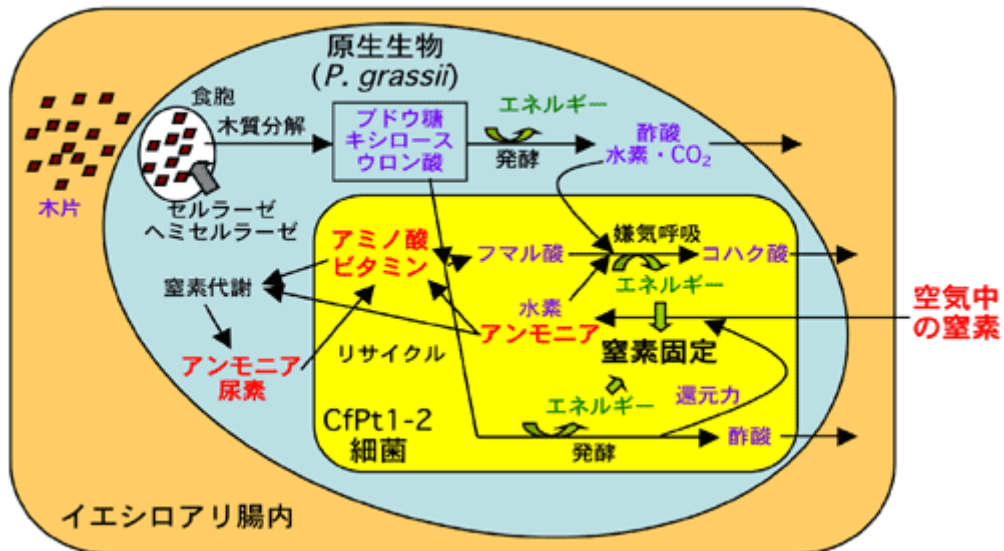


図 研究グループが明らかにした CfPt1-2 細菌の役割

2008年11月14日  
独立行政法人 理化学研究所

## シロアリの強力な木質分解能を支える驚異の腸内共生機構を解明

- エシロアリの原生生物と細菌による多重共生メカニズムが明らかに -

### ◇ポイント◇

- ・ イエシロアリ腸内共生原生生物の細胞内共生細菌のゲノムを完全解読
- ・ 腸内細菌群集の7割を占める共生細菌が、空気中の窒素を吸収して栄養分を供給
- ・ 木質バイオマス資源利用・害虫防除など応用研究への基盤構築に貢献

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、木材の世界的大害虫であるイエシロアリの腸内共生原生生物の細胞内に共生する細菌のゲノムの完全解読に、世界で初めて成功しました。理研基幹研究所（玉尾皓平所長）環境分子分解科学研究チーム／前田バイオ工学研究室の本郷裕一協力研究員、大熊盛也副主任研究員と、理研ゲノム科学総合研究センター（現・生命情報基盤研究部門）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）、服部正平客員主管研究員（東京大学教授）、システム基本情報解析研究チーム（現・基幹研究所メタシステム研究チーム）の Vineet K. Sharma（ヴィニート・シャルマ）リサーチアソシエイトらの研究グループによる成果です。

イエシロアリは、日本・中国・米国など世界各地における木造建築物の大害虫であり、深刻な経済被害をもたらしています。一方、シロアリの強力な木質分解能力は、人の食料と競合しないセルロースなどの原料からの次世代バイオ燃料開発への応用という観点から、現在世界中の注目を集めています。ところが、その能力をもたらしている腸内共生微生物の大部分が培養に成功していないため、共生メカニズムの詳細は不明でした。

研究では、チームが以前に確立した、培養不能細菌種からのゲノム完全長取得法を用いて、イエシロアリの腸内でセルロース分解を担う原生生物の、その細胞の中だけに生息する細菌のゲノム配列の完全解読を行いました。その結果、この細菌は、原生生物が木質分解した産物の一部をエネルギー源にして空気中の窒素を吸収し、さらに、原生生物の窒素老廃物を分解して、窒素供給源としてリサイクルしていることがわかりました。シロアリの餌である木材には窒素分がほとんど含まれていません。それを、腸内細菌群集の7割を占めるこの共生細菌が、空気中から窒素を吸収して必須アミノ酸やビタミンを合成し、さらに窒素老廃物をリサイクルすることにより、イエシロアリと原生生物は窒素欠乏に陥ることなく、驚異的な木材分解力と増殖力を発揮していると考えられます。

今回、イエシロアリの増殖に必須と考えられる共生細菌のゲノム配列を完全解読したことにより、新たな木質バイオマス利用法や害虫防除法の開発につながることを期待されます。

本研究成果は、米科学雑誌『*Science*』（11月14日号）に掲載されます。

## 1. 背景

イエシロアリは、日本・中国・米国をはじめ世界各地で木材の大害虫として知られ、日本で年間数 100 億円、米国でも年間約 1,000 億円の損害を与えています。その破壊的な木質分解能力は、腸内に共生する微生物群 (図 1) の力によるものです。しかし、それら微生物の大部分は、いまだに培養することができないため、強固で栄養源が偏った木質だけを餌とすることを可能にした、シロアリと微生物群、微生物種 (原生生物や細菌) 間の詳細な共生メカニズムというのは、ほとんどわかっていませんでした。

研究チームは、イエシロアリ腸内で木材消化に最も重要な役割を果たすと考えられている原生生物種の、その細胞の中だけに生息する細菌のゲノム配列完全解読を行いました。この細菌種は、イエシロアリ腸内の総細菌数の約 7 割をも占めており、宿主のシロアリ、原生生物と共に進化してきたことがわかっています。したがって、シロアリと原生生物にとって極めて重要な役割を果たしていると予想されますが、その機能はほとんど未知でした。この細菌のゲノム解析を通じて、イエシロアリにおける、シロアリ・原生生物・細菌の多重共生メカニズムを解明することを目指しました。

## 2. 研究手法

解析対象の細菌は、バクテロイデス門バクテロイデス目<sup>\*1</sup>に属する培養不能種 CfPt1-2 で、シロアリ腸内に共生している培養できない原生生物 *Pseudotriconympha grassii* (シュードトリコニンファ・グラッシイ) の細胞内のみ生息しています (図 2)。この細菌や原生生物が培養できない以上、解析にはできるだけ多くの宿主原生生物を集めて共生細菌を回収したいところですが、そうすると同じ CfPt1-2 種でも複数の系統が混在してしまい、ゲノム配列を結合することができません。そこで、腸内微生物群集から原生生物を 1 細胞だけ分離し、その細胞膜を界面活性剤で壊して、中に含まれる同一系統と予想される共生細菌だけを数千個回収しました。

回収した細菌は、計算上では合計約 10 pg (ピコグラム : 10 のマイナス 12 乗グラム) のゲノム DNA を含むこととなりますが、ゲノム解析にはその 10 万倍の 1 μg (マイクログラム : 10 のマイナス 6 乗グラム) 以上の量が必要です。そこで、ファージ (細菌寄生性ウイルス) 由来の Phi29 DNA 合成酵素を用いて、等温全ゲノム増幅<sup>\*2</sup>を行い、100 万倍の量 (10 μg 以上) の DNA を調製して、塩基配列を解析しました。これは、研究チームが確立し、以前、ヤマトシロアリ腸内の原生生物 *Triconympha agilis* (トリコニンファ・アギリス) の細胞内共生細菌 Rs-D17<sup>\*3</sup> のゲノム解析に用いた手法です (4 月 1 日理研プレス発表 : シロアリ腸内共生微生物のゲノム解読に世界で初めて成功)。

また、配列上の遺伝子とその機能の予測には、iMetaSys<sup>\*4</sup> という、理研が開発したプログラムを用いました。

## 3. 研究成果

塩基配列解析の結果、CfPt1-2 細菌の、ほとんど変異を含まない単一の環状染色体配列 (1.1 メガ塩基 : 10 の 6 乗塩基、758 個のタンパク質遺伝子をコード) を再

構築することに成功しました。そのゲノムサイズは、ほかのバクテロイデス目細菌のゲノムサイズ 2.3~6.3 メガ塩基と比較するとかなり小さく、原生生物細胞内環境に適応するために不要あるいは有害な機能遺伝子を消失させ、ゲノムを縮小させる進化の過程にあることが推測できます。Rs-D17 細菌も、ゲノムサイズが 1.1 メガ塩基（761 個のタンパク質遺伝子をコード）と小さく、同様の進化過程をたどっていると考えられます。

実際、CfPt1-2 細菌と Rs-D17 細菌のゲノム配列から推測された機能には、それらがまったく異なる細菌系統であるにもかかわらず、多くの共通点がありました。いずれの細菌も細胞壁、防御系、膜間輸送系が退化している一方で、アミノ酸合成系とビタミン合成系は豊富に存在していました。シロアリは窒素分が非常に乏しい枯死材のみを餌としているため、シロアリも原生生物も、自身で合成できない窒素化合物を餌から摂取することができません。それを Rs-D17 細菌の場合、原生生物自身が合成すると考えられるグルタミンを変換して、15 種類のアミノ酸とさまざまなビタミン類を合成し、シロアリや原生生物に供給していると考えられています。今回のゲノム解析で、CfPt1-2 細菌は 19 種類ものアミノ酸といくつかのビタミン類を合成できることが明らかとなり、Rs-D17 細菌と同様の役割を果たしていることが示唆されました。

さらに、CfPt1-2 細菌のゲノムから、Rs-D17 細菌にはない、極めて重要な機能を発見しました。CfPt1-2 細菌は、空気中の窒素を吸収して、アミノ酸やビタミンの原材料となるアンモニアを合成する能力を持つことがわかったのです。また、原生生物の最終窒素老廃物と考えられている尿素とアンモニアを取り込み、尿素もアンモニアに分解して、窒素栄養源としてリサイクルしていることも明らかにしました。CfPt1-2 細菌は、このようにして得たアンモニアからグルタミンを合成し、さまざまなアミノ酸やビタミンに変換していることがわかりました。

こうした窒素固定・リサイクル・化合物合成に必要なエネルギー源は、原生生物が細胞内に取り込んだ木片（セルロースとヘミセルロース）を分解した産物であるブドウ糖、キシロース、ウロン酸と、最終代謝産物である水素の一部です。つまり、シロアリは木を食べるだけで、これらの微生物共同体の働きにより、木質の分解による炭素源・エネルギー源の獲得と、空気中からの必要な窒素分の獲得を同時に行なっていることとなります（図 3）。CfPt1-2 細菌は、1 つの原生生物細胞内に 10 万個、イエシロアリの腸内細菌総数の 7 割をも占めるほど大量に存在しているため、その窒素供給源としての威力の大きさは明白です。

イエシロアリは、時に 100 万以上の個体からなる巨大なコロニーを形成し、周囲の木材を食べ尽くしてしまいます。通常ですと、乏しい窒素源がその増殖力を抑えるわけですが、この原生生物と CfPt1-2 細菌からなる大量の「スーパー共生体」が、木質分解で得られるエネルギーの一部で空気中の窒素を吸収・同化して、止まることのない、強力な繁殖力をイエシロアリにもたらしていることがわかりました。

#### 4. 今後の期待

研究チームが確立した培養不能微生物のゲノム解析手法により、Rs-D17 細菌に続いて CfPt1-2 細菌のように、シロアリ腸内共生系で重要な鍵となる働きをしながら、培養できないために、これまでまったく機能が未知であった微生物の役割

を解明することができました。今後も、この画期的な手法によって、さらに多様なシロアリ腸内共生微生物のゲノムを解読することが可能であり、今後さらに詳細なシロアリ腸内共生メカニズムの解明が進むはずで。それによって、いかに複雑で巧妙な共生関係が生物の営みを支えているかを、私たちは詳細に知ることができるでしょう。また、得られる情報によって、人の食料と競合しない木質からのバイオ燃料開発や、新しい害虫駆除法の開発などにつながることを期待できます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 基幹研究所

前田バイオ工学研究室 環境分子分解科学研究チーム

チームヘッド 大熊 盛也 (おおくま もりや)

協力研究員 本郷 裕一 (ほんごう ゆういち)

Tel : 048-467-9648 / Fax : 048-462-4672

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

## <補足説明>

### ※1 バクテロイデス門バクテロイデス目

真正細菌の分類体系は高次のものから、門、綱、目、科、属、種となっている。バクテロイデス目には、ヒトなど動物の消化管に共生・寄生する細菌種が多い。CfPt1-2 細菌は、本研究で”*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae*”と命名した。「シュードトリコニンファに共生する窒素固定能を持つバクテロイデス」という意味である。”*Candidatus*”は、培養株が存在しない細菌に仮の学名を与える場合につける。

### ※2 等温全ゲノム増幅

ファージ(細菌寄生性ウイルス)由来の Phi29 DNA 合成酵素(商品名 GenomiPhi HY、GE ヘルスケア社)は、DNA の 2 重鎖をほどこしながら数十キロ塩基にわたって DNA を複製することができる。Polymerase chain reaction (PCR) 法を応用した全ゲノム増幅法よりも、ゲノム部位間での増幅の偏りや複製エラーが少ない。

### ※3 Rs-D17 細菌

培養不能細菌の 1 種で、未培養新門 Termite Group 1 に属する。研究チームが、シロアリ腸内微生物で初めてゲノム完全長配列の取得に成功した細菌。解析結果は(2008年4月1日プレス発表 : シロアリ腸内共生微生物のゲノム解読に世界で初めて成功)を参照。

#### ※4 iMetaSys

理研ゲノム科学総合研究センターシステム基本情報解析研究チーム（現、理研基幹研究所メタシステム研究チーム）が開発した、塩基配列から遺伝子とその機能を予測するプログラム。既存の Glimmer と GeneMarkS というソフトウェアを用いて、ゲノムあるいはゲノム断片上の遺伝子存在位置を予測し、さらに、遺伝子配列終止点の位置から、遺伝子の完全性を確認する。予測した遺伝子は、BLASTP という配列相同性検索ソフトによってデータベースと照合し、機能を推定する。実際には、この後さらにマニュアルで1つ1つの遺伝子の完全性と機能予測を再チェックし、解析精度を高めている。

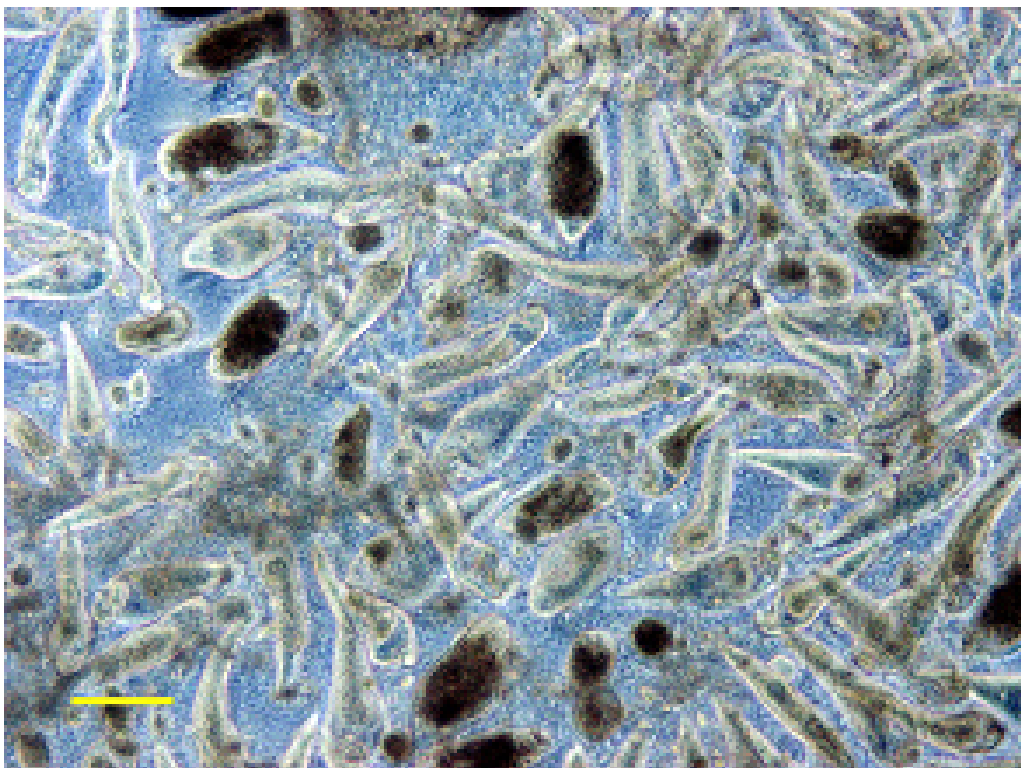


図1 イエシロアリ腸内に共生する微生物群

イエシロアリの腸内に共生する微生物群集。1匹の腸に数千匹の原生生物と約1億個の細菌が共生する。茶～黒色の木片が原生生物の細胞内に観察できる。左下の黄色線は0.1 mm。





図2 イエシロアリ(左)と腸内原生生物 *P. grassii*(右上)、  
細胞内共生細菌 CfPt1-2(右下)

イエシロアリ (左) は体長約 6 mm。腸内原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* (右上) は体長 200~300  $\mu\text{m}$  で、イエシロアリ一匹の腸内に約 1,000 個共生する。細胞内に見える薄茶色の物質は、細胞内に取り込んだ木片。その細胞内には約 10 万個もの CfPt1-2 細菌が共生する (右下)。緑色の小さな粒子が特異的に検出された CfPt1-2 細菌。大きさは 0.7  $\mu\text{m}$ 。黄色く見えるのは、原生生物が取り込んだ木片の自家蛍光。



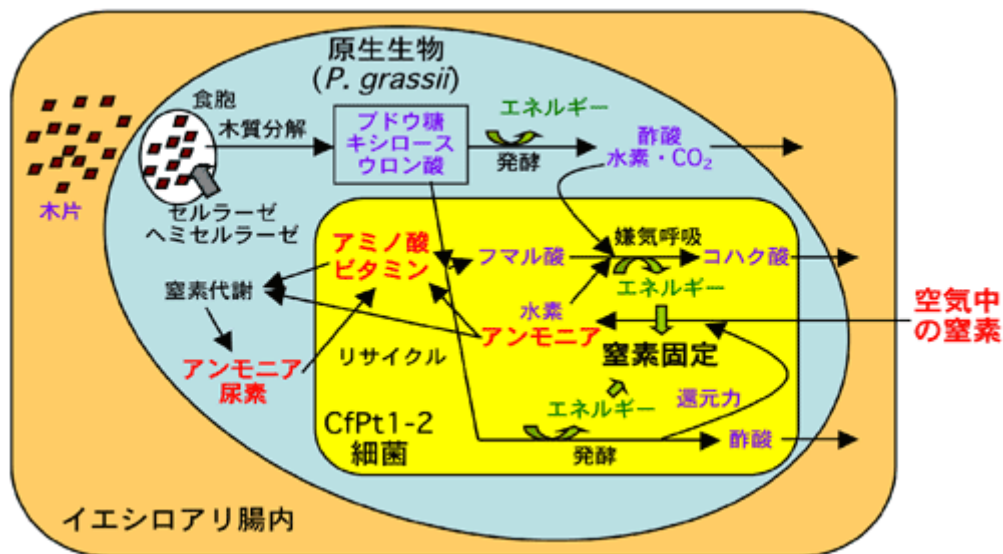


図3 研究グループが明らかにした CfPt1-2 細菌の役割

イエシロアリが食べた木片は原生生物 *P. grassii* に取り込まれ、木片中のセルロースとヘミセルロースは、原生生物の酵素によってブドウ糖、キシロース、ウロン酸などに分解される。これは原生生物によって発酵し、酢酸、水素、二酸化炭素になる。酢酸はシロアリに吸収され、シロアリの主要な炭素・エネルギー源となる。ブドウ糖や水素の一部は細胞内に共生する CfPt1-2 細菌に取り込まれ、発酵あるいは嫌気呼吸によってエネルギーを産生し、それを使って空気中の窒素をアンモニアに変換する。CfPt1-2 細菌はこのアンモニアを使って、さまざまなアミノ酸やビタミンを合成する。原生生物の最終窒素老廃物と考えられるアンモニアと尿素も、CfPt1-2 は取り込んでリサイクルする。