

研究課題別評価

1 研究課題名: 高効率バイオリサイクル共生システムの解明

2 研究者氏名: 大熊盛也

研究員: 野田 悟子 (研究期間 平成 15 年 4 月～平成 17 年 11 月)

研究員: 井上 徹志 (研究期間 平成 16 年 4 月～平成 17 年 8 月)

研究員: 城島 透 (研究期間 平成 16 年 4 月～平成 17 年 8 月)

技術員: 斎田 佳菜子 (研究期間 平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月)

3 研究のねらい:

自然界で効率よく資源を利用するシステムを細胞・分子レベルで理解し、資源の有効利用・バイオリサイクルについて学ぶ。このために、セルロースの高い分解能を有し、得られるエネルギーのほとんどを酢酸に変換して有効利用しているシロアリの腸内共生微生物群を題材に、共生による高効率性の要因を探る。

しかしながら、シロアリ腸内の共生微生物は、大半が培養が困難な微生物であり、どのような微生物がどのような機能を果たしているかはほとんど解明されていない。そこで、これまでに培養を介さない分子生物学的な方法を適用して共生微生物の研究を行ってきた結果、腸内には多くの新規・未知の微生物が共生していることを明かにし、原生生物の細胞内や細胞表層に様々な細菌が共生していることも見出した。

本研究では、資源利用の効率性をもたらす特徴的な機能について、特に種々の原生生物と細菌の細胞レベルでの共生に注目し、共生の進化過程をもみすえて、どのような細菌種が特定機能を発現するのかを明らかにする。培養を介さない方法で腸内での局在・存在状態と機能をリンクさせて統合的にこの共生システムを理解する。

4 研究成果:

(1) 原生生物に細胞共生する多様な細菌

様々な原生生物種について、細胞レベルで共生する細菌を解析した。マイクロマニピュレータ装置を用いて原生生物種を物理的に単離し、共生細菌の rRNA 遺伝子等を PCR 増幅してクローンを解析し、分子系統学的に同定した。さらに、同定した遺伝子配列に特異的なプローブを作製し、細胞形態を維持したままの蛍光 in situ hybridization (FISH) 法により、原生生物細胞への局在、分布を調べた。桿菌様のスピロヘータ細菌が大型原生生物に高密度に細胞内共生するものを見出した。細胞表層のスピロヘータのうちのある種のものが、恐らく細胞内へ入って生じたと分子系統学的に推定された。

この他に多くの原生生物種の細胞表層に Bacteroidales 目の細菌が付着共生している例を多く見出した。いずれも良く似た細胞壁構造にもかかわらず、少なくとも3つ以上の異なる系統群に別れ、宿主原生生物の分類群と細胞形態に与える影響は複雑であった。ある種の原生生物の細胞内にも Bacteroidales の共生細菌を見出した。さらに、3種の異なる細菌と細胞共生する原生生物も見出した。原生生物と細胞共生するものの他、腸壁に付着するものなど、シロアリ腸内の微生物群集構造を解明し、それぞれの微生物種がそれぞれ特定の場所に局在していることを明らかにした。特に大型の原生生物の細胞内共生細菌は腸内細菌群の大半を占めていた。

(2) 原生生物と細胞共生細菌の機能的相互作用

原生生物と細胞共生する細菌が、還元的酢酸生成能を有するか、嫌気性条件下で微小分画した細胞を用いた生理・生化学的解析と機能関連遺伝子の分子生物学的な研究を通して検討した。ある種の大型原生生物の細胞内共生細菌が、水素依存性の二酸化炭素からの還元的酢酸生成能を有していることを明らかにした。セルロースは原生生物の細胞内で分解され、酢酸、水素、二酸化炭素に変換される。酢酸はシロアリのエネルギー源として吸収される。分

解の副産物の水素と二酸化炭素を効率良く除いて分解そのものを促進し、さらにセルロース資源をほとんど酢酸としてシロアリに供給するので、シロアリ、原生生物、細胞内共生細菌の3者にとっての相利共生であると同時に資源を実に効率良く利用する理想的なシステムを解明した。

(3) 共生原生生物の機能へのアプローチ

腸内の原生生物混合相から培養を介さず直接遺伝情報を解析する手法を適用した。原生生物混合細胞から発現 cDNA ライブラリーを構築し、大腸菌においてセルロース分解活性を検出して、セルラーゼ遺伝子を取得することができた。大腸菌で発現した組み換え酵素は典型的なエンドグルカナーゼであった。また、cDNA ライブラリーから 2000 クローン程度を無作為抽出して部分塩基配列を決定し、相同性検索を行なって、原生生物が発現する遺伝子を網羅的に解析した。セルロース分解に関与する糖質分解酵素群のホモログは全クローンのうち3%含まれており、分解関連遺伝子が高発現していることが、高い分解能の要因の一つと考えられた。また、嫌氣的エネルギー産生器官で水素生成の場であるヒドロゲノソームの代謝に関わると予測される遺伝子は、全クローンの約1%であり、水素生成酵素遺伝子も複数得ることができた。これらの発現遺伝子がどの原生生物種由来であるかは、物理的に単離した細胞を用いて同定する方法を確立した。

5 自己評価:

共生微生物群の注目した機能(還元的酢酸生成)が発現する微小の場とそこに局在する微生物についてリンクさせることにより、原生生物と細胞内共生細菌の関係を解明することができ、この細胞共生関係を通して、効率的な資源利用機構を理解することができた。一方で、原生生物と細胞共生する細菌は多様であることを見出し、解明した共生関係がすべてではないことも明らかとなったが、これらのひとつひとつを解明することにより、細胞レベルでの普遍的な共生機構、進化機構の理解といった今後の展開に大変期待される研究成果と位置づけられる。

資源利用の効率性をもたらす特徴的な機能については、予定していたものほぼすべてで機能に関連した遺伝子群を培養を介することなく網羅的に明らかにすることができた。これらの有用性などの検討はセルラーゼなど限られたもののみしかできなかったが、応用利用に期待される多くの遺伝子群を取得したことは十分な成果と考える。近年環境中の微生物のゲノムに直接アクセスするメタゲノム研究が盛んとなりつつあるが、機能に直結する発現遺伝子にアプローチする手法は特色があり、シロアリ共生原生生物という特異な系ではあるが、難培養性微生物から有用(と期待される)遺伝子群を取得し解析する上で大変意義深い成果である。

本研究は、ポスドク研究員、技術員がまさに原動力であり、心より感謝したい。それぞれが秀でた分野を持つことで互いに刺激しあい、研究の発展と私自身の研鑽に大変有用であった。短い期間での雇用であることが大変残念である。

6 研究総括の見解:

自然界での物質循環の重要な部分である炭素-セルロース-シロアリ系について新しい解析法を用いて解明した。シロアリ腸内の共生微生物群がこのプロセスに主要な役割を果たしていることは周知であるが、その実際のメカニズムは、ほとんど未解明であり、原因が共生微生物の難培養性にあった。この難点を機能発現遺伝子にアプローチする方法で克服し、さらに蛍光可視化法(FISH 法)を発展させて細胞内での発現遺伝子の分布を解明することに成功している。結果として、シロアリ腸内の原生生物およびそれへの共生細菌などの分布、共生状況を明らかにすることに成功し複雑な微生物群集構造を解明できている。この手法は従来困難であった微生物群集システムの構造を明らかにするのに非常に有効である。本方法を用いて数多くの対象のなかから主としてセルラーゼを検討したところ、シロアリの腸内における共生系が、非常に効率的な組合せとなっておりセルロース資源を現実的に利用するシステムとなっていることをあきらかにしている。同時にセルラーゼにかぎらず有用と思われる数多くの遺伝子群を確保しており、今後の発展が大いに期待できる。自然界では難培養性の微生物群は非常に多いので、

意義ある成果である。

7 主な論文等:

原著論文(国際 19 件)

1. M. Ohkuma, T. Iida, O. Kuniyo, H. Yuzawa, S. Noda, E. Viscogliosi, T. Kudo. Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Hypermastigae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 35, 646–655 (2005).
2. T. Inoue, S. Moriya, M. Ohkuma, T. Kudo. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. *Gene*, 349, 67–75 (2005).
3. H. Nakajima, Y. Hongoh, R. Usami, T. Kudo, M. Ohkuma. Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and bacterial community colonizing on the gut epithelium. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54, 247–255 (2005).
4. S. Noda, T. Iida, O. Kitade, H. Nakajima, T. Kudo, M. Ohkuma. Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8811–8817 (2005).
5. S. Noda, T. Inoue, Y. Hongoh, M. Kawai, C. C. Nalepa, C. Vongkaluang, T. Kudo, M. Ohkuma. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in *Bacteroidales* attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environ. Microbiol.*, 8, 11–20 (2006).

著書・総説(国際 2 件、国内 7 件)

1. 大熊盛也、シロアリ腸内の微生物共生システム、日本農芸化学会誌、77, 134–136, (2003).
2. 大熊盛也、シロアリ微生物共生系の分子生態学的研究、日本農芸化学会誌、77, 846–851, (2003).
3. 大熊盛也、工藤俊章、シロアリ共生微生物への培養を介さないアプローチ、日本農芸化学会誌、77, 1237–1239, (2003).
4. 工藤俊章、大熊盛也(監修)、バイオテクノロジーシリーズ 難培養微生物研究の最新技術—未利用微生物資源へのアプローチ—、シーエムシー出版(2004).
5. M. Ohkuma, Y. Hongoh, T. Kudo. Chapter 12. Diversity and molecular analyses of yet-uncultivated microorganisms. In H. König, A. Avarma (eds.), Soil Biology Volume 6, Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 303–317 (2005).

学会発表(招待講演)(国際 1 件、国内 4 件)

1. 大熊盛也、工藤俊章、シロアリ腸内の共生微生物の機能とマイクロエコロジー、日本農芸化学会大会(シンポジウム「難培養微生物資源へのアプローチ」)、2003 年 3 月
2. 大熊盛也、シロアリ微生物共生系の分子生態学的研究(平成 15 年農芸化学奨励賞受賞記念講演)、日本農芸化学会関東支部第 1 回例会、2003 年 6 月
3. 大熊盛也、シロアリと微生物共生系の分子生態学的研究、筑波大学生命環境科学研究科 21 世紀 COE プログラム第 1 回若手シンポジウム「環境応答の分子機構とバイオ機能の高度利用」、2004 年 3 月
4. M. Ohkuma. Cellular symbioses within the symbiotic microbial community in the gut of termites. Okazaki Biology Conference (OBC) on “Terra Microbiology”, Sep. (2004).
5. 大熊盛也、難培養性微生物研究の手法とその応用—シロアリ共生微生物をモデルとして—、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所平成 17 年度問題別研究会「ポストゲノムにむけた畜産研究の新潮流—II」、2005 年 11 月

学会発表

国際 13 件

国内 38 件

受賞

1. 2003 年 3 月、日本農芸化学会農芸化学奨励賞：大熊盛也、「シロアリ-微生物共生系の分子生態学的研究」
2. 2004 年 7 月、Journal of Eukaryotic Microbiology, Co-Winner of The William Trager Award for Outstanding Paper of the Year : S. Moriya, J. B. Dacks, A. Takagi, S. Noda, M. Ohkuma, W. F. Doolittle, T. Kudo. Molecular evolution of three oxymonad genera: *Pyrsonympha*, *Dinenympha* and *Oxymonas*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 190-197, (2003).
3. 2004 年 8 月、10th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-10), Best Poster Award : S. Hattori, M. Ohkuma, H. Yuzawa, T. Kudo. Symbiotic relationship between cellulose-utilizing protists and their associated homoacetogenes in the gut of lower termite.
4. 2004 年 10 月、The 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10), Best Poster Award : Y. Hongoh, M. Ohkuma, S. Trakulnaleamsai, P. Deevong, T. Inoue, C. Vongkhaluang, N. Noparatnaraporn, T. Kudo. Novel (sub)divisional lineages of bacteria found from the gut of termites.
5. 2004 年 11 月、日本微生物生態学会第 20 回大会、ポスター賞：野田悟子、工藤俊章、大熊盛也、「シロアリ腸内原生生物とその共生 CFB グループ細菌の系統・進化」