

シロアリ腸内の原生生物細胞内共生系における主要代謝の解明

大熊 盛也
(理化学研究所)

研究の目的

シロアリはリグノセルロースを効率良く分解して枯死植物を利用できる数少ない昆虫であり、腸内に共生する多様な微生物群集がその効率的な分解に大変重要であることから、シロアリの共生微生物群集はバイオマス資源の利用に期待されている¹⁾。共生微生物群集は原生生物(単細胞真核生物)と原核生物からなり、ほとんどが培養困難である。これまでの分子生態学的研究から、これらが極めて多様かつ新規の微生物群であることを明らかにしてきたが^{2,3)}、原生生物と細菌の細胞レベルでの共生が高頻度に見られる特徴的な群集構造となっている³⁻⁸⁾。これらの細胞共生は効率的な分解をもたらすのに重要と考えられ、本研究では宿主原生生物細胞の主要代謝と共生細菌の相互作用を明らかにすることとした。

方法

主に培養を介さない分子生物学的手法を適用した。イエシロアリ (*Coptotermes formosanus*) の腸内原生生物群より作成したcDNAライブラリー⁹⁾をEST (expressed sequence tags) 解析を行って、主要代謝経路を推定した(未発表)。イエシロアリには3種の原生生物のみが共生し、いずれも嫌気性エネルギー産生オルガネラであるヒドロゲノソームを有するパラバサリア門に属する¹⁰⁾。ヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は異種発現させて、精製組換え酵素の性質を調べた。遺伝子の由来する原生生物種は、単離した原生生物細胞を用いた特異的なPCR、あるいは、特異的プローブを用いたwhole-cell in situ hybridizationによって特定した。原生生物細胞を腸内から濃縮して、細胞分画によってヒドロゲナーゼ活性を評価した¹¹⁾。

結果

EST解析で、糖質分解酵素ファミリーの5, 7, 45に属する様々なセルラーゼ遺伝子群を見出した。これはヤマトシロアリ腸内原生生物での結果と同様であった¹²⁾。解糖系酵素と、ピルビン酸—フェレドキシン酸化還元酵素やヒドロゲナーゼ(水素生成酵素)などヒドロゲノソーム関連酵素の遺伝子群も見出した。PEPからピルビン酸を生じる経路よりむしろ、細胞質のホスホエノールピルビン酸(PEP)カルボキシキナーゼ(PCK)とリンゴ酸脱水素酵素(MDH)、および、ヒドロゲノソームのリンゴ酸酵素(ME)の高発現が特徴的であった。細胞質で生じたリンゴ酸がヒドロゲノソームに移行して酢酸、CO₂、H₂に代謝されると推定した(図1)。

ヒドロゲノソームの鉄型(Fe-)ヒドロゲナーゼの2種の遺伝子を大型原生生物*Pseudotrichonympha grassii*から同定したが、これらは系統学的にもN末の付属的ドメイ

ンも異なっていた。これらの異種発現に成功し、組換え酵素を解析した結果、比活性、至適 pH が異なっており（表 1）、細胞内で異なる機能を果たすことが示唆された。一方で両者とも水素取込み活性よりも高い水素生成活性を示し、少なくとも一方は高水素分圧下でも水素生成活性を維持していた。シロアリの共生微生物は腸内環境に適応した新規なヒドロゲナーゼを有していると考えられた。

*P. grassii*細胞の分画で高い水素生成活性がヒドロゲノソーム画分に認められたが、極めて高い水素取込み活性が細胞内共生細菌（Bacteroidales目の新規種と同定⁸⁾）画分に検出され、宿主原生生物の高い水素生成能は共生細菌の水素取込み能により大変低く見積もられていたものと考えられた。実際に、シロアリから放出される水素は、原生生物の代謝から予想される消費グルコース 1 モルあたり 4 モルよりも低い 0.75 モル程度であった。

結論

腸内原生生物が木片を細胞内に取込んでセルロースを細胞内で分解するとされていたが、本研究で推定した原生生物群の主要代謝はこれを支持する。原生生物細胞が細胞質でリンゴ酸を生成する点に関しては、セルロース代謝過程で細胞質において生じる還元力（NADH）をリンゴ酸に転移させてヒドロゲノソームに運び、強力な水素生成酵素で水素のかたちで処理することとなるので、細胞質での効率的なNAD⁺の再生と同時により多くの還元力を水素として処理できるという利点が考えられる（図 1）。さらに、生じた水素は細胞内共生細菌に利用されるので、嫌気性発酵の律速段階とも言われる還元力の処理がさらに効率的に行われて、セルロースの分解・代謝が一層促進されると考えられる。細胞内共生細菌が水素利用に際しての電子受容体にどのような物質を利用するのかなどの代謝を明らかにする必要があり、現在この細菌のゲノム解析を進めている。シロアリ腸内の原生生物と細菌の細胞共生は、原生生物自身の代謝機能とともにシロアリによるセルロース利用の効率性に大変重要な役割を果たしていると考えられた。

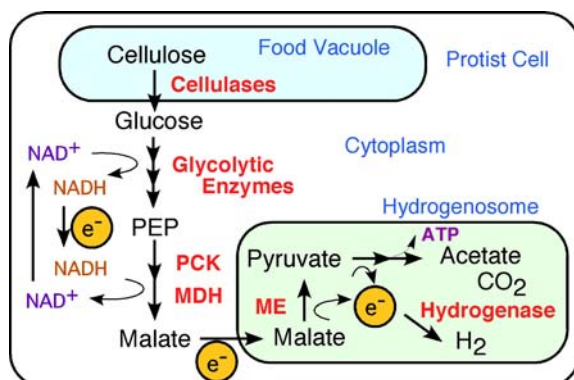


Fig. 1. Schematic showing the reconstructed primary metabolism of parabasalian protists in the gut of termites, with the emphasis on the flow of reducing equivalents (e⁻).

Table 1. Characteristics of two Fe-hydrogenases in *P. grassii*.

	Activity		Optimal pH
	H ₂ evolution	H ₂ uptake	
Long-form	121 ± 7.8	ND	6.0
Short-form	2131 ± 54	431 ± 12	8.0

Hydrogenase activity (\pm standard deviation) measured using methylviologen as an electron carrier is expressed as mmol H₂ min⁻¹ mg-protein⁻¹. ND, not detected.

文献

1. Ohkuma, M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 1-9 (2003).
2. Ohkuma, M., Hongoh, Y., Kudo, T. Diversity and molecular analyses of yet-uncultivated microorganisms. In H. König, and A. Varma (eds.), Soil Biology Vol. 6, Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 303-317 (2005)
3. Ohkuma, M., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T., Hongoh, Y. The candidate phylum “Termite Group 1” of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 467-476 (2007)
4. Hongoh, Y., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T., Ohkuma, M. *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of termite gut protists. *Environ. Microbiol.* **9**: 2631-2635 (2007)
5. Hongoh, Y., Sato, T., Dolan, M. F., Noda, S., Ui, S., Kudo, T., Ohkuma, M. The motility symbiont of the termite-gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the “*Synergistes*” group. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6270-6276 (2007)
6. Noda, S., Kitade, O., Inoue, T., Kawai, M., Kanuka, M., Hiroshima, K., Hongoh, Y., Constantino, R., Uys, V., Zhong, J.-H., Kudo, T., Ohkuma, M. Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol. Ecol.* **16**: 1257-1266 (2007)
7. Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Nalepa, C. A., Vongkaluang, C., Kudo, T., Ohkuma, M. 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)
8. Noda, S., Iida, T., Kitade, O., Nakajima, H., Kudo, T., Ohkuma, M. Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8811-8817 (2005)
9. Inoue, T., Moriya, S., Ohkuma, M., Kudo, T. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. *Gene* **349**: 67-75 (2005)

10. Ohkuma, M., Saita, K., Inoue, T., Kudo, T. Comparison of four protein phylogeny of parabasalium symbionts in termite guts. *Mol. Phylogenet. Evol.* **42**: 847-853 (2007)
11. Inoue, J. -I., Saita, K., Kudo, T., Ui, S., Ohkuma, M. Hydrogen production by termite gut protists: characterization of iron hydrogenases of parabasalium symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1925-1932 (2007)
12. Todaka, N., Moriya, S., Saita, K., Hondo, T., Kiuchi, I., Takasu, H., Ohkuma, M., Piero, C., Hayashizaki, Y., Kudo, T. Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 592-599 (2007)