

## シロアリ腸内共生微生物群の多様性とゲノム解析

### Diversity and Genome Analysis of Symbiotic Microbiota in Termite Guts

本郷 裕一\*, 大熊 盛也  
YUICHI HONGO and MORIYA OHKUMA

独立行政法人理化学研究所 環境分子分解科学研究チーム 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

\*TEL: 048-467-9648 FAX: 048-462-4672

\*E-mail: yhongo@riken.jp

*Ecomolecular Biorecycling Science Research Team, RIKEN, Hirosawa 2-1, Wako, Saitama 351-0198, Japan*

キーワード: 木質バイオマス, 難培養, 腸内細菌, 多重共生系, 昆虫

Key words: woody biomass, uncultivable, gut bacteria, multilayered symbiosis, insect

(原稿受付 2008年4月23日/原稿受理 2008年5月1日)

#### 1. はじめに

シロアリはゴキブリに近縁な社会性昆虫で, 7科280属2600種以上が記載されている。枯死木, 枯葉, 腐葉土などの植物枯死体のみを摂食し, 温帯から熱帯にかけて分布する。特に熱帯と亜熱帯においては, 最も生物量の多い動物群の一つであり, 重要な分解者として位置づけられている。熱帯では植物枯死体の1-2割をシロアリが無機化しており, サバンナにおいては草食哺乳動物全体, 森林ではシロアリ以外の動物全体に匹敵する貢献である<sup>26,35)</sup>。結果として, 陸上二酸化炭素総排出量の約2%, メタンの2-4%がシロアリ由来と推定されている<sup>26)</sup>。畜産を含めた人間の社会活動を除けば, 地球の炭素循環において, 一つの動物群がこれほどの寄与をしている例は, ほかに知られていない。

枯死材を摂食することから, シロアリは木造建築物の害虫としても, 人間社会に大きな影響を与えている。イエシロアリなど一部のシロアリは, その爆発的な繁殖力に伴う破壊的な食性によって, 世界規模で多大な被害をもたらしており, 年あたりの被害総額は日本で1,000億円<sup>27)</sup>, 米国で2,000億円<sup>3)</sup>を超えるとされている。一方, 近年, 化石燃料に代わるバイオマスエネルギーの開発が急務となり, シロアリの高効率な木質分解能は世界的に脚光を浴びている。現在主流のバイオエタノールはサトウキビ, トウモロコシなど, 人間の食料と競合する材料から生成されており, 様々な問題を引き起こしている。そこで, シロアリの木材消化能力を応用した木質バイオマス燃料開発の試みが, 世界各地で始められている。

しかしながら, シロアリの木質消化機構は実はよくわかっていない。シロアリは唾液腺, あるいは中腸からセルラーゼを分泌しており, 木片を自身で一部消化できる。これが後腸で最終的な消化を受ける事で, セルロースとヘミセルロースの約9割を無機化できる。この後腸部で

の木質消化を担っているのが, 原生生物(単細胞真核生物), 真正細菌, 古細菌とからなる共生微生物群である<sup>20)</sup>。これらは群集全体として, リグノセルロース嫌気発酵, 窒素固定, 尿酸を介した窒素再利用, 還元的酢酸生成, メタン発酵, などを行う事が知られている。ところが, 群集を構成する微生物種の大部分が現在にいたるまで培養に成功しておらず, 個々の機能や種間相互作用については, ほとんど未知のままである。

本稿では, シロアリ腸内共生微生物研究の成果を, 培養を介さない手法により解明された腸内細菌叢の多様性と局在を中心に論じ, 続いて, 二つの対照的なゲノム解析手法による最新の結果を紹介する。

#### 2. シロアリ腸内微生物の多様性

シロアリは系統分類学的に, 下等シロアリと高等シロアリという二つの大きなグループに分けられる。前者は温帯から熱帯に分布し, 日本で普通に見られるヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) やイエシロアリ (*Coptotermes formosanus*) を含むミゾガシラシロアリ科 (*Rhinotermitidae*) などの6科から成り, セルロース分解性の腸内共生原生生物を保有する。一方, 高等シロアリはシロアリ科 (*Termitidae*) のみで構成され, 亜熱帯から熱帯にかけて繁栄している。セルロース分解性腸内原生生物を持たず, 腸内微生物叢は原核生物のみで構成される。下等シロアリが全て食性であるのに対し, 高等シロアリは木材の他, 枯葉, 腐葉土, 土壌, 菌類, 地衣類等, 様々な食性をもつ種類がいる。

下等シロアリの腸内共生原生生物群は, *Parabasalial* 門と *Preaxostyla* 門に属する種類のみから構成されており, 絶対嫌気性で, ほとんどがセルロース分解を行うとされている。これらはシロアリとキゴキブリ (*Cryptocercus* 属ゴキブリ) の腸だけに生息しており, 他の環

境では見られない特異な系統群である。通常, 1 種類のシロアリに数種類から 10 数種類が共生しており, 1 匹の腸に  $10^4$ – $10^5$  個生息する。培養に成功した例は稀である。

シロアリ腸内に生息する古細菌はほとんどがメタン生成菌で, *Methanobrevibacter* 属のものが多く, 高等シロアリでは *Methanomicrobiales* 目, *Methanosarcinales* 目のものも見られる<sup>23)</sup>。腸内原核生物群集 ( $10^6$ – $10^9$  個/腸) の数%を占めており, 後腸液中に自由生活するもの, 腸壁に付着するもの, 原生生物細胞内に共生するものが知られている。多様性は高くなく, 16S rRNA 遺伝子クローン解析の結果では, 1 種類のシロアリから数種~10 数種類程度の配列しか得られない<sup>5,33)</sup>。メタン菌の炭化水素無機化への寄与は, シロアリの食性に大きく依存しており, 最大で, 土食性シロアリにおける 10%程度と考えられている<sup>29)</sup>。今までに数系統の *Methanobrevibacter* がシロアリ腸から単離培養されている。

一方, シロアリ腸内共生真正細菌の多様性は極めて高く, また優占種の単離培養成功例はほとんどない。これまでに, 多様なシロアリ種における腸内真正細菌の網羅的な 16S rRNA 遺伝子クローン解析結果が報告されており (表 1), 通常 100 クローンあたり 50 種程度の *phylo-type* (97%の配列相同性で定義) が見出されている。一つの DNA サンプルから最も多くの 16S クローンが解析されたのはヤマトシロアリの腸全体で, 1923 クローンから 312 *phylo-type* が得られている<sup>9,13)</sup>。これらの結果を基に, Curtis らの方法<sup>3)</sup> による一匹の腸あたりの真正細菌 *phylo-type* 数推定を行ったところ, ヤマトシロアリで 700<sup>9)</sup>, *Microcerotermes* spp. で 1200<sup>7)</sup>, オオキノコシロアリ (*Macrotermes*) では 3000 *phylo-type*<sup>8)</sup> も存在することが明らかとなった。

これらの網羅的解析結果を含め, 現在までに報告されているシロアリ腸内由来の真正細菌 16S rRNA 配列に基づいた系統樹が図 1 である。22 の多様な細菌門に分類されたが, 特筆すべきは, シロアリ複数種由来の配列が, 各細菌門の中で一つないし複数の単系統群を形成することである<sup>7)</sup>。その多くは既知の単離培養株配列とも他環境からの未培養細菌配列とも大きく異なる系統で, 明らかに属~門レベルで新規な系統群であった。即ち, シロアリ腸内共生真正細菌の大部分はシロアリ特異的な系統であり, 日和見的共生者ではない。

また重要なのは, これら多様な真正細菌は原生生物同様, 宿主シロアリ種に特異的なことである。つまり, シロアリ種が同じならば, 個体・コロニー・産地を問わず, その腸内微生物叢は高度に保存されている<sup>6-8)</sup>。これはシロアリと腸内微生物, 及び微生物同士が極めて堅固な共生関係を結んでいることを示している。腸内共生微生物は吐き戻しと糞食によってコロニー内で共有され, 有翅生殖虫が腸内に保持して次世代に伝える。

### 3. シロアリ共生微生物の腸内における局在

シロアリ腸内共生微生物は, 腸内にランダムに存在しているわけではなく, 明らかな局在性を有していることが, 顕微鏡観察や, 腸の部位ごとの多様性解析, 細菌の 16S rRNA 配列を標的とした蛍光ハイブリダイゼーション法 (fluorescent in situ hybridization; FISH) などによ

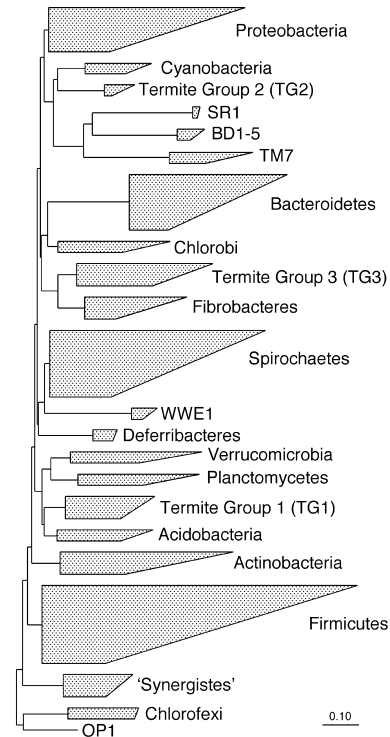


図 1. シロアリ腸内共生真正細菌の 16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹

現在 (2008 年 4 月) までに DDBJ などのデータベース上に公開されているシロアリ腸由来配列を 97%の配列相同性で定義された *phylo-type* に分類した。得られた 1650 *phylo-type* から各 1 クローンを代表として, ARB software<sup>16)</sup> を用いて最節約法によって系統解析した。台形のサイズは, 各細菌門に分類されたシロアリ腸由来配列の多様性を大まかに示す。

て, 明らかとなってきた。腸内微生物の大部分は後腸肥大部 (図 2) に高密度に存在している。原生生物の多くは, 後腸液中を互いの細胞表面を這い回る形で存在するが, *Preaxostyla* 門の *Oxymonas* 属や *Pyrsonympha* 属は, 特殊な突起様細胞構造を用いて腸壁に付着することができる。古細菌の局在は前述の通りである。真正細菌は腸液中を自由遊泳する種類の他, 腸壁に固着するもの, 原生生物の細胞内に共生するもの, 原生生物細胞表面に付着共生するもの, などが見つかっている。

とりわけ注目されるのは, 極めて多様な細菌系統群が原生生物と細胞共生していることである。スピロヘータが原生生物細胞表面に付着共生していることは古くから知られていたが<sup>1,14,19)</sup>, 筆者らの研究では, *Spirochaetes* 門の他, *Bacteroidetes* 門と '*Synergistes*' 門の細菌が付着共生していることも明らかとなった。前者は *Spirochaetes* 門と同程度に普遍的に, 多様な種類が様々な形態で多くの原生生物種の細胞表面に付着共生している<sup>10,11,18)</sup>。後者は *Caduceia versatilis* という原生生物種のみに見られるが, 宿主と接していない面にだけ鞭毛を保有し, この鞭毛によってのみ宿主原生生物が遊泳できるという, 非常に特異な共生をしている<sup>10,28)</sup> (図 3)。

また, 原生生物細胞内にも様々な系統の細菌が共生していることがわかってきた。筆者らの研究では, *Bacteroidetes* 門, *Termite Group 1* 門など 7 門に属する多様な

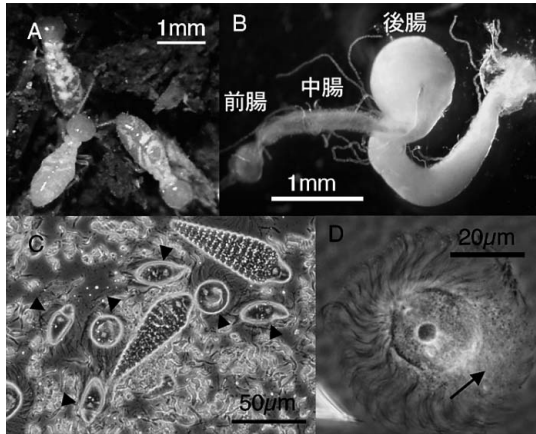


図2. シロアリと腸内共生微生物

A. ヤマトシロアリ。日本で最も普通なシロアリ。B. 同シロアリの腸。C. 同シロアリ後腸内の共生微生物。1匹の腸には約6万匹の原生生物と1千万個の細菌が共生する。矢印は原生生物 *Trichonympha agilis*。D. マイクロマンピュレーターで分離した *T. agilis* 細胞。界面活性剤で細胞後半部の膜を破裂させ、細胞内共生する Termite Group 1 門細菌 Rs-D17 (矢印) を漏出させたところ。 *T. agilis* 細胞内の小球は核。参考文献<sup>12)</sup> より改変。

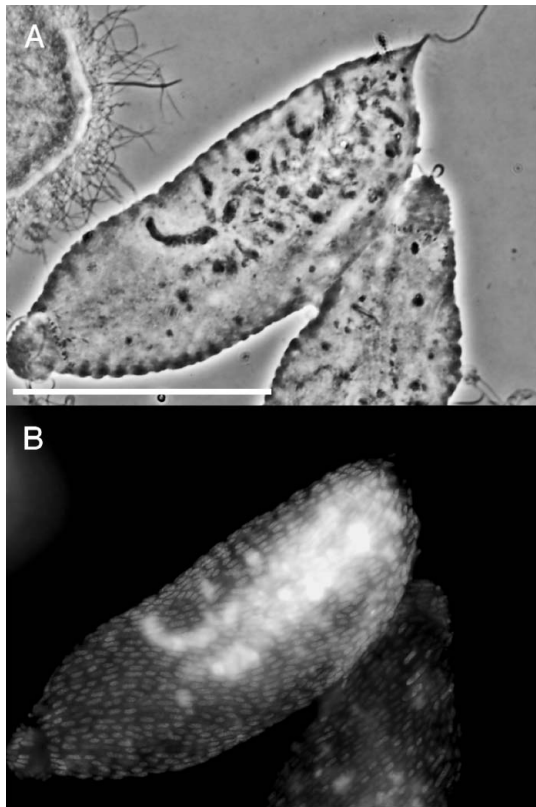


図3. 原生生物細胞に付着共生する細菌の例

A. 米国産シロアリ *Cryptotermes cavifrons* 腸内に共生する原生生物 *Caduceia versatilis* の位相差顕微鏡像。バーは100µm。B. 16S rRNA 配列を標的とした特異的蛍光プローブによって標識された未培養共生細菌 '*Candidatus Tammella caduceiae*'。細菌細胞は3分の2だけ原生生物細胞表面に埋まり、開放されている部分から伸びる12本の鞭毛が、隣接する共生細菌の鞭毛とともに太い鞭毛束を形成する。これが波打つ事で宿主原生生物はかなりのスピードで遊泳できる。強い不定形のシグナルは原生生物細胞内に取り込まれた木片の自家蛍光。参考文献<sup>10)</sup> より改変。

細菌系統群が細胞内共生していた<sup>17,22)</sup> (一部未発表)。このうち Termite Group 1 門は、Ohkuma & Kudo<sup>21)</sup> が1996年に初めて16S rRNA 遺伝子配列を報告した未培養新門だが、高等シロアリを含むほぼ全てのシロアリ種に共生し、腸内細菌叢の約1割を占めることがわかってきた。下等シロアリにおいては、これらは多様な原生生物の種特異的な細胞内共生体として見出されている<sup>22)</sup>。このように多様な系統、形態、組み合わせの細胞共生が観察される系は他に知られていない。

#### 4. 高等シロアリ後腸内細菌叢のメタゲノム解析

これまで述べてきたとおり、シロアリ腸内に共生する微生物は、ほとんどが現時点で培養不能である。腸全体あるいはシロアリ個体を用いた生理化学実験によって、微生物群集全体としての機能がわかっていても、その分子機構に関する知見は極めて乏しかった。米国のJGI (Joint Genome Institute) のWarneckeと、Caltech (California Institute of Technology) のLeadbetter、そしてVerenium (旧 Diversa) 社のLuginbühlらは、南米産高等シロアリの一種 *Nasutitermes ephratae* の後腸液中の細菌叢のメタゲノム解析とプロテオーム解析を行い、2007年11月にNatureに発表した<sup>34)</sup>。彼らは当初、下等シロアリの一種のメタゲノム解析を計画していたようだが、巨大なゲノムサイズをもつ真核生物 (原生生物) を含む微生物叢のメタゲノム解析は困難であることから、共生原生生物を持たない高等シロアリを材料にしたと思われる。

単一の巣から採集した165匹のシロアリ個体の後腸肥大部 (P3 領域) を、個々に微量の緩衝液中で破裂させて腸液を回収し、混合してDNA抽出を行った。Sanger法によるショットガンクローンの配列解析によって、合計71Mbが読まれた。得られた配列断片のassembleは困難で、断片を結合してできたcontigの最大長は15kbにとどまった。これは、腸内細菌種があまりに多様で、配列断片同士が結合できなかったためである。加えて、シロアリ腸内細菌は新規な系統で占められるため、各断片の系統分類学的解析も困難を極め、わずか9%の断片のみが、門以下に分類可能であった。つまり断片の9割以上は由来不明のままである。

平行して行われた16S rRNA 遺伝子クローン解析では、PCR増幅で得られた1750クローンから、12門216 phylotype (99%相同性で定義; 筆者の再解析では97%相同性で85種類, 表1) が得られた。近縁の八重山産タカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis*, 表1) について、筆者ら (Hongoh et al.) がその前年に発表した腸内細菌叢の16Sクローン解析及びFISHによる群集構造解析結果<sup>9)</sup> 同様に、Spirochaetes 門の *Treponema* 属とFibrobacetrtes 門の新規綱 (あるいは亜門)、及びTermite Group 3 (TG3) 門 (WarneckeらはFibrobacteres 門に含めている) が優占していた。配列のほとんどは *N. takasagoensis* 由来のものと同系統群を形成した (注: 筆者・本郷の解析)。

Warneckeらの最も重要な成果は、700以上もの糖加水分解酵素 (glycosyl hydrolase, GH) 活性ドメイン配列を発見したことである。これらは45種類のGH family

表 1. シロアリ全腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子クローン配列に基づく多様性解析

シロアリの種類	Phylotype 数 <sup>1</sup>	解析クローン数	文献
レイビシロアリ科 (Kalotermitidae)			
<i>Cryptotermes cavifrons</i>	51	112	10
ミゾガシラシロアリ科 (Rhinotermitidae)			
<i>Reticulitermes speratus</i> (越生産)	312	1923	9, 13
<i>R. speratus</i> (丹沢産)	55	96	7
<i>R. speratus</i> (対馬産)	53	96	7
<i>Reticulitermes</i> sp. RPK	50	96	7
<i>Coptotermes formosanus</i>	49	261	24
シロアリ科 (Termitidae)			
キノコシロアリ亜科 (Macrotermitinae)			
<i>Macrotermes gilvus</i> 老齢虫	88	114	8
<i>M. gilvus</i> 若齢虫	82	118	8
<i>Odontotermes formosanus</i>			
シロアリ亜科 (Termitinae)			
<i>Termes comis</i>	56	280	25
<i>Termes comis</i>	27	71	30
<i>Microcerotermes</i> sp. 1 (Nakhon Pathom 産)	56	96	7
<i>Microcerotermes</i> sp. 1 (Nakhon Pathom 産)	48	96	7
<i>Microcerotermes</i> sp. 1 (Pitsanulok 産)	53	96	7
<i>Microcerotermes</i> sp. 1 (Pathum Thani 産)	60	96	7
<i>Microcerotermes</i> sp. 2 (Pathum Thani 産)	69	96	7
<i>Microcerotermes</i> sp. 2 (Prachinburi 産)			
テングシロアリ亜科 (Nasutitermitinae)			
<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	59	96	7
<i>N. ephratae</i>	51	170	6
<i>N. ephratae</i>	85	1703 <sup>2</sup>	34

<sup>1</sup> 97.0%の相同性で分類

<sup>2</sup> 後腸の一部 (P3 領域) の腸液のみ

に分類され、100個以上の新規セルラーゼおよび cellobiose/cellodextrin phosphorylase などの関連酵素遺伝子配列を含んでいた。また、xylanase などのヘミセルラーゼ遺伝子も約 100 個見出された。ほとんどの GH は配列組成から *Treponema* 属細菌由来と推定され、一部は Fibrobacteres 門細菌由来と推定された。これらの遺伝子の一部は、Verenium 社によって異種発現と活性検定が試みられており、産業応用への期待が高まっている。高等シロアリ後腸における共生細菌によるセルロース分解活性確認は、この論文以前の 2007 年 2 月に Tokuda & Watanabe が発表している<sup>32)</sup>。

Warnecke らが注目したもう一つの酵素群はヒドロゲナーゼである。バイオエタノールに次いで、水素燃料はクリーンエネルギーとして注目されている。発見されたヒドロゲナーゼはほぼ全て iron-only hydrogenase で、159 個あった。多くは配列相同性と配列組成から *Treponema* 属由来と推定され、このシロアリにおける水素主生産者はスピロヘータであることが示唆された。この他、腸内細菌の重要な役割である窒素固定に関与する遺伝子も 100 個程度発見されたが、由来は特定できなかった。

### 5. 全ゲノム増幅法を用いた単一細菌種のゲノム解析

Warnecke らのメタゲノム解析によって、シロアリ腸内細菌群集全体の機能が、遺伝子レベルで網羅的に解明

されたが、上記のように、ゲノム断片の 9 割は由来不明であり、個々の細菌種の機能推定にはほとんど寄与しなかった。個々の細菌種の機能がわからなければ、種間相互作用、つまりシロアリ腸内共生系の実体は解明できない。筆者・本郷らは、個々の共生細菌種の機能解明を目指し、典型的なメタゲノム解析とは異なるアプローチを取った。筆者らは、ファージ由来の Phi29 DNA polymerase を用いた等温全ゲノム増幅法に着目し、これを利用して少数の培養不能細菌細胞からのゲノム完全長取得を試みた。同法は Multiple Displacement Amplification (MDA) に基づく全ゲノム増幅法で<sup>4,15)</sup>、図 4 に示したように、DNA 二重鎖をほどこきながら、ランダムプライマーから数 10kb にわたり DNA 合成していく。PCR 法を応用した各種全ゲノム増幅法に比べて増幅バイアスがかかりにくく、複製エラー率も驚異的に低い。

筆者らが標的としたのは、未培養細菌門 Termite Group 1 の一種、phylotype Rs-D17 である。この細菌種は、ヤマトシロアリ腸内に共生するセルロース分解性原生生物 *Trichonympha agilis* (図 2C, D) の細胞内にもみ特異的に生息しており、1 個の宿主細胞に 4,000 個程度含まれる<sup>22)</sup>。合計で腸内原核生物叢の約 4% に相当する優占種である。前述のように、Termite Group 1 門細菌はシロアリ腸に普遍的かつ優占的に存在し、セルロース分解性原生生物細胞内にもみ見られることから、腸内共生系において重要な役割を果たしている可能性が高い。

宿主の *T. agilis* も培養不能であり、筆者らはまず宿主

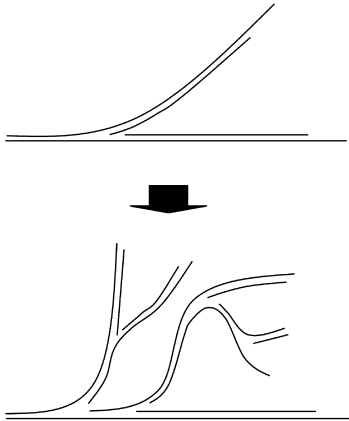


図4. Phi29 DNA polymerase による Multiple Displacement Amplification の概念図 DNA 二重鎖をほどこきながら、ランダムプライマーから数 10kb の DNA を複製できる。最近では、同法を応用した細菌 1 細胞からのゲノム配列解析も試みられているが、キメラ生成、増幅バイアス、コンタミネーションなど、克服すべき問題点は多い。

細胞を 1 個だけ、腸内微生物群集からマイクロマニピュレーターで分離した。ゲノム増幅のための鋳型 DNA 量が多い方が良いが、*T. agilis* は多様な系統が腸内で混在しているため、複数の宿主細胞を用いると、細胞内共生する標的細菌も異なる系統が混在してしまう。そうすると、得られたゲノム断片同士を assemble できない可能性が高いため、単一の宿主細胞を用いた。また、*T. agilis* は Rs-D17 以外の細菌も細胞内外に共生させているため、Rs-D17 が優占する原生生物細胞後半部の細胞膜を壊して Rs-D17 細菌を漏出させ、数百細胞を毛細管で回収した(図 2D)。回収した細菌細胞を 0.4N KOH で融解、タンパク変性、DNA 変性させ、中和した後、Phi29 DNA polymerase を含む Qiagen 社の Repli-g キットで 37°C、8 時間の等温全ゲノム増幅反応を行った。これによって鋳型 DNA を 1 千万倍以上に増幅し、50 $\mu$ g の数 kb ~ 数 10kb の産物を得た。

増幅産物から 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅してクローン解析したところ、95% が Rs-D17 の配列であり、それらのほとんどが 100% 相同であった。さらに 16S-23S の internal transcribed spacer (ITS) のクローン解析をしたところ、配列 variation はほとんど無く、一つの宿主細胞内の Rs-D17 細菌は、ほぼ単一系統であることがわかった。ゲノム配列解析は、理化学研究所ゲノム科学総合研究センターの豊田敦上級研究員らによって、Sanger 法と 454 pyrosequence 法を組み合わせで行われた。最終的に、Sanger 法で完全長、454 法で 98% をカバーした、1.1Mb の単一の環状染色体配列再構築に成功した<sup>12)</sup>。配列の変異や曖昧な部分はほとんどなく、わずかに数百細胞の細菌からゲノムの完全長を再構築できることが実証された。

Rs-D17 のゲノムは 761 個のタンパク遺伝子と 1 個の rRNA 遺伝子オペロン、45 個の tRNA 遺伝子をコードしていたが、さらに 121 個もの偽遺伝子が発見された。1.1Mb という小さなゲノムサイズと合わせて、この細菌ゲノムが縮小進化の過程にあることは明らかである。偽遺伝子は、細胞壁合成系、DNA 修復・複製系、防御系、

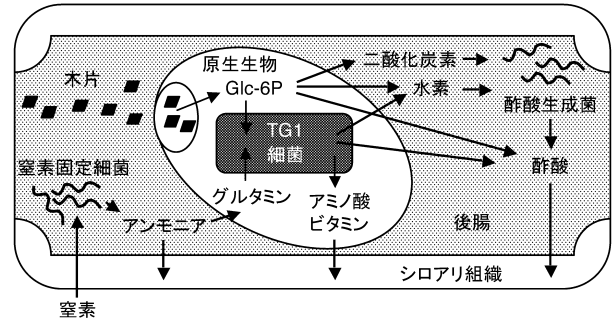


図5. ゲノム解析で明らかとなった Termite Group 1 (TG1) 細菌の役割

TG1 細菌は原生生物細胞内のグルコース-6リン酸を取り込んで C 源・エネルギー源とし、グルタミンを様々な窒素化合物に変換する。宿主原生生物は、TG1 細菌を消化することで、これらの栄養を得ていると考えられる。参考文献<sup>12)</sup>より改変。

調節系、膜輸送系などに集中しており、通常の細菌に必須の *dnaA* 遺伝子までもが偽遺伝子化していた。一方、アミノ酸や補因子合成系は潤沢に残されていた。宿主シロアリは窒素分に乏しい枯死材のみを摂食するため、シロアリや共生原生生物は、自身で合成できない必須窒素化合物の合成を、共生細菌に依拠せざるを得ない。原生生物の種特異的細胞内共生体である Termite Group 1 細菌は、原生生物やシロアリに必須な窒素化合物を合成するための、いわば細胞内小器官のように進化してきたものと考えられる(図 5)。

## 6. おわりに

今回、筆者らが確立したゲノム解析系により、シロアリ腸内共生原生生物に細胞共生する多様な細菌群の、個々の機能推定が可能となった。今後得られていくであろうこれらの知見と、原生生物のメタトランスクリプトーム解析<sup>31)</sup>などの結果を組み合わせれば、この複雑な多重共生系をかなりの程度まで解明できるであろう。その過程で得られる新規有用遺伝子や、解明されていく高効率な木質分解機構は、バイオ燃料開発などの産業応用へつながっていくことが期待される。

## 謝 辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、理化学研究所の工藤俊章主任研究員、野田悟子博士ら、環境分子生物学研究室のメンバーと、東京大学の服部正平教授、理研・ゲノム科学総合研究センターの豊田敦上級研究員、Vineet K. Sharma 博士らとの共同研究によって得られたものである。理研および、日本学術振興会、科学技術振興機構の助成金によって遂行された。

## 文 献

- 1) Cleveland, L.R., and A.V. Grimstone. 1964. The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated microorganisms. Proc. R. Soc. Lond. B 159: 668–686.
- 2) Culliney, T.W., and J.K. Grace. 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermiti-

- dae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. Bull. Entomol. Res. 90: 9–21.
- 3) Curtis, T.P., W.T. Sloan, and J.W. Scannell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10494–10499.
  - 4) Dean, F.B., S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A.F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, *et al.* 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5261–5266.
  - 5) Donovan, S.E., K.J. Purdy, M.D. Kane, and P. Eggleton. 2004. Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3884–3892.
  - 6) Hongoh, Y., P. Deevong, S. Hattori, T. Inoue, S. Noda, N. Noparatnaraporn, T. Kudo, and M. Ohkuma. 2006. Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6780–6788.
  - 7) Hongoh, Y., P. Deevong, T. Inoue, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, M. Ohkuma, C. Vongkaluang, N. Noparatnaraporn, and T. Kudo. 2005. Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. Appl. Environ. Microbiol. 71: 6590–6599.
  - 8) Hongoh, Y., L. Ekpornprasit, T. Inoue, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, M. Ohkuma, N. Noparatnaraporn, and T. Kudo. 2006. Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. Mol. Ecol. 15: 505–516.
  - 9) Hongoh, Y., M. Ohkuma, and T. Kudo. 2003. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). FEMS Microbiol. Ecol. 44: 231–242.
  - 10) Hongoh, Y., T. Sato, M.F. Dolan, S. Noda, S. Ui, T. Kudo, and M. Ohkuma. 2007. The motility symbiont of the termite gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the “*Synergistes*” group. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6270–6276.
  - 11) Hongoh, Y., T. Sato, S. Noda, S. Ui, T. Kudo, and M. Ohkuma. 2007. *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae: bristle-like Bacteroidales ectosymbionts of termite gut protists. Environ. Microbiol. 9: 2631–2635.
  - 12) Hongoh, Y., V.K. Sharma, T. Prakash, S. Noda, T.D. Taylor, T. Kudo, Y. Sakaki, A. Toyoda, M. Hattori, and M. Ohkuma. 2008. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 5555–5560.
  - 13) Hongoh, Y., H. Yuzawa, M. Ohkuma, and T. Kudo. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS Microbiol. Lett. 221: 299–304.
  - 14) Iida, T., M. Ohkuma, K. Ohtoko, and T. Kudo. 2000. Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. FEMS Microbiol. Ecol. 34: 17–26.
  - 15) Lasken, R.S. 2007. Single-cell genomic sequencing using multiple displacement amplification. Curr. Opin. Microbiol. 10: 510–506.
  - 16) Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, *et al.* 2004. ARB: a software environment for sequence data. Nucl. Acids Res. 32: 1363–1371.
  - 17) Noda, S., T. Iida, O. Kitade, H. Nakajima, T. Kudo, and M. Ohkuma. 2005. Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotriconympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8811–8817.
  - 18) Noda, S., T. Inoue, Y. Hongoh, M. Kawai, C.A. Nalepa, C. Vongkaluang, T. Kudo, and M. Ohkuma. 2006. 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.
  - 19) Noda, S., M. Ohkuma, A. Yamada, Y. Hongoh, and T. Kudo. 2003. Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. Appl. Environ. Microbiol. 69: 625–633.
  - 20) Ohkuma, M. 2003. Termite symbiotic systems: efficient biorecycling of lignocellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 1–9.
  - 21) Ohkuma, M., and T. Kudo. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 461–468.
  - 22) Ohkuma, M., T. Sato, S. Noda, S. Ui, T. Kudo, and Y. Hongoh. 2007. 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.
  - 23) Purdy, K.J. 2007. The distribution and diversity of *Euryarchaeota* in termite guts. Adv. Appl. Microbiol. 62: 63–80.
  - 24) Shinzato, N., M. Muramatsu, T. Matsui, and Y. Watanabe. 2005. Molecular phylogenetic diversity of the bacterial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1145–1155.
  - 25) Shinzato, N., M. Muramatsu, T. Matsui, and Y. Watanabe. 2007. Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71: 906–915.
  - 26) Sugimoto, A., D.E. Bignell, and J. Macdonald. 2000. Global Impact of Termites on the Carbon Cycle, pp. 409–436. In Abe, T., D.E. Bignell, M. Higashi (ed.), Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
  - 27) Takahashi, M., and T. Yoshimura. 2002. Recent development in the control of Japanese subterranean termites. Sociobiology 40: 13–23.
  - 28) Tamm, S.L. 1982. Flagellated ectosymbiotic bacteria propel a eucaryotic cell. J. Cell Biol. 94: 697–709.
  - 29) Tholen, A., and A. Brune. 1999. Localization and in situ activities of homoacetogenic bacteria in the highly compartmentalized hindgut of soil-feeding higher termites (*Cubitermes* spp.). Appl. Environ. Microbiol. 65: 4497–4505.
  - 30) Thongaram, T., Y. Hongoh, S. Kosono, M. Ohkuma, S. Trakulnaleamsai, N. Noparatnaraporn, and T. Kudo. 2005. Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. Extremophiles 9: 229–238.
  - 31) Todaka, N., S. Moriya, K. Saita, T. Hondo, I. Kiuchi, H. Takasu, M. Ohkuma, C. Piero, Y. Hayashizaki, and T. Kudo. 2007. Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. FEMS Microbiol. Ecol. 59: 592–599.
  - 32) Tokuda, G., and H. Watanabe. 2007. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. Biol. Lett. 3: 336–339.
  - 33) Tokura, M., M. Ohkuma, and T. Kudo. 2000. Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. FEMS Microbiol. Ecol. 33: 233–240.
  - 34) Warnecke, F., P. Luginbühl, N. Ivanova, M. Ghasseman, T.H. Richardson, J.T. Stege, M. Cayouette, A.C. McHardy, G. Djordjevic, N. Aboushadi, *et al.* 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature 450: 560–565.
  - 35) Yamada, A., T. Inoue, D. Wiwatwitaya, M. Ohkuma, T. Kudo, T. Abe, and A. Sugimoto. 2005. Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs. Ecol. Res. 20: 453–460.