

身近で活躍する有用微生物 環境と有用微生物 4.

シロアリと共生微生物

の だ さと こ
野 田 悟 子
Satoko NODA

はじめに

シロアリと聞くと、多くの人は木造建造物の害虫を思い浮かべるのではないだろうか。ところがほとんどのシロアリ種は森林などの自然生態系に生息しており、害虫として知られているのはごく限られた種類でしかない。シロアリは木材などの植物枯死体を摂食するが、自身の消化酵素には十分な消化能力がなく、腸内に共生する微生物の働きで効率的な代謝が可能となっている。しかし、共生微生物は培養が難しく、単離・培養操作を伴う一般の微生物学的な研究手法は適用できないため、これらに関する知見は長い間限定的であった。近年になり、メタゲノム解析を始めとする様々な解析手法の進展の結果、その多様性や機能が次第に明らかになりつつある。本稿では、森林生態系の物質循環に大きな役割を果たすシロアリと、植物枯死体の分解による炭素循環や窒素循環を支える共生微生物について概説したい。

I. シロアリと共生する微生物

シロアリは熱帯や亜熱帯地域の森林生態系に多く生息する多様性の高い土壌昆虫で、これまでに2600種以上が知られている¹⁾。シロアリは多数の個体からなる家族集団(コロニー)で生活する。コロニーは繁殖をする王や女王、巣作りや幼虫の世話をを行うワーカー(働きアリ)、防御を行うソルジャー(兵隊)などからなる。この様な役割の違いはカーストと呼ばれ、シロアリでは形態や行動がカーストにより大きく異なる²⁾。

日本を含む温帯地域の生態系では、植物が供給す

るリター(落葉落枝)の有機物を分解する役割は主にミミズが担っていることが知られているが、熱帯地方では代わりにシロアリがリターの分解者としての大きな役割を担っている。例えばナイジェリアのサバンナでは、地表のリターの約55%がシロアリによって消費される³⁾。植物細胞壁の主成分であるセルロースやヘミセルロースのような多糖類は、多くの動物にとって分解と利用が非常に難しい物質である。このため、その分解は陸上生態系の物質循環にとって重要な意味を持つ。もし、地球上からシロアリが消滅してしまったとすると、特に熱帯地域では植物バイオマスの多くが分解されずに残り、物質循環に大きな影響がでることが予想される。言い換えれば、シロアリは他の動物が利用できない餌資源をほぼ独占的に利用し、特異的な生態的地位(ニッチ)を獲得することができたのである。

多くの動物は摂食した食物を自分の消化酵素で分解して栄養として吸収できるが、シロアリ自身の植物枯死体消化能力は非常に低く、これを十分に分解することができない。ではなぜシロアリが植物枯死体を食べることができるのかといえば、多様な微生物との共生関係を築くよう進化してきたからである⁴⁾。シロアリは現在7科に分けられており、シロアリ科は高等シロアリ、残りの6科は合わせて下等シロアリと呼ばれる。シロアリ全種数の約75%を占める高等シロアリは主に熱帯に分布している。下等シロアリは温帯まで分布を広げており、日本の北海道から九州まで広く分布するヤマトシロアリはこのグループに属する(図1)。この2つのグループでは消化管に生息する微生物叢が大きく異なる。下等シロアリでは消化管の後方(後腸)が肥大化しており²⁾、原核生物(細菌・古細菌)と真核微生物(原

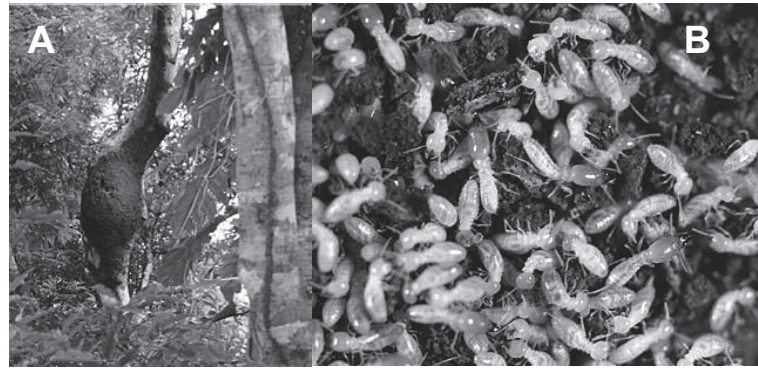


図1 高等シロアリと下等シロアリ

A. 高等シロアリ（樹上シロアリ：タカサゴシロアリ）の巣。
B. 日本で最も分布域の広いヤマトシロアリ。

（図1は巻末にカラーで掲載しています）

生生物）が生息している。一方の高等シロアリでは、消化管には細菌と古細菌のみが生息しており、原生生物は通常見られない。また、一部に巣でキノコ（菌類）を栽培している種類や、地衣類や土を食べる種類がいるなど食性が多様化している。これらシロアリの腸内微生物の多くは単離・培養が非常に難しい、いわゆる難培養性微生物であり、一般的な微生物学の手法で解析することは困難である。

II. 腸内原生生物

下等シロアリの後腸には1～10数種の原生生物が生息しており、ヤマトシロアリには13種程度が観察される⁵⁾。下等シロアリが餌とする木材はセルロース、キシラン等のヘミセルロース、リグニンを主成分としている。このうちセルロースとヘミセルロースは分解されると、それぞれグルコースとキシロースなどの糖が生成されるため、エネルギー源として利用される。リグニンは芳香環をもつ不定形の高分子化合物で、植物の物理的強度の付与などの機能を果たしているとされている。下等シロアリ後腸内の微生物共生系では、セルロースとヘミセルロースのほぼ全てが分解・代謝され、リグニンはほとんど分解されない⁴⁾。このセルロースなどの分解を担っているのが原生生物である。腸内原生生物を除去したシロアリは、木材を与えても消化できずに死んでしまうが、原生生物を再感染させるとまた食べられるようになることが報告されている⁶⁾。植物枯死体の分解には原生生物が生産する酵素が不可欠で

ある一方で、原生生物は嫌気性でシロアリの消化管の外では生存できないため、生息場所と餌の供給を宿主シロアリに依存している。また、原生生物の種組成は宿主シロアリの系統と極めて強い相関があることが報告されており、同じシロアリの種には採集場所や時期が異なってもほぼ同じ種の原生生物群集が生息している。これら両者の関係は、典型的な相利共生関係として知られている。

共生原生生物は、大きくパラバサリア門とプレアクソスティラ門オキシモナス目の2つに分けられる。いずれのグループでも細胞内に木材の取り込みが観察できることから、木質成分の分解を行っていることが予想される。

パラバサリア門は、分類群名の由来となっている「副基体 (parabasal body)」という構造を持つ。またミトコンドリアを欠いており、代わりに嫌氣的にエネルギー産生を行う水素発生オルガネラ「ヒドロゲノソーム」を有するなど、細胞の大きさや形態も様々な多様な種が含まれる（図2）。パラバサリア門にはヒトの性感染症であるトリコモナス症の原因となる *Trichomonas vaginalis* や鳥類などの動物の消化管に寄生する種も含まれるが、多くはシロアリ類に共生する種で構成される⁷⁾。一般に脊椎動物に寄生する種は比較的細胞が小型で鞭毛の数が少なく培養が可能な種が多いが、木材成分の分解能は報告されていない。一方、シロアリ共生原生生物は細胞が大型で鞭毛が10～数千と多く、これまでに培養に成功した例はごく限られている。そこで筆者らは培養を介さずに、複数種が混在している腸内容液か

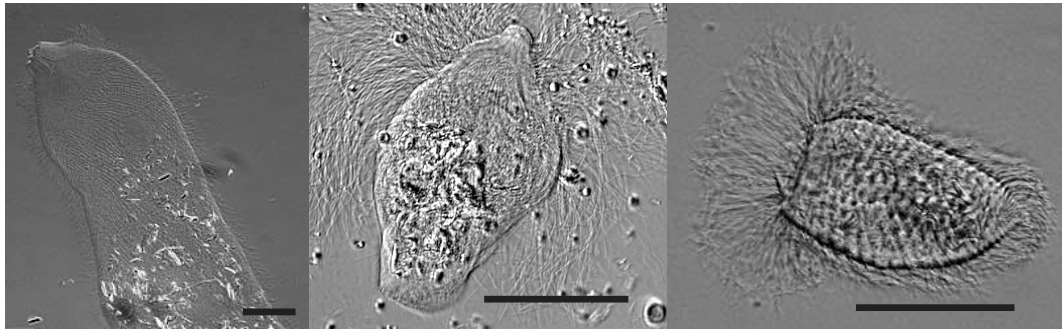


図2 シロアリ共生原生生物

細胞の大きさや形態も様々な種が混在して生息している。
 白く光っているのは原生生物が取り込んだ木片。図中のバーは50 μ m

(図2は巻末にカラーで掲載しています)

ら顕微授精で用いられるマイクロマニピュレーターを使用して直接目的細胞を物理的に分取し、その細胞からDNAを増幅して解析を行った。分子系統解析の結果、シロアリ共生種で見られる鞭毛装置の増加や細胞構造の複雑化は、進化の過程で複数回起ったことが推定された⁸⁾。細胞の大型化は木片を取込んで分解するのに、鞭毛の増加は消化管からの流出を防ぐなど、シロアリ腸内環境への適応に有利であったことが考えられる。プレアクソスティラ門オキシモナス目原生生物は「preaxostyle」という構造で隔てられた特殊な鞭毛系をもち、ヒドロゲノソームやゴルジ体のような膜系のオルガネラを持たない。これまでに12属が記載されている。

ヤマトシロアリの場合、ワーカーの後腸内の原生生物の総個体数は10万を超える⁹⁾。シロアリは脱皮を繰り返し成長するが、脱皮の際には後腸の内壁も剥がれ、原生生物はほぼ失われてしまい、卵から孵化した直後の幼虫も原生生物を持たない。原生生物を持たない個体は、シロアリが親子や巣仲間で行う協力行動である肛門から口への消化管内容物の受け渡し(肛門食栄養交換)の際に宿主個体間で伝達され¹⁰⁾、獲得・再獲得できる⁹⁾。

木質成分の分解代謝には糖質加水分解酵素群(Glycoside Hydrolase Family, GHF)が関与し、セルロース鎖の還元末端から切断するセロビオハイドロラーゼ、分子内部を切断するエンドグルカナーゼ、これらの分解産物であるセロビオースやセロオリゴ糖をグルコースに分解する β -グルコシダーゼが協働して作用することが必要となる¹¹⁾。シロアリ共生原生生物群集を対象とした発現遺伝子解析(Expressed

Sequence Tag, EST)の結果から、腸内ではこれら複数のGHF遺伝子が高発現していることが明らかになっている¹²⁾。木質成分を効率的に分解できる生物としては、シロアリ共生原生生物以外に真菌類(カビ・キノコなど)が知られているが、両者の分解様式は異なる。真菌類は木質分解酵素を細胞外に分泌して木材を低分子に分解してから細胞に取り込んで代謝する。一方、シロアリ共生系ではシロアリが大顎と前腸にある隆起した構造体で木材を細かく粉碎し、それを後腸で原生生物が食作用により細胞内に取り込み、細胞内の食胞で酵素により分解する。シロアリ共生原生生物の持つ木質分解酵素のいくつかは、大腸菌や麹菌(*Aspergillus*)などの異種発現系を用いてタンパク質発現・酵素学的性質の解析が行われている^{13, 14)}。化石燃料に替わるカーボンニュートラルなバイオ燃料は温暖化対策として期待されており、トウモロコシなどを原料としたバイオエタノールが実用化されている。しかし、トウモロコシやサトウキビなどを原料としたバイオ燃料の増産は食糧や飼料の価格高騰を招き、食料供給が脅かされることが懸念されている。木質系のバイオマスは食糧・飼料と競合しないことから、これらの糖化・発酵によって製造するエタノールなどは低炭素社会実現への切り札として期待されるが、現状では実用化には至っていない。

Ⅲ. 腸内細菌・古細菌

シロアリの腸内には原生生物以外にも原核生物(真正細菌と古細菌)が共生している。腸内容液中

を自由遊泳する種や腸壁にシート状に固着する種もいるが、多くの原核生物の種は原生生物の細胞内に存在したり細胞表層に付着している。つまり、これらの種は「シロアリ-原生生物-原核生物」という多重の共生関係を構築しているのである。私たちはシロアリと原生生物、その細胞内共生細菌の DNA 配列を取得して系統関係を推定した。その結果から、細胞内共生細菌はシロアリ・原生生物と系統樹の樹形がほぼ一致しており、同調的系統分化（共種分化）していること^{15, 16)}、細胞外共生細菌は独立して複数回共生関係を構築した可能性が推定された¹⁷⁾。

シロアリ腸内には嫌気的環境下でメタンを生成するメタン生成古細菌が生息しており、中でも *Methanobrevibacter* 属が多い。シロアリの種にもよるが、1 匹の腸内の原核生物の総数 10^6 - 10^9 細胞程度の数%を占めている。存在形態は、自由生活性やシロアリの腸壁に付着したり、原生生物の細胞内など様々である。これまでに *Methanobrevibacter* 属の数種が単離・培養されている。

真正細菌の多様性は極めて高く、単離・培養された種はごくわずかな種に限られている。環境中に存在する微生物群の多様性は、対象となる環境サンプルから微生物群集の DNA をまとめて抽出し、16S rRNA 遺伝子などの指標となる配列を PCR で同時に増幅し、次世代シーケンサーで塩基配列を決定して、配列の種類と数から微生物の種類組成を推定する解析手法が広く用いられている。この手法がシロアリ腸内細菌の多様性解析にも用いられた結果、数百~数千種の細菌がわずかに数 μ L 程度の容積しかない腸内に存在していることが明らかにされている⁴⁾。そのほとんどは、これまでに未培養の種である。腸内で最も優占的であるのは、らせん形をした細菌グループである Spirochaetes 門の *Treponema* 属の種で、この属にはヒトの病原細菌として知られている梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*) も分類される。シロアリの腸内共生種には病原性は確認されておらず、共生系にとって重要な機能を持つことが報告されている。これらの一部は空気中の窒素をアンモニアに変換する窒素固定能を持つ。植物枯死体には炭素源は豊富だが窒素源は極端に乏しい。そのため、窒素固定を行う *Treponema* 属はシロアリ共生系全体の窒素代謝に非常に重要な役割を果たしているといえる¹¹⁾。腸内の多様な *Treponema* 属のう

ち単離・培養されている種は数種のみであるが、未培養種には原生生物の細胞外に付着したり細胞内に共生する種が非常に多い (図 3)。オオシロアリ腸内に生息する大型の原生生物 *Eucomonympha* の 1 細胞内には 10^4 以上もの桿菌様の *Treponema* 属細菌の 1 種が共生し、原生生物がセルロースを分解する過程で副産物として生じる二酸化炭素と水素を使って、シロアリがエネルギー源として利用できる酢酸をつくり出す（還元的酢酸生成）能力があることや、窒素固定を行って栄養価の高いアミノ酸などに変換することが明らかにされている²⁰⁾。また、大型の原生生物 *Mixotricha* の細胞表面には非常に多くの *Treponema* 属の種が付着共生している。この原生生物は、共生 *Treponema* の同調した波状運動によってのみ遊泳可能であることが実験的に示されている¹⁸⁾。原生生物を持たない高等シロアリの一種であるタカサゴシロアリでは、自由遊泳性の *Treponema* がキシランの分解に寄与していることが報告されている¹⁹⁾。

共生細菌の多くは難培養性であるが、これまでに多くの研究者が培養を試みている。培養可能な種は非常に限られており、様々なシロアリ種から細菌を培養すると乳酸菌が優占種として単離されることが報告されている²¹⁾。乳酸菌のなかでも *Lactococcus* 属が多く分離されており、これまでに日本のヤマトシロアリから *L. reticulitermitis*、中国で採集された高等シロアリ *Nasutitermes hainanensis* から *L. nasutitermitis* が、アメリカで採集されたイエシロアリから別属の乳酸菌 *Plibacter termitis* が分離されている。筆者らのグループでも *Lactococcus* 属の乳酸菌を複数単離し、いくつかは新種として記載している (*L. hodotermopsis*, *L. termiticola*, *L. insecticola*)^{22, 23)}。シロアリ共生系における乳酸菌類の役割はほとんど分かっていないが、前述の *Treponema* 属細菌が行う還元的酢酸生成反応に必要なとなる葉酸の供給源として *Lactococcus* 属が候補の一つとして考えられている。実際に、*L. reticulitermitis* などのゲノム上には葉酸の生合成に関わる遺伝子群がコードされている。

IV. 外部共生真菌類

高等シロアリのキノコシロアリ亜科 (Macrotermittinae) のシロアリは巣に真菌類を根付かせて菌園を作る²⁴⁾。シロアリのキノコ栽培は、キノコによ

る木材成分の分解と栄養的に優れた餌としてキノコを利用できるなどメリットが考えられる。この巣内で栽培される菌類は、担子菌ハラタケ目シメジ科オシロアリタケ属 (*Termitomyces*) に属し、特に東南アジアなどでは高級食材として食用されている。筆者もタイのマーケットで売られていたものを食べたことがあるが、シメジに似た食感でおいしいキノコであった (図 4)。残念ながら人工的な培養で子

実体 (キノコ) の形成は成功していないが、短い旬の時期にだけ野外で採集できる。日本でも沖縄以南にキノコを栽培するタイワンシロアリという種が分布している。このシロアリは分布の北限である沖縄本島では、琉球王朝の首都であった首里だけでみることができる。このため、琉球王朝の身分の高い人々がキノコを食べることができるよう、八重山諸島から移植されたのだろうと考える研究者もいる。

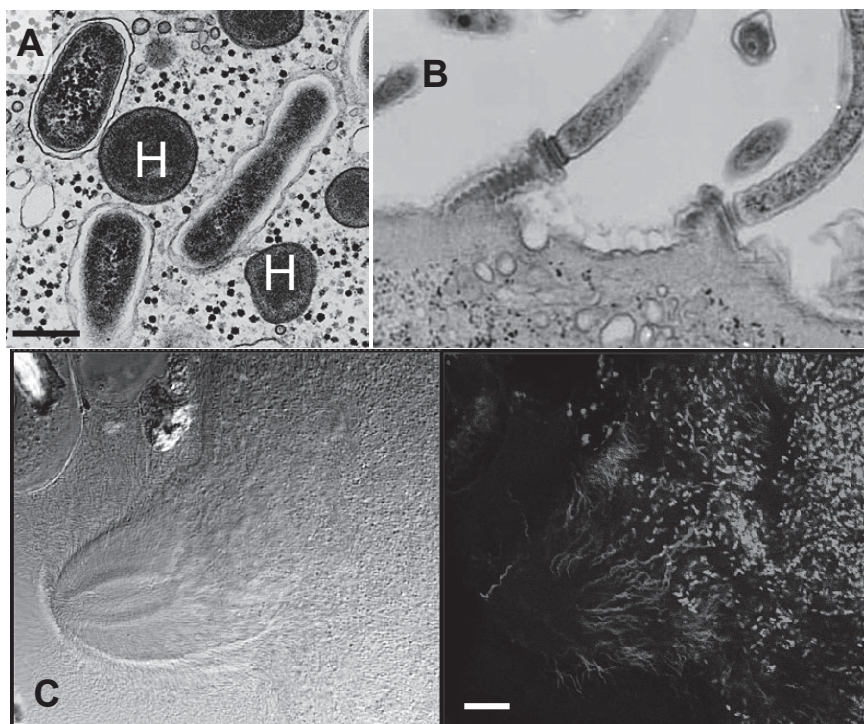


図 3 シロアリ腸内の原生生物に細胞共生する原核生物

- A. 原生生物の細胞内共生細菌の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像 バーは $0.5\mu\text{m}$ 、H はヒドロゲノソーム
 B. 原生生物に付着する *Treponema* 属の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像
 C. 原生生物と細胞内 (緑)・細胞外 (赤) 共生細菌の共焦点レーザー顕微鏡像 バーは $10\mu\text{m}$



図 4 キノコシロアリとシロアリキノコ

- A. タイワンシロアリの菌園 B. シロアリキノコのスープ C. シロアリキノコの子実体

(図 3, 4 は巻末にカラーで掲載しています)

おわりに

シロアリは、ここでは紹介できなかった種も含め実に多種多様な微生物と共生し、宿主と微生物群集全体で非常に効率的な植物バイオマスの分解・利用システムを構築している。このような効率的なシステムは単独の生物種だけではなし得ないものである。「共生」は生物学の重要なテーマの一つで、古くから様々な自然環境の共生現象が発見・研究されてきた。しかし、共生系の複雑な生物間相互作用が影響し、特に共生微生物は単離・培養が難しいことから研究が進んでいなかった。近年の塩基配列解析技術をはじめとする、微量成分の分析法や single cell ゲノム解析などの新しい技術を用いることで、共生微生物の機能が明らかにされてきている。森に生きる小さな昆虫の体内に構築されている非常に効率的な「バイオリアクター」と、その効率を支える肉眼では見えない微生物について、興味をもっていただけなら幸いである。本稿の執筆にあたり、茨城大学の北出理教授にご助言いただいた。感謝の意を表する。

文 献

- 1) Kambhampati S, and Eggleton P. Taxonomy and physiology of termites, Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology (Abe T, Bignell D E, Higashi M eds), Kluwer Academic Publishers; 2000; 1-23.
- 2) Eggleton P. An introduction to termites: Biology, taxonomy and Functional morphology (Biology of termites: a modern synthesis (Bignell D.E, Roisin Y, Lo N. eds) Dordrecht: Springer; 2010. 1-26.
- 3) 陀安一郎. 熱帯の生態系とシロアリの役割. 住まいとシロアリ (今村祐嗣、角田邦夫、吉村剛編). 京都: 海青社; 2000. 103-113.
- 4) Brune A, Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. Nat. Rev. Microbiol. 2014; 12: 168-180.
- 5) Kitade O, and Matsumoto T. Characteristics of the symbiotic flagellate composition within the termite family Rhinotermitidae (Isoptera). Symbiosis 1998; 25: 271-278.
- 6) Cleveland, L. R. Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1923; 9: 424-428.
- 7) Cepicka I, Dolan M.F, and Gile G.H. Parabasalia. Handbook of the Protists, (Archibald J.M., et al. eds.), 2016; 1-44.
- 8) Noda S, Mantini C, Meloni D. et al. Molecular Phylogeny and Evolution of Parabasalia with Improved Taxon Sampling and New Protein Markers of Actin and Elongation Factor-1 alpha. Plos One 2012; 7(1): e29938.
- 9) Yamaoka I, Sasabe K, and Terada K. A timely infection of intestinal protozoa in the developing hindgut of the termite (*Reticulitermes speratus*). Zoological Science. 1986; 3(1): 175-180.
- 10) Andrew, B.J. Method and rate of protozoan refaunation in the termite *Termopsis angusticollis* Hagen. University of California Publications in Zoology. 1930; 33: 449-470.
- 11) Brune A, and Ohkuma M. Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. Biology of Termites. A Modern Synthesis (Bignell DE, Roisin Y, Lo N, eds.). Dordrecht: Springer; 2011. 439-475.
- 12) Todaka N, Moriya S, Saita K, et al. Environmental cDNA Analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. FEMS Microbiol Ecol. 2007; 59: 592-599.
- 13) Inoue T, Moriya S, Ohkuma M, et al. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. Gene. 2005; 349: 67-75.
- 14) Otagiri M, Lopez C. M, Kitamoto K. Heterologous Expression and Characterization of a Glycoside Hydrolase Family 45 endo- β -1,4-Glucanase from a Symbiotic Protist of the Lower Termite, *Reticulitermes speratus*. Appl Biochem Biotechnol. 2013; 169: 1910-1918.
- 15) Noda S, Shimizu D, Yuki M, et al. Host-symbiont cospeciation of termite-gut cellulolytic protists of the genera *Teranympha* and *Eucomonympha* and their *Treponema* endosymbionts. Microbes Environ. 2018; 33: 26-33.
- 16) Noda S, Kitade O, Inoue T, et al. Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotriconympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. Mol Ecol. 2007; 16: 1257-1266.
- 17) Noda S, Hongoh Y, Sato T. et al. Complex coevolutionary history of symbiotic Bacteroidales bacteria of various protists in the gut of termites. BMC Evolutionary Biology. 2009; 9: 158.
- 18) Wenzel M, Radek R, Brugerolle G. et al. Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. Eur J Protistol. 2003; 39: 11-23.
- 19) Tokuda G, Mikaelian A, Fukui C. et al. Fiber-associated spirochetes are major agents of hemicellulose degradation in the hindgut of wood-feeding higher termites. Proc Natl Acad Sci USA. 2018; 115: E11996-E12004.
- 20) Ohkuma M, Noda S, Hattori S. et al. Acetogenesis from H_2 plus CO_2 and nitrogen fixation by an endosymbiotic spirochete of a termite-gut cellulolytic protist. Proc Natl Acad Sci USA. 2015; 112: 10224-10230.
- 21) Bauer S, Tholen A, Overmann J. et al. Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. Arch Microbiol. 2000; 173: 126-137.

- 22) Noda S, Sakamoto M, Aihara C, *et al.* *Lactococcus termiticola* sp. nov., isolated from the gut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. Int J Syst Evol Microbiol 2018; **68**: 3832-3836.
- 23) Noda S, Koyama F, Aihara C, *et al.* *Lactococcus insecticola* sp. nov. and *Lactococcus hodotermopsidis* sp. nov., isolated from the gut of the wood-feeding lower termite *Hodotermopsis sjostedti* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020; **70**: 4514-4522.
- 24) 金城一彦. オオシロアリタケの多様性と繁殖戦略. シロアリの事典(吉村剛 他編). 京都：海青社；2012. 90-97.



図1 高等シロアリと下等シロアリ

- A. 高等シロアリ（樹上シロアリ：タカサゴシロアリ）の巣。
B. 日本で最も分布域の広いヤマトシロアリ。

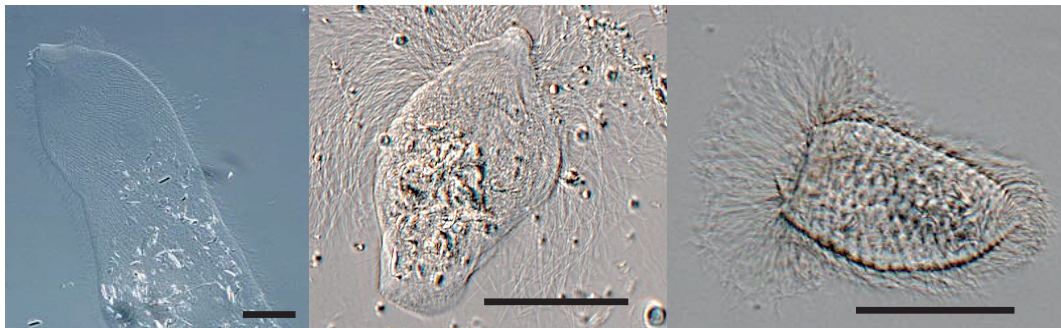


図2 シロアリ共生原生生物

細胞の大きさや形態も様々な種が混在して生息している。
白く光っているのは原生生物が取り込んだ木片。図中のバーは $50\mu\text{m}$

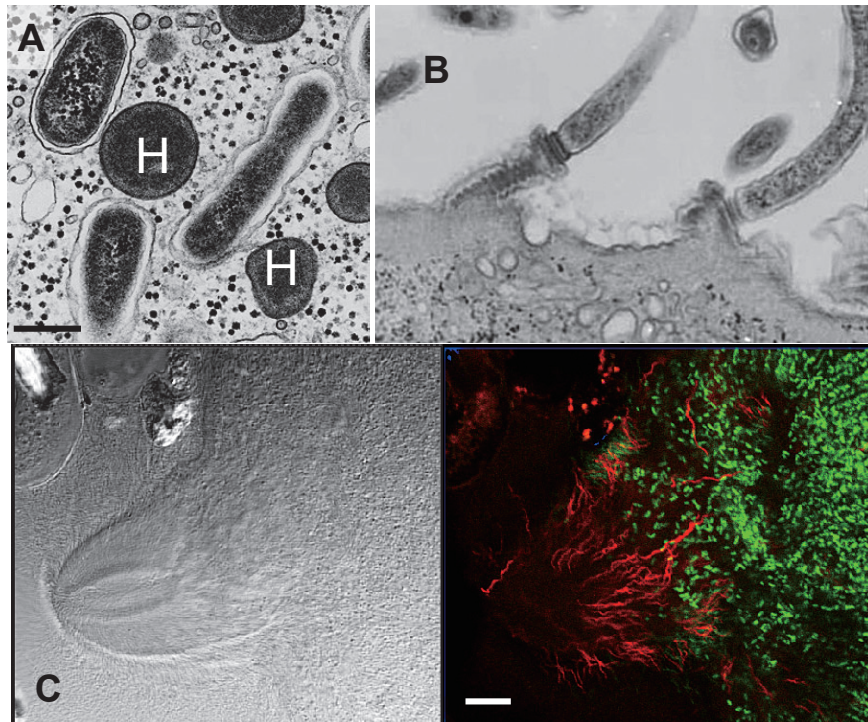


図3 シロアリ腸内の原生生物に細胞共生する原核生物

- A. 原生生物の細胞内共生細菌の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像 バーは $0.5\mu\text{m}$ 、H はヒドロゲノソーム
 B. 原生生物に付着する *Treponema* 属の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像
 C. 原生生物と細胞内 (緑)・細胞外 (赤) 共生細菌の共焦点レーザー顕微鏡像 バーは $10\mu\text{m}$



図4 キノコシロアリとシロアリキノコ

- A. タイワンシロアリの菌園 B. シロアリキノコのスープ C. シロアリキノコの子実体