

## 口頭発表 OK

## 共生・相互作用

## OK-001

Bacterial community profiles in the gut of green dock beetles *Gastrophysa atrocyanea*

○Ikeda-Ohtsubo Wakako<sup>1</sup>, Miyagi Atsuko<sup>2</sup>, Ojima Noriyuki<sup>3</sup>, Kawai-Yamada Maki<sup>2</sup>, Uchimiya Hirofumi<sup>2</sup>, Endo Ginro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, <sup>2</sup>Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, <sup>3</sup>Tohoku Gakuin Junior and Senior High School

Green dock leaf beetles *Gastrophysa atrocyanea* has a unique life-style depending on oxalate-rich diet such as *Rumex obtusifolius* plants. A recent finding showing that *G. atrocyanea* larva accumulate only a low amount of oxalate has prompted us to hypothesize that their gut microorganisms may be involved in oxalate degradation. Our feeding experiments of *G. atrocyanea* larva with tetracycline-treated *R. obtusifolius* leaves resulted in oxalate accumulation in larva and showed concentration-dependent negative effect on their fitness i.e., low survivability and reduced pupation rates. 16S rRNA gene analyses of DNA extracted from eggs and larva of *G. atrocyanea* suggested that the beetle larva harbor a unique gut bacterial community consisting mainly of lactic acid bacteria, which has probably been acquired from the *R. obtusifolius* leaves they vigorously feed on. Intriguingly, one of the major metabolites of *G. atrocyanea* larva has been shown as lactate, a metabolic end product of lactic acid bacteria. Our findings supports our current hypothesis that gut bacteria are responsible for oxalate degradation in the gut of *G. atrocyanea* larva and may therefore protect the insect host from the toxicity of oxalate.

Key words: insect gut bacteria, green dock beetles, oxalate degradation,

E-mail: wohtsubo@eng.tohoku-gakuin.ac.jp

## OK-003

## トリミエマ原虫の機能未知共生体 TC1のゲノム解析

○新里 尚也<sup>1</sup>, 齋藤 星耕<sup>1</sup>, 青山 洋昭<sup>1</sup>, 長濱 秀樹<sup>1</sup>, 砂川 春樹<sup>1,2</sup>, 松井 徹<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>琉球大・熱生研, <sup>2</sup>沖縄美ら島財団, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス

嫌気性繊毛虫の一種であるトリミエマ・コンプレッサムは、メタン生成アーキアとTC1と呼ばれるFirmicutesに属する真正細菌の2つの共生体を細胞内に保持していることが知られている。メタン生成アーキアはトリミエマ原虫のヒドロゲノソームから生じる水素をメタン化していることが推定されているが、TC1については、トリミエマ原虫の活発な増殖に必須であることが抗生物質を用いた実験で示されているものの、共生体の基本的な代謝様式や宿主への寄与は明らかとなっていない。そこで本研究ではこれらの点を明らかにすべくTC1共生体の全ゲノム解析を試みた。トリミエマ原虫を飢餓状態に置いて、餌である乳酸菌を十分に消化させた上で、TC1の分画条件の検討を行った。その結果、パーコールを用いた不連続密度勾配遠心により本共生体をほぼ純粋に精製することに成功し、この画分より約200 ngのゲノムDNAを得ることができた。このゲノムDNAを直接、またはゲノム増幅を介して、ギガシーケンサー（ロシユGS Jr.ならびにイルミナMiSeq）でのショットガン・ゲノムシーケンスに供した。その結果、リピート領域の問題等によりcompleteまでは至っていないものの、コンティグ数106、最大長約110 kbの配列を解読することができた。このデータより、TC1の推定ゲノムサイズは約1.6 Mbであり、35 kb程度のプラスミドを保持していることが明らかとなった。また、2200余りのCDSの内、約半数がORFの分断や末端の欠損等によりシールドゾーン化しており、本共生体が著しいゲノム縮退の過程にあることが示された。本発表では、これらのゲノム情報から推定されるTC1の機能についても報告する。

Key words: symbiosis, ciliate, methane, hydrogen  
E-mail: naoya-s@comb.u-ryukyu.ac.jp

## OK-002

## オオシロアリのセルロース消化共生系における代謝物の動態

○徳田 岳<sup>1</sup>, 坪井 裕理<sup>2</sup>, 木原 久美子<sup>3</sup>, 齋藤 星耕<sup>1</sup>, 守屋 繁春<sup>4,5</sup>, 菊地 淳<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup>琉球大・熱生研, <sup>2</sup>理研・環境資源, <sup>3</sup>東工大・生命理工, <sup>4</sup>理研・抗生物質, <sup>5</sup>横市院・生命医, <sup>6</sup>名大院・生命農

オオシロアリ (*Hodotermopsis sjpstedti*) は国内最大の食材料の高等シロアリであり、セルロース分解に後腸の共生原生動物が深く関与していることが知られている。本研究ではオオシロアリに<sup>13</sup>C標識セルロースを摂食させた後、2次元HSQC-NMRによって消化管内の代謝物を同定し、前腸から後腸の消化管各部位において代謝物の経時変化を解析した。また、土壌との接触の有無による消化管への微量元素の流入と窒素安定同位体比の変化にも着目した。2次元NMR解析の結果、46種類の消化管内代謝物が同定された。これらはセルロース分解物に加え、解糖系中間代謝物、TCAサイクル関連代謝物やアミノ酸などから構成されていた。セルロース分解物の代謝シグナルは摂食後ただちに前腸において増強され、遅れて中腸及び後腸においても検出された。このことは前腸がセルロースの物理的破砕だけではなく、内源性セルラーゼによる初期酵素消化に関与していることを示唆している。また、後腸では通常の解糖系代謝物に加えて、グルコースリン酸の代謝シグナルがセルロース分解と同調して増加することが確認された。このことは原生動物による通常のセルロース分解に加えて、共生細菌によるセロオリゴ糖の加リン酸分解の存在を示唆していると考えられる。いずれのアミノ酸シグナルも消化管各部のうち中腸で最も強く観察されたが、消化管全体を通じて明らかな必須アミノ酸シグナルの増強は認められなかった。シロアリと土壌との接触を遮断した場合には中腸アミノ酸の強度が減少しており、栄養交換や土壌から供給される有機物が必須アミノ酸の重要な供給源である可能性が示唆された。

Key words: termite, cellulose digestion, metabolites, symbiosis

E-mail: tokuda@comb.u-ryukyu.ac.jp

## OK-004

## 共生窒素固定細菌フランキアの突然変異株の単離

○九町 健一<sup>1</sup>, 梶 健太郎<sup>1</sup>, 山浦 真穂<sup>1</sup>, 上拂 智仁<sup>1</sup>, 玉利 大樹<sup>1</sup>, 阿部 美紀子<sup>1</sup>, 内海 俊樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大・院理工, <sup>2</sup>鹿児島大・理

フランキア (*Frankia* spp.) はアクチノリザルと呼ばれる樹木の根に共生し、窒素固定を行う多細胞性の放線菌だ。フランキアの窒素固定や共生に関わる遺伝子の多くは、同様の能力をもつ他のバクテリアとは異なると予想されるが、それらに関する知見は極めて乏しい。胞子の発芽率やプロトプラストの再生率が低く、これらを用いた変異株のスクリーニングが難しいことが原因の一つだ。そこで私たちは、菌糸断片を用いて変異株スクリーニングを試みた。まず、ウラシル要求性変異株を、5-fluoroorotic acid (5-FOA) に耐性を示すgain-of-function変異株としてスクリーニングした。得られた7種の5-FOA耐性変異株はすべて生育にウラシルを必要とした。5株は*pyrF*遺伝子にフレームシフト変異を持ち、2株は*pyrE*遺伝子に置換変異が起こっていた。次に、loss-of-function変異株のスクリーニングを試みた。変異原処理した菌糸を超音波により断片化し、菌糸末端の細胞を分裂させた。再び菌糸を断片化し、5 μmのフィルターを通すことで短い菌糸断片を集めた。この短い菌糸断片からコロニーを形成させ、次世代シーケンサーによりゲノム解析を行ったところ、調べた13株すべてにおいて突然変異が見つかった。さらに、3種の色素異常変異株と、アンモニア欠損培地での生育と窒素固定活性とに異常を示す変異株を単離した。これらの結果から、私たちの方法はloss-of-function変異株を単離するのに有効なことが分かった。

Key words: symbiosis, nitrogen fixation, auxotroph, mutant  
E-mail: kkucho@sci.kagoshima-u.ac.jp