

PK-021

Study on functional genes of termite-gut flagellate protists through single-cell analyses

○Martinez Anna¹, Yuki Masahiro², Inoue Jun-ichi^{1,3}, Ohkuma Moriya¹

¹RIKEN BRC-JCM, ²RIKEN BMPEP, ³Synaptech Inc.

Termites are ecologically important because of their ability to decompose lignocelluloses and the ability largely depends on the microorganisms, especially flagellated protists, in their gut. In addition to protists, symbiotic bacteria are known as intracellular endosymbionts or surface attached ectosymbionts of protist cells. Our purpose is to know the extent of bacterial genes having been transferred to the genomes of gut protists and the importance of Horizontal Gene Transfer (HGT) for adaptation of the gut protists to this particular environment. Based on morphological criteria, all species of symbiotic protist were isolated in single cell, by micromanipulation under microscope. By optimized protocols for cDNA synthesis from small amount of starting material, cDNA libraries were successfully constructed from 12 protist species of the termite *Reticulitermes speratus*. Actin gene is being used for genetical identification after cell sorting. And as a HGT gene from bacteria, FeFe-hydrogenase gene was identified in the gut protists belonging to the order Oxymonadida. Furthermore, to develop a high throughput method to isolate and study all those protists without cultivation, single cell sorting of immunostained protist cells are performing by flow cytometry system. Following cell sorting, whole genome amplification will be performed and genes of interest will be studied.

Key words: termite, single cell, protist, horizontal gene transfer, phylogenetic analyses
E-mail: jun-inoue@riken.jp

PK-023

ゴキブリ目昆虫における宿主生態の変化と細胞内共生細菌Blattabacteriumとの共進化動態の解析

○金城 幸宏¹, Lo Nathan², 重信 秀治³, 徳田 岳¹
¹琉球大・熱生研, ²シドニー大・生物科学, ³基生研

昆虫における細胞内共生は宿主と共生細菌との厳密な相互依存を背景に数億年も前から進化してきた。このような絶対的な共生関係の成立によって外界から隔離された細菌集団は不可逆的な進化圧にさらされ、著しくゲノムサイズが縮小していく。一方で、そのゲノム、あるいは遺伝子は構造的な安定性を維持し続けている。このような安定性は共生細菌のゲノムに対する強力な縮小進化圧に対して、遺伝子発現の効率および正確性、あるいは翻訳産物の頑健性がそれぞれ、塩基、タンパク質レベルでの制約として緩衝する事によって保たれている。しかしながら、これらの相反する進化メカニズムの相互バランスが、宿主の食性や生態の変化によってどのように影響を受けるのかは明らかにされていない。我々はこのような細胞内共生関係の動的な進化メカニズムを解明するため、食性や社会性などの生態が非常に多様化したゴキブリ目昆虫の保有する偏性細胞内共生細菌であるBlattabacteriumを研究対象にして、比較ゲノム解析を行った。その結果、社会性を有する宿主系統群において保有しているBlattabacteriumゲノムにアミノ酸合成遺伝子群の明らかな欠陥がみられ、細胞内共生細菌の役割が腸内共生微生物によって置き換わりつつある可能性が示唆された。本研究ではさらにこれらの共生ステージの異なる系統群について共生細菌ゲノムに対する機能的制約を遺伝子の発現効率・精度、翻訳産物の構造的頑健性に対する選択圧を網羅的に解析し、各機能カテゴリーに対するそれらの制約傾向の変化から、宿主-細胞内共生細菌間の共生関係の進化動態について議論する。

Key words: endosymbiont, genome reduction, translational robustness
E-mail: k128434@eve.u-ryukyuu.ac.jp

PK-022

カメムシ共生細菌Burkholderia sp. SFA1株の農薬分解機構

○佐藤 由也¹, ナバロ ロナルド¹, 青柳 智¹, 佐藤 浩昭¹, 伊藤 英臣², 多胡 香奈子³, 早津 雅仁³, 菊池 義智³, 堀 知行¹
¹産総研・環境管理, ²産総研・生物プロセス, ³農環研・生物生態機能

【背景・目的】生物の中には他の生物種と協力して生存競争を乗り越える「共生」という戦略をとるものがある。その一例として、多くの動植物がその体内に微生物を保持する「内部共生」が知られている。最近我々は、農業害虫のカメムシ類が土壤中のフェニトロチオン（有機リン系殺虫剤の一種で通称MEP）分解細菌（*Burkholderia* spp.）を体内に共生させ、MEP抵抗性を獲得するという興味深い現象を発見した。しかし、農薬分解細菌のカメムシへの感染機構や農薬分解代謝過程の全容は不明である。本研究では、ホソヘリカメムシ共生細菌である*Burkholderia* sp. SFA1株のMEP分解機構と分解代謝の中核酵素の解明を目指す。【方法・結果】MEPのカメムシ体内での動態を解明するため、安定同位体ラベルしたMEPを、農薬分解菌を共生させたカメムシに投与し生育させた。カメムシ共生器官から農薬分解菌を回収し、RNA及びリン脂質由来の脂肪酸をそれぞれ分画し、同位体標識された各分子種を定量的に評価した。その結果、投与したMEPの大部分は細菌に取り込まれていないことが示唆された。この結果から、SFA1株の菌体外もしくは細胞壁上でMEP分解が行われることが推測された。MEPを炭素源にSFA1株を培養したところ、その培養上清からMEP分解活性が検出され、菌体外でのMEP分解の可能性が強く示唆された。本発表では、菌体外タンパク質のTOF-MS解析、菌体のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析などについて報告し、SFA1株におけるMEP分解過程およびMEP分解酵素について総合的に議論する。

Key words: symbiosis, pesticide degradation, insect, Burkholderia

PK-024

ホソヘリカメムシ共生細菌Burkholderia sp. RPE64株の比較ゲノム解析

○竹下 和貴¹, 二河 成男², 柴田 朋子³, 前田 太郎⁴, 西山 智明⁴, 重信 秀治⁵, 長谷部 光泰^{3,6}, 深津 武馬¹, 菊池 義智¹
¹産総研・生物プロセス, ²放送大・教養, ³基生研, ⁴金沢大・学際科学実験セ, ⁵総研大・院生命科学

多くの動植物がその体内に共生微生物を保有し、緊密な相互作用を行っているが、共生の遺伝的基盤についてはいまだ不明な点が多い。大豆の害虫であるホソヘリカメムシ (*Riptortus pedestris*) は*Burkholderia*属の共生細菌を環境土壌中より獲得し、共生器官である中腸盲嚢部に共生させている。*Burkholderia*共生細菌は単離培養が容易で遺伝子組み換え技術も確立されている。加えて宿主であるホソヘリカメムシのRNAiが容易なことから、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia*共生系は宿主・共生者の双方から実験アプローチが可能なモデル系として近年注目が集まっている。最近、ホソヘリカメムシ野外採集個体から単離された*Burkholderia*共生細菌株 (RPE64株)、および土壌から単離された共生細菌株 (YI23株) のゲノム配列が相次いで決定された。本研究では、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia*モデル系における共生の遺伝的基盤の解明を目指して、RPE64株・YI23株のゲノムと、既にゲノム配列が決定済みの非共生性*Burkholderia*属細菌34株との比較ゲノム解析を行った。全36株の遺伝子レパートリを比較したところ、共生細菌系統 (RPE64株+YI23株) に特異的な遺伝子が多数見つかった。これらの遺伝子には、接着性線毛の一部をコードする*Tad* (tight adherence) 遺伝子など細菌の細胞表層構造に関わる遺伝子が含まれており、これらがホソヘリカメムシ-*Burkholderia*共生系における共生者側の“共生因子”である可能性が示唆される。

Key words: Symbiotic bacteria, *Burkholderia*, Comparative genomics