

---

## Review

---

### シロアリ共生鞭毛虫の特徴と宿主との関係

北出 理

茨城大学理学部理学科  
〒310-8512 水戸市文京2-1-1

### *Characteristics and host-symbiont relationships of termite gut flagellates*

Osamu KITADE

College of Science, Ibaraki University, Mito 310-8512, Japan

#### はじめに

シロアリがその消化管内に複数種の鞭毛虫を共生させ、その両者が相利共生の関係にあることはよく知られる。シロアリは主として木材を摂食するが、そのセルロース成分の分解には鞭毛虫のつくセルラーゼが大きな役割を果たしている。シロアリは熱帯・亜熱帯域を中心に3000種近い種数をもつ多様性の高い分類群であり、同時にバイオマスも非常に大きい。このような生物学的成功をもたらした要因は、一つは家族集団での生活と非繁殖カーストの進化に由来する高度な社会性の獲得だと考えられるが、もう一つは微生物と共生関係を結ぶことで多くの動物にとっては利用が難しい、植物の材成分の利用を可能にしたことであろう。本稿ではシロアリと共生する鞭毛虫について、分類学・系統学的位置づけと生態の特性を宿主昆虫との関係を中心に概説するとともに、日本で普通なヤマトシロア리를例に、その簡便な観察の方法について紹介する。

#### 宿主昆虫の分類と系統について

シロアリ目は全部で7科からなっている(図1)。このうちシロアリ科を除く6科は下等シロアリと総称

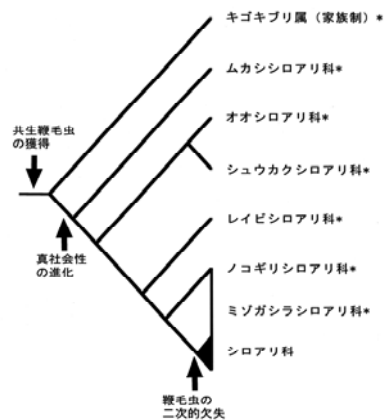


図1. シロアリの科間の、分子系統解析から推定される系統関係。シロアリ目の姉妹群はゴキブリ目のキゴキブリ科と推定されている。\*は共生鞭毛虫を消化管内に保有する科であり、鞭毛虫の獲得はシロアリとキゴキブリの共通祖先で、シロアリの真社会性の進化に先立って起こったと考えられる。

Tel: +81-29-228-8375 Fax: +81-29-228-8404

E-mail: kitade@mx.ibaraki.ac.jp

Received: 4 January 2007

され、これらの科のシロアリは後腸の後腸嚢内に嫌気性の共生鞭毛虫を保有する。また、ゴキブリの中で食材性のグループであるキゴキブリ属 *Cryptocercus* は、シロアリと同じグループの鞭毛虫を消化管内に保有する。近年の宿主昆虫の分子系統学的解析から、ゴキブリ目は単系統群ではなく、シロアリ目をその中に含む形で単系統群を構成することが示されており、シロアリ目の姉妹群がキゴキブリ属であることが示されている (Lo et al., 2000)。シロアリ目の中で、シロアリ科は比較の後から他の群から分岐したグループであり、シロアリ科における鞭毛虫の消失は二次的に生じたものと考えられる。

## 鞭毛虫の分類学的な位置づけ

シロアリ類の共生鞭毛虫は、従来の分類ではオキシモナス綱に属する「オキシモナス目」と、副基体綱 (パラバサリア綱) に属する、単一の鞭毛系をもつ単純な体制の「トリコモナス目」、および多数の鞭毛系をもつ「超鞭毛虫目」として位置づけられてきた。

最近、Brugerolleらは、電子顕微鏡で観察される鞭毛系の微細構造の知見等に基づいて副基体綱内部の高次分類の変更を提唱した (Brugerolle & Patterson, 2001; Brugerolle & Radek, 2006, 表1)。以下、基本的にこの分類に従って共生鞭毛虫各グループの形態的特徴について概説する。より詳細な、特に微細形態の特徴についてはBrugerolle & Radek, 2006を参照されたい。

表1. シロアリ類に共生する鞭毛虫の分類と、代表的な属。T: 従来の分類 (Brugerolle & Lee 2001a,b) でトリコモナス類とされていたもの、H: 超鞭毛虫類とされていたもの。

Brugerolle & Patterson (2001)	シロアリ類に共生する代表的な属
オキシモナス綱 Oxymonada	
オキシモナス目 Oxymonadida	
1. Polymastigidae科	<i>Monocercomonoides</i>
2. Saccinobaculus科	<i>Saccinobaculus</i>
3. Oxymonadidae科	<i>Notila, Oxymonas</i>
4. Streblomastigidae科	<i>Streblomastix</i>
5. Pyrsonymphidae科	<i>Dinenympha, Pyrsonympha</i>
副基体綱 Parabasala	
トリコモナス目 Trichomonadida	
6. Monocercomonadidae科 (T)	<i>Hexamastix, Monocercomonas</i>
7. Trichomonadidae科 (T)	<i>Trichomitopsis, Trichomonoides</i>
クリスタモナス目 Crystamonadida	
8. Devescovinidae科 (T)	<i>Devescovina, Metadevescovina, Mixotricha</i>
9. Calonymphidae科 (T)	<i>Calonympha, Stephanonympha, Snyderella</i>
10. Lophomonadidae科 (H)	<i>Prolophomonas</i>
11. Joeniidae科 (H)	<i>Joenia, Joenina, Placojoenia</i>
12. Kofoidiidae科 (H)	<i>Kofoidea</i>
13. Deltotrichonymphidae科 (H)	<i>Deltotrichonympha</i>
トリコニンファ目 Trichonymphida	
トリコニンファ亜目 Trichonymphina	
14. Hoplonymphidae科 (H)	<i>Hoplonympha, Idionympha</i>
15. Staurojoeniidae科 (H)	<i>Barbulanympha, Staurojoenia</i>
16. Trichonymphidae科 (H)	<i>Trichonympha</i>
17. Eucomonymphidae科 (H)	<i>Eucomonympha, Pseudotrichonympha</i>
18. Teranymphidae科 (H)	<i>Teranympha</i>
19. Spirotrichosomidae科 (H)	<i>Spirotrichosoma</i>
スピロトリコニンファ亜目 Spirotrichonymphina	
20. Spirotrichonymphidae科 (H)	<i>Microjoenia, Spirotrichonympha, Spironympha</i>
21. Holomastigotoididae科 (H)	<i>Holomastigotoides, Rostronympha</i>
22. Holomastigotidae科 (H)	<i>Holomastigotes</i>

### オキシモナス綱の形態的特徴

オキシモナス綱からは12属が知られ、このうち8属がシロアリから、3属がキゴキブリから見つかっている。10属はシロアリかキゴキブリからのみ見いだされるグループである。オキシモナス目は基本的に、preaxostyleという構造で隔てられた2つの「2つの基底小体と2本の鞭毛の組」からなる特殊な鞭毛系をもつ。鞭毛は細胞の前端部から生じて遊離するが(図2a)、一部の属では細胞表面に付着し、らせん状にこれを取り巻いて後端に達し、さらに遊離する(図7a-i)。種によっては体表面に波動膜状の構造をつくる。核は細胞の前端部近くに位置する。またpreaxostyleから生じ、体を前端部から後端までつらぬく、軸桿(axostyle)という微小管で構成される支持器官をもつ(図2a)。軸桿は運動性で、グループによっては鞭毛よりもむしろこれを激しく動かすことで細胞を運動させる。ゴルジ体は知られておらず、ミトコンドリアのような膜構造をもつエネルギー産生オルガネラもみつかっていない。

### 副基体綱の形態的特徴

副基体綱の種は、数個の基底小体-鞭毛の複合体からなる典型的な鞭毛装置をもち、ミトコンドリアを欠く代わりに嫌氣的なエネルギー産生器官であるhydrogenosomeをもつ。またゴルジ体の集合した副基体(parabasal body: 図2b, c, e, f)といわれるオルガネラを保有する。

Brugerolle & Patterson (1991)は、副基体綱をトリコモナス目・クリスタモナス目・トリコニンファ目に分け、さらにトリコニンファ目をトリコニンファ亜目とスピロトリコニンファ亜目に分けた(以下これらの群について「-類」と表記する)。トリコモナス類はシロアリのほかに、昆虫を含む動物の消化管内から見いだされ、わずかに自由生活性のグループを含むが、それ以外のグループはシロアリ目かキゴキブリ属の消化管からのみ知られる。

「トリコモナス類」: 単核の鞭毛虫で、3-5本の前鞭毛(anterior flagella)、1本の、前鞭毛と直行する方向に生じる後曳鞭毛(posterior flagellum)、激しい運動性をもたない軸桿、副基体のセットからなる鞭毛系(akaryomastigont)を備える。後曳鞭毛が細胞表面に波動膜構造をつくる属が多く、それらでは膜の支持器官であるコスタ(costa)が発達する。「クリスタモナス類」: 従来トリコモナス目に分類されていた単核1鞭毛系の種、多核・多鞭毛系の種と、超鞭毛虫目に含まれていた単核・多鞭毛系の種を含

むグループである。Devescovinidae科(図2c)はトリコモナス類同様に単核で、3本の前鞭毛と、時にリボン状の1本の後曳鞭毛をもつ。波動膜はないが、コスタに似たクレスト(cresta)と呼ばれる構造をもつ。Calonymphidae科(図2d)では核と鞭毛系がともに多数に増加している。Lophomondidae科やJoeniidae科では、単核であるが鞭毛系が多数になっている。

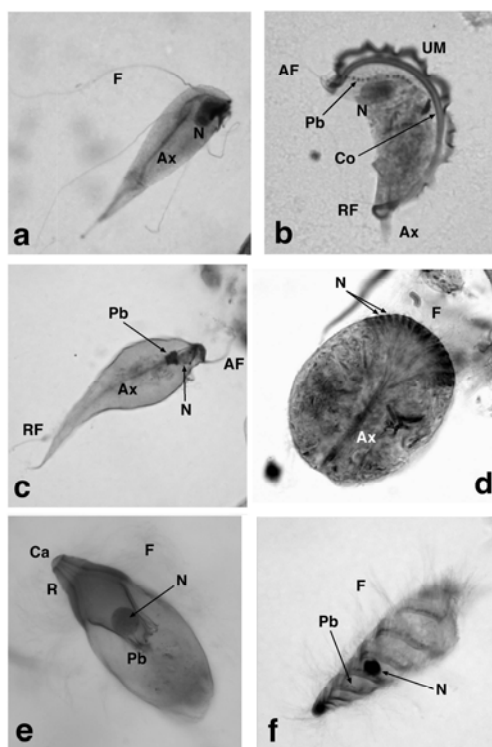


図2. 各グループの共生鞭毛虫。a: オキシモナス類の *Oxymonas* sp. (宿主: キゴキブリ *Cryptocercus kyebangensis*)。b: トリコモナス類の *Trichomitopsis* sp. (ヒマラヤオオシロアリの1種 *Archotermopsis* sp.)。c: クリスタモナス類の *Devescovina* sp. (コウシュンシロアリ *Neotermes koshunensis*)。d: 同じくクリスタモナス類の多核鞭毛虫 *Stephanonympha* sp. (コウシュンシロアリ)。体の前端部に多数の核が集まっている部位があり、多数の鞭毛が生じる。e: トリコニンファ類の *Trichonympha agilis* (ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus*)。f: スピロトリコニンファ類の *Spirotrichonympha* sp. (アマミシロアリ *Reticulitermes amamianus*)。N: 核、F: 鞭毛、AF: 前鞭毛、RF: 後曳鞭毛、UM: 波動膜、Pb: 副基体、Ax: 軸桿、Co: コスタ、R: rostrum、Ca: cap. Schaudinn液固定、プロタルゴール染色。

「トリコニンファ類」(図2e)：大型で数百から数千の鞭毛系をもつ、単核・多鞭毛系の鞭毛虫のグループである。細胞はrostrumとよばれる細胞前部の突出した構造を備え、先端部にcap構造を持つ。体の基本構造は二軸相称であり、多数の鞭毛系がrostrum部分、あるいはその後部にも列状に配置している。放射状に配置される副基体をもつ。「スピロトリコニンファ類」(図2f)：単核・多鞭毛系のグループで、小型から大型の種を含む、二軸相称の基本体制をもち、細胞前端部から鞭毛系が2-8列のらせん状の列をなして配置する。副基体も鞭毛系の列に沿って配置される。

### 副基体類・オキシモナス類の分子系統学的解析

副基体類、オキシモナス類はともにミトコンドリアを欠く嫌気性の鞭毛虫である。広範囲の真核生物を対象にした初期の分子系統学的研究では、副基体類はディプロモナス類(Diplomonads)とともに、真核生物の最初期に分岐した群であることがSSU rRNA遺伝子の配列から推定され(Sogin, 1991)、ミトコンドリアと真核生物の共生成立以前に他から分岐したグループではないかとして注目を浴びた。しかし、その後これらの類からミトコンドリア型の遺伝子が見つかり(Germot, et al., 1996; Hashimoto et al., 1998)、現在では、副基体類はいったんミトコンドリアを獲得した後、それがhydrogenosomeへ変化したと考えられている。

近年では、多数の遺伝子の配列情報から真核生物の主要分類群の系統推定が試みられるようになった(Keeling & Leander, 2003; Arisue et al., 2005; Hampl et al., 2005; Simpson et al., 2006)。現時点ではまだ、真核生物の諸分類群が共通祖先から分岐していった過程について、決定的な結果は得られていない状況にあるが、副基体類・オキシモナス類、さらにJakobids・Euglenozoa・Trimastixなどを含め「excavates」と総称される諸分類群は、この過程を推定する上で重要なグループであるといえる。Simpson et al. (2006)は6遺伝子を用いてexcavatesの9群を含めた真核生物全体の解析を行っており、オキシモナス類はTrimastixと、副基体類は(ディプロモナス + Carpediemonas)の群と各々姉妹群になることが強く示唆されている。副基体類とディプロモナスの近縁性はArisue et al. (2005)でも支持されている。

シロアリに共生する副基体類内部の系統関係についても、1990年代後半から分子系統学的研究が活発に行われてきた。これらの研究では、宿主消化管内

で複数種が混じって存在する鞭毛虫の塩基配列を決定するために、マイクロマニピュレータによる釣り出し(Berchtold & König 1995; Dacks et al., 2001; Keeling et al., 1998; Keeling, 2002)や、複数種の鞭毛虫を含むシロアリ消化管内容物からDNAを抽出し、標的遺伝子をクローニング・配列決定したのちにin situハイブリダイゼーションで由来する鞭毛虫を同定する手法(Ohkuma et al., 1998, 2000; Gerbod et al., 2002)が用いられている。

最近のSSU rRNA遺伝子を用いた最尤法による系統解析(Hampl et al., 2004; Ohkuma et al., 2005)によれば、従来「超鞭毛虫」としてまとめられてきた、多数の鞭毛系を持つ種は単系統群にはならない(図3)。表1の分類群では、クリスタモナス類、スピロトリコニンファ類が単系統群になることは強く支持される。トリコニンファ類も単系統群になるが、単系統性は相対的に弱くしか支持されない。トリコモナス類は単系統群ではないと考えられる。副基体類の中で、単一鞭毛系の祖先種から多数の鞭毛を持つ複雑な体制の種へと形態の進化がおこったと仮定すれば、鞭毛系、もしくは鞭毛装置の増加は少なくともクリスタモナス類、スピロトリコニンファ類、トリコニンファ類でそれぞれ独立に生じたものと推定される。またクリスタモナス類のCalonymphidae科でみられる、多核化をともなった鞭毛系の増加も、クリスタモナス類の中で少なくとも2回独立に生じた可能性がある。

オキシモナス類に関しても、EF1- $\alpha$ 遺伝子(Moriya et al., 1998)やSSU rRNA遺伝子(Moriya et al., 2003; Stingle & Brune, 2003)を用いた解析が行われており、Hampl et al., 2005は、SSU rRNA遺伝子で((*Monocercomonas*・*Streblomastix*) ((*Pyrsonympha*・*Dinenympha*) *Oxymonas*))という関係を推定している。

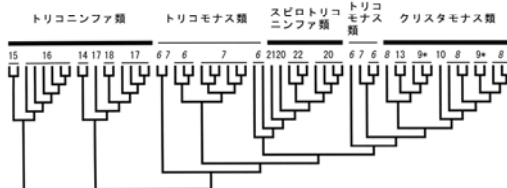


図3. 副基体綱の各分類群間のSSU rRNA遺伝子の配列に基づいて推定された無根系統樹。Ohkuma et al. (2005)に基づいて作図した。枝の末端の数字は表1の科の番号に対応し、斜体は単核単鞭毛系の科、\*は多核の科を示す。

オキシモナス類、副基体類ともに、現時点では解析に含められていない分類群が多く残されている。また副基体類のSSU rRNA遺伝子による系統推定では、おそらく進化速度が分類群間で大きく異なるため樹形の推定に誤りが生じやすいこと、ごく近縁な分類群が無いために系統樹の根の位置の推定が難しいこと、等の問題点が指摘されている (Hampl et al., 2004)。このため、信頼性の高い系統推定を行うためには、形態による分類学的検討を進めるとともに、解析する遺伝子の数も増やしていく必要がある。最近、Gerbod et al. (2004)やOhkuma et al. (2007)は4遺伝子を用いて副基体類の、Keeling & Leander (2003)は5遺伝子を使ってオキシモナス類の一部の系統推定を試みている。今後、より多様な共生鞭毛虫の分類群に対して、複数の遺伝子による解析が進められることが期待される。

### 宿主シロアリとの関係と鞭毛虫の生態

シロアリは社会性昆虫であり、職蟻・兵蟻・幼虫・有翅繁殖虫(王・女王)・ニンフ(1-数回の脱皮を経て有翅繁殖虫になる個体)など、異なるカスト(階級)の個体が家族集団である「コロニー」を構成して、共同で生活する(図4)。これらのカストのうち、とくに職蟻では後腸の一部が大きく発達し、後腸嚢とよばれる。後腸嚢の中には多数の共生鞭毛虫がぎっしりと詰め込まれている。

Yamin (1979)の共生鞭毛虫の記載論文をまとめたチェックリストによれば、1979年時点までに、約205種のシロアリと2種のキゴキブリから434種の鞭毛虫が記載されている。宿主シロアリが保有する鞭毛虫の種は、シロアリの種によって決まっている。シロアリの属によっては保有する鞭毛虫が1種の場合もあるが(Kitade, 2004)、通常1個体のシロアリは複数種の鞭毛虫をもつため、後腸嚢内には鞭毛虫の群集が存在するとみなすことができる。日本で最も普通に見られるヤマトシロアリ*Reticulitermes speratus*では、未記載種も含めて少なくとも13種の鞭毛虫が確認されており、またキゴキブリの1種*Cryptocercus punctulatus*では25種にのぼる。

ヤマトシロアリの野外コロニーから得られた職蟻の場合、後腸内の鞭毛虫の総個体数はしばしば10万を越える(Yamaoka, 1986)。鞭毛虫の種により個体数は異なり、シロアリ1個体あたり数十個体の種から、多いものでは約3万個体の種までである(権田・北出、未発表)。兵蟻や老齢ニンフ、有翅虫では後腸嚢はあまり発達せず、鞭毛虫の個体数も少ない。

アリやシロアリなどの社会性昆虫は、コロニー内

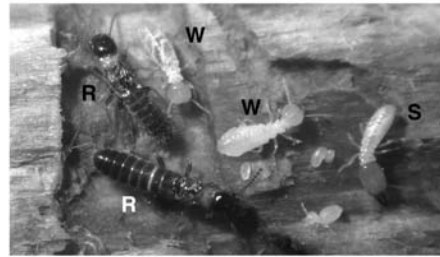


図4. カンモンシロアリ*Reticulitermes kanmonensis*の創設初期のコロニー。職蟻(W)、繁殖虫(R)、兵蟻(S)と、孵化後間もない幼虫や卵が見える。コロニーが成長すると構成個体は数万、報告によれば数十万に達する。

の個体間で、しばしば栄養交換を行うことが知られる。シロアリではとくにproctodeal feeding(肛門食)とよばれる肛門から口への消化管内容物の受け渡しがよく見られ、この際に共生鞭毛虫が個体間で伝達される(Andrew 1930)。シロアリの卵から孵化した直後の若い幼虫は鞭毛虫を全く保有していない。またシロアリは脱皮を何度も繰り返しながら成長するが、脱皮の際には鞭毛虫のほとんどは失われる。これらの個体は、肛門食を通じて共生鞭毛虫を回復する(Yamaoka, 1986; Kitade & Matsumoto 1997)。失われた共生鞭毛虫を周りの個体から回復する必要があることは、シロアリの社会性の進化要因、あるいは重要な維持要因の一つと考えられている(松本, 1993)。

共生鞭毛虫は通常縦分裂による無性生殖を行う。キゴキブリの共生鞭毛虫では、宿主のホルモン量の変化に反応し、脱皮と同期して有性生殖(接合)を行うものが数種類知られ、その多くは接合した後にシスト形成を行う。これに対してシロアリの共生鞭毛虫からは有性生殖はまれにしか報告されていない(Honigberg, 1970)。

### 消化管内共生系とセルロースの分解

シロアリの後腸嚢内には鞭毛虫と共に多数の細菌(真正細菌・古細菌)が存在する。多くの鞭毛虫で、特定の細菌が細胞内に入り込んで共生していたり、細胞表面に付着していたりするものが確認されている(Brune & Stingl, 2005; Noda et al., 2005とその引用文献)。最も有名なものはムカシシロアリ*Mastotermes darwinensis*の鞭毛虫*Mixotricha paradoxa*

と細胞表面に付着するスピロヘータであろう。この鞭毛虫は自身の鞭毛ではなく、体表面に付着したスピロヘータの運動により消化管内を泳ぐ(Cleveland & Grimstone, 1969; Wenzel et al., 2003)。またムカシシロアリでは、後腸嚢内にいる細菌の大部分が、鞭毛虫細胞内あるいはその表面に存在することが推定されている(Berchtold et al., 1999)。

鞭毛虫群集はその食物源をシロアリが摂食した木材に依存する。逆に、共生鞭毛虫をもつ下等シロアリの側は、摂食した材のセルロースの分解のために、鞭毛虫のもつ分解系が必須である。下等シロアリでは、鞭毛虫を高圧酸素等で除去するとシロアリ自身も死んでしまうが、鞭毛虫を再感染させれば生き延びることができる(Cleveland, 1924)。鞭毛虫はシロアリが摂食した木材片を細胞内に取り込み、その成分であるセルロースを嫌氣的に酢酸、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>に分解する(井上, 2001、大熊他, 2001)。生じた酢酸はシロアリにより好氣的に分解され、エネルギー源として利用される。

鞭毛虫の種により、セルロース分解過程への関与のし方は異なる可能性がある。少なくとも材の取り込み能力について、イエシロアリ *Coptotermes formosanus* では、後腸内に3種いる共生鞭毛虫のうち、大型の *Pseudotrichonympha* 属の種は比較的大きな材片しか取り込み・利用ができないが、*Holomastigotoides* 属・*Spirotrichonympha* 属の2種は半ば可溶化したような小さい断片でも利用できることが示唆されている(Yoshimura et al., 1993)。セルロース分解に関わるセルラーゼ遺伝子は、現在では数種の鞭毛虫から取得されている(Ohtoko et al., 2000; Nakashima et al., 2002a; Watanabe et al., 2002; Inoue et al., 2005)。その一方、宿主であるシロアリ自身もセルラーゼを産生し(Watanabe et al., 1998)、セルロース分解を行う系をもつと考えられる(渡辺・徳田, 2001; Nakashima et al., 2002b; Li et al., 2006)。共生鞭毛虫をもたないシロアリ科のシロアリでは、シロアリ自身の系だけでセルロース分解を行うと考えられている。

セルロース分解によって生じた「廃棄物」であるCO<sub>2</sub>やH<sub>2</sub>は、鞭毛虫の細胞質内に共生して、あるいは消化管内に遊離して存在する細菌により、酢酸やメタンに代謝される。この酢酸はさらにシロアリに吸収され、エネルギー源として利用されている(井上, 2001; 大熊他, 2001)。すなわち、シロアリの消化管内では、単に鞭毛虫だけでなく、種々の細菌を含めた多様な微生物の共同による、巧みな木質分解系が成立しているということができる。シロアリ消化管内の微生物共生系については、Inoue et al. (2000)、Breznak (2000)、井上(2001)、大熊他(2001)、

Ohkuma (2003)、Brune & Stingl (2006)、そこではたらくセルラーゼとセルロース分解の詳細については渡辺・徳田(2001)、Li et al. (2006)等も参照されたい。

### 腸内鞭毛虫群集の特徴と、宿主系統の影響

シロアリの共生鞭毛虫群集はそのほとんど全ての構成種が強い寄主特異性を示す。これは、(1)シロアリの巣仲間間で肛門食により鞭毛虫の受け渡しが行われること、(2)新しい巣が創設される際に新たな王・女王のペアは母巢の鞭毛虫組成を引き継ぐこと、(3)鞭毛虫が嫌氣性で環境に耐性のあるシスト等をつくらないことにより、世代間で一種の垂直感染が実現されるためである。このような強い宿主特異性は、消化管内共生(寄生)生物の群集としてはかなりめずらしい(Inoue et al., 2000)。

このような特性のため、宿主の系統関係が鞭毛虫の組成に強く影響を及ぼしている可能性が指摘されてきた(Kirby, 1937; Honigberg, 1960; Inoue et al., 2000)。著者らは日本周辺に分布するヤマトシロアリ属の種で、腸内鞭毛虫の組成を調査した。同じ種のシロアリは同じ鞭毛虫組成を保有するが、組成の類似性のパターンが、シロアリの生息地とその地史(Kitade & Matsumoto, 1993)、さらに宿主の系統樹とも対応することから、組成の規定の主要因は宿主の系統であることが示唆される(図5)。またシロアリの各属が保有する鞭毛虫の属組成は、単系統性が支持されるシロアリの科ごとに似たものになることも指摘されている(Kitade, 2004)。最近、著者らはミゾガシラシロアリ科のシロアリ・*Pseudotrichonympha*属の鞭毛虫・鞭毛虫の細胞内に共生するBacteroidales目の真正細菌、という3重の共生体について、各々系統推定を行い、共進化の過程を検討した。その結果、シロアリと鞭毛虫の間にはほぼ完全な樹形の一致が見られ、両者の共種分化の過程が裏付けられている(Noda et al., 2007)。例外的に、一部のシロアリの属では、近縁な属と大きく異なる鞭毛虫を持つ場合があり、これらの祖先では鞭毛虫の系統間水平感染が生じたかもしれない。

### 共生鞭毛虫の観察のための、シロアリの採集法

日本には約30種のシロアリが生息するが、この中で最も分布域が広く、容易にみつけれられる種がヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* (Kolbe)である。本種を材料にすれば、比較的簡単に共生鞭毛虫を生きた状態で観察することができる。ヤマトシロアリ

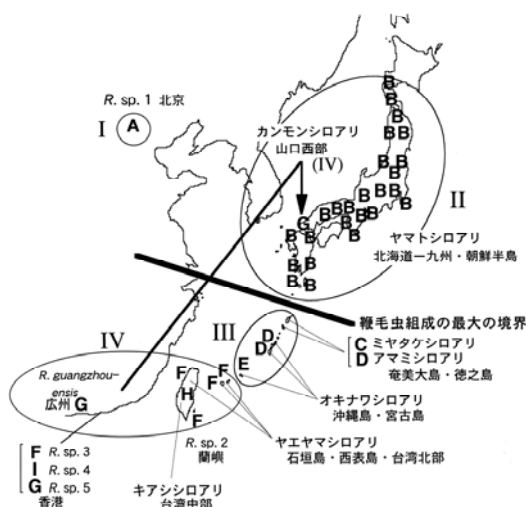


図5. 日本周辺のヤマトシロアリ属の鞭毛虫組成とその類似性。各種のシロアリのコロニーが持っていた鞭毛虫の種組成の違いをA-Iの記号で示す。これらの組成は、その類似性にもとづいてI-IVの群に分けられるが、人為的移入種（カンモンシロアリ）を除けば地理的な分布とも対応する。さらに組成の類似性の最大の境界は日本列島の古地理における障壁（トカラ海峡）と一致する。Kitade & Matsumoto (1993)に基づいて作図。

は、北海道南部（旭川周辺が北限）から屋久島・種子島・トカラ海峡北部にかけての地域に分布する。

（奄美諸島以南の琉球列島には、同属の別種が地域ごとに分布する。）本種は海岸林から低地林にかけて多く見られ、一般に緯度や標高が高く冬季に寒いところでは生息密度は低くなる。

シロアリを採集する際には、鋳物用のチゼルハンマーや、バチグワとよばれる小型のクワ、あるいは小型ツルハシの平たい側などを用いるとよい。これで朽ちた倒木や枯枝、切り株を壊しながらシロアリを探す（図6a）。ヤマトシロアリは雑木林の枯死木や公園林の杭などにも普通に生息するが、とくにアカマツやクロマツを好むため、松林を探すとみつけやすい。落葉・常緑広葉樹林でもよくみられるが、スギやヒノキの植林には少ない。また、春と秋には地表の枯死木に多くの個体が採餌に出るため採集しやすい。

朽ち木の中にシロアリが見つかったら、少数の個体を採ればよい場合は、吸虫管とよばれる小型昆虫を吸い集める道具を用いて虫を集め、巣のあった木とともにプラスチックの箱に入れ、ビニルテープで

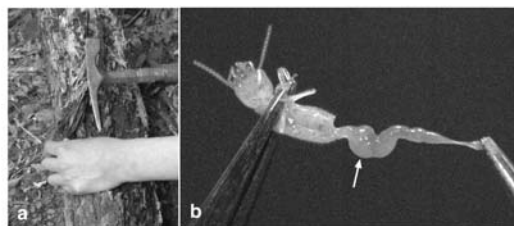


図6. a: 朽ち木を壊してシロアリのコロニーを探しているところ。b: ピンセットで消化管を抜き取るところ。矢印の膨らんでいる部分が後腸囊。

ふたをとめる。多数の個体が必要な場合は、営巣木をノコギリで適当な長さに切り、農業用コンバイン袋などに入れて持ち帰る。共生鞭毛虫は高温に弱く、およそ35℃を越えるとシロアリより先に死滅してしまうため、特に夏季には直射日光が当たらないよう気をつける必要がある。

採集したシロアリをしばらく飼育する場合、小型容器で採集した時はそのまま、多数の個体を採取した時は大型のタッパー容器やプラスチック製衣装ケースなどに入れておく。材が乾燥しないよう適度に水をやり、温度が30℃以上に上がらないように注意すれば、しばらくの間そのまま保持できる。シロアリは低酸素条件には強いようで、特に空気穴を開ける必要はない。

### 簡便な鞭毛虫の生体観察法

光学顕微鏡を用いて、シロアリの消化管から取り出してすぐに生体の観察を行えば、多数の鞭毛虫の非常に活発な運動を観察できる。

まず、よく先端の尖ったピンセットでシロアリの胸部をつまみ、これを左手に持ち替える。もう一つのピンセットでシロアリの腹部の後端をつまみ、そのまま引っ張ると、消化管の中腸から後腸にかけての部分抜き取ることができる（図6b）。このとき抜き取る側のピンセットを、より尖ったものにしてやると成功しやすい。スライドガラス上に適量のNaCl水溶液を滴下しておき、その中で抜き取った消化管の後腸組織をピンセットで壊してやると、鞭毛虫が液中に遊離する。これにカバーガラスをかけてそのまま顕微鏡で検鏡すればよい。食塩水はヤマトシロアリなどミゾガシラシロアリ科の種では0.45%、それ以外の科では0.6%程度がよい。

微分干渉顕微鏡を用いると、微細な構造や鞭毛の

動きまでよく観察できる。明視野検鏡を行う場合は、開口絞りを絞って見ると観察しやすい。消化管内容物中には桿状の細菌や菌糸状に連なった細菌、あるいは鞭毛虫に付着するものを含む多数のスピロヘータも見ることができる。鞭毛虫は動きも面白く見飽きないが、嫌気性であるため、消化管から取り出すと数分で死ぬ。検鏡している場合にはカバーガラスの周縁部のほうから徐々に死んでくる。食塩水の代わりにTrager (1934)のSolution Uを用いると、生存時間が改善されるようである。

### ヤマトシロアリの共生鞭毛虫

ヤマトシロアリから見いだされる共生鞭毛虫の種類と、特に生体の検鏡で観察できる特徴を以下に説明する。体サイズはKoidzumi (1921)、森本(1965)、安藤他(1991)による。

### オキシモナス類

#### 1. *Pyrsonympha grandis* Koidzumi (図7a)

オキシモナス類の中では大型の種で、体長40-170 $\mu\text{m}$ 、体幅10-50 $\mu\text{m}$ 。核は大きく細胞前端部にある。体の前端から生じた鞭毛が体表面に付着して互いに平行に細胞をらせん状に巻き(鞭毛条)、後端近くに達して遊離する。鞭毛条は隆起して波打ち、しばしば波動膜状の稜をつくる。大きさや概形に変異が大きい。とくに宿主腸壁に前端部で付着する個体もみられ、その場合体は非常に細長くなる。体表に疎にスピロヘータが付着する場合もある。よく木材片を取り込む。

#### 2. *Pyrsonympha modesta* Koidzumi (図7b)

前種より小型で体長30-80 $\mu\text{m}$ 。核は球形で体の前端部にある。鞭毛条ははっきり隆起せず、波打たない。木材片をとりこむ。スピロヘータの付着はない。

#### 3. *Dinenympha exilis* Koidzumi (図7c)

非常に細長い種で、50-100 $\times$ 4-8 $\mu\text{m}$ 。鞭毛条は螺旋の巻きがゆるやかで、隆起がほとんどなく目立たない。核は原記載と異なり、通常細胞の中央部かやや後方にある。木材片の取り込みはみられるが、あまり活発ではない。

#### 4. *Dinenympha rugosa* Koidzumi (図7d)

同じく細長い種で体長は全種と同程度、体幅は約2倍である。鞭毛条がかなり隆起し、螺旋の巻きもやや強く、ジグザグな概形。核は細胞の中央部かやや後方にある。木材片を取り込む。

#### 5. *Dinenympha leidy* Koidzumi (図7e)

体は太く、後端部でより太くなって強くねじれ、

蛇がとぐろを巻いているような概形である。鞭毛条は明瞭で、体の後端より鞭毛が非常に長く遊離する。核は体の前端部。体表の前端と後端にスピロヘータが付着し、中程にも疎につく。活発に木材片を取り込む。

#### 6. *Dinenympha parva* Koidzumi (図7f)

ヤマトシロアリのオキシモナス類の中では小型の種で、20-40 $\times$ 3-5 $\mu\text{m}$ 。体は先端部以外はほとんど曲がらない。鞭毛条はあまり目立たない。核は体の前端部。細胞表面に付着する共生細菌がやや粗い顆粒状に確認できる。木材片の取り込みはほとんど確認できない。

#### 7. *Dinenympha porteri* Koidzumi

*D. leidy*にやや似るが、体の後端はより細くなる。鞭毛条の隆起は弱い。木材片を取り込む。体表へのスピロヘータの付き方等を指標にKoidzumi (1921)は4つの形態型に分けている。Type 1 (図7g)：スピロヘータは付着しない。30-60 $\times$ 7-15 $\mu\text{m}$ で体の両端が尖る。Type 2 (図7h)：スピロヘータが体の前端と後端に付着する。大きさや概形はType 1と同様。Type 3 (図7i)：前2タイプよりは細長く、25-80 $\times$ 6-

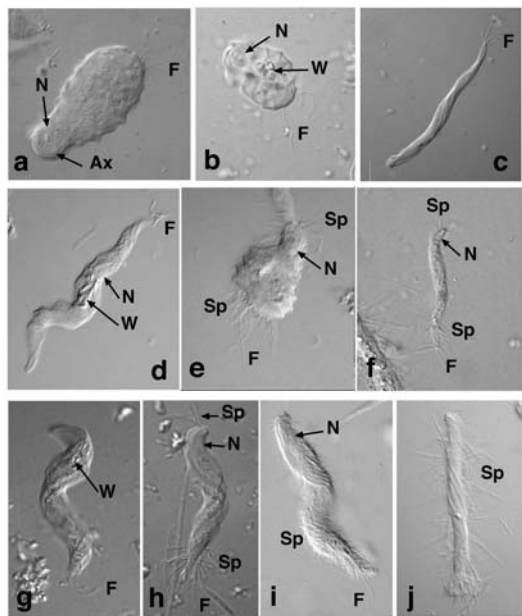


図7. ヤマトシロアリに共生する鞭毛虫。a : *Pyrsonympha grandis*, b : *P. modesta*, c : *Dinenympha exilis*, d : *D. rugosa*, e : *D. leidy*, f : *D. parva*, g : *D. porteri* Type 1, h : *D. porteri* Type 2, i : *D. porteri* Type 3, j : *D. porteri* Type 4。N : 核, F : 鞭毛, Sp : 体表に付着するスピロヘータ, W : 取り込まれた木材片。オスミウム酸固定。



10 $\mu$ m。体表全域にスピロヘータが付着する。Type 4 (図7j) : 大きさや概形はType 3と同様。スピロヘータが特徴的な輪状の列をなして体表に付着する。

このほかにKoidzumi (1921)は*Dinenympha nobilis*を記載しているが、どの鞭毛虫がそれにあたるかやや疑問がある。

### トリコモナス類

#### 8. *Trichomonoides* sp. (図7k)

未記載の小型種で、体は紡錘形で体長約10-20 $\mu$ m。4本の前鞭毛と1本の後曳鞭毛をもち、後曳鞭毛は体表面によく発達した波動膜を形成し、これを活発に波打たせて運動する。小型で数が少ないが、動きが特異的でわかりやすい。木材片の取り込みは確認できない。本種は従来*Trichomonas*属とされてきたが、本稿では属の位置づけはBrugerolle & Bordereau (2004)に従った。欧州のシロアリ*Reticulitermes lucifugus*から知られる*Trichomonoides trypanoides*と同種である可能性がある。

#### 9. *Hexamastix* sp. (図7l)

未記載の小型種で、体は球形で体長約10-20 $\mu$ m。5本の長い前鞭毛と1本の後曳鞭毛をもつ。前鞭毛を束ねて小刻みに動かし、時折波打たせて体の向きを変える特有の動きをする。木材片の取り込みは確認できない。生体の観察時には、数が少ないため同じくらいの大きさの*Microjoenia* sp.と見分けづらいが、運動が特徴的なことから見分けることができる。

### トリコニンファ類

#### 10. *Trichonympha agilis* Leidy ケカムリ (図7m)

長さ70-90 $\mu$ m×幅40-70 $\mu$ m。細胞前半部(rostrumとその後ろの部分)から多数の鞭毛が縦列をなして生じる。体の後半部には鞭毛はなく、非常に柔軟であり、この部分から木材片を取り込んで分解する。大型でよく目立つ。本種はKoidzumiにより*T. agilis*と同一とされているが、染色標本を観察すると副基体の形態が明らかに異なり、再検討を要する。

#### 11. *Teranympha mirabilis* Koidzumi ナガケカムリ (図7n)

200-300×40-50 $\mu$ m。ヤマトシロアリに共生する鞭毛虫の中で最大。細胞の前端部にrostrum構造をもち、そこから長い鞭毛が縦列をなして生えている。体のrostrumより後部には、非常に特異的な多数の横方向の隆起があり、あたかも体節を持つように見える。体節状の隆起部分にも短い鞭毛を生じる。本属は1属1種で、東アジアのヤマトシロアリ属からのみ見つかっている。

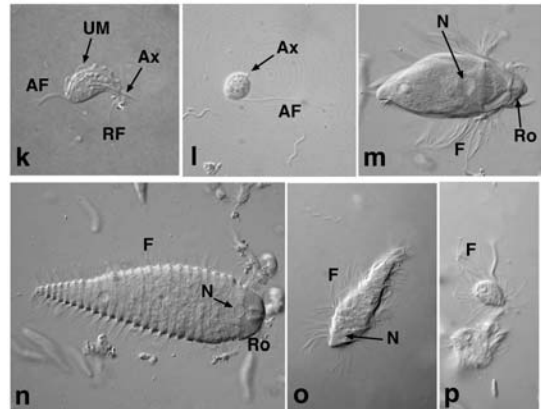


図7(続き) . k : *Trichomonoides* sp.、l : *Hexamastix* sp.、m : *Trichonympha agilis*、n : *Teranympha mirabilis*、e : *Holomastigotes elongatum*、f : *Microjoenia* sp. N : 核、F : 鞭毛、AF : 前鞭毛、PF : 後曳鞭毛、Pb : 副基体、Ax : 軸桿、Ro : rostrum。オスミウム酸固定。

### スピロトリコニンファ類

#### 12. *Holomastigotes elongatum* Koidzumi (図7o)

比較的小型の種で20-55×20-40 $\mu$ m。体は紡錘状であるが、体の前端かららせん状に生じた鞭毛列が後端まで達する。鞭毛列の生じている部分は畝状に隆起するため、「まつかさ」のようにみえる。核は体の前端部。微分干渉顕微鏡を使うと、細胞内にやや大型の顆粒が多数あるのが確認できる。本種は木材片の取り込みを全く行わない。

#### 13. *Microjoenia* sp. (図7p)

未記載の小型の種で、体長は5-30 $\mu$ m。体は球形から卵形で、前端部に8本から数十本の鞭毛がほぼ輪状か、らせん状の列をなして生じる。細い針状の軸桿をもち、個体によってはこれが細胞後端から突出する。

### 染色標本の作成法について

共生鞭毛虫の細胞内部の形態を光学顕微鏡で観察するためには、染色標本を作製する必要がある。本稿では詳しくは述べないが、以下の手順で標本を作製できる：(1) シロアリの腸をピンセットで破り、消化管の内容物をアルブミン・グリセリン接着剤を

塗布したカバーガラスに滴下し、消化管を筆のように使って塗布する、(2) Shaudinn液を入れたシャーレにカバーガラスを標本面が下向きになるよう浮かべて固定する、(3) 昇汞を除く処理の後、KMnO<sub>4</sub>水溶液とシュウ酸水溶液による漂白を行う、(4) プロタルゴール鍍銀染色法や(Heidenheinの鉄みょうばん)ヘマトキシリン染色法で染色する、(5) 脱水・透徹してスライドガラス上に封入する。染色法の詳細や固定液の組成については、渡辺他(1988)などを参照されたい。

著者は材料の変形と凝集を少なくするため、材料の固定・接着の際に以下の手順をとることが多い：  
(1-1) 消化管内容物を少量の食塩水中に出し、1%オスミウム酸水溶液を数滴加えて前固定する、(1-2) これにゼラチン・アルブミン接着剤(渡辺他1988)を加えてよく混ぜ、カバーガラスに薄く塗布する、(1-3) さらに4℃で、湿った濾紙を敷いたシャーレ中で冷却固化し、手順(2)に移る(この場合Shaudinn液には酢酸を加えない)。ただし、より簡便な手順で安定した染色結果が得られるよう、染色標本の作製法にはさらに工夫が必要だと思われる。

## おわりに

シロアリ類の共生鞭毛虫であるオキシモナス類・副基体類は、形態的にも特異で多様な構造を備える点で興味深いと共に、真核生物全体で様々な特性がいかに進化してきたか研究する上でも重要なグループであるといえる。これらの共生鞭毛虫は嫌気性で、ほとんど単離培養が成功していないことが、とくに個々の種についての研究を進める上での大きな障害となってきた。しかし近年では培養を介さずに、特定の鞭毛虫、もしくは消化管内容物全体からPCRを使って遺伝子を取得する手法や、特定の機能遺伝子の発現の様子を調べる手法なども盛んに行われるようになってきている。消化管内の鞭毛虫と共生系の働きに関しても、まだまだ面白い事実が明らかにされていくに違いない。

生態学的な視点からみると、シロアリ類の鞭毛虫群集は、(1) 境界が明確で宿主コロニーにより構造化された群集であること、(2) 宿主の系統推定を行うことで群集の歴史的由来や長い時間スケールでの分岐過程を推定できること、(3) 宿主個体の飼育条件の操作により、鞭毛虫の群集レベルの操作実験が比較的容易に行える、等の群集研究の題材として優れた点をもつ。シロアリ類の共生微生物を材料とした、群集の生態・進化の研究についても今後の発展が期待される。

本稿をまとめるにあたり、筑波大学大学院の橋本哲男様には真核生物の初期進化過程に関してご教示いただき、また理化学研究所の井上徹志様、野田悟子様には原稿を見ていただき、多くのご助言をいただきました。この場を借りて心よりお礼申し上げます。

## 引用文献

- 安藤和明・村上隆太郎・山岡郁雄 1991. ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* (Kolbe)の腸内共生原虫について. 山口生物, 18: 78-79.
- Arisue, N., Hasegawa, M. and Hashimoto, T. 2005. Root of the Eukaryota tree as inferred from combined maximum likelihood analyses of multiple molecular sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 22: 409-420.
- Berchtold, M. and König, H. 1995. Phylogenetic positions of the two uncultivated trichomonads *Pentatrichomonoides scroa* Kirby and *Metadevescovina extranea* Kirby from the hindgut of the termite *Mastotermes darwinensis* Froggatt. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18: 567-573.
- Berchtold, M., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Brune, A., Amann, R., Hahn, D. and König, H. 1999. Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwinensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. *Arch. Microbiol.*, 172: 407-416.
- Breznak, J. A. 2000. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litter-feeding termites. In: *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Abe, T., Bignel, D. E. and Higashi, M. (eds.), Kluwer, Dordrecht, pp. 209-231.
- Brugerolle, G. and Patterson, D. J. 2001. Ultrastructure of *Joenina pulchella* Grassi, 1917 (Protista, Parabasalia), a reassessment of evolutionary trends in the parabasalids, and a new order Cristamonadida for devescovinid, calonymphid and lophomonad flagellates. *Org. Divers. Evol.* 1: 147-160.
- Brugerolle, G. and Boredereau, C. 2004. The flagellate of the termite *Hodotermopsis sjoestedti* with special reference to *Hoplonympha*, *Holomastigotes* and *Trichomonoides trypanoides* n. comb. *Europ. J. Protistol.*, 40: 163-174.
- Brugerolle, G. and Radek, R. 2006. Symbiotic protozoa of termites. In: K. König and A. Varma (eds.), Springer, Berlin Heidelberg, pp. 243-269.
- Cleveland, L. R. 1924. The physiological and symbiotic

- relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes* Koller. Biol. Bull., 46: 177-225.
- Cleveland L. R. and Grimstone, A. V. 1964. The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated microorganisms. Proc. Loy. Soc. Lond. Ser. B, 159: 668-686.
- Dack, J. B. and Redfield, R. J. 1998. Phylogenetic placement of *Trichonympha*. J. Euk. Microbiol. 45: 445-447.
- Dacks, J. B., Silberman, J. D., Simpson, A. G. B., Moriya, S., Kudo, T., Ohkuma, M., Redfield, R. J. 2001. Oxy-monads are closely related to the excavate taxon *Trimastix*. Mol. Biol. Evol., 18: 1034-1044.
- Gerbod, D., Noël, C., Dolan, M. F., Edgcomb, V. P., Kitade, O., Noda, S., Dufernez, F., Ohkuma, M., Kudo, T., Capron, M., Sogin, M. and Viscogliosi, E. 2002. Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Devescovinidae and Calonymphidae (Trichomonadea). Mol. Phy. Evol., 25: 545-556.
- Gerbod, D., Sanders, E., Moriya, S., Noël, C., Takasu, H., Fast, N. M., Delado-Viscogliosi, P., Ohkuma, M., Kudo, T., Capron, M., Palmer, J. D., Keeling, P. J. and Viscogliosi, E. 2004. Molecular phylogenetics of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees. Mol. Phy. Evol., 31: 572-580.
- Germot, A., Philippe, H. and Le Guyader, H. 1996. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. Proc. Nat. Ac. Sci. 93: 14614-14617.
- Hampl, V., Cepicka, I., Flegr, J., Tachezy, J. and Kuluda, J. 2004. Critical analysis of the topology and rooting of the parabasalid 16S rRNA tree. Mol. Phy. Evol., 32: 711-723.
- Hampl, V., Horner, D. S., Dyal, P., Kulda, J., Flegr, J., Foster, P. G. and Embley, T. M. 2005. Inference of the phylogenetic position of oxy-monads based on nine genes: support for metamonada and excavata. Mol. Biol. Evol., 22: 2508-2518.
- Hashimoto, T., Sánchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M., Hasegawa, M. 1998. Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valil-t-RNA synthetase phylogeny. Proc. Nat. Acad. Sci., 95: 6860-6865.
- Honigberg, B. M. 1970. Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: The Biology of Termites. vol.II. Krishna, K. and Weesner, F. M. (eds.), Academic Press, New York, pp. 1-36.
- 井上徹志 2001. シロアリの生態. 化学と生物. 39: 326-332.
- Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T. and Yamaoka, I. 2000. Symbiotic associations with protists. In: Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. Abe, T., Bignel, D. E. and Higashi, M. (eds.), Kluwer, Dordrecht, pp. 275-288.
- Inoue, T., Moriya, S., Ohkuma, M. and Kudo, T. 2005. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. Gene, 349: 67-75.
- Keeling, P. J. 2002. Molecular phylogenetic position of *Trichomitopsis termopsidis* (Parabasalia) and evidence for the Trichomitopsiinae. Eur. J. Protistol. 38: 279-286.
- Keeling, P. J., Poulsen, N. and McFadden, G. I. 1998. Phylogenetic diversity of parabasalian symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrichonympha* and *Trichonympha*. J. Euk. Microbiol. 45: 643-650.
- Keeling, P. J. and Leander, B. S. 2003. Characterisation of a non-canonical genetic code in the oxy-monad *Streblo-mastix strix*. J. Mol. Biol., 326: 1337-1349.
- Kirby, H. 1937. Host-Parasite relations in the distribution of protozoa in termites. Univ. Calif. Publ. Zool., 41: 189-212
- Kitade, O. 2004. Comparison of symbiotic flagellate faunae between termites and a wood-feeding cockroach of the genus *Cryptocercus*. Microb. Env. 19: 215-220.
- Kitade, O. and Matsumoto, T. 1993. Symbiotic protistan faunae of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Japan Archipelago. Sociobiol., 23: 135-153.
- Kitade, O., Maeyama, T. and Matsumoto, T. 1997. Establishment of symbiotic flagellate fauna of *Hodotermopsis* (Isoptera: Termopsidae). Sociobiol., 30: 161-167.
- Koidzumi, M. 1921. Studies on the intestinal protozoa found in the termites of Japan. Parasitol., 13:235-309.
- Li, L., Fröhlich, J., König, H. 2006. Cellulose digestion in the termite gut. In: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. K. König and A. Varma (eds.), Springer, Berlin Heidelberg, pp. 221-241.
- Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H., Rose, H., Slaton, M., Maekawa, K., Bandi, C., Noda, H. 2000. Evidence of multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. Curr. Biol., 10: B01-B04.
- 松本忠夫 1993. シロアリの真社会性の起源とその維持機構. 社会性昆虫の進化生態学. 松本忠夫・東正剛編, 海游舎, pp.246-297.
- 森本桂 1965. シロアリと原生動物. しろあり, No. 4:

- 33-37.
- Nakashima, K., Watanabe, H. and Azuma, J-I. 2002a. Cellulase genes from the parabasalian symbiont *Pseudotrichonympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus*. Cell. Mol. Life Sci., 59: 1554-1560.
- Nakashima, K., Watanabe, H., Saitoh, H., Tokuda, G. and Azuma, J-I. 2002b. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. Insect Biochem. Mol. Biol., 32: 777-784.
- Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Nalepa, C., Vongkaluang, C., Kudo, T., Ohkuma, M. 2005. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in Bacteroidales attached to flagellated protists in the guts of termites and a wood-feeding cockroach. Env. Microbiol., 8: 11-20.
- Noda, S., Kitade, O., Inoue, T., Kawai, M., Kanuka, M., Hiroshima, K., Hongoh, Y., Constantino, R., Uys, V., Zhong, J., Kudo, T. and Ohkuma, M. 2007. Cospeciation in the triplex symbiosis of termites gut protist (*Pseudotrichonympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. Mol. Ecol., 16: 1257-1266.
- Ohkuma, M., Iida, T., Ohtoko, K., Yuzawa, H., Noda, S., Viscogliosi, E. and Kudo, T. 2005. Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Hypermastigea. Mol. Phy. Evol., 35: 646-655.
- Ohkuma, M., Ohtoko, K., Grunau, C., Moriya, S. and Kudo, T. 1998. Phylogenetic identification of the symbiotic hypermastigote *Trichonympha agilis* in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus* based on small-subunit rRNA sequence. J. Euk. Microbiol. 45: 439-444.
- Ohkuma, M., Ohtoko, K., Iida, T., Tokura, M., Moriya, S., Usami, R., Horikoshi, K. and Kudo, T. 1998. Phylogenetic identification of hypermastigotes, *Pseudotrichonympha*, *Spirotrichonympha*, *Holomastigotoides*, and parabasalian symbionts in the hindguts of termites. J. Euk. Microbiol. 47: 249-259.
- Ohkuma, M., Saita, K., Inoue, T. and Kudo, T. 2007. Comparison of four protein phylogeny of Parabasalian symbionts in termite guts. Mol. Phy. Evol., 42: 847-853.
- 大熊盛也・野田悟子・守屋繁春・工藤俊章 2001. シロアリ共生微生物の多様性と機能. 化学と生物. 39: 542-548.
- Ohtoko, K., Ohkuma, M., Moriya, S., Inoue, T., Usami, R. and Kudo, T. 2000. Diverse genes of cellulase homologues of glycosyl hydase family 45 from the symbiotic protists in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus*. Extremophila, 4: 343-349.
- Simpson, A.G. B., Inagaki, Y. and Rogers, A. J. 2005. Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes. Mol. Biol. Evol., 23: 615-625.
- Sogin, M. L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. Curr. Opin. Genet. Dev. 1: 457-463.
- Trager, W. 1934. The cultivation of a cellulose-digesting flagellate, *Trichomonas termopsidis*, and of certain other termite protozoa. Biol. Bull., 66: 182-190.
- Watanabe, H., Tokuda, G., Lo, N. and Noda, H. 1998. A cellulose gene of termite origin. Nature, 349: 330-331.
- Watanabe, H., Nakashima, K., Saitoh, H. and Slator, M. 2002. New endo- $\beta$ -1,4-glucanase from the parabasalian symbionts, *Pseudotrichonympha grassii* and *Holomastigotoides mirabile* of *Coptotermes* termites. Cell. Mol. Life Sci., 59: 1983-1992.
- 渡辺清・武井修一・柴田正裕・猿渡清正・村上和之 1988. 光学顕微鏡による観察法. 原生動物の観察と実験法. 重中義信監修, 共立出版, pp.63-98.
- 渡辺裕文・徳田岳 2001. シロアリとセルロース分解. 化学と生物. 39: 618-623.
- Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle, G., König, H. 2003. Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. Europ. J. Protistol., 39: 11-23.
- Yamaoka, I., Sasabe, K. and Terada, K. 1986. A timely infection of intestinal protozoa in the developing hindgut of the termite (*Reticulitermes speratus*). Zool. Sci., 3: 175-180.
- Yamin, M. A. 1979. Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foà reported from lower termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). Sociobiol., 4: 1-119.
- Yoshimura, T., Azuma, J.-I., Tsunoda, K. and Takahashi, M. 1993. Cellulose metabolism of the symbiotic protozoa in termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae): I. Effect of degree of polymerization of cellulose. Mokuzai Gakkaishi, 39: 221-226.