

シロアリ類に共生する Spirotrichonymphida 目原生生物の分子系統解析

高柳 美希¹, 栗崎 倫江², 大槻 隆司¹, 宇井 定春¹, 大熊 盛也², 野田 悟子^{1,2}
(¹山梨大・院医学工学総合, ²理研)

Molecular phylogenetic analysis of Spirotrichonymphida protists
in the gut of termites

Miki TAKAYANAGI¹, Tomoe KURISAKI², Takashi OHTSUKI¹, Sadaharu UI¹, Moriya OHKUMA²
and Satoko NODA^{1,2}

(¹Interdisciplinary Grad. Sch. Med. Engn., Univ. Yamanashi, ²JCM, Bioresource Ctr., RIKEN)

SUMMARY

The phylum Parabasalia is a group of anaerobic flagellates that possess characteristic parabasal apparatus. The majority of parabasalid species are symbionts of various animal hosts as either parasites or mutualists. Parabasalia repre-

sents a complex assemblage of species and its taxonomy recently received extensive reorganization. Presently, Parabasalialia is divided into four orders: Spirotrichonymphida, Cristamonadida, Trichonymphida, and Trichomonadida. The former three orders occur exclusively in the guts of termites and related insects. Almost all gut-dwelling members are extremely difficult to cultivate. Their existence in complex microbial communities has prevented molecular phylogenetic studies of them. Particularly, only four species of Spirotrichonymphida have been investigated. In this study, we obtained the sequences of small subunit rRNA genes of spirotrichonymphids from the mixed population of protists in the gut of the termite *Hodotermopsis sjoestedti*. Fluorescent-labeled oligonucleotide probes specific for each sequence were designed and used for the *in situ* identification of spirotrichonymphids species by whole-cell hybridization. Five species of spirotrichonymphids—*Spiromyxa obtusa*, *S. oblonga*, *Microjoenia minima*, *Spirotrichonympha cincta*, and *Holomastigotes elongatum*—were identified. The phylogeny of parabasalids was inferred using these newly identified sequences to establish more reliable taxonomic classification of spirotrichonymphids.

【目的】 パラバサリア門原生生物は副基体 (parabasal body) と呼ばれるオルガネラを有し、多様な細胞構造を持つ種から構成される嫌気性原生生物で、現在 4 つの目に分類されている^{1, 2)}。このうち 3 目は食料性のシロアリや近縁の昆虫の消化管に特異的に共生していることが知られている。これまでパラバサリア門原生生物の分類は形態学的な特徴に基づいてなされてきたが、近年の small subunit (SSU) rRNA 遺伝子配列を用いた分子系統解析から、再分類の必要性が示唆されている¹⁾。しかし、培養法が確立されている種はわずかで、特に Spirotrichonymphida 目原生生物の遺伝子配列情報は少なく、これまでに 4 種の配列しか報告されていない。そこで、本研究では Spirotrichonymphida 目原生生物の分子系統学的知見を得るため、オオシロアリ (*Hodotermopsis sjoestedti*) の腸内に共生する本目の原生生物から SSU rRNA 遺伝子を取得して系統解析を行った。

【方法】 複数種の原生生物が混在するオオシロアリの腸内容物の懸濁液から RNA を抽出し、真核生物に広く保存されている配列領域から設計したプライマーを用いて RT-PCR 法により SSU rRNA 遺伝子を増幅した。目的のサイズの PCR 増幅断片を精製後、T-vector と連結して、*E. coli* を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。その後、各配列に特異的なプローブを設計し、配列の由来を FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 法により同定した。今回同定した配列を、既に報告されている配列とともに Clustal W を用いてアライメントし、RaxML-7.0.4 を用いた最尤推定や MrBAYES-3.1.2 を用いた Bayes 推定により系統樹を作成した。系統樹作成時のモデルは general time-reversible model (GTR) を使用した。RaxML では 500 回の bootstrap 解析、MrBAYES では 50 万回の試行により統計学的検定を行った。

【結果と考察】 オオシロアリ腸内原生生物から抽出し

た RNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、約 1.6 kb と 2.0 kb の断片長のバンドが認められた。1.6 kb の断片はパラバサリア門原生生物、2.0 kb の断片はオキシモナス目 (Preaxostila 門) 原生生物であると推定された。クローニング後、塩基配列を決定して相同性が 95% 以上のクローンを 1 つの phylotype としてまとめたところ、パラバサリア門由来と推定される 18 phylotype が得られた。このうち 7 つの phylotype が Spirotrichonymphida 目由来と推定され、オオシロアリで記載されている^{3, 4)} 全ての Spirotrichonymphida 目から配列が取得されたと考えられた。次いで、これまでに同定されている *Holomastigotes lanceolata* と推定された 2 つの phylotype を除く、各 phylotype に特異的な配列からプローブを設計して、FISH 法で *Spiromyxa obtusa*, *S. oblonga*, *Microjoenia minima*, *Spirotrichonympha cincta*, *Holomastigotes elongatum* の 5 種を同定した。系統解析の結果は、Spirotrichonymphida 目は単系統群となったが、属ごとにはグループ化されず、形態に基づいた分類とは一致しなかった。この結果は、従来の形態観察による分類が不十分である可能性を示唆している。しかし、SSU rRNA 遺伝子は分類群間で進化速度が大きく異なるため系統樹の推定に誤りが生じやすいといった問題点も指摘されている。今後、SSU rRNA 遺伝子に加え、タンパク質をコードする系統マーカー遺伝子等の配列情報を取得して解析を行うことで、より正確な Spirotrichonymphida 目の系統関係が推定できるものと考えられる。

【文献】

- 1) Ohkuma et al. (2005) Mol. Phylogenet. Evol., 35, 646-655.
- 2) Adl et al. (2005) J. Eukaryot. Microbiol., 52, 399-451.
- 3) Kitade et al. (1997) Sociobiol., 30, 161-167.
- 4) Brugerolle and Bordereau (2004) Eur. J. Protistol., 40, 163-174.