
Review

シロアリ腸内原生生物と原核生物の細胞共生

本郷 裕一

東京工業大学大学院生命理工学研究科
〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1-W3-48

Cellular symbiosis between protists and prokaryotes in termite guts

Yuichi HONGO

Department of Biological Sciences, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152-8550, Japan

Key words: Insect, Protozoa, Lignocellulose, Gut bacteria

はじめに

シロアリは植物枯死体のみを餌とする社会性昆虫で、温帯から熱帯にかけて分布している。分子系統学的にはゴキブリの一群であり、キゴキブリ属 *Cryptocercus* が最もシロアリに近縁である (Lo et al., 2000)。キゴキブリと下等シロアリは後腸内に多数の原生生物を保有しており (Fig. 1)、ゴキブリからシロアリが進化する以前 (~1.5 億年前) から共生していたと考えられる (Ohkuma et al., 2009)。下等シロアリから派生した共生原生生物を欠く一群 (シロアリ科) を、高等シロアリと呼ぶ。

下等シロアリの大多数とキゴキブリは枯死材の

みを摂食する。枯死材は主に木質 (リグノセルロース) で構成される。リグノセルロースはリグニン (ポリフェノール系高分子化合物)、セルロース (β -グルコース重合体) とヘミセルロース (キシラン、マンナン、アラビノースなど、セルロース以外の植物系多糖の総称) の堅牢な複合体であり、ほとんどの動物はこれらを消化する能力を持たない (Watanabe and Tokuda, 2001)。つまり、動物に食べられないように進化した、植物の体の支持と防御を兼ねた構造体である。

この堅固な構造物を、シロアリは頑丈な大顎と前腸内のクチクラの隆起で物理的に破砕し、10-20 μ m に断片化する (Fujita et al., 2010)。さらに、唾液腺や中腸からセルラーゼ (セルロース繊維の非結晶部位を加水分解してセロビオースにする *endo- β -1,4-glucanase* と、セロビオースを β -グルコースに加水分解する *β -glucosidase*) を分泌して木質の一部を消化するが (Watanabe and Tokuda, 2010)、大部分は未消

Tel: +81-3-5734-2865/Fax: +81-3-5734-2946

E-mail: yhongo@bio.titech.ac.jp

Received: 30 August 2011; Accepted: 4 October 2011.

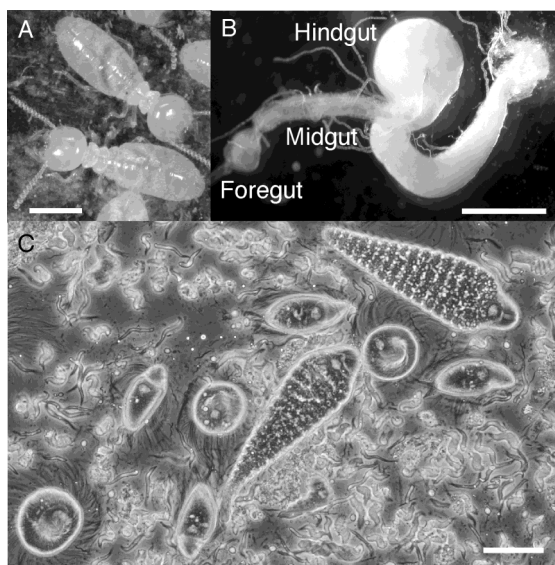


Fig. 1. Termite and gut microbiota. (A) The lower termites *Reticulitermes speratus*. Bar = 1 mm. (B) A removed gut of *R. speratus*. Bar = 1 mm. (C) Phase contrast microscopy of protists in the gut of *R. speratus*. Bar = 50 μ m. *R. speratus* harbors 13 species of gut protists (Kitade, 2007).

化のまま後腸に送られる。これを共生原生物が食作用によって細胞内に取り込み、セルラーゼ (endo- β -1,4-glucanase, β -glucosidase および結晶性セルロースを加水分解する cellobiohydrolase) とヘミセルラーゼで単糖に分解して、嫌氣的に発酵する (Hongoh, 2011)。結果として、セルロースは $n(C_6H_{12}O_6) + n(2H_2O) \rightarrow n(2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2)$ の反応によって、酢酸と二酸化炭素と水素に変換される (Yamin, 1981)。生成した酢酸は後腸で吸収され、シロアリの主な炭素・エネルギー源となる (Slaytor, 2000)。

このように、腸内原生物はシロアリの栄養に必須の貢献をしており、原生物を除去するとシロアリは生存できない (Cleveland, 1923)。通常、1 から 10 数種類の原生物が腸あたり数万細胞以上共生し、シロアリの種ごとに特異的な群集構造をとる (Inoue et al., 2000)。これらの原生物種は下等シロアリとキゴキブリの腸以外には存在せず、分類学的には Excavata 界の Parabasalia 門と Preaxostyla 門のどちらかに属する。絶対嫌気性でミトコンドリアを欠くため、ミトコンドリアの祖先細菌が細胞内共生する以前に分岐した “Archezoa” として注目されたこともあるが、現在では否定されている (Cavalier-Smith, 1989, 1993)。Parabasalia 門原生物ではミトコンドリアはヒドロゲノソームに変化し (Boxma et

al., 2005)、Preaxostyla 門はヒドロゲノソームも欠くが、核内にミトコンドリアから移行したと思われる遺伝子が残存しているため、二次的に喪失したと考えられる (Hampl et al., 2008)。共生原生物の詳細な系統分類と形態学的特徴は、Kitade (2007) を参照してもらいたい。

シロアリと原生物の絶対共生は 1920 年代から研究されてきたが、共生原生物は純粋培養が極めて困難であり、詳細な生理・生態は依然として謎のままである。複数の細胞を出発点とした (つまりクローンではない) Parabasalia 門原生物 *Trichomitopsis termopsidis* と *Trichonympha sphaerica* の純粋培養成功例があり (Yamin, 1981; Odelson and Breznak, 1985)、上記のようなセルロース分解・発酵能力の存在が確認されたが、それら培養株も現存しない。

培養困難なため、1990 年代後半からは、原生物各種をマイクロマニピュレーターなどで回収し、PCR 法による個々の遺伝子配列の取得・解析が行われてきた。rRNA や EF1- α 、GAPDH などの遺伝子配列に基づく詳細な系統進化が明らかにされつつあり (Ohkuma et al., 1998; Moriya et al., 2001; Ohkuma et al., 2007a; Noda et al., 2009b)、セルラーゼ遺伝子の存在も確認された (Ohtoko et al., 2000; Nakashima et al., 2002; Li et al., 2003; Inoue et al., 2005)。2000 年代後半からは腸内原生物群集全体のメタトランスクリプトーム (転写産物) 解析が行われ、遺伝子レベルでの網羅的機能解析がはじまっている (Todaka et al., 2007; Tartar et al., 2009; Todaka et al., 2010)。

原生物の分子生物学的解析と平行して、シロアリ腸内に共生する真正細菌と古細菌の解析も進んでいる。原生物同様、これらも難培養性で、1990 年代後半に 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子生態学的解析法が導入されるまでは、群集構造すら不明であった。通常、数百種以上の真正細菌と数種以上の古細菌が 1 つの腸内に共生し、その群集構造はシロアリの種に特異的である。これらは 24 もの多様な門レベルクラスターに分類され、各門内で一つないし複数のシロアリ特異的単系統群を形成する (Hongoh, 2010)。つまり原生物、真正細菌、古細菌からなる腸内微生物群集が、一つの共生群体としてシロアリと共進化を遂げてきたといえよう。

シロアリと腸内微生物の特異的関係は、シロアリの社会性によって維持されている。シロアリは他の節足動物同様、脱皮を繰り返して成長する。その際、外胚葉由来の前腸と後腸の内皮を腸内微生物ごと脱ぎ捨ててしまう。したがって、脱皮直後の個体は腸内微生物をほとんど持たないが、他の個体の肛門から直接腸内微生物を受け取ることで (肛門食 proctodeal trophallaxis)、共生群集を速やかに再構築

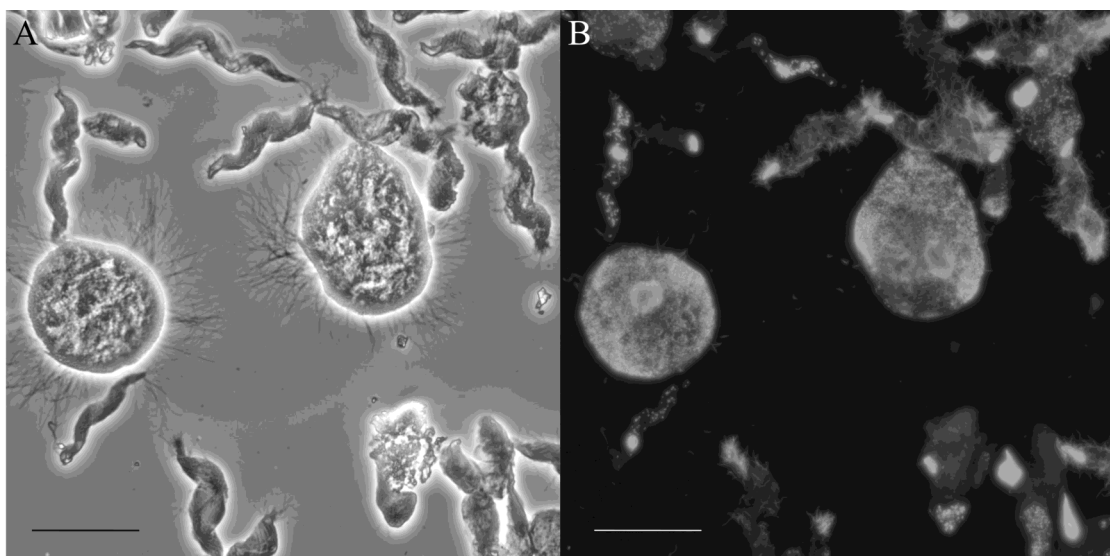


Fig. 2. Bacterial symbionts of protists in the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. (A) Phase contrast microscopy of protists in the gut of *R. speratus*. These protists were fixed in 4% formaldehyde and dehydrated with ethanol series. (B) Fluorescent microscopy of the microbiota. DNA in the bacterial cells and nuclei of protists were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). All of the protist cells harbored endo- and/or ectosymbiotic bacteria. Bar = 50 μ m.

する (Kitade et al., 1997) . こうしてコロニーの構成メンバーは、腸内微生物群集を共有することになる。

コロニー内の腸内微生物群集は有翅生殖虫にも受け継がれる。有翅生殖虫は巣を離れて結婚飛行を行った後、雌雄で共同して土中や枯木中などに営巣し、産卵する。孵化した個体は腸内微生物を持たないが、親 (女王と王) からの肛門食により腸内微生物を受け取る。このように、必ず親が子供と共存することで、確実に腸内微生物を子孫に垂直伝播していくのである。実際、腸内細菌は、シロアリ特異的な各単系統群内で宿主シロアリ種ごとにクラスターを形成する傾向が強い。ただし、腸内微生物は排泄物や共食などを介して、シロアリ種間で比較的水平伝播しやすいためか、アブラムシと細胞内共生細菌 *Buchnera* の関係のような、長期にわたる厳密な共種分化はみられない (Munson et al., 1991; Hongoh et al., 2005) . ちなみに、シロアリは通常肉食をしないが、傷ついたシロアリ個体と死骸は例外的に摂食される。枯死材に乏しい窒素分を保存するために進化した習性であろう。

厳密な共種分化はしていなくとも、長い進化過程で共存してきた腸内微生物は、群集内で複雑かつ巧妙な共生関係を持っているであろう。それを象徴するのが、原生物と原核生物の細胞共生である

(Ohkuma, 2008) . 下等シロアリ腸内に生息する原生物の大多数は、細胞表面や細胞質に原核生物を共生させており (Fig. 2) , 核内に共生する例も知られている (Kirby, 1944; d'Ambrosio et al., 1999) . 共生する原核生物の分類群も共生形態も多様で、真核生物と原核生物の細胞共生研究には絶好の材料である。本総説では、原生物と原核生物の細胞共生に焦点を当て、分子生態学や環境ゲノム科学的手法により明らかにされつつある、シロアリ腸内の多重共生機構を紹介する。

原生物細胞表面に付着共生する細菌の多様性と役割

シロアリ腸内の多くの原生物種は、Fig. 2のように、鞭毛か繊毛のようにも見える、毛状に突出した原核生物を付着させている。これらの多くは Spirochaetes 門の *Treponema* 属か Bacteroidetes 門 Bacteroidales 目の絶対嫌気性真正細菌である (Hongoh et al., 2007b) . 何れも螺旋か波形あるいは繊維状で、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization: FISH) 法で特異的に染め分けないと、種同定は困難である。透過型電子顕微鏡観察では、各々の分類群に特徴的な細胞断面が確認できる (Fig. 3) (Hongoh et al., 2007b) .

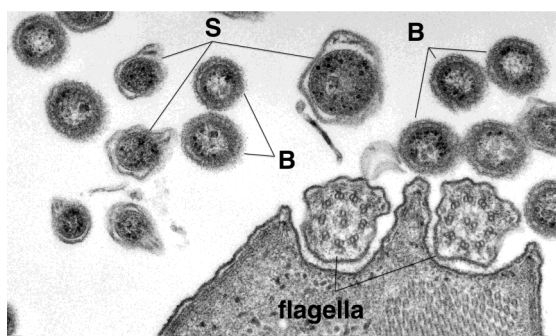


Fig. 3. Transmission electron microscopy of bristle-like ectosymbionts attached to the oxymonad protist *Dinympha porteri* type II. S: spirochetal ectosymbionts, B: bacteroides ectosymbionts. Bar = 0.5 μ m. This picture was originally published in Hongoh et al. (2007a) and slightly modified here.

16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析によると、これらスピロヘータとバクテロイデスは、シロアリ腸内のみから PCR 法によって検出される難培養系統群に属している (Noda et al., 2003; Hongoh et al., 2007b) . 腸液中を遊泳する多様な細菌種がランダムに結合するわけではなく、宿主原生生物種に各々特異的な種類が常に共生している (Hongoh and Ohkuma, 2011) . 宿主と同調して分裂するのか、あるいは原生生物細胞から離れることがあるのか、などは不明である。

形態が原生生物の鞭毛に類似するため (Figs. 2, 4A, B) , これらの真正細菌の原生生物の運動への関与が想像されるが、それが観察・証明された例は 1 つしかない。ムカシシロアリ *Mastotermes darwiniensis* の腸内に見られる Parabasalia 門原生生物 *Mixotricha paradoxa* は、細胞表面に多数の *Treponema* 属スピロヘータを共生させている (Wenzel et al., 2003) . Cleveland and Grimstone (1964) は、これら共生スピロヘータの同調した波状運動によってのみ宿主原生生物が遊泳可能であることを、実験的に証明した。細胞内共生説 (endosymbiotic theory) を唱えた Lynn Margulis (1979) は、この原生生物とスピロヘータの運動共生から、スピロヘータが真核生物の鞭毛の起源であると発想したほどである。真核生物の鞭毛がスピロヘータ細胞由来であるという形態学的・分子生物学的証拠は乏しく、現在ではあまり支持されていない。

鞭毛状の共生体以外では、シロアリ腸内原生生物と付着細菌の運動共生は、あと 1 例知られている。米国に生息するシロアリの一種 *Cryptotermes cavifrons* の腸内には、Parabasalia 門原生生物 *Caduceia versa-*

tilis が共生している (Fig. 4C) . この原生生物は 4 本の鞭毛をもつが駆動力は無く、驚くべきことに、細胞表面に共生する桿菌 (棒状の細菌, rod) の鞭毛の波状運動によってのみ遊泳可能である (Tamm, 1982) . この桿菌は、原生生物 1 細胞あたり 2,500-3,000 個ほど共生し、表面を螺旋状に取り巻くように並列している (Fig. 4D) (Tamm, 1980; Hongoh et al., 2007a) . Tamm (1980, 1982) によると、桿菌細胞の 2/3 ほどが原生生物細胞表層に埋まり、残りの開口部分から 12 本の鞭毛が出ている。これらが同調して波動すると 1 本の鞭毛束となり、それが桿菌の長軸方向の前後に隣接する桿菌の鞭毛束と融合し、結果として宿主原生生物細胞を螺旋状に巻く長大な鞭毛束になるという。この鞭毛束の同調した波状運動により、宿主原生生物は遊泳する。筆者も実際に位相差顕微鏡で観察したが、スライドガラス面を、かなりのスピードで滑るように移動していた。

同原生生物の細胞表面には、運動共生桿菌の隙間を埋めるように、繊維状の細菌がさらに共生している (Fig. 4E, F) . Tamm (1980) の電子顕微鏡観察によると、宿主細胞表面の凸部に適合する形で細菌細胞に切れ込みが入っている (Fig. 5) . 筆者らが 16S rRNA 遺伝子配列解析と FISH 解析を行ったところ、この繊維状細菌は Bacteroidales 目に、運動共生桿菌は Synergistetes 門に属することが明らかとなった (Hongoh et al., 2007a) . Synergistetes 門細菌は絶対嫌気性で、アミノ酸を主要な栄養源とし、鞭毛をもつ種が多い。同門の細菌は多様なシロアリ種の腸内から PCR 法で検出され、それらはシロアリ特異的単系統群を形成する。本運動共生細菌も、この未培養単系統群のメンバーであり、*Candidatus Tammella caduceiae* と命名した (未培養種を仮記載する場合に *Candidatus* をつける) . 本種以外は腸内で自由遊泳型として存在するらしく、どのような過程を経て奇妙な共生系が進化したのかは不明である。

このように、繊維状細菌または桿菌が毛状に突出するのではなく、細胞表面に張り付く形で付着共生する例は、シロアリ腸内原生生物において普通に見られる。これらの多くは Bacteroidales 目に属し、シロアリ特異的な複数の単系統群を形成する (Stingl et al., 2004; Noda et al., 2006a; Noda et al., 2006b) . 毛状のものと、張り付く桿菌タイプ、同繊維状のものは、各々別の単系統群を形成する傾向がある。宿主原生生物の同属内では Bacteroidales 目細菌との共種分化が見られるが、属より上のレベルでは一致しない。したがって、複数回、独立に付着共生が進化したと考えられる (Noda et al., 2009a; Desai et al., 2010) .

原生生物細胞表面に共生する Bacteroidales 目細菌

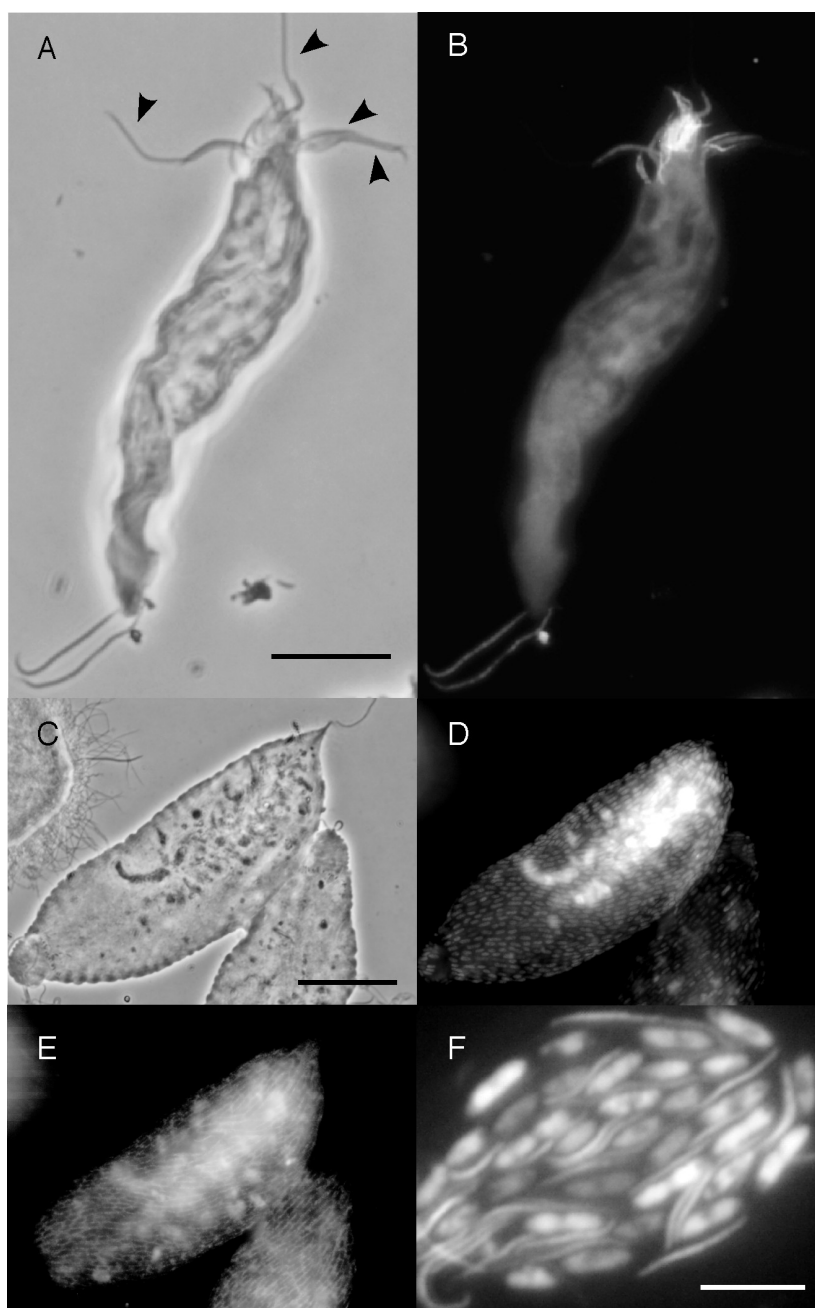


Fig. 4. Ectosymbiotic bacteria discovered on the surface of protist cells in termite guts. (A) Phase contrast image of the oxymonad protist *Dinenympha porteri* type II from the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. (B) Detection of the ectosymbiotic spirochetes and Bacteroidales bacteria by FISH analysis using taxon-specific probes. All the bristle-like structures were ectosymbiotic bacteria except the true flagella of the protist host indicated by arrowheads in panel A. Bar = 10 μm in panel A. (C) Phase contrast image of the parabasalid protist *Caduceia versatilis* from the gut of the termite *Cryptotermes cavifrons*. (D) FISH analysis of the ectosymbiotic “*Candidatus Tammella caduceiae*” in the phylum Synergistetes. (E) FISH analysis of ectosymbiotic Bacteroidales bacteria. Bar = 50 μm in panel C. (F) DAPI-stained ectosymbiotic bacteria on the surface of a *Caduceia versatilis* cell. Bar = 5 μm . Panels A and B were originally published in Hongoh et al. (2007b). Panels C–F were originally published in Hongoh et al. (2007a).

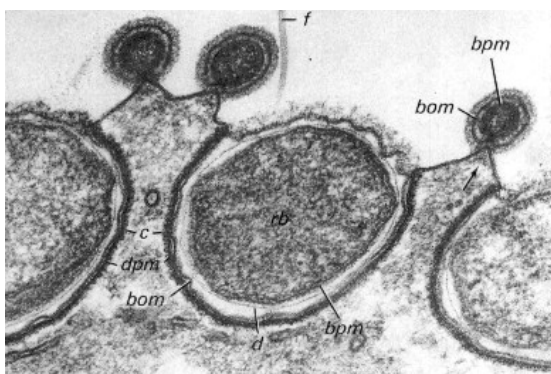


Fig. 5. Transmission electron microscopy of ectosymbiotic bacteria on the cell surface of the parabasalid protist *Caduceia versatilis*. The larger bacteria are “*Candidatus Tammella caduceiae*” in the phylum Synergistetes and the smaller belong to the order Bacteroidales. This picture was originally published in Tamm (1980). See the reference paper for the detail.

の系統群は、腸内で自由生活する系統と姉妹群を形成することが多い (Noda et al., 2009a)。つまり、シロアリ腸内に特異的な Bacteroidales 目の系統群があり、その中の腸内自由生活型のある種が、ある要因によって、原生物細胞表面に共生する。宿主と共生細菌はある期間、共種分化するが、いずれ別の細菌系統に置き代わられる。シロアリ腸内における原生物のバイオマスは巨大で、その中の優占種と細胞共生する細菌種も、腸内における優占種となる。原生物はシロアリの栄養に不可欠な存在であり、原生物と細胞共生していれば、その細菌種も確実に垂直伝播され、優占種であり続けられる。腸内の自由生活型 Bacteroidales 目細菌種群は、原生物との付着共生というニッチをめぐる競争する、共生体予備軍と見ることもできよう。

スピロヘータについても同じことが言える。Spirochaetes 門 *Treponema* 属には、2つのシロアリ特異的単系統群が存在する。少なくとも一方の系統群には腸内自由生活型と原生物共生型が混在しており (Iida et al., 2000)、原生物との関係は宿主特異的であるものの、共種分化は見られない (Noda et al., 2003)。バクテロイデス同様に、何度も独立に原生物との付着共生が進化したのであろう。Spirochaetes 門では *Spirochaeta* 属にもシロアリ特異的単系統群があるが、原生物との細胞共生例は知られていない。

シロアリ腸内原生物に付着共生する細菌の培養成功例は皆無で、機能は未知である。運動共生例を

除けば、共生系における役割も不明である。現状では、比較的近縁な腸内自由生活型の培養株の性質から推定するしかない。Spirochaetes 門 *Treponema* 属のシロアリ特異的系統群からは、これまでに3種が単離培養に成功している (Leadbetter et al., 1999; Lilburn et al., 2001; Dröge et al., 2008)。絶対嫌気性という以外は、各種ごとに性質はかなり異なる。

Zootermopsis angusticollis というシロアリの腸内から単離培養された *Treponema primitia* は、グルコースやアラビノース、キシランなど、リグノセルロース由来の単糖や二炭糖を発酵してエネルギーを得られるが、還元的酢酸生成能により独立栄養生活を営むこともできる (Graber and Breznak, 2004)。後者では、 $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ という代謝を行う。原生物によるセルロース分解・発酵では、 $n(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) + n(2\text{H}_2\text{O}) \rightarrow n(2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2)$ の反応により、グルコース1分子あたり、酢酸2分子のほかに 4H_2 と 2CO_2 が生成する。原生物のみの代謝では水素と二酸化炭素はシロアリ体外に捨てられ、エネルギーと炭素源が無駄になるが、還元的酢酸生成細菌がいればそれらはさらに酢酸に変換され、シロアリの栄養源となる。

Treponema primitia は腸内を自由遊泳するスピロヘータだが、水素と二酸化炭素の主発生源である原生物細胞に付着共生することができれば、還元的酢酸生成菌としてのメリットは大きいであろう。腸内は辺縁部から中央に向かって急激に酸素分圧が低下し、中央では0となるが、水素は逆の勾配を持つ (Ebert and Brune, 1997; Pester and Brune, 2007)。しかし原生物に付着共生していれば、細菌は安定した水素供給を受けることができる。

一方、原生物にメリットはあるだろうか。一般に、水素が高濃度に蓄積すると、発酵は阻害される。Parabasalia 門原生物は、ヒドロゲノソーム (hydrogenosome) というミトコンドリア起源とされる細胞内小器官を持ち、ヒドロゲナーゼのはたらきによって水素と ATP を生産する。結果としてシロアリ後腸内の水素分圧は、15-72 kPa にも達する (Pester and Brune, 2007)。ただしこの数値は、腸を取り出してアガロースに包埋し、微小電極を挿入して計測したもので、実際の生きたシロアリ個体から放出される水素は 1/30 から 1/50 程度にすぎない。これは健全な状態のシロアリ腸内では、発生する水素の大部分が還元的酢酸生成細菌などにより消費されることを示唆している。したがって、細胞表面にそうした水素消費型細菌が共生していると仮定すれば、原生物自身が産生する水素の速やかな除去という点で、利益があるものと推測される。いずれにせよ還元的酢酸生成菌は、水素除去による原生物

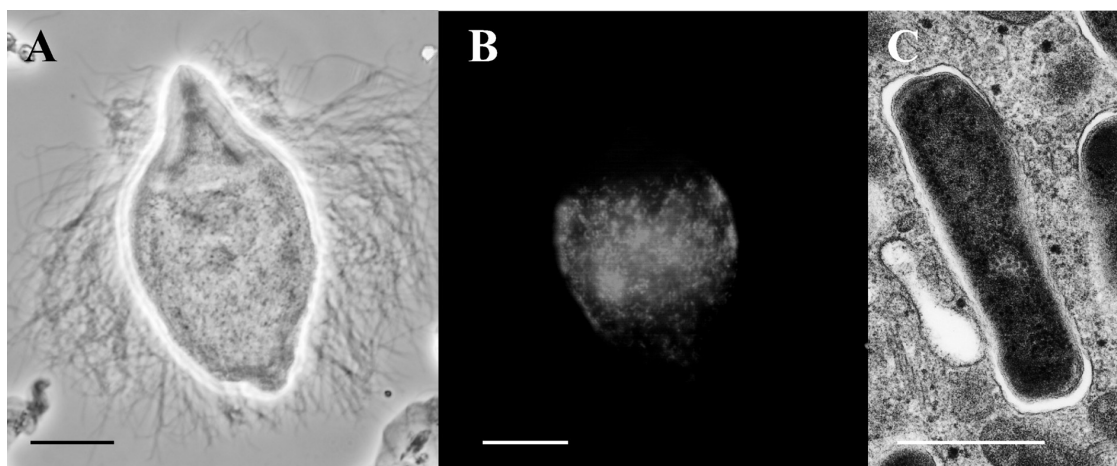


Fig. 6. Endosymbiotic Rs-D17 bacteria in the phylum Elusimicrobia (Termite Group 1) inside the cell of the parabasalid protist *Trichonympha agilis*. (A) Phase contrast image of the *T. agilis* from the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. (B) Detection of Rs-D17 by FISH analysis. Bars = 20 μm . (C) Transmission electron microscopy of Rs-D17. Bar = 0.5 μm . The pictures were originally published in Hongoh et al. (2008a).

のリグノセルロース発酵促進と、水素と二酸化炭素からの酢酸生成により、原生生物にもシロアリにも大きな利益を与えている。

原生生物自身も、高濃度水素に適応した進化を遂げている。Inoue et al. (2007) は、イエシロアリ腸内の Parabasalia 門原生生物 *Pseudotriconympha grassii* が持つ 2 種類の鉄ヒドロゲナーゼ遺伝子を取得し、大腸菌での異種発現に成功した。いずれも水素発生型で、20 kPa という高い水素分圧下でも、活性の半分を維持していた (Inoue et al., 2007)。

Bacteroidales 目の付着共生細菌については、近縁の培養株が存在しない。ただ、原生生物に細胞内共生する、比較的近縁な Bacteroidales 目細菌の機能が解明されたため (Hongoh et al., 2008b)、ある程度の推測が可能である。これについては後述する。

原生生物細胞内に共生する細菌の多様性と役割

シロアリ腸内原生生物の多くは、細胞表面だけではなく、細胞内にも原核生物を共生させている (Fig. 2)。通常、1 ないし複数種が共生しており、原生生物種に特異的なことが多い。これまでに、Termite Group 1 (TG1) (Elusimicrobia) 門, Bacteroidetes 門 Bacteroidales 目, Tenericutes 門 Mycoplasmatales 目, Proteobacteria 門 *Desulfovibrio* 属などの真正細菌と, Euryarchaeota 門 *Methanobrevibacter* 属のメタン生成古細菌などが、原生生物細胞内共生体として同定されている (Hongoh and Ohkuma, 2011)。

最も古くから認識されていたシロアリ腸内原生生物細胞内共生体は、メタン生成古細菌である。様々な環境中の嫌気性原生生物の細胞内共生体としても知られているが、シロアリ腸内の Parabasalia 門原生生物 *Trichomitopsis termopsidis* や *Hexamastix termopsidis*, *Spirotrichonympha leidy*, *Microjoenia* sp., また Preaxostyla 門の *Dinenympha parva* などの細胞内に共生している (Lee et al., 1987; Tsunoda et al., 1993; Tokura et al., 2000; Hara et al., 2004)。何れも未培養種で、*S. leidy*, *Microjoenia* sp., *D. parva* の共生菌については、16S rRNA 遺伝子配列に基づき、*Methanobrevibacter* 属古細菌であることがわかっている (Tokura et al., 2000; Hara et al., 2004; Inoue et al., 2008)。

下等シロアリ腸内からは、これまでに 3 種の *Methanobrevibacter* 属古細菌が単離培養されている (Leadbetter and Breznak, 1996; Leadbetter et al., 1998)。何れも後腸上皮に付着共生する水素依存型メタン生成菌で、 $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ という代謝を行う独立栄養生物である。3 種の中でも *Methanobrevibacter filiformis* は原生生物共生体に比較的近縁で、16S rRNA 配列で 95-97% 相同である (Hongoh and Ohkuma, 2011)。原生生物細胞内に共生するメタン生成菌も同様の性質を持つと仮定するならば、前述の還元的酢酸生成菌同様、水素消費による発酵促進という役割を持つであろう。

もう一点、重要な示唆がなされている。Yamin (1978) は *Trichomitopsis termopsidis* の培養に成功した

が、この原生生物種にはメタン生成古細菌が細胞内共生している (Lee et al., 1987) . Breznak and Odelson (1985) はこの原生生物培養株にメタン菌の活動を阻害する試薬を加え、除去に成功した。ところが、細胞内共生体を除去した株は、それまでの培養条件では増殖困難になった。彼らの試行錯誤の結果、ある系統の細菌培養株をオートクレーブしたものを与えると、再増殖させることができたが、他の細菌系統を与えても増殖しなかった。このことから、細胞内共生メタン生成古細菌は、何らかの特殊な成長因子を宿主原生生物に与えていたと考えられる。また、再増殖中の純粋培養株に *Methanospirillum hungatii* という生きたメタン生成古細菌を加えて培養すると、培養液から水素の代わりにメタンが発生するようになり、*Trichomitopsis termopsidis* の増殖が促進された。これは、メタン生成古細菌との共生によって水素が消費され、原生生物の成長が促されることを裏付けている。

原生生物細胞内共生体の機能の全貌が初めて明らかとなったのは、ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* 腸内に生息する Parabasalia 門原生生物 *Trichonympha agilis* の細胞内共生菌 Rs-D17 においてである (Fig. 6) (Hongoh et al., 2008a) . Rs-D17 は当時培養株が存在しなかった Termite Group 1 (TG1) (Elusimicrobia) 門に属している (Hongoh et al., 2003) . TG1 門は、シロアリ腸から PCR 増幅された 16S rRNA 遺伝子配列により、初めてその存在が報告された真正細菌の一群である (Ohkuma and Kudo, 1996) . その後、このグループが多様なシロアリ腸内原生生物種の細胞内共生菌であることが明らかになるとともに (Stingl et al., 2005; Ikeda-Ohtsubo et al., 2007; Ohkuma et al., 2007b) , 原生生物の共生体ではないと考えられる姉妹群の存在も発見された (Herlemann et al., 2007; Ohkuma et al., 2007b; Ikeda-Ohtsubo et al., 2010) . 後者は多様な環境から PCR によって 16S rRNA 遺伝子配列が取得されていたが、ハナムグリ (コガネムシ科) 幼虫の腸内からの単離培養株 *Elusimicrobium minutum* が記載され、TG1 も Elusimicrobia 門と正式に命名された (Geissinger et al., 2009; Herlemann et al., 2009) .

Elusimicrobia 門の原生生物細胞内共生体は単系統群を形成し (“Endomicrobia” 綱) (Stingl et al., 2005) , 現在でも培養株は存在しない。筆者らは、これら細胞内共生体の機能を解明するため、Rs-D17 のゲノム完全長配列取得を目指した。細菌ゲノムの完全長取得には通常 10^{10} 細胞以上必要であるが、培養不能なため、Phi29 DNA polymerase による等温全ゲノム増幅を行う戦略をとった。宿主原生生物 *Trichonympha agilis* も培養不能であり、一つの腸内に

複数の系統が混在している。宿主の系統が異なれば、細胞内共生細菌の系統も異なる可能性が高い。そこで、宿主原生生物を 1 細胞のみマイクロマニピュレーションで分離し、界面活性剤で細胞膜を破壊して、漏出した Rs-D17 と見られる細胞を数十から数百個程度回収した。全ゲノム増幅の詳細な手順については、他に記した (Hongoh and Toyoda, 2011) .

塩基配列解析の結果、1.1 Mb の、完全長の環状染色体配列取得に成功した (Hongoh et al., 2008a) . 曖昧な塩基サイトは少なく、宿主 1 細胞内の Rs-D17 細菌がほぼ単一系統であることがわかった。得られた染色体配列は 761 個のタンパク遺伝子をコードしていたが、それに加えて、偽遺伝子が 121 個も見出された。これは、Rs-D17 細菌のゲノムが縮小進化過程にあることを示している。興味深いことに、染色体複製開始因子 DnaA の遺伝子まで偽遺伝子化しており、Rs-D17 は宿主細胞外での増殖能を既に失っている可能性が高い。既知の配列との相同性から代謝系を予測したところ、Rs-D17 細菌は、グルコース-6リン酸とウロン酸を主な炭素・エネルギー源とする、絶対嫌気性の発酵性細菌であることが明らかとなった。宿主原生生物によるリグノセルロース分解産物であるグルコースとウロン酸は、豊富に宿主細胞質に存在するはずである。

一方、窒素源については、アンモニア輸送体 AmtB とグルタミン合成酵素 GlnA の遺伝子が偽遺伝子化しており、宿主からのグルタミン供給が必須である。しかし、15 種類のアミノ酸と数種のビタミン類および核酸の合成系は保持していた。このことは、細胞壁 (莢膜) 成分のリポ多糖合成系や制限酵素ユニットなどの防御系、各種膜間輸送体などの遺伝子の多くが偽遺伝子化していたことと対照的である。また、Chlamydiales 目や Rickettsiales 目の細胞内寄生性細菌 (病原菌) が多くの窒素化合物の合成能を失い、宿主からの供給に依存するのとも大きく異なっている。

シロアリは窒素分をほとんど含まない枯死材のみを餌とするため、シロアリも腸内原生生物も、餌の木材から必須窒素化合物を補給できない。それらを合成し、供給するのが Rs-D17 細菌だと考えられる。つまり、Rs-D17 は原生生物とシロアリの相利共生者である。ただし、原生生物の窒素代謝系は未知なため、アブラムシと細胞内共生細菌 *Buchnera* の間で見られるような (Shigenobu et al., 2000) , 正確な栄養相補関係にあるのかは不明である。また、Rs-D17 から原生生物、さらにシロアリへと、どのように窒素化合物が受け渡されるかも、わかっていない。

Rs-D17 は水素産生型の鉄ヒドロゲナーゼ遺伝子を

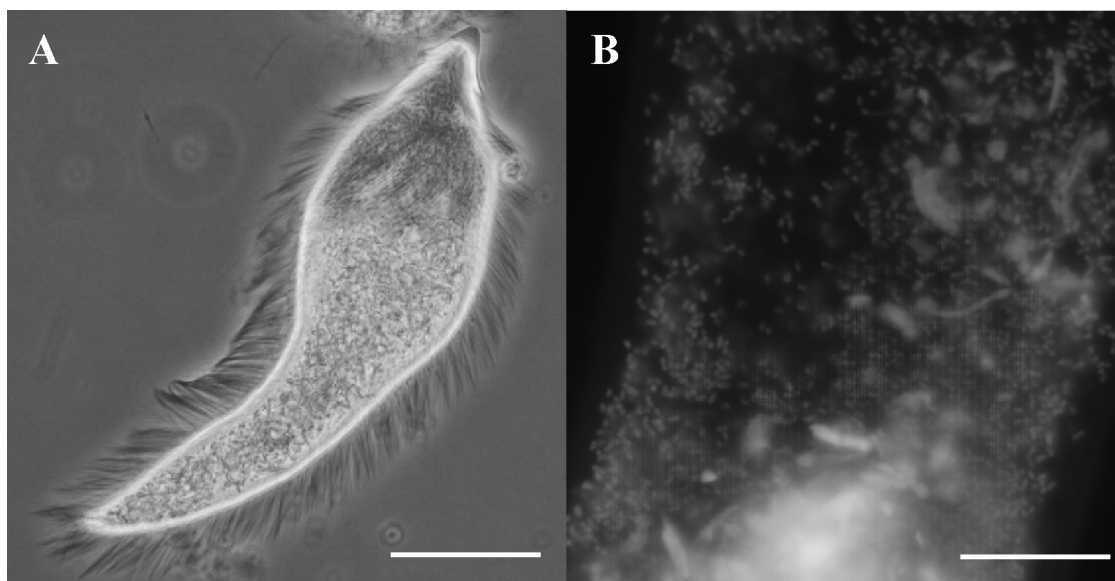


Fig. 7. Endosymbiotic CfPt1-2 bacteria (“*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae*”) inside the cell of the parabasalid protist *Pseudotrichonympha grassii*. (A) Phase contrast image of *P. grassii* from the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Bar = 50 μ m. (B) Detection of CfPt1-2 by FISH analysis. Bar = 10 μ m. The pictures were originally published as supporting information in Hongoh et al. (2008b).

もっており、メタン生成古細菌や還元的酢酸生成細菌のように、水素消費によって原生生物の発酵を促進することはなさそうである。ところが、宿主の *Trichonympha agilis* にはもう1種類、細胞内共生体と見られる真正細菌が存在し、これが水素を消費している可能性が高い。*Trichonympha* 細胞前部の細胞膜直下、ヒドロゲノソーム近傍に局在する *Candidatus Desulfovibrio trichonymphae* と命名した細菌で、Deltaproteobacteria 綱 *Desulfovibrio* 属の、シロアリ特異的な未培養単系統群のメンバーである (Sato et al., 2009)。ゲノムは未解読だが、PCR 法によって、水素酸化型の鉄ニッケル含有ヒドロゲナーゼ遺伝子と、同属の生理的特徴である硫酸還元関連遺伝子の存在と発現が確認されている。

次に、上記のゲノム増幅法を用いて、イエシロアリ腸内原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* の細胞内共生細菌である CfPt1-2 についても (Fig. 7)、ゲノム配列取得を試みた。その結果、1.1 Mb の完全長の環状染色体配列再構築に成功した (Hongoh et al., 2008b)。CfPt1-2 細菌は、前述の原生生物細胞表面共生細菌とともに、Bacteroidetes 門 Bacteroidales 目のシロアリ腸内由来未培養系統群に属している (Noda et al., 2005)。*Pseudotrichonympha* 属原生生物と宿主のミゾガシラシロアリ科 (Rhinotermitidae) のシロア

リ、そして CfPt1-2 を含む *Pseudotrichonympha* 細胞内共生細菌は、かなり厳密な共種分化を遂げている (Noda et al., 2007)。

ゲノム解読の結果、758 個のタンパク遺伝子をコードしており、Rs-D17 同様に、細胞壁合成系や制限酵素などの防御系、膜間輸送系など多くの遺伝子を欠失している一方、19 種類のアミノ酸と数種のビタミン、それに核酸の合成系を保持していた (Hongoh et al., 2008b)。注目されるのは、空中窒素固定遺伝子群 (*nif* オペロンなど) を保有していたことである。これは、Bacteroidetes 門細菌からは初めての発見であった。ニトロゲナーゼをコードする *nifH* 遺伝子の発現も、RT-PCR により確認した。また、原生生物の窒素老廃物と予想される尿素とアンモニアを取込んで再利用する系も存在した。

イエシロアリは *P. grassii* を除去すると、他種の原生生物が健在でも、木材消化能力を失うことが知られており、必須の共生原生生物である (Yoshimura, 1995)。CfPt1-2 細菌は、その *P. grassii* の1細胞あたりに数万個も共生しており、合計で腸内細菌細胞総数の 6-7 割をも占める (Noda et al., 2005)。それが空中からの窒素補給能力を持っていたのである。CfPt1-2 細菌の炭素源は、原生生物によるリグノセルロース分解産物のグルコース、キシロース、ウロン

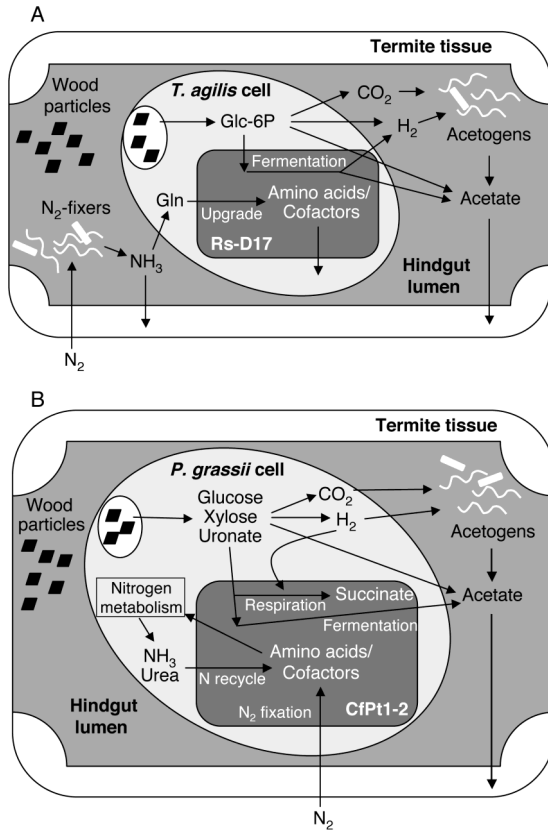


Fig. 8. Predicted functions of endosymbiotic *Rs-D17* bacteria (A) and *CfPt1-2* bacteria (B). Panel A was originally published in Hongoh et al. (2008a) and panel B was published as supporting information in Hongoh et al. (2008b).

酸であり、解糖系によるこれらの発酵と、水素を電子供与体とするフマル酸呼吸によって ATP を生成すると推定された。これら単糖と水素は原生生物細胞内に豊富に存在するはずである。

CfPt1-2 が水素を消費することは、*P. grassii* の細胞を多数集めて分画した生理化学実験から示唆されていた (Inoue et al., 2007)。ゲノム上には典型的な水素酸化型ヒドロゲナーゼは存在しないが、メタン生成古細菌の *heterodisulfide reductase* やヒドロゲナーゼのサブユニットに相同なタンパク遺伝子群がオペロンを形成しており、それらが役割を果たすものと推定した。空中窒素固定は、一般的には $N_2 + 8H^+ + e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$ という、ATP を大量に消費する反応である。そのため、窒素固定を行わない *Rs-D17* とは異なり、発酵に加え、より効率的なフマル酸呼吸能を残しているのではないだろう

か。また水素をエネルギー源として消費することで、これまで述べてきたように宿主の発酵を促進するとともに、窒素固定反応の副産物として生じる水素も無駄にせず利用することができる。*CfPt1-2* は、その窒素固定能にちなんで、*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae* と命名した。

CfPt1-2 と *Rs-D17* の共生系における役割を、簡略に Fig. 8 にまとめた。細胞内共生メタン生成古細菌と *Ca. Desulfovibrio trichonympha* も含めて考えると、結局これら細胞内共生体の役割は、アミノ酸、ビタミンなどの窒素化合物供給と、水素消費による宿主原生生物のリグノセルロース分解・発酵の促進、と考えられる。特に *CfPt1-2* は、空中窒素固定という極めて重要な役割も担っている。原生生物細胞表面に付着共生するバクテロイデスの機能は未知であるが、*CfPt1-2* と同様の機能を持つ可能性もある。実際、付着共生バクテロイデスが宿主原生生物細胞内に取り込まれて消化されるかのような電子顕微鏡観察も報告されており (Noda et al., 2006a)、栄養面で重要な役割を果たすのかもしれない。シロアリ腸内から単離培養されたスピロヘータの一種 *Treponema azotonutricum* は、高い空中窒素固定能を持つことが知られており (Graber et al., 2004)、原生生物細胞表面に付着共生するスピロヘータも同様の機能をもつかもしれない。

結論として、シロアリが枯死材を摂食・粉砕して、腸内原生生物がそれを分解・発酵して酢酸とし、細胞内外の共生細菌が宿主原生生物の発酵を促進するとともに窒素分の固定・合成を担当するという、3 者の複雑で巧妙な多重共生が、シロアリに枯死材の高効率な利用という特別なニッチを与えているのである。

これからの展望

本総説では、原生生物に細胞共生するいくつかの原核生物の機能を中心に述べてきた。しかし、その全貌がわかっているのはゲノム解析に成功した 2 種の細胞内共生細菌のみであり、その他の多様な共生細菌と宿主原生生物の生理・生態の詳細は、依然として未知のままである。また、腸内を自由遊泳する、あるいは腸壁に付着する原核生物の大多数も培養不能であり、機能は未知である。

こうした難培養微生物種の培養法の最適化を進めることも重要だが、そのための情報取得という意味でも、ここで紹介したような手法により、個々の微生物種の全ゲノム解析を進めていくべきである。2000 年代半ば以降、メタゲノム、メタトランスクリプトーム、メタボロームといった、培養不能種も含

めた微生物群集全体を網羅的に解析するオミックス的手法が普及しているが、個々の微生物種の機能や相互作用を解明することはできない。現在、筆者らは、単一の細菌細胞あるいは原生生物の単核からのゲノム解析、すなわちシングルセル・ゲノミクスの確立を目指している（本郷と大熊, 2010）。同様の試みは米国のいくつかのグループでも行われ、徐々に成果が出始めている（Rodrigue et al., 2009; Woyke et al., 2009; Allen et al., 2011; Blainey et al., 2011; Yoon et al., 2011）。メタ解析で群集全体の機能を概観し、シングルセルゲノム解析で優占種やキーストーン種の詳細な解析が可能となれば、微生物群集に関する知見は、飛躍的に増加していくはずである。

引用文献

- Allen, L. Z., Ishoey, T., Novotny, M. A., McLean, J. S., Lasken, R. S. and Williamson, S. J. (2011) Single virus genomics: a new tool for virus discovery. *PLoS One*, 6, e17722.
- Blainey, P. C., Mosier, A. C., Potanina, A., Francis, C. A. and Quake, S. R. (2011) Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *PLoS One*, 6, e16626.
- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A. H., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A. and Hackstein, J. H. (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, 434, 74–79.
- Cavalier-Smith, T. (1989) Molecular phylogeny. *Archaea-bacteria and Archezoa*. *Nature*, 339, 100–101.
- Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews*, 57, 953–994.
- Cleveland, L. R. (1923) Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9, 424–428.
- Cleveland, L. R. and Grimstone, A. V. (1964) The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated micro-organisms. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 159, 668–686.
- d'Ambrosio, U., Dolan, M., Wier, A. M. and Margulis, L. (1999) Devescovinid trichomonad with axostyle-based rotary motor ("Rubberneckia"): taxonomic assignment as *Caduceia versatilis* sp. nov. *Eur. J. Protistol.*, 35, 327–337.
- Desai, M. S., Strassert, J. F. H., Meuser, K., Hertel, H., Ikeda-Ohtsubo, W., Radek, R. and Brune, A. (2010) Strict cospeciation of devescovinid flagellates and *Bacteroidales* ectosymbionts in the gut of dry-wood termites (Kalotermitidae). *Environ. Microbiol.*, 12, 2120–2132.
- Dröge, S., Rachel, R., Radek, R. and König, H. (2008) *Treponema isoptericolens* sp. nov., a novel spirochaete from the hindgut of the termite *Incisitermes tabogae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1079–1083.
- Ebert, A. and Brune, A. (1997) Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface: a microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4039–4046.
- Fujita, A., Hojo, M., Aoyagi, T., Hayashi, Y., Arakawa, G., Tokuda, G. and Watanabe, H. (2010) Details of the digestive system in the midgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. *J. Wood Sci.*, 56, 222–226.
- Geissinger, O., Herlemann, D. P., Morschel, E., Maier, U. G. and Brune, A. (2009) The ultramicrobacterium "*Elusimicrobium minutum*" gen. nov., sp. nov., the first cultivated representative of the Termite Group 1 phylum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 2831–2840.
- Graber, J. R. and Breznak, J. A. (2004) Physiology and nutrition of *Treponema primitia*, an H₂/CO₂-acetogenic spirochete from termite hindguts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1307–1314.
- Graber, J. R., Leadbetter, J. R. and Breznak, J. A. (2004) Description of *Treponema azotonutricium* sp. nov. and *Treponema primitia* sp. nov., the first spirochetes isolated from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1315–1320.
- Hampel, V., Silberman, J. D., Stechmann, A., Diaz-Trivino, S., Johnson, P. J. and Roger, A. J. (2008) Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS One*, 3, e1383.
- Hara, K., Shinzato, N., Oshima, T. and Yamagishi, A. (2004) Endosymbiotic *Methanobrevibacter* species living in symbiotic protists of the termite *Reticulitermes speratus* detected by fluorescent *in situ* hybridization. *Microbes Environ.*, 19, 120–127.
- Herlemann, D. P., Geissinger, O. and Brune, A. (2007) The Termite Group I phylum is highly diverse and widespread in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 6682–6685.
- Herlemann, D. P., Geissinger, O., Ikeda-Ohtsubo, W.,

- Kunin, V., Sun, H., Lapidus, A., Hugenholtz, P. and Brune, A. (2009) Genomic analysis of "*Elusimicrobium minutum*," the first cultivated representative of the phylum "*Elusimicrobia*" (formerly Termite Group 1). *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 2841–2849.
- Hongoh, Y., Ohkuma, M. and Kudo, T. (2003) Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44, 231–242.
- Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnalaemsai, S., Ohkuma, M., Vongkaluang, C., Noparatnaraporn, N. and Kudo, T. (2005) Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6590–6599.
- Hongoh, Y., Sato, T., Dolan, M. F., Noda, S., Ui, S., Kudo, T. and Ohkuma, M. (2007a) The motility symbiont of the termite gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the "*Synergistes*" group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 6270–6276.
- Hongoh, Y., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T. and Ohkuma, M. (2007b) *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of termite gut protists. *Environ. Microbiol.*, 9, 2631–2635.
- Hongoh, Y., Sharma, V. K., Prakash, T., Noda, S., Taylor, T. D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M. and Ohkuma, M. (2008a) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 5555–5560.
- Hongoh, Y., Sharma, V. K., Prakash, T., Noda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M. and Ohkuma, M. (2008b) Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, 322, 1108–1109.
- Hongoh, Y. (2010) Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1145–1151.
- 本郷裕一, 大熊盛也 (2010) Single Cellのゲノム解析. *In: 難培養微生物研究の最新技術 II—ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望—*. 大熊盛也, 工藤俊章 (編). シーエムシー出版, pp. 51–60.
- Hongoh, Y. (2011) Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68, 1311–1325.
- Hongoh, Y. and Ohkuma, M. (2011) Termite gut flagellates and their methanogenic and eubacterial symbionts. *In* *Microbiology Monographs: (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea*. Hackstein, J. H. P. (ed). Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 55–79.
- Hongoh, Y. and Toyoda, A. (2011) Whole-genome sequencing of unculturable bacterium using whole-genome amplification. *Methods Mol. Biol.*, 733, 25–33.
- Iida, T., Ohkuma, M., Ohtoko, K. and Kudo, T. (2000) Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 34, 17–26.
- Ikeda-Ohtsubo, W., Desai, M., Stingl, U. and Brune, A. (2007) Phylogenetic diversity of '*Endomicrobia*' and their specific affiliation with termite gut flagellates. *Microbiology*, 153, 3458–3465.
- Ikeda-Ohtsubo, W., Falvre, N. and Brune, A. (2010) Putatively free-living '*Endomicrobia*' – ancestors of the intracellular symbionts of termite gut flagellates? *Environ. Microbiol. Rep.*, 2, 554–559.
- Inoue, J., Saita, K., Kudo, T., Ui, S. and Ohkuma, M. (2007) Hydrogen production by termite gut protists: characterization of iron hydrogenases of parabasal symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. *Eukaryot. Cell*, 6, 1925–1932.
- Inoue, J., Noda, S., Hongoh, Y., Ui, S. and Ohkuma, M. (2008) Identification of endosymbiotic methanogen and ectosymbiotic spirochetes of gut protists of the termite *Coptotermes formosanus*. *Microbes Environ.*, 23, 94–97.
- Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T. and Yamaoka, I. (2000) Symbiotic associations with protists. *In* *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Abe, T., Bignell, D. E., and Higashi, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, 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.
- Kirby, H. (1944) The structural characteristics and nuclear parasites of some species of *Trichonympha* in termites. *Univ. Calif. (Berkeley) Publ. Zool.*, 49, 185–282.
- Kitade, O., Maeyama, T. and Matsumoto, T. (1997) Establishment of symbiotic flagellate fauna of *Hodoter-*

- mopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). Sociobiology, 30, 161–167.
- Kitade, O. (2007) Characteristics and host-symbiont relationships of termite gut flagellates. Jpn. J. Protozool., 40, 101–112.
- Leadbetter, J. R. and Breznak, J. A. (1996) Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Appl. Environ. Microbiol., 62, 3620–3631.
- Leadbetter, J. R., Crosby, L. D. and Breznak, J. A. (1998) *Methanobrevibacter filiformis* sp. nov., a filamentous methanogen from termite hindguts. Arch. Microbiol., 169, 287–292.
- Leadbetter, J. R., Schmidt, T. M., Graber, J. R. and Breznak, J. A. (1999) Acetogenesis from H₂ plus CO₂ by spirochetes from termite guts. Science, 283, 686–689.
- Lee, M. J., Schreurs, P. J., Messer, A. C. and Zinder, S. H. (1987) Association of methanogenic bacteria with flagellated protozoa from a termite gut. Curr. Microbiol., 15, 337–341.
- Li, L., Fröhlich, J., Pfeiffer, P. and König, H. (2003) Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. Eukaryot. Cell, 2, 1091–1098.
- Lilburn, T. G., Kim, K. S., Ostrom, N. E., Byzek, K. R., Leadbetter, J. R. and Breznak, J. A. (2001) Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. Science, 292, 2495–2498.
- Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H., Rose, H., Slaytor, M., Maekawa, K., Bandi, C. and Noda, H. (2000) Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. Curr. Biol., 10, 801–804.
- Moriya, S., Tanaka, K., Ohkuma, M., Sugano, S. and Kudo, T. (2001) Diversification of the microtubule system in the early stage of eukaryote evolution: elongation factor 1 alpha and alpha-tubulin protein phylogeny of termite symbiotic Oxymonad and Hypermastigote protists. J. Mol. Evol., 52, 6–16.
- Munson, M. A., Baumann, P., Clark, M. A., Baumann, L., Moran, N. A., Voegtlin, D. J. and Campbell, B. C. (1991) Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. J. Bacteriol., 173, 6321–6324.
- Nakashima, K. I., Watanabe, H. and Azuma, J. I. (2002) Cellulase genes from the parabasal symbiont *Pseudotriconympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus*. Cell. Mol. Life Sci., 59, 1554–1560.
- Noda, S., Ohkuma, M., Yamada, A., Hongoh, Y. and Kudo, T. (2003) Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. Appl. Environ. Microbiol., 69, 625–633.
- Noda, S., Iida, T., Kitade, O., Nakajima, H., Kudo, T. and Ohkuma, M. (2005) Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotriconympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Appl. Environ. Microbiol., 71, 8811–8817.
- Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Nalepa, C. A., Vongkaluang, C., Kudo, T. and Ohkuma, M. (2006a) Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in *Bacteroidales* attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. Environ. Microbiol., 8, 11–20.
- Noda, S., Kawai, M., Nakajima, H., Kudo, T. and Ohkuma, M. (2006b) Identification and *in situ* detection of two lineages of *Bacteroidales* ectosymbionts associated with a termite gut protist, *Oxymonas* sp. Microbes Environ., 21, 16–22.
- Noda, S., Kitade, O., Inoue, T., Kawai, M., Kanuka, M., Hiroshima, K., Hongoh, Y., Constantino, R., Uys, V., Zhong, J.-H., Kudo, T. and Ohkuma, M. (2007) Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotriconympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. Mol. Ecol., 16, 1257–1266.
- Noda, S., Hongoh, Y., Sato, T. and Ohkuma, M. (2009a) Complex coevolutionary history of symbiotic *Bacteroidales* bacteria of various protists in the gut of termites. BMC Evol. Biol., 9, e158.
- Noda, S., Mantini, C., Bordereau, C., Kitade, O., Dolan, M. F., Viscogliosi, E. and Ohkuma, M. (2009b) Molecular phylogeny of parabasalids with emphasis on the order Cristamonadida and its complex morphological evolution. Mol. Phylogenet. Evol., 52, 217–224.
- Odelson, D. A. and Breznak, J. A. (1985) Nutrition and growth characteristics of *Trichomitopsis termopsidis*, a cellulolytic protozoan from termites. Appl. Environ. Microbiol., 49, 614–621.
- Ohkuma, M. and Kudo, T. (1996) Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol., 62, 461–468.

- 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. Eukaryot. Microbiol.*, 45, 439–444.
- Ohkuma, M., Saita, K., Inoue, T. and Kudo, T. (2007a) Comparison of four protein phylogeny of parabasalians symbionts in termite guts. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 42, 847–853.
- Ohkuma, M., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T. and Hongoh, Y. (2007b) The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60, 467–476.
- Ohkuma, M. (2008) Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends Microbiol.*, 16, 345–352.
- Ohkuma, M., Noda, S., Hongoh, Y., Nalepa, C. A. and Inoue, T. (2009) Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach *Cryptocercus*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 276, 239–245.
- Ohtoko, K., Ohkuma, M., Moriya, S., Inoue, T., Usami, R. and Kudo, T. (2000) Diverse genes of cellulase homologues of glycosyl hydrolase family 45 from the symbiotic protists in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus*. *Extremophiles*, 4, 343–349.
- Pester, M. and Brune, A. (2007) Hydrogen is the central free intermediate during lignocellulose degradation by termite gut symbionts. *ISME J.*, 1, 551–565.
- Rodrigue, S., Malmstrom, R. R., Berlin, A. M., Birren, B. W., Henn, M. R. and Chisholm, S. W. (2009) Whole genome amplification and de novo assembly of single bacterial cells. *PLoS One*, 4, e6864.
- Sato, T., Hongoh, Y., Noda, S., Hattori, S., Ui, S. and Ohkuma, M. (2009) *Candidatus* Desulfovibrio trichonymphae, a novel intracellular symbiont of the flagellate *Trichonympha agilis* in termite gut. *Environ. Microbiol.*, 11, 1007–1015.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. and Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature*, 407, 81–86.
- Slaytor, M. (2000) Energy metabolism in the termite and its gut microbiota. In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Abe, T., Bignell, D. E., and Higashi, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 307–332.
- Stingl, U., Maass, A., Radek, R. and Brune, A. (2004) Symbionts of the gut flagellate *Staurojoenina* sp. from *Neotermes cubanus* represent a novel, termite-associated lineage of Bacteroidales: description of '*Candidatus* Vestibaculum illigatum'. *Microbiology*, 150, 2229–2235.
- Stingl, U., Radek, R., Yang, H. and Brune, A. (2005) '*Endomicrobia*': cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1473–1479.
- Tamm, S. L. (1980) The ultrastructure of prokaryotic-eukaryotic cell junctions. *J. Cell Sci.*, 44, 335–352.
- Tamm, S. L. (1982) Flagellated ectosymbiotic bacteria propel a eucaryotic cell. *J. Cell Biol.*, 94, 697–709.
- Tartar, A., Wheeler, M. M., Zhou, X., Coy, M. R., Boucias, D. G. and Scharf, M. E. (2009) Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Biotechnol. Biofuels*, 2, e25.
- Todaka, N., Moriya, S., Saita, K., Hondo, T., Kiuchi, I., Takasu, H., Ohkuma, M., Piero, C., Hayashizaki, Y. and Kudo, T. (2007) Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 592–599.
- Todaka, N., Inoue, T., Saita, K., Ohkuma, M., Nalepa, C. A., Lenz, M., Kudo, T. and Moriya, S. (2010) Phylogenetic analysis of cellulolytic enzyme genes from representative lineages of termites and a related cockroach. *PLoS One*, 5, e8636.
- Tokura, M., Ohkuma, M. and Kudo, T. (2000) Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 33, 233–240.
- Tsunoda, K., Ohmura, W. and Yoshimura, T. (1993) Methane emission by the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae) (II) Presence of methanogenic bacteria and effect of food on methane emission rates. *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.*, 5, 166–174.
- Watanabe, H. and Tokuda, G. (2001) Animal cellulases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 1167–1178.
- Watanabe, H. and Tokuda, G. (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 55, 609–632.
- Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle, G. and König, H. (2003) Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. *Eur. J. Protistol.*, 39, 11–23.

- Woyke, T., Xie, G., Copeland, A., Gonzalez, J. M., Han, C., Kiss, H., Saw, J. H., Senin, P., Yang, C., Chatterji, S., Cheng, J. F., Eisen, J. A., Sieracki, M. E. and Stepanauskas, R. (2009) Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS One*, 4, e5299.
- Yamin, M. A. (1978) Axenic cultivation of the cellulolytic flagellate *Trichomitopsis termopsisidis* (Cleveland) from the termite *Zootermopsis*. *J. Protozool.*, 25, 535–538.
- Yamin, M. A. (1981) Cellulose metabolism by the flagellate *Trichonympha* from a termite is independent of endosymbiotic bacteria. *Science*, 211, 58–59.
- Yoon, H. S., Price, D. C., Stepanauskas, R., Rajah, V. D., Sieracki, M. E., Wilson, W. H., Yang, E. C., Duffy, S. and Bhattacharya, D. (2011) Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science*, 332, 714–717.
- Yoshimura, T. (1995) Contribution of the protozoan fauna to nutritional physiology of the lower termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Wood Res.*, 82, 68–129.