



TITLE:

STUDIES ON THE CELLULOSE
DECOMPOSING ABILITY OF JAPANESE
COMMON BRACKISH-WATER CLAM
"Corbicula japonica(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sakamoto, Kentaro

CITATION:

Sakamoto, Kentaro. STUDIES ON THE CELLULOSE DECOMPOSING ABILITY OF JAPANESE
COMMON BRACKISH-WATER CLAM "Corbicula japonica. 京都大学, 2009, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2009-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/123976>

RIGHT:

氏名	坂本健太郎
----	-------

(論文内容の要旨)

ヤマトシジミ(*Corbicula japonica*)は日本の汽水環境に優占する二枚貝であり、水産上重要な漁獲対象種である。ヤマトシジミは懸濁物食者に分類され、主に植物プランクトンを摂餌すると考えられてきたが、近年、安定同位体分析により定説に反しヤマトシジミが陸上植物由来の有機物を同化している可能性が示唆された。一方、河川に流入する陸上植物由来の有機物はその大部分が難分解性の構造多糖であり、その主要成分はセルロースである。これまで、河川に流入したセルロースはバクテリア等の微生物により分解を受けるとされてきたが、河川物質循環の中でのその動態は十分に明らかにされているとは言えない。陸上においてはシロアリ等の昆虫がセルロース分解に重要な役割を担っていることが示唆されており、河川においても無脊椎動物がセルロース分解に寄与している可能性は十分に考えられる。

本研究では、ヤマトシジミが陸上植物由来のセルロースを同化しており、その分解過程に寄与しているのではないかという仮説を立て、生化学的な立場からその仮説を検証した。そしてさらに、このセルロース分解機能を担う酵素「セルラーゼ」及び「 β -グルコシダーゼ」に着目し、ヤマトシジミのセルロース分解機構を解明することを目的として研究を行った。論文内容の要旨は以下の通りである。

第1章では、ヤマトシジミがセルロースを含む陸上植物由来の有機物を同化している可能性を消化酵素の面から検証するため、ヤマトシジミの晶桿体(軟体動物特有の消化酵素複合体)に含まれるセルラーゼ等の多糖類分解酵素活性を、他のマルスダレガイ科二枚貝(アサリ、チョウセンハマグリ、ハマグリ)と比較した。その結果、ヤマトシジミ晶桿体は陸上植物細胞壁の主たる構造多糖であるセルロース及びヘミセルロースに高い分解活性を示すことが明らかになり、本種が陸上植物由来の構造多糖を他の二枚貝に比べ効率的に分解できることが示唆された。また、ヤマトシジミの消化器官におけるセルロース分解過程を解明するため晶桿体と中腸腺のセルラーゼ活性及び β -グルコシダーゼ活性を測定した。その結果、①セルラーゼ活性は晶桿体と中腸腺の両方に分布すること、② β -グルコシダーゼ活性は主に中腸腺に分布すること、が明らかになり、ヤマトシジミでは、セルロースをセロオリゴ糖又はセロビオースまで分解する反応を晶桿体が、最終的にグルコースへ分解する反応を中腸腺が担っていることが示唆された。

第2章では、ヤマトシジミの内源性のセルラーゼの存否を検討するため、本種からセルラーゼ遺伝子のクローニングを行い、その一次構造解析及び機能解析を行った。その結果、糖質加水分解酵素ファミリー (Glycoside Hydrolase Family : GHF) 9, 10, 45 に属する3つのセルラーゼ遺伝子 *CjCel9A*, *CjCel10A* 及び *CjCel45A* の単離に成功し、ゲノム DNA のクローニングによりこれらの遺伝子の内源性を確認した。また、これらの遺伝子がコードする酵素の組換えタンパク質はセルラーゼ活性を示したことから、*CjCel9A*, *CjCel10A* 及び *CjCel45A* が機能を持つ酵素をコードしていることが確認され、ヤマトシジミが複数の内源性セルラーゼ遺伝子を有することが明らかになった。

第3章では、*CjCel9A*, *CjCel10A* 及び *CjCel45A* がヤマトシジミ体内でどのように機能するのかを検討するため、RT-PCR 分析及び *in situ hybridization* 法により遺伝子発現部位を特定すると共に、抗 CjCEL9A 抗体を用いたウエスタンブロット分析及び組織免疫染色法により翻訳タンパク質の局在を解析した。その結果、①これらの遺伝子は中腸腺小管上皮の分泌細胞で発現していること、②CjCEL9A は主に晶桿体に蓄積していること、が明らかになり、ヤマトシジミの内源性セルラーゼは中腸腺で生産され、晶桿体に蓄積されることが示された。

第4章では、セルロースをエネルギーとして利用する場合に必須であると考えられるβ-グルコシダーゼについて、ヤマトシジミの内源性遺伝子の存在、及びその機能を検討するため、本種からβ-グルコシダーゼ遺伝子のクローニングを行い、その一次構造解析、並びに RT-PCR 分析及び *in situ hybridization* 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、GHF1 に属する新規な構造のβ-グルコシダーゼ遺伝子 *CjCel1A* の単離に成功し、ゲノム DNA のクローニングによりこれらの遺伝子の内源性を確認した。また、*CjCel1A* は中腸腺小管上皮の一部の細胞で発現していることが明らかになり、CjCEL1A はセルロース分解に関わる消化酵素であることが示唆された。

以上のことから、ヤマトシジミが内源性のセルラーゼ及びβ-グルコシダーゼによって、陸上植物由来のセルロースを同化しているとする仮説が支持されたと結論付けた。

(論文審査の結果の要旨)

水圏環境にはセルロースを始めとする陸上植物由来の難分解性物質が大量に流入する。こうした物質はバクテリアや菌類によってゆるやかな分解を受けると考えられてきたが、環境中での詳しい動態は明らかになっていない。一方、懸濁物食者である二枚貝は主に植物プランクトンや微細藻類を摂餌していると考えられてきたが、ヤマトシジミに関しては、安定同位体分析の結果、陸上植物起源の有機物を同化していることが示されており、詳細な食性にはなお不明な点が多い。

本研究は、このような背景から、ヤマトシジミが陸上植物由来のセルロースを分解・同化する能力を有しているのではないかという仮説を立て、これを生化学的に検証したものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. ヤマトシジミとその他のマルスダレガイ目の二枚貝（アサリ，チョウセンハマグリ，ハマグリ）の晶桿体に含まれる多糖類分解酵素活性を詳細に比較することで、ヤマトシジミが特に強いセルロース・ヘミセルロース分解活性を有することを明らかにし、二枚貝の糖質利用能に関する新たな水産学的知見を創出した。また、二枚貝が陸上植物由来のセルロースを分解・同化している可能性に初めて言及した。
2. 動物由来のセルラーゼ研究はこれまでシロアリ等典型的な食植性動物に関するものがほとんどであったが、懸濁物植者である二枚貝がシロアリと同様複数の内源性セルラーゼ遺伝子を有していることを明らかにした。本研究により、ヤマトシジミは軟体動物の中で最も多くのセルロース分解酵素遺伝子が単離された種となった。
3. 二枚貝晶桿体のセルラーゼ活性は、これまで共生微生物や摂餌物等の外因性のものであるのか、二枚貝の内源性酵素によるものなのか不明であったが、免疫組織学的手法によって、ヤマトシジミ晶桿体に内源性セルラーゼが蓄積していることを明らかにした。
4. セルロース分解の最終段階で働く β -グルコシダーゼの遺伝子を軟体動物で初めてヤマトシジミから単離し、新規な構造を有することを明らかにした。
5. 上記の結果から、汽水域に生息するヤマトシジミ以外の底生無脊椎動物についてもさらにセルロース分解機能の比較検討を行うことで、これらの生物の生態学的役割の解明に新たな道が拓かれる可能性を指摘した。

以上のように本論文は、ヤマトシジミのセルロース分解機能を、酵素活性の解析と遺伝子解析の両面から解明したものである。ヤマトシジミのような底生無脊椎動物がセルロース分解機能を有している事実が明らかになったことは、漁業資源管理上重要な本種の食性に関する新規な生理学的知見であると同時に、水圏の物質循環を考える上で非常に重要な生態学的知見でもあり、水産学並びに海洋生物学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成21年1月27日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。