

氏名	なかしま けいすけ 中島 啓介
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1265号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科地域環境科学専攻
学位論文題目	DUAL CELLULOSE-DIGESTING SYSTEM BY THE WOOD-FEEDING TERMITE, <i>COPTOTERMES FORMOSANUS</i> , AND ITS HINDGUT FLAGELLATES (イエシロアリとその後腸内共生鞭毛虫によるセルロースの消化機構) (主査)
論文調査委員	教授 東 順一 教授 武田博清 教授 津田盛也

論 文 内 容 の 要 旨

シロアリは、多様な微生物との栄養共生を介して、植物遺体を分解・利用している。材食性の下等シロアリの場合、摂食した木材中のセルロースは後腸に棲息するパラバサリア・オキシモナス綱鞭毛虫によって分解され、シロアリはその分解産物である酢酸を吸収・利用している。本論文では、下等シロアリに属するイエシロアリとその後腸に共生しているパラバサリア鞭毛虫によるセルロースの分解機構を研究した。本論文で得られた結果は以下のように要約される。

1. イエシロアリの消化器官系(唾液腺・前腸・中腸・後腸)におけるセルロース加水分解活性および結晶性セルロースからのグルコース生産活性の分布を調べたところ、これらの活性の分布は鞭毛虫の分布と一致せず、唾液腺・前腸・中腸においても認められた。この結果から、後腸以外の消化器官においてもセルロース分解が起きている可能性が示された。また、エンドグルカナーゼ活性の80%以上が唾液腺に局在するなど、唾液腺がセルロース分解において重要な役割を果たしている可能性が示された。

2. エンドグルカナーゼ活性のザイモグラフ分析およびN末端アミノ酸配列分析を行い、唾液腺・前腸・中腸には糖加水分解酵素ファミリー9に相同性を示すエンドグルカナーゼ成分が分布しているのに対し、後腸には糖加水分解酵素ファミリー7に相同性を示すエンドグルカナーゼ成分が特異的に分布していることが明らかとなった。中腸に認められるエンドグルカナーゼ成分が後腸に認められないことから、これら2つの消化器官はセルロース分解の場として独立していることが示唆された。

3. 糖加水分解酵素ファミリー9内で共通に保存された塩基配列を利用してRT-PCRを行い、唾液腺と中腸において糖加水分解酵素ファミリー9に属する遺伝子が発現していることを明らかにするとともに、これらの遺伝子の全塩基配列を決定した。これらの遺伝子は、唾液腺・前腸・中腸に認められるエンドグルカナーゼ成分と同じN末端アミノ酸配列を含んだ445アミノ酸残基の読み枠を持つ5つの相同遺伝子であり、吸着ドメインなどの付属のドメインを持つバクテリア・カビ由来のセルラーゼとは異なって、触媒ドメインのみからなるシングルドメイン構造のセルラーゼをコードしていることを明らかにした。

4. 糖加水分解酵素ファミリー7に相同性を示すエンドグルカナーゼ成分を精製し、決定したN末端アミノ酸配列に基づいて、糖加水分解酵素ファミリー7に属するセルロース分解酵素遺伝子群を後腸からクローニングした。クローニングした遺伝子配列に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い、それらが鞭毛虫 *Pseudotriconympha grassii* の体内で発現していることを明らかにした。加えて、同遺伝子群を大腸菌で発現させ、それらのコードするタンパク質がセルロースを分解することを明らかにした。これらのことから、後腸鞭毛虫がセルロースを分解するという従来の説を初めて遺伝子レベルで裏付けることができた。

これらの結果から、イエシロアリの消化器官系内には、中腸におけるイエシロアリ内源性的のセルラーゼ成分で構成される分解系と、後腸における鞭毛虫由来のセルラーゼ成分で構成される分解系の異なる2つのセルロース分解系が存在すること

を提案した。両分解系における結晶性セルロースからのグルコースの生産能を比較検討した結果、イエシロアリの呼吸代謝を支えるには中腸における分解系だけでは不十分であり、セルロース分解者として後腸鞭毛虫が必要であると推論された。

論文審査の結果の要旨

シロアリは植物遺体の分解者として陸上生態系における腐食連鎖を支える重要種であるが、その消化管における植物遺体の分解機構には不明な点が多い。その要因として、シロアリは多様な微生物と栄養共生関係にあり、それらの微生物の多くが培養不可能であることが挙げられる。

本論文は、消化器官系内に認められるエンドグルカナーゼ成分の同定およびそれらの分布と由来の分析を通じて、共生微生物の培養を介さずに、我国で最大の木造建築物の害虫であるイエシロアリによるセルロースの分解機構の詳細を検討している。従来、イエシロアリが摂食した木材中のセルロースは後腸に棲息するパラバサリア鞭毛虫が分解すると考えられていたが、本論文はイエシロアリ自身もセルロース分解に関わっていることを明らかにした。

本論文の成果として評価される点は以下の通りである。

1. 後腸から糖加水分解酵素ファミリー7に属するセルラーゼ遺伝子群をクローニングし、それらが鞭毛虫 *Pseudotrichonympha grassii* の体内で発現していることを明らかにした。加えて、大腸菌を用いて同遺伝子群を発現させ、それらのコードするタンパク質がセルロース分解活性を示すことを明らかにし、鞭毛虫がセルロースを分解するという従来のシロアリ・鞭毛虫共生像における基本的な概念を遺伝子レベルで初めて裏付けた。

2. 消化器官系（唾液腺・前腸・中腸・後腸）におけるセルロース加水分解活性および結晶性セルロースからのグルコース生産活性の分布を調べ、鞭毛虫の棲息しない消化器官においてもセルロース分解が起きている可能性を示した。

3. 糖加水分解酵素ファミリー9に属するセルラーゼ遺伝子がイエシロアリの唾液腺と中腸で発現していることを明らかにするとともに、その全塩基配列を決定することにより、イエシロアリ内源性セルラーゼの存在を明らかにした。

4. ザイモグラム分析とN末端アミノ酸配列分析を行い、内源性のファミリー9セルラーゼは唾液腺・前腸・中腸に、鞭毛虫由来のファミリー7セルラーゼは後腸に、それぞれ特異的に分布していることを明らかにし、イエシロアリの後腸はセルロース分解の場として独立していることを示した。

5. 以上の結果をとりまとめ、摂食されたセルロースは中腸におけるイエシロアリ内源性のセルラーゼ成分で構成される分解系と、後腸における鞭毛虫由来のセルラーゼ成分で構成される分解系の異なる2つのセルロース分解系により分解される機構を提案した。また、両分解系における結晶性セルロースからのグルコースの生産能と、呼吸商など既知のイエシロアリ代謝に関する情報とを比較検討した結果、中腸の分解系だけではイエシロアリの呼吸代謝を支えるには不十分であることを明らかにし、イエシロアリがセルロース分解者としての鞭毛虫を必要としている1つの根拠を示した。

以上のように、本論文はイエシロアリと後腸鞭毛虫の共生関係を介したセルロースの分解・利用に関する新知見をもたらしており、バイオマス循環学、森林生態学、微生物環境制御学などの発展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14年2月18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。