

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380037

研究課題名（和文） シロアリ共生細菌によるセルロース分解機構

研究課題名（英文） Cellulolytic systems by the symbiotic bacteria in termites

研究代表者

徳田 岳（TOKUDA GAKU）

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：90322750

研究成果の概要（和文）：セルロース分解に関する分野は、公害の少ない安価なバイオエタノールの生産に向けて非常に注目されている。シロアリは植物バイオマスを中腸および後腸セルロース消化系を利用して効率的に分解しており、本研究では後腸消化系の解析を試みた。その結果、後腸に共生するバクテリアから多様なリグノセルロース分解酵素遺伝子と糖質結合タンパク質の遺伝子を得ることができた。解析の結果から、中腸でセルロースを中心に分解し、後腸で主にヘミセルロースを分解するという二重分解系モデルが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Research areas in cellulose digestion have generally attracted many people as it could be converted to non-harmful bioethanol in a reasonable price. Termites digest plant biomass efficiently in both the midgut and the hindgut digestive systems, In the present study, the hindgut cellulolytic systems were primarily analyzed. As a result, diverse genes relevant to lignocellulose decompositions and to carbohydrate-binding modules were obtained. Detailed analyses suggest that the termites are equipped with dual digestive systems, in which the midgut system hydrolyzes cellulose and the hindgut system is primarily involved in hemicellulose degradations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	10,100,000	3,030,000	13,130,000

研究分野：昆虫生理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫利用・機能開発

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁の主成分はセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから構成されており、これらの複合体をリグノセルロースと呼んでいる。特にセルロースはブドウ糖の重合体であり、自然界では毎年約 9×10^{12} から 9×10^{13} kg が生産されていると見積もられている。こ

のことが、セルロースは世界でもっとも豊富なリサイクル可能なバイオマスであると言われる所以である。

しかしながら、リグノセルロースは難分解性の物質であり、多くの生物はこれを利用することができない。そのような中で、シロアリ類はリグノセルロースの効率的な分解シス

テムを身につけ、これを主食として生き延びてきた。これまでの研究により、シロアリ類は枯死植物に含まれるセルロースの74~99%を分解していると考えられている。

このようなシロアリ類による効率的なリグノセルロース分解系は、多くの研究者の注目を集め、20世紀のはじめから、特にセルロース分解に注目した研究が数多く行われてきた。一連の研究の中で、シロアリ類の後腸に共生する原生動物がシロアリ類のセルロース消化に主要な役割を果たすこと、そして、シロアリ自身もセルロース分解に必要な酵素を分泌する可能性が報告された。ところが、全世界に分布するシロアリ類のうち、75%の種は後腸内にセルロース分解に関与する原生動物を共生させていないことが知られている。これらのシロアリ（高等シロアリと呼ばれる）は、熱帯や亜熱帯地域を中心に分布しており、日本では沖縄諸島のみ分布する。これらのシロアリは後腸内に多くの原核生物（細菌・古細菌）を共生させており、1980年代初頭までは、共生細菌が原生動物に変わってセルロース消化に関与するのではないかと推測されていた。しかしながら、80年代後半に原生動物を持たないシロアリを用いて行われた研究において、①微生物が共生しないシロアリ中腸に強いセルラーゼ活性が存在すること、②微生物が共生する後腸ホモジネートの上清にセルラーゼ活性がほとんどないこと、③不溶成分に対してリゾチームや超音波破碎処理を施しても上清にセルラーゼ活性が遊離してこないことを根拠に、共生原核生物がシロアリ類のセルロース消化に関与している可能性が否定された。

これまでにいくつかの研究が、シロアリからセルロース分解能を持ったバクテリアの単離や、共生バクテリアがセルロース分解に関与する可能性を示唆しているが、これらが実際にシロアリ消化管内でセルロース消化に働いていることを示す直接的な証拠を示されるには至っていない。したがって、他の環境におけるセルロース分解の例とは大きく異なり、シロアリではこれまでに真核生物（シロアリ自身および共生原生動物）のみがセルロース消化の主人公であると考えられてきた。

これまでに申請者らは、シロアリ類のセルロース分解に関する研究の中で、原生動物が共生するシロアリでは唾液腺でシロアリ自身がセルラーゼを分泌していることを明らかにしたと同時に、原生動物が共生しないシロアリにおいては主に中腸でセルラーゼを分泌していることを明らかにしてきた。また、セルラーゼの分泌場所が、シロアリ進化の過程で原生動物の喪失を境に変化してきたことを明らかにしてきた。しかし、その過程の中で、共生原生動物を持たない高等シロアリにおいて、①シロアリ中腸に存在するセルラーゼ活性が

シロアリの呼吸に必要な量の糖を供給するに十分ではないこと、②シロアリ後腸の沈殿物に比較的強いセルラーゼ活性が残っていることを報告した。

その後、本計画に先立って、西表島に分布するタカサゴシロアリおよびオーストラリア産の同属シロアリを用いて行った研究によって、ある種のデタージェントを用いることで後腸沈殿物に存在するセルラーゼ活性が可溶化されること、そしてZymogramによる解析を行った結果、可溶化された抽出物中のセルラーゼが、Native-PAGEの条件下では高分子のバンドとして現れ、SDS-PAGE条件下では複数のバンドとして現れることを発見した。これらのバンドの位置はシロアリ自身が分泌する中腸セルラーゼと全く異なっており、実際には中腸に由来するセルラーゼ活性は、微生物が多数共生する後腸膨大部に到達する前にほぼ消失することが確かめられている。また、タカサゴシロアリ後腸壁は4層のクチクラで覆われており分泌細胞も観察されないことから、後腸において新たにシロアリ由来のセルラーゼが分泌されていることは考えられない。さらに抗生物質処理の結果、後腸内のセルラーゼ活性は優位に減少することが確認されている。したがって、ここで検出されたセルラーゼは後腸内腔に観察されるバクテリアに由来する可能性が強く考えられた。

これまでに*Clostridium thermoCELLUM*を中心とした嫌気性セルロース分解細菌を用いた研究では、セルロソームと呼ばれる細胞壁に付着したセルラーゼ複合体が、これらの細菌のセルロース消化に中心的な役割を果たすことが報告されている。セルラーゼとは、セロビオハイドラーゼやエンドグルカナーゼといったセルロース分解に関与する酵素の総称である。効率的なセルロース分解のためにはこれらの酵素に加えて、セルロースと結合したヘミセルロースの分解酵素など、複数のリグノセルロース分解に関与する酵素が必要である。セルロソームは、そのような酵素をすべて含んだ複合体であり、究極のリグノセルロース分解装置である。

申請者のこれまでの研究結果は、シロアリセルロース消化系において、真核生物によるセルロース分解システムに加えて、セルロソームもしくはその類似物を備えた原核生物によるセルロース分解系が関与していることを強く示唆している。このように全く性質を異にする二つの分解システムが、ひとまとまりとして働くセルロース分解系は他に例がなく、本研究によって独創性の高い効率的なリグノセルロース分解系のモデルを提唱できることが期待される。また、下等シロアリとは異なる高等シロアリの多様な食性への適応は、後腸微生物の働きと密接に関係していることが考えられる。

なお、本研究で中心的に用いる高等シロアリ類、すなわち共生原生動物を持たないシロアリ類は、日本では沖縄県内のみ分布し、特に食材性高等シロアリであるタカサゴシロアリは八重山諸島のみ分布している。西表島には琉球大学熱帯生物圏研究センターがあり、本研究では安定的かつ十分な材料供給と、必要に応じて現地実験も可能である。したがって、他機関と比べた際の地理的優位性の観点からも、本研究が琉球大学において遂行されることの意義は深い。

2. 研究の目的

セルロース分解に関する分野は、公害の少ない安価なバイオエタノールの生産に向けて非常に注目されている。バイオエタノール生産はサトウキビが豊富なブラジルで古くから行われているが、現在、アメリカなどの先進国でもトウモロコシ等から18億ガロンのバイオエタノールが作られ、一部の地域ではガソリンと10%の割合でブレンドされている。しかし、現状においてバイオエタノールがガソリンとの価格競争に耐えるためには、より安価なセルロース系バイオマスからエタノールが作られ、かつ現状よりも生産コストが1ガロンあたり50セント抑えられる必要があると試算されている（現在のセルロース系バイオマスから生産されるエタノールの1ガロンあたりの販売価格は\$1.20である。日本でも農林水産基本計画によって、平成22年までに木質バイオマスからのエタノール収率70%以上を実現し、平成27年までに実用価格での市場提供を目指すことが謳われているが、見通しは厳しい。この実現のためには多種多様なセルロース系基質から効率的なセルロース分解を行うシステムの構築が急務であり、本研究は新しい研究の方向性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵素活性抽出

材料は主に西表島において採集したタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis*) を用いた。

タカサゴシロアリ後腸を MilliQ 中でホモジナイズし、遠心によって上清と沈殿とに分画した。沈殿物については 40% CellLytic IB (Sigma) 中でボルテックスし、酵素活性を抽出した。

(2) 酵素精製

酵素精製は主に以下の方法で行った。

抽出物をイオン交換カラム (HiLoad SP 16/20 HP カラムおよび MonoS 5/50 カラム) によって精製し、得られた分画をさらにゲル濾過 (Superdex 75) によって分離した。そ

の後、限外濾過によって脱塩し、アセトン沈殿によってサンプルを濃縮した。得られたサンプルを SDS-PAGE によって展開し、主要なバンドについてプロテインシーケンサーによる N 末端アミノ酸配列の解析を行った。

(3) 次世代シーケンサーによるメタゲノム解析

細菌と木片との相互作用が頻繁に観察される部位として、タカサゴシロアリ後腸膨大部 (P3) 前半部内容物より DNA を抽出、精製した。GS チタニウムライブラリー調整キット、GS Junior チタニウム emPCR キット、および GS Junior チタニウムシーケンシングキットを用いてメタゲノム解析用サンプルを調整した。DNA のシーケンシングには 454 GS Junior を用い、得られたリードを Newbler によってアセンブルした。生成されたコンテイングについて、CAZy (Carbohydrate-Active enZymes: <http://www.cazy.org/>) データベースに登録された配列のうち糖質加水分解酵素 (GH) および糖質結合モジュール (CBM) に対してホモロジー検索を行い、得られた結果を集計した。また、特に重要なコンテイングについては内部配列の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 細菌由来セルラーゼ抽出法および精製法の検討

まずシロアリ共生細菌からのセルラーゼ抽出に関して、これまでに報告のあるセルロソーム抽出法も並行して検討した。しかし、従来の方法ではセルラーゼ活性の溶出が認められなかったため、当研究室で新たに確立された後腸微生物セルラーゼの溶出方法に従ってシロアリホモジネートから粗酵素液を調整した。この粗酵素液にはセルラーゼ活性のほか、主要なヘミセルロース成分であるキシランに対する分解活性も含まれていた。本粗酵素液に対し、Superdex-200カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、約500 kDaと50 kDa付近にセルロース分解活性が認められた。小さい分子量のピークは内源性セルラーゼである可能性が考えられたため、これを効率的に除去するための抗体作製を行い、ウェスタンブロットにより抗体の特異性について確認した。また、粗精製物の電気泳動を行い、一部のバンドについてはアミノ酸配列の解析を試みた。しかし、既知の細菌由来セルラーゼとホモロジーを示す配列は得られなかった。

(2) 細菌由来セルラーゼ精製法の改良についての検討

次にセルラーゼ精製法のさらなる改良を試みた。シロアリ後腸抽出物を SPカラムに通

し、さらに酵素活性を示した分画をMonoSカラムで分離した後、ゲル濾過と限外濾過を組み合わせることで精製した。完全な精製には至らなかったが、部分精製物について電気泳動後のバンドをN末端アミノ酸分析（各15残基）により解析した。しかしながら、これらは既知のリグノセルロース分解酵素と高いホモロジーは示していなかった。さらに、電気泳動の組み合わせによる後腸沈殿抽出物からのセルラーゼ精製も試みた。後腸から得られた100kDa以上の抽出物をスピカラムで濃縮し、native-PAGEで分離した。セルラーゼ活性を示す部分をゲルから切り出し、酵素を溶出した。さらに溶出物を濃縮し、未変性SDS-PAGEとZymogramによって解析したところ、約3本のメジャーなバンドが確認された。しかし更なる解析を進めるにはタンパク量が十分ではなく、今後は直接遺伝子解析を行う方が有効であろうと考えられた。

(3) 次世代シーケンサーによるセルラーゼ遺伝子の網羅的探索

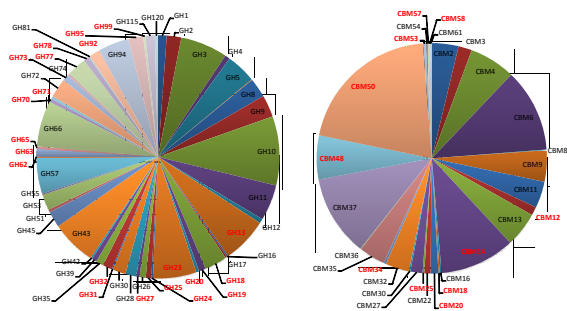
そこで次世代シーケンサー（Roche社454GSjunior）を用い、シロアリ後腸から抽出した細菌由来DNAをメタゲノム解析によりリグノセルロース分解酵素の遺伝子について包括的に解析を進めた。我々のこれまでの電子顕微鏡による観察では、後腸前半部において細菌と木片との相互作用を伺わせる像が頻りに観察されている。そこで必要な情報を集中的に得るために後腸前半部にターゲットを絞って、当該部分の消化管内容物のみからDNAを抽出した。このようにして得られたサンプルについて次世代シーケンサーで解析したところ、合計で82,148,129 bpの共生細菌由来DNA配列を決定することができ、総リード数は190,627個であった。さらにこれらをアセンブルしたところ4870個のコンティグ配列が得られた。

(4) 細菌由来セルラーゼ遺伝子多様性の解析

これらを前述のCAZyデータベース登録配列に対してホモロジー検索したところ、このうち386個のコンティグ（2474リード）が何らかの糖質加水分解酵素の遺伝子を含んでおり、これらはリード数としては全体の1.3%であった。また、全コンティグ配列のうち318個（1473リード）は糖質結合タンパク質をコードしていると考えられ、これらはリード数としてみると全体の0.9%を占めていた。したがって、共生微生物ゲノムの1~2%は糖質分解に関わる因子をコードしていると考えられた（図参照）。

さらに詳しく解析したところ、糖質加水分解酵素は54ファミリーがコードされており、

このうち約43%はペプチドグリカンやキチンなど木質分解に関係しない酵素をコードしていた。



図：タカサゴシロアリメタゲノム解析における糖質加水分解酵素（左）と糖質結合タンパク質（右）の多様性

木質分解に関連する酵素のうち、リード数でみると約1/3がセルロース分解に関連する酵素（10ファミリー）をコードしており、残りの2/3はヘミセルロース分解に関与する酵素（20ファミリー）遺伝子をコードしていると考えられた。セルロース分解に関連する酵素の中には結晶セルロースに強く作用するセロビオハイドロラーゼをコードしていると考えられる遺伝子は含まれていなかった。配列の多くはエンドグルカナーゼをコードしており、β-グルコシダーゼやセロビオースホスホリラーゼやセロデキストリンホスホリラーゼをコードすると考えられる配列も含まれていた。

糖質結合タンパク質をコードしていると考えられる配列は318個のコンティグ配列（1743リード）として得られ、これらは29の糖質結合タンパク質ファミリーに渡った。このうち、約35%はでんぷんやキチンなど、主要な木質成分（リグノセルロース）以外の糖と結合する因子であった。

主要な木質成分に結合すると考えられるタンパク質をコードすると考えられる配列（18ファミリー）を含むリードのうち、1/3が主にセルロースに結合する配列を含んでいると考えられた（5ファミリー）。約1/5はセルロースとヘミセルロースの双方に結合しうる配列をコードしており（10ファミリー）、残りはヘミセルロースと結合すると考えられるタンパク質をコードしていた（3ファミリー）。

以上の結果を考え合わせると、セロビオハイドロラーゼが今回のメタゲノムデータに含まれないことから本種の後腸内で結晶セルロースの分解が活発に行われている可能性は低く、エンドグルカナーゼやセロビオースホスホリラーゼの存在を考え合わせるとむしろセルロース分解の最終段階（すなわち中腸で部分消化のまま後腸に流入したセロオリゴ糖類の消化）に関与していることが何

われた。また、後腸バクテリア相にはヘミセルロース分解関連遺伝子が多く含まれており、これまでにシロアリの前腸や中腸でヘミセルロース分解が証明された例はないことから、この部位がヘミセルロースの分解に対して重要な働きを担っている可能性が強く示唆された。

(5) タカサゴシロアリのリグノセルロース消化モデル

これまでの研究から、タカサゴシロアリでは中腸でセルロース分解を行うことが明らかになっている。これまでのところ、中腸におけるセルロース分解に関わる酵素は2ファミリーのみが知られており、酵素の多様性は本研究で明らかになった後腸リグノセルロース分解酵素群に比べて著しく低い。しかし中腸では後腸よりも強いセルロース分解活性を示すことが知られている。

反対に本研究では多様なヘミセルロース分解酵素遺伝子群が後腸バクテリアから取得された。これらは今後、有用な遺伝資源として活用されることが期待される。リグノセルロース分解酵素遺伝子の近傍には細胞壁結合タンパクや機能未知の遺伝子配列が配置されている場合がありいわゆる xylanosome に似た構造を形成している可能性がある。得られた配列情報が膨大であることから、現在解析をさらに進めており、今後新たにこのような構造体に関する有用な情報が得られる可能性がある。

本研究から示唆されることは、消化管の前半部にセルロース分解系が配置され、後半部にヘミセルロース消化系が配置されるという独特なシロアリのリグノセルロース消化システムである。通常、リグノセルロース消化を考える上では、このシステムは真逆（つまりヘミセルロース分解が先でセルロース分解が後）であることが望ましいと考えられる。なぜなら、セルロースはリグニン中に埋没しており、ヘミセルロース分解はセルロースとリグニンの剥離に有効であることが期待されるからである。シロアリではなぜこのようなシステムになっているのか、このことによって植物バイオマスの分解効率が実際にどの程度上昇するのかは今後さらなる検討が必要である。しかしながら、シロアリ類の行動特性を勘案すると、必ずしもこの消化系が非効率的と考えられるわけではない。幼若なシロアリ個体は、成熟働きアリの後腸排泄物を食べており（肛門食）、この場合はヘミセルロース分解の行われたバイオマスを幼若個体に取り込み、中腸でさらにセルロース分解を行うことになる。もしかすると、成熟働きアリは消化管内でのセルロース分解を部分的にとどめ、さらにヘミセルロース分解後の消化しやすい肛門食を消化系が未発

達な幼若個体に与えることで、シロアリコロニー全体として無駄のないセルロース分解システムを達成しているのかもしれない。その意味では、今後シロアリコロニーレベルでのリグノセルロース消化システムを理解していくことがますます重要になってくるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

- ① Tokuda, G., Watanabe, H., Hojo, M., Fujita, A., Makiya, H., Miyagi, M., Arakawa, G., Arioka, M. (2012) Cellulolytic environment in the midgut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Journal of Insect Physiology* 58, 147-154. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.10.012
- ② Watanabe, H. & Tokuda, G. (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology* 55, 609-632. (査読有)
DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085319
- ③ Tokuda, G., Miyagi, M., Makiya, H., Watanabe, H. & Arakawa, G. (2009) Digestive β -glucosidases from the wood-feeding higher termite, *Nasutitermes takasagoensis*: intestinal distribution, molecular characterization, and alteration in sites of expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 931-937. (査読有)
DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.11.003
- ④ Arakawa, G., Watanabe, H., Yamasaki, H., Maekawa, H. & Tokuda, G. (2009) Purification and molecular cloning of xylanases from the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73, 710-718. (査読有)
DOI: 10.1271/bbb.80788
- ⑤ Matsui, T., Tokuda, G. & Shinzato, N. (2009) Termites as functional gene resources. *Recent Patents on Biotechnology* 3, 10-18. (査読有)
<http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?BIOT/2009/00000003/0000001/0002BIOT.SGM>

[学会発表] (計13件)

- ① Tokuda, G.: Cellulose digestion by termites and their symbionts. The 9th Pacific-Rim Termite Research Group Conference, 27 February 2012, Hanoi, Vietnam.
- ② Tokuda, G.: Lignocellulolytic systems in higher termites. International Symposium on Digestive systems in Termites, 6 October 2011, Okinawa, Japan.
- ③ 徳田 岳・齋藤星耕 タカサゴシロアリ後腸メタゲノム解析による細菌由来リグノセルロース分解酵素の多様性。(社)日本動物学会第82回大会 2011年9月21-23日旭川市神楽地区公共施設 (旭川市)
- ④ Tokuda, G.: Lignocellulolytic systems in termites: how do endogenous and microbial enzymes participate in lignocelluloses breakdown? Max Plank Institute Seminar Series in Molecular, Cellular, and Environmental Microbiology, 16th August, 2010, Marburg, Germany
- ⑤ 徳田 岳: シロアリ類によるリグノセルロース消化機構と応用への展望。第12回建設・環境マネジメント講演会 2010年2月19日 山口大学 (山口市)
- ⑥ Tokuda, G. & Watanabe, H.: An overview of the cellulolytic system in the wood-feeding termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki). Mie Bioforum 2008, 1st-5th September, 2008, Mie, Japan.

[図書] (計1件)

- ① Lo, N., Tokuda, G., & Watanabe, H. (2011) Evolution and function of endogenous termite cellulases. In: *Biology of Termites: a Modern Synthesis* (Bignell, D.E., Lo, N. & Roisin, Y., eds.), Springer, pp. 51-67.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.cc.u-ryukyu.ac.jp/~tokuda>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 岳 (TOKUDA GAKU)
 琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授
 研究者番号：90322750

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし