

自己評価報告書

平成23年 4月 7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

研究分野：昆虫生理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫

キーワード：応用動物、昆虫、酵素、セルラーゼ、共生細菌

1. 研究計画の概要

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。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、現在よりもさらに効率の良いリグノセルロース分解系の構築が急務である。本研究ではこれまでのシロアリセルラーゼ研究で蓄えたノウハウを最大限生かしながら、原生動物を共生しないいわゆる高等シロアリ類を中心に、

- (1) 後腸内共生細菌のセルラーゼの精製および遺伝子の特定
- (2) 共生細菌がセルロソーム類似物によってセルロース分解を行うこと
- (3) セルロソーム類似物構造の特定
- (4) その性能の評価および更なる改変の可能性について研究

を行い、本研究に基づいた効率的なリグノセルロース消化系モデルの提示を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) 初年度は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。この粗酵素液に対して 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ので、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。

(2) 2年目は、初年度の方法をさらに改良した。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て精製した。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を示していなかった。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нка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策が有効であろうと考えられた。

(3) そこで3年目は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り、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、4870個のコンティグ配列が得られた。これらをデータベース検索にかけたところ、このうち300個のコンティグが何らかの糖の分解や代謝に関わる物質の遺伝子を含んでおり、この中には各種セルラーゼやキシラナーゼなどのヘミセルラーゼ、その他のセルロース加リン酸分解酵素、またセルロース結合タンパク質などが含まれることが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究で当初予定していたバクテリア由来タンパク質の精製については、様々な試行錯誤の結果、十分に満足な結果を得るにはこれまでのところ至っていない。しかしながら、包括的な遺伝子解析を行うことによって当初の研究目標を達成するために必要なデータが蓄積されており、セルロース分解装置の構造解明に近付いている。さらに遺伝子レベルでの解析を進めることによって、当初の目標をおおむね達成できると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

今後の推進方策としては、現在得られている包括的な遺伝子群の解析を進め、バクテリアゲノム上に存在するセルロース分解関連遺伝子クラスターを明らかにするとともに、重要なものについては発現レベルを解析する必要があると考えられる。以上の結果を評価し変更の可能性を考察するとともに、本研究結果の取りまとめを行っていくことを予定している。

5. 代表的な研究成果

(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11件)

- ① Hirayama, K., Watanabe, H., Tokuda, G., Kitamoto, K. & Arioka, M. (2010) Purification and characterization of termite endogenous β -1,4-endoglucanases produced in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 1680-1686. (査読有)
- ② Watanabe, H. & Tokuda, G. (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology* 55, 609-632. (査読有)
- 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)

- 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)
- ⑤ Matsui, T., Tokuda, G. & Shinzato, N. (2009) Termites as functional gene resources. *Recent Patents on Biotechnology* 3, 10-18. (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① 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
- ② Tokuda, G. 他4名: Similarities in midgut cellulolytic environment between a higher termite and a lower termite. XVI International Congress of IUSI, 8-14th August, 2010, Copenhagen, Denmark.
- ③ 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)
- ④ 藤田愛 他7名: バイオマス転換の前処理装置モデルとしてのシロアリ 1) シロアリの消化機構の解明 第23回セルラーゼ研究会 2009年6月19日 花王(株)霞ヶ浦研修所 (茨城県美浦村)
- ⑤ Tokuda, G. 他1名: 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.

[その他]

ホームページ

<http://www.cc.u-ryukyu.ac.jp/~tokuda/>