

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14900

研究課題名(和文)モノクローナル抗体によるシロアリ腸内共生細菌の表層木質分解酵素分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of lignocellulolytic enzymes on the surface of bacterial cell walls in the gut of termites using monoclonal antibodies

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・教授

研究者番号：90322750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタカサゴシロアリの後腸内に分布する木質付着細菌叢そのものを抗原として、表層タンパク質に対するモノクローナル抗体作製を試み、後腸の木質分解に関わる主要な細菌の同定に挑戦した。抗体作製の結果、15種類のモノクローナル抗体を得た。本種の後腸内細菌のメタトランスクリプトームにおいて特に発現量の多かったキシラナーゼに対してモノクローナル抗体のスクリーニングを実施したところ、交差活性を示す抗体が見つかった。蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡による観察の結果、この抗体は一部のらせん型形態をした細菌を認識していた。これらの抗体は今後のシロアリ共生系研究の中で貴重な財産となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify bacteria that produce major lignocellulolytic enzymes in the hindgut of higher termites, with the aid of production of monoclonal antibodies against proteins on the surface of bacterial community associated with wood particles using the wood-feeding termite, *Nasutitermes takasagoensis*. We successfully obtained 15 different monoclonal antibodies, while the screening against the predominantly expressed xylanase in the wood fiber-associated bacterial community identified one monoclonal antibody cross-reacting the xylanase. Indirect fluorescence microscopy using epifluorescence and confocal laser-scanning microscopes indicated that this antibody recognized the entire cell surface of some helical bacteria associated with the wood-fibers in the hindgut. These antibodies are among valuable property for future studies on bacterial symbiosis in termites.

研究分野：昆虫科学

キーワード：昆虫 酵素 寄生・共生 木質分解 キシラナーゼ スピロヘータ モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

シロアリ類は熱帯・亜熱帯域を中心に分布し、世界規模では年間30-70億トンのリグノセルロース(木質主成分であるセルロース・ヘミセルロース・リグニン複合体)を分解していると推計されている(Breznak and Brune, 1994. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 453-487)。シロアリによる木質分解には、腸内に共生する微生物が重要な働きを担っている。近年、シロアリの消化管に共生する細菌のメタゲノム解析により、多様な木質分解酵素遺伝子の存在が明らかになった(Warnecke et al., 2007. *Nature* 450, 560-565; He et al., 2013. *PLoS One* 8, e61126; Paulsen et al., 2014. *PNAS* 111, 14500-14505)ものの、この中で中心的な役割を果たす酵素は未だに明らかになっていない。これは、シロアリの腸内には1000を超える細菌の phylotypes が存在しており、単純なメタゲノム解析からは結果として断片的な木質分解酵素の情報が取得できているにすぎないからである。さらに、シロアリ共生細菌の持つ木質分解酵素は細胞表層でセルロソーム様の構造体を作って機能していると推測されるが(Tokuda and Watanabe, 2007. *Biol. Lett.* 3, 336-339)、セルローム結合タンパク質に相同な配列を含む遺伝子は食材性シロアリのメタゲノムデータ内に見つかっていない。私たちは近年、タカサゴシロアリを用い、腸内から木片に付着した共生細菌だけを分離する方法を報告した(Mikaelyan et al., 2014. *Environ. Microbiol.* 16, 2711-2722)。現在、私たちの研究室ではこれら木片付着細菌叢のメタゲノム解析を開始しており(発酵研究所助成)さらにその中から木質分解に中心的機能を果たす分子を新たに同定する方法の開発が急務となっている。

これまでに、ゾウリムシの核内共生系に関する研究では、近年まで宿主や核内共生細菌の包括的遺伝子解析が行われてこなかったにも関わらず、モノクローナル抗体を利用することで共生に関わる多様な分子情報が明らかにされている(Fujishima, 2009. In "Endosymbionts in Paramecium" *Microbiol. Monogr.* 12, 201-225. Springer)。モノクローナル抗体の作成には、精製した抗原だけでなく、抗原の局在性が明らかであれば、細胞、組織、または、それらのホモジネートをマウスの腹腔に注射し、目的の抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を間接蛍光抗体法と限界希釈法で選択することが可能である。

シロアリ類の木材消化生理に関する研究分野では、モノクローナル抗体を利用して重要な生体機能を担う分子を解析した研究は皆無である。そればかりではなく、このような研究手法は昆虫研究分野全体を見回してもほとんど例がなく、そのような研究計画はポストゲノム時代に向けて極めて斬新な方法論を提案することになるかもしれない。モ

ノクローナル抗体を用いることで、ゲノム解析やトランスクリプトーム研究によってもたらされる機能未知の遺伝子に対するアノテーションの付与や機能未知分子の研究をどのように行うかという難題に対して新たな方法論を展開していくことが強く期待される。微生物細胞そのものを抗原としてモノクローナル抗体作製を試みることで、目的の抗体以外にも、腸内細菌表層に露出した様々な分子に対する抗体なども取得できることが期待される。また、同時に、感作後の脾臓摘出マウスを用いて、ポリクローナル抗体も得られる。これらの抗体については本研究では深く取り上げないものの、スクリーニング結果をデータベース化し得られた抗体と共に保管しておくことで、今後のシロアリ共生系研究の中で貴重な財産となり得るものである。また、本研究では腸内細菌表層のセルロース分解酵素複合体形成に関与する分子の探索を計画しており、このような構造や酵素に関する抗体や対応する分子情報はバイオエタノールやバイオリファイナリー実現に向けた効率的な酵素複合体の研究や、将来的に雑多な廃棄物等から木質系バイオマスのみを選別するためのデバイスの開発にも役立つ可能性があり、本研究は学術的価値のみならず極めて高い応用的価値を持つと考えられる。

2. 研究の目的

近年のシロアリ類の消化共生に関する研究では、メタゲノミクスやメタトラスクリプトミクスに代表される包括的遺伝子解析が盛んに行われている(Watanabe and Tokuda, 2010. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 609-632; Hongoh, 2011. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1311-1325; Ni and Tokuda, 2013; Paulsen et al., 2014)。そのような研究は、これまで知られていなかった生体機能の一端を解き明かし、各種酵素遺伝子などの有用な生物資源情報の蓄積に役立っている。しかし、包括的であるがゆえに、その中には木質分解に対して本質的に機能しているわけではない遺伝子情報も数多く含まれる。したがって、それらの中から中心的な機能を果たす遺伝子群を洗い出すことは、応用的視点からも極めて重要なステップである。ところが、シロアリの腸内共生細菌は種数が多い上に、培養が困難であり、標的とする未知遺伝子のノックアウトや発現抑制などによって、それに伴う現象を追跡することはほぼ不可能である。このような中、本研究は顕微鏡観察で得られる情報を解析の最初の足がかりとして本質的な生体機能を担う分子に迫ろうとすることを当初の目的とした。

前述の目的を達成するため、本研究では木質付着細菌叢そのものを抗原として、その各種表層タンパク質に対するモノクローナル抗体作製を試み、メタゲノム結果を参照しながら細菌表層に露出した木質分解酵素類の

同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) シロアリ

西表島に分布するタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis*) を研究材料として用いた。研究には全て働きアリを用いた。

(2) モノクローナル抗体の作製

これまでに私たちはドイツ・Max Planck 研究所の Brune 教授と共に密度勾配遠心による木片附着細菌のみの分離方法を確立している (Mikaelyan et al. 2014)。そこで本研究では腸内細菌全体ではなく、本手法によって分離された木質附着細菌叢のみを抗原として用い、細菌表層を認識するモノクローナル抗体作製を試みた。

抗原接種後、免疫したマウスから感作後の脾臓を摘出し、ハイブリドーマ用培地 (GIT 培地) に移した。摘出した脾臓の脾臓細胞を調整し、NS1 マウスミエローム細胞と細胞融合してハイブリドーマを作製した。調整した細胞を 96 穴マイクロプレートに播き、CO₂ インキュベーター中で HAT 培地により選択培養した。上清を間接蛍光抗体法でアッセイし、陽性穴の細胞を限界希釈して培養し、表層抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマのクローニングを行った。得られたクローンの培養上清を一次抗体として用いた。また、大量培養後のハイブリドーマはディープフリーザー内で凍結保存した。

(3) 抗体のスクリーニング

得られた抗体に対する間接蛍光抗体法によるスクリーニングは、次のように実施した。間接蛍光抗体法では、木片附着細菌をカバーガラス上で風乾または 4%パラフォルムアルデヒド固定液に浮遊させて固定し、PBS で洗浄後、蛍光標識した二次抗体で処理し、再度洗浄後に蛍光顕微鏡で観察した。固定しない細胞を観察することで、抗原決定基の細胞表層外への露出の有無を判定した。また、モノクローナル抗体の作製と並行して実施したタカサゴシロアリの腸内細菌が産生するトランスクリプトームデータについて、解析を実施したところ、腸内細菌は主にキシラナーゼを発現していることが示唆されたため、後腸内細菌が主に産生するキシラナーゼの発現ベクターを構築し、大腸菌によるキシラナーゼの異種発現を行った。これを抗原として、現在キシラナーゼと反応するモノクローナル抗体のスクリーニングを実施した。

(4) 主要キシラナーゼ認識抗体のタンパク質認識部位とキシラナーゼ産生細菌の観察

大腸菌を用いて主要キシラナーゼの各領域を発現させ、得られたタンパク質との交差

活性をウエスタンブロットングにより調べた。また、腸内容を蛍光顕微鏡に加え、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 西表島に分布するタカサゴシロアリの後腸より解剖によって腸内容物を解剖し、これらを Mikaelyan et al. (2014) の方法に従って Percoll 密度勾配遠心にかけることによって木片附着細菌を精製した。得られた木片附着細菌を抗原として、連携研究者である山口大学理学部の藤島教授の指導の下、細菌細胞表層を認識するモノクローナル抗体の作製を実施した。まず、精製した抗原をマウス 3 個体に免疫した。隔週 3 回の免疫ののち、マウスより脾臓を摘出し、ミエローム細胞との細胞融合を行った。これを 96 穴プレートに播き、HAT 培地を用いてハイブリドーマを培養した。この培養上清を用いて間接蛍光抗体法により、木片附着細菌を認識する 1 次抗体のスクリーニングを行った。その後、目的抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈し、さらに細胞培養を行った。シングルコロニーの培養上清に目的の抗体が確認できるまでスクリーニングを行った結果、細菌細胞表層を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを 15 種類得ることができた。これらを大量培養した後、上清と細胞を液体窒素で凍結し、極低温フリーザーに保管した。

(2) モノクローナル抗体の作製と並行して実施したタカサゴシロアリの腸内細菌が産生するトランスクリプトームデータについて、解析を実施した。その結果、腸内細菌は主にキシラナーゼを発現していることが示唆されたため、タカサゴシロアリの消化管における酵素活性測定を実施した。セルラーゼ及びキシラナーゼの間で酵素活性の比較を行ったところ、タカサゴシロアリの後腸内ではキシラナーゼの方が明らかにセルラーゼよりも高い活性を示した。

以上の結果より、これまでに作製したモノクローナル抗体の中からキシラナーゼを認識する抗体をスクリーニングすることで、キシラナーゼを産生する細菌の種類と分解酵素作用機序の解明に繋がることが期待された。そこで、後腸内細菌が主に産生するキシラナーゼの発現ベクターを構築し、大腸菌によるキシラナーゼの異種発現を行った。これを抗原として、キシラナーゼと反応するモノクローナル抗体のスクリーニングを実施したところ、1 種類の抗体が大腸菌による異種発現キシラナーゼと明らかな交差反応を示した。

(3) 次に大腸菌でキシラナーゼの各領域を発現させ、得られたタンパク質との交差活性を調べた結果、このモノクローナル抗体は主要キシラナーゼの糖結合領域を特異的に認

識することが示唆された。間接蛍光抗体法によって腸内容物を観察した結果、主要キシラナーゼはスピロヘータ様の構造をしたらせん型バクテリアの一部に由来することが明らかとなった。さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察の結果、当初の想定通り、これらのバクテリアは自由生活よりも木片に付着して分布する傾向があることが明らかとなった。別途実施したメタゲノム解析は、本キシラナーゼがスピロヘータに由来することを示唆しており、モノクローナル抗体を用いた研究結果とも矛盾しない。これまでスピロヘータがヘミセルロース分解に関与することはほとんど認識されておらず、このことは本研究における特筆すべき発見であると言える(投稿準備中)。本成果により、今後、高等シロアリの後腸における木質分解系の研究を進める上で重要なツールとなり得る抗体を得ることができた。他の抗体が認識する抗原についても現在解析中であり、これらの抗体は今後のシロアリ共生系研究の中で貴重な財産となり得るものである。

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 2件)

徳田 岳、シロアリ消化システムの変遷、*生物科学*、査読有、Vol. 68、2017、pp.142-153.

徳田 岳、シロアリ社会性の発達と木質消化、*査読無*、*昆虫と自然*、Vol. 52、2017、pp. 38-40.

[学会発表](計 5件)

北本真理奈・徳田 岳・渡辺裕文・有岡学、シロアリ腸内細菌由来 GH11 キシラナーゼの生産と機能解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

徳田 岳、福井知穂、松浦 優、渡辺裕文、藤島政博、タカサゴシロアリの腸内共生スピロヘータによるキシラン分解、第 62 回日本応用動物昆虫学会大会、2018 年

Tokuda, G., Fukui, C., Bacterial xylolysis in the hindgut of the xylophagous termite, *Nasutitermes takasagoensis*, The 22nd ICZ and 87th meeting of ZSJ, 2016 年

Gaku Tokuda, Exploration of bacterial cellulolytic system in the hindgut of the wood-feeding termite, *Nasutitermes takasagoensis*, Mini-Symposium on Insect Evolution, Ecology, Physiology, and Symbiosis, 2015 年

徳田 岳、タカサゴシロアリのセルロース消化に関与する微生物由来消化酵素の探索、日本動物学会第 86 回大会、2015

年

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

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・教授
研究者番号：90322750

(2) 研究分担者

松浦 優 (MATSUURA, Yu)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教
研究者番号：80723824

(3) 連携研究者

藤島 政博 (FUJISHIMA, Masahiro)

山口大学・創成科学研究科・教授(特命)
研究者番号：40127783

(4) 研究協力者

ミカエルヤン, アラム (MIKAELYAN, Aram)
Vanderbilt University (USA)・PD

ブルネ, アンドレアス (BRUNE, Andreas)

Max Planck Institute (Germany)・教授