

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658018

研究課題名（和文）メタボローム解析から俯瞰するシロアリの高効率セルロース分解・代謝系

研究課題名（英文）Efficient cellulolytic systems viewed from metabolomics analyses

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）：本研究では消化管内に存在する分解産物や代謝物の多様性と分布について一次元(^1H)および二次元核磁気共鳴法 (^1H , ^{13}C NMR) を応用し、シロアリ類による消化システムの全貌を明らかにするための実験系を確立することを目的とした。オオシロアリの消化管内容物を解析した結果、多様な代謝物を検出することができた。同時に、シロアリ消化系におけるセルロース分解やアミノ酸代謝についてバクテリアの関与を示唆する新たな結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish an experimental methodology to analyze diversity of hydrolysates and metabolites present in the digestive systems of termites with the aid of one (^1H) and two (^1H , ^{13}C) dimensional NMR (nuclear magnetic resonance) analyses. The analysis of the gut contents in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* revealed the presence of diverse metabolites for the first time. In addition, possible involvements of intestinal bacteria in cellulolysis and amino acid supplement were suggested by the present study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

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：木質バイオマス

1. 研究開始当初の背景

シロアリ類は食材中に含まれるセルロース分の74～99%を分解すると考えられており(Breznak & Brune, 1994. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 453-487)、シロアリ類の効率的なセルロース消化系は木質バイオマス利用の観点からも近年注目され始めている。シロアリ類のセルロース消化に関する研究は世界的にも

我々の研究室が中心になって精力的に推し進めているが、これまでシロアリ類によるセルロース分解の仕組みはセルラーゼ(エンドグルカナーゼ・セロビオヒドロラーゼ)と β -グルコシダーゼを中心としたセルロース分解活性の分布やセルラーゼ遺伝子の発現部位などからの推定(e.g. Tokuda *et al.*, 2004. *Mol. Ecol.* 13, 3219-3228; Tokuda *et al.*, 2005. *Physiol. Entomol.* 30, 372-380; Tokuda *et al.*,

2007. *Gene* 401, 131-134)によって説明されてきた。しかしこの考え方は特定の酵素のみを対象としていることから、実際にはセルロース消化に関わる現象のうちの一部を捉えているにすぎない。事実、シロアリ類の消化管に含まれるセルラーゼ活性だけでは十分なセルロース分解能を説明できないケースや測定方法を変えることで今まで認められなかったセルロース分解活性が新たに発見されることもあった(Tokuda *et al.*, 2005; Tokuda & Watanabe, 2007. *Biol. Lett.* 3, 336-339)。また、シロアリ消化管内には多くの微生物が共生しており、微生物のセルロース消化に関わる酵素はセルラーゼと β -グルコシダーゼだけではないことが知られている。

分解代謝物から分解代謝系へのアプローチによってシロアリのセルロース消化系に切り込む研究はこれまでに例がなく、本実験系が確立すればこれまでの研究から見落とされていた分解関連酵素の存在を明確に指し示すことができると考えられる。さらに将来的には共生微生物の除去実験を組み合わせることにより、シロアリ自身の代謝系と微生物代謝系との相互作用を深く理解するきっかけになることが期待される。また、近年注目される木質バイオマスの利用を考える上でも、本研究からシロアリ類による極めて効率的なリグノセルロース消化機構に関して、従来見落とされてきた非常に有用な情報が得られることが期待される。

2. 研究の目的

以上の経緯から、本研究では消化管内に存在する分解産物や代謝物の多様性と分布について一次元(^1H)および二次元核磁気共鳴法(^1H , ^{13}C NMR)を応用し、シロアリ類による消化システムの全貌を明らかにするための実験系を確立することを目的としている。具体的には、消化管内におけるセルロース分解産物の分布を基に、従来酵素活性・遺伝子発現の分布によって推定されてきたシロアリ類によるセルロース消化モデルを検証すると共に、グルコースやオリゴ糖以外の分解産物や代謝物の検出によってセルロース分解に関連する新規な分解代謝系の探索とそれらが関与する消化管部位の推定を試みた。

分解代謝物から分解代謝系へのアプローチによってシロアリのセルロース消化系に切り込む研究はこれまでに例がなく、本実験系が確立すればこれまでの研究から見落とされていた分解関連酵素の存在を明確に指し示すことができると考えた。さらに将来的には共生微生物の除去実験を組み合わせることにより、シロアリ自身の代謝系と微生物代謝系との相互作用を深く理解するきっかけになることが期待される。また、近年注目

される木質バイオマスの利用を考える上でも、本研究からシロアリ類による極めて効率的なリグノセルロース消化機構に関して、従来見落とされてきた非常に有用な情報が得られることが期待される。本研究はセルロース消化に関してこれまでに比較的研究の進んだオオシロアリを用いた。オオシロアリは北琉球である屋久島近辺や中琉球である奄美諸島で分布が確認されており、非常に大型であり本研究のための実験条件検討には最も優れた種である。本研究を通じて、琉球大学の地域性と理化学研究所の最先端技術、さらにこれまでの研究によって集積された知識との協調・融合作用による新しい研究領域の創成に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) 材料およびサンプル調整

本研究材料としては、大型のオオシロアリ(*Hodotermopsis sjostedti*)を屋久島において採集し実験に用いた。1回の実験にはシロアリ20個体を解剖し、ドライアイス上で前腸、中腸、後腸前部、後腸後部とに切り分け、チューブに回収した。実験に応じて、中腸は内容物と腸壁とに分離した。サンプルを凍結乾燥し、粉碎装置(オートミル)で1400rpmの条件で2分間粉碎処理した。可溶性成分を99%重水と1mM MDSS(0ppmリファレンス)を含む100mMリン酸カリウム溶媒を用いて65°Cで15分抽出した後、遠心後の上清をNMR解析に用いた。NMR測定はBruker Avance-700を用い、極低温プローブにおいて1D- ^1H および2D ^1H - ^{13}C HSQC解析を行った。1D- ^1H の結果は0.04ppmごとにbin化し、統計解析ソフトによりPCA解析を行った。2D ^1H - ^{13}C HSCCの結果は、NMRPipeソフトを用いてプロセスし、SpinAssignにて各スポットの代謝物への帰属を行った。

^{13}C 標識セルロースの合成は、次に述べる方法で行った。市販の ^{13}C 標識グルコースを含む培地で酢酸菌(*Acetobacter xylinum*)を30°Cで2~3週間培養し、セルロースシート(ナタデココ)を形成させた。これを10%ビューラックス(次亜塩素酸)とNaOH溶液に漬け込みバクテリアの不活化とタンパク質などの不純物の溶出を行い、よく水洗した後、 ^{13}C 標識セルロースとして用いた。なお、 ^{13}C 標識セルロースは一部をNMRで解析し、十分な純度であることを確認してから実験に用いた。

(2) 代謝物変動の経時的解析

通常条件で飼育しておいたシロアリを、新たに調整した ^{13}C 標識セルロースの入った飼育容器に移し、継時的に解剖を行った。標識セルロース摂食前の個体を0時間目サンプル

- ① Tokuda, G. (2012) Cellulose digestion in termites and their symbionts. Proceedings of the 9th Pacific-Rim Termite Research Group Conference, 10-15 (査読無)。

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kikuchi, J., Tsuboi, Y., Kihara, K., Moriya, S., Tokuda, G.: Tracing ¹³C-cellulose metabolism into termite organs. October 6, 2011, Internatinal Symposium on Digestive systems in Termites, Okinawa, Japan.
- ② Tokuda, G., Kihara, K., Tsuboi, Y., Moriya, S. & Kikuchi, J.: Metabolomic and enzymatic analysis of cellulose digestion in termites. December 7-8, 2010, Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology (Biology of Symbiosis), Tsukuba, Japan.

[図書] (計 0 件)

[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

菊地 淳 (KIKUCHI JUN)
理化学研究所・先端NMRメタボミクスチーム・チームリーダー

研究者番号：00321753

守屋 繁春 (MORIYA SHIGEHARU)
理化学研究所・分子情報生命科学特別ユニット・専任研究員

研究者番号：00321828

(3) 連携研究者

なし