

論文の内容の要旨

論文題目 下等シロアリ類のセルラーゼに関する生化学・分子生物学的研究

氏名 渡辺 裕文

序 論

セルロースは地上で最も豊富なバイオマスであるが、水に不溶性な上、強固な結晶構造をもつため酵素による分解が難しい。このためか、一般に動物はセルロースを利用せず、セルラーゼも持たないとされてきた。その中で”例外的に”セルロースを分解することで知られるのがシロアリ類である。Cleveland (1924)はシロアリ *Reticulitermes flavipes* が後腸原生生物を除去されると死滅することから、本種が原生生物によってセルロースを消化すると結論した。これ以降、今日に至るまで、共生原生生物は、シロアリ類のセルロース消化に関する教科書的な解答である。しかしながら、後に同属のヤマトシロアリ (*R. speratus*) では原生生物をもたないカーストや、それらを除去したワーカーからもセルラーゼ活性が検出され、シロアリ自身がセルラーゼを生産すると推測されている。その後、ヤマトシロアリで、唾液腺抽出液が水溶性セルロース(carboxymethylcellulose = CMC)を分解するが、濾紙(結晶性セルロース)の分解活性は原生生物相のみがもつことが示され、加えてオーストラリア産シロアリ *Coptotermes lacteus* でも二元的(シロアリおよび原生生物起源)と考えられるセルラーゼ活性が認められている。

シロアリ類(約 2600 種)は、後腸内に原生生物相をもつ下等シロアリ類ともたない高等シロアリ類(全体の約 8 割)に大別される。これら高等種からは、セルロース分解性共生者は見つかっていない。このため一部の高等シロアリ類のセルラーゼは内源性であると推測されてきた。一方、巣内でキノコを栽培するキノコシロアリ類(高等種)は菌糸体より結晶性セルロース分解酵素を得ていると推測され、その後、「内源性セルラーゼは例外であり、通常高等動物のセルロース消化は獲得酵素説で説明される」と総括されている。

このように活性分布による状況証拠が根拠である動物セルラーゼは、高等動物はセルラーゼ(遺伝子)

をもたないとするセルロース共生消化説に対し十分に反論するに至っていない。一方では、シロアリ類の共生原生生物が生産するセルラーゼの本質も明らかになってはいない。本研究は、シロアリ類の内源性および原生生物起源双方の本質を明らかにすることを目的とした。加えて、高等動物における内源性セルラーゼの特性および進化起源についての考察を行った。

第1部 ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* 唾液腺セルラーゼの精製とカイネティクスの解明

ヤマトシロアリ虫体 (10g) より粗酵素液を抽出、ゲル濾過、ハイドロキシルアパタイト吸着クロマトによりセルラーゼ(エンド- β -1,4-グルカナーゼ; YEG1 および YEG2, 41kDa および 42kDa)を精製した。この後精製セルラーゼに対するマウス抗血清を得て免疫組織化学観察を行ったところ唾液腺で特異的反応が観察され、同酵素が唾液腺組織で生産されている可能性が強く示唆された。

YEG1 および YEG2 は、40°C (30 分間) までは活性が安定である一方、50°C で最大活性を示し、55°C で完全に失活した。また、両酵素とも pH6.0 で最大活性を示した。YEG1 は pH5.3~7.4 で、YEG2 は 4.9~7.4 で 80%以上の活性を示し、pH9.0 でもそれぞれ最大活性の 32 および 46%の活性を保っていた。酸性側では YEG1 が 4.0、YEG2 が pH3.5 で完全に失活した。

YEG1 および YEG2 は、CMC および結晶性セルロースの双方に単独で活性を示した。結晶性セルロースからの主産物はセロビオースであったが、副産物として YEG1 および YEG2 それぞれセロビオースに対してモル比で 1/25 および 1/8 に上るグルコースを生成した。YEG1 および YEG2 はセロペンタオース(G5)を主にセロビオース(G2)とセロトリオース(G3)に、セロテトラオースを G2 にそれぞれ分解した。また、G5 および G4 双方から副産物として少量のグルコースも得られた。G3 に対しては、YEG2 のみが活性を示し、ほぼ等量の G3 および G2、少量のグルコースを生じた。両酵素とも Km 値は G3 (YEG1 は ∞) >G4>G5>>CMC (CMC は平均分子量による換算値で比較) の順に低下しており、比較的鎖長の長い水溶性のセルロースに親和性が高いことを示した。

第2部 ヤマトシロアリセルラーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の解明

ヤマトシロアリワーカーの cDNA ライブラリーを YEG2 に対するマウス抗血清によりスクリーニングしたところ 333bp の cDNA を得た。これに続く RACE 法によりの全長 cDNA (*RsEG*: 1522bp) を得た。加えて、この遺伝子が唾液腺で発現していることを逆転写 PCR により確認した。cDNA 特異的なプライマーを使ったゲノミック DNA の PCR からはイントロンが増幅され、同遺伝子が真核生物起源であることが確認された。さらに、シロアリ頭部より抽出したゲノミック DNA に対するサザンブロッティングによりヤマトシロアリゲノム上に *RsEG* 遺伝子が存在していることが確認された。

近年、セルラーゼ遺伝子を含む糖質分解酵素類はアミノ酸列の相同性を基に 87 のファミリー (Glycosyl-hydrolase family : GHF)に分類されているが、*RsEG* のコードするアミノ酸配列は植物・細胞性粘菌・バクテリアの GHF9 セルラーゼにアミノ酸配列上で 30%以上の相同性を示し、同遺伝子がこれらの GHF9 セルラーゼ遺伝子と進化的起源を同じくすることが示唆された。

第3部 下等シロアリ類の原生生物起源セルラーゼの精製とクローニング

イエシロアリ (*Coptotermes formosanus*: 下等シロアリ)近縁種 (*C. lacteus*: オーストラリア産)の後腸内容物からエンド- β -1,4-グルカナーゼを精製し、そのN末端アミノ酸配列を解読した。本種後腸内容物より mRNA を抽出し、アミノ酸情報よりクローニングを行ったところ 307 および 303 アミノ酸からなるセルラーゼをコードする cDNA を得た。その後、イエシロアリ後腸内容物を材料として再びクローニ

ングを試みたところ、328 および 326 アミノ酸からなる GHF7 セルラーゼ cDNA を得た。イエシロアリ後腸内で確認できた 3 種のイエシロアリ共生原生生物 (*Pseudotrichonympha grassii*, *Holomastigotoides mirabile* および *Spirotrichonympha leydi*) のうち *P. grassii* が前者を *H. mirabile* が後者を発現していることを逆転写 PCR により確認した。これらの cDNA のコードするアミノ酸配列は最低 68% は互いに保存され、GHF7 の中で単系統群を形成した。イエシロアリでは *RsEG* 相同遺伝子が唾液腺および中腸で発現していること、それらが原生生物の生息する後腸に流れこんでいないことが確認されており、*Coptotermes* 属の原生生物は、内源性セルラーゼとは独立して作用する (同時には作用しない) セルラーゼをもっていると結論された。また、それらはホスト起源のセルラーゼとは GHF レベルで異なるためホストへ遺伝子が水平伝搬してはいないと考えられる。

総合考察

動物セルラーゼの遺伝子情報の蓄積により、多くの動物セルラーゼが活性ドメインのみから構成されていることが近年解明されている。一般に結晶性セルロースに対して高い活性をもつセルラーゼは活性ドメイン以外にセルロース結合ドメインやそれらをつなぐリンカーなどの構造をもっている。動物セルラーゼの構造は一見、結晶部分を含む天然セルロースの分解には向かないようであるが、そしやく器官が酵素分解以前に基質を破壊し酵素の接触面積を増やすことや、消化管が分泌された酵素と基質を高濃度で長時間反応させることが単純な動物セルラーゼの構造の弱点を補っていると考えられる。加えて、きわめて高度にセルロース食に適応し、共生原生生物を後腸に有するに至った下等シロアリ類は、シロアリ自身のセルラーゼで消化できなかった基質を原生生物がさらに消化することによって、より高い消化効率を可能としていると考えられる。

現在までに、シロアリ類を中心とした GHF9 セルラーゼ遺伝子に加え、植物寄生性線虫類から GHF5、甲虫類と二枚貝から GHF45 に属するセルラーゼ遺伝子が高等動物からクローニングされている。これらの遺伝子のコードするセルラーゼは、動物以外のセルラーゼとの間でファミリーごとに構造がよく保存されており、同じファミリーに属する他のセルラーゼと進化的起源を同じくすると考えられる。しかしながら、これらの動物セルラーゼ遺伝子は高等動物の近傍に生息する微生物などから直接伝搬したとは考えにくい。たとえば、シロアリ類の内源性セルラーゼ (GHF9) と共生原生生物のセルラーゼ (GHF7) は相同性が全くなく、シロアリセルラーゼ遺伝子の進化的起源を共生原生生物に求めることはできない。現段階では各々の動物セルラーゼ遺伝子の進化的起源を解明するには遺伝子情報が十分ではないが、その様な状況の中、近年、ゴキブリ類、ザリガニ (節足動物等脚類)、アワビ (軟体動物)、ユウレイボヤ (原索動物) 等からシロアリ類と同様な GHF9 セルラーゼ遺伝子が発見され、動物 GHF9 セルラーゼ遺伝子の起源が高等動物の放散時期にさかのぼる可能性があることが示唆されている。今後、他のファミリーを含め多くの動物セルラーゼ遺伝子がクローニングされることにより動物セルラーゼ遺伝子の進化的起源は徐々に明らかになると予測される。