

審 査 の 結 果 の 要 旨

論文提出者氏名 渡辺 裕文

木材の主要成分であるセルロースは地球上で最も豊富な生体物質であるが、水に不溶性な上、強固な結晶構造を持っているため、酵素によって分解されはするものの、その分解速度は遅く、一般の動物ではセルロースを栄養とすることはできない。しかし、本研究で対象にしたシロアリ類は、木材などのセルロースを分解し栄養として利用している。特に下等シロアリでは、後腸内に生息している多数の原生生物の働きによってセルロースを消化するのであると古くからされてきた。また、下等シロアリの唾液腺からの抽出液が水溶性セルロースを分解すること、そして結晶性セルロースに対する分解活性は原生生物相のみが持つことから、セルラーゼの生産場所は、原生動物とシロアリ唾液の両方であると、近年になって考えられてきた。一方、高等シロアリの腸内からは、セルロース分解微生物は見つかっておらず、中腸におけるセルラーゼ活性は、シロアリ起源のものであるとされてきた。

しかし、シロアリ自身がセルラーゼを生産しているとする説は、活性分布による状況データが根拠であり、セルラーゼが共生生物から由来しているとする「セルロース共生消化説」に対して、十分に反論する研究がなかった。また、共生の根拠となる共生原生生物が生産するセルラーゼの実態も明らかになっていなかった。

そこで、本研究は、シロアリ類の腸内におけるセルラーゼ類に関して、シロアリ起源のものおよび原生生物起源のもの双方について、それらの生化学的・分子生物学的な実態を明らかにすることを目的としている。加えて、体制の複雑な多細胞生物におけるセルラーゼ生成の普遍性についての考察を行っている。

第1部では、下等シロアリであるヤマトシロアリの唾液腺に存在しているセルラーゼ類の精製と、その酵素活性の解明を行っている。その後、精製したセルラーゼ類に対するマウス抗血清を得て、免疫組織化学的な観察を行い、セルラーゼ類が唾液腺組織で確実に生産されている事実を明らかにした。そして、これらの酵素群の温度および pH に対する活性変化を調べている。さらに、水溶性セルロースおよび結晶性セルロースの双方にそれらのセルラーゼを作用させ、得られたさまざまな分解産物を同定している。

第2部では、ヤマトシロアリのセルラーゼ遺伝子のクローニングと、発現部位の特定を行っている。結果として、448 アミノ酸をコードした2つの cDNA をクローニングしているが、それがコードしているアミノ酸配列は、互いに 99% 以上一致していて、植物、細胞性粘菌、一部のバクテリア由来の糖質分解酵素ファミリー 9 に属するセルラーゼにもアミノ酸配列上で 30% 以上の相同性を示していた。逆転写 PCR によって、これらの遺伝子が唾液腺で発現していることを確認し、サザンブロットによりゲノム上での存在を確認している。また、それらは高等シロアリのタカサゴシロアリから由来する相同遺伝子とイントロンの位置が完全に一致し、下等及び高等シロアリ類のセルラーゼが、共通祖先に起源をもつ可能性を示唆している。

第3部では、下等シロアリ類の腸内における原生生物セルラーゼの精製と、クローニングを行っている。イエシアリの後腸内容物から、セルラーゼを精製し、そのN末端アミノ酸配列を解読している。また、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 を得ている。イエシロアリの後腸内で確認できた3種の共生原生生物 (*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 法により確認している。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、ファミリー7の中で単系統群を形成した。イエシロアリで、この相同遺伝子が唾液腺および中腸で発現していること、それらが原生生物が生息している後腸に流れこんでいないことを確認している。このことから、イエシロアリ属における共生原生生物は、シロアリ内源性セルラーゼとは独立して作用するセルラーゼをもっていて、また、それらは宿主起源のセルラーゼとはファミリーレベルで異なるため遺伝子の水平伝搬でないと考察している。

第4部では、体制の複雑な多細胞生物起源のセルラーゼ類に関する総合考察を行っている。現在、知られている動物セルラーゼ類とそれらの遺伝子は、ファミリー9に加えて、線虫類から見いだされたファミリー5、甲虫類と二枚貝から見いだされたファミリー45などが知られている。これらの遺伝子がコードしているセルラーゼ類は、活性中心を構成するアミノ酸の多くが、動物以外の生物に由来するセルラーゼとの間で、ファミリーごとによく保存されている。そして、酵素としての機能があること、他のセルラーゼと進化的起源を同じくすることが示唆されている。しかし、多くの動物セルラーゼ遺伝子が宿主動物の祖先種に取り入れられた後に、相当の年月が経過していると考えられ、各動物種が成立してから、微生物等から水平伝搬したことを明確に示す事例はない。特にファミリー9については、昆虫類と進化的起源を同じくする等脚類のザリガニからもイントロンの位置までも一致する相同遺伝子が得られており、その起源は昆虫類の成立以前にさかのぼると考察している。

以上のように本論文では、下等シロアリ類およびその共生原生生物が生成するセルラーゼ類に関して、その生化学、分子生物学的研究を精緻に行い、複雑なセルラーゼ群の性質や機能を世界で初めて詳細に明らかにしている。また、昆虫類、軟体類、甲殻類、ホヤ類などのさまざまな動物が保有するセルラーゼ遺伝子群の分子系統学的な位置に関して、総合的な考察を行い、それらの起源が昆虫類の成立以前にさかのぼる事を明らかにしている。よって本審査委員会は、本研究が博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。