

2010年1月20日
独立行政法人理化学研究所

シロアリ腸内共生系の高効率木質バイオマス糖化酵素を網羅的に解析

—各種シロアリ腸内共生系に共通した酵素群特定とその特異な進化過程を解明—

本研究成果のポイント

- 各種シロアリ腸内共生系に共通するセルラーゼ遺伝子を網羅的に取得
- バクテリアから共生原生生物への遺伝子水平伝播が、高効率糖化システムを実現
- 食糧と競合しない強力なバイオマスリソース利用基盤技術としての実用化へ期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、各種のシロアリ腸内に生息する共生原生生物が共通して持つ特異的な「セルラーゼ^{*1}」群遺伝子を網羅的に取得し、この遺伝子群による高効率なバイオマス糖化^{*2}システムの実現には、シロアリ腸内微生物複合系^{*3}（シロアリ腸内共生系）のバクテリアと共生原生生物間の遺伝子水平伝播^{*4}が関係していることを明らかにしました。理研基幹研究所守屋バイオスフェア科学創成研究ユニットの守屋繁春ユニットリーダー、同工藤環境分子生物学研究室の戸高眠ジュニア・リサーチ・アソシエイト（現 株式会社豊田中央研究所）、井上徹志協力研究員（現 学校法人香川学園 宇部環境技術センター）、斎田佳奈子 研修生（現 熊本県産業技術センター）、大熊盛也副主任研究員（現 バイオリソースセンター微生物材料開発室長）、工藤俊章主任研究員（現 国立大学法人 長崎大学教授）、オーストラリア連邦科学産業研究機構のミカエル・レンツ（Michael Lenz）教授、米国ノースカロライナ州立大学のクリスティーン・ナレパ（Christine Nalepa）准教授らの研究グループによる成果です。

シロアリは、亜熱帯から熱帯にかけて分布し、枯れた植物を食べてセルロースを糖類に分解する昆虫で、非常に効率の良い木質バイオマスの分解者です。今回、シロアリの腸内に生息し、独自の進化を遂げた共生原生生物が持つセルラーゼを、すべての下等シロアリ^{*5}腸内共生系のメタトランスクリプトーム解析^{*6}によって網羅的に取得し、詳細に解析しました。その結果、シロアリ腸内共生系には、糖質加水分解酵素ファミリー（GHF;Glycosyl hydrolase family）5、GHF 7 と呼ぶ 2 つのセルラーゼが中心（コア酵素）として存在し、GHF 10、11、45 などのセルラーゼが、コア酵素群に加えて多くのシロアリで保存されていることが分かりました。特に、コア酵素のうち GHF 5 は、分子進化学的な解析の結果、バクテリアから水平伝播で共生原生生物へ移ったことが分かりました。つまり、シロアリの持つ驚くべき高効率のバイオマス糖化システムの確立には、シロアリ腸内の濃密な微生物複合系での遺伝子の生物間移動が重要でした。本研究で得た酵素遺伝子は、従来型の酵素の 5～10 倍もの活性があることも明らかであり、今後、食糧問題と拮抗（きっこう）しないセルロース系バイオマスの利用に当たって、シロアリの持つセルラーゼ群は重要なリソースとなることが期待できます。

本研究成果は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センターの「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」における研究課題「バイオエネルギー生産のためのシロアリ共生系高度利用技術の基盤的研究」（研究代表者 守屋繁春）などの一環として行ったもので、米国の科学雑誌『*PLoS ONE*』オンライン版（1月8日付）に掲載されました。

1. 背景

現在、地球温暖化対策や持続可能な社会構築の必要性が叫ばれ、バイオマス利用に関する研究を加速させる機運が高まっています。バイオマス利用に関係する酵素群のうち、セルロース系バイオマスを糖化し、バイオ燃料やバイオプラスチックの製造原料に転換するセルラーゼは、第二次世界大戦中に発見された菌類 (*Trichoderma reesei*) のセルラーゼが主に使用されています。この *Trichoderma reesei* の持つセルラーゼは非常に優秀な酵素群ですが、セルロースを発酵の原料であるグルコースまで分解し糖化を進めるためには、ある種の酵素を別途大量に添加する必要があります。そのため、自然界の生物多様性の中から有用なリソースを新たに開発・利用して、糖化までのステップを単純化し、高効率化することが望まれています。

シロアリは、温帯から亜熱帯にかけて分布し、森林生態系における植物枯死体、すなわちセルロース系バイオマスの主要な分解生物の1つで、菌類と同等かそれ以上の効率でセルロースを分解することが知られています。セルロース系バイオマスの分解は、シロアリ腸内に共生する共生原生生物 (図1) が担っていることが分かっていますが、これらの原生生物は培養が困難で、それらが保有する高度な糖化効率の基になっている酵素群の網羅的な解析は進んでいませんでした。

2. 研究手法と成果

今回の研究では、理研をはじめとするわが国の研究コミュニティが開発してきた複数の完全長 cDNA ライブラリー構築法^{*7}を用いて、培養困難なシロアリ共生原生生物から、実際に発現している遺伝子を集めたライブラリーを構築し、その網羅的な解析を試みました。

解析に当たっては、共生原生生物が生息するほぼすべてのシロアリの科と、その近縁の材食性ゴキブリを代表するキゴキブリを、オーストラリア・アメリカ合衆国・屋久島・西表島・秩父といったさまざまな場所から収集しました (図2)。次に、キゴキブリを含む各種シロアリの腸内共生系より構築した共生原生生物群 cDNA ライブラリーを用いて、高い効率で森林内の植物枯死体を分解・利用している共通のバイオマス糖化システムの同定と、その進化過程の解明を、メタトランスクリプトーム解析と分子進化学的手法を用いて試みました。

その結果、シロアリやキゴキブリの腸内共生系からは、例外なく糖質加水分解酵素ファミリー (GHF; Glycosyl hydrolase family) 5 や 7 に属するセルラーゼ遺伝子が数多く発現していることや、GHF10、11、45 に属するセルラーゼやキシラナーゼ^{*1} も、多くの種の腸内共生系に共通して発現していることを発見しました (図3)。

次に酵素のアミノ酸配列や分子系統樹上での位置から検討した結果、これらの遺伝子は、通常の菌類やバクテリアで多く見られるセルロースに結合するための構造 (セルロースバインディングモチーフ) を欠く非常に単純な配列で、シロアリ腸内共生系が形成した後、ほかの生物のセルラーゼから分化し、独自の進化を遂げたものであることが明らかになりました。

また、驚くべきことに、GHF 5 に属するセルラーゼの遺伝子は、系統樹の樹型を網羅的に比較する分子進化学的手法を用いた解析の結果、バクテリアから共生原生生物のゲノム中に、酵素遺伝子が2回の独立した水平伝播によって、シロアリ腸内共生系にもたらされたことが分かりました。すなわち、シロアリ腸内の非常に濃密な微生物

複合系では、遺伝子が異なる生物の間を伝播し、それがシロアリ共生原生生物群の持つ高効率のセルロース系バイオマス糖化を確立、生態系機能の進化に重要な役割を果たしていたという貴重な知見を得ました。

3.今後の期待

今回の研究では、セルラーゼにかかわる遺伝子の転移が、遺伝子の発現様式などが大きく異なっているバクテリアと共生原生生物間で起こっていることを明らかにすることができました。

現在、これらの酵素遺伝子解析を進めています。このうち、GHF 7 のエンドグルカナナーゼ遺伝子についてはすでに解析を終了し、従来公表されてきたほかの菌類やバクテリアの酵素の反応速度の 5~10 倍にも達する反応速度を有する高性能酵素であることが分かりました (*Todaka et al. Appl Biochem Biotechnol*, 2009)。

今後、世界的に希求されている高性能のセルロース系バイオマス糖化システムの確立を目指すとともに、本研究で培ったメタトランスクリプトーム解析法を発展させて、さらに新しい関連因子群の探索と解析・その実用化が期待できます。

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

基幹研究所 守屋バイオスフェア科学創成研究ユニット

ユニットリーダー 守屋 繁春(もりや しげはる)

TEL : 045-508-7221 FAX : 045-508-7364

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715

<補足説明>

※1 セルラーゼ・キシラナーゼ

セルラーゼは、バイオマスの中でもヒトをはじめとする大部分の動物が消化できないセルロース(グルコースが直鎖状に重合した多糖。同じグルコースの重合体であるデンプンと異なり高度に結晶化可能な重合構造を持つため酵素分解が難しい)を分解する酵素。セルラーゼを含む糖質加水分解酵素(Glycosyl hydrolase)は、その二次構造などによって115のファミリーに分けられており、現在でもファミリー数は増加し続けている。糖質加水分解酵素の中には、セルロースの周囲を囲むように存在する複数の種類の単糖が重合したヘミセルロースを分解するヘミセルラーゼが存在する。本研究ではバイオマスの主成分であるセルロースを分解するセルラーゼと同時に、このヘミセルロースの中でも最も主要な成分であるキシロースを分解するキシラナーゼの存在も明らかとなった。

一方、セルラーゼはその反応様式によっても分類される。具体的には、糖鎖をその鎖の内側でランダムに切断してオリゴ糖（グルコースが数分子連結した非常に短いセルロース分子）を生成する「エンドグルカナーゼ」、糖鎖を端からグルコース分子 2 つずつの単位（セロビオース分子）で切断していく「セロビオヒドロラーゼ」、そして、セロビオースを含むオリゴ糖をグルコースまで分解する「 β グルコシダーゼ」の 3 つのカテゴリーがあり、本研究ではエンドグルカナーゼとセロビオヒドロラーゼがシロアリ腸内共生系共通酵素として発見されている。

※2 糖化

セルロースやヘミセルロースは不溶性の安定した多糖であり、そのままでは発酵生産の基質とはならない。しかし、セルロースを分解するセルラーゼや、ヘミセルロースの主成分であるキシランを分解するキシラナーゼなどの分解酵素によって、その構成要素であるグルコースやキシロースなどの単糖まで分解することによって、有用な発酵基質に転換できる。このプロセスを糖化と呼び、得られた単糖は酵母を用いたアルコール発酵によるバイオ燃料の生産や、理研で開発したバイオポリエステル発酵のような、バイオポリマー生産などに結びつけることができる。特に非可食性の多糖であるセルロースは、地上で最大のバイオマス量を誇り、その発酵基質化を意味するセルロースの糖化技術は、食糧と競合しない強力なバイオマスリソース利用基盤技術として世界中で希求されている。しかし、現状は化学・物理的な手法に依存しており、エネルギー要求性の非常に低い生化学的なプロセスへの転換が望まれている。

※3 シロアリ腸内微生物複合系(シロアリ腸内共生系)

シロアリの腸内には、共生原生生物のほかにバクテリアや古細菌が共生しており、これらは互いに共生関係となる場合がある。共生原生生物はさらにその細胞内や細胞表面に各種のバクテリアや古細菌を共生させていることが知られており、入れ子状態になった多重共生系を構成している。この多種多様な微生物から成る濃密なシロアリ腸内共生系の様態は、米国の科学者 リン＝マーグリスによるミトコンドリア共生説の着想の元になったといわれている。また、このような共生原生生物細胞内共生バクテリアのいくつかは、世界に先駆け理研の本郷・大熊らによってゲノム解読が行われている。

※4 水平伝播

生物間で遺伝子が移動する現象のこと。細胞内小器官であるミトコンドリアや葉緑体からの遺伝子の移動はよく知られているが、最近の分子進化学的研究によれば、多種の生物間で遺伝子がゲノム間を移動している例もある。しかし、その詳しいメカニズムや進化に対する影響度についての知見は少ない。

※5 下等シロアリ

シロアリは、腸内の共生原生生物の有無によって 2 つのタイプに分けることができる。1 つは真核微生物である原生生物が腸内に共生する下等シロアリであり、もう 1 つは原生生物が共生していない高等シロアリである。下等シロアリは、腸内の共生原生生物によって、非常に高い効率で植物枯死体の中のセルロースなどの多糖類を消化し、酢酸と二酸化炭素、水素、水を生成する。下等シロアリは共生原生生物が排出する酢酸を炭素源として利用す

る。一方、高等シロアリは、下等シロアリが進化の過程で共生原生生物を欠失して出現したと考えられており、体外消化管として独自の菌類を巣内で育成するキノコシロアリをはじめ、土やコケ、枯れ草など多種のバイオマスに適応した生活様式を持つが、そのバイオマス分解能力は下等シロアリよりも低い。

※6 メタトランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析とは、生物の中で発現している遺伝子の量を遺伝子ごとに定量し、その生物、組織または細胞内でどの遺伝子がどれだけ、どのタイミングで働いているのかを解析することを指す。その手法には、cDNA ライブラリーの解析やハイスループットシーケンサーがある。本研究では、遺伝子の網羅的取得が大きな目的の1つだったので、cDNA ライブラリーの構築を伴う手法を用いた。メタとは、主に複数の生物から成る環境サンプルを用いてこのような解析を行う際に付けられる接頭語で、環境サンプルを対象とした培養を介さない新しい解析手法であることを示す。

※7 完全長 cDNA ライブラリー構築法

cDNA とは、ゲノム DNA 中の遺伝子部分が転写され、タンパク質への翻訳に使われる mRNA (メッセンジャーRNA) を鋳型にして作られた相補鎖 DNA のこと。完全長 cDNA ライブラリーは、cDNA ライブラリーの中でもタンパク質のポリペプチド鎖の全体を含む mRNA の全長を選択してライブラリー化したもので、発現遺伝子の動態解析に加えて、重要な遺伝子について該当するクローンから遺伝子の全長を取得し、大腸菌、酵母、麹菌などの中で効率よく機能するタンパク質を生産することができる。完全長 cDNA ライブラリーを構築するには、mRNA の全長を選択する独自の技術が必要であり、理研のオミックス基盤研究領域で運用されている「キャップトラッパー法」と、東京大学の菅野らのグループによって開発された「オリゴキャッピング法」の2種類が有名である。本研究では、この2種類の構築法を用いて各種シロアリ腸内共生系の cDNA ライブラリーを構築した。

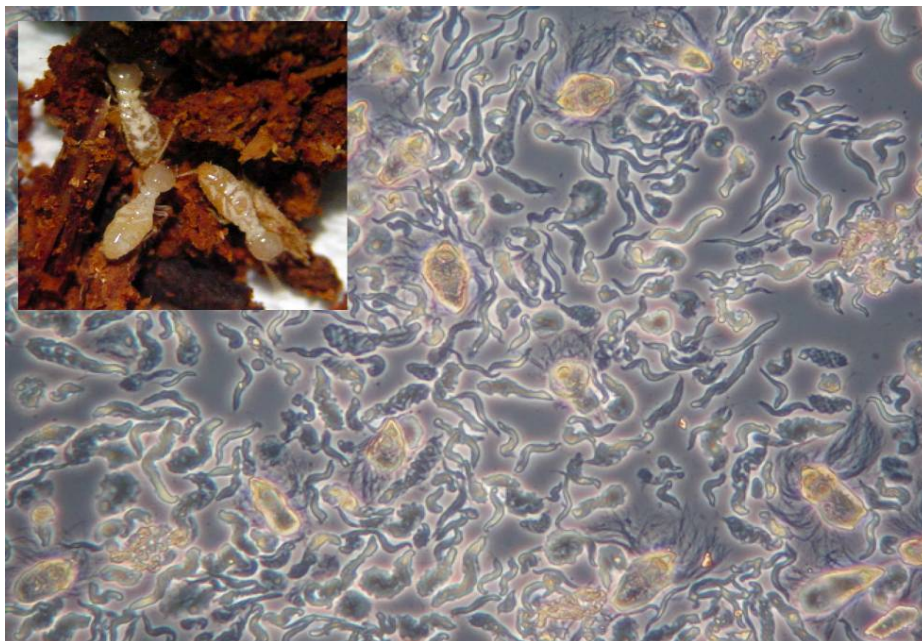


図1 日本で最も広く分布するヤマトシロアリ(左上)とその共生原生生物群

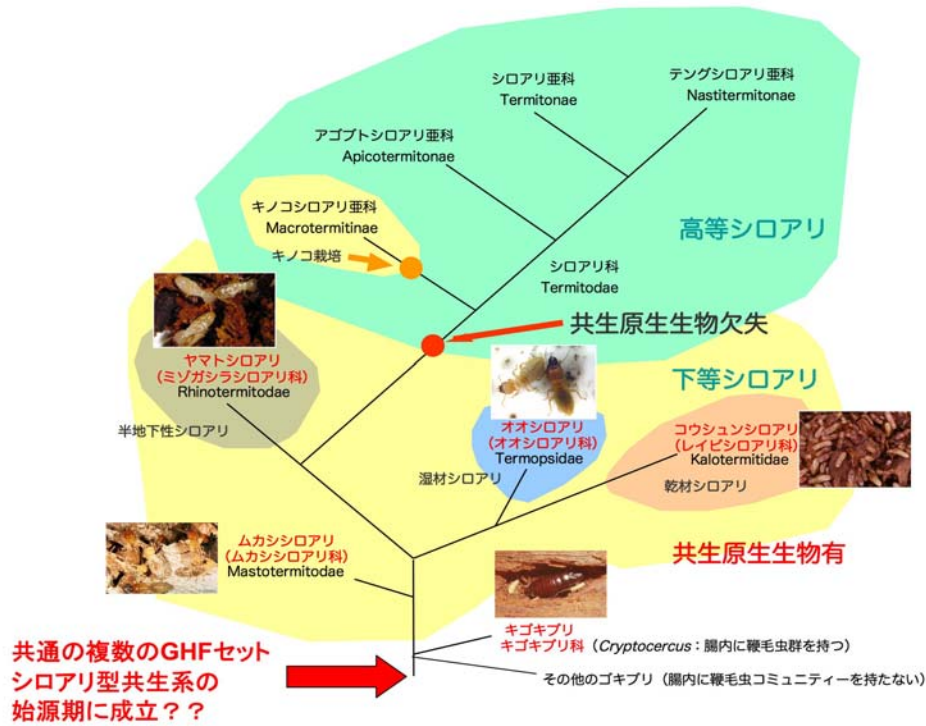


図2 シロアリの系統樹と今回用いたシロアリ(赤字)

シロアリは、高等シロアリと下等シロアリに分かれ、このうち下等シロアリが高効率のバイオマス分解系を持つ。本研究ではこの下等シロアリ全科の共生系を対象に解析を行った。

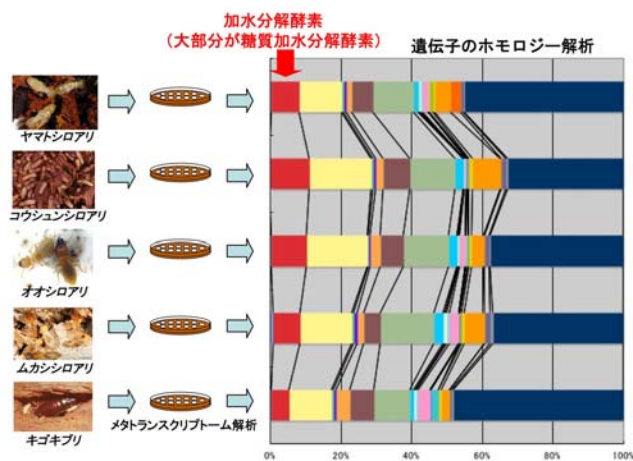


図3 各種シロアリ腸内共生系のメタトランスクリプトーム解析

各シロアリ腸内共生系より構築した cDNA ライブラリーの配列を解析したところ、大量の糖質加水分解酵素ファミリーが発現していた。