

下等シロアリの消化管内でのセルラーゼ系 酵素の分布とそれら酵素の部分精製

板倉修司, 田中裕美, 榎 章郎

近畿大学農学部農芸化学科

Distribution of Cellulases in the Digestive System of the Lower Termite and Partial Purification of Cellulases from the Termite

Shuji ITAKURA, Hiromi TANAKA, and Akio ENOKI

Department of Agricultural Chemistry, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

Synopsis

About 20%, 18%, and 36% of the total avicelase activity in *Coptotermes formosanus* were detected in the salivary glands, midgut, and hindgut, respectively. About 35% of the total CMCase activity in the termite was detected in the salivary glands, whereas the activities in the midgut and hindgut were 21.1% and 18.2%, respectively. About 75% of the total β -D-glucosidase activity in the termite was detected in the midgut. Thus all of the cellulase components necessary for hydrolysis of natural cellulose were present in the digestive system in locations ranging from the salivary glands to the midgut. Most of the glucose (about 93%) and trehalose (about 87%) detected in the termite were present in the gutted-body. Furthermore, most (about 66%) of the glucose in the gut was detected in the midgut. These results suggest that natural cellulose ingested by the termite is hydrolyzed to oligosaccharides in the foregut and midgut, that β -D-glucosidase hydrolyzes the oligosaccharides to glucose mainly in the midgut, and that the resultant glucose is absorbed through the midgut wall into termite tissue.

Five cellulase components were separated from the termite tissue extract by anion exchange and gel filtration chromatography, whereas two components were separated from the hindgut (with symbiotic protozoa) extract. Three cellulase components with avicelase and CMCase activities, one cellulase component with CMCase activity, and one with β -D-glucosidase activity were found in the termite tissue extract. A cellulase component with avicelase and CMCase activities, and one with avicelase, CMCase, and cellobiohydrolase activities were found in the hindgut extract. These results show that the cellulase components in the termite tissue are distinguishable from those of protozoa origin.

緒 言

下等シロアリのセルロース代謝機構は次のように報告されている¹⁻⁴⁾：(1) シロアリの咀嚼により微粉碎された木材が、後腸内に達し共生原生動物の体内に取り込まれる。(2) 木材細胞壁の主要な構成成分であるセルロースが、原生動物により嫌氣的に酢酸、水素と二酸化炭素に変換される。(3) 原生動物により分泌された酢酸が後腸壁を通過してシ

ロアリに吸収されエネルギー源^{5,6)} やアミノ酸合成の前駆体⁷⁾ として使われる。この代謝機構は、

(1) 下等シロアリの唾液腺からはエンド-1,4- β -グルカナーゼが分泌されるが、結晶性セルロースの分解に必要な不可欠なエキソ-1,4- β -グルカナーゼの大部分は後腸内に生息する共生原生動物の体内に存在しているという結果^{8,9)}、および(2) 下等シロアリと高等シロアリには、解糖系とTCA回路の全酵素が存在しているが、これら2つの代謝経路を結ぶ重

要な働きをするビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が不活性化あるいは欠損しているため、解糖系で生じたビルビン酸はアセチル-CoAに変換されないという知見¹⁰⁾に基づいて提案されている。

紙・綿などの天然セルロースや、約50%のセルロースより成る木材を餌とするシロアリが、セルロースの加水分解により生成するグルコースを直接吸収・消化できず、共生原生動物の分泌する酢酸を利用するという機構は極めて非効率的である。最近我々は後腸を除去したイエシロアリ (*Coptotermes formosanus*)——原生動物は後腸内に存在するので、この試料は原生動物を含まない——の抽出液がNAD⁺の存在下でビルビン酸をアセチル-CoAへ変換することを見いだした。すなわちイエシロアリ体内でビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体によりビルビン酸がアセチル-CoAへ直接変換されることを明らかにした¹¹⁾。セルロースの加水分解により生成したグルコースを中腸で吸収できれば、シロアリは共生原生動物の助けを借りずに解糖系とTCA回路によってグルコースを直接酸化しエネルギーを得ることが可能となる。

本研究では、セルロースの加水分解が原生動物の生息する後腸内で起こるのか、あるいは前腸や中腸においても起こるのかを明らかにするために、シロアリの消化管内におけるエキソ-1,4-β-グルカナーゼ、エンド-1,4-β-グルカナーゼおよびβ-D-グルコシダーゼ活性の分布を検討した。また、シロアリがグルコースあるいは酢酸のいずれをエネルギー源や炭素源として利用しているのかを明らかにするために、中腸、後腸とシロアリ組織におけるグルコース、トレハロース(グルコースから合成され、昆虫のエネルギー源や貯蔵炭水化物として重要な役割を果たしている)と酢酸の存在量を測定した。さらに、原生動物体内およびシロアリの消化管内に存在するセルラーゼ成分を比較するために、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにより、後腸を取り除いたシロアリの体組織と後腸に存在するセルラーゼ系酵素(エキソ-1,4-β-グルカナーゼ、エンド-1,4-β-グルカナーゼ、β-D-グルコシダーゼおよびセロビオヒドロラーゼ)をそれぞれ精製した。

なお、シロアリ体内に存在するセルラーゼ成分のセルロース分解における作用機構がまだ十分に解明されていないため、以下ではエキソ-1,4-β-グルカナーゼを結晶性セルロースであるアビセルを分解する酵素という意味でアビセルラーゼ、エンド-1,4-β-グルカナーゼを非晶性セルロースであるカルボキシメチルセルロース(CMC)を分解する酵素という意

味でCMCアーゼと称する。

材料および方法

1. シロアリ

研究室で約13年間維持した巣からイエシロアリ (*C. formosanus*) の職蟻を採集した。アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) を餌として飼育したシロアリを、採集日から1週間以内に解剖した。

2. 消化管からの粗酵素液の調製

職蟻7頭を解剖し唾液腺と腸を摘出した。腸を前腸、中腸と後腸に切断した。唾液腺をピンセットで前腸から分離するとき素囊の内容物が胸部へ漏出したので、前腸とその内容物は腸を除いた体組織と混合した。7頭の職蟻より得た各組織を700μlの生理的塩類溶液(43mM NaCl, 22mM KCl, 3.7mM CaCl₂, 14mM MgSO₄, 8.6mM KH₂PO₄, 15mM K₂HPO₄)に浸漬し、ポッター・エルページェムホモジナイザーにより破碎した。各ホモジェネートを11,500×gで3分間遠心分離した上澄み液を、唾液腺、中腸、後腸、および前腸プラス腸を除いた体組織の粗酵素液とした。全ての操作は0~4℃で行った。

3. 体全体からの部分精製酵素の調製

職蟻500頭からピンセットで腸を引き抜き、中腸と後腸に分割した。腸を除いた体と中腸を混合した(以後、この混合物をシロアリ組織と称する)。シロアリ組織および後腸をそれぞれ蒸留水(5ml)に浸漬しホモジナイズした。ホモジェネートを19,500×gで20分間遠心分離し、上澄み液を回収した。上澄み液を硫酸分画し30~60%飽和で沈殿した画分を再び19,500×gで30分間遠心分離し、沈殿物を蒸留水(5ml)に溶解した。この酵素液をSephadex G-15(ファルマシア)で脱塩し、凍結乾燥した。再び蒸留水(5ml)あるいは1.2mlの20mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に溶解し、シロアリ組織と後腸の部分精製酵素液とした。全ての操作は0~4℃で行った。

4. 酵素活性の測定

アビセルラーゼ活性;各粗酵素液(400μl)を1mlの2%(w/v)アビセル(フナセルSF薄層クロマトグラフィー用,フナコシ)-0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)とともに30℃で6時間振とうした。遠心分離によりアビセルを取り除いた上澄み液中に含まれる還元糖をSOMOGYI法¹²⁾により定量した。また、カラムクロマトグラフィー後の活性測定時には、画

分 (250 μ l) と 2% アビセル-酢酸緩衝液 (250 μ l) の混合物を 30 $^{\circ}$ C で 20 時間振とうし、生成した還元糖を定量した。

CMC アーゼ活性；各粗酵素液 (400 μ l) を 1 ml の 2% (w/v) CMC (CMC ナトリウム, ナカライテスク) -酢酸緩衝液とともに 30 $^{\circ}$ C で 30 分間振とうし、生成した還元糖を SOMOGYI 法¹²⁾ により定量した。カラムクロマトグラフィーで分画した画分 (50 μ l) と 2% CMC-酢酸緩衝液 (450 μ l) の混合物を 30 $^{\circ}$ C で 3 時間振とうし、CMC アーゼ活性を測定した。

β -D-グルコシダーゼ活性；各粗酵素液 (400 μ l) を 1 ml の 35 mM D-サリシン (キシダ化学) -酢酸緩衝液とともに 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、生成した還元糖を SOMOGYI 法¹²⁾ により定量した。またカラムクロマトグラフィーにより分画した画分の活性は、画分 (50 μ l) と 33 mM *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (シグマ) -酢酸緩衝液 (50 μ l) を混合し、30 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させ生成した *p*-ニトロフェノールを定量し¹³⁾ 測定した。

セロビオヒドロラーゼ活性；カラムクロマトグラフィーによる画分 (50 μ l) を 22 mM *p*-ニトロフェニル- β -D-セロビオシド (シグマ) -酢酸緩衝液 (50 μ l) とともに 30 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させ生成した *p*-ニトロフェノールを定量した¹³⁾。

1 分間に 1 μ モルのグルコースに相当する還元糖あるいは *p*-ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 Unit とした。標準誤差の推定と測定値間の有意性の検定は、スチューデントの *t*-検定¹⁴⁾ に従った。

5. カラムクロマトグラフィー

トリス-塩酸緩衝液に溶解したシロアリ組織と後腸の部分精製酵素液 (500 μ l) を 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した Mono Q HR 5/5 (ファルマシア) 陰イオン交換カラムに注入した。0~1 M の塩化ナトリウムの濃度勾配 (Fig. 1, 2) をかけ、流速 1 ml/分 で溶出し、1 ml ずつ分取した。セルラーゼ活性の検出された画分を集め Sephadex G-15 で脱塩し、凍結乾燥した。これを Milli Q 水 (100 μ l) に溶解し、塩化ナトリウム (150 mM) を添加した 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Superdex 75 HR 10/30 (ファルマシア) カラムクロマトグラフィーを行った。溶出条件は注入体積 50 μ l、流速 500 μ l/分、分画体積 500 μ l で行った。セルラーゼ活性の検出された画分を Sephadex G-15 で脱塩し、凍結乾燥した。凍結乾燥は室温で行い、その他の操作は 4 $^{\circ}$ C で行った。

6. 電気泳動

精製したセルラーゼ成分の分子量を LAEMMLI 法¹⁵⁾ に従い SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動) で推定した。すなわち、凍結乾燥した精製セルラーゼを 20 μ l の変性用緩衝液 (50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8), 8% グリセロール, 1.6% SDS, 0.001% プロモフェノールブルーと 0.04% β -メルカプトエタノール) に溶解した。100 $^{\circ}$ C で 5 分間変性した試料 (10 μ l) と標準タンパク (低分子量キャリブレーションキット, ファルマシア) を 12% あるいは 15% (w/v) アクリルアミドゲルを用いて 30 mA で泳動した。泳動後、タンパク質を銀染色キット (バイオラッド) で染色した。

7. シロアリ体内における結晶性セルロース加水分解率

蒸留水に溶解したシロアリ組織と後腸の部分精製酵素液 (1.5 ml) を 1.5 ml の 2% (w/v) アビセル-酢酸緩衝液と混合し、30 $^{\circ}$ C で 6 時間振とうした。遠心分離により上澄み液を回収した。

グルコース、セロビオースの定量；上澄み液に含まれるグルコースとセロビオースをトリメチルシリル (TMS) 化し、ガスクロマトグラフィー (GC) により定量した。TMS 化糖の分析は、Silicon SE-30 充填カラムを用い、130 $^{\circ}$ C から 230 $^{\circ}$ C への昇温分析 (昇温速度 5 $^{\circ}$ C/分) で行った。

8. シロアリ体内に存在するグルコース、トレハロースと酢酸の定量

職蟻 100 頭を解剖し、腸を摘出した。腸に付着している血リンパを洗い流し、中腸と後腸に分離した。各組織のホモジェネートを 11,500 $\times g$ で 3 分間遠心分離し、上澄み液を回収した。全ての操作は 0~4 $^{\circ}$ C で行った。

グルコース、トレハロースの定量；各上澄み液に含まれるグルコースとトレハロースを TMS 化し GC で定量した。TMS 化糖の分析はグルコース、セロビオースの定量と同じ条件で行った。

酢酸の定量；各上澄み液を塩酸酸性にし酢酸塩を酢酸へ変換した後に、酢酸を GC で定量した。Unisol F-200 (ジーエルサイエンス) を充填したカラムを用い、140 $^{\circ}$ C から 180 $^{\circ}$ C への昇温分析 (昇温速度 10 $^{\circ}$ C/分) で分析した。

結 果

イエシロアリの消化管から調製した抽出液中に検出されたアビセルラーゼ活性、CMC アーゼ活性と β -

D-グルコシダーゼ活性をTable 1に示した。アビセラゼ活性は、後腸抽出液(36.4%)だけでなく、唾液腺(19.6%)や中腸(18.1%)抽出液においても検出された。CMCアーゼ活性は唾液腺抽出液で最も高く、その値は他の組織の抽出液で検出された値よりも有意に高かった($p < 0.05$)。β-D-グルコシダーゼ活性は中腸で最も高く、中腸で検出された活性は他の組織で検出された活性より有意に高かった($p < 0.05$)。体全体の活性に対し約75%に相当するβ-D-グルコシダーゼ活性が中腸で検出された。

シロアリ組織および後腸から別々に調製した部分精製酵素と結晶性セルロースを反応させた場合に生成したグルコースとセロビオースの量をTable 2に示した。シロアリ組織および後腸から調製した両酵素液は結晶性セルロースをかなりの速度で加水分解してグルコースとセロビオースを生成した。6時間

反応させた場合に、後腸を除いたシロアリ組織の部分精製酵素により生成されたグルコース量は、後腸の部分精製酵素により生成されたグルコース量よりも約50%多かった。約42nモル/頭のセロビオースを生成するのに要する時間は、後腸の部分精製酵素では6時間、後腸を除いたシロアリ組織の部分精製酵素では3時間であった。

イエシロアリ体内におけるグルコース、トレハロースと酢酸の分布をTable 3に示した。腸の中に存在するグルコースの約66%が中腸で、またトレハロースの約75%が後腸で検出された。また、腸の中のグルコースの大部分は中腸壁とその内容物中に存在していた。シロアリ体内ではグルコース(約93%)とトレハロース(約87%)の大部分が腸を除いたシロアリ組織に、これとは対照的にほとんどの酢酸(約75%)は腸内に見出された。

Table 1. Distribution of cellulase components in the digestive system* of the worker caste termite of *C. formosanus*.

	Activity (mU/termite) ± SEM			
	Salivary glands	Midgut	Hindgut	Foregut/ dissected-body
Avicelase	0.454 ± 0.113a† (19.6)‡	0.420 ± 0.063a (18.1)	0.845 ± 0.105b (36.4)	0.603 ± 0.108a,b (26.0)
CMCase	28.1 ± 1.35 (34.5)	17.2 ± 1.25c (21.1)	14.8 ± 2.11c (18.2)	21.4 ± 2.57c (26.3)
β-D-Glucosidase	2.65 ± 0.550d (12.7)	15.7 ± 2.04 (75.5)	0.867 ± 0.121d (4.2)	1.58 ± 0.0421d (7.6)

* Salivary glands and whole gut of seven worker caste termites were removed and the gut divided into foregut, midgut, and hindgut. The foregut and dissected-body segments were combined for all analyses.

† Values represent means of five replications ± SEM.

Values followed by same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

‡ Values in parentheses represent relative value (%) of total enzyme activity.

Table 2. Rate of hydrolysis of crystalline cellulose in the hindgut and termite tissue* homogenates.

	Incubation period (h)	Amount formed from crystalline cellulose (nmol/termite)	
		Hindgut preparation	Termite tissue preparation
Glucose	0.1	0.58† (44.6)‡	0.72 (55.4)
	3	6.12 (42.3)	8.34 (57.7)
	6	10.7 (40.1)	16.0 (59.9)
Cellobiose	0.1	0.45 (13.0)	3.0 (87.0)
	3	28.5 (40.3)	42.3 (59.7)
	6	42.4 (47.2)	47.4 (52.8)
Total	0.1	1.03 (21.7)	3.72 (78.3)
	3	34.6 (40.6)	50.6 (59.4)
	6	53.1 (45.6)	63.4 (54.4)

* Gut was pulled out and divided into midgut and hindgut. The midgut was combined with the gutted-body.

† Values represent means of two replications.

‡ Values in parentheses represent relative value (%) of total amount of saccharide at the same incubation period.

Table 3. Distribution of glucose, trehalose, and acetate in whole-body homogenates.

	Glucose	Trehalose	Acetate
		(nmol/termite)	
Midgut homogenate*	7.5	0.92	
Hindgut homogenate*	3.9	2.7	8.6‡
Gutted-body homogenate†	147.5	24.3	2.8

* Midgut and hindgut homogenates were prepared from whole gut, which was removed from dissected body.

† Gutted-body from which midgut and hindgut had been pulled out.

‡ acetate was assayed in gut homogenate, which comprised midgut and hindgut.

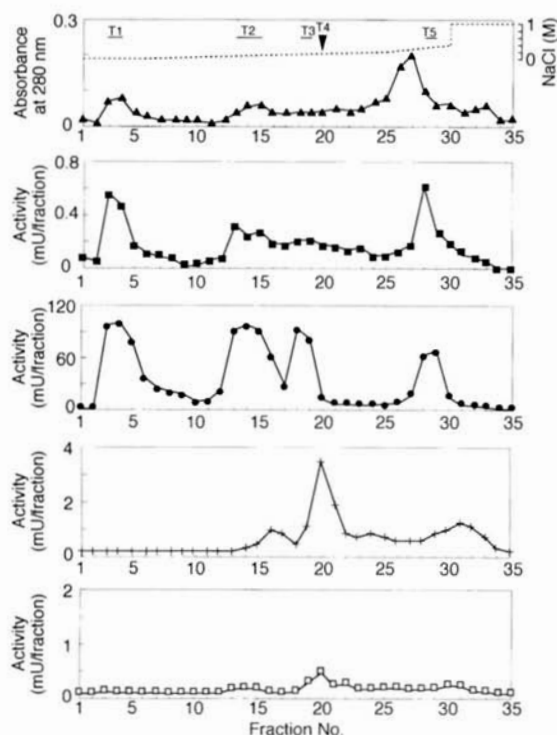


Fig. 1 Partial purification of cellulases in the termite tissue extract from *C.formosanus* on a Mono Q HR 5/5 column. A 500 μ l of the partially purified enzyme (420 termites/ml) dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5 was applied to the column and eluted at 1 ml/min using a 0-1 M sodium chloride gradient in the same buffer. \blacktriangle , Absorbance at 280 nm; \blacksquare , avicelase, \bullet , CMCCase, $+$, β -D-glucosidase, and \square , cellobiohydrolase activities.

後腸を除いたシロアリ組織および後腸から得た抽出液に含まれるセルラーゼ成分の陰イオン交換クロマトグラフィーの結果をそれぞれFig. 1と2に示した。シロアリ組織からの抽出液からは5種類のセルラーゼ成分が、また後腸からの抽出液からは2種類のセルラーゼ成分が分離された。シロアリ組織にはアビセラーゼとCMCアーゼ活性の両方の活性を示す成分 (T 1, 画分 3~4, T 2, 画分 13~15と T 5, 画分 28~29), CMCアーゼ活性のみを示す成分 (T 3, 画分 18~19), および, β -D-グルコシダーゼおよびセロビオヒドロラーゼの両活性を示す成分

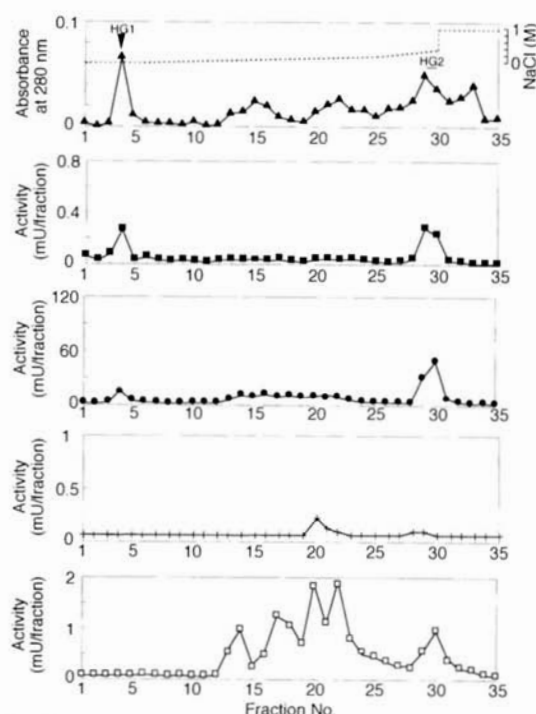


Fig. 2 Partial purification of cellulases in the hindgut extract from *C.formosanus* on a Mono Q HR 5/5 column. A 500 μ l of the partially purified enzyme (420 termites/ml) dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5 was applied to the column and eluted at 1 ml/min using a 0-1 M sodium chloride gradient in the same buffer. \blacktriangle , Absorbance at 280 nm; \blacksquare , avicelase, \bullet , CMCCase, $+$, β -D-glucosidase, and \square , cellobiohydrolase activities.

(T 4, 画分 20) が含まれていた。後腸にはアビセラーゼとCMCアーゼの両者の活性を示す成分 (HG 1, 画分 4), アビセラーゼ, CMCアーゼおよびセロビオヒドロラーゼの両活性を示す成分 (HG 2, 画分 29~30) が見出された。この他に後腸の抽出液からは強いセロビオヒドロラーゼ活性を示すが全く結晶性セルロースや非晶セルロースを分解できない4種類の成分 (画分 13~14, 16~18, 20, 22) が分離された。この中の1成分 (画分 20) には β -D-グルコシダーゼ活性も検出された。

陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離され

たセルラーゼ成分をゲル濾過によりさらに精製した (Fig. 3)。シロアリ組織より分離された成分 T1, T2 および T5 は, それぞれ分子量 22.9, 22.9, 36.3 kDa に相当する位置で溶出された。また, T3 はゲル濾過の段階で失活し回収できなかった。後腸より分離されたセルラーゼ成分 HG2 は, 分子量 31.6 kDa に相当する位置に溶出された。HG1 では 16.2 kDa に相当する溶出位置 (画分 28) に CMC アーゼ活性が検出されたが, その活性は非常に弱くゲル濾過後の段階でほとんど失活していた。

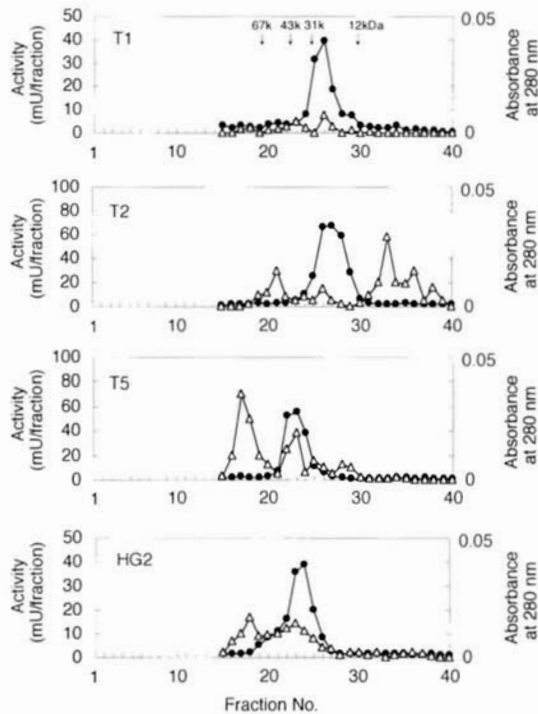


Fig. 3 Elution profiles of partially purified cellulases on Superdex 75 HR 10/30 column. Partially purified cellulases from the termite tissue extract (T1, T2, and T5) and the hindgut extract (HG2) by Mono Q column. Δ , Absorbance at 280 nm; \bullet , CMCase activity. Arrows indicate bovin serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), deoxyribonuclease I (31 kDa), and cytochrome C (12 kDa) eluted as molecular weight standards.

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーとゲル濾過により部分精製したセルラーゼ成分を SDS-PAGE で分析した (Fig. 4, 5)。シロアリ組織 (T1) と後腸 (HG1) の両抽出液から陰イオン交換クロマトグラフィーで初めに溶出された成分は, どちらも SDS-PAGE で検出できなかった。シロアリ組織抽出液より部分精製したセルラーゼ成分は, 31.0 (T2), 30.3 (T4), 53.2 (T5) kDa, また後腸抽出液より部分精製したセルラーゼ成分は, 31.5

kDa (HG2) に相当する位置にタンパク質のバンドが観察された。

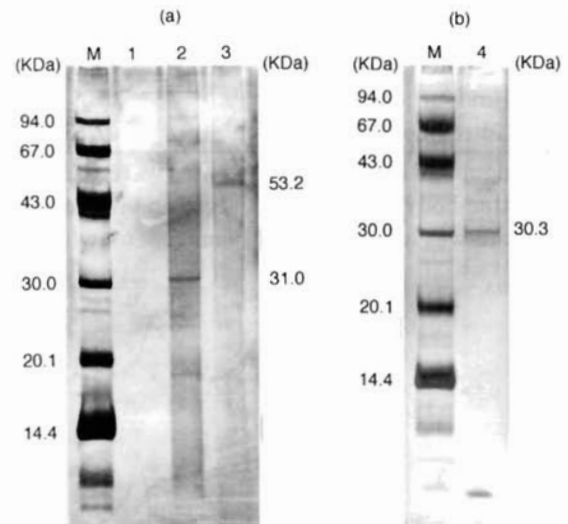


Fig. 4 Estimation of molecular weights of the purified cellulase components in the termite tissue of *C. formosanus* on SDS-PAGE (a, 12% and b, 15% acrylamide). Proteins were visualized by silver stain. Lanes: M, molecular weight markers; 1, cellulase component with avicelase and CMCcase activities (T1); 2, cellulase component with avicelase and CMCcase activities (T2); 3, cellulase component with avicelase and CMCcase activities (T5); 4, β -D-glucosidase (T4).

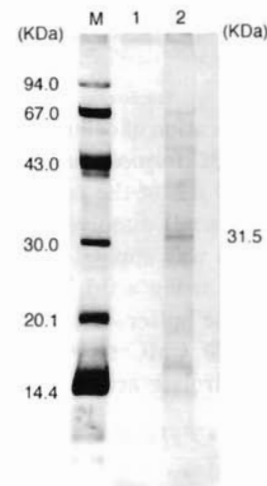


Fig. 5 Estimation of molecular weights of the purified cellulase components in the hindgut of *C. formosanus* on SDS-PAGE (12% acrylamide). Proteins were visualized by silver stain. Lanes: M, molecular weight markers; 1, cellulase component with avicelase and CMCcase activities (HG1); 2, cellulase component with avicelase, CMCcase, and cellobiohydrolase activities (HG2).

考 察

唾液腺と中腸に相当量のアビセララーゼ活性とCMCアーゼ活性が検出された。この結果は他の下等シロアリに関する結果^{16,17)}とはほぼ一致しているが、イエシロアリ体内のアビセララーゼの大部分(約87%)は後腸内に存在するという吉村らの結果⁹⁾とは異なっている。吉村らは、下等シロアリに摂取されたセルロースは前腸や中腸ではほとんど分解されずに後腸に達し、後腸内で共生原生動物の体内に取り込まれ、原生動物の生成するアビセララーゼとシロアリが分泌したCMCアーゼの作用により、原生動物の体内において初めて完全に分解されると報告している。本研究では、後腸内だけで天然セルロースが分解されるのかどうか検討するために、後腸を除いたシロアリ組織と後腸から得た抽出液と結晶性セルロースを反応させて、生成するグルコースとセロビオースを定量した。その結果、シロアリ組織抽出液でのグルコースとセロビオースの生成率は、後腸抽出液での生成率よりも高いことが見出された。これらの結果はシロアリの体のアビセララーゼ活性とCMCアーゼ活性の50%以上が組織に検出された事実と一致している。

シロアリ体内に存在する β -D-グルコシダーゼの大部分が中腸(約75%)で検出された。また腸内に存在するグルコースの約66%が中腸で検出された。これらの結果はシロアリに取り込まれたセルロースが前腸と中腸でセロオリゴ糖まで加水分解され、主として中腸で β -D-グルコシダーゼの作用でグルコースへ分解されることを示唆している。前腸と中腸でシロアリの代謝に十分な量のグルコースが生成されるという同様な結果が、下等シロアリであるヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)¹⁷⁾と高等シロアリである*Nasutitermes walkeri*¹⁸⁾において報告されている。一般に、昆虫においては中腸が栄養素の吸収組織であるので¹⁹⁾、セルロースの加水分解によって生成したグルコースは中腸壁を通してシロアリ体内に吸収されるものと考えられる。また、シロアリ体内に存在するトレハロースの約87%が腸以外の組織中に検出されたことから、グルコースは組織中ではトレハロースとして蓄えられ、必要に応じてグルコースへ再転換されて利用されるものと推測される。

下等シロアリは共生原生動物を除去されるとセルロースを単一の飼料として生存できないことが指摘されており²⁰⁾、共生原生動物が下等シロアリのセルロースの資化に直接関与していると考えられている。しかし、本研究で明らかにしたように、後腸に

は共生する原生動物とシロアリの双方に由来するアビセララーゼ、CMCアーゼ、 β -D-グルコシダーゼが混在すると考えられることから、共生原生動物はシロアリの生存においてセルロースの分解以外の重要な役目を果たしていることが示唆される。

陰イオン交換クロマトグラフィーにより、シロアリ組織には少なくとも5種類のセルラーゼ成分が、また後腸には少なくとも2種類のセルラーゼ成分が含まれていることが明らかとなった。約350mM塩化ナトリウムで溶出された成分T5とHG2は、どちらも強いアビセララーゼ活性とCMCアーゼ活性を示すが、その分子量はゲル濾過によりそれぞれ36.3、31.6 kDa、またSDS-PAGEによりそれぞれ53.2、31.5kDaと測定された。これらの結果により、後腸から分離されたセルラーゼ成分HG2は、シロアリ組織には存在しないことが明らかとなった。HG2は原生動物体内で生成された酵素か、あるいはシロアリ腸内のセルラーゼが原生動物の体内で何らかの修飾を受けた酵素であると思われる。また、HG2に関してはゲル濾過とSDS-PAGEで測定された分子量がほぼ一致していた。シロアリ組織からは、後腸には存在しないセルラーゼ成分(T2、T3)が分離された。これは後腸よりもシロアリ組織に高いアビセララーゼ、CMCアーゼ活性が検出された事実と一致する。ヤマトシロアリでは、CMCアーゼが唾液腺から分泌されると報告されており²¹⁾、T2やT3もイエシロアリ自身が生成し消化管内へ分泌している可能性が高い。

シロアリ組織と後腸抽出液のどちらにも、陰イオン交換体のカラムに保持されずに溶出された画分(T1、HG1)にアビセララーゼとCMCアーゼ活性が検出された。これらの画分を再度Mono Q陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(pH 8.5に緩衝化)を行ったが、カラムに吸着されなかった。このことからT1、HG1の等電点はpH 9よりもアルカリ側にあると推測される。

シロアリ組織(T1、T2、T5)と後腸(HG1)より分離されたアビセララーゼ活性を示す画分には、セロビオヒドロラーゼ活性が検出されなかった。エキソ-1,4- β -グルカナーゼすなわちセロビオヒドロラーゼは、結晶性セルロースに単独で作用し非還元末端からセロビオース単位でセルロース鎖を加水分解する酵素と定義されている。シロアリから分離されたこれら4種のセルラーゼ成分は、結晶性セルロースであるアビセルをそれぞれ単独で分解できるにも関わらず、*p*-ニトロフェニル- β -D-セロビオシドをセロビオースと*p*-ニトロフェノールに分解できなかったため、エキソ-1,4- β -グルカナーゼとは異

なった作用で結晶性セルロースを分解しているものと考えられる。

後腸抽出液から強いセロビオヒドロラーゼ活性を示す4種類の成分が分離された。しかしこれらの画分によって結晶性セルロースであるアビセルは全く分解されなかった。セロビオヒドロラーゼは、結晶性セルロースの非還元末端に作用しセロビオース単位で糖鎖を切断する酵素を指すもので、これらの4成分はセロビオヒドロラーゼではない。

以上の結果が示すように、シロアリ体内に存在するアビセララーゼ活性を示す成分は、従来一般に言われてきたエキソ-1,4-β-グルカナーゼとはセルロースに対する作用機構が異なっている。不完全菌である *Trichoderma reesei* では結晶性のセルロースを非還元末端から順次セロビオース単位で切断する酵素(エキソ-1,4-β-グルカナーゼ)と、非結晶性セルロースをランダムに切断する酵素(エンド-1,4-β-グルカナーゼ)との相乗作用によってセルロースが効率的に分解されるという(エンド-エキソ説)。しかし、本研究で用いた下等シロアリでは、これとは異なったメカニズムによってセルロースが効率的に分解されていることが明らかになった。近年、セルラーゼの分子構造に関する研究が盛んになり、その成果から活性中心近傍のアミノ酸配列がセルロースの分解の機構と密接に関係していることが明らかになってきている²²⁾。シロアリのセルラーゼの分子構造の研究は未だ見られないが、今後、本研究で見出されたセルラーゼの分子構造を明らかにして、下等シロアリでセルロースが効率的に分解される機作を明らかにしたい。

要 約

イエシロアリの体全体で検出されたアビセララーゼ活性の、約20%、18%および36%に相当する活性が、唾液腺、中腸と後腸でそれぞれ検出された。また、これらの組織でのCMCアーゼ活性の値は、唾液腺(約35%)、中腸(約21%)と後腸(約18%)であった。体全体に存在するβ-D-グルコシダーゼの約75%に相当する活性が中腸で検出された。すなわち天然セルロースをグルコースにまで加水分解するのに必要な全てのセルラーゼ成分が唾液腺から中腸までの消化管内に存在していた。シロアリ体内に存在するグルコースと、グルコースから合成され昆虫のエネルギー源として重要な役割を果たすトレハロースの大部分は、腸を除いたシロアリ組織に存在しており、また腸内のグルコースのほとんどが中腸で検出された。これらの結果は、シロアリに取り込まれた

天然セルロースが前腸と中腸でセロオリゴ糖まで加水分解され、このセロオリゴ糖が主として中腸でグルコースまで分解され、中腸壁を通してシロアリ体内に吸収されることを示している。

陰イオン交換クロマトグラフィーにより、シロアリ組織から5種類のセルラーゼ成分が、また後腸(原生動物を含む)から2種類のセルラーゼ成分が分離された。シロアリ組織抽出液には、アビセララーゼとCMCアーゼの両活性を示すセルラーゼ成分(3種類)、CMCアーゼ活性のみを示すセルラーゼ成分(1種類)、および主としてβ-D-グルコシダーゼ活性を示すセルラーゼ成分(1種類)が存在していた。後腸抽出液には、アビセララーゼおよびCMCアーゼの両活性を示すセルラーゼ成分(1種類)と、アビセララーゼ活性、CMCアーゼ活性およびセロビオヒドロラーゼ活性を示すセルラーゼ成分(1種類)が見出された。これらの結果から、原生動物体内のセルラーゼ成分とは異なるセルラーゼ成分がシロアリの消化管内に存在していることが明らかとなった。

文 献

- 1) R.W.O'BRIEN and M.SLAYTOR: *Aust. J. Biol. Sci.*, **35**, 239~262 (1982)
- 2) R.E.EATON and M.D.C.HALE: in "Wood: Decay, Pests, and PROTECTION", Chapman and Hall, Cambridge, pp. 209~218 (1993)
- 3) J.A.BREZNAK and A.BRUNE: *Annu. Rev. Entomol.*, **39**, 453~487 (1994)
- 4) T.YOSHIMURA: *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.*, **8**, 48~59 (1996)
- 5) D.A.ODELSON and J.A.BREZNAK: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1602~1613 (1983)
- 6) M.E.HOGAN, M.SLAYTOR, and R.W.O'BRIEN: *J. Insect Physiol.*, **31**, 587~591 (1985)
- 7) J.K.MAULDIN, N.M.RICH, and D.W.COOK: *Insect Biochem.*, **8**, 105~109 (1978)
- 8) I.YAMAOKA and Y.NAGATANI: *Zool. Mag.*, **84**, 23~29 (1975)
- 9) T.YOSHIMURA, T.WATANABE, K.TSUNODA, and M.TAKAHASHI: *Mat. Org.*, **27**, 273~284 (1992)
- 10) R.W.O'BRIEN and J.A.BREZNAK: *Insect Biochem.*, **14**, 639~643 (1984)
- 11) S.ITAKURA, M.MATSUMURA, H.TANAKA, and A.ENOKI: *Mokuzai Gakkaishi*, **43**, 800~802 (1997)
- 12) M.SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19~23 (1951)
- 13) M.V.DESHPANDE, K.-E.ERIKSSON, and L.G.PETTERSSON: *Analytical Biochem.*, **138**, 481~487 (1984)
- 14) 山田 武: "生物学実験のための統計学入門", pp.101~110, 川島書店, 東京 (1993)
- 15) U.K.LAEMMLI: *Nature*, **227**, 680~685 (1970)
- 16) P.C.VEIFERS, A.M.MUSCA, R.W.O'BRIEN, and M.SLAY-

- TOR: *Insect Biochem.*, **12**, 35~40 (1982)
- 17) T.INOUE, K.MURASHIMA, J.-I.,AZUMA, A.SUGIMOTO, and M.SLAYTOR: *J. Insect Physiol.*, **43**, 235~242 (1997)
- 18) M.HOGAN, P.C.VEIFERS, M.SLAYTOR, and R.T.CZOLIJ: *J. Insect Physiol.*, **34**, 891~899 (1988)
- 19) 松香光夫: “昆虫の生物学”, pp.65~68, 玉川大学出版部, 東京 (1992)
- 20) J.K.MAULDIN, R.V.SMYTHE, and C.C.BAXTER: *Insect Biochem.*, **2**, 209~217 (1972)
- 21) H.WATANABE, M.NAKAMURA, G.TOKUDA, I.YAMAOKA, A.M.Scrivener, and H.Noda: *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **27**, 305~313 (1997)
- 22) B.HENRISSAT and A.BAIROCH: *Biochem. J.*, **316**, 695~696 (1996)

(受理: 1997年9月30日)