（様式第３号）

論　文　要　旨

論　文　題　目

Studies on degradation and ingestion of xylan by the termite *Coptotermes formosanus* Shiraki

Coptotermes formosanus is one of the most destructive termites against woody architectures in the southern part in Japan as well as in United States. The hindgut of the termite harbors three protozoan species; i.e. *Pseudotrichonympha grassii, Holomastigotoides mirabile,* and *Spirotrichonympha leiydi*. These protists are known to play an important role in cellulose digestion. Hemicellulose represents noncellulosic polysaccharides in plant cell walls and xylan is the major constituent of hemicellulose. Since hemicellulose prevents access of cellulolytic enzymes to cellulose, analyzing the mechanism by which termites digest hemicellulose is of great importance to understand the degradation machinery of plant cell walls in termites. In the digestive tract of *C. formosanus*, 88% of total xylanase activity was confined to the hindgut. The xylanolytic activities of *C. formosanus* are most likely to be originated from the symbiotic microbes. The forced feeding experiments with xylan demonstrated that decline of xylanase activities occurred according to decrease of the protozoan number. This result suggests that xylanase activities of *C. formosanus* were derived from the symbiotic protists. To elucidate the origin of xylanolytic activities, three functional xylanases were purified to homogeneity from *C. fomosanus* for the first time. Elution profile from the whole termite extract suggests that three xylanases are major components of xylan digestion in the gut of the termite. The corresponding cDNAs were successfully obtained based on the N-terminal amino acid sequences. Nowadays, carbohydrolytic enzymes including xylanases are classified into Glycoside Hydrolase Families (GHF) based on amino acids similarities. The deduced amino acid sequences of these xylanases showed the conserved motifs of GHF 11 xylanase. RT-PCR experiments revealed that the corresponding genes are expressed in the symbiotic flagellated protist, *Holomastigotoides mirabile*. This is the first study showing only a specific protozoan species plays a major role in xylan degradation of termites. The findings give a new insight into a mutualistic relationship between termites and their intestinal protists in terms of hemicellulose digestion.

氏　名　荒川　岳

（様式第５－２号）課程博士

平成 21 年 2 月 13 日

琉球大学大学院
理工学研究科長　殿

論文審査委員
主査　氏　名　　前川　秀彰　印
副査　氏　名　　山崎　秀雄　印
副査　氏　名　　広瀬　裕一　印

学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し，学位論文の審査及び最終試験を終了したので，下記のとおり報告します。

記

申　請　者	専攻名　海洋環境学　氏名　荒川　岳　　学籍番号 [redacted]			
指導教員名	前川　秀彰			
成績評価	学位論文　合格　不合格		最終試験　合格　不合格	
論文題目	Studies on degradation and ingestion of xylan by the termite *Coptotermes formosanus* Shiraki （食材性シロアリ *Coptotermes formosanus* Shiraki のキシラン消化機構の研究）			

審査要旨（２０００字以内）

シロアリ類による木材消化の仕組みに関する研究はこれまで、木質主成分であるセルロースの分解酵素を中心に進められてきた。しかしながら、木材を構成する二次細胞壁中においてセルロースはヘミセルロースやリグニンに埋没して存在しており、これらをシロアリがどのように除去しているかは現在までほとんど明らかになっていなかった。本学位申請論文はシロアリによるヘミセルロース分解の仕組みについて、その主要成分であるキシラン分解の観点から生化学・分子生物学的な手法を用いて初めて明らかにしたものである。

（次頁へ続く）

平成21年2月13日10時から学位論文の内容に関する最終試験を行った。最終試験では研究内容の口頭発表を40分間、論文審査委員を含む参加者との間で質疑応答を20分間行った。申請論文および最終試験の内容に関して、2月13日午後に学位論文審査委員会を開催し、発表の組立、研究の背景と目的、方法論、実験結果、結論の各内容が的確に判り易く述べられていたか、上記の研究内容について学術的価値も含め、その新規性、独創性を強調することが出来たか、質問に的確に応答できたかについて議論した。

[研究の背景と目的]:木材のヘミセルロースを除去できなければセルロースを消化できないため、まず、ヘミセルロースの主要成分であるキシラン分解に関与するキシラナーゼの精製を行った。この目的にいたる説明はシロアリの生態系での重要性を含む適切で判り易いものであった。

[方法論・実験結果]:後腸の共生微生物とこのキシラン分解の関係については、精製した酵素の末端アミノ酸配列を決定し、それを基に後腸で発現されているmRNAのcDNAクローンを単離することで、発現している本体に迫る方法論を選択した。末端アミノ酸配列の決定は、この精製度により左右される。酵素の精製はかなり労力と時間を有するものであるが、3ステップで電気泳動により1本のバンドになるまで精製できる方法を開発することで省力化を計ることが出来た。その結果、イエシロアリから分子量が17-19kDaと異なる3種類のキシラナーゼが得られ、それらが消化管内で主要な働きを担っていることを初めて明らかにすることが出来た。この段階の的確な判断がcDNAクローンの単離に繋がっているといえる。

[結論]:発現場所の特定については、予想される原生生物をそれぞれ顕微鏡下で分けるという直接的ではあるが熟練の要るユニークな方法を使っている。単離されたキシラナーゼ遺伝子が共生原生生物の1種である*Holomastigotoides mirabile*一種においてのみ発現していることを指摘できたのもこのアプローチの成果である。

[新規性・独創性]:近年のシロアリを用いたメタゲノムおよびトランスクリプトーム解析では、木材分解において多様な微生物由来キシラナーゼの関与が予想されていたが、本研究はその予想を覆す結果を示したインパクトの高い内容であった。さらに、申請者はシロアリによる従来のセルロース分解系モデルに対して本研究結果を踏まえた新しいモデルの提唱を行っており、シロアリにおける木質バイオマス消化を考える上で、非常に重要な貢献を行ったと判定できる。

以上の発表は上記の判定基準をはるかに超えており、又質疑応答も的確であったと判定できた。

申請者は、「琉球大学理工学研究科博士後期課程の学位授与に関する申し合わせ第2項」の規程を満たし、かつ「海洋環境学専攻における学位授与に関する申し合わせ」のうち生物学分野の規程（査読付き論文2報以上、うち一つ以上を第一著者とする）を満たしている。

審査の結果、学術的価値に関する審査や口頭試問を通した本人の能力の審査について、全ての基準を満していると判断して本申請学位（博士）評価を「合格」とした。