

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282234

研究課題名(和文) GDSLリパーゼによるピレスリン生合成の分子機構解明と昆虫抵抗性植物作出への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of pyrethrin biosynthesis by a GDSL lipase and its application to creation of insect resistant plants

研究代表者

松田 一彦 (MATSUDA, Kazuhiko)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：00199796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：エステル構造をもつ殺虫性物質ピレスリンは、除虫菊の中で酸部とアルコール部とがGDSLリパーゼTcGLIPのはたらきにより連結されることにより生合成される。本研究では、本酵素の制御機構を解明するため、まずその触媒機構に必須のアミノ酸を大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて同定し、結晶化に適した塩類溶液を明らかにした。また、低濃度で不可逆的に本酵素を阻害するホスホン酸エステル類を創出し、本酵素の遺伝子発現が傷害誘導的に生じる揮発性物質により促進されることを明らかにした。さらに、シロイヌナズナで本酵素遺伝子のホモログ遺伝子を破壊すると、防御遺伝子のプロモータ促進活性が低下することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Insecticide pyrethrins containing an ester bond are biosynthesized by catalysis of a GDSL lipase TcGLIP using the acyl and the alcohol substrates. The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism of TcGLIP in pyrethrin synthesis and regulation in terms of gene expression and catalysis. First, TcGLIP was expressed in *E. coli* and amino acids essential for the catalysis were identified. Next, a method to obtain recombinant TcGLIP with high yield and purity was established and solutions to crystallize the enzyme were found. On the other hand, phosphonates were synthesized as TcGLIP inhibitor candidates and tested for their inhibitory activity. As a result, several compounds were found to block the pyrethrin-synthesizing activity of TcGLIP at nanomolar concentrations. On the other hand, a TcGLIP homolog gene was knocked out in *Arabidopsis*, resulting in reduced potency of exudates to activate the defensin gene promoter.

研究分野：農業科学、ケミカルバイオロジー、神経活性物質化学

キーワード：除虫菊 ピレスリン 生合成 GDSLリパーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)キク科植物除虫菊は天然殺虫剤ピレスリンを生合成し、花部(子房)に蓄積する。ピレスリンは化学的には深く研究されていたものの、その生合成の機構については分子生物学的あるいは分子遺伝学手法によって研究されていなかった。そこで、安定同位元素で標識した前駆体を用いてピレスリン生合成の概要について研究し、エステル化合物ピレスリンの酸部(菊酸類)は非メバロン酸経路により、アルコール部(レスロロン類)はオキシリピン経路により生合成されることを明らかにした。そして生合成の最終ステップが、菊酸から導かれた活性アシル誘導体とレスロロン類とがアシル基転移反応により連結されることでピレスリンが生成すると仮説をたて、本反応を触媒する酵素を除虫菊の蕾から精製し、遺伝子を単離した。予想に反して、本酵素はアシルトランスフェラーゼではなく GDSL リパーゼの一種(TcGLIP と命名)であった。GDSL リパーゼファミリーは植物普遍的に分布し、イネ、シロイヌナズナともに 100 種以上存在し、その中で真の基質が判明しているものはわずかであった。しかも本酵素のように加水分解ではなく、合成系に平衡がシフトしている GDSL リパーゼの例は稀有であり、その触媒反応に寄与する基質の認識機構や、エステル合成反応と分解反応の平衡を制御する分子機構も理解されていなかった(文献)。

(2)一般に植物の二次代謝は、細胞内のシグナルのみならず、細胞外のシグナルによっても調節を受ける。特に後者の例として、植物が病害虫により攻撃を受けたときに誘導的に生じる揮発性有機化合物(VOCs)によって、隣接する未被害の植物に攻撃のリスクを伝える現象が知られている。そこで、除虫菊幼苗に物理的に傷を付けた際に生じる揮発性物質を調査し、その主成分はみどりの香りと呼ばれる 4 種の Green Leaf Volatiles (GLVs) とセスキテルペンの一種(*E*)- β -farnesene であることを明らかにした。これらを傷害葉から生じたときと同じ組成で再構成し無傷の除虫菊の幼苗に気体として処理すると、数種のピレスリン生合成遺伝子の発現が上昇した。しかしこのような遺伝子発現促進現象が TcGLIP 遺伝子も含めた全てのピレスリン生合成酵素遺伝子で見られるのか、また VOCs がどのようにピレスリン生合成遺伝子の発現を促進するのか、不明であった(文献)。

2. 研究の目的

(1)TcGLIP の基質認識と触媒機構を解明するため、これらの機構に深く寄与する本酵素の構造因子を部位特異的変異実験と X 線結晶構造解析により解明する。

(2)本酵素を特異的かつ低濃度で阻害する阻害剤を独自に開発し、酵素-阻害剤複合体の

X 線結晶構造をも解明するとともに、本阻害剤を除虫菊に処理することで生じる遺伝子発現の変化と代謝物の変化を明らかにする。

(3)TcGLIP と相同の遺伝子を破壊あるいは過剰発現させモデル植物シロイヌナズナにおける抵抗性システムの変化を調査し、昆虫抵抗性に対する本酵素遺伝子の植物普遍的寄与を実証するとともに、傷害誘導的に除虫菊から生成する VOCs のブレンドによる TcGLIP の調節機構を解明する。

以上の研究によって得られる成果をもとに、TcGLIP および関連因子を利用して除虫菊によるピレスリン生産を向上させるのみならず、広く植物の昆虫抵抗性を増強する基盤技術を創出することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)TcGLIP の大量精製法の確立と結晶化

TcGLIP はマルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質 MBP-TcGLIP として大腸菌で過剰発現させ、アミロースレジンと陰イオン交換樹脂で精製した。次いで、プロテアーゼで処理して MBP を MBP-TcGLIP から切断し、TcGLIP を精製した。これを透析後、限外濾過で濃縮し、結晶化条件の調査に使用した。結晶化の基本条件の探索には市販のキットを使用し、結晶化条件の最適化には独自に調製した溶液を使用した。

(2)TcGLIP 阻害剤の合成と TcGLIP の結晶化

TcGLIP は触媒機構の中で四面体中間体を生じる。本機構を阻害する化合物として、3-(2-methyl-1-propenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropyl 基と phenyl 基を固定置換基として有するホスホン酸エステル類を 2,5-dimethyl-2,4-hexadiene へのカルベンの付加を鍵として合成(Type I、合成スキーム図 1)、あるいは Type I 阻害剤の置換 cyclopropyl 基の代わりに直鎖のアルキル基を有するホスホン酸エステル類を phenyl 基または *p*-nitrophenyl 基を 2 つもつ中間体の部分加水分解を鍵として合成した(Type II、合成スキーム図 2)。これらの化合物の TcGLIP 阻害活性は、阻害剤存在下および非存在下で本酵素による pyrethrin I 合成量を比較することにより評価した。さらに活性化化合物については、TcGLIP との共結晶化を試みた。

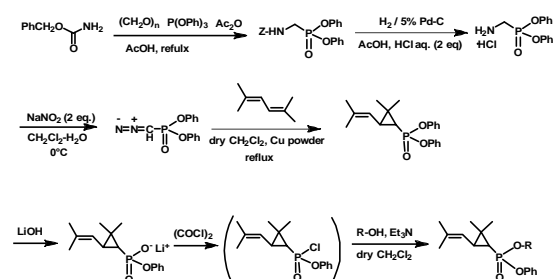


図 1 Type I 型阻害剤の合成スキーム

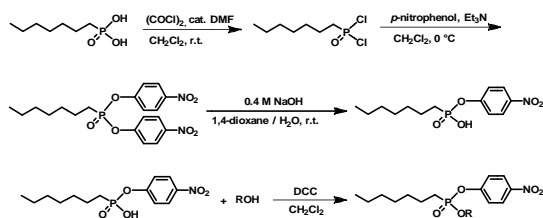


図2 Type II 型阻害剤の合成スキーム

(3)植物中での TcGLIP の役割と制御機構

TcGLIP 類縁遺伝子の普遍的意義を解明するため、本遺伝子類縁遺伝子を破壊したシロイヌナズナのヘテロ破壊株を米国から入手し、自殖してホモ系統を作出した。同様にピレスリン生合成の最上流に位置するリポキシゲナーゼ遺伝子についてもそのすべてについてシロイヌナズナの破壊株を作出し、ピレスリン生合成に關与する GLVs 生合成に対する寄与について解析した。

TcGLIP の制御機構解明の一環として除虫菊幼苗から傷害に応じて放出される VOCs ブレンドを未被害の除虫菊幼苗に一定時間処理し、TcGLIP を含む既知のピレスリン生合成遺伝子あるいは候補の発現を、actin 遺伝子を内部標準として realtime PCR で定量した。

4. 研究成果

(1)TcGLIP の大量精製法の確立と結晶化

TcGLIP の X 線結晶構造解析を目指し、まず MBP-TcGLIP を大腸菌で著量発現させる方法について検討した。大腸菌 DE3 株で発現させ、アミロースレジンをを用いて精製したところ、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) ではほぼ均一に精製できているように見えた。しかし、このように得られた MBP-TcGLIP はゲルろ過で複数のピークを与えたことから、ミスフォールディングが生じていることが判明した。このミスフォールディング問題を解決することが効率的な MBP-TcGLIP の生産につながると考え、入手可能な全ての大腸菌株で本酵素を発現させ、比活性を調査した。その結果選択した、蛋白質フォールディング機能に優れた大腸菌株を用いることによって、DE3 株よりも格段に多量の活性型 MBP-TcGLIP を調製することが可能になった。

次に、活性画分に混入する不活性酵素を除くため、精製に必要なと計算される量よりも多くの陰イオン交換樹脂を充填したカラムを用いて精製したところ、SDS-PAGE で単一のバンドを示し、ゲルろ過で単一ピークを描く MBP-TcGLIP を得た。そこで、本蛋白質にプロテアーゼを処理し、再度上記の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製した結果、MBP を除いた TcGLIP を高純度で調製することに成功した。これを透析後、限外濾過膜を用いて濃縮することにより、5-10 mg/mL の濃度の TcGLIP を得た。このように精製した TcGLIP を材料として、結晶化条件について調査し、針状結晶を与える条件を見出した。

(2)TcGLIP 阻害剤の合成と TcGLIP の結晶化

ホスホン酸エステル構造をもつ Type I 型阻害剤 (図1) で問題となるのはシクロプロパン環に關する幾何異性である。合成スキーム第4段階で生じる異性体を比べるとトランス体が優先して生成したので、これを分離し、以降の反応に使用した。この段階でシクロプロパン環1位の炭素に由来する光学異性体は分離しないため、最終化合物はリン原子の光学異性体も含めて4つの立体異性体の混合物となった。図1のスキームに従って R 部として phenyl、ethyl、cyclopentyl および allethrolone を導入した化合物を合成し、TcGLIP 阻害活性を測定したところ、いずれの化合物も 10 μM の濃度で阻害活性を示したが、その阻害率は 50% に満たなかった。その中で最も高い活性を示したのが、R 部として phenyl 基をもつ化合物であった。そこで R 部を phenyl 基に固定し、もう一つの置換基を phenyl 基から p-nitrophenyl 基に置換したところ、阻害活性は向上し、1 μM の濃度で TcGLIP をほぼ完全に阻害した。

Type I 阻害剤中の菊酸類縁ユニットは剛直で2つの不斉炭素を有する。そこでこの部分の柔軟性を上げるとともに簡素化するためアルキル鎖に置換した Type II 阻害剤を合成した。本阻害剤では、Type I 型阻害剤と同様にリン原子が不斉中心となり2つの光学異性体のラセミ混合物を生成するが、置換シクロプロパン環に由来する異性体は存在しない。Type I 阻害剤の構造活性相関をもとに、図2の R 部として allethrolone を導入した結果、TcGLIP に対する半数阻害濃度は数十 nM 程度にまで上昇した。以上のように合成した化合物で完全にピレスリン合成活性を阻害した場合、一昼夜透析しても TcGLIP の活性は回復しなかったことから、化合物は本酵素の活性中心であるセリンの水酸基を不可逆的にリン酸エステル化したと推察された。

Type I および Type II 阻害剤の中で最強の活性を示す化合物を用いて TcGLIP を完全に阻害し、透析後、その結晶化を試みた結果、阻害剤を作用させなかったときには見られない形状をもつ結晶が生成した (図3)。

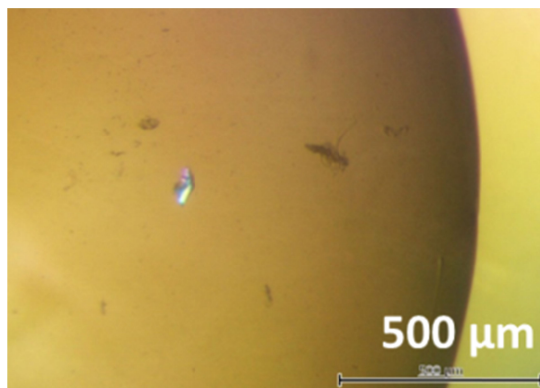


図3 TcGLIP とホスホン酸エステル型阻害剤とを反応させた場合に生成した結晶

(3)植物中での TcGLIP の制御機構と役割

TcGLIP 類縁遺伝子の昆虫抵抗性に関わる普遍的意義を解明するため、相同遺伝子を破壊したシロイヌナズナを作成した。Plant Defensin Promoter の下流に β -glucuronidase (GUS) を連結した pPDF1.2::GUS レポーターアッセイ系を用いて野生株と破壊株の浸出液の活性を比較したところ、破壊株の方が野生株よりも低い活性を示す傾向が見られた。

ピレスリンと GLVs はどちらも過酸化リノレン酸を原料としており、TcGLIP 遺伝子の発現は GLVs によって調節されていることがこれまでの研究によって明らかにされている。過酸化されたリノレン酸はリポキシゲナーゼ (LOX) のはたらきにより生成するが、植物には複数の LOX があり、そのうちどれが GLVs の生合成に直接寄与しているのか明確に証明されていなかった。そこで、シロイヌナズナの 6 種の LOX 遺伝子をひとつずつノックアウトした変異体株を入手し、ホモ接合体を単離した。そして、このように作成した全ノックアウト株について GLVs 生成の有無を調べた結果、LOX2 が GLVs の生成に必須であることが判明した。

リポキシゲナーゼによって過酸化されたリノレン酸はヒドロペルオキシドリアーゼにより切断され、GLVs の基盤物質 (Z)-3-hexenal が生成する。お茶のヒドロペルオキシドリアーゼは不明であったが CYP74B24 がその役割を担うことが判明した。本成果をもとに、除虫菊でも相同の酵素が GLVs の生産を担うと推測された。

GLVs も含めて活性カルボニル化合物が植物に取り込まれた後の運命も、全くと言って良いほど理解が進んでいなかった。そこでトマトを用いて外気から取り込んだ活性カルボニル化合物の運命を調査した結果、グルタチオンと結合することがわかった。こうした制御は、除虫菊での TcGLIP の制御に対しても影響すると考えられた。

これまでに傷害誘導的に除虫菊幼苗から放出される GLVs と (E)- β -farnesene とからなる VOCs のブレンドは、クリサンテミルジホスフェートシンターゼ (CDS) 等の一部のピレスリン生合成酵素の遺伝子発現を活性化することが見出されている。このような制御が他のピレスリン生合成酵素でも見られるのかどうか確かめるため、CDS を陽性の対照とし、クリサンテミックアシッドシンターゼ (CAS) および TcGLIP 遺伝子に加えて、ピレスリンと同様にリノレン酸からつくられるジャスモン酸の生合成遺伝子発現に対する VOCs ブレンドの影響を調査した。その結果、GLVs と (E)- β -farnesene とからなる VOCs のブレンドの処理によって、ピレスリンの酸部の生合成に直接関わる CDS や CAS のみならず、エステル結合の形成に関わる TcGLIP 遺伝子の発現も顕著に促進された。それに対して、ジャスモン酸の生合成に寄与する 12-オキシ

フィットジエン酸レダクターゼ 3 やアシル CoA オキシダーゼ 1 遺伝子の発現は、傷害誘導的に生じる VOCs ブレンドを処理しても影響を受けなかった。さらに、VOCs ブレンドによるピレスリン生合成促進現象は除虫菊をカルス化しても認められたことから、VOCs ブレンドの受容からピレスリン生合成遺伝子の発現促進に至るまでの機構は脱分化しても維持されることが初めて明らかとなった。

<引用文献>

Yukio Kikuta, Hirokazu Ueda, Masafumi Takahashi, Tomonori Mitsumori, Gen Yamada, Koji Sakamori, Kengo Takeda, Shogo Furutani, Koji Nakayama, Yoshio Katsuda, Akikazu Hatanaka and Kazuhiko Matsuda, Identification and characterization of a GDSL-lipase like protein that catalyzes the ester forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerarii folium* - a new target for plant protection. *Plant Journal* **71**, 183-193 (2012).

Yukio Kikuta, Hirokazu Ueda, Koji Nakayama, Yoshio Katsuda, Rika Ozawa, Junji Takabayashi, Akikazu Hatanaka and Kazuhiko Matsuda, Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from artificially damaged conspecific plant. *Plant and Cell Physiology* **52**, 588-596 (2011).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Koji Sakamori, Naoaki Ono, Makoto Ihara, Hideyuki Suzuki, Hideyuki Matsuura, Ken Tanaka, Daisaku Ohta, Shigehiko Kanaya and Kazuhiko Matsuda, Selective regulation of pyrethrin biosynthesis by the specific blend of wound induced volatiles in *Tanacetum cinerarii folium*. *Plant Signaling & Behavior* **11**, e1149675 (2016). 査読有

Satoshi Mochizuki, Koichi Sugimoto, Takao Koeduka and Kenji Matsui, *Arabidopsis* lipoxygenase 2 is essential for formation of green leaf volatiles and five-carbon volatiles. *FEBS Letters* **590**, 1017-1027 (2016). 査読有

Eiichiro Ono, Taiki Handa, Takao Koeduka, Hiromi Toyonaga, Moataz Mohammed Tawfik, Akira Shiraishi, Jun Murata and Kenji Matsui, CYP74B24 is the 13-hydroperoxide lyase involved in biosynthesis of green leaf volatiles in tea (*Camellia sinensis*). *Plant Physiology and Biochemistry* **98**, 112-118 (2016). 査読有

Shoko Muramoto, Yayoi Matsubara, Cynthia Mugo Mwenda, Takao Koeduka, Takuya Sakami, Akira Tani and Kenji Matsui, Glutathionylation and reduction of methacrolein in tomato plants account for its absorption from the vapor phase. *Plant Physiology* **169**, 1744-1754 (2015). 査読有

Yukio Kikuta, Gen Yamada, Tomonori Mitsumori, Takayuki Takeuchi, Koji Nakayama, Yoshio Katsuda, Akikazu Hatanaka and Kazuhiko Matsuda, Catalytic-triad and related amino acids are required for acyltransferase activity of the *Tanacetum cinerariifolium* GDSL lipase/esterase-like enzyme TcGLIP for ester-bond formation in pyrethrin biosynthesis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **77**, 1822-1825 (2013). 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

阪森 宏治、松田 一彦、除虫菊のピレスリン合成に対する傷害誘導性揮発性化合物の作用：分化状態と脱分化状態の比較、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

松田 一彦、ピレスリン合成から導かれるオキシリピン経路の理解、シンポジウム「植物をとりまく生態系の環境応答鍵因子：オキシリピン類の新展開」(招待講演)、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

明石 拓也、山崎 智穂子、宇都宮 麻衣、伊原 誠、松田 一彦、平竹 潤、ピレスリン合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究(1)：新規不可逆阻害剤の合成展開、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

山崎 智穂子、宇都宮 麻衣、伊原 誠、明石 拓也、平竹 潤、松田 一彦、ピレスリン合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究(2)：不可逆阻害剤存在の活性評価、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

宇都宮 麻衣、山崎 智穂子、伊原 誠、明石拓也、平竹 潤、松田 一彦、ピレスリン合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究(3)：不可逆阻害剤存在下での結晶化、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

Kazuhiko Matsuda, Deciphering biosynthesis of natural insecticide pyrethrins, Pacificchem 2015 (招待講演), 2015 年 12 月 15 日, Honolulu, Hawaii, USA

阪森 宏治、小野 直亮、鈴木 秀幸、太田大策、松田 一彦、金谷 重彦、ピレスリン合成遺伝子の同定に向けた RNAseq データのバイオインフォマティクス解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学（岡山県岡山市）

宇都宮 麻衣、松田 和奈、廣瀬 友璃香、伊原 誠、松田 一彦、ピレスリン合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明(1) - 発現と精製 -、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学(岡山県岡山市)

明石 拓也、竹内 孝幸、宇都宮 麻衣、伊原 誠、松田 一彦、平竹 潤、ピレスリン合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明(2)-ホスホン酸型反応機構依存型阻害剤の設計と合成-、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学（岡山県岡山市）

竹内 孝幸、明石 拓也、宇都宮 麻衣、伊原 誠、平竹 潤、松田 一彦、ピレスリン合成に関わる TcGLIP の機能および構造の解明(3) - 阻害活性と阻害の様式 -、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学（岡山県岡山市）

荒井 紀梨子、松田 一彦、肥塚 崇男、松井 健二、シロイヌナズナの腐生菌感染応答シグナル生成には GDSL リパーゼが関与する、日本農芸化学会中四国支部第 41 回講演会、2015 年 1 月 24 日、水産大学校（山口県下関市）

宇都宮 麻衣、松田 和奈、廣瀬 友璃香、伊原 誠、松田 一彦、ピレスリン合成関連酵素 TcGLIP の発現・精製条件の検討と結晶化、2014 年度日本農芸化学会関西支部大会、2014 年 9 月 20 日、奈良先端科学技術大学院大学（奈良県生駒市）

松田 一彦、ケミカルセンシングによる生命恒常性の維持と昆虫制御、JSPS シンポジウム「日本におけるケミカルバイオロジー研究の新展開」(招待講演)、2014 年 6 月 14 日、東京大学（東京都文京区）

松田 一彦、温故知新：ピレスリンから学ぶ昆虫制御の原理、第 17 回中四国支部若手シンポジウム(招待講演)、2014 年 5 月 16 日、岡山大学（岡山県岡山市）

阪森 宏治、安達 元希、古谷 章悟、畑中 顯和、松田 一彦、除虫菊の分化状態とピレスリン生合成、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

〔図書〕(計 1 件)

松田 一彦、植物は揮発性シグナル分子をどのように受け取るのか？、生きものたちをつなぐ「かおり」~エコロジカルボラタイルズ~、松井 健二、高林 純示、東原 和成編著、フレグランスジャーナル社、44-52 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学農学部生物制御化学研究室

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/03ouyou/seigyolab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 一彦 (MATSUDA Kazuhiko)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：00199796

(2) 研究分担者

平竹 潤 (HIRATAKE Jun)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80199075

松井 健二 (MATSUI Kenji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90199729

(3) 連携研究者

山下 敦子 (YAMASHITA Atsuko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10321738

伊原 誠 (IHARA Makoto)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：30466031