

平成 25 年度

博士 学位 論文

内容の要旨
および
審査結果の要旨

(平成 26 年 3 月)

近畿大学大学院
農学 研究科

農 学 研 究 科

平 成 25 年 度

(論 文 提 出 に よ る)

(平 成 26 年 3 月)

倉 田 道 雄

小 宮 正 文

城 智 也

菊 田 幸 雄

学位論文審査結果の報告書

氏 名 菊田 幸雄

生 年 月 日 (昭和)・平成 54年 8月 27日

本 籍 (国籍) 兵庫県

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第**193**号

学位授与の条件 学位規程第5条2項該当
(博士の学位)

論 文 題 目 Studies on regulatory roles of wound induced volatiles

and a GDSL lipase in pyrethrin biosynthesis by *Tanacetum cinerariifolium*

(除虫菊のピレスリン生合成における傷害誘導性揮発物質とGDSLリパーゼの調節的役割に関する研究)

審 査 委 員

(主 査) 松田 一彦 教授



(副主査) 板倉 修司 教授



(副主査) 深溝 慶 教授



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

ダルマチア地方が原産とする除虫菊(*Tanacetum cinerariifolium*、旧学名 *Chrysanthemum cinerariaefolium*)は殺虫性物質ピレスリン類を生合成し、その花に蓄積することで知られている。ピレスリンは6種の類縁エステル化合物(pyrethrin I、II、jasmolin I、IIおよびcinerin I、II)から成り、中でもpyrethrin I、IIが最も多く生合成される。ピレスリンは残留性が低く、人畜に対する毒性が低いため、家庭の衛生害虫や貯穀害虫のみならず、園芸害虫を駆除するためにも使用されている。そのため、世界におけるピレスリンの生産量は、戦前から変わらないレベルで維持されている。

ピレスリンの化学構造はその立体配置も含めて完全に解明されており、化学的には研究の余地がない。しかし、除虫菊の中でどのようにピレスリンが生合成され、それがどのようなしくみで調節されているのか、生化学・分子生物学的な視点からはほとんど研究されていなかった。このような背景の中で、1位を¹³Cで標識したグルコースの取り込み実験によって、酸部が非メバロン酸(MEP)経路で生合成されるのに対して、アルコール部は、植物ホルモンジャスモン酸と同じく、リノレン酸を原料としてオキシリピン経路で生合成されることが明らかにされた。しかし、これら両経路の生合成の調節機構と、酸部とアルコール部とをつなぐ最後のエステル化反応を触媒する酵素の実体は謎に包まれていた。そこで本研究では、ピレスリン生合成の調節については揮発性化合物によるものを中心に、またエステル化酵素については生化学的アプローチによってその実体を解明したので、その概要を以下に記す。

I. 傷害誘導性揮発性化合物によるピレスリン生合成の調節

除虫菊は、植食者から身を守る防御物質としてピレスリン類を生合成する。一般に植物は、食者による攻撃に応答して揮発性分子(Volatile Organic Compounds, VOCs)を放出し、天敵を誘引し、無傷の同種の植物に対して防御反応を誘起することが知られている。これらの概念をもとに、傷害誘導的に除虫菊から生じるVOCsがピレスリン生合成を誘起するシグナルとして機能すると仮説を立てた。材料として選択したのは播種してから数週間目の幼苗である。ピレスリンは花に著量蓄積されるが、幼苗も生合成する。幼苗であれば、実験を繰り返すことが可能である。この利点を生かして、除虫菊幼苗に物理的傷害を与えたときに誘導的に放出される揮発性物質をGCMSによって同定した。その結果、幼苗からは緑の香り(Green Leaf Volatiles; GLVs)と総称される炭素数6個のアルコール・アルデヒド類((*Z*)-3-hexenal、(*E*)-2-hexenal、(*Z*)-3-hexenol、(*Z*)-hexen-1-yl acetate)とセスキテルペンに属する(*E*)- β -farneseneの5種の化合物が主要な化合物として、時間依存的に除虫菊幼苗から放出されることが明らかとなった。

除虫菊幼苗から放出されるこれら5種のVOCsを処理するとき、その濃度は大切な実験条件である。そこで傷を受けた幼苗に隣接する無傷の幼苗が感知する濃度で当該VOCsを混合し、気体として無傷の幼苗に処理したところ、幼苗内のピレスリン生合成遺伝子である1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)、chrysanthemyl diphosphate synthase (CPPase)、13-lipoxygenase (13-LOX) およびallene oxide synthase (AOS) 遺伝子の発現が促進され、ピレスリン含量も上昇した。特に、DXSと13-LOXの遺伝子発現は、生合成経路でそれらより下流に位置するCPPaseとAOSよりもVOCs処理に対する応答が速かった。ピレスリン遺伝子発現の上昇を指標にVOCs処理濃度に対する依存性を調べたところ、濃度が傷害を受けた幼苗で観察された濃度であるときに限り遺伝子発現は上昇し、それよりも1/10あるいは10倍高い濃度で幼苗をVOCsで処理したときには生合成遺伝子の発現は有意に上昇しなかった。

このようなピレスリン生合成の促進効果という現象をもたらすVOCsの主役を決定するため、それぞれのVOCsを単独あるいは混合し、無傷の幼苗に処理し、生合成遺伝子の発現を定量した。その結果、それぞれのVOCはどれ一つとして単独では生合成促進効果を示さなかった。また2種あるいは3種のVOCsを組み合わせて処理した場合でも同様な結果が得られた。さらに、5つのVOCsから一つだけを除いたVOCs混合物を幼苗に処理した場合でも、ピレスリン生合成促進効果が認められなかったことから、除虫菊幼苗から傷害誘導的に生じるVOCsはブレンドとして無傷の幼苗にピレスリン生合成を促進するシグナルとしてはたらくことが初めて明らかとなった。

II. ピレスリン生合成の最終ステップに位置するエステル化反応を触媒する酵素

ピレスリンはその酸部およびアルコール部のどちらも多段階の反応によってつくられる。その中で、ピレスリンの生合成の律速となっている酵素の実体と、その遺伝子発現の調節機構を解明することは、ピレスリン生合成に関する研究において、最上位に位置する研究課題である。ピレスリン生合成における最終ステップ、すなわちエステル結合を形成する酵素の解明は、それが無ければいくらか前駆体を与えてもピレスリンができないことから、極めて重要な研究課題である。本エステル結合形成反応は、ピレスリンの酸部であるchrysanthemic acidあるいはpyrethric acidのCoAエステルをアシル供与体として、レスロロン(pyrethrolone, jasmololone, cinerolone)にそのアシル部を転位する反応によって触媒されると推定された。菊酸からCoAエステルを合成し、これとpyrethroloneとを基質として除虫菊の蕾の磨砕物から調製した粗酵素に加えたところ、pyrethrin Iが生成した。そこで、本アシル基転移反応を触媒するタンパク質を除虫菊の蕾から精製することを試みた。度重なる失敗を経て、陰イオン交換樹脂を用いたバッチ処理と硫酸アンモニウムによる沈殿操作の後、phenyl superoseおよびゲルろ過を組み合わせた液体クロマトグラフィーによって活性本体を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で40 kDaの位置に単一のバンドを示すタンパク質として得た。本タンパク質のN末端およびプロテアーゼによって限定分解することで生成するペプチド断片のN末端配列をエドマン分解により決定した。それによって明らかとなったアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計してPCRを行い、エステル結合形成反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の断片を得、その核酸配列を決定した。さらに5' および3'-RACEによって末端の核酸配列を決めたのち、最後に本酵素遺伝子の全長をPCRによって増幅し、その塩基配列を決定した。その結果、本遺伝子は研究前に予想していたacyltransferaseではなくGDSL-リパーゼ・エステラーゼファミリーに属する酵素をコードしていた。さらに、本遺伝子をコードするゲノムDNAも併せてクローニングし、その塩基配列を解明することによって、遺伝子が6つのエクソンから成ることをも決定した。

GDSL-リパーゼ・エステラーゼに類似するエステル結合形成酵素(TcGLIP)の機能を証明するため、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによって精製したのち、酵素活性を測定したところ、chrysanthemoyl CoAとpyrethroloneとからピレスリンIを合成した。そこで、本酵素の基質特異性について調べた。chrysanthemoyl CoAをbenzoyl CoAに置き換えると、対応するエステル化合物は生成しなかった。同様にアルコール基質をpyrethroloneからbenzyl alcoholに置き換えた場合にも、対応するエステルは生成しなかった。TcGLIPは、3つの天然基質に対して類似の選択性を示したが、わずかではあるものの、jasmololoneに対してやや高い選好性を示した。

天然の基質を用いてTcGLIPのキネティクスを調べたところ、酵素はpyrethroyl CoAよりもchrysanthemoyl CoAに対して選好性を示した。またTcGLIPはchrysanthemoyl CoAよりもpyrethroloneに対して高い親和性を示した。Chrysanthemoyl CoAの4つの立体異性体とpyrethroloneの2つのエナンチオマーを合成し、TcGLIPの基質特異性を調べた。その結果、本酵素は計8通りの基質の組み合わせの中で、chrysanthemoyl CoAおよびpyrethroloneのいずれにおいても天然の絶対配置をもつ基質に対して最も高い選好性を示した。

TcGLIPは加水分解系酵素であるリパーゼに類似する。そこで、pyrethrin Iとp-nitrophenyl butanoateおよびp-nitrophenyl octanoateを基質として加水分解反応の有無について検討した結果、いずれの基質も加水分解し、その活性はSer40をアラニンに置換することで失活した。

TcGLIPの細胞内局在について、タマネギ表皮細胞を用いて調べた。すなわち、オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質としてTcGLIP全体あるいはシグナルペプチドを一過的に発現させると、蛍光を示すタンパク質は細胞外へと分泌され、原形質膜と細胞壁の間に蓄積された。この図はあたかも、TcGLIPが細胞を害虫からの攻撃を守るシールドとして機能するかのごとくふるまう可能性を示した。

さらに本研究では、除虫菊各部位におけるTcGLIP遺伝子の発現とピレスリン生合成との関係についても調査した。TcGLIP遺伝子の発現をrealtime PCRで定量した結果、遺伝子は花と蕾で最も高く、次いで葉部で中程度発現し、根ではほとんど発現していないことが明らかとなった。同様に、pyrethrin Iは花と蕾で多く、葉部で中程度検出され、根ではほとんど検出されなかった。葉部に物理的な傷害を与えると、TcGLIP遺伝子の発現量は増加した。このことから、TcGLIP遺伝子は、防御遺伝子として機能することが示唆された。

以上の実験結果を総合し、TcGLIPは除虫菊においてピレスリン生合成の最終ステップを触媒する酵素であると結論づけた。

III. ピレスリン生合成のエステル結合形成反応を触媒するTcGLIPのアシル基転移反応を触媒するアミノ酸残基

トマトのフェニルプロパノイド生合成に寄与するGDSL-lipaseの一種glucarate caffeoyltransferaseでは、加水分解活性に重要な役割を果たすアミノ酸を変異させても、フェニルプロパノイド生合成活性には大きな影響を及ぼさないと報告されている。ピレスリン生合成に寄与するTcGLIPにも加水分解活性に重要な役割を果たすと思われるSer40、Gly64、Asn168、Asp318およびHis321が存在するが、これらがピレスリン合成活性にも重要な役割を果たしているのかどうかは不明であった。

そこで本研究では、まずTcGLIPを可溶性タンパク質として発現させるときに融合させたマルトース結合タンパク質が酵素活性には影響しないことを証明するため、組換えTcGLIPをアフィニティークロマトグラフィーとMono Qカラムクロマトグラフィーで精製した後、PresScission Proteaseでマルトース結合タンパク質の部分を除いた。そして融合タンパク質とマルトース結合タンパク質を除いたときとで、TcGLIPのキネティクスを比較した結果、解離定数およびkcatはどちらもマルトース結合タンパク質によって影響を受けないことが明らかとなった。次に、Ser40、Gly64、Asn168、Asp318およびHis321をアラニンに置換し、それぞれの変異体のピレスリン合成活性を測定した結果、Ser40、Gly64、Asp318およびHis321を変異させると酵素は失活し、Asn168を変異させた場合も野生型酵素のおよそ18.8%にまで酵素活性は低下した。これらの結果から、TcGLIPの加水分解活性とピレスリン合成活性は、共通の触媒機構により進行すると考えられた。

以上の研究成果は、除虫菊のピレスリン生産の向上のみならず、植物の対昆虫防衛戦略の普遍原理の一端を示し、環境調和型の植物保護技術の発展に寄与すると期待される。

論文審査結果の要旨

除虫菊と呼ばれるシロバナムシヨケギク (*Tanacetum cinerariaefolium*) は、中世の時代にバルカン半島のダルマチア地方 (旧ユーゴスラビア) で発見されたと言われている。除虫菊は天然殺虫剤ピレスリン (あるいはピレトリン) を生合成し、それを花に蓄積する。ピレスリンは天然物であり、環境中では、光、酸素、や生物により容易に分解される。そのため、製剤を工夫しない限り、大規模な農業で害虫防除に利用することは極めて難しい。加えて、その生産は除虫菊の生育に依存するため、天候の変化を受ける。そこで、このような欠点を補い、しかもピレスリンよりも高い殺虫効果を示す類縁体合成ピレスロイドが開発された。今現在、合成ピレスロイドは家庭の衛生害虫のみならず、農業害虫の防除にも広く使われている。その一方で、ピレスリンに対する社会の注目度は薄れていった。ところが時代は移っていくにつれ、合成農薬の利点である残効性は残留性とみなされるようになり、構造修飾により生まれたピレスロイドの副作用が指摘されると、再び天然ピレスリンの良さが見直されるようになった。

ピレスリンは除虫菊の花に著量蓄積されるが、花は播種から足掛け2年を待たないと開かない。こうした難点を克服し、従来とは異なる方法でピレスリンを効率良く生産するためには、その生合成のメカニズムを分子レベルで理解することが必要であった。そこで本学位の対象者は、大きく分けて2つの視点からピレスリン生合成について研究した。すなわち、揮発性有機化合物VOCsによるピレスリン生合成の調節と、ピレスリン生合成の最終ステップであるエステル結合形成反応を触媒する酵素の正体の解明である。ピレスリンの化学的研究は既述の通り決着しているが、生化学・分子生物学的観点からの研究は、これまで非常に少なく、これらの2つの研究はいずれも新規性・独自性に優れている。そのことをまず記した上で、本研究論文を評する。

植物は足を持たないため、環境から受けるストレスに応じて逃げることで対処することはできない。その代わり、直接あるいは間接防御手段を用いて、環境から受けるストレスから身を守り、種を維持し続けている。ピレスリンはまさにこうした植物の知恵の一つである。除虫菊はひとのためではなく、自身が昆虫によって食べ尽くされないように生合成している。特に花にピレスリンを蓄積するのも、種を残すためであると理解できる。ピレスリンは多段階のプロセスを経て生合成される。その中にはNADPHという光合成により生まれる電子供与体を使用する酵素反応が含まれ、エネルギーを要する。したがって、植食者に攻撃されたときにピレスリンの生合成を高めるのがエネルギー効率において優れている。

一般に植物は、植食者から受ける物理的なストレスに応じて、自身の抵抗性因子の蓄積を促すとともに、VOCsを放出し、周囲の同種の植物に対して危険を通知することで知られている。物理的な傷害に対する防御物質の研究に関しては幾多の知見が積み重ねられつつあるのに対して、VOCsによる二次代謝の制御、とくに濃度依存性と成分の組み合わせの問題について、理解が乏しいことに注目し、本研究では傷害誘導性のVOCsによるピレスリン生合成の促進効果について研究を進めた。ここでまず目にしたのは、傷害ストレスを与えた後にダイナミックにVOCsの組成と総量に変動したことである。それは一過的な変化であり、VOCs発火と消火と理解できる。ここまでは特段驚きもしないことであるが、本研究では、無傷の除虫菊幼苗に対するVOCsのピレスリン生合成の促進効果を生合成関連遺伝子の発現とピレスリン量を指標にして検討し、係る生合成促進効果においてVOCsの最適濃度があることが見出された。興味深いのは、その濃度がちょうど隣接する無傷の除虫菊が感知する濃度であったことである。実に驚くべき調節であり、これまでVOCsによる植物の防御機構に関する研究の中で一度も報告が無いという点からして、極めて重要な知見である。さらに本研究では、傷害誘導的に除虫菊から生じる主要なVOCsが、単独では有意にピレスリン生合成を促進する機能は弱い、幼苗から生じる濃度でブレンドすることで有意に生合成促進活性を発揮することも明らかにされた。除虫菊の傷害誘導性のVOCsはいずれも他の植物でも見られる化合物である。それゆえ単独では種特異性を発揮することはできない。しかし特定の濃度でブレンドすると、そこに種特異性が生まれる。この発見は、植物の会話現象を支配する普遍性を示したことになることから、大きな意義有すると考えられる。

ピレスリンはエステル化合物であり、2種の酸部 (chrysanthemic acidとpyrethric acid) と3種のアルコール部(pyrethrolone, jasmololone, cinerolone)の組み合わせによって生じる6種の類縁体から成る。このピレスリンの定義ともいべきエステル結合の形成は、酸部とアルコールが生合成されてから行われる。このエステル結合形成反応を触媒する酵素は、酸部から生合成されるCoAエステルとアルコール部を基質とするアシルトランスフェラーゼと予想されたが、その実体は不明であった。本酵素は生合成経路の最終ステップに位置し、酸部とアルコール部の生合成を監視する要としての役割をもつ。そこで本研究では、ピレスリン生合成においてこのような重要な役割を果たしている本酵素を同定し、その機能特性の解明に挑戦した。予備実験で、除虫菊の蕾から得た粗酵素に予想されたアシルトランスフェラーゼ活性が認められたため、その活性本体を単離しようと試みたというが、その前にはcDNAライブラリの中からアシルトランスフェラーゼに相同性をもつ遺伝子が探索されたものの徒労に終わったという経緯もあった。

様々な試行錯誤と数多くの失敗を乗り越えて、ようやく蕾から得たタンパク質は当初予想されたアシルトランスフェラーゼではなく、GDSLリパーゼ(TcGLIP)であった。まず本研究では、cDNAの配列解読にとどまらず、ゲノムDNAも併せて解明した。ゲノムDNAの配列は、遺伝子発現の制御を担う基盤をなすものであり、将来の研究展開の布石として重要である。本研究の一番の難しさは、この予想外のタンパク質が目的とした酵素であることを証明することにあつた。その方法として酵素の活性中心と予想されたセリンをアラニンに置換することで活性が失われることと、酵素が高い基質特異性を示すことを証明することが選ばれた。すなわち、TcGLIPのセリン40をアラニンに置換し、ピレスリン合成活性が無くなることで酵素反応が大腸菌で生産した組換え酵素が示していることを確認した。そして、天然の基質に加えて、その立体異性体をも合成し、TcGLIPが基質の中から天然の絶対配置を持つものを最も選好することを明らかにした。これらの結果は、発表論文の審査員の説得に威力を発揮したと考えられる。

本研究では、単に基質特異性を示しただけにとどまらず、2種の酸部CoAエステルとpyrethroloneについてキネティクスを詳細に調べ、酵素がCoAエステルよりもpyrethroloneに対して高い親和性をもつことを明らかにした。このことは酵素反応の律速がCoAエステルであることを示している。また、TcGLIPはピレスリン合成活性のみならず、加水分解活性をもつことをも、ピレスリンとp-nitrophenylエステル類を用いて示した。さらに、タマネギ表皮細胞を用いて、TcGLIPの細胞内での局在についても調べ、酵素が細胞外に放出され、細胞壁と原形質膜の間領域に蓄積されることを示し、生理学的にも興味深い知見を得ている。この現象は、ピレスリンがあたかも細胞を守るシールドとしての役目を持つことを示唆している。しかしこの結果だけでは植物体の中でのTcGLIPの局在を示したことにはならず、将来の検討課題を残した。基質特異性はTcGLIPがピレスリン生合成に寄与する有力な証拠であるが、TcGLIP遺伝子が除虫菊の至るところで発現しているのであれば、ピレスリン生合成の要としての本酵素の役目を否定することになる。そこで本研究では、花をつけた除虫菊と、幼苗を用いて、TcGLIP遺伝子の発現量とピレスリン含量との関係について検討した。その結果、本遺伝子の発現は根や茎では極めて低く、花や蕾では非常に高いこと、そして遺伝子発現量はピレスリン蓄積量と高い正の相関を示すことを明らかにし、TcGLIPがピレスリン生合成において重要な役割を果たしているとの結論を強化した。

TcGLIPの基質特異性とキネティクスに関する上記の研究では、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌で発現させたTcGLIPが用いられた。しかし融合タンパク質としたために、本酵素の真の特性が観測されていない恐れがあつた。そこで、マルトース結合タンパク質との融合状態と非融合状態とでキネティクスを比較し、マルトース結合タンパク質はTcGLIPのキネティクスに影響しないことを示した。さらに、TcGLIPのピレスリン合成活性と加水分解活性が共通のアミノ酸を使用することを明らかにした。この知見は、別の研究グループにより報告された、トマトのフェニルプロパノイド生合成に寄与するGDSLリパーゼでは両活性が独立するとの知見を否定するものである。

以上の研究成果は、ピレスリン生合成研究の歴史において重要なマイルストーンとなるばかりではなく、植物の会話の原理や対昆虫防御におけるGDSLリパーゼの役割を示したという意味で極めて高く評価される。よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成26年2月7日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。