

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780049

研究課題名（和文） 新規ピレスロイド代謝酵素の機能解析ならびに特異的農薬開発への応用

研究課題名（英文） Novel pyrethroid-metabolizing enzyme in the silkworm

研究代表者

山本 幸治 (Kohji Yamamoto)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00346834

研究成果の概要(和文)：

代表的第二相解毒酵素であるグルタチオン転移酵素(GST)は、生体外異物ならびに内因性の求核化合物に還元グルタチオンを抱合し、体外への排出を促進する。これまで、基質特異性の異なる5種のカイコ GST アイソザイムを同定した。本研究では、新たにカイコの unclassified GST (bmGSTU) の組換え酵素を作製し、bmGSTU の 1-chloro-2,4-dinitrobenzene に対する代謝活性、bmGSTU の立体構造(分解能 2.1 Å)を明らかにした。カイコ・ピレスロイド耐性ならびに感受性系統間における GST の誘導機構について調査したところ、耐性系統幼虫にて bmGSTU mRNA の高発現が認められた。

研究成果の概要(英文)：

Glutathione transferases comprise a major family of detoxification enzyme. Here, we report the substrate specificity, the crystal structure of unclassified GST of *Bombyx mori*, bmGSTU, and showing that it occurred as a dimer, like other GSTs. The bmGSTU was able to conjugate glutathione to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, the universal substrate of GST. The structure of bmGSTU was determined with resolutions of 2.1 Å, by synchrotron radiation and molecular replacement method. Each subunit of bmGSTU displayed a glutathione-binding site in the active center. Furthermore, the bmGSTU mRNA was highly expressed in insecticide-resistance strain of *B. mori*.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目:農学・応用昆虫

キーワード:環境、解毒酵素、昆虫、マイクロアレイ、農薬

1. 研究開始当初の背景

生体外異物(農薬)の解毒に関与する解毒酵素系にはシトクロム P450 酸化酵素を主とする第一相解毒酵素群ならびにグルタチオン転移酵素(GST)をはじめとする第二相解毒酵素群が知られている。GST は生体外異物に還元グルタチ

オン(GSH)を抱合し、異物の体外への排出を促進する。GST は、さまざまな生物において広く分布している。ヒトゲノム配列をはじめとして、多くの生物のゲノム構造が明らかとなるにつれて、GST は遺伝子ファミリー(class)を形成しており、基質特異性の異なる複数のアイソザイムが存在

することが分かってきた。研究代表者は、これら GST が農薬ピレスロイドの一種であるパーメスリンの脱塩素化反応を触媒することを見いだしている。本研究では、この GST の基質特異性ならびに発現機構について網羅的解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、カイコGSTの新規作用機構を探る極めて独創的な研究である。以下にあげる項目を本研究の主たる目的とする。

(1) カイコGSTの基質特異性ならびに外来異物の代謝について検討する。

(2) 活性に重要なアミノ酸残基を同定する。また酵素の立体構造解析を行い、標的基質との構造活性相関を解析する。

(3) 害虫駆除に頻用されている各種ピレスロイドに対するカイコ系統における感受性差を検定する。選抜されたカイコ感受性と耐性系統間におけるGST mRNAレベルの誘導機構についてはノーザン解析を、タンパク質レベルでは二次元電気泳動法を用い、発現調節について網羅的かつ正確に評価できる基盤を確立する。

3. 研究の方法

本課題の研究方法を以下に述べる。

(1) GSTの標的基質の探索

GSTの新規作用機構を調べることを目的とし、標的基質の網羅的解析を行う。大腸菌を用いて得られた組換え酵素をそれぞれ使用し、頻用されている農薬を含む基質類の分解・代謝に与える影響を検討し、その作用機構を酵素の反応速度論的に解析する。

(2) 昆虫GSTの構造活性相関解析

部位特異的アミノ酸置換法によりGST変異体を作製する。各組換え酵素の作用機構を比較し、活性発現ならびにGSH結合に必要なアミノ酸残基を同定する。また昆虫GSTの結晶化条件を検索して、良好な結晶を調製する。

(3) カイコ・ピレスロイド耐性ならびに感受性系統間におけるGSTの誘導機構

カイコ・ピレスロイド耐性ならびに感受性系統間の解毒酵素の動態を網羅的に解析することを目的とする。GSTの遺伝子レベルでの誘導

機構についてはノーザン解析を、そしてタンパク質レベルでは二次元電気泳動法を用いて調査する。カイコ・ピレスロイド耐性ならびに感受性の選抜はその50%致死薬量を測定することにより検討する。

4. 研究成果

(1) GSTの標的基質の探索

bmGSTD、bmGSTS、bmGSTOならびにbmGSTZの基質特異性については、すでに調査を終了している。本研究では、新たにカイコのunclassified GST (bmGSTU) の組換え酵素を作製し、bmGSTUアミノ酸配列中に存在するSerそしてTyrをAlaに置換した変異体を部位特異的アミノ酸置換法により作製した。さらにbmGSTU アミノ酸配列中Glu41Ala、Glu52Ala、His53Ala等の10種類のbmGSTU変異体を作製し、あわせて12種類の組換え体発現系を大腸菌を用い構築した。それぞれの変異体酵素を硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィーそしてゲル濾過クロマトグラフィーの各手法を用いて電気泳動的に均一に精製した。精製後、GST標準基質である

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)に対して活性を測定した。その結果、N末端の7番目Tyrならびに12番目SerをAlaに変換した変異体について大幅な活性低下が観察された。この結果により、これらのアミノ酸残基がbmGSTU活性発現に関与することが示唆された。

(2) 昆虫GSTの構造活性相関解析

構造解析をすすめることを目的とし、bmGSTUの結晶化を行った。この結晶を用いてX線解析実験を行い、分解能2.1Åの回折データを得た。分子置換法により位相を決定し、bmGSTUの三次構造を決定した。この構造をもとにSer12ならびにTyr7が活性に関与していることが示された。現在、bmGSTU基質結合部位の形状と基質特異性の関係を解析中である。

(3) カイコ・ピレスロイド耐性ならびに感受性系統間におけるGSTの誘導機構

カイコ5齢幼虫にパーメスリンを作用させた結果、増加するmRNAの網羅的解析をマイクロアレイにより行った。その結果、bmGSTUをはじめとするオメガクラスそしてシグマクラスGST mRNAの増加が確認された。これは、昨年得られたPCRによる結果と一致することが明らかとなり、bmGSTUはパーメスリンの解毒に関与する可能性が得られた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- (1) Yoshimitsu Kakuta, Kazuyuki Usuda, Takashi Nakashima, Makoto Kimura, Yoichi Aso, Kohji Yamamoto: Crystallographic survey of active sites of an unclassified glutathione transferase from *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810, 1355-1360 (2011) (査読あり)
- (2) Kohji Yamamoto, Satoshi Teshiba, Yuichi Shigeoka, Yoichi Aso, Yutaka Banno, Toru Fujiki and Yoshinori Katakura: Characterization of an omega-class glutathione S-transferase in the stress response of the silkworm. *Insect Mol. Biol.*, 20 (3), 379-386 (2011) (査読あり)
- (3) Kohji Yamamoto, Yukiko Tsuji, Yoichi Aso, Takeki Hamasaki, Sanetaka Shirahata, and Yoshinori Katakura: Effect of diazinon exposure on antioxidant reactions in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Appl. Entomol.*, 135, 320-325 (2011)(査読あり)
- (4) Kohji Yamamoto, Hirofumi Ichinose, Yoichi Aso, Yutaka Banno, Makoto Kimura, and Takashi Nakashima: Molecular characterization of an insecticide-induced novel glutathione transferase in silkworm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810, 420-426 (2011) (査読あり)
- (5) Kohji Yamamoto, Hirofumi Ichinose, Yoichi Aso and Hiroshi Fujii: Expression analysis of cytochrome P450s in the silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97, 1-6 (2010) (査読あり)
- (6) MD. Tofazzal Hossain, Satoshi Teshiba, Yuichi Shigeoka, Tetsuro Fujisawa, Yoji Inoko, Daisuke Sakano, Kohji Yamamoto, Yutaka Banno and Yoichi Aso: Structural properties of silkworm small heat-shock proteins: sHSP19.9 and sHSP20.8. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (8), 1556-1563 (2010) (査読あり)
- (7) Yutaka Banno, Kazunori Yamamoto, Kazuhiro Nishikawa, Kei Tamura, Kohji Yamamoto, and Yoichi Aso: Integration of the twenty-fourth and twenty-seventh linkage groups of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.*, 79, 67-70 (2010) (査読あり)
- (8) Kohji Yamamoto, Yoichi Aso and Hiroshi Fujii: Identification and expression analysis of minichromosome maintenance proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science*, 10, 1-8(2010) (査読あり)
- (9) Kohji Yamamoto, Yoichi Aso and Hiroshi Fujii: New appearance of melanization in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 49 (4), 435-441 (2009) (査読あり)
- (10) Kohji Yamamoto, Pingbo Zhang, Yutaka Banno, and Hiroshi Fujii: Proteomic profiling of testis proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 49, 33-41 (2009) (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 福森寿善・伴野 豊・山本幸治・麻生陽一. カイコ成虫トロンビン様プロテアーゼの精製法の再検討. 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2012年3月19日, 福岡
- (2) 山本幸治・東浦彰史・魚留信子・有竹浩介・中川敦史・鈴木 守. 昆虫プロスタグランシン合成酵素の機能と構造. 日本結晶学会, 2011年11月19日, 札幌
- (3) 山本幸治・伴野 豊・麻生陽一. オメガクラス・グルタチオン転移酵素の分子特性. 日本農芸化学会. 2011年3月28日, 京都
- (4) 臼田一弘・兼清美帆・川口喜朗・中島 崇・角田佳充・木村 誠・麻生陽一・山本幸治. カイコグルタチオンS-トランスフェラーゼのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会西日本支部大会. 2010年9月18日, 熊本
- (5) Kohji Yamamoto. Insecticide-induced glutathione S-transferase of the silkworm. IUPAC-RACI 2010, 2010年7月7日. オーストラリア・メルボルン
- (6) 山本幸治・辻 幸子・伴野 豊・麻生陽一・藤井 博. カイコにおける薬剤応答因子の探索. 日本生化学会, 2009年10月23日, 神戸

[図書] (計 0 件)

該当ありません。

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○ 取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

(1)カイクプロテオームデータベース
<http://rcshigen.lab.nig.ac.jp/ISPD/ISPDU10JSP>

(2)研究成果データベース
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001650/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 幸治 (Kohji Yamamoto)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号:00346834

(2)研究分担者

該当ありません。

(3)連携研究者

該当ありません。