

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850063

研究課題名(和文) 栄養代謝調節因子FACsの節足動物における網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of nutrition metabolism regulator FACs in Arthropod

研究代表者

吉永 直子 (Yoshinaga, Naoko)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40456819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：鱗翅目幼虫の唾液に含まれるFACsは植物の揮発成分放出を誘導するエリシターであり、この揮発成分が幼虫の天敵である寄生蜂を誘引することから、一連の反応は植物の関節防御応答と考えられる。研究代表者は、FACsが幼虫の窒素代謝の効率化に関わることを突き止め、鱗翅目幼虫以外にもFACs持つ昆虫を発見したことから、生合成酵素遺伝子を同定することを本研究の第一目標とした。また、FACsは幼虫体内で生理学的な機能を果たすと同時に、生物間相互作用のキー化合物として生態学的にも機能する。単純な低分子であるFACsがどのようにして生物間相互作用の重要な鍵となりえたのか、生態学的な背景を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fatty acid-amino acid conjugates (FACs), identified from lepidopteran larval regurgitant, are known plant volatile elicitors. Since the released plant volatile compounds attract parasitic wasp (a natural enemy of the larvae), such plant volatile emission is considered as an indirect plant defense reaction. The FACs also function as enhancer of larval nitrogen assimilation and we identified these FACs from outside of lepidopteran insects. The research aimed to identify a synthase of FACs from insects. The other question was how such simple and popular chemical compounds could become a key elicitor in insect-plant interaction. In order to understand the ecological background of FACs, detailed analysis was conducted using different plant seedlings treated with purified each FAC compounds. It was suggested that plants have developed herbivory-detection systems customized to their herbivorous enemies.

研究分野：化学生態学

キーワード：昆虫 窒素代謝 FACs

1. 研究開始当初の背景

鱗翅目幼虫に食害された植物は、全身から花のような香りを放出し、これら揮発成分は幼虫の天敵である寄生蜂にとって宿主の場所を特定する重要な手がかりとなる。この間接防御応答では、単なる物理的な傷と虫の食害をいかに植物が識別できるかが重要である。食害のサインとなる化学因子(エリシター)が幼虫の唾液から発見され、FACs (Fatty acid Amino acid Conjugates)と同定された(Alborn ら、1997)。研究代表者らは、何故鱗翅目幼虫がFACsを持つのかに着目し、その生理機能を探索した結果、ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)の中腸でFACsが窒素代謝の促進に関わっていることを突き止めた。また、鱗翅目約30種を対象にFACsの有無を調べたところ、3分の2が保有種であった。類縁体プロフィールは個体レベルでわずかな差があるものの、採取年度や産地、幼虫の齢、餌の違いに関係なく一定の比率を示したことから、種特異的であると考えている。一部の鱗翅目に限らず、コオロギやショウジョウバエからもFACsを同定した。いずれの生物でもFACsが腸管にのみ局在する点が共通するが、系統関係は不明で、生理機能についてもわかっていない。また、FACsにはいくつかの類縁体パターンがあるが、そのバリエーションは種・目・類を越えて保存されていた。

2. 研究の目的

(1)幅広い生物種に散見されるFACsが祖先種からの遺伝なのか、あるいは収斂進化の結果であるかの議論を進めるためにも、FACs縮合酵素を同定し、それらの系統関係を明らかにすることを本研究の第一の目的とした。

(2)FACsは幼虫体内で生理学的な機能を果たすと同時に、生物間相互作用のキー化合物として生態学的にも機能する。植物にありふれたリノレン酸・リノール酸と、グルタミン(またはグルタミン酸)が縮合した単純な低分子であるFACsがどのようにして生物間相互作用の重要な鍵となりえたのか、生態学的な背景を探ることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1)カイコ(*Bombyx mori*)終齢幼虫600匹から中腸組織を取り出し、マイクロソーム画分を取り出した。イオン交換カラム(MonoQ)、HILICカラム(ToyopearlM-650)、ゲルろ過カラム(Sephalose, Superdex)等各種カラムにより活性タンパク質を精製し、TMT試薬でラベル化した後HPLC-Orbitrap-MSで分析し、活性ピークと同じ挙動を示すタンパク質をAminopeptidaseNのファミリーに属する2種のタンパク質と同定した。これら候補タンパ

ク質をカイコ蛹において大量発現し、タグ精製した上清をin vitroのFACs生合成アッセイに供試し、生合成能の有無を確認した。また、カイコを用いたゲノム編集技術TALENにより候補タンパク質を人為的にノックアウトし、候補タンパク質がターゲット酵素であるかどうかを確認した。

(2)FACsのエリシター研究は主に欧米で進められてきたが、対象昆虫はわずか数種に限られており、幼虫が持つ個々のFACsに植物がどのように応答するかはわかっていなかった。特に、未知のFACsエリシターに対する応答性に比べて、自身の害虫が持つFACsに対する応答性がより強ければ、植物が個々のFACs分子に対して、食害シグナルとしての識別を行い、応答メカニズムをカスタマイズしてきた可能性を探ることができる。そこで、タバコスズメガ幼虫から新たに見つかった18位水酸化型FACsのエリシター活性を、タバコスズメの寄主植物であるナス(*Solanum melongena*)やタバコ(*Nicotiana tabacum*)に処理し、非寄主植物であるトウモロコシ(*Zea mays*)での応答性と比較した。ポジティブコントロールとして、いずれの植物に対しても強いエリシター活性を示すvolicitin(17-hydroxylinolenoyl-L-glutamine)を用いた。それぞれ単離精製もしくは合成したFACsを10 nmolずつ植物に処理し、処理後24時間以内に放出される揮発成分を一定時間ごとに吸着剤HeyesepQに捕集し、GC及びGCMSで分析した。

4. 研究成果

(1)カイコ蛹での候補タンパク質の大量発現を行い、目的とする分子量のタンパク質が得られたことをSDS-PAGE及びウェスタンブロットで確認した。しかしながら、精製した酵素の失活が極めて早く、FACs生合成活性は確認できなかった。そこで、カイコでの有効性が実証されているゲノム編集技術TALENを用いて、目的タンパク質(APN1及びAPN4)をコードする遺伝子のノックアウトを行った結果、それぞれのシングルノックアウト系統とダブルノックアウト系統、両遺伝子の切断部位間が欠落したLarge deletion系統の作出に成功した。目的のアミノペプチダーゼのノックアウト個体は致死性を示したことから、ホモ化系統の固定に3世代かかったが、FACs生合成能は確認できなかった。そもそもカイコはin vitroアッセイ系で腸管組織にFACs生合成能があることを確認したものの、通常飼育では腸管内にFACsを持たない。その理由はわかっていないが、分子学的手法に頼る以上、止むを得ずFACs生合成能の低いカイコを用いたことが実験の敗因の1つであると考えられる。

(2)水酸化型の一種であるvolicitinは植物揮発成分を誘導する昆虫エリシターの第一

号であり、トウモロコシに対するエリシター活性は非水酸化型より数倍高い。合成した 18 位水酸化型の **volicitin** をトウモロコシ幼苗に処理したところ、水酸基があるにも拘らず、非酸化型と同程度の揮発成分誘導活性しか持たないことがわかった (図 1 a)。同様のアッセイを本種の食草であるナスやタバコで行ったところ、これらナス科植物に対しては 17 位酸化型と同様に強いエリシター活性が見られた (図 1 b)。これらの結果から、植物は自身の害虫が持つ **FACs** パターンに合わせて防御機構をカスタマイズしてきた可能性が示唆された。

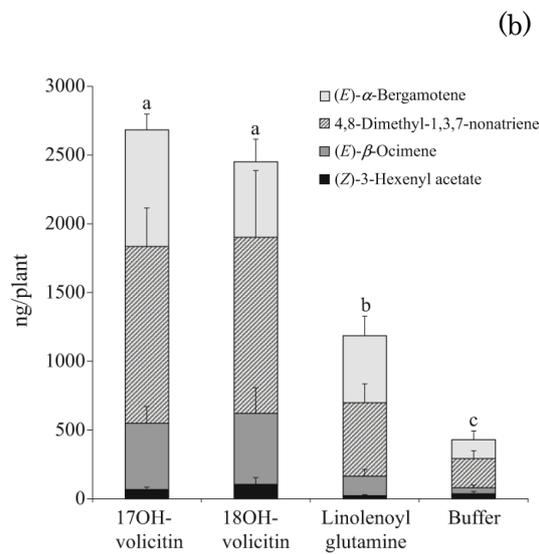
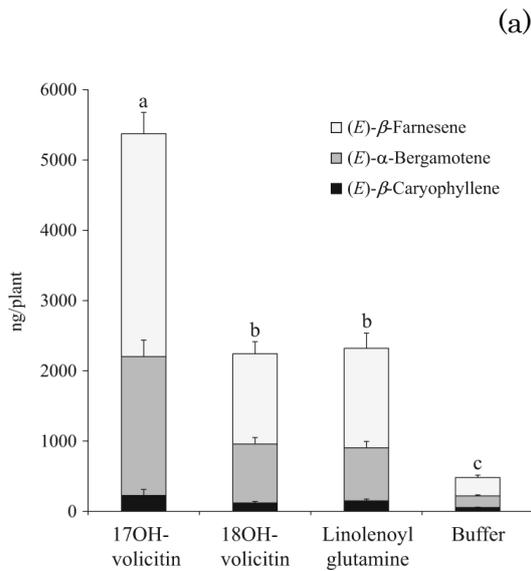
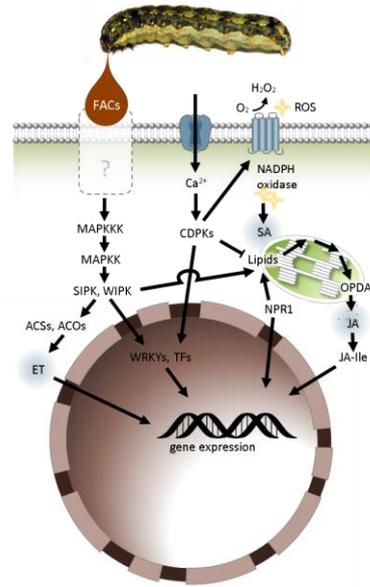


図 1 FACs 処理したトウモロコシ(a)及びナス(b)から放出される揮発成分の比較

同様の結果は、アミノ酸部位がグルタミン及びグルタミン酸である **FACs** のエリシター活性を比較した場合にも見られた。グルタミン酸型の **FACs** を持つ鱗翅目幼虫は極

めて少ない。現在のところ、トウモロコシの害虫からは見つかっておらず、ナス科の害虫であるタバコスズメやメンガタスズメなど一部の鱗翅目種からのみ見つかっている。トウモロコシではグルタミン型の **FACs** に比べてグルタミン酸型 **FACs** に対する応答が低いことが知られていたが、ナス科植物であるナス及びタバコではグルタミン型と同様の揮発成分放出活性が見られた。

(a)



(b)

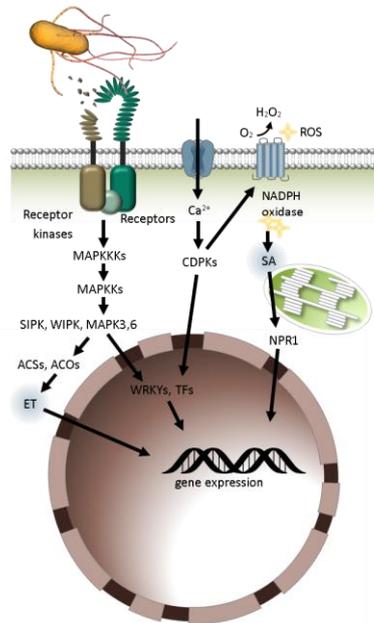


図 2 FACs 処理(a)及び病害(b)により応答する遺伝子と細胞内シグナル伝達の比較

この結果と合わせて、**FACs** の起源について最近の知見をまとめた結果、興味深いことが

わかってきた。FACsで誘導されるストレス応答遺伝子の多くが病害応答に関わる遺伝子と類似していることが指摘される(図2)。昆虫が地上に出現した時点で既に、植物-微生物環相互作用は成立しており、そこから派生する形でFACs応答性の間接防御メカニズムができたと考えられる。鱗翅目ではFACsの組成が種レベルで異なるが、上で明らかにしたような寄主植物からの負のフィードバックが影響してきた可能性が示唆された。これに対し、コオロギは独自の生合成ルートを持っており、昆虫の祖先種で分岐した後に、それぞれの昆虫において生理学的・生態学的戦略に基づいてFACsが取捨選択・改変されてきたことが示唆された。この研究は農芸化学会の若手奨励賞を受賞し、これをまとめたレビューは volicitin 研究の先駆者である James H Tumlinson 博士から直接高い評価を受けた。

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 5件)

- ① Naoko Yoshinaga, Physiological function and ecological aspects of fatty acid-amino acid conjugates in insects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 査読有, 80 (7), 2016, 1274-1282, doi: 10.1080/09168451.2016.1153956
- ② I. Seidl-Adams, A. Richter, K. B. Boomer, N. Yoshinaga, J. Degenhardt, J. H. Tumlinson. Emission of herbivore elicitor-induced sesquiterpenes is regulated by stomatal aperture in maize (*Zea mays*) seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 査読有, 38 (1), 2015, 23-34, doi: 10.1111/pce.12347
- ③ Shinichiro Murakami, Ryu Nakata, Takako Aboshi, Naoko Yoshinaga, Masayoshi Teraishi, Yutaka Okumoto, Atsushi Ishihara, Hironobu Morisaka, Alisa Huffaker, Eric A Schmelz and Naoki Mori, Insect-Induced daidzein, formononetin and their conjugates in Soybean leaves. *Metabolites*, 査読有, 4, 2014, 532-546;doi:10.3390/metabo4030532
- ④ Naoko Yoshinaga, Chihiro Ishikawa, Irmgard Seidl-Adams, Elizabeth Bosak, Takako Aboshi, James H Tumlinson, Naoki Mori, *N*-(18-Hydroxylinolenoyl)-L-glutamine: A newly discovered analog of volicitin in *Manduca sexta* and its elicitor activity in plants, *J Chem Ecol*, 査読有, 40(5), 2014, 484-90. DOI:

10.1007/s10886-014-0436-y

- ⑤ Naoko Yoshinaga, Hiroaki Abe, Sayo Morita, Tetsuya Yoshida, Takako Aboshi, Masao Fukui, James H. Tumlinson and Naoki Mori, Plant volatile eliciting FACs in lepidopteran caterpillars, fruit flies, and crickets: a convergent evolution or phylogenetic inheritance? *Front. Physiol.*, 査読有, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00121.

[学会発表] (計 4件)

- ① 吉永直子, 昆虫の脂肪酸-アミノ酸縮合物 (FACs) の生理・生態学的機能解析、農芸化学会関西支部例会特別講演、2016年2月5日、京都大学、京都
- ② 吉永直子, 昆虫の脂肪酸-アミノ酸縮合物の生理・生態学的機能解析、2015年度農芸化学会奨励賞受賞講演、2015年3月26日、ホテルグランヴィア岡山、岡山
- ③ 志野真実子、内藤裕彬、齋藤準、網干貴子、吉永直子、西田律夫、森直樹、クチナン防御物質と広食性ハスモンヨトウ幼虫に見られる攻防の分子機構、2015年3月20日、玉川大学、東京
- ④ M. Shino, H. Naito, T. Aboshi, N. Yoshinaga, R. Nishida, N. Mori, The unsuccessful adaptation of *Spodoptera litura* larvae against the defense substance of *Gardenia jasminoides*, *International Society of Chemical Ecology*, July 10, 2014, Urbana-Champaign, IL, USA

[図書] (計 1件)

- ① 森直樹、吉永直子、食う、食われるの狭間で 昆虫科学読本 虫の目で見た驚きの世界 (日本昆虫科学連合編), p78-91, 東海大学出版

[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

（研究室）
<http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 直子 (YOSHINAGA, Naoko)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号： 40456819

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：