

平成 31 年 2 月 15 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07405

研究課題名(和文) 昆虫におけるオーキシン生合成酵素の分子進化とゴール形成能獲得の因果性の解明

研究課題名(英文) Molecular evolution of auxin biosynthetic enzymes in insects, and their causal relations to acquirement of gall inducing ability by galling insects

研究代表者

鈴木 義人 (Suzuki, Yoshihito)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90222067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはこれまでにゴール形成昆虫が植物ホルモンの1種であるオーキシンを自ら合成し、高濃度に体内に保有していることを明らかにしていた。また、昆虫における独自の生合成経路を提唱し、それに対する阻害剤の取得も行った。本研究では、阻害剤を用いたオーキシン生合成のゴール形成への関与の立証、生合成経路の再検討、生合成酵素の同定を行った。その結果、昆虫体液に阻害剤の作用をキャンセルする物質が含まれており、個体レベルでオーキシン生産を抑えることが困難なこと、生成速度と代謝速度の差から生合成中間体が蓄積しない理由、主要な変換を担う生合成酵素などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that galling insects biosynthesize auxin, a class of phytohormones, and accumulate it at high concentrations. We have also proposed the highly probable auxin biosynthetic pathway in insects, and have succeeded in obtaining a biosynthetic inhibitor. In this study, we tried to demonstrate the importance of auxin for gall induction by using the inhibitor, but it was clarified that some substances to cancel the function of the inhibitor exist in hemolymph, resulting in the failure in inducing auxin defect in insects in vivo. On the other hand, we have successfully interpreted the reason why biosynthetic intermediates cannot be detected by showing that their metabolizing rates were much faster than their producing rates. We have also successfully identified an enzyme involved in the conversion of indole-3-acetaldehyde to indole-3-acetic acid, the active auxin, from *Bombyx mori* silk-gland extract.

研究分野：農学

キーワード：ゴール オーキシン 生合成 *Bombyx mori* *Pontania* sp.

### 1. 研究開始当初の背景

一部の植食性昆虫は、植物組織の形状および性状を変化させ、住まい兼食料としてゴール(虫えい、虫コブ)と呼ばれる異常組織を形成する。ゴール形成昆虫の抽出物に、植物細胞の変形や分裂を引き起こす活性が認められた例があることから、ゴールの形成には昆虫が分泌する化学物質の関与が考えられてきた。一方で、ゴール形成過程に見られる細胞の分裂、変形、あるいは維管束の発達などの組織分化の様子から、植物ホルモンであるオーキシンやサイトカイニンの関与も想定されてきた。申請者はシバヤナギにコブ状のゴールを形成するハバチ幼虫には、植物組織の約 100 倍濃度のインドール酢酸 (IAA: オーキシンの活性本体) が含まれており、しかもハバチ幼虫はトリプトファン (Trp) を前駆体として IAA を盛んに生合成することを明らかにした。これは昆虫生体内でオーキシンが生産されることを示した最初の例であった。また、オーキシン情報伝達のマーカー遺伝子の発現解析によって、ゴールはオーキシンが盛んに働いている組織であることも明らかにした。さらに、ヨモギにゴールを形成するタマバエやハルニレにゴールを形成するアブラムシなど、数種のゴール形成昆虫が何れも宿主植物組織より高濃度の IAA を含有すること、および IAA 生合成能を有することが確認された。すなわち、『ゴール形成昆虫は自らが生産した植物ホルモンを利用して植物の分化・生長を操ることによってゴールを形成する』との興味深い形成機構が考えられた。しかし、未だ昆虫が作るオーキシンの関与を完全に証明するには至っていなかった。

一方、ゴールを形成しない昆虫を解析した結果、解析した全ての昆虫が低濃度ながら IAA を含み、さらに Trp を前駆体とした IAA 生合成能を有していた。共生微生物などが存在しない無菌状態のカイコを用いて生合成中間体の精査を行った結果、各化合物から IAA への変換効率の比較に基づき、Trp からインドールアセトアルドキシム (IAOx)、インドールアセトアルデヒド (IAAld) を経て IAA が生成する経路を提唱した。しかし、Trp の代謝物として IAOx が検出されないこと、同様に Trp や IAOx の代謝物としても IAAld が検出されない、という問題点があり、完全に本生合成経路が証明されたとは言えない状況にあった。一方で、ゴール形成昆虫のハバチでも、カイコと同様の代謝実験結果が得られ、同じ生合成経路が機能していると考えられた。Trp IAOx の変換については、微生物あるいは植物から変換酵素が同定されているが、カイコを含めてゲノム配列の確定している昆虫には、それらのオーソログ遺伝子は存在しない。また、IAOx IAAld を変換する酵素は同定されていなかったことから、この生合成過程は昆虫が独自に獲得した生合成機構と考えられた。

カイコから調製した IAA 生合成酵素液を対象に、化合物ライブラリーから阻害剤を探索した結果、50%阻害濃度 IC50 = 1.2 μM という強い阻害作用をもつ化合物 IBI1 を見出した。IBI1 は IAAld IAA の変換を阻害し、更に Trp や IAOx からの IAA への変換も阻害したことから、IAAld IAA のステップが Trp や IAOx から IAA への変換に含まれていることの証拠と考えられた。また、ゴール形成昆虫であるハバチから調製した酵素液では、この化合物に加えて、カイコでは弱い阻害活性を示した化合物 IBI2 も、同等の強い阻害活性を示した。以上の結果から、カイコとハバチは相同な酵素によって触媒され、同じ中間体を経る IAA 生合成系を有していることが分かり、『ゴール形成昆虫は、昆虫が一般的に有している IAA 生合成能を進化させ、より高い生合成能を獲得することによってゴール形成に役立てた』との仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、阻害剤を活用して、ゴール形成への IAA の関与を明らかにすること、および提唱した生合成経路について、そのより確かな証拠を得るために、何故、IAOx や IAAld の中間体が蓄積しないのかを明らかにすることを目的とした。更に、ゴール形成昆虫の高い IAA 生合成能を説明するためには、生合成酵素等の生合成機構を分子レベルで明らかにする必要があると考え、生合成酵素の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゴール形成昆虫への阻害剤投与実験

東京大学千葉演習林に発生するハバチが形成するゴールを用い、IAA 生合成阻害剤 IBI1 処理を行った。ごく初期のゴールの形成箇所へ外から処理し、ゴールの発達状況を確認するとともに、ゴールに孔を開けて内部に注入する方法を試みた。後者は処理前と処理後の外径、重量を比較すると共に、モック処理と内壁の厚みの比較も行った。また、内部のハバチ幼虫の内生 IAA 量が低下するかの確認を行った。また、個体レベルでの阻害剤の効果を確認するための実験として、カイコへの処理実験もおこない、内生 IAA 量の分析を行った。分析は<sup>13</sup>C<sub>6</sub>IAA を内部標準物質として用い、LC-MS/MS により定量した。

#### (2) 生合成中間体が検出されない理由の検証

IAA 生合成中間体と考えられる IAOx と IAAld が検出されない理由として、それらの生成速度より代謝速度が速いことを想定し、各前駆体から IAA 生成の見かけの酵素活性を測定し、比較した。また、IBI1 処理をしても、その標的変換反応の基質である IAAld が蓄積しないことから、IBI1 存在下で IAA とは別の代謝物に変換される可能性を想定し、

IBI1 存在下で IAAld の変換実験を行い、代謝物の特定を試みた。

### (3) 生合成酵素の同定

IAA 生合成経路中、もっとも活性の高い IAAld IAA の変換酵素をカイコ絹糸腺から精製、単離を試みた。変換活性を指標に、各種クロマトグラフィーにより分画・精製し、N 末端配列解析により、カイコデータベースよりタンパク質の特定を行った。また、基質特異性、至適 pH、至適温度、 $V_{max}$ 、 $K_m$  等を解析した。また、本酵素および将来的に明らかにする予定のその他の変換酵素をハバチから同定するための情報整理として、次世代シーケンサーを用いたハバチの RNA-seq 解析、および de novo ゲノム配列解析を行った。

## 4. 研究成果

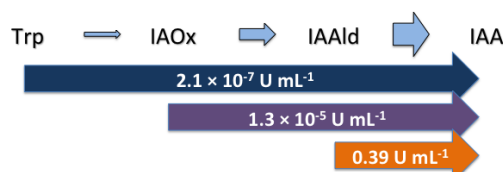
### (1) ゴール形成昆虫への阻害剤投与実験

試みたいずれの方法によっても、IBI1 処理によってゴール形成を阻害、あるいは抑制する事は出来なかった。内部に注入した場合にも、内部の幼虫の内生 IAA 量は低下しなかった。そこでカイコをもちいて、個体レベルで内生 IAA 濃度を低下させることが出来るかを試みた。既に確立されているインジェクション法により、十分量の IBI1 を処理したが、カイコの内生 IAA 量の低下は認められなかった。一方、カイコ絹糸腺の抽出物に体液が混在すると、IBI1 の効果が認められないことが判明した。絹糸腺を洗浄してから調製した酵素液では、IBI1 は強い阻害活性を示したが、体液が混入すると阻害効果が打ち消された。また、体液にも Trp を IAA へと代謝させる酵素活性が認められたが、熱処理により酵素活性が消失した体液を絹糸腺抽出物に添加した場合にも、IBI1 の効果が消失する現象が認められ、体液中には何らかの阻害剤の効果を打ち消す物質が含まれていることが判明した。

### (2) 生合成中間体が検出されない理由の検証

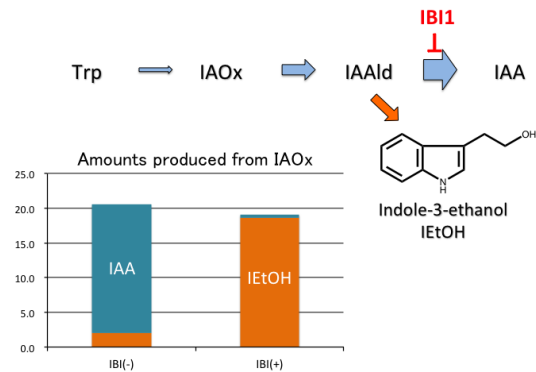
Trp IAA、IAOx IAA、IAAld IAA の各変換の見かけの酵素活性を比較したところ、IAOx IAA の変換活性は Trp IAA の 60 倍高いこと、また IAAld IAA の変換活性は IAOx IAA の更に 30,000 倍高いことが判明した。すなわち、各中間体の生成速度に比べて代謝速度が速いことが、中間体が蓄積しない理由と考えられた(下図)。

Apparent enzyme activities



また、IBI1 存在下で IAAld から変換され

て生成する化合物を探索したところ、インドール-3-エタノール (IEtOH) が同定された。IAOx をインキュベートした時、IBI1 非存在下では、ほぼ IAA が生成するのに対し、IBI1 存在下で生成する IAA の低下量に相当する量の IEtOH が生成することが分かり、IBI1 によって IAAld IAA から IAAld IEtOH への変換の切り替えが起こっていることが判明した(下図)。



### (3) 生合成酵素の同定

カイコ絹糸腺抽出物について、精製法を検討し、陰イオン交換、疎水相互作用、ゲルろ過の各種クロマトグラフィーを用いて、IAAld IAA 変換酵素の精製を行った。タンパク質ピークとして単一になった画分を SDS-PAGE 上、CBB 染色によりほぼ単一バンドになっていることを確認後、N 末端配列解析を行った。その結果、xanthine dehydrogenase-like とアノテーションされている 1 つのクローンを特定した。xanthine dehydrogenase (XDH) は、アルデヒドオキシダーゼ (AO) と高い相同性が有り、XDH は AO の進化的祖先を考えられていること、また、植物から同定されている IAAld を IAA へ変換する活性を持つ酵素とも高い相同性があることから、目的とする酵素であると考えられた。各種性状解析の結果、至適温度は約 40 °C、至適 pH は約 9 であった。また、各 IAAld 濃度での IAA 生成量の解析結果から Lineweaver-Burk plot を作成し、速度論的解析を行ったところ、 $V_{max} = 1.3 \mu\text{M}/\text{min}$ 、 $K_m = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$  となった。また、基質としてはキサンチンは代謝しなかったのに対して、ベンズアルデヒドは IAAld と同等の良い基質となった。IAAld よりメチレンが 1 つ少ないインドール-3-アルデヒドにはほとんど代謝活性を示さなかった。

## 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 7 件)

Takei, M., Kogure, S., Yokoyama, C., Kouzuma, Y., Suzuki, Y. Identification of an aldehyde oxidase involved in

indole-3-acetic acid synthesis in *Bombyx mori* silk gland. Biosci. Biotechnol. Biochem. 83: 129-136 (2018) (査読有).

Yokoyama, C., Takei, M., Kouzuma, Y., Nagata, S., Suzuki, Y., Novel tryptophan metabolic pathways in auxin biosynthesis in silkworm. J. Insect Physiol. 101: 91-96 (2017) (査読有).

Takei, M., Ito, S., Tanaka, K., Ishige, T., Suzuki, Y., Transcriptomic characterization of gall tissue of Japanese elm tree (*Ulmus davidiana* var. japonica) induced by the aphid *Tetraneura nigriabdominalis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81: 1069-1077 (2017) (査読有).

Kai, S., Kumashiro, S., Adachi, S., Suzuki, Y., Shiomi, Y., Matsunaga, K., Gyoutoku, N., Asami, T., Tokuda, M., Life History of *Stenopsylla nigricornis* (Hemiptera: Psylloidea: Trioziidae) and phytohormones involved in its gall induction. Arthropod-Plant Interactions 11 (1), 99-108 (2017) (査読有).

Fujiwara, A., Nishi, M., Yoshida, S., Hasegawa, M., Yasuma, C., Ryo, A., Suzuki, Y., Eucommicin A, a -truxinate lignan from *Eucommia ulmoides*, is a selective inhibitor of cancer stem cells. Phytochemistry 122: 139-145 (2016) (査読有).

Takei, M., Yoshida, S., Kawai, T., Hasegawa, M., Suzuki, Y., Adaptive significance of gall formation for a gall-inducing aphids on Japanese elm trees. J. Insect Physiol. 72: 43-51 (2015) (査読有).

Suzuki, H., Yokokura, J., Ito, T., Arai, R., Yokoyama, C., Toshima, H., Nagata, S., Asami, T., Suzuki, Y., Biosynthetic pathway of the phytohormone auxin in insects and screening of its inhibitors. Insect Biochem. Mol. Biol. 53: 66-72 (2014) (査読有).

[学会発表] (計 2 1 件)

Adachi, S., Nakayabashi, Y., Fujita, S., Suzuki, Y., Endo, N., Tokuda, M. Effects of *Riptortus pedestris* infestation on the phenology and physiology of the present and next generations of soybean and Glycine soja, 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会, 2018 年 3 月 27 日 (鹿児島)

鈴木義人, 昆虫による植物ホルモン生産とゴール形成, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 18 日 (名古屋)

徳田 誠, 鈴木義人, 安達修平, 藤田将平, 節足動物における植物ホルモン (オーキシン, サイトカイニン) 内生量の比較および植食性の進化との関連, 日本生態学会第 65 回全国大会, 2018 年 3 月 17 日 (札幌)

木村優花, 青木玲二, 高山喜晴, 鈴木チセ,

鈴木義人, 有用芳香族アミノ酸代謝物の発酵食品における分布と食品微生物による生産性に関する研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 17 日 (名古屋)

武井麻美, 小暮奨太, 横山千晃, 上妻由章, 鈴木義人, 昆虫におけるインドール酢酸の生合成の機構に関する研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 16 日 (名古屋)

Tokuda, M., Suzuki, Y., Fujita, S., Adachi, S., Hattori, M., Sobagaki, K. Endogenous levels of phytohormone auxin and cytokinins in arthropods and implications for the evolution of phytophagous and gall inducing habits in insects 7th International Symposium on Cecidology. 2018 年 3 月 3-8 日 Mar 3-8 (台湾)

中林ゆい, 安達修平, 藤田将平, 鈴木義人, 遠藤信幸, 徳田誠, ホソヘリカメムシによる花芽や種子の吸汁がダイズとツルマメに及ぼす影響, 九州病害虫研究会第 94 回研究発表会, 2017 年 11 月 8 日 (沖縄)

小暮奨太, 横山千晃, 武井麻美, 上妻由章, 鈴木義人, 昆虫におけるインドール酢酸生合成経路の検証と生合成酵素の同定, 第 52 回植物化学調節学会, 2017 年 10 月 28 日 (鹿児島)

徳田 誠, 鈴木義人, 安達修平, 藤田将平, 昆虫体内における植物ホルモン内生量の比較およびニセダイコンアブラムシ体内における急速な tZR の蓄積, 第 52 回植物化学調節学会, 2017 年 10 月 28 日 (鹿児島)

Tokuda, M., Suzuki, Y., Muryati, Fujita, S., Adachi, S. Rapid accumulation of a cytokinin precursor in aphid body and implications for host plant manipulation by aphids. 10th International symposium on aphids. 2017 年 9 月 18 日 (トルコ)

徳田誠, 鈴木義人, 藤田将平, 安達修平, 昆虫体内における植物ホルモン内生量の比較およびアブラムシ体内における急速なサイトカイニン前駆物質合成の可能性, 日本昆虫学会第 77 回大会, 2017 年 9 月 4 日 (松山)

鈴木義人, 昆虫による植物ホルモン生産とゴール形成, 第 35 回日本植物細胞分子生物学会 (さいたま) 大会, 2017 年 8 月 31 日 (埼玉)

横山千晃, 永田晋治, 上妻由章, 鈴木義人, 昆虫におけるインドール酢酸の生合成に関する研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 20 日 (京都)

Takei, S., Ito, S., Ishige, T., Tanaka, K., Suzuki, Y. A study on adaptive significance of gall formation for an aphid inducing galls on Japanese elm trees. 22nd International Conference on Plant Growth Substances. 2016 年 6 月 21-25 日 (カナダ, トロント)

Suzuki, Y., Suzuki, H., Yokoyama, C., Nagata, S., Asami, T. Insect-producing auxin involved in insect gall induction.

22nd International Conference on Plant Growth Substances 2016年6月21-25日(カナダ, トロント)

鈴木宏佳, 岡崎麻衣子, 小笠原勝, 鈴木義人, 刈込みにより獲得されたスズメノカタビラの矮性形質に関する研究, 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016年3月29日(札幌)

藤原綾香, 西真由子, 吉田茂男, 長谷川守文, 安間智慧子, 梁明秀, 鈴木義人, トチュウに含まれる癌幹細胞特異的阻害剤 Eucommicin A の同定, 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016年3月29日(札幌)

武井麻美, 伊藤晋作, 石毛太一郎, 田中啓介, 鈴木義人, オカボノクロアブラムシが形成するハルニレゴールの適応的意義に関する研究, 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016年3月29日(札幌)

横山千晃, 永田晋治, 鈴木義人, 昆虫におけるインドール酢酸生合成過程に関する研究, 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016年3月29日(札幌)

横山千晃, 鈴木義人, 昆虫におけるインドール酢酸の生合成過程に関する研究, 第50回植物化学調節学会, 2015年10月24日(東京)

②武井麻美, 伊藤晋作, 石毛太一郎, 田中啓介, 鈴木義人, オカボノクロアブラムシによるハルニレゴール形成の適応的意義に関する研究, 日本農芸化学会 2015年度大会, 2015年3月27日(岡山)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 義人 (SUZUKI Yoshihito)  
茨城大学・農学部・教授  
研究者番号: 90222067

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

新井 良馬 (ARAI, Ryoma)  
横山 千晃 (YOKOYAMA, Chiaki)