

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14722

研究課題名(和文) ジェット燃料の生物学的合成を目指したカメムシ炭化水素生合成系の解明

研究課題名(英文) Biosynthesis of hydrocarbons in Heteroptera toward biological production of jet fuel

研究代表者

野下 浩二 (Noge, Koji)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40423008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：炭化水素のひとつトリデカンを生産するカメムシを材料に、トリデカン生合成経路の特定と関連する生合成酵素の探索を行った。安定同位体標識したグルコースをカメムシに与えたところ、その標識がトリデカンに取り込まれること、トリデカンの生合成中間体と予想されるミリスチン酸にも標識が取り込まれることがわかり、カメムシ体内でトリデカンがグルコースからデノボ合成されることが示唆された。カメムシ分泌腺には脂肪族アルデヒドを代謝するアルデヒドオキシダーゼが存在すること、同じような活性を持つ酵素がカメムシ体内に広く分布するものの、分泌腺由来のアルデヒドオキシダーゼとは異なることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Some heteropteran species secrete a hydrocarbon, tridecane. Tridecane was determined to be synthesized from glucose in a heteropteran species using deuterium-labeled compounds. Tridecane was suggested to be synthesized via myristic acid in which deuterium-labeled glucose was also incorporated. An aldehyde oxidase was found from the heteropteran scent gland, which was different from the ones detected from other body parts, for example, midgut.

研究分野：生物有機化学

キーワード：炭化水素 トリデカン カメムシ グルコース 脂肪酸 アルデヒドオキシダーゼ 生合成

1. 研究開始当初の背景

石油燃料は、車や火力発電の燃料として、また様々な化成品の原料として、我々の生活に欠かすことができないものである。石油資源の枯渇や石油燃料の過度な利用による温暖化といった地球規模の問題に直面する一方で、我々の生活は今なお石油燃料に頼らざるを得ないのが現状である。そのような中、近年、オイルを生産する藻類やバイオエタノールなど、バイオ燃料が非常に大きな注目を浴びている。

カメムシは悪臭を発することがよく知られるが、その悪臭の元となるアルデヒド類に加え、クサギカメムシ *Halyomorpha halys* など一部の種はトリデカンなど炭化水素を生産することが知られる。トリデカンはジェット燃料や灯油の一成分としても知られ、カメムシにおけるトリデカン生合成を明らかにできれば、カメムシの能力を有効活用して新しいバイオ燃料を作り出すことができると考え、本研究を着想するに至った。研究を始める段階で、カメムシ分泌腺にアルデヒドの代謝に関わると予想される酵素が存在することを見出しており、代謝レベルでのトリデカン生合成の解明に加え、本酵素の機能解析を進めることで、カメムシのトリデカン生合成の全容解明に近づくことができると考えた。

2. 研究の目的

ジェット燃料を生物学的に合成する研究開発基盤を確立するために、トリデカンを産生できるクサギカメムシを主な材料として、カメムシがトリデカンを作り出す仕組みについて、代謝経路と酵素レベルで明らかにすることを目的とした。カメムシにおいて、トリデカンはミリスチン酸からミリスチルアルデヒドを経て生じると予想できる。そこで、安定同位体を用いて、その生合成経路の特定を試みた。また、カメムシ分泌腺に存在する酵素を単離・精製し、トリデカン生合成との

関連を検討するために、その機能解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

トリデカンを産生できるクサギカメムシに、安定同位体で標識したグルコースを餌とともに与え、その標識がミリスチン酸やトリデカンに取り込まれるか、GC-MSを用いて、安定同位体由来する質量の増加を指標に解析した。また、カメムシ分泌腺に存在し、トリデカン生合成に何らかのかかわりがあると推定される酵素について、アフィニティークロマトグラフィーなど各種クロマトグラフィーを用いて単離・精製し、その基質特異性など酵素化学的諸性質を検討した。

4. 研究成果

①クサギカメムシにおけるトリデカン生合成経路

トリデカン生合成経路の特定を進めるために、まず、クサギカメムシに安定同位体標識したグルコースを与える方法を検討した。飼育条件下で、クサギカメムシが比較的良好に水を吸うことを利用して、安定同位体標識したグルコース水溶液をクサギカメムシ若虫に与え、飼育した。この条件ではクサギカメムシの生育が遅くなり、また脱皮までの時間が通常よりも長くなった。この飼育条件下で、適当な頻度で十分に栄養を含む餌を与えることで、脱皮が進行し、ある程度クサギカメムシの成長をコントロールできることがわかった。クサギカメムシは通常成長が早く、安定同位体標識が十分に取込まれる前に成虫になる。グルコース水溶液のみでの飼育による脱皮の遅延を一定期間保ち、安定同位体標識したグルコースを十分に取込ませることが可能となった。クサギカメムシは脱皮すると、その脱皮殻に古い分泌腺を残すことから、この古い分泌腺をヘキササンで抽出し、そこに含まれるトリデカンに安定同位体標識が取り込まれているかを GC-MS により解

析した。その結果、トリデカンにグルコースに由来する安定同位体標識が取り込まれていることが確認できた (図 1)。

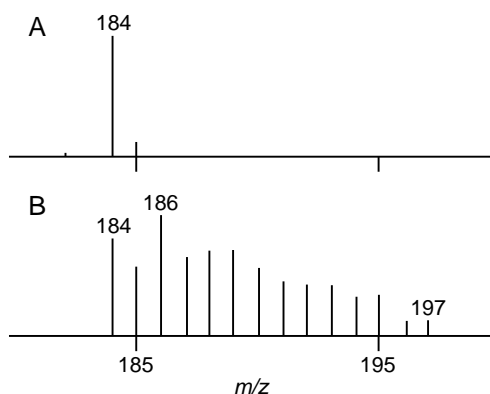


図 1. 異なる餌で飼育したクサギカメムシに由来するトリデカン分子イオンピークの比較。(A) 通常の餌で飼育したクサギカメムシ由来のトリデカン (天然物)、(B) ^{13}C で標識したグルコースを餌に与えたクサギカメムシに由来するトリデカン。トリデカンの分子量は 184 であり、標識した餌を与えた場合、天然とは異なり、 m/z 185~197 が強く観測された。炭素数に対応し、最大 13 個の ^{13}C 標識が取り込まれたことがわかった。

また、トリデカンの生合成前駆体と考えられるミリスチン酸にも安定同位体標識が取り込まれるかを調べるために、カメムシ虫体内の脂肪酸分析を行った。同様の方法で、若虫から安定同位体標識したグルコースで飼育し、羽化したクサギカメムシ成虫から分泌腺と腸管を摘出した。それぞれに含まれる脂質を Folch 法で抽出し、その脂質を加水分解し、脂肪酸メチルエステルに誘導した後、GC-MS で分析した。結果、分泌腺中のミリスチン酸にグルコースに由来する安定同位体標識が取り込まれていることが明らかとなった。

ミリスチン酸以外にも、分泌腺中のパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸に安定同位体標識が取り込まれた一方、リノール酸への取り込みは確認できなかった。すなわち、動物における一般的な脂肪酸生合成と同様に、カメムシ体内でも飽和脂肪酸と不飽和のオレイン酸がデノボ合成されることが明らかとなった。腸管でも同様の傾向が見られ、分泌腺だけでトリデカンの原料と考えられ

るミリスチン酸が特異的に合成されるわけではないことが示唆された。しかしながら、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合を、分泌腺と腸管で比較すると、分泌腺では飽和脂肪酸の割合が高い傾向が見られた。したがって、分泌腺では飽和脂肪酸の生合成が活発であるか、分泌腺への飽和脂肪酸の積極的な輸送・蓄積が起こっていると考えられる。

以上をまとめると、クサギカメムシにおいて、トリデカンはグルコースからデノボ合成されるミリスチン酸を経て生合成されることが明らかとなった。クサギカメムシ分泌腺からはごく微量のミリスチルアルデヒドが検出されるが、ごく微量であるために、今回はそのミリスチルアルデヒドへの安定同位体標識の取り込みは確認できなかった。

②クサギカメムシにおけるアルデヒドオキシダーゼとその体内分布

研究を開始する段階で、native PAGE と活性染色を組み合わせ、クサギカメムシ分泌腺中にアルデヒド代謝に関わると予想される酵素の存在を見出していた。本酵素は飽和のアルデヒドであるヘキサナールをヘキサン酸に変換するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) と考えられ、同じく飽和のミリスチルアルデヒドの代謝にも関わると予想していた。そこで、本酵素を単離・精製し、その酵素化学的性質を明らかにすることで、トリデカン生合成との関連を明らかにできると考えた。

まず、クサギカメムシ分泌腺に含まれる ALDH の精製に取り組んだ。当初は、 NAD^+ ないしは NADP^+ を補酵素とし、アルデヒドとカルボン酸の酸化還元反応を可逆的に触媒する酵素と考え、 NAD(P)^+ をターゲットにアフィニティークロマトグラフィーを行ったが、目的とする酵素が担体に全く吸着されなかった。そこで補酵素の必要性を検討し直したところ、本酵素は NAD(P)^+ を必要とし

ないアルデヒドオキシダーゼであることが示唆された。また、触角、頭部、腸管からも同様に脂肪族アルデヒドを基質とするアルデヒドオキシダーゼ活性が検出された (図 2)。これら 3 つの部位から見出されたアルデヒドオキシダーゼは、native PAGE での移動度がほぼ同じであり、同一の酵素と考えられる。一方、これらと分泌腺中のアルデヒドオキシダーゼはその移動度が異なり、似通った酵素活性を示すものの、分泌腺にのみ異なる酵素が存在することが示唆された。

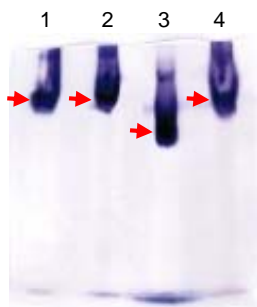


図 2. クサギカメムシから見出されたアルデヒドオキシダーゼ活性 (矢印). (1) 触角、(2) 頭部、(3) 分泌腺、(4) 腸管。各部位からタンパク質を抽出し、native PAGE でタンパク質を分離した。泳動後のゲルを pH 8.8 のバッファーに浸け、ヘキサナールを基質に発色試薬のニトロブルーテトラゾリウムとともにインキュベートし、アルデヒドオキシダーゼを青色バンドとして検出した。

クサギカメムシに由来するアルデヒドオキシダーゼのひとつとして、酵素活性の高かったカメムシ頭部からアルデヒドオキシダーゼをイオン交換クロマトグラフィーなど 4 段階で精製した。その大きさは約 260 kDa で、65 kDa のサブユニットからなる四量体であることが示唆された。また、ヘキサナールなど脂肪族アルデヒドの他に、ベンズアルデヒドなど芳香族アルデヒドも酸化できる幅広い基質特異性を持つ酵素であることが明らかとなった。触角や頭部、腸管に共通して存在するアルデヒドオキシダーゼは、その基質特異性の広さから、外来のアルデヒド類の解毒代謝に関わると予想される。一方で、分泌腺中のアルデヒドオキシダーゼはそういった解毒酵素とは少し役割が異なると予想

される。今後は、頭部に含まれるアルデヒドオキシダーゼの精製方法を活用し、分泌腺中のアルデヒドオキシダーゼの単離・精製と酵素化学的な性質の検討が求められる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 野下 浩二、田母神 繁「クサギカメムシ由来アルデヒド酸化酵素の体内分布と基質特異性」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27~30 日、札幌コンベンションセンター

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=241>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野下 浩二 (NOGE, Koji)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40423008