

令和 4 年 2 月 1 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02141

研究課題名(和文) ゴール形成昆虫による植物ホルモン生産能の進化的獲得機構の解明

研究課題名(英文) Evolutionary acquisition of phytohormone production system by gall-inducing 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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゴール(虫こぶ)形成ハバチが高濃度で保有しているオーキシンやサイトカイニン等の植物ホルモンの生合成機構の分子メカニズムの解明に挑戦している。本研究では、ゴール非形成カイコには存在せず、ハバチにのみ存在するオーキシン合成に関わる酵素を明らかにし、また、その酵素の阻害剤のスクリーニングを達成した。更に阻害剤に改良を加えることによって、ゴール形成にIAAが必須であることを真に証明する道が拓けた。サイトカイニンについては鍵酵素と考えられるイソペンテニル基転移酵素が存在せず、これまで植物等で明らかにされていたのとは異なり、tRNAを経由する経路が主経路である可能性が高まり、解析すべき対象が絞り込まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴール形成への植物ホルモンへの関与は長年指摘されてきたが、筆者等の研究によって初めてゴール形成昆虫がオーキシンを合成することが明らかにされた。また、本研究ではそれに関わる酵素が同定されたことによって、更に解析を進めれば、如何にしてゴール形成昆虫が高いオーキシン生産能を進化的に獲得したかを明らかにすることが出来る。サイトカイニンについても、昆虫により生産されることがほぼ間違いなく、その機構解明に資する結果を得つつある。多様な種の昆虫がゴール形成能をもち、その獲得機構を植物ホルモン生産性の観点から解明することは、学術的に高い意義がある。

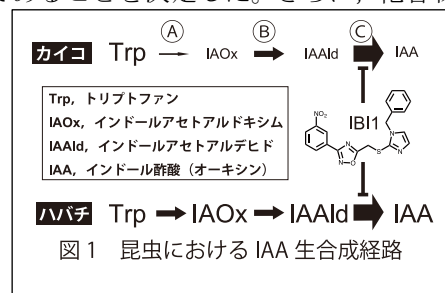
研究成果の概要(英文)：We have been trying to elucidate the molecular mechanism of biosynthesis of plant hormones such as auxin and cytokinin, which are highly concentrated in gall-inducing sawfly. In this study, we identified the enzyme involved in auxin biosynthesis, which is present only in galling sawfly but not in non-gall-inducing silkworm. We have also identified an inhibitors of the enzyme. Further improvement of the inhibitor will pave the way to prove that IAA is essential for gall induction. Regarding cytokinin, there is no isopentenyl transferase in the sawfly genome, raising the possibility that the main pathway is via tRNA, which is different from what has been shown in plants.

研究分野：天然物化学

キーワード：ゴール 昆虫 オーキシン サイトカイニン 生合成

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。すなわち、昆虫は植物が本来もつ成長プログラムを刺激・攪乱することによって、植物にゴールを形成させていると表現できる。申請者はゴール形成昆虫であるハバチ (*Pontania* sp.) が自らオーキシシンやサイトカイニン等の植物ホルモンを高生産し、それらを刺激物質として利用してゴールを誘導することを明らかにした。他のゴール形成昆虫においても両植物ホルモンが生産、蓄積されることから、ゴール形成において普遍的に機能しているシステムであると考えられた。また申請者は、ゴール非形成昆虫にも弱いオーキシシン生産能があることを見出し、「ゴール形成昆虫は、もともと昆虫が持っていたオーキシシン合成系の効率を高めることによって、ゴール形成能を獲得した」との仮説を立てた。本仮説に基づき、ゴール非形成昆虫であり、材料調達にも有利なカイコ (*Bombyx mori*) の絹糸腺酵素液を用いて、図1に示す①~③の3ステップからなる生合成経路、あるいはIAOxを経ずにTrpからIAAldが中間体として生成する2通りの経路のいずれかであることを決定した。さらに、化合物ライブラリーから、③の変換を阻害する化合物IBI1の探索にも成功した。この経路はハバチとカイコで共通であり、いずれもIBI1による阻害を受けることから、両昆虫のIAA（活性型オーキシシン）生合成系は共通な進化的祖先を持つと考えられ、上記仮説の裏付けとなった。上記の研究において、カイコでは各変換の活性が①<<②<<③の関係にあり、①の変換が律速段階であることが明らかとなった。それに対して、ハバチでは①における変換能が相対的に高く、ゴール形成昆虫のIAA高生産能を説明する鍵となる反応と考えられた。



一方、サイトカイニンは、ゴール非形成昆虫にはほとんど存在しないのに対し、ハバチの産卵時分泌液や幼虫には極めて高濃度のサイトカイニンが含まれる。サイトカイニン生産に関して、植物やサイトカイニン高生産微生物のように ATP や AMP 等の低分子を前駆体とする経路が存在するのか、全く別の生産系が存在するのかが明らかにすべき課題であった。

2. 研究の目的

ゴール形成昆虫であるハバチを中心に、オーキシシン、サイトカイニンの高生産のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。すなわち、オーキシシンに関しては、ゴール非形成昆虫で律速段階となっている変換が、ゴール形成昆虫ではいかにして効率化されているのか、その分子基盤となる酵素を同定する。また、サイトカイニンについては、鍵酵素であるイソペンテニルトランスフェラーゼ (IPT) を特定し、共生細菌の関与を含めた当該酵素の起源を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IAA 生合成酵素の解明

カイコ絹糸腺を用いて、Trp→IAOx や Trp→IAAld の変換を担う酵素を生化学的に単離、同定する。また、*de novo* RNA-seq 解析により、ハバチの cDNA 情報を整備し、既知の情報からこれらの変換酵素を特定する。

(2) サイトカイニンの鍵酵素 IPT の機能解析および水酸化酵素の探索

ハバチには配列的には tRNA をイソペンテニル化するイソペンテニル基転移酵素 (IPT) しか見いだせず、これが効率的なサイトカイニン生産に寄与している可能性を探るため、大腸菌による発現系を介した機能解析を行う。また、ハバチ tRNA 上のアデニン残基のイソペンテニル化、あるいは側鎖の水酸化の状態を分析する。更に、共生微生物の存在を検討すると共に、その遺伝子配列を確認する。また、ゴール非形成昆虫にも IAA やサイトカイニンが含まれていることを利用して、モデル昆虫におけるサイトカイニン生産への共生微生物の関与を検討する。また、植物においては、側鎖の水酸化酵素がシトクローム P450 酵素 (CYP) であることから、ハバチにおける同等の酵素を特定することを目的に、酵母発現系を用いてハバチの CYP 遺伝子のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) IAA 生合成酵素の解明

研究期間の初頭にはカイコ絹糸腺からの酵素単離を目指したが、Trp→IAAld の反応は *in vivo* の変換系で非酵素的に生じてしまい、カイコには IAA 生合成に積極的に関わる酵素が存在しない可能性も考えられたこと、また、実際に非常に弱い変換活性を指標に大量精製をすすめた、活性が分散してしまい、単離が困難であったことから、確実に律速段階の酵素を保有しているハバチの遺伝子情報から酵素の同定を行うという方針に切り替えた。まず、ゴール形成時に発現しているハバチの遺伝子配列情報を整備するため、オーキシシン、サイトカイニン共に内生量が多い時期の幼虫と、いずれのホルモンも内生量が低下するゴールから脱出後の幼虫から調製した RNA を用いて、3 連での *de novo* RNA-seq 解析を行い、contig として cDNA 配列を取得した。Trp→IAOx の反応は放線菌 *Streptomyces coelicolor* の flavin-dependent monooxygenase (FMO) が触媒することが知られていた。また、Trp→IAAld の反応は植物では aromatic aldehyde synthases (AAS) が触媒する事が知られていた。また、昆虫でも、AAS の相同な酵素が L-DOPA (dihydroxyphenylalanine) を 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde へと変換し、AAS としての活性が示されていた。そこで、RNA-seq 解析から得られた contig 配列から両者の相同遺伝子を検索した。また、既にゲノム配列既知のカイコからも同様な相同遺伝子を検索した。その結果、FMO、AAS とともに、カイコからもハバチからも 3 クローンずつの相同遺伝子が見出された (カイコ FMO: BmFMO1 (ADH16746), BmFMO2 (ADH16748), BmFMO3 (ADH16750), ハバチ FMO: PonFMO1 (LC612386), PonFMO2 (LC612387), PonFMO3 (LC612388), カイコ AAS: BmAAS1 (AK379034), BmAAS2 (AK383978), BmAAS3 (AK377240), ハバチ AAS: PonAAS1 (LC612383), PonAAS2 (LC612384), PonAAS3 (LC612385))。これらが大腸菌で発現させ、変換活性の検出を行ったところ、いずれの酵素についても可溶性タンパク質として調製することが出来たが、FMO についてはハバチの PonFMO1 と名付けた遺伝子産物のみ、また AAS についても PonAAS2 と名付けた遺伝子産物のみに変換活性が認められた (図 2 および図 3)。

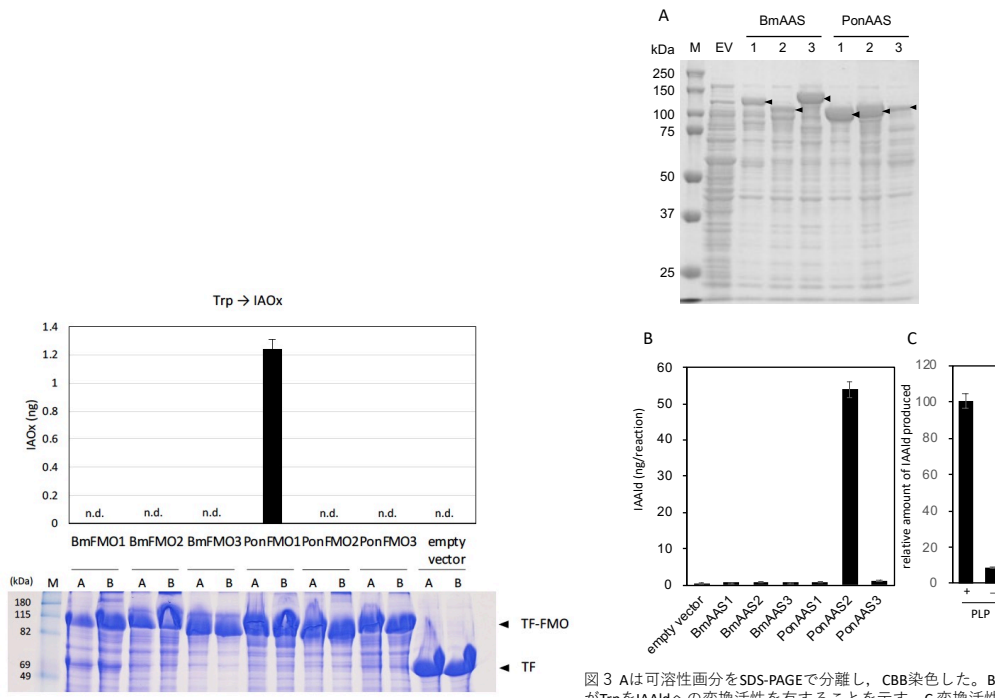


図 2 SDS-PAGE の A は全タンパク質、B は可溶性画分

図 3 A は可溶性画分を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色した。B PonAAS2 が Trp を IAAld への変換活性を有することを示す。C 変換活性への PLP の影響

しかし、PonFMO1 の活性は極めて低く、本来の基質は別にあるものと考えられたのに対して、PonAAS2 は高い活性を示した。カイネティック解析により、本酵素の K_M および V_{max} をそれぞれ $9.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ および $1.1 \times 10^{-5} \text{ M min}^{-1}$ と決定した。本酵素の発現量を RNA-seq 解析結果から参照したところ、内生 IAA 量がほぼ 0 となる脱出後の幼虫では発現量も低下しており、内生量と発現量の相関性がみられ、本酵素が IAA 生産の鍵酵素である可能性が高いと考えられた。

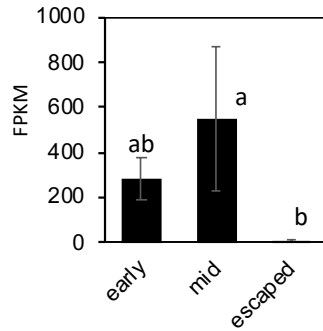


図4 RNA-seq解析による各時期のハバチ幼虫におけるPonAAS2の発現量の相対値

次に PonAAS2 の阻害剤を化合物ライブラリーからスクリーニングした。約 2000 化合物をスクリーニングしたところ、2つの化合物で阻害効果の再現性が認められた。より活性の強い化合物では、カイネティック解析の結果、競合的阻害であるとの結果が得られた。また、この阻害剤によって、ハバチから調製した酵素液における Trp→IAA の変換が 80%阻害されたことから、ハバチにおける主要な IAA 生合成機構に PonAAS2 が関与していると考えられたが、阻害の標的となる酵素の特異性などは不明であり、今後、本化合物の有効な利用法を検討する上での課題である。

(2) サイトカインの鍵酵素 IPT の機能解析および水酸化酵素の探索

上記で記載した RNA-seq により整備されたハバチにおける発現遺伝子の contig を対象に、サイトカイニン生合成の鍵酵素である isopentenyl transferase (IPT) および、側鎖の水酸化酵素候補として CYP 遺伝子を整理した。

IPT については、配列上、ATP 等の低分子を基質とする AP-IPT は存在せず、tRNA を基質とする IPT (PonIPT1 と命名) がただ 1 つ発現していることが明らかとなった。大腸菌における発現により、AP-IPT を発現させた場合、大腸菌の培地中に iP や iPR などのサイトカイニンが放出されるのに対して、PonIPT1 を発現させても、その効果はなく、一方、tRNA-IPT である MiaA を過剰発現させた場合と同様に、PonIPT1 の発現によって大腸菌の tRNA 上のアデニン修飾量が増加し、PonIPT1 が tRNA-IPT であることが判明した。一方、大量の tZ 型サイトカイニンを含むハバチの tRNA 加水分解物を解析した結果、IP 化されたアデニンしか見出されず、側鎖が水酸化されたジメチルアシル基をもつアデニンは tRNA 上では生成していないことが分かった。すなわち、PonIPT1 がハバチの高濃度の tZ 型サイトカイニンの生成に関与している場合、イソペンテニル化された tRNA が加水分解後に水酸化を受けると考えられた。

そこで、次に、酵母発現系を利用して、水酸化酵素の候補として CYP のスクリーニングを行った。対象は RNA-seq 解析から見出された CYP のうち、サイトカイニン含量が高い初期および中期の幼虫に対して、サイトカイニン含量が低下するゴール脱出後の幼虫で発現が低下するものを選抜し、30 弱の CYP について解析を行った。ポジティブコントロールとして用いた AtIPT4 では酵母による tZ 型サイトカイニンの生産が明瞭に確認されたが、ハバチの CYP はいずれのクローンも水酸化活性を示さなかった。ウェスタン解析により、数種の CYP でタンパク質の発現が確認出来なかったものがあり、また解析候補としなかった CYP も存在するため、CYP の関与を完全には否定できない。また、CYP とは異なる水酸化酵素についても対象を広げて検討する必要がある。

サイトカイニン合成に対する共生微生物の関与を検討するため、rRNA 枯濁法によって調製した原核生物型の mRNA を含む RNA を用いた RNA-seq 解析を行ったが、その結果、原核生物の遺伝子と考えられる contig は少なく、また見出された house keeping 遺伝子も発現量が低く、サイトカイニンを含め、ゴール形成への共生微生物の関与を支持しない結果となった。また、微生物との共生が必須であるゴール非形成性のエンドウヒゲナガアブラムシも tZ 型サイトカイニンを含むことから、抗生物質処理によって共生菌である *Buchnera* を除いたアブラムシを調製したが、内生サイトカイニン量は変化せず、*Buchnera* がサイトカイニン生合成には関与しないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takei, M., Kogure, S., Yokoyama, C., Kouzuma, Y., Suzuki, Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 Identification of an aldehyde oxidase involved in indole-3-acetic acid synthesis in Bombyx mori silk gland	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 129-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1525275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyata, U., Arakawa, K., Takei, M., Asami, T., Asanbou, K., Toshima, H., and Suzuki, Y.	4. 巻 137
2. 論文標題 Identification of an aromatic aldehyde synthase involved in indole-3-acetic acid biosynthesis in the galling sawfly (Pontania sp.) and screening of an inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Biochem. Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 103639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2021.103639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小暮奨太, 武井麻美, 伊藤晋作, 上妻由章, 鈴木義人
2. 発表標題 ゴール形成昆虫ハバチによるインドール酢酸生合成酵素に関する研究.
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井麻美, 伊藤晋作, 鈴木義人
2. 発表標題 昆虫におけるオーキシン生合成酵素類の同定
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武井麻美, 小暮奨太, 伊藤晋作, 鈴木義人
2. 発表標題 昆虫におけるインドール酢酸生成酵素の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上輝起, 遠藤理夏, 土田努, 徳田誠, 鈴木義人
2. 発表標題 昆虫におけるサイトカイニン生成に関する研究
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田海, 武井麻美, 鈴木義人
2. 発表標題 ゴール形成ハバチにおけるインドール酢酸生成に関わる芳香族アルデヒド合成酵素の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------