

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05468

研究課題名(和文)コナダニ類の脂質代謝に関わる酸化的な炭素鎖短縮反応の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of oxidative carbon chain shortening reactions involved in lipid metabolism in mites

研究代表者

清水 伸泰 (Shimizu, Nobuhiro)

京都先端科学大学・バイオ環境学部・教授

研究者番号：30434658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コナダニの脂肪酸由来代謝物の生合成に深く関与する新規なBaeyer-Villiger酸化酵素(BVMO)の同定を目的とし、粗酵素の遠心分離、塩析、各種クロマトグラフィーによる精製を進めた。それに並行して本酵素の同定を目指したトランスクリプトーム解析により生合成遺伝子群の絞り込みを行った。コナダニのトランスクリプトーム塩基配列について、既知のBVMOと配列類似性を示すタンパク質を検索したところ、6種のタンパク質が特有のBVMOモチーフ配列と2カ所のRossmannモチーフ配列をもつことが明らかとなった。候補遺伝子の酵素機能を調べるため、コナダニからmRNAを抽出し、候補遺伝子をクローニングした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで微生物を中心に発見されたBVMOが触媒する反応形式は、環状ケトンを経由してラクトンに、あるいは芳香族ケトンを経由してエステルに変換するものが大半である。それに比べコナダニ由来の酸化酵素は、アルデヒドを基質として直接、1炭素短縮したアルコールあるいはギ酸エステルへ変換可能な新規な反応を触媒する。BVMOはケトンのラセミ体からエナンチオ選択的酸化により、光学活性ラクトンあるいはエステルを供給できる点において、特に天然物や医薬品の有機合成分野で有用な生体触媒になりうる。酵素遺伝子および生成機構の全容が解明できれば緩和に減炭反応を成し遂げる新たな生体触媒の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To identify a novel Baeyer-Villiger oxidase (BVMO), which is closely involved in the biosynthesis of fatty acid-derived metabolites in the mite, we purified the crude enzyme by centrifugation, salting out, and various chromatographic methods. In parallel, transcriptome analysis was conducted to narrow down the biosynthetic gene cluster for the identification of this enzyme. A search of mite transcriptome sequences for proteins showing sequence similarity to known BVMOs revealed six proteins with unique BVMO motif sequences and two Rossmann motif sequences. To investigate the enzymatic function of the candidate genes, mRNA was extracted from the mites and the candidate genes were cloned.

研究分野：化学生態学

キーワード：コナダニ 脂質代謝 炭化水素 ギ酸エステル Baeyer-Villiger酸化 生合成

1. 研究開始当初の背景

昆虫の長鎖炭化水素はクチクラを防水する役割をもつほか、種内および種間のケミカルコミュニケーションにおいて多様に機能している。無気門亜目ダニ(コナダニ)からも多種の炭化水素は知られているが、その大部分は昆虫と比較すると炭素鎖が短い(< C20)のが特徴である。コナダニに最も広く分布する炭化水素は tridecane である。不飽和炭化水素では、(Z)-8-heptadecene (8-C17) がコナダニ科とヒゲダニ科を中心に、さらに (Z,Z)-6,9-heptadecadiene (6,9-C17) はコナダニ科を中心に広く分布する。8-C17 はヤケヒョウヒダニの性フェロモンとして、6,9-C17 はマメコバチの巣に寄生する未記載種 *Tortonia* sp. の警報フェロモンとして同定されている。

不飽和炭化水素 6,9-C17 の前駆体はリノール酸であることが、サトウダニ(無気門亜目サトウダニ科)への同位体標識化合物の投与実験で証明された。それに加えてコナダニはリノール酸の生合成能をもつことや、数種のダニの警報フェロモン neryl [(Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadienal] が、メバロン酸経路を経由して生合成されることなどが実験的に証明されており、コナダニの分泌成分に関連した脂質代謝機構が徐々に明らかになりつつある。

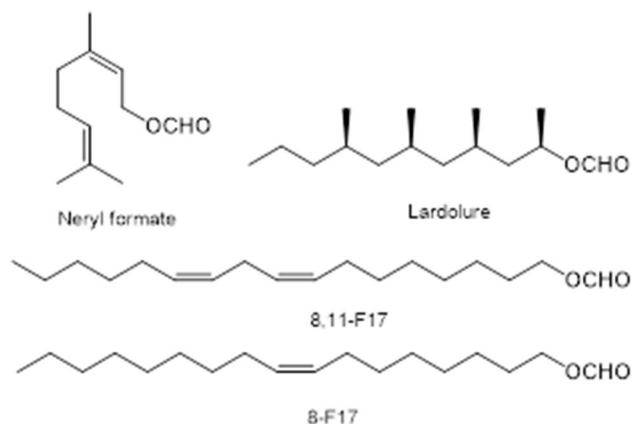
一方で、コナダニの代表的な脂肪族化合物として鎖状ギ酸エステルが同定されているが、生合成に関する研究はこれまで行われてこなかった。Neryl formate [(Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl formate] はケナガコナダニ(無気門亜目コナダニ科)の警報フェロモンとして 1975 年に報告されて以来、コナダニ科数種で警報フェロモンとして同定されている。Lardolure [(1R,3R,5R,7R)-1,3,5,7-tetramethyldecyl formate] はコウノホシカダニ(無気門亜目ホシカダニ科)の集合フェロモンとして同定されたが、サトウダニ、ムギコナダニ(無気門亜目コナダニ科)、ケナガコナダニでも誘因活性を示すことが判明している。

2. 研究の目的

我々の先行研究において、コナダニ科の未記載種 *Sancassania* sp. sasagawa (無気門亜目コナダニ科)の主要分泌成分として 2 種のギ酸エステル(Z,Z)-8,11-heptadecadienyl formate(8,11-F17)と(Z)-8-heptadecenyl formate(8-F17)を同定した。二重結合位置をもとに、8,11-F17 の生合成の前駆体はリノール酸で、8-F17 の前駆体はオレイン酸と推測することができる。本種ダニで見つかる不飽和炭化水素 6,9-C17 と 8-C17 の生合成前駆体もそれぞれリノール酸とオレイン酸であることを考え合わせると、同じ前駆体をもとにギ酸エステルの生成機構を推察するためには炭素鎖の短縮およびギ酸エステル化に関する新たな知見を必要とする。すなわち、これまで昆虫などで報告された炭化水素の生合成機構では、ギ酸エステルの生成機構を推察することは困難である。

Sancassania sp. sasagawa に対して摂食による ¹³C 標識化合物のトレーサー実験を実施し、核磁気共鳴分光計(NMR)とガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)から得られた ¹³C NMR スペクトルおよび MS スペクトルに基づいて、代謝物であるギ酸エステルの ¹³C 標識パターンを決定した。我々はそれらの結果をもとに、脂肪族ギ酸エステルの生合成にはこれまで報告例のない Baeyer-Villiger 酸化酵素(BVMO)が関与していると仮説を立てた。我々の知る限り、本反応を触媒する酵素は発見されていない。よって本課題ではコナダニ特有の BVMO の酵素遺伝子や酵素機能を明らかにし、将来的に産業利用を見据えた高機能な生体触媒の創製を目指した。

また、コナダニで広くフェロモン活性が報告されている neryl formate の生合成について、昆虫の中でも特にアリ類の報告例を参考にして、ギ酸分子の生合成を同位体標識アミノ酸のトレーサー実験を通して検証を行った。



3. 研究の方法

我々が提案するギ酸エステルの生成機構は、脂肪酸（脂肪族アシル CoA）がアルデヒドに還元された後、Bayer-Villiger 酸化でギ酸エステルが生成する機構である。アルデヒドが直接の生合成前駆体であることを証明するため、同位体ラベル化アルデヒドを調製してダニへの投与実験を実施した。しかし、アルデヒドがダニに対して毒性を示し、生育状態が悪化したため、本実験は断念した。

そこで、ダニから調製した粗酵素と基質の同位体ラベル化アルデヒドとの変換反応により、生成物が同位体でラベル化されるかどうかを検証した。反応条件を種々検討した結果、ギ酸エステルがラベル化されていたことから、本反応の前駆体をアルデヒドと決定した。次のステップとしてコナダニ由来の粗酵素の精製およびトランスクリプトーム解析を行った。

さらに、コナダニで広くフェロモン活性が報告されている neryl formate の生合成について、昆虫での報告例を基にした仮説の検証を行った。特に生体内でのギ酸生成機構に着目して、推定した前駆体アミノ酸の摂食実験を通して合成経路の特定を進めた。

4. 研究成果

大量繁殖させたコナダニから粗酵素液を調製して、遠心分離法によって得た沈殿画分に酵素活性を認めた。酵素活性はリノレイルアルデヒドを基質として加えて 8,11-F17 への変換の有無で判断した。沈殿画分に Triton X-100 を添加すると酵素が可溶化できたため、膜タンパク質および核タンパク質である可能性が示唆された。硫酸による塩析と各種クロマトグラフィーによる精製を進めており、アミノ酸配列の決定を行う予定である。

目的の酵素を同定するもう一つのアプローチとして、トランスクリプトーム解析を行った。本種ダニのようにゲノム配列の分かっていない非モデル生物でも de novo RNA-seq を行うことで、RNA 分子の情報を網羅的に調べることができる。ゲノムに代わるダニのトランスクリプトーム塩基配列について、Blast 検索を含めた Gene ontology (GO) 解析を行うことで、アノテーションを付加することができる。これらの情報をもとに既知の BVMO と配列類似性を示すタンパク質を検索したところ、6 種のタンパク質が特有の BVMO モチーフ配列と 2 カ所の Rossmann モチーフ配列をもつことが明らかとなった。

近年、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) も Bayer-Villiger 酸化を触媒するものが報告され、BVMO と類似のモチーフ配列をもつことが分かっている。現在、異種発現系により候補遺伝子の酵素機能を調べるため、ダニから mRNA を抽出し、cDNA を合成後、これをテンプレートとして候補遺伝子をクローニングしている。今後、これらをタンパク質発現ベクターに挿入し、大腸菌にて融合タンパク質を異種発現させる予定である。

コナダニ由来のモノテルペンにはメバロン酸経路を経由することが判明しているため、neryl formate 生合成の最終工程である nerol とギ酸との縮合、特にギ酸分子の由来が不明である。昆虫の中でも特にアリの報告例をもとにギ酸の生合成の検証を行った。コナダニの飼育培地に安定同位体ラベル化アミノ酸を餌に混合して摂食させた。その結果、投与したアミノ酸はホルミル化テトラヒドロ葉酸の合成に関与することで、ギ酸の前駆体となっていることが明らかになった。さらに、アミノ酸のカルボキシ基もギ酸の合成に利用されていることが新たに示唆されたことから、昆虫には見られないギ酸の合成経路がコナダニに存在していると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 清水伸泰	4. 巻 109
2. 論文標題 ヤスデ綱が分泌する防御分泌物の多様性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Edaphologia	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kartika Titik, Shimizu Nobuhiro, Himmi Khoirul Setiawan, Guswenrivo Ikhsan, Tarmadi Didi, Yusuf Sulaeman, Yoshimura Tsuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Influence of Age and Mating Status on Pheromone Production in a Powderpost Beetle <i>Lyctus africanus</i> (Coleoptera: Lyctinae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects12010008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Moriyama Daisuke, Shimizu Nobuhiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Biosynthesis of the widely distributed hydrocarbon (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in astigmatid mites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1119-1122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1723403	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 Moriyama Daisuke, Shimizu Nobuhiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Biosynthesis of the widely distributed hydrocarbon (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in astigmatid mites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1119 ~ 1122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1723403	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 Kartika Titik, Shimizu Nobuhiro, Yoshimura Tsuyoshi	4. 巻 374
2. 論文標題 Behavioral changes of powderpost beetle, <i>Lyctus africanus</i> Lesne (Coleoptera: Bostrichidae): responses on female extract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 012022 ~ 012022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1755-1315/374/1/012022	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 該当する

1. 著者名 清水伸泰、藤井毅、戎煜、石川幸男、櫻井健志、光野秀文	4. 巻 57
2. 論文標題 セミナー室 / 農芸化学の中での化学生態学研究-その発展と展望- 昆虫のフェロモン2 脂肪酸に由来するフェロモンの生合成と受容機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 749 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 清水伸泰	4. 巻 53
2. 論文標題 ダニと昆虫の多機能フェロモンとその活用術	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 4-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shimano Satoshi, Hiruta Shimpei F., Shimizu Nobuhiro, Hagino Wataru, Aoki Jun-ichi, OConnor Barry M.	4. 巻 87
2. 論文標題 Do 'cheese factory-specific' mites (Acari: Astigmata) exist in the cheese-ripening cabinet?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Applied Acarology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10493-022-00725-8	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 Shimizu Nobuhiro, OConnor Barry M., Hiruta Shimpei F., Hagino Wataru, Shimano Satoshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Mite secretions from three traditional mite-ripened cheese types: are ripened French cheeses flavored by the mites (Acari: Astigmata)?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Applied Acarology	6. 最初と最後の頁 309 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10493-022-00734-7	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17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉野広軌、清水伸泰
2. 発表標題 トウキョウコシピロダンゴムシのフェロモンの解析
3. 学会等名 日本土壤動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻間晴子、清水伸泰、坂本文夫、萩下大郎
2. 発表標題 ダニ共生微生物群の菌叢解析とその諸性質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉野広軌、清水伸泰
2. 発表標題 トウキョウコシピロダンゴムシのフェロモンの解析
3. 学会等名 日本土壤動物学会 第43回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山太介、荒谷剛史、清水伸泰
2. 発表標題 コナダニ類に由来する脂肪酸ギ酸エステルの生合成
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水伸泰
2. 発表標題 コナダニ類における多機能フェロモン
3. 学会等名 日本土壤動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島野智之、蛭田眞平、清水伸泰
2. 発表標題 良いチーズを熟成するチーズコナダニTyrollichus casei Oudemans, 1910 (Acariformes: Sarcoptiformes: Acaridae) の分子系統解析
3. 学会等名 日本動物分類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島野智之、蛭田眞平、清水伸泰
2. 発表標題 チーズを熟成するチーズコナダニTyrollichus casei Oudemans, 1910 (Acariformes: Sarcoptiformes: Acaridae) の分子系統解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島野智之、蛭田眞平、清水伸泰
2. 発表標題 チーズを熟成するチーズコナダニTyrollichus casei Oudemans, 1910 (Acariformes: Sarcoptiformes: Acaridae) の分子系統解析
3. 学会等名 日本ダニ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水伸泰
2. 発表標題 節足動物が産生する情報化学物質の生物有機化学的研究
3. 学会等名 日本環境動物昆虫学会 学会賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水伸泰
2. 発表標題 微小な衛生・不快害虫のフェロモン研究からわかってきたこと
3. 学会等名 日本環境動物昆虫学会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山太介、吉田直樹、清水伸泰
2. 発表標題 コナダニ類の警報フェロモンneryl formate分子を形成するギ酸の生合成
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井禎己、石丸善明、唐澤重考、清水伸泰
2. 発表標題 ワラジムシ由来の防御物質キナルジン酸誘導体の同定と生物活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高原千尋、清水伸泰
2. 発表標題 シキミグンバイ若虫分泌物とその類縁体の抗菌活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水伸泰、井上萌佳、小野淳也
2. 発表標題 日本産タマヤスデの防御分泌物に含まれるアルカロイドとタンパク質
3. 学会等名 日本土壤動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水伸泰、小野淳也、平坂高一、市川直美、川瀬穂高
2. 発表標題 節足動物の防御物質を用いた殺虫および殺ダニ効果の検証
3. 学会等名 日本環境動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高原千尋、清水伸泰
2. 発表標題 シキミグンバイ若虫分泌物に含まれる抗菌活性物質の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本環境動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山太介、高原千尋、島野智之、清水伸泰
2. 発表標題 ササラダニ類が産生するシアン化合物からシアン化水素の生成機構
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水伸泰	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 168
3. 書名 土の中の生き物の話 / ヤスデとダニの化学防衛	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 グンバイ由来ポリケチドとその合成類縁体の抗菌活性	発明者 高原千尋、清水伸泰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-55710	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

個人ホームページ
<https://lab.kuas.ac.jp/~bioorgchem/>
京都先端科学大学、教員紹介
<https://www.kuas.ac.jp/profile/nobuhiro-shimizu>

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
---------	---------