

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05402

研究課題名（和文）クサカゲロウ緑色色素の同定ならびに生合成経路の解明

研究課題名（英文）Identification of green pigments of green lacewings and their biosynthesis pathways

研究代表者

西脇 寿 (Nishiwaki, Hisashi)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：30508784

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ニッポンクサカゲロウ成虫の緑色の体色を構成する色素を精製して、MSなど機器分析を試み、緑色色素の一つとしてビリベルジンが含まれていることを明らかにした。次に、ビリベルジン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を明らかにし、組換え体酵素を過剰発現させ、酵素の基質特性などを明らかにした。さらに、realtime PCRを用いてmRNAを定量するとともに、RNAiによる発現抑制をかけて成虫の体色を観察し、クサカゲロウの体色を構成する色素はビリベルジンだけではなく、他の緑色色素も関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中で緑色の体色を持つ昆虫は数多く認められるが、その緑色の生合成経路や役割は未解明の点も多い。本研究でクサカゲロウを用いて得られた成果は、他の緑色昆虫と比較することにより、緑色色素が昆虫の生理、生態にどのように影響をおよぼしているのかを解き明かすうえで役立つことから、学術的意義は高い。また、得られた色素は食品添加物、着色料や塗料などの応用が期待でき、社会的に研究成果を還元できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The green pigments contained in the body color of green lacewings, *Crysoperla nipponensis*, were investigated using MS, and biliverdin was identified as one of the green pigments. The sequences of the genes encoding the enzymes related in the biosynthesis of biliverdin were revealed, and the recombinant enzymes were overexpressed in *E. coli* to clarify the features of these enzymes. In addition, the mRNA levels were quantified using realtime PCR, and the suppression of the gene expression by the injection of the double strand RNAs. These results demonstrate that the green pigments contain not only biliverdin but also the other green pigment(s).

研究分野：生物有機化学

キーワード：green pigments

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫は色とりどりの体色をしているが、体表がメタリックに輝くルリセンチコガネのように体表構造によって発色するものもいれば、色素により色づいているものも存在する。昆虫由来の色素を利用している例は古くからあり、カイガラムシの生産する赤色色素コチニールは、食品や化粧品の着色料として利用されており、昆虫(生理機能)の有効利用の一つと言える。また、昆虫には幼虫や成虫といった違うステージで体色が異なるものが存在するだけでなく、同じ成虫でも季節や周りの環境により体色が変化するものも多く、その体色の生理学的役割に興味をもたれる。

体色が緑色である昆虫として、チョウ目幼虫やバッタ、カマキリなど多くの昆虫を挙げるができるであろう。クサカゲロウの成虫の体表も鮮やかな緑色をしている (Figure 1-d)。アミメカゲロウ目クサカゲロウ科に属するニッポンクサカゲロウ (*Crysoperla nipponensis*)は、「優曇華」として知られる卵は緑色をしている (Figure 1-a)が、孵化する頃には緑色が退色していき茶色の幼虫が出現する (Figure 1-b)。その幼虫は3齢まで生育したあと繭の中で茶色のまま蛹化するが、羽化までに徐々に蛹が緑色に色づいてきて (Figure 1-c)、緑色成虫が羽化する。このように、クサカゲロウは幼虫と成虫で色が異なる完全変態型昆虫であり、この体色を構成する色素の構造や生合成経路に興味をもたれるが、現在までこれらに関連した総括的な研究はない。

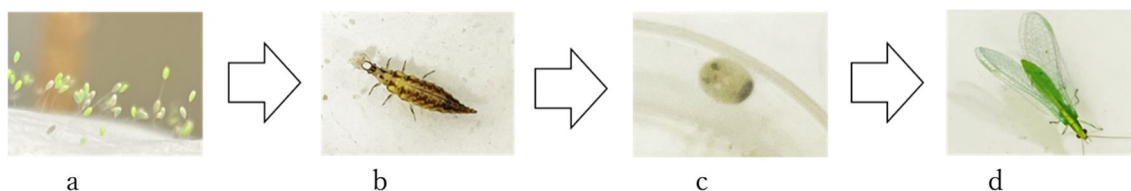


Figure 1 ニッポンクサカゲロウの成長過程

a. 卵 b. 幼虫 c. 蛹 d. 成虫

2. 研究の目的

研究室で継代飼育しているニッポンクサカゲロウ *C. nipponensis* を用いて、成虫の体色である緑色を構成する色素の構造を解明し、その生合成機構に関する知見を得ることを目的とする。さらに、得られた知見をもとに、着色料などへと応用できるか諸性質を調査する。本研究の成果は、クサカゲロウの生活環における緑色色素の生理学的役割を考察する手がかりになるだけでなく、新規構造をもつ緑色色素を提示できる可能性があり、学術的なことだけでなく応用面でも社会に貢献できる。

3. 研究の方法

(1) 色素の精製

はじめに成虫を水中でよく磨碎して得られた抽出液を遠心分離し、上清のみを回収した。得られた抽出サンプルに80%飽和となるよう硫酸アンモニウムを加えて塩析し、回収した沈殿物を水に懸濁して、透析膜にて脱塩後、限外ろ過膜にて濃縮した。一方、水抽出後の残渣にエタノールを加え、磨碎した後に遠心分離し、得られたエタノール画分を減圧濃縮した。そのサンプルをシリカゲルクロマトグラフィーに供して得られた緑色画分を減圧濃縮した。得られた緑色色素の質量をUPLC/ESI-Q-TOF MSにより測定した。

(2) 生合成遺伝子の検討

既知の緑色色素であるbiliverdinの生合成に関連するheme oxygenaseとbiliverdin reductaseをコードするmRNAをニッポンクサカゲロウが有するのかが検討した。まず、ヒト由来heme oxygenaseとbiliverdin reductaseをコードする遺伝子配列を取得し、クサカゲロウのRNA seqのデータからLocal BLAST検索することで相同性が高い塩基配列を見出した。その塩基配列をもとに、mRNAの定量実験、組換え体タンパク質の発現実験、RNAiによる抑制実験を実施した。

(3) 生合成遺伝子の定量

ニッポンクサカゲロウの成虫の緑色個体ならびに越冬型茶色個体から、SV Total RNA Isolation System (Promega) を使用してRNAを抽出した後、Verso cDNA Synthesis Kitを用いてcDNAを調製した。そしてQuantStudio 3 Real-Time PCR装置を用いてheme oxygenaseおよびbiliverdin reductaseをコードする遺伝子を定量した。

(4) RNAi による抑制

MEGAscript RNAi Kit を用いて調製した dsRNA をニッポンクサカゲロウの3 齢幼虫に投与し、成虫になるまでの体色の様子を観察した

(5) Biliverdin reductase 組換え体酵素の過剰発現

クサカゲロウの緑色個体から調製した cDNA を用いて増幅した PCR 産物と pET22b(+) vector とを用いて in Fusion 法により plasmid を作成し、それを用いて大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換した。LBamp 液体培地で振とう培養し、OD600 が 0.4 に達した後に IPTG を添加して、一晚振とう培養した。その後、培養液を遠心分離してえられる菌体に Bug buster と benzonase を加えてゆっくり振とうし、遠心分離して得られる上清からニッケルカラム (His Trap HP) を用いて組換え体酵素を精製した。

(6) 緑色色素の性質

緑色色素の応用を考慮するうえで重要と考えられる pH や温度による安定性を見るために、粗精製ならびに精製した色素を用いて、酸性領域からアルカリ性領域まで、また、高温ならびに低温環境下での色調の変化や酸化還元剤が色調に与える影響を調査した。

4. 研究成果

(1) 色素の精製

抽出して得られた色素画分をカラムクロマトグラフィーで精製したところ、黄色、黄緑、青緑色の画分に分離することができた (Figure 2)。この青緑色の画分を既知の緑色成分である biliverdin と比較したところ、UPLC の retention time、m/z、MSMS によるフラグメントピークが一致したことから、biliverdin と同定した。

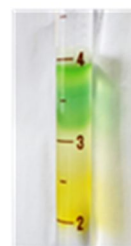


Figure 2
カラムの一例

(2) 生合成遺伝子の検討

ヒト由来の heme oxygenase と biliverdin reductase の mRNA の配列をもとに、Local BLAST 検索した結果、高い相同性を有するクサカゲロウ由来の Heme oxygenase と Biliverdin reductase の配列を得ることができた。なお、ヒトの配列との homology は約 50% であった。

(3) 生合成遺伝子の定量

ニッポンクサカゲロウの緑色個体と茶色個体間で heme oxygenase (HO) と biliverdin reductase (BR) をコードする mRNA の発現量を比較するため RT-PCR により解析したところ、各種 mRNA の発現量が緑色個体と茶色個体で異なっていることが明らかとなった (Figure 3)。

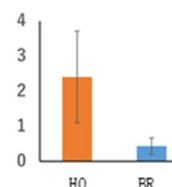


Figure 3 mRNA 発現量の一例

(4) RNAi による抑制

各種生合成関連遺伝子の dsRNA を処理したニッポンクサカゲロウの3 齢幼虫を成虫になるまで飼育し、羽化後の体色の様子を観察したところ、mRNA の抑制は認められる一方で、体色の変化は認められなかった (Figure 4)。

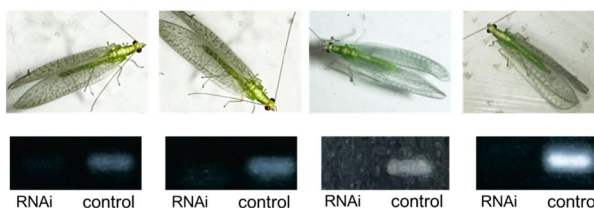


Figure 4 RNAi により mRNA の発現を抑制した個体の体色

(5) Biliverdin reductase 組換え体酵素の過剰発現

Biliverdin を biliverdin reductase を過剰発現している大腸菌と共培養することにより、緑色が分解されるのを確認した (Figure 5)。また、ニッケルアフィニティークラムを用いて精製した組換え体酵素を用いて、biliverdin reductase の基質特異性を明らかにすることができた。

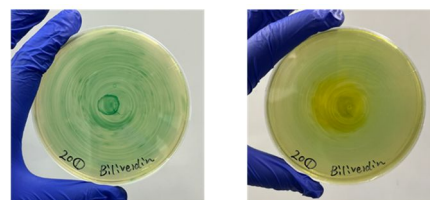


Figure 5 Biliverdin reductase を発現させた *E. coli* と biliverdin との培養

(6) 緑色色素の性質

酸化剤や還元剤の処理で色調は変化した、pH に関してはかなり広域で緑色を保持しており、比較的安定であることを確認できた。

本研究では、クサカゲロウの緑色を構成する色素として既知の biliverdin が含まれていることを明らかにしただけでなく、新たに別の緑色色素も含まれていることを見出した。Biliverdin 生

合成経路関連酵素の研究で得られた知見から、未同定の緑色色素の重要性は高いと推測される。また、独自に調製方法を見出している越冬型の茶色個体と通常緑色個体との酵素発現量を比較することにより、昆虫生理学的に興味深い知見を得ることができた。将来、この緑色色素の生理学的な意味を解き明かすだけでなく、応用面も見越した成果を得ることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部風音・山内聡・西脇寿 |
| 2. 発表標題 ニッポンクサカゲロウ緑色色素の精製と生合成遺伝子の検討 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度中四国・西日本支部合同大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部風音・山内聡・西脇寿 |
| 2. 発表標題 ニッポンクサカゲロウ緑色色素の精製と生合成酵素の検討 |
| 3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会合同大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shion Abe, Satoshi Yamauchi, Hisashi Nishiwaki |
| 2. 発表標題 Biosynthesis of the pigments constructing the body colour of green lacewing insects |
| 3. 学会等名 XXVII International Congress of Entomology (国際学会) |
| 4. 発表年 2024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 |
|---------|---------|
|---------|---------|