

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580151

研究課題名(和文) 鱗翅目昆虫絹糸腺由来植物誘導防衛抑制因子の同定とその生態学的意義の解明

研究課題名(英文) Study on a factor in silk glands that suppresses defense responses of plants during infestation

研究代表者

松井 健二 (Matsui, Kenji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90199729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：カイコ絹糸腺に植物みどりの香り生成抑制活性を見だし、これが脂肪酸ヒドロペルオキシド脱水酵素であることを明らかにした。当該酵素を精製した結果本酵素は分子量31 kDaの単純タンパク質であった。ゲル内消化とTOF-MS分析から得られた配列情報に基づいて遺伝子をクローニングしたところ、これまで機能未知とされてきた遺伝子であった。この因子は脂肪酸ヒドロペルオキシドのなかでみどりの香り生成に寄与する成分だけを脱水する比較的狭い基質特異性を有していた。このため本因子は単に抗酸化酵素として機能しているのではなく、オキシリピン類代謝経路に関与していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found an activity to suppress formation of green leaf volatiles in the silk gland of silkworms. After purification, we obtained a protein of 31 kDa, that showed high fatty acid hydroperoxide dehydratase activity. When various isomers of substrates were used, the enzyme showed very strict substrate specificity to 13S-ZE isomer. In fact, this isomer is the one accountable to formation of green leaf volatiles in plants. From these observation, it was suggested that the enzyme is not only the antioxidative enzyme but probably involved in oxylipin metabolism either in plants or in the insects. When we analyzed the gene encoding the enzyme, we found it was a gene that had not been assigned. We are now trying to get a transgenic silkworm that has deletion of the gene, thereafter, we will be able to see the physiological and ecological significances of the enzyme activity for silkworms.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 生物生産化学・生物有機化学

キーワード：みどりの香り カイコ 絹糸腺 リポキシゲナーゼ 植物昆虫相互作用

1. 研究開始当初の背景

緑多き地球環境は植物の多様な環境適能力、環境突破能力に依存している。もし、植物が草食昆虫に対する防御機能を失えば、地球上の全ての植物は数週間で食べ尽くされる、とされている。植物の草食昆虫に対する防御機能のひとつがみどりの香り (Green Leaf Volatiles: GLVs) である。GLV はリノレン酸などから酸化、開裂反応により生成する炭素数 6 の揮発性化合物群で、無傷植物ではわずかにしか見られないが、草食昆虫の食害などで組織が破壊されると直ちに生成される。申請者は GLV 生合成経路とその生理的役割の解明を進め、食害部位では GLV のうち、カルボニル化合物が数 mM 程度の高濃度になり、草食昆虫の生体成分と反応することで毒性を発揮することで直接防御に寄与すること、また、放散された GLV が寄生蜂を誘引し、植食者を殺すことで間接防御にも寄与することを明らかにした。

一方、草食昆虫も数千万年にわたる共進化を通じてこうした植物の防御を凌駕するシステムを開発してきた。鱗翅目昆虫ゲノム解析の結果、これら植食性昆虫で植物防御物質解毒作用を持つ P450 遺伝子のコピー数が近年急速に増加したことが明らかとなっている。また、タバコスズメガ幼虫の唾液中に GLV 化合物異性化活性があることが報告され、この異性化活性によってタバコ葉から放散される GLV 組成がタバコスズメガの捕食寄生者をよりよく誘引する組成になっていることが示された。

最近、研究分担者の小澤らはアワヨトウ幼虫に食害を受けたイネ葉からの GLV 生成量が機械傷に比べ少ないことを見だし、アワヨトウ幼虫絹糸腺に GLV 生成阻害活性があることを明らかにした。アワヨトウのような鱗翅目昆虫の幼虫は糸を吐きながら摂食することが知られており、絹糸腺分泌物を摂食時に取り込んでいる。GLV の直接/間接防御効果

を考えるとこの阻害活性は摂食中に GLV 生成を抑えることでアワヨトウが植物防御をかいくぐるシステムのひとつであると予想される。植物-草食昆虫相互作用の中で、植物が草食昆虫唾液成分を認識して防御反応を活性化することが知られているが、今回、アワヨトウで見いだされた現象は昆虫が摂食中に植物の誘導防御反応を回避するシステムで、これまでに知られていない新規の現象であった。

2. 研究の目的

本研究ではアワヨトウ絹糸腺分泌物中でのような因子が植物 GLV 生成を抑制しているのか、その因子がどのように機能しているのかを明らかにすることを目的としている。こうした知見の集積により新たな植物-草食昆虫相互作用を示すことが可能となる。また、アワヨトウはイネやトウモロコシの重要害虫であり、この相互作用の全貌を明らかにすることでこれまでにない発想に基づいた新たな鱗翅目害虫制御技術へと応用可能であると考えられる。

そこで、本研究では、この阻害因子はどのような因子で、植物 GLV 生成をどのように阻害するのか？を明らかにすることを目的とした。その中で、申請者は研究分担者の小澤、小林と予備的共同研究を進め、カイコ絹糸腺にも同様の活性があることを見だし、これがタンパク質性の因子であることを明らかにした。また本阻害因子が GLV 生合成経路のうち、リポキシゲナーゼ (LOX) 活性を阻害することも明らかとした。カイコは絹糸腺が発達しており、人工飼料で季節を問わず飼育できるため生化学的研究に適している。さらに、カイコゲノム配列が解読されており、遺伝子組換え技術も確立されているため分子生物学的研究にも適している (分担者の小林はカイコ分子生物学に優れた実績を有している)。

3. 研究の方法

人工飼料で生育させたカイコを解剖し、絹糸腺を摘出した。絹糸腺を緩衝液で破碎し、可溶性画分に活性を得た。活性測定用の基質として、ダイズリポキシゲナーゼを用いてリノール酸から調製し精製したリノール酸 13-ヒドロペルオキシドを用いて分光高度計で 234 nm/280 nm の吸光度の減少・増加を追跡することで活性を測定した。

因子の精製にあたっては祖抽出液を硫酸分画し、イオン交換クロマト、疎水性相互作用クロマトにより実施した。内部アミノ酸配列は in gel digestion の後、TOF-MS 解析により実施した。得られたアミノ酸配列をカイコゲノムデータベースを対象に MASCOT 解析し当該遺伝子を特定した。本遺伝子由来 cDNA を昆虫細胞発現ベクターに挿入し、Sf9 細胞で発現させた。

4. 研究成果

リノール酸 13-ヒドロペルオキシドを基質とすると、基質の減少に応じてケトジエン脂肪酸の蓄積が観察された。そこで HPLC により解析したところ、リノール酸 13-ヒドロペルオキシドから 13-オキソリノール酸が生成されていることが明らかとなった。そのため、この因子を脂肪酸ヒドロペルオキシド脱水酵素であると結論づけた。様々な脂肪酸ヒドロペルオキシド異性体を調製し反応性を見た結果、本因子は 13(S)-hydroperoxy-(9Z,12E)-octadienoic acid にきわめて特異的で、ヒドロペルオキシド基の位置とキラリティ、二重結合の幾何、に関して基質特異性はかなり狭く、GLV 生成経路の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼと同程度と確認できた。

精製酵素は分子量 31 kDa の単純タンパク質と思われる、その内部配列から機能未知とされていた遺伝子産物であることが明らかに

なった（配列については未発表）。カイコベースでは当該遺伝子は絹糸腺と皮膚に多く発現していることが明らかであった。この遺伝子は鱗翅目昆虫では保存されているが、他の昆虫、節足動物では相同遺伝子は見いだされなかった。

本因子はそのアミノ末端側に分泌性シグナルを有していた。そこで、この遺伝子全長を昆虫細胞で発現させると培養液中に脂肪酸ヒドロペルオキシド脱水酵素活性が認められ、分泌されていることが確認できた。

現在、この遺伝子をノックアウトしたカイコを準備中で、当該組換えカイコを用いた GLV 生成量の解析により本因子の生理的役割を明らかにできると考えている。

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3件)

Kana Miyamoto, Tomoko Murakami, Pattana Kakumyan, Nancy P. Keller, Kenji Matsui, (2014) Formation of 1-octen-3-ol from *Aspergillus flavus* conidia is accelerated after disruption of cells independently of Ppo oxygenases, and is not a main cause of inhibition of germination. PeerJ, doi 10.7717/peerj.395 (査読有)

Koichi Sugimoto, Kenji Matsui, Yoko Iijima, Yoshihiko Akakabe, Shoko Muramoto, Rika Ozawa, Masayoshi Uefune, Ryosuke Sasaki, Kabir Md. Alamgir, Shota, Akitake, Tatsunori Nobuke, Ivan Galis, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Junji Takabayashi (2014) Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111,

7144-7149. (査読有)

Anna Nakashima, Stephan H. von Reuss, Hiroyuki Tasaka, Misaki Nomura, Satoshi Mochizuki, Yoko Iijima, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Wilhelm Boland, Junji Takabayashi, Kenji Matsui (2013) Traumatins- and dinortraumatins-containing galactolipids in Arabidopsis. Their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles. J. Biol. Chem., 288, 26078-26088. (査読有)

[学会発表](計2件)

Hiroki Takai, Saki Fujii, Rika Ozawa, Hideo Dohra, Tosshiyuki Ohnishi, Jun Kobayashi, Junji Takabayashi, Kenji Matsui, Purification and characterization of a factor suppressing green leaf volatile formation in silk gland of silkworms. 5th Asian Symposium on Plant Lipids (Gwangju, Korea, 2013/11/29)

高井嘉樹、藤井沙季、小澤理香、道羅英夫、大西利幸、小林淳、高林純示、松井健二、カイコ絹糸腺のみどりの香り精製抑制因子の精製とその性質に着いて、日本農芸化学会支部合同広島大会(2013/9/5、県立広島大学広島キャンパス)広島市

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~matsui/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 健二 (MATSUI, Kenji)

山口大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90199729

(2) 研究分担者

小澤 理香 (OZAWA, Rika)

京大大学生態学研究センター・研究員

研究者番号：90597725

小林 淳 (KOBAYASHI, Jun)

山口大学農学部・教授

研究者番号：70242930

(3) 連携研究者

()

研究者番号：