

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏 名 菊池 直也
指導教員名 長澤 寛道

論文題目

カイガラムシ色素の生合成に関する研究

カイガラムシは、その体内に蓄積される鮮やかな色素が染料や食品添加物として有効利用されるため、資源生物としての役割を持っている。代表的なカイガラムシ色素であるコチニール色素やラック色素は、大量飼育したカイガラムシから色素を抽出することで生産されている。もし、それら色素の一成分を大量生産する技術が確立すれば、現在使用されている合成色素に代わる自然に優しい天然色素として、インクなどの色素成分に利用することが可能となる。カイガラムシ色素の生産技術としては、生合成遺伝子を利用した生合成工学が第一に挙げられるが、これまでにカイガラムシ色素の生合成に関する知見は全く得られていない。

これまでに知られているカイガラムシ色素は図 1 に示した *laccaic acid D*、*deoxyerythrolaccin* あるいは *emodin* を基本骨格とするアントラキノンを有する。*emodin* 骨格は真菌の代謝産物や植物中にも見出されているが、前二者の骨格はカイガラムシに特有である。これらアントラキノンを骨格はオクタケタイドとして生合成されると考えられ、その生合成にはポリケタイド合成酵素 (PKS) の関与が推定される。

PKS は微生物や植物の二次代謝に見られ、昆虫自身が持つという報告はない。従って、カイガラムシ色素の生合成を探る上ではカイガラムシに普遍的に共生する細胞内共生細菌との関係を考える必要がある。

以上の背景から、本研究では、飼育方法が確立され、ライフサイクルが 40 日と短いフジコナカイガラムシ (*Planococcus kraunhiae*) を対象とし、その虫体に含まれる色素の生産者及びそ

の生合成機構を解明することを目的に以下の実験を行った。

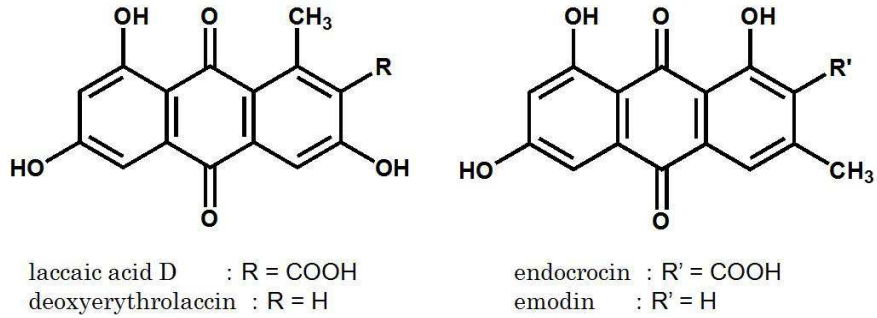


図1 カイガラムシ色素の構造

1. フジコナカイガラムシの虫体内色素の同定と色素非生産変異体の解析

まず、フジコナカイガラムシの虫体内色素を分析した。その結果、主成分として endocrocin (1) を単離、同定した。1は真菌の代謝産物として知られるが、カイガラムシ色素として単離されたのは初めてであった。さらに、emodin 8- β -D-glucopyranoside (2)、2-hydroxyemodin 8- β -D-glucoside (3)、1,6,8-trihydroxyanthraquinone-2,3-dicarboxylic acid (4)の3種の色素を副成分として単離、同定した。3及び4は新規化合物であった。

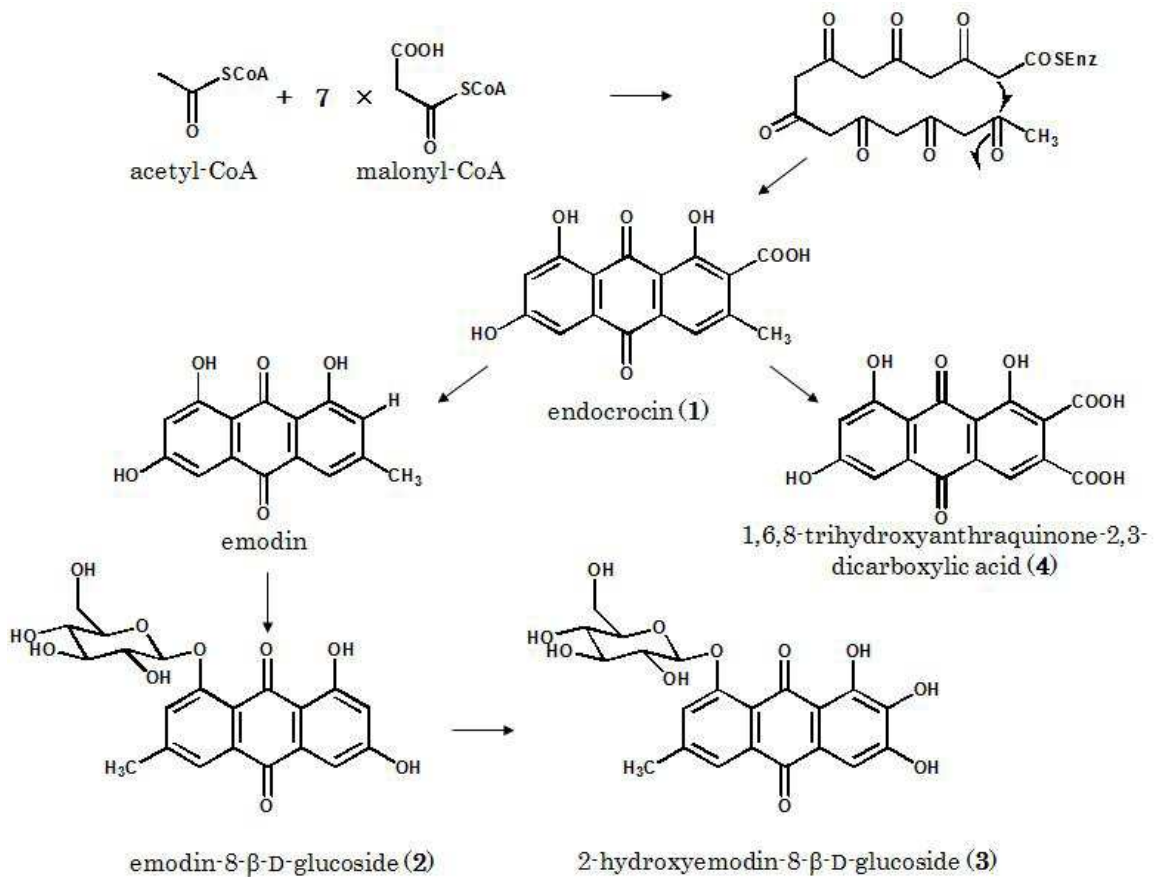


図2 フジコナカイガラムシ色素の推定生合成経路

これらの色素の生合成経路を図2のように推定した。ポリケタイド経路によって色素の基本骨格である**1**が生成し、グルコシル化、水酸化によって**2**及び**3**が、メチル基の酸化によって**4**が生成すると推定された。2の前駆体と考えられる **emodin** は生体から得られなかった。これら色素はカイガラムシのどの生育段階においても体重の増加に比例して生産されていた。

一方、フジコナカイガラムシの飼育の過程で、体色の異なる変異体を見出し、その系統化に成功した。変異体の虫体からは前述の**1**~**4**の色素のいずれもが全く検出されなかった。変異体には細胞内共生細菌として、 β -プロテオバクテリア及び γ -プロテオバクテリアが野生型と同様に存在していた。

一方、野生型と変異体を用いて交配実験を行ったところ、野生型と変異体をヘテロに交配した群のF1世代の表現型は野生型と変異体型が混在していた。従って、色素の生合成には、雌の垂直伝搬で伝わる共生細菌ではなく、昆虫自身が関与していることが示唆された。

2. フジコナカイガラムシの EST 解析と endocrocin 生合成遺伝子の同定

endocrocin 生合成遺伝子を得るため、まず I 型、II 型、III 型の PKS 遺伝子それぞれについて、PCR による探索を行ったが、候補遺伝子を見出すことができなかった。そこで、EST 解析により、カイガラムシ中で発現している遺伝子を網羅的に取得した。得られた遺伝子の中に芳香族系化合物を生成する I 型、II 型あるいは III 型 PKS 遺伝子と同一性を有する配列は存在しないことが確認された。

次に脂肪酸生合成酵素 (FAS) の遺伝子に着目した。FAS は PKS と類似した遺伝子構造をしており、違いは FAS ではポリケタイド鎖を還元するが PKS では必ずしも還元しないことである。そこで、EST 解析データをもとに、FAS 遺伝子と同一性の高い配列に関して、5'-RACE 及び 3'-RACE を行い、endocrocin 生合成に必要と推定されるケトシンターゼ (KS) ドメイン及びアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメインを有し、endocrocin 生合成に不必要と推定されるアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) ドメイン、ケトレダクターゼ (KR) ドメインは持たない遺伝子を探索した。その結果、全長 2kb~7 kb の 4 種の候補遺伝子を取得した。それら遺伝子に関して、野生型と変異体における遺伝子の発現解析を行ったが、いずれの遺伝子においても野生型と変異体間での発現差は見られなかった。現在、それらの候補遺伝子の塩基配列を、野生型、変異体それぞれにおいて解析し、異なる配列がないか調べている。また、RNAi による遺伝子ノックダウンによる表現型の解析を行っている。

3. **emodin glucosyltransferase** の精製

フジコナカイガラムシの虫体内色素として単離された **emodin 8-O- β -D-glucopyranoside(2)**は、**emodin** を基質として **glucosyltransferase** によってグルコシル化され生成することが予想された。この酵素の情報が、カイガラムシ色素の生合成機構の解明に役立つと考え、**emodin**

glucosyltransferase の精製を試みた。まず、酵素活性の測定系の確立を試みた。emodin と UDP-glucose を含む Tris バッファーに酵素粗抽出液を加え、26.5°C でインキュベートした結果、**2** の生成が認められた。**2** の生成量は反応時間及び酵素粗抽出液量とそれぞれ比例関係にあった。

酵素の抽出法に関して、虫体を破碎し、Tris バッファーで抽出した際の沈殿を 0.1% Triton X-100 を含む Tris バッファーで再抽出した溶液において活性が強く観察された。

次に酵素の精製方法について検討した。Q Sepharose では pH 11 で活性の吸着が見られた。SP sepharose では、pH 7.5、pH 6.0 では活性が吸着せず、pH 4.5 では酵素が失活した。Butyl Sepharose、Octyl Sepharose、Phenyl Sepharose、Butyl-S Sepharose について検討を行ったところ、Butyl-S Sepharose でのみ、効率よい活性の吸着及び溶出が見られた。CHTI (ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー) では吸着後活性が失われ、Reactive yellow 86 (アフィニティークロマトグラフィー)、Mono P (クロマトフォーカシング) では、活性が吸着しなかった。これらの結果を踏まえ、硫酸沈殿、Butyl-S Sepharose、Q Sepharose、Superdex 200 による 4 段階の精製の結果、活性を約 90 倍に濃縮することに成功した。現在、更なる精製段階の検討を行っている。

総括

フジコナカイガラムシは endocrocin 及びその誘導体を虫体内色素として有していた。また、色素非生産変異体を用いた交配実験から、色素生合成遺伝子は昆虫ゲノム内に存在していることが強く示唆された。アズキゾウムシやアブラムシでは共生細菌のゲノムの水平転移が報告されており、カイガラムシにおいても微生物の色素生合成遺伝子が水平伝搬した可能性が考えられた。しかし、EST 解析の結果から、微生物由来の PKS 遺伝子と相同性の高い配列は得られなかった。一方、色素生合成候補遺伝子として、昆虫の FAS 遺伝子に相同性の高い遺伝子を 4 種見出した。これらは KS ドメイン及び、AT ドメインを遺伝子内に有している一方、KR ドメインについては部分的にアミノ酸配列が欠損していた。昆虫においてこのようなドメイン構造をもつ遺伝子は、現在までにエンドウヒゲナガアブラムシのゲノム解析によって得られた推定遺伝子のみである。また、昆虫における PKS 遺伝子の例は初めてであるので、emodin glucosyltransferase やその他の色素生合成関連遺伝子が昆虫ゲノムの近傍に存在してクラスター構造を形成している可能性もあり、興味深い。今後の研究によりカイガラムシ色素生合成機構の全容解明が期待される。