

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菊池 直也

カイガラムシは、その体内に蓄積す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、資源生物として重要である。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抽出・生産されている。それらの色素をさらに大量生産する技術として、生合成遺伝子を利用した生合成工学が有力と考えられるが、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。既知のカイガラムシ色素はアントラキノン構造を有する。アントラキノン骨格はオクタケチ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チド合成酵素 (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、これまで昆虫自身が持つという報告はないので、カイガラムシに普遍的に共生する細胞内共生細菌の可能性を考慮する必要がある。本論文は、フジコナカイガラムシ (*Planococcus kraunhiae*) 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行ったもので、序論以下 3 章から成る。

まず、序論で研究背景を述べた後、第 1 章では、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を行っている。まず、虫体内色素を分析し、主成分として endocrocin (1) を、副成分として emodin 1-*O*- β -D-glucopyranoside (2)、7-hydroxyemodin 1-*O*- β -D-glucoside (3)、1,6,8-trihydroxyanthraquinone-2,3-dicarboxylic acid (4) の 3 種の色素を単離、同定した。3 及び 4 は新規化合物であった。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ている。変異体の虫体から前述の 1~4 の色素は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。野生型と変異体を用いた交配実験の結果から、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。

第 2 章では、フジコナカイガラムシの EST 解析と endocrocin 生合成遺伝子の探索を行っている。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、III 型 PKS 遺伝子と相同性を有する配列は存在しないことが確認された。そこで、次に、脂肪酸生合成酵素 (FAS) の遺伝子に着目した。EST 解析データをもとに、FAS 遺伝子と相同性の高い配列に関して、5' -RACE 及び 3' -RACE を行い、endocrocin 生合成に必要な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、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 2~7 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発現差は見られなかった。一方、RNAi による遺伝子ノックダウンを行い、4 種の中の 1 種が色素含量を有意に減少させることがわかった。

第 3 章では、emodin glucosyltransferase 遺伝子が色素合成遺伝子の近傍にあることを想定して、この酵素をまず精製し、その遺伝子を取得することによって色素の合成遺伝子を取得することを計画した。まず、この酵素の活性測定系を確立し、これを用いて emodin glucosyltransferase の精製を試みた。虫体を破碎し、Tris 緩衝液で洗浄した残りの沈殿を 0.1% Triton X-100 を含む Tris 緩衝液で抽出した溶液に高い活性が回収された。これについて種々の精製法を検討した結果に基づいて、硫酸沈殿、Butyl-S Sepharose、Q Sepharose、Superdex 200 による 4 段階の精製を行った結果、活性を約 90 倍に濃縮できたが、まだ単離にまでは至っていない。

以上、本論文は、フジコナカイガラムシの色素が昆虫自身によって生合成されることを初めて示し、その生合成の候補遺伝子を取得したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。