



# 除虫菊類のゲノムや有用物質生合成酵素の生物情報 基盤構築に関する研究

山城, 敬範

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Date of Publication)

2024-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8652号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482400>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

## 論文内容の要旨

氏 名 \_\_\_\_\_ 山城 敬範 \_\_\_\_\_

専 攻 \_\_\_\_\_ 応用化学専攻 \_\_\_\_\_

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

除虫菊類のゲノムや有用物質生合成酵素の生物情報基盤構  
築に関する研究

指導教員 \_\_\_\_\_ 佐竹 炎 \_\_\_\_\_

(注) 2, 000 字~4, 000 字でまとめること。

## 第1章 (序論)

除虫菊 (*Tanacetum cinerariifolium*) が作る種特異的二次代謝産物のピレトリン類とその合成類縁体であるピレスロイドは世界的に広汎で使用されている殺虫成分であり、昆虫媒介性感染症から人命を守る役割を果たしている。化学合成が困難なピレトリン類と異なり、ピレスロイドは安定的な生産が可能のため、頻繁に使用されているが、その乱用によりピレスロイド抵抗性害虫の発生が問題となっている。一方で、ピレトリン類はこのピレスロイド抵抗性害虫への効果が確認されており、将来的に需要の拡大が予想される。ピレトリン類は 6 種のエステル化合物の混合物であり、その生合成経路は完全に解明されておらず、代謝工学的な生産技術が確立していない。そのため、現在でも除虫菊の大規模栽培による物量的方法でその需要を賄っているが、今後拡大する需要を満たすために、さらなる効率的な生産方法の開発が求められる。過去の研究から、除虫菊が傷害を受けた際に放出する揮発性有機化合物 (VOCs) は近隣の無傷の除虫菊個体のピレトリン類生合成を促進させる現象が確認されており、ピレトリン類の生合成制御技術に応用できることが考えられているが、この VOCs を介したピレトリン類生産量増大メカニズムについては解明されていない。このように、植物科学の面でも、有用物質生産の面でも高い潜在的な重要性を秘める除虫菊類について本質的な研究を進展させるためには、除虫菊やその近縁種のゲノム情報とピレトリン類生合成酵素のタンパク構造情報は不可欠であることから、これら情報基盤の構築を主目的とし研究を行った。

## 第2章

除虫菊のゲノム解読を行い、全長約 7.1 Gb、N50 が 14 Kb、BUSCO 解析による完全性が 91.8%のドラフトゲノムを作成した。植物ゲノムを特徴づける重要な因子の一つである転移因子 (Transposable Element : TE) の種類と数の解析では、sire および oryco クレード TE が他のキク科植物から分岐した後に重複されたことが示され、除虫菊ゲノムの肥大化

には、この *sire* および *oryco* クレード *TE* の重複が関与していることが示唆された。遺伝子の属間比較解析では、シグナリング伝達関連タンパク質としてヒスチジinkinナーゼ、生体防御関連タンパク質としてリボソーム不活性化タンパク質 (RIP)、二次代謝関連タンパク質としてリポキシゲナーゼやシトクロム P450 が、除虫菊で特異的に重複しているタンパク質スーパーファミリーとして検出された。VOC 誘導性のシグナル伝達機能を有する *Arabidopsis thaliana* のエチレンレセプター *AtETR1* はヒスチジinkinナーゼファミリーに属することから、除虫菊におけるヒスチジinkinナーゼの重複は、ピレトリン類の VOCs 依存的調節機構を解明する上での決定的な手掛かりとなりうる。RIP は生体防御成分として様々な生物が産生するタンパク質であり、RIP の重複は除虫菊の生体防御機構の特徴と考えられる。さらに、セイヨウニワトコの殺虫性 RIP である *SNA-I* (*Sambucus nigra* agglutinin I) と同一性を有する RIP が検出されたことから、除虫菊は対食植性昆虫防御成分としてピレトリン類だけでなく、RIP も利用していることが示唆された。一方で、対真菌防御成分とされるエンドキチナーゼの数が除虫菊では他の植物よりも少なかった。これらの結果は、除虫菊が原産地であるバルカン半島の乾燥した気候を反映した防御機構を構築してきたことを示唆している。ピレトリン類生合成関連酵素の系統解析では、特に *TciGLIP* (*T. cinerariifolium* GDSL (Gly-Asp-Ser-Leu モチーフ) リパーゼ) において、同じタンパク質ファミリーで配列同一性の高い GDSL リパーゼが除虫菊ゲノム内で大量に重複されたことが示された。さらに、*TciGLIP* の分布解析では、*TciGLIP* をコードする遺伝子座の近傍に、他の機能未知な GDSL リパーゼをコードする遺伝子が共局在することが示された。これらの結果は、未解明のピレトリン類生合成酵素の解明への手掛かりとなる。

### 第3章

除虫菊の近縁種であるアカバナムシヨケギク (*Tanacetum coccineum*) は、除虫菊と同様にピレトリン類を生合成するが、その産生量はかなり少ない。そこでアカバナムシヨケ

ギクのゲノム解析を行い、除虫菊のゲノムとの比較を行うことで、ピレトリン類生合成関連酵素をはじめとする特徴の違いを比較ゲノム科学的に解析した。アカバナムシヨケギクにおいて、全長約 9.46 Gb、N50 が 27.8 Kb、BUSCO 解析による完全性が 97.8%のドラフトゲノムを作成した。除虫菊の既知のピレトリン類生合成関連酵素について、アカバナムシヨケギクゲノム内での存在を確認したところ、いずれの酵素についても高い配列相同性を有する対応した酵素が検出された。ピレトリン類生合成関連酵素をコードする遺伝子のシンテニー解析を行ったところ、第 2 章で見られた除虫菊における TciGLIP の遺伝子座付近の GDSL リパーゼの重複が、アカバナムシヨケギクの TcoGLIP (*T. coccineum* GDSL リパーゼ、TciGLIP の同族体) 遺伝子座においても見られたが、上流および下流領域においてそのシンテニーが除虫菊と異なり、この領域が祖先植物から除虫菊とアカバナムシヨケギクに分かれた後に転座した可能性が示唆された。この近傍領域の違いは、Tci(o)GLIP をコードする遺伝子の発現調節、ひいてはピレトリン類産生量の違いを解明する手掛かりになることが考えられる。遺伝子の属間比較解析では、除虫菊と同様に、アカバナムシヨケギクゲノムにおいても RIP が重複していることが示され、その数は除虫菊のそれを上回っていた。一方で、RIP を分類して解析すると、毒性の弱い I 型 RIP はアカバナムシヨケギクで、毒性の強い II 型 RIP は除虫菊で多いことが示された。さらに、対真菌防御因子であるエンドキチナーゼの数は、アカバナムシヨケギクでは他の植物種と同程度であり、2 章で示された除虫菊におけるエンドキチナーゼ数の少なさをより強調する結果となった。この RIP 構成の違いやエンドキチナーゼ数の違いは、除虫菊とアカバナムシヨケギクの防御機構がそれぞれの原産地の自然環境に合わせて進化し、多様化していることを示唆している。二次代謝関連酵素については、除虫菊ゲノムと同様にアカバナムシヨケギクゲノムにおいても、一部のピレトリン類生合成酵素を含む、リポキシゲナーゼやシトクロム P450 スーパーファミリータンパク質が重複していることが確認された。シグナリング伝達関連タンパク質のヒスチジンキナーゼは、除虫菊でみられた重複傾向がアカバナムシヨケギクではみ

られなかった。除虫菊とアカバナムシヨケギクにおけるヒスチジンキナーゼの数とピレトリン類の産生量の多寡は相関性があり、2章で示唆された除虫菊ゲノムにおけるヒスチジンキナーゼの重複化とピレトリン類の VOCs 依存的生合成調節機構との関連性を裏付ける結果となった。以上、除虫菊とアカバナムシヨケギクのゲノム比較から防御機構をはじめとする遺伝的特徴の違いが明らかになり、さらにこれら 2 種の植物のピレトリン類産生量の違いを解明する上での手掛かりを得ることができた。

#### 第 4 章

TciGLIP はピレトリン I の生合成において最終のエステル化反応を担う重要な酵素である。TciGLIP が属する GDSL エステラーゼ/リパーゼファミリータンパク質 (GELPs) は一般的にエステラーゼ活性を有しているが、数種の GELPs は TciGLIP のようにトランスフェラーゼ活性を示す。そこで、除虫菊がピレトリン類生合成能を獲得するにあたり、TciGLIP がトランスフェラーゼ活性を獲得した鍵となる部位を *in silico* 解析を用いて特定した。TciGLIP および TcoGLIP を含む 4 種のトランスフェラーゼ活性が報告されている GELPs (tr-GELPs) およびエステラーゼ活性が報告されている 6 種の GELPs、さらに BLASTP で得られた 274 種の推定 GELPs のアミノ酸配列を用いてアラインメントを作成し、two entropy 解析を用いて tr-GELPs に特徴的なアミノ酸残基を調べたところ、[N/R]208 および D484 がトランスフェラーゼ活性に重要な残基候補として検出された。分子系統解析を行ったところ、tr-GELP は tr-GELPs 以外の他の GELPs と同じクラスターに属し、そこに属するほとんどの GELPs は [N/R]208 または D484 の少なくとも一つを有していた。この結果から、tr-GELP はそれぞれの植物種の GELP から遺伝子変異により誕生したことが明らかになった。また、TciGLIP について、ColabFold を用いたタンパク質構造予測と AutoDock Vina を用いた基質結合シミュレーションを用いて、TciGLIP の活性中心に基質が接近できる合理的モデルの数を調べたところ、これら 2 つの候補残基の Ala 変異体の合

理的モデルの数は、天然型の TciGLIP の合理的モデルの数と比較して有意に少なく、この結果は、これら 2 つの残基が TciGLIP のトランスフェラーゼ活性に重要な残基であることを示唆していた。TciGLIP のこれら 2 つの候補残基の変異によるトランスフェラーゼ活性への影響の実験的検証は、現在進行中である。

## 第 5 章 (総括)

本研究では、除虫菊および近縁種のアカバナムシヨケギクのゲノム解析を行い、それらと比較することで、ピレトリン類の生合成機構やタンパク性の抗菌因子などによる防御機構の違いを明らかにした。また、ピレトリン類生合成の鍵酵素である TciGLIP について、その活性に重要な部位を *in silico* 解析で特定した。これらの知見は、ピレトリン類の生合成経路とその制御機構の完全解明、ならびに、外敵に対する新たな防御因子発見への手がかりとなる。特に取り組むべき課題として、未解明のピレトリン類生合成酵素の同定や、除虫菊の部位・時期・条件による関連遺伝子群の発現量とピレトリン類生合成量との相関を詳細に解析することで、生合成機構の全容を解明していく方針である。さらに、本研究で得られたゲノムや生合成酵素の生物情報学的な基盤は、遺伝子改変個体の創出やそれらの栽培の最適化にも大きく貢献することが期待される。たとえば、除虫菊ゲノム情報を活用し、ピレトリン類の収量に関与した遺伝子マーカーのような分子育種ツールの開発や遺伝子改変技術の確立といった応用研究へ展開させ、最終的には、ピレトリン類高生産除虫菊株の創出や合成生物学的手法などを駆使した大量生産体制を構築することで、世界的な昆虫媒介性感染症の被害の根絶に貢献することを目指していきたい。

氏名	山城 敬範		
論文 題目	除虫菊類のゲノムや有用物質生合成酵素の生物情報基盤構築に関する研究		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	佐竹 炎
	副査	教授	萩野 千秋
	副査	教授	山地 秀樹
	副査		
	副査		
要 旨			
<p>概要</p> <p>本研究では、蚊取り線香の主成分であり、様々な殺虫剤や除虫剤に利用されている天然有機化合物、ピレトリン類を生成する除虫菊 (<i>Tanacetum cinerariifolium</i>)、および、その近縁種でありながらピレトリン類をわずかししか生成しないアカバナムシヨケギク (<i>Tanacetum coccineum</i>) のゲノム解読と比較ゲノム解析を行い、これらの植物の生物学的・進化生物学的特性とピレトリン類生合成の制御機構における基盤を構築した。さらに、ピレトリン類生合成における鍵酵素、TciGLIP (<i>T. cinerariifolium</i> GDSL(Gly-Asp-Ser-Leu motif) lipase) の構造を <i>in silico</i> で解析することで、同酵素の活性に必須のアミノ酸残基を解明する知見を得た。本審査では、予備検討委員会で指摘を受けた学位論文草稿の修正、および追加記載項目について以下の様に確認を行った。</p> <p>第1章では、除虫菊の特異的二次代謝物であるピレトリン類の化学構造、生合成経路、および蚊に対する天然殺虫剤としての有効性と、世界中で広く使用されているピレトリン類の合成類縁体であるピレスロイドに耐性を有する蚊が出現しているため、ピレトリン類の社会需要が大きくなっているという背景を概説した。特に、天然ピレトリン類の増産の基礎となる除虫菊の生物学的特質やピレトリン類生合成の制御機構を解明する必要性を概説している。</p> <p>第2章では、除虫菊 (<i>T. cinerariifolium</i>) のドラフトゲノム解読と、そのゲノム科学的特徴について論述している。本研究により、完全性が91.8%の全長約7.1 Gb、N50が14 kbの除虫菊ドラフトゲノム配列を解読した。次に、ゲノム内の転移因子 (TE) を解析し、他の植物と比較したところ、除虫菊では、sire および oryco クレイド TE が他のキク科植物から分岐後に多く重複されたことが示された。したがって、この遺伝子重複により除虫菊ゲノムが肥大化したと推定される。遺伝子の属間比較解析により、シグナリング伝達関連タンパク質のヒスチジンキナーゼ、生体防御関連タンパク質のリボソーム不活性化タンパク質 (RIP)、二次代謝関連酵素の TciGLIP、リポキシゲナーゼ、シトクロム P450 などのファミリー遺伝子が、除虫菊で特異的に重複していることが判明した。揮発性有機化合物 (VOCs) によりピレトリン類の生成が誘導されること、および、VOC と反応してシグナル伝達を駆動するシロイヌナズナのエチレンレセプター AtETR1 はヒスチジンキナーゼファミリーに属するという既知の研究結果から、除虫菊におけるヒスチジンキナーゼの重複とピレトリン類生合成制御機構の確立との関連が示唆され、ピレトリン類の VOC 依存的調節機構を解明する上での重要な生物学的情報の基盤となることが期待される。RIP は生体防御成分として様々な産生されるタンパク質であることから、RIP の種特異的な重複は除虫菊の生体防御機構の特徴と考えられた。さらに、セイヨウニワトコの殺虫性 RIP である SNA-I (<i>Sambucus nigra</i> agglutinin I) と相同性を有する RIP が多数検出されたことから、除虫菊は対食植性昆虫防御成分としてピレトリン類だけでなく、RIP を重複することで防御機構を強化していることが示唆された。一方で、対真菌防御因子であるエンドキチナーゼの数が除虫菊では他の植物よりも少なかったこともわかった。これらの結果は、除虫菊が原産地であるバルカン半島の乾燥した気候を反映した防御機構を構築してきたことを示している。加えて、ピレトリン類生合成関連酵素の分子系統解析により、特に TciGLIP の同族体遺伝子が除虫菊ゲノム特異的に大量に重複されたことが示された。この結果は、ピレトリン類による防虫機構が除虫菊特異的であることを支持する。また、TciGLIP の分布解析で、TciGLIP をコードする遺伝子座の近傍に、他の機能未知な同族体をコードする遺伝子が存在することが示された。この結果は、未解明のピレトリン類生合成酵素の同定につながる。</p>			

氏名	山城 敬範
----	-------

この研究内容に関しては、英文雑誌に以下の様に掲載されたことを確認した。

Yamashiro T., Shiraishi, A., Nakayama K., Satake H. (2019) Draft genome of *Tanacetum cinerariifolium*, the natural source of mosquito coil. *Sci Rep.* 9(1), 18249.

第3章では、除虫菊の近縁種でありながら、ピレトリン類生合成量をはるかに低いアカバナムシヨケギク (*T. coccineum*) のドラフトゲノムを解読し、除虫菊のドラフトゲノムと比較解析することにより、アカバナムシヨケギクのゲノム科学的特徴を解明するとともに、ピレトリン類生合成の違いをゲノムワイドに解明することを目的とした研究について論述している。本研究により、完全性が97.8%の全長約9.46 Gb、N50が27.8 Kbのドラフトゲノムを解読した。同ゲノム内においてピレトリン類生合成関連酵素高い配列相同性を有する対応した酵素が検出されたため、アカバナムシヨケギク内においてもピレトリン類生合成関連酵素が揃っていることが示された。一方、TciGLIP とそのアカバナムシヨケギクと同族体、TcoGLIP とではシステニーが異なることから、この違いによりアカバナムシヨケギクではGLIPの発現量が低くなり、最終的にはピレトリン類生合成量が少ない原因であると推定された。さらに、除虫菊で検出されたヒスチジンキナーゼ遺伝子重複がアカバナムシヨケギクでは検出されなかったため、2章で示唆された除虫菊ゲノムにおけるヒスチジンキナーゼの重複化とピレトリン類の VOCs 依存的調節機構との関連性を裏付ける結果となった。RIP についてゲノム比較解析をした結果、毒性の弱いI型RIPはアカバナムシヨケギクで、毒性の強いII型RIPは除虫菊で多いことが判明した。さらに、対真菌防御因子であるエンドキチナーゼの数は、アカバナムシヨケギクで他の植物種と同程度であり除虫菊より多くコードされていた。これらの結果は、RIPやエンドキチナーゼ数の違いは、除虫菊とアカバナムシヨケギクの防御機構がそれぞれの原産地の自然環境に合わせて進化し、多様化していることを示唆している。以上の除虫菊とアカバナムシヨケギクのゲノム比較解析から、ピレトリン類生成などの防御機構関連遺伝子のゲノムレベルでの種特異性が明らかになり、ピレトリン類産生量の違いを分子レベルで解明する基盤を構築できた。

この研究内容に関しては、英文雑誌に以下の様に掲載されたことを確認した。

Yamashiro T., Shiraishi, A., Nakayama K., Satake H. (2022) Draft genome of *Tanacetum Coccineum*: genomic comparison of closely related *Tanacetum* Family Plants. *Int J Mol Sci.* 23(13), 7039.

第4章では、TciGLIPのトランスフェラーゼ活性に必須のアミノ酸残基を *in silico* で解析した研究について論述している。TciGLIPが属するGDSLリパーゼ/エステラーゼファミリータンパク (GELPs) はエステラーゼ活性を有しているが、数種のGELPsはTciGLIPのようにトランスフェラーゼ活性を示す。そこで、TciGLIPおよびTcoGLIPに加え、トランスフェラーゼ活性が報告されている計4種のGELPs(tr-GELPs)、基質既知のエステラーゼ活性を有する6種類のGELPs、さらにBLASTPで得られた274種の推定GELPsのアミノ酸配列アラインメントを作成し、two-entropy解析したところ、[N/R]208およびD484がtr-GELPsのトランスフェラーゼ活性に重要な残基候補として検出された。分子系統樹解析の結果、tr-GELPはtr-GELPs以外の他のGELPsと同じクラスターに属し、そこに属するほとんどのGELPsは[N/R]208またはD484の少なくとも一つを有していた。この結果から、tr-GELPはそれぞれの植物種のGELPから遺伝子変異により誕生したことが判明した。さらに、TciGLIPについて、ColabFoldを用いてタンパク質構造を予測し、AutoDock Vinaにより基質結合シミュレーションを行った結果、上記の二つのアミノ酸残基部位の一つでもAla変異を導入すると、活性中心に基質が接近できる合理的モデルの数は、天然型のTciGLIPと比較して劇的に減少することがわかった。これらの結果は、同アミノ酸残基がTciGLIPのトランスフェラーゼ活性に必須であることを示唆している。

この研究内容に関しては、英文雑誌に以下の様に掲載されたことを確認した。

Yamashiro T., Shiraishi, A., Nakayama K., Satake H. (2022) Key amino acids for transferase activity of GDSL lipases. *Int J Mol Sci.* 23(23), 15141.

第5章では、本研究で得られた知見がピレトリン類の生合成経路とその制御機構の完全解明、ならびに、外敵に対する新たな防御因子発見への手がかりとなること、さらに、遺伝子改変個体の創出やそれらの栽培の最適化に大きく貢献し、ピレトリン類をはじめとする有用物質の分子育種法の確立などの応用研究への展望を論述している。

以上のように、本研究は、ほとんど不明だった除虫菊類のゲノム科学的特徴や防御機関連因子を解明し、ゲノム編集体や遺伝子組換え体の作製、および、人工的に活性を制御した酵素の開発による代謝工学的な有用物質の生産への道を拓いた。提出された論文は工学研究科学学位論文評価基準を満たしており、学位申請者の 山城敬範 は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。