ミニレビュー

ゲノム研究から見えてきた昆虫カルボキシルエステラーゼの特徴

塩月孝博*・坪田拓也

独立行政法人 農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域

(平成22年8月3日受理)

Keywords: carboxyl/cholinesterase (CCE), gene function.

はじめに

分子生物学の進展に伴い、その方法の確立と簡便化からさまざまな生物種のゲノム解析が進んでいる。それに伴い、生理生化学研究にもこれまでとは違った逆遺伝学的アプローチによる新展開が導かれている。昆虫においては、キイロショウジョウバエに始まり、ハエ目のネッタイシマカ、ガンビエハマダラカ、ハチ目のセイヨウミツバチ、甲虫目のコクヌストモドキで、チョウ目の中ではカイコでゲノムが解読されデータベースが整備された。さらに2010年になり、ハチ目のキョウソヤドリコバチとカメムシ目のエンドウヒゲナガアブラムシのゲノムのドラフトが発表された。ゲノム解読が終了、あるいは進行中の昆虫種のリストをTable 1に示す。こうしていくつか複数の目にわたって全遺伝子が明らかになると、昆虫における遺伝子の特徴が見えてきた。すなわち、広く昆虫や動物に共通なものから、昆虫内では共通だが昆虫に固有な生活史や環境適応等の多様性に関与するものなどがわかってきた。殺虫剤等の解毒代謝に関わるカルボキシルエステラーゼについても、その遺伝子群の配列とその系統樹解析から、昆虫のカルボキシルエステラーゼの特徴が明らかにされつつある。そこで、その遺伝子解析の側面から考察したい。

1. 昆虫ゲノム解読状況と カルボキシルエステラーゼ遺伝子

前述のように、ハエ目で14種 (*Drosophila* 族12種とガンビエハマダラカ、ネッタイシマカ)、ハチ目で2種、甲虫目、チョウ目、カメムシ目でそれぞれ1種のゲノム解読情報が公開されている。遺伝子レベルでは、カルボキシルエステラーゼはコリンエステラーゼと合わせた一つのグループ：カルボキシル/コリンエステラーゼ (CCE) として位

置づけられている。酵素 (EC) 番号は、反応機構と基質から分類されたものである。遺伝子の配列によるグルーピングと EC 番号による分類は必ずしも一致しない。実際に、EC.3.1.1 (カルボン酸エステル加水分解酵素) は、生体内基質のグループごとに4桁目の番号が割り振られ、現時点で74グループがある。いわゆるカルボキシルエステラーゼ (3.1.1.1), アリルエステラーゼ (3.1.1.2) アセチルコリンエステラーゼ (3.1.1.7) の他、リパーゼ、ホスホリパーゼも含まれる。さらにアリエステラーゼ、 α -エステラーゼ、 β -エステラーゼという分類も、基質の細分化によるサブグルーピングといえよう。

さて、遺伝子配列レベルでの CCE に分類されるものは、キイロショウジョウバエで35、ガンビエハマダラカで44、ネッタイシマカで56、セイヨウミツバチで24、キョウソヤドリコバチで41、コクヌストモドキで48、エンドウヒゲナガアブラムシで28であるのに比べて、カイコでは73遺伝子と明らかに多いことがわかった¹⁾。同じチョウ目のオオタバコガの EST・プロテオーム解析でも、CCE 遺伝子が多いことが示唆されている²⁾。ただし、この遺伝子数には、活性中心のモチーフを欠くなど酵素活性を示さない可能性がある疑似遺伝子を含む。アミノ酸配列に基づいた系統樹解析により、Oakeshottらは14のグループに分けることを提唱しており³⁾、2010年に解読完了したキョウソヤドリコバチとエンドウヒゲナガアブラムシを加えても、この14グループでの分類が可能であった¹⁾。ゲノム解読の終了した5目8種 (*Drosophila* 近縁種を除く) を中心とする系統樹解析結果を見ると、それぞれの昆虫種に単独の遺伝子から成るグループと、ほとんどがある目の昆虫種由来の遺伝子から成るグループの2つの特徴的なパターンがあることがわかった。前者はアセチルコリンエステラーゼ (AChE) や幼若ホルモンエステラーゼ (JHE) のように機能が明確な場合が多く、後者は目ごとに固有の生活史や栄養形態に応じた分子進化の結果と考えられる。

* 〒305-8634 つくば市大わし1-2
E-mail: shiotsuk@affrc.go.jp
©Pesticide Science Society of Japan

Table 1. ゲノム解読が終了, あるいは進行中の昆虫種。
(NCBI のリストから: 2010.8.18 時点)

<p>[Completed]</p> <p><u>ハエ目</u></p> <p><i>Drosophila simulans</i> — オナジショウジョウバエ <i>Drosophila virilis</i> — クロショウジョウバエ</p> <p>[Draft assembly]</p> <p><u>ハエ目</u></p> <p><i>Drosophila ananassae</i> — アナナスショウジョウバエ <i>Drosophila erecta</i> — キリシマキノコショウジョウバエ <i>Drosophila grimshawi</i> — (ハワイ産ショウジョウバエ (ハワイ固有種)) <i>Drosophila melanogaster</i> — キイロショウジョウバエ <i>Drosophila mojavensis</i> — (ショウジョウバエの一種) <i>Drosophila persimilis</i> — (ショウジョウバエの一種) <i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i> — ウスグロショウジョウバエ <i>Drosophila sechellia</i> — セイシェルショウジョウバエ <i>Drosophila willistoni</i> — (ショウジョウバエの一種) <i>Drosophila yakuba</i> — (ショウジョウバエの一種) <i>Aedes aegypti</i> — ネットアイシマカ <i>Anopheles gambiae</i> — ガンビアハナダラカ <i>Culex quinquefasciatus</i> — ネットアイエカ</p> <p><u>ハチ目</u></p> <p><i>Apis mellifera</i> — セイヨウミツバチ <i>Atta cephalotes</i> — ハキリアリ <i>Nasonia vitripennis</i> — キョウソヤドリコバチ <i>Nasonia giraulti</i> — (キョウソヤドリコバチ近縁種) <i>Nasonia longicornis</i> — (キョウソヤドリコバチ近縁種)</p> <p><u>甲虫目</u></p> <p><i>Tribolium castaneum</i> — コクヌストモドキ</p> <p><u>チョウ目</u></p> <p><i>Bombyx mori</i> — カイコ</p> <p><u>シラミ目</u></p> <p><i>Pediculus humanus corporis</i> — コロモジラミ</p>	<p><u>カメムシ目</u></p> <p><i>Rhodnius prolixus</i> — サシガメ <i>Acyrtosiphon pisum</i> — エンドウヒゲナガアブラムシ</p> <p>[In Progress]</p> <p><u>ハエ目</u></p> <p><i>Ceratitis capitata</i> — チチュウカイミバエ <i>Cochliomyia hominivorax</i> — ラセンウジバエ <i>Anopheles darlingi</i> — (ハマダラカ属 中南米) <i>Drosophila albomicans</i> — アカショウジョウバエ <i>Drosophila mauritiana</i> — モーリシャスショウジョウバエ <i>Haematobia irritans</i> — ノサシバエ <i>Lutzomyia longipalpis</i> — スナバエ <i>Mayetiola destructor</i> — コムギタマバエ</p> <p><u>ハチ目</u></p> <p><i>Apis florea</i> — コミツバチ <i>Bombus terrestris</i> — セイヨウオオマルハナバチ <i>Trissolcus basalis</i> — (タマゴクロバチの一種) <i>Camponotus floridanus</i> — (オオアリの一種) <i>Linepithema humile</i> — アルゼンチンアリ <i>Pogonomyrmex barbatus</i> — アカシュウカクアリ <i>Solenopsis invicta</i> — (アカ) ヒアリ <i>Harpegnathos saltator</i> — (アリ Jerdon's jumping ant インド)</p> <p><u>チョウ目</u></p> <p><i>Bicyclus anynana</i> — (ジャノメチョウの一種)</p> <p><u>カメムシ目</u></p> <p><i>Myzus persicae</i> — モモアカアブラムシ</p> <p><u>シラミ目</u></p> <p><i>Bemisia tabaci</i> — タバココナジラミ <i>Diaphorina citri</i> — ミカンキジラミ</p> <p><u>シロアリ目</u></p> <p><i>Psammotermes</i> — (プサモテルメス種)</p>
--	---

2. AChE 遺伝子と JHE 遺伝子

これらの中で最も生化学的および分子生物学的に研究が進んでいるのは AChE である。殺虫剤の作用点分子として、そして抵抗性機構の因子として、その研究の歴史は長い。多くの昆虫種で性質の異なる 2 つの AChE があること、抵抗性発現では、その内の一つが関わっていること、などが明らかとなっており、詳細は本ミニレビューの古崎のもの

を参照されたい。その AChE 遺伝子については、一つの昆虫種の中で、先に見つかった方が 1 型 (AChE-1)、後から見つかった方が 2 型 (AChE-2) と命名される場合や、1 種しかないキイロショウジョウバエの AChE 遺伝子 (*ace*) に相同性が近い遺伝子を 1 型 (AChE-1) とする場合など、配列の相同性と 1 型/2 型は必ずしも関連性がなく、混乱していた。そこで河野らは、遺伝子の類似性による命名法を提案した。キイロショウジョウバエの AChE 遺伝子 (*ace*) は

1種しかないので、これに類似性の高いオルソログスなもの (*ace-orthologous*) を AO-AChE, もう一方の類似性の低いパラログスなもの (*ace-paralogous*) を AP-AChE とした⁴⁾. 1型/2型という表現を使わず, かつ混乱を防ぐ系統的命名法として期待される. AO-, AP-AChE はそれぞれ, 各昆虫種に単独遺伝子でのクラスタを形成し, 相互の類似性よりも, AO, あるいは AP の中での類似性が高いこと, それらのクラスタの中に類似遺伝子はないことが明らかとなった.

一方, JHE 遺伝子には配列の相同性の高い類縁遺伝子が数種あることがわかってきた. キイロショウジョウバエ⁵⁾ とカイコ⁶⁾ の類縁遺伝子については, 遺伝子の配列と発現解析とともに, リコンビナントタンパク質による機能解析の結果から, 幼若ホルモン (JH) を特異的に分解する JHE は各昆虫種に単独遺伝子として存在すると推定される. 過去の酵素精製による生化学的な単離による結果でも, それぞれの種における機能的 JHE について複数の分子が存在する例は報告されていない. JH の分解に関わるもう一つの酵素, JH 特異的エポキシドヒドラーゼについては, 複数の遺伝子が機能していることとは対照的である^{7,8)}. また JHE 遺伝子では, チョウ目の JHE 遺伝子はチョウ目以外の JHE 遺伝子から独立している. チョウ目以外では, 甲虫目, ハエ目, バッタ目のものは相互の配列相同性は高いが, それ以外の JHE 遺伝子はまたさらに別のグループに分類された. AChE の場合, その基質のアセチルコリンは共通なのに対して, JH には構造の異なるタイプが存在し, チョウ目では JH I と II, その他の目の多くでは JH III, 高等なハエ目では JH III bisepoxide (JHB₃) で, 最近, カメムシ目のチャバネアオカメムシでは, JHB₃ とは2つのエポキシ環のうち1つの位置が異なる JH III skipped bisepoxide (JHSB₃) であることが発見された. その JH のタイプと JHE 遺伝子の系統樹に相関があることから, 基質認識と共に JHE が分子進化したものと推測される.

3. その他のカルボキシルエステラーゼ遺伝子

エステラーゼの長い研究の歴史の初期において, アイソザイムを区別するため, カルボキシルエステラーゼの一般的な基質として用いられる α -酢酸ナフチルと β -酢酸ナフチルの基質選択性の違いにより命名された. α -エステラーゼは両者を分解し, β -エステラーゼは β -酢酸ナフチルしか分解できないものを指した. ショウジョウバエでそれらの遺伝子が単離され, それぞれの遺伝子配列に相同性が高いものが系統樹上で α -, および β -エステラーゼと呼ばれている. 遺伝子分類における α -, および β -エステラーゼという名前と本来の基質選択性との関係は十分に調べられていないので, その関係は必ずしも一致しない可能性がある. さて, 14 の遺伝子グループの中で, 最も大きなグループがこの α -エステラーゼである. 目ごとに1~3のサブグループが

あるので, 未だ解読されていない目の α -エステラーゼは新規のサブグループを形成する可能性がある. 目ごとに独立したサブグループを形成しているということは, 昆虫の進化の過程で, 目に分化したあとに α -エステラーゼ遺伝子が多様化したものと考えられる. これは, 遺伝子のエクソン/イントロン構造が保存されていたり, 遺伝子座上でのクラスタが形成していたりする場合が多いことから, 一つの遺伝子が重複して出来た可能性が高いことを示す. したがって, それらは, それぞれの目に固有の生理に対応した酵素群と考えられ, その中のいくつかは殺虫剤を分解し, さらに抵抗性に関わる例も報告されている.

β -エステラーゼには二つのグループがあり, フェロモン分解酵素のほか, 殺虫剤分解と抵抗性発達に関わる例も知られる. この β -エステラーゼで特徴的なのは, チョウ目の遺伝子がほとんどないことである. 例外的に一つのカイコの遺伝子が存在し, チョウ目のポリフェムス蚕と甲虫目のマメコガネのフェロモン分解酵素に相同性が高いことがわかった. ポリフェムス蚕とマメコガネは酢酸エステル構造のフェロモンをもち, それらの遺伝子は成虫オスの触角で特異的に発現しているのに対し, カイコの場合はボンピコールとボンピカールを主体としエステル構造のフェロモンを持たないこと, 成虫の触角ではその遺伝子発現はほとんど認められないことなど, 特徴が大きく異なっていた. しかし一つの可能性として, カイコの先祖はエステル構造のフェロモンを利用していたが, 進化の過程で失われたということも考えられる.

α -エステラーゼに次いで大きなグループを形成しているには, チョウ目特異的エステラーゼ遺伝子で, 他の昆虫種のものから独立し特徴的と考えられる大きなクラスタを形成していた¹⁾. カイコの場合, カルボキシルエステラーゼの6割以上はこのカイコのグループのものであった. このグループのカルボキシルエステラーゼ遺伝子の多くは中腸で発現していることがわかった⁹⁾. 他の解読された昆虫と比べて幼虫期の摂食様式が食植性と大きく異なることから, 生体内へ取り込む食餌中の化合物の解毒代謝, すなわち植物成分の消化や植物由来の二次代謝物の解毒分解に関わるものと考えられた. そしてそれらの遺伝子はゲノムの遺伝子座の物理的地図上でも近傍に複数が存在しクラスタを形成していることから, 一つの遺伝子の重複により分化してきたものと推測される⁹⁾.

α -エステラーゼ, β -エステラーゼ, チョウ目特異的エステラーゼは, 植物の二次代謝物の解毒代謝のほか, 病原微生物に対する先天性の生体防御機構の一部としても機能している可能性がある. そのため, それらの基質選択性は低いと考えられ, この中のいくつかは殺虫剤の解毒分解に関わるようになったものではないかと推測される.

4. 酵素活性を持たない カルボキシエステラーゼ遺伝子

全体的な配列の相同性から CCE 遺伝子とされるが、その中にはエステル分解活性をもつことが期待されない分子もある。CCE はいわゆるセリン酵素で、酵素活性中心に Ser-His-Glu/Asp の触媒 3 残基を有するが、その一つ以上を持たないものには加水分解活性は無い。CCE のグループの中で、gliotactin, neurotactin, neuroligin はエステル分解活性でなく、細胞接着など別の生理活性を持つものとして知られるグループもある¹⁾。それらは機能的に保存されているので、一種に一遺伝子、あるいは、neurotactin のハエ目で二遺伝子、neuroligin では五つのサブグループ (*nlg-1~nlg-5*) ごとに一つずつの遺伝子がほぼ全部の昆虫種で認められるように、セットとして存在し類似遺伝子を持たない。未だ機能も分かっていない遺伝子グループには、同様に類似遺伝子を持たず、一昆虫種に一遺伝子のタイプのものもある。それらは何らかの特定の生理的な役割を担っている可能性が高いため、その機能究明が待たれる。こうした機能性分子は、これまでにない害虫制御剤の新しい標的分子となる可能性を秘めている。

おわりに

これまでは酵素の性質や活性を指標とする生化学的手段により精製してから遺伝子を解析するという研究方法に対して、ゲノム解読が進むことにより、類縁遺伝子の網羅的解析から機能解析へと向かう逆遺伝学的な手法が可能となってきた。その機能解析の方法としては、遺伝子のノックアウト/ノックダウン法や RNAi 法により遺伝子発現を抑制した場合、あるいは形質転換法などにより対象遺伝子を過剰に発現させた場合に生じる表現型を調査することが、最も直接的である。生化学的側面からでは、リコンビナントタンパク質を発現させ、本来の酵素として機能しているかを調べることが直接的である。その際、関連基質を対象とした場合の親和性や反応速度など速度論的解析により、最も酵素機能が高いのはどの遺伝子産物で複数存在するのか、また基質の選択性などから酵素としての性質はそれぞれどう違うか、など生理学的な役割が推定できる。また定量的 PCR 法や EST データベースにより、mRNA が発現している組織・時期が特定できれば、間接的ではあるが、およそその生理機能が推測出来る場合もある。それらの情報を統合してようやく、ある特定の機能を担っているタンパ

ク質とその遺伝子が特定される。殺虫剤の解毒分解に関わる CCE についても同様の方法によって特定することは可能で、さらに各種殺虫剤等を処理した個体における遺伝子発現の誘導や抑制、関連遺伝子との相互調節機構などを検討することで、各分子の関与が明らかにされるであろう。その研究においては、抵抗性の発現と発達の機構についても新発見が得られることが予想され、その情報に基づいた効果的な抵抗性管理技術の確立へつながらるものと期待される。

引用文献

- 1) T. Tsubota and T. Shiotsuki: *J. Pestic. Sci.* **35**, 310-314 (2010).
- 2) M. G. Teese, P. M. Campbell, C. Scott, K. H. J. Gordon, A. Southon, D. Hovan, C. Robin, R. J. Russell and J. G. Oakeshott: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 1-16 (2010).
- 3) J. G. Oakeshott, C. Claudianos, P. M. Campbell, R. D. Newcomb and R. J. Russell: "Comprehensive Molecular Insect Science-Pharmacology," Vol. 5, ed. by L. I. Gilbert, K. Iatrou and S. S. Gill: Elsevier, Oxford, pp. 309-381, 2005.
- 4) A. Seino, T. Kazuma, A.-J. Tan, H. Tanaka, Y. Kono, K. Mita and T. Shiotsuki: *Pestic. Biochem. Physiol.* **88**, 92-101 (2007).
- 5) E. J. Crone, T. D. Sutherland, P. M. Campbell, C. W. Coppin, R. J. Russell and J. G. Oakeshott: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 540-549 (2007).
- 6) T. Tsubota, M. Shimomura, T. Ogura, A. Seino, T. Nakakura, K. Mita, T. Shinoda and T. Shiotsuki: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 100-112 (2010).
- 7) A. Seino, T. Ogura, T. Tsubota, M. Shimomura, T. Nakakura, A. Tan, K. Mita, T. Shinoda Y. Nakagawa and T. Shiotsuki: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1421-1429 (2010).
- 8) T. Tsubota, T. Nakakura and T. Shiotsuki: *Insect Mol. Biol.* **19**, 399-408 (2010).
- 9) T. Tsubota and T. Shiotsuki: *BMC Genomics* **11**, 377 (2010).

略歴

塩月孝博 (しおつき たかひろ)

生年月日: 1961年8月5日

最終学歴: 九州大学大学院農学研究所博士課程修了

研究テーマ: 幼若ホルモン活性の発現と制御に関わるタンパク質と酵素の機能と遺伝子解析

趣味: ピアノ, 作曲

坪田拓也 (つばた たくや)

生年月日: 1979年2月20日

最終学歴: 東京大学大学院理学系研究科博士課程

研究テーマ: 遺伝子組換えカイコ作出基盤技術の開発

趣味: ソフトテニス