今日の話題

天然殺虫成分ピレスリンのエステル結合形成機構の解明 温故知新：ピレスリン生合成から学ぶGDSLリパーゼ／エステラーゼファミリー酵素の機能

除虫菊（シロバナムシヨケギク、旧学名：*Chrysanthemum cinerariaefolium*、現学名：*Tanacetum cinerariifolium*）（図1A）は天然殺虫剤ピレスリンを生合成し、それを花（子房）に蓄える。そのため、ピレスリンを高濃度で含む除虫菊の花は乾燥され、エキスをはじめとするピレスリン製剤の原料として利用される。除虫菊が殺虫成分を有することは14～15世紀にバルカン半島のダルマチア地方で発見されたと言われている。しかし、それ以前に中国で発見され、シルクロードを経てダルマチア地方に伝わったという説もあり、真の起源は定かではない。いずれにせよ、高価値な除虫菊は世界に広がり、明治時代に日本に入ってきた。当初は試験栽培にとどまっていた除虫菊は、次のようなエピソードにより一挙に日本で開花した。すなわち、1885年、大日本除虫菊株式会社初代社長・上山英一郎は、恩師福沢諭吉により紹介された H. E. Amoore に蜜柑をはじめとする植物の苗を贈った。翌年、Amoore から上山に数々の植物の種子が贈られ、そのなかに除虫菊の種子が含まれていた。除虫菊粉の効力を認識した上山は各地で種子を無償で提供し、除虫菊の栽培を奨励した。その結果、和歌山、広島、香川、北海道を中心に広く栽培されるようになり、第一次大戦から第二次大戦までの一時期、日本は世界最大の除虫菊生産国となった。

除虫菊の有用性が認識されると、ピレスリンは著名な天然物化学者から注目されるようになった。ピレスリンの化学構造の解明は1923年に理化学研究所（のちに台北帝国大学、東京農業大学教授）・山本 亮によって先

鞭がつけられ、ピレスリンの酸部の1つ、第一菊酸を酸化するとトランス-カロン酸が生じることが明らかにされた⁽¹⁾。その直後の1924年に H. Staudinger と L. Ruzicka（いずれもノーベル化学賞受賞者）によって主成分であるピレスリンI・IIの平面構造がほぼ正しく決定された⁽²⁾（複数の関連論文は文献2参照）。アルコール部の構造は後に修正されたが、現代のように優れた分析機器がない時代に達成されたこの成果は驚異的というほかはない。その後、ピレスリンのマイナー成分ジャスモリンI・II、シネリンI・IIの構造が明らかにされた。ピレスリンの立体化学についても日本の貢献は大きく、L. Crombie と S. H. Harper による第一菊酸の絶対配置の解明では⁽³⁾、(-)-パイロシンをオゾン酸化することで(+)-テレビン酸が生成するという松井正直・東京大学名誉教授らの知見⁽⁴⁾が基盤となった。一方、第二菊酸の側鎖の二重結合の幾何配置も含めた立体構造は、京都大学化学研究所武居研究室（武居三吉教授）において、井上雄三（現 京都大学名誉教授）らにより解明された⁽⁵⁾。さらにアルコール部の絶対配置も、同じく武居門下の大日本除虫菊株式会社・勝田純郎らにより決定された⁽⁶⁾。これらの研究成果にNMRやX線結晶構造のデータが加わり、ピレスリン全6種の構造が確定された。すなわち、ピレスリンはエステル化合物であり、シクロプロパン環を有する2種の酸（第一菊酸と第二菊酸）とシクロペンテノロン環を有する3種のアルコール（ピレスロロン、シネロロン、ジャスモロロン）からなる。その酸部のシクロプロパン環を構成する2つの不斉炭素の絶

図1 ■ 除虫菊 (A；左，満開の花；右，幼苗) とピレスリン全6種の構造 (B)。

対配置は 1*R*, 3*R* であり，アルコール部のヒドロキシ基を有する1位の不斉炭素の絶対配置は*S*である．そして，第二菊酸の二重結合の幾何配置は*E*である (図1B)。

除虫菊の生産は天候により左右され，ピレスリンは光や酸素によって容易に分解される．このような欠点を克服するため，家庭のみならず，日照，降雨，気温変動などの環境変化にさらされる農業条件下でも使用可能なピレスリンのアナログ，合成ピレスロイドが開発された⁽⁷⁻⁹⁾．合成ピレスロイドはマラリア感染を予防する蚊帳の製造にも利用され，今や世界の殺虫剤市場で主要な一角を担うようになった．一方除虫菊は，ケニアをはじめとする新興国での生産増加と合成ピレスロイドの勢いに押され，第二次大戦後日本から姿を消していった．

日本から除虫菊がほとんど姿を消し，ピレスリンからピレスロイドに至る化学が完成されたなかで，なぜ古典的化合物ピレスリンなのか．筆者はかつて藤田稔夫・京都大学名誉教授から合成ピレスロイドの定量的構造活性相関と作用機構に関するテーマをいただき研究した．当初は化学的に決着がつけられた天然ピレスリンには全く興味がなく，記述する機会を得てもわずか1段落にも満たない記述で済ませていた．しかし，昆虫制御の起源と機構に興味をもち合成ピレスロイドの研究を積み重ねて

いくにつれ，天然ピレスリンに対する見方は変わっていった．ピレスリンは化学的には決着がつけられていても生物学的には不明な点が多い．ピレスリンはトレンドとは対極にあるので不必要な情報が入らない．この2つを動機として，筆者は天然ピレスリンの研究に着手した．

ピレスリンの酸部是一种のモノテルペンである．M. P. Crowleyらはこの酸部の生合成の前駆物質がメバロン酸であると推定し，¹⁴Cで標識したメバロン酸を除虫菊に与え，酸部に放射活性が取り込まれると報告した^(10, 11)．しかし，取り込み率が悪い．今の常識ではテルペン類の生合成経路にはメバロン酸経路と非メバロン酸経路 (MEP) 経路があり，モノテルペン類は後者によってつくられるとされる．もしそうであるならば，Crowleyらの説は疑しい．そこで筆者らは [¹⁻¹³C] グルコースを前駆体として除虫菊幼苗に与え，ピレスリン中で標識される炭素を調べたところ，MEP経路で生合成される場合に対応する炭素が選択的に標識された．したがって，ピレスリンの酸部の生合成には主にMEP経路がかかわっていることが明らかとなった⁽¹²⁾．一方，ピレスリンのアルコール部は植物ホルモンの一種ジャスモン酸と類似の構造をもつ．ジャスモン酸は脂質を起源としてオキシリピン経路によって生合成されるので，ピレ

スリンのアルコール部も同様であろうと推測された。実際、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを前駆体とする標識実験によって、予想どおりの位置の炭素に ^{13}C が取り込まれた⁽¹²⁾。

除虫菊はヒトのためではなく昆虫から自分自身を守るためにピレスリンをつくる。その生合成が、昆虫に対する抵抗性の調節に寄与する植物ホルモン、ジャスモン酸によって調節を受けることは容易に察しがつくが、それを示しても意味がない。植物は揮発性物質によって未被害の仲間への危険を知らせ、その知らせを受けた植物は防衛機構を強化すると言われている⁽¹³⁾。揮発性シグナル分子としてのジャスモン酸メチルやサリチル酸メチルの研究も含めて、これまでの揮発性物質を介した植物の会話に関する研究では、食害や病害等のストレスによって植物から生じる揮発性物質を同定し、それぞれの物質を一定の濃度で処理したときに生じる植物の変化を調べるのが常であった⁽¹⁴⁾。しかしそれでは、自然界での状況を反映しておらず、濃度依存性の問題や、本当に揮発性物質が単独で機能するのかどうかかわからない。除虫菊にとってピレスリンは対昆虫防御物質であることは自明であり、幼苗（図1A）も花と同様にピレスリンを生合成できる。そのことを念頭に置いて、除虫菊の幼苗を用いて揮発性物質を介した植物の会話現象における未解明の問題を解くことにした。除虫菊幼苗に物理的傷害を与えると、“みどりの香り”（武居三吉による宇治の茶生葉からの青葉アルコールの発見（1933年）を源泉とし、学際的な研究の対象へと発展を遂げた、植物脂質から生成するアルコール・アルデヒド類）⁽¹⁵⁾ に属する (*Z*)-3-ヘキセナール、(*E*)-2-ヘキセナール、(*Z*)-3-ヘキセノールおよびその酢酸エステルに加えてセスキテルペンに属する (*E*)- β -ファルネセンが主要な揮発性物質として生成した。これら5種の揮発性物質を、傷害を与えた幼苗に隣接する位置で検知される濃度でブレンドし、無傷の幼苗に処理したところ、ピレスリン生合成の活性化が認められた。このような現象は、当該ブレンドの濃度を傷害葉の近辺で計測される濃度よりも1桁上下させたり、ブレンドから1つでも成分を除いたりすると見られなくなった⁽¹⁶⁾。みどりの香りや (*E*)- β -ファルネセンはほかの植物でも見られる普遍的な化合物である。すなわち、除虫菊は特有の濃度でこれらの化合物をブレンドすることで特異性のある言語をつくっているらしい。ほかの植物も同様な原理で会話を行っている可能性がある⁽¹⁴⁾。

このようにしてピレスリン生合成の外堀を埋め、いよいよ本丸へというところで、筆者はどの生合成反応を攻めるか思案した。さまざまな構造に思いをめぐらすなかで、ピレスリンやピレスロイドに関する講義を受けたことのある人が最後まで記憶のなかにとどめている構造は何かということを考えて。それは酸部とアルコール部という言葉の起源、エステル結合であろう。エステル結合は、酸部をつくるMEP経路とアルコール部をつくるオキシリピン経路を束ねる“かなめ”に位置しているので、それが生成する仕組みを解明することで大切なことがわかるに違いない。そう考えて、ピレスリンのエステル結合の形成にかかわる遺伝子の解明に挑むことにした。しかし、除虫菊のゲノムは未解読で、スマートな方法をとることができない。エステル結合の形成はアシルトランスフェラーゼによって触媒されると推定し、花のcDNAライブラリを探索してみたものの徒労に終わった。残る手段は酵素の精製である。第一菊酸CoAを合成し、別途調製したピレスロロンとともに除虫菊の蕾から調製した粗タンパク質溶液に加えたところ、ピレスリンIが生成した。このことに勇気づけられて活性本体の精製を試みた。徹夜続きの泥沼のような試行錯誤を繰り返し、ようやく除虫菊の蕾からSDS-PAGEで単一のバンドを示すわずかなタンパク質を得ることに成功した。その部分アミノ酸配列を読んだところ、部分配列はアシルトランスフェラーゼではなくGDSLリパーゼ/エステラーゼ類と相同性を示した。筆者は、その酵素はアシルトランスフェラーゼではないがアシル基転移反応を触媒する可能性をもっていると考えた。人工的にエステルを不斉合成するときしばしばリパーゼが使われるからである。そこで除虫菊から標的酵素をコードする全長cDNAをクローニングし、大腸菌で発現させたところ、果たして遺伝子産物は第一菊酸CoAとピレスロロンからピレスリンIを合成する能力を示した。

本酵素がピレスリン合成活性を示すことだけではピレスリン生合成に寄与するとは言えない。ピレスリンは酸部に2つ、アルコール部に1つの不斉炭素をもつ。このことに着目して、第一菊酸CoAの4種の立体異性体およびピレスロロンの2種の立体異性体を自前でそろえ基質特異性を調べたところ、酵素は天然の絶対配置をもつ基質を最も好むことが明らかとなった⁽¹⁷⁾。

さらに筆者らは、本酵素の加水分解活性、細胞内での局在、遺伝子発現とピレスリン含量との高い相関、遺伝

子発現の傷害誘導性などについても確認し、この「GDSLリパーゼ（エステラーゼ）・アシルトランスフェラーゼ」が実際にピレスリン合成にかかわっていることを初めて明らかにしたのである⁽¹⁷⁾。

第二次大戦後日本から姿を消していった除虫菊は今、オーストラリア、ケニア、タンザニア、ルワンダ、中国などの国々で栽培されている。近年の除虫菊の世界総生産量は、戦前の総生産量とほとんど変わらないと聞く。筆者らはピレスリンという古典的化合物をひも解くことでこのような除虫菊の現状を学び、ピレスリンのエステル結合形成の謎を探ることで典型的なアシルトランスフェラーゼではなくGDSLリパーゼ／エステラーゼファミリーに属する酵素に遭遇した。本酵素の仲間は植物のみならずほかの生物でも見られる。このような普遍性に通じる知見が得られるとは全く予想外であった。“温故知新”とはまさにこのことである。

謝辞：本研究は科学研究費補助金、私立大学学術研究高度化推進事業および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の支援を受けました。また、本研究を推進するにあたり、山口大学名誉教授・畑中顯和先生、大日本除虫菊株式会社特別顧問・勝田純郎先生、同社中央研究所所長・中山幸治博士からご指導ご鞭撻を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

- 1) 山本 亮：理研彙報，**2**, 57 (1923).
- 2) K. Matsuda: "Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide," eds. by N. Matsuo & T. Mori, Springer, 2012, p. 73.
- 3) L. Crombie & S. H. Harper: *J. Chem. Soc.*, **1954**, 470 (1954).
- 4) M. Matsui, T. Ohno, S. Kitamura & M. Toyao: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **25**, 210 (1952).
- 5) Y. Inouye, Y. Takeshita & M. Ohno: *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **19**, 193 (1955).
- 6) Y. Katsuda, T. Chikamoto & Y. Inouye: *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **22**, 427 (1958).
- 7) Y. Katsuda: *Pestic. Sci.*, **55**, 775 (1999).

- 8) Y. Katsuda: "Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide," eds. by N. Matsuo & T. Mori, Springer, 2012, p. 1.
- 9) K. Ujihara, T. Mori & N. Matsuo (eds.): "Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide," Springer, 2012, p. 31.
- 10) M. P. Crowley, H. S. Inglis, M. Snarey & E. M. Thain: *Nature*, **191**, 281 (1961).
- 11) M. P. Crowley, P. J. Godin, H. S. Inglis, M. Snarey & E. M. Thain: *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 312 (1962).
- 12) K. Matsuda, Y. Kikuta, A. Haba, K. Nakayama, Y. Katsuda, A. Hatanaka & K. Komai: *Phytochemistry*, **66**, 1529 (2005).
- 13) G. Arimura, K. Matsui & J. Takabayashi: *Plant Cell Physiol.*, **50**, 911 (2009).
- 14) H. Ueda, Y. Kikuta & K. Matsuda: *Plant Signal. Behav.*, **7**, 222 (2012).
- 15) A. Hatanaka: "Comprehensive Natural Products Chemistry," eds. by O. Meth-Cohn, D. Barton & K. Nakanishi, Elsevier, 1999, p. 83.
- 16) Y. Kikuta, H. Ueda, K. Nakayama, Y. Katsuda, R. Ozawa, J. Takabayashi, A. Hatanaka & K. Matsuda: *Plant Cell Physiol.*, **52**, 588 (2011).
- 17) Y. Kikuta, H. Ueda, M. Takahashi, T. Mitsumori, G. Yamada, K. Sakamori, K. Takeda, S. Furutani, K. Nakayama, Y. Katsuda, A. Hatanaka & K. Matsuda: *Plant J.*, **71**, 183 (2012).

(松田一彦，近畿大学農学部)

プロフィール

松田 一彦 (Kazuhiko MATSUDA)

＜略歴＞1985年京都大学農学部農芸化学科卒業／1987年同大学大学院農学研究科修士課程修了／1987年近畿大学農学部助手／1993年同講師／1998年同助教授／2005年同教授＜研究テーマと抱負＞広い視野に立って昆虫制御の普遍原理を解き明かしたい＜趣味＞蝶の収集と写真撮影