

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06854

研究課題名（和文）多様な性フェロモン分子を生み出す炭素鎖短縮メカニズムの解明

研究課題名（英文）Biosynthetic pathway for C15 conjugated diene aldehyde sex pheromone

研究代表者

上原 拓也（Uehara, Takuya）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域・研究員

研究者番号：80756023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：サザナミスズメのメスから性フェロモンとして見つかった9,11-pentadecadienalは、天然物として珍しい構造をしており、既知の性フェロモン生合成経路からは説明がつかない。本研究では、重水素で標識した脂肪酸のメス体内への取り込み実験やメス性フェロモン腺の次世代シーケンス解析を行い、生体内に普遍的に存在しているパルミチン酸を材料として本成分が生合成されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Conjugated diene aldehyde 9,11-pentadecadienal was isolated from a hawk moth *Dolbina tancrei*. Its odd-carbon chain structure is unique as a natural product, therefore the molecular mechanism for biosynthesis is unknown. In this study, chemical analysis of precursors of the sex pheromone in female moth, incorporation experiment of deuterium labeled fatty acid to the precursor and NGS analysis of sex pheromone gland revealed that the sex pheromone component was biosynthesised from a palmitic acid, which existed ubiquitously in the body.

研究分野：化学生態学

キーワード：性フェロモン 性フェロモン生合成 スズメガ 奇数炭素性フェロモン サザナミスズメ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガ類のメスは性フェロモンという特殊な揮発性化合物を放出し、オスを遠方から誘引することで交尾を成立させる。性フェロモンは種によって、成分やブレンド比が異なっており、この違いによって種の隔離が行われている。我々は、これまでスズメガというガを材料に、性フェロモンによる種の認識機構について研究してきた (Uehara et al. 2012; 2013; 2015; 2016)。その結果多くのスズメガは、炭素数が16個 (C16) で11位に二重結合を持つモノエンアルデヒド及び10位と12位に二重結合を持つ共役ジエンアルデヒドを主成分に用いていた。例えば、日本全国に分布しているベニスズメのメスは、(E)-11-hexadecenal と(10E, 12E)-10, 12-hexadecadienal という2種の成分を85:15の割合で放出しており、この成分を合成し野外で試験すると同種のオス以外誘引されなかった (Uehara et al. 2012)。つまり、スズメガもこれらの異性体の種類やブレンド比の違いによって同種を認識していることが明らかになった。

上に示した以外の化合物を性フェロモンとしているスズメガが数種存在する。エビガラスズメは、C16の共役ジエンアルデヒドという点は共通するものの、異なる位置に二重結合を持つ (11E, 13E)-11,13-hexadecadienal を性フェロモンとする (Wakamura et al. 1996)。タバコスズメガはC16の共役トリエンアルデヒド(10E, 12E, 14Z)-10,12,14-hexadecatrienal を性フェロモンの1成分としている (Tomlinson et al. 1994)。そして、我々は2013年にサザナミスズメからC15の共役ジエンアルデヒド 9,11-pentadecadienal を性フェロモンとして発見した (図1, Uehara et al. 2013)。本種の性フェロモンのように奇数個の炭素を持つガ類性フェロモンは比較的珍しい。

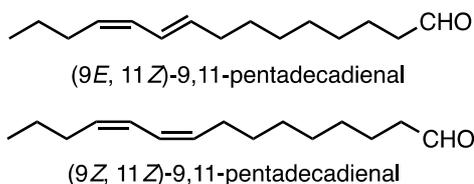


図1. サザナミスズメの性フェロモン成分。メスはEZ体とZZ体を90:10の比率で放出している。

C16性フェロモンの生合成経路は、カイコガやタバコスズメガを使った実験によって明らかになっている。カイコガの性フェロモンは、C16の共役ジエンアルコール(10E, 12E)-10,12-hexadecadienolである。本成分はC16の飽和脂肪酸であるパルミチン酸を材料として、分子に二重結合を導入する不飽和化反応、脂肪酸をアルコールにする還元反応を介して生合成される。それぞれの反応は、性フェロモン腺特異的に特異

的に発現する酵素によって触媒される。スズメガの性フェロモンの生合成は、おおよそカイコガと同一である考えられているが、アルデヒドへの合成が、還元後に酸化されるか、脂肪酸前駆体から直接変換するか未だ明らかになっていない。

サザナミスズメから見つかったC15性フェロモンの生合成の前に、生物における脂肪酸の生合成と代謝について考えたい。一般的に、生物の脂肪酸は、アセチル-CoA (C2) にマロニル-CoA (C3) が脱炭酸的に結合していくことで生合成される。つまり、2分子ずつ伸長していく。また、脂肪酸の代謝は酸化が知られるように、2分子ずつ短縮するのが一般的である。したがって、脂肪酸誘導体であるガ類性フェロモンは、多くの場合、偶数個の炭素鎖を持つ。

奇数炭素鎖をもつ性フェロモンはこれまでも同定されているが、その分子メカニズムは不明のままである。スズメガは実験昆虫としてよく用いられてきた経緯から、生理学的知見や性フェロモンの生合成機構に関する知見の蓄積がある。そこで本研究では、この利点を生かして分子機構を明らかにすることを目指した。

### 2. 研究の目的

ガ類の性フェロモン分子の多くは偶数炭素を持つ脂肪酸誘導体だが、我々はスズメガ科のサザナミスズメから奇数炭素鎖を持つ性フェロモンを発見した。この化合物がどのような物質を原料として、どのような酵素反応を介して生合成されるのか、その分子メカニズムの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 性フェロモン前駆体の分析

ガ類性フェロモンの多くは、脂肪酸から生合成されるので、性フェロモン合成器官である性フェロモン腺の脂肪酸組成を明らかにすることによって、どのような前駆体が存在するかを明らかにした。

メス腹部末端の性フェロモン腺を切除し、ジクロロメタンメタノール(2:1)溶媒に1日浸漬し、脂肪酸を抽出した。抽出物の溶媒を窒素気流下で蒸発させ、0.5N KOHメタノール溶液を加えて2時間反応させた。溶液に1.0N HClを加え、攪拌した後、溶液をエーテル抽出した。エーテル抽出物は、次にジアゾメタンで処理し、遊離脂肪酸を脂肪酸メチルエステル(FAME)に変換した。

FAMEはガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)によって、構造決定した。二重結合の存在が示唆される場合には、Dimethyl Disulfide (DMDS) や4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MTAD)等の試薬を使って誘導体化し、位置を決定した。

上記方法によって分析した、性フェロモン腺に存在する前駆体の組成から、生合成経路を推定した。

## (2) 標識脂肪酸の取込み実験

(1) で推定された生合成経路を確認するため、重水素標識化合物の性フェロモン前駆体への取り込みを調査した。

重水素標識された脂肪酸 ( $D_3$ -palmitic acid) を DMSO に溶解させ、 $20\mu\text{g}$  を明期の後半にメスのフェロモン腺に塗布した。性フェロモン放出時刻になったら、メスの性フェロモン腺を切除し、(1) と同様の方法で、抽出、メチルエステル化した。重水素標識化合物の性フェロモン前駆体への取込みは GC-MS の selected ion monitor (SIM) モードで、 $M^+$  および  $[M^++3]$  のイオンを検出し、 $[M^++3]$  の相対強度 ( $[M^++3]/M^+$ ) を比較することで明らかにした。

## (3) 次世代シーケンス分析

奇数炭素鎖性フェロモンの生合成に関わる酵素遺伝子を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いて性フェロモン腺 ( $n=2$ ) で発現する遺伝子の網羅的解析を行うとともに、他の体組織 ( $n=2$ ) と遺伝子の発現量解析を行い性フェロモン腺特異的な遺伝子を明らかにした。

## (4) 近縁種の性フェロモン分析

他に C15 化合物を性フェロモンとしている種がないか調査するため、スズメガの性フェロモン同定を進めた。

ホシヒメホウジャクの幼虫を野外から採集し、16L8D の光条件下で飼育した。蛹化後、腹部形態に基づいて、雌雄を判別した。羽化後にメスの行動を 30 分おきに 24 時間観察し、性フェロモン腺を露出させる性フェロモン放出行動 (コーリング行動) が起こる時間帯を明らかにした。コーリング行動中にメスの性フェロモン腺を切除し、ヘキサンで 20 分間抽出した。抽出物は、ガスクロマトグラフ-触角電図分析 (GC-EAD) に供し、抽出物中の生理活性成分を探索した。活性成分は、GC-MS 分析で構造決定した。生理活性は、成分の合成品を用いた野外でのオス誘引試験を行うことで確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 性フェロモン前駆体の分析

性フェロモン腺からは、表 1 の脂肪酸メチルエステルが検出された。C15 の飽和脂肪酸であるペンタデカン酸の ME が検出されたが、性フェロモン成分の直前の前駆体と考えられる 9,11-15:ME までの中間体となるような ME (10-15:ME 等) は検出されなかった。一方で、他のスズメガと同様にパルミチン酸を材料として C16 の性フェロモンを生合成する経路を採用していると仮定すると、 $16:ME \rightarrow 11-16:ME \rightarrow 10,12-16:ME$  という生合成経路の後に、1 分子短縮を介して  $10,12-16:ME \rightarrow 9,11-15:ME \rightarrow$  性フェロモン分子を生合成するという経路が考えられた。

表 1 性フェロモン前駆体のメチルエステル

炭素数	メチルエステル (ME)
C15	15:ME
	5-15:ME
	9,11-15:ME
C16	16:ME
	7-16:ME
	9-16:ME
	11-16:ME
	10,12-16:ME
C18	18:ME
	9-18:ME
	11-18:ME

## (2) 標識脂肪酸の取込み実験

(1) の実験で示唆された経路から、11-16:ME, 10,12-16:ME, 9,11-16:ME への重水素化合物の取り込みを比較した。いずれの前駆体でも  $[M^++3]$  の強度は高くなり、10,12-16:ME, 9,11-16:ME では有意に増加した (図 2)。つまり、重水素標識脂肪酸の性フェロモン前駆体への取り込みが確認できた。以上のことから、パルミチン酸を材料として不飽和化反応を経て、10,12-16:ME の炭素鎖 1 分子短縮によって奇数炭素鎖の骨格が生合成されることが明らかになった。

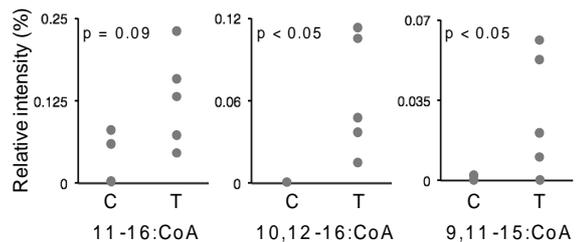


図 2. 重水素標識イオンの相対強度. 対照区と標識脂肪酸処理区の相対強度を比較した ( $n=5$ , Man-Whitney U-test).

## (3) 次世代シーケンサー分析

性フェロモン腺、脂肪体それぞれ 2 サンプル分の RNA を抽出し、Illumina HiSeq で分析した。生データをすべて合一した上で *de novo* assembly を行い、コンティグ配列を得た。この配列を用い、アノテーションおよび発現量解析を行った。その結果、性フェロモン腺で高発現している 14 の遺伝子を炭素鎖短縮に関わる候補遺伝子として絞り込んだ。

## (4) 近縁種の性フェロモン分析

ホシヒメホウジャクのオス触角は、メス抽出物中の 2 成分に対して応答した。化学分析の結果、この成分は EZ 体および EE 体の 10,12-hecadedecadienal であり、それぞれの

割合は 98:2 であった。合成性フェロモンを天然比で混合し野外に設置するとオスが誘引されたが、EZ 体のみの場合に、より多数のオスが誘引された。EE 体の比率を増加させることにより、オスの誘引活性は低下し、10%で活性はほぼ消失した。以上の結果から、ホシヒメホウジャクの性フェロモンは、(10E, 12Z)-10,12-hexadecadienal 単一成分で構成されると結論付けた。

#### < 引用文献 >

- 1) Uehara T, Naka H, Matsuyama S, Ando T, Honda H (2012) Identification and field evaluation of sex pheromones in two hawk moths *Deilephila elpenor lewisii* and *Theretra oldenlandiae oldenlandiae* (Lepidoptera: Sphingidae). Applied Entomology and Zoology 47, 227-232. DOI: 10.1007/s13355-012-0111-0
- 2) Uehara T, Naka H, Matsuyama S, Le van Vang, Ando T, Honda H (2013) Identification of conjugated pentadecadienals as sex pheromone components of the sphingid moth, *Dolbina tancrei*. Journal of Chemical Ecology 39, 1441-1447. DOI: 10.1007/s10886-013-0357-1
- 3) Uehara T, Naka H, Matsuyama S, Ando T, Honda H (2015) Identification of the sex pheromone of the diurnal hawk moth, *Hemaris affinis*. Journal of Chemical Ecology 41, 9-14. DOI: 10.1007/s10886-014-0537-7
- 4) Uehara T, Kitahara H, Naka H, Matsuyama S, Ando T, Honda H (2016) Single-component pheromone consisting of bombykal in a diurnal hawk moth, *Neogurelca himachala sangaica*. Journal of Chemical Ecology 42, 517-522. DOI: 10.1007/s10886-016-0714-y
- 5) Wakamura S, Yasuda T, Watanabe M, Kiguchi K, Shimoda M, Ando T (1996) Sex pheromone of the sweetpotato hornworm, *Agrilus convolvuli* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae): identification of a major component and its activity in a wind tunnel. Applied Entomology and Zoology 31, 171-174. DOI: <http://doi.org/10.1303/aez.31.171>
- 6) Tumlinson JH, Mitchell ER, Doolittle RE, Jackson DM (1994) Field tests of synthetic *Manduca sexta* sex pheromone. Journal of Chemical Ecology 20: 579-591. DOI: 10.1007/BF02059599

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[ 雑誌論文 ] (計 1 件)

Uehara T, Kitahara H, Naka H, Matsuyama S, Ando T, Honda H (2016) Single-component pheromone consisting of bombykal in a diurnal hawk moth, *Neogurelca himachala sangaica*. Journal of Chemical Ecology 42, 517-522. DOI: 10.1007/s10886-016-0714-y

[ 学会発表 ] (計 0 件)

[ 産業財産権 ]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[ その他 ]

上原拓也の研究ブログ

<http://blog2016uehara.japanprize.jp>

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

上原 拓也 (UEHARA, Takuya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用部門 昆虫制御研究領域・研究員

研究者番号 : 8 0 7 5 6 0 2 3