

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18823

研究課題名(和文)ガ類の炭化水素型性フェロモン生合成器官の探索

研究課題名(英文)Exploration of the producing site for the alkenyl sex pheromone in moth.

研究代表者

藤井 毅 (Fujii, Takeshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：30730626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ガのメスが分泌する性フェロモンは、広大な空間から同種オスを誘引し交配するために不可欠な揮発性低分子化合物である。ガの性フェロモン分子には、脂肪族型と炭化水素型の二種類が存在するが、これまでに炭化水素型性フェロモンの産生場所とそこで働く生合成酵素の実体は不明であった。本課題の成果により、農業害虫であるアメリカシロヒトリの炭化水素型性フェロモンの生合成には、腹部真皮細胞層に内側で接する細胞層で働く酸化酵素P450ファミリーのCYP4Gグループが関与していることが示唆された。現段階では、この細胞層を仮に「フェロモン産生細胞」と名付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農業の重要害虫にガ類が多くみられる理由の一つは、メスガの出す性フェロモンが広大な空間から同種オスを誘引し効率の良い交配の実現に加え、生殖隔離が働き交雑種の出現を抑え、多様化した種を安定して維持できるためである。本課題の成果により、これまで不明だった炭化水素型性フェロモンの生合成の場と、そこで働く酵素の遺伝子の実体が示された。この結果、既に分子レベルで概要が明らかとなっているガ類脂肪族型性フェロモンの生合成機構と比較しながら、ガ類の種分化と性フェロモンの交信系の分子進化のより深い考察が可能となった。

研究成果の概要(英文)：The unknown cell and enzymatic gene involved in decarboxylation or decarbonylation on the synthetic pathway of alkenyl sex pheromone was explored. The candidate gene, which specifically expressing in the female epidermal cells of *Hyphantria cunea*, was found and given name as HcCYP4G77. To demonstrate the function of the gene, recombinant was constructed by insect cell expression system. Incubation the construct with an essential fatty acid or its aldehyde form and GC-MS analysis for the extracts revealed the function is decarbonylase. Due to the weak activity of the construct, RNAi was subsequently challenged to investigate the gene function of HcCYP4G77. Down regulation with three double strands (#1-#3) designed by sequence information of HcCYP4G77 by RNAi revealed #1 only reduced pheromone level to 19.2%. Finally, in situ hybridization demonstrated the gene expressing cell was vicinity of the epidermis, we tentatively given the name of cell as "pheromone producing cell".

研究分野：昆虫生理・生化学、化学生態学

キーワード：ガ類性フェロモン生合成経路 炭化水素型性フェロモン ガ類性フェロモン交信系 脂肪滴 CYP4G エノサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ガ類のメスが分泌する揮発性の性フェロモンは、広大な空間で同種オスを誘引し、効率良い交配の実現に必須な揮発性の生理活性物質である。この性フェロモン分子はアセチル CoA を由来とする脂肪族型と、食草中の必須脂肪酸を由来とする炭化水素型に大別できる(文献 )。これまでの標識した化合物の追跡実験結果より、前者の生合成機構はフェロモン腺で完結するのに対して、後者は腹部において必須脂肪酸から炭化水素を生合成してフェロモン腺へ輸送され放出される点で、両者の機構が全く異なることが示されていた(文献②)。

ガ類の炭化水素型性フェロモンの生合成機構では、この必須脂肪酸から炭化水素への変換ステップが「揮発性の変化」という観点から重要であるが、そこに関わる「発現部位」と「酵素」の実体は全く不明であった。ゴキブリ類やハエ類では、自身の体表を覆うクチクラ炭化水素をエノサイトと呼ばれる細胞で生産することが実証された背景から(文献 )、エノサイトはガ類の炭化水素型性フェロモンをも生合成するという予想が多くを占めていた(文献 )。しかし、実際はエノサイトの解剖学的位置と形態、及び機能が昆虫種によって多彩であるため(文献 )、ガ類の性フェロモンの生合成機構におけるエノサイトの関与は検証が必要な状況であった。

## 2. 研究の目的

ガ類メスが分泌する炭化水素型性フェロモンの生産機構の中でも重要と位置づけられる、必須脂肪酸から炭化水素への変換過程の「場」の解剖学的所見を得ることと、そこで働く「酵素」を分子レベルで明らかとする。

## 3. 研究の方法

### (1) ガ類成虫のエノサイトの探索

エノサイトの多彩な機能の一つに、昆虫の体表を覆うクチクラ炭化水素の生合成が知られている。このため、ガ類に限らず、脱皮のある幼虫期と比べて脱皮のない成虫では目印となる解剖学的情報は少ない。そこで、文献にみられた「気管と融合した細胞塊」と「長軸 100  $\mu$ m を超える巨大な細胞」という二つのキーワードに注目し、最初に炭化水素型性フェロモンを分泌するトモエガ科のキマエホソバ(*Eilema japonica*)の幼虫を解剖し、実体顕微鏡下で文献の特徴を満たす細胞塊を発見した。この細胞塊を成虫までステージごとに追跡した。この幼虫で発見した細胞塊と相同の成虫の細胞塊をナイルレッドと DAPI で二重染色し暗視野顕微鏡で観察した(図 1)。この知見に基づき、更に炭化水素型と脂肪族型の性フェロモンを分泌するトモエガ科のアメリカシロヒトリ(*Hyphantria cunea*)と、脂肪族型性フェロモンのみを分泌するツトガ科アワノメイガ(*Ostrinia furnacalis*)、カイコガ科カイコ(*Bombyx mori*)の成虫を用いてエノサイトを探索した。

### (2) フェロモン関連炭化水素のメス成虫における組織分布調査

フェロモン関連炭化水素がメス成虫のどの部位に局在するかを調査するため、血液を良く洗い流したアメリカシロヒトリのメス成虫を頭部、胸部、腹部(フェロモン腺は切除)に分割しヘキサソル抽出物を得た。この粗抽出物をシリカゲルカラムで精製し、ヘキサソル中に含まれるジエチルエーテルが 10%未満の炭化水素画分を質量分析した。Flushing out 法で回収した血液もクロロホルム-メタノールで抽出後、同じくシリカゲルカラムで精製後に炭化水素画分の質量分析を行なった(図 2)。1) で発見したエノサイトと思われる細胞塊は、気管と共に表皮から切除し、ヘキサソル抽出物(炭化水素画分)とクロロホルム-メタノール抽出物(脂質画分)を得て、質量分析を行なった。

### (3) 表皮組織で特異的に発現する候補遺伝子の塩基配列情報の獲得

必須脂肪酸から炭化水素の生合成時に経由すると言われる、脱カルボン酸反応を触媒する酵素遺伝子の塩基配列情報を得るために、アメリカシロヒトリの表皮 RNA の大規模シーケンシング解析を行なった。これまでに報告された性フェロモン生合成酵素遺伝子は高発現する傾向を踏まえて、目的とする反応を触媒する酵素遺伝子も高発現していると考えた。この作業仮説に基づいて大規模シーケンシング解析で得られた発現量が上位 1000 位までの候補遺伝子を BLAST 検索し、脱カルボキシル酵素または脱カルボニル酵素とアノテーションされた候補遺伝子スクリーニングした。更に組織・性特異性の発現パターンを RT-PCR 法により調査し、表皮クチクラで特異的に高発現しているかを他の組織と比較して確かめた(図 3)。

### (4) 候補遺伝子の機能解析

(3) で得た候補遺伝子を HcCYP4G77 と名付け、C 末端をヒスチジンタグ化したクローンと個別にバキュロウイルスゲノムに組み込み昆虫細胞(Sf9)に感染させた。得られたタンパク質の分子量をウェスタンブロットングで解析し、翻訳後修飾の有無を確認した。目的遺伝子が目的タンパク質に正しく翻訳されていることを確認後、改めて同ウイルスの感染細胞を基質候補である Z13, Z16, Z19-22:COOH または、Z13, Z16, Z19-22:CHO と NADPH 存在下で培養した。60 時間培養した培養細胞のヘキサソル抽出物を質量分析し、酵素活性を評価した(図 4-1)。

別角度から HcCYP4G77 の遺伝子機能を解析するために、当該遺伝子のノックダウンを試みた。二本鎖 RNA はカイコの前列に倣って HcCYP4G77 の三か所に設計した(図 4-2, #1-#3)。それぞれの二本鎖(10  $\mu$ g)を個別に蛹期のアメリカシロヒトリの幼虫に注射し、羽化個体の性フェロモン量を測定した。対照区は dsGFP の 10  $\mu$ g 処理区とした。

### (5) 候補遺伝子の発現部位

in situ ハイブリダイゼーションにより、HcCYP4G77 の発現組織を調査した。目的配列内で異なる2か所でDIGラベルしたプローブを設計し、矢状面の腹部切片を染色した。切片から得られる顕微鏡像の細胞同士の正確な位置や周辺環境の情報を得るため、同時にヘマトキシリン-エオシン染色 (HE 染色) も行なった。

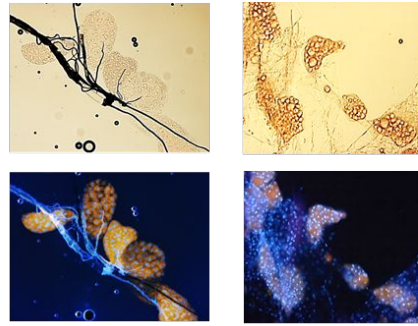


図1. キマエホソバ(左)とアメリカシロヒトリ(右)の成虫で観察されたエノサイトと予想された気管と癒着した細胞塊。上段は明視野像、下段は暗視野像。暗視野像では、ナイルレッドとDAPIにより脂肪滴が橙色に、核が青色に染まっている。スケールバー：50 μm

### 4. 研究成果

#### (1) ガ類成虫のエノサイトの探索

キマエホソバの幼虫から、先行研究のエノサイトのスケッチと類似した「気管と癒着した房状の細胞塊」を満たす細胞塊を発見した。幼虫期の本細胞は気管末梢と癒着し、直径は大きなもので150 μm を超えることも先行研究の描写と一致していた。暗視野顕微鏡像のDAPI染色結果より、幼虫期の房は一つの巨大な核を持つ細胞群から構成され、またナイルレッドによる染色結果より細胞群の脂質代謝への何らかの関与が示唆された。この情報を手がかりに、キマエホソバとアメリカシロヒトリのメス成虫の両方から、「エノサイト」といえる細胞塊を発見した。成虫期では、当該細胞の解剖学的な位置は変わらず気管の末梢に位置していたが、房を形成する粒は油滴を含んだ直径約20-30 μmの細胞群に変化していた(図1)。この細胞塊に含まれる脂肪滴は、現在カイコガとその近縁種クワコのフェロモン腺からのみ報告されている脂肪滴とよく似ていた(文献)。この細胞群はカイコを除く観察したすべてのガ類種成虫の気管末梢から見つかったことから、フェロモン腺内の脂肪滴の有無との関連が興味深い。

#### (2) フェロモン関連炭化水素のメス成虫における組織分布調査

アメリカシロヒトリの頭部、胸部、腹部から検出されたフェロモン関連炭化水素は、約1 ng/ であった(図2左)。400 μL の flushing out バッファーと血液の混合液には約3 ngの炭化水素が含まれていた(図2右)。更に、アメリカシロヒトリ、キマエホソバの二種から抽出した細胞塊のヘキサン抽出物から性フェロモン関連炭化水素は検出されなかった。両種の脂肪酸分析結果から、本細胞塊から炭素数20を超える長鎖脂肪酸化合物も検出されなかった。この結果より、必須脂肪酸から生合成されるフェロモン関連炭化水素の多くは組織に局在せず血中に存在すると考えた。量はわずかだが、メスのフェロモン関連炭化水素はアメリカシロヒトリのオスの血中にも含まれていた。

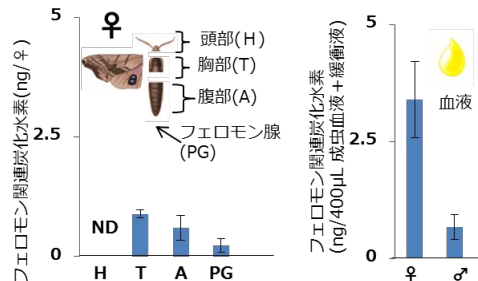


図2. フェロモン関連炭化水素の極在の調査 (N=3)

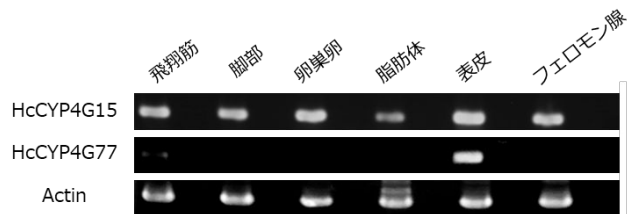


図3. 脱カルボニル酵素遺伝子(CYP4G)の発現組織の解析結果

#### (3) 表皮クチクラで特異的に発現する候補遺伝子の塩基配列情報の獲得

フェロモン関連炭化水素が組織に局在せず血中に多く存在したこと、エノサイトと思われた細胞塊からフェロモン生合成に関連すると思われる長鎖の脂肪酸や炭化水素が検出されなかったことから、視点を変えて脱炭酸酵素/脱カルボニル酵素をコードする遺伝子を探索した。その結果、脱カルボニル酵素遺伝子は見つからなかったが脱カルボニル酵素をコードするP450ファミリーに属するCYP4G遺伝子を2クローン発見し、それぞれHcCYP4G15(翻訳領域1659 bp., コードするタンパクの分子量 ca.63.0 kDa), HcCYP4G77(翻訳領域1689 bp., コードするタンパクの分子量 ca.

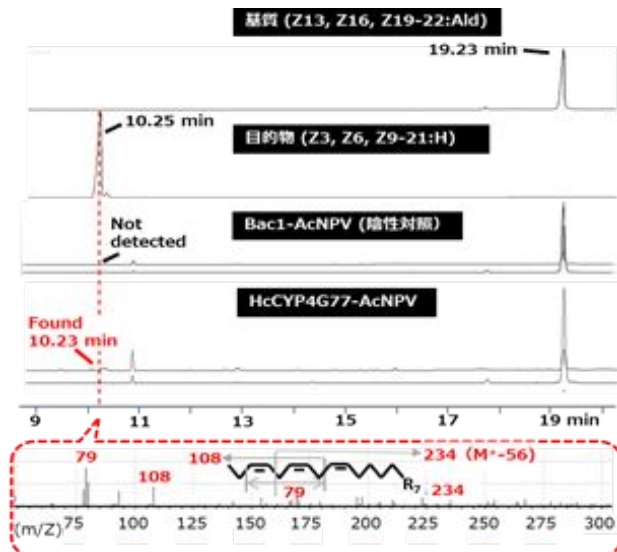


図4-1. 遺伝子の機能解析 (過剰発現)

64.3kDa)と名付けた。これらの発現組織を調査した結果、HcCYP4G15 遺伝子は試験した組織すべてで発現していたが、HcCYP4G77 は表皮特異的に発現していた(図3)。

#### (4) 候補遺伝子の機能解析

HcCYP4G77 をバキュロウイルスゲノムに組み換え、その組み換えウイルスを昆虫細胞に感染させ目的タンパク質 HcCYP4G77 を過剰発現させた。ウェスタンブロッティングでアミノ酸配列から計算した分子量とほぼ一致する約 63kDa のタンパクの発現を確認し、基質はフェロモン前駆体成分である Z13,Z16, Z19-22:C00H と Z13,Z16, Z19-22:CHO を個別に試験した。その結果、アルデヒドを基質とした試験区の抽出物から、わずかだが脱カルボニルされた目的炭化水素成分 Z3,Z6,Z9-21:H を検出した(図4-1)。この保持時間とイオン開裂パターンは同成分の標品と一致することを確認した。

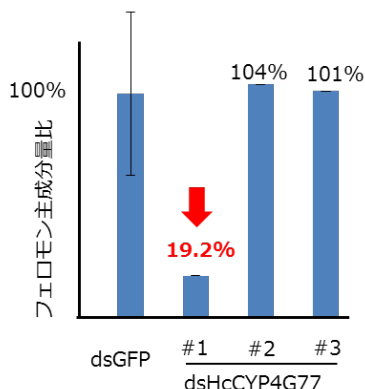


図4-2. 遺伝子の機能解析 (RNAi, n=3)

別の角度から遺伝子の機能を探るために HcCYP4G77 のノックダウンを試みた。その結果、最上流でデザインした dsHcCYP4G77 の#1 をノックダウンした際、フェロモン腺中のフェロモン主成分量を 19.2%まで減少させた(図4-2)。これらの結果より、HcCYP4G77 が必須脂肪酸から炭化水素への変換過程に関与することが示唆された。

#### (5) 候補遺伝子の発現部位

in situ ハイブリダイゼーションを用いて、HcCYP4G77 の発現する部位を調査した。HE 染色像と照らし合わせて、HcCYP4G77 は、真皮細胞の内側の細胞層で発現していることが分かった(図5、黄色矢印)。研究開始段階ではエノサイトと考えていた細胞塊(図1)は、in situ ハイブリダイゼーションにおける染色像の特徴が同じチョウ目のヨトウ類の幼虫の栄養細胞(Torophocyte)と良く一致した(文献7)。背景にあるように、エノサイトは細胞の形態や機能が多彩であり、解剖学的な聊かの混乱もあるため(文献)、本課題で明らかとした細胞の呼称はエノサイトの使用を控えて、現段階では仮に「フェロモン産生細胞」と名付けることにする。

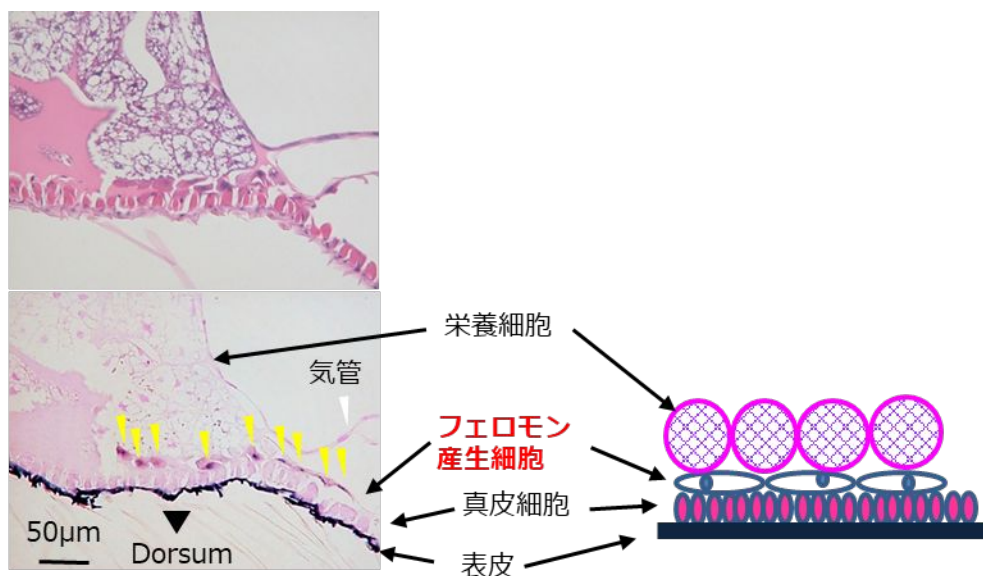


図5. in situ ハイブリダイゼーションにより明らかとなった、HcCYP4G77の発現場所(図中黄色の矢印)写真は、アメリカシロヒトリのメス成虫の腹部矢状断の切片像(上: HE染色像、下: DIG染色)。

#### <引用文献>

- Ando, T., Inomata, S., Yamamoto, M. (2004) *Top. Curr. Chem.* 239: 51-96.
- Schal, C., Sevala, V., Cardé, R. T. (1998) *Naturwissenschaften.* 85: 339-342.
- Martins, G. F., Ramalho-Ortigão, J. M. (2012) *Invert. Survival J.* 9: 139-152.
- Makki, R., Cinnamon, E., Gould, A. P. (2014) *Annu. Rev. Entomol.* 59: 405-425.
- Jurenka, R. A. Subchev, M. Abad, J.-L. Choi M.-Y. Fabrias, G. *PNAS* 100: 809-814.
- Fujii, T., 他4名 (2018) *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 87:29-34.
- Scudeler, E. L. 他3名 (2019) *Protoplasma,* 256:839-856.
- Nelson, D. (1969) *Nature* 221: 854-855.
- Diehl, P. A. (1975) *J. Insect Physiol.* 21: 1237-1246.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeshi FUJII, Sakurai T, Ito K, Yokoyama T, Kanzaki R, Lipid droplets in the pheromone gland of wild silkmoth *Bombyx mandarina*, Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 査読有、Vol.87、2018、pp.29-34.

### 〔学会発表〕(計 7 件)

藤井 毅、櫻井 健志、伊藤 克彦、横山 岳、神崎 亮平、カイコガ属のフェロモン腺中にみられる油滴について、日本応用動物昆虫学会、2018

Takeshi FUJII, Inaba H, Yamamoto M, Ito K, Yokoyama T, Rong Y, Ishikawa Y, Candidate cells producing alkenyl sex pheromones in moths, 第 33 回国際化学生態学 / 第 9 回アジア太平洋化学生態学合同会議、2017

藤井 毅、石川 幸男 ガの性フェロモン分子、その生合成と多様性を考える、「鱗翅目 Type II フェロモンに関するセミナー (招待講演：信越化学工業)」、2017

藤井 毅、稲葉 寛、石川 幸男、ガ類の炭化水素型性フェロモン生合成器官、日本蚕糸学会 (招待講演：日本蚕糸学会)、2017

藤井 毅、稲葉 寛、山本 雅信、横山 岳、伊藤 克彦、石川 幸男、ガ類炭化水素型性フェロモン生合成器官の探索、日本応用動物昆虫学会、2017

稲葉 寛、藤井 毅、戎 煜、山本 雅信、石川 幸男、ガ類フェロモン関連炭化水素の組織分布、日本応用動物昆虫学会、2017

Fujii Takeshi 他 8 名、Analogues of sex pheromone component in the pheromone gland of *Bombyx mori*, International Congress of Entomology, 2016

### 〔図書〕(計 2 件)

藤井 毅、中 秀司、ニューサイエンス社、昆虫と自然、ガ類種の多様性と性フェロモン分子の変遷、2018、Vol.53, No.13, pp8-12、(査読なし)

藤井 毅、北隆館、アグリバイオ、ガの性フェロモンの二つの形 Dimorphism in molecular of moth sex pheromone 2017 7月号 pp33-36、(査読なし)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：稲葉 寛

ローマ字氏名：Inaba Hiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。