

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380031

研究課題名（和文）エポキシ性フェロモンの生合成とその制御に関する分子機構の解明

研究課題名（英文）Study on Molecular Mechanisms of Biosynthesis of Epoxy Pheromones and its Regulation

研究代表者

安藤 哲（ANDO TETSU）

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50151204

研究成果の概要（和文）：

より進化したシャクガ科やヒトリガ科などの昆虫は、 $C_{17} \sim C_{23}$ の直鎖不飽和炭化水素とそのエポキシ誘導体（タイプフェロモン）を分泌する。それらの体内での生産様式を確認すべく、ヨモギエダシャクを用いて、エポキシ化酵素ならびにPBANの受容体タンパク質に対応する候補遺伝子をフェロモン腺よりクローニングした。加えて、アメリカシロヒトリを実験材料に、4成分からなるフェロモンの生合成経路を実証するとともに、最終段階で働いている酸化酵素の基質特異性を明らかにした。一方、これまでフェロモンの同定例がないアオシャク類からは、12-位に二重結合を含む新規なタイプフェロモン成分の同定に成功し、生殖隔離に重要な役割を担う分子種の多様性を示す結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Lepidopteran female insects in highly evolved groups, such as Geometridae and Arctiidae, secretes a sex pheromone composed with C_{17} - C_{23} polyalkenes and/or their epoxy derivatives. In order to confirm biosynthesis and its endocrinal regulation mechanism, candidates of cDNAs encoding an epoxydase and a receptor of PBAN (pheromone biosynthesis activating neuropeptide) were characterized from pheromone glands in female moths of the giant looper. In addition to these cloning experiments, biosynthetic pathways of four pheromone components produced by the American white arctiid moth were confirmed by application of labeled precursors and examined substrate selectivity of the oxidation enzymes working in pheromone glands. Furthermore, novel pheromone compounds unsaturated at a 12-position were identified from some species of emerald moths, indicating reproductive isolation was established by diversity of chemical communication systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫

キーワード：昆虫分子生物学・フェロモン生産

1. 研究開始当初の背景
地球上に約15万種もの鱗翅目昆虫が生息し、種の

保存に性フェロモンの多様性が重要な役割を担っている。これまで、世界で600種を超えるガ類が

ら性フェロモンが同定され、その約75%はカイコのボンビコールやハマキ類が分泌するアセテートのようなタイプ の化合物(C₁₀~C₁₈で直鎖末端に官能基を有するもの)である。一方、より進化したシャクガ科昆虫から、タイプ の化合物が近年多数同定されるようになった。末端官能基を含まないC₁₇~C₂₃の直鎖不飽和炭化水素(ポリアルケン)とそのエポキシ誘導体で、約15%を占めている。

タイプ の性フェロモンは、腹部末端にあるフェロモン腺において、アセチル CoA より *de novo* 合成される。生合成経路に加え、二重結合を導入する不飽和化酵素やアシル基の還元酵素も同定され、分子レベルでの理解が深まりつつある。一方、タイプ のエポキシ性フェロモンは全く異った流れで生産される。まず、前駆体であるポリアルケンが、食餌由来のリノレン酸などからエノサイトあるいは脂肪体で形成され、その後に腹部先端のフェロモン腺に移動し、そこでエポキシ化され体外に分泌されることが考えられるようになった。しかし、実証された生合成過程はエポキシ化反応のみで、ポリアルケンの生成過程は未だ実験的な裏付けがなされておらず、酵素レベルでの研究は全く報告されていない。

ところで、多くのガ類昆虫では、交尾時刻に合わせてフェロモン量は日周変動する。頭部で感知された明暗のリズムが、食道下神経節で作られるホルモンを介して生合成を制御している。すなわち、フェロモン生合成活性化ペプチド(PBAN)を介した制御機構が存在し、カイコなどタイプのフェロモンを生産する10種ほどの昆虫において、PBANのアミノ酸配列(約30残基)およびそれをコードするcDNAが報告されてきた。さらにカイコでは、PBANのレセプターも同定された。一方シャクガでは、本研究者らが、PBANはエポキシ化反応のような合成ステップを活性化するのではなく、前駆体のフェロモン腺への移動を促すという興味深い事実を明らかにし、また38残基からなる新規な構造を決定した。しかしながらタイプ フェロモンの生合成に関する研究は大変限られており、総合的に理解しその知見を害虫防除などへ役立てることが求められる。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえ、引き続き茶の重要害虫であるヨモギエダシャクを実験材料にするとともに、戦後日本に帰化し街路樹等を広く

食害するアメリカシロヒトリにおいて、フェロモン腺やエノサイトなどを用いて下記の事項を追究することとした。ところで、これまで発見されているタイプ 性フェロモン化合物は、それがそれぞれの種の生殖隔離に重要な役割を担っておりながら、昆虫種の多様性を反映しておらず、リノール酸およびリノレン酸をさらに化学修飾した化合物の存在も考えられる。ヨモギエダシャクなどで得られた知見が、多くのタイプ 性フェロモンを分泌する昆虫種でも共通な事項であるかを検証するために、これまで性フェロモンが報告されていない昆虫を対象にその性フェロモンの構造決定を行い、生合成研究の材料とすることも計画した。具体的には下記の5つの研究目的の下に、実験を行った。

[研究1] エポキシ化酵素の同定と機能解析: 本種の酵素は3-位二重結合のみを酸化する反応特異性を持つ。本研究により、特異性の異なる他種のエポキシ化酵素との比較研究が可能となる。

[研究2] PBANレセプターの同定と機能解析: 本種PBANは特異なフェロモン生産活性化能を有しており、本研究はその機構解明の第一歩として位置付けられる。

[研究3] ポリアルケンの生合成経路の実証: エノサイトや脂肪体を中心にポリアルケンの生産能を検討し、特定した器官を用いてポリアルケンの生成を実験的に証明する。

[研究4] ヒトリガ性フェロモンの生合成経路と酸化酵素の基質特異性: このヒトリガ科の昆虫は、シャクガが生産するタイプ フェロモンとは異なった化合物も分泌する。それらフェロモン成分を含め、各成分の混合比が決定される要因は興味深く、生合成に関わる酵素群を明確にするとともに、それらの基質特異性を明らかにする。

[研究5] アオシャク類の性フェロモンの同定: シャクガ科はエダシャク亜科、ナミシャク亜科など9つの亜科に分類される大きなグループである。これまでエダシャク類を中心に性フェロモンが同定されてきた。一方、アオシャク亜科の昆虫は翅が緑色である共通の特徴を有し、日本に80を超える種が分布するにもかかわらず、未だ性フェロモンは報告されておらず、新規なタイプ 性フェロモン成分を分泌していることが考えられた。それらの化学構造を解明することにより、さらにタイプ 性フェ

ロモンの生合成の実態が明らかになることが期待され、沖縄県西表島にて採集したアオシヤク類の性フェロモンを同定することとした。

3. 研究の方法

分子生物学的手法を活用し、機能しているタンパク質のアミノ酸配列を明らかにする。また、それらの機能解析にはこれまでの研究過程で得られている性フェロモン関連化合物、さらには生合成前駆体を活用し、物質レベルでの理解を深める。特にGC-MSなどの機器分析の十分な裏づけの基に、実験を進める。

4. 研究成果

4-1. エポキシ化酵素の同定

生理活性物質を含む二次代謝産物の生合成において、特定の二重結合のみをエポキシ化する酵素の働きは重要である。このような酵素をコードする遺伝子についての知見が乏しい中で、植物から脂肪酸合成系に関わるエポキシ化酵素が、非ヘム型ではあるが不飽和化酵素との相同性のもとに同定された。このことに注目してプライマーを設計し、ヨモギエダシヤクからエポキシ化酵素のクローニングを行い、フェロモン腺に特異的に発現する遺伝子を同定した。しかし、昆虫細胞での発現系にてエポキシ化活性を確認することができず、求めるエポキシ化酵素でないと結論付けた。

一方、昆虫の幼若ホルモン(JH)生合成に関わるエポキシ化酵素は、チトクロームP450(CYP)のグループに属するヘム型タンパク質であることがすでに知られている。タイプフェロモンの生合成もCYPが関与していることが十分に考えられた。昆虫からもすでに多くのCYP遺伝子が報告されている。その中からエポキシ化反応に関与している可能性の高いものを検索し、特徴的な保存領域の有無を検討したが、有効なプライマーの設計は難しいことが判明した。

そこでフェロモン腺からの遺伝子ミニライブラリーを構築すべく、シヤクガのフェロモン産生細胞内にて強発現している遺伝子集団を抽出し、ヘム結合領域をコードする配列を含むクローンを選別後、過剰発現系にてエポキシ化活性を測定し絞り込みを行うこととした。特異な構造を有するシヤク

ガの腹部8~9節の詳細な観察とエポキシ化活性の検討から、フェロモン腺は節間膜の限られた部分に位置することが明らかになった。この知見をもとに、フェロモン腺と他組織とでの発現遺伝子の差を指標にエポキシ化酵素の絞り込みを行いサブトラクトPCR法により、十数個の候補遺伝子のクローニングに成功した。今後、個々の遺伝子の機能解析を行い最終的に3-位二重結合のみを選択的に酸化するエポキシ化酵素の同定を完成させる予定である。

4-2. PBANレセプターの同定

新規な構造と機能を有するヨモギエダシヤクのPBANも、C-末側にアミド化されたFXPRLMモチーフを含み、そのレセプターも他種のものと比較的高い相同性を有していることが予測された。そこでカイコから同定されているレセプター遺伝子を参考にプライマーを設計し、ヨモギエダシヤクから候補遺伝子をクローニングしたところ、ORFに7回膜貫通構造を有する435アミノ酸残基をコードする全長1930 bpのcDNAを得ることができた。

対応するタンパク質のアミノ酸配列はカイコガPBAN受容体と同様にC-末端側配列が長く、Tyr(Y)に基づいたエンドサイトーシスモチーフ配列であるYXXL配列を含む。またこの受容体タンパク質は、多種と比べて25残基も長いN-末端配列を有していた。現在、アフリカツメガエルを用いた発現系で機能解析を行い、真のPBAN受容タンパク質であることを実証中である。

4-3. ポリアルケンの生合成経路の追究

エポキシ性フェロモンの特徴的な二重結合位置から、前駆体であるポリアルケン(リノレン酸やリノール酸(C₁₈))を出発原料として、炭素鎖の伸張、脱炭酸あるいは還元によって合成されることが予想される。すなわち、ヨモギエダシヤクのエポキシ成分(C₁₉)の前駆体(C₁₉トリエン)は、リノレン酸から導かれるC₂₀脂肪酸の脱炭酸によって生成することが考えられた。そこでまず、トリエンを生産する組織の特定を行った。クチクラの飽和炭化水素は、エノサイトなどで生産されることが知られている。フェロモン前駆体もエノサイトで生合成されることが考えられた。エノサイトを含む腹部体表の脂肪酸を分析したところ、雌成虫において特異的にC₂₀脂肪酸が

存在することが明らかになった。現時点では、重水素で標識した C_{20} 脂肪酸の脱炭酸を *in vivo* の系にて再現できていないが、今後、エノサイトを抽出し、その培養系を用いて検討する。

4-4. ヒトリにおける性フェロモン生合成

アメリカシロヒトリは性フェロモンとして、 C_{18} の2つのアルデヒド[9,12-ジエニルアルデヒド(I)と9,12,15-トリエニルアルデヒド(II)]および C_{21} の2つのエポキシ化合物[9,10-エポキシジエン(III)と9,10-エポキシトリエン(IV)]をフェロモン成分として分泌する。いずれも、植物由来のリノール酸やリノレン酸を生合成の原料とするタイプフェロモン成分である。明暗のリズムに同調し各成分量は変化するが、混合比はほぼ一定で、約5:4:10:2である。

(a) アルデヒド成分IおよびIIの生合成経路について ^{13}C 標識体を用いて解明した。10 $\mu g/\mu l$ の濃度に調整したDMSO溶液をフェロモン腺へ塗布し、その20時間後に抽出しGC-MSでの分析を行ったところ、

$^{13}C_{18}$ 標識-アルコールは対応するトリエニルアルデヒド成分(II)へ確実に変換した。一方、 $^{13}C_{18}$ 標識-リノレン酸の塗布では、塗布後の時間に関わらず変換は全く認められないことから、アルデヒド成分の生産の最終段階にはアルコール酸化酵素が関与していることが判明した。

(b) アルコール酸化酵素の基質特異性を探るべく、 C_{19} のジエニルおよびトリエニルアルコール、 C_{18} のモノエニルおよび飽和アルコールをフェロモン腺に塗布し、対応するアルデヒドへの変換を調べた。その結果、酸化酵素は炭素数や不飽和結合の有無に関わらず、アルデヒドへの変換を行うことが明らかになった。

(c) エポキシ成分の生合成の最終ステップを確認するために、 C_{21} のトリエンの重水素標識体を合成した。フェロモン腺へ塗布したところ、9-位の二重結合のみが選択的に酸化され、エポキシジエン(III)へと変換されることが確認でき、最終ステップはフェロモン腺で進行していることが示された。また、フェロモン腺への塗布に比べ腹腔内への注射で、また注射後20時間のインキュベーションにおいて、最大な変換量が認められた。シャクガと同様にヒトリガでもトリエン前駆体はフェロモン腺ではなく、他の器官(エ

ノサイト)で生産され、その後、体液を通してフェロモン腺に移動することが実証された。

(d) エポキシ化酵素の基質特異性を探るべく、 $C_{18}\sim C_{23}$ のトリエン、 C_{21} のジエンおよびモノエンをフェロモン腺に塗布するとともに、腹腔内に注射し、その後フェロモン腺に存在するエポキシ化合物をGC-MSにて分析した。その結果、いずれの不飽和炭化水素の9-位二重結合は酸化され、対応する9,10-エポキシ化物へと変換することから、基質特異性は低いことが明らかになった。この結果から、本種の性フェロモンの構築には、前駆体である C_{21} のトリエンやテトラエンが混合比を含めて正確に生合成されていることが前提となっていることが判明した。ただし、モノエンのエポキシ化は他に比べ有意に劣っていた。エポキシ化酵素は9-位二重結合を1-位メチル側からの位置で認識し、3-位と6-位二重結合の欠如したモノエン化合物ではかなり分子の立体構造が異なることが考えられた。

(e) フェロモン前駆体が体液中のタンパク質であるリポホリンによりフェロモン腺に輸送されることを、雌成虫の体液を分析することにより確かめた。エポキシジエン(III)に対応するトリエンとエポキシトリエン(IV)に対応するテトラエンは約10:2の割合で含まれたおり、この値はIIIとIVの存在比と一致していることから、両者の割合はエノサイトでの生合成の結果がもとらしていることがわかった。

4-5. アオシャク類の性フェロモンの同定

性フェロモンに刺激された雄蛾の触角は微弱な電位差を生じ、それは触覚電位(EAG)として記録される。EAGを検出器としたGC分析(GC-EAD)によって、ヘリグロヒメアオシャク雌成虫のフェロモン腺抽出物に2つの活性成分(A1、A2)が存在することが明らかになった。当初A1の構造は決定できなかったが、A2はGC-MS分析において m/z 248の M^+ を示し C_{18} のトリエン化合物であることが判明した。ただし既知のマスペクトルと異なることから、新規化合物であることが考えられた。このトリエンは他の多くのタイプフェロモンと同様にリノール酸から生合成されると仮定すると、6-位と9-位の(2)-体二重結合にさらに1つ二

重結合が加わった構造が予想され、抽出物をジイミド還元したところ、2つのモノエン化合物のみが検出された。合成標品との比較から、(Z)-6-octadecene と (Z)-9-octadecene が 2 : 1 の割合で生成したことを確認でき、**A2** は対称性のある (Z,Z,Z)-6,9,12-octadecatriene (Z6,Z9,Z12-18:H) と結論付けた。このトリエンを合成し誘引試験を実施したところ、少数ながら雌成虫の誘引を認めることができた。

同様の方法で、サキシマツバメアオシャクのフェロモン腺抽出物の分析を行なった。2つの活性成分 (**B1**、**B2**) が認められ、**B2** は m/z 274 の M^+ から C_{20} のテトラエンであることが考えられたが、既知のスペクトルとは一致せず、やはり新規化合物であることが判明した。このテトラエンはリノレン酸から生合成されると仮定すると、3-位、6-位、9-位の (Z)-体二重結合にさらに1つ二重結合が加わった構造が予想された。(Z,Z,Z,Z)-3,6,9,12-icosatetraene (Z3,Z6,Z9,Z12-20:H) を合成したところ、**B2** と同一の GC-MS データを示した。抽出物を用いてジイミド還元を試みたが、生成したモノエンを完全に分離できず、12-位の幾何異性は決定できなかった。そこで12-位のみが (E)-体の化合物 (Z3,Z6,Z9,E12-20:H) も合成し誘引試験を実施した結果、Z3,Z6,Z9,Z12-20:H のみに誘引活性が認められ、**B2** の12-位の二重結合は (Z)-体であると結論付けた。

加えて別の2種のアオシャクからも、(Z,Z,Z)-6,9,12-トリエンが検出された。さらに、合成した $C_{17} \sim C_{20}$ の6,9,12-トリエンと3,6,9,12-テトラエンを用いたランダムスクリーニング試験を八王子市で実施し、現在までに数種のアオシャク類の誘引を認めるに至っており、12-位の二重結合は多くのアオシャク類の性フェロモンに共通な化学構造上の特徴であることが明らかになった。加えて、**A1** と **B1** は (E,E)- α -farnesene であることを明らかにすることに成功した。

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6件)

Biosynthetic Pathways of the Sex Pheromone Components and Substrate Selectivity of the Oxidation Enzymes Working in Pheromone Glands of the Fall Webworm, *Hyphantria cunea*.

Insect Biochem. Mol. Biol., **41** (6): 362-369 (2011), Ryutaro KIYOTA, Maki Arakawa, Rei Yamakawa, Abeda YASMIN, and Tetsu ANDO.

Novel Components of the Sex Pheromones Produced by Emerald Moths: Identification, Synthesis, and Field Evaluation. *J. Chem. Ecol.*, **37** (1): 105-113 (2011), Rei YAMAKAWA, Nguyen Duc DO, Masakatsu KINJO, Yoshie TERASHIMA, Tetsu ANDO.

Female Sex Pheromone of a Lichen Moth *Eilema japonica* (Arctiidae, Lithosiinae): Components and Control of Production. *J. Insect Physiol.*, **56** (12): 1986-1991 (2010), Takeshi FUJII, Ryo NAKANO, Yoshiko TAKUBO, Shuguang QIAN, Rei YAMAKAWA, Tetsu ANDO, and Yukio ISHIKAWA.

(6Z,9Z,12Z)-6,9,12-Octadecatriene and (3Z,6Z,9Z,12Z)-3,6,9,12-Icosatetraene, the Novel Sex Pheromones Produced by Emerald Moths. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4738-4740 (2009), Rei YAMAKAWA, Nguyen Duc DO, Yasushi ADACHI, Masakatsu KINJO, and Tetsu ANDO.

Identification of a New Pheromone-binding Protein in the Antennae of a Geometrid Species and Preparation of Its Antibody to Analyze the Antennal Proteins of Moths Secreting Type II Sex Pheromone Components. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (6): 1443-1446 (2009), Hayaki WATANABE, Hiroko TABUNOKI, Nami MIURA, Aya MATSUI, Ryoichi SATO, and Tetsu ANDO.

Identification of Novel C_{20} and C_{22} Trienoic Acids from Arctiid and Geometrid Female Moths That Produce Polyenyl Type II Sex Pheromone Components. *J. Chem. Ecol.*, **34** (11): 1437-1445 (2008), Kanae MATSUOKA, Masanobu YAMAMOTO, Rei YAMAKAWA, Minoru MURAMATSU, Hideshi NAKA, Yusuke KONDO, and Tetsu ANDO.

[学会発表](計9件)

Sex Pheromone Biosynthesis in the Fall Webworm Moth, *Hyphantria cunea* (Arctiidae). Part 1: Conversion of Linolenyl Alcohol into an Aldehyde Component and Substrate Specificity of the Oxidation. 26th Annual Meeting (International Society of Chemical Ecology), Tours, France, August (2010), Ryutaro KIYOTA, Maki ARAKAWA, and Tetsu ANDO

Sex Pheromone Biosynthesis in the Fall Webworm Moth, *Hyphantria cunea* (Arctiidae).

Part 2: Conversion of C₂₁ Triene into the Epoxydiene Component and Substrate Specificity of the Oxidation. 26th Annual Meeting (International Society of Chemical Ecology), Tours, France, August (2010), Maki ARAKAWA, Ryutaro KIYOTA, and Tetsu ANDO.

6Z,9Z,12Z)-6,9,12-Octadecatriene and (3Z,6Z,9Z,12Z)-3,6,9,12-Icosatetraene, the Novel Sex Pheromones Produced by Emerald Moths. The 5th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, Honolulu, Hawaii, U.S.A., October (2009) Rei YAMAKAWA, Nguyen Duc DO, Yasushi ADACHI, Masakatsu KINJO and Tetsu ANDO.

Identification of C₂₁ Type II Sex pheromone Components and Novel C₂₀ and C₂₂ Trienyl Biosynthetic Precursors from a Wasp Moth, *Syntomoides imaon* (Arctiidae: Syntominiinae). Anniversary ISCE Meeting, State College, Pennsylvania, U.S.A., August (2008), T. ANDO, K. MATSUOKA, M. YAMAMOTO, M. MURAMATSU and H. NAKA.

西表島の蛾類昆虫が生産する新規性フェロモン成分に関する研究、天然有機化学討論会(静岡県コンベンションアーツセンター)、2010.9.29、山川 玲、Nguyen Duc Do、足立康、金城 政勝、安藤 哲

アメリカシロヒトリ性フェロモンの生合成に関する研究 第1報：アルデヒド成分の生合成、日本農芸化学会(東京大学)、2010.3.28、清田隆太郎、荒川まき、Abenda Yasmin、山川 玲、安藤 哲

アメリカシロヒトリ性フェロモンの生合成に関する研究 第2報：重水素標識前駆体の合成と変換実験、日本農芸化学会(東京大学)、2010.3.28、荒川まき、清田隆太郎、Abenda Yasmin、山川 玲、安藤 哲

アオシヤク類の性フェロモン 第2報：3,6,9,12-テトラエン等の合成と野外誘引試験、日本農芸化学会(東京大学)、2010.3.28、山川 玲、Nguyen Duc Do、金城 政勝、安藤 哲

アオシヤク類が分泌する新規性フェロモンの同定、日本農芸化学会、(マリンメッセ福岡) 2009.3.27、山川 玲、Nguyen Duc Do、金城 政勝、安藤 哲

〔図書〕(計1件)

「日本の鱗翅類」 駒井古実・吉安 裕・那須義次・齊藤寿久編、東海大学出版会 第

部：形態と生態 3：鱗翅目性フェロモンの化学構造の多様性、pp. 49-56(2011)、安藤 哲

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 哲 (ANDO TETSU)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：50151204

(2) 研究分担者

無し ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

松本 正吾 (MATSUMOTO SHOGO)
独立行政法人理化学研究所・
理化学研究所・主任研究員
研究者番号：60134516

佐藤 令一 (SATO RYOICHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30235428