

平成23年6月1日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20580058
 研究課題名(和文)
 ガ類性フェロモン産生に関わるアルコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の機能解析
 研究課題名(英文) Functional analysis of an alcohol acetyltransferase gene involved in sex pheromone biosynthesis
 研究代表者
 本 賢一 (MOTO KEN-ICHI)
 独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・専任研究員
 研究者番号： 90333335

研究成果の概要(和文)：

蛾類昆虫の性フェロモン生合成に関わるアルコールアセチルトランスフェラーゼ(AAT)は未同定であり、また、他の動物でもAAT遺伝子は同定されていないことから、ホモロジーを利用したAAT遺伝子の同定はできない。一方、AATはアワヨトウにはあるが、カイコガにはないことから、両種のフェロモン腺ESTクローンを比較し、アワヨトウでのみ見出され、かつ既知の性フェロモン生合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素と同じ部位で発現する3種類の新規遺伝子を得た。

研究成果の概要(英文)：

To isolate a novel alcohol acetyltransferase (AAT) gene involved in sex pheromone biosynthesis from of army worm, *Pseudaletia separata*, 1,000 pheromone gland EST clones were analyzed. Since the silkworm, *Bombyx mori*, has no AAT, the pheromone gland EST clones of *P. separata* were compared with that of *B. mori*. Finally, 3 novel genes were isolated as AAT candidates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：

アルコールアセチルトランスフェラーゼ、アワヨトウ、カイコガ、性フェロモン、EST

1. 研究開始当初の背景

ガ類昆虫の性フェロモンの研究はフェロモンの研究分野で歴史が最も古く、その学術的興味に加え、種特異的な誘引活性を利用した交信攪乱法が農薬を使用しない環境に優しい農業害虫防除法として期待できたことから、これまでに570種以上もの多くのガ類から性フェロモンが同定されている。これらのガ類の75%以上は炭素数10-18で、数個の二重結合と末端に酸素を含む官能基（アルコール、アセテート、またはアルデヒド）を有する直鎖脂肪族化合物を性フェロモン成分とし、またほとんどのガ類は複数のこれらの成分をブレンドし、その成分比を厳密に規定することにより、種特異的な性フェロモンを作り出している。そのフェロモン成分の生合成酵素の実体は長年不明であったが、脂肪酸不飽和化酵素については1998年に米国のRoe lofs らのグループがイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) の $\Delta 11$ 不飽和化酵素遺伝子を報告したことがきっかけとなり、現在までに10種以上のガ類から報告されており、また申請者もカイコガ (*Bombyx mori*) の ESTデータベースを利用することにより① $\Delta 11$ と② $\Delta 10, 12$ の2つの不飽和化活性を有する極めてユニークな酵素Desat1を報告した (Moto *et al.*, 2004)。また直鎖脂肪族化合物末端のアシル基を還元しアルコール基に変換する酵素 (pgFAR) については、カイコガを実験材料とすることにより申請者が世界に先駆けて遺伝子レベルでの研究成果を報告し、その基質特異性がフェロモンブレンドの成分比率決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Moto *et al.*, 2003)。一方、直鎖脂肪族化合物末端のアルコール基をアセチル化し、酢酸エステルを生成するアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AAT) についてもフェロモンブレンドの成分比率決定に重要な役割を果たしていることが予想されること

から、上述の二酵素に次ぐ標的として多くの研究者がその解明に取り組んでいることが予想されるが、その実体は不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではアワヨトウ (*Pseudaletia separata*) を実験材料とし、性フェロモン生合成に関わるAAT 遺伝子の単離を目的とする。

3. 研究の方法

ガ類AAT遺伝子に関しては多くの研究者が単離を試みていると思われるが、未だにその実体は不明であった。その理由としては、動物ではAAT遺伝子が同定されていないこと、また酵母や植物ではAAT遺伝子が同定されているが、ガ類AAT遺伝子との相同性が低いと予想されることから、既知遺伝子との相同性を利用してガ類AAT遺伝子をクローニングすることが困難であることが挙げられる。

申請者はこれまでカイコガを実験材料としてフェロモン腺のEST解析を行い、計312個の独立ESTクローンを単離した。また、RT-PCR解析の結果、機能未知を含む少なくとも29の遺伝子がフェロモン腺特異的あるいは優先的に発現していること、そしてフェロモン腺特異的に発現しているdesat1およびpgFARが実際に性フェロモン生合成に関与していることを明らかにした。しかしながら、カイコガのフェロモン成分 (ボンビコール) の末端官能基は酢酸エステルではなくアルコールであるため、本研究で単離を試みるAAT遺伝子は、その312個の独立クローンには含まれていないと考えられた。一方、アワヨトウのフェロモン成分の一部は末端官能基が酢酸エステルであることから、アワヨトウのフェロモン腺ではAAT遺伝子が発現していると考えられた。そこで、本研究ではアワヨトウフェロモン腺のEST解析を行い、その結果とカイコガフェロモン腺のEST解析結果を比較することによりアワヨトウに特異的な遺伝子を選抜し、これをAAT候補遺伝子とすることとした。また、研究遂行の過程で、カイコ

が *desat1* および *pgFAR* とそれぞれ相同性が高く、実際にアワヨトウの性フェロモン産生に関与していると思われる遺伝子 *PsΔ11* および *PspgFAR* が単離され、これらが共に腹部末端の特定部分で発現していたことから、この発現部位を指標としてさらに AAT 候補遺伝子を選抜した。

4. 研究成果

アワヨトウフェロモン腺からアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AAT) 遺伝子を効率よく単離するためには、この遺伝子の転写レベルが最も高い時期のフェロモン腺を用いて cDNA ライブラリーを作製すべきであるが、AAT 遺伝子の発現時期は不明であった。一方、これまでのカイコガの研究成果から、*desat1* や *pgFAR* のようなフェロモン生合成酵素遺伝子は同じ時期に転写レベルが上昇することが分かっており、実際に両遺伝子の転写レベルの最も高い羽化一日目のカイコガフェロモン腺 cDNA ライブラリーからは、*desat1* や *pgFAR* などのフェロモン産生に関連する EST クローンが多数得られている。そこでアワヨトウでも同じ事象が見られると仮定し、まず degenerate RT-PCR などによりアワヨトウフェロモン腺からフェロモン生合成酵素の一つである $\Delta 11$ 脂肪酸飽和化酵素遺伝子 (*PsΔ11*) の単離を試みた結果、カイコガ *desat1* と 67.1% の相同性を有する cDNA クローンを得た。またバキュロウイルス発現系を利用して機能解析を行った結果、この酵素が $\Delta 11$ 脂肪酸飽和化活性を有し、実際に性フェロモン産生に関与していることが明らかとなった。さらに RT-PCR 解析により発現時期を調べた結果、羽化 3 日目に最も転写レベルが高かったことから、この時期のメスのアワヨトウ 1,009 頭からフェロモン腺を含む腹部末端組織を摘出して total RNA を調製した。これをもとにノーマライズド cDNA ライブラリーを作製し、ランダムに選抜した約 2,000

クローンについて 5' 末端の塩基配列解析を行った。前述のように、カイコガフェロモン腺では AAT 遺伝子が発現していないと思われることから、カイコガとアワヨトウの EST クローンを比較し、アワヨトウでのみで発現している遺伝子を選抜したところ 38 個の独立 EST クローンを得た。

本研究の遂行の過程で、degenerate RT-PCR によりアワヨトウ *pgFAR* の単離を試みた結果、8 種類のホモログが得られ、そのうちの 1 つが長鎖脂肪酸アシル基還元活性を有すること、すなわちアワヨトウの性フェロモン生合成に関与することが明らかとなったことから、これを *PspgFAR* と名付けた。これまでアワヨトウのフェロモン腺の部位に関して詳細な解析はされていなかったが、RT-PCR 解析の結果、*PsΔ11* および *PspgFAR* はともに腹部末端で発現していること、さらにその腹部末端を 4 箇所 (A-D) に分けて調べたところ、共に転写レベルが B で最も高いこと、すなわち、フェロモン産生細胞が B に最も多く存在することが分かった。そこで、この条件を指標として上記 38 クローンを選抜し、最終的に 5 個の AAT 候補遺伝子を得た。次に、上記 AAT 候補遺伝子を酵母発現系により機能解析したが、芳しい結果を得るには至らなかった。これまでのカイコガフェロモン産生関連遺伝子の解析結果などから、昆虫遺伝子は酵母細胞では機能発現しない場合があることが分かっており、今回の結果から AAT 候補遺伝子は昆虫培養細胞あるいはトランスジェニック系を利用した個体レベルでの発現など別の方法で解析する必要があることが分かった。

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 2 件)

1. Fónagy A., Moto K., Ohnishi A., Kurihara M., Kis J., Matsumoto S. (2011) Studies of sex pheromone production under neuroendocrine control by analytical and morphological means in the oriental armyworm, *Pseudaletia separata*, Walker

(Lepidoptera: Noctuidae). Gen Comp Endocrinol., 172, 62-76. (査読有り)

2. Binu A., Fujii T., Moto K., Matsumoto S., Fukusawa M., Tatsuki S., Ishikawa Y. (2009) Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 39, 90-95. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 本賢一、李載みん、栗原政明、永田宏次、田之倉優、長澤寛道、松本正吾 (2011) アワヨトウ性フェロモン生合成に関わるアシル基還元酵素遺伝子の単離と機能解析、第 55 回日本応用動物昆虫学会大会 (福岡) 3 月 29 日
- ② Adrien F., Moto K., Ohnishi A., Matsumoto S. (2010) Studies of sex pheromone production under neuroendocrine control by analytical and morphological means in the oriental armyworm, *Pseudaletia separata*, Walker (Lepidoptera: Noctuidae). 25th Conference of European comparative endocrinologists. Pecs, Hungary. 9 月 3 日
- ③ Moto K., Matsumoto S. (2010) Molecular analysis of sex pheromone production-related gene in the silkworm, *Bombyx mori.*, 9th European congress of entomology. Budapest, Hungary. 8 月 25 日
- ④ 本賢一、李載みん、栗原政明、永田宏次、田之倉優、長澤寛道、松本正吾 (2010) アワヨトウ性フェロモン生合成に関わるアシル基還元酵素遺伝子

の単離、日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) 3 月 30 日

- ⑤ 李載畝、本賢一、大西敦、永峰俊弘、田之倉優、長澤寛道、永田宏次、松本正吾 (2010) 「害虫の繁殖抑制に応用可能なリガンドと受容体膜タンパク質の機能解析: フェロモン産生関連分子の遺伝子および機能解析」 [平成 22 年度] ターゲットタンパク研究プログラムから見える未来 3 (東京) 3 月 5 日
- ⑥ 永田宏次、岡田晃季、河合岳志、大塚淳、Jimmy Joe Hull、本賢一、松本正吾、長澤寛道、田之倉優 (2009) 「カイコガ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN) の活性型立体構造の解析」 第 9 回日本蛋白質科学会年会 (熊本) 5 月 22 日
- ⑦ 本賢一、栗原政明、李載畝、永田宏次、長澤寛道、松本正吾 (2009) 「アワヨトウ性フェロモン生合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素」日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 3 月 29 日
- ⑧ 李載畝、Jimmy Joe Hull、本賢一、大西敦、永田宏次、長澤寛道、松本正吾 (2009) 「カイコガ PBAN 受容体 (PBANR) アイソフォームの同定とその遺伝子発現解析」日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 3 月 29 日
- ⑨ 永田宏次、岡田晃季、河合岳志、大塚淳、Jimmy Joe Hull、本賢一、松本正吾、長澤寛道、田之倉優 (2009) 「カイコガ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN) の環状アゴニストの NMR 構造解析」日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 3 月 29 日
- ⑩ 本賢一、李載畝、大西敦、Jimmy Joe Hull、長澤寛道、永田宏次、松本正吾 (2009) 「害虫の繁殖抑制に応用可能なリガンドと受容体膜タンパク質の構造・機能解析ーガ類昆虫の性フェロモン産生関連遺伝子の単離と機能解析ー」 [平成 20 年度] ターゲットタンパク研究プログラムから見える未

来2（東京）1月15日

〔図書〕（計1件）

- ① 本賢一、松本正吾（2010）「蛾類昆虫の
性フェロモンとその生合成メカニズム」
バイオフィリア、23、75-80

〔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

<http://www.riken.jp/insect/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本 賢一（MOTO KEN-ICHI）
独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学
研究室・専任研究員
90333335

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し