

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06067

研究課題名(和文)カメムシ類に特異的な集合フェロモン合成酵素の逆化学生態学的解明

研究課題名(英文) Reverse chemical ecological analysis for biosynthesis enzymes of stink bug specific aggregation pheromones

研究代表者

篠田 徹郎 (SHINODA, TETSURO)

福島大学・食農学類・教授

研究者番号：10355620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：チャバネアオカメムシの集合フェロモン(MDT)の合成に関わる酵素遺伝子の同定、および合成器官の同定を目的に、幼若ホルモン酸メチル基転移酵素(JHAMT)様遺伝子に着目して研究を行った。その結果、本種には7種のJHAMT様遺伝子が存在しており、そのうちの1つL2がMDTの合成に関与する可能性が高いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であったチャバネアオカメムシの集合フェロモンの生合成酵素遺伝子および生合成器官に関する新規な知見が得られた。本種以外にも、カメムシ類やコガネムシ類には類似の構造を持つ集合フェロモンを生産する種が多数おり、本研究は集合フェロモンを利用した新たな農業害虫の防除法開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：In order to identify genes and organs involved in the synthesis of aggregation pheromone in the green-winged stink bug, *Plautia stali*, we have conducted a research focusing on the analysis of juvenile hormone acid methyltransferase-like genes. Eventually, we have identified 7 JHAMT-like genes in this species and found that one of them, L2, is most likely involved in the synthesis of aggregation pheromone.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：幼若ホルモン 集合フェロモン カメムシ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) チャバネアオカメムシ *Plautia stali* Scott (カメムシ目:カメムシ科)は、果樹の果実を吸汁加害するいわゆる「果樹カメムシ類」の中でもとりわけ重要な種で、日本全土に分布しモモやナシなどをはじめ様々な果樹に被害をもたらす。本種の雄成虫は、集合フェロモンを放出し、同種だけでなく他種の果樹カメムシ類や天敵類をも誘引することが知られていた。チャバネアオカメムシは十分に摂食した非休眠雄成虫だけが集合フェロモンを生産し、非休眠雌成虫、幼虫、休眠成虫は生産しないことが明らかになっていた。その主成分として、(2*E*,4*E*,6*Z*)-2,4,6-デカトリエン酸メチルエステル(MDT)(図1B)が同定され、発生予察や大量誘殺など害虫防除に利用されていた。

(2) チャバネアオカメムシ以外にも、カメムシ類やコガネムシ類にはカルボキシメチル(CM)基を有する集合フェロモン(CM型フェロモン)を合成する種が知られていた。しかしフェロモンの生合成機構については、チョウ目昆虫の性フェロモンを除き研究事例が少なく、チャバネアオカメムシを含めカメムシ類の集合フェロモンの合成酵素や合成器官はまったく不明であった。

(3) 幼若ホルモン(JH)は昆虫の脱皮・変態・生殖など重要な生理現象を調節する内分泌物質で、その生合成経路の解明が進んでおり、最終ステップにおけるJH酸のメチル化に、幼若ホルモン酸メチル基転移酵素(JHAMT)が関わるということが明らかにされていた(図1A)。JHAMT遺伝子は、カイコから初めてクローニングされ、その後ショウジョウバエをはじめ複数の昆虫からJHAMTがクローニングされ機能が確認されていた。一方、ゲノム解析の進展により、昆虫のゲノム中には一般的に複数のJHAMT様遺伝子が存在することが明らかになってきた。しかし、それらの機能はまったく解析されていなかった。

(4) MDTはJHと全体的に類似の化学構造をしており、またメチルエステル基を有するという共通点がある(図1)。このことから、申請者はMDTのメチル基生成にはJHAMT様遺伝子の一つが関わっているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1) チャバネアオカメムシの集合フェロモンの主成分であるMDTとJHの構造の類似性に着目し、JHAMT様遺伝子がMDTの合成に関わっている可能性を検証する。また、チャバネアオカメムシのJHAMT様遺伝子の発現組織を明らかにする。それにより、これまでまったく不明であった、JH合成以外のJHAMT様遺伝子の機能を明らかにするとともに、カメムシを始めとするCM型フェロモンの生合成機構および生合成器官解明への手がかりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) チャバネアオカメムシ JHAMT 様遺伝子配列の取得および解析

チャバネアオカメムシのRNAseqデータをアセンブルしてトランスクリプトームデータベースを作成した。これに対して、既知の昆虫JHAMTのアミノ酸配列をクエリーとしてBLAST検索を行い、本種のJHAMT様遺伝子の配列情報を網羅的に取得した。得られた塩基配列を元に相同性解析、およびMEGAを使用して分子系統解析を行った。

(2) GC/MSによるMDTの定量および逆遺伝学的解析(RNAi)

日齢の異なるチャバネアオカメムシ雄成虫をヘキサソランに浸漬して抽出し、GC/MSによる定量を行った。なお、当初計画ではJHAMT様遺伝子の2本鎖RNAを終齢幼虫にインジェクションし、羽化後に雄成虫のヘキサソラン抽出物をGC/MSによりMDTを定量し、逆遺伝学的にMDT生産に関わるJHAMT様遺伝子を探索する予定であったが、結果の項で述べる理由により実施できなかった。

(3) リアルタイム定量PCRによる遺伝子発現解析

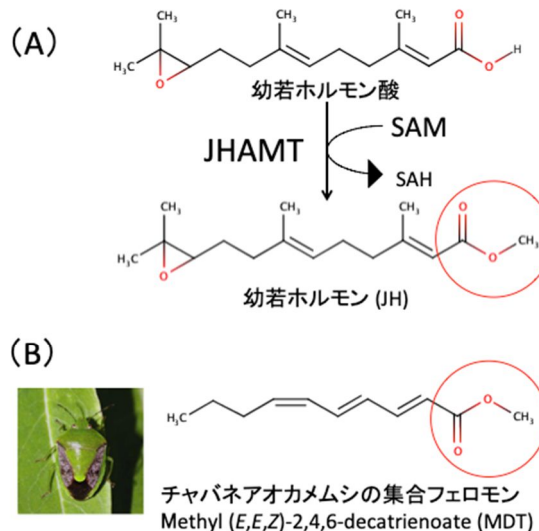


図1 昆虫の幼若ホルモン(A)とCM型フェロモン(B)
JHのカルボキシメチル基(CM基:丸で囲んだ部分)は、S-アデノシルメチオニン(SAM)依存性のメチル基転移酵素JHAMTによって合成される。

得られた JHAMT 様遺伝子の塩基配列情報に基づき、リアルタイム定量 PCR 用の特異プライマーをデザインした。各プライマーペアは、ゲノム DNA のコンタミによる影響を避けるため、クサギカメムシの JHAMT 様遺伝子とのアラインメントにより推定したイントロンを挟む位置に設計した。解析サンプルは、発育ステージ、性、休眠状態の異なる本種の全虫体から、RNA を抽出し、逆転写して作成した cDNA を鋳型として用いた。雄成虫で特異的に発現していた JHAMT 様遺伝子については、さらに解剖した組織別に RNA を抽出して定量を行った。リアルタイム定量 PCR は、サイバークリーン系試薬を用いた系で実施した。リファレンス遺伝子として RpL32 を用い、Ct 法により相対発現量を算出した。

4. 研究成果

(1) チャバネアオカメムシの JHAMT 様遺伝子の同定および配列解析

トランスクリプトーム解析の結果、チャバネアオカメムシには、7 種類の JHAMT 様遺伝子 (PsJHAMTL1-L7; 以下 L1-L7 と略す) が存在していることが明らかになった。分子系統解析の結果、JH 合成が実験的に確認されている既知昆虫の JHAMT と最も近縁な遺伝子は L7 で、ついで、L6 が近縁であった。一方、L1-L5 は、各遺伝子がクサギカメムシの JHAMTL とクラスターを作っており、カメムシ類に特有の JHAMTL と考えられた。特に、L3、L4、L5、は 1 : 1 ホモログとなっており、両種に共通の機能を持つ可能性が示唆された。一方、クサギカメムシの L6 が単独で含まれるクラスターには、チャバネアオカメムシでは L1 と L2 の 2 種類が含まれており、L1 または L2 はチャバネアオカメムシ特有の遺伝子である可能性が示唆された。

(2) GC/MS による MDT の定量

GC/MS 解析により、いずれの日齢のチャバネアオカメムシ雄成虫からも、MDT が検出されなかった。その原因として、検出系の不備以外に、飼育条件 (密度、餌) あるいは累代飼育系統でフェロモン合成能の低下などの可能性が考えられたが、研究実施期間中にその解決に至らなかった。その結果、当初計画していた、逆遺伝学的な MDT 合成酵素の探索 (RNAi による MDT 合成酵素候補遺伝子の抑制と MDT 産生量の解析) による実施が困難となった。そのため、本研究では、JHAMT 様遺伝子の発現解析をメインとして、MDT 合成に関わる JHAMTL の探索を進めるように計画を変更した。

(3) 非休眠雌雄成虫および幼虫における JHAMT 様遺伝子の発現

全虫体をサンプルとした定量 PCR 解析の結果、各 JHAMT 様遺伝子は、それぞれユニークな発現パターンを示すことが明らかになった。L1 および L3 は雄雌成虫および幼虫のいずれでも発現が確認された。一方、L2 は雄成虫で比較的強い発現が認められたが、雌成虫および幼虫ではほとんど発現が認められなかった。L4 と L5 は類似の発現パターンを示し、雌成虫で強く発現していたが、雄成虫と幼虫ではほとんど発現していなかった。L6 は雌雄成虫・幼虫のいずれでも発現が弱かった。L7 は雌雄成虫および幼虫すべてでやや弱い発現が認められた。

(4) 非休眠雄成虫腹部の各器官における JHAMT 様遺伝子の発現

非休眠雄成虫における JHAMT 様遺伝子の発現部位を明らかにするために、頭胸部、腹部、幼若ホルモン (JH) の産生組織であるアラタ体から抽出した RNA を用いて定量 PCR を行った。その結果、L1 は頭胸部、腹部に比べて、アラタ体で著しく高い発現が認められた。アラタ体は昆虫の JH の主要な合成組織であることから、L1 は JH 合成に関わる JHAMT 遺伝子であることが示唆された。一方、L2 は、腹部で高い発現が認められ、頭胸部およびアラタ体では発現がまったく認められなかった。さらに、非休眠雄成虫の腹部を、背面皮膚、腹面皮膚、交尾器、精巣、付属腺、中腸 + マルピーギ管に分けて解析した結果、腹面皮膚で特異的な発現が認められた。

(5) 総合考察

チャバネアオカメムシから 7 種の JHAMT 様遺伝子を同定し、発現解析を行った結果、各遺伝子は、発育ステージ、性、および休眠状態に応じてユニークな発現プロファイルを示すことが明らかになった。L1 はアラタ体特異的な発現から、本種のオーセンティックな JHAMT であると考えられた。本研究で得られた最も興味深い結果は、L2 だけが非休眠雄成虫でのみ特異的に発現しており、幼虫や非休眠雌成虫、休眠雄成虫ではまったく発現が認められなかったことである。先行研究で、本種の集合フェロモンは十分な餌が与えられた条件で育った非休眠の雄成虫のみが生産することが報告されていることから考えて、L2 は MDT の合成に関わる可能性が高いことが示唆された。さらに、L2 は非休眠雌成虫腹部腹面の皮膚においてほぼ特異的に発現していたことから、L2 が MDT の合成に関与するとすれば、本種の集合フェロモンは主に腹部腹面の皮膚またはそれに付随する組織で合成される可能性が高いと考えられた。

今後、PsJHAMTL2 を中心に、さらに詳細な発現組織の解析、RNAi および組換えタンパク質を用いた *in vitro* で酵素の機能解析を進めることで、不明な点の多いカメムシ類の集合フェロモンの合成酵素および合成器官の解明、JH 合成以外の JHAMT 様遺伝子の新たな機能の解明が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuri Homma, Tomohiro Inui, Takumi Kayukawa, Kouhei Toga, Tetsuro Shinoda, Toru Togawa	4. 巻 39
2. 論文標題 The Mitochondrial Phosphatase PTPMT1 is Required for the Proper Growth Rate in the Red Flour Beetle, <i>Tribolium castaneum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs210092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daimon Takaaki, Koyama Takashi, Yamamoto Gaku, Sezutsu Hideki, Mirth Christen K., Shinoda Tetsuro	4. 巻 31
2. 論文標題 The Number of Larval Molts Is Controlled by Hox in Caterpillars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 884 ~ 891.e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.11.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kayukawa Takumi, Furuta Kenjiro, Nagamine Keisuke, Shinoda Tetsuro, Yonesu Kiyooki, Okabe Takayoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of a juvenile-hormone signaling inhibitor via high-throughput screening of a chemical library	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75386-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sapin Gelyn D., Tomoda Kai, Tanaka Sayumi, Shinoda Tetsuro, Miura Ken, Minakuchi Chieka	4. 巻 126
2. 論文標題 Involvement of the transcription factor E75 in adult cuticular formation in the red flour beetle <i>Tribolium castaneum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103450 ~ 103450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2020.103450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Homma Yuri, Toga Kouhei, Daimon Takaaki, Shinoda Tetsuro, Togawa Toru	4. 巻 530
2. 論文標題 A mitochondrial phosphatase PTPMT1 is essential for the early development of silkworm, Bombyx mori	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 713 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------