

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：34303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780106

研究課題名（和文）ダニ類が生産する脂肪酸とその代謝産物の有機化学的解析と生合成研究

研究課題名（英文）Organic chemical analysis and biosynthetic study of fatty acids and the metabolites produced by mites

研究代表者

清水 伸泰（SHIMIZU NOBUHIRO）

京都学園大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：30434658

研究成果の概要（和文）：

特定の昆虫を除いて、一般的に動物にはオレイン酸の  $\omega$ -6 位に二重結合を作る  $\Delta^{12}$ -デサチユラーゼがないためリノール酸を生合成できない。そこで、コナダニ類がリノール酸を生合成する事実を同位体標識化合物の取り込み実験で証明した。また、分泌物である不飽和炭化水素がリノール酸から直接変換されることを実証するため、NMR スペクトルにより、同位体標識位置の特定および取り込み率の算出を行った。その結果、炭化水素はリノール酸から直接、脱炭酸あるいは脱 CO により生成していることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

The biosynthesis of linoleic acid is generally restricted to animals capable of inserting a double bond into the  $\omega$ -6 position of oleic acid, and includes specific class of insects. The de novo biosynthesis of linoleic acid was demonstrated by incorporation experiments of isotope-labeled compounds in astigmatid mites. To demonstrate the direct conversion of linoleic acid into unsaturated hydrocarbon, labeled positions and incorporation rates in those compounds were determined by NMR spectra. As a result, the data support a mechanism in which linoleic acid is converted to unsaturated hydrocarbon by release of CO<sub>2</sub> or CO.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：脂肪酸，生合成，代謝機構，コナダニ，二次代謝産物，脂質

## 1. 研究開始当初の背景

無気門亜目ダニ(以下コナダニと略す)は、隠気門亜目ダニ(以下ササラダニと略す)と同じく、多くの種は土壤中に生息し、動物植物遺体の分解者の役割を果たしている。そのごく一部が、農業害虫、食品害虫あるいは喘息やアトピー性皮膚炎を促す衛生害虫として知られている。コナダニ類はササラダニ類に比べ分泌化合物の天然物化学的研究は進展しており、炭化水素、テルペン、芳香族化合物を中心として約 90 化合物が、10 科 61 種のダニから同定されている。国内外において、コナダニ類の有機化学的研究を行っているグループは我々を除いて皆無であり、唯一オーストリアの研究グループが 2008 年、ササラダニ類の天然物化学的研究をスタートさせた。

コナダニ類は炭化水素を分泌する種と脂肪酸エステルを分泌する種に大別できる。炭化水素を分泌する種の中で、*Z,Z*-6,9-ヘプタデカジエン (6,9-C17:2) を主成分とするダニが非常に多く、生合成的に相当する前駆物質はリノール酸である。炭化水素はダニ体表から水分の蒸発を防ぐのに役立っており、乾燥に弱いコナダニ類にとっては生命活動を維持する上で重要な物質である。また *Tortonia* sp. では、警報フェロモンとして機能することが判明した。サトウダニを使ったモノテルペン生合成経路の研究において、同位体標識したグルコース-1-<sup>13</sup>C を継続的に摂食させたところ、6,9-C17:2 が同位体でラベル化されることを GC-MS で確認した。よってサトウダニは前駆物質であるリノール酸を生合成し、6,9-C17:2 に誘導していると推測した。一部の昆虫(ゴキブリ、アブラムシ、コオロギ、シロアリなどの特定種)を除いて、一般的に動物には ω-6

位に二重結合を作る Δ<sup>12</sup>-デサチュラーゼがないためリノール酸を生合成できない。

## 2. 研究の目的

本研究では、コナダニ類がリノール酸を生合成する事実を同位体標識化合物を用いた取り込み実験で証明する。さらに 6,9-C17:2 がリノール酸から直接変換されることを実証するため、両化合物の同位体標識位置および取り込み率を <sup>13</sup>C-NMR で詳細に解析する。さらに、脂肪酸から炭化水素への変換機構にも注目する。Kolattukudy らは、植物(エンドウの葉)、緑藻類、水鳥の尾羽腺、シリアカニクバエの体表ワックスは、脂肪酸から直接脱炭酸するデカルボキシラーゼによるものではなく、脂肪酸はアシル CoA レダクターゼによりアルデヒドまで還元されたのち、脱 CO 酵素(デカルボニラーゼ)の作用により炭化水素と CO が生成すると報告した。しかし、Blomquist らはさまざまな昆虫を用いた実験で、アルデヒドから O<sub>2</sub>, NADPH, シトクロム P450 の作用で炭化水素と CO<sub>2</sub> が生成すると報告した。本研究では、同位体標識化合物の取り込み実験で脂肪酸のカルボニル炭素を <sup>13</sup>C で標識し、6,9-C17:2 が生合成される際、<sup>13</sup>CO あるいは <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> のどちらが放出されるかを分析する。現在まで、ダニ類のリノール酸生合成能およびリノール酸から 6,9-C17:2 が直接変換される生合成機構を解明した報告はない。

これまで他種コナダニから新規不飽和炭化水素として *Z,Z*-1,6,9-ヘプタデカトリエン (1,6,9-C17:3)、*Z,Z*-4,8-ヘプタデカジエン (4,8-C17:2)、*Z,Z,Z*-4,8,11-ヘプタデカトリエン (4,8,11-C17:3) を同定している。4,8-C17:2 の前駆脂肪酸は、その不飽和結合

位置からリノール酸とは異なるジエン脂肪酸である。また2種のトリエン(1,6,9-C17:3, 4,8,11-C17:3)については、末端に二重結合をもつ新規な高度不飽和脂肪酸や松の実油であるピノレン酸が前駆体であると考えられ、これらの生合成機構は非常に興味深い。同位体標識化合物の取り込み実験で、これら化合物の生合成が証明できれば、動物界では全く新しいデサチュラーゼが機能していることになる。生合成機構の解明に加え、同定する高度不飽和脂肪酸の薬理学における重要性を視野に入れて研究を展開する。

### 3. 研究の方法

#### (1)ダニ類分泌成分の探索研究

多種のダニ類を野外から効率的に採集し、本学所有のGC-MS(アジレント・テクノロジー社の6890N)による成分分析を行った。また、NMRやFTIRなど各種機器分析を行うのに必要なサンプル量を確保するために、安定した繁殖を可能にするササラダニの飼育条件(餌、温度、湿度、密度等)を検討した。さらに餌として与えているクロレラあるいは乾燥酵母をベースとした人工飼料の開発を目指した。

#### (2) 同位体標識リノール酸の解析

6,9-C17:2を主要成分として分泌するサトウダニを用いて、同位体標識したグルコース-1-<sup>13</sup>Cの取り込み実験を行った。経時的に分泌化合物のGC-MS分析を行い、ラベル体の取り込み量を分泌化合物のマススペクトルから推定した。十分な取り込みを確認したところで、ダニの脂質を溶媒抽出し、加水分解とエステル化反応を行って脂肪酸エステルに誘導した。各種クロマトグラフィーによりリノール酸エステルを単離精製し、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを測定した。市販のリノール酸エステルのスペクトルデー

タと比較し、同位体標識された炭素原子を帰属した。この実験でサトウダニによるリノール酸の生合成を証明した。

#### (3) 同位体標識 Z,Z-6,9-ヘプタデカジエン(6,9-C17:2)の解析

方法(2)とは別途、グルコース-1-<sup>13</sup>Cの取り込み実験を行った。分泌化合物を溶媒抽出し、6,9-C17:2を各種クロマトグラフィーにより単離精製し、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを測定した。合成により調製した6,9-C17:2のスペクトルデータと比較し、同位体標識された炭素原子を帰属した。方法(2)と(3)の実験結果を照らし合わせて、6,9-C17:2が直接リノール酸から変換されることを実証した。

### 4. 研究成果

(1) ユリ根から得られたゴミコナダニの一種 *Sancassania mycophaga* のヘキササン抽出物を、GC-MSで分析したところ、高級脂肪酸エステル3成分を認めた。炭素数22の不飽和脂肪酸と炭素数5の飽和・不飽和アルコールのエステルであるドコセン酸ペンチル、ドコセン酸ペンテニル、ドコサジエン酸ペンチルと推定した。そこでこれら脂肪酸エステルの構造決定を行った。マススペクトルの開裂様式から、モノエン脂肪酸エステルは2成分であり、ともに二重結合位置を13位と決定した。エルカ酸とイソペンチルアルコールからエステルを合成したところ、天然物と保持時間およびマススペクトルが一致した。幾何構造を決定するため、エルカ酸イソペンチルをE体に異性化したところ、天然物のGC保持時間と異なった。その結果、このモノエン脂肪酸エステルを新規化合物である(Z)-13-ドコセン酸イソペンチルと同定した。現在、残る2成分の構造決定を進めている。

(2) 同位体標識化合物を給餌したダニの脂質を溶媒抽出し、加水分解とエステル化反応を行って脂肪酸エステルに誘導した。カラムクロマトグラフィーによりリノール酸エステルを単離精製し、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを測定した。標品のスペクトルデータと比較し、同位体標識された炭素原子を帰属することで、サトウダニによるリノール酸の生合成を証明した。さらに、6,9-C17:2 がリノール酸から直接変換されることを実証するため、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにより、リノール酸と6,9-C17:2の同位体 $^{13}\text{C}$ 標識位置の特定および取り込み率の算出を行った。その結果、6,9-C17:2 はリノール酸から直接、脱炭酸あるいは脱 CO により生成していることを確認した。昆虫において関連する報告では、同位体標識化合物と酵素との *in vitro* における変換反応を確認することで、特定化合物の生合成の証明としているものが多い。一方、本研究は、ダニ類に同位体標識化合物を摂食させ、その代謝産物のスペクトル解析から生合成機構を実証するものであり、直接的に動物の生命活動を認識することができる。本研究の成果として、研究対象とするコナダニ類が一次代謝産物およびそこから誘導される二次代謝産物の生合成研究に有効であることを示すことができた。

(3) ゴミコナダニの一種 *Caloglyphus* sp. “sasagawa” は、クワガタムシの飼育容器から数年前に単離して以後、人工培地で継代飼育している。分泌腺成分を分析したところ、コナダニ特有の炭化水素類の他に、これまで報告例のない2種の脂肪族アルコールのギ酸エステルを検出した。両化合物の炭素数は17と奇数個であるが、不飽和結合の位置から炭素数18のリノール酸とオレイン酸がそれぞれの前駆物質と推定した。

これまで脂肪族ギ酸エステルの生合成に関する報告は無く、生成過程におけるギ酸部分の炭素の由来および減炭機構は未解明である。そこで、これまでの研究成果に照らし合わせて、*Caloglyphus* sp. “sasagawa” に対する同位体標識化合物の取り込み実験を行っている。これら天然物学的に興味深い化合物群の生合成過程には、全く新しい酵素が関与している可能性が高いと考えられる。

#### 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5件)

1. Shimizu, N., Yakumaru, R., Sakata, T., Shimano, S., Kuwahara, Y.

The absolute configuration of chrysomelidial: a widely distributed defensive component among Oribotritiid mites (Acari: Oribatida)

Journal of Chemical Ecology, 38, 29-35, 2012.

査読有り, DOI: 10.1007/s10886-012-0064-3

2. Shimizu, N., Kuwahara, Y., Yakumaru, R., Tanabe, T.

*n*-Hexyl Laurate and Fourteen Related Fatty Acid Esters: New secretory compounds from the Julid Millipede, *Anaulaciulus* sp.

Journal of Chemical Ecology, 38, 23-28, 2012.

査読有り, DOI: 10.1007/s10886-012-0063-4

3. Kuwahara, Y., Kawai, A., Shimizu, N., Tokumaru, S., Ueyama, H.

Geraniol, *E*-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol, as the alarm pheromone of the sycamore lace bug *Corythucha ciliata* (Say)

Journal of Chemical Ecology, 37, 1211-1215,

2011. 査読有り, DOI:

10.1007/s10886-011-0025-2

4. Kuwahara, Y., Shimizu, N., Tanabe, T.

Release of hydrogen cyanide via a post-secretion Schotten-Baumann reaction in

defensive fluids of polydesmoid millipedes.  
*Journal of Chemical Ecology*, 37, 232-238,  
2011. 査読有り, DOI:  
10.1007/s10886-011-9920-9  
5. Tamura, S., Fujiwara, K., Shimizu, N.,  
Shingo, T., Kimura, T., Murakami, N.  
Concise synthesis of 5,6-dihydrovaltrate  
leading to enhanced Rev-export inhibitory  
congener.  
*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18,  
5975-5980, 2010. 査読有り, DOI:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>

[学会発表] (計 8 件)

1. 花香に含まれる 2-エチルヘキサノールとその誘導体, 桑原保正, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月, 京都女子大学
2. コガタルリハムシ *Gastrophysa atrocyanea* の防御物質によるアリ忌避活性, 薬丸亮太, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月, 京都女子大学
3. Volatile Chemicals from the Drywood Termite *Incisitermes minor* (Hagen) (Blattodea: Kalotermitidae), Emiria Chrysanti, 第 62 回日本木材学会, 2012 年 3 月, 北海道大学
4. 脂肪酸の脱炭酸反応を利用したコナダニ由来脂肪族ギ酸エステルの合成, 清水伸泰, 日本環境動物昆虫学会 年次大会, 2011 年 11 月, 宮崎県宮崎市 ホテルメリージュ
5. *n*-Hexyl laurate and fourteen related esters other than benzoquinones from an unidentified *Anaulaciulus* sp. (Julida: Julidae), Nobuhiro Shimizu, International Society of Chemical Ecology, 27<sup>th</sup> Annual Meeting, July 24th-28th, 2011, Vancouver, Canada
6. ゴミコナダニの一種 *Sancassania mycophaga* 由来新規脂肪酸エステルの同定,

藤原昂希, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月, 京都女子大学  
7. グンバイ 7 種が分泌する体表成分の比較と生物活性, 桑原保正, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月, 京都女子大学  
8. Absolute stereochemistry of iridoid monoterpene widely distributed among Oribotritriidae mites (Acari: Oribatida), Nobuhiro Shimizu, International Society of Chemical Ecology, 26<sup>th</sup> Annual Meeting, July 31st-August 4th, 2010, Tours, France

[図書] (計 0 件)

[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  
清水 伸泰 (SHIMIZU NOBUHIRO)  
京都学園大学・バイオ環境学部・准教授  
研究者番号: 30434658  
(2) 研究分担者  
( )  
研究者番号:  
(3) 連携研究者  
( )  
研究者番号: