

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82112
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24580085
研究課題名(和文)カイコガ性フェロモン不活化過程の分子基盤研究

研究課題名(英文)PDE analysis

研究代表者

宮澤 光博(miyazawa, mitsuhiro)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・ユニット長

研究者番号：90370684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の化学交信において、フェロモン結合タンパク質(PBP)とフェロモン分解酵素(PDE)は重要な機能を担っている。PBPの研究は広く行われているが、PDEに関する知見は多くはない。本研究ではPDEの機能を担っていると推定される2つの酵素を同定することに成功した。我々は3,000匹のカイコガ触角から、PDEの精製を行った。高分解のイオン交換クロマトグラフィーから得られた精製試料は、SDS-PAGEを行うと、複数のバンドに分かれることが示された。このためPDEと推定された酵素は多量体を形成し、機能していると考えられた。

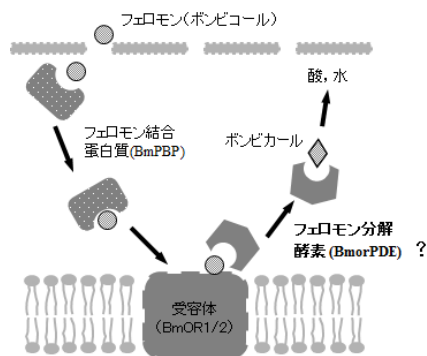
研究成果の概要(英文)：Pheromone binding proteins (PBPs) and pheromone degradation enzymes (PDEs) play a part in chemical communication of insects. Although the PBP is unfolds widely, molecular mechanism analysis of PDE is still insufficient. In this study, we identified two estimated enzymes from the antenna of Japanese silkworm when it affected pheromone degradation. We purified these enzymes from approximately 3,000 antennae of the silkworm. However, the purest fraction separated by high resolution ion exchange chromatography contains several proteins in SDS-PAGE analysis. PDE from silkworm might be composed of various subunit.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：フェロモン分解 アルコールオキシダーゼ アルコールデハイドロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

昆虫の触角内に存在する嗅覚感覚子には、フェロモンの信号伝達に特化した分子機構が備わっている。疎水性の高いフェロモン分子は、感覚子リンパ中に高濃度で存在するフェロモン結合タンパク質（以下 PBP と記載）と結合することで溶解性が向上し、樹状突起膜に存在する受容体に移動する。受容体と相互作用を行ったフェロモン分子は、その後フェロモン分解酵素（以下 PDE と記載）によって化学的に不活化され、フェロモンシグナルは一旦リセットされる。



触角内においてフェロモン分子によるシグナル伝達のイメージ

PBP と PDE は、1981 年にポリフェムス蚕成虫の触角から最初に発見された。現在では種々の昆虫から PBP が単離されているが、このうち研究代表者らは、コガネムシおよびカイコガ成虫の PBP の同定と抽出に関する研究を行った。その後、構造生物学分野の研究者らによって、カイコガ由来 PBP の分子機構に関する多くの知見が得られるようになった。

一方、性フェロモン分子の不活化に関する研究は、ポリフェムス蚕およびコガネムシ成虫の触角から直接 PDE を抽出・精製することに成功したという報告がなされている。

脂肪酸を出発物質として生合成される昆虫フェロモンの大半は、アセテート、アルデヒド、およびアルコール型に分類される。このうちアセテートとアルデヒド型フェロモンの不活化に関する研究は、本研究の協力者らのグループによって行われたが、残るアルコール型フェロモンの不活化に関する研究は未だ行われていない。昆虫のフェロモン不活化機構を包括的に理解するためには、水酸基を有するアルコール型フェロモンの分解に関する知見は必要不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

昆虫の性フェロモン分子の受容に関する研究は、近年大きな進展が見られる。その一方、フェロモン分子が分解され、化学交信シ

グナルがリセットされるプロセスの知見は殆ど得られていない。カイコガ成虫はボンビコール(10E,12Z-hexadeca-10,12-dien-1-ol)のみで配偶行動を発動するため、アルコール型フェロモンの不活化過程を解析する上で、理想的な対象昆虫である。

そこで本研究は、カイコガ成虫を用いて性フェロモン(ボンビコール)を分解する因子の存在を突き止め、同定を行う。

3. 研究の方法

実験に供したカイコガ成虫は、人工飼料で雌雄に別けて飼育したものを活用した。サナギから脱皮した成虫は、一旦-20度の冷凍庫に保管し、凍結した個体のオスおよびメスの触角、頭部、脚部などの採取を行った。

採取した各組織は、20mMの緩衝液中にて破砕し、内容物の抽出を行い、3000 rpmの条件にて10分間遠心処理を行い、各種泳動実験、および液体クロマトグラフィーなどの実験に活用した。

本研究では、分解因子として幾つかの酵素を対象とし、native PAGE-活性染色法を用いてカイコガ成虫由来 PDE と推定される酵素の組織局在性の解析を行った。

特に水酸基を有するボンビコールは、触角感覚子腔内でアルデヒド基を持つボンビカルに変換されることによってフェロモン活性が失われると推測している。このため、感覚子リンパと同じ pH(中性)環境で触媒機能を有するアルコールオキシダーゼの組織局在性および雌雄の違いについて検討を行った。またアルカリ性環境下で触媒機能を示すアルコールデハイドロゲナーゼについても同様な検討を行う。組織局在性の解析と共に、サナギから脱皮後4日後の成虫に至るまでの時期特異性についても評価を行い、先に報告されている知見と比較を行いながらカイコガ成虫由来の同定を行う。

4. 研究成果

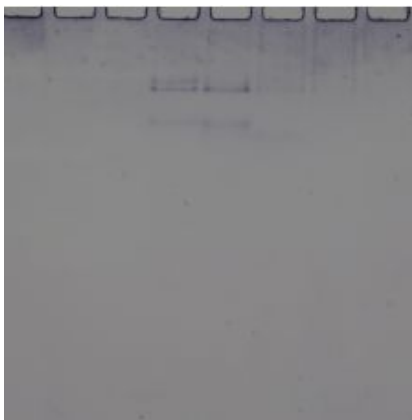
これまでボンビコールは、最終的に酸と水に分解することが報告されている。そこで水酸基を有するボンビコールは、他の動物と同様に、アルデヒド基を持つボンビカルに転化する酵素が、フェロモン不活化因子と推定し、その化学反応を担うと思われるアルコールデハイドロゲナーゼ、およびアルコールオキシダーゼの候補遺伝子を、カイコゲノムのデータベースを用いて探索を行った。

その結果、アルコールデハイドロゲナーゼは67個の候補遺伝子が見出されたが、アルコールオキシダーゼに関連する候補遺伝子は見出されなかった。アルコールデハイドロゲナーゼは、補酵素(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドやニコチンアミドアデニ

ンジヌクレオチドリン酸)を必要とし、アルカリ性で高い触媒活性を示す。一方、アルコールオキシダーゼは補酵素を必要とせず、中性付近で高い触媒活性を示すため、中性付近のpHを有する感覚子リンパでは効率的に機能すると考えた。

そこでカイコガの抽出物について native PAGE-活性染色法を用いて酵素活性の確認を行った。その結果、アルコールオキシダーゼおよびアルコールデハイドロゲナーゼ共に触角に特異的に発現していることが示された。一方、雄雌間において、発現量に明瞭な違いは観察されなかった。また成虫に変態後の経時変化において酵素発現量に明確な差は見出されなかった。ゲノム情報から見出されなかった酵素の存在が推定されたが、読取り枠の予測が困難なことが原因と考えられている。

想定した2種類の酵素が触角に存在することが明確になったので、次に3000頭のカイコガ触角を採取し、その抽出液の精製を行った。弱イオン交換カラムを用いて抽出液の分画を行い、特にアルコールオキシダーゼはNaCl濃度150~200 mMの画各に溶出されることが示された。



nativePAGE 活性染色法を用いたアルコールオキシダーゼの確認

得られた酵素画分をさらに高分解のイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過カラムを用いて精製を行い、目的とするアルコールオキシダーゼの精製画分を得ることができた。native PAGE-活性染色法では、ほぼ単一と思われたバンドは、SDS-PAGE-活性染色法を用いると複数のバンドに分離され、該当の酵素は多量体を形成していることが推定された。この段階で得られた試料濃度から種々の実験を行うには、さらに10倍以上の試が必要であることが示され、更なる試料調製の必要性が示唆された。

様々な昆虫において、PBPは触角内リンパ液に極めて高い濃度で存在することが報告されているが、今回、PDEと推定した酵素の存在量は極めて少なく、安定性も低いことが示された。また本研究では誘因フェロモン因

子であるボンピコールの水酸基は、他の動物と同様にアルデヒドを有するボンピカルに変換された後、最終的に水と酸等に分解されると推定したが、近年ボンピカルも性行動に関与することが報告されている。もし、ボンピカルもカイコガの行動に必須な因子であるならば、アルコール分解酵素も一定以上の発現は制御されると考えられる。またボンピカルの生合成経路にボンピコールが含まれるならば、フェロモンシグナルを最後にリセットする因子やそのメカニズムも考慮しなければならない。カイコガの性行動に関わるシグナル分子の代謝メカニズムは、当初想定した機構より複雑なことが考えられた。

1 2 3 4 5 6 7



nativePAGE 活性染色法を用いたアルコールオキシダーゼの精製画分

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 光博 (MIYAZAWA MITSUHIRO)
独立行政法人 農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・昆虫機能研究開発ユニット長
研究者番号：90370684

(2) 研究分担者

山崎 俊正 (YAMAZAKI TOSHIMASA)
独立行政法人 農業生物資源研究所・先

端ゲノム研究センター・生体分子研究ユニット長
研究者番号：40360458

石田 裕幸 (ISHIDA YOKO)
神戸大学理学(系)研究科(研究院)・グローバルCOE 研究員
研究者番号：90509861