

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03776

研究課題名(和文)ガ類性フェロモン交信系の進化の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of the evolution of sex pheromone communication systems in moths and its application

研究代表者

石川 幸男 (Ishikawa, Yukio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：60125987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ガ類の性フェロモンはType I、Type IIに大別されるが、最近、その両者を混用する種(Hybrid type)が見つかった。本研究では、メイガ上科におけるHybrid typeフェロモン利用の実態の解明とType II生産系に特異的な生合成酵素の起源の解明を目的に研究を行ない、1)メイガ上科(ツトガ科+メイガ科)のガ類を体系的に収集し、Hybrid type性フェロモンが利用されている分類群を明らかとするとともに、2)Type I性フェロモンの生合成に関わる鍵酵素の一つであるepoxidaseの実体を分子レベルで初めて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- ・本研究により、炭化水素及びその誘導体(Type I成分)がガ類の性フェロモンの微量成分として重要であることが示され、今後の性フェロモン同定研究に指針を示すことができた。
- ・本研究により、Type IからType II性フェロモン交信系への進化の過程を推定することができた。どの分類群でHybrid typeが利用されているかの推定が合理的にできるようになり、微量成分の同定を効率的に行うことができるようになった。
- ・Type I性フェロモンの生合成に重要な役割を果たすエポキシ化酵素について、初めてその実態を分子レベルで明らかにすることができた。今後、この分野の研究が深化、加速されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Moth female sex pheromones have been largely classified into type I and type II; however, reports on the moth species that utilize both types (Hybrid type) have recently increased. In the present study, we studied 1) the use of hybrid type pheromone in the superfamily Pyraloidea (Pyralidae + Crambidae families), and 2) the enzymes involved in the production of type-II sex pheromones. Results are as follows. 1) By systematic collection of moth species belonging to Pyraloidea, we were able to reveal the taxa in which hybrid-type sex pheromones are utilized. 2) by utilizing RNA-seq technology and functional assays of heterologously expressed proteins, we were able to identify the molecular entity of epoxidases that introduce epoxy ring into the precursor of type-II sex pheromones to be cytochrome P450s (CYPs).

研究分野：昆虫化学生態学

キーワード：Type-II性フェロモン 生合成 エポキシダーゼ P450 シャクガ科 トモエガ科 ノメイガ亜科 炭化水素成分

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ガ類の交尾前生殖隔離に大きな役割を果たす性フェロモンは、その末端に水酸基(OH)、ホルミル基(CHO)などの官能基をもつ Type と官能基をもたない Type に大別される(図1参照)。興味深いことに、Type と Type ではその生合成の出発原料も合成経路も異なっている。Type は体内で合成される普遍的な脂肪酸(パルミチン酸)を原料としてフェロモン腺内で生合成される。これに対し、Type は寄主植物(食物)から摂取した必須脂肪酸(リノール酸とリノレン酸)が原料であり、必須脂肪酸はエノサイトと呼ばれる特殊な細胞中で炭素鎖の伸長/短縮反応を受けたのち、脱炭酸されて不飽和炭化水素となる。この炭化水素は血液中のリポフォリンに積載されて血中を移動し、フェロモン腺に取り込まれ、そのまま、あるいはエポキシ化などの修飾を経たのち、性フェロモンとして放出される。

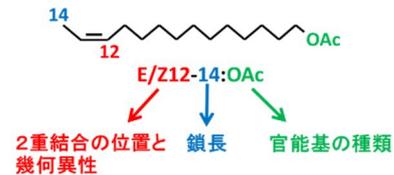
これまで、「Type フェロモンは大部分の科に属するガが利用しているのに対し、Type フェロモンはシャクガ科、ヒトリガ科、ドクガ科、そしてヤガ科の一部に属するガ類のみが利用している」とされてきた。ところが最近、Type と Type を併用する Hybrid type がノメイガ類から相次いで見つかるようになった。共同研究者の一人、中らは、ノメイガ亜科のカクモンノメイガ *Rehimena surusalis* とサツマイモノメイガ *Omphisa anastomosalis* が Hybrid type であることを明らかにしている。

Type I : 分子の末端に官能基がある ~65%

例



アワノメイガ
(*Ostrinia furnacalis*)

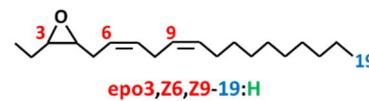


Type II : 分子の末端に官能基がない ~35%

例



ヨモギエダシャク
(*Ascotis selenaria*)



(Millar, 2000; Ando et al., 2004; Ando and Yamakawa, 2011)

図1. ガ類性フェロモンのType I, II の構造上の特徴

2. 研究の目的

本研究では、農業上重要な害虫を多く含むノメイガ類を中心に Type 成分の関与の観点から性フェロモンを再検討し、これまで見落とされていた Type 成分の利用の実態を明らかにすることを第一の目的としている。さらに、フェロモン前駆体のエポキシ化酵素など、Type の利用開始にあたって鍵となったと考えられる酵素に焦点を当てて機能を解析し、Type から Type への性フェロモン交信系の進化に関する理解を深めることを第二の目的としている。

3. 研究の方法

- (1) メイガ上科(ツトガ科+メイガ科)における Type 成分の利用の分布を体系的に調査する。まず、これまで Hybrid type が多くみつかったツトガ科ノメイガ亜科を集中的に調査し、フェロモン中の Type 成分の有無をなるべく多くの種で確認する。つづいて、ツトガ科の他の亜科に属する種、メイガ科に属する種、そして他科の種へと対象を体系的に広げていく。
- (2) Type 性フェロモンに多様性をもたらした epoxidase に注目する。Type のフェロモンは、その原料(必須脂肪酸)に由来する二重結合を3,6,9位に持つことを特徴としている。どの位置の二重結合がエポキシ化されるかは分類群ごとに異なっており、epoxidase の選択性に依存していると考えられる。この酵素の変異を追うことで Type 成分の多様化を解析する。

4. 研究成果

- (1) ガ類における Type 性フェロモン利用の実態の解明。ガ類(鱗翅目, Lepidoptera)の系統樹(Regier et al. 2013)に、本研究による調査結果及び性フェロモン成分のデータベース(Ando and Yamamoto, 2020)から得られた情報を重ね合わせるにより、ガ類の進化史上における Type 、Type 、Hybrid type フェロモンの出現時期を推定した(図2)。これによると、ガ類の中でも、ガ類の祖先と考えられているトビケラ類(Trichoptera, 図2左端)から分岐して間もない科ではトビケラ類で性フェロモンとして利用されている短鎖の第2級アルコールをフェロモン成分としていること、Type フェロモンを獲得してから間もなくムモンハモグリ科において Type フェロモンが利用されるようになったこと、Hybrid タイプの利用はメイガ科の出現以降であることが推定された。

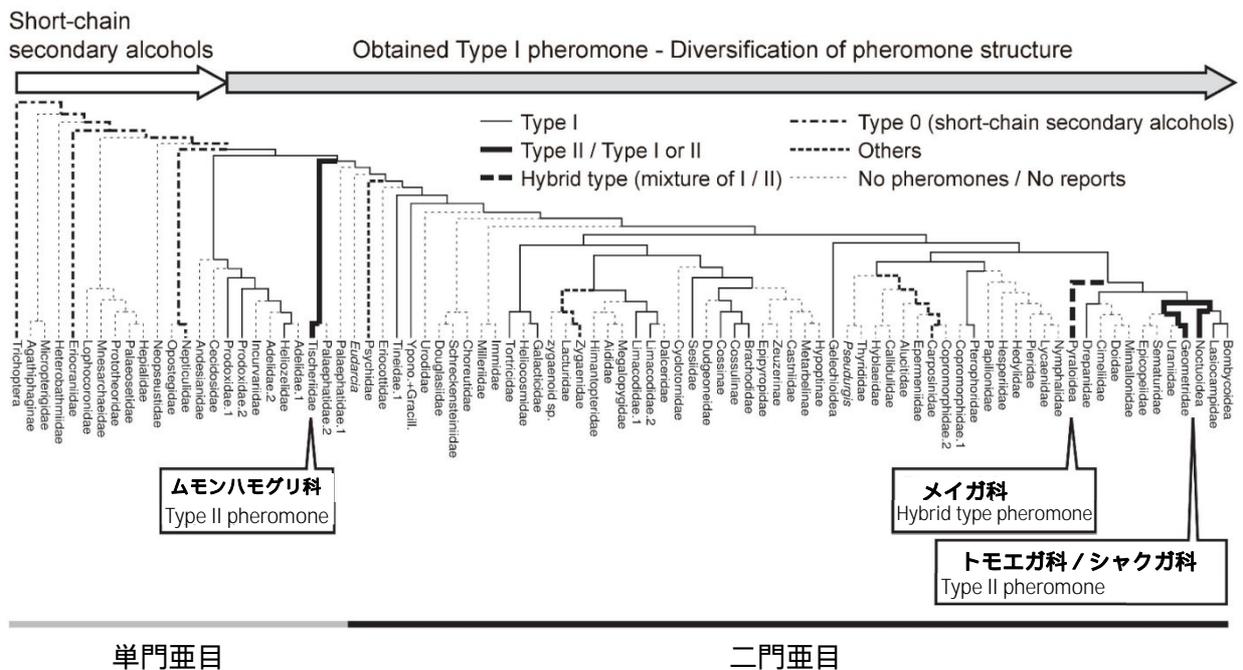


図 2 . ガ類の分子系統樹と利用している性フェロモンの種類を重ね合わせた図 . Naka and Fujii (2020)を改変。

(2) エポキシダーゼの分子実体の解明 . Type 性フェロモンの大きな特徴の一つであるエポキシ環を分子中に導入する酵素、エポキシダーゼを図 3 に示したガ類を用いて、3 位、6 位、9 位に特異的にエポキシ環を導入するエポキシダーゼの同定を試みた。

種名	性フェロモン主成分	科
 アメリカシロヒトリ (<i>Hyphantria cunea</i>)	 Z3,Z6,epo9-21:H	Arctiinae (ヒトリガ亜科)
 クワゴマダラヒトリ (<i>Lemyra imparilis</i>)	 Z3,Z6,epo9-21:H	
 ヨモギエダシャク (<i>Ascotis selenaria</i>)	 epo3,Z6,Z9-19:H	Geometridae (シャクガ科)
 トビモンオオエダシャク (<i>Biston robustum</i>)	 Z3,epo6,Z9-19:H	

図 3 . 研究対象とされたガ類の種名とそれらの性フェロモン主成分 . ヒトリガ科の 2 種の性フェロモン主成分には 9 位に、ヨモギエダシャクは 3 位に、トビモンオオエダシャクは 6 位にエポキシ環がある .

アメリカシロヒトリの 9 位エポキシ化酵素 (9epo、Hc_epo1) の同定は、当研究室の戎ら (Rong et al., 2014) が、性フェロモン腺の EST ライブラリーの解析と候補遺伝子の機能解析により、その分子実態が P450 であり、CYP341B サブファミリーに属することを明らかにしていた (図 4) . 本研究では、アメリカシロヒトリと同じヒトリガ科に属し、同じく Z3,Z6,epo9-21:H を性フェロモン主成分とするクワゴマダラヒトリから Hc_epo1 のホモログ Li_epo1 の単離を行なった。Lc_epo1 と Hc_epo1 アミノ酸配列の相同性は 88.5% であり、Li_epo1 は Hc_epo1 と同じ CYP341 ファミリーに属することがわかった。

ヨモギエダシャクの 3 位エポキシ化酵素 (3epo、As_epo1) の同定 . ヨモギエダシャクのフェロモン腺を用いて次世代 RNA シークエンス (RNA-seq) を行い、フェロモン腺で

発現する遺伝子を網羅的に解析した。RNA-seq より得られた配列情報から、(1)P450 ファミリーに属し、(2)フェロモン腺での発現量が他組織より多い、という2条件でエポキシ化酵素の候補遺伝子を絞り込んだ。これらの候補の組織ごとの発現を比較した結果、comp17297 と comp17936 がフェロモン腺で特異的に発現していたが、フェロモン腺での発現量が約 300 倍高い comp17297 遺伝子を As_epo1 と名づけ、機能解析を行った。As_epo1 の酵素活性は、Li_epo1 と同じくバキュロウイルス発現システムを用いてタンパク質を昆虫細胞に発現させ酵素活性を評価した。分析の結果、細胞画分の抽出物にのみ、基質である性フェロモン前駆体 Z3,Z6,Z9-19:H の 3 位エポキシ化を示す化合物のピークを認めた。これにより、As_epo1 が 3 位エポキシ化活性をもつことが証明された。As_epo1 はヒトリガ科 2 種より同定した 9 位エポキシ化酵素とは異なり、CYP340 ファミリーに属していた (図 4)。

トビモンオオエダシャクの 6 位エポキシ化酵素の探索。フェロモン腺の RNA-seq を行い、P450 であることや mRNA 発現量、発現の組織特異性に基づいて選抜した結果、Biston462 が 6 位エポキシ化酵素遺伝子の候補として残り、これを Br_epo1 と名づけた。分子系統解析の結果、Br_epo1 は 9 位エポキシ化酵素、3 位エポキシ化酵素のいずれとも異なり、CYP4AU ファミリーに属することがわかった (図 4)。昆虫細胞で Br_epo1 を発現させ、性フェロモン前駆体である Z3,Z6,Z9-19:H を基質として培養細胞に添加しその変化を追跡した。しかし、エポキシ化を示唆するピークは細胞画分からも培地画分からも検出されなかった。Br_epo1 のエポキシ化酵素活性については証明に至っていない。

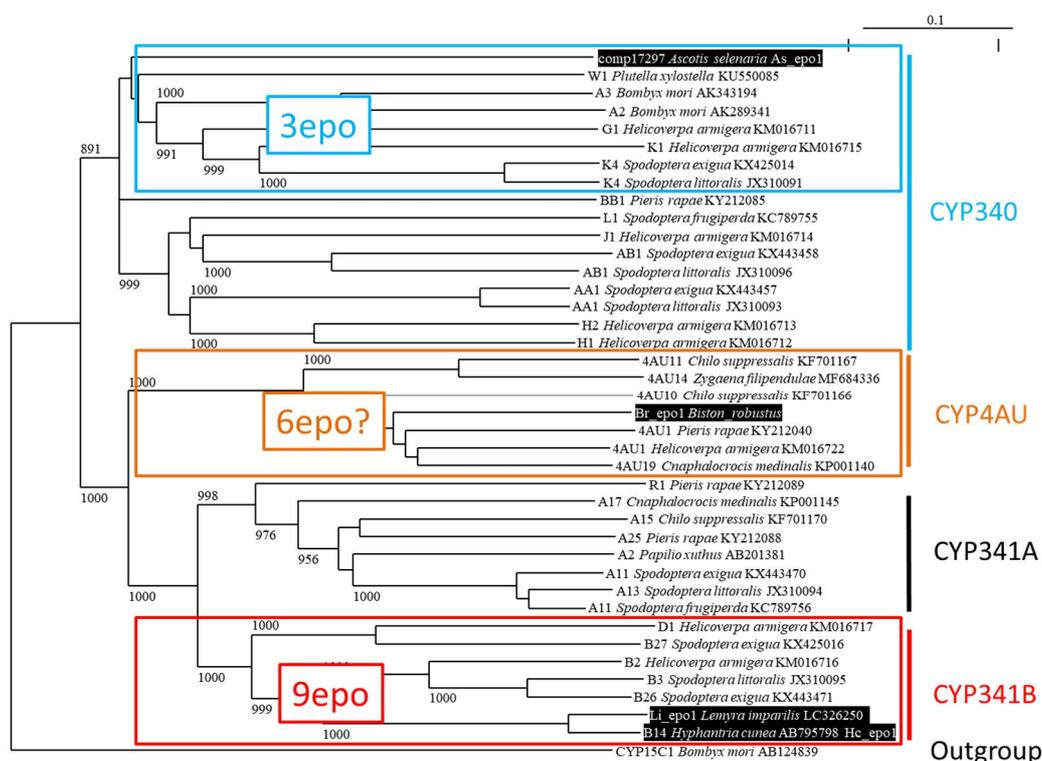


図 4 .アメリカシロヒトリ (9epo)、クワゴマダラヒトリ (9epo)、ヨモギエダシャク (3epo)、トビモンオオエダシャク (6epo) の性フェロモン腺で働くエポキシ化酵素の分子系統関係。ただし、トビモンオオエダシャクの 6epo の活性は未確認。Fujii et al. (2020) を改変。本研究で得られた配列は黒地に白抜きで示した。

(2) のまとめ

ガ類の Type 性フェロモン生合成に関与する 3 位、6 位、9 位エポキシ化酵素遺伝子候補のクローニング及び機能解析を試み、このうち 9 位エポキシ化酵素 (Hc_epo1、Li_epo1) 及び 3 位エポキシ化酵素 (As_epo1) の分子実体を明らかにすることができた (図 4)。トビモンオオエダシャクの 6 位エポキシ化酵素遺伝子の候補 (Br_epo1) は分子系統解析の結果、9 位エポキシ化酵素、3 位エポキシ化酵素のいずれとも異なり、CYP4AU ファミリーに属することがわかった (図 4)。昆虫においてホルモンの生合成や解毒過程におけるエポキシ化はクラン 2 やクラン 3 の CYP が担っており、ガ類の性フェロモン腺でエポキシダーゼとして働く CYP がすべてクラン 4 に属する (図 5) ことは興味深い。NCBI タンパク質アミノ酸配列データベースに基づく、CYP340、CYP341 はチョウ目特異的である可能性が高いが、性フェロモン生合成系の進化との関係の解析は今後の課題である。

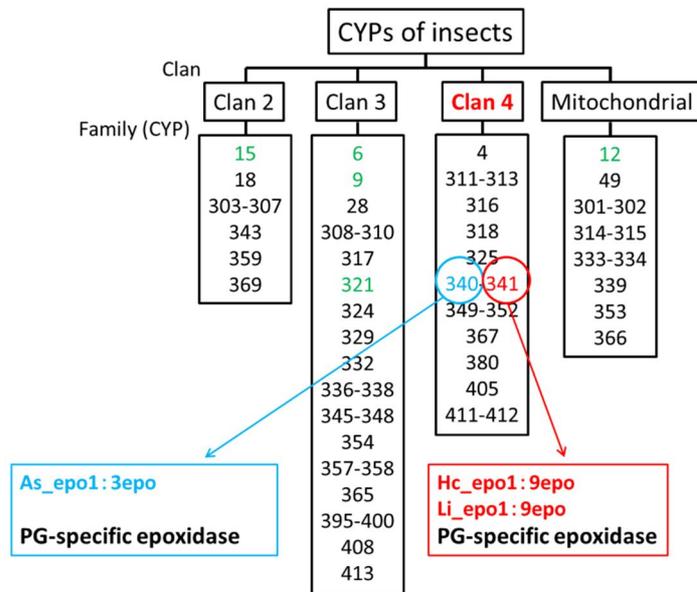


図5 . 性フェロモン腺 (PG) 特異的に発現し、Type II 成分のエポキシ化に関与するチトクローム P450 (CYP) はクラン 4 に属していた。クラン 4 の中では、9 位をエポキシ化する酵素 (9epo) はクラン 4 の CYP341 ファミリーに、3 位をエポキシ化する酵素 (3epo) は CYP340 ファミリーに属していた。Fujii et al. (2020) を改変。緑色で示した番号はエポキシ化活性をもつ分子種の存在が確認されているファミリーを示している。

引用文献

- Ando T, Yamamoto M (2019) Internet database: https://lepiphormone.sakura.ne.jp/pdb_top.html Cited 15 Nov. 2019.
- Regier JC, Mitter C, Zwick A, Bazinet AL, Cummings MP, Kawahara AY, Sohn J-C, Zwickl DJ, Cho S, Davis DR, Baixeras J, Brown J, Parr C, Weller S, Lees DC, Mitter K (2013) A large-scale, higher-level, molecular phylogenetic study of the insect order Lepidoptera (moths and butterflies). *PLoS One* 8: e58568.
- Rong Y., T. Fujii, S. Katsuma, M. Yamamoto, T. Ando, Y. Ishikawa (2014) CYP341B14: a cytochrome P450 involved in the specific epoxidation of pheromone precursors in the fall webworm *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 54: 122–128.
- Rong, Y., T. Fujii, H. Naka, M. Yamamoto, Y. Ishikawa (2019). Functional characterization of the epoxidase gene, *Li_epo1* (*CYP341B14*), involved in generation of epoxyalkene pheromones in the mulberry tiger moth *Lemyra imparilis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 107: 46–52.
- Rong, Y., T. Fujii, Y. Ishikawa (2019) CYPs in different families are involved in the divergent regio-specific epoxidation of alkenyl sex pheromone precursors in moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 108: 9–15.
- Fujii, T., Y. Rong, Y. Ishikawa (2020) Epoxidases Involved in the Biosynthesis of Type II Sex Pheromones. In: *Insect Sex Pheromone Research and Beyond* (pp. 169-181). Springer, Singapore.
- Naka, H., T. Fujii (2020) Chemical Divergences in the Sex Pheromone Communication Systems in Moths. In: *Insect Sex Pheromone Research and Beyond* (pp. 3-17). Springer, Singapore.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rong Yu, Fujii Takeshi, Ishikawa Yukio	4. 巻 108
2. 論文標題 CYPs in different families are involved in the divergent regio-specific epoxidation of alkenyl sex pheromone precursors in moths	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 9~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2019.03.002	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 Rong Yu, Fujii Takeshi, Naka Hideshi, Yamamoto Masanobu, Ishikawa Yukio	4. 巻 107
2. 論文標題 Functional characterization of the epoxidase gene, <i>Li_epo1</i> (CYP341B14), involved in generation of epoxyalkene pheromones in the mulberry tiger moth <i>Lemyra imparilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 46~52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2019.02.001	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 Fujii Takeshi, Rong Yu, Ishikawa Yukio	4. 巻 -
2. 論文標題 Epoxidases Involved in the Biosynthesis of Type II Sex Pheromones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Sex Pheromone Research and Beyond	6. 最初と最後の頁 169~181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/978-981-15-3082-1_8	査読の有無 無
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 Ishikawa Yukio, Fujii Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular Bases for the Biosynthesis of Species-Specific Sex Pheromones in the Genus <i>Ostrinia</i> (Lepidoptera: Crambidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Sex Pheromone Research and Beyond	6. 最初と最後の頁 151~167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/978-981-15-3082-1_7	査読の有無 無
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 Naka Hideshi, Fujii Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemical Divergences in the Sex Pheromone Communication Systems in Moths	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Sex Pheromone Research and Beyond	6. 最初と最後の頁 3~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/978-981-15-3082-1_1	査読の有無 無
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 中 秀司, 松井悠樹	4. 巻 45
2. 論文標題 ガ類性フェロモンの進化 –ガの系統からフェロモン化合物の変遷を辿る–	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本農業学会誌	6. 最初と最後の頁 13~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yukio Ishikawa, Yu Rong, and Takeshi Fujii
2. 発表標題 Type-II sex pheromones in moth: biosynthetic pathways and enzymes involved therein
3. 学会等名 2018 World Life Science Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukio Ishikawa, Yu Rong, and Takeshi Fujii
2. 発表標題 Type-II sex pheromones in moths: biosynthetic pathways and enzymes involved therein
3. 学会等名 Meeting of the Chinese Association of Chemical Ecologists (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担者	中 秀司 (Naka Hideshi) (00443846)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究 分担者	松尾 隆嗣 (Matsuo Takashi) (70301223)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	