

機関番号：34428

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20510208

研究課題名 (和文) ミツバチカスト制を維持する制御物質の探索

研究課題名 (英文) Search for semiochemicals of honeybee (*Apis mellifera*)

研究代表者

野田 直規 (NODA NAOKI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：40180749

研究成果の概要 (和文)：本研究は「ミツバチ(*Apis mellifera*) のカスト制を制御する未知の情報伝達物質、semiochemicals の発見」を目的とする。研究方法として、Johnstoneらの仮説に基づき、女王バチ分泌物質から情報伝達物質そのものを探索する従来法と異なり、ローヤルゼリーより semiochemicals の前駆体の単離の企図した。その結果 7 種のヒドロキシ脂肪酸を単離構造決定した。これらは女王物質として知られる 9-ODA 同様、水酸基のエナンチオ混合部であることが判明し semiochemicals 前駆体の可能性が大いに想定された。本研究では、それらのうち 3 種のおキノ体への変換を完了しており、残すすべての化合物をおキノ体へ変換後、これら化合物群の生物活性試験を実施する。

研究成果の概要 (英文)：This study was undertaken to search for semiochemicals, which have various important functions and roles for caste maintenance in honeybee colonies (*Apis mellifera*). Rather than looking for semiochemicals in the mandibular glands of the queen bee, this study involves the search for precursors of pheromones from large quantities of royal jelly. Seven chiral hydroxy fatty acids were isolated. Interestingly enough, except for 3-hydroxyl fatty acid, all chiral acids are present in royal jelly as optical isomers. Considering the relationship between 9-ODA and 9-HDA, it is expected that these chiral acids are precursors of semiochemicals, and that their corresponding oxo-forms may play physiologically important functions and roles in the hierarchy of honeybee colonies. The biological activities of these compounds will be examined.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：天然有機化学

1. 研究開始当初の背景

ミツバチは、高度なカスト制を形成して種の繁栄を図る代表的な社会性昆虫の一つである。今日、ミツバチのカスト機構ならびにカスト社会を維持・制御するメカニズムを解明するため、形態学的あるいは分子生物学的見地から膨大な研究が活発に展開されている。

ごく最近、ミツバチゲノムの全塩基配列が解読され、ミツバチがショウジョウバエやハマダラ蚊と比較してはるかに多くの嗅覚受容体遺伝子をもつことが判明し、ミツバチ社会における多彩な情報伝達物質 (semiochemicals) の存在が強く示唆された。しかしながら、ミツバチのカスト社会を制御、維持する semiochemicals に関し、これまでに明らかにされた化学物質としては、2 種の警報フェロモン (isoamyl acetate, 2-oxo heptane)、齢差分業に関わる幼若ホルモン (juvenile hormone) のほか女王物質と呼称されている 9-oxo-2-decenoic acid (9-ODA) など数種を数えるのみで、特定交尾場所への雄バチの集合や分蜂現象を司る物質はおろか、女王分化を促す Key 化合物も未詳のまま残されておりカスト制の制御機構は依然として神秘的ベールに包まれたままといっても過言ではない。

今日までに明らかにされた数少ない semiochemicals のうち 1961 年 Butler らによって女王バチの大顎腺分泌物中から単離された 9-ODA は、巣内の働きバチ達の行動制御や働きバチの卵巣発育阻害作用などを有しカスト社会を維持するための重要な役割を担っていることが明らかにされた。

ミツバチ巣内から女王バチを取り除くと、遅くとも 2 時間以内のうちに全群がざわめきたち、働きバチたちが一部の働きバチの巣室に生みつけられている卵や幼虫を女王室 (王台) に移し変え始めるが、この働きバチの行動は巣内に 9-ODA を置くことにより阻止される。これらの観察から Johnston らは 9-ODA 体が、受け手の働きバチ体内で短時間に 9-hydroxy-2-decenoic acid (9-HDA) など

の不活性な物質に変換される事実を突き止めるとともに不活性な代謝産物は、ローヤルゼリーに混入されて女王バチに返送され、女王バチ体内で活性な 9-ODA に変換されて再び大顎腺から分泌される「フェロモンサイクル」説を提唱した。(Fig. 1)

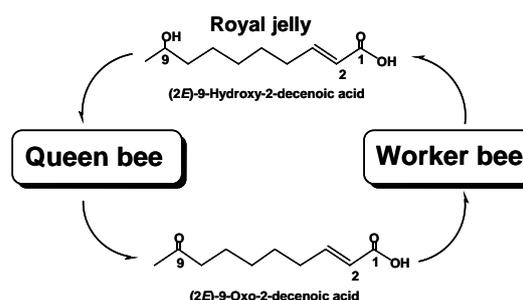


Fig. 1

ローヤルゼリー中に 9-ODA は皆無で、不活性代謝産物に相当する 9-HDA などが有意な量含有されている事実は、彼らのフェロモンサイクル説を裏付ける有力な証拠の一つと考えられている。

我々はごく最近、ローヤルゼリーの成分精査途上、女王物質、9-ODA の前駆体である 9-HDA が 9 位 *R, S* 混合物として存在していることを知った。さらにローヤルゼリー中に多数のヒドロキシ脂肪酸が *R, S* 混合物として存在している興味深い事実をつきとめた。9-HDA から 9-ODA への変換位置が enantio-mixture であることならびに Johnston の仮説を考え合わせると、これらヒドロキシ脂肪酸のあるものは 9-HDA 同様、ローヤルゼリーを摂取した女王バチ体内で enantio-mixture の水酸基がケトンに変換され、カスト制を維持する重要な制御物質に変身する前駆体である可能性が極めて高いと推定される。

2. 研究の目的

本研究は、ミツバチカスト制を維持する未知の制御物質 (semiochemicals) の発見を目的とする。

3. 研究の方法

女王物質、9-ODA 発見以降、重要な **semiochemicals** が見出されていない主因として、それらが極微量しか存在しないため同定困難なことならびに原料である女王バチ大顎腺分泌物などの量的確保の困難さが挙げられる。

本研究では、女王バチの分泌物から直接カスト制を支配する **semiochemicals** そのものの同定を行う従来法とは以下の点で大きく異なる手法を取り入れた。すなわち本研究では、Johnstone の仮説に則り、大量（数千オーダー）のローヤルゼリーを調達し、それより制御物質を「前駆体」として単離せんとしたことを特徴とする。

具体的な研究方策：

- (1) ローヤルゼリー含有成分のうち特にヒドロキシ脂肪酸の徹底単離を企図し、それら絶対配置を含む全構造を決定する。
- (2) 得られたヒドロキシ脂肪酸のうち、**enantio-mixture** として存在する化合物について、不斉水酸基をケト体に変換する。
- (3) 極微量で生物活性評価が困難な化合物に関しては、ローヤルゼリーの主成分、10-hydroxy-2-decenoic acid を出発原料として部分合成する。
- (4) 得られたすべてのケト体の生物活性を評価する。具体的な評価方法として、これまで9-ODA 発見の過程で用いられた評価系を用いる。

4. 研究成果

ローヤルゼリー中の脂肪酸、特にヒドロキシ脂肪酸を徹底精査し、脂肪酸フラクションより7種の化合物を単離した。¹H-NMRおよびMSスペクトルなどからそれらの構造は9,10-dihydroxy-2*E*-decenoic, 4,10-dihydroxy-2*E*-decenoic, 4,9-dihydroxy-2*E*-decenoic, 3-hydroxydecanoic, 3,9-dihydroxy-decanoic, 3,11-dihydroxy-dodecanoic ならびに 3,10-dihydroxy-decanoic acids (10-HDA) と決定した。

二級水酸基の絶対配置の決定には、改良 Mosher法を適用し上記7種のヒドロキシ脂肪酸のうち5種がエナンチオ混合物として存在することを明らかにした。*R*, *S*混合物の存

在比率は¹H-NMRスペクトルにおけるピーク強度より決定した。(Fig. 2)

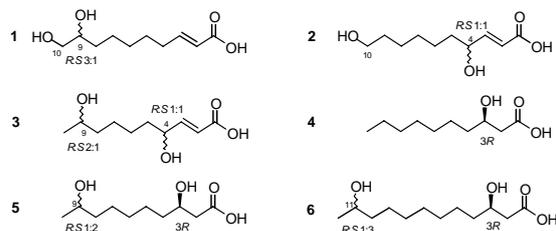


Fig. 2

この結果、ローヤルゼリー中のヒドロキシ脂肪酸に関しては、3位水酸基はすべて*R*配置をもつが、他の位置(4,9,11)の水酸基はいずれも*R,S*混合物として存在することをあきらかとした。

これらヒドロキシ脂肪酸の二級水酸基が*R,S*混合物として存在する事実は、対応する水酸基がケト体に置き換わった脂肪酸が9-ODA 同様ミツバチ社会における **semiochemicals** としての役割を持つ可能性が高い (Fig. 3)。

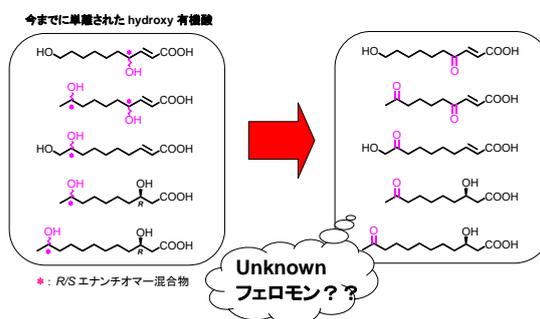


Fig. 3

しかしながら、いずれの化合物も数十ミリグラムしか得られず、生物活性を評価するには量的に足りない。そこでローヤルゼリー含有脂肪酸の主構成成分、10-hydroxy-2*E*-decenoic acid を原料として各ケト体の合成を試みた。

はじめにヒドロキシ脂肪酸フラクションをcollins酸化し crude な酸化混合物(sample-1)を得た。本合成途中、生成物に入った試験管に、多数の虫（現在同定中）が入り込んでいるのが確認され、生成物中に昆虫誘引物質の存在が想定された。そこで、ヒドロキシ脂肪

酸フラクションの主構成成分である 10-HDA を collines 酸化して formyl 体 (sample-2) を調整した。

つぎに二級水酸基をもつ脂肪酸に対応する oxo 体の合成を試みた。

10-HDA (1) に、アリル位にブロモ基を導入後、水酸基に置換して 4,10-dihydroxy-2-decenoic acid (3) を得た。また、2-acetyl-cyclohexanone より合成した 9-ODA (4) を同様の処理によって 4-hydroxy-9-oxo-2-decenoic acid (6) とした後、これら hydroxy 体 3、6 を Collins 酸化などのクロム酸処理によりケト体への変換を試みたが、Michael 付加型の副反応などが競合し、目的物は得られなかった (Fig. 4)。

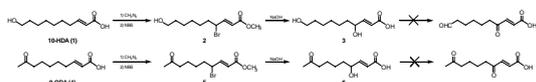


Fig. 4

そこで無水クロム酸と *t*-ブチルアルコールより、強力な酸化剤であるクロム酸水素 *t*-ブチルを作製し、これを 9-ODA (4) の酸化に用いたところ、アリル位メチレンを直接カルボニル基へと酸化させることに成功し、低収率ながらケト体、4,9-oxo-2-decenoic acid (sample-3) を得ることができた (Fig. 5)。

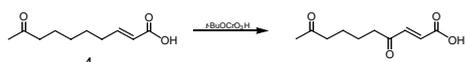


Fig. 5

現在、残るヒドロキシ脂肪酸の oxo 体の合成・増量に注力中である。

今後、調整した各 sample について 9-ODA に対して実施された評価系を用い、9-ODA との各種生物活性比較実験を行うことにより研究の最終目標である未知の semiochemicals の発見をめざす。

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 1 件)

1. Kodai T., Nakatani T., Noda N., The Absolute Configurations of Some Hydroxy Fatty Acids from the Royal Jelly of Honeybees (*Apis mellifera*). *Lipids*, 査読有、2011, 46, 263-270.

[学会発表] (計 1 件)

1. 小鯛哲也、中谷尊史、野田直規, Absolute Configurations of Some Hydroxy Fatty Acids from the Royal Jelly of Honeybees (*Apis mellifera*). アメリカ油化学会、101st AOCs Annual Meeting & Expo. May 16-19 (2010), Phoenix, Arizona, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-tennen/HTML-file/TOP/TOP-right/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 直規 (NODA NAOKI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：40180749

(2) 研究分担者

中谷 尊史 (NAKATANI TAKAFUMI)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：10340861

小鯛 哲也 (KODAI TETSUYA)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：70548891

(3) 連携研究者

中村 純 (NAKAMURA JYUN)

玉川大学・ミツバチ科学研究センター・

教授

研究者番号：30256002