

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248008

研究課題名(和文)ガ類のメス及びオス性フェロモン交信システム進化のダイナミクスを探る

研究課題名(英文)Studies on the female and male sex pheromone communication systems in moths

研究代表者

石川 幸男 (Ishikawa, Yukio)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60125987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,200,000円

研究成果の概要(和文)：ガ類の性フェロモンは、化学構造的に大きく2つのタイプ(Type-I, Type-II)に分類できる。大部分のガ類がType-Iを利用しており、Type-IIの利用はシャクガ科、ヒトリガ科などのより進化した分類群にみられる。このことから、Type-IIの利用は、Type-Iのあとで2次的に進化したのではないかと推測された。本研究は、Type-I、Type-IIのフェロモン生合成系で働く生合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析を通して、ガ類におけるフェロモン交信系の進化を探ろうとした。その結果、フェロモン合成酵素のうちとくに不飽和化酵素について、その進化過程を明瞭に示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The sex pheromones of moths have generally been classified into two types based on the presence (type I) or absence (type II) of a terminal functional group. Type-I pheromones are derived from de novo synthesized fatty acids, whereas type-II pheromones are biosynthesized from dietary essential fatty acids such as linoleic and linolenic acids. The use of type-II pheromones has only been observed in moth species belonging to more advanced moth groups such as Geometridae and Arctiidae. We presumed that the use of type-II pheromones has secondarily evolved from the communication systems using type-I pheromones. In the present study, we attempted to gain insights into the evolution of sex pheromone communication systems by analysing genes encoding enzymes involved in sex pheromone biosynthesis. By the analysis of moths utilizing type-I and type-II pheromones, we were able to obtain valuable information on the evolution of enzymes involved in pheromone biosynthesis such as desaturases.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：ガ類 フェロモン交信系 不飽和化酵素 進化

1. 研究開始当初の背景

トウモロコシの重要害虫アワノメイガ *Ostrinia furnacalis* を代表とする日本産アワノメイガ類 9 種は、きわめて近縁でありながらメス性フェロモンがそれぞれ異なっており、性フェロモンによる雌雄間コミュニケーションの進化の研究に格好の材料となっている。日本産アワノメイガ類のメス性フェロモンはすべて研究代表者のグループで同定されたものであり、世界の研究をリードしている(文献)。申請者は、この独壇場とも言える領域の研究を着実に発展させるため、2007 年度～2010 年度にわたり基盤研究(A)を推進した。アワノメイガのメスにおける性フェロモン生産系の進化を探るため(図1参照)、フェロモン生合成酵素をコードする遺伝子のクローニングと酵素活性の調節機構を調査した。2009 年からはスウェーデンの Löfstedt 教授のグループとの共同研究を開始し、性フェロモン成分の混合比を支配している Fatty acyl-CoA reductase のクローニングと機能解析を開始した。オスについては、性フェロモン受容体(OR) 8 種をクローニングし、幅広い反応スペクトラムを示す OR3 を含めて、わずかな数のよく保存された OR がアワノメイガ類の性フェロモン受容に関与していることを明らかにした(文献)。

メス性フェロモンの生産と受容に関する研究は、このように目覚しく進歩したが、一方、その存在が古くから指摘されていたオス性フェロモンの実体は長らく不明であり、「ある」という説と「ない」という説が対峙していた。

ガ類の配偶行動には、メス性フェロモンだけではなく、オス性フェロモンが関与している場合がある。アワノメイガ類では、これら二つのフェロモンはそれぞれメスのフェロモン腺及びオスのヘアペンシルから分泌されるが、これらの器官はいずれも腹部末端

(第8,9節間)に存在し、相同器官であると推定される。これら二つの器官ではフェロモン生産に関わる異なる酵素のセットが発現しており、メスとオスで異なるフェロモン成分が生産される所以となっている。

2. 研究の目的

当初の計画では、アワノメイガ類のオス性フェロモンに焦点を当て、メス性フェロモンとの違いを中心に研究する計画であった。しかし、研究を進めたところ、オス性フェロモン様物質は同定されたものの、その機能は必ずしも明確とならなかった。そこで、研究対象をガ類全体に大きく広げて、ガ類における性フェロモン交信系の進化について研究することとした。

ガ類の性フェロモンは、化学構造的に大きく 2 つのタイプ(Type-I, Type-II)に分類できる(図2参照)。Type-I は、1~3 の二重結合を含む 10~18 の直鎖不飽和炭化水素骨格を有し、末端に水酸基、ホルミル基などの官能基を持つことを特徴としている。これに対し、Type-II は、11~4 個の二重結合を含む、炭素数 17~23 の不飽和炭化水素またはそのエポキシ誘導体である。

この 2 種のフェロモンは、その出発原料も異なっている。Type-I が体内で生合成された脂肪酸を原料とするのに対し、Type-II フェロモンの出発原料は寄主植物由来の必須脂肪酸(リノール酸とリノレン酸)である。それぞれの生合成経路で使用されている酵素について Type-I を使用するガ類では、脂肪酸不飽和化酵素と脂肪酸還元酵素を中心に精力的に遺伝子のクローニングを行うとともに、クローニングした遺伝子の機能解析を行った。

大部分のガ類が Type-II を利用しているのに対し、Type-II を利用するガはシャクガ科、ヒトリガ科などのより進化した分類群にみられる。このことから、Type-II フェロモン

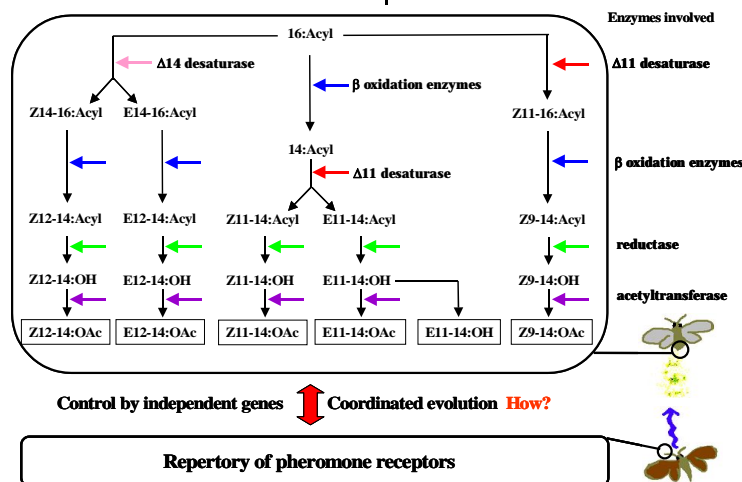


図1. <アワノメイガ類のメス性フェロモン生産系とオスのフェロモン受容系の共進化>

は、Type-I の交信系の確立のあとに、2 次的に進化してきたのではないかと推測されている。

本研究では、Type-I、Type-II のフェロモン生合成系で働く生合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析を通して、ガ類におけるフェロモン交信系の進化を探ろうとしたものである。

3. 研究の方法

Type-I を利用するガの代表としてアワノメイガ類 (*Ostrinia*) を用い、Type-II を利用するガとしてはヨモギエダシャクとキマエホソバを用いた。これらに加えて、Type-I と Type-II 成分を合わせもつという特徴をもつアメリカシロヒトリを研究材料とした。

(1) Type-II フェロモンを利用しているヨモギエダシャクの性フェロモン腺で発現している desaturase について研究した。本種の性フェロモン腺から常法により cDNA を調製し、desaturase をターゲットとする縮重プ

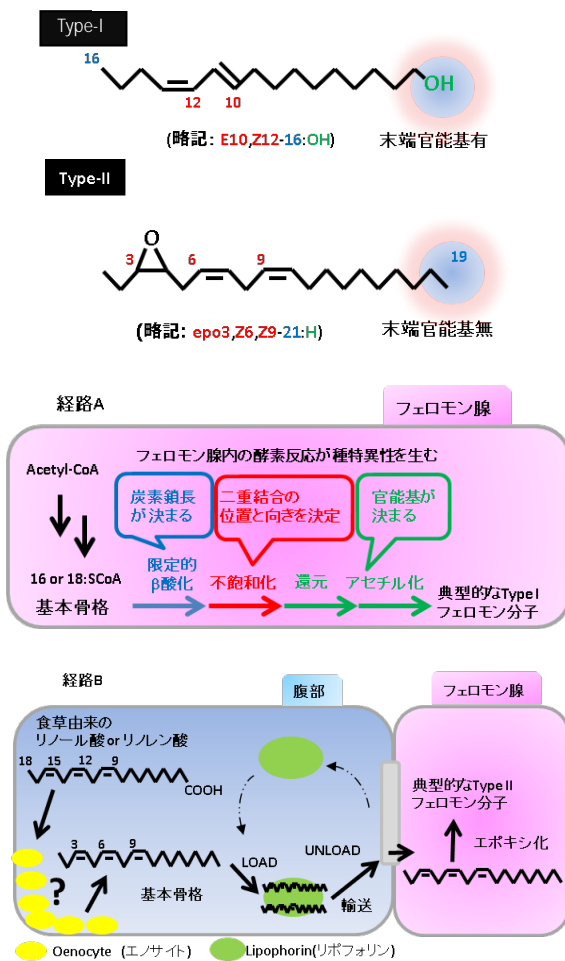


図 2. ガ類の性フェロモンは、その化学構造から大きく Type-I、Type-II の 2 種類に分けられる。Type-I は Acetyl-CoA から経路 A を経て合成される。これに対し Type-II は必須脂肪酸から経路 B を経て合成される。

イマーを用いて RT-PCR を行った。増幅産物のシーケンスを行い、各遺伝子の発現の組織特異性をみたのち、フェロモン腺特異的なもののみ、全長シーケンスを行った。

(2) アメリカシロヒトリのフェロモン腺で発現しているエポキシダーゼのクローニングと機能解析。

Type-I、Type-II の両方を利用しているアメリカシロヒトリを用い、本種の性フェロモン生合成の最終ステップであるエポキシダーゼについて、チトクローム P450 系の酸化酵素である可能性を探った。

アメリカシロヒトリ 170 頭のフェロモン腺から常法により、cDNA ライブラリーを作成した。288 コロニーについてシーケンスを行った。3 種類の P450 様遺伝子がとれたので、これらについて発現の組織特異性をみた。つづいて、常法により候補遺伝子のシーケンスを行い、さらには Sf9 の培養細胞を用いた遺伝子の一過性発現を行い、生成したタンパク質のエポキシダーゼ活性を調査した。

(3) アワノメイガ類における desaturase 遺伝子の進化をゲノム解析と遺伝子のクローニングにより解析した。

4. 研究成果

(1) ヨモギエダシャク *Ascotis selenaria* は、Type-II フェロモンを利用しており、その性フェロモン合成経路の中に脂肪酸を不飽和化するステップは含まれていない。しかし、フェロモン腺で特異的に発現する desaturase 様遺伝子 *Asdesat1* を発見した (図 3)。詳細に検討した結果、本遺伝子がコードするタンパク質は膜貫通領域を失っており、desaturase として機能しないことがわかった (図 4)。Type-II フェロモンの利用が Type-I から進化したと考えれば、*Asdesat1* は Type-I を使っていた時代の痕跡であると考えられることができる (論文 5)。

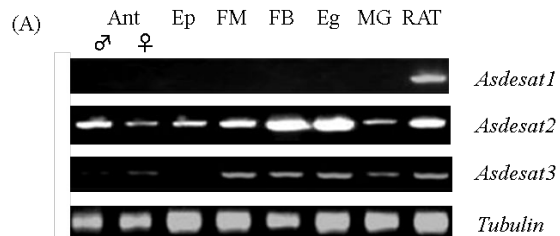


図 3. Desaturase 様の遺伝子 *Asdesat1-3* がヨモギエダシャクのフェロモン腺 (RAT) で発現していた。このうち、*Asdesat1* だけがフェロモン腺特異的であった。

```

_AM158251 : M-N.....FGNEVSSPIVAE-SYEK-IPP--A--K-KYLYANMIYF--W--GL--I 53
_AM076339 : M-N.....FGTEMSAHIDAE-SYEK-IPP--A--K-KYLYANMIYFA--W--GL--I 53
_EU285580 : MDQS.....VRTTTLRKGKPEPLTW--P--S--K-QIVYPMLETFG--W--GL-- 52
_EU152399 : M-N.....L-NEELI-S..ETDHDQSKRP--E--Q-HIVYRNIAVFL-Y--G-- 51
_esat1 : MAFY.....LTVSTGVA..DEGLKLVAPQAGREYQVTHRVLLTYQHASLYGL 51
_AF441220 : M-DIDATNHYD-QDKSEDDKPE-TEGELTIVGTQYSYTHRII-PI-MVYVVM--GA-T-- 60
_AY062023 : M-DIDATNHYD-QDKSEDDKPE-TEGELTIVGTQYSYTHRII-PI-MVYVVM--GA-T-- 60
_AB264085 : M-DIDATNHYD-QDKSEDDKPE-TEGELTIVGTQYSYTHRII-PI-MVYVVM--GA-T-- 60

_AM158251 : Y-AI..-T-K-A--LLAYLL-VAGEI-TT-----A-K---KL---IL---FN-T-F-N 112
_AM076339 : Y-AF..-S-K-A--LLAYLL-VAGDI-T-----A-K---KL---IL---FSTM-F-N 112
_EU285580 : Y-CF..-S-K-Q-MI-SFLI-V-AEI-T-----A-K---KL---IL---ILN--F-N 111
_EU152399 : Y-CFG..N-M-T-FW-VF--LIAG--T-----K---K---I--V-AQ-V-N-- 110
_esat1 : HLLTT.FAAWFPTVFNWTFYLSLGVCAHRLWHRHSYKATRELQFPLMLCHSIASQH 110
_AF441220 : L-VLGGWVIAS-IWAVYSIVATE-AHM--CF--AF--KPL-KVI-LIMQT-SG-- 120
_AY062023 : L-VLGGWVIAS-IWAVYSIVATE-AHM--CF--AF--KPL-KVI-LIMQT-SG-- 120
_AB264085 : L-VLGGWVIAS-IWAVYSIVATE-AHM--CF--AF--KPL-KVI-LIMQT-SG-- 120

_AM158251 : -VIT-----M-K-----A-H-T--F--V--LM-K---AI---SL-M--YN- 172
_AM076339 : TVIT-----M-K-----A-H-T--F--V--LM-K---AI---SL-M--YN- 172
_EU285580 : -AID-R---KF---A-H-T--F--V--LL-RK---KR---EL-M--YN- 171
_EU152399 : -VAH-AR---K---A-H-ST--F--V--LM-RK---TR--T-M--YN- 170
_esat1 : SIFTWKDRHLHRRYSYDGDYPYASRGEVYSHIGWTCVNRHEEVQKRGKLVLDLSDIFAN 170
_AF441220 : -TY--CR--Q-----H-SK--F--V--LMTS--LCK-LR-TI-M--LQQD 180
_AY062023 : -TY--CR--Q-----H-SK--F--V--LMTS--LCK-LR-TI-M--LQQD 180
_AB264085 : -TY--CR--Q-----H-SK--F--V--LMTS--LCK-LR-TI-M--LQQD 180

_AM158251 : -VLK--KVAIP-ITVA-V---I-----D-S-N-V-H-WML--IN--TI-LW--V- 231
_AM076339 : -VLR--NYALFFIGAVC-G--L--V-C-G-W--T-W-ITM--VNN--VT-LW--A- 230
_EU285580 : -YLR--NYALFFIGAVC-G--L--V-C-G-W--T-W-ITM--VNN--VT-LW--A- 230
_EU152399 : -YLKL-DK-SY-FPILLS-FI--Y--T-L-G-SLT-N-W-I-M--N--A--CV--V- 228
_esat1 : PIVMQRQKHKWLMVMGFLPTTFIMYFVNETS.IAFHANQFRYLCLNGTFSINSLA 229
_AF441220 : -L-M--YRFRS-FFTF--L--VWV--H-FQ-S-TNAV-VCFEL--VYAL-V-YF-- 240
_AY062023 : -L-M--YRFRS-FFTF--L--VWV--H-FQ-S-TNAV-VCFEL--VYAL-V-YF-- 240
_AB264085 : -L-M--YRFRS-FFTF--L--VWV--H-FQ-S-TNAV-VCFEL--VYAL-V-YF-- 240

```

図 4. *Asdesat1* の配列 (一部分を表示) を調べたところ、不飽和化酵素に特徴的な膜貫通領域 (下線) が破壊されていた。これにより、*Asdesat1* は機能を失っている。

(2) アメリカシロヒトリの性フェロモンは、Type-I と Type-II の両成分を含み、フェロモンのタイプの進化を考えるうえで非常に興味深い。フェロモン生合成は、エノサイトと呼ばれる特殊な細胞とフェロモン腺の 2 カ所で行われると推定されている (図 5 参照)。まず、餌から取り入れた必須脂肪酸 (リノール酸、リノレン酸) はエノサイトにおいて脱炭酸され、対応する炭化水素に変換される (図 5 の 5,6)。これらの炭化水素はリポフォリンに結合した状態で血液中を移動し、フェロモン腺に取り込まれる。そして、フェロモン腺で、フェロモン生合成の最終段階であるエポキシ化が行われ、空气中に放散されると考えられている。

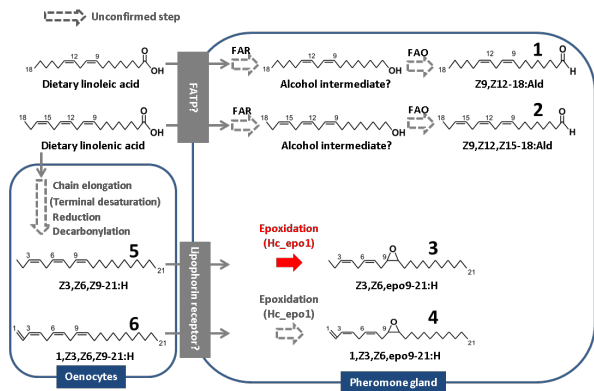


図 5. アメリカシロヒトリにおけるフェロモン生合成の推定経路。アメリカシロヒトリは Type-I、Typ-II の両方を生成する生合成酵素をもち、研究材料としてユニークな系を提供する。

フェロモン腺で特異に発現していると考えられるエポキシダーゼの同定を目指した。フェロモン腺から作成した cDNA ライブラリーのシーケンスとアノテーションを勧めたところ、チトクローム P450 様遺伝子 *Hc_epo1-3* を発見した。これらの遺伝子の発現の組織特異性を調べたところ、*Hc_epo1* だけがフェロモン腺特異的であった (図 6)。

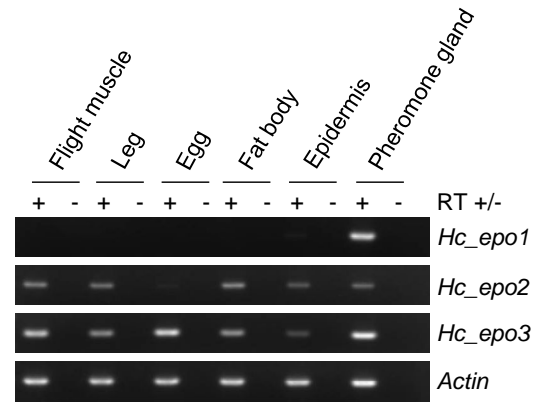


図 6. アメリカシロヒトリのフェロモン腺から P450 様の遺伝子 *Hc_epo1-3* が発見された。このうち、*Hc_epo1* だけがフェロモン腺特異的に発現していた。

Hc_epo1 遺伝子について、その全長をクローニングしたところ、本酵素は新規な P450 酸化酵素であることがわかり、*CYP341B14* (*Hc_epo1*) と命名された。本酵素を Sf9 細胞を用いたタンパク質発現系により、一過性に発現させてその活性を調査したところ、本酵素はフェロモンの前駆体である炭化水素の 9 位の 2 重結合を特異的にエポキシ化することが確認され、本酵素のフェロモン生合成への関与が確認された (論文 4)。

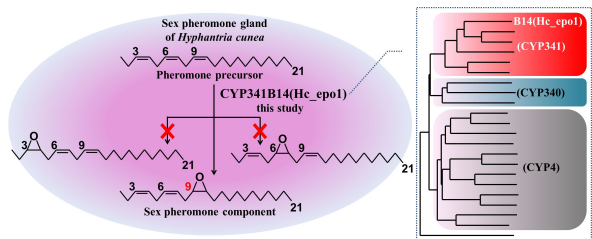


図 7. アメリカシロヒトリのフェロモン腺からフェロモン生合成の最終段階で働くエポキシ化酵素のクローニングおよび機能解析に成功した。本酵素は、新規な P450 酸化酵素であることがわかり、*CYP341B14* (*Hc_epo1*) と命名された。

(3) アワノメイガ類 (*Ostrinia*) では、性フェロモンの生合成に少なくとも3種類の異なる desaturase が使われていることが知られていた。アワノメイガ *O. furnacalis* (アワと略)、アズキノメイガ *O. scapularis* (アズキ)、ウスジロキノメイガ *O. latipennis* (ウスジロ) の3種で現在使われている desaturase 遺伝子とゲノム上に存在している desaturase 遺伝子を調査した (論文1)。

アズキとウスジロでは、性フェロモン生合成の過程で、脂肪酸の11位に二重結合が導入されるが、これを担う酵素は11-desaturase (以後、11) である。アズキとウスジロでは生産物の幾何異性特異性が異なっており、アズキではE体とZ体の両方の幾何異性体が生成されるのに対し、ウスジロではE体のみが生成される。11遺伝子のクローニングの結果、ウスジロの11 (*latpg1*) は、アズキのゲノム中で、レトロポゾン *ezi* の挿入により不活化された *ezi*-11 遺伝子のオーソログであることが判明した (図8)。アワノメイガでは、11の代わりに14が使用されているが、アズキのゲノム中に14が発見された。

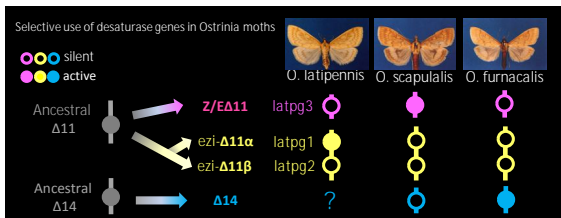


図8. アワノメイガ類で現在、フェロモン生合成に使用されている desaturase 遺伝子とゲノム上で保存されている遺伝子の関係

レトロポゾン *ezi* の挿入と遺伝子の不活化の関係を調べるため、ゲノムのシーケンス解析を行った。その結果、*latpg1* にも *ezi* の挿入が認められた (図9)。

以上の結果から、アワノメイガ類では、i) 過去に desaturase の重複が起こったこと、ii) ゲノム中にこれらの遺伝子が保存されていること、iii) 現存種で使用される desaturase は転写制御により選択されていることが明らかとなった。

< 引用文献 >

Ishikawa, Y., T. Takanashi, C. Kim, S. Hoshizaki, S. Tatsuki and Y. Huang (1999) *Ostrinia* spp. in Japan: their host plants and sex pheromones. Entomol. Exp. Appl. 91: 237–244.

Miura, N., T. Nakagawa, K. Touhara and Y. Ishikawa (2010) Broadly and narrowly tuned odorant receptors are involved in female sex pheromone reception in *Ostrinia* moths. Insect Biochem. Mol. Biol. 40: 64–73.

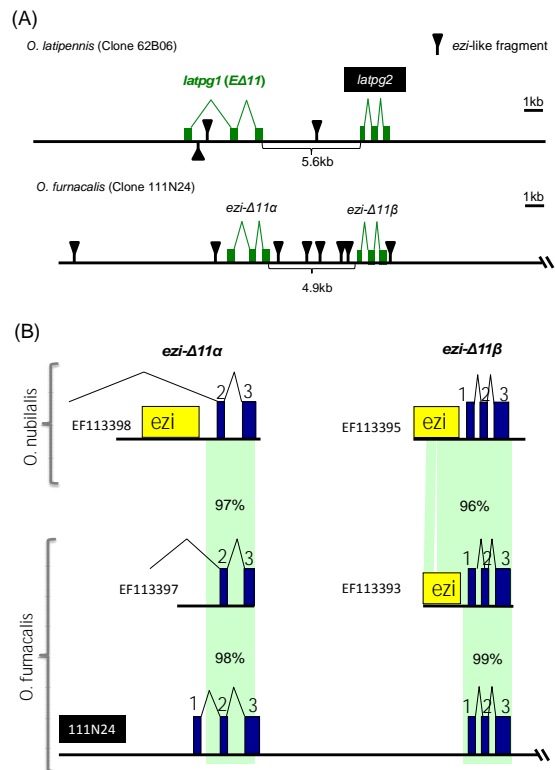


図9. アワノメイガ類の11-desaturase 遺伝子の構造。ezi と呼ばれるレトロポソンの挿入と遺伝子の不活化 (不使用) との間に明瞭な相関はなかった。

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11件)

1. Fujii, T., Y. Yasukochi, Y. Rong, T. Matsuo, Y. Ishikawa (2015) Multiple $\Delta 11$ -desaturase genes selectively used for sex pheromone biosynthesis are conserved in *Ostrinia* moth genomes. Insect Biochem. Mol. Biol. 61: 62–68. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.04.007
2. Win, A.T., W. Kojima, and Y. Ishikawa (2015) Female condition-dependent allocation of nuptial gifts by males in the moth *Ostrinia scapularis*. Ann. Entomol. Soc. Am. 1–6 (2015). DOI: 10.1093/aesa/sav010
3. Yang, B., Ozaki, Y. Ishikawa, and T. Matsuo (2015) Identification of candidate odorant receptors in Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. PLoS ONE 10(3): e0121261. doi:10.1371/journal.pone.0121261
4. Rong Y., T. Fujii, S. Katsuma, M. Yamamoto, T. Ando, and 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. DOI: 10.1016/j.ibmb.2014.09.009
5. Fujii, T., M.G. Suzuki, S. Katsuma, K. Ito, Y. Rong, S. Matsumoto, T. Ando, and Y. Ishikawa (2013) Discovery of a disused desaturase gene from the pheromone gland of the moth *Ascotis selenaria*, which secretes an epoxyalkenyl sex pheromone. Biochem. Biophys. Res. Comm. 441: 849–855. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.143
 6. Antony, B. and Y. Ishikawa (2013) Tissue-specific expression of the pheromone gland-specific fatty acyl reductase gene in *Ostrinia scapulalis*. Entomol. Exp. Appl. 149: 94–98. DOI: 10.1111/eea.12106
 7. Win, A.T., W. Kojima and Y. Ishikawa (2013) Age-related male reproductive investment in courtship display and nuptial gifts in a moth, *Ostrinia scapulalis*. Ethology 119: 325–334. DOI: 10.1111/eth.12069
 8. Lassance, J-M., M.A. Liénard, B. Antony, S. Qian, T. Fujii, J. Tabata, Y. Ishikawa and C. Löfstedt (2013) Functional consequences of sequence variation in the pheromone biosynthetic gene *pgFAR* for *Ostrinia* moths. PNAS 110: 3967-3972. DOI: 10.1073/pnas.1208706110
 9. Namiki S., T. Fujii, Y. Ishikawa and R. Kanzaki (2012) The brain organization of the lichen moth *Eilema japonica*, which secretes an alkenyl sex pheromone. NeuroReport 23: 857–861. DOI: 10.1097/WNR.0b013e3283582007
 10. Daimon T., T. Fujii, T. Fujii, T. Yokoyama, S. Katsuma, T. Shinoda, T. Shimada and Y. Ishikawa (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkmoth *Bombyx mandarina*: The effects of bombykal and bombykyl acetate. J. Chem. Ecol. 38: 1031-1035. DOI: 10.1007/s10886-012-0164-0
 11. Daimon T., T. Fujii, M. Yago, Y.-F. Hsu, Y. Nakajima, T. Fujii, S. Katsuma, Y. Ishikawa and T. Shimada (2012) Female sex pheromone and male behavioral responses of the bombycid moth *Trilocho varians*: comparison with those of the domesticated silkmoth *Bombyx mori*. Naturwissenschaften 99: 207–215. DOI: 10.1007/s00114-012-0887-3

[学会発表](計8件)

1. 藤井毅・山本雅信・中野亮・戒煜・薫双林・石川幸男 (2015) Type-II 性フェロモンを分泌するキマエホソバ (*Eilema japonica*) および Type-I を分泌するガ類の血液に含まれる不飽和炭化水素の分析 .第 59 回日

本応用動物昆虫学会大会 (山形大学、山形市) 講演要旨 W305

2. 山本雅信・藤井毅・石川幸男 (2015) アワノメイガ類にオスの性フェロモンは本当にあるのか? 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会 (山形大学、山形市) 講演要旨 W306
3. 藤井毅・戒煜・安藤哲・石川幸男 (2014) アメリカシロヒトリのフェロモン腺由来のエポキシ化酵素とガ類フェロモン生合成経路 .第 58 回日本応用動物昆虫学会大会 (高知大学、高知市) 講演要旨 W111
4. Rong Yu・藤井毅・勝間進・安藤哲・石川幸男 (2013) アメリカシロヒトリのフェロモン腺で高発現している P450 遺伝子の性状解析 .第 57 回日本応用動物昆虫学会大会 (日本大学、藤沢市) 講演要旨 J214
5. 藤井毅・安河内祐二・Rong Yu・中野亮・石川幸男 (2013) アワノメイガ類の性フェロモン生合成に関与する不飽和化酵素遺伝子の種間比較 .第 57 回日本応用動物昆虫学会大会 (日本大学、藤沢市) 講演要旨 J202
6. 藤井毅・石川幸男 (2012) 発信者の持つ 11 位不飽和化酵素とガ類性フェロモンの多様性 .第 56 回日本応用動物昆虫学会大会 (近畿大学、奈良市) 講演要旨 W091
7. 戒煜・藤井毅・勝間進・清田隆太郎・山川玲・安藤哲・石川幸男 (2012) アメリカシロヒトリのフェロモン腺 EST ライブラリーの解析 .第 56 回日本応用動物昆虫学会大会 (近畿大学、奈良市) 講演要旨 L206
8. 光嶋脩剛・藤井毅・石川幸男 (2012) アワノメイガ類における 11 不飽和化酵素の進化 .第 56 回日本応用動物昆虫学会大会 (近畿大学、奈良市) 講演要旨 L205

6 . 研究組織

(1)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・教授
研究者番号 : 6 0 1 2 5 9 8 7

(2)研究分担者

松尾 隆嗣 (MATSUO, Takashi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号 : 7 0 3 0 1 2 2 3