

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658055

研究課題名（和文） カイコガにおける害虫性フェロモン産生の挑戦とフェロモンブレンド生成メカニズム解明

研究課題名（英文） Challenge of constructing the transgenic silkmoth that produces the sex pheromone of a harmful insect.

## 研究代表者

本 賢一（MOTO KEN-ICHI）

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：90333335

## 研究成果の概要（和文）：

農業害虫の一種であるアワヨトウの性フェロモン生合成酵素遺伝子の単離を試みた。EST 解析により得た遺伝子について機能解析を行った結果、その生合成に関わる  $\Delta 11$  不飽和化酵素遺伝子およびアシル基還元酵素遺伝子の同定に成功した。トランスジェニック系を利用したフェロモン腺特異的に目的遺伝子を発現させる実験系を応用し、性フェロモン生合成酵素遺伝子を発現抑制させたトランスジェニックカイコガを作製した。

## 研究成果の概要（英文）：

I identified two enzyme genes involved in the sex pheromone biosynthesis of the oriental armyworm, *Pseudaletia separata*. I have constructed a transgenic silkmoth which was degreased the amount of sex pheromone components by pheromone gland-specific RNAi.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：

ガ類昆虫、性フェロモン、トランスジェニックカイコガ

## 1. 研究開始当初の背景

多くの蛾類昆虫は直鎖脂肪族化合物を性フェロモンの成分として利用しており、さらに複数の成分をブレンドし、その成分比を厳密に規定することにより種特異的な性フェロモンを作り出している。蛾類昆虫は15万種以上知られていることから、そのフェロモンブレンドの多様性は種特異的な性フェロ

モンを作り出す上で非常に重要な役割を果たしている。

申請者らはカイコガ (*Bombyx mori*) を実験材料として、長鎖脂肪族化合物のアシル基を還元しアルコールを生成する酵素 (pgFAR) を動物界で初めて報告し、さらに pgFAR がカイコガの性フェロモン (ボンピコール) の生合成に関与していることを明らかにした。ま

たボンビコール前駆体を含む炭素数 16 の脂肪酸の多くは、単独では pgFAR の基質となるにも関わらず、それらの脂肪酸を混在させた場合には特定の脂肪酸のみが優先的に基質となることを示した。実際のカイコガフェロモン腺にも様々な長鎖脂肪酸が含まれているにもかかわらず、ボンビコール前駆体脂肪酸が優先的にアルコール（つまりボンビコール）に変換されていることから、pgFAR 等のフェロモン生合成酵素の基質特異性がフェロモンブレンドの成分比決定に重要な役割を担っていることが考えられた。その後 Lassance らはヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) を実験材料とし、pgFAR がフェロモン成分決定に際し、重要な役割を示すさらに直接的な実験結果を報告した (Nature, 2010)。

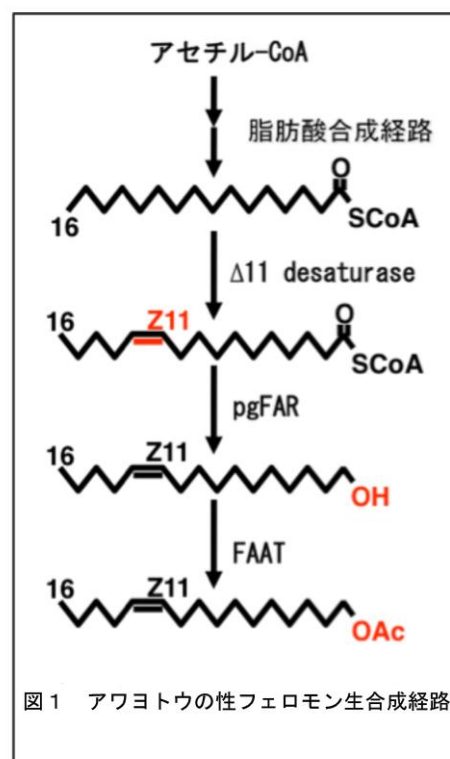
## 2. 研究の目的

これまでに pgFAR 等のフェロモン生合成酵素が種特異的なフェロモンブレンド生成に重要な役割を果たしていることを示したデータは揃いつつあったが、申請者自身のデータも含め、いずれも機能解析は昆虫固体レベルではなく、酵母発現系などを利用して行われていた。そこで本研究では、ガ類の一種で代表的な農業害虫であるアワヨトウのフェロモン生合成酵素遺伝子 3 種類の単離、および蛾類で最もトランスジェニック系が確立されているカイコガ個体でのアワヨトウ性フェロモンの産生を目指した。

## 3. 研究の方法

アワヨトウの性フェロモンは 2 種類のフェロモン成分 Z11-16:0Ac および Z11-16:0H のブレンドであることが既に報告されている。これらの生合成経路は、まずパルミトイル CoA (16:CoA) の 11 位が不飽和化されて Z11-16:CoA になった後、アシル基が還元され

て Z11-16:0H になり、さらに末端 OH 基のアセチル化により Z11-16:0Ac となることが予想されることから、これらの生合成経路に  $\Delta 11$  desaturase、pgFAR、および脂肪族アルコールアセチルトランスフェラーゼ (FAAT) の 3 種類の生合成酵素が関与していると考えた (図 1)。本研究ではこれらの 3 種類の遺伝子を単離するため、アワヨトウフェロモン腺の EST 解析、および次世代シーケンサーを利用した de novo transcriptome 解析を行った。



本研究ではトランスジェニック系を利用し、カイコガ個体でアワヨトウの性フェロモン生合成酵素遺伝子の発現を試みたが、これに際し、カイコガが本来持つ生合成酵素 (Bmpgdesat1 および pgFAR) の発現を抑制する必要があった。そこでカイコガフェロモン腺特異的に標的遺伝子を発現させる系 (Moto et al., 2012) と RNAi を併用し、カイコガ個体でこれらの遺伝子発現の抑制を試みた。

#### 4. 研究成果

##### ○アワヨトウ性フェロモン生合成酵素遺伝子の単離

本研究の開始当初、アワヨトウフェロモン腺の正確な部位が不明瞭であったことから、フェロモン腺を確実に含む雌の腹部末端の cDNA ライブラリーを作成した。これを用いて EST 解析を行った結果、カイコガの Bmdsat1 遺伝子および pgFAR 遺伝子のホモログを得た。そこで、これらの遺伝子の ORF 全長の塩基配列を決定し、さらにバキュロウイルス発現系を利用して酵素活性を調べた結果、これらが  $\Delta 11$  不飽和化酵素、および pgFAR であることが明らかとなった（論文投稿準備中）。一方、FAAT 遺伝子はこれまでどのガ類昆虫からも報告されていなかったためホモロジー検索では単離できなかった。そこで、カイコガの性フェロモン生合成系では FAAT が不要無いに着目し、①カイコガゲノムにホモログが無い EST クローンを選抜後、さらに② RT-PCR によりアワヨトウフェロモン腺特異的に発現している遺伝子を選抜することによって FAAT 遺伝子の候補を得たが、いずれも既知遺伝子と相同性が高く、FAAT 活性が無いことが予想された。EST 解析により FAAT 遺伝子が同定できなかった原因としては、使用した cDNA ライブラリーがフェロモン腺だけではなくその周りの組織を含む物由来であり、ライブラリーのクオリティーに問題があると考えた。一方、アワヨトウの  $\Delta 11$  不飽和化酵素遺伝子および pgFAR 遺伝子の同定に伴い、アワヨトウ雌腹部末端におけるこれらの遺伝子の発現部位が明らかとなり、またアワヨトウ腹部末端の形態学的解析を行うことによってフェロモン腺細胞を同定できた (Fonagy et al., 2011)。そこで、次にアワヨトウフェロモン腺細胞だけから mRNA を調

整し、これを用いて de novo transcriptome 解析を行った。この解析により得たアワヨトウフェロモン腺由来の contig について 5 段階の選抜を行った。

- ①  $\Delta 11$  不飽和化酵素遺伝子および pgFAR 遺伝子と発現レベルほぼ同じあるいはそれ以上の物を選抜
- ② カイコガゲノムにホモログが無いものを選抜
- ③ RT-PCR によりアワヨトウフェロモン腺特異的に発現しているものを選抜
- ④ 羽化 0 日目より 2 日目の発現レベルが 8 倍以上高い物を選抜
- ⑤ ORF を含むと予想される物を選抜

その結果選抜した contig はいずれも他の生物では同定されていない新規遺伝子であったことから、これらを FAAT 遺伝子候補とした。

##### ○ トランスジェニック系を利用したカイコガフェロモン腺における性フェロモン生合成酵素遺伝子の発現抑制

トランスジェニックカイコガにアワヨトウの性フェロモンを産生させるためには、カイコガの性フェロモン生合成酵素遺伝子を発現抑制する必要がある。カイコガなどの鱗翅目昆虫における遺伝子発現抑制法としては目的遺伝子に特異的な塩基配列を有する dsRNA を体液中に注射する方法が知られており、これにより大西らはフェロモン産生関連遺伝子を発現抑制させることに成功している

(2006, PNAS, 103, 4398-4403)。しかしながら、この方法では dsRNA が体液中に拡散し、フェロモン腺だけではなくそれ以外の組織にも取り込まれるため組織特異的な遺伝子ノックダウンは不可能であり、また万が一フェロモン腺以外の組織でオフターゲット効果が出た場合、それを調べることは非常に困難である。そこ

で本研究ではカイコガフェロモン腺で組織特異的に目的遺伝子を発現させる実験系 (Moto et al., 2012) を応用してBmpgdesat1遺伝子を発現抑制させたトランスジェニックカイコガを作製した。GC/MSでそのフェロモン成分を調べたところ、野生型に比べてボンビコール及びZ11-16:0Hが優位に減少していることを確認した (論文投稿準備中)。

#### 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 2 件)

1. Moto K., and Matsumoto S. (2012)  
Construction of an *in vivo* system for functional analysis of the genes involved in sex pheromone production in the silkworm, *Bombyx mori*. *Frontiers in Entocrinol.*, Epub 2012 Feb 27. (査読有)
2. Fónagy A., Moto K., Ohnishi A., Kurihara M., Kis J., and Matsumoto S. (2011)  
Studies of sex pheromone production under neuroendocrine control by analytical and morphological means in the oriental armyworm, *Pseudaletia separata*, Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Gen Comp Endocrinol.*, 172, 62-76. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. 本賢一、李載みん、栗原政明、永田宏次、田之倉優、長澤寛道、松本正吾、アワヨトウ性フェロモン生合成に関わるアシル基還元酵素遺伝子、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年3月23日、京都

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

本 賢一 (MOTO KEN-ICHI)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：90333335

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

Adrien Fonagy

ハンガリー科学アカデミー植物保護研究

所・シニア研究員