

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：平成 23 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：23880014

研究課題名（和文）

昆虫の窒素代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）

Research of nitrogen metabolism controlling system in insects

研究代表者

吉永直子 (YOSHINAGA NAKO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40456819

研究成果の概要（和文）：

本研究では鱗翅目幼虫の加速度的生育を支える窒素代謝に注目し、その制御メカニズムを解明することを目的として昆虫腸内 FACs (fatty acid amino acid conjugates) の生合成代謝を明らかにした。

これまでに確認できなかった鱗翅目幼虫のグルタミン酸型 FACs の *in vitro* 生合成に初めて成功した。これにより、既に生合成経路がわかっているエンマコオロギ *Gryllus emma* の例と比較して全く異なる経路を経ていることが明らかとなった。すなわちコオロギはグルタミン型 FACs 末端の加水分解によってグルタミン酸型 FACs を作るが、鱗翅目幼虫では直接グルタミン酸を FACs に組み込む。一方、FACs を持つショウジョウバエ幼虫では鱗翅目と同様の経路であることがわかった。これら昆虫における FACs は、いずれも腸管特異的であるという点、及びグルタミンとグルタミン酸の 2 種のアミノ酸のみからなる類縁体パターンから、極めて似ていると考えられてきたが、進化的には無関係である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Fatty acid amino acid conjugates (FACs) in lepidopteran caterpillars enhance their nitrogen assimilation and are considered to accelerate their growth ratio. The research focused on the biosynthetic mechanism of FACs in lepidopteran caterpillars.

For the first time, *in vitro* biosynthesis of glutamate conjugates were observed when the substrates were incubated with a midgut tissue of *Spodoptera litura*, silkworm, tobacco hornworm and a few other species. That means glutamate is directly conjugated with fatty acid in lepidopteran caterpillars, suggesting the synthetic route is the same with the case of fruit fly *Drosophila melanogaster* but clearly different from the case of crickets *Gryllus emma*. Crickets first conjugate glutamine with fatty acid and modify the side chain of glutamine moiety to make a glutamate conjugate. Although FACs in these insects share a common ground such as localization in the midgut tissues and the same analog pattern consisting of glutamine/glutamate, the finding suggest that at least glutamate type FACs were independently developed in these insect order.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：鱗翅目幼虫、FACs、窒素代謝、アミノ酸、腸管

1. 研究開始当初の背景

これまで植物抵抗性を誘導する昆虫由来エリシターとして知られてきた鱗翅目幼虫腸内物質 FACs が、幼虫の窒素代謝の効率化に関わることが示唆された。また30種近い鱗翅目幼虫において FACs のスクリーニングを行った結果から、種分化に伴って、脂肪酸とグルタミンの単純な縮合物からいくつかの類縁体が派生してきた可能性が指摘された。FACs は植物の間接的防御応答を誘導することから、それぞれの種における FACs パターンは共進化の結果を反映している可能性も考えられた。ところが、鱗翅目幼虫に留まらず、直翅目コオロギ2種 (*G. emma* 及び *G. taiwanemma*) と双翅目キイロショウジョウバエからも全く同じパターンの FACs が見つかった。これらの昆虫は雑食性であり、その FACs 組成に寄主植物の防御応答による選択圧が強く影響したとは考えにくく、祖先種からの遺伝的産物 (phylogenetic inheritance) か、あるいは収斂進化 (convergent evolution) の産物のどちらかであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、幼虫中腸組織からのFACs 生合成酵素の同定を第一目的とし、そこから発展して、様々な鱗翅目幼虫におけるFACs の窒素代謝への影響を評価する。さらに、コオロギやショウジョウバエでの腸内から見つかったFACsと鱗翅目のFACs との関係性を明らかにし、昆虫における窒素代謝制御の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

基質であるグルタミン及びリノレン酸ナトリウム塩を使った縮合アッセイで酵素活性を測定できることから、これを指標に活性タンパク質の単離を試みた。タンパク精製用液体クロマトグラフィーAKTA purifier UPC10 に接続したイオン交換カラム Q-sepharose、MonoQ、及び疎水性相互作用 Toyopearl Phenyl カラム等により活性フラクションの精製を進めた。得られた酵素を Native-PAGE 及び SDS-PAGE により単離し、プロテインシーケンサーにてアミノ酸配列の解読、LCMS/MS や MALDI-TOF により酵素タンパク質の同定を試みた。

さらに鱗翅目幼虫におけるグルタミン酸型 FACs の生合成メカニズムの解明を試

みた。まず *in vitro* での生合成アッセイ系を確立した。新鮮な中腸組織を Imidazole-HCl バッファー中でホモジナイズした上清 (粗酵素抽出液) 200 μ l に 50 mM リノレン酸 Na 水溶液 50 μ l 及び 100 mM グルタミン又はグルタミン酸水溶液 50 μ l を加えて 30 $^{\circ}$ C で 30 分間培養した。加熱処理によって酵素を失活させた後、アセトニトリル 100 μ l を加えて上清を LCMS (島津 LCMS2010) で ESI-ネガティブで分析した。生成した FACs は合成 Palmitoleoyl glutamine を内部標準として MS クロマトグラムの面積値より定量した。

4. 研究成果

まず、これまでに確認できなかった鱗翅目幼虫のグルタミン酸型 FACs の *in vitro* 生合成に初めて成功した点は大きい (図1)。

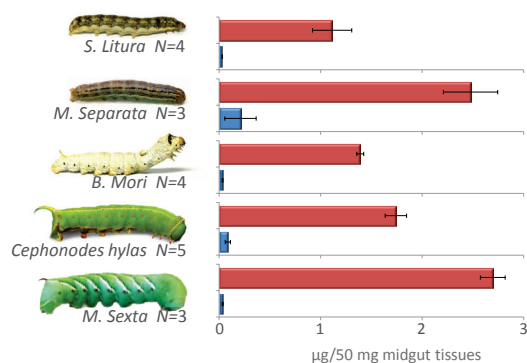


図1 各種鱗翅目幼虫における FACs の *in vitro* 生合成 (赤: linolenoyl glutamine、青: linolenoyl glutamate)

グルタミン型 FACs に比べてグルタミン酸型 FACs の生成量が非常に小さい点、また *in vitro* での FACs 生成パターンが *in vivo* での FACs パターンを反映せず、全ての種でグルタミン型が優先した理由は解明できていない。しかし、既に生合成経路がわかっているコオロギがグルタミン型 FACs 末端の加水分解によってグルタミン酸型 FACs を作るのと異なり、鱗翅目幼虫は直接グルタミン酸を FACs に組み込むことから、ショウジョウバエと同じ生合成経路であると示された。グルタミンとグルタミン酸の2種のアミノ酸のみから FACs を作る点、及びこれら FACs が

腸管特異的であるという点で鱗翅目幼虫とコオロギの FACs は極めて似ているが、進化的には無関係である可能性が示唆された (図 2)。

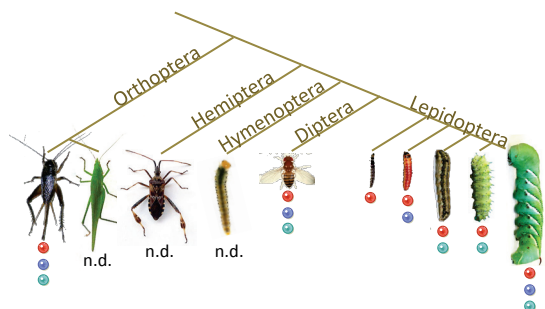


図 2 昆虫の進化系統樹と FACs パターン (赤○ : acyl glutamine、青○ : acyl glutamate、緑○ : hydroxyacyl glutamine/glutamate)

また、カイコは FACs を持たない種として知られていたが、カイコ中腸を基質とインキュベートすると FACs が in vitro で生合成する。ところが、同じく FACs を持たないマダラガ科ルリイロスカシクロバを用いた実験では、FACs は生成しなかった。このことから、表現型として FACs を持たない種には 2 通りあることが明らかとなった。カイコは近縁種がいずれも FACs を持つのに対して、ルリイロスカシクロバ近縁種では FACs が見つからなかったことから、カイコは家畜化の過程で FACs を作らなくなった可能性が考えられた。

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 2 件)

吉永直子、森直樹、鱗翅目幼虫腸内物質 FACs の多様性、昆虫と自然、査読無、48 巻、2013、pp. 24-27

N. Mori, N. Yoshinaga, Function and evolutionary diversity of fatty acid amino acid conjugates in insects, *Journal of Plant Interactions*, 査読有, Vol. 6, 2011, pp. 103-107, DOI:10.1080/17429145.2010.544412

[学会発表] (計 3 件)

Naoko Yoshinaga, et al., Biosynthesis of plant volatile eliciting FACs in lepidopteran caterpillars, fruit flies and crickets: Convergent evolution or phylogenetic inheritance? *International*

Society of Chemical Ecology, 2012 年 07 月 24 日~26 日, Vilnius, Lithuania

Naoko Yoshinaga, et al., Fatty acid-amino acid conjugates diversification in lepidopteran caterpillars. *International Congress of Entomology*, 2012 年 08 月 20 日~24 日, Daegu, Korea

吉永直子、森直樹、昆虫腸管に含まれる脂肪酸アミノ酸縮合物 (FACs) の生理機能、日本応用動物昆虫学会、2013 年 03 月 27 日~29 日、日本大学、藤沢市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

京都大学農学研究科応用生命科学専攻 化学生態学研究室ウェブサイト
<http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永直子 (YOSHINAGA NAOKO)

研究者番号 : 40456819

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :