

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 20 年度博士課程入学

銭 曙光

指導教員 教授 石川 幸男

Comparative studies on the sex pheromone biosynthesis in moths with a focus on lipid metabolism in the pheromone gland

(ガ類の性フェロモン生合成に関する比較研究—フェロモン腺における脂質代謝に注目して—)

生物は個体間の情報伝達において視覚や聴覚を利用すると同時に、化学物質を重要な伝達手段の一つとして利用している。なかでも昆虫は化学物質による情報伝達を高度に発達させたグループである。ガ類は、雌雄間の情報伝達に性フェロモンを利用している。ガ類の性フェロモンは一般に、複数の揮発性化合物が一定の比率で混合したものであり、メス成虫の腹部末端に位置するフェロモン腺（節間膜が特殊化したもの）で生合成される。性フェロモンは、その末端に官能基をもつグループ（Type I）と末端に官能基の無いグループ（Type II）に大別される。

Type I の性フェロモンは炭素数 10~18 の直鎖脂肪族骨格と 1~3 個の 2 重結合、そしてアルコール、アセテート、アルデヒドに代表される官能基を末端にもつ。これらの成分は、体内に普遍的な飽和脂肪酸であるパルミチン酸（palmitic acid）やステアリン酸（stearic acid）がフェロモン腺において炭素鎖の短縮、不飽和化、還元などの酵素反応

を受けることにより合成される。他方、Type II の性フェロモンは、食物由来のリノレン酸 (linolenic acid) が原料であると考えられている。腹部にあるエノサイトでリノレン酸から Type II 性フェロモンの骨格をもった炭化水素が生合成され、体液を介してフェロモン腺へ運ばれ、そこでエポキシ化等の最終的な化学的修飾が施されることが示されている。

ガ類の性フェロモン腺細胞内には微小な油滴がしばしば観察されるが、油滴の化学成分や油滴の生成メカニズムが詳細に研究されているのはカイコガに限られる。カイコガのフェロモン腺には、数多くの微小油滴が存在し、その中には性フェロモンの前駆体が結合したトリアシルグリセロールが豊富に含まれている。油滴の数は羽化2日前より急激に増大し、羽化後は性フェロモンであるボンビコールの産生に伴って、その数とサイズが日周性をもって劇的に変動する。

Fatty acid transport protein (FATP) は多くの生物に普遍的に存在する膜タンパク質で、細胞内への遊離脂肪酸の取り込みに重要な働きをしている。哺乳類では 6 種類の FATP アイソフォームが存在していることが明らかとされており、それぞれが異なった組織で発現し、特異な機能を果たしている。しかし、昆虫では FATP に関する知見がきわめて限られている。最近、カイコガの性フェロモン腺から FATP が単離され、BmFATP と名づけられた。RNAi 法によりこの遺伝子の発現を抑制したところ、フェロモン量の半減が認められた。このことから、BmFATP は細胞外遊離脂肪酸のフェロモン腺細胞内への取り込みを通して、性フェロモンの生産に寄与していると考えられている。

本研究では、Type I の性フェロモンを利用するアズキノメイガ (*Ostrinia scapularis*) と Type II の性フェロモンを利用するキマエホソバ (*Eilema japonica*) を材料として用い、両種の性フェロモン腺における油滴の発見をその端緒として、両種の性フェロモンの生合成の様相をフェロモン腺で高発現している FATP の機能解析を中心として比較解析したものである。

1. フェロモン腺中の油滴の観察

Type I 性フェロモンを利用するアズキノメイガと Type II 性フェロモンを利用するキマエホソバを用いて、性フェロモン腺における油滴を Nile Red により染色し暗視野顕微

鏡下で観察した。陽性対照として用いたカイコガと比較すると少なかったが、アズキノメイガとキマエホソバの両種のフェロモン腺内にも微小油滴を観察することができた。この結果は、性フェロモン腺における油滴の有無は、性フェロモンのタイプ (Type I、Type II) とは必ずしも関係がないことを示していた。前述の通り、Type II の性フェロモンを利用するガ類では、脂肪酸は性フェロモンの直接の原料とはならない。従って、Type II の性フェロモンを利用するキマエホソバのフェロモン腺内の油滴については、その役割に興味もたれる。

2. FATPのクローニング

本章ではアズキノメイガ、キマエホソバ、ヨモギエダシヤク (*Ascotis selenaria*) の性フェロモン腺から FATP のホモログである OsFATP、EjFATP、AsFATP をコードする遺伝子をクローニングし、それらの系統関係や発現パターンを解析した。系統解析の結果、3 種類の FATP はいずれもカイコガの BmFATP と高い相同性を示し (OsFATP 72.6% ; EjFATP 77.9% ; AsFATP 70.3%)、同一のグループを形成していた。Type II 性フェロモンを利用しているキマエホソバから単離した *Ejfatp* は、定量 PCR 法による解析の結果、他の組織に比べ性フェロモン腺で高発現していた。また、発現量の時間変動を調査したところ、蛹期では低く、羽化後に約 5 倍まで増加した。アズキノメイガ由来の *Osfatp* はフェロモン腺に特異的ではなく、多くの組織で高い発現がみられた。しかし、フェロモン腺における発現量の時間変動はフェロモン分泌の変動と一致した。これらの結果から、EjFATP と OsFATP はカイコガにおけるのと同様に、性フェロモンの生合成に関わっている可能性が示唆された。FATP ホモログのアミノ酸配列の膜貫通領域を解析ソフト SOSUI により推測した結果、EjFATP と OsFATP には他の FATP で N 末側に保存されている膜貫通領域が認められたが、AsFATP には膜貫通領域がなかった。AsFATP は機能を失っている可能性が考えられる。

3. EjFATPとOsFATPの機能解析

Type II の性フェロモンを利用するガ類では、エノサイトにより生合成されたフェロモン前駆体炭化水素は血液を介してフェロモン腺へ運搬されると考えられている。従って、フェロモン生合成に直接関与する FATP がフェロモン腺に存在することは考えられ

ない。その為、大腸菌過剰発現系を用いて、キマエホソバの性フェロモン腺由来の EjFATP の機能解析を行った。EjFATP が発現した大腸菌は野生株と比較してステアリン酸 (stearic acid) とアラキジン酸 (eicosanoic acid) 約 1.5 倍多く取り込む事がわかった。しかし、EjFATP にキマエホソバの性フェロモン前駆体 (炭化水素) や類似炭化水素の取り込み能は認められなかった。

アズキノメイガの性フェロモン腺における OsFATP の役割を評価するため、RNAi 法により *Osfatp* の発現を抑制してその性フェロモン生産に及ぼす効果を調べた。RNAi 処理したアズキノメイガにおける *Osfatp* の発現は、二本鎖 *Osfatp* RNA の注射量に依存して減少したが、それに伴うノックダウン個体の性フェロモン量の減少は認められなかった。

以上、本研究ではガ類の性フェロモン腺における脂質代謝に注目し、Type I と Type II の性フェロモンの生合成に関する比較研究を行った。Type I と Type II 性フェロモンの生合成経路は大きく異なるが、何れの Type を生産するフェロモン腺からも微小な油滴を発見した。また、性フェロモンの Type とは関係なく FATP ホモログが性フェロモン腺で発現していることを明らかとした。これらの結果は、フェロモン腺において FATP ホモログが性フェロモンの生産に関与している可能性を示唆していた。大腸菌を用いたタンパク質発現系を用いて EjFATP、OsFATP の機能を評価したところ、大腸菌で発現した EjFATP に細胞外の脂肪酸を細胞内に取り込む能力が認められたが、炭化水素の取り込み能は認められなかった。RNAi 法で OsFATP の発現を抑制してもフェロモン生産量は変化しなかったことから、OsFATP は性フェロモンの生合成と直接的な関係はないことが分かった。FATP は性フェロモン腺で必要されるエネルギーの供給に関与しているのではないかと考えられる。