

博士論文

ガ類のタイプⅡ性フェロモン生合成に関与するエポキシ化酵素に関する研究

戎 煜

目次

序論

第 1 章 アメリカシロヒトリにおける 9 位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

1.1 第 1 章序論

1.2 方法

1.3 第 1 章結果

1.4 第 1 章考察

第 2 章 クワゴマダラヒトリにおける 9 位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

2.1 第 2 章序論

2.2 方法

2.3 第 2 章結果

2.4 第 2 章考察

第 3 章 ヨモギエダシヤクにおける 3 位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

2.1 第 3 章序論

2.2 方法

2.3 第3章結果

2.4 第3章考察

第4章トビモンオオエダシャクにおける6位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

2.1 第3章序論

2.2 方法

2.3 第3章結果

2.4 第3章考察

総合考察

謝辞

参考文献

背景

ガ類のメスが分泌する性フェロモンは、メス成虫の腹部末端に位置するフェロモン腺で生産される揮発性低分子の生理活性物質であり、フェロモン分子はフェロモン腺で分泌後に大気中へ放散され、同種オス成虫の触角で受容・認識されると、オスを性的に興奮させ交尾行動を引き起こす。性フェロモンを構成する分子はその化学構造から大きく二つにわけて考えることができる。すなわち、炭素骨格の末端に官能基を持つフェロモン分子は Type I 性フェロモンと呼ばれ、末端に官能基を持たないフェロモン分子は Type II 性フェロモンと呼ばれている (Fig. 1) (Ando et al., 2004; Millar 2000)。Type I 性フェロモンは炭素数 10 から 18 の直鎖不飽和アルコール、アセテート、アルデヒドなどの化合物が報告されている (Jurenka et al., 2003)。一方、Type II 性フェロモンは 17 から 23 の炭素が形成する骨格の 3 位、6 位、9 位の炭素原子に 2 から 3 個の二重結合を含む不飽和炭化水素及びそのエポキシ化物から構成されている (Ando et al., 2004)。現在までに 681 種類のガ類の性フェロモンが同定され、Type I が 65%、Type II が 35%を占めている (Ando, List of Sex Pheromones, 2017, <https://lepipheromone.sakura.ne.jp/PheromoneList/>)。どちらのタイプについても、性フェロモンはフェロモン分子自身の持つ三つの基本情報、すなわち

- (i) 骨格を形成する炭素鎖の長さ、
- (ii) 二重結合やエポキシ環の位置と立体

異性体構造、(iii) 官能基の種類、そして第 4 の情報としてそれら分子の混合比で種の認識を行ない、膨大な種数を誇るガ類の生殖前隔離の役割を果たしている。

Type I、Type II フェロモン分子は化学構造が異なるだけでなく、その原料と生合成経路も異なっている (Fig. 1)。Type I 性フェロモン分子は生物種を通じて普遍的な飽和脂肪酸、すなわち Acetyl-CoA を原料として、限定的 β 酸化反応、不飽和化反応、酸化還元反応、アセチル化反応などのステップを経て生合成される。これらすべての酵素反応がフェロモン腺の中で行われるのが特徴である (Fig. 1) (Jurenka 2004)。一方、Type II 性フェロモン分子は幼虫期に摂取した食草に含まれる必須脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸を原料として、エノサイト (oenocyte) で炭素鎖伸長、脱炭酸などのステップを経由して Type II 性フェロモンの炭化水素前駆体が合成される。この炭化水素前駆体の基本構造にはリノール酸やリノレン酸由来で、3 位、6 位、9 位の炭素原子に 2 から 3 個のシス体の二重結合が含まれる。更に、この前駆体は血液中に存在するリポフォリン (lipophorin) と呼ばれる運搬タンパク質によってフェロモン腺へ運ばれ (Chino et al., 1985; Matsuoka et al., 2006)、最終的にフェロモン腺中でエポキシ化酵素により酸化され、すなわち前駆体に含まれる 3 か所の二重結合のうち、1 から 2 か所にエポキシ環を導入し、Type II 性フェロモン成分となる

(Fig. 1) (Millar 2000; Rule and Roelofs, 1989; Wei et al., 2003)。

ガ類の Type II 性フェロモンの炭化水素前駆体の炭素骨格に必須脂肪酸由来の 3 位、6 位、9 位の 3 か所に二重結合があるため、自ずとエポキシ化反応を経て生合成される最終産物である Type II 性フェロモン分子も多様なエポキシサイドの位置異性体が含まれることになる。フェロモンデータベースによると、現在までに性フェロモン成分が同定されたガ類種のうち、3 位にエポキシ環を持つ性フェロモン成分を分泌するガ類は 31 種存在し、エポキシ化合物を性フェロモンとして利用するガ類昆虫全体の 21.8%を占めている (Fig. Table.)。6 位及び 9 位にエポキシ環を持つ性フェロモンを使用するガ類はそれぞれ 44、61 種存在し、31.0%、43.0%の割合を占めている (Fig. Table.)。更に、3 位と 6 位 (2 種)、あるいは 6 位と 9 位 (1 種) にエポキシ環が同時に存在するジエポキシ化合物 (diepoxide) を性フェロモンとして利用するガ類種や、必須脂肪酸由来の基本構造と異なる 7 位 (11 種)、4 位 (1 種)、11 位 (1 種) のエポキシ化合物を分泌するガ類も少ないながら存在する (Fig. Table.) (Ando, 2017)。一方、性フェロモン生合成経路上にエポキシ化のプロセスが存在せず、Type II の炭化水素前駆体をそのまま性フェロモンとして利用するガ類は 98 種存在し、Type II ガ類昆虫の 40.8%の割合を占めている (Fig. Table.) (Ando, 2017)。いずれにせよ、Type II 性フェロモンの生合成系では炭化水素を基質としたエポキシ化反応がフ

フェロモン腺で起こることが重水素標識化合物の追跡実験により複数のガ類で確認されているものの、関与する酸化酵素、すなわちエポキシ化酵素に関する知見は限られており、その遺伝子はこれまでに一つも単離されていなかった (Miyamoto et al., 1999; Wei et al., 2003; Fujii et al., 2007; Kiyota et al., 2011)。このように、性フェロモン生合成に関与するエポキシ化酵素の分子の実体は残されたブラックボックスの一つであった。私は、大学院在学期間を通じて、このエポキシ化酵素の実体を分子レベルで明らかにするためにガ類昆虫のフェロモン腺で発現し、Type II 性フェロモンの前駆体である不飽和炭化水素を酸化し性フェロモン成分であるエポキシアルケンの生産を触媒するエポキシ化酵素の性状解析に取り組んだ。

エポキシ化酵素は分子構造により Heme 型と non-heme 型の二種類が知られている。Heme 型のエポキシ化酵素は、P450 ファミリーに属し、活性中心では1つの鉄原子がポルフィリン環と配位している。このヘム鉄は、ヘム結合領域 (heme-binding region) の中にあるシステイン残基 (Proximal Cys) からのチオラートアニオンの電子の給与を受けて、Heme 型酵素の活性を示す (吉田雄三ら, 2000)。一方、non-heme 型のエポキシ化酵素は desaturase ファミリーに属し、タンパク質の活性中心には 2 つの鉄原子が存在し、それら鉄原子がタンパク質分子内のヒスチジン残基が連続して現れる 3 か所のクラスター (His-box)

と配位して酵素活性を示すと考えられている (Fig.) (Dyer et al., 2002)。

non-heme 型のエポキシ化酵素は、植物から同定された報告に留まる (Lee et al., 1998)。このエポキシ化酵素は基質が昆虫の Type II 性フェロモン生合成の原料でもあるリノール酸であり、同じ植物の脂質代謝に関わる不飽和化酵素と同様に 3 か所ある His-box のアミノ酸配列が保存され、desaturase ファミリーに属する (Lee et al., 1998)。そして興味深いことに、現在までに明らかとされたガ類昆虫の Type I 性フェロモンではあるものの、その生合成に関わる不飽和化酵素も 3 か所に His-box を含んだ non-heme 型 desaturase ファミリーに分類される (Knipple et al., 2002)。

当研究室の藤井毅助教はこれらの知見を合わせ、ヨモギエダシヤク (*Ascotis selenaria*) の性フェロモン生合成に関わるエポキシ化酵素は non-heme 型であるという作業仮説の下、不飽和化酵素と似て非なるエポキシ化酵素の単離を試みた。しかし、His-box の配列を参考にプライマーを設計し、degenerate PCR によって獲得した遺伝子 *Asdesat1* は、フェロモン腺で特異的に発現し、バキュロウイルス昆虫細胞発現系によってタンパク質の発現も確認されたにも関わらず、不飽和化活性もエポキシ化活性も認められなかった (藤井, 2007)。この先行研究の知見を活用し、本研究ではガ類性フェロモンを生合成するエポキシ化酵素を P450 に属する Heme 型と仮定した。

P450 は微生物から植物、動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質であり、大きく CYP2 clan、CYP3 clan、CYP4 clan、Mitochondrial CYP との 4 つのグループに分類されている (Fig.)。昆虫の P450 において、CYP2 clan に属する遺伝子は昆虫の生理機能を果たすための酵素として報告された例があり、CYP3 及び CYP4 clan に属する遺伝子は環境の毒物代謝に関わるものが多く、Mitochondrial CYP clan に属する遺伝子はエクジステロイド代謝に関与するものも報告された (Feyereisen, 2012)。この中では、エポキシ化酵素として機能する遺伝子は CYP2 clan の CYP15 ファミリー、CYP3 clan の CYP6、CYP9、CYP321 ファミリー、Mitochondrial CYP clan の CYP12 ファミリーからの報告がある (Feyereisen, 2012)。例えば、エポキシ化酵素が幼若ホルモン (JH) の生合成に関与していることが報告され、配列情報が明らかとされている (Helvig et al., 2004; Daimon et al., 2012)。最初の JH 生合成に関与するエポキシ化酵素は、ゴキブリの一種 (*Diploptera punctata*) から遺伝子がクローニングされ、その配列から P450 ファミリーに属していることが示された (CYP15A1) (Helvig et al., 2004)。CYP15A1 の mRNA はアラタ体で特異的に発現し、大腸菌で発現させた組換え体タンパク質を用いて、この酵素が高い基質選択性を伴って実際に JH 生合成の最終ステップのエポキシ化反応を触媒することが示された (Helvig et al., 2004)。すなわち、CYP15A1 は、methyl farnesoate を効率的にエポキシ化し、

JH を合成したが、farnesol、farnesal、farnesoic acid など MF の類縁体に対しては活性を示さなかった (Helvig et al., 2004)。更に、この CYP15A1 の発現は本種ゴキブリの生活史を通じて JH の分泌時期とよく一致していた (Helvig et al., 2004)。最近、カイコガからもエポキシ化酵素 (CYP15C1) が同定され、JH の生合成に関与していることが証明された (Daimon et al., 2012)。但し CYP15A1 と異なり、CYP15C1 はアラタ体で常に発現していて、幼若ホルモンの分泌時期との同調性を示さなかった。しかも CYP15C1 は CYP15A1 と異なる基質選択性を示した。*D. punctata* の CYP15A1 が methyl farnesoate に対する高い特異性を示すのに対し、カイコガの CYP15C1 は farnesoic acid に対する活性は methyl farnesoate に対する活性より少なくとも 18 倍高いことがわかった。

本研究課題では、JH と同じく性フェロモン生合成という内分泌系に作用する未知のエポキシ化酵素遺伝子をコードする遺伝子を同定し、その機能解析を行なうことを目的として行なわれた。本研究では、代表的な酸化酵素のファミリーである P450 に着目し、9 位、3 位、6 位に二重結合を持つアルケン前駆体のそれぞれの不飽和の位置にエポキシ環を導入するエポキシ化酵素遺伝子を、ヒトリガ科アメリカシロヒトリ (第一章: 9 位エポキシ化酵素)、ヒトリガ科クワゴマダラヒトリ (第二章: 9 位エポキシ化酵素)、シャクガ科ヨモギエダシャク (第三章: 3 位エポキシ化酵素)そしてシャクガ科トビモンオオエダシャク (第四章:

6 位エポキシ化酵素) より、cDNA ライブラリー作製や次世代シーケンス技術を駆使して、フェロモン腺で発現している P450 をスクリーニングし機能解析するストラテジーをとった。

第1章 アメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) における9位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

1.1 第1章序論

本研究は、9位エポキシ化酵素遺伝子をコードする遺伝子を同定し、その機能解析を行うために、チョウ目（鱗翅目）ヒトリガ科のアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) を材料としてこの課題に取り組んだ。

アメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) は戦後米軍の軍需物資に紛れて日本に侵入・定着した外来種である。食草の範囲は広く、サクラ、ヤナギ、カキ、コナラ、リンゴなど100種類以上の樹木に害を及ぼすことが知られている。アメリカシロヒトリは Type I の Z9, Z12-18:Ald と Z9, Z12, Z15-18:Ald（不飽和アルデヒド）及び Type II の Z3, Z6, epo9-21:H と 1, Z3, Z6, epo9-21:H（エポキシアルケン）の両タイプの性フェロモン成分を同時に分泌していることが示されている (Fig. 2) (Einhorn et al., 1982; Hill et al., 1982; Toth et al., 1989)。

アメリカシロヒトリの Type I 性フェロモン成分は、「分子の末端に官能基がある」という定義に基づくと確かに Type I に分類されるべきものであるが、通常 Type I 性フェロモンとは異なり、その基本構造は9位、12位、15位に2重結合を持つなど、Type II に類似している。実際、アメリカシロヒトリの Type I 性フェロモンの生合成経路を重水素標識実験により追跡したところ、このガの

Type I 成分の原料は、通常の Type I とは異なり、Type II と同様に、食草由来のリノール酸、リノレン酸であると推定された (Kiyota et al., 2011)。リノール酸、リノレン酸から、アルコール中間体を経て、長鎖脂肪族アルコールを基質とする酸化酵素により Type I 成分が生産されると予想されたが、アルコール中間体がフェロモン腺から検出されないなど、不明な点も残されている (Fig. 3) (Kiyota et al., 2011)。

一方、アメリカシロヒトリの Type II 性フェロモン成分の生合成経路は、シャクガ科のヨモギエダシャク (*Ascotis selenaria*) の性フェロモン生合成経路 (Fujii et al., 2007) と相同の生合成経路であることが標識実験により示された (Kiyota et al., 2011)。すなわち、生合成は食草中に含まれるリノール酸やリノレン酸から出発し、エノサイト (oenocyte) で Type II 性フェロモンの炭化水素前駆体が合成される。この前駆体は血液中に存在するリポフォリン (lipophorin) と呼ばれる運搬タンパク質によってフェロモン腺へ運ばれ、最終的にフェロモン腺中でエポキシ化酵素により酸化され、Type II 性フェロモン成分となる (Fig. 3) (Kiyota et al., 2011)。以上のように、アメリカシロヒトリの Type II 性フェロモンの生合成経路は標識実験により明らかにされていたが、フェロモン腺で発現しているエポキシ化酵素の分子の実体については、全く知見がなかった。

未知な酵素の実体を分子レベルで明らかにするためには、EST ライブラリーが必要となるが、アメリカシロヒトリのフェロモン腺 EST ライブラリーは、東京大学応用昆虫学研究室の藤井毅助教が既に構築していた。本章では、このアメリカシロヒトリのフェロモン腺 cDNA ライブラリーから 288 クローンをシーケンスし、配列情報を獲得後、候補遺伝子を選抜した過程を報告する。現在までに機能解析が行われたすべてのガ類性フェロモン生合成に関与する酵素遺伝子は、フェロモン腺で他組織より高発現している、あるいは特異的に発現していることが知られている。本研究においても、この情報を最重要視して P450 酸化酵素の候補遺伝子の組織ごとの発現を比較することで目的となるクロンを絞り込んだ。

Hc_epo1 の cDNA にコードされたタンパク質の機能を実験的に解析するためには、適切なタンパク質発現系を選択する必要がある。本研究では、*in vivo* と *in vitro* 両方で活性実験を行い、*Hc_epo1* の酸化酵素活性を調べることを目指した。タンパク質発現系の第一の選択肢としてもっとも頻繁に用いられているのが大腸菌の系である。簡便な操作により大量発現と精製が容易にできる特徴がある。実際、DH5 α 株による大腸菌発現系を用いて *Diploptera punctata* の幼若ホルモンの生合成経路で最後のエポキシ化反応を触媒する P450 型エポキシ化酵素 (CYP15A1) を発現させた例も報告されている (Helvig et al., 2004)。し

かし、多くのタンパク質は特有の翻訳後修飾を受けた状態で機能するが、大腸菌では真核細胞とは異なり、翻訳後修飾が起こらない。

最近、リポフェクションによる昆虫個体への簡便な遺伝子導入・遺伝子機能解析技術の開発の成果が Kanamori et al. (2010) により報告された。リポフェクションは、DNA を脂質との複合体にして無理なく細胞に取り込ませる簡便な遺伝子導入法で、昆虫培養細胞に対して用いられ、一過的に発現させることができる (Fig. 9A)。このことから、*in vitro* で昆虫細胞 (Sf9) へのトランスフェクションにより *Hc_epo1* を過剰発現させ、基質とともに培養し、その活性を調べる方法も並行して試験することにした (Fig. 9A)。アメリカシロヒトリの Type II 性フェロモン分子の炭素骨格の長さは 21 であるため、*in vitro* の実験で Z3, Z6, Z9-21:H を基質として選択した。この系では、この疎水性の高いトリエン前駆体を如何に細胞内に取り込ませるかが重要となる。そのため、トリエンを効率よく可溶化させるための方法を検討する必要があった。従来の研究では、炭化水素や長鎖脂肪酸の可溶化に関して、DMSO (藤井毅 2007) と NP-40 (Fujii et al., 2011) の有効性が示されていた。本研究では、これらの報告を参考にして、昆虫細胞への影響と GC-MS 分析への影響を考慮し、活性試験時には DMSO にトリエン前駆体を溶解しトリエン前駆体を可溶化することにした。

メスの蛾が分泌する性フェロモンは微量であるため、性フェロモンの検出と

その化学構造の推定には、GC-MS（ガスクロマトグラフィーー結合型質量分析計）が有効となる。Type I および Type II 性フェロモン分子を同定する際、これらの化合物の二重結合やエポキシ環の位置を決定することは重要であり、GC-MS 分析では、マススペクトルに関する豊富なスペクトル情報が蓄積されている（Ando and Yamakawa, 2011）。本研究では、*Hc_epo1* の *in vivo* と *in vitro* 活性試験の産物を GC-MS を用いて同定することにした。

1.2 方法

1.2.1 供試昆虫と培養細胞

アメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) は愛知県名古屋市の桑の木より採取した卵塊を東京農工大学の安藤哲教授より供試していただき研究に用いた。飼育条件は、室温 24°C、明暗周期が 16L8D (9 時消灯 ; 17 時点灯) であり、餌としてクワ (*Morus bombycis*) の生葉を与えた。雌雄の判別は蛹の時期に行われ、蛹は羽化までの間十分な湿度のもと保管した。

発現実験に用いた昆虫細胞は本研究室で継代培養されているヨトウガの卵母細胞由来の Sf9 細胞を用いた。細胞培養は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む TC-100 (TC-100(+)) にて 27°Cにて行った。

1.2.2 cDNA ライブラリー

羽化後 3 日以内の本種処女メス成虫 170 頭のフェロモン腺より、本研究室の藤井毅助教が TaKaRa cDNA Library Construction Kit (TaKaRa) を用いてプラスミド cDNA ライブラリーを構築した。制限酵素サイト *Not*I と *Eco*RI により pAP3neo ベクターに繋がれた cDNA 断片は、大腸菌 (DH5 α 株 : TaKaRa) を形質転換後、プレート上でコロニー化された状態で受け取った。このライブラリーは、スピンカラムにより、400bp 以下の DNA 断片は除去されていた。

1.2.3 候補遺伝子のプロファイルとスクリーニング

コロニーをピックアップし、コロニーPCR 法による cDNA インサートの確認を行った。コロニーPCR 法によりインサートを確認する際、カラムで除去しきれなかった 400bp 以下の DNA 断片を含むクローンは除外され、最終的に 400bp 以上のインサートの確認ができたクローンを 288 集めた。インサート確認の PCR の際、プライマーは T7 プライマーおよび T3 プライマー (Table 1) を使用した。コロニーPCR 反応の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR 反応の温度サイクル条件は 94°C で 2 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 3 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロマイドで染色し可視化した。イン

サートを含む陽性クローンは、そのコロニーを再度ピックアップし、アンピシリン (100 μ g/mL) を含んだ LB 液体培地で 37°C、16 時間培養後、QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドは、T7 プライマーを用いて、5' 側からシーケンスを行った。シーケンス解析は、ファスマック株式会社 (FASMAC Co., Ltd. ; <http://www.fasmac.co.jp/>) に依頼した。得られた配列情報は、DNASIS-Mac v 3.0 (日立ソリューションズ) を用いて解析した。シーケンス解析により得られた配列情報は、National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の tblastx 解析を用いて、類似遺伝子の検索を行い、分類した。この分類で酵素機能が推定されたクローンのうち、P450 ファミリーとして同定されたクローンを選抜した。

1.2.4 候補遺伝子の組織別発現パターンの解析

性フェロモン生合成酵素遺伝子がフェロモン腺で高発現していることを踏まえて、RT-PCR 法により候補遺伝子の発現を組織間で比較した。各組織由来の鋳型 mRNA は、飛翔筋、脚、卵、脂肪体、表皮、フェロモン腺をアメリカシロヒトリのメス成虫から冷 PBS (2.5mM KCl, 141mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, and 2.5mM KH₂PO₄, pH=7.0) (Fujii et al., 2011) 中で解剖し、それぞれの組織から抽出した。抽

出物液は、分光光度計 (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer ; 旭テクノグラフィクス株式会社) を用いて mRNA 濃度を推定し、約 100ng に調整した。つづいて、各組織由来の mRNA に対し、PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行った。組織間での発現を比較するためのプライマーは得られた各クローンの配列情報に基づき、特異的な配列を選び設計した (Table 1)。PCR の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR の温度サイクル条件は 94°C で 1 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、50°C で 30 秒、68°C で 1 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。使用した mRNA にゲノム DNA が混入していないことを確認するため、各組織から抽出した mRNA サンプルの RT-PCR も同時に行った (RT-試験区)。Loading control として Actin を増幅するプライマーを用いた PCR を行った。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロマイドで染色し可視化した。

1.2.5 RACE 法による *Hc_epo1* の全長配列の獲得

先の選抜で得た、フェロモン腺で特異的に発現する候補遺伝子 (P450-1) を *Hc_epo1* と名付けた。この全長塩基配列情報を優先的に RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により獲得することとした。

20 頭のメスからフェロモン腺を分離し、TaKaRa RNAiso Plus reagent (TaKaRa)

を用いて 8 μ g の total RNA を抽出した。Total RNA を抽出した後、混入した鋳型 DNA を消化するために、RNase-free DNase I (QIAGEN) で処理した。

RACE にはこのフェロモン腺由来の total RNA を全量使用した。RACE 法は GeneRacer Kit (invitrogen) を用いて行った。手順はキットのプロトコルに従った。プライマーは、GeneRacer Kit (invitrogen) に含まれたアダプタープライマー (Table 1) と、前の実験で得られた候補遺伝子 (*Hc_epo1*) の配列情報に基づいて設計した GSP プライマー (Gene-Specific Primers) (Table 1) を使用した。cDNA 全長配列は、*Hc_epo1* の断片配列情報、3' RACE と 5' RACE により得られた各断片の配列情報を組み合わせることによって獲得した。各断片配列の接続を確認するために、RACE 法により獲得した塩基配列情報に基づいて、全翻訳領域をコードするプライマー (Table 1) をデザインし PCR を行った。この PCR により得られた cDNA を pGEM®-T Easy Vector (Promega) に再度サブクローニングした後、先に示したのと同じ方法でシーケンス解析を行い全長塩基配列を決定した。

1.2.6 発現ベクター (pIZT/V5-His-*Hc_epo1*) の構築

in vivo と *in vitro* で *Hc_epo1* の活性実験を行うために、*Hc_epo1* の翻訳領域をコードする塩基配列を、0pIE2 プロモーターを持つ pIZT/V5-His vector

(Invitrogen) につなげ、一過的に *Hc_epo1* を発現させるための発現ベクター pIZT/V5-His-*Hc_epo1* を構築した。

まず、*Hc_epo1* の翻訳領域に相当する塩基配列の開始コドン上流域に *Sac* I 制限酵素サイトを、終始コドン下流域に *Not* I 制限酵素サイトを PCR 法により挿入し全翻訳領域をコードするプライマー (Table 1) をデザインした。次に、*Hc_epo1* の cDNA は、このプライマーを用いた PCR 法により増幅した。PCR 反応の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR 反応の温度サイクル条件は 94°C で 3 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 2 分を 30 サイクル、そして 72°C で 10 分間保持した。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、産物をエチジウムブロマイドで染色し可視化した。目的産物を含むバンドは Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル抽出した。得られた cDNA を pGEM®-T Easy Vector (Promega) に 16°C で一晩ライゲーション反応した後、大腸菌 (DH5 α 株 : TaKaRa) を形質転換しプレート上でコロニー化させた。続いて 1.2.2 で示したのと同じ方法でプラスミドを抽出後、37°C で 2 時間 *Sac* I と *Not* I で同時に消化した。得られた消化産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。インサートにあたるバンドは Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル抽出した。pIZT/V5-His vector (Invitrogen) を同様に *Sac* I と *Not* I で消化し、電気

泳動後ゲル抽出を行った。得られた *Hc_epo1* の cDNA (両端に *Sac* I と *Not* I 制限酵素サイトを含む) を pIZT/V5-His vector の cDNA (*Sac* I と *Not* I により消化済み) に 16°C で一晩ライゲーション反応し、大腸菌 (DH5 α 株: TaKaRa) を形質転換させ、zeocin (50 μ g/mL) を含んだ LB 液体培地で 37°C、16 時間培養後、QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。最終的なプラスミド溶液の濃度は 1 μ g/ μ l に調製し、使用まで -20°C で保存した。

1.2.7 トランスフェクションの条件検討

pIZT/V5-His vector に含まれる GFP をレポーターとして、トランスフェクション開始までに要する時間を培養細胞で測定し、活性実験の条件検討を行った。pIZT/V5-His vector は InsectSelect™ Glow System キット (invitrogen) を用いて Sf9 細胞にトランスフェクションした。TC-100 培養液中の Sf9 細胞は、60mm のシャーレに撒き 27°C にて一晩静置した。翌日、250 μ l の TC100(-) (FBS を含まない TC-100) 培養液を 18 μ l の Cellfectin® II Reagent (invitrogen) と混合し 30 分間室温にて静置した。静置終了後、発現ベクター (pIZT/V5-His vector) 2 μ g を含んだ 250 μ l の TC-100(-) の培養液と混合し、更に 30 分間インキュベーションした。インキュベーションした後、培養液を 15ml のチューブに移し 1.5ml の TC-100(-) と穏やかに混合した。前日に細胞を撒いた培地とこの培養液

2.02 ml を交換し 27°C で 5 時間培養した。5 時間の培養の間、1 時間ごとにシャーレを前後左右に振盪して、トランスフェクションを均一にした。培養終了後、更に 2ml の TC-100(-) を加え、27°C で培養した。培養開始後、12 時間ごとに FLoid™ Cell Imaging Station (Life technologies) を用いてトランスフェクション状況を暗視野下で観察した。この観察結果により、トランスフェクションを開始して発現が最大となった時間帯を把握し、*in vivo* 活性実験において注射された昆虫の組織あるいは *in vitro* 活性実験における Sf9 細胞を回収するタイミングを決めた。

1.2.8 GC-MS 分析条件とエポキシ化物標品の合成

GC-MS の分析条件として、カラムは DB-WAX を選択し、カラムオーブンの昇温条件は、120°C で 2min、12°C · min⁻¹ → 180°C、5°C · min⁻¹ → 240°C、そして 240°C で 5min 保持した。イオン化は、加速電圧 70eV の電子衝撃法 (EI 法) で行った。

キマエホソバの性フェロモン化合物及び活性実験により生成が予想されるエポキシ化産物はいずれもホモ共役二重結合を含むが、これらの分子は、EI 法でイオン化した際、*m/z*=79 が良好な基準イオンピークを与えることが知られている

(Ando et al., 2004 ; Ando and Yamakawa. 2011)。そこで本分析では、解析の際に TIC (Total Ion Chromatogram) に加え、質量イオン 79 のマスクロマトグ

ラム情報も参照にした。

エポキシ環の位置異性体のリテンションタイムとマススペクトラムパターンの違いを調べるために、標準品を合成した (Fig. 9B)。メタクロロ過安息香酸 (*m*-chloroperoxybenzoic acid、mCPBA) は非選択的に二重結合をエポキシ環に酸化できる。Z3, Z6, Z9-21:H を mCPBA を用いて塩化メチレン (CH₂Cl₂) 中で、室温にて一晩反応させ、位置異性体標準品 epo3, Z6, Z9-21:H、Z3, epo6, Z9-21:H、Z3, Z6, epo9-21:H を合成した (Fig. 9B)。発現系から得られたエポキシ化産物は、これらの開裂パターンと比較してエポキシ環の位置を特定した (Fig. 9C)。

1.2.9 *in vitro* トランスフェクションによる過剰発現系を用いた *Hc_epo1* の活性実験

Sf9 培養細胞でのタンパク質の発現を確認するために、Western blotting を行った。2.2.3 と同様の方法にて pIZT/V5-His-*Hc_epo1* を Sf9 細胞にトランスフェクトし、トランスフェクション条件の検討結果を参考に、65 時間培養した。培養終了後、接着している Sf9 細胞は、60mm ディッシュ上で 2ml の PBS(-) で 3 回洗浄した後、1ml の PBS(-) を入れ、セルリフターによりかき集めて新しい 1.5ml チューブに移した。48 μ l の PBS(-) と 2 μ l の 50xComplete mini を混合し混合液を用意した。PBS(-) に懸濁した細胞を卓上遠心機で 20 秒遠心しペレット化し

た。上清を廃棄し用意した混合液を入れペレットを再懸濁した。2x SDS サンプルバッファー (125mM Tris-HCl (pH 6.8) ; 138.7mM SDS ; 2.74M グリセロール ; 0.15mM BPB ; 1.42M β メルカプトエタノール) を 50 μ l 加え、サンプルバッファーとした。タンパク質が細胞外に分泌されていないことを確認するために、培養後の培地も 100 μ l 採取し、2xSDS サンプルバッファーを 100 μ l 加え、サンプルバッファーとした。陰性対照区として、目的遺伝子を含まない pIZT/V5-His vector を同様の手順で用意し、電気泳動に用いた。全ての泳動サンプルを 5 分間煮沸処理後、飛沫を遠心にてエッペンチューブの底に集め電気泳動用の試料として 10 μ l をゲルにアプライした。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は 20mA の定電流に設定しタンパク質の分離を行った。

SDS-PAGE 終了後、ウェスタンブロッティングは、60mA の定電流に設定し 60 分間ブロッティングを行い、ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を Immobilon-P PVDF Transfer membrane (MILLIPORE) に転写した。ブロッティング終了後、PVDF 膜をブロッキング液 (5%スキムミルク) の入ったプラスチックケースに移して 1 時間振盪し、4°Cで一晩ブロッキングを行った。ブロッキングの終了した PVDF 膜を TBST (137mM NaCl ; 2.68mM KCl ; 25mM Tris ; 0.05% Tween 20) 中で洗浄し、1 次抗体処理を行った。1 次抗体処理は mouse anti-His antibody (nacalai tesque, 1:3000 希釈) を目的タンパク質に 1 時間反応させた。反応

終了後、PVDF 膜を適量の TBST 中で 30 分間振盪して洗浄した。この時、TBST は 10 分ごとに取り替えた。洗浄終了後、2 次抗体処理を行った。2 次抗体処理は goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (1:3000 希釈) を用いて 1 時間反応させた。2 次抗体反応終了後の PVDF 膜の洗浄は 1 次抗体処理の時と同様に行った。洗浄済みの PVDF 膜は、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いてプロトコールに従い化学発色させ ImageQuant 400 (GE Healthcare Bioscience) を用いて検出した。

アメリカシロヒトリの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-21:H は東京農工大学の安藤哲教授より供与していただいた。2.2.3 に示した条件で 5h トランスフェクションを行い、トランスフェクション条件の検討結果を参考に、更に 72h 培養した後、Z3, Z6, Z9-21:H を $10 \mu\text{g}$ 、0.5% のジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO) と共に TC100(-) に溶かし 1 時間超音波処理後、60mm シャーレに培地交換し、12h 培養した。培養後、細胞分画と培地分画をそれぞれヘキサンにて抽出した。

培地分画について、培地を $500 \mu\text{l}$ 取り、ガラスの試験管に移した。続いて 1ml のヘキサンを入れてヘキサン抽出を 1h 行った。抽出する際、抽出を十分に行うために、10min ごとに vortex を行った。抽出終了後、 Na_2SO_4 により脱水処理を行い、窒素気流下でヘキサンを蒸発させ、 $10 \mu\text{l}$ のヘキサンを入れて炭化水素を

再溶解し、 $2\mu\text{l}$ を取り GC-MS により Z3, Z6, Z9-21:H の変化を追跡した。

細胞分画について、分析用培地を回収してから残りの培地を廃棄し、接着している Sf9 昆虫細胞は、60mm ディッシュ上で 2ml の PBS(-) で 3 回洗浄した後、 1ml の PBS(-) を入れ、セルリフターによりかき集めて新しい 1.5ml チューブに移した。続いて PBS(-) に懸濁した細胞を卓上遠心機で 20 秒遠心しペレット化した。上清を廃棄し $100\mu\text{l}$ の水を入れペレットを再懸濁し、ガラスの試験管に移した。更に $500\mu\text{l}$ のヘキサンを入れてヘキサン抽出を 1h 行った。抽出する際、抽出を十分に行うために、10min ごとに vortex を行った。抽出終了後、 Na_2SO_4 により脱水処理を行い、窒素気流下でヘキサンを蒸発させ、 $10\mu\text{l}$ のヘキサンを入れて炭化水素を再溶解し、 $2\mu\text{l}$ を取り GC-MS により Z3, Z6, Z9-21:H の変化を追跡した。

1.2.10 系統解析

系統解析は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ:<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) が提供するオンライン・サービスを使用した。アミノ酸配列のアライメントは、Clustal W プログラムを用いて行った。系統樹は近隣結合法 (neighbor-joining method) により推定し、枝の分岐の信頼性は bootstrap 値 (1,000 re-samplings) によって判断した。National Center for Biotechnology Information database

(NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の blastp を用いて *Hc_epo1* の演繹アミノ酸配列との相同性検索で高いスコアを示した以下のアミノ酸配列を系統解析に用いた。以下、それらを学名 (P450 ファミリーの分類)、アクセッション番号の順に示した。*Papilio xuthus* (CYP341A2) , AB201381 ; *Spodoptera littoralis* (CYP341A13) , JX310094 ; *Papilio xuthus* (CYP4C3) , AK402852 ; *Blaberus discoidalis* (CYP4C1) , P29981 ; *Macaca mulatta* (CYP4V2) , NM_001193838 ; *Mus musculus* (CYP4V2) , NM_133969 ; *Bos taurus* (CYP4V2) , NM_001034373 ; *Homo sapiens* (CYP4V2) , NM_207352 ; *Nilaparvata lugens* (CYP4C61) , FM163384 ; *Pongo abelii* (CYP4V2) , NM_001131773 ; *Oryzias melastigma* (CYP4V2) , JX454632 ; *Heterocephalus glaber* (CYP4V2) , JH171204 ; *Gallus gallus* (CYP4V2) , NM_001001879 ; *Rattus norvegicus* (CYP4V2) , NM_001135600 ; *Reticulitermes flavipes* (CYP4U3V1) , DQ279461 ; *Danio rerio* (CYP4V7) , NM_001079996 ; *Fenneropenaeus chinensis* (CYP4) , GU218693 ; *Bombyx mori* (CYP4G23) , AK289276 ; *Balaenoptera acutorostrata* (CYP4V6) , AB290012 ; *Bombyx mori* (CYP4G22) , AK289271 ; *Laodelphax striatella* (CYP4C62) , JX876495.

1.3 第1章結果

1.3.1 アメリカシロヒトリのフェロモン腺 EST ライブラリーの構成とスクリ

ーニング

最初に、400bp以上の長さのインサートを有するクローンを選別し、288クローンを選択した。選択した288クローンのうち、コロニーPCRの結果により、塩基配列が400~800bpの長さを有するクローン数は172、801~1200bpは71、1201~1600bpは30、1601~2000bpは8、2001~2400bpは6、塩基配列の長さが2400以上のクローン数は1であった (Fig. 4)。288クローンをシーケンスし塩基配列情報入手した後、入手した塩基配列に基づき、BLAST検索によりクローンがコードするタンパクの機能を推定し分類した結果、全288クローンの中に貯蔵タンパク質は16クローン (5.6%)、収縮タンパク質は27クローン (9.4%)、構造タンパク質は26クローン (9.0%)、調節タンパク質は61クローン (21.2%)、そして酵素は37クローン (12.8%) 含まれていた (Fig. 5)。更に酵素遺伝子として分類された37クローンがコードする酵素の機能を同じくBLAST検索より推定した結果、Cytochrome P450は4クローン (3種類)、Desaturaseは2クローン (1種類)、Reductaseは1クローン、Dehydrogenaseは5クローン、Hydrolaseは1クローン、Cytochrome Oxidaseは5クローン (4種類)、Transferaseは7クローン、Catalaseは2クローン (1種類)、Dismutaseは1クローン、Thiolaseは1クローン、Lipaseは1クローン、Carboxypeptidaseは1クローン、ATPaseは6クローン (5種類) であった (Fig. 5)。

1.3.2 候補遺伝子の組織別発現プロファイル

アメリカシロヒトリの性フェロモン生合成経路のエポキシ化酵素は、酸化酵素の一種であることから、37 クローンの中に含まれていた3種類の Cytochrome P450 をコードする遺伝子を候補として、P450-1~3 と名付け、RT-PCR 法により組織間の発現を比較した (Fig. 6)。その結果、P450-1 以外の遺伝子は試験したほとんどの組織で発現していたため、この段階で候補から外した。P450-1 はフェロモン腺で特異的に発現していて、エポキシ化反応を触媒している可能性が強まった。この結果から、この遺伝子 (P450-1) を *Hc_epo1* と名付け、このクローンの翻訳領域の全長配列情報を優先的に獲得し、機能解析を行うことにした。

1.3.3 *Hc_epo1* の翻訳領域における配列情報

RACE 法により、*Hc_epo1* の cDNA 全長塩基配列は 1907bp、その翻訳領域は 1527bp、509 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていることがわかった (Fig. 7A)。SOSUI プログラム (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を用いて *Hc_epo1* の二次構造を予測した結果、アミノ末端 (N 末端) 側に膜貫通ドメイン (amino acid position 2~24) が存在していることが示唆された (大村ら 2003) (Fig. 7A)。このアミノ酸配列より計算されるタンパク質の分子量は 57.9kDa であった。

Hc_epo1 のカルボキシル末端 (C 末端) 側には、P450 ファミリーの酸化酵素が活性を持つために必須な近位の Cys 残基とその周辺配列 (amino acid position 432~441) が保存されていることが確認できた (Fig. 7B)。他にも、P450 ファミリーの分子で特徴的な配列である遠位の Thr 残基とその周辺配列 (amino acid position 301~305)、K 領域 (amino acid position 359~362)、芳香族領域 (amino acid position 406~418) が保存されていることを確認することができた (Fig. 7B)。但し、P450 のアミノ末端 (N 末端) の近くでよく報告されているプロリンに富む領域 (proline-rich region) については確認できなかった。

1.3.4 昆虫細胞へのトランスフェクションによる活性実験の条件決定

Hc_epo1 タンパク質の発現条件および活性実験の条件を検討するために、pIZT/V5-His vector の GFP をレポーターとして、トランスフェクション開始までに要する時間を培養細胞を用いて観察した (Fig. 10)。その結果、36 時間後から GFP の蛍光発光を検出した (Fig. 10A)。トランスフェクションが起こり、蛍光を発する Sf9 細胞数は培養時間の延長と共に次第に増加し、トランスフェクション開始 60~72 時間後に最大となった。顕微鏡下で発光細胞の数を数え、その発現は約 30%であることがわかった (発光細胞/全細胞=約 88/約 288≒30.5%) (Fig. 10B)。

1.3.5 位置異性体（標品）の GC-MS の分析結果

合成した標品を GC-MS で分析した結果、Z3, epo6, Z9-21:H と推定されるピークの保持時間は 14.65min であった。epo3, Z6, Z9-21:H と Z3, Z6, epo9-21:H と推定されるピークの保持時間はともに 14.86min であり、保持時間で区別することができなかった。そのため、発現系から得られた産物を分析した際、標品の保持時間と比較するだけでなく、epo3, Z6, Z9-21:H と Z3, Z6, epo9-21:H のエポキサイドの位置の違いにより生じた診断イオンの違いによって判断することにした。

1.3.6 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

1.3.6.1 目的タンパク質の過剰発現

Hc_epo1 タンパク質の発現の確認は His 抗体を用いた Western blotting 法にて行った (Fig. 12)。その結果、培地にタンパク質の発現は確認できなかった。一方、細胞の抽出物に目的産物と思われるバンドを確認した。分子量マーカーのサイズと移動距離より算出したタンパク質のサイズは 66.8kDa であった。His-tag を含んだ *Hc_epo1* アミノ酸配列から計算されたサイズ (62kDa) より約 5kDa 大きいことがわかった (Fig. 12)。

1.3.6.2 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

Hc_epo1 を Sf9 昆虫細胞へトランスフェクションし発現させて、アメリカシロヒトリの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-21:H と共に培養し、ヘキサン抽出液の GC-MS 解析により、Z3, Z6, Z9-21:H の変化を追跡した。その結果、細胞分画にのみエポキシ化を示唆するピーク (Retention Time=14.90min) を認めた。このピークの保持時間は 14.90min であり、*epo3*, Z6, Z9-21:H および Z3, Z6, *epo9-21:H* の標品と同じ保持時間 (14.86min) を与えた。更に分子イオン $m/z=306$ が確認され、そのイオンスペクトラムパターン (診断イオンは $m/z=108$ と $m/z=122$) により、前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、9 位にエポキシ環が形成されていることが分かった (Fig. 9C) (Fig. 13A)。以上により、発現系から得られた化合物が Z3, Z6, *epo9-21:H* であることが証明された。一方、pIZT/V5-His vector を用いた陰性対照区及び培地分画で本ピークは認められなかった (Fig. 13B)。

1.3.7 系統解析

Hc_epo1 と他の P450 遺伝子の系統関係を調べるために、blastp により *Hc_epo1* と相同性を示す遺伝子を用いて系統樹を構築した (Fig. 8)。系統解析の結果から、*Hc_epo1* は CYP4 および CYP341 サブグループから派生していることが示唆された。*Hc_epo1* の演繹アミノ酸配列は、その配列との相同性検索で最も高いスコ

アを示したナミアゲハ *Papilio xuthus* の CYP341A2、CYP4C3、ヨトウの一種 *Spodoptera littoralis* の CYP341A13 と比較しても、アミノ酸レベルの相同性はそれぞれ 43.1%、31.8%、40.7%であり、あまり高くなかった。

1.4 第1章考察

2017年現在、性フェロモンのデータベース (<http://www.phero.net/>) には、Type I 性フェロモンを分泌しているガ類は 450 種類以上、Type II も 90 種類以上登録されているが、二つのタイプの性フェロモン成分を同時に分泌しているガ類はアメリカシロヒトリ以外にツトガ科の *Neoleucinodes elegantalis* (Cabrera et al., 2001) と *Deanolis sublimbalis* (Gibb et al., 2007)、メイガ科の *Pyralis farinalis* (Landolt and Curtis, 1982; Leal et al., 2005; Kuenen et al., 2010)、*Amyelois transitella* (Coffelt et al., 1979; Leal et al., 2005; Millar et al., 2005; Kuenen et al., 2010)、*Dioryctria abietivorella* (Millar et al., 2005; Grant et al., 2009) の 5 種に限られている。故に、アメリカシロヒトリはガ類の中でも性フェロモン生合成メカニズムの研究にとって貴重な材料である。

序章で述べたようにフェロモン前駆体の重水素標識体を用いた追跡実験は、アメリカシロヒトリの性フェロモン生合成経路上に長鎖脂肪族アルコール酸化

酵素とエポキシ化酵素が存在することを示唆した (Kiyota et al., 2011)。本研究の EST ライブラリーからも P450 型遺伝子 (3 種類 4 クローン) が同定され (Fig. 5) (Table 2)、更に RT-PCR 法により組織間の発現を比較することにより、*Hc_epo1* がフェロモン腺で特異的に発現していることが明らかとなった (Fig. 6)。

P450 は微生物から植物、動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質で、モノオキシゲナーゼ、すなわち一原子酸素添加酵素として知られ、基質を酸化し、基質に酸素原子を挿入する反応を触媒している (大村ら 2003)。

P450 ファミリーには、ヘム結合領域 (heme-binding region)、保存性の高い遠位のトレオニン残基 (Thr) とその周辺配列、K 領域 (K-region)、芳香族領域 (aromatic region)、プロリンに富む領域 (proline-rich region)、オルガネラに局在するための配列など特徴的な共通配列が知られており、それらの配列と 1 次構造における配列の相対位置が P450 の機能の上で重要であることが示されている (大村ら 2003)。特にヘム結合領域 (heme-binding region) は P450 の独特の配列であり、この配列の中にある Cys 残基が P450 の活性中心であるヘム鉄に配位する S⁻ (thiolate anion) を提供しており、「近位の Cys (proximal Cys)」と呼ばれている。このモチーフが存在すると、P450 ファミリーと見なすことができる (大村ら 2003)。

Hc_epo1 でも、保存されたヘム結合領域 (heme-binding region) と近位の Cys

残基が確認できたため、P450 ファミリーに属すると結論できる (Fig. 7)。他にも P450 ファミリーの分子で特徴的な配列である遠位の Thr 残基、K 領域、芳香族領域を確認することができた (Fig. 7A)。更に、SOSUI プログラムを用いて *Hc_epo1* の二次構造を予測した結果、アミノ末端にマイクロソーム型 P450 がオルガネラに局在するための配列が存在していることがわかり、*Hc_epo1* はマイクロソーム型 P450 であると思われる (Fig. 7A)。一方、*Hc_epo1* では P450 で報告されたプロリンに富む領域が確認できなかったが、この共通配列は P450 ファミリーにより異なることが知られている (大村ら 2003)。この点において *Hc_epo1* は、P450 の中でも新規と呼べるかもしれない。

in vitro の発現系で *Hc_epo1* が性フェロモン生合成酵素としてエポキシ化を触媒していることが証明できた。まず、ウェスタンブロットティングの結果から、*Hc_epo1* タンパク質の発現は細胞分画のみから確認できたため、細胞外に分泌されず、細胞内に局在していたことがわかった (Fig. 11)。この結果は SOSUI プログラムを用いて *Hc_epo1* は膜タンパク質であるとの予測と一致している (Fig. 7A)。ウェスタンブロットティングでは、*Hc_epo1* のアミノ酸配列から推定された分子量より約 5kDa 大きな分子量のタンパク質が発現したが、この原因は明らかにできなかった。GC-MS の分析結果から、タンパク質の発現と同様に細胞分画のみからエポキシ化を示唆するピークが検出された。標品の保持時間及び

診断イオンと比較することにより、この化合物は Z3, Z6, epo9-21;H であることがわかったため、*Hc_epo1* がアメリカシロヒトリの性フェロモン生合成経路上でエポキシ化反応を触媒することが証明された (Fig. 13)。エポキシ化合物を性フェロモンとして分泌するガ類には、本種と同じくヒトリガ科に属するものの他に、ドクガ科、シャクガ科に属するものが知られている。更に性フェロモンは種の認識を行い、生殖前隔離の役割を果たしている重要な化合物であり、その生合成酵素は一般に基質選択性が高い。このため、*Hc_epo1* の基質選択性を調査し、他種のもつエポキシ化酵素と比較する必要がある。

blastp により *Hc_epo1* と相同性を示す遺伝子を用いて系統樹を作製し、*Hc_epo1* と他の P450 遺伝子のホモログの系統関係を調べた結果、類似アミノ酸配列とのホモロジーは 30~43% であり (Fig. 8)、このことから、*Hc_epo1* は CYP4 および CYP341 と同一のファミリーから派生していることが示唆された。*Hc_epo1* と相同性を示した CYP4 サブファミリーは節足動物の昆虫綱から脊椎動物の哺乳類まで幅広く分布しており、多様な機能を持っている (Fig. 8)。*Hc_epo1* とも近い CYP341A2 は、*Papilio xuthus* の脚のふ節 (tarsi)、触角などの化学感覚器官で発現し、寄主植物の匂い物質の分解に機能すると推測されているが、機能の解析には至っていない (Ono et al., 2005)。更に、*Hc_epo1* は昆虫の JH 生合成という生理機能に関わるエポキシ化酵素である CYP15A1 や CYP15C1 とは

別のファミリーに属し、独立して進化してきた可能性が高い。

第 2 章 クワゴマダラヒトリ () における 9 位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

2.1 第 2 章序論

第 1 章で、ヒトリガ科のアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) のフェロモン腺で特異的に発現し、フェロモン前駆体の不飽和炭化水素である Z3, Z6, Z9-21:H の 9 位にエポキシ環を導入する位置選択性の高い酵素遺伝子 *Hc_epo1* を単離した。分子系統解析により、*Hc_epo1* は P450 の CYP341 サブファミリーに属し、CYP341B14 と命名された。これはガ類の性フェロモン生合成に関わるエポキシ化酵素としては初めての発見であり、類似遺伝子に関する知見は全くなかった。性フェロモン生合成に関与するエポキシ化酵素の分子進化を考察するためには、まず近縁種における配列保存性を確かめる必要がある。本章では、アメリカシロヒトリと同じヒトリガ科に属するクワゴマダラヒトリ (*Lemyra imparilis*) から *Hc_epo1* のホモログの単離及び機能解析を目指した。

クワゴマダラヒトリ (*Lemyra imparilis*) は Type II の 1, Z3, Z6, epo9-21:H、Z3, Z6, epo9-21:H、Z3, Z6, epo9-23:H、Z6, epo9-23:H (エポキシアルケン) 及び Z3, Z6, Z9-21:H (アルケン) を性フェロモン成分として分泌している (Ando et al., 2004)。エポキシ化成分に関してはどれも三箇所ある二重結合のうち 9 位にだけエポキシ化されている。その中に 1, Z3, Z6, epo9-21:H 及び Z3, Z6, epo9-21:H の

二成分が近縁種のアメリカシロヒトリと同じである。更に、本種の血液からエポキシ化フェロモン成分にそれぞれ相応する不飽和炭化水素前駆体の 1, Z3, Z6, Z9-21:H、Z3, Z6, Z9-21:H、Z3, Z6, Z9-23:H、Z6, Z9-23:H が検出された (Wei et al., 2003)。この結果により、クワゴマダラヒトリのフェロモン腺にエポキシ化酵素遺伝子が発現し、*Hc_epo1* のホモログである可能性を示唆した。本章では *Hc_epo1* が属する CYP341B ファミリーから縮重プライマーにより候補遺伝子の単離を試みた。

本研究では、*in vitro* で活性実験を行い、酸化酵素活性を調べることを目指した。昆虫細胞とバキュロウイルスを用いたタンパク質発現系は、現在広く使用されている。例えば、Type I のウスジロキノメイガ (*Ostrinia latipennis*) の性フェロモン生合成に関与する不飽和化酵素遺伝子 *latpg1* は昆虫細胞発現系で機能が証明された (Fujii et al., 2010)。この系では、真核細胞である昆虫細胞を使用するので、合成されたタンパク質は高等動物細胞で見られるリン酸化、糖の付加などの翻訳後修飾を受ける。それゆえ、タンパク質を本来の生物活性を保持した形で発現できる。更に、バキュロウイルスは、感染細胞の核内に多角体 (polyhedrin) と呼ばれる封入体を大量に作る核多角体病ウイルスで、このウイルスの強力な多角体プロモーター (polyhedrin promoter) または P10 プロモーターが目的タンパク質を大量発現させることができる。本章では、夜

盗蛾科のバキュロウイルス *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)、そして夜蛾科由来の細胞 *Spodoptera frugiperda* (Sf9 細胞) を用い、*in vitro* で昆虫細胞 (Sf9) へのインフェクションによりエポキシ化酵素遺伝子を過剰発現させ、基質とともに培養し、その活性を調べることにした。本章ではアメリカシロヒトリと同様に Z3, Z6, Z9-21:H を基質として選択し、GC-MS (ガスクロマトグラフィー-結合型質量分析計) を用いて活性試験の産物を同定することにした。

2.2 方法

2.2.1 供試昆虫と培養細胞

クワゴマダラヒトリ (*Lemyra imparilis*) はXX県XX市より採集した幼虫を鳥取大学の中秀司准教授より供試していただき研究に用いた。飼育条件は、室温 24°C、明暗周期が 16L8D (9 時消灯 ; 17 時点灯) であり、餌としてシルクメイト 2M (日本農産工業) を与えた。雌雄の判別は蛹の時期に行い、蛹は羽化までの間十分な湿度のもと保管した。

発現実験に用いた昆虫細胞は本研究室で継代培養されているヨトウガの卵母細胞由来の Sf9 細胞を用いた。細胞培養は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む TC-100 (TC-100(+)) にて 27°Cにて行った。

2.2.2 各組織の回収及び Total RNA の抽出

各組織由来の鋳型 Total RNA は、飛翔筋、中腸、マルピーギ管、脚、卵、脂肪体、表皮、フェロモン腺をクワゴマダラヒトリのメス成虫から冷 PBS (2.5mM KCl, 141mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, and 2.5mM KH₂PO₄, pH=7.0) (Fujii et al., 2011) 中で解剖し、それぞれの組織から抽出した。抽出物液は、分光光度計 (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer ; 旭テクノグラス株式会社) を用いて Total RNA 濃度を推定し、約 100ng に調整した。つづいて、各組織由来の Total RNA に対し、PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行った。

2.2.3 候補遺伝子のクロニング

Hc_epo1 のホモログをクロニングするために、degenerate PCR を行った。鋳型は 2.2.2 でフェロモン腺から抽出した Total RNA を逆転写するによって合成した cDNA を用いた。プライマーの設計は、*Hc_epo1* の属する CYP341B ファミリーの CYP341B1 (*Bombyx mori*; AB436841)、CYP341B2 (*Helicoverpa armigera*; KM016716) 及び *Hc_epo1* のアミノ酸配列を参考にデザインした (Table1)。Degenerate PCR の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR の温度サイクル条件

は 94°C で 3 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、52°C で 30 秒、68°C で 1 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。陰性対照区として、反応系からそれぞれ鋳型、Forward primer、Reverse primer を除いて PCR を行った。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、産物をエチジウムブロマイドで染色し可視化した。目的産物を含むバンドは Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル抽出した。得られた cDNA を pGEM®-T Easy Vector (Promega) に 16°C で一晩ライゲーション反応した後、大腸菌 (DH5 α 株: TaKaRa) を形質転換しプレート上でコロニー化させた。コロニーをピックアップし、コロニー-PCR 法による cDNA インサートの確認を行った。インサート確認の PCR の際、プライマーは M13 プライマー (Table 1) を使用した。コロニー-PCR 反応の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR 反応の温度サイクル条件は 94°C で 2 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 3 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロマイドで染色し可視化した。インサートを含む陽性クローンは、そのコロニーを再度ピックアップし、アンピシリン (100 μ g/mL) を含んだ LB 液体培地で 37°C、16 時間培養後、QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドは、M13 プライマーを用いて、5' 側からシーケンスを行った。シーケンス解析は、ファスマック株式

会社 (FASMAC Co., Ltd. ; <http://www.fasmac.co.jp/>) に依頼した。得られた配列情報は、DNASIS-Mac v 3.0 (日立ソリューションズ) を用いて解析した。この候補遺伝子を *Li_epo1* と名付けた。

この全長塩基配列情報を RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により獲得することとした。RACE には 2.2.2 でフェロモン腺から抽出した Total RNA を 1 μ g を使用した。RACE 法は GeneRacer Kit (invitrogen) を用いて行った。手順はキットのプロトコルに従った。プライマーは、GeneRacer Kit (invitrogen) に含まれたアダプタープライマー (Table 1) と、前の実験で得られた候補遺伝子 (*Li_epo1*) の配列情報に基づいて設計した GSP プライマー (Gene-Specific Primers) (Table 1) を使用した。cDNA 全長配列は、*Li_epo1* の断片配列情報、3' RACE と 5' RACE により得られた各断片の配列情報を組み合わせることによって獲得した。各断片配列の接続を確認するために、RACE 法により獲得した塩基配列情報に基づいて、全翻訳領域をコードするプライマー (Table 1) をデザインし PCR を行った。この PCR により得られた cDNA を pGEM®-T Easy Vector (Promega) に再度サブクローニングした後、先に示したのと同じ方法でシーケンス解析を行い全長塩基配列を決定した。

2.2.4 候補遺伝子の組織別発現パターンの解析

性フェロモン生合成酵素遺伝子がフェロモン腺で高発現していることを踏まえて、RT-PCR 法により候補遺伝子の発現を組織間で比較した。組織間での発現を比較するためのプライマーは得られた *Li_epo1* の配列情報に基づき、特異的な配列を選び設計した (Table 1)。PCR の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR の温度サイクル条件は 94°C で 1 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、68°C で 1 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。使用した Total RNA にゲノム DNA が混入していないことを確認するため、各組織から抽出した Total RNA サンプルの RT-PCR も同時に行った (RT-試験区)。Loading control として Actin を増幅するプライマーを用いた PCR を行った。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロマイドで染色し可視化した。

2.2.5 発現ベクターの構築

in vitro で *Li_epo1* の活性実験を行うために、*Li_epo1* の翻訳領域をコードする塩基配列を、PH プロモーターを持つ pFastBac1 vector (Invitrogen) につなげ、一過的に *Li_epo1* を発現させるための発現ベクター pFastBac1-*Li_epo1* を構築した。

まず、*Li_epo1* の翻訳領域に相当する塩基配列の開始コドン上流域に *Bam*H I

制限酵素サイトを、終始コドン下流域に *Sph* I 制限酵素サイトを PCR 法により挿入し全翻訳領域をコードするプライマー (Table 1) をデザインした。次に、*Li_epo1* の cDNA は、このプライマーを用いた PCR 法により増幅した。PCR 反応の酵素は ExTaq® (TaKaRa) を用いた。PCR 反応の温度サイクル条件は 94°C で 3 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 2 分を 30 サイクル、そして 72°C で 10 分間保持した。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、産物をエチジウムブロマイドで染色し可視化した。目的産物を含むバンドは Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル抽出した。得られた cDNA を pGEM®-T Easy Vector (Promega) に 16°C で一晩ライゲーション反応した後、大腸菌 (DH5 α 株 : TaKaRa) を形質転換しプレート上でコロニー化させた。続いて 1.2.2 で示したのと同じ方法でプラスミドを抽出後、37°C で 2 時間 *Bam*HI と *Sph* I で同時に消化した。得られた消化産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。インサートにあたるバンドは Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル抽出した。pFastBac1 vector (Invitrogen) を同様に *Bam*HI と *Sph* I で消化し、電気泳動後ゲル抽出を行った。得られた *Li_epo1* の cDNA (両端に *Bam*HI と *Sph* I 制限酵素サイトを含む) を pFastBac1 vector の cDNA (*Bam*HI と *Sph* I により消化済み) に 16°C で一晩ライゲーション反応し、大腸菌 (DH5 α 株 : TaKaRa)

を形質転換させ、アンピシリン (50 μ g/mL) を含んだ LB 液体培地で 37°C、16 時間培養後、FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd) を用いてプラスミドを抽出した。更にプラスミド溶液の濃度は 200pg/ μ l に調製し、大腸菌 (DH10Bac : Invitrogen) を形質転換させ、kanamycin (50 μ g/mL)、gentamicin (7 μ g/mL)、tetracycline (10 μ g/mL) を含んだ LB 液体培地で 37°C、16 時間培養後、PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) を用いて Bacmid DNA を抽出し、使用まで 4°C で保存した。Western Blotting により目的タンパク質の発現を確認するため、*Li_epo1* の翻訳領域の C 末端に His-tag を付ける発現ベクター pFastBac1-Li_epo1-His も構築した。陰性対照区として、目的遺伝子を含まない pFasBac1 vector を同様に DH10Bac を形質転換させ、Bacmid DNA を用意した。

2.2.6 トランスフェクション及びバキュロウイルスの増幅

Bacmid DNA は Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System キット (Invitrogen) を用いて Sf9 細胞にトランスフェクションした。TC-100 培養液中の Sf9 細胞は、60mm のシャーレに撒き 27°C にて一晩静置した。翌日、100 μ l の TC100(-) (FBS を含まない TC-100) 培養液を 8 μ l の Cellfectin® II Reagent (Invitrogen) と混合し 30 分間室温にて静置した。静置終了後、発現ベクター Bacmid DNA を

2 μ g を含んだ 100 μ l の TC-100(-) の培養液と混合し、更に 30 分間インキュベーションした。インキュベーションした後、混合液を前日に撒いた細胞に入れて 27°C で 5 時間培養した。5 時間の培養の間、1 時間ごとにシャーレを前後左右に振盪して、トランスフェクションを均一にした。培養終了後、4ml の TC-100(+)(FBS を含む TC-100) に培地交換し、27°C で五日間培養した。培養終了後、培地を 15ml チューブに回収し、500g、5min の遠心 (室温) によって Sf9 細胞及び大きいデブリを除去した。これを passage 1 (P1) viral stock とし、4°C で遮光保存した。

P1 stock を P2 に増幅するために、前の実験と同じく Sf9 細胞を 60mm のシャーレに撒き 27°C にて一晩静置した。翌日、P1 stock を 0.5ml 入れ、27°C にて 72 時間培養した。培養終了後、前述のように passage 2 (P2) viral stock を回収した。活性実験における Sf9 細胞へのインフェクションはこの P2 stock を使用した。

Li_epo1 を発現するために、P2 stock を用い Sf9 細胞へのインフェクションを行った。まずインフェクション開始までに要する時間を Western blotting により測定し、活性実験の条件検討を行った。TC-100 培養液中の Sf9 細胞は、6 穴プレートに撒き 27°C にて一晩静置した。翌日、0.3ml の Li_epo1_His-AcNPV の P2 stock を 0.3ml の TC100(-) と混合し、前日に細胞を撒いた培地とこの混合

液を交換し 27°C で 1 時間培養した。1 時間の培養の間、15 分ごとにシャーレを前後左右に振盪して、インフエクションを均一にした。培養終了後、2ml の TC-100(-) に培地交換し、27°C で 72 時間培養した。培養開始後、12 時間ごとに泳動サンプルを回収し、Western blotting を行った。方法として、接着している Sf9 細胞は、6 穴プレートの上で 1ml の PBS(-) で 3 回洗浄した後、1ml の PBS(-) を入れ、セルリフターによりかき集めて新しい 1.5ml チューブに移した。87.4 μ l の PBS(-) と 14.3 μ l の 7xComplete mini と 1 μ l の E-64 (2M) を混合し混合液を用意した。PBS(-) に懸濁した細胞を 2500rpm で 7 分遠心しペレット化した。上清を廃棄し用意した混合液を入れペレットを再懸濁した。2x SDS サンプルバッファー (125mM Tris-HCl (pH 6.8) ; 138.7mM SDS ; 2.74M グリセロール ; 0.15mM BPB ; 1.42M β メルカプトエタノール) を 100 μ l 加え、サンプルとした。全ての泳動サンプルを 5 分間煮沸処理後、飛沫を遠心にてエッペンチューブの底に集め電気泳動用の試料として 10 μ l をゲルにアプライした。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は 10mA の定電流に設定しタンパク質の分離を行った。

SDS-PAGE 終了後、ウェスタンブロットティングは、90mA の定電流に設定し 60 分間ブロットティングを行い、ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を Immobilon-P PVDF Transfer membrane (MILLIPORE) に転写した。ブロットイン

グ終了後、PVDF 膜をブロッキング液（5%スキムミルク）の入ったプラスチックケースに移して1時間振盪し、4°Cで一晩ブロッキングを行った。ブロッキングの終了した PVDF 膜を TBST（137mM NaCl ; 2.68mM KCl ; 25mM Tris ; 0.05% Tween 20）中で洗浄し、1次抗体処理を行った。1次抗体処理は mouse anti-His antibody（MBL, 1:5000 希釈）を目的タンパク質に1時間反応させた。反応終了後、PVDF 膜を適量の TBST 中で30分間振盪して洗浄した。この時、TBST は10分ごとに取り替えた。洗浄終了後、2次抗体処理を行った。2次抗体処理は goat anti-mouse IgG-HRP conjugate（1:10000 希釈）を用いて1時間反応させた。2次抗体反応終了後の PVDF 膜の洗浄は1次抗体処理の時と同様に行った。洗浄済みの PVDF 膜は、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate（Millipore）を用いてプロトコールに従い化学発色させ ImageQuant 400（GE Healthcare Bioscience）を用いて検出した。この結果により、インフェクションを開始して発現が最大となった時間帯を把握し、*in vitro* 活性実験における Sf9 細胞を回収するタイミングを決めた。

更に、前述の方法で Li_epo1_His-AcNPV、Li_epo1-AcNPV をそれぞれ Sf9 細胞にインフェクションし、48時間培養した。培養終了後、前述と同様の方法で泳動サンプルを準備した。タンパク質が細胞外に分泌されていないことを確認するために、培養後の培地も 100 μ l 採取し、2xSDS サンプルバッファーを 100 μ l

加え、サンプルとした。陰性対照区として、目的遺伝子を含まない Bac1-AcNPV を同様の手順で用意し、電気泳動に用いた。

2.2.7 バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いた *Li_epo1* の活性実験

クワゴマダラヒトリの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-21:H は東京農工大学の安藤哲教授より供与していただいた。2.2.6 に示した条件でインフェクションを行い、インフェクション条件の検討結果を参考に、48h 培養した後、Z3, Z6, Z9-21:H を 40 μ g、NADPH (ORIENTAL YEAST CO., LTD) 1.5mg、0.5% のジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO) と共に TC100(-) に溶かし 1 時間超音波処理後、60mm シャーレに培地交換し、12h 培養した。培養後、細胞分画と培地分画をそれぞれヘキサンにて抽出した。

培地分画について、培地を 500 μ l 取り、ガラスの試験管に移した。続いて 1ml のヘキサンを入れてヘキサン抽出を 1h 行った。抽出する際、抽出を十分に行うために、10min ごとに vortex を行った。抽出終了後、Na₂SO₄ により脱水処理を行い、窒素気流下でヘキサンを蒸発させ、10 μ l のヘキサンを入れて炭化水素を再溶解し、2 μ l を取り GC-MS により Z3, Z6, Z9-21:H の変化を追跡した。

細胞分画について、分析用培地を回収してから残りの培地を廃棄し、接着している Sf9 昆虫細胞は、60mm ディッシュ上で 2ml の PBS(-) で 3 回洗浄した後、

1ml の PBS(-) を入れ、セルリフターによりかき集めて新しい 1.5ml チューブに移した。続いて PBS(-) に懸濁した細胞を卓上遠心機で 20 秒遠心しペレット化した。上清を廃棄し 100 μ l の水を入れペレットを再懸濁し、ガラスの試験管に移した。更に 500 μ l のヘキサンを入れてヘキサン抽出を 1h 行った。抽出する際、抽出を十分に行うために、10min ごとに vortex を行った。抽出終了後、Na₂SO₄ により脱水処理を行い、窒素気流下でヘキサンを蒸発させ、10 μ l のヘキサンを入れて炭化水素を再溶解し、2 μ l を取り GC-MS により Z3, Z6, Z9-21:H の変化を追跡した。

GC-MS の分析条件として、カラムは DB-WAX を選択し、カラムオーブンの昇温条件は、120°C で 2min、12°C \cdot min⁻¹ \rightarrow 180°C、5°C \cdot min⁻¹ \rightarrow 240°C、そして 240°C で 5min 保持した。イオン化は、加速電圧 70eV の電子衝撃法 (EI 法) で行った。キマエホソバの性フェロモン化合物及び活性実験により生成が予想されるエポキシ化産物はいずれもホモ共役二重結合を含むが、これらの分子は、EI 法でイオン化した際、 $m/z=79$ が良好な基準イオンピークを与えることが知られている (Ando et al., 2004 ; Ando and Yamakawa. 2011)。そこで本分析では、解析の際に TIC (Total Ion Chromatogram) に加え、質量イオン 79 のマスクロマトグラム情報も参照にした。

2.2.8 系統解析

系統解析は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ:<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) が提供するオンライン・サービスを使用した。アミノ酸配列のアライメントは、Clustal W プログラムを用いて行った。系統樹は近隣結合法 (neighbor-joining method) により推定し、枝の分岐の信頼性は bootstrap 値 (1,000 re-samplings) によって判断した。National Center for Biotechnology Information database (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の blastp を用いて *Hc_epo1* の演繹アミノ酸配列との相同性検索で高いスコアを示した以下のアミノ酸配列を系統解析に用いた。以下、それらを学名 (P450 ファミリーの分類)、アクセッション番号の順に示した。 *Hyphantria cunea* (CYP341B14: *Hc_epo1*) *Papilio xuthus* (CYP341A2) , AB201381 ; *Spodoptera littoralis* (CYP341A13) , JX310094 ; *Papilio xuthus* (CYP4C3) , AK402852 ; *Blaberus discoidalis* (CYP4C1) , P29981 ; *Macaca mulatta* (CYP4V2) , NM_001193838 ; *Mus musculus* (CYP4V2) , NM_133969 ; *Bos taurus* (CYP4V2) , NM_001034373 ; *Homo sapiens* (CYP4V2) , NM_207352 ; *Nilaparvata lugens* (CYP4C61) , FM163384 ; *Pongo abelii* (CYP4V2) , NM_001131773 ; *Oryzias melastigma* (CYP4V2) , JX454632 ; *Heterocephalus glaber* (CYP4V2) , JH171204 ; *Gallus gallus* (CYP4V2) , NM_001001879 ; *Rattus norvegicus* (CYP4V2) , NM_001135600 ; *Reticulitermes flavipes* (CYP4U3V1) ,

DQ279461 ; *Danio rerio* (CYP4V7) , NM_001079996 ; *Fenneropenaeus chinensis* (CYP4) , GU218693 ; *Bombyx mori* (CYP4G23) , AK289276 ; *Balaenoptera acutorostrata* (CYP4V6) , AB290012 ; *Bombyx mori* (CYP4G22) , AK289271 ; *Laodelphax striatella* (CYP4C62) , JX876495.

2.3 第2章結果

2.3.1 *Li_epo1* の翻訳領域における配列情報

RACE 法により、*Li_epo1* の cDNA 全長塩基配列は 1839bp、その翻訳領域は 1530bp、510 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていることがわかった (Fig.)。SOSUI プログラム (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を用いて *Li_epo1* の二次構造を予測した結果、アミノ末端 (N 末端) 側に膜貫通ドメイン (amino acid position 1~15 and 41~63) が存在していることが示唆された (大村ら 2003) (Fig.)。このアミノ酸配列より計算されるタンパク質の分子量は 57.9kDa であった。*Li_epo1* のカルボキシル末端 (C 末端) 側には、P450 ファミリーの酸化酵素が活性を持つために必須な近位の Cys 残基とその周辺配列 (amino acid position 432~441) が保存されていることが確認できた (Fig.)。他にも、P450 ファミリーの分子で特徴的な配列である遠位の Thr 残基とその周辺配列 (amino acid position 301~305)、K 領域 (amino acid position 359~362)、芳香族領

域 (amino acid position 406~418) が保存されていることを確認することができた (Fig.)。

2.3.2 候補遺伝子の組織別発現プロファイル

RT-PCR 法により *Li_epo1* の組織間の発現を比較した (Fig.)。その結果、*Li_epo1* はフェロモン腺で特異的に発現していて、エポキシ化反応を触媒している可能性が強まった。

2.3.3 昆虫細胞へのインフェクションによる活性実験の条件決定

Li_epo1 タンパク質の発現条件および活性実験の条件を検討するために、Western blotting を用い、インフェクション開始までに要する時間を培養細胞を用いて観察した (Fig.)。その結果、36 時間後からバンドを検出した (Fig.)。インフェクション開始 60~72 時間後にバンドが複数現れ、タンパク質に変化が起こった可能性が生じた。この結果により、インフェクション後 48 時間に活性実験を行うことを決めた。

2.3.4 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

2.3.4.1 目的タンパク質の過剰発現

Li_epo1 タンパク質の発現の確認は His 抗体を用いた Western blotting 法にて行った (Fig.)。その結果、培地にタンパク質の発現は確認できなかった。一方、細胞の抽出物において *Li_epo1*-His-AcNPV に目的産物と思われるバンドを確認した。分子量マーカーのサイズと移動距離より算出したタンパク質のサイズは 58.9kDa であった。His-tag を含んだ *Li_epo1* アミノ酸配列から計算されたサイズ (57.9kDa) より約 1kDa 大きいことがわかった (Fig.)。

2.3.4.2 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

Li_epo1 を Sf9 昆虫細胞へインフュクションし発現させて、クワゴマダラヒトリの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-21:H と共に培養し、ヘキサン抽出液の GC-MS 解析により、Z3, Z6, Z9-21:H の変化を追跡した。その結果、細胞分画にのみエポキシ化を示唆するピーク (Retention Time=14.92min) を認めた。このピークの保持時間は 14.92min であり、Z3, Z6, *epo9-21:H* の標品と同じ保持時間 (14.92min) を与えた。更にそのイオンスペクトラムパターン (診断イオンは $m/z=108$ と $m/z=122$) により、前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、9 位にエポキシ環が形成されていることが分かった (Fig.)。以上により、発現系から得られた化合物が Z3, Z6, *epo9-21:H* であることが証明された。一方、Bac1-AcNPV を用いた陰性対照区及び培地分画で本ピークは認められなかった (Fig.)。

2.3.5 系統解析

Li_epo1 と他の P450 遺伝子の系統関係を調べるために、blastp により *Li_epo1* と相同性を示す遺伝子を用いて系統樹を構築した (Fig.)。系統解析の結果から、*Li_epo1* は CYP4 および CYP341 サブグループから派生していることが示唆された。*Li_epo1* の演繹アミノ酸配列は、その配列との相同性検索で *Hc_epo1* と 88.5% の相同性を示した。

2.4 第 2 章考察

第 1 章で、ヒトリガ科のアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) のフェロモン腺で特異的に発現し、フェロモン前駆体の不飽和炭化水素である Z3, Z6, Z9-21:H の 9 位にエポキシ環を導入する位置選択性の高い酵素遺伝子 *Hc_epo1* を単離した。分子系統解析により、*Hc_epo1* は P450 の CYP341 サブファミリーに属し、CYP341B14 と命名された。本章では、アメリカシロヒトリの近縁種である同じヒトリガ科のクワゴマダラヒトリから *Hc_epo1* のホモログである *Li_epo1* が同定され、バキュロウイルス発現系を用いた活性実験により、*Hc_epo1* と同じ機能を持っていることが証明された。これはアメリカシロヒトリの次が類性フェロモン生合成に関わるエポキシ化酵素として第二番目の報告である。

クワゴマダラヒトリのフェロモン腺からアメリカシロヒトリと同じ化合物である Z3, Z6, epo9-21:H と 1, Z3, Z6, Z9-21:H が検出され、血液中にこれらエポキシ化物の前駆体が存在することにより、Li_epo1 の存在が示唆されていた。Li_epo1 は Hc_epo1 と 88.4%の塩基配列相同性を示した。系統解析により、Li_epo1 は Hc_epo1 と同じグレードに落ち、CYP341B ファミリーに属することがわかった。一方、クワゴマダラヒトリはアメリカシロヒトリと違い、タイプ 2 成分の Z3, Z6, epo9-23:H 及び Z6, epo9-23:H の二成分を持ち、1, Z3, Z6, epo9-21:H も含め、Li_epo1 のこれらの成分の前駆体に対する基質選択性を調査する必要がある。

エポキシアルケンを性フェロモンとして分泌するガ類は、ヒトリガ科の他に、ドクガ科、シャクガ科からも報告されている。シャクガ科のヨモギエダシャク (*Ascotis selenaria*) は 3 位にエポキシ環を持つ epo3, Z6, Z9-19:H を性フェロモン成分として生産している。一方、同じシャクガ科のトビモンオオエダシャク (*Biston robustum*) は 6 位にエポキシ環を持つ epo6, Z9-19:H 及び Z3, epo6, Z9-19:H を分泌している。性フェロモン生合成に関与するエポキシ化酵素の分子進化を考察するためには、まずアメリカシロヒトリとクワゴマダラヒトリのエポキシ環の位置異性体を性フェロモン成分とするこれらの種におけるエポキシ化酵素遺伝子の配列を確かめる必要がある。Li_epo1 によりエポキシアルケンの位置異性体を合成するエポキシ化酵素も P450 である可能性が強まった。

ヨモギエダシヤクにおいて Hc_epo1 及び Li_epo1 の配列を参考に設計した縮重プライマーによる PCR では候補遺伝子の断片が増幅できなかったため、他種のフェロモン腺を用いて次世代シーケンスを行い、P450 遺伝子に注目して網羅的に解析する必要がある。更に、ドクガ科のスキバドクガ (*Perina nuda*) は Type-II の epo3, epo6, Z9-21:H を性フェロモン成分として生産している。エポキシ環を2つ持つ化合物を性フェロモン成分とするスキバドクガは、エポキシ化酵素の分子進化の側面から見ても興味深い。

第3章 ヨモギエダシヤク (*Ascotis selenaria*) における3位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

3.1 第3章序論

第1章及び第2章で9位エポキシ化酵素の同定及び機能解析に成功した。本章では、シヤクガ科のヨモギエダシヤク (*Ascotis selenaria*) を用いて3位エポキシ化酵素の同定及び機能解析を目標とする。

ヨモギエダシヤクはシヤクガ科エダシヤク亜科に属する多食性の害虫で、主に茶、果樹類、ヨモギなどの葉を食害する。日本では三重県、静岡県的茶園で大きい被害を出している (Ando et al., 1997)。本種では Type II の epo3, Z6, Z9-19:H 及び Z3, Z6, Z9-19:H が性フェロモン成分として同定され、圃場での誘引実験により主成分の epo3, Z6, Z9-19:H 及び低濃度での相乗効果のある Z3, Z6, Z9-19:H の両成分は共に誘引活性があることが示された (Ando et al., 1997; Witjaksono et al., 1999)。重水素標識された不飽和炭化水素前駆体によるフェロモン腺への塗布実験により、ヨモギエダシヤクのフェロモン腺には3位二重結合を特異的にエポキシ化するエポキシ化酵素が発現していることが示唆された (Miyamoto et al., 1999)。更に、本種の血液から Z3, Z6, Z9-19:H が検出されながら、epo3, Z6, Z9-19:H が検出されないことから、本種も典型的な Type II 生合成経路を通じて性フェロモンを生産していることが示唆された (Wei

et al., 2003; Matsuoka et al., 2006)。すなわち、フェロモン腺の外で不飽和炭化水素前駆体が合成され、血液を通じてフェロモン腺に運ばれ、最後にこの炭化水素前駆体がフェロモン腺でエポキシ化され、フェロモン成分となる。

ヨモギエダシヤクの 3 位エポキシ化酵素を分子レベルで明らかにするためのアプローチは、昔当研究室の藤井毅助教によって行われていた。序論で述べたように、エポキシ化酵素の分子構造は二種類が知られている。1 つは Heme 型のエポキシ化酵素で、活性中心では 1 つの鉄原子がポルフィリン環と配位している。このへム鉄は、へム結合領域 (heme-binding region) の中にあるシステイン残基 (Proximal Cys) からのチオラートアニオンの電子の給与を受けて、Heme 型酵素の活性を示す。一方、non-heme 型のエポキシ化酵素は desaturase ファミリーに属し、タンパク質の活性中心には 2 つの鉄原子が存在し、それら鉄原子がタンパク質分子内のヒスチジン残基が連続して現れる 3 箇所のクラスター (His-box) と配位して酵素活性を示す (Fig. 19)。

前述のように、昆虫では、heme 型エポキシ化酵素が幼若ホルモンの生合成に関与していることが報告され、分子レベルで明らかとされている (Helvig et al., 2004; Daimon et al., 2012)。一方、non-heme 型のエポキシ化酵素について、植物から同定された報告に留まる (Lee et al., 1998)。このエポキシ化酵素は基質が昆虫の Type II 性フェロモン生合成の原料でもあるリノール酸であり、同

じ植物の脂質代謝に関わる不飽和化酵素と同様に 3 箇所ある His-box のアミノ酸配列が保存され、desaturase ファミリーに属する (Lee et al., 1998)。そして興味深いことに、現在までに明らかとされたガ類昆虫の性フェロモン生合成に関わる不飽和化酵素も、3 箇所に His-box を含んだ non-heme 型 desaturase ファミリーに分類される。

藤井毅助教はこれらの知見を合わせ、ヨモギエダシャクの性フェロモン生合成に関わるエポキシ化酵素は non-heme 型であるという仮説を立ち、エポキシ化酵素の単離を行った。しかし、His-box の配列を参考にプライマーを設計し、degenerate PCR によって獲得した遺伝子 Asdesat1 は、フェロモン腺で特異的に発現し、バキュロウイルス昆虫細胞発現系によってタンパク質の発現も確認されたにも関わらず、不飽和化活性もエポキシ化活性も認められなかった (藤井, 2007)。Hc_epo1 及び Li_epo1 が heme 型エポキシ化酵素であり、P450 ファミリーに属することから、本章では P450 に注目し、ヨモギエダシャクの 3 位エポキシ化酵素の単離と機能解析を目指した。Hc_epo1 及び Li_epo1 の属する CYP341B ファミリーによりデザインした縮重プライマーでは候補遺伝子の増幅ができなかったため (データ未公表)、本章はフェロモン腺の次世代シーケンスを行い、フェロモン腺で発現する遺伝子を網羅的に解析することにした。そして候補遺伝子の機能解析は Li_epo1 と同様にバキュロウイルス昆虫細胞発現

系の手法を用いた。

3.2 方法

3.2.1 供試昆虫と培養細胞

ヨモギエダシヤクはXXより分与された卵塊を当研究室にて、孵化後飼育・継代した個体を研究に用いた。飼育条件は、室温 24°C、明暗周期が 16L8D（9 時消灯；17 時点灯）である。孵化後間もない幼虫にはヨモギの生葉を給草し、その後人工飼料インセクター（日本農産工業）を与えた。雌雄の判別は蛹の時期に行い、蛹は羽化までの間十分な湿度のもと保管した。成虫には清涼飲料水ポカリスエット（大塚製薬）を約 2 倍に薄め与えた。

培養細胞に関して 2.2.1 に準ずる。

3.2.2 各組織の回収及び Total RNA の抽出

飛翔筋、中腸、マルピーギ管、脚、卵、脂肪体、表皮、フェロモン腺の各組織から Total RNA を抽出した。方法は 2.2.2 に準ずる。

3.2.3 RNA シークエンス

3.2.2 でフェロモン腺から抽出した Total RNA を 4 μ g を用い、RNA シークエ

ンスを行った。RNA シークエンスは、マクロジェン・ジャパン株式会社に依頼した。Platform は Illumina HiSeq2000、Read Length は 100bp、Library Type は Paired End との条件でシークエンスを行った。

得られた RAW data は、当研究室の石川幸男教授によって解析した。具体的には、DDBJ パイプラインを利用し、Preprocessing 処理（リードのクオリティ値によるフィルタリング）、*de novo* Assembly (Trinity の実行) を行った。得られた Trinity 実行済みの配列をアミノ酸配列に変換し、BLASTP にかけて、類似遺伝子の検索を行い、分類した。更に、リード配列を得られた mRNA 配列にマッピングし、遺伝子発現量を予測した。類似遺伝子検索による分類で酵素機能が推定されたクローンのうち、P450 ファミリーとして同定され、かつ発現量の高いクローンを選抜した。

3.2.4 候補遺伝子の組織別発現パターンの解析

性フェロモン生合成酵素遺伝子がフェロモン腺で高発現していることを踏まえて、RT-PCR 法により候補遺伝子の発現を組織間で比較した。3.2.2 で各組織から抽出した Total RNA (100ng) を 1.2.4 と同様の方法で逆転写し、cDNA を合成した。組織間での発現を比較するためのプライマーは得られた各クローンの配列情報に基づき、特異的な配列を選び設計した (Table 4)。PCR の温度サイク

ル条件は 94°C で 1 分を 1 サイクル、94°C で 30 秒、57°C で 30 秒、68°C で 1 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。使用した mRNA にゲノム DNA が混入していないことを確認するため、各組織から抽出した mRNA サンプルの RT-PCR も同時に行った (RT-試験区)。Loading control として Actin を増幅するプライマーを用いた PCR を行った。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロマイドで染色し可視化した。

3.2.5 発現ベクターの構築

2.2.5 に準ずる。ただし、選抜した候補遺伝子 *As_epo1* の翻訳領域に相当する塩基配列の開始コドン上流域に *Bam*H I 制限酵素サイトを、終始コドン下流域に *Hind*III 制限酵素サイトを PCR 法により挿入し全翻訳領域をコードするプライマー (Table 4) をデザインし、PCR 法により増幅した。

3.2.6 トランスフェクション及びバキュロウイルスの増幅

2.2.6 に準ずる。

3.2.7 GC-MS 分析条件とエポキシ化物標品の合成

1.2.8 に準ずる。

3.2.8 バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いた *Li_epo1* の活性実験

2.2.7 に準ずる。ヨモギエダシャクの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-19:H は東京農工大学の安藤哲教授より供与していただいた。

3.2.9 系統解析

2.2.8 に準ずる。

3.3 第3章結果

3.3.1 ヨモギエダシャクのフェロモン腺 RNA シークエンスの結果とスクリーニング

RNA シークエンスにより得られた Raw data を統計した結果、56,615,028 のリードを得られ、5.7Gbp が読まれた。全塩基の GC 率は 46.835%であった。

遺伝子発現量解析及び BLASTP の結果により、発現量上位 1000 クローンのうち、P450 ファミリーに属するクローンは 49 個見つかった。更に 49 クローンのうち発現量上位 10 クローンの comp17297、comp4083、comp14868、comp16213、comp14198、comp17427、comp17691、comp17936、comp3817、comp9223 を候補とした。

3.3.2 候補遺伝子の組織別発現プロファイル

ヨモギエダシャクのパロモン腺大規模シーケンスから絞り込んだ 9 種類の Cytochrome P450 をコードする遺伝子を候補として、RT-PCR 法により組織間の発現を比較した (Fig. 20)。その結果、comp19297、comp17691、comp17936 はパロモン腺で特異的に発現していた。遺伝子発現量を予測した結果から、comp17297 の発現量が他より高いため、この遺伝子 (comp17297) を *As_epo1* と名付け、優先的に機能解析を行うことにした。

3.3.3 *As_epo1* の翻訳領域における配列情報

RNA シーケンスの結果により、*As_epo1* の cDNA 全長塩基配列は 1769bp、その翻訳領域は 1455bp、485 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていることがわかった (Fig. 21)。SOSUI プログラム (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を用いて *As-epo1* の二次構造を予測した結果、アミノ末端 (N 末端) 側に膜貫通ドメイン (amino acid position 1~20) が存在していることが示唆された (大村ら 2003) (Fig. 21)。このアミノ酸配列より計算されるタンパク質の分子量は XXkDa であった。*Li_epo1* のカルボキシル末端 (C 末端) 側には、P450 ファミリーの酸化酵素が活性を持つために必須な近位の Cys 残基とその周辺配列 (amino

acid position 426~435) が保存されていることが確認できた (Fig. 21)。他にも、P450 ファミリーの分子で特徴的な配列である遠位の Thr 残基とその周辺配列 (amino acid position 296~300)、K 領域 (amino acid position 354~357)、芳香族領域 (amino acid position 399~411) が保存されていることを確認することができた (Fig. 21)。但し、P450 のアミノ末端 (N 末端) の近くでよく報告されているプロリンに富む領域 (proline-rich region) については確認できなかった。

3.3.4 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

3.3.4.1 目的タンパク質の過剰発現

As_epo1 タンパク質の発現の確認は His 抗体を用いた Western blotting 法で行った (Fig. 22)。その結果、培地にタンパク質の発現は確認できなかった。一方、細胞の抽出物において *As_epo1*-His-AcNPV に目的産物と思われるバンドを確認した。分子量マーカーのサイズと移動距離より算出したタンパク質のサイズは XXkDa であった。His-tag を含んだ *As_epo1* アミノ酸配列から計算されたサイズ (XXkDa) より約 XkDa 大きいことがわかった (Fig. 22)。

3.3.4.2 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

As_epo1 を Sf9 昆虫細胞へインフュクシオンし発現させて、ヨモギエダシヤクの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-19:H と共に培養し、ヘキサン抽出液の GC-MS 解析により、Z3, Z6, Z9-19:H の変化を追跡した。その結果、細胞分画にのみエポキシ化を示唆するピーク (Retention Time=XXmin) を認めた (Fig. 23A)。このピークの保持時間は 14.92min であり、epo3, Z6, Z9-19:H の標品と同じ保持時間 (14.92min) を与えた。更にそのイオンスペクトラムパターン (診断イオンは $m/z=206$ と $m/z=220$) により、前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、3 位にエポキシ環が形成されていることが分かった (Fig. 23BC)。以上により、発現系から得られた化合物が Z3, Z6, epo9-21:H であることが証明された。一方、Bac1-AcNPV を用いた陰性対照区及び培地分画で本ピークは認められなかった (Fig. 23A)。

3.3.5 系統解析

As_epo1 と他の P450 遺伝子の系統関係を調べるために、blastp により *As_epo1* と相同性を示す遺伝子を用いて系統樹を構築した (Fig. 24)。系統解析の結果から、*As_epo1* は CYP4 および CYP340 サブグループから派生していることが示唆された。*As_epo1* の演繹アミノ酸配列は、その配列との相同性検索で Hc_epo1 と 88.5%の相同性を示した。

3.4 第3章考察

本章では、大規模 RNA シークエンスの結果から、P450 ファミリーに属すると発現量が多いとの二つの条件で候補遺伝子を選抜した。更に、遺伝子組織分布調査の結果、*As_epo1* は他組織よりフェロモン腺で高発現しているため (Fig.)、バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いて、この遺伝子を Sf9 昆虫細胞で発現させ、ヨモギエダシヤクの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-19:H と共に培養し、ヘキサン抽出液の GC-MS 解析により、Z3, Z6, Z9-19:H の変化を追跡した。その結果、*epo3*, Z6, Z9-19:H および Z3, Z6, *epo9-19:H* の標品と同じ保持時間を与え、エポキシ化を示唆するピークを認めた (Fig.)。更にそのイオンスペクトラムパターン (診断イオンは $m/z=206$ と $m/z=220$) により、前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、3 位にだけエポキシ環が形成されていることが分かった (Fig. Fig.)。この結果は重水素標識された前駆体の塗布実験の結果と一致している (Miyamoto et al., 1999; Matsuoka et al., 2006)。すなわち、ヨモギエダシヤクのフェロモン腺で発現するエポキシ化酵素は性フェロモン前駆体の二重結合の位置に対する選択性の高い酵素である。*Hc_epo1* 及び *Li_epo1* も同じく二重結合の位置選択性の高い酵素遺伝子であることを加え、ガ類性フェロモンを合成するエポキシ化酵素は前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、1 か所のみに対して活性を持つことが示唆された。更に、Miyamoto らの研究により (Miyamoto et

al., 1999)、*in vitro*の実験で As_epo1 の炭素鎖の長さや二重結合の数の異なる基質への基質選択性を調べる必要がある。

系統解析の結果により、As_epo1 は CYP340 ファミリーに属することがわかった。As_epo1 とアミノ酸配列の相同性の高い遺伝子のうち、CYP340G1 (KM016711)、CYP340K1 (KM016715)、CYP340J1 (KM016714)、CYP340H1 (KM016712)、CYP340H2 (KM016713) が *Helicoverpa armigera* 幼虫で過剰発現していることは、cypermethrin への抵抗性に影響しないことがわかったものの (Rasool et al., 2014)、これらの遺伝子の具体的な機能が不明である。CYP340L1 (KC789755) は *Spodoptera frugiperda* 幼虫の腸、脂肪体などの組織で発現し、植物或は殺虫剤由来の毒性のある化学物質への適応性に関わっていることが示唆された (Giraud et al., 2014)。CYP340K4 (JX310091)、CYP340AB1 (JX310096)、CYP340AA1 (JX310093) は *Spodoptera littoralis* の触角で発現し、匂い物質を代謝する機能を持っていることが示唆された (Pottier et al., 2012)。しかし、As_epo1 のアミノ酸配列と最も高い相同性を示す CYP340G1 でも 21.6%であるため、As_epo1 は CYP の中でも新規と呼べるかもしれない。更に、As_epo1 は Hc_epo1 及び Li_epo1 とのアミノ酸配列相同性は 10%以下であり、CYP341B ファミリーによりデザインした縮重プライマーで As_epo1 が増幅されない結果と一致している (data not show)。この結果から、ガ類昆虫の性フェロモン生合成に参与す

る3位、6位、9位のエポキシ化酵素の配列が離れていることが示唆された。

一方、大規模 RNA シークエンスから選抜した comp17936 は As_epo1 と比べ発現量が低いものの (As_epo1 の発現量は comp17936 の約 329 倍)、As_epo1 と同様に他組織よりフェロモン腺で高発現している。系統解析により、comp17936 は CYP4U ファミリーに属している。このファミリーの遺伝子は昆虫の毒質代謝に関与している (Wang et al., 2014; Zagrobelny et al., 2009)。As_epo1 と異なり、comp17936 は CYP4AU11 (KF701167) 及び CYP4AU14 (MF684336) とそれぞれ 75%、69.4%のアミノ酸配列相同性を示したが、この遺伝子も候補の1つと考える必要があるかもしれない。

第4章 トビモンオオエダシヤク (*Biston robustus*) における6位エポキシ化酵素候補遺伝子のスクリーニング及び機能解析

4.1 第4章序論

第1章、第2章及び第3章は、9位及び3位エポキシ化酵素を同定し、機能解析を成功した。9位及び3位エポキシ化酵素はどちらもフェロモン腺で他組織より高発現しており、アミノ酸配列による分子系統解析により、P450ファミリーのCYP4 clanに属することがわかった。本章では、これらの情報を重視し、トビモンオオエダシヤク (*Biston robustus*) を用い、6位エポキシ化酵素の単離及び機能解析を目指した。

トビモンオオエダシヤクはシヤクガ上科 (Geometroidea) シヤクガ科 (Geometridae) の1種で、幼虫はサクラ、リンゴ、ナシなどのバラ科やブナ科カエデ科、ツバキ科などの広葉樹の葉を食害する。本種のメス成虫はZ6, Z9-19:H、Z3, Z6, Z9-19:H、epo6, Z9-19:H、Z3, epo6, Z9-19:H との4成分を13:2:70:15の比率で性フェロモンとして分泌する。圃場での誘引実験により、フェロモンの主成分はepo6, Z9-19:H、Z3, epo6, Z9-19:Hであり、Z6, Z9-19:HとZ3, Z6, Z9-19:Hとの2成分は同種のおス成虫の誘引に相乗効果を果たす (Yamamoto et al., 2000)。

本章では、本種のフェロモン腺大規模シーケンスを行ない、発現量が多い、

かつ CYP4 clan に属する遺伝子を候補として選抜し、更に組織分布調査で機能解析を行なう候補遺伝子を絞り込む。

4.2 方法

4.2.1 供試昆虫と培養細胞

トビモンオオエダシヤクは当研究室石川幸男教授が利島から採取した卵塊を当研究室にて、孵化後飼育・継代した個体を研究に用いた。飼育条件は、室温 24℃、明暗周期が 16L:8D (9 時消灯:17 時点灯) である。孵化後間もない幼虫にはツバキ (*Camellia japonica*) の生葉を与えた。2 齢後、餌としてツバキの生葉を枝につながる状態で与えた。枝は水の入ったガラスの瓶に刺し湿度を保った。雌雄の判別は蛹の時期に行われた。蛹になった後、土の中に入れ (深さは 4 ~5cm)、十分な湿度のもとで、10℃のインキュベーターで保管した。後に徐々に温度を上げて羽化を待った。

培養細胞に関して 2.2.1 に準ずる。

4.2.2 各組織の回収及び Total RNA の抽出

飛翔筋、中腸、マルピーギ管、脚、卵、脂肪体、表皮、フェロモン腺の各組織から Total RNA を抽出した。方法は 2.2.2 に準ずる。

4.2.3 RNA シークエンス

4.2.2 でフェロモン腺から抽出した Total RNA を $3\mu\text{g}$ を用い、RNA シークエンスを行った。RNA シークエンスは、マクロジェン・ジャパン株式会社に依頼した。Platform は Illumina HiSeq2000、Read Length は 100bp、Library Type は Paired End との条件でシークエンスを行った。

得られた RAW data は、当研究室の石川幸男教授によって解析した。方法は 3.2.3 に準ずる。

4.2.4 候補遺伝子の組織別発現パターンの解析

性フェロモン生合成酵素遺伝子がフェロモン腺で高発現していることを踏まえて、RT-PCR 法により候補遺伝子の発現を組織間で比較した。4.2.2 で各組織から抽出した Total RNA (100ng) を 1.2.4 と同様の方法で逆転写し、cDNA を合成した。組織間での発現を比較するためのプライマーは得られた各クローンの配列情報に基づき、特異的な配列を選び設計した (Table 5)。PCR の温度サイクル条件は 94°C で 1 分を 1 サイクル、 94°C で 30 秒、 60°C で 30 秒、 68°C で 1 分を 30 サイクル、そして 72°C で 7 分間保持した。使用した mRNA にゲノム DNA が混入していないことを確認するため、各組織から抽出した mRNA サンプルの RT-PCR

も同時に行った (RT-試験区)。Loading control として Actin を増幅するプライマーを用いた PCR を行った。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、バンドをエチジウムブロマイドで染色し可視化した。

4.2.5 発現ベクターの構築

2.2.5 に準ずる。ただし、選抜した候補遺伝子 *Br_epo1* の翻訳領域に相当する塩基配列の開始コドン上流域に *Bam*H I 制限酵素サイトを、終始コドン下流域に *Kpn* I 制限酵素サイトを PCR 法により挿入し全翻訳領域をコードするプライマー (Table 5) をデザインし、PCR 法により増幅した。

3.2.6 トランスフェクション及びバキュロウイルスの増幅

2.2.6 に準ずる。

3.2.7 GC-MS 分析条件とエポキシ化物標品の合成

1.2.8 に準ずる。

3.2.8 バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いた *Li_epo1* の活性実験

2.2.7 に準ずる。ヨモギエダシャクの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-19:H は東

京農工大学の安藤哲教授より供与していただいた。

3.2.9 系統解析

2.2.8 に準ずる。

4.3 第4章結果

4.3.1 トビモンオオエダシャクのアロマトン腺 RNA シークエンスの結果とスクリーニング

RNA シークエンスにより得られた Raw data を統計した結果、49,900,488 のリードを得られ、5.0Gbp が読まれた。全塩基の GC 率は 46.432%であった。

遺伝子発現量解析及び BLASTP の結果により、発現量上位 1000 クローンのうち、P450 ファミリーに属するクローンは 10 個見つかった。更に 10 クローンのうち発現量上位 3 クローンの Br130、Br397、Br462 を候補とした。

4.3.2 候補遺伝子の組織別発現プロファイル

トビモンオオエダシャクのアロマトン腺大規模シークエンスから絞り込んだ 3 種類の Cytochrome P450 をコードする遺伝子を候補として、RT-PCR 法により組織間の発現を比較した (Fig. 25)。Br462 以外の遺伝子は試験したほとんどの

組織で発現していたため、この段階で候補から外した。Br462 はフェロモン腺で特異的に発現していて、エポキシ化反応を触媒している可能性が強まった。この結果から、この遺伝子 (Br462) を *Br_epo1* と名付け、優先的に機能解析を行うことにした。

4.3.3 *Br_epo1* の翻訳領域における配列情報

RNA シークエンスの結果により、*Br_epo1* の cDNA 全長塩基配列は 2384bp、その翻訳領域は 1464bp、488 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていることがわかった (Fig. 26)。このアミノ酸配列より計算されるタンパク質の分子量は XXkDa であった。*Br_epo1* のカルボキシル末端 (C 末端) 側には、P450 ファミリーの酸化酵素が活性を持つために必須な近位の Cys 残基とその周辺配列 (amino acid position 428~437) が保存されていることが確認できた (Fig. 26)。他にも、P450 ファミリーの分子で特徴的な配列である遠位の Thr 残基とその周辺配列 (amino acid position 296~300)、K 領域 (amino acid position 354~357)、芳香族領域 (amino acid position 400~412) が保存されていることを確認することができた (Fig. 26)。但し、P450 のアミノ末端 (N 末端) の近くでよく報告されているプロリンに富む領域 (proline-rich region) については確認できなかった。

4.3.4 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

4.3.4.1 目的タンパク質の過剰発現

Br_epo1 タンパク質の発現の確認は His 抗体を用いた Western blotting 法に行った (Fig. 27)。その結果、培地にタンパク質の発現は確認できなかった。一方、細胞の抽出物において *Br_epo1*-His-AcNPV に目的産物と思われるバンドを確認した。分子量マーカーのサイズと移動距離より算出したタンパク質のサイズは XXkDa であった。His-tag を含んだ *As_epo1* アミノ酸配列から計算されたサイズ (XXkDa) より約 XkDa 大きいことがわかった (Fig. 27)。

4.3.4.2 *in vitro* 過剰発現系における活性評価

Br_epo1 を Sf9 昆虫細胞へインフュクションし発現させて、トビモンオオエダシヤクの性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-19:H と共に培養し、ヘキサン抽出液の GC-MS 解析により、Z3, Z6, Z9-19:H の変化を追跡した。その結果、エポキシ化が実現した時に現れる $m/z=79$ のピークは、どのサンプルからも確認できなかった (Fig. 28)。

4.3.5 系統解析

Br_epo1 と他の P450 遺伝子の系統関係を調べるために、blastp により *Br_epo1* と相同性を示す遺伝子を用いて系統樹を構築した (Fig. 29)。系統解析の結果から、*Br_epo1* は CYP4 および CYP340 サブグループから派生していることが示唆された。*Br_epo1* の演繹アミノ酸配列は、その配列との相同性検索で Hc_epo1 と XX%の相同性を示した。

4.4 第4章考察

トビモンオオエダシヤク由来の6位エポキシ化酵素の候補遺伝子 *Br_epo1* は活性が認められなかった。この結果の原因は、*Asdeat1* に関する先行研究からヒントがもらえるかもしれない (Fuji et al., 2013)。背景で述べたように、*Asdeat1* は non-heme 型の desaturase ファミリーに属し、ヨモギエダシヤクのフェロモン腺で特異的に発現している。バキュロウイルス発現系で *Asdeat1* タンパク質の発現が確認できたものの、不飽和化活性とエポキシ化活性のいずれも認められなかった。当研究室の藤井毅助教らはその原因を調べると、*Asdesat1* の細胞内での局在は、ガ類の Type I 性フェロモン生合成に使われる活性型の不飽和化酵素が細胞膜に局在するのと異なり、*Asdesat1* は細胞質全体で発現することが観察された。もしかしたら *Asdesat1* は desaturase でありながら、膜貫通領域が失われたかもしれない。この仮説は、SOSUI プログラムを用いた予測結

果とも一致した。従って、Asdesat1 の desaturase として機能しない原因は膜貫通領域が失われたかもしれない。Br_epo1 も同様に、SOSUI プログラム (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を用いて二次構造を予測した結果、アミノ末端 (N 末端) 側に膜貫通ドメイン (amino acid position) が存在しないことが示唆された。膜貫通領域の喪失は Br_epo1 が活性を示さない原因と考えられる。いずれにせよ、更に活性実験を行い再現性を見る必要がある。

総合考察

本研究課題では 35%のガ類が分泌する Type II 性フェロモンのうち、59%が用い
る 3 位、6 位、9 位エポキシ化酵素遺伝子のクローニング及び機能解析を行った。
エポキシ化能が証明された 9 位エポキシ化酵素 (Hc_epo1、Li_epo1) 及び 3 位
エポキシ化酵素 (As_epo1) を通じて、(1) 既知の性フェロモン生合成酵素遺伝
子と同じく、エポキシ化酵素遺伝子はフェロモン腺で他組織より高発現してお
り (Fig.) (Fuji et al., 2011)、(2) *in vivo* の先行研究の塗布実験結果と同
じく (Miyamoto et al., 1999; Kiyota et al., 2010)、エポキシ化酵素はフェロ
モン前駆体の二重結合の位置に対して高い選択性を示した (Fig.)。これは、ガ
類のフェロモン腺が、性フェロモンを生合成し分泌することを目的とした器官
であり、ガの進化の過程で同器官が種特異的な性フェロモンを生合成する必要
性があったことを考えれば、合理的な性質と言える。

現段階では、Br_epo1 の機能解析が成功していないが、仮に Br_epo1 が 6 位エ
ポキシ化酵素遺伝子として考える。本課題で明らかとした 4 つの遺伝子の分子
系統関係を調べた結果、As_epo1 は CYP340 ファミリー、Hc_epo1 と Li_epo1 は
CYP341 ファミリー、Br_epo1 は CYP4 ファミリーにそれぞれ属する。系統樹の枝
分かれの様子を見ると、まず CYP340 クレード、及び CYP341 と CYP4 クレードと
の二つのクレードに大きく分かれていた。CYP341 と CYP4 クレードは更に CYP341

クレードと CYP4 クレードとの二つのクレードに分かれていた。この結果は、ガ類性フェロモンを生合成するエポキシ化酵素遺伝子は「3 位エポキシ化酵素遺伝子が祖先型遺伝子で、進化の過程で 6 位と 9 位エポキシ化酵素遺伝子も現れた」か、もしくは「3 位エポキシ化酵素と 9 位エポキシ化酵素の遺伝子が最初に現れ、6 位エポキシ化酵素遺伝子が 9 位エポキシ化酵素遺伝子から派生した」の少なくとも 2 つのシナリオを考えることができる (Fig.)。興味深いことに、Br_epo1 は、ヨモギエダシャク由来のもう一つフェロモン腺で特異的に発現する遺伝子 comp17936 と同じ CYP4 クレードに属し、ヨモギエダシャクも 6 位エポキシ化酵素のホモログを持っている可能性があると考えられる (Fig.)。このことは、エポキサイドの位置異性体を作るエポキシ化酵素も、Type I 性フェロモンを生合成する不飽和化酵素みたいに (Fujii et al., 2011)、1 種のガ類昆虫のゲノム上に多コピーが存在しながら、1 つしか使っていないことを示唆した。

P450 の CYP4 clan に属する遺伝子は毒物によって発現が誘導されるものが多く含まれているが、昆虫の P450 酵素の中で酵素遺伝子の機能解析という点に限れば最も研究されていないグループであると言われている (Feyereisen, 2012)。実際にこれまで遺伝子データベースに登録されている遺伝子を用いて系統樹を構築したが、そのほとんどが大規模ゲノムシーケンス由来で、植物や農薬の毒物代謝及び匂い物質の代謝に関わっている遺伝子であることが予測されたも

の、具体的にどのような機能を持っているかは不明である (Fig.) (参考文献 沢山)。

分子系統樹の中には、*Helicoverpa armigera* や *Spodoptera littoralis* などエポキシアルケンの性フェロモンを使わない Type-I のガ類種から同定された遺伝子コピーが混在する点が興味深い。Type-II 性フェロモンを分泌するヨモギエダシヤク of フェロモン腺で Type-I 性フェロモンの生合成の鍵酵素である $\Delta 11$ 不飽和化酵素遺伝子 *Asdesat1* が発現していたことを考えると、これらの遺伝子がそれぞれの種のフェロモン腺で発現するか、更にエポキシ化機能を持っているかを確認必要がある。いずれにせよ、*As_epo1*、*Hc_epo1* 及び *Li_epo1* の機能解析を行った本研究の結果が、昆虫 P450 の CYP4 clan に属する他の酵素遺伝子の同定に分子レベルの知見を与え、遺伝子機能の解明に役立つことが期待される。

これまでに性フェロモンが同定されたガ類のエポキシ化合物は 3 位、6 位、9 位のエポキシ化物に留まらない。ヤガ上科トモエガ科のドクガ亜科、クルマアツバ亜科、ヒトリガ亜科とメイガ上科ツトガ科のツトガ亜科のガ類は 7epo の成分も使っていることが重水素標識した成分の追跡で明らかとなっている (参考文献)。特にドクガ亜科の *Lymantria dispar* における性フェロモン生合成機構の先行研究は、7 位の不飽和化酵素によって前駆体が不飽和化され、更にエポキ

シ化反応を経て生合成されることを明らかとしている (Jurenka et al., 2004)。

しかし、不飽和化酵素の同定及び機能解析が行われていたものの、7位のエポキシ化酵素に関する知見はなかった。更に、シャクガ科の *Bupalus piniarius* は4位、ヤガ上科トモエガ科ドクガ亜科の *Orgyia postica* は11位、*Leucoma salicis* は6と9のdiepo、*Perina nuda* は3と6のdiepo、クチバ亜科の *Hypocala rostrata* は3と6のdiepo など、非常に多様な成分を性フェロモンとして使用している。

特にドクガ亜科に属するものの中に性フェロモンが同定されたガ類種において7epo成分使う種は8種、11epo1種、diepo1種で、エポキシ化酵素遺伝子の進化において興味深いファミリーである。更に、Type II性フェロモンを分泌するガ類種はエポキシ化されていない不飽和炭化水素を性フェロモンとして利用するものも多く、例えばヒトリガ亜科コケガ族の *Eilema japonica* のフェロモン腺から7成分が検出され、うち4成分がエポキシ化を受けないまま活性を示すことが報告されている (Fujii et al., 2010)。Type I性フェロモンを生合成するアワノメイガ類の不飽和化酵素ファミリーので示されたように (Roelofs et al., 2002, 2003; Fujii et al., 2011, 2015; Rooney 2011)、*Eilema japonica* のゲノム上にエポキシ化酵素遺伝子のホモログが存在するかどうかを調べれば、エポキシ化酵素遺伝子の進化を解明できるメドは立っている。これからは、As_epo1、Hc_epo1、Li_epo1の配列を手がかりとして、Type-I性フェロモンを使用するガ

類と双壁をなす Type-II 性フェロモン分子の変遷を更に深化させ追求したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導ご鞭撻を賜りました石川幸男教授に、厚く御礼申し上げます。石川幸男教授には、日本で研究を行うチャンスをいただき、留学生である自分を快く受け入れてくださいました。心より深く感謝を申し上げます。

本研究は石川幸男教授、東京農工大学安藤哲教授により成り立っている研究であり、安藤哲教授には、供試昆虫の飼育、ご提供、及び化学分析に用いる試薬の合成、そして研究に対するご指導など、本研究を遂行する基盤になるご助力を賜りました。安藤哲教授ならび、東京農工大学 BASE 安藤研究室の方々に心より感謝を申し上げます。

東京大学昆虫遺伝研究室勝間進准教授には、実験に用いる培養細胞、タンパク質実験用試薬などのご提供、また、蛍光顕微鏡、プラスミド自動抽出装置などの設備を快く貸していただき、使用法などを教えていただき、更に研究に対するご指導ご助言など、多大なるご助力を賜りました。勝間進准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究室の山本雅信博士には、化学品の合成、及び化学分析に関するご助言ご助力を賜りましたことに、厚く御礼申し上げます。東京農工大学伊藤克彦助教には、培養細胞及び研究に対するご助言などいただき、心より感謝を申し上

げます。研究室生活全般において多々ご指導いただきました松尾隆嗣准教授、星崎杉彦助教に、深く感謝申し上げます。様々なご助言ご協力をいただいた同研究室の皆様、この場を借りて御礼を申し上げます。

最後に、入学以来の研究室生活において、全研究の実験に際し、多くの時間を費やし、常日頃より懇切丁寧ご指導ご鞭撻を賜りました藤井毅助教に、厚く御礼申し上げます。藤井毅助教には、勉強、実験技術、論文執筆などのことだけでなく、研究に対する態度、生活に対する態度、なるべき人間、なるべき研究者、御自身の知識、経験の全てを留保することなく、教えていただき、必ず自分が将来立派な研究者になるための貴重な経験になること間違いありません。本当にありがとうございました。

参考文献

大村恒雄, 石村巽, 藤井義明 (2003) P450 の分子生物学. 講談社サイエンティフィック.

藤井毅 (2007) ‘ヨモギエダシヤクの性フェロモン生合成に関わる器官とエポキシ化酵素に関する研究’. 東京農工大学.

Ando, T., Inomata, S., Yamamoto, M. (2004) Lepidopteran sex pheromones. In: Schulz, S. (Ed), The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I. Topics in Current Chemistry 239, 51-96.

Ando, T., Yamakawa, R. (2011) Analyses of lepidopteran sex pheromones by mass spectrometry. Trends in Analytical Chemistry 30, 990-1002.

Antony, B., Fujii, T., Moto, K., Matsumoto, S., Fukuzawa, M., Nakano, R., Tatsuki, S., Ishikawa, Y. (2009) Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 90-95.

Arn, H., Brauchli, J., Koch, U. T., Pop, L., Rauscher, S. (1997) The need for standards in pheromone technology. in: Witzgall, P., Arn, H. (Eds.), IOBC Wprs Bulletin 20, 27-34.

Cabrera, A., Eiras, A. E., Gries, G., Gries, R., Urdaneta, N., Miras, B.,

- Badji, C., Jaffe, K. (2001) Sex pheromone of tomato fruit borer, *Neolucinodes elegantalis*. *J. Chem. Ecol* 27, 2097-2107.
- Coffelt, J. A., Vick, K. W., Sonnet, P. E., Doolittle, R. E. (1979) Isolation, identification, and synthesis of a female sex pheromone of the navel orangeworm, *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Chemical Ecology* 5, 955-966.
- Daimon, T., Kozaki, T., Niwa, R., Kobayashi, I., Furuta, K., Namiki, T., Uchino, K., Banno, Y., Katsuma, S., Tamura, T., Mita, K., Sezutsu, H., Nakayama, M., Itoyama, K., Shimada, T., Shinoda, T. (2012) Precocious Metamorphosis in the Juvenile Hormone-Deficient Mutant of the Silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genetics* 8, e1002486.
- Einhorn, J., Lallemand, J. Y., Zagatti, P., Gallois, M., Virelizier, H., Riom, J., Menassieu, P. (1982) Isolation and identification of the sex pheromone blend of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera, Arctiidae). *C. R. Acad. Sci. Ser. 2*, 41-44.
- Fujii, T., Suzuki, M. G., Kawai, T., Tsuneizumi, K., Ohnishi, A., Kurihara, M., Matsumoto, S., Ando, T. (2007) Determination of the pheromone-producing region that has epoxidation activity in the

- abdominal tip of the Japanese giant looper, *Ascotis selenaria cretacea* (Lepidoptera: Geometridae). Journal of Insect Physiology 53, 312-318.
- Fujii, T., Nakano, R., Takubo, Y., Qian, S. G., Yamakawa, R., Ando, T., Ishikawa, Y. (2010) Female sex pheromone of a lichen moth *Eilema japonica* (Arctiidae, Lithosiinae): components and control of production. J. Insect Physiol. 56, 1986-1991.
- Fujii T., Ito, K., Tatematsu, M., Shimada, T., Katsuma, S., Ishikawa, Y. (2011) Sex pheromone desaturase functioning in a primitive *Ostrinia* moth is cryptically conserved in congeners' genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 7102-7106.
- Fujii, T., Suzuki, M. G., Katsuma, S., Ito, K., Rong, Y., Matsumoto, S., Ando, T., Ishikawa, Y. (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.
- Gibb, A. R., Pinese, B., Tenakania, D., Kawi, A. P., Bunn, B., Ramankutty, P., Suckling, D. M. (2007) (Z)-11-Hexadecenal and (3Z,6Z,9Z)-tricosatriene: sex pheromone components of the red banded

- mango caterpillar *Deanolis sublimbalis*. J. Chem. Ecol. 33, 579-589.
- Goswami, P., Chinnadayala, S., Chakraborty, M., Kumar, A. K., Kakoti, A. (2013) An overview on alcohol oxidases and their potential applications. Appl Microbiol Biotechnol 97, 4259-4275.
- Grant, G. G., Millar, J. G., Trudel, R. (2009) Pheromone identification of *Dioryctria abietivorella* (Lepidoptera: Pyralidae) from an eastern North American population: geographic variation in pheromone response. The Canadian Entomologist 141, 129-135.
- Helvig, C., Koener, J. F., Unnithan, G. C., Feyereisen, R. (2004) CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4024-4029.
- Hill, A. S., Kovalev, B. G., Nikolaeva, L. N., Roelofs, W. L. (1982) Sex pheromone of the fall webworm moth, *Hyphantria cunea*. J. Chem. Ecol. 8, 383-396.
- Jurenka, R. A., Subchev, M., Abad, J. L., Choi, M. Y., Fabrias, G. (2003) Sex pheromone biosynthetic pathway for disparlure in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 809-814.

- Jurenka, R. (2004) Insect pheromone biosynthesis. *Top Curr. Chem.* 239, 97-132.
- Kanamori, Y., Hayakawa, Y., Matsumoto, H., Yasukochi, Y., Shimura, S., Nakahara, Y., Kiuchi, M., Kamimura, M. (2010) "A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning." *J. Biol. Chem.* 285, 36933-36944.
- Kemp, G. D., Dickinson, F. M., Ratledge, C. (1988) Inducible long chain alcohol oxidase from alkane-grown *Candida tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 370-374.
- Kemp, G. D., Dickinson, F. M., Ratledge, C. (1990) Light sensitivity of the n-alkane-induced fatty alcohol oxidase from *Candida tropicalis* and *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 461-464.
- Kiyota, R., Arakawa, M., Yamakawa, R., Yasmin, A., Ando, T. (2011) Biosynthetic pathways of the sex pheromone components and substrate selectivity of the oxidation enzymes working in pheromone glands of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 362-369.
- Knipple, D. C., Rosenfield, C. L., Miller, S. J., Liu, W., Tang, J., Ma, P. W. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a

- pheromone gland-specific acyl-CoA Delta11-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15287-15292.
- Kuenen, L. P. S., Mcelfresh, J. S., Millar, J. G. (2010) Identification of critical secondary components of the sex pheromone of the navel orangeworm, (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 103, 314-330.
- Landolt, P. J., Curtis, C. E. (1982) Interspecific sexual attraction between *Pyralis farinalis* L. and *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). J. Kansas Entomol. Soc. 55, 248-252.
- Leal, W. S., Parra-Pedrazzoli, A. L., Kaissling, K.-E., Morgan, T. I., Zalom, F. G., Pesak, D. J., Dundulis, E. A., Burks, C. S., Higbee, B. S. (2005) Unusual pheromone chemistry in the navel orangeworm: novel sex attractants and a behavioral antagonist. Naturwissenschaften 92, 139-146.
- Millar, J. G. (2000) Polyene hydrocarbons and epoxides: a second major class of lepidopteran sex attractant pheromones. Annu. Rev. Entomol. 45, 575-604.
- Millar, J. G., Grant, G. G., Mcelfresh, J. S., Strong, W., Rudolph, C.,

- Stein, J. D., Moreira, J. A. (2005) (3Z, 6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-Pentacosapentaene, a key pheromone component of the fir coneworm moth, *Dioryctria abietivorella*. J. Chem. Ecol. 31, 1229-1234.
- Miyamoto, T., Yamamoto, M., Ono, A., Ohtani, K., Ando, T. (1999) Substrate specificity of the epoxidation reaction in sex pheromone biosynthesis of the Japanese giant looper (Lepidoptera: Geometridae). Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 63-69.
- Ono, H., Ozaki, K., Yoshikawa, H. (2005) Identification of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genes preferentially expressed in chemosensory organs of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 837-846.
- Rule, G. S., Roelofs, W. L. (1989) Biosynthesis of sex pheromone components from linolenic acid in arctiid moths. Arch. Insect Biochem. Physiol. 12, 89-97.
- Savitha, J., Ratledge, C. (1991) Alcohol oxidase of *Aspergillus flavipes* grown on hexadecanol. FEMS Microbiol. Lett. 80, 221-224.
- Tóth, M., Buser, H. R., Penã, A., Arn, H., Mori, K., Takeuchi, T., Nikolaeva, L. N., Kovalev, B. G., (1989) Identification of (3Z, 6Z)-1, 3, 6-9, 10-

- epoxyheneicosatriene and (3Z, 6Z)-1, 3, 6-9, 10-epoxyeicosatriene in the sex pheromone of *Hyphantria cunea*. *Tetrahedron Lett.* 30, 3405-3408.
- Wei, W., Miyamoto, T., Endo, M., Murakawa, T., Pu, G-Q., Ando, T. (2003) Polyunsaturated hydrocarbons in the hemolymph: biosynthetic precursors of epoxy pheromones of geometrid and Arctiid moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 397-405.
- Wolf, W. A., Roelofs, W. L. (1986) Properties of the Δ^{11} -desaturase enzyme used in cabbage looper moth sex pheromone biosynthesis, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3, 45-52.
- Zhao, S., Lin, Z., Ma, W., Luo, D., Cheng, Q. (2008) Cloning and characterization of long-chain fatty alcohol oxidase LjFA01 in *Lotus japonicas*. *Biotechnol. Prog.* 24, 773-779.

ヤガ科、ノメイガ科、スカシバ科、カイコガ科等

ドクガ科、ヒトリガ科、シヤクガ科等

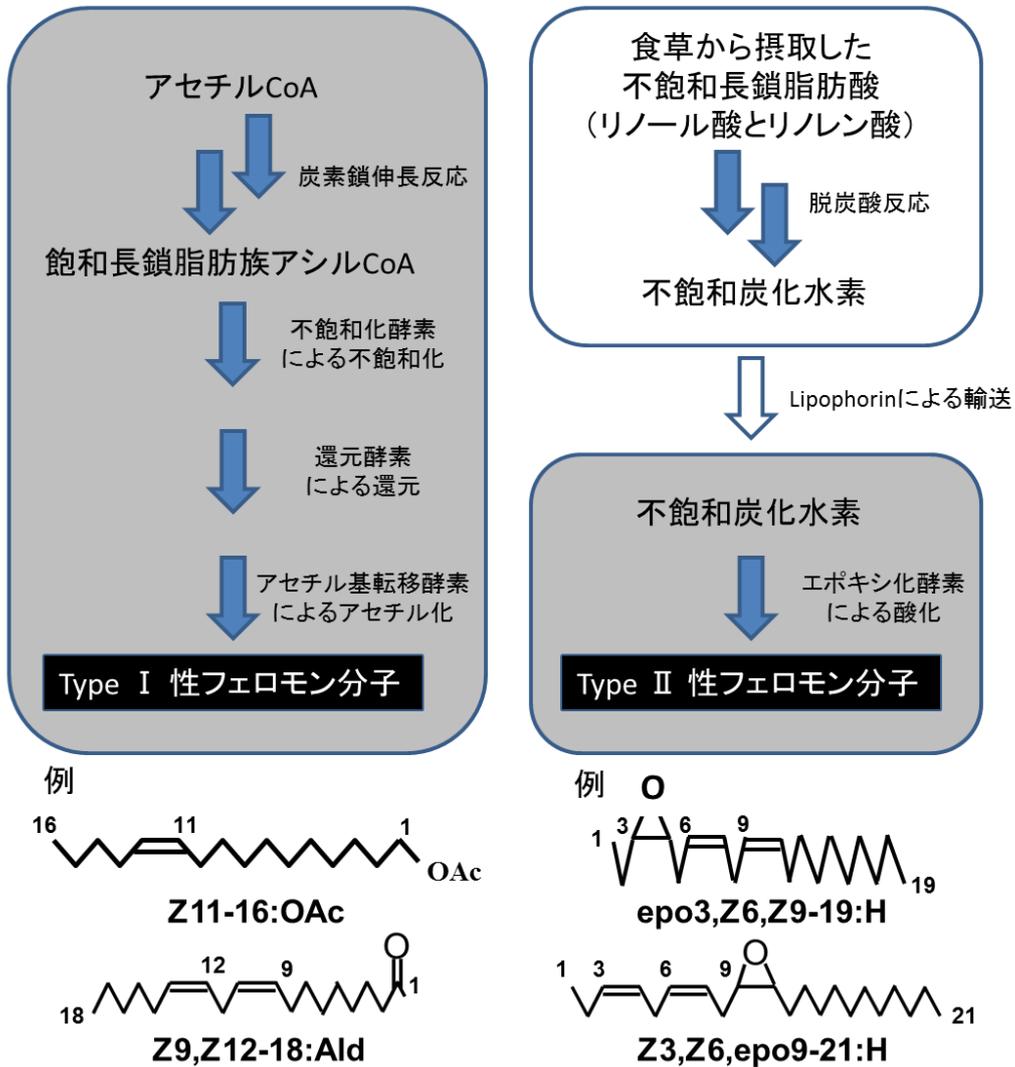
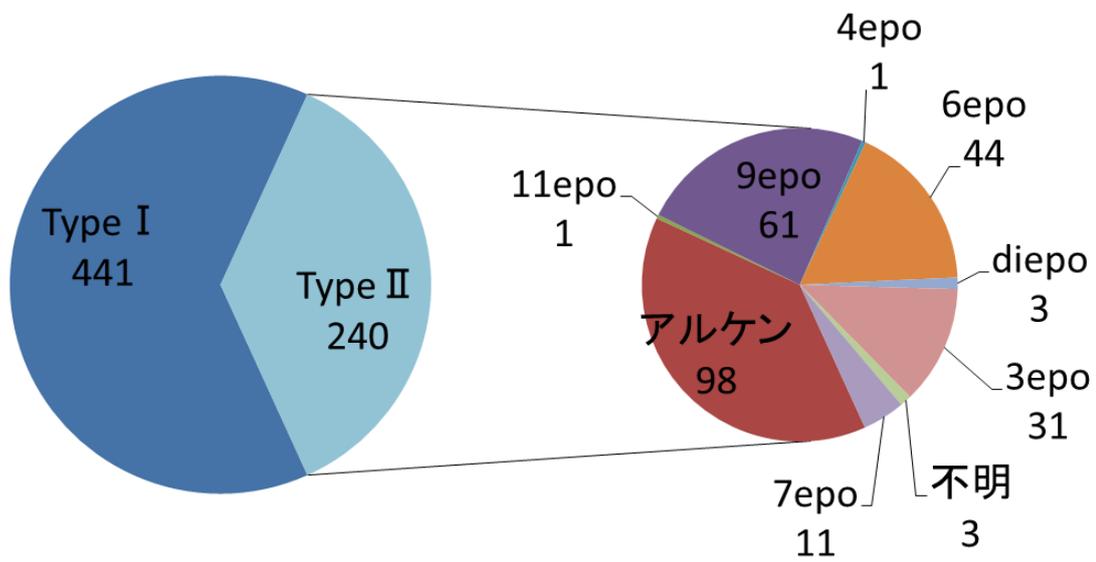
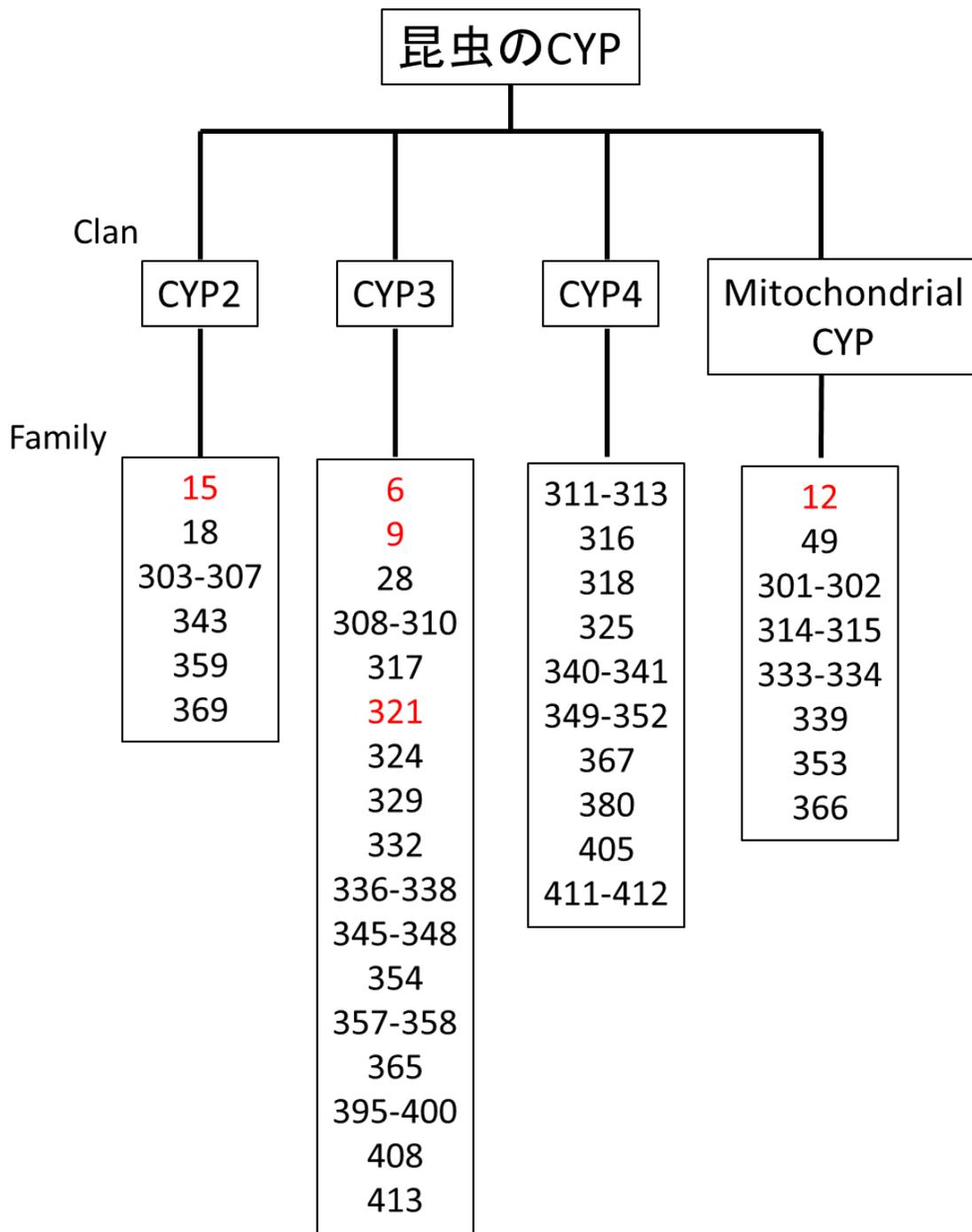


Figure 1
メスが分泌するガ類性フェロモンの典型的な2種類の生合成経路

メスが分泌する性フェロモンの生合成経路は、アセチルCoAを原料とする経路と食草由来の不飽和脂肪酸を原料とする経路の主に二種類が知られており、それぞれTypeIとTypeIIの性フェロモン分子が作られている。これら二つの生合成経路のうち、TypeI性フェロモン分子の生合成経路では全ての反応ステップがフェロモン腺で起こるのに対して、TypeII性フェロモン分子の生合成反応は、腹部にあるエノサイトで脂肪酸が炭化水素前駆体に変換された後、リポフォリンと呼ばれる運搬タンパク質によりフェロモン腺へ輸送され、最終的に酵素による化学修飾を受け、完了することが示されている。図中でフェロモン腺内で起こる反応は影付けをした (Fujii et al., 2013を改編)。



異なるタイプの性フェロモンを分泌するガ類の種数



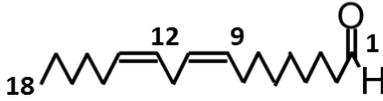
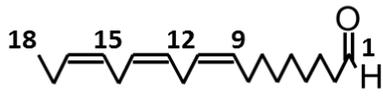
種類	構造式	比率
Type I	A 	5
	B 	4
Type II	C 	10
	D 	2

Figure 2
アメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) の分泌する性フェロモン成分の化学構造式

アメリカシロヒトリは2タイプの性フェロモン成分を同時に分泌している。(A) (9Z,12Z)-9,12-octadecadienal (Z9,Z12-18:Ald) , (B) (9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienal (Z9,Z12,Z15-18:Ald) , (C) cis-9,10-epoxy-(3Z,6Z)-3,6-henicosadiene (Z3,Z6,epo9-21:H) , (D) cis-9,10-epoxy-(3Z,6Z)-1,3,6-henicosatriene (1,Z3,Z6,epo9-21:H) の比率は5:4:10:2 (Einhorn et al.,1982;Hill et al.,1982;Toth et al.,1989) 。

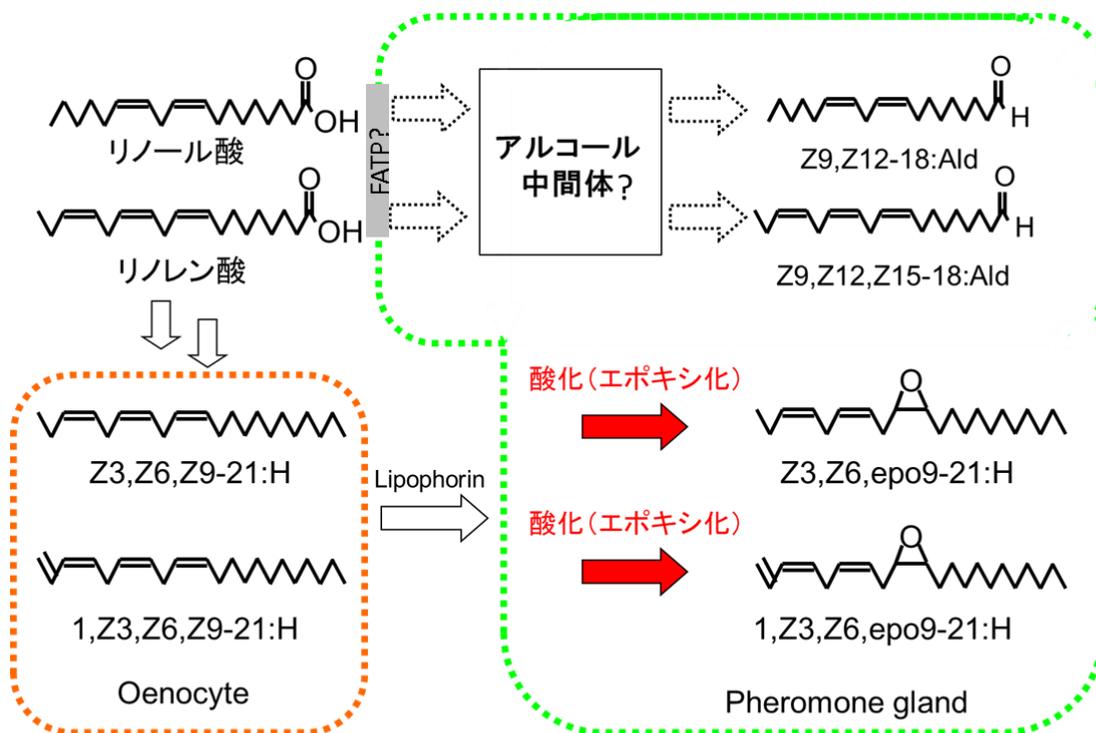


Figure 3
重水素標識実験により示されたアメリカシロヒトリの性フェロモン生合成経路

標識実験は、本種アメリカシロヒトリの性フェロモン生合成経路上のエポキシ化酵素の存在を示唆した (Kiyota et al., 2011を改編)。

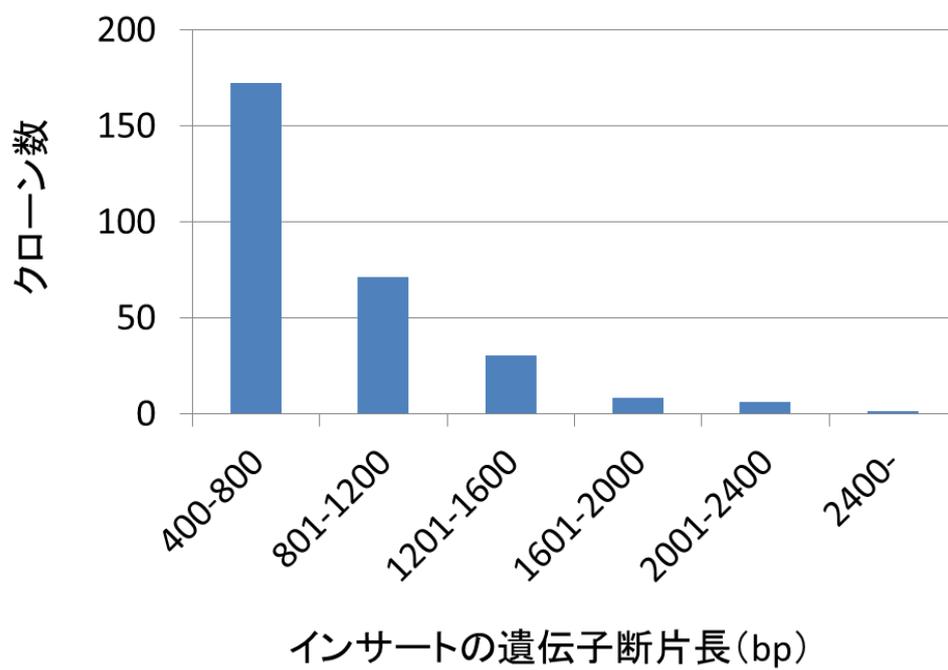


Figure 4
 アメリカシロヒトリのフェロモン腺由来のcDNAライブラリー288クローン中に含まれる遺伝子断片の長さの分布

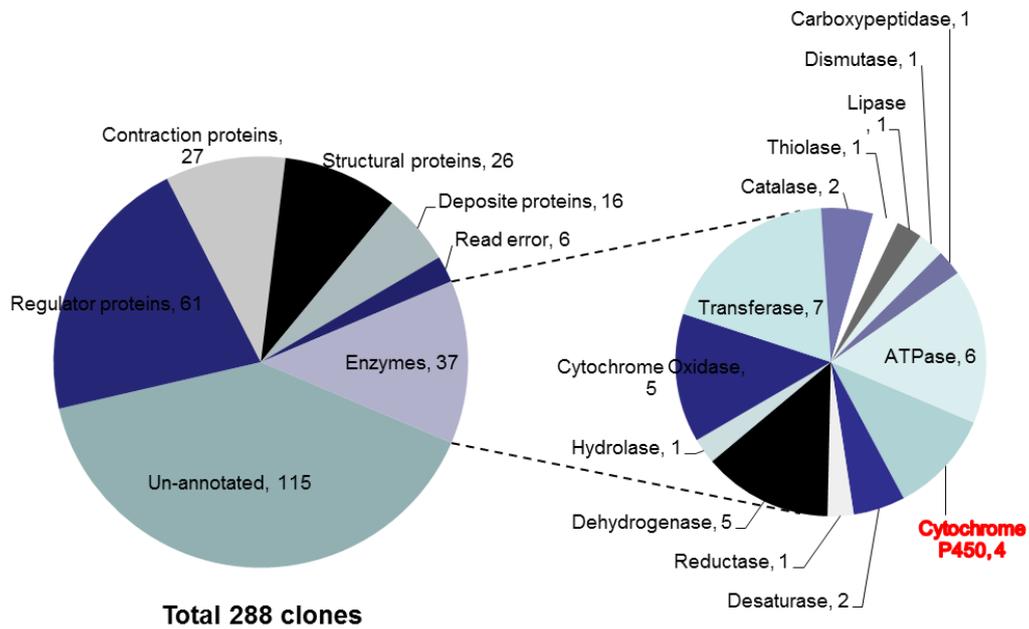


Figure 5
BLAST検索により明らかとなったクローンがコードするタンパク質の内訳と推定される機能

アメリカシロヒトリのフェロモン腺cDNAライブラリーよりCytochrome P450をコードする酵素遺伝子を4クローン発見した。BLAST検索はtblastx (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用した。

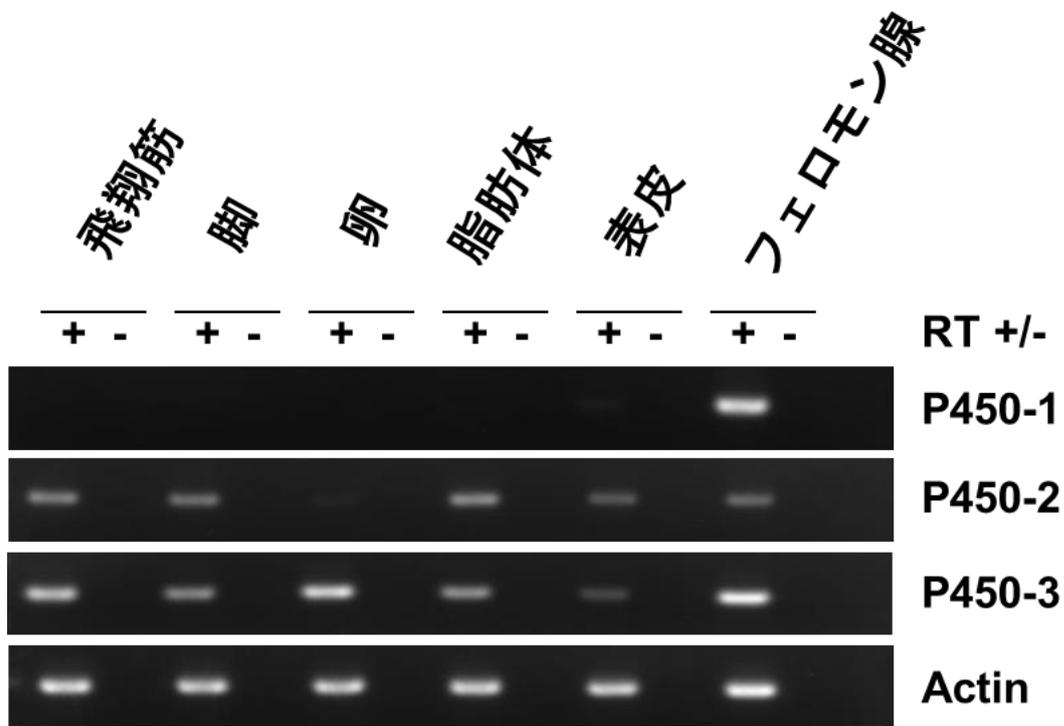
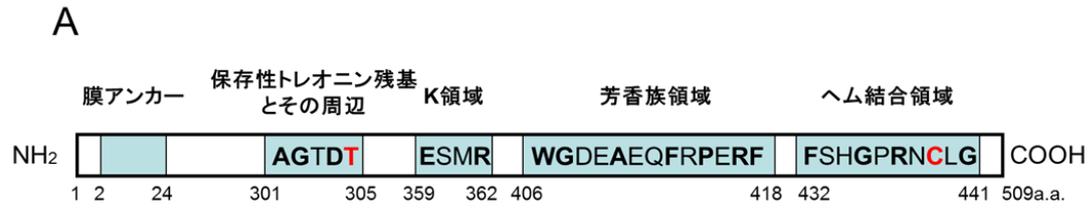


Figure 6
RT-PCR法によるP450候補遺伝子の組織別発現パターンの比較

現在までに発見された性フェロモン生成に関与する酵素遺伝子は機能に関わらず、フェロモン腺で特異的あるいは高発現している。調査した3種の遺伝子のうちP450-1のみがフェロモン腺でのみ発現していた。RT+/-は逆転写反応の有無を示す。



B

ヘム結合領域

Hc_ipo1	FSHGPRN C LG
CYP341A2	FSSGPRN C IG
CYP341A13	FSNGPRN C IG
CYP4C3	FKMGRRN C YG

保存性トレオニン残基とその周辺

Hc_ipo1	AGTD T
CYP341A2	AGTD T
CYP341A13	AGTD T
CYP4C3	AGHD T

芳香族領域

Hc_ipo1	WGDEAEQFRPERF
CYP341A2	WGPDAEVFDPDFR
CYP341A13	WGPDAERFDPDFR
CYP4C3	WGPDAEEFKPERW

K領域

Hc_ipo1	ESMR
CYP341A2	ESLR
CYP341A13	ESLR
CYP4C3	ETMR

Figure 7

*Hc_ipo1*の分子構造の模式図 (A) と他のP450モチーフとの部分配列の比較 (B)

(A) 下の数字はN末端側より数えたアミノ酸残基の位置を示す。*Hc_ipo1*ではプロリンに富む領域が確認できなかった。
 (B) *Hc_ipo1*との相同性検索で高いスコアを示した遺伝子とP450の特徴的なモチーフを比較した。赤い文字は近位のCysと遠位のThrを示し、活性中心である鉄原子と直接配位するアミノ酸残基である。

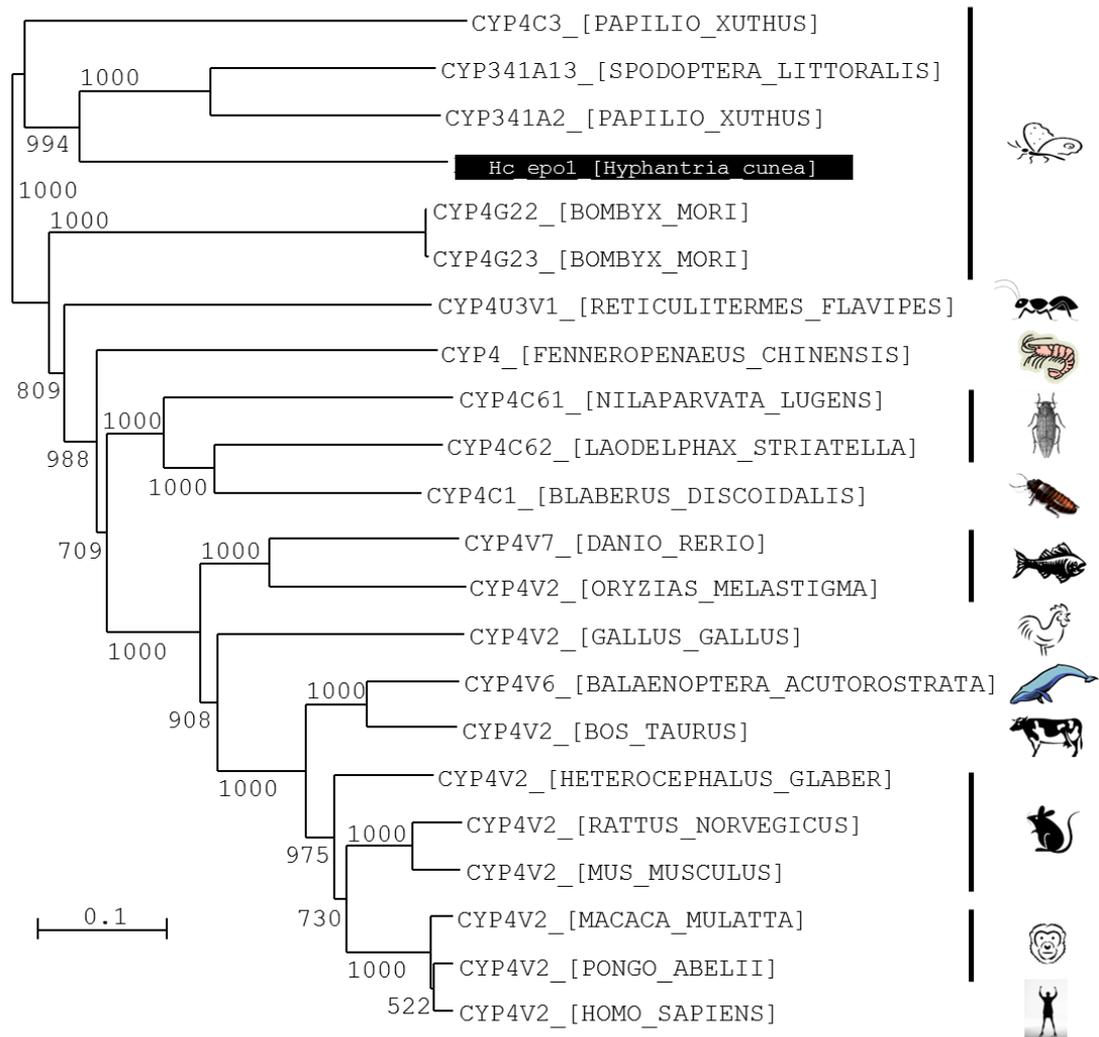


Figure 8
*Hc epo1*の系統解析の結果

*Hc epo1*の演繹アミノ酸配列との相同性検索で高いスコアを示した配列で系統樹を作製した。系統樹は近隣結合法 (neighbor-joining method) により作製し、枝の分岐の信頼性はbootstrap値 (1,000 re-samplings) によって判断した。

B

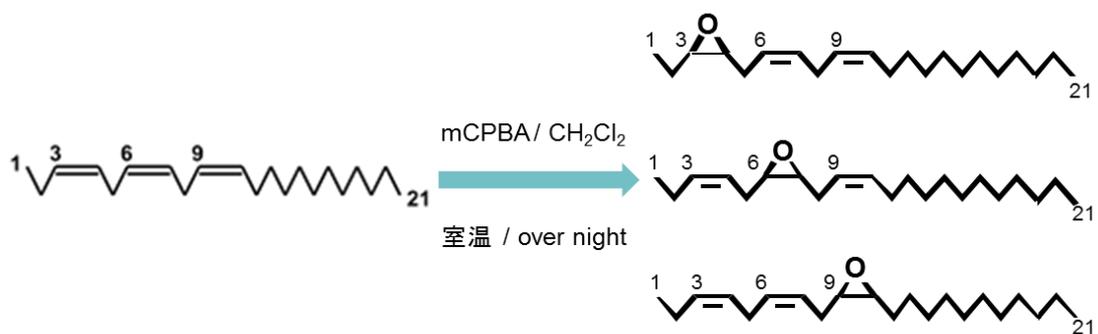


Figure 9B
標品となるエポキシドの作製

エポキシ化反応の選択性をGC-MS、スペクトラムパターンにより比較、同定するために、全ての位置異性体を作製した。

C

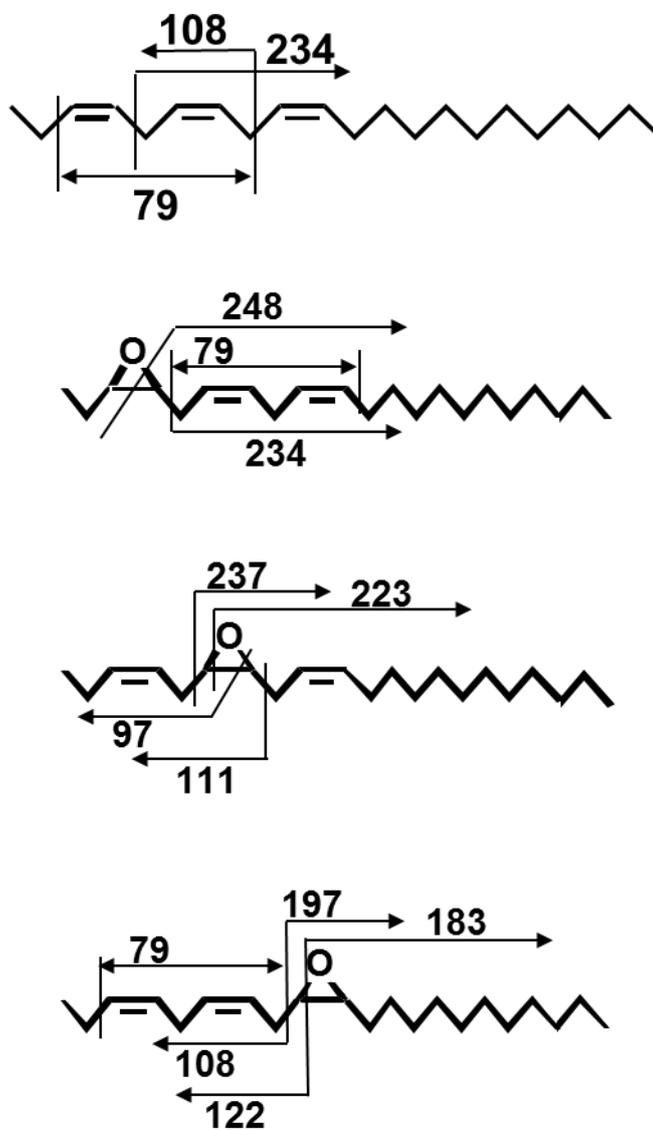
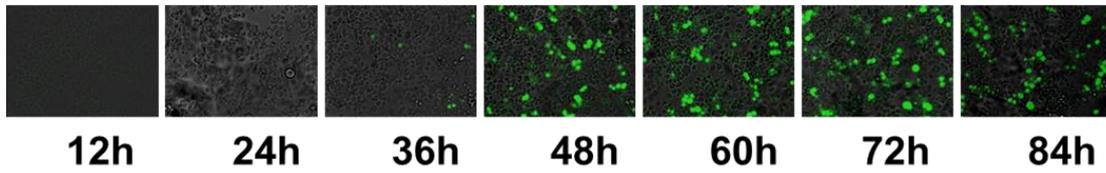


Figure 9C
基質と作製した標品のGC-MS分析における開裂パターン (Ando et al., 2004)

A



B

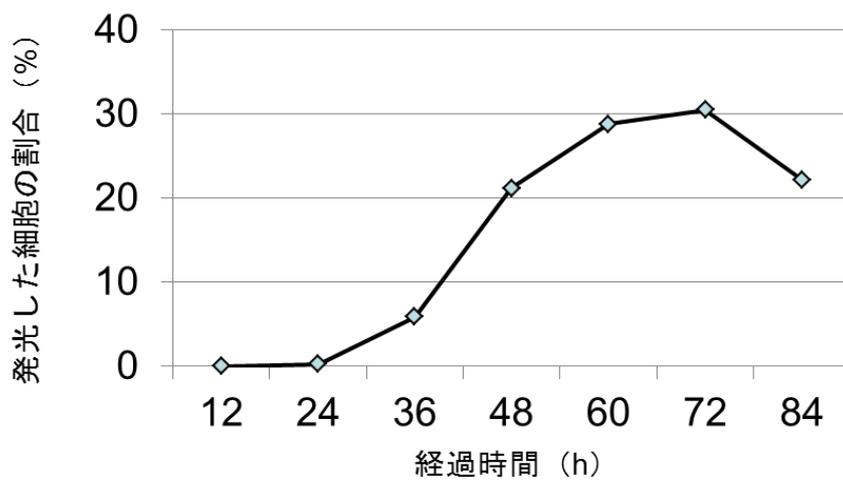


Figure 10
導入遺伝子の発現までの経時観察結果

- (A) トランスフェクション後の細胞の12hごとの暗視野顕微鏡観察結果。
(B) 発光した細胞の数の経時的な変化。この観察により、遺伝子の導入後60~72h後に発光した細胞の割合が約30%となることがわかった。

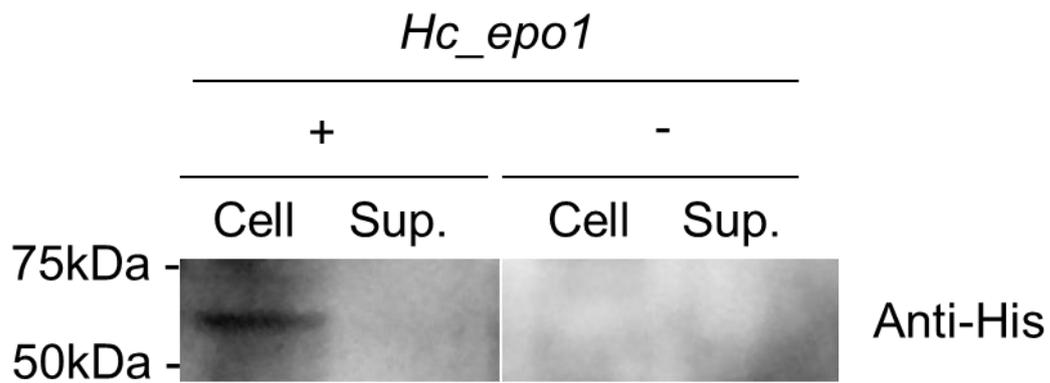


Figure 12
*Hc_epo1*タンパク質発現の確認

Western blotting法を用いてSf9細胞での*Hc_epo1*タンパク質の発現を確認した。細胞分画にのみ目的産物と思われるバンドを認めた。このバンドは分子量マーカーとその移動度から算出したタンパク質のサイズは66.8kDaであった。

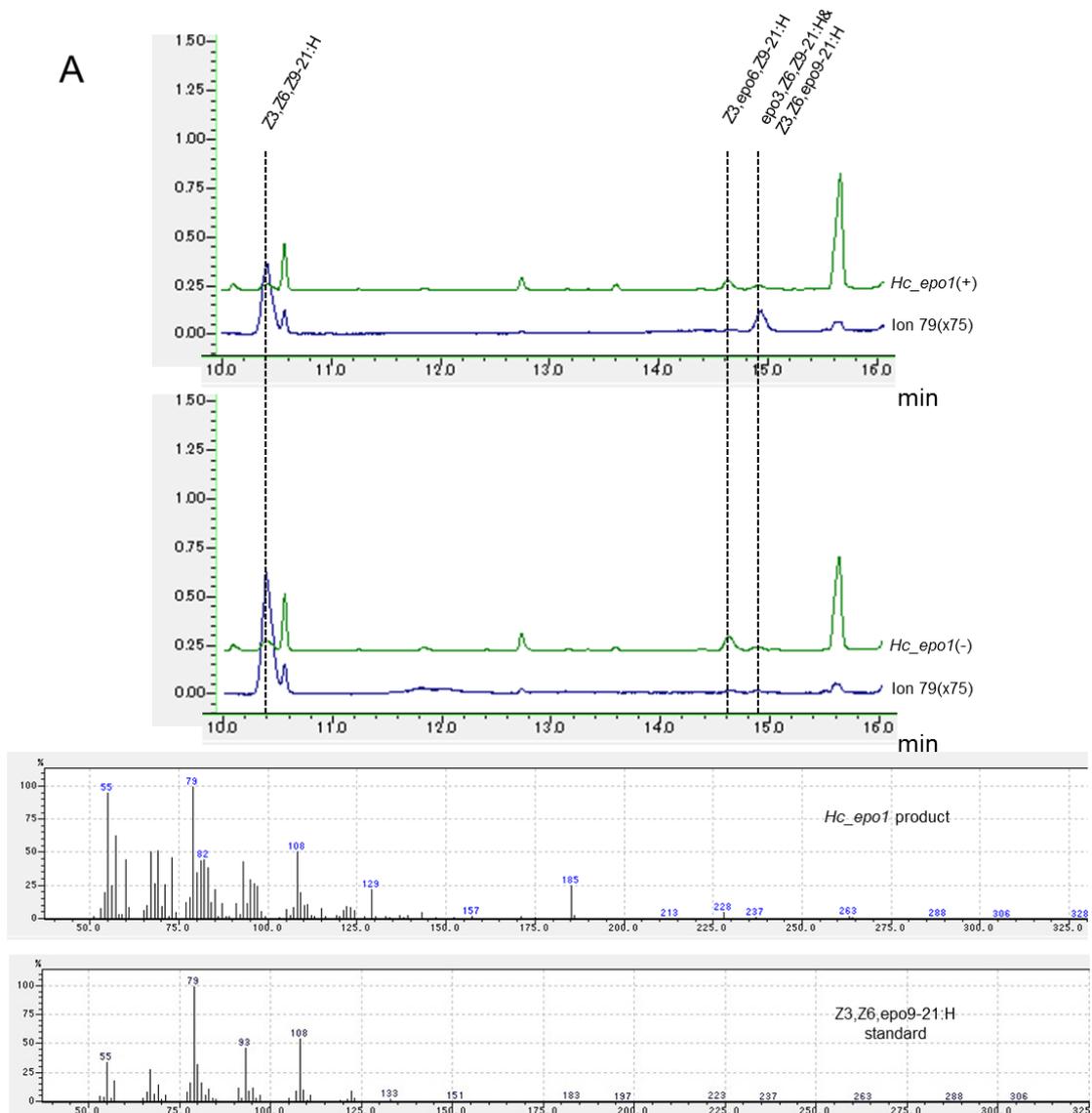
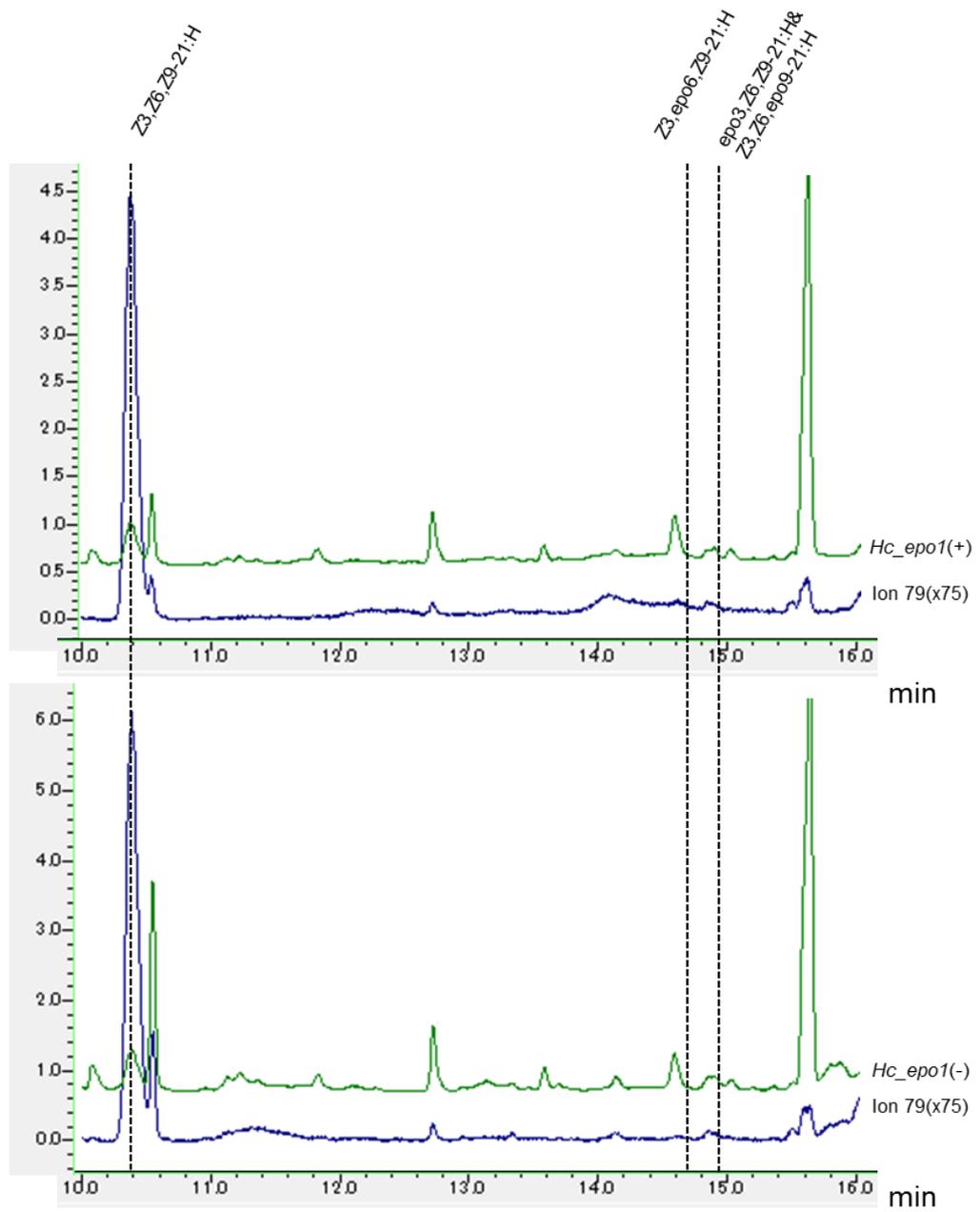


Figure 13
*in vitro*発現系での*Hc_epo1*活性実験の結果

*Hc_epo1*が発現したSf9昆虫細胞のHx抽出物をGC-MSで分析した。(A)細胞画分、(B)培地画分。全ての図の上段がpIZT/V5-His-*Hc_epo1*を2 μ g、下段がpIZT/V5-His vectorを2 μ g Sf9昆虫細胞へトランスフェクションした結果を示している。基質及びエポキシ化反応が触媒された際の主産物は、10.40min, 14.86minで点線で図中に示した。Z3,Z6,epo9-21:Hの基準イオンのマスクロマトグラム ($m/z=79$) も示した。*Hc_epo1(+)*をトランスフェクションしたSf9昆虫細胞の細胞画分からのHxの抽出物において14.90minのピークにあたる化合物の開裂パターン及びZ3,Z6,epo9-21:Hの標品の開裂パターンも図Aに示した。検索イオンである $m/z=79, 108, 122, 183, 197, 237, 288, 306$ が確認できた。エポキシ化が実現した時に現れる14.90minのピークを細胞画分のみで検出することができた。Z3,epo8,Z9-21:Hが検出されなかった。

B



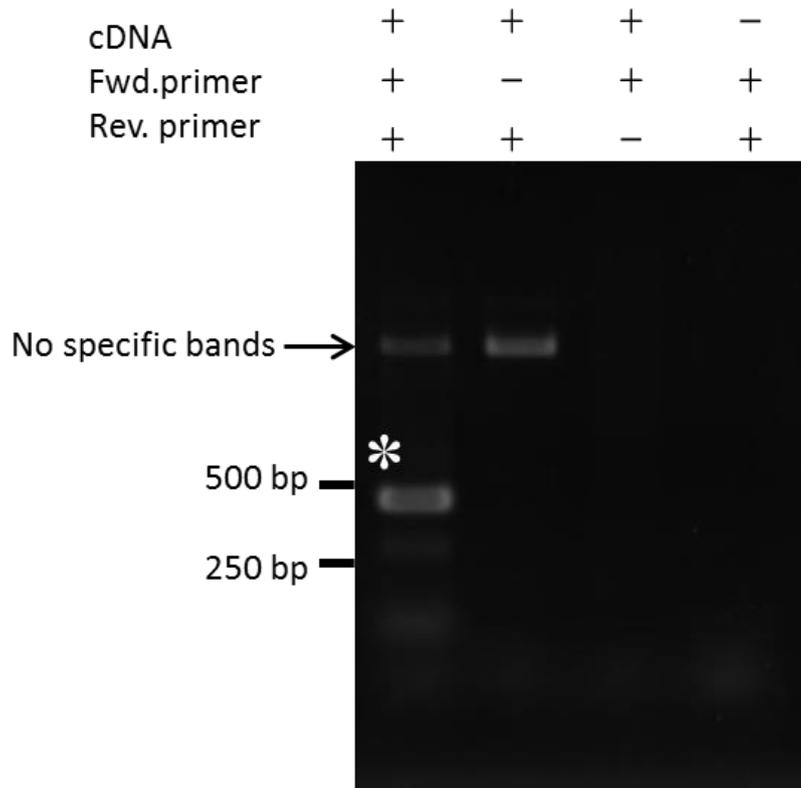


Fig.S2. Amplification of a fragment of candidate gene expressed in the pheromone gland of *L.imparilis* by PCR with degenerate primers. The degenerate primers were designed based on the sequences of CYP341B family. A single band of expected size, approximately 457 bp, was amplified (asterisk).

Rong et al., Fig. 1

1 GAAAAACAGTGTGGTTAAATTAGCCTTCAGCGA**ATG**TTGTTACTAGTATTACTCGTGGTTTTAATTCTCCTAATAGTAAGGCGAA
M L L L V L L V V L I L L I V R R
Predicted transmembrane domain

85 GGAAATACAGAAGTTTATTAACCTGTCAAACAAATAAAATGTGAAATAAGAAGTTATCCCTTGATTGGGCACGCCTATTTGT
R K I Q K F I N L S K Q I K C E I R S Y P L I G H A Y L

169 TGACTGGTGGGTCAGTGAATTTTATGAACACTTTCCAAATGTTTGTCTCGTGAAGCTATAAGGAATGGCGGTATGACTAATTTAT
L T G G S V N F M N T F Q M F A R E A I R N G G M T N L
Predicted transmembrane domain

253 GGATAGGATCAAATATTACATAGTTGCAGTTGATGCTGCCGACATAGAAATAGTATTAATAATCGTCTTTAGAGAAGGATAATG
W I G S K Y Y I V A V D A A D I E I V L K S S L E K D N

337 TAGTACGTTTTGTGAGAAATTTTATTGAAATGGACCCATATTTGCACCTGTTTCAATCTGGCGACCACGTGGAAGGTACACAG
V V R F V R N F I G N G L I F A P V S I W R P R R K V T

421 CTCCTACTTTTCAGTTTAAAGAACCTGAACAGATTTGTGAAGATATTTGCTCGACAGAGTGCCAACTTAGTGCAGGCTCTGAAGG
A P T F S L K N L N R F V K I F A R Q S A N L V Q A L K

505 CAGTTGAAGGGAATGGAGCGCAGCCTGTTTGGAACTACATGACTACCTACACCTTGGACTCTGTATGTGAAACAGTTTTTGGTG
A V E G N G A Q P V W N Y M T T Y T L D S V C E T V F G

589 TAAAAATGAATTCGCACGAAAACCAAGAAGAGCCAATACTGAAAGCATTGAAATCGTTTCCTCACTAATAGCTGAGCGAATGC
V K M N S H E N Q E E P I L K A F E I V S S L I A E R M

673 TTCAGCCGTGGTTGCAAACCTGATTGATGATACAAGCTTCTTAGCTGCCACTACAGATTTGAGAAGATAAGAAGTTTTGCATG
L Q P W L Q T D S V Y K L L S C H Y R F E K N K K V L H

757 ACTTTGTTAAAAAGGTAATAACATTAACCCGAGAAAGGTTGAAAGAAAATTTGAAACTGATGAAAGTAGCACAACAGGGCGA
D F V K K V I T L T R E R L K E N C E T D E S S T N R A

841 AGTGTCTTTCTAGAACTTCTGATAGAAGCATCTGGCGGGGAGCGTGGTTACTCCGATGTGGAGCTACTAGAAGGGTCTGGTCA
K C F L E L L I E A S G G E R G Y S D V E L L E E G L V

925 TGTTAATA**ECTGGTACTGATACTTCT**GGTTCGGGAATGCTCTTTTACTGTCTCTATGATGGCAAACAATCTGATGTACAGGATA
M L I **A G T D T** S A S G M S F T V S M M A N N P D V Q D
Distal threonine residue

1009 AAGTTTTTCAAGAATTACATGAAGTGTGGTGGTTCAGACAGACCAGTTGTGCCAGAAGATTGCCACATCTCAAATATCTAG
K V F Q E L H E V F G D S D R P V V P E D L P H L K Y L

1093 ATGCTGTTATTAGAGAGATGATGCGCTTATATCCACAGTACCAATAATTTGTTAGAGAAAATTCATGCGGATACACAACACTACCGT
D A V I R **E S M R** L Y P P V P I I V R E I H A D T Q L P
Region K

1177 CTGGTATCACCGTAACGAAAGAGTGTGCAATTATAATAATATATGTTGGGCGTACATCGCAACCCAGCTTATTTGGGAGATGACG
S G I T V T K E C A I I I N I W G V H R N P A Y W G D D

1261 CAGAGGAGTTCGGACCTGAACGATTTCTAGAAGAAACAGGGAGGCACTCAGTAGCCTACTTAGCATTTAGTAATGGACCTCGCA
A E E F R P E R F L E E T G G H S V A Y L A **F S N G P R**
Heme-binding region and proximal cysteine residue

1345 ACTGTTTAGGTACCCAGTATTCAATGATGTC**CAATGAAGACGGCAC**TAGCTACATTGTTCCGAAATACCGCGTCTAAGTCCGG
N C L G T Q Y S M M S M K T A L A T L F R N Y R V L S P

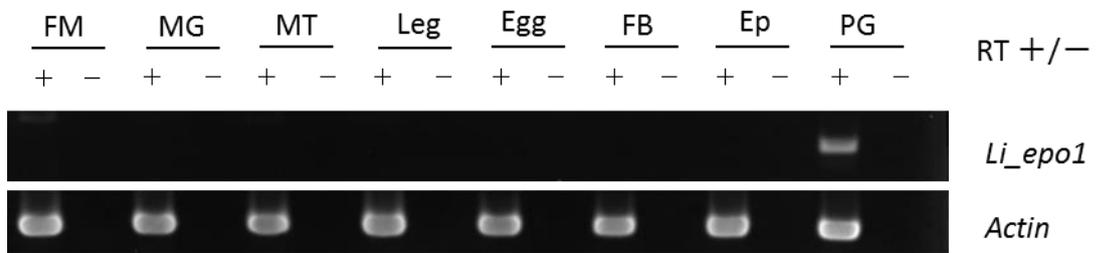
1429 AAGATAATATGAAACAAAGTGCAGGAGTAACTAACCGTGAACCATTAAGTCAAATTTGAAGTCATGATGAAGGACGTTGACG
E D N M K Q S A G V T N R E P L K V K F E V M M K D V D

1513 GGTCCGAGTTAAATTTGGTTAAAAGGAAGAATCACATCAAACGTA**CTTAA**AGTTTGTGCCCCCCCACTGAGAAAAGTTGTTTGA
G F R V K L V K R K N H I K R T *

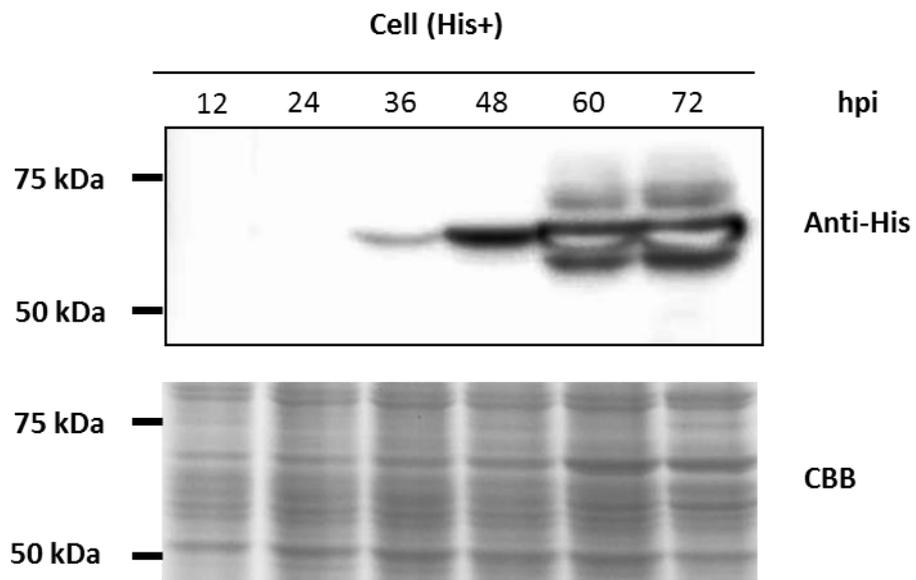
1597 TTTTTATTTTAAATAGAAAAGTAAAAATGCATACAAGCTGTATTTACAGGGGTTTACTTTAAGTTAAAGGGAAATGAAAAGTGT
1681 TTTTATTTAATTATGGTTATTTGGAAGATAACTCACGTAATTTGTTATTTCCCTGTACATAAAATGTTAACATTTGTGTACATTG
1765 AAT**AATAAA**TGAAACGAAAACAATTATATTACCTGCGTATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Polyadenylation signal

Rong, et al., Fig. 2

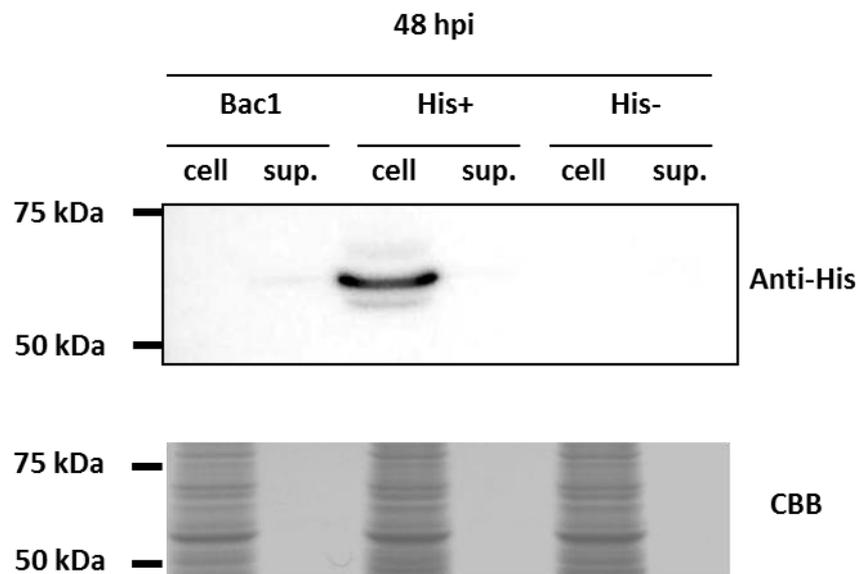
	around distal T	K region	Proximal Cys in heme binding region
<i>Lemyra imparilis</i>	-GT--	-SM-	--N-P-N-L-
Consensus	A--DT	E--R	FS-G-R-C-G
<i>Hyphantria cunea</i> _B14	-GT--	-SM-	--H-P-N-L-
<i>Helicoverpa armigera</i> _B2	-GT--	-TL-	--H-P-N-L-
<i>Spodoptera littoralis</i> _B3	-GT--	-TL-	(Not found)
_A13	-GT--	-SL-	--N-P-N-I-
_AA1	-AY--	-SM-	--I-K-N-L-
<i>Bombyx mori</i> _A3	-GY--	-TL-	--V-K-T-I-
_B1	-GT--	-TM-	--H-P-A-I-
_C1	-GH--	-SL-	--S-P-N-I-
<i>Papilio xuthus</i> _A2	-GT--	-SL-	--S-P-N-I-



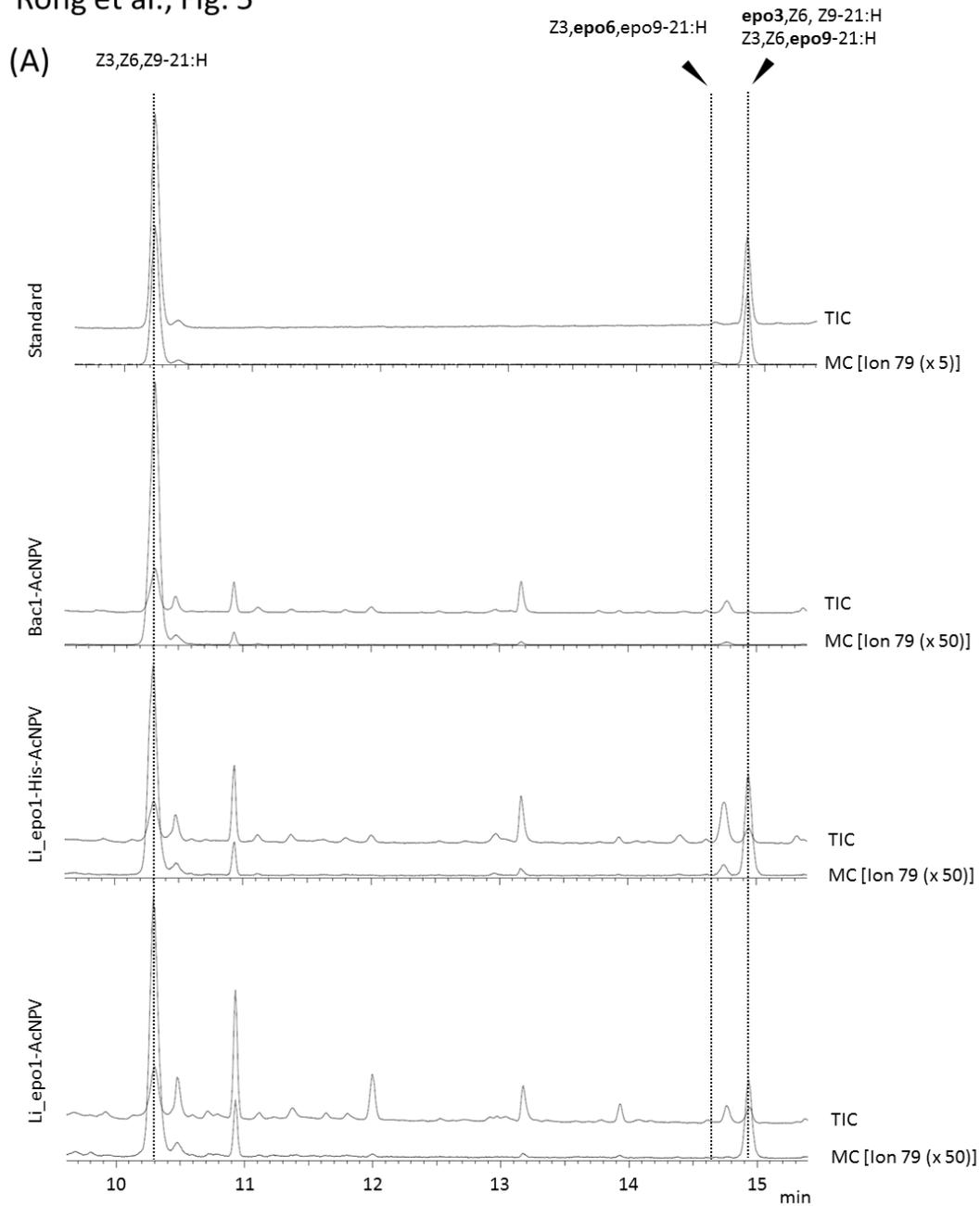
(A)



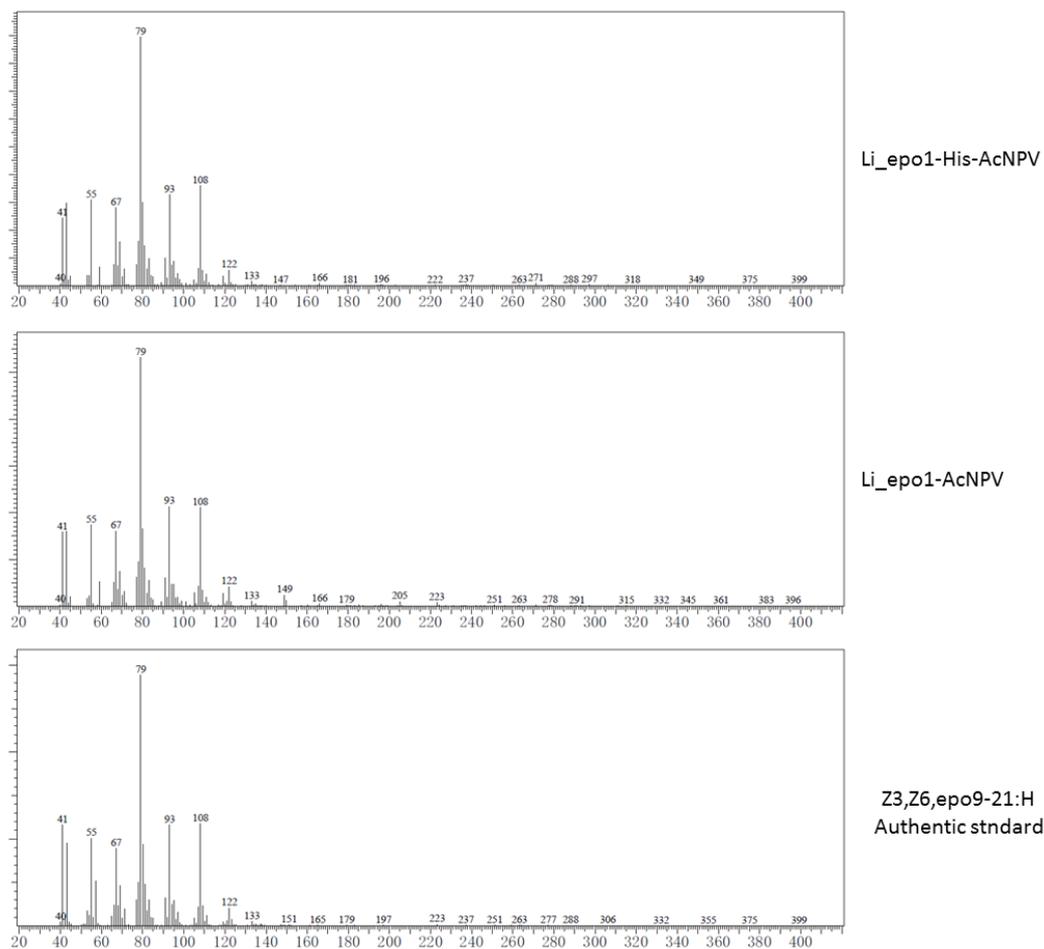
(B)



Rong et al., Fig. 5

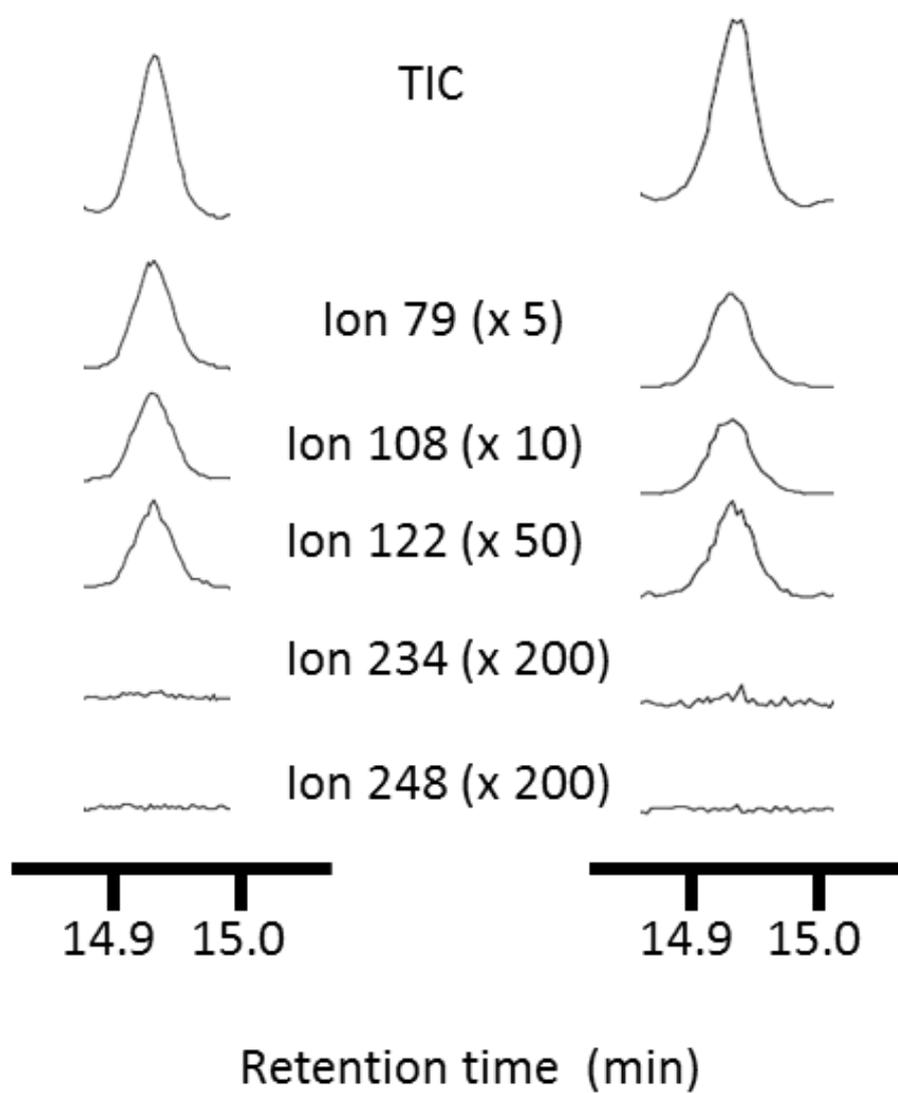


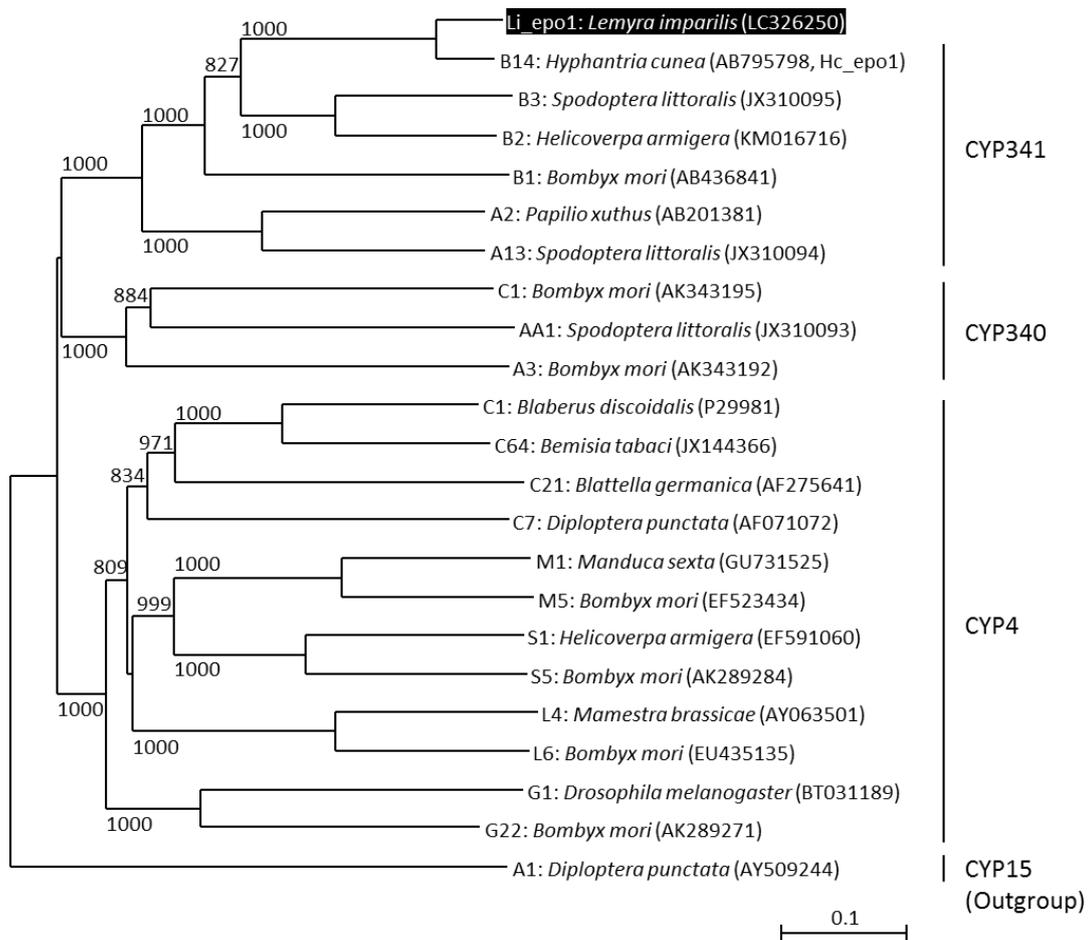
(B)

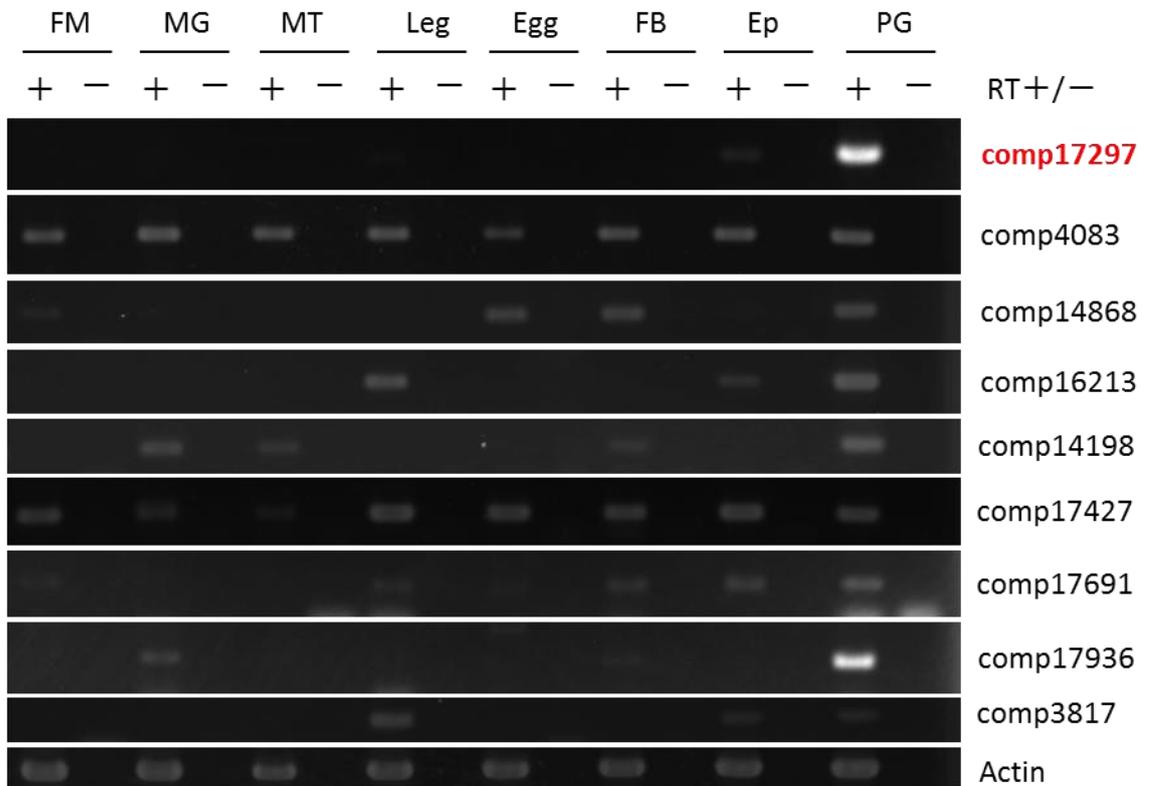


Li_epo1-His-AcNPV

Li_epo1-AcNPV







1 **ATG**TTTTTTCTAATAGTGCATTAAAGTTTATCGTTGTGTATAATTTGGAGGTATTTAAAAAGCAAGGATAAAAACAGAGCCTCCT
M F F L I V L L S L S L C I I W R Y L K S K D K T E P P
Predicted transmembrane domain
85 GCTTTATCGGGGTGGCTGCCTCTTATGGTCATGGGAAAAGATTTTTTATAAATGGTTTTGAATTCTACAGATCTTTTGAAAA
A L S G W L P L I G H G K R F F I N G F E F Y R S F E K
169 ATATCCGAAGAATGTCTTCGTAAGGAGGTGTTGTTACATTATATTTAGGATTTAATAAAGTTTATTGTGTATCTGATCCAGAC
I S E E C L R K G G V V T L Y L G F N K V Y C V S D P D
253 GACTGTTTACTGTAATGAACATGTGTTTAGAAAAATCTATGATGATCAAATTCGCAAAACAATTTCTTGAAATGGACTATTT
D C L T V M N M C L E K S M M I K F A K Q F L G N G L F
337 ACTGCCGATGTTTCATCGGTGGCAAACCTAGTCGAAACTTCTAAATCCAGCGTTTAAATCAAAGATTTTAGATTCTTTTATAGAC
T A D V H R W Q T S R K L L N P A F N Q K I L D S F I D
421 ATTTTTAATAATAAGGCTCGCGAACTGGCAAAATATATTGCTACTGAAATAGGGAAGCCTTTTGATCACCAATATCCTTAAGG
I F N N K A R E L A N I F A T E I G K P F D H Q I S L R
505 ACAAAGAATTTGGAAACAATATGTGCGACGTCATTTGACGTACACGACAGTGAGTCCAGGAACATTTTGAATCAATATCTGCCA
T K N L E T I C A T S F D V H D S E S R N I L N Q Y L P
589 TTATTGGCAACTCTGGTGATTAAACTGAGTCAAAGACTGCAGTGTCTTGCTCCACAACGATTTTATTACAGCTTGTCTTCC
L L A T L V I K L S Q R L Q C F W L H N D F I Y S L S S
673 CTGAAAAGAGAAACCGATGAGATTGTAAAGAAAACGAAGGTCTTGTGTAGCACGATGATTA AAAAGAACAGAAATAATGAGACTA
L K R E T D E I V K K T K V L C S T M I K K N R I M R L
757 AACCGTGCAGTGA AATGACGCAACCGGAAAACCTAAAAGTTTATAGATTTAATCTGGACCTGAGTGAAGAGACCGACTGT
N R A S E N D A T G K P K K F I D L I L D L S E E T D C
841 TTCACGGACGAGCAGATTCGAGAAGAATCCGACACGGTGGTGGTGGGGGGCAGACACCGAGCGCTTCTACCTCACGTTTCGCT
F T D E Q I R E E S D T V V V G G H D T S A S T L T F A
Distal threonine residue
925 TTCACCTTGTGGGATCACATCCACACGCTCAGCAGAAACTTTACCAGGAATAATTCGTGTTTGC GGAACATCAGACAAGGAT
F T L L G S H P H A Q Q K L Y Q E I I R V C G T S D K D
1009 GTGAAAAGCAGGATTTGTCTAAACTAGTTTACTGAAGCTGTTTAAAGGAAACTCTTCGATTGTATCCCATCGCATTACTT
V E K Q D L S K L V Y T E A V L K E T L R L Y P I A L L
Region K
1093 CTACCAAGATACATCGACAGAGATGTTAAATTAAGAAGTATACATTA AAAAGCAAATTCGATTGCTTTGTAATGGCAAACGGT
L P R Y I D R D V K L K N Y T L K A N S D C F V M A N G
1177 CTCCACCGCCACGCTATATGGGGTGAAGACGCGGAGCAGTTCCGACCGGAGCGGTGGCTGGACAAGGACACTCTACCAGACGCT
L H R H A I W G E D A E Q F R P E R W L D K D T L P D A
Aromatic region
1261 AAATACTACGCTGCGTTTGGACTCGGGAGACGATCCGTATTGGTAGACATATGCATTAATGTGCGATGAAGATTGTTGTGGTT
K Y Y A A F G L G R R S C I G R A Y A L M S M K I V V V
Heme-binding region and proximal cysteine residue
1345 CACGTGTTGAGGAGTTTCAGCATCTCCTCGGATGTCAGCAAGATGGAAGTCAGTCTCTCTATCGTGTCTAGGCCTGAAAGAGGA
H V L R R F S I S S D V S K M E V S L S I V S R P E R G
1429 CATTCTATCTCTTGA AACGACGCTAA
H S I L L K R R *

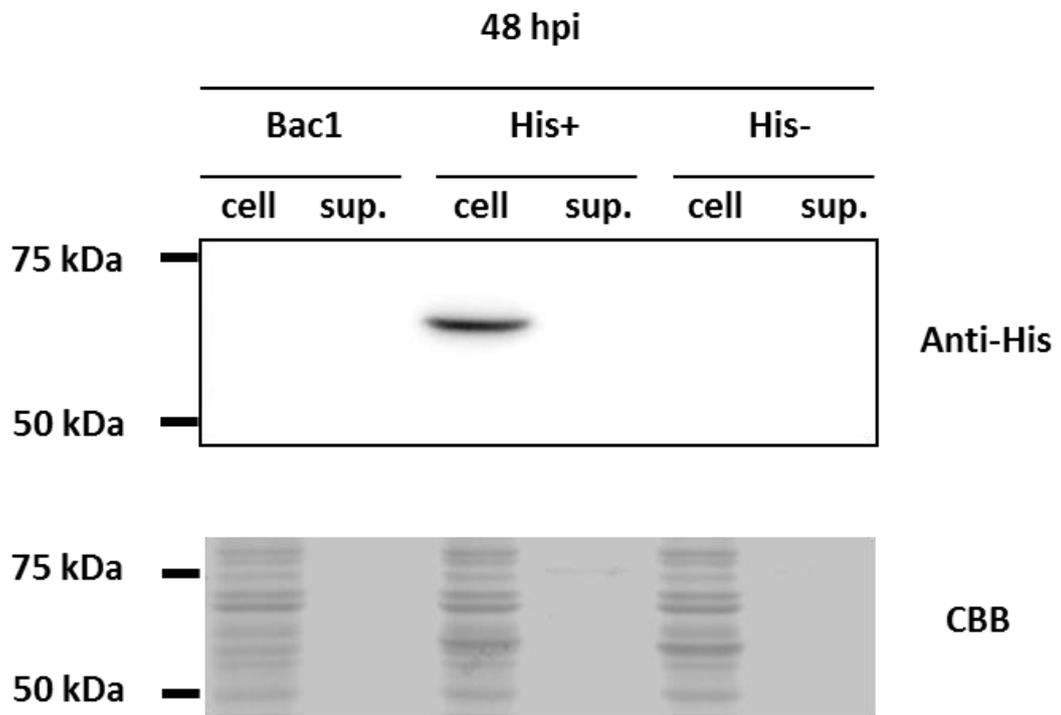
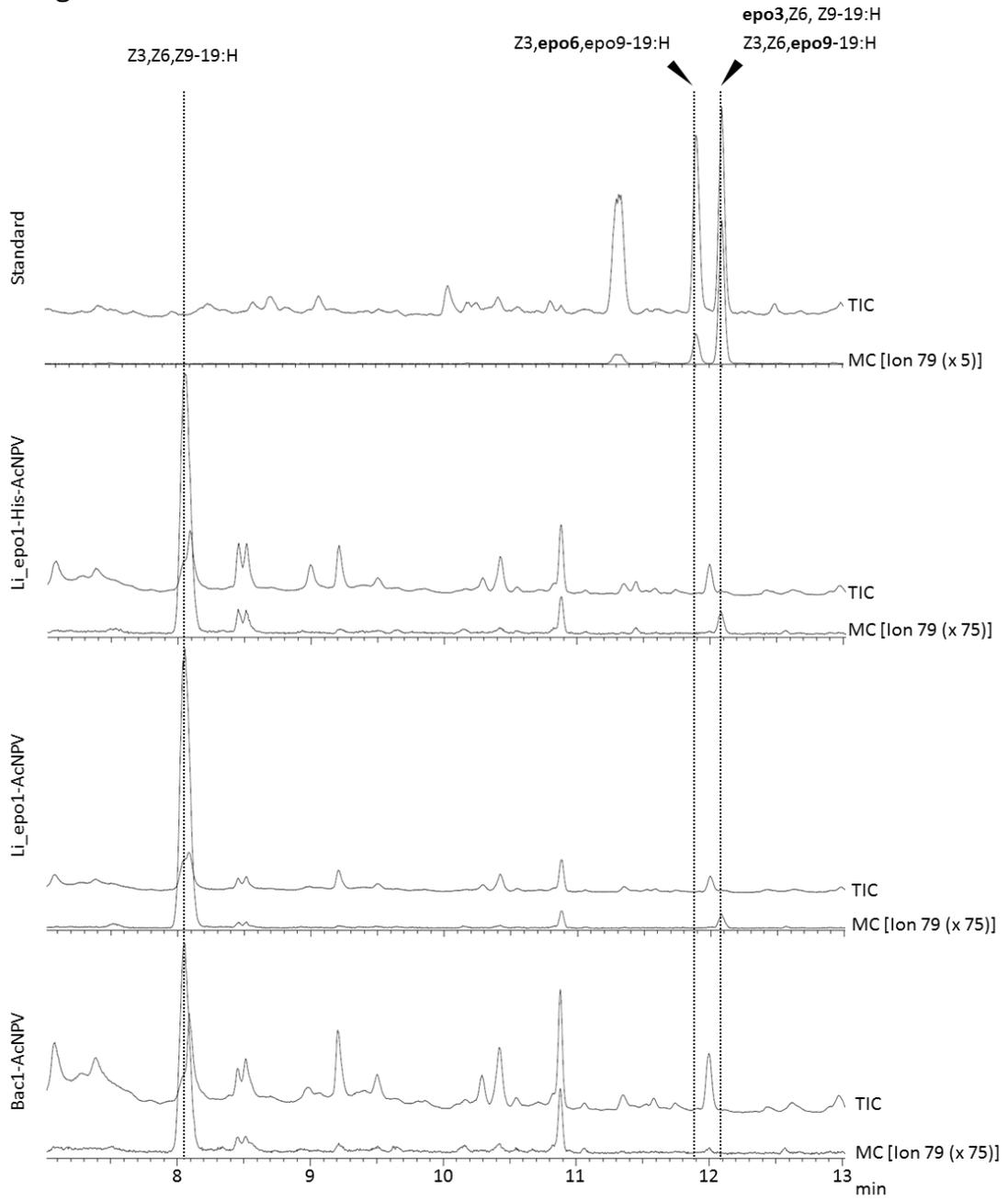
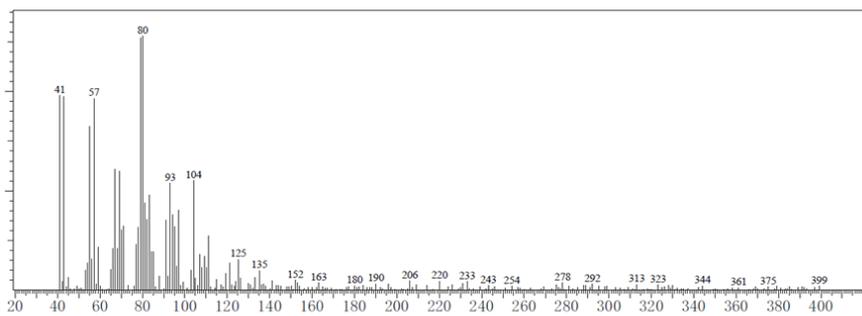
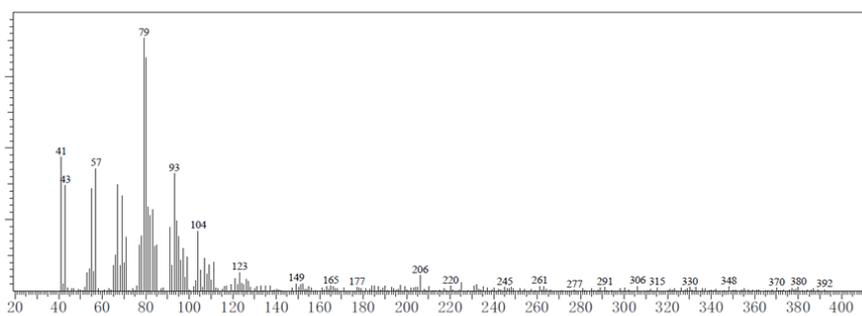


Fig.23A

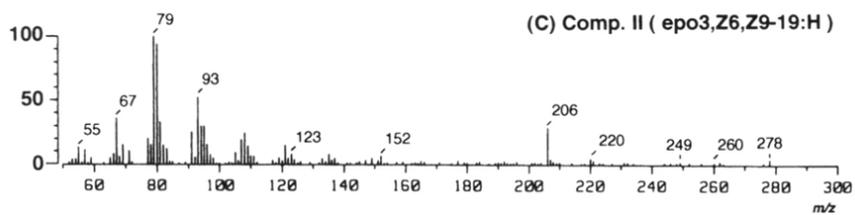




Li_epo1-His-AcNPV



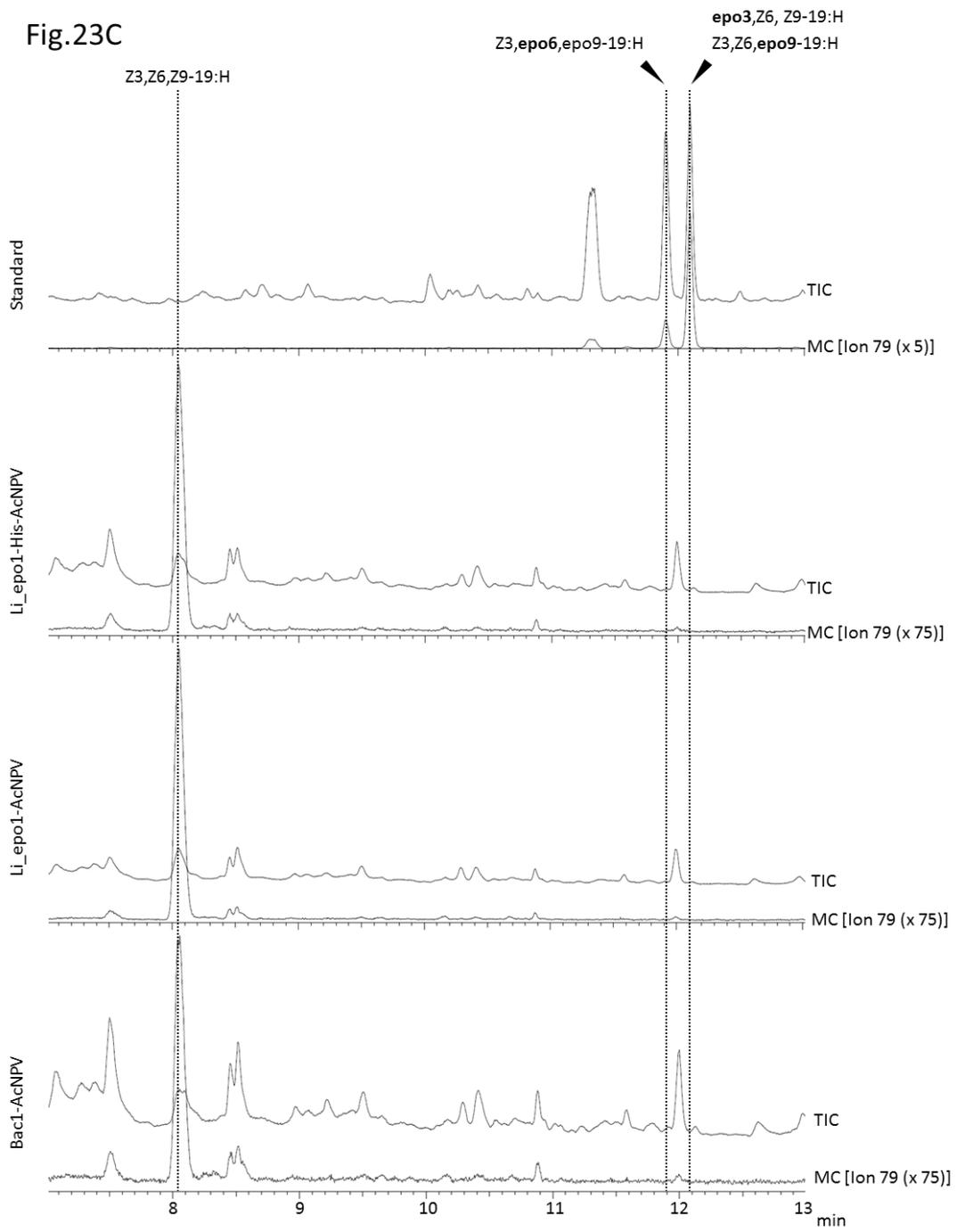
Li_epo1-AcNPV



epo3,Z6,Z9-19:H

Ando et al.,1997

Fig.23C



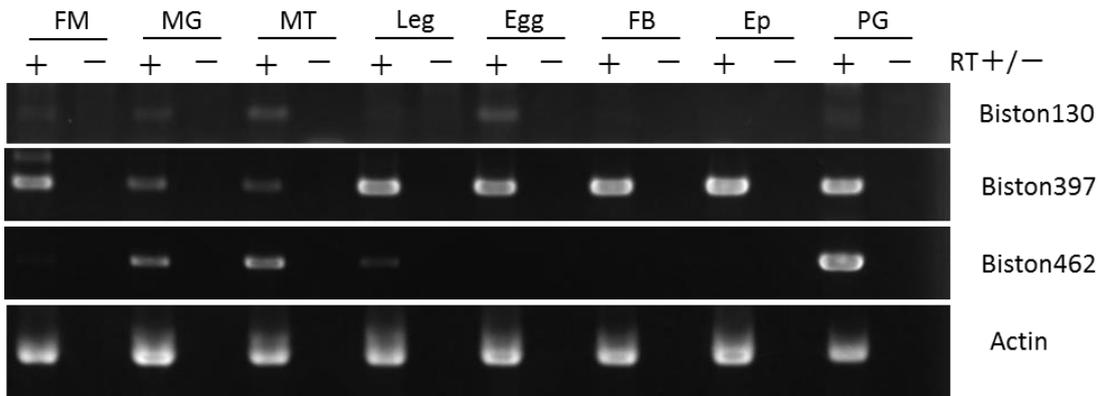


Fig.26

1 **ATG**TACGTGCTAATAATTTTCTTCATTGTGACGTTAGTGTATTATATAAAGTATAGGAAATCCAGAAAGGTTCTATACCGTTG
M Y V L I I F F I V T L V Y Y I K Y R K S R K V L Y Q L

85 TCTGATGTGCTTCCCGACGCGAGGGGACTTCCGATCCTCGGACAATCTCATTGGTTCATTGGAGGGCCTGAAACGTTGTATAAA
S D V L P D A G G L P I L G Q S H W F I G G P E T L Y K

169 AATATACGAACGCTATACAGCAAATTAGAAGAAACTGCAGATTTAACAAAAATTTGGATCGGTCTCAGCTCTACATTGTGCC
N I R T L Y S K L E E T A D L T K I W I G P Q L Y I V P

253 ACCGACTTGGACGATGTGCAAAAGATTTTGGAAAATTTCTACAAAAGACTTTACATACAAATTTCTAAGGACATGGCTTGGA
T D L D D V Q K I L E N C L Q K D F T Y K F L R T W L G

337 AACGGACTTTTTGTGACCTGTGCACTTGTGGAAGAGTCAGCGGCGACTGCTGCTGCCTGTGTTCCACAATCGGCTGGCGGAG
N G L F V A P V H L W K S Q R R L L L P V F H N R L A E

421 GACCACATCGAGGTATTCGGAGAGCAAAGCGCAGTCTGTTAGACCGCTTGGAGGAGCTCGTAGGCGCCGGGAGTTTGACGTC
D H I E V F G E Q S A V L V D R L E E L V G A G E F D V

505 TACGAGTACATCACCTCTTGCATGCTGGACATCGTGTTCGAGACGGCGATGGGTGAGAAGATGGATGTGAGAACAAAGCCGGAT
Y E Y I T S C M L D I V F E T A M G E K M D V Q N K P D

589 ACGCCGTACTTGC GCGCGCAAGACTGTCATGTCCATTATCGGCATGCGTATGTTCAAACCTGGCTGCAGCCCGACCCCGCTG
T P Y L R A R K T V M S I I G M R M F K P W L Q P D P L

673 TTCAACCTCACGTCGACAGCACCGTGCAGAAAGAAAGCATCGATCTCACACATCAGTTACTGACGAGGTAGTTGCAAAAGAAA
F N L T S H S T V Q K E S I D L T H Q F T D E V V A K K

757 AAAATAACAGTTGAAAGTACTAGAGAAGACAAAAAAAAGGCCGAAAGACATATTAGAGCTGCTGCTGGTAAAGACATGAAC
K I T V E S T R E D K K K G R K D I L E L L L G K N M N

841 TTTACCAACGAGCAGCTGCGCGAGCATATCGACTCCATCACCATTTGCCGGCAACGACACCACAGCGCTGGTGATCGCATACGCT
F T N E Q L R E H I D S I T I A G N D T T A L V I A Y A
Distal threonine residue

925 CTCATGATGCTGGGGATACACCAGGAGGAGCAGGACAAGGTTTATCAAGAAATAAAATCTGTGTTCCGGTGACTCTATGAGATCT
L M M L G I H Q E E Q D K V Y Q E I K S V F G D S M R S

1009 CCCACAAAAGAAAGACTTGAACAAATTTGGAATATCTAGAGAGAGTACTGAAGGAAACCATGAGATTATACACTGTTGTGCCAATC
P T K E D L N K L E Y L E R V L K E T M R L Y T V V P I
Region K

1093 ATTGCCAGAGAAACACAACGAACTAAAGCTTTCAACATGCACAATACCCGCGGGCGTAGGTTGCGGCGTGTGCTCCCTTCATG
I A R E T Q H E L K L S T C T I P A G V G C G V L P F M

1177 TTGCACCGTCCAAGAAGGTGTGGGGCCGGACGCGGATGATTTCAAACCGGACAGGTTCTGCGGAGAACTGCGCGAACAGG
L H R S K K V W G P D A D D F K P D R F L P E N C A N R
Aromatic region

1261 CATCCCTGCGCCTACCTGCCGTTACGCTACGGGATCAGGAACGTCATAGGTCGTCACCTTCGGTATGCTTGTCTATGAAAAGCGTC
H P C A Y L P F S Y G I R N C I G R H F G M L A M K S V
Heme-binding region and proximal cysteine residue

1345 ATTGCAACTATGCTCCGCAAGTACGAAGTCACAGCGAAGCCTTTTGTATCGGTTAAAGATAGAAATTTTACTCTTTCTGTCCACA
I A T M L R S Y E V T A K P F D R L K I E I L L F P V T

1429 GGACACCTCATTTTTATAAGAAAACGTAATAAATAA
G H L I F I R K R N K *

