

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 26 年度博士課程進学
戎 焜
指導教員 東京大学教授 石川幸男

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

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の低分子生理活性物質であり、オスを性的に興奮させ交尾行動を引き起こす。ガ類の性フェロモン分子はその化学構造から大きく二つに分類されている。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。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、脱炭酸などの反応を経由して 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化学構造はリノール酸やリノレン酸に由来する 3、6、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ていることが特徴である。更に、この前駆体は血中を介し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前駆体に含まれる 3、6、9 位の炭化水素上の二重結合のうち、1 から 2 か所がエポキシ化され Type II 性フェロモン成分となる。これまでに、複数種のガ類で重水素標識化合物の追跡実験により 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ェロモン腺で起こることが確認されているものの、関与するエポキシ化酵素の配列は知られておらず、その分子の実体は不明であった。

本研究課題では、性フェロモン生合成に関与するエポキシ化酵素の実体を分子レベルで明らかとし、ガの進化と種分化に伴った Type II 性フェロモンの分子の変遷に考察を加えることを目的とした。このために、代表的な酸化酵素のファミリーである P450 に着目し、3 位、6 位、9 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 (9 位エポキシ化酵素、性フェロモン成分 Z3, Z6, epo9-21:H)、ヒトリガ科クワゴマダラヒトリ (9 位エポキシ化酵素、性フェロモン成分 Z3, Z6, epo9-21:H)、シヤクガ科ヨモギエダシヤク (3 位エポキシ化酵素、性フェロモン成分 epo3, Z6, Z9-19:H)そしてシヤクガ科トビモンオオエダシヤク (6 位エポキシ化酵素、性フェロモン成分 Z3, epo6, Z9-19:H) よりフェロモン腺で発現している P450 を、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、候補遺伝子を獲得、その発現量の情報、分子系統解析の結果、そして発現組織の分布の情報より選抜された候補遺伝子の機能解析を行う戦略をとった。

1. 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

事前に配列情報が全くない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、アメリカシロヒトリのフェロモン腺 EST ライブラリーから 288 クローンをシーケンスし、塩基配列情報を獲得した。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質の機能を推定し分類した結果、全 288 クローンの中に酵素は 37 クローン (12.8%) 含まれていた。更に、酵素遺伝子として分類された 37 クローン中に含まれていた 4 クローン (3 種類) の Cytochrome P450 をコードする遺伝子を候補として、P450-1~P450-3 と名づけ、RT-PCR 法により組織ごとの発現を比較した。その結果、P450-1 だけがフェロモン腺で特異的に発現しており、P450-1 を *Hc_epo1* と名付けた。RACE 法により *Hc_epo1* の cDNA 全長塩基配列を決定したところ、全長は 1907 bp、その翻訳領域は 1527 bp、509 アミノ酸残基で 57.9 kDa の分子量のタンパク質をコードしていることがわかった。更に *Hc_epo1* は N 末端に膜アンカードメインを持ち、C 末端側には Cytochrome P450 ファミリーが活性を持つために必須なヘム結合領域 (heme-binding region) と近位の Cys 残基が保存されていることが確認できた。これら配列の特徴から、*Hc_epo1* は Cytochrome P450 ファミリーに属することを確認した。アミノ酸配列による分子系統解析の結果から、*Hc_epo1* は clan4 の CYP341 ファミリーに属していることが示された。

Hc_epo1 の酵素活性を調べるために、配列を pIZT/V5-His ベクターにつなぎ、昆虫細胞 (Sf9) で発現させた。*Hc_epo1* タンパク質の発現は、ウェスタンブロッティング法によりヒスチジン抗体で免疫染色を行い確認した。続いて、発現させたタンパク質の酵素活性を調べるために、Sf9 をシャーレにまき性フェロモン前駆体の Z3, Z6, Z9-21:H を添加し、12 時間培養後、細胞分画と培養液分画をそれぞれへキサソールにより抽出し、GC-MS による質量分析で基質である性フェロモン前駆体の Z3, Z6, Z9-21:H の化学的変化を追跡した。この解析の結果、細胞分画にのみエポキシ化を示唆するピークを認めた。このピークは、アメリカシロヒトリの性フェロモン成分 Z3, Z6, epo9-21:H の標品と同じ保持時間を示し、分子イオンとそのイオン開裂パターンから、前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、本種アメリカシロヒトリの性フェロモンと同じ 9 位にエポキシ環が形成されていることが確認された。

2. クワゴマダラヒトリ (*Lemyra imparilis*) 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

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の保存性を確かめる必要がある。アメリカシロヒトリの 9 位エポキシ化酵素遺伝子 *Hc_epo1* の同定が、ガ類の性フェロモン生合成に関与するエポキシ化酵素としては初めて分子配列が明らかとなったことより、同じヒトリガ科に属し、同じく Z3, Z6, epo9-21:H を性フェロモン主成分とするクワゴマダラヒトリ (*Lemyra imparilis*) から *Hc_epo1* のホモログの単離を行なった。縮重プライマーを用いて得られた PCR 増幅産物を、続く RT-PCR 法を利用して他組織との発現量を比較した結果、*Hc_epo1* と同じくフェロモン腺特異的な発現を示した。このため、この遺伝子を *Li_epo1* と名付け、RACE 法により全長塩基配列情報を取得した。*Li_epo1* の全長塩基配列 1839 bp のうち、翻訳領域は 1530 bp であり、演繹アミノ酸配列は 510 アミノ酸残基からなる 57.9 kDa の分子量のタンパク質をコードしていた。*Hc_epo1* アミノ酸配列と

の相同性は 88.5%であり、分子系統解析より Li_epo1 は Hc_epo1 と同じ CYP341 ファミリーに属することがわかった。

Li_epo1 の酵素活性は、バキュロウイルス-昆虫細胞系により Li_epo1 タンパク質を発現させ基質である性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-21:H を添加し、その化学的変化を GC-MS で評価した。Li_epo1 タンパク質の発現は、ウェスタンブロット法によりヒスチジンタグを含めて 58.9 kDa のバンドを膜上に確認し、同じウイルスが感染した細胞画分よりエポキシ化を示唆するピークを確認した。このピークは、クワゴマダラヒトリの性フェロモン主成分である Z3, Z6, epo9-21:H の標品と同じ保持時間を示し、分子イオンとそのイオン開裂パターンから、前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、性フェロモンと同じ 9 位にエポキシ環が形成されていることが確認された。

3. ヨモギエダシャク (*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

Hc_epo1 及び *Li_epo1* の属する CYP341 ファミリーに属する塩基配列よりデザインした縮重プライマーを用いた PCR では候補遺伝子の増幅ができなかった。このため、本種のフェロモン腺で発現する RNA の大規模シーケンスを行い、フェロモン腺で発現する遺伝子を網羅的に解析した。大規模シーケンスより得られた膨大な配列情報から、(1) P450 ファミリーに属し、(2) フェロモン腺での発現量が他組織より多い、との二つの条件でエポキシ化酵素の候補遺伝子を絞り込んだ。その結果、まず P450 とアノテートされた comp17297、comp4083、comp14868、comp16213、comp14198、comp17427、comp17691、comp17936、comp3817、comp9223 の 10 遺伝子を候補として選抜し、続く RT-PCR 法による組織ごとの発現を比較した結果、comp17297 と comp17936 がフェロモン腺で特異的に発現していた。続く、分子系統解析により comp17297 は CYP340 ファミリーに、comp17936 は CYP4AU ファミリーにそれぞれ分類されたため、comp17297 遺伝子を *As_epo1* と名づけ、優先的に機能解析を行った。*As_epo1* の翻訳領域は 1455 bp であり、演繹アミノ酸配列は、485 アミノ酸残基で 55.7 kDa の分子量のタンパク質をコードしていた。*As_epo1* の酵素活性は、*Li_epo1* と同じくバキュロウイルス発現システムを用いてタンパク質を昆虫細胞に発現させ酵素活性を評価した。分析の結果、細胞画分の抽出物にのみ、基質である性フェロモン前駆体 Z3, Z6, Z9-19:H の 3 位エポキシ化を示唆する化合物のピークを認めた。このピークの保持時間は、ヨモギエダシャクの性フェロモン成分である epo3, Z6, Z9-19:H の標品と一致し、分子イオンと診断イオンから前駆体の 3 か所ある二重結合のうち、性フェロモンと同じ 3 位にエポキシ環が形成されていることが確認された。活性試験の結果と合わせて、シャクガ科ヨモギエダシャクの 3 位エポキシ化酵素 *As_epo1* は先述のヒトリガ科 2 種より同定した 9 位エポキシ化酵素とファミリーが異なることが分かった。

4. トビモンオオエダシャク (*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

本種から 6 位エポキシ化酵素遺伝子を単離するために、ヨモギエダシャクの 3 位エポキシ化酵素の際と同様にフェロモン腺 RNA 大規模シーケンスを行い、スクリーニングも 3 位エポキシ化酵素に倣い、P450 であることや分子系統樹上の位置と組織間の発現量の比較結果を加味して候補遺伝子を選抜した。その結果、P450 とアノテートされた Biston130、Biston397、Biston462 の 3 遺伝子が候補として選抜された。選抜した遺伝子を RT-PCR 法により組織ごとの発現を比較した結果、Biston462 がフェロモン腺で他組織より高発現していたため、この遺伝子を *Br_epo1* と名づけた。*Br_epo1* の翻訳領域は 1464 bp であり、演繹アミノ酸配列を解析したところ、488 アミノ酸残基で 56.2 kDa の分子量のタンパク質をコードしていることがわ

かった。分子系統解析の結果、Br_epo1 は 9 位エポキシ化酵素や 3 位エポキシ化酵素とも異なり、clan4 の CYP4AU ファミリーに属することがわかったが、他の候補遺伝子が見つからなかったため Br_epo1 がコードする酵素の活性を確かめた。

Br_epo1 の酵素活性を先行して行った 3 位と 9 位のエポキシ化酵素の活性試験と同様の手法で昆虫細胞で発現させ、Br_epo1 タンパク質の発現をウェスタンブロッティング法により His 抗体で免疫染色を行い確認した。続いて、トビモンオオエダシヤクの性フェロモン前駆体である Z3, Z6, Z9-19:H を基質として培養細胞に添加した。しかし、分析の結果、エポキシ化を示唆するピークは細胞画分からも培地画分からも検出されなかった。このため、現在は酵素活性を評価する実験条件を模索しながら、再現性を確認中である。

5. まとめ

本研究ではガ類の Type II 性フェロモン生合成に関与する 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、(2) P450 の clan4 に属し、(3) *in vivo* の先行研究の塗布実験結果と同じく、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。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と、本研究で明らかとした 4 つの遺伝子の分子系統関係を調べた結果は全て clan4 に分類されるものの、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し、異なるファミリーに分類されることがわかった(右図)。clan4 に属する遺伝子がコードする酵素は、解毒に関わるものが多く含まれると言われるが、実際、構築した系統樹を構成する他昆虫種の遺伝子はゲノムシーケンス由来で、具体的な機能は未知であると言っている。今後は、本研究課題で明らかとした機能解析を伴った配列を足掛かりとし、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。

