

審査の結果の要旨

氏名 戎 煜

本論文は、ガ類の Type II 性フェロモン生合成に関与する酵素遺伝子の探索・同定に関する研究をまとめたものである。

ガ類の性フェロモンは化学構造から、炭素骨格の末端に官能基を持つ Type I と末端に官能基を持たない Type II の 2 つに大きく分類されている。Type II 性フェロモン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フェロモンの前駆体である炭化水素が合成される。この前駆体は血液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の 3, 6, 9 位の二重結合のうち、1~2 か所がエポキシ化され Type II 性フェロモンの成分となる。この性フェロモン生合成の最終過程に関与するエポキシ化酵素の分子の実体は不明であった。本研究では、代表的な酸化酵素である P450 に着目し、3 位、6 位、9 位にエポキシ環を導入するエポキシ化酵素遺伝子の候補を、ヒトリガ科アメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*)、ヒトリガ科クワゴマダラヒトリ (*Lemyra imparilis*)、シャクガ科ヨモギエダシャク (*Ascotis selenaria*)、そしてシャクガ科トビモンオオエダシャク (*Biston robustus*) よりクローニングし、その機能解析を行っている。

1. アメリカシロヒトリの性フェロモン生合成に関与する 9 位エポキシ化酵素遺伝子の機能解析

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 クローンをシークエンスし、塩基配列情報を獲得した。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た結果、全 288 クローンの中に 3 種類 (4 クローン) の Cytochrome P450 をコードする遺伝子 P450-1~P450-3 が含まれていた。RT-PCR により組織ごとの発現を比較した結果、P450-1 だけがフェロモン腺特異的に発現しており、P450-1 を Hc_epo1 と名づけた。分子系統解析の結果から、Hc_epo1 は P450 の CYP341 ファミリーに属していることが示された。Hc_epo1 を発現させた昆虫細胞 Sf9 の培養系に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、細胞画分と培地画分をそれぞれヘキサンにより抽出し、GC-MS による質量分析で Z3,Z6,Z9-21:H の化学的変化を追跡した。この解析の結果、細胞画分にのみ Z3,Z6,epo9-21:H の標品と同じ保持時間とイオン開裂パターンを示すピークが得られたことから、Hc_epo1 に 9 位エポキシ化活性があることが証明された。

2. クワゴマダラヒトリの性フェロモン生合成に関与する 9 位エポキシ化酵素遺伝子の機能解析

アメリカシロヒトリと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から Hc_epo1 のホモログ Li_epo1 の単離を行なった。Lc_epo1 と Hc_epo1 アミノ酸配列の相同性は 88.5% であり、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 で追跡することにより評価した。ウイルスが感染した細胞画分から Z3,Z6,epo9-21:H のピークが確認されたことから、Li_epo1 に 9 位エポキシ化活性があることが証明された。

3. ヨモギエダシヤクの性フェロモン生合成に関与する 3 位エポキシ化酵素遺伝子の機能解析

ヨモギエダシヤクのフェロモン腺を用いて次世代 RNA シークエンス (RNA-seq) 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。RNA-seq より得られた配列情報から、(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、という 2 条件でエポキシ化酵素の候補遺伝子を絞り込んだ。これらの候補の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が、フェロモン腺での発現量が約 300 倍高い comp17297 遺伝子を As_epo1 と名づけ、機能解析を行った。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 位エポキシ化を示す化合物のピークを認めた。これにより、As_epo1 が 3 位エポキシ化活性をもつことが証明された。As_epo1 はヒトリガ科 2 種より同定した 9 位エポキシ化酵素とは異なり、CYP340 ファミリーに属していた。

4. トビモンオオエダシヤクの性フェロモン生合成に関与する 6 位エポキシ化酵素遺伝子の機能解析

トビモンオオエダシヤクのフェロモン腺の RNA-seq を行い、P450 であることや mRNA 発現量、発現の組織特異性に基づいて選抜した結果、Biston462 が 6 位エポキシ化酵素遺伝子の候補として残り、これを Br_epo1 と名づけた。分子系統解析の結果、Br_epo1 は 9 位エポキシ化酵素、3 位エポキシ化酵素のいずれとも異なり、CYP4AU ファミリーに属することがわかった。昆虫細胞で Br_epo1 を発現させ、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その変化を追跡した。しかし、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。Br_epo1 のエポキシ化酵素活性については証明に至っていない。

以上、本研究はガ類の 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候補のクローニング及び機能解析を試み、このうち 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) の分子の実体を明らかにしたものである。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。