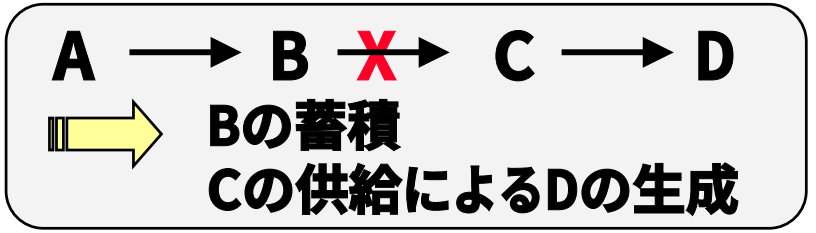
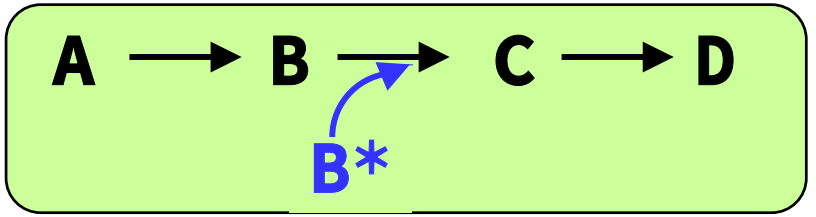
第4章　蛾類性フェロモンの生合成とその制御機構

(A) 生合成の研究法





A-1) 実験法

1. 突然変異株 (種) の利用

2. 標識前駆体の投与実験

a) 安定同位元素　　^{2}H (D), ^{13}C

分析方法：　GC-MS , NMR

フェロモン成分：超微量物質　→　問題点

多量の前駆体の投与　→　本来の生合成系の撹乱の可能性

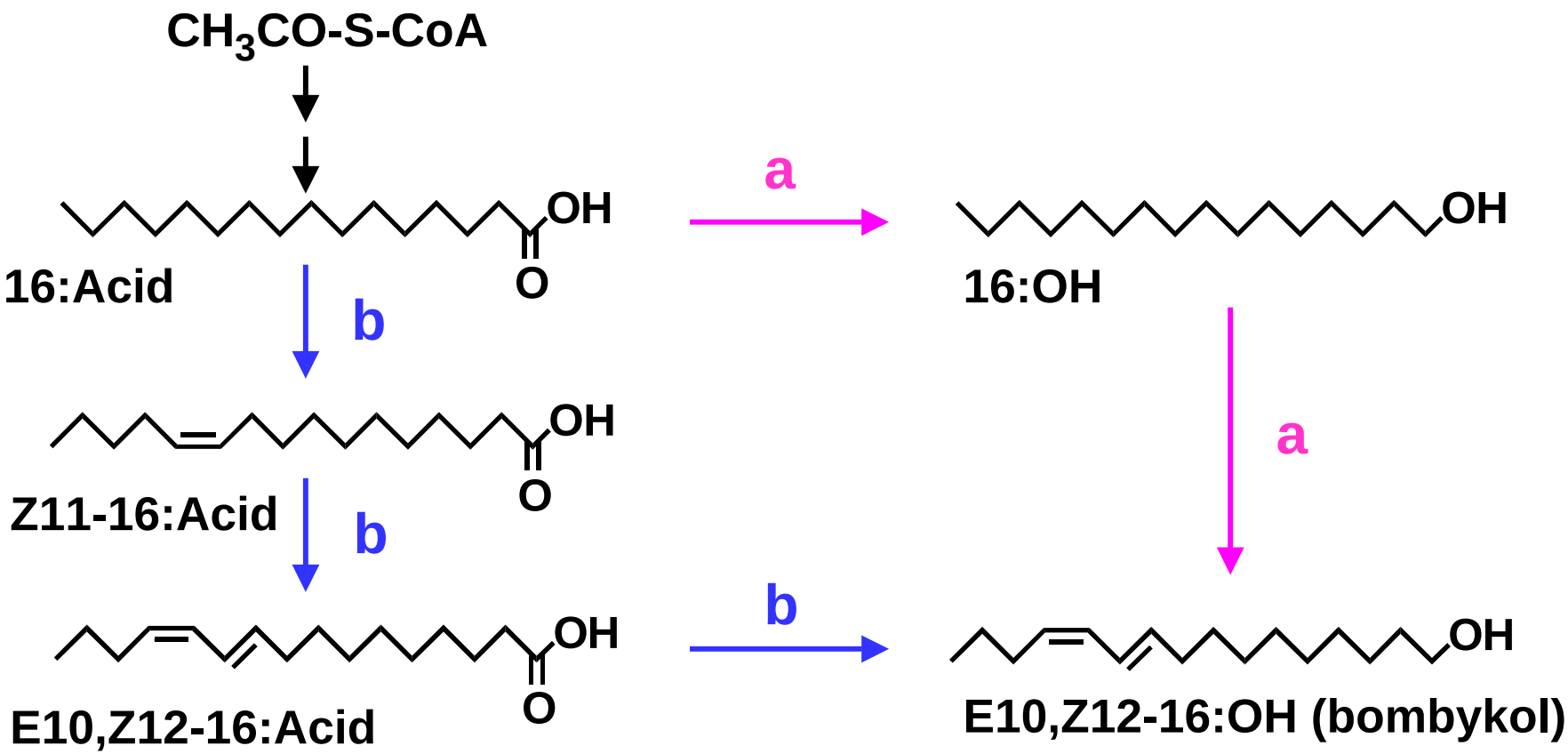
b) 放射性同位元素　^{3}H (T), ^{14}C, ^{11}C

分析方法：　ｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾌｨｰ　→　化学構造 OK？

→　問題点

個体：再結晶　　液体：クロマトグラフィー

A-2) Bombykol (カイコの性フェロモン) の生合成経路 ①

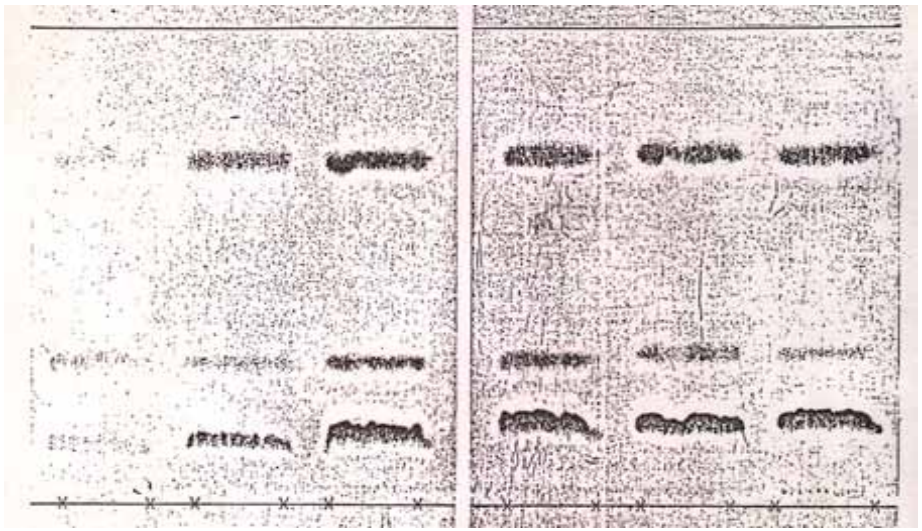


a Inoue & Hamamura, 1972. *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* 46, 645

b Yamaoka *et al.*, 1984. *Experientia,* 48, 80
Bjostad & Roelofs, 1984. *Insect Biochem.*, 14: 275

A-3) パルミチン酸 (16:Acid) の変換

TLC (ｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾌｨｰ)



solvent: benzene + ethyl acetate (4:1)

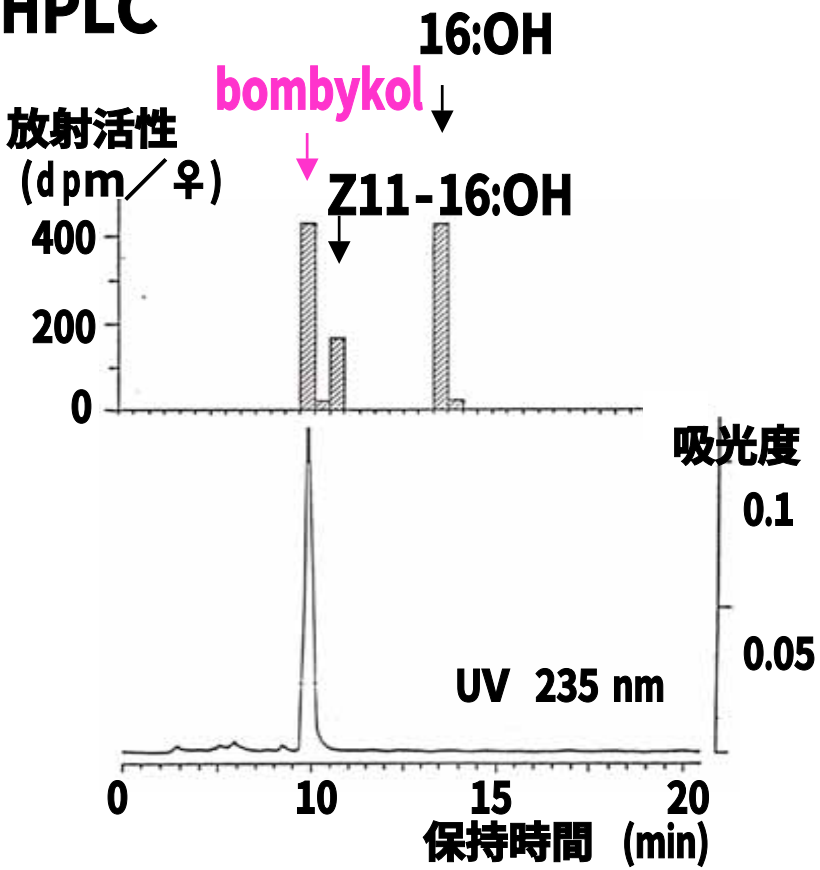
i [1-^{14}C]12:Acid
ii [1-^{14}C]14:Acid
iii [1-^{14}C]16:Acid
iv [16-^{14}C]16:Acid
v [1-^{14}C]18:Acid
vi [18-^{14}C]18:Acid

A: triacylglycerols

B: alcohols

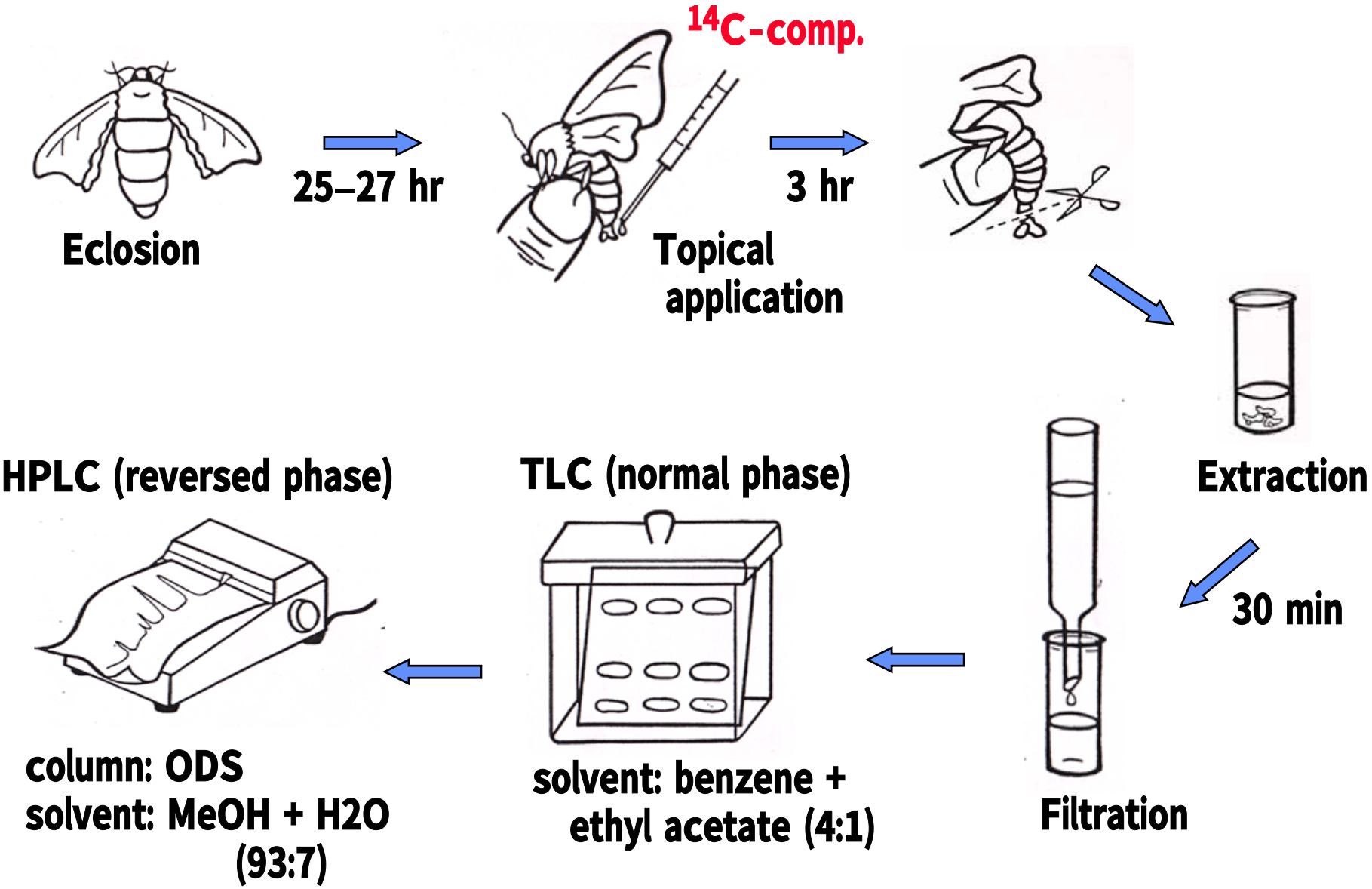
C: acids (recovery)

HPLC

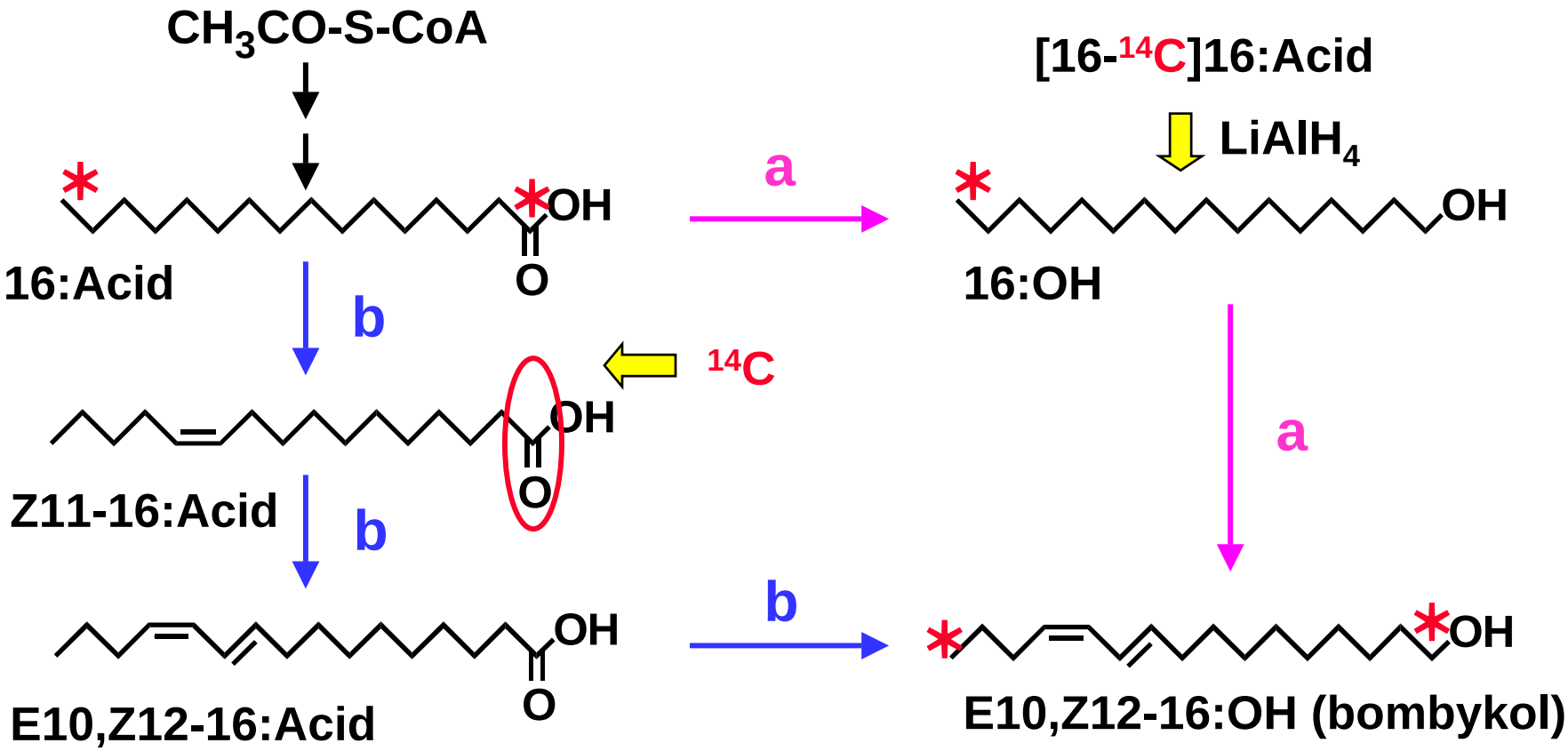


column: ODS (8 mm X 15 cm)
solvent: MeOH + H_2O (93:7)

A-4) 取込み実験法


Eclosion
25–27 hr
^{14}C-comp.
Topical application
3 hr
Extraction
30 min
Filtration
TLC (normal phase)
solvent: benzene + ethyl acetate (4:1)
HPLC (reversed phase)
column: ODS
solvent: MeOH + H2O (93:7)

A-2) Bombykol (カイコの性フェロモン) の生合成経路　②



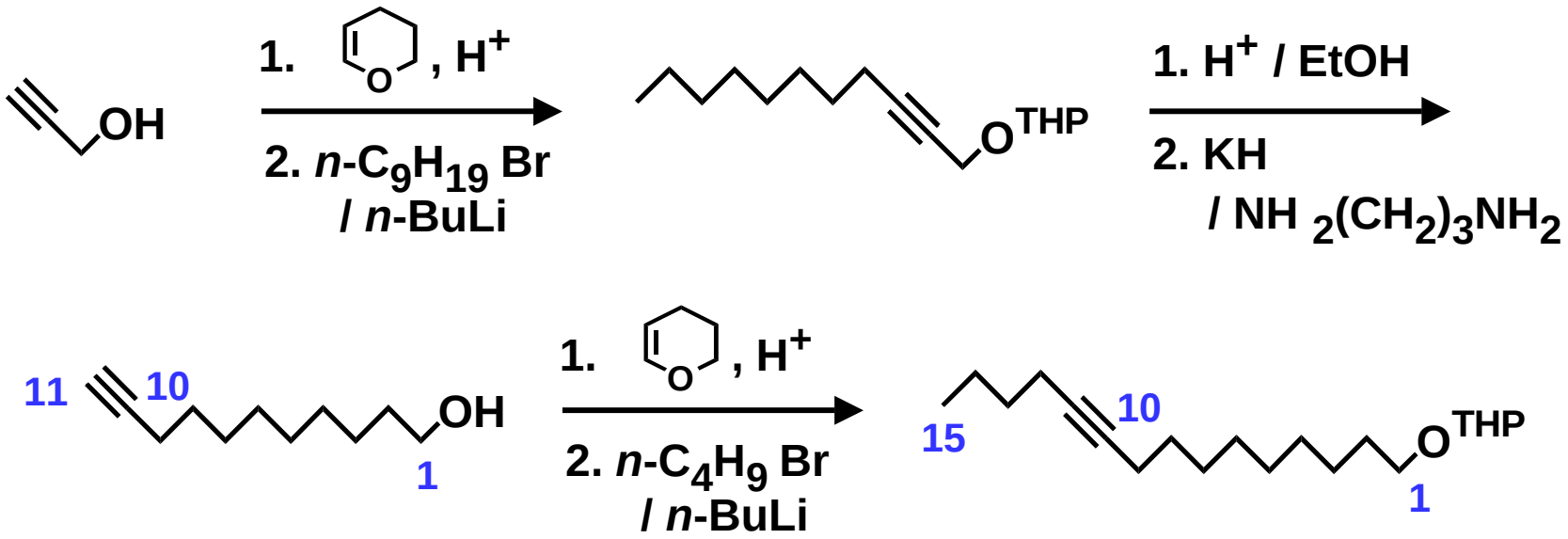
a Inoue & Hamamura, 1972. *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* 46, 645

b Yamaoka *et al.*, 1984. *Experientia,* 48, 80
Bjostad & Roelofs, 1984. *Insect Biochem.*, 14: 275

A-5) 標識化合物の合成

鉄則： アイソトープの導入は最終段階

Synthesis of [1-^{14}C](*Z*)-11-hexadecenoic acid

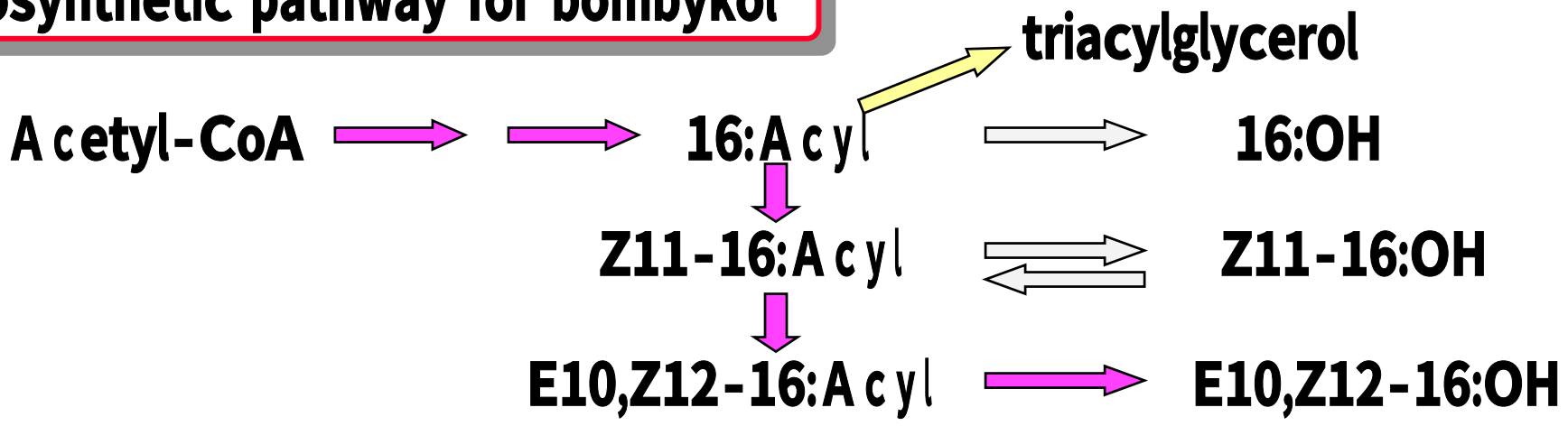


A-6) 取込み量の比較

	^{14}C-Labeled compound	Incorporatin ratio (%)
[a]	12:Acid	0.2
	14:Acid	0.1
	16:Acid	1.7
	18:Acid	0.1
[b]	16:OH	0.2
	Z11-16:OH	0.9
	Z11-16:Acid	3.3

	^{14}C-Labeled compound	Incorporatin ratio (%)
[c]	Z10-16:Acid	0.3
	E10-16:Acid	0.4
	E11-16:Acid	0.2
	Z12-16:Acid	0.4
	E12-16:Acid	0.5

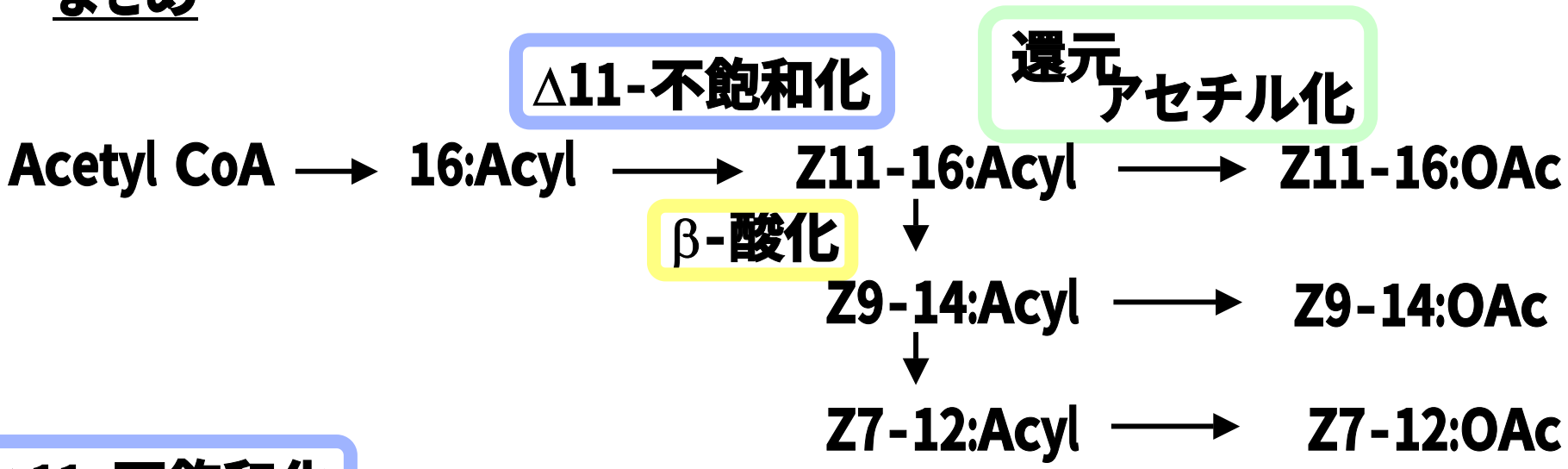
Biosynthetic pathway for bombykol



(B) 蛾類性フェロモン生合成

B-1) Type I のフェロモン ①

まとめ



Δ11-不飽和化

イラクサギンウワバにて遺伝子がクローニング

酵母内で発現 (Knipple et al., *ProNAS USA*, 95: 15287, 1998)

β-酸化酵素 ？ **還元、アセチル化酵素** 低い基質特異性

課題： 不飽和化の位置特異性のメカニズム、混合比の制御

(B-1) Type Ⅰのフェロモン ③

二重結合位置

(A) Monoene compounds

Chain length	Double bond position															
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
C-10				●		●			—	—	—	—	—	—	—	—
C-12		○		●		●	○	●		○	—	—	—	—	—	—
C-14				○		●	○	●		●	○		—	—	—	—
C-16						○		●	○	●					—	—
C-18										●		○				

(B) Diene compounds

Chain length	Double bond position														
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C-12				⌒		⌒		⌒			—	—	—	—	—
C-14			⌒					⌒		⌒			—	—	—
C-16			⌒			⌒		⌒		⌒					—
C-18		⌒								⌒					

不飽和化酵素

遺伝子の単離（一覧、その1）

Z9	← 16	*Helicoverpa zea*	(Noct.)	Rosenfield *et al*., 2001
		Helicoverpa assulta	(Noct.)	Jeong *et al*., 2003
	← E11-14	*Spodopteta littoralis*	(Noct.)	Rosenfield *et al*., 2004
Z10	← 14	*Planotortrix octo*	(Tort.)	Hao *et al*., 2002(a)
Z11	← 16	*Trichoplusia ni*	(Noct.)	Knipple *et al*., 2001
		H. zea	(Noct.)	Rosenfield *et al*., 2001
		H. assulta	(Noct.)	Jeong *et al*., 2003
		Bombyx mori	(Bomb.)	Moto *et al*., 2004
		Manduca sexta	(Sphi.)	Matouskova *et al*., 2007
E11	←14,16	*Epiphyas postvittana*	(Tort.)	Liu *et al*., 2002
	← E9-14	*E. postvittana*	(Tort.)	Liu *et al*., 2002
	← 14	*Choristoneura parallela*	(Tort.)	Liu et al., 2004

不飽和化酵素

遺伝子の単離　(一覧、その2)

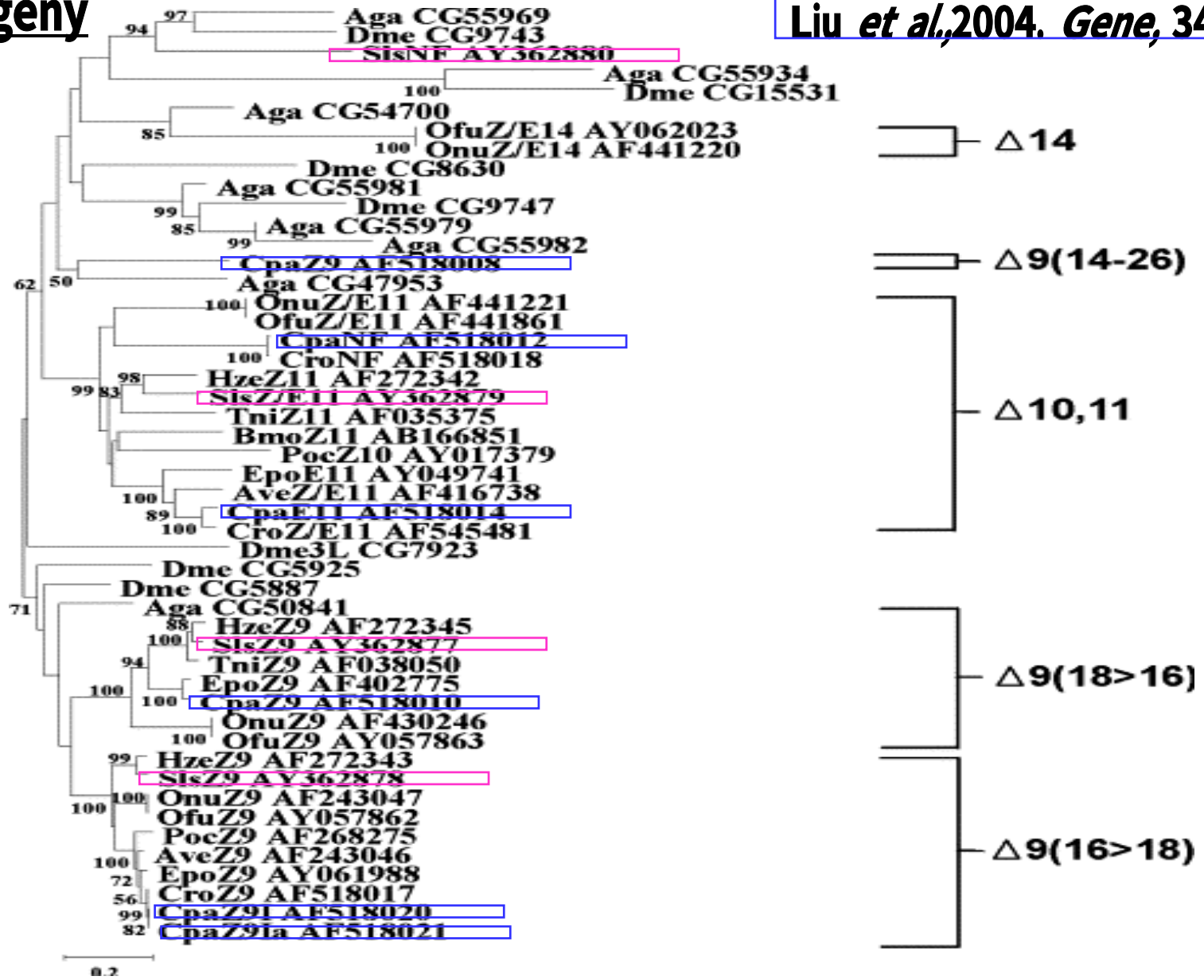
Z/E11	←14	*Argyrotaenia velutinana*	(Tort.)	Liu *et al*., 2002
		Choristoneura rosaceana	(Tort.)	Hao *et al*., 2002(b)
		Ostrinia furnacalis	(Pyra.)	Roelofs *et al*., 2002
		Ostrinia nubilalis	(Pyra.)	Roelofs *et al*., 2002
		S. littoralis	(Noct.)	Rodriguez *et al*., 2004
		Ostrinia scapulalis	(Pyra.)	Fukuzawa *et al*., 2006
Z/E14	←16	*O. furnacalis*	(Pyra.)	Roelofs *et al*., 2002
		O. nubilalis	(Pyra.)	Roelofs *et al*., 2002
E10,Z12	←16	*B. mori*	(Bomb.)	Moto *et al*., 2004
	← Z11-16	*M. sexta*	(Sphi.)	Matouskova *et al*., 2007

不飽和化酵素

Phylogeny

Rodriguez *et al.*, 2004. *IBMB* 34: 1315

Liu *et al.*,2004. *Gene*, 342: 303.



B-1) Type Ⅰ のフェロモン ②

ウワバ類 のフェロモン

Δ11 18:Acyl
Z11-18
Δ 9 16:Acyl
Z9-16
Z7-14
イネキン
Z5-12
Z3-10

Δ11 16:Acyl
Z11-16
Z9-14
キクギン
ギンモンシロ
タマナギン
Δ5
Z7-12
E5,Z7-12
キクキン
ネッタイキクキン
Z5-10
ウリキン
エゾギクキン

Δ 13 16:Acyl
Z13-16
Δ11 14:Acyl
Z11-14
イラクサギン
ガマギン
イチジクキン
ミツモンキン
Z9-12
Z7-10
エゾヒサゴキン

ω7-化合物

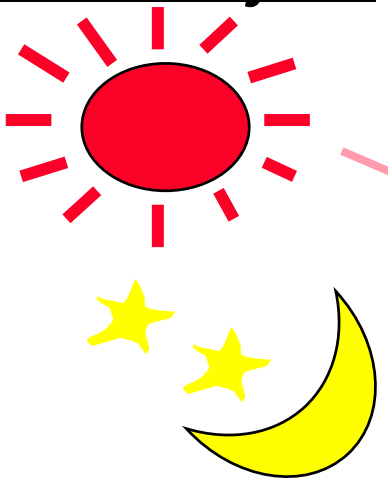
ω5-化合物

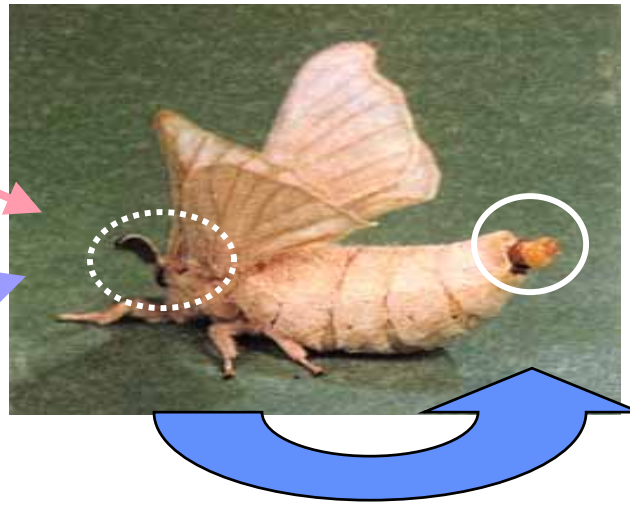
ω3-化合物

(B) 生合成の制御機構

B-1) Introduction ①

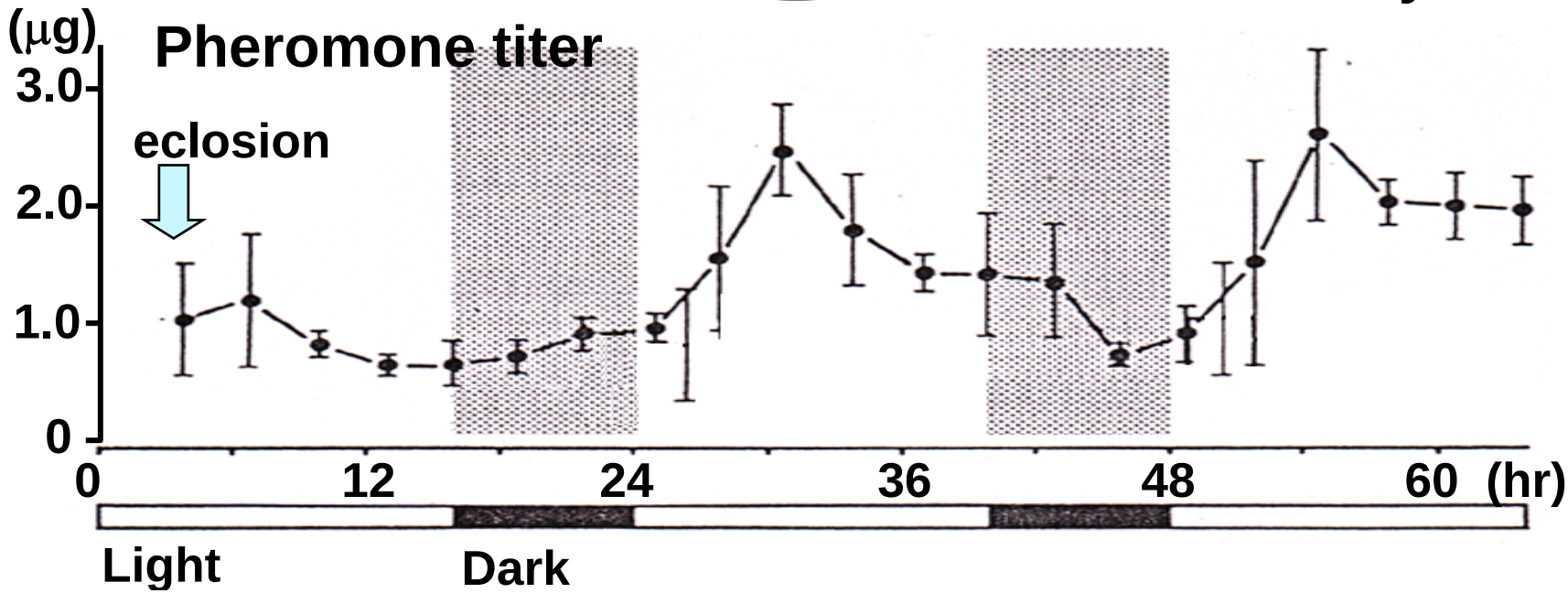
Circadian rhythm





pheromone biosynthesis

nerve system ?
or
endocrine system ?



B-1) Introduction ②

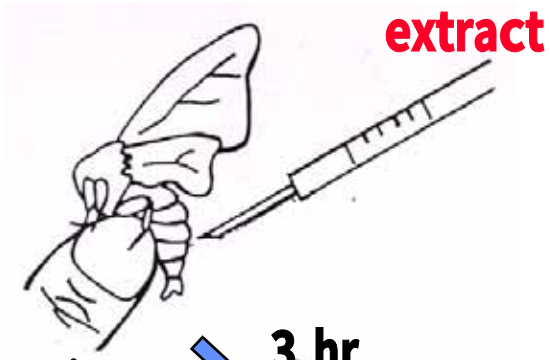
断頭実験

Eclosion

4 hr

Decapitation

24 hr



head extract

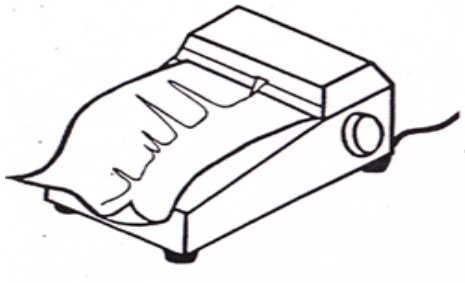
Injection

3 hr

Extraction

30 min

Filtration



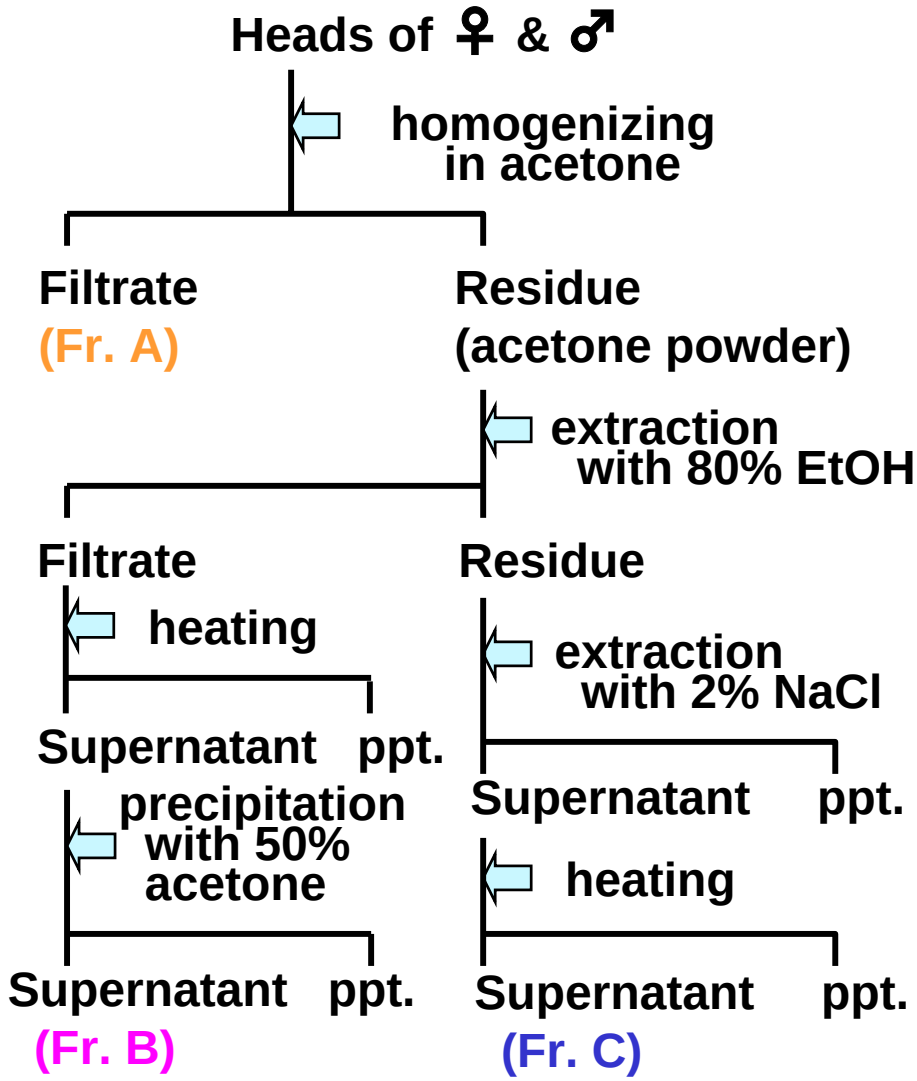
HPLC (normal phase)

column: NO_2
solvent: *n*-hexane + IPA (98:2)
UV detector: 235 nm

B-1) Introduction ③

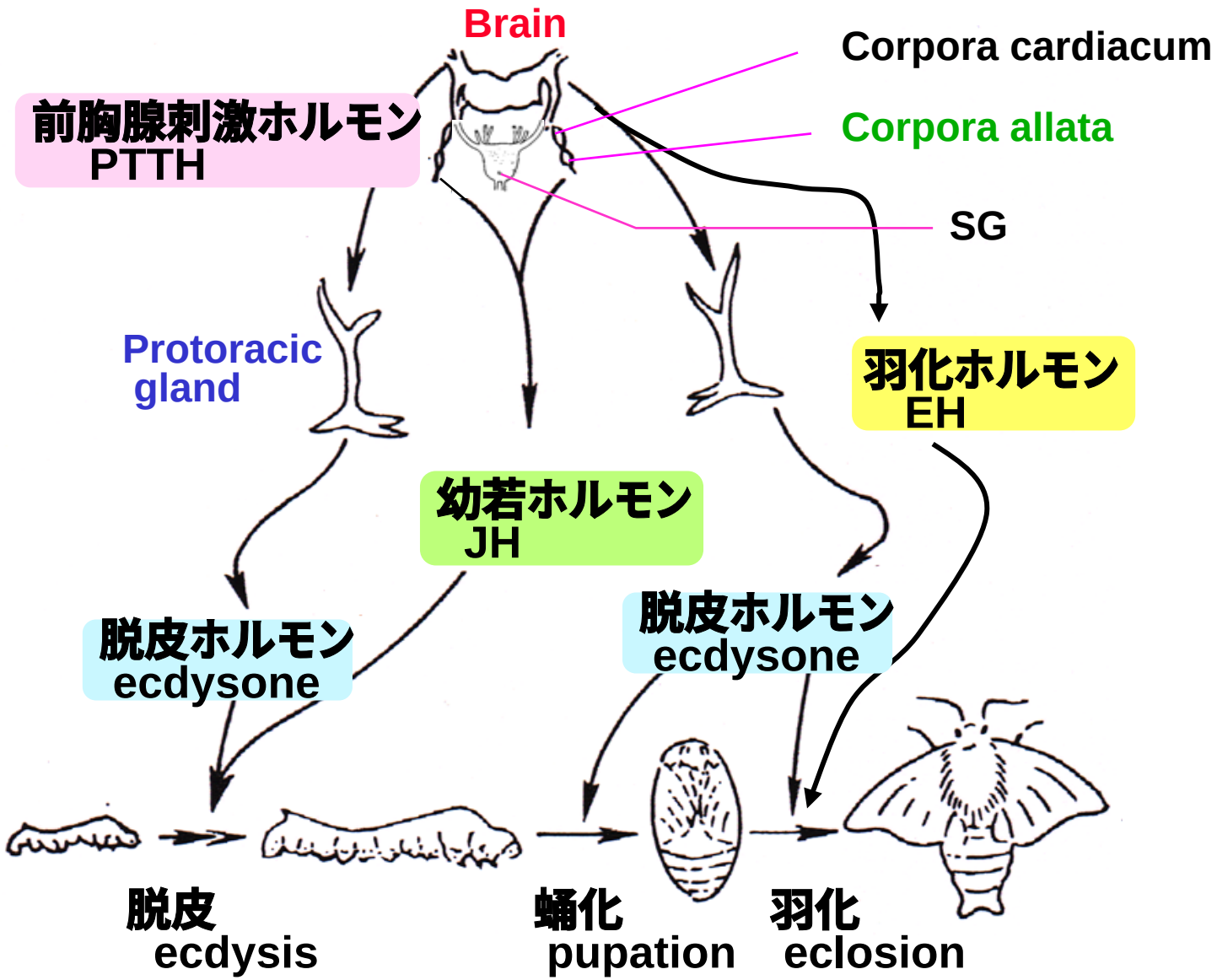
カイコでの予備実験

Treatment	Bombykol (μg/♀)
Exp. 1)	
None	1.31 ± 0.05
Decapitated	
+ Buffer	0.00 ± 0.00
+ ♀ heads	0.19 ± 0.07
Exp. 2)	
None	0.87 ± 0.20
Decapitated	
+ Buffer	0.00 ± 0.00
+ ♂ heads	0.15 ± 0.05



B-1) Introduction ④

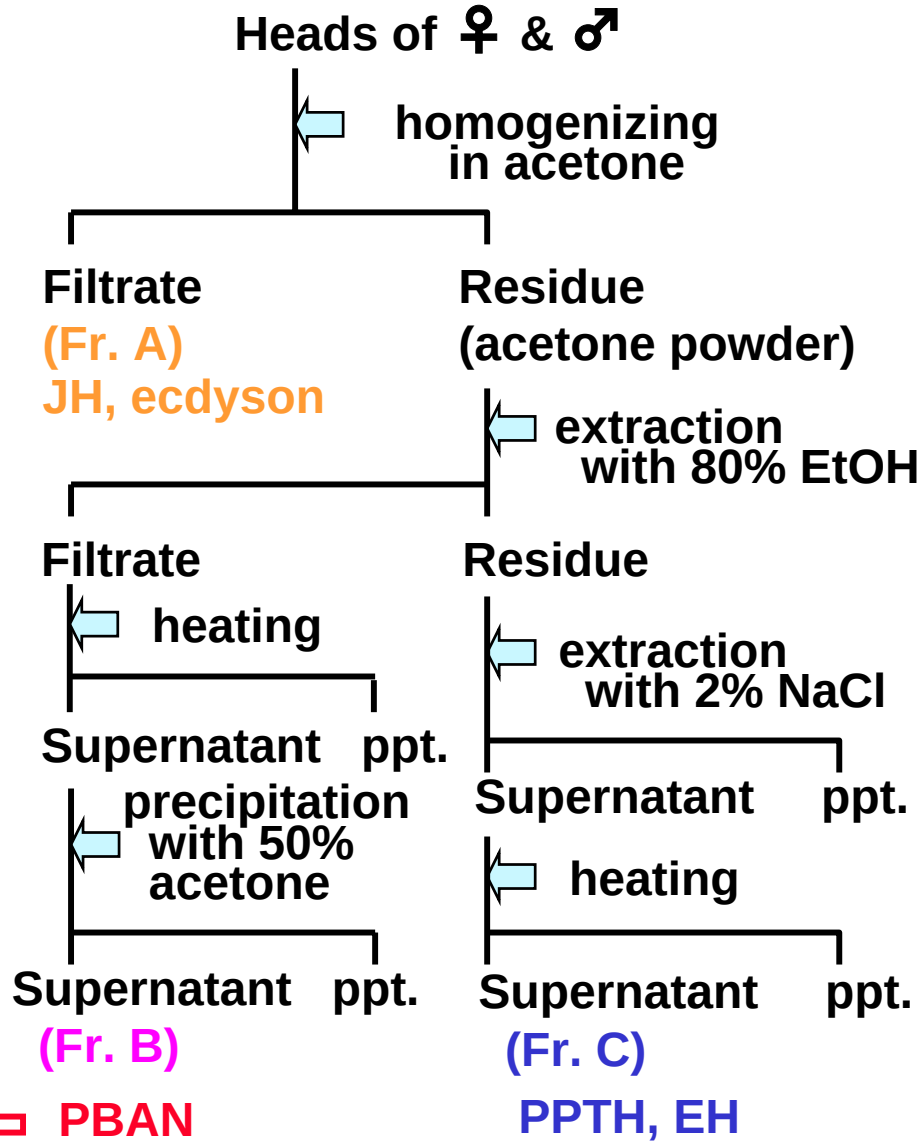
昆虫のホルモン



B-1) Introduction ③

カイコでの予備実験

Treatment	Bombykol (μg/♀)
Exp. 1)	
None	1.31 ± 0.05
Decapitated	
+ Buffer	0.00 ± 0.00
+ ♀ heads	0.19 ± 0.07
Exp. 2)	
None	0.87 ± 0.20
Decapitated	
+ Buffer	0.00 ± 0.00
+ ♂ heads	0.15 ± 0.05
Exp. 3)	
None	0.69 ± 0.16
Decapitated	
+ Buffer	0.00 ± 0.00
+ Fr. A	0.06 ± 0.04
+ Fr. B	0.24 ± 0.06
+ Fr. C	0.03 ± 0.02



B-2) PBANの化学構造 ①

aetone powder (75,000 ♂, 560 g)

↓ 80% EtOH extraction

↓ evaporation

aq. solution

↓ heating

↓ + acetone

supernatant

charcoal column

water 25%EtOH 80%EtOH 25%Py

Sephadex G-50 column

0.2 M $AcNH_4$ + 2% n-BuOH

(600 ml)

↓ ultradiltration

Amicon YM-2 membrane

(50 ml)

↓ QAE Sephadex column

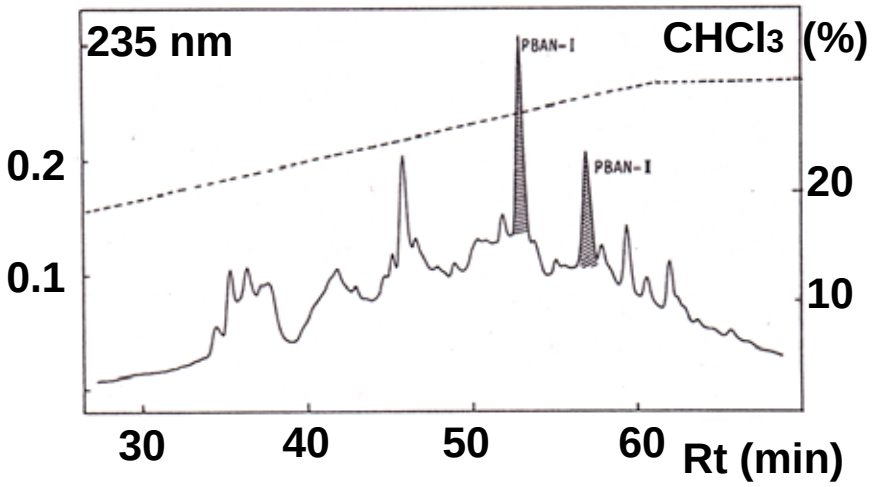
0.02M Tris-HCl + 0-0.5M NaCl

0.3 M NaCl fraction

↓ HPLC

1. Develosil C8
2. VP-318
3. Vydac C18

1.5 μg (4700 unit ⇨ 6% yield)



B-2） PBANの化学構造 ②

FXPRL-amide

	1				5					10						15			
Hez-PBAN	H-Leu	Ser	Asp	Asp	Met	Pro	Ala	Thr	Pro	Ala	Asp	Gln	Glu	Met	Tyr	Arg	Gln-		
Bom-PBAN I	H-Leu	Ser	Glu	Asp	Met	Pro	Ala	Thr	Pro	Ala	Asp	Gln	Glu	Met	Tyr	Gln	Pro-		
Bom-PBAN II	H-Arg	Leu	Ser	Glu	Asp	Met	Pro	Ala	Thr	Pro	Ala	Asp	Gln	Glu	Met	Tyr	Gln	Pro-	
Lyd-PBAN	H-Leu	Ala	Asp	Asp	Met	Pro	Ala	Thr	Met	Ala	Asp	Gln	Glu	Val	Tyr	Arg	Pro-		
Bom-DH													H	-Thr	Asp	Met	Lys	Asp	Glu	Ser	Asp-
Pss-MRCH																		H-Lsy	Leu-		

	20					25						30			33
Hez-PBAN	-Asp	Pro	Glu	Gln	Ile	Asp	Ser	Arg	Thr	Lys	Tyr	Phe	Ser	Pro	Arg	Leu-NH_2
Bom-PBAN I	-Asp	Pro	Glu	Glu	Met	Glu	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Phe	Ser	Pro	Arg	Leu-NH_2
Bom-PBAN II	-Asp	Pro	Glu	Glu	Met	Glu	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Phe	Ser	Pro	Arg	Leu-NH_2
Lyd-PBAN	-Glu	Pro	Glu	Gln	Ile	Asp	Ser	Arg	Asn	Lys	Tyr	Phe	Ser	Pro	Arg	Leu-NH_2
Bom-DH	-Arg	Gly	Ala	His	Ser	Glu	Arg	Gly	Ala	Leu	Trp	Phe	Gly	Pro	Arg	Leu-NH_2
Pss-MRCH	-Ser	Tyr	Asp	Asp	Lys	Val	Phe	Glu	Asn	Val	Glu	Phe	Thr	Pro	Arg	Leu-NH_2
Lom-MT I	H-Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Gln	Phe	Ser	Pro	Arg	Leu-NH_2				
Lem-PK	pGlu	Thr	Ser	Phe	Thr	Pro	Arg	Leu-NH_2								

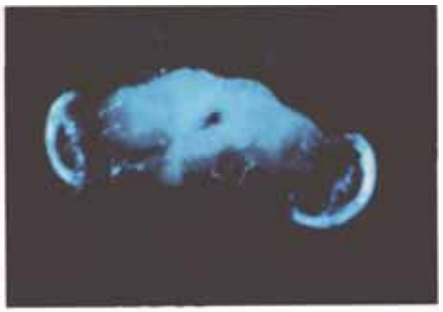
Hez-PBAN (Raina *et al.,* 1989), Bom-PBAN I and II (Kitamura *et al*., 1989, 1990), Lyd-PBAN I (Masler *et al*., 1994), Bom-DH (Imai *et al.,* 1991), Pss-MRCH (Matsumoto *et al.,* 1992), Lom-MT I and Lem-PK (Nachman and Holman, 1991)

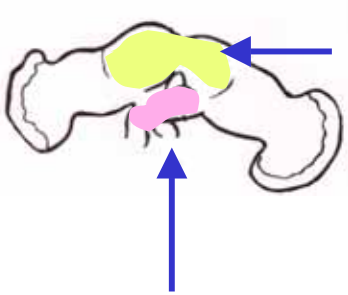
B-3）　PBAN研究のまとめ　①

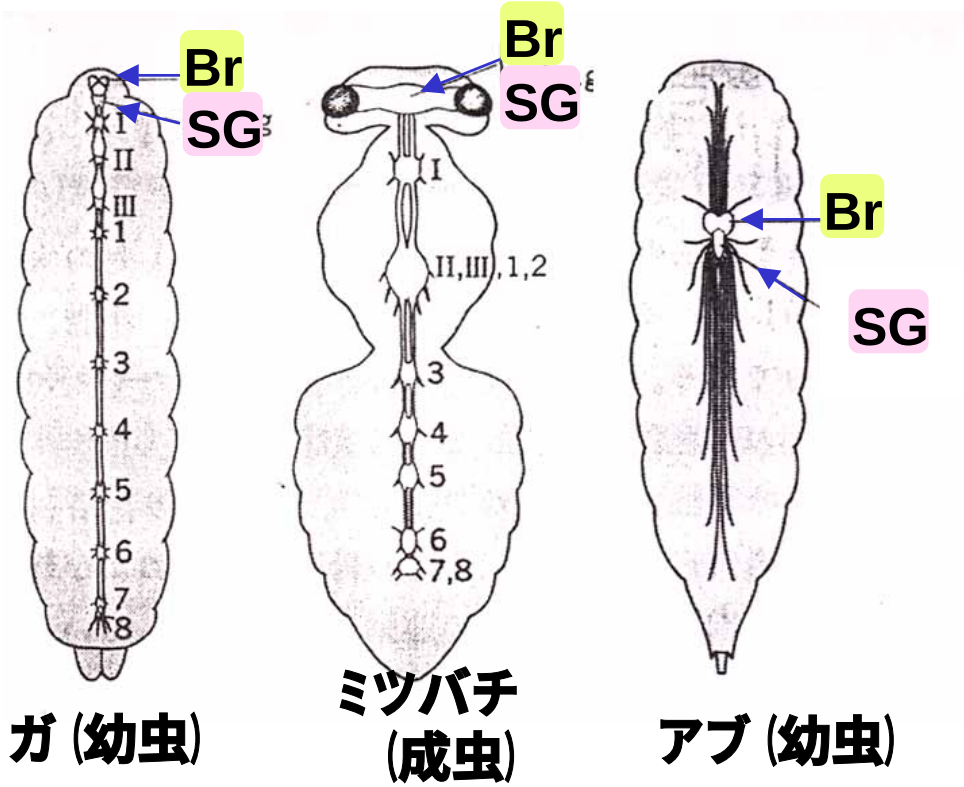
1. PBANの普遍性：　20種以上の蛾類昆虫で存在が示唆
2. 生産器官：　SG (SOG, suboesophageal ganglion、食道下神経球)
3. 標的器官：　フェロモン腺　(pheromone gland)
   培養フェロモン腺を用いた実験により確認
   例外）　タバコヤガ　*Helicoverpa zea*
   VNC (ventral nerve cord)
   → TAG (terminal abdominal ganglion)
   → secondary messenger → pheromone gland
   Teal *et al.*, 1989. *ProNAS USA*, 86: 2488.
4. ペプチドの活性発現部位：　アミド化C-末端5残基 (FXPRL)
5. レセプターたん白質：マウスneuromedin U のレセプター
   → *Drosophila*の遺伝子　→
   タバコヤガ　Choi *et al.*, 2004. *ProNAS USA*, 100: 9721.
   カイコ　Hall *et al.*, 2004. *J. Biol. Chem.*, 279: 51500.
6. 活性化する生合成ステップ：　いろいろ？
7. 遺伝子：　PBAN と DH の関係？

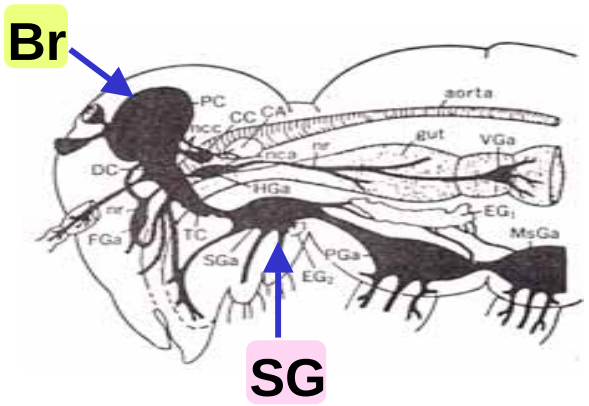
B-3)　PBAN研究のまとめ　②

食道下神経球



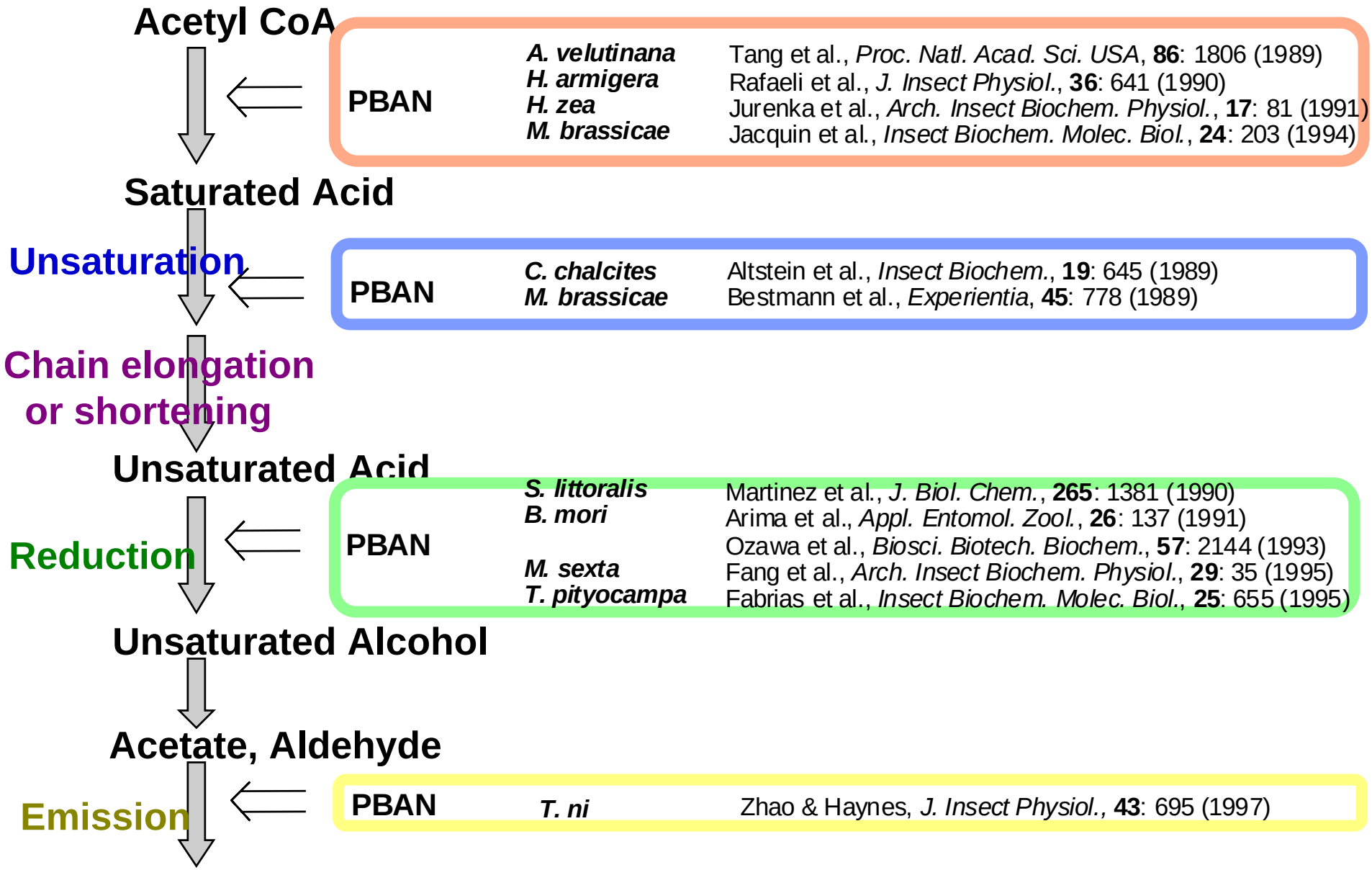






B-3） PBAN研究のまとめ ③

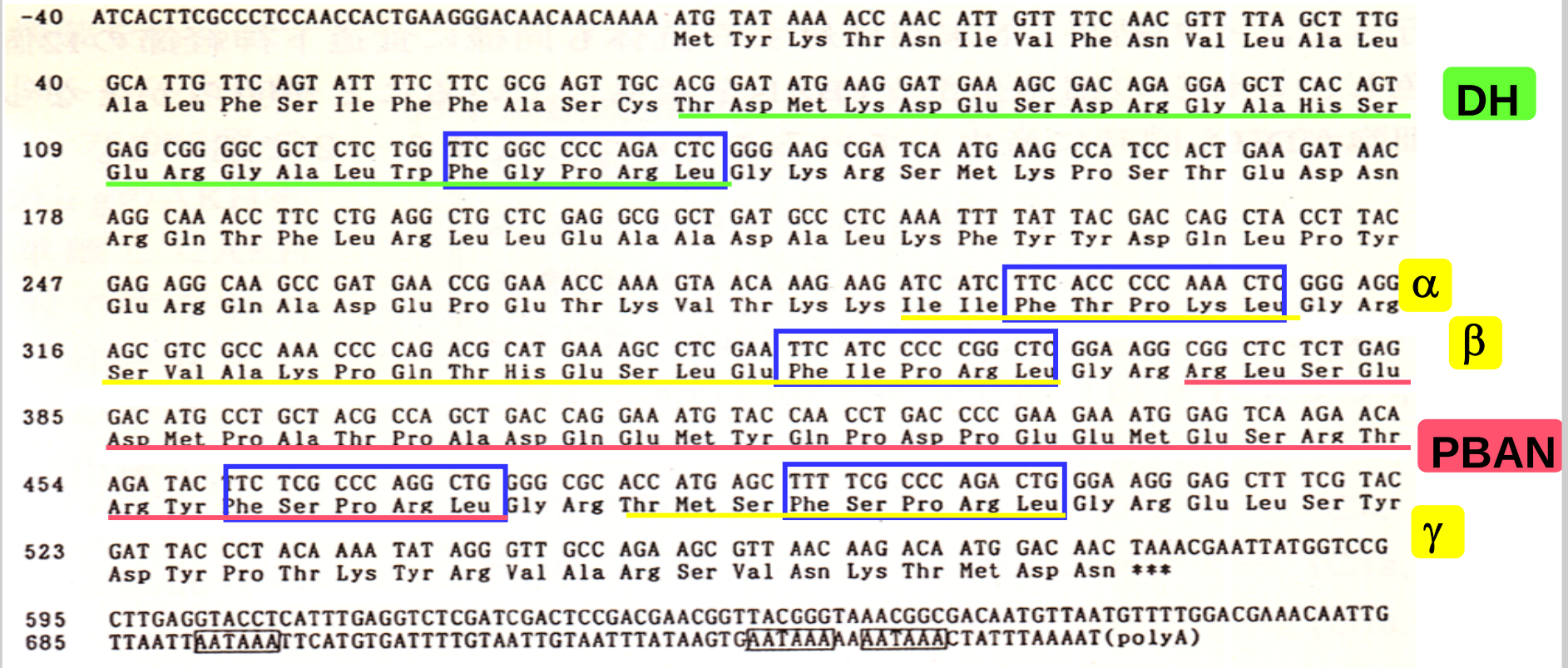
PBANの活性化ステップ



B-3）　PBAN研究のまとめ　④

カイコPBANcDNAの構造

Kawano *et al.*, 1992.　*B. B. R. C.*, 189: 221.

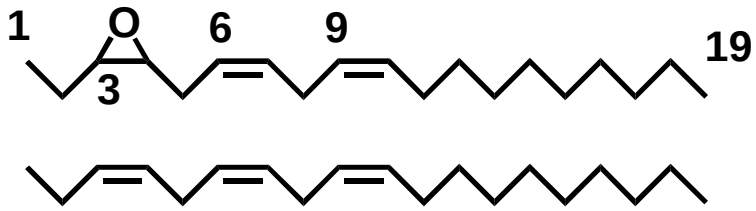


タバコガ　Davis *et al.*, 1992.　*ProNAS USA*, 89: 142.

B-4）シャクガでのPBAN研究 ①

末端官能基がない （約 15%）

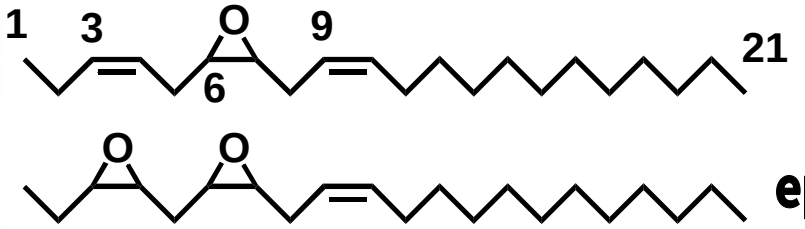
ヨモギエダシャク：Japanese giant looper (*Ascotis selenaria cretacea*)



epo3,Z6,Z9-19:H 100

Z3,Z6,Z9-19:H 1

スキバドクガ：clear-winged tussock moth (*Perina nuda*)



Z3,epo6,Z9-21:H

epo3,epo6,Z9-21:H

- i 不飽和炭化水素とそのエポキシ化物
- ii 直鎖の炭素数： 17 ～23
- iii 二重結合数： 1 ～4
- iv リノール酸、リノレン酸から生合成される

B-4）シャクガでのPBAN研究 ②

Z9,Z12,Z15-18:Acyl —還元→ Z3,Z6,Z9-18:H —エポキシ化→ epo3,Z6,Z9-18:H

↓

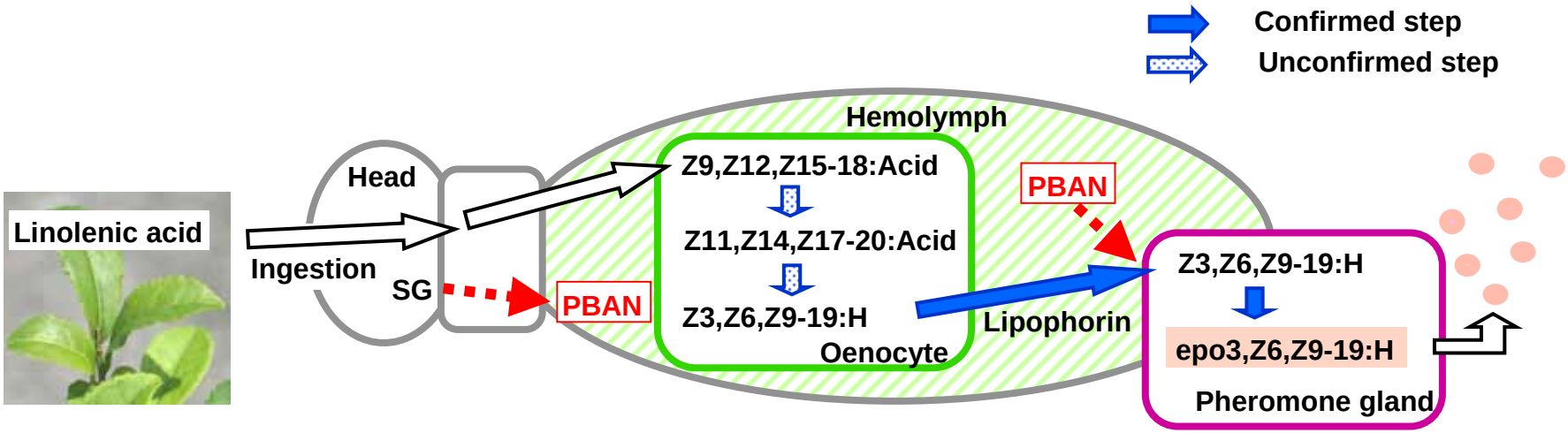
Z11,Z14,Z17-20:Acyl —脱炭酸→ Z3,Z6,Z9-19:H —エポキシ化→ epo3,Z6,Z9-19:H

↓

還元酵素 ？　脱炭酸酵素 ？　長鎖脂肪酸：未同定

エポキシ化酵素（P_{450}-dependent mono-oxygenase）

反応の位置選択性：高い　基質特異性：低い



B-4）シャクガでのPBAN研究 ③

Degenerateプライマーを用いたPCR

DH

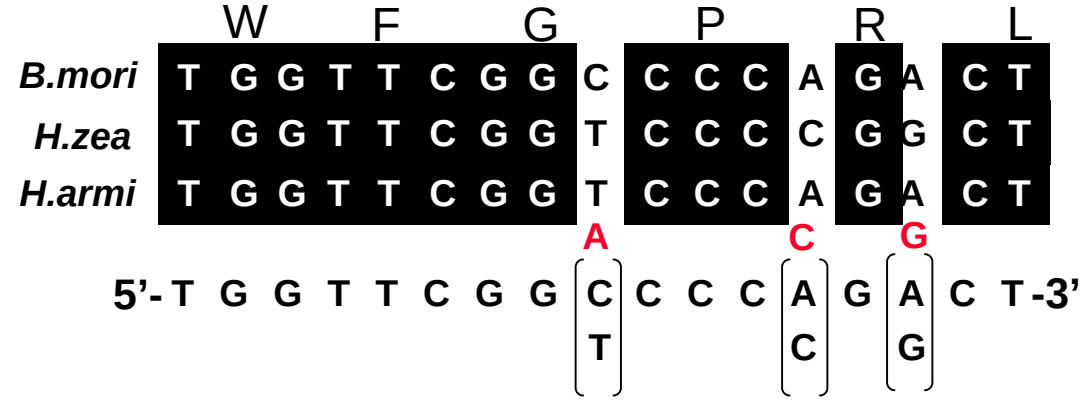
MYKTNIVFNVLALALFSIFFASCTDMKDESDRGAHSERGALW**FGPRL**GKR

SMKPSTEDNRQTFLRLLEAADALKFYYDQLPYERQADEPETK VTKK I I **FT**

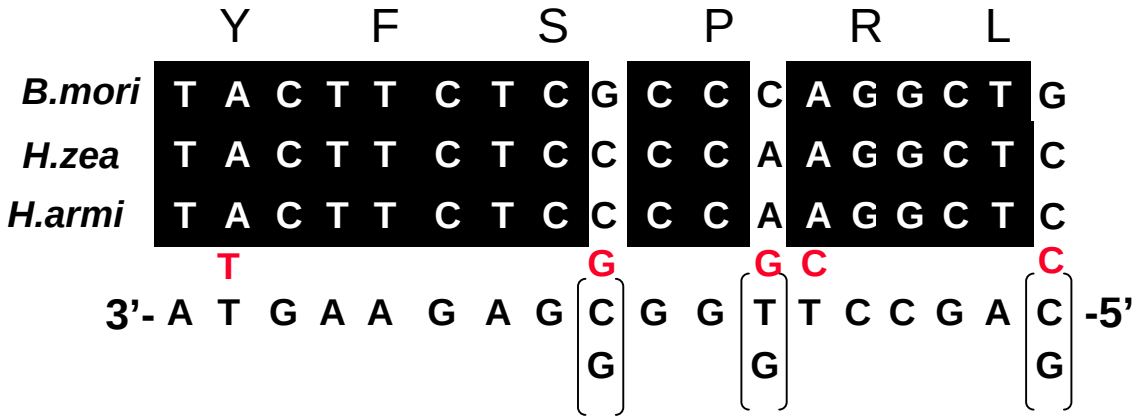
PKLGRSVAKPQTHESLE**FIPRL**GRRLSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESR

PBAN TRY**FSPRL**GRTMS**FSPRL**GRELSYDYPTKYRVARSVNKTMDN

DH



PBAN



ヨモギエダシャク
１００♀のSG

↓

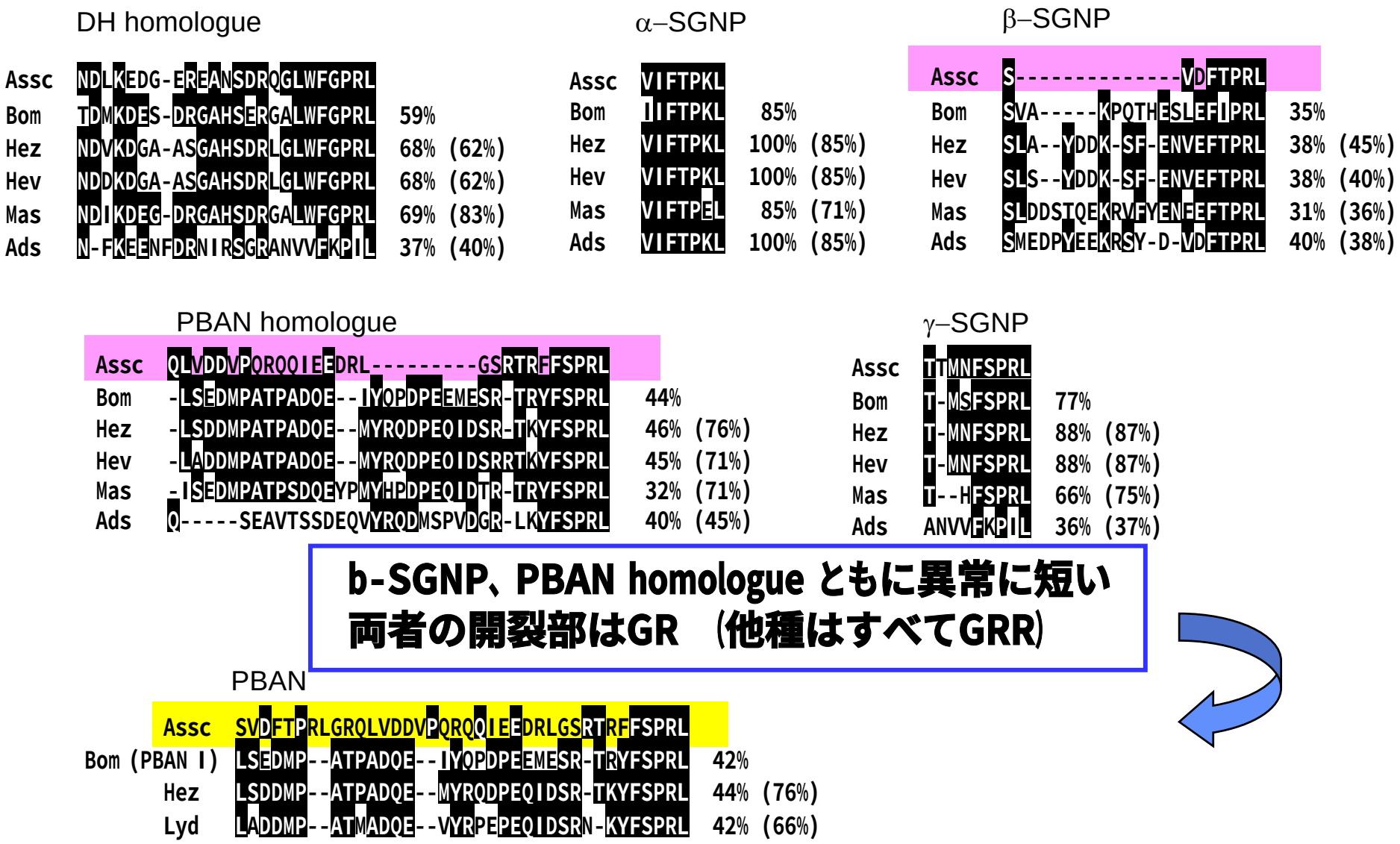
PCR

↓

3'RASE
5'RASE

B-4）シャクガでのPBAN研究 ④

ヨモギエダシャクのPBANの構造



Kawai *et al.*, 2007. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 330

B-4）シャクガでのPBAN研究 ⑤

PBAN遺伝子に関する系統樹