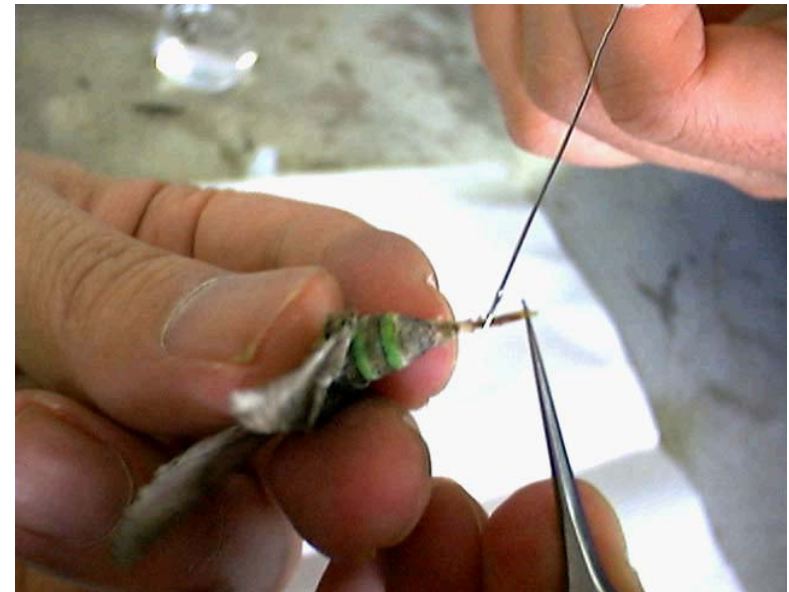


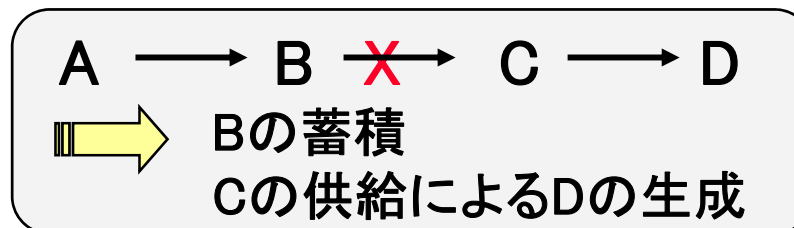
蛾類性フェロモンの生合成

- I. Introduction: 生合成経路解明の研究法
- II. カイコにおける生合成研究
- III. 蛾類性フェロモンの生合成経路
 - A) Type I のフェロモン成分の生合成
 - B) Type II のフェロモン成分の生合成経路
- IV. 性フェロモン生合成の酵素レベルでの研究
 - A) 不飽和化酵素
 - B) アシル還元酵素
- V. 性フェロモン生合成の阻害剤
- VI. 非テルペン系分岐フェロモンの生合成
 - A) プロピオン酸の取り込み
 - B) ポリケチド類 (Polyketide)
 - C) アミノ酸の取り込み
 - D) メチル分岐を有する2-ケトン類



I. 生合成経路解明の研究法

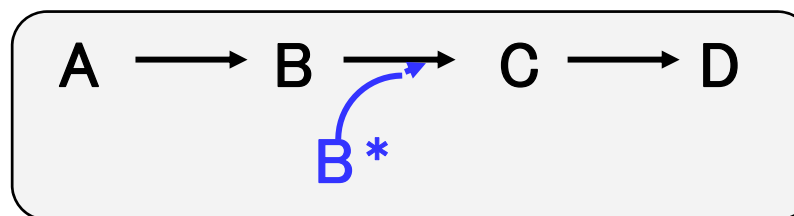
1. 突然変異(種)の利用



2. 標識前駆体の投与実験

安定同位元素 ^2H (D), ^{13}C

分析方法: GC-MS, NMR



放射性同位元素 ^3H (T), ^{14}C , ^{11}C

分析方法: オートラジオグラフィー \rightarrow 化学構造 OK?
 \rightarrow 問題点

フェロモン成分: 超微量物質 \rightarrow 問題点

多量の前駆体の投与 \rightarrow 本来の生合成系の攪乱の可能性

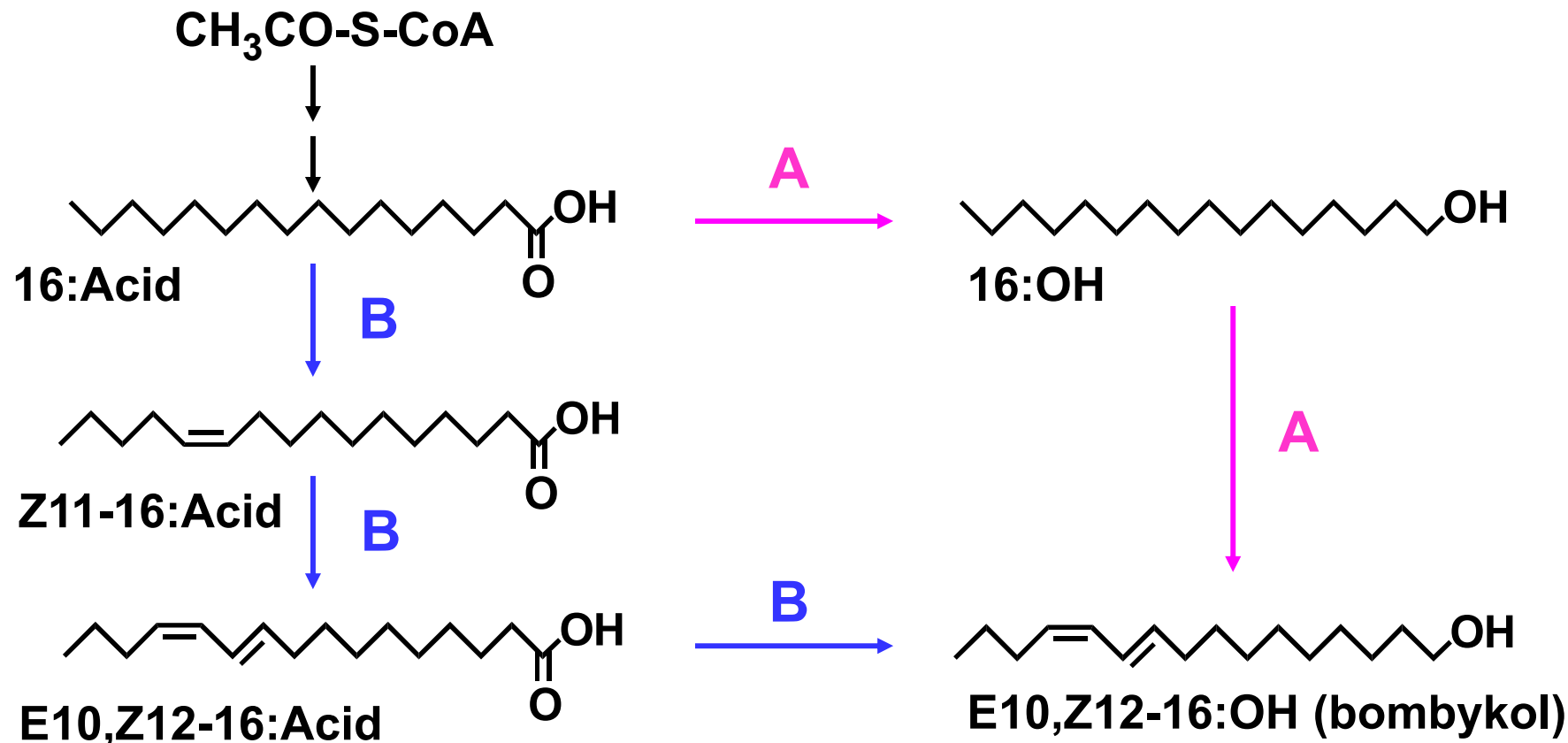
例) パルミチン酸の1%が変換

^{14}C -ラベル (比活性 50 mCi/mmol) 500 dpm \rightarrow 50,000 dpm

D-ラベル 10 ng \rightarrow 1000 ng = 1 μg = 100 ng

II. カイコにおける生合成研究

a) Bombykol (カイコの性フェロモン) の生合成経路



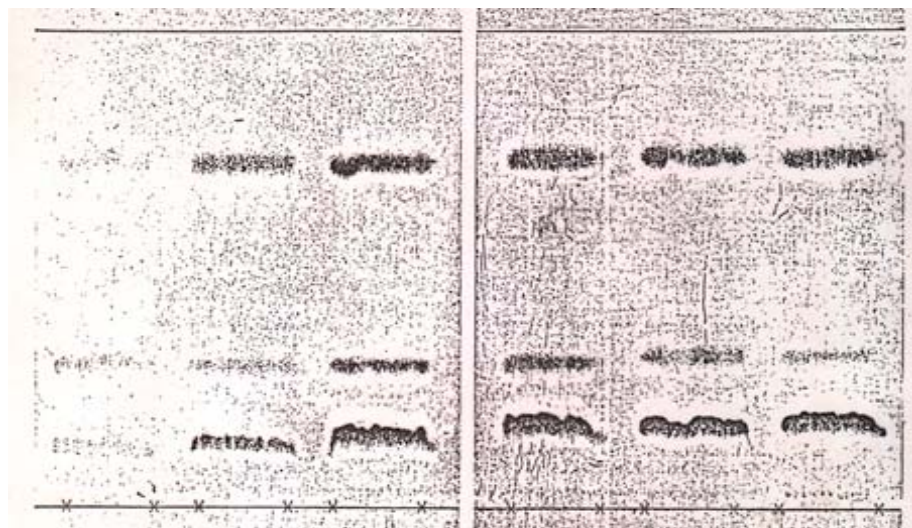
A Inoue & Hamamura, 1972. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **46**: 645

B Yamaoka *et al.*, 1984. *Experientia*, **48**: 80

Bjostad & Roelofs, 1984. *Insect Biochem.*, **14**: 275

b) パルミチン酸 (16:Acid) の変換

TLC (オートラジオグラフィー)



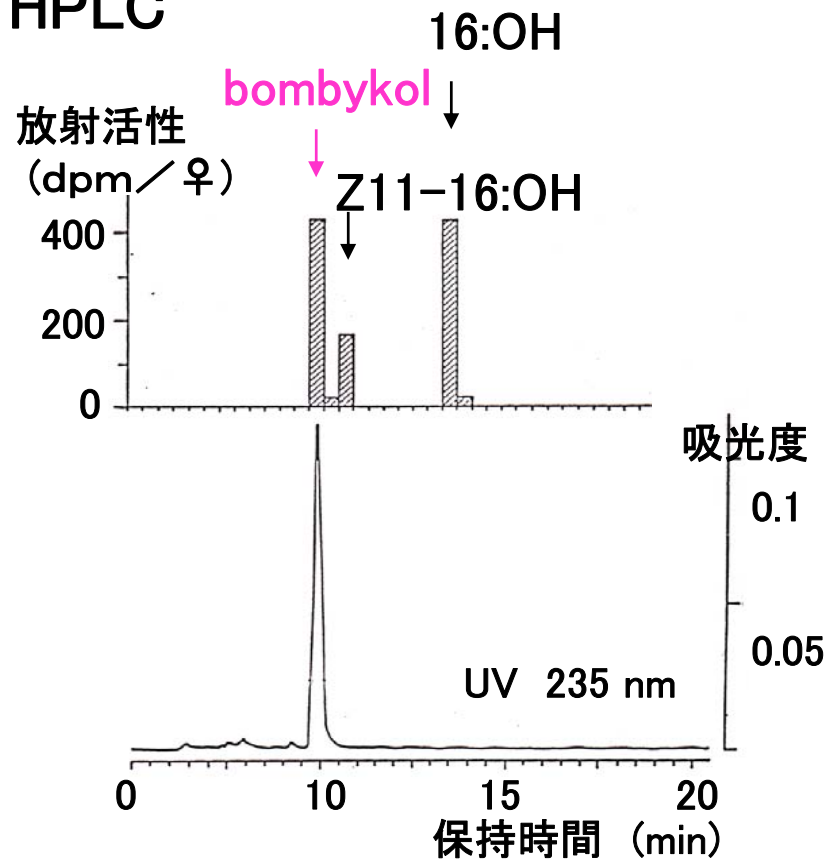
i ii iii iv v vi
 solvent: benzene + ethyl acetate (4:1)

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

- A: triacylglycerols
- B: alcohols
- C: acids (recovery)



HPLC



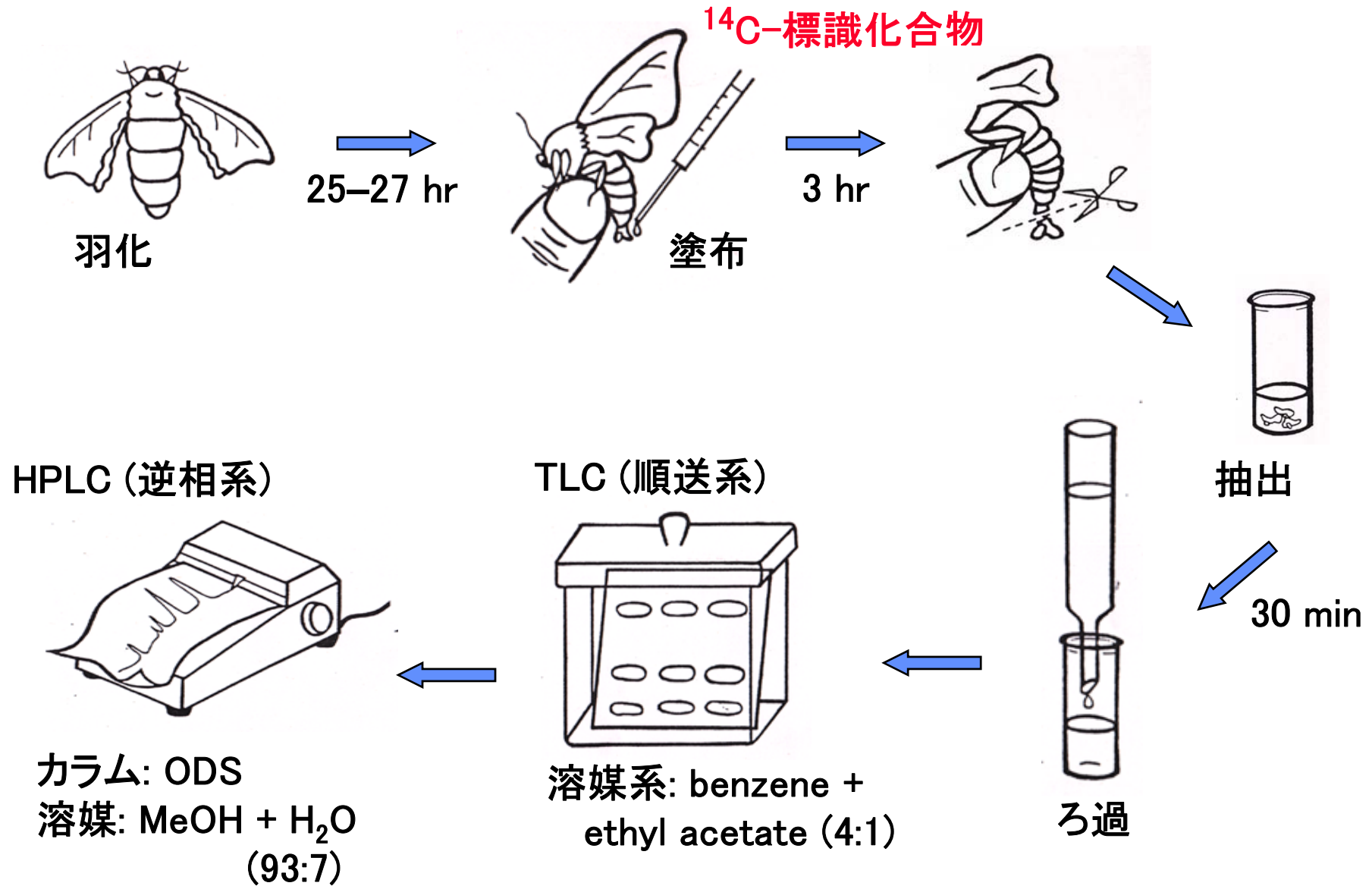
column: ODS (8 mm X 15 cm)
 solvent: MeOH + H₂O (93:7)

c) 取り込み量の経時的変化

異なった処理時間による [16-¹⁴C]hexadecanoic acid の取り込み率(%)の変化

	処理時間 (hr)				
	1	3	6	24	48
Band A (triacylglycerol)	7.2 ± 0.4	7.8 ± 0.9	4.3 ± 0.7	1.6 ± 0.4	1.1 ± 0.1
Fr. B-I (Bombykol)	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1
Fr. B-II (Z11-16:OH)	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
Fr. B-III (16:OH)	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Band C (unconversion)	17.1 ± 2.0	11.1 ± 0.8	7.5 ± 1.2	5.2 ± 2.2	3.2 ± 0.8

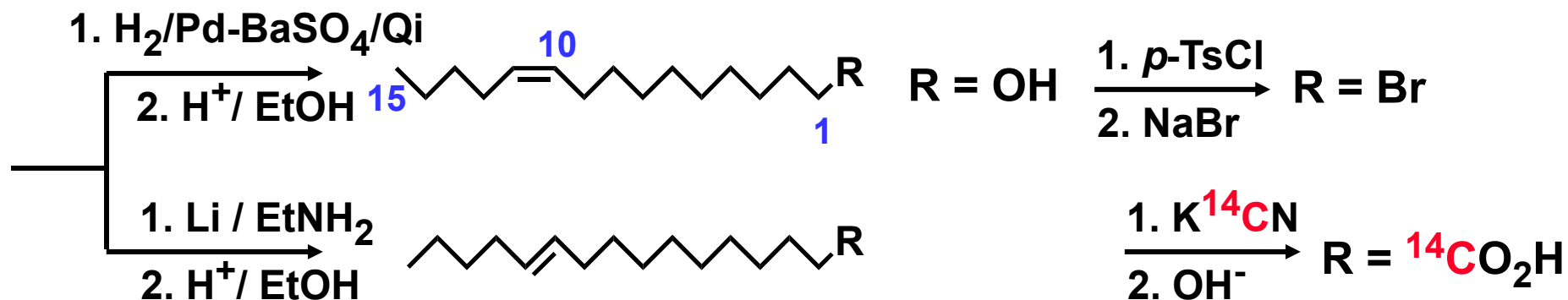
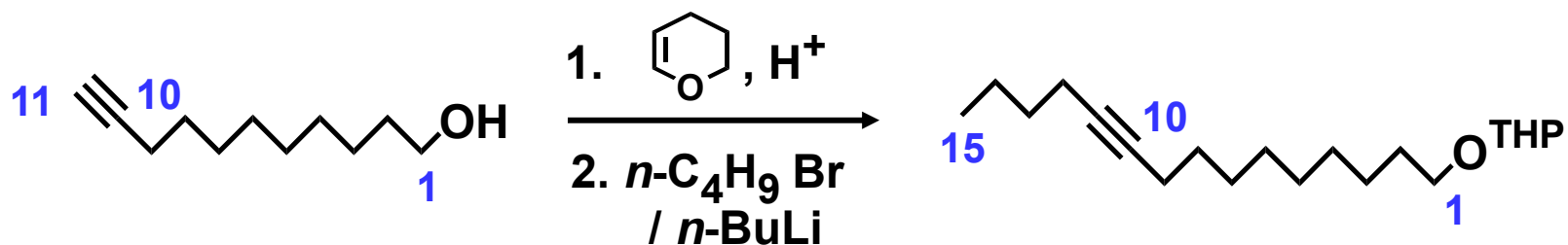
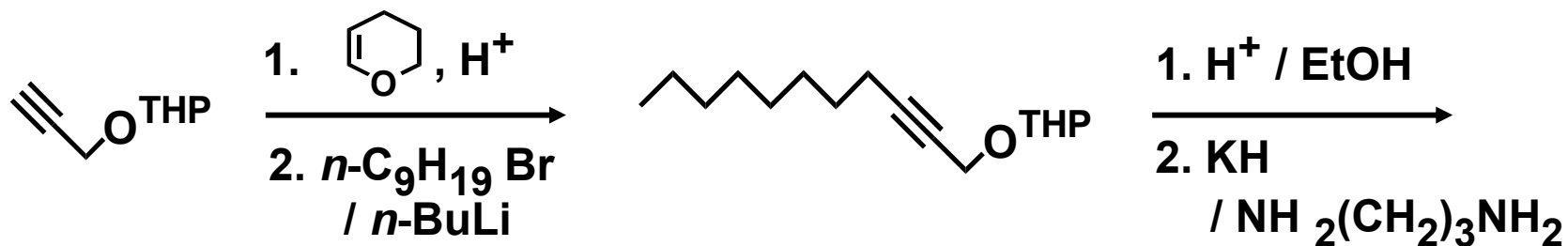
d) 取込み実験法



e) 標識化合物の合成

鉄則: アイトープの導入は最終段階

[1-¹⁴C](Z)-11-hexadecenoic acidの合成



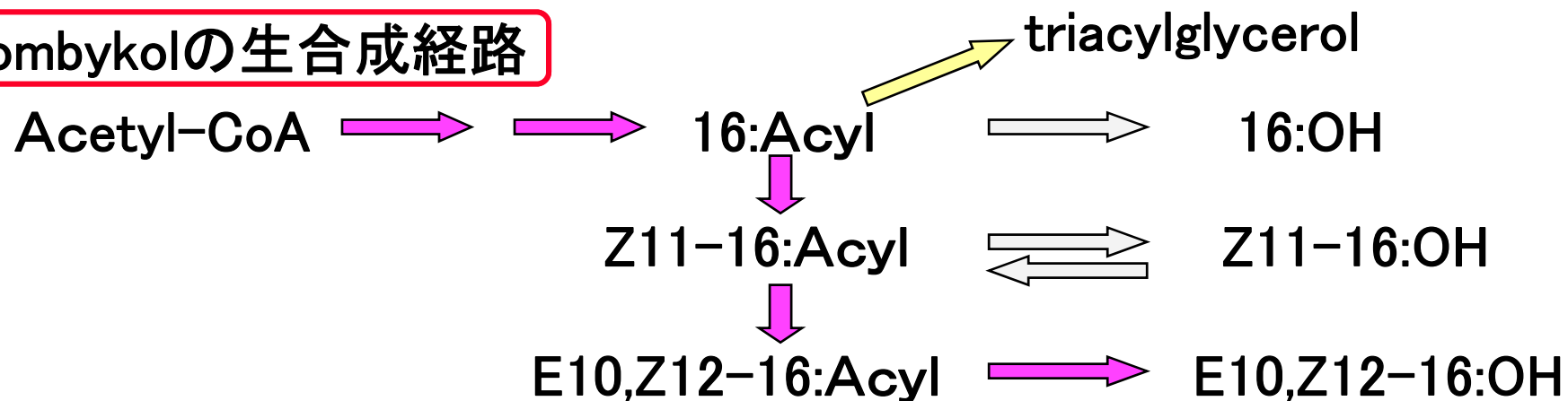
f) 取込み量の比較

^{14}C -標識化合物	取り込み率 (%)
[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 -標識化合物	取り込み率 (%)
[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

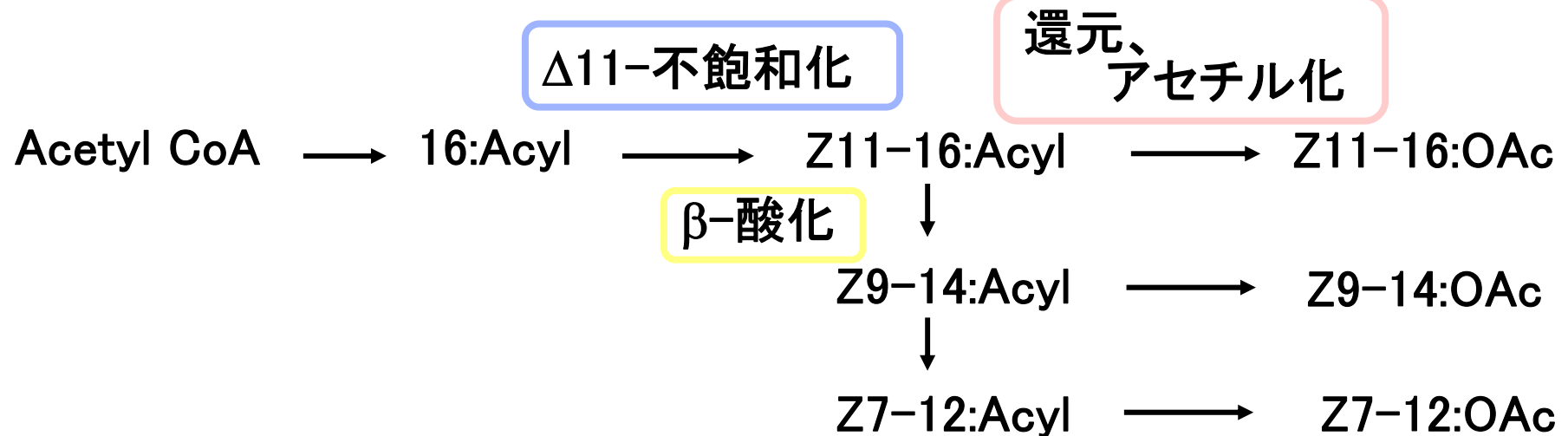
Ando et al., 1988. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 473

Bombykolの生合成経路



III. 蛾類性フェロモンの生合成経路

A) Type I のフェロモン成分の生合成



$\Delta 11$ -不飽和化酵素

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.*, 1998. *PNAS*, 95: 15287)

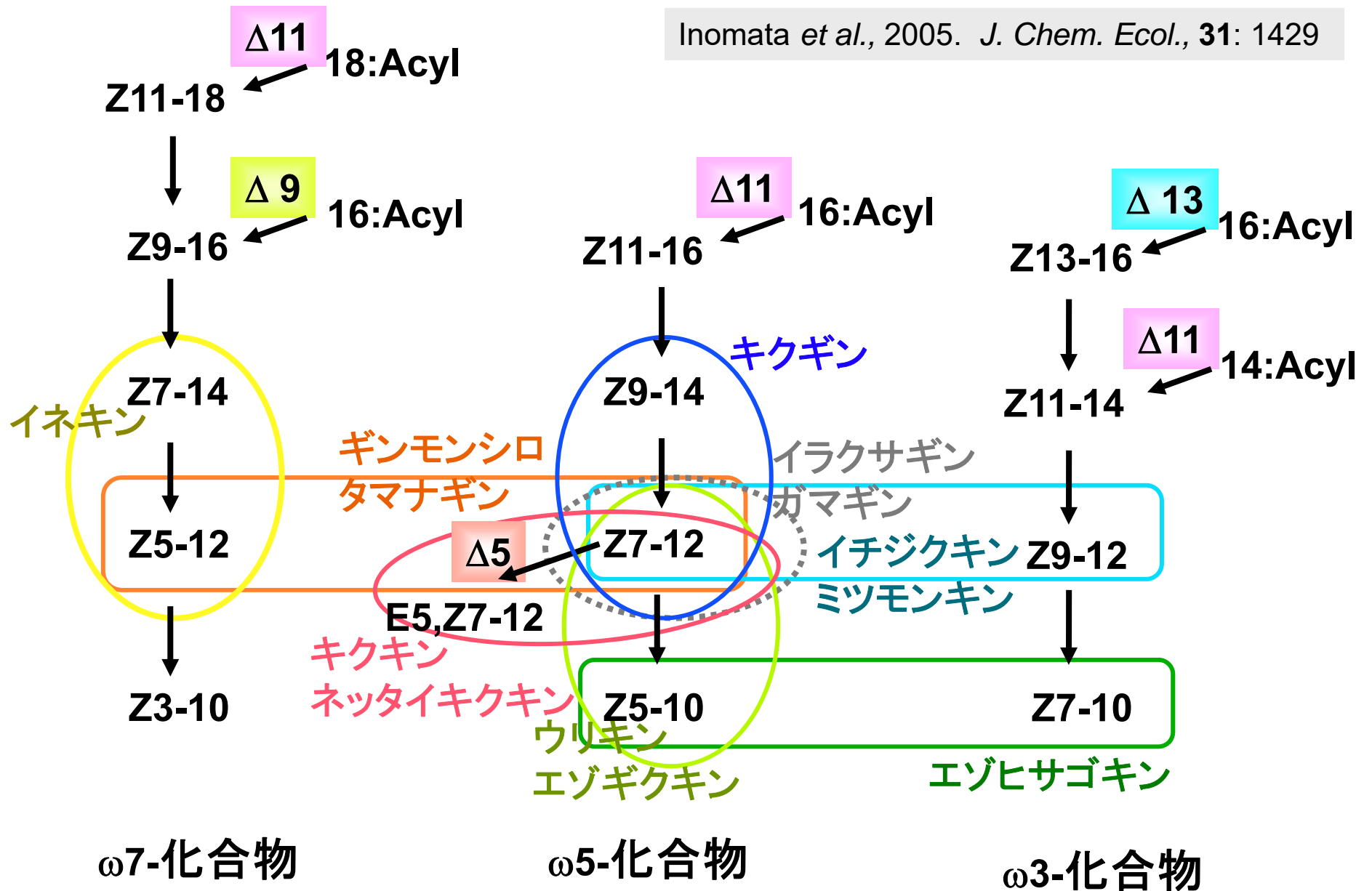
β -酸化酵素 ?

還元酵素、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

a) ウワバ類 のフェロモンの生合成

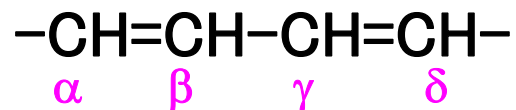
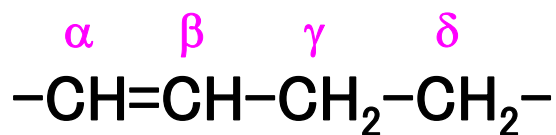
Inomata et al., 2005. *J. Chem. Ecol.*, 31: 1429



c) 共役ジエンの生合成 ①

(i) α -monoene

→ α,γ -diene



Spodoptera littoralis (Noctuidae)

E11-14 → Z9,E11-14:OAc

Epiphyas postvittana (Tortricidae)

E11-16 → E9-14 → E9,E11-14:OAc

Thysanoplusia intermixta (Noctuidae)

Z11-16 → Z7-12 → E5,Z7-12:OAc

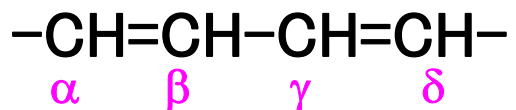
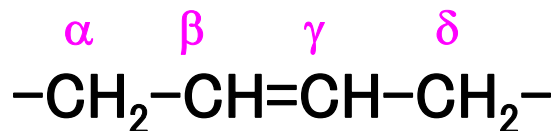
Dendrolimus punctatus (Lasiocampidae)

Z11-18 → Z9-16 → Z9,E11-16

→ Z5,E7-12:OH

(ii) β -monoene

→ α,γ -diene



Bombyx mori (Bombycidae)

Z11-16 → E10,Z12-16:OH

Manduca sexta (Sphingidae)

Z11-16 → E10,Z12-16:Ald,
E10,E12-16:Ald

Cydia pomonella (Tortricidae)

E9-12 → E8,E10-12:OH

c) 共役ジエンの生合成 ② (文献)

(i) α -monoene \rightarrow α,γ -diene

Spodoptera littoralis (Noctuidae)

E11-14 \rightarrow Z9,E11-14:OAc

Dunkelblum & Kehat, 1987. *Insect Biochem.*, **17**: 877

Martinez *et al.*, 1990. *J. Biol. Chem.*, **265**: 1381

Epiphyas postvittana (Tortricidae)

E11-16 \rightarrow E9-14 \rightarrow E9,E11-14:OAc

Foster & Roelofs, 1990. *Experientia*, **46**: 269

Thysanoplusia intermixta (Noctuidae)

Z11-16 \rightarrow Z7-12 \rightarrow E5,Z7-12:OAc

Ono *et al.*, 2002. *IBMB*, **32**: 701

Dendrolimus punctatus (Lasiocampidae)

Z11-18 \rightarrow Z9-16 \rightarrow Z9,E11-16

Zhao *et al.*, 2004. *IBMB*, **34**: 261

\rightarrow Z5,E7-12:OH

(ii) β -monoene \rightarrow α,γ -diene

Bombyx mori (Bombycidae)

Z11-16 \rightarrow E10,Z12-16:OH

Yamaoka *et al.*, 1984. *Experientia*, **40**: 80

Roelofs & Bjostad, 1984. *Bioorg. Chem.*, **12**: 279

Ando *et al.*, 1988. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 473

Manduca sexta (Sphingidae)

Z11-16 \rightarrow E10,Z12-16:Ald,

Fang *et al.*, 1995. *IBMB*, **25**: 39

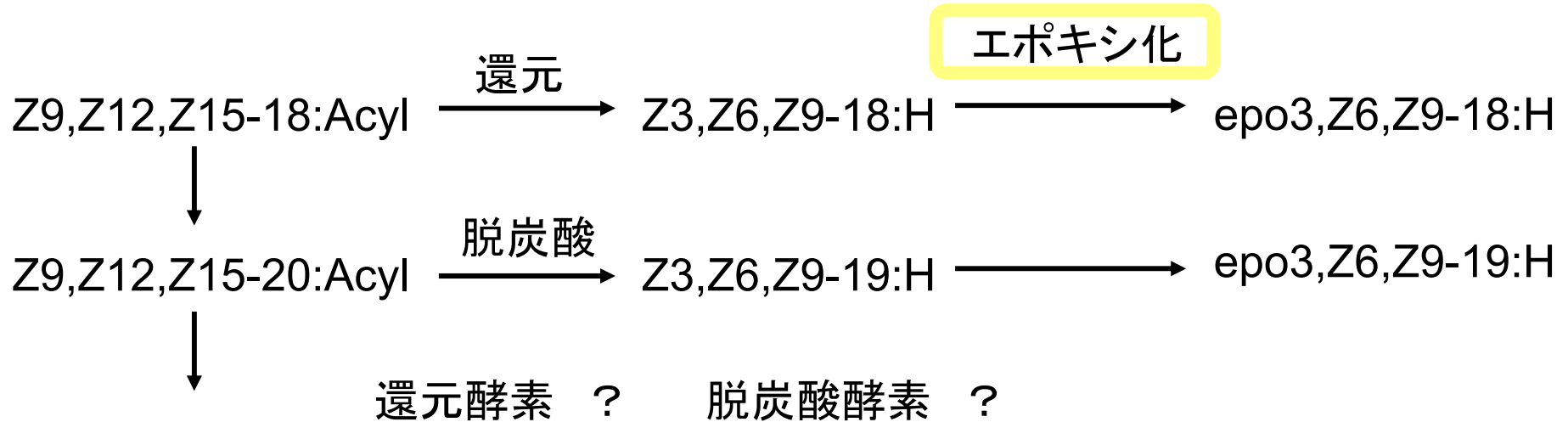
E10,E12-16:Ald

Cydia pomonella (Tortricidae)

E9-12 \rightarrow E8,E10-12:OH

Löfstedt & Bengtsson, 1988. *JCE*, **14**: 903

B) Type II のフェロモン成分の生合成

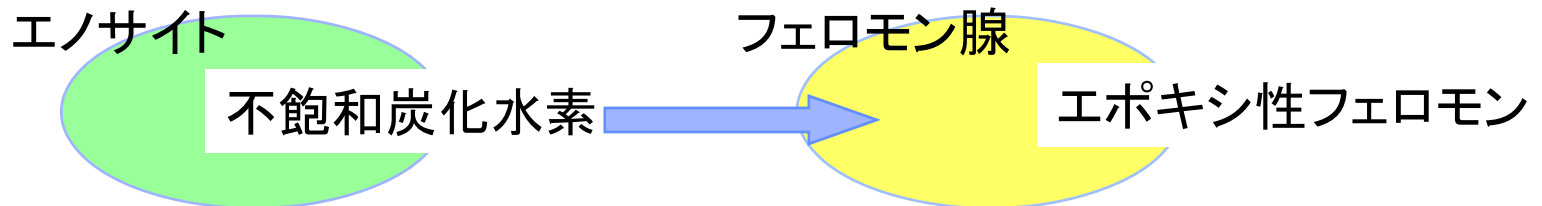


還元酵素 ? 脱炭酸酵素 ?

エポキシ化酵素 (P₄₅₀-dependent mono-oxygenase)

反応の位置選択性: 高い 基質特異性: 低い

親油性の不飽和炭化水素はリポホリンに結合しフェロモン腺に移動する



Ando *et al.*, 2008. *J. Pestic. Sci.*, **33**: 17

課題: 不飽和炭化水素の生成過程の実験的証明

IV. 性フェロモン生合成の酵素レベルでの研究

A) 不飽和化酵素

a) 研究の経緯 ①

Δ11-不飽和化酵素 Knipple *et al.*, 1998. *PNAS*, **95**: 15287

イラクサギンウワバ から遺伝子をクローニング

フェロモン: Z7-12:OAc ← Z11-16:Acyl

primers: ラットと酵母のΔ9-不飽和化酵素

酵母内(不飽和化酵素欠損株)で発現

NADH-cytochrome *b5* reductase (flavoprotein) と

cytochrome *b5* (hemoprotein)が必要

引き続いた研究

Δ11-不飽和化酵素 (カイコ) Yoshiga *et al.*, 2000. *Gene*, **246**: 339

Δ9-不飽和化酵素 (イラクサギンウワバ) Liu *et al.*, 1999. *IBMB*, **29**: 435

Δ9- および Δ11-不飽和化酵素 (タバコヤガ: *Helicoverpa zea*)

Rosenfield *et al.*, 2001. *IBMB*, **31**: 949

a) 研究の経緯 ②

ハマキの $\Delta 9$ -および $\Delta 10$ -不飽和化酵素

Hao *et al.*, 2002. *IBMB*, **32**: 961

New Zealand産 (*Planotortrix octo*)

相同性(%)

	<u>Plo-Z9</u>	<u>Trn-Z9</u>	<u>Hez-9</u>	<u>Trn-Z11</u>	<u>Hez-Z11</u>
<u>Plo-Z9</u>	-	73	80		
<u>Plo-Z10</u>	62	62	61	66	66

その後、2007年までの研究 (一覽参照)

Helicoverpa assulta

Jeong *et al.*, 2003. *IBMB*, **33**: 609

Choristoneura parallela

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

など

ヤガ科	5種
ハマキガ科	5種
メイガ科	2種
カイコガ科	1種

b) E-体の二重結合の導入

ハマキ (*Argyrotaenia velutinana*) の Δ 11-不飽和化酵素

Liu *et al.*, 2002. *IBMB*, **32**: 1489

フェロモン: Z11-14:OAc + E11-14:OAc (92:8)

不飽和脂肪酸: 3:2 Z/E ratio ← 14:Acid (基質)

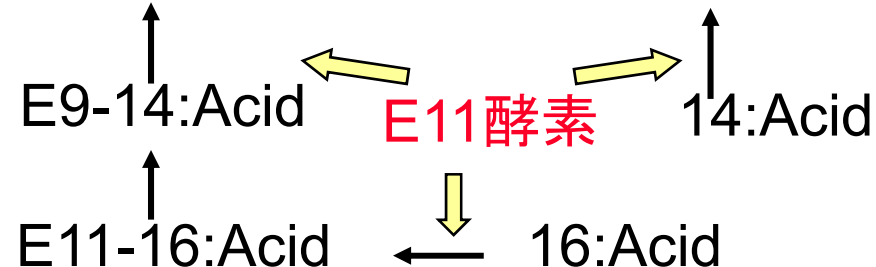
Δ 11-不飽和化酵素を酵母で発現 → 6:1 Z/E ratio

ハマキ (*Epiphyas postvittana*) のE11-不飽和化酵素

Liu *et al.*, 2002. *PNAS*, **99**: 620

酵素cDNAのクローニング: フェロモン腺 E11(1つ)、Z9(1つ)
脂肪体 Z9(1つ)

フェロモン: E9,E11-14:OAc + E11-14:OAc (1:20)



c) ヤガ (*Spodoptera littoralis*) の不飽和化酵素

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

フェロモン: Z9,E11-14:OAc (main), E10,E12-14:OAc (minor) など



4つの不飽和酵素様遺伝子

(脂肪体から#1、フェロモン腺から#2~#4)

#1($\Delta 9$) Z9-16/Z9-18 1:4.5 Z9-14 ← 14:Acid も行う

#2($\Delta 9$) Z9-16/Z9-18 1.5:1 Z9-14 ← 14:Acid も行う

ただし 14:Acid と E11-14:Acid の存在下では、
Z9,E11-14:Acid のみを生産

#3($\Delta 11$) * E11-14 / Z11-14 / Z11-16 / Z11-18 5:4:60:31

#4(?) 機能発現無し

* Z11-14:Acid → E10,E12-14:Acid も行う (bifunctional enzyme)

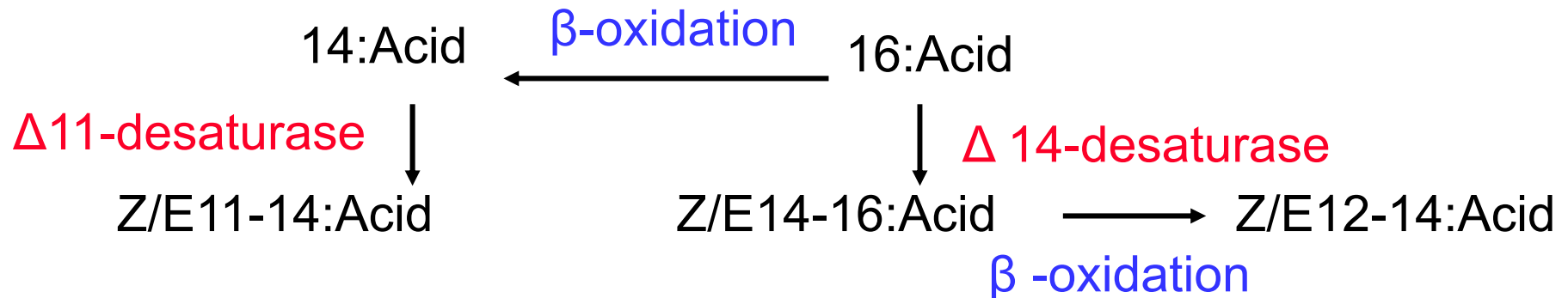
Serra *et al.*, 2006. *IBMB*, **36**: 634

d) アワノメイガ類の不飽和化酵素

Roelofs *et al.*, 2002. *PNAS*, **99**: 13621

European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) Z/E11-14:OAc

Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) Z/E12-14:OAc



両種 of フェロモン腺ともに、
不飽和化酵素($\Delta 11$ -、 $\Delta 14$ -、 $\Delta 9$ -desaturase)をコードする3つの
cDNA(両種でほぼ同一)が存在する

*O. nubilalis*では $\Delta 11$ -の遺伝子が、*O. furnacalis*では $\Delta 14$ -の遺伝子が
機能発現している

e) 遺伝子の単離 (一覧) ①

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

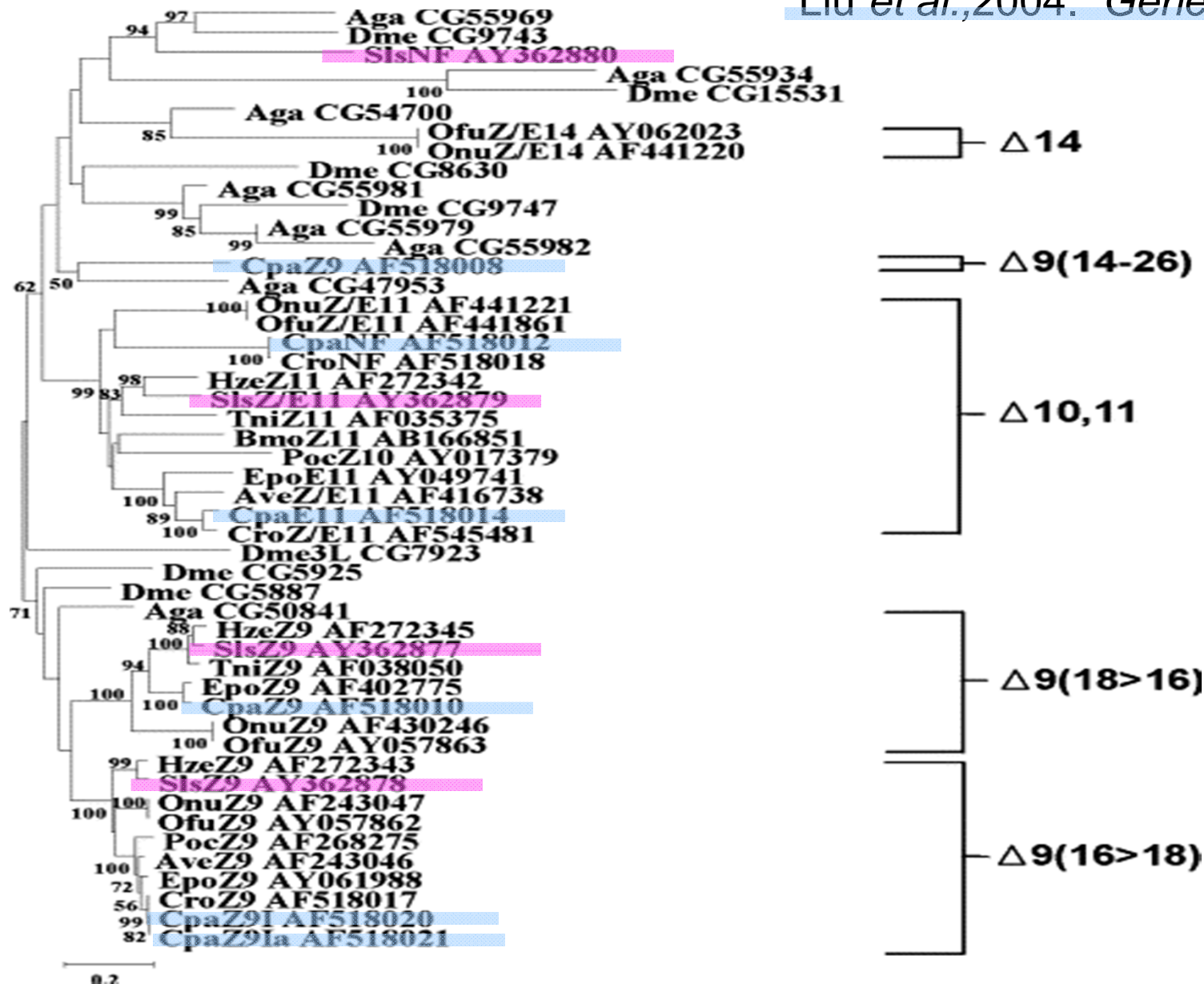
e) 遺伝子の単離 (一覧) ②

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

f) 系統樹

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

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



B) アシル還元酵素

カイコガ の還元酵素

Moto *et al.*, 2003. *PNAS*, **100**: 9156

植物の酵素を鋳型に PCR

→ 460アミノ酸をコードするcDNAをクローニング

NAD(P)H結合モチーフを含む

→ 酵母にて発現、還元酵素としての活性を確認

基質特異性

飽和脂肪酸 16:Acid, 15:Acid >> 17:Acid >> 14:Acid

モノエン脂肪酸

Z11-16:Acid, E11-16:Acid > E9-16:Acid > Z9-16:Acid

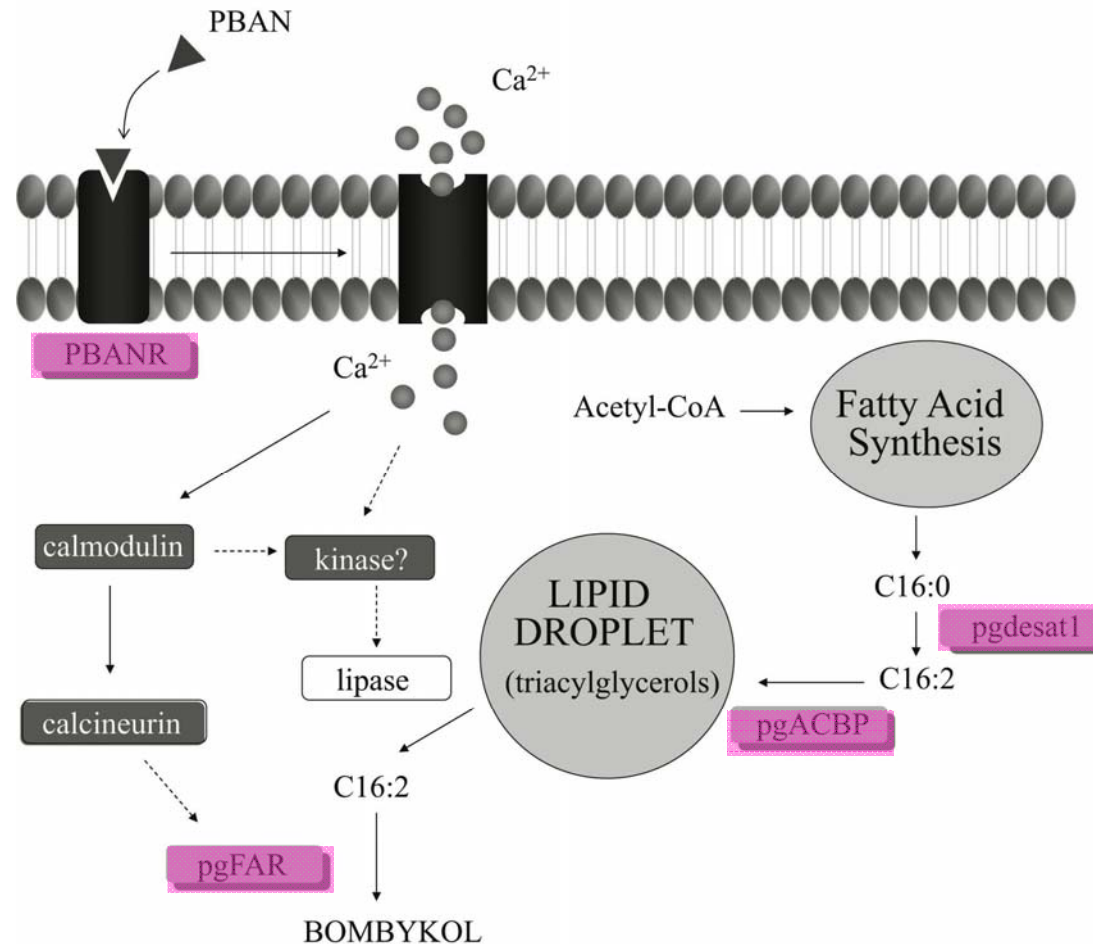
ジエン脂肪酸 E10Z12-16:Acid >> E10,E12-16:Acid

C) RNAi (gene knockdown effects of RNA interference)

カイコガでの実験

Ohnishi *et al.*, 2006. *PNAS*, **103**: 4399

不飽和化酵素 (pgdesat1)、Acyl-CoA結合タンパク (pgACBP)
還元酵素 (pgFAR)、PBANレセプタータンパク (PBANR)

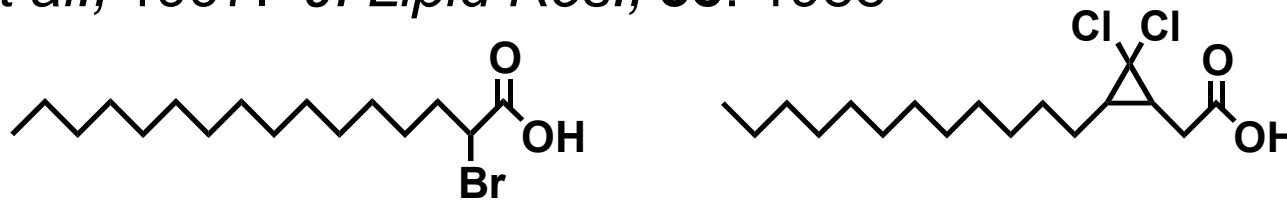


V. 性フェロモン生合成の阻害剤

A) β -酸化の阻害

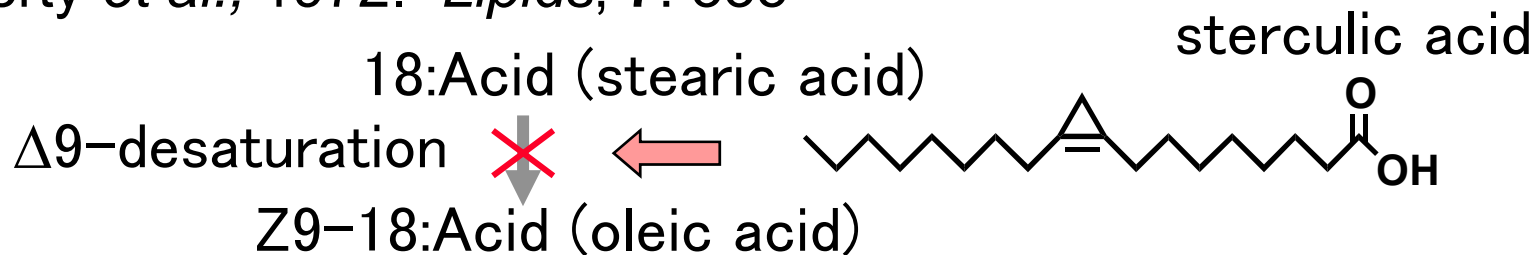
Rosell *et al.*, 1992. *IBMB*, **22**: 679

Hernanz *et al.*, 1997. *J. Lipid Res.*, **38**: 1988



B) 不飽和化の阻害

Fogerty *et al.*, 1972. *Lipids*, **7**: 335



Arsequell *et al.*, 1989. *Insect Biochem.*, **19**: 949 ヤガでの阻害

Ando *et al.*, 1995. *J. Pestic Sci.*, **20**: 25 カイコでの阻害

norflurazon (phytoeneの生合成阻害剤): 阻害活性なし

a) Cyclopropenyl 化合物



Spodoptera littoralis (Noctuidae) での阻害実験

フェロモン: [Z9,E11-14:OAc](#)

- R: CO₂H Arsequell *et al.*, 1989. *Insect Biochem.*, **19**: 949
Gosalbo *et al.*, 1992. *IBMB*, **22**: 687
1994. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **26**: 279
Fabrias *et al.*, 1996. *J. Lipid Res.*, **37**: 1503
- R: CH₂OH Rodriguez *et al.*, 2004. *IBMB*, **34**: 283

Thaumetopoea pityocampa (Notodontidae) での阻害実験

フェロモン: [≡11,Z13-16:OAc](#)

- R: CO₂H Rodriguez *et al.*, 2004. *IBMB.*, **34**: 283

Bombyx mori (Bombycidae) での阻害実験

フェロモン: [E10,Z12-16:OH](#)

- R: CO₂H Ando *et al.*, 1995. *J. Pestic Sci.*, **20**: 25
CO₂NH₂ 1996. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 3350
1998. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **37**: 8

b) Fluorinated 化合物

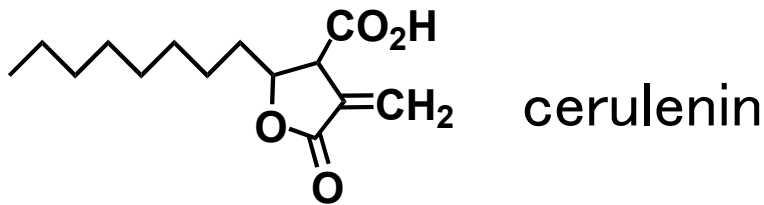


Spodoptera littoralis (Noctuidae) 14:Acid → E11-14:Acid

Abad et al., 2003. *Lipids*, **38**: 865

c) 脂質合成の阻害

Choi & Jurenka, 2006. *J. Asia-Pacific Entomol.*, **9**: 43

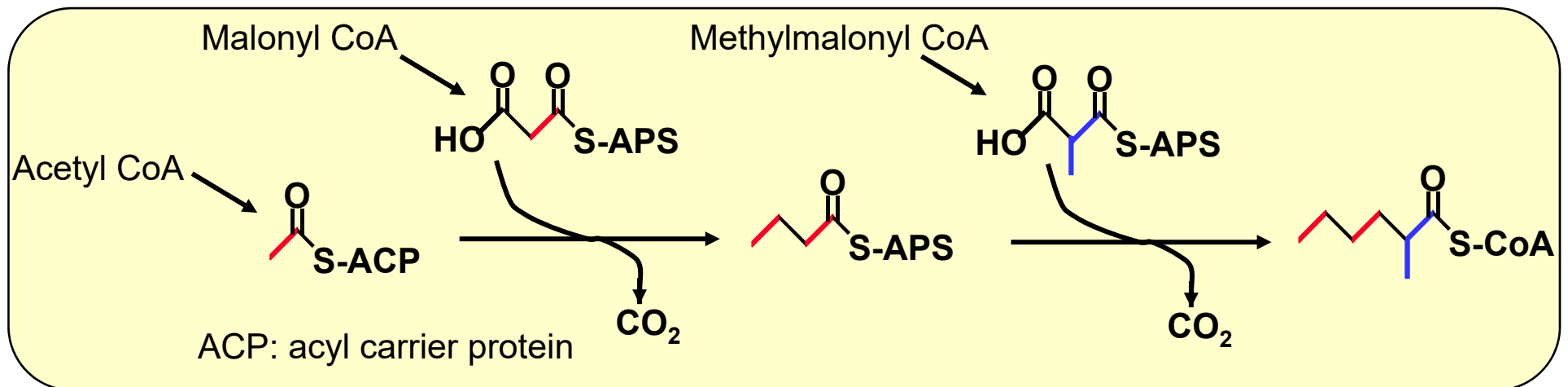


VI. 非テルペン系分岐フェロモンの生合成

非テルペン系フェロモン類の生合成に関する疑問点

- 1) 炭素骨格の形成
メチル側鎖の由来は？
- 2) 官能基の導入

A) プロピオン酸の取り込み (propanogenins)



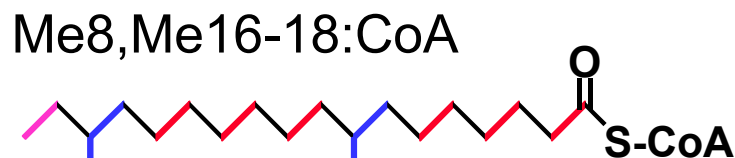
非テルペン系化合物にメチル分岐が導入される最も一般的なプロセス：
ポリケチド合成酵素(PKS)や脂肪酸合成酵素(FAS)による

a) German cockroach

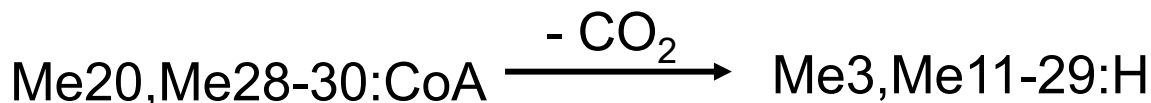
チャバネゴキブリ

Chase *et al.*, 1992. *PNAS*, **89**: 6050

acetyl CoA X 1
malonyl CoA X 6
methylmalonyl CoA X 2



Malonyl CoA X 6



Me₃,Me₁₁₋₂₉:2-OH

Me₃,Me₁₁₋₂₉:2-one

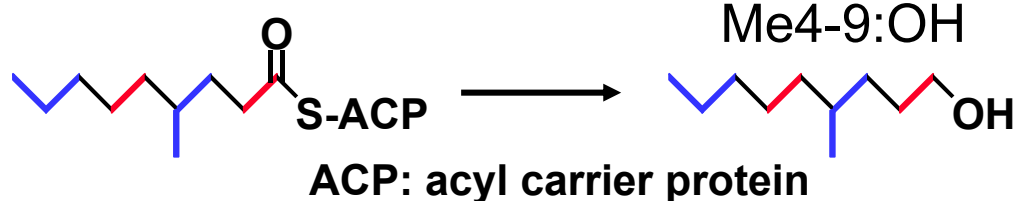


b) Mealworm beetle (*Tenebrio molitor*)

ゴミムシダマシ

Islam *et al.*, 1999. *BMB*, **29**: 201

propionyl CoA X 1
malonyl CoA X 3
methylmalonyl CoA X 1

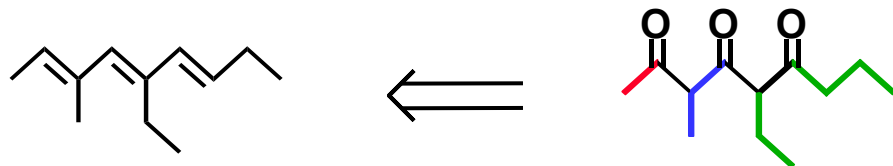


²H- および ¹³C-標識カルボン酸の取り込み実験より

B) ポリケチド類 (Polyketide)

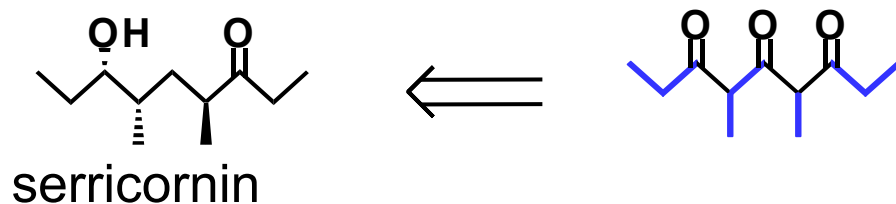
a) Sap beetle (*Carpophilus davidsoni*)

ウスチャデオキシイ



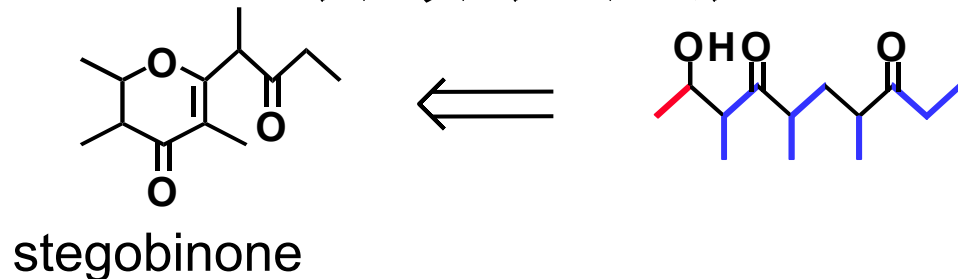
b) Cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*)

タバコシバンムシ

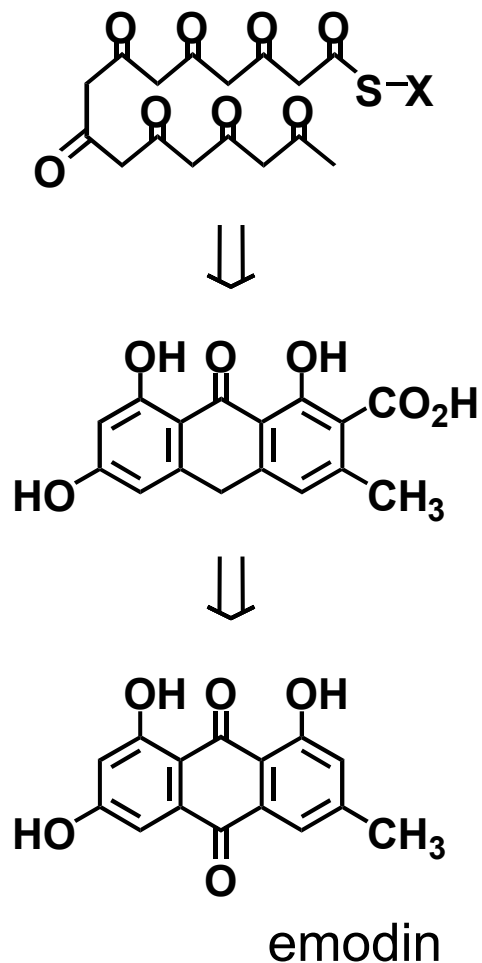


c) Drugstore beetle (*Stegobium paniceum*)

ジンサンシバンムシ



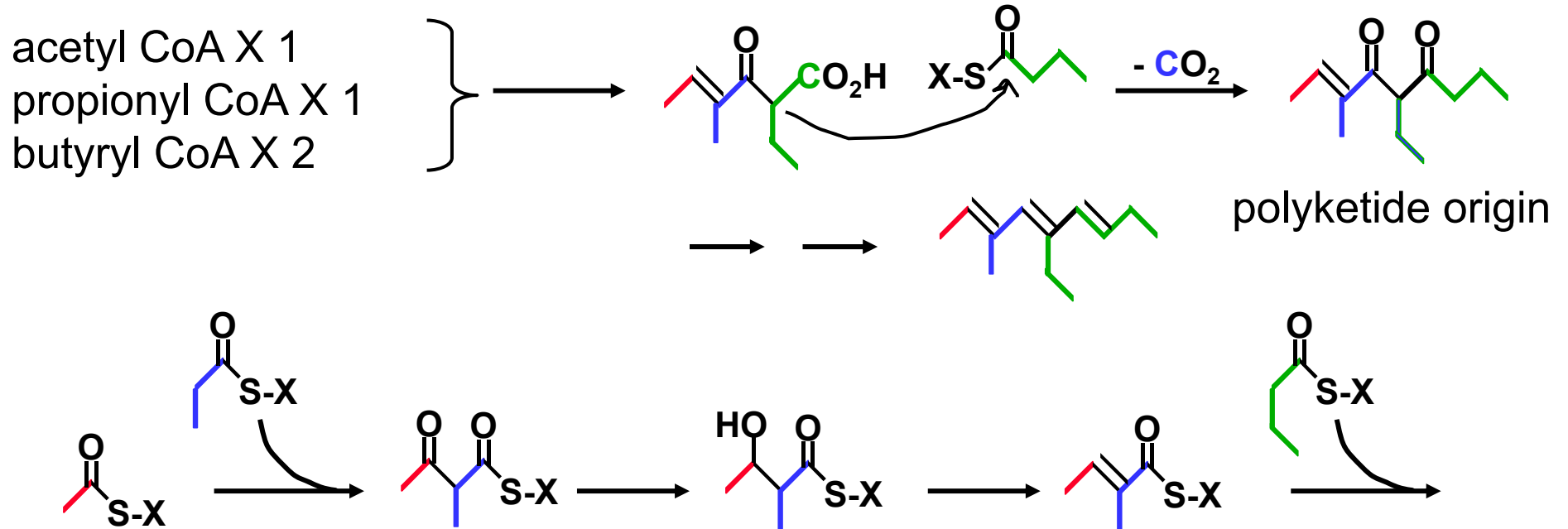
植物の生産するキノン類



d) Sap beetle (*Carpophilus davidsoni*)

ウスチャデオキシイ

Petroski et al., 1994. *IBMB*, 24: 69



C) アミノ酸の取り込み

gypsy moth (*Lymantria disper*)

Jurenka et al., 2003. *PNAS*, 100: 809

valine

isobutyryl CoA X 1
malonyl CoA X 8

Me18-19:CoA



→ Me18,Z12-19:CoA

- CO₂

Me2,Z7-18:H

epoxidation

Me2,epo7-18:H



他の *Lymantria* 属昆虫のフェロモン

Me2,epo7,17-18:H

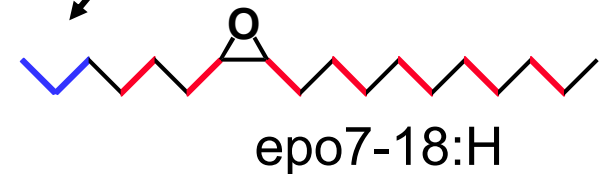


Me2,epo7-20:H



propyl CoA

?

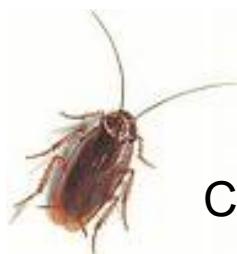


epo7-18:H

D) メチル分岐を有する2-ケトン類

a) 代表的なフェロモン

Blattodea



Blattella germanica
(German cockroach)



Me3,Me11-29:2-one

Nishida *et al.*, 1974. *Experientia*, **30**: 978

Lepidoptera



Lyclene dharmadharma
(Lithosiinae moth)

Me6-18:2-one

Me14-18:2-one

Me6,Me14-18:2-one

Yamamoto *et al.*, 2007. *BBB*, **71**: 2860

Coleoptera



Diabrotica balteata
(banded cucumber beetle)



Me6,Me12-15:2-one

Chuman *et al.*, 1987. *JCE*, **13**: 1601

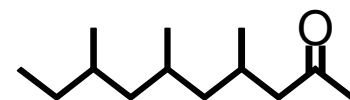
Diabrotica undecimpunctata
(spotted cucumber beetle)

Me10-13:2-one

Guss *et al.*, 1983. *JCE*, **9**: 1363

Arachnida (Acari)

Chortoglyphus arcuatus
(storage mite)



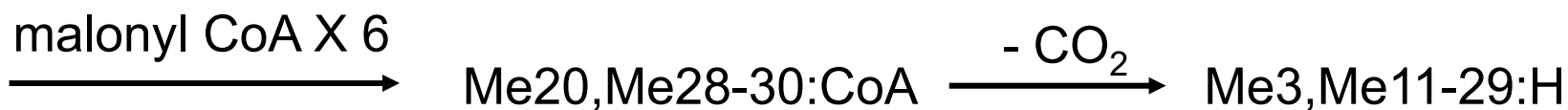
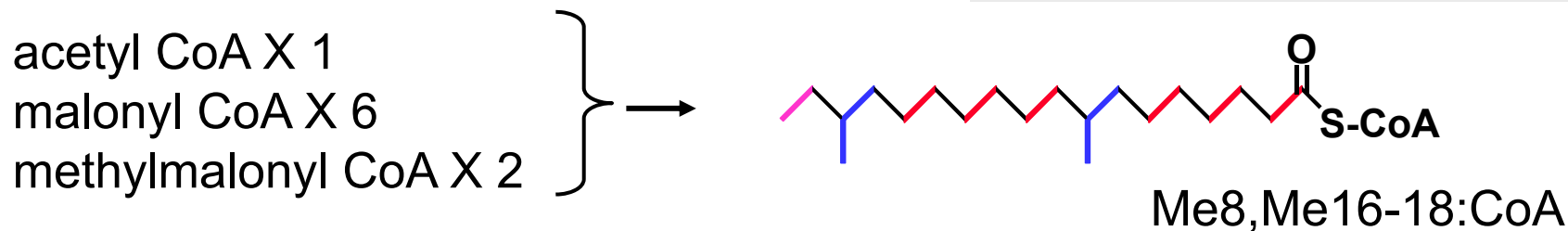
chortolure

Me4,Me6,Me8-10:2-one

Schulz *et al.*, 2004. *Chembiochem*, **5**: 1500

b) チャバネゴキブリの性フェロモン

Chase *et al.*, 1992. *PNAS*, **89**: 6050



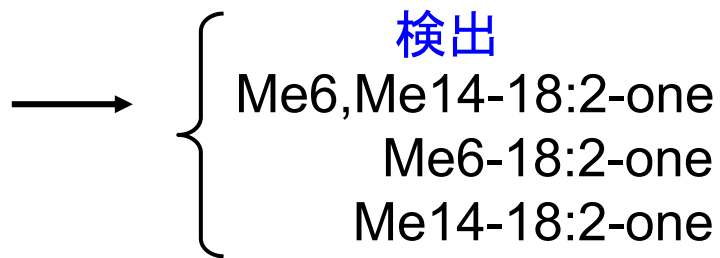
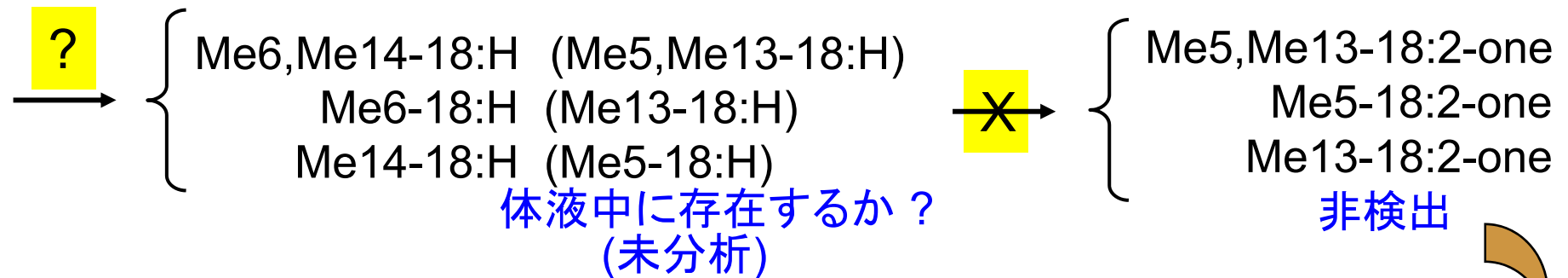
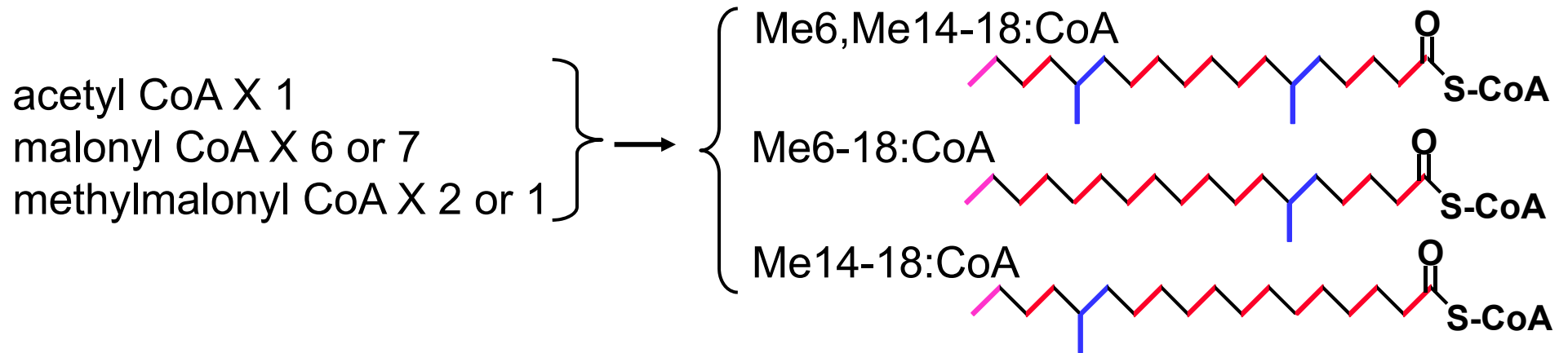
3-位メチル基による
2-位の認識



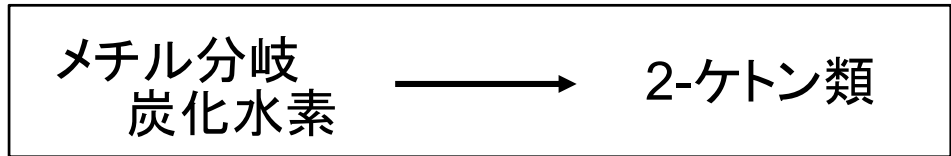
メチル分岐
炭化水素 → 2-ケトン類

← 一般的な生合成経路か?

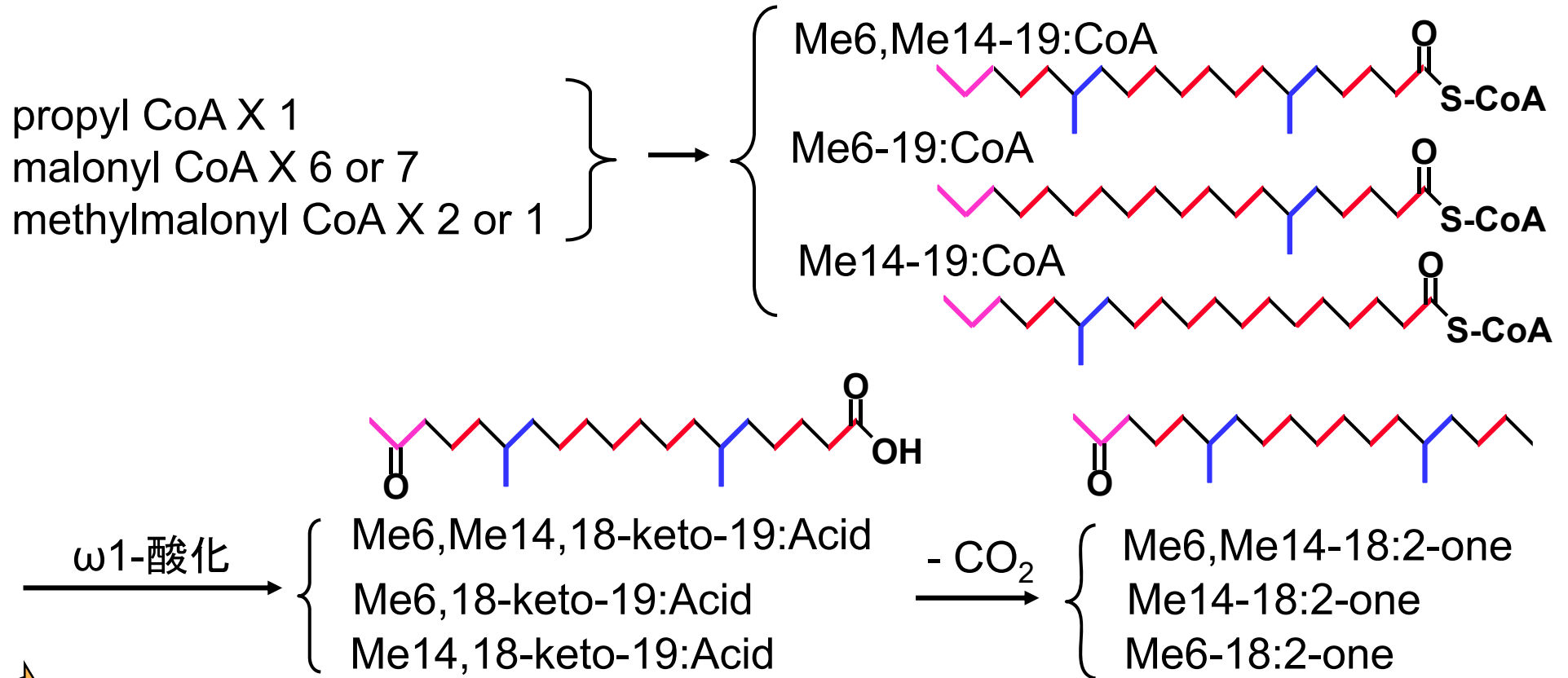
c) コケガ性フェロモン (生合成経路の予測) ①



一般的な経路ではない

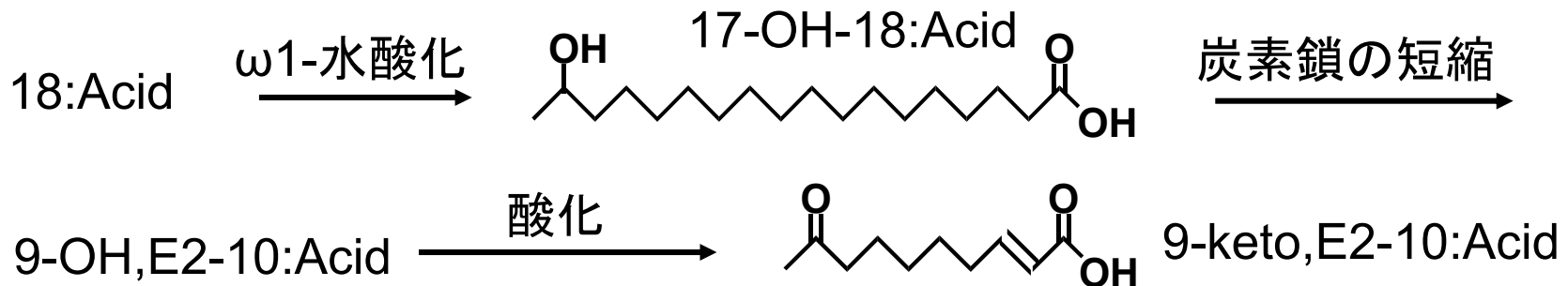


c) コケガ性フェロモン (生合成経路の予測) ②



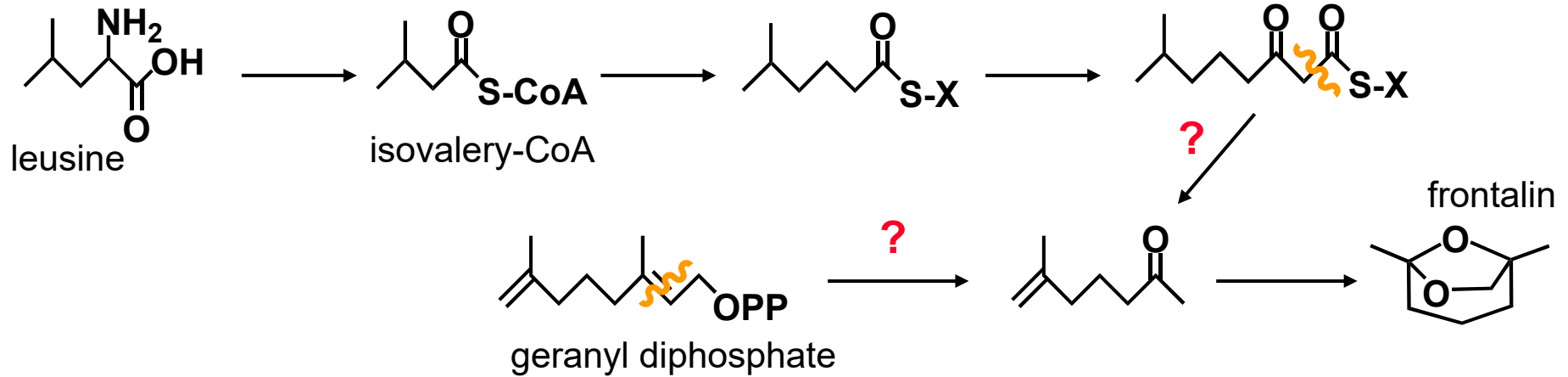
脂肪酸の ω 1-酸化 (ミツバチ)

Plettner *et al.*, 1996. *Science*, **271**: 1851
 1998. *IBMB*, **28**: 31



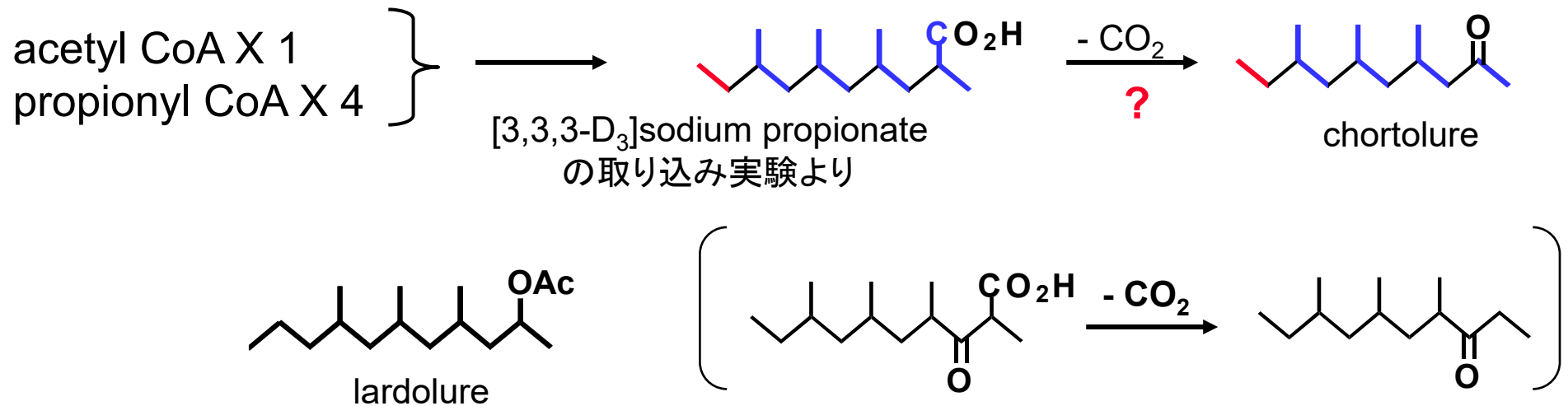
d) Bark beetle

Barkawi et al., 2003. *IBMB*, 33: 1773



e) Storage mite

Schulz et al., 2004. *Chembiochem*, 5: 1500



f) Intermediate of homoteropene

Boland *et al.*, 1998. *Tetrahedron*, **54**: 14725

