

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04618

研究課題名(和文)担子菌-細菌共生系におけるネオニコチノイド系殺虫剤完全分解系の構築

研究課題名(英文) Microbial degradation and detoxification of neonicotinoides by symbiotic systems of white-rot fungi with bacteria

研究代表者

平井 浩文(Hirai, Hirofumi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70322138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：世界中で蜂群崩壊症候群や人類に対する悪影響が危惧されている難分解性ネオニコチノイド系殺虫剤(NEOs)が白色腐朽菌により分解可能であるとともに毒性も除去可能であることが明らかとなった。また、本分解反応にはシトクロムP450が関与していることも突き止めた。さらにNEOsのピリジン環を資化可能な細菌を選抜し、白色腐朽菌との共培養を行ったところ、NEOsを効率的に分解可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neonicotinoides (NEOs) have been widely used world-wide. However, its toxicity for bees and neurological toxicity for humans are urgent problems. In the present study, we clarified that white-rot fungi could degrade and detoxify NEOs, and that cytochrome P450 was involved in the degradation. Moreover, the symbiotic systems of white-rot fungi with bacteria effectively degraded NEOs.

研究分野：環境生化学

キーワード：ネオニコチノイド 白色腐朽菌 細菌 バイオレメディエーション

1. 研究開始当初の背景

本来農薬は、農産物を安定的に提供するために必要不可欠な農業資材として使用されている。しかしながら、1960年代に問題となった DDT 等の塩素系有機化合物を始め、開発当時は「安全」と謳われてきた農薬が、後に人類に対して毒性を示すことが発覚し、農薬登録が失効した化合物が多数存在する。

今回のターゲットであるネオニコチノイド系殺虫剤 (NEOs、図 1) は、1990年代に有機リン系農薬の代替農薬として開発された比較的新しい農薬で、昆虫に対する選択毒性が極めて高く、低濃度でかつ単独使用した場合にも比較的低毒性であると報告されてきた。しかしながら、2000年代になり世界各地でミツバチの大量死・大量失踪 (蜂群崩壊症候群) が報告されるようになり、その主原因として NEOs がクローズアップされ社会問題化してきている。既に EU では、3種の NEOs の使用が原則禁止されており、昨年には、アセタミプリド (ACE) 及びイミダクロプリド (IMI) が人間の発達中の神経系統に悪影響を及ぼす可能性があるという警告を発している。

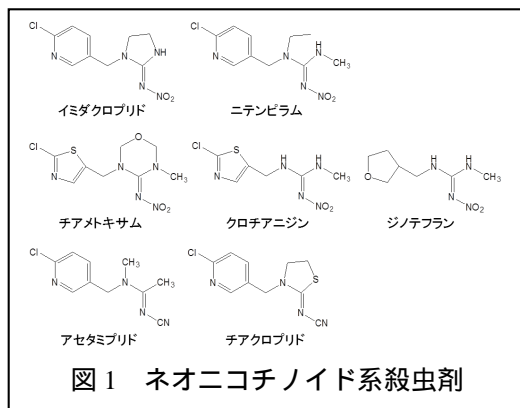


図 1 ネオニコチノイド系殺虫剤

日本における NEOs の国内出荷量は 1992 年以降年々増加し、今もなお年間約 400 トンが出荷され使用されている状況にある。従って、今後とも使用し続けると、その難分解性が故に、今後土壌汚染・水環境汚染が顕在化し、社会問題化が懸念されるとともに、「第二の DDT」となる危険性を孕んでいる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、世界中で蜂群崩壊症候群や人類に対する悪影響が危惧されている難分解性 NEOs の微生物を巧みに利用した低環境負荷型の無害化技術を確立し、安全・安心技術を提案する。申請者が独自に発見した高活性リグニン分解菌に着目し、NEOs 代謝経路を分子論的に解明して代謝産物を特定し、生じた一次代謝産物に対する資化性細菌と組み合わせることで、その効果と効率を飛躍的に高めた共生培養系を構築し、完全分解・無毒化技術を実現する。

3. 研究の方法

(1) 供試菌

供試菌として白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株及び *P. chrysosporium* を使用した。

(2) NEOs 分解実験

供試菌を 10 mL の Kirk またはポテトデキストロース (PD) 液体培地を含む 100 mL 三角フラスコに接種し、30 °C で 5 日間静置培養した。前培養後 NEOs 溶液を添加し、さらに培養を行った。培養後、内部標準物質と 20 mL アセトンを添加し、菌体を破砕した。その後、上澄み液をエバポレーターにて濃縮し、10 mL メタノールにて再溶解させ、HPLC 分析に供した。また培養系にピペロニルブトキシド (PB) もしくは 1-アミノベンゾトリアゾール (ABT) を添加し、NEOs 分解に対するシトクロム P450 (CYP) の影響についても検討した。

(3) NEOs 代謝産物の同定

供試菌を培養した Kirk 液体培地 (全 5 L) に NEOs を添加し 20 日間培養を行い、得られた培養液を酢酸エチルにて抽出し濃縮した。得られた抽出物を各種クロマトグラフィーに供し、代謝産物を単離・精製した。代謝産物を各種 NMR 及び ESI-MS 解析に供した。

(4) マウス神経芽細胞に対する毒性試験

マウス神経芽細胞 Neuro2a 細胞に対して、NEOs あるいは NEOs 代謝産物を添加し 24 時間無血清培地条件で培養を行った。培養後、細胞生存率を MTT 法により測定し、毒性を評価した。Student's t-test により有意差検定を行った。

(5) NEOs 分解に関与する CYP の同定

304 種類の担子菌由来シトクロム P450 遺伝子がそれぞれ導入された酵母を利用した機能スクリーニングシステムを用いて、網羅的に NEOs の代謝に関与するシトクロム P450 を探索した。

(6) NEOs 代謝産物資化性細菌の獲得及び共生培養系における NEOs 分解実験

NEOs 代謝産物を唯一炭素源として含む M9 液体培地に静岡大学構内にて採取した土壌を添加し、1 週間培養した。その後集積培養を繰り返し、NEOs 代謝産物資化性細菌を単離した。得られた細菌と *P. chrysosporium* を PD 液体培地に接種し前培養後、0.1 mM アセタミプリド (ACE) を添加し、所定期間培養後、培養液中の ACE を HPLC にて定量した。

4. 研究成果

(1) 高活性リグニン分解菌による NEOs の分解

これまでに、高活性リグニン分解菌 *P. sordida* YK-624 株により、ACE 及びイミダ

クロプリド (IMI) が分解されることを報告している。そこで本研究ではその他の NEOs (クロチアニジン (CLO)、ジノテフラン (DIN)、ニテンピラム (NIT)、チアマトキサム (THI)) の分解実験を行った。その結果、Kirk 液体培地にて、CLO は培養 20 日間で 40%、NIT は培養 5 日間で 100%、THI は培養 20 日間で約 18%、DIN は培養 20 日間で 31% 分解されることが判明した。なお、PD 液体培地においても分解は認められたものの、Kirk 液体培地より極めて低い結果となった。

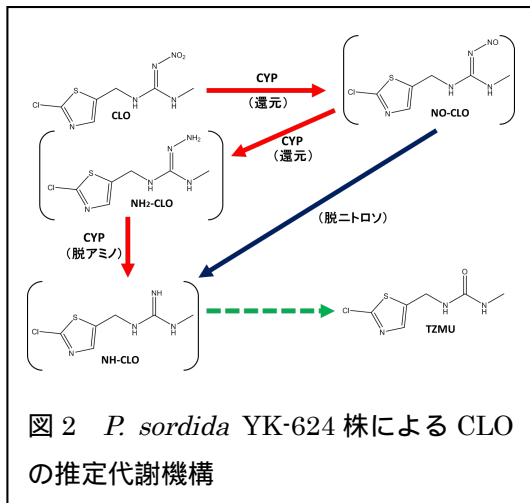


図 2 *P. sordida* YK-624 株による CLO の推定代謝機構

そこで分解代謝産物を同定すべく大量培養を行い、分解代謝産物を単離精製し、構造解析を行った。まず CLO からは *N*-(2-chlorothiazol-5-yl-methyl)-*N*²-methylurea (TZMU) が分解代謝産物として同定された (図 2)。次いで NIT からは (E)-*N*-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-*N*-ethyl-*N*²-hydroxy acetimidamide (CPMHA) が同定された (図 3)。また DIN からは *N*-((4a*S*,7a*S*,*E*)-1-methylhexahydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2(1*H*)-ylidene)nitramide (PHPF) が同定された (図 4)。なお、CPMHA 及び PHPF は新規化合物であった。

これまでの検討において、NEOs の分解に CYP が関与していることが判明しているため、上記の NEOs の分解に CYP が関与しているかどうか確認するため、培養系に CYP

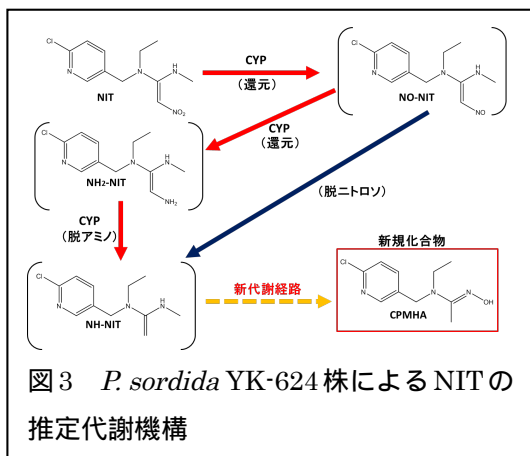


図 3 *P. sordida* YK-624 株による NIT の推定代謝機構

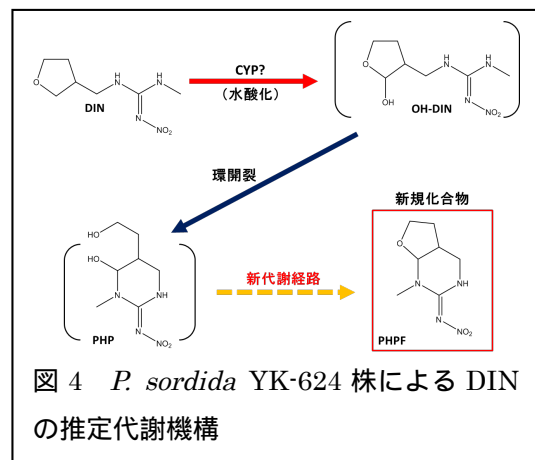


図 4 *P. sordida* YK-624 株による DIN の推定代謝機構

阻害剤 (PB 及び ABT) を添加し、検討を行った。その結果、どの NEOs の分解も CYP 阻害剤の添加により阻害されることが判明した。つまり *P. sordida* YK-624 株による NEOs の分解に CYP が関与していることが判明した。

以上の結果より、CLO、NIT、DIN の分解代謝機構をそれぞれ図 2、図 3、図 4 のように推定した。

(2) 毒性評価

これまでの検討において、*P. sordida* YK-624 株は各種 NEOs を分解可能であることが判明している。そこで毒性除去も可能かどうか検討するため、分解代謝産物の毒性を、マウス神経芽細胞 Neuro2a 細胞を用いて評価した。毒性評価に必要な量が得られた TZMU を供した結果、CLO では濃度依存的に毒性が認められたのに対して、TZMU では供試した濃度全てにおいて毒性が認められなかった (図 5)。つまり、*P. sordida* YK-624 株は NEOs を分解可能であるとともに、毒性も除去可能であることが判明した。

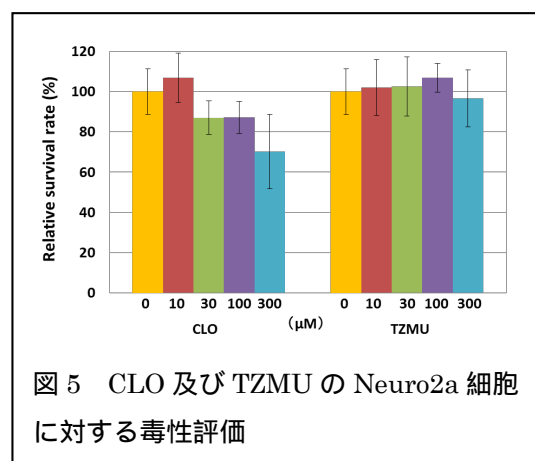


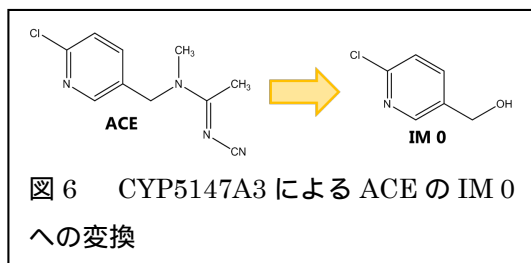
図 5 CLO 及び TZMU の Neuro2a 細胞に対する毒性評価

(3) NEOs 分解に関与する CYP の同定

これまでの検討において、*P. sordida* YK-624 株による NEOs の分解において CYP の関与が判明している。しかしながら *P. sordida* YK-624 株は全ゲノム解析を行っておらず、分解に関与する CYP の同定は困難を極める。そこで既に全ゲノム解析が行われ

ており、なおかつ、各種 CYP 遺伝子を導入した酵母による機能スクリーニングシステムが構築されている *P. chrysosporium* における ACE の分解及び関与する CYP の同定を試みた。

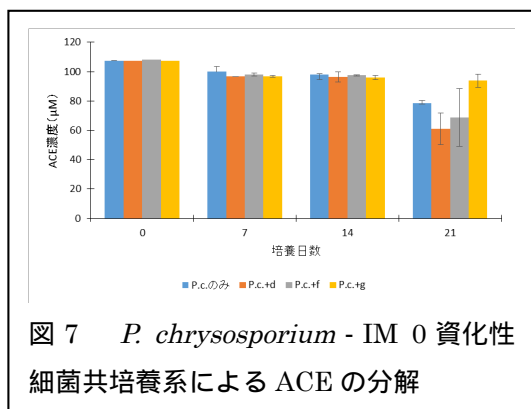
まず分解試験を行った結果、本菌は PD 液体培地において培養 20 日間で ACE を 51% 分解した。また分解代謝産物として 6-chloro-3-pyridinemethanol (IM 0) が同定された (図 6)



そこで、機能スクリーニングシステムを用いて ACE を IM 0 に代謝する CYP の検索を行った結果、CYP5147A3 組換え酵母が ACE を IM 0 に代謝することが判明した。CYP5147A3 はこれまでに、O-脱エチル、S 酸化、ステロイド 11-β 水酸化反応に関与することが報告されており、本研究により CYP5147A3 は ACE の脱側鎖の反応も可能であることが示された。

(4) IM 0 資化性細菌の獲得及び共培養系における ACE 分解実験

以上の検討により、白色腐朽菌は各種 NEOs を分解可能であり、IM 0 や TZMU を始めとする各種分解代謝産物が得られている。しかしながら白色腐朽菌が行う反応はあくまでも側鎖の脱離や酸化反応に止まっており、ピリジン環の開裂には至っていない。そこで NEOs の完全分解を目的に、モデル化合物として ACE を用いて、さらに供試菌として *P. chrysosporium* を使用し、ACE の分解代謝産物である IM 0 資化性細菌を獲得し、本細菌と *P. chrysosporium* の共培養系を確立し、ACE の完全分解を試みた。



まず静岡大学構内の土壌を IM 0 を唯一炭素源とする培地で集積培養を行い、IM 0 の分解にすぐれた細菌 3 種 (未同定でありここで

は d 株、f 株、g 株とする) を得た。これら細菌を *P. chrysosporium* と共培養し、ACE の分解を検討した結果、*P. chrysosporium* 単独より分解に優れた共培養系 (d 株及び f 株) が認められた (図 7)。今後、細菌の種同定、及び培養条件の最適化などまだまだ検討の余地を残しているものの、*P. chrysosporium* - 細菌共培養による ACE の効率的分解系の構築に成功したと結論づけた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

平井浩文、白色腐朽菌を用いたネオニコチノイド系殺虫剤の分解・無毒化、アグリバイオ、査読無、2 巻、2018、53-55

T. Mori, J. Wang, Y. Tanaka, K. Nagai, H. Kawagishi, H. Hirai, Bioremediation of the neonicotinoid insecticide clothianidin by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*, Journal of Hazardous Materials, 査読有, 321, 2017, 586-590. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.09.049

〔学会発表〕(計 5 件)

大野遥、二瀬博文、森智夫、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌によるアセタミプリド分解に関与するシトクロム P450 遺伝子の同定、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

J. Wang, Y. Tanaka, T. Mori, H. Kawagishi, H. Hirai, Degradation of neonicotinoid insecticides by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances, 2017

田中佑典、王剣橋、長井薫、森智夫、河岸洋和、平井浩文、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によるネオニコチノイド系殺虫剤の分解及び無毒化、第 61 回リグニン討論会、2016 年

平井浩文、地球環境問題解決に向けた担子菌の利用研究、日本きのこ学会第 20 回大会 公開シンポジウム (招待講演)、2016 年

田中佑典、王剣橋、長井薫、森智夫、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株によるクロチアニジンの分解、第 66 回日本

木材学会大会、2016年

〔図書〕(計1件)

平井浩文 他 44名、S&T出版、きのこの生理機能と応用開発の展望、2017、126-135

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 浩文 (HIRAI, Hirofumi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70322138

(2) 研究分担者

一瀬 博文 (ICHINOSE, Hirofumi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00432948

長井 薫 (NAGAI, Kaoru)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：20340953

亀井 一郎 (KAMEI, Ichiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90526526