様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：８７６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０５７７８

研究課題名（和文）糸状菌由来遺伝子組み換え酵母により生産されるテルペンを用いた抗蟻性物質の探索

研究課題名（英文）Research for anti-termite chemicals using terpenoids produced by fungal cytochrome P450monooxygenase recombinant yeast.

研究代表者
須原　弘登（Suhara, Hiroto）

宮崎県木材利用技術センター・その他部局等・副部長

研究者番号：９０４２３５４０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では糸状菌のセスキテルペンシンターゼ（以下「STS」）遺伝子またはこれにシトクロームP450モノオキシゲナーゼ（以下「CYP」）遺伝子を組み込んだ酵母を用いてテルペン類を生産・代謝させ、防蟻性能を評価し、テルペンおよびその生物変換物による防蟻処理技術の確立を目指す。本研究では13種のSTSクローンが生産するセスキテルペンと3種のSTS/CYPクローンの生産するセスキテルペン代謝物について防蟻性能評価を行った。試験の結果、10クローン9種の化合物にシロアリ食害抑制効果を見出した。このうち7化合物についてはポジコンとして用いたフェルギノールと同程度（有意差なし）の食害抑制効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在、シロアリ防除は主に化学合成系薬剤（農薬）が用いられている。これらの薬剤はヒトや特定の生物に対して一定の安全性は確認されているものの、使用に不安を覚える消費者は少なくない。過去に安全とされてきた薬剤で、様々な理由により現在使用禁止となっているものは多数存在する。本研究はこのリスクを最小化するために、生物由来の化合物（天然物）をシロアリ防除に用いることを目的としている。生物由来の材料を用いることで、環境への負荷の低減、意図しない副作用のリスク低下が期待できる。
　本研究では防蟻成分の探索に遺伝子組み換え技術を用いることで、特定の化合物の評価が可能であり、速やかな研究成果の提供を期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, terpenes are produced and metabolized using recombinant yeast expressing the sesquiterpene synthase (STS) genes with/without the cytochrome P450 monooxygenase (CYP), both of which are derived from filamentous fungi. The anti-termite activity of these terpenes and their metabolites is being evaluated to develop anti-termite treatment technology.
The anti-termite activity of sesquiterpenes produced by 13 STS clones and sesquiterpene metabolites produced by three STS clones that co-express CYP, was evaluated. Nine compounds (from ten clones) exhibited an inhibitory effect on termite feeding. Seven of these compounds were comparable to that of ferruginol, which was used as a positive control.

研究分野：木材保存

キーワード：シロアリ　テルペン　木材保存処理　セスキテルペン合成酵素　シトクロームP450モノオキシゲナーゼ

様　式　C－１９、F－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

木質構造物を良好な状態で長期間使用するためには、木材を劣化から守ることが必要である。シロアリ食害は木材を劣化させる大きな原因の一つであり、我が国の白アリ防除市場は推計で 494 億円 [1]、また世界では推計で 55 億米ドル [2]（いずれも 2023 年見込み）の巨大な市場を形成している。シロアリ防除は化学合成薬剤（農薬）を用いることが主流であるが、脱ケミカルが今後の課題となると考えられる。天然物ではテルペン類をはじめ多くの成分に防蟻効果が報告されているが、生産量が微量である場合が多く、一部を除いて研究・開発 [3]が進んでいない。

２．研究の目的

本研究では糸状菌のセスキテルペン合成酵素（以下「STS」とする）及び様々な化合物に対して代謝能を持つ糸状菌のシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ(以下「CYP」とする）遺伝子を酵母に導入しテルペン類の生産・代謝を行い、これにより生産されたテルペンを用いて防蟻性能試験を行うことで、天然物であるテルペンまたはその生物変換物による防蟻処理技術の開発を目指す。

３．研究の方法

供試生物

本研究では供試生物：図 1 に示す 7 種の糸状菌から得た 54 種の STS 遺伝子と 5 種の糸状菌より得た 615 種の CYP 遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* INVSc-1（*MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*）株（Invitorgen）で異種発現させた酵母ライブラリ(図 1)を用いる。これにより STS 遺伝子にセスキテルペン合成を行わせ、その後 CYP 遺伝子によって STS 遺伝子が生産したテルペンを代謝させるというスキームになっている。本取り組みではまず上流側の反応となる STS 遺伝子のみを組み込んだ STS ライブラリを用いた。このライブラリよりセスキテルペン生産能の高いクローン 13 株を選抜した。その後、これらのクローンと CYP 遺伝子を共発現させた遺伝子組み換え酵母から、代謝物生産能の高い 3 クローンを選抜した。選抜したクローンを培養し得られたテルペンを用いて、イエシロアリ食害阻害活性の評価を行った。表 1 に今回用いたクローンとその産物を示す。テルペンの純度は GC-MS 分析により検出されたピークの面積比により算出している。

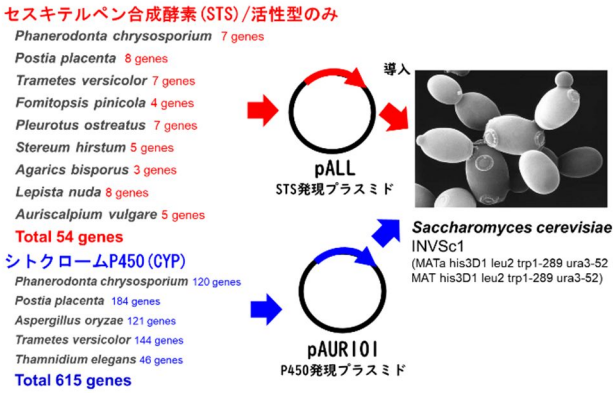

図１　本研究で用いる遺伝子組み換え酵母ライブラリ

強制摂食試験

20mm 角にカットしたろ紙を 5 枚重ねて針無しホッチキスで留めたもの（約 160 mg）に遺伝子組み換え酵母により生産されたテルペン 17 mg を添加し、デシケーター内で 1 日乾燥させ、秤量したものを用い、JIS K 1571 に準じてイエシロアリ（*Coptotermes formosanus*）を対象に強制摂食試験を行った（*n*=3）。14 日間食害処理を行った後、試験体の重量減少を評価した。

４．研究成果

13 種の STS クローンが生産するセスキテルペンの食害抑制試験の結果、8 クローン（AbSTS-07, AvSTS-01, PcSTS-03, PcSTS-08, PoSTS-11, PoSTS-16, PpSTS-14, TvSTS-12）で有意な食害の減少が見られた。これらの内、PoSTS-16、TvSTS-12 はポジティブコントロールとして用いたフェルギノールに対して有意に食害抑制効果が低く、食害抑制効果が弱いと考えられた。また、AvSTS-01 と PpSTS-14 は同じ化合物 Iltremulanol A を生産し、試験結果も再現性が良く、本試験結果の妥当性が示せた。

引き続き行った STS 遺伝子と CYP 遺伝子を共発現したクローンの代謝物を用いた試験では、選抜した 3 クローンの代謝前後での食害阻害活性の変動は三者三様であった。食害抑制効果の高い AvSTS-01 の生産する Iltremulanol A を代謝させて得られた Iltremulanol-14-ol では食害抑制効果が弱くなり、食害抑制効果の見られない PpSTS-08 の生産する Δ6-Protoilludene を代謝させた Δ6-Protoilludene-8-ol では強い食害抑制効果が見られた。また、弱い食害抑制効果の見られた TvSTS-12 の生産する γ-Cadinene を代謝させた γ-Cadinene-8-ol の食害阻害効果は大きく変わらなかった。いずれの代謝も水酸基の導入であるが、その影響は一様にならず、クローンライブラリをスクリーニングする際にはすべてのクローン産物を対象として評価することが重要であることが示された。

本結果を踏まえて、今後は効果のあったクローンについて有効処理濃度の下限値の検討や、本研究では検討できなかったヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）に対する防蟻効果についても検証をしたい。

表 1 試験に用いたクローンとその生産物

クローン名	生産されるテルペンとその純度
AbSTS-07	Unidentified (87%), etc
AvSTS-01	Iltremulanol A (100%)
LnSTS-20	β-Barabatene (95%) Isobazzanene (5%)
LnSTS-27	Acora-3,7(14)-diene (100%)
PcSTS-03	Epicubenol (100%)
PcSTS-08	α-Bisabolene (100%)
PcSTS-11	α-Santalene (100%)
PoSTS-06	Unidentified (100%)
PoSTS-16	α-Cuperene (93%), β(4%),δ(3%),
PoSTS-11	Nerolidol (100%)
PpSTS-08	Δ6-Protoilludene (100%)
PpSTS-14	Iltremulanol A (100%)
TvSTS-12	γ-Cadinene (100%)
AvSTS-01 /JoCYP08	Iltremulanol-14-ol
PpSTS-08 /CYP5344B1	Δ6-Protoilludene-8-ol
TvSTS12 /TvCYP68	γ-Cadinene-3-ol

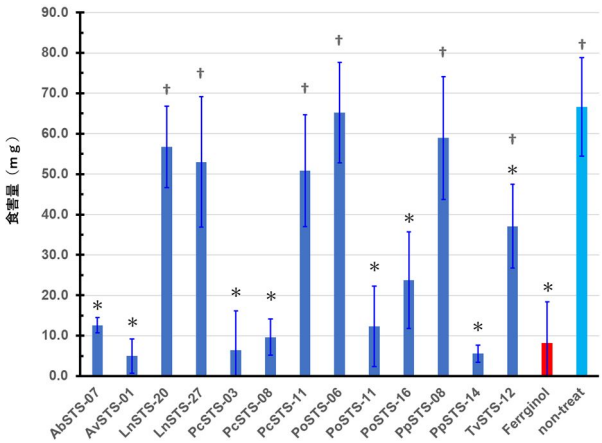

図 2 STS クローンが生産するテルペンによるシロアリ食害阻害試験
＊無処理との有意差が p<0.05。
†フェルギノール処理との有意差が P<0.05。

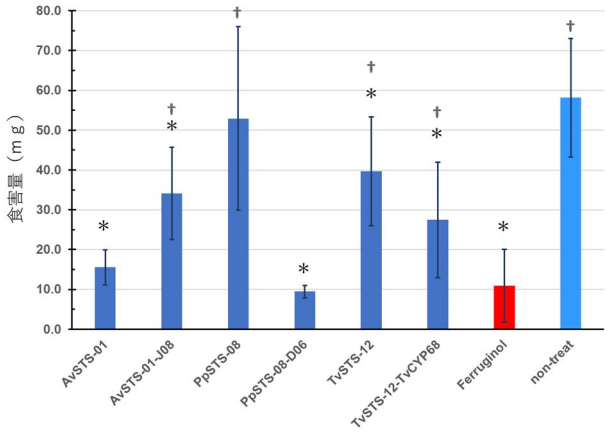

図 3 STS/CYP 共発現クローンが生産するテルペンによるシロアリ食害阻害試験
＊無処理との有意差が p<0.05。
†フェルギノール処理との有意差が P<0.05。

<引用文献>
1：㈱矢野経済研究所「2024 年版 PCO・TCO・燻蒸サービスの市場実態と中期展望」
2:㈱クローバルインフォメーション「Termite control market. Global forecast 2025-2030」
3：公益社団法人日本しろあり対策協会「しろあり防除薬剤・工法等認定登録製品」(https://www.hakutaikyo.or.jp/contents/uploads/yakuzai.xlsx／最終更新日 令和 6 年 12 月 31 日)

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和 4 年度業務報告書
https://www.pref.miyazaki.lg.jp/contents/org/kankyo/mokuzai/wurc/kankoubutu/gyoumuhoukoku/r04-gyoumuhoukoku/r04-gyoumuhoukoku.html
令和 5 年度業務報告書
https://www.pref.miyazaki.lg.jp/contents/org/kankyo/mokuzai/wurc/kankoubutu/gyoumuhoukoku/r05-gyoumuhoukoku/r05-gyoumuhoukoku.html

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	一瀬　博文 (Ichinose Hirofumi) (00432948)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	加藤　政和 (Kato Masakazu) (90966582)	宮崎県木材利用技術センター・材料開発部・主任技師 (87601)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関