

令和2年8月31日

静岡県庁社会部 各報道機関 御中

国立大学法人静岡大学長
石井 潔

**白色腐朽菌がネオニコチノイド系殺虫剤を分解し、
本分解反応をシトクロム P450 が効率的に触媒することを解明**

静岡大学農学部の平井浩文教授らのグループは、キノコの仲間である白色腐朽菌が、ミツバチの大量失踪・大量死や人類に対しても悪影響を及ぼしているネオニコチノイド系殺虫剤を分解・無毒化できることを証明し、また、本分解反応に2種類の酵素シトクロム P450 が関与し、さらに本シトクロム P450 がネオニコチノイド系殺虫剤の分解を効率的に触媒することを解明しました。

本研究成果により、世界で幅広く使用されているネオニコチノイド系殺虫剤により汚染された環境の浄化・無毒化に白色腐朽菌の利用が期待でき、分解の仕組みを解明したことにより、様々な環境汚染問題への応用が期待されます。

なお、本研究成果は、オランダの Elsevier 社の科学雑誌「Journal of Hazardous Materials」に掲載されます。

お問い合わせ先

静岡大学 農学部

教授 平井浩文

電話番号 054-238-4853

FAX番号 054-238-4853

メールアドレス hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【1. 研究概要】

本研究では、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* によりネオニコチノイド系殺虫剤 (NEOs) が分解されるかどうか検討を行い、分解に関与するシトクロム P450 (CYP) の同定を試みた。*P. chrysosporium* は NEOs であるアセタミプリド (ACE)、クロチアニジン (CLO)、イミダクロプリド (IMI)、チアクロプリド (THI) を分解可能であり、*P. chrysosporium* 由来 CYP の酵母異種発現機能スクリーニングシステムにより、2 種類の CYP が分解に関与していることが判明した。これら CYP は、NEOs の *N*-脱アルキル反応を触媒し、分解産物として 6-chloro-3-pyridinemethanol (Fig. 1) 及びその側鎖を与えることが判明した。

【2. 研究成果】

ネオニコチノイド系殺虫剤 (NEOs) は世界で広く使用されている殺虫剤の一種であり、1990 年代に有機リン系殺虫剤の代替として開発された比較的新しい殺虫剤である。これはニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストであり、昆虫の中樞神経系を攪乱することによって選択的な生物学的毒性を発揮することが知られている。NEOs には、ACE、CLO、ジノテフラン (DIN)、IMI、ニテンピラム (NIT)、THI 及びチアメトキサム (TMX) の 7 種類がある (Fig. 2)。世界の殺虫剤の総販売量に基づくと、2014 年の NEOs の市場シェアは 25% を超え、その約 85% を TMX、IMI、CLO が占めていた。NEOs の用途は幅広く、世界の 120 か国で 140 種以上の作物に対する殺虫剤として登録されており、日本でも 1990 年代に発売されて以降、NEOs の出荷量は増加している。

しかしながら NEOs にはいくつかの問題点が挙げられている。例えば土壌中での長い半減期やミツバチに対する有害な影響などが挙げられている。とくにミツバチの大量死・大量失踪は蜂群崩壊症候群と呼ばれ、NEOs によってミツバチが方向感覚・帰巢本能が麻痺し、NEOs とミツバチの大量死が関連していると報告された。2013 年には NEOs の 3 種 (CLO、IMI、TMX) が EU 全域で暫定使用禁止措置が行われており、2018 年にはこれら 3 種の屋外での使用禁止が決定した。さらに最近の研究では、水生無脊椎動物やヒトに対する影響が明らかになっている。このような問題点から、NEOs 汚染環境の浄化・無毒化技術の開発は喫緊の課題である。

白色腐朽菌は木材の主要成分の一つである難分解性天然高分子リグニンを分解する独特な能力を持ち、農薬や多環式芳香族炭化水素など様々な環境汚染物質も分解可能であることが知られている。そこで本研究では、*P. chrysosporium* による NEOs の分解、さらにその分解機構の解明を目的に検討を行った。

まず 6 種類の NEOs の *P. chrysosporium* による分解を試みたところ、DIN 及び NIT 以外の NEOs の分解が観察された (Fig. 3)。ACE は培養後期から分解が観察され、培養 4 週間で 27.5% の分解が認められた。CLO も ACE と同じ傾向であり、培養 4 週間で 28% の分解が認められた。IMI は培養初期から分解が認

められ、培養 4 週間で 100% 分解された。THI の分解は IMI よりは遅いものの、ACE や CLO よりは速く分解された。

P. chrysosporium による NEOs の分解において CYP が関与しているかどうか検討すべく、CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (1-ABT) の NEOs 分解に与える影響について検討した (Fig. 4)。その結果、濃度依存的に 1-ABT が NEOs 分解を阻害することが判明した。本結果は、*P. chrysosporium* による NEOs の分解において CYP が関与していることを示唆している。

そこで、NEOs 分解に関与している CYP の同定を、*P. chrysosporium* 由来 CYP の酵母異種発現機能スクリーニングシステムにより行った。その結果、CYP5147A3 及び CYP5037B3 が NEOs 分解に関する CYP として同定された (Fig. 5)。そこで、これら CYP 遺伝子を発現させた酵母による NEOs の分解を行った。CYP5147A3 もしくは CYP5037B3 遺伝子発現酵母で ACE を処理すると 2 種類の分解産物を与え、一つは 6-chloro-3-pyridylmethanol であり、もう一つは *N*'-cyano-*N*-methyl acetamidine であった。CYP5037B3 遺伝子発現酵母で IMI を処理すると 2 種類の分解産物を与え、一つは 6-chloro-3-pyridylmethanol であり、もう一つは 2-nitroamino-2-imidazoline であった。CYP5147A3 遺伝子発現酵母で THI を処理すると 3 種類の代謝物を与え、それぞれ 6-chloro-3-pyridylmethanol、2-cyanoimino-1,3-thiazolidine、及び thiachloprid amide であった。本結果は、これらの CYP が NEOs の *N*-脱アルキル化反応を触媒していることを示している。

実際に *P. chrysosporium* により NEOs の分解を行うと、ACE、IMI 及び THI 全てにおいて、6-chloro-3-pyridylmethanol の蓄積は観察されず、脱アルキル反応で生成する側鎖部分のみの蓄積が見られた。よって、*P. chrysosporium* による NEOs の処理では、6-chloro-3-pyridylmethanol はさらに代謝されていることが予想された。

さらに、*P. chrysosporium* における CYP5147A3 及び CYP5037B3 遺伝子発現挙動を解析した結果、これら CYP 遺伝子の発現と NEOs 分解が類似した傾向を示した (Fig. 6)。

【3. 研究のポイント】

- キノコの仲間である白色腐朽菌が、ミツバチの大量失踪・大量死や人類に対しても悪影響を及ぼしているネオニコチノイド殺虫剤を分解であることを証明。
- 本分解反応に 2 種類の酵素シトクロム P450 が関与。
- 本シトクロム P450 は、ネオニコチノイド殺虫剤の *N*-脱アルキル化反応を効率的に触媒。

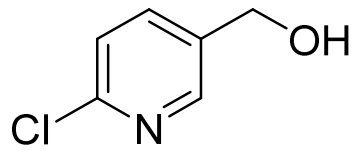


Fig. 1 6-chloro-3-pyridinemethanol (IM 0) の構造

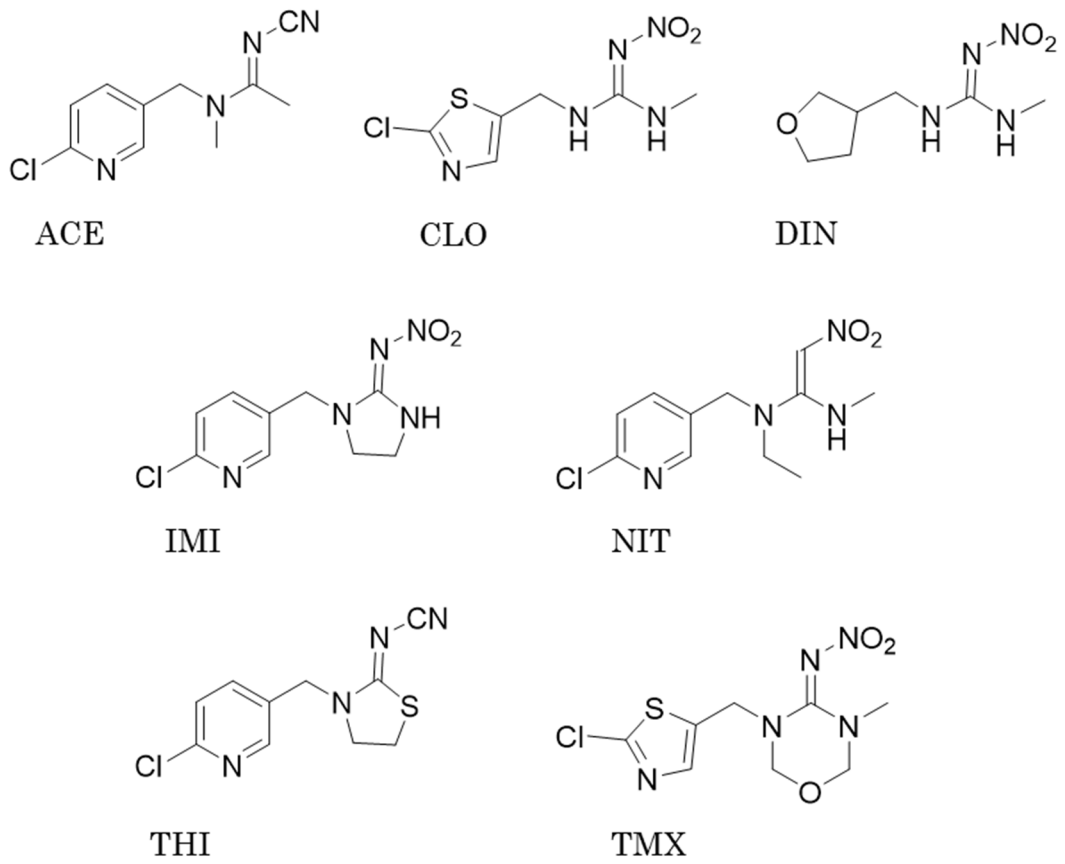


Fig. 2 NEOs の構造

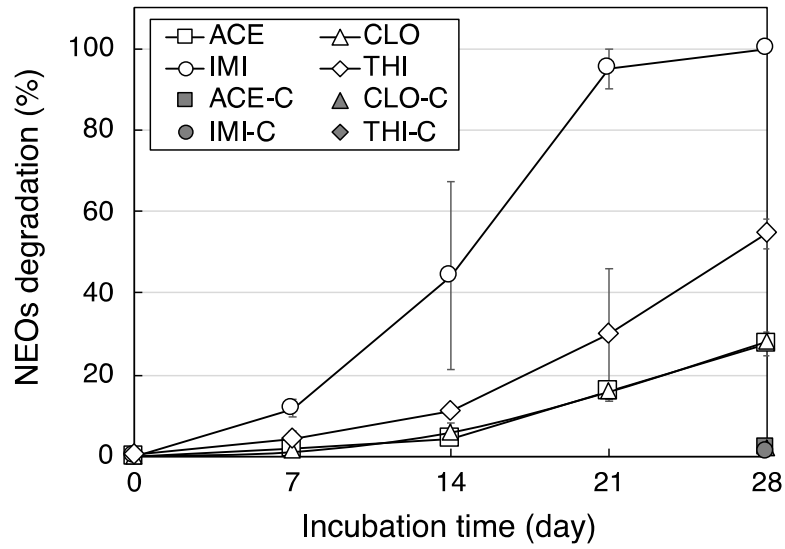


Fig. 3 *P. chrysosporium* による NEOs 分解の経時変化

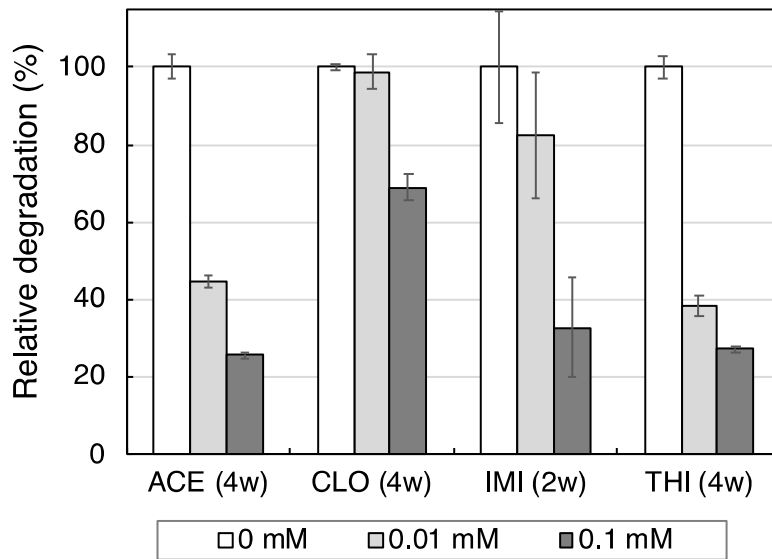


Fig. 4 *P. chrysosporium* による NEOs 分解に及ぼす 1-ABT の影響

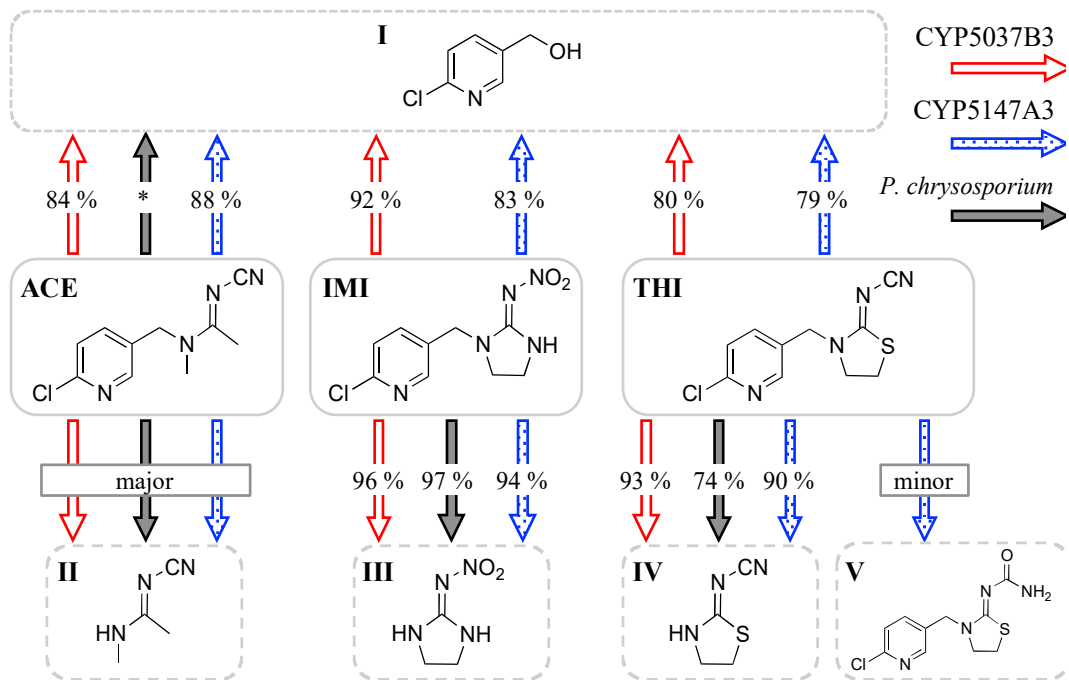


Fig. 5 *P. chrysosporium* もしくは CYP5037B3 または CYP5147A3 を発現している酵母による NEOs 代謝機構

I: 6-chloro-3-pyridylmethanol, II: *N*²-cyano-*N*-methyl acetamidine, III: 2-nitroamino-2-imidazoline, IV: 2-cyanoimino-1,3-thiazolidine, V: thiachloprid amide

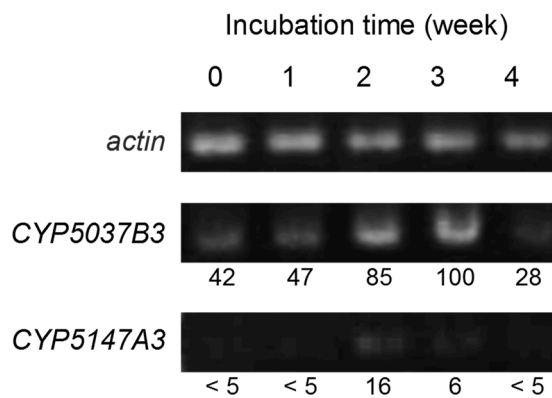


Fig. 6 各 CYP 遺伝子の発現挙動

各バンドの下に示している数値は、相対発現量 (%) を示す。