

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580183

研究課題名(和文) シロアリの階級分化機構の解明とシロアリ養殖によるバイオディーゼル燃料生産への応用

研究課題名(英文) Bio-diesel fuel production from termite biomass by applying a termite differentiation mechanism to mass production of termites

研究代表者

板倉 修司 (ITAKURA SHUJI)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60257988

研究成果の概要(和文)：幼若ホルモン結合タンパク質の1種であるヘキサメリン遺伝子の発現をRNA干渉により抑制すると、ヤマトシロアリのニンフ(将来、翅蟻へ分化する階級)の幼形成熟(女王と王とは異なり幼形形質をとどめたまま産卵能をもつようになった個体)への分化が促進されることが分かった。また、ブナシメジ廃菌床には、ヤマトシロアリの職蟻およびニンフの幼形成熟への分化ならびに幼形成熟による産卵を促進する物質が含まれていた。この物質の候補として、ヒドロキシシナピン酸とアラビノキシロビオースのエステルを分離・同定した。

研究成果の概要(英文)：Termites express polyphenism, in that nymphs can differentiate into either the alate or the nymphoid form, which is one of the reproductive caste phenotypes (neotenics). The siRNA injection treatment used to silence hexamerin caused moderate suppression of hexamerin gene expression in the termite, *Reticulitermes speratus*. Promotion of nymph differentiation to nymphoid form occurred with the siRNA injection treatment. The number of oviposition and neotenics that developed from workers and nymphs fed the waste of *Hypsizigus marmoreus* was significantly higher than the control. An ester of arabinoxylobiose and 2-hydroxysynapic acid may be the key elements in mushroom waste that affect termite development and oviposition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：昆虫生化学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：シロアリ、生殖虫、脂質

1. 研究開始当初の背景

(1) 下等シロアリ(イエシロアリおよびヤマトシロアリ)の乾燥質量の50-70%を脂質が占め、その主要な構成脂肪酸がリノール酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸であり、シロアリオイルは組成的にはオリーブ

オイルに近いことが分かった。

(2) ヤマトシロアリに含有される蛍光性アルカロイド(ノルハルマン)に、シロアリの幼形成熟による産卵を促進する作用があることがわかった。

(3) ブナシメジ廃菌床にヤマトシロアリの産

卵を促進し、職蟻から幼形成熟への分化を促進する物質が含有されていることが分かった。

この様な背景のもと、産業廃棄物である食用きのご廃菌床をシロアリの餌として用いたシロアリ養殖によりシロアリを大量に繁殖させ、この大量飼育シロアリから搾油することで得られるシロアリオイルをバイオディーゼル燃料として有効利用することが可能であるとの発想に至った。

2. 研究の目的

- (1) 各種食用きのご廃菌床に含有されるシロアリの階級分化および産卵促進物質の検索・同定
- (2) シロアリに含有されるノルハルマンによるシロアリ階級分化の制御機構の解明
- (3) 食用きのご廃菌床を餌として用いた場合のシロアリの生育・増殖に適した条件の検討
- (4) シロアリ飼育条件と構成脂肪酸の組成の関係

3. 研究の方法

- (1) 食用きのご廃菌床を餌としたシロアリ飼育条件の検討と階級分化の観察
 - ①食用きのご（ブナシメジ、マイタケ、エノキタケ）廃菌床を餌としたイエシロアリとヤマトシロアリの飼育実験による飼育容器および廃菌床供給方法の最適化。
 - ②シロアリの飼育実験後の廃菌床に含まれる多糖類の構成単糖の組成ならびに含有量の測定。シロアリによる廃菌床の摂取効率を検討。
 - ③これら実験中に起こる職蟻からニンフあるいは幼形成熟（ニンフォイド、エルガトイド）への分化の頻度を観察し、餌と階級分化の関係を検討。
- (2) 廃菌床に含有される階級分化制御物質と産卵促進物質の単離・構造決定
 - ①食用きのご廃菌床に含有される成分を、水、エタノール、酢酸エチル、クロロホルムで抽出。抽出物を添加したる紙でシロアリを飼育。
 - ②3~6ヶ月間の飼育実験を行い職蟻からニンフあるいは幼形成熟への階級分化、あるいは産卵の促進など生理活性をもつ化合物を含む抽出画分をスクリーニング。
 - ③陽性の抽出画分に含まれる生理活性物質を、薄層クロマトグラフィー（TLC）ならびにカラムクロマトグラフィーで単離・精製する。
 - ④マスキロマトグラフィー（GC-MS、Q-TOF）およびNMR解析で生理活性物質を同定。
- (3) シロアリ階級分化の分子生物学的機構の解析
 - ①シロアリの職蟻からニンフあるいは幼形成熟への階級分化の誘導のために、RNAi（RNA干渉）によるシロアリの幼若ホルモン結合タ

ンパク質（ヘキサメリン、ピテロジェニン、リポフォリン）の発現抑制実験。この手法により、シロアリの階級分化を制御することが可能かどうか検討。

②長鎖 dsRNA と 21bp の短鎖 dsRNA によるヘキサメリン遺伝子の抑制実験を行い、mRNA レベルの変化を解析。

(4) 高等シロアリの成分分析

- ①高等シロアリ（タカサゴシロアリおよびタイワンシロアリ）の成分組成を分析
- ②下等シロアリ（イエシロアリおよびヤマトシロアリ）と比較して、高等シロアリが燃料としての利用に適しているか検討。

4. 研究成果

- (1) 食用きのご廃菌床によるシロアリ飼育では、廃菌床を円柱状に圧縮し餌として用いると、シロアリの生存率が向上することがわかった。また、廃菌床を一旦滅菌すると、シロアリ飼育中に、空中浮遊菌による廃菌床の汚染が生じ、この菌が廃菌床上で生育することに起因するシロアリの死虫率の上昇が観察された。このことから、廃菌床を滅菌せず食用きのごが生きた状態で餌として用いる方が、シロアリの生存率が高くなることがわかった。イエシロアリよりもヤマトシロアリの方が、廃菌床を餌とした際に、長期間生存することがわかった。ブナシメジ廃菌床には、ヤマトシロアリの職蟻およびニンフの幼形成熟（女王と王とは異なり幼形形質をとどめたまま産卵能をもつようになった個体）への分化ならびに幼形成熟による産卵を促進する物質が含まれることが示唆された。
- (2) ブナシメジ廃菌床に含まれるヤマトシロアリの幼形成熟への分化ならびに幼形成熟による産卵を促進する物質の候補として、ヒドロキシシナピン酸とアラビノキシロビオースのエステルを分離・同定した。エノキタケ、マイタケ、ブナシメジの廃菌床ならびに廃菌床の水、熱水、50%エタノール、エタノール抽出物を添加したる紙でヤマトシロアリを飼育し、各廃菌床の50%エタノール抽出物にヤマトシロアリの幼形成熟による産卵促進活性があることを見出した。これら3種類のきのご廃菌床の50%エタノール抽出物を液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析し、共通する成分の単離を試みたが、共通成分は存在していないことがわかった。
- (3) シロアリの階級分化で主要な働きをする幼若ホルモンの運搬や保護に深くかわる幼若ホルモン結合蛋白質の1つであるヘキサメリン遺伝子を対象としたRNA干渉をヤマトシロアリの職蟻とニンフに対して行った。職蟻では兵蟻への分化の促進などは起こらなかったが、ニンフではRNA干渉でヘキサメリンの発現を抑制した個体で幼形成熟への分化が促進されることが明らかになった。

幼形成熟への分化が促進されることは産卵能をもつ個体数の増加を意味しており、シロアリ養殖に重要なシロアリの個体数を増やすための方法が1つ新たに確立されたことになる。このことは、シロアリを人為的に増殖させ、バイオディーゼル燃料として利用する技術の開発への道を開くものである。さらに、短鎖 dsRNA よりも長鎖 dsRNA の方がヘキサメリン遺伝子の抑制効果が高いことが分かった。具体的には、長鎖2本鎖 RNA を注入した場合に著しいヘキサメリン遺伝子の発現量の低下が認められ、短鎖2本鎖 RNA を注入した場合には、配列によりヘキサメリン遺伝子の発現量に大きな差異があることが明らかになった。また RNA 干渉の副産的技術として、シロアリの共生原生生物の遺伝子を標的とした siRNA により共生原生生物を破裂させることに成功した。この技術はシロアリ特異的であり、人畜に安全なシロアリ駆除技術へと発展する可能性がある重要な発見である。

(4) タカサゴシロアリとタイワンシロアリの職蟻および兵蟻に含まれる灰分、食物繊維、グリコーゲン、脂質、窒素、還元糖、トレハロースおよび水分を定量した。さらにタンパク質と遊離アミノ酸のアミノ酸組成、エーテル抽出物に含まれる脂質の脂肪酸組成を分析した。シロアリ乾燥質量に対する総脂質はタカサゴシロアリ職蟻で 1.9%、タイワンシロアリ職蟻で 0.7% であった。また粗タンパク質(キチン由来の窒素を除いた値)は、タカサゴシロアリの職蟻と兵蟻で各々 3.0% と 4.4%、タイワンシロアリ職蟻で 1.9% であった。脂質を構成する主要な脂肪酸はオレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸ならびに必須脂肪酸のリノール酸であり、下等シロアリの脂肪酸組成と類似していた。アミノ酸組成分析では、非必須アミノ酸に加えて、必須アミノ酸であるヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリンも多く含まれていることが明らかとなった。この様に、高等シロアリの脂質含有率は、下等シロアリよりも著しく少なく、バイオディーゼル燃料として高等シロアリは適していないことがわかった。下等シロアリは高脂質・低タンパク質、高等シロアリは低脂質・高タンパク質であり、家禽類の餌などへの利用など新たな可能性が見出された。

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 5 件)

①板倉修司、森山仁史、福田未央、田中裕美、榎章郎、タカサゴシロアリとタイワンシロアリの栄養価、環動昆、査読有、22 巻、2011、

87-91

②Nambu Yumiko, Hiromi Tanaka, Akio Enoki, Shuji Itakura, RNA interference in the termite *Reticulitermes speratus*: silencing of the hexamerin gene using a single 21 nucleotide small interfering RNA-promoted differentiation of nymph to nymphoid, Sociobiology, 査読有, Vol. 55, 2010, 527-546

③ Shuji Itakura, Satoshi Murayama, Yasutaka Kamata, Hiromi Tanaka, Akio Enoki, RNA interference in symbiotic protists of the termite *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) through ingestion of siRNA by the host termite, Sociobiology, 査読有, Vol. 54, 2009, 77-87

④板倉修司、松本隆、藤原勇輝、南部由美子、浜田章弘、城戸竜太、田中裕美、榎章郎、食用きのこ廃菌床抽出物のヤマトシロアリ幼形生殖虫による産卵への影響、環動昆、査読有、20 巻、2009、63-69

⑤ Shuji Itakura, Toshiyuki Kankawa, Hirofumi Nishiguchi, Tomoe Tanaka, Hiromi Tanaka, Akio Enoki, The waste of edible mushrooms (*Hypsizygus marmoreus*) affects differentiation and oviposition of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae), Sociobiology, 査読有, Vol. 52, 2008, 67-80

[学会発表] (計 7 件)

①森山仁史、福田未央、田中裕美、榎章郎、板倉修司、高等シロアリと下等シロアリの成分比較、第 61 回日本木材学会大会、2011 年 3 月 19 日、京都大学(京都府)

② Shuji Itakura, Nambu Yumiko, Hiromi Tanaka, Akio Enoki, RNA interference in the termite *Reticulitermes speratus*: silencing of the hexamerin gene using a single 21 nt siRNA, The XVI Congress of the International Union for the Study of Social Insects, 2010 年 8 月 12 日, University of Copenhagen (Denmark)

③ Shuji Itakura, Yumiko Nambu, Hiromi Tanaka, Akio Enoki, RNA interference in the termite *Reticulitermes speratus*: silencing of the hexamerin gene using a single 21 nucleotide small interfering RNA, 7th Pacific Rim Termite Research Group, 2010 年 3 月 2 日, Quality Hotel Singapore (Singapore)

④板倉修司、寒川敏行、西口裕文、田中裕美、榎章郎、食用きのこ廃菌床および廃菌床抽出物によるヤマトシロアリの飼育、第 53 回日本応用動物昆虫学会、2009 年 3 月 28 日、北海道大学(札幌市)

⑤板倉修司、田中裕美、榎章郎、ブナシメジ、エノキタケ、マイタケ廃菌床と廃菌床抽出物

によるヤマトシロアリの飼育、第 59 回日本木材学会、2009 年 3 月 16 日、松本大学（長野県松本市）

⑥ Shuji Itakura, Satoshi Murayama, Yasutaka Kamata, Hiromi Tanaka, Akio Enoki, RNA interference in symbiotic protists of the termite *Coptotermes formosanus* Shiraki through ingestion of siRNA by the host termite, 6th Pacific Rim Termite Research Group, 2009 年 3 月 3 日, 京都全日空ホテル（京都市）

⑦ 板倉修司、榎章郎、食用きのこ廃菌床抽出物のヤマトシロアリへの影響、日本環境動物昆虫学会創立 20 周年記念大会、2008 年 11 月 17 日、京都大学（京都市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板倉 修司 (ITAKURA SHUJI)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：60257988

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：