

研究課題

ゼブラフィッシュを用いたネオニコチノイド系農薬の低濃度曝露による発達神経毒性の *in vivo*・*in silico* 評価

研究代表者 久保田 彰 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

共同研究者 沖澤 優花 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

平野 将司 (熊本高等専門学校生物化学システム工学科)

坂田 真有美 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

岩田 久人 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

背景と目的

近年、環境毒性学分野でホットトピックの一つに挙げられているのが、ネオニコチノイド系農薬（ネオニコチノイド）による発達神経毒性である。ネオニコチノイドは、現在世界で最も多く広範囲に使用されている農薬の一つである。国内では現在9種が年間計約400トン出荷され、140種類以上の農作物に使われている。ネオニコチノイドの名を世に知らしめたきっかけは、世界各国で発生しているミツバチの大量失踪・大量死、すなわち蜂群崩壊症候群である。わが国でも全国各地でミツバチの大量死が報告され、北海道では水稲のカメムシ防除で使用されたクロチアニジンが原因と思われるミツバチ被害が2000年以降頻発している。他方、従来の報告では脊椎動物に対するネオニコチノイドの毒性は低いとされていた。しかしながら、近年の報告によれば、許容一日摂取量の根拠となっている無毒性量レベルの曝露でマウスに多動や不安様行動などが認められている。こうした状況を受けて、EUではすでに一部のネオニコチノイドの屋外使用が全面的に禁止されている。これに対し、わが国ではもともと食品の最大残留基準値が他国と比べ高いうえに、近年それを引き上げるなど、使用を奨励する政策を取っている。当該農薬の低濃度曝露による発達神経毒性が疑われる状況においては、個々の物質の曝露実態に即した毒性評価が急務と考えられる。本研究では、こうした課題に取り組むため環境毒性脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュを用いれば、行動解析に加えて組織学的解析も簡便・迅速にできるため、化学物質誘発性の行動異常が真に中枢神経系に対する影響によるものなのか、あるいは感覚器・運動器や特定臓器に対する影響によるものなのか評価することも可能と考えられる。またネオニコチノイドが作用すると予想されるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) サブタイプの遺伝子配列も明らかにされているため、ホモロジーモデルを構築することでネオニコチノイドとの相互作用を *in silico* 解析することも可能と考えられる。

本研究の目的は、ゼブラフィッシュを用いてネオニコチノイドによる発達神経毒性を *in vivo* および *in silico* で評価することである。

研究内容

In silico 解析には、分子シミュレーションソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE, CCG 社) を用いた。ゼブラフィッシュの nAchR α 4 β 2 モデルを構築するため、アメフラシのアセチルコリン結合タンパク質 (AchBP) の結晶構造 (PDB ID: 3C79, AchBP と imidacloprid の共結晶構造) から chain A および E の境界領域を選択し、ホモロジーモデリングの鋳型として用いた。最適モデル構造を得るため、中間モデル構造数を 10,000 とした (主鎖: 100、側鎖: 100)。すなわち、100 個の主鎖モデルに対し、100 個の側鎖モデルを候補構造として構築した。得られた 10,000 個の候補構造から Score (GB/VI) の高かった構造に適切な水素を付加し、分子力学計算を行ったモデルを最終構造として抽出した。モデル構築には力場 Amber10:EHT を用いた。

本研究の *in silico* 解析ではネオニコチノイド 4 種 (イミダクロプリド、チアクロプリド、アセタミプリド、ジノテフラン) とイミダクロプリドの代謝物 8 種を対象とした。対象化合物の化学構造は PubChem compound から 2 次元構造を得た。代謝物など PubChem に登録されていない化学構造については、化学構造式描画ソフトウェア Accelrys Draw (Accelrys Software) を用いて 2 次元構造を作成した。これらを MOE の Rebuild3D を用いて 3 次元化し、MMFF94x 力場で極小化することで構造最適化した。3 次元化した化学構造をデータベースファイル化し、化合物ライブラリとした。

ドッキングシミュレーションには MOE-Dock および ASEDock の 2 つのアルゴリズムを実施し、作成した化合物との配座解析を行った。力場は Amber10:EHT を使用した。評価スコアとして結合ポテンシャルエネルギー (S score; kcal/mol) を算出し、結合状態を解析した。

In vivo 試験では、北海道で使用量の多いイミダクロプリドに着目し、受精後 5 時間のゼブラフィッシュ胚 (20 匹/ペトリ皿) に 10^{-7} M ~ 10^{-3} M で曝露した。この濃度は、ゼブラフィッシュにおける当該物質の LC₅₀ に基づき設定した。曝露は 4 日齢まで継続し、毎日水替え曝露を行った。受精後 5 日および 6 日において、各ペトリ皿の稚魚 6 匹を無作為に選び、48 ウェルプレートに、1 匹/1.5mL/ウェルになるように稚魚を入れて行動解析を実施した。48 ウェルプレート内の稚魚は、自作の行動解析装置と HAS-XViewer Ver. 1.3.4.2 (Ditect Digital Image Technology) を用いて 10 分間×5 回、ビデオ撮影した。撮影した動画は、Dipp-Motion V Ver.1.2.0 を用いて、1 匹ずつ追尾して総移動距離を解析した。

研究成果

ゼブラフィッシュ nAChR α 4 β 2 のモデルを構築し、上記 12 種のネオニコチノイドと nAChR α 4 β 2 の結合状態について *in silico* でシミュレーションを行った。例として、イミダクロプリドとの結合状態を Fig. 1 に示す。イミダクロプリドは、nAChR α 4 β 2 のヘテロダイマーにおいて、リガンド結合にかかわる α 4 サブタイプのループ C 領域に配置された。この結合状態における相互作用エネルギー (S-score) は、-6.55 kcal/mol であった。他 3 種のネオニコチノイドでは、チアクロプリドでの相互作用エネルギーがアセタミプリドやジノテフラン



Fig. 1. A predicted interaction between zebrafish nAChR α 4 β 2 and imidacloprid.

より相対的に低地を示した (Table 1)。また、イミダクロプリド代謝物 8 種を比較すると、5-メトキシメトキシ-イミダクロプリドのエネルギー値はイミダクロプリドよりも低い値を示し (Table 2)、この代謝物は親化合物よりも nAChR α 4 β 2 に安定的に結合するものと考えられた。一方、イミダクロプリドの最終代謝産物である 6-CNA および 6-CNA グリシンのエネルギー値は相対的に高く、nAChR α 4 β 2 への結合性は低いと考えられた。今後は、nAChR α 4 β 2 とネオニコチノイドおよびその代謝物との *in vitro* 結合性試験を行うことで、*in silico* ドッキングシミュレーションにより *in vitro* 結合親和性が予測できるかを検討する必要がある。

Table 1. Interaction energy between nAChR α 4 β 2 and neonicotinoides		Table 2. Interaction energy between nAChR α 4 β 2 and metabolites of imidacloprid	
Chemicals	S-score (kcal/mol)	Chemicals	S-score (kcal/mol)
Imidacloprid	-6.55	Imidacloprid	-6.55
Thiacloprid	-6.42	4OH-Imidacloprid	-6.48
Acetamiprid	-6.10	5OH-Imidacloprid	-6.18
Dinotefuran	-6.10	5-Methoxymethoxy-Imidacloprid	-7.55
		6-CNA	-5.01
		6-CNA-glycine	-5.83
		Imidacloprid-olefin	-6.18
		dn-dh-Imidacloprid	-5.72
		dn-Imidacloprid	-5.54

ゼブラフィッシュ胚を用いたイミダクロプリドの曝露試験では、いずれの濃度でも明期における稚魚（5日齢、6日齢）の総移動距離に影響はみられなかった（data not shown）。また、5分間の暗期の後、明転直後から10分間撮影した場合でも、イミダクロプリド曝露による総移動距離の有意な変化はみられなかった（data not shown）。今回、いずれの測定においても、直前まで稚魚をインキュベーターに入れ28°Cに保っていたが、10分間の測定中に外側のウェルでは大幅な水温低下が生じており、稚魚の行動は曝露の有無に関係なく顕著に抑制されていた。本研究で使用した行動解析装置は温度コントローラーが無く、設置部屋の室温を水温近くまで上げることで対応していたが、それでは不十分であることが明らかとなった。以上の予備検討を踏まえ、当該行動解析装置ではゼブラフィッシュ稚魚の定量的な行動量の測定や化学物質の影響評価は難しいと考えている。現時点で、ゼブラフィッシュ稚魚用の温度コントローラー付き行動解析装置 Zantiks MWP (Zantiks) を購入し、稚魚の行動量測定のための予備検討を実施している。

今後は神経発生期にネオニコチノイドを曝露し、スループット性の高い評価系である稚魚の運動性を Zantiks MWP により定量化する。評価項目としては、単なる総移動距離だけではなく、不安様行動試験に用いられる明暗刺激に対する接触走性や、逃避行動試験に用いられる聴覚・振動刺激に対する初回応答や馴化などを対象とする。併せて、曝露稚魚におけるニューロトランスミッター、グリオトランスミッター、ニューロステロイドの各濃度やその生合成系の遺伝子発現量、神経活動マーカー発現量を定量化する。得られる結果を総合し、ネオニコチノイド曝露による発達神経毒性を多面的に評価したい。

成果発表

(論文)

1. **Kubota A**, Kawai YK, Yamashita N, Lee JS, Kondoh D, Zhang S, Nishi Y, Suzuki K, Kitazawa T, Teraoka H. (2019): Transcriptional profiling of cytochrome P450 genes in the liver of adult zebrafish, *Danio rerio*. *J Toxicol Sci* 44, 345-356.
2. Kawai YK, Ito K, Yoshino T, Iima H, Matsumoto F, **Kubota A**. (2020): Hepatic transcriptional profile and tissue distribution of cytochrome P450 1-3 genes in the red-crowned crane *Grus japonensis*. *Comp Biochem Physiol C* 228, 108643 (9 pages).
3. Lee JS, Morita Y, Kawai YK, Covaci A, **Kubota A**. (2020): Developmental circulatory failure caused by metabolites of organophosphorus flame retardants in zebrafish, *Danio rerio*. *Chemosphere* 246, 125738 (7 pages).

(学会発表等)

【招待講演】

1. **Akira Kubota**, Ito K, Sakamoto R, Yamamoto S, Yoshino T, Iima H, Matsumoto F,

Nishikawa M, Ikushiro S, Kawai Y (2020): Characterization of cytochrome P450 genes and enzymes in the red-crowned cranes: toward understanding of drug sensitivity. International Symposium on Chemical Hazard in Wildlife, Sapporo, January.

【国際学会】

1. **Akira Kubota**, Jae Seung Lee, Yuri Morita, Yusuke K Kawai, Adrian Covaci. (2019): Developmental effects of organophosphorus flame retardants and their metabolites in zebrafish. DIOXIN 2019, Kyoto, August.
2. **Akira Kubota**, Jae Seung Lee, Yumi Wakayama, Michiko Nakamura, Yuka Yoshinouchi, Hisato Iwata, Masashi Hirano, Yusuke Kawai. (2019): *In vivo* and *in silico* assessment of estrogenic and anti-estrogenic potency of bisphenol A and its replacement in zebrafish. SETAC North America 40th Annual Meeting, Toronto, November.

【国内学会】

1. Jae Seung Lee, Yuri Morita, Adrian Covaci, Yusuke Kawai, **Akira Kubota** (2019): Developmental effects of organophosphorus flame retardants and their metabolites in zebrafish. 第28回環境化学討論会、さいたま市、6月.
2. 坂本 梨果子、伊藤 究、西川 美宇、生城 真一、吉野 智生、飯間 裕子、松本 文雄、川合 佑典、**久保田 彰** (2019) : タンチョウ (*Grus japonensis*) における異物代謝酵素シトクロム P450 1-3 遺伝子の同定・定量と機能解析. 第28回環境化学討論会、さいたま市、6月.
3. **久保田 彰**、Jae Seung Lee、若山 裕己、中村 倫子、芳之内 結加、岩田 久人、平野 将司、中田 晴彦、川合 佑典 (2019) : ゼブラフィッシュを用いた新世代ビスフェノール類のエストロゲン様作用の比較. 第46回日本毒性学会学術年会、徳島市、6月.
4. **久保田 彰**、川合 佑典、山下 夏未、Jae Seung Lee、近藤 大輔、Shuangyi Zhang、西 康暢、鈴木 一由、北澤 多喜雄、寺岡 宏樹 (2019) : ゼブラフィッシュ肝臓におけるシトクロムP450分子種のmRNA発現プロファイル. 第46回日本毒性学会学術年会、徳島市、6月.
5. **久保田 彰**、平野 将司、イゼスン、中村 倫子、芳之内 結加、岩田 久人、川合 佑典 (2019) : ゼブラフィッシュを用いたインビボおよびインシリコ解析によるビスフェノール類の内分泌攪乱作用の評価. 第25回日本環境毒性学会研究発表会、つくば市、9月.
6. **久保田 彰**、イゼスン、森田 友理、Adrian Covaci、川合 佑典 (2019) : 発達期ゼブラフィッシュにおけるリン酸エステル系難燃剤の代謝物の発生活性. 第22回環境ホルモン学会研究発表会、文京区、12月.