

## 研究課題

家畜動物におけるゼアラレノン類とエストロゲン受容体の *in silico* 相互作用解析：*in silico* 解析で種特異的な生殖毒性を予測できるか？

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 Rehab Salama (帯広畜産大学大学院畜産学研究科)

川合 佑典 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

平野 将司 (東海大学農学部バイオサイエンス学科)

神田 宗欣 (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

ゼアラレノン (ZEN) は、麦やとうもろこしの穂に感染し赤かび病を起こす病原菌 (*Fusarium graminearum* 等) によって産生されるかび毒の一種である。家畜および家禽に給与される飼料には管理基準が設けられており、配合飼料では 0.5 ppm、その他の飼料では 1 ppm とされている。輸入とうもろこしや大豆粕などの飼料原料やそれらを混合した配混合飼料では、基準値超過事例は認められないものの、検出率は例年 80–100% と高い値で推移している。また自給飼料では、検査事例は少ないものの、とうもろこしサイレージから ZEN を含む赤かび病菌が産生するかび毒がしばしば検出されている。申請者らが実施した北海道で採取したとうもろこしサイレージにおけるかび毒汚染の実態調査では、飼料用とうもろこしの圃場での立毛条件がかび毒残留レベルに重要であり、台風などによる天候不良の年ではとうもろこしが倒伏することで赤かび病菌の感染事例が多発し、ZEN を含むかび毒の検出率や残留レベルが顕著に増加することが明らかとなった<sup>1)</sup>。気候変動に伴う異常気象は世界的に増加していることから、飼料におけるかび毒のモニタリングが重要であるのは無論のこと、家畜動物におけるかび毒の影響や感受性に関する理解も重要性を増している。

ZEN は、強いエストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質として知られている。家畜動物における ZEN の毒性には顕著な種差が認められ、とくにブタは高感受性で外陰部の肥大や死流産等の生殖毒性が起きやすい<sup>2)</sup>。一方、ウシやニワトリの ZEN に対する感受性は低く影響は小さいと考えられているが<sup>3)</sup>、ウシでも繁殖障害との関連性が指摘されている<sup>4)</sup>。ZEN は生体内で様々な経路により代謝される。このうち 3 $\alpha$ -ヒドロキシ- $\Delta$ 5-ステロイドデヒドロゲナーゼ (3 $\alpha$ -HSD) および 3 $\beta$ -HSD による還元的代謝反応では、エストロゲン活性の高い代謝物も生成される<sup>5)</sup>。

一方、ZEN やその還元代謝物のエストロゲン受容体 (Esr) 結合能には種差が存在すると予想される。したがって、家畜動物における ZEN の毒性影響を評価するためには、種特異的な Esr に着目し、代謝物も含めた化合物の Esr 結合能を評価することが有効と考えられる。

本研究の目的は、家畜動物の種特異的な Esr 配列を用いて、*in silico* 解析により ZEN およびその還元代謝物の Esr 結合能を明らかにすることである。さらに、これまでに報告されている ZEN に対する家畜動物の感受性に関する知見と、本研究で得られる Esr 結合能の相関性を解析することで、*in silico* 解析により種特異的な生殖毒性を予測できるか検討する。

## 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。家畜動物としてウシ・ヤギ・ブタ・ニワトリを対象とし、それらの Esr1・Esr2 ホモロジーモデルを構築するため、ヒト Esr1 と ZEN の共結晶構造 (PDB ID: 5KRC) ならびにヒト Esr2 と 17 $\beta$ -エストラジオールの共結晶構造 (PDB ID: 3OLS) を鋳型として用いた。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 ZEN、 $\alpha$ -ゼアラレノール (aZEL)、 $\beta$ -ゼアラレノール (bZEL)、 $\alpha$ -ゼアララノール (aZAL)、 $\beta$ -ゼアララノール (bZAL)、ゼアララノン (ZAN) 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。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、Dock-Induced Fit、ASEDock の 3 つのアルゴリズムを使用し、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 または U\_Dock; kcal/mol) を算出し、結合状態を解析した。

## 研究成果

ウシ・ヤギ・ブタ・ニワトリの Esr1・Esr2 モデルを構築し、リガンド結合領域 (LBD) の立体構造を比較した。例として各動物種の Esr1-LBDs を重ね合わせた立体構造を Fig. 1 に示す。結果として、RMSD 値はそれぞれ 1.165 Å・0.620 Å と低値を示したため、各動物種 Esr1-LBDs・Esr2-LBDs の類似性はいずれも高いと考えら

れた。他方、哺乳類とニワトリの Esr1-LBDs において、ループ領域の立体構造にわずかな差がみられた (Fig. 1)。

次いで、ZEN およびその還元代謝物 5 種と各動物種 Esr1-LBDs・Esr2-LBDs 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 ASE\_Dock で得られた U\_Dock 値の結果をそれぞれ Table 1 および Table 2 に示す。用いたアルゴリズムにより同一動物種の Esr1・Esr2 でも相互作用エネルギーの順位に若干の差はみられたものの、いずれの動物種においてもほとんどの場合 ZEN よりも還元代謝物でエネルギーは低値を示した。したがって、還元代謝物の Esr 結合能は相対的に高いと推察された。aZAL、aZEL、bZAL、ZAN については、Esr1 との相互作用エネルギーで顕著な種差がみられ、結合能はヤギ > ブタ ≒ ニワトリ > ウシの順であった。bZEL についてはウシのみ他種と比べて Esr1 結合能は低く、ZEN についてはウシとニワトリで Esr1 結合能は相対的に低いと考えられた。これに対し、Esr2 との相互作用エネルギーについては、ブタ Esr2 と bZEL の結合能およびブタ・ニワトリ Esr2 と ZEN の結合能が相対的に弱いと推察されたものの、その他では顕著な種差はみられなかった。

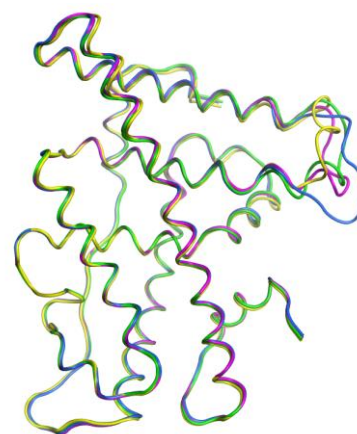


Fig. 1. Superimposed structures of livestock Esr1-LBDs. Cow (blue), goat (green), pig (magenta) and chicken (yellow).

Table 1. Interaction energy between livestock esr1 and zearalenone and its related compounds

| Chemical                | U_dock (kcal/mol) |        |        |         |
|-------------------------|-------------------|--------|--------|---------|
|                         | Cow               | Goat   | Pig    | Chicken |
| alpha_Zearalanol (aZAL) | -54.09            | -82.49 | -66.96 | -65.63  |
| alpha_Zearalenol (aZEL) | -43.14            | -84.16 | -71.22 | -70.66  |
| beta_Zearalanol (bZAL)  | -49.11            | -76.09 | -66.80 | -65.79  |
| beta_Zearalenol (bZEL)  | -38.86            | -63.38 | -63.16 | -66.13  |
| Zearalanone (ZAN)       | -47.51            | -77.87 | -65.87 | -66.07  |
| Zearalenone (ZEN)       | -48.91            | -58.11 | -60.47 | -44.09  |

Table 2. Interaction energy between livestock esr2 and zearalenone and its related compounds

| Chemical                | U_dock (kcal/mol) |        |        |         |
|-------------------------|-------------------|--------|--------|---------|
|                         | Cow               | Goat   | Pig    | Chicken |
| alpha_Zearalanol (aZAL) | -65.03            | -65.34 | -63.98 | -63.89  |
| alpha_Zearalenol (aZEL) | -66.10            | -64.69 | -65.95 | -65.97  |
| beta_Zearalanol (bZAL)  | -61.28            | -62.92 | -56.04 | -63.21  |
| beta_Zearalenol (bZEL)  | -59.91            | -63.47 | -42.21 | -63.69  |
| Zearalanone (ZAN)       | -57.98            | -57.93 | -57.72 | -58.65  |
| Zearalenone (ZEN)       | -62.33            | -57.01 | -50.17 | -50.63  |

肝ミクロソームを用いて ZEN の代謝を調べた *in vitro* 研究では、家畜を含む多くの動物種において還元代謝物である aZEL が最も多く検出されている<sup>6)</sup>。一方、代謝経路としてみた場合、ウシ・ヤギ・ニワトリでは酸化的代謝が主要経路であるのに対し、ブタでは還元的代謝が主要経路である<sup>6)</sup>。本研究の *in silico* 解析において、ブタ Esr1 と aZEL の相互作用エネルギーはヤギに次いで低く、Esr1 結合能は相対的に強いと考えられた。したがって、aZEL の高い産生率と強い Esr1 結合能がブタの高感受性の一因と考えられた。一方、ウシではとくに Esr1 と各化合物の相互作用エネルギーが他種と比べて顕著に高く Esr1 結合能は弱いと考えられた。したがって、酸化的代謝が主要経路であることに加え還元代謝物の Esr1 結合能が低いことがウシの低感受性の一因と考えられた。これに対し、ヤギでは多くの還元代謝物で Esr1 との相互作用エネルギーが他種と比べて低く Esr1 結合能は強いと推察されたものの、ヤギは低感受性種であることから、酸化的代謝が主要経路であることが低感受性の一因と考えられた。ニワトリ Esr1 については、aZEL との相互作用エネルギーは高感受性種であるブタと同等であったことから、酸化的代謝が主要経路であることがニワトリの低感受性の一因と考えられた。

本研究の結果は、家畜動物固有の Esr 配列を用いたホモロジーモデルの構築と、それを用いたゼアラレノンおよびその還元代謝物との *in silico* ドッキングシミュレーションにより、種固有の Esr 結合能を予測できること、ならびに種固有の代謝経路に関する既存の知見と合わせて考察することで、当該化合物に対する種固有の感受性を予測できると考えられた。他方、本研究で参照した種固有の代謝経路は肝ミクロソームを用いた *in vitro* 研究に基づくものであり、動物個体を用いた *in vivo* 研究では代謝経路や主要代謝産物が肝ミクロソームの場合と異なることも報告されている<sup>6)</sup>。したがって今後は、ZEN の体内動態に影響を及ぼす腸管粘膜での代謝や腸内細菌叢による脱抱合（腸肝循環）なども踏まえた全身レベルでの代謝経路を考慮し、主要代謝物の Esr 結合能と比較することで家畜動物の感受性予測が可能かどうか検証する必要があると考えられた。

## 引用文献

- 1) 川島千帆, 久保田彰 (2018) *北海道畜産草地学会報* 6, 29-33.
- 2) Döll S, *et al.* (2003) *Arch Tierernahr* 57, 311-334.
- 3) EFSA Journal (2017) 15, 4851.
- 4) Kallela K, Ettala E. (1984) *Nord Vet Med* 36, 305-309.
- 5) Molina-Molina J-M, *et al.* (2014) *Food Chem Toxicol* 74, 233-239.
- 6) Yang S, *et al.* (2017) *J Agric Food Chem* 65, 11292-11303.

## 成果発表

(論文)

1. Rehab S, **Kubota A**, Kawai YK, Ibrahim A, El-Hamd DMWS, Osman N. (2021): Antibioqram Assay and Pathogenesis of Staphylococcus aureus in Baby Chicks. *Adv Anim Vet Sci* 9, 11, 1844 (7 pages).
2. Lee JS, Kawai YK, Morita Y, Covaci A, **Kubota A**. (2022): Estrogenic and growth inhibitory responses to organophosphorus flame retardant metabolites in zebrafish embryos. *Comp Biochem Physiol, Part C*, in press.

(学会発表等)

【国際学会招待講演】

1. **Akira Kubota**, Jae Seung Lee, Yusuke K Kawai, Adrian Covaci. (2021): Assessment of developmental toxicity caused by organophosphate triesters and their metabolites using zebrafish. ASIATOX-IX, “Reproductive and developmental toxicology” Session, Hangzhou, China (online), October 20-23.

【国際シンポジウム】

1. Xing Chen, Yusuke K Kawai, **Akira Kubota** (2022): Estrogenic potency and developmental toxicity of BPA and its alternatives in zebrafish embryos. 5<sup>th</sup> Chemical Hazard Symposium in Online, January.

【国内学会】

1. Xing Chen, Yusuke K Kawai, Masashi Hirano, **Akira Kubota** (2021): Establishment of evaluation method for anti-androgenic potency of environmental chemicals using zebrafish. 令和3年度 日本環境毒性学会オンライン研究発表会、8月。
2. Jae Seung Lee, Yusuke K Kawai, Yuri Morita, Adrian Covaci, **Akira Kubota** (2021): Assessment of developmental toxicity caused by organophosphorus flame retardants and their metabolites in zebrafish embryos. 第23回環境ホルモン学会研究発表会、オンライン、9月。
3. Rehab Y Salama, Yusuke K Kawai, **Akira Kubota** (2021): Counteracting effect of zearalenone on diethylstilbestrol-induced developmental toxicity in zebrafish 第23回環境ホルモン学会研究発表会、オンライン、9月。
4. 池本 秀樹、沖澤 優花、川合 佑典、一瀬 貴大、池中 良徳、**久保田 彰** : ゼブラフィッシュを用いたネオニコチノイド系農薬の体内動態と発達神経毒性の解明. 第23回環境ホルモン学会研究発表会、オンライン、9月。
5. Xing Chen, Jae Seung Lee, Yusuke K Kawai, **Akira Kubota** (2022): Estrogenic potency and developmental toxicity of BPA and its alternatives in zebrafish embryos. 令和3年度 日本環境毒性学会第2回オンライン研究発表会、3月 (予定) .