

令和元年6月3日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07836

研究課題名(和文) 内在性短鎖RNAによる養殖魚の残留農薬モニタリング

研究課題名(英文) Monitoring of pesticide residues in cultured fish using endogenous miRNA

研究代表者

二見 邦彦 (FUTAMI, Kunihiko)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：00513459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ティラピアに様々な農薬類を高濃度で経口曝露させた際に、肝臓あるいは血漿中において発現が上昇するmiRNAをRT-qPCRにより探索した。その結果、miR-34とmiR-199-1は、合成抗菌剤ロイコマラカイトグリーン(LMG)が魚体内にある程度蓄積したときに有用なバイオマーカーとなりうることが明らかとなった。しかしながら、血漿中miRNA量の個体間変動により、低濃度の農薬類の浸漬曝露に対してはバイオマーカーとしての使用が困難であると考えられた。一方で、主成分分析により複数のmiRNA発現データを少ない変数に集約して個体間変動を低減することで、この問題点を解決できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産物の安全性確保においては、生産段階での適切なリスク管理が求められる。しかしながら、水産養殖の過程では使用されないはずの農薬が養殖魚から検出されるなど、想定外のケースが報告されている。近年、医学分野においては、薬の毒性評価や病気の診断のために、ヒト血漿や血清中の内在性の短鎖RNA(miRNA)をバイオマーカーとして用いる研究が盛んに進められている。一方で、養殖魚における残留農薬類のモニタリングを目的とした研究は皆無である。本研究では、LMGが魚体内にある程度蓄積した状態では、miR-34とmiR-199-1が有用なバイオマーカーとなりうる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched miRNAs whose expression was significantly increased in the liver and/or plasma of Nile tilapia orally exposed to high concentrations of various pesticides. RT-qPCR revealed that miR-34 and miR-199-1 are useful candidate biomarkers to detect the leucomalachite green (LMG) accumulated in fish body. However, it was difficult to apply them as biomarkers to monitor the low concentrations of pesticide residues in fish body due to inter-individual variation in plasma miRNA levels. On the other hand, our results indicate that integrating multiple miRNA expression data into fewer variables by principal component analysis may reduce the inter-individual variation.

研究分野：水族病態生理学

キーワード：miRNA 経口曝露 浸漬曝露 ティラピア 農薬 バイオマーカー リアルタイムPCR ロイコマラカイトグリーン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食のグローバル化に伴い、食品の安全性確保は世界的に重要性が増してきている。我が国では、ポジティブリスト制により一律基準値 (0.01 ppm) を超える農薬類およびそれらの代謝物を含む食品の流通が禁止となり、生産段階での適切なリスクマネジメントがより一層求められるようになった。しかしながら、水産養殖の過程では使用されないはずの農薬類が養殖魚から検出されるなどのケースが報告されている。大雨などによる河川からの流出やドリフト、養魚飼料の汚染などが原因として疑われているが、想定外の残留を未然に防ぐことは困難である。また、こうした事例はメディア等でも報道され、消費者の養殖魚に対する不安を招いている。

(2) 養殖魚の安全性確保においては、モニタリング頻度を上げることが重要である。農薬類の残留分析は、LC-MS や GC-MS などの質量分析による一斉分析法が公定法となっているが、前処理には手間と時間がかかり、また残留検査に伴うコストも高額であるため、頻繁にモニタリングを行うことは困難である。我々はこれまでに、市販の ELISA キットを用いて特定の農薬類を簡便かつ安価に検出する方法を確立したが (引用文献)、すべての農薬類を網羅するには限界があり、代謝物まで含め、何が汚染しているか分からない状況下での測定が課題となっている。

(3) 一方で我々は、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の網羅的解析により、農薬類に曝露されたティラピアで特異的に発現する遺伝子群を明らかにした (木下ら、第 37 回 日本分子生物学会年会)。しかし、遺伝的に近交化していない養殖魚では、遺伝子の発現量や薬物動態において個体差 (個体間変動) が大きく、また、ネガティブフィードバック機構をもつ系では遺伝子発現も一過性であることが多い (個体内変動)。さらに、分解しやすい mRNA を扱う際には、技術的変動も大きく影響する。そのため、遺伝子発現量と残留農薬量は必ずしもパラレルには変動せず、遺伝子発現を指標として残留農薬類をモニタリングすることも困難である。さらに我々は、発光レポーター遺伝子によるモニタリングシステムの構築も試みたが (木下ら、平成 26 年日本魚病学会秋季大会)、培養細胞を用いた測定系であるため、細胞毒性のある農薬類の場合、このシステムは機能しない。

2. 研究の目的

(1) 近年、遺伝子とは別の内在性の短鎖 RNA である microRNA (miRNA) が、ヒトの血清や血漿においても安定して存在することが示された。また、アセトアミノフェン誘発性肝障害のモデルマウスでは、肝特異的な miRNA である miR-192 が、AST や ALT に変わる薬物性肝細胞壊死の新規バイオマーカーとして有用性であることが立証された (引用文献)。このように、薬の毒性評価や病気の診断のために miRNA バイオマーカーとして用いる研究は、医学分野においては盛んに進められているが、養殖魚における残留農薬類のモニタリングを目的とした研究は皆無である。そこで本研究では、魚類血漿中の内在性 miRNA をバイオマーカーとした、養殖魚の新規残留農薬モニタリングシステムを開発することを目的とした。

(2) 具体的には、残留農薬類をモニタリングするためのバイオマーカーとして魚類の miRNA を用い、最終的には、採材 抽出 検出 解析といった簡単なステップでできるシステムを開発する。また、有用性の高いバイオマーカーとして求められる条件は、単に miRNA の発現量と農薬類の体内濃度との相関が認められることだけではなく、その理論的裏付けである。そのため、農薬類によって miRNA が生合成されるメカニズムや生理学的意義についても明らかにし、バイオマーカーとしての正当性の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 供試魚としてティラピアを用いた。本研究では、合成抗菌剤マラカイトグリーンの代謝産物 LMG およびゴルフ場からのドリフトが確認された農薬エンドスルファン、クロルピリホス、CAT、イソプロチオラン、フルトラニルを使用した。

(2) 経口曝露においては、LMG またはエンドスルファンを飼料に対して 2500 ppb、500 ppb、100 ppb となるよう添加した。溶媒にはメタノールを使用し、農薬類を溶解した後、飼料に添加して瞬時にボルトテックスをし、均一に混合して空気乾燥させた。コントロール区にはメタノールのみを添加し、同様の手順で飼料の調製を行った。ティラピアを一週間馴致した後、LMG を含んだ総魚体重の 3.0% 相当の飼料を与え、その次の日は通常給餌を行い、LMG を含んだ餌を与えた 2 日後にそれぞれ肝臓を採取し ($n = 5$)、RNA later (Thermo Fisher Scientific) 中で -20°C で保存した。

一方、浸漬曝露では、一週間の馴致後、LMG、クロルピリホス、CAT、イソプロチオラン、フルトラニルを各水槽に投入した。溶媒にはエタノールを使用した。農場やゴルフ場で使用された農薬類が河川へ流出した場合、低濃度で検出されることが多いため、ここでは最終濃度が 50 ppb となるように設定した。なお、コントロール区では 100% のエタノールのみを投入した。0、24、48、72 時間後に採血をし ($n = 9$)、 $400 \times g$ 、4 分で 5 分遠心分離した後、血漿 0.4 ml を

新しいチューブに移し、-80 で保存した。

(3) 得られた血漿から、ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて small RNA を抽出し、Universal stem-loop primer (5'-GAA AGA AGG CGA GGA GCA GAT CGA GGA AGA AGA CGG AAG AAT GTG CGT CTC GCC TTC TTT CNN NNN NNN-3')を用いて revertAid M-MuLV Reverse Transcriptase(Thermo Fisher Scientific)により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、iQ SYBR Green Supermix および MiniOpticon Real-Time PCR System (いずれも Bio-Rad) により RT-qPCR を行った。

テラピアにおいては、魚種間で保存された miRNA が 21 種同定されている(引用文献)。本研究では、ドライ(情報)型手法により、これら既知の miRNA の中から、薬物代謝酵素や内分泌攪乱化学物質の受容体などをターゲットとしていると推測される 6 種類の miRNA(miR-153b、-22a-1、-34、-222、-133、-199-1)に着目した。なお、内部標準には U6 を用いた。RT-qPCR に用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

表 1 RT-qPCR に用いたプライマー

microRNA	Forward primer (5'-3')	Target gene
oni-miR-153b	TTGCATAGTCACAAAAATGAGC	Type II estrogen receptor
oni-miR-22a-1	AAGCTGCCAGCTGAAGAACTGT	Cytochrome P450 1B1 protein
oni-miR-34	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	ATP-binding cassette subfamily
oni-miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC	Type I estrogen receptor
oni-miR-133	TTTGGTCCCCTCAACCAGCTG	Cytochrome P450 1B1 protein
oni-miR-199-1	CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTC	Type I estrogen receptor
oni-let-7e	TGAGGTAGTAGATTGAATAGTT	Type I estrogen receptor
U6	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	
Universal reverse primer	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT	

(4) 二元配置分散分析、ROC 曲線の作成および主成分分析にあたっては、R 用のグラフィカルユーザインターフェースである EZR(<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/download.html>)を用いた(引用文献)。

4. 研究成果

(1) 確実に発現が変動すると予想される高濃度の LMG とエンドスルファンをテラピアに経口曝露させ、肝臓中の miR-153b、-22a-1、-34、-222、-133、-199-1 の発現変動を観察した。その結果、LMG 曝露区では、miR-153b、-22a-1、-34、-199-1 について有意な発現変動が見られ(繰り返しのある二元配置分散分析)、miR-34、-199-1 については、曝露して 2 日後から著しい発現の増加が確認できた。ROC 曲線の結果も、ともに感度と AUC の値が最も高い値となり、有用なバイオマーカーとなりうると考えられた(図 1)。当初の研究計画では、必要に応じて cDNA ライブラリーの作製や次世代シーケンズ技術により、未知の miRNA をクローニングすること

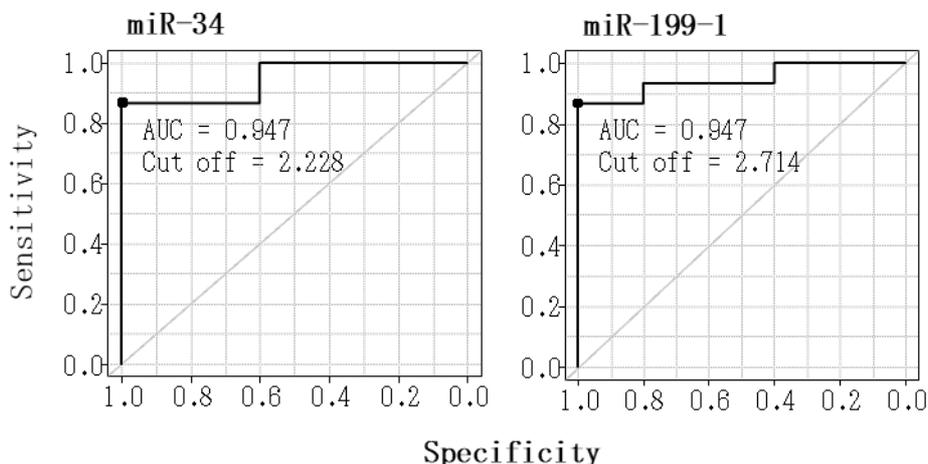


図1 LMG曝露により発現変動したmiRNAのROC曲線

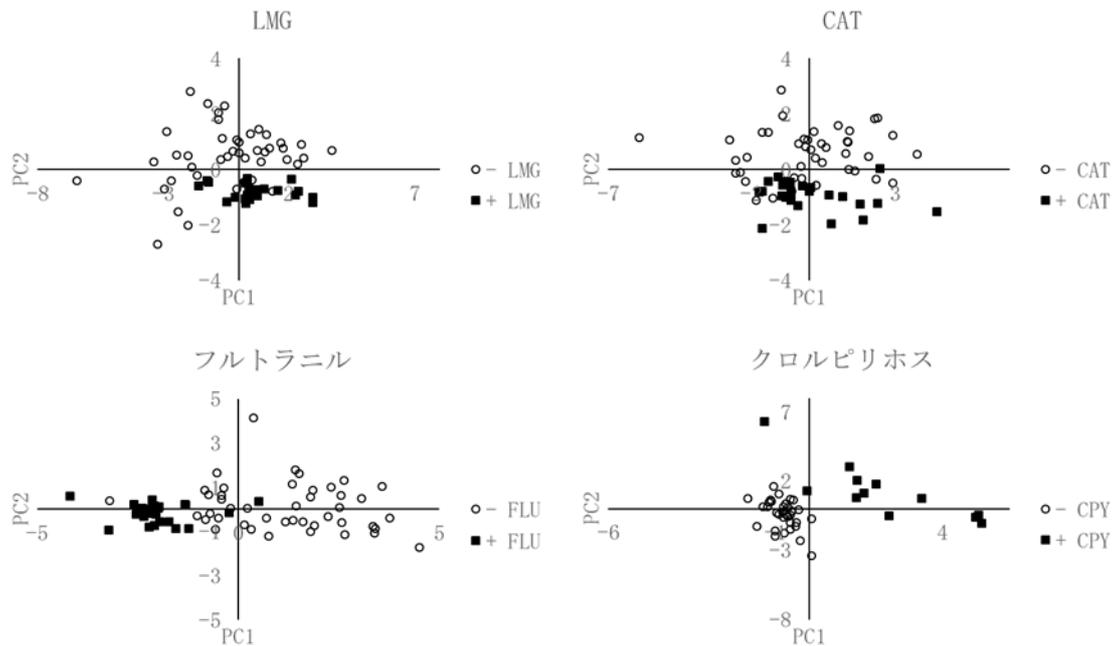


図2 PC1とPC2における各miRNAの主成分得点

を想定していたが、これらのウェット（実験）型手法を用いることなく、候補 miRNA を絞り込むことができた。この2つの miRNA を併用することにより、その他の有害化学物質を特定することも可能となることが示唆された。なお、miR-34 と miR-199-1 の発現量は、いずれも農薬類の体内濃度と平行に変動しなかったことから、これら2つの miRNA は、LMG が魚体内にある程度蓄積した状態においてのみ有用であると考えられた。一方、エンドスルファン曝露区では、miR-222、-22a-1、-199-1 について有意な発現変動が見られたが、LMG 曝露の際と比較すると miRNA の発現変動は小さかった。養殖魚における残留エンドスルファンのモニタリングとして miRNA の使用を考えた場合、miR-222、-22a-1、-199-1 以外の miRNA の使用についても検討し、LMG 曝露の際と同様に著しく発現が変動する、より信用性の高い miRNA を探していく必要がある。

(2) 次に、LMG、クロルピリホス、CAT、イソプロチオラン、フルトラニルを浸漬曝露したティラピア血漿中の miR-153b、-22a-1、-34、-222、-133、-199-1、let-7e の発現変動を観察した。その結果、本研究で用いた全ての化学物質において有意に発現が変動する miRNA は無かった。これは、研究成果(1)においてバイオマーカーの候補とされた mir-34、199-1 においても同様だった。農薬類の毒性として肝障害などが報告されているが（引用文献），本研究で行った低濃度の農薬類の浸漬曝露では肝障害を伴わない可能性がある。したがって、壊死した肝細胞からの miRNA の漏出がみられず、そのために有意な血漿中 miRNA の上昇が検出されなかったことが考えられる。実際、mir-34、miR-199-1 以外の miRNA の上昇も検出されなかったことは、このことを反映しているのかもしれない。したがって、これらの miRNA は低濃度の化学物質の曝露に対してはバイオマーカーとしての使用が困難であると考えられた。

(3) 一方で、有意な差は認められなかったものの、コントロール区に対して発現が上昇しているように見える曝露区があり、血漿中 miRNA 量の個体間変動が示唆された。そこで、個体間変動を低減させるために、農薬曝露群/非曝露群に分け、主成分分析により、すべての miRNA 発現データを少ない変数に集約し総合的に判断することを試みた。なお、解析にあたっては、Ct 値が 8-35 の範囲に入らないものは除外した。その結果、イソプロチオラン以外は農薬曝露群/非曝露群をおおよそ判別できることが明らかになった（図2）。しかしながら、精度と確度の向上には課題が残された。

< 引用文献 >

Krongpong L, Futami K, Katagiri T, Endo M, Maita M (2008) Application of ELISA-based kit for detecting AOZ and determining its clearance in eel tissues. *Fish Sci* 74:1055-1061.

Seel-audom M, Krongpong L, Futami K, Goncalves AT, Katagiri T, Areechon N, Endo M, Maita M (2013) Toxicity and absorption of dietary leucomalachite green in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Sci* 79:119-127.

Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. Proc Natl Acad Sci USA 106(11):4402-4407.

Li XH, Wu JS, Tang LH, Hu D (2015) Identification of conserved microRNA and their target genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by bioinformatic analysis. Genet Mol Res 14(1):2785-2792.

Kanda Y (2013) Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZR” (Easy R) for medical statistics. Bone Marrow Transplant 48:452-458.

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〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：延東 真

ローマ字氏名：Makoto ENDO

所属研究機関名：東京海洋大学

部局名：学術研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：80128355

研究分担者氏名：舞田 正志

ローマ字氏名：Masashi MAITA

所属研究機関名：東京海洋大学

部局名：学術研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 60238839

研究分担者氏名 : 片桐 孝之

ローマ字氏名 : Takayuki KATAGIRI

所属研究機関名 : 東京海洋大学

部局名 : 学術研究院

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁): 50361811

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。