

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14988

研究課題名（和文）cQSARコンセプトによる野生動物の“非侵襲的”化学物質感受性評価法の確立

研究課題名（英文）Establishment of an evaluation method of a chemical-susceptibility for wildlife using counter-QSAR and machine learning

研究代表者

武田 一貴（Takeda, Kazuki）

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：00896350

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）：化学物質は野生動物へ種々の被害を引き起こし、時に個体群の局所的な絶滅を生じる事もある。このため野生動物の化学物質感受性評価は必須だが、これらを用いた動物実験は禁忌である。このため非侵襲的に入手できるDNAなど限られた情報を用い野生動物の感受性評価を行う手法を確立する必要がある。感受性に影響を与える主要因は標的分子・解毒代謝酵素の種差である。これらの非侵襲的な評価手法としてDNA情報から構築した標的分子・代謝酵素の3D構造を用いたシミュレーションを実施した。成果の一例として、一アミノ酸多型が与える殺鼠剤抵抗性の影響の評価も可能となり、遺伝情報を用いた化学物質感受性評価の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生動物での毒性試験は希少種保護の観点から困難であり、これらの化学物質感受性評価は立ち遅れている。一方、DNAは被毛から非侵襲的に入手できるため野生動物においても遺伝子解析は容易である。本研究で実施したin silicoモデリング評価系は、DNA情報を活用する事で野生動物研究の制限を超え、生体レベルでの感受性評価を可能とする独創的な研究である。本研究手法は標的分子・代謝酵素を変える事で殺鼠剤以外の化学物質へも応用可能だと予想される。当該研究は従来種差の壁が阻んでいた野生動物の化学物質感受性評価を世界に先駆け可能とする環境毒性学におけるトランスフォーマティブリサーチとなり得る。

研究成果の概要（英文）：Chemicals cause a variety of damage to wildlife, sometimes resulting in local extinction of populations. For this reason, it is essential to evaluate the sensitivity of wild animals to chemical substances, but animal experiments using these substances are contraindicated. Therefore, it is necessary to establish a method to evaluate the sensitivity of wild animals using limited information such as DNA that can be obtained non-invasively. The main factors affecting susceptibility are species differences in target molecules and detoxification-metabolizing enzymes. As a non-invasive evaluation method, we conducted simulations using 3D structures of target molecules and metabolic enzymes constructed from DNA information. As an example of our achievement, we were able to evaluate the effect of a single amino acid polymorphism on rodenticide resistance, showing the possibility of using genetic information to evaluate chemical sensitivity.

研究分野：環境毒性学

キーワード：動物種差 化学物質感受性 中毒 AlphaFold2 分子動力学 分子ドッキング 農薬 医薬品

1. 研究開始当初の背景

化学物質は野生動物へ種々の被害を引き起こす。インドハゲワシの個体数がジクロフェナクで 99%減少しアメリカでは農薬でアリゲーターの繁殖率が低下、殺鼠剤による猛禽類の中毒死は Nature News (Lovett, 2012)で “Killing rats is killing birds” と報じられる等、被害は世界規模で生じている。このため野生動物の化学物質感受性評価は必須である。

これら中毒事故の原因に化学物質感受性の動物種差に対する理解不足がある。感受性の種差は時に数千倍にもなるが、現在の安全性評価は実験動物でのみ実施されており、これら実験動物と野生動物の種差が被害の根底にある。また、野生動物はその希少性から *in vivo* 毒性試験の実施が禁忌である。つまり、現状野生動物の感受性を示す知見は乏しいという化学物質感受性の評価手法自体が存在しない事が最大の問題である。このため非侵襲的に入手できる DNA など限られた情報を用い野生動物の感受性評価を行う手法を確立する必要がある。

感受性に影響を与える主要因は標的分子・解毒代謝酵素の種差である。これらの非侵襲的な評価手法として DNA 情報から構築した標的分子・代謝酵素の 3D 構造を用いたシミュレーションに着目し、定量的構造活性相関(QSAR)と機械学習法を応用した cQSAR コンセプトを想起した。

2. 研究の目的

本研究は分子動力学シミュレーションと機械学習を応用し DNA 配列から野生動物の化学物質感受性評価を行う新規評価手法の構築を目的とする。当該研究計画では世界的な猛禽類・食肉目中毒死の原因である殺鼠剤をモデル化合物とし、被害種やその他動物種の感受性予測を実施、予測の信頼性をいくつかの代表種での *in vivo* 投与試験で評価する事を目的としていた。一方で、世界的な環境汚染問題の広がりを受け、対象物質は殺鼠剤に加え、古紙リサイクル工場排水成分やパーフルオロアルキル化合物へ拡大した。

3. 研究の方法

3-1. 天然記念物オガサワラオオコウモリの殺鼠剤感受性評価

小笠原諸島は多くの固有動植物を有するユネスコ世界自然遺産登録地である。しかしながら、クマネズミなど外来種による生態系攪乱が問題となっている。外来ネズミ駆除に環境省主導の抗血液凝固系殺鼠剤(ダイファシノン)散布がこれまで実施されてきた。一方で、国際的には殺鼠剤による野生動物の中毒死も報告されている。そこで本研究では小笠原諸島唯一の固有哺乳類であるオガサワラオオコウモリの殺鼠剤感受性評価を、AlphaFold2 で予測した殺鼠剤標的分子ビタミン K エポキシド還元酵素(VKOR)立体構造と殺鼠剤の分子ドッキングシミュレーション・分子動力学シミュレーションにより試みた。オガサワラオオコウモリ 1 個体から抽出した RNA を用いた RNA シークエンスで VKOR 配列を同定した。このオガサワラオオコウモリ VKOR 配列、エジプシャンルーセットオオコウモリ、ラットの VKOR 配列からそれぞれのタンパク質立体構造を AlphaFold2 正規版で予測した。これら VKOR とワルファリン・ダイファシノンの結合力は分子ドッキング(Glide, Standard precision)で評価した。VKOR-殺鼠剤複合体の動的解析は Desmond を用いた分子動力学シミュレーションで評価した(OPLS3e 力場、TIP3P 水モデル、POPC 脂質膜モデルを使用した 250ns の全原子シミュレーション)。

3-2. 古紙リサイクル排水成分の芳香族炭化水素受容体(AhR)活性化能の評価

芳香族系増感剤は印刷インキの発色剤・発色助剤として広く使用されているが、古紙リサイクル過程で溶出し排水を通した環境汚染と有害影響が懸念される。実際に我が国でも静岡県製の紙排水流入水域において増感剤関連物質が多数検出されているが、これらの水圏生物への影響は不明である(Environ. Pollt. 2008;151:53-59)。そこで、本研究では上記水域で検出された SRCs 11 物質について *in silico* ドッキングシミュレーションで AhR 結合活性を予測するとともに、代表的な水圏モデル生物であるゼブラフィッシュの初期胚を用いた曝露試験を行い SRCs が有する AhR 作用と発生毒性を評価した。

3-3. 永遠の化学物質パーフルオロアルキル化合物の毒性影響評価

パーフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物(PFASs)は現在 4000 種類以上存在する有機フッ素化合物の総称である。難分解性で特徴的な化学的性質を有し生理的に不活性で低毒性と考えられていたことから、消化剤や食品包装材など幅広い用途で使用されてきた。しかしながら、近年 PFASs は残留性が高く生体内に蓄積しやすいという性質が明らかとなり、その生体毒性についての懸念が深まっている。代表的な PFASs として知られるパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)とパーフルオロオクタ酸(PFOA)については高用量曝露による研究から発がん性や発生毒性等が報告されている。一方で、これらの物質は生体蓄積性が高いことから低濃度の曝露であっても長期間の摂取により生体内濃度が高濃度になる懸念がある。しかし

ながら PFOS と PFOA 以外の PFASs の毒性や、環境中で起こり得る低用量での長期曝露、特に、複数の PFASs の同時曝露による毒性影響はほとんど検討されていない。そこで、本研究は PFOS・PFOA を含む 9 種類の PFASs の低濃度混合物をマウスへ 1 か月間曝露してこれらの哺乳類へ対する亜慢性毒性について評価するとともに各化合物の核内受容体への結合性を分子ドッキングで評価した。

3-4. 分子シミュレーションと機械学習による一塩基多型の薬剤耐性への影響評価

3-1 で紹介した抗血液凝固系殺鼠剤に関しては VKOR の遺伝子多型による殺鼠剤耐性齧歯類も問題となっている。一方でアミノ酸多型がタンパク質構造全体に与える影響は小さく、AlphaFold2 の予測単体ではその影響を検出できない。本研究では、VKOR とワルファリンの立体構造を用いた分子動力学シミュレーションと機械学習による多変量データ解析により、VKOR 遺伝子多型から殺鼠剤感受性を評価する手法の構築を試みた。

4. 研究成果

4-1. 天然記念物オガサワラオオウモリの殺鼠剤感受性評価

上記 3 種の VKOR アミノ配列を比較すると全群での相同性は 76.7%、コウモリ間では 93.3% (163aa) と比較的高度に保存されており主要な結合サイトは全て同一のアミノ酸だった。また、AlphaFold2 による予測構造も pLDDT 値を基準に判定すると高品質な構造が構築できた。分子ドッキングでは全パターンで -7.0kcal/mol 以上の良好なドッキングスコアが得られた。このドッキングスコアを比較した所、ワルファリンではラット (-8.66) の方がコウモリ (オガサワラ -7.15、エジブシャン -7.25) よりも値が高く、反対にダイファシノンではコウモリ (オガサワラ -8.59、エジブシャン -8.24) の方がラット (-7.96) よりも高くコウモリ VKOR はワルファリンよりダイファシノンに強く結合する事が示唆される結果となった。これは in vivo で確認されたコウモリはワルファリンに低感受性な反面ダイファシノンに高感受性な傾向と一致する。分子動力学シミュレーションでこれらの動的結合解析を実施した結果、コウモリ VKOR のワルファリン結合サイト TYR139 とワルファリンの相互作用が比較的弱く、その結果ワルファリンの安定性が減弱している事が判明した。以上のように、実験が困難な希少種に対しても非侵襲的に入手可能な遺伝資源とこれを用いたタンパク質-化学物質結合解析を実施する事で感受性種差の評価ができる可能性が示された。本研究成果は *Ecotoxicology and Environmental Safety* 誌に公開済である (EES, V243, p113971, 2022)。

4-2. 古紙リサイクル排水成分の芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性化能の評価

SRCs とゼブラフィッシュ (ZF) AhR またはヒト AhR との分子ドッキングで得られたドッキングスコアからゼブラフィッシュ AhR1 はヒト AhR と比較して SRCs とのドッキングスコアが低い傾向があり、AhR 活性化作用は比較的弱く働く可能性が示唆された。一方で、ゼブラフィッシュ AhR に対しても薬理活性を持ちうるほどドッキングスコアの高い TEP、BNE および DME と、ドッキングスコアの低い BME について曝露試験を実施した。リアルタイム PCR では、10 μ M の BNE 曝露群において ahr 発現量が溶媒対照群と比較し 1.7 倍程度有意に増加した。10 および 0.1 μ M BNE 曝露群と、0.1 μ M DME 曝露群において cyp1a2 の発現量が 15-150 倍と大きく増加した。また、0.1 μ M BNE 曝露群において酸化ストレスの指標の一つであるカタラーゼの遺伝子発現量も有意に高かった。曝露による形態学的変化として 10 μ M BNE 曝露群では体長短縮、心臓浮腫、眼球縮小が確認された。本研究から、SRCs はゼブラフィッシュ生体についても AhR に結合し CYP1A 等の転写活性を有する事が明らかになった。また、一部の物質では高濃度曝露で胚への催奇形性も確認された。今後、慢性曝露試験や懸念地域での SRCs 蓄積濃度測定による更なる生態毒性影響の検証が求められる。本研究成果は 2022 年の第一回環境化学物質 3 学会合同大会にて発表し SETAC 賞を受賞した。

4-3. 永遠の化学物質パーフルオロアルキル化合物の毒性影響評価

一般的な組織染色手法のヘマトキシリン・エオジン染色標本では、低、高濃度両群の肝臓において、肝細胞索の配列不整が観察された他、肝細胞の腫大と細胞質内の空胞形成・好酸性顆粒を伴う空胞変性が認められた (Fig. 1)。この原因として PFASs 曝露に起因するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の活性化による適応的肝細胞肥大と考えられる。一方で、心臓、腎臓および脾臓の組織所見では PFASs 曝露に伴う顕著な病理組織学的変化は見られなかった。そこで曝露した 9 種の PFASs の PPAR 受容体 (, ,) への結合性を分子ドッキング法で解析した所、概ね炭素鎖長依存的な結合性の増加が見られ、炭素鎖長 6 以上からは各 PPAR 既知リガンド以上の結合性を示した。特に PPAR α については結合性が高く、結合ポーズも類似している事から肝細胞肥大の一因である事が示唆された。

また、顕著な組織学的変化が観察された肝臓での遺伝子発現量変化を RNA-Seq で解析した。その結果、低・高濃度双方で代謝系の遺伝子と次いで化学発癌に関連するパスウェイの変動が大きい事が示された。リアルタイム PCR でも発癌促進の原因となる Ccnd1 や脂肪酸合成酵素 Fasn の有意な発現量の増加が確認された。以上から、日常レベルの曝露濃度であっても混合曝露により肝細胞肥大・発癌指向性の変化が生じる事が判明した。本研究成果は bioRxiv にプレプリントを公

開している

(<https://doi.org/10.1101/2023.05.17.541082>),

4-4. 分子シミュレーションと機械学習による一塩基多型の薬剤耐性への影響評価

変異 VKOR100 種を用いて実施した分子ドッキングでは、多くの変異体が同じスコアとなり、1つのアミノ酸変異の効果を解析で適切に評価できないことが示された。一方、分子動力学シミュレーションから得られた特徴量を用いた殺鼠剤耐性/感受性 2 値判別モデルでは、単純なサポートベクターマシンでも比較的高い F1 スコアが示された。これらの結果は、タンパク質の構造に起因する化学物質感受性を評価するために、経時的・動的解析手法である分子動力学シミュレーションが有用であることを示唆している。本研究結果は国際学会 Proceedings として公表している (PACCON 2022)。

4-5. 総括

以上の研究成果から、AlphaFold2 による高精度なタンパク質立体構造予測と分子シミュレーション、特にタンパク質の可塑性を反映できる分子動力学シミュレーションを複合的に運用する事で遺伝子情報から薬剤感受性を評価できる事が示された。今後はより一般的・網羅的な毒性予測ツールとしての汎用性を高める事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Tomohiro, Hirai Anri, Khidkhan Kraisiri, Nimako Collins, Ichise Takahiro, Takeda Kazuki, Mizukawa Hazuki, Nakayama Shouta M.M., Nomiyama Kei, Hoshi Nobuhiko, Maeda Mizuki, Hirano Tetsushi, Sasaoka Kazuyoshi, Sasaki Noboru, Takiguchi Mitsuyoshi, Ishizuka Mayumi, Ikenaka Yoshinori	4. 巻 175
2. 論文標題 The effects of fipronil on emotional and cognitive behaviors in mammals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pesticide Biochemistry and Physiology	6. 最初と最後の頁 104847 ~ 104847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pestbp.2021.104847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamura Yoshiya, Takeda Kazuki, Kawai Yusuke K., Ikenaka Yoshinori, Kitayama Chiyo, Kondo Satomi, Kezuka Chiho, Taniguchi Mari, Ishizuka Mayumi, Nakayama Shouta M.M.	4. 巻 233
2. 論文標題 Sensitivity of turtles to anticoagulant rodenticides: Risk assessment for green sea turtles (Chelonia mydas) in the Ogasawara Islands and comparison of warfarin sensitivity among turtle species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 105792 ~ 105792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2021.105792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SATO Ryo, WATANABE Kanami, KAMATA Ryo, TAKEDA Kazuki	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantify -glutamyl-carboxylated clotting factor IX and assess redox susceptibility of anticoagulant chemicals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田 一貴, 安尾 信明, 渡邊 可菜実, 佐藤 玲, 鎌田 亮, 関嶋 政和
2. 発表標題 分子動力学シミュレーションと機械学習によるビタミン K エポキシド還元酵素遺伝子多型からの殺鼠剤感受性の評価法の確立
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Takeda, Shouta M.M. Nakayama, Kosuke Manago, Yoshiya Yamamura, Yusuke Kawai, Ayuko Morita, Yoshinori Ikenaka, Noriyuki Komatsu, Chiyo Kitayama, Satomi Kondo, Takuma Hashimoto, Ryuichi Minato, Yusuke Oyamada, Kazuo Horikoshi, and Mayumi Ishizuka
2. 発表標題 Anticoagulant rodenticide in Bonin Islands, Japan “Galapagos of the Orient” - investigation of rodenticide-susceptibility of the endemic species by toxicokinetic analysis -
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊可菜実 佐藤玲 鎌田亮 武田一貴
2. 発表標題 血液凝固第IX因子 スプライシングバリエント2の機能解析
3. 学会等名 第4回日本比較薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊可菜実 佐藤玲 鎌田亮 武田一貴
2. 発表標題 培養細胞発現系と AI による構造推定を用いた血液凝固 第 IX 因子スプライシングバリエント 2 の機能解析
3. 学会等名 第5回環境化学討論会 北海道東北地区部会・中国四国地区部会 合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------