

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19157

研究課題名（和文）殺虫剤に曝露されたクルマエビの適応戦略 ～「あえて脱皮をしない」理由の解明～

研究課題名（英文）Elucidating the possible mechanism to cope with the insecticides in Kuruma prawn (Penaeus Japonicus)

研究代表者

羽野 健志 (Hano, Takeshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員

研究者番号：30621057

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：クルマエビに殺虫剤を曝露すると、脱皮個体の死亡率が未脱皮個体に比べ増加する現象を確認した。さらに脱皮個体の殺虫剤体内濃度が未脱皮個体に比べ有意に増加していた。一方、殺虫剤に曝露されると脱皮に関与する殻中代謝物群が減少し、脱皮を抑制しようとする傾向も確認された。これは殺虫剤曝露下で生き抜くうえで「脱皮をしない」ことが重要な選択であることを示唆している。一方で、成長のためには「脱皮」を繰り返す必要があり、「生存」と「成長」のジレンマの狭間で生き抜くクルマエビの「苦渋の」生存戦略が垣間見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クルマエビを含む甲殻類において「脱皮」は成長にとって重要なイベントである。これまで「脱皮」と殺虫剤影響との関係を詳細に調べた研究事例は皆無であった。本研究は、クルマエビが「脱皮をしない」選択をすることが殺虫剤曝露を生き抜く有効な戦略であることを示した。一方、クルマエビは成長のためには「脱皮」を繰り返す必要がある。人為的化学物质がクルマエビ稚エビの生存戦略を攪乱している可能性を示唆した点において本研究の意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：The present study assessed the relationships between molting and survival in estuarine resident marine crustacean species, the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. A 96-h laboratory bioassay included the exposure of the crustacean to graded concentrations of insecticide fipronil. The results showed that mortality was more frequent in molted specimens than those that were unmolting. Possible reason for this observation might be explained by the fact that internal insecticide concentrations in molted specimens were higher than those of unmolting ones but comparable with those of dead ones. In addition, enzyme genes associated with the insecticide metabolism showed a tendency to increase in fipronil-exposed shrimps. We further observed down-regulation of molting-related metabolites after insecticide exposure. Taken together, it is evident that not to molt is a pivotal choice to allow the organism to survive the exposure period and minimize the internal body concentrations of the insecticide.

研究分野：環境毒性学

キーワード：クルマエビ 殺虫剤 脱皮 薬物代謝 体内濃度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱皮は水生甲殻類の成長にとって重要なイベントである。水産重要種クルマエビは、脱皮を数日間隔で頻りに繰り返す稚エビ期(体長~50 mm)を沿岸干潟域で過ごす。その間、河川から流入する殺虫剤のリスクに曝されている。申請者らは、先行研究においてクルマエビをネオニコチノイド系殺虫剤に曝露すると脱皮せずに生き残る個体の割合が増加する現象を確認した(図-1)。さらに研究を進めると、脱皮をしなかった個体は「あえて脱皮をしない戦略」を選択している可能性が浮上した。

しかしながら、クルマエビが脱皮をどう制御し生存戦略を構築しているのかは全くの不明である。



図-1 クルマエビ稚エビと脱皮殻

2. 研究の目的

脱皮の有無で変わる殺虫剤への感受性の差異に着目し、その特徴を分子・代謝レベルで詳細に読み解くことでクルマエビの殺虫剤に対する適応戦略を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 被験物質 先行的に研究を進めたネオニコチノイド系殺虫剤に加え、クルマエビに極めて強い毒性を持つフェニルピラゾール系殺虫剤フィプロニルを用いた(Hano et al., 2019)。

(2) 試験対象種

沿岸干潟域で確認され、国内主要水産物の1種であるクルマエビ稚エビ(*Penaeus japonicus*)を用いた。

(3) 【実験1】特徴の異なる殺虫剤での「脱皮しない」戦略の検証

2濃度区(0.2 µg/L : 96時間 LC₅₀値に相当、0.02 µg/L)に設定したフィプロニルにクルマエビ稚エビを96時間曝露し、曝露期間中の脱皮の有無と、生存との関係を調べた。死亡個体及び試験終了時の生存個体は、体内中フィプロニル濃度の分析に供した。

(4) 【実験2】特徴的な遺伝子群の抽出

3濃度区(0.025、0.05、0.1 µg/L)に設定したフィプロニルにクルマエビ稚エビを96時間曝露した。得られた供試個体を用い、次世代シーケンサー(mRNA-seq)によるトランスクリプトーム解析を行った。脱皮、及び殺虫剤の薬物代謝に関する酵素群を抽出し、その変動を調べた。

(5) 【実験3】薬物代謝酵素活性の測定

3濃度区(0.025、0.05、0.1 µg/L)に設定したフィプロニルにクルマエビ稚エビを96時間曝露した。得られた供試個体を用い、薬物代謝酵素の発現を調べた。

(6) 【実験4】脱皮関連代謝物の測定

脱皮に關与する2種類の解糖系の中間代謝物(3-ホスホグリセリン酸;3PG、ホスホエノールピルビン酸;PEP)(Sato et al., 2011)を稚エビ殻中から検出する分析手法の開発を試みた。

【実験3】で得られた供試個体を用い、フィプロニル曝露と脱皮関連代謝物群の変動を比較した。

4. 研究成果

【実験1】特徴の異なる殺虫剤での「脱皮しない」戦略の検証

曝露期間中の脱皮の有無と生存の関係を図2に示す。Control区、0.02 µg/L区では脱皮と生存には明瞭な関係はみられなかった。一方、0.2 µg/L区では未脱皮個体に比べ脱皮個体で死亡した個体の割合が有意に増加する現象が観察された(図-2)。さらに、これらの個体のフィプロニル体内濃度を調べた結果、フィプロニル曝露期間中に脱皮した個体では、脱皮しなかった個体に比べ有意に高く、死亡個体のそれに近い値を示した(図-3)。この結果は、「脱皮をしない」ことが致死レベルの殺虫剤曝露下での生存には必要な戦略の1つであることを示唆している。

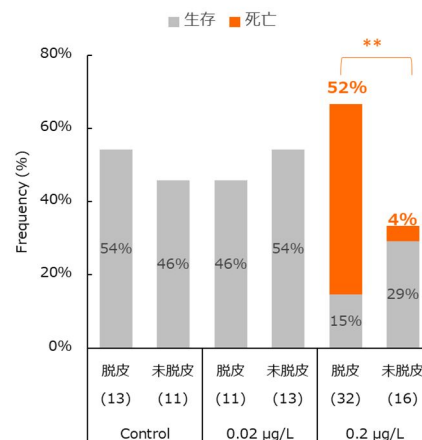


図-2 フィプロニルに曝露されたクルマエビの曝露期間中の脱皮と生存の関係

【実験 2】特徴的な遺伝子群の抽出

3 濃度区(0.025、0.05、0.1 µg/L)に設定したフィプロニルにクルマエビ稚エビを 96 時間曝露した。得られた個体の total RNA を抽出後、次世代シーケンサー(mRNA-seq)によるトランスクリプトーム解析を行った。得られたシーケンスデータは、クルマエビゲノムにマッピング後、BLAST 検索を経て発現量解析(GO 解析、パスウェイ解析)を行った。その結果、27540 個の発現遺伝子のうち、脱皮をしなかった個体では 961 遺伝子、脱皮をした個体では 1264 遺伝子が Fip 曝露によって発現が変動していた。薬物代謝酵素に着目して解析を進めた結果、フィプロニル曝露により発現量が変動した薬物代謝関連遺伝子群(CYP2L1-like、CYP4C1-like、CYP4C3-like、CYP2C42-like、CYP49A1)、フィプロニル曝露個体で未脱皮群と脱皮個体群で変動した脱皮制御関連遺伝子群(CYP302A、CYP306A1-like)の存在を確認した。

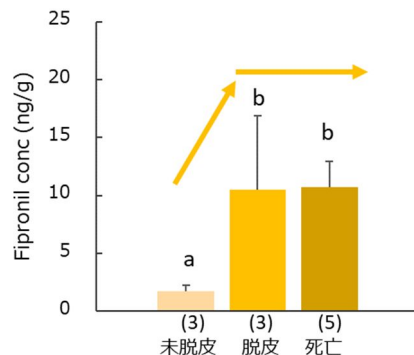


図-3 フィプロニル(0.2 µg/L)に曝露したクルマエビの曝露期間中の脱皮と生存の関係。a,b : $p < 0.05$ 。()内の数字は検体数

【実験 3】薬物代謝酵素活性の測定

トランスクリプトーム解析で抽出された候補遺伝子群から、CYP2、3 ファミリーに注目した。哺乳類等の先行研究(Carrão et al., 2019; Koenig et al., 2012)をもとに酵素活性が測定可能な酵素群から CYP2C19、CYP3A4 を抽出した(表 1)。両者を基質としてもつと報告されている CEC、BFC、及び DBF をエビ肝臓(約 100 mg-wet)から得られたマイクロソーム画分と反応させそれぞれの活性を調べたところ、DBF にのみ活性が見られたことから、DBF を対象にさらに検証を進めた。

3 濃度区(0.025、0.05、0.1 µg/L)に設定したフィプロニルにクルマエビ稚エビを 96 時間曝露した。得られた未脱皮個体の DBF 活性を調べたところ、対照区に比べ 0.1 µg/L で増加傾向を示したが有意ではなかった(図-4)。表 1 の通り DBF は CYP3A4 の他に CYP2 群の活性も同時に検出可能であることから、CYP3A4 のみの酵素活性を測定できていない。今後、基質の再検討等により CYP3A4 の活性を特異的に検出できる手法の確立を進める予定である。

表 1 フィプロニルの代謝に関与すると予想される薬物代謝酵素群(Koenig et al., (2012) から抜粋)

基質	代謝物	Ex/Em	基質濃度	哺乳類CYPsリスト ^a
CEC (3-cyano-7-ethoxycoumarin)	3-cyano-7-hydroxy-4-ethoxycoumarin	408/455	10 µM	1A2, 2C9, 2C19
BFC (7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin)	7-OH-4-trifluoromethylcoumarin	410/538	500 µM	2C19, 3A4
DBF (Dibenzylfluorescein)	Fluorescein	485/538	1 µM	2C8, 2C9, 2C19, 3A4

^a: Smith and Wilson (2010)

【実験 4】脱皮関連代謝物の測定

クルマエビ稚エビの頭胸殻を用い、殻中の代謝物 2 種(PEP、3PG)を検出する分析法の確立を進めた。その結果、200 mg-wet の稚エビから得られた約 2 mg-dry の頭胸殻から上記代謝物を検出することに成功した。具体的な方法を以下に示す。まず、凍結乾燥したエビ個体から頭部を取り出し、殻を剥いた。殻を粉碎 酢酸による溶解 陽イオン界面活性剤を用いたクリーンアップ 乾固 超純水に再懸濁を経て LC-MSMS(液体クロマトグラフタンデム質量分析計)による分析・定量に供した。

実験 3 同様、3 濃度区(0.025、0.05、0.1 µg/L)に設定したフィプロニルにクルマエビ稚エビ(約 200 mg-wet)を曝露した。24 時間目には未脱皮個体(no_molt)のみ、96 時間後には未脱皮、脱皮個体(molt)をそれぞれサンプリングし、頭胸殻を採取し代謝物を抽出した。得られた結果を 24 時間、96 時間の個体でそれぞれ一般化線形モデルに供し、フィプロニル曝露及び脱皮の有無による各代謝物濃度の変動を調べた(図-5)。図-5 右下表に示す通り、未脱皮個体のみを対象とした 24 時間後ではフィプロニル曝露個体では 3PG、PEP が減少しており、これは脱皮を抑制しようとする反応であると考えられた。またこれに伴い、下流に位置する TCA 回路のクエン酸は増加したものと考えられた。

未脱皮、脱皮個体を対象とした 96 時間後では、総じて未脱皮個体では 3PG、PEP が増加してお

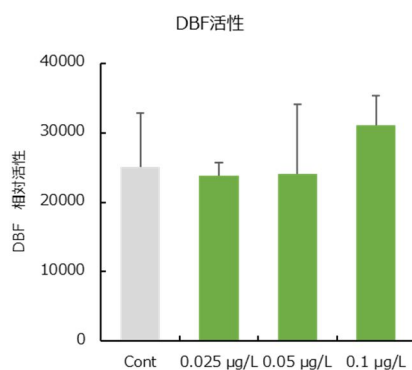


図-4 フィプロニルに曝露されたクルマエビの DBF の相対活性

り、これは脱皮に備えこれらの代謝物を蓄積しようとするクルマエビの生理的反応であると考えられた。一方で、フィプロニル曝露個体ではPEPは減少し、クエン酸は増加しており、これらの変化は24時間同様、脱皮を抑制しようとする反応であると考えられた。

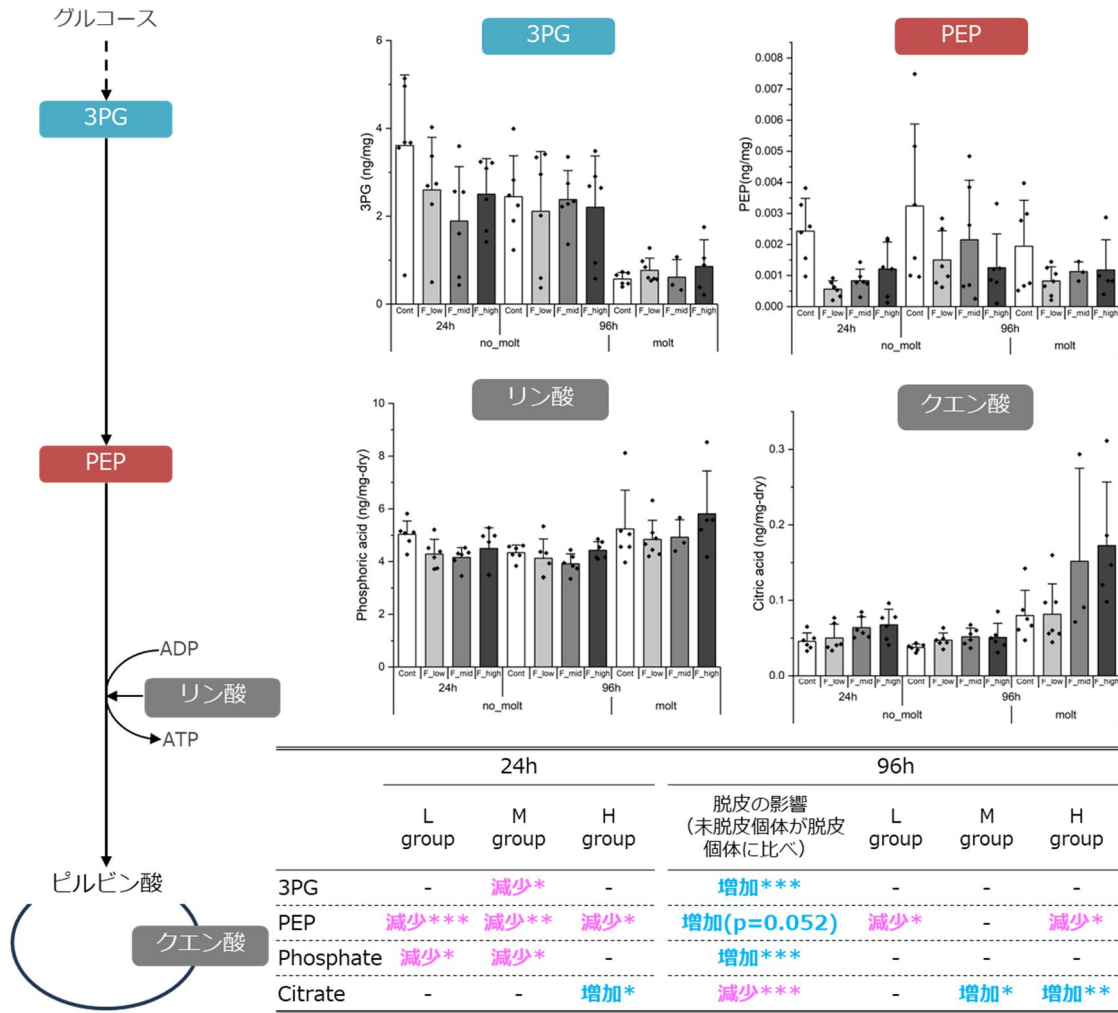


図-5 フィプロニルに曝露されたクルマエビ頭胸殻中の3PG, PEP濃度。F_low, 0.025 μg/L; F_mid, 0.05μg/L; F_high, 0.1 μg/L。

【参考文献】

- Carrão, D.B et al., 2019. Evaluation of the enantioselective in vitro metabolism of the chiral pesticide fipronil employing a human model: Risk assessment through in vitro-in vivo correlation and prediction of toxicokinetic parameters. Food Chem. Toxicol. 123, 225-232.
- Hano, T et al., 2019. Occurrence of neonicotinoids and fipronil in estuaries and their potential risks to aquatic invertebrates. Environ. Pollut. 252, 205-215.
- Koenig, S et al., 2012. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: Relationship with the bioaccumulation patterns of polychlorobiphenyls (PCBs). Aquat. Toxicol. 108, 11-17.
- Sato, A et al., 2011. Glycolytic intermediates induce amorphous calcium carbonate formation in crustaceans. Nat. Chem. Biol. 7, 197-199.
- Smith, E.M and Wilson, J.Y. 2010. Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16 -carbonitrile, rifampicin, and -naphthoflavone. Aquat. Toxicol. 97, 324-333.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hano Takeshi, Ito Katsutoshi, Ito Mana, Takashima Kei, Takai Yuki, Oshima Yuji, Ohkubo Nobuyuki	4. 巻 268
2. 論文標題 Relationship closeness of tolerance to two neonicotinoids with their internal body burden in two estuarine resident marine crustaceans	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology	6. 最初と最後の頁 109613 ~ 109613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpc.2023.109613	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 Hano Takeshi, Ito Katsutoshi, Ito Mana, Takashima Kei, Somiya Rei, Takai Yuki, Oshima Yuji, Ohkubo Nobuyuki	4. 巻 247
2. 論文標題 Molting enhances internal concentrations of fipronil and thereby decreases survival of two estuarine resident marine crustaceans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 106172 ~ 106172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2022.106172	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽野健志, 伊藤克敏, 伊藤真奈, 高島景, 宗宮麗, 高井優生, 大嶋雄治, 大久保信幸
2. 発表標題 海産甲殻類における殺虫剤曝露下での脱皮が致死毒性に及ぼす影響
3. 学会等名 環境化学物質3学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽野健志・伊藤克敏・大久保信幸・伊藤真奈・佐藤琢・菅谷琢磨・阪地英男・高島景・関谷真一
2. 発表標題 瀬戸内海河口干潟域で検出される殺虫剤の濃度と海産甲殻類に対するリスク評価
3. 学会等名 日本環境毒性学会研究発表会
4. 発表年 2021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
研究分担者	伊藤 真奈 (Ito Mana) (60735900)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	大嶋 雄治 (Oshima Yuji) (70176874)	九州大学・農学研究院・学術研究員 (17102)	

	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
研究協力者	高井 優生 (Takai Yuki) (50992351)	九州大学・農学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------