

5. 両生類の核内受容体についての情報収集

西川淳一（大阪大学大学院薬学研究科 助教授）

研究要旨

アフリカツメガエルは古くから発生生物学のモデル生物として取り上げられ、その知見や実験手技の蓄積から内分泌攪乱作用のような胎生期における影響が懸念される事象の研究に適していると考えられる。また、世界中で見られるカエルや山椒魚等の両生類の減少と化学物質による環境汚染の因果関係を考える上でも、両生類を用いた内分泌攪乱作用の研究は必要である。すでに、日本においてもアフリカツメガエルを用いた内分泌攪乱物質のスクリーニング法は検討されており、甲状腺ホルモン様作用を検出する方法として変態アッセイが、エストロゲン様作用を検出する方法としてビテロジェニンアッセイや性転換試験が行われてきた。

一方、我々のグループではこれまでヒト核内受容体ファミリーに対する化学物質の影響を網羅的に調べるハイスループット型アッセイ法を構築し、内分泌攪乱性が疑われる20種類の化学物質について、多種類の核内受容体に対する影響を調べてきた。その結果、アルキルフェノール類の化学物質はエストロゲン受容体だけでなくレチノイン酸受容体に作用すること、有機スズ化合物がレチノイドX受容体とペルオキシソーム増殖剤活性化受容体に強力なアゴニスト活性を示すこと等を明らかにした。つまり、内分泌攪乱物質の作用点はこれまで重点的に研究が行われてきたエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体以外にも存在し、内分泌攪乱作用の分子機構を解明するためには多種類の核内受容体ファミリーに関する包括的な検討が必要であると考えられた。特に、調べた化合物の多くが結合性を示したレチノイドの受容体は、脊椎動物の発生・分化に重要な役割を果たす事が知られており、レチノイド受容体を介する発生毒性に関する研究が必要である。アフリカツメガエルをモデル生物として、レチノイドの発生における役割も盛んに研究されている。

そこで、これまでに得た知見をさらに生物学的分野、特に発生学的観点からの毒性研究に展開するため、今回、アフリカツメガエルに着目し、核内受容体を介する化学物質の毒性を研究する試験動物としての有用性を検討した。

研究協力者

Bruce Blumberg (University of California, Irvine)

A. これまでの研究経過

ステロイドホルモンをはじめとして様々な脂溶性生理活性物質の作用を仲介する核内受容体は、医療用薬剤のターゲット分子としてだけでなく、内分泌攪乱作用などの毒性発現の

観点からも注目されている。最近のゲノムプロジェクトの成果として、ヒトにはリガンド未同定の所謂オーファン受容体も含めて 48 種類の核内受容体が存在すると言われている。これらの受容体は、そのほとんどが生物の発生や分化、恒常性の維持に重要な役割を果たしていることから、潜在的にはすべての受容体が内分泌攪乱物質の標的分子と考えられる。そのため、化学物質の内分泌攪乱性を予測するためには、これらすべての受容体への結合性を調べる必要があるが、これまでの方法論では無理があった。そこで、本研究では、最初に簡便・迅速で経済性に優れたハイスループット型核内受容体リガンド検出系を開発し、それを用いて内分泌攪乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への結合性を網羅的に調べた。その結果、ノニルフェノールやオクチルフェノール等のアルキルフェノール類は、これまでに知られているエストロゲンレセプター (ER) への影響に加えて、レチノイン酸レセプター (RAR) にも作用すること、その他にも多くの化学物質が複数の受容体に活性を示し、内分泌攪乱物質の作用点の一つではないことを明らかにした。また、トリブチルスズ (TBT) やトリフェニルスズ (TPT) は、レチノイド X レセプター (RXR) やペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (PPAR) に非常に低濃度からアゴニスト作用を示すことが分かった。TBT や TPT 等の有機スズ化合物は、かつて船底塗料や魚網防汚剤として大量に使用され、その海洋汚染により海産性巻貝類にインポセックス (雌の雄性化現象) を誘起するとして問題になっている化合物である。これまで、巻貝類のインポセックス誘導メカニズムは長く不明のままであったが、我々は海産性巻貝の一種であるイボニシから RXR ホモログをクローニングし、有機スズ化合物がイボニシ RXR にも結合すること、RXR 内因性リガンドの 9-*cis* retinoic acid がメスのイボニシを雄性化させる事示し、有機スズ化合物によるインポセックス誘導に RXR が関与している可能性を示した。今後、これらの研究を生物学的側面からさらに発展させるため、実験モデル生物として有名で、かつ野生生物に対する環境汚染問題を考える上で重要な両性類に着目し、情報収集を行った。

B. 実験モデル生物としてのアフリカツメガエル

発生研究のためのモデル生物として、過去においては他の両生類も用いられたこともあるが、近年はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* が世界標準となっている。その理由は、維持や産卵誘発が容易であり、胚が大量に得られることにある。アフリカツメガエル胚を実験的に得るのは極めて単純で、雌と雄の両方に絨毛性ゴナドトロピンを注射し、一晚同居させれば翌朝には胚を得ることができるし、*in vitro* で受精させることも可能である。胚の大きさは直径約 1.4 mm と大きく、顕微操作を行うのが容易であることから、mRNA を胚に直接注入することにより遺伝子を強制発現させることができ、この方法は分子生物学分野における定法となっている。また、DNA を精子に導入し、これを卵に注入することによりトランスジェニックカエルを作製することも可能である。遺伝子を不活性化させる方法として最近繁用されている RNA 干渉 (RNAi) はあまり用いられていないが、morpholino 型アンチセンスオ

リゴヌクレオチドを用いることにより特定の遺伝子の発現を抑制することができる。アフリカツメガエルのモデル生物としての欠点はその生活環の長さであり、性成熟に達するには約1年を要する。しかしながら近縁の種である *Xenopus tropicalis* は4ヶ月で成熟するので、こちらを用いる方が良いのかもしれない。

アフリカツメガエルのゲノム解析も、EST とあわせて現在進行中である (<http://genome.wustl.edu/projects/xenopus/> に公開されている)。しかし、*Xenopus laevis* の染色体は2本ではなく、4倍体となっている。重複した遺伝子は、かなり似ており、機能も同じであるが、よりたくさんの塩基配列を決定しなければならず、ゲノム解析には適していない。これに対し、*Xenopus tropicalis* は真の2倍体であり、生活環の短さ、飼育のしやすさ、胚のサイズ、遺伝学への適応を合わせて考えると、理想的な実験動物となる可能性が高い。

C. アフリカツメガエルの核内受容体ファミリー

核内受容体は、リガンド作動性の転写調節因子であり、各リガンドに対応した数多くの受容体が存在している。核内受容体のリガンドとなる物質として、脊椎動物においては、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミンの活性化体などが知られている。これらの受容体群は、遺伝子スーパーファミリーを形成しており、相互に機能、構造に類似点を持っている。進化上、核内受容体は後生動物の初期に現れ、菌類や植物、単細胞真核生物には存在しない。これまでにゲノム解析が終了している生物で見ると、*Homo sapiens* には48種類、*Drosophila melanogaster* には21種類、*Caenorhabditis elegans* には220種類の核内受容体遺伝子が存在する。しかし、それぞれの種に存在する核内受容体ファミリー遺伝子のセットは脊椎動物と無脊椎動物の間で大きく異なっている。例えば、性ステロイドや副腎皮質ホルモンの受容体は、これまでゲノム解析が行われたどのような無脊椎動物種にも見つかっていない。最近、軟体動物からERにアミノ酸配列が類似した遺伝子のクローニングが報告されたが、この遺伝子にコードされているタンパク質はエストロゲンに結合しないし、エストロゲン依存的な転写活性化も起こらない。ステロイドホルモン受容体群に対し、ステロイド以外の脂溶性生理活性物質をリガンドとする甲状腺ホルモンレセプター (TR) やビタミンDレセプター (VDR)、RAR、PPAR等の受容体群は、半索動物あたりから見つかり、これらのサブグループは進化上、比較的早くから現れたと思われる。一方、RXRやオーファン受容体の相同遺伝子は、軟体動物や昆虫にも見られる (図1)。

さて、アフリカツメガエルの核内受容体ファミリー遺伝子であるが、アフリカツメガエルは脊椎動物であるので、ヒトで知られているほとんどの受容体が存在する。RAR β 、PPAR δ 、LXR α 、FXR、CARについては、現在のところデータベースに登録は無いが、今後のゲノム解析の進展によって見つかる可能性も考えられる。表1及び2に、これまでにクローニングされているアフリカツメガエル由来核内受容体のアミノ酸配列の、ヒト核内受容体アミノ酸

配列に対する類似性（一致したアミノ酸の割合）を示した。表には、DNA 結合領域とリガンド結合領域のみを示したが、これはその他の領域に多くのギャップが見られ、比較が困難であったためである。

表を見て分かるように、DNA 結合領域は哺乳類と両生類の間で非常に高度に保存されているが、リガンド結合領域にはかなりのアミノ酸の違いが見られる。従って、外来性の化学物質については、哺乳類と両生類の受容体について結合性の違いを検討する必要がある。また、外来異物の受容体である SXR については、マウスやラットのホモログですらそれほど類似性が高くなく、両生類のホモログ（アフリカツメガエルには BXR α と BXR β の2種類が存在する）では50%以上のアミノ酸が異なる。CAR や SXR は、外来異物に応答して薬物代謝酵素を誘導する受容体であり、これらの受容体の相同性が低い事は、種間の薬物代謝の違いを示唆している。従って、化学物質の代謝物が内分泌攪乱作用を示す場合、それぞれの種において薬物代謝を検討しなければならないと考えられる。

D. 有機スズ化合物のアフリカツメガエルへの影響

我々は、環境省が内分泌攪乱作用が疑われるとしてリストアップした化学物質の核内受容体への作用を網羅的にスクリーニングする過程で、有機スズ化合物の TBT や TPT が顕著に RXR と PPAR γ に対しアゴニスト活性を示すことを明らかにした。哺乳動物において、PPAR γ は脂肪細胞の分化に重要な役割を果たしており、そのリガンドは脂肪細胞への分化を顕著に促進することが知られている。また、PPAR γ は RXR とヘテロダイマーを形成して DNA に結合するが、PPAR γ /RXR は permissive 型のヘテロダイマーを形成することから、RXR リガンドも脂肪細胞の分化を促進する。有機スズ化合物は、この PPAR γ と RXR の両方のアゴニストとして機能することから、有機スズは哺乳動物において脂肪細胞を増加させることが予想された。そこで、我々はマウスの前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を用いて、有機スズ化合物の脂肪細胞分化への影響を検討した。その結果、低濃度の TBT と TPT の暴露は、3T3-L1 細胞内に大量の脂肪滴を蓄積させ、脂肪細胞への分化を顕著に促進した (Kanayama, T *et al.* *Molecular Pharmacology*, 67: 766-774, 2005)。

同様の研究は、米国 University of California Irvine の Dr. Bruce Blumberg 等のグループも行っている。彼等はアフリカツメガエル由来の PPAR γ と RXR にも有機スズ化合物がアゴニスト活性を示すこと、アフリカツメガエルへの有機スズの暴露は生殖腺周辺の脂肪を増加させることを明らかにした (投稿中)。これらの結果は、我々が行った哺乳動物細胞での結果と良く一致しており、核内受容体を介する生体影響は、脊椎動物間ではある程度、共通していることを予想させる。

E. 結論

1. アフリカツメガエルは、既に確立された実験モデル生物であり、特に発生学の研究に適し

ている。

2. *Xenopus laevis* と *Xenopus tropicalis* を較べた場合、*Xenopus tropicalis* の方がその染色体構成や生活環の短さから、実験材料として適している。
3. 哺乳動物で知られている核内受容体のほとんどはアフリカツメガエルにも存在するが、薬物代謝酵素の誘導に関与する受容体には、アミノ酸配列に大きな違いがある。
4. 有機スズ化合物の生体影響において、哺乳動物とアフリカツメガエルは良く似た挙動を示す。

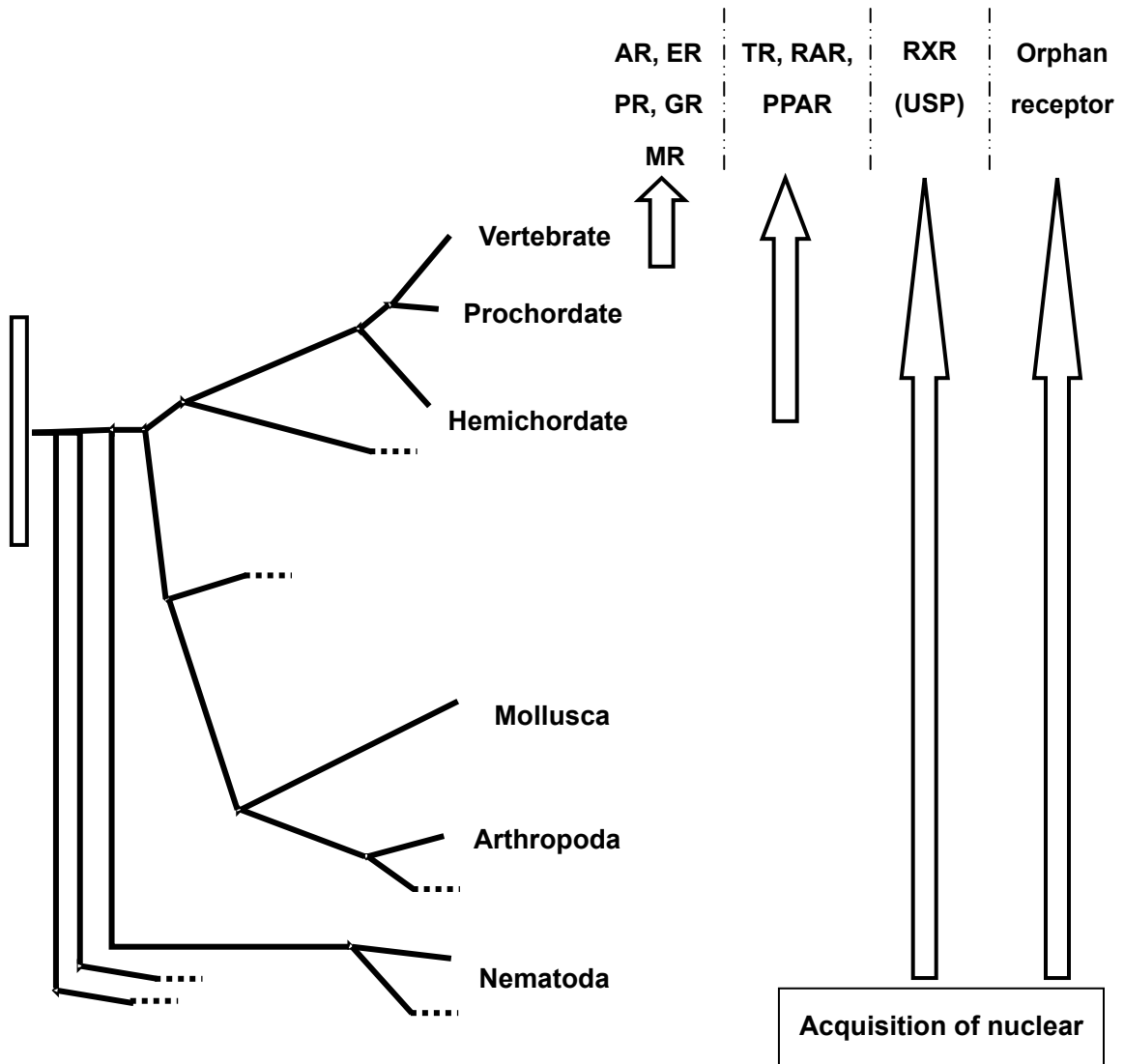


図1 核内受容体遺伝子の進化