

核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

西川淳一（大阪大学大学院薬学研究科 助教授）

研究要旨

近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定され、核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトにおいては48種類存在することが明らかとなっている。核内受容体ファミリーの中で、これまで知られている内因性のリガンドは、ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンなどの脂溶性で低分子の生理活性物質である。一方、内分泌攪乱物質と疑われている化学物質も、環境中に放出されやすく、残留性の高い脂溶性低分子物質であり、これらの物質が核内受容体に作用して、アゴニストやアンタゴニストとして働く可能性が考えられる。これまで、内分泌攪乱物質のターゲットとしては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が注目されてきたが、その他の受容体も同様に内分泌攪乱物質の標的となる可能性が高い。本研究課題では、このような観点のもと、網羅的にヒト核内受容体ファミリーに対する内分泌攪乱化学物質の結合性を調べてきた。前年度までに、環境省が優先的にリスク評価に取り組む20物質について網羅的に核内受容体ファミリーに対する影響を調べたところ、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エストロゲン受容体だけでなくビタミンA受容体にも強いアゴニスト活性を持つこと、トリブチルスズやトリフェニルスズ等の有機スズ化合物はレチノイドX受容体に内因性リガンドの9-cis retinoic acidと同等かそれより強いアゴニスト活性を示すことを発見した。有機スズ化合物は、海産性巻貝類の雌の雄性化（インポセックス）を引き起こすとして大きな社会問題となっていることから、今年度はこれをさらに進め、海産性巻貝類からのレチノイドX受容体のクローニング、得られた受容体への有機スズ化合物の影響を中心に検討した。

研究協力者

今川 正良（名古屋市立大学薬学部 教授）

A. 研究目的

近年、環境中に存在する人工化学物質による生殖毒性やそれに伴う生態系の異変が大きな社会問題となっている。このような影響をもたらす化学物質は、一般に内分泌攪乱物質あるいは環境ホルモンと呼ばれている。内分泌攪乱物質は、生体の内分泌系に影響を与える可能性、すなわち内分泌攪乱作用を示す化学物質の総称と捉えることができるが、その

作用点や作用機構に関しては不明な点も多い。内分泌系は多細胞生物の全体的なバランスを調節する上でも重要なシステムであり、非常に精巧で複雑な系として成り立っている。化学物質がこのような複雑な系に対し影響を与える場合、そのエンドポイントは多岐にわたり、どのような物質を内分泌攪乱物質と定義するかについては議論の余地があると考えられる。

生体の内分泌系は、主にホルモンと呼ばれる微量の生理活性物質とその標的器官に存在する受容体によって構成されている。その中でも、低分子で脂溶性の生理活性物質の作用は、主に核内受容体と呼ばれる転写因子群によって仲介されている。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。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。核内受容体の転写活性化はリガンドとの結合、2量体化、DNA上の特定配列への結合、転写コアクチベーターのリクルートという流れで行われる。核内受容体のリガンドとなる物質には、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含まれる。核内受容体は、これら生理活性物質のシグナルを伝達することにより、生体の様々な営み（細胞の増殖や分化、生殖、代謝、恒常性の維持等）を制御しており、重要な生物学的機能を担っている。

近年、ヒトゲノムの解析によりヒトのゲノム上には48種類の核内受容体が存在することが明らかになってきた。それらの中には、ステロイドホルモン受容体のようなリガンド既知の受容体だけでなく、オーファン受容体に分類される受容体も数多く存在している。リガンド既知の受容体のほとんどは、内分泌系の機能維持に重要な役割を果たしていることなど多くの事が分かってきているが、オーファン受容体に関しては、リガンドとなる物質の存在やその機能、また転写活性化機構に関しても不明な点が多く、その全容の解明は未だなされていない。

これまでに、内分泌攪乱物質をはじめとして生体外物質が核内受容体を介し、生体内でホルモン様作用を示すとの報告は多くある。特に、環境中に残留する化学物質の野生生物に対する生殖影響から、核内受容体のなかでも性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体が注目を集めてきた。しかしながら、前述したように核内受容体遺伝子はスーパーファミリーを形成し、数多くの関連受容体が存在し、これら全てが様々な化学物質の標的となりうる可能性を秘めていると考えられる。また、この受容体ファミリーの機能の多様性を考慮すれば、内分泌攪乱作用に限らず、化学物質がこれらの受容体を介して、様々な毒性を発現する危険性がある。以上のような観点から、我々は核内受容体ファミリーに対する化学物質の影響を調べ、化学物質の毒性発現機構を明らかにすることを目的に、研究を開始した。

B. 研究方法

1. 酵母 two-hybrid 系の構築

前年度までに単離したヒト由来核内受容体遺伝子を酵母 two-hybrid 用ベクター-pGBT9 (Clontech 社) に組み込み、コアクチベーター遺伝子 (TIF2) を組込んだ pGAD424 とともに酵母 Y190 に導入した。

得られた酵母を培養し、その懸濁液に被検物質を加え、30℃ で 4 時間反応させた。その後、酵母を遠心分離により集め、Zymolyase で酵母細胞壁を溶解後、被検試薬で誘導されたβ-galactosidase 活性を比色法にて定量した。試験はすべて n=3 で行った。

2. レポーター遺伝子試験

・ プラスミド

哺乳動物用発現ベクター-pBK-CMV (Stratagene 社) に、酵母由来転写因子 GAL4 の DNA 結合領域 (アミノ酸番号 1 ~ 94) を制限酵素 EcoRI と SalI を用いて挿入した。さらに、ヒト由来 RXR (Retinoid X Receptor) α の LBD (Ligand Binding Domain) を制限酵素 EcoRI と NotI を用いて挿入し、GAL4DBD と RXRαLBD が哺乳動物細胞内で融合タンパク質として発現するようなベクターを構築した。

レポーター遺伝子としては、GAL4 の結合配列 (UAS) を 4 個並べた配列の後に、tk プロモーターをつなげ、さらにその後ルシフェラーゼ遺伝子をつないだものを用いた。

また、遺伝子導入効率を補正するため、RSV プロモーターの下流にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子をつないだものを作製し、内部標準として用いた。

・ 遺伝子導入

マウス由来胚性癌細胞 F9 を、 1×10^5 cells/ml になるよう希釈し、2 ml ずつ 35 mm ディッシュに播き、37℃、5% CO₂ 存在下で 24 hr 培養した。

GAL4DBD-RXRαLBD : UAS-tk-Luciferase : RSV-β-Galactosidase = 3 : 6 : 1 の割合になるよう混合し、1 枚のディッシュあたり 1 μg/10 μl のプラスミドを、FuGENE6 (Roche 社) を用いて、細胞に導入した。

遺伝子導入 24 hr 後、培地に各リガンドを添加し、さらに 24 hr 培養を続けた。その後、培地を除去し、PBS で洗浄後、細胞を回収した。

ルシフェラーゼ活性は、Lumant LB9501 (Berthold 社) を用いて測定した。

3. イボニシからの RXR ホモログの単離

・ cDNA ライブラリーの構築

茨城県ひたちなか市平磯で採取した雄のイボニシより精巣及び消化腺を単離し、液体窒素により急速凍結した後、-80℃にて保存した。臓器を解凍後、TRIzol 試薬 (Invitrogen 社) を使用し、Total RNA を調整した。得られた Total RNA より Oligotex-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (宝バイオ社) を用いた 2 段精製法により、poly(A)⁺RNA を調整した。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 社) により、分解等が見られないことを確認した。

cDNA ライブラリーの作製は、基本的には cDNA Synthesis Kit (Staratgene 社) を用いて行った。概略は以下の通りである。Oligo (dT)₁₈Anchor Primer 及び逆転写酵素を用いて 5 µg の poly(A)⁺RNA を鋳型として 1st strand cDNA を合成した。1st strand 合成時には 5-methyl dCTP を使用した。DNA polymerase を用いて 2nd strand を合成後、末端を平滑化し、EcoRI アダプターをつないだ。末端をリン酸化処理し、制限酵素 XhoI で切断した後、スピнкаラム (Clontech 社 CHROMO SPIN TE-1000) を用いて低分子量 DNA を除去した。得られた 2 本鎖 DNA をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱後、λZAPII (EcoRI-XhoI 切断) ファージベクターに連結した。

得られたファージベクターを Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene 社) を使用した *In vitro* Packaging 反応後、SM 緩衝液を 500 µl 加えた。20 µl のクロロホルムを添加し混合後、水性画分に終濃度 7% となるよう DMSO を加え、cDNA ライブラリーとして -80℃にて保存した。

・ RT-PCR

哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類の RXR のアミノ配列を比較し、相同性の高い部分を抽出し、その配列をもとに以下のプライマーを合成した。

Forward primer : 5'-TGYGARGGNTGYAARGGNTTYTTAARMG-3'

Reverse primer : 5'-RAAGTGNGGVABNMKYTTVGCCCAATC-3'

cDNA ライブラリーの項で精製した poly(A)⁺RNA を鋳型として逆転写酵素 (Reverta Ace、東洋紡) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold、Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行うことにより、イボニシ由来 RXR の部分配列をコードする DNA を増幅した。

・ スクリーニング

RT-PCR により得られた DNA を ³²P 標識し、これをプローブとして cDNA ライブラリーに対しハイブリダイゼーションを行うことにより、イボニシ由来 RXR の cDNA をクローニングした。

・ 塩基配列の決定

スクリーニングにより得られた DNA 断片を pBluescript (Staratgene 社) にサブクロ

ーニングし、自動蛍光式 DNA シーケンサー-DSQ1000 (島津製作所) にて塩基配列を決定した。

4. 試薬

RXR のリガンドとしては、9-*cis*-Retinoic acid を SIGMA より購入して用いた。環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質は、日本エヌ・ユー・エス株式会社より供与して頂いた。

5. 被検試薬の調整

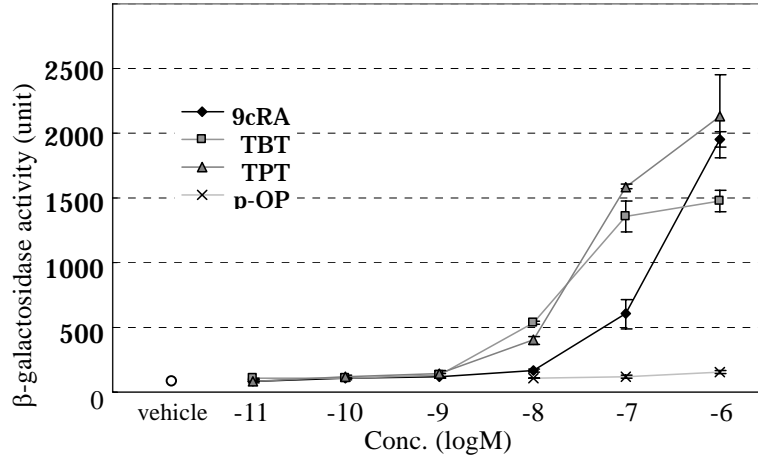
標準リガンドを含め全ての試薬は DMSO に溶解後-20 で保存し、使用前に DMSO で段階希釈して用いた。

C . 研究結果

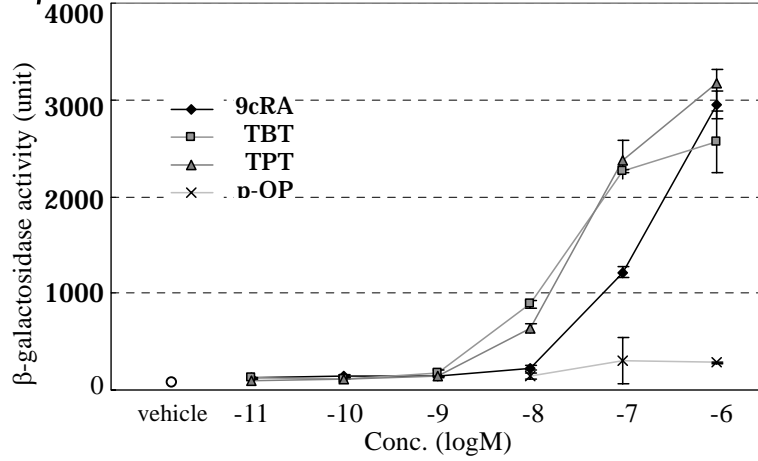
1. 有機スズ化合物の RXR に対する影響

前年度までに構築した酵母 two-hybrid 法による、ヒト RXR α 、 β 、 γ に対する有機スズ化合物の活性評価を図 1 に示した。これまで、環境省が優先的にリスク評価に取り組むべきとして指定した化学物質について、様々な核内受容体に対する影響を調べてきたが、トリブチルスズ (TBT) とトリフェニルスズ (TPT) の RXR に対するアゴニスト活性は例外的に強力なものであった。RXR 類の内因性リガンドとしてはレチノイドの代謝体である 9-*cis* Retinoic Acid (RA) が知られているが、酵母 two-hybrid 法で 9-*cis* RA が 10^{-7} M から活性を示したのに対し、TBT 及び TPT はそれより 10 倍低い 10^{-8} M の濃度から活性を示した。このように、受容体に対して、本来リガンドとなることを意図されていない合成化学物質が生理的リガンドに匹敵するような影響を示す例は非常に稀である。

A. hRXR α



B. hRXR β



C. hRXR γ

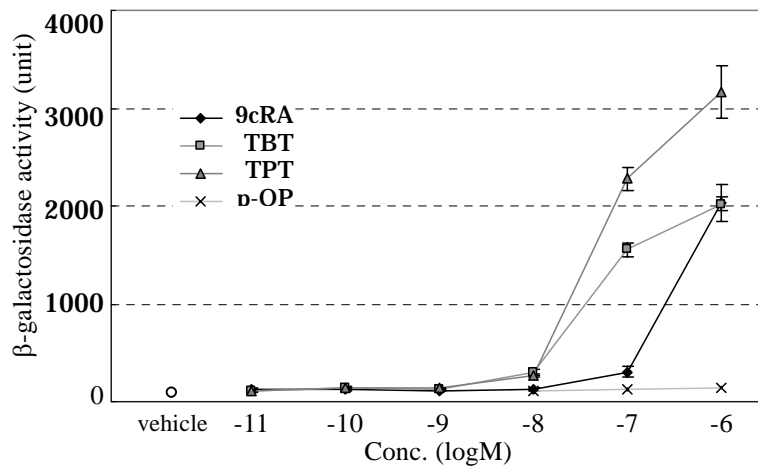


図1 ヒト RXR サブタイプに対する有機スズ化合物の影響 (酵母 two-hybrid 法)

酵母 two-hybrid 法において、有機スズ化合物が RXR とコアクチベーターの相互作用を強力に促進する事が分かったので、さらに哺乳動物細胞を用いたレポーター遺伝子試験を用いて、RXR を介する転写活性化への有機スズ化合物の影響を調べた。RXR は、普遍的にどの細胞においても存在することが知られているため、ここでは内因性の RXR の影響を排除する目的で、エフェクターとして GAL4 の DNA 結合領域にヒト由来 RXR のリガンド結合領域をつないだものを用い、レポーターとして GAL4 応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものを使用した。エフェクター遺伝子とレポーター遺伝子をマウス胚性腫瘍細胞 F9 に遺伝子導入した後、9-cis RA、TBT、TPT を添加することにより濃度依存的なルシフェラーゼ活性の増強が認められた(図 2)。また、その活性の強さも 9-cis RA と TBT、TPT に大きな差は認められなかった。これらのことから、哺乳動物細胞内においても、有機スズ化合物が本来のリガンドである 9-cis RA と同様に RXR に結合し、受容体の転写活性化を強力に活性化させることが分かった。

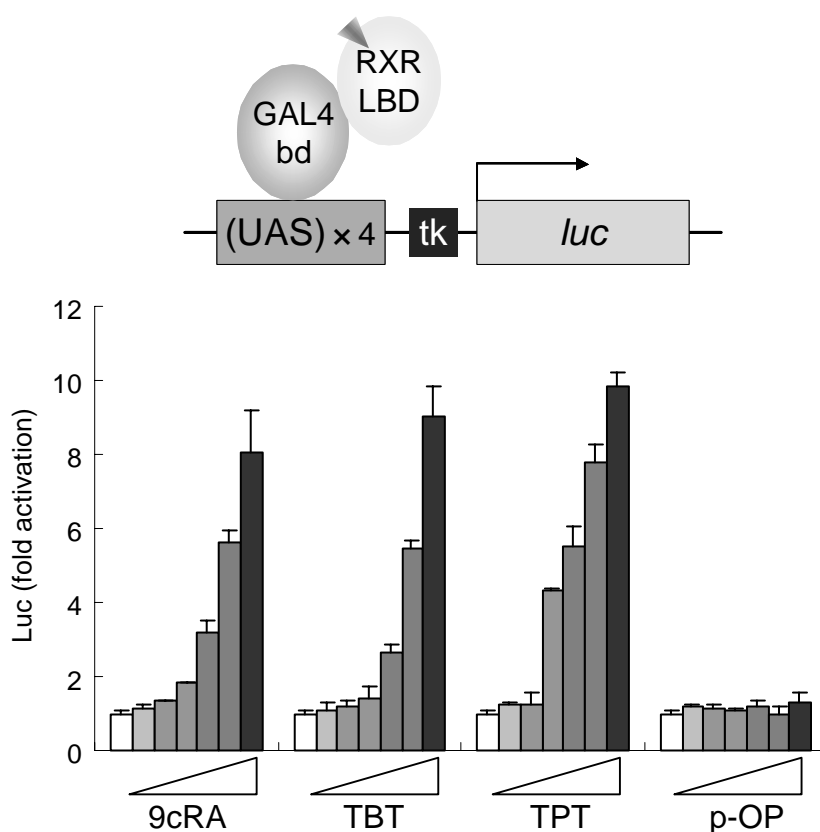


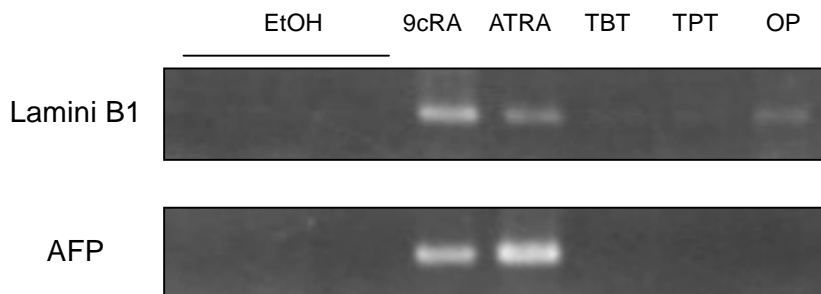
図 2 有機スズ化合物による hRXR α の転写活性化 (哺乳動物細胞)

用いた濃度は、それぞれの化合物共通で、左から 0、0.3、1、3、10、30、100 nM であり、試験は独立して 3 回繰返し行い、その平均値と標準偏差を示した。

6. 有機スズ化合物の分化誘導能に関する検討

哺乳動物細胞における、有機スズ化合物の RXR を介した影響を調べるため、引き続き F9 細胞を用いて、分化に対する影響について検討を行った。マウスの胚性細胞である F9 細胞は、分化能を保持した腫瘍細胞であり、初期胚の多分化能を持った細胞に類似した性質を持っている。この細胞は、レチノイドシグナル経路の活性化により分化が進行することが既に知られており、レチノイドを添加することにより胚体外内胚葉細胞、遠位内胚葉細胞へと分化し、ラミニンや α -フェトプロテイン (AFP) を誘導する。そこで、これらを分化マーカーとして、有機スズ化合物を添加した細胞を培養後、RNA を回収し、RT-PCR によってラミニン及び AFP の発現を調べた。その結果、レチノイドである all trans retinoic acid (ATRA) や 9cis RA を添加した場合は、ラミニンと AFP の発現が確認されたが、TBT 及び TPT を添加した培地においてはこれらの分化マーカーの発現増加は検出されなかった(図 3、A)。また、結果には示していないが、2 種類のレチノイドを添加した状態では、明らかな細胞の形態変化が観察されたのに対し、有機スズ化合物では形態変化が認められなかった。

A. 分化マーカー遺伝子の発現



B. RXR 標的遺伝子の発現

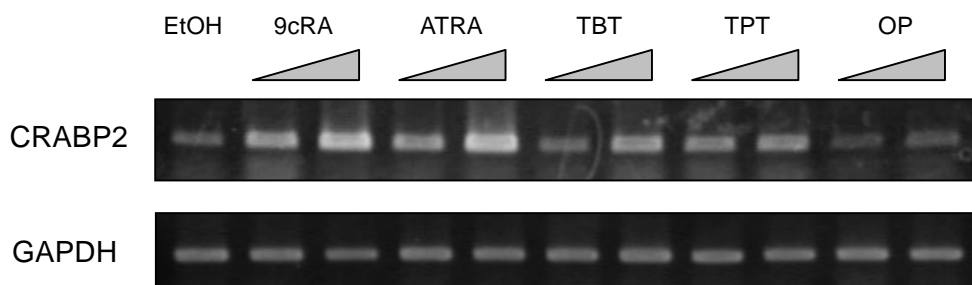


図 3 F9 細胞への有機スズ化合物の影響

以上の結果から、有機スズ化合物は F9 細胞における分化に対して顕著な影響を示さないと考えられる。レチノイドと有機スズ化合物の違いは、9-cis RA や ATRA は RXR だけでなくビタミン A 受容体 (RAR) も活性化できるのに対し、有機スズ化合物は RXR のみしか活性化することが出来ない。従って、F9 細胞の分化への影響を考えた場合、分化の進行には RAR の活性化が重要であり、有機スズ化合物は分化に必要なシグナル経路を活性化できなかったと考えられる。

分化以外の影響を調べるため、他の因子の発現を検討したところ、有機スズ化合物により CRABP II の誘導が認められた (図 3、B)。細胞内でレチノイドに結合し、その輸送に関わる CRABP II は、レチノイドによって誘導されるレチノイド応答性の因子として知られているが、一方で、代表的な RXR 標的遺伝子でもある。つまり、内因性のレチノイドは、RAR と RXR の両方を活性化し、細胞の分化のような生物学的機能を持つが、有機スズ化合物のその一方しか活性化できないため哺乳動物細胞への影響が小さかったと推察される。

7. 有機スズ化合物の海産性巻貝 RXR への影響

化学物質が生体に与える影響は種差が大きく、ある種の生物で観察された現象をそのままヒトに外挿することは出来ない。有機スズ化合物についても、巻貝類におけるインポセックスという現象は、哺乳動物においては認められない。しかしながら、有機スズ化合物が結合する RXR は、核内受容体ファミリーの中でも例外的に種を超えて保存されており、昆虫類においても USP と呼ばれるホモログの存在が知られている。このことから、RXR を介する有機スズ化合物の影響は種を超えて共通である可能性も考えられるため、ここでは海産性巻貝類の一種であるイボニシから RXR をクローニングし、それに対する TBT や TPT の影響を調べた。

イボニシから RXR をクローニングするため、まず GenBank に登録されている塩基配列情報を用いて広範な種の RXR のアミノ酸配列を見比べ、相同性が高い領域を抽出した。いくつかの候補からプライマーを設計し、イボニシより抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、特異的に増幅するバンドが見い出された。そこで、このバンドを切り出し、塩基配列を調べた後、これをプローブとして、イボニシ mRNA より作製したライブラリーに対してスクリーニングを行った。これにより、ストップコドンを含むイボニシ RXR が得られたが、開始コドンを含む 5' 端は含まれていなかった。そこで、さらに 5'-RACE を行うことにより、5' 端を PCR で増幅させ、塩基配列を決定することにより、完全長のイボニシ RXR の配列を明らかにした (図 4)。

A. ヒト、マウス、イボニシ由来 RXR のアミノ酸配列の比較

human.gpt	1	MDTKHFLPLDFSTQVNSS-LTSPTRGSGMAAPSLHPSLGPGLGSP----	QQLHSPISTLS	55
mouse.gpt	1	MDTKHFLPLDFSTQVNSSSLNSPTGRGSMVPSLHPSLGPGLGSPQLHSPISTLS	60	
rock shell.gpt	1	M-----GHQVEACQVAMHMGVPGMGGMGGPHQPDIK	31	
human.gpt	56	SPINGMGPPFVSISSPMGPHSMVETPTTLGFST-GSPQLSSP-MNPVSSSEDIKPPPLGL	113	
mouse.gpt	61	SPINGMGPPFVSISSPMGPHSMVETPTTLGFST-GSPQLNSP-MNPVSSSEDIKPPPLGL	118	
rock shell.gpt	32	PDISTLNPFSSSTHPGFSPYGGMEGMPSSSTQASPGGPNMTSPQMHSPTSSSLGSPMMCL	91	
human.gpt	114	NGVLKVPAPHSNMASTFKHICAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRD	173	
mouse.gpt	119	NGVLKVPAPHSNMASTFKHICAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRD	178	
rock shell.gpt	92	SPT--GTSSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACRD	149	
human.gpt	174	NKDCLIDKRQRNRCQYCRYQKCLAMGMKREAVQERQRGKDRNENEVESTSSANEDMPVE	233	
mouse.gpt	179	NKDCLIDKRQRNRCQYCRYQKCLAMGMKREAVQERQRGKDRNENEVESTSSANEDMPVE	238	
rock shell.gpt	150	DKNCMIDKRQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREAVQERQRVKEKGDGEVESTSSANSMPVE	209	
human.gpt	234	KILEAEI AVEPKTE TYVEANMGLNPSSPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHFSELP	293	
mouse.gpt	239	KILEAEI AVEPKTE TYVEANMGLNPSSPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHFSELP	298	
rock shell.gpt	210	QILEAEI AVEPKIDTYIDAQ-----KEPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHFVSELP	261	
human.gpt	294	LDDQVILLRAGWNELLIASFSHRSTAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRVLTTEL	353	
mouse.gpt	299	LDDQVILLRAGWNELLIASFSHRSTAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRVLTTEL	358	
rock shell.gpt	262	LEDQVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGTIFDRVLTTEL	321	
human.gpt	354	VSKMRDMQMDKTELGCLRAIVLFPDSSKGLSNPAEVEALREKVVYASLEAYCKHKYFPEQPG	413	
mouse.gpt	359	VSKMRDMQMDKTELGCLRAIVLFPDSSKGLSNPAEVEALREKVVYASLEAYCKHKYFPEQPG	418	
rock shell.gpt	322	VAKMREKMDKTELGCLRAIVLFPDAKGLQSVQVEALREKVVYASLEAYCKQRYFDEPG	381	
human.gpt	414	RFAKLLRLPALRSIGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDTFLEMELAPHQMT-	462	
mouse.gpt	419	RFAKLLRLPALRSIGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDTFLEMELAPHQAT-	467	
rock shell.gpt	382	RFAKLLRLPALRSIGLKCLEHLFFFKLIGDTPIDTFLEMELSPSHPAT	431	

B. イボニシ RXR に対するアミノ酸配列のホモロジー

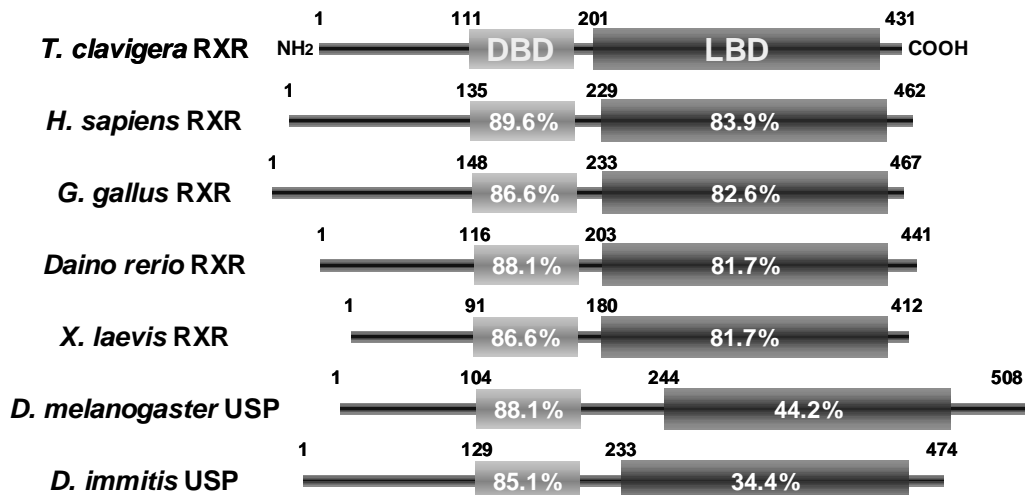
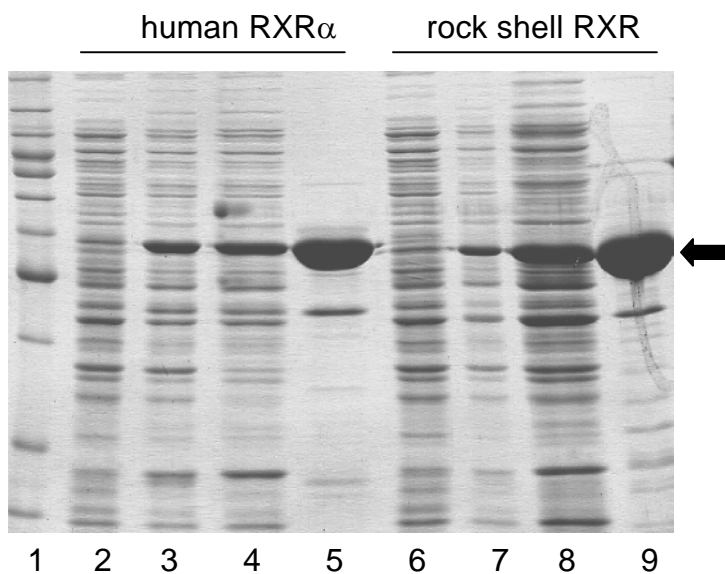


図4 イボニシからの RXR のクローニング

図4に示したように、イボニシ RXR も核内受容体ファミリーに特徴的な C2C2 タイプの亜鉛フィンガーを2つ持っており、DNA 結合領域の保存度はヒト、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、シヨウジョウバエ、フィラリアの RXR 及びその関連受容体と比較しても、非常に高い。また、リガンド結合領域に関しては、イボニシ由来 RXR は脊椎動物の RXR と非常に高いホモロジーを持つが、シヨウジョウバエやフィラリアの RXR とはあまり似ていない。USP は、無脊椎動物における RXR ホモログとされているが、9-cis RA は結合しない。イボニシは、脊椎動物ではないが、RXR の配列は脊椎動物タイプであり、9-cis RA が結合することが考えられた。

そこで、次に、クローニングしたイボニシ RXR を用いて、これを大腸菌で発現させ、得られたタンパク質に対する 9-cis RA 及び有機スズ化合物の結合性を検討した。イボニシ RXR のリガンド結合領域をコードする DNA を大腸菌用発現ベクター pGEX-4T に組み込み、Gluthathione S-Transferase (GST) との融合タンパク質として発現するようなプラスミドを構築した。これを大腸菌 BL21 に導入し、IPTG による発現誘導後、大腸菌を超音波破碎し、ここから Glutathione-Sepharose 4B を用いて精製した (図5)。



1 2 3 4 5 6 7 8 9
 Lane 1 : size marker
 Lane 2,6 : uninduced whole cells
 Lane 3,7 : IPTG induced whole cells
 Lane 4,8 : supernatant
 Lane 5,9 : purified GST-RXR

図5 RXR の大腸菌で大量発現と精製

精製したイボニシ RXR タンパク質に ^3H 標識した 9-cis RA を加え、RXR に結合した放射活性を測定したところ、図 6 (A) に示したような飽和曲線が得られた。これを Schtchard 解析により直線回帰することにより、イボニシ RXR に対する K_d 値が 5 nM と算出された (図 6、B)。ヒトの RXR に対する 9-cis RA は 1-10 nM と報告されており、イボニシ RXR はヒトと同等の親和性で 9-cis RA に結合することが分かった。

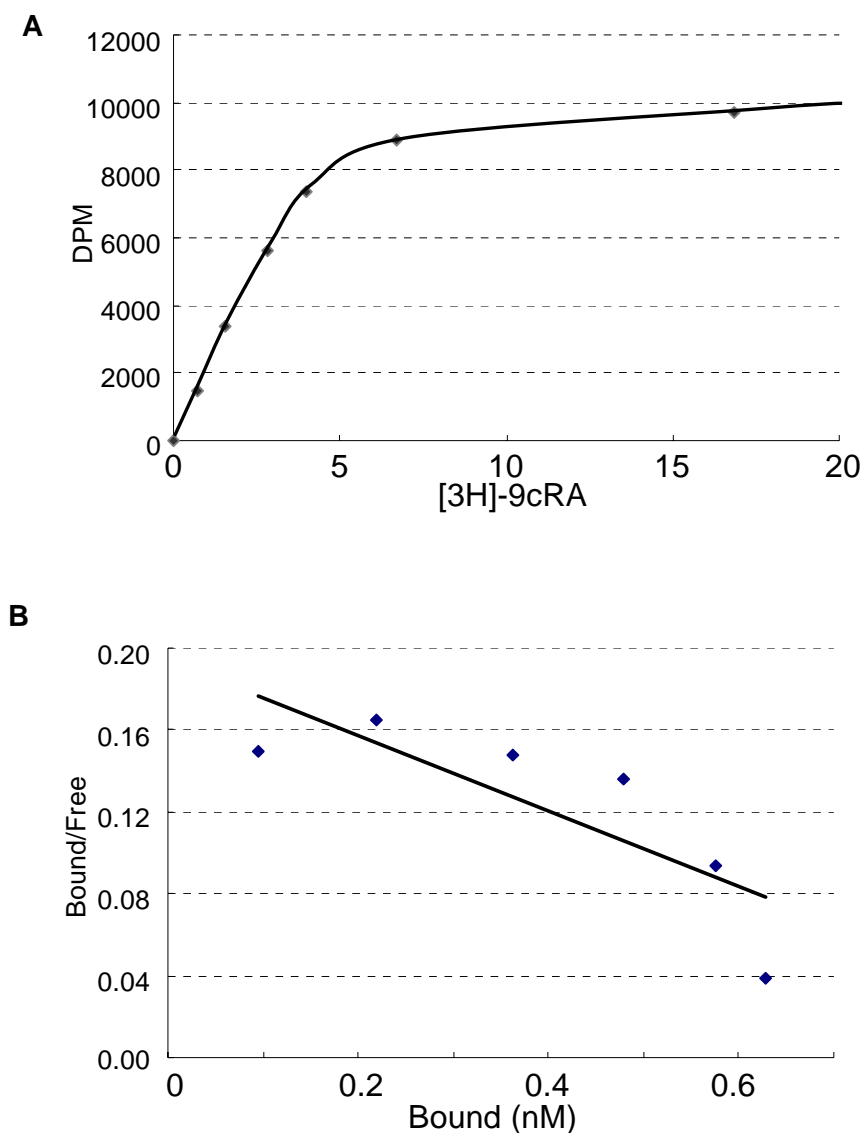
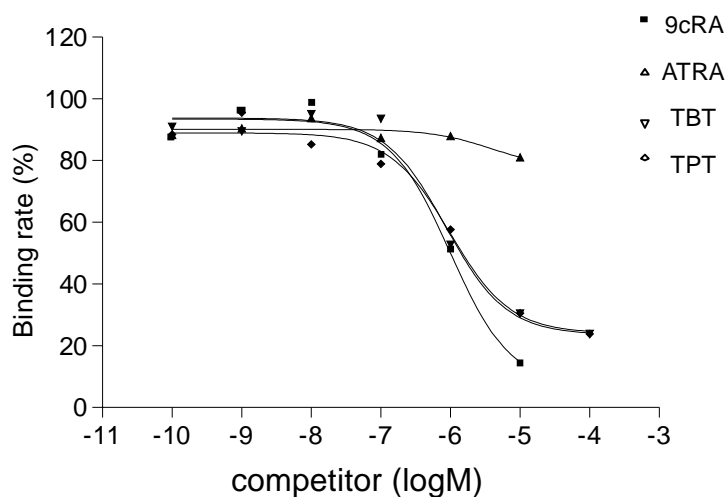


図 6 イボニシ RXR への 9-cis RA の結合性

A. 飽和曲線 B. Schtchard 解析

そこで、次に有機スズ化合物が RXR に結合するかどうかを、 ^3H 標識した 9-cis RA に対する競合的受容体結合試験により確認した (図 7)。ヒト及びイボニシ由来 RXR ともに、TBT と TPT により ^3H -9-cis RA の結合阻害が認められた。その IC_{50} 値は、ヒト RXR で 9-cis RA が $0.99 \mu\text{M}$ 、TBT が $0.99 \mu\text{M}$ 、TPT が $0.85 \mu\text{M}$ 、イボニシ RXR では 9-cis RA が $0.81 \mu\text{M}$ 、TBT が $8.16 \mu\text{M}$ 、TPT が $6.49 \mu\text{M}$ であった。これらのことから、TBT や TPT はヒト RXR より 10 倍程度弱いながらイボニシ RXR にも結合することが明らかとなった。

A. human RXR



B. rock shell RXR

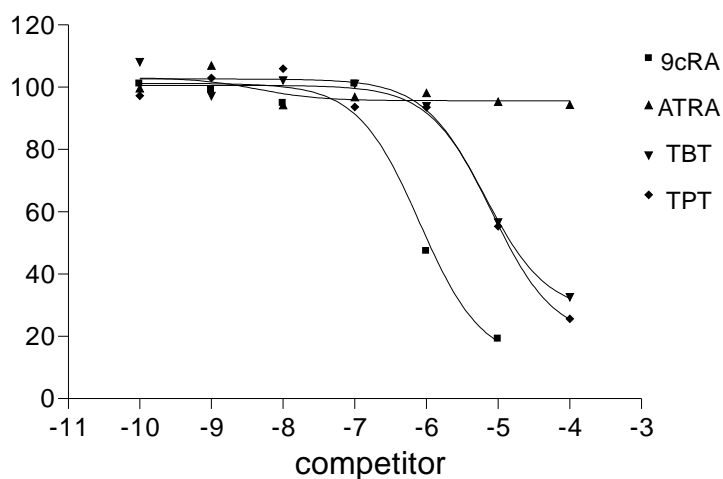


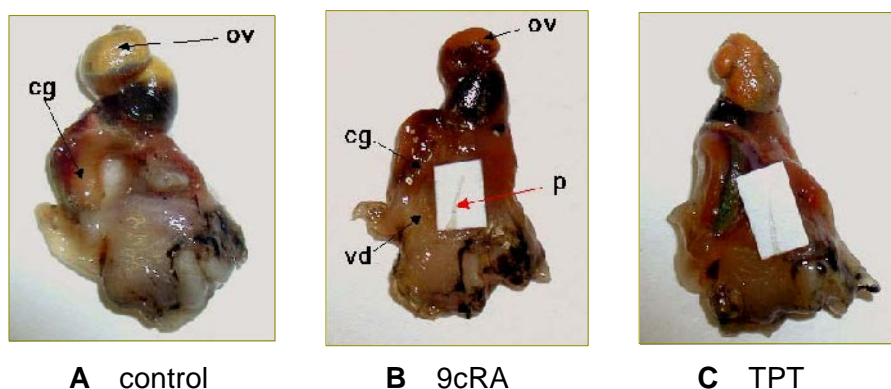
図 7 有機スズ化合物の RXR への結合性 (競合的結合阻害実験)

D. 考察

内分泌攪乱物質の候補としてもリストアップされている有機スズ化合物は、非常に毒性の強い物質である。哺乳動物に対する毒性としては、エネルギー代謝の低下、胸腺重量の低下、リンパ節の萎縮、TSH (Thyroid Stimulating Hormone) の減少、LH (Luteinizing hormone) の増加等、多岐にわたって報告がある。日本においては、その使用は1990年に化審法による規制が施されてはいるが、特にTBTやTPTは、その毒性の強さ、安定性、安価である等の利便性から殺菌剤や防汚剤として広く使用された経歴を持つ。特に、船底の塗料や魚網の防汚剤として用いられた有機スズ化合物は徐々に環境水中へと移行し、そこに住む生物に対し様々な弊害を引き起こしていることが問題となっている。特に、貝類への影響は深刻であり、牡蠣の生産量の減少等との因果関係が指摘されている。また、巻貝類において観察される、TBTやTPTによるインポセックスと呼ばれる雌の雄性化現象は、内分泌攪乱作用として有名である。この現象は、雌の貝に雄の生殖器官が形成されるものであり、結果として、産卵能力の低下や喪失が引き起こされる。この現象は古くから知られており、TBTやTPTの環境水中濃度および貝類の生体内濃度と生殖異常との因果関係から原因物質であることが特定されている。これまで、有機スズ化合物によるインポセックスの誘導メカニズムに関しては、アロマターゼ阻害説やテストステロン硫酸抱合酵素阻害説などが提唱されてきたが、雄性化という明確な現象が観察されるにも関わらず、その作用機構の詳細については不明な点が多かった。

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、TBTとTPTが顕著にRXRに対しアゴニスト活性を持つことを明らかにした。しかし、スクリーニングに用いた受容体はヒト由来であり、環境問題として特にクローズアップされている巻貝類において有機スズ化合物がRXRを介してインポセックスを誘導している証拠は無い。特に、核内受容体は、脊椎動物と無脊椎動物で大きくその性質が異なり、ERやAR等のステロイドホルモン受容体は、無脊椎動物においては存在が確認されていない。従って、インポセックスが問題となっている巻貝類にRXRが存在するかどうかは大きな疑問点であり、本年度の研究において巻貝類の一種であるイボニシからのRXRのクローニングを試みた。その結果、イボニシには脊椎動物のRXRに非常に相同性の高い遺伝子が存在した。また、イボニシから単離したRXRを用いて、脊椎動物RXRの内因性リガンドとされている9-cis RAや有機スズ化合物の結合性を検討した結果、イボニシRXRにもこれらの物質は結合性を示した。また、国立環境研究所の堀口敏宏氏との共同研究で、雌のイボニシに9-cis RAを筋肉注射する、インポセックスの特徴であるペニス、輸精管の形成が認められ、明らかに雄性化が観察された(参

考図)。これまでに、有機スズ化合物以外にインポセックスを誘導した物質の報告は無く、9-cis RAによっても有機スズ化合物と同様にインポセックスが引き起こされたという結果は非常に興味深い。イボニシにも RXR が存在し、その RXR は 9-cis RA や有機スズに結合し、さらに 9-cis RA によってインポセックスが誘導されたという結果は、巻貝類において観察される雌の雄性化現象が RXR を介した作用、すなわちレチノイドシグナルの活性化に原因があることを強く示唆している。一般に、9-cis RA は RXR の生理的リガンドとして知られているが、無脊椎動物である巻貝類においても 9-cis RA が生理的リガンドとして働き、生殖器官の形成に関与しているかどうかは、今後の検討を要する。



参考図 9-cis Retinoic Acid によるインポセックスの誘導

これまで述べてきたように、有機スズ化合物によるインポセックスの誘導はレチノイドシグナル経路の活性化が原因であると考えられる。しかし、巻貝類において雄性化という明確な現象が報告されているにも関わらず、哺乳類に対しては内分泌攪乱作用としての報告例はほとんど無い。そこで、マウスの胚性腫瘍細胞である F9 細胞を用いて、有機スズ化合物の影響を調べてみた。F9 細胞は、腫瘍細胞ではあるが、初期胚の多分化能を持った細胞に類似した性質を持っており、レチノイドシグナルの活性化により分化が進行する。この系を用い、哺乳動物細胞において有機スズ化合物が分化を起こさせるかどうかを検討したが、結果は否定的であった。有機スズ化合物は RXR に強いアゴニスト作用を示すが、9-cis RA や ATRA などの活性型レチノイドと違い、RAR (Retinoic Acid Receptor) には結合しない。哺乳動物において、RXR は RAR や TR、VDR 等、多くの核内受容体のヘテロダイマー・パートナーとして働くことが知られている。こういう RXR 機能の特殊性を考えれば、高等生物においておそらくレチノイドのシグナルは主に RAR によって伝達されていると考

えられる。遺伝子データベースを用いて核内受容体遺伝子を解析した結果、おそらく軟体動物門に属するイボニシには RAR は存在しない。従って、このような下等な種においては、レチノイドのシグナル伝達は RXR を通して行われていると思われる。そのため、RXR に作用する化学物質の作用が直接に表現系として現れやすいのではないかと考えられる。巻貝類においてインポセックスという特異な現象が観察される原因はこの辺りにあるのかもしれない。

有機スズのヒトに対する影響という観点からは、最近、臨床的に応用されている RXR 選択的な合成化学物質の副作用が参考になる。RXR アゴニストである bexarotene は、T 細胞リンパ腫の患者に重篤な甲状腺機能低下を引き起こす。また、RXR 選択的アゴニストである LG100268 をラットに投与したところ、やはり急性の甲状腺機能障害が見られ、その原因は脳下垂体からの TSH 分泌が減少していることであった。有機スズ化合物においても、リンパ節の萎縮や TSH の減少が認められることから、両者が同じ機構で作用している可能性が考えられる。レチノイドは、生体における重要なシグナル伝達物質であり、様々な生理作用に関わっている。特に胚の発生や分化、器官形成時にも働く生理活性物質であることが報告されている。前年度の研究成果として報告したように、ノニルフェノールやオクチルフェノールは ER だけでなく、レチノイドの受容体である RAR にもアゴニスト活性を持つ。このような事から、レチノイドのシグナル伝達経路に影響を及ぼすことが、内分泌攪乱物質の作用機構の一つであることが考えられる。さらに、哺乳類における RXR の機能が非常に広範囲の受容体に関与することを考えれば、RXR の関与するシグナル伝達機構を詳細に検討することにより、内分泌攪乱物質の作用発現機構がより明確になることが期待される。

E. 結論

1. 内分泌攪乱作用が疑われる物質について、様々なヒト核内受容体への作用を検討した結果、有機スズ化合物が RXR に対し強いアゴニスト作用を示すことが明らかとなった。
2. 有機スズ化合物は、マウス胚性腫瘍細胞に分化誘導作用は示さなかったが、RXR の標的遺伝子である CRABP II の発現を誘導した。
3. 海産性巻貝類の一種であるイボニシにも、哺乳類 RXR と非常に似た遺伝子が存在することを明らかにした。
4. イボニシ RXR にも、9-cis retinoic acid が強い親和性を持ち、有機スズ化合物も結合することを明らかにした。
5. イボニシにおける有機スズ化合物による内分泌攪乱作用が、RXR の活性化に起因することを明らかにした。

Imposex in marine gastropods is caused by binding of organotins to the retinoid X receptor

Jun-ichi Nishikawa

**Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of
Pharmaceutical Sciences, Osaka University**

Organotin compounds have been used worldwide in antifouling paints for ships and fishing nets, and released into ocean since the mid-1960s. Most marine gastropods including rock shells (*Thais clavigera*) in organotin-polluted area have showed reproductive failure due to either oviduct blockage by vas deferens formation or ovarian spermatogenesis, resulting in population declines. This phenomenon is called imposex as an abbreviation of imposed sexual organs, because male genital tracts, such as penis and vas deferens, are imposed upon females by exposure to very low concentrations of organotins . Despite several hypotheses about imposex induction mechanisms, the exact pathway is still unclear.

Here, we show that TBT and TPT bind the retinoid X receptors (RXRs) with high affinity, and that injection of 9-cis retinoic acid (RA), the natural ligand of RXR, into females of the marine gastropod *Thais clavigera* (rock shells) induces substantial penis growth. Cloning of the RXR homologue from *Thais clavigera* revealed that the ligand-binding domain of rock shell RXR was very similar to vertebrate RXR and bound to both 9-cis RA and to organotin compounds. These results suggest that RXR is a key target of organotins and plays an important role in the induction and development of male genital tracts in female gastropods.

