

トラフグ *raldh2* のクローニング —魚類ビタミンAの胚発生での役割解明に向けて—

宇治 督^{*1}・黒川忠英^{*1}・鈴木 徹^{*2}

Molecular cloning of *raldh2* from *Takifugu rubripes*

Susumu UJI^{*1}, Tadahide KUROKAWA^{*1} and Tohru SUZUKI^{*2}

Abstract Embryonic development of organs and tissues in viviparous organisms such as mammals, particularly organs such as the central nervous system, heart and skeletons, is dependent upon vitamin A supplemented from the mother. Conversely, in fish, which are oviparous, embryogenesis is entirely dependent on nutrients stored mainly as yolk within eggs during vitellogenesis. It is therefore possible that abnormalities in seed production by broodstock may arise during embryogenesis in an aquacultural setting due to vitamin A deficiency or hypervitaminosis. The authors hypothesize that, not only is vitamin A metabolism essential to the development of mature female fish, but vitamin A transfer to the eggs is essential for healthy seed production. Here we review the role of vitamin A in mammals and fish. In addition, we describe the molecular characteristics and gene expression patterns in *Takifugu rubripes* retinaldehyde dehydrogenase 2 (*raldh2*), which converts retinal to retinoic acid, an active form of vitamin A that controls the mRNA expression of various genes involved in embryogenesis.

Key words : vitamin A, early development, malformation, metabolic pathway of vitamin A, *raldh2*

魚類種苗生産現場において、色素異常（特にヒラメ *Paralichthys olivaceus*、マツカワ *Verasper moseri* における白化、黒化現象）、骨形成異常（特にブリ *Seriola quinqueradiata* における上下顎骨異常、脊椎骨癒合、前頭骨異常）など、形態の異常な稚魚が多数発生することがあり問題となっている。

形態異常を考えるうえで非常に重要な要素は2つある。1つは原因要因、もう1つは時期的要因である。要因が何なのか、それがいつ起こるかによって、形態異常の表現型は大きく変わる。我々は1つのモデルとしてトラフグ *Takifugu rubripes* をもちいて、原因要因をビタミンAの活性本体であるレチノイン酸 (RA) に決め、時期的要因を胚発生期に絞って実験を行い、有用魚種における胚発生と、稚魚および成魚における形態異常との関連を調べている。

ビタミンAは必須の栄養素として網膜における視

覚としての作用だけでなく、脊椎動物の発生過程に重要な役割を持っている。このことは古くからの欠乏症、過剰症などの栄養学的、奇形学的研究からだけでなく、最近の分子生物学的なRAシグナル伝達機構の研究から明らかである。しかしながら、そのほとんどは哺乳類での知見であり、魚類での知見はモデル生物であるゼブラフィッシュに限られているのが現状である。哺乳類は「子が母体内で養分を受け、ある程度の発達を遂げたのち生まれる」胎生である。それゆえヒトなどでは、妊婦が皮膚病の治療薬としてレチノイド薬を経口投与されるとその影響で奇形胎児が生じる (Lammer et al. 1985)。魚類は「卵の形のままで母体外に産み出され、体外で発育して孵化する」卵生である。この産卵様式の違いは非常に重要である。胎生の場合、その発生は親の栄養状態の影響を直接受けるのに対し、卵生の場合、卵黄という栄養素のみで発生する。つまり

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency 422-1 Nakatsuhamaura, Minamiise, Mie, 516-0193, Japan)

^{*2} 東北大学大学院農学研究科 〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (Laboratory of Bioindustrial Informatics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan)

未受精卵の状態に必要な栄養素は親からすべて与えられていて、それ以降全く栄養素の供給はない。卵生の鳥類ウズラでビタミンA欠乏症があることが知られているように (Maden et al. 1996)、魚類の場合も親魚から与えられる栄養素としてのビタミンAの供給が適切でなければ、欠乏症、過剰症を引きおこす可能性がある。

ビタミンAの活性型であるRAを含む海水にヒラメやトラフグ仔魚を浸漬すると、色素異常や骨形成異常が起こる (Haga et al. 2003; 宇治ら、未発表)。これは孵化後に与える餌にビタミンAが過剰に存在すると、形態異常が起こる可能性があるということを示唆している。実際に、ヒラメにおいて餌料のビタミンAの多寡が形態異常を起こすことが知られている (Dedi et al. 1995; Takeuchi et al. 1998)。だがRAによる色素異常、骨形成異常は仔魚期のみ原因があるのだろうか。我々はRAレセプターがトラフグ胚発生において色素細胞系列前駆細胞で発現していることを観察している (宇治ら、未発表)。これは仔魚期におけるRAの浸漬実験によって色素異常が起こるという先ほどの事実と合致していると同時に、胚発生時においてもこれらの細胞系列にビタミンAが影響を与えることを示唆している。例えば、孵化前の卵黄の中にあるビタミンAの過剰もしくは欠乏が発生初期の前駆色素細胞や前駆骨細胞などに影響を与え、表現型として検出されるのが仔魚期であるということはないのだろうか。

このような卵質に関わる発生異常、形態異常の問題は初期減耗抑制技術の開発に当たっては極めて重要な研究課題である。そこで、本プロジェクトでは有用魚種での卵内ビタミンAの胚発生での役割、そして形態異常への影響を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。ここでは「ビタミンA」という発生に重要な栄養成分であり、催奇形性因子でもある分子に関する知見、特に胚発生過程での機能の現状を我々の研究成果を含めて紹介する。

ビタミンAとは

ビタミンAは脂溶性ビタミンのひとつであり低分子化合物である。他の脂溶性ビタミンにはビタミンD、E、Kがあり計4種類知られている。水溶性ビタミンは9種類あり、ビタミンとしては合計13種類ある。ビタミンは一般に栄養物質として細胞内に摂取され、多くの場合酵素タンパク質の補助因子となる。水

溶性ビタミンは体内で貯蔵できないので、毎日必要量を摂取しないと欠乏症になることがある。これに対して、脂溶性ビタミンは、体内に特定の貯蔵細胞が存在するなど、一般に長時間保持されるので水溶性ビタミンに比べて欠乏症に陥ることが少ない。また体内に蓄えられるという同じ理由で脂溶性ビタミンは過剰症が存在する。ビタミンA過剰症は人間の場合、少なくとも一日当たり15,000～50,000IUを数ヶ月から1年以上摂取し続けると過剰症になるといわれている (Silverman et al. 1987)。ビタミンA過剰症の症状は多岐にわたり、食欲不振、肝機能異常、関節炎、頭痛、発疹などが認められる。そこで過剰症の発症という点から、一般に成人では25,000IU/日以上の摂取は避けるべきであるとされている*。ビタミンAには欠乏症も知られている。例えばビタミンA欠乏食で飼育したラットは生殖機能障害をきたす (Clagett-Dame et al. 2002)。ラットのビタミンA欠乏状態は、胎児に無眼症、小眼症などの眼の奇形、神経系の奇形、中軸骨格異常などを生じる (Morriss-Kay 1992; White et al. 2000; Kaiser et al. 2003)。また、ビタミンAは催奇形性があることでも知られている。ニキビの経口治療薬であるイソトレチノイン (ビタミンAの誘導体) の投与を受けていた母親は、奇形の子供を産む危険性が高くなる (Lammer et al. 1985)。さらに妊娠母獣にRAを投与すると、中枢神経系、顔面奇形、鰓弓奇形、眼の奇形、中軸骨格の奇形、四肢の奇形など、70種類以上の奇形を生じることが知られている (Shenefelt 1972)。後述するように内因性レチノイドは胎児の形態形成に関わる。そのレチノイドがなんらかの要因で外因的に与えられた場合、正常発生過程を攪乱する結果となり、このような作用がレチノイドの持つ催奇形性へと結びつくのであろう。

ビタミンAの代謝経路

食物中に含まれるビタミンAは大別すると、動物性食品由来の長鎖飽和脂肪酸と重合したレチニルエステルと植物性食品由来のカロテノイドがある。動物性食品由来のレチニルエステル (多くはパルミチン酸エステル) は、動物の肝臓、ウナギ、アナゴ、卵類、バターなどに多く含まれている。植物性食品由来のカロテノイドは、にんじん、ほうれん草などに多く含まれている。

小腸より吸収されたビタミンAは主として長鎖飽和脂肪酸と再びエステルを形成し、他の脂質と共にカ

* 日本ビタミン学会, 1996. ビタミンの事典. 朝倉書店

イロミクロン中に組み込まれて血液中へと輸送され、最終的には肝臓内に取り込まれ貯蔵される。小腸粘膜上皮細胞内におけるレチノールの再エステル化には cellular retinol binding protein (CRBP), acyl-CoA retinol acyltransferase (ARAT)、lecithin retinol acyltransferase (LRAT) が関与すると考えられている。レチノール自体は脂溶性であるので単独では血液に溶解しないが、肝臓に貯蔵されているレチニルエステルは必要に応じて LRAT によって加水分解されてレチノールになった後、レチノール結合タンパク (RBP) に結合することで血液中での輸送が可能になる。レチノール・RBP 複合体はレチノイドを必要とする組織の細胞に取り込まれる。この取り込み機構は長年議論的となっていたが最近新たな知見が加わった。これまでは細胞膜上の特異的なレセプターを介するという説と、非特異的に膜を通過するという説とがあった。Kawaguchi ら (2007) は RBP の細胞膜上のレセプターの存在を確認し、それが細胞内にレチノールを取り込む作用があることを示した。細胞内に取り込まれたレチノールは、酸化されレチナールとして作用するか、もしくはさらに酸化を受けて RA に代謝され生理作用を引き起こす。レチノールからレチナールへの代謝はアルコール脱水酵素である Retinol dehydrogenase (RDH) が関与し、レチナールから RA への代謝にはアルデヒド脱水酵素である retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) が関与している (Fig. 1)。

魚類においては卵黄形成過程に卵にもレチノイドが輸送される。魚類の卵中のレチノイドの主なものは

all trans 型のレチナールである (Costaridis et al. 1996; Irie et al. 2002)。これら卵レチナールは肝臓でつくられ、同じく肝臓で合成されるビテロゲニンに結合した状態で卵に運ばれると考えられる。また油球を含む魚卵ではレチニルエステルを含むのに対し、油球を含まない魚卵ではレチナールがほぼ唯一のレチノイドであることが示唆されている (Irie et al. 2002)。

ビタミン A の生理作用

レチノイドは、視覚、生殖、形態形成、成長、分化誘導、免疫など多くの生理作用を持つことが知られている。そのほとんどの生理作用を担う本体として RA が考えられている。

ビタミン A の活性本体である RA のうち、all trans-RA は核内レセプターである RA 受容体 (RAR) と、9-cis RA は同じく核内レセプターである RA 受容体 (RXR) のリガンドとして働く (Chambon 1996)。核内レセプターは、生理活性物質をリガンドとした転写調節因子の一つであり、Hox 遺伝子を初めとする様々な標的遺伝子の発現を転写レベルで調節する (Fig. 1)。脊椎動物の体作りに劇的な効果を与えるのは、このようにビタミン A の活性本体である RA が転写調節因子の活性化を直接引き起こすリガンドとして発生の制御に働くためである。

よく知られた RA の発生制御のシグナルとしての形態形成作用の例ではマウス、ラットでの Hox 遺伝子を介した後脳領域のパターニングがある。後脳にはロ

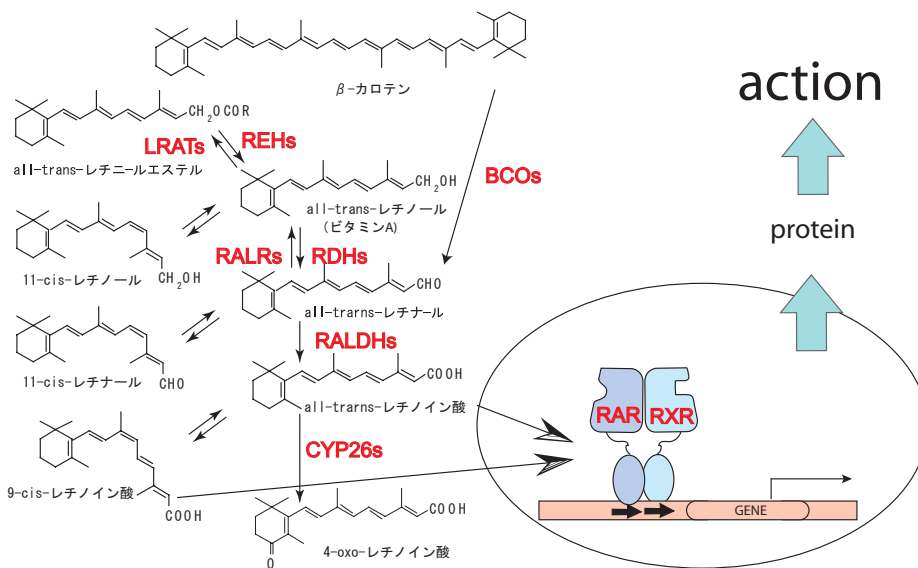


Fig.1. metabolic pathway of vitamin A. BCO, β,β-carotene-15, 15-oxygenase; CYP26, cytochrome P450, family 26; LRAT, lecithin:retinol acyltransferase; RALDH, retinaldehyde dehydrogenase; RALR, Retinal reductase; RAR; retinoic acid receptor; RDH, retinol dehydrogenase; REH, retinyl ester hydrolases; RXR; retinoid X receptor

ンボメアという分節構造があり、その分節構造と一致して Hox 遺伝子という転写因子ファミリーの規則的な発現がみられる。すなわち、発現する Hox 遺伝子の種類がロンボメアの領域特異性を決定している。領域特異的に発現するこれらの転写因子は、胚発生の初期に位置情報を担うシグナル分子により発現が活性化される。そのシグナル分子として働くのが RA である (Niederreither et al. 2000)。ゼブラフィッシュにおいても RA や 4-diethylamino-benzaldehyde (DEAB) という RA 合成を阻害する試薬の浸潤実験から後脳のパターンニングに RA が関与していることが示されている (Maves et al. 2005)。また、ゼブラフィッシュにおいて *raldh2* や RA を不活性型に変換する酵素の一つである cytochrome P450, family 26a (*cyp26a*) のミュータント解析などからも後脳において前後軸パターンニングにビタミン A が必須であることが示されている (Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002; Emoto et al. 2005; Maves et al. 2005; Hernandez et al. 2007)。その他、魚類胚発生において RA は顔面の骨格および筋肉の発生、胸鰭形成、体節の左右対称性形成に重要な役割を果たしている (Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002; Kawakami et al. 2005; Gibert et al. 2006)。

RA 以外のビタミン A の生理作用としてはレチナールの視覚での作用がある。ビタミン A の活性本体である RA への代謝中間産物のアルデヒド体であるレチナールは、視覚作用では all trans retinal が 11-cis retinal に異性化され、つぎに視細胞中オプシンと結合し、光感受性のロドプシンとなる。光によってロドプシン上の 11-cis retinal から all trans-retinal に瞬時に異性化され、ロドプシンを活性化させる。活性化したロドプシンは一連の酵素反応を引きおこし、視興奮を神

経に伝える。ビタミン A が欠乏すると夜盲症になる。

トラフグ *Raldh2* の分子生物学

我々は本プロジェクトを通じて全ゲノム塩基配列が公開されているトラフグから、ビタミン A 代謝関連遺伝子のうち LRAT を 2 種類、RALDH を 2 種類、CYP26 を 3 種類、RAR を 5 種類、RXR を 4 種類同定した。これらの発現パターンを解析することで、いつどこで RA が合成され、いつどこで分解され、どこに作用するのか、どこで貯蓄型になるのかを余すことなく推測することができる。哺乳類には RA を合成する RALDH は 3 種類知られているが、ミドリフグ、トラフグ、ゼブラフィッシュのどのゲノム上にも 2 種類しか存在しなかった。魚類では RALDH 遺伝子は 2 種類しかないようである。トラフグ *raldh2* は 502 アミノ酸を持つ酵素で、ヒトやマウスとの同一性はそれぞれ 77.2% および 77.4% である (Uji et al. 2006)。Whole mount in situ hybridization 法により胚における発現パターンを調べたところ、トラフグ *raldh2* は胚発生時には様々な器官で発現しており、トラフグ *raldh3* はほぼ眼でのみ、その発現が認められた (Fig. 2)。つまり *raldh2* がトラフグ胚発生における器官形成過程で RA を合成する主な酵素であると考えられた。我々はヒラメからも *raldh2*, *raldh3* 遺伝子を同定し、発現パターンを解析した (宇治ら、未発表)。その結果、同様に *raldh2* が胚発生において RA を合成する主な酵素であることが示唆された。我々はこれらの *raldh2* の発現パターンを様々な魚種で解析し、その魚種で形態異常が生じるパターンを比較することにより、ビタミン A と形態異常の関連が見えてくると考えている。

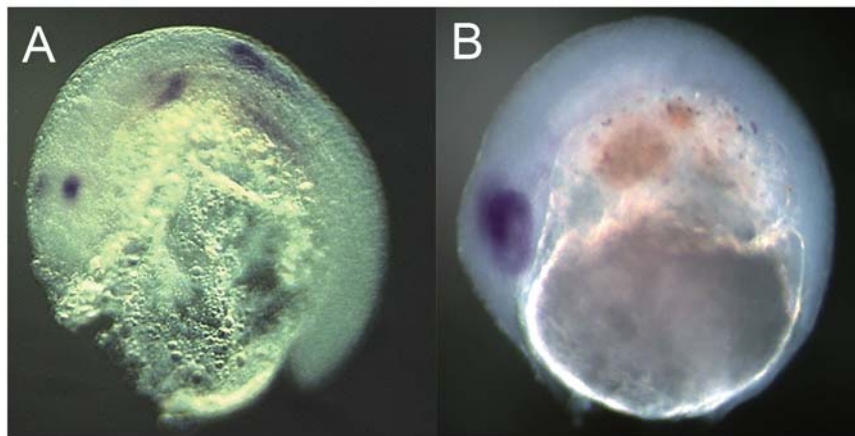


Fig. 2. Expression pattern of *Takifugu rubripes raldh2* (A) and *raldh3* (B) by whole-mount in situ hybridization.

おわりに

今後、すべてのビタミン A 関連遺伝子の発現解析を行い、海産魚類初期発生でのビタミン A の役割を解明していくことが重要である。さらに、親魚飼料のビタミン A 含量の違いと卵内ビタミン A 含量との関係及び、卵内ビタミン A 含量と形態異常の関係を調べていく必要がある。また、最近ビタミン A の新たな展開があった。レチナールの眼以外での役割が Ziouzenkova らによって初めて報告された (Ziouzenkova et al. 2007)。それによると脂肪組織中のレチナールは、脂肪の貯蔵や動態をコントロールすると考えられる peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) のアンタゴニストとして作用し、脂肪細胞分化を抑制しているらしい。これはビタミン A 代謝を調節することにより、脂肪形成を制御できる可能性を示唆する発見であり、「脂ののった魚を育てる」という養殖への応用が期待される。

文 献

- Begemann G., Schilling T.F., Rauch G.J., Geisler R., and Ingham P.W., 2001: The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development*, **128**, 3081-3094.
- Chambon P., 1996: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb. J.*, **10**, 940-954.
- Clagett-Dame M., and DeLuca H.F., 2002: The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu. Rev. Nutr.*, **22**, 347-381.
- Costaridis P., Horton C., Zeitlinger J., Holder N., and Maden M., 1996: Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev. Dyn.*, **205**, 41-51.
- Dedi J., Takeuchi T., Seikai T., and Watanabe T., 1995: Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed Artemia nauplii. *Aquaculture*, **133**, 135-146.
- Emoto Y., Wada H., Okamoto H., Kudo A., and Imai Y., 2005: Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Dev. Biol.*, **278**, 415-427.
- Gibert Y., Gajewski A., Meyer A., and Begemann G., 2006: Induction and prepatterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development*, **133**, 2649-2659.
- Grandel H., Lun K., Rauch G.J., Rhinn M., Piotrowski T., Houart C., Sordino P., Kuchler A.M., Schulte-Merker S., Geisler R., Holder N., Wilson S.W., and Brand M., 2002: Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development*, **129**, 2851-2865.
- Haga Y., Suzuki T., Kagechika H., and Takeuchi T., 2003: A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **221**, 381-392.
- Hernandez R.E., Putzke A.P., Myers J.P., Margaretha L., and Moens C.B., 2007: Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development*, **134**, 177-187.
- Irie T., and Seki T., 2002: Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **131**, 209-219.
- Kaiser M.E., Merrill R.A., Stein A.C., Breburda E., and Clagett-Dame M., 2003: Vitamin A deficiency in the late gastrula stage rat embryo results in a one to two vertebral anteriorization that extends throughout the axial skeleton. *Dev. Biol.*, **257**, 14-29.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H., 2007: A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*, **315**, 820-825.
- Kawakami Y., Raya A., Raya R.M., Rodriguez-Esteban C., and Belmonte J.C., 2005: Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature*, **435**, 165-171.
- Lammer E.J., Chen D.T., Hoar R.M., Agnish N.D., Benke P.J., Braun J.T., Curry C.J., Fernhoff P.M., Grix A.W., Jr., Lott I.T., et al., 1985: Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*, **313**, 837-841.
- Maden M., Gale E., Kostetskii I., and Zile M., 1996: Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol.*, **6**, 417-426.
- Maves, L., Kimmel, C.B., 2005: Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev. Biol.*, **285**, 593-605.
- Morriss-Kay G., 1992: Retinoic acid and development.

- Pathobiology*, **60**, 264–270.
- Niederreither K., Vermot J., Schuhbauer B., Chambon P., and Dolle P., 2000: Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development*, **127**, 75–85.
- Shenefelt, R.E., 1972: Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology*, **5**, 103–118.
- Silverman A.K., Ellis C.N., and Voorhees J.J., 1987: Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **16**, 1027–1039.
- Takeuchi T., Dedi J., Haga Y., Seikai T., and Watanabe, T., 1998: Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **169**, 155–165.
- Uji S., Suzuki T., and Kurokawa T., 2006: Molecular cloning and expression of retinoic-acid synthesizing enzyme raldh2 from *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genomics and Proteomics*, **1**, 133–138.
- White J.C., Highland M., Kaiser M., and Clagett-Dame M., 2000: Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev. Biol.*, **220**, 263–284.
- Ziouzenkova O., Orasanu G., Sharlach M., Akiyama T.E., Berger J.P., Viereck, J., Hamilton J.A., Tang G., Dolnikowski G.G., Vogel S., Duester G., and Plutzky J., 2007: Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat. Med.*, **13**, 695–702.