||||||| 総 説 |||||

レチノイドの栄養学的意義に対する新しい概念： 環境因子と遺伝子の相互作用

四 童 子 好 広
岐阜大学医学部第一内科

A Novel Concept Needed for Nutritional Aspects of Retinoids :
Interaction between Environmental Factors and Genes

Yoshihiro Shidoji
First Department of Internal Medicine, Gifu University of Medicine

は じ め に

生体は絶えず外界と、物質及びエネルギーを交換することによって生存を維持している。このことを、生命は環境に依存しているという。生命活動を1つのシステムとして捉えたと、それは独立栄養生物と従属栄養生物とを問わず、環境に対して開放系（Open system）である。開放系は環境による攪乱（Perturbation）の危機に絶えず曝されている。この危機に対処するために、生体はむしろ積極的に環境因子をシステム内に取り込み、物質代謝やエネルギー代謝を通して、その内部恒常性を維持するために利用している¹⁾。しかし、環境因子は生体に対して化学物質やエネルギー源としての意義だけではないことが近年解明されつつある。ある種の環境因子には、それに対する特異的な受容体（レセプター）が存在し、生体に対し情報としての意義を示す。物質やエネルギーに対して開放系であった生体は、果たして情報の攪乱に対して無防備なのだろうか？

最近、微量栄養素の1つであるレチノイドに対する特異的レセプターがいくつか発見された。レチノイドはこれらのレセプターを介して、種々の遺伝子の発現を調節していることが明らかにされようとしている。本稿では、レチノイドの新しい栄養学的意義を理解するために、まず環境因子と遺伝子の相互作用に関するこれまでの知見を整理し、次にレチノイドレセプターに関する最新の知見を、筆者らの研究も交えて紹介し、最後に肝細胞の機能発現におけるレチノイドの関与について考察する。

I. 栄養素と遺伝子発現

栄養素は体内に摂取された後、代謝され、生体構成成分（単なる構造物だけではなく、酵素などの機能たん白も含む）、またはエネルギー源として利用される。これは、物質代謝やエネルギー代謝を考え方の中心に据えてきた栄養学のドグマともいえるものである。

その代謝は、前述のように環境因子を生体内部に持ち込むものであり、物質やエネルギーレベルの内部恒常性の維持のためには、代謝の調節が極めて重要となる。栄養素自身による代謝の調節は、3つの階層に分けて考えると理解しやすい（表1）。

栄養素が体内で代謝調節に関与する場合、生体側にその栄養素と直接相互作用する高分子（多くの場合、たん白質）が存在する。その生体高分子と栄養素の相互作用の形式によって、栄養素による代謝調節は以下の3つの階層に分かれる。最も直接的に代謝調節にかかわるのは、その栄養素の代謝反応そのものにおける基質濃度の変動による調節である。例えば、グルコキナーゼ（GK）は、血糖値（血中グルコース濃度）の上昇とと

もにその活性が上昇する。グルコースはGKの基質である。しかも、GKのグルコースに対するKm値が10 mM以上であるのに比べて、血糖値が5 mM前後と低いので、血糖値の上昇に比例して酵素活性も上昇するからである。これは、基質と酵素の親和性の低さが、調節系を形成していると考えてよい。いわば、基質と酵素の組み合わせで自動的に生じる調節といえる。最も原始的な調節である。

表1 栄養素による代謝調節の階層性

階層	相互作用する生体高分子	効果	様式
I.	結合蛋白(酵素)	反応速度	基質濃度
II.	酵素	酵素活性	補酵素
III.	レセプター / DNA	遺伝子発現	蛋白合成

次に、その栄養素が関係する代謝系の酵素に、栄養素が基質以外の因子として相互作用し、その酵素活性を変動させるのが第Ⅱ階層の調節である。例えば、肝ホスホリラーゼaは、グリコーゲンを分解してグルコース-6-リン酸を生産する酵素であるが、血糖値が高い時はグルコースを結合してT型ホスホリラーゼa（不活性型）となり、その酵素活性は抑制された状態になる。ところが、血糖値が低下するとT型ホスホリラーゼaはグルコースを遊離してR型ホスホリラーゼa（活性型）となり、その酵素活性はただちに上昇する。肝におけるグルコース-6-リン酸の供給は、やがて血糖の供給に結び付くので、ホスホリラーゼaのT型/R型変換は、血糖値の変化に即座に対応する調節といえる（ホスホリラーゼbのリン酸化によるホスホリラーゼaへの変換に伴う活性化も、現象的にはこのカテゴリーに入るようにみえるが、栄養素の作用点はホルモン分泌のほうにあり、もう少し持続的な調節である。これは、次に述べる第Ⅲ階層の調節に入る）。

第Ⅲ階層の調節系は、栄養素が遺伝子発現系に作用して、酵素たん白質や基質キャリアたん白質などの代謝反応に直接関与する因子の量的調節を行うものや、ホルモンやサイトカインなどの生理活性物質の合成量を変動させて、最終的に代謝調節に至るものなどである。この調節系の存在は、以前から指摘され考えられていたものである。しかし、そのメカニズムに関する研究はあまり手が付けられず、最近ようやく開始されたばかりである。栄養状態と遺伝子発現の変動の詳細については観察も不十分で、未解明の点も多い。現時点では、間接的な影響も加えると、すべての栄養素は遺伝子発現の調節に関与しているといってもよい。

その中で、分子レベルでの解析が進んでいるのは、多価不飽和脂肪酸による脂肪酸合成酵素遺伝子の発現抑制、コレステロール酸化物によるHMG-CoA還元酵素遺伝子の発現抑制、グルコースによる解糖系の鍵酵素遺伝子やインスリン遺伝子の発現誘導、亜鉛によるメタロチオネイン遺伝子の発現誘導、並びにビタミンDによるオステオカルシン遺伝子の発現誘導などである²⁾。このように、脂質、糖質、ミネラル、そしてビタミンなど、主栄養素と微量栄養素とにかかわりなく、遺伝子発現系に関与していることが分かる。ミネラルと遺伝子発現調節に関する研究は、現在最も詳細に解析されている分野なので、その代表的な例を図1に示す。図から明らかなように、① 転写活性化（遺伝子DNAと相互作用し、RNAポリメラーゼⅡの活性を制御）、② 翻訳活性化（mRNAと相互作用し、翻訳過程を制御）、③ mRNAの不安定化（mRNAと相互作用し、RNA分解反応を制御）など、環境因子である金属元素は遺伝子発現の種々の過程で作用する〔また、最近の報告では、コリン欠乏の飼料でラットを一時期飼育すると、c-myc遺伝子の増幅が誘導されるという³⁾。この場合は、おそらく栄養素（もしくは栄養状態）が、DNAに何らかの影響を与え、DNAポリメラーゼの機能を制御するこ

図1 金属元素による遺伝子発現の調節

とを意味しており、これまでに例のない栄養素と遺伝子の相互作用になる)。図1に示した例では、いずれの場合も、解毒や貯蔵、細胞内への取り込みなど、各金属元素の体内代謝に対して目的的な調節機構を成立させている。しかも、これらの調節は各遺伝子に特異的に備わっているものである。その特異性は、遺伝子DNAの中でたん白質をコードしている“構造遺伝子領域”ではなく、通常その上流にあるたん白質をコードしていない“調節領域”の塩基配列に由来する。これは、化学反応による調節というよりは、塩基配列“情報”による調節と考えると理解しやすい。言い換えると、遺伝子DNAは環境因子に対して調節領域を設定することにより、環境因子の量的並びに質的変動（広義の細胞外情報）を、遺伝子発現のスイッチのON/OFFに利用するように進化してきたことになる。このような細胞外情報に反応してその発現を変化させる遺伝子群を誘導型の（Inductive）遺伝子と呼び、発現調節を受けず一定の発現をしているような遺伝子を構成型の（Constitutive）遺伝子と呼んで区別している。前者は細胞機能に特異的なものが多く、後者は細胞の生存に必須のものが多い。後者の遺伝子群を特にハウスキーピング遺伝子と呼ぶことがある。ハウスキーピング遺伝子は、その上流に細胞外情報に呼応する調節領域をもたない⁴⁾。

このように栄養素は、遺伝子の調節領域に働きかけて、誘導型遺伝子の発現調節をすることが分かった。では、次に微量栄養素レチノイドが標的遺伝子の調節領域に働きかける場合の必須の機能因子、レチノイドレセプターについて解説する。

II. レチノイドレセプター

生体内でレチノイドと相互作用する高分子は多数知られている。ロドプシンのようなレチノイドを共有結合する分子を除くと、血液中的の特異的転送たん白 RBP (Retinol-binding protein), 細胞内レチノイド結合たん白 CRBP (Cellular retinol-binding protein), CRABP (Cellular retinoic acid-binding protein), CRALBP (Cellular retinal-binding protein), レチノイドを代謝する酵素群, 網膜視細胞の生存因子Purpurin, 乳汁中のベータラクトグロブリン, 涙液中の Prealbumin⁵⁾など, 中にはその機能の未解明のものもある。しかし、これらはいずれも水に溶け難いレチノイドを結合し、レチノイドの体内代謝を円滑に進める因子であり、以下に述べるレチノイドの持つ情報を受け取る高分子（レセプター）とは趣きを異にしているようである⁶⁾。

現在見出されているレチノイドレセプターは、RAR と RXR の2種類に大別される。いずれも、 α , β , γ

図2 レチノイドレセプターのドメイン構造

注) 数字は各αサブタイプを100とした時のアミノ酸配列の類似性を表している。

標的遺伝子	
RARE(retinoic acid responsive element)	
RARα	AGTTCA-gcaag-AGTTCA
RARβ	GGTTCA-ccgaa-AGTTCA
RARγ	GGGTCA-ggagg-AGGTGA
ADH-3	GGGTCA-ttcag-AGTTCA
CP-H	AGGTCA-ctgac-AGGGCA
CRBP I	GGTCA- aa -AGGTCA
RXRE(retinoid X responsive element)	
CRBP II	AGGTCA-c-AGGTCA-c- AGGTCA-c-AGTTCA
Apo AI	AGGGCA-g-GGGTCA-a-GGGTCA
MHC I	AGGTCA-g-GGGTGG

図3 レチノイド応答性エレメント

ADH-3, alcohol dehydrogenase-3; CP-H, complement factor H;
MHC I, major histocompatibility complex class I

の3種のサブタイプが存在する。従って、計6種類のレチノイドレセプター遺伝子が存在することになる。これらのレセプターたん白質は、いずれも核内に局在し、種々の遺伝子の発現調節をする、いわゆる転写調節因子と考えられている。レチノイドはこれらのレセプターのリガンドになることにより、レセプターたん白の転写調節作用を制御しているものと考えられているが、その詳細は現在精力的に研究されている⁷⁾ (RXRαのリガンドはレチノイドのシス異性体であることが最近示されたが、RXRβ, γのリガンドは未同定である)。

レセプターたん白質の機能の分子下レベルでの詳細については未解明だが、レチノイドレセプターは少なくとも2つの機能ドメインをもっていることが明らかにされている。ペプチド鎖の中央部分にあるDNA結合ドメイン、C末端側のリガンド結合ドメインである(図2)。リガンド結合ドメインは二量体形成ドメインとオーバーラップしているようだが、ここではその詳細には触れない。いずれにせよ、レチノイドレセプターがレチノイド濃度依存的に、標的遺伝子の転写活性化を行う場合、この2つのドメインは、分子下で協調的に相互作用するものと思われる。DNA結合ドメインを介して、レチノイドレセプターはその標的遺伝子の調節領域に結合する。調節領域の中でレチノイドレセプターの結合する部位を、レチノイド応答性エレメントと呼ぶ。

図4 生理的レチノイドと非環式レチノイドの構造的対応

逆にいうと、レチノイド応答性エレメントをもつ遺伝子は、レチノイドの標的遺伝子になり得ることを示している。これまでに解明されたレチノイドの標的遺伝子のレチノイド応答性エレメントの塩基配列を、図3に示した。

図から明らかなように、RARとRXRの応答性エレメントは微妙に異なっているが、いずれも“AGGTCA”という6塩基配列をモチーフとした基本構造をもっている。そして、このモチーフが、1-5塩基のスペースを置いて直接反復する、ダイレクトリピート (DR) 構造を共通の特徴としている。Evansらのグループ⁷⁾は、RAR応答性エレメントはモチーフ間のスペースが5塩基であるのに対して、スペースが4塩基の場合は甲状腺ホルモン応答性エレメントに、3塩基の場合は活性型ビタミンD応答性エレメントになることを示し、“3-4-5則”を提唱している。遺伝子発現の基本原則の一部を明らかにするような魅力あふれる仮説だが、図3にもあるように、例外もあるようである。また、この“3-4-5則”に入らないステロイドホルモン応答性エレメントは、モチーフが対称的に反復するパリンδροーム構造をとる。

レチノイドレセプターのDNA結合ドメインのアミノ酸配列は、RAR並びにRXRの各サブタイプ間で酷似している。このドメインは、亜鉛をリガンドとするフィンガー構造 (Zn-finger) を形成し、図3に示した種々のシスエレメントを認識し、結合するものと考えられている。

一方、図2にも示したように、C末端側のリガンド結合ドメインのアミノ酸配列は、各サブタイプ間で比較的良好に保存されているものの、微妙に異なっている。この構造上の微妙な違いは、リガンドに対する結合特異性に影響するものと思われる。実際、橋本らは、RARのサブタイプ間で親和性の異なるレチノイドを開発している⁹⁾。これらの合成レチノイドはいずれも、all-trans RAとは異なり、CRABPには結合しないか、もしくは親和性が極めて低い。ところが、HL-60のような白血病細胞由来の細胞株に対して分化誘導能を示すことから、その作用にはレセプターとの結合が重要であり、CRABPとの親和性は必ずしも必須ではないことを意味している。

一方、武藤らは、CRABPに対する親和性を指標にして生物活性のあるレチノイドを探索し、強い抗腫瘍作用をもつ非環式レチノイド (図4) を開発した⁹⁾。しかし、レチノイドレセプターの発見される以前に開発されたこの非環式レチノイドは、レチノイドレセプターに結合するか否か長い間不明であった。すなわち、非環

図5 MBP/RAR β E/F 融合蛋白産生のためのプラズミド構築

式レチノイドの示す抗腫瘍作用は、レチノイドレセプターを介したいわゆる“レチノイド”作用かどうか不問に付されてきたといえる。

そこで、筆者らは、組み換え型レチノイドレセプターを作製して、非環式レチノイドが結合するか否か検討した。図5に、RAR β のリガンド結合ドメインを大腸菌の発現ベクターに組み換えた時のプラズミド構築を示した。tac プロモーターの支配下に原核生物のマルトース結合たん白 (MBP) の遺伝子を配置し、その下流にRAR β のリガンド結合ドメイン (E/F) を組み換え、更にベクターの終始コドンを利用して融合たん白とした。ガラクトース誘導体によって、tac プロモーターを誘導すると、MBP とRAR β E/F ドメインとの融合たん白 (MBP/RAR β E/F) が大量生産される。500 ml、一昼夜の培養で、およそ20~30 mg の融合たん白質を精製することができる¹⁰⁾。この発現ベクターには、融合部位に第X因子の認識配列 (Ile-Glu-Gly-Arg-Ile) を導入してあるので、融合たん白を精製後、第X因子により切断し、RAR β のリガンド結合ドメイン部分のみを単離することができる (図5. b)。こうして得られた融合たん白やリガンド結合ドメインを用いて、レチノイドとの結合実験を行った。図6は、精製したMBP/RAR β E/F 融合たん白とレチノイドのUV 吸収スペクトルを示している。RA (all-trans) は緩衝液に分散させた状態では、345 nm 付近に吸収極大が観察されるが、分子吸光係数は小さい。RA とMBP/RAR β E/F 融合たん白を混合すると、345 nm 付近の吸収は数倍に増大する。ちょうど、RA を有機溶媒に溶解した場合の吸収スペクトルに近似してくる。すなわち、緩衝液中のRA が、極性の高い環境から融合たん白内部の疎水性領域に移行したことを示唆している。CRABP に結合したRA は、UV スペクトルに微細構造が現れることから、RA の六員環面の向きと側鎖の二重結合の向きの固定があるものと推定されている。しかし、この融合たん白ではそのような微細構造は出現しない。RBP とRA (またはレチノール) の結合の場合、微細構造は出現しないことから、融合たん白とRA の結合は、むしろRBP とレチノイドとの結合に類似しているのかもしれない。また図には示していないが、融合たん白質のトリプトファン

図6 MBP/RAR β E/F融合蛋白とレチノイド溶液のUV吸収スペクトル

残基の内部蛍光は、RAの添加により消光する。これは、トリプトファン残基（リガンド結合ドメインに1つあるTrp）からRAにエネルギー遷移（Energy transfer）が生起するほどにRAはTrp残基に接近していることを意味している。RBPとレチノールの結合の際にも、同様のエネルギー遷移が観察される。

一方、非環式レチノイドを緩衝液に分散させた場合は、295 nm近傍に吸収極大が観察される。図6に示したように、この吸収は融合たん白の添加により数倍に増大した。RAの場合と同様に、非環式レチノイドの微小環境も極性の高い状態から疎水性に変化したことを意味している。非環式レチノイドの吸収極大がTrp残基の励起波長に近い場合、融合たん白Trp残基の内部蛍光は全く観察されなくなる（Inner filter effect）。従って、この場合、エネルギー遷移の測定は困難であった。いずれにせよ、MBP/RAR β E/F融合たん白質は、非環式レチノイドを結合すると考えていいだろう。現在、この結合様式について詳細に検討中である。

RXR α は、all-*trans* RAを結合せず、その立体異性体である9-*cis* RA（図4）がリガンドとなる¹¹⁾。9-*cis* RAはRARにも結合することが知られているので、既に述べた組み換え型RAR（融合たん白質）に結合性を示した非環式レチノイドが、同様の組み換え型RXRにも結合するかどうかに興味をもたれた。そこで、RARの場合と同様の方法で、MBP/RXR α E/F融合たん白質を作製した。その結果、RARの場合と同様に、295 nm近傍の吸光度が数倍に増大し、非環式レチノイドは9-*cis*RAと同様にMBP/RXR α E/F融合たん白質にも結合することが示唆された¹⁰⁾。

レチノイドレセプターに関する筆者らの最近の研究を紹介したために、記述が詳細すぎたかもしれない。そこで、ひとまず以上を要約すると、レチノイドはレチノイドレセプターを介して、種々の遺伝子の発現を調節し、そのことを通してその生理作用を発揮すると考えてよい。All-*trans* RAはRAR α , β , γ を、9-*cis* RAはRARsとRXR α を介して、その作用を発現する。RARとRXRの支配する遺伝子が微妙に異なることから、この2つのレチノイドの作用は微妙に異なってくる。特に両方のレセプターに親和性を示す9-*cis* RAは、レチノイ

ドの活性型として注目される。標的細胞内での all-*trans* RA と 9-*cis* RA との異性化反応, そしてその結果としての両異性体の量比などが, レチノイドのもつ多彩な生物作用を実現しているのであろう。All-*trans* RA は CRABP に結合するが, 9-*cis* RA は結合しない。こうして, 標的細胞における CRABP の存在も all-*trans* RA と 9-*cis* RA の量比を変えることになり, 多彩なレチノイド作用を微調整することになる。抗腫瘍作用を示し, 毒性の低い非環式レチノイドは, 9-*cis* RA と同様に, RXR α と RARs を介してその作用を発現しているものと考えられる。ところが, 9-*cis* RA とは異なり, CRABP に結合することから毒性が低いものと思われる。

環境因子としてのレチノイドは通常, RA の前駆体である。つまり, レチノイドはマスクされた情報として体内に入り, 細胞内で酸化反応や異性化反応, そして CRABP などを駆使して“情報”に変換される。いわば, 内発情報のソースとしてレチノイドを摂取しているといえる。こうして, 環境因子による直接的な情報の攪乱を防いでいるのかもしれない。次節では, レチノイドによる遺伝子発現の調節を, 肝細胞を例に挙げて考察してみよう。

Ⅲ. 肝細胞特異的遺伝子の発現とレチノイド

肝臓は, レチノイド代謝の重要な臓器として以前から注目されてきた。それは, レチノイドの貯蔵 (Ito 細胞) や分泌 (RBP の合成), 排泄 (グルクロン酸抱合) などを一手に引き受けている臓器だからである。しかしながら, 前述の RAR や RXR が肝臓に発現していることが報告されて以来¹²⁾, レチノイド作用の標的臓器としての肝臓に, 今, 関心が寄せられている。武藤らは, レチノイドレセプターが発見される以前から肝細胞癌とレチノイドとの関係の研究に着手し¹³⁾, 最近では, レチノイドによる肝細胞癌に対する抗腫瘍作用と, 肝細胞癌の発癌抑制に焦点を絞って研究している¹⁴⁾。そのような研究の流れの中で, レチノイドが示す肝細胞癌に対する抗腫瘍作用は, レチノイドが肝細胞に対して生理作用をもつことを示唆しているのではないかと考えるようになってきた。しかも, この研究での特徴は, 合成レチノイドである非環式レチノイドを用いることにより, レチノイドの作用をより詳細に, あるいは分子医学的に解析できるようになってきたことである。以下に述べる肝細胞の機能発現におけるレチノイドの役割に関する考え方は, 武藤及び筆者らの独自の概念であり, 未だ研究者の間で認められたものではない。そこで, 極力実験的事実とアイデアとを区別して記述するつもりである。

一般に, 癌細胞の培養液にレチノイドを添加すると, 癌細胞はその増殖が抑えられ, 分化誘導されることが多い¹⁵⁾。CRABP との結合性を指標にして開発した非環式レチノイドも, 種々の癌性細胞株に対してこのようなレチノイド作用を示す。実際, Fukutomi ら¹⁶⁾は, 肝細胞癌由来の細胞株 (PLC/PRF/5) を非環式レチノイドで処理すると, α -fetoprotein (AFP) の発現が低下し, アルブミンの発現が増大することを見出した。AFP は増殖している肝細胞や肝癌細胞で合成が盛んになる癌胎児性たん白質の 1 つであり, アルブミンは成熟した肝細胞の生産する最も主要なたん白質であり, アルブミンの合成は重要な肝細胞機能の 1 つである。従って, Fukutomi らの観察は, 非環式レチノイドが肝癌細胞の増殖を抑制し, 肝細胞機能の回復 (広義の分化) を誘導したと解釈できる。つまり, 非環式レチノイドは肝癌細胞に対してレチノイド作用を示したといえる。

そこで, 生理的なレチノイドである all-*trans* RA を 2 種類の肝細胞癌由来の細胞株 (PLC/PRF/5, HuH7) に添加すると, AFP の発現はいずれの細胞株においても, 非環式レチノイドの場合と同様に予測どおり抑制された。ところが, アルブミンの発現は非環式レチノイドの場合とは異なり, 増加するどころか逆に抑制された (図 7)¹⁷⁾。つまり, 非環式レチノイドは, レチノイド作用を示す際, 単に生理的なレチノイドである all-*trans*

図7 レチノイドによるメッセンジャー RNA レベルの変動
注) ヒト肝癌由来細胞株を用いた Northern Blot 解析による。

RA の模倣（あるいは代替）をしているのではないことが分かった。これはレチノイド作用を，“癌細胞の増殖抑制と分化マーカーの回復”というワンセットの視点では解釈できないことを意味している。そこで，単純に増殖抑制と分化マーカーの回復を分けて解析した。

まず，増殖抑制について簡単に考察する。AFP は，確かに増殖中の肝細胞や肝癌細胞に発現する遺伝子であるが，細胞増殖の一般的な指標ではない。AFP はむしろ，肝細胞特異的遺伝子産物の 1 つに数えられている。しかも，AFP 遺伝子は染色体上でアルブミン遺伝子とタンデムに近接していること，更にこの配置と関連した両遺伝子発現のスイッチング機構の存在が知られていること¹⁰⁾などを考え合わせると，アルブミン遺伝子の発現調節と AFP 遺伝子の発現調節を分離して考えるのは必ずしも妥当ではないのかもしれない。そこで，細胞増殖のより一般的な指標の 1 つである c-myc プロト癌遺伝子の発現を観察した。図 7 に示したように，AFP mRNA の場合と同様に，c-myc 遺伝子の発現は，2 種類のレチノイドによって著明に抑制された。All-trans RA による c-myc 遺伝子の発現抑制は，RAR は発現しているが RXR を発現していない HL 60 細胞や，RAR と RXR の両方を発現している HeLa 細胞でも観察されることから（筆者ら，未発表），おそらく RAR を介した系の作動によるものと考えられる。実際，筆者らの用いた肝癌細胞株はいずれも RARβ を発現していること，そして非環式レチノイド並びに all-trans RA のいずれも RARβ の発現を増加させること（Up-regulation），更に非環式レチノイドは組み換え型 RARβ 融合たん白のリガンドになることなどの実験結果は，上の考えを支持している。いずれにせよ，この両レチノイドによる c-myc 遺伝子の発現抑制は，肝癌細胞株の増殖抑制メカニズムの主要な部分を構成しているといつてよい。

次に，アルブミン遺伝子の発現調節について考察する。既に述べたように，アルブミンの合成と分泌は肝細胞の主要な機能の 1 つである。従って，従来多くの研究者がこの分野に参入し，アルブミン遺伝子の発現調節

図8 アルブミン遺伝子の調節領域に結合する転写因子群

図9 アルブミン遺伝子の発現調節における階層性

は、今や真核細胞（または哺乳類細胞）の遺伝子発現調節の中で最も詳細に解析が進んでいる領域の1つになっている。そこで、まず簡単にアルブミン遺伝子の発現調節機構に関する最新のモデル¹⁹⁾を紹介する。

アルブミン遺伝子は、肝細胞に特異的に発現する遺伝子であり、細胞の生存に必須の遺伝子ではない。このような遺伝子は誘導型の遺伝子に分類され、構造遺伝子領域以外の部位（通常その上流）に、“調節領域”をもっていることは既に述べた。アルブミン遺伝子も例外ではない。調節領域には転写因子と呼ばれるたん白質が結合し、遺伝子発現の調節を行っている。アルブミン遺伝子の調節領域に結合する転写因子は、図8に示したように現在5種類知られている²⁰⁾。その中で、HNF-1（Hepatocyte nuclear factor-1）が、アルブミン遺伝子の転写活性化（発現）に最も重要と考えられている。このことを、ここではHNF-1がアルブミン遺伝子の発現を支配していると呼ぶことにする。この支配関係を矢印で示したのが図9である。この遺伝子支配は階層構造を形成していて、HNF-1遺伝子は更に上位のHNF-4から支配されているというのがDarnellらのモデルである。HNF-1遺伝子の調節領域には、他にHNF-3やAP-1が結合するが、HNF-3はHNF-1遺伝子の転写をあまり促進しない。一方、AP-1は、それ自身ではHNF-1遺伝子の転写を促進しないが、HNF-4による

図10 リガンド結合ドメインにおけるRXR α とHNF-4のアミノ酸配列の類似性

注) 上の列がヒトRXR α , 下の列がラットHNF-4のアミノ酸配列を示す。Mac Mollyの相同性探索ソフトを用い、30残基/50残基許容で検出した。

HNF-1 遺伝子の転写活性化を促進する(許容効果)。従って、AP-1とHNF-1 遺伝子とは本来の支配関係ではない。AP-1は癌遺伝子産物の1つであり、その活性は発癌プロモーターによって調節されている。HNF-3の発現は、自己調節的ループ(HNF-3がHNF-3 遺伝子を支配する)と、細胞外基質により調節されていることが知られている。一方、HNF-4 遺伝子の発現調節については全く知られていない。

前に述べたように、all-trans RAはアルブミン遺伝子の発現を抑制し、非環式レチノイドはその発現を促進した。このような、レチノイドによるアルブミン遺伝子の両方向の発現調節を理解する場合、それがHNF-1の発現調節を介したものであるかどうかを決める必要がある。そこで、レチノイド処理によるHNF-1 遺伝子の発現レベルの変動を観察すると、図7に示したように、アルブミン遺伝子の発現レベルの変動と全く一致していることが分かった。すなわち、レチノイドは、HNF-1 遺伝子の発現調節を行うことによって、間接的にアルブミン遺伝子の発現調節を行っていると解釈できる。そこで、レチノイドによるアルブミン遺伝子の正と負の発現調節をDarnellらのモデルに当てはめて考察することにした。

All-trans RAは、RARには結合するが、RXRには結合しない。従って、all-trans RAがアルブミン遺伝子の発現調節を行う場合、RARを介して働くものと思われる。ところが、DarnellらのモデルにはRARが構成因子として入っていない。このモデルの中でRARが相互作用することが知られている因子はAP-1のみである。しかも、RARはAP-1とたん白-たん白複合体を形成することにより、AP-1の作用を阻害することが知られている(クロスカップリング)²¹⁾。肝癌細胞では一般にAP-1が活性化されていることを考えると、筆者らの観察した肝癌細胞株では、“All-trans RAはRAR β を誘導し、誘導されたRAR β がAP-1を結合し、HNF-4に対するAP-1の許容効果を解消する”結果、HNF-1 遺伝子の発現が抑制され、アルブミン遺伝子の発現抑制に結びつくものと考えている。

非環式レチノイドもRAR β に結合し、更にRAR β を誘導したが、all-trans RAの場合と同様にRAR β を介して、all-trans RAの場合とは逆にHNF-1 遺伝子の発現を増加させることは考え難い。非環式レチノイドは、もう1つのレチノイドレセプターであるRXR α にも結合する。RXR α を介してHNF-1 遺伝子の発現を増加させる可能性が考えられる。しかし、やはりDarnellらのモデルにはRXR α は構成因子として入っていない。

RXR α とDarnellらのモデルとの唯一の接点はHNF-4である。HNF-4は、レチノイドレセプターと同様に、

MCAD, medium chain acyl-CoA dehydrogenase [脂肪酸の β -酸化]; Gln Syn, glutamine synthetase [アンモニアの解毒]; $\alpha 2,6ST$, $\alpha 2,6$ sialyl transferase [糖蛋白代謝]; ALDB, aldolase B; PK, pyruvate kinase [解糖系]; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase [糖新生]; ADH-3, class I alcohol dehydrogenase type 3 [薬物代謝]; ALB, albumin [浸透圧]; AFP, α -fetoprotein; FIB, fibrinogen; Factor X, [血液凝固]; TTR, transthyretin [ホルモン輸送]; apoAII, apoB, apoCIII, [脂質輸送]; CRP, c-reactive protein; $\alpha 1AT$, $\alpha 1$ anti trypsin [感染]

図 11 肝細胞特異的遺伝子の発現調節ネットワーク

注) 個々の遺伝子についての文献は煩雑になるので省略した。いずれも1990～1992年に報告されたものである。

肝細胞特異的遺伝子とその転写調節因子との支配関係は決して1対1に対応していない。末端の遺伝子は複数の転写因子による支配を受け、転写因子は複数の末端の遺伝子を支配している。また、HNF-4のように末端の遺伝子と転写因子の両方を支配している転写因子もある。環境情報の変化に対応して、主要な転写因子の発現の割合(リガンドによる活性化も含む)が変動し、それに応じて末端遺伝子発現の質的ならびに量的変動が誘導されるものと考えられる。

亜鉛フィンガー構造をもった核内レセプターファミリーに属する転写因子である²²⁾。核内レセプターファミリーの他のメンバーと同様に、HNF-4のC末端側にはリガンド結合ドメインがあり、また二量体形成ドメインともオーバーラップしている。この領域のアミノ酸配列をRXR α と比較したのが図10である。

リガンド結合ドメインの270アミノ酸残基のうち91残基が同一である。同一アミノ酸はドメイン全体に散在しているのではなく、3箇所集中して類似した部位が認められる。特に最もN末端側の類似部位は、RXR α のTrp残基の周辺であり、Trp内部蛍光の解消からレチノイド結合部位の重要なサブドメインと考えられている部位である。従って、まず第1に非環式レチノイドがHNF-4のリガンドになり、HNF-1遺伝子の発現を活性化する可能性が考えられる。現在、組み換え型HNF-4を作製し、この可能性を検討している。次に、非

環式レチノイドがRXR α のリガンドになり、RXR α がHNF-4とヘテロダイマーを形成してHNF-4の活性を促進する可能性が考えられる。実際、RXR α は、RARやVDR (Vitamin D receptor), TR (Thyroid hormone receptor) など亜鉛フィンガー型核内レセプターファミリーの他のメンバーとヘテロダイマーを形成して、それらの働きを強めることが知られている²³⁾。更に、第3の可能性として、RXR α がHNF-4の転写因子となっている可能性が考えられる。筆者らの最近の観察では、RXR α の生理的リガンドと考えられている9-*cis* RAが、非環式レチノイドと同様にHNF-1並びにアルブミン遺伝子の発現を高めている (Yamada, Y., Shidoji, Y. ら、投稿中)。この実験結果は、上の3つの仮説のいずれとも矛盾しないものであるが、アルブミン遺伝子発現の調節にRXR α が深くかかわっていることを示唆している。

ここ数年の間、肝細胞特異的遺伝子の発現調節に関する報告が相次いでいる。それらをすべて網羅してここに示すことはあまりに複雑すぎる。転写因子を上記述べたRAR β , RXR α , HNF-4, HNF-1, HNF-3と本稿では触れなかったC/EBP²⁴⁾の6種類に絞って、それらが支配する遺伝子をネットワークの形で図11に示した。肝細胞はこれらの遺伝子を質的並びに量的に調整することによって、肝細胞の特徴を実現している。環境因子が情報としてこれらのネットワークに加わっているという証拠は個体レベルでは未だない。しかし、図に示した肝細胞特異的遺伝子がすべての肝細胞に一樣に発現しているというわけではなく、例えばアルブミン遺伝子は門脈周囲の肝細胞でその発現が高く²⁵⁾、アンモニア処理の重要な酵素、グルタミン合成酵素 (Gln Syn) の遺伝子発現は、中心静脈や肝静脈周囲の肝細胞に局限していること²⁶⁾などは、肝外情報がこれらの遺伝子発現を調節していることを示唆している。肝細胞は決して一樣ではなく、肝臓の中の部位によって受け取る情報が異なり、その情報に応じて遺伝子発現の様相を変えているのである。

お わ り に

かつて、ビタミン研究は“補酵素の時代”と呼ばれる時期があった。1928～1943年の15年間に、10人以上の科学者が何らかの形でビタミンに関係した業績でノーベル賞を受賞した。これは、戦争がもたらした栄養素欠乏症が引き金になったと一般には考えられている。しかし、科学史的には1907年にノーベル賞を受賞したBuchner, E.が酵素を生化学的に解析できることを示したことで切り離して考えることはできない。Watson, J., Crick, F., Wilkins, M. によって遺伝子の物質的基盤が明らかにされ (1962年, ノーベル賞受賞), その後、遺伝情報の解読が一段落し、今、遺伝子発現の調節機構が分子レベルで明らかにされようとしている。かつての補酵素の時代、解糖系やTCA サイクルなどの代謝調節に水溶性ビタミンが重要な役割を果たしていることが明らかにされた。ここに遺伝子の時代を迎えて、その発現調節に再びビタミンが重要な役割を果たしている可能性が示されようとしている。社会的には、栄養素欠乏症が代謝研究の引き金になったように、遺伝子発現の研究には、癌という遺伝子の病気の解決への期待が大きな駆動力になっている²⁷⁾。21世紀を前にして、レチノイドの栄養学的意義に新しい、そして大きな1ページが加えられることは疑う余地もない。

*

ここで示した実験結果はすべて岐阜大学医学部第一内科で行ったものです。稿を終えるに当たり、本草稿を校閲していただいた武藤泰敏教授、執筆の機会を与えて下さった細谷憲政 東京大学名誉教授、奥 恒 行 東京大学講師に感謝致します。

文 献

- 1) 四童子好広, 堤ちはる: 物質代謝の調節 (第4章) / 奥 恒行, 高橋正侑編: 「生化学」(1992) 南江堂, 東京
- 2) Clarke, S. and Abraham, S.: Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events, *FASEB J.* **6**, 3146~3152 (1992)
- 3) Chandar, N. et al.: c-myc gene amplification during hepatocarcinogenesis by a choline-devoid diet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2703~2707 (1989)
- 4) Alberts, D. et al.: Control of gene expression (Chapter 10), in *Molecular Biology of Cell* (1989) Garland Pub., New York
- 5) Redl, B. et al.: cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20282~20287 (1992)
- 6) 四童子好広: ビタミンA レセプター, *ビタミン*, **62**, 358~360 (1988)
- 7) 梅園和彦, 他: 新たな核内レチノイドレセプター, RXR, *実験医学*, **10**, 35~41 (1992)
- 8) Hashimoto, Y.: Retinobenzoic acids and nuclear retinoic acid receptor, *Cell Struc. Func.* **16**, 113~123 (1991)
- 9) Muto, Y. and Moriwaki, H.: Antitumor activity of vitamin A and its derivatives, *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 1389~1393 (1984)
- 10) Shidoji, Y. et al.: 投稿準備中
- 11) Levin, A. et al.: 9-*cis* retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α , *Nature*, **355**, 359~361 (1992)
- 12) Mangelsdorf, D. et al.: Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway, *Nature*, **345**, 224~229 (1990)
- 13) 武藤泰敏, 他: 原発性肝臓における cytosol retinoic acid-binding protein (CRABP) の発現, *肝臓*, **18**, 370 (1977)
- 14) Muto, Y. et al.: Present status of research on cancer chemoprevention in Japan, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **20**, 219~224 (1990)
- 15) De Luca, L.: Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J.* **5**, 2924~2933 (1991)
- 16) Fukutomi, Y. et al.: Inhibitory effects of acyclic retinoid (polyprenoic acid) and its hydroxy derivative on cell growth and on secretion of α -fetoprotein in human hepatoma-derived cell line (PLC/PRF/5), *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1281~1285 (1990)
- 17) Yamada, Y., Shidoji, Y. et al.: 投稿中
- 18) Nakata, K. et al.: A possible mechanism of inverse developmental regulation of α -fetoprotein and albumin genes, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1331~1334 (1992)
- 19) Kuo, C. et al.: A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification, *Nature*, **355**, 457~461 (1992)
- 20) De Simone, V. and Cortese, R.: Transcription factors and liver-specific genes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1132**, 119~126 (1992)
- 21) Shule, R. et al.: Retinoic acid is a negative regulator of Ap-1-responsive genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6092~6096 (1991)
- 22) Sladek, F. et al.: Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily, *Genes Develop.*, **4**, 2353~2365 (1990)
- 23) Bugge, T. et al.: RXR α , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors, *EMBO J.*, **11**, 1409~1418 (1992)
- 24) Landschulz, W. et al.: The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite, *Sci-*

- ence*, **243**, 1681~1688 (1989)
- 25) Hillan, K. : Demonstration of rat albumin mRNA in formalin-fixed tissue sections with a DIG-labeled RNA probe, *in* Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual (1992) Boehringer Mannheim, Germany
- 26) Kuo, F. et al. : Colocalization in pericentral hepatocytes in adult mice and similarity in developmental expression pattern of ornithine aminotransferase and glutamine synthetase mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9468~9472 (1991)
- 27) 四童子好広, 武藤泰敏 : 癌とレチノイド, 臨床検査, **36**, 276~279 (1992)