核内受容体研究の最近の進歩

井上 聡

〈要 約〉 ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、レチノイン酸、ビタミン D 等の脂溶性低分子リガンドの受容体は、核内受容体スーパーファミリーに属し、共通の祖先遺伝子から進化を遂げたものと考えられている。この情報伝達のモデルは、リガンドが細胞内に入り、核内にて受容体と結合し、標的遺伝子の転写を調節し、その産物である蛋白質がリガンドの作用を発揮するというものである。これら受容体のリガンドとしては、老年医学において、老化の指標や老年病の病因や治療薬としても関連が深い、エストロゲン、グルココルチコイドをはじめとする脂溶性ビタミン/ホルモン/生理活性物質等が含まれている。一方、リガンドが不明や未同定の核内受容体-オーファンレセプターからは新しいホルモンの発見や創薬への応用が期待できる。さらに共役因子、応答遺伝子、遺伝子異常症、遺伝子改変動物等の研究が進展しており、最近の核内受容体の研究の進歩は老年医学の発展に大いに貢献するものと考えられる

Key words: 核内受容体, リガンド, 共役因子, 応答遺伝子, エストロゲン

(日老医誌 2000; 37: 265—270)

はじめに

細胞内部に存在する低分子ホルモン受容体の研究は、1980年代後半に、グルココルチコイド受容体が単離されて以来、急速な発展を遂げた。すなわち、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、レチノイン酸、ビタミン D などは、全て同じ基本構造をもつ蛋白質群である、核内受容体スーパーファミリーを介して作用するという基本的概念が確立した。これら核内受容体のリガンドは、老年医学において、老化の指標や老年病の病因や治療薬としても関連が深い脂溶性ビタミン/ホルモン/生理活性物質等である。核内受容体の情報伝達のモデルは、リガンドが細胞内に入り、核内にて受容体と結合し、応答遺伝子の転写を調節し、その産物である蛋白質がリガンドの作用を発揮するというものである。核内受容体が機能するためには、1) リガンド分子の識別を行うリガンド結合ドメイン (LBD)、2) 標的遺伝子の識別を行う DNA 結合ドメイン (DBD)、3) 転写を調節するための転写開始複合体との相互作用・介在因子の識別を行う転写活性化ドメイン (AF-1と AF-2) が基本構造として必要である。ヒトゲノム中には、これらの構造をもつ、核内受容体をコードする遺伝子が約40程度見い出されている。

この数は、既に知られているリガンドの種類を上回っており、半数以上は「親」に相当するリガンドが不明の「みなしご」の受容体、オーファンレセプターという一群に分類される。本稿では核内受容体研究の最近の成果をまとめ将来を展望する。

核内受容体の構造と機能

ステロイド、レチノイン酸、甲状腺ホルモン、ビタミン D 受容体は核内受容体スーパーファミリーに属しており、リガンド依存性転写因子である^{1)~3)}。基本的にはリガンドが受容体の C 端側にあるリガンド結合ドメイン (LBD) に結合すると、受容体中央に存在する DNA 結合ドメイン (DBD) を介して核内のゲノム上で、標的遺伝子近傍の転写調節領域に存在するホルモン応答エレメント (HRE) と結合し、その標的遺伝子の転写を調節する (図 1A)。

このように、リガンドに応答して標的細胞核内で転写制御が行われ、その結果、それぞれのリガンドに応じた生理作用が発揮されるわけであるが、リガンド、受容体に加えてその HRE についても、各受容体に対して特異的である。その多くでは六つの塩基(ハーフサイト)が、真ん中にいくつかの塩基を挟んで、回文状 (palindrome) に、または直列 (direct repeated) に並んでいる。

核内受容体の構造の比較を図1Bに示した。受容体ファミリー間での高い相同性と機能から A から F までの領域に分けられ、リガンド結合領域は E 領域に存在し、

図1 核内受容体 (NR) の作用機序 (A) ならびに核内受容体の構造とその比較 (B)。

DNA 結合ドメインはC領域に存在する。DNA 結合ドメインは約65アミノ酸から成り、その中にジンク (Zn) フィンガーと呼ばれる四つのシステインが一定間隔に並んでいて、亜鉛イオンのまわりに配位する構造をとる部分が2カ所存在する。核内受容体が実際にDNA結合を行う様式は、ステロイド受容体や一部のオーファンレセプターのようにホモ二量体で結合するもの、RXRとヘテロ二量体で結合するもの、単量体で結合するもの、LBDのみ存在しDBDを持っていないものに大別される²⁾。

核内受容体が転写制御因子として転写を促進する場合には複数の領域が関与しており、なかでもA/B領域、E領域がとくに重要である。これらの転写活性化領域は、各々AF-1 (activation function 1), AF-2と呼ばれる (図1B)^{2,3)}。AF-1は細胞種に特異的で恒常的な転写活性化能を有し、リン酸化によって制御を受けることが報告され⁴⁾, growth factor やペプチドホルモンなどの細胞膜受容体を介する情報伝達機構と、核受容体とのクロストークが存在している。

一方のAF-2の転写活性化はリガンド依存的で、かつAF-1とは異なり細胞種間であまり差がない。RNAポリメラーゼIIをはじめとする基本転写因子群と複合体を形成し、転写制御を担うことが示唆されている。

核内受容体が転写調節因子として機能する際に、RNAポリメラーゼIIをはじめとする基本転写因子群に加えて、共役因子 (コファクター) 群の存在が不可欠であることが、最近の研究で解明されつつある。これらは転写制御に果たす役割からcoactivator, corepressor, その他のcofactorに大別され、SRC-1/p160コアクティベータ群、DRIP/TRAPコアクティベータ群に加え、RNAとして機能するSRAなど各種のものが報告されている (図2)^{5,6)}。核内受容体と共役因子群との相互作用や、AF-1, AF-2を介した転写活性化能の差異により、核内受容体の作用が調節されている可能性が考えられている。

オーファンレセプターとそのリガンド

新しい核内受容体の発見は現在も進行中で、ヒトゲノム中には、核内受容体をコードする遺伝子が40程度見出されている。最近のゲノムプロジェクトの進展に伴い、線虫のゲノム中には200以上の核内受容体が存在することが示された⁷⁾。これらの数は、現在知られている脂溶性ホルモン・ビタミンの種類をはるかに上回っており、半数以上は「親」としてのリガンドが未同定の「みなしご」のレセプター、オーファンレセプターという一群に分類される。近年核内受容体の総数が増え、リガンドが発見されないものも多く命名に混乱をまねいたことから、構造の類似を指標にした統一的な命名法が定められた (図3)⁸⁾。

オーファンレセプターのなかにはリガンドを持たないものも含んでいると想定されるが、いくつかのオーファンレセプターでは「親」であるリガンドが判明しつつある。それらは、主に脂肪酸およびコレステロール代謝経路によって活性化されるものである (図4)⁹⁾。PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) γというレセプターは、プロスタグランジン誘導体 (15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2) により活性化されることが示されている¹⁰⁾。FXR (farnesoid X-activated receptor) は、ファルネソール誘導体 (ファルネソイド) によって活性化され¹¹⁾, 最近では胆汁酸が生理的なリガンドであることが示唆され、BARとも呼ばれている¹²⁻¹⁴⁾。また、LXRαは常時転写活性が高いオーファンレセプターでありオキシステロールがリガンドの一つと考えられている¹⁵⁾。

このように、脂溶性ビタミン、コレステロール、脂肪

図2 核内受容体の共役因子群 (corepressor/coactivator) と基本転写因子群 [文献6より改変引用]

図3 核内受容体スーパーファミリーの統一的命名法 [文献8より改変引用]

酸代謝の各種脂質が核内受容体に直接作用することが判明してきており、今後新たな核内受容体のリガンドが同定されることにより、新規ホルモン、生理活性物質が発見される可能性が考えられ、今後の展開が楽しみである。

エストロゲン受容体 (ER) と応答遺伝子

この節では核内受容体の研究の進歩をステロイド受容体の代表例 ER を例に取り上げ述べてゆく。ステロイドホルモンは、細胞の増殖、分化、機能の調節において多彩な生理的作用を及ぼしている。そのうち、エストロゲンは性ホルモンとして、女性の二次性徴や生殖機能に必須なステロイドホルモンであるばかりでなく、脳神経や免疫組織、血管、脂質・骨代謝などにおいて多彩な生理的作用を及ぼす。同時に、エストロゲンは、乳癌、子宮癌、前立腺癌などの癌、動脈硬化症、骨粗鬆症、アルツハイマー病などの老年病を含む各種疾患の病因、治療にも深く関与していることが明らかになっている。

1996年以降、新規 ER (ERβ) がラット、ヒト、マウスで相次いで同定され、従来知られていた ER は ERα と呼ばれ、二つのサブタイプが存在することが判明した¹⁶⁾。筆者らが単離したヒト ERβ¹⁷⁾ のアミノ酸構造を ERα と比較すると、ERβ では A/B 領域が短くなっており、ホモロジーとしては C 領域 (DBD) で 96% と非常に良く保存されており、E 領域 (LBD) でも 53% であった。ERβ も ERα 同様のリガンド (17β - エストラジオール) に対する高い結合能、リガンド特異性を有し、ERE を介する転写活性も 17β - エストラジオールの添加に

図5 核内受容体を介する応答カスケード—エストロゲン受容体 (ER) を例にして [文献30より改変引用]

筆者らはEREをゲノム上に同定するゲノム結合部位 (GBS) クローニング法を用いて新規の一次的エストロゲン応答遺伝子を探索している²³⁾。最近この方法により興奮性グルタミン酸受容体であるNMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体のサブユニットであるNR2Dがエストロゲン応答遺伝子のひとつであることを発見した²⁴⁾。脳の特定の部位にはERαもしくはERβが発現していることがわかっているが、性行動や記憶、感情に対するエストロゲン作用が、中枢神経系のERから下流のNMDA受容体などを介して引き起こされる可能性が想定され、大変興味深い。同じくGBSクローニング法で同定され、RINGフィンガーモチーフをもつエストロゲン下流応答遺伝子efpの発現部位は、子宮の内膜細胞、乳腺の上皮細胞、卵巣の顆粒膜細胞においてERαの発現部位と一致している^{25) 26)}。efpの発現誘導は、17β-エストラジオールにより刺激された子宮において、2時間後をピークとする迅速な応答性を示したことから、一次的応答遺伝子として、ある特定のエストロゲン作用を媒介している可能性が示唆された²⁶⁾。efpの生体内での役割を解明するために作製されたefp遺伝子ノックアウトマウスは成長障害をきたすことなく発育するが、雌マウスにおいて子宮低形成およびエストロゲン低応答性が認められる²⁷⁾。このことから、efpは子宮内膜に対しエストロゲン依存性に増殖促進の方向へに作用していることが考えられる。さらには、CpGアイランドを用いたGBSクローニング法の改良法も考案され、新規エストロゲン応答遺伝子COX7RPとEBAG9が同定された²⁸⁾。このEBAG9は後に報告された子宮癌の腫瘍マーカーとして得られた抗

体が認識する抗原であるRCAS1と同一のものであった²⁹⁾。EBAG9/RCAS1は、むしろ増殖抑制、アポトシスに働き、腫瘍細胞が産生して免疫系細胞にアポトシスを引き起こし癌の進展、転位に関与しているというモデルが提唱されている²⁹⁾。このように、同じエストロゲン応答遺伝子群でもそれらの機能、発現様式、誘導のされ方はさまざまである。したがって、筆者らはエストロゲン応答遺伝子を同定しその機能を調べることにより、エストロゲン作用の機構とその多様性、組織特異性を知ることができると考え研究を進めている (図5)³⁰⁾。同様に、転写因子としての核内受容体の応答遺伝子、応答カスケードを解明することにより核内受容体の生体機能、疾患における役割を知ることが可能となり、そのリガンドの同定、共役因子の解明も含めて新しい創薬への応用へ発展させることができるであろう。

おわりに

核内受容体に関する最近の知見について生化学、老年医学の立場から概説した。核内受容体スーパーファミリーは老化や老年病の原因、治療と密接に関連しているものを多く含んでいる。最近の研究の進歩としては、特に各種受容体とそのサブタイプの発見と受容体の新しい共役因子や下流応答遺伝子の解析が大きく寄与していると思われる。さらに、今回は他の文献^{31) 32)}に譲ったが受容体欠失マウスの作製と解析ならびに受容体異常症の発見とその臨床的知見により、新しい病態が注目されている。

今後さらに各研究の進歩によって、核内受容体とその

リガンドの多彩な生理的機能が明らかになり、新しいホルモン、生理活性物質の発見や、臨床的に新しい診断法やより治療法の開発に応用され、老化、老年医学を含めた医学の世界に大いに貢献していくものと考えられる。

文 献

- 1) Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988; 240: 889—895.
- 2) 梅園和彦: 核内受容体の構造分類と内分泌情報の統合. *日本臨床* 1998; 56: 1693—1698.
- 3) 井上 聡: ステロイド受容体とその異常. *医学の歩み* 1999; 190: 651—658.
- 4) Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al.: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270: 1491—1494.
- 5) Freedman LP: Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 1999; 97: 5—8.
- 6) Glass CK, Rosenfeld MG: The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000; 14: 121—41.
- 7) Sluder AE, Mathews SW, Hough D, Yin VP, Maina CV: The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes. *Genome Res* 1999; 9: 103—20.
- 8) Nuclear Receptors Nomenclature Committee: A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999; 97: 161—163.
- 9) 梅園和彦: 核内受容体の構造分類と内分泌情報の統合. *日本臨床* 1998; 56: 1693—1698.
- 10) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM: 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83: 803—12.
- 11) Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al.: Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995; 81: 687—93.
- 12) Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM: Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 1999; 3: 543—53.
- 13) Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al.: Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999; 284: 1362—1365.
- 14) Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Conslor TG, Kliewer SA, et al.: Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999; 284: 1365—1368.
- 15) Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ: An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. 1996; 383: 728—731.
- 16) 井上 聡: エストロゲンレセプターに関する研究の進歩. *日本産婦人科雑誌* 1999; 51: 681—692.
- 17) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, et al.: The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 122—126.
- 18) Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al.: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138: 863—870.
- 19) Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Mo-moeda M, et al.: Differential immunolocalization of estrogen receptor a and b in rat ovary and uterus. *J Mol Endocrinol*. 1999; 22: 37—44.
- 20) Nishihara E, Nagayama Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, et al.: Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor alpha and beta in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology*. 2000; 141: 615—620.
- 21) Couse JF, Korach KS: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*. 1999; 20: 358—417.
- 22) 折茂 彰, 井上 聡, 村松正実: エストロゲンレセプターの下流応答遺伝子とその生体内機能. *実験医学* 1998; 16: 2447—2453.
- 23) Inoue S, Kondo S, Muramatsu M: Identification of target genes for a transcription factor by genomic binding site (GBS) cloning. *Transcription Factors-A Practical Approach*, 2nd Edition Latchman, D.S. (ed), IRL press, New York, 1998; 9: 165—178.
- 24) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Muramatsu M: NMDA receptor type 2D gene as target for estrogen receptor in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 63: 375—379.
- 25) Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, et al.: Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11117—11121.
- 26) Orimo A, Inoue S, Ikeda K, Noji S, Muramatsu M: Molecular cloning, structure, and expression of mouse estrogen-responsive finger protein Efp. Co-localization with estrogen receptor mRNA in target organs. *J Biol Chem* 1995; 270: 24406—24413.
- 27) Orimo A, Inoue S, Minowa O, Tominaga N, Tomioka Y, Sato M, et al.: Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12027—12032.
- 28) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M: Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 442—449.
- 29) Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T: Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med*. 1999; 5: 938—42.
- 30) Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptors: How do they control reproductive and non-reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).