

が3bp隔てられている。これらGR、MR、PR、ARが全く同じ配列を認識するのにも関わらず、何故全く異なる生理作用（異なる標的遺伝子群の発現制御）を現すかは依然謎である。一方非ステロイドホルモンレセプターの標的配列は直接繰返し型（ダイレクトリピート）であり、そのコア配列は5'-AGGTCA-3'であり、この2つの配列が直列に並びヘテロ二量体が結合する(31)。このモチーフ間のスペースが各レセプターの標的特異性を規定しており、1, 2, 5bpはRAR/RXR、3bpはVDR/RXR、4bpはTR/RXRが結合する。この際興味深いことにRXRは常に5'上流側のコア配列に結合し、いわゆる共役レセプターとして働くように外見上見え、3'側のコア配列に結合するレセプターのみがリガンドに応答し転写促進を行うことが分かっている(32)。またオーファンレセプターの中にはホモ二量体として結合するものの他に、単量体として標的DNAに結合するものが知られているが、いずれの標的配列もAGGTCAを基本として配列されている。

2-5. 核内レセプターによる転写促進の分子メカニズム

核内レセプター群はエンハンサー/サイレンサーに結合するDNA結合性転写制御因子群の1種と言える。従って他のDNA結合性転写制御因子同様の分子メカニズムで転写制御を行うと考えられ(図11)、TATA boxを中心とする巨大複合体である基本転写装置を必須としている(25)。この際染色体DNA上では、基本転写装置と転写促進に必須な複合体を形成するが、図10に示すように、染色体DNAは大きく湾曲すると予想されている。このようなDNA構造の大きな変化を伴うことで、RNAポリメラーゼ・を呼び入れる環境が整えられる。このような核内レセプター-基本転写因子との転写開始複合体形成には更に両者を介在する転写共役因子が必須であることが最近わかり始めた(14、15、33)。

核内レセプターの転写促進作用は、先にも述べたようにリガンド結合依存的である。従って、このような転写介し複合体形成はリガンド依存的であると考えられ、少なくとも核内レセプターに直接結合する転写共役因子は、リガンド結合依存的に相互作用すると予想された。また同時にリガンド末結合状態の核内レセプターの転写促進能はむしろ抑制されている状態であるので、この時には逆に転写を抑制する共役因子群の存在が考えられた。つまりリガンド末結合状態では共役転写抑制因子(co-repressor)が結合していて、リガンド結合により、転写抑制因子が解離する。逆に共役転写活性化因子(co-activator)が入れ替わるように結合し、転写促進を助けるというスキームである(図12)。

2-6. 核内レセプター転写共役因子

現在までにco-activatorとして働くものに3つの160kDaの機能が極めて類似したSRC-1(ERAP160)(34、35)、TIF2(36)、AIB1のファミリータンパクが知られている(37、38)。その他PGC-1(39)、Smad3(40)など、リガンド依存的に相互作用する核内因子群がいくつか同定されている。更に最近では、以

上述べてきたco-activatorを全く含まない新たなco-activator複合体TRAP (DRIP) が同定されている(14)。この他核内レセプターのみならず、他の転写因子群のco-activatorとして働くものにCBP/P300が挙げられている(41)。一方co-repressorとしてはN-CoRやSMRTが同定されているが、いずれもステロイドホルモンレセプターには作用しないようである(42、43)。これら核内レセプター共役因子群はレセプター種固有のものは同定されておらず、複数のレセプターが共有しているようである。このような転写共役因子群と共通した特徴として明らかになったことの1つは、転写共役因子自身が、ヒストンのアセチル化(44、45)、脱アセチル化する酵素(46、47)であることにある。ヒストンは染色体DNAに固く巻き付き、遺伝子発現が起きないように眠らせている。しかしヒストンがアセチル化されると、ヒストンタンパク自身の物理化学的性質に変化が生じ、DNAに固く巻き付いたヒストンに変化が生じることになる。そうしてヒストンがはずされたDNA部分が露出することで、眠っていた遺伝子が起き出す(発現誘導)と考えられている。このように核内レセプターのリガンド(ホルモン)は、核内レセプター自身の転写促進能を引き出すが、このような転写促進能の獲得には、実際細胞核内ではクロマチン構造のダイナミックな変化を伴うのである(図13)。

しかしながら、これら転写共役因子として同定されたものはいずれもAF-2に対するものであり、現在AF-1に対する転写共役因子として同定された例は極めて少ない(24)。また以上述べてきたように、実際のレセプターの転写促進はAF-1、AF-2との協調作用の上に成り立っているため、AF-1の転写共役因子群の同定は必須な課題であろう。このように、AF-1、AF-2の細胞種特異的転写促進能は、結局当該細胞種における転写共役因子群の質および量の違いによると考えるのが現在一番妥当のようである。

2-7. リガンド結合によるレセプターの構造変化と転写共役因子群との相互作用

転写共役因子群と核内レセプターの相互作用がレセプターのリガンド結合依存的であることは、レセプターのリガンド依存的な転写促進能から容易に推測できる。このため結合に伴う核内レセプターの構造変化が古くから予想されていた。最近、X線解析によるリガンド結合領域(E領域)のリガンド結合による構造変化が、いくつかの核内レセプターについて調べられた。その結果、リガンド結合によるリガンド結合領域の構造変化は、領域全体ではなくその一端が大きく変化することがわかった。即ちリガンド結合領域は、いくつかの小さな領域が集まり、リガンドを迎え入れるポケット構造から構成される。このポケットにリガンドが埋め込まれると、ポケットの外側にあるE領域C末端側に存在する小さな領域(Helix12)が大きく移動することがわかった(48)。一方AF-2を詳細に解析することで、AF-2のうち特にE領域のC末端側の部分が、直接転写共役因子に結合することが証明されており、AF-2

AD(activation domain)と呼ばれていた(49、50)。興味深いことにこのAF-2 ADこそがHelix 12そのものであることがわかったのである。更に最近のE

Rのリガンド結合領域の解析から、Helix 12のリガンド結合に伴う移動はエストロゲンによっては引き起こされるが、エストロゲンアンタゴニスト (tamoxifen、ICI 164、384) では引き起こされなかったという (51) (図14)。更に最近の解析では、アンタゴニストによるHelix 12の移動は、転写共役因子との正常な相互作用面が失われることが明らかになっている。このことは、リガンド分子のアゴニスト/アンタゴニスト活性は、Helix 12の移動によって振り分けられ、その結果、転写共役因子との相互作用に異常が生じることがわかった (52)。

一方このようなリガンド結合依存的なレセプターの構造変化は、E領域に限るものではなく、レセプター分子全体に及ぶと考えられる (53)。特にAF-1、AF-2との機能をリガンド依存的な相互作用を考えると、当然両者の間にリガンド結合依存的な構造変化が生じると考えるのが妥当である。現在まで方法上の限界からAF-2での解析に頼っているが、今後はこのAF-1 (A/B領域) とAF-2 (E領域) とのリガンド結合依存的な相互作用、構造変化を転写促進の分子メカニズム解明には視野に入れるべきであろう。特に内分泌攪乱物質は、核内レセプターリガンドとして働くと、予想外の構造変化を引き起こす可能性もあるので、AF-1機能の解析は重要である。

2-8. 組織特異的なエストロゲン化合物の分子作用メカニズム

最近、エストロゲン依存性癌の内分泌療法を目的に開発されたエストロゲン (E2) アンタゴニストとして作られたタモキシフェン (TAM) が、骨組織や脂質代謝にはアゴニストとして働くことが示された。中でもE2の骨組織特異的作用が近年臨床の場で特に脚光を浴びるようになったのは、骨特異的なE2骨粗鬆薬 (ラロキシフェン) の開発の成功であろう。ラロキシフェン (LAX) は、タモキシフェン (TAM) の類縁体であり、当初はいわゆるE2アンタゴニストとして開発された。LAXはTAM同様、乳腺や子宮に対しては、E2アンタゴニスト様作用を示すが、骨組織に対してはアゴニスト様作用を示す。TAM、LAXは厳密には完全ではなく部分的アンタゴニストでしか働かないケースがあることがin vitro系の実験から確かめられている。即ちTAM、LAXはリガンド結合領域に存在するAF-2活性を完全に阻害するが、AF-1の活性を抑制することができない (54)。AF-1やAF-2の転写促進能は細胞の種類や状態で活性が異なっているので (26)、ERのAF-1活性が高い細胞 (組織) では、TAM、LAXはアンタゴニストではなくむしろ部分的アゴニストとして働くように思われる (図15)。LAXが骨組織特異的にE2作用を示す1つの可能性は、この組織ではERのAF-1活性が高いためと推測できよう (26、27、28)。ERへはリガンド結合依存的に転写共役因子群が結合するが、この転写共役因子群は転写促進に必須なコンポーネントである。従って、TAM、LAXによるERの特徴的な構造変化は、AF-1とAF-2間のみならず、転写共役因子群との相互作用においても、E2では大きく異なることが良そうされる。いずれにしてもTAM、LAXはAF-2の機能を阻害するものの、AF-1活性を抑制し

ないことが骨特異的作用として重要と考えられる。

このように内分泌攪乱物質の想定分子の作用メカニズムの1つは、リガンドとして結合する複雑なレセプターの構造変化により引き起こされる機能の逸脱によって説明できるかもしれない。一方でこのような構造変化の違いによる機能的変異は、先に述べた転写共役因子群との相互作用を変えるものと理解されている(55)。

2-9. 核内レセプター研究の今後の展望

核内レセプターに属するメンバーが未だに続々と発見されている現状を考えると、内分泌攪乱物質を直接リガンドとするレセプターの発見は極めて可能性が高いように思われる。一方で既知レセプターに弱い結合力であっても、リガンドポケットにはまり込み、ある程度リガンドとして作用してしまう可能性も考えられる(43、49)。この場合、レセプターの異常な立体構造変化が引き起こされるので、AF-1、AF-2の細胞種特異的機能により、組織特異的に作用を現す可能性が考えられる。

いずれも核内レセプター研究の進展が著しい今、新たな知見を盛り込んだ視野に立ち、内分泌攪乱物質の作用を見極めることが必須である。

3. 文献

- 1) Rommerts F F G, van der Molen H J: Testosterone steroidogenesis. In: Burger H G, Kertzer D M, eds. The Testis. New York: Raven Press, 303-328, 1989.
- 2) Wilson J D, Griffin J E, Russell D W: Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. Endocr Rev, 14, 577-593, 1993.
- 3) Quigley C A, Debellis A, Marschke K B, et al.: Androgen receptor defects: Historical, clinical and molecular perspectives. Endocr Rev, 16, 271-321, 1995.
- 4) Kreidberg J A, Sariola H, Loring J M, et al.: WT-1 is required for early kidney development. Cell, 74, 679-691, 1993.
- 5) Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler G R, Gruss P: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. Development, 121, 4057-4065, 1995.
- 6) Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. Nature, 351, 117-121, 1991.
- 7) Swain A, Zanaria E, Hacker A, et al.: Mouse Dax 1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal function. Nature Genet, 12, 404-409, 1996.
- 8) Kwok C, Weller P A, Guili S, et al.: Mutations in SOX9, the gene responsible for campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. Am J Hum Genet, 57,

1028-1036, 1995.

9) Rappaport R, Forest M G: Disorders of sexual differentiation. In: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko P C, eds. *Pediatric Endocrinology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 447-470, 1993.

10) 加藤茂明: 核内レセプターと情報伝達 羊土社

11) Mangelsdorf D J, Evans R M: The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83, 841-850, 1995.

12) Nuclear Receptors Nomenclature Committee: A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97, 161-163, 1999.

13) Kliewer S A, Moore J T, Wade L, Staudinger J L, Watson M A, Jones S A, McKee D D, Oliver B B, Willson T M, Zetterstrom R H, Perlmann T, Lehmann J M: An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, 92, 73-82, 1998.

14) Freedman L P: Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*, 97, 5-8 1999.

15) Lanz R B, McKenna N J, Onate S A, Albrecht U, Wong J, Tsai S Y, Tsai M-J, O'Malley B W: A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*, 97, 17-27, 1999.

16) Devchand P R, Keller H, Peters J M, Tizabi M, Gonzales, F J: The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature*, 384, 39-43, 1996.

17) Forman B M, Tontonoz P, Chen J, Brun R P, Spiegelman B M, Evans R M: 15-deoxy- Δ^2 , 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, 83, 803-812, 1995.

18) Ricote M, Li A C, Willson T M, Kelly C J, Glass C K: The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82, 1988.

19) Jiang C, Ting A T, Seed B: PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-86, 1988.

20) Forman B M, Goode E, Chen J, Oro A E, Bradley D J, Perlman T, Noonan D J, Burks L T, McMorris T, Lamph W W, Evans R, Weinberger C: Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolite. *Cell*, 81 687-693 1995.

21) Janowski B A, Willy P, Thota R D, Falck J R, Mangelsdorf D J: An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXRA. *Nature*, 383, 728-731 1996.

22) Russell D W: Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell*, 97, 539-542, 1999.

- 23) Kastner P, Mark M, Chambon P: Nonsteroid Nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83, 859-869, 1995.
- 24) Ylikomi T, Bocquel M T, Berry M, et al.: Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J*, 11, 3681-3694, 1992.
- 25) Beato M, Herrlich P, Schutz G: Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell*, 83, 851-857, 1995.
- 26) Tasset D, Tora L, Fromental C, Sheer E, Chambon P: Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell*, 62, 1177-1187, 1990.
- 27) Kato S, Endo H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Goto Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 270, 1491-1494, 1995.
- 28) Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol Cell Biol*, 1999 (in press).
- 29) Umesono K, Murakami K, Thompson C, Evans R M: Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptor. *Cell*, 65, 1255-1266, 1991.
- 30) Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H: Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, 15, 5858-5867, 1995.
- 31) Vivat V, Zechel C, Wurtz J M, Chambon P, Gronemeyer H: A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J*, 16 5697-5709, 1997.
- 32) Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld M G, Glass C K: Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-activator. *Nature*, 377, 451-454, 1995.
- 33) Horwitz K B, Jackson T A, Bain D L, Richer J K, Takimoto G S, Tung L: Nuclear Receptor Coactivators and Corepressors. *Mol Endocrinol*, 10, 1167-1177, 1996.
- 34) Onate S A, Tsai M-J, O'Malley B W: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptors. *Science*, 271 1354-1357, 1996.

- 35)Cavailles V, Dauvois P, Danielson P S, Parker M G: Interaction of protein with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad.Sci*, 91, 10009-10013, 1994.
- 36)Voegel J J, Heine M J S, Zechel C, Chambon P, Groneymmer H: TIF2, a 160-kD a transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J*, 15, 3667-3675, 1996.
- 37)Anzick S L, Kononen J, Walker R L: AIB1, a steroid hormone receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, 277: 965-968, 1997.
- 38)Chen H, Lin R J, Schiltz R L, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalski M L, Nakatani Y, Evans R M: Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, 90, 569-580, 1997.
- 39)Puigserver P, Wu Z, Park C W, Graves R, Wright M, Spiegelman B M: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-839, 1998.
- 40)Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Toriyabe T, Kashiwagi K, Watanabe M, Kawabata M, Miyazono K, Kato S: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
- 41)Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin S-C, Heyman R A, Rose D W, Glass C K, Rosenfeld M G: A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85, 403-414, 1996.
- 42)Horlein A J, Naar A M, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass C K, Rosenfeld M G: Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor. *Nature*, 377, 397-404, 1995.
- 43)Chen J D, Evans R M: A transcriptional corepressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, 454-457, 1995.
- 44)Ogryzko V V, Schiltz R L, Russanova V, Howard B H, Nakatani Y: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959, 1996.
- 45)Spencer T E, Jenster G, Burcin M M, Allis C D, Zhou J, Mizzen C A, McKenna N J, Onate S A, Tsai S Y, O'Malley B W: Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389, 194-198, 1997.
- 46)Nagy L, Kao H Y, Chakravarti D, Lin R J, Hassig C A, Ayer D E, Schreiber S L, Evans R M: Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89, 373-380, 1997.

- 47)Heinzel T, Lavinsky R M, Mullen T M, Kamei Y, Soderstrom M, Glass C K, Rosenfeld M G: A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, 387, 43-48, 1997.
- 48)Renaud J P, Rochel N, Ruff M, Vivat P, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378 681-689, 1995.
- 49)Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R, Chambon P: Activation function 2(AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis-retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element of the AF-2 activity. *EMBO J*, 13, 5370-5382, 1994.
- 50)Heery H, Kalkhoven E, Hoare S, Parker M G: A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387, 733-736, 1997.
- 51)Brzozowski A M, Pike A C, Dauter Z, et al.: Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758, 1997.
- 52)Shiau A K, Barstad D, Loria P M, Cheng L, Kushner P J, Agard D A, Greene G L: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, 927-937, 1998.
- 53)McInerney E M, Tsai M-J, O'Malley B W, Katzenellenbogen B S: Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear receptor coactivator. *Proc Natl Acad Sci*, 93, 10069-10073, 1996.
- 54)Berry M, Metzger D, Chambon P: Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type promoter context-dependent agonistic activity of the antioestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, 9, 2811-2818, 1990.
- 55)Takeyama K, Masuhiro Y, Fuse H, Endoh H, Murayama A, Kitanaka S, Suzawa M, Yanagisawa J, Kato S: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol Cell Biol*, 19, 1049-1055, 1999.

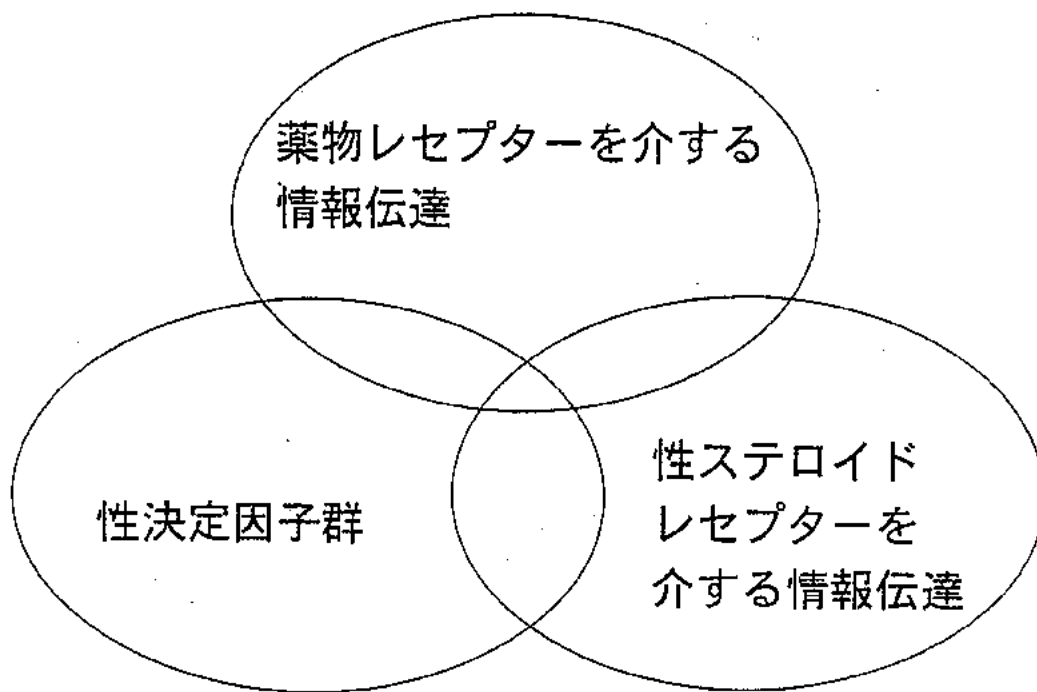


図 1

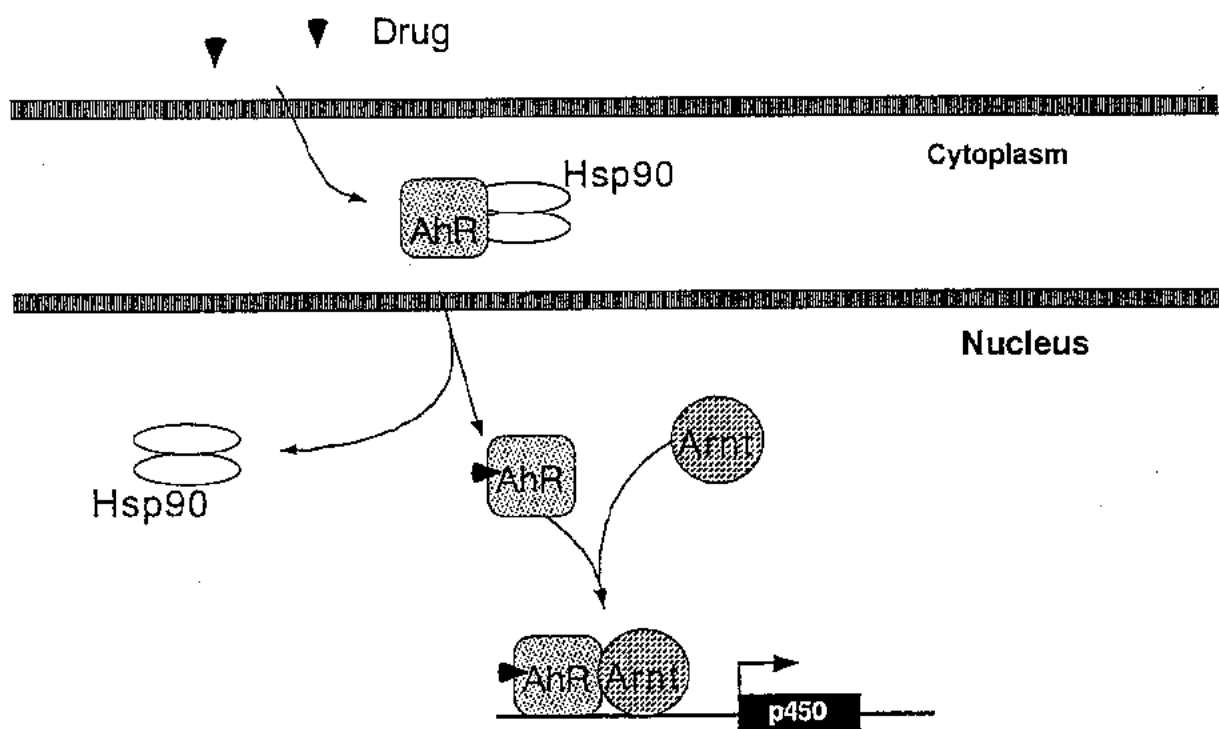


図 2