—Reviews—

コレステロール代謝に関わる核内受容体 Farnesoid X Receptor の解析

大 野 雅 恵

Functional Analysis of Nuclear Receptor FXR Controlling Metabolism of Cholesterol

Masae OHNO
Department of Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3–1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467–8603, Japan

(Received October 15, 2007)

Nuclear receptors function as ligand-inducible transcription factors that regulate various physiological functions such as development, reproduction, and metabolism. Dysregulation of the metabolism of cholesterol, triglyceride, and glucose leads to the metabolic syndrome including type 2 diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, and atherosclerosis. Studies of nuclear receptors promise to provide discoveries of therapeutic agents against the metabolic syndrome. Farnesoid X receptor (FXR) is a member of the nuclear receptor superfamily and is activated by bile acids. FXR regulates the metabolism of not only bile acid but also cholesterol, lipoprotein, triglyceride, and glucose, and is considered a potential therapeutic target for the metabolic syndrome because of these functions. Nuclear receptors have two regions for transactivation, a constitutive activation function (AF-1) and a ligand-dependent activation function (AF-2). AF-1 and AF-2 seem to require interactions with coactivators for the activation function and both work synergistically to give full transactivation of nuclear receptors. However, coactivators for AF-1 activity are poorly understood, whereas coactivators required for AF-2 activity have been well studied. To understand the molecular mechanism of AF-1 in FXR, we isolated proteins associated with AF-1 by GST pull-down assay using the N-terminal region of FXR and nuclear extracts from HeLa cells. This review focuses on the roles of FXR and our new findings regarding FXR-associated factors.

Key words——cholesterol; atherosclerosis; nuclear receptor; farnesoid X receptor (FXR); coactivator; activation function-1 (AF-1)

1. はじめに

核内受容体は，ステロイドホルモン，甲状腺ホルモン，脂溶性ビタミンであるビタミン A やビタミン D などの低分子量脂溶性物質をリガンドとする転写因子であり，発生，細胞の増殖や分化，代謝などに関与する遺伝子の発現を調節している．また，核内受容体は，糖尿病や脂質異常症（高脂血症）といった代謝異常症，がんなど様々な疾病に関与している.[1] コレステロールから合成される胆汁酸をリガンドとする核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) は，胆汁酸・コレステロール代謝に関与する．また，FXR は脂質や糖代謝にも関与することから，生活習慣病の薬物治療の標的分子として注目されている.[2,3] FXR を含む核内受容体には，2 つの転写活性化能を持つ領域 activation function (AF-1, AF-2) が存在し，その転写活性には転写共役因子が必要である.[4–6] AF-2 に関与する転写共役因子は複数同定され，その転写制御機構は解明されつつある．一方，AF-1 に関しては不明な点が多い.[7] そこでわれわれは，AF-1 を介した転写メカニズムの解明を目的とし，特に FXR の AF-1 に注目して解析を行っている．本稿では，大学院シンポジウムにおいて発表した内容を中心に，FXR をはじめとした核内受容体を概説するとともに，FXR の AF-1 に関与する領域と相互作用する因子について紹介する．

2. 核内受容体の構造と機能

1 つの原初遺伝子から分子進化した核内受容体は，スーパーファミリーを形成している.[8] それぞれの核内受容体は，発生，細胞の増殖や分化，代謝など，多岐に渡る機能を持つ．最近のゲノムプロジ

名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野（〒467–8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3–1）
e-mail: p052715@phar.nagoya-cu.ac.jp
本総説は，日本薬学会第 127 年会シンポジウム SD4 で発表したものを中心に記述したものである．

ェクトの成果により，ヒトにおいては48種類の核内受容体が見い出されている．核内受容体のDNA結合領域の配列の相同性と系統樹から，6つのグループとDNA結合領域を持たないdosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1（DAX1），small heterodimer partner（SHP）に分けられている（Table 1）．[9,10]

核内受容体は，ホモ2量体あるいはヘテロ2量体，又は単量体として特異的なDNA配列（hormone response element, HRE）に結合する．HREは，6塩基からなるハーフサイトが2つ直列型あるいは回文型に並び，そのハーフサイトの間は数塩基離れる構造を取る．このHREのハーフサイトに核内受容体が結合し，核内受容体のDNA結合の特異性が生まれる．このDNAへの結合様式とリガンドから，核内受容体は4つのグループに分類される（Fig. 1）．1つはステロイドホルモン型受容体で，もう1つは非ステロイドホルモン型受容体である．非ステロイドホルモン型受容体は，DNAへの結合様式からさらに3つに分類されている．retinoid X receptor（RXR）とヘテロダイマーを形成する受容体と，ホモダイマーあるいはモノマーで機能するオーファン受容体に分けられている．

ステロイドホルモン型受容体は，体内で作られるステロイドホルモンなどをリガンドとし，高い親和性でリガンドと結合する．estrogen receptor（ER）やandrogen receptor（AR）などの核内受容体はこのグループに属する．これらの核内受容体は，ホモ2量体を形成し，回文型に並んだHREに結合する．非ステロイドホルモン型受容体には，RXRとヘテロ2量体を形成し，直列型に並んだHREに結合する核内受容体が属している．FXRはこのグループに属しているが，回文型に並んだHREに結合することが知られている．FXRの結合様式の詳細については次章で述べる．また，非ステロイドホルモン型受容体のグループには，生体内のリガンドがみつけられる前に，ステロイドホルモン受容体と相同性の高い遺伝子として単離された核内受容体も含まれている．これらの核内受容体は，リガンドが未知であるため，オーファン受容体と呼ばれている．オーファン受容体には，ホモ2量体を形成し，直列型に並んだHREに結合する核内受容体と，単量体としてHREに結合する核内受容体がある．[10,11] いくつかのオーファン核内受容体については，のちにリガンドが同定された．これらのリガンドと非ステロイドホルモン型受容体との結合親和性は，ステロイドホルモン型受容体とそれらのリガンドとの親和性より低いことが知られている．また，生体外異物や食餌から摂取する脂質をリガンドとするため，脂質のセンサーとして働いていると考えられている．[12]

3. FXRと胆汁酸・コレステロール代謝

48種の核内受容体の中でも，胆汁酸をリガンドとするFXRは，コレステロール及び脂質代謝に関与するため，動脈硬化治療薬の標的分子として最近注目されている．われわれは，このFXRに着目して解析を進めている．FXRは，標的遺伝子のプロモーター領域に存在するFXR response element（FXRE）に，RXRとヘテロダイマーを形成して結合し，標的遺伝子の転写を制御する．FXRの主な標的遺伝子とそのFXREをFig. 2に示した．[17]

FXRは，オーファン受容体として単離され，コレステロール生合成経路の中間体であるfarnesolによって弱い活性が示されたことからこの名前が付けられた．[13] のちに内因性のリガンドとして，胆汁酸（bile acids, BA）が同定された．FXRは，胆汁酸の中でも特にchenodeoxycholic acid（CDCA）と高い親和性で結合する．[14,15] farnesol, CDCAとFXRの合成リガンドであるGW4064[16] の構造式をFig. 3に示した．胆汁酸は，肝臓でコレステロールから合成され，胆嚢に貯められ，胆管を通って小腸に排出され，脂質や脂溶性ビタミンの吸収に関与する．小腸に排出された胆汁酸の大部分は，再吸収されて肝臓に戻る腸肝循環を繰り返す．FXRは，主に肝臓，小腸に発現し，胆汁酸の合成や排出，抱合，輸送など，腸肝循環に関与する遺伝子を直接あるいは間接的に制御し，胆汁酸のホメオスタシスを担っている．[3,11,17] FXRを介した胆汁酸代謝についてTable 2及びFig. 4にまとめた．

肝臓において，FXRは胆汁酸のセンサーとして機能していると考えられている．胆汁酸は細胞毒性があるので，肝臓で胆汁酸濃度が上昇すると，FXRは細胞を保護するため胆汁酸の合成を阻害する．この機構には，FXRのほかに2つの核内受容体が関与する．胆汁酸合成律速酵素である

Table 1. Human Nuclear Receptor Superfamily[9,10)]

Group	Nomenclature	Name	Abbreviation	Ligand
1	NR1A1	Thyroid hormone receptor α	TRα	Thyroid hormone
	NR1A2	Thyroid hormone receptor β	TRβ	Thyroid hormone
	NR1B1	Retinoic acid receptor α	RARα	All-*trans*-retinoic acid
	NR1B2	Retinoic acid receptor β	RARβ	All-*trans*-retinoic acid
	NR1B3	Retinoic acid receptor γ	RARγ	All-*trans*-retinoic acid
	NR1C1	Peroxisome proliferator-activated receptor α	PPARα	Fatty acids
	NR1C2	Peroxisome proliferator-activated receptor δ	PPARδ	Fatty acids
	NR1C3	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPARγ	Fatty acids
	NR1D1	Reverse erbA α	Rev-erbα	Orphan
	NR1D2	Reverse erbA β	Rev-erbβ	Orphan
	NR1F1	RAR-related orphan receptor α	RORα	Orphan
	NR1F2	RAR-related orphan receptor β	RORβ	Orphan
	NR1F3	RAR-related orphan receptor γ	RORγ	Orphan
	NR1H3	Liver X receptor α	LXRα	Oxysterols
	NR1H2	Liver X receptor β	LXRβ	Oxysterols
	NR1H4	Farnesoid X receptor	FXR	Bile acids
	NR1I1	Vitamin D receptor	VDR	Vitamin D
	NR1I2	Pregnane X receptor	PXR	Xenobiotics
	NR1I3	Constitutive androstane receptor	CAR	Xenobiotics
2	NR2A1	Hepatocyte nuclear factor 4 α	HNF4α	Fatty acids
	NR2A2	Hepatocyte nuclear factor 4 γ	HNF4γ	Fatty acids
	NR2B1	Retinoid X receptor α	RXRα	9-*cis*-retinoic acid
	NR2B2	Retinoid X receptor β	RXRβ	9-*cis*-retinoic acid
	NR2B3	Retinoid X receptor γ	RXRγ	9-*cis*-retinoic acid
	NR2C1	Testicular receptor 2	TR2	Orphan
	NR2C2	Testicular receptor 4	TR4	Orphan
	NR2E1	Tailless homolog	TLX	Orphan
	NR2E3	Photoreceptor-specific nuclear receptor	PNR	Orphan
	NR2F1	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcripition factor I	COUP–TFI	Orphan
	NR2F2	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II	COUP–TFII	Orphan
	NR2F6	v-erbA-related protein 2	EAR2	Orphan
3	NR3A1	Estrogen receptor α	ERα	Estrogens
	NR3A2	Estrogen receptor β	ERβ	Estrogens
	NR3B1	Estrogen-related receptor α	ERRα	Orphan
	NR3B2	Estrogen-related receptor β	ERRβ	4-OH tamoxifen
	NR3B3	Estrogen-related receptor γ	ERRγ	4-OH tamoxifen
	NR3C1	Glucocorticoid receptor	GR	Glucocorticoids
	NR3C2	Mineralocorticoid receptor	MR	Mineralocorticoids
	NR3C3	Progesterone receptor	PR	Progesterone
	NR3C4	Androgen receptor	AR	Androgens
4	NR4A1	Nerve growth factor-induced protein B	NGFI–B	Orphan
	NR4A2	Nur related factor 1	NURRI	Orphan
	NR4A3	Neuron-derived orphan receptor 1	NOR1	Orphan
5	NR5A1	Steroidogenic factor 1	SF1	Orphan
	NR5A2	Liver receptor homolog 1	LRH1	Orphan
6	NR6A1	Germ cell nuclear factor	GCNF	Orphan
0	NR0B1	Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1	DAX1	Orphan
	NR0B2	Small heterodimer partner	SHP	Orphan

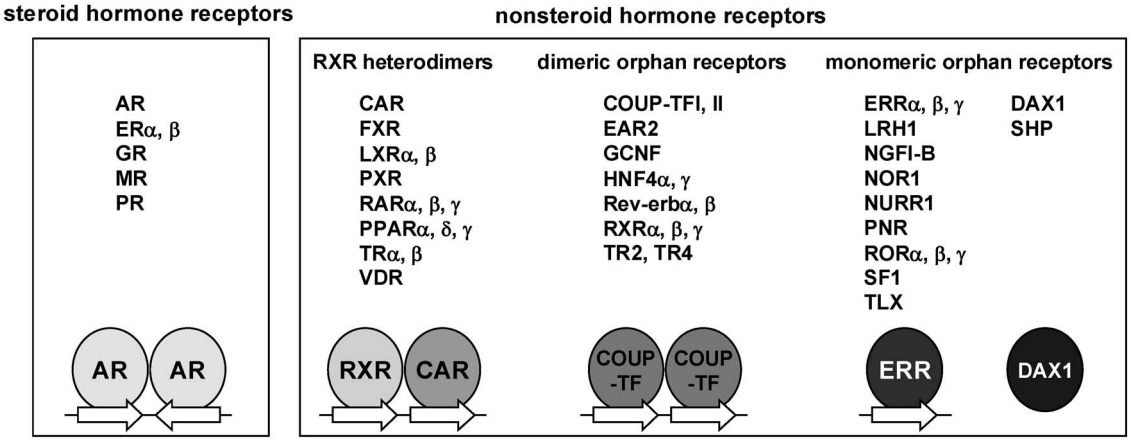

Fig. 1. Classification of Nuclear Receptors[1,11]

Nuclear receptors (NRs) recognize the specific DNA sequence called hormone response elements (HREs) to regulate the expression of target genes. HREs are bipartite elements composed of two hexameric core half-site motifs. NRs are divided into subgroups on the basis of their pattern of dimerization, DNA-binding and ligand-binding. One group consists of steroid hormone receptors which function as homodimers and bind to the inverted repeats of DNA half-sites. Another one consists of nonsteroid hormone receptors such as FXR. This group was further divided into three subgroups. Some nonsteroid receptors heterodimerize with RXR and characteristically bind to direct repeats. Almost all of other nonsteroid hormone receptors are orphan receptors. They bind to HREs as homodimers or monomers.

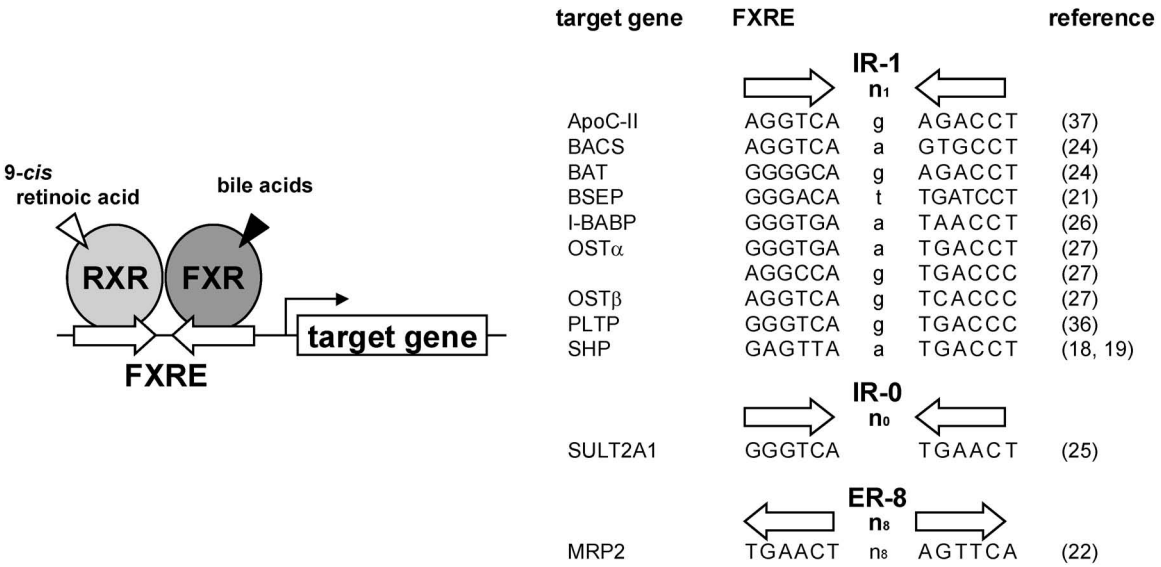

Fig. 2. FXR Target Genes and FXR Responsive Element

FXR binds as a heterodimer with RXR to FXR response element (FXRE) in the promoter region of the target gene. FXREs are composed of inverted repeats (IR) or everted repeats (ER) of hexameric core half-site motifs that are separated by number (n) of nucleotides (IR-n, ER-n).

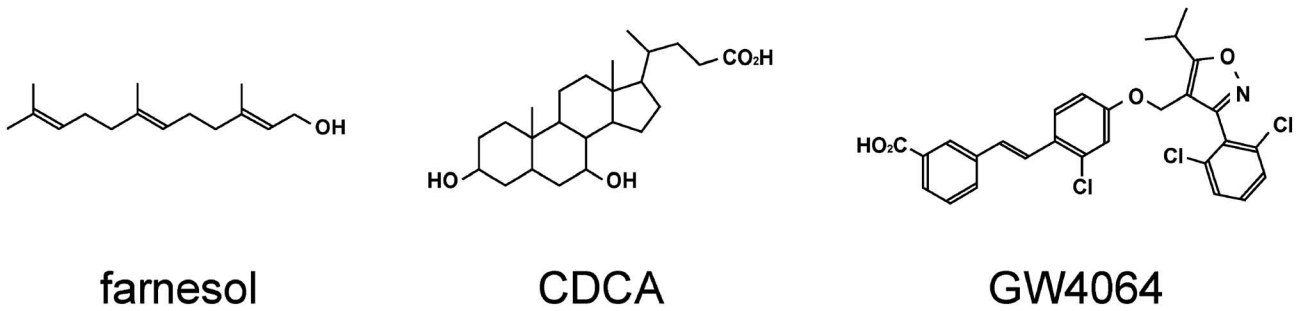

Fig. 3. Chemical Structures of farnesol, CDCA and GW4064

Table 2. Genes Regulated by FXR[2,3)]

Gene	Function		Regulatory effect	Reference
SHP	Nuclear receptor inhibitor		Induced	(18, 19)
CYP7A1	Bile acid metabolism	Bile acid synthesis	Repressed	(19)
CYP8B1		Bile acid synthesis	Repressed	(20)
BSEP		Bile acid efflux from hepatocyte	Induced	(21)
MRP2		Bile acid efflux from hepatocyte	Induced	(22)
OSTα, OSTβ		Bile acid efflux from enterocyte	Induced	(27)
NTCP		Bile acid uptake into hepatocyte	Repressed	(23)
ASBT		Bile acid uptake into enterocyte	Repressed	(28)
I-BABP		Intestine bile acid dinding	Induced	(26)
BACS		Bile acid conjugaiton	Induced	(24)
BAT		Bile acid conjugation	Induced	(24)
SULT2Al		Bile acid detoxification	Induced	(25)
SREBP-1c	Lipid metabolism	Lipogenesis	Repressed	(33)
PLTP	Lipoprotein metabolism	Reverse cholesterol transport	Induced	(36)
SR-BI		Reverse cholesterol transport	Induced	(39)
ApoC-II		LPL activator	Induced	(37)
ApoC-III		LPL inhibitor	Repressed	(38)
ANGPTL3		LPL inhibitor	Repressed	(33)
PEPCK	Glucose metabolism	Gluconeogenesis	Induced and repressed	(40, 45)
G6Pase		Gluconeogenesis	Repressed	(40)

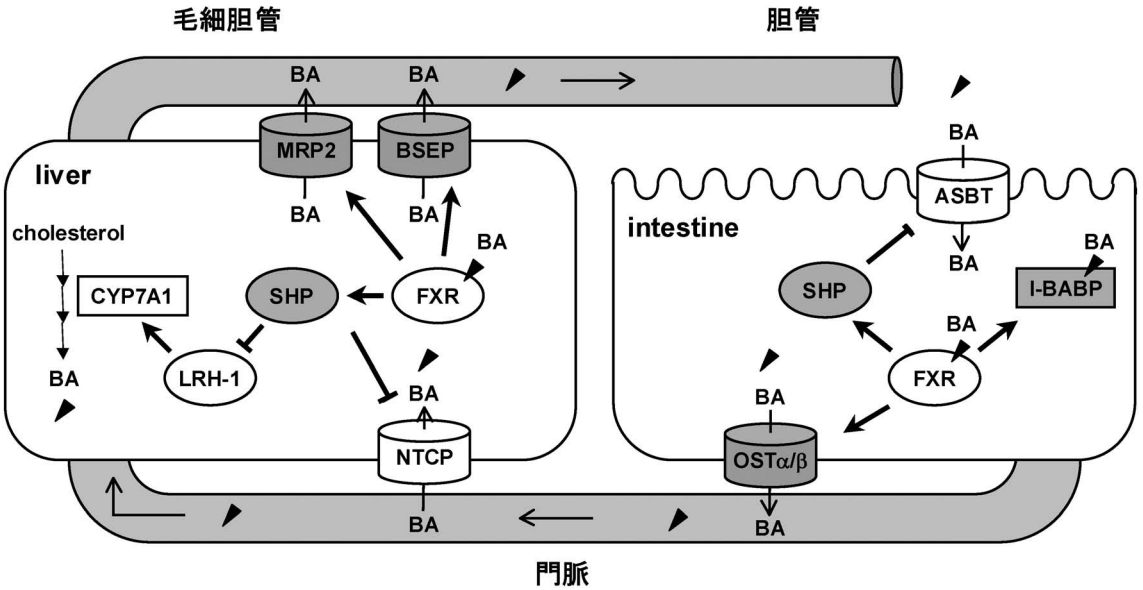

Fig. 4. Regulation of the Bile Acid Metabolism by FXR

Bile acids (BAs) are synthesized from cholesterol in the liver, excreted to the bile canaliculus, reabsorbed from the intestine and transported back to the liver through the portal vein. This process called the enterohepatic circulation. FXR activated by BAs, inhibits the transcription of genes involved in synthesis and uptake of BAs and stimulates gene expression in concerned with excretion of BAs to regulate the enterohepatic circulation.

CYP7A1 の発現を正に制御する核内受容体 liver receptor homolog 1（LRH1）と，DNA 結合領域のない核内受容体で他の核内受容体と結合する SHP である．LRH1 は CYP7A1 のプロモーター領域に結合し，CYP7A1 の発現を正に制御し，SHP は LRH1 と複合体を形成し，LRH1 の機能を阻害する．FXR は胆汁酸と結合すると，SHP のプロモーター領域に結合し，SHP の発現を正に制御する．[18)] そ

して，SHP が LRH1 の活性を阻害し，CYP7A1 の発現を抑制することより，胆汁酸の合成を阻害する（Fig. 4）．また，FXR は SHP を介して他の胆汁酸合成酵素である CYP8B1 の発現も抑制する．[19,20]

さらに FXR は胆汁酸を細胞外に排出するトランスポーターの発現を促進し，細胞内に取り込むトランスポーターの発現を抑制することで，細胞内の胆汁酸濃度を制御する．胆汁酸の排出トランスポーターである bile salt export pump（BSEP）[21]や multidrug resistance-associated protein 2（MRP2）[22]の発現を FXR は正に制御する．これらのトランスポーターは，ATP-binding cassette transporter に属しており，肝細胞の胆管側に発現し，細胞外へ胆汁酸を排出する．FXR は，これらのトランスポーターの発現を直接的に制御する．逆に，胆汁酸を取り込むトランスポーターである Na^+/taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP）の発現を FXR は SHP を介して間接的に抑制し，細胞内の胆汁酸濃度を調節する．[23] また，FXR は胆汁酸のグリシン及びタウリン抱合に関与する酵素（bile acid-CoA synthetase, BACS; bile acid-CoA: amino acid *N*-acetyltransferase, BAT）や，[24] 胆汁酸の解毒化に関与する酵素（dehydroepiandrosterone sulfotransferase, SULT2A1）の発現を上昇させ，[25] 胆汁酸の腸肝循環を制御する（Fig. 4）．

小腸において，FXR は胆汁酸結合タンパク質 ileal bile-acid binding protein（I-BABP）の発現を正に制御する．[26] I-BABP は，小腸細胞に発現し，細胞質において胆汁酸と結合する．I-BABP の機能の詳細は不明であるが，胆汁酸の取り込みと細胞内輸送を促進すると考えられている．また，FXR は肝臓のみではなく，小腸においても胆汁酸トランスポーターの発現を制御する．小腸細胞の基底膜上の胆汁酸排出トランスポーターである organic solute transporter α（OSTα）及び OSTβ の発現を正に制御する．[27] 一方，小腸細胞の頂端膜上の胆汁酸取り込みトランスポーターである apical sodium-dependent bile acid transporter（ASBT）の発現を抑制する（Fig. 4）．[28]

このように，FXR は細胞内の胆汁酸濃度が上昇すると，胆汁酸合成や胆汁酸を取り込むトランスポーターの発現を抑制する一方で，胆汁酸排出や胆汁酸抱合を促進する．そのため，FXR は胆汁酸のセンサーとして機能していると考えられている．

4. FXR と疾患

脂質代謝異常，特に high-density lipoprotein（HDL）コレステロールの減少，low-density lipoprotein（LDL）コレステロールの増加と中性脂肪の増加は，動脈硬化のリスクファクターとして知られている．動脈硬化は，コレステロールを取り込んだマクロファージが血管壁に沈着し，酸化 LDL がさらに蓄積することで引き起こされる．コレステロールや脂質代謝，マクロファージのスカベンジャーレセプターの発現に関与する核内受容体である liver X receptor（LXR）や peroxisome proliferator-activated receptor などは，動脈硬化の薬物治療において注目されている．[29]

コレステロール，脂質及び糖代謝に関与する遺伝子で，FXR によってその発現が制御される遺伝子を Table 2 に示した．FXR は，コレステロールを胆汁酸に変え，胆汁酸を排出する遺伝子を制御することでコレステロール代謝に関与する．また，FXR が中性脂肪代謝にも関与することは古くから知られていた．FXR のリガンドである胆汁酸を，脂質異常症（高脂血症）やコレステロール胆石症の患者に投与すると，中性脂肪が減少することが報告されている．[30,31] さらに，胆汁酸と結合し，コレステロール吸収を阻害する薬剤であるコレスチラミンを投与すると，血中 very-low-density lipoprotein（VLDL）と中性脂肪量が増加することが知られている．[32] この胆汁酸と脂質代謝のメカニズムについては不明であったが，最近になって FXR が LXR 及び SHP を介して sterol regulatory element binding protein-1c（SREBP-1c）の発現を抑制することで，脂質合成を抑制し，肝臓から放出される VLDL を減少させることが報告された．[33] その一方で，血中高中性脂肪量を呈するハムスターに CDCA を投与しても SREBP-1c の mRNA レベルは減少しないことが報告されていることから，[34] SREBP-1c を介する以外の経路も考えられている．[2]

FXR のノックアウトマウスは血中，肝臓のコレステロール及び中性脂肪量の上昇を示す．[35] 特に，血中の VLDL や LDL コレステロールの上昇，また HDL コレステロールも上昇し，総コレステロールが増加するなどの脂質代謝異常を呈し，動脈硬化のリスクが高くなる（Table 3）．これは FXR がコレ

Table 3. Metabolic Parameters in $FXR^{-/-}$ Mice

血清	
胆汁酸	↑
コレステロール	↑
中性脂肪	↑
リポプロテイン	
VLDL	↑
LDL	↑
HDL	↑
肝臓	
コレステロール	↑
中性脂肪	↑
インスリン感受性	↓
耐糖能	↓

references：35, 40).

ステロールや中性脂肪代謝に加え，リポプロテインも制御するためである.[2,3] FXR は phospholipid transfer protein（PLTP）の発現を正に制御する.[36] PLTP は中性脂肪やコレステロールの多い VLDL や LDL からリン脂質やコレステロールを HDL に移すタンパク質であり，中性脂肪のクリアランスに関与する．また，FXR は apolipoprotein C-Ⅱ（ApoC-Ⅱ）の発現を正に制御する一方で，[37] ApoC-Ⅲ,[38] angiopoietin-like protein 3（ANGPTL3）の発現を負に制御する.[33] ApoC-Ⅱはリポプロテイン中の中性脂肪を分解する lipoprotein lipase（LPL）を活性化するのに対し，ApoC-Ⅲ, ANGPTL3 は LPL 活性を抑制する．これらのタンパク質を制御することによって，FXR は血清中の中性脂肪のクリアランスを制御する.[2] また，FXR は間接的に scavenger receptor BI（SR-BI）の発現を正に制御する因子である．SR-BI は，肝臓に発現し，HDL コレステロールの取り込みに関与するタンパク質である．そのため FXR のノックアウトマウスは，HDL コレステロールが肝臓に取り込まれなくなり，コレステロールや中性脂肪のクリアランスが低下し，血中の総コレステロールや中性脂肪が上昇する.[39]

以上のノックアウトマウスなどの検討より，FXR を活性化することが動脈硬化の治療につながると考えられるため，FXR のアゴニストが薬物治療の標的分子として注目されている．実際に，合成アゴニストである GW4064 をマウスに投与すると，血中コレステロール及び中性脂肪値が下がることが報告されている．これは FXR のノックアウトマウスでは起こらないことから，FXR を介した経路であるとされている．さらに糖尿病モデルマウス（KK-Ay, db/db）に GW4064 を投与すると，血中中性脂肪量が減少すること，さらにコレステロール値や遊離脂肪酸の値も減少することが示されている.[33,40] また，FXR のアゴニストはコレステロール胆石症にも有用である．胆石症を誘発させる食餌を与えた FXR のノックアウトマウスはコレステロール胆石症の症状を呈することや，胆石症を誘発させる食餌を与えたマウスに FXR の合成リガンドを投与することによって，胆石症の悪化を防ぐと報告されている．これも FXR のノックアウトマウスでは起こらないことから，FXR を介した作用であると考えられている.[41]

これらの解析から，FXR アゴニストが脂質代謝異常の治療に適していると考えられるが，FXR のアンタゴニストであるググルステロンをマウスに投与することにより肝コレステロールが減少するという報告がなされた.[42] しかし，ググルステロンは FXR 以外の核内受容体により高い結合性を示すことが示された．このことから，ググルステロンのコレステロール低下作用は FXR のアンタゴニスト作用ではなく，他の核内受容体を介していると考えられている.[43]

また，FXR はコレステロール及び脂質代謝のみならず，糖代謝にも関与する．FXR のノックアウトマウスはインスリン抵抗性を呈し，糖代謝異常を来たす.[40] また，糖尿病モデルラットでは FXR の発現が低いことが知られている.[44] さらに GW4064 を糖尿病モデルマウスに投与すると，脂質異常症（高脂血症）に加えて，インスリン抵抗性，高血糖が改善することが報告されている．この機構として FXR がインスリンシグナルを活性化することや，グリコーゲン合成を抑制すること，さらに糖新生に関与する酵素（phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK; glucose-6-phosphatase, G6Pase）の発現を抑制することが報告されている.[40] その一方で，PEPCK の発現が上昇するとの異なる報告もされていることから，[45] FXR が糖代謝に与える影響については，今後さらなる検討が必要であると思われる．

これまで述べてきたように，FXR はコレステロール，脂質，リポプロテインや糖代謝を制御することから，動脈硬化に加え，生活習慣病の治療薬の

ターゲットとして注目されている．FXR のアゴニストが治療に有効であると考えられるが，実験によって異なる例も報告されており，今後の詳細な検討が期待される．

5. 核内受容体の AF-1 に関与するコファクター

核内受容体は構造と機能の特徴から A から F の 6 つの領域に分けられている（Fig. 5）．A/B 領域は，リガンドに依存しない恒常的な転写活性化能（AF-1）を有する領域である．C 領域は，核内受容体スーパーファミリーのなかで最も保存された領域であり，2 つの Zn フィンガーモチーフを持ち，DNA 配列への結合能を有する領域である．D 領域は，C 領域と後述の E/F 領域をつなぐヒンジ領域である．E/F 領域は，疎水性アミノ酸に富んだリガンド結合ポケットを形成しリガンド結合能を有する．またこの領域は，リガンド依存性の転写活性化能（AF-2）を有する領域である．AF-1 はリガンド非依存的であるが，リガンド未結合の状態では核内受容体は転写活性化能を持たないことから，AF-1 は AF-2 によって制御されていると考えられている．リガンドが結合することによって，核内受容体の AF-1, AF-2 の両方の転写活性化能が誘導されると考えられている．[1,10] そのため，核内受容体の転写制御メカニズムの解明には AF-1 及び AF-2 の解明が必要である．

核内受容体は，リガンドと結合すると HRE を認識し，それぞれの受容体特異的な標的遺伝子の転写を制御する．その転写制御には転写共役因子が必要であり，そのほとんどは複合体として機能する．この転写共役因子群は大きく 2 つの役割を持つ．1 つは，ヒストンを化学修飾（アセチル化，メチル化，リン酸化など）し，クロマチンの構造を変換することと，もう 1 つは核内受容体と基本転写因子（general transcription factors, GTFs）や RNA ポリメラーゼⅡ（RNA polymerase Ⅱ, pol Ⅱ）とを橋渡し，転写開始前複合体の形成を促進する役割である．転写共役因子群には転写を活性化するコアクチベーターと，転写を抑制するコリプレッサーがある．一般に，コリプレッサーはリガンド未結合の核内受容体に結合し，転写を抑制している．しかし，リガンドが核内受容体に結合すると，核内受容体の立体構造が変化し，コリプレッサーが解離し，コアクチベーターが結合する．そして，核内受容体の標的遺伝子の転写が促進される．核内受容体の転写制御に関与するコアクチベーターとコリプレッサーを Fig. 6 に示した．[6,46,47]

これまでに AF-2 に関与する転写共役因子が同定され，AF-2 を介した転写制御機構が解明されつつある．コアクチベーターとして Brahma（Brm），Brahma/SWI2-related gene 1（BRG1）や CREB

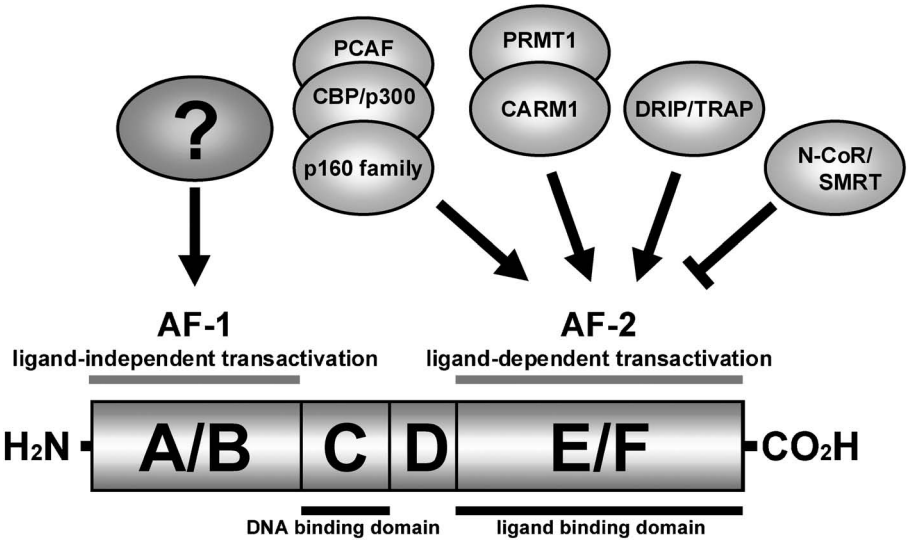

Fig. 5. Cofactors for AF-2 and AF-1

On the basis of structural and functional similarities, NRs are divided into A–F domains. NRs have two transcriptional regulatory functions, AF-1 and AF-2. AF-2 works by recruiting a large coactivator complex in a ligand-dependent fashion. Coactivators for the AF-1 activity are poorly understood, whereas coactivators required for the AF-2 activity have been well studied.

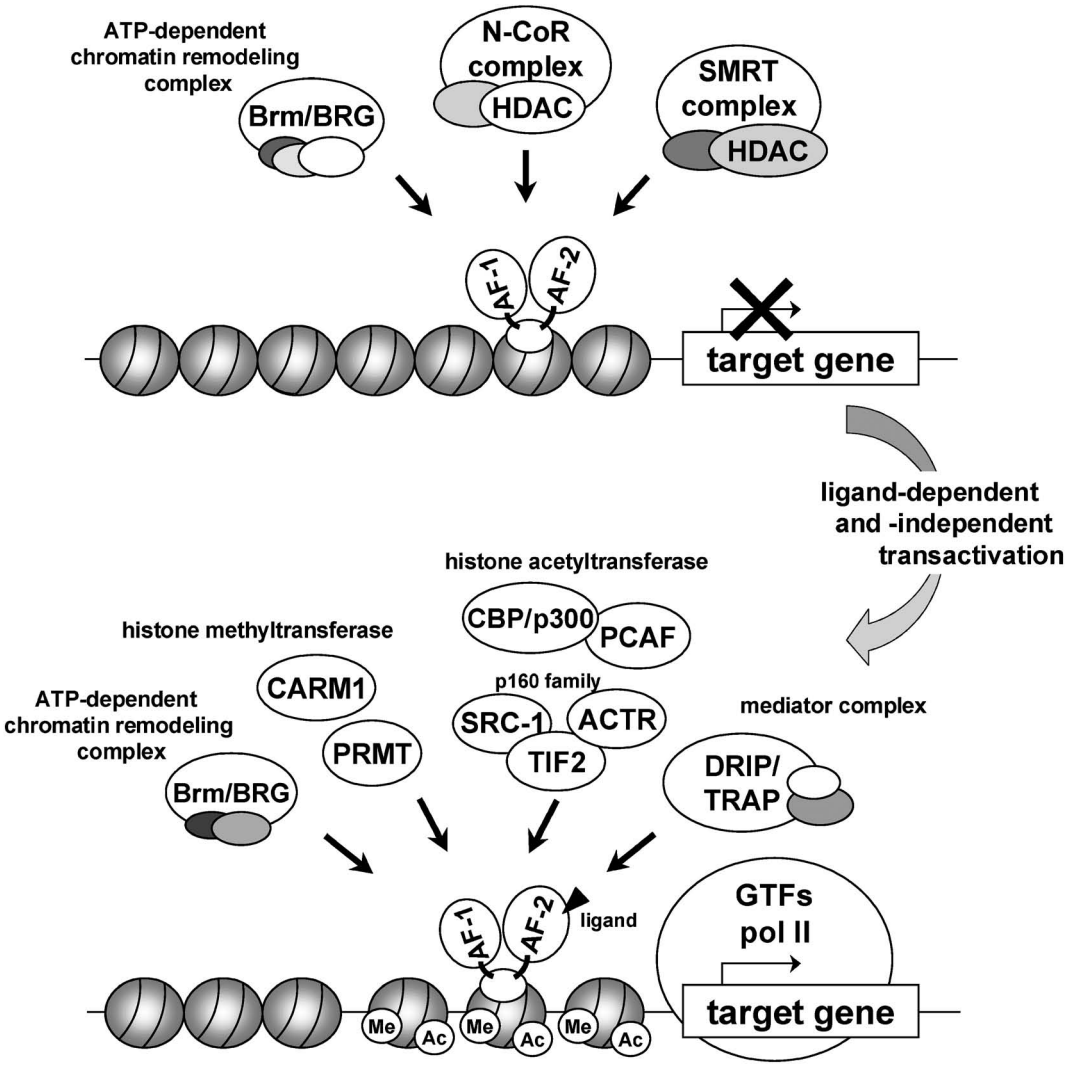

Fig. 6. Activation and Repression Function of Nuclear Receptor Regulated by Coactivators and Corepressors

Transcription mediated by NRs requires the recruitment of large corepressor or coactivator complexes for switching gene repression or expression. Corepressor complexes including Brm, BRG1, N-CoR and SMRT complexes are recruited to nuclear receptors and repress the transcription of target genes in the absence of ligand. Coactivator complexes including Brm/BRG, histone acetyltransferases, histone methyltransferases and DRIP/TRAP complex activate the transcription of target gene.

binding protein（CBP）, p300, p300/CBP-associated factor（PCAF）, p160 ファミリー（steroid receptor coactivator-1, SRC-1; transcriptional intermediary factor 2, TIF-2; activator of thyroid and retinoic acid receptors, ACTR）などが知られている．Brm/BRG は ATP 依存的にクロマチンの構造変換を引き起こす複合体（ATP 依存性クロマチンリモデリング因子）であり，転写活性化にも抑制化にも寄与する．CBP/p300, PCAF, SRC-1, ACTR は，ヒストンアセチル化酵素（histone acetyltransferase, HAT）活性を持つため，プロモーター領域のヒストンをアセチル化し，クロマチンの構造を弛緩させると考えられている．また，ヒストンメチル化活性を持つ coactivator-associated arginine methyltransferase 1（CARM1）, protein arginine methyltransferase 1（PRMT1）などもコアクチベーターとして機能する．CBP/p300, p160 ファミリーや CARM1 は，複合体を形成しクロマチンの構造を弛緩させることで，基本転写因子や pol Ⅱのプロモーター領域への結合を促進し，転写を活性化させると考えられている．その他，HAT 活性が見い出されていない vitamin D receptor interacting protein（DRIP）, thyroid hormone receptor associated protein（TRAP）複合体は，核内受容体と基本転写装置とを橋渡しすることで，転写開始前複合体の形成を促進していると考えられている．コリプレッサーとしては，

nuclear receptor corepressor (N-CoR), silencing mediator of retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT)などがある．N-CoR, SMRTはヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase, HDAC）と複合体を形成している．このHDACがヒストンを脱アセチル化し，クロマチンの構造を凝集させることによって，転写が抑制されると考えられている．[6,46,47]

一方，AF-1に関与する転写共役因子として，ERαなどのAF-1に関与するp68 RNA helicaseや，[48,49] ARのAF-1に関与するAR N-terminal domain transactivating protein-1,[50] breast cancer susceptibility gene 1,[51] cdk activating kinase[52]などがコアクチベーターとして同定されている．しかし，AF-1を介した転写制御はAF-2と比較して不明な点が多い（Fig. 5）．

6. FXRのAF-1に関与する領域と相互作用する因子

われわれは，AF-1に関与する転写制御因子を探索することで，AF-1を介した転写制御機構を明らかにし，さらにAF-2を含む核内受容体の転写制御機構を明らかにすることを目的としている．そこで，FXRのAF-1に関与する領域を含むA-C領域と相互作用する因子の探索を行った．FXRのA-C領域のglutathione S-transferase（GST）融合タンパク質とHeLa細胞核抽出液を用いたpull-down assay，及び相互作用するタンパク質を質量分析計により検出する方法を用いた．その結果，FXRのA-C領域に結合する因子として，DNA-dependent protein kinase catalytic subunit（DNA-PKcs），Ku80, Ku70が同定された．

DNA-PKcs, Ku80, Ku70はDNA-dependent protein kinase（DNA-PK）と呼ばれる複合体を形成する．DNA-PKはセリン／スレオニンキナーゼ型のPI 3-キナーゼ関連キナーゼファミリーの1つであり，Sp1, Oct-1, p53などの様々な転写因子のリン酸化やKu80, Ku70, DNA-PKcsをリン酸化することが報告されている（Table 4）．また，Ku80, Ku70はヘテロダイマーを形成して機能するだけではなく，Ku70は単独でも機能することが知られている．Ku80, Ku70は，ヘテロダイマーでリング状の構造を作り，DNAと結合する．[53] Ku80, Ku70は，DNA二本鎖開裂修復に関与するタンパク質として主に研究が進んでおり，DNA二本鎖開裂部のDNA末端部分に結合し，DNA-PKcsやDNAライゲースなどのDNA修復タンパク質をリクルートする機能を持っている．その他にもDNA-PKはV(D)J組換え，テロメアの維持，アポトーシス，転写など様々な現象に関与することが報告されている．[54-56]

Table 4. Properties of DNA-PK

触媒サブユニット	DNA-PKcs
活性化タンパク質	Ku70, Ku80
基質	
DNA修復関連因子	
Ku70, Ku80, DNA-PKcs, PARP-1, XRCC4, artemis, RPA	
転写因子	
PR, GR, Sp1, Oct-1, p53, c-Myc, c-Fos, c-Jun, TBP, TFⅡB, RNA polymeraseⅠ, Ⅱ	
転写共役因子	
TRBP	
ヒストン修飾因子	
HDAC3	
ヒストン	
H1, H2AX	

references：54-62).

このように，FXRに相互作用する因子として同定されたこれら3つの因子DNA-PKcs, Ku80, Ku70は，様々な機能を持つタンパク質である．これらが核内受容体を含めた転写因子の転写制御に関与することが知られている．核内受容体については，glucocorticoid receptor（GR），progesterone receptor（PR）やARの転写に関与することが報告されている．DNA-PKはGRやPRに相互作用し，これらの核内受容体をリン酸化する．[57,58] DNA-PKはGRを介したプロモーター活性を抑制することが報告されているが，[59] ARを介したプロモーターに対しては活性化することが報告されている．[60] また，DNA-PKは転写共役因子の制御も行っている．GR, thyroid hormone receptorやAP-1などの転写因子のコアクチベーターであるthyroid hormone receptor-binding protein（TRBP）をDNA-PKはリン酸化し，その機能を制御することが報告されている．[61] また，DNA-PKはコリプレッサーであるN-CoR/SMRTと相互作用し，その複合体中に含まれるHDAC3をリン酸化することによってHDACの

活性を制御することが示されている.[62] このようにDNA-PKの多岐に渡る機能の報告があることから，DNA-PKがFXRの転写制御に与える影響についても詳細な検討が必要である.

7. おわりに

FXRは胆汁酸をリガンドとする核内受容体であり，コレステロール，脂質及び糖代謝に関与するため，動脈硬化を始め，脂質異常症（高脂血症）や糖尿病などの生活習慣病の治療薬の標的分子としての研究が盛んに行われている．われわれは，核内受容体の転写活性化能機構のうち，未解明の部分が多いAF-1に着目し，FXRのAF-1に関与するA-C領域に相互作用する因子として，DNA-PKcs, Ku80, Ku70を同定した．これらの因子は，核内受容体を含む様々な転写因子の転写活性を制御する報告がなされている．今後，DNA-PKcs, Ku80, Ku70がFXRのAF-1を介した転写制御に与える影響についての検討が，FXRの転写制御機構の解明，さらには動脈硬化の創薬・治療の研究につながると期待される.

謝辞　本総説で紹介したわれわれの研究は，名古屋市立大学大学院薬学研究科・分子生物薬学分野において行われました．名古屋市立大学大学院薬学研究科，今川正良教授に篤く御礼申し上げます．また，研究を遂行するに当たって御指導を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科，長田茂宏准教授，西塚誠助教，並びに国本真明修士を始め，研究室の皆様に感謝致します.

REFERENCES

1) Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M., *Cell*, **83**, 835–839 (1995).
2) Cariou B., Staels B., *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**, 236–243 (2007).
3) Modica S., Moschetta A., *FEBS Lett.*, **580**, 5492–5499 (2006).
4) Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P., *Cell*, **59**, 477–487 (1989).
5) Tasset D., Tora L., Fromental C., Scheer E., Chambon P., *Cell*, **21**, 1177–1187 (1990).
6) Glass C. K., Rosenfeld M. G., *Genes Dev.*, **15**, 121–141 (2000).
7) Warnmark A., Treuter E., Wright A. P., Gustafsson J. A., *Mol. Endocrinol.*, **17**, 1901–1909 (2003).
8) Nuclear Receptors Nomenclature Committee, *Cell*, **16**, 161–163 (1999).
9) Gronemeyer H., Gustafsson J. A., Laudet V., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 950–964 (2004).
10) Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 685–704 (2006).
11) Makishima M., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 177–183 (2005).
12) Chawla A., Repa J. J., Evans R. M., Mangelsdorf D.J., *Science*, **294**, 1866–1870 (2001).
13) Forman B. M., Goode E., Chen J., Oro A. E., Bradley D. J., Perlmann T., Noonan D. J., Burka L. T., McMorris T., Lamph W. W., Evans R. M., Weinberger C., *Cell*, **81**, 687–693 (1995).
14) Makishima M., Okamoto A. Y., Repa J. J., Tu H., Learned R. M., Luk A., Hull M. V., Lustig K. D., Mangelsdorf D. J., Shan B., *Science*, **284**, 1362–1365 (1999).
15) Parks D. J., Blanchard S. G., Bledsoe R. K., Chandra G., Consler T. G., Kliewer S. A., Stimmel J. B., Willson T. M., Zavacki A. M., Moore D. D., Lehmann J. M., *Science*, **284**, 1365–1368 (1999).
16) Maloney P. R., Parks D. J., Haffner C. D., Fivush A. M., Chandra G., Plunket K. D., Creech K. L., Moore L. B., Wilson J. G., Lewis M. C., Jones S. A., Willson T. M., *J. Med. Chem.*, **43**, 2971–2974 (2000).
17) Chiang J. Y., *Endocr. Rev.*, **23**, 443–463 (2002).
18) Goodwin B., Jones S. A., Price R. R., Watson M. A., McKee D. D., Moore L. B., Galardi C., Wilson J. G., Lewis M. C., Roth M. E., Maloney P. R., Willson T. M., Kliewer S. A., *Mol. Cell*, **6**, 517–526 (2000).
19) Lu T. T., Makishima M., Repa J. J., Schoonjans K., Kerr T. A., Auwerx J., Mangelsdorf D. J., *Mol. Cell*, **6**, 507–515 (2000).
20) del Castillo-Olivares A., Gil G., *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3587–3593 (2000).
21) Ananthanarayanan M., Balasubramanian N., Makishima M., Mangelsdorf D. J., Suchy F.

J., *J. Biol. Chem.*, **276**, 28857–28865 (2001).
22) Kast H. R., Goodwin B., Tarr P. T., Jones S. A., Anisfeld A. M., Stoltz C. M., Tontonoz P., Kliewer S., Willson T. M., Edwards P. A., *J. Biol. Chem.*, **277**, 2908–2915 (2002).
23) Denson L. A., Sturm E., Echevarria W., Zimmerman T. L., Makishima M., Mangelsdorf D. J., Karpen S. J., *Gastroenterology*, **121**, 140–147 (2001).
24) Pircher P. C., Kitto J. L., Petrowski M. L., Tangirala R. K., Bischoff E. D., Schulman I. G., Westin S. K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 27703–27711 (2003).
25) Song C. S., Echchgadda I., Baek B. S., Ahn S. C., Oh T., Roy A. K., Chatterjee B., *J. Biol. Chem.*, **276**, 42549–42556 (2001).
26) Grober J., Zaghini I., Fujii H., Jones S. A., Kliewer S. A., Willson T. M., Ono T., Besnard P., *J. Biol. Chem.*, **274**, 29749–29754 (1999).
27) Landrier J. F., Eloranta J. J., Vavricka S. R., Kullak-Ublick G. A., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **290**, G476–G485 (2006).
28) Neimark E., Chen F., Li X., Shneider B. L., *Hepatology*, **40**, 149–156 (2004).
29) Lusis A. J., *Nature*, **407**, 233–241 (2000).
30) Bell G. D., Lewis B., Petrie A., Dowling R. H., *Br. Med. J.*, **3**, 520–523 (1973).
31) Bateson M. C., Maclean D., Evans J. R., Bouchier I. A., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **5**, 249–254 (1978).
32) Angelin B., Einarsson K., Hellstrom K., Leijd B., *J. Lipid Res.*, **19**, 1017–1024 (1978).
33) Watanabe M., Houten S. M., Wang L., Moschetta A., Mangelsdorf D. J., Heyman R. A., Moore D. D., Auwerx J., *J. Clin. Invest.*, **113**, 1408–1418 (2004).
34) Bilz S., Samuel V., Morino K., Savage D., Choi C. S., Shulman G. I., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **290**, E716–E722 (2006).
35) Sinal C. J., Tohkin M., Miyata M., Ward J. M., Lambert G., Gonzalez F. J., *Cell*, **102**, 731–744 (2000).
36) Urizar N. L., Dowhan D. H., Moore D. D., *J. Biol. Chem.*, **275**, 39313–39317 (2000).
37) Kast H. R., Nguyen C. M., Sinal C. J., Jones S. A., Laffitte B. A., Reue K., Gonzalez F. J., Willson T. M., Edwards P. A., *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1720–1728 (2001).
38) Claudel T., Inoue Y., Barbier O., Duran-Sandoval D., Kosykh V., Fruchart J., Fruchart J. C., Gonzalez F. J., Staels B., *Gastroenterology*, **125**, 544–555 (2003).
39) Lambert G., Amar M. J., Guo G., Brewer Jr. H. B., Gonzalez F. J., Sinal C. J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 2563–2570 (2003).
40) Zhang Y., Lee F. Y., Barrera G., Lee H., Vales C., Gonzalez F. J., Willson T. M., Edwards P. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1006–1011 (2006).
41) Moschetta A., Bookout A. L., Mangelsdorf D. J., *Nat. Med.*, **10**, 1352–1358 (2004).
42) Urizar N. L., Liverman A. B., Dodds D. T., Silva F. V., Ordentlich P., Yan Y., Gonzalez F. J., Heyman R. A., Mangelsdorf D. J., Moore D. D., *Science*, **296**, 1703–1706 (2002).
43) Burris T. P., Montrose C., Houck K. A., Osborne H. E., Bocchinfuso W. P., Yaden B. C., Cheng C. C., Zink R. W., Barr R. J., Hepler C. D., Krishnan V., Bullock H. A., Burris L. L., Galvin R. J., Bramlett K., Stayrook K. R., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 948–954 (2005).
44) Duran-Sandoval D., Mautino G., Martin G., Percevault F., Barbier O., Fruchart J. C., Kuipers F., Staels B., *Diabetes*, **53**, 890–898 (2004).
45) Stayrook K. R., Bramlett K. S., Savkur R. S., Ficorilli J., Cook T., Christe M. E., Michael L. F., Burris T. P., *Endocrinology*, **146**, 984–991 (2005).
46) McKenna N. J., O'Malley B. W., *Cell*, **108**, 465–474 (2002).
47) Rosenfeld M. G., Lunyak V. V., Glass C. K., *Genes Dev.*, **20**, 1405–1428 (2006).
48) Endoh H., Maruyama K., Masuhiro Y., Kobayashi Y., Goto M., Tai H., Yanagisawa J., Metzger D., Hashimoto S., Kato S., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5363–5372 (1999).
49) Watanabe M., Yanagisawa J., Kitagawa H., Takeyama K., Ogawa S., Arao Y., Suzawa M., Kobayashi Y., Yano T., Yoshikawa H., Masuhiro Y., Kato S., *EMBO J.*, **20**, 1341–1352 (2001).
50) Zhao Y., Goto K., Saitoh M., Yanase T., Nomura M., Okabe T., Takayanagi R., Nawata H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 30031–30039 (2002).

51) Park J. J., Irvine R. A., Buchanan G., Koh S. S., Park J. M., Tilley W. D., Stallcup M. R., Press M. F., Coetzee G. A., *Cancer Res.*, **60**, 5946–5949 (2000).
52) Lee D. K., Duan H. O., Chang C., *J. Biol. Chem.*, **275**, 9308–9313 (2000).
53) Spagnolo L., Rivera-Calzada A., Pearl L. H., Llorca O., *Mol. Cell*, **22**, 511–519 (2006).
54) Smith G. C., Jackson S. P., *Genes Dev.*, **13**, 916–934 (1999).
55) Dip R., Naegeli H., *FASEB J.*, **19**, 704–715 (2005).
56) Downs J. A. Jackson S. P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 367–378 (2004).
57) Weigel N. L., Carter T. H., Schrader W. T., O'Malley B. W., *Mol. Endocrinol.*, **6**, 8–14 (1992).
58) Giffin W., Kwast-Welfeld J., Rodda D. J., Prefontaine G. G., Traykova-Andonova M., Zhang Y., Weigel N. L., Lefebvre Y. A., Hache R. J., *J. Biol. Chem.*, **272**, 5647–5658 (1997).
59) Giffin W., Torrance H., Rodda D. J., Prefontaine G. G., Pope L., Hache R. J., *Nature*, **380**, 265–268 (1996).
60) Mayeur G. L., Kung W. J., Martinez A., Izumiya C., Chen D. J., Kung H. J., *J. Biol. Chem.*, **280**, 10827–10833 (2005).
61) Ko L., Cardona G. R., Chin W. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 6212–6217 (2000).
62) Jeyakumar M., Liu X. F., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Bagchi M. K., *J. Biol. Chem.*, **282**, 9312–9322 (2007).