

生理的な薬物代謝酵素発現レベルの変動機構の解明を目指した核内受容体による 遺伝子発現調節機構に関する研究

吉成 浩一

Roles of Nuclear Receptors in the Gene Expression of Drug-metabolizing Enzymes under Various Physiological Conditions

Kouichi YOSHINARI

Department of Pharmaco-Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka City 422-8526, Japan

(Received February 27, 2006)

The nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR), a key transcription factor for the expression of cytochrome P450 (CYP) 2B genes, resides in the cytoplasm under untreated conditions and translocates into the nucleus upon xenobiotic exposure. CAR forms a multiprotein complex including heat shock protein 90 in the cytoplasm as the glucocorticoid receptor, and it is likely that protein phosphatase 2A plays a critical role in the first step of CAR nuclear translocation. In addition to the xenobiotic induction of CYP2Bs, our recent studies have indicated that CAR is important for sex and strain differences and obesity/diabetes-associated changes in the expression of CYP2B genes. These results have raised the hypothesis that the expression of nuclear receptors varies depending on the physiologic condition, leading to the dysregulation of CYP expression. In obese mice fed a high-fat diet, however, hepatic CYP3A levels are drastically decreased without any significant changes in the expression of nuclear receptors including the pregnane X receptor and hepatocyte nuclear factor-4, which are known to be key transcription factors in the expression of CYP3A genes. These results indicate that it is important to investigate the mechanism of the transcriptional regulation of nuclear receptor genes as well as the activation of nuclear receptors to understand the CYP expression system fully.

Key words—cytochrome P450; nuclear receptor; constitutive androstane receptor; model animal; nuclear translocation; obesity

1. はじめに

代表的なチトクロム P450 (CYP) 誘導剤である phenobarbital (PB) や dexamethasone (DEX) は、CYP2B 並びに CYP3A サブファミリー酵素を誘導することが知られていたが、その分子機構は長らく不明であった。しかし、1998 年に核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) と pregnane X receptor (PXR) がそれぞれ CYP2B 並びに CYP3A 遺伝子の薬物応答性転写活性化に重要な役割を果たしていることが報告され、^{1,2)} その機構の一端が明らかにされてきた。また CAR や PXR が同定された

ことは、CYP だけではなく第 II 相酵素や薬物トランスポーターの転写調節機構の解明にも大きく寄与するものであった。^{3–6)}

一般に、核内受容体はその分子内に DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインを有しており、リガンド結合により活性化されてホモあるいはヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーター DNA に結合することでその転写を調節する。CAR と PXR は共に retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成するが、薬物による活性化機構は非常に異なっている。すなわち、PXR は DEX などのリガンド結合により活性化されるのに対し、CAR は他の核内受容体とは異なり、リガンドの有無に関わらず常に活性化状態にあり、^{7,8)} その転写活性は薬物応答性の細胞質から核内への局在変化により制御されている。^{9,10)} 本稿ではまず初めにこの CAR 核内移行メカニズムについて、筆者らの研究成果¹¹⁾と最

静岡県立大学薬学部臨床薬品学教室 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

現住所: 東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: kyoshina@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

近の知見を基に紹介する。

肝 CYP レベルは、薬物や環境汚染物質など外来性化合物の曝露によって変動するだけでなく、性、年齢、栄養状態、疾病といった様々な生理的要因によっても影響を受けることが知られている。しかし、薬物による酵素誘導には核内受容体が重要な役割を果たしていることが示されているのに対し、生理変化に伴う構成的 CYP レベルの変動メカニズムについては明らかとなっていない。筆者らはこれらの発現調節機構における核内受容体の寄与について、様々なモデル動物を用いて検討を行っているが、本稿ではそのうち CYP2B 発現の性差・種差や肥満・糖尿病時の変動における CAR の役割について、^{12,13)} また食餌性肥満に伴う CYP 発現変動と核内受容体の関連性について¹⁴⁾ 紹介する。

2. 核内受容体 CAR の細胞質複合体の性状解析

CAR と同様に薬物に応答して細胞質から核内へ移行する核内受容体として glucocorticoid receptor (GR) が知られている。GR は通常 heat shock protein 90 (HSP90) やイムノフィリン様タンパク質と複合体を形成して細胞質に留まっており、リガンドが結合すると GR の構造変化が起こり、核移行シグナルが露出するため核内へ移行すると考えられている。^{15,16)} この GR の核移行はプロテインフォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸により阻害されることが報告されていたが、^{17,18)} PB による CYP2B 誘導もオカダ酸により阻害されることが既に報告されており、^{19,20)} また筆者が在籍していた根岸博士の研究室は、オカダ酸が CAR の核内移行も阻害することを明らかにしていた。⁹⁾ これら知見から、CAR は細胞質において GR と類似した複合体を形成しているとの作業仮説を立て、その性状解析を行った。¹¹⁾ マウス初代肝培養細胞を HSP90 阻害剤であるゲルダナマイシンで処理したところ、マウス CAR 活性化剤である 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene による CAR の核内移行や CYP2B10 mRNA レベルの上昇が阻害されたことから、CAR の核内移行に HSP90 の関与が示唆された。¹¹⁾ ついで、マウス肝細胞質画分を試料としてカラムクロマトグラフィー並びに生化学的、免疫化学的手法により CAR 複合体の構成分子について解析を進めたところ、CAR は細胞質では HSP90 を含む 400 kDa 以上の高分子複合体として存在しており、PB 処理によりプロテ

インフォスファターゼ PP2A がこの複合体にリクルートされることが明らかとなった。¹¹⁾ また、PP2A は CAR 複合体だけではなく GR 複合体中にも存在していた。その後、根岸博士のグループにより、CAR 複合体中に含まれるイムノフィリン様タンパク質 cytoplasmic CAR retention protein (CCRP) が同定され、この CCRP が CAR を細胞質中に留めておくために重要であることが示された。²¹⁾ 以上の結果より、CAR は GR と非常に類似した細胞質複合体を形成しており、その核内移行には PP2A による脱リン酸化反応が重要であることが明らかとなった (Fig. 1)。

3. CYP2B 発現レベルの性差・系統差と CAR

げっ歯類では肝 CYP の発現レベルにしばしば性差や種差、系統差が認められる。CYP2B サブファミリー酵素も例外ではなく、特に Wistar Kyoto (WKY) ラットでは F344 ラットに比べて構成的発現並びに PB 誘導性が雌で顕著に低下していることが Jefcoate らのグループにより報告されていた。^{22,23)} げっ歯動物における CYP レベルの性差には成長ホルモンの分泌パターンの性差が重要であると考えられているが、²⁴⁾ 筆者らはこの性差及び系統差における CAR の寄与を解析した。¹²⁾ WKY 及び F344 ラットに PB を投与し、肝 CYP2B1 mRNA レベルをノーザンブロットにより測定したところ、雌性 WKY ラットでは CYP2B1 誘導がほとんど認められないことが確認された。CAR は CYP2B 遺伝子のプロモーター領域に存在する PB 応答配列モジュール PBREM に結合して転写を活性化することが知られているので、^{1,25)} 次に *in vivo* レポーターアッセイを用いて、これらラットの肝臓における PBREM 活性化能を測定した。その結果、雌性 WKY ラットでは PB による PBREM 活性化が起こらないことが示された。¹²⁾ また、このラットでは PB を投与しても CAR の核内含量は増加しなかった。¹²⁾ そこで、雌性 WKY ラットでは CAR の核内移行に障害があるのか、あるいは CAR 発現量が低下しているのかを明らかにするため、肝細胞総抽出液と細胞質画分中の CAR タンパク質含量並びに CAR mRNA レベルを測定した。その結果、雌性 WKY ラットの CAR mRNA レベルは雄性 WKY ラットよりも若干低かったが、その差は F344 ラットの場合と同程度であったのに対し、細胞質中の

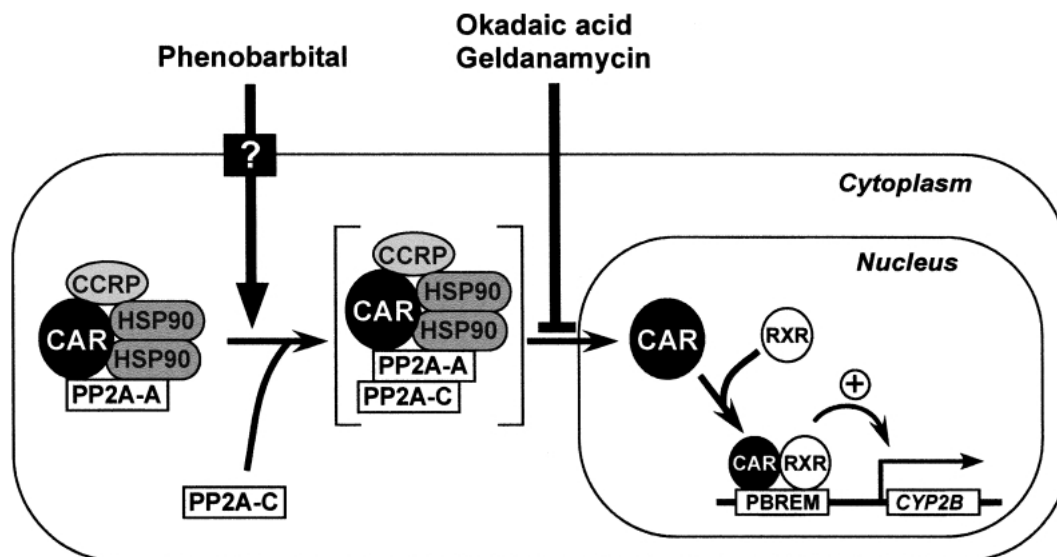


Fig. 1. Proposed Mechanism for PB-induced CAR Nuclear Translocation

In the cytoplasm, CAR forms a multi-protein complex including HSP90 and CCRP. PB treatment recruits PP2A catalytic subunit to the complex and translocates CAR into the nucleus. Then, CAR heterodimerizes with RXR and transactivates the expression of CYP2B genes by binding to the PB-responsive enhancer module (PBREM).

CAR 含量には両系統間で顕著な差が認められ、WKY ラットでは雄に比べ雌で著しく低いことが明らかとなった。¹²⁾ 以上の結果より、雌性 WKY ラットの肝では未知の転写後調節メカニズムにより細胞内の CAR タンパク質レベルが絶対的に低下しており、そのため CYP2B 遺伝子の発現が低下していると考えられた (Table 1)。

4. 遺伝的肥満ラット肝における CYP2B 発現低下と CAR

雌性 WKY ラットに加えて、レプチン受容体に変異を有し遺伝的肥満動物として広く用いられている Zucker 肥満 (*fa/fa*) ラットの肝においても CYP2B 発現レベルが低下していることが報告されていた。^{26,27)} そこで筆者らはこれら動物における CYP2B と CAR の発現レベルの関連性についても解析を行った。¹³⁾ まず逆転写 PCR により肝 CYP2B1/2B2 mRNA レベルを測定したところ、Zucker 肥満ラットでは、構成的な CYP2B2 mRNA レベルが対照ラットに比べて低く、また PB による CYP2B1/2B2 誘導性も低下していることが確認された。次に先ほどと同様に CAR の mRNA レベル、核内及び総細胞抽出液中のタンパク質含量を測定した。その結果、Zucker 肥満ラットでは対照ラットに比べて CAR mRNA レベルが低く、それに伴い細胞中の CAR タンパク質レベルも低く、その

Table 1. CAR is a Regulatory Factor for the Sexual Dimorphic Induction of CYP2B1 Gene in WKY Rat

	F344		WKY	
	Male	Female	Male	Female
CYP2B1 induction	###*	##	##	+
PBREM activation	++	++	##	-
CAR nuclear translocation	##	++	++	±
Total CAR protein level	##	##	++	±
CAR mRNA level	##	++	##	++

* ##, ++, +, ±, -: relative intensity/level with “##” being the highest and “-” being the lowest.

ため PB を投与しても核内 CAR レベルの増加もまた起こらないことが明らかとなった (Table 2)。¹³⁾

以上、雌性 WKY ラットと Zucker 肥満ラットの肝では、そのメカニズムは異なるもののいずれにおいても CAR タンパク質レベルが著しく低く、そのため CYP2B の構成的発現や PB 誘導性が低下していることを明らかにすることができた。これらの結果は、CAR は外来性化合物による CYP2B 誘導だけではなく、性差や系統差、あるいは生理状態の変化に伴う CYP2B 発現レベルの変動にも重要であることを示している。PB による CYP2B 誘導の性差に関しては成長ホルモンや性ホルモンの関与が古くから知られていることから、²⁸⁻³¹⁾ これらホルモンと CAR による転写調節機構にクロストークが存在

するのか、あるいはこれらホルモンにより CAR の発現が制御されているのかなどが今後の研究課題になると思われる。

5. 食餌性肥満動物肝における CYP と核内受容体

他の肥満モデル動物においても Zucker 肥満ラットで認められた現象が起こっているか否かを検討するため、Zucker 肥満ラットと同様にレプチン受容体に変異を有する *db/db* マウスの肝における CYP や核内受容体の発現パターンを解析したところ、Zucker ラットの場合とは逆に CYP2B や CAR の発現レベルは対照マウスに比べて肥満マウスで高かった (論文投稿中)。そこで次に、ヒトの生理状態をより反映していると考えられる食餌性肥満モデル動物を用いて解析を行った。¹⁴⁾ 肥満モデル動物は雄性マウスにラードを多量に含む高脂肪食を 5 週間与えることにより作製した。肥満マウスの体重は対照マウスの約 1.2 倍であり、白色脂肪組織量の増加や肝細胞への中性脂肪の蓄積が認められた。¹⁴⁾ これらのマウスの肝 CYP 分子種発現パターンを解析したところ、CYP3A が mRNA 及びタンパク質レベルで顕著に低下していた。¹⁴⁾ しかし、この肥満マウスに DEX を投与すると、CYP3A レベルは対照マウスと同程度上昇し、薬物による誘導性には変化は認め

られなかった。¹⁴⁾ また、組成の異なる他の高脂肪食を用いた場合にも肝 CYP3A レベルの低下は認められたが、視床下部破壊薬であるゴールドチオグルコース^{32,33)} を投与し、高脂肪食を使用しない中枢性の肥満を誘発したマウスでは、そのような変動は認められず、*db/db* マウスと同様に CYP2B レベルの上昇が認められた。¹⁴⁾ これらの結果は、食餌性肥満マウスで認められた肝 CYP3A レベルの低下は高脂肪食の摂取と関連していることを示唆している。CYP3A 遺伝子の発現調節には核内受容体 PXR, CAR, hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) や chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor などの関与が報告されていることから、³⁴⁻³⁸⁾ 次にこれら転写調節因子の発現レベルを測定した。しかしながら、これら核内受容体レベルには肥満に伴う顕著な変動は認められず、¹⁴⁾ 雌性 WKY ラットや Zucker 肥満ラットの場合とは異なり、核内受容体レベルで CYP 分子種の発現変動を説明することができなかった (Table 3)。

6. おわりに

核内受容体 CAR の同定により、CYP2B 遺伝子の発現調節機構の理解は急激に深まった。CAR は他の核内受容体とは異なり、リガンド結合ではなく核内移行によりその転写活性が制御されていることが明らかとなったことから、筆者らは CAR の薬物応答性核内移行の極初期の段階の分子メカニズムの解明を試みた。その結果、CAR は細胞質で HSP90 などと複合体を形成しており、薬物による CAR の核内移行には HSP90 活性が必要であること、また PB に応答して CAR 複合体に PP2A がリクルートされ、脱リン酸化反応が核内移行に必要であることが明らかとなった (Fig. 1)。しかしながら、PP2A の標的分子はいまだに不明であり、CAR 核内移行における PP2A の役割については十分解明されて

Table 2. Expression of CYP2B and CAR is Coordinately Attenuated in the Liver of Obese (*fa/fa*) Zucker Rats

	Lean	Obese
Constitutive expression of CYP2B2	###*	+
PB induction of CYP2B1/2B2	##	+
CAR mRNA level	##	+
Total CAR protein level	##	+
CAR nuclear translocation	##	##

* ##, #, +: relative intensity/level with “##” being the highest and “+” being the lowest.

Table 3. Changes in the Expression of Hepatic CYPs in Various Obese Animals

Model animal	Changes in CYPs	Changes in NRs
Zucker (<i>fa/fa</i>) rat	CYP2B/3A ↓↓	CAR ↓↓
<i>db/db</i> mouse	CYP2B/4A ↑↑	CAR, PXR ↑
High-fat diet-induced obese mouse	CYP3A ↓↓*; CYP2C ↓	CAR, PXR, HNF-4⇒
GTG-induced obese mouse	CYP1A2 ↓; CYP2B/4A ↑↑	Not determined

* CYP3A induction by dexamethasone is not affected by obesity. ↑: up-regulated, ↓: down-regulated, ⇒: not changed. NR: nuclear receptor, GTG: gold thioglucose.

いない。PBはCARに結合せずに核内移行を引き起こすことから^{25,39)} PBによるCARの活性化には何らかの細胞内情報伝達経路が関与している可能性が考えられる。したがって、PP2A標的分子の同定は、PBによるCYP2B誘導における極初期の分子メカニズムを解明する上で非常に重要であると思われる。一方で、PP2AはGR複合体中にも含まれていたことから、核内移行を示す核内受容体に共通した作用を有している可能性も否定できない。本研究では筆者らはさらに、内因性要因によるCYP発現変動における核内受容体の役割についてCYP2BとCARに着目して解析を進めた。その結果、これまでメカニズムがよく分かっていなかった性差や系統差、あるいは病態に伴うCYP発現レベルの変動に関しても、一部は核内受容体レベルで説明可能であることを明らかにすることができた (Tables 1, 2)。今後はCARやPXRなど転写因子自身の発現調節機構について解析を進め、これら遺伝子の発現が内因性因子によってどのように制御されているのか、核内受容体と内因性因子による転写調節機構にクロストークが存在するのかなどについて解明する必要があると思われる。また、本研究成果は、薬物による*in vivo*でのCYP誘導機構を理解するためには、核内受容体活性化能だけではなく、核内受容体の遺伝子発現に対する影響に関しても検討する必要があることを示している。最後に、食餌性肥満マウスの肝では転写調節因子の変動を伴わないCYP3Aの発現低下が起こることを紹介した (Table 3)。現在このメカニズムに関して研究を進めているが、ヒトCYP3Aは半数以上の医薬品の代謝に関与する酵素であり、その発現レベルには遺伝的要因では説明不可能な大きな個人差が存在することが知られている。したがって、本モデルマウスを用いた解析で得られる知見は臨床上の観点からも有用であると考えている。

謝辞 本研究の遂行にあたりご指導とご鞭撻を賜りました静岡県立大学薬学部教授三輪匡男先生並びに米国国立環境保健科学研究所遺伝薬理学部門長根岸正彦先生に心より感謝致します。また、共同研究者の米国国立環境保健科学研究所末吉達也博士、静岡県立大学薬学部助教授菅谷純子博士をはじめ、本研究を遂行するにあたり多大なご協力を頂きまし

た静岡県立大学薬学部臨床薬品学教室並びに米国国立環境保健科学研究所遺伝薬理学部門のスタッフ、卒業生、在校生の方々に感謝致します。

REFERENCES

- 1) Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T., Negishi M., *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5652–5658 (1998).
- 2) 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., *Cell*, **92**, 73–82 (1998).
- 3) Sugatani J., Kojima H., Ueda A., Kakizaki S., Yoshinari K., Gong Q. H., Owens I. S., Negishi M., Sueyoshi T., *Hepatology*, **33**, 1232–1238 (2001).
- 4) Sonoda J., Xie W., Rosenfeld J. M., Barwick J. L., Guzelian P. S., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 13801–13806 (2002).
- 5) Xie W., Yeuh M. F., Radomska-Pandya A., Saini S. P., Negishi Y., Bottroff B. S., Cabrera G. Y., Tukey R. H., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 4150–4155 (2003).
- 6) Wang H., LeCluyse E. L., *Clin. Pharmacokinetics*, **42**, 1331–1357 (2003).
- 7) Baes M., Gulick T., Choi H. S., Martinoli M. G., Simha D., Moore D. D., *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1544–1552 (1994).
- 8) Choi H. S., Chung M., Tzamelis I., Simha D., Lee Y. K., Seol W., Moore D. D., *J. Biol. Chem.*, **272**, 23565–23571 (1997).
- 9) Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I., Moore R., Washburn K., Negishi M., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6318–6322 (1999).
- 10) Zelko I., Sueyoshi T., Kawamoto T., Moore R., Negishi M., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2838–2846 (2001).
- 11) Yoshinari K., Kobayashi K., Moore R., Kawamoto T., Negishi M., *FEBS Lett.*, **548**, 17–20 (2003).
- 12) Yoshinari K., Sueyoshi T., Moore R., Negishi M., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 278–284 (2001).
- 13) Xiong H., Yoshinari K., Brouwer K. L. R., Negishi M., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 918–923 (2002).
- 14) Yoshinari K., Takagi S., Yoshimasa T., Sugatani J., Miwa M., *Pharm. Res.*, (2006)

- (in press).
- 15) Pratt W. B., Czar M. J., Stancato L. F., Owens J. K., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **46**, 269–279 (1993).
 - 16) Pratt W. B., Silverstein A. M., Galigniana M. D., *Cell Signal.*, **11**, 839–851 (1999).
 - 17) DeFranco D. B., Qi M., Borrer K. C., Garabedian M. J., Brautigan D. L., *Mol. Endocrinol.*, **5**, 1215–1228 (1991).
 - 18) Galigniana M. D., Housley P. R., DeFranco D. B., Pratt W. B., *J. Biol. Chem.*, **274**, 16222–16227 (1999).
 - 19) Sidhu J. S., Omiecinski C. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 1122–1129 (1997).
 - 20) Honkakoski P., Negishi M., *Biochem. J.*, **330**, 889–895 (1998).
 - 21) Kobayashi K., Sueyoshi T., Inoue K., Moore R., Negishi M., *Mol. Pharmacol.*, **64**, 1069–1075 (2003).
 - 22) Larsen M. C., Brake P. B., Parmar D., Jefcoate C. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 24–34 (1994).
 - 23) Larsen M. C., Jefcoate C. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **321**, 467–476 (1995).
 - 24) Wiwi C. A., Waxman D. J., *Growth Factors*, **22**, 79–88 (2004).
 - 25) Sueyoshi T., Kawamoto T., Zelko I., Honkakoski P., Negishi M., *J. Biol. Chem.*, **274**, 6043–6046 (1999).
 - 26) Blouin R. A., Bandyopadhyay A. M., Chaudhary I., Robertson L. W., Gemzik B., Parkinson A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 313–320 (1993).
 - 27) Zannikos P. N., Bandyopadhyay A. M., Robertson L. W., Blouin R. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1565–1570 (1994).
 - 28) Yamazoe Y., Shimada M., Murayama N., Kato R., *J. Biol. Chem.*, **262**, 7423–7428 (1987).
 - 29) Honkakoski P., Kojo A., Lang M. A., *Biochem. J.*, **285**, 979–983 (1992).
 - 30) Shapiro B. H., Pampori N. A., Lapenson D. P., Waxman D. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 234–239 (1994).
 - 31) Nemoto N., Sakurai J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 286–292 (1995).
 - 32) Marshall N. B., Barrnett R. J., Mayer J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 240–244 (1955).
 - 33) Debons A. F., Krinsky I., Maayan M. L., Fani K., Jemenez F. A., *Fed. Proc.*, **36**, 143–147 (1977).
 - 34) Miyata M., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 71–79 (1995).
 - 35) Goodwin B., Hodgson E., Liddle C., *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1329–1339 (1999).
 - 36) Huss J. M., Wang S. I., Kasper C. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **372**, 321–332 (1999).
 - 37) Goodwin B., Hodgson E., D’Costa D. J., Robertson G. R., Liddle C., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 359–365 (2002).
 - 38) Tirona R. G., Lee W., Leake B. F., Lan L. B., Cline C. B., Lamba V., Parviz F., Duncan S. A., Inoue Y., Gonzalez F. J., Schuetz E. G., Kim R. B., *Nat. Med.*, **9**, 220–224 (2003).
 - 39) Moore L. B., Parks D. J., Jones S. A., Bledsoe R. K., Consler T. G., Stimmel J. B., Goodwin B., Liddle C., Blanchard S. G., Willson T. M., Collins J. L., Kliewer S. A., *J. Biol. Chem.*, **275**, 15122–15127 (2000).