

## 綜 説

## 甲状腺ホルモン核受容体の構造と機能

櫻 井 晃 洋

信州大学医学部老年医学教室

## Structure and Function of Thyroid Hormone Nuclear Receptors

Akihiro SAKURAI

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,  
Shinshu University School of Medicine**Key words:** thyroid hormone receptor, gene expression, thyroid hormone resistance, mutation, gene analysis

甲状腺ホルモン受容体, 遺伝子発現, 甲状腺ホルモン不応症, 変異, 遺伝子解析

## はじめに

甲状腺ホルモンは脊椎動物の成長, 発達, 種々の代謝活性にきわめて重要な役割を担っており, こうしたホルモン作用はおもに細胞核内にある甲状腺ホルモン受容体を介している<sup>1)</sup>。歴史的には1972年, Oppenheimer ら<sup>2)</sup>によりラットの細胞核に  $T_3$  と高い親和性を有する蛋白が発見され, またこの蛋白は下垂体, 肝, 腎といった甲状腺ホルモンの標的臓器に多く分布していた。その後, この蛋白- $T_3$  受容体を精製する試みが十余年にわたって多くのグループにより続けられてきたが, 組織内の受容体蛋白がきわめて微量であることや, 精製中に容易に失活することなどから困難を極め, 最も高い純度のものでも4kgのラット肝から最終的に数%の純度の蛋白を約10 $\mu$ g 得られたに過ぎない<sup>3)</sup>。

こうした状況を一気に打破し, この分野に飛躍的な進展をもたらしたのは, 今日分子生物学の進歩であった。1985年 Hollenberg ら<sup>4)</sup>によりグルコルチコイド受容体 (GR) の cDNA がクローニングされた。興味深いことには GR 蛋白の構造が, トリに赤芽球症を誘発するウイルス (avian erythroblastosis virus) がもつ癌遺伝子のうちの1つである *v-erbA* のそれに酷似していた<sup>5)</sup>。その後わずか2年ほどの間に次々と

ステロイドホルモン<sup>6)-9)</sup>, ビタミン D<sup>10)</sup>, 甲状腺ホルモン<sup>11)-13)</sup> およびレチノール酸<sup>14)-16)</sup> の受容体 cDNA がクローニングされた。これらはいずれも *v-erbA* と構造的に類似しており, 現在では *erbA* superfamily として分類されている<sup>17)18)</sup> (Fig. 1)。これらホルモン受容体のほか, 結合するリガンドが不明な遺伝子 (orphan receptor) も数多くクローニングされており<sup>19)-21)</sup>, *erbA* superfamily の総数は現在も増えつつある。本稿では, まず *erbA* superfamily に共通する構造的特徴について概括したのち, 甲状腺ホルモン受容体に関する最近の知見を紹介したい。

## I 核受容体蛋白の構造と機能

Fig. 1に示したように, *erbA* superfamily に属する蛋白は基本的にいくつかの領域に分けることができる。このうちで機能的に良く研究されているのは中央付近に位置する DNA 結合ドメイン (C 領域) とカルボキシ末端に位置するホルモン結合ドメイン (E 領域) である。

## A DNA 結合ドメイン

DNA 結合ドメイン (C 領域) は約70アミノ酸によってコードされる部分で, *erbA* superfamily の蛋白相互の間で最も良く保存されている部分である。この

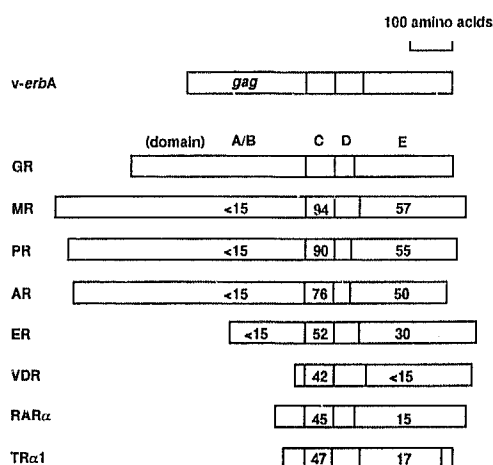


Fig. 1 Schematic structural comparison of members of the *erbA* superfamily. Percentage amino acid homologies of each domain in relation to the GR are shown. GR; glucocorticoid receptor, MR; mineralocorticoid receptor, PR; progesterone receptor, AR; androgen receptor, ER; estrogen receptor, VDR; vitamin D receptor, RAR $\alpha$ ; retinoic acid receptor  $\alpha$ , TR  $\alpha$ 1; thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1.

領域は塩基性のアミノ酸に富み、4つのシステイン残基が1つのZnイオンと結合することにより、Fig. 2に示すような2つのZnフィンガーと呼ばれる構造を形成する<sup>22)</sup>。Chambonら<sup>23)</sup>のグループはエストロゲン受容体(ER)を用いて種々の欠失変異受容体を作成し、それらについてホルモン結合、標的遺伝子の転写活性について詳しい検討を行った。これにより彼らはC領域がDNA結合に必要であること、このDNA結合が転写制御の特異性を決定していることを

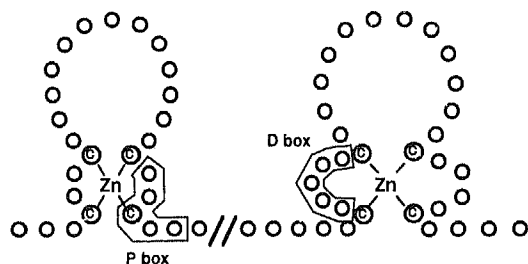


Fig. 2 Hypothetical structure of the DNA binding domain of *erbA* superfamily. Each open circle represents one amino acid molecule. Positions of P box and D box<sup>26)</sup> are shown. c: cysteine.

キメラベクターを用いた実験により明らかにした。すなわち、GRのC領域をERの相同部位に組み込んだキメラ受容体はエストロゲンによりグルココルチコイド反応性遺伝子を活性化した<sup>24)</sup>。さらに彼らはGRで2つのZnフィンガーについておのおのの欠失変異受容体やキメラ受容体を作成し、標的遺伝子に対する特異性はおもに第1(N端側)のZnフィンガーにより決定され、第2(C端側)のZnフィンガーがこのDNA-蛋白の結合を安定させている可能性を示唆した<sup>25)</sup>。

UmesonoとEvans<sup>26)</sup>はこのDNA結合領域についてさらに詳細な解析を行い、2つのZnフィンガーの基部に位置する短いアミノ酸配列(P boxとD box, Fig. 2)が標的遺伝子の特異的な認識に必須であり、ループ部分はそれほど重要でないことを示した。同様の結果はDanielsenら<sup>27)</sup>によっても同時に報告されている。実際コンピュータグラフィックの手法を用いた解析では、ループ部分ではなく2つのZnフィンガーの間に位置するアミノ酸部分がDNAのmajor grooveに嵌まり込んで結合すると想定されている<sup>28)</sup>。

## B ホルモン結合ドメイン

ホルモン結合ドメイン(E領域)は核受容体蛋白のカルボキシ末端に位置する約250アミノ酸からなる疎水性を有する部分で、各受容体間の相同性は前述のDNA結合ドメインに比べるとさほど高くない。この部分についても欠失変異受容体による研究が数多くなされ、E領域の一部の欠失でもホルモン結合能や標的遺伝子の活性化能が失われることから、ホルモン結合にはこの領域全体の立体構造が重要であることが示された<sup>23)</sup>。一方受容体の標的遺伝子発現調節を考えると興味深いことには、E領域全体を失った欠失変異受容体はホルモンを結合できないにも拘わらず、標的遺伝子を恒常的に活性化した<sup>29)</sup>。受容体はホルモンを結合しない状態でもDNAと結合できることが明らかにされており、この結果はホルモンを結合していない状態のE領域が標的遺伝子の転写調節に対して抑制的に作用していることを意味する。E領域はこのほか受容体蛋白の二量体形成や標的遺伝子の転写活性、あるいは熱ショック蛋白を始めとする数々の細胞内蛋白との相互作用に関与していると考えられているが<sup>30)~32)</sup>、その全容については未だ不明の部分が多い。

## C その他のドメイン

アミノ末端のA/B領域、およびDNA結合ドメインとホルモン結合ドメインの間に位置するD領域の機

能についてはステロイドホルモン受容体でいくつかの研究がなされている。A/B領域はGRにおいて標的遺伝子の転写に際して必須の部分であり、特に領域のほぼ中心に位置する酸性アミノ酸に富む部分が重要であると考えられている<sup>33)34)</sup>。ErikssonとWrange<sup>35)</sup>はGRのA/B領域を欠失させると、GR蛋白分子の二量体形成に影響を与え、その結果DNA結合にも影響が及ぶと報告した。ただしA/B領域は*erbA* superfamilyに属する蛋白相互の間でも保存性に乏しく、甲状腺ホルモン受容体(TR)のそれはステロイドホルモン受容体に比べて非常に短く、ビタミンD受容体(VDR)ではこの領域を欠いている(Fig. 1)。TRにおけるA/B領域の意義は現在のところ不明である。

D領域についても不明の部分が多いが、HollenbergとEvans<sup>36)</sup>はA/B領域に加えてこのD領域も転写活性に必要としている。プロジェステロン受容体では、受容体蛋白の核への移行シグナルがこの部分にコードされており<sup>37)</sup>、またTRでは後述する他の核蛋白との二量体形成にこのD領域が必要であるという。

## II 甲状腺ホルモン受容体の多様性

TRのcDNAは前述のGRのクローニングからちょうど1年後に、Sapら<sup>11)</sup>とWeinbergerら<sup>12)</sup>によってそれぞれトリ胚、ヒト胎盤のライブラリーから単離された。いずれもT<sub>3</sub>に対して高い親和性を有する蛋白をコードしており、また他の甲状腺ホルモンアナログに対しても細胞核抽出物で得られる結果と良く符合する親和性を示していたが、両者を比較したとき、種差では説明しえない構造上の差が見られたことは驚きであった。両者はコードする蛋白の分子量も異なり、特にアミノ末端部(A/B領域)ではまったく相同性が認められなかったことから別個の遺伝子と考えられ、

前者はTR $\alpha$ あるいは*c-erbA $\alpha$* 、後者はTR $\beta$ あるいは*c-erbA $\beta$* とよんで区別された。その後ラットやヒトでクローニングが進められ、ヒトでは $\alpha$ は第17染色体(17q11-21)に<sup>38)</sup>、 $\beta$ は第3染色体(3p24)に<sup>39)</sup>位置することが明らかにされている。ラットでは現在、Fig. 3に示すように全部で3種のTR、およびそのvariantsがクローニングされている。

### A $\beta$ 受容体

ラットTR $\beta$ 1とTR $\beta$ 2はDNA結合ドメインより下流は100%一致しており、両者は異なるプロモーターから転写が開始されるsplice variantであると考えられる<sup>13)</sup>。TR $\beta$ 1のメッセンジャー(m)RNAはラット<sup>40)</sup>およびヒト<sup>41)</sup>で種々の臓器に広く分布しているのに対し、TR $\beta$ 2は下垂体と視床下部の一部に局在している<sup>13)42)</sup>。T<sub>3</sub>投与によりTR $\beta$ 1のmRNA量はほとんどの組織で変動しないが、下垂体では約3.5倍に増加する。これに対し下垂体でのTR $\beta$ 2の発現はT<sub>3</sub>により強い抑制を受ける<sup>40)</sup>。ヒトではTR $\beta$ 2はまだ同定されていない。これはおもにヒト下垂体の良好なcDNAライブラリーを得にくいという技術的要因によるが、我々はすでにTR $\beta$ 2特異領域の一部塩基配列を決定しており(未発表データ)、ヒト下垂体にも $\beta$ 2受容体が存在する。TR $\beta$ 2はその局在様式から当初下垂体特異的な機能の存在が推定されたが、現在までTR $\beta$ 1や次に述べるTR $\alpha$ 1との本質的な違いは見いだされていない<sup>43)</sup>。

### B $\alpha$ 受容体

TR $\alpha$ 遺伝子には少なくとも3種の蛋白がコードされているが、このうちT<sub>3</sub>と結合し標的遺伝子を活性化しうるのはTR $\alpha$ 1のみである。TR $\alpha$ 2は最初T<sub>3</sub>を結合すると報告されたためTR $\alpha$ 2と呼ばれたが<sup>44)45)</sup>、現在ではホルモン結合能はなく、したがって甲状腺ホルモン受容体ではないとされており、混乱を避けるた

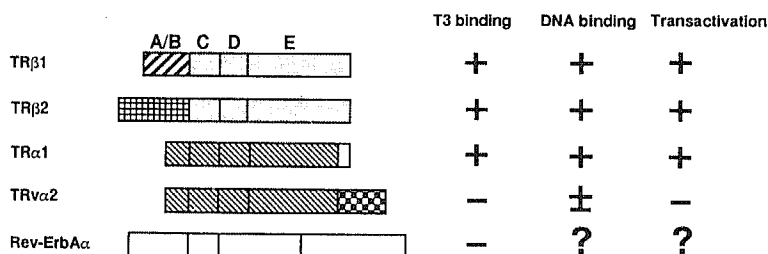


Fig. 3 Structural and functional comparison of thyroid hormone receptors and related proteins.

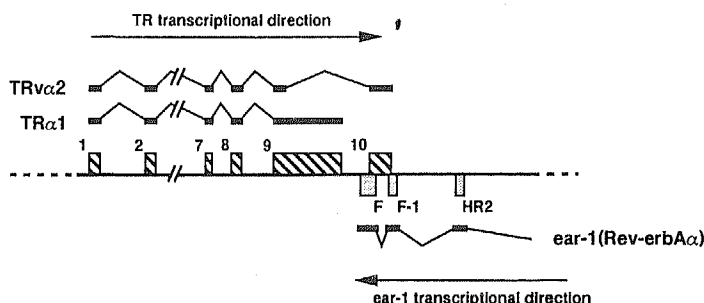


Fig. 4 Genomic organization of TR $\alpha$  gene. Note that TRv $\alpha$ 2 transcript and Rev-erbA $\alpha$  transcript is encoded by the opposite strand of the DNA and their C terminals are overlapping.

め TRv (variant) $\alpha$ 2あるいはc-erbA $\alpha$ 2と呼ばれている。TR $\alpha$ 1と TRv $\alpha$ 2はアミノ末端から370番目のアミノ酸までは完全に同一であるが、それより下流ではまったく相同性がない。TRv $\alpha$ 2はTR $\alpha$ 1の最終エクソン内にある370番目のアミノ酸の位置から約4kb下流にある TRv $\alpha$ 2特異的エクソンへのスプライシングによって形成される<sup>46)</sup>。もう1つの蛋白は Rev-ErbA $\alpha$ <sup>47)</sup>または Ear-1<sup>48)</sup>と呼ばれるものでこれは Fig. 4に示すように TR $\alpha$ 1, TRv $\alpha$ 2とは反対のDNA鎖にコードされている orphan receptor の1つで、そのカルボキシ末端をコードする部分は TRv $\alpha$ 2をコードする部分と逆向きにオーバーラップしている。TR $\alpha$ 1と TRv $\alpha$ 2は調べられたすべての組織に広く分布しているが<sup>40)41)</sup>、TR $\alpha$ 1は特に脳、筋、褐色脂肪組織に多く認められ、他の組織では一般に TRv $\alpha$ 2のほうが TR $\alpha$ 1より強く発現している。TR $\alpha$ 1と TRv $\alpha$ 2は T $_3$ により心、腎、下垂体でその発現が抑制されるが、大脳では変化しない<sup>40)</sup>。TRv $\alpha$ 2と同様 Rev-ErbA $\alpha$ も T $_3$ と結合せず、また後者についてはその標的DNAも明らかでない。この両者については後で再び述べる。

### III 甲状腺ホルモン受容体による遺伝子発現

### A DNA上のレスポンスエレメント

TR は *erbA* superfamily に属する他の受容体と同様、標的遺伝子上の結合部位 (response element: RE) に結合することによってその遺伝子の発現を調節する<sup>17)</sup>。TR の結合部位 (thyroid response element: TRE) についてはラット成長ホルモン (GH)<sup>49)</sup>、TSH $\alpha$  および  $\beta$  サブユニット<sup>50)51)</sup> などの T<sub>3</sub> 反応性遺伝子を用いて研究がなされたが、GR や ER のそれに比べると各 TRE 間の相同性は低い

(Fig. 5)。Brent 等<sup>52)</sup>はこれらの TRE を解析し、コンセンサス TRE, すなわち TR 一分子の結合部位の基本配列として AGGT(C/A)A という 6 塩基を提唱するとともに、T<sub>3</sub> による転写活性の調節にはこの TRE が最低 2 コピー必要であることを示した。事実、現在知られているほとんどの T<sub>3</sub> 反応性遺伝子はこの TRE あるいは類似塩基配列を複数有している。またこの TRE の塩基配列は他のホルモン受容体が結合する RE と良く似ており、*in vitro* では TR がエストロゲンやレチノール酸の RE に、あるいはレチノール酸受容体 (RAR) が TRE に結合しうることが示されている<sup>53)54)</sup>。

こうした現象が *in vivo* でも起きているのか、また起きているとすればどの程度それぞれの遺伝子発現調

TRE consensus		<b>AGGTC/AA</b>	
rat GH	-189	<b>AGGTA</b> XXXXXXXX <b>AGGgAc</b> <b>TGAC</b> <b>Cg</b>	-167
rat $\alpha$ MHC	-132	<b>AGGTA</b> XXXXXXXX <b>AGG</b> <b>aCA</b> <b>nn</b> <b>aG</b> <b>cCCT</b>	-157
rat $\alpha$ subunit	-19	<b>AGGTA</b> XXXX <b>ActCTCA</b> <b>TAA</b> <b>CT</b>	+1
rat TSH $\beta$	+26	<b>AGGTA</b> <b>AGGTC</b> <b>tTAC</b> <b>Cc</b>	+35
Spot14	-2626	<b>AGG</b> <b>cC</b> <b>ct</b> <b>TGAC</b> <b>Cc</b>	-2611

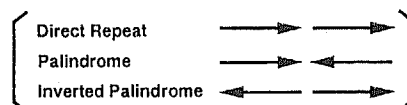


Fig. 5 Promoter elements from various T<sub>3</sub> responsive genes. Arrows indicate putative TRE half sites. Lower case letters show nucleotides which do not fit the TRE consensus sequence proposed by Brent *et al*<sup>(52)</sup>.

節に参与しているのかはわかっていない。Umesono<sup>59)</sup>はTRE (AGGTCA) の direct repeat では2つのTREの間に介在する塩基数が反応しうる受容体を決定していると報告した。すなわち2つのTREの間隔が4塩基の時はTRがDNAに結合し転写活性を示すが、3塩基ではVDRに、5塩基ではRARによってのみ転写活性が見られたという。またERはdirect repeatには結合せず、palindromeの形をとったときのみDNAに結合し転写活性を示した。一塩基の挿入は二本鎖DNA上では34nmの距離の伸張と36°の捩れを生じる。こうした物理的な位置関係がどのように受容体の特異性を決定しているかは今後解明されるべき点である。これを時を同じくしてNaär<sup>50)</sup>は2つのTREの方向、すなわちpalindrome, direct repeat, inverted repeatのそれぞれで不完全ながらER, RAR, TRによる特異的な転写活性が認められたと報告している。

さてTRはTREに結合し遺伝子発現を調節するわけであるが、この調節はラットGH遺伝子では促進的であり、一方ラットTSH $\beta$ サブユニット遺伝子では抑制的である。同じTRとTREの相互作用でありながらこの正反対の結果はどこからもたらされるのであろうか。ラットGH遺伝子のTREは転写開始部位から約180bp上流にあり<sup>49)</sup>、一方ラットTSH $\beta$ サブユニット遺伝子のそれはほぼ転写開始部位にある<sup>51)</sup>ことから、当初この位置関係が正負の反応を決定していると考えられた。すなわちTSH $\beta$ 遺伝子ではTRが転写開始部位に結合する結果、RNAポリメラーゼを始めとする転写ユニットの結合が妨げられると想定されたわけである。しかしこのモデルはTRがホルモンと結合していない状態でもDNAに結合できるという点で大きな矛盾をはらんでいた。この問題についてBrent<sup>57)</sup>は、GHとTSH $\beta$ 遺伝子のTRE塩基配列を転写開始部位から様々な距離に組み込んで2つのTREの転写活性を評価したところ、GH遺伝子のTREはその位置に関係なく常に転写活性を促進し、逆にTSH $\beta$ 遺伝子のTREは常に抑制的に作用した。このことは転写活性に対するTREの正負の方向性は塩基配列のみによって決定されることを意味する。類似の塩基配列がどのようにして正反対の制御機構を保持しうるかについてはまだわかっていない。

## B 受容体蛋白の二量体形成

前述したごとく自然界に見られるTREがほとんど常に複数のユニットとして存在することは、複数の

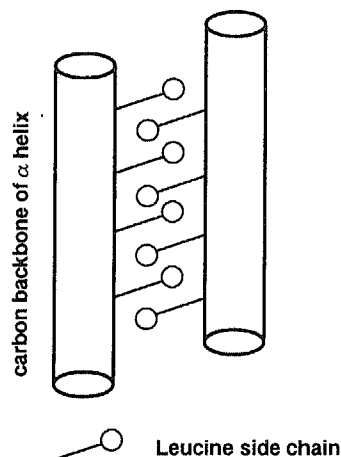


Fig. 6 Schematic diagram of 'leucine zipper' model. Leucine residues appear in the same side of  $\alpha$  helix every other turn.

TRが単一のDNAに結合することを想像させる。Landschulz<sup>58)</sup>はMyc, Jun, FosといったDNA結合蛋白の一部でロイシンが規則的(7アミノ酸ごと)に存在することに注目した。この部分は $\alpha$ -ヘリックス構造をとったとき、ロイシンが同じ側に位置し( $\alpha$ -ヘリックスのループは3.5アミノ酸で一周する)、ヘリックスの側面に疎水性の部分が形成される。彼らは2つの蛋白分子の疎水面同士が会合することによって二量体を作ると考え、「leucine zipper」モデルとして提唱した(Fig. 6)。Samuels<sup>59)</sup>、FormanとSamuels<sup>60)</sup>のグループはleucine zipperに似たアミノ酸配列(彼らはheptadと名付けた)がTRのホルモン結合ドメインに全部で9カ所見られるとし、この部分を介してTRが二量体を形成すると考えた。受容体蛋白が二量体としてDNAに結合することはこれ以前にまずERとGRで示されている<sup>61)62)</sup>。

ところで、受容体蛋白分子は二量体を作ってからDNAに結合するのであろうか、あるいは一分子ずつ結合したのちに二量体となるのであろうか。チロシンアミノトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域にはGRの結合部位があり不完全なpalindromeの形をとっている。ここではまずGR一分子が結合し、これによってもう一方の部位でのGRの結合が可能となる<sup>63)</sup>。また細胞質中のGRはグリセロール密度勾配遠心によって単量体、二量体のいずれの形でも存在することが示されており、後者は前者に比べてDNAに対する親和性が高いという<sup>64)</sup>。TRではこうした研究は

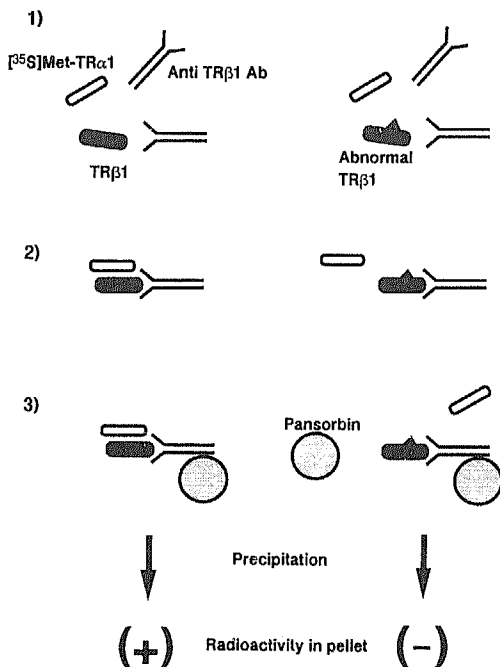


Fig. 7 Schematic representation of co-immunoprecipitation method. 1)  $[^{35}\text{S}]\text{Met-TR}\alpha 1$ ,  $\text{TR}\beta 1$  and anti- $\text{TR}\beta 1$  antibody are incubated. 2)  $\text{TR}\alpha 1$  and  $\text{TR}\beta 1$  dimerize and antibody binds to  $\text{TR}\beta 1$ . Abnormal  $\text{TR}\beta 1$  cannot dimerize to  $\text{TR}\alpha 1$  but can be recognized by antibody. 3)  $\text{TR-antibody complex}$  is precipitated by Pansorbin. Radioactivity in precipitated protein is measured.

まだあまり進んでいないが、我々は特異抗体を用いて  $\text{TR}\alpha 1$  と  $\text{TR}\beta 1$  が DNA 非存在下でヘテロ二量体を作ることを確認した<sup>65)</sup>。  $[^{35}\text{S}]$  メチオニンでラベルした  $\text{TR}\alpha 1$  をラベルしない  $\text{TR}\beta 1$  とインキュベートするとこの  $\text{TR}\alpha 1$  は  $\text{TR}\beta 1$  に対する特異抗体により免疫沈降した。この反応は  $\text{TR}\beta 1$  の代わりに他の蛋白や heptad 部分にアミノ酸挿入のある変異  $\text{TR}\beta 1$  を加えたときには認められなかったことから、heptad 部を介した二量体形成を反映するものと考えられる (Fig. 7)。

TR も GR 同様単量体、二量体両方の形で存在していると思われるが、GR のように両者の DNA に対する親和性が異なるとすれば、標的遺伝子の転写活性は単に TR の絶対量のみでなく、その存在様式によっても調節されている可能性がある。特に TR は  $\alpha 1$  と  $\beta 1$ 、そして下垂体や視床ではさらに  $\beta 2$  という複数の受容

体が存在し、これらがホモ二量体のみならずヘテロ二量体も形成することは、TR による遺伝子発現調節がきわめて複雑にコントロールされていることを容易に想像させる。さらには TR は RAR とヘテロ二量体を作り、TR ホモ二量体と TR-RAR ヘテロ二量体は、ミオシン重鎖遺伝子の TRE に対して正負反対の作用を示すことも明らかにされている<sup>66)</sup>。最近こうした知見に加えて、次に述べるように TR と他の蛋白との相互作用に関して新たな事実が明らかにされ、TR の作用機序に関するモデルは一層複雑になってきている。

### C TRAP (=RXR?) -TR 機能に關与する核蛋白

1989年、Murray と Towle<sup>67)</sup> は肝細胞核抽出物中に TRE に対する TR の結合を特異的に促進する蛋白が存在すると報告した。翌年には Chin ら<sup>68)</sup> のグループも同様の蛋白がラット下垂体由来の GH3 細胞に存在し、分子量約 65kDa であることを明らかにした。彼らはこの蛋白を TR-auxiliary protein (TRAP) と名付け、以後の研究はこのグループを中心に進んだ。TRAP はそれ自身配列特異的に DNA に結合し<sup>69)</sup>、かつ TR 蛋白とヘテロ二量体を形成できる<sup>70)</sup>。TR 分子上で TRAP との二量体形成にかかわる部位は、欠失変異受容体を用いた実験からホルモン結合ドメインの中央部と第 2 の Zn フィンガーのすぐ下流の独立した 2 カ所であるという<sup>71)</sup>。また TRAP は  $\text{TR}\nu\alpha 2$  の DNA 結合には影響しない<sup>72)</sup>。TR-TRAP ヘテロ二量体は TR 二量体に比べ DNA 結合の点でより安定である。VDR についても同様の蛋白 (55kDa) の存在が知られている<sup>73)</sup>。

最近 3 つのグループが *erbA* superfamily の一員であるレチノイド X 受容体 (RXR) が TR, VDR あるいは RAR とヘテロ二量体を形成することによりこれら受容体の標的遺伝子の活性化能を増強し、かつ RE への結合の特異性を高めると報告した<sup>74)-76)</sup>。後者の機能は前述した異種受容体による同一 RE への結合を抑えるのに重要と思われる。RXR $\alpha$  と RXR $\beta$  はいずれも約 55kDa の蛋白で Chin らの報告とはそのサイズに若干の差があるものの、TRAP と RXR は同一の蛋白である可能性が高い。Zhang ら<sup>75)</sup> は RXR を “booster receptor”, RXR によって機能を増強される TR や RAR を “activator receptor” と名付けたが、この発見は *erbA* superfamily の機能やメンバー間の相互作用の理解に新しい一面を開いたと言える。

### D $\text{TR}\nu\alpha 2$ と Rev-ErbA $\alpha$

すでに述べたように TR の遺伝子は受容体ではない

類似蛋白, TR $\nu$ 2と Rev-ErbA $\alpha$  の2つをコードしている。これらの蛋白は生理的にどういう意味を持つのだろうか。Koenig ら<sup>77)</sup>は TR $\nu$ 2が TR $\beta$ 1, TR $\alpha$ 1の転写活性を抑制することを示し、我々も同様の結果を報告した<sup>78)</sup>。TR $\nu$ 2は睾丸、脳などで多く発現していることから、これらの組織が TR を発現しているにも拘わらず T<sub>3</sub>に対する反応に乏しいのは、TR $\nu$ 2の抑制作用によるものと考えられた。TR $\nu$ 2による抑制の機序としては、TRE への結合競合、不活性ヘテロ二量体の形成、受容体機能に必須な未知の補助因子の消費などがあげられる。しかしながら、TR $\nu$ 2は TR $\alpha$ 1と同一の結合ドメインを持ちながらその DNA 結合能は明らかに TR $\alpha$ 1よりも低い<sup>79)</sup>。また我々は TR $\nu$ 2は TR $\beta$ 1や TR $\alpha$ 1とヘテロ二量体を作れないことを示した<sup>85)</sup>。Selmi と Samuels<sup>80)</sup>は *v-erbA* が TR とヘテロ二量体を作れないことを示したうえでその塩基配列を *c-erbA* (TR $\alpha$ 1) のそれと比較し、二量体形成には最後(9番目)の heptad およびその周辺の塩基配列が重要であることを示した。実際 TR $\nu$ 2はスプライシングによって第9heptad は失われており、彼らの報告と矛盾しない。またこの部分にアミノ酸を人工的に挿入した変異 TR $\beta$ 1は TR や RAR とヘテロ二量体を作ることができない<sup>85)</sup><sup>86)</sup>。注意すべきは TR $\nu$ 2による転写抑制の実験が発現ベクターを培養細胞に導入する一過性発現システムを用いていることで、このシステムでは目的とする蛋白は細胞内できわめて大量に発現され、必ずしも生理的状況を再現しているとはいえない。生体内で TR $\nu$ 2が現実には TR に対する抑制遺伝子として作用しているかという点についてはこれを疑問視する研究者もいる。実際 TR $\nu$ 2による TR $\beta$ 1, TR $\alpha$ 1に対する抑制作用は細胞内に比較的大量の発現ベクターを導入したときしか認められない。TR $\nu$ 2が未知のリガンド、未知の機能を有する可能性は否定できない。

Rev-erbA $\alpha$  についてはその意義はほとんどわかっていない。蛋白合成阻害剤である cycloheximide によって Rev-erbA $\alpha$  の mRNA レベルが上昇し、これに伴って TR $\alpha$ 1の mRNA レベルの上昇と TR $\nu$ 2の mRNA レベルの低下をみることから、Lazar<sup>81)</sup>、Munroe と Lazar<sup>82)</sup>のグループは Rev-erbA $\alpha$  は mRNA レベルで TR $\alpha$ 1と TR $\nu$ 2のスプライシングを調節することによって細胞の T<sub>3</sub>に対する反応性をコントロールすると考えた。Rev-erbA $\alpha$  蛋白の機能についてはまだまったくわかっていない。TR $\nu$ 2と

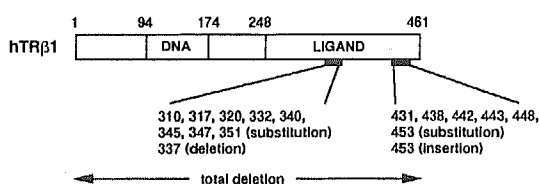


Fig. 8 Topological distribution of mutations isolated from subjects with generalized resistance to thyroid hormone. Position of mutations are indicated by amino acid number. Amino acid numbering is according to deduced nucleotide sequence by Sakurai *et al*<sup>93)</sup>.

Rev-ErbA $\alpha$  は他の *erbA* superfamily では認められない TR に特異な蛋白であり、これらの生理的意義の解明が待たれる。

#### IV 異常 TR と臨床

甲状腺ホルモン不応症 (Refetoff 症候群) は血中甲状腺ホルモンの高値にも拘わらず TSH の抑制と全身の機能亢進症状を欠如する病態で<sup>83)</sup><sup>84)</sup>、1967年に Refetoff ら<sup>85)</sup>が最初の報告をして以来、世界各地で現在200以上の症例が発見されている<sup>86)</sup>。本症候群の原因としては当初から核受容体の異常が想定され、患者のリンパ球や培養線維芽細胞を用いた研究が行われたが満足する結果は得られず、その機序の解明は分子生物学の進歩を待たねばならなかった。

##### A TR 遺伝子の点変異

Usala ら<sup>87)</sup>は甲状腺ホルモン不応症の1家系で臨床的異常とサザンブロット法での TR $\beta$  遺伝子の多型性が連関していることを報告し、本症候群が受容体の異常によるという従来の仮説を裏付けた。我々は別の1家系で患者の TR $\beta$ 1 cDNA のクローニングを試み、その結果患者はホルモン結合ドメインにある345番目のアミノ酸が遺伝子の点変異によってグリシンからアルギニンに置換していることを見つけた<sup>88)</sup>。In vitro で作成したこの変異 TR $\beta$ 1は T<sub>3</sub>結合能をまったく持たず、この変異が甲状腺ホルモン不応の原因であると結論された。その後いくつかの家系で TR $\beta$  遺伝子の点変異が同定されたが<sup>89)</sup>–<sup>92)</sup>、異常はすべてホルモン結合ドメインに認められ、各家系で異なる点変異を有している (Fig. 8)<sup>93)</sup>。これらの家系では異常はすべて常染色体優性遺伝の形をとっている。

##### B なぜ優性遺伝なのか

患者はヘテロ接合体であり、正常 TR $\beta$  も有してい

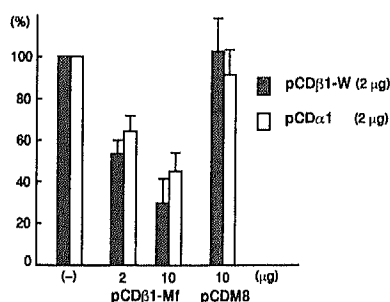


Fig. 9 Negative transcriptional regulation by a mutant hTRβ1. Transcriptional activation by Wild-type hTRβ1 and hTRα1 (pCDβ1-W and pCDα1, respectively) are inhibited by co-transfection of expression vector for mutant hTRβ1 (pCDβ1-Mf) in a dose dependent manner. When 10 μg of host expression vector (pCDM8) was used for co-transfection no inhibition was observed. Modified from the original<sup>96)</sup>.

ながらもなぜ発症するのかは当初からの疑問であった。最も単純には正常受容体の発現量が半分になったためと考えることができる。しかしこれが事実でないことはある一家系の検索によって明らかとなった<sup>94)95)</sup>。この家系は近親婚があり、常染色体劣性遺伝のパターンを示す点で他の不応症家系と異なっている。患者のDNAをサザンブロット法によって調べたところ、驚くことに患者ではTRβの蛋白をコードするエクソンがすべて失われていた。つまり患者は欠失ホモであり、TRβをまったく持っていないことになる。一方患者の両親は正常対立遺伝子を1つしか持っていないにも拘わらず臨床的には完全に正常であった。

これらのことから点変異を持った異常TRβは何らかの機序で正常受容体の機能を阻害していると考えられた。これを証明するため変異TRβ1を正常受容体と一緒に培養細胞内にトランスフェクトすると、正常受容体による標的遺伝子の転写活性は変異TRβ1によって容量依存性に抑制された<sup>96)97)</sup> (Fig. 9)。この抑制には正常受容体と変異受容体とのDNAへの結合における競合、および正常受容体と変異TRβによる不活性化ヘテロ二量体形成が関与していると考えられるが、おそらく前者が主要なメカニズムであろう。なぜならばビタミンD抵抗性くる病の家系でVDRのDNA結合ドメインに点変異が発見されており、この異常受容体はDNA結合能を喪失していることが示されたが、この異常は劣性遺伝を示し、ヘテロ接合体では何ら臨床的に異常を認めない<sup>98)</sup>。これは異常受容体による正

常受容体機能の阻害がDNA結合を介していることを示唆するものである。最近ホルモン結合ドメインでの点変異TRβをホモで持つ症例が報告されたが<sup>99)100)</sup>、患者の全身の異常はTRβ遺伝子欠損例と比べても遙かに重篤で、このことも上述の仮説を支持するものである。点変異ホモ接合体と欠失ホモ接合体の臨床像の差は、TRαに対する抑制の有無によるものであろう。

### C TRαとTRβ

これまで述べてきたように現在までに判明した異常TRはすべてTRβであり、TRα遺伝子の異常は見つかっていない。Takedaら<sup>101)</sup>はGCクランプと呼ばれるpolymerase chain reactionを利用したスクリーニング法で約20の甲状腺ホルモン不応症家系を検索したが、ほとんどの家系でTRβ遺伝子の異常が見いだされた。Oppenheimerら<sup>102)</sup>のグループは*in vitro*で作成したTRα1はTRβ1に比べてT<sub>3</sub>の結合親和性は約1/5であり、TRα1はその低い親和性ゆえに生理的なホルモン濃度下ではほとんどT<sub>3</sub>と結合しておらず、したがってTRβが生理的に作動している主要な受容体であると考えた。古典的にT<sub>3</sub>反応性組織とされている肝や腎にTRβのmRNA発現が高いことはこの考えを支持する。また彼らは、正常な脳の発達にT<sub>3</sub>がきわめて重要とされる胎生期末期と新生児期に一致してラットの脳でTRβ発現が上昇していることからTRβの主要受容体としての可能性を提唱した<sup>103)</sup>。したがって彼らの説によればTRαに異常があっても必ずしも臨床症状を現さないということなのかも知れない。しかしながら、前述のTRβ完全欠損症例では、聾啞はあるものの明らかな精神発達遅延や小脳失調はなく<sup>85)95)</sup>、TRβのみで脳における甲状腺ホルモン作用を説明するのは無理がある。逆にTRβ点変異ホモの症例では重度の精神発達遅延があり<sup>100)</sup>、この両者の差がTRαに対する機能抑制の有無によるものと考えれば、かえってTRαこそが正常な精神神経機能に必須の受容体である可能性がある。著者は異常TRαが見つからない理由として、TRαのmRNAがTRβとは異なり胎生期の早くから高いレベルで発現していることから、TRαが胎児の発育にきわめて重要であり、この異常は何らかの形で胎児に致死性結末をもたらすのかも知れないと考えている。この仮説に対する答えはトランスジェニックマウスを用いた研究によって早晚明らかにされるであろう。



おわりに

GR 遺伝子が同定されてからの 6 年間にホルモン核受容体に対する我々の理解は飛躍的に進み、TR ももちろん例外ではない。しかしながら現在でも明らかでない部分は数多く、TR が複数存在する理由、TR $\alpha$ 2 や Rev-ErbA $\alpha$  の果たす役割、TR と他の核蛋白（ホルモン受容体）との相互作用とその生理的意義などはそれらの一部に過ぎない。我々の教室でも、TR $\beta$  遺伝子の発現調節、培養細胞を用いた TR $\alpha$ 、

TR $\beta$  の特異的機能の検索、TR $\alpha$ 1 と  $\alpha$ 2 のスプライシングの機序などについて研究中、あるいは研究を予定している。これらの成果が TR ひいてはホルモン作用機序の理解を深めるうえで有用なものとなれば、この上ない喜びである。

稿を終えるにあたり執筆の機会を与えてくださった老年医学教室の橋爪潔志先生に深謝致します。筆者の行った研究は全てシカゴ大学留学中に行われたものであり、終始指導、助言を賜った Leslie J. DeGroot, Samuel Refetoff 両教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Oppenheimer, J. H.: Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203: 971-979, 1979
- 2) Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L. and Surks, M. I.: Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. *Endocrinology*, 95: 897-903, 1974
- 3) Ichikawa, K. and DeGroot, L. J.: Purification and characterization of rat liver nuclear thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 3420-3424, 1987
- 4) Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.: Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318: 641-646, 1985
- 5) Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.: Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the *v-erb-A* oncogene product. *Nature*, 318: 670-672, 1985
- 6) Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. and Shine, J.: Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231: 1150-1154, 1986
- 7) Greene, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. and Chambon, P.: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature*, 320: 134-139, 1986
- 8) Conneely, O. M., Sullivan, W. P., Toft, D. O., Birnbaumer, M., Cook, R. G., Maxwell, B. L., Zarucki-Schulz, T., Greene, G. L., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W.: Molecular cloning of the chicken progesterone receptor. *Science*, 233: 767-770, 1986
- 9) Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M. and Handelin, B. L.: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237: 268-275, 1987
- 10) McDonnell, D. P., Mangelsdorf, D. J., Pike, J. W., Haussler, M. R. and O'Malley, B. W.: Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science*, 235: 1214-1217, 1987
- 11) Sap, J., Munõz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennström, B.: The *c-erb-A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 324: 635-640, 1986
- 12) Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. and Evans, R. M.: The *c-erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324: 641-646, 1986
- 13) Hodin, R. A., Lazar, M. A., Wintman, B. I., Darling, D. S., Koenig, R. J., Larsen, P. R., Moore, D. D. and Chin, W. W.: Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, 244: 76-79, 1989

- 14) Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. and Chambon, P. : A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, 330 : 444-450, 1987
- 15) Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. M. : Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330 : 624-629, 1987
- 16) Krust, A., Kastner, P. H., Petkovich, M., Zelent, A. and Chambon, P. : A third human retinoic acid receptor, hRAR- $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 5310-5314, 1989
- 17) Evans, R. M. : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240 : 889-895, 1988
- 18) Beato, M. : Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56 : 335-344, 1989
- 19) de Thé, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A. : A novel steroid/thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 330 : 667-670, 1987
- 20) Giguere, V., Yang, N., Segui, P. and Evans, R. M. : Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 331 : 91-94, 1988
- 21) Hazel, T. G., Nathan, D. and Lau, L. F. : A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 8444-8448, 1988
- 22) Evans, R. M. and Hollenberg, S. M. : Zinc fingers: guilt by association. *Cell*, 52 : 1-3, 1988
- 23) Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. R. and Chambon, P. : Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 51 : 941-951, 1987
- 24) Green, S. and Chambon, P. : Oestrogen induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature*, 325 : 75-78, 1987
- 25) Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W. and Chambon, P. : The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J*, 7 : 3037-3044, 1988
- 26) Umesono, K. and Evans, R. M. : Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57 : 1139-1146, 1989
- 27) Danielsen, M., Hinck, L. and Ringold, G. M. : Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell*, 57 : 1131-1138, 1989
- 28) Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J.-Å. and Kaptein, R. : Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science*, 249 : 157-160, 1990
- 29) Godowski, P. J., Ruscone, S., Miesfeld, R. and Yamamoto, K. R. : Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature*, 325 : 365-368, 1987
- 30) Holloway, J. M., Glass, C. K., Adler, S., Nelson, C. A. and Rosenfeld, M. G. : The C'-terminal interaction domain of the thyroid hormone receptor confers the ability of the DNA site to dictate positive or negative transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 8160-8164, 1990
- 31) Fawell, S. E., Lees, J. A., White, R. and Parker, M. G. : Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell*, 60 : 953-962, 1990
- 32) Dalman, F. C., Scherrer, L. C., Taylor, L. P., Akil, H. and Pratt, W. B. : Localization of the 90-KDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. *J Biol Chem*, 266 : 3482-3490, 1991
- 33) Wright, A. P. H. and Gustafsson, J.-Å. : Mechanism of synergistic transcriptional transactivation by the human glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 8283-8287, 1991
- 34) Muller, M., Baniahmad, C., Kaltschmidt, C. and Renkawitz, R. : Multiple domains of the glucocorticoid receptor involved in synergism with the CACCC box factor(s). *Mol Endocrinol*, 5 : 1498-1503, 1991
- 35) Eriksson, P. and Wrangé, Ö. : Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer

- influence its DNA binding properties. J Biol Chem, 265 : 3535-3542, 1990
- 36) Hollenberg, S. M. and Evans, R. M. : Multiple and cooperative *trans*-activation domains of the human glucocorticoid receptor. Cell, 55 : 899-906, 1988
- 37) Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M. and Milgrom, E. : Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. EMBO J, 10 : 3851-3859, 1991
- 38) Dayton, A. I., Selden, J. R., Laws, G., Dorney, D. J., Finan, J., Tripputi, P., Emanuel, B. S., Rovega, G., Nowell, P. C. and Croce, C. M. : A human c-erbA oncogene homologue is closely proximal to the chromosome 17 breakpoint in acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA, 81 : 4495-4499, 1984
- 39) Albertson, D. G., Sherrington, P. D. and Rabbitts, P. H. : Localization of polymorphic DNA probes frequently deleted in lung carcinoma. Hum Genet, 83 : 127-132, 1989
- 40) Hodin, R. A., Lazar, M. A. and Chin, W. W. : Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. J Clin Invest, 85 : 101-105, 1990
- 41) Sakurai, A., Nakai, A. and DeGroot, L. J. : Expression of three forms of thyroid hormone receptor in human tissues. Mol Endocrinol, 3 : 392-399, 1989
- 42) Cook, C. B., Kakucska, I., Lechan, R. M. and Koenig, R. L. : Expression of thyroid hormone receptor  $\beta$ 2 in rat hypothalamus. Endocrinology, 130 : 1077-1079, 1992
- 43) Yen, P. M., Darling, D. S. and Chin, W. W. : Basal and thyroid hormone receptor auxiliary protein-enhanced binding of thyroid hormone receptor isoforms to native thyroid hormone response elements. Endocrinology, 129 : 3331-3336, 1991
- 44) Benbrook, D. and Pfahl, M. : A novel thyroid hormone receptor encoded by a cDNA clone from a human testis library. Science, 238 : 788-791, 1987
- 45) Nakai, A., Seino, S., Sakurai, A., Szilak, I., Bell, G. I. and DeGroot, L. J. : Characterization of a thyroid hormone receptor expressed in human kidney and other tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 85 : 2781-2785, 1988
- 46) Laudet, V., Begue, A., Henry-Duthoit, C., Joubel, A., Martin, P., Stehelin, D. and Saule, S. : Genomic organization of the human thyroid hormone receptor  $\alpha$  (c-erbA-1) gene. Nucleic Acids Res, 19 : 1105-1112, 1991
- 47) Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. and Chin, W. W. : A novel member of the thyroid-steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA $\alpha$  transcriptional unit. Mol Cell Biol, 9 : 1128-1136, 1989
- 48) Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S.-i., Matsubara, K.-i., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. : Two *erbA* homologs encoding proteins with different T<sub>3</sub> binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. Cell, 57 : 31-39, 1989
- 49) Glass, C. K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V. R., Evans, R. M. and Rosenfeld, M. G. : A c-erbA binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. Nature, 329 : 738-741, 1987
- 50) Burnside, J., Darling, D. S., Carr, F. E. and Chin, W. W. : Thyroid hormone regulation of the rat glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene promoter activity. J Biol Chem, 264 : 6886-6891, 1989
- 51) Carr, F. E., Burnside, J. and Chin, W. W. : Thyroid hormones regulate rat thyrotropin  $\beta$  gene promoter activity expressed in GH3 cells. Mol Endocrinol, 3 : 709-716, 1989
- 52) Brent, G. A., Harney, J. W., Chen, Y., Warne, R. L., Moore, D. D. and Chin, W. W. : Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. Mol Endocrinol, 3 : 1996-2004, 1989

- 53) Glass, C. K., Holloway, J. M., Devary, O. V. and Rosenfeld, M. G. : The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*, 54 : 313-323, 1988
- 54) Umesono, K., Giguere, V., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. : Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature*, 336 : 262-265, 1988
- 55) Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. and Evans, R. M. : Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D<sub>3</sub> receptors. *Cell*, 65 : 1255-1266, 1991
- 56) Näär, A. M., Boutin, J.-M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. : The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell*, 65 : 1267-1279, 1991
- 57) Brent, G. A., Williams, G. R., Harney, J. W., Forman, B. M., Samuels, H. H., Moore, D. D. and Larsen, P. R. : Effects of varying the position of thyroid hormone response elements within the rat growth hormone promoter : Implications for positive and negative regulation by 3, 5, 3'-triiodothyronine. *Mol Endocrinol*, 5 : 542-548, 1991
- 58) Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. : The leucine zipper : A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240 : 1759-1764, 1988
- 59) Forman, B. M., Yang, C.-r., Au, M., Casanova, J., Ghysdael, J. and Samuels, H. H. : A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel *in vivo* interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol Endocrinol*, 3 : 1610-1626, 1989
- 60) Forman, B. M. and Samuels, H. H. : Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors : The regulatory zipper model. *Mol Endocrinol*, 4 : 1293-1301, 1990
- 61) Kumar, V. and Chambon, P. : The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 55 : 145-156, 1988
- 62) Tsai, S. Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N. L., Dahlman, K., Gustafsson, J.-Å., Tsai, M.-J. and O'Malley, B. W. : Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element : Evidence for receptor dimer formation. *Cell*, 55 : 361-369, 1988
- 63) Dahlman-Wright, K., Siltala-Roos, H., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.-Å. : Protein-protein interactions facilitate DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *J Biol Chem*, 265 : 14030-14035, 1990
- 64) Cairns, W., Cairns, C., Pongratz, I., Poellinger, L. and Okret, S. : Assembly of a glucocorticoid receptor complex prior to DNA binding enhances its specific interaction with a glucocorticoid response element. *J Biol Chem*, 266 : 11221-11226, 1991
- 65) 宮本高秀, 櫻井晃洋, DeGroot, L. J. : 甲状腺ホルモン受容体蛋白の二量体形成. 第65回日本内分泌学会学術総会抄録, p. 387, 1992
- 66) Glass, C. K., Lipkin, S. M., Devary, O. V. and Rosenfeld, M. G. : Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell*, 59 : 697-708, 1989
- 67) Murray, M. B. and Towle, H. C. : Identification of nuclear factors that enhance binding of the thyroid hormone receptor to a thyroid hormone response element. *Mol Endocrinol*, 3 : 1434-1442, 1989
- 68) Burnside, J., Darling, D. S. and Chin, W. W. : A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements. *J Biol Chem*, 265 : 2500-2504, 1990
- 69) Beebe, J. S., Darling, D. S. and Chin, W. W. : 3, 5, 3'-Triiodothyronine receptor auxiliary protein (TRAP) enhances receptor binding by interactions within the thyroid hormone response element. *Mol Endocrinol*, 5 : 85-93, 1991
- 70) Darling, D. S., Beebe, J. S., Burnside, J., Wihslow, E. R. and Chin, W. W. : 3, 5, 3'-Triiodothyronine (T<sub>3</sub>)

- receptor-auxiliary protein (TRAP) binds DNA and forms heterodimers with the  $T_3$  receptor. Mol Endocrinol, 5: 73-84, 1991
- 71) Rosen, E. D., O'Donnell, A. L. and Koenig, R. J.: Protein-protein interactions involving erbA super-family receptors: through the TRAP door. Mol Cell Endocrinol, 78: C83-C88, 1991
- 72) O'Donnell, A. L., Rosen, E. D., Darling, D. S. and Koenig, R. J.: Thyroid hormone receptor mutations that interfere with transcriptional activation also interfere with receptor interaction with a nuclear protein. Mol Endocrinol, 5: 94-99, 1991
- 73) Sone, T., Ozono, K. and Pike, J. W.: A 55-kilodalton accessory factor facilitates vitamin-D receptor DNA binding. Mol Endocrinol, 5: 1578-1586, 1991
- 74) Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Näär, A., Kim, S. Y., Boutin, J.-M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.: RXR $\beta$ : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. Cell, 67: 1251-1266, 1991
- 75) Zhang, X.-k., Hoffmann, B., Tran, P. B.-V., Graupner, G. and Pfahl, M.: Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. Nature, 355: 441-446, 1992
- 76) Kliewer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M.: Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D $_3$  signalling. Nature, 355: 446-449, 1992
- 77) Koenig, R. J., Lazar, M. A., Hodin, R. A., Brent, G. A., Larsen, P. R., Chin, W. W. and Moore, D. D.: Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding *c-erbA* protein generated by alternative mRNA splicing. Nature, 337: 659-661, 1989
- 78) Nakai, A., Sakurai, A., Macchia, E., Fang, V. and DeGroot, L. J.: The roles of three forms of human thyroid hormone receptor in gene regulation. Mol Cell Endocrinol, 72: 143-148, 1990
- 79) Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. and Chin, W. W.: Identification of a rat *c-erbA*  $\alpha$ -related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. Mol Endocrinol, 2: 893-901, 1988
- 80) Selmi, S. and Samuels, H. H.: Thyroid hormone receptor/and *v-erbA*. A single amino acid difference in the C-terminal region influences dominant negative activity and receptor dimer formation. J Biol Chem, 266: 11589-11593, 1991
- 81) Lazar, M. A., Hodin, R. A., Cardona, G. and Chin, W. W.: Gene expression from the *c-erbA* $\alpha$ /Rev-ErbA $\alpha$  genomic locus. Potential regulation of alternative splicing by opposite strand transcription. J Biol Chem, 265: 12859-12863, 1990
- 82) Munroe, S. H. and Lazar, M. A.: Inhibition of *c-erbA* mRNA splicing by a naturally occurring antisense RNA. J Biol Chem, 266: 22083-22086, 1991
- 83) Refetoff, S.: Syndrome of thyroid hormone resistance. Am J Physiol, 243: E88-E98, 1982
- 84) Refetoff, S.: The syndrome of generalized resistance to thyroid hormone (GRTH). Endocr Res, 15: 717-743, 1989
- 85) Refetoff, S., DeWind, L. T. and DeGroot, L. J.: Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter, and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab, 27: 279-294, 1967
- 86) Refetoff, S.: Resistance to thyroid hormone revisited. Thyroid Today, 13: 1-11, 1990
- 87) Usala, S. J., Bale, A. E., Gesundheit, N., Weinberger, C., Lash, R. W., Wondisford, F. E., McBride, O. W. and Weintraub, B. D.: Tight linkage between the syndrome of generalized thyroid hormone resistance and the human *c-erbA* $\beta$  gene. Mol Endocrinol, 2: 1217-1220, 1988
- 88) Sakurai, A., Takeda, K., Ain, K., Ceccarelli, P., Nakai, A., Seino, S., Bell, G. I., Refetoff, S. and DeGroot,

- L. J.: Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 8977-8981, 1989
- 89) Usala, S. J., Tennyson, G. E., Bale, A. E., Lash, R. W., Gesundheit, N., Wondisford, F. E., Accili, D., Hauser, P. and Weintraub, B. D.: A base mutation of the c-erbA $\beta$  thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other kindreds. *J Clin Invest*, 85: 93-100, 1990
- 90) Usala, S. J., Menke, J. B., Watson, T. L., Berard, J., Bradley, C., Bale, A. E., Lash, R. W., Hauser, P. and Weintraub, B. D.: A novel point mutation in the T<sub>3</sub>-binding domain of the c-erbA $\beta$  is tightly linked to generalized thyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 72: 32-38, 1991
- 91) Boothroyd, C. V., Teh, B. T., Hayward, N. K., Hickman, P. E., Ward, G. J. and Camerorr, D. P.: Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor  $\beta$  gene in generalized thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 178: 606-612, 1991
- 92) Parrilla, R., Mixson, A. J., McPherson, J. A., McClaskey, J. H. and Weintraub, B. D.: Characterization of seven novel mutations of the c-erbA $\beta$  gene in unrelated kindreds with generalized thyroid hormone resistance. Evidence for two "hot spot" regions of the ligand binding domain. *J Clin Invest*, 88: 2123-2130, 1991
- 93) Sakurai, A., Nakai, A. and DeGroot, L. J.: Structural analysis of human thyroid hormone receptor  $\beta$  gene. *Mol Cell Endocrinol*, 71: 83-91, 1990
- 94) Takeda, K., Balzano, S., Sakurai, A., DeGroot, L. J. and Refetoff, S.: Screening of nineteen unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone for known point mutations in the thyroid hormone receptor  $\beta$  gene and the detection of a new mutation. *J Clin Invest*, 87: 496-502, 1991
- 95) Takeda, K., Sakurai, A., DeGroot, L. J. and Refetoff, S.: Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor- $\beta$  gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 74: 49-55, 1992
- 96) Sakurai, A., Miyamoto, T., Refetoff, S. and DeGroot, L. J.: Dominant negative transcriptional regulation by a mutant thyroid hormone receptor- $\beta$  in a family with generalized resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*, 4: 1988-1994, 1990
- 97) Chatterjee, V. K. K., Nagaya, T., Madison, L. D., Datta, S., Rentoumis, A. and Jameson, J. L.: Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors. *J Clin Invest*, 87: 1977-1984, 1991
- 98) Hughes, M. R., Malloy, P. J., Kieback, D. G., Kesterson, R. A., Pike, J. W., Feldman, D. and O'Malley B. W.: Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science*, 242: 1702-1705, 1988
- 99) Usala, S. J., Menke, J. B., Watson, T. L., Wondisford, F. E., Weintraub, B. D., Berard, J., Bradley, W. E. C., Ono, S., Mueller, O. T. and Bercu, B. D.: A homozygous deletion in the c-erbA $\beta$  thyroid hormone receptor gene in a patient with generalized thyroid hormone resistance: isolation and characterization of the mutant receptor. *Mol Endocrinol*, 5: 327-335, 1991
- 100) Ono, S., Schwartz, I. D., Mueller, O., Root, A. W., Usala, S. J. and Bercu, B. B.: Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 73: 990-994, 1991
- 101) Takeda, K., Weiss, R. E. and Refetoff, S.: Rapid localization of mutations in the thyroid hormone receptor  $\beta$  gene by denaturing gradient gel electrophoresis in eighteen families with thyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 74: 712-719, 1992

- 102) Schueler, P. A., Schwartz, H. L., Strait, K. A., Mariash, C. N. and Oppenheimer, J. H. : Binding of 3, 5, 3'-triiodothyronine ( $T_3$ ) and its analogs to the *in vitro* translational products of c-erbA protooncogenes : Differences in the affinity of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -forms for the acetic acid analog and failure of the human testis and kidney  $\alpha$ -2 products to bind  $T_3$ . Mol Endocrinol, 4 : 227-234, 1990
- 103) Strait, K. A., Schwartz, H. L., Perez-Castillo, A. and Oppenheimer, J. H. : Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. J Biol Chem, 265 : 10514-10521, 1990

(4. 3. 23 受稿)

---