

核内リセプター LXR による コレステロール合成系遺伝子の制御

新潟大学医学部内科学第一教室 (主任: 相澤義房教授)

中 村 彰

Regulation of the Gene Involved in Cholesterol Biosynthesis
by Nuclear Receptor LXR

Akira NAKAMURA

*The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

We had shown that squalene epoxidase (SE) gene, which is one of the enzymes in cholesterol biosynthesis, is regulated by oxysterol, and SE is able to synthesize one of the oxysterol, epoxycholesterol.

Recently, it was reported that the ligands of nuclear receptor LXRs and Ad4BP/SF-1 are oxysterols. We have studied whether LXRs are involved in the signal transduction pathway from oxysterol to transcriptional factors regulating cholesterol metabolism related genes or not.

Our data show over expression of LXR in HeLa cells cause to induction of LXRE (LXR-response element) driven gene, while suppression of SE promoter driven gene. Most efficient inducer to LXRE is proved to be epoxycholesterol, and in order according to induction ability, 22R-hydroxycholesterol, 20 α -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol and 22S-hydroxycholesterol. Induction ability to LXRE of oxysterols correlates suppression ability to SE promoter. The quantity of epoxycholesterol, putative physiological LXR ligand, must be regulated by the ratio of activities of SE and following enzyme lanosterol synthase. Tissue specificities of the two enzymes show extremely different pattern. It is possible that the epoxycholesterol works as hormone in various tissue.

Key words: cholesterol, squalene epoxidase, transcriptional regulation,
nuclear receptor, LXR

コレステロール, スクアレンエポキシダーゼ, 転写制御, 核内受容体

Reprint requests to: Akira NAKAMURA, 別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
The First Department of Internal Medicine, 新潟大学医学部内科学第一教室 中村 彰
Niigata University School of Medicine
757, Asahimachi-dori 1, Niigata,
951-8510, Japan

はじめに

コレステロールは生体内の必須物質であるが、高濃度の血中コレステロールは冠動脈硬化症をはじめとする循環器疾患の危険因子であることが知られている。従って、血中コレステロール濃度を適度に保つことが、循環器疾患の発症を抑える上で最大の課題である。最近になって、コレステロール合成を抑える HMG-CoA 還元酵素阻害剤が開発され広く用いられるようになった。ヨーロッパにおいて大規模な試験が数年間にわたって行われた結果、この阻害剤を使用した患者群は使用しなかった患者群に比べて、循環器疾患の発病が3割減り、死亡率も同様に減少していることが報告されている¹⁾²⁾。また動脈硬化の伸展を抑えるだけでなく、プラークがはがれて血栓をおこす確率も抑制することが明らかになり、ますますコレステロール濃度制御の重要性が高まっている。

適切に血中コレステロール濃度を維持し、またより効果的な新しい薬剤開発を目指すためには、生体内におけるコレステロール代謝の調節機構について解明することが重要である。既に LDL 受容体³⁾、HMG-CoA 合成酵素⁴⁾ HMG-CoA 還元酵素⁵⁾⁶⁾、ファルネシルピロリン酸合成酵素⁷⁾、スクアレン合成酵素⁸⁾、スクアレンエポキシダーゼ (SE)⁹⁾、各遺伝子の発現調節機構についての解析が進められている。その結果、これらの遺伝子群の調節が、主に SREBP (sterol regulatory element binding protein)¹⁰⁾ と NF-Y¹¹⁾ という二つの転写因子によって行われていることが明らかになっている。また、SREBP は小胞体膜、核膜に存在しており、ステロールの欠乏によりプロテアーゼによって切断され、核内に移行して遺伝子を活性化することも明らかになっている¹²⁾。これらの遺伝子にネガティブにフィードバック制御を行う制御物質は、コレステロール自身ではなく酸化ステロールであると考えられている。しかしながら制御物質がどのような酸化ステロールであるのか具体的には特定されておらず、またその制御物質からこれらの転写因子への情報伝達経路についても全く明らかになっていない。

最近になって、肝臓に多く存在している LXR α ¹³⁾⁻¹⁵⁾、脳など各臓器に広く存在する LXR β ¹⁶⁾⁻¹⁹⁾、性分化と関わり、またステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の制御因子である Ad 4 BP/SF-1²⁰⁾⁻²²⁾ などの核内レセプターのリガンドが酸化ステロールであることが明らかになった。そこでこれらの核内レセプターが、酸化ステロールによるコレステロールネガティブフィードバ

ック制御機構に関わっているのかどうか非常に興味深い。本研究においては、これらの核内レセプター、特にコレステロール代謝の中心である肝臓に多く発現している LXR α が、実際にコレステロール代謝系酵素遺伝子、中でも合成経路後半の律速酵素と考えられるスクアレンエポキシダーゼ (SE) 遺伝子²³⁾⁻²⁵⁾ の発現調節に関わっているかどうかについて実験を行った。また、SE はエポキシコレステロールといわれる酸化ステロールを生成することが知られている²⁶⁾。エポキシコレステロールが LXR α の生理的リガンドである可能性についても検討を行った。

方 法

プラスミドの作製

LXR α 遺伝子の発現ベクター pCMVLXR α は次のように作製した。まず HeLa 細胞より ISOGEN キット (日本ジーン) を用いてグアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム法にて total RNA を得、さらに 1st strand cDNA synthesis kit (CLONTEC Laboratories Inc.) を用いて 1st strand cDNA を合成した。合成した cDNA から、5'-GAATTCAA GCTTAGAGATGTCCTTGTGGCTGG-3' 及び 5'-GAATTCTCTAGAACAGTCATTCGTGCAC ATCC-3' 配列をプライマーとして用いて PCR 法により LXR α 遺伝子を増幅し、さらに制限酵素 Hind III 及び Xba I を用いて切断し精製した断片を、pcDNA 3 ベクターのサイトメガロウイルスのプロモーター下流の Hind III-Xba I サイトに挿入した。

LXR 反応エレメント LXRE (LXR response element) のレポータープラスミド pGVLXRE は、LXRE 配列である 5'-CTTGCGGTTCCCAAGGT TTAATAAGTTCA-3' を 3 回繰り返した配列を合成し、サイレントプロモーターである β 型インターフェロン遺伝子のプロモーター-55 から +19 遺伝子を pGVB (東洋インキ) のルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだプラスミド pGVB β IFN のさらに上流の Sac I-Xho I サイトに挿入し作製した。

SE プロモーターのレポータープラスミド pGVHSE-741 は、ヒト SE プロモーターの-741 から +20 の断片を pGVB のルシフェラーゼ遺伝子の上流、Sac I-Xho I サイトに挿入し作製した。

ルシフェラーゼアッセイ

直径 3.5 cm の培養皿中に 5×10^5 個の HeLa 細胞をまき、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を加えた DMEM

(Dulbecco's modified essential medium) 培地 2 ml 中において 5% 炭酸ガス 37°C 条件下で 24 時間培養し、コンフルエントになった時点でトランスフェクションに用いた。発現ベクター pCMVLXR α 10 μ g, レポーター遺伝子 pGVLXRE または pGVHSE-741 10 μ g, 及び内部コントロールとして β -ガラクトシダーゼ発現ベクター pCMV β 5 μ g に, 2 M CaCl₂ 12.5 μ l を加え 10 mM TrisCl (pH 7.5) で 100 μ l とした後, 100 μ l HBS (HEPES buffered saline) を加えて 3 分間ヴォルテックスし, さらに室温で 30 分静置し, 培養皿に 185 μ l ずつ加えた後 37°C で培養した。8 時間後培養皿を取り出し 10% DMSO (Dimethylsulfoxide) で 1 分間ショックを与え, PBS (Phosphate buffered saline) で洗った後, 10% リポプロテイン除去血清 (LPDS) を加えた DMEM 中で 48 時間培養し, ラバーポリスマンを用いて回収した。必要に応じて各種酸化ステロール (25-ヒドロキシコレステロール, 20 α -ヒドロキシコレステロール, 22S-ヒドロキシコレステロール, 22R-ヒドロキシコレステロール, 24-25エポキシコレステロール) 1 μ g/ml, あるいは mock induction (エタノール) を加えている。回収した HeLa 細胞を LC β (東洋インキ) で懸濁した後, 室温に 15 分静置し遠心した上清を細胞抽出液として用いた。細胞抽出液 20 μ l にピッカジーン基質溶液 (東洋インキ) 100 μ l を加え Lumat LB 9501 (ベルトールド) を用いて 10 秒間ルシフェラーゼ活性を測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性は細胞抽出液 10 μ l に Reaction Buffer Diluent で 100 倍に希釈した基質 Galacto-Light Plus (Tropix) 100 μ l を加え, 室温で 1 時間静置し, Light Emission Accelerator-II 100 μ l を加え Lumat LB 9501 を用いて 10 秒間 β -ガラクトシダーゼ活性を測定し, その値によってルシフェラーゼ活性の値を補正した。

ヒト組織ノーザンハイブリダイゼーション

ヒト組織より得られた各 2 μ g のポリ A RNA をアガロースゲル電気泳動し陽性荷電ナイロン膜にブロッティングした Multiple Tissue Northern Blot. Human I 及び Human II (CLONTEC Laboratories Inc.) を用いた Human I は心臓, 脳, 胎盤, 肺, 肝臓, 骨格筋, 腎臓, 膵臓, Human II は脾臓, 胸腺, 前立腺, 精巣, 卵巣, 小腸, 大腸, 白血球, 各組織由来の RNA が含まれている。ヒト HMG CoA 還元酵素 cDNA pHRED の 2.8 kb Bgl II 断片, ヒト SE cDNA (Genbank No. D 78129), ヒトラノステロール合成酵素 (LS) cDNA 断片 (1-1432) に MegaPrime キッ

ト (Amersham Corp.) を用いてランダムプライム法にて [α -³²P-] dCTP (DuPon NEN) を取り込ませ標識した。0.5M リン酸緩衝液 (pH 7.2), 7% SDS, 1 mM EDTA 溶液にて 65°C, 15 分プレハイブリダイゼーションを行い, プレハイブリダイゼーションと同一の溶液にプローブを加え 65°C 18 時間ハイブリダイゼーションを行った。40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で 65°C で 5 分, さらに 25°C で 15 分 3 回振盪しメンブレンを洗った。その後 X Ray film (Fuji RX) を用いてオートラジオグラフィーを行った。同一のメンブレンを各プローブ毎にリハイブリダイゼーションを行った。

結 果

LXR α の強発現による LXRE 及び SE 遺伝子プロモーターへの影響

HeLa 細胞に, LXR 反応エレメント LXRE (LXR response element) によって制御されるレポータープラスミドを導入し, その発現量の変化についてルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。遺伝子導入後, 10% リポプロテイン除去血清 LPDS (Lipoprotein deficient serum) を加え 48 時間培養した細胞と, 10% LPDS にさらに 1 μ g/ml の 25-ヒドロキシコレステロールを加え 48 時間培養した細胞における発現量を比較すると, 25-ヒドロキシコレステロールを加えた細胞においてはコントロールに比べて 1.75 倍の増加が見られた (図 1)。また, さらにサイトメガロウイルスプロモーターにより LXR α を強発現させて, 同様の実験を行ったところ, LXR α を強発現させた細胞は強発現させていない細胞に比べて 18.7 倍もの発現量の増加が見られた。また 25-ヒドロキシコレステロールを加えると 24.9 倍とさらなる発現量の増加が見られた (図 1)。

次にスクアレンエポキシダーゼ (SE) プロモーターのレポータープラスミドを導入して同様の実験を行った。まず 25-ヒドロキシコレステロールを加えると LXRE の場合とは逆に 0.29 倍と減少した。さらに LXR α を強発現させて発現量の変化を調べたところ, LXR α を強発現させていないものに比べ, 10% LPDS のみの培養下では 0.031 倍と極めて強く発現が抑制され, さらに 25-ヒドロキシコレステロールを加えると 0.017 倍とさらなる強い抑制が観察され, LXRE と SE プロモーターにおいては全く逆の挙動を示すことが見いだされた。

各種酸化ステロールによる LXRE 及び SE 遺伝子プロモーターへの影響

次に, LXR に対する生理的リガンドを検索する目

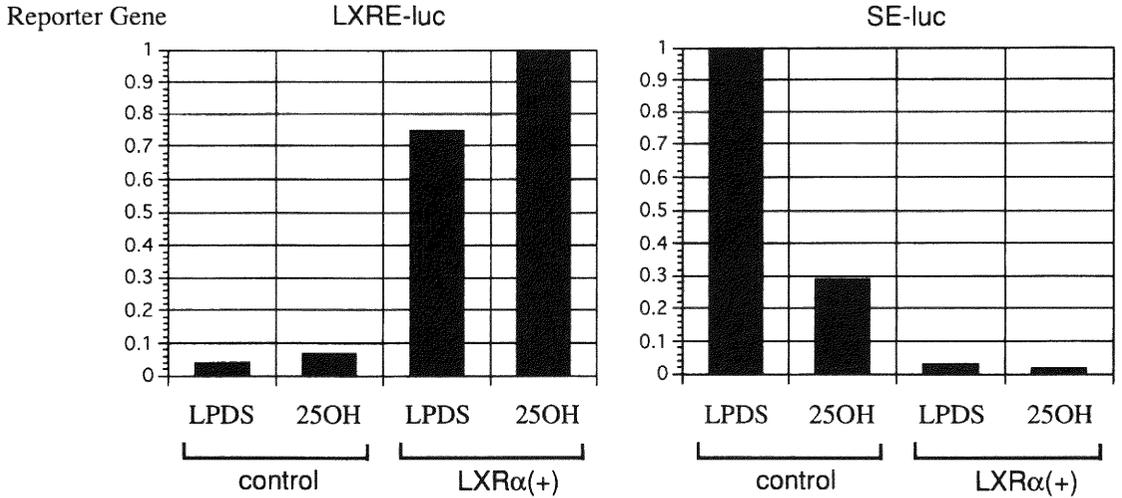


図 1 LXR α の大量発現による LXRE 及び SE プロモーターに対する影響
 LPDS : リボプロテイン除去血清, 25OH : LPDS+25ヒドロキシコレステロール

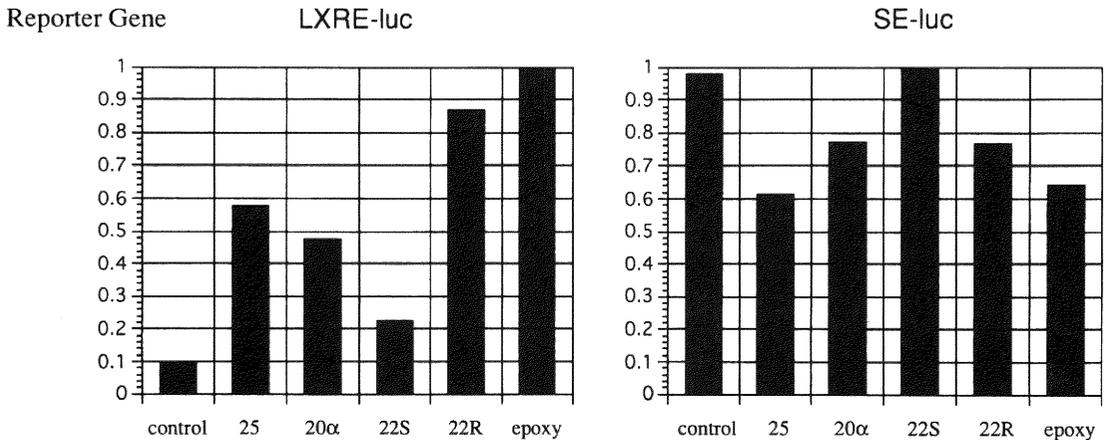


図 2 各種酸化ステロールの LXRE 及び SE プロモーターに対する影響
 25 : 25ヒドロキシコレステロール, 20α : 20αヒドロキシコレステロール,
 22S : 22Sヒドロキシコレステロール, 22R : 22Rヒドロキシコレステロール,
 epoxy : 24-25エポキシコレステロール

ので、HeLa 細胞に LXRE レポータープラミッドを導入し、様々な酸化ステロールによる発現量の変化について調べた。その結果、25-ヒドロキシコレステロール、20α-ヒドロキシコレステロール、22S-ヒドロキシコレステロール、22R-ヒドロキシコレステロール、24-25エポキシコレステロールを各 1 μg/ml 加えて 48 時間培養した細胞においては、対照に比べそれぞれ 5.9 倍、

4.9 倍、2.3 倍、8.9 倍、10.2 倍と発現量が増大しているのが観察された (図 2)。もっとも発現量が増大する、誘導効率の高い酸化ステロールは 24-25エポキシコレステロールであった。

また、同じ酸化ステロールが SE 遺伝子プロモーターに対しどのような影響を与えるか、同様に実験を行った。その結果、25-ヒドロキシコレステロール、20α-ヒド

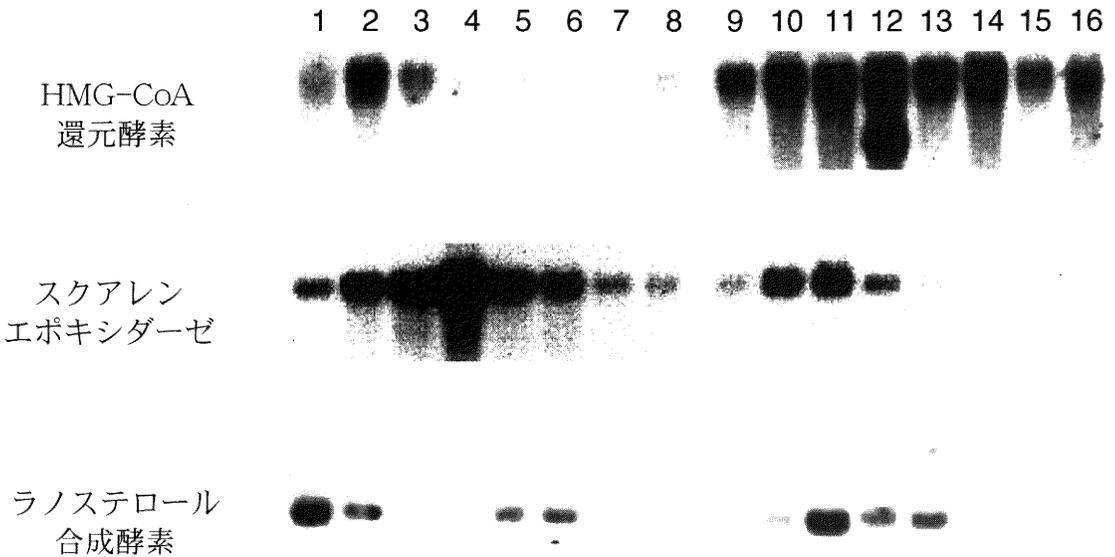


図4 HMG-CoA 還元酵素, スクアレンエポキシダーゼ, ラノステロール合成酵素 mRNA の組織特異性

1. 脾臓, 2. 胸腺, 3. 前立腺, 4. 精巣, 5. 卵巣, 6. 小腸, 7. 大腸, 8. 白血球, 9. 心臓, 10. 脳, 11. 胎盤, 12. 肺, 13. 肝臓, 14. 骨格筋, 15. 腎臓, 16. 膵臓

ターの発現が劇的に抑制されることが明らかになった(図1). また様々な酸化ステロールによる LXRE の誘導能と SE 遺伝子プロモーターの抑制能がほぼ相関していることが明らかになった(図2). なかでも22S-ヒドロキシコレステロール, 22R-ヒドロキシコレステロールは光学異性体であるにもかかわらず, LXRE に対する誘導能が2.3倍, 8.9倍と全く異なっているが, SE プロモーターに対する抑制能も1.02倍, 0.78倍と全く異なっていることが明らかになった. これらの結果は LXR α がコレステロール合成の調節機構に重要な役割を果たしていることを強く示唆している. おそらく LXR α が調節物質である酸化ステロールのセンサーとして働き, その存在量によってコレステロール代謝系遺伝子群を調節しているのであろう. しかしながらその調節機構は間接的なものであると考えられる. それは LXR α により LXRE が誘導されるのに対し, SE プロモーターは逆に抑制されるからである. その抑制機構が SREBP を介するものか現時点では明かではない. SREBP を介するのであれば, 例えば SREBP を活性化するプロテアーゼの阻害物質を誘導するという可能性が考えられる. また, 今までに知られていないコレステ

ロール代謝系遺伝子群のリプレッサーを誘導している可能性もある. この点を明らかにするためには, LXR α により誘導される(つまり LXRE により抑制されている)標的遺伝子を特定することが次の重要な課題となるであろう.

また本研究において, 酸化ステロールの中で25-ヒドロキシコレステロールのみが, LXRE に対する誘導能がさほど高くないにもかかわらず, SE 遺伝子プロモーターに対する抑制能が高くなっているのが見いだされた. 最近, 酸化ステロールと細胞内輸送との関係が注目を集めているが, 25-ヒドロキシコレステロールは細胞内輸送を阻害してしまうことが明らかになっている. 25-ヒドロキシコレステロールは LXR α を介する情報伝達機構以外に, このような別の働きをしているのかもしれない.

LXR α の生理的リガンドは何か?

本研究により様々な酸化ステロールのなかで最も LXR α の誘導能が高いのはエポキシコレステロールであることが明らかになった(図2). エポキシコレステロールは, コレステロール代謝の中心的な役割を果たしている肝臓における主要な酸化ステロールであると考えられている. このことはエポキシコレステロールが LXR α

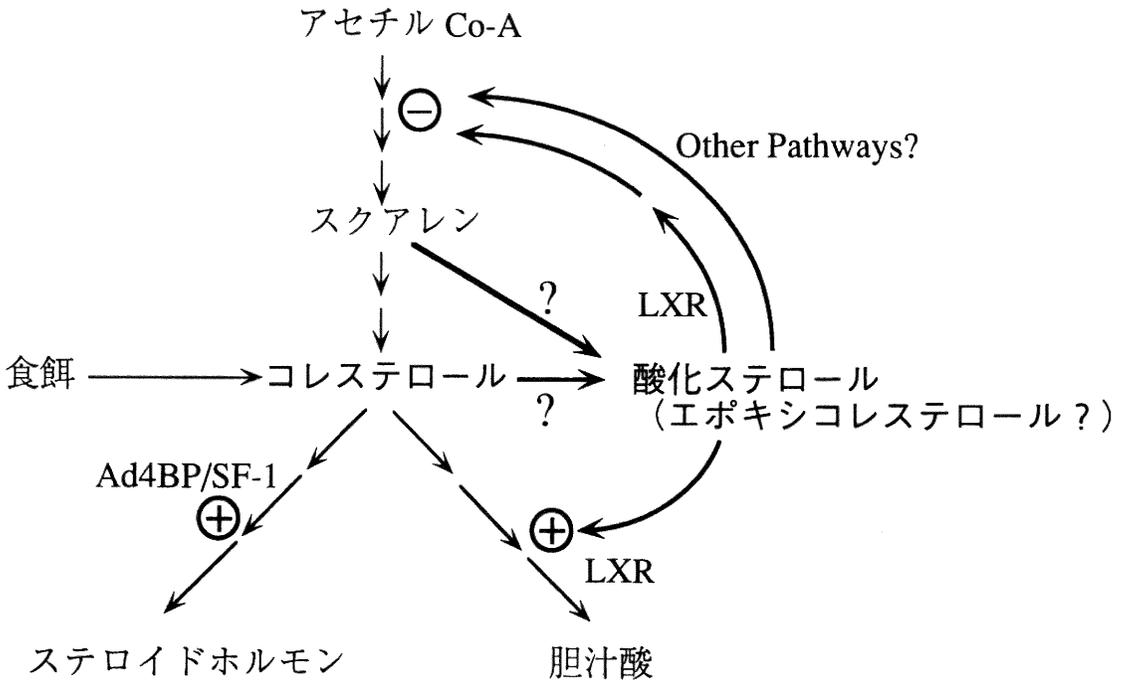


図5 ステロールの制御モデル

の生理的リガンドとして働いている可能性が極めて高いことを示している。本研究に用いた SE には、スクアレンエポキシドばかりではなくスクアレングエポキシドを生成する活性があり、そのスクアレングエポキシドからまずエポキシラノステロールが生成され、さらにエポキシコレステロールが生成されると考えられている。エポキシラノステロールは HMG-CoA 還元酵素の分解を最も促進するステロールとして知られている²⁷⁾。これらの事実からすれば、スクアレングエポキシドの生成量がコレステロール代謝を調整しているのかもしれない。このスクアレングエポキシドの生成量は、未知の機構が働いている可能性もあるが、基本的には SE と次のラノステロール合成酵素 (LS) との活性の比によって決まってくると考えられている。例えば LS の活性を阻害するとスクアレングエポキシドの生成量が増えるのである。今回は SE と LS の活性を直接測定することはできなかったが、それぞれの mRNA 量の比較を試みた。その結果、ステロール代謝に関わる遺伝子群は SREBP や NF- κ B などほぼ共通の制御機構を持つことから、同じ様な組織特異性を示すと考えられていたに

もかわらず、HMG-CoA 還元酵素、SE、LS という3つの遺伝子が全く異なる組織特異性を示すという驚くべき事実が明らかになった。最近、酸化ステロールが脳神経系など様々な臓器においてホルモン様の働きをし、またコレステロールが形態形成に重要な役割を果たしているのではないかと考えられるようになった。本実験の結果はコレステロール生合成系が生体内で様々な役割を果たしていることを示唆している。中でも注目されるのは肝臓において SE の発現が極めて低いことである。このことは肝臓において、SE が律速酵素として働いていることを強く示唆している。もう一つの注目すべき点は、精巣、卵巣、前立腺、といった臓器に SE が極めて強く発現しており、一方 LS はほとんど発現が見られないことである。同じコレステロール生合成系に属し、しかも連続する酵素でありながらこれほど発現に違いが観察されることは驚異的である。LXR α と同様に酸化ステロールがリガンドであることが明らかになっている Ad4BP/SF-1 (fushitarazu F-1 の哺乳類カウンターパート) はステロイドホルモン産生臓器に特異的に発現しており、性決定やステロイドホルモン合成に関わ

る6つのP450遺伝子の制御に関わっていることが知られている。SEが大量に発現しLSがほとんど発現していないことから、これらの臓器においてはエポキシコレステロールが大量に存在していると考えられ、Ad4BP/SF-1のリガンドとして働いている可能性が強く示唆される。エポキシコレステロールがAd4BP/SF-1の生理的リガンドであるのか今後の研究が待たれる。また、脳においても同様にエポキシコレステロールが蓄積されていると考えられ、LXR β のリガンドとして重要な役割を果たしている可能性がある。

以上の結果をまとめるとつぎのようなステロール制御モデルが考えられる(図5)。酸化ステロール(SEによって生成されたエポキシコレステロール?)により、LXRを介してコレステロールを合成する遺伝子群が負に制御される。一方コレステロールから合成される胆汁酸合成経路はLXRを介して正に制御される。(胆汁酸合成の律速酵素であるコレステロール7 α -ヒドロキシラーゼ遺伝子プロモーターにはLXREが存在し、LXRによって誘導されることが示されている)またコレステロールから合成されるステロイドホルモン合成系遺伝子群はAd4BP/SF-1を介して酸化ステロールにより正に制御される。

本研究により、LXR α がこのようなコレステロール制御系に関わっていることが強く示された。今後このようなコレステロール制御モデルを立証し、さらにその情報伝達機構を明らかにすることは、新たなコレステロール制御薬剤の開発に重要な役割を果たすであろう。

結 語

LXR α を強発現することにより、SE遺伝子が強く抑制されることがわかった。また様々な酸化ステロールのLXREに対する誘導能とSE遺伝子プロモーターに対する抑制能が相関していることからLXR α がコレステロール生合成系酵素遺伝子の発現制御に関わっていることが強く示唆された。またエポキシコレステロールが肝臓における中心的な酸化ステロールであり、最も強くLXREを誘導することから生理的リガンドである可能性が高いことも示された。そのエポキシコレステロールを生成するSEの発現の組織特異性から、エポキシコレステロールがLXR α ばかりではなく、Ad4BP/SF-1を介してステロイドホルモン合成の制御にも関わっている可能性が示された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、直接ご指導いただいた新潟大学医学部第二生化学教室 小野輝夫教授、ノーザンプロット解析を手伝っていただいた永井雅昭先生に深謝いたします。また、研究指導並びに本論文の御校閲を賜りました新潟大学医学部第一内科相澤義房教授にも心から御礼を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) **Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S):** Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet* **344**: 1383~1389, 1994.
- 2) **Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., MacFarlane, P.W., McKillop, J.H., Packard, C.J., and West of Scotland Coronary Prevention Study Group:** Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*. **333**: 1301~1307, 1995.
- 3) **Smith, J.R., Osborne, T.F., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.:** Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *Journal of Biological Chemistry*. **265**: 2306~2310, 1990.
- 4) **Smith, J.R., Osborne, T.F., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Gil, G.:** Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *Journal of Biological Chemistry*. **263**: 18480~18487, 1988.
- 5) **Osborne, T.F., Bennett, M. and Rhee, K.:** Red 25, a protein that binds specifically to the sterol regulatory region in the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Journal of Biological Chemistry*. **267**: 18973~18982, 1992.
- 6) **Vallett, S.M., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M. and Osborne, T.F.:** A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *Journal of Biological Chemistry*. **271**: 12247~12253, 1996.
- 7) **Spear, D.H., Ericsson, J., Jackson, S.M. and Edwards, P.A.:** Identification of a 6-base pair

- element involved in the sterol-mediated transcriptional regulation of farnesyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*. **269**: 25212~25218, 1994.
- 8) Guan, G., Dai, P.H., Osborne, T.F., Kim, J.B. and Shechter, I.: Multiple sequence elements are involved in the transcriptional regulation of the human squalene synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*. **272**: 10295~10302, 1997.
- 9) Nakamura, Y., Sakakibara, J., Izumi, T., Shibata, A. and Ono, T.: Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*. **271**: 8053~8056, 1996.
- 10) Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L. and Brown, M.S.: SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. **75**: 187~197, 1993.
- 11) Jackson, S.M., Ericsson, J., Osborne, T.F. and Edwards, P.A.: NF-Y has a novel role in sterol-dependent transcription of two cholesterol genes. *Journal of Biological Chemistry*. **270**: 21445~21448, 1995.
- 12) Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X. and Goldstein, J.L.: SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis [see comments]. *Cell*. **77**: 53~62, 1994.
- 13) Willy P.J., Umesono, K., Ong E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A. and Mangelsdorf, D.J.: LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & Development*. **9**: 1033~1045, 1995.
- 14) Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G. and Pfahl, M.: A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Molecular & Cellular Biology*. **14**: 7025~7035, 1994.
- 15) Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R. and Mangelsdorf, D.J.: An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. **383**: 728~731, 1996.
- 16) Shinar D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A. and Schmidt, A.: NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene*. **147**: 273~276, 1994.
- 17) Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A. and Liao, S.: Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 10809~10813, 1994.
- 18) Kainu, T., Kononen, J., Enmark, E., Gustafsson, J.A. and Peltö-Huikko, M.: Localization and ontogeny of the orphan receptor OR-1 in the rat brain. *Journal of Molecular Neuroscience*. **7**: 29~39, 1996.
- 19) Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A. and Willson, T.M.: Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **272**: 3137~3140, 1997.
- 20) Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A. and Parker, K.L.: Developmental expression of mouse steroidogenic factor - 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*. **8**: 654~662, 1994.
- 21) Tsukiyama, T., Ueda, H., Hirose, S. and Niwa, O.: Embryonal long terminal repeat-binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. *Molecular & Cellular Biology*. **12**: 1286~1291, 1992.
- 22) Lala, D.S., Syka, P.M., Lazarchik, S.B., Mangelsdorf, D.J., Parker, K.L. and Heyman, R.A.: Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**: 4895~4900, 1997.
- 23) Hidaka, Y.: Regulation of squalene epoxidase in cholesterol biosynthesis and metabolism. *Vitamins*, **65**: 227~242, 1991.
- 24) Sakakibara, J., Watanabe, R., Kanai, Y. and

- Ono, T.:** Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. *Journal of Biological Chemistry.* **270:** 17~20, 1995.
- 25) **Nagai, M., Sakakibara, J., Wakui, K., Fukushima, Y., Igarashi, S., Tsuji, S., Arakawa, M. and Ono, T.:** Localization of the squalene epoxidase gene (SQLE) to human chromosome region 8q24.1 *Genomics.* **44:** 141~143, 1997.
- 26) **Nagumo, A., Kamei, T., Sakakibara, J. and Ono, T.:** Purification and characterization of recombinant squalene epoxidase. *Journal of Lipid Research.* **36:** 1489~1497, 1995.
- 27) **Panini, S.R., Delate, T.A. and Sinensky, M.:** Post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by 24 (S), 25-oxidolanosterol. *Journal of Biological Chemistry.* **267:** 12647~12654, 1992.

(平成11年 2 月 9 日受付)
