

コルチコステロイド受容体ダイナミクスのバイオイメージング

Bioimaging of Corticosteroid Receptor Dynamics

西 真 弓

Mayumi Nishi

奈良県立医科大学・第一解剖学

要 旨 コルチコステロイドは、脂溶性であるため細胞膜を容易に通過し、細胞内の特異的受容体と結合し、多彩な作用を発揮する。コルチコステロイド受容体の細胞内局在について、これまでに様々な方法で調べられてきたが、その詳細は未だ完全には解明されていない。近年、GFP (green fluorescent protein) という緑色蛍光タンパクとの融合蛋白を用いることによって、生細胞内での受容体の動きをリアルタイムに可視化して解析することが可能となり、これまでの固定した細胞内では見られなかった新しい知見が得られるようになってきた。本解説においては、glucocorticoid receptor (GR) と mineralocorticoid receptor (MR) に焦点を置き、これらと GFP あるいはそれらの色変異体との融合蛋白を培養細胞に発現させ、蛍光イメージング法による受容体の生細胞内における動態の解析について概説する。

キーワード：緑色蛍光タンパク質、リアルタイムイメージング、in vivo イメージング、FRAP、FRET

1. はじめに

副腎コルチコステロイド（ヒトではコーチゾール／齧歯類ではコルチコステロン）は、低分子脂溶性ホルモンであるため細胞膜を容易に通過し、細胞内の特異的受容体と結合し、転写因子として働き、標的遺伝子の発現を通して糖質、タンパク、脂質、電解質などの代謝や免疫反応などに関与する重要なホルモンである¹⁾。中枢神経系においては、ストレス応答、情動の制御、記憶・学習などに関わり、重要な役割を果たしている。コルチコステロイド受容体には glucocorticoid receptor (GR) と mineralocorticoid receptor (MR) の2種類が存在し、GRはコルチコステロイドに対する親和性 (Kd 値 5×10^{-9} M) が MR (Kd 値 5×10^{-10} M) より約 10 倍低いことが知られている²⁾。これら受容体は、このようなコルチコステロイドに対する親和性の差を反映して、日内変動やストレス負荷などに伴う血中コルチコステロイドの変化に応答し、その下流遺伝子の転写を制御することによって多彩な機能を発揮するものと考えられる。さらに最近では、転写因子としてのコルチコステロイド受容体に加えて、膜受容体としてのコルチコステロイド受容体の存在も報告されている。その細胞内局在について、これまでに生化学的な方法、免疫組織化学的方法など様々な方法で調べられてきたが、その詳細は未だ完全には解明されていない。近年、green fluorescent protein (GFP)³⁾ やその色変異体との融合蛋白を用いること

によって、生細胞内での受容体の動きをリアルタイムに可視化して解析することが可能となり、これまでの固定した細胞内では見られなかった新しい知見が得られるようになってきた。本稿では、主として培養生細胞内におけるコルチコステロイド受容体の動態をリアルタイムイメージングにより時空間特異的に解析する方法について解説し、さらに全脳レベルにおける in vivo でのリアルタイムイメージングについても簡単に紹介する。

2. GR と MR の細胞質—核間輸送

GR と MR は、リガンドの非存在下では主として細胞質に存在するが、リガンドと結合すると受容体の立体構造が大きく変化し、熱ショック蛋白 90 (heat shock protein 90; hsp 90) などのシャペロン分子が解離し、それまで隠れていた核移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) が露出し、速やかに核へ移行すると考えられている。この過程をよりダイナミックに観察するために、GFP やその色変異体である CFP (cyan fluorescent protein)、YFP (yellow fluorescent protein) と GR および MR の融合蛋白を COS 細胞や海馬培養神経細胞に発現させ、リアルタイムイメージングで解析する系を確立した。具体的には、市販の pEGFP ベクターの multiple cloning site に GR あるいは MR の cDNA の open reading frame をインフレームとなるようにサブクローニングする。融合蛋白の性質について、ウエスタンブロットイングにより目的の大きさの融合蛋白が発現すること、またレポーターアッセイにより転写活性を有していることなどを予め確かめておくことが必要である。このようにして作製したキメラコンストラクトを培養細胞にリポフェクション法、カルシウム

〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840
TEL: 0744-29-8822; FAX: 0744-29-7199
E-mail: nmayumi@narmed-u.ac.jp
2013年11月26日受付

リン酸法などでトランスフェクションし、37°Cの温度環境下で観察する。まず、受容体の細胞質-核間輸送に影響を及ぼす種々の因子について、私たちのデータを中心に紹介する。以下に述べるリアルタイムイメージング実験は、落射型蛍光顕微鏡と冷却 CCD カメラを組み合わせるか、あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った⁴⁾。

2.1 共通のリガンドであるコルチコステロンに対する GR および MR の反応性の相違

コルチコステロイドの合成・分泌は、視床下部の室傍核から分泌される corticotropin-releasing hormone (CRH) やバソプレッシンの刺激で、下垂体から分泌される ACTH によって促進される。分泌されたコルチコステロイドは下垂体および大脳辺縁系、視床下部などに作用し、CRH、ACTH の分泌制御に留まらず、コルチコステロイド自身の分泌制御も行うという、多重のループ機構を形成している。このように脳はコルチコステロイドの分泌制御に重要な役割を演じているが、海馬におけるコルチコステロイド受容体の存在が明らかにされて以来⁵⁾、その脳内作用についての研究が進み、多くの知見が集積されてきた⁶⁾。海馬はコルチコステロイドホルモンに対して脳内で最も感受性の高い部位であり、GR、MR ともに豊富に存在すること、また同一細胞において両者が共存すること、なども報告されている⁷⁾。こうしたことからコルチコステロイドによりネガティブフィードバックを受ける HPA-axis (視床下部・下垂体・副腎軸) の調節に海馬が関与することが示されている。GR および MR のコルチコステロイドに対する親和性の差を反映して、コルチコステロイド濃度が低い時には MR が主に占拠され、ホメオスタシスの維持に関与し、コルチコステロイドがより高濃度の場合は GR が主として活性化されることが知られている。このようなことから、同一細胞内において GR と MR がどのような挙動を示すのかという点に、大いに興味を持たれる。そこで CFP および YFP でそれぞれ GR と MR を標識し、同一細胞内に共発現させ、核-細胞質間輸送を調べた。コルチコステロイド非存在下では両受容体とも細胞質に局在したが、 10^{-6} M という高濃度のコルチコステロイドを投与すると、

COS 細胞においては CFP-GR および YFP-MR はほぼ同様の時間経過で核内へ移行した。一方両受容体の Kd 値の間くらいの 10^{-9} M のコルチコステロイドを添加すると、COS 細胞においては YFP-MR の方が CFP-GR より速く核内へ移行し、コルチコステロイドに対する親和性の差を反映していることが示唆された (図 1)。これに対し、海馬培養神経細胞においては、 10^{-6} M および 10^{-9} M のどちらにおいても核内への移行速度には差が認められず、内因性受容体の存在の影響、あるいは細胞種特異性などが示唆された。

2.2 インポーチンの役割

分子質量 20–40 kDa 以下の分子は核膜孔を自由に通過できるが、40 kDa 以上の分子 (GR、MR を含む) の場合には能動的に輸送する輸送因子が必要となる⁸⁾。コルチコステロイド受容体の輸送因子の一つとして、細胞質-核間輸送因子のインポーチンが知られている。GR や MR は共に核移行シグナル (Nuclear localization signal; NLS) を有しており、受容体が細胞質でリガンドと結合して熱ショック蛋白が解離すると、それまでマスクされていた NLS が露出し、この NLS を輸送因子インポーチン α が認識する。さらにこのインポーチン α を輸送担体インポーチン β が認識し、受容体と三量体を形成して核内に輸送されると考えられている。インポーチン α には NLS 結合ドメイン、インポーチン β には核膜孔複合体結合ドメインがそれぞれ存在する。また、核内に輸送された受容体は低分子量 GTPase Ran の関与により、速やかにインポーチンと解離することも生化学的実験や、セミインタクト細胞を用いた実験から明らかにされている⁹⁾。私たちは、インタクトな生細胞内でこうした細胞質-核輸送のプロセスがいかにして起こるのかを時空間特異的に可視化して解析するために、CFP-GR あるいは CFP-MR と YFP-インポーチンとの融合蛋白を培養細胞に共発現させ、コルチコステロイド投与後の動態を追跡した¹⁰⁾。インポーチン α は細胞質にも核にも同程度存在するが、コルチコステロイドを投与すると、インポーチン α は GR、MR と同様な時間経過で核内へ集積するのが認められた。これに対し、インポーチン β は主として核膜周辺部に局在し、受容体の核移行に伴って見ら

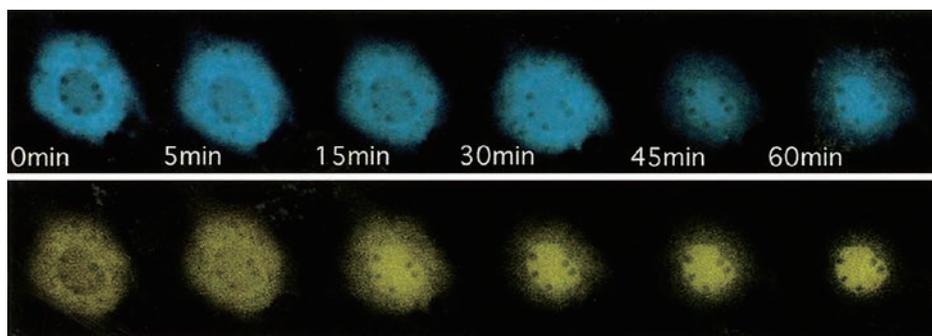


図 1 CFP-GR および YFP-MR の COS 細胞における動態の可視化

COS 細胞に CFP-GR と YFP-MR を共発現させた。上段が CFP-GR、下段が YFP-MR のイメージ。コルチコステロン 10^{-9} M を投与後 0、5、15、30、45、60 分後の各融合タンパク質の細胞内分布を示した。コルチコステロンに対する親和性の高い MR の方が核への集積速度が速いことがわかる。

れたインポーチン α のようなダイナミックな局在の変化は認められなかった。

さらに、インポーチン α とGRならびにMRとが実際に相互作用して核へ輸送されるのかをより詳細に確かめるために、私たちはGFPを用いたFRET (fluorescent resonance energy transfer; 蛍光の共鳴エネルギー移動) という方法を用いて観察した¹¹⁾。FRETとは、エネルギー供与体(ドナー)からエネルギー受容体(アクセプター)への蛍光エネルギー移動を用いて、細胞内外の生体分子の相互作用などの動態を可視化する技術のことで、1948年Försterによってその基本的概念が示された。それは、ドナーの発光エネルギーレベルとアクセプターの吸収エネルギーレベルに重なりがある場合、励起状態にあるドナーの近傍10 nm以内のところに、ある相対的向きを保ってアクセプターが存在すると、ドナーからの発光が起こらないうちに、その励起エネルギーがアクセプターを励起する確率が生じる。アクセプターが蛍光分子であれば、アクセプター固有の発光が検出されることとなる。私たちはCFPをドナー、YFPをアクセプターとして用いたFRETによってGRあるいはMRとインポーチンとの蛋白質-蛋白質相互作用を解析した。落射型蛍光顕微鏡で取得したFRET画像をドナー画像で割り算し、疑似カラーを付けて示したratio画像を作成することによって、リガンド投与数分後には細胞質内においてFRETがおり、GRとインポーチン α とが相互作用していることが認められた。核内に移行した後は速やかにFRETは消失し、受容体とインポーチン α とが解離するのが観察された¹⁰⁾。一方、インポーチン β とGRやMRは直接相互作用しないことがFRET実験から示唆された。さらに、GRのNLSに点突然変異を挿入した場合には、インポーチン α との直接相互作用が認められなくなり、また核移行も起こらなくなったことから、NLSをインポーチン α が認識して結合し、核内へ運ばれることが確認された。以上の結果から、GRやMRの細胞質から核への移行経路の一つとして、まずインポーチン α がリガンドと結合した受容体のNLSを認識し、核膜周辺部まで運ばれ、そこでインポーチン β が核膜孔複合体と直接相互作用することによって核内へ導かれることが推察された。

2.3 細胞骨格系の影響

近年、細胞質-核輸送の研究において、核膜孔複合体などの研究は急速に進んでいるが¹²⁾、実際にGRやMRなどの受容体分子が細胞質から核膜孔周辺部にまで移行するメカニズムに関しては、インポーチン分子と相互作用し、その後自由拡散で核膜周辺部まで運ばれるのか、あるいは細胞骨格系のようなレールの上を運ばれるのか、その詳細についてはよくわかっていない。そこで、細胞骨格の微小管を破壊する薬物のコルヒチンで細胞を処理し、受容体の核移行に対する影響を調べた。その結果、コルヒチン処理によってわずかに核移行の速度は遅くなったが、COS細胞においても培養海馬神経細胞においても核内移行の阻害は認められず、微小管はコルチコステロイド受容体の核移行には関与しないことが示唆

された¹³⁾。しかしながら、今回のコルヒチン処理による結果のみでは、細胞骨格系の関与を完全に否定することはできず、より詳細な破壊処理の検討や、またアクチンの影響などについても今後さらに調べていく必要がある。

3. GRとMRの核内における動態

さて、細胞質から核内へ移行した後、GRとMRはどのような動態を示すのか。次に、GFPとの融合蛋白を用いた生細胞内での研究から明らかになってきた核内でのGRとMRのダイナミックな局在様式や相互作用を中心に紹介する。

3.1 GRとMRの核内での局在様式

GFP-GRやGFP-MRは核内に集積後、ドット状に分布することが報告されている^{4,13,14)}。特に、このようなドット形成はホルモンと結合した、転写活性を有した受容体に特異的に認められるという報告もある¹⁵⁾。それでは、このドットの生理的意味は何なのか。Steensel¹⁶⁾らは免疫蛍光抗体法と共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から、これらドットは新たに合成されてくるpre-mRNAの存在部位とは関係がない。すなわち必ずしも転写活性とは関係しないという知見を報告した。一方、転写の進行部位と関連するhyperphosphorylated RNA polymerase II (pol II)の分布とGRやMRのドット状局在部位とが一致するという報告もある⁴⁾。このような知見の相違は、核内での転写因子とDNA上の結合部位との相互作用は非常にダイナミックで、転写活性部位に長く留まっているものではないことが一つの要因ではないかと推察された。このようなダイナミックな動態を捉えるには生細胞での観察が重要であり、これにはFRAP (fluorescent recovery after photobleaching) という方法が有用であった。FRAPとは、特定のある領域に分布する蛍光物質を強力な光を照射することによって不可逆的にブリーチし、その後の蛍光回復の速度からその物質の動きやすさを解析する方法である¹⁷⁾。McNally¹⁸⁾らはGRとその標的遺伝子のグルココルチコイド応答配列(GRE)との相互作用を、mouse mammary tumor virus/Harvey viral ras レポーターを繋げたアレーを用いて直接可視化し、その部位でFRAPを行うことによって、GFP-GRの不可逆的にブリーチされた蛍光が速やかに回復することからGRはGREに持続的に結合するのではなく、結合と解離を繰り返している事を示し、これをhit-and-runモデルと呼んだ。また私たちのFRAP実験においても、転写部位は特定していないが、ホルモン結合後核内に集積したGFP-GRやGFP-MRはある特定領域に留まるのではなく、極めて速い速度で動いていることが確かめられた。このような結果から、ステロイドホルモン受容体による転写は従来考えられていた以上にダイナミックに制御されていることが明らかになってきた。

3.2 核内におけるコルチコステロイド受容体のダイマー形成の可視化

転写因子としてのコルチコステロイド受容体は、ホルモン応答配列に一般的にはホモダイマーを形成して結合すると言

われている。しかしながら、レチノイン X 受容体とレチノイン酸受容体、ビタミン D 受容体と甲状腺ホルモン受容体のように、ヘテロダイマーを形成するものが知られている¹⁹⁾。GR と MR に関しては、そのジンクフィンガーモチーフの構造からヘテロダイマーを形成することは可能であり、GR と MR を培養細胞に共発現させて行ったレポーター実験の結果より、ヘテロダイマーの形成が示されていた²⁰⁾。しかしながら、細胞内のどの部位で、どのようなタイミングでヘテロダイマーが形成されるかを検討した研究はなかった。そこで、私たちは FRET を用いて GR と MR のヘテロダイマー形成の可能性を生細胞で可視化して時空間特異的に解析した。この実験においては、FRET をより正確に評価するために、分光型マルチスペクトル共焦点レーザー顕微鏡 LSM510META (現在では次世代の LSM700 が出ている) を用い、生細胞から分光スペクトルをとったデータも加えて解析した^{21,22)}。ここでは、CFP-GR と YFP-MR の組み合わせで FRET 解析を行った。分光型マルチスペクトル共焦点レーザー顕微鏡は、フィルターを交換することなく蛍光顕微鏡画像をリアルタイムに分光し、その蛍光波長スペクトルを画像データとして記録できる。ドナーの CFP はその最大励起波長の 433 nm のレーザーを用いて励起するのが最適であるが、この領域のレーザーは

かなり高価であるため、標準装備されている 458 nm のアルゴンレーザーで励起しても計測は可能である。アクセプターの YFP の蛍光スペクトルを META デテクターを用いて 10 nm 間隔で 470 nm から 600 nm 程度まで連続的に取得する。META の特性を活かしたいわゆる 1 波長励起多波長測光型のイメージング方法である。細胞全体あるいは細胞のある限定した領域 (細胞質、核など) から何カ所かを選定してスペクトルを取得することができる。その結果、COS 細胞においても培養海馬神経細胞においても細胞質内では FRET は認められなかったが、ホルモン添加 15 分後くらいから核内で FRET が認められるようになり、60 分後に FRET 効率はほぼプラトーに達した (図 2)。COS 細胞においても培養海馬神経細胞においても、コルチコステロン 10^{-9} M よりも 10^{-6} M において FRET が強くおこり、GR と MR のヘテロダイマーがより多く形成されることがわかった²¹⁾。この結果から、 10^{-9} M という生理学的濃度に近い環境下においては、おそらくコルチコステロンに対する親和性の高い MR が主として働くことから、MR-MR のホモダイマーの形成される確率が高く、一方 10^{-6} M という高濃度、いわばストレス負荷を反映する環境下においては GR が MR に加えて関与するようになり、GR-MR ヘテロダイマー形成の確率が高くなることが示唆された。

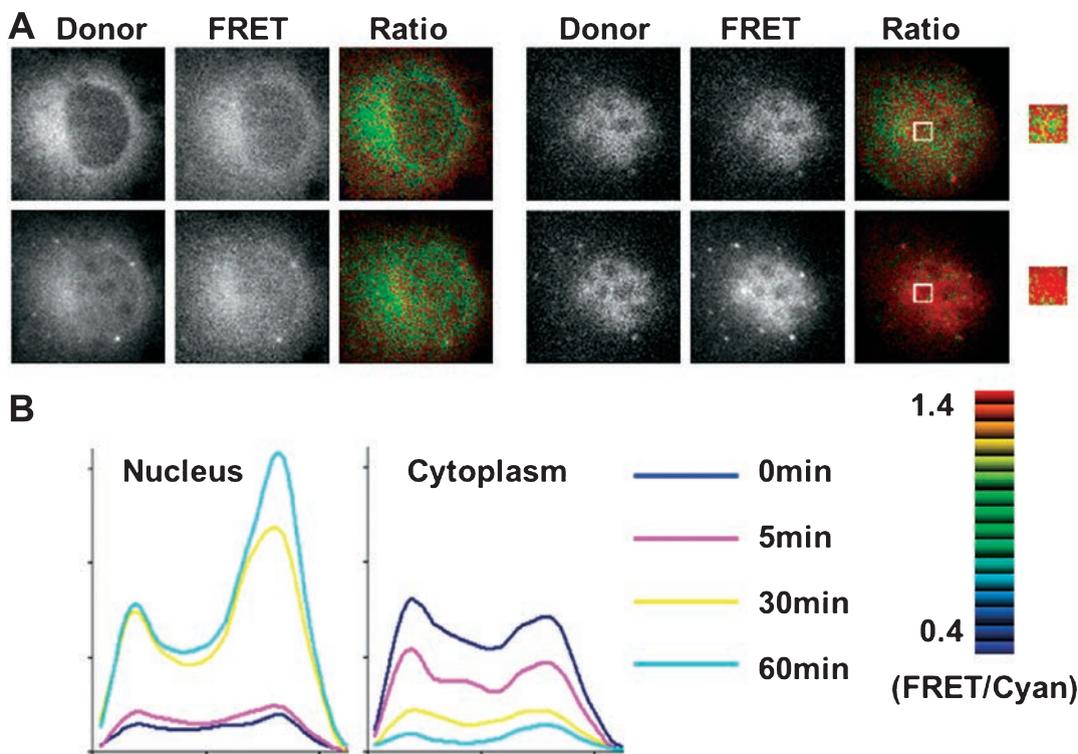


図2 CFP-GR および YFP-MR の COS 細胞における相互作用の FRET による時空間特異的解析

A: COS 細胞に CFP-GR と YFP-MR を共発現させ、コルチコステロン 10^{-6} M を投与後 0, 5, 30, 60 分 (各々左上, 左下, 右上, 右下) 後において、Donor および FRET 画像を取得し、FRET/Donor の ratio イメージを作成して擬似カラー表示した。赤色は FRET 効率が大きく、青色は FRET 効率が低いことを示す。細胞質内では FRET はほとんど認められず、核内へ集積した後強い FRET が観察され、GR と MR が相互作用していることが認められた。

B: 分光機能を用いてスペクトル解析した結果、核内においては YFP の蛍光波長の 527 nm にシャープな高いピークが認められたが、CFP の蛍光波長の 433 nm にはわずかなピークしか認められず、FRET が生じていることが確認された。一方、細胞質内においては 527 nm における背の高いピークは認められず、核内においてのみ FRET が起こっていることが確認された。

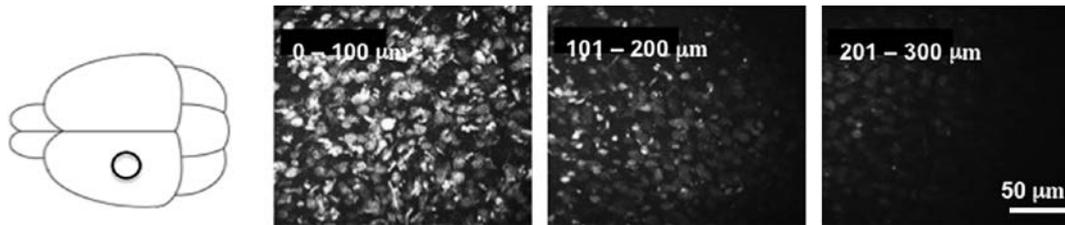


図3 GFP-GR ノックインマウスを用いた GR の全脳レベルでの *in vivo* イメージング
 脳の表層の○で示した部分に二光子共焦点顕微鏡の対物レンズを置き、脳の表層からイメージを取得した。図に示すように、
 200 μm 辺りまで GFP-GR の蛍光を観察することができた。

4. *in vivo* リアルタイムイメージング

GFP トランスジェニックマウスやノックインマウスを用いた *in vivo* イメージングについて、脳を例にして簡単に紹介する。神経科学分野においては、2000年初頭以降、2光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングが飛躍的な広がりを見せている。現在では脳機能の成熟過程、環境変化への適応あるいは障害時の回復期において、神経細胞や神経回路の微細構造や活動のダイナミックな変化を生体内で直接可視化して観察することが可能となっている²³⁾。ここでは、GFP-GR ノックインマウス²⁴⁾ の大脳皮質における GR の *in vivo* イメージングについて概説する。

マウスを麻酔下で頭毛を剃り、脳定位固定装置に固定後、頭皮を切開した後小型ドリルを用いて目的部位の頭蓋を切削する。最近はこのように頭蓋骨を除去する Open skull 法がよく用いられる。ついでカバーガラスを硬膜にのせ、頭蓋骨とカバーガラスの間に歯科用セメントあるいは生体組織用接着剤を浸潤させてカバーガラスを固定し、観察窓 (cranial window) を作製する。2光子顕微鏡下に移動し、イメージングを開始する。マウスの場合、大脳皮質の2層までの深さに存在する神経細胞やグリア細胞に発現する GFP-GR を全脳レベルで可視化できる可能性が示された (図3)。今後、ファイバー型の2光子顕微鏡等が開発されることによって、動物の動きにも対応することが可能となり、無麻酔下の覚醒時の脳での観察も可能となる。

5. まとめ

コルチコステロイド受容体の生細胞内における動態について、GFP との融合蛋白を用いて蛍光リアルタイムイメージングによる解析を中心に解説した。ホルモンと結合していない GR および MR は主として細胞質に存在し、ホルモンと結合することにより速やかに細胞質から核へ移行することが明らかになった。特に生理的濃度に近い環境下では親和性の高い MR が速く核内に移行したが、ホルモン濃度による核移行速度には細胞種により相違が認められた。また、この細胞質-核間輸送には細胞質-核輸送因子であるインポーチン分子が重要な役割を担っていることも明らかになった。核内へ集積した受容体は、ホルモン応答配列に静的に結合した状態で存在するのではなく、結合と解離を繰り返して転写を調

節することが FRAP を用いた実験により明らかになってきた。また、GR と MR の蛋白質-蛋白質相互作用を FRET を用いて解析した結果から、これら受容体はコルチコステロン濃度により、GR-GR あるいは MR-MR のホモダイマーを形成したり、GR-MR のヘテロダイマーを形成する可能性が示され、日内変動やストレス負荷などで変化するコルチコステロイド環境に対してより柔軟に対応する仕組みが存在するのではないかと推測される。ただし、今回の結果はあくまで培養細胞を用いたのものであり、これらの現象が生体内において実際に起こっているか否かは、今後の研究課題である。最後に簡単に紹介したように、近年 GFP 融合蛋白を発現する遺伝子改変動物作製技術が著しく進歩し、これらが二光子レーザー顕微鏡やファイバー型顕微鏡などのハード面の進歩と結びつくことにより、近い将来シャーレの中ではなく、生体内において様々な機能分子のダイナミックかつ多様な動態を可視化できるのではないかと大いに期待される。

文 献

- 1) McEwen, B.S.: *Trends Pharmacol. Sci.*, 12, 141-147 (1991)
- 2) De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S. and Joels, M.: *Endocr. Rev.*, 19, 269-301 (1998)
- 3) 西 真弓, 河田光博: 宮脇敦史 (編) 実験医学別冊, 羊土社, 東京, 52-59 (2000)
- 4) Nishi, M., Ogawa, H., Ito, T., Matsuda, K.I. and Kawata, M.: *Mol. Endocrinol.*, 15, 1077-1092 (2001)
- 5) McEwen, B.S., Weiss, J.M. and Schwartz, L.S.: *Nature*, 220, 911-912 (1968)
- 6) Kawata, M.: *Neurosci. Res.*, 24, 1-46 (1995)
- 7) Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K., Nishi, M. and Kawata, M.: *Neurosci. Res.*, 51, 371-381 (2005)
- 8) Weis, K.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14, 328-335 (2002)
- 9) 米田悦啓: In 中野明彦, 今本尚子, 藤木幸夫 (編) 実験医学増刊号, 羊土社, 東京, 1850-1855 (2003)
- 10) Tanaka, M., Nishi, M., Morimoto, M., Sugimoto, T. and Kawata, M.: *Endocrinology*, 144, 4070-4079 (2003)
- 11) Miyawaki, A. and Tsien, R.Y.: *Methods Enzymol.*, 327, 472-500 (2000)
- 12) Nakielny, S. and Dreyfuss, G.: *Curr. Biol.*, 8, 89-95 (1998)
- 13) Nishi, M., Takenaka, N., Morita, N., Ito, T., Ozawa, H. and Kawata, M.: *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1927-1936 (1999)
- 14) Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D.L. and Hager, G.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93, 4845-4850 (1996)

- 15) Fejes-Toth, G., Pearce, D. and Naray-Fejes-Toth, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 2973–2978 (1998)
- 16) van Steensel, B., van Binnendijk, E.P., Hornsby, C.D., van der Voort, H.T., Krozowski, Z.S., de Kloet, E.R. and van Driel, R.: *J. Cell Sci.*, **109** (Pt 4), 787–792 (1996)
- 17) 和栗 聡 : 高田邦昭 (編) FRAP による GFP 融合分子の解析, 羊土社, 東京, 127–132 (2004)
- 18) McNally, J.G., Muller, W.G., Walker, D., Wolford, R. and Hager, G.L.: *Science*, **287**, 1262–1265 (2000)
- 19) Kliewer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M.: *Nature*, **355**, 446–449 (1992)
- 20) Liu, W., Wang, J., Sauter, N.K. and Pearce, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 12480–12484 (1995)
- 21) Nishi, M., Tanaka, M., Matsuda, K., Sunaguchi, M. and Kawata, M.: *J. Neurosci.*, **24**, 4918–4927 (2004)
- 22) Weisshart, K., Jungel, V. and Briddon, S.J.: *Current pharmaceutical biotechnology*, **5**, 135–154 (2004)
- 23) 稲田浩之, 加藤 剛, 江藤 圭, 鍋倉淳一 : 実験医学別冊最強のステップ Up シリーズ *in vivo* イメージング 実験プロトコル, 羊土社, 東京, 171–180 (2012)
- 24) Usuku, T., Nishi, M., Morimoto, M., Brewer, J.A., Muglia, L.J., Sugimoto, T. and Kawata, M.: *Neuroscience*, **135**, 1119–1128 (2005)