

生体内代謝をモニターする転写システム： 核内受容体 PPAR γ による転写を介した 代謝ネットワーク間のクロストーク

白 木 琢 磨¹, 和 久 剛², 森 川 耿 右^{3,4}

高等生物は複雑な代謝—転写ネットワークを形成し、環境変動に適応することで個体を維持する。生命はこの複雑なネットワークをどのように制御しているのだろうか？ 本稿では、核内受容体を軸にして、高等生物における代謝と転写の連携機構の仕組みについて解説する。特に、エネルギー代謝に関わる PPAR γ の活性調節機構の構造基盤に関する我々の研究成果は、代謝ネットワーク間のクロストークにおけるこの核内受容体の重要な役割を示唆する。本稿では、現在この分野の抱える問題点を整理し、今後の代謝・転写研究の展望について議論したい。

1. はじめに

同じ生命現象を解析する手段として生化学と分子生物学が見かけ上異なる道を歩み始めたのは、セントラルドグマの発見の頃であろうか？ 生体の機能分子であるタンパク質が遺伝情報に基づき造られるというこの考えは、タンパク質から遺伝子へと、機能分子の意義についてイメージの転換を生物学者にもたらした。一方、分子生物学の祖とも言うべき Max Delbrück による 1963 年のコペンハーゲンでの講演は、

「われわれの現在持っている生命の見取り図—情報を持った分子の指令でタンパク質がつくられ、そのタンパク質によって高分子 [タンパクや核酸] を作る材料となる小分子 [アミノ酸、ヌクレオチドなど] が作られるというものが生物学のすべてを説明する枠組みとして十分なものであるかどうか……は、いまだに未解決の問題である。」

と結ばれている¹⁾。Delbrück のこの発言はおそらく、セントラルドグマだけでは系が閉じておらず、とどまることのない時間に対して生命活動を一定に維持するためには、遺伝情報に対して何らかの形でフィードバックするシステムが必要なのではないか、という疑問から生じていると考えられる。さらに推しはかれば Jacob と Monod が「タンパク質合成における遺伝的制御機構」を 1961 年に発表したことに連動していたのかもしれない。この問題、つまり代謝と転写の連携機構は今でもホットなテーマである。換言すると、遺伝子配列に従って産生されるタンパク質が代謝を制御し、代謝の変動がタンパク質である受容体を介して遺伝的制御を行う、というこの視点は、生物個体の恒常性維持の観点からますます重要になりつつある。本稿では生体内代謝物の増減を直接検知し、転写制御を行う核内受容体に着目し、構造生物学的観点から明らかにされた活性制御機構について我々の研究成果を概説する。さらに、代

¹ 近畿大学生理工学部

² 東京大学大学院薬学研究科

³ 国際高等研究所

⁴ 京都大学 iCeMS (〒606-8501 京都市左京区吉田牛ノ宮町 京都大学 iCeMS)

Transcriptional machinery sensing cellular metabolism: nuclear receptor, PPAR γ , mediates crosstalk between metabolic networks

Takuma Shiraki¹, Tsuyoshi Waku² and Kosuke Morikawa^{3,4}
(¹BOST, Kinki University, ²Graduate School of Pharmaceutical Science, University of Tokyo, ³International Institute for Advanced Studies, ⁴iCeMS, Kyoto University, Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Yoshida Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

謝・転写研究に残された問題を整理することで、今後の展望を議論したい。

2. 核内受容体 PPAR γ の機能解析

転写因子である核内受容体は、栄養素や性ホルモン、ビタミン等の低分子リガンドと相互作用することで転写活性が制御されている。生体内の低分子代謝物が直接作用する転写因子としての機能は、核内受容体が高等生物における代謝と転写をつなぐ接点としても位置づけられることを意味しており、生体恒常性維持の観点から注目されてきた。核内受容体は低分子リガンドを結合する受容体としての機能と、転写因子としての機能の二つの性質を持っているため、必然的に様々な分野の実験データを巻き込む研究対象となる。つまり、受容体遺伝子のクローニングをきっかけとして、受容体がどのような標的遺伝子を制御するかを解析することで転写因子としての機能が明らかになると同時に、受容体に対応するリガンドを研究することによって、生体内のどの代謝経路が転写を制御するのか、を解明することができた。さらには、核内受容体は低分子化合物を通じてその活性が制御できることから、転写制御機構の分子基盤、つまりエピゲノムやクロマチン構造の関与とRNAポリメラーゼIIの活性化に至る分子機構を明らかにするきっかけにもなった。このように核内受容体研究はこれまで転写因子の分子生物学における中心的研究課題であった。

2.1 遺伝子の同定

細胞内のオルガネラであるペルオキシソームは、超長鎖脂肪酸の β -酸化をはじめD-アミノ酸、ポリアミン、グリセリン脂質などの代謝を行う場として機能する。ペルオキシソームはペルオキシソーム増殖剤と呼ばれる一連の化合物で増加することが知られていたが、これらの化合物が作用する受容体としてペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) α が同定された²⁾。興味深いことに同定されたPPAR α は β -酸化に必要な酵素群の発現誘導を行うことから、脂質代謝を制御する核内受容体として広く知られるようになった。

PPAR α に相同性を示す核内受容体として遺伝子同定されたのがPPAR β/δ とPPAR γ である³⁻⁶⁾。いずれもレチノイドX受容体 α (RXR α)とヘテロ二量体を形成し、脂質代謝関連酵素の発現誘導を行うことが判明した。

一方、脂肪細胞の分化誘導の研究から、脂肪酸結合タンパク質aP2(FABP4)遺伝子の脂肪細胞特異的発現誘導に関わる転写因子としてPPAR γ のアイソフォーム (PPAR γ 2)が同定された⁷⁾。PPAR γ 1はマクロファージや大腸上皮細胞など様々な細胞に発現するのにに対し、PPAR γ 2は脂肪細胞に特異的に発現しているのが特徴である。PPAR γ 2タン

パク質はPPAR γ 1のN末端側にさらに30アミノ酸が付加した構造をとっている (図1A)。

2.2 PPAR γ の標的遺伝子群と機能解析

原核生物では、多くの場合特定の代謝物の合成に関わる遺伝子群をオペロンとして配置し、一つのプロモーターにより発現調節を行っている。したがってオペロンを解析すればその遺伝子の機能が大体予想可能である。このような解析手法を高等生物に適用したのが、トランスクリプトーム解析である。特定の転写因子が制御する遺伝子群を網羅的に解析することで、その転写因子の機能を類推する手法としてDNAマイクロアレイ、RNAシーケンシング、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) が盛んに用いられている。

PPAR γ においては、マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1の脂肪細胞分化に伴うPPAR γ の標的遺伝子と、その発現変化がマイクロアレイとChIP-seqにより詳細に解析されている⁸⁻¹¹⁾。これらのゲノムワイドな解析から、脂肪細胞の分化においてPPAR γ はCCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (C/EBP α)と協調して発現誘導を行っていること⁹⁾、PPAR γ は脂質代謝・糖代謝に関わる主要な酵素の発現誘導を直接制御していること、PPAR γ が誘導されるまでは標的となるDNA領域にはRXRだけが結合していること⁸⁾などが明らかにされた。また、PPAR γ の直接的標的遺伝子群の中から、脂肪細胞分化制御に関わる新たな遺伝子も同定された¹⁰⁾。最近では、脂肪細胞分化過程においてPPAR γ が直接発現制御するmicroRNAの同定も行われた¹¹⁾、脂肪細胞分化におけるmicroRNAの役割についてはまだ機能解析が進んでいない。脂肪細胞において重要な機能を担う遺伝子群が、PPAR γ の標的遺伝子として直接制御されているにもかかわらず、その発現誘導の時間変化は様々であり⁸⁾、また、PPAR γ のノックダウンに対する感受性⁹⁾、PPAR γ リガンドに対する応答性も様々である¹⁰⁾。その結果、これまでは単純なPPAR応答配列 (図1C)をタンデムにつないだモデルシステムで、PPAR γ の活性制御を解析する手法が主流であったが、ゲノムワイドに見たときの転写制御機構の複雑さが浮き彫りとなったように思われる。さらに、マクロファージにおけるPPAR γ の直接的標的遺伝子をChIP-seqで解析した研究では、ヒトとマウスで標的遺伝子群が大きく異なり、PPAR γ 結合領域としては5%しか共通でないと報告されている¹²⁾。今後、転写制御機構の標的遺伝子特異性、組織特異性、時間変化の特異性、さらには種特異性を説明する新たな研究の方向性と方法論を模索する必要があるように思われる。

2.3 分子遺伝学的解析をめぐる混乱

最近、ある人が「生物学は歴史学である」と言っている

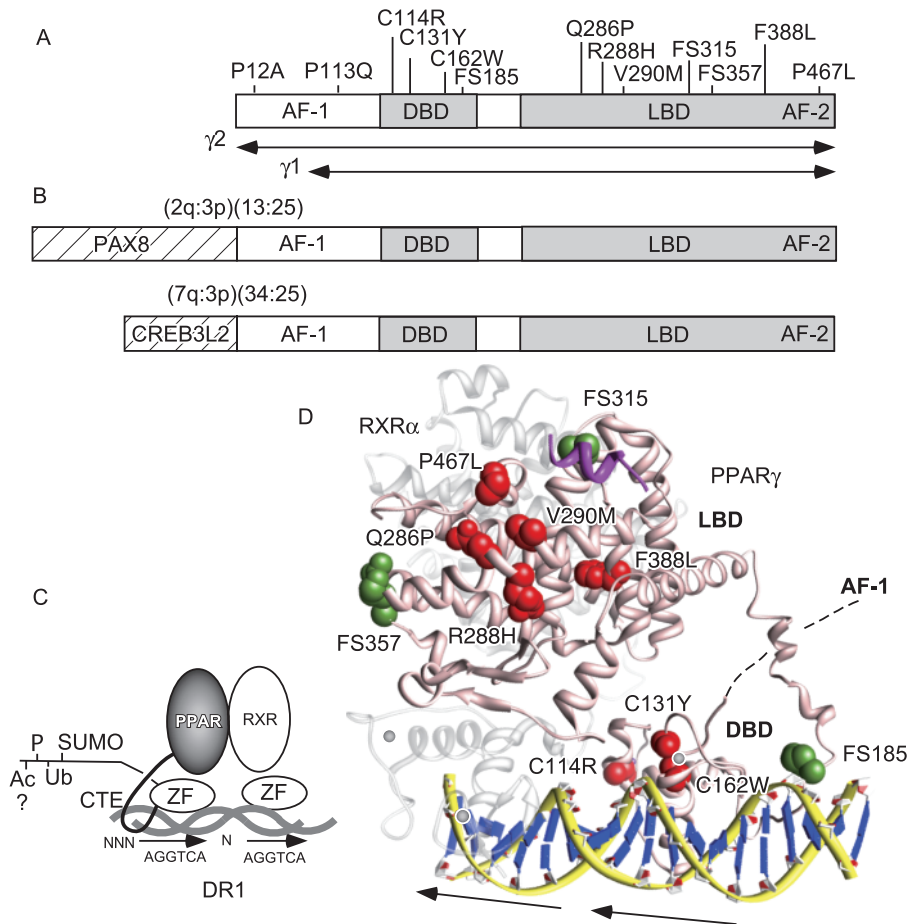


図1 PPAR γ のドメイン構造と遺伝学的に報告されている変異

(A) PPAR γ にはDNAに結合するDNA結合ドメイン(DBD)、リガンドに結合するリガンド結合ドメイン(LBD)が数十アミノ酸を挟んで存在している。また転写活性化に寄与する二つの異なる活性化領域AF-1とAF-2が含まれ、それぞれリガンド非依存的とリガンド依存的に転写調節に関与する。N末端側のエクソンの違いにより脂肪細胞特異的なPPAR γ 2と様々な臓器で発現するPPAR γ 1の二つのアイソフォームが存在する。ヒトにおいて同定されている変異アミノ酸の番号はPPAR γ 2のアミノ酸番号で示されている。FS：フレームシフト。

(B) 甲状腺がんにおいて見られる転座で見つかったPPAR γ と他の遺伝子の融合タンパク質。このタイプの甲状腺がんに対しては、PPAR γ アゴニストが細胞分化誘導を引き起こすことで抗がん作用を示す。

(C) DNAに結合したPPAR/RXRヘテロ二量体の模式図。PPAR/RXRはdirect repeat 1(DR1)に分類されるPPAR応答配列に結合する。DR1の上流(NNNで示した)にはPPARのDNA結合領域のすぐそばに位置するC末端領域(CTE)が結合することで特異性を決めていると考えられている。また構造を持たないAF-1領域にはリン酸化(P)やSUMO化修飾が報告されている。アセチル化(Ac)、ユビキチン化(Ub)については修飾されるアミノ酸は同定されていない。ZF：ジンクフィンガー。

(D) PPAR γ -RXR α -DNA-リガンド-共役因子複合体の立体構造。(A)で示したPPAR γ 中の変異の位置をボールモデルで示した。赤は点変異、緑はフレームシフト変異。DNA結合に必須のZnを小さな灰色の点で、共役因子は紫のリボンで、RXR α は灰色のリボン図で示した。この構造解析ではAF-1領域は部分的に欠失したタンパク質を用いていた(点線)。リガンドはここでは表示していない。DR1の向きを矢印で表示した。

のを耳にした。確かに生命誕生以来、代々受け継いできた遺伝情報の中には、その時代時代で生命が直面した環境変化に対する適応の結果が多重に刻まれていることであろう。配列に含まれる情報の整理もままならぬうちに、遺伝

子操作により遺伝子の機能解析を始めてしまったのが分子遺伝学であるとも言える。実際、現在までに、全身性や様々な組織特異的なPPAR γ ノックアウトマウスが数多く報告されているが、これら分子遺伝学的解析の結果から結

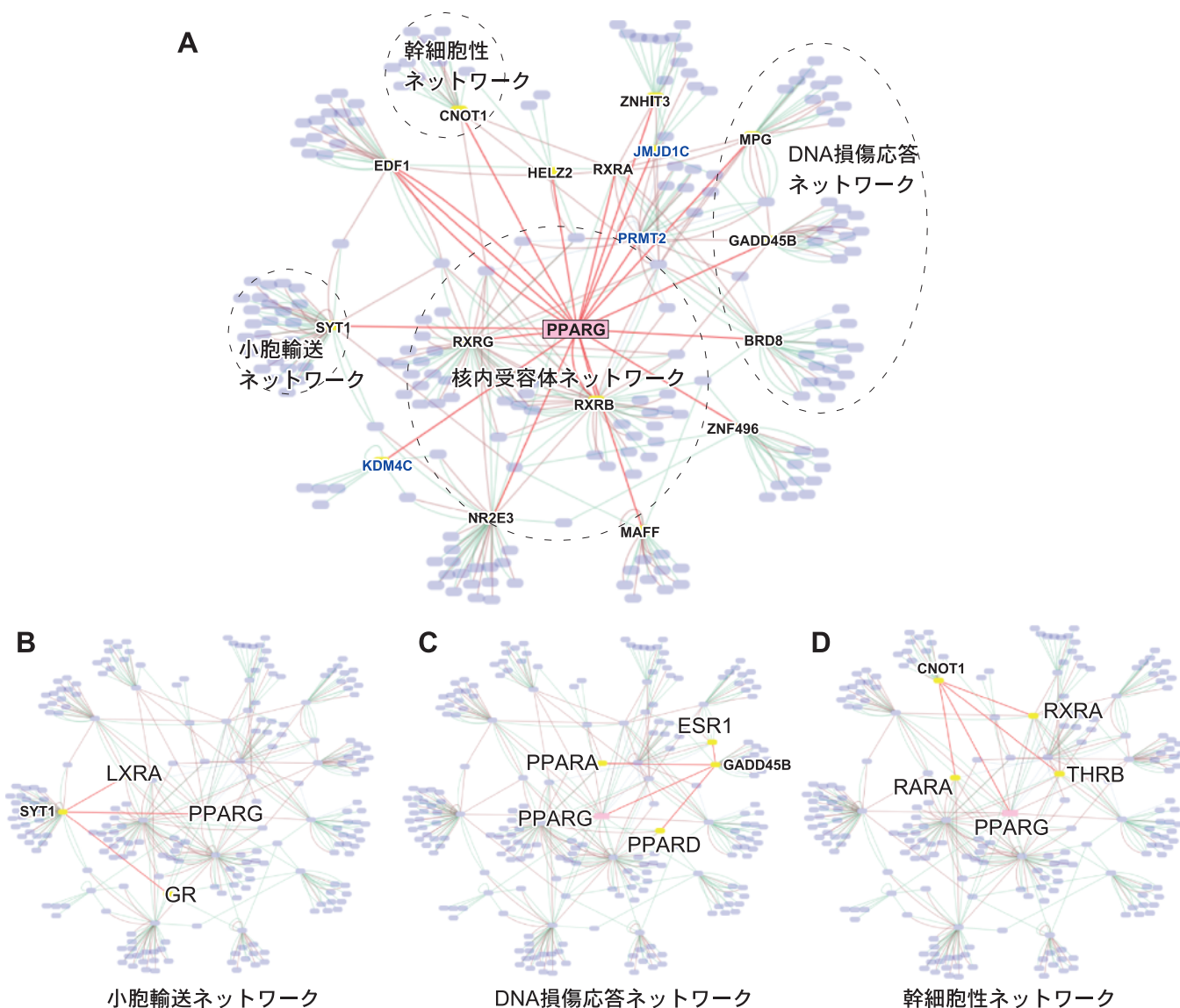


図2 データベースを用いた PPAR γ タンパク質ネットワーク

(A) 古典的な転写共役因子以外にも様々なタンパク質の相互作用がデータベースに登録されている。一部のネットワークについてネットワーク可視化ソフト Cytoscape を用いて表示した。楕円は各タンパク質を、線は相互作用を示している。PPARG と直接相互作用するタンパク質は黄色で示し、その相互作用を太赤線で示した。

(B) 小胞輸送に関与するシナプトタグミン 1 (SYT1) は、いくつかの核内受容体と相互作用する。

(C) DNA 損傷応答に関わるタンパク質 GADD45B との相互作用。

(D) 幹細胞性に関わるタンパク質 CNOT1 との相互作用。

論を導くことはきわめて困難である (表 1)。またそれ以上に、肥満が引き起こすインスリン抵抗性が生活習慣病の問題点であり、PPAR γ リガンドにより改善することが明白であるにもかかわらず (後述)、分子遺伝学的解析が進むにつれ、「なぜ PPAR γ リガンドは糖尿病を改善するのか？」という PPAR γ 研究の出発点ですら混乱してきているように思われる。さらに、マウスの遺伝的バックグラウンドの影響を引きずっているのか？ 組織間での機能的相補性もしくは、他の PPAR ファミリーとの機能的相補性があるのか？ PPAR γ はインスリン感受性に関わるのは間

違いないが、一体いつどこで PPAR γ が機能することがインスリン感受性を生み出しているのか？ こうした疑問に対しても分子遺伝学では明確な答えを出すことができないのが現状である。また、完全な PPAR γ ノックアウトマウスが胎生致死となる理由も不明なままである。発生生物学のように、相対的に単純な転写ネットワーク・シグナルネットワークを解析する上で分子遺伝学が威力を発揮した事実は、高く評価されるべきである。しかし、生活習慣病のような多因子疾患を特定の遺伝子の破壊で解析することには、おそらく限界が来ているのではないであろうか？

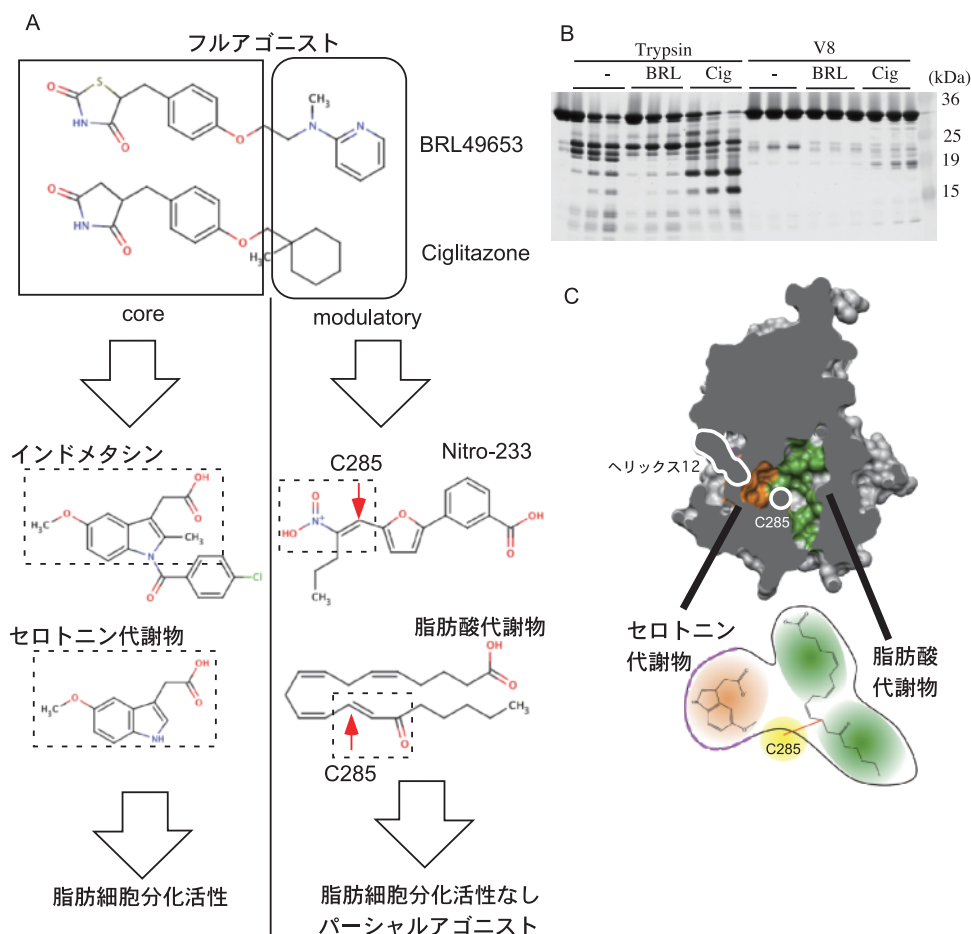


図3 PPAR γ リガンドの部分構造とその役割 (リガンドーム)

(A) 2型糖尿病改善薬として見つかったチアゾリジン誘導体は、PPAR γ に対するフルアゴニストであった。共通する領域 (core 領域) は PPAR γ のヘリックス 12 と相互作用していた。一方、チアゾリジン誘導体間で異なる領域 (modulatory 領域) は、PPAR γ の活性を微妙に調節する。内在性リガンドの解析から、core 領域はセロトニン代謝物の活性を、modulatory 領域は脂肪酸代謝物の活性を誘導していることが示された。内在性リガンドにはその活性を発揮するために共通した部分構造が見いだされた (点線)。それぞれの部分構造を参考に各内在性リガンドをまねた合成リガンドを同定することに成功した。インドメタシンはセロトニン代謝物を、Nitro-233 は脂肪酸代謝物と同様の効果を PPAR γ に対して誘導する。後者は脂肪細胞分化誘導活性がないためパーシャルアゴニストと呼ばれる。

(B) チアゾリジン誘導体 (BRL, Cig) は PPAR γ のリガンド結合領域に対して異なる構造変化を誘導する。構造の違いはプロテアーゼ (Trypsin, V8) に対する感受性の違いで評価した。

(C) PPAR γ リガンド結合領域の立体構造の断面図。セロトニン代謝物および脂肪酸代謝物による活性化に重要なヘリックス 12 とシステイン 285 (C285) を白線で示した。セロトニン代謝物は茶色で示したポケットに結合する。一方脂肪酸代謝物は緑で示した別のポケットに結合し、さらに C285 とマイケル付加することで受容体を活性化する。それぞれの代謝物リガンドは異なるポケットに作用するため、同時に PPAR γ に結合することが可能で、独立して PPAR γ の活性を制御することがわかった。

2.4 遺伝学による研究成果

様々な疾患の遺伝学的解析から、ヒト *PPARG* 遺伝子座とこれらの疾患の関連性が報告されている。インスリン抵抗性や高血圧を示す生活習慣病との関連からリガンド結合領域に V290M, P467L の変異を持つ家系が見つかり、この変異 PPAR γ はドミナントネガティブ作用を引き起こすことが示唆されている (図 1A, D)^{13,14)}。実際に、これら

の変異を持つ *PPARG* 遺伝子を平滑筋特異的に発現するトランスジェニックマウスでは、血管弛緩応答が悪くなり、高血圧が引き起こされることが示されている¹⁵⁾。しかし、P467L のノックインマウスにおいては、高血圧は再現するが、インスリン抵抗性は再現していない¹⁶⁾。このようにヒトとマウスにおける PPAR γ の機能には若干の違いがあるのかもしれない。

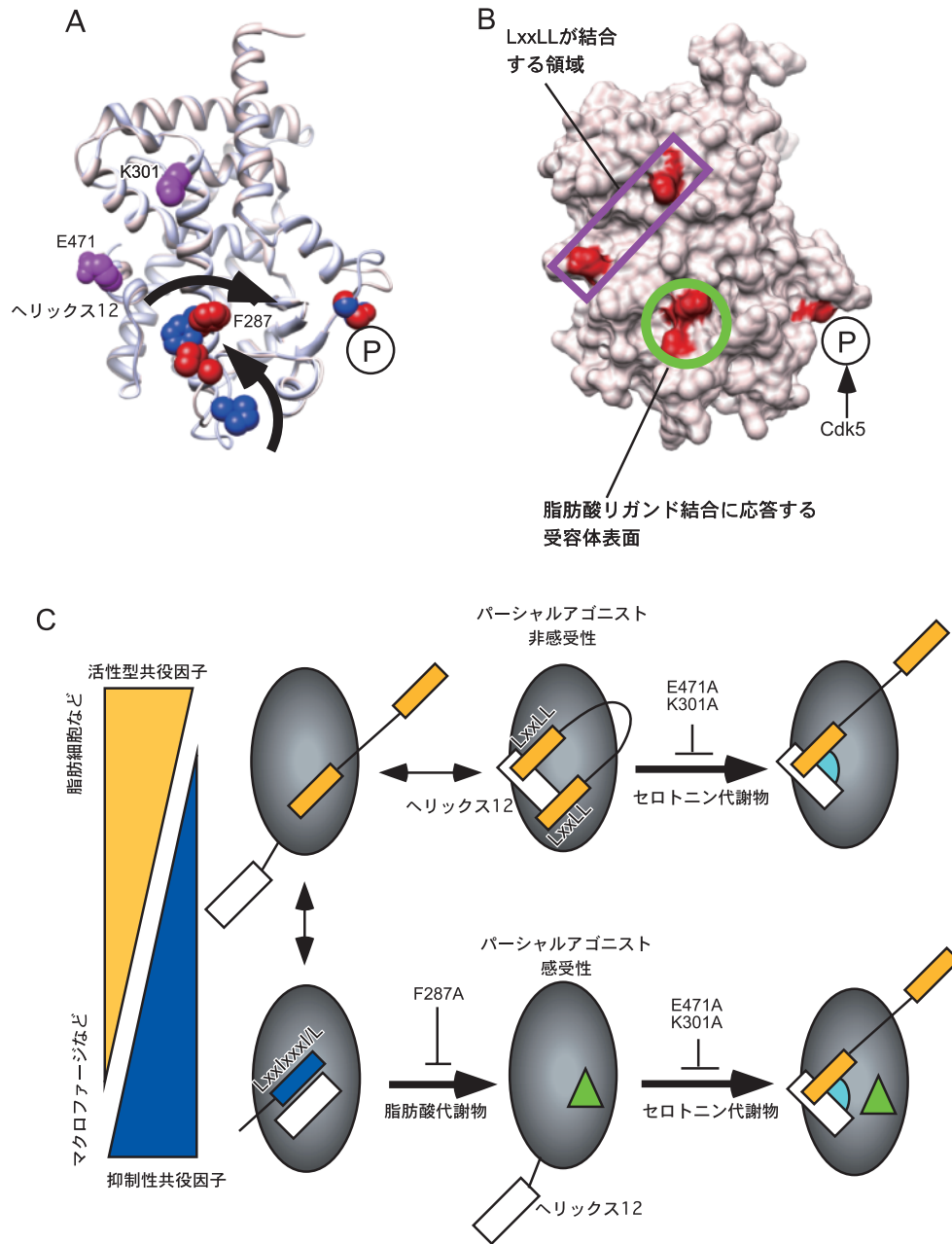


図4 リガンドによる PPAR γ の活性化機構

(A) X線結晶構造解析によって解明された脂肪酸代謝物による活性化の際に誘導される構造変化. 活性のない状態 (青) と脂肪酸代謝物が共有結合し活性化された状態 (赤) を示した. 紫はこれまでに報告されていた共役因子の結合部位. またリガンドにより異なるリン酸化状態を示すと指摘されているセリンの場所を P で表示した^{55, 56}.

(B) 構造変化する領域を PPAR γ の表面モデルに表示した. 共役因子に含まれる LxxLL モチーフが結合する領域を四角で示した (紫). 脂肪酸代謝物の共有結合により誘導される構造変化は共役因子の LxxLL モチーフの結合する領域とは異なる領域であった. (A) と同様にリガンドにより異なるリン酸化状態を示すと指摘されているセリンの場所を P で表示した^{55, 56}.

(C) 組織ごとに異なるリガンド応答性を説明する活性化モデル. PPAR γ はリガンドが存在しない状態でも共役因子と結合する. 組織によって活性化共役因子 (オレンジ) と抑制性共役因子 (青) の存在比が異なるため, リガンド応答性が異なるのではないかと推測される. 脂肪酸代謝物 (緑三角) は抑制性共役因子が多い場合には抑制性共役因子の結合を外すことにより活性を誘導できるが, 活性化共役因子が多い場合は活性を誘導しない. 一方, セロトニン代謝物 (水色丸) はいずれの場合も活性化共役因子の構造変化を誘導し, 活性化を引き起こす. それぞれの活性化ステップを特異的に抑制する変異体を示した. E471, K301 は (A) の紫で示される部位に位置し, F287 は (A) の矢印で表示されるように構造変化を引き起こすアミノ酸である. 活性化共役因子は LxxLL モチーフで, 抑制性共役因子は LxxxIxxx (I/L) モチーフで核内受容体と結合する.

表 1 マウス PPAR γ 遺伝子のノックアウトもしくはノックインによる表現型

ノックアウト	脂質代謝関連	糖尿病関連	その他	参考文献
-/-	脂肪組織形成不全 リポジストロフィー(キメラ)、脂肪肝		胎生致死 胎生致死、出血 成長抑制(オス)	Rosen et al. (1999) Mol. Cell, 4, 611-617. Barak et al. (1999) Mol. Cell, 4, 585-595.
+/-	脂肪細胞肥大↓(HFD) 脂肪細胞肥大↓(HFD)	インスリン感受性増加 (HFD) インスリン感受性増加 (HFD) TZD処理により感受性減少		Rieusset et al. (2004) Mol. Endocrinol., 18, 2363-2377. Kubota et al. (1999) Mol. Cell, 4, 597-609. Miles et al. (2003) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 284, E618-E626.
PPAR γ 2 -/-	脂肪組織減少	インスリン抵抗性		Zhang et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 10703-10708.
コンディショナルノックアウト				
全身			致死	Jones et al. (2002) Genesis, 32, 134-137.
脂肪組織	リポジストロフィー 脂肪組織減少(HFD) 脂肪細胞死(CreER)	インスリン抵抗性 正常(HFD)		He et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100, 15712-15717. Jones et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102, 6207-6212. Imai et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 4543-4547.
肝臓	肥満 脂肪肝(ob/ob) 抗脂肪蓄積(HFD) TZD依存性脂肪肝誘導の消失(HFD)	インスリン抵抗性 インスリン感受性正常 血中グルコース量低下	抗炎症(HFD)	Matsusue et al. (2003) J. Clin. Invest., 111, 737-747. Gavrilova et al. (2003) J. Biol. Chem., 278, 34268-34276. Moran-Salvador et al. (2011) FASEB J., 25, 2538-2550.
筋肉	脂肪増加	インスリン抵抗性		Norris et al. (2003) J. Clin. Invest., 112, 608-618. Hevener et al. (2003) Nature Med., 9, 1491-1497.
脾臓	正常	正常	B細胞増加(NC)/減少(HFD)	Rosen et al. (2003) Mol. Cell. Biol., 23, 7222-7229.
脳	脂肪組織減少	TZD依存性肝臓インスリン感受性の消失	摂食量/体重減少(HFD)	Lu et al. (2011) Nature Med., 17, 618-622.
マクロファージ	CD36発現減少 CD36発現減少 CD36, ABCA1, ABCG1 減少、血中コレステロール、脂質タンパク質増加 脂肪肝(HFD) TZD依存性脂肪肝誘導の保持(HFD)	インスリン抵抗性 正常 インスリン抵抗性	分化正常 分化正常 M2分化不全 M2正常 炎症応答の保持(HFD)	Moore et al. (2001) Nature Med., 7, 41-47. Chawla et al. (2001) Nature Med., 7, 48-52. Odegaard et al. (2007) Nature, 447, 1116-1120. Hevener et al. (2007) J. Clin. Invest., 117, 1658-1669. Marathe et al. (2009) J. Lipid Res., 50, 214-224. Akiyama et al. (2002) Mol. Cell. Biol., 22, 2607-2619. Moran-Salvador et al. (2011) FASEB J., 25, 2538-2550.
Treg細胞	脂肪組織内Treg細胞減少	TZD依存性インスリン感受性の消失 (HFD)		Cipolletta et al. (2012) Nature, 486, 549-553.
血管内皮 /骨髄細胞	白色脂肪細胞減少(HFD) HDL-コレステロール増加	インスリン感受性改善(HFD)		Kanda et al. (2009) J. Clin. Invest., 119, 110-124.
乳腺			正常	Cui et al. (2002) J. Biol. Chem., 277, 17830-17835.
卵巣			黄体形成正常、着床不全	Cui et al. (2002) J. Biol. Chem., 277, 17830-17835.
T細胞			正常	Cui et al. (2002) J. Biol. Chem., 277, 17830-17835.
B細胞			正常	Cui et al. (2002) J. Biol. Chem., 277, 17830-17835.
ノックイン				
P12A	リポジストロフィー	インスリン抵抗性	体重減少	Koutnikova et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100, 14457-14462.
S112A		正常(HFD)	体重減少(HFD)	Rangwala et al. (2003) Dev. Cell, 5, 657-663.

NC: 通常食、HFD: 高脂肪食、TZD: チアゾリジン誘導体.

さらに変異体の活性の変化に関して興味深いことが報告されている。プロテアソーム阻害剤 MG132 処理することで PPAR γ タンパク質の分解を阻害すると、タンパク質量は増加するにもかかわらず転写活性が下がることが観察されている^{17,18)}。したがって PPAR γ の転写活性の維持には PPAR γ のプロモーター領域からのクリアランスが重要であると考えられる。今後、PPAR γ 変異体のドミナントネガティブ作用についてもプロモーター領域における PPAR γ タンパク質のリサイクリングを解析する必要がある。タンパク質の安定化が活性阻害を引き起こすことは、PPAR γ のリン酸化による活性制御機構の解析から明らかにされている^{17,19)}。PPAR γ の AF-1 領域にある S112 がリン酸化されると転写活性が減少する¹⁹⁾。S112 のリン酸化に伴ってポリユビキチン化が阻害され、タンパク質安定化が引き起こされる一方で、PPAR γ の転写活性は減少する¹⁷⁾。肥満の患者において S112 の直後の P113Q 変異が報告されてお

り (図 1A, D)²⁰⁾、プロモーター領域における PPAR γ タンパク質のリサイクリングと転写活性の制御の関係が注目されている。既にエストロゲン受容体では、リガンド依存的、非依存的にポリユビキチン化酵素やプロテアソームサブユニットがエストロゲン受容体にリクルートされ、プロモーター領域から受容体を取り除いていることが ChIP 解析により観察されており、この受容体リサイクリングが転写制御に重要であることが示されている²¹⁻²³⁾。今後、核内受容体による転写活性についてはタンパク質の分解、プロモーターからのクリアランス、RNA ポリメラーゼ II の活性化サイクルなどダイナミックな制御機構の視点に立った解析が必要であろう。

他にも DNA 結合領域内の亜鉛 (Zn) 結合に関わるアミノ酸の点変異、リガンド結合領域内の変異によるフレームシフトがインスリン抵抗性を示す家系で見つかっている (図 1A, D)。これらの変異はヘテロ接合性の患者でも症状を引き起こしていることから、ドミナントネガティブ作

用を持ち、野生型の PPAR γ の活性を抑制すると考えられている²⁴⁾。一方、極度のインスリン抵抗性を示す家系から、PPARG 遺伝子の DNA 結合領域においてフレームシフトを引き起こす変異が見つかったが、この患者においてはプロテインホスファターゼ PPP1R3A 遺伝子にもフレームシフトが同時に見つかっており、家系解析における PPARG 遺伝子の変異のみで生活習慣病の病態を説明するのではなく、糖代謝・脂質代謝ネットワーク全体を俯瞰した遺伝学的解析が必要であると考えられる²⁵⁾。

近年では家系解析だけでなく、全ゲノム関連解析 (genome wide association studies : GWAS) による大規模解析が主流となっている。2 型糖尿病や肥満などを指標とした GWAS により PPARG 遺伝子の 1 塩基多型 (SNP) である P12A と病態との関連が示唆されている (図 1A)^{26,27)}。GWAS で同定される疾患関連遺伝子は多因子疾患において威力を発揮することが多く、同定後のメカニズム解析において課題を残しているのが現状である。実際、PPARG 遺伝子で見つかった P12A の遺伝子多型が PPAR γ の機能をどのように変化させているのかについては、はっきりとしたメカニズムはわかっていない。さらに、染色体転座により PPARG 遺伝子と他の遺伝子の融合タンパク質が甲状腺がんの原因として報告されており (図 1B)、このタイプの転座が引き起こすがんに対しては PPAR γ のリガンドが有効な抗がん治療になる可能性が示唆されている^{28,29)}。他にも大腸がん PPARG リガンド結合領域に R288H の変異が報告されている (図 1A, D)³⁰⁾。しかし、いずれの場合も PPAR γ の機能変化ががん発症の原因であるかどうかについては結論が出ていない。

以上、PPAR γ の機能について主に分子生物学的な研究からの成果を振り返ってみた。正直歯切れが悪いという印象であるが、その原因の一つとして、PPARG 遺伝子の遺伝的解析だけでは、PPAR γ タンパク質がいつどこでどの内在性リガンドで活性制御された結果なのかが全くわからないことが考えられる。遺伝学的に発見されている変異による PPAR γ の機能変調が、生体内のリガンドの変動による PPAR γ の活性をどのように変調するのかを明らかにする必要がある。

2.5 複合体解析による転写制御共役因子の同定

核内受容体による転写制御機構を明らかにする過程で、ヒストンアセチル化・脱アセチル化を介したエピジェネティック制御機構が発見され、現在受け入れられているエピゲノム研究の基本的スキームが導かれた³¹⁾。酵母 2 ハイブリッド法、リコンビナントタンパク質を使ったプルダウン法、さらにはタグ抗体もしくは抗体を用いた免疫沈降法により、膨大な数の PPAR γ 複合体タンパク質が報告された。質量分析技術が爆発的に進歩したこともこの分野の興

隆を支えた要因と言える。また、ルシフェラーゼ法やゲルシフト法などの古典的な転写解析手法に加え、ChIP アッセイや RNA 干渉 (RNAi) 法など新しい技術が広く浸透し、転写制御における共役因子の機能解析が可能になった。

複合体解析の進歩に伴い、タンパク質相互作用データベースも充実し、バイオインフォマティクスツールも数多く開発され、転写機構研究に生かされている。複合体データベースの利用は完全にバーチャルであることに注意する必要があるが、論理的推測だけでは行き着かない新しい研究へと展開する可能性を秘めている。例えば、NCBI などのタンパク質相互作用 web データベースからは PPAR γ の複合体ネットワークの様々な情報を入手することができる。これらのデータベースを利用することで、各々の実験データの正確さは別として、文献に報告されているタンパク質相互作用ネットワークを俯瞰することが可能である。あまりにも数が膨大になるため、ここでは一部のネットワークのみを Cytoscape を用いて視覚化を試みた (図 2A)。PPAR γ は RXR とヘテロ二量体を形成するため、核内受容体同士のネットワークが中心に表示される (図 2A、核内受容体ネットワーク)。これらの核内受容体相互作用ネットワークは、各々の標的遺伝子群を含む転写ネットワークと複雑に絡み合う。一方、もう少し周辺の相互作用ネットワークに目を向けると、転写の直接的制御以外にも核内受容体が関与するかもしれない様々な現象が見えてくる。例えば、PPAR γ 、肝臓 X 受容体 α (LXR α)、グルココルチコイド受容体 (GR) は RXR α とは別にシナプトタグミン 1 (SYT1) と相互作用を示すことから (図 2B)、これらの核内受容体は転写制御とは別に、小胞輸送の制御に関与する可能性が想像できる。また PPAR ファミリーは共通して増殖停止/DNA 損傷誘導性タンパク質 45 β (GADD45 β) に相互作用することから、DNA 損傷応答とのクロストークが考えられる (図 2C)。また、PPAR γ レチノイン酸受容体 α (RAR α)、RXR α 、甲状腺ホルモン受容体 β (THR β) は、細胞の幹細胞性に重要な CNOT 複合体と相互作用する (図 2D)。これらの視点から、初期発生だけでなく、成人後における様々な組織の細胞の入れ替わりに、これらの核内受容体がどのように関与するか、といった問題が明らかにできるかもしれない。

このように、複合体解析は特定の現象を説明するメカニズムを解明するにはあまりにも膨大かつ複雑で、明快な結果を得ることは困難である。一方、複合体データベースの有効利用は、PPAR γ による転写制御だけでなく、他の様々な生命現象のネットワーク制御へと視野を広げてくれる可能性を秘めている。

3. リガンドによる受容体活性化機構

一方、実際に核内受容体タンパク質を手にして、リガ

ドによる活性化機構を探る生化学研究からこの分野に入った我々は、意外な結果と出会い、分子生物学ではおそらくわからなかったと思われる様々な新しい現象と出会うことになった。生化学研究の三種の神器として遺伝子、抗体、精製タンパク質と言われていた時代が懐かしいが、意外にも精製したタンパク質をきちんと使った核内受容体研究が少ないことに気付かされた。

3.1 リガンド探索

2 型糖尿病改善薬として見つかったチアゾリジン誘導体が、実は核内受容体 PPAR γ のアゴニストであることが判明し³²⁾、PPAR γ を分子標的とした新規リガンドの探索が数多くなされた。リガンド探索初期には酵母由来の転写因子 Gal4 の DNA 結合領域と人工的に融合させた PPAR γ リガンド結合領域を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして使った実験手法が主に用いられた。さらに、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化刺激を指標として PPAR γ リガンドであるということの検証としていた。いずれの場合も細胞に対してリガンドをふりかけるバイオアッセイである。

PPAR γ リガンドの同定に続き、PPAR γ リガンド結合領域とアゴニストの複合体の立体構造が明らかにされた³³⁾。これら一連の仕事は主に GlaxoSmithKline (GSK) 社によって進められたと言うことができる。分子標的薬設計の古典的な考え方は鍵と鍵穴であり、分子標的 (鍵穴) の構造を調べ、その形にはまる薬 (鍵) を探索するのが主流であった。ところが近年、計算機科学の発展に伴ってこの分野も発展し、リガンド分子そのものやタンパク質内の結合部位の相互作用に伴った立体構造変化を考慮したドッキング・シミュレーション技術も利用されるようになってきた。いずれにしても、実際に PPAR γ リガンドの探索では、リガンド同定は構造解析とセットになって報告されることが多かった。各々のリガンドについてはリストにするだけでも大変な量になるので、ここでは PPAR γ リガンドの中でもフルアゴニスト、パーシャルアゴニスト、アンタゴニストと呼ばれるようになったリガンドについて述べることにする。

まず、脂肪細胞分化活性のある薬剤³⁴⁾、2 型糖尿病改善活性のある薬剤³⁵⁾として、チアゾリジン誘導体が同定されていた。一方で Tontonoz らによる一連の脂肪細胞分化誘導の転写制御機構の解析から、PPAR γ がそのマスター制御因子であることが明らかにされた^{7, 36)}。これらの独立した研究が互いにつながり、1995 年にチアゾリジン誘導体が PPAR γ リガンドであることが示された³²⁾。最初に同定されたこれらのリガンドは、PPAR γ の活性化という点において作用が最も強く、フルアゴニストと呼ばれている。フルアゴニストに分類されるリガンドは、PPAR γ リガ

ンド結合領域にあるヘリックス 12 との直接的相互作用を有することが特徴である (図 3A, C, 図 4A)。ヘリックス 12 は AF-2 とも呼ばれ、リガンド依存性の核内受容体活性化の本体であると考えられている。

一方、PPAR γ リガンドの指標として使われてきたレポーターアッセイによる転写活性と脂肪細胞分化誘導活性を解離できるリガンドが見つかった。これらのリガンドはレポーターアッセイにおいて活性を示し、インスリン抵抗性を改善するにもかかわらず、脂肪細胞分化誘導活性が見られないというのが特徴である^{37~39)}。これらの一連のリガンドは、パーシャルアゴニストと呼ばれている。パーシャルアゴニストに分類されるリガンドは、フルアゴニストと異なり、ヘリックス 12 との直接相互作用がないことが特徴である (図 3)。

さらに、ハイスループットスクリーニングにより GSK 社、Merck 社、Tularik 社からフルアゴニストの活性を抑制する競合的アンタゴニストが同定された^{40~42)}。興味深いことに、いずれのアンタゴニストもハロゲン置換反応により、PPAR γ リガンド結合領域にある Cys285 と共有結合するという性質を有していた。

3.2 内在性リガンド

チアゾリジン誘導体が PPAR γ リガンドであることがわかると同時に、放射性同位体で標識したリガンドに対して競合的に結合する内在性リガンドが検索され、様々な不飽和脂肪酸代謝物が PPAR γ を活性化することが発見された^{43~46)}。脂肪酸代謝物の中でもアラキドン酸代謝物である 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) は特に高い活性を示すと報告されていた。

我々が PPAR γ 研究に参入した 10 年前の 2003 年当時は、毎月メジャーなジャーナルに核内受容体に関する論文が発表されていた。特にヒトにおいて 48 種類ある (しかない) 核内受容体のリガンド結合領域の結晶構造が次々と解かれていた時代である。我々のグループでは PPAR γ リガンドを探すことになった際に、「リガンド側にも活性に意味を持った構造がある」という考え方を出発点にした。つまり、内在性リガンドに共通する「形」こそが薬の探索に重要だと考えた訳である。これを思いついた頃にはリガンドームという造語をこのアイデアにあてはめて喜んでいたのである。実際に、既知の PPAR γ リガンドを結合したリガンド結合領域をプロテアーゼにより限定分解することで構造変化を調べていた際、同じフルアゴニストでもリガンドによって異なる構造変化を引き起こしていることに気付いた (図 3B)。非常によく似たりガンドがいかにして異なる構造変化を受容体に引き起こすのか、という問題を推敲し、リガンドの化学構造を、共通構造 (core) と異なる構造 (modulatory) をブロックのような組み合わせとみなすア

アイデアを思いついた。このとき以来、リガンドは、活性に必要な構造と、活性を何らかの形で変調する構造、の二つの機能ブロックに分割が可能であるのではないかと考えるようになった。

この考えを基に、PPAR γ を活性化することができる様々な脂肪酸代謝物に共通する「形」を探った。脂肪酸リガンドをPPAR γ リガンド結合領域の内腔（ポケット）にドッキングするシミュレーションをしてみたところ、アンタゴニストが共有結合することがわかっていたシステイン残基（Cys285）の近傍に、脂肪酸リガンド15d-PGJ₂の部分構造 α,β -不飽和ケトンが位置することが判明した。 α,β -不飽和ケトンはシステインのチオール基とマイケル付加により共有結合することが知られていたため、このシミュレーションで得られた構造を見た瞬間に共有結合の可能性がひらめいた。ところが、細胞内に分布するタンパク質は、通常凝集を防止する目的で1mMのジチオトレイトール（DTT）を添加して貯蔵するのが常套手段である。DTTはチオール基を持つため、通常の条件で精製したタンパク質ではマイケル付加の実験ができない。そこでおそろおそろ精製条件からDTTを抜き、PPAR γ タンパク質を調製し直した。このようにして調製したPPAR γ タンパク質を15d-PGJ₂と混ぜるとMALDI-TOF型質量分析器でリガンド分の分子量の増加を確認することができた。結果として、報告されていた脂肪酸代謝物のうち α,β -不飽和ケトンを共通の部分構造として持つものはCys285との共有結合を介してPPAR γ を活性化していることを明らかにすることができた^{47,48}。さらには、内在性リガンドの結合した立体構造を明らかにし、活性化に必要な内在性リガンドの化学的性質を真似た新規合成リガンド（Nitro-233）の同定へとつなげることができた（図3A）⁴⁹。脂肪酸リガンドが結合したPPAR γ の立体構造を見てみると、フルアゴニストのmodulatoryブロックの領域に相当する部分が結合する領域にのみ脂肪酸リガンドが結合しており、一方のcoreブロック結合領域には脂肪酸の結合が見られないことがわかった（図3C）。このことは何を意味するか？

脂肪酸リガンドの結合により、受容体のポケット空間の全てが占有されるわけではなく、空の領域が存在するという事実は、この空の領域に作用する別の内在性リガンドの存在を示唆していた。結果としてセロトニン代謝物がこの空いたポケット部分を利用して結合し、PPAR γ を活性化することを発見するに至った（図3A, C）。さらに、セロトニン代謝物リガンドを「真似る」合成リガンドとして、インドール酢酸を共通構造として持つインドメタシンを同定した。興味深いことに、脂肪酸代謝物リガンドとセロトニン代謝物リガンドは互いに競合阻害せず、二つのリガンドが同時にPPAR γ に結合できることが判明した（図3C）。つまり、二つの異なる代謝物リガンドは、独立して

PPAR γ の活性を制御できることを意味している。これらの結果は、フルアゴニストとパーシャルアゴニストの違いを見事に説明できる。すなわち、フルアゴニストはセロトニン代謝物と脂肪酸代謝物の両方の活性を発揮するのに対し、パーシャルアゴニストは脂肪酸リガンドの活性のみに寄与することを意味している。実際に、脂肪細胞の分化誘導実験では、脂肪酸リガンドの活性を真似るNitro-233には分化誘導活性はなく、セロトニン代謝物を真似るインドメタシンに分化誘導活性が観察された。こうして、パーシャルアゴニストの存在の意味が、内在性リガンドによるポケットの使い分けで説明された（図3C）⁵⁰。

以上のように、PPAR γ リガンドとして機能する生体内代謝物の構造に着目することで、PPAR γ の活性を制御する新しい代謝ネットワークを見いだすことができた。特に、脂肪酸代謝物とセロトニン代謝物はPPAR γ において独立した結合ポケットに作用することから、PPAR γ は複数の代謝ネットワークのクロストークを担う場、つまり「ハブ」として機能するという新しい視点を提供することが可能になったと言える。分子遺伝学や転写ネットワーク解析により明らかにされているPPAR γ の機能は、エネルギー代謝・糖代謝の制御である。摂食を制御するセロトニンとエネルギー蓄積を担う脂肪酸が、PPAR γ を介してエネルギー代謝・糖代謝を制御するというマクロな視点は、高等生物における環境応答制御およびホメオスタシスを理解する上で重要な知見を与えてくれる。つまり高等生物における代謝・転写の連携機構は、複数どころか多数の代謝系と転写系とが相互に調節しあうネットワーク間のクロストーク制御として理解されるものではなかろうか？

3.3 活性化機構

前節ではPPAR γ により内在性リガンドが認識されるスキームについて、構造生物学的視点から述べた。この節では結合したリガンドは受容体をどのようにして活性化するのか、活性化した受容体はいかにして転写制御複合体の活性を調節するのか、というPPAR γ の活性化機構について議論したい。

これまで、エストロゲン受容体などの構造解析から、核内受容体はリガンド結合領域のC末端に位置するヘリックス12の特徴的構造変化が活性化の引き金になっているという一般化されたモデルが立てられている。実際、PPAR γ においてもヘリックス12は活性化に必須である。しかし、PPAR γ のヘリックス12はリガンド非存在下においてもリガンド存在下とほぼ同じヘリックス12の構造をとる³³。また、共役因子の相互作用を表面プラズモン共鳴（SPR）により解析してみると、リガンドの有無にかかわらずPPAR γ は転写活性化共役因子と同程度の親和性で結合した⁵⁰。これまでの核内受容体研究では、リガンドによ

る核内受容体の活性化は共役因子の結合を誘導し、転写調節領域に転写制御因子群がリクルートされることが活性化機構の本質であると説明されてきた。PPAR γ と相互作用したリガンドは共役因子の結合ステップとは無関係に、いかにして転写活性化を行っているのであろうか？

PPAR γ のリガンド結合領域と転写活性化共役因子の結合は、共役因子にある LxxLL モチーフ (x は任意のアミノ酸) と呼ばれる領域を介して行われることが知られている。実際に、PPAR γ と結合する転写活性化共役因子には複数の LxxLL モチーフが存在することが多い。この結合は PPAR γ のヘリックス 12 を介することから、先に述べたヘリックス 12 が活性化に必須であることが説明できる。不思議なことはリガンドが存在しない場合でも、PPAR γ と LxxLL モチーフを持つ共役因子はほぼ同じ結合様式を持つことである (図 4A)^{33, 49)}。我々は転写活性化共役因子には LxxLL モチーフが複数ならんで存在することが多いことに着目し、複数の LxxLL モチーフを含む領域の転写共役因子タンパク質を発現精製し、PPAR γ との相互作用を検討した。PPAR γ -共役因子複合体はリガンド非存在下でも形成されることが、ゲル濾過を用いた複合体解析で確認された。リガンドの添加は、PPAR γ -共役因子複合体のゲル濾過での溶出パターンを変化させることがわかった。つまり PPAR γ へのリガンド結合は、共役因子の結合そのものを誘導するのではなく、結合様式を変化させることが推測される (図 4)。

リガンドの有無に応じて構造変化する PPAR γ タンパク質の表面を探してみると、LxxLL モチーフが結合する部位ではなく、そこから少し離れた領域に集中していることがわかった (図 4B)。この領域のアミノ酸をアラニンに置換すると、リガンド結合には影響せずに転写の活性化が抑えられることが明らかとなった。これらのデータに基づいて我々は新たな活性化モデルを提唱した⁵⁰⁾。すなわち、PPAR γ はリガンド非存在下でも転写共役因子と結合しているが、その結合様式では転写活性化は引き起こされず、リガンド結合に伴う PPAR γ の構造変化により新たな共役因子の結合領域が形成され、それに応じて共役因子の結合様式が変化することにより、共役因子に構造変化が伝搬し転写活性化が引き起こされる、というモデルである (図 4C)。現在、我々は共役因子に引き起こされる構造変化を視覚化することを目指して研究を継続しており、近い将来リガンド依存性の活性化機構の全貌を明らかにできると確信している。

4. PPAR γ 研究の成功と蹉跌

これまでの議論からわかるように、PPAR γ によるリガンド認識機構と、リガンドによる受容体活性化についてはかなり詳細な議論ができるようになった。これらの一連の

内在性リガンドによる受容体活性化機構の解析の結果を基に、内在性リガンドの作用機構を「真似る」合成リガンドも理論的類推から効率よく同定することができた。これらの一連の研究は、立体構造解析と生化学による検証のキャッチボールによる成功例として大きな成果であったと自負している。

しかし、問題はいまだに山積みの状態である。本稿で我々は PPAR γ の DNA 結合について一切触れてこなかった。2.2 節で議論したように、PPAR γ の標的遺伝子群を見渡した場合、リガンドに対する応答の強さと時間変化が異なることが指摘されている。我々のモデルでは、標的遺伝子ごとに異なるリガンド応答性や、細胞内における動的挙動 (ダイナミクス) については全く説明できない。また、臓器に対応してリガンドの種類に対する感受性が異なるメカニズムに関しても不明なままである。核内受容体の業界で待ち望まれていたほぼ全長の PPAR γ -RXR α -リガンド-DNA-共役因子の複合体の立体構造が報告されたにもかかわらず、前述の問題はいまだに解決されていない (図 1D)^{51, 52)}。むしろ結合した DNA 配列が核内受容体にアロステリックな作用を引き起こすという考え方は⁵³⁾、今後標的遺伝子群の発現誘導ダイナミクスを理解する上で新しい切り口になるかもしれない。また、リガンドは核内受容体の不活性化・活性化という 2 状態変化のスイッチとして働くのではなく、核内受容体タンパク質は常にゲノム上で代謝され続けており、その動的平衡がリガンドにより調節される、といった考え方もある⁵⁴⁾。今後は核内受容体による転写制御のダイナミクスまで言及可能な新たな方法論の開発が必要となるかもしれない。

5. おわりに：今後の展望

ここで、「はじめに」でも触れた生物学における一般的疑問、「セントラルドグマだけでは系が閉じておらず、生物の恒常性維持のためには、遺伝情報に対してフィードバックするシステムが必要なはず」という問題に再度立ち戻って考えてみたい。さらに、議論の枠を「生物個体の恒常性は遺伝子発現と代謝の間のフィードバック的制御機構に依存する」といったより普遍的な問題に拡張して考えてみよう。例えば、アセチル化、メチル化、リン酸化等の細胞核内タンパク質の翻訳後修飾 (さらには tRNA や rRNA 等の微量塩基に代表される non-coding RNA の転写後修飾も)、このフィードバック・システム維持のための生物学的戦略ではないか、とも我々は推測している。特に、ヒストンテイルの化学修飾はエピジェネティクスにおいて中心的役割を果たしているが、これらの修飾酵素の活性はアセチル CoA、S-アデノシルメチオニン (SAM)、アデノシン三リン酸 (ATP) 等の基質や、ニコチンアミドジヌクレオチド (NAD)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)

等の補酵素を必要とする。したがって、このような基質や補酵素の濃度は細胞内で何らかの機構で検知されているものと推測する。換言すれば、これらの化学修飾は、その基質や補酵素の代謝系とも密接な関係を保持しているものと考えてよい。繰り返しになるが、遺伝子発現は転写後修飾や翻訳後修飾と細胞質、オルガネラ中の多種多様な代謝系とクロストークを含む広範なネットワークを通じてつながっており、このシステムが生体の恒常性維持の基盤と言えるのではないだろうか。PPAR γ とリガンドの相互作用に関する我々の研究結果は、そのような代謝と転写の広範なカップリング機構の一端を垣間見たものに過ぎない気がする。以上、我田引水的議論になったきらいもあるが、この総説が読者の問題意識を高める上で一助となることを願って筆をおきたい。

文 献

- Fischer, E.P. & Lipson, C. (1993) 分子生物学の誕生 (石館三枝子, 石館康平訳), pp. 305, 朝日新聞社.
- Isseman, I. & Green, S. (1990) *Nature*, **347**, 645-650.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., & Wahli, W. (1992) *Cell*, **68**, 879-887.
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D., & Rodan, G.A. (1992) *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1634-1641.
- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, M.S., & Reddy, J.K. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 26817-26820.
- Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., & Evans, R.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7355-7359.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., & Spiegelman, B.M. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 1224-1234.
- Nielsen, R., Pedersen, T.A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersbaek, R., Megens, E., Denissov, S., Borgesen, M., Francoijs, K.J., Mandrup, S., & Stunnenberg, H.G. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 2953-2967.
- Lefterova, M.I.L., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, Jr., C.J., Liu, X.S., & Lazar, M.A. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 2941-2952.
- Hamza, M.S., Pott, S., Vega, V.B., Thomsen, J.S., Kandhadayar, S., Ng, P.W.P., Chiu, K.P., Pettersson, S., Wei, C.L., Ruan, Y., & Liu, E. (2009) *PLoS One*, **4**, e4907.
- John, E., Wienecke-Baldacchino, A., Livrand, M., Heinaniemi, M., Carlberg, C., & Sinkkonen, L. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4446-4460.
- Pott, S., Kamrani, N.K., Bourque, G., Pettersson, S., & Liu, E. T. (2012) *Plos One*, **7**, e48102.
- Barroso, I., Gurnell, M., Crowley, V.E.F., Agostini, M., Schwabe, J.W., Soos, M.A., Maslen, G.L., Williams, T.D.M., Lewis, H., Schafer, A.J., Chatterjee, V.K.K., & O'Rahilly, S. (1999) *Nature*, **402**, 880-883.
- Savage, D.B., Tan, G.D., Acerini, C.L., Jebb, S.A., Agostini, M., Gurnell, M., Williams, R.L., Umpoleby, A.M., Thomas, E. L., Bell, J.D., Dixon, A.K., Dunne, F., Boiani, R., Cinti, S., Vidal-Puig, A., Karpe, F., Chatterjee, V.K.K., & O'Hahilly, S. (2003) *Diabetes*, **52**, 910-917.
- Halabi, C.M., Beyer, A.M., de Lange, W.J., Keen, H.L., Baumbach, G.L., Faraci, F.M., & Sigmund, C.D. (2008) *Cell Metab.*, **7**, 215-226.
- Tsai, Y.-S., Kim, H.-J., Takahashi, N., Kim, H.-S., Hagaman, J. R., Kim, J.K., & Maeda, N. (2004) *J. Clin. Invest.*, **114**, 240-249.
- Fujimoto, Y., Shiraki, T., Horiuchi, Y., Waku, T., Shigenaga, A., Otaka, A., Ikura, T., Igarashi, K., Aimoto, S., Tate, S., & Morikawa, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 3126-3132.
- Li, G. & Leff, T. (2007) *Mol. Endocrinol.*, **21**, 857-864.
- Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P., & Spiegelman, B.M. (1996) *Science*, **274**, 2100-2103.
- Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W., & Kahn, C.R. (1998) *N. Engl. J. Med.*, **339**, 953-959.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., & Gannon, F. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 695-707.
- Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., & O'Malley, B.W. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 939-948.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., & Gannon, F. (2003) *Cell*, **115**, 751-763.
- Agostini, M., Schoenmakers, E., Mitchell, C., Szatmari, I., Savage, D., Smith, A., Rajanayagam, O., Semple, R., Luan, J., Bath, L., Zalin, A., Labib, M., Kumar, S., Simpson, H., Blom, D., Marais, D., Schwabe, J., Barroso, I., Trembath, R., Wareham, N., Nagy, L., Gurnell, M., O'Rahilly, S., & Chatterjee, K. (2006) *Cell Metab.*, **4**, 303-311.
- Savage, D.B., Agostini, M., Barroso, I., Gurnell, M., Luan, J., Meirhaeghe, A., Harding, A.-H., Ihrke, G., Rajanayagam, O., Soos, M.A., George, S., Berger, D., Thomas, E.L., Bell, J.D., Meeran, K., Ross, R.J., Vidal-Puig, A., Wareham, N.J., O'Rahilly, S., Chatterjee, V.K.K., & Scafer, A.J. (2002) *Nat. Genet.*, **31**, 379-384.
- Deeb, S.S., Fajas, L., Nemoto, M., Pihlajamaki, J., Mykkanen, L., Kuusisto, J., Laakso, M., Fujimoto, W., & Auwerx, J. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 284-287.
- Razquin, C., Marti, A., & Martinez, J.A. (2011) *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 136-149.
- Dobson, M.E., Diallo-Krou, E., Grachtchouk, V., Yu, J., Colby, L.A., Wilkinson, J.E., Giordano, T.J., & Koenig, R.J. (2011) *Endocrinology*, **152**, 4455-4465.
- Klemke, M., Drieschner, N., Laabs, A., Rippe, V., Belge, G., Bullerdiek, J., & Sendt, W. (2011) *Cancer Gen.*, **204**, 334-339.
- Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., Aaltonen, L.A., Chapelle, A., Spiegelman, B.M., & Eng, C. (1999) *Mol. Cell*, **3**, 799-804.
- Kuo, M.H. & Allis, C.D. (1998) *Bioessays*, **20**, 615-626.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W. O., Willson, T.M., & Kliwer, S.A. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 12953-12956.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C. K., & Milburn, M.V. (1998) *Nature*, **395**, 137-143.
- Hiragun, A., Sato, M., & Mitsui, H. (1988) *J. Cell Physiol.*, **134**, 124-130.
- Cantello, B.C., Cawthorne, M.A., Cottam, G.P., Duff, P.T., Haigh, D., Hindley, R.M., Lister, C.A., Smith, S.A., & Thurlby, P.L. (1994) *J. Med. Chem.*, **37**, 3977-3985.
- Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B.M. (1994) *Cell*, **79**, 1147-1156.
- Rocchi, S., Picard, F., Vamecq, J., Gelman, L., Potier, N., Zeyer, D., Dubuquoy, L., Bac, P., Champy, M.F., Plunket, K.

- D., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S.G., Desreumaux, P., Moras, D., Renaud, J.P., & Auwerx, J. (2001) *Mol. Cell*, 8, 737–747.
- 38) Brown, K.K., Henke, B.R., Blanchard, S.G., Cobb, J.E., Mook, R., Kaldor, I., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Harrington, W.W., Novak, P.J., Faison, W., Binz, J.G., Hashim, M.A., Oliver, W.O., Brown, H.R., Parks, D.J., Plunket, K.D., Tong, W.Q., Menius, J.A., Adkison, K., Noble, S.A., & Willson, T.M. (1999) *Diabetes*, 48, 1415–1424.
- 39) Oberfield, J.L., Collins, J.L., Holmes, C.P., Goreham, D.M., Cooper, J.P., Cobb, J.E., Lenhard, J.M., Hull-Ryde, E.A., Mohr, C.P., Blanchard, S.G., Parks, D.J., Moore, L.B., Lehmann, J.M., Plunket, K., Miller, A.B., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., & Willson, T.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6102–6106.
- 40) Elbrecht, A., Chen, Y., Adams, A., Berger, J., Griffin, P., Klatt, T., Zhang, B., Menke, J., Zhou, G., Smith, R.G., & Moller, D. E. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 7913–7922.
- 41) Leesnitzer, L.M., Parks, D.J., Bledsoe, R.K., Cobb, J.E., Collins, J.L., Consler, T.G., Davis, R.G., Hull-Ryde, E.A., Lenhard, J.M., Patel, L., Plunket, K.D., Shenk, J.L., Stimmel, J.B., Therapontos, C., Willson, T.M., & Blanchard, S.G. (2002) *Biochemistry*, 41, 6640–6650.
- 42) Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmman, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R. M., Chen, J.L., & Li, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 19649–19657.
- 43) Forman, B.M., Chen, J., & Evans, R.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4312–4317.
- 44) Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., & Wahli, W. (1997) *Mol. Endocrinol.*, 11, 779–791.
- 45) Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., & Evans, R.M. (1995) *Cell*, 83, 803–812.
- 46) Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., & Lehmann, J.M. (1995) *Cell*, 83, 813–819.
- 47) Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T.S., Kakizuka, A., & Jingami, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 14145–14153.
- 48) Shiraki, T., Kodama, T.S., Shiki, S., Nakagawa, T., & Jingami, H. (2006) *Biochem. J.*, 393, 749–755.
- 49) Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., Jingami, H., & Morikawa, K. (2009) *J. Mol. Biol.*, 385, 188–199.
- 50) Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Maebara, K., Nakamori, R., & Morikawa, K. (2010) *EMBO J.*, 29, 3395–3407.
- 51) Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T.P., & Rastinejad, F. (2008) *Nature*, 456, 350–356.
- 52) Moras, D. (2009) *Cell Metab.*, 9, 8–10.
- 53) Meijssing, S.H., Pufall, M.A., So, A.Y., Bates, D.L., Chen, L., & Yamamoto, K.R. (2009) *Science*, 324, 407–410.
- 54) Metivier, R., Penot, G., Carmouche, R.P., Hubner, M.R., Reid, G., Denger, S., Manu, D., Brand, H., Kos, M., Benes, V., & Gannon, F. (2004) *EMBO J.*, 23, 3653–3666.
- 55) Choi, J.H., Banks, A.S., Estall, J.L., Kajimura, S., Bostrom, P., Laznik, D., Ruas, J.L., Chalmers, M.J., Kamenecka, T.M., Blucher, M., Griffin, P.R., & Spiegelman, B.M. (2010) *Nature*, 466, 451–456.
- 56) Choi, J.H., Banks, A.S., Kamenecka, T.M., Busby, S.A., Chalmers, M.J., Kumar, N., Kuruvilla, D.S., Shin, Y., He, Y., Bruning, J.B., Marciano, D.P., Cameron, M.D., Laznik, D., Jurczak, M.J., Schurer, S.C., Vidovic, D., Shulman, G.I., Spiegelman, B.M., & Griffin, P.R. (2011) *Nature*, 477, 477–481.