3) Moriyama, Y. & Yamamoto, A. (2004) *J. Biochem*., **135**, 155–163.
4) Ni, B., Rosteck Jr., P.R., Nadi, N.S., & Paul, S.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., **91**, 5607–5611.
5) Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I., & Takeda, J. (2000) *J. Neurochem*., **74**, 2622–2625.
6) Lee, R.Y.N., Sawin, E.R., Chalfie, M., Horvitz, H.R., & Avery, L. (1999) *J. Neurosci*., **19**, 159–167.
7) Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2000) *Nature*, **407**, 189–194.
8) Jung, S.K., Morimoto, R., Otsuka, M., & Omote, H. (2006) *Biol. Pharm. Bull*., **29**, 547–549.
9) Naito, S. & Ueda, T. (1985) *J. Neurochem*., **44**, 99–108.
10) Moriyama, Y. & Yamamoto, A. (1995) *J. Biol. Chem*., **270**, 22314–22320.
11) Burger, P.M., Mehl, E., Cameron, D.L., Maycox, P.R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P., & Jahn, R. (1989) *Neuron*, **3**, 715–720.
12) Parsons, S.M. (2000) *FASEB J*., **14**, 2423–2434.
13) Roseth, S., Fykse, E.M., & Fonnum, F. (1995) *J. Neurochem*., **65**, 96–103.
14) Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2006) *J. Biol. Chem*., **281**, 39499–39506.
15) Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., & Futai, M. (1991) *J. Biol. Chem*., **266**, 22141–22146.

表 弘志，樹下 成信
（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
膜蛋白質機能科学，生体膜機能生化学）

Molecular mechanism of vesicular glutamate transporter
Hiroshi Omote and Narinobu Juge (Laboratory of Membrane Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, 1–1–1 Tsushima-naka, Okayama 700–8530, Japan)

核内受容体PPARγの機能と内在性リガンドによる活性調節

は じ め に

ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプターガンマ（peroxisome proliferator-activating receptor gamma；PPARγ）は，核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である．PPARγは肥満や2型糖尿病との関連で注目されており，機能解析や創薬に関する研究が数多く存在する．一方で，PPARγを活性化する内在性のリガンドは多岐にわたっており，内在性リガンドとPPARγの機能との関連が十分明らかになっているとは言い難い．本稿ではPPARγの機能について概説した後，構造生物学的視点に立った内在性リガンドによる活性化機構を述べる．最後に，PPARγに残されている課題について考察したい．

1. PPARγの 機 能

脂肪細胞の分化誘導において中心的な役割を担っているのがPPARγである．*in vitro*の研究において，PPARγ遺伝子の強制発現により繊維芽細胞から脂肪滴を含む脂肪細胞が分化すること，PPARγアゴニストの投与により分化が増強されることが確認されている[1]．ノックアウトマウスを用いた*in vivo*の研究では，ホモで致死になってしまうため，キメラマウスを用いて脂肪細胞の分化が検討され

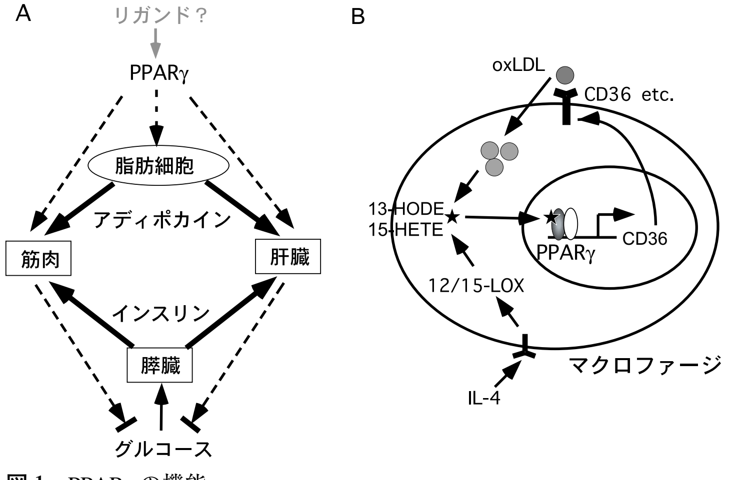

図1 PPARγの機能
A. PPARγが関与する血糖値の維持機構．**B.** マクロファージにおけるPPARγの役割．

た．その結果，*PPARγ*$^{-/-}$の細胞は皮下の脂肪細胞に分化していないことが観察され，PPARγが脂肪細胞の分化に決定的な役割を担っていることが示された[2]．

2型糖尿病の指標となるインスリン抵抗性を改善する薬剤として見つかっていたチアゾリジン（TZD）化合物がPPARγの強力なアゴニストであることがわかり[3]，PPARγとインスリン感受性の関係が注目された．しかし，*PPARγ*$^{-/+}$のマウスでは高脂肪食による肥満とインスリン抵抗性が起こりにくいという結果になり[4]，PPARγとインスリン感受性の関係は未だにはっきりしていない．脂肪細胞，筋肉，肝臓において組織特異的に*PPARγ*をノックアウトするとインスリン抵抗性になるのに対し，膵臓特異的な*PPARγ*ノックアウトマウスではインスリン感受性が保たれていた[5]．これらの結果から，PPARγはインスリンの標的組織において，インスリン受容体からのシグナル伝達に作用していると考えられた（**図1A**）．近年になり，インスリン感受性/抵抗性の調節には，脂肪細胞が分泌するシグナル分子群（アディポカイン）が重要な役割を持つことが明らかにされており，TZD化合物によるインスリン抵抗性の改善の新たな機構として注目されている（図1A）．ヒトにおける遺伝学的研究でも，*PPARγ*遺伝子の変異と，肥満[6]や2型糖尿病[7]との関連付けがなされている．ヒトにおいては，突発性大腸がんにおいて*PPARγ*遺伝子の変異が発見されているが[8]，がん化との因果関係は未解明である．

2.　PPARγに作用する内在性リガンド

以上の研究はすべて遺伝子としてのPPARγの機能解析，もしくはTZD化合物を用いた薬理学的解析であり，PPARγの活性を調節する内在性リガンドとの対応に言及した研究は非常に少ない．一方，マクロファージにおけるPPARγの機能解析においては，内在性リガンドとPPARγの対応が明確に議論されている．動脈硬化の原因となる酸化LDLを取り込んだマクロファージでは，酸化LDL受容体であるスカベンジャー受容体（SR-A，SR-BI CD36など）の発現が誘導されるため，さらに酸化LDLを取り込むというサイクルが起こり，最終的には動脈硬化において観察される泡沫細胞を形成する．酸化LDL由来の酸化脂質である9-hydroxyoctadecadienoic acid（9-HODE）や13-HODEが，PPARγのリガンドとして作用することが発見され，マクロファージにおける上記サイクルの引き金になっていることが示された（図1B）[9]．また，マクロファージをインターロイキン4で処理した場合，マクロファージが活性化しCD36が発現誘導されることが知られている．この際には12/15-リポキシゲナーゼ（LOX）が誘導され，リノレイン酸やアラキドン酸から13-HODEや15-hydroxy-eicosatetraenoic acid（15-HETE）などが産生される．つまりマクロファージの活性化に伴い産生されたPPARγリガンドが，PPARγ依存性にCD36の発現誘導を行う（図1B）[10]．このように内在性リガンド産生とPPARγの機能が明確に結びついている例は比較的少なく，PPARγがいつどのリガンドによって活性を調節されているかを明確にしていく研究が必要とされている[11]．

3.　PPARγによる内在性リガンドの認識機構

前節までに紹介したように，PPARγは病気との関連からその機能解析が進んだと言える．同様に，創薬ターゲットとしての興味から，PPARγの立体構造解析は主に製薬会社を中心に研究が進み，多くの成果を残した．プロテインデータバンク（PDB）に登録されているPPARγの構造を見てみるとPPARγは他の核内受容体に比べてかなり大きなリガンド結合ポケットを持つことがわかる．このことは多様な脂質代謝物がリガンドとなりうることと対応している．しかし，PPARγとの複合体の立体構造が解明されているのはすべて合成アゴニストであり，内在性リガンドの結合した複合体の構造は解明されていない．我々はこの点に着目し，合成リガンドとPPARγとの複合体の構造情報（**図2A**）をもとにして，内在性リガンドである15d-PGJ_2とPPARγの複合体構造を予想した（図2B）．ここで，15d-PGJ_2のカルボキシル基をPPARγのポケットにある親水性部位に置いた場合，15d-PGJ_2の二つの求電子性炭素がPPARγのヘリックス3に存在するシステイン残基（Cys-285）の近くに位置することがわかり，両者が共有結合する可能性が考えられた．共有結合することは，MALDI-TOF-MSによるリガンド結合後の分子量の増大と，システイン残基の定量試薬であるローダミンマレイミドによるシステイン標識の阻害活性により確認した（図2C）．様々なPPARγリガンドのPPARγに対する共有結合活性を検討した結果，α，β-不飽和ケトンを有する内在性リガンドのみ共有結合することがわかった（図2D）．α，β-不飽和ケトンに対してチオール基などの求核基が共有結合する反応はマイケル付加と呼ばれ，リガンドとPPARγはこの反応により共有結合したと考えられる．このシステインを変異したPPARγを用いて転写活性を測定すると，合成リガンドによる活性化は変化しないが，内在性リガンドによる活性化は完全に失われた．このことから合成リガンドとは異な

り，内在性リガンドによるPPARγの活性化には共有結合が必要であることが示された[12]．

4.　内在性リガンドによるPPARγ活性化機構

我々は共有結合の意義を探るために，PPARγにリガンドが結合する過程を詳細に検討した．リガンドの光分解を

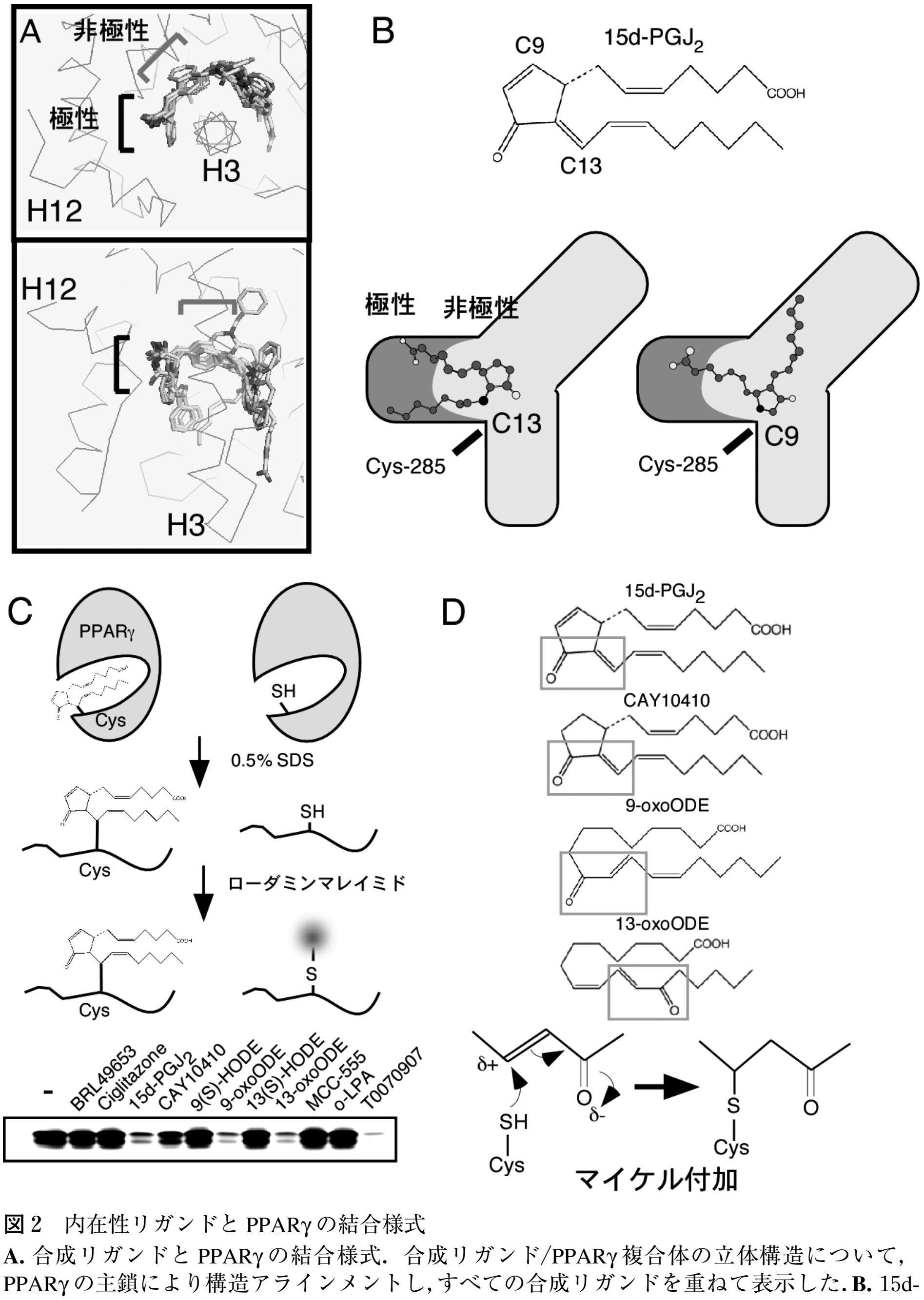

図2　内在性リガンドとPPARγの結合様式
A. 合成リガンドとPPARγの結合様式．合成リガンド/PPARγ複合体の立体構造について，PPARγの主鎖により構造アラインメントし，すべての合成リガンドを重ねて表示した．**B.** 15d-PGJ₂の化学構造と，リガンド結合ポケットにおける15d-PGJ₂の結合モデル．15d-PGJ₂のカルボキシル基を白丸で，PPARγのシステイン（Cys-285）と近づく15d-PGJ₂の9位と13位の炭素を黒丸で示した．**C.** ローダミンマレイミドを用いた内在性リガンドの共有結合の検証．**D.** α, β-不飽和ケトンとシステインとのマイケル付加反応．

極力減らすために新たに開発したストップトフロー装置を用い，紫外領域の吸収スペクトルを測定することで，15d-PGJ_2がPPARγに共有結合する過程をリアルタイムにモニターすることに成功した（**図3A**）．スペクトルの時間変化を解析した結果，15d-PGJ_2はまずPPARγのポケットに入り，共有結合のない中間状態を形成した後，秒から数十秒のスケールで比較的ゆっくりと共有結合反応を起こすことが判明した（図3B）．システインを変異したPPARγを用いて15d-PGJ_2のスペクトル変化を観察した結果，中間状態は形成されていることがわかった．しかし，このシステイン変異体は内在性リガンドでは全く活性化されないことから，この中間状態は不活性である．このことは共有結合が受容体の活性化に直接必要であることを示している[13]．これまで，リガンドと受容体は「鍵と鍵穴（key & key hole)」の関係でとらえられてきた．これはリガンドとリガンド結合ポケットがぴったり合った場合，受容体が活性化されるという考えである．一方，我々はリガンドと受容体における結合・活性化過程を「dock & lock」メカニズムで説明している（図3C）．つまり，リガンドが受容体のポケットにはまる（dock）だけでは不十分であり，鍵を回す操作（lock，PPARγ内在性リガンドの場合は共有結合）が必要であるという考えである[14]．我々はすでに後者のアイデアを取り入れた化合物ライブラリーのスクリーニング法を構築し，新規のPPARγアゴニストを同定することに成功している．今後，我々のこのアイデアがますます広まり，創薬に役立つことを期待している．

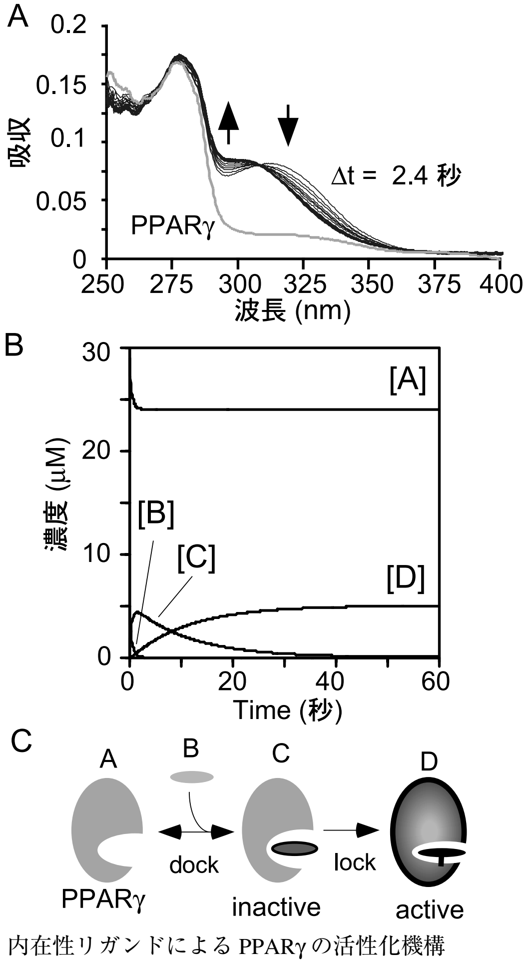

図3　内在性リガンドによるPPARγの活性化機構
A. 15d-PGJ_2とPPARγとの結合キネティクスを吸収スペクトルの変化により観察した．PPARγ単独の吸収スペクトルをグレーで示した．**B.** 吸収スペクトルの変化から求めた結合キネティクス．［A］+［B］←→［C］→［D］の反応スキームを用いて計算した．A：PPARγ，B：15d-PGJ_2，C：PPARγ/15d-PGJ_2結合中間体，D：PPARγ/15d-PGJ_2共有結合複合体．**C.** PPARγの活性化を説明する「dock & lock」メカニズム．　分子の記号は**B**と同じ．

お　わ　り　に

本稿ではリガンド依存性のPPARγの機能とその活性化機構に絞って解説した．PPARγは受容体であるので，リガンドによる転写の活性化に着目しがちであるが，最近ではPPARγによるリガンド依存性の転写抑制（トランスリプレッション）や，リガンド非依存性の機能も重要視されつつある．例えば，昔からPPARγアゴニストが抗炎症作用を持つことは知られていたがその分子機構は不明であった．最近，アゴニスト依存性にPPARγがsmall ubiquitin-like modifier（SUMO）化された場合，DNA上でNF-κBと複合体を形成し，リプレッサー複合体をリクルートすることで，NF-κBによる炎症作用を抑制するという機構が明らかにされた[15]．腸内における共生細菌がホストに対して炎症反応を起こさせない理由として，共生細菌がPPARγ依存性にNF-κBを抑制していることが考えられており[16]，おそらくこの系ではPPARγによるトランスリプレッションが関与していると思われる．また，PPARγのAF-1領域はリン酸化やSUMO化されることが知られており，細胞内の他のシグナル伝達とのクロストークを考える上で重要であると考えられている．今後，これらの修飾がどのような分子機構を介してPPARγの機能を調節しているのかを明らかにすることが必要であろう．これらの研究によりPPARγの活性調節機構の全貌が明らかになれば，第1節で考察したPPARγの機能に関する混乱もすっきりするのかもしれない．

1）Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B.M.（1994）*Cell*, **79**,

1147–1156.
2) Rosen, E.M., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., & Mortensen, R.M. (1999) *Mol. Cell*, 4, 611–617.
3) Lehmann, J.M., Moor, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkinson, W. O., Wilson, T.M., & Kliewer, S.A. (1995) *J. Biol. Chem*., **270**, 12953–12956.
4) Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., et al. (1999) *Mol. Cell*, 4, 597–609.
5) Cock, T.-A., Houten, S.M., & Auwerx, J. (2004) *EMBO Rep*., **5**, 142–147.
6) Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pheiffer, A., Krone, W., & Kahn, C.R. (1998) *N. Engl. J. Med*., **339**, 953–959.
7) 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.
8) 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.
9) Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G.A., Thomazy, V.A., & Evans, R.M. (1998) *Cell*, **93**, 241–252.
10) Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T. M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., & Glass, C.K. (1999) *Nature*, **400**, 378–382.
11) Funk, C.D. (2001) *Science*, **294**, 1871–1875.
12) Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T.S., & Jingami, H. (2005) *J. Biol. Chem*., **280**, 14145–14153.
13) Shiraki, T., Kodama, T. S., Shiki, S., Nakagawa, T., & Jingami, H. (2006) *Biochem. J*., **393**, 749–755.
14) Shiraki, T. (2006) in Functional and Structural Biology on the Lipo-network 2006 (Morikawa, K. & Tate, S. eds.), pp. 37–48, Transworld Research Network, Kerala, India.
15) Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., & Glass, C.K. (2005) *Nature*, **437**, 759–763.
16) Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G.P., Pettersson, S., & Conway, S. (2004) *Nat. Immunol*., **5**, 104–112.

白木　琢磨
(大阪大学蛋白質研究所
生体分子認識（タカラバイオ）寄附研究部門)

Activation mechanism of PPARγ by its endogenous ligands
Takuma Shiraki (Division of Biomolecular Recognition, Institute for Protein Research, Osaka University, 6–2–3 Furuedai, Suita, Osaka 565–0874, Japan)

セレノプロテイン生合成系について

1. はじめに

セレノシステイン（以下，Secと表記）は，システインのチオール基がセレノール基（-SeH）に置き換わったアミノ酸である．セレン（Se）は少なくとも哺乳類では微量必須元素の一つであり，欠乏によるいくつかの疾病が知られている[1]．Secを含むタンパク質，いわゆるセレノプロテインは生物界に広く見出され，当初この生合成経路（以下，Sec系と呼ぶ）は普遍的に存在するものと予想されたが，現在ではSec系を持たない生物も見つかっている．このように生物によってSec系の有無があるという事実は我々に次のような疑問を投げかける．遺伝暗号の進化の中でこの系はいつごろ誕生して，どのように保存されてきたのか，言い換えると現存する生物で何がSec系の有無を決めているのであろう．本稿では我々の研究結果も交えてセレノプロテイン生合成系に関する最近の研究状況について述べる．

2. セレノプロテインの生合成経路（Sec系）

Sec はしばしば glutathione peroxidase や thioredoxin reductase等の酸化還元酵素の活性部位に見出される．これらセレノプロテインは，活性酸素種の除去や細胞内の酸化還元反応と関係しており，酸化的ストレスを介するアポトーシスやがん化等との関連が調べられている[1]．

Secのタンパク質への取り込みは，SecのtRNA（$tRNA^{Sec}$）とそれに対応するmRNA上のコドンとによってリボソーム上で行われる．真正細菌でのセレノプロテインの生合成経路の解明にはBöckらの貢献が大きい（**図1**）[2]．大腸菌では，四つの遺伝子，*selA*，*selB*，*selC*，*selD*が合成系に必要であり，最初に*selC*遺伝子から転写される$tRNA^{Sec}$は直接Secを受容せずにセリン（Ser）を受容する．このセリル化は通常のSer tRNAをアミノアシル化する酵素である seryl-tRNA synthetase（SerRS）によって行われ，その後Ser残基の骨格を用いてtRNA上でSec基への変換反応が起こる．まず pyridoxal phosphate-dependent protein である SelA（*selA* product, selenocysteine synthase）がSer残基の-OH基を脱離させてアミノアクリル基へと導く．次に SelD（*selD* product, selenophosphate synthase）が作る selenophos-