

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の発現量が調節可能な
ヒト肝癌由来細胞株の樹立とその応用

橘 敬 祐

**Application of the Human Hepatoblastoma Cell Lines Inducibly Expressing Peroxisome
Proliferator-activated Receptors (PPARs)**

Keisuke TACHIBANA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received April 25, 2007)

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors and commonly play an important role in the regulation of lipid homeostasis. Although three PPAR subtypes, α , δ and γ show a relatively close amino acid sequence homology, the functions of each PPAR are distinct. For example, PPAR α and PPAR δ induce lipid oxidation, while PPAR γ activates lipid storage and adipogenesis. To analyze the detail functions of human PPARs, we previously established tetracycline-regulated human hepatoblastoma cell lines that can be induced to express each human PPAR subtype. The expression of each PPAR subtype in established cell line was tightly controlled by the concentration of doxycycline. DNA microarray analyses using these cell lines were performed with or without adding ligand and provided the important information on the PPAR target genes. Furthermore, we analyzed the 5'-flanking region of the human *adipose differentiation-related protein (adrp)* gene that responded to all subtypes of PPARs, and determined the functional PPRE of the human *adrp* gene. Here we discuss the usefulness of these cell lines.

Key words—peroxisome proliferator-activated receptor; Tet-system; gene expression analysis; adipose differentiation-related protein

1. はじめに

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) は、リガンド依存的に転写を制御する核内受容体の1つであり、哺乳動物においては PPAR α , δ , γ の3種類のサブタイプが存在する。¹⁾ PPAR α は主として肝臓、腎臓、心臓、小腸などに発現しており、脂肪酸 β 酸化系の酵素などの発現を誘導し、脂質代謝の調節において重要な役割を担っている。²⁾ チアゾリジン系薬剤をリガンドとする PPAR γ は、脂肪組織、マクロファージなどに発現しており、脂肪細胞の分化、脂質の取り込みや抗炎症作用などを発揮する。³⁾ また、脂肪肝を伴うような過栄養状態に生体がおかれると肝臓での発現が誘導されるが、その機

能に関しては不明な点が多く残されている。^{4,5)} PPAR δ は組織特異的な発現がみられず普遍的に発現しているが、骨格筋や脂肪組織において脂肪酸代謝の亢進やエネルギーの消費を誘導すること、⁶⁾ また、皮膚の上皮組織において分化促進や創傷治癒に関与すること⁷⁾などが報告されている。

このように、PPARの機能は徐々に明らかにされつつあるが、その機能はヒトとげっ歯類で異なることも報告されている。例えば、PPAR α のリガンドであるフィブラート系薬剤は、ヒトにおいて脂質代謝改善作用を発揮するが、げっ歯類においてはペルオキシゾームの増殖や肝癌を誘発する。しかし、これら種差が生じる機構については明らかにされていない。⁸⁾

このような観点から筆者らは、ヒト PPAR の機能を明らかにする目的で、テトラサイクリン誘導システムを用いた PPAR の発現を制御できるヒト肝癌由来細胞株を樹立し、トランスクリプトーム解析を行った。本稿では、筆者らが得た研究成果を交え、

大阪大学大学院薬学研究科蛋白質情報解析学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: nya@phs.osaka-u.ac.jp

*本総説は、平成18年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

PPAR の機能について概説したい。

2. PPAR の構造と機能

ヒト PPAR には α , δ , γ の 3 種類のサブタイプが存在し、さらに、PPAR γ には $\gamma 1$ と $\gamma 2$ のアイソフォームが存在する (Fig. 1(A)). PPAR は他の核内受容体と同様に、N 末端側よりリガンド非依存的な転写活性化領域である A/B 領域、DNA 結合領域である C 領域、ヒンジ領域である D 領域、リガンド結合部位を含むリガンド依存的な転写活性化を司る E/F 領域よりなる。¹⁾ PPAR は 9-*cis*-レチノイン酸をリガンドとする核内受容体 retinoid X receptor (RXR) とヘテロ 2 量体を形成することにより、基本モチーフの配列 (5'-AGGTCA-3') が 1 塩基隔てて同じ方向に並んだダイレクトリピート 1 (DR1) の配列を有する PPAR 応答配列 (PPAR response element; PPRE) に結合する。この DNA との結合に重要な C 領域は、PPAR サブタイプ間で 80% 以上の高い相同性を有している。この領域には 2 つの Zn フィンガー構造があり、N 末端側の Zn フィンガー構造に存在する 5 アミノ酸残基からなる P ボックスが、結合する基本モチーフの配列

を認識する。また、C 末端側の Zn フィンガー構造には D ボックスがあり、モチーフ間の距離を認識すると考えられている (Fig. 1(A)).⁹⁾ 一方、PPAR のリガンド結合領域は他の核内受容体と比較し、非常に大きなリガンド結合ポケットを有していることが構造解析の結果より明らかになっている。¹⁰⁾ このことは、多様な化合物が PPAR のリガンドになり得ることを示唆している。

これら PPAR の内因性のリガンドとしては、長鎖脂肪酸やエイコサノイドがすべてのサブタイプのアゴニストとして働くほか、ロイコトリエン B4 が PPAR α の、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 などの脂肪酸誘導体が PPAR γ のアゴニストとして報告されている。¹⁾ 一方、合成リガンドとしては PPAR α のリガンドであるフィブラート系薬剤が抗高脂血症薬として、PPAR γ のリガンドであるチアゾリジン系薬剤が抗糖尿病薬として用いられている。¹⁾ また、PPAR δ のリガンドは、骨格筋や脂肪組織においてエネルギー消費を亢進し、体重増加抑制及びインスリン抵抗性改善効果を示すことから、抗肥満薬になり得ることが示唆されている。^{6,11)}

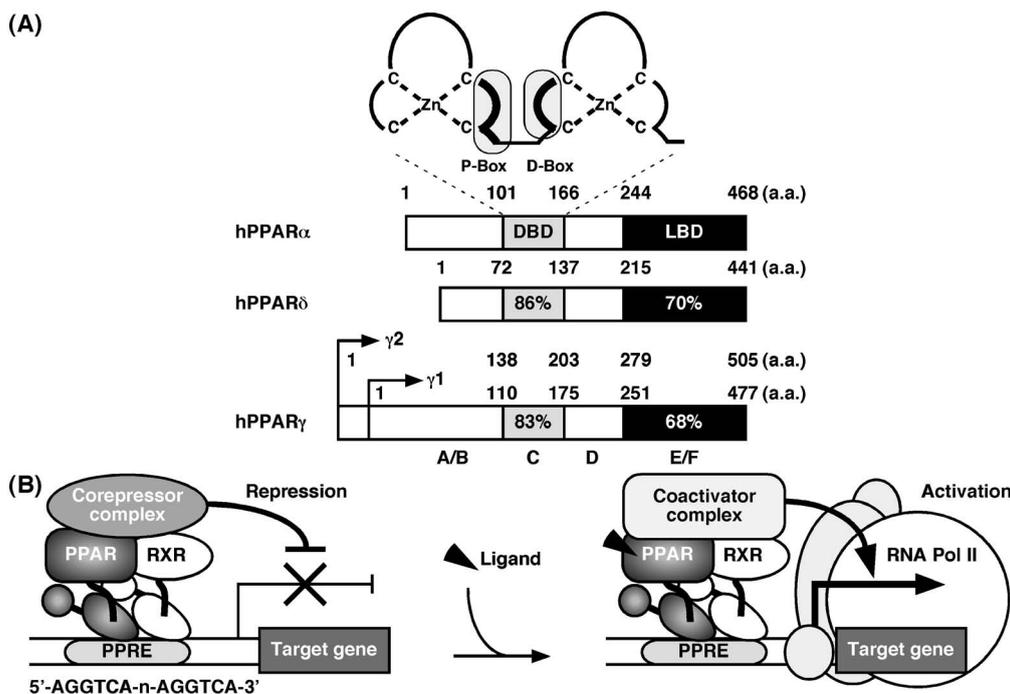


Fig. 1. The General Features of Human PPARs

(A) Structure and functional domain of human PPARs. A/B, C, D and E/F indicate N-terminal A/B domain containing a ligand-independent activation function 1, DNA-binding domain (DBD), hinge region and C-terminal ligand-binding domain (LBD), respectively. (B) PPAR/RXR heterodimers bind to a PPRE located in the promoter of target genes through the DBD. Unliganded PPAR associates with the corepressor complex. In the presence of ligand, the ligand-bound LBD associates with the coactivator complex.

PPARはこれらリガンドと結合することで、ヒストンアセチル化酵素活性を有するコアクチベーターなどと相互作用し標的遺伝子の転写を活性化する。一方、リガンドと結合していない状態では、コリプレッサーと相互作用することで転写活性を抑制している (Fig. 1 (B)).^{12,13)} また、PPARにはリガンド非依存的な転写制御機構も存在する。様々な刺激を受けることでPPARはリン酸化などの翻訳後修飾を受け、その転写活性化能が調節される。^{14,15)} このように、PPARによる転写は様々な因子が複雑に絡み合って制御されている。

3. テトラサイクリン誘導システムを用いたヒトPPARを発現する細胞株の樹立

前述したように、PPARはリガンド依存的な転写因子であることから、標的遺伝子産物群の発現を介してその機能を発揮する。したがって、ヒトにおけるPPARの機能を解析するためには、ヒトの細胞におけるPPARの標的遺伝子を明らかにすることが重要である。

そこで筆者らは、テトラサイクリン誘導システム (Tet-Off システム) を用いて4種類のPPARサブタイプの発現を制御できるヒト肝癌由来細胞株を樹立した (HepG2-tet-off-hPPAR α , hPPAR δ , hPPAR γ 1, hPPAR γ 2).¹⁶⁾ これら細胞株におけるPPARの発現量は、テトラサイクリン (又は、その誘導体であるドキシサイクリン (Dox)) を培地から除去することで上昇し、その発現量はDox濃度依存的であった (Fig. 2). また、Doxを除去しPPARを発現させたのちにリガンドで処理することにより、標的遺伝子である3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2)の発現が誘導された (Fig. 3). 以上のことから、これらPPAR発現細胞株は、Doxを除去することにより機能するPPARを発現することが確認できた。

4. PPAR発現細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析

次に、この細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行うことにより、PPARに反応する遺伝子の網羅的解析を試みた。¹⁶⁾ Dox除去後のPPARが発現している細胞に、それぞれのリガンド、若しくは、コントロールとしてDMSOを添加して24時間培養したものと、Doxを除去せずにPPARを発現させていない細胞を用いて各遺伝子の発現変動を

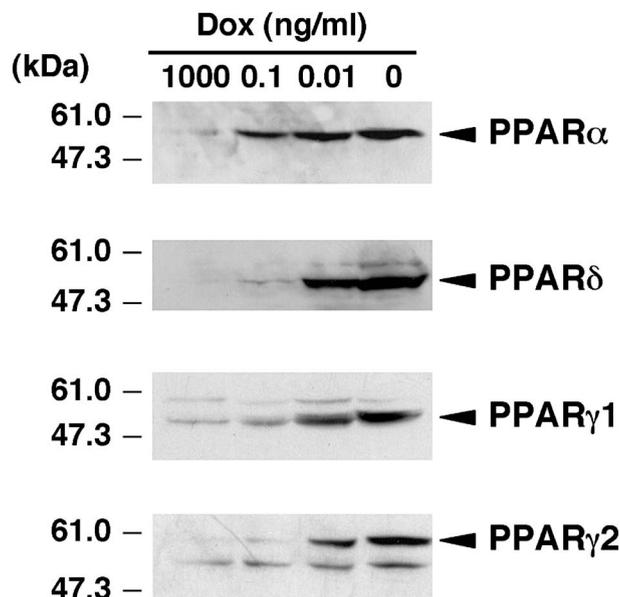


Fig. 2. Induction of the Expression of PPAR by Doxycycline in Established Cell Lines

Nuclear extracts from each cell line cultured in the presence of the indicated amounts of Dox for 5 days were subjected to SDS-PAGE and immunoblots were performed with anti-PPAR α , anti-PPAR δ or anti-PPAR γ .

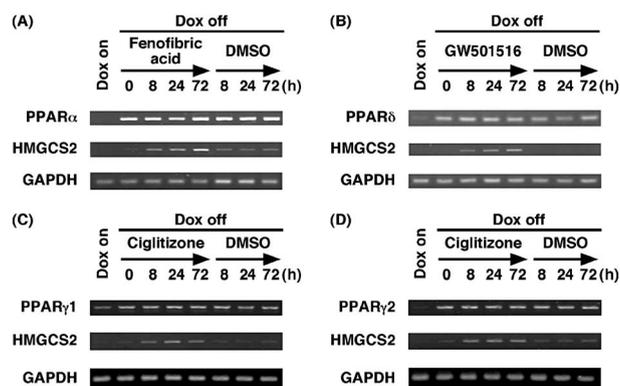


Fig. 3. HMGCS2 mRNA Expressions were Modulated by PPARs in Tet-Regulated HepG2 Cells

(A, B, C and D) HepG2-tet-off-hPPAR cells were treated with DMSO or ligands (100 μ M fenofibric acid for PPAR α (A), 100 nM GW501516 for PPAR δ (B) or 10 μ M ciglitizone for PPAR γ (C and D)) for 0, 8, 24 or 72 h in the absence of Dox. Messenger RNA levels of human HMGCS2 were measured by RT-PCR.

解析した。その結果、リガンドに反応して脂肪酸代謝に係わる遺伝子を始め、脂肪酸輸送、糖代謝などに係わる遺伝子の発現が上昇した (Table 1). 生体内においては、PPAR α は肝臓で脂肪酸代謝を制御しており、また、PPAR γ は脂肪細胞の分化、脂質の蓄積に関与している。今回の実験結果から、樹立した細胞株においても主にPPAR α は脂肪酸代謝に関する遺伝子群を誘導し、また、PPAR γ は脂肪酸

Table 1. Changes in mRNA Expression Levels of Metabolism-related Genes in HepG2-tet-off-hPPAR Cells by Ligands

Gene	Fold change							
	PPAR α		PPAR δ		PPAR γ 1		PPAR γ 2	
	DMSO vs. Dox	Feno vs. Dox	DMSO vs. Dox	GW vs. Dox	DMSO vs. Dox	Cig vs. Dox	DMSO vs. Dox	Cig vs. Dox
Fatty acid metabolism								
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	1.84	3.49	0.82	1.72	0.88	2.30	0.82	1.00
Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	1.48	2.86	0.37	2.05	0.74	1.35	1.12	1.24
Solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	1.20	2.23	0.91	1.36	0.83	0.93	1.04	1.27
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	2.16	3.46	0.92	2.69	1.36	1.97	1.55	2.33
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	1.62	2.52	0.64	2.03	1.24	1.48	1.40	1.80
Trifunctional protein, beta subunit	1.74	2.66	0.95	1.30	1.17	1.49	1.14	1.62
Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	1.58	1.92	1.06	1.63	0.89	1.31	1.18	2.44
Enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	2.28	2.61	0.99	2.05	1.16	1.46	1.44	1.98
Antioxidant								
Catalase	1.51	2.36	0.68	1.45	1.06	1.54	1.69	2.59
Ketogenesis								
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	32.40	156.62	1.13	2.51	2.14	6.57	2.20	6.53
Transport/strage								
Fatty acid binding protein 1, liver	1.39	2.08	0.18	1.33	2.73	6.52	3.52	10.44
Adipose differentiation-related protein	1.96	3.44	0.22	2.90	3.33	6.06	3.40	5.73
PDZ domain containing 1	2.16	3.02	0.52	2.85	1.03	2.42	1.98	3.21
Lipase, hepatic	8.34	10.39	0.72	2.89	1.08	2.47	1.64	3.99
Gluconeogenesis								
Aquaporin 3	3.00	5.86	0.26	1.91	1.58	3.41	1.38	3.09
Glycerol kinase	0.87	1.57	0.73	0.79	1.00	1.21	1.84	3.17
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	6.39	17.90	0.83	4.64	6.94	29.19	34.46	110.78
Metabolism								
Angiopoietin-like protein 4	1.71	17.97	3.00	25.67	1.24	7.27	3.88	33.56
Heme oxygenase (decycling) 1	1.25	2.21	0.66	1.25	1.31	2.20	2.18	4.20

Microarray analyses were performed on HepG2-tet-off-hPPAR cells; the cells were cultured in the presence (Dox) or absence of Dox for 5 days. In the absence of Dox, the cells were treated with ligands (100 μ M fenofibric acid for PPAR α (Feno), 100 nM GW501516 for PPAR δ (GW) or 10 μ M ciglitizone for PPAR γ (Cig) or DMSO for 24 h. Gene expression profiles were compared between DMSO and Dox or ligands and Dox.

の取り込みや輸送に関する遺伝子群を誘導する傾向が認められた。しかしながら、いずれの PPAR もこれら遺伝子の発現を誘導した。このことから、生体内における PPAR の特異的な機能は、主にその組織特異的な発現パターンによって規定されているのではないかと考えられる。すなわち、組織特異的な転写共役因子や他の転写因子の存在、リガンドの

有無、クロマチン構造などが PPAR の組織における機能の違いに重要な影響を及ぼしていると思われる。^{12,17)}

興味深いことに、リガンドのない状態でも PPAR α と PPAR γ は標的遺伝子の発現を誘導した。これは、細胞内に含まれる脂肪酸やアラキドン酸の代謝物などがリガンドとして働いている可能性

が考えられた.^{18,19)}一方で, PPAR δ はリガンドのない状態ではいくつかの遺伝子の発現を抑制した. これまでに, PPAR δ はリガンドのない状態でコリプレッサーと相互作用し, 標的遺伝子の転写を抑制することが報告されている.^{20,21)} また, PPAR δ のリガンド結合ポケットは, PPAR α や PPAR γ に比較して小さいことが報告されている.²²⁾ これらのことが, 今回樹立した細胞株における PPAR α , γ と PPAR δ の転写制御の違いに現れたのかもしれない. この点に関しては更なる研究が必要であるものの, 本研究結果から, 今回樹立した細胞株は PPAR の転写制御機構を解析する上で, よいツールになると考えられる.

5. PPAR による ADRP 遺伝子の発現制御機構

トランスクリプトーム解析の結果, adipose differentiation-related protein (ADRP) 遺伝子の発現がいずれの PPAR サブタイプにも応答して変化していた (Table 1). ADRP は脂肪滴に特異的に局

在するタンパク質で, 様々な細胞で発現しており, 脂質の輸送や蓄積に参与している.²³⁾ これまでに, マウス ADRP プロモーターの -2000 bp 付近に PPRE が存在することが報告されていたが,²⁴⁾ ヒトの PPRE は同定されていなかった. そこで, PPAR によるヒト ADRP の発現調節機構を解析した.¹⁶⁾

まず, ヒト ADRP プロモーターの塩基配列をマウスのプロモーターと比較した結果, ヒトのプロモーターの -2300 bp 付近に PPRE の候補配列を見出した (Fig. 4(A)). そこで, この領域を含むプロモーターを用いてレポーターアッセイを行った (hADRP-4K). 同時に, PPRE と推定される領域から上流部分を削ったプロモーター (hADRP-d1), 及び, その配列に変異を加えたプロモーター (hADRP-mut) を含むレポータープラスミドも用いた. その結果, いずれの PPAR サブタイプもリガンドに応答してヒト ADRP プロモーターを活性

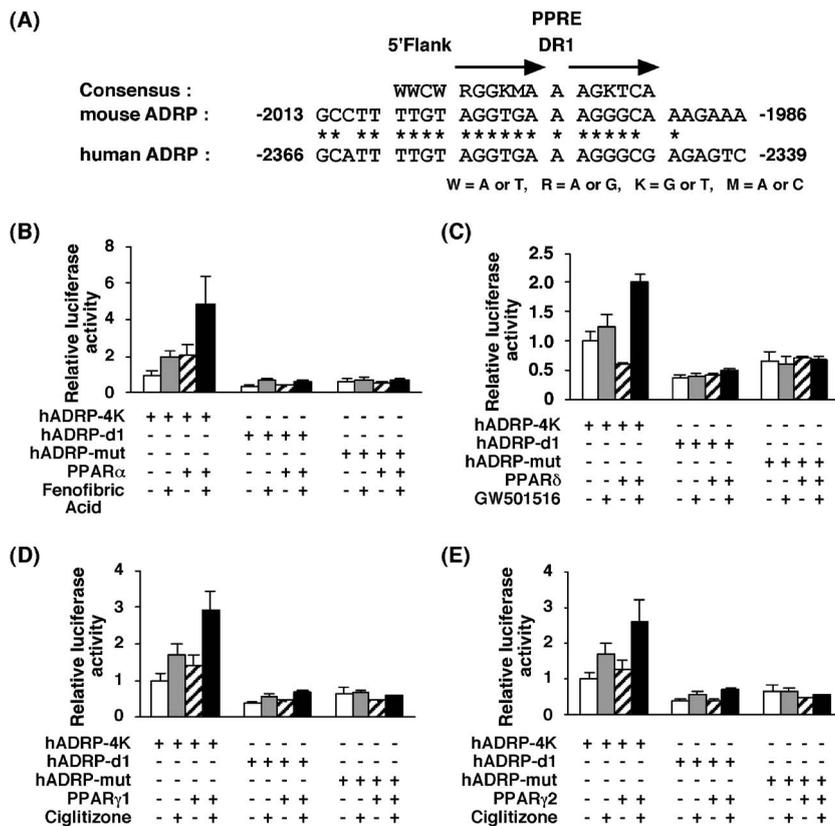


Fig. 4. PPARs Modulate Human ADRP Promoter Activity via a PPRE Located between -2361 and -2345 bp

(A) A sequence corresponding to the -2366/-2339 region of the human *adrp* gene, was compared with a consensus PPRE and the analogous regions in the mouse *adrp* gene promoter (-2013/-1986). Asterisks denote conserved bases. (B, C, D and E) HepG2 cells were co-transfected with a human ADRP reporter plasmid, pRL-TK and either pcDNA3-hPPAR α (B), pcDNA3-hPPAR δ (C), pcDNA3-hPPAR γ 1 (D) or pcDNA3-hPPAR γ 2 (E). Transfected cells were treated with ligands (100 μ M fenofibric acid (B), 100 nM GW501516 (C) or 10 μ M ciglitizone (D and E)) for 24 h and the cells were used for reporter gene assays. Luciferase activities from reporter plasmids were normalized by internal *Renilla* luciferase activity.

化した。また、この効果は PPRE を欠失、又は、変異を加えた場合には認められなかった (Fig. 4 (B-E))。このことから、この領域がヒト ADRP の PPRE である可能性が示唆された。

次に、PPAR のこの領域への結合を調べた。まず、ゲルシフトアッセイを行ったところ、いずれの PPAR サブタイプも RXR α と 2 量体を形成してこの領域に結合した (Fig. 5(A); ここには PPAR α の結果のみ示す)。さらに、クロマチン免疫沈降法により、細胞内での PPAR と RXR α の ADRP プロモーターへの結合を調べた。その結果、細胞内においても PPAR と RXR α の 2 量体が ADRP プロモーターに結合していることが明らかになった (Fig. 5(B); ここには PPAR α の結果のみ示す)。

以上の結果、筆者らはヒト ADRP の PPRE を同

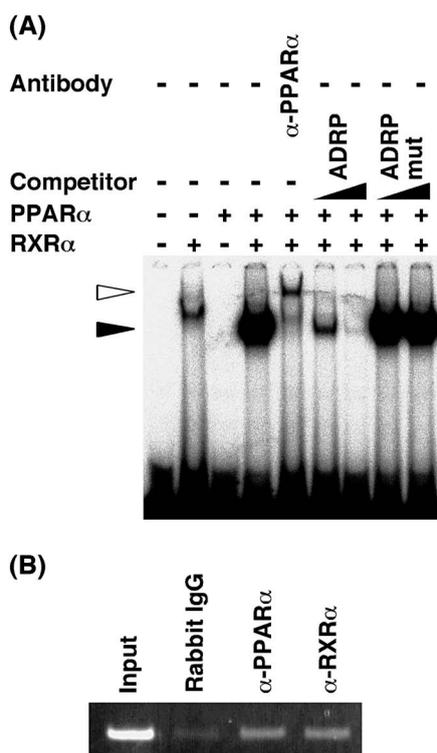


Fig. 5. PPAR α Binds to the PPRE in the $-2366/-2339$ Region of the Human *adrp* Gene

(A) EMSA was performed with the 32 P-labelled ADRP oligonucleotides in the presence of purified PPAR α and/or purified RXR α proteins. Supershift experiment was carried out using anti-PPAR α antibody. Unlabelled oligonucleotides (ADRP or ADRP mut) were used at 10- or 100-fold molar excess to the labelled probe to perform competition assays. Closed and open arrowheads indicate the specific bands and the supershift band, respectively. (B) HepG2-tet-off-hPPAR α cells were treated with 100 μ M fenofibric acid for 8 h in the absence of Dox and processed for the ChIP assays. Soluble chromatin was immunoprecipitated with pre-immune rabbit IgG, anti-PPAR α antibody or anti-RXR α antibody. Immunoprecipitates were subjected to PCR with a primer-pair specific to the ADRP promoter. PCR was performed with total chromatin input.

定し、いずれの PPAR サブタイプも RXR α と 2 量体を形成してこの領域に結合し、転写を制御していることを明らかにした。¹⁶⁾

6. おわりに

近年、核内受容体の転写制御には、コアクチベーターやコリプレッサーなどの転写共役因子の重要性が唱えられている。転写共役因子の組織特異的な発現が、核内受容体リガンドの組織特異的なアゴニスト、アンタゴニストとしての作用を担っていると考えられている。このような組織特異的な PPAR の活性調節薬 (selective PPAR modulator; SPPARM) と PPAR、転写共役因子との相互作用は、高脂血症、糖尿病、肥満など生活習慣病を標的とした薬剤開発の観点からも非常に重要である。^{17,25,26)} これら SPPARM による転写制御機構を解明する 1 つの方法として、筆者らが樹立したヒト肝癌由来 PPAR 発現細胞株と、他の組織由来の PPAR 発現細胞株を樹立して、PPAR を中心とした複合体を比較・解析することが考えられる。一方で、PPAR にはヒトとげっ歯類でその作用に種差が現れることが知られている。⁸⁾ このことから、ヒトに対して薬理効果を発揮する SPPARM を探索するためには、ヒトの細胞を用いることが重要である。すなわち、今回筆者らが樹立した細胞株とレポーターアッセイを組み合わせることで、新たな SPPARM のスクリーニング系を構築することも可能であると考えられる。

本稿で概説した以外にも、筆者らは樹立した細胞株を用いて新たな PPAR 標的遺伝子の同定を行っている (投稿準備中)。また、他の核内受容体である liver X receptor α (LXR α) を発現する細胞株を樹立し、LXR α の新たな標的遺伝子の同定にも成功している。²⁷⁾ 今後、これら核内受容体の発現量が調節可能なヒト細胞株を用いることで、核内受容体のさらなる機能の解明や新たな医薬品の開発を行いたい。

謝辞 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科蛋白質情報解析学分野で行われた研究であり、終始、御指導、御鞭撻を賜りました土井健史教授に心から感謝申し上げます。また、本研究を行うに当たり、御協力と御助言を賜りました同研究室の皆様にも心より御礼申し上げます。本研究を推進するに当たり、幾多の御協力と有益な御助言を賜りました東京大学先

端科学技術研究センター システム生物医学ラボラトリー 児玉龍彦教授, 浜窪隆雄教授, 酒井寿郎教授, 田中十志也准教授に深謝致します。

REFERENCES

- 1) Desvergne B., Wahli W., *Endocr. Rev.*, **20**, 649–688 (1999).
- 2) Mandard S., Muller M., Kersten S., *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 393–416 (2004).
- 3) Lehrke M., Lazar M. A., *Cell*, **123**, 993–999 (2005).
- 4) Yu S., Matsusue K., Kashireddy P., Cao W. Q., Yeldandi V., Yeldandi A.V., Rao M. S., Gonzalez F. J., Reddy J. K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 498–505 (2003).
- 5) Matsusue K., Haluzik M., Lambert G., Yim S. H., Gavrilova O., Ward J. M., Brewer Jr. B., Reitman M. L., Gonzalez F. J., *J. Clin. Invest.*, **111**, 737–747 (2003).
- 6) Takahashi S., Tanaka T., Kodama T., Sakai J., *Pharmacol. Res.*, **53**, 501–507 (2006).
- 7) Tan N. S., Michalik L., Noy N., Yasmin R., Pacot C., Heim M., Fluhmann B., Desvergne B., Wahli W., *Genes Dev.*, **15**, 3263–3277 (2001).
- 8) Holden P. R., Tugwood J. D., *J. Mol. Endocrinol.*, **22**, 1–8 (1999).
- 9) Escher P., Wahli W., *Mutat. Res.*, **448**, 121–138 (2000).
- 10) 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., *Nature*, **395**, 137–143 (1998).
- 11) Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R. X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 15924–15929 (2003).
- 12) Glass C. K., Rosenfeld M. G., *Genes Dev.*, **14**, 121–141 (2000).
- 13) Robyr D., Wolffe A. P., Wahli W., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 329–347 (2000).
- 14) Diradourian C., Girard J., Pegorier J. P., *Biochimie*, **87**, 33–38 (2005).
- 15) Gelman L., Michalik L., Desvergne B., Wahli W., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 216–222 (2005).
- 16) Tachibana K., Kobayashi Y., Tanaka T., Tagami M., Sugiyama A., Katayama T., Ueda C., Yamasaki D., Ishimoto K., Sumitomo M., Uchiyama Y., Kohro T., Sakai J., Hamakubo T., Kodama T., Doi T., *Nucl. Recept.*, **3**, 3 (2005).
- 17) Smith C. L., O'Malley B. W., *Endocr. Rev.*, **25**, 45–71 (2004).
- 18) Rodriguez J. C., Gil-Gomez G., Hegardt F. G., Haro D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 18767–18772 (1994).
- 19) Vu-Dac N., Chopin-Delannoy S., Gervois P., Bonnelye E., Martin G., Fruchart J. C., Laudet V., Staels B., *J. Biol. Chem.*, **273**, 25713–25720 (1998).
- 20) Krogsdam A. M., Nielsen C. A., Neve S., Holst D., Helledie T., Thomsen B., Bendixen C., Mandrup S., Kristiansen K., *Biochem. J.*, **363**, 157–165 (2002).
- 21) Shi Y., Hon M., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2613–2618 (2002).
- 22) Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Plunket K. D., Moore L. B., Collins J. L., Oplinger J. A., Kliewer S. A., Gampe Jr. R. T., McKee D. D., Moore J. T., Willson T. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13919–13924 (2001).
- 23) Brasaemle D. L., Barber T., Wolins N. E., Serrero G., Blanchette-Mackie E.J., Londos C., *J. Lipid Res.*, **38**, 2249–2263 (1997).
- 24) Chawla A., Lee C. H., Barak Y., He W., Rosenfeld J., Liao D., Han J., Kang H., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1268–1273 (2003).
- 25) Olefsky J. M., *J. Clin. Invest.*, **106**, 467–472 (2000).
- 26) Sporn M. B., Suh N., Mangelsdorf D. J., *Trends Mol. Med.*, **7**, 395–400 (2001).
- 27) Ishimoto K., Tachibana K., Sumitomo M., Omote S., Hanano I., Yamasaki D., Watanabe Y., Tanaka T., Hamakubo T., Sakai J., Kodama T., Doi T., *FEBS Lett.*, **580**, 4929–4933 (2006).