

脂肪細胞分化を制御する新規遺伝子群の機能解析

城村由和

Characterization of Novel Genes Regulating Adipocyte Differentiation

Yoshikazu JOHMURA

Department of Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya City 467-8603, Japan

(Received August 11, 2006)

The mid- and late stages of adipocyte differentiation are known to be regulated by transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and CCAAT-box/enhancer binder protein (C/EBP) families. However, events in the early stage of adipocyte differentiation remain largely unknown. To gain insights into the molecular mechanisms underlying the beginning of adipocyte differentiation, we have isolated 102 genes, which are induced at the beginning of the differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes, using the polymerase chain reaction (PCR)-subtraction method. Of these, 46 appear to be unknown genes. Since rapid amplification of cDNA end (RACE), cDNA library screening, and a genome database search have revealed that two of these genes are novel, we have named them factor for adipocyte differentiation (fad) 24 and fad158. The database research of amino acid sequences revealed that fad24 has a basic leucine zipper motif and an NOC domain, and fad158 has four transmembrane domains and eight leucine-rich repeats. The expression of fad24 and fad158 transiently increased after the addition of adipogenic inducers [insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, fetal bovine serum (FBS)]. RNAi-mediated knockdown of fad24 or antisense fad158 inhibited adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes and decreased expressions of PPAR γ and C/EBP α . Furthermore, the constitutive overexpression of fad24 or fad158 in the mouse fibroblast cell line NIH-3T3 resulted in adipocyte conversion when stimulated with adipogenic inducers and PPAR γ ligand BRL49653. Moreover, it was found that FAD24 localizes in the nucleus, especially within nuclear speckles and nucleolus, and FAD158 localizes to the endoplasmic reticulum (ER). Taken together, fad24 and fad158 appear to regulate adipocyte differentiation by activating the PPAR γ pathway.

Key words—adipocyte differentiation; obesity; novel genes; peroxisome proliferator-activated receptor γ ; 3T3-L1 cells

1. はじめに

肥満は、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症などの生活習慣病の主要なリスクファクターとして現在大きな問題になっている。また、現代は文明が発達し多くのエネルギーを簡単に摂取できる社会であり、世界規模で肥満が流行している。21世紀の健康科学を考える上で生活習慣病の克服は必須であることから、それに直結する肥満の分子機構の解明は最重要課題の1つだと考えられる。

肥満の形成には、成熟脂肪細胞がより多くの脂肪

を蓄積し、その体積を増加させることにより引き起こされる脂肪細胞の肥大化だけでなく、前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へと分化し、その数が増えることも重要であることが分かってきた。すなわち、肥満やそれに起因する疾病の創薬開発や治療には、脂肪細胞の肥大化のメカニズムのみならず、脂肪細胞分化の分子メカニズムを解明することは非常に重要である。

脂肪細胞の分化とその調節機構については、初代培養細胞株や株化培養細胞系を用いて分子レベルでの検討が数多く行われているが、特に mouse 由来前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を利用した研究が進んでいる。3T3-L1 細胞は線維芽細胞の形態で増殖するが、コンプレントに達したのち、脂肪細胞分化誘導剤である insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-

名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野
(〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

e-mail: p032733@phar.nagoya-cu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウム GS2 で発表したものを中心に記述したものである。

1-methylxanthine, FBS を添加すると, およそ一週間後に脂肪滴を含んだ脂肪細胞へ分化する.¹⁻³⁾

脂肪細胞分化過程の中期以降に, PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) ファミリー, SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein-1) がマスターレギュレーターとして機能していることが種々の検討から明らかとなっている.⁴⁻⁷⁾ しかしながら, 脂肪細胞分化のまさに引き金になっていると考えられる分化初期の分子メカニズムについては, ほとんど不明である.

筆者らは, 脂肪細胞分化初期の分子メカニズムを解明するために, 3T3-L1 細胞に分化誘導剤を添加し, 分化誘導 3 時間後に発現の上昇する遺伝子を PCR-サブトラクション法により 102 クローン単離している.^{8,9)} これまでの検討から, この中に含まれていた RGS2 (regulators of G protein signaling 2) 及び TCL/TC10 β L (TC10-like/TC10 β Long) が, 脂肪細胞分化を正に制御していることを明らかにしている.^{10,11)}

一方, 単離した 102 クローンのうち, 46 クローンはデータベースに登録がなく, 新規遺伝子をコードしている可能性が示唆された. すなわち, これら 46 クローンの解析は脂肪細胞分化初期においてこれまでに明らかとされていない分子メカニズムを解明する足掛かりになると考えられる. そこで, 本総説では 46 クローンに含まれていた新規遺伝子群のクローニング及び機能解析のこれまでの検討結果を中心に, 脂肪細胞分化初期の分子メカニズムについて概説する.

2. 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化初期に発現が上昇する新規遺伝子群の単離

46 クローンの未知遺伝子群の中に新規遺伝子が含まれているか否か検討するため, これら 46 クローンの全長配列クローニングを試みた. PCR-サブトラクション法により単離された cDNA 断片は 300-500 base pairs (bp) 程度であり, 遺伝子構造の全体像は不明であった. そこで, マウスゲノムデータベース及びヒューマンゲノムデータベース, さらにこれらのデータベースを包含的に統合した UCSC ゲノムバイオインフォマティクスサイト (<http://genome.ucsc.edu/>) を用いることにより, open reading frame (ORF) 領域の予測を行った.

さらに, この予測配列を参考に reverse transcriptase coupled polymerase chain reaction (RT-PCR), 5'-RACE, 3'-RACE, library screening を行った. その結果, clone 24 では 2421 bp の ORF を含む 2782 bp の cDNA (Fig. 1(A)), clone 158 では 2409 bp の ORF を含む 2851 bp の cDNA (Fig. 1(B)) を単離することができた. また, これらのクローンについてはヒト cDNA の ORF 領域のクローニングもを行い, 配列を決定した.^{12,13)}

得られた各遺伝子の ORF 領域を Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) で検索し, 相同性の高い塩基配列の登録の有無を検討した. その結果, clone 24 及び clone 158 と相同性の高い遺伝子の登録はなく, これらは新規遺伝子であると考えられた. そこで, 両因子を factor for adipocyte differentiation の頭文字から, fad24 及び fad158 と名付けた.

新規遺伝子 fad24 はマウスでは 807 アミノ酸, ヒトでは 800 アミノ酸より構成されるタンパク質をコードする遺伝子であった. 保存性の高いドメインの有無を検討するため, Search the conserved domain database (RPS-BLAST) に対する検索を行った結果, マウス及びヒト配列中に, ベーシックロイシンジッパー様構造及び NOC (Nucleolar complex) ドメインが保存されていた (Fig. 1(C)).¹²⁾

新規遺伝子 fad158 はマウス, ヒトともに 803 アミノ酸より構成されるタンパク質をコードする遺伝子であった. RPS-BLAST に対する検索及び, 膜貫通領域の有無を検討するための SOSUI システムによる検索を行った結果, N 末端に 4 回膜貫通領域, C 末端にロイシンリッチリピートモチーフがマウス及びヒトの配列中に保存されていた (Fig. 1(D)).¹³⁾

3. 単離した新規遺伝子群の脂肪細胞分化初期における発現変化

Fad24 及び fad158 について, 脂肪細胞分化との関連を解析するために, 3T3-L1 細胞分化初期における発現をノザンプロット法により解析した. その結果, fad24 及び fad158 はいずれも脂肪細胞分化初期過程に一過的に発現が増加し, その後速やかに減少することが明らかになった (Fig. 2).^{12,13)} この結果より, fad24 及び fad158 が脂肪細胞分化初期過程において重要な役割を担っていることが示唆された.

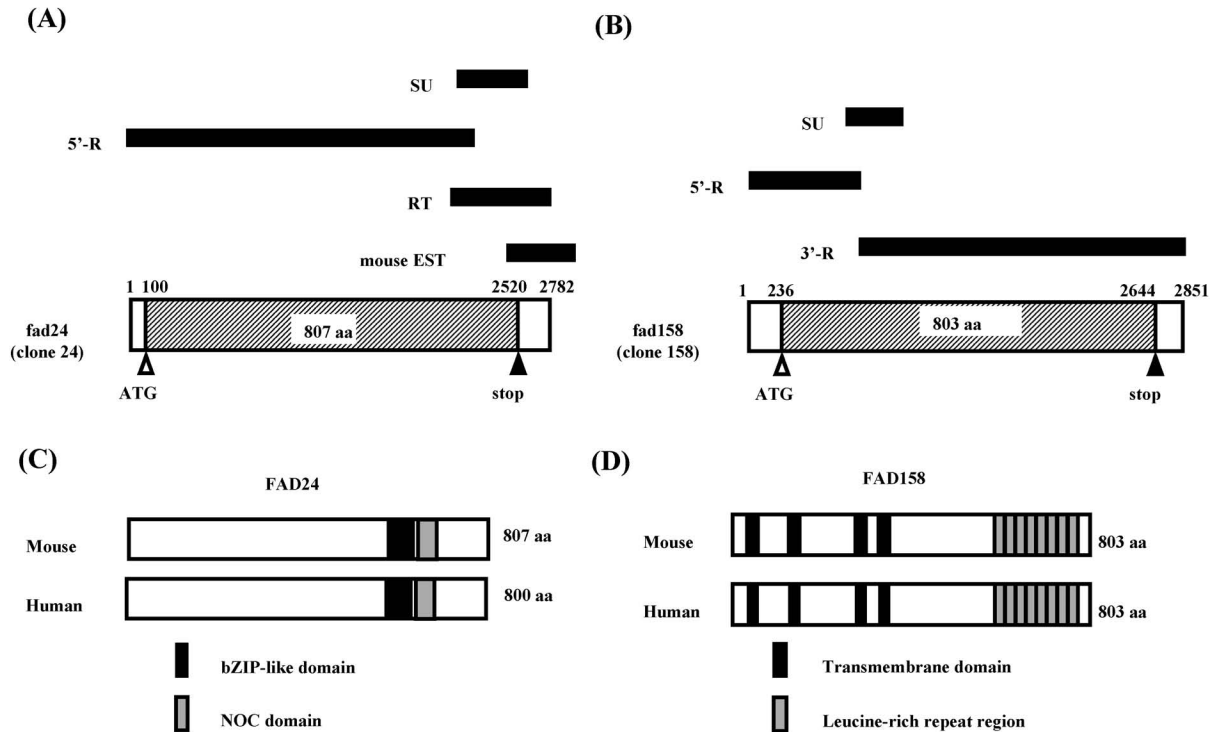


Fig. 1. Cloning and Schematic Representation of Clone 24 and Clone 158

(A, B) Cloning of clone 24 and clone 158. The full-length cDNA for mouse *fad24* and *fad158* were isolated by 5'-RACE and 3'-RACE. Su, R-5' and R-3' are fragments obtained by original PCR-subtraction, 5'-RACE and 3'-RACE, respectively. The combined sequence are shown as *fad24* and *fad158*, and the first methionine and stop codon are indicated. (C) The schematic structure of FAD24. A basic leucine zipper (bZIP) like-domain and a NOC domain (according to NCBI RPS-BLAST) are shown. (D) The schematic structure of FAD158. The four transmembrane domains (according to the SOSUI system) and eight leucine-rich repeat motifs (according to NCBI RPS-BLAST) are shown.

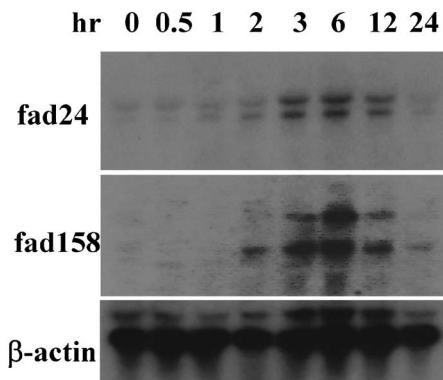


Fig. 2. Time Course of mRNA Expressions of *Fad24* and *Fad158* during the Early Stage of Adipocyte Differentiation

Total RNA from different time point after induction was prepared from 3T3-L1 cells. Isolated total RNA (25 μ g) was loaded and subjected to Northern blot analysis of *fad24* and *fad158*. β -actin is also shown as a control.

4. *Fad24* の脂肪細胞分化に対する影響の解析

Fad24 は新規遺伝子であり、脂肪細胞分化初期に一過的に発現が上昇することが明らかになった。次に、*fad24* の脂肪細胞分化における機能を解明するために、RNA interference (RNAi) 法による *fad24*

の発現抑制が脂肪細胞分化に及ぼす影響について解析した。ショートヘアピン RNA 発現ベクターに *fad24* ターゲット配列をサブクローニングしたプラスミドを 3T3-L1 細胞に導入し、分化誘導後 0, 6, 12, 18, 24 時間における *fad24* の発現を定量 PCR によって解析した。その結果、スクランブル配列をサブクローニングしたショートヘアピン RNA 発現プラスミドを導入したコントロール細胞に比べて、*fad24* ショートヘアピン RNA 発現プラスミドを導入した細胞では、いずれの時間においても *fad24* の発現が減少することが示された (Fig. 3(A))。そこで、これらのプラスミドを導入した細胞に分化誘導剤を添加したところ、コントロール細胞に比べて、*fad24* の発現を抑制した細胞において脂肪滴の蓄積の障害が認められ (Fig. 3(B))、さらに、脂肪細胞のマーカー遺伝子である aP2 (adipocyte fatty acid-binding protein) の発現が減少した。また、脂肪細胞関連遺伝子の発現を定量 PCR で解析した結果、*fad24* 発現抑制細胞において脂肪細胞分化のマスタレーギュレーターである PPAR γ , C/EBP α の発

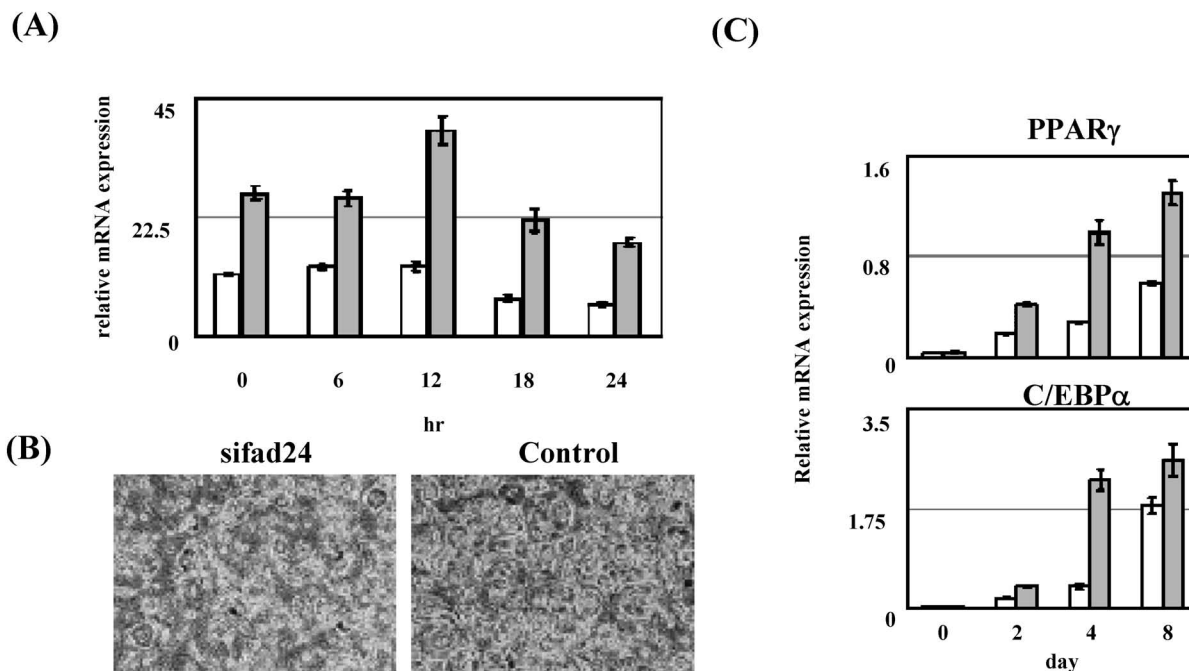


Fig. 3. Knockdown of Fad24 Inhibits Adipocyte Differentiation

(A) The endogenous expression of fad24. Total RNA obtained from 3T3-L1 cells transfected with short-hairpin RNA (shRNA) expression vector for fad24 (sifad24: white bar) or with scrambled shRNA expression vector as a control (Control: gray bar) at each time points were subjected to real-time quantitative RT-PCR. Expression level was normalized with 18S rRNA. The column showed the mean with standard deviation ($n=3$). (B) Differentiation of 3T3-L1 cells transfected with shRNA expression vector for fad24 (sifad24) or with scrambled shRNA expression vector as a control (Control) were stimulated with adipogenic inducers. After 8 days of induction, the cells were fixed and stained with Oil red O to detect oil droplets. (C) The expression of PPAR γ and C/EBP α . Total RNA obtained from sifad24 cells (white bar) or control cells (gray bar) at each time points were subjected to real-time quantitative RT-PCR. Expression levels were normalized with β -actin. The column showed the mean with standard deviation ($n=3$).

現も減少することを明らかにした (Fig. 3(C)). 一方, 脂肪細胞分化初期に重要な役割を果たしている C/EBP β 及び C/EBP δ の発現に差は認められなかった.¹²⁾

さらに, レトロウイルスシステムを用いて, 脂肪細胞への分化能を有していない NIH-3T3 細胞に fad24 センス mRNA を過剰に発現させた単一の stable transformant を樹立し, その分化能を検討した. 樹立した細胞における fad24 の発現をノザンブロット法により解析した結果, fad24 センス mRNA 発現細胞においてのみ外来性の fad24 の発現が認められた (Fig. 4(A)). 次に, fad24 センス mRNA 発現細胞とコントロール細胞の休止期に 3T3-L1 細胞と同様の分化誘導剤を添加したが, ともに脂肪細胞への分化は認められなかった. しかしながら, 分化誘導剤に加え PPAR γ のリガンドである BRL49653 を添加した結果, fad24 センス mRNA 発現細胞においてのみ脂肪滴の蓄積が認められた (Fig. 4(B)). さらにノザンブロット法により脂肪細胞関連遺伝子の発現を検討した結果,

fad24 センス mRNA 発現細胞において PPAR γ 及び SREBP-1 の発現が上昇していたのに対して, C/EBP ファミリーの発現に差は認められなかった (Fig. 4(C)).¹²⁾ これらの結果より, fad24 は PPAR γ のリガンドに依存して, PPAR γ の発現量を増加させることにより, 脂肪細胞分化を強く誘導すると考えられた. これまで, 脂肪細胞分化には PPAR γ と C/EBP α はともに必要であると考えられていたが, 2002 年に PPAR γ は分化に必須であるが, C/EBP α は直接関与しないという報告が出された.¹⁴⁾ 筆者らのこれまでの検討結果は, その報告を支持するものと思われる.

5. Fad158 の脂肪細胞分化に対する影響の解析

新規遺伝子 fad158 について脂肪細胞分化における役割を明らかにするために, fad158 発現抑制が脂肪細胞分化に及ぼす影響について検討した. Fad158 アンチセンス mRNA を発現するプラスミドと Lac repressor を発現するプラスミドを 3T3-L1 細胞に導入し, アンチセンス mRNA の発現を isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) によ

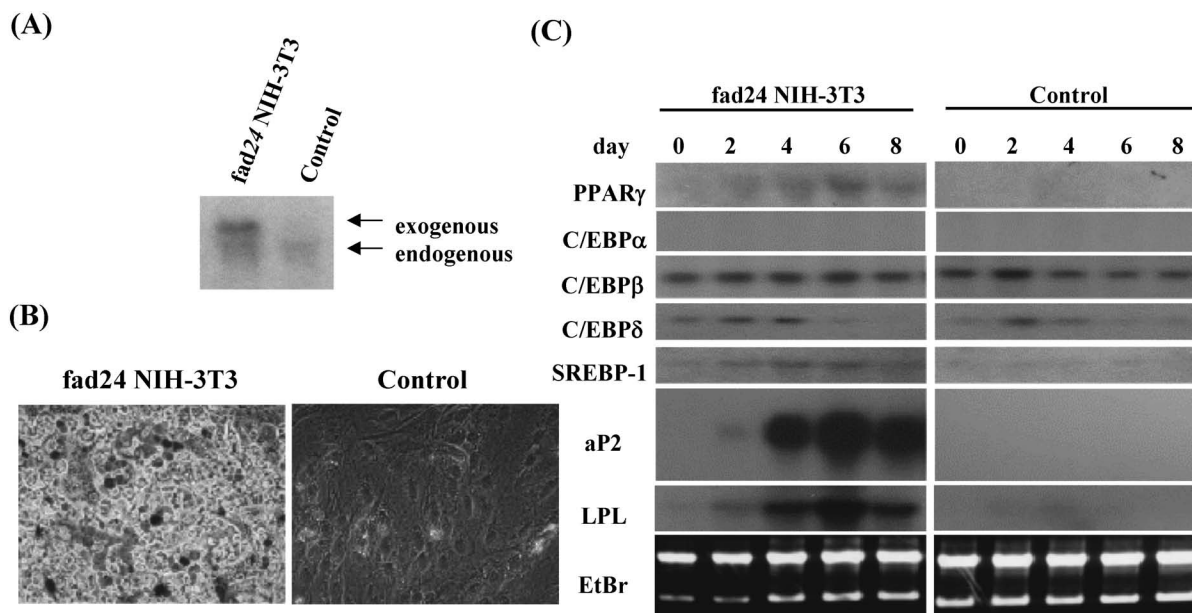


Fig. 4. Fad24 Promotes Adipocyte Differentiation in the Presence of PPAR γ Ligand

(A) The exogenous expression of fad24 was determined by Northern blot analysis. Total RNA (25 μ g) obtained from a stable transformant was subjected to Northern blot analysis of fad24. The retroviral exogenous gene expression and endogenous gene expression are shown. (B) Differentiation of FAD24-overexpressing NIH-3T3 in the presence of BRL49653, a ligand for PPAR γ . NIH-3T3 cells stably expressing fad24 or control cells (infected with empty vector) were treated with adipogenic inducers containing BRL49653. After 8 days of induction, the cells were fixed and stained with Oil Red O to detect oil droplets. (C) Northern blot analysis of adipocyte marker genes during the differentiation of fad24-overexpressing NIH-3T3 cells. Total RNA (25 μ g) from cells after the induction was subjected to Northern blot analysis for each adipocyte marker gene.

って制御できる単一の stable transformant を樹立した。このように樹立した細胞に分化誘導剤を添加した結果、fad158 の発現を抑制した細胞において、脂肪滴の蓄積が阻害された。また、PPAR γ 及び C/EBP α の発現をノザンプロット法によって解析した結果、どちらの因子の発現も減少していることが明らかとなった。¹³⁾

そこで、fad158 について fad24 同様、レトロウイルスシステムを用いた fad158 センス mRNA 発現細胞の樹立及び解析を行った。その結果、fad158 センス mRNA 発現細胞についても fad24 センス mRNA 発現細胞と同様の結果が得られた (Fig. 5)。すなわち、fad158 センス mRNA 発現細胞においても PPAR γ のリガンド存在下、脂肪細胞へ分化することを明らかにした。¹³⁾ これらの結果は、fad158 が fad24 同様に PPAR γ の活性化を介して、脂肪細胞分化を促進していることを示唆している。

6. Fad24 及び Fad158 の細胞内局在の検討

発現抑制系及び過剰発現系を用いた検討により、fad24 及び fad158 が脂肪細胞分化において重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら、両因子の脂肪細胞分化過程における具体的な機

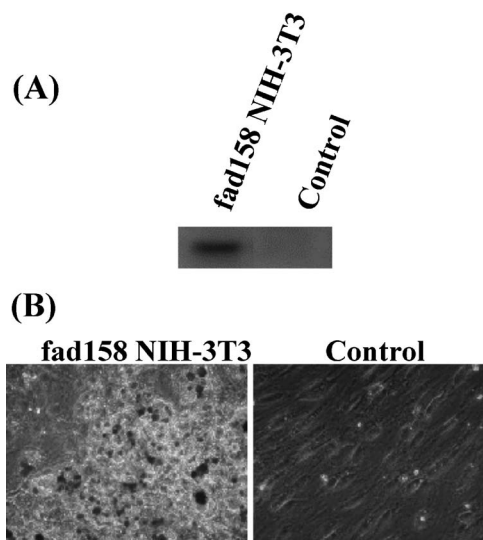


Fig. 5. Fad158 Promotes Adipocyte Differentiation in the Presence of PPAR γ Ligand

(A) The exogenous expression of fad158 was determined by Northern blot analysis. Total RNA (25 μ g) obtained from a stable transformant was subjected to Northern blot analysis of fad158. The retroviral exogenous gene expression was shown. (B) Differentiation of fad158-overexpressing NIH-3T3 in the presence of BRL49653, a ligand for PPAR γ . NIH-3T3 cells stably expressing fad158 or control cells (infected with empty vector) were treated with adipogenic inducers containing BRL49653. After 8 days of induction, the cells were fixed and stained with Oil Red O to detect oil droplets.

能は依然不明である。そこで、これら因子の機能の一端を明らかにするために、細胞内局在を検討した。Green fluorescent protein (GFP)-FAD24 融合タンパク質発現プラスミドを構築し、HeLa 細胞に導入した結果、GFP-FAD24 は核内にドット状に局在した (Fig. 6(A))。このドット状の核内構造体と核スペckルの関係を明らかにするために、核スペckルのマーカータンパク質である SC35 の抗体を用いて免疫染色した。その結果、GFP-FAD24 の蛍光シグナルと SC35 の染色が重なることが明らかとなった。また、GFP-FAD24 の蛍光シグナルと細胞の位相差像を重ね合せたところ、核小体にも局在が認められた (Fig. 6(A))。¹²⁾ 核スペckルは転写とスプライシングの場であることが知られている。Fad24 は核スペckルに局在することから、転写・スプライシングを介して、脂肪細胞分化を制御していることが考えられる。

Fad158 についても同様に、GFP-FAD158 融合タンパク質発現プラスミドを構築し、細胞内局在を検討した。構築したプラスミドを 3T3-L1 細胞へと導入した結果、核周辺領域に GFP-FAD158 の蛍光シグナルが認められた (Fig. 6(B))。この FAD158 の

細胞内局在をより詳細に検討するために、小胞体のマーカータンパク質であるカルネキシンの抗体で免疫染色したところ、GFP-FAD158 の蛍光シグナルがカルネキシンの染色と重なることが分かった (Fig. 6 (B))。また、N 末端の 4 つの膜貫通領域を欠損させた GFP-FAD158 融合タンパク質発現プラスミドを用いた検討により、fad158 は N 末端の 4 つの膜貫通領域を介して小胞体に局在することが明らかになった。¹³⁾ 近年、小胞体ストレスに代表されるように、小胞体はシグナル伝達の集約の場として注目を集めている。また、ロイシンリッチリピートモチーフを有する因子にはシグナル伝達に関与するものが数多く知られている。Fad158 は脂肪細胞分化初期におけるシグナル伝達の担い手として、重要な機能を果たしているものと考えられる。

7. おわりに

本総説に示したように、筆者らのこれまでの検討結果より、脂肪細胞分化初期に発現が増加する遺伝子群として単離した新規遺伝子 fad24 及び fad158 が、脂肪細胞分化を正に制御していることが明らかになった。また、そのメカニズムは、fad24 及び fad158 が PPAR γ のリガンドに依存して、PPAR γ

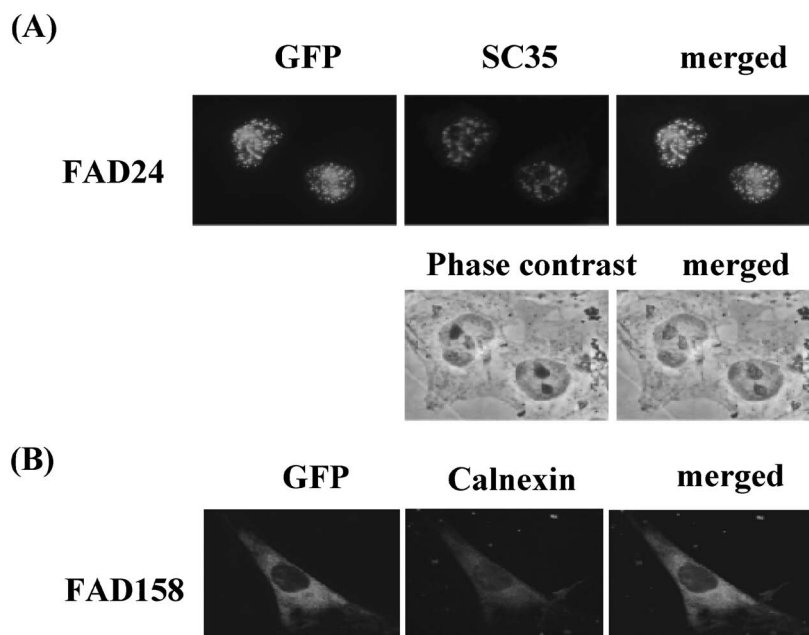


Fig. 6. Localization of FAD24 and FAD158

(A) Localization of FAD24 with nuclear speckles and the nucleolus. HeLa cells transiently transfected with GFP-FAD24-expressing plasmid were fixed and stained with the nuclear speckle marker SC35. The fluorescence of FAD24 and SC35 were detected with a fluorescence microscope. Moreover, GFP signal and phase contrast were detected with a fluorescence microscope. (B) Localization of FAD158 with an ER. 3T3-L1 cells were transiently transfected with GFP-FAD158-expressing plasmid. Twenty-four hours after transfection, transfected 3T3-L1 cells were fixed and stained with the ER marker calnexin. Fluorescence of FAD158 and calnexin were detected with fluorescence microscopy.

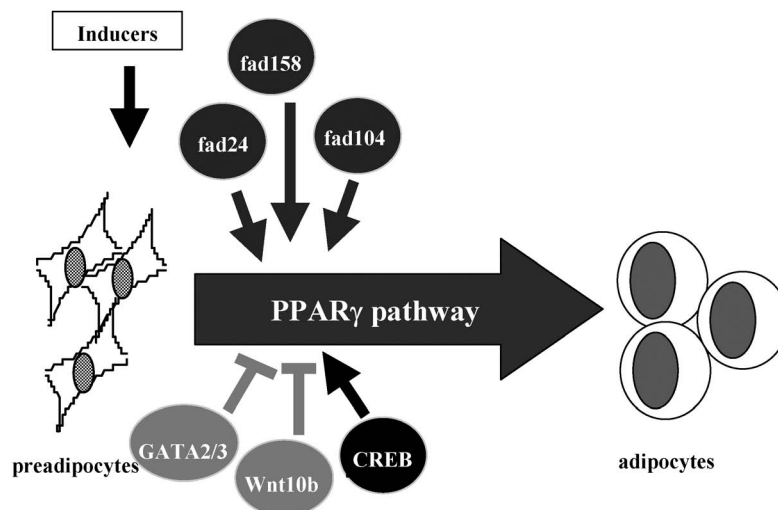


Fig. 7. The Possible Cascades of Isolated Novel Genes in the Early Stage of Adipocyte Differentiation

The early stage of adipocyte differentiation is controlled by complex actions involving gene expression and signal transduction. Fad24 and fad158 were induced at the early stage of adipocyte differentiation. These genes seem to regulate adipocyte differentiation by promoting PPAR γ pathway through unknown targets.

の発現量を増加させることにより、脂肪細胞分化を強く誘導することが考えられた。

近年、脂肪細胞分化初期過程における研究は、活発に進められており、いくつかの因子が脂肪細胞分化初期に機能していることが明らかになっている。そこで、最近の知見と合わせて、筆者らのこれまでの検討結果より明らかになった新規遺伝子 fad24 及び fad158 の役割についてまとめた (Fig. 7)。CREB (cAMP-responsive element binding protein) は、脂肪細胞分化過程の極めて初期にリン酸化による活性化を受け、C/EBP β 及び C/EBP δ の発現を誘導し、脂肪細胞分化を正に制御することが報告された。¹⁵⁾ また、Wnt10b は β -catenin/TCF (T-cell factor) 経路を介し分化を負に制御すること、¹⁶⁾ GATA2/GATA3 (GATA binding protein 2/3) は直接 PPAR γ の転写活性を抑制することが報告された。¹⁷⁾ 本稿では言及しなかったが、PCR-サブトラクション法で単離した他の未知遺伝子群について既に当研究室では、興味深い結果を得ている。¹⁸⁻²⁰⁾ これらの新しい知見は、分化初期において様々な未解明のカスケードが存在している可能性を示唆するものである。Fad24 はその局在から、転写やスプライシングに関与していることが考えられる。脂肪細胞分化初期において、分化に重要な因子の発現制御の役割を担っている可能性がある。また、fad158 は小胞体において、ロイシンリッチリピートモチーフを介してシグナル伝達を制御している可能性がある。これら因

子の詳細な機能を解明するために、下流のターゲット遺伝子群や相互作用する因子群の探索・同定並びにそれらの機能解析が今後の課題である。

本総説で示した筆者らのこれまでの検討結果は、脂肪細胞分化初期における分子メカニズムの一端を明らかにしたものである。今後、これら新規遺伝子群の詳細な機能解析によって脂肪細胞分化の全体像が明らかになり、新たな肥満治療薬の開発へと結び付くことが期待される。

謝辞 本総説で紹介した研究の成果は、名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野で行われたものであり、終始あたたかい御指導、御鞭撻を賜りました今川正良教授に深甚なる表意を表します。また、本研究において終始御指導、御協力いただきました長田茂宏助教授、西塚 誠助手並びに名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野の研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Green H., Kehinde O., *Cell*, **1**, 113-116 (1974).
- 2) Green H., Kehinde O., *Cell*, **5**, 19-27 (1975).
- 3) Mackall J. C., Student A. K., Polakis S. E., Lane M. D., *J. Biol. Chem.*, **251**, 6462-6464 (1976).
- 4) Rosen E. D., Walkey C. J., Puigserver P., Spiegelman B. M., *Genes Develop.*, **14**, 1293-

- 1307 (2000).
- 5) Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B. M., *Cell*, **79**, 1147–1156 (1994).
 - 6) Lin F.-T., Lane M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 8757–8761 (1994).
 - 7) Tanaka T., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S., *EMBO J.*, **16**, 7432–7443 (1997).
 - 8) Imagawa M., Tsuchiya T., Nishihara T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 299–305 (1999).
 - 9) Nishizuka M., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *Biochem. J.*, **361**, 629–633 (2002).
 - 10) Nishizuka M., Honda K., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 29625–29627 (2001).
 - 11) Nishizuka M., Arimoto E., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 15279–15284 (2003).
 - 12) Tominaga K., Johmura Y., Nishizuka M., Imagawa M., *J. Cell Sci.*, **117**, 6217–6226 (2004).
 - 13) Tominaga K., Kondo C., Kagata T., Hishida T., Nishizuka M., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **279**, 34840–34848 (2004).
 - 14) Rosen E. D., Hsu C. H., Wang X., Sakai S., Freeman M. W., Gonzalez F. J., Spiegelman B. M., *Genes Develop.*, **16**, 22–26 (2002).
 - 15) Reusch J. E., Colton L. A., Klemm D. J., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1008–1020 (2000).
 - 16) Ross S. E., Hemati N., Longo K. A., Bennett C. N., Lucas P. C., Erickson R. L., MacDougald O. A., *Science*, **289**, 950–953 (2000).
 - 17) Tong Q., Dalgin G., Xu H., Ting C. N., Leiden J. M., Hotamisligil G. S., *Science*, **290**, 134–138 (2000).
 - 18) Kitamura A., Nishizuka M., Tominaga K., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 435–439 (2001).
 - 19) Tominaga K., Kondo C., Johmura Y., Nishizuka M., Imagawa M., *FEBS Lett.*, **577**, 49–54 (2004).
 - 20) Tominaga K., Kagata T., Johmura Y., Hishida T., Nishizuka M., Imagawa M., *FEBS J.*, **272**, 1590–1599 (2005).