

卵巣摘出ラットの脂肪蓄積に及ぼすジンゲロンの影響

韓 立坤,^{*,a} 森本千恵,^b 鄭 毅男,^c 李 偉,^c
浅見悦子,^a 奥田拓道,^d 齋藤雅人^a

Effects of Zingerone on Fat Storage in Ovariectomized Rats

Li-Kun HAN,^{*,a} Chie MORIMOTO,^b Yi-Nan ZHENG,^c Wei LI,^c
Etsuko ASAMI,^a Hiromichi OKUDA,^d and Masato SAITO^a^aR&D Laboratory, Kracie Holdings Ltd., 3-20-20 Kaigan, Minato-ku, Tokyo 108-8080, Japan, ^bFaculty of Pharmacy, Yasuda Women's University, Yasuhigashi, Asaminami-ku, Hiroshima 731-0153, Japan, ^cDepartment of Chinese Material Medicine, Chinese Material Medicine College of Jilin Agricultural University, Changchun City, Jilin 130118, China, and ^dProfessor Emeritus, Ehime University School of Medicine, Shitsukawa, Toon City, Ehime 791-0295, Japan

(Received May 29, 2007; Accepted May 9, 2008; Published online June 11, 2008)

We reported that ginger prevented obesity in mice fed a high-fat diet in previous study. In this experiment, we examined the effects of zingerone, the major pungent component of ginger on fat storage in ovariectomized (Ovx) rats. Oral administration of 170 mg/kg zingerone significantly reduced body weight and the final parametrial adipose tissue weight in ovariectomized rats. Blood glucose levels after oral administration of glucose were lower in zingerone-treated Ovx-rats than in the Ovx-rats (control). Basal lipolysis in zingerone-treated Ovx-rats was increased compared with that in the Ovx-rats. Zingerone significantly increased norepinephrine-induced lipolysis associated with the translocation of hormone-sensitive lipase (HSL) from the cytosol to lipid droplets in adipocytes. These results indicate that zingerone may prevent the fat storage through increasing norepinephrine-induced lipolysis in adipocytes.

Key words—zingerone; basal lipolysis; norepinephrine; hormone-sensitive lipase; ovariectomized rat

はじめに

閉経後の女性に肥満が多発することはよく知られている。その原因の1つとして、卵巣ホルモンの消退が考えられている。以前われわれは、卵巣ホルモンと肥満の関係を研究し、卵巣ホルモンの分泌が、脂肪合成に係わるとされているリポ蛋白質リパーゼ活性と脂肪分解活性の変動に大きく係わっていることを報告した。¹⁾ この報告では、卵巣ホルモンはノルエピネフリンによる脂肪分解の促進作用を有しており、閉経によってこのホルモンの働きがなくなり体内に脂肪が蓄積され易い状態に陥るため肥満になり易いことを示唆している。したがって、卵巣ホルモン分泌の少ない閉経後や排卵後には肥満し易くなるため、この肥満傾向を阻止するには脂肪分解を高め

る必要がある。

ジンゲロンはショウガの辛味成分の一種であり、その構造式は抗肥満作用を持つことが知られているカプサイシンと構造式がよく似ている (Fig. 1)。近年、辛味食品 (唐辛子、マスタード及びガーリック) 摂取によってエネルギー代謝が亢進し熱産生が増加すること、及びその作用発現には交感神経系を介して副腎から分泌されるエピネフリン並びに褐色脂肪組織が関与していることが報告されている。²⁾ また最近われわれは、ジンゲロンやカプサイシンとよく似た構造式を持つ物質でラズベリーの香気成分の1つであるラズベリーケトンが、脂肪細胞におけるノルエピネフリンによる脂肪分解作用を増強し、抗肥満作用を示すことを明らかにした。³⁾ さらに前報ではわれわれは高脂肪食誘発肥満マウスに対するショウガの抗肥満作用を報告した。⁴⁾ 最近、われわれはジンゲロンが脂肪細胞におけるノルエピネフリンによる脂肪分解作用を増強することを見出したことから閉経後更年期のモデルである卵巣摘出手術

^aクラシエホールディングス㈱R & D 総括部, ^b安田女子大学薬学部薬学科, ^c吉林農業大学中薬材学院, ^d愛媛大学名誉教授

*e-mail: r.han@khp.kracie.co.jp

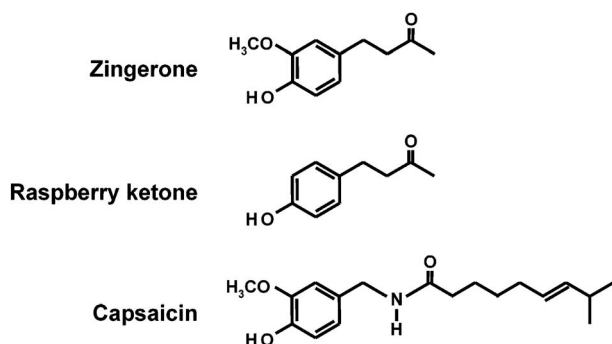


Fig. 1. Structural Formula of Zingerone, Raspberry Ketone and Capsaicin

を施したラットに脂肪分解促進作用のあるジンゲロンを経口投与し、その投与効果を検討することにした。また、ジンゲロンの作用機序を検討するために脂肪細胞を用いてホルモン感性リパーゼ活性に対する影響も検討した。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物及び飼料 5週齢 Kud:Wistar 系雄性ラット〔九動株, 熊本〕を1週間予備飼育したのち、卵巣摘出手術を行い実験に供した。1群5匹の計4群に分け3群は腹部より卵巣を摘出し1群は偽手術を施した。卵巣摘出後3日間の観察飼育ののち、卵巣摘出の3群は水投与群 (Ovx-c)、62.5 mg/kg ジンゲロン投与群 (Ovx-z 62.5) 及び 170 mg/kg ジンゲロン投与群 (Ovx-z 170) の3群に分けた。純水及びジンゲロンの投与は1日2回 (投与時間: 朝 10:00, 夕方 16:00), 1 ml を72日間経口投与した。偽手術 (Sham-c) 群については、Ovx-c 群と同様に1日2回、水 1 ml を経口投与した。飼育期間中、飼料は固形飼育用飼料 CE-2 を、水は水道水を自由摂取させた。飼料摂取量は毎週1回測定し、そのつど飼料を交換した。体重も1週間毎に測定した。また、飼育は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間毎の明暗サイクル (明期: 7:00 am-暗期: 7:00 pm) の環境で行った。なお、本実験は愛媛大学医学部制定の動物実験指針に基づく動物実験管理委員会の承認の下に行われた。

2. 卵巣摘出ラットの体重、摂食量及び子宮傍脂肪組織重量に及ぼす影響 卵巣摘出手術を行ったのち、3日間予備飼育して平均体重が等しくなるよう1群5匹の3群に分け72日間飼育した。飼育期

間中、体重と摂食量は週1回測定し、飼料は測定毎に新しく入れ替えた。平均摂取エネルギーは飼育期間中の平均摂食量から算出した。

飼育終了後、ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部下大静脈より採血した。その後、速やかに子宮傍脂肪組織及び小腸を摘出し重量を測定した。血液は 4°C 、3000 rpm で10分間遠心分離し血清を得た。小腸は 200 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄したのち、 -80°C 保存し、後日の α -グルコシダーゼ活性の分析に供した。

3. 卵巣摘出ラットの基礎脂肪分解能に及ぼす影響 基礎分解能とは、エピネフリンやノルエピネフリンなどの脂肪分解促進ホルモン非存在下での脂肪分解能を示す。採取した子宮傍脂肪組織の血管などを除去し、脂肪組織切片を調製した。0.25 ml の 2.5% 牛血清アルブミン溶液に 0.05 ml の脂肪組織切片を加え 37°C で1時間反応したのち遊離した脂肪酸を Zapf の方法⁵⁾で測定した。

4. 脂肪細胞におけるノルエピネフリンによる脂肪分解に及ぼす影響 6週齢の Wistar 系雄性ラットを頸椎脱臼後、直ちに副睾丸脂肪組織を採取し、Rodbell の方法⁶⁾に準じて脂肪細胞を調製した。脂肪細胞 0.05 ml に 2.5% 牛血清アルブミンを含む Hanks 緩衝液 (pH 7.4) を 0.2 ml, 反応液中の最終濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ になるように調製したノルエピネフリンを 0.025 ml 及び種々の濃度のジンゲロンを 0.025 ml 加え 37°C で1時間反応したのち、Zapf の方法⁵⁾を用いて遊離脂肪酸を測定した。一方、脂肪細胞の生存率に対するジンゲロンの影響を LDH C-II テストワコー (和光純薬工業製) にて測定した。

5. 脂肪細胞におけるノルエピネフリンによる脂肪分解及びホルモン感性リパーゼ (HSL) の局在に及ぼす影響 脂肪細胞に 2.5% 牛血清アルブミンを含む Hanks 緩衝液 0.4 ml, ノルエピネフリン 0.05 ml 及びジンゲロン 0.05 ml を加え 37°C で1時間反応したのち、室温で $100 \times g$, 30秒遠心分離し、脂肪細胞と反応液に分離した。反応液を 70°C で10分間加温したのち、0.05 ml を採取し酵素法にて遊離グリセロールを測定した。一方、残った脂肪細胞に緩衝液 A (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 254 mM サッカロース, 1 mM EDTA, 0.1 mM ベンズアミジン, 20 μM ロイペプチン及び 2 mg/ml トリプシン阻害剤を

含む) を 0.45 ml 加えてホモジナイズし, 2500 ×g, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を抜き取り, 残った脂肪層に 20% SDS を含む Laemmli sample solution を加えよくかく拌した. 抜き取った上清には 1% SDS を含む Laemmli sample solution を加え同様に よくかく拌した. これら sample solution は 5 分間煮沸したのち, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 8%) 及び Western blotting を行い, HSL 抗体を用いてタンパクを検出した. なお, HSL 抗体は, ラットの脂肪細胞 HSL のアミノ酸 326 番目から 341 番目のペプチド GPRLELRPRPQQAPPS を合成し, これをウサギに投与し抗血清として作成した.

6. 統計処理 測定値は平均値±標準誤差で表した. 2 群間の有意差検定は対応なしの Student's *t* 検定を用いて行った. 多群間の有意差検定は Dunnett 検定によって行った. 計算には SPSS 14.0J ソフト [エス・ビー・エス・エス株式会社] を用いた. すべての検定において $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判断した.

結 果

1. 脂肪分解能の比較 ジンゲロンの構造がカプサイシン及びラズベリーケトンによく似ていることから, 脂肪細胞における脂肪分解に対する影響を比較した (Fig. 1). Figure 2 に示すように, 脂肪細胞より単離した脂肪細胞に 0.05 及び 0.1 mg/ml のノルエピネフリンを作用させると脂肪分解が著明に亢進した. しかし, 0.01 mg/ml では著しい脂肪分解の亢進は認められなかった. 一方それぞれ 1 mM のジンゲロン, カプサイシン及びラズベリーケトンを単独で脂肪細胞に作用させると, カプサイシン及びラズベリーケトンの単独添加では脂肪分解の著明な亢進が認められなかったが, ジンゲロンの単独添加では有意な脂肪分解促進作用が認められた. さらに, 脂肪分解の亢進が認められなかった 0.01 mg/ml のノルエピネフリンにそれぞれ 1 mM のジンゲ

ロン, カプサイシン及びラズベリーケトンを添加すると, いずれもノルエピネフリンの脂肪分解促進作用を増強し, 特にジンゲロンが最も強く増強した.

2. 摂食量, 体重及び子宮傍脂肪組織重量 飼育期間中の平均摂取エネルギーを Table 1 に示した. Sham-c 群に比べて Ovx-c 群では有意な平均摂取エネルギーの増加が認められた. Ovx-c 群に比べて Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群では有意な平均摂取エネルギーの低下が認められなかった. 育期間中のラットの体重を Fig. 3 に示した. Sham-c 群に比べて Ovx-c 群では有意な体重増加が認められた. Ovx-c 群に比べて Ovx-z 62.5 mg/kg 群では有意な体重低下が認められなかったが, Ovx-z 170 mg/kg 群では飼育 60 日目以後に有意な体重低下が認められた. 子宮傍脂肪組織重量については, Fig. 3 に示すように Ovx-c 群では Sham-c 群に比べて有意な増加が認められ, Ovx-c 群の体重増加原因の 1 つとして脂肪組織量の増加が考えられる. Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群では

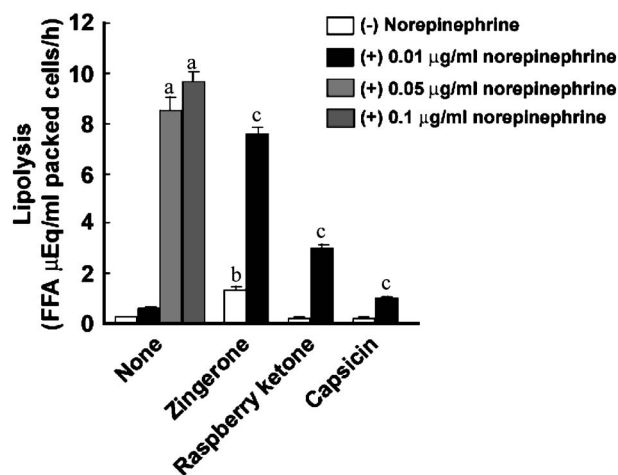


Fig. 2. Effects of Zingerone, Raspberry Ketone and Capsaicin on Lipolysis in Rat Epididymal Fat Cells

Lipolysis was expressed as μEq FFA released per ml packed fat cells per h. Values are means \pm S.E. in each group. a= $p < 0.05$, vs. (-) norepinephrine by student's *t* test. b= $p < 0.05$, vs. (-) norepinephrine by student's *t* test. c= $p < 0.05$, vs. (-) 0.01 $\mu\text{g/ml}$ norepinephrine by student's *t* test.

Table 1. Effects of Zingerone on Food Intake

	Sham	Ovx	Ovx-z62.5	Ovx-z170
Energy intake (kcal/d/rat)	48.92 \pm 2.05*	58.55 \pm 2.10	60.64 \pm 4.71	56.77 \pm 4.97

Results are expressed as mean \pm S.E. * $p < 0.05$, vs. Ovx-group by Dunnett test.

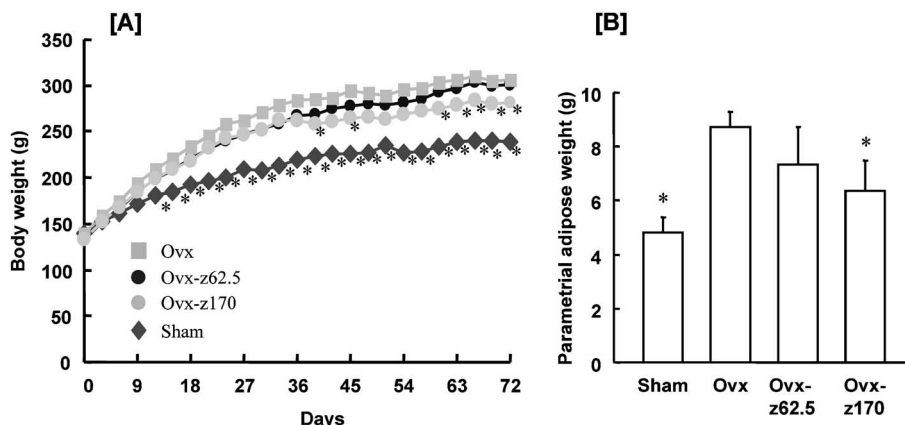


Fig. 3. Effect of Zingerone on Body Weight [A] and Parametrial Adipose Tissue Weight [B] in Ovariectomized Rats. Values are means \pm S.E. in each group. * $p < 0.05$, vs. Ovx-group by Dunnett test.

Table 2. Effects of Zingerone on Sucrase and Maltase Activities in Rat Intestinal Mucosa at 72 Days after Sham-operation or Ovariectomy

	Sham	Ovx	Ovx-z62.5	Ovx-z170
Small intestine weight (g)	4.24 \pm 0.62	4.88 \pm 0.88	4.10 \pm 0.60	4.37 \pm 0.87
Sucrase (μ moles/h/mg protein)	4.14 \pm 0.22*	5.75 \pm 0.16	5.21 \pm 0.13	4.81 \pm 0.34
Maltase (μ moles/h/mg protein)	17.38 \pm 1.51*	29.62 \pm 1.25	27.98 \pm 2.69	25.31 \pm 3.83

Results are expressed as mean \pm S.E. of 5 rats. * $p < 0.05$, vs. Ovx-group by Dunnett test.

Ovx-c 群に比べてジンゲロンの投与量依存的に子宮傍脂肪組織重量が低下傾向を示し、Ovx-z 170 mg/kg 群では Ovx-c 群に対して有意な低下が認められた。血中 GOT 及び GPT の値について測定したところ、GOT (IU/l) の値については、Sham-c 群、Ovx-c 群、Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群の GOT の値がそれぞれ 105.0 ± 11.8 , 118.0 ± 14 , 121.0 ± 16.5 , 110 ± 21.1 であった。GPT (IU/l) の値については、Sham-c 群、Ovx-c 群、Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群の GPT の値がそれぞれ 16.5 ± 1.1 , 17.5 ± 3.4 , 18.1 ± 1.5 , 17.7 ± 2.3 であった。Sham-c 及び Ovx-c 群に比べてジンゲロン投与による血中の GOT, GPT 値には有意な変化が認められなかった。

3. 小腸及び小腸粘膜由来酵素活性 Table 2 に示すように小腸重量については、各群の間において有意な変化が認められなかった。小腸粘膜由来酵素であるスクラーゼ活性及びマルターゼ活性については、Ovx-c 群では Sham-c 群に比べて有意な上昇が認められた。Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群では、Ovx-c 群に比べてスクラーゼ活性及びマルターゼ活性は低下傾向がみられたが有意な変

化は認められなかった。

4. 基礎脂肪分解能 Table 3 に基礎脂肪分解能を示した。Sham-c 群に比べて、Ovx-c 群では基礎脂肪分解能が上昇したが有意な差が認められなかった。一方 Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群では、ジンゲロンの投与量依存的に基礎脂肪分解能を高めた。

5. 飼育期間中グルコース負荷後ラットの血糖値の変化 一晩絶食した各群のラットに 0.8 mg/ml のグルコース溶液 1 ml を経口投与した血糖値の変化を Fig. 4 に示した。グルコース負荷後の血糖値は、Ovx-c 群においては Sham-c 群に比べて高値を示した。Ovx-z 62.5 mg/kg 及び Ovx-z 170 mg/kg 群においては、Sham-c 群と同様な血糖値推移を示した。

6. 脂肪細胞におけるノルエピネフリンの脂肪分解に及ぼす影響 Figure 5 に示すように、ジンゲロン単独では 10^{-6} ~ 10^{-4} M の濃度で脂肪分解の促進はほとんどみられなかったが、 10^{-3} M の濃度では脂肪分解を促進した。ノルエピネフリン存在下では、 10^{-4} M のジンゲロン添加でノルエピネフリンの脂肪分解作用を有意に増強した。また反応後の反

Table 3. Effects of Zingerone on Basal Lipolysis in Fat Cells Isolated from Ovariectomized Rats

	Sham	Ovx	Ovx-z62.5	Ovx-z170
Basal lipolysis (FFA $\mu\text{mol/h/g}$)	0.095 \pm 0.021	0.102 \pm 0.023	0.124 \pm 0.017	0.149 \pm 0.055*

Results are expressed as mean \pm S.E. of 5 rats. * p <0.05, vs. Ovx-group by Dunnett test.

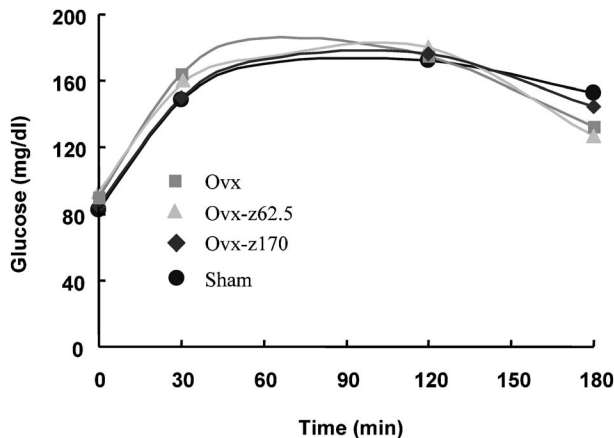


Fig. 4. Effect of Zingerone on Blood Glucose after Oral Administration of Glucose in Ovariectomized Rats
Values are means \pm S.E. in each group.

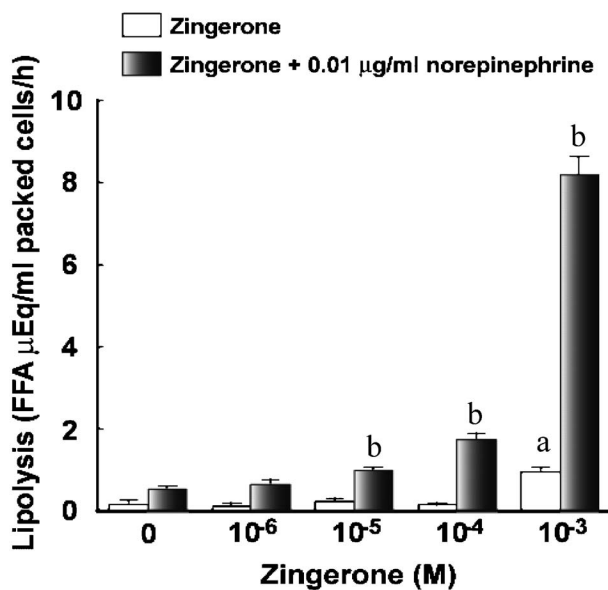


Fig. 5. Effect of Various Concentrations of Zingerone on Lipolysis in Rat Epididymal Fat Cells

Lipolysis was expressed as μEq FFA released per ml packed fat cells per h. Values are means \pm S.E. in each group. a= p <0.05, vs. zingerone (0 M) by student's t test. b= p <0.05, vs. 0.01 $\mu\text{g/ml}$ norepinephrine by student's t test.

応液を採取して LDH 活性を測定したところ、無添加時の LDH 値を 100% とし、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 及び 10^{-3} M ジンゲロンを添加したときの LDH 値は

それぞれ 100.5 ± 3.1 、 97.2 ± 5.7 、 109.2 ± 4.5 、 103.5 ± 6.3 であった。いずれも有意な変化が認められなかった。

7. 脂肪細胞におけるノルエピネフリンの脂肪分解及びホルモン感性リパーゼの局在に及ぼす影響
つぎに、ジンゲロンの脂肪分解増強作用とホルモン感性リパーゼ (HSL) の局在の関係を検討した。Figure 6 に示すように、ジンゲロンがノルエピネフリンの脂肪分解作用を増強するに従って、HSL の細胞質から脂肪層への移行が認められた。また、結果には示していないが、ホルモン感性リパーゼ活性及び総タンパク量には全く影響を及ぼさなかった。

考 察

今回の結果は、ジンゲロンが摂取エネルギーを低下させずに脂肪分解促進作用を高めることを通じて、卵巣摘出ラットの体重及び脂肪組織重量の増加を抑制し、肥満を緩和したことを示した。卵巣を摘出することによって、マウス及びラットの摂食量の増加や自発運動の低下を引き起こすことが報告されている。⁷⁾ また最近では、卵巣摘出ラットにおいては、小腸粘膜由来酵素活性が増加することが報告されている。⁸⁾ 本研究では、卵巣摘出ラットの平均摂取エネルギーが有意に増加したことが認められた。また、小腸粘膜由来酵素の活性が有意に高いことも認められた。一方、ジンゲロン投与では、平均摂取エネルギーや小腸粘膜由来酵素の活性に対していずれも有意な影響が認められなかった。したがって、本研究で認められたジンゲロンの体重及び脂肪組織重量の増加抑制作用は、摂取エネルギー低下作用及び小腸粘膜由来酵素活性の抑制作用以外の作用機序を通じて発揮したことが示唆された。最近、石見らは動物実験においてジンゲロンの酸素消費の増加並びに呼吸商の低下に対して有意な効果を持つことを明らかにした。⁹⁾ すなわちジンゲロンには脂肪分解を促進し、同時にエネルギー消費を高める作用を持つことを示している。⁹⁾ 今回の実験では、ジンゲロ

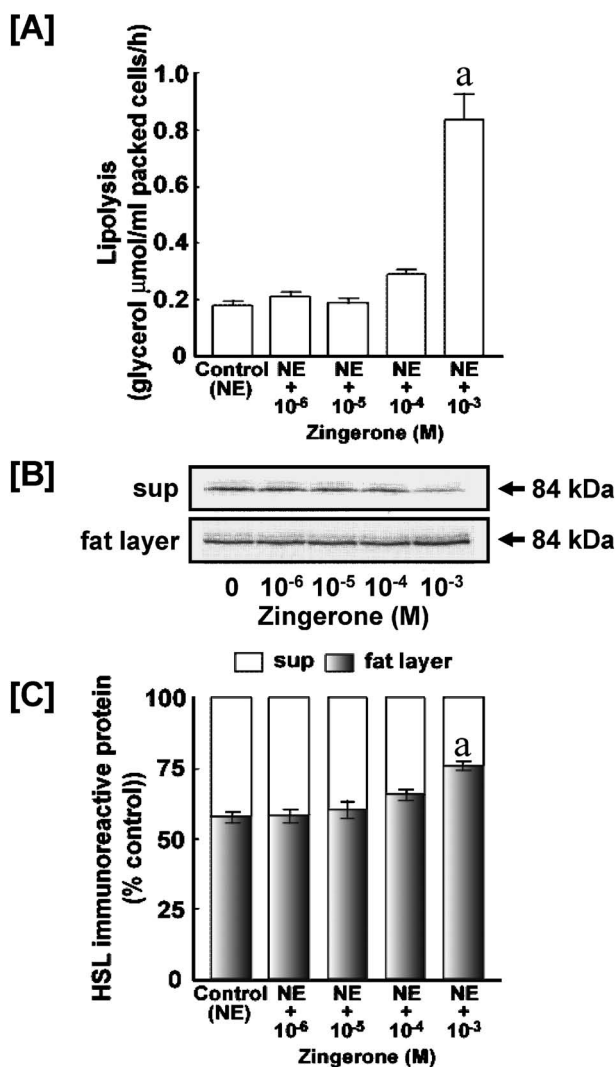


Fig. 6. Effect of Various Concentrations of Zingerone on Lipolysis [A] and Localization of Hormone-sensitive Lipase (HSL) [B], [C] in Rat Epididymal Fat Cells

Values are means \pm S.E. in each group. [A]: Lipolysis was expressed as μ mol glycerol released per ml packed fat cells per h. $a=p<0.05$, vs. control (NE) by student's t test. [B]: A representative immunoblot showing the HSL protein levels of norepinephrine- and zingerone-treated cells. [C]: HSL immunoreactive protein levels of the supernatant and fat layer tabulated as the percentage fraction of the density detected by enhanced chemifluorescence determined using a FluorImager, Fluorescence Imaging Analyzer (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd. Bucks UK). $a=p<0.05$, vs. control (NE) by student's t test.

ン投与によって基礎脂肪分解能を高めたことが認められた。脂肪細胞にエピネフリンやノルエピネフリンなどのホルモンを作用させると脂肪分解が促進するが、それらの脂肪分解促進剤を作用させない場合の自発的に行われる脂肪分解、すなわち基礎脂肪分解能は、肥満になり脂肪細胞が拡大するにつれて増加する。¹⁰⁾ その原因の1つとして、脂肪細胞が拡大する。すなわち脂肪細胞中の大部分を占める油滴が

拡大すると、油滴表面にあるレシチン量はその拡大によって相対的に減少し、油滴表面にレシチンの隙間が生じ、HSLが細胞内の油滴と接触し易くなり脂肪分解を引き起こすことが考えられる。これまでに、われわれは脂肪分解促進作用のあるカフェインやコレウスなどの卵巣摘出ラットにおける有用性を報告し、卵巣摘出ラットにおけるカフェインやコレウスの脂肪蓄積抑制作用は、基礎脂肪分解能を高めたことによることを示唆した。^{11,12)} 本研究において、ジンゲロン投与によって基礎脂肪分解能が高まったことは、生体内に取り込まれたジンゲロンがHSLと細胞内の油滴との接触を高めたことによるものと考えられる。そこで、このジンゲロンの脂肪分解増強作用のメカニズムを検討するために、ラット副睾丸脂肪組織より脂肪細胞を調製し、脂肪細胞におけるノルエピネフリン存在下又は非存在下でのジンゲロンの脂肪分解作用とHSLの局在を検討した。その結果、ジンゲロン単独で 10^{-3} Mという濃度で脂肪分解を促進したが、ノルエピネフリンと併用するとさらに低い濃度 10^{-4} Mで脂肪分解を促進した。そのときのHSLの局在は、Cytosolから脂肪層へ移行していることが明らかになった (Fig. 5)。また、結果には示していないが、ホルモン感受性リパーゼ活性及び総タンパク量には全く影響を及ぼさなかった。したがって、ジンゲロンの脂肪分解増強作用は脂肪細胞におけるHSLの活性化によるものではなく、HSLの脂肪滴への結合の促進によるものと示唆された。一方、*in vivo* で得られたジンゲロンの効果が*in vitro* のそれに比べて弱く、これは恐らく*in vitro* においてジンゲロンが直接脂肪細胞に作用しており、*in vivo* では腸管吸収及び血中濃度、他の因子 (インスリンなど) などの影響も考えられる。今後、ジンゲロンの腸管吸収効率や血中濃度などについて詳細な検討を行っていく必要がある。

今回、閉経後更年期のモデル動物である卵巣摘出ラットにおいて、ジンゲロンの脂肪蓄積抑制作用が認められ、ジンゲロンを摂取することによって女性ホルモンの低下による肥満を改善する可能性が示された。今後、ヒトにおけるジンゲロンの有用性についてさらに検討していきたい。

REFERENCES

- 1) Yamaguchi M., Katoh S., Morimoto C., Sakayama K., Shiosaka T., Masuno H., Okuda H., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26**, 610–617 (2002).
- 2) Iwai K., Watanabe T., “Red Peppers-Science of Pungency,” Saiwaishobou Co., Ltd., Tokyo, 2000, pp. 157–167.
- 3) Morimoto C., Satoh Y., Hara M., Inoue S., Tsujita T., Okuda H., *Life Sci.*, **77**, 194–204 (2005).
- 4) Han L.-K., Gong X.-J., Kawano S., Saito M., Kimura Y., Okuda H., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 213–217 (2005).
- 5) Zapf J., Schoenle E., Waldvogel M., Sand M., Foresch E. R., *Eur. J. Biochem.*, **133**, 605–609 (1981).
- 6) Rodbell M., *J. Biol. Chem.*, **239**, 375–380 (1964).
- 7) Mook D. G., Kenney N. J., Roberts S., Nussbaum A. I., Rodier 3rd. W. I., *J. Comp. Physiol., Psychol.*, **81**(2), 198–211 (1972).
- 8) Ishiguro S., Harimoto Y., Horie K., Takahashi S., Kato Y., Yamada K., Moriuchi S., *Jap. Women’s Univ. J.*, **32**, 25–27 (1985).
- 9) Iwami M., Terada S., Sunahara M., Shimooka R., Shimazu T., *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **56**, 159–165 (2003).
- 10) Morimoto C., Tsujita T., Okuda H., *J. Lipid Res.*, **38**, 957–962 (1998).
- 11) Han L.-K., Kai F., Okuda H., *Yakugaku Zasshi*, **124**, 841–846 (2004).
- 12) Han L.-K., Morimoto C., Yu R.-H., Okuda H., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 449–453 (2005).