

消化管脂肪酸受容体とその生理作用

平澤 明,* 原 貴史, 市村敦彦, 辻本豪三

Free Fatty Acid Receptors and Their Physiological Role in Metabolic Regulation

Akira HIRASAWA,* Takafumi HARA, Atsuhiko ICHIMURA, and Gozoh TSUJIMOTO
*Department of Genomic Drug Discovery Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimo-Adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

(Received August 23, 2011)

Free fatty acids (FFAs) are not only essential nutrient components, but they also function as signaling molecules in various physiological processes. In the progression of genomic analysis, many orphan G-protein coupled receptors (GPCRs) are found. Recently, GPCRs deorphanizing strategy successfully identified multiple receptors for FFAs. In these FFA receptors (FFARs), GPR40 (FFAR1) and GPR120 are activated by medium- to long- chain FFAs. GPR40 is expressed mainly in pancreatic β -cell and mediates insulin secretion, whereas GPR120 is expressed abundantly in the intestine and regulates the secretion of cholecystokinin (CCK) and glucagons-like peptide-1 (GLP-1), it promotes insulin secretion. Due to these biological activity, GPR40 and GPR120 are potential drug target for type 2 diabetes and selective ligands have been developed. In this review, we provide recent development in the field and discuss their physiological roles and their potential as drug targets.

Key words—free fatty acid receptor; GPR40 (FFAR1); GPR120; structure-activity relationship

はじめに

遊離脂肪酸 (FFAs) は必須栄養素であるばかりでなく、細胞内の様々な機能調節に働くシグナル分子としても重要である。核内受容体であるペロオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPARs) や脂肪酸結合タンパク質 (FABPs) は遊離脂肪酸のセンサーとして働くことが知られている。¹⁾ これらは脂質の取り込み、合成、輸送、貯蔵、分解、排出に係わり、遊離脂肪酸の恒常性を維持している。しかし、これらのタンパク質のみでこれら機構のすべてを説明することはできず、細胞膜上の受容体を介していると考えられる機構も存在する。^{2,3)} 近年、オーファンGタンパク結合受容体 (GPCR) のリガンド探索により複数の遊離脂肪酸の受容体の存在が明らかとなり、その生理機構の解明が進められている (Table 1)。⁴⁾ これら受容体の中で、GPR41 (FFAR3) 及び GPR43 (FFAR2) は腸内細菌叢により食餌中

の食物繊維が分解されることにより生じる短鎖脂肪酸により活性化される。⁵⁻⁷⁾ また、GPR40 (FFAR1) 及び GPR120 は食餌由来の脂質から取り込んだ中鎖と長鎖の脂肪酸により活性化され、GPR84 は中鎖によってのみ活性化される。⁸⁾ 本稿では、これら遊離脂肪酸受容体のうち、長鎖脂肪酸をリガンドとする GPR40 及び GPR120 について最新の知見を踏まえて概説する。

1. GPR40

1-1. リガンド GPR40 は中鎖、長鎖の飽和、不飽和脂肪酸により活性化されることがほぼ同時期、独立のグループにより報告されている。⁹⁻¹¹⁾ これら脂肪酸はマイクロモルオーダーの濃度でリガンドとして作用し、中でもエイコサトリエン酸 (C20) の作用が最も強い。Briscoe らの報告によれば、数多くの飽和、不飽和脂肪酸がアゴニストとして作用するが、飽和脂肪酸のアゴニスト活性はその炭素鎖長に依存し、ペンタデカン酸 (C15) 及びパルミチン酸 (C16) で最も作用が強くなる。だが面白いことに、不飽和脂肪酸の作用では炭素鎖長やその不飽和度に相関がみられなかった。¹¹⁾

1-2. シグナル伝達 外因性に GPR40 を安定

京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

*e-mail: akira_h@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 131 年会シンポジウム S15 で発表したものを中心に記述したものである。

Table 1. Characteristics of FFARs

| Nomenclature | GPR40 (FFAR1) | GPR41 (FFAR3) | GPR43 (FFAR2) | GPR120 |
|------------------------|---|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Agonist (FFA) | Medium-long C8-C22 | Short chain C3>C4>>C2 | Short chain C3>C2>C4 | Medium-long C10-C22 |
| Agonist (others) | Thiazolidinediones GW9508 MEDICA16 TAK-875 | | | GW9508 NCG21 |
| G-protein coupling | Gq/11 | Gi/o | Gq/11, Gi/o | Gq/11 |
| Chromosomal location | 19q13.1 | 19q13.1 | 19q13.1 | 10q23.33 |
| Protein (human) | NP_005294 300aa | NP_005295 346aa | NP_005297 330aa | NP_859529 377aa |
| Expression | Pancreatic β -cell Intestinal tract | Adipose tissue | Adipose tissue Leukocyte | Intestinal tract Macrophage |
| Physiological function | Insulin secretion | Leptin secretion | 5-HT secretion | GLP-1 secretion CCK secretion |

発現させた CHO 細胞において、遊離脂肪酸は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2 の活性化を引き起こす。⁹⁾ これは GPR40 が Gq 型 G タンパク質と共役していることを示している。一方、これらの反応は cAMP 産生に対して影響を与えないため、GPR40 は膵島 β 細胞において Gs 型や Gi/o 型 G タンパク質とは共役していないと考えられる。^{11,12)} また、GPR40 を過剰発現させた HEK293 細胞ではリノール酸 (C18) が内因性のリガンドとして Gq 型タンパク質を介したホスホリパーゼ C (PLC) の活性化を引き起こすことが知られている。¹³⁾ GPR40 活性化によるイノシトールリン酸の加水分解を直接 β 細胞で観察した報告はまだないが、遊離脂肪酸による β 細胞内カルシウムイオン濃度上昇と PLC の関与が示唆されている。あるいは、さらに別の機構が働いている可能性もある。Feng らはラットを用いた実験によりリノレン酸 (C18) が GPR40 を介して cAMP とプロテインキナーゼ A の活性化により電位依存性カリウムチャンネル電流を減少させ、膵島 β 細胞の興奮性とインスリン分泌を促進することを発見した。¹⁴⁾

1-3. 発現 RT-PCR, 免疫組織染色, *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた解析により、GPR40 はインスリンを産生する膵島 β 細胞に高発現していることが分かっている。⁹⁾ また、腸管での発現も報告されており、^{9,15,16)} Edfalk らは GLP-1 やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド

(GIP) をともに発現している消化管内分泌細胞において GPR40 タンパク質が発現していることを明らかにしている。¹⁷⁾ また、われわれは、抗 GPR40 モノクローナル抗体を用いた研究により脾細胞、THP-1 細胞、ヒト末梢血単核球において GPR40 の存在を同定した。¹⁸⁾

1-4. 生理的機能 膵島 β 細胞における遊離脂肪酸の生理的機能に関しては多くの報告がある。Itoh らは GPR40 の活性化が β 細胞からのグルコース誘導性インスリン分泌を増強すること、この反応が siRNA により GPR40 発現を抑制すると消失することを明らかにしている。⁹⁾ また、消化管での GPR40 の発現は GPR40 が膵島 β 細胞からのインスリン分泌を直接制御しているだけでなく、こうしたインクレチンホルモンを介した間接的なインスリン分泌にも係わっている可能性を示唆している。遊離脂肪酸の急速投与はインスリン分泌を促進するにもかかわらず、慢性的に高濃度の遊離脂肪酸にさらされると、 β 細胞はその機能を障害される。Steneberg らは遊離脂肪酸の急性的、慢性的作用がともに GPR40 を介していることを GPR40 ノックアウトマウス及び GPR40 トランスジェニックマウスを用いて示した。¹⁶⁾ GPR40 欠損 β 細胞は遊離脂肪酸刺激に対するグルコース誘導性インスリン分泌量が少なく、また、GPR40 ノックアウトマウスは肥満誘発性の高インスリン血症、脂肪肝、高トリグリセリド血症、肝グルコース排出量の増加、高血糖、耐糖能異常を示さなかった。逆に、マウスにおける GPR40 の過

剩発現は、 β 細胞の機能異常による高インスリン血症、糖尿病を引き起こした。¹⁶⁾ これらの結果より、GPR40が肥満や糖尿病の病態において重要な役割を果たしていることが示唆される。

1-5. 多型 ヒト GPR40 では Asp175Asn と Arg211His という2つの塩基多型が報告されている。EC50の値はともに野生型と同等であるが、Asp175Asnの最大反応は野生型よりも低くなっている。しかし、現時点では、これら多型とインスリン分泌量の変化とは関連がないようである。¹⁹⁾ 一方で、臨床検査値の比較により、日本人男性では Arg211His がインスリン分泌能に関与しているとする報告もある。²⁰⁾ また、別の研究では734人の患者のスクリーニングから新たに Gly180Ser という多型が発見された。この多型では遊離脂肪酸に対する β 細胞の反応性の消失がみられるが、これは細胞内カルシウムイオン濃度上昇の障害による。²¹⁾

1-6. GPR40 リガンドの構造活性相関 その生物学的活性や組織分布から、GPR40はII型糖尿病などの代謝疾患の有望な創薬標的として注目されている。今日まで様々な実験系を用いて、アゴニスト活性若しくはアンタゴニスト活性を示す多くの化合物が同定され、その生理学的、薬理学的作用が検討されてきた。²²⁾ 3-{4-[(N-alkyl) amino] phenyl} propanoic acid を基にした新規の GPR40 アゴニストを最初に報告したのが Garrido らである。²³⁾ この化合物群は100倍の活性を示し、それらのうちのいくつかで構造活性相関が検討された。さらに GPR40 の合成アンタゴニストも同定され、*in vitro*, *in vivo* でその活性が研究されている。^{11,24-26)} GPR40 アゴニストである GW9508 は GPR40 だけでなく、GPR120 に対するアゴニスト活性も有していることからその生理学的、薬理学的活性の検討が詳細に行われてきた。さらに、いくつかのグループでは 4-phenethynyl dihydrocinnamic acid などの bromophenyl 誘導体や、PPAR γ アゴニストである thiazolidinediones の構造を基にした新規化合物の研究が進められてきた。これら化合物のアゴニスト活性を評価するために GPR40 ノックアウトマウスを用いた腹腔内グルコース負荷試験のほか、GPR40 強制発現細胞での細胞内カルシウムイオン濃度上昇や GPR40 を内因性に発現している MIN6 細胞でのインスリン分泌の計測が行われてきた。²⁷⁻³¹⁾ 糖尿病治

療薬である thiazolidinediones の rosiglitazone や troglitazone、実験的抗肥満化合物 MEDICA16 も GPR40 アゴニストとして作用することが知られている。^{32,33)} また、最近 Sasaki らによって報告された TAK-875 は経口投与可能な GPR40 選択的アゴニストとしてII型糖尿病治療薬としての開発が進んでいる。³⁴⁾

受容体とリガンド間での直接の相互作用を測定することは GPR40 の薬理学的性質を理解する上で大変重要である。しかしながら、GPR40 のリガンド親和性、特異性が低いため、この相互作用を検出する適切な実験系が構築されず、GPR40 のリガンドに対する結合親和性の研究はあまり進んでいない。そこでわれわれはフローサイトメトリーを用いて GPR40 とリガンド間での直接相互作用を検出する実験系を確立した。まず、FLAG タグをつけた GPR40 を Sf9 細胞で発現させ、それを可溶化し、GPR40 タンパク質を含むそのライセートを免疫磁気ビーズを用いて固定化した。フローサイトメトリーを基にした結合解析を行った結果、蛍光標識した遊離脂肪酸が GPR40 の結合部位特異的に相互作用し、受容体を活性化することを証明できた。この手法を用いて、GPR40 とそのリガンドである GW9508 や MEDICA16 との直接相互作用を検出することに成功した。³³⁾ この研究の成果により、これらリガンドが GPR40 の生理学的機能のさらなる解析に有用であることが証明できた。このアプローチは他の GPCR の機能解析にも役立つことが予想される。受容体へのリガンドの結合様式を解明することは、受容体活性化の分子メカニズムを理解し、より強力に選択的なリガンドを設計するために有用である。ホモロジーモデリングによる解析により、GPR40 の細胞外第2ループに位置する2つのグルタミン酸残基 (Glu-145, Glu-172) が膜貫通部位に位置するアルギニン残基と相互作用することで“イオンロック”を形成している可能性が示唆された。この2つのグルタミン酸残基をアラニン残基に置換した変異体は恒常的活性を示し、これは前述のロックが外れるためと考えられる。このことから、これらグルタミン酸、アルギニン残基間での相互作用がリガンド結合による GPR40 活性化のスイッチとして機能している可能性が示唆された。³⁵⁾

2. GPR120

2-1. リガンド われわれはマウス及びヒトのゲノム DNA からオーファン GPCR として GPR120 を単離した。また、受容体のインターナライゼーションアッセイにより、その内因性リガンドが中、長鎖の遊離脂肪酸であることを同定した。³⁶⁾ GPR120 は C16-22 の不飽和脂肪酸、及び C14-18 の飽和脂肪酸により活性化される。GPR120 と GPR40 は進化系統樹でも離れた場所に位置し、そのアミノ酸相同性はわずか 10% に過ぎないにもかかわらず類似したリガンド特性を示す。これは収束進化の結果によると考えられる。遊離脂肪酸以外の内因性リガンドを同定するため、われわれはスクリーニングを行い、ある種のキノコ子実体由来の天然化合物が GPR120 選択的なパーシャルアゴニストとして働くことを発見した。³³⁾ この化合物は GPR120 を強制発現させた細胞だけでなく、内在性に GPR120 を発現している STC-1 細胞においても GPR120 を活性化させることが判明した。さらに、われわれは PPAR γ アゴニストである thiazolidinediones の構造を基に、カルボキシ基を持つ新規化合物群を合成、GPR120 のホモロジーモデルを用いて選択的化合物の開発を行った。以上の発見は、これら化合物が GPR120 の生理機能の解明に有用なツールであること、新規創薬候補の開発に応用できることを示唆している。³⁷⁾

2-2. シグナル伝達 われわれは、マウス及びヒトの GPR120 の cDNA を一過性に発現させた HEK293 細胞において、長鎖遊離脂肪酸が細胞質遊離カルシウムイオンを増加させるが、cAMP 産生は促進しないことを発見した。これは GPR120 が GPR40 と類似して Gq タンパク質と共役していること、しかし Gs や Gi/o 型とは共役していないことを示唆している。^{33,38)} また、GPR120 は特定の条件下で ERK1/2 の活性化を引き起こすほか、PI₃ キナーゼ-Ekt 経路を活性化したが、^{33,39)} これが細胞内カルシウムイオン濃度上昇によるものなのか、独立した共役メカニズムに係わるものなのかどうかは不明である。さらなる研究が必要ではあるが、これらの発見は GLP-1 分泌のシグナル経路の研究結果と合わない点がある。³⁸⁾ 最近、Oh らはドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの ω -3 遊離脂肪酸が GPR120 を介した抗炎症

作用を示すことを見出した。⁴⁰⁾ このメカニズムはマウスマクロファージ様単核細胞 RAW264.7 細胞と腹腔マクロファージの初代培養細胞において、 β -アレスチンシグナルを介した Toll 様受容体や TNF- α による炎症経路に係わっている TGF- β 活性化キナーゼ 1 (TAK1) リン酸化を抑制していることに関係している。

2-3. 生理機能 GPR120 はヒトやマウスの腸管組織及び、マウス由来の腸内分泌細胞株 STC-1 細胞に高発現している。^{38,39)} また、脂肪細胞や肺、味蕾を含む全身の多くの組織への分布が確認されているがその詳細な機能はあまり分かっていない。われわれは以前の研究で、大腸内の GLP-1 発現腸内分泌細胞に GPR120 が局在していることを発見した。^{38,40)} さらに、GPR120 を発現している K 細胞が腸管に局在し、GIP を合成していることが判明した。⁴¹⁾ STC-1 細胞は遊離脂肪酸による刺激を受けると GLP-1 やコレシストキニン (CCK) を分泌するが、⁴²⁾ この応答は GPR120 特異的 siRNA の導入により抑制された。⁴³⁾ また、マウス結腸へ遊離脂肪酸を直接投与することにより血中 GLP-1 濃度、インスリン濃度が上昇した。³⁸⁾ これらの報告より *in vivo* での GPR120 を介した GLP-1 分泌機序が明らかになった。さらに GPR120 ノックアウトマウスを用いた解析により、遊離脂肪酸によるインスリン分泌機序の詳細や GPR120 と代謝ホメオスタシスとの関係が明らかになるだろう。最近、GPR120 の新たな生理機能に関する報告があった。Oh らは GPR120 が ω -3 遊離脂肪酸 (DHA や EPA) の受容体として働くことを発見した。⁴⁰⁾ 彼らは GPR120 が単核細胞 RAW264.7 細胞や炎症誘発性の M1 型マクロファージ初代培養細胞に内因性に発現し、 ω -3 遊離脂肪酸による刺激がこれら細胞において広範囲に抗炎症作用を示すこと、その効果が GPR120 特異的 siRNA により抑制されることを見出した。さらに、*in vitro* の実験により ω -3 遊離脂肪酸による抗炎症作用の分子メカニズムが明らかとなった。GPR120 への刺激が、一般的な炎症メカニズムに関与している TLR, TNF- α の抑制を行う TAK1 のリン酸化活性化を特異的に抑制している。*In vivo* の実験により ω -3 遊離脂肪酸処置が野生型マウスで抗炎症、全身性インスリン感受性上昇を引き起こすのに対し、GPR120 ノックアウトマウスではそれが

みられなかった。これらの結果は GPR120 が ω -3 遊離脂肪酸の機能的な受容体であること、マクロファージ誘導性の炎症を抑制することで、インスリン感受性の上昇や抗糖尿病作用を調節していることを示している。

2-4. GPR120 リガンドの構造活性相関 われわれは、GPR120 のホモロジーモデルを利用したドッキングシミュレーションを行った。ホモロジーモデルは光活性化したウシロドプシンのモデルをテンプレートとしたもので、これはウシロドプシンの結晶構造を基にしている。このモデルを用い、対照化合物として GPR120 アゴニスト活性を持つことが分かっていた grifolic acid を用いて、新規に合成した化合物群のアゴニスト活性の予測を行った。化合物と GPR120 ホモロジーモデル間の水素結合エネルギーを算出したところ、この値が GPR120 アゴニスト活性と高い相関を示した。⁴⁴⁾ このことから、この GPR120 ホモロジーモデルが GPR120 と化合物間の結合様式を予測できていることが示唆された (Fig. 1)。さらに、この GPR120 ホモロジーモデルを利用したドッキングシミュレーションは様々な化合物のアゴニスト活性を予測するのに有用であると思われる。

まとめ

様々な鎖長の遊離脂肪酸を内因性のリガンドとする脂肪酸受容体が報告されている。これらは、PPARs や FABPs とは独立した、新たな栄養因子感知受容体として働き、代謝ホメオスタシスを調節している。また、消化管以外にも膵臓、マクロフ

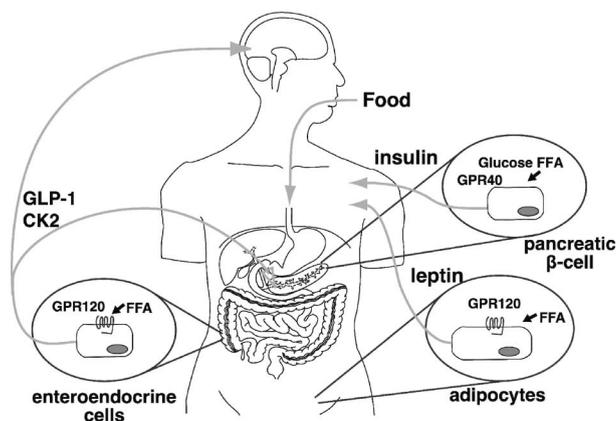
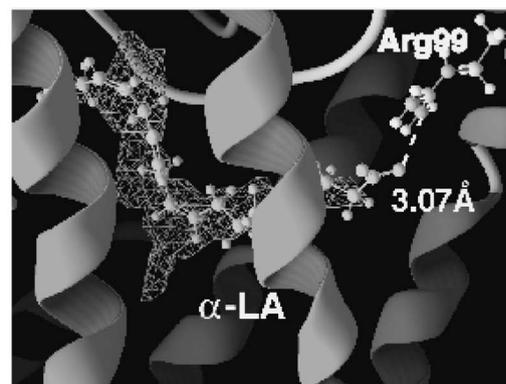


Fig. 1. Involvement of Free Fatty Acid Receptors in Nutritional Regulation

ァージ、脂肪組織等の遊離脂肪酸濃度をモニターしている。なかでも、GPR40 や GPR120 は、その生理機能から、II 型糖尿病などの代謝性疾患に対する有望な創薬標的として注目されている。遊離脂肪酸とその受容体間の相互作用を直接モニターすることは、非特異的結合の割合が高いことや、リガンドの低親和性から困難であったが、われわれはフローサイトメトリーと特異的な蛍光標識した脂肪酸を用いた GPR40 バインディングアッセイの開発に成功し、リガンドと GPR40 の結合を直接定量した。また、受容体の機能解明に加えて、GPR40 や GPR120 受容体特異的な新規合成リガンドの開発が進んでおり、いくつかの研究グループが成果を出している。われわれの研究室でも受容体ホモロジーモデリングを利用したドッキングシミュレーションを用いた新規合成リガンドの探索に関する研究報告を行っている。これら化合物を利用したさらなる研究により脂

A



B

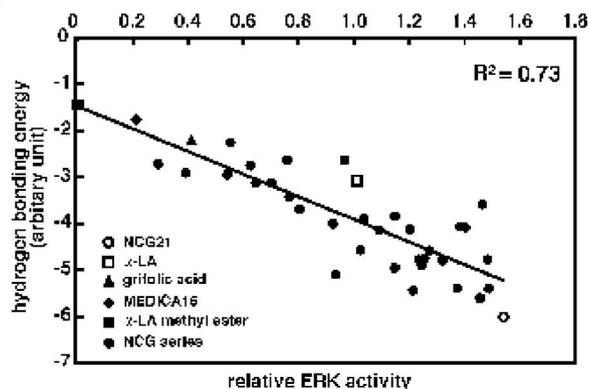


Fig. 2. Structure-activity Relationships of GPR120 Ligands (A) GPR120 homology model docked with α -LA. (B) The relative ERK activity correlated well with the calculated energy of interaction based on modeling.

脂肪酸受容体の詳細な生理機能解析が行われることで、シグナル分子としての脂肪酸の役割と代謝ホメオスタシスの仕組みが解明されることが期待される (Fig. 2).

謝辞 本原稿の作成に関して、竹内理人氏に感謝いたします。

REFERENCES

- Chawla A., Repa J. J., Evans R. M., Mangelsdorf D. J., *Science*, **294**, 1866–1870 (2001).
- Sauer L. A., Dauchy R. T., Blask D. E., *Cancer Res.*, **60**, 5289–5295 (2000).
- Louet J. F., Chatelain F., Decaux J. F., Park E. A., Kohl C., Pineau T., Girard J., Pegorier J. P., *Biochem. J.*, **354**, 189–197 (2001).
- Civelli O., *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 15–19 (2005).
- Brown A. J., Goldsworthy S. M., Barnes A. A., Eilert M. M., Tcheang L., Daniels D., Muir A. I., Wigglesworth M. J., Kinghorn I., Fraser N. J., Pike N. B., Strum J. C., Steplewski K. M., Murdock P. R., Holder J. C., Marshall F. H., Szekeres P. G., Wilson S., Ignar D. M., Foord S. M., Wise A., Dowell S. J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 11312–11319 (2003).
- Nilsson N. E., Kotarsky K., Owman C., Olde B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 1047–1052 (2003).
- Le Poul E., Loison C., Struyf S., Springael J. Y., Lannoy V., Decobecq M. E., Brezillon S., Dupriez V., Vassart G., Van Damme J., Parmentier M., Detheux M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 25481–25489 (2003).
- Miyauchi S., Hirasawa A., Ichimura A., Hara T., Tsujimoto G., *J. Pharmacol. Sci.*, **112**, 19–24 (2010).
- Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., Tanaka Y., Uejima H., Tanaka H., Maruyama M., Satoh R., Okubo S., Kizawa H., Komatsu H., Matsumura F., Noguchi Y., Shinohara T., Hinuma S., Fujisawa Y., Fujino M., *Nature*, **422**, 173–176 (2003).
- Kotarsky K., Nilsson N. E., Flodgren E., Owman C., Olde B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 406–410 (2003).
- Briscoe C. P., Tadayyon M., Andrews J. L., Benson W. G., Chambers J. K., Eilert M. M., Ellis C., Elshourbagy N. A., Goetz A. S., Minnick D. T., Murdock P. R., Sauls H. R. Jr., Shabon U., Spinage L. D., Strum J. C., Szekeres P. G., Tan K. B., Way J. M., Ignar D. M., Wilson S., Muir A. I., *J. Biol. Chem.*, **278**, 11303–11311 (2003).
- Welters H. J., Diakogiannaki E., Mordue J. M., Tadayyon M., Smith S. A., Morgan N. G., *Apoptosis*, **11**, 1231–1238 (2006).
- Salehi A., Flodgren E., Nilsson N. E., Jimenez-Feltstrom J., Miyazaki J., Owman C., Olde B., *Cell Tissue Res.*, **322**, 207–215 (2005).
- Feng D. D., Luo Z., Roh S. G., Hernandez M., Tawadros N., Keating D. J., Chen C., *Endocrinology*, **147**, 674–682 (2006).
- Latour M. G., Alquier T., Oseid E., Tremblay C., Jetton T. L., Luo J., Lin D. C., Poitout V., *Diabetes*, **56**, 1087–1094 (2007).
- Steneberg P., Rubins N., Bartoov-Shifman R., Walker M. D., Edlund H., *Cell Metab.*, **1**, 245–258 (2005).
- Edfalk S., Steneberg P., Edlund H., *Diabetes*, **57**, 2280–2287 (2008).
- Hirasawa A., Itsubo C., Sadakane K., Hara T., Shinagawa S., Koga H., Nose H., Koshimizu T. A., Tsujimoto G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **365**, 22–28 (2008).
- Hamid Y. H., Vissing H., Holst B., Urhammer S. A., Pyke C., Hansen S. K., Glümer C., Borch-Johnsen K., Jørgensen T., Schwartz T. W., Pedersen O., Hansen T., *Diabet. Med.*, **22**, 74–80 (2005).
- Ogawa T., Hirose H., Miyashita K., Saito I., Saruta T., *Metabolism*, **54**, 296–299 (2005).
- Vettor R., Granzotto M., De Stefani D., Trevelin E., Rossato M., Farina M. G., Milan G., Pilon C., Nigro A., Federspil G., Vigneri R., Vitiello L., Rizzuto R., Baratta R., Frittitta L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 3541–3550 (2008).
- Bharate S. B., Nemmani K. V., Vishwakarma R. A., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **19**, 237–264 (2009).
- Garrido D. M., Corbett D. F., Dwornik K. A., Goetz A. S., Littleton T. R., McKeown S. C., Mills W. Y., Smalley T. L., Briscoe C. P.,

- Peat A. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 1840–1845 (2006).
- 24) Hu H., He L. Y., Gong Z., Li N., Lu Y. N., Zhai Q. W., Liu H., Jiang H. L., Zhu W. L., Wang H. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 557–563 (2009).
- 25) Humphries P. S., Benbow J. W., Bonin P. D., Boyer D., Doran S. D., Frisbie R. K., Piotrowski D. W., Balan G., Bechle B. M., Conn E. L., Dirico K. J., Oliver R. M., Soeller W. C., Southers J. A., Yang X., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2400–2403 (2009).
- 26) Zhang X., Yan G., Li Y., Zhu W., Wang H., *Biomed. Pharmacother.*, **64**, 647–651 (2010).
- 27) Bharate S. B., Rodge A., Joshi R. K., Kaur J., Srinivasan S., Kumar S. S., Kulkarni-Almeida A., Balachandran S., Balakrishnan A., Vishwakarma R. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6357–6361 (2008).
- 28) Christiansen E., Urban C., Merten N., Liebscher K., Karlsen K. K., Hamacher A., Spinrath A., Bond A. D., Drewke C., Ullrich S., Kassack M. U., Kostenis E., Ulven T., *J. Med. Chem.*, **51**, 7061–7064 (2008).
- 29) McKeown S. C., Corbett D. F., Goetz A. S., Littleton T. R., Bigham E., Briscoe C. P., Peat A. J., Watson S. P., Hickey D. M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1584–1589 (2007).
- 30) Song F., Lu S., Gunnet J., Xu J. Z., Wines P., Proost J., Liang Y., Baumann C., Lenhard J., Murray W. V., Demarest K. T., Kuo G. H., *J. Med. Chem.*, **50**, 2807–2817 (2007).
- 31) Zhou C., Tang C., Chang E., Ge M., Lin S., Cline E., Tan C. P., Feng Y., Zhou Y. P., Eiermann G. J., Petrov A., Salituro G., Meinke P., Mosley R., Akiyama T. E., Einstein M., Kumar S., Berger J., Howard A. D., Thornberry N., Mills S. G., Yang L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 1298–1301 (2010).
- 32) Briscoe C. P., Peat A. J., McKeown S. C., Corbett D. F., Goetz A. S., Littleton T. R., McCoy D. C., Kenakin T. P., Andrews J. L., Ammala C., Fornwald J. A., Ignar D. M., Jenkinson S., *Br. J. Pharmacol.*, **148**, 619–628 (2006).
- 33) Hara T., Hirasawa A., Sun Q., Koshimizu T. A., Itsubo C., Sadakane K., Awaji T., Tsujimoto G., *Mol. Pharmacol.*, **75**, 85–91 (2009).
- 34) Sasaki S., Kitamura S., Negoro N., Suzuki M., Tsujihata Y., Suzuki N., Santou T., Kanzaki N., Harada M., Tanaka Y., Kobayashi M., Tada N., Funami M., Tanaka T., Yamamoto Y., Fukatsu K., Yasuma T., Momose Y., *J. Med. Chem.*, **54**, 1365–1378 (2011).
- 35) Sum C. S., Tikhonova I. G., Costanzi S., Gershengorn M. C., *J. Biol. Chem.*, **284**, 3529–3536 (2009).
- 36) Fukunaga S., Setoguchi S., Hirasawa A., Tsujimoto G., *Life Sci.*, **80**, 17–23 (2006).
- 37) Suzuki T., Igari S., Hirasawa A., Hata M., Ishiguro M., Fujieda H., Itoh Y., Hirano T., Nakagawa H., Ogura M., Makishima M., Tsujimoto G., Miyata N., *J. Med. Chem.*, **51**, 7640–7644 (2008).
- 38) Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., Sugimoto Y., Miyazaki S., Tsujimoto G., *Nat. Med.*, **11**, 90–94 (2005).
- 39) Katsuma S., Hatae N., Yano T., Ruike Y., Kimura M., Hirasawa A., Tsujimoto G., *J. Biol. Chem.*, **280**, 19507–19515 (2005).
- 40) Oh D. Y., Talukdar S., Bae E. J., Imamura T., Morinaga H., Fan W., Li P., Lu W. J., Watkins S. M., Olefsky J. M., *Cell*, **142**, 687–698 (2010).
- 41) Miyauchi S., Hirasawa A., Iga T., Liu N., Itsubo C., Sadakane K., Hara T., Tsujimoto G., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **379**, 427–434 (2009).
- 42) Parker H. E., Habib A. M., Rogers G. J., Gribble F. M., Reimann F., *Diabetologia*, **52**, 289–298 (2009).
- 43) Sidhu S. S., Thompson D. G., Warhurst G., Case R. M., Benson R. S., *J. Physiol.*, **528**, 165–176 (2000).
- 44) Tanaka T., Katsuma S., Adachi T., Koshimizu T. A., Hirasawa A., Tsujimoto G., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **377**, 523–527 (2008).