

## 당뇨병연구를 위한 유전학적 접근: 형질전환 마우스 모델 Genetical Approach to the Study of Diabetes: Transgenic Mice Model

김 양 하 (Yangha Kim Moon)

창원대학교 식품영양학과

### Abstract

Non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is characterized by insulin resistance and impaired insulin secretion. The transgenic technology, in which a specific gene can be introduced or deleted to study its function, has been established. A number of transgenic mice, altered the expression of genes potentially involved in insulin action or pancreatic  $\beta$ -cell function, have recently been developed to address questions concerning NIDDM. Transgenic mice model may help understanding the molecular basis of complex patho-physiologies of NIDDM. This review outlines the new insights obtained from the studies of transgenic mice that overexpress or show decreased expression of putative key genes involved in the regulation of insulin resistance and pancreatic  $\beta$ -cell function, therefore in the control of glucose homeostasis.

### 서 론

인슐린 비의존성 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM)은 췌장  $\beta$ -세포의 기능저하로 인한 인슐린 분비에 이상이 있거나 인슐린 저항성으로 인하여 포도당 항상성(glucose homeostasis)에 이상을 초래하는 질병이다(1-3). NIDDM의 초기증상은 신체에서의 인슐린에 대한 반응력의 감소가 나타나는데, 췌장은 이와 같은 인슐린 저항성(insulin resistance)을 상쇄하기 위하여 인슐린의 분비를 증가시킴으로써 포도당 내성을 정상으로 유지할 수 있다. 그러나 시간이 오래됨에 따라 췌장  $\beta$ -세포는 지속적으로 인슐린을 많이 분비할 수 없게 됨으로써 포도당 항상성이 깨져서 당뇨병의 증상이 나타나게 된다(2). NIDDM의 원인으로는 유전적 요인과 환경적 요인을 들 수 있다. 유전적 요인으로는 당뇨병 증상에 관여하는 유전자들의 변이가 당뇨병을 일으킬 수 있으며 식이, 운동, 유해물질과 같은 환경적 요인들도 당뇨병을 일으키거나 증상을 심화시킬 수 있다(1).

형질전환 마우스는 외부 유전자가 전이되어 형질이 전환된 마우스를 말한다. 인슐린 저항성이나 인슐린 분비 이상을 일으키는 분자생물학적 기전을 밝히기 위하여 인슐린의 작용과  $\beta$ -세포의 기능에 관여하는 유전자들의 발현이 변화된 형질전환 마우스들이 개발이 되어 연구중에

있다(4-6). 이와 같은 시도를 통하여 당뇨병에 관련된 유전자의 역할과 어떠한 유전자가 정상 포도당 농도를 유지하는데 보다 중요한 역할을 하는지를 알아 낼 수 있을 것이다.

따라서 본 고에서는 형질전환 마우스를 생성하는 방법을 간단히 소개하고, NIDDM의 연구를 위하여 인슐린, 인슐린 수용체, 포도당 전달 단백질(glucose transporter protein), glucokinase 등의 유전자들의 발현을 변화시키거나 유전적으로 비만을 유발시킨 형질전환 마우스들에 대한 최근의 연구결과들에 대하여 논하고자 한다.

### 형질전환 마우스 생산

형질전환 마우스(transgenic mice)는 외부 유전자를 마우스 수정란의 male 전핵에 미세주입후 대리모 마우스에 옮겨 넣은 후에 태어난 마우스 중에 PCR 분석에 의하여 새로 삽입한 외부 유전자 유무를 확인함으로써 형질전환 성이 검증된 마우스를 말한다. 대리모에서 태어난 founder 마우스는 비형질전환 동물과 교접시킨다. 그 사이에 태어난 1세대(F1) 형질전환 동물이 특정 유전자의 발현을 비교 연구 및 새로운 형질을 가진 동물의 특성을 연구하기 위하여 사용된다. 형질전환 마우스의 생산에 사용되는 promoter 혹은 enhancer는 조직특이성이나 호르몬에 민감한 반

응을 나타내는 것을 주로 이용한다. 따라서 정상 포도당 농도를 유지하는데 중요한 역할을 하는 단백질들의 생산을 조직 특이적으로 조절할 수 있는 형질전환 마우스는 각 조직에서의 NIDDM과 관련된 기전을 연구하는데 도움이 될 수 있을 것이다(4,5).

또 하나의 방법은 endogenous DNA의 발현을 방해함으로써 특정 유전자가 제거된 돌연변이 형질전환 마우스(knock-out 마우스)를 생산하는 것이다. Homologous recombination 과정을 통하여 특정 유전자가 제거되는데 이를 recombinant allele라고 한다. 전기충격법(electroporation)을 이용하여 recombinant allele를 마우스 embryonic stem(ES) 세포에 전이시킨다. Recombinant ES 세포를 blastocytes에 미세주입시킨 후 대리모 마우스에 옮겨 넣은 후에 태어난 마우스 중에 chimera 마우스를 털의 색에 의하여 검증한다. Chimera 마우스를 정상 마우스와 교배시킴으로써 heterozygous knock-out 마우스가 생산되며, heterozygous knockout 마우스끼리의 교배에 의하여 homozygous knockout 마우스를 생산할 수 있다(4,5).

## 형질전환 마우스를 이용한 당뇨병 연구

### 인슐린

사람 인슐린 유전자 promoter의 조절하에 사람 인슐린을 발현시키는 유전자가 전이된 형질전환 마우스가 1986년에 생산되어 사람의 인슐린이 형질전환 마우스의 췌장  $\beta$ -세포에서 조직 특이적으로 발현되어짐이 보고되었다(7). 사람 인슐린을 발현시킨 형질전환 마우스 췌장에서 인슐린 mRNA의 양은 2배가 증가하였으나 혈청 인슐린과 췌장의 인슐린의 양은 변하지 않음을 보여줌으로써 인슐린 발현이 전사 후 단계에서 조절되어짐을 알 수 있었다(8). 또한 인슐린 coding region의 HisB10을 Asp으로 point mutation시킨 유전자를 발현시키는 형질전환 마우스는 돌연변이된 프로인슐린(proinsulin)이 인슐린으로 되는 과정을 거치지 않고 과잉 분비되어 hyperproinsulinemia를 나타내었다(9). 이와 같은 연구 결과로부터 유전적으로 hyperproinsulinemia를 나타내는 환자의 경우 돌연변이된 인슐린에 의한 프로인슐린의 비정상적인 과잉 분비에 따른 것임을 알 수 있다(9).

### 인슐린 수용체

인슐린의 작용은 인슐린과 인슐린 수용체(insulin receptor)의 결합을 통하여 이루어지는데, 인슐린이 tyrosine kinase 활성도를 갖고 있는 transmembrane 인슐린 수용

체에 결합하면 tyrosine kinase가 자기인산화(autophosphorylation)되면서 kinase 활성도가 증가된다. Kinase는 IRS-1, PI 3-kinase 등의 단백질을 인산화시킴으로써 1개 내지 여러 개의 효소의 활성화를 통하여 인슐린의 효과가 나타나게 된다(1).

NIDDM의 경우에 나타나는 인슐린 저항성은 세포가 정상적인 인슐린 농도에 대하여 반응하지 않는 것이다(1, 10). 이와 같은 인슐린 저항성의 분자 생물학적 기전을 밝히기 위하여 인슐린 수용체의 발현을 변화시킨 형질전환 마우스가 생산되었다. 근육에서 조직 특이적으로 인슐린 수용체 유전자의 발현이 증가된 형질전환 마우스에서 근육의 인슐린 수용체 mRNA 및 단백질이 증가하였으며, 혈중 인슐린의 양과 포도당의 양이 감소되었다(11). 이와 같은 결과는 인슐린 수용체가 포도당 항상성을 유지하는데 관여하고 있음을 보여준다. 인슐린 수용체의 작용을 자세히 알아보기 위하여 인슐린 수용체를 돌연변이시킨 tyrosine-deficient 인슐린 수용체의 발현이 증가된 형질전환 마우스에서는 정상 마우스에 비하여 인슐린 수용체-tyrosine kinase, IRS-1 tyrosine kinase, IRS-1-associated PI 3-kinase의 활성도가 저하되었다(12). 또한 포도당의 인산화, 근육내 글리코겐 양, 인슐린 민감성(sensitivity) 등이 감소되었으며, 포도당 내성 테스트(glucose tolerance test)시 혈중 포도당 및 인슐린의 함량이 형질전환 마우스에서 정상 마우스에 비하여 높았다(13-16). 이와 같은 결과들은 돌연변이된 인슐린 수용체가 NIDDM의 원인이 될 수도 있다는 가능성을 시사한다. 따라서 kinase-deficient 인슐린 수용체가 전이된 형질전환 마우스는 인슐린 저항성을 나타내는 NIDDM의 연구를 위한 동물모델로 이용될 수 있을 것이다.

### Glucokinase

간과 췌장에 있는 glucokinase(GK)는 포도당으로부터 글리코겐 합성을 촉진하는 효소로써 GK 활성도는 포도당 감지(glucose sensing)에 의한  $\beta$ -세포에서의 인슐린 분비에 있어서 중요한 역할을 하는 요소중의 하나로써 사려되어지고 있다(17). 췌장  $\beta$ -세포에서 GK 발현이 2배 증가된 형질전환 마우스는 GK 활성도의 증가 및 glucose-stimulated 인슐린 분비의 증가를 나타내었다(18). 또한 포도당 농도가 증가함에 따른 인슐린 mRNA 및 인슐린 생합성의 증가에 있어서 GK 발현이 증가된 형질전환 마우스가 정상 마우스에 비하여 높은 인슐린 합성을 나타내어 GK에 의한 포도당의 인산화가 포도당의 감지 및 인슐린 분비에 중요한 역할을 하고 있음을 보여준다(19).

NIDDM의 한 형태인 MODY(maturity-onset diabetes of the young) 환자의 경우는 GK 유전자에 돌연변이가 있음이 밝혀졌다. 돌연변이된 GK 유전자는 활성도가 매우 저하되었으므로 Efrat 등(1994)은 저하된 GK 활성도가 포도당 감지의 극치(threshold)를 변화시켜, 생리적 포도당 농도에서 인슐린 분비에 이상이 오는 것이 아닌가 하고 추측하였다(20). 따라서 GK와 NIDDM의 관계를 보기 위하여 GK 유전자의 발현이 감소된 형질전환 마우스가 생산되었는데, 이 경우에 GK 활성도가 정상 마우스의 30% 밖에 되지 않았으며 이 형질전환 마우스는 glucose-stimulated 인슐린 분비가 정상 마우스에 비하여 감소를 나타내었다(20). GK 유전자가 heterozygous knock-out된 마우스에서도 GK 활성도 감소, 인슐린 분비의 감소 및 포도당의 이용율의 감소에 따른 혈액내의 포도당 농도의 증가와 같은 MODY 질병의 증세를 보여주었다(21). GK 유전자가 완전히 제거된 homozygous knock-out 마우스의 경우를 보면 GK 활성도가 없어졌으며 인슐린 분비의 감소에 따라 혈액내의 포도당 농도가 정상 마우스에 비하여 5배정도 증가하였다. 이와 같은 심각한 당뇨병 증상과 함께 몸무게가 증가되지 않았으며 1주일 안에 모두 사망하였다(22). 여러 실험에서 제시하는 바와 같이 GK는 포도당 감지에 따른 인슐린 분비 및 포도당 항상성에 주요한 역할을 하고 있음을 알 수 있고, 따라서 GK 유전자의 발현이 변이된 형질전환 마우스는 인슐린 분비기능의 이상을 보여주는 NIDDM 연구를 위한 동물모델로서 이용될 수 있을 것이다.

#### Glucose transporter

포도당의 세포 내외로의 이동은 포도당 전달 단백질군(glucose transport proteins: GLUT1~GLUT5, GLUT7)에 의하여 촉진된다(23,24). NIDDM 동물에서 GLUT2의 양이 감소되었다는 연구결과로부터 췌장  $\beta$ -세포에서 포도당 감지에 의한 인슐린 분비에 있어서 GLUT2의 중요한 역할의 가능성이 제기되었다(25). Tal 등(1992)에 의하면 GLUT2 유전자의 발현이 감소된 형질전환 마우스에서 GK 활성도, glucose-stimulated 인슐린 분비, 혈중 포도당 농도가 정상 마우스와 차이를 나타내지 않아 정상 GLUT2 농도가 포도당 항상성에 필수적이지는 않다고 보고하였다(26). 그러나 Valera 등(1994)은 GLUT2 유전자의 발현이 감소된 형질전환 마우스에서 glucose-stimulated 인슐린 분비가 감소되었고, 포도당 내성 테스트에서 혈중 포도당의 농도가 정상 마우스에 비해 높아 GLUT2의 감소가 당뇨병의 발달에 중요한 원인이 될 수 있음을 시사하

였다(27). 따라서 GLUT2의 역할에 대하여서는 좀 더 깊은 연구가 필요하다.

근육에서 포도당 이동에 관여하는 GLUT1 유전자의 발현이 근육에서 증가된 형질전환 마우스에서는 근육의 포도당 흡수 상승, 근육 글리코겐 양의 증가, 혈중 포도당 농도 저하가 나타났다(28,29). 이는 신체의 40% 정도를 차지하는 근육에서의 GLUT1이 포도당 이동에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 따라서 NIDDM 증상중의 하나인 인슐린 저항성을 치료하는 시도로써 GLUT1을 유전적으로 변이시킨 형질전환 마우스를 이용할 수 있을 것이다.

GLUT4 유전자의 발현이 증가된 형질전환 마우스에서도 근육의 포도당 흡수 상승, 근육 글리코겐 양의 증가 및 혈중 포도당 농도 저하가 나타났다(30-34). 인슐린으로 처리하였을 때 포도당의 이동을 위하여 GLUT4가 microsomal 막에서 plasma 막으로 이동하였으며, GLUT4 유전자의 발현이 증가된 형질전환 마우스에서 GLUT4 이동효율이 정상 마우스보다 높았다(35). 또한 운동을 했을 때 근육과 지방조직에서의 GLUT4 mRNA 및 단백질의 양이 증가하였으며, 혈중 포도당의 농도를 낮추어주는 운동 효과에 있어서 형질전환 마우스가 정상 마우스보다 컸다(36). 이와 같은 결과들은 인슐린에 의하여 촉진되는 포도당 이동에 있어서 GLUT4가 중요한 중간 물질로 작용한다라는 것을 보여준다.

#### 비만

NIDDM의 주요 위험 인자중의 하나인 비만과 인슐린 저항성과의 관계를 밝히기 위하여 브라운 지방조직(brown adipose tissue)이 감소됨으로써 몸무게와 체지방이 증가된 비만 형질전환 마우스를 생산하였다. 비만 형질전환 마우스에서 근육의 포도당 흡수가 감소하였다. 인슐린 수용체 및 인슐린 수용체-tyrosine kinase 활성도가 감소하였으며, GLUT4 mRNA 및 단백질의 양이 감소되었다. 반면에 포도당 내성 테스트(glucose tolerance test)시 혈중 포도당 함량이 형질전환 마우스에서 정상 마우스에 비하여 높았다(37,38). 따라서 브라운 지방조직이 감소된 비만 형질전환 마우스는 비만과 관련된 NIDDM 연구를 위한 동물모델로 이용할 수 있을 것이다.

## 결론

NIDDM은 인슐린 작용과 췌장  $\beta$ -세포의 이상에 따른 여러 가지 증상을 나타내고 있으나 그 원인은 아직 정확하게 규명되어 있지 않다. 다만 유전학적인 요인으로 인슐린

저항성과 인슐린 분비를 조절하는 여러 유전자들의 발현이 변화됨에 따라 이차적인 증상이 나타나는 것으로 사려되어지고 있다. 따라서 NIDDM에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하거나 제거시킬 수 있는 형질전환 마우스는 NIDDM과 관련된 유전자들의 분자생물학적 작용기전을 상세하게 밝힘으로써 NIDDM의 원인을 연구하는데 유용한 동물모델이 될 수 있다. 더 나아가 이와 같은 형질전환 동물을 이용하여 어떠한 유전자가 정상 포도당 농도를 유지하는데 보다 중요한 역할을 하는지를 밝혀냄으로써 특정 유전자의 유전자 치료를 통한 NIDDM 치료에 대한 가능성을 높일 수 있을 것이다.

## 문 헌

- Kahn, C. R. : Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, **43**, 1066(1994)
- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C. and Ferrannini, E. : Pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care*, **15**, 318(1992)
- Grnner, D. K. and O'Brein, R. M. : Molecular physiology and genetics of NIDDM. *Diabetes Care*, **15**, 369(1992)
- Joshi, R. L., Lamothe, B., Bucchini, D. and Jami, J. : Genetically engineered mice as animal models for NIDDM. *FEBS Letters*, **401**, 99(1997)
- Moller, D. E. : Transgenic approaches to the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes*, **43**, 1394(1994)
- Moller, D. E., Bjorbeck, C. and Vidal-Puig, A. : Candidate genes for insulin resistance. *Diabetes Care*, **19**, 396(1996)
- Bucchini, D., Ripoché, M. A., Stinnakre, M. G., Desbois, P., Lores, P., Monthieux, E., Absil, J., Lepesant, J. A., Pictet, R. and Jami, J. : Pancreatic expression of human insulin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2511(1986)
- Schnetzler, B., Murakawa, G., Abalos, D., Halban, P. and Selden, R. : Adatation to supraphysiological levels of insulin gene expression in transgenic mice: evidence for the importance of posttranscriptional regulation. *J. Clin. Invest.*, **92**, 272(1993)
- Carroll, R. J., Hammer, R. E., Chan, S. J., Swift, H. H., Rubenstein, A. H. and Steiner, D. F. : A mutant human proinsulin is secreted from islets of Langerhans in increased amounts via an unregulated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8943(1988)
- White, M. F. and Kahn, C. R. : The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1(1994)
- Benecke, H., Flier, J. S., Rosenthal, N., Siddle, K., Klein, H. H. and Moller, D. E. : Muscle-specific expression of human insulin receptor in transgenic mice. *Diabetes*, **42**, 206(1993)
- Chang, P., Goodyears, L. J., Benecke, H., Markuns, J. S. and Moller, D. E. : Impaired insulin signalling in skeletal muscles from transgenic mice expressing kinase-deficient insulin receptors. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12593(1995)
- Nishiyama, T., Shirohani, T., Murakami, T., Shimada, F., Todaka, M., Saita, S., Hayashi, H., Noma, Y., Shima, K., Makino, H., Shichiri, M., Miyazaki, J., Yamamura, K. and Ebina Y. : Expression of the gene coding the tyrosine kinase-deficient human insulin receptor in transgenic mice. *Gene*, **141**, 187(1994)
- Chang, P., Benecke, H., Marchand-Brustel, Y., Lawitts, J. and Moller, D. E. : Expression of a dominant-negative mutant human insulin receptor in the muscle of transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16034(1994)
- Joshi, R. L., Lamonthe, B., Cordonnier, N., Mesbah, K., Monthieux, E., Jami, J. and Bucchini, D. : Targeted disruption of the insulin receptor lethality. *The Embo. J.*, **15**, 1542(1996)
- Schaffer, E. M., Viard, V., Morin, J., Ferre, P., Penicaud, L., Ramos, P., Maika, S. D., Ellis, L. and Hammer, R. E. : A new transgenic mouse of chronic hyperglycemia. *Diabetes*, **43**, 143(1994)
- Permutt, M. A., Chiu, K. C. and Tanizawa, Y. : Glucokinase and NIDDM. *Diabetes*, **41**, 1367(1992)
- Epstein, P. N., Boschero, A. C., Atwater, I., Cai, X. and Overbeek, P. A. : Expression of yeast hexokinase in pancreatic  $\beta$ -cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12038(1992)
- Voss-McCowan, M. E., Xu, B. and Epstein, P. N. : Insulin synthesis, secretory competence, and glucose utilization are sensitized by transgenic yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15814(1994)
- Efrat, S., Leiser, M., Wu, Y., Fusco-Demane, D., Emran, O. A., Surana, M., Jetton, T. L., Magnuson, M. A., Weir, G. and Fleischer, N. : Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic  $\beta$ -cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2051(1994)
- Bali, D., Svetlanov, A., Lee, H., Fusco-Demane, D., Leiser, M., Li, B., Barzilai, N., Surana, M., Hou, H., Fleischer, N., DePinho, R., Rossetti, L. and Efrat, S. : Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21464(1995)
- Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kasai, H., Suzuki, H., Ueda, O., Kamada, N., Jishage, K., Komeda, K., Noda, M., Kanazawa, Y., Taniguchi, S., Miwa, I., Akanuma, Y., Kodama, T., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. : Pancreatic  $\beta$ -cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30253(1995)
- Kahn, B. B. : Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and

- muscle. *J. Nutr.*, **124**, 1289S(1994)
24. Olson, A. and Pessin, J. E. : Structure, function and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Ann. Rev. Nutr.*, **16**, 235(1996)
  25. Unger, R. H. : Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science*, **251**, 1200(1991)
  26. Tal, M., Wu, Y., Leiser, M., Surana, M., Lodish, H., Fleischer, N., Weir, G. and Efrat, S. : [ $^{125}$ I]HRAS downregulates GLUT2 in  $\beta$  cells of transgenic mice without affecting glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5744(1992)
  27. Valera, A., Solanes, G., Fernandez-Alvarez, J., Pujol, A., Ferrer, J., Asins, G., Gomis, R. and Bosch, F. : Expression of GLUT-2 antisense RNA in  $\beta$  cells of transgenic mice leads to diabetes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 28543(1994)
  28. Ren, J., Marshall, B. A., Gulve, E. A., Gao, J., Johnson, D. W., Holloszy, J. O. and Mueckler, M. : Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16113(1993)
  29. Marshall, B. A., Ren, J., Johnson, D. W., Gibbs, E. M., Lillquist, J. S., Soeller, W. C., Holloszy, J. O. and Mueckler, M. : Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18442(1993)
  30. Hansen, P. A., Gulve, E. A., Marshall, B. A., Gao, J., Pessin, J., Holloszy, J. O. and Mueckler, M. : Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpression the Glut4 glucose transporter. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1679(1995)
  31. Ren, J., Marshall, B. A., Mueckler, M., Amatruda, J. M. and Shulman, G. I. : Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J. Clin. Invest.*, **95**, 429(1995)
  32. Tsao, T., Burcelin, R., Katz, E. B., Huang, L. and Charron, M. J. : Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes*, **45**, 28 (1996)
  33. Ikemoto, S., Thompson, K. S., Takahashi, M., Itakura, H. and Lane, M. D. : high fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigen in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3096(1995)
  34. Shepherd, P. R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F. and Kahn, B. B. : Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22243(1993)
  35. Liu, M., Gibbs, E. M., McCoid, S. C., Milici, A. J., Stukenbrok, H. A., McPherson, R. K., Treaway, J. L. and Pessin, J. E. : Transgenic mice expression the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11346(1993)
  36. Ikemoto, S., Thompson, K. S., Itakura, H., Lane, M. D. and Ezaki, O. : Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigen in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 865(1995)
  37. Hamann, A., Benecke, H., Marchand-Brustel, Y., Susulic, V. S., Lowell, B. B. and Flier, J. S. : Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. *Diabetes*, **44**, 1266(1995)
  38. Kozak, L. P., Kozak, U. C. and Clarke, G. T. : Abnormal brown and white fat development in transgenic mice overexpression glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Genes Development*, **5**, 2256(1991)