

学位論文題名

ラット褐色脂肪組織におけるグルコース利用と
グルコーストランスポーターのアドレナリン性調節

学位論文内容の要旨

哺乳動物には、白色及び褐色の2種類の脂肪組織があることが知られている。白色脂肪組織（white adipose tissue, WAT）は皮下や内臓周囲に大量に存在するいわゆる脂肪組織であり、余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積している。一方、褐色脂肪組織（brown adipose tissue, BAT）は、中性脂肪を酸化分解して熱に変換する代謝的熱産生の部位である。BATの体内分布は、肩甲間、腋窩部や腎臓周囲部等、比較的限定されており、量的にも少ないが、新生児や寒冷順化動物、冬眠動物ではよく発達しており、寒冷暴露時の体温維持や冬眠からの覚醒時の体温上昇に寄与している。このように、BATはWATに比べて代謝的に活発な組織であるが、形態学的にも、毛細血管がよく発達し細胞内にはミトコンドリアが豊富にあり、このため褐色を呈している。

BATでの熱産生は、この組織に豊富に分布する交感神経から放出されるノルアドレナリンの β 作用により直接支配されると考えられている。すなわち、ノルアドレナリンが β 受容体に結合し、アデニル酸シクラーゼの活性化 \rightarrow cAMPの生成 \rightarrow リパーゼの活性化 \rightarrow 中性脂肪の加水分解という一連の反応を惹起し、遊離した脂肪酸がミトコンドリアで酸化される際にATP生成を伴わず、熱として放出される。

このようにBATでの熱産生は、脂肪の代謝分解の亢進に基づいているが、最近、動物に寒冷刺激を与えると、BATにおけるグルコース利用が上昇することが報告され、熱産生とグルコース代謝との関係が注

目されている。ところで、脂肪細胞でのグルコースの利用については、一般に細胞内へのグルコースの取り込み輸送が律速段階になっている。この輸送反応は細胞膜に存在するグルコーストランスポーター (GLUT) を介して行われると考えられている。GLUTは、最近遺伝子クローニングによりその全塩基配列が明かにされたが、それによると GLUT蛋白質は、約500個のアミノ酸からなり細胞膜を12回貫通しているという。またアミノ酸配列の違いにより1型から7型までの7種類のアイソフォームが知られている。これらのGLUTのうちBATには1型と4型のGLUTが発現しており、4型は1型に比べ多量に存在することが知られている。この4型GLUT (GLUT4) はインスリンに応答してグルコース輸送を亢進させる本体に他ならず、BATを始めWAT、骨格筋、心筋に特異的に発現しており、インスリンによる血糖値の急速な低下や、運動時にみられる筋組織での多量のグルコース消費に主役を演じていると考えられる。これに対し1型GLUT (GLUT1) は、脳、腎臓、胎盤を始めとするほとんど全ての組織に発現しているので、細胞が生きて行くために必要となるグルコースを恒常的に取り込む働きをしていると考えられる。いずれにせよ、先述のBATにおけるグルコース利用の変動は、これらGLUTの変化に基づいていると予想することができる。しかしながらBATにおけるGLUTとグルコース利用の調節機構に関しては詳細にはまだ明らかにされていない。

以上のことをふまえて、本研究ではBATでのグルコース代謝調節の機構を明らかにすることを目的としてラットを用いて個体レベルから細胞レベルまで幅広く実験を行った。まず、1) BATでのグルコース利用とGLUT発現に及ぼす寒冷曝露の影響を*in vivo*で調べ、これらに対する交感神経因子の関与について検討した。2) 次に細胞レベルでの*in vitro*実験のために、褐色脂肪細胞の初代培養系を確立し、グルコース利用とGLUTの調節メカニズムについて、特に β 受容体に焦点を当てて解析した。

ラットを寒冷に曝すと、BATでのグルコース利用の著しい亢進と共にGLUT4蛋白質の増加が見られた。この時、GLUT4 mRNAも並行し

て増加した。従って、寒冷暴露はBATでのGLUT4の生合成を促進することによって、この組織でのグルコース利用を高めるものと考えられた。これらのグルコース利用やGLUT4に対する寒冷暴露の促進効果は、この組織に分布する交感神経を外科的に切除することによって完全に消失したが、寒冷暴露の代わりにノルアドレナリンを持続的に投与すると、寒冷暴露と同様の効果が再現された。一方、BAT同様GLUT4が発現しているWATや筋肉では、GLUT4発現量は寒冷暴露やノルアドレナリンによっては全く影響を受けなかった。これらの結果から、BATでのGLUT4の発現が交感神経のノルアドレナリンによって直接調節されていることが明らかになった。この知見は、GLUT4の調節因子として従来から知られているインスリン以外に、ノルアドレナリンの役割を明らかにしたものである。また、ノルアドレナリンの代わりに β アドレナリン作動薬であるイソプロテレノールを投与しても、やはりGLUT4の増加が認められたが、 α 作動薬であるフェニレフリンは全く影響が無かった。従って、ノルアドレナリンの作用は主に β 受容体を介した機構によると結論した。

さらに細胞レベルでの検討を加えるために、褐色脂肪細胞の初代培養系を確立し、グルコース利用とGLUTの調節メカニズムについて、特に β 受容体に焦点を当てて解析した。ラットのBATをコラゲナーゼで処理して得られた前駆脂肪細胞を*in vitro*で培養・分化させ、初代培養脂肪細胞を得た。培養細胞は速やかに増殖しコンフルエントの状態になるが、このままでは脂肪細胞の特徴は見られなかった。しかし、培養液にデキサメサゾンを加えると細胞内に脂肪滴がたまと共に、GLUT4、ホルモン感受性リパーゼ、CCAAT/enhancer binding protein α のmRNAが発現して、脂肪細胞に分化した。BATに発現している3種類の β 受容体mRNAについて調べると、未分化細胞には $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体のみが認められ、高感度で分析しても $\beta 3$ 受容体mRNAは検出できなかった。しかし、細胞を分化させると3種類共に発現し、BATの*in vivo*での発現パターンに近い細胞を得ることができた。この細胞を用いて実験を行ったところ、未分化細胞ではノルアドレナリンはグルコ

ース利用に対してなんら影響を与えなかったが、分化脂肪細胞では亢進効果が認められ、*in vivo*での結果が再現された。 $\beta 3$ 受容体を選択的な作動薬も、同程度の促進効果を分化脂肪細胞に対してのみ示した。その有効濃度はノルアドレナリンより低かったが、 $\beta 3$ 受容体に対する親和性の違いとほぼ並行していた。以上のことより、褐色脂肪細胞でのグルコース利用に対するノルアドレナリンの作用は、脂肪細胞の分化と共に発現する $\beta 3$ 受容体を介した機構が重要であると結論した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 助 教 授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

ラット褐色脂肪組織におけるグルコース利用と グルコーストランスポーターのアドレナリン性調節

哺乳動物には2種類の脂肪組織が存在する。通常白色脂肪組織がエネルギーの貯蔵部位であるのに対して、褐色脂肪組織 (BAT)は調節性熱産生の部位であり、寒冷曝露時の体温維持や冬眠覚醒時の体温上昇、多食によって摂取した過剰エネルギーの散逸、などに寄与している。BAT熱産生は脂肪酸が酸化分解されることによって起こるが、同時にグルコース利用も増加することが知られており、グルコース代謝調節の新しい機構の存在が示唆されていた。本論文は、BATでのグルコース代謝の調節機構について、特に交感神経性因子の関与を中心にラットを用いて研究した。その要旨は以下の通りである。

1、ラットを寒冷環境に数日間曝すと、BATでのグルコース利用の著しい亢進とともに、グルコース輸送担体であるGLUT4のmRNAと蛋白質レベルの増加が見られた。この時、白色脂肪組織や骨格筋には全く変化が見られなかった。寒冷曝露によるBATでの変化は、この組織に分布する交感神経を外科的に切除しておくで完全に消失したが、ノルアドレナリン(NA)を持続的に投与すると室温でも再現された。また、NAの代わりに β アドレナリン作動薬であるイソプロテレノールを投与しても有効であったが、 α 作動薬投与では全く変化が見られなかった。これらの結果は、寒冷曝露によって交感神経活動が亢進し、放出されたNAが β 受容体を介してBATのGLUT4の合成を促進し、グルコースの利用を高めたことを示している。

2、上記のin vivoでの結果を細胞レベルで検討するために、ラットのBATをコラゲナーゼで処理して前駆脂肪細胞を得、in vitroで増殖させた。この初代培養脂肪細胞にデキサメサゾンを加えると、細胞内に脂肪滴がたまると共に、GLUT4やホルモン感受性リパーゼなどが発現して、脂肪細胞に分化した。これらの細胞でグルコース取り込みを測定したところ、NAの促進効果は分化した細胞でのみ認められた。BATに存在する3種類の β 受容体mRNAの発現を調べると、分化に伴い $\beta 3$ 受容体が発現し、その時グルコース取り込みも $\beta 3$ 受容体作動薬によって促進されることが明らかになった。これらの成績に基づき、BATでのグルコース利用の交感神経性調節には、脂肪細胞の分化と共に発現

する $\beta 3$ 受容体を介する機構が重要であると結論した。

このように、本論文は、BATでのグルコース代謝の調節について、動物個体での現象から出発し、その機構を細胞・分子レベルで解明したものであり、哺乳動物の生理学・生化学に貢献するところが大きい。よって、審査員一同は二上英樹氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。