

学位論文題名

ラット脂肪細胞における糖取り込み促進機構

— アデニル酸シクラーゼ系の関与 —

学位論文内容の要旨

- (1) L-243の β_3 -受容体に対する特異性および β_1 、 β_2 -アゴニスト、isoproterenolの作用との比較

β -アドレナリン受容体は、従来 β_1 、 β_2 -アドレナリン受容体サブタイプに分類されてきたが、新たに β_3 -受容体サブタイプの存在が確認され、脂肪組織に多く存在することが示された。ノーザンブロット解析および $[^3\text{H}]$ CGP-12177Aの細胞膜への結合活性から、ラット白色脂肪細胞には、大量の β_3 -受容体のほか、 β_1 -受容体、わずかの β_2 -受容体の存在が確認された。 β_3 -アゴニストのBRL、L-243、ICIは、 β_1 、 β_2 -受容体アゴニストのisoproterenol(Iso)同様アデニル酸シクラーゼを活性化した。アデニル酸シクラーゼの活性化により上昇したcAMPは脂肪酸遊離活性を引き起こし、この脂肪酸遊離活性はprotein kinase A 阻害剤の添加により抑制された。また、 β_3 -アゴニストは、Isoと同様にグルコース取り込み促進作用を引き起こした。 β_1 -受容体が存在するラット心筋細胞膜、 β_2 -受容体が存在する肺気管支平滑筋細胞膜において β_3 -受容体アゴニストによるアデニル酸シクラーゼ活性の上昇は認められなかった。また、 β_1 、 β_2 -ブロッカーの添加によって、脂肪酸遊離活性およびグルコース取り込み活性は抑制されなかった。中でも、L-243は β_3 -受容体により特異的であり脂肪酸遊離活性およびグルコース取り込み活性は他の β_3 -アゴニストBRL、ICIより、さらには、Isoより強い作用を示した。以上のことから、L-243は、 β_3 -受容体特異的であり、かつ β_1 、 β_2 -アゴニストのIsoより作用の強い β_3 -受容体アゴニストであることが分かった。

- (2) L-243のPI 3-kinaseおよびGLUT4の移動に対する作用

脂肪細胞において、insulinによるグルコース取り込みの亢進にはPI 3-kinase (PI 3-K)の活性化、GLUT4の軽ミクロゾームから細胞膜への移動が必須である。L-243はinsulin同様、GLUT4の軽ミクロゾーム画分から細胞膜画分への移動を亢進させた。このとき、PI 3-Kは活性化されPIP₃生成が認められた。PI 3-Kの特異的阻害剤であるwortmannin (WT)はGLUT4の細胞膜への移動を減少させ、L-243によるグルコース取り込み促進作用を抑制した。したがって、L-243はinsulin同様、PI 3-Kを活性化して細胞膜でのGLUT4の増加を引き起こすことによってグルコース取り込みを亢進させると結論した。

(3) L-243によるPI 3-K活性、GLUT4の移動、グルコース取り込み活性の アデニル酸シクラーゼ系の関与

ラット脂肪細胞をインキュベートするとadenosineがメデイウム中に遊離され、このadenosineがアデニル酸シクラーゼ抑制性GTP結合蛋白質(Gi蛋白質)に共役した受容体に結合してcAMP生成を抑制する。したがって、L-243を添加してもcAMP生成はわずかであり、著しいcAMPの上昇は認められなかった。この条件下で、L-243を添加するとinsulin同様、PI 3-K活性、GLUT4の移動、グルコースの取り込みの亢進作用が発現した。メデイウム中に遊離したadenosineはアデノシンデアミナーゼ(ADA)を添加して分解する、あるいは百日咳毒素(PTX)処理し、細胞膜中のGi蛋白質の機能を消失させると、L-243は著しくcAMPを上昇させPI 3-K活性、GLUT4の移動、グルコース取り込み活性は完全に消失した。ADAを添加しても非水解性アデノシンアナログのN⁶-phenylisopropyl adenosine (PIA) を添加すると著しいcAMP上昇は抑制され、L-243によるグルコース取り込み活性は回復した。しかし、PTX処理した場合には、PIA添加しても、Gi蛋白質の機能が消失されているため回復しなかった。一方、insulinによるグルコース取り込み活性はADAやPTX処理しても影響を受けることはなかった。しかし、さらにL-243を添加してcAMPを著しく上昇させた条件では、insulinの作用は抑制されることが分かった。膜透過性dibutyl cAMPを添加するとinsulin作用は抑制された。これらのことから、L-243によるグルコース取り込み促進作用にはGi蛋白質が活性化されcAMPが著しく上昇していないことが必要であることが分かった。それに対して、insulinによるグルコース取り込み促進の作用はGi蛋白質の機能の消失によって影響されないが、cAMPの異常増加がinsulinの作用を抑制すると推定した。

(4) AIF₄およびforskolinのPI 3-K活性化、GLUT 4の細胞膜への移動、グルコース取り込み促進に対する作用

L-243によるPI 3-K活性化、GLUT 4の細胞膜への移動、グルコース取り込み促進作用は著しいcAMP増加を抑制したとき発現する。しかしながら、L-243はわずかながらcAMPを上昇させる。G蛋白質を活性化するAIF₄、アデニル酸シクラーゼを活性化するforskolinを添加すると、いずれもinsulin同様PI 3-K活性化、GLUT 4を細胞膜へ移動させた。GLUT 4の細胞膜への移動はwortmanninを添加すると抑制された。PTX処理し、AIF₄を添加してもcAMP生成は認められなかった。この時、AIF₄によるPI 3-K活性は認められなかった。また、ADA存在下あるいはPTX処理し、forskolinを添加し著しくcAMPを増加させると、forskolinによるPI 3-K活性は認められなかった。L-243同様、百日咳毒素感受性G蛋白質の活性化が必須であった。

insulinの場合、insulin受容体基質-1(IRS-1)とPI 3-Kの調節サブユニットが結合し、insulin受容体、IRS-1、PI 3-Kが複合体を形成し活性化される。したがって、cytosol画分のPI 3-Kは減少し、細胞膜画分で増加する。L-243、AIF₄、forskolinもinsulin同様、PI 3-Kはcytosol画分で減少し、細胞膜画分で増加した。また、insulinはPI 3-Kを活性化すると同時にMAP-kinase(MAP-K)を活性化する。L-243、AIF₄、forskolinを添加してもMAP-Kの活性化が認められた。このことは、insulinと一部共通の機構を介してPI 3-Kを活性化する事を示している。insulinによるPI 3-K活性化はGiの機能の消失によっても影響されないが、L-243、AIF₄、forskolinいずれの作用も百日咳毒素感受性G蛋白質の活性化が必須であった。以上のことから、アデニル酸シクラーゼ系におけるβ-受容体アゴニスト、AIF₄、ForskolinのPI 3-K活性化経路にはinsulinと一部共通の機構が存在すると結論した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野村靖幸
副査	教授	栗原堅三
副査	助教授	徳光幸子
副査	助教授	三宅教尚

学位論文題名

ラット脂肪細胞における糖取り込み促進機構

— アデニル酸シクラーゼ系の関与 —

本論文はラット脂肪細胞において、アデニル酸シクラーゼ系が関与した糖取り込み促進機構の解析を行ったものである。アデニル酸シクラーゼを活性化し、インスリンの作用と拮抗するホルモンが糖取り込みを促進させ、インスリン様作用を発現しうることを見出した。この新しく見出されたインスリン様作用について、以下確立した知見を述べる。

(1) β_3 -アドレナリン受容体アゴニスト、L-243, BRL, ICIの β_3 -受容体に対する特異性および β_1 、 β_2 -アゴニスト、イソプロテレノールの作用との比較

β -アドレナリン受容体は、従来 β_1 、 β_2 -アドレナリン受容体サブタイプに分類されてきたが、新たに β_3 -受容体サブタイプの存在が確認され、脂肪組織に多く存在することが示された。ノーザンブロット解析および $[^3\text{H}]$ CGP-12177Aの細胞膜への結合活性から、ラット白色脂肪細胞には、大量の β_3 -受容体のほか、 β_1 -受容体、わずかの β_2 -受容体の存在が確認された。 β_3 -アゴニストのBRL、L-243、ICIは、 β_1 、 β_2 -受容体アゴニストのイソプロテレノール (Iso) 同様アデニル酸シクラーゼを活性化した。アデニル酸シクラーゼの活性化により上昇したcAMPは脂肪酸遊離活性を引き起こした。この脂肪酸

遊離活性はprotein kinase A阻害剤の添加により抑制された。また、 $\beta 3$ -アゴニストは、Isoと同様にグルコース取り込み促進作用を引き起こした。 $\beta 1$ -受容体が存在するラット心筋細胞膜、 $\beta 2$ -受容体が存在する肺気管支平滑筋細胞膜において $\beta 3$ -受容体アゴニストによるアデニル酸シクラーゼ活性の上昇は認められなかった。また、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ -ブロッカーの添加によって、脂肪酸遊離活性およびグルコース取り込み活性は抑制されなかった。中でも、L-243は $\beta 3$ -受容体により特異的であり脂肪酸遊離活性およびグルコース取り込み活性は他の $\beta 3$ -アゴニストBRL、ICIより、さらには、Isoより強い作用を示した。以上のことから、L-243は、 $\beta 3$ -受容体特異的であり、かつ $\beta 1$ 、 $\beta 2$ -アゴニストのIsoより作用の強い $\beta 3$ -受容体アゴニストであることが分かった。

(2) L-243のPI 3-kinaseおよびGLUT4の移動に対する作用

脂肪細胞において、insulinによるグルコース取り込みの亢進にはPI 3-kinaseの活性化、GLUT4の軽ミクロゾームから細胞膜への移動が必須である。L-243はinsulin同様GLUT4の軽ミクロゾーム画分から細胞膜画分への移動を亢進させた。このとき、PI 3-kinaseは活性化されPIP₃生成が認められた。PI 3-kinaseの特異的阻害剤であるwortmannin (WT)はGLUT4の細胞膜への移動を減少させ、L-243によるグルコース取り込み促進作用を抑制した。したがって、L-243はinsulin同様、PI 3-kinaseを活性化して細胞膜でのGLUT4の増加を引き起こすことによってグルコース取り込みを亢進させると結論した。

(3) L-243によるPI 3-kinase活性、GLUT4の移動、グルコース取り込み活性に対するアデニル酸シクラーゼ系の関与

ラット脂肪細胞をインキュベートするとadenosineがメデイウム中に遊離され、このadenosineがアデニル酸シクラーゼ抑制性GTP結合蛋白質(Gi蛋白質)に共役した受容体に結合してcAMP生成を抑制する。したがって、L-243を添加してもcAMP生成はわずかであり、著しいcAMPの上昇は認められなかった。この条件下で、L-243を添加するとinsulin同様、PI 3-kinase活性、GLUT4の移動、グルコースの取り込みの亢進作用が発現した。メデイウム中に遊離したadenosineをアデノシンデアミナーゼ(ADA)を添加してadenosineを分解する、あるいはPTX処理し、細胞膜中のGi蛋白質の機能を消失させると、L-243は著

しくcAMPを上昇させPI 3-kinase活性、GLUT4の移動、グルコース取り込み活性は完全に消失した。ADAを添加しても新たに非水解性アデノシンアナログのN⁶-phenylisopropyl adenosine (PIA) を添加すると、著しいcAMP上昇は抑制され、L-243によるグルコース取り込み活性は回復した。しかし、PTX処理した場合には、PIA添加しても、Gi蛋白質の機能が消失されているため回復しなかった。一方、insulinによるグルコース取り込み活性はADAやPTX処理しても影響を受けることはなかった。しかし、さらにL-243を添加してcAMPを著しく上昇させた条件では、insulinの作用は抑制されることが分かった。膜透過性のcAMPアナログであるdibutyryl cAMPを添加するとinsulin作用は抑制された。

これらのことから、L-243によるグルコース取り込み促進作用にはGi蛋白質が活性化されcAMP生成が抑制されていることが必要である。それに対してinsulinによるグルコース取り込み促進作用はGi蛋白質の機能の消失によって影響されないが、cAMPの異常増加がinsulinの作用を抑制すると推定した。

(4) AIF₄およびforskolinのPI3-kinase活性化、GLUT 4の細胞膜への移動、グルコース取り込み促進に対する作用

L-243によるPI3-kinase活性化、GLUT 4の細胞膜への移動、グルコース取り込み促進作用は著しいcAMP増加を抑制したとき発現する。しかしながら、L-243はわずかながらcAMPを上昇させる。G蛋白質を活性化するAIF₄、アデニル酸シクラーゼを活性化するforskolinを添加すると、いずれもinsulin同様PI3-kinase活性化、GLUT 4の細胞膜への移動を引き起こした。GLUT 4の細胞膜への移動はwortmanninを添加すると抑制された。PTX処理し、AIF₄を添加してもcAMP生成は認められなかった。このとき、AIF₄によるPI 3-kinase活性は認められなかった。また、ADA存在下あるいはPTX処理した後に、forskolinを添加し著しくcAMPを増加させると、forskolinによるPI 3-kinase活性化は認められなかった。したがって、forskolinによるPI3-kinaseの活性化には、L-243同様PTX感受性G蛋白質の活性化が必須であった。insulinの場合、insulin受容体基質-1 (IRS-1)とPI 3-kinaseの調節サブユニットが結合し、insulin受容体、IRS-1、PI 3-kinaseが複合体を形成し活性化される。その結果

PI 3-kinaseはcytosol画分で減少し、細胞膜画分で増加する。L-243、AlF₄、forskolinもinsulin同様、PI 3-kinaseをcytosol画分で減少させ、細胞膜画分で増加させた。また、insulinはPI 3-kinaseを活性化すると同時にMAP-kinaseを活性化する。L-243、AlF₄、またはforskolinを添加するとMAP-Kの活性化が認められた。insulinによるPI 3-kinase活性化はPTX処理によって影響されないが、L-243、AlF₄、forskolinいずれの作用もPTX感受性G蛋白質の活性化が必須であった。これらのことから、アデニル酸シクラーゼ系における β -受容体アゴニスト、AlF₄、forskolinのPI3-kinase活性化経路にはinsulinと一部共通の機構を介して作用すると結論した。

以上の研究は、アデニル酸シクラーゼ活性化因子としてのホルモンがグルコース取り込み促進作用を発現することを見出し、その作用機構を確立したものであり、博士（薬学）の学位論文として十分な内容を有すると認めた。