

学位論文題名

ウシのグルコーストランスポーターの構造、
組織分布および発育に伴う発現量の変化

学位論文内容の要旨

反芻動物の糖代謝の特徴として、食餌由来のグルコースが少ない、体内グルコースの多くは糖新生に依存している、単胃動物に比べて低血糖である、といった点が挙げられる。さらに、インスリンの血糖低下効果が弱い、いわゆる「インスリン抵抗性」も知られている。血中グルコースが細胞内へ取り込まれ利用される最初の律速段階分子は細胞膜のグルコース輸送担体GLUTであるが、特にインスリンはGLUTアイソフォームの一つであるGLUT4に作用してグルコース取り込みを促進する。そこで本研究では、反芻動物でのインスリン抵抗性の原因を探る手がかりとして、ウシのGLUT4に焦点を当てて、そのcDNAをクローニングして、アミノ酸配列を決定したのち、組織分布や生後発達に伴う変化を検討した。

第1章では、まず、ホルスタイン種のウシの骨格筋から抽出したRNAを出発材料としてRT-PCR、RACEなどの手法を用いてウシGLUT4cDNAをクローニングした。その後、プラスミドに組み込み、大腸菌に形質導入して増殖し塩基配列を決定した。ウシGLUT4cDNAは全長2,624bpで1,527bpの翻訳領域を持ち509アミノ酸をコードすることが予想された。このアミノ酸配列を他の単胃動物種（ヒト、マウスおよびラット）のGLUT4と比較したところ、90.6～93.5%と高い相同性がみられ、特に糖鎖付加部位である57番目のアスパラギン、約20個の疎水性アミノ酸からなる12カ所の膜貫通領域などの保存構造が確認された。しかし、単胃動物でインスリンによるGLUT4のトランスポーションに関与するといわれているC-末端領域については、508番目のアスパラギンがウシではヒスチジンに置換していることが明らかとなった。

次いで、ホルスタイン種のウシGLUT4における508番目のアミノ酸置換が反芻動物に共通か否かを確かめるために、黒毛和種のウシ、ヒツジ、ヤギおよびブタのGLUT4cDNAの一部を上記と同様にクローニングした。C-末端領域の25アミノ酸の配列の比較をしたところ、黒毛和種ではホルスタイン種のウシと同様に508番目のアミノ酸はヒスチジンであったが、ヒツジ、ヤギおよびブタはヒト、マウスおよびラットと全く同じ配列であり、508番目のアミノ

酸はアスパラギンであった。したがって、このアミノ酸置換は、反芻動物共通にみられるインスリン抵抗性を説明するものではないと思われる。

さらに、ウシGLUT4の発現組織を明らかにするために、ホルスタイン種の成牛の骨格筋、心臓、肝臓、大脳皮質および脂肪組織などの組織サンプルについてウエスタンブロットおよびノーザンブロット解析を行った。GLUT4のタンパク質、mRNAともに、単胃動物と同様にインスリン感受性部位である心臓、骨格筋および脂肪組織にのみ発現していたが、その発現量は少ないことが明らかとなった。

第2章では、ウシにおけるGLUT4の発現量の低さと反芻胃の発達や揮発性脂肪酸VFAの生成との関係を明らかにするために、出生直後（0ヶ月齢）から12ヶ月齢までのホルスタイン種のウシのGLUT4のタンパク質レベルの推移をウエスタンブロット法で調べ、GLUT1の変化と比較した。骨格筋（胸最長筋、大腿四頭筋）、脂肪組織（腎周囲脂肪組織、腰部皮下脂肪組織）および大脳皮質のいずれにおいてもGLUT1タンパク質レベルは0～12ヶ月齢まで大きな変化が認められなかった。これに対してGLUT4タンパク質は出生直後が最大の発現レベル（100%）であり、月齢が進むにしたがって減少し、12ヶ月齢になると、脂肪組織で32～40%、骨格筋では43～69%の低いレベルになった。

また大腿四頭筋のGLUT4mRNAをノーザンブロット法で測定したところ、0.5～2ヶ月齢にいったん上昇したのち3ヶ月齢から減少に転じ12ヶ月齢では出生時の73%レベルとなった。このようなウシGLUTの生後変化は、ラットやマウスなどの単胃動物での成績、すなわちGLUT1は新生子期に高く離乳前後で低下するのに対して、GLUT4は当初低く離乳期にかけて上昇するという生後発達変化と大きく異なっている。これは、ウシなどの反芻動物では、生後の哺乳期から牧草へと飼料条件が変わることに伴い、反芻胃の発達と反芻胃内発酵が盛んになることにより、末梢に供給される主要なエネルギー源がグルコースからVFAに切り替わっていくことに対応した適応に他ならない。したがって、このようなGLUT4の適応的低下が反芻動物に特有のインスリン抵抗性の一因になっていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 助 教 授 木 村 和 弘
副 査 助 教 授 森 松 正 美 (岩手大学農学部)

学 位 論 文 題 名

ウシのグルコーストランスポーターの構造、 組織分布および発育に伴う発現量の変化

反芻動物の糖代謝は、体内グルコースの多くが食餌由来ではなく糖新生に依存しており、単胃動物に比べて低血糖であるという特徴がある。さらに、インスリンの血糖低下効果が弱い、いわゆる「インスリン抵抗性」も知られている。本学位論文は、反芻動物でのインスリン抵抗性の原因を探る手がかりとして、細胞膜グルコース輸送担体 (GLUT)、特にインスリン応答性の GLUT4 に焦点を当てて、ウシ GLUT4 の分子構造や、組織分布、生後発達に伴う変化を検討したものである。

第 1 章では、ホルスタイン種牛の骨格筋から抽出した RNA を出発材料としてウシ GLUT4cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。ウシ GLUT4cDNA は全長 2,624bp で 1,527bp の翻訳領域を有していた。予想される 509 アミノ酸の配列は、他の単胃動物種 (ヒト、マウスおよびラット) のそれと約 92% の高い相同性がみられ、特に糖鎖付加部位である 57 番目のアスパラギン、約 20 個の疎水性アミノ酸からなる 12 ケ所の膜貫通領域などの保存構造が確認された。しかし、単胃動物でインスリン応答に関与するといわれている C-末端領域については、508 番目のアスパラギンがヒスチジンに置換していることが明らかとなった。このアミノ酸置換は、ヒツジとヤギでは見られず、単胃動物と同様にアスパラギンであった。したがって、これは、反芻動物共通にみられるインスリン抵抗性を説明するものではないと結論した。さらに、ウシ GLUT4 の組織分布について、ホルスタイン種成牛の組織サンプルを用いてウエスタンブロットおよびノザンブロット解析で調べたところ、単胃動物と同様にインスリン感受性部位である心臓、骨格筋および脂肪組織にのみ存在するが、その発現量は少ないことが明らかとなった。

第 2 章では、ウシにおける GLUT4 の発現と反芻胃の発達の関係を明らかにするために、出生直後 (0 カ月齢) から 12 カ月齢までのホルスタインの GLUT4 の推移を調べ、GLUT1 の変化と比較した。骨格筋、脂肪組織および大脳皮質のいずれにおいても GLUT1 タンパク質レベルは 0~12 カ月齢まで大きな変化が認められなかった。これに対して

GLUT4 タンパク質は出生直後が最大の発現レベルであり、月齢が進むにしたがって減少し、12 ヶ月齢になると成牛と同じ低いレベルになった。このような GLUT の生後変化は、単胃動物での成績、すなわち GLUT1 は新生子期に高く離乳前後で低下するのに対して、GLUT4 は当初低く離乳期にかけて上昇するという変化と正反対である。これは、発育に伴い反芻胃の発達と反芻胃内発酵が盛んになり、末梢に供給される主要なエネルギー源がグルコースから揮発性脂肪酸に切り替わっていくことへの適応に他ならず、反芻動物に特有のインスリン抵抗性の一因になっていると思われる。

以上のように本研究は、反芻動物の糖代謝の特徴の一端についてウシ GLUT4 に焦点を当てて解明したものであり、獣医生理学・生化学領域の発展に貢献するものである。よって審査員一同は上記学位論文提出者阿部啓之氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。