

氏 名	やま もと ゆう じ 山 本 祐 二
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1740 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Increases GLUT 1 Expression and Recruits Both GLUT 1 and GLUT4 at the Cell Surface in 3T3-L1 Adipocytes (3T3-L1 脂肪細胞における糖輸送担体 1 の発現及び糖輸送担体 1 及び 4 の細胞内局在に対する恒常活性型 mitogen-activated protein キナーゼ・キナーゼの効果に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 北 徹 教 授 清 野 裕

論 文 内 容 の 要 旨

mitogen-activated protein kinase (MAPK) は、様々な細胞外刺激により活性化され、細胞増殖や分化において重要な役割を担う。MAPK は特異的な MAP キナーゼ・キナーゼ (MAPKK) により183位のスレオニンと185位のチロシンが磷酸化されて活性化される。一方、糖輸送担体の GLUT1 は広く種々の細胞に発現しているが、インスリン反応性糖輸送担体である GLUT4 はインスリンの標的細胞である筋、脂肪細胞に特異的に発現している。GLUT4 はインスリン刺激に反応して細胞内から細胞表面へとトランスロケーションし、糖取り込みを亢進させるが、それはインスリンがインスリン受容体に結合したあとインスリン受容体基質、phosphatidylinositol 3-キナーゼを介してシグナルを伝えることによる。一方、インスリンシグナルは Ras-MAPK 経路へも伝わるが、この経路の糖取り込みにおける役割は未だ明らかではない。

本研究では、脂肪細胞へ分化する細胞株 3T3-L1 細胞にレトロウイルスを用い恒常活性型の変異 MAPKK を発現させることにより MAPK を特異的に活性化させ、その細胞の糖輸送活性、GLUT1 と GLUT4 の mRNA 発現及び蛋白量、さらに細胞内局在を解析した。

xenopus MAPKK の218位と222位のセリンをグルタミン酸に置換し更に32位から51位までの20アミノ酸を欠失させた dSESE-MAPKK は恒常的に MAPK を活性化させることが報告されている。この dSESE-MAPKK cDNA をレトロウイルス・ベクターに挿入してウイルスを調製し、3T3-L1 細胞へ感染させて dSESE-MAPKK 高発現細胞株 (高発現細胞) と低発現細胞株 (低発現細胞) を得た。これらの細胞と親株を比較検討した。

高発現細胞では、基礎時の MAPK のリン酸化及び活性の上昇が認められた。高発現細胞及び低発現細胞は、イソブチルメチルキサンチン、デキサメサゾン、インスリンによる通常の分化誘導で親株と同様に脂肪細胞へ分化した。分化前の状態では、2-デオキシグルコース取り込みで検討した糖輸送活性は、親株、高発現細胞、低発現細胞の各細胞間で差が認められず、インスリン刺激時及び基礎時の糖輸送活性比でみたインスリン反応性は2倍であった。脂肪細胞への分化後、糖輸送活性は、基礎時において高発現細胞で親株及び低発現細胞の4倍に増加した。一方、糖輸送活性のインスリン反応性は、親株で6.5倍、低発現細胞で7倍を示したのに対し、高発現細胞においては2倍と低下していた。GLUT1 の mRNA 発現及び蛋白量は、分化前では各細胞間で差は認められなかったが、分化後では高発現細胞において著明に増加した。また、分化後の GLUT4 の mRNA 発現は細胞間でほとんど変化しなかった。高発現細胞の GLUT1 及び GLUT4 は、すでに基礎時において細胞表面により多く局在していた。

以上のことより、3T3-L1 細胞において持続的な MAPK の活性化は、GLUT1 の mRNA 発現を亢進し、その蛋白量を増加させ、更に基礎時における GLUT1 及び GLUT4 の細胞表面での局在を増加させることによって、インスリン反応性を低下させることが示された。

従って、MAPK が慢性的に活性化された状況では、インスリン抵抗性がもたらされると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、脂肪細胞に分化する3T3-L1細胞に恒常活性型の変異MAPキナーゼ・キナーゼを発現させ、高発現細胞及び低発現細胞における糖輸送活性、GLUT1とGLUT4のmRNA発現及び蛋白量、さらにそれらの細胞内局在を親株と比較検討した。

高発現細胞では、基礎時の乱MAPキナーゼのリン酸化及び活性の上昇が認められたが、通常の分化誘導で親株と同様に脂肪細胞へ分化した。脂肪細胞への分化後、糖輸送活性は、基礎時において高発現細胞で親株及び低発現細胞の4倍に増加した。インスリン刺激時及び基礎時の糖輸送活性比でみたインスリン反応性は、親株で6.5倍、低発現細胞で7倍であるのに対し、高発現細胞において2倍と低下した。GLUT1のmRNA発現及び蛋白量は、高発現細胞において著明に増加した。高発現細胞のGLUT1及びGLUT4は、基礎時において細胞表面により多く局在した。

以上の結果より、3T3-L1細胞において持続的なMAPキナーゼの活性化は、GLUT1のmRNA発現を亢進して、その蛋白量を増加させ、さらに基礎時におけるGLUT1及びGLUT4の細胞表面での局在を増加させて、インスリン反応性を低下させることが示された。

以上の研究は、糖代謝調節におけるMAPキナーゼ経路の役割の解明に貢献し、糖尿病におけるインスリン抵抗性の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月5日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。