OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	ラット脳グルコース輸送体の研究
Author(s)	原, 正之
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35964
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【5】

氏名・(本籍)	原(はら)　正之(まさゆき)
学位の種類	理学博士
学位記番号	第7866号
学位授与の日付	昭和62年9月30日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ラット脳グルコース輸送体の研究
論文審査委員	(主査) 教授 中川 八郎 (副査) 教授 堀尾 武一　教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

高等動物の脳は通常グルコースを唯一のエネルギー源とし，その供給は血糖に依存する。血液から脳へグルコースが取り込まれる過程には，血液脳関門の血管壁と，脳内に存在する神経細胞およびグリア細胞に入る2段階に促進拡散型のグルコース輸送体が関与すると考えられてきた。しかし，それらの分子的性質および調節機構については，十分明らかにされていない。

発表者はまずラット脳よりグルコース輸送体の精製を試み，得られた部分精製標品について諸性質を明らかにした。更に，ラット胎児脳より分離した初代培養神経細胞並びに星状グリア細胞について，非代謝性の2－デオキシ－D－グルコース（2－DG）を用いて糖類取り込みの解析を行い，調節機構の相違などを明らかにしたので，それらの結果を合わせて報告する。先ず，グルコース輸送体の検出・測定には特異的阻害剤として知られているサイトカラシンBを用いた。ラット脳にはD－グルコースと拮抗する[^{3}H]サイトカラシンB結合活性が認められたが，Scatchard plotにより求めた結合定数はP1，P2およびP3のいずれの膜画分についても約100nMであった。また，Photoaffinity labeling法により[^{3}H]サイトカラシンB結合蛋白質の分子量はSDS－PAGE上で45Kと推定された。この値はラット脳の毛細血管のグルコース輸送体について報告されているもの（55K）とは異なるので，得られた結合蛋白質は血管系以外の細胞の膜上に存在する輸送体と考えられた。

ラット脳膜画分を0.5%Triton X－100によって可溶化し，DE－52，Bio-Gel HTおよびSepharose CL－6Bの3種のカラムクロマトグラフィーによりグルコース輸送体を部分精製した。精製標品の分子量はゲルろ過法により0.1%Triton X－100存在下で約200Kと求められた。上述のSDS－PAGEで得られた分子量45Kと考え合わせると，このグルコース輸送体分子は4量体と推定された。

精製標品を凍結－融解－超音波処理法によって卵黄レシチン小胞中に再構成すると，D－グルコースを特異的に，しかも濃度依存的に取り込んだ。そのK$_m$値は血糖値に近い7mMと計算された。この取り込みはサイトカラシンB及びフロレチンにより阻害された。

一方，初代培養神経細胞ならびに星状グリア細胞は時間及び濃度に依存した2－DG取り込み活性を示し，K$_m$値はそれぞれ1.7mM，0.36mMであった。しかし，両培養細胞における取り込みの基質特異性は極めて類似し，再構成実験の結果ともほぼ一致した。

これらの細胞への2－DG取り込みはサイトカラシンB，フロレチンによって阻害されるほか，アデノシン等のヌクレオシド及びフォルスコリンによっても阻害された。但し，フォルスコリンの阻害効果はサイクリックAMP濃度の変化を介さず，直接輸送体分子に作用した結果と考えられる。

Photoaffinity labeling法により，星状グリア細胞にはSDS－PAGE上で45Kの[^{3}H]サイトカラシンB結合蛋白の存在が認められた。したがって前述の45Kの輸送体分子は主として星状グリア細胞に存在するものと考えられる。

次に両細胞についてのグルコース輸送体の調節機構について解析を行った。インスリンはいずれの細胞においても，2－DG取り込み活性に影響を与えなかった。しかし，糖欠乏状態では両種細胞の応答に相違がみられた。すなわち，神経細胞を糖欠乏状態に置くと，40時間以内にその2－DG取り込み活性は約2倍に増加したが，星状グリア細胞にはこのような増加はなかった。この糖欠乏による活性増加は可逆的であり，V$_{max}$値の変化によること，蛋白質生合成の阻害剤であるシクロヘキシミドにより抑制されることなどが証明された。これらの事実は，神経細胞におけるグルコース輸送体の調節は糖欠乏状態が引き金的作用をすること，またそれが神経細胞におけるグルコース輸送体の合成速度に影響を与え，量的な変化を誘起したことを示唆している。

論文の審査結果の要旨

高等動物の脳は通常グルコースを唯一のエネルギー源とし，その供給は血液中のグルコース（血糖）に依存している。しかし，血液からグルコースが脳に取り込まれる過程には，血液脳関門の血管壁と脳内に存在する神経細胞およびグリア細胞に入る2段階の促進拡散型のグルコース供与体が関与すると考えられてきたにかかわらず，後2者の分子的特性，調節的性質は未だ十分明らかにされていない。

本論文は先ずラット脳よりグルコース輸送体の特異的阻害剤であるサイトカラシンBの[^{3}H]標識化合物との結合性を指標として同輸送体を精製し，サブユニットの分子量を45Kと決定し，55Kと報告されている血液脳関門のグルコース輸送体と異なること，天然の状態では4量体と形成していることを明らかにした。

更に，初代培養神経細胞ならびに星状グリア細胞について解析をおこない，本輸送体が星状グリア細胞に確実に存在することを明らかにした。

他方，グルコース代謝の拮抗阻害剤である2－デオキシグルコースの取込みを指標として，神経細胞

とグリア細胞に存在するグルコース輸送体の調節機構の相違を研究し，両者共インスリンの影響は受けないが，神経細胞の輸送体は糖欠乏状態におくと，適応的に増加し，しかもそれが輸送体タンパク質の合成率の変化によることを明らかにした。

以上のごとく，本論文は脳のエネルギー利用に量も基本的なグルコース輸送に関与する輸送体の分子特性，調節機構を明らかにしており，理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。