HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	二上, 英樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第5325号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137288
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51518
Type	doctoral thesis
File Information	000000322478.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

二　上　英　樹

博士学位論文

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

二　上　英　樹

【目　次】

略語表 …… 4

緒言 …… 5

第１章　褐色脂肪組織におけるグルコース輸送のアドレナリン性調節

序文 …… 7

材料および方法 …… 8

１）供試動物 …… 8

２）組織におけるグルコース利用速度の測定 …… 8

ａ）心臓カテーテルの留置 …… 8

ｂ）2-デオキシグルコース（dGlc）の細胞内取込み …… 8

３）GLUT4蛋白質の解析 …… 9

ａ）組織ホモジネイトの調製 …… 10

ｂ）ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE） …… 10

ｃ）特異抗体の作製 …… 10

ｄ）Westernblotting法によるGLUT4蛋白質の測定 …… 11

４）GLUT4 mRNAの解析 …… 11

ａ）全RNAの調製 …… 11

ｂ）poly(A) RNAの精製 …… 12

ｃ）cDNAの調製 …… 12

i) GLUT4 …… 13

ii) β-actin …… 13

ｄ）Northernblotting法によるGLUT4 mRNAの測定 …… 13

５）神経の切除 …… 14

６）アドレナリン性受容体各種作動薬の長期投与 …… 14

７）実験データの統計計算 …… 14

結果 …… 15
1）組織でのグルコース利用に対する寒冷曝露の効果 …… 15
2）寒冷曝露時のGLUT4発現量の変化 …… 16
3）寒冷曝露時のグルコース利用並びにGLUT4発現の変化に
及ぼす交感神経の影響 …… 18
4）GLUT4蛋白質量に対する各種アドレナリン性受容体作動薬長期投与の効果
…… 20
5）GLUT4 mRNA発現量に対するノルアドレナリン長期投与の効果 …… 22
考察 …… 24
小括 …… 27

第2章　培養褐色脂肪細胞におけるグルコース輸送とアドレナリン性β3受容体
序文 …… 28
材料および方法 …… 30
1）供試動物 …… 30
2）褐色脂肪細胞の初代培養 …… 30
3）オイル赤O染色（ズダンII染色） …… 31
4）mRNAの解析 …… 31
a）全RNAの調製 …… 31
b）poly(A) RNAの調製 …… 31
b）cDNAの調製 …… 32
i) GLUT4 …… 32
ii) C/EBP α …… 32
iii) C/EBP β …… 32
iv) C/EBP δ …… 32
v) ホルモン感受性リパーゼ …… 32
vi) β1受容体 …… 32
vii) β2受容体 …… 32

viii) β3受容体 …… 32
c）Northernblotting法による各種mRNAの測定 …… 32
d）RT-PCR法による測定 …… 33
5）培養細胞におけるグルコース利用速度の測定 …… 34
6）実験データの統計計算 …… 34
結果 …… 35
1）初代培養褐色脂肪細胞におけるデキサメサゾンの効果 …… 35
2）初代培養褐色脂肪細胞におけるβ受容体の発現 …… 38
3）初代培養褐色脂肪細胞でのグルコース輸送におけるβ3作動薬の効果 …… 40
考察 …… 43
小括 …… 46
総括 …… 47
謝辞 …… 49
引用文献 …… 50
英文抄録 …… 55

【略　語　表】

BAT：褐色脂肪組織

intact BAT：交感神経を切除していないそのままのBAT

denervated BAT：交感神経を切除したBAT

BSA：ウシ血清アルブミン

C/EBP：CCAAT/Enhancer Binding Protein

dGlc：2-デオキシグルコース

DMEM：Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

FCS：ウシ胎児血清

GLUT：グルコーストランスポーター

GLUT1：1型グルコーストランスポーター

GLUT4：4型グルコーストランスポーター

RT-PCR：Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

PBS：リン酸緩衝液

SDS-PAGE：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SSC：150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムを含む混合溶液

SSPE：150 mM 塩化ナトリウム、10 mM リン酸二水素ナトリウム及び1 mM EDTAを含む混合溶液

WAT：白色脂肪組織

【緒　言】

哺乳動物には、白色及び褐色の２種類の脂肪組織がある。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（23、30）。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（55）。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→cAMPの生成→リパーゼの活性化→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（59、60、62、67、68）、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（64）。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（34）。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（7、14、24、

34）、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（18）。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（14）、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。

なお、これらの研究内容については、以下の通り発表した。

(i) Nikami, H., Shimizu, Y., Endoh, D., Yano, H. and Saito, M. (1992): Cold exposure increases glucose utilization and glucose transporter expression in brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 1078-1082

(ii) Tsukazaki, K., Nikami, H., Shimizu, Y., Kawada, T., Yoshida, T. and Saito, M. (1995): Chronic administration of β-adrenergic agonists can mimic the stimulative effect of cold exposure c protein synthesis in rat brown adipose tissue. *J. Biochem.* 117, 96-100

(iii) Nikami, H., Shimizu, Y., Sumida, M., Minokoshi, Y., Yoshida, T., Saito, M., and Shimazu, M. (1996): Expression of β3-adrenoceptor and stimulation of glucose transport by β3-agonists in brown adipocyte primary culture. *J. Biochem.* 119, 120-125

第１章　褐色脂肪組織におけるグルコース輸送のアドレナリン性調節

【序　文】

BATでの熱産生に必要なエネルギー源は、褐色脂肪細胞内に脂肪滴として蓄積されていた中性脂肪、あるいは肝臓や小腸で合成され血液中に放出されたリポ蛋白質中の中性脂肪である。従って、交感神経の活性化によって熱産生が亢進するときには、必ず中性脂肪の加水分解が起こり遊離した脂肪酸がミトコンドリアで酸化分解される。このような脂肪分解に加えて、BATでのグルコース代謝も熱産生に伴って亢進することが、最近明らかになってきた（59、60、62、67、68）。これは、消費した細胞内の中性脂肪を合成・補充するためと考えられるが、事実、熱産生にやや遅れてグルコースから中性脂肪への合成速度が大幅に上昇することが確かめられている（47、55）。更に、グルコースは、脂肪酸がクエン酸回路で速やかに分解されるのに必要なオキサロ酢酸の供給や、嫌気的な解糖によるATP合成のためにも必須である。細胞でグルコースが利用されるには、まずグルコースが細胞膜を通って細胞外から細胞内に取り込まれねばならない。この膜輸送過程は、細胞膜を貫通する輸送蛋白質（GLUT）によっており、脂肪細胞ではグルコースの代謝速度を規定する律速段階のひとつとなっている（16）。褐色脂肪細胞にはGLUTアイソフォームのうちGLUT1とGLUT4が存在しているが、特に後者はインスリンのグルコース取り込み亢進作用の標的分子であり、グルコース代謝の調節に中心的な役割を果たしている（56）。そこで、本章では、BATにおけるグルコース利用とGLUT4が熱産生と関連してどのように調節されているのかを明らかにするために、特に交感神経の役割に焦点を当てて、実験動物としてラットを用い、*in vivo*で以下の研究を行った。1）まず、BATの交感神経が賦活化される生理的刺激の一つである寒冷暴露の条件下で、BATでのグルコース利用とGLUT4の蛋白とmRNAの発現がどのように変化するかを調べた。2）次に、これらに対する交感神経の関与について、神経切除の影響を調べた。3）更に、寄与している交感神経性の因子・機構を明らかにするために、各種カテコールアミン類の投与効果について、同様に検討した。

【材料および方法】

1）供試動物

雌性Wister系ラットを、室温24±1℃、12時間毎の明暗交代の照明条件下（午前7時点燈）で飼育し、体重160～220 gのものを実験に供した。以下記載がない限り、市販固形飼料および水を自由に摂取させ、実験の24時間前から絶食させた。

寒冷に曝露する実験では、室温を4±1℃に設定する以外は同じ条件とした。

2）組織におけるグルコース利用速度の測定

a）心臓カテーテルの留置

ラットをアトロピン（250 μg/kg、腹腔内注射）で前処置後、ペントバルビタール（40 mg/kg、腹腔内注射）で麻酔し、仰臥位に固定した。採血用カテーテル（長さ10 cm、内径0.5 mm、外径 1.0 mm のシリコーンチューブ）を適当な注射針を介して 1 ml の注射器と繋ぎ、ヘパリン（25 units/ml）を含む生理食塩水を満たした。右頸部を約 2 cm 切開し、外頸静脈を周囲組織から剥離、露出後、外頸静脈をピンセットでつまみ上げながら小切開し、そこから採血用カテーテルを右心房に向け挿入した。心臓の動きが伝わるまで挿入後、わずかに戻し（腋窩静脈との合流点より約 1 cm 遠位部に挿入すると約 3.5 cm で右心房に達した）、注射器で容易に採血できることを確認した。次にカテーテルを挿入部で血管に結び固定し、他端は皮下を這わせて耳後部を通し、頭部より外に出し、頭部で皮膚に縫いつけ固定後、ストッパー（採血用カテーテルの内径より、やや外径の大きいチューブの一方を熱でつぶしたもの）でカテーテルに栓をした。すべての切開部を縫合した後、個別ケージで飼育し、3 日後に実験に供した。

b）2-デオキシグルコース（dGlc）の細胞内取込み

グルコースの利用速度を、*in vivo* で個々の臓器ごとに測定するために、Homらの方法（33）を一部改変して用いた。この方法は、非代謝性グルコース誘導体であるdGlcが、グルコースと同じ輸送系で細胞内に取り込まれ、ヘキソキナーゼによりリン酸化されるがそれ以上代謝されず、細胞内に蓄積されることを利用する方法である。

dGlc取り込み量の測定に関する実験は、心臓にカテーテルを留置したラットを24時間絶食後、以下の手順に従って行った。[^{3}H]-dGlc（ARC）（3.7 MBq/ml）と[^{14}C]スクロース（ARC）（370 kBq/ml）の生理食塩水溶液100 μlをカテーテルより注入し、同じカテーテルからただちに、200 μlのヘパリン（25 units/ml）含有生理食塩水をフラッシュした。5、7、9、11、13分後に同じカテーテルより約100 μl採血し、血漿を分離し、^{3}H、^{14}Cの放射能を測定した。最後の採血後ただちにラットを放血屠殺し、各組織を採取し、その重量を測定した。各組織（100～500 mg）を1 N水酸化ナトリウム1 ml（100℃、15分）で溶解し、冷却後、20% 過塩素酸500 μlを加えて遠心（400×g、5分）し、上清（1 ml）にシンチレーター（5 ml）を加え、^{3}H、^{14}Cの放射能を測定した。

細胞外液中に存在する[^{3}H]-dGlcによる誤差を、細胞外に存在する[^{14}C]スクロースにより補正し、細胞内への[^{3}H]-dGlcの取り込み速度定数（Ki）を以下の計算式から算出した。

$$Ki = \frac{Ci_t}{Cp_0 \times (1 - e^{-Kp \times t})}$$

Ki : 取込み速度

Kp : 血漿中からの[^{3}H]-dGlcの消失速度定数（min^{-1}）

Cp_0 : 時間（t = 0 min）における血漿中の[^{3}H]-dGlc濃度（dpm/μl）

Ci_t : 時間（t min）における細胞内の[^{3}H]-dGlc濃度（dpm/mg）

血漿^{3}H値の対数を時間に対してプロットし、最小二乗法で得られる直線の傾きからKpを、また、時間0分のときの数値からCp_0を求めた。Ci_tは以下のようにして求めた。

細胞外液量（μl/mg）＝総組織中の^{14}C量（dpm/mg）÷血漿中の^{14}C量（dpm/μl）

細胞外液中の^{3}H量（dpm/mg）＝細胞外液量（μl/mg）×血漿中の^{3}H（dpm/μl）

Ci_t（dpm/mg）＝総組織中の^{3}H量（dpm/mg）－細胞外液中の^{3}H量（dpm/mg）

3）GLUT4蛋白質の解析

組織中のGLUT4蛋白質を、以下のように組織ホモジネイトを電気泳動した後、GLUT4

に対する特異抗体を用いたWesternblotting法により測定した。

a）組織ホモジネイトの調製

24時間絶食したラットを、放血屠殺後、肩甲間BATを素早く採取し、－70℃で保存した。

BATのホモジネイト調製はGiacobino（25）の方法に従った。氷冷した緩衝液（500 μM塩化カルシウム、1 mM 炭酸水素ナトリウム、200 μM 硫酸マグネシウム、pH 7.5）を試料に加え、ガラスホモジナイザーで破砕後、1,500×gで10分間遠心した。表層の脂肪層を除き、上清を－70℃に保存した。蛋白質の定量はLowryら（44）の方法に従った。

b）ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGEはLaemmliの方法に準じて行った（38）。

［ゲルの作製］　アクリルアミド混合液（30% アクリルアミド、0.8% ビスアクリルアミド）6.0 ml、蒸留水 6.42 ml、1.5 M 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール（Tris）-塩酸（pH 8.9）4.5 ml、10% SDS 180 μlを混合脱気後、N,N,N',N',-テトラメチレンジアミン 18 μl、1.5% 過硫酸アンモニウム900μlを加え混合し、平板ゲル作製用モールドに加えて10% 分離用ゲル溶液を作製した。濃縮ゲル溶液として、上記アクリルアミド混合溶液 1.2 ml、蒸留水 2.5 ml、0.5 M Tris-塩酸 (pH 6.8) 1.9 ml、10% SDS 75 μlを混合脱気後、N,N,N',N',-テトラメチレンジアミン 16 μl、1.5% 過硫酸アンモニウム750 μlを加え混合し、分離用ゲル上に重層した。

［試料溶液の調製］　試料と試料用緩衝液（9% SDS、15% グリセロール、50 mM Tris-塩酸（pH 7.5）、0.05% ブロムフェノールブルー、6% 2-メルカプトエタノール）を、2:1で混合し、100℃、3分間加熱した。

［電気泳動］　ゲルモールドをスラブ電気泳動槽に装着し、試料を添加後、泳動用緩衝液（250 mM Tris-塩酸、10 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、1.9 M グリシン、0.5% SDS、pH 8.3）中で、50 mA 2時間泳動した。

c）特異抗体の作製

抗体の作製は、Gullick（28）の方法に準じて行った。GLUT4の498～509番目のアミノ酸に相当する、C末端側のペプチド（TELEYLGPDEND）を合成した（東レ基礎研究所）。このペプチド7 mgをカサガイヘモシアニン（Calbiochem）7.5 mgに、グルタルアルデヒド

を用いて結合させ、使用するまで−20℃で保存した。この複合体の一部（ペプチド量として1 mg）をFreundの完全アジュバンドと混合し、ウサギに免疫した。初回投与から14日、及び28日後に、Freundの不完全アジュバンドと初回と同じ量の抗原を混合して追加免疫を行い、35日以降、イムノブロット法により抗体価が上昇していることを確認して、抗血清を分離した。

d）Westernblotting法によるGLUT4蛋白質の測定

SDS-PAGE後、ゲルとニトロセルロース膜（Advantec東洋）を密着し、転写用緩衝液（20% メタノール、10% リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（10 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2））中で、ゲル内蛋白質を、膜上に電気的に転写した。この膜を6% ウシ血清アルブミン（BSA）（Sigma）を含むPBSで30分間ブロッキング後、6% BSAを含むPBSで200倍に希釈したウサギ抗GLUT4血清と37℃、2時間反応させた。つぎに、PBSで各15分間、5回洗浄後、1.85 kBq/ml [^{125}I]-プロテインA（ICN）と4% BSAを含むPBSと2時間反応後、1% Triton X-100を含むPBSで5分間、5回洗浄した。この膜を自然乾燥後、X線フィルム（Hyperfilm-MP、Amarshem）を密着し、増感紙を当てて−80℃で5日間感光させた。オートラジオグラフィー後、バンドに該当する膜部分を切り取り、ガンマカウンター（ARC-600、Aloka）でその放射能を測定した（37）。

4）GLUT4 mRNAの解析

GLUT4 mRNA を、以下のように組織から抽出したRNA を電気泳動した後、GLUT4 cDNA プローブを用いたNorthernblotting法で測定した。

a）全RNAの調製

RNA抽出用試薬の調製には、一晩放置した0.1% ジエチルピロカーボネイトを含む溶液をオートクレーブ（120℃、20分）にかけてから用いた。また、チップやチューブ類も全てオートクレーブ（120℃、20分）にかけたものを使用した。

24時間絶食したラットを放血屠殺後、組織を素早く採取し、液体窒素中で凍結した。採取臓器からのRNA抽出はBirnboim（8）の方法に準じて行った。凍ったままの臓器（100〜500 mg）を50 ml 遠心管に入れ、RES-1（500 mM 塩化リチウム、1 M 尿素、1% SDS、20

mMクエン酸ナトリウム、2.5 mM シクロヘキサンジアミン四酢酸、pH 6.8）を10 ml 加えた。ポリトロン（Kinematica）で1分間破砕後、プロティナーゼK（和光）を50 μg/mlになるように加え、50℃で1時間反応させ蛋白質を消化した。この臓器抽出液に2.5容のエタノール、1/10容の2 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）を加え、−20℃に冷却し核酸を沈澱させた。これを12,000×g、4℃、20分間遠心し、その沈澱物に、再度先のRES-1を 1 ml 加え、ポリトロンで30秒間破粋後、プロティナーゼKを50 μg/mlになるように加え、50℃で30分間反応させた。この溶液に等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1）混合液を加え、はげしく撹拌後、遠心し水層を回収した。中間層がなくなるまでフェノール抽出を繰り返した後、等量のクロロホルム／イソアミルアルコール（24:1）混合液を加えて同様の操作を行い溶液中のフェノールを除去した。次にこの溶液に等量の5 M 塩化リチウム／エタノール（3:2）混合液と1/100容の2 M 酢酸を加え、0℃に一晩保存してRNAを塩化リチウムと共沈させた。この沈澱したRNAを遠心して回収し、少量のCCS溶液（1 mM クエン酸ナトリウム、1 mM シクロヘキサンジアミン四酢酸、0.1% SDS）に溶解し1/5容の 2 M 酢酸ナトリウムと2.5容のエタノールを加えてエタノール沈澱し、塩化リチウムを除去した。沈査は少量の蒸留水に溶解し、260 nmでの吸光度を測定して濃度を決定後、−70℃で保存した。

b） poly(A) RNAの精製

poly(A) RNAの精製は、AvivとLeder（5）らの方法に準じて、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにより行った。まずオリゴ（dT）セルロース（Type2、Collaborative）を0.1 N 水酸化ナトリウム、続いて結合溶液（500 mM 塩化リチウム、1 mM EDTA、0.1% SDS、10 mM Tris-塩酸、pH 7.5）で洗浄した。RNAを70℃で加熱後、急冷し一本鎖に解離させ、結合溶液に懸濁したオリゴ（dT）セルロースと室温で結合させた。次に塩類溶液（150 mM 塩化リチウム、0.1% SDS、10 mM Tris-塩酸、pH 7.5）で洗浄し、poly(A)を持たないRNAを除去した。最後にpoly(A) RNAを溶出液（2 mM EDTA、0.01% SDS、10 mM Tris-塩酸、pH 7.5）で溶出し、溶出画分をエタノール沈澱した。沈査は少量の蒸留水に溶解し、260 nmでの吸光度を測定して濃度を決定後、−70℃に保存した。

c）cDNAの調製

［実験に供したcDNAについて］

i）GLUT4：ラットGLUT4 cDNAフラグメント（+1-+1330 bp）（7）。京都大学医学部、清野裕博士より供与。

ii）β-actin：ヒトβ-actin cDNAフラグメント（+134-+576 bp）（52）（日本ジーン）。

［cDNAプローブの作製］各cDNAをマルチプライム法（20）によって、^{32}Pで標識した。すなわち、cDNAをマルチプライムキット（Amarshem）を用いて、α-[^{32}P］dCTP（37 kBq/μl）（Bresatec）で標識し、遊離の^{32}PをQuick Spin Columns（Sephadex G-50、Boehringer Mannheim）で除去した。得られたプローブの放射能を液体シンチレーションカウンター（LSC-750、Aloka）で測定した。

d）Northernblotting法によるGLUT4 mRNAの測定

RNA又はpoly(A) RNAをRNA泳動用緩衝液（20 mM 3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸、5 mM 酢酸ナトリウム、100 μM EDTA、pH 8.0）、50% ホルムアミド及び6.5% ホルマリンを含む溶液中で70℃、3分間加熱後、氷上で急冷し変性させた。このmRNAを、サブマリン型電気泳動槽を用い1% アガロースゲル中で、100 μg/ml 臭化エチジウムを含むRNA泳動用緩衝液を電極槽液として100 V、3時間電気泳動した。泳動終了後、長波長紫外線（304 nm）下でゲルの写真をとった。ゲルを20×SSC（3 M 塩化ナトリウム、300 mM クエン酸ナトリウム）に浸した濾紙の上にのせて、さらにその上にナイロンメンブレンフィルター（Hybond N、Amarshem）、濾紙、ペーパータオル、ガラス及びおもりの順にのせ、一晩静置することによりゲル中のRNAをナイロンメンブレンフィルターに移行させた。RNAが吸着したフィルターを2× SSCで洗浄後、紫外線照射によりRNAをフィルターに固定させた。このフィルターをハイブリダイゼーション液（50% ホルムアミド、5× Denhardt's 溶液（0.1% Ficoll、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% BSA）、5×SSPE（750 mM 塩化ナトリウム、50 mM リン酸二水素ナトリウム、5 mM EDTA）、200 μg/ml サケ精子DNA（Sigma）、0.1% SDS）に浸し、42℃で最低2時間インキュベーション後、^{32}Pを標識したcDNAプローブを1～2×10^{6} cpm/mlとなるように加えて、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応後、フィルターを2×SSC及び 0.1% SDSを含む溶液中で室温、15分間、2回洗浄し、続いて0.1×SSC及び 0.1% SDSを含む溶液中で55℃、30～60分洗浄した。洗浄したフィルターを、増感紙を用いてX線フィルム（X-Omat、Kodak）に－80℃で

一晩から二晩感光後、感光したフィルムをデンシトメトリーにかけ解析した。

5）　神経の切除

肩甲間BATの腹側には、中頚神経節、星状神経節および第2～5胸神経節からでた交感神経繊維が、第1～5肋間神経の枝として入り込んでおり、この5本の肋間神経を切断することにより肩甲間BATの除神経が可能である。ラットを、硫酸アトロピン（250 μg/kg）で前処置した後、ペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg）で麻酔し、伏臥位で保定した。肩甲間に小切開を加え、右側肩甲間BATと腹側の筋肉の間を剥離し、上記5本の肋間神経を分離切断した（denervated BAT）。左側BATは、対照とするため神経の切断は行なわなかった（intact BAT）。

6）　アドレナリン性受容体各種作動薬の長期投与

アドレナリン性受容体作動薬を持続的に長期間にわたって投与するためにAlzet浸透圧ポンプ（model 2002、Alza）を用いた。このポンプは体液とポンプ内部の浸透剤との間の浸透圧差を利用して、ポンプ内部の薬液を 500 nl/時 の速度で、2週間持続的に排出できるものである。このポンプに、300 mM の各作動薬（ノルアドレナリン、イソプロテレノール、フェニレフリン）をアスコルビン酸（100 mM）、4,5-ジハイドロキシ-1,3-ベンゼン-ジスルフォン酸（20 mM）を含む水溶液に溶かして充填し、ラットの第1～2腰椎上の皮膚を 1 cm 切開し、皮下に挿入した。この条件で、毎時1.5 μmoleの作動薬が放出される。

7）実験データの統計計算

実験データは平均値±標準誤差で表示した。実験群間の有意差検定はStudent's-*t* 検定により行った。

【結　果】

1）組織でのグルコース利用に対する寒冷曝露の効果

寒冷曝露はBATでの熱産生を亢進させる生理的条件の代表例である。そこで最初に、ラットを4℃環境下に10日間置いた後に、生体組織でのグルコース利用を、非代謝性グルコース誘導体であるdGlcを用いて調べた。組織は、BAT（肩甲間部）、WAT（子宮周囲部）、骨格筋（ヒラメ筋、腓腹筋）、心臓（全部）、小腸（回腸の一部）、腎臓（全部）、肝臓（外側左葉の一部）、脳（大脳）を、それぞれ全組織含む形で採材した。

室温（24℃）で飼育した動物の組織におけるグルコース利用速度は、WATが著しく低い値をとる以外は、各組織ほぼ同程度であった（Fig1-1）。しかし、4℃で10日間飼育するとBATにおけるグルコース利用が著しく亢進した（約4.5倍）。WATでもやはり上昇したが、その程度は少なく（約2.5倍）、脳では逆に下降する傾向を示した。また、骨格筋など他の組織ではほとんど変化しなかった。このように、寒冷曝露によって、BATでのグルコース利用が特異的に亢進することが示された。

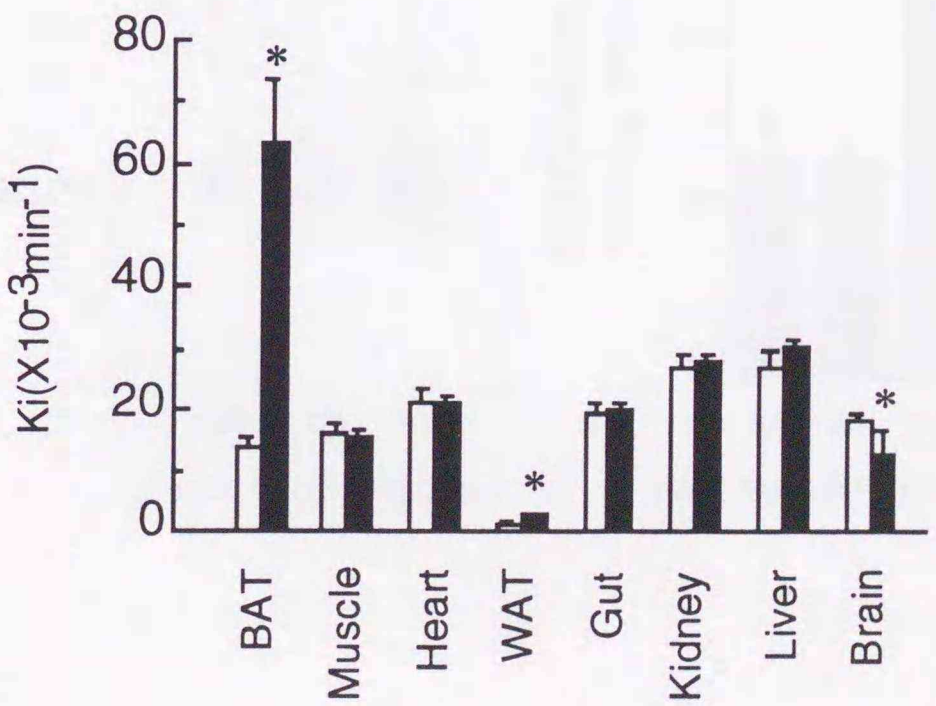


Fig1-1.　組織でのグルコース利用に対する寒冷曝露の効果
（□）は24℃飼育群、（■）は10日間の寒冷曝露群を表す。測定値はラットについて平均値±標準誤差（n=6）で表した。＊は各24℃飼育群の値との有意差P<0.05を表す。

2）寒冷曝露時のGLUT4発現量の変化

上述の寒冷曝露によるグルコース利用の増加のメカニズムを解明する目的で、脂肪細胞でのグルコース利用の初発段階であるGLUT4の変化について調べた。

まずGLUT4蛋白質について、ラットGLUT4C末端合成ペプチドをウサギに免疫して得られた抗ラットGLUT4血清を用いて、Westernblotting法で調べた。Fig1-2に示すように、寒冷曝露前でも、GLUT4は単一バンドとして同定され、BATにかなりの量存在することが確認された。そして、ラットを10日間寒冷に曝すとGLUT4蛋白質の発現量は約2倍に増加した（Fig1-2）。

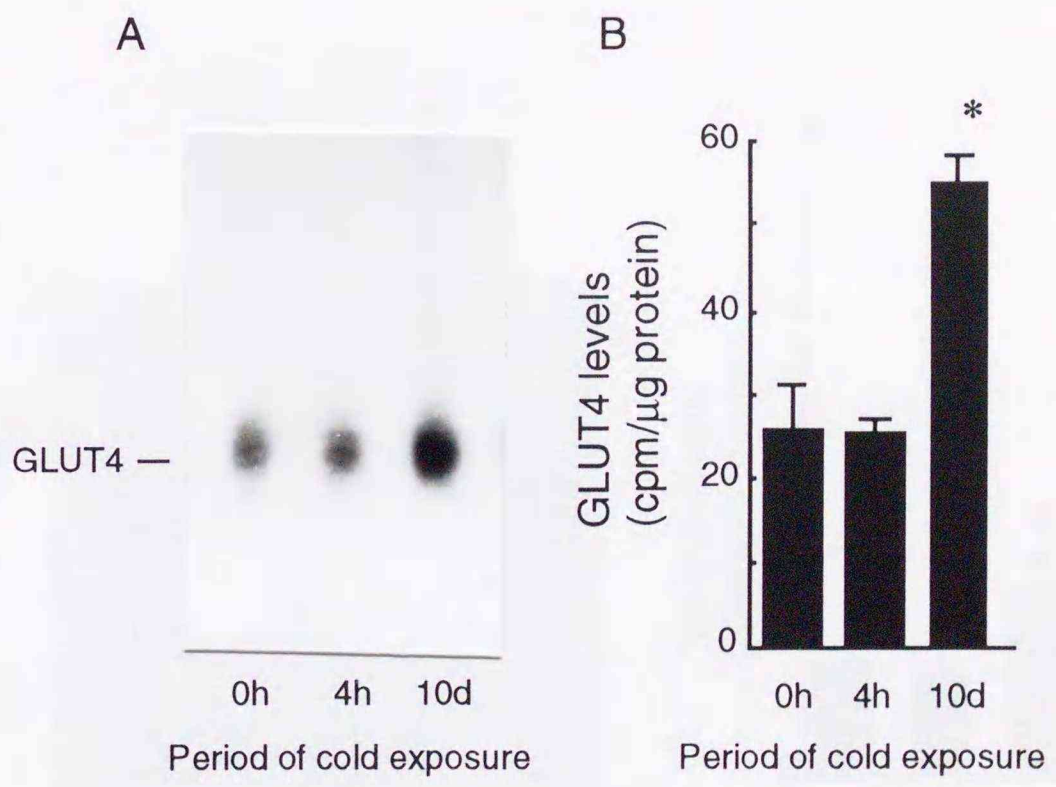


Fig1-2. 寒冷環境下でのBATにおけるGLUT4 蛋白質の量的変化
蛋白質試料（30 μg／レーン）を電気泳動後、「材料と方法」の項に記述した方法でWesternblottingした（A）。GLUT4に相応するバンドの放射活性を測定した。実験値は平均値±標準誤差で表した（n=3）（B）。＊は0時間群の値との有意差P<0.05を表す。

さらにこの増加が蛋白合成によるものかどうかを調べるために、GLUT4 mRNA の発現量についても、ラットGLUT4 cDNA プローブを用いてNorthernblotting法によって調べた。GLUT4 mRNA もGLUT4蛋白質と同様、寒冷曝露前でも検出同定できたが、寒冷に曝すと、24時間後から GLUT4 mRNA 発現量の増加が見られ、10日後には約2.5倍となった（Fig1-3）。一方GLUT4を発現している他の組織（WAT、骨格筋、心臓）に関しても同様に調べたところ、BATで見られたような増加は見られず、寒冷曝露によって有意の変化は認められなかった（Fig1-4）。これらのことから、慢性的な寒冷曝露により見られるグルコース取り込みの増加は、GLUT4蛋白質の新規合成を伴うGLUT4総量の増加によるものであることが示唆された。また、この変化は、BAT特異的であり、その他の組織では見られない。

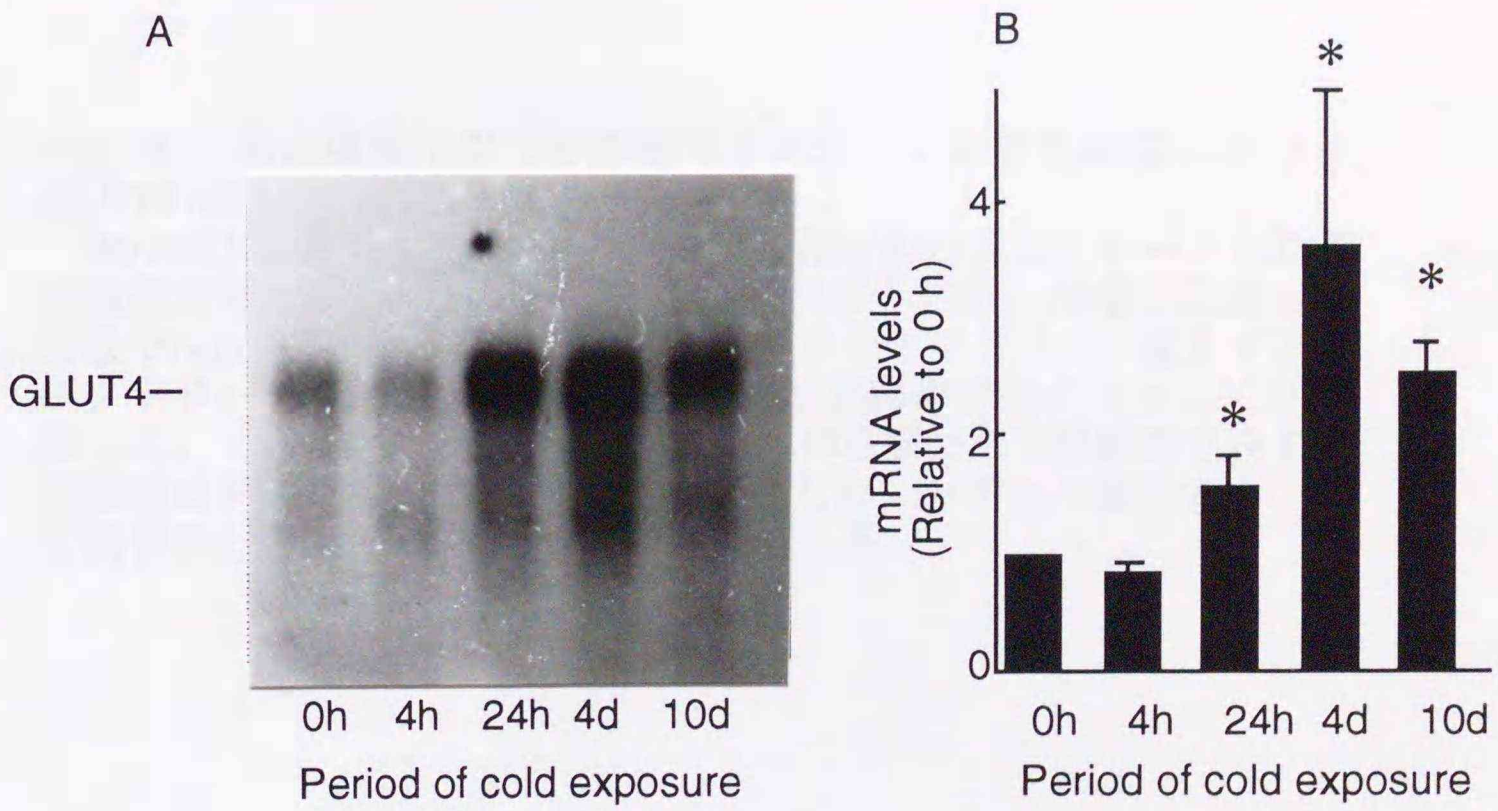


Fig1-3. 寒冷環境下でのBATにおけるGLUT4 mRNAの量的変化
Poly(A)RNA試料（4 μg／レーン）を電気泳動し、「材料と方法」の項に記述した方法でNorthernblottingした（A）。そのオートラジオグラフィー像をデンシトメトリーにかけ、各寒冷曝露時の値を0時間群を１として比で表した（B）。対照群は24℃で飼育した群である。実験値は平均値±標準誤差（n=4）で表した。＊は0時間群の値との有意差P<0.05を表す。

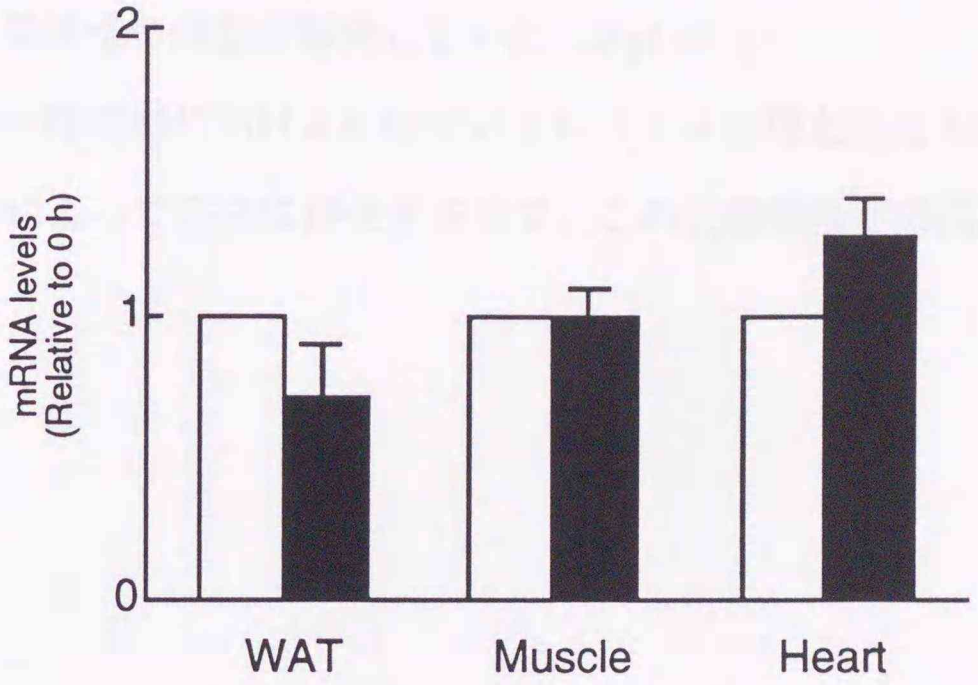


Fig1-4.　寒冷環境下でのその他のインスリン応答性臓器における GLUT4 mRNAの量的変化

WATはPoly(A) RNAを、骨格筋、心臓は全RNAを、１レーンあたり各組織で等量のRNAを電気泳動し、「材料と方法」の項に記述した方法でNorthernblottingした。そのオートラジオグラフィー像をデンシトメトリーにかけ、各寒冷曝露時の値を寒冷曝露前の１として比で表した。（□）は24℃飼育群、（■）は10日間の寒冷曝露群を表す。実験値は平均値±標準誤差（n=4）で表した。いずれの臓器でも、24℃飼育群と寒冷曝露群の数値間に有意差は無い。

3）寒冷曝露時のグルコース利用並びにGLUT4発現の変化に及ぼす交感神経の影響

BATにおける熱産生を支配しているのは、交感神経であることがよく知られており、しかも、寒冷曝露時にはBATの交感神経活動が上昇することも報告されている（70）。従って、今回見られたグルコース利用並びにGLUT4発現の増加においても、交感神経の関与が予想された。肩甲間BATには、交感神経が第1～第5肋間神経枝として入り込んでおり、

視覚的に確認することが容易であるため、この5本の神経枝を外科的に切断して寒冷曝露の影響を調べた。すると、非切断の intact BAT では、寒冷曝露によってグルコース利用が大幅に亢進するのに対して同じ個体の denervated BAT では24℃の時と全て変わらなかった。（Fig1-5）。さらに、GLUT4 mRNAに関しても同様に調べたところ、denervated BAT においてはmRNA発現量の増加が消失していた（Fig1-6）。

このように、寒冷曝露時におけるBATでのグルコース利用亢進と GLUT4 mRNA の増加は交感神経の切断によって完全に消失するので、この交感神経が必須であることが示された。

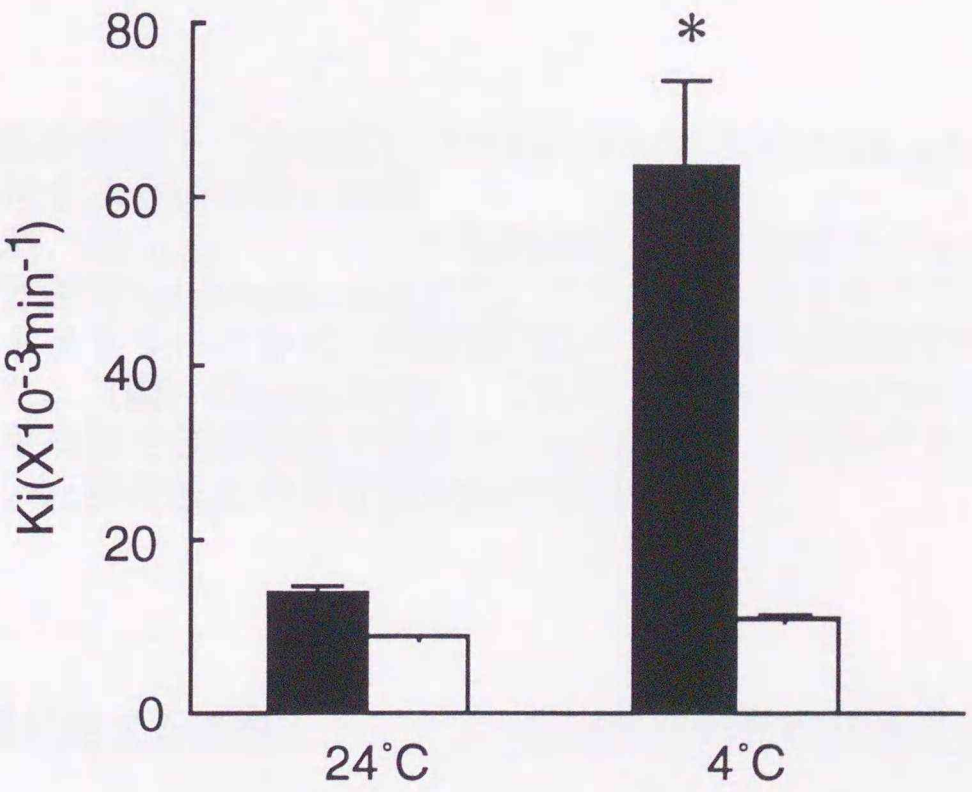


Fig1-5. 寒冷環境下（10日間）でのBATにおけるグルコース利用に対する交感神経の影響

（■）はintact BAT 、（□）はdenervated BATを表す。実験値は平均値±標準誤差で表した（n=6）。＊はそれぞれ24℃で飼育されていた群の値との有意差P<0.05を表す。

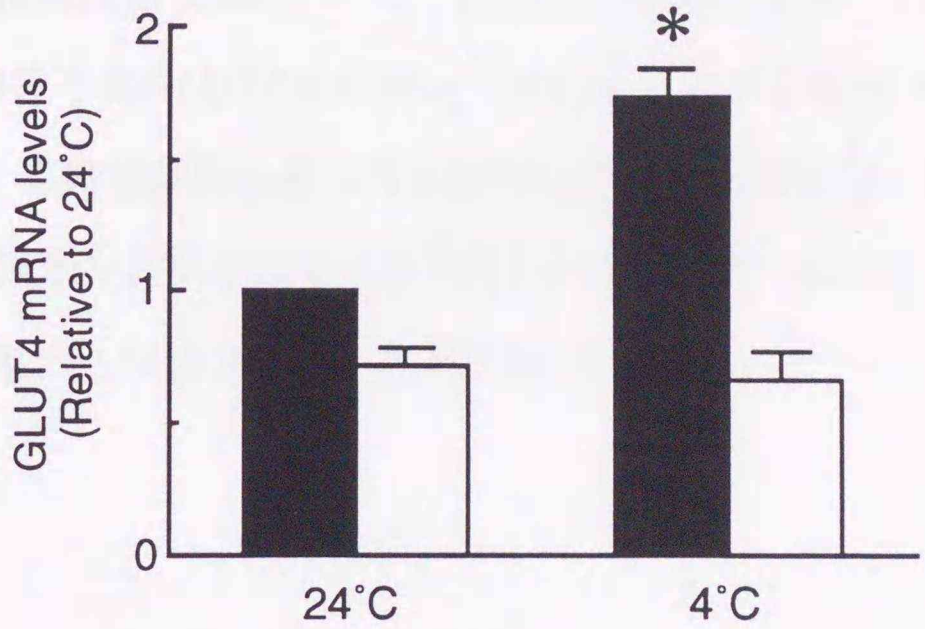


Fig1-6. 寒冷環境下（10日間）でのBATにおけるGLUT4 mRNAの量的変化に対する交感神経の影響

RNA試料（40 μg／レーン）を電気泳動し、「材料と方法」の項に記述した方法でNorthernblottingした。そのオートラジオグラフィー像をデンシトメトリーにかけ、寒冷曝露時の値は寒冷曝露前を1として比で表した。（■）はintact BAT、（□）はdenervated BATを表す。実験値は平均値±標準誤差で表した（n=6）。＊はそれぞれ24℃で飼育されていた群の値との有意差P<0.05を表す。

4）GLUT4蛋白質量に対する各種アドレナリン性受容体作動薬長期投与の効果

上述のようにBATにおけるグルコース利用とGLUT発現の亢進には、交感神経が重要であることが明らかになったが、これをさらに確認するために、寒冷曝露の代わりに室温（24℃）下で、交感神経伝達物質であるノルアドレナリンや受容体作動薬の投与効果について検討した。薬物の投与には、寒冷曝露時の交感神経の持続的興奮を再現するために、浸透圧ポンプを用いて毎時約 1.5 μmole の割合で放出されるように設定し、10日間の持続

投与を行なった。薬物は、ノルアドレナリンの他に、α作動薬であるフェニレフリン、β作動薬であるイソプロテレノールを使用した。

このようにノルアドレナリンを慢性的に投与すると、BATでのGLUT4蛋白質量が寒冷曝露時と同様に増加し、1.5倍程になった（Fig1-7）。これと同様の効果は、イソプロテレノール投与においても得られたが、フェニレフリン投与ではGLUT4蛋白質は対照群と差が無く、無効であった。なお、この様な変化は、BATに至る交感神経枝を切断しているかどうかにかかわらず同程度に見られた。一方、BAT以外の組織においては、WAT、骨格筋、心臓いずれでも薬物投与はGLUT4蛋白質レベルにほとんど影響を与えなかった（Fig1-8）。このことから、寒冷曝露時に見られるBATでのGLUT4蛋白質の増加はBATに特異的であり、交感神経終末から放出されるノルアドレナリンによっており、しかもβ受容体を介して、褐色脂肪細胞内へ伝達されることが示唆された。

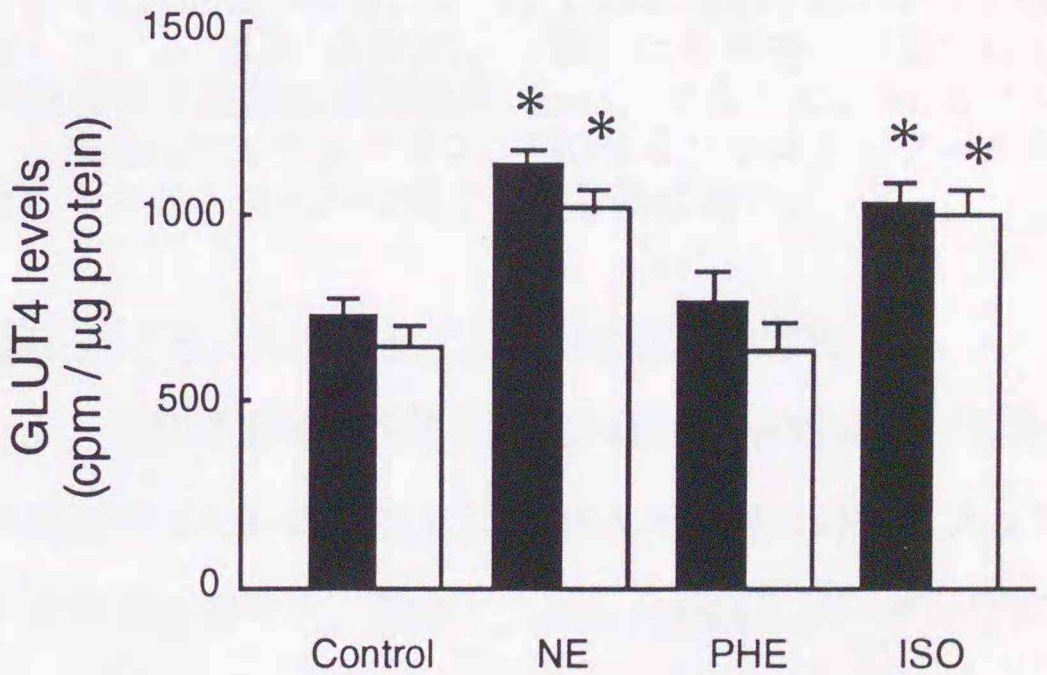


Fig1-7. BATにおけるGLUT4蛋白質の量的変化に及ぼす各種アドレナリン性受容体作動薬の効果
蛋白質試料（10μg／レーン）を電気泳動後、「材料と方法」の項に記述した方法でWesternblottingした。GLUT4に相応するバンドの放射活性を測定した。実験値は平均値±標準誤差（n=5）で表した。NEはノルアドレナリン、PHEはフェニレフリン、ISOはイソプロテレノールを表す。（■）はintact BAT、（□）はdenervated BATを表す。＊はコントロールの値との有意差P<0.05を表す。

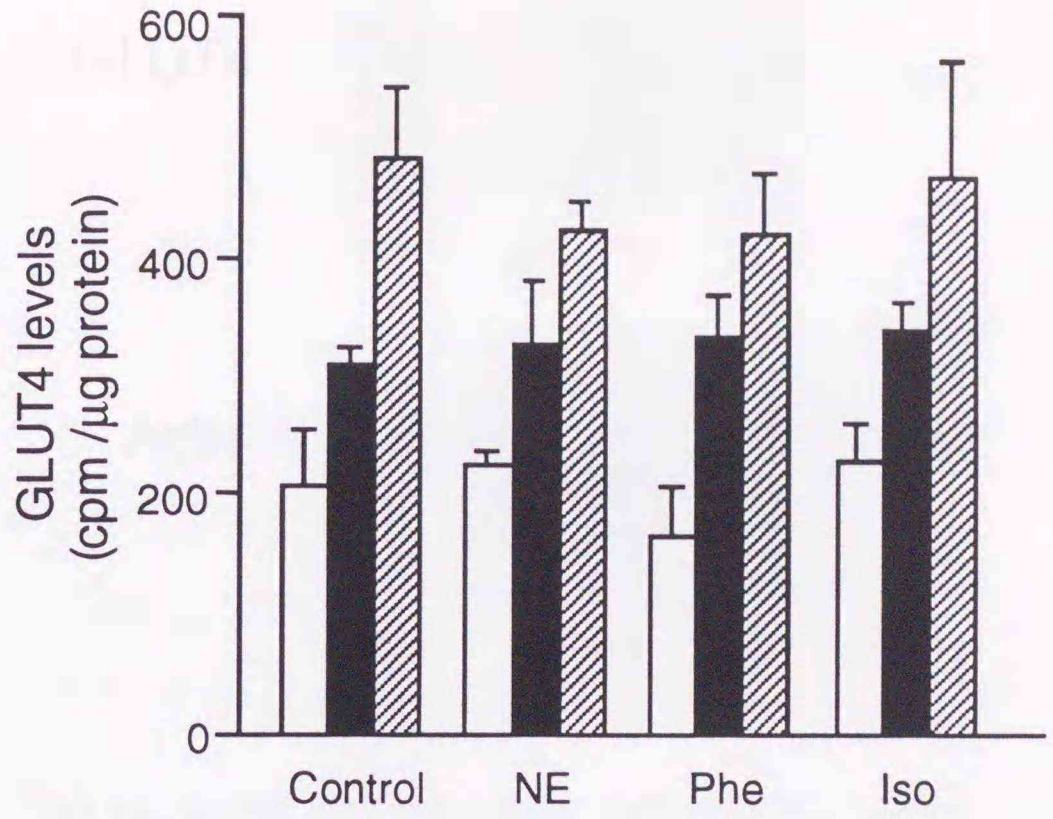


Fig1-8. その他のインスリン応答性臓器におけるGLUT4蛋白の量的変化に及ぼす各種アドレナリン性受容体作動薬の効果
蛋白質試料（10 μg／レーン）を電気泳動後、「材料と方法」の項に記述した方法でWesternblottingした（GLUT4に相応するバンドの放射活性を測定した）。（□）はWAT、（■）は骨格筋、（▨）は心臓を表す。実験値は平均値±標準誤差（n=5）で表した。NEはノルアドレナリン、PHEはフェニレフリン、ISOはイソプロテレノールを表す。各臓器ともコントロールの値との有意差は無い。

5）<u>GLUT4 mRNA発現量に対するノルアドレナリン長期投与の効果</u>

Fig1-7で見られた変化が、寒冷曝露時と同様にGLUT4蛋白のmRNAからの合成亢進によるものであるかどうかを確認するために、GLUT4 mRNA 発現量に対するノルアドレナリンの長期投与（10日間）の効果を調べた。同時に、actin mRNAもノーザンブロッティングを行う際の内部標準として測定した。Fig1-9に示すようにBATのGLUT4 mRNAのレベルも、GLUT4蛋白質と同様に交感神経枝の有無に拘らずノルアドレナリン投与によって増加した。一方、GLUT4 mRNA を測定したメンブランをリハイブリダイゼーションした後、actin mRNAの発現を調べたが、ノルアドレナリン投与によっては変化しなかった。一方、骨格筋においてはGLUT4、actin 共にmRNA発現量はノルアドレナリン投与の影響は全て見られなかった（Fig1-10）。従って、ノルアドレナリン投与によるGLUT4の発現増加は、BATに特異的であることが確認された。



Fig1-9. BATにおけるGLUT4 mRNAの量的変化に及ぼすノルアドレナリンの効果

全RNA（10 μg／レーン）を電気泳動後、「材料と方法」の項に記述した方法でNorthernblottingした（n=2）。代表的なバンド像を示す。レーン1とレーン2はコントロール群、レーン3とレーン4はノルアドレナリン投与群、レーン1とレーン3はintact BAT、レーン2とレーン4はdenervated BATを表わす。

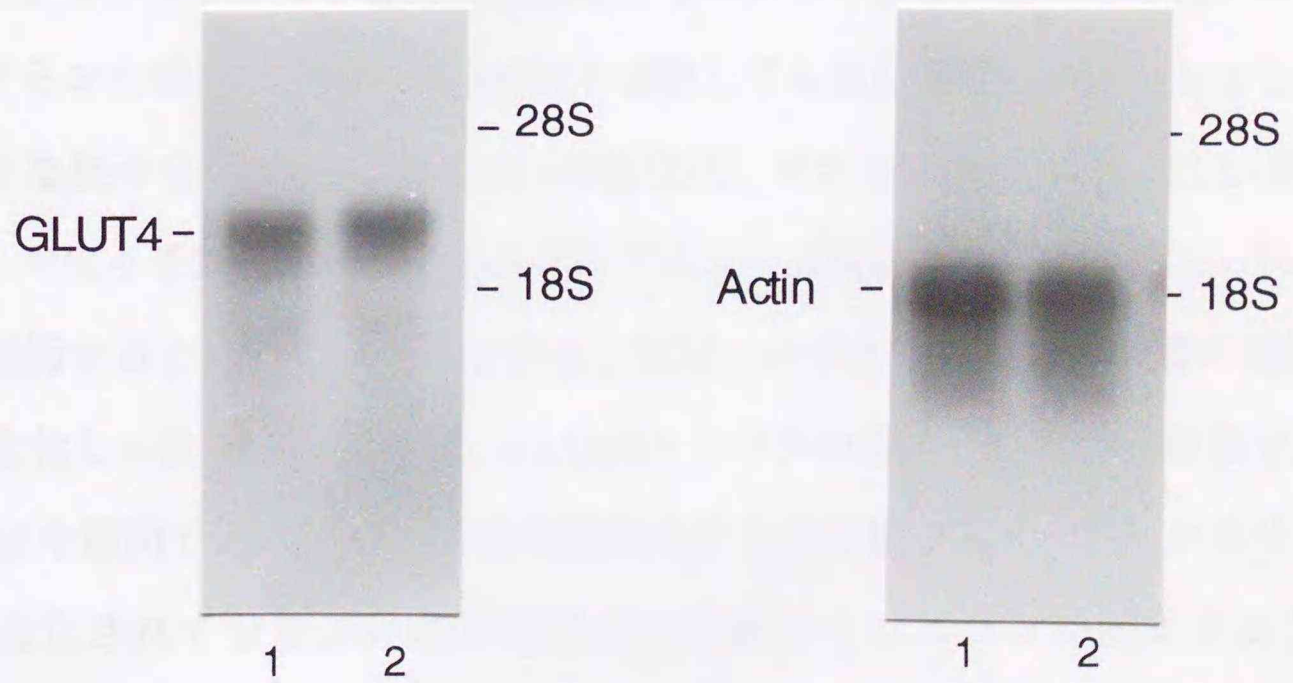


Fig1-10. 骨格筋におけるGLUT4 mRNAの量的変化に及ぼすノルアドレナリンの効果

全RNA（10 μg／レーン）を電気泳動後、「材料と方法」の項に記述した方法でNorthernblottingした（n=2）。代表的なバンド像を示す。レーン1はコントロール群、レーン2はノルアドレナリン投与群を表す。

【考　察】

BATでの熱産生を亢進させる代表的な生理的刺激である寒冷暴露を行うと、BATでのグルコース利用が増加することは、既に報告されているが（59、61、67、68）、今回の結果でも、ラットを４℃で10日間飼育すると、BATでのdGlcの取り込みが大幅に増加することが確認できた。このグルコース利用の亢進はBATに特異的であり、WATや筋肉組織では起こらない。また、他のBATの機能と同様に、この組織に分布している交感神経を切除すると寒冷刺激の効果は消失することも、従来の報告とおおむね一致している（61）。本研究ではこの細胞分子機構を明らかにするために、脂肪細胞でのグルコース利用の律速段階に当たるGLUT4に注目して、その蛋白質とmRNAの発現を調べ、以下の新知見を得た。１）寒冷暴露によるグルコースの利用亢進と並行して、BATでのGLUT4の蛋白質とmRNAの量が増加した。２）WATや骨格筋、心臓でのGLUT4は変化しなかった。３）BATでのGLUT4の増加が交感神経の切除により完全に消失した。４）室温で交感神経伝達物質であるノルアドレナリンを投与すると、寒冷暴露の効果が再現された。５）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同様の結果が得られたが、αアドレナリン作動薬であるフェニレフリンは無効であった。６）これらカテコールアミンの効果はBATの交感神経を切除してもなんら影響されなかった。

このような様々な条件下でのGLUT4の変化は、グルコース利用の変化とほぼ並行しているので、やはり予想したとおりBATでのグルコース利用の亢進は主にGLUT4蛋白質の量的増加に起因すると考えることができる。更に、いずれの場合も蛋白質の増加はGLUT4 mRNAの変化と一致しているので、GLUT4タンパクの合成が促進した結果であると思われる。WATや筋肉でのGLUT4の合成を活性化する最も重要な因子がインスリンであることは現在確立されており、絶食や糖尿病など血中インスリンが低下するときには、GLUT4量も減少する（36）。これはBATにおいても同様で、インスリンによってGLUT4遺伝子の転写が亢進することが知られている（11）。しかし、本研究で行った寒冷暴露においては、血中インスリン濃度は上昇せずむしろ低下し（61、66）、更にGLUT4の増加はWATや筋肉では見られずBATに特異的である。これらの事実は、インスリンをはじめとする液性因子よりは、むしろBATに特異的な神経性機構の役割を示唆するものである。実

際にBATでのグルコース利用はインスリンに加えて、交感神経により直接促進されることは、本研究でも確認された。更に、GLUT4についても、蛋白質、mRNA共に寒冷暴露後の増加は交感神経を切除すると消失し、ノルアドレナリン投与によって回復した。従って、BATにおけるGLUT4の合成亢進は、交感神経のノルアドレナリンの作用によると結論することができる。BATでの蛋白質合成が交感神経によって活性化されることは、ミトコンドリアのアンカップリングプロテイン（9）、リポプロテインリパーゼ（48）、サイロキシン5'-脱ヨード化酵素（30）等、他にも多くの事例で知られており、最終的には、寒冷順化におけるBATの肥大に至る過程と考えられる。なお、このことは、BATでの蛋白質合成の活性化には他の液性因子が不要であるということを意味するものではない。実際、ノルアドレナリンの効果は甲状腺ホルモンによって更に増強されることが知られており（6）、ノルアドレナリンは必須の因子であっても十分因子であるわけではなさそうである。*in vivo*での実験ではこれを解析するのは難しく、分離した細胞等を用いた*in vitro*での研究が必要である。

ノルアドレナリンの投与効果は、イソプロテレノールによって完全に再現することができたがフェニレフリンは全く無効であった。従って、ノルアドレナリンのGLUT4合成亢進効果は、大部分β受容体を介した作用によっていると思われる。アンカップリングプロテインをはじめとする多くのBAT蛋白質の合成はβ作用によって亢進することが知られているので、GLUT4についても同様であることが明らかとなったことになる。このβ受容体については、第2章で詳細に検討する。BATにはα受容体も存在しており、熱産生機能の一部はα作用に依存することも知られているが（58）、少なくともGLUT4に関しては、これの関与は少ないと結論できる。

交感神経の終末からは、ノルアドレナリンだけでなくニューロペプチドYやアデニンヌクレオチド等も放出されており、神経伝達物質あるいはneuromodulatorとして働くと言われている（12）。今回のGLUT4については、ノルアドレナリンやイソプロテレノールの投与効果は、交感神経がintactでも切除されていても全く同様に観察された。この結果は、交感神経のGLUT4発現に対する促進作用はもっぱらノルアドレナリンによっており、他の交感神経因子は少ないことを示している。GLUT4に限らず、BATの機能に対するノルアドレナリン以外の交感神経因子の作用やその生理的役割については、ほとんど知見が無い

のが現状である。BATで熱産生が起こると組織の血流が増加し、暖めた血液を速やかに全身に回すと共に熱産生に必要な酸素などの大量供給を支えるが、このようなBATでの血流調節にニューロペプチドYなどが関与している可能性もあり、今後の研究が必要である。

今回、GLUT4合成の交感神経性の促進はBATでのみ見られ、同じ脂肪組織であるWATや、筋肉では影響が無かった。これは、インスリンがいずれの組織にたいしても有効であるのと対照的である。BATはWATに比べて交感神経の分布がはるかに密なので、交感神経の効果がBATのみに現れるのは一見当たり前のようにも思えるが、ノルアドレナリンを投与してWATや筋肉にも同じように作用させても、やはりGLUT4の発現はBATでのみ増加した。従って、BATには他の組織と異なる何らかのGLUT4発現調節の機構が備わっていると考えざるをえない。おそらくBAT特異的なDNA結合蛋白質（転写因子）が係わっているのであろうが、その実体は不明である。

【小　括】

動物を寒冷暴露すると、交感神経の活性化と共に熱産生部位であるBATでのグルコース利用が特異的に亢進する。この細胞分子機構を明らかにするために、BATでのグルコース利用の律速段階にあたるグルコース輸送担体GLUT4に着目し、ラットでの*in vivo*の実験を行い、以下の結果を得た。

1）ラットを常温（24℃）から4℃の寒冷環境下に移して10日間飼育すると、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も並行して増加していた。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。

2）BATで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。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、WATや筋肉のGLUT4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。

3）ノルアドレナリンの代わりにβ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っていると思われる。

4）これらの結果を総合して、寒冷暴露時にはBATの交感神経活動が亢進し、放出されたノルアドレナリンが褐色脂肪細胞のβ受容体に作用してGLUT4の合成を促進しこの組織でのグルコース利用を高めるものと結論した。

第２章　培養褐色脂肪細胞におけるグルコース輸送とアドレナリン性β3受容体

【序　文】

第1章において、寒冷曝露時に見られるBATでのグルコース輸送亢進は、GLUT4蛋白の合成亢進によるものであり、これが交感神経からのノルアドレナリンのβ作用によって調節されていることが示された。ところで、ノルアドレナリンのβ作用には、従来、2種の受容体、β1、β2受容体を介するものが良く知られている。β1作用は心拍数の増加、β2作用は気管平滑筋の弛緩などが著明な作用である。脂肪細胞での脂肪分解応答についても、主にβ1作用によるとされてきた。しかし、薬理学的な解析を詳細に行うと脂肪分解応答は必ずしも典型的なβ1、β2作用のみでは説明できないことが判明し、別のタイプのβ受容体の存在が予想された。そして、実際に、β1とβ2受容体に続いて、脂肪細胞からβ3受容体cDNAがクローニングされ、その存在が立証された（3、26、27、39）。BATには3種のβ受容体とも存在しており、個体を用いた*in vivo*実験では、β3受容体に特異的な作動薬を投与すると、BATでのグルコース利用やGLUT4発現が亢進し、ノルアドレナリンのβ作用を再現することが報告されている（4、41、43、50）。しかしながら、これらの報告は組織レベルで行われた実験であり、細胞を用いたものではない。これまでのところ、β3作用によるグルコース利用については、褐色脂肪細胞を用いてはよく調べられていない。

BATを細胞レベルで解析する場合、分離細胞を用いる方法、細胞株を用いる方法、初代培養細胞を用いる方法の三つが考えられる。これらの方法は、それぞれに長所と短所をもっている。すなわち分離細胞を用いる方法では、採取してきた細胞が数時間しかもたないため、長時間の実験、観察が不可能である。この点は細胞株を用いれば克服できるが、現在までのところ適当な褐色脂肪細胞株は得られていない。従って初代培養細胞を用いる方法は、1989年 Rehnmark らによって報告されて以来、マウスやハムスターの褐色脂肪細胞の初代培養系が*in vitro*の実験系として用いられている（57）。最近、Shimizuらはラットの肩甲間BATより前駆脂肪細胞を含むStromal-Vascular Cellsを分離培養し、デキサメサゾンを添加すると多房性の脂肪滴を貯留するようになり、インスリンやノルアドレナリンに対

する応答性をもつ脂肪細胞に分化することを報告している（63）。

そこで本章では、BATにおけるグルコース利用とβ3受容体の関係を細胞レベルで明らかにすることを目的として、この初代培養褐色脂肪細胞を用いてグルコース利用やGLUT、各β受容体の発現を比較検討した。

【材料および方法】

1）供試動物

雌雄のSDラットを、室温24±1℃、12時間毎の明暗交代の照明条件下（午前7時点燈）で飼育し、市販固形飼料および水を自由に摂取させた。8～16週令の雌雄を用い自然交配させ、得られた新生仔（生後1～3日目）を実験に供した。

2）褐色脂肪細胞の初代培養

Shimizuらの方法に従って行った（63）。まず、手術に用いる鋏やピンセットなどは乾熱滅菌を施し、また、使用するメディウムは濾過滅菌を行った。その他の器具も、標準的な細胞培養実験のプロトコルに基づき滅菌を行った。ラット新生仔を70% エタノールで丁寧に消毒した後に放血殺、肩甲間BATを無菌的に摘出しDMEM（FCS（－））中に浸した。最終的に必要なディッシュの数により、実験に供する新生仔の数が異なるが、おおよそ60 mmのディッシュ1枚に2匹ほどの新生仔を必要とした。用意した新生仔全てから肩甲間BATを摘出し終えたら、メディウムに浸してあるBAT中の血液をできるだけピンセットなどで押し出した。組織の水気をきり、無菌的なディッシュなどの上に移して鋏で破砕。充分細砕できたなら、50 ml チューブに移し、1% コラゲナーゼ（Sigma）を含んだDMEM中で37℃1時間軽く振盪した。さらにナイロンメッシュ（100 μm）で濾過した後に、BAT用メディウム（DMEM、10% FCS、17 μM D-pantothenic acid、33 μM d-biotin、100 μM アスコルビン酸、1 μM オクタネート、100 units/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、50 nM インスリン、50 nM トリヨードサイロニン）を等量から倍量加え、コラゲーナーゼの反応を止め、100×g 室温10分遠心し、目的の細胞を沈殿させた。上清を捨てた後に、沈殿を適当量のBAT用メディウムでサスペンドし、再びナイロンメッシュ（50 μm）で濾過した。これらの細胞をコラーゲン（typeI）コートディッシュ（35 mm または60 mm）に蒔き、37℃、5% CO_2下で培養した。翌日、付着しなかった細胞や細胞の破片などをPBS（－）で洗い、引き続きBAT用メディウム中で培養を行った。

3～4日で細胞はコンフルエントな状態になる。この状態の細胞を実験に供した。また、一部の細胞は、この状態の細胞に1 μM デキサメサゾンを添加して48時間後に実験に供し

た。

3）オイル赤O染色（ズダンII染色）

細胞内の脂肪滴の染色には、操作が簡単で短時間で微細な脂肪滴も染色できるオイル赤O染色を用いた。

細胞の入ったディッシュをPBSで二回洗浄し、その後10% ホルマリンを細胞全体が浸るくらい加え、45分間固定した。洗浄や溶液を加える時は、細胞がディッシュからはがれないように気をつけながら行った。固定し終えた細胞をPBSで二回洗浄し、オイル赤O調製用液（0.5% オイル赤O溶液（イソプロテレノール：蒸留水=6：4））を細胞全体が浸るくらい加え、5分間処理した。蒸留水で3回洗浄した後に、顕微鏡下で写真に記録した。

4）mRNAの解析

a）全RNAの調製

RNA抽出用試薬の調製には、一晩放置した0.1% ジエチルピロカーボネイトを含む溶液をオートクレーブ（120℃、20分）にかけてから用いた。また、チップやチューブ類も全てオートクレーブ（120℃、20分）にかけたものを使用した。

培養細胞からのRNA抽出はChomczynskiとSacchiらの方法に準じて行なった（15）。細胞の入った60 mm ディッシュを冷PBSで二回洗浄し、D溶液（4 M Guanidine thiocyanate、25 mM クエン酸（pH 7.0）、0.5% Sarcosyl、100 mM 2-Mercaptoethanol）を 500 μl 加え、細胞を溶解した。溶解液を 2 ml チューブに移し、2 M 酢酸ナトリウム（pH 4.0）を 50 μl 加えて転倒混和した。続いて水飽和フェノールを 500 μl 加えて転倒混和した。さらにクロロホルム／イソアミルアルコール（24:1）混合液を 100 μl 加えて転倒混和した後に、10秒間激しく混和した。氷中で15分間放置した後、遠心した（12,000×g、4℃、5分）。水相を別のチューブにとり、1 ml の氷冷エタノールを加えエタノール沈殿を行なった。沈査は少量の蒸留水に溶解し、260 nm での吸光度を測定して濃度を決定後、−70℃で保存した。

b）　poly(A)RNAの精製

poly(A)RNAの精製は、第1章の材料と方法の項に従って行った。

c）cDNAの調製

[実験に供したcDNAについて]

i）GLUT4：ラットGLUT4　cDNAフラグメント（+1-+1330 bp）（7）。京都大学医学部、清野裕博士より供与。

ii）CCAAT/Enhancer binding protein（C/EBP）α：ラットC/EBPα　cDNAフラグメント（+586-+865 bp）（40）。Reverse transcriptase-polymerase chain reaction（RT-PCR）法にて合成。

iii）C/EBPβ：マウスC/EBPβ　cDNA（full-length）（13）。名古屋大学生物分子応答研究センター、三木清史博士より供与。

iv）C/EBPδ：ラットC/EBPδ　cDNAフラグメント（+76-+453 bp）（35）。RT-PCR法にて合成。

v）ホルモン感受性リパーゼ：ラットホルモン感受性リパーゼ　cDNAフラグメント（+1903-+2490 bp）（32）。愛媛大学医学部、澄田道博助教授より供与。

vi）β1受容体：ラットβ1受容体cDNAフラグメント（+1-+600 bp）（54）。愛媛大学医学部、澄田道博助教授より供与。

vii）β2受容体：マウスβ2受容体cDNAフラグメント（-168-+160 bp）（51）。愛媛大学医学部、澄田道博助教授より供与。

viii）β3受容体：ラットβ3受容体cDNAフラグメント（-4-+308 bp）（49）。愛媛大学医学部、澄田道博助教授より供与。

［cDNAプローブの作製］cDNAプローブの作製は、第1章の材料と方法の項に従って行った。

c）Northernblotting法による各種mRNAの測定

Northernblotting法による測定は、第1章の材料と方法の項にほぼ準じて行った。RNA又はpoly(A) RNAをRNA泳動用緩衝液、50% ホルムアミド及び6.5% ホルマリンを含む溶液中で70℃、3分間加熱後、氷上で急冷し変性させた。このmRNAを、RNA泳動用緩衝液を泳動槽に満たしたサブマリン型電気泳動槽を用い1% アガロース（SeaKem ME、FMC）ゲル中で、100 V、2時間電気泳動した。ゲル中のRNAを20× SSC溶液によりナイロンメンブレンフィルター（Hybond N+、Amarshem）に一晩かけてトランスファーさせた。RNAが吸

着したフィルターを2× SSC 溶液で洗浄後、紫外線照射によりRNAをフィルターに固定させた。このフィルターをハイブリダイゼーション液（5× SSPE 溶液、5× Denhardt's 溶液、0.5% SDS、100 μg/ml サケ精子DNA（Sigma））に浸し、65℃で1時間インキュベーション後、^{32}Pを標識したcDNAプローブを1～2×10^6 cpm/mlとなるように加えて、65℃で一晩ハイブリオーブン中でハイブリダイゼーションを行った。反応後、フィルターを 2× SSC 及び 0.5% SDS を含む溶液中で室温、10分間2回洗浄し、続いて 0.1× SSC 及び 0.5% SDS を含む溶液中で65℃、20分間洗浄した。洗浄したフィルターを、イメージングアナライザーBAS1000（Fuji Photo Film）を用いて解析した（2）。

d）RT-PCR法による測定

β3受容体のRT-PCRは報告されている塩基配列を基に、オリゴヌクレオチド（5'-CACCTCGAGATGGCTCCGTGGCCTCAC-3'：Forwardプライマー、5'-GTCGGTACCCAAGGGCCAGTGGCCAGTCAGCG-3'：Reverseプライマー）を合成し、PCR用プライマーに使用した。全RNA 1 μg、50 mM Tris-塩酸（pH 8.3）、75 mM 塩化カリウム、3 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、500 μM dNTP、100 pmol Reverseプライマー、100 units M-MLV逆転写酵素（Gibco BRL）を10 μl 中で42℃で15分反応させ、RNAに相補的な一本鎖DNAを合成した。この反応液を99℃で5分処理し逆転写酵素を不活化させた後に 5 ml とり、これに 20 mM Tris-塩酸（pH 8.4）、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム、500 μM dNTP、100 pmol Forward プライマー、1 unit *Taq* DNAポリメラーゼ（Gibco BRL）を 25 μl になるように加え、PCRを行なった。PCR反応はサーマルサイクラー（PC-800、Astec）を用い、94℃ 3分、60℃ 30秒、72℃ 1分30秒で40サイクル行なった。

PCR産物は、Mupid電気泳動槽を用い、1 mg/ml 臭化エチジウムを含む2% アガロースゲル中で、1× TAE液（40 mM Tris、20 mM 酢酸ナトリウム、40 mM EDTA、pH 7.9）を泳動槽液として、電気泳動した。泳動後、UVトランスイルミネータ上で、ゲルをポラロイド写真にとり、パーソナル画像解析システム（パーソナルコンピューター Power Macintosh 7100（Apple）、イメージスキャナー GT-8000（Epson）、画像解析ソフト NIH Image ver. 1.54（Wayne Rasband氏、NIH））を用いて、PCR産物の解析をした。

5）培養細胞におけるグルコース利用速度の測定

培養細胞へのグルコースの取り込みは、非代謝性グルコース誘導体であるdGlcを用いて測定した。

実験に用いる細胞は、前日の内に必ず新鮮なBAT用メディウムに交換しておいた。実験日当日、35 mm ディッシュに播かれた細胞を、HEPES-Krebs-Ringer液（140 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化カルシウム、5 mM 塩化カリウム、2.5 mM 硫酸マグネシウム、20 mM HEPES、pH 7.4）（37℃）で三回洗浄し、あらかじめDMEM（1.5 ml）中で37℃3時間インキュベイトした。最後の1時間はノルアドレナリンやBRL 37344（Smith Kline Beecham）、CL316,243（American Cyanamid）のβ3作動薬を添加して、細胞を刺激した。次に、HEPES-Krebs-Ringerで二回洗浄した。さらに各作動薬の入った2% BSA（fatty acid-free）を含むHEPES-Krebs-Ringer液（1.5 ml）で20分間インキュベイトした後に、アイソトープ溶液（[^{3}H]-dGlc（740 kBq/ml）、[^{14}C]-スクロース（74 kBq/ml））を40 μl添加した。正確に2分間インキュベイトし、素早く3 mM $HgCl_2$を含んだ氷冷PBSで3回洗浄し、グルコースの細胞内への取込みを停止させた。ディッシュ内の余分な液を充分吸い取ってから、Cell lysis solution（0.2 N 水酸化ナトリウム、1% SDS）液（700 μl）を加え、細胞を含む全ての溶液をシンチレーションバイアルに移した。2 N 塩酸（100 μl）で中和した後、シンチレーター（10 ml）を加え、^{3}H、^{14}Cの放射能を測定した。細胞外液中に存在する[^{3}H]-dGlcによる誤差を、細胞外に存在する[^{14}C]スクロースにより補正し、細胞内への[^{3}H]-dGlcの取り込みを算出した。

6）実験データの統計計算

実験データは平均値±標準誤差で表示した。実験群間の有意差検定はStudent's-*t* 検定により行った。

【結　果】

1）初代培養褐色脂肪細胞におけるデキサメサゾンの効果

ラット新生仔の肩甲間BATから採取したstromal-vascular 細胞画分を*in vitro* で培養分化させ、初代培養褐色脂肪細胞として実験に用いた。採取した細胞画分はディッシュに蒔いた後、2〜3日でコンフルエントな状態になった。この細胞は形態的には線維芽細胞様であるが、デキサメサゾンの添加後２～３日で細胞内に房状の滴を抱えるようになる（Fig2-1A、B）。中性脂肪を染めるオイルレッドO色素で染色してみると赤色に染まることから、これらのものが脂肪滴であることがわかる（Fig2-1D）。一方、デキサメサゾン添加前の細胞には、脂肪滴はほとんど見られなかった（Fig2-1C）。

このデキサメサゾンの効果を、各種遺伝子の発現レベルの上から検討するために、脂肪細胞の分化指標マーカーとして知られている（1）GLUT4、ホルモン感受性リパーゼ、C/EBP α のmRNAレベルをNorthernblotting法によって調べた（Fig2-2A,B,C）。細胞がコンフルエントに達する頃の増殖中の細胞では、これらのmRNAはほとんど同定できなかった。このことは、分離してきた細胞中に組織由来の成熟した脂肪細胞が混入していないことを示している。この細胞をデキサメサゾンで処理すると、GLUT4、ホルモン感受性リパーゼ、C/EBP α の各mRNAは著しく増加した。一方、処理しなかった細胞では、mRNAレベルに変化が見られなかった。

C/EBP α だけでなく、C/EBP転写因子ファミリーを形成しているC/EBP β、C/EBP δ について調べた（Fig2-2D,E）。C/EBP α mRNAが分化に伴い、劇的な増加を示したのとは異なり、C/EBP β とC/EBP δ はコンフルエントの状態からある程度発現しており、そのレベルは、デキサメサゾン添加後も変化しなかった。

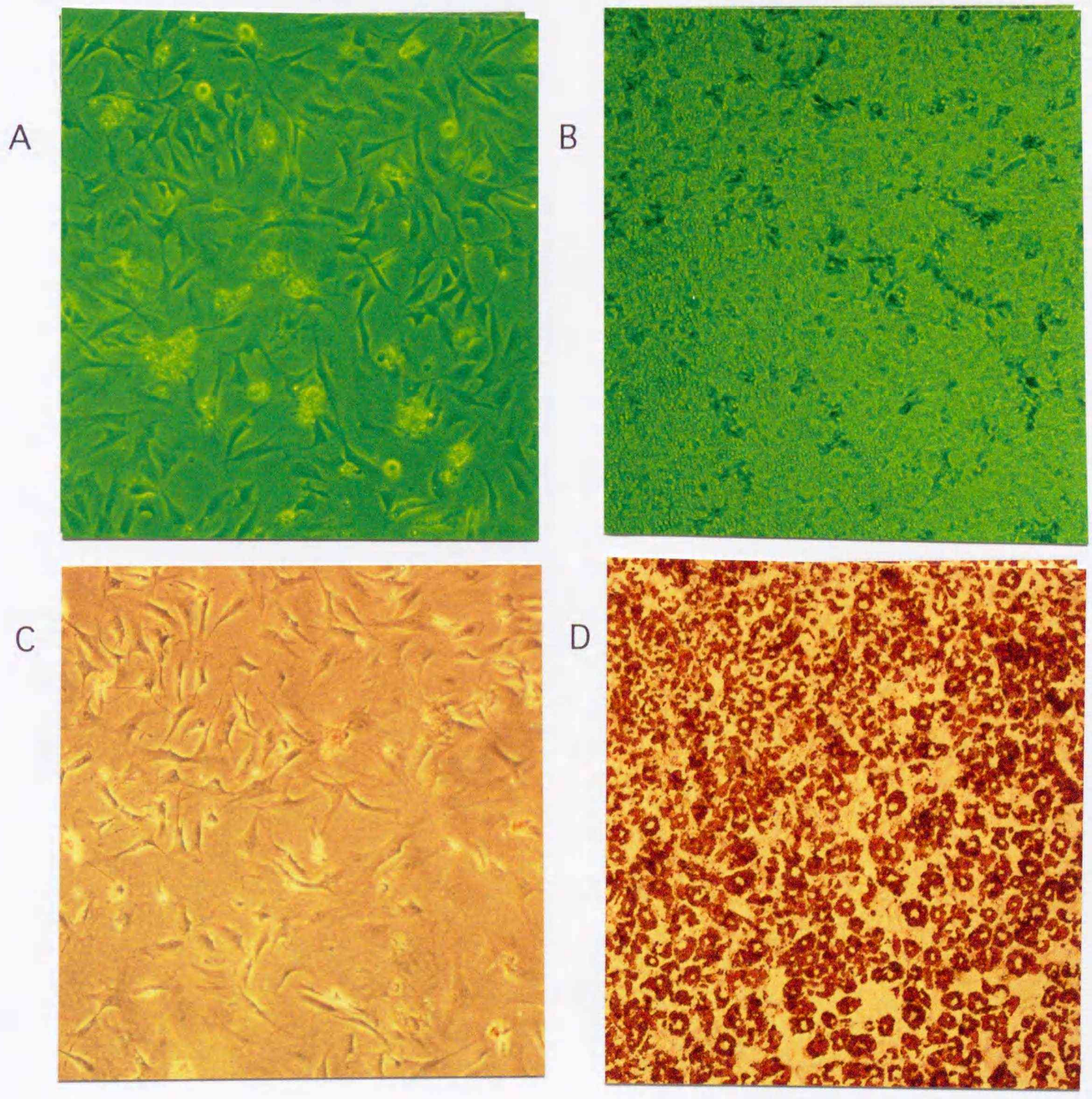


Fig2-1. デキサメサゾン添加による初代培養褐色脂肪細胞分化
褐色脂肪細胞の顕微鏡写真。デキサメサゾン添加前の細胞（A、C）と添加後の細胞（B、D）の位相差顕微鏡像（A、B）と、オイルレッドO染色による像（C、D）。

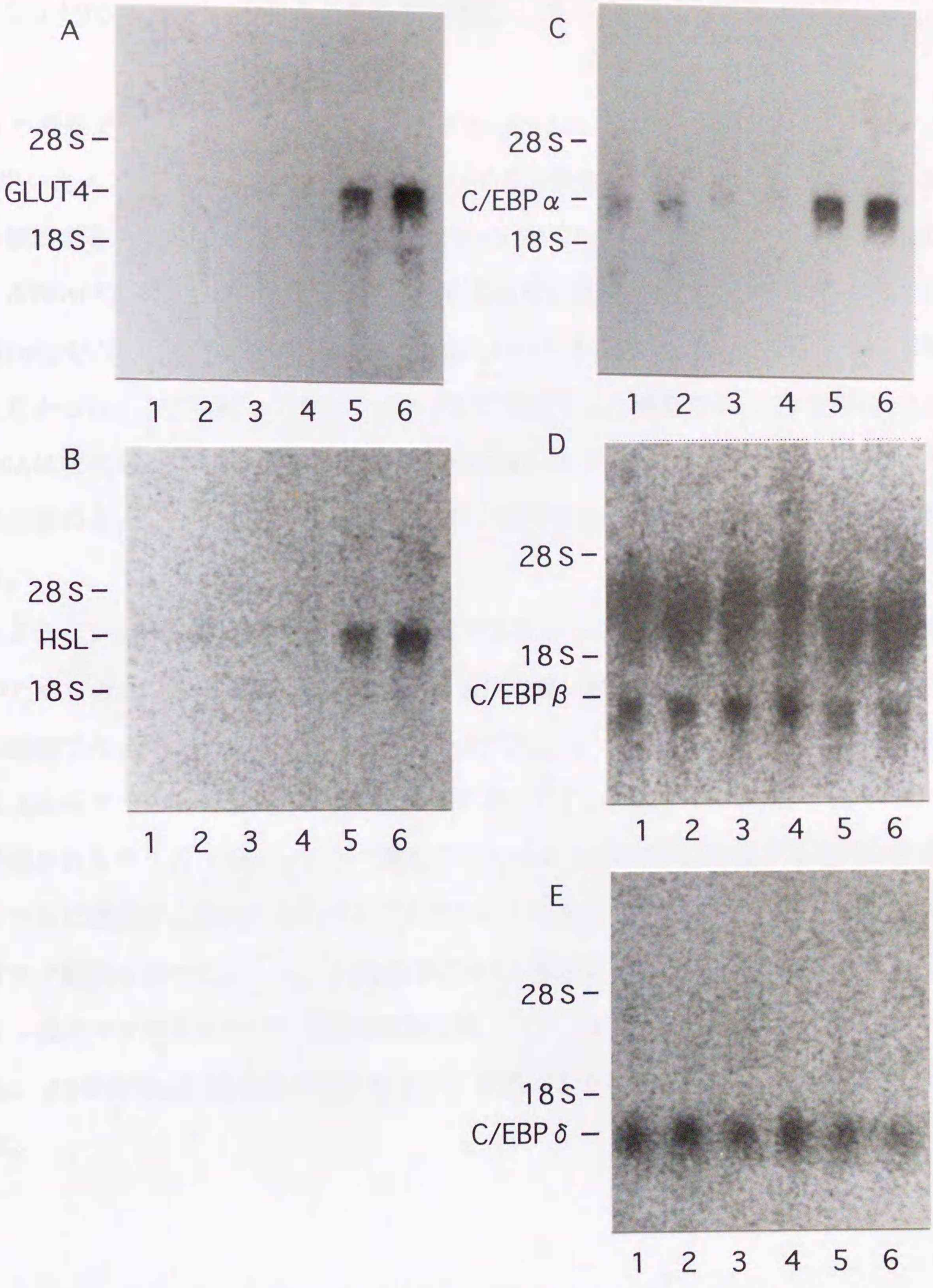


Fig2-2. GLUT4、ホルモン感受性リパーゼ、C/EBPの各mRNA発現量に対するデキサメサゾン添加の効果

褐色脂肪細胞がコンフルエントになった後、2日間デキサメサゾン（1 μM）を添加して培養した。全RNAをコンフルエントな状態の細胞（レーン 1, 2）、デキサメサゾン無添加細胞（レーン 3, 4）、デキサメサゾン添加細胞（レーン 5, 6）から各々抽出した。40 μgの全RNAをNorthernblotting法により解析した。（A）GLUT4、（B）ホルモン感受性リパーゼ（HSL）、（C）C/EBP α、（D）C/EBP β、（E）C/EBP δ。

2）褐色脂肪初代培養細胞におけるβ受容体の発現

これらの細胞でのβ1、β2、β3各々の受容体mRNAの発現を調べた。まず始めに、Fig2-2で用いたメンブランをリハイブリダイズして各β受容体mRNAの解析をしたが、シグナルは検出できなかった。そこで、より多量のmRNAについて分析するために全RNAから精製したPoly(A) RNAを 10 μg 用いて解析を行なった。Fig2-3に示すように、β1並びにβ2受容体mRNAはコンフルエントな状態の細胞においても発現しているが、β3受容体は検出できなかった。これに対し、デキサメサゾンで処理をした細胞では、β1並びにβ2受容体mRNAは変化しなかったが、β3受容体のmRNAレベルは劇的に上昇した。デキサメサゾン処理後の各β受容体のmRNA発現の割合は、肩甲間BATでの発現の割合とほぼ一致している。

デキサメサゾン未処理細胞でβ3受容体が検出できなかったのは、Northernblotting法の感度が低いためなのか否かを調べるために、より感度の高い検出法であるRT-PCR法によりこれらの細胞でのβ3受容体mRNAの検出を試みた（Fig2-4）。デキサメサゾンで処理した細胞では 320 bp のサイズ付近にバンドが認められた。このcDNAサイズは用いたプライマーから予想されるサイズ（ 324 bp ）と一致しているのでβ3受容体に由来するものと考えられる。さらに確認するためにこのバンドをゲルから切り出してDNAシークエンサーにてヌクレオチド配列を調べたところ、β3受容体cDNAの配列と完全に一致した。一方、コンフルエント細胞やデキサメサゾン未処理細胞には、バンドが認められなかった。これらのことから、β3受容体mRNAはデキサメサンゾン処理により初めて発現することが明らかとなった。

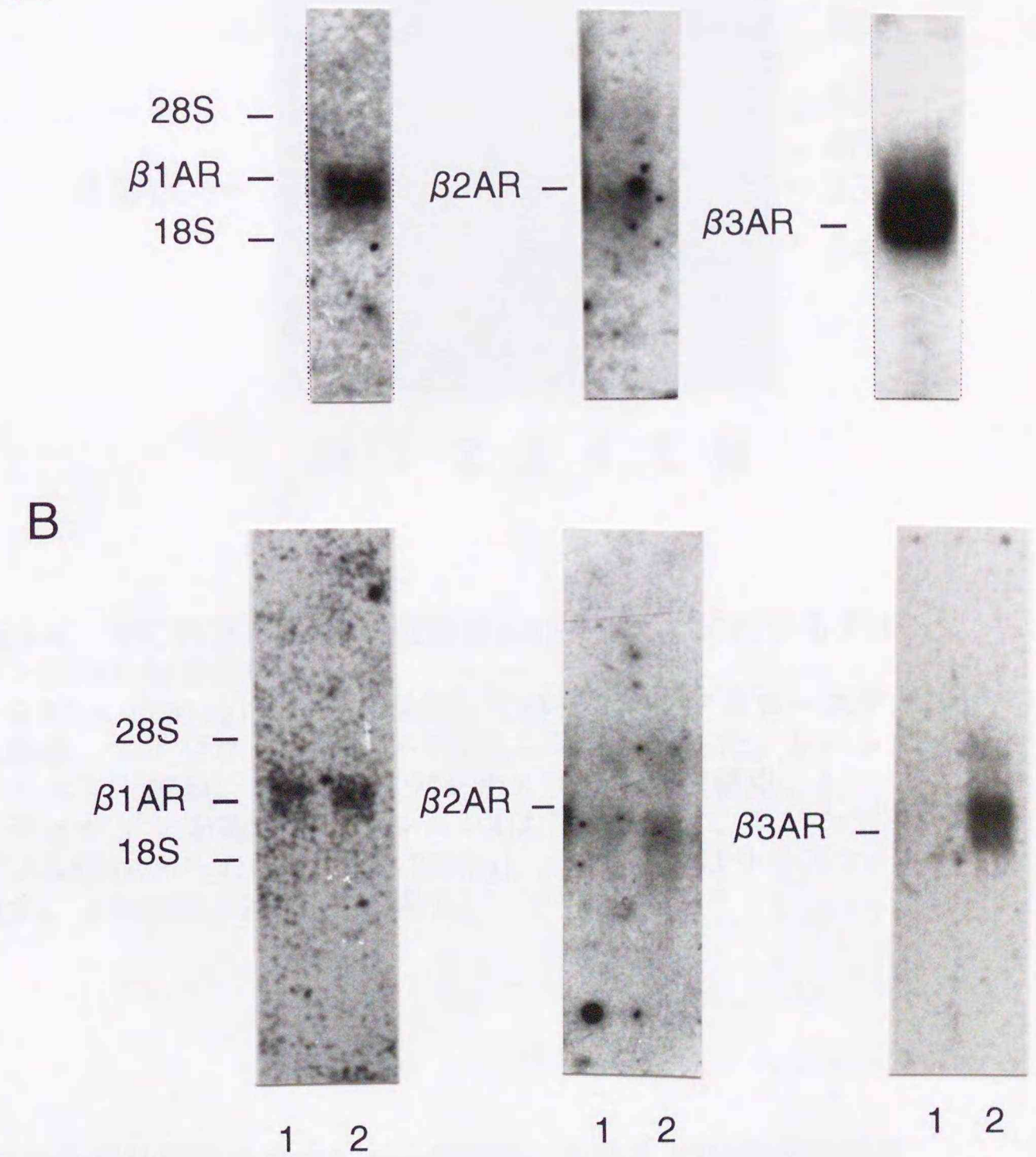


Fig2-3. β受容体のmRNA発現量に対するデキサメサゾン添加の効果
ラットの肩甲間BAT（A）、及び初代培養細胞（B）から得た全RNAより精製したpoly(A) RNAを10 μg用いてNorthernblotting法により解析した。レーン1はコンフルエント細胞、レーン2はデキサメサゾン処理細胞を表す。β1ARはβ1受容体、β2ARはβ2受容体、β3ARはβ3受容体を表す。

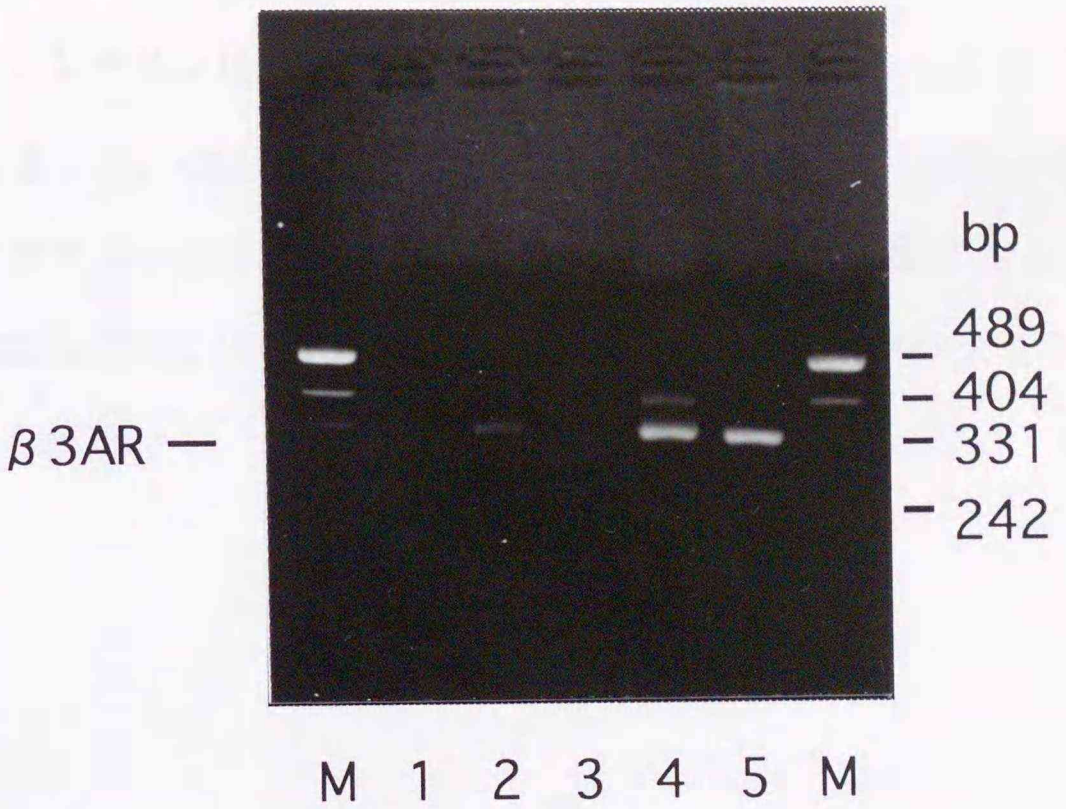


Fig2-4. RT-PCRによるβ3受容体mRNA発現量に対するデキサメサゾン添加の効果の検討

全RNA（250 ng）をRT-PCR法にて解析した。アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロミドで染色し写真撮影した。レーン1はコンフルエント細胞、レーン2はデキサメサゾン処理細胞、レーン3はデキサメサゾン未処理細胞、レーン4はラットBAT、レーン5はラットゲノムDNAからのPCR産物（250 ng）、レーンMはサイズマーカーを表す。β3ARはβ3受容体を表す。

3）初代培養褐色脂肪細胞でのグルコース輸送におけるβ3作動薬の効果

分離褐色脂肪細胞では、ノルアドレナリンによるグルコース利用亢進はβ受容体を介していることが知られている（45、46）。初代培養細胞で発現しているβ3受容体の機能的解析を行なう目的で、ノルアドレナリンやβ3作動薬を添加したときのグルコース利用がどの様に変化するのかを調べた。デキサメサゾン未処理細胞では、ノルアドレナリン、およびβ3 作動薬である BRL 37344、 CL316,243 を作用させても、dGlcの取込みに変化は見られなかった。しかしデキサメサゾン処理した細胞では、ノルアドレナリンはdGlc取込み

を促進し、β3作動薬はノルアドレナリンと同程度まで亢進させた（Fig2-5）。このことは、分化した培養細胞に発現したβ3受容体が充分機能していることを示している。Fig2-6に培養細胞でのグルコース輸送に与えるノルアドレナリンとCL316,243の用量依存曲線を示した。ノルアドレナリンはdGlcの取り込みを10^{-11} Mから10^{-6} Mにかけて上昇させ、10^{-6} M でほぼ最大になった。CL316,243も、濃度依存性にグルコース取込みを促進し、その最大取込み量はノルアドレナリンと同程度であった。ED_{50}値で比較すると、ノルアドレナリンが$10^{-8.2}$ M、CL316,243が$10^{-10.0}$ Mであり、その効果はノルアドレナリンに比べ、二桁ほど低い濃度で見られた。

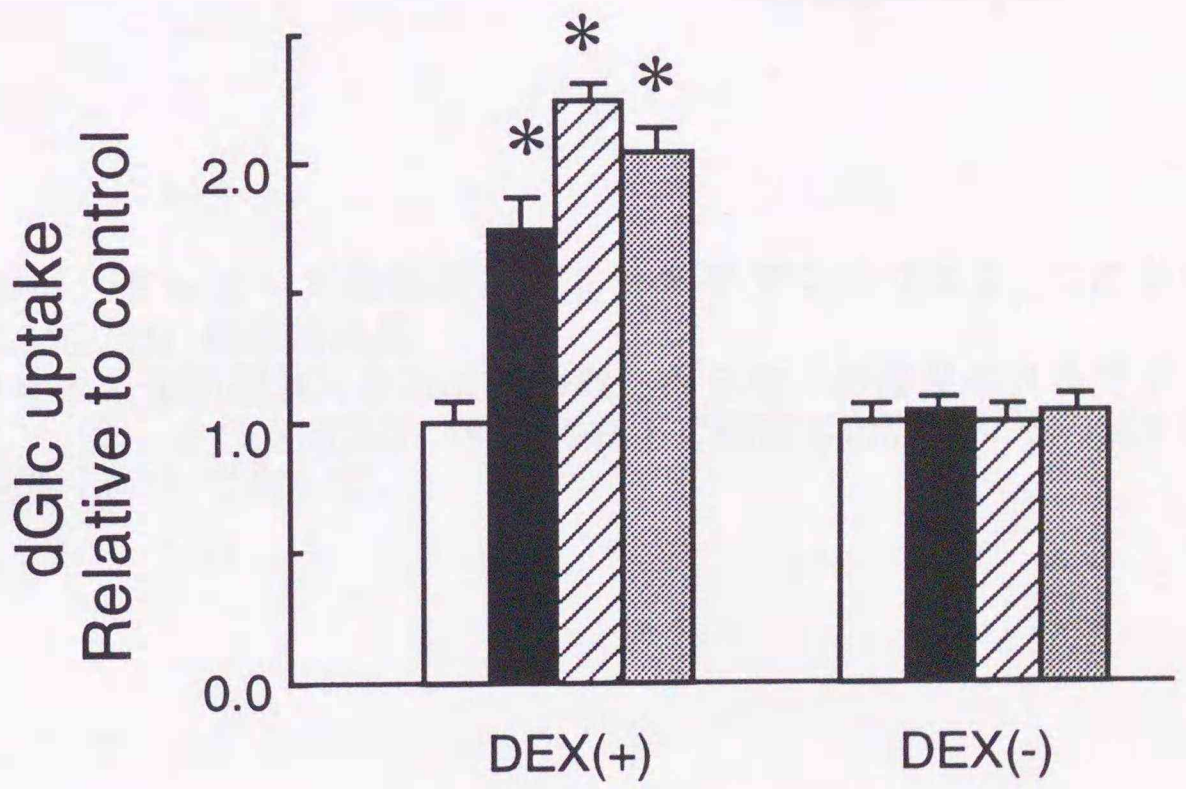


Fig2-5. グルコース輸送に対するノルアドレナリン並びにβ3作動薬（BRL 37344、CL316,243）の効果
培養褐色脂肪細胞によるdGlcの取込みは、10^{-7} M ノルアドレナリン（■）、10^{-7} M BRL 37344（▨）、10^{-7} M CL316,243（▩）の存在下、並びに非存在下（□）で行った。値は平均値±標準誤差（n=4）で表した。コントロールの取込みの値は 4.44±0.36 pmol/min/mg である。
＊はコントロール（□）値との有意差$P<0.05$を表す。

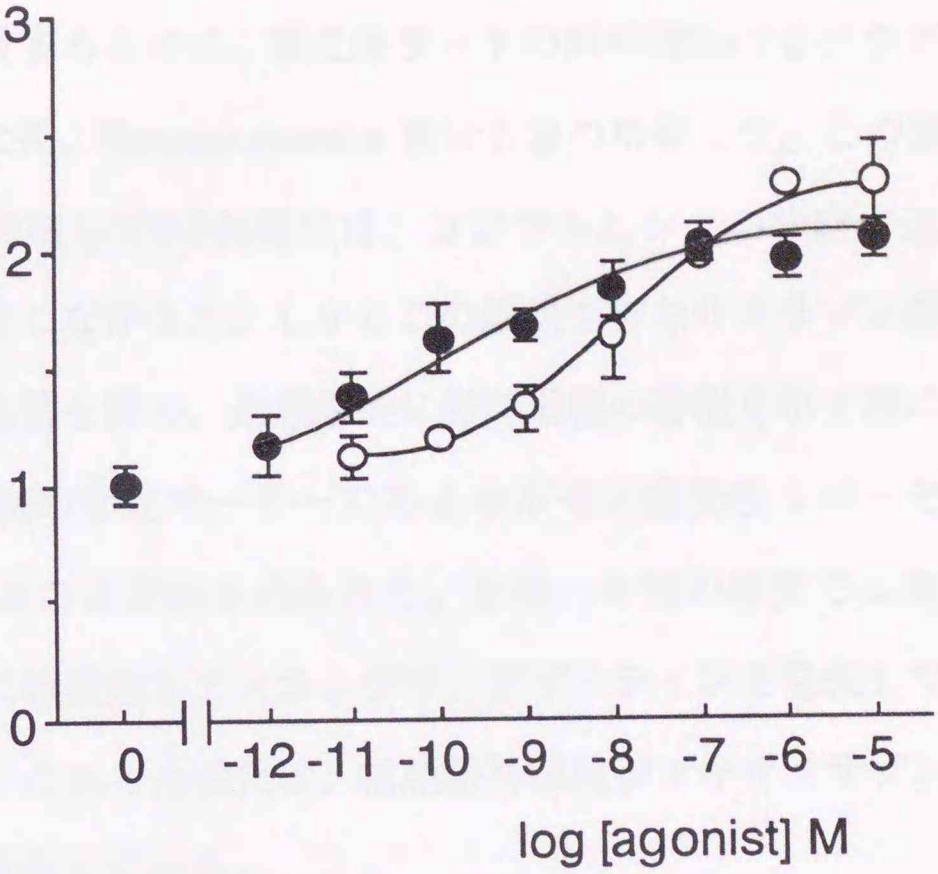


Fig2-6. グルコース輸送に対するノルアドレナリンとβ3作動薬（CL316,243）の量的効果
培養褐色脂肪細胞によるdGlcの取込みを種々の濃度のノルアドレナリン（○）とCL316,243（●）存在下で測定した。値は平均値±標準誤差（n=3）で表した。

【考　察】

褐色脂肪組織を初代培養するために、新生仔ラットの肩甲間BATをコラゲナーゼで処理し、成熟脂肪細胞を除いた後、Stromal-vascular 画分を集め培養した。この画分には前駆脂肪細胞が含まれ、活発に増殖して2-3日後には、コンフルエントの状態に達するが、そのままでは脂肪細胞には分化しなかった。しかしこの細胞をデキサメサゾン存在下で培養すると、細胞内に多数の脂肪滴を貯め、形態学的に脂肪細胞の特徴を示す様になった。さらに、生化学的にも脂肪細胞の分化マーカーであるホルモン感受性リパーゼ、C/EBPα、GLUT4のmRNAを発現することが確かめられた。なお、今回の研究では測定しなかったが、この細胞には、BATに特異的なアンカップリングプロテインを発現していることは既に報告されている（63）。これらの変化は、前駆脂肪細胞がデキサメサゾンにより褐色脂肪細胞に分化したことを意味している。

さらに細胞が分化するにつれて、三種のβ受容体のうち、β3受容体が特異的に発現するようになることが明らかとなった。β3受容体は、脂肪細胞に多量に存在するβアドレナリン作動性受容体としてクローニングされたが、この細胞には他にもβ1、β2受容体も発現している。今回、BAT全体からRNAを抽出しNorthernblotting法により分析を行うと3種のβ受容体全ての存在が確認された。しかし、培養細胞においては、デキサメサゾンを添加しない未分化な状態ではβ1と β2受容体 mRNA しか存在せず、β3受容体 mRNA に関しては、極めて微量の mRNA でも検出できるRT-PCR法を用いてもなお、検出できなかった。従って、前駆細胞にはβ3受容体は発現していないと結論できる。ところが、デキサメサゾンを加えて、脂肪細胞に分化させると多量のβ3受容体 mRNAが発現されるようになり、組織での各β3受容体 mRNA の発現パターンに近い状態となった。このような分化に伴うβ3受容体の発現は3T3-F442A細胞においても報告されているが、3T3-F442A細胞の場合、グルココルチコイドが存在しなくても分化することができる（21）。さらに褐色脂肪細胞と異なり、3T3-F442A細胞ではデキサメサゾンがβ3受容体の発現を抑制する（22）。実際、β3受容体の 5' flanking region にグルココルチコイドの認識配列が存在し、AP-1や脂肪特異的因子に対して抑制的に働くということが知られている（69）。しかし、このようなβ3受容体発現に対する直接作用とは別に、グルココルチコイドは脂肪前駆細

胞が脂肪細胞になる引き金にもなり（1、60、63）、分化誘導の二次的な結果として、β3受容体を発現させるのである。従って、先に述べた二つの細胞でのデキサメサゾンの効果の違いは、細胞のタイプの違いによるのではなく、むしろ細胞の分化ステージの違いによるものであると考えることができる。

いずれにせよ、β3受容体は褐色脂肪細胞の分化に伴って出現するので、この細胞に固有の機能、例えば脂肪分解、熱産生、グルコース利用の調節に重要な役割を果たしていると考えることができる。本研究では、第1章のBATでのグルコース利用の*in vivo*での結果を踏まえて、*in vitro*での解析として、まず培養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とβ3作動薬の効果を調べた。その結果、前駆脂肪細胞でのグルコース利用に対してはノルアドレナリンはまったく影響を与えなかったが、デキサメサゾンで分化させた脂肪細胞では、*in vivo*と同様に、促進効果を持つことが示された。さらに、β3受容体の選択的作動薬であるCL316,243やBRL 37344によっても、ノルアドレナリンとほぼ同程度にグルコース利用が亢進することも明らかとなった。この場合もやはり、β3受容体が発現している分化した褐色脂肪細胞でのみ効果があった。有効濃度を比較すると、CL316,243の方がノルアドレナリンよりも二桁ほど低かったが、この違いは両者のβ3受容体に対する親和性の違いとほぼ一致している（17、19）。これらの結果はノルアドレナリンによるグルコース利用促進の大部分はβ3受容体を介していることを示している。脂肪細胞におけるノルアドレナリンの急性代謝応答でのβ3受容体の重要性は脂肪分解やcAMP産生においても報告されており（3）、ノルアドレナリンの作用はβ3受容体が発現している分化細胞でのみ見られ、たとえβ1、β2受容体が発現していても未分化な細胞では見られないのが通例である。このことは、ノルアドレナリンによる褐色脂肪細胞の代謝活性化において、β3受容体が非常に重要であることを改めて示すものである。なお、代謝の活性化には、GLUT4やホルモン感受性リパーゼ、アンカップリングプロテインなど、受容体以降の経路を構成している各因子も十分に発現機能することが必要であることは言うまでもない。

本研究において、分化後の褐色脂肪細胞でのみβ3受容体が発現していることが明らかとなったが、このことはこれまで報告されてきたノルアドレナリンの多様な効果についての知見とも矛盾しない。例えば、*in vivo*ではノルアドレナリン投与は幾つかの遺伝子発現

に加えて、脂肪前駆細胞の増殖や成熟を刺激し、BATの増生を引き起こすが（65）、β3作動薬の投与はノルアドレナリンの作用の一部を再現するだけで細胞増殖は起こさないことが知られている（31）。これは、増殖可能な未分化な細胞にはβ3受容体が発現していないと考えると、当然の結果である。事実、Bronnikovらはマウスの初代培養細胞でノルアドレナリンによって引き起こされる増殖は、β1受容体を介して行なわれるものでβ3受容体は介さないということを報告している（10）。

BATにおいてβ1やβ2受容体に加えてβ3受容体が発現している生理的意義については、必ずしも十分に理解されている訳ではないが、以下のように考えることができる。β3受容体はβ1、β2受容体に比べ、カテコールアミンに対して低親和性である（3、26、27、39）。この性質は、血中を循環するカテコールアミンによる影響を受けにくくし、交感神経から放出されるノルアドレナリンによる刺激だけを選択的に受け入れるのに好都合であろう。また、β1、β2受容体は共にcAMP依存性プロテインキナーゼによってリン酸化されるアミノ酸配列を持っており、このためカテコールアミンによる脱感作を受けるのに対し、β3受容体はこの配列を持たないために脱感作を受けにくいという性質を持つ（29、42、53）。従ってβ3受容体が作働していると、動物が寒冷下におかれた時など、体温を維持するためのBATの熱産生を持続させることが可能となる。このように、分化に伴うβ3受容体の発現は、褐色脂肪細胞が機能的に成熟するのに必須であるといえよう。

【小　括】

ラットのBATをコラゲナーゼで消化してえられたstromal vascular 画分（前駆脂肪細胞を含む）を*in vitro*で培養・分化させ、この初代培養脂肪細胞を用いてグルコース利用とβ受容体との関係について、特に脂肪細胞に特異的なβ3受容体に焦点を当てて調べた。

1）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ると共に、GLUT4、ホルモン感受性リパーゼ、C/EBPαの各mRNAが発現して、脂肪細胞に分化した。

2）3種類のβ受容体mRNAについて調べると、未分化細胞にはβ1、β2受容体のみが認められ、高感度で分析してもβ3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くなった。

3）未分化細胞ではノルアドレナリンはグルコース利用にたいしてなんら影響を与えなかったが、分化した脂肪細胞では約2倍の亢進効果が認められ、*in vivo*での結果が再現された。

4）β3受容体に選択的な作動薬も、同程度の促進効果を分化した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くかったが、β3受容体に対する親和性の違いとほぼ一致していた。

5）これらの結果から、褐色脂肪細胞でのグルコース利用にたいするノルアドレナリンの促進効果は主にβ3受容体を介するものと結論した。

【総　括】

動物を寒冷暴露すると、交感神経の活性化と共に熱産生部位であるBATでのグルコース利用が特異的に亢進する。このような、寒冷曝露時に見られるグルコース代謝変動の機構を明らかにするすることを目的として、本研究ではBATでのグルコース輸送の律速段階にあたるグルコース輸送担体GLUT4、並びに交感神経の関与に焦点を当て、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。

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ると共に、GLUT4、ホルモン感受性リパーゼ、C/EBPα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β1、β2受容体のみが認められ、高感度で分析してもβ3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。β3受容体に選択的な作動薬も、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、β3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β3受容体を介した機構が重要であると結論した。

【謝　辞】

本論文の作成にあたり、終始御指導いただきました北海道大学大学院獣医学研究科の斉藤昌之教授に感謝いたします。有益な助言を頂きましたました愛媛大学医学部の嶋津孝教授、岐阜大学農学部獣医学科の志水泰武助手、北海道大学大学院獣医学研究科の遠藤大二助手に感謝いたします。

GLUT4のc末端に相当する合成ペプチドを提供下さった東レ基礎研究所の内海潤博士、GLUT4 cDNAを提供下さいましたChicago Univ.のDr. G. I. Bell、京都大学医学部の矢野秀樹博士、清野裕博士、ホルモン感受性リパーゼ並びにβ受容体cDNAを提供下さいました愛媛大学医学部の澄田道博助教授、C/EBPβ cDNAを提供下さいましたTularik Inc.のDr. S. L. McKnight、名古屋大学生物分子応答研究センターの三木清史博士に感謝いたします。

最後に、本論文を御校閲頂いた北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座の中里幸和教授、葉原芳昭教授、並びに木村和弘助教授に感謝いたします。

【引用文献】

1) Ailhaud, G., Grimaldi, P., and Negrel, R. (1992): Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.*, **12**, 207-233.

2) Amemiya, Y. and Miyahara, J. (1988): Imaging plate illuminates many fields. *Nature*, **336**, 89-90.

3) Arch, J. R. S., and Kaumann, A. J. (1993): β 3 and atypical β -adrenoceptors. *Medicinal Res. Rev.*, **13**, 663-729.

4) Assimacopoulos-Jeannet, F., Greco-Perotto, R., Terrettaz, J., Meier, M.K., and Jeanrenaud, B. (1992): Effect of a β -adrenergic agonist on glucose transport and insulin-responsive glucose-transporters (GLUT4) in brown adipose tissue of control and obese *fa/fa* rats. *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.*, **421**, 52-58.

5) Aviv, H. and Leder, P. (1972): Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 1408-1412.

6) Bianco, A.C., Sheng, X. and Silva, J.E. (1988): Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18168-18175.

7) Birnbaum, M. J. (1989): Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell*, **57**, 305-315.

8) Birnboim, H. C. (1988): Rapid extraction of high molecular weight RNA from cultured cells and granulocytes for northern analysis. *Nucleic Acids Res.*, ***16***, 1487-1497.

9) Bouillaud, F., Ricquier, D., Mory, G., and Thibault, J. (1984): Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11583-11586.

10) Bronnikov, G., Houstek, J., and Nedergaard, J. (1992): β -Adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via β 1 but not via β 3 adrenoceptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 2006-2013.

11) Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Monfar, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano. A. (1992): Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem. J.*, **282**, 765-772.

12) Cannon B., Nedergaard, J., Lundberg, J.M., Hokfelt, T., Terenius, L. and Goldstein, M. (1986): 'Neuropeptide Tyrosine' (NPY) is co-stored with noradrenaline in vascular but not in parenchymal sympathetic nerves of brown adipose tissue. *Exp. Cell Res.*, **164**, 546-550.

13) Cao, Z., Umek, R. M., and McKnight, S. L. (1991): Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.*, **5**, 1538-1552.

14) Charron, M. J., Brosius III, F. C., Alper, S. L. and Lodish, H. F. (1989): A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2535-2539.

15) Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.

16) Czech, M. P., J. C. Lawrence, and W. S. Lynn. (1974): Hexose transport in isolated brown fat cells. *J. Biol. Chem.*, **249** : 5421-5427.

17) D'Allaire, F., Atgie, C., Mauriege, P., Simard, P.M., and Bukowiecki, L. J. (1995): Characterization of β 1- and β 3-adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 275-282.

18) Douen, A. G., Ramlal, T., Rastogi, S., Bilan, P. J., Cartee, G. D., Vranic, M., Holloszy, J. O. and Klip, A. (1990): Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". *J. Biol. Chem.*, **265**, 13427-13430.

19) Emorine, L., Blin, N., and Strosberg, A.D. (1994): The human β 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 3-7.

20) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.

21) Feve, B., Emorine, L. J., Lasnier, F., Blin, N., Baude, B., Nahmias, C., Strosberg, A. D., and Pairault, J. (1991): Atypical β -adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. Pharmacological and molecular relationship with the human β 3-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20329-20336.

22) Feve, B., Baude, B., Krief, S., Strosberg, A. D., Pairault, J., and Emorine, L. J. (1992): Inhibition by dexamethasone of β 3-adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes. Evidence for a transcriptional mechanism. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15909-15915.

23) Foster, D. O. and Frydman, M. L. (1979): Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow : the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, 257-270.

24) Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I. and Seino, S. (1989): Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissue. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7776-7779.

25) Giacobino, J. P. (1979): Subcellular fractionation of brown adipose tissue. *J. Supramol. Struct.*, **11**, 445-449.

26) Giacobino, J. P. (1995): β 3-adrenoceptor: an update. *Eur. J. Endocrinol.*, **132**, 377-385.

27) Granneman, J. G., Lahners, K. N., and Chaudhry, A. (1992): Molecular cloning and expression of the rat β 3-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, **40**, 895-899.

28) Gullick, W. J. (1988): Production of antisera to synthetic peptides. In : *Method in Mol. Biol.* Vol.3. (Walker, J.M. ed.) pp.341-354, Humana Press Clifton, New Jersey.

29) Hausdorff, W. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990): Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.*, **4**, 2881-2889

30) Himms-Hagen, J. (1990): Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.*, **4**, 2890-2898.

31) Himms-Hagen, J., Cui, J., Danforth, E. Jr., Taatjes, D. J., Lang, S.S., Waters, B. L., and Claus, T.H. (1994): Effect of CL-316,243, a thermogenic β 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am. J. Physiol.*, **266**, R1371-R1382.

32) Holm, C., Kirchgessner, T.G., Svenson, K.L., Lusis, A.J., Belfrage, P. and Schotz, M.C. (1988): Nucleotide sequence of rat adipose hormone sensitive lipase cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9879.

33) Hom, F. G.,Goodner, C. J. and Berrie, M. A. (1984): A (^{3}H) 2-deoxyglucose method for comparing rates of glucose metabolism and insulin responses among rat tissues *in vivo*. *Diabetes*, **33**, 141-152.

34) James, D. E., Strube, M. and Mueckler, M. (1989): Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*, **338**, 83-87.

35) Kageyama, R., Sasai, Y. and Nakanishi, S. (1991): Molecular characterization of transcription factors that bind to the cAMP responsive region of the substance P precursor gene: cDNA cloning of a novel C/EBP-related factor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15525-15531.

36) Kahn, B. B., Charron, M. J., Lodish, H. F., Cushman, S. W. and Flier, J. S. (1989): Differential regulation of two glucose transporters in adipose cells from diabetic and insulin-treated diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, **84**, 404-411.

37) Kruger, N. J. and Hammond, J. B. W. (1988): Immunodetection of proteins on "Western" blots using ^{125}I-labeled protein A. In : *Method in Mol. Biol.* Vol.3. (Walker, J. M. ed.) pp.409-417, Humana Press Clifton, New Jersey.

38) Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227**, 680-685.

39) Lafontan, M., and Berlan, M. (1993): Fat cell adrenergic receptors and control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.,* **34**, 1057-1091.

40) Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J. and McKnight, S.L. (1988): Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev.*, **2**, 786-800.

41) Le Marchand-Brustel, Y., Olichon-Berthe, C., Gremeaux, T., Tanti, J.F., Rochet, N., and Van Obberghen, E. (1990): Glucose transporters in insulin sensitive tissues of lean and obese mice. Effects of the thermogenic agent BRL 26830A. *Endocrinology,* **127**, 2687-2695.

42) Liggett, S.B., Freedman, N.J., Schwinn, D.A., and Lefkowitz, R.J. (1993): Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β 3/ β 2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **90**, 3665-3669.

43) Liu, Y.L., and Stock, M.J. (1995): Acute effects of the β 3-adrenoceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilization. *Br. J. Pharmacol.,* **114**, 888-894.

44) Lowry, O. H., Rosebrough, A. L., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

45) Marette, A., and Bukowiecki, L.J. (1989): Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol.,* **257**, C714-C721.

46) Marette, A., and Bukowiecki, L.J. (1991): Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis. Evidence that fatty acid activation of mitochondrial respiration enhances glucose transport. *Biochem. J.,* **277**, 119-124.

47) McCormack, J. G. (1982): The regulation of fatty acid synthesis in brown adipose tissue by insulin. *Prog. Lipid Res.*, **21**, 195-223

48) Mitchell, J.R., Carneheim, C.M.H., Jacobsson, A., Kirchgessner, T., Schotz, M.C., Alexson, S.E.H., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1989): in Obesity in Europe 88 (Bjorntorp, P., and Rossner, S. eds.) pp. 235-239, Libbey, London.

49) Muzzin, P., Revelli, J. P., Kuhne, F., Gocayne, J. D., McCombie, W. R., Venter, J., Giacobino, J. P., and Fraser, C.M. (1992): An adipose tissue-specific β-adrenergic receptor: molecular cloning and down-regulation in obesity. *J. Biol. Chem.* , **266**, 24053-24058.

50) Nagase, I., Sasaki, N., Tsukazaki, K., Yoshida, T., Morimatsu, M., and Saito, M. (1994): Hyperplasia of brown adipose tissue after chronic stimulation of β 3-adrenergic receptor in rats. *Jpn. J. Vet. Res.*, **42**, 137-145.

51) Nakada, M.T., Haskell, K.M., Ecker, D.J., Stadel, J.M., and Crooke, S.T. (1989): Genetic regulation of β 2-adrenergic receptors in 3T3-L1 fibroblasts *Biochem. J.*, **260**, 53-59.

52) Nakajima-Iijima, S., Hamada, H., Reddg, P. and Kakunaga, T. (1985): Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6133-6137.

53) Nantel, F., Bonin, H., Emorine, L.J., Zilberfarb, V., Strosberg, A.D. Bouvier, M, and Marullo, S. (1993): The human β 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol. Pharmacol.*, **43**, 548-555.

54) Neve, K.A., Teal, P., Nipper, Y., and Civelli, O. (1990): Molecular cloning and expression of the rat β 1-adrenergic receptor. *K. Biol. Chem.*, **265**, 12960-12965.

55) Nicholls, D. G., and R. M. Locke. (1984): Thermogenic mechanism in brown fat. *Physiol. Rev.*, **64,** 1-64.

56) Pessin, J. E., and Bell, G. I. (1992): Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu. Rev. Physiol.*, **54**, 911-930

57) Rehnmark, S., Kopecky, J., Jacobsson, A., Nechad, M., Herron, D., Nelson, B.D., Obregon, M-J, Nedergaard, J. and Cannon, B. (1989): Brown adipocytes differentiated *in vivo* can express the gene for the uncoupling protein thermogenin: effects of hypothyroidism and norepinephrine. *Exp. Cell Res.* , **182,** 75-83

58) Schimmel, R.J., McCarthy, L. and McMahon, K.K. (1983): α 1-Adrenergic stimulation of hamster brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, **244**, C362-C368.

59) Shibata, H., Perusse, F., Vallerand, A. and Bukowiecki, L. J. (1989): Cold exposure reverses inhibitory effects of fasting on peripheral glucose uptake in rats. *Am. J. Physiol.*, **257**, R96-R101.

60) Shima, A., Shinohara, Y., Doi, K., and Terada, H. (1994): Normal differentiation of rat brown adipocytes in primary culture judged by their expressions of uncoupling protein and the physiological isoform of glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta,* **1223**, 1-8.

61) Shimizu, Y.,Nikami, H. and Saito, M. (1991): Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *J. Biochem.*, **110**, 688-692.

62) Shimizu, Y., Nikami, H., Tsukazaki, K., Machado, U. F., Yano, H., Seino, Y., and Saito, M. (1993): Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *Am. J. Physiol.*, **264**, E890-E895.

63) Shimizu, Y., Kielar, D., Masuno, H., Minokoshi, Y., and Shimazu, T. (1994): Dexamethasone induces the GLUT4 glucose transporter, and responses of glucose transport to norepinephrine and insulin in primary cultures of brown adipocytes. *J. Biochem.*, **115**, 1069-1074.

64) Simpson, I. A. and Cushman, S. W. (1986): Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1059-1089.

65) Tsukazaki, K., Nikami, H., Shimizu, Y., Kawada, T., Yoshida, T., and Saito, M. (1995): Chronic administration of β -adrenergic agonists can mimic the stimulative effect of cold exposure on protein synthesis in rat brown adipose tissue. *J. Biochem.*, **117**, 96-100.

66) Vallerand, A. L., J. Lupien, and L. J. Bukowiecki. (1983): Interaction of cold exposure and starvation on glucose tolerance and insulin response. *Am. J. Physiol.*, **245**, E575-E581.

67) Vallerand, A. L., Perusse, F. and Bukowiecki, L. J. (1987): Cold exposure potentiates the effect of insulin on *in vivo* glucose uptake. *Am. J. Physiol.*, **253**, E179-E186.

68) Vallerand, A. L., Perusse, F. and Bukowiecki, L. J. (1990): Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *Am. J. Physiol.*, **259**, R1043-R1049.

69) Van Spronsen, A., Nahmias, C., Krief, S., Briend-Sutren, M. M., Strosberg, A. D., and Emorine, L. J. (1993): The promoter and intron/exon structure of the human and mouse β 3-adrenergic-receptor genes. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1117-1124.

70) Young, J.B., Saville, E., Rothwell, N.J., Stock, M.J. (1982): Effects of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. *J. Clin. Invest.* **69**, 1061-1071.

Adrenergic Regulation of Glucose Utilization and Glucose Transporter in Rat Brown Adipose Tissue

Hideki NIKAMI

Laboratory of Animal Experiment,
Institute of Immunological Science,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Most mammals have two types of adipose tissues. White adipose tissue is the site for energy storage, whereas brown adipose tissue (BAT) for energy dissipation: that is, this is the major site of nonshivering heat production during cold acclimation, spontaneous overfeeding, and arousal from hibernation. The metabolic activation and subsequent heat production in BAT are primarily controlled by sympathetic nerves distributed abundantly to this tissue. Although the main substrate for BAT thermogenesis is fatty acids derived from intracellular triglyceride, glucose metabolism in BAT is also activated by the sympathetic nerves. In order to clarify the regulatory mechanism of BAT glucose metabolism, in this study, I examined the effects of cold exposure and adrenergic stimulation on tissue glucose utilization and glucose transporter both *in vivo* using the rat as an experimental animal and *in vitro* using a primary culture cell system.

Exposure of rats to a cold environment at 4 ˚C for 10 days increased the uptake of 2-deoxy-D-glucose, an index of cellular glucose utilization, remarkably in BAT. In parallel with tissue glucose utilization, the protein and mRNA levels of an insulin-responsive glucose transporter GLUT4, which is the major glucose transporter in rat adipose tissues, were also increased after cold exposure. The stimulative effects of cold exposure on BAT glucose utilization and GLUT4 expression were completely abolished when sympathetic nerves into BAT had been surgically severed, but were mimicked when noradrenaline was administered continuously using an osmotic mini-pump for 10 days at 24 ˚C. Continuous administration of a β-adrenergic agonist (isoproterenol) was as effective as noradrenaline, whereas an α-adrenergic agonist (phenylephrine) showed no effect. In contrast to

BAT, in other insulin-sensitive tissues such as white adipose tissue, skeletal muscle and heart, neither cold exposure nor adrenergic agonist-treatment showed noticeable effects on tissue glucose utilization and GLUT4. From these results, it was concluded that the stimulative effect of cold exposure on glucose utilization in BAT is based on the increased synthesis of GLUT4 protein evoked by the β-adrenergic action of noradrenaline released from sympathetic nerve entering to this tissue.

To confirm the above results obtained from the *in vivo* experiments and to investigate the molecular mechanism of the β-adrenergic action on BAT glucose utilization, next, some *in vitro* experiments were performed using a primary culture system of brown adipocytes, with special reference to adrenoceptors. Precursor cells of brown adipocytes were isolated from the interscapular BAT of newborn rats and cultured on collagen-coated dishes. When confluent cells were treated with dexamethasone, mRNAs for GLUT4, hormone-sensitive lipase, and CCAAT/enhancer binding protein α were increased remarkably, indicating a predominant effect of dexamethasone on the terminal differentiation of the cultured cell. BAT has an adipocyte-specific β-adrenoceptor (β3) in addition to β1- and β2-adrenoceptors. Effects of dexamethasone on the expression of three subtypes of β-adrenoceptor were also examined. β1- and β2-adrenoceptor mRNA remained constant regardless of dexamethasone-treatment, while β3-adrenoceptor mRNA was present only in dexamethasone-treated differentiated cells. To assess the metabolic response mediated by β3-adrenoceptor, glucose transport into the cells was estimated. Noradrenaline enhanced glucose transport in dexamethasone-treated differentiated cells, but not in undifferentiated cells. β3-adrenergic agonists mimicked completely the stimulatory effect of noradrenaline at concentrations lower by two orders of magnitude. These results suggest that the β3-adrenoceptor plays a significant role in the response of glucose transport to adrenergic stimulation.

inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19