



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1489号
学位記番号	第308号
氏名	林 孝弘
授与年月日	平成27年3月25日
学位論文の題名	脂肪細胞分化制御因子 fad158 および KCNK10 の機能解析
論文審査担当者	主査： 林 秀敏 副査： 今川 正良、 平嶋 尚英、 中村 克徳

氏名	はやし たかひろ 林 孝弘
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 308 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	脂肪細胞分化制御因子 fad158 および KCNK10 の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 林 秀敏 (副査) 教授 今川 正良・教授 平嶋 尚英・准教授 中村 克徳

#### 論文内容の要旨

日本人の死因の約三分の一を占める心疾患、脳血管疾患の多くは、肥満に基づく糖尿病、高血圧、脂質異常症のような生活習慣病が原因となり動脈硬化に結びついた結果だと考えられている。日本の健康長寿社会を実現する上で生活習慣病の克服は必須であり、それに直結する肥満のメカニズムを解明することは非常に重要である。

脂肪組織は摂取したエネルギーのうち余剰なエネルギーを中性脂肪として蓄えるが、その蓄積が過剰になり脂肪組織中の脂肪細胞が肥大化したときに肥満が形成されると長年考えられてきた。しかしその後、脂肪組織中の脂肪細胞の数が増加することも肥満の原因であることが明らかにされ注目されている。脂肪細胞の数の増加は前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が深く関与しており、この機構を解明することは極めて重要である。

脂肪細胞分化の研究では、マウス由来前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞がよく用いられ、様々な知見が集まりつつある。3T3-L1 細胞は線維芽の形態で増殖し、コンプレントに達し休止期に入る。この時、insulin、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、dexamethasone (Dex)、fetal bovine serum (FBS)を添加すると、mitotic clonal expansion (MCE)とよばれる一過性の細胞増殖を経て、およそ一週間後に脂肪滴を含んだ脂肪細胞へと分化する。その過程の中期以降に peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )や CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)ファミリーが重要な役割を果たしていることが報告されている。また、脂肪細胞分化初期については、その分化の引き金となる転写やシグナル伝達のダイナミックな変化が起こっていることが想定されているが、詳細なメカニズムについては依然解明されていない。

そこで、当研究室では脂肪細胞分化機構の解明を目的とし、脂肪細胞分化の極めて初期に着目して研究を進めている。当研究室ではこれまでに、3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞分化誘導 3 時間後に発現が上昇する遺伝子を PCR-サブトラクシオン法により 102 クローン単離している。その中の 46 クローンは、単離当時データベースに登録のない未知遺伝子であった。この 46 クローンの中で、脂肪細胞分化初期に一過性に発現が上昇する clone 158 に着目し、全長 cDNA をクローニングしたところ新規遺伝子であることが明らかとなり、factor for adipocyte differentiation 158 (fad158)と命名した。これまで当研究室により、fad158 は、マウス、ヒトともに N 末端に 4 つの膜貫通領域、C 末端に leucine-rich repeat region (LRR)を有する 803 アミノ酸のタンパク質をコードしていることを明らかとしている。さらに fad158 は過剰発現系および発現抑制系の実験により脂肪細胞分化を正に制御していることを明らかとしている。

また、当研究室は家畜改良センターとの共同研究として potassium channel, subfamily K, member 10 (KCNK10)の解析を行ってきた。家畜改良センターは肉質の改良を効率的に行える豚の育成技術の確立を目的とし、筋肉内脂肪含量についての

quantitative trait locus (QTL)解析を進めた。その結果、ブタ第七染色体上に存在する遺伝子 12 個が検出され、さらにこの 12 個の遺伝子はマウスでは 11 個の遺伝子に対応していた。この 11 個の遺伝子について 3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞分化初期過程の mRNA の発現変化を検討した。その結果、発現量が大きく変化したのは 11 個中 1 つの遺伝子のみで、KCNK10 だけだった。そこで、当研究室では脂肪細胞分化初期における KCNK10 の機能解析を行ってきた。その結果、脂肪細胞分化の極めて初期に KCNK10 の発現が一過性に上昇すること、発現抑制系の検討により KCNK10 が脂肪細胞分化を正に制御していることを明らかとしている。

そこで、本研究では fad158 と KCNK10 について更なる機能解析を進めることを目的とした。まず、FAD158 のトポロジーの解析を行った。続いて fad158 ノックアウトマウスを樹立し、fad158 欠損が肥満に与える影響を解析した。次に、KCNK10 の脂肪細胞分化初期における機能について MCE を中心に解析した。

## **1. fad158 の機能解析**

### <fad158 のトポロジーの解析>

当研究室ではこれまでに、FAD158 は小胞体膜に局在することを明らかとしていたが、どのような構造で組み込まれているのかは不明のままである。小胞体膜に局在するタンパク質を機能解析する上で、そのトポロジーを明らかにすることは重要である。そこで、FAD158 のトポロジーを検討するため、N 末端に Myc タグ、C 末端に FLAG タグを融合した FAD158 を発現させた HeLa 細胞から、小胞体を含む膜画分を分画した。これを Protease K で処理し Western blot 解析により、FAD158 の消化断片を検出する Protease digestion assay を行った。

その結果、N 末端および C 末端が小胞体内腔に存在する場合に生じる FAD158 の断片は検出されなかった。以上より、FAD158 は N 末端および C 末端が細胞質側に存在する構造で小胞体膜に局在することが明らかとなった。

### <fad158 ノックアウトマウスの解析>

当研究室のこれまでの検討から、fad158 についての細胞レベルでの知見は徐々に集まりつつあるが、個体レベルでの役割は全く不明である。そこで、fad158 の個体レベルでの解析を進めるため、fad158 ノックアウトマウスを樹立した。fad158 は mouse chromosome 5 にある遺伝子で、4 つの exon から成り ORF の約 95 % が exon 4 に存在する。そこで、exon 4 をターゲットとして fad158 ノックアウトマウスを作製した。

fad158 は、leucine-rich repeat containing 8 (LRRC8) ファミリーに属し、その中の LRRC8c と同一であることが現在では明らかとなっている。また、LRRC8 ファミリーは LRRC8a から LRRC8e までの 5 つが存在することが報告されている。そこで、fad158 欠損が LRRC8 ファミリーの発現に影響を与えるか否か検討するため、肝臓および皮下白色脂肪組織における LRRC8 ファミリーの発現を半定量 PCR で比較した。その結果、野生型マウスと比べて fad158 ノックアウトマウスでは皮下白色脂肪組織において LRRC8e の発現が若干上昇した。しかし、他の LRRC8 ファミリーの発現は野生型マウスと fad158 ノックアウトマウスでは大きな差はみられなかった。

次に、fad158 欠損が肥満に与える影響を検討した。普通食摂取条件下において、マウスの体重、摂食量、摂水量、皮下白色脂肪量、精巣上体白色脂肪量、腎周囲白色脂肪量、肝臓重量を調べた結果、野生型マウスと fad158 ノックアウトマウスでは差はみられなかった。さらに、この時のインスリン感受性と糖代謝能を調べるために、インスリン耐性試験と糖負荷試験を行った。その結果、野生型マウスと fad158 ノックアウトマウスではインスリン感受性、糖代謝能ともに差はみられなかった。

続いて、高脂肪食摂取条件下における、マウスの体重、摂食量、摂水量、皮下白色脂肪量、精巣上体白色脂肪量、腎周囲白色脂肪量、肝臓重量を調べた。その結果、摂食量、摂水量、精巣上体白色脂肪量は野生型マウスと fad158 ノックアウトマウスでは差はみられなかった。一方、マウスの体重、皮下白色脂肪量、腎周囲白色脂肪量、肝臓重量は、いずれも野生型マウスよりも fad158 ノックアウトマウスの方が軽い結果が得られた。さらに、この時のインスリン感受性と糖代謝能を調べるために、インスリン耐性試験と糖負荷試験を行った。糖代謝能は野生型マウスと fad158 ノックアウトマウスで差はなかったが、インスリン耐性試験では fad158 ノックアウトマウスにおいてインスリン感受性が上昇した。

以上、fad158 ノックアウトマウスの解析結果より、fad158 は高脂肪食摂取による体重増加、白色脂肪量増加、インスリン感受性の低下に関与することを見出した。

## 2. KCNK10 の機能解析

当研究室では 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化初期において KCNK10 の発現が一過性に上昇することを明らかとしていた。しかし、この一過性の発現が脂肪細胞分化誘導剤成分の何に由来するものなのか詳しい検討はなされていなかった。そこで、3T3-L1 細胞が脂肪細胞へと分化するのに必要な FBS、IBMX、insulin、Dex のうち KCNK10 の発現上昇に関与するものを検討した。その結果、IBMX が KCNK10 の発現上昇に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

次に、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化初期に KCNK10 が一過性に発現上昇することから、同じく脂肪細胞分化初期に起こる現象である MCE に着目した。KCNK10 の発現を抑制した結果、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化初期にみられるはずの MCE による細胞数の増加が阻害された。この結果から、KCNK10 は MCE を正に制御して脂肪細胞分化を制御していることがわかった。

脂肪細胞分化過程の MCE において C/EBP $\beta$  および C/EBP $\delta$  が重要な役割を担っており、共に脂肪細胞分化初期に発現が上昇することが知られている。そこで、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における C/EBP $\beta$  および C/EBP $\delta$  の発現上昇に KCNK10 の発現抑制が与える影響を検討した。KCNK10 の発現を抑制した結果、C/EBP $\beta$  および C/EBP $\delta$  の発現上昇が阻害された。以上より、KCNK10 は C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  を介して MCE を制御している可能性が示唆された。

insulin は脂肪細胞分化の重要な因子であるとともに、MCE の制御にも重要であることが知られている。そこで、KCNK10 がインスリンシグナルに関与するか否か検討した。脂肪細胞分化過程において KCNK10 の発現を抑制したところ、インスリンシグナルの伝達に重要な Akt のリン酸化が阻害された。さらに、この KCNK10 が Akt に及ぼす影響は insulin を介するものかどうか検討した。KCNK10 の発現を抑制した 3T3-L1 細胞を 4 時間血清飢餓状態にして insulin 刺激したところ、KCNK10 発現抑制では Akt のリン酸化が阻害された。以上より、KCNK10 はインスリンシグナルを介して MCE を制御している可能性が示唆された。

## 総括

本研究により FAD158 の C 末端にある LRR が細胞質側に位置することを見出した。LRR はタンパク質間相互作用部位として様々な報告がされている。よって、FAD158 も LRR を介して何らかのタンパク質と相互作用している可能性が高いと考えられる。FAD158 の LRR のトポロジーが解明されたことは、FAD158 と相互作用するタンパク質を探索する一助となり、更なる FAD158 の機能解析への足掛かりとなることが期待される。

当研究室ではこれまでに、*in vitro* の実験において *fad158* が脂肪細胞分化を正に制御していることを明らかにした。本研究において、樹立した *fad158* ノックアウトマウスを解析することにより、高脂肪食摂取条件下で *fad158* が白色脂肪組織に影響を与えることを見出した。このことより、*fad158* は *in vivo* においても脂肪細胞分化の制御に重要である可能性が考えられる。よって、この解析を糸口に、今後 *fad158* ノックアウトマウスの白色脂肪組織の詳細な解析を行うことで、さらに進んだ *fad158* の理解に繋がることが考えられる。

KCNK10 の解析において、脂肪細胞分化初期の発現上昇には IBMX が重要であることを明らかにした。また、MCE を制御する因子として新たに KCNK10 を見出し、その制御は C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  の発現およびインスリンシグナルを介していることを明らかにした。MCE は細胞増殖に関わる因子や細胞骨格に関わる因子など様々な因子が関与していることが報告されている。このように MCE を解明することは複雑で困難である。しかし、今回新たに K<sup>+</sup>チャネルである KCNK10 も関与することが明らかとなり、MCE の分子メカニズムの解明がさらに進むことが期待される。

以上の成果が脂肪細胞分化の分子メカニズムの解明の一助となり、肥満やそれにとまなう様々な疾患の病態の解明や創薬、新たな予防・治療に結びつくことが期待される。

## 結論

1. FAD158 は、N 末端および C 末端ともに細胞質側に存在する構造で小胞体膜に局在していることを明らかにした。
2. *fad158* は、高脂肪食摂取による体重増加、白色脂肪量増加、インスリン感受性の低下に関与することを見出した。
3. KCNK10 の発現は、IBMX で強く誘導されることを明らかにした。
4. KCNK10 は、C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  の発現制御およびインスリンシグナルを介して、脂肪細胞分化に必須な MCE を正に

制御していることを明らかにした。

(基礎となる報文)

1. Takahiro Hayashi, Yuriko Nozaki, Makoto Nishizuka, Masahito Ikawa, Shigehiro Osada and Masayoshi Imagawa  
*Factor for adipocyte differentiation 158* gene disruption prevents the body weight gain and insulin resistance induced by a high-fat diet.  
*Biol. Pharm. Bull.*, 34(8), 1257-1263 (2011).
2. Makoto Nishizuka, Takahiro Hayashi, Mami Asano, Shigehiro Osada and Masayoshi Imagawa  
KCNK10, a tandem pore domain potassium channel, is a regulator of mitotic clonal expansion during the early stage of adipocyte differentiation.  
*Int. J. Mol. Sci.*, 15(12), 22743-22756 (2014)

### 論文審査の結果の要旨

林孝弘氏は、脂肪細胞分化初期に重要な役割を果たすことが知られている新規遺伝子 *fad158* (*factor for adipocyte differentiation 158*) およびカリウムチャネル KCNK10 について研究を行った。*fad158* については、細胞内局在に関してそのトポロジーを検討すると共に、ノックアウトマウスを作製し、高脂肪食摂取時の体重増加やインスリン感受性に関与することを新たに見出した。KCNK10 については、脂肪細胞分化を誘導する物質として cAMP 賦活剤が重要であることを見出すと共に、インスリンシグナルを介する制御機構の一端を明らかにした。以上のように、本研究結果は、脂肪細胞分化機構解明に重要な業績と認められる。

公開発表会（平成 27 年 1 月 8 日開催）においては、良くまとまった口頭発表を行った。また質疑応答については、多くの先生方の質問に対して、丁寧にわかりやすく返答した。さらに、最終審査会（平成 27 年 3 月 5 日開催）においては、公開発表会ならびに主査・副査による精査で指摘された事項を新たにスライドを要領良くまとめ、質の高い口頭発表を行うと共に質疑応答についても概ね的確に返答した。以上の結果より、林氏は博士（薬学）の学位を得る資格があると認め、主査および副査全員より最終試験合格の判定を得た。

これらの結果を、教授および准教授で構成される薬学研究科論文審査会（平成 27 年 3 月 13 日開催）に報告したところ、合格が認定された。