



## 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<br>副査： 今川 正良、 平嶋 尚英、中村 克徳 |

名古屋市立大学学位論文

脂肪細胞分化制御因子  
*fad158* および **KCNK10** の機能解析

平成 26 年度 (2015 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

分子生物薬学分野

林 孝弘

1. 本論文は、2015 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

|    |       |     |
|----|-------|-----|
| 主査 | 林 秀敏  | 教授  |
| 副査 | 今川 正良 | 教授  |
|    | 平嶋 尚英 | 教授  |
|    | 中村 克徳 | 准教授 |

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

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)**

3. 本論文の基礎となる研究は、今川 正良教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

## 目 次

|      |  |    |
|------|--|----|
| 緒論   |  | 1  |
| 本論   |  | 5  |
| 第一章  | <i>fad158</i> の機能解析  | 5  |
| 第一節  | FAD158 のトポロジーの解析   | 5  |
| 第二節  | <i>fad158</i> ノックアウトマウスの樹立と解析  | 12 |
| 第三節  | 考察および小括  | 22 |
| 第二章  | KCNK10 の脂肪細胞分化制御メカニズムの解析   | 25 |
| 第一節  | <i>Kcnk10</i> の発現上昇に関与する脂肪細胞分化誘導剤<br>の成分の検討                              | 25 |
| 第二節  | <i>Kcnk10</i> の発現抑制が MCE に与える影響の検討                                       | 27 |
| 第三節  | <i>Kcnk10</i> の発現抑制が C/EBP $\beta$ および C/EBP $\delta$ の発現上昇<br>に与える影響の検討 | 29 |
| 第四節  | <i>Kcnk10</i> の発現抑制がインスリンシグナルに与える影響<br>の検討                               | 33 |
| 第五節  | 考察および小括  | 37 |
| 総括   |  | 39 |
| 結論   |  | 43 |
| 謝辞   |  | 44 |
| 引用文献 |  | 45 |

## 略 語

|               |   |
|---------------|---|
| BSA           | bovine serum albumin                                      |
| C/EBP         | CCAAT/enhancer-binding protein                            |
| CREB          | cAMP-response element-binding protein                     |
| Dex           | dexamethasone   |
| DTT           | dithiothreitol  |
| ES            | embryonic stem  |
| fad           | factor for adipocyte differentiation                      |
| FBS           | fetal bovine serum  |
| HEPES         | N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid        |
| IBMX          | 3-isobutyl-1-methylxanthine                               |
| KCNK10        | potassium channel, subfamily K, member 10                 |
| LRR           | leucine-rich repeat                                       |
| LRRC8         | leucine-rich repeat containing 8                          |
| MCE           | mitotic clonal expansion                                  |
| ORF           | open reading frame  |
| PBS           | phosphate buffered saline                                 |
| PCR           | polymerase chain reaction                                 |
| PI3K          | phosphatidylinositol-3 kinase                             |
| PKA           | protein kinase A  |
| PMSF          | phenylmethylsulfonyl fluoride                             |
| PPAR $\gamma$ | peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$       |
| Q-PCR         | quantitative polymerase chain reaction                    |
| RT-PCR        | reverse transcriptase coupled polymerase chain reaction   |
| SDS-PAGE      | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| shRNA         | short hairpin RNA   |
| SREBP         | sterol regulatory element-binding protein                 |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor $\alpha$                            |
| VRAC          | volume-regulated anion channel                            |

## 緒 論

世界的規模で脂肪分摂取の増大や運動不足などによる肥満とそれに伴う生活習慣病が深刻な社会問題となっている (1)。平成 26 年版厚生労働白書によると、日本においても食生活の欧米化に伴い同様の問題を抱えている。平成 25 年の統計では、日本人の死因の第二位と第四位はそれぞれ心疾患と脳血管疾患であり、全体の約四分の一を占める。これら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付いた結果だと考えられている (Fig. 1)。したがって、日本をはじめとする世界各国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の解明は最重要課題の一つである。

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。その蓄積が過剰となり脂肪組織中の脂肪細胞が肥大化した時に肥満が形成されると長年考えられてきた。その後、脂肪組織中の脂肪細胞の数が増加することまた、肥満形成の重要なメカニズムの一つであることが明らかにされた (2)。脂肪組織には、成熟脂肪細胞に加えて前駆脂肪細胞が多数存在し、脂肪細胞への分化の準備をしていると考えられている。これら前駆脂肪細胞は摂食や栄養条件により分化へのスイッチが入り脂肪細胞の数が増加することが推察されている。したがって、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なことである (Fig. 1)。

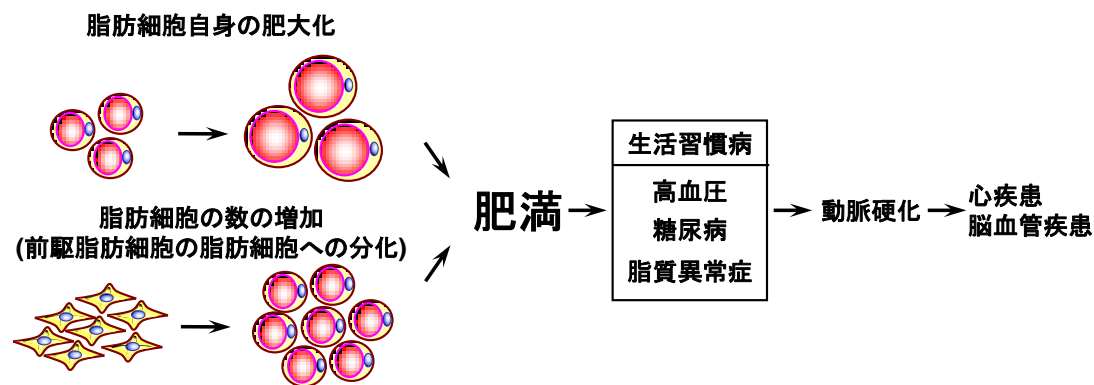
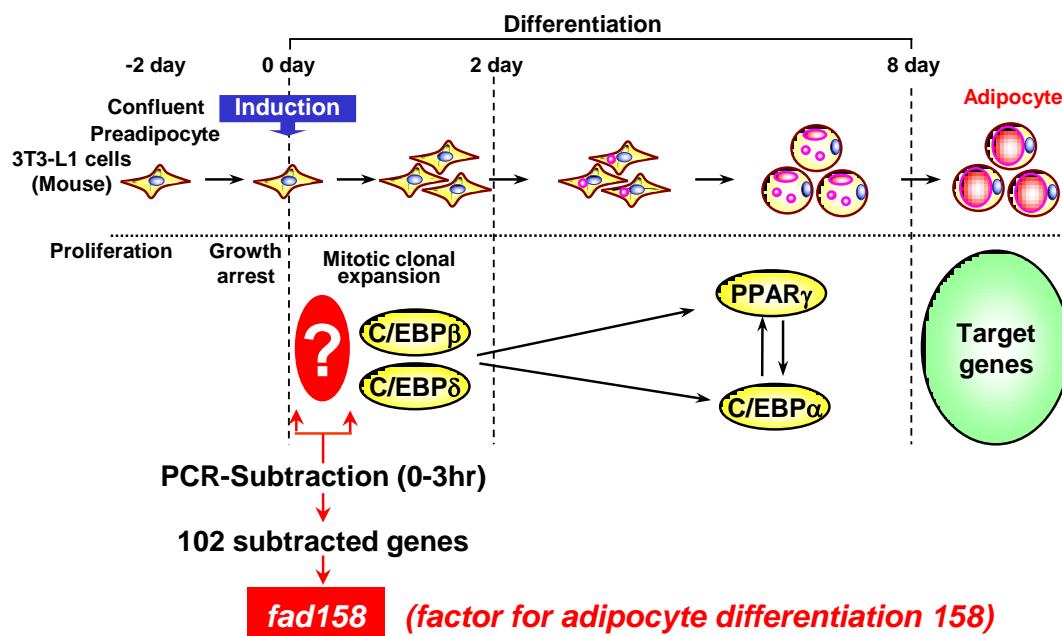


Fig. 1. Metabolic syndrome and mechanism of obesity.

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、線維芽細胞の形態で増殖し、コンフレントに達し休止期に入った時、脂肪細胞分化誘導剤である、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 (3-5)。その過程の中期以降において、核内受容体型転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )やロイシンジッパー型転写因子である CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)ファミリー、脂肪酸やコレステロール合成に必須な転写因子である sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1)が重要な役割を果たしていることが報告されている (6, 7)。さらに、これらの欠損マウスの検討から、PPAR $\gamma$ と C/EBP ファミリーが脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであることが証明された (6-12)。一方で、脂肪細胞分化初期については未だに不明な点が多く残されている (Fig. 2)。



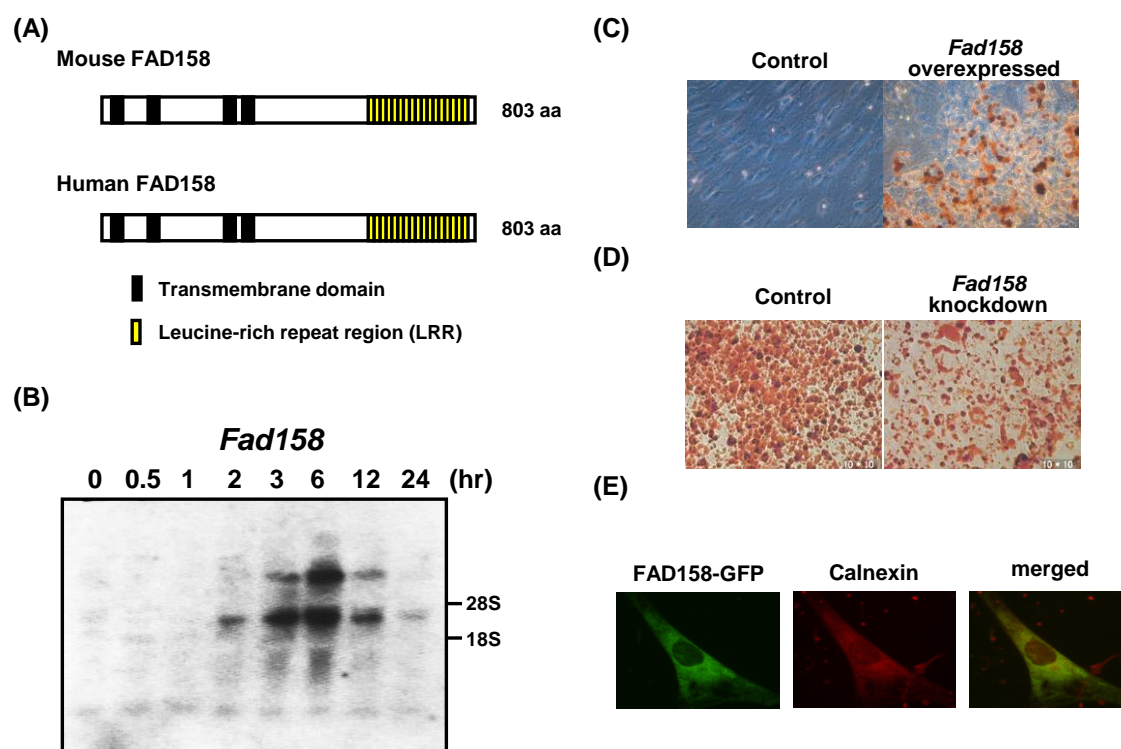
(独) 家畜改良センターとの共同研究

***kcnk10*** (potassium channel, subfamily K, member 10)

**Fig. 2. Stages in adipocyte differentiation and the isolation of *fad158* and *kcnk10* in the early stage of adipogenesis.**

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て、脂肪細胞分化の極めて初期に着目して研究を進めてきた。当研究室では、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-サブトラクション法により、これまでに 102 クローン単離している (13, 14)。その中の clone 158 は、脂肪細胞分化初期に一過性に発現が上昇し、単離当時未知遺伝子であったことから、*factor for adipocyte differentiation 158* (*fad158*) と命名した。*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、*fad158* の発現が脂肪細胞分化誘導 6 時間後をピークに一過性で上昇すること、過剰発現系および発現抑制系の検討から *fad158* が脂肪細胞分化を正に制御すること、FAD158 が小胞体に局在することが明らかとなっている (15) (Fig. 3)。



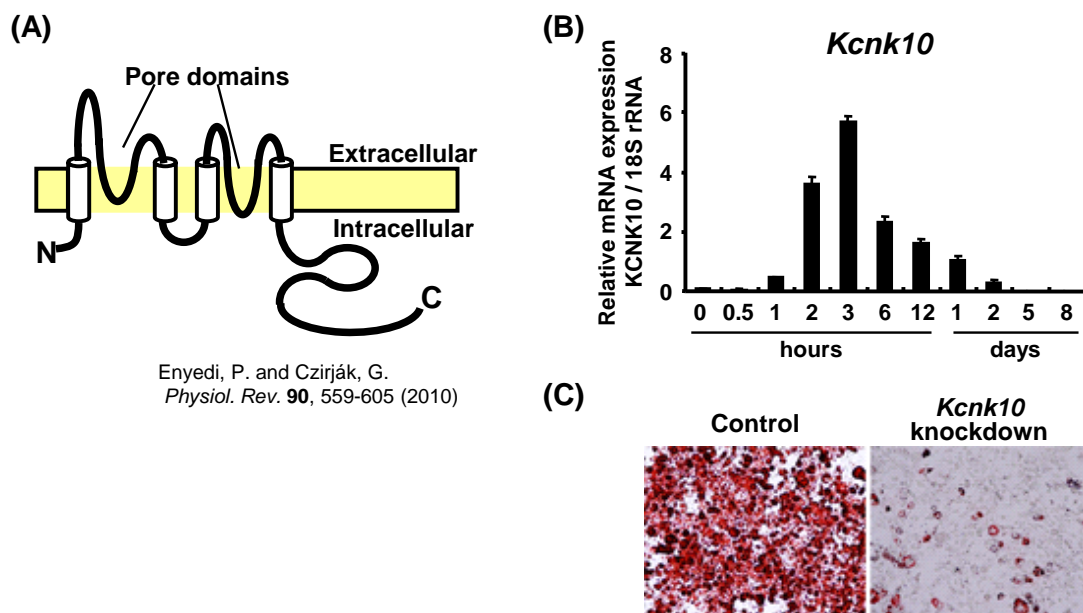
**Fig. 3. Characterization of FAD158 and functional analysis of *fad158* on adipogenesis.**

(A) The schematic structures of mouse and human FAD158. (B) The change in *fad158* expression level during the early stage of adipocyte differentiation. (C) NIH-3T3 cells stably expressing *fad158* or control cells were treated with adipogenic inducers containing BRL49653, a PPAR $\gamma$  ligand. After 8 days of induction, the cells were stained with oil red O to detect oil droplets. (D) Adipocyte differentiation in *fad158* knockdown 3T3-L1 cells was estimated by oil red O stain. (E) Subcellular localization of FAD158.

また、当研究室では独立行政法人家畜改良センターとの共同研究として、K<sup>+</sup>チャネルの一つである potassium channel, subfamily K, member 10 (KCNK10)の解析を行ってきた。同センターでは、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て、筋肉内脂肪含量についての quantitative trait locus 解析を行った (16)。その解析結果から検出された遺伝子について、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における mRNA の発現変化を検討した結果、発現量が大きく変化したのは *kcnk10* のみであった (17)。K<sup>+</sup>チャネルは大きく分類すると、電位依存性 K<sup>+</sup>チャネル、内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネル、Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネル、two-pore domain (K<sub>2p</sub>) K<sup>+</sup>チャネルの 4 つに分けられる。KCNK10 は、その中の K<sub>2p</sub> チャネルに属する (18, 19)。K<sub>2p</sub> チャネルは 4 つの膜貫通領域と 2 つの pore domain



を持つことが分かっている (18, 19)。当研究室では、*kcnk10* の発現が脂肪細胞分化誘導 3 時間後をピークに一過性で上昇すること、発現抑制系の検討から KCNK10 が脂肪細胞分化を正に制御することを明らかとしている (Fig. 4)。



**Fig. 4. Characterization of KCNK10 and functional analysis of *kcnk10* on adipogenesis.**

(A) Schematic transmembrane topology of two-pore domain potassium (K<sub>2P</sub>) channels. K<sub>2P</sub> channels have four transmembrane domains and two pore domains. (B) The change in *kcnk10* expression level during the early stage of adipocyte differentiation. (C) Adipocyte differentiation in *kcnk10* knockdown 3T3-L1 cells was estimated by oil red O stain.

そこで本研究では、*fad158* および KCNK10 の更なる機能解析を進めることを目的とした。まず、FAD158 が小胞体膜タンパク質であることから、そのトポロジーの解析を行った。次に、*fad158* の個体レベルの役割を明らかにするため、*fad158* ノックアウトマウスを樹立し、その解析を行った。さらに、KCNK10 については、脂肪細胞分化に必須である MCE を中心に機能解析を行った。

## 本 論

### 第一章 *fad158* の機能解析

#### 第一節 FAD158 のトポロジーの解析

FAD158 はドメイン検索により 4 つの膜貫通領域を持つこと、細胞内局在の検討により小胞体に局在していることが明らかになっている (15)。しかし、FAD158 が小胞体膜にどのような構造で局在しているか、そのトポロジーは明らかとなっていない。そこで、FAD158 のトポロジーの解析を行った。

##### (1) 実験材料および実験方法

###### 1-1 実験材料

HeLa 細胞 (東京大学から供与)

イーグル MEM 培地 (ニッスイ)

Cell line Nucleofector Kit R (Amaxa)

FBS (GIBCO BRL)

PBST 0.1% Tween 20, PBS

Buffer A 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 250 mM Sucrose, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1/1000 vol. Protease inhibitor cocktail (Sigma)

Buffer B 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 250 mM Sucrose, 1 mM DTT

Triton X-100 (ナカライテスク)

Proteinase K (Roche)

SDS loading buffer 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue

Blotting buffer 25 mM Tris (hydroxymethyl) aminometane, 192 mM Glycine, 20% Methanol

Blocking buffer Block Ace (大日本製薬)

一次抗体

- c-Myc Monoclonal Antibody (BD Biosciences) (ウェスタンブロット解析では、Blocking buffer で 500 倍希釈して使用し、免疫染色では、1% BSA 含有 PBST で 20 倍希釈して使用した)
- ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody (Sigma) (ウェスタンブロット解析では、Blocking buffer で 1,000 倍希釈して使用し、免疫染色では、1% BSA 含有 PBST で 500 倍希釈して使用した)
- Rabbit anti human Calnexin polyclonal antibody (Santa Cruz) (ウェスタンブロット解析では、Blocking buffer で 200 倍希釈して使用し、免

|  |  |
|--|--|
| 二次抗体   | <p>疫染色では、1% BSA 含有 PBST で 100 倍希釈して使用した)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) (Blocking buffer で 4,000 倍希釈して使用)</li> <li>• Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) (Blocking buffer で 5,000 倍希釈して使用)</li> <li>• ANTI-Mouse IgG (Fab specific) FITC conjugate (Sigma) (1% BSA 含有 PBST で 200 倍希釈して使用)</li> <li>• ANTI-Rabbit IgG (Whole Molecule) TRITC conjugate (Sigma) (1% BSA 含有 PBST で 200 倍希釈して使用)</li> </ul> |
| TTBS   | 150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8.0), 0.1% Tween   |
| BCIP/NBT Phosphatase Substrate (1-Component) (Kirkegaard & Perry Laboratories) |  |

## 1-2 Myc-FAD158-Flag 融合タンパク質発現プラスミドの構築

*Fad158* の ORF の 5' 側に *EcoRI* サイト、終止コドンの前に *KpnI* サイトをつけて PCR で増幅させ、pCMV-Myc ベクター (BD Biosciences) の *EcoRI*、*KpnI* サイトに導入した。さらに、5' 側に *KpnI* サイト、3' 側に *NotI* サイトをつけた Flag tag をコードするカセットを Oligonucleotide で作製し、*KpnI*、*NotI* サイトに導入した。

## 1-3 HeLa 細胞の培養

10% FBS 含有イーグル MEM 培地を用いて、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。

## 1-4 トランスフェクション

HeLa 細胞へのプラスミド導入は、Nucleofector (Amaxa)を用いて行った。2×10<sup>6</sup> 個の細胞に対して、プラスミド 1 µg、Cell line Nucleofector Kit R (Amaxa) 95 µl を用い program: I-13 で電気パルスを与えた。その細胞を 10 cm dish (FALCON)に播き、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。

## 1-5 免疫染色

Myc-FAD158-Flag 融合タンパク質発現プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、セルデスク (SUMILON)上で 24 時間培養した。PBS で 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間室温で固定した。PBS で 3 回洗浄した後、0.2%ゼラチン、0.2% Triton X-100 を含む PBS で 30 分間処理した。さらに、PBS で 3 回洗浄した後、1% BSA 含有 PBST で 1 時間処理した。その後、室温で 1 時間一次抗体反応させた後、PBST で 3 回洗浄し、室温で 1 時間二次抗体反応させた。PBST で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡 BX51 (OLYMPUS)で観察した。

#### 1-6 Protease digestion assay

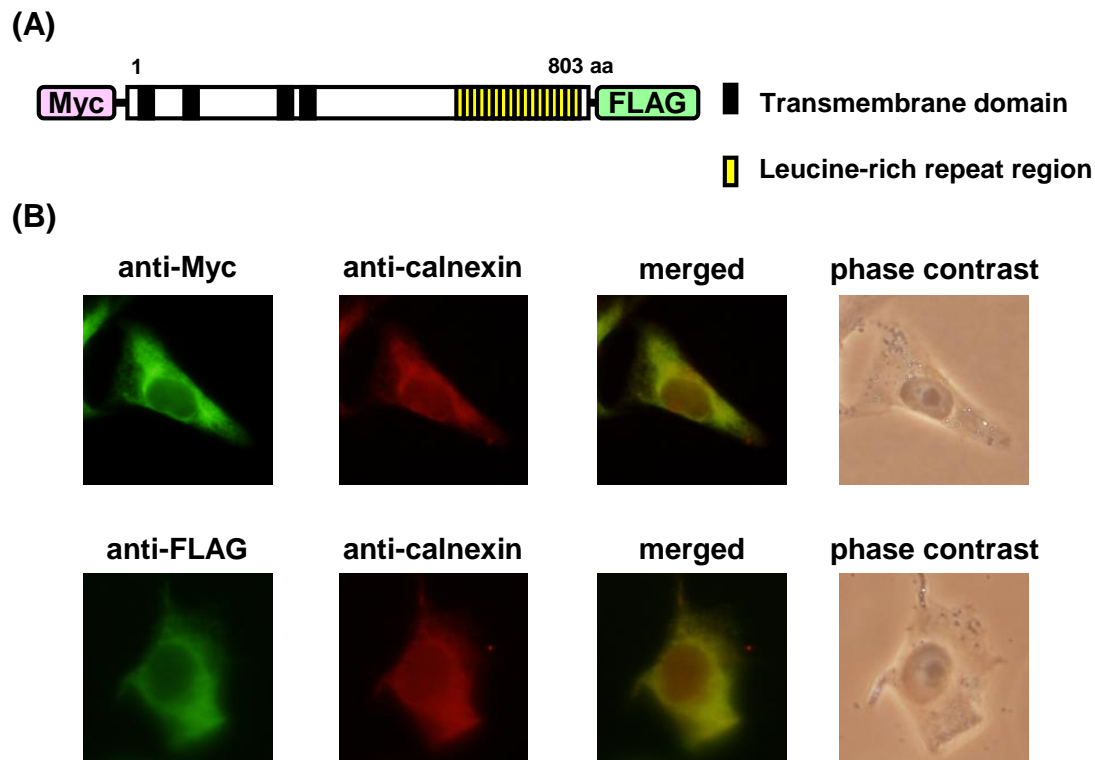
Myc-FAD158-Flag 融合タンパク質発現プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。細胞を Buffer A で懸濁した後、Dounce 型ホモジナイザーで 10 回ホモジナイズし、1,000 ×g で 5 分間、4°C で遠心した。さらに、上清を 55,000 rpm で 1 時間、4 °C で遠心し、上清を除去し、膜画分を得た。膜画分を Buffer B で懸濁してタンパク定量し、膜画分 100 µg を Triton X-100 で処理または未処理で、Proteinase K を加え 1 時間、4 °C で消化した。アセトン沈殿した後、SDS loading buffer に懸濁し 5 分間煮沸しサンプルを調製した。続いて、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)、ウェスタンブロット解析を行った。

#### 1-7 ウェスタンブロット解析

Protease digestion assay により得られたサンプルを SDS-PAGE により分離した。Blotting buffer 中で Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)へトランスファーした。トランスファー後、membrane を Blocking buffer に浸し、4°C で一晩ブロッキングした。次に、membrane を一次抗体に浸し、室温で 1 時間反応させた。続いて、membrane を二次抗体に浸し、室温で 1 時間反応させた後、BCIP/NBT を用いて発色させた。

#### (2) 結果

FAD158 のトポロジーを明らかにするため、N 末端に Myc タグ、C 末端に FLAG タグを持つダブルタグ融合 FAD158 を発現するプラスミドを構築した (Fig. 5A)。次に、ダブルタグが FAD158 の局在に影響を与えていないかを検討するため、HeLa 細胞にダブルタグ融合 FAD158 を発現させ、抗 Myc 抗体および抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 5B)。その結果、抗 Myc 抗体、抗 FLAG 抗体のどちらで免疫染色を行った時も、小胞体膜タンパク質である calnexin の局在と一致した。以上の結果より、ダブルタグを融合しても FAD158 の局在が変化しないことを確認した。



**Fig. 5. Schematic representation and subcellular localization of Myc-FAD158-FLAG fusion protein.**

(A) Schematic representation of Myc-FAD158-FLAG fusion protein. (B) Subcellular localization of Myc-FAD158-FLAG fusion protein. Transiently transfected HeLa cells were fixed for immunofluorescence staining with anti-Myc or anti-FLAG and anti-calnexin, the endoplasmic reticulum marker. Fluorescence of Myc (green, FITC), FLAG (green, FITC) and calnexin (red, TRITC) was detected with fluorescence microscopy.

トポロジーは protease digestion assay により検討した (Fig. 6)。FAD158 はドメイン検索の結果から 4 回膜貫通タンパク質である可能性が高いと考えられる (15)。このことを前提に考えると、FAD158 の構造は、末端が小胞体内腔に存在する構造 (A)、末端が細胞質内に存在する構造 (B) の 2 通りが考えられる。FAD158 がどちらの構造であるかは、Proteinase K 処理および Triton X-100 処理の有無によって、消化断片が検出されるか否かによって決定される。まず、Proteinase K を加えない場合、(A)、(B)ともに、タンパク質の全長が検出される。次に、Proteinase K を加えた場合、Triton X-100 を加えないと、(A)はエピトープを含む末端が小胞体内腔にあるため消化されず、ウェスタンブロット解析で消化断片が検出される。一方、(B)はエピトープを含む末端が小胞体の外側にあるため消化され、ウェスタンブロット解析で何も検出されない。続いて、Triton X-100 を加えると、(A)、(B)ともに小胞体膜が破壊されて、すべてが消化されるため、ウェスタンブロット解析で何も検出されない。

以上より、抗 Myc 抗体、抗 FLAG 抗体とともに消化断片が検出されたら、両末端が

小胞体内腔に、ともに検出されなかったら両末端は細胞質側に存在すると判断する。なお、抗 Myc 抗体、抗 FLAG 抗体のうち、どちらか一方で検出され、もう片方で検出されなかった場合は、4 回膜貫通ではなく、膜貫通領域が奇数個存在する可能性が示唆される。

(A) In the case where N- and C- terminal ends of FAD158 are oriented toward the ER lumen.

(B) In the case where N- and C- terminal ends of FAD158 are oriented toward the cytoplasm.

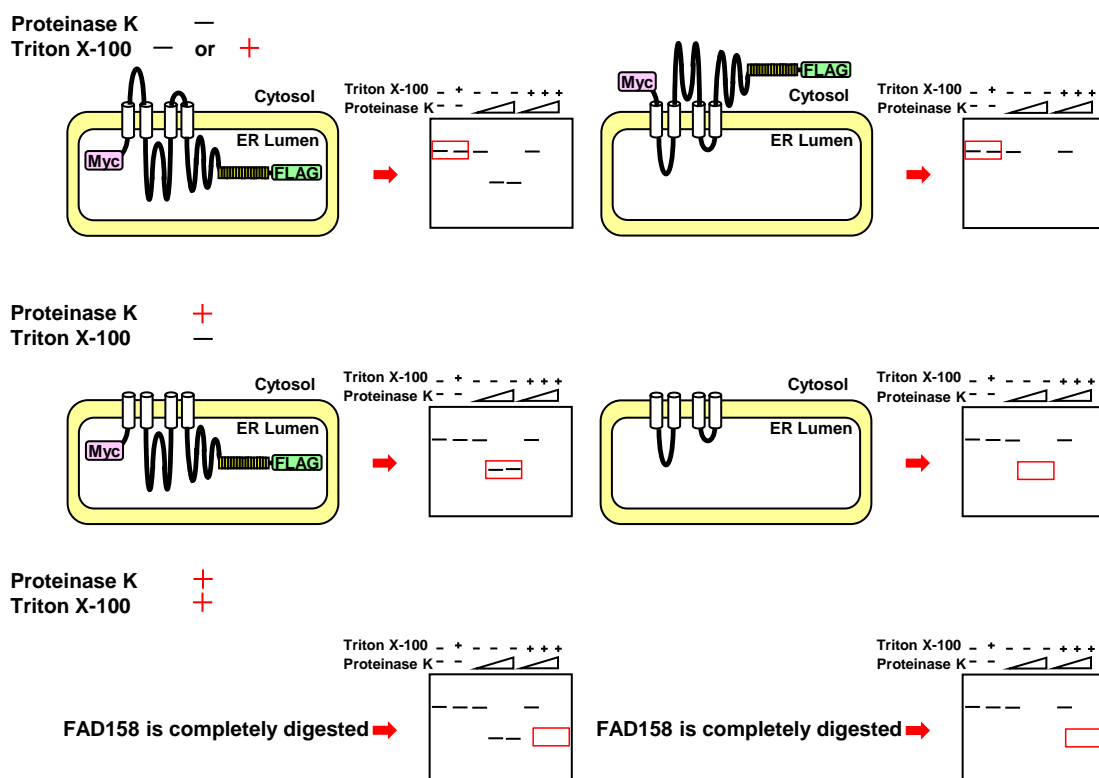
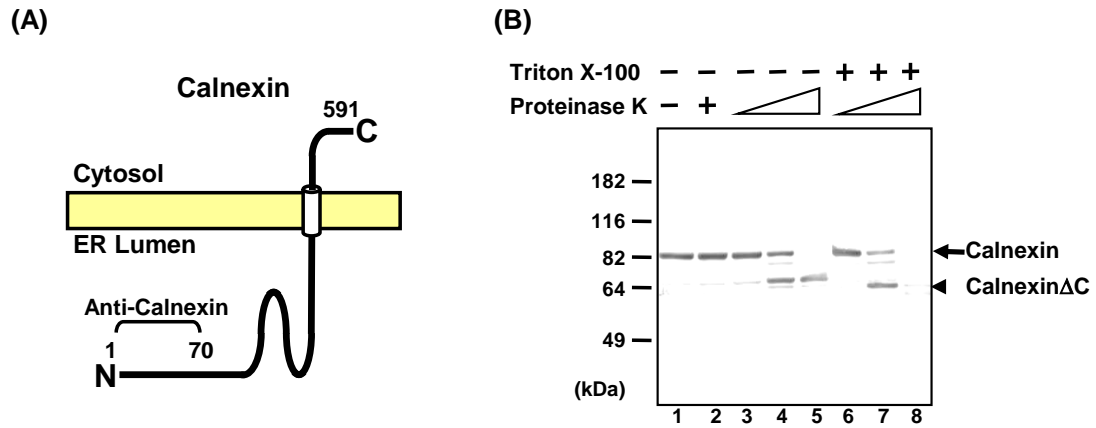


Fig. 6. Principle of protease digestion assay and determination of FAD158 membrane topology.

はじめに、コントロールとして calnexin の Protease digestion assay を行った。calnexin は、1 回膜貫通型の小胞体膜タンパク質であり、解析に用いた抗 calnexin 抗体は、小胞体内腔に位置する N 末端 (amino acid residues 1-70) を認識する (Fig. 7A)。まず、Proteinase K を加えない場合、約 82 kDa の全長 calnexin が検出された (Fig. 7B, lane 1, 2)。次に、Proteinase K を加えた場合、Triton X-100 を加えないと、C 末端が消化され生じた約 65 kDa の消化断片が検出された (Fig. 7B, lane 3-5)。続いて、Triton X-100 を加えると、約 65 kDa の calnexin 消化断片が消失した (Fig. 7B, lane 8)。以上の結果より、Protease digestion assay の実験系が成立していることが確認できた。

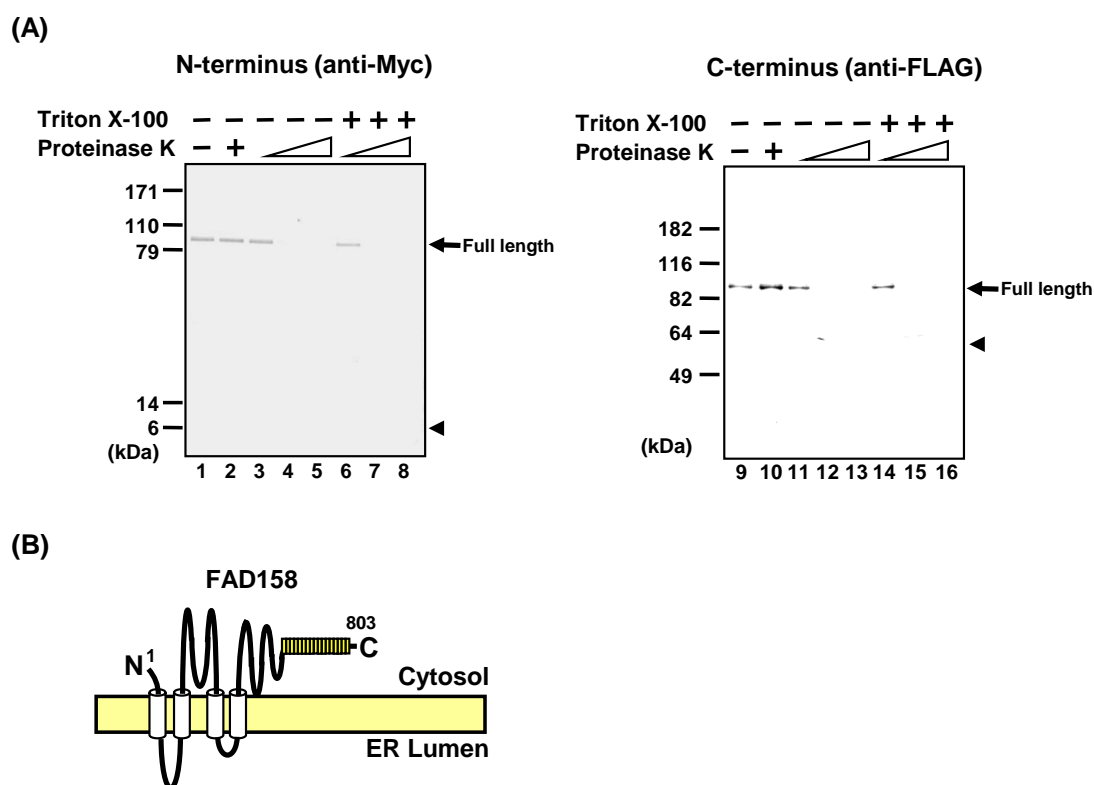


**Fig. 7. Determination of the membrane topology of calnexin.**

(A) Schematic transmembrane topology of calnexin. The anti-calnexin antibody recognizes the N terminal region of calnexin (amino acid residues 1-70). (B) Total membrane fractions were prepared from HeLa cells transfected Myc-FAD158-FLAG fusion protein expression plasmid and treated without or with proteinase K in the absence or presence of Triton X-100. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane, followed by immunoblotting with anti-calnexin antibody.

この条件下で、FAD158 のトポロジーの検討を行った。まず、Proteinase K を加えない場合、抗 Myc 抗体、抗 FLAG 抗体を用いた時、ともに約 95 kDa の全長 FAD158 が検出された (Fig. 8A, lane 1, 2, 9, 10)。次に、Proteinase K を加えた場合、末端が小胞体内腔に位置する時に抗 Myc 抗体では約 6 kDa に、抗 FLAG 抗体では約 56 kDa に検出されることが予想される消化断片は検出されなかった (Fig. 8A, lane 3-5, 11-13)。

以上の結果より、FAD158 は N 末端および C 末端がともに細胞質側に存在する構造で小胞体膜に局在する可能性が示唆された (Fig. 8B)。



**Fig. 8. Determination of the membrane topology of FAD158.**

(A) Total membrane fractions were prepared from HeLa cells transfected Myc-FAD158-FLAG fusion protein expression plasmid and treated without or with proteinase K in the absence or presence of Triton X-100. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane, followed by immunoblotting with anti-Myc (right) and anti-FLAG (left) antibody. (B) A model depicting the proposed membrane topology of FAD158.



## 第二節 *fad158* ノックアウトマウスの樹立と解析

細胞レベルでは、*fad158* が脂肪細胞分化を正に制御していることが分かっているが、個体レベルでの *fad158* の役割は全く分かっていない (15)。そこで、*fad158* ノックアウトマウスの樹立と、その解析を行った。

### (1) 実験動物

本検討で用いた動物は、明暗 12 時間周期、室温 23°C、湿度 52-59%、自由摂食、自由摂水下で飼育した。なお、動物実験は「名古屋市立大学動物実験規定」に基づき、名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センターで行った。

### (2) 実験材料および実験方法

#### 2-1 実験材料

*fad158* ターゲティングベクター (20)

tail prep buffer      0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS 0.5 mg/mL Proteinase K

phenol/CIAA      phenol, chloroform, isoamylalcohol (25:24:1 で混合)

RNase A (MARLIGEN)

アルカリ変性溶液    0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

中和溶液      1.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl

20× SSC      3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate

50× Denhardt's      1% ficoll 400, 1% Polyvinylpyrrolidone, 1% bovine serum albumin

20× SSPE      3.6 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M EDTA

NaOH で pH 7.7 に調整

ハイブリダイゼーションバッファー

20 g/ml salmon sperm DNA, 50% formamide, 5× SSPE, 5× Denhardt's, 0.1% SDS

標準飼料      MEQ (オリエンタル酵母工業株式会社)

高脂肪飼料      HFD 32 (日本クレア株式会社)

ノボリン R 注 100 単位/ml (ノボ ノルディスク ファーマ株式会社)

テルモシリンジ 1 ml (テルモ株式会社)

テルモ注射針 27G (テルモ株式会社)

テルモヘマトクリット毛細管 (テルモ株式会社)

グルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社)

D(+)-Glucose (和光純薬工業株式会社)

## 2-2 組み換え ES 細胞のスクリーニング

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa)を用いて、以下の条件で PCR を行った。得られた PCR 産物を 0.8% agarose gel で電気泳動し、EtBr で染色した。

反応組成 TaKaRa LA Taq (TaKaRa)に準じた。

反応条件     denature     :   94°C     1 min  
              annealing    :   70°C     1 min  
              extension    :   72°C     3 min  
              サイクル数   :   40

プライマー                         :   5'-TGCCAGGCACCCACATAGCAGGTCACAA-3'  
                                      :   5'-GGGAGGAGTAGAAGGTGGCGCGAAGGGG-3'

## 2-3 ゲノミックサザンブロット解析による遺伝子型決定

ES 細胞またはマウスの尾から tail prep buffer、phenol/CIAA を用いてゲノムを抽出した。得られたゲノム 10 µg を制限酵素 *SphI* で処理しエタノール沈殿を行った後、0.8% agarose gel で電気泳動した。ゲルを 0.25 N HCl で 15 分、アルカリ変性溶液で 30 分、中和溶液で 45 分処理した後、DNA を Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia)にトランスファーした。トランスファーは 12 時間以上行い、バッファーは 20× SSC を用いた。トランスファーしたフィルターを 2× SSC で洗浄し 6 時間風乾させた。その後、UV 照射を行い固定した。フィルターを ハイブリダイゼーションバッファーに浸し、42°C 一晩、プレハイブリダイゼーションを行った。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて回収したフラグメント 60 ng を BcaBEST™ Labeling kit (TaKaRa) を用いて[α-<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham Pharmacia) で標識し、Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia) を用いたカラムに通し、プローブを作成した。ハイブリダイゼーションバッファーに熱変性させたプローブを加え、42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを一次洗浄液 (2× SSPE、0.1% SDS)を用いて 42°C で 15 分間、さらに一次洗浄液を用いて 42°C で 15 分間、二次洗浄液 (1× SSPE、0.1% SDS)を用いて 42°C で 15 分間、二次洗浄液を用いて 64°C で 15 分間の条件で洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

## 2-4 *fad158* ノックアウトマウスの樹立

*fad158* ターゲティングベクターを D3 ES 細胞へトランスフェクションした。得られた ES 細胞をスクリーニングしたところ、3 つのクローンで相同組み換えが確認された。この 3 つのクローンを胚盤胞期の C57BL/6 Cr 由来受精卵へインジェクションし、キメラマウスを得た。キメラマウスを C57BL/6J 雌マウスと交配したところ、3 系統のうち 2 系統でジャームライントランスミッションが確認できた。*fad158* ヘテロノックアウトマウス雄について戻し交配を 9 回以上行い、C57BL/6J に遺伝的背景を揃えた。

なお、ES 細胞へのターゲティングベクターの導入と ES 細胞からのキメラマウスの

作製は、大阪大学微生物病研究所、岡部先生、伊川先生との共同研究で行った。

## 2-5 total RNA の調製

TriPure (Roche)を用いて添付プロトコルに従い、摘出したマウスの各臓器から total RNA を調製した。

## 2-6 RT-PCR

ReverTra Ace - $\alpha$ - (TOYOBO)を用いて添付プロトコルに従い、調製した total RNA から single strand cDNA を作製した。

## 2-7 Real-time quantitative PCR (Q-PCR)

ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems)を用いて、以下の条件で行った。なお、内部標準として 18S rRNA を用いた。

反応組成      TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)に準じた。

反応条件      1 cycle : 50°C    2 min

                 1 cycle : 95°C    10 min

                 40 cycles : 95°C    15 sec, 60°C    1 min

プライマーおよびプローブ

*fad158* : Mm00505716\_m1

18S rRNA : 4308329

検量線          3T3-L1 細胞の分化誘導後 6 時間由来の single strand cDNA を用いた。

## 2-8 Semi-quantitative RT-PCR

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa)を用いて、以下の条件で PCR を行った。得られた PCR 産物を 8% polyacrylamide gel で電気泳動し、EtBr で染色後、フルオロイメジャー (Molecular Dynamics)で目的のバンドを定量化した。なお、内部標準として 18S rRNA を用いた。

反応組成      AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)に準じた。

反応条件      denature : 95°C    30 sec

                 annealing : 56°C    30 sec

                 extension : 72°C    1 min

|       |   |               |     |    |       |    |
|-------|---|---------------|-----|----|-------|----|
| サイクル数 | : | <i>fad158</i> | WAT | 28 | liver | 32 |
|       |   | LRRC8a        | WAT | 27 | liver | 29 |
|       |   | LRRC8b        | WAT | 27 | liver | 30 |
|       |   | LRRC8d        | WAT | 27 | liver | 27 |
|       |   | LRRC8e        | WAT | 31 | liver | 35 |

|       |               |          |                            |    |       |    |
|-------|---------------|----------|----------------------------|----|-------|----|
|       |               | 18S rRNA | WAT                        | 21 | liver | 21 |
| プライマー | <i>fad158</i> | :        | 5'-TCCCAATGTCTCCCAGGCAG-3' |    |       |    |
|       |               |          | 5'-CTTGGCCTGCTCACCTTCCT-3' |    |       |    |
|       | LRRC8a        | :        | 5'-ACCAAAGACTCCTGCAAC-3'   |    |       |    |
|       |               |          | 5'-GTAGACGGTGTAGCAGAT-3'   |    |       |    |
|       | LRRC8b        | :        | 5'-TGACAATCAGTGCGCTGT-3'   |    |       |    |
|       |               |          | 5'-CACTGGTAGCGCTTATAG-3'   |    |       |    |
|       | LRRC8d        | :        | 5'-GCTCCAAGGTTGAGCATT-3'   |    |       |    |
|       |               |          | 5'-TTCGGGGATCAGTTCAAG-3'   |    |       |    |
|       | LRRC8e        | :        | 5'-CCACGAATCTCGTGAGAA-3'   |    |       |    |
|       |               |          | 5'-GTTGTAAACCAGGATGGC-3'   |    |       |    |

## 2-9 インスリン耐性試験

マウスを3時間絶食させた後、インスリンを0.75 U/kg body weightで腹腔内投与し、投与後0、15、30、60分の血液を尾静脈から採取した。得られた血液の血中グルコース濃度をグルコースCII-テストワコーを用いて測定した。

## 2-10 糖負荷試験

マウスを16時間絶食させた後、グルコースを1 g/kg body weightで腹腔内投与し、投与後0、15、30、60、120分の血液を尾静脈から採取した。得られた血液の血中グルコース濃度をグルコースCII-テストワコーを用いて測定した。

## 2-11 高脂肪食摂食下の実験

高脂肪食摂食下の実験では、マウスに32%の脂肪分を含む飼料を、5週齢から実験終了まで与えた。

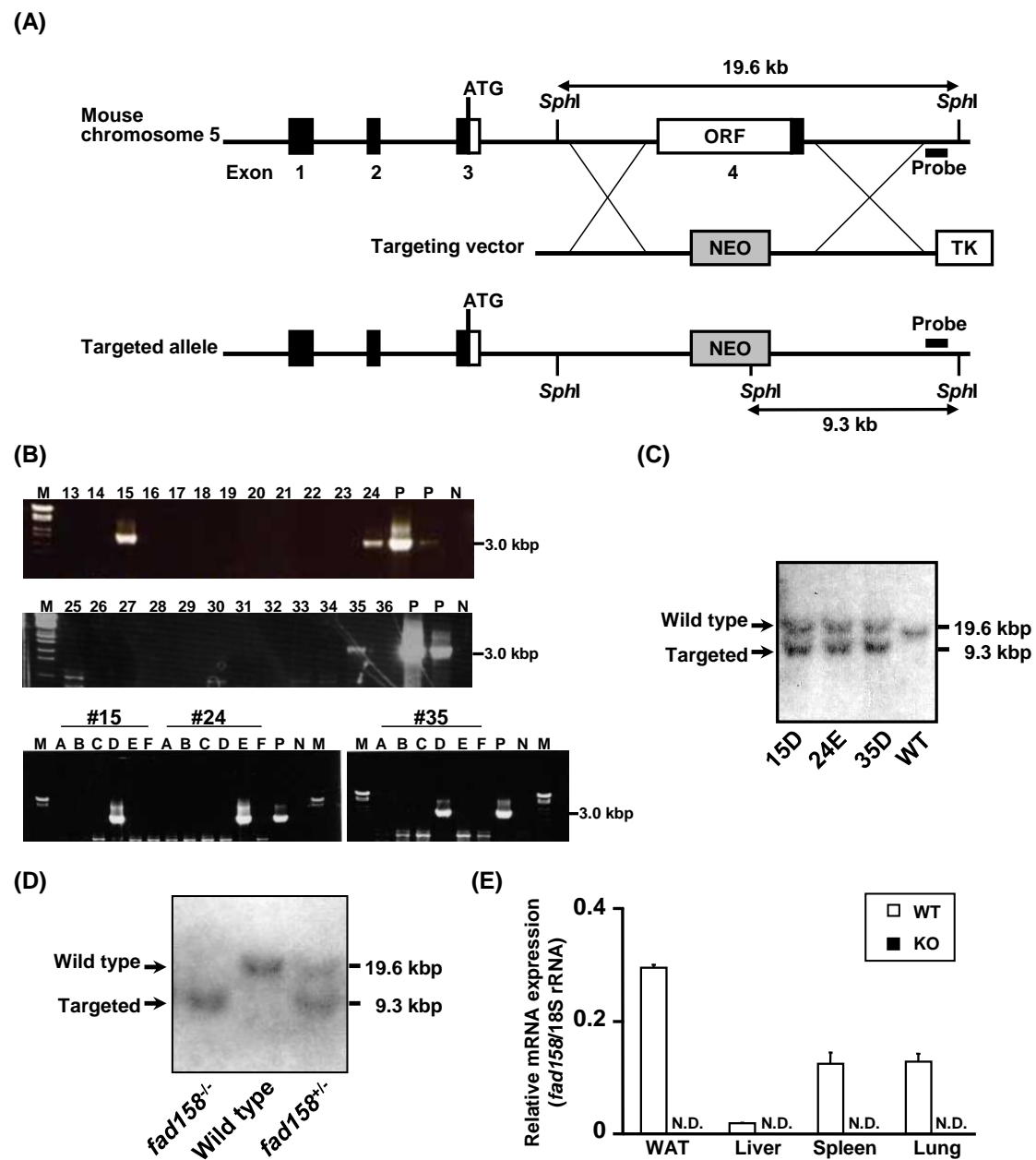
## 2-12 統計処理

Fig. 9Cを除いて、実験結果は全て平均値±標準誤差として表示した。2群間の平均値差の検定にはStudent's t-testを用いた。なお、Fig. 9Cは平均値±標準偏差として表示した。

## (3) 結果

*fad158*の個体レベルでの役割を明らかにするため、*fad158*ノックアウトマウスの樹立を行った。*fad158*はmouse chromosome 5にある単一コピー遺伝子であり、4つのexonからなり、翻訳開始コドンはexon 3に存在する。ORFの約95%がexon 4に存在することから、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 (Fig. 9A)。

まず、ES 細胞にターゲティングベクターをトランスフェクションし、相同組み換えを起こしたものを選別する目的で、PCR スクリーニングを行った (Fig. 9B)。PCR スクリーニングは、2 段階に分けて行った。まず、6 クローンずつ混合した検体でスクリーニングした。次に、ポジティブバンドが得られた検体について、各クローンに分けてスクリーニングを行った。その結果、1 段階目のスクリーニングでは、15、24、35 の 3 つの検体でポジティブバンドが得られ、2 段階目のスクリーニングでは、15D、24E、35D の 3 クローンでポジティブバンドが得られた (Fig. 9B)。続いて、この 3 クローンについて、正しく相同組み換えが起こっているか否か確認するため、ゲノミックサザンブロット解析を行った (Fig. 9C)。その結果、3 クローンすべてにおいて、野生型アレル由来の 19.6 kbp および組み換えアレル由来の 9.3 kbp のバンドが検出された (Fig. 9C)。この 3 クローンからキメラマウスを作製した結果、15D と 24E でジャームライントランスミッションが確認され、2 系統の *fad158* ノックアウトマウスを樹立した。得られたマウスについて、ゲノミックサザンブロット解析を用いてマウスの遺伝子型を調べた (Fig. 9D)。その結果、野生型アレル由来の 19.6 kbp および組み換えアレル由来の 9.3 kbp のバンドが検出でき、野生型、ヘテロノックアウト、ホモノックアウト、いずれのマウスの遺伝子型も確認できた。また、*fad158* ノックアウトマウスは、メンデル率に従って生まれ、成体まで成長することが明らかとなった。次に、得られた *fad158* ノックアウトマウスにおいて各種組織の *fad158* の発現を解析し、*fad158* が発現していないことを確認した (Fig. 9E)。以上より、*fad158* ノックアウトマウスの樹立を完了した。

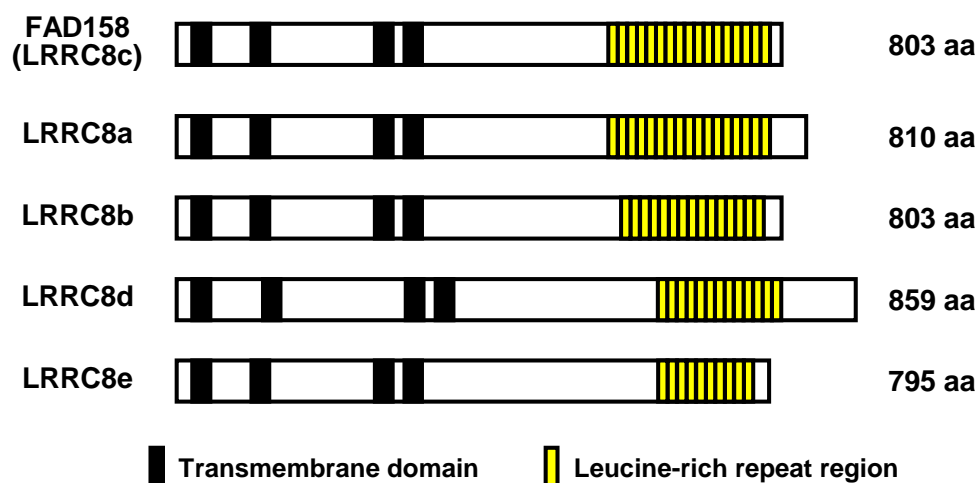


**Fig. 9. The generation of mice lacking *fad158*.**

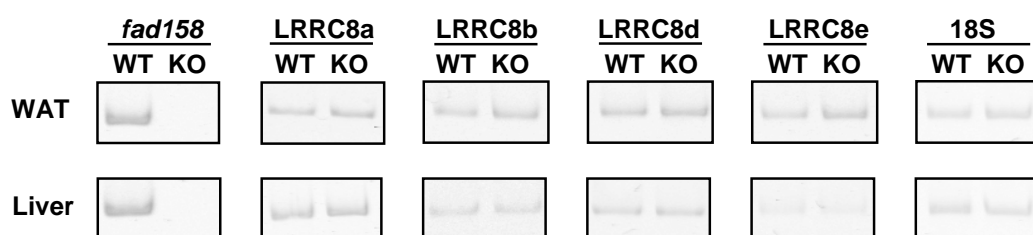
(A) Schematic representation of the gene-targeting strategy. Top: partial restriction map of the *fad158* locus. Middle: construct of the *fad158*-targeting vector. Bottom: the expected mutant locus. The black and white boxes represent the exon and ORF of the *fad158* gene, respectively. The gray and white boxes represent pgk-neo and pgk-tk cassettes, respectively. The DNA fragment used as a probe for Southern blotting is shown as a closed bar. (B) Results of PCR screening. P: positive control. N: negative control. M: marker. (C) Southern blot analysis of ES cell genomic DNA. *SphI*-digested genomic DNA was hybridized with the probe. The 19.6-kb band corresponds to the wild-type allele, and the 9.3-kb band, to the mutant allele. (D) Southern blot analysis of mouse genomic DNA. (E) Evidence for deletion of *fad158*. The level of *fad158* expression in each tissue was determined by Q-PCR and normalized to 18S rRNA expression. The data represent means with standard deviations ( $n = 3$ ).

*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になっている (21)。また、LRRC8 ファミリーは a から e までの 5 つが存在することが報告されている (21) (Fig. 10A)。そこで、*fad158* 欠損が、他の LRRC8 ファミリーの発現に影響を与えるか否か半定量 PCR で検討した (Fig. 10B)。なお、検討は白色脂肪組織および肝臓で行った。その結果、白色脂肪組織および肝臓において他の 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大きな差がない可能性が示唆された。

(A)



(B)

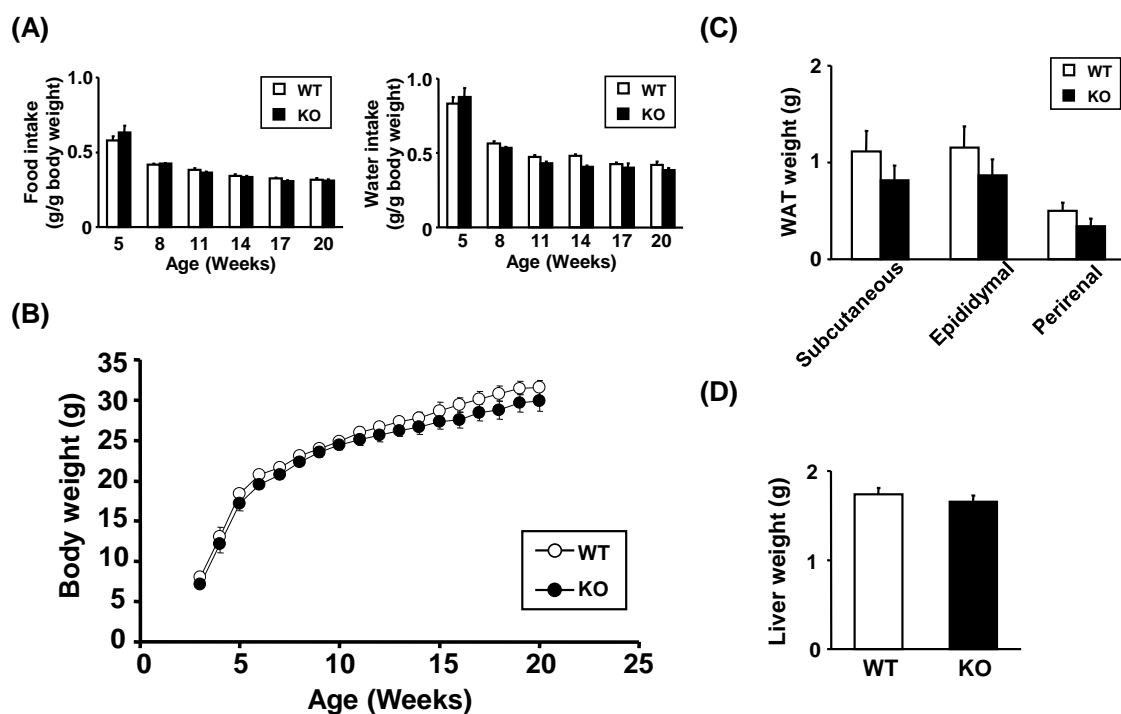


**Fig. 10. Tissue expression of LRRC8 family genes.**

(A) Schematic structures of LRRC8 family proteins. (B) The levels of LRRC8 family genes expression in subcutaneous WAT and liver were determined by semi-quantitative PCR.

次に、*fad158* 欠損が肥満に与える影響について解析した。まず、普通食摂食条件下において解析を行った。摂食量と摂水量を測定した結果、野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスで差が見られなかった (Fig. 11A)。また、野生型マウスと *fad158* ノックア

ウトマウスで体重変化に差が見られなかった (Fig. 11B)。30 週齢でマウスを解剖し組織重量を測定した。その結果、各種白色脂肪組織、肝臓、いずれの組織についても、野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスで差が見られなかった (Figs. 11C, D)。



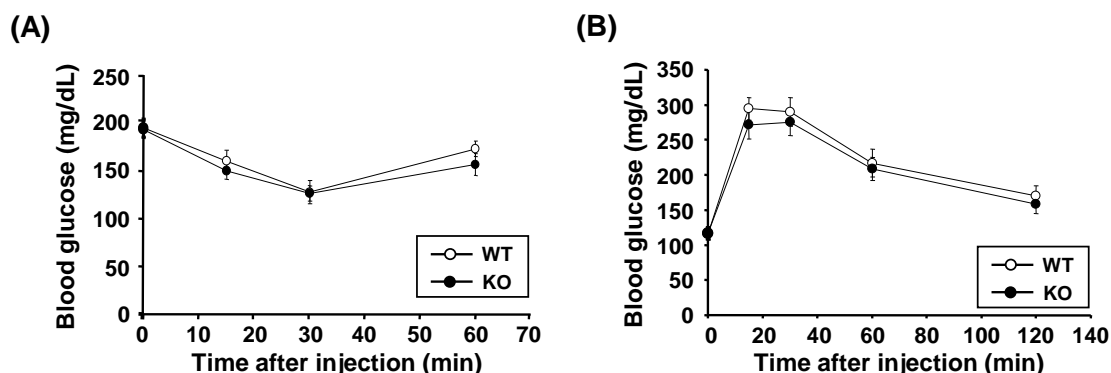
**Fig. 11. Characterization of *fad158*-deficient mice fed a normal chow diet.**

(A) Food intake (left panel) and water intake (right panel) were measured for WT (white bar,  $n = 5$ ) and KO (black bar,  $n = 7$ ) mice fed a normal diet. (B) Time course of changes in body weight in WT (white dots,  $n = 5$ ) and KO (black dots,  $n = 7$ ) mice on a normal diet. (C) Weights of various adipose tissues. WT (white bar,  $n = 5$ ) and KO (black bar,  $n = 7$ ) mice fed a normal diet were sacrificed and dissected at 30 weeks of age. (D) Weight of liver. WT (white bar,  $n = 5$ ) and KO (black bar,  $n = 7$ ) mice fed a normal diet were sacrificed and dissected at 30 weeks of age. Results are presented as the mean and standard error.

普通摂食条件下において、*fad158* 欠損がインスリン感受性および糖代謝能に与える影響を検討するため、23 週齢にインスリン耐性試験、27 週齢に糖負荷試験を行った。インスリン耐性試験の結果、インスリン投与後の血中グルコース濃度変化は野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスで差が見られなかった (Fig. 12A)。また、糖負荷試験の結果、野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスで、グルコース投与後の血中グルコース濃度変化に差が見られなかった (Fig. 12B)。これらの結果から、*fad158* 欠損は普通食摂食下においてインスリン感受性、糖代謝能に影響を与えなかった。



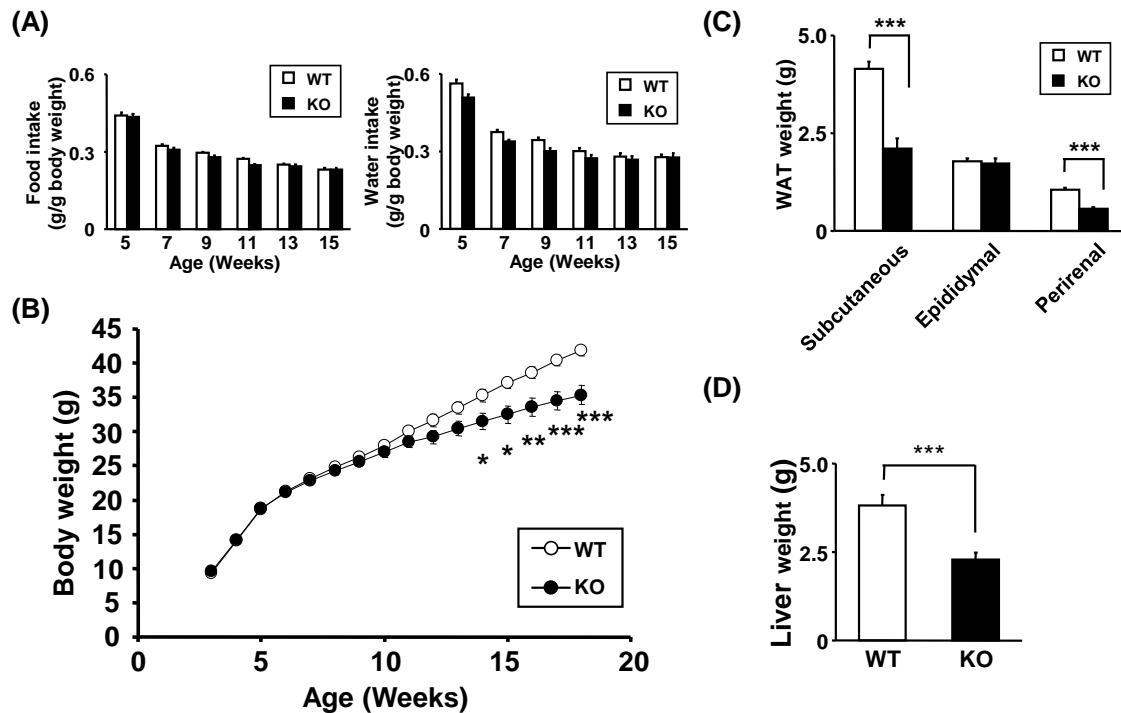
以上の結果より、普通食摂食条件下において、*fad158* 欠損は、解析したいずれのパラメーターにも影響を及ぼさないことが明らかとなった。



**Fig. 12. Insulin sensitivity and glucose homeostasis in wild-type and *fad158*-deficient mice fed a normal chow diet.**

(A) ITT; 3-h fasted WT (white dots,  $n = 5$ ) and KO (black dots,  $n = 7$ ) mice at 23 weeks of age were used. The mice were given an intraperitoneal injection of insulin (0.75 U/kg body weight). (B) GTT; 16-h fasted WT (white dots,  $n = 5$ ) and KO (black dots,  $n = 7$ ) mice at 27 weeks of age were used. The mice were given an intraperitoneal injection of glucose (1.0 g/kg body weight). Results are presented as the mean and standard error.

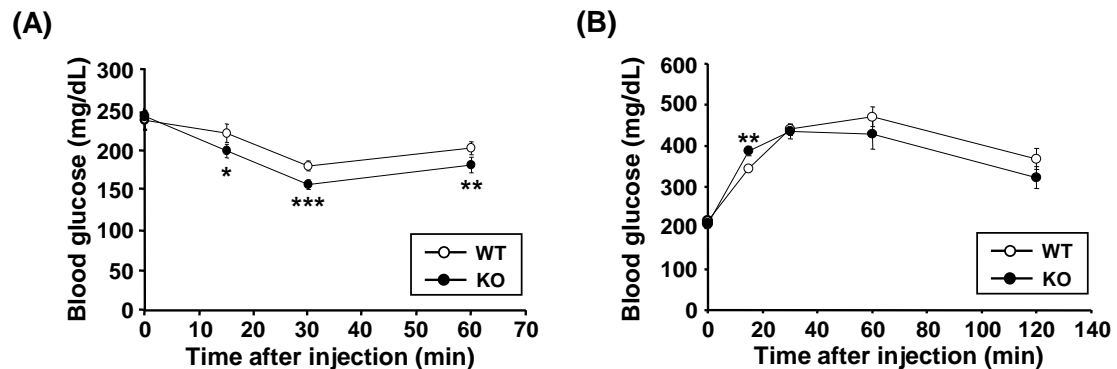
続いて、高脂肪食摂食条件下において解析を行った。摂食量と摂水量を測定した結果、野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスで差が見られなかった (Fig. 13A)。この時のマウスの体重変化を比較すると、野生型マウスでは高脂肪食による体重増加が著しいのに対して、*fad158* ノックアウトマウスでは野生型マウスほど体重増加が大きくなり、14週齢では有意に *fad158* ノックアウトマウスが軽くなった (Fig. 13B)。また、25週齢でマウスを解剖し組織重量を測定した結果、精巣上体白色脂肪組織では差が見られなかったが、皮下および腎周囲白色脂肪組織、肝臓においては、*fad158* ノックアウトマウスの方が軽い結果が得られた (Figs. 13C, D)。



**Fig. 13. Characterization of *fad158*-deficient mice fed a high-fat diet.**

(A) Food intake (left panel) and water intake (right panel) were measured for WT (white bar,  $n = 8$ ) and KO (black bar,  $n = 8$ ) mice fed a high-fat diet. (B) Time course of changes in body weight in WT (white dots,  $n = 8$ ) and KO (black dots,  $n = 8$ ) mice on a high-fat diet. (C) Weights of various adipose tissues. WT (white bar,  $n = 8$ ) and KO (black bar,  $n = 8$ ) mice fed a high-fat diet were sacrificed and dissected at 25 weeks of age. (D) Weight of liver. WT (white bar,  $n = 8$ ) and KO (black bar,  $n = 8$ ) mice fed a high-fat diet were sacrificed and dissected at 25 weeks of age. Results are presented as the mean and standard error. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ; compared with the WT mice under the same conditions.

高脂肪摂食条件下において、*fad158* 欠損がインスリン感受性および糖代謝能に与える影響を検討するため、19 週齢にインスリン耐性試験、22 週齢に糖負荷試験を行った。インスリン耐性試験の結果、インスリン投与後いずれの時点においても、大きな差ではないものの、*fad158* ノックアウトマウスで血中グルコース濃度が有意に低い結果が得られた (Fig. 14A)。一方、糖負荷試験では、グルコース投与後の血中グルコース濃度変化は野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスで差が見られなかった (Fig. 14B)。以上の結果より、*fad158* 欠損は高脂肪食摂食条件下で、インスリン感受性を増加させる一方で、糖代謝能には影響を与えなかった。



**Fig. 14. Insulin sensitivity and glucose homeostasis in wild-type and *fad158*-deficient mice fed a high-fat diet.**

(A) ITT; 3-h fasted WT (white dots,  $n = 8$ ) and KO (black dots,  $n = 8$ ) mice at 19 weeks of age were used. The mice were given an intraperitoneal injection of insulin (0.75 U/kg body weight). (B) GTT; 16-h fasted WT (white dots,  $n = 8$ ) and KO (black dots,  $n = 8$ ) mice at 22 weeks of age were used. The mice were given an intraperitoneal injection of glucose (1.0 g/kg body weight). Results are presented as the mean and standard error. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.005$ ; compared with the WT mice under the same conditions.

### 第三節 考察および小括

#### (1) 考察

FAD158 について、ドメイン検索の結果より 4 つの膜貫通領域を持つことと、細胞内局在の検討から小胞体に局在することが明らかとなっていた (15)。しかし、FAD158 がどのような構造で小胞体膜に局在しているか、そのトポロジーは不明であった。そこで、本章では Protease digestion assay を用いて FAD158 のトポロジーを解析した。その結果、FAD158 の 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可能性が示唆された (Fig. 8)。N 末端、C 末端ともに細胞質側に存在することから、FAD158 は膜貫通領域を偶数個持つ可能性も示唆された。ドメイン検索の結果を考慮すると FAD158 は 4 回膜貫通タンパク質である可能性が高いことが考えられる。今後、抗 FAD158 抗体を用いた protease digestion assay や、N-glycosylation site mapping を行うことで、本研究結果の信頼性が高められると考えられる。本検討より、FAD158 が C 末端に持つ LRR が細胞質に存在することが示唆された。LRR はタンパク質間相互作用部位として報告されている (21-24)。よって、FAD158 が細胞質で LRR を介して何らかの因子と相互作用し機能していることが予想される。今後、3T3-L1 細胞の細胞質画分を用いて、FAD158 の LRR と相互作用する因子を探索することが、FAD158 の分子機能を解明する上で重要であると考えられる。

これまで当研究室では、細胞レベルで *fad158* が脂肪細胞分化を正に制御することを

明らかにしている (15)。しかし、個体レベルにおける *fad158* の役割は全く不明であった。そこで、本章では *fad158* ノックアウトマウスを作製し、その解析を行った。まず、*fad158* は LRRC8 ファミリーに属することから、*fad158* 欠損が他の LRRC8 ファミリーの発現に影響を与えるか否か検討した。その結果、白色脂肪組織および肝臓において *fad158* 欠損は LRRC8 ファミリーの発現に影響を与えない可能性が示唆された (Fig. 10)。このことより、少なくとも白色脂肪組織と肝臓では、他の LRRC8 ファミリーの発現上昇により、*fad158* 欠損が補われていない可能性が示唆された。しかし、タンパク質レベルの発現上昇や活性上昇により *fad158* 欠損を補っている可能性もあるため、redundancy に関して、より詳細な検討が必要と考えられる。

次に、*fad158* 欠損が肥満に与える影響を普通食摂食条件下と、高脂肪食摂食条件下で検討した。その結果、普通食摂食条件下では、*fad158* ノックアウトマウスと野生型マウスで肥満に関するパラメーターに差がなかった (Figs. 11, 12)。一方、高脂肪食摂食条件下では、*fad158* ノックアウトマウスで体重、皮下および腎周囲白色脂肪組織、肝臓が軽く、インスリン感受性が上昇した (Figs. 13, 14)。*Fad158* ノックアウトマウスの体重の減少は、白色脂肪組織と肝臓の重量の減少が一つの要因として考えられる。しかし、野生型マウスと *fad158* ノックアウトマウスの白色脂肪組織重量の差と肝臓重量の差の合計よりも、体重の差の方が大きいことから他の原因も考えられる。今後、他の組織の重量や運動量、エネルギー代謝などの解析により、*fad158* の脂肪細胞分化以外の役割が明らかになる可能性が考えられる。細胞レベルで *fad158* は脂肪細胞分化を正に制御することから、*fad158* ノックアウトマウスの白色脂肪組織重量の減少は脂肪細胞分化の阻害が原因として考えられる。今後、*fad158* ノックアウトマウスの白色脂肪組織について、脂肪細胞の数や大きさなどの組織学的解析を行うことにより、*fad158* が個体レベルで脂肪細胞分化を制御しているか否か明らかになると考えられる。

また、*fad158* ノックアウトマウスの皮下、精巣上体、腎周囲白色脂肪組織の重量について検討したところ、皮下と腎周囲白色脂肪組織では重量が減少していたのに対し、精巣上体白色脂肪組織では野生型マウスと重量に差が見られなかった (Fig. 13C)。このことから、各種白色脂肪組織間で *fad158* の発現や活性に差がある可能性が考えられる。各種白色脂肪組織における *fad158* の発現の解析など、より詳細な検討が必要と考えられる。さらに、*fad158* ノックアウトマウスでは肝臓重量が減少していた (Fig. 13D)。肝臓における *fad158* の機能は全く不明であるが、恐らくこの重量減少は脂肪肝が抑制されたためと考えられる。今後、*fad158* ノックアウトマウスの肝臓の組織学的解析とともに、脂肪肝と *fad158* の関連の検討が必要である。インスリン感受性について、*fad158* ノックアウトマウスで上昇した (Fig. 14A)。インスリン抵抗性の原因物質として、脂肪細胞から分泌される tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、レジスチン、free fatty acid (FFA) などのアディポサイトカインが報告されており、これらがインスリンの情報伝達を阻害することが分かっている (25)。また、アディポサイトカインの一つであるアディポネク

チンは、インスリン感受性を上昇させることや、肥満により血中アディポネクチン濃度が減少することが分かっている (26)。*fad158* ノックアウトマウスは白色脂肪組織が減少していることから、脂肪細胞からの  $\text{TNF}\alpha$ 、レジスチン、FFA の分泌量が減少し、アディポネクチンの分泌量が増加したことにより、インスリン感受性が上昇したと考えられる。*fad158* 欠損によるインスリン感受性上昇の原因を明らかにするためには、今後、これらアディポサイトカインの血中濃度を測定することが必要であると考えられる。

## (2) 小括

1. *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可能性が示唆された。
2. *Fad158* ノックアウトマウスを樹立した。
3. *Fad158* 欠損は、白色脂肪組織および肝臓において他の *LRRC8* ファミリーの発現に影響を与えない可能性が示唆された。
4. *Fad158* 欠損は、普通食摂食条件下において体重、白色脂肪組織重量、肝臓重量、インスリン感受性、糖代謝能に影響を与えなかった。
5. *Fad158* 欠損は野生型と比べ、高脂肪食摂食条件下において体重、白色脂肪組織重量、肝臓重量が減少し、インスリン感受性が増加した。

## 第二章 KCNK10 の脂肪細胞分化制御メカニズムの解析

### 第一節 *Kcnk10* の発現上昇に関与する脂肪細胞分化誘導剤の成分の検討

当研究室のこれまでの検討から、*kcnk10* は 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化誘導 3 時間後をピークに一過性に発現が上昇することが分かっている (17)。しかし、この発現上昇が脂肪細胞分化誘導剤の何の成分に由来するのか、詳しい検討はなされていなかった。そこで、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に必要とされる誘導剤成分 insulin、IBMX、Dex、FBS のうち、どの成分が *kcnk10* の発現上昇に関与するかを検討した。

#### (1) 実験材料および実験方法

##### 1-1 実験材料

3T3-L1 細胞 (大日本製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

Calf Serum (Life Technologies)

FBS (Life Technologies)

Insulin (Sigma)

Dex (Sigma)

IBMX (ナカライテスク)

基本培地                      DMEM, 10% Calf Serum

分化誘導培地                DMEM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex

分化促進培地                DMEM, 10% FBS, 5 µg/ml insulin

##### 1-2 3T3-L1 細胞の培養と脂肪細胞分化誘導

コンフレントまで基本培地を用いて 5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。コンフレントに達した後、基本培地で培地交換を行い、そのまま 48 時間培養した。続いて、分化誘導培地で培地交換し分化誘導した。その後は、1 日おきに分化促進培地で培地交換した。

##### 1-3 3T3-L1 細胞への各種培地の添加

脂肪細胞分化誘導方法に倣い各種培地を添加した。用いた培地の組成は以下に示す。

+ins, +Dex, +IBMX, +FBS : DMEM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex

-ins, -Dex, -IBMX, -FBS : DMEM, 10% Calf Serum

+ins : DMEM, 10% Calf Serum, 10 µg/ml insulin

+Dex : DMEM, 10% Calf Serum, 1 µM Dex

+IBMX : DMEM, 10% Calf Serum, 0.5 mM IBMX

|       |   |
|-------|---|
| +FBS  | : DMEM, 10% FBS   |
| -ins  | : DMEM, 10% FBS, 1 $\mu$ M Dex, 0.5 mM IBMX                               |
| -Dex  | : DMEM, 10% FBS, 10 $\mu$ g/ml insulin, 0.5 mM IBMX                       |
| -IBMX | : DMEM, 10% FBS, 10 $\mu$ g/ml insulin, 1 $\mu$ M Dex                     |
| -FBS  | : DMEM, 10% Calf Serum, 10 $\mu$ g/ml insulin, 1 $\mu$ M Dex, 0.5 mM IBMX |

#### 1-4 total RNA の調製

分化誘導前 0 時間および分化誘導後 3 時間の細胞から、TriPure (Roche)を用いて添付プロトコルに従い total RNA を調製した。

#### 1-5 RT-PCR

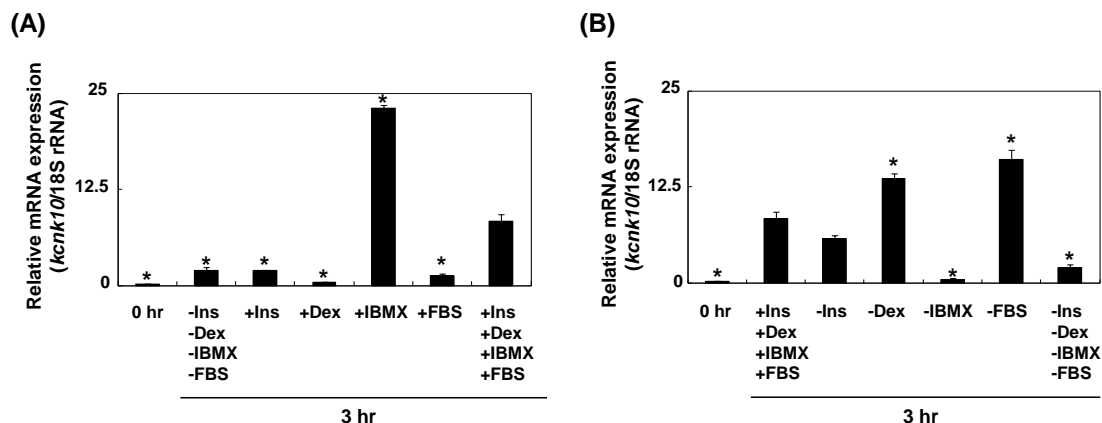
第一章 第二節に準じた。

#### 1-6 Q-PCR

第一章 第二節に準じた。但し、プローブは *kcnk10* (Mm00504118\_m1)、検量線は 3T3-L1 細胞の分化誘導後 3 時間由来の single strand cDNA を用いた。

### (2) 結果

*Kcnk10* の発現上昇に関与する脂肪細胞分化誘導剤成分を調べるため、まず、誘導剤成分 insulin、Dex、IBMX、FBS の 4 つのうち、1 つを加えた時の *kcnk10* の発現変化を検討した (Fig. 15A)。分化誘導 0 時間から 3 時間において、4 つすべて含む通常の分化誘導剤では *kcnk10* の発現が上昇し、4 つすべて除いた培地では *kcnk10* の発現はほとんど上昇しなかった (Fig. 15A)。insulin、Dex、FBS それぞれ 1 つのみを含む培地では *kcnk10* の発現がほとんど上昇しなかった。一方、IBMX のみを含む培地では、通常の分化誘導剤よりも *kcnk10* の発現が大きく上昇した (Fig. 15A)。次に、誘導剤成分 4 つのうち、1 つを除いた時の *kcnk10* の発現変化を検討した (Fig. 15B)。通常の分化誘導剤と比較して、insulin を除いた培地の *kcnk10* 発現レベルは変化しなかったが、Dex、FBS それぞれ 1 つを除いた培地の *kcnk10* 発現レベルは上昇した (Fig. 15B)。一方、IBMX を除いた培地では *kcnk10* の発現がほとんど上昇しなかった (Fig. 15B)。以上の結果より、*kcnk10* の発現上昇には IBMX が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



**Fig. 15. Effect of adipogenic inducers on the *kcnk10* expression.**

(A) The effects of media in which only one inducer was added. (B) The effects of media in which only one inducer was omitted on *kcnk10* expression. In columns labeled “-” the indicated inducer was omitted; in those labeled “+” the indicated inducer was added. Total RNA was prepared from 3T3-L1 cells before induction (0 h) and at 3 h after the addition of various inducers. The expression level of *kcnk10* was normalized to the 18S rRNA expression level, determined by quantitative real time PCR (Q-PCR). The data represent means with standard deviations ( $n = 3$ ). The asterisks indicate significant differences. (\* $p < 0.01$  vs. “+Ins, +Dex, +IBMX, +FBS”).

## 第二節 *Kcnk10* の発現抑制が MCE に与える影響の検討

脂肪細胞分化過程の初期には一過性の細胞増殖が起こる。この現象は MCE と呼ばれ、脂肪細胞分化に必須だと考えられている (27)。3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における *kcnk10* の発現上昇する時期は、MCE が起こる時期と同時期であることより、KCNK10 が MCE に関与するか否か検討した。

### (1) 実験材料および実験方法

#### 1-1 実験材料

3T3-L1 細胞 (大日本製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

Calf Serum (Life Technologies)

FBS (Life Technologies)

Insulin (Sigma)

Dex (Sigma)

IBMX (ナカライテスク)

基本培地                      DMEM, 10% Calf Serum



分化誘導培地           DMEM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex

分化促進培地           DMEM, 10% FBS, 5 µg/ml insulin

Nucleofector solution kit V (Lonza)

*Kcnk10* short hairpin RNA (shRNA) 発現プラスミド (17)

## 1-2 3T3-L1 細胞の培養と脂肪細胞分化誘導

第二章 第一節に準じた。

## 1-3 Nucleofector を用いた transfection

3T3-L1 細胞への shRNA 発現プラスミド導入は、Nucleofector (Amaxa)を用いて行った。 $2 \times 10^6$  個の細胞に対し shRNA 発現プラスミド 9 µg、Nucleofector solution kit V (Lonza) 95 µl を用い、program: T-20 で電気パルスを与えた。その細胞を 12-well plate に  $3 \times 10^5$  cells/well で撒いた。24 時間培養後に基本培地で培地交換し、コンフレントに達した後、再び基本培地で培地交換した。そのまま 48 時間培養した後、分化誘導培地に培地交換し分化誘導した。その後は、1 日おきに分化促進培地で培地交換した。

なお、ネガティブコントロールとして、GenBank に登録されている mRNA とほとんど相同性がない 5'-GTAAGATGAGGCAATGGAG-3' フラグメントを発現する scramble shRNA 発現プラスミドを用いた。

## 1-4 Q-PCR

第二章 第一節に準じた。

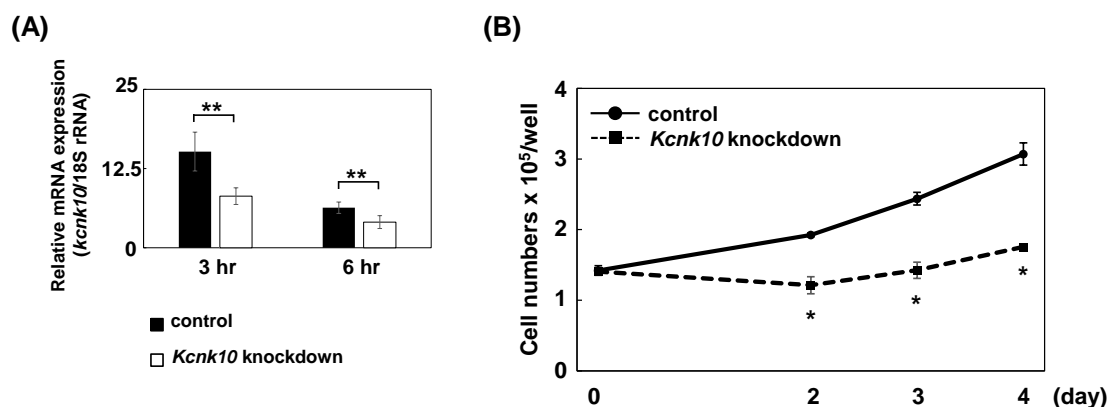
## 1-5 細胞数の計測

12-well plate に培養した細胞を用いて、分化誘導前 0 日から分化誘導後 4 日目まで細胞数の計測を行った。培地を除き、PBS で 2 回洗浄した後、0.25% Trypsin を 0.3 ml 加え、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C で 5 分間放置した。細胞を回収した後、培地を加え懸濁し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

## (2) 結果

*Kcnk10* の発現抑制が MCE に影響を与えるか否か検討した。まず、*kcnk10* の発現を Q-PCR で解析した結果、scramble shRNA を導入したコントロール細胞と比較して、*kcnk10* を標的とした shRNA 発現プラスミドを導入した細胞では、分化誘導 3 時間後では約 50%、6 時間後では約 40%、*kcnk10* の発現が抑制されていた (Fig. 16A)。この時、脂肪細胞分化過程における細胞数の変化を計測した結果、コントロール細胞の細胞数は分化誘導から 4 日で約 3 倍に増加したのに対して、*kcnk10* 発現抑制細胞の細胞数は分化誘導から 4 日経過してもほとんど増加しなかった (Fig. 16B)。以上の結果より、*kcnk10*

発現抑制で MCE が阻害されたことから、KCNK10 が MCE を正に制御していることが明らかとなった。



**Fig. 16. Effect of knockdown of *kcnk10* expression on MCE.**

(A) Knockdown of *kcnk10* expression by shRNA expression plasmid at 3 and 6 h after induction. Total RNA obtained from 3T3-L1 cells transfected with a shRNA expression plasmid targeting *kcnk10* was subjected to Q-PCR. A scrambled shRNA expression plasmid was used as a control. The level of *kcnk10* expression was normalized to the 18S rRNA expression determined by Q-PCR. The data represent means with standard deviations ( $n = 3$ ). The asterisks indicate significant differences compared with the values for control cells (\*\* $p < 0.05$ ). (B) At 72 h after transfection, post-confluent *kcnk10* knockdown cells or control cells were induced to differentiate into adipocytes. Cell numbers were determined at various time points using a hemocytometer. The data represent means with standard deviations ( $n = 3$ ). The asterisks indicate significant differences compared with the values for control cells (\* $p < 0.01$ ).

### 第三節 *Kcnk10* の発現抑制が C/EBP $\beta$ および C/EBP $\delta$ の発現上昇に与える影響の検討

脂肪細胞分化過程における MCE には、転写因子である C/EBP $\beta$ が必要であることが報告されている (28)。また、同じく転写因子である C/EBP $\delta$ が MCE を制御していることが、当研究室により明らかとされている (29)。そこで、脂肪細胞分化過程における KCNK10 と C/EBP $\beta$ および C/EBP $\delta$ の関連性を検討した。

#### (1) 実験材料および実験方法

##### 1-1 実験材料

3T3-L1 細胞 (大日本製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

Calf Serum (Life Technologies)

FBS (Life Technologies)

Insulin (Sigma)

Dex (Sigma)

IBMX (ナカライテスク)

基本培地 DMEM, 10% Calf Serum

分化誘導培地 DMEM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex

分化促進培地 DMEM, 10% FBS, 5 µg/ml insulin

Nucleofector solution kit V (Lonza)

*Kcnk10* shRNA 発現プラスミド (17)

RIPA buffer 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40

SDS loading buffer 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue

TTBS 150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8.0), 0.1% Tween

PBST 0.1% Tween 20, PBS

Blotting buffer 25 mM Tris (hydroxymethyl) aminometane, 192 mM Glycine, 20% Methanol

Blocking buffer

- 5% BSA 含有 TTBS (抗 p-C/EBPβ抗体を用いるとき使用)
- 1% Nonfat Dry Milk (Cell signaling) 含有 TTBS (抗 C/EBPβ抗体および抗 C/EBPδ抗体を用いるとき使用)

一次抗体

- Rabbit anti human p-C/EBPβ (Thr235) polyclonal antibody (Cell Signaling Technology) (5% BSA 含有 TTBS で 400 倍希釈して使用)
- Rabbit anti rat C/EBPβ polyclonal antibody (Santa Cruz) (1% Nonfat Dry Milk 含有 TTBS で 500 倍希釈して使用)
- Rabbit anti mouse C/EBPδ polyclonal antibody (Santa Cruz) (1% Nonfat Dry Milk 含有 TTBS で 500 倍希釈して使用)
- Mouse anti β-actin monoclonal antibody (Sigma) (5% BSA 含有 TTBS で 100,000 倍希釈して使用)

二次抗体

- Goat anti rabbit IgG (H + L) IgG conjugated horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) (PBST で 10,000 倍希釈して使用)
- Sheep anti mouse IgG whole antibody conjugated horseradish peroxidase (GE Healthcare) (PBST で 10,000 倍希釈して使用)

ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences)

## 1-2 3T3-L1 細胞の培養と脂肪細胞分化誘導

第二章 第一節に準じた。

## 1-3 Nucleofector を用いた transfection

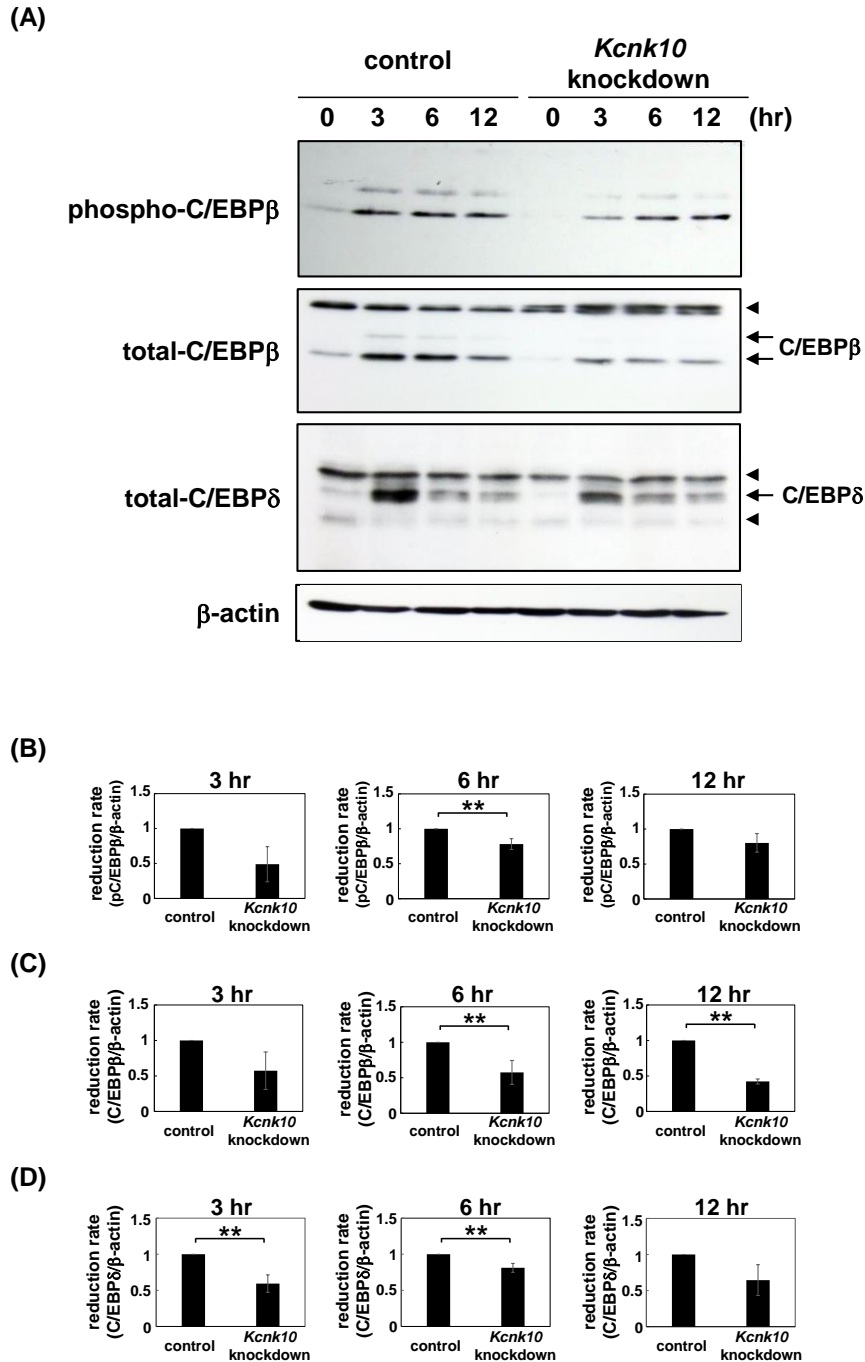
第二章 第二節に準じた。

## 1-4 ウェスタンブロット解析

3T3-L1 細胞を RIPA buffer で溶解し、総タンパク質量を揃えて得られた細胞溶解液を SDS-PAGE により分離した。分離したタンパク質を、Blotting buffer 中で Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)へトランスファーした。トランスファー後、membrane を Blocking buffer に浸し、室温で 2 時間ブロッキングした。次に、membrane を一次抗体に浸し、4 °C で一晩反応させた。続いて、membrane を二次抗体に浸し、室温で 2 時間反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagents で検出した。

## (2) 結果

*Kcnk10* の発現抑制が、脂肪細胞分化過程における C/EBP $\beta$ の発現レベルとリン酸化レベル、C/EBP $\delta$ の発現レベルに与える影響を、ウェスタンブロット解析で検討した。なお、リン酸化 C/EBP $\beta$ と total C/EBP $\beta$ のウェスタンブロット解析で 2 つの特異的バンドが検出された。この 2 つのうち、下のバンドが主な C/EBP $\beta$  生成物であることが報告されているので、リン酸化 C/EBP $\beta$ と total C/EBP $\beta$ の定量には下のバンドを用いた (30)。まず、コントロール細胞について、C/EBP $\beta$ の発現レベルは分化誘導 3 時間後に上昇して分化誘導 12 時間後に減少した (Fig. 17A)。リン酸化レベルは分化誘導 3 時間後に上昇しそのまま分化誘導 12 時間後まで高いレベルを保った (Fig. 17A)。C/EBP $\delta$ の発現レベルは分化誘導 3 時間をピークに一過性に上昇した (Fig. 17A)。コントロール細胞と比べ *kcnk10* 発現抑制細胞では、C/EBP $\beta$ の発現量が分化誘導 6 時間後と 12 時間後で有意に減少した (Figs. 17A, C)。また、C/EBP $\beta$ のリン酸化レベルも *kcnk10* 発現抑制細胞で分化誘導 6 時間後に有意に減少した (Figs. 17A, B)。このリン酸化レベルの減少は、発現レベルの減少と同程度であった。したがって、リン酸化レベルの減少は発現量の減少による結果である可能性が考えられる。さらに、C/EBP $\delta$ の発現量も *kcnk10* 発現抑制細胞で分化誘導 3 時間後と 6 時間後に有意に減少した (Figs. 17A, D)。以上の結果より、KCNC10 が C/EBP $\beta$ と C/EBP $\delta$ の発現制御に寄与することが明らかとなった。



**Fig. 17. Effect of *kcnk10* knockdown on the phosphorylation and protein levels of C/EBP $\beta$ , and the protein level of C/EBP $\delta$ .**

At 72 h after transfection, post-confluent *kcnk10* knockdown cells or control cells were induced to differentiate into adipocytes. Whole-cell lysates were prepared from the cells at various time points after induction and were subjected to Western blot analyses.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. (A) These figures show typical results. Arrowheads show nonspecific bands. (B) Quantitation of reduction rate of phospho-C/EBP $\beta$  after induction. (C) Quantitation of reduction rate of total-C/EBP $\beta$  after induction. (D) Quantitation of reduction rate of C/EBP $\delta$  after induction. The asterisks indicate significant differences compared with the values for control cells (\*\* $p < 0.05$ ).

#### 第四節 *Kcnk10* の発現抑制がインスリンシグナルに与える影響の検討

Insulin は脂肪細胞分化に必須であるとともに、MCE にも大きく寄与している。例えば、インスリンシグナルにより Foxo1 がリン酸化され、細胞周期を抑制する p21 を阻害することが、MCE に必須であることが報告されている (31)。さらに、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 阻害剤の実験から、インスリンシグナルにおいて重要な役割を担っている PI3K が MCE に必要であることが明らかとなっている (32, 33)。そこで、KCNK10 とインスリンシグナルの関連性を検討した。

##### (1) 実験材料および実験方法

###### 1-1 実験材料

3T3-L1 細胞 (大日本製薬)

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) (ニッスイ)

Calf Serum (Life Technologies)

FBS (Life Technologies)

Insulin (Sigma)

Dex (Sigma)

IBMX (ナカライテスク)

基本培地                      DMEM, 10% Calf Serum

分化誘導培地                DMEM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex

分化促進培地                DMEM, 10% FBS, 5 µg/ml insulin

Nucleofector solution kit V (Lonza)

*Kcnk10* shRNA 発現プラスミド (17)

RIPA buffer                150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40

SDS loading buffer        62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue

TTBS                        150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8.0), 0.1% Tween

PBST                        0.1% Tween 20, PBS

Blotting buffer            25 mM Tris (hydroxymethyl) aminometane, 192 mM Glycine, 20% Methanol

Blocking buffer            • 1% Nonfat Dry Milk (Cell signaling) 含有 TTBS (抗 Akt 抗体を用いるとき使用)

• 5% BSA 含有 TTBS (抗 p-Akt 抗体を用いるとき使用)

一次抗体                    • Rabbit anti mouse Akt polyclonal antibody (Cell Signaling Technology) (5% BSA 含有 TTBS で 1,000 倍希釈して使用)

- Rabbit anti mouse phospho-Akt (Ser473) polyclonal antibody (Cell Signaling Technology) (5% BSA 含有 TTBS で 1,000 倍希釈して使用)
- Mouse anti  $\beta$ -actin monoclonal antibody (Sigma) (5% BSA 含有 TTBS で 100,000 倍希釈して使用)
- 二次抗体
  - Goat anti rabbit IgG (H + L) IgG conjugated horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) (PBST で 10,000 倍希釈して使用)
  - Sheep anti mouse IgG whole antibody conjugated horseradish peroxidase (GE Healthcare) (PBST で 10,000 倍希釈して使用)

ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences)

## 1-2 3T3-L1 細胞の培養と脂肪細胞分化誘導

第二章 第一節に準じた。

## 1-3 Nucleofector を用いた transfection

第二章 第二節に準じた。

## 1-4 ウェスタンブロット解析

第二章 第三節に準じた

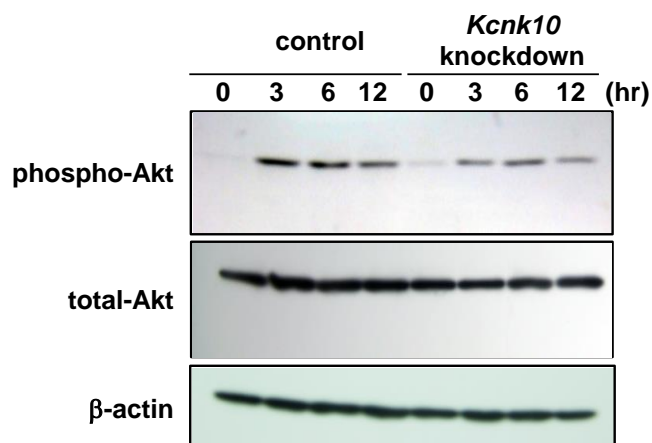
## (2) 結果

*Kcnk10* の発現抑制が、脂肪細胞分化過程の Akt のリン酸化に与える影響をウェスタンブロット解析で検討した。まず、コントロール細胞では、分化過程で Akt の発現レベルに変化はなかった。一方、リン酸化レベルは分化誘導 3 時間後に上昇し、その後、徐々に減少した (Fig. 18A)。コントロール細胞と *kcnk10* 発現抑制細胞を比較すると、Akt の発現レベルは差がなく、リン酸化レベルは *kcnk10* 発現抑制細胞で分化誘導後いずれの時点でも有意に減少した (Fig. 18)。以上の結果より、KCNK10 は脂肪細胞分化過程におけるインスリンシグナルの調節に寄与していることが明らかとなった。

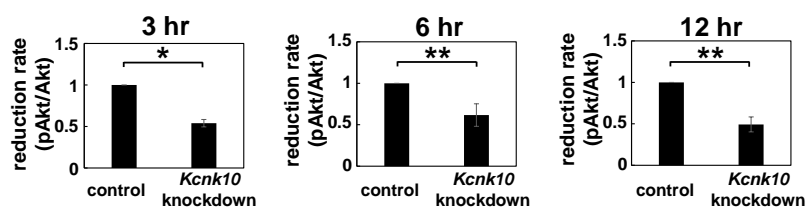
次に、insulin 刺激によるインスリンシグナル伝達においても KCNK10 が関与するかどうか調べるため、*kcnk10* の発現抑制が insulin 刺激時の Akt のリン酸化に与える影響をウェスタンブロット解析で検討した。検討は、コントロール細胞と *kcnk10* 発現抑制細胞を 4 時間無血清培地下で培養した後、10 nM insulin で刺激して行った。コントロール細胞では、インスリン刺激後 Akt の発現レベルは変化しなかったが、リン酸化レベルは刺激後 30 分で上昇し、60 分でも同じレベルを保った (Fig. 19A)。この時、コントロール細胞と *kcnk10* 発現抑制細胞を比較すると、Akt の発現レベルは差がなく、リン酸化レベルは *kcnk10* 発現抑制細胞で刺激後いずれの時点でも有意に減少した (Fig. 19)。以

上の結果より、KCNK10 がインスリンシグナルの調節に寄与することが明らかとなった。

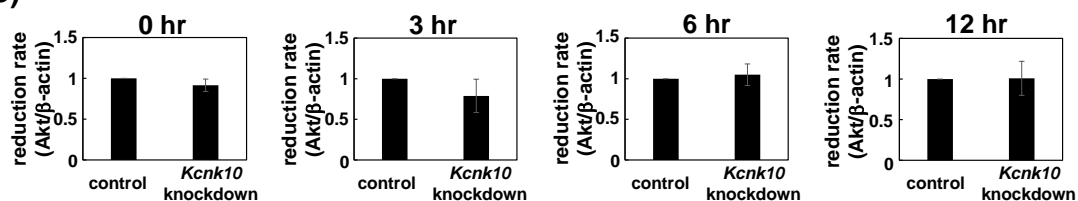
(A)



(B)



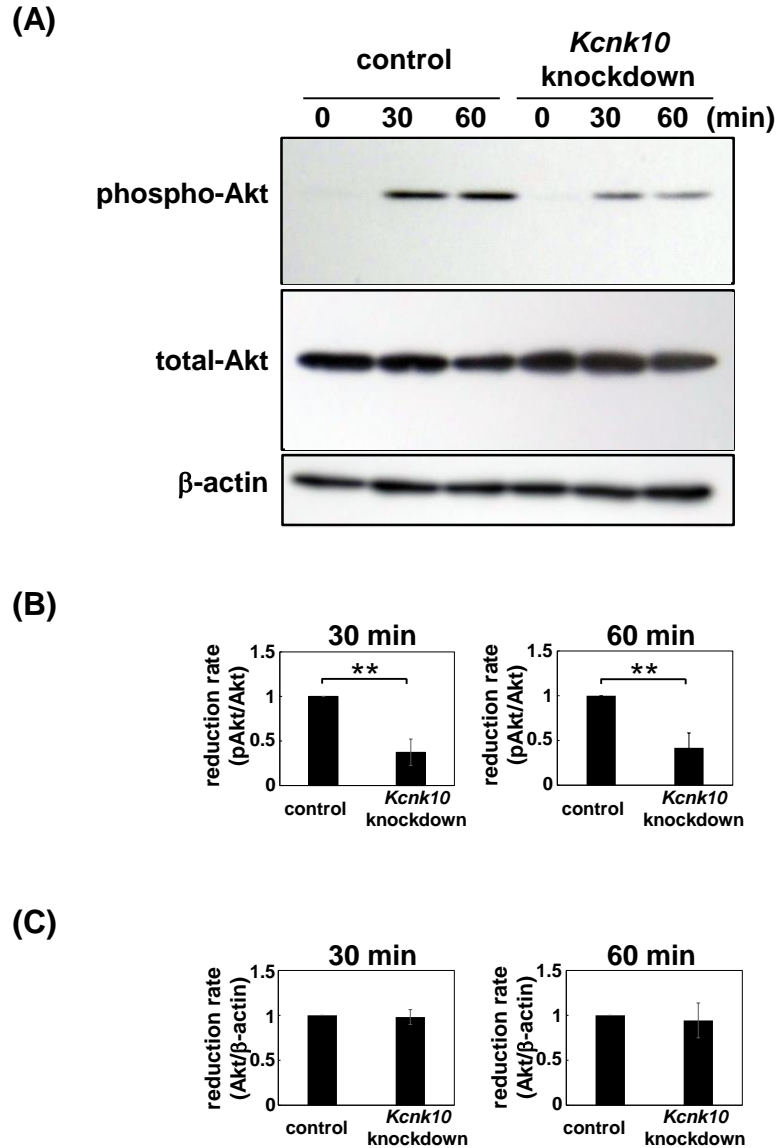
(C)



**Fig. 18. Effect of *kcnk10* knockdown on Akt phosphorylation.**

At 72 h after transfection, post-confluent *kcnk10* knockdown cells or control cells were induced to differentiate into adipocytes. Whole-cell lysates were prepared at various time points after induction and were subjected to Western blot analyses. (A) These figures show typical results. (B) Quantitation of reduction rate of phospho-Akt after induction. (C) Quantitation of reduction rate of total-Akt after induction. The asterisks indicate significant differences compared with the values for control cells (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ).





**Figure 19. Effect of *kcnk10* knockdown on insulin-induced Akt phosphorylation.**

*Kcnk10* knockdown cells or control cells were starved for 4 h and treated with 10 nM insulin. Whole-cell lysates were prepared at various time points after treatment and were subjected to Western blot analyses.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. (A) These figures show typical results. (B) Quantitation of reduction rate of phospho-Akt after insulin stimulation. (C) Quantitation of reduction rate of total-Akt after insulin stimulation. The asterisks indicate significant differences compared with the values for control cells (\*\* $p < 0.05$ ).

## 第五節 考察および小括

### (1) 考察

当研究室のこれまでの検討により、脂肪細胞分化初期に *kcnk10* が一過性に発現が上昇することが明らかとなっていたが、その発現上昇がどの誘導剤成分に由来するのか不明であった (17)。そこで本章ではまず、*kcnk10* の発現上昇に重要な誘導剤成分を探索した。その結果、IBMX が *kcnk10* 発現上昇に寄与していることが明らかとなった (Fig. 16)。IBMX は cAMP の賦活剤であり、細胞内の cAMP 濃度が上昇すると protein kinase A (PKA) のシグナルが活性化される。PKA のシグナルで活性化し脂肪細胞分化を制御する転写因子として cAMP-response element-binding protein (CREB) が報告されている (34)。脂肪細胞分化過程において、CREB は分化誘導 5 分後にリン酸化され、*kcnk10* の発現上昇より早い時期に活性化することから、*kcnk10* の発現上昇には CREB が関与している可能性が考えられる (34)。また、この検討において、IBMX のみを含む培地と insulin、Dex、IBMX、FBS を含む通常分化誘導培地の *kcnk10* の発現レベルを比較した時、IBMX のみを含む培地の方が *kcnk10* 発現レベルが高かった (Fig. 15A)。さらに、通常分化誘導培地から Dex または FBS を除いた場合、*kcnk10* 発現レベルが上昇した (Fig. 15B)。これらのことから、Dex と FBS は *kcnk10* の発現を負に制御している可能性が考えられる。

当研究室のこれまでの検討により、KCNK10 が脂肪細胞分化を正に制御することが明らかとなっていたが、その詳細な制御機構は不明であった (17)。そこで、脂肪細胞分化に必須である MCE が、*kcnk10* の発現上昇時期と同時期に起こることから、次に、MCE に着目して解析を進めた。その結果、KCNK10 が MCE を正に制御することが明らかとなった (Fig. 16)。K<sup>+</sup>チャネルと細胞増殖については、K<sub>2p</sub>ファミリーの中で KCNK10 と同じサブファミリーに属する KCNK2 が、前立腺がんの細胞増殖に関与することが報告されている (35)。また、細胞が細胞周期の G<sub>1</sub> 期に移行するには、K<sup>+</sup>チャネルの活性化が必要であることが報告されているが、その詳しい機構はいまだ不明である (36, 37)。したがって、KCNK10 の MCE 制御機構の解明には、細胞周期を中心とした KCNK10 の機能解析も必要と考えられる。

次に、MCE の制御因子である C/EBPβ および C/EBPδ と KCNK10 との関連性を検討した。その結果、KCNK10 が C/EBPβ と C/EBPδ の発現制御に寄与することが明らかとなった (Fig. 17)。Kcnk10 発現抑制細胞では、分化誘導 3 時間後から C/EBPβ と C/EBPδ の発現が減少していたことから、KCNK10 は迅速な反応を介して C/EBPβ と C/EBPδ の発現上昇に寄与していることが予想される。これまでの報告から、C/EBPβ、C/EBPδ の発現は、CREB により制御されていることが分かっている (38, 39)。しかし、K<sup>+</sup>チャネルが C/EBPβ や C/EBPδ、他の遺伝子の発現調節に関わっている報告はされていない。KCNK10 による C/EBPβ、C/EBPδ の発現調節はイオン透過性制御によるものなのか、イ

オン透過非依存的なメカニズムによるものなのかの検討も含めた、詳しい解析が必要であると考えられる。

さらに、MCE を制御するシグナル伝達機構の 1 つであるインスリンシグナルと KCNK10 との関連性を検討した。その結果、KCNK10 がインスリンシグナルの調節に寄与していることが明らかとなった (Figs. 18, 19)。内皮細胞では、脱分極が PI3K や Akt の活性化の引き金となることが、これまでに報告されている (40)。KCNK10 は  $K^+$  の透過性を調節し、膜電位を制御していることが分かっている (18, 19)。よって、KCNK10 が膜電位を調節し、Akt の活性化をしていることが考えられる。今後、KCNK10 のドミナントネガティブ体や恒常的活性体を用いて、KCNK10 のイオン透過性がインスリンシグナルの調節に寄与しているか否か検討する必要がある。

## (2) 小括

1. *Kcnk10* の発現は、IBMX で強く誘導される。
2. KCNK10 は、MCE を正に制御する。
3. 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の調節に寄与する。

## 総 括

肥満は、糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病のリスクファクターであり、これらの病態が重なることで動脈硬化が引き起こされ、心疾患や脳血管疾患に繋がることが社会問題となっている。したがって、肥満形成の分子メカニズムの研究が盛んに行われている。肥満の原因として、脂肪細胞自身の肥大化の他に、脂肪細胞の数の増加も重要であることが分かっている (2)。脂肪細胞の数の増加は、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化が深く関与している。脂肪細胞分化において、中期以降に PPAR $\gamma$  や C/EBP ファミリーなどの転写因子が重要であることが報告されている (6-12)。しかし、分化初期については、いまだ不明な点が多く残されている。

そこで、当研究室では PCR-サブトラクション法を用いて、脂肪細胞分化初期において発現が上昇する遺伝子を多数単離した (13, 14)。その中の一つは、新規遺伝子であることから *fad158* と命名した。これまでの当研究室の検討から、*fad158* が N 末端に 4 つの膜貫通領域、C 末端に LRR のタンパク質をコードしていること、*fad158* の発現が脂肪細胞分化誘導 6 時間後をピークに一過性に上昇すること、過剰発現系および発現抑制系の検討から *fad158* が脂肪細胞分化を正に制御すること、FAD158 小胞体に局在することが明らかになっている (15)。

また、当研究室では独立行政法人家畜改良センターとの共同研究より K<sup>+</sup>チャネルである *kcnk10* が脂肪細胞分化初期に発現が一過性で上昇することを明らかにしている (16)。これまでの当研究室の検討により、*kcnk10* の発現が脂肪細胞分化誘導 3 時間後をピークに一過性に上昇すること、発現抑制系の検討より KCNK10 が脂肪細胞分化を正に制御することが明らかになっている (17)。

本研究では、*fad158* および KCNK10 の更なる機能解析を目的として検討を進めた。前半では、*fad158* の機能解析として、FAD158 のトポロジーの解析、*fad158* ノックアウトマウスの樹立と解析を行った。後半では、KCNK10 の機能解析として、MCE を中心に解析を行った。

まず、*fad158* の機能解析として、FAD158 は小胞体膜タンパク質であることから、そのトポロジーの解析を protease digestion assay を用いて行った。その結果、FAD158 の N 末端および C 末端どちらも細胞質側に存在する構造で小胞体膜に局在する可能性が示唆された。この結果より、FAD158 の LRR は細胞質側にある可能性が高いことが考えられる。*Fad158* は LRRC8 ファミリーに属していることが現在では分かっている (21)。これまでに、LRRC8 ファミリーの中の一つである LRRC8a は、無 $\gamma$ グロブリン血症の患者から LRR が欠損した変異体が見つかり、この変異体が発現すると B 細胞分化が阻害されることが報告されている (41)。このことから、FAD158 がその機能を果たすためには LRR が重要と考えられる。また、LRR はタンパク質間相互作用部位としての機能について様々な報告がある (22-24)。よって、FAD158 の LRR は、細胞質で何らかの因子と

相互作用することにより、機能を発揮していることが予想される。最近、LRRC8a の機能について 2 つのグループから報告され、LRRC8a は容量調節性アニオンチャネル、volume-regulated anion channel (VRAC) の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかになった (42, 43)。したがって、同じファミリーに属する FAD158 も同様に、VRAC もしくは他のチャネル分子の活性化に関わっているのではないかと推察される。今後、LRR を介して FAD158 と相互作用しているチャネルがあるか否か検討する必要がある。

次に、*fad158* の個体レベルでの役割を明らかにするため、*fad158* ノックアウトマウスの樹立と、その解析を行った。その結果、高脂肪食摂取条件下において、*fad158* が、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が明らかとなった。細胞レベルの検討では、*fad158* 発現抑制により脂肪細胞分化が抑制された。したがって、*fad158* ノックアウトマウスで、体重および白色脂肪量が減少したのは、個体レベルで脂肪細胞分化が抑制されたためだと予測される。このことを明らかにするため、今後、*fad158* ノックアウトマウスの白色脂肪組織において、成熟脂肪細胞と前駆脂肪細胞の割合の計測や、*fad158* ノックアウトマウス由来前駆脂肪細胞の分化実験が必要と考えられる。

インスリン感受性が *fad158* 欠損で上昇する原因として、白色脂肪組織の減少によってインスリン抵抗性を惹起する TNF $\alpha$ 、レジスチン、FFA などの分泌の減少や、インスリン感受性を高めるアディポネクチンの分泌の上昇が考えられる。また、骨格筋や肝臓などがインスリンのターゲットの組織として知られ、特に骨格筋におけるインスリンの機能不全が糖尿病に深く関与していることが報告されている (44, 45)。当研究室のこれまでの検討から、ヒト *fad158* が骨格筋で高く発現していることが分かっている。このことから、骨格筋で *fad158* がインスリン感受性に関与している可能性も考えられる。今後、骨格筋における *fad158* の機能解析も必要と考えられる。

最近、*fad158* と同じ LRRC8 ファミリーである LRRC8a のノックアウトマウスの解析が行われ、LRRC8a ノックアウトマウスの表現型として、胎生致死率の上昇、寿命の減少、成長不良による体重の減少、脾臓と胸腺のサイズの減少が報告された (46)。また、野生型と比べ LRRC8a 欠損では、B 細胞の発生が若干阻害され、T 細胞の発生および機能が大きく阻害されることが明らかとされた (46)。さらに、LRRC8a の作用機序として、LRRC8a が growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)、GRB2-associated binder-like protein2 (GAB2)、lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) と相互作用し、PI3K のカスケードを活性化することにより、LRRC8a が T 細胞の発生を正に制御していることが示された (46)。脂肪細胞分化においても、PI3K のカスケードを含むインスリンシグナルが重要であることが分かっている (47)。したがって、FAD158 も GRB2 や GAB2、LCK と相互作用して、PI3K のカスケードを制御している可能性が考えられたため、今後、FAD158 とこれらの因子との相互作用実験、*fad158* 欠損が Akt のリン酸化に与える影響の解析などを行う必要があると考えられる。

*Fad158* の機能解析により、*FAD158* の両端が細胞質側に存在する可能性と、*fad158* が高脂肪食による肥満とインスリン抵抗性を引き起こす新たな分子である可能性が示された。トポロジーの解析結果をもとに相互作用因子を見つけ出し、得られた結果を *fad158* ノックアウトマウスの更なる解析に還元することで、*fad158* の分子機能の解明に繋げることが今後の課題である。

続いて、*KCNK10* の機能解析を行った。まず、*kcnk10* の発現に関与する脂肪細胞分化誘導剤成分を探索したところ、cAMP 賦活剤である IBMX が *kcnk10* の発現上昇に重要であることが明らかとなった。一方、Dex、FBS が *kcnk10* の発現を抑制する可能性が示唆された。細胞内 cAMP 濃度上昇により活性化される転写因子として CREB、Dex が関与する転写因子として glucocorticoid receptor (GR) が考えられる。今後、*kcnk10* のプロモーター解析により、脂肪細胞分化過程における *kcnk10* 発現制御機構を明らかにする必要がある。

*KCNK10* は脂肪細胞分化を正に制御するが、その詳細なメカニズムは不明であった。*Kcnk10* の発現上昇時期と、MCE が起こる時期が同時期であることから、MCE を中心に検討した。その結果、*KCNK10* が MCE を正に制御するとともに、C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  の発現に寄与すること、インスリンシグナルの調節に寄与することが明らかとなった (Fig. 20)。これまでに、脱分極を誘発させた間葉系幹細胞では、脂肪細胞分化が阻害されることが報告されている (48)。*KCNK10* は脱分極した膜を静止膜電位に戻し、安定化させることが知られている (18, 19)。このような観点から、*KCNK10* は膜電位の安定化を図ることにより脂肪細胞分化を制御している可能性も考えられる。よって、*KCNK10* が脂肪細胞分化過程において膜電位の安定化に寄与しているか否か検討することが今後の課題である。さらに、*KCNK10* と *KCNK2* はイオン透過性非依存的にアクチン細胞骨格の形成に重要であることが報告されている (49)。また、脂肪細胞分化過程においてアクチン細胞骨格の変化により細胞の形が変化することが重要であることが報告されている (50)。この 2 つの報告を合わせて考えると、*KCNK10* がアクチン細胞骨格を制御することにより MCE や脂肪細胞分化を制御していることが考えられる。*KCNK10* のアクチン細胞骨格の制御は、PKA による *KCNK10* の C 末端のリン酸化が重要であることが分かっている (49)。よって、*KCNK10* のリン酸化レベルの検討が今後必要である。

脂肪細胞分化と K<sup>+</sup>チャネルについて、KCa1.1 チャネルと Kv10.1 チャネルの発現抑制により間葉系幹細胞の脂肪細胞分化が阻害されることが報告されている (51)。また、間葉系幹細胞が脂肪細胞へ分化する過程で、様々な電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルにおいて発現変化が見られたことが報告されている (52)。K<sup>+</sup>チャネルは非常に多くの種類が存在することが分かっており、それらが複雑に脂肪細胞分化を制御していることが予想される。本検討が、その制御機構の解明の一助になることが期待される。

以上より、本研究の成果が、脂肪細胞分化機構の解明に役立ち、肥満やそれに伴う様々

な疾患の病態の解明や創薬に繋がると考えられる。

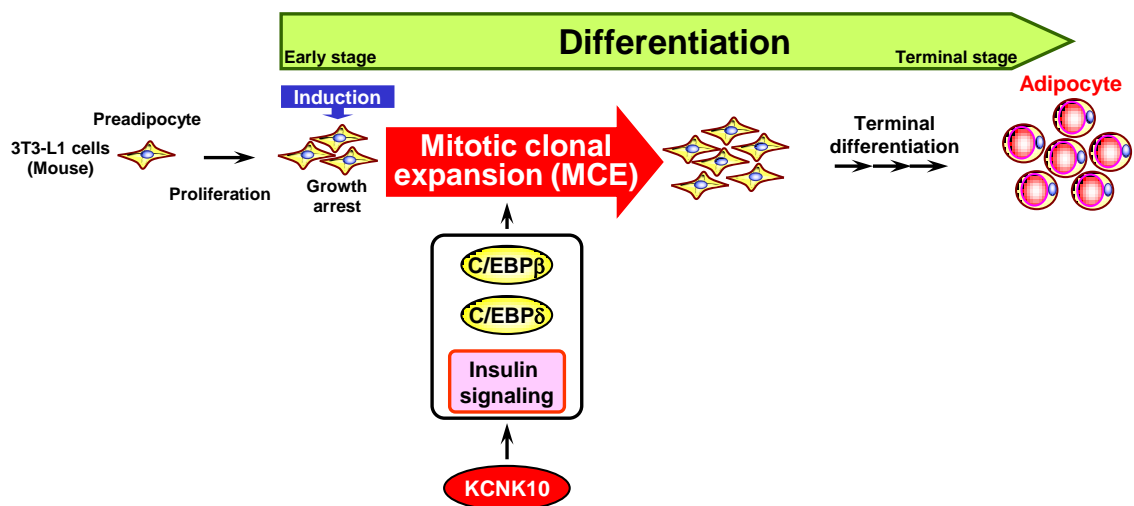


Fig. 20. Schematic representation of the regulation of MCE by KCNK10 during adipogenesis.

## 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可能性を見出した。
2. *Fad158* は、高脂肪食摂食による体重増加、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の調節により、脂肪細胞分化に必須である **MCE** を正に制御することを明らかにした。



## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科教授、今川 正良先生に篤く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、終始温かい御指導を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科准教授、長田 茂宏先生、名古屋市立大学大学院薬学研究科講師、西塚 誠先生に深く感謝いたします。

ノックアウトマウス作製に当たり、共同研究を行うとともに温かい御指導を賜りました、大阪大学微生物病研究所教授、岡部 勝先生 (現 同研究所特任研究員)、准教授、伊川 正人先生 (現 同研究所教授)、ならびに名古屋市立大学大学院医学研究科教授、中西 真先生、助教、丹伊田 浩行先生 (現 浜松医科大学医学部准教授) に感謝いたします。

FAD158 のトポロジーの解析を行うに当たり、御助言を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科教授、服部 光治先生に感謝いたします。

KCNK10 の機能解析で統計処理を行うに当たり、御助言を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科准教授、大澤 匡弘先生に感謝いたします。

終始御指導、実験に御協力いただきました、城村 由和博士、野崎 友里子修士、浅野 真美修士をはじめ、名古屋市立大学大学院薬学研究科、分子生物薬学分野の皆様感謝いたします。

最後になりましたが、経済的・精神的に支えてくださいました両親をはじめ、家族、友人に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635-643 (2000).
2. Gregoire, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med.* **226**, 997-1002 (2001).
3. Green, H. and Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133 (1974).
4. Green, H. and Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19-27 (1975).
5. Mackall, J. C., Student, A. K., Polakis, S. E. and Lane, M. D. Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line. *J. Biol. Chem.* **251**, 6462-6464 (1976).
6. Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145-171 (2000).
7. Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* **4**, 263-273 (2006).
8. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. and Mortensen, R. M. PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* **4**, 611-617 (1999).
9. Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J. and Spiegelman, B. M. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes Dev.* **16**, 22-26 (2002).
10. Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J.* **16**, 7432-7443 (1997).
11. Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M. and Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 4333-4337 (1998).
12. Simano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. and Horton, J. D. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted of the SREBP-1 gene. *J. Clin. Invest.* **100**, 2115-2124 (1997).
13. Imagawa, M., Tsuchiya, T. and Nishihara, T. Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 299-305 (1999).
14. Nishizuka, M., Tsuchiya, T., Nishihara, T. and Imagawa, M. Induction of Bach1 and ARA70 gene expression at early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biochem. J.* **361**, 629-633 (2002).
15. Tominaga, K., Kondo, C., Kagata, T., Hishida, T., Nishizuka, M. and Imagawa, M. The

- novel gene fad158, having a transmembrane domain and leucine-rich repeat, stimulates adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 34840-34848 (2004).
16. Sato, S., Hasebe, H., Sato, S., Asahi, Y., Hayashi, T., Kobayashi, E. and Sugimoto, Y. High-resolution physical mapping and construction of a porcine contig spanning the intramuscular fat content QTL. *Anim. Genet.* **37**, 113-120 (2006).
  17. Sato, S., Nishizuka, M., Asano, M., Ohtake, T., Imagawa, M. and Kobayashi, E. RNA interference-mediated knockdown of the mouse gene encoding potassium channel subfamily K member 10 inhibits hormone-induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **157**, 46-53. (2010).
  18. Enyedi, P. and Czirják, G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* **90**, 559-605 (2010).
  19. Noël, J., Sandoz, G. and Lesage, F. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* **5**, 402-409 (2011).
  20. 加賀田 健 脂肪細胞分化初期に発現が上昇する新規遺伝子 fad123 と fad158 の機能解析 修士論文 (2004).
  21. Kubota, K., Kim, J. Y., Sawada, A., Tokimasa, S., Fujisaki, H., Matsuda-Hashii, Y., Ozono, K., Hara, J. LRRC8 involved in B cell development belongs to a novel family of leucine-rich repeat proteins. *FEBS Lett.* **564**, 147-152 (2004).
  22. Kobe, B. and Deisenhofer, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 415-421 (1994).
  23. Kobe, B. and Deisenhofer, J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 409-416 (1995).
  24. Kobe, B. and Kajava, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 725-732 (2001).
  25. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171-176 (2000).
  26. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941-946 (2001).
  27. Tang, Q. Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 44-49 (2003).
  28. Tang, Q. Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**,

- 850-855 (2003).
29. Hishida, T., Nishizuka, M., Osada, S. and Imagawa, M. The role of C/EBPdelta in the early stages of adipogenesis. *Biochimie* **91**, 654-657 (2009).
  30. Descombes, P. and Schibler, U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, **67**, 569-579 (1991).
  31. Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs 3rd, W. H., Arden, K. C. and Accili, D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell*, **4**, 119-129 (2003).
  32. Auld, C. A., Caccia, C. D. and Morrison, R. F. Hormonal induction of adipogenesis induces Skp2 expression through PI3K and MAPK pathways. *J. Cell. Biochem.* **100**, 204-216 (2007).
  33. Gagnon, A., Chen, C. S. and Sorisky, A. Activation of protein kinase B and induction of adipogenesis by insulin in 3T3-L1 preadipocytes: contribution of phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate versus phosphoinositide-3,4-bisphosphate. *Diabetes* **48**, 691-698 (1999).
  34. Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. and Lane, M. D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 4471-4478 (2004).
  35. Voloshyna, I., Besana, A., Castillo, M., Matos, T., Weinstein, I. B., Mansukhani, M., Robinson, R. B., Cordon-Cardo, C. and Feinmark, S. J. Trek-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer Res.* **68**, 1197-1203 (2008).
  36. Pardo, L.A. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology* **19**, 285-292 (2004).
  37. Day, M. L., Pickering, S. J., Johnson, M. H. and Cook, D. I. Cell-cycle control of a large-conductance K<sup>+</sup> channel in mouse early embryos. *Nature* **365**, 560-562 (1993).
  38. Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. and Lane, M. D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 4471-4478 (2004).
  39. Fox, K. E., Fankell, D. M., Erickson, P. F., Majka, S. M., Crossno Jr, J. T. and Klemm, D. J. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J. Biol. Chem.*, **281**, 40341-40353 (2006).
  40. Chatterjee, S., Browning, E. A., Hong, N., DeBolt, K., Sorokina, E. M., Liu, W., Birnbaum, M. J. and Fisher, A. B. Membrane depolarization is the trigger for PI3K/Akt activation and leads to the generation of ROS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **302**, H105-H114

- (2012).
41. Sawada, A., Takihara, Y., Kim, J. Y., Matsuda-Hashii, Y., Tokimasa, S., Fujisaki, H., Kubota, K., Endo, H., Onodera, T., Ohta, H., Ozono, K. and Hara J. A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. *J. Clin. Invest.* **112**, 1707-1713 (2003).
  42. Qiu, Z., Dubin, A. E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L. J., Reinhardt, J., Orth, A. P. and Patapoutian, A. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* **157**, 447-458 (2014).
  43. Voss, F. K., Ullrich, F., Münch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M. A., von Kries, J. P., Stauber, T. and Jentsch T. J. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* **344**, 634-638 (2014).
  44. DeFronzo, R. A. and Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **32**, 157-163 (2009).
  45. Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W. and Lopaschuk, G. D. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta*, **1801**, 1-22 (2010).
  46. Kumar, L., Chou, J., Yee, C. S., Borzutzky, A., Vollmann, E. H., von Andrian, U. H., Park, S. Y., Hollander, G., Manis, J. P., Poliani, P. L. and Geha, R. S. Leucine-rich repeat containing 8A (LRRC8A) is essential for T lymphocyte development and function. *J. Exp. Med.* **211**, 929-942 (2014).
  47. Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 885-896 (2006).
  48. Sundelacruz, S., Levin, M. and Kaplan, D. L. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* **3**, e3737 (2008).
  49. Lauritzen, I., Chemin, J., Honoré, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M. and Patel, A. J. Cross-talk between the mechano-gated K<sub>2P</sub> channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* **6**, 642-648 (2005).
  50. Nobusue, H., Onishi, N., Shimizu, T., Sugihara, E., Oki, Y., Sumikawa, Y., Chiyoda, T., Akashi, K., Saya, H. and Kano, K. Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat. Commun.* **5**, 3368 (2014).
  51. Zhang, Y. Y., Yue, J., Che, H., Sun, H. Y., Tse, H. F., Li, G. R. BKCa and hEag1 channels regulate cell proliferation and differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **229**, 202-212 (2014).
  52. You, M. H., Song, M. S., Lee, S. K., Ryu, P. D., Lee, S. Y. and Kim, D. Y. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in adipogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem

cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 129-136 (2013).