

Ca²⁺活性化カリウムチャネル KCNMA1 による成熟脂肪細胞のインスリン感受性制御機構の解明とインスリン抵抗性惹起における KCNMA1 の役割の検討

西塚 誠

名古屋市立大学大学院薬学研究科

概要【目的】 近年、先進国を中心として糖尿病、高血圧、脂質異常症をはじめとした生活習慣病の増加が社会問題となっている。肥満の形成には、成熟脂肪細胞自身の容積が大きくなる「肥大化」に加え、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への「分化」による成熟脂肪細胞の数の増加も大きく寄与している。申請者らは、two pore 型カリウムチャネルに属する KCNK10 が脂肪細胞分化を促進すること、また、カルシウム活性化型カリウムチャネルに属する KCNMA1 が成熟脂肪細胞において発現していることをこれまでに明らかにしてきた。そこで本研究では、成熟脂肪細胞における KCNMA1 の役割を明らかにすること、さらに、肥満形成、脂肪細胞分化に関与する新たなカリウムチャネルの探索を試みた。

【方法】 KCNMA1 の発現抑制、チャネル活性制御剤を用いて、成熟脂肪細胞における KCNMA1 の役割を検討した。さらに、高脂肪食負荷により肥満を呈したマウスより白色脂肪組織を採取し、KCNMA1 をはじめとした各種カリウムチャネルの発現を検討した。

【結果・考察】 KCNMA1 の発現が成熟脂肪細胞の肥大化に伴い減少すること、さらに、肥満を呈した白色脂肪組織においても顕著にその発現が減少することを明らかにした。また、発現抑制系ならびにチャネル阻害剤を用いた検討により、KCNMA1 が成熟脂肪細胞においてインスリンシグナルの制御に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、KCNK10 や KCNMA1 以外にも、多くのカリウムチャネルが脂肪細胞分化過程で発現が変動すること、また、肥満の誘発により白色脂肪組織での発現が大きく変動することを見出した。

本検討で得られた知見が、カリウムチャネルによるインスリンシグナル制御の更なる機能解析につながるだけでなく、カリウムチャネルを標的とした肥満ならびに生活習慣病の予防、治療薬開発につながることを期待される。

1. 研究目的

近年、先進国を中心として糖尿病、高血圧、脂質異常症をはじめとした生活習慣病の増加が社会問題となっている。肥満の形成には、成熟脂肪細胞自身の容積が大きくなる「肥大化」に加え、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への「分化」による成熟脂肪細胞の数の増加も大きく寄与している。カリウムチャネルは、膵臓におけるインスリン分泌制御や血管平滑筋における静止膜電位の維持を介して、糖尿病や高血圧といった生活習慣病の発症に密接に関与していることが知られており、多くの有益な知見も集積しつつある。その一方、脂肪細胞の分化および肥大化の過程におけるカリウムチャネルの役割はほとんど明らか

になっていない。

申請者らは家畜改良センターとの共同研究により、ブタの筋肉内脂肪含量に関与する候補遺伝子として QTL (quantitative trait loci) 解析により見つかった potassium channel, subfamily K, member10 (KCNK10) の脂肪細胞分化における役割について検討を進めてきた。KCNK10 (TREK2) は 4 回膜貫通型で 2 つのポアを持った two-pore (K_{2p}) 型のカリウムチャネルに属する⁽¹⁾。K_{2p} 型カリウムチャネルは、ニューロンの静止膜電位の制御や神経興奮性に寄与し、多くの全身麻酔薬の作用点になることが知られていたが、脂肪細胞における役割についてはまったくわかっていなかった。申請者らのこれまでの検討により、

KCNK10 は脂肪細胞分化初期において一過性の発現増加を示すこと、また、KCNK10 の発現を抑制することにより脂肪細胞分化が著しく阻害されたことから、KCNK10 が脂肪細胞分化初期において分化を促進する重要な役割を担うことが明らかになった⁽²⁾。さらに、KCNK10 は、脂肪細胞分化に必須と考えられている分化初期に観察される一過性の細胞増殖 (clonal expansion) を制御することにより、脂肪細胞分化を促進することも見出した⁽³⁾。また、KCNK10 と同じ K_{2P} 型のカリウムチャンネルに属する KCN2 (TREK1) と Ca^{2+} 活性化カリウムチャンネルに属する BK チャンネルの α subunit である KCNMA1 が KCNK10 と異なり、分化の後期、すなわち成熟脂肪細胞においてのみ発現が顕著に増加することを明らかにした。これらの知見は、脂肪細胞の分化と機能維持にカリウムチャンネルが重要な役割を担っていることを強く示唆するだけでなく、これまで不明であったカリウムやナトリウム塩と肥満との密接な関連性を示すものであると考えられる。しかしながら、KCNMA1 が成熟脂肪細胞においてどのような役割を担っているか、さらに、多くのファミリーから構成されるカリウムチャンネルの中で、どのような因子が肥満形成、脂肪細胞の分化ならびに肥大化に寄与するかその全容についてまったくわかっていない。

そこで本研究では、成熟脂肪細胞における KCNMA1 の役割を解明するために、まず成熟脂肪細胞の機能制御に重要な役割を担うインスリンシグナル伝達機構に特に着目して、KCNMA1 が担う役割の解明を目指した。次に、肥満形成と各種カリウムチャンネルとの関係性を明らかにするために、肥満を誘発したマウスの白色脂肪組織と骨格筋に加え、株化前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化誘導過程における各種カリウムチャンネルの発現について検討した。

2. 研究方法

2.1 株化前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化誘導

3T3-L1 細胞を 10% Calf serum を含む DMEM 培地 (10% Calf serum) を用いて 5% CO_2 , 37°C において培養し、confluent まで増殖させた。confluent に達した後、再び 10% Calf serum に交換し、48 時間培養した。48 時間後、細胞を分化誘導培地 (DMEM, 10% FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 10 μ g/ml Insulin, 1 μ M Dexamethasone) に交換し、さらに 48 時間培養したのち、

分化促進培地 (DMEM, 10% FBS, 5 μ g/ml Insulin) に交換した。分化促進培地は 48 時間おきに交換した。

2.2 成熟脂肪細胞への siRNA の導入

脂肪細胞分化誘導から 12 日目の 3T3-L1 細胞を回収した後、 2×10^6 個の細胞、Nucleofector[®] Solution L 100 μ l、および KCNMA1 siRNA 100 pmol、コントロールとして Luciferase siRNA 100 pmol をそれぞれ混合し、キュベットに入れ、Nucleofector[®] を用いて program A-33 の条件でトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は 12-well plate (collagen type I dish) に 2×10^5 cells/well になるように播種した。トランスフェクションから 24 時間後に新しい培地に交換した。トランスフェクション 72 時間後に serum free の DMEM 培地に交換し、serum starvation を 3 時間行った後、10 nM のインスリンで 20 min 刺激した。

2.3 成熟脂肪細胞へのインスリン刺激およびチャンネル活性制御剤の添加

3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化誘導後 12 日に、serum free の培地に交換して 3 時間培養し、serum starvation を行った。その後、10 nM のインスリンで 20 分間刺激した。チャンネル活性阻害剤 paxilline、もしくはチャンネル活性化剤 NS1619 は serum starvation と同時に添加し、インスリン刺激後も同濃度添加した。

2.4 マウスへの高脂肪食負荷

すべての動物実験は、名古屋市立大学動物実験規定に基づいて行った。10 週齢の C57BL/6 マウスに 12 週間 (22 週齢まで) 高脂肪食 (32% fat) もしくは普通食 (4.6 % fat) を与えた。22 週齢時に体重ならびに随時血糖値を測定した。測定後、白色脂肪組織と骨格筋を採取し、RNA を調製した。

2.5 Western Blotting

PBS (-) で 2 回洗浄し、lysis buffer を添加した。氷上で 20 分間インキュベートし、細胞溶解液を回収した。15,000 rpm, 4°C で 20 分間遠心し、上清を cell lysates とした。SDS-PAGE により分離した後、Immobilon[®]-P Transfer Membrane に 100V で 2 時間トランスファーを行った。トランスファー後、blocking buffer を用いて、室温で 2 時間インキュベートし、ブロッキングした。その後、TTBS で洗浄し、種々の一次抗体を 4°C で一晩反応させた。反応後 TTBS で洗浄し、二次抗体を室温で 2 時間反応させた。TTBS で洗浄した後、ECL を用いて検出した。

2. 6 リアルタイム PCR

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて Real-time PCR を行った。内部標準には 18S rRNA を用いた。各種カリウムチャネルの発現を検討するプライマーは、これまでに報告がある配列をもとに合成した。

3. 研究結果

3. 1 肥満形成、成熟脂肪細胞の肥大化過程における *kcnma1* の発現検討

これまでの検討により、*kcnma1* が脂肪細胞分化後期、すなわち成熟脂肪細胞において発現が顕著に増加することを明らかにした。しかしながら、肥満を呈した白色脂肪組織や成熟脂肪細胞の肥大化過程における *kcnma1* の発現は不明であった。そこでまず、高脂肪食負荷により肥満を誘発したマウスの白色脂肪組織における *kcnma1* の発現を検討した。12 週間高脂肪食を与えたマウスはコントロールとして用いた普通食摂食マウスに比べ、有意な体重ならびに随時血糖値の上昇が観察された。このことから、高脂肪食を負荷したマウスが肥満および糖尿病を呈していることが強く示唆された。このマウスから白色脂肪組織を採取し、*kcnma1* の発現を検討した。その結果、普通食摂食条件のマウスに比べ、高脂肪食負荷マウスにおいて顕著にその発現が減少することが明らかになった。

白色脂肪組織には、成熟脂肪細胞に加え、前駆脂肪細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど多くの細胞種が含まれる。そこで次に、*kcnma1* の発現が成熟脂肪細胞の肥大化に伴い変動するか否か、株化前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて検討した。3T3-L1 細胞は分化誘導剤を添加するとおよそ 10 日で成熟脂肪細胞へと分化する。分化後も培養を続けると、個々の細胞に含まれる油滴量が増加し、肥大化した成熟脂肪細胞へと変化する。この肥大化過程における *kcnma1* の発現を検討した結果、成熟脂肪細胞の肥大化に伴って *kcnma1* の発現が有意に減少した。これらの結果より、*kcnma1* は、肥大化した成熟脂肪細胞において発現が減少することが明らかになった。

3. 2 KCNMA1 発現抑制が成熟脂肪細胞のインスリンシグナルに与える影響

成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルは、糖の取りこみやアディポネクチンをはじめとしたアディポサイトカイ

ンの発現、分泌に極めて重要な役割を担う。肥満を呈し、成熟脂肪細胞が肥大化するとインスリンシグナルが減弱し、インスリン抵抗性が惹起される。そのため、成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナル制御機構を明らかにすることが極めて重要である。そこで、成熟脂肪細胞の肥大化に伴って発現が減少する *kcnma1* がインスリンシグナル制御に寄与するか否か検討した。

Kcnma1 を標的とした siRNA を成熟脂肪細胞へ導入した細胞にインスリン刺激を行い、インスリンシグナルにより活性化される Akt のリン酸化レベルを評価した。その結果、*kcnma1* の発現を抑制した成熟脂肪細胞では、コントロール細胞に比べて、インスリン刺激後の Akt のリン酸化レベルが有意に低いことがわかった。このことから、成熟脂肪細胞における *kcnma1* の発現減少は、インスリンシグナルの減弱を引き起こすことが強く示唆された。

3. 3 BK チャネル活性制御剤が成熟脂肪細胞のインスリンシグナルに与える影響

次に、KCNMA1 が構成する BK チャネルのチャネル活性が成熟脂肪細胞のインスリンシグナルに重要か否か検討を行った。BK チャネルの選択的阻害剤である paxilline と活性化剤として利用される NS1619 を検討に用いた。3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞へと分化させ、インスリン刺激を行う際に paxilline もしくは NS1619 を添加し、Akt のリン酸化に与える影響を評価した。その結果、チャネル阻害剤である paxilline は、インスリン刺激による Akt のリン酸化レベルを濃度依存的に抑制することが明らかになった。一方、NS1619 を添加すると若干インスリン刺激に応答した Akt のリン酸化レベルが亢進する傾向は観察されたが、有意な差は得られなかった。これらの検討の結果より、成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルの伝達には、BK チャネルの活性化が寄与する可能性が強く示唆された。

3. 4 高脂肪食負荷マウスの白色脂肪組織における各種カリウムチャネルの発現検討

これまでの検討により、BK チャネルの構成因子である KCNMA1 が成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルの制御に重要な役割を担うことが明らかになった。さらに申請者らは、two-pore (K_{2P}) 型のカリウムチャネルに属する KCNK10 が分化初期において clonal expansion の制御を介して脂肪細胞分化を促進することも見出している^(2, 3)。これらの検討から、脂肪細胞の分化や機能には多くのカリウ

ムチャンネルが関与していることが予想された。そこでまず、肥満を呈したマウスの白色脂肪組織において発現が変動するカリウムチャンネルの探索を試みた。カリウムチャンネルは、大きく (1) 電位依存型, (2) カルシウム活性型, (3) 内向き整流型, (4) two pore 型に分類することができるため、それぞれに属するカリウムチャンネルのいくつかをピックアップし、その発現量について検討した。肥満を呈したマウスは、10 週齢から 12 週間高脂肪食を与えたマウスを用い、コントロールには、同期間普通食を摂取したマウスを用いた。

電位依存型に属するカリウムチャンネルでは、KCNA1 が高脂肪食負荷マウスの白色脂肪組織において有意な発現減少を示した。一方、KCNA5 は普通食摂取マウスに比べ、高脂肪食摂取マウスの白色脂肪組織において有意に発現が増加した。KCNA1, KCNA5 と同じく電位依存型に属する KCNA6 は、高脂肪食負荷マウスにおいて発現が減少する傾向が見られたが、有意な差は得られなかった。カルシウム活性型カリウムチャンネルに属する SK3 は、高脂肪食負荷マウスの白色脂肪組織においてわずかに発現が減少する傾向が観察された。その一方、IK1 は、高脂肪食負荷により有意に発現が増加した。内向き整流型に属するカリウムチャンネルに関しては、KCNJ11 および KCNJ12 はいずれも高脂肪食負荷マウスの白色脂肪組織において有意に発現が減少した。また、KCNJ10 は、高脂肪食負荷マウスにおいてややその発現が減少する傾向が観察された。Two pore 型のカリウムチャンネルに属する TWIK1, TRAAK に関しては、高脂肪食負荷マウスにおいて発現は減少する傾向が観察されたものの、有意な差は得られなかった。TWIK2 は、普通食摂取および高脂肪食摂取マウスの白色脂肪組織において発現に差が見られなかった。TASK3 と TRESK は、高脂肪食負荷マウスにおいて発現が減少する傾向が観察された一方、TASK1 は、高脂肪食負荷マウスにおいて顕著に発現増加していた。

以上の検討結果より、多くのカリウムチャンネルが肥満を呈した白色脂肪組織において発現が変動することが明らかになった。

3. 5 高脂肪食負荷マウスの骨格筋における各種カリウムチャンネルの発現

骨格筋は白色脂肪組織同様、インスリンの重要な標的臓器の一つである。これまでのけんとうにより、KCNMA1 が成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルを制御するこ

とが明らかになっているため、KCNMA1 を含めた各種カリウムチャンネルの発現が肥満を呈することにより変動するかどうか検討を行った。白色脂肪組織における発現検討と同様、肥満を呈したマウスは、10 週齢から 12 週間高脂肪食を与えたマウスを用い、コントロールには、同期間普通食を摂取したマウスを用いた。

白色脂肪組織の検討において、発現の変動が観察された電位依存型カリウムチャンネルである KCNA1, KCNA5, KCNA6 はいずれも高脂肪食負荷により、その発現は変動しなかった。カルシウム活性型に属する KCNMA1, SK3, IK1 もいずれも普通食摂取のマウスと高脂肪食負荷したマウスから調製した骨格筋において同程度発現していた。内向き整流型のカリウムチャンネルに関しては、KCNJ10, KCNJ12 の発現は普通食および高脂肪食摂取マウスの骨格筋で違いは認められなかったが、KCNJ11 は、高脂肪食負荷マウスの骨格筋において発現が有意に減少していた。Two pore 型に属するカリウムチャンネルに属する TWIK1, TWIK2 および TRAAK はいずれも高脂肪食負荷マウスにおいて有意ではないものの、発現が増加する傾向が観察された。一方、TASK1 はその発現が減少する傾向を示した。

これらの結果より、肥満を呈した骨格筋でも複数のカリウムチャンネルの発現量は変動していることが明らかになった。

3. 6 脂肪細胞分化過程における各種カリウムチャンネルの発現変化

最後に脂肪細胞分化過程における各種カリウムチャンネルの発現を検討した。電位依存型カリウムチャンネルに属する KCNA1, KCNA5, KCNA6 に関しては、発現量が低く測定できなかった。カルシウム活性型カリウムチャンネルである IK1 は、脂肪細胞分化誘導 2 日目に顕著な一過性の発現増加を示すことが明らかになった。このことから、IK1 は分化の初期に機能していることが考えられた。内向き整流型に属する KCNJ12, two pore 型に属する TASK3 は KCNMA1 と同様、脂肪細胞分化後期にその発現が増加したことから、両因子は分化後期、すなわち成熟脂肪細胞において機能している可能性が強く示唆された。一方、two pore 型に属する TRESK は、分化誘導後 2 日目に発現が減少し、その後 8 日目から増加する 2 相性の変動をすることが明らかになった。

以上の検討により、脂肪細胞分化過程においては複数のステージにおいて種々のカリウムチャンネルが発現増加し、機能している可能性が示唆された。

4. 考察と今後の課題

本検討において、成熟脂肪細胞における KCNMA1 の役割を明らかにすることができた。これまでに、膵臓におけるインスリン分泌制御や血管平滑筋における静止膜電位の維持に寄与することによって多くのカリウムチャンネルが、糖尿病、高血圧といった生活習慣病に密接に関与していることはわかっていたが、成熟脂肪細胞においてもカリウムチャンネルが重要な役割を担っていることが明らかになった。成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルは、糖の取りこみやアディポサイトカインの発現、分泌に極めて重要な役割を担うシグナルであり、このシグナルの破綻、すなわちインスリン抵抗性の惹起は、糖尿病、高血圧、脂質異常症、さらに、脳卒中、心筋梗塞の発症につながる。本検討により、KCNMA1 は、成熟脂肪細胞の肥大化、肥満を呈した白色脂肪組織においてその発現が減少することがわかった。このことから、運動不足などによりエネルギーバランスが崩れて肥満が誘発されると、KCNMA1 の発現が減少し、それが引き金になってインスリンシグナルの減弱、さらには、インスリン抵抗性が引き起こされる可能性が示唆された。今後、KCNMA1 の発現調節機構を解明することが必要不可欠である。

BK チャンネルの活性制御剤を用いた検討から、成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルの伝達には BK チャンネルの活性化が必要であることが示唆された。インスリンシグナルと膜電位の関係性はまだよくわかっていないが、BK チャンネルによる静止膜電位の維持がインスリンシグナルには必要である可能性がある。また、BK チャンネルの α subunit を構成する KCNMA1 は多くのタンパク質と相互作用することが報告されている^(4, 5)。それらのタンパク質の中には、インスリンシグナルに関連するものも含まれていることから、それらのタンパク質との相互作用がインスリンシグナルの制御には重要であるかもしれない。今後、KCNMA1 によるインスリンシグナル制御の分子機構を明らかにする必要がある。

高脂肪食負荷により肥満を誘発したマウスを用いた検討から、様々なカリウムチャンネルが肥満を呈した白色脂肪

組織ならびに骨格筋において発現が変動していることが明らかになった。このことから、非常に多くのカリウムチャンネルが白色脂肪組織や骨格筋において、肥満形成や生活習慣病の発症に重要な役割を担っている可能性が考えられた。今後、培養細胞を用いた過剰発現、発現抑制実験に加え、組織特異的ノックアウトマウスの樹立と解析を行うことにより、それぞれのカリウムチャンネルが担う役割と機能を明らかにしていく必要がある。

以上、本検討により、KCNMA1 の発現が成熟脂肪細胞の肥大化ならびに肥満を呈した白色脂肪組織において減少すること、さらに、KCNMA1 が成熟脂肪細胞においてインスリンシグナルの制御に重要な役割を担うことを明らかにした。また、KCNMA1 だけでなく、多くのカリウムチャンネルの発現が肥満を呈した白色脂肪組織、骨格筋において変動していることを見出した。本検討で得られた知見が、カリウムチャンネルによるインスリンシグナル制御の更なる機能解析につながるだけでなく、カリウムチャンネルを標的とした肥満ならびに生活習慣病の予防、治療薬開発につながることを期待される。

5. 参考文献

- (1) Enyedi P, Czirják G (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **90**, 559-605.
- (2) Sato S, Nishizuka M, Asano M, Ohtake T, Imagawa M, Kobayashi E (2010) 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.
- (3) Nishizuka M, Hayashi T, Asano M, Osada S, Imagawa M (2014) 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**, 22743-22756.
- (4) Toro L, Li M, Zhang Z, Singh H, Wu Y, Stefani E (2014) MaxiK channel and cell signalling. *Pflugers Arch* **466**, 875-886.
- (5) Sokolowski B, Orchard S, Harvey M, Sridhar S, Sakai

Y (2011) Conserved BK channel-protein interactions reveal signals relevant to cell death and survival. *PLoS One* 6, e28532.

The Role of KCNMA1 on Insulin Signaling in Mature Adipocytes

Makoto Nishizuka

Nagoya City University

Summary

Potassium channel, calcium activated large conductance subfamily M alpha, member 1 (KCNMA1) has the ability to integrate changes in intracellular calcium and membrane potential and plays significant roles in various physiological functions such as the regulation of smooth muscle tone, neurotransmitter release and neuronal excitability. Some reports showed that the function of BK channels in vascular smooth muscle are involved in the development of hypertension, diabetes, and insulin resistance. However, little is known about the expression and physiological role of KCNMA1 in mature adipocytes.

In this study, we revealed that the expression level of *kcnma1* was drastically elevated at the late stage of adipogenesis in 3T3-L1 cells. The expression of *kcnma1* abundantly expressed in white adipose tissue (WAT) and *kcnma1* expression in WAT was decreased by a high-fat diet. Furthermore, *kcnma1* expression was decreased in hypertrophic mature 3T3-L1 adipocytes. These results suggested that KCNMA1 has an important role in the function of mature adipocytes. It is well known that mature adipocytes are highly sensitive to insulin. To examine whether KCNMA1 regulates insulin signaling in mature adipocytes, we next performed the knockdown experiments. Insulin-induced Akt phosphorylation in mature adipocytes was clearly suppressed by the reduction of *kcnma1* expression, whereas the level of total Akt did not differ between *kcnma1* knockdown and control cells. In addition, paxilline, a BK channel blocker, repressed insulin-induced Akt phosphorylation in mature adipocytes, indicating that KCNMA1 contributes to the regulation of insulin signaling in mature adipocytes. Furthermore, we showed that the expression of some potassium channels including KCNA1, KCNA5, KCNJ11 and KCNJ12 in WAT was changed by a high fat diet. These results suggested that some potassium channels in addition to KCNMA1 have an important role of regulation of obesity and insulin resistance.