

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08902

研究課題名(和文) 脂肪細胞開口放出における分泌制御因子ELKSの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of exocytosis regulator ELKS in adipokine secretion

研究代表者

金 然正 (Kim, Yeon-Jeong)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：00345266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞における開口放出の代謝生理学的な意義とELKS分子基盤のダイナミクスを明らかにするため、脂肪細胞選択的ELKS欠損マウスを作出し、高脂肪食投与による生理学的変容を解析した。ELKSの脂肪細胞選択的欠損により、体重増加と非アルコール性脂肪肝の発症率が増加した。脂肪細胞選択的ELKS欠損マウスの代謝表現型は、ELKS機能の一端が、アディポカインの分泌制御より、脂肪細胞における貯蔵脂質代謝の制御機構に起因する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脂肪細胞における開口放出の代謝生理学的な意義とELKS分子基盤のダイナミクスを明らかにすることを目的としている。本研究により、脂肪細胞における貯蔵脂質代謝の制御機構が明らかになり、肥満や非アルコール性脂肪肝などの疾患の予防や治療に役立つ可能性がある。また、ELKS分子基盤のダイナミクスを理解することで、新たな治療法の開発につながる可能性がある。これらは、学術的意義だけでなく、社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of ELKS in adipocytes and its physiological significance, we created adipocyte-specific ELKS knockout mice. Under high-fat diet feeding conditions, adipocyte-specific ELKS deficiency resulted in increased body weight and incidence of non-alcoholic steatosis. The metabolic phenotype of adipocyte-selective ELKS knockout mice suggests that ELKS function controls the metabolism of stored lipids in adipocytes, rather than the secretion control of adipokines.

研究分野：生化学

キーワード：ELKS 貯蔵脂質 液 液相分離 脂肪細胞 非アルコール性脂肪肝

### 1. 研究開始当初の背景

開口放出は、神経伝達物質およびホルモンなどの小胞を細胞外に放出する機構であり、細胞間、または臓器間クロストークの根幹をなす。脂肪細胞からはレプチンやアディポネクチンなどのアディポカインが放出され、これらのホルモンは生体エネルギーの恒常性維持において極めて重要な役割を果たす。アディポカインそのものの機能および受容体を介した情報伝達システムについてはこれまで数多くの報告がなされているが、アディポカイン放出の分子機構については未だに明らかになっていない。そこで本研究では、開口放出制御因子 ELKS の脂肪細胞選択的欠損マウスの解析と、アディポカイン放出における ELKS 複合体の解析を進めることで、生体恒常性維持におけるアディポカイン分泌調節機構の役割を解明する。本研究によってアディポカイン開口放出の新たな制御機構が明らかとなり、得られる成果は、放出メカニズムの観点から脂質代謝研究分野に新たな知見をもたらすことが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪細胞における開口放出の代謝生理学的な意義と ELKS 分子基盤のダイナミクスを明らかにすることであり、脂肪細胞選択的 ELKS 欠損マウスの生理学的解析と ELKS 分子基盤の生化学的解析を統合させることにその先駆性がある。従って、本研究では、脂肪細胞選択的 ELKS 欠損マウスの代謝生理学的解析と ELKS 分子基盤の生化学的解析を融合させ、脂肪細胞分泌機構の変容の病態生理学的意義とアディポカイン分泌における ELKS の分子構造基盤とその役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究は、研究目標を達成するため、(項目1)脂肪細胞選択的 ELKS 欠損マウスの生理学的解析、(項目2)ELKS 複合体の探索、(項目3)開口放出の制御基盤解析、以上の3項目を設定し実施した。

#### (項目1)脂肪細胞選択的 ELKS 欠損マウスの生理学的解析

脂肪細胞選択的 ELKS 欠損マウスは、申請者が所属する研究室で開発された ELKS flox マウス (Dong, et al. 2018, Cell Reports) をアディポネクチンのプロモーターにより Cre recombinase の発現がコントロールされる Cre マウス (Adipoq-Cre) と交配し作出した。膵臓細胞における ELKS の選択的欠損はインスリン放出の不全に繋がる研究結果 (Ohara-Imaizumi, et al. 2019, Cell Reports) を踏まえ、ELKS の脂肪細胞選択的欠損では、脂肪組織から放出されるアディポカインの分泌異常が予測される。そこで、アディポカインの分泌変動と、それに付随する糖・脂質代謝の変動を捉える。野生型および遺伝子改変マウスでの、糖、中性脂質、アディポカインの血中濃度を測定した。さらに、アディポカインの中で、レプチンは中枢神経系に働きかけ、食欲制御や情動に影響するため、摂食量、自発的運動量を測定した。

#### (項目2)ELKS 複合体の探索

近位依存性ビオチン標識法は、ビオチンリガーゼ (BirA) に融合させたタンパク質 (ELKS) の近傍のタンパク質 (結合タンパク質) に、ビオチンを付加することで、ELKS に直接、または間接的に相互作用するタンパク質群を捉える手法である。本研究では、高活性ビオチンリガーゼである TurboID を用い、ELKS 周辺因子を網羅的に解析した。

#### (項目3)開口放出の制御基盤解析

代謝に応答した開口放出の変動が ELKS 複合体のダイナミクスに影響を及ぼすかは、開口放出の分子メカニズムを探る上で、極めて重要な課題である。エネルギー代謝の恒

常性維持において、インスリンおよび AMPK シグナルは中心的な役割を果たしている。申請者は既に、ELKS に進化的に保存されている 55Ser が、AMPK によりリン酸化されることを見出した（未発表データ）。そこで、AMPK の活性化による ELKS の機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、開口放出制御因子 ELKS の脂肪細胞選択的欠損マウス（ELKS cKO）の解析と、アディポカイン放出における ELKS 複合体の解析を進めることで、生体恒常性維持におけるアディポカイン分泌調節機構の役割を解明する。

ELKS cKO の体重変動および摂食量、行動量を解析した。まず、高脂肪食と普通食に分け、飼育時の体重変動を調べた結果、高脂肪食のみ、ELKS cKO において著しい高体重が観られた（図 1A）。摂食量および行動量の変動は、野生型に比べ、普通食・高脂肪食いずれにも差がなかった（図 1B）。さらに、解剖学的解析を行った結果、ELKS cKO において、著しい脂肪肝発症が観られた（図 1C）。

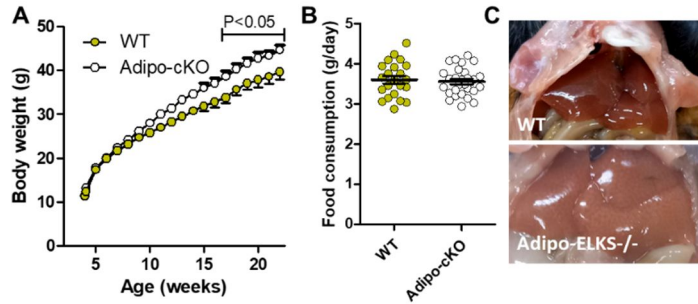


図1. 脂肪細胞ELKS欠損マウスの高脂肪食による代謝表現型。(A)体重変動。(B)摂食量。(C)肝臓病変（脂肪肝）

血中アディポカイン濃度の変動は細胞自律性脂質代謝に大きく影響する。しかし、摂食量においては野生型と cKO で有意な差が得られなかったため、

血中アディポネクチンの量をウェスタンブロットにより評価した。しかし、アディポネクチンにおける変動は見られなかった。一方、血中中性脂質の量は cKO において高かったため、ELKS の機能の一端は脂肪細胞の貯蔵脂質管理に影響すると考えた。その分子メカニズムを探るべく、ELKS 周辺因子の網羅的解析を近依存性ビオチン標識により評価した。ELKS の発現量は脳神経において最も豊富であり、まず、海馬ニューロンにおいて評価した結果、いくつかの Rab ファミリータンパク質の同定に成功した。免疫沈降において ELKS は Rab 6 と結合することがわかった。脳神経における ELKS は選択的スプライシングにより、脂肪細胞の ELKS と C 末端が異なる（ELKSe）。よって、ELKSe についても調べた結果、Rab11 結合ドメインを有することがわかった。

さらに、生化学的手法に基づく解析を進め、ELKS の様な足場タンパク質の多くは液液相分離を引き起こす。HEK293T 細胞に ELKS を過剰発現し観察した結果、直系 1 ~ 5 μm の液滴が形成された。さらに、光褪色後蛍光回復法（Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP）による流動性を確認した。液液相分離はタンパク複合体の形成を促進させることが知られており、ELKS 液滴における結合因子の動員を観察した。その結果、Rab6 のみならず、Rab3、Rab12、Rab18 を効率よく動員することがわかった。これらの結果から ELKS による貯蔵脂質代謝は ELKS Rab の membrane traffic 制御による可能性が示唆された。

ELKS は殆どの組織で幅広く分布する分子量約 130 kD の足場タンパク質であり、全長の 60% が coiled coil ドメインで構成され、coiled coil の領域特異的な結合タンパク質を有する。神経細胞においてはプレシナプスのアクティブゾーンの構成因子であり、膵臓細胞においてはインスリン分泌の放出に重要な役割をしている足場タンパク質である。このことから、ELKS の足場機能は分泌の制御において重要な役割を果たしており、脂肪細胞においてもアディポカインの放出において重要であると考えた。しかし、脂肪細胞選択的 ELKS 欠損マウスの解析から、貯蔵脂質の管理において、アディポカインの制御より、細胞内小胞トラフィックを制御する結果となった。今後、ELKS が介在する液液相分離と貯蔵脂質代謝の制御機構について研究を展開したい。

<引用文献>

1. Dong, Wei, et al. "CAST/ELKS proteins control voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel density and synaptic release probability at a mammalian central synapse." *Cell reports* 24.2 (2018): 284-293.
2. Ohara-Imaizumi, Mica, et al. "ELKS/Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel-β subunit module regulates polarized Ca<sup>2+</sup> influx in pancreatic β cells." *Cell Reports* 26.5 (2019): 1213-1226.
3. Ohara-Imaizumi, Mica, Kyota Aoyagi, and Toshihisa Ohtsuka. "Role of the active zone protein, ELKS, in insulin secretion from pancreatic β-cells." *Molecular Metabolism* 27 (2019): S81-S91.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirabayashi Yoshio, Kim Yeon-Jeong	4. 巻 167
2. 論文標題 Roles of GPRC5 family proteins: focusing on GPRC5B and lipid-mediated signalling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 541 ~ 547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚 稔久、金 然正
2. 発表標題 液相分離に基づいたアクティブゾーン機能におけるCAST/ELKSタンパク質の役割
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------