

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08271

研究課題名(和文)心筋細胞間接着を基点とする新しいAMPKのバイオロジー

研究課題名(英文)A novel AMPK signaling at the intercalated disc in heart

研究代表者

新谷 泰範 (SHINTANI, YASUNORI)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：20712243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心筋細胞同士の接着部に、従来代謝制御において中心的役割をはたすリン酸化酵素AMPKが局在することを見だし、その特異的な基質の同定、さらに微小管ダイナミクスの制御をなうことを解明した。またそのリン酸化酵素の活性制御は、心筋細胞が常にさらされている力学的負荷がトリガーとなることを世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, AMP-activated protein kinase (AMPK) has been reported to reshape cells by regulating cell polarity and division in addition to its canonical role in metabolism. We found that phosphorylated AMPK localized at the intercalated disks in adult mouse heart. We revealed CLIP170 and several other novel molecules as AMPK substrate at the intercalated disc. The inhibition of AMPK or CLIP S311A mutant increased the stability of microtubules near the cell-cell junction in cardiomyocytes. In order to reveal pathophysiological relevance of AMPK-CLIP signal in the heart, we made inducible heart-specific CLIP S311A overexpressing transgenic mice. In the pathological condition that was induced by doxorubicin injection, S311A mice exacerbated cardiac dysfunction with significant tissue fibrosis compared to the control. In conclusion, the regulation of microtubule dynamic instability by AMPK-CLIP signal is important for maintenance of heart function and the pathogenesis of heart diseases.

研究分野：医化学

キーワード：AMPK 微小管 介在板 メカノストレス

1. 研究開始当初の背景

心臓特異的細胞接着-介在板:

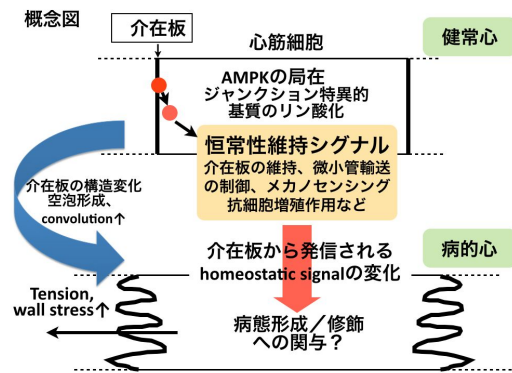
心筋細胞は隣り合う細胞との接着を細胞の長軸端のみに形成し、介在板とよばれる心臓特異的な細胞接着を形成する。介在板は、心筋細胞同士の細胞接着の強度を保つことにより、アクチン-ミオシン分子の収縮を組織としての収縮力へ変換し、またギャップジャンクションを介した素早いイオンの拡散により複数の細胞の同期的収縮を可能とする。すなわち心臓の根幹の機能を支える重要な構造といえる。一方で病的心(心不全)においては介在板の開裂、空泡形成がみられるなど、構造的な変化がおこる(*Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:30)。さらに介在板に局在する分子の遺伝子変異がヒトの遺伝性拡張型心筋症にて見いだされており、介在板の構造異常は病態形成メカニズムの一つと考えられる。

AMPKと心臓:

AMP-activated kinase(AMPK)はATPの加水分解より産生されるAMPによって活性化される唯一のリン酸化酵素である。そのため、臓器の中で最も大量のATPを産生・消費する心臓での重要な働きが示唆されていた。事実、AMPK  $\alpha 2$ および、AMPKの活性をコントロールする上流分子であるLkb1の心臓特異的ノックアウトマウスではベースラインの心重量の低下がみられ、さらに圧負荷による心機能の悪化が増大する。糖尿病治療薬であるメトホルミンにはAMPK活性化作用があり、英国で行われたUKPDS(前向き糖尿病試験)をはじめとする大規模臨床試験にて、メトホルミンが心血管イベントを抑制することが明らかとなった。基礎研究からも、メトホルミンの心筋保護効果、心肥大抑制効果が報告されており、心臓、心筋におけるAMPK活性の重要性は明らかである。しかしながら心筋細胞におけるAMPKの作用メカニズムについてはその局在も含めて依然不明な点が多い。

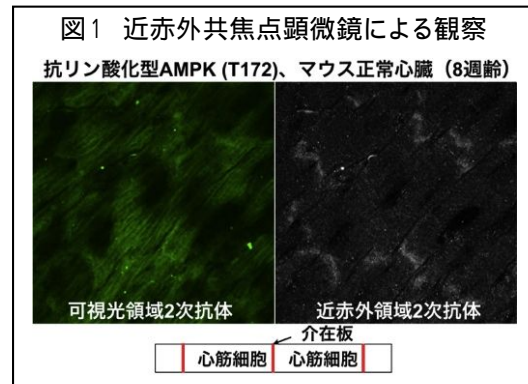
AMPKのエネルギー代謝以外の生物学的作用:

AMPKは細胞内エネルギーセンサーとして、異化反応を促しエネルギー産生を亢進するが、エネルギー代謝以外にも細胞極性、増殖抑制など多彩な生物学的作用を持つ。我々は以前、AMPKの新規基質として微小管の伸長端に局在する蛋白質であるCLIP-170を同定した。さらにCLIP-170のSer311リン酸化は微小管の伸展スピードの保持に必須であり、AMPK活性阻害により、微小管の伸



長反応が障害されることで細胞遊走が抑制されることを明らかにした(*Nature Cell Biol* 2010 ; 12:583)。

【構想に至った経緯】



AMPK の生理作用の多様性と心臓における重要性に着目し、心臓組織における細胞内局在を確かめるために施行した免疫組織によって、新たな AMPK の作用を予感させる事実を発見した。

光電子増倍管検出を用いる従来の共焦点顕微鏡では近赤外領域の検出効率は極端に低下する。我々が開発した高感度CCDカメラによる検出とスピニングディスクを用いた共焦点ユニットを組み合わせた近赤外共焦点顕微鏡は、組織由来の可視光領域にみられる高いバックグラウンド、自家蛍光を可能な限り排除して、微小なシグナルの検出を可能とする(図1)。この近赤外共焦点顕微鏡を用いることにより、正常心臓において活性化型AMPKが恒常的に介在板に局在することを見いだした。

そこで介在板におけるAMPKの基質を同定するため、マウス心臓のジャンクション分画をリン酸化AMPK基質に対する抗体で免疫沈降し、ショットガン質量分析により候補タンパク質を精製・同定した。候補分子は以下のグループに分類された。

- (i) 我々が以前AMPKの基質として同定した微小管伸長速度を調節するCLIP170が再

び同定された。さらにCLIP170と細胞膜上で結合し、微小管を膜にターゲットさせるIQGAP1(*Cell*, 2002;109:873)も同時に同定され、成熟心筋における極性をもった介在板の形成・維持にAMPK-CLIP170-IQGAP1が重要である可能性が示唆された。

- (ii) 不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子であり、デスモゾームを構成する分子群 (*J Hum Genet.* 2005;50:375)
- (iii) 心筋細胞においてメカノセンシングにかかわるとされている分子群。遺伝子異常がヒトの拡張型心筋症で発見されている、あるいはノックアウトマウスが拡張型心筋症を呈する分子群
- (iv) まったく機能未知の新規膜タンパク質群

本研究では同定された基質を手がかりに、介在板を発信源とする AMPK シグナルの解明を目指す。

## 2. 研究の目的

所属する研究室で開発した近赤外共焦点顕微鏡を用いて、AMP-activated kinase (AMPK)が、正常心臓において介在板に局在することを見いだした。AMPKはエネルギー代謝以外にも細胞極性、増殖抑制など生命現象の多くの局面において重要な働きをすることが注目されており、心臓における介在板の隠された役割の存在とその重要性が強く示唆される。そこで本研究提案では、介在板から発信される恒常的な AMPK シグナルおよび病態によるその変容を解明し、心筋細胞間接着を基点とする新しい AMPK のバイオロジーを明らかにすることを目標とする。

## 3. 研究方法

### (1)AMPK の直接の基質であることの証明、リン酸化部位の同定

AMPK 精製標品および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて、*in vitro*リン酸化反応を行う。基質は大腸菌で発現させた GST-tagged リコンビナントタンパクを精製したのち用いる。AMPK によるリン酸化セリン・スレオニン周辺アミノ酸のコンセンサスシーケンス予測をおこない、候補部位に対して、unphosphorylatable mutant (当該アミノ酸をアラニンに置換)を作成、*in vitro*リン酸化反応にて取り込まれるアイソトープを指標にリン酸化部位を同定していく。

### (2)介在板の形成・維持における、同定された基質分子の AMPK によるリン酸化の生理学的意義を心筋培養系を用いて検討する

基質として同定した分子のリン酸化部位を Unphosphorylatable(当該アミノ酸をアラニンに置換)あるいは Phosphomimetic(当該ア

ミノ酸をアスパラギン酸に置換)に置換したアデノウイルスを作製し、介在板の形成・維持における AMPK によるリン酸化の意義につき心筋細胞を用いて検討する。候補分子のリン酸化ミュータントのアデノウイルスをトランスフェクション、また AMPK 活性化剤、阻害剤を組み合わせ、細胞生物学的、生化学的検討を行う。

### (3)リン酸化ミュータント心筋特異的誘導発現型トランスジェニックマウスを用いた検討

(1),(2)において有意な所見がえられた分子について、Unphosphorylatable ミュータントをタモキシフェン誘導下で心筋組織においてのみ発現コントロールできるトランスジェニックマウスを作成する。発現誘導のち心エコーにより心機能、心電図、組織構造の変化を検討する。

## 4. 研究成果

### (1)AMPK の直接の基質であることの証明、リン酸化部位の同定

心臓介在板における AMPK の基質として CLIP170 および機能未知の新規分子 X を同定した。それぞれについてリン酸化されるアミノ酸を同定し、心臓組織における介在板への局在も確認した。新規分子 X はこれまで既報告もなく、その発現が心筋と骨格筋に限定しており、非常に興味深いものであった。

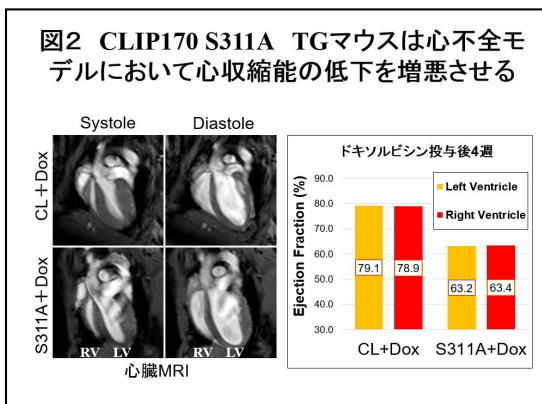
### (2)介在板の形成・維持における、同定された基質分子の AMPK によるリン酸化の生理学的意義の検討

CLIP170 のリン酸化部位をアラニンに置換した mutant では心臓微小管の turn over の異常が生じ、細胞接着部への微小管の集積を認めた。またアラニン mutant や AMPK 阻害剤により安定化微小管のマーカーである、脱チロシン化チューブリンの免疫染色シグナルの増強を認めた。

### (3)リン酸化ミュータント心筋特異的誘導発現型トランスジェニックマウスを用いた検討

CLIP170 S311 を AMPK によるリン酸化部位として同定し、そのアラニン置換 mutant を心筋特異的にタモキシフェン投与下で誘導する TG マウスを作成した。このマウスを用いてアラニン置換 mutant を発現誘導したところ、心収縮力の低下を認めた。さらに心毒性が知られるドキシソルピシン投与心不全モデルにおいてその収縮力低下をさらに増悪させ、組織の顕著な線維化を誘発した。これらの結果は、心臓においてあまり注目されることのなかった微小管のダイナミックな動的制御が、恒常性維持において重要であること、そしてその破たんが心筋収縮力の低下および線維化を引き起こし病態生理学的にも

重要であることが示唆する。近年、AMPKの活性促進剤が心不全を改善すること、AMPKが虚血障害に抑制的に働くことが報告されているが、本発見はこれらの分子メカニズムにも



深く関与することが示唆される。今後の心臓特異的な保護機構の解明、治療法開発につながることを期待する。

新規分子 X の AMPK によるリン酸化の機能解析は現在鋭意進行中であり、現在 CLIP とともに論文投稿準備中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Ikeda, Kayo, Kinoshita, Makoto, Kayama, Hisako, Nagamori, Shushi, Kongpracha, Pornparn, Uemoto, Eiji, Okumura, Ryu, Kurakawa, Takashi, Murakami, Mari, Mikami, Norihisa, Shintani, Yasunori, Ueno, Satoko, Andou, Ayatoshi, Ito, Morihiro, Tsumura, Hideki, Yasutomo, Koji, Ozono, Keiichi, Takashima, Seiji, Sakaguchi, Shimon, Kanai, Yoshikatsu, Takeda, Kiyoshi. Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino-Acid- Dependent Maintenance of Regulatory T Cells. CellReports. 2017, vol. 21, no. 7, pp. 1824-1838. (査読あり)

Nishida, Yuya, Ikeya, Teppei, Mikawa, Tsutomu, Inoue, Jin, Ito, Yutaka, Shintani, Yasunori, Masui, Ryoji, Kuramitsu, Seiki, Takashima, Seiji. A specific single-stranded DNA induces a distinct conformational change in the nucleoid-associated protein HU. Biochemistry and Biophysics Reports. 2016, vol. 8, no. C, pp. 318-324. (査読あり)

Campbell, Niall G., Kaneko, Masahiro, Shintani, Yasunori, Narita, Takuya, Sawhney, Vinit, Coppen, Steven R., Yashiro, Kenta, Mathur, Anthony, Suzuki, Ken. Cell Size Critically Determines Initial

Retention of Bone Marrow Mononuclear Cells in the Heart after Intracoronary Injection: Evidence from a Rat Model. PLoS one. 2016, vol. 11, no. 7, pp. e0158232-19. (査読あり)

Masumura, Yuki, Higo, Shuichiro, Asano, Yoshihiro, Kato, Hisakazu, Yan, Yi, Ishino, Saki, Tsukamoto, Osamu, Kioka, Hidetaka, Hayashi, Takaharu, Shintani, Yasunori, Yamazaki, Satoru, Minamino, Tetsuo, Kitakaze, Masafumi, Komuro, Issei, Takashima, Seiji, Sakata, Yasushi. Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. Scientific Reports. 2016, pp. 1-13. (査読あり)

Shiraishi, Manabu, Shintani, Yasunori, Shintani, Yusuke, Ishida, Hidekazu, Saba, Rie, Yamaguchi, Atsushi, Adachi, Hideo, Yashiro, Kenta, Suzuki, Ken. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. The Journal of clinical investigation. 2016, vol. 126, no. 6, pp. 2151-2166. (査読あり)

Tano, Nobuko, Kaneko, Masahiro, Ichihara, Yuki, Ikebe, Chiho, Coppen, Steven R., Shiraishi, Manabu, Shintani, Yasunori, Yashiro, Kenta, Warrens, Anthony, Suzuki, Ken. Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Transplanted Onto the Heart Surface Achieve Therapeutic Myocardial Repair Despite Immunologic Responses in Rats. Journal of the American Heart Association. 2016, vol. 5, no. 2, pp. e002815-14. (査読あり)

Kokkinopoulos, Ioannis, Ishida, Hidekazu, Saba, Rie, Ruchaya, Prashant, Cabrera, Claudia, Struebig, Monika, Barnes, Michael, Terry, Anna, Kaneko, Masahiro, Shintani, Yasunori, Coppen, Steven, Shiratori, Hidetaka, Ameen, Torath, Mein, Charles, Hamada, Hiroshi, Suzuki, Ken, Yashiro, Kenta. Single-Cell Expression Profiling Reveals a Dynamic State of Cardiac Precursor Cells in the Early Mouse Embryo. PLoS one. 2015, vol. 10, no. 10, pp. e0140831-25. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

矢澤 一生, 矢白木 翔平, 新谷 泰範, 高島 成二, “心臓における新規 AMPK 基質の同定”, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月、神戸(兵庫)(ポスター、査読あり)

矢白木 翔平, 新谷 泰範, 高島 成二、  
“Regulation of microtubules dynamic  
instability by AMPK in cardiomyocytes”  
3rd European Workshop on AMPK、2017 年  
9 月、Ile de Porquerolles, Hyeres,  
(France) (口頭発表、査読あり)

矢白木 翔平, 新谷 泰範, 高島 成  
二、” The analysis of microtubules  
dynamic instability by AMPK in  
cardiomyocytes”、第 69 回日本細胞生物  
学会大会、2017 年 6 月、仙台国際センター  
(宮城)(ポスター、査読あり)

矢白木 翔平, 新谷 泰範, 高島 成  
二、” The analysis of microtubules  
dynamic instability by AMPK in  
cardiomyocytes”、第 38 回日本分子生物  
学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合  
同大会、2015 年 12 月、神戸国際展示場(兵  
庫)(ポスター、査読あり)

矢澤 一生, 矢白木 翔平, 新谷 泰範,  
高島 成二、” 心筋特異的な膜タンパク質  
の同定”、第 62 回 日本生化学会 近畿支  
部例会、2015 年 5 月、草津(滋賀)  
(口頭発表、査読あり)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

新谷 泰範 (SHINTANI, Yasunori)  
大阪大学・大学院医学系研究科・生命機能  
研究科・准教授  
研究者番号：20712243

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

森島 圭祐 (MORISHIMA, Keisuke)  
大阪大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号：60359114

ヤリクン ヤシャイラ (YALIKUN, Yaxiaer)  
大阪大学・大学院工学系研究科・特任助教  
研究者番号：30735064

山口 修 (YAMAGUCHI, Osamu)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90467580

塚本 蔵 (TSUKAMOTO, Osamu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80589150

加藤 久和 (KATO, Hisakazu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30589312

### (4)研究協力者

矢白木 翔平 (YASHIROGI, Shohei)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・大学院  
生

矢澤 一生 (YAZAWA, Issei)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・大学院  
生