

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2009

課題番号：20790653

研究課題名 (和文) 視床下部における LKB1 の細胞内局在と AMPK 活性化調節機構の解析

研究課題名 (英文) The investigation of mechanisms on the regulation of AMPK activation mediated by LKB1 translocation in hypothalamus

研究代表者

河島 淳司 (KAWASHIMA JUNJI)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70467984

研究成果の概要 (和文)：LKB1を強制発現させたHeLa細胞を用いて抗LKB1抗体 (Ley37D) の有用性を確認した。マウスを絶食群 (F群) と再摂食群 (R群；36時間絶食後2時間自由摂食) に分け、肝臓における $\alpha$ AMPKのリン酸化 (Thr<sup>172</sup>) を検討したところ、R群の $\alpha$ AMPKのリン酸化はF群に比べ低下していた。しかしながら、培養細胞で有効であった抗LKB1抗体 (Ley37D)、もう一つの抗LKB1抗体である抗LKB1抗体 (D-19)、いずれの抗体でもマウス肝臓のLKB1を免疫染色法で認識することができなかった。POMC発現ニューロン細胞であるN43/5細胞を細胞内glucose代謝の阻害剤である2-deoxy-D-glucose (2DG) もしくはAMPKの活性化剤であるAICARで30分間刺激したところ、いずれの刺激でも $\alpha$ AMPKのリン酸化 (Thr<sup>172</sup>) 著明に上昇し、LKB1の細胞内局在も核内から細胞質内に移行していた。

研究成果の概要 (英文)：LKB1 expression was recognized by immunohistochemistry (IHC) using the anti-LKB1 antibody (Ley37D) in HeLa cells which LKB1 are overexpressed. AMPK phosphorylation (Thr<sup>172</sup>) in re-fed mice was suppressed in liver, compared to fasted mice. However, it was difficult to recognize LKB1 localization in liver by IHC using anti-LKB1 antibodies (Ley37D or D-19). 2-deoxy-D-glucose (2DG) or AICAR (an AMPK activator) markedly increased AMPK phosphorylation (Thr<sup>172</sup>) in N43/5 cells, which are POMC expressing hypothalamic neurons. 2DG or AICAR also induced LKB1 translocation from nuclear to cytoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

### 1. 研究開始当初の背景

レプチンやインスリンといった末梢組織から分泌されるホルモンが視床下部に作用し、摂食行動を制御していることがよく知られているが、近年、これらのホルモンが視床下部の AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性を抑制することにより摂食を低下させることが明らかとなった。逆に、低血糖刺激や摂食亢進作用を有するホルモンであるグレリンにより視床下部の AMPK 活性が増強され摂食が亢進することや、AMPK の活性化剤である AICAR の脳室内投与により摂食が亢進することが示され、視床下部における AMPK の活性化が摂食行動を制御していることが明らかとなってきた。一方、AMPK の活性化を調節するタンパクとして、LKB1、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKKs)、Transforming growth factor-beta-activating kinase 1 (TAK1) などが報告されており、これら AMPK の上流に位置する AMPK kinase によって AMPK の  $\alpha$  サブユニットがリン酸化 ( $\alpha$  AMPK Thr<sup>172</sup>) されることによって、AMPK が活性化することが知られている。また、培養細胞においては LKB1 の核内から細胞質への移行 (translocation) により AMPK が活性化されることが報告されている。しかしながら、低血糖やグレリン刺激による視床下部 AMPK の活性化やレプチン、インスリンといったホルモンによる視床下部における AMPK 活性の抑制がどのような経路を介して行われているのか今のところ明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

視床下部における低血糖やグレリンによる AMPK 活性増強もしくはレプチンやインスリンによる AMPK の活性抑制のメカニズムを解明すること、特に LKB1 の細胞内局在を中心に、視床下部における LKB1 による AMPK の活性化調節機構について検討することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

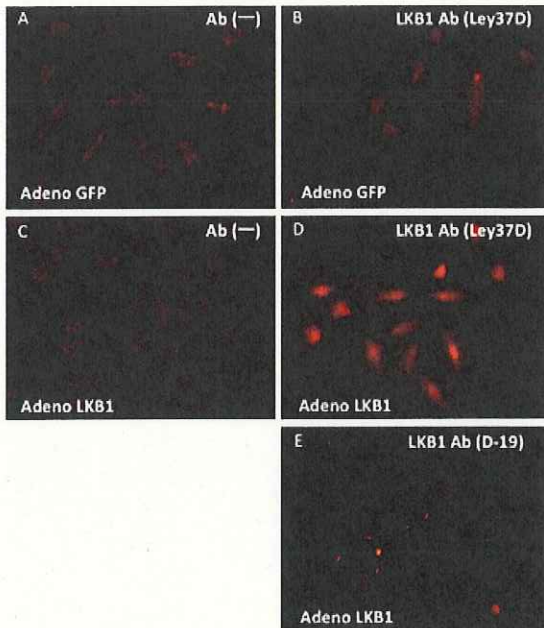
(1) 抗 LKB1 抗体の有用性の確認：LKB1 を発現していない HeLa 細胞にアデノウイルスを用いて LKB1 を過剰発現させた後、2 種類の抗 LKB1 抗体 (Ley37D、D-19) を用いて免疫染色を行い、それぞれの抗体の有用性について確認する。

(2) *in vivo* における抗 LKB1 抗体の有用性の確認と AMPK のリン酸化の検討：マウス (B57/BL6) を 36 時間絶食群 (F 群) と再摂食群 (R 群; 36 時間絶食後 2 時間自由摂食) に分け、それぞれの群の肝臓を摘出し、①免疫染色法にて LKB1 の発現を検討、②ウェスタンブロット法を用いて AMPK のリン酸化 (Thr<sup>172</sup>) を検討する。

(3) N43/5 細胞を用いた LKB1 の細胞内局在と AMPK リン酸化 (Thr<sup>172</sup>) の検討：視床下部 cell line の一つで、POMC 発現ニューロン細胞である N43/5 細胞を細胞内 glucose 代謝の阻害剤である 2-deoxy-D-glucose (2DG; 20 mM) もしくは AMPK の活性化剤である AICAR (1 mM) で 30 分間刺激した後に、①免疫染色にて LKB1 の発現を検討、②ウェスタンブロット法にて AMPK のリン酸化 (Thr<sup>172</sup>) を検討、③核タンパクと細胞質タンパクを抽出し、ウェスタンブロット法にて LKB1 の細胞内局在を検討する。

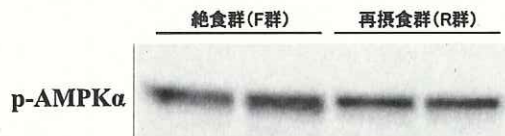
### 4. 研究成果

(1) GFP (Fig.1A,B) もしくは LKB1 (Fig.1C,D,E) を強制発現させた HeLa 細胞に対して抗 LKB1 抗体 (Ley37D) を一次抗体として免疫染色を行ったところ (Fig.1B,D)、一次抗体を使用しなかった HeLa 細胞 (Fig.1A,C) や GFP のみを過剰発現させた HeLa 細胞 (Fig.1B) と異なり、LKB1 を過剰発現させ、抗 LKB1 抗体 (Ley37D) 抗体を用いた場合で LKB1 の発現を核内に認めることができた (Fig.1D)。一方、もう一つの抗 LKB1 抗体である D-19 抗体は LKB1 を認識できなかった (Fig.1E)。



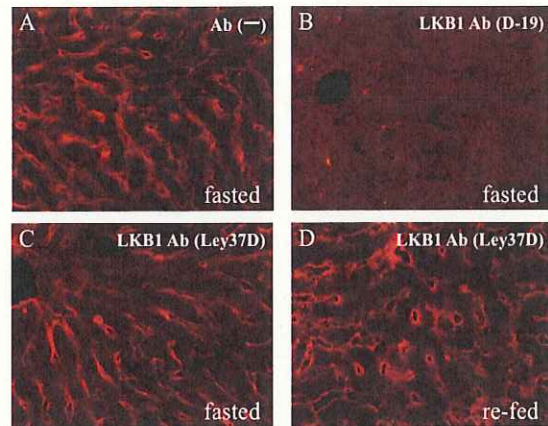
**Fig.1** HeLa細胞を用いた抗LKB1抗体の有用性  
アデノウイルスを用いてGFP (A, B) もしくはLKB1 (C, D, E) を過剰発現させたHeLa細胞に対して免疫染色を施行。一次抗体として、抗LKB1抗体 (Ley37D) を使用 (B, D)、抗LKB1抗体 (D-19) を使用 (E)。Fig. 1A, 1Cは一次抗体未使用。

(2)再摂食群 (R 群; 36 時間絶食後 2 時間自由摂食) は 2 時間で  $1.3 \pm 0.1$  g を摂食し、血糖値は 2 時間の摂食により  $59.2 \pm 6.5$  mg/dl から  $155.2 \pm 19.4$  mg/dl まで上昇した。両群の肝臓を取り出し、肝臓における AMPK のリン酸化をウェスタンブロットで検討したところ、36 時間絶食群 (F 群) と比べ、R 群の肝臓では  $\alpha$ AMPK のリン酸化が低下していた (Fig.2)。



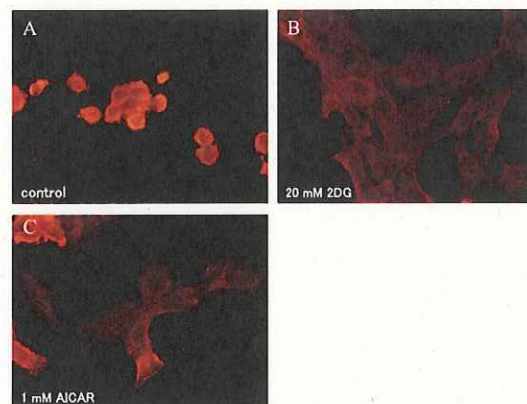
**Fig.2** マウス肝臓における $\alpha$ AMPKのリン酸化 (Thr<sup>172</sup>)  
肝臓におけるAMPKのリン酸化 (Thr<sup>172</sup>) は、F群と比べて (左2レーン)、R群 (右2レーン) で低下していた。

しかしながら、培養細胞で有効であった抗LKB1抗体 (Ley37D)、もう一つの抗LKB1抗体である抗LKB1抗体 (D-19)、いずれの抗体でも免疫染色法ではマウス肝臓内のLKB1を認識することができなかった (Fig.3)。



**Fig.3** 肝臓におけるLKB1の細胞内局在  
36時間絶食マウスの肝臓 (A-C) もしくは再摂食マウスの肝臓 (D) を取り出し免疫染色。Bは抗LKB1抗体 (D-19) を使用し、C及びDは抗LKB1抗体 (Ley37D) を使用。Aは一次抗体未使用。

(3)N43/5細胞を 2DG もしくは AICAR で 30 分間刺激した後に抗LKB1抗体 (Ley37D) を一次抗体として用いた免疫染色を行ったところ、コントロールの細胞ではLKB1が主に核内に存在していたが、2DG、AICAR いずれの刺激でもLKB1の細胞内局在が核内から細胞質内に移行していることがわかった (Fig.4)



**Fig.4** N43/5細胞におけるLKB1の細胞内局在  
N43/5細胞を、コントロールメディウム (25 mM glucose) で培養 (A)、20 mM 2DG + 5 mM glucoseで30分間培養 (B)、コントロールメディウム (25 mM glucose) + 1 mM AICARで30分間培養 (C) した後、抗LKB1抗体 (Ley37D) を用いて免疫染色。

また、N43/5細胞を 2DG もしくは AICAR で 30 分間刺激した後にタンパクを精製し、ウェスタンブロットを行ったところ、2DG 刺激により  $\alpha$ AMPK のリン酸化が著明に増加し (Fig.5)、さらにタンパクを核分画と細胞質分画に分けてウェスタンブロットを行ったところ、2DG 刺激により細胞質分画内のLKB1発現が増加していた (Fig.6)。

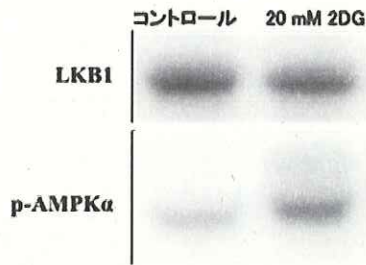


Fig.5 2DG刺激によるAMPKのリン酸化 (Thr<sup>172</sup>)  
N43/5細胞を20 mM 2DGで30分間刺激した後にタンパク精製し、抗LKB1抗体 (Ley37D) もしくは抗phospho-AMPK (Thr<sup>172</sup>) 抗体を用いてウェスタンブロット。

以上のように視床下部培養細胞である N43/5 細胞において、2DG もしくは AICAR 刺激により LKB1 が核内から細胞質へ移行することがわかった。今後は、LKB1 の細胞内移行を阻害する薬剤 (Leptomycin B) や核から細胞質への移行ができない変異型 LKB1 (

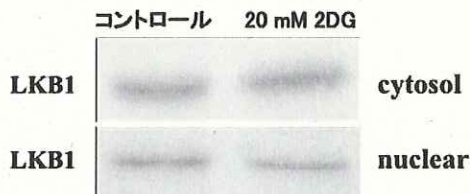


Fig.6 2DG刺激によるLKB1の細胞内局在の変化  
N43/5細胞を20 mM 2DGで30分間刺激した後に細胞質内タンパク (cytosol) と核内タンパク (nuclear) に分けてタンパク精製し、抗LKB1抗体 (Ley37D) を用いてウェスタンブロット。

SL26) を用いて LKB1 の細胞内移行を阻害することにより、2DG や AICAR による AMPK の活性化 (リン酸化) がブロックできるか検討し、さらには *in vivo* の視床下部においても低血糖などの刺激により同様のことが起きているか検討する予定である。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河島 淳司 (KAWASHIMA JUNJI)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70467984

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：