

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860738

研究課題名(和文) AMPKのERストレス応答に対して非受容体型チロシンキナーゼFynが果たす役割

研究課題名(英文) Identifying the role of Fyn for the ER stress regulated by AMPK

研究代表者

山田 英二郎 (Yamada, Eijiro)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60645563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：AMPキナーゼが肥満治療の標的分子として注目されているが、我々は非受容体型チロシンキナーゼFynがAMPKサブユニットを直接チロシンリン酸化することで、その分子内活性を調節することを報告してきた。今回更に検討を行い、長期TNFでAICAR依存性のAMPKの活性化の減弱を認めた。長期TNFでFynの活性の上昇を認めた。siRNAを用いてFynをノックダウンすると長期TNF下でのAICAR依存性のAMPK活性の減弱が起らなかった。これらの成果はメタボリック症候群に深く関与する炎症性サイトカインTNFがFynの活性調節を介してAMPK活性を調節することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Metabolic imbalance is associated with diabetes and linked with dysfunctions of nutrient-sensors such as AMPK. Additionally pro-inflammatory cytokines such as TNF contributes to chronic low-grade inflammation and insulin resistance. Previously we reported that Fyn knockout mice display increased energy expenditure due to increased AMPK activity. More recently, we demonstrated that Fyn regulates AMPK activity through Y426 phosphorylation of the subunit. We then examined the crosstalk between Fyn and pro-inflammatory cytokines on AMPK regulation. Prolonged incubation with TNF suppressed AICAR stimulated T172 subunit phosphorylation. In parallel, TNF increased Fyn kinase activity and siRNA knockdown of Fyn prevented the chronic TNF inhibition of AICAR-stimulated AMPK T172 subunit phosphorylation. Taken together, these data suggest that prolonged stimulation of TNF blunts AICAR dependent AMPK activation through Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of AMPK subunit.

研究分野：代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

肥満とそれに伴うメタボリックシンドロームは世界で急激に増加傾向であり、日本でも社会問題となっているが、これらは細胞、個体レベルにおけるエネルギー状態の破綻によって起こるとされている。こうした中で、細胞内のエネルギーセンサーであり、エネルギー代謝を上げることのできる AMP キナーゼ(AMPK)がメタボリックシンドロームの標的分子として脚光を浴びてきている。

AMPK は α, β, γ のサブユニットからなり、その活性調節はAMP/ATP比によってなされるとされているが、これによる AMPK のアロステリックな変化による活性上昇は数倍程度にとどまり、 α サブユニットの172番目のスレオニンのリン酸化とこれらサブユニットの複合体の変化も必要であると考えられている (Yamada E et al. Future Med Chem. 2010)。このリン酸化を行うキナーゼとしては LKB1、CAMKK β 、TAK1 が知られているが、近年、申請者らは LKB1 が非受容体型チロシンキナーゼの一つである Fyn によって直接リン酸化されており、このリン酸化によって、その活性が抑制されることを報告した (Yamada E et al. Cell Metab. 2010)。

しかし、メタボリックシンドロームにおいて Fyn が実際にどのように調節されているかは明らかではなく、さらに Fyn の標的因子は LKB1 のみではない可能性もある。

2. 研究の目的

申請者は最近、メタボリックシンドロームの標的分子 AMP キナーゼ(AMPK)の活性化因子 LKB1 が、非受容体型チロシンキナーゼである Fyn によって直接調節されていることを報告した。今回、Fyn がメタボリックストレスで励起される ER ストレスによってその活性が上がるかどうか？ Fyn が LKB1 を介さずとも、AMPK を直接チロシンリン酸化することで、その活性調節、脂肪酸の酸化を調節するかどうか検討する。これらが明らかになることで高脂肪食による AMPK 活性調節の新たなメカニズムが判明することとなり、肥満治療に大きく貢献することができると考えられる。

3. 研究の方法

1) ER Stress による Fyn-(LKB1)-AMPK の調節の確認

マウス、293T 細胞において ER stress によって Fyn の発現調節が行われることが確認されたが、これを更に異なる細胞、特に代謝に関わる細胞において確認検討し、さらにそれによって AMPK がどのように調節されるかどうかの検討を行う。

様々な濃度、時間で ER stress を励起すると考えられているタプシガルギン、ト

ニカマイシンによって Fyn の発現調節もしくは活性調節が起こるかどうかを複数の細胞、特に HepG2 や C2C12 といった代謝に関わる組織の細胞株にて確認する。特に発現調節に関しては、高脂肪食は長時間の刺激であり、比較的、長時間の刺激により起こる可能性があると考えられる。Fyn の活性調節に関しては Fyn に特異的な抗体で免疫沈降を行った後、活性に重要とされている、2つのリン酸化部位のリン酸化を特異的に認識する抗体によるウェスタンブロット法もしくは基質ペプチドをプレートに固定した ELISA を用いたキット(TAKARA Bio で購入可)によって検討を行う。こういった手法での解析は既に既報 (Yamada E et al. Cell Metab. 2010) にもある通り、申請者らは問題なく行うことができる。我々のマウスの高脂肪食負荷による結果からは Fyn の活性が上昇することが示唆される。

これら化合物の長期的な刺激によって AMPK と β 酸化が細胞内でどのように影響をうけるか検討する。特にこれら化合物の短期的な刺激においては、AMPK 活性はむしろ上昇することが報告されているが、長時間の刺激の報告は少ない。今回申請者が想定しているメタボリックストレスの状態は長期的なものであり、この状態での活性調節を検討する必要がある。 β 酸化に関しては放射性同位元素である[1- 14 C]パルミテートをトレーサーとして用いて検討を行う。これも既報(Yamada E et al. Cell Metab. 2010) にもある通り、申請者らは問題なく行うことができ、また問題があれば Dr.Pessin 研究室の助言を受けることができる体制となっている。

Fyn をノックダウンして、それら化合物による AMPK の活性、 β 酸化がどのようになるかを確認する。この検討を行うことで ER stress による AMPK の調節において Fyn がしている役割を確認することができる。siRNA に関してはノックダウン効率が低い、もしくはターゲット遺伝子以外がノックダウンされる可能性もあるため、2種類以上の siRNA 単独もしくは混合により行い再現性の確認をする。

2) AMPK の Fyn によるリン酸化とその生理的意義の確認。

マウスにおいて AMPK のチロシン残基のリン酸化が確認されたが、これが Fyn によって直接起こるものかどうか *in vitro* の系を用いて検討する。さらにそのリン酸化によって AMPK の活性調節が行われているかを確認する。大腸菌内に発現して単離精製した GST-AMPK と活性型 His-Fyn(購入可)を ATP/Mg を含んだ

バッファー内で *in vitro* の系にてリン酸化反応を行ったのち、SDS-PAGE に流し、リン酸化されたチロシン残基を特異的に認識する抗体にてウェスタンブロット法にて確認することで、実際に AMPK のチロシン残基が Fyn によって直接リン酸化されるかどうかを確認する。さらに Fyn によってリン酸化されうる 432 番目のリン酸化部位をフェニルアラニンに変異させた GST-AMPK-Y432F を単離精製し、同様の実験を行い、この部位以外にリン酸化部位が存在するかどうかの検討も行う。申請者は大腸菌のタンパク発現系また変異導入の実験に長けており、また申請者の働く病態制御内科糖尿病内分泌研究室の岡田講師はこれら実験系に詳しく、問題のある際にはいつでも相談することができる。

AMPK は α , β , γ の複合体からなっており、この複合体の状態の変化が活性調節に大きく影響する。そのため我々の発見したリン酸化部位のリン酸化により、これら複合体の状態が変化するかどうかを確認する。具体的には *in vitro* もしくは *in vivo* の系を用いて、pull down 法もしくは免疫沈降法を用いて、AMPK α サブユニット WT やチロシン残基がリン酸化されない Y432F と β , γ サブユニットの結合状態を観察する。活性に関しては AMPK の活性に重要とされている T172 のリン酸化の有無、基質ペプチド、p32-ATP を用いた *in vitro* のキナーゼアッセイを用いて検討する。

AMPK-WT とリン酸化部位に変異を導入した AMPK-Y432F のベクターを用い、細胞内での AMPK の下流に関する検討を行う。この際、内因性の AMPK の影響をなくすため、ヒト細胞株を用いて、ヒト siRNA もしくは shRNA を用いて AMPK をノックダウンした後、ラットもしくはマウスの AMPK-WT と AMPK-Y432F のベクターを用いて過剰発現し、AMPK と β 酸化が細胞内でどのように影響をうけるか検討する。

の細胞をタブシガルギンによって長期刺激し AMPK で調節される β 酸化がどう変化するか検討する。ER stress によって Fyn が活性化され、AMPK のチロシンリン酸化が起こることが、 β 酸化の調節に重要であるならば、チロシンのリン酸化が起きない AMPK では ER stress による β 酸化の調節が起きない、もしくはは減弱することが想定される。

4. 研究成果

Fyn がこの LKB1 を介さずとも、AMPK α サブユニットの 432 番目のチロシン残基を直接リン酸化することで、その分子内活性の調節が可能であることを報告した。さらに、そのメカニズムは不明であったため更に検討を行い、

下記のような結果を得た。 の Fyn によるリン酸化部位を変異させた GST 融合変異体 (GST-AMPK -Y432F) と GST-AMPK -WT を 293 細胞で発現し、GST 抗体を用いた免疫沈降法を行った後に、抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、これら と結合する内因性の、は変化がなかった 293 細胞で発現した GST-AMPK -WT/Y432F と結合する、をプルダウン法で確認したところ変化がなかった 293 細胞で発現した と結合する GST-AMPK -WT/Y432F をプルダウン法で確認したところやはり変化がなかった内因性の をノックダウンした細胞にて GST-AMPK -WT/Y432F を発現したところ、変異体を発現した細胞にて AMPK の基質であるアセチル CoA カルボキシラーゼのリン酸化の上昇を認めるのみならず、他の基質である raptor, ulk1 のリン酸化が上昇した の細胞で の活性を確認したところ、変異体を発現した細胞にて AMPK の活性の上昇を認めた。更にその調節機構がどのような病態を反映するかは不明であったため検討を行い、下記のような結果を得た。 HEK293 細胞にて長期 TNF で AICAR 依存性の AMPK の の 172 番目のスレオニンのリン酸化とその基質であるアセチル CoA カルボキシラーゼのリン酸化の減弱を認めた。 長期 TNF で Fyn の活性の上昇を認めた。 HEK293 細胞で siRNA を用いて Fyn をノックダウンし、長期 TNF 下での AICAR 依存性の AMPK のリン酸化を確認したところ、その減弱が起こらないことを確認した。これらの結果はメタボリック症候群に深く関与する炎症性サイトカイン TNF が Fyn の活性を上げる事、さらにそれにより AMPK 活性調節が生じる可能性を示唆している。これら一連の発見によってメタボリック症候群において AMPK を抑制する新たなメカニズムが判明したこととなり、肥満治療に大きく貢献することができると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

第 56 回 日本糖尿病学会年次学術集会
山田英二郎、岡田秀一、Claire C. Batie,、高橋洋樹、斎藤従道、Jeffrey E. Pessin、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正信、大島喜八、森昌朋、非受容体型チロシンキナーゼ Fyn は AMP キナーゼ (AMPK) を直接リン酸化する事でその活性と脂肪酸代謝を調節する。

2013 年 5 月 16-18 日 熊本

第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会
山田英二郎、岡田秀一、高橋洋樹、斎藤従道、下田容子、佐藤哲郎、大島喜八、森昌朋、山田正信、非受容体型チロシンキナーゼ Fyn は AMP キナーゼの サブユニットを直接リン酸

化し、その分子内活性を調節する。

2014年5月22-24日 大阪

第58回 日本糖尿病学会年次学術集会
山田英二郎、岡田秀一、澁澤良、多賀谷裕子、
大崎綾、下田容子、斎藤従道、小暮光一郎、
佐藤哲郎、大島喜八、森昌朋、山田正信、長
期 TNF 刺激による AMP キナーゼ調節機構の
解明 2015年5月21-23日 下関

第74回 アメリカ糖尿病学会
EIJIRO YAMADA, SHUICHI OKADA, TSUGUMICHI
SAITO, YOKO SHIMODA, YUKO TAGAYA, CLAIRE
C. BASTIE, JEFFREY E. PESSIN
Fyn-Dependent Tyrosine Phosphorylation of
AMPK on Y436 regulates its intrinsic
activity 2014年6月13-17日 サンフラン
シスコ

第75回 アメリカ糖尿病学会
EIJIRO YAMADA, SHUICHI OKADA, RYO
SHIBUSAWA, YUKO TAGAYA, AYA OSAKI, YOKO
SHIMODA, TSUGUMICHI SAITO, CLAIRE C.
BASTIE, JEFFREY E. PESSIN, MASANOBU YAMADA
Identifying a new pathway to regulate AMPK
activity under metabolic stress.

2014年6月5-9日 ボストン

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田英二郎 (YAMADA, Eijiro)
群馬大学医学部附属病院・助教
研究者番号: 60645563

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: