

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21393

研究課題名(和文) AMPK-GSK3 複合体形成がグリコーゲン代謝へ及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The analysis of the effect of AMPK-GSK3 complex on glycogen metabolism

研究代表者

鈴木 司 (Tsukasa, Suzuki)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20714588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、申請者らが見出したAMPK-GSK3複合体が協調して両者の基質に対してどのように活性制御を行っているのかを解析することにある。共通する基質のうち、グリコーゲン合成酵素であるGSの活性に対してAMPK-GSK3複合体が形成されないと、GSK3はGSをリン酸化する能力が低下することを見出した。また、この他GSK3とAMPKに共通する新たな基質として、微小管関連タンパク質であるMAP1Bを見出した。特に、AMPKは細胞内でMAP1Bをリン酸化することで細胞内の微小管の再形成に影響を及ぼすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：We reported that AMPK interacts with GSK3 previously, however, it was not clear how this complex formation affects its own substrates. In this study, we found that GSK3 needs complex formation with AMPK to regulate glycogen synthase (GS). Interestingly, the interaction between AMPK and amylose resin promoted association with GSK3, suggesting that glycogen enhances AMPK-GSK3 complex formation. Furthermore, we identified MAP1B, which is microtubule related protein and also known as a substrate of GSK3, as a substrate of AMPK. The phosphorylation of MAP1B by AMPK affected cellular microtubule reconstitution like GSK3 regulates MAP1B.

研究分野：栄養生化学

キーワード：AMPK GSK3 リン酸化修飾

## 1. 研究開始当初の背景

AMPK (AMP-activated protein kinase) は細胞内のエネルギー恒常性を制御するセリンスレオニンキナーゼである。飢餓状態により活性化され、ATP 産生の促進・ATP 消費の阻害を進めることでエネルギーバランスを図る。申請者は、AMPK が阻害されるメカニズムについて研究を行ってきた。その結果、GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) が AMPK と結合し、また、インスリン刺激により AMPK をリン酸化し、キナーゼ活性を阻害することを初めて明らかにした (Suzuki et al. Mol Cell 2013)。

一般的に、インスリン刺激により GSK3 はリン酸化され、キナーゼ活性を失う。これはリン酸基が、ターゲットとなる基質と結合する部位を塞ぐためである。しかし、AMPK は GSK3 のリン酸化によらず結合できるユニークな基質であり、また、インスリン刺激による AMPK の立体構造の変化が、GSK3 によるリン酸化を促進することを示した。つまり、インスリン刺激は、GSK3 の一般的な基質へのキナーゼ活性をオフにするとともに、AMPK の阻害を促進する。

興味深いことに、AMPK と GSK3 は共通する基質を複数有し、基質への作用は両者により増幅または補完傾向を示す。その 1 つの GS は、両者により異なる部位へのリン酸化を受けることで阻害され、グリコーゲン合成が抑制される。一般的に AMPK と GSK3 は、それぞれ別々に GS をリン酸化すると考えられている。しかし、AMPK と GSK3 が複合体を形成することで、より効率的にそして同時に GS を制御する新しいモデルが考えられる。

また、AMPK はグリコーゲン結合領域を有するが、一方、GSK3 はこれを持たない。それゆえ、GSK3 は AMPK を足場とすることで、GS へ接近するモデルが考えられる。これはグリコーゲンに局在する AMPK は GSK3 と結合し、その結果 GS を効率的に阻害する可能性が考えられる。

この共通する基質は GS のみならず、インスリンシグナル伝達経路の因子である TSC2 や IRS1、そしてアルツハイマーとの関連が示唆される tau など複数あげられる。また、これらの基質は AMPK と GSK3 により、それぞれ異なる部位をリン酸化され、その基質への作用は、効果の増幅または補完傾向を示すことが特徴である。特に GS に関しては、複数存在するリン酸化部位のなかでも、AMPK と GSK3 によるリン酸化制御が、GS を阻害する上で必須である。

次に、インスリン刺激が「複合体の活性のスイッチ」となる利点があげられる。飢餓状態では AMPK・GSK3 とともに活性化しており、一方インスリン刺激は、GSK3 による AMPK の阻害と同時に、GSK3 の GS を含む、一般的な基質へのキナーゼ活性も阻害する。よって、AMPK と GSK3 は同時に GS に対する作用を失う。つまり、細胞が栄養を得た時に速

やかに GS への阻害作用をオフにし、グリコーゲン合成の促進に切り替えるモデルが考えられる。実際にインスリン添加によって、AMPK による GS の阻害が減少するとの報告がある (Hunter, R.W. et al. Diabetes 60, 766-774. 2011)。

以上の学術的背景により本研究は、「AMPK-GSK3 複合体」を形成することが、GS などの共通する基質の活性を調節する上で重要な役割を果たしているという新しい制御モデルが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、新しく見出した AMPK-GSK3 複合体の形成が、GS の活性調節に及ぼす影響の解明を目的とし、その詳細な制御メカニズムだけでなく、グリコーゲン代謝などへの生理学的意義をも明らかにする。そのために、AMPK と GSK3 の結合部位を調べ、結合に重要なアミノ酸配列を明らかにすることや、GSK3 と AMPK の結合が、GS の活性調節に寄与しているか解明する。また、細胞内のグリコーゲン量またはその形態が AMPK-GSK3 の複合体形成に与える影響を解析することを目的とする。

この他に、GSK3 と共通する新たな AMPK の基質を探索し、GSK3-AMPK 複合体の新たな制御経路を見出すことも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) グリコーゲンが AMPK-GSK3 の複合体形成に及ぼす影響の解析

AMPK と GSK3 との結合にグリコーゲンが影響を与えるかどうかを解析するために、グリコーゲンを模倣したアミロースビーズを用いて検討した。AMPK のサブユニットにはグリコーゲンと結合するドメインが存在するため、アミロースビーズと結合する。そこで、HEK293T 細胞から得た破碎液を用いて免疫沈降法にて精製した AMPK とアミロースビーズにて精製した AMPK にそれぞれ GSK3 がどの程度結合するか解析をすることで、AMPK と GSK3 との結合にグリコーゲンが与える影響を解析した。

(2) AMPK ノックダウンが GSK3 による GS のリン酸化に及ぼす影響の解析

GSK3 が GS をリン酸化するために AMPK が必要であるか検討した。AMPK は / / サブユニットから形成されるヘテロ三量体であり、これまでに申請者は AMPK のサブユニットが GSK3 と結合することを既に報告した。そこで HEK293T 細胞を用いて、AMPK サブユニットをレンチウイルスにてノックダウンし、GSK3 による GS のリン酸化が減少するか western blotting 法を用いて解析した。

(3) AMPK における GSK3 との結合ドメインの探索および結合が出来ない AMPK 変異体が

#### GSK3 の活性に及ぼす影響の解析

GS の活性やグリコーゲン代謝を解析するために、複合体を形成できない AMPK 変異体を作成した。

既に作成した AMPK<sup>Δ</sup>、発現プラスミドを用い、それぞれ複数の異なる欠失変異体を作成し HEK293T 細胞に発現させ、免疫沈降法により GSK3 との結合部位を同定した。その後、その変異体と GSK3 を共発現させ、GS に対するリン酸化状態を western blotting 法にて解析した。

#### (4) AMPK-GSK3 に共通する新規基質の探索

AMPK の新規結合因子を探索し、その中からすでに GSK3 の基質として知られているタンパク質を抽出し、AMPK の基質でもあるのかどうか解析することで AMPK と GSK3 に共通する新たな基質を探索した。具体的には、ストレプトアビジンビーズにて精製することが可能なタグを融合した AMPK のサブユニットの発現ベクターを作成し、これを HEK293T 細胞に安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、AMPK を精製し、これを LC-MS/MS を用いたショットガン解析を行うことで AMPK に結合するタンパク質を網羅的に検索した。その後、GSK3 の基質として知られているタンパク質を抽出し、AMPK の基質でもあるか、*in vitro* kinase assay を行った。また、それと同時に、AMPK によるリン酸化部位の特定をリン酸化抗体も使用して行った。

#### (5) AMPK が MAP1B に及ぼす影響の解析

AMPK の新規基質として同定した MAP1B のリン酸化修飾は、MAP1B が関与する微小管形成にどのような影響を及ぼすか解析をした。AMPK による MAP1B のリン酸化部位を変異した発現プラスミドを作成し、MAP1B の発現が比較的低いことが知られている Cos-1 細胞に導入し、その後、微小管の重合を nocodazole にて分解し、再形成にどのような影響が現れるかについて解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) グリコーゲンが AMPK-GSK3 の複合体形成に及ぼす影響の解析

グリコーゲンが AMPK と GSK3 との結合に影響を及ぼすか、アミロースビーズを用いて解析をした結果、免疫沈降法にて精製した AMPK と比較して、アミロースビーズと結合した AMPK の方がより GSK3 と結合することが示され、グリコーゲンと結合している AMPK はより GSK3 と結合することが示唆された。また、AMPK のサブユニットに存在するグリコーゲン認識モチーフを変異した結果、GSK3 との結合が低下することも示された。この結果からも、グリコーゲンに局在する AMPK は GSK3 とより結合することが示唆された。GSK3 はグリコーゲンを認識するモチーフを持たないことから、GSK3 は AMPK を介することでグリコーゲンに局在して GS の活性化を制御する

可能性が示された。

#### (2) AMPK ノックダウンが GSK3 による GS のリン酸化に及ぼす影響の解析

GSK3 が GS をリン酸化するために AMPK が必要であるか、AMPK の 1 及び 2 サブユニットをノックダウンし、GSK3 による GS のリン酸化状態を解析した結果、AMPK をノックダウンすると GSK3 による GS のリン酸化状態が低下する結果が得られた。GSK3 がグリコーゲンへの局在に AMPK が関与するかどうかを免疫染色法にて確認するまでには至らなかったものの、研究成果(1)の結果から鑑みても、GSK3 が AMPK に結合してグリコーゲンに局在することで GS をリン酸化することが示唆された。今後は様々な手法を用いて GSK3 のグリコーゲンへの局在に AMPK を介しているか検討を重ねる必要があると考える。

#### (3) AMPK における GSK3 との結合ドメインの探索および結合が出来ない AMPK 変異体が GSK3 の活性に及ぼす影響の解析

AMPK のどの部位が GSK3 との結合に重要であるのか解析した結果、AMPK のサブユニットの C 末端に近い 20 から 30 アミノ酸であることが示された。また、この部位を欠損した AMPK サブユニットを GSK3 とともに発現させた細胞では、GSK3 による GS のリン酸化状態が低下する傾向にあることが示された。この結果からも、GSK3 は AMPK と複合体を形成することで GS の制御を行っていることが示唆された。

#### (4) AMPK-GSK3 に共通する新規基質の探索

GSK3 と共通する新たな AMPK の基質を探索するために、AMPK の結合因子を解析した結果、新たに微小管関連タンパク質である MAP1B が候補として検出された。MAP1B は微小管の重合に関与しており、GSK3 によってリン酸化されることでその作用が制御されることがすでに知られている。そこで、MAP1B に存在する AMPK のリン酸化モチーフが含まれるペプチドを大腸菌内にて作成し、AMPK による *in vitro* kinase assay を行った結果、AMPK によってリン酸化されることが示された。また、リン酸化部位の特定にも至った。さらに抗リン酸化 MAP1B 特異的抗体を作成し、細胞内にて本研究で見出した MAP1B のリン酸化状態を解析したところ、細胞内においてもリン酸化が確認された。これらの結果より、GSK3 と共通する AMPK の新たな基質として MAP1B を同定することができた。

#### (5) AMPK が MAP1B に及ぼす影響の解析

AMPK による MAP1B のリン酸化修飾が微小管の再形成におよぼす影響を解析した結果、MAP1B のリン酸化部位をアスパラギン酸に変異させたリン酸化模倣変異体を発現させた細胞において、再形成が他と比較して遅れる

現象が観察された。微小管の再形成などは細胞周期や神経細胞の制御においても重要であることから、AMPK-GSK3 複合体が GS のみならず、MAP1B を介してエネルギー代謝以外にも関与することが新たに示唆された。

#### 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 10 件)

松本 雄宇, 津村 孝之, 貴家 康尋, 福井 勝, 田所 忠弘, 鈴木 司, 小林 謙一, 山本 祐司、大豆乳酸菌発酵物は Nrf2/SHP 経路の活性化を介して血中および肝臓中脂質を減少させる、日本食生活学会誌 第 27 巻 第 2 号 pp.101-108、2016 年 (査読有り)

松本雄宇、鈴木 司、山本祐司、小林謙一、ヒト大腸癌由来培養細胞 Caco-2 における蛍光標識化イソフラボンの細胞内動的イメージング、消化と吸収、第 38 巻 第 2 号 pp. 113-116、2016 年 (査読有り)

Aizawa Y, Shirai T, Kobayashi T, Hino O, Tsujii Y, Inoue H, Kazami M, Tadokoro T, Suzuki T, Kobayashi K, Yuji Yamamoto, Metabolic abnormalities induced by mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of the renal carcinoma Eker (TSC2+/-) rat model. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 第 80 巻 第 8 号 pp.1513-1519 2016 年 (査読有り)

白井 智美, 影山 洋平, 佐藤 拓也, 柳 楽 大気, 相澤 有美, 志賀 孝宏, 田所 忠弘, 鈴木 司, 小林 謙一, 山本 祐司、メタボローム解析法を用いたコーヒー摂取が代謝変動を介して Eker ラットの腎腫瘍形成に及ぼす影響の解析、日本食生活学会誌、第 27 巻 第 1 号、pp.49-56、2016 年 (査読有り)

Shirai T, Shichi Y, Sato M, Tanioka Y, Furusho T, Ota T, Tadokoro T, Suzuki T, Kobayashi K, Yamamoto Y. High dietary fat-induced obesity in Wistar rats and type 2 diabetes in nonobese Goto-Kakizaki rats differentially affect retinol binding protein 4 expression and vitamin A metabolism. Nutrition Research, 第 36 巻 第 3 号、pp.262-270、2016 年 (査読有り)

Aizawa Y, Shirai T, Kobayashi T, Hino O, Tsujii Y, Inoue H, Kazami M, Tadokoro T, Suzuki T, Kobayashi K, Yamamoto Y. The tuberous sclerosis complex model Eker (TSC2+/-) rat exhibits hyperglycemia and hyperketonemia due to decreased

glycolysis in the liver. Archives of Biochemistry and Biophysics 第 590 巻 pp.48-55, 2016 年 (査読有り)

小林 謙一, 茂木 裕暉, 高橋 明日香, 相澤 有美, 鈴木 司, 山本 祐司、オリブ葉由来ヒドロキシチロソール蛍光化誘導物を用いた細胞内動態解析法について、日本食品保蔵科学会誌、第 42 巻 第 1 号、pp.23-28、2016 年 (査読有り)

小林 謙一, 山岸 彩乃, 中川 徹, 前田 雪恵, 伊藤 有紗, 山田 千春, 徳永 洗貴, 藤田 沙也, 鈴木 司, 辻井 良政, 高野 克己, 山本 祐司、アルファ化玄米が肥満モデルラットにおける血中コレステロール値に及ぼす影響、日本食品保蔵科学会誌、第 42 巻 第 1 号、pp.3-8、2016 年 (査読有り)

Shiga T, Kimira Y, Mano H, Kawata T, Tadokoro T, Suzuki T, Yamamoto Y. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency-induced increase of osteoclastic bone resorption caused by abnormal renal resorption of inorganic phosphorus via Napi2a. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 第 80 巻 第 3 号、pp.510-513、2015 年 (査読有り)

Shiga T, Kawata T, Furusho T, Tadokoro T, Suzuki T, Yamamoto Y. Elevation of urinary methylmalonic acid induces the suppression of megalin-mediated endocytotic cycles during vitamin B12 deficiency. Biochemical and Biophysical Research Communications, 第 465 巻 第 2 号、pp.206-212, 2015 年 (査読有り)

〔学会発表〕(計 18 件)

秋山果歩、齋藤卓弥、息才大紀、小林謙一、鈴木 司、山本祐司、AMPK は微小管関連タンパク質である MAP1B をリン酸する、第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15 日、京都テルサ (京都府・京都市)

佐藤祐太、池田貴浩、津谷一総、小幡俊介、北田望、鈴木 司、小林謙一、山本祐司、TSC1 片アレル欠損による代謝変動の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Sae Yoshinuma, Yuri Tanaka, Kaori Nakayama, Takahiro Shiga, Suzuna Onuma, Yuki Kato, Kentarou Matsumoto, Kei Katayama, Humio Sugawara, Isamu Shiina, Tsukasa Suzuki, Ken-ichi Kobayashi, Yuji Yamamoto, Analysis of the mechanism that organic compound of SF231, 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜

(神奈川県・横浜市)

田所政毅、友永省三、日向楓希、藤田萌、飯塚宏和、伊勢瑛、後藤圭太、瀬崎沙織、武井史郎、福岡伸一、佐々木隆造、柴田克己、鈴木司、小林謙一、山本祐司、トリプトファン代謝産物であるキノリン酸の蓄積が腎系球体の機能に及ぼす影響の解析、第 37 回日本トリプトファン研究会学術集会、2016 年 12 月 10 日、東京農業大学(東京都・世田谷区)

Saya Fujita, Ayano Yamagishi, Hinako Kimura, Hirotaka Sato, Toru Nakagawa, Yukie Maeda, Arisa Itho, Chiharu Yamada, Tsukasa Suzuki, Katsumi Takano, Ken-Ichi Kobayashi, Yuji Yamamoto, Pregelatinized brown rice improve pancreatic disorder by decreasing serum insulin level in obese model zucker fatty rat. International Society for Southeast Asia Agriculture Science, 2016 年 11 月 6 日、Vietnam National University of Agriculture(ベトナム社会主義共和国) Satsuki Tsuruhara, Mina Fukuchi, Nozomi Suzuki, Takuya Sakai, Yasuhiro Sasuga, Masaru Fukui, Tsukasa Suzuki, Ken-Ichi Kobayashi, Yuji Yamamoto, Effect of lactic acid bacteria extract fermentation products on gut microbiota in rats fed a high fat diet, International Society for Southeast Asia Agriculture Science, 2016 年 11 月 6 日、Vietnam National University of Agriculture(ベトナム社会主義共和国) 杉山拓洋、大場聡子、立川有里花、鈴木司、小林謙一、山本祐司、TSC2 による mTORC1 を介さない転写調節因子 AP-1 の制御機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

池田一貴、加藤延郎、志知雄太、大野詩織、鈴木司、小林謙一、山本祐司、ケトジェニックダイエットが腎臓の糖新生に及ぼす影響、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

齋藤卓弥、秋山果歩、息才大紀、岡本笑佳、倉本奈美、小林謙一、鈴木司、山本祐司、AMPK は微小管関連タンパク質である MAP1B をリン酸化する、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) 伊勢瑛、小林謙一、鈴木司、山本祐司、チモーゲン顆粒膜タンパク質 GP2 が消化酵素輸送機構に及ぼす影響の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Tsukasa Suzuki, Kanako Sato, Jun-Ichi Iwata, Machiko Kazami, Ken-Ichi

Kobayashi, Yuji Yamamoto, Calcium signaling induces TSC2 phosphorylation independently of Akt, 2015 International Tuberous Sclerosis Complex Research Conference, 2015 年 9 月 11 日、Windsor・UK

Yuji Yamamoto, Shintaro Sato, Kazuyuki Tsuchiya, Ikue Tsuchiya, Ken-Ichi Kobayashi, Yoshimitsu Matsui-Ito, Tsukasa Suzuki, Tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) regulates the Caveolae mediated endocytosis via controlling the Rab5 activity. 2015 International Tuberous Sclerosis Complex Research Conference, 2015 年 9 月 11 日、Windsor・UK

岩田洵一、風見真千子、佐藤佳菜子、八島春奈、鈴木司、小林謙一、山本祐司、Ca<sup>2+</sup>シグナルがインスリンシグナルに与える影響の解析、第 96 回日本栄養・食糧学会関東支部大会、2015 年 9 月 5 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

吉沼咲枝、中山佳織、田中友里、高杉美里、鈴木司、小林謙一、山本祐司、インスリンシグナルを制御する有機化合物の探索：SF231 は TSC1/TSC2/mTOR を濃度・時間依存的に分解する、第 96 回日本栄養・食糧学会関東支部大会、2015 年 9 月 5 日、新潟大学(新潟県・新潟市) 佐藤晋太郎、萩原真、土屋郁恵、室田友紀子、土屋和之、鈴木司、小林謙一、山本祐司、TSC1/2 複合体がカベオラ依存性エンドサイトーシスにおける Rab5 の活性に与える影響の解析、第 96 回日本栄養・食糧学会関東支部大会、2015 年 9 月 5 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

相澤有美、飯田美咲、小林敏之、樋野興夫、鈴木司、小林謙一、山本祐司、Eker TSC2 (+/-) ラットは、ミトコンドリア減少により解糖系・脂肪酸分解が低下する、第 3 回がんと代謝研究会、石川県立音楽堂交流ホール(石川県・金沢市)

山岸彩乃、前田雪恵、徳永洸貴、藤田沙也、辻井良政、風見真千子、鈴木司、小林謙一、高野克己、山本祐司、アルファ化米が肥満モデル Zucker rat の脂質代謝に及ぼす影響、日本食品工学会第 62 回大会、2015 年 7 月 16 日、京都大学(京都府・京都市)

Yamagishi A, Maeda Y, Ito A, Yamada C, Majima S, Nagashima M, Tsujii Y, Suzuki T, Kobayashi K, Yamamoto Y, Pregelatinized brown rice ameliorates liver injury and pancreatitis in obese model rats, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 15 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

鈴木 司、他、診断と治療社、結節性硬化症の診断と治療最前線、2016、151

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 司 (Tsukasa Suzuki)  
東京農業大学・応用生物科学部・助教  
研究者番号：20714588

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし