

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461119

研究課題名(和文) 虚血性心疾患治療を目指した心臓における細胞極性を制御するメカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of regulation for cell polarity in heart targeting ischemic heart disease treatment

研究代表者

中野 敦 (Nakano, Atsushi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究開発基盤センター・室長

研究者番号：90648106

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)：AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)はその下流であるCLIP-170と共に、細胞レベルの研究では細胞遊走や極性維持に重要な酵素であることが知られているが、生体における機能については不明であり本研究にて検討した。目的遺伝子を心臓特異的に発現させることが出来るゼブラフィッシュ(hspGFP3A)を用いて、AMPKによるリン酸化を受けないCLIP-170を心臓に強制発現させたところ、1心房1心室であるゼブラフィッシュの心臓のループが逆の方向を示した。このことから、細胞遊走や極性の形成にAMPK-CLIP-170系が重要な機能を果たしているものと推測された。

研究成果の概要(英文)：In cell biology, AMP activated protein kinase (AMPK) is known to be a key protein kinase to regulate and maintain cell migration and polarity by phosphorylating cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170), a downstream target of AMPK. However, the function in vivo is not understood. In this study, we examined whether AMPK-CLIP-170 axis play a crucial role for cell migration and polarity at early development stage of heart. By using a line of zebrafish (hspGFP3A) that express target genes specifically at 1 atrial 1 ventricle zebrafish heart, we expressed mutant CLIP-170 gene resistant to phosphorylation by AMPK in heart, and found that the fish showed opposite direction of heart looping. These results suggest that AMPK-CLIP-170 axis play a crucial role for establishment of cell migration and polarity in heart.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 細胞極性 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞を含めて細胞は虚血にさらされると細胞内の AMP 濃度が低下し, AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) がこの変化を鋭敏に感知して細胞保護的に働くことが広く知られている。一方, AMPK は細胞の極性にも深く関与していることが知られ, 歴史的に細胞極性を調節している因子の同定やその機能解析に関する研究は, 線虫やショウジョウバエをモデルにして精力的に行われ, 蛋白リン酸化酵素の LKB1 (Liver kinase B 1) やその基質である AMPK がその中心的な役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかし, 脊椎動物において AMPK の下流因子が同定されていなかったこともあり, 細胞極性に関わる役割は不明であった。

心筋細胞を含め, 組織を構成する全ての細胞は, 適切な細胞極性を示すことで整然と且つ機能的に臓器を構成している。脊椎動物の心臓発生において, 心臓前駆細胞は原腸陥入後に予定心臓領域に遊走し, 心臓原基, 心筒を形成し, その後も細胞分裂を繰り返して心臓を形成していく。成体においては, 心筋細胞は分裂を停止させるものの, 心筋梗塞等による組織傷害後には一時極性を失った残存心筋細胞は再構築することから, 胎生期のみならず成体期においても心筋細胞には何らかの極性維持メカニズムが存在することが示唆される。しかしながら, 心筋細胞における細胞極性を制御するメカニズムは依然不明であった。

研究代表者は独自の蛋白リン酸化基質同定法を駆使し, 心臓組織から AMPK の新規リン酸化器質として CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein-170) を精製, 同定し, AMPK

による CLIP-170 のリン酸化が培養細胞における細胞極性, 細胞遊走の維持に必須であることを明確に示した。CLIP-170 は微小管伸長端に局在する微小管結合蛋白質であり, AMPK によるリン酸化を受けることで微小管の伸長スピードを維持し, 効率的に細胞内の物質輸送や細胞形態の変化に対応していることが明らかになり, AMPK とその下流の CLIP-170 が細胞極性と細胞遊走に関与していることが示された。

2. 研究の目的

AMPK-CLIP-170 系が心臓の初期発生, 特に細胞極性と細胞遊走に関与するかどうかを, その分子機構とともに解明することを目的とした。

3. 研究の方法

心筋梗塞や心筋虚血の病変部では, 低酸素状態による心筋細胞傷害によって, 一時的に極性を失った残存心筋細胞の再構築 (再極性化) が起こることが知られており, 心臓をモデルとして研究を行った。生体内での観察には, 拍動心臓を直視下にて観察でき, 遺伝子操作技術が確立されつつあり, モデル動物の中でも成育が早いゼブラフィッシュを使用した。非リン酸化 CLIP-170 をゼブラフィッシュの心筋細胞特異的に発現させるために, 酵母転写調節因子 Gal4 と, Gal4 の認識配列である UAS (upstream activator sequence) を用いた発現システムを利用した。

4. 研究成果

遺伝子トラップ法を用いて作成した心臓特異的に Gal4 が発現しているゼブラフィッシュライン (hspGFF3A) では, Gal4 により

UAS を介して転写が活性化される GFP が心臓特異的に発現していることが確認できる。このゼブラフィッシュの受精卵における GFP の発現を、受精 3, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 56 時間後において経時的に確認したところ、受精 12 時間後から持続的に発現していることが確認できた。

ゼブラフィッシュの稚魚から採取した RNA を用いて作成した DNA ライブラリーから CLIP-170 の cDNA を単離して、AMPK によるリン酸化部位であるセリン 311 をアラニンに置換することで AMPK によるリン酸化を受けない CLIP-170 変異体 (CLIP-170 S311A) を作成した。hspGFP3A の交配によって得られた 1 細胞期の受精卵に UAS-CLIP-170 S311A 配列を持つプラスミドをトランスポゾン Tol2 の mRNA とともに注入し、心臓特異的に CLIP-170 S311A が発現している系を作成した。その結果、変異のない CLIP-170 が発現している個体と比較して、変異 CLIP-170 (CLIP-170 S311A) が発現している個体にて、1 心房 1 心室のゼブラフィッシュ心臓のループが逆方向に形成される異常が有意に多く認められた。

ゼブラフィッシュの心臓前駆細胞は受精 8 時間頃から 12 時間後頃までに予定心臓領域に遊走して心臓原基となり、ループ形成がおこなわれることから、これらの細胞遊走や極性の形成に AMPK-CLIP-170 系が重要な機能を果たしているものと推測された。

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 4 件)

- (1) Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity 1 inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlm5. Nat Commun. 6:6137 (2015).
査読有
- (2) Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of Cytochrome c Oxidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 112(5):1553-8 (2015). 査読有
- (3) Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T. Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. Cell Struct Funct. 39(1), 45-59 (2014). 査読有
- (4) Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M,

Komuro I, Asano Y, Takashima S.
Evaluation of intramitochondrial ATP
levels identifies G0/G1 switch gene 2 as
a positive regulator of oxidative
phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U
S A. 111(1), 273-8 (2014).査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1)Atsushi Nakano, Seiji Takashima,
Naoki Mochizuki, Masafumi Kitakaze
Phosphorylation of CLIP-170 by AMPK
plays a crucial role for the speed of
microtubule polymerization and
directional cell migration
Federation of American Societies for
Experimental Biology Science Research
Conference, AMPK: Biological Action
and Therapeutic Perspectives,
September 28 - October 3, 2014, Barga,
Lucca, Italy

〔図書〕(計 0 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 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 敦 (NAKANO, Atsushi)

国立循環器病研究センター・

研究開発基盤センター・室長

研究者番号 : 90648106

(2)研究分担者

北風 政史 (KITAKAZE, Masafumi)

国立循環器病研究センター・

研究開発基盤センター・部長

研究者番号 : 20294069

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者 該当なし