

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461108

研究課題名(和文) AMPキナーゼ(AMPK)活性化による抗動脈硬化効果、抗癌効果の機序解明

研究課題名(英文) anti-atherosclerotic and anti-cancer effects of AMPK activation

研究代表者

塚本 蔵 (Tsukamoto, Osamu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80589151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：AMPKの新規基質PDLIM5を同定した。PDLIM5はSer177残基がAMPKにより直接リン酸化され、Ser177疑似リン酸化PDLIM5を発現させた細胞は、AMPK賦活剤非投与下でもlamellipodiaの形成異常を認め、細胞遊走が阻害された。S177D-PDLIM5発現細胞では、Rac1特異的RhoGEFsとPDLIM5の結合が阻害されるため、細胞のleading edgeにおけるRac1活性が低下し、Arp2/3 complexがleading edgeから細胞質へとdisplaceされるため、ラメディポディアが形成されず、細胞遊走が阻害されると考えられた。

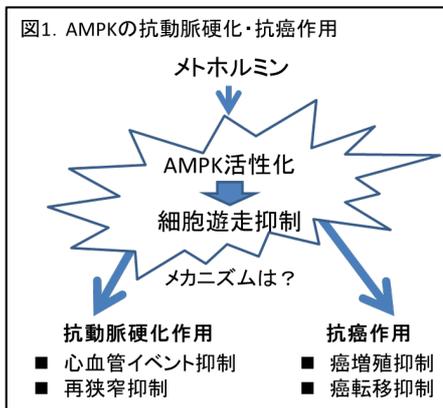
研究成果の概要(英文)：We identified Pdlim5 as a novel AMPK substrate. AMPK phosphorylates Pdlim5 at Ser177. To investigate the role of Ser177 phosphorylation by AMPK, we produced the knockdown-and-rescue (KDR) system of vSMCs, in which endogenous Pdlim5 were replaced by exogenous EGFP-tagged-Pdlim5s. KDR/S177D-Pdlim5 cells exhibited perturbed cell migration compared with KDR/wild-type- and KDR/S177A-Pdlim5 cells even in the absence of AMPK activator. Furthermore, KDR/S177D-Pdlim5 cells exhibited defective lamellipodia formation. Consistent with this, KDR/S177D-Pdlim5 cells exhibited dislocation of Arp2/3 complex from the leading edge to cytosol and suppressed Rac1 activity. Finally, KDR/S177D-Pdlim5 cells disrupted the physical association with Arhgef6, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1. In conclusion, enhanced AMPK activation inhibits cell migration by interfering lamellipodia formation by suppressing the Arhgef6-Rac1-Arp2/3 signaling pathway via phosphorylating Pdlim5.

研究分野：循環器

キーワード：AMPK PDLIM5 cell migration

1. 研究開始当初の背景

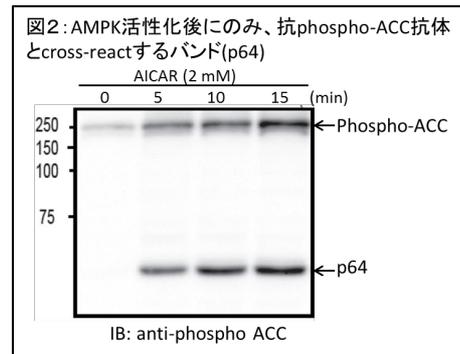
(1) 英国で行われた UKPDS(前向き糖尿病試験)をはじめとする大規模臨床試験にて、糖尿病治療薬メトホルミンは2型糖尿病患者の心血管イベントを抑制した。基礎研究の面からも、メトホルミンの心血管保護作用に関する多くの報告があり、その抗動脈硬化作用は注目に値する。一方、2型糖尿病を有する乳癌患者では、メトホルミンが術前化学療法の効果を高めることが報告されており、この抗癌作用は乳癌、子宮癌において基礎および臨床的に確認されている。一見、異なるように思われる抗動脈硬化作用と抗癌作用を結びつける分子機構として有力視されているのがメトホルミンによる AMP キナーゼ(AMPK)の活性化である(図1)。血管平滑筋細胞や癌細胞を含む多様な細胞にて、AMPK 活性化による細胞遊走・増殖の抑制効果に関する多数の報告があるが、その詳細なメカニズムについては明らかになってない。



(2) 従来、AMPK は細胞内エネルギーセンサーとして知られ、細胞内 ATP 枯渇と AMP 増加に反応して活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである。複数の基質をリン酸化することで、細胞内 ATP を維持する方向に作用する。近年、AMPK のエネルギー代謝に対する作用以外にも、細胞極性、細胞遊走、細胞増殖に対する作用が大きな注目を集めている。我々は (Nature Cell Biol 2010)、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 AMPK による CLIP-170 の Ser311 リン酸化は微小管の進展スピードの保持に必須であり、AMPK 活性阻害により、CLIP-170 が脱リン酸化され、微小管の伸長反応が障害されることで細胞遊走抑制が誘導されることを明らかにしている。

(3) 一方、AMPK 活性化によっても細胞遊走が抑制されることが基礎および臨床的に確認されているが、AMPK 活性化による細胞遊走抑制の機序は不明である。我々の検討でも、AMPK 賦活剤 (AICAR, 2-deoxyglucose, A-769662) による AMPK 活性化により細胞遊走は抑制されるが、AMPK 阻害とは異なり、CLIP-170 (Ser311) のリン酸化状態の変化や微小管構造・機能の変化は認めなかった。この所見は、AMPK 阻害と AMPK 活性化でそ

の細胞遊走抑制の機序が異なることを強く示唆した。さらに我々は AMPK 活性化刺激後のみ、抗 phospho-ACC 抗体(ACC は AMPK の代表的な基質)と cross-react する分子量 64kD の蛋白質(p64)を偶然、発見した(図2)。ACC や CLIP-170 など既存の AMPK の基質の多くは、AMPK 賦活剤の非存在下でもある程度のリン酸化を受けているが、興味深いことに、この p64 は AMPK 賦活剤により AMPK を高度に活性化しないとリン酸化を受けないユニークな AMPK の新規基質である可能性が考えられた。



2. 研究の目的

AMPK 活性化による抗動脈硬化作用・抗癌作用が、臨床および基礎医学的に明らかになっており、AMPK の細胞遊走における作用との関係が注目されている。以前、我々は AMPK 阻害と細胞遊走抑制の機序を解明した。本研究は、AMPK 活性化による細胞遊走抑制の機序を解明し、AMPK 活性化の抗動脈硬化作用・抗癌作用のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) p65 の同定と AMPK の直接の基質であることを証明

three-step column chromatography による精製後、LC-MS/MS にて、この p64 が如何なる蛋白質であるかを同定する。

ラット肝臓から精製した AMPK および [g-32P]ATP を用いて、in vitro phosphosrylation assay を行う。基質は大腸菌から精製した GST-tagged p65 を用いる。

(2) p65 の AMPK によるリン酸化部位の同定

293T 細胞に Flag-tagged p65 mutant を発現させ、AICAR で AMPK を活性化させた後、cell lysate を回収し、Flag beads で精製後、immunoblot を行う。AMPK 刺激後の PDLIM5 のみ cross-react した抗 phospho-ACC 抗体をプローブとして、リン酸化部位を同定していく。まずは p65 の deletion mutants で候補リン酸化部位を狭めた後、point mutants を作成してリン酸化部位を特定する

次に、同定されたリン酸化部位に対する unphosphorylatable mutant (GST-tagged) を作成する。in vitro phosphosrylation assay を行い、野生型(WT)はリン酸化されるが、

unphosphorylatable mutant PDLIM5 はリン酸化されないことを確認する。

更に、リン酸化部位に対する特異的リン酸化抗体を作成する。in vitro phosphosrylation assay 後、immunoblot を行い、特異的リン酸化抗体で WT は認識されるが、unphosphorylatable mutant PDLIM5 は認識されないことを確認する。

### (3) 同定したリン酸化部位の mutant 発現細胞 (unphosphorylatable および phosphomimetic) を樹立

PDLIM5 の AMPK によるリン酸化の機能の解明が目的であるため、その正確な評価のためには内因性の PDLIM5 を unphosphorylatable mutant または phosphomimetic mutant PDLIM5 に置換する必要がある (knock-down and rescue cell: KDR 細胞)。内因性の PDLIM5 は 3' UTR region に対する siRNA で knock-down する。また、置換する recombinant PDLIM5 には、その N 末端に EGFP を付加したものの (EGFP-PDLIM5) を細胞に導入する。

### (4) p64 のリン酸化による生化学的性質変化の検討

PDLIM5 はすでにいくつかの蛋白質との結合が知られている。なかでも  $\alpha$ -actinin は PDLIM5 と直接結合し、また、細胞遊走に重要な機能を担うアクチン線維とダイナミックに associate している。AMPK による PDLIM5 のリン酸化が、細胞遊走を担うアクチン線維構成蛋白質群との関係に及ぼす影響について生化学的に検討する。具体的には、PDKIM5 の D mutant と A mutant との間で、結合する蛋白質群に変化がないかを免疫沈降法、質量蛋白質分析などで評価する。

### (5) AMPK による p64 (PDLIM5) リン酸化の細胞遊走における役割・機能を評価

上記の 3 種類の KDR 細胞を用いて、細胞遊走における AMPK による PDLIM5 リン酸化の役割を下記の方法を用いて検討する。

#### **Scratch assay :**

KDR 細胞を単層培養でコンフルエントな状態まで培養後、scratch を形成し、一定時間後に scratch の幅を観察する。

#### **Free cell migration assay :**

KDR 細胞がお互い重ならないように低密度で播種した後、ひとつひとつの細胞の migration path を time-lapse imaging で記録する。

#### **細胞形態に関する検討 :**

蛍光顕微鏡を使って 3 種類の KDR 細胞の形態を観察する。特に、アクチン骨格系構造、細胞マトリックス接着部、微小管構造などを重点的に観察する。

### (6) AMPK 阻害と AMPK 活性化による細胞遊走抑制機序の違いの解明

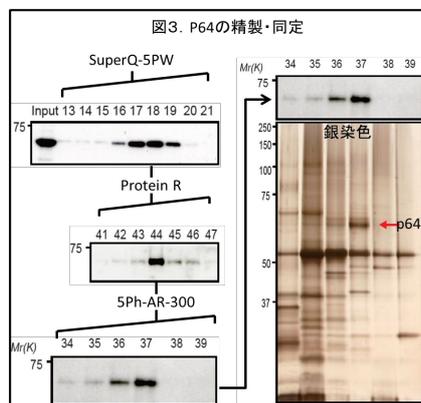
AMPK 活性を阻害すると CLIP-170 の Ser311

の脱リン酸化反応によって微小管伸長反応が障害され、細胞遊走が抑制される。今回は、上述の計画に従い実験を遂行することで、AMPK の活性化による細胞遊走抑制の機序を解明する。その後、AMPK 活性阻害による遊走抑制の結果と今回の結果を合わせて、AMPK 阻害と AMPK 活性化による細胞遊走抑制機序の違い、および AMPK 活性と細胞遊走の関係について総合的な考察を行う。さらに、これらの検討を踏まえて、AMPK 活性化による抗動脈硬化作用および抗癌作用についてのメカニズムについて考察する。

## 4. 研究成果

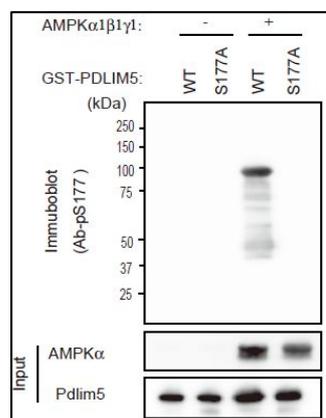
### (1) p65 の同定と AMPK の直接の基質であることを証明

C2C12 細胞を AICAR で刺激して AMPK を活性化した細胞の細胞抽出液を super Q-5PW, Protein R, 5Ph-AR-300 のカラムを用いて sequential に p65 を精製 (図 3) し、LC-MS/MS にて p64 が PDLIM5 であることを同定した。



### (2) p65 の AMPK によるリン酸化部位の同定

PDLIM5 の point mutants を用いたリン酸化反応の結果から、Ser177 が AMPK によるリン酸化部位と考えられた。このことはリン酸化 Ser177 に対する特異的抗体の実験にて確認された。



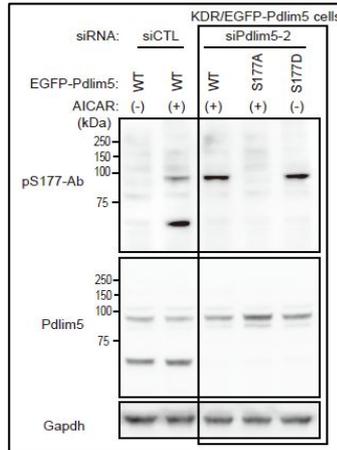
### (3) 同定したリン酸化部位の mutant 発現細胞 (unphosphorylatable および phosphomimetic) を樹立

KDR 細胞として、下記の 3 種類の細胞を樹立した。

EGFP-PDLIM5 WT: Wild-type と同じだが、EGFP が付加されている。

EGFP-PDLIM5 A mutant : AMPK 活性化によっても PDLIM5 がリン酸化されない。

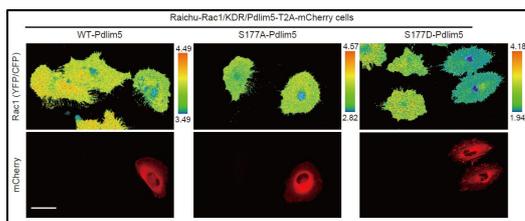
EGFP-PDLIM5 D mutant : AMPK によるリン酸化状態を疑似した PDLIM5 を発現。AMPK 活性化刺激がなくてもリン酸化された状態を模倣。



#### (4) p64 のリン酸化による生化学的性質変化の検討

精製した GST-PDLIM5 WT と GST-PDLIM5 S177D mutant とを用いて細胞抽出液を用いて pull-down assay を行い、結合する蛋白質の比較をした結果、細胞遊走やラメディポディア形成に重要な Rac1 の活性化因子である ARHGEF2 の結合が S177D mutant にて有意に低下していた。

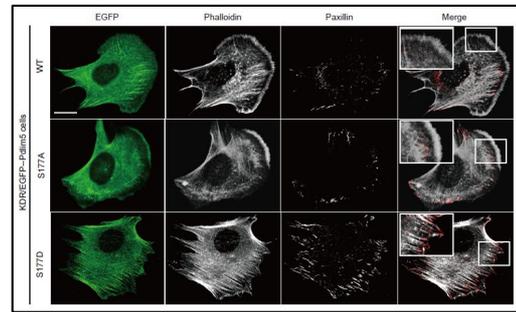
さらに live cell の状態で細胞の Rac1 活性を観察できる細胞を作製して Ser177 のリン酸化の影響を観察したところ、S177D mutant 細胞にて Rac1 活性が低下していることが観察された。



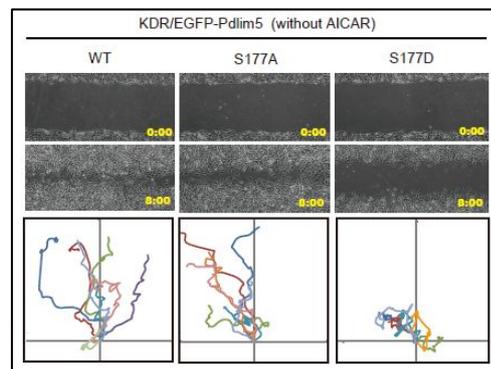
#### (5) AMPK による p64 (PDLIM5) リン酸化の細胞遊走における役割・機能を評価

細胞の形態を確認したところ、WT 細胞では典型的なラメディポディア構造が認められるのに対して、S177D mutant 細胞ではラメディポディア構造は認められず、ストレス線維が増強していた。この形態変化が AMPK 賦活化に起因するものかを確認するために、WT と S177A mutant 細胞に対して AMPK 賦活化剤を投与したところ、WT では AMPK 活性化後にラメディポディア構造が消失し、細胞末梢からのストレス線維の伸長増強が認められたが、S177A mutant 細胞ではこの変化が認められな

かった。



次に、scratch assay および free cell migration assay にて細胞遊走について検討したところ、S177D mutant 細胞のみが AMPK 賦活化剤を投与しない条件下にても細胞遊走能が抑制されていた。

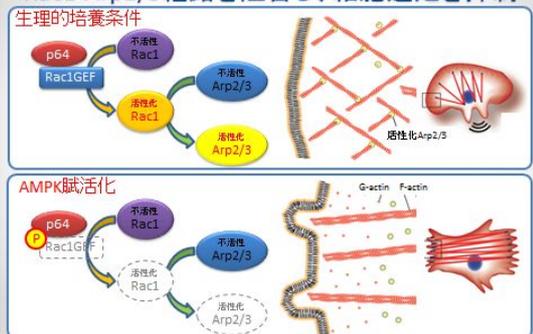


以上の結果から、AMPK 活性化により PDLIM5 の Ser177 がリン酸化されると、Rac1 の活性化分子 Rac1GEF (ARHGEF6) が Rac1 から解離して Rac1 の活性が阻害されることで、ラメディポディア形成が阻害され、細胞遊走が抑制されることが解明された。

#### (6) AMPK 阻害と AMPK 活性化による細胞遊走抑制機序の違いの解明

これまでの検討の結果、AMPK 活性低下は CLIP170 の脱リン酸化による微小管伸長阻害により細胞遊走を抑制し、一方、AMPK の賦活化は PDLIM5 のリン酸化による細胞末梢のアクチン構造の変化によって細胞遊走を阻害する事が考えられた。

#### AMPK賦活化によるp64のリン酸化はRac1GEF-Rac1-Arp2/3経路を阻害し、細胞遊走を抑制



## 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 5 件)

Yi Yan, Osamu Tsukamoto (共同筆頭著者および corresponding author), 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 inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. Nature Communications. 2015;6:6137. doi: 10.1038/ncomms7137

Tsukamoto O, Kitakaze M. Different Implications of Functional Tricuspid Regurgitation Between Heart Failure (HF) With Reduced Ejection Fraction (EF) and HF With Preserved EF. Circ J. 2015;79(7):1448-9. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0560.

Tsukamoto O, Kitakaze M. Recent Progress and Next Challenges in the Treatment of Symptomatic Heart Failure in Japan. Circ J. 2015 Oct 23;79(11):2322-3. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1014.

Tsukamoto O, Asanuma H, Kitakaze M. Targeting lysosomal Ca<sup>2+</sup> to reduce reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2015;108:321-3. doi: 10.1093/cvr/cvv242.

Kanzaki M, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Oiki E, Nishida T, Asanuma H, Kato H, Oka T, Ohtani T, Tsukamoto O, Higo S, Kioka H, Matsuoka K, Sawa Y, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S, Sakata Y. A Development of Nucleic Chromatin Measurements as a New Prognostic Marker for Severe Chronic Heart Failure. PLoS One. 2016;11:e0148209. doi:10.1371/journal.pone.0148209. eCollection 2016.

[学会発表](計 2 件)

燕翼、Enhanced AMPK activity inhibits vascular smooth muscle cell migration by phosphorylation of the novel substrate Pdlim5、第 79 回日本循環器学会学術集会 2015 年 4 月 24 日、大阪、

塚本蔵、AMPK 活性レベルに応じた細胞遊走抑制機構の解明、Molecular Cardiovascular Conference II、2014 年 9 月、神戸

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 蔵 (TSUKAMORO, Osamu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80589151

### (2) 研究分担者

朝野 仁裕 (ASANO, Yoshihiro)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：60527670

### (3) 連携研究者

新谷 泰範 (SHINTANI, Yasunori)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20712243

肥後 修一郎 (HIGO, Shuichiro)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00604034

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：00604034

### (4) 研究協力者

燕 翼 (Yi Yan)  
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生