

## 財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011年 2 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 高島 成二  
所属機関名： 大阪大学  
所属部署名： 医学系研究科 職名： 准教授  
所在地： 大阪府吹田市山田丘 2-2  
電 話： 06-6879-3492 内線： 3492



1. 助成金額： 1,000,000 円

### 2. 研究テーマ

エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用

### 3. 成果の概要

心臓のエネルギー代謝にかかわる新たな経路としてAMPKと呼ばれる酵素の器質を精製・同定した。AMPKの活性化を介する微小管制御という新たなストレス応答メカニズムを明らかにした。

#### ※発表論文等

Nakano T. et al. Nature Cell Biology 12 (6): 583-590 (2010)

### 4. 研究組織

日本側研究者氏名： 高島 成二	職名： 准教授
所属機関名： 大阪大学大学院	部署名： 医学系研究科
中国側研究者氏名： 廖 禹林	職名： 教授
所属機関名： 南方医科大学	部署名： 病態生理部門

## エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用

研究者氏名 高島 成二

所属機関 大阪大学 大学院医学系研究科・准教授

中国側共同研究代表者 廖 禹林

所属機関 南方医科大学 病態生理部門・教授

### 要 旨

心臓の特異性を決定するシグナル因子の同定を行い、それらの機能解析を行うことにより、心血管疾患の病態解析から新しい治療法の開発につなげることを目的とする。心臓で特異的に発現誘導される因子としてGSという蛋白質を同定し、低酸素ストレス時にエネルギー代謝酵素を活性に調節する因子であることを明らかにした。またストレス応答酵素の新規器質CLI-170を心臓から同定し、その機能を明らかにした。2つのストレス応答機構の発見が、今後心不全の病態解明と新規の治療法の開発につながると期待される。

**Key Words** 心臓、代謝、微小管、細胞極性

### 緒 言：

分裂して同化反応を積極的に行う癌細胞などの細胞とは異なり、生後間もなく分裂を中止し収縮のためのエネルギー産生と異化反応を積極的に行う心筋細胞は、エネルギー代謝につながるシグナル、増殖シグナルに大きな差があることが予想される。こういった心臓としての臓器特異性に注目し、独自のシグナル経路を同定する。そしてこれらにかかわる因子の機能を明らかにすることにより新しい心疾患の診断・治療法の開発につながると考え本研究を考案・実行することとした。

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要な増殖因子シグナルを中心とした機能分子を新たに同定することにより心筋特有の生存維持機構・ストレス応答機構を解明する。

そのために独自のスクリーニング系を開発するとともに、敏速な生体内での分子機能評価系を確立し、重要な因子の同定を敏速化させる。それらの相互作用から心臓の生存の分子機構を解明し、心不全の病態解明、さらには新たな治療法への展開を図る。

### 研究の対象と方法：

(1) 心臓の特異的機能維持にかかわる分子の同定

①心筋の非分裂性を規定する分子の同定

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要なシグナルの解析を通して、心臓特異的な生存維持機構の解明を行った。心臓は生後まもなく細胞分裂を中止し、さらに決して癌化をおこさない唯一の器官である。そこで、この細胞分裂抑制機構の解明を主な目的として、細胞分裂

に必要な転写因子に対する心臓の反応性を比較した。心臓特異的な転写誘導をきたす分子を同定、機能解析を行った。

## ②心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

リン酸化酵素は特定の器質のリン酸化により多彩な生理作用を有することが知られているが、細胞内局所、あるいは各臓器で独自の作用を有している。リン酸化酵素はその標的器質によって機能を空間的・時間的に多様化させていることが近年明らかになりつつある。ストレス応答に関与すると考えられている AMPK ファミリー分子も心臓での強発現が確認されている。そこで心臓特異的な AMPK の器質を新たに検索同定しその生理的役割の解明を行った。

### (2) 独自の技術による新規リン酸化酵素器質の同定法の確立

上記の計画を実行するために、蛋白精製手法と *in vitro* リン酸化反応を組み合わせた新たな器質同定法を確立した。この手法は心臓組織を最初に高分離能のカラムで精製することにより脱リン酸化酵素を効率よく除くことが可能である。また分離されたたんぱくを器質として *in vitro* でリン酸化反応を行うため  $K_m$  の低い(アフィニティの高い)器質を同定することが可能である。そのため臓器において特異的に重要なシグナルの同定につながった。

### (3) 同定された分子機能のゼブラフィッシュ等を利用した生体内解析

上記で新たに同定されたシグナルをゼブラフィッシュを使ったアッセイ系を利用して機能解析を行った。解析には心臓特異的 GFP 発光個体、GAL4-UAS システムを利用した心臓特異的遺伝子高発現系などを利用した。

## 結 果：

### (1) 心臓の特異的機能維持にかかわる特異的分子の同定

我々は以前、HB-EGF と呼ばれる増殖因子が心臓の機能維持に重要な役割を果たすことを報告してきた。この増殖シグナルの働きにより心臓においても分裂細胞と同様 *c-fos* や *c-myc* と呼ばれる癌遺伝子の誘導がおこる。しかしその後は特異的な遺伝子の調整機構が働き心臓の非分裂性が規定されている。特に *c-myc* は最近 iPS 細胞の誘導に使用されるなど細胞運命決定とも深い関与が示唆されている。そこで *c-myc* を心臓および分裂細胞で発現させ、それにより誘導される遺伝子の差を網羅的に解析した。

結果、GS という蛋白が心臓特異的に *c-myc* により発現誘導されることが明らかになった。GS は今日までほとんど、その機能が解析されていなかった。そこで、GS の結合蛋白の精製・同定を行い F-ATP synthase という蛋白との結合を証明した。

F-ATP synthase はミトコンドリアに存在する酸化的リン酸化に関与する重要な分子であり、特にミトコンドリアの発達した心臓においてはその細胞機能に直接かかわることが考えられた。そこで、ATP 感受性 FRET を使用した実験により細胞内では GS が F-ATP synthase の活性を上昇させること、低酸素により強く発現誘導されることなどを明らかにした。つまり、GS は F-ATP synthase の働きを動的に制御し低酸素などのストレスに応答する重要な適応物質であることが明らかになった。

今後はさらに GS の分子メカニズムを解明し、ATP の産生の直接調整という新しい心不全治療への可能性を検討していく。

### (2) 心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

ストレス応答蛋白として知られる AMPK の新しい器質として CLIP-170 を心臓組織から同定し、

その微小管動態における役割を明らかにした。まず心筋ホモジネートを高分離能のカラムにて分離し、その各フラクションにおいて *in vitro* リン酸化反応を行い、放射線標識されたたんぱくをさらに高分離能のカラムにより精製することにより同定した。同定された CLIP-170 は微小管の先端に結合することは既知であったがその機能は不明であった。

そこでその機能を解析するために、まずリン酸化部位 (S311) を同定し、S311 リン酸化 CLIP-170 抗体を作成することにより、*in vivo* においても AMPK が CLIP-170 の S311 をリン酸化することを証明した (図 1)

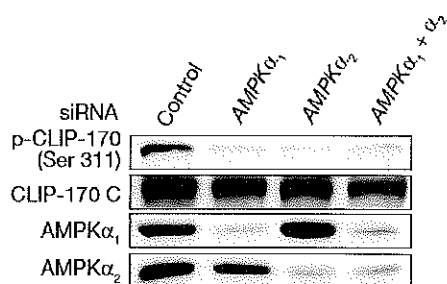


図 1、AMPK の阻害により CLIP-170 のリン酸化が抑制される。p-CLIP-170 は CLIP-170 のリン酸化特異的抗体、CLIP-170C はリン酸化非特異的抗体によるウエスタンブロットングをそれぞれ示す。AMPK の活性を siRNA により抑制すると CLIP-170 のリン酸化レベルは著明に低下する。

さらに AMPK を抑制すると微小管スピードが減少するという興味深い現象が観察された (図 2)。

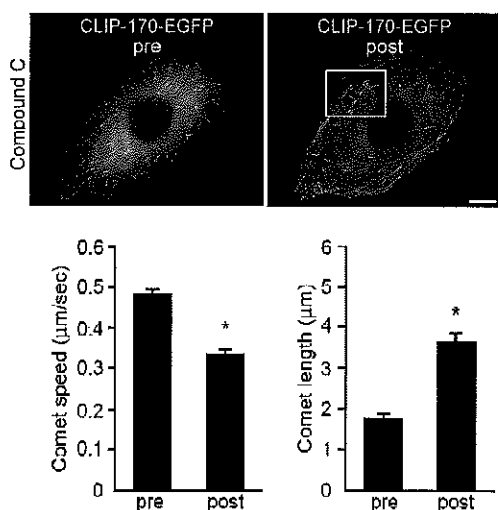


図 2、AMPK 抑制剤 Compound C による微小管伸長スピード抑制作用。CLIP-170-GFP を安定発現させた細胞に Compound C を投与した。CLIP-170 は上図のように comet 状に微小管のスピードに合わせて中心体から細胞膜側に向かって移動する。Compound C により AMPK の活性が抑制されると CLIP-170 の comet の長さが伸びるとともに微小管の伸長スピードを表す comet のスピードも顕著に減少した (下図)。

これまで微小管の伸長スピードを動的に制御する酵素は知られておらず、エネルギー代謝の異常をはじめとした様々なストレスによって活性化される AMPK が CLIP-170 のリン酸化を介して微小管制御を介して何らかのストレス応答をおこなっていると考え

られた。

さらに CLIP-170 のリン酸化を抑制するあるいは CLIP-170 の非リン酸化変異体を導入すると、微小管の伸長スピードの低下のみならず退縮距離の短縮も観察された。これにより微小管の安定性が過剰に増加し、微小管を構成するチューブリンの N 末端のチロシンが脱落した微小管が増加することも観察された。安定化した微小管は通常細胞遊走の方向にのみ伸長しているが AMPK が抑制された状態では安定化した微小管が全方向性に広がり、細胞極性の消失および細胞遊走が極端に抑制された (図 3)。

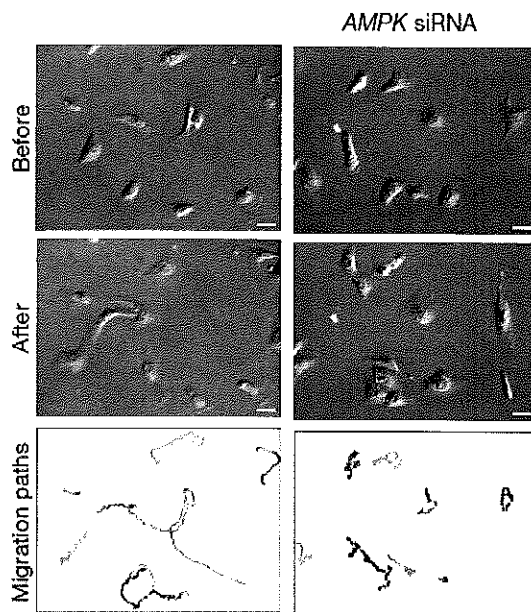


図3、AMPKの抑制により細胞遊走が障害される。

線虫やショウジョウバエでは早期からAMPKが細胞極性を規定する因子として注目されていたが長年その器質・および分子メカニズムは不明であった。本実験からAMPKによる極性形成にはこのCLIP-170が関与することが強く示唆された。

さらにzebrafishを使った実験によりin vivoでもCLIP-170が極性形成に重要であることを証明した。

これらの発見は、ストレスにตอบสนองして活性化され解糖系などを変化させてATP産生に働くと考えられていたAMPKが、実は微小管の活性化による細胞機能全体の補強を行

っているという全く新しい分子メカニズムを明らかにした。これは細胞生物学的にも大変興味深い発見でありNature Cell Biology誌にcurrent topicsとして取り上げられた。

#### 考察：

近年、AMPKの活性促進剤が心不全を改善すること、AMPKが虚血障害に抑制的に働くことなどが報告されているが、本発見はこれらの分子メカニズムにも深く関与することが示唆される。今後さらにこのAMPK-CLIP-170の生体内での作用が明らかとなれば、心臓特異的な保護機構の解明、治療法の開発につながると期待される。

#### 参考文献：

Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S.

AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation.

*Nat Cell Biol.* 12 (6) :583-590. 2010

作成日：2011年2月10日