

# 生活習慣病治療を指向した エネルギーセンサー分子 AMPK の 新たな活性調節機構の解明

所属： 徳島大学 医歯薬学研究部 医薬品機能生化学分野

助成対象者：宮本 理人

共同研究者：土屋 浩一郎

## 概要

代謝疾患などに有効な運動療法の分子メカニズムとして、5' AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化の重要性が近年注目されている。AMPK 活性化には AMP によるアロステリック効果とそれに続く、 $\alpha$  サブユニット Thr172 残基のリン酸化亢進が重要と考えられているが、本研究では、我々のこれまでの経験を元に新たな翻訳後修飾に基づく活性調節機構の探索を試みた。マウスおよび培養細胞による検討の結果、食餌性の刺激によりリン酸化状態が変化する新たな修飾部位を見出した。このリン酸化状態の変化は主に PI 3-kinase 依存性のインスリン作用によるものであり、AMPK 活性の変化とこの部位のリン酸化状態に負の相関性が示唆された。本研究により、食後のエネルギー代謝調節に重要な AMPK の新たな活性調節機構が解明されたと考えられ、今後、新規創薬標的部位としての可能性が期待される。

## abstract

5' AMP-activated protein kinase (AMPK) has attracted attention as a key molecule regulating metabolic alterations during physical exercise, suggesting its high potential for therapeutic target. The AMPK is activated in response to rise in the

intracellular AMP levels through allosteric effects and following facilitation of phosphorylation levels of Thr172 residue in the catalytic alpha subunit. However, our previous experiences of discrepancies between the phosphorylation and its activity lead us to the idea that there should be other mechanisms regulating the activity. Thus, we explored post-translational modifications of AMPK in the current study using cultured cells and mice. We found a novel modulation site of which phosphorylation levels are altered in response to feeding cues. Following screening studies revealed that it is dependent on insulin signaling sensitive to wortmannin. The phosphorylation corresponds to alpha2-isoform specific inactivation of AMPK. In conclusion, the post-translational modification of the novel phosphorylation site which here we found is supposed to modulate postprandial metabolic alterations through PI 3-kinase-dependent insulin signaling, which would be a novel target site for future drug discovery.

## 研究内容

### 本研究の背景と目的

身体運動が健康の維持増進に効果的であることは一般的にもよく知られている。実際、近年の疫学的研究や運動生理学的研究により、様々な疾患の予防や治療に身体運動が役立つことが示されている。特に、糖尿病、肥満症、脂質異常症といった代謝疾患に対しては運動療法の有用性が顕著であり、たとえばメタボリックシンドロームの基盤をなすすべての代謝疾患において、運動療法は食事療法と共に第一選択療法として治療ガイドライン上位置づけられている。運動療法による代謝改善の分子機序としては近年、5' AMP-activated protein kinase (AMPK)の重要性が幅広く認識されてきている (AMPK 仮説)<sup>1-4)</sup>。近年の研究により AMPK は細胞内エネルギー状態の低下を検知し、細胞内の代謝状態を同化から異

化優位に切り替える、細胞内エネルギー代謝の調節分子であることが示されている<sup>5, 6)</sup>。各臓器の AMPK の機能により細胞内だけではなく、個体レベルでもエネルギー恒常性が保たれていることが解明されつつあり、AMPK は糖尿病をはじめとする様々な代謝疾患に対する理想的な創薬標的として製薬会社を中心に創薬の試みも多く行われてきている。AMPK は様々な代謝疾患の治療標的として有望視されているだけでなく、最近では神経変性疾患やガンなど、高齢化社会の進行に伴い増加している様々な疾患に対する効果も期待されており、AMPK を標的とした治療薬の社会的期待は極めて大きい。しかしながら、数多くの試みにも関わらず、臨床応用に有望な AMPK 活性化剤は未だ見出されていない。そこで我々は AMPK の活性調節機構をより深く知ることで、運動療法模倣効果を指向した新たなメタボリックシンドローム治療薬の開発に繋がるのではないかと考えた。

AMPK はその名が示すように、細胞内の AMP により活性化されるキナーゼであり、AMP によるアロステリック効果とそれに続く、触媒サブユニットである  $\alpha$  サブユニットの Thr172 残基のリン酸化亢進が活性化に重要と考えられている。一般的に、この  $\alpha$  サブユニット Thr172 残基のリン酸化状態が活性と相関する指標と考えられているが、我々が実際に酵素活性を測定すると Thr172 残基のリン酸化の程度と相関しないことも少なくなく、さらなる活性調節機構の存在が示唆された。そこで、本研究では創薬研究への展開を念頭に、新たな活性調節機構を明らかにすべく、AMPK の翻訳後修飾の探索とその制御機構の解析を行った。

## 研究手法

試薬類は主に和光純薬工業、東京化成もしくは関東化学より入手した。Rat hepatoma Fao 細胞は European Collection of Authenticated Cell Cultures より入手し、10% FBS を含む Ham' s F12 培地にて培養した。C2C12 myoblast 細胞は American Type Culture Collections から入手し、10% FBS を含む DMEM 培地にて培養し、必要に応じて 2% Horse serum を含む培地で myotube に分化させた。実験動物は主に日本クレアより入手した。抗体は cell signaling technology もしくは millipore-upstate より主に入手したほか、すでに特異性、免疫性の上で良好な抗原となることが判明している配列のペプチド抗原を用いてウサギに免疫した自家製の抗血清を用いた。

個体レベルでの解析には主に 7-10 週齢の雄性 ddY マウスを用いた。飼育は個飼いで行い、12 時間の明暗サイクル下にて行った。高脂肪食負荷は 60%高脂肪食(リサーチダイエツ

ト社 D12492)を3週間自由摂食させることにより行った。

AMPK活性の測定は $\alpha 1, 2$ 各触媒サブユニットに対する免疫沈降画分におけるSAMS配列ペプチドに対するリン酸化活性を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ を用いた古典的キナーゼアッセイにより行った。測定条件等の詳細は既報を参照されたい。<sup>7, 8)</sup>

## 結果

正常マウスを用いてさまざまな刺激下における末梢組織でのAMPK翻訳後修飾の変化を探索したところ、食事負荷の有無によりリン酸化状態が変化する、Thr172残基とは異なる新たな修飾部位を見出した。また、このリン酸化亢進に伴い、AMPK活性の低下が認められた。この時、Thr172残基のリン酸化状態の変化は殆ど認められなかった。一方、高脂肪食負荷によりメタボリックシンドローム様の病態を呈するマウスでは、この摂餌状況によるリン酸化状態の変化はほぼ消失していた。

培養細胞系を用い、摂食状況により変化を受けるホルモンによるさまざまな刺激を試したところ、同様なリン酸化状態の変化がインスリン刺激時において認められた。この時、リン酸化亢進と相応して $\alpha 2$ アイソフォーム特異的なAMPK活性低下が認められた。個体レベルにおいてもインスリン投与による影響は同様に認められ、この時もリン酸化の亢進に伴うAMPK活性の低下が $\alpha 2$ アイソフォーム特異的に認められた。

培養細胞系において、インスリン刺激によるこのリン酸化状態変化はPI 3-kinaseの阻害剤であるwortmanninにより阻害された一方、mTORやPKCに対する阻害剤などの影響を受けなかった。さらに、インスリン刺激によるAMPK活性の変化は同様にwortmanninにより阻害された。

この修飾部位の周辺部位の配列をクローニングし、GFPのC末側に組み込んだ発現ベクターを作成した。この発現ベクターを肝実質細胞系の培養細胞株であるFa0細胞ならびに、骨格筋モデル細胞の一つであるC2C12細胞に導入し、安定発現株のクローニングを試みたが、このコンストラクトを高発現するクローン株はすべて、十分に増殖せずに死滅した。

## 考察

AMPKは細胞内エネルギー代謝調節の鍵となる分子であり、その活性化剤は代謝疾患をはじめとする幅広い疾患に対する効果が期待されることから、AMPKの活性調節機構を理解することは科学的な興味だけではなく、創薬研究への応用を進める上でも意義が大きい。上

述のように、AMPK 活性化における  $\alpha$  サブユニット Thr172 残基リン酸化亢進の重要性が古くより知られているが、実際には乖離例も多く、本研究ではその乖離を説明しうる新たな活性調節機構を探索してきた。食事の摂取は身体運動とともに生体内のエネルギー代謝状態を大きく変える刺激の一つであるが、AMPK 活性制御との関係については明瞭な説明が成されておらず、確立されていなかった。そこで、我々は食事と末梢組織における AMPK 活性との関係を集中的に解析することにより、食餌性の刺激が Thr172 残基とは異なる部位のリン酸化修飾を変化させることを見出した。この部位がリン酸化修飾を受けうる可能性は AMPK 研究の比較的初期の論文で既に報告され、AMPK 活性に影響することが示唆されていたことから、絶食時一食後の状態変化における AMPK 活性修飾に関わる新たな翻訳後修飾機構であると思われた。実際、この部位のリン酸化が亢進している条件下では AMPK 活性の低下が認められた。

引きつづき、この新たな AMPK リン酸化修飾変化を担う媒介因子を明らかにするために、肝実質細胞系や骨格筋系の培養細胞をモデルとして用い、各種内分泌因子による刺激の効果を検討した。我々はレプチンによる肝 AMPK 活性化の機構を報告してきており、中枢を介した作用と肝臓に対する直接的な作用が拮抗的に働くことなどから、レプチンが有望な媒介因子と思われたが、レプチン刺激によるリン酸化状態の変化は少なくともこれまでの検討では認められなかった。一方、インスリン刺激時には著明なリン酸化状態の変化が生じたことから、インスリンが主要な媒介因子として作用しているのではないかと考えられた。実際、正常マウスにおけるインスリン投与後の末梢組織でも同様のリン酸化状態の変化が認められた。個体レベルでの確認は困難であるが、少なくとも培養細胞においてはこの作用は PI 3-kinase の阻害剤、wortmannin に感受性であり、PI 3-kinase より下流で生じている変化であることが明らかとなった。一方、インスリンシグナルにおいて PI 3-kinase より下流に位置している、mTOR や PKC などに対する阻害剤等の効果が認められず、PI 3-kinase にかなり近い、インスリンによる細胞内情報伝達の比較的上流に位置した制御機構であることがうかがえた。この新規修飾部位の周辺配列は極めて多数の kinase によるリン酸化を受けうる配列であり、一次配列から直接本部位をリン酸化する kinase を同定するのは困難と思われた。このリン酸化修飾はさまざまな刺激により、複数の kinase からの修飾を受けるのかもしれない。

培養細胞、マウス個体のいずれにおいても、インスリン刺激による AMPK 活性の変化は興味深いことに  $\alpha 2$  アイソフォーム特異的に生じていた。本研究で我々の用いた、抗体によ

る検出方法では $\alpha 1$  アイソフォームの相当する部位のリン酸化変化を併せて検出していると考えられ、現行の手法では2つのアイソフォームの分離が困難であるが、アイソフォーム間で周辺配列に若干の違いがあり、少なくともインスリン刺激によるリン酸化状態変化は $\alpha 2$  アイソフォームに選択的に生じているのではないかと考えられた。触媒サブユニットである $\alpha$ のアイソフォーム間での翻訳後修飾の差異について知られていることは少なく、今後質量分析法などの技術を用いてその検証と生理的意義の解明を進めていきたい。

今回我々が見出した絶食-食後間でのリン酸化状態変化は高脂肪食負荷によるメタボリックシンドローム病態モデルマウスではほぼ消失していた。このモデルでは著しいインスリン抵抗性を生じることを確認しており、この現象の背景にはインスリン抵抗性が関わっていることが示唆された。一方、このことは、インスリン抵抗性の状態下では食餌性刺激による AMPK 活性調節が適切に行われなことを示唆しており、メタボリックシンドローム病態のさらなる進展に関わっているのではないかと考えられる。この意義のさらなる解明のため、本修飾部位のドミナントネガティブ体として作用することを期待して、比較的安定で不活性なタンパク質である GFP に本部位の周辺配列を結合させたコンストラクトを作成し、過剰発現細胞株の作成を試みた。しかしながら、肝実質細胞系の Fa0 細胞、骨格筋系の C2C12 細胞のいずれにおいても、高発現クローン株は十分に増殖することなく死滅してしまっただけでなく、構造的に不安定であったり、非特異的になんらかの細胞障害的な作用を示したりした可能性は否定できないが、この修飾部位が基本的な細胞機能の維持に関わる可能性が示唆されたともいえる。今後、この新規 AMPK 活性調節機構が代謝に及ぼす影響のさらなる解明のため、異なるコンストラクトデザインによるドミナントネガティブ体の作成を試みるとともに、ゲノム編集技術の応用による本修飾部位への変異導入の効果の検討を行うことを考えている。

おわりに

本研究により、食事のような日常生活と密接した刺激による AMPK の活性調節に Thr172 とは異なるリン酸化部位の新たな翻訳後修飾に関わることが明らかとなった。この機構は少なくとも食餌性の刺激によるインスリン分泌亢進を介する制御を受けており、個体レベルにおける臓器間連携を介したエネルギー代謝調節機構の一端を担う重要な機構である可能性が明らかとなった。メタボリックシンドローム様の病態下ではこの調節機構の破綻が認められ、負のスパイラルとして病態の進展に関わっていることが示唆された。このリン

酸化修飾を適切に制御することにより、代謝疾患をはじめとするさまざまな疾患の予防、治療に結びつくことが考えられ、ドラッグデザインの標的部位として今後の創薬研究への応用が期待される。

#### 謝辞

本研究に対して助成頂きました、住友電工グループ社会貢献基金および関係者の皆様に感謝申し上げます。共同研究者であり、当研究分野主任教授の土屋浩一郎教授、本研究を中心となって進めてくれた梅本果奈さん、上島沙弥香さんをはじめ、日々一緒に活動している徳島大学医薬品機能生化学分野の皆さんにも感謝致します。

#### 引用文献

- 1) Miyamoto L.: Significance of 5'AMP-activated protein kinase in metabolomic regulation by skeletal muscle contraction. *J Phys Fitness Sports Med.*2015; 4; 93-102.
- 2) Miyamoto L.: Metabolomic analysis on the AMPK-dependent and -independent regulation of metabolic pathways in contracting skeletal muscles. *Endocrinology, diabetology & metabolism* 2015; 41; 354-360.
- 3) Miyamoto L.: Novel Strategies for Treating Lifestyle-related Diseases Using Various Approaches. *Yakugaku Zasshi.*2016; 136; 751-759.
- 4) Miyamoto L., Egawa T., Oshima R., et al.: AICAR stimulation metabolome widely mimics electrical contraction in isolated rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.*2013; 305; C1214-1222.
- 5) Hardie D. G.: AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes.*2013; 62; 2164-2172.
- 6) Hardie D. G., Ross F. A., Hawley S. A.: AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2012; 13; 251-262.
- 7) Miyamoto L., Ebihara K., Kusakabe T., et al.: Leptin activates hepatic 5'-AMP-activated protein kinase through sympathetic nervous system and alpha1-adrenergic receptor: a potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. *J Biol Chem.*2012; 287; 40441-40447.
- 8) Miyamoto L., Toyoda T., Hayashi T., et al.: Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).*2007; 102; 1007-1013.

#### 本助成に関わる成果物

##### [論文発表]

**宮本理人\***, 「身体運動と食をつなぐ生体内エネルギー調節の分子機構 (AMPK as a metabolic intersection between diet and physical exercise)」 *Yakugaku Zasshi (薬学雑誌)*, in press (2018), (*invited review*)

##### [口頭発表]

**宮本理人**, 「AMPK as a metabolic intersection between diet and physical exercise /身体運動と食をつなぐ生体内エネルギー調節の分子機構」 日本薬学会第137年会シンポジウム S41 食事、運動、睡眠～生活習慣から薬物治療と創薬を考える～

**宮本理人**、梅本果奈、上島沙弥香、友成奈央実、池田康将、玉置俊晃、土屋浩一郎、食後の末梢組織における代謝調節を担う新たな AMPK の活性調節機構、第 61 回日本糖

尿病学会年会

宮本理人、梅本果奈、上島沙弥香、友成奈央実、土橋有希、井上貴久、許文婷、津田勝範、土屋浩一郎、食と運動による代謝制御のクロスロードとしての新たな AMPK 活性制御機構、第 38 回日本肥満学会年会

[ポスター発表]

Kana Umemoto, Licht Miyamoto, Sayaka Ueshima, Mayu Hosoi, Gouki Tomokawa, Koichiro Tsuchiya, Mechanisms of postprandial suppression of hepatic AMPK activity through insulin- PI 3-kinase pathway, 第 8 回アジアオセアニア糖尿病学会

[その他]