

Title	AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation
Author(s)	中野, 敦
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58207
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	なかのあつし 中野 敦
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 24128 号
学位授与年月日	平成 22 年 6 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation (AMPKはCLIP-170のリン酸化を介して微小管の重合スピードと細胞移動をコントロールする)
論文審査委員	(主査) 教授 望月 直樹 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 月田早智子

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

アデノシンリン酸 (AMP) 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は、細胞内AMPの上昇を感知して活性化することから細胞内エネルギーセンサーとして働く蛋白リン酸化酵素であると広く知られている。現在まで同定されているリン酸化基質の働きから、AMPKは細胞内の代謝維持に関わっていると考えられているが、近年、細胞の極性に関与していることを示唆する報告が散見されている。しかし、その標的となるリン酸化基質を含めてメカニズムの詳細は不明である。そこで我々は、AMPKの新規基質を検索、同定し、その生理的意義を検討することを目的とした。

〔 方法ならびに成績 〕

マウスの心臓を破碎、溶解した後にイオン交換クロマトグラフィーにて分離後、各分画に対して合成AMPKを用いて³²P-ATPの存在下にてリン酸化反応を行いSDS-PAGEで分離した。その結果、AMPKによってリン酸化される約170kDaのペプチドの存在が明らかになり、これを更に逆相高速液体クロマトグラフィーを使用して精製した。SDS-PAGEで分離した後にこのペプチドの質量分析を行ったところ、このペプチドは微小管プラス端結合蛋白質の一つであるCLIP-170 (cytoplasmic linker protein of 170 kDa) であった。*In vitro*での生化学的解析によって、CLIP-170はAMPKによってSer311がリン酸化される新規基質であることが判明した。AMPKによってリン酸化を受けない変異体CLIP-170 (S311A) を培養細胞に強制発現させると、微小管伸長端に局在するCLIP-170の集積量が増強して、微小管の伸長スピードが減弱した。これはAMPKの阻害薬やsiRNAにてAMPKを落とした場合にも同様に見られたことから、AMPKによるCLIP-170のリン酸化は微小管との結合様式や微小管の伸長スピードのコントロールに不可欠と考えられた。同様に、S311A CLIP-170を強制発現したり、AMPK阻害薬を使用したり、siRNAにてAMPKを落としたりすると、安定化微小管の指標である脱チロシン化チューブリンの微小管への集積が増強したことから、AMPKはCLIP-170を介して微小管のダイナミズムを調節していると考えられた。さらに、AMPKの抑制により接着斑の面積が増大したが、この所見は微小管の重合や脱重合を促進するpaclitaxelやnocodazolの使用時にも同様に見られた。このことから、AMPKはCLIP-170を介して接着斑の形成に深く関わっていることが示唆された。接着斑は接着細胞の内部と細胞外マトリックス (ECM) の間に物理的架橋を作り、細胞の遊走、接着、ECMとの機械的相互作用に関与している。そこで、AMPKによる細胞極性の制御にCLIP-170が実際に関与するか否かを検討するためにScratch assayを行った。AMPKを抑制するとMTOC (microtubule organizing center) の適切な配向性が阻害されるが、S311A CLIP-170の強制発現でも同様の所見が得られた。さらにS311A CLIP-170を強

制発現させたり、AMPKを抑制させたりすることで単離細胞の遊走が阻害された。これらのAMPKの阻害や抑制にて認められた現象は、CLIP-170のリン酸化状態を模造したS311D CLIP-170の使用にて救助できたことから、AMPKによる微小管動態、細胞極性、遊走にはCLIP-170のリン酸化が重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、zebra fishにおいて心臓特異的にS311A CLIP-170を発現させると心臓逆位を呈したことから、培養細胞のみならず生体においてもAMPK-CLIP-170系は特に器官形成において重要な働きを示していると考えられた。

〔 総 括 〕

我々の独自の基質蛋白の精製方法によってAMPKの新規基質としてCLIP-170を同定した。AMPKはCLIP-170をリン酸化することによって微小管のダイナミクスを保持し、細胞の極性、遊走に深く関わっていることが示された。このAMPKによる微小管を介する新たな細胞内分子機構の発見により、細胞内のエネルギー調節と細胞運動との連関の理解が深まり、細胞生物学の発展に大きく寄与するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

細胞のエネルギー状態の重要なセンサーであるアデノシン一リン酸 (AMP) 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は細胞内の代謝経路だけではなく、近年、細胞の極性に深く関与していることが示唆されている。しかし、そのリン酸化基質を含めてメカニズムの詳細は不明である。そこで本研究では、AMPKの新規基質を同定するために、破碎、溶解したマウスの心臓からAMPKによってリン酸化される基質を精製した。蛋白質質量分析により、この蛋白質は微小管プラス端集積因子の一つであるCLIP-170と同定された。生化学的解析にてCLIP-170はAMPKによってリン酸化されること、生細胞を使用したイムノプロットにてCLIP-170は恒常的にリン酸化されており、AMPKの阻害薬やsiRNAによるAMPKの枯渇でこのリン酸化が抑制されることが示された。細胞内における蛍光標識したCLIP-170の動態を観察すると、伸長する微小管の先端に集積しているCLIP-170はその殆どがリン酸化状態であり、AMPKの阻害薬やsiRNAによるAMPKの枯渇にてリン酸化CLIP-170は著明に減少し、非リン酸化CLIP-170が微小管側面に広範に集積した。さらに微小管の伸長スピードが減弱したことから、AMPKによるCLIP-170のリン酸化は微小管との結合様式や微小管の伸長に不可欠と考えられた。さらに、AMPKの阻害やリン酸化されないCLIP-170の過剰発現にて、細胞の極性が障害され、細胞の移動が高度に抑制された。さらにこれらの現象はリン酸化状態を模倣したCLIP-170の強制発現にて救助された。以上のことから、AMPKはCLIP-170をリン酸化することによって微小管のダイナミクスを保持し、細胞の極性、遊走に深く関わっていることが示された。本業績による知見は、新規性が高く、細胞生物学のみならず一般科学的にも重要な発見であることから学位に値するものとする。